(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12N 15/87 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년08월02일
(11) 등록번호 10-0606322
(24) 등록일자 2006년07월21일

(21) 출원번호 10-2000-7007207
(22) 출원일자 2000년06월28일
번역문 제출일자 2000년06월28일
(86) 국제출원번호 PCT/EP1998/008345
국제출원일자 1998년12월18일
(65) 공개번호 10-2001-0033684
(43) 공개일자 2001년04월25일
(87) 국제공개번호 WO 1999/34007
국제공개일자 1999년07월08일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 크로아티아, 인도네시아, 시에라리온, 짐바브웨, 세르비아 앤 몬테네그로, 가나, 감비아, 인도,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 08/999,391 1997년12월29일 미국(US)

(73) 특허권자
쉐링 악티엔게젤샤프트
독일 베를린 뮬레르스트라쎄 178 (우편번호 : 데-13353)

(72) 발명자
괴벨, 베르너
독일 데-97218 게르브룬 암 하파흐 12

디트리히, 기도
독일 데-97209 파이트슈퇴크하임 암 쉔켄펠트 19

겐트쉐브, 이바일로
독일 데-97270 키스트 바우베크 5

카우프만, 슈테판
독일 데-13465 베를린 암 로제난거 57아

헤스, 위르겐
독일 데-10318 베를린 리프니쯔스트라쎄 31

(74) 대리인 주성민
김영

심사관 : 신원혜

(54) 약독화된 자멸 박테리아에 의한 마크로파지의 세포질로폴리펩티드-암호화 플라스미드 ＤＮＡ의 전달

요약

본 발명은 폴리펩티드의 조절된 발현을 달성하기 위해 포유류 세포에 DNA 및 RNA 서열의 도입에 관한 것이다. 따라서, 그것은 유전자 요법, 백신 접종 및 폴리펩티드가 숙주 또는 상기 숙주의 세포에 투여되어야 하는 임의 치료 상황 및 포유류 세포, 예를 들어 배양 또는 유전자 도입 동물에 의한 폴리펩티드의 생산에 있어 유용하다.

색인어

약독화된 침투성 박테리아, 구조 유전자, 리스테리아 모노시토제네스(Listeria monocytogenes), 라이신, 자가 용해, 유전자 요법.

명세서

배경기술

본 발명은 조절된 폴리펩티드의 발현을 달성하기 위해 포유류 세포에 DNA 및 RNA 서열을 도입하는 것에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 유전자 요법, 백신 접종 및 폴리펩티드가 숙주 또는 상기 숙주의 세포에 투여되어야 하는 임의 치료 상황 및 포유류 세포, 예를 들어 배양물 또는 유전자 도입 동물에 의한 폴리펩티드의 생산에 있어 유용하다.

유전자 요법은 개체에로의 유전 물질(DNA/RNA)의 전달을 기초로 인간의 질병을 치료하는 일련의 방법이다. 유전자 전달은 유전자를 포함하는 바이러스 또는 DNA를 혈중 또는 조직에 직접 투여하거나 또는 실험실에서 조작된 세포의 도입을 통해 외래 DNA를 포함하도록 함으로써 간접적으로 달성될 수 있다[미국 특허 제5,399,346호 참조]. 비효율적인 유전자 전달은 유전자 요법의 유망한 미래에 방해가 된다[파미아니(G. Parmiani), 아리엔티(F. Arienti), 술레-수소(J. Sule-Suso), 멜라니(C. Melani), 콜롬보(MP Colombo), 라마크리쉬나(V. Ramakrishna), 벨리(F. Belli), 마쉐로니(L. Mascheroni), 리볼티니(L. Rivoltini) 및 카쉬넬리(N. Cascinelli)의 문헌[Cytokine-based gene therapy of human tumors, An Overview, Division of Experimental Oncology D, Instituto Nazionale Tumori, Milan, Italy, Folia Biol (Phraha) 42: 305-9 (1996)], 헤스(P. Hess)의 문헌[Gene therapy: a review, American Association of Clinical Chemistry, Laboratory Corporation of America, Louisville, Kentucky, 40213, USA, Clin Lab Med 16: 197-211 (1996)] 및 밀러(N. Miller) 및 빌레(R. Vile)의 문헌[Targeted vectors for gene therapy, Laboratory of Cancer Gene Therapy, Rayne Institute, St. Thomas' Hospital, London, United Kingdom, FASEB J 9: 190-9 (1995)]].

안전성 고려를 이유로 유전자 요법의 임상적 응용 및 재조합 레트로바이러스 벡터의 이용을 미루어 왔다. 세포의 게놈에 외래의 DNA를 통합하면 위험할 수 있는 수용체 세포의 DNA 손상을 일으킬 수 있고 유전자 변화 가능성이 있다. 유전자 요법을 안전하고 효과적인 것으로 만드는데 있어 이러한 잠재적인 문제를 없앤 방법이 상당히 이로울 것이다.

면역원 단백질을 백신 접종하여 많은 질병의 발병을 막거나 또는 감소시켜왔으나, 다른 병원체 또는 질병 상태와 관련된 단백질을 면역원으로 사용하는데는 큰 어려움이 있다. 많은 단백질 항원이 본래 면역원인 것은 아니다. 흔히, 면역계가 작동하는 방식때문에 많은 단백질 항원은 백신으로서 효과적이지 못하다.

포유류의 면역계는 몇가지 상호작용하는 성분으로 이루어져 있다. 가장 특징적이고 가장 중요한 부분은 체액 및 세포 부분이다. 체액성 면역에는 체내로 분비되어 항원을 직접 인식하는 단백질인 항체가 포함된다. 대조적으로, 세포계는 외래 항원을 생산하는 다른 세포를 인식하고 사멸시키는 특수 세포에 의존한다. 이러한 기본적인 기능 분류는 면역 방어의 두가지 다른 전략을 반영한다. 체액성 면역은 주로 그 동물에 대해 외부에서 온 항원에 대한 것인 반면, 세포계는 주로 동물 세포 내에서 활발하게 합성되는 항원에 반응한다.

체액성 면역의 작동체인 항체 분자는 항원에 대한 반응으로 특수 세포인 B 세포에 의해 분비된다. 항체는 항원에 직접 결합하여 항원을 실활시키거나(항체를 중성화함) 또는 항원을 파괴하는 면역계의 다른 세포를 활성화시킨다.

세포성 면역 인식은 림프계 세포의 특수한 종류인 세포상해성 T 세포에 의해 매개된다. 이 세포는 전체 항원을 인식하는 것이 아니라 대신 주요 조직 적합 유전자 복합체(MHC) 클래스 I 분자로 불리는 단백질에 결합된 표적 세포의 표면상에 있는 항원의 분해된 펩티드 단편에 반응한다. 본질적으로, 모든 핵형성 세포들은 클래스 I 분자를 갖는다. 세포내 생산된 단백질은 정상적인 세포 대사의 일부로써 펩티드로 지속적으로 분해되는 것으로 생각된다. 이 단편은 MHC 분자에 결합되어 세포 표면으로 운반된다. 따라서, 세포 면역계는 체내의 모든 세포에서 생산된 단백질의 폭넓은 범위를 지속적으로 감시하고 있으며 외래 항원을 생산하는 임의 세포를 제거할 준비가 되어 있다.

다수의 질병 상태에 치료 및(또는) 예방 폴리펩티드를 투여하면 이로울 수 있다. 이 폴리펩티드에는 림포카인, 예를 들어 인터루킨, 종양 괴사 인자, 인터페론이 포함되고, 성장 인자, 예를 들어 신경 성장 인자, 및 인간 성장 호르몬이 포함되며, 조직 플라스미노겐 활성자, 인자 Ⅷ: C, 과립구-마크로파지 콜로니-촉진 인자, 에리트로포이에틴, 인슐린, 칼시토닌, 티미딘 키나제 등이 포함된다. 게다가, 병에 걸린 세포 또는 종양 세포에 독성 펩티드(예를 들어 리신, 디프테리아 독소 또는 코브라 독 인자)를 선택적 전달하여 큰 치료 이익을 얻을 수 있다.

항원을 암호화하는 DNA의 근육내 주사에 의한 백신 접종은 유망한 연구이다[돈넬리(J. J. Donnelly), 울머(J. B. Ulmer) 및 리우(M. A. Liu)의 문헌[J. Immunol. Methods 176, 145 (1994)], 콘리(R. M. Conry) 등의 문헌[Cancer Res. 54, 1164 (1994)], 휴(C. H. Hsu) 등의 문헌[Nature Med. 2, 540 (1996)], 타스콘(R. E. Tascon) 등의 문헌[Nature Med. 2, 888 (1996))]. 그러나, 면역 반응이 근세포보다는 골수 유래의 항원 제시 세포가 비장으로 이동한 후에 면역 반응을 유도하는 것으로 생각되지만, 어떻게 달성되는지 충분히 이해되진 않는다[코르(M. Corr) 등의 문헌[J. Exp. Med. 184, 1555 (1996)]]. 순수한 플라스미드 DNA를 숙주에 근육내 주사하는 것에는 여전히 다음의 몇가지 문제점이 있다. (i) DNA-수용 효율은 아주 낮으며 투여량에 의존한다. 이는 방어적 면역 반응을 유도하기 위해서 다량의 플라스미드 DNA가 주사되어야함을 의미한다[데크(R. R. Deck) 등의 문헌[Vaccine, 15, 71 (1997)]]. 또한, 다량의 플라스미드 주사는 박테리아 DNA 서열에 의한 면역 촉진으로 인해 부작용을 유발할 수도 있다[피셋키(D. S. Pisetsky)의 문헌[J: Immunol. 156, 421 (1996)]]. (ii) 근육내 DNA 주사는 멀리 떨어진 점막 표면에서는 면역 반응을 유도하는 것으로 생각되지 않는다[데크(R. R. Deck) 등의 문헌[Vaccine, 15, 71 (1997)]]. (iii) 근육 조직 내에는 적은 수의 항원-제시 세포가 있을 뿐이어서 플라스미드 DNA의 근육내 주사 후 감염 물질에 대한 방어는 면역학적으로 매우 강력한 항원으로만 가능할 수 있다. 때문에, 비장 APC에 항원-암호화 DNA를 직접 전달하는 것이 바람직하다.

최근, 배양된 포유류 세포, 기니 피그 및 마우스에 플라스미드를 전달하는데 약독화된 쉬겔라 플렉스네리(Shigella flexneri)[시즈모어(D. R. Sizemore) 및 브란스트롬(A. A. Branstrom), 사도프(J. C. Sadoff)의 문헌[J. C.Sadoff, Science 270, 299 (1995)]] 및 침투성 대장균(Escherichia coli)[코우발린(P. Courvalin), 고우사드(S. Goussard) 및 그릴로트-코우발린(C. Grillot-Courvalin)의 문헌[Life Sciences 318, 1207 (1995)]]이 이용되었다. 쉬겔라 플렉스네리 및 대장균은 포유류에서 강력한 내독소 효과를 나타내는 리포폴리사카라이드(LPS)를 함유한 그람-음성 박테리아이다. 또한, 이 박테리아는 특정 세포 유형, 예를 들어 장세포에 치료제 분자를 도입하는데만 적합하다[산소네티(P.J. Sansonetti)의 문헌[Pathogenesis of shigellosis. Curr. Top.Microbiol.Immunol., 180:1-143(1992)]].

따라서, 생체외 및 생체내 모두에서 면역화, 유전자 요법 및 세포에 대한 치료 폴리펩티드의 전달과 관련된 상기 기술한 문제를 해결하기 위해 새로운 기술이 필요했다.

도면의 간단한 설명

덧붙인 도면과 함께 생각하면 본 발명의 여러가지 다른 특징 및 부가적인 잇점은 보다 완전히 이해될 것이고, 여기서,

도 1은 BHI에서의 배양 또는 마크로파지의 감염 중 박테리아에서 엘. 모노시토제네스(L. monocytogenes)의 actA-프로모터의 조절 하의 gfp의 cDNA 및 ply118-유전자의 발현을 나타낸다.

(A) 세포외 배양된 엘. 모노시토제네스 EGD 야생형(c), prfA의 다수의 카피를 운반하는 EGD(pERL3501)(a), 돌연변이 △2(b) 및 △prfA(d)의 방출 스펙트럼 및 형광 강도. 이들 모두 P_{actA}의 조절 하에 gfp 유전자를 운반한다. BHI 배지에서 대수적으로 증식된 2 ×10^6의 박테리아를 인산 완충 염수(PBS)로 세척하고 PBS 2 ml 중 재현탁시켰다. SPEX FluoroMax fluorimeter의 고정된 여기 파장 481 nm를 사용하여 방출 스펙트럼을 500 내지 550 nm에서 기록하였다. gfp 플라스미드가 없는 엘. 모노시토제네스 EGD를 바탕값으로 사용하였다. 예상된 피크 507 nm에서 측정된 광자는 임의 단위(AU)로 주어져 있다.

(B) 감염된 마크로파지 세포 라인 J774A.1 및 P388D_1에서 P_{actA}의 조절 하에 엘. 모노시토제네스 돌연변이체 △2에서 ply118 유전자의 세포내 발현은 감염된 세포의 세포질에서 엘. 모노시토제네스의 부분적인 실활을 유발한다. 감염다중도(MOI) 1:1 비율(웰당 약 2.5 x 10^4 마크로파지)로 테트라싸이클린(Sigma) 10 ㎍/ml을 함유하는 완전 배지(12)에서 △2(p3L118) 및 △2(pcDNA3L)로 마크로파지를 감염시켰다. 마크로파지 세포를 60분 동안 인큐베이션하고 PBS로 세번 세척하고 겐타마이신(Boehringer) 10㎍/ml 및 테트라싸이클린 10㎍/ml을 보충한 완전 배지에서 배양하였다. 지시된 바와 같이 마크로파지를 용균시키고 BHI-아가 상에 단계 희석법으로 평판 배양하여 생존 박테리아 수를 측정하였다. 세가지 독립적인 실험으로부터 조합된 데이타가 나타나 있다.

도 2에는 엘. 모노시토제네스로 매개된 플라스미드 DNA 전달을 이용한 마크로파지에서의 이종 유전자 발현이 나타나 있다.

(A) 플라스미드 p3LGFP118, p3LGFP[감염 2시간 후부터 세포내 박테리아를 용균시킬 때까지 페니실린(100㎍/ml) 및 스트렙토마이신(100㎍/ml)(P/S, Gibco)의 존재 또는 부재] 및 대조군 플라스미드 pcDNA3L를 운반하는 엘. 모노시토제네스 돌연변이 △2로 감염된 P388D1에서의 GFP의 발현.

감염다중도 50:1의 비율로 플라스크당 마크로파지 10^6개를 박테리아로 감염시켰다. 24시간 마다 배지를 바꿔주었다. 매 시간마다 플라스크당 세포 5 x 10^4개 이상에 대해 형광현미경 검사로 GFP를 발현시키는 세포를 결정하였다. 2회의 반복 실험에 대한 조합된 데이타가 나타나 있다.

(B) 플라스미드 p3LCAT118, p3LCAT(페니실린 및 스트렙토마이신을 첨가하거나 첨가하지 않음) 및 대조군 플라스미드 pcDNA3L를 지닌 엘. 모노시토제네스 균주 △2로 감염시킨 P388D1 세포의 CAT-발현. 세포를 수집하고 구입한 CAT-효소(Boehringer)를 표준으로 하여 제작자(Invitrogen)의 지시에 따라 총 단백질 100 ㎍을 함유하는 세포 용해물의 CAT 활성[Bradford assay (Bio-Rad)]을 측정하였다. 2회의 반복 실험에 대한 조합된 데이타가 나타나 있다.

(C) △2(p3LOVA118)에 의한 전달 후 OVA-에피톱(257-264)의 제시.

IFN-g 500 u/ml 및 테트라싸이클린 10 ㎍/ml 함유 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)(10 % FCS, 2 mM L-글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트를 함유하는 DMEM)에서 미리 24시간 동안 배양한 점착성 C57BL/6-유래의 골수 마크로파지(BMM)(웰 당 10^5)에 박테리아를 첨가하였다. 1시간 동안의 식작용(phagocytosis) 후에, 겐타마이신 50 ㎍/ml을 첨가하고 감염된 마크로파지를 37 ℃에서 24시간 동안 10 % CO_2 존재 하에 인큐베이션하였다. 이 세포를 3회 세척하고 PBS 중 1 %의 파라포름알데히드로 고정시켰다. 그 후에, 10 % FCS, 2mM L-글루타민 및 50 ㎍/ml 겐타마이신을 보충한 RPMI 1640에 OVA(257-264)-K^b(웰당 10^5)에 특이적인 RF33.70 T-T 하이브리도마 세포를 24시간 동안 첨가하였다. 48시간 후 분비된 인터루킨-2(IL-2)의 양을 상기 기술한 바와 같이 IL-2 의존성 CTLL 세포의 ^{3}H-티미딘 함유도에 의해 정량화하였다(20). 이 결과는 3가지 각 실험을 대표한다.

<발명의 개요>

본 발명은, 포유류 숙주 또는 그의 세포를 감염시킬 수 있으나 (a) 박테리아가 숙주 세포의 세포질에 존재할 때 활성화되는, 박테리아에 치명적인 폴리펩티드를 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편에 작동가능하게 연결된 프로모터, (b) 치료 및(또는) 예방 특성을 갖는 폴리펩티드, 예를 들어 항원을 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편에 작동가능하게 연결된, 숙주 세포에 적합한 프로모터로 형질전환된, 야생형 박테리아에 비해 상기 숙주에서 감소된 세포내 및 세포간 운동 능력을 지닌 약독화된 침투성 세포내 박테리아에 관한 것이고, 여기서 (a) 및 (b)는 동일한 플라스미드 또는 다른 플라스미드 상에 있을 수 있거나 또는 (a)는 박테리아 염색체내로 통합될 수 있다.

백신, 및 생체내 및 생체외 유전자 요법을 비롯한 여러가지 방법에 상기 침투성 박테리아를 이용할 수 있다.

약독화된 침투성 박테리아라는 용어는 예를 들어 숙주 또는 그의 세포에 침투할 수는 있으나 병원성이 아닌 박테리아를 의미한다. 통상적으로, 약독화는 예를 들어 돌연변이에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어 마니아티스(T. Maniatis) 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989)] 참조. 예를 들어 약독화는 병원성 및(또는) 독성 폴리펩티드를 암호화하는 박테리아 유전자를 돌연변이시켜 유발될 수 있다. 이 돌연변이는 무작위적으로, 예를 들어 화학적 변형에 의해 수행하고, 나중에 예를 들어 기능 상실에 의해 선택할 수 있거나 또는 병발생을 유발하는 폴리펩티드를 암호화하는 몇가지 유전자의 기능을 제거하는, 예를 들어 결실, 삽입 또는 점 돌연변이에 의해 부위 특이적으로 수행할 수 있다. 예를 들어, 염색체 결실에 의해 전체 오페론을 상실한 약독화된 엘. 모노시토제네스 돌연변이체 균주 △2는 독성이 충분히 있는 야생형 균주 EGD의 유도체이고 염색체 결실로 인해 유전자 mp1, actA 및 plcB로 이루어진 전체 레시티나제 오페론이 부족하다. 이 오페론의 결실로 인해, 포유류 숙주의 감염 동안 엘. 모노시토제네스에 의해 유발된 염증 반응이 상당히 감소된다.

본 발명에 있어서, 약독화된 박테리아는 세포내 생장가능한 세포내 박테리아, 예를 들어 살모넬라(Salmonella), 예르시니아(Yersinia), 레니박테리아(Renibacterium) 및 리스테리아(Listeria)이다[코이나울트(C. Coynault), 로베-사울레(V. Robbe-Saule) 및 노렐(F. Norel)의 문헌[Virulence and vaccine potential of Salmonella typhimurium mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon, Molecular Microbiology 22, 149-160 (1996)], 호만(E. L. Hohmann), 올레타(C. A. Oletta) 및 밀러(S. I. Miller)의 문헌[Evaluation of a phoP/phoQ-deleted, aroA-deleted live oral Salmonella typhi vaccine strain in human volunteers, Vaccine 14, 19-14 (1996)], 카렘(K. L. Karem), 카트필드(S. Chatfield), 쿠클린(N. Kuklin) 및 로우세(B. T. Rouse)의 문헌[Differential induction of carrier antigen-specific immunity by Salmonella typhimurium live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BALB/c mice. Infection and Immuity 63, 4557-4563 (1995)], 캘러간(D. O'Callaghan), 마스켈(D. Maskell), 류(F. Y. Liew), 에아스몬(C. S.F. Easmon) 및 도우간(G. Dougan)의 문헌[Characterization of aromatic- and purine- defendant Salmonella typhimurium: attenuation, persistence and ability to induce protective immunity in BALB/c mince, Infection and Immunity 56, 419-423 (1988)], 시그바르트(D. F. Sigwart), 스토커(B. A. Stocker) 및 클레멘츠(J. D. Clements)의 문헌[Effect of a purA mutation on efficacy of Salmonella live-vaccine vectors, Infection and Immunity 57, 1858-61 (1989)], 및 신하(K. Sinha), 마스트로에니(P. Mastroeni), 해리스(J. Harris), 호르마쉐(R. D. de Hormaeche) 및 호르마쉐(C. E. Hormaeche)의 문헌[Salmonella typhimurim aroA, htrA, and aroD htrA mutants cause progressive infections in athymic (nu/nu) BALB/c mice, Infection and Immunity 65, 1566-1569 (1997)]].

본 발명의 바람직한 실시태양에서, 약독화된 박테리아는 숙주 세포에 침입하여 야생형 균주와 같은 비슷한 효율로 감염된 세포의 세포질로 방출되나, 세포내 및 세포간 운동능이 손상된 야생형 리스테리아의 돌연변이체, 즉 돌연변이체 엘. 모노시토제네스 균주 △2이며, 이 균주는 엘. 모노시토제네스 야생형 균주가 숙주 세포내 그의 운동에 사용하는 숙주 세포 액틴을 세포질에서 중합할 수 없다. 또한, plcB의 결실로 인해, 야생형 균주가 이웃하는 세포로 진입할 때 용해시키는 숙주 세포막을 용해시킬 수 없다. 따라서, 돌연변이체 박테리아는 감염된 세포로부터 이웃하는 세포로 이동할 수 없다(세포에서 세포로의 확산). 이는 세포내 및 세포간 운동능의 감소(예를 들어 야생형 균주에 비해)를 설명한다.

본 발명의 보다 바람직한 실시태양에서, 약독화된 박테리아는 염증 반응을 야생형 균주보다 적게, 예를 들어 감염된 마우스에서 측정된 바의 50 % 이상, 바람직하게는 70 %, 보다 바람직하게는 90 % 이상 더 적게 염증 반응을 일으킬 수 있다.

바람직한 실시태양에서, 약독화된 박테리아는 숙주 세포에 침입하고 야생형 균주와 비슷한 효율로 감염된 세포의 세포질로 방출되나 병원성은 아닌, 즉 병을 유발하지 않는 엘. 모노시토제네스의 돌연변이체이다. 보다 바람직한 실시태양에서, 돌연변이체 박테리아는 엘. 모노시토제네스이며 유전자 mpl, actA 및 plcB을 포함하는 전체 레시티나제 오페론이 없다.

엘. 모노시토제네스는 특히 시험관내에서 배양되면 많은 다양한 유형의 세포에 침입할 수 있다[쿤(M. Kuhn) 및 괴벨(W. Goebel)의 문헌[Genetic Engineering, Vol. 17. Edited by J.K. Setlow Plenum Press, New York (1995)]]. 포유류 숙주는 인간, 개, 고양이, 소, 양 또는 돼지 등일 수 있다.

본 발명에 있어서, 박테리아에 치명적인 폴리펩티드를 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편이란 박테리아내에서 발현되면 플라스미드 DNA의 방출 및 상기 박테리아의 사멸, 예를 들어 박테리아의 용균을 초래할 임의 폴리펩티드이다. 이 폴리펩티드는 박테리오파지 라이신, 바람직하게는 PLY118의 유전자 산물 또는 다른 리스테리아-파지-암호화 라이신, 예를 들어 엘. 모노시토제네스의 iap 유전자 또는 다른 iap-관련 유전자, 특히 엘. 그라이(L. grayi)의 iap 유전자에 의해 암호화

되는 뮤레인히드롤라제일 수 있다. 용균 단백질 PLY118은 자손 파지의 방출에 필요한 리스테리아 박테리오파지 A118의 후기 유전자 산물이다. PLY118은 매우 활성인, 리스테리아에 특이적인 세포벽-가수분해 효소이다[뢰스너((M. J. Loessner), 벤드링거(G. Wendlinger), 쉐러(S. Scherer)의 문헌[Mol. Microbiol. 16, 1231(1995)]].

숙주 세포의 세포질에 있는 침투성 박테리아내에 존재할 때 활성화되는 프로모터는 이 박테리아가 감염된 세포내에 있을 때 우선적으로 개시되어(전사 활성자의 조절 하에) 그의 전사를 조종하는 임의 프로모터를 의미한다. 예를 들어 엘. 모노시토제네스 프로모터 P_{actA}가 사용될 수 있다. P_{actA} 프로모터는 엘. 모노시토제네스의 알려진 독성 유전자의 대부분을 조절하고 구체적으로는 감염된 숙주 세포의 세포질에서 활성화되어 actA 프로모터와 상호작용하는 전사 활성자 PrfA에 의해 조절된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 프로모터에는 예를 들어 엘. 모노시토제네스의 다른 프로모터, 예를 들어 inlC 및 작은 인터날린(internalin)의 다른 유전자의 발현을 조절하는 프로모터가 있다[엔젤브레흐트(F. Engelbrecht), 춘(S. K. Chun), 오크스(C. Ochs), 헤스(J. Hess), 로트슈파이흐(F. Lottspeich), 괴벨(W. Goebel) 및 소콜로빅(Z. Sokolovic)의 문헌[Mol. Microbiol. 21:823-837(1996)], 엔젠브레흐트(F. Engelbrecht), 딕크나이트(C. Dickneite), 람피디스(R. Lampidis), 괴츠(M. Goetz), 다스구프타(U. DasGupta) 및 괴벨(W. Goebel)의 문헌["Sequence comparison of the chromosomal regions carrying the internalin C gene (inlC) of Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii". in press (1998)]].

다른 바람직한 실시태양에서, 약독화된 침투성 박테리아는 엘. 모노시토제네스이고, 숙주 세포의 세포질에 있는 침투성 박테리아내에 존재할 때 활성화되는 프로모터는 용균 단백질 PLY118을 암호화하는 유전자 ply118에 작동가능하게 연결된 PactA이다.

또한, 본 발명은 목적하는 폴리펩티드, 예를 들어 항원을 암호화하는 유전자가 숙주 세포에 적합하고 박테리아내에 존재하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 백신 접종 방법 및(또는) 유전자 요법에 관한 것이다. 본 발명에 있어서, 발현가능한 DNA 및 mRNA 둘다뿐 아니라, 발현가능하지 않은 DNA 및 RNA, 예를 들어 안티센스 올리고디옥시뉴클레오티드(ODN)[바그너(R.W.Wagner)의 문헌[Nature 372, 333 (1994)], 크레이크(A. Craig), 반스톤(D. Vanstone) 및 아그라발(S. Agrawal)의 문헌[Exp. Opin. Ther. Patents 7, 1175 (1997)]] 또는 리보자임이 사용될 수 있다.

본 발명에 있어서, 숙주 세포에 적합한 프로모터는 예를 들어 상기 숙주 세포에서 동종 또는 이종 유전자, 또는 그의 단편에 작동가능하게 연결되어 그의 충분한 전사를 개시할 수 있는 임의 프로모터 또는 프로모터/인핸서이다. 의도하는 목적에 유용한 양의 폴리펩티드를 발현시키는 임의 프로모터 또는 프로모터/인핸서를 사용하여 예를 들어 예방 및(또는) 치료 결과를 달성할 수 있고(있거나) 면역 반응을 유발시킬 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 포유류 세포의 몇가지 예에는 예를 들어 상피세포, 섬유아세포, 수상세포 및 상기 프로모터, 예를 들어 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 유전자(immediate early gene)1 또는 로우스육종바이러스의 긴 말단 반복 서열 또는 시미안바이러스40 프로모터 또는 아데노바이러스 2 주요 후기 프로모터 또는 마우스 유방암바이러스 프로모터(MMTV) 유래의 프로모터/인핸서를 갖는 마크로파지이다. 바이러스 유전자 프로모터는 일반적으로 세포의 하우스키핑유전자 프로모터보다 강력하고 마우스 근육내 주사 후 생체내에서 리포터 유전자의 높은 발현 수준을 제공하는 것으로 나타났다[만트로프(Manthrope, M.), 코르네페르트-젠센(Cornefert-Jensen, F.), 하르티카(Hartikka, J.), 펠그너(Felgner, J.), 룬델(Rundell, A.), 마갈리트(Margalith, M.) 및 드워키(Dwarrki,V.)의 문헌[Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA; studies on firefly luciferase gene expression in mice. Hum. Gen. Ther.4:419-431 (1993)]]. 또한, 비바이러스성 프로모터, 예를들어 세포의 하우스키핑 유전자, 알부민, 액틴의 프로모터 또는 구성적 프로모터 등이 사용될 수 있다. 더 높은 수준의 경우에는, 강력한 구성적 프로모터가 바람직할 수도 있다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, 유도 프로모터, 예를 들어 약물 유도 프로모터, 예를 들어 호르몬 또는 금속 프로모터가 사용된다.

본 발명에 있어서, 숙주 세포에 적합한 프로모터는 폴리펩티드를 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편에 작동가능하게 연결되고, 이 폴리펩티드는 항원 및(또는) 치료 및(또는) 예방에 유용한 물질일 수 있다.

본 발명에 따른 항원은 목적하는 숙주 또는 그의 세포에서 발현될 때 면역 반응을 조절하는 분자, 예를 들어 인플루엔자 항원 NP, HA, HIV gp160, 인간 파필로마바이러스 항원, 투명대(zona pellucida) 펩티드, IFN-β, MBP와 같은 자기항원, 콜라겐 등이다. 항원은 동일한 또는 다른 공급원으로부터의 여러개의 에피톱, 또는 여러개가 연결된 에피톱, 1개의 에피톱 등을 포함하는 전체 단백질일 수 있다.

치료 및(또는) 예방에 유용한 물질에는 병 또는 그의 증상을 치료하고(하거나) 예방하는 임의 물질, 예를 들어 림포카인, 예를 들어 인터루킨, 종양 괴사 인자, 인터페론(α,β,γ등)이 있고, 성장 인자, 예를 들어 신경 성장 인자 및 인체 성장 호르몬이 있으며, 조직 플라스미노겐 활성자, 인자 Ⅷ: C, 과립구마크로파지 콜로니-촉진 인자, 에리트로포이에틴, 인슐린, 칼시토

닌, 티미딘 키나제 등이 있다. 또한, 병에 걸린 세포 또는 종양 세포에 독성 펩티드(예를 들어 리신, 디프테리아 톡신 또는 코브라 독 인자)를 선택적 전달하여 큰 치료 이익을 얻을 수 있다. 사용할 수 있는 치료 및(또는) 예방 물질의 다른 예는 몇몇 환자에 결핍된 효소 또는 호르몬이다.

본 발명의 한 면에 있어서, 생체내 또는 생체외 유전자 요법에 의해 인간 질병을 치료하는 방법도 제공된다. 유전자 요법에 의해 치료될 수 있는 병의 유형에는 단일 유전자 유전 질환(single-gene inherited disorders) 또는 다인성 질환(multifactorial disorders) 또는 암 및 감염증이 포함된다. 단일 유전자 유전 질환은 한 유전자의 돌연변이가 원인인 질환이다(즉, 1개의 유전자 또는 단일 유전자 질환). 다인성 질환에는 통상적으로 몇가지 유전자가 관여하는 질환, 예를 들어 관상동맥 심장병 또는 당뇨병이 있다. 특정 유전자 산물이 어떻게 세포 생리 작용에 영향을 주는지를 고려하여 각 경우에서 정확한 연구로 평가해야 한다.

과거 20년 간의 암연구로 암이 세포 수준의 유전병으로 밝혀졌다. 암은, 유전되며 비교적 빈번한 세포내 유전자의 체세포 돌연변이에 의해 유도되는 다단계 과정을 통해 발병한 후에, 점점 더 공격적인 증식 특성을 갖는 변이 세포가 클로날 선택된다. 적어도 3가지의 중요한 유전자 군, 즉 원종양 유전자, 종양억제 유전자 및 DNA 복구 유전자가 돌연변이 표적이다. 암의 원인인 돌연변이의 대다수는 체세포 돌연변이이며, 즉 환자의 종양 세포에서만 나타난다. 종양 억제 유전자(예를 들어 p53 또는 Rb)의 정상 카피를 암세포 라인으로 도입함으로써 시험관내 정상 증식 특성을 회복시키는 실험 데이타에 나타낸 바와 같이 특정 유전자의 암세포로의 도입은 악성 표현형을 변경시키거나 또는 억제시킬 것이다. 따라서, 본 발명을 이용하여 종양 억제 산물 또는 암세포에 존재하지 않는 산물을 암세포들 간에 전달할 수 있다. 다른 보다 간접적인 유전자 요법은 암세포에 싸이토카인 또는 다른 면역조절 생성물을 암호화하는 유전자를 체외(생체외) 또는 환자(생체내)에게 직접 전달하여 유전적으로 변형된 암세포뿐 아니라 체내의 임의 위치에 위치된 유전자를 수용하지 않은 암세포의 면역 인식을 촉진하는 것이다. 다른 방법은 종양 세포에 대한 특이성 또는 반응성을 증가시키기 위해 종양 침투 림프구 또는 다른 면역 수행 세포에 본 발명에 따른 박테리아를 형질도입하는 것에 관한 것이다. 약독화된 엘. 모노시토제네스 △2 돌연변이체 및 상기 혈장을 갖는 종양 세포에 억제 유전자(예를 들어 B 또는 Rb) 또는 세포자멸사 유도 유전자(예를 들어 ICE에 관한 유전자)의 도입을 효과적으로 수행할 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 효과적인 유전자 요법에서는 체외(생체외) 또는 환자에 직접적인 투여(생체내)에 의해 DNA를 수용 세포에 전달해야 한다. 많은 경우, 성공적인 유전자 요법을 위해서는 특정 세포 또는 조직으로의 유전자 전달이 수반될 것이지만, 표적 특이성이 항상 요구되는 것은 아니다. 적합한 "속의(generic)" 세포(예를 들어 섬유아세포)는 순환하며 기능하거나 또는 다른 체세포에 의해 취해지는 단백질을 생산하는 공장을 만드는 역할을 할 수 있다(예를 들어 몇몇 효소 저장 질환(enzyme storage disorder)에서). 본 발명의 한 실시태양에서, 세포는 본 발명에 따른 박테리아로 체외 또는 체내에서 "감염될" 수 있다. 본 발명에 따른 엘. 모노시토제네스 및 다른 박테리아는 시험관내의 영구 세포 라인에 있어 본 발명에 따른 엘. 모노시토제네스 및 다른 박테리아가 지닌 몇가지 인터날린에 따라 좌우되는 듯한 세포 지향성(tropism)을 나타내는데, 예를 들어 인터날린A는 상피세포로의 침투를 촉진시키고 인터날린B는 간세포로의 침투를 촉진시킨다.

엘. 모노시토제네스는 그람-양성인 통성의 세포내 박테리아이다. 주로, 그람-음성 박테리아에 비해, 엘. 모노시토제네스는 리포폴리사카라이드(LPS)가 없고, 그 세포질에서 복제할 수 있는 더 넓은 범위의 포유류 세포에 침입할 수도 있다[포트노이(D. A. Portnoy), 차크라보티(T. Chakraborty), 괴벨(W. Goebel), 코사르트(P. Cossart)의 문헌[Infect. Immun. 60, 1263 (1992)]]. 엘. 모노시토제네스는 장 점막을 통해 그의 숙주에 침입하기 때문에 경구 백신 투여의 후보이기도 하다. 감염 후 얼마 안있어, 박테리아는 효과적인 APC가 풍부한 비장에서 발견된다. 따라서, 적당하게 작제된 엘. 모노시토제네스를 사용하여 이 세포로의 플라스미드 DNA의 전달을 상당히 증가시킬 수 있다. 인간 사이토메갈로바이러스의 주요 즉시형 초기 프로모터/인핸서 영역(PCMV)의 조절 하에 다른 이종 유전자를 운반하는 P_{actA}-의존성 파지 라이신의 방출 플라스미드 DNA의 생산에 의해 숙주 세포의 세포질에서 약독화된 엘. 모노시토제네스 세포가 용균되었다. 항생제 사용을 회피하는 유리함 외에도, 라이신-매개 플라스미드 방출은 항생제 치료에 의해 박테리아를 제거하는데 견줄만한 효과적인 방법이다.

또한, 본 발명에는 본 명세서에 기재된 방법에서 예상되는 모든 용도에 대한 제약 생성물이 포함된다. 예를 들어 본 발명에는 본 발명에 따른 약독화된 침투성 박테리아가 포함된다. 본 발명에 따른 엘. 모노시토제네스 또는 다른 박테리아는 경구적으로(주로는, 생분해 중합체, 예를 들어 PLPG로 캅셀화됨), 근육내로 또는 정맥내로 투여될 수 있고, 경구 투여가 바람직하다. 상기 박테리아는 뇌 심장 혼합 브로쓰(BHI) 또는 다른 통상의 생장 배지에서 배양될 수 있고, 수집된 박테리아는 동결건조되어 수개월간 -20 ℃에서 저장될 수 있다. 그는 장기간 동안(예를 들어 3 내지 4 개월 까지) 4 ℃에서 살아있는 형태로 유지될 수도 있다.

투여량은 투여되는 대상의 증상 및 크기뿐 아니라 처치 빈도 및 투여 경로에 따라 크게 좌우된다. 투여량 및 횟수를 포함하는 지속적인 요법에 대한 관리는 초기 반응 및 임상적 판단에 의해 좌우될 수 있다.

상기 기재 사항 및 하기 실시예에 있어서, 모든 온도는 수정하지 않고 섭씨로 나타냈고 다른 지시가 없는 한, 모든 비율 및 퍼센트는 중량에 의한다.

상기 및 하기 언급된 모든 출원, 특허 및 문헌의 전체 기재 내용이 본 발명에 참조된다.

본 발명은 하기 실시예에서 상세히 설명된다. 이 실시예는 설명을 목적으로 포함되나 본 발명을 제한하는 것으로 생각되어서는 안된다.

실시예

<실시예 1>: 약독화된 엘. 모노시토제네스 돌연변이체 균주 △2의 작제.

약독화된 리스테리아 모노시토제네스 돌연변이체 균주 △2는 독성이 충분한 야생형 균주 EGD의 유도체이다. 이 돌연변이체에는 부위-특이적인 염색체 결실로 인해, 유전자 mpl, actA 및 plcB(9)로 이루어진 전체 레시티나제 오페론이 결핍되어 있다. 이 돌연변이체는 숙주 세포에 침입하여 야생형 균주와 비슷한 효율로 감염된 세포의 세포질로 방출되나, 세포내 및 세포간 운동능이 손상되어 있다(10). 또한, 이 돌연변이체는 야생형 균주 또는 actA 돌연변이체 보다 염증 반응을 덜 일으켰다(9). △2 돌연변이체로 BALB/c 마우스를 감염시킨 결과, 야생형 엘. 모노시토제네스 EGD의 것 보다 로그 3이 더 높은 LD_{50}(정맥 주입)을 나타냈다(즉, EGD의 경우 박테리아 1 x 10^4마리에 비해 △2에서는 박테리아 1 x 10^7마리).

<실시예 2>: 외래 DNA의 도입 및 발현.

녹색 형광 단백질(GFP)의 cDNA 및 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT) 및 난알부민의 유전자 각각을 운반하는 진핵생물 발현 벡터를 마크로파지로 전달하는데 약독화된 돌연변이체 균주 △2를 사용하였다. 상기 숙주 세포실에서 활성화되는 리스테리아 프로모터를 이용하는, 약독화된 리스테리아의 세포내 용균에 의해 숙주 세포의 세포질로의 플라스미드 DNA의 방출이 시작되었다. 클로닝된 유전자의 세포내 발현 및 항원 제시 모두가 달성되었다.

<실시예 3>: P_{actA}-유도 gfp-발현은 엄격히 PrfA-의존적이다.

엘. 모노시토제네스의 알려진 독성 유전자의 대부분을 조절하는 전사 활성자 PrfA의 조절 하에 엘. 모노시토제네스의 유전자 actA 및 plcB를 프로모터 P_{actA}로부터 전사하였다(8). 프로모터 P_{actA}는 감염된 숙주 세포의 세포질에서 우선적으로 활성화된다. 이러한 관찰을 토대로, gfp 유전자를 셔틀 벡터 pLSV16내 actA 프로모터 뒤쪽에 삽입하였다(11). 야생형 균주 및 P_{act}-gfp 플라스미드를 운반하는 △2 돌연변이체 박테리아에 의해 발현된 형광은, 박테리아를 뇌 심장 혼합(BHI) 배지에서 증식시켰을 때 P_{act}-gfp를 운반하는 EGD △prfA 돌연변이체의 배경값보다 그리 높지 않았다(도 1A). 이러한 증식 조건 하에, PrfA를 매우 과다발현시키는 EGD 균주에서만 형광을 검출할 수 있었다(도 1A). 그러나, 두 리스테리아 균주(EGD 및 P_{act}-gfp를 운반하는 △2 돌연변이체)를 사용하여 마크로파지계 세포 라인 $P388D_1$(12)을 감염시킬 때 형광을 띠는 박테리아가 관찰되었다. 상기 조건 하에, 감염 후(p.i.) 약 2시간 경과 후에, 즉 대부분의 세포내 리스테리아가 숙주 세포의 세포질(13)에 편재되었을 때 박테리아의 형광이 관찰되었다. 형광은 적어도 10시간 동안 높은 수준으로 지속되었다. 예상된 바와 같이, 야생형 박테리아는 감염 후 6시간 후에 인접 세포로 퍼졌으나(13), △2 돌연변이체는 감염된 세포내에 마이크로콜로니로 축적되었다. P_{actA}-gfp를 운반하는 △prfA 돌연변이체 균주가 사용되었을 때 이 숙주 세포에서 형광이 검출되지 않았고(데이타는 나타내지 않음), 이는 P_{actA}-유도 gfp-발현이 엄격하게 PrfA-의존성임을 나타낸다.

<실시예 4>: 라이신의 효과적인 세포질-활성화 생산은 박테리아의 자멸을 초래한다.

용균 단백질 PLY118은 자손 파지의 방출에 필요한 리스테리아 박테리오파지 A118의 후기 유전자 생성물이다. PLY118은 리스테리아에 대해 특이적인 매우 활성적인 세포벽 가수분해효소이다(14). 숙주 세포내 엘. 모노시토제네스의 자멸을 유도하기 위해, 유전자 ply118(PLY118를 암호화함)를 actA 프로모터의 하류에 클로닝하고 플라스미드 pcDNA3L내에 삽입하여 p3Ll18을 생성하였다(15). 예상된 바와 같이, 상기 박테리아가 BHI에서 배양되면 플라스미드 p3L118을 운반하는 △2 돌연변이체는 영향받지 않았다. 그러나, 감염된 J774A.1 및 P388D1 마크로파지의 세포질에서는 박테리아의 빠른 용균이 일어났다(도 1B). pcDNA3L을 운반하는 대조군 균주를 24시간 동안 J774A.1의 세포질에서 증식시켰고, $P388D_1$

세포에서는 6시간 동안만 증식시켰다. 감염 후 6시간 및 24시간 사이에 $P388D_1$ 세포의 생존 박테리아 수의 관찰된 감소 결과에 대한 이유는 현재로서는 알려지지 않았다(16). P_{actA}가 활성화되어 라이신 합성을 가능케하는 구획(상기 참조)인 숙주 세포의 세포질에서 박테리아가 우세할 때인 감염 후 2시간 후에, 리스테리아의 두 균주 사이의 세포내 증식 속도의 차이를 관찰하였다. △2(pcDNA3L) 및 △2(p3L118) 사이의 생존 박테리아 수 차이는 세포내 증식 6시간 후에 두 마크로파지 세포 라인에서 약 로그 1의 크기였다. 이 차이는 감염 후 24시간 후에, J774A.1에서는 2배 이상의 크기로 증가했고, 이는 라이신의 효과적인 세포질 활성화 생산이 박테리아의 자멸을 초래함을 나타낸다.

<실시예 5>: 엘. 모노시토제네스의 PLY118-매개 세포질 용균은 마크로파지의 세포질내로 DNA의 효과적인 방출을 초래한다.

P_{CMV}의 조절 하에, 플라스미드에 포함된 유전자를 감염된 숙주 세포 내에서 발현시킬 수 있다. P_{CMV} 조절 하에, 다른 동일한 벡터 플라스미드 상에 gfp(인간 녹색 형광 단백질인 GFP를 암호화함), cat(클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제인 CAT를 암호화함), 또는 ova 유전자(닭의 난알부민 유래 T 세포-반응성 에피톱을 암호화함) 일부를 운반하는 플라스미드 p3LGFP118, p3LCAT118 및 p3LOVA118을 작제하였다. ply118(각각 p3LGFP, p3LCAT 및 p3LOVA)이 없는 비슷한 플라스미드를 포함하는 균주를 대조군으로써 사용하였다(17). L929 세포(p3LGFP118, p3LGFP, p3LCAT118 및 p3LCAT을 가짐)의 일시적인 형질감염에 의해 플라스미드의 기능적 일체성(즉, CAT 및 GFP의 발현)을 시험하였다(18).

<실시예 6>: 상기 박테리아를 통해 마크로파지에 플라스미드를 전달하고 숙주 세포에 의해 GFP 발현시켰다.

마크로파지당 박테리아 50마리의 투여량으로 $P388D_1$ 마크로파지를 플라스미드 p3LGFP118, p3LGFP 및 pcDNA3L 각각을 운반하는 엘. 모노시토제네스 돌연변이체 △2(도 2A)로 감염시켰다. 본 발명자들은 감염 후 1시간 후에, 대부분의 마크로파지가 숙주 세포당 평균 1마리의 박테리아를 포함함을 알아냈다. ply118이 없는 플라스미드를 운반하는 세포내 박테리아의 수는 시간에 따라 증가하였으나 P_{actA}-plyll8를 지닌 플라스미드를 운반하는 박테리아의 수는 감염된 마크로파지의 초기 수준으로 유지되었다. 감염된 마크로파지에서 박테리아를 사멸시키는 라이신의 효과는 상당했으나(감염 후 6시간 후에 90 %를 초과하는 박테리아가 사멸함), 항생제 페니실린 및 스트렙토마이신으로 처리하여 달성된 수준에는 이르지 못했다(감염 후 6시간 후에 99 %를 초과하는 박테리아가 사멸함). p3LGFP118를 운반하는 △2 돌연변이체로 감염된 약 0.03 %의 마크로파지가 감염 후 24 내지 48시간 사이에 GFP-발현을 나타냈다. GFP-발현 마크로파지의 형광은 전체 세포질에 걸쳐 분포하였고, P_{actA}의 조절 하에 GFP가 발현될 때 관찰한 결과 박테리아에 농축되지 않았다. 이 결과는 플라스미드가 박테리아를 통해 마크로파지로 전달되고 GFP는 숙주 세포에 의해 발현됨을 나타낸다. 균주 △2(p3LGFP)로의 감염은 마크로파지의 GFP-발현을 0.001 % 미만으로 유도하였고, 대조군 균주 △2(pcDNA3L)로의 감염은 발광 세포가 없었다. 엘. 모노시토제네스에 의한 숙주 세포의 세포질로의 플라스미드 DNA의 효과적인 전달은 숙주 세포질내 PLY118의 발현에 의한 박테리아의 자기-사멸에 의해 상당히 촉진되었다. 항생제의 사용을 피하는 이점뿐 아니라, 라이신-매개 플라스미드 방출은 항생제 치료로 박테리아를 제거하는 방법에 필적하는 효과적인 방법이라고 생각된다. 돌연변이체 △2(p3LGFP)로 감염시킨 마크로파지 중 0.01 %미만이 페니실린 및 스트렙토마이신으로 처리한 후에 GFP를 발현시키는 것으로 밝혀졌다.

<실시예 7>: 마크로파지내에서 GFP의 안정성.

GFP를 발현시키는 마크로파지는 돌연변이체 △2(p3LGFP)에 의한 플라스미드 전달 후 세포 분열을 거쳐 형광-활성화 세포 정렬(FACS)(19)에 의해 단리하고 새 배지에서 배양할 수 있었다. 오랜 시간 배양으로 형광의 점진적인 감소가 관찰되었다. 상기 마크로파지에서 GFP의 수명은 길다는 것을 볼 수 있었다. △2(p3LGFP118)로 감염시킨지 48시간 후 GFP를 발현시키는 마크로파지에 시클로헥시미드(100 ㎍/ml)를 첨가하였을 때, 시클로헥시미드 첨가 후 24시간 까지의 시간 동안에도 상기 세포에서 형광을 관찰할 수 있었다. 감염 후 48시간 후에, 프로테아제 저해제 N-아세틸-L-류시닐-L-류시날-L-노르류시날(LLnL, 100 ㎍/ml, Sigma) 또는 N-카르복시벤족실-L-류시닐-L-노르발리날(MG115, 50 ㎍/ml, Sigma)의 첨가는 GFP-발현 마크로파지 또는 GFP-발현 세포의 형광 %를 증가시키지 않았다(데이타는 나타내지 않음). 이 결과는 GFP-발현 마크로파지의 상대적으로 낮은 %가 상기 세포에서 GFP의 높은 불안정성 때문은 아님을 입증한다.

<실시예 8>: 약독화된 자멸 리스테리아 모노시토제네스에 의한 플라스미드 전달 후에 마크로파지의 CAT의 발현.

상기 방법에 의해 플라스미드 전달 후 발현된 이종 단백질의 양을 측정하기 위해, p3LCAT118, p3LCAT 또는 pcDNA3L을 운반하는 돌연변이체 △2로 $P388D_1$ 마크로파지를 감염시켰다(도 2B). 먼저, 감염 후 4시간 후에 p3LCAT118 및 p3LCAT를 운반하는 박테리아로 감염시킨 마크로파지의 추출물에서 CAT 활성이 관찰되었고, CAT 활성은 감염 후 48시

간 후에 최대치에 도달하였다. 이 시점에서, △2(p3LCAT118)로 감염시킨 마크로파지에서 측정된 CAT-활성은 △2(p3LCAT)로 감염시킨 세포의 CAT-활성의 약 10배였다. BHI에서 생장시켰을 때 이 박테리아만으로는 CAT-활성은 나타나지 않았고(데이타는 나타내지 않음), 이는 내부에 들어온 리스테리아로부터의 플라스미드 DNA의 방출 후에 감염된 숙주 세포에 의해 CAT가 합성됨을 나타낸다. PLY118에 의한 용균은 항생제로 세포내 박테리아를 사멸시키는 것보다 보다 효과적인 플라스미드 방출 및 보다 높은 CAT-활성으로 나타났다.

<실시예 9>: 리스테리아에 의한 항원-암호화 플라스미드의 전달 후에 마크로파지에 의한 항원 제시의 효율.

리스테리아에 의한 항원-암호화 플라스미드의 전달 후에 마크로파지에 의한 항원 제시의 효율을 시험하기 위해, p3LOVA118를 운반하는 △2 돌연변이체를 사용하였다. 이 플라스미드는 닭의 난알부민으로부터 H-2K 에피톱(OVA 257-264)을 암호화하는 난 유전자의 일부분을 함유한다(20). OVA-특이적 T-세포 하이브리도마 RF33.70(20)는 △2(p3LOVA118)로 감염시킨 마크로파지는 인식하나 △2(pcDNA3L)로 감염시킨 마크로파지는 인식하지 못했으므로, MHC 클래스 I의 상황에서 상기 에피톱의 효과적인 항원 제시가 골수 유래 마크로파지에서 나타났다(도 2C).

<실시예 10>: 숙주 게놈에 플라스미드 DNA의 통합.

DNA-백신 접종의 주요 문제는 플라스미드 DNA의 숙주 게놈으로의 통합 가능성이다. 이 문제를 조사하기 위해, 각 벡터 작제물의 일부인 벡터 pcDNA3 상에 운반되는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제Ⅱ 유전자(neo)를 이용하였다. 감염다중도 50:1의 비율로 △2(p3LCAT)를 갖는 $P388D_1$ 세포의 감염은 대부분의 숙주 세포의 감염을 유발시켰다. 12주 이상 동안의 선택적 조건 하에 유지하여 G418로 선별한 결과 내성 마크로파지 클론을 얻었다. 모든 클론에서, 방사성 표지된 p3LCAT로 서든 혼성화에 의해 마크로파지 염색체 DNA 중 일체화된 플라스미드 p3LCAT를 검출하였으나, 감염되지 않은 $P388D_1$ 세포의 염색체 DNA에서는 이러한 서열은 존재하지 않았다. 세가지 다른 클론의 전체 DNA를 SrfI(벡터 p3LCAT는 절단하지 않음)으로 자르고, 그 단편을 펄스-필드 겔 전기영동에 의해 분리하였으며 각 경우에서 프로브와 혼성화되는 단일한 사이즈가 큰 단편이 검출되었다. 유리 정제 벡터 DNA는 상기 조건 하에 높은 이동성이 있는 두개의 밴드(아마도 수퍼코일링되고 열린 환형)를 나타냈다. 세가지 분석된 클론 각각은 "플라스미드-혼성화하는" 큰 DNA-단편에서 다른 강도를 나타냈고, 이는 숙주 게놈으로 삽입되는 플라스미드 DNA의 카피가 다른 여러개임을 암시한다. 이러한 플라스미드 카피는 PstI으로 게놈 DNA를 자른 결과, 플라스미드가 두개의 단편으로 잘려지고 이러한 모든 경우에서 동일한 두개의 단편이 되기 때문에 직선으로 배열되고, 이는 SrfI 절단으로 생성되는 잘라지지 않은 큰 염색체 단편과 혼성화 강도에서의 동일한 차이를 나타낸다. $P388D_1$ 마크로파지의 산출된 통합율은 10^{-7}이었다. 이 데이타는 DNA 백신 접종에 통상적으로 사용되는 유형의 플라스미드 DNA가 형질감염된 숙주 세포의 게놈내로 잘 통합될 수 있음을 나타낸다.

DNA 백신 접종의 결과 있을 수도 있는 안전성 문제는 이미 논의되었다. 이 중, 숙주 세포 염색체로의 응용된 플라스미드 DNA의 통합은 주요한 관심사이다(2, 21, 22). 대부분의 참고문헌에서, 플라스미드 DNA가 마우스 근육 조직으로 주사될 때, 이 DNA가 19개월 이상 지속함에도 "백신 DNA"의 통합은 관찰되지 않는 것처럼 가능하지 않은 것으로 간주된다(23). 그러나, 두가지 다른 연구 결과, 플라스미드 DNA가 대장균에 의해 배야오딘 포유류 세포로 전달될 때(7) 또는 M13mp18 DNA가 마우스에 의해 경구적으로 잘릴때(24) 숙주 세포의 게놈으로 이종 단백질의 통합은 가능한 것으로 나타났다. 본 명세서에 보고된 데이타는 DNA 백신 접종에 통상적으로 사용되는, 진핵생물 발현 벡터 pcDNA3의 유도체인 플라스미드 p3LCAT가 기재된 전달 방법의 결과로 약 10^{-7}의 빈도로 마크로파지 세포 라인 $P388D_1$의 게놈에 통합될 수 있음을 나타낸다. 이러한 예상치 못한 높은 플라스미드 통합 빈도는 감염된 세포의 대부분에 전달된 높은 플라스미드 카피수일 수 있고 일반적으로 모든 DNA 백신 접종 전략에 대해 사실이다. 그러나, 이 사실은 이러한 플라스미드의 통합이 일어날 수 있고, 따라서 상기 기재된 시스템은 임상적 시도에서 백신으로 사용되는 것으로 의도된 플라스미드 DNA의 통합율(변화가능함)을 분석하는데 있어서 적합하고 용이한 시험관내 시험 시스템을 제공할 수 있다.

한편, 강력한 항원을 암호화하는 DNA로의 근육내 면역화는 항원에 대한 CD8+ T 세포 반응으로 인해 항원-발현 근섬유의 대부분의 파괴를 유발하는 것으로 보인다(25). 엘. 모노시토제네스에 의해 감염된 백신 접종된 숙주의 식세포 및 비식세포가 이 세포의 리스테리아 p60 및 리스테리올라이신의 존재로 인해 강력한 CTL 반응을 유도할 수 있기 때문에 약독화된 엘. 모노시토제네스 균주에 의한 플라스미드 DNA의 전달은 이러한 효과를 증가시킬 수도 있다(26). 두가지 단백질 모두 MHC 클래스 1의 배경(context)에 나타난 매우 강력한 T 세포를 포함하는 것으로 나타났다. 따라서, 통합된 플라스미드 서열을 함유한 균주를 비롯한 엘. 모노시토제네스에 감염된 숙주 세포는 결국 세포의 면역계에 의해 제거되고, 그 때문에 게놈 플라스미드 통합에 관련된 위험을 감소시킨다.

마크로파지 $P388D_1$의 게놈에 플라스미드 p3LCAT의 통합은 하기와 같이 연구되었다: 50:1의 MOI에서 △2(p3LCAT)로 마크로파지 세포를 감염시켰고, 감염 후 2시간 후에 배지를 겐타마이신(10 ㎍/ml), 테트라싸이클린(10 ㎍/ml), 페니실린(100 IU/ml) 및 스트렙토마이신(100 ㎍/ml)으로 보충하였고, 5일후 G418 (600 ㎍/ml)(Gibco)으로 보충하였다. G418에 대한 콜로니 내성이 검출될 때까지 배지를 매일 바꿔주면서 마크로파지 세포를 유지하고 각각 수획하였다. 선택적 조건 하에 합류시까지 클론을 생장시켰다. 감염 후 90일 후에, 핵산 혼성화에 의해 주입된 플라스미드 p3LCAT을 분석하였다. 펄스-필드 겔 전기영동 후 핵산 혼성화에 의해 플라스미드 DNA의 통합에 대한 분석을 수행하였다. 마크로파지 세포는 아가로스에 끼워졌고 단백질분해효소 K(Merck)로 처리하였다. 그 후에, DNA를 SrfI으로 자르고 펄스-필드 겔 전기영동으로 분리하고 Hybond N 막에 전달하여 BamHI효소에 의해 선형으로된 ^{32}P-표지 p3LCAT 벡터에 혼성화시켰다.

독립적으로 얻어진 세개의 G418 내성 $P388D_1$-클론의 DNA에 대한 서든 블롯 분석을 수행하였다. 게놈 DNA를 단리하고 PstI으로 자르고 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하고 Hybond N 막(Amersham)에 전달하여 BamHI효소에 의해 선형으로된 ^{32}P-표지 p3LCAT 벡터에 혼성화시켰다.

<실시예 11>: pFLO1 셔틀 벡터계의 작제.

벡터 pFLO1는 비. 세레우스(B.cereus)-벡터 pBC16[베른하르트(K.Bernhard) 등의 문헌[J. Bacteriol., 113,897 (1978)]]의 유도체이고 대장균 복제의 ColEl 기점을 추가로 포함한다. 벡터 pUCl9의 ColEl 기점[비에이라(J. Vieira) 및 메싱(J. Messing)의 문헌[Gene, 19, 259 (1982)]]을 올리고뉴클레오티드 ori19code2(5'-AGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGAATTCTCATATATAC-3', EcoRI 제한효소 부위) 및 ori19rev(5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGC-3')로 PCR-증폭시켰고, 생성된 DNA-단편을 EcoRI로 처리하고 EcoRI-처리된 pBC16의 2.8 kb 단편과 접합시켰다. 이 벡터는 크기가 매우 작았고 그람-음성 박테리아(예를 들어 대장균, 살모넬라, 예르시니아, 쉬겔라, 비브로) 및 그람-양성 박테리아(예를 들어 리스테리아 spp, 바실러스 spp.)에서 복제되었다. 그것은 항생제/화학요법제의 선택이 없는 그람양성 박테리아, 예를 들어 리스테리아 모노시토제네스에서 6시간 동안 항생제 없이 배양시킨 후 뇌 심장 혼합 브로쓰(BHI)에서 이 박테리아를 배양시켰을 때 플라스미드 안정성은 80 %를 초과하며, 24시간 동안 항생제 없이 배양시킨 후 70 %를 초과하였다.

pFLO1-벡터계내로의 진핵생물 발현 카세트의 클로닝.

포유류 세포에서 활성인 프로모터, 예를 들어 CMV프로모터에 작동가능하게 연결된 서열(예를 들어 녹색 형광 단백질을 암호화하는 gfp 유전자)을 pFLO1 또는 그의 유도체에 삽입할 수도 있었다. 엘. 모노시토제네스와 같은 박테리아에 의해 생성된 벡터의 세포내 전달 후에, 진핵 생물 프로모터의 조절 하에 플라스미드-암호화 폴리펩티드를 숙주 세포에 의해 합성할 수 있었다. 예를 들어 약독화된 자멸 엘. 모노시토제네스에 의해 P_{CMV}-gfp 전사 유닛을 쥐의 마크로파지 세포($P388D_1$)로 운반하는 pFL01의 유도체의 전달이 포유류 숙주 세포에 의한 효과적인 GFP-발현을 유발한 후임.

상기 실시예에서 사용된 것에 대한 본 발명의 일반적으로나 또는 특정적으로 기술된 반응물 및(또는) 작동 조건을 대신하여 마찬가지의 성공으로 상기 실시예를 반복할 수 있었다.

상기 기술사항으로부터, 당업자라면 본 발명의 사상 및 범주를 벗어남 없이 본 발명의 특징을 용이하게 주장할 수 있고, 여러가지 사용 및 상태에 본 발명을 적용시키기 위해 본 발명에 여러가지 변화 및 변형을 가할 수 있다.

참고문헌 및 기록

1. 돈넬리(J. J. Donnelly), 울머(J. B. Ulmer), 류(M. A. Liu)의 문헌[J. Immunol. Methods 176, 145 (1994)], 콘리(R. M. Conry) 등의 문헌[Cancer Res. 54, 1164(1994)], 휴(C. H. Hsu) 등의 문헌[Nature Med. 2, 540 (1996)].

2. 타스콘(R. E. Tascon) 등의 문헌[Nature Med. 2, 888 (1996)].

3. 코르(M. Corr) 등의 문헌[J. Exp. Med. 184, 1555 (1996)].

4. 데크(R. R. Deck) 등의 문헌[Vaccine, 15, 71 (1997)].

5. 피세츠키(D. S. Pisetsky)의 문헌[J: Immunol. 156, 421(1996)].

6. 시즈모어(D. R. Sizemore), 브란스트롬(A. A. Branstrom), 사도프(J. C. Sadoff)의 문헌[Science 270, 299 (1995)]

7. 코우발린(P. Courvalin), 고우사드(S. Goussard), 그릴로트-코우발린(C. Grillot-Courvalin)의 문헌[Life Sciences 318, 1207 (1995)].

8. 포트노이(D. A. Portnoy), 차크라보티(T. Chakraborty), 괴벨(W. Goebel), 코사르트(P. Cossart)의 문헌[Infect. Immun. 60, 1263 (1992)].

9. 하우프(N. Hauf), 괴벨(W. Goebel), 피들러(F. Fiedler), 소코로빅(Z. Sokolovic), 쿤(M. Kuhn)의 문헌[Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., in press].

10. 쉴러(S. Schiiller), 크글러(S. Kgler), 괴벨(W. Goebel)의 제출서.

11. 플라스미드 pLSV16[보네(J. Bohne) 등의 문헌[Mol. Microbiol, 20, 1189 (1996)]]은 대장균 플라스미드 pUC18로 이루어지고 원래 바실러스 세레우스[베른하르트(K. Bernhard) 등의 문헌[J. Bacteriol. 133, 897 (1978)]]로부터 단리되고 엘. 모노시토제네스의 세포당 약 30 카피로 안정하게 복제하는, 테트라싸이클린-저항성 플라스미드 pBCE16을 포함하여 4.2 kb이다. 프로모터 없는 돌연변이체 gfp 유전자 단편은 pKEN2로부터 XbaI/PstI 단편으로써 잘려지고[코르마크(B. P. Cormack), 발디비아(R. H. Valdivia), 폴코우(S. Falkow)의 문헌[Gene 173, 33 (1996)]] XbaI/PstI-부위가 열린 pLSV16내에 삽입된다. XbaI 부위(굵은 글씨)를 운반하는 프라이머 PXAct5(AGCGCT**TCTAGA**AGCAGCGAAAG) 및 PXAct3(TCCTC**TCTAGA**CGCTAATACAACC)를 갖는 PCR 반응에 의해 actA 프로모터 영역을 증폭시키고 XbaI로 잘라내고 gfp 유전자 앞의 XbaI-부위에 삽입하였다. XbaI, PstI으로 제한 분석 및 gfp 유전자로부터 유래한 PXact5 및 3'-프라이머를 이용하는 PCR에 의해 프로모터 단편의 정확한 삽입 및 방향이 확실시 된다. 그 후에, 생성된 플라스미드 P_{act}-gfp을 균주 엘. 모노시토제네스 EGD, 그의 동유전자 결실 돌연변이체 △prfA[비크만(R. Bijckmann) 등의 문헌 [Mol. Microbiol. 22, 643 (1996)]] 및 △2 및 EGD(pERL3501)[보네(J. Bohne) 등의 문헌 1996]내로 전기천공으로 삽입하였다.

12. 습윤 5 %의 CO_2 분위기에서 마크로파지와 비슷한 세포 라인 P388D1을 완전 배지로써 언급되는, 10% 열-실활화 FCS(Gibco) 및 2mM L-글루타민(Gibco)을 보충한 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)에서 배양시켰다. 완전 배지에서 마크로파지 106 개를 마크로파지당 10배의 대수적으로 생장하는 박테리아와 감염시켰다. 45분 동안 인큐베이션한 후에, 배양된 세포를 PBS로 3회 세척하여 세포외 박테리아를 제거하였다. 세포외 박테리아의 선택적 제거를 위해, 감염된 마크로파지를 통상적으로 겐타마이신 10 ㎍/ml의 존재 하에 배양시켰다. 도립현미경(Leica)(40 x 배율에서) 및 Seescan CCD 카메라 시스템(INTAS)을 및 문서화된 데이타를 이용하여 다른 시간 간격으로 감염된 층에서 형광 박테리아를 현미경으로 분석하였다.

13. 도만(E. Domann) 등의 문헌[EMBO J. 11, 1981 (1992)].

14. 뢰스너(M. J. Loessner), 벤드링거(G. Wendlinger), 쉐러(S. Scherer)의 문헌[Mol. Microbiol. 16, 1231(1995)].

15. 벡터 pBCE16을 BamHI로 자르고 pCDNA3(Invitrogen)의 1개의 BglII-부위에 삽입하여 플라스미드 pcDNA3L을 생성시켰다. 리스테리아 박테리오파지 A118 유래 라이신 ply118을 BamHI 및 SalI를 이용하여 벡터 pHPL118[뢰스너(M. J. Loessner) 등의 문헌 [Appl. Env. Microbiol. 62, 3057 (1996)]]로부터 제거하고 BamHI-SalI-미리 자른 pUC18에 삽입하여 pUC118을 생성시켰다. actA 프로모터 영역을 프라이머 PactA5(5'-TCCCAG**GGTACC**ATGCGA-3') 및 PactA3(5'-TCCCAC**GGATCC**TCCCTCC-3')로 PCR 증폭시키고 KpnI 및 BamHI에 관한 부위(굵은 글씨)를 각각 도입하였다. 314bp PCR-생성물을 KpnI 및 BamHI로 잘라서 KpnI-, BamHI-미리 자른 pUC118에 삽입하였다. 생성된 벡터 pActPrll8의 PactA-plyll8 전사 단위를 PvuII로 자르고 이 1470bp 단편을 pcDNA3L의 1개의 SmaI-부위에 삽입하였다. 생성된 플라스미드 p3L118 및 pcDNA3L을 엘. 모노시토제네스 돌연변이체 △2에 전기천공으로 삽입하였다.

16. 가능한 설명은 겐타마이신 함유 배지에서 J774A.1에 비해 $P388D_1$의 높은 박테리아 사멸 활성 및(또는) $P388D_1$ 세포의 용균 증가 및 그 후의 방출된 세포외 박테리아의 사멸일 수 있다.

17. NotI으로 pCEP4-RG[왕(Y. Wang) 등의 문헌[Bioluminescence and Chemiluminescence], 하스팅(J. W. Hastings), 크릭카(L. J. Kricka), 스탠리(P. E. Stanley)의 문헌[Eds. (John Wiley & Sons, Chichester, 1996), pp. 419-422,]]을 자르고, NotI로 미리 자른 벡터 p3L118 및 pcDNA3L 각각에 인간의 ghp 유전자를 포함하는 0.7kb 단편을 삽입하여 플라스미드 p3LGFP118 및 p3LGFP을 작제하였다. pcDNA/CAT(Invitrogen)의 BglII-부위에 BamHI-으로 자른 pBCE16을 삽입시켜 벡터 p3LCAT을 작제하였다. PvuII부위가 잘린 플라스미드 pActPrl18의 PactA-plyll8 전사 단위를 p3LCAT의 SmaI-부위에 삽입하여 벡터 p3LCAT118를 생성하였다. 올리고뉴클레오티드 OVACODE (5'-GGCCATGAAGAGCATCATCAACTTCGAGAAGCTGAAG-3') 및 OVAREV (5'-GGCCCTTCAGCTTCTCGAAGTTGATGATGCTCTTCAT-3')로 이루어진 링커를 p3L118 및 pcDNA3L의 NotI-부위에 삽입시켜 플라스미드 p3LOVA118 및 p3LOVA을 작제하였다. 이 결과, 아미노산 서열 MLSIINFEKLKGRSSMHLEGPIL을 갖는 펩티드가 발현되었다. 디데옥시-쇄 결정 방법으로 DNA-서열을 분석하여 상기 삽입을 확인하였다. 모든 플라스미드를 엘. 모노시토제네스 돌연변이체 △2내로 전기천공하여 삽입하였다.

18. 제작자의 지침에 따라, 칼슘-포스페이트 침전 방법을 이용하여 형질감염 MBS 포유류 형질감염 키트(Transfection MBS Mammalian Transfection Kit)(Stratagene)으로 형질감염을 수행하였다. 형질 감염 48시간 후에, GFP- 또는 CAT- 활성에 대해 각각 세포를 분석하였다.

19. GFP를 발현시키는 마크로파지를 Epics Elite ESP 세포 정렬기(Coulter)로 정렬시켰다. GFP-형광을 분석하였다. 515 내지 535 nm 밴드패스 필터 및 아르곤 레이저의 488 nm 라인을 갖는 여기를 이용하여 GFP-형광을 분석하였다. + 로 정렬된 세포는 형광이 25배 이상 증가하였다.

20. 코바크소빅스-반코브스키(M. Kovacsovics-Bankowsky) 및 로크(K. L. Rock)의 문헌[Science 267, 243 (1995)].

21. 돈넬리(J. J. Donnelly) 등의 문헌[Nature Med. 1,583 (1995)].

22. 하셋(D. E. Hassett) 및 휘틴(J. L. Whitton)의 문헌[Trends Microbial. 4, 307 (1996)], 에틀(H. C. J. Ertl) 및 치앙(Z. Xiang)의 문헌[J. Immunol. 156, 3579 (1996)], 보겔(F. R. Vogel) 및 사르버(N. Sarver)의 문헌[Clin. Microbiol. Rev. 8, 406 (1995)].

23. 볼프(J. A. Wolff) 등의 문헌[Hum. Mol. Gen. 1, 363 (1992)].

24. 슈베르트(R. Schubbert) 등의 문헌[Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 94, 961 (1997)].

25. 데이비스(H. L. Davis), 브라졸로트 밀란(C. L. Brazolot Millan), 왓킨스(S. C. Watkins)의 문헌[Gene Ther. 4, 181 (1997)].

26. 하티(J. T. Harty) 및 베반(M. J. Bevan)의 문헌[J. Exp. Med. 175, 1531-1538 (1992)], 파머(E. G. Pamer)의 문헌[J. Immunol. 152, 686 (1994)].

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 약독화된 침투성 박테리아가 숙주 세포의 세포질에 존재할 때 활성화되는 프로모터에 작동가능하게 연결된, 박테리아에 치명적인 폴리펩티드를 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편, 및 (b) 숙주 세포에 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결된, 치료 또는 예방 특성을 지닌 폴리펩티드를 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편

을 갖는 플라스미드로 형질전환된, 포유류 숙주 또는 그의 숙주 세포를 감염시킬 수 있으나 야생형 박테리아에 비해 상기 숙주에서 감소된 세포내 및 세포간 운동 능력을 지닌 약독화된 침투성 세포내 리스테리아(Listeria) 박테리아.

청구항 2.

제1항에 있어서, (a) 및 (b)가 동일한 플라스미드 또는 다른 플라스미드에 있을 수 있는 것인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 3.

제1항에 있어서, (a)가 박테리아 염색체내에 통합될 수 있고 (b)가 플라스미드 상에 있는 것인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

제1항에 있어서, 박테리아가 리스테리아 모노시토제네스(Listeria monocytogenes)인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 6.

제1항에 있어서, 박테리아가 레시티나제 오페론이 결핍된 것인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 7.

제1항에 있어서, 박테리아에 치명적인 폴리펩티드가 박테리오파지 라이신인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 8.

제1항에 있어서, (a)의 프로모터가 리스테리아 프로모터 P_{actA}인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 9.

제1항에 있어서, (b)의 숙주 세포에 적합한 프로모터가 프로모터 P_{CMV}인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 10.

제1항에 있어서, 박테리아에 치명적인 폴리펩티드가 상기 숙주 세포의 세포질에서 박테리아의 자가용해를 일으키는 것인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 11.

제1항에 있어서, 박테리아에 치명적인 폴리펩티드가 폴리펩티드의 118번 위치에 라이신 잔기를 갖는 것인 약독화된 침투성 박테리아.

청구항 12.

(a) 포유류 숙주 세포의 세포질에 있는 침투성 리스테리아 박테리아내에 존재할 때 활성화되는 프로모터에 작동가능하게 연결된, 박테리아에 치명적인 단백질을 암호화하는 구조 유전자, 및 (b) 포유류 숙주 세포에 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결된, 치료 또는 예방 특성을 지닌 단백질을 암호화하는 구조 유전자

를 갖는 플라스미드.

청구항 13.

제12항에 있어서, (b)의 단백질이 항원인 플라스미드.

청구항 14.

제12항에 있어서, (a)의 단백질이 박테리오파지 라이신인 플라스미드.

청구항 15.

제12항에 있어서, (a)의 프로모터가 리스테리아 프로모터 P_{actA}인 플라스미드.

청구항 16.

제12항에 있어서, 숙주 세포에 적합한 (b)의 프로모터가 프로모터 P_{CMV}인 플라스미드.

청구항 17.

제12항에 있어서, (a)의 단백질이 상기 숙주 세포의 세포질에서 박테리아의 자가분해를 일으키는 것인 플라스미드.

청구항 18.

(a) 약독화된 침투성 박테리아가 숙주 세포의 세포질에 존재할 때 활성화되는 프로모터에 작동가능하게 연결된, 박테리아에 치명적인 폴리펩티드를 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편, 및 (b) 숙주 세포에 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결된, 치료 또는 예방 특성을 지닌 폴리펩티드를 암호화하는 구조 유전자 또는 그의 단편

을 갖는, 포유류 숙주 또는 그의 숙주 세포를 생체내 또는 시험관내에서 감염시킬 수 있으나 야생형 박테리아에 비해 상기 숙주에서 감소된 세포내 및 세포간 운동 능력을 지닌 약독화된 침투성 세포내 리스테리아 박테리아를 생성시키기 위한 유전자 형질전환 벡터.

청구항 19.

제18항에 있어서, (b)의 구조 유전자가 항원을 암호화하는 것인 벡터.

청구항 20.

제18항에 있어서, (b)의 구조 유전자가 치료 물질을 암호화하는 것인 벡터.

청구항 21.

제18항에 있어서, (b)의 구조 유전자가 분비가능한 단백질 산물을 암호화하는 것인 벡터.

청구항 22.

제1항에 있어서, 의약 제조를 위한 박테리아.

청구항 23.

제22항에 있어서, 상기 박테리아가 포유류의 단구(monocyte)에 침투하는 것인 박테리아.

청구항 24.

제23항에 있어서, 단구가 효과적인 항원 제시 세포(APC)인 박테리아.

청구항 25.

제24항에 있어서, (b)에서 암호화된 항원 단백질이 발현되고 APC에 의해 제시되며 그에 따라 면역 반응이 유도되는 것인 박테리아.

청구항 26.

제25항에 있어서, 박테리아에 의해 감염된 포유류의 세포가 항원이 제시된 후에 세포 면역계에 의해 제거되는 것인 박테리아.

청구항 27.

제22항에 있어서, 투여 경로가 경구인 박테리아.

청구항 28.

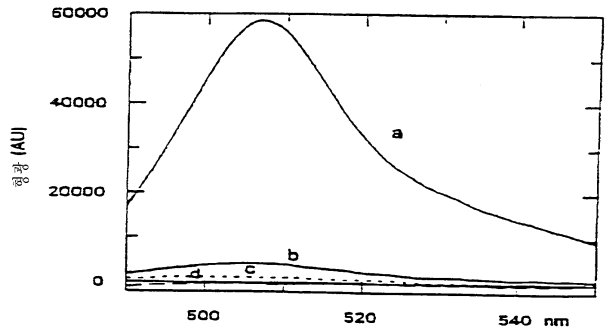
삭제

청구항 29.

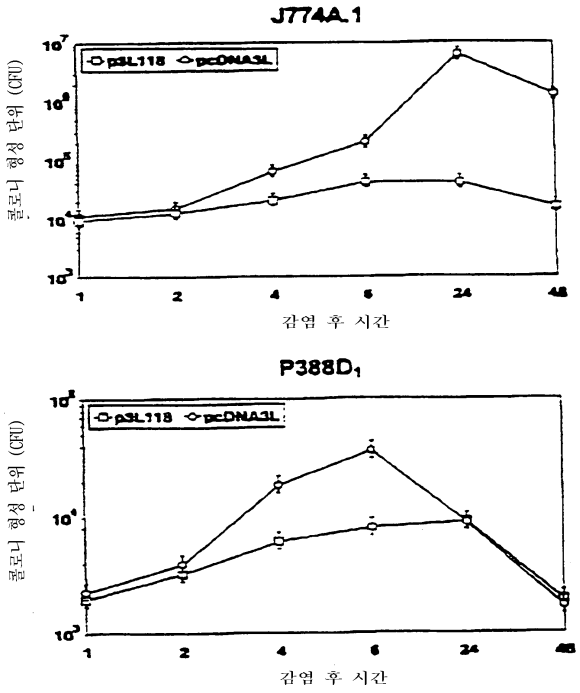
삭제

도면

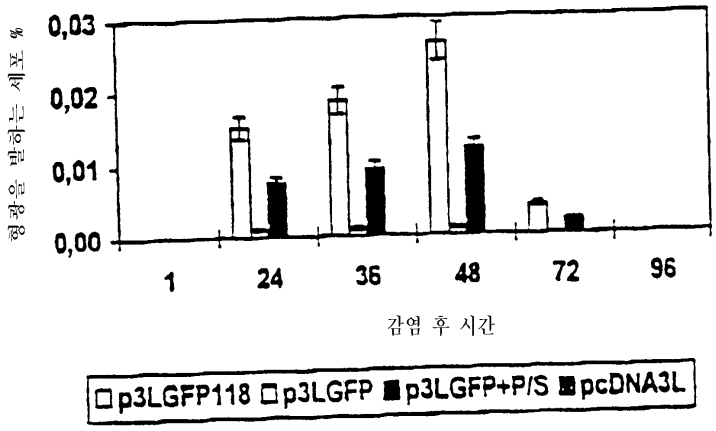
도면1A



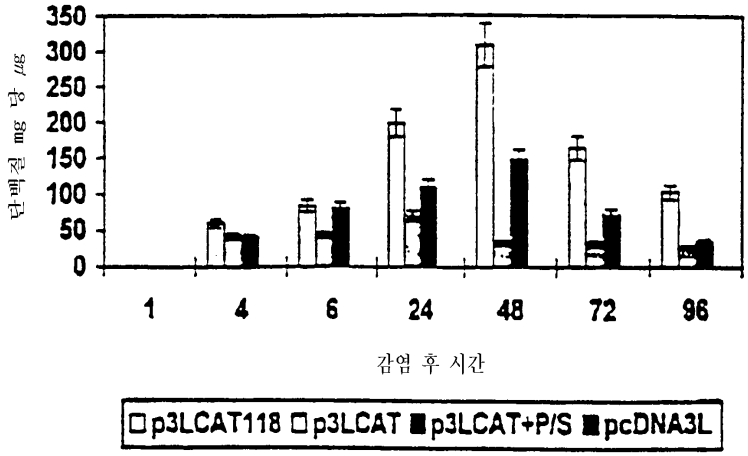
도면1B



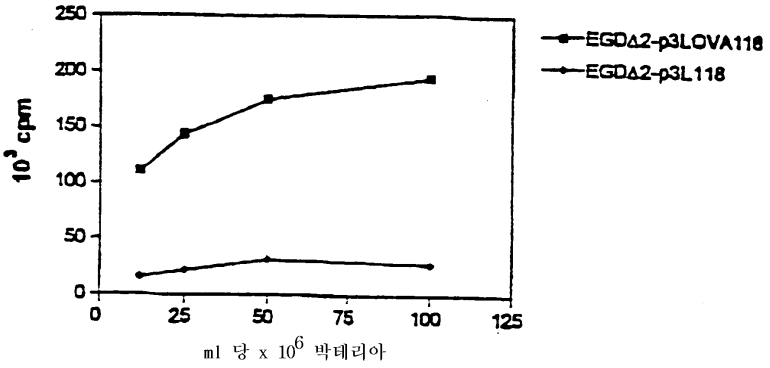
도면2A



도면2B


350
300
250
200
150
100
50
0
단백질 mg 당 μg
1
4
6
24
48
72
96
감염 후 시간
p3LCAT118 p3LCAT p3LCAT+P/S pcDNA3L

도면2C


250
200
150
100
50
0
10³ cpm
0
25
50
75
100
125
ml 당 x 10⁶ 박테리아
EGDΔ2-p3LOVA118
EGDΔ2-p3L118