



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2012-0093163  
 (43) 공개일자 2012년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/02* (2006.01) *A61K 39/38* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-7006494  
 (22) 출원일자(국제) 2010년09월14일  
 심사청구일자 없음  
 (85) 번역문제출일자 2012년03월13일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/048827  
 (87) 국제공개번호 WO 2011/032179  
 국제공개일자 2011년03월17일  
 (30) 우선권주장  
 61/242,210 2009년09월14일 미국(US)

(71) 출원인  
 더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아  
 미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케  
 스트너트스트리트 3160  
 (72) 발명자  
 와이너, 데이비드, 비.  
 미국 19066 펜실베니아주 메리온 비컴 레인 717  
 크레이냐크, 김벌리, 에이.  
 미국 92008 캘리포니아주 칼스배드 아파트먼트  
 111 워트먼 웨이 5154  
 쿠츨러, 미셸  
 미국 18964 펜실베니아주 수더튼 펜 애비뉴 18  
 (74) 대리인  
 김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 I L-15 수용체 알파 및/또는 이를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 백신 및 면역 치료제, 및 이를 이용하는 방법

**(57) 요약**

IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 단리된 핵산 분자와 조합된, 면역원을 인코딩하는 1 이상의 단리된 핵산 분자를 포함하는 조성물, 제조법 백신 및 살아있는 약독화된 병원균을 제공한다. 이러한 조성물을 이용하여, 면역원에 대해 개체에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

면역원을 인코딩하는 단리된 핵산 분자; 및 IL-15R $\alpha$  또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 면역원은 병원균 항원, 암에 관련된 항원 또는 자가면역 질환에 관한 세포에 관련된 항원인, 조성물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 면역원은 만성 감염을 야기하는 병원균으로부터의 병원균 항원인, 조성물.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 IL-15R $\alpha$ 를 인코딩하는 단리된 핵산 분자는, 서열 번호 1에서 제시된 것과 같은 서열을 갖는 IL-15Ra를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, IL-15 또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 플라스미드인, 조성물.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물을 포함하는, 주사 가능한 약학 조성물.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 면역원에 대항하여 개체에 면역 반응을 유도하는 방법.

**청구항 9**

조절 인자에 작동 가능하도록 연결된 면역원을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 IL-15R $\alpha$  또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 제조합 백신.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 면역원은 병원균 항원, 암-관련된 항원 또는 자가면역 질환에 관한 세포에 관련된 항원인, 제조합 백신.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 면역원은 만성 감염을 야기하는 병원균으로부터의 병원균 항원인, 제조합 백신.

**청구항 12**

제9항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 IL-15R $\alpha$ 를 인코딩하는 단리된 핵산 분자는, 서열 번호 1에서 제시된 것과 같은 서열을 갖는 IL-15Ra를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 포함하는, 제조합 백신.

**청구항 13**

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, IL-15 또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 추가

로 포함하는 재조합 백신.

**청구항 14**

제9항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 재조합 백신을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 면역원에 대하여 개체에 면역 반응을 유도하는 방법.

**청구항 15**

IL-15R $\alpha$  또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 살아있는 약독화된 병원균.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 병원균은 만성 감염을 야기하는 병원균의 약독화된 균주인, 살아있는 약독화된 병원균.

**청구항 17**

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 IL-15R $\alpha$ 를 인코딩하는 핵산 코딩 서열이 서열 번호 1인, 살아있는 약독화된 병원균.

**청구항 18**

제15항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, IL-15 또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 살아있는 약독화된 병원균.

**청구항 19**

제15항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 따른 살아있는 약독화된 병원균을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 면역원에 대하여 개체에 면역 반응을 유도하는 방법.

**청구항 20**

IL-15R $\alpha$  면역 조절 기능, IL-15 결합 기능, IL-15 수용체 복합체의 다른 서브 유닛에 대한 결합 기능, 또는 이들의 조합 기능을 갖는, 서열 번호 1 또는 이의 단편을 포함하는 핵산 분자.

**명세서**

**기술분야**

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2009년 9월 14일에 출원된 미국 가출원 제61/242,210호에 대해 우선권을 주장하며, 그 전문이 본원에 참조로서 통합된다.

[0003] **발명의 기술 분야**

[0004] 본 발명은 면역원에 대하여 개체들을 예방적으로 및/또는 치료적으로 면역화시키기 위한, 개선된 백신, 개선된 방법, 및 개선된 면역치료 조성물과 개선된 면역요법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 면역 요법(Immunotherapy)은 바람직한 치료 효과를 부여하기 위하여 개체의 면역 반응을 조절하는 것을 말한다. 면역 요법은 개체에게 투여되었을 때, 바람직하지 못한 면역 반응과 연관된 증상을 궁극적으로 감소시키는데 충분하거나, 바람직한 면역 반응을 증가시킴으로써 궁극적으로 증상을 경감시키는데 충분한, 개체의 면역계를 조절하는 조성물을 가리킨다. 일부 경우, 면역 요법은 개체에게 백신이 투여되어, 면역원에 개체가 노출됨으로써, 이에 대하여 면역 반응을 일으키는 백신 접종 프로토콜의 일부이며, 이 경우 면역요법은 특정 건강 상태, 감염 또는 질환을 치료 또는 예방하는데 바람직한 면역 반응을 증가시키거나 및/또는 면역 반응의

일부(예컨대, 세포적 부분 또는 체액적 부분)를 선택적으로 강화시킨다.

- [0006] 백신 프로토콜은 개선된 면역 반응을 유도하기 위하여 개체의 면역 반응들을 조절하는 물질을 전달함으로써 개선될 수 있다. 개체에게 백신이 투여되어, 면역원에 개체가 노출됨으로써, 이에 대항하여 면역 반응을 일으키는 일부 백신 접종 프로토콜에서, 특정 건강 상태, 감염 또는 질환을 치료 또는 예방하는데 바람직한 면역 반응을 증가시키거나 및/또는 면역 반응의 일부(예컨대, 세포적 부분 또는 체액적 부분)를 선택적으로 강화시키는 물질이 제공된다.
- [0007] 백신은 알레르겐, 병원균 항원 또는 인간 질환과 연관된 세포들에 관한 항원과 같은 표적 항원들에 대항하여 개체를 면역화시키는데 유용하다. 인간 질환과 연관된 세포들에 관한 항원들은 암-관련된 종양 항원들과 자가면역 질환들에 관련된 세포에 관한 항원들을 포함한다.
- [0008] 이러한 백신들을 설계함에 있어서, 백신 접종을 맞은 개체의 세포들에서 표적 항원을 생산하는 백신들은 면역계의 세포적 부분을 유도하는데 효과적인 것으로 인식되어 왔다. 특히, 살아있는 약독 백신(attenuated vaccines), 비병원성 박터들을 이용하는 재조합 백신들, 및 DNA 백신들 각각은 백신 접종을 맞은 개체의 세포에서 항원의 생산을 이끄는 면역계의 세포적 부분을 유도한다. 다른 한편, 죽었거나 비활성화된 백신들, 및 단백질만을 포함하는 서브 유닛 백신들은 효과적인 체액성 반응을 유도하지만 양호한 세포성 면역 반응을 유도하지는 못한다.
- [0009] 세포성 면역 반응은 병원균 감염에 대항한 방어를 제공하고, 그리고 병원균 감염, 암 또는 자가면역 질환들의 치료를 위한 효과적인 면역-매개 요법을 제공하는데 종종 필수적이다. 따라서, 백신 접종을 맞은 개체의 세포에서 표적 항원을 생산하는 백신, 예컨대 살아있는 약독 백신, 비병원성 박터를 이용하는 재조합 백신과 DNA 백신과 같은 백신들이 종종 바람직하다.
- [0010] DNA 백신 기술을 이용하여 강력한 CD8+ T 세포 반응들을 발생시키는 것이 DNA 백신 개발자들이 추구하는 목표다. CD8+ T 세포들은 HIV 모델뿐만 아니라 다른 바이러스 감염에서 인간(Koup 등, 1994; Cao 등, 1995; Musey 등, 1997; Ogg 등, 1998; Betts 등, 1999) 및 인간이 아닌 영장류 모델 (Jin 등, 1999; Schmitz 등, 1999; Barouch 등, 2000; Amara 등, 2001; Shiver 등, 2002) 모두에서 바이러스성 복제를 조절하는데 기여한다는 보고들이 있다.
- [0011] 개선된 전달 기술들, 강화된 구조체 설계, 이중 프라임-부스트(heterologous prime boost) 전략 및 분자 보조제의 이용을 포함하는 DNA 백신 기술과 함께, 상이한 많은 전략들이 이용되어 왔다. 면역 반응을 세포성 또는 체액성 면역으로 지향하도록 하기 위하여 케모킨(chemokines) 및 사이토킨(cytokines)을 포함하는 분자 보조제들을 백신 전략에 통합시킬 수 있다. IL-12 및 IL-15와 같은 사이토킨은 뮤린(murine) 및 인간이 아닌 영장류 모델 모두에서 면역 반응을 강화하는데 효과적이었다(Morrow 및 Weiner, 2008).
- [0012] 인터루킨-15 (IL-15)는 IL-2에 의해 또한 이용되기도 하는 공통적인  $\beta \gamma$  쌍을 통하여 신호를 보내기 때문에, CD8+ T 세포의 생산 및 유지에 역할을 하는 것으로 나타났다. IL-15는 천연 킬러(Natural Killer) 및 CD8+T 세포의 프라임링(priming) 동안 IL-15R $\alpha$ 를 통하여 항원 제시 세포의 표면에 교차(trans)-제시되는 것으로 밝혀졌다(Dubois 등, 2002; Koka 등, 2004; Lucas 등, 2007; Sato 등, 2007). IL-15R $\alpha$ 는 또한 IL-15 분비의 조절에도 역할을 한다는 것이 최근 밝혀졌다(Duitman 등, 2008). 이 세포 표면 복합체는, IL-15가 이들 세포의 세포 분할 및 생존을 촉진시키는 기억 CD8+ T 세포상의  $\beta \gamma$  수용체를 통하여 신호를 보내는 것을 허용하는 것으로 생각된다(Lodolce 등, 1998; Kennedy 등, 2000; Lodolce 등, 2001; Burkett 등, 2003; Burkett 등, 2004; Sandau 등, 2004; Schluns 등, 2004a; Schluns 등, 2004b). IL-15 및 IL-15R $\alpha$ 는 복합체로써, 이들 분자 단독의 경우와 비교하여 강화된 안정성 및 분비를 나타낸다(Bergamaschi 등, 2008).
- [0013] 백신 접종 모델에 이의 사용과 관련하여, HIV-1 백신 보조체로서 IL-15가 인코딩된 플라스미드를 사용하여 마우스에서 세포 용해성 반응 및 기억 CD8+T 세포 반응들을 강화시킨다는 것이 이미 보고되었다(Oh 등, 2003; Kutzler 등, 2005; Zhang 등, 2006; Calarota 등, 2008; Li 등, 2008). 붉은 털 원숭이(rhesus macaques)의 연구에서 IL-15는 CD4+T 세포의 반응기(effector) 기능을 강화시키고(Picker 등, 2006), 반응기 CD4+ 및 CD8+ T 세포 모두에서 탈환된 이중 IFN- $\gamma$ /TNF 반응들을 강화시키는 능력이 있음을 또한 보여주었다(Halwani 등, 2008). 중요한 것은, 레소스 마카크(rhesus macaques)에 SIV/HIV 항원들과 pIL-15를 추가하면 SHIV89.6p 공격 후 강화된 방어를 야기하였다(Boyer 등, 2007).
- [0014] 이러한 백신들은 병원균 감염 또는 인간 질환들에 대항하여 개체를 예방적으로 또는 치료적으로 면역화시키는데 대체로 효과적이며, 개선된 백신들이 요구되고 있다. 강화된 면역 반응을 만드는 조성물 및 방법들도

필요하다. DNA 백신에 면역 반응을 강화시키는 새로운 보조제를 포함한, 효과적인 DNA 백신을 가능하게 하는 개선된 전략들도 여전히 필요하다.

[0015] 유사하게, 환자의 면역 반응을 조절하는데 유용한 일부 면역 치료제가 존재하나, 개선된 면역치료 조성물 및 방법들도 여전히 필요하다.

### 발명의 내용

[0016] **본 발명의 요약**

[0017] 본 발명은 IL-15Ra 면역 조절 기능 및/또는 IL-15 결합 기능 및/또는 IL-15 수용체 복합체의 다른 서브 유닛에 결합하는 기능을 가진 단백질을 인코딩하는 서열 번호 1 또는 이의 단편들을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0018] 본 발명은 IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는, 단리된 핵산 분자와 조합하여 면역원을 인코딩하는 단리된 핵산 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 면역원 및 IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 모두 인코딩하는 단리된 핵산 분자 조성물에 더 관한 것이다.

[0020] 본 발명은 IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 단리된 핵산 분자와 조합하여 면역원을 인코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 주사 가능한 약학 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 면역원과 IL-Ra 또는 이의 기능적 단편들을 모두 인코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 주사 가능한 약학 조성물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 면역원은 병원균 항원, 암-관련된 항원 또는 자가면역 질환과 관련된 세포의 항원이다. 일부 측면에서, 병원균은 만성 감염을 야기하는 병원균이다.

[0023] 본 발명은 또한 면역원에 대하여 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 단리된 핵산 분자와 조합하여 면역원을 인코딩하는 단리된 핵산 분자 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0024] 본 발명은 또한 면역원에 대하여 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 면역원 및 IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 단리된 핵산 분자를 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0025] 본 발명은 또한 조절 인자에 작동 가능하도록 연결된 면역원을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 면역원에 대하여 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0026] 본 발명은 또한 IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 살아있는 약독 병원균, 및 개체에 상기 살아있는 약독 병원균을 투여하는 것을 포함하는 병원균에 대하여 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0027] 도 1a-1e는 IL-15R α 단일 클론 항체의 생산과 관련된 결과 및 정보를 보여준다. 도 1a는 단백질 12.0 내지 16 μg인 2배의 희석물 내의 재조합 인간 IL-15R α 단백질의 쿠마시 염색을 나타낸다. 도 1b에서는 시판되는 항-인간 IL-15R α 항체가 직접법(direct) ELISA에서 재조합 IL-15R α 단백질을 검출할 수 있다는 것을 보여준다. 도 1c는 BALB/c 마우스에서 항-인간 IL-15R α 단일 클론 항체 생성을 위한 면역화 일정을 보여준다. 도 1d는 클론 KK1.23의 하이브리도마 상등액은 재조합 IL-15R α 단백질에 대항하는 고역가 항체를 보유한다는 것을 ELISA로 보여준다. 도 1e는 ELISA 및 특히, 웨스턴 블랏 분석에서 볼 수 있는 것과 같이, 정제된 단일 클론 항체 KK1.23은 재조합 IL-15R α 에 결합한다는 것을 보여준다.

도 2a-2g는 IL-15R α DNA 플라스미드의 제조 및 발현에 관한 것이다. 도 2a는 인간 IL-15R α cDNA를 어떻게 pVAX1 발현 벡터 내에 삽입하였는지를 나타낸다. 도 2b 및 2c에서는 플라스미드 IL-15R α 가 각각 R&D 및

KK1.23 단일 클론 항-인간 IL-15R α 항체로 시험관 내 방사능 활성 해독에 의해 검출되었을 때, 적절한 크기의 단백질 (~30 kDa)을 발현한다는 것을 보여준다. 도 2d에서는 단일 클론 KK1.23 항체 (IgG1 이소타입)가 형질 감염이 되지 않은 HeLa 세포에 결합하지 않는다는 것을 보여준다(20x). 도 2e는 마우스 IgG1 이소타입 대조군으로 염색된 pTRACER-IL-15R α 형질 감염된 세포(녹색)를 보여준다(20x). 도 2f 및 2g에서는 KK1.23 항-인간 IL-15R α 항체 (적색)가 각각 20x 및 60x에서 pIL-15R α-pTRACER 형질 감염된 세포에 결합한다는 것을 보여준다.

도 3a-3c에서는 pIL-15 또는 pIL-15R가 단독으로 전달된 플라스미드와 비교하여, pIL-15 및 pIL-15R α의 조합이 면역 반응들을 증대시킨다는 것을 보여준다. 도 3a는 벡터, 항원성 플라스미드 (HIV-1 gag 및 pol), pIL-15, 및/또는 pIL-15R α의 조합을 포함하는 DNA 체제가 주입된 BALB/c 마우스 군의 면역화 일정을 보여준다. 상기 pIL-15/pIL-15R α의 조합은 동일한 다리 또는 상이한 두 다리 간에 분할하여(한 다리에는 pIL-15을, 다른 다리에는 pIL-15R α을) 제공되었다. 근육내 면역화는 3회 전기천공으로 제공되었으며, 최종 부스팅 후 1주일 후에 마우스를 희생시켰다. 도 3b 및 3c는 세포성 반응들을 보여준다. 면역화된 마우스의 비장세포를 IFN-γ ELISpot 분석에 이용하였다. 비장세포를 배지(음성 대조군), 콘카나발린 A (양성 대조군) 또는 항원성 펩티드 (HIV-1 gag 및 pol 풀)로 밤새 자극하였고, IFN-γ 스팟 형성 유닛을 계산하였다.

도 4a 및 4b에서는 IL-15R α DNA 플라스미드가 pIL-15 없이 투여량-의존적 방식으로 면역원성이라는 것을 보여준다. BALB/c 마우스는 도 3a에서 나타낸 것과 같이, 벡터, 5 μg의 항원성 플라스미드 (HIV-1 gag 및 pol), 및 IL-15R α (7.5, 10, 또는 15 μg)의 증가된 투여량을 함유하는 DNA 체제로 면역화되었다. IFN-γ ELISpot는 R10 (음성 대조군), ConA (양성 대조군), 및 HIV-1 gag 펩티드 풀 또는 HIV-1 pol 펩티드 풀로 자극을 받은 비장 세포상에서 수행되었다. HIV-1 gag 펩티드 풀을 이용한 실험의 데이터는 도 4a에 나타난다. HIV-1 pol 펩티드 풀을 이용한 실험의 데이터는 도 4b에 나타난다.

도 5a 및 5b에서는 pIL-15R α가 CD8+ T 세포에 의해 주로 IFN-γ 분비를 증대시킨다는 것을 보여준다. CD8+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비 기여는 밀테니(Miltenyi) 비드를 이용하여 면역화된 마우스의 비장세포로부터 CD8+ T 세포의 생체 외 고갈로 측정하였다. 도 5a는 전체 비장세포(검정색 막대)와 CD8 고갈된 비장세포 (회색 막대)에 대한 총 항원성 반응을 나타내며, IFN-γ ELISpot로 측정하였다. 도 5b에서, HIV-1 gag p24 항원성 단백질에 대한 항체 역가는 재료 및 방법 단락에서 설명된 것과 같이, 동일한 구조체 및 일정으로 면역화된 BALB/c 마우스의 혈청 시료로부터 측정하였다. 마우스를 희생시킬 때 취한 혈청 희석물은 p24로 피복된 ELISA 플레이트 상에 이동시키고, 항-마우스 IgG-HRP 항체로 탐지하여 항원 특이적 IgG의 레벨을 측정하였다. 그래프로 나타내기 전, 희석 웰 내 배경 반응들만을 상기 시료 OD 값에서 차감하였다.

도 6a 내지 6c에서는 pIL-15 및 pIL-15R α의 조합이 기억 반응들을 강화시키지 않는다는 것을 보여준다. 마우스를 3 차례 면역화하였고, 희생시키기 전 30주 동안 방치해 두었다. 도 6a는 IFN-γ ELISpot에 의해 면역화된 마우스의 비장세포로부터 IFN-γ 분비를 측정하는 것을 나타낸다. 도 6b는 면역화된 마우스로부터 기억 반응을 측정하기 위하여 사용된 세포내 사이토킨 염색을 보여준다. 면역화된 마우스의 비장세포를 배지, PMA/이오노마이신, 또는 브레펠딘(Brefeldin) A 존재하에 우성 및 준우성 HIV-1 gag 및 pol 항원성 펩티드로 5시간 동안 자극하였다. 도 6c에서, 면역화된 마우스로부터 혈청을 취하고, HIV-1 gag p24 ELISA에서 이동시켰다. 항원 특이적 IgG에 대해 혈청 희석물을 분석하였다. 그래프로 나타내기 전, 희석 웰 내 배경 반응들만을 상기 시료 OD 값에서 차감하였다.

도 7a 내지 7c는 pIL-15R α가 내생성 IL-15 없이 보조제가 될 수 있다는 것을 보여준다. 보조제로서 IL-15R α의 메커니즘을 조사하기 위하여, 무린 IL-15에 결합하는 인간 IL-15R α의 능력을 검사하였다. 도 7a는 방사능 표지된 인간 IL-15R α가 마우스 IL-15에 결합하고, 항-마우스 IL-15 항체와 공면역 침강된다는 것을 보여준다. 도 7b에서 나타낸 대조군 C57BL/6, 도 7c에서 나타낸 IL-15 녹아웃 마우스에서, 도 3a의 일정에 따라 면역화를 또한 반복하였고, 비장세포에서 IFN-γ ELISpot을 실행하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0028] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "IL-15Ra"는 인터루킨 15 수용체 알파 단백질을 지칭한다.
- [0029] 본원에서 사용된 것과 같이, "기능적 단편"은 면역원과 접합하여 전달되었을 때, 상기 면역원이 IL-15Ra의 단편 없이 전달된 경우 유도되는 면역과 비교하여, 증가된 면역 반응을 제공하는 IL-15Ra의 단편을 의미한다. 단편은 일반적으로 길이가 10개 이상의 아미노산이다.
- [0030] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "표적 단백질"은 면역 반응을 위한 표적 단백질로 작용할 수 있는 본 발명의

유전자 구조체에 의해 인코딩되는 펩티드 및 단백질을 지칭한다. 용어 "표적 단백질" 및 "면역원"은 상호호환적으로 이용되며, 이에 대하여 면역 반응이 유도될 수 있는 단백질을 말한다. 상기 표적 단백질은 면역 반응이 필요한 병원균, 또는 암 세포나 자가면역 질환에 관련된 세포와 같이 바람직하지 못한 세포 유형으로부터의 단백질과 1 이상의 에피토프를 공유하는 면역원성 단백질이다. 상기 표적 단백질에 대하여 지시된 상기 면역 반응은 표적 단백질이 관련된 특이적 감염 또는 질환에 대하여 개체를 보호하거나 및/또는 특이적 감염 또는 질환에 대해 개체를 치료할 것이다.

- [0031] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "유전적 구조체(genetic construct)"는 표적 단백질 또는 면역 조정 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 말한다. 상기 코딩 서열은 상기 핵산 분자가 투여되는 개체의 세포 안에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 인자들에 게 작동 가능하도록 연결된 개시 및 종료 신호를 포함한다.
- [0032] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "발현 가능한 형"은 표적 단백질 또는 면역 조정 단백질을 인코딩하는 코딩 서열에 작동 가능하도록 연결된 필수 조절 인자들을 함유 있어, 개체의 세포안에 있을 때 상기 코딩 서열이 발현되도록 하는 유전자 구조체를 말한다.
- [0033] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "에피토프(epitope)를 공유"한다는 것은, 단백질이 다른 단백질의 에피토프와 동일하거나 실질적으로 유사한 1 이상의 에피토프를 포함한다는 것을 말한다.
- [0034] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "실질적으로 유사한 에피토프"는 한 단백질의 에피토프와 동일하지 않은 구조를 가지지만, 그럼에도 불구하고 그 단백질과 교차-반응하는 세포성 또는 체액성 면역 반응을 일으키는 에피토프를 의미한다.
- [0035] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "세포 내 병원균"은 바이러스 또는 병원성 유기체의 생식 주기 또는 생활 주기의 적어도 일부가 숙주 세포 안에 존재하여, 그 안에서 병원균 단백질을 생성하거나 또는 생성하도록 야기하는 바이러스 또는 병원성 유기체를 말한다.
- [0036] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "과다 증식성 질환들"은 세포의 과다증식을 특징으로 하는 질환 및 장애를 의미한다.
- [0037] 본원에서 사용된 것과 같이, "과다증식성-관련 단백질"은 과다증식성 질환과 관련된 단백질을 지칭한다.
- [0038] 본 발명은 IL-15Ra 및 이의 기능적 단편들, 그리고 이의 조합을 인코딩하는 핵산 분자들이 백신의 일부분으로 전달되었을 때, 면역 반응을 조절한다는 발견으로부터 기인된다. 따라서 IL-15Ra 및 이의 기능적 단편들, 그리고 이의 조합을 인코딩하는 핵산 분자들은 백신과 조합하여 또는 백신의 성분으로써 면역 치료제로 전달될 수 있다.
- [0039] 추가적으로, 본 발명은 IL-15 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 핵산 분자들과 조합하여, IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 핵산 분자들을 백신의 일부로 전달하였을 때, 면역 반응을 조절한다는 발견으로부터 기인된다. 따라서 IL-15 또는 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 분자들과 조합하여, IL-15Ra 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 핵산 분자들은 백신과 조합하여 또는 백신의 성분으로써 면역 치료제로 전달될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일부 측면들은 치료 백신 내 IL-15Ra 단백질의 핵산 코딩 서열의 용도를 제공하며, 특히 CD8+ 기억 T 세포 반응이 바람직하지 않는 경우에 이러한 용도를 제공한다. 이러한 치료 백신들은 질환 관련된 세포뿐만 아니라 정상 세포에서도 발현되는 항원인, 항원 표적을 포함하여 발현되는 항원이고, 이로 인하여 상기 항원을 발현시키는 정상 세포에 대한 장기적 면역 반응없이, 항원-보유 세포들의 단기 제거가 치료 효과를 가지는 백신이다. 따라서, 본 발명의 이러한 측면은 정상 세포에도 또한 존재하는 암세포 상의 항원들을 향한 치료 백신, 정상 세포에도 또한 존재하는 자가면역 질환 관련된 세포에 의해 발현되는 항원들을 향한 치료 백신, 그리고 지속적인 면역 반응이 바람직하지 못할 수 있는 만성 감염에 관련된 병원균 항원들을 향한 치료 백신들에서 특히 유용하다. 만성 감염은 병원균이 제거되지 않는 병원균 감염을 말한다. 예를 들어, 소아마비, 천연두, 유행성 이하선염 등과 같은 급성 감염과 대조적으로, HCV, HSV, CMV, 수두, HIV 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 일부 측면들은 치료 백신 내 IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 조합하여 IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열의 용도를 제공하는데, 강화된 폭발(burst) 면역 반응이 바람직한 경우에 특히 유용하다. IL-15Ra 단백질의 핵산 코딩 서열과 IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열의 상기 조합은 면역 반응의 초기 유도

시 추가적인 보조제 효과를 제공한다. IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 동일한 부위로 투여되거나, IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 상기 핵산 코딩 서열은 추가 면역 반응을 얻기 위하여 상이한 부위로 전달될 수 있다.

- [0042] 인간 IL-15Ra의 뉴클레오티드 서열은 유전자 은행(Genbank) 기탁 번호 NM172200 및 NM002189로 공개되며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. 인간 IL-15Ra의 단백질 서열은 유전자 은행 기탁 번호 Q13261, NP002180 및 NP751950으로 공개되며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. 본 발명의 일부 구체예에서, IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 높은 수준의 발현을 위하여 최적화된다. 본 발명의 일부 구체예에서, IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 서열 번호 1에서와 같이 최적화된다. 본 발명의 일부 구체예에서, IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 서열 번호:2에서와 같이 최적화된다.
- [0043] 인간 IL-15의 뉴클레오티드 서열은 유전자 은행 기탁 번호 NM172174 및 NM000585로 공개되며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. 인간 IL-15의 단백질 서열은 유전자 은행 기탁 번호 CAA86100, CAA62616, AAI00964, CAA72044, AAH18149 및 AAU21241로 공개되며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. 본 발명의 일부 구체예에서, IL-15 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 높은 수준의 발현을 위하여 최적화된다. 일부 구체예에서, 미국 출원 번호 10/560,650 (US 20070041941)에서 설명된 것과 같은 개선된 IL-15 구조체들이 이용된다. 일부 구체예에서, 미국 출원 번호 12/160,766에서 설명된 것과 같은 개선된 IL-15 구조체들이 이용되며, 이는 본원에 참조로서 통합된다. 본 발명의 일부 구체예에서, IL-15 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 서열 번호 3이다.
- [0044] 본 발명의 일부 구체예에서, IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 상기 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 각각 동일한 플라스미드 상에 있다.
- [0045] 본 발명의 일부 구체예에서, 2가지 플라스미드를 포함하는 조성물이 제공된다: IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 포함하는 제1 플라스미드; 및 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 포함하는 제2 플라스미드. 각각은 각각 동일한 플라스미드 상에 있다.
- [0046] 본 발명의 일부 구체예에서, 두 가지 조성물이 제공된다. 제1 조성물은 IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함하고, 제2 조성물은 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 이들은 각각 동일한 플라스미드 상에 있다. 이들 두 조성물은 별도 용기에 제공될 수 있으며, 키트로 포장될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일부 구체예에서, IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열, IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열, 그리고 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 각각 동일한 플라스미드 상에 있다.
- [0048] 본 발명의 일부 구체예에서, 이 발명은 2가지 플라스미드를 포함하는 조성물을 제공한다. IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 제1의 플라스미드 상에 있고, 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 제2 플라스미드 상에 있다.
- [0049] 본 발명의 일부 구체예에서, 이 발명은 3가지 플라스미드를 포함하는 조성물을 제공한다. IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 제1 플라스미드 상에, IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 제2 플라스미드 상에, 그리고 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열은 제 3 플라스미드 상에 있다.
- [0050] 본 발명의 일부 구체예에서, 이 발명은 하나의 플라스미드를 포함하는 제1 조성물과 하나의 플라스미드를 포함하는 제2 조성물의 2가지 조성물을 제공한다. 이러한 일부 구체예에서, 상기 제1 조성물은 IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 제2 조성물은 IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 이러한 일부 구체예에서, 상기 제1 조성물은 IL-15 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 제2 조성물은 IL-15Ra를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 이러한 일부 구체예에서, 상기 제1 조성물은 IL-15 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열과 IL-15Ra를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 제2 조성물은 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 복수의 조성물들은 키트 형태로 포장된 별도 용기에 제공될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일부 구체예에서, 이 발명은 2개 플라스미드를 포함하는 제1 조성물과, 1개 플라스미드를 포함하는 제2 조성물의 두 가지 조성물을 제공한다. 이러한 일부 구체예에서, 상기 제1 조성물은 IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 제1 플라스미드와, 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 제2

플라스미드를 포함한다. 상기 제2 조성물은 IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 이러한 일부 구체예에서, 상기 제1 조성물은 IL-15 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 제1 플라스미드와, 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 제2 플라스미드를 포함한다. 상기 제2 조성물은 IL-15Ra를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 이러한 일부 구체예에서, 상기 제1 조성물은 IL-15 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 제1 플라스미드와, IL-15Ra를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 제2 플라스미드를 포함한다. 상기 제2 조성물은 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 복수의 조성물들은 키트 형태로 포장된 별도 용기에 제공될 수 있다.

[0052] 본 발명의 일부 구체예에서, 이 발명은 3가지 조성물, 즉, 하나의 플라스미드를 포함하는 제1 조성물, 하나의 플라스미드를 포함하는 제2 조성물 그리고 하나의 플라스미드를 포함하는 제 3 조성물을 제공한다. 이러한 일부 구체예에서, 상기 제1 조성물은 IL-15Ra 단백질을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 제2 조성물은 표적 항원을 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 제 3 조성물은 IL-15를 인코딩하는 핵산 코딩 서열을 함유하는 플라스미드를 포함한다. 상기 복수의 조성물들은 키트 형태로 포장된 별도 용기에 제공될 수 있다.

[0053] 면역 조정 단백질을 인코딩하는 단리된 cDNA는 면역 조정 단백질을 생산할 수 있는 구조체들을 제조할 때 출발 물질로 유용하다. 표준 기술들 및 용이하게 이용가능한 출발 물질들을 이용하여, 면역 조정 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 제조할 수 있다.

[0054] 상기 핵산 분자들은 DNA 주입 (또한 DNA 백신 접종으로도 지칭됨), 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 관련된 바이러스 및 재조합 우두 바이러스와 같은 재조합 벡터들을 포함한 몇 가지 잘 알려진 기술 중 임의의 것을 이용하여 전달될 수 있다.

[0055] DNA 백신들은 미국 특허 제5,593,972호, 제5,739,118호, 제5,817,637호, 제5,830,876호, 제5,962,428호, 제5,981,505호, 제5,580,859호, 제5,703,055호, 제5,676,594호, 및 본원에서 언급된 우선권 출원들에서 설명되고 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. 이들 출원에서 설명된 전달 프로토콜에 추가하여, DNA를 전달하는 대안적인 방법은 미국 특허 제4,945,050호 및 제5,036,006호에서 설명되며, 이들 각각은 모두 본원에 참조로서 통합된다.

[0056] 투여 경로는 근육내, 비강내, 복막내, 피내, 피하내, 정맥내, 동맥내, 안구내 및 구강뿐만 아니라, 국소적으로, 경피적으로, 흡입 또는 좌약 또는 질, 직장, 요도, 불 및 설하 조직과 같은 점막 조직에 세척에 의한 경로를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 바람직한 투여 경로는 점막 조직, 근육내, 복막내, 피내 및 피하 주사를 포함한다. 유전적 구조체는 전통적인 주사기, 바늘없는 주사 장치 또는 “미세 발사 투하 유전자 총(microprojectile bombardment gene guns)” 을 포함하는 수단에 의해 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0057] 상기 유전적 구조체를 전달하기 위한 또다른 투여 경로는 전기 천공 사용과 관련되며, 이는 미국 특허 제5,273,525호, 제5,439,440호, 제5,702,359호, 제5,810,762호, 제5,993,434호, 제6,014,584호, 제6,055,453호, 제6,068,650호, 제6,110,161호, 제6,120,493호, 제6,135,990호, 제6,181,964호, 제6,216,034호, 제6,233,482호, 제6,241,701호, 제6,347,247호, 제6,418,341호, 제6,451,002호, 제6,516,223호, 제6,567,694호, 제6,569,149호, 제6,610,044호, 제6,654,636호, 제6,678,556호, 제6,697,669호, 제6,763,264호, 제6,778,853호, 제6,865,416호, 제6,939,862호 및 제6,958,060호에서 설명되고 있으며, 이들은 본원에 참조로서 통합된다.

[0058] 유전적 구조체가 세포에 의해 취입될 때, 이 유전적 구조체(들)은 기능을 하는 염색체의 분자로 세포에 잔류할 수 있다. DNA는 플라스미드 또는 플라스미드들의 형태로 일시적으로 세포안으로 도입될 수 있다. 대안으로, RNA를 세포 안으로 투여할 수 있다. 센트로미어, 텔로미어 및 복제 기점을 포함하는 선형 미니염색체로써 상기 유전적 구조체를 제공하는 것 또한 고려된다. 유전자 구조체들은 대상체에 투여되는 약독화된 살아있는 미생물 또는 재조합 미생물 벡터들 안에서 유전자 물질의 일부를 구성할 수 있다. 유전자 구조체들은 재조합 바이러스 백신의 계놈의 일부가 될 수 있고, 여기서 상기 유전 물질은 염색체 외적인 것으로 유지된다. 유전적 구조체는 핵산 분자의 유전자 발현에 필수적인 조절 인자들을 포함한다. 이 요소들은 프로모터, 개시 코돈, 종결 코돈, 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 또한, 표적 단백질 또는 면역 조정 단백질을 인코딩하는 서열의 유전자 발현을 위하여 종종 인핸서들이 필요하다. 이들 인자들은 원하는 단백질을 인코딩하는 서열에 작동 가능하도록 연결될 필요가 있으며, 조절 인자들은 이들이 투여되는 개체 안에서 작동 가능할 필요가 있다.

- [0059] 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 원하는 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주된다. 그러나, 이들 인자들은 상기 유전자 구조체가 투여되는 개체 안에서 기능적일 필요가 있다. 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 상기 코딩 서열과 동일한 프레임 내에 존재해야만 한다.
- [0060] 이용되는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호는 개체의 세포안에서 기능적이어야한다.
- [0061] 본 발명을 실행하는데 유용한 프로모터의 예로, 특히 인간을 위한 유전자 백신의 생산에 유용한 프로모터는 원숭이(Simian) 바이러스 40 (SV40)의 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스 (MV)의 프로모터, 예컨대 BIV 롱 터미널 리피트(Long Terminal Repeat:LTR) 프로모터, 몰로니(Moloney) 바이러스, ALV, 사이토메갈로바이러스 (CMV)의 프로모터, 예컨대, CMV 즉시 초기 프로모터, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 (EBV), 라우스 육종(Rous Sarcoma) 바이러스 (RSV)의 프로모터뿐만 아니라, 예컨대, 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 인간 메탈로티오네인(metallothionein)과 같은 인간 유전자의 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0062] 본 발명을 실행하는데 유용한 폴리아데닐화 신호의 예로, 특히 인간을 위한 유전자 백신 생산에 유용한 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bgh-PolyA) 신호 및 LTR 폴리아데닐화 신호를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특히, SV40 폴리아데닐화 신호로 지칭되는 pCEP4 플라스미드 (인비트로젠, 샌디에고, 캘리포니아)내에 있는 SV40 폴리아데닐화 신호가 이용된다.
- [0063] DNA 발현에 필요한 조절 인자들에 추가하여, DNA 분자 안에는 기타 인자들 또한 포함될 수 있다. 이러한 추가적인 인자들은 인헨서를 포함한다. 인헨서는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 그리고 바이러스 인헨서들 예컨대, CMV, RSV 및 EBV의 바이러스 인헨서를 포함하는 군에서 선택될 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0064] 유전자 구조체가 염색체외적으로 유지되고, 세포 안에서 상기 다수의 구조체 복사체를 만들 수 있도록 하기 위하여 포유류 복제 기점이 유전적 구조체에 제공될 수 있다. 인비트로젠으로부터 입수한 플라스미드 pVAX1, pCEP4 및 pREP4 (샌디에고, 캘리포니아)는 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 복제 기점과 통합 없이 다수의 에피솜 복제를 만들 수 있는 핵 항원 EBNA-1 코딩 부분을 가지고 있다.
- [0065] 면역화 적용과 관련된 일부 바람직한 구제예에서, 표적 단백질, 면역 조정 단백질 그리고, 추가적으로, 이러한 표적 단백질에 대하여 면역 반응을 더 강화시키는 단백질에 대한 유전자들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자(들)이 전달된다. 이러한 유전자들의 예는 알파-인터페론, 감마-인터페론, 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF), TNF, GM-CSF, 상피 성장 인자 (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 및 결손된 신호 서열을 가지고, 임의적으로 IgE로부터의 신호 펩티드를 포함하는 있는 IL-15를 포함한 IL-15와 같은 기타 사이토킨 및 림포킨을 인코딩하는 유전자들이 있다.
- [0066] 미국 공개 제20030176378호에 상응하는 미국 출원 제10/139,423호에서 제시한 것과 같이, 이들 방법에 이용되는 조성물은 다음의 단백질 및/또는 이러한 단백질들을 인코딩하는 핵산 분자들을 하나 이상 추가로 포함할 수 있다: 주요 조직적합성 복합체 부류 I 항원 또는 주요 조직적합성 복합체 부류 II 항원을 포함하는 주요 조직적합성 복합체 항원들; Apo-1, Fas, TNFR-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, 및 DR6을 포함하나 이에 한정되지 않는 사멸 도메인 수용체; 사멸 신호, 즉, 사멸 도메인 수용체와 상호작용하는 FADD, FAP-1, TRADD, RIP, FLICE, 및 RAIDD를 포함하나 이에 한정되지 않는 단백질; 또는 사멸 도메인 수용체에 결합하여 아포토시스를 개시하는 FAS-L, 및 TNF를 포함하나 이에 한정되지 않는 리간드를 포함하는 사멸 신호; 그리고 사멸 도메인 수용체와 상호작용하는 FADD, MORT1, 및 MyD88을 포함하나 이에 한정되지 않는 중개 물질들; 곤충 및 뱀독, 슈도모나스(Pseudomonas) 내독소와 같은 세균성 내독소, 단일 쇠 독소를 포함하는 리친과 같은 이중 쇠 리보솜 비활성화 단백질 및 젤로닌과 같은 것을 포함하나 이에 제한되지 않는 세포를 죽이는 단백질을 포함하는 독소.
- [0067] 미국 공개 제20070041941호에 상응하는 미국 출원 제10/560,650호에서 제시한 것과 같이, 이들 방법에 이용되는 조성물은 다음의 단백질 및/또는 이러한 단백질들을 인코딩하는 핵산 분자들을 하나 이상 추가로 포함할 수 있으며, 이들은 본원에 참조로서 통합되어 있다: IL-15 단백질 서열에 연결된 비-IL-15 신호 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 IL-15, 이러한 융합 단백질은 IL-15 단백질 서열에 연결된 IgE 신호 펩티드, CD40L, TRAIL를 포함하고; TRAILrecDRC5, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, F461811 또는 MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, CD30, CD153 (CD30L), Fos, c-jun, Sp-1, Ap1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, NIK, SAP K, SAP1, JNK2, JNK1B2, JNK1B1, JNK2B2,

JNK2B1, JNK1A2, JNK2A1, JNK3A1, JNK3A2, NF-kappa-B2, p49 스플라이스(splice) 형, NF-kappa-B2, p100 스플라이스 형, NF-kappa-B2, p105 스플라이스 형, NF-kappa-B 50K 쉐 전구물질, NFkB p50, 인간 IL-1알파, 인간 IL-2, 인간 IL-4, 뮤린 IL-4, 인간 IL-5, 인간 IL-10, 인간 IL-15, 인간 IL-18, 인간 TNF-알파, 인간 TNF-β, 인간 인터루킨 12, MadCAM-1, NGF IL-7, VEGF, TNF-R, Fas, CD40L, IL-4, CSF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, LFA-3, ICAM-3, ICAM-2, ICAM-1, PECAM, P150.95, Mac-1, LFA-1, CD34, RANTES, IL-8, MIP-1알파, E-셀렉톤, CD2, MCP-1, L-셀렉톤, P-셀렉톤, FLT, Apo-1, Fas, TNFR-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4 (TRAIL), DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, ICE, VLA-1, 및 CD86 (B7.2)을 포함한다.

- [0068] 미국 공개 제20070104686호에 상응하는 미국 출원 제10/560,653호에서 제시한 것과 같이, 이들 방법에 이용되는 조성물은 다음의 단백질 및/또는 이러한 단백질들을 인코딩하는 핵산 분자들을 하나 이상 추가로 포함할 수 있으며 이들은 본원에 참조로서 통합되어 있다: Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, 비활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, 및TAP2.
- [0069] 어떤 이유로 유전적 구조체를 수용하는 세포를 제거하는 것이 바람직한 경우, 세포 파괴를 위한 표적으로 작용하는 추가 요소가 포함될 수 있다. 발현가능한 형태의 포진(herpes) 티미딘 키나제(tk) 유전자가 이 유전적 구조체 안에 포함될 수 있다. 약물 강시클로비어(gancyclovir)가 개체로 투여되어, 이 약물이 tk를 생산하는 임의의 세포를 선택적으로 사멸시키고, 따라서, 이 유전적 구조체를 가진 세포의 선택적 파괴를 위한 수단을 제공할 수 있다.
- [0070] 단백질 생산을 최대화하기 위하여, 상기 구조체가 투여되는 세포 안에서 유전자 발현에 아주 적합한 조절 서열을 선택할 수 있다. 더욱이, 이 세포 안에서 가장 효과적으로 전사되는 코돈을 선택할 수 있다. 당해 기술 분야에서 통상의 기술을 가진 자는 이 세포 안에서 기능을 하는 DNA 구조체들을 만들 수 있다.
- [0071] 일부 구체예에서, IgE 신호 펩티드에 연결된 본원에서 설명하는 면역 조절 단백질의 코딩 서열을 만들기 위하여 유전자 구조체가 제공될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 한 방법은 근육내, 비강내, 복막내, 피하내, 피내, 또는 국소적으로, 또는 흡입 질, 직장, 요도, 볼 및 설하 조직으로 이루어진 군에서 선택된 점막 조직에 세척에 의한 경로를 통하여 핵산 분자들을 투여하는 단계들을 포함한다.
- [0073] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 기능 인핸서 또는 유전적 백신 촉진 물질의 투여와 함께 핵산 분자는 세포로 전달된다. 폴리뉴클레오티드 기능 인핸서는 미국 특허 제5,593,972호 및 제5,962,428호에 개시되어 있으며, 이들은 각각 본원에 참조로서 통합된다. 유전적 백신 촉진 물질은 미국 특허 제5,739,118호에개시되어 있으며, 이들은 각각 본원에 참조로서 통합된다. 핵산 분자들과 함께 투여되는 공동-물질들은 상기 핵산 분자와의 혼합물로 투여되거나, 핵산 분자들의 투여 전 또는 투여 후 또는 동시에, 별도로 투여될 수 있다. 추가로, 형질 감염 물질 및/또는 복제 물질 및/또는 염증 물질로 기능을 하며, 폴리뉴클레오티드 기능 인핸서와 함께 투여할 수 있는 기타 물질로는 성장 인자, 사이토킨 및 림포킨 가령, 알파-인터페론, 감마-인터페론, GM-CSF, 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF), TNF, 상피 성장 인자 (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 및 IL-15 뿐만 아니라 섬유아세포 성장 인자, 표면 활성 물질, 예컨대, 면역-자극 복합체(ISCOMS), 모노포스포릴 리피드 A (WL), 뮤라밀 펩티드, 퀴논 유사체 및 스쿠알렌 및 스쿠알렌과 같은 비히클을 포함하는 LPS 유사체, 및 히알루론산을 포함하며, 또한 상기 유전적 구조체와 접합하여 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 조정 단백질은 폴리뉴클레오티드 기능 인핸서로 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 전달/흡수(uptake)를 강화시키기 위하여 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLG)와 연합하여 제공된다.
- [0074] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약 1 나노그램 내지 약 2000 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 1 내지 약 350 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 25 내지 약 250 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 100 내지 약 200 마이크로그램의 DNA를 함유한다.
- [0075] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 이용되는 투여 방식에 따라 제조된다. 약학 조성물이 주사 가능한 약학 조

성물인 경우, 이들은 멸균되고, 발열물질 없고, 그리고 미립자를 가지지 않는다. 등장성 제제가 바람직하게 이용된다. 일반적으로, 등장성을 위한 첨가제는 염화나트륨, 텍스트로즈, 만니톨, 솔비톨 및 락토즈를 포함할 수 있다. 일부 경우, 인산 완충염과 같은 등장성 용액이 바람직하다. 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제제에 혈관수축제가 추가된다.

[0076] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 면역원에 대항하여 면역 반응을 유도하는 방법은 면역원과 IL-15R $\alpha$  또는 이의 기능적 단편들의 복합물을 개체로 전달하여 제공된다. 상기 백신은 살아있는 약독 백신, 재조합 백신 또는 핵산 또는 DNA 백신일 수 있다.

[0077] 본 발명은 표적 단백질, 즉 특히 병원균, 알레르겐 또는 개체의 자신의 “비정상” 세포와 관련된 단백질에 대항하여 강화된 면역 반응을 유도하는데 유용하다. 본 발명은 병원성 물질에 대항하여 개체 및 유기체를 면역화시켜, 병원균 단백질에 대항한 면역 반응이 병원균에 대한 보호성 면역을 제공하는데 유용하다. 본 발명은 과다증식성 세포와 특히 관련된 표적 단백질에 대항한 면역 반응을 유도함으로써, 암과 같은 과다증식성 질환들 및 장애에 맞서 싸우는데 유용하다. 본 발명은 자가면역 질환과 특히 관련된 표적 단백질에 대항한 면역 반응을 유도함으로써, 자가면역 질환들 및 장애에 맞서 싸우는데 유용하다

[0078] 본 발명의 일부 측면들에 따르면, 표적 단백질 및 면역 조정 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 RNA는 이들이 발현되는 개체의 조직 세포 안으로 도입되어, 인코딩된 단백질을 생산한다. 표적 단백질 및 면역 조정 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 RNA 서열은 개별 세포에서 발현에 필수적인 조절 인자들에 연결된다. DNA 발현을 조절하는 인자들은 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 추가적으로, 코작(Kozak) 부위와 같은 기타 요소들이 유전적 구조체 내에 또한 포함될 수 있다.

[0079] 일부 구체예에서, 표적 단백질을 인코딩하는 발현 가능한 형태의 서열과 면역 조정 단백질을 모두 인코딩하는 발현 가능한 형태의 서열은 개체로 전달되는 동일한 핵산 분자상에서 발견된다.

[0080] 일부 구체예에서, 표적 단백질을 인코딩하는 발현 가능한 형태는 면역 조절 단백질을 인코딩하는 발현 가능한 형태의 서열과는 별도의 핵산 분자에서 일어난다. 일부 구체예에서, 표적 단백질을 인코딩하는 발현 가능한 형태의 서열과 1 이상의 면역 조절 단백질을 인코딩하는 발현 가능한 형태의 서열은 면역 조정 단백질을 인코딩하는 발현 가능한 형태의 서열을 함유하는 핵산 분자와는 별도의 하나의 핵산 분자에서 일어난다. 본 발명에 따라 상이한 다중 핵산 분자들을 만들고, 전달할 수 있다.

[0081] 핵산 분자(들)은 플라스미드 DNA, 재조합 벡터들의 핵산 분자들 또는 약독화된 백신에 제공되는 유전 물질의 일부로 제공될 수 있다. 대안으로, 일부 구체예에서, 표적 단백질 및 면역 조정 단백질은 이들을 인코딩하는 핵산 분자들에 추가하여 또는 이들을 인코딩하는 핵산 분자들을 대신하여 전달될 수 있다.

[0082] 유전적 구조체는 유전자 발현에 필요한 조절 인자들에 작동 가능하도록 연결된 표적 단백질 또는 면역 조정 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, 표적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드의 발현 가능한 형태를 포함하는 하나의 구조체와 면역 조정 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드의 발현 가능한 형태를 포함하는 하나의 구조체를 포함하는 유전자 구조체들의 조합이 제공된다. 상기 유전자 구조체들의 조합을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자(들)을 살아있는 세포로 전달하면 DNA 또는 RNA의 발현 및 표적 단백질과 1 이상의 면역 조정 단백질이 생산된다. 표적 단백질에 대한 강화된 면역 반응이 생성된다.

[0083] 본 발명은 바이러스, 원핵 생물 그리고 병원성 진핵 생물 유기체 예컨대, 단세포성 병원성 유기체 및 다세포성 기생충과 같은 병원균에 대항하여 개체를 면역화시키는데 이용할 수 있다. 본 발명은 세포를 감염시키고, 바이러스, 및 임질, 리스테리아 및 쉬겔라와 같은 원핵 생물과 같이 캡슐화되지 않는 병원균에 대항하여 개체를 면역화시키는데 특히 유용하다. 또한, 본 발명은 세포 내 병원균인 생활 주기내 단계를 포함하는 원생 동물 병원균에 대항하여 개체를 면역화시키는데 또한 유용하다. 표 1은 본 발명에 따라 백신을 만들 수 있는 일부 바이러스 과(family) 및 속(genera)의 목록을 제공한다. 표에 열거된 항원들과 같이 병원균 항원에서 나열된 에피토프와 동일한 또는 실질적으로 유사한 에피토프를 1 이상 함유하는 펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체들은 백신에 유용하다. 더욱이, 본 발명은 표 2에 열거된 것과 같은 원핵 및 진핵 원생동물 병원균 뿐만 아니라, 다세포성 기생충을 포함하는 기타 병원균들에 대항하여 개체를 면역화시키는데 또한 유용하다. 당해 기술 분야에서 숙련된 자는 감염 후 제거되는 즉, 급성 만염으로부터, 만성 감염을 야기하는 이러한 병원균을 용이하게 확인하고 구별할 수 있다.

- [0084] **표**
- [0085] 표 1 - 바이러스
- [0086] **피코르나바이러스(Picornavirus) 과**
- [0087] 속:
- [0088] 리노바이러스: (의학적) 일반 감기의 ~50% 경우 원인이 됨.
- [0089] 에테로바이러스: (의학적) 폴리오바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스, 및 인간 장바이러스, 예컨대, A 형 간염 바이러스를 포함한다.
- [0090] 압소바이러스: (수의학적) 구제역 바이러스.
- [0091] 표적 항원들: VP1, VP2, VP3, VP4, VPG
- [0092] **칼시바이러스(Calcivirus) 과**
- [0093] 속:
- [0094] 바이러스의 노워크(Norwalk) 군: (의학적) 이들 바이러스는 유행성 위장염의 주요 원인 물질이다.
- [0095] **토가바이러스(Togavirus) 과**
- [0096] 속:
- [0097] 알파바이러스: (의학적 및 수의학적) 예로 신드비스 바이러스, 로스리버 바이러스 및 베네수엘라 이스턴 & 웨스턴 말 뇌염 바이러스를 포함한다.
- [0098] 레오바이러스: (의학적) 풍진 바이러스.
- [0099] **플라리비리데(Flariviridae) 과**
- [0100] 예로는 다음을 포함한다: (의학적) 뎅기열, 황열병, 일본 뇌염, St. 루이스 뇌염 및 진드기 매개 뇌염 바이러스. 웨스트 나일 바이러스 (유전자 은행 NC001563, AF533540, AF404757, AF404756, AF404755, AF404754, AF404753, AF481864, M12294, AF317203, AF196835, AF260969, AF260968, AF260967, AF206518 및 AF202541)
- [0101] 대표적 표적 항원들: E NS5 C
- [0102] C형 간염(Hepatitis C) 바이러스: (의학적) 이들 바이러스는 과에 속하지 않지만, 그럼에도 불구하고 토가바이러스 또는 플라비바이러스로 본다. 가장 유사한 것은 토가바이러스 과이다.
- [0103] **코로나바이러스(Coronavirus)과: (의학적 및 수의학적)**
- [0104] 감염성 기관지염 바이러스 (가금)
- [0105] 돼지 전염성 위장 바이러스 (돼지)
- [0106] 돼지 혈구 응집성 뇌척수염 바이러스 (돼지)
- [0107] 고양이 감염성 복막염 바이러스 (고양이)
- [0108] 고양이 장 코로나바이러스 (고양이)
- [0109] 개 코로나바이러스 (개)
- [0110] SARS 관련된 코로나바이러스
- [0111] 인간 호흡기 코로나바이러스는 일반 감기의 약 40%의 원인이다. EX. 224E, OC43 주석- 코로나바이러스는 비-A, B 또는 C형 간염을 일으킬 수 있다.
- [0112] 표적 항원들: E1 - 또한 M 또는 매트릭스 단백질이라고 칭함; E2 - 또한 S 또는 스파이크 단백질이라고 칭함; E3 - 또한 BE 또는 헤마글루틴-엘테로즈 당단백질이라고도 칭함 (모든 코로나바이러스에 존재하지 않음) N - 뉴클레오캡시드
- [0113] **라도바이러스(Rhabdovirus) 과**

- [0114] 속:
- [0115] 메시콜로바이러스, 리싸바이러스: (의학적 및 수의학적) 광견병;
- [0116] 표적 항원: G 단백질, N 단백질
- [0117] **필로비리데(Filoviridae) 과:** (의학적)
- [0118] 출혈성 열 바이러스, 예컨대, 마르부르크 및 에볼라 바이러스
- [0119] **파라믹소바이러스(Paramyxovirus) 과:**
- [0120] 속:
- [0121] 파라믹소바이러스: (의학적 및 수의학적) 이하선염 바이러스, 뉴 캐슬 질환 바이러스 (닭에서 중요한 병원균)
- [0122] 모빌리바이러스: (의학적 및 수의학적) 홍역, 개 홍역
- [0123] 뉴모바이러스: (의학적 및 수의학적) 호흡기 합포체 바이러스
- [0124] **오르믹소바이러스(Orthomyxovirus) 과** (의학적) 인플루엔자 바이러스
- [0125] **분야바이러스(Bunyavirus) 과**
- [0126] 속:
- [0127] 분야바이러스: (의학적) 캘리포니아 뇌염, 라크로스
- [0128] 플레보바이러스: (의학적) 리프트 벨리 열(Rift Valley Fever)
- [0129] 한타바이러스: 퓨어말라(Puremala)는 헤마하긴(hemahagin) 열 바이러스이다
- [0130] 나이어바이러스(Nairvirus) (수의학적) 나이로비 면양 질환(Nairobi sheep disease)
- [0131] 또한 많은 미할당된 봉가바이러스
- [0132] **아레나바이러스(Arenavirus) 과** (의학적) LCM, 라사 열 바이러스
- [0133] **레오바이러스(Reovirus) 과**
- [0134] 속:
- [0135] 레오바이러스: 잠재적 인간 병원균
- [0136] 로타바이러스: 어린 아이에서 급성 위장염
- [0137] 오르비바이러스: (의학적 및 수의학적) 콜로라도 진드기 열,
- [0138] 레봄보(Lebombo) (인간) 말 뇌염, 청색 허
- [0139] **레트로바이러스 과**
- [0140] 아과(sub-family):
- [0141] 온코바이러스성: (수의학적) (의학적) 고양이 백혈병 바이러스, HTLVI 및 HTLVII
- [0142] 렌티바이러스성: (의학적 및 수의학적) HIV, 고양이 면역결핍 바이러스, 말의 감염, 빈혈 바이러스
- [0143] **스푸마바이러스성 파포마바이러스(Spumavirinal Papovavirus) 과**
- [0144] 아과: 폴리오마바이러스: (의학적) BKU 및 JCU 바이러스
- [0145] 아과: 파필로마바이러스: (의학적) 암 또는 악성 유두종의 진행과 관련된 많은 바이러스 유형
- [0146] 아테노바이러스 (의학적) EX AD7, ARD., O.B. - 호흡기 질환의 원인 - 일부 아테노바이러스, 예컨대 275은 장염을 일으킴
- [0147] **파르보바이러스(Parvovirus) 과** (수의학적)

- [0148] 고양이 파르보바이러스: 고양이 장염을 일으킴
- [0149] 고양이 판류코페니아바이러스
- [0150] 개 파르보바이러스
- [0151] 돼지 파르보바이러스
- [0152] **포진바이러스(Herpesvirus) 과**
- [0153] 아과:
- [0154] 알파포진비리데
- [0155] 속:
- [0156] 단순 포진바이러스(simplexvirus) (의학적)
- [0157] HSVI (유전자 은행 X14112, NC001806),
- [0158] HSV II (NC001798)
- [0159] 수두 대상포진: (의학적 수의학적)
- [0160] 위 광견병
- [0161] 수두 대상포진
- [0162] 아과
- [0163] 베타포진비리데
- [0164] 속:
- [0165] 사이토메갈로바이러스 (의학적)
- [0166] HCMV
- [0167] 무로메갈로바이러스
- [0168] 아과.
- [0169] 감마포진비리데
- [0170] 속:
- [0171] 림포크립토바이러스 (의학적)
- [0172] EBV - (버킷 림프종)
- [0173] **폭스바이러스(Poxvirus) 과**
- [0174] 아과:
- [0175] 콜도폭스비리데(의학적 - 수의학적)
- [0176] 속:
- [0177] 바리올라(천연두)
- [0178] 백시니아(우두)
- [0179] 파라폭스바이러스 - 수의학적
- [0180] 아우이폭스바이러스 - 수의학적
- [0181] 카프리폭스바이러스
- [0182] 레포리폭스바이러스
- [0183] 수이폭스바이러스

- [0184]           아과:
- [0185]           엔테모폭스비리데
- [0186]   **헤파드나바이러스(Hepadnavirus) 과**
- [0187]           B형 간염 바이러스
- [0188]           미분류된 델타 간염 바이러스
  
- [0189]   표 2
- [0190]   **세균성 병원균**
- [0191]           병원성 그람-양성 구균: 폐렴구균; 포도상구균; 및 연쇄상구균을 포함.
- [0192]           병원성 그람-음성 구균: 수막구균; 및 임균을 포함.
- [0193]           병원성 장 그람-음성 바실러스: 장내 세균(enterobacteriaceae); 슈도모나스(pseudomonas), 아시네토박테리아(acinetobacteria) 및 에이케넬라(eikenella), 유비저(melioidosis); 살모넬라(salmonella); 이질(shigellosis); 헤모필러스(haemophilus); 연성하감(chancroid); 브루셀라증(brucellosis); 야토병(tularemia); 예르시니아(yersinia) (프스튜렐라증); 스트렙토바실러스 모르틸리포르미스(streptobacillus mortiformis) 및 나선균(spirillum); 리스테리아 모노사이토제니스(listeria monocytogenes); 에리시펠로트릭스 루시오파티에(erysipelothrix rhusiopathiae); 디프테리아(diphtheria), 콜레라(cholera), 탄저 anthrax); 도노바니아증(donovanosis)(서혜육아증); 및 바르토넬라증(bartonellosis)을 포함한다.
- [0194]           병원성 혐기성 세균: 과상풍; 보틀리누스중독; 기타 클로스트리디아(clostridia); 결핵; 나병; 그리고 기타 마이코박테리아를 포함한다.
- [0195]           병원성 스피로헤타(spirochetal) 질환: 매독; -지방병매독(treponematoses): 딸기종(yaws), 반점이 생기는 피부병(pinta) 및 전염성 매독; 그리고 렙토스피라증(leptospirosis)을 포함한다.
- [0196]           고등 병원균 박테리아 및 병원성 진균에 의한 기타 감염: 방선균증(actinomycosis); 노카르디아증(nocardiosis); 효모균증(cryptococcosis), 분아균증(blastomycosis), 히스토플라스마증(histoplasmosis) 및 콕시디오이데스진균증(coccidioidomycosis); 칸디다증(candidiasis), 아스페르길루스증(aspergillosis), 그리고 털곰팡이증(mucormycosis); 스포로트리쿰증(sporotrichosis); 파라콕시디오이데스진균증(paracoccidioidomycosis), 페트리엘리둠증(petriellidiosis), 토룰롭시스증(torulopsosis), 균종(mycetoma), 및 색소진균증(chromomycosis); 그리고 피부사상균증(dermatophytosis)을 포함한다.
- [0197]           리켓치아(Rickettsial) 감염은 리켓치아균 및 리켓치아병(rickettsioses)을 포함한다.
- [0198]           미코플라스마(mycoplasma) 및 클라미디아(chlamydial) 감염 예: 미코플라스마 뉴모니에(mycoplasma pneumoniae); 림프그래눌로마 베네류움(lymphogranuloma venereum); 앵무병(psittacosis); 그리고 페리나탈 클라미디아 감염을 포함한다.
- [0199]           병원성 진핵생물
- [0200]           병원성 원생동물 및 연충 및 이에 의한 감염: 아메바증(amebiasis); 말라리아(malaria); 리슈마니아증(leishmaniasis); 파동편모충증(trypanosomiasis); 톡소포자충증(toxoplasmosis); 뉴모시스티스 폐렴(pneumocystis carinii); 바베시아병(babesiosis); 람블편모충증(giardiasis); 선모충병(trichinosis); 필라리아증(filariasis); 주혈흡충병(schistosomiasis); 선충류(nematodes); 흡충(trematodes) 또는 편충(flukes); 및 촌충(cestode) (tapeworm) 감염을 포함한다.
- [0201]   병원균 감염에 대항하여 방어하기 위한 유전자 백신을 만들기 위하여, 보호성 면역 반응이 개시될 수 있는 대항 면역원 단백질을 인코딩하는 유전 물질은 표적용 코딩 서열로써 유전자 구조체내에 포함되어야 한다. DNA 및 RNA는 모두 상대적으로 작고 상대적으로 용이하게 만들어질 수 있기 때문에, 본 발명은 다중 병원균 항원들로 백신 접종을 할 수 있는 추가적인 이점을 제공한다. 유전자 백신에 이용되는 유전적 구조체는 많은 병원균 항원들을 인코딩하는 유전 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 몇 가지 바이러스 유전자들은 단일 구조체 내에 포함되어 다중 표적을 제공할 수 있다.

- [0202] 표 1 및 2는 일부 병원성 물질 및 유기체의 목록을 포함하는데, 이들로 인한 감염으로부터 개체를 보호하기 위하여 유전자 백신을 만들 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 병원균에 대하여 개체를 면역화시키는 방법들은 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 단순 포진 바이러스 (HSV), C 형 간염바이러스 (HCV), 웨스트 나일 바이러스 (WNV) 또는 B 형 간염 바이러스 (HBV)에 대항한 것이다.
- [0203] 본 발명의 또 다른 측면은 과다증식성 질환들에서 특징적인 과다증식성 세포에 대한 보호성 면역 반응을 부여하는 방법과, 과다증식성 질환들을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 과다증식성 질환들의 예는 모든 형태의 암과 건선을 포함한다.
- [0204] 면역원성 "과다증식성 세포"-관련된 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전적 구조체를 개체의 세포안으로 도입시키면, 개체의 백신 접종된 세포 안에서 이들 단백질이 생산된다는 것을 발견하였다. 과다증식성 질환들에 대하여 면역화시키기 위하여, 과다증식성 질환과 관련된 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전적 구조체를 개체로 투여한다.
- [0205] 과다증식성-관련된 단백질을 유효한 면역원적 표적으로 삼기 위하여, 정상 세포와 비교하였을 때, 과다증식성 세포 내에서 이들 단백질은 과도하게 또는 더 높은 수준으로 생산되어야만 한다. 표적 항원들은 이러한 단백질, 이의 단편들 및 펩티드를 포함하며; 이들은 이러한 단백질에서 발견되는 1 이상의 에피토프를 포함한다. 일부 경우들에서, 과다증식성-관련된 단백질은 단백질을 인코딩하는 유전자의 돌연변이 산물이다. 돌연변이된 유전자는 정상 단백질과 거의 동일하지만, 약간 상이한 아미노산 서열을 보유하여, 정상 단백질에서는 볼 수 없는 상이한 에피토프를 만든다는 점이 다르다. 이러한 표적 단백질은 myb, myc, fyn과 같은 종양유전자들과 전위(translocation) 유전자 bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk 및 EGRF에 의해 인코딩되는 단백질들을 포함한다. 표적 항원들로서 종양 유전자 산물에 추가하여, 항암 치료 및 보호 섭생을 위한 표적 단백질은 B 세포 림프종에 의해 만들어지는 항체의 가변 부분들과 T 세포 임파종의 T-세포수용체의 가변 부분들을 포함하는데, 일부 구체예에서, 자가면역 질환의 표적 항원들로도 이용되었다. 기타 종양-관련된 단백질은 표적 단백질로 이용될 수 있는데, 단일 클론 항체 17-1A 및 염산 결합 단백질 또는 PSA에 의해 인지되는 단백질을 포함하는 이러한 단백질은 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발견된다.
- [0206] 본 발명은 몇 가지 형태의 암 중 하나 이상에 대하여 개체를 면역화시키는데 이용될 수 있지만, 본 발명은 특정 암의 발생 경향이 있는 개체 또는 암에 걸렸던, 따라서 재발 경향을 가진 개체를 예방차원으로 면역화시키는데 특히 유용하다. 유전학 및 기술뿐만 아니라 유행병학의 발달로, 개체에서 암 발생의 가능성 및 위험도 측정이 가능하다. 유전자 스크리닝 및/또는 가족 병력을 이용하여, 특정 개체가 몇 가지 유형의 암 중 어느 암의 발생에 대한 개연성을 예측하는 것이 가능하다.
- [0207] 유사하게, 이미 암이 발생한 개체와 암을 제거하기 위해 치료를 받은 개체 또는 다른 방식으로 경감된 개체들은 특히 재발 및 재발생에 취약하다. 치료 섭생의 일환으로, 이러한 개체들은 재발을 막기 위하여, 암을 지니고 있는 것으로 진단을 받은 암에 대해 면역화될 수 있다. 따라서, 개체가 한 종류의 암을 앓은 적이 있었고, 재발 위험에 처한 것을 알았을 때, 임의의 암의 미래 출현에 대항하기 위하여 그의 면역계가 준비할 수 있도록 이러한 개체들을 면역화시킬 수 있다.
- [0208] 본 발명은 과다증식성 질환들을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법들에서, 유전적 구조체의 도입은 면역 치료제로 작용하여, 개체의 면역계로 향하고, 면역계를 촉진하여 표적 단백질을 생산하는 과다증식성 세포와 싸우게 된다.
- [0209] 본 발명은 "자기"-지향적 항체들을 만드는 세포수용체 및 세포를 포함하는 자가면역과 관련된 표적에 대하여 광범위한 기반의 보호성 면역 반응을 부여함으로써, 자가면역 질환들 및 장애들을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0210] T 세포 매개된 자가면역 질환들은 류마티스 관절염(RA), 다발성 경화증 (MS), 쇼그렌(Sjogren) 증후군, 유육종증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반동성 관절염, 유착성 척추염, 경피증, 다발성근염, 피부근염, 건선, 맥관염, 베게너(Wegener) 육아종증, 크론(Crohn) 질환 및 궤양성 결장염을 포함한다. 이들 각 질환들은 내생성 항원들에 결합하여 자가면역 질환과 관련된 염증 캐스케이드를 시작하는 T 세포 수용체를 특징으로 한다. T 세포의 가변 부위에 대항하는 백신 접종은 이러한 T 세포들을 제거하기 위하여 CTLs를 포함하는 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0211] RA에서, 상기 질환에 관련된 T 세포 수용체(TCRs)의 몇 가지 특이적 가변 부분들의 특징이 확인되었다. 이들 TCRs은 V $\beta$ -3, V $\beta$ -14, 20 V $\beta$ -17 및 Va-17을 포함한다. 따라서, 이들 단백질 중 1 이상을 인코딩하는 DNA 구

조체로 백신 접종하면 RA에 관련된 T 세포들을 표적으로 하는 면역 반응을 유도할 것이다. Howell, M. D., 등, 1991 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:10921-10925; Piliard, X., 등, 1991 Science 253:325-329; Williams, W. V., 등, 1992 J Clin. Invest. 90:326-333을 참고; 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. MS에서, 이 질환에 관련된 TCRs의 몇 가지 특이적 가변 부분들의 특징이 확인되었다. 이들 TCRs는 VfP 및 Va-10을 포함한다. 따라서, 이들 단백질 중 1 이상을 인코딩하는 DNA 구조체로 백신 접종하면 MS에 관련된 T 세포들을 표적으로 하는 면역 반응을 유도할 것이다. Wucherpfennig, K. W., 등, 1990 사이언스 248:1016-1019; Oksenberg, J. R., 등, 1990 네이처 345:344-346을 참고; 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다.

- [0212] 경피증에서, 이 질환에 관련된 TCRs의 몇 가지 특이적 가변 부분들의 특징이 확인되었다. 이들 TCRs는 V $\beta$ -6, V $\beta$ -8, V $\beta$ -14 및 Va-16, Va-3C, Va-7, Va-14, Va-15, Va-16, Va-28 및 Va-12를 포함한다. 따라서, 이들 단백질 중 1 이상을 인코딩하는 DNA 구조체로 백신 접종하면 경피증에 관련된 T 세포들을 표적으로 하는 면역 반응을 유도할 것이다.
- [0213] T 세포 매개된 자가 면역 질환, 특히 TCR의 가변 부분이 아직 특징화되지 않은 T-세포 매개된 자가면역 질환을 앓고 있는 환자들을 치료하기 위하여, 활액 생검을 실행할 수 있다. 존재하는 T 세포의 시료를 취하고, 표준 기술들을 이용하여 이들 TCRs의 가변 부분을 확인할 수 있다. 이러한 정보를 이용하여 유전자 백신을 준비할 수 있다.
- [0214] B 세포 매개된 자가면역 질환들은 낭창(SLE), 그레이브스(Grave's) 질환, 중증근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소증, 천식, 한랭글로불린혈증, 원발성 담경 경화증 및 악성 빈혈을 포함한다. 상기 각 질환은 내생성 항원들에 결합하여 자가면역 질환과 관련된 염증 캐스캐이드를 시작하는 항체를 특징으로 한다. 항체들의 가변 부위에 대항하는 백신 접종은 상기 항체를 생산하는 이러한 B 세포들을 제거하기 위하여 CTLs를 포함하는 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0215] B 세포 매개된 자가면역 질환을 앓고 있는 환자들을 치료하기 위하여, 자가면역 활성화에 관련된 항체들의 가변 부분을 확인해야만 한다. 생검을 실시할 수 있고, 염증 부위에 존재하는 항체의 시료를 취할 수 있다. 표준 기술들을 이용하여 이들 항체의 가변 부분을 확인할 수 있다. 이러한 정보를 이용하여 유전자 백신을 준비할 수 있다.
- [0216] SLE의 경우, 하나의 항원은 DNA일 것으로 여겨진다. 따라서, SLE에 대항하여 면역화된 환자들에서, 항-DNA 항체들에 대해 이들 혈청을 스크리닝할 수 있고, 혈청에서 발견되는 이러한 항-DNA 항체들의 가변 부분을 인코딩하는 DNA 구조체를 포함하는 백신을 만들 수 있다.
- [0217] TCRs 및 항체들 모두의 가변 부분들 가운데 공통적인 구조적 특징은 잘 알려져 있다. 특정 TCR 또는 항체를 인코딩하는 DNA 서열은 Kabat, 등 1987 Sequence of Protein of Immunological Interest U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda Md.에서 설명된 것과 같은 잘 알려진 방법들에 의해 일반적으로 발견할 수 있으며, 이들은 본원에 참조로서 통합된다. 또한, 항체의 기능적 가변 부분들을 클로닝하는 일반적인 방법은 Chaudhary, V. K., 등, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066에서 찾아볼 수 있으며, 이들은 본원에 참조로서 통합된다.
- [0218] 유전자 백신들을 개선시키기 위하여 면역 조정 단백질 코딩 서열의 발현가능한 형태를 이용하는 것에 추가하여, 본 발명은 항원들을 인코딩하는 외부 유전자들을 운반하는 재조합 벡터를 이용하는 약독화된 개선된 살아있는 백신들 및 개선된 백신들에 관한 것이다. 약독화된 살아있는 백신들의 예와 외부 항원들을 운반하기 위해 재조합 벡터를 이용하는 예는 미국 특허 제4,722,848호; 제5,017,487호; 제5,077,044호; 제5,110,587호; 제5,112,749호; 제5,174,993호; 제5,223,424호; 제5,225,336호; 제5,240,703호; 제5,242,829호; 제5,294,441호; 제5,294,548호; 제5,310,668호; 제5,387,744호; 제5,389,368호; 제5,424,065호; 제5,451,499호; 제5,453,364호; 제5,462,734호; 제5,470,734호; 및 제5,482,713호에서 설명하고 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. IL-R15 a 또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 구조체들이 제공되는데, 여기서 상기 뉴클레오티드 서열은 발현이 실현되도록 백신 안에서 기능을 할 수 있는 조절 서열에 작동 가능하도록 연결된다. 이 유전자 구조체들은 본 발명에 따른 개선된 백신들을 만들기 위하여 약독화된 살아있는 백신들 및 재조합 백신들 안에 통합된다.
- [0219] 본 발명은 DNA 백신들, 약독화된 살아있는 백신들 및 재조합 백신들을 포함하는 백신 조성물의 일부로써 개체의 세포로 유전자 구조체를 전달하는 단계를 포함하는, 개체를 면역화시키는 개선된 방법을 제공한다. 이 유전자 구조체들은 발현이 실현되도록 백신 안에서 기능을 할 수 있는 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되고, IL-R15

수용체  $\alpha$  또는 이의 기능적 단편들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 개선된 백신들은 강화된 세포성 면역 반응을 일으킨다.

[0220] **실시예**

[0221] HIV-1 DNA 백신 항원들을 이용하여 생성되는 강화된 면역 반응을 측정하기 위하여 pIL-15 및 pIL-15R  $\alpha$ 로 마우스들을 공동-면역화시켰다. IL-15 및 IL-15R  $\alpha$  조합이 실질적으로 전체적인 세포성 면역 반응을 강화시키기는 하지만, 놀랍게도 IL-15R  $\alpha$  플라스미드가 IL-15에 독립적인 방식으로 면역 반응들을 증가시켰다는 것을 데이터에서 볼 수 있다. 유도된 기억 반응은 pIL-15 뿐만 아니라 pIL-15R  $\alpha$ 로 공동 백신 접종을 받은 마우스에서만 유지되었고, IL-15R  $\alpha$  단독으로 접종을 받은 경우는 유지되지 않았다는 것이 중요하다. 첫 번째 연구는 IL-15R  $\alpha$  단백질 단독으로 제한된 면역 확장 표현형을 가진 보조제로 기능을 할 수 있다는 것을 설명한다.

[0222] **재료 및 방법들**

[0223] **웨스턴 블랏 분석**

[0224] 웨스턴 블랏팅 분석은 표준 프로토콜에 따라 실시하였다. 웰당 3  $\mu$ g의 재조합 IL-15R  $\alpha$  또는 VPR 단백질 (Abgent)을 SDS-PAGE 겔(Cambrex, Rockland, ME) 상에서 이동시키고, 니트로셀룰로오즈 막 상에서 블랏팅하였고, 그리고 R&D 또는 KK1.23 항-인간 IL-15R  $\alpha$  항체로 검사하였다. 항-마우스 IgG-HRP (Zymed)을 이용하여 신호를 증폭시켰고, 그리고 ECL (GE 헬스케어, Chalfont St. Giles, 영국)로 검출하였다.

[0225] **DNA 플라스미드**

[0226] HIV-1 gag 및 HIV-1 pol (Kim 등, 1998) 그리고 인간 IL-15 (Kutzler 등, 2005)를 발현시키는 DNA 백신 구조체들은 이미 설명된 것과 같이 준비하였다. 인간 IL-15R  $\alpha$ 의 오픈 리딩 프레임은 pVAX1 및 pTRACER 벡터들 (인비트로젠, Carlsbad, CA)안으로 이동시켰다. EcoRI 및 BamHI 또는 NheI 및 EcoRI (뉴 잉글랜드 바이오랩, Beverly, MA)을 이용한 제한 효소 절단을 각각 이용하였다. 양성 클론은 서열 분석으로 증명하였다.

[0227] **시험관 내 번역 분석**

[0228] TNT-T7 신속한 전사/번역 결합된 망상적혈구 용해물 시스템(Quick Coupled Transcription/Translation Reticulocyte Lysate system (프로메가, WI)) 및 [<sup>35</sup>S] 메티오닌을 이용하여 표지된 IL-15R  $\alpha$  단백질 산물을 만들었다. 제조업자에 의해 공급된 지시에 따라 pVAX 벡터 단독 (음성 대조군) 또는 IL-15R  $\alpha$  및 [<sup>35</sup>S] 메티오닌을 포함하는 pVAX 벡터를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응은 1시간 동안 30°C에서 실시하였다. 표지된 단백질은 5  $\mu$ g 정제된 단일 클론 항-IL-15R  $\alpha$  항체 (R&D 시스템) 또는 클론 KK1.23을 이용하여 4°C에서 RIPA 완충액 내에서 밤새 회전시키면서 면역 침강시켰다. 약 5 mg의 단백질 G-세파로스 비드(GE 헬스케어) (50  $\mu$ l의 100 mg/mL 원액)을 각 면역 침강 반응에 추가하였고, 시료는 2시간 동안 회전시키면서 4°C에서 인큐베이션하였다. 비드는 염 및 소 혈청 알부민을 다량 함유하는 결합 완충액으로 3차례 세척하였고, 최종적으로 2x 시료 완충액에 현탁시켰다. 면역 침강된 단백질 복합체를 5분간 가열시켜 세파로스 비드로부터 용리시켰고, 12% SDS-PAGE 겔 (Cambrex)에서 이동시켰다. 겔을 고정시켰고, 증폭 용액(GE 헬스케어)으로 처리하였고, 그리고 겔 건조기 (바이오-래드, 허큘러스, CA) 내에서 2시간 동안 건조시켰다. 건조된 겔을 -80°C에서 X-선 필름에 노출시키고, 코닥 자동 현상기(코닥, 로체스터, NY)를 이용하여 현상하였다.

[0229] **간접 면역형광 분석(Indirect Immunofluorescent Assay)**

[0230] pIL-15R  $\alpha$  플라스미드 발현을 확인하기 위한 간접 면역형광 분석은 이미 설명된 프로토콜에 따라 실행하였다 (Ramanathan 등, 2002). 완전한 DMEM 및 10%FBS (Hyclone, Logan, UT) 및 항생제-항곰팡이제(GIBCO, 인비트로젠, 칼스배드, CA)에서 챔버당 100,000 세포의 밀도로 슬라이드 챔버(BD 바이오사이언스, 베드포드, MA)에서 생장시킨 HeLa 세포 (ATCC, 록빌, MD)를 밤새 흡착되도록 두었다. 제조업자의 프로토콜에 따라 FuGENE 6 형질 감염 시약(로슈 진단, 바젤, 스위스)을 이용하여 pIL-15R  $\alpha$  pTRACER 또는 pVAX-1 (1  $\mu$ g/웰)로 세포를 형질 감염시켰다. 형질 감염 후 24시간 후에, PBS로 세포를 세척하였고, RT에서 1시간 동안 2% PFA/PBS를 이용하여 슬라이드 상에서 고정시켰다. 우리 실험실에서 만든 5  $\mu$ g의 클론 KK1.23 마우스 항 인간 IL-15R  $\alpha$  또는 IgG1 이소타입 대조군 (R&D 시스템, 미니애폴리스, MN)과 함께 37°C에서 90분간 슬라이드를 인큐베이션하였다. 2차 항체에 콘쥬게이션된 항 마우스 IgG-로다민(산타 크루즈 바이오테크놀로지, 산타 크루즈, CA)을 1:200으로 첨가하였고, 상기 슬라이드를 실온에서 45분간 인큐베이션하였다. 이어서, DAPI (몰레큘라 프로브, 인비트로젠)로 실온에서

10분간 염색시키고, 슬라이드는 플루오로마운트 G 배지 (Electron Microscopy Sciences, 하트필드, PA)에 마운팅하고, 형광 현미경용 상 3 이미지(Phase 3 Image) 프로 프로그램(Media Cybernetics, 베테스다, MD)을 이용하여 분석하였다.

[0231] **플라스미드 면역화 및 마우스**

[0232] 6 내지 8 주령의 암컷 BALB/c (Jackson Laboratory, 마 하버, ME), C57BL/6 (타코닉, 저먼타운, NY), 또는 IL-15 녹아웃 (Taconic) (Kennedy 등, 2000) 마우스의 전경골근(tibialis anterior)에 2주 간격으로, 3차례 주사였고, 이미 설명한 것과 같이 CELLECTRA® 적응형 정진류 장치(VGX Pharmaceuticals, The Woodlands, TX)를 이용하여 전기천공하였다(Khan 등, 2003; Laddy 등, 2008). 마우스의 모든 실험에서, 35  $\mu$ g의 pVAX1, 5  $\mu$ g의 HIV-1 항원성 플라스미드 (gag, pol), 10  $\mu$ g의 pIL-15, 및/또는 7.5, 10, 또는 15  $\mu$ g의 pIL-15R $\alpha$  (그룹당 n=3-7)으로 동물을 면역화시켰다. 다양한 유전자 플라스미드의 공동 투여는 최종 용적을 40  $\mu$ l로 만들기 위하여 등장성 구연산 완충액(Kim 등, 1998; Kutzler 등, 2005)내 0.25% 부피비카인-HCL (시그마)로 주사하기 전 설계된 DNA 플라스미드 혼합을 포함하였다. 모든 동물은 펜실베니아 대학의 온도-조절된, 그리고 명암주기가 있는 설비에 수용하였고, 이들 동물은 미국 국립 보건원 및 펜실베니아 대학의 지침에 따라 관리되었다.

[0233] **마우스를 희생시키고, 시료를 수집하고, 조직을 채취하는 방법**

[0234] 면역화 일정에서 지정된 시점에 진통제를 이용하여 동물을 진정시키고, 경부 전위를 이용하여 동물을 희생시키기 전에 채혈하였다. 각 마우스의 비장을 채취하였고, R10 배지 (RPMI1640 및 10% 태아 소 혈청, 항생체/항진균제 및 B-머캅토에탄올)을 함유하고 있는 15 ml 코니칼에 모았다(실험 그룹당). 멸균 조직 배양 후드 안에서, 모아진 각 실험 그룹의 비장/배지 혼합물은 스토마커 장비(Seward 80, Metrohm, 리버뷰, FL)를 이용하여 단일 세포 현탁액으로 으깨었다. 세포/조직 기질은 40-미크론 세포 여과기를 통과시키고, R10으로 세척시키고, 펠렛화시키고, ACK 용해 완충액(Lonza, 스위스) 내에서 실온에서 5분간 인큐베이션하여 적혈구 세포를 용해시켰다. 그 다음 비장세포를 계산하였고, 하기에 설명하는 것과 같이 면역 분석에 이용하였다.

[0235] **IFN- $\gamma$  ELISPOT 분석**

[0236] 면역화된 마우스의 항원 특이적 사이토킨 분비를 측정하기 위하여 IFN- $\gamma$  ELISPOT을 이미 설명된 것과 같이 (Kutzler 등, 2005) 실시하였다. 간략하게 설명하자면, ELISpot 96-웰 플레이트를 항-마우스 IFN- $\gamma$  포획 항체로 피복시키고, 4°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다(R&D 시스템). 면역화된 마우스의  $2 \times 10^5$ 개 비장세포를 ELISpot 플레이트의 각 웰에 첨가하였고, R10 (음성 대조군), 콘카나발린 A (양성 대조군), 또는 특이적 펩티드 (HIV-1 gag 또는 pol) 항원들 (10  $\mu$ g/ml) 존재하에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 밤새 자극시켰다. 전체 해당 단백질에 걸친, 11개 아미노산이 중첩되는 HIV-1 콘센서스 클라드 B 서브 타입 HIV-1 gag 및 pol 15-mer 펩티드는 AIDS 시약 및 지식 공유(AIDS Reagent and Reference Repository) (Frederick, MD)으로부터 획득하였다. CD8 고갈 실험을 위하여, 제조업자의 프로토콜에 따라 항-CD8a (Ly-2) 항체 (밀테니 바이오테크, 독일)를 이용하여 양성 자극 선별에 의해 전체 비장세포로부터 CD8+ T 세포를 제거하였다. 자극 24시간 후, 플레이트를 세척하였고, 4°C에서 바이오티닐화된 항-마우스 IFN- $\gamma$  항체 (R&D 시스템)와 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하였고, 스트렙타비딘알칼린 포스포타제(R&D 시스템)와 함께 밤새 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하였고, 5-브로모-4-클로로-3' 인돌일포스페이트 p-톨루이딘 염(BCIP) 및 니트로 블루 테트라졸륨 클로라이드 (NBT) (크로모젠 색깔 시약, R&D 시스템)를 첨가하였다. 플레이트를 증류수로 세척하였고, 실온에서 건조시켰다. 자동화된 ELISpot 관독기(CTL Limited, Inc. 클리블랜드, OH)로 스팟을 카운트하였다. 원시 값(Raw values)을 측정하였고, 5를 곱하여, 데이터는 100만개 비장세포당 스팟 형성 세포를 나타낸다. 각 그룹의 R10 웰의 배경 값은 그래프로 나타내기 전, 펩티드-자극된 웰로부터 차감하였다.

[0237] 사이토폭스/사이토펜(Cytofix/Cytoperm) 키트 및 표준 프로토콜(BD 바이오사이언스)을 이용한 세포 내 사이토킨 염색에 의해 세포내 사이토킨 염색 HIV-1 특이적 T 세포 반응을 또한 측정하였다. R10 및 DMSO (음성 대조군), 10 ng/ml PMA 및 250 ng/ml 이오노마이신 (양성 대조군), 또는 HIV-1 콘센서스 클라드 B gag 또는 pol 15-mer 펩티드와 함께 1  $\mu$ l/ml 골지플러그 (BD 바이오사이언스) 존재하에 면역화된 마우스의 비장 세포를 5시간 동안 자극시켰다. 표면 염색전, 세포를 LIVE/DEAD 고정가능한 바이올렛 키트(몰레큘라 프로브, 인비트로젠)로 10분간 37°C에서 염색시키고, Fc 수용체를 차단시키기 위하여 Fc 블락(BD)을 4°C에서 15분 동안 첨가하였다. 모든 항체는 BD 바이오사이언스로부터 구입하였고, 테스트당 1  $\mu$ l 농도로 이용하였다. 투과/고정 전에, 세포를 CD4-알렉사700 및 CD8-PerCP 으로 4°C에서 30분간 염색시켰다. CD3-PECy5 및 IFN- $\gamma$  PE-Cy7은 4°C에서 45분간 세포내 염색에 포함되었다. LSR II 유체 세포측정기(BD 바이오사이언스)를 이용하여 50,000개 살아있는

CD3+ 림프구 통과된 사건으로부터 데이터를 획득하였고, 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(트리스타, Inc., 애슬랜드, OR)를 이용하여 분석하였다. 음성 대조군 웰의 반응들은 그래프로 나타내기 전, 항원성 자극으로부터 차감하였다.

[0238] HIV-1 Gag 결합 항체의 분석

[0239] ELISA를 이용하여 설명된 것과 같이(Ogawa 등, 1989; Mestecky 등, 2004) 마우스 내 HIV-1 Gag-특이적 항체 IgG를 측정하였다. EIA/RIA 플레이트(Corning Costar, 캠브리지, MA)는 웰당 최종 용적이 100  $\mu$ l이 되도록 PBS (Mediatech, 헨든, VA)로 희석된 1  $\mu$ g/ml의 재조합 HIV-1III<sub>B</sub> gag p24 (Immunodiagnosics, 워번, MA)으로 피복시키고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트는 PBS/트윈 (0.05% 트윈 20)으로 세척하였고, 그리고 실온에서 2시간 동안 200 $\mu$ l의 차단 완충액/희석액(PBS 중 3% BSA)으로 비-특이적 결합에 대해 차단시켰다. 플레이트를 세척하였고, 면역화된 마우스로부터 모은(pool) 혈청 희석액을, 1 내지 10부터 1 내지 1600 희석액으로 3중으로 추가(웰당 100  $\mu$ l)하였고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 항체는 양고추냉이 과산화효소-표지된 염소 항-마우스 IgG (H+L) (Zymed)로 검출하였고, 기질 TMB H2O2 (시그마-알드리치)로 발달시켰다. 색깔 반응은 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 중단시켰으며, 450 nm에서 흡수도는 EL312 바이오-키네틱스 마이크로플레이트 판독기(Bio-Tek Instruments Inc., 위누스키, VT)에서 판독하였다.

[0240] 결과

[0241] 항-인간 IL-15R  $\alpha$  항체의 생산

[0242] 시판되는 항체는 세포 상에서 IL-15R  $\alpha$  플라스미드 (pIL-15R  $\alpha$ )의 발현을 검출하는 능력이 부족하기 때문에 인간 IL-15R  $\alpha$ 에 대한 단일 클론 항체를 만들었다. 재조합 인간 IL-15R  $\alpha$ 는 다음과 같이 생성되었다:

[0243] 재조합 인간 IL-15R  $\alpha$  단백질은 Abgent (샌디에고, CA)에 의해 생성되었다. 인간 IL-15R  $\alpha$  (Thomas Waldmann (NCI, NIH, Bethesda, MD)로부터 입수)의 오픈 리딩 프레임에 고발현 박테리아 벡터, pET21a (EMD 바이오사이언스, 깁스타운, NJ) 내에 클로닝하였다. 충분한 세포를 형질 감염시켰고, E.coli에서 증폭시키고, Ni-NTA 컬럼을 이용하여 재조합 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질의 정확성은 직접적 ELISA에서 항-인간 IL-15R  $\alpha$  항체 (R&D 시스템, 미니애폴리스, MN)를 이용하여 확인하였다.

[0244] 새로 생성된 IL-15R  $\alpha$  단백질의 크기를 확인하기 위하여, 정제된 단백질의 희석을 감소시키면서 SDS-PAGE 겔 상에서 이동시켰고, 쿠마시 블루 염료로 염색시켰다(도 1a). 도 1a에서 볼 수 있는 것과 같이, 생성된 단백질은 예측 크기인 약 30 kDa으로 이동하였다. 정확한 통일성을 나타내기 위해 상기 단백질이 시판되는 이용가능한 항체에 결합하는 능력이 있는 지에 대해 테스트하였다. 도 1b는 재조합 IL-15R  $\alpha$  또는 VPR 단백질, 음성 대조군으로 포획된 플레이트의 ELISA 분석을 나타낸다. VPR은 IL-15R  $\alpha$  단백질에 대해 유사한 방법으로 만들어졌기 때문에 이용하였다. 도 1b는 시판되는 이용가능한 항-인간 IL-15R  $\alpha$  항체가 상기 만들어진 재조합 단백질에 결합할 수 있음을 보여준다.

[0245] IL-15R  $\alpha$ 에 대한 항체를 만들기 위하여, 재조합 인간 IL-15R  $\alpha$  단백질을 도 1c에서 볼 수 있는 것과 같이, 그리고 다음과 같이 BALB/c 마우스에게 주입하였다:

[0246] 단일 클론 항체 생산을 위하여 BALB/c 마우스 (n=4)에게 재조합 인간 IL-15R  $\alpha$  단백질을 주입하였다. 완전한 프로인트 보조제 (첫 면역화에만 국한) 또는 불완전한 프로인트 보조제 (후속 면역화)에서 유화된 5  $\mu$ g의 총 단백질이 주사마다 제공되었다(시그마, St. 루이스, MO). 50  $\mu$ l를 각 옆구리 피하로 주사하고, 100  $\mu$ l는 복막으로 주사하였다. 융합 3일전 최종 부스트로 멸균 PBS내 35  $\mu$ g 단백질이 마우스에게 정맥으로 제공되었다. 혈청 내 항체 레벨은 재조합 IL-15R  $\alpha$  단백질 및 항-마우스IgG-HRP (Zymed, 샌프란시스코, CA)를 이용하여 직접적 ELISA를 이용하여 측정하였다. IL-15R  $\alpha$ 에 대해 1:8,000 항체 역가를 가진 한 마리 마우스를 골수종 세포계와 융합을 위하여 그 마우스의 비장을 제거할 때 희생시켰다. 1,500개 하이브리도마 상등액을 ELISA에 대하여 스크리닝하였고, 8개 양성 클론을 확장시켰고, 황산 암모늄 컬럼, 항체 KK1.23으로 하나를 정제하였다. 단일 클론 항체가 생성되었고, 위스타 연구소 하이브리도마 기관 (필라델피아, PA)의 줄리아 코니첼로 (Julia Conicello)가 정제하였다.

[0247] ELISA에 의해 약 1,500개 하이브리도마 상등액을 스크리닝한 후, 하나의 하이브리도마 KK1.23은 도 1d에 나타난 것과 같은 항체 역가를 나타내었다(> 1 내지 12,800). 이 하이브리도마를 후속적으로 클로닝하고, 확장시키고 정제하였다. 정제된 항체 KK1.23은 도 1e의 웨스턴 블랏 분석에서 나타난 것과 같이, 인간 IL-15R  $\alpha$ 에 특이적이다. 또한, KK1.23은 시판되는 항체보다 더 높은 친화력으로 인간 IL-15R  $\alpha$ 에 결합하는 것으로 보인다(도

1e).

[0248] **pIL-15R α는 생물 활성 단백질을 발현한다.**

[0249] 백신 접종 연구에 사용하기에 적합한 IL-15R α 발현 벡터를 만들었다. CMV 프로모터의 조절하에서 도 2a에 나타난 것과 같이 인간 IL-15R α ORF를 pVAX1 발현 벡터 안에 클로닝하였다. IL-15R α 플라스미드의 적절한 발현을 평가하기 위하여, 시험관 내 번역 분석을 실시하였다. 도 2b & 2c에서 볼 수 있는 것과 같이, S<sup>35</sup> 방사능 표지된 단백질은 대략 30.0kD로 이동하였고, 대조군 플라스미드, pVAX는 예상한 것과 같이 임의의 검출가능한 단백질 산물을 만들지 않았다. 시판되는 R&D (2b) 또는 인간 IL-15R α에 대항하는 KK1.23 (2c) 항체를 이용하여 방사능 표지된 단백질을 면역 침강시켰다.

[0250] 플라스미드 IL-15R α의 발현을 확인하기 위하여, 상기 실시예 I의 KK1.23 항체를 이용하여 면역형광 분석을 실행하였다. 인간 IL-15R α의 ORF는 pTRACER 발현 벡터 안으로 클로닝시켰고, 이 벡터는 또한 녹색 형광 단백질 (GFP) 리포터를 인코딩한다. 따라서, 녹색 형광을 발하는 세포들(도 2e-g) 또한 pIL-15R α를 발현시킨다. KK1.23 항-인간 IL-15R α는 항-마우스 IgG-PE (적색)를 이용하여 검출한다. 형질 감염안된 대조군은 도 2d에 나타내고, 이소타입 대조군은 도 2e에 나타낸다. 데이터는 pIL-15R α 플라스미드의 발현 능력뿐만 아니라 번역된 단백질 산물을 검출하기 위한 항-인간 pIL-15R α 항체의 능력을 모두 설명한다. pIL-15R α 플라스미드는 형태학적으로 정확하고, 표면 국소화된 단백질을 인코딩한다.

[0251] **보조제로써 pIL-15와 pIL-15R α의 조합**

[0252] pIL-15와 비교하여 pIL-15R α의 면역 반응을 강화시키는 능력을 검사하기 위하여, BALB/c 마우스를 도 3a에 나타난 바와 같은 일정에 따라 생체 내 전기 천공에 동반된 전경골근육으로 근육내 면역화시켰다. pVAX 대조군 벡터, 또는 10 μg의 pIL-15, 15 μg의 pIL-15R α와 함께, 또는 pIL-15와 pIL-15R α 모두와 함께 5 μg의 항원성 구조체들 (HIV-1 gag, HIV-1 pol)을 최종 용적 40 μl로 하여 마우스를 면역화시켰다. 이러한 투여량은 예비 연구에서 최적의 반응을 제공하기 위하여 미리 측정된 것들이다(데이터 제공하지 않음). 도 3b에 나타난 것과 같이, 항원성 구조체들만으로 면역화하는 것은 IFN-γ ELISpot으로 측정하였을 때, 2,300개 스팟 형성 세포 (SFC)/10<sup>6</sup> 비장세포의 결과를 내었다. pIL-15의 추가는 3,800개의 SFC에 대한 반응을 강화시켰고, pIL-15R α 및 pIL-15의 공동-면역화는 항원성 그룹 단독에 비하여 가장 극적인 증가를 보여, 5,900개의 SFC 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 IL-15/IL-15R α 면역 복합체의 형성이 IL-15 단독보다는 더 강력한 보조제로 작용할 수 있다는 생각을 뒷받침한다.

[0253] 이러한 면역 복합체가 생체 내에서 실제로 형성되는 지를 파악하기 위하여, pIL-15 및 pIL-15R α가 별도의 다리에 주사된(항원과 함께) 또 다른 면역화 그룹을 추가하였다. 이러한 분할 전달 방법에서, 플라스미드에 의해 전달된 IL-15 및 IL-15R α는 면역 복합체를 형성할 수 없을 것이다. 별개의 다리에 pIL-15 및 IL-15R α를 공동-면역화시키면 동일한 다리에 전달된 상기 동일한 복합체에서 관찰되는 것과 유사한 수준의 IFN-γ을 유도하는 것으로 밝혀졌다(각각 4,562 vs. 4,072 SFC). 항원성 구조체 및 pIL-15R α의 면역화 그룹은 또한 항원 특이적 IFN-γ 분비를 대략 3500개 SFC로 증가시켰다는 것에 주목한다(도 3b). 이들 결과를 확인하기 위하여, 우리는 pIL-15R α가 투여량 의존적 방식으로 반응을 유도할 수 있는지를 보기 위하여 항원성 구조체들과 공동으로 pIL-15R α 플라스미드의 투여량을 증가시킨 새로운 마우스 세트를 면역화시켰다. 도 4에서 볼 수 있는 것과 같이, pIL-15 α 함유물은 pGag (패널 A) 또는 pPol (패널 B)에 대항하여 측정된 반응에서, 투여량 의존적 방식으로 IFN-γ의 유도된 분비를 강화시켰다. 이용된 HIV-1 항원성 구조체와는 무관하게, pIL-15R α와의 공동-면역화는 이용된 최대 약량에서 세포성 면역 반응들을 1.5 내지 2 배 증가시켰다. 특히, IL-15R α는 IL-15가 없는 경우에도 항원 특이적 면역 반응들을 강화시킨 것으로 보인다.

[0254] pIL-15R α의 보조제 성질을 더 확인하기 위하여, 백신 접종 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 반응기 기능을 검사하였다. IFN-γ ELISpot 분석을 실행하기 전, 이미 앞서 언급된 각 백신 조합으로 면역화된 마우스의 비장세포로부터 CD8+ T 세포를 고갈시켰다. 도 5a에서 볼 수 있는 것과 같이, pIL-15, pIL-15R α 또는 이의 조합으로 면역화된 마우스의 비장세포로부터 CD8+ T 세포의 고갈은, 검출된 IFN-γ 분비의 양을 상당히 감소시켰다. 전체 비장세포에서 관찰된 총 반응(검정색 막대)과 비교하였을 때, 임의의 면역화된 그룹에서 CD4+ T 세포 기여(회색 막대) 사이에 차이는 없었다. 이와 함께, 백신 접종 전략에서 pIL-15R α 및 pIL-15의 조합은 이들 단독으로 전달된 구조체와 비교하여 면역반응을 상당히 강화시킨다. 이러한 부가 효과는 주로 CD8+T 세포에서 작용하는데, 그 이유는 상기 효과는 상기 세포 집단의 고갈시에는 상실되기 때문이다.

[0255] pIL-15R α가 체액성 면역 반응들에서 또한 효과를 가지는 지를 확인하기 위하여, 각 백신 접종 전략을 통하여

유도된 항체 반응들 또한 ELISA로 측정하였다. 면역화된 마우스의 혈청을 분석하여 HIV-1 Gag (p24) 단백질에 대항하는 IgG 항체 레벨을 측정하였다(도 5b). pIL-15 및 pIL-15R α의 조합은 세포성 면역을 유도하는데 최상이지만, pIL-15 또는 pIL-15R α 단독으로 면역화된 마우스는 pVAX (검출되지 않음), pGag 단독 또는 이의 조합 (1:800)으로 면역화된 마우스와 비교하여 최대 역가의 HIV-1 특이적 항체 (1:1600)를 보유하였다.

[0256] **pIL-15Ra 보조제는 CD8+T 세포 기억을 강화시키지 않는 것으로 보인다.**

[0257] 본원에서 이미 언급한 것과 같이 마우스를 3차례 면역화시켰다; 그러나, 이들 동물을 제3 면역화 후 1주 후에 희생시키는 대신, 대략 30주를 휴식하도록 하여 관찰된 반응들이 기억 집단에 의해 주로 기여된 것인지를 확인한다. 도 6a에서 볼 수 있는 것과 같이, 상당한 휴식 기간 후 반응들은 여전히 상당히 강력하였다. 항원성 구조체 단독으로 면역화된 마우스는 대략 1700 SFC의 반응을 가졌다. pIL-15와 공동 면역화된 마우스 그룹에서 명백하게 최대 반응을 가졌는데, pIL-15 및 pIL-15/pIL-15Ra 조합 모두에 대해 대략 2800 SFC를 가졌다. pIL-15 없이, pIL-15R α로 공동-면역화된 마우스에서는 더 이상 보조제 효과가 관찰되지 않았다(~1700 SFC). 세포 내 사이토킨 염색 및 유체 세포측정기(도 6b)로 관찰하였을 때, 동일한 경향이 또한 관찰되었는데, CD8+ T 세포에 의한 IFN-γ 생산 수준은 pIL-15로 공동 면역화된 마우스에서 가장 현저하였다. 백신 접종 전략에서 pIL-15R α의 첨가는 기억 반응들에서는 거의 효과가 없는 것으로 관찰되었지만, 반면에 pIL-15는 큰 효과를 갖는 것으로 관찰되었다. 따라서, pIL-15R α는 백신 접종 후 초기에는 강력한 보조제이지만, 시간이 경과함에 따라 IL-15가 기억 CD8+ T 세포의 보다 나은 유도물질이라는 이라는 이론을 뒷받침한다.

[0258] 기억 항체 반응은 반응기 단계 동안 관찰되는 것과 유사하였다. 도 6c에서 볼 수 있는 것과 같이, pIL-15로 면역화된 마우스는 1:1600으로 희석시켰을 때 HIV-1 Gag (p24)에 대항하는 검출 가능한 항체를 보유하였지만, pIL-15/pIL-15R α의 조합을 포함하는 모든 다른 그룹은 1:400에서 희석되었다. pIL-15는 체액성뿐만 아니라 세포성 기억 반응들의 생성에 있어서 유효한 보조제임을 보여주지만; 다른 한편으로 pIL-15R α는 항원에 대한 정확한 면역 반응을 가속시키는 역할을 하는 것으로 보인다.

[0259] **IL-15 없는 pIL-15R α 보조제**

[0260] 인간 IL-15R α 단백질이 백신 접종을 맞은 마우스에서 내생성 무린 IL-15와 복합체를 형성함으로써, 또는 IL-15 독립적으로 면역 반응을 증가시킬 수 있는 지를 테스트하기 위하여, IL-15 녹아웃 마우스에서 백신 접종을 연구하였다. 우선, 대조군으로써, 마우스 IL-15에 대한 결합에 대하여 번역된 인간 IL-15R α 단백질을 테스트하였다. 도 7a에서 볼 수 있는 것과 같이, 무린 IL-15와 함께 인큐베이션된 S<sup>35</sup> 방사능 표지된 인간 IL-15R α 단백질은 항-마우스IL-15 항체와 면역 침강할 수 있었고, 이는 무린 IL-15가 인간 IL-15R α에 결합하는 능력을 의미한다.

[0261] 무린 IL-15 없이 보조제에 대한 pIL-15R α의 상기 능력을 검사하였다. 따라서, 내생성 IL-15가 부족하여, NK 및 기억 CD8+T 세포가 부족하게 된 IL-15 녹아웃 마우스에서(Kennedy 등, 2000) 상기와 동일한 백신 접종 연구를 실행하였다. 도 7c는 IFN-γ ELISpot으로 측정하였을 때, 녹아웃 마우스 내에서 내생성 무린 IL-15 없이 pIL-15R α가 면역 반응들을 보조한다는 것을 보여준다. 더구나, pIL-15 및 pIL-15R α의 조합은 BALB/c 마우스에서 처음 관찰된 것과 같이, 보조제 단독으로 투여된 면역 반응을 더 강화시키지는 못하였다. 타코닉의 C57/BL6 배경에서 IL-15<sup>-/-</sup> 마우스를 만들었다. 따라서, BALB/c에서 관찰된 것과 같이, 적절한 배경 대조군 마우스에서 우리가 유사한 반응을 얻을 수 있는 지를 증명하기 위하여 동일한 실험을 반복하였다. 도 7b는 동일한 일정으로 면역화된 대조군 마우스는 BALB/c 면역화된 마우스와 동일한 경향을 보인다는 것을 나타낸다.

[0262] **결론**

[0263] 인간 IL-15 및 HIV-1 항원성 DNA 구조체들과 함께 IL-15R α 구조체의 공동 면역화는 항원성 구조체들 단독으로 면역화된 것보다 2.5배 더 강력한 IFN-γ 분비 레벨을 초래하였다(도 3b). ELISpot상에 플레이팅하기 전 CD8+ T 세포를 고갈시키면 IFN-γ 분비가 10배 적어지는 결과를 야기하기 때문에, IFN-γ 분비는 CD8+ T 세포에 기인한 것이었다. IL-15/IL-15R α의 조합된 전달에서 관찰된 증가된 능력은 형질 감염된 세포 내에서 안정적인 복합체의 형성 때문은 아닐 것인데, 그 이유는 이들 pIL-15 및 pIL-15Ra를 별개의 다리(항원과 함께)에 주사하여도 동일한 다리에 전달된 것과 유사한 면역 반응들을 또한 유도할 수 있기 때문이다. 따라서, pIL-15/pIL-15R α의 공동-전달에서 관찰된 강화된 반응은 두 개의 독립된 보조제의 부가 효과일 가능성이 더 크다. 혈청내 IgG 항체로 측정하였을 때, 이들 두 가지 보조제의 공동-전달은 체액성 면역 반응들을 더 강화시키지는 않는 것으로 보였다.

[0264] 면역 반응에서 pIL-15/pIL-15R α 조합의 장기 효과 또한 검사하였다. 기억 반응들을 관찰하기 위하여, 제 3 면

역화 후 면역 분석을 실시하기 전 30 주를 기다렸다. 이러한 결과에서 이들 두 보조제의 조합은 면역 반응의 초기 단계에서 강력한 CD8+ T 세포 반응들을 유도하지만, 기억 T 세포에서의 효과는 pIL-15 와 함께 면역화된 마우스에서만 주로 관찰된다는 것을 볼 수 있었다. pIL-15의 함유물은 항원 단독에 비하여 강화된 기억 면역 반응에 필요하였다. 유사하게, IL-15R $\alpha$ 는 처음에는 IL-15와 동일하거나 더 큰 면역 반응을 유도하였지만, 기억 반응을 지속시키는데 도움을 주지는 않았다. 따라서, IL-15R $\alpha$ 가 폭발(burst) 크기를 확장시킨 반면, 기억에 대한 IL-15 신호 없이, 폭발 크기가 장기적 반응을 유지하는데 있어서는 충분하지 않았다.

[0265] 놀라운 관찰에서, pIL-15R $\alpha$ 와 함께 항원성 플라즈미드의 전달은 또한 세포성 면역 반응들을 강화시켰고, pIL-15에 의해 유도되는 것과 동일하였다. 확실하게 하기 위하여, pIL-15R $\alpha$ 의 양을 증가시키면서 면역화를 실행하였고, 투여량-의존적 반응을 관찰하였다. 인간 IL-15R $\alpha$  단백질은 내생성 뮤린 IL-15에 결합할 수 있었고, 유사한 방식으로 다른쪽으로 제공할 수 있는데(transpresent)할 수 있는데, 그 이유는 뮤린 IL-15는 인간 IL-15과 -73% 동일하기 때문이다(Anderson 등, 1995a). 이러한 가설을 테스트하기 위하여, 임의의 내생성 IL-15가 부족한 IL-15 녹아웃 마우스를 면역화시켰다. 항원 단독으로 면역화된 것과 비교하여 pIL-15R $\alpha$ 으로 면역화된 IL-15 녹아웃 마우스에서 약 2배의 증가가 관찰되었다. 6-8 주령의 IL-15 $^{-/-}$  암컷 마우스를 다수 수득하는 것의 어려움으로 인하여, 이들 실험에서 pIL-15 그룹은 배제하였다. 그러나, pIL-15/pIL-15R $\alpha$  조합의 강화된 효과는 더 이상 관찰되지 않았다. 대조군 C57/BL6 마우스는 BALB/c 마우스에서 보여진 동일한 경향을 나타내었고 (비록 pVAX 그룹에서 총 스팟 수가 더 적고, 배경이 더 높았다 하더라도) 그리고 IL-15 녹아웃 마우스는 C57/BL6 마우스와 비교하였을 때도 전반적으로 더 낮은 반응을 가졌다는 것을 주목해야만 한다. 이들 마우스는 우두 공격에 대하여 보호하는 능력의 부재를 포함한 다소 부족한 숙주 방어 반응들을 가진다는 것이 이미 설명되었다(Kennedy 등, 2000). 전반적으로 낮은 면역 반응들에도 불구하고, pIL-15R $\alpha$ 의 보조제 효과는 임의의 내생성 IL-15가 없을 때도 여전히 관찰되었다. 이러한 이론에 결부시키려는 의도는 없지만, 이러한 충분한 보충 결과들을 고려할 때, IL-15R $\alpha$ 는 IL-15와 독립적인 반응을 유도할 수 있는 신규한 보조제로 작용할 수 있는 것으로 여겨진다. 이러한 면역 반응의 증폭은 숙주 T 세포 반응의 기억 단계보다는 급성 단계동안 면역 확장에 특히 집중되는 것으로 보인다.

[0266] **참고문헌**

[0267] AMARA, R.R., VILLINGER, F., ALTMAN, J.D., LYDY, S.L., O'NEIL, S.P., STAPRANS, S.I., MONTEFIORI, D.C., XU, Y., HERNDON, J.G., WYATT, L.S., CANDIDO, M.A., KOZYR, N.L., EARL, P.L., SMITH, J.M., MA, H.L., GRIMM, B.D., HULSEY, M.L., MILLER, J., MCCLURE, H.M., MCNICHOLL, J.M., MOSS, B., 및 ROBINSON, H.L. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. 사이언스 (뉴욕, N.Y 292, 69-74).

[0268] ANDERSON, D.M., JOHNSON, L., GLACCUM, M.B., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., VALENTINE, V., KIRSTEIN, M.N., SHAPIRO, D.N., MORRIS, S.W., 등 (1995a). Chromosomal assignment and genomic structure of 1115. Genomics 25, 701-706.

[0269] ANDERSON, D.M., KUMAKI, S., AHDIEH, M., BERTLES, J., TOMETSKO, M., LOOMIS, A., GIRI, J., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., 등 (1995b). Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. The Journal of biological chemistry 270, 29862-29869.

[0270] BAMFORD, R.N., DEFILIPPIS, A.P., AZIMI, N., KURYS, G., 및 WALDMANN, T.A. (1998). The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. J Immunol 160, 4418-4426.

[0271] BAROUCH, D.H., SANTRA, S., SCHMITZ, J.E., KURODA, M.J., FU, T.M., WAGNER, W., BILSKA, M., CRAIU, A., ZHENG, X.X., KRIVULKA, G.R., BEAUDRY, K., LIFTON, M.A., NICKERSON, C.E., TRIGONA, W.L., PUNT, K., FREED, D.C., GUAN, L., DUBEY, S., CASIMIRO, D., SIMON, A., DA VIES, M.E., CHASTAIN, M., STROM, T.B., GELMAN, R.S., MONTEFIORI, D.C., LEWIS, M.G., E M F N I, E.A., SHIVER, J.W., 및 LETVIN, N.L. (2000). Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. 사이언스 (뉴욕, N.Y 290, 486-492).

[0272] BECKER, T.C., WHERRY, E.J., BOONE, D., MURALI-KRISHNA, K., ANTIA, R., MA, A., 및 AHMED, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. The Journal

of experimental medicine 195, 1541-1548.

- [0273] BERGAMASCHI, C, ROSATI, M., JALAH, R., VALENTIN, A., KULKARNI, V., ALICEA, C, ZHANG, G.M., PATEL, V., FELBER, B.K., 및 PAVLAKIS, G.N. (2008). Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *The Journal of biological chemistry* 283, 4189-4199.
- [0274] BETTS, M.R., KROWKA, J.F., KEPLER, T.B., DA VIDIAN, M., CHRISTOPHERSON, C, KWOK, S., LOUIE, L., ERON, J., SHEPPARD, H., and FRELINGER, J.A. (1999). Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors. *AIDS research and human retroviruses* 15, 1219-1228.
- [0275] BOYER, J.D., ROBINSON, T.M., KUTZLER, M.A., VANSANT, G., HOKEY, D.A., KUMAR, S., PARKINSON, R., WU, L., SIDHU, M.K., PAVLAKIS, G.N., FELBER, B.K., BROWN, C, SILVERA, P., LEWIS, M.G., MONFORTE, J., WALDMANN, T.A., ELDRIDGE, J., 및 WEINER, D.B. (2007). Protection against simian/human immunodeficiency virus (SHIV) 89.6P in macaques after coimmunization with SHIV antigen and IL-15 plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18648-18653.
- [0276] BULANOVA, E., BUDAGIAN, V., POHL, T., KRAUSE, H., DURKOP, H., PAUS, R., 및 BULFONE-PAUS, S. (2001). The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J Immunol* 167, 6292-6302.
- [0277] BURKETT, P.R., KOKA, R., CHIEN, M., CHAI, S., BOONE, D.L., 및 MA, A. (2004). Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 200, 825-834.
- [0278] BURKETT, P.R., KOKA, R., CHIEN, M., CHAI, S., CHAN, F., MA, A., 및 BOONE, D. L. (2003). IL-15R alpha expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4724-4729.
- [0279] CALAROTA, S.A., DAI, A., TROCIO, J.N., WEINER, D.B., LORI, F., 및 LISZIEWICZ, J. (2008). IL-15 as memory T-cell adjuvant for topical HIV-1 DermaVir vaccine. *Vaccine*.
- [0280] CAO, Y., QIN, L., ZHANG, L., SAFRIT, J., 및 HO, D.D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine* 332, 201-208.
- [0281] DUBOIS, S., MARINER, J., WALDMANN, T.A., 및 TAGAYA, Y. (2002). IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* 17, 537-547.
- [0282] DUITMAN, E.H., ORINSKA, Z., BULANOVA, E., PAUS, R., 및 BULFONE-PAUS, S. (2008). How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from IL-15/IL-15R {alpha}. *Molecular and cellular biology*.
- [0283] FULLER, D.H., LOUDON, P., 및 SCHMALJOHN, C. (2006). Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods (샌디에고, 캘리포니아)* 40, 86-97.
- [0284] GAO, F., LI, Y., DECKER, J.M., PEYERL, F.W., BIBOLLET-RUCHE, F., RODENBURG, CM., CHEN, Y., SHAW, D.R., ALLEN, S., MUSONDA, R., SHAW, G.M., ZAJAC, A. J., LETVIN, N., 및 HAHN, B.H. (2003). Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *AIDS research and human retroviruses* 19, 817-823.
- [0285] GIRI, J.G., AHDIEH, M., EISENMAN, J., SHANEBECK, K., GRAB STEIN, K., KUMAKI, S., NAMEN, A., PARK, L.S., COSMAN, D., 및 ANDERSON, D. (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *The EMBO journal* 13, 2822-2830.
- [0286] GIRI, J.G., ANDERSON, D.M., KUMAKI, S., PARK, L.S., GRABSTEIN, K.H., 및 COSMAN, D. (1995). IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *Journal of leukocyte biology* 57, 763-766.

- [0287] HALWANI, R., BOYER, J.D., YASSINE-DIAB, B., HADDAD, E.K., ROBINSON, T.M., KUMAR, S., PARKINSON, R., WU, L., SIDHU, M.K., PHILLIP SON-WEINER, R., PAVLAKIS, G.N., FELBER, B.K., LEWIS, M.G., SHEN, A., SILICIANO, R.F., WEINER, D.B., 및 SEKALY, R.P. (2008). Therapeutic vaccination with simian immunodeficiency virus (SIV)-DNA+IL-12 or IL-15 induces distinct CD8 memory subsets in SIV-infected macaques. *J Immunol* 180, 7969-7979.
- [0288] HOKEY, D.A., 및 WEINER, D.B. (2006). DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. *Springer seminars in immunopathology* 28, 267-279.
- [0289] JIN, X., BAUER, D.E., TUTTLETON, S.E., LEWIN, S., GETTIE, A., BLANCHARD, J., IRWIN, C.E., SAFRIT, J.T., MITTLER, J., WEINBERGER, L., KOSTRIKIS, L.G., ZHANG, L., PERELSON, A.S., 및 HO, D.D. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *The Journal of experimental medicine* 189, 991-998.
- [0290] KENNEDY, M.K., GLACCUM, M., BROWN, S.N., BUTZ, E.A., VINEY, J.L., EMBERS, M., MATSUKI, N., CHARRIER, K., SEDGER, L., WILLIS, C.R., BRASEL, K., MORRISSEY, P.J., STOCKING, K., SCHUH, J.C., JOYCE, S., 및 PESCHON, J.J. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191, 771-780.
- [0291] KHAN, A.S., SMITH, L.C., ABRUZZESE, R.V., CUMMINGS, K.K., POPE, M.A., BROWN, P.A., 및 DRAGHIA-AKLI, R. (2003). Optimization of electroporation parameters for the intramuscular delivery of plasmids in pigs. *DNA and cell biology* 22, 807-814.
- [0292] KIM, J.J., NOTTINGHAM, L.K., SIN, J.I., TSAI, A., MORRISON, L., OH, J., DANG, K., HU, Y., KAZAHAYA, K., BENNETT, M., DENTCHEV, T., WILSON, D.M., CHALIAN, A.A., BOYER, J.D., AGADJANYAN, M.G., 및 WEINER, D.B. (1998). CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. *The Journal of clinical investigation* 102, 1112-1124.
- [0293] KOKA, R., BURKETT, P., CHIEN, M., CHAI, S., BOONE, D.L., 및 MA, A. (2004). Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells. *J Immunol* 173, 3594-3598.
- [0294] KOUP, R.A., SAFRIT, J.T., CAO, Y., ANDREWS, C.A., MCLEOD, G., BORKOWSKY, W., FARTHING, C., 및 HO, D.D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of virology* 68, 4650-4655.
- [0295] KU, C.C., MURAKAMI, M., SAKAMOTO, A., KAPPLER, J., 및 MARRACK, P. (2000). Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *사이언스 (뉴욕, N.Y)* 288, 675-678.
- [0296] KUTZLER, M.A., ROBINSON, T.M., CHATTERGOON, M.A., CHOO, D.K., CHOO, A.Y., CHOE, P.Y., RAMANATHAN, M.P., PARKINSON, R., KUDCHODKAR, S., TAMURA, Y., SIDHU, M., ROOPCHAND, V., KIM, J.J., PAVLAKIS, G.N., FELBER, B.K., WALDMANN, T.A., BOYER, J.D., 및 WEINER, D.B. (2005). Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. *J Immunol* 175, 112-123.
- [0297] LADDY, D.J., YAN, J., KUTZLER, M., KOBASA, D., KOBINGER, G.P., KHAN, A.S., GREENHOUSE, J., SARDESAI, N.Y., DRAGHIA-AKLI, R., 및 WEINER, D.B. (2008). Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens. *PLoS ONE* 3, e2517.
- [0298] LEIFERT, J.A., RODRIGUEZ-CARRENO, M.P., RODRIGUEZ, F., 및 WHITTON, J.L. (2004). Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. *Immunological reviews* 199, 40-53.
- [0299] LI, W., LI, S., HU, Y., TANG, B., CUI, L., 및 HE, W. (2008). Efficient augmentation of a long-lasting immune responses in HIV-1 gag DNA vaccination by IL-15 plasmid boosting. *Vaccine* 26, 3282-3290.
- [0300] LODOLCE, J.P., BOONE, D.L., CHAI, S., SWAIN, R.E., DASSOPOULOS, T., TRETTIN, S., 및 MA, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669-676.

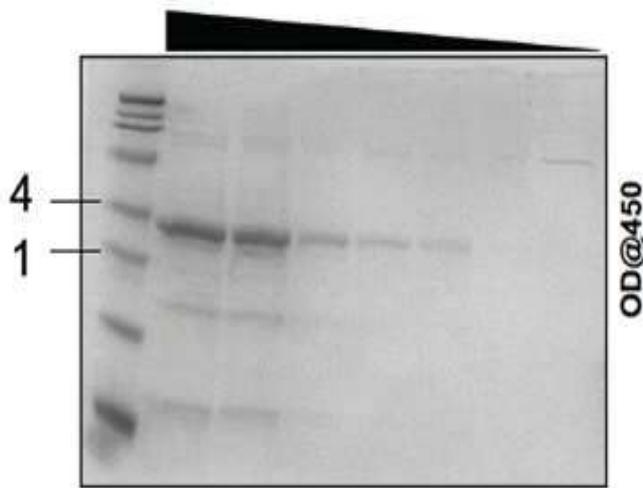
- [0301] LODOLCE, J.P., BURKETT, P.R., BOONE, D.L., CHIEN, M., 및 MA, A. (2001). T cell-independent interleukin 15 $\alpha$  signals are required for bystander proliferation. *The Journal of experimental medicine* 194, 1187-1194.
- [0302] LUCAS, M., SCHACHTERLE, W., OBERLE, K., AICHELE, P., 및 DIEFENBACH, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503-517.
- [0303] MESTECKY, J., JACKSON, S., MOLDOVEANU, Z., NESBIT, L.R., KULHAVY, R., PRINCE, S.J., SABBAJ, S., MULLIGAN, M.J., 및 GOEPFERT, P.A. (2004). Paucity of antigen-specific IgA responses in sera and external secretions of HIV-type 1 -infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20, 972-988.
- [0304] MOORE, A.C., KONG, W.P., CHAKRABARTI, B.K., 및 NABEL, G.J. (2002). Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. *Journal of virology* 76, 243-250.
- [0305] MORROW, M.P., 및 WEINER, D.B. (2008). Cytokines as adjuvants for improving anti-HIV responses. *AIDS (London, England)* 22, 333-338.
- [0306] MUSEY, L., HUGHES, J., SCHACKER, T., SHEA, T., COREY, L., 및 MCEL RATH, M.J. (1997). Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine* 337, 1267-1274.
- [0307] OGAWA, T., TARKOWSKI, A., MCGHEE, M.L., MOLDOVEANU, Z., MESTECKY, J., HIRSCH, H.Z., KOOPMAN, W.J., HAMAD A, S., MCGHEE, J.R., 및 KIYONO, H. (1989). Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. *J Immunol* 142, 1150-1158.
- [0308] OGG, G.S., JIN, X., BONHOEFFER, S., DUNBAR, P.R., NOWAK, M.A., MONARD, S., SEGAL, J.P., CAO, Y., ROWLAND-JONES, S.L., CERUNDOLO, V., HURLEY, A., MARKOWITZ, M., HO, D.D., NIXON, D.F., 및 MCMICHAEL, A.J. (1998). Quantitation of HIV- 1 -specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *사이언스 (뉴욕, N.Y)* 279, 2103-2106).
- [0309] OH, S., BERZOF SKY, J.A., BURKE, D.S., WALDMANN, T.A., 및 PERERA, L.P. (2003) . Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3392-3397.
- [0310] OH, S., PERERA, L.P., BURKE, D.S., WALDMANN, T.A., 및 BERZOF SKY, J.A. (2004) . IL-15/IL-15 $\alpha$ -mediated avidity maturation of memory CD8 $^{+}$  T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15154-15159.
- [0311] OH, S., PERERA, L.P., TERABE, M., NI, L., WALDMANN, T.A., 및 BERZOF SKY, J.A. (2008). IL-15 as a mediator of CD4 $^{+}$  help for CD8 $^{+}$  T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5201-5206.
- [0312] ONU, A., POHL, T., KRAUSE, H., 및 BULFONE-PAUS, S. (1997). Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J Immunol* 158, 255-262.
- [0313] PICKER, L.J., REED-INDERBITZIN, E.F., HAGEN, S.I., EDGAR, J.B., HANSEN, S.G., LEGASSE, A., PLANER, S., PIATAK, M., JR., LIFSON, J.D., MAINO, V.C., AXTHELM, M.K., 및 VILLINGER, F. (2006). IL-15 induces CD4 effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates. *The Journal of clinical investigation* 116, 1514-1524.
- [0314] RAMANATHAN, M.P., CURLEY, E., 3RD, SU, M., CHAMBERS, J.A., 및 WEINER, D.B. (2002). Carboxyl terminus of hVIP/mov34 is critical for HIV-1-Vpr interaction and glucocorticoid-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry* 277, 47854-47860.
- [0315] SANDAU, M.M., SCHLUNS, K.S., LEFRANCOIS, L., 및 JAMESON, S.C. (2004). Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15 $\alpha$  by the same

cells. *J Immunol* 173, 6537-6541.

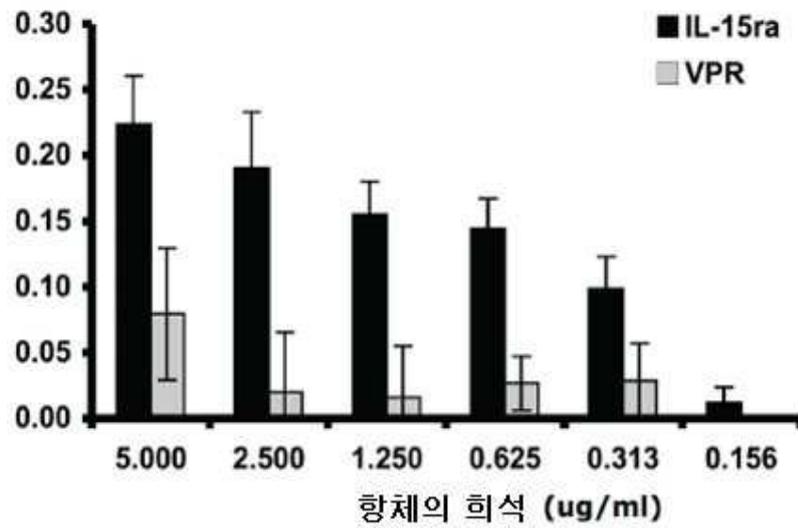
- [0316] SATO, N., PATEL, H.J., WALDMANN, T.A., 및 TAGAYA, Y. (2007). The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 588-593.
- [0317] SCHLUNS, K.S., KLONOWSKI, K.D., 및 LEFRANCOIS, L. (2004a). Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15Ralpha+ bone marrow-derived cells. *Blood* 103, 988-994.
- [0318] SCHLUNS, K.S., NOWAK, E.C., CABRERA-HERNANDEZ, A., PUDDINGTON, L., LEFRANCOIS, L., 및 AGUILA, H.L. (2004b). Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5616-5621.
- [0319] SCHMITZ, J.E., KURODA, M.J., SANTRA, S., SASSEVILLE, V.G., SIMON, M.A., LIFTON, M.A., RACZ, P., TENNER-RACZ, K., DALESANDRO, M., SCALLON, B.J., GHAYEB, J., FORMAN, M.A., MONTEFIORI, D.C., RIEBER, E.P., LETVIN, N.L., 및 REIMANN, K.A. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *사이언스 (뉴욕, N.Y)* 283, 857-860.
- [0320] SCHOENLY, K.A., 및 WEINER, D.B. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 vaccine development: recent advances in the cytotoxic T-lymphocyte platform "spotty business". *Journal of virology* 82, 3166-3180.
- [0321] SHIVER, J.W., FU, T.M., CHEN, L., CASIMIRO, D.R., DA VIES, M.E., EVANS, R.K., ZHANG, Z.Q., SIMON, A.J., TRIGONA, W.L., DUBEY, S.A., HUANG, L., HARRIS, V.A., LONG, R.S., LIANG, X., HANDT, L., SCHLEIF, W.A., ZHU, L., FREED, D.C., PERSAUD, N.V., GUAN, L., PUNT, K.S., TANG, A., CHEN, M., WILSON, K.A., COLLINS, K.B., HEIDECKER, G.J., FERNANDEZ, V.R., PERRY, H.C., JOYCE, J.G., GRIMM, K.M., COOK, J.C., KELLER, P.M., KRESOCK, D.S., MACH, H., TROUTMAN, R.D., ISOPI, L.A., WILLIAMS, D.M., XU, Z., BOHANNON, K.E., VOLKIN, D.B., MONTEFIORI, D.C., MIURA, A., KRIVULKA, G.R., LIFTON, M.A., KURODA, M.J., SCHMITZ, J.E., LETVIN, N.L., CAULFIELD, M.J., BETT, A.J., YOUIL, R., KASLOW, D.C., 및 EMINI, E.A. (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415, 331-335.
- [0322] SPRENT, J. (2003). Turnover of memory-phenotype CD8+ T cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 227-231.
- [0323] TAGAYA, Y., BAMFORD, R.N., DEFILIPPIS, A.P., 및 WALDMANN, T.A. (1996). IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 4, 329-336.
- [0324] WALDMANN, T. (2002). The contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for the immunotherapy of rheumatological diseases. *Arthritis research* 4 Suppl 3, S161-167.
- [0325] WALDMANN, T.A., 및 TAGAYA, Y. (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annual review of immunology* 17, 19-49.
- [0326] YAJIMA, T., NISHIMURA, H., ISHIMITSU, R., WATASE, T., BUSCH, D.H., PAMER, E.G., KUWANO, H., 및 YOSHIKAI, Y. (2002). Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure. *J Immunol* 168, 1198-1203.
- [0327] ZHANG, W., DONG, S.F., SUN, S.H., WANG, Y., LI, G.D., 및 QU, D. (2006). Coimmunization with IL-15 plasmid enhances the longevity of CD8 T cells induced by DNA encoding hepatitis B virus core antigen. *World J Gastroenterol* 12, 4727-4735.
- [0328] ZHANG, X., SUN, S., HWANG, I., TOUGH, D.F., 및 SPRENT, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591-599.

도면

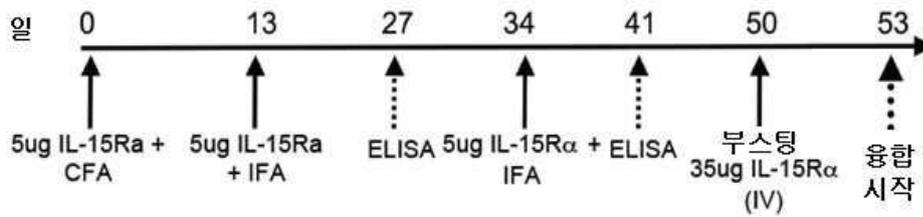
도면1a



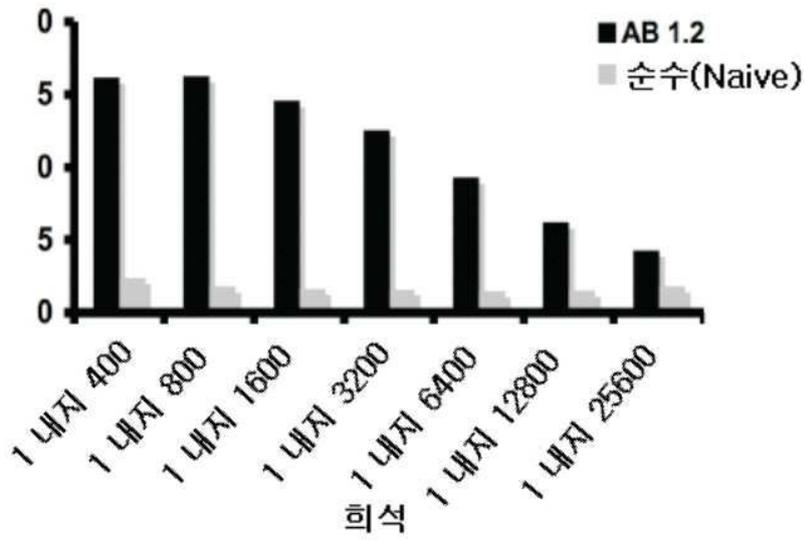
도면1b



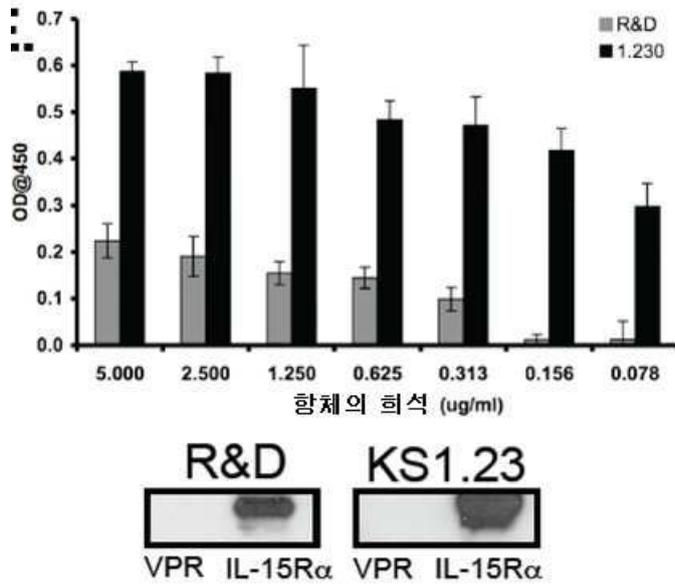
도면1c



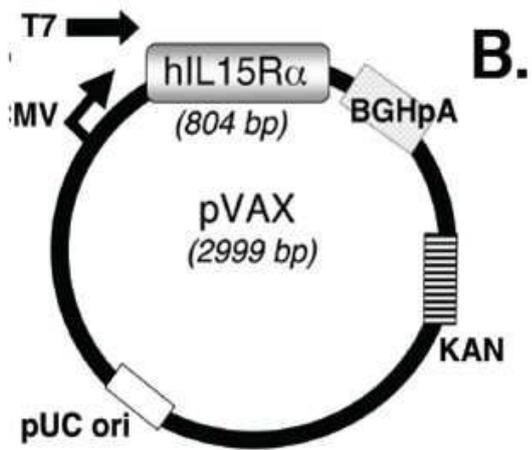
도면1d



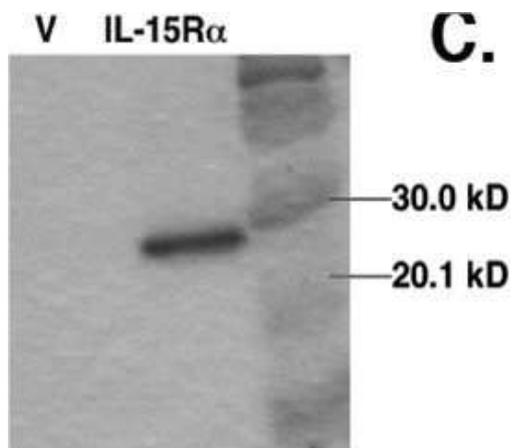
도면1e



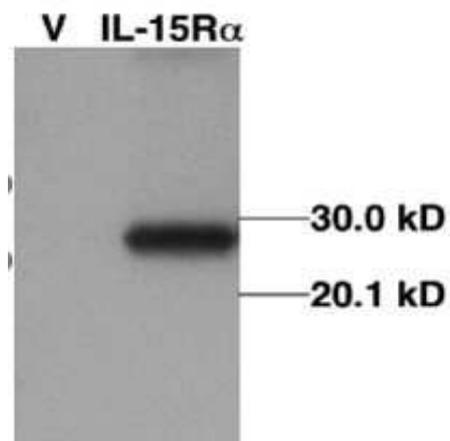
도면2a



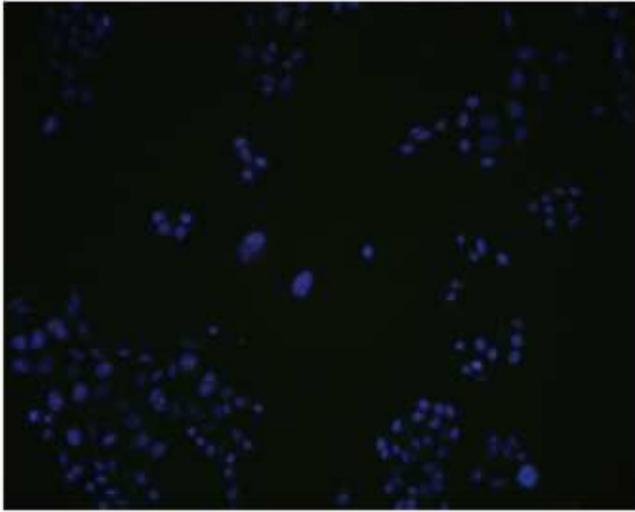
도면2b



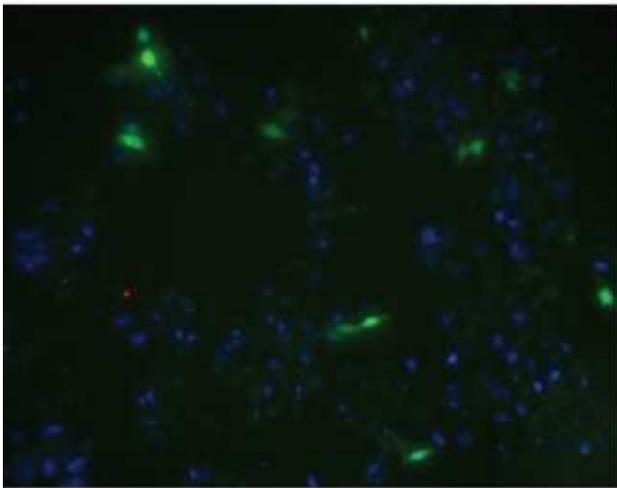
도면2c



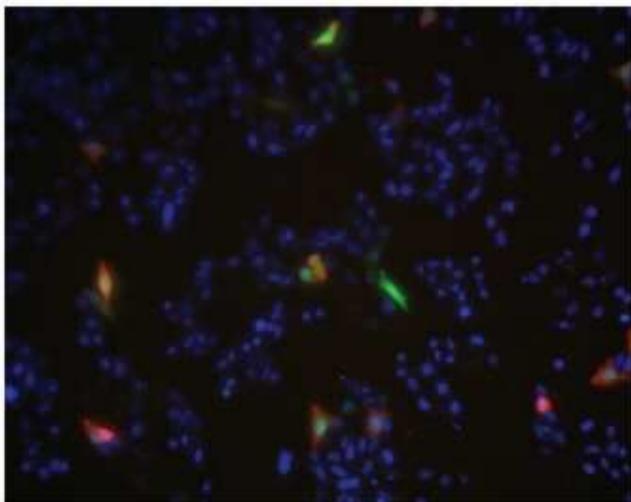
도면2d



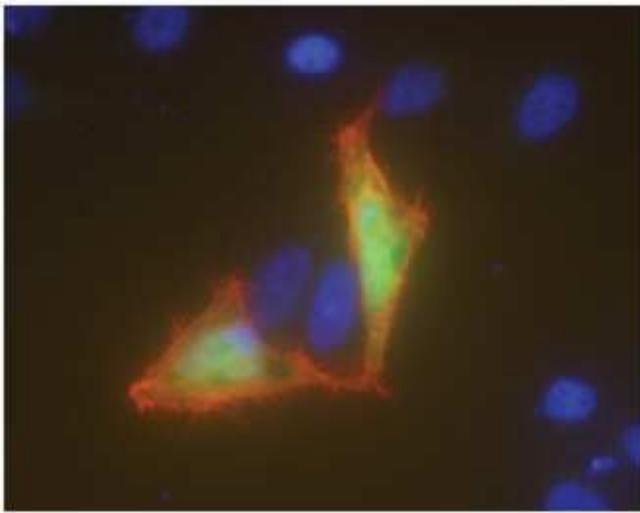
도면2e



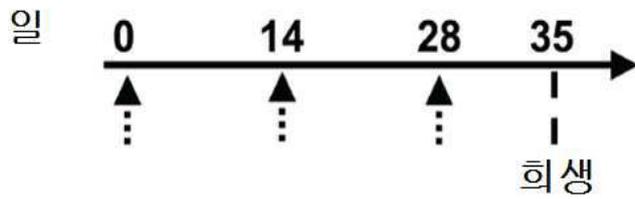
도면2f



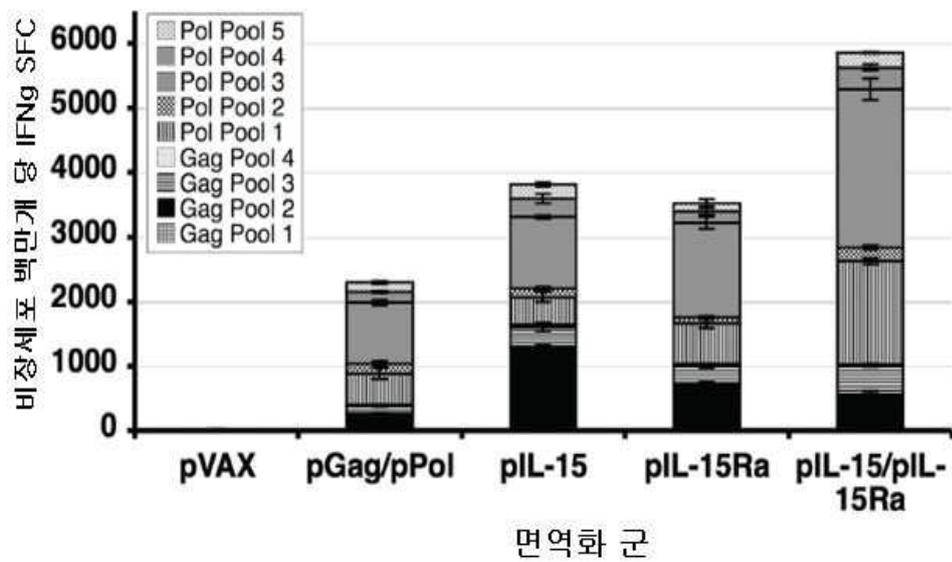
도면2g



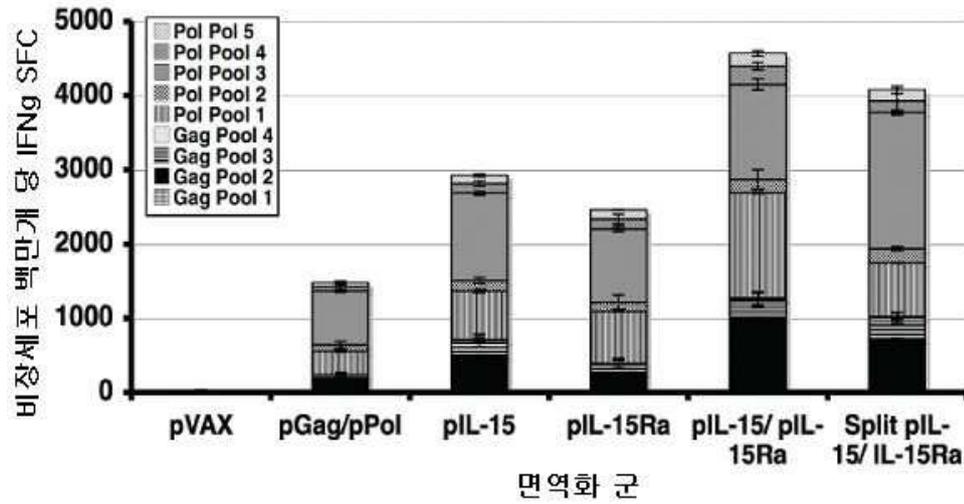
도면3a



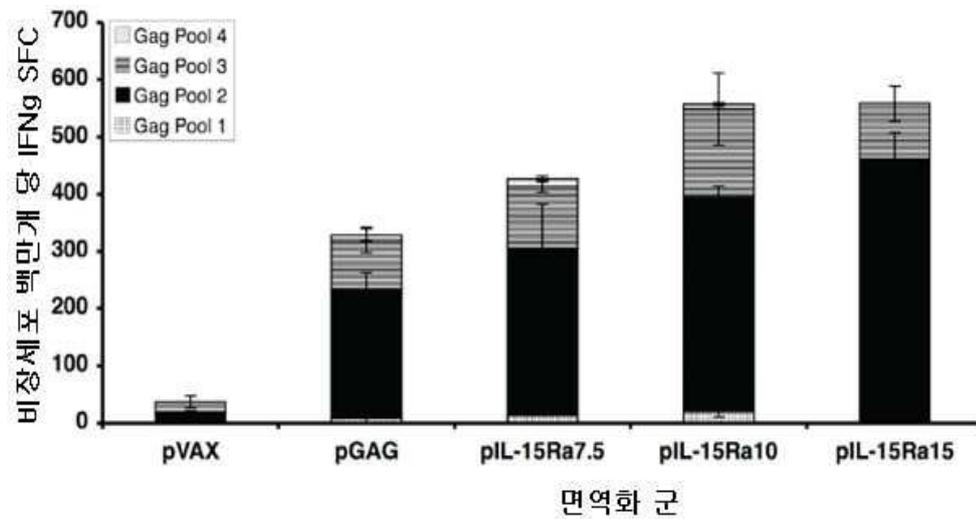
도면3b



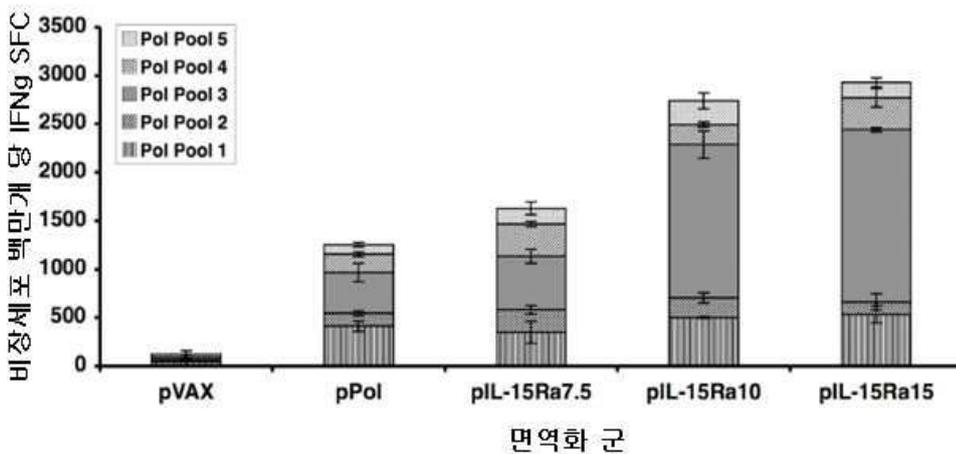
도면3c



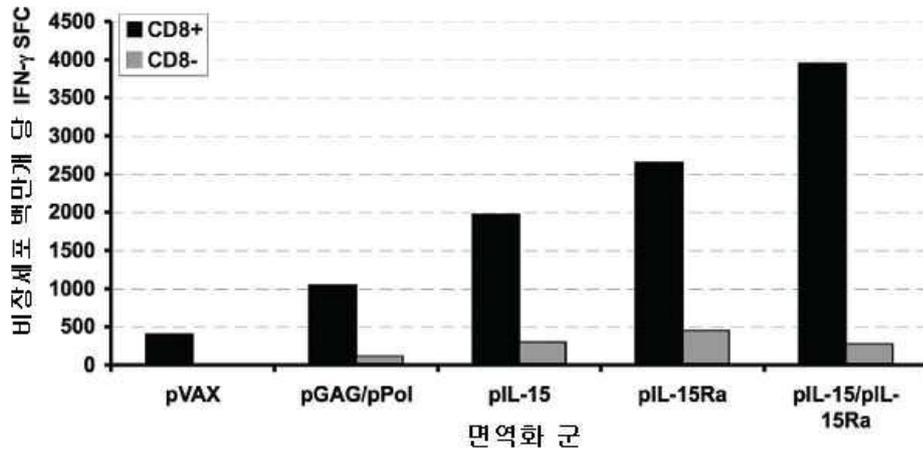
도면4a



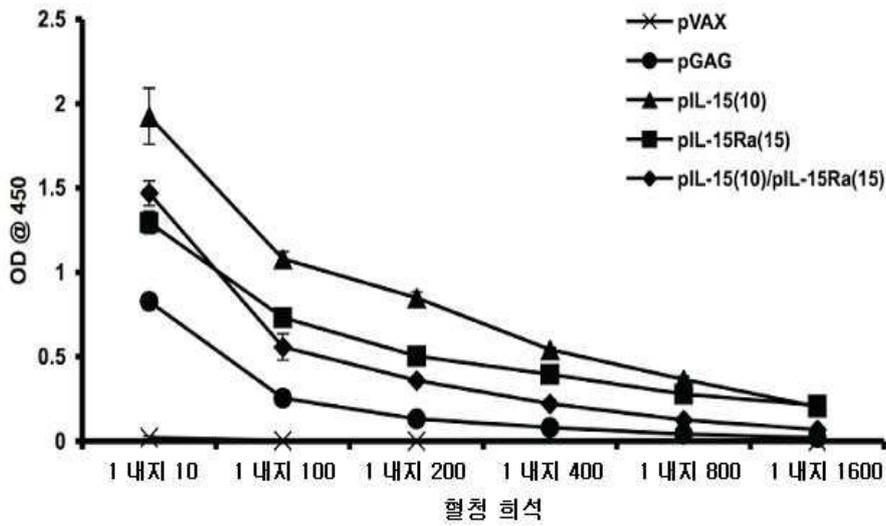
도면4b



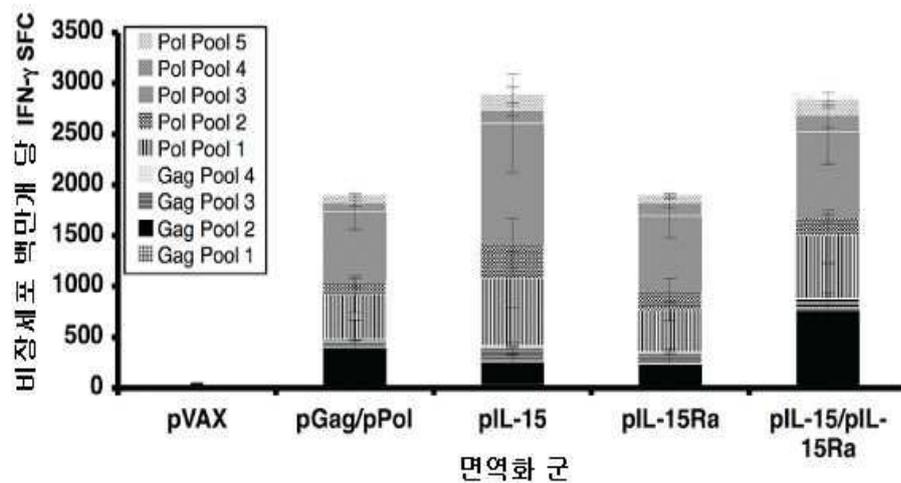
도면5a



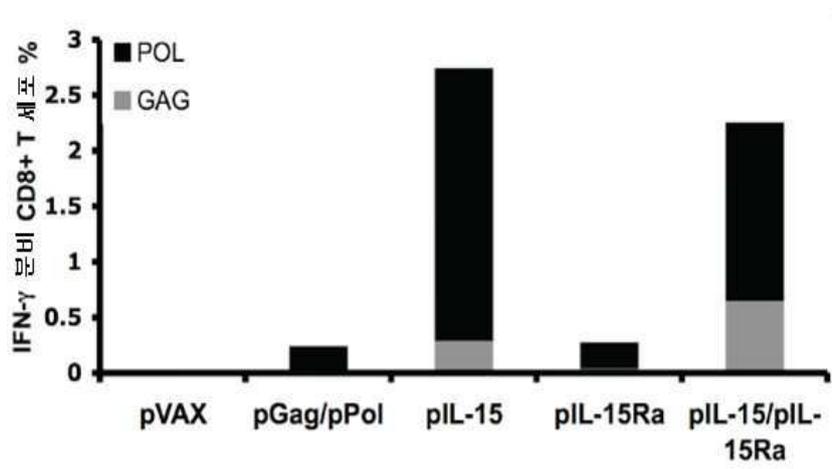
도면5b



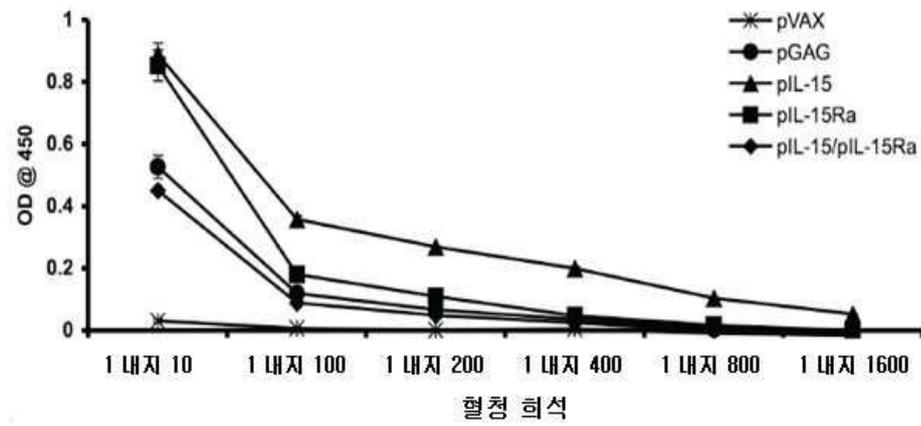
도면6a



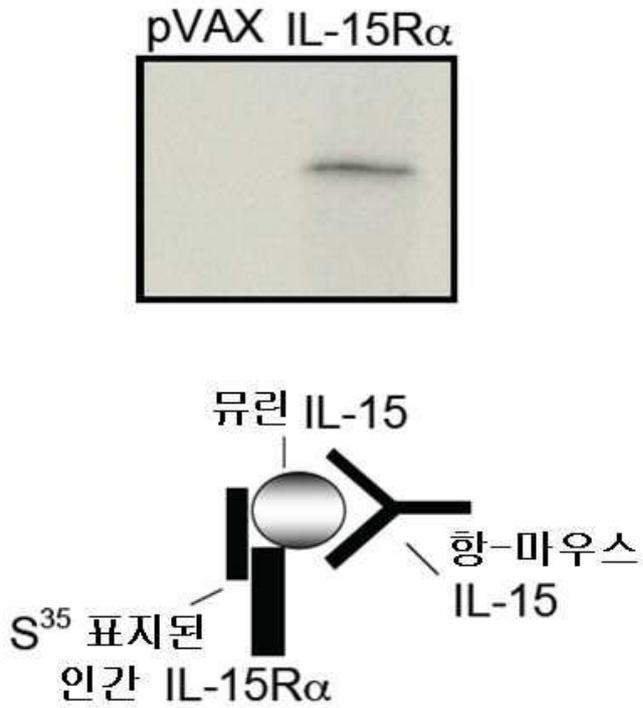
도면6b



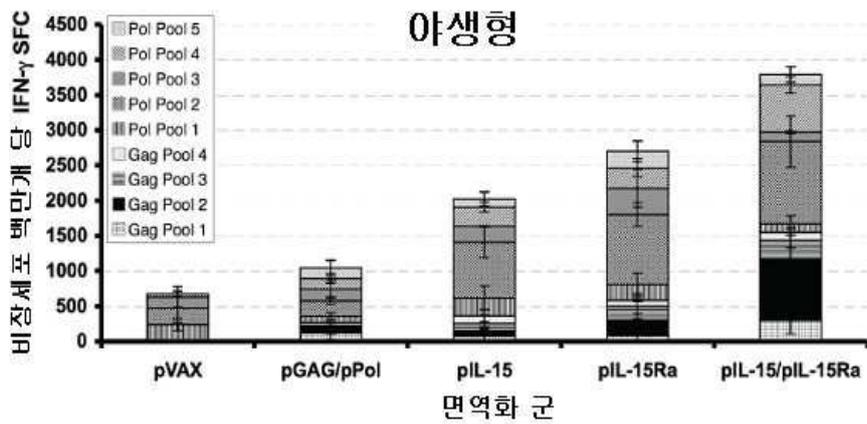
도면6c



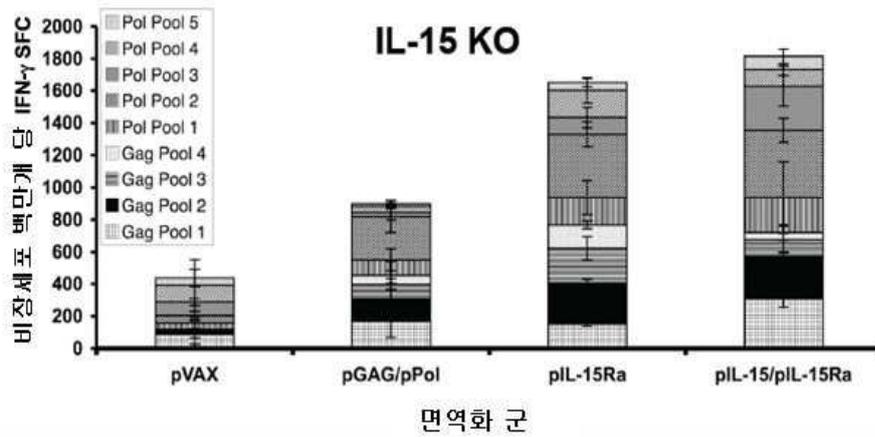
도면7a



도면7b



도면7c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania  
 Weiner, David B.  
 Kraynyak, Kimberly A.  
 Kutzler, Michele A.

<120> VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS COMPRISING IL-15 RECEPTOR ALPHA

<130> 133172.02802

<150> US 61/242,210

<151> 2009-09-14

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Optimized IL-15 Receptor Alpha DNA Sequence

<400> 1

```

ggtaccggat cgccaccat ggactggacc tggattetgt tcttgggtgc tgcccacaca      60

agagtgcaca gcgccccag gcgggccaga ggctgtagaa ccctgggcct gctgtctctg      120
ctgtgctgctg tctctctgag gcccectgcc acccggggca tcactgccc ccttcccatg      180
agcgtggagc acgccgacat ctgggtgaag agctacagcc tgtacagccg ggagcggtag      240
atctgcaaca gcggcttcaa gcggaaggcc ggcaccagca gcctgaccga gtgcgtgctg      300
    
```

aacaaggcca ccaacgtggc ccactggacc acccccagcc tgaagtgcac cgggacccc 360  
 gccctggtgc atcagagacc cgccctcct agcacagtga ccacagccgg cgtgacccc 420  
 cagcccgaga gcctctccc cagcggcaaa gacctgccc ccagcagccc cagcagcaac 480

aacaccgccg ccacaaccgc cgccatcgtg cccggcagcc agctgatgcc cagcaagagc 540  
 ccttcaccg gcacaaccga gatcagcagc cacgagagca gccacggaac accctctcag 600  
 accaccgcca agacctggga gctgaccgcc agcgcctctc accagcctcc tggcgtgtac 660  
 cctcagggcc acagcgacac caccgtggcc atcagcacct ccaccgtgct gctgtgcggc 720  
 ctgagcgccc tgagcctgct ggctgctac ctgaagagcc ggcagacccc ccctctggcc 780  
 agcgtggaga tggaagctat ggaagccctg cctgtcacct ggggcaccag ctccaggagc 840  
 gaggacctgg aaaactgcag ccaccacctg tgatgagaat tcgagctc 888

<210> 2

<211> 855

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Non-optimized IL-15 Receptor Alpha Sequence

<400> 2

atggattgga ctggatctt attttagtt gctgctgcta ctagagtcca ttctgccccg 60  
 cggcggggcg gcggctgccg gaccctcggc ctcccggcgc tgctactgct gctgctgctc 120  
 cggcccggcg cgacgcgggg catcacgtgc cctccccca tgtccgtgga acacgcagac 180  
 atctgggtca agagctacag cttgtactcc agggagcggc acattttaa ctctggtttc 240  
 aagcgtaaag ccggcacgct cagcctgacg gactgcgtgt tgaacaaggc cacgaatgct 300

gcccactgga caacccccag tctcaaatgc attagagacc ctgcctcgtt tcaccaaagg 360  
 ccagcggcac cctccacagt aacgacggca ggggtgacct cacagccaga gacctctcc 420  
 ccttctggaa aagagccccg agcttcatct ccagctcaa acaacacagc ggccacaaca 480  
 gcagctattg tccgggctc ccagctgatg cttcaaaat caccttcac aggaaccaca 540  
 gagataagca gtcatgagtc ctcccacggc acccctctc agacaacagc caagacctgg 600  
 gaactcacag catccgctc ccaccagccg ccaggtgtgt atccacaggc ccacagcgac 660  
 accactgtgg ctatctccac gtccactgic ctgctgtgtg ggctgagcgc tgtgtctctc 720

ctggcatgct acctcaagtc aaggcaaact cccccctgg ccagcgttga aatggaagcc 780  
 atggaggctc tgccggtgac ttgggggacc agcagcagag atgaagactt ggaaaactgc 840  
 tctcaccacc tatga 855

<210> 3

<211> 3751

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Optimized IL-15 Receptor Alpha Sequence with an IgE leader

<400> 3

```

aatgggggc gctgaggctc gcctcgtgaa gaaggtgttg ctgactcata ccaggcctga      60
atcgcccat catccagcca gaaagtgagg gagccacggt tgatgagagc tttgtttag      120

gtggaccagt tggtgatttt gaacttttgc tttgccacgg aacggtctgc gttgtcggga      180
agatgctgta tctgacctt caactcagca aaagttcgat ttattcaaca aagccgccgt      240
cccgtaagt cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgcgttca      300
aatggtatg cgttttgaca catccactat atatccgtgt cgttctgtcc actcctgaat      360
cccattccag aaatttctca gcgattccag aagtttctca gagtccgaaa gttgaccaga      420
cattacgaac tggcacagat ggtcataacc tgaaggaaga tctgattgct taactgcttc      480
agttaagacc gacgcgctcg tctgataaca gatgcatga tgcagaccaa tcaacatggc      540

acctgccatt gctacctgta cagtcaagga tggtagaagt gttgtcggtc ctgacacag      600
aatattacgc catttgctg catattcaaa cagctcttct acgataaggg cacaaatcgc      660
atcgtggaac gtttgggctt ctaccgattt agcagtttga tacactttct ctaagtatcc      720
acctgaatca taaatcggca aaatagagaa aaattgacca tgtgtaagcg gccaatctga      780
ttccacctga gatgcataat ctagtagaat ctcttcgcta tcaaaattca ctccacctt      840
cactcaccg gttgtccatt catggctgaa ctctgcttcc tctgttgaca tgacacacat      900
catctcaata tccgaatag gaccatcagt ctgacgacca agagagccat aaacaccaat      960

agccttaaca tcatcccat atttatcaa tttcgttcc ttaatttcat gaacaatctt      1020
cattctttct tctctagtea ttattattgg tccgttcata acacccttg tattactgtt      1080
tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga tgatatattt ttatcttgtg caatgtaaca      1140
tcagagattt tgagacacaa cgtggctttc cccggcccat gacaaaatc ccttaactgtg      1200
agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc      1260
cttttttctt gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg      1320
ttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag      1380

cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact      1440
ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg      1500

```

gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 1560  
 ggtcgggctg aacggggggt tctgtcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 1620  
 aactgagata cctacacgct gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg 1680  
 cggacaggtg tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 1740  
 ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc 1800

gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 1860  
 ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc 1920  
 ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cggcgcagcc 1980  
 gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcctg atgcggtatt 2040  
 ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgactctc agtacaatct 2100  
 gctctgatgc cgcatagtta agccagtatc tgcctcctgc ttgtgtgttg gaggtcgtcg 2160  
 agtagtgcgc gagcaaaatt taagctaaa caaggcaagg cttgaccgac aattgcatga 2220

agaatctgct tagggttagg cgttttgcgc tgcttcgca tgtacgggc agatatagcc 2280  
 gcggcatcga tgatatccat tgcatacgtt gtatctatat cataatatgt acatttatat 2340  
 tggctcatgt ccaatatgac cgccatgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta 2400  
 atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac 2460  
 ggtaaatggc ccgcctggct gacccccacg cgacccccgc ccattgacgt caataatgac 2520  
 gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt 2580  
 acggtaaact gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atccaagtc cgccccctat 2640

tgacgtcaat gacggtaaat ggcccccttg gcattatgcc cagtacatga ccttacggga 2700  
 ctttctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgtc attacatgg tgatgcggtt 2760  
 ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca 2820  
 cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg 2880  
 tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta 2940  
 tataagcaga gctcgtttag tgaaccgtca gatcgctgg agacccatc cacgtgttt 3000  
 tgacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgc gggcgcgcgg tccagtgtgg 3060

tggaattcgc cgccaccatg gattggactt ggatcttatt tttagttgct getgctacta 3120  
 gagttcattc taactgggtg aatgtaataa gtgattttaa aaaaattgaa gatcttattc 3180  
 aatctatgca tattgatgct actttatata cggaaagtga tgttcacccc agttgcaaag 3240  
 taacagcaat gaagtgtttt ctcttggagt tacaagtat ttcacttgag tccggagatg 3300  
 caagtattca tgatacagta gaaaatctga tcatcctagc aaacaacagt ttgtcttcta 3360

atgggaatgt aacagaatct ggatgcaaag aatgtgagga actggaggaa aaaaatatta	3420
aagaattttt gcagagtttt gtacatattg tccaaatgtt catcaacact tcttgactcg	3480
gggcgacgcg aaacttgggc ccactcgaga ggcgcgccga gctcgctgat cagcctcgac	3540
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgaccct	3600
ggaagtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct	3660
gagtaggtgt cattctatc tgggggtgg ggtgggcag gacagcaagg gggaggattg	3720
ggaagacaat agcagcatg ctggggaatt t	3751