



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0054136

A61K 39/12 (2006.01)

(43) 공개일자 2007년05월28일

A61K 38/20 (2006.01)*A61P 37/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7009283

(22) 출원일자 2006년05월12일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년05월12일

(87) 국제공개번호 WO 2005/039634

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/011620

국제공개일자 2005년05월06일

국제출원일자 2004년10월11일

(30) 우선권주장 0323965.4 2003년10월13일 영국(GB)

(71) 출원인
 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89
 스미스클라인 비참 코포레이션
 미국 펜실베니아 필라델피아 프랭클린 플라자 1

(72) 발명자
 브룩, 클라우딘, 엘비례, 마리
 미국 19406 펜실베니아 킹 오브 프루시아 스웨데랜드 로드 709글락소
 스미스클라인
 제랄드, 캐더린, 마리, 기슬라인
 벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인
 바이오로지칼즈 에스에이
 조나, 즈덴카, 루드밀라
 미국 19406 펜실베니아 킹 오브 프루시아 스웨데랜드 로드 709글락소
 스미스클라인

(74) 대리인 남상선

전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 인터루킨 18 및 사포닌 애주번트 시스템을 포함하는 백신조성물

(57) 요약

본 발명은 감염 질환, 암, 자가면역 질환 및 관련 이상의 치료 또는 예방에서 유용성이 발견된 병용 요법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1.

포유 동물에게 안전하고 유효한 양의 1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 2) 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하여, 포유 동물에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법.

청구항 2.

제 2항에 있어서, 항원 또는 그의 면역원성 유도체가 인간 면역결핍 바이러스 HIV-1, 인간 단순헤르페스 바이러스, 시토 메갈로바이러스, 로타바이러스, 앱스타인 바 바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스, 간염 바이러스 (예: B형 간염 바이러스, A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스), 호흡기 합포체 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 인간 유두종 바이러스, 플라비바이러스 또는 인플루엔자 바이러스, 나이세리아 종(*Neisseria spp.*), 모라셀라 종(*Moraxella spp.*), 보르데텔라 종(*Bordetella spp.*); 마이코박테리움 종(*Mycobacterium spp.*)(*M. 튜베르콜로시스(M. tuberculosis)* 포함); 에스체리치아 종(*Escherichia spp.*)(*E. coli* 포함); 살모넬라 종(*Salmonella spp.*); 리스테리아 종(*Listeria spp.*); 헬리코박터 종(*Helicobacter spp.*); 스타필로코쿠스 종(*Staphylococcus spp.*)(*S. 아우레우스(S. aureus)*, *S. 에피더미디스(S. epidermidis)* 포함); 보르렐리아 종(*Borrelia spp.*); 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*)(*C. 트라코마티스(C. trachomatis)*, *C. 뉴모니아에(C. pneumoniae)* 포함); 플라스모디움 종(*Plasmodium spp.*)(*P. 팔시파리(P. falciparum)* 포함); 톡소플라스마 종(*Toxoplasma spp.*), 칸디다 종(*Candida spp.*)으로부터 선택되는 유기체로부터 유래됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

안전하고 유효한 양의 1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 2) 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자에서 암의 증증도를 저하시키는 방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체가 MAGE 패밀리로부터의 항원, PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2, SAGE, HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, 프로스테인, P501S, HASH2, 크립토, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, 프로스타제, STEAP, 티로시나아제, 텔로머라아제, 서바이빈, CASB616, P53, 또는 her 2 neu를 포함하는 그룹으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항중 어느 한 항에 있어서, IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 면역원성 조성물이 동시에, 별개로 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서, TH-1 사이토카인 및 면역원성 조성물이 조합된 약제학적 제조물의 형태로 동시에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 1항 내지 제 6항중 어느 한 항에 있어서, IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체가 인간 또는 뮤린 기원임을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 7항에 있어서, IL-18이 서열번호 6 또는 서열번호 7의 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 유도체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 1항 내지 제 8항중 어느 한 항에 있어서, 사포닌 애주번트가 QS-21 또는 QS-17임을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

감염 질환, 암, 자가면역 질환 및 관련 이상의 예방 및/또는 치료를 위해 동시에, 별개로 또는 순차적으로 사용하기 위한 활성 성분으로서 하기의 개별적 성분: (1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 (2) 항원 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하는 조합 제조물.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 성분 (1) 및 (2)가 하나의 조성물로 혼합됨을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 12.

제 10항 또는 제 11항에 있어서, 면역원성 조성물이 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체를 포함하고, 암에 대하여 예방학적으로 또는 치료학적으로 활성임을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 13.

제 12항에 있어서, 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체가 MAGE 패밀리로부터의 항원, PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2, SAGE, HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, 프로스테인, P501S, HASH2, 크립토, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, 프로스타제, STEAP, 티로시나아제, 텔로머라아제, 서바이빈, CASB616, P53, 또는 her 2 neu를 포함하는 그룹으로부터 선택됨을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 14.

제 10항 내지 제 13항중 어느 한 항에 있어서, IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체가 인간 또는 뮤린 기원임을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 15.

제 14항에 있어서, IL-18이 서열번호 6 또는 서열번호 7의 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 유도체임을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 16.

제 10항 내지 제 15항중 어느 한 항에 있어서, 사포닌 애주번트가 QS-21 또는 QS-17임을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 17.

제 10항 내지 제 16항중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물이 3D-MPL, 콜레스테롤, 적어도 하나의 면역자극성 CG 디누클레오티드를 포함하는 CpG 올리고누클레오티드, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 토코페롤, 및 수중유 에멀젼 또는 2개 이상의 상기 애주번트들의 조합물을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 면역자극성 화학 물질을 추가로 포함함을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 18.

제 17항에 있어서, 면역원성 조성물 애주번트가 3D-MPL, QS21, 콜레스테롤, 수중유 에멀젼을 포함함을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 19.

제 18항에 있어서, 수중유 에멀젼이 스쿠알렌, 토코페롤 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레아이트(Tween 80)를 포함함을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 20.

제 17항에 있어서, 면역원성 조성물이 QS21, 콜레스테롤 및 적어도 하나의 면역자극성 CG 디누클레오티드를 포함하는 CpG 올리고누클레오티드를 포함함을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 21.

제 10항 내지 제 20항중 어느 한 항에 있어서, 2개의 활성 성분 모두가 주사용 용액의 형태로 존재함을 특징으로 하는 조합 제조물.

청구항 22.

감염 질환, 암, 및 자가면역 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 동시에, 별개로 또는 순차적으로 사용하기 위한 활성 성분으로서 하기의 개별적 성분: (1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 (2) 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하는 약제학적 키트.

청구항 23.

제 22항에 있어서, 면역원성 조성물이 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체를 포함하고, 암에 대하여 예방학적으로 또는 치료학적으로 활성임을 특징으로 하는 약제학적 키트.

청구항 24.

제 23항에 있어서, 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체가 MAGE 패밀리로부터의 항원, PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2, SAGE, HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, 프로스테인, P501S, HASH2, 크립토, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, 프로스타제, STEAP, 티로시나아제, 텔로머라아제, 서바이빈, CASB616, P53, 또는 her 2 neu를 포함하는 그룹으로부터 선택됨을 특징으로 하는 약제학적 키트.

청구항 25.

제 10항 내지 제 20항중 어느 한 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 조합 제조물.

청구항 26.

제 1항 내지 제 9항중 어느 한 항에 있어서, 제 10항 내지 제 20항중 어느 한 항의 조합 제조물의 사용을 포함하는 방법.

청구항 27.

감염 질환, 암, 자가면역 질환 및 관련 이상을 앓고 있거나 그에 걸리기 쉽고, 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물로 이미 초회감작된(primed) 환자를 예방 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에서 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체의 용도.

청구항 28.

감염 질환, 암, 자가면역 질환 및 관련 이상을 앓고 있거나 그에 걸리기 쉽고, IL-18 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편 또는 변이체로 이미 초회감작된 환자를 치료하기 위한 약제의 제조에서 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물의 용도.

청구항 29.

제 27항 또는 제 28항에 있어서, 항원은 종양 관련 항원이고, 암은 유방암, 폐암, NSCLC, 결장암, 흑색종, 난소암, 방광암, 두경부 평평암종, 식도암을 포함하는 그룹으로부터 선택됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 30.

제 27항 내지 제 29항중 어느 한 항에 있어서, IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체가 인간 또는 뮤린 기원임을 특징으로 하는 용도.

청구항 31.

제 30항에 있어서, IL-18이 서열번호 6 또는 서열번호 7의 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 유도체임을 특징으로 하는 용도.

청구항 32.

제 27항 내지 제 31항중 어느 한 항에 있어서, 사포닌 애주번트가 QS-21 또는 QS-17임을 특징으로 하는 용도.

명세서

기술분야

본 발명은 감염 질환, 암, 자가면역 질환 및 관련 이상의 치료 또는 예방에서 유용성이 발견된 병용 요법에 관한 것이다. 특히, 병용 요법은 TH-1 사이토카인, 특히 IL-18, 및 항원 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물, 특히 백신의 투여를 포함한다. 특히, 본 발명은 프리네오플라스(proneoplastic) 병변 또는 암의 치료를 위한 IL-18 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 종양 관련 항원 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명에 따라 사용하기 적절한 조합 제조물 및 약제학적 키트에 관한 것이다. 상기 치료 방법 및 약제학적 제조물은 예방학적 및 면역요법 적용, 특히 종양의 예방 및/또는 치료에 적절한 면역 반응의 자극에 특히 유용하다.

배경기술

암은 유전적 변화에 기인하는, 단세포부터 발생하는 질환이다. 재정 및 인적 자원의 막대한 투자에도 불구하고, 암은 주요 사망 원인중 하나로 남아있다. 종양은 대개 일차적인 종양이 수술에 의해 제거될 수 있고 상이한 장기에 정착된 미세 전이가 주로 이미 출현한 상태인 상대적으로 늦은 질환의 단계에서 임상적으로 발견된다. 암을 유발하는 기작에 대한 이해는 상당히 진보하였음에도 불구하고, 전이성 암의 치료 및 더욱 악성인 병변 및 전이성 병변으로 진행되는 초기 종양의 진행을 저해하는 것에 대해서는 덜 발전되어 왔다. 화학요법은 주로 상기 세포를 완전하게 제거시키지 못한 바, 재발성 질환에 대한 근원으로서 남아 있게 된다.

TH-1형 사이토카인, 예로서, IFN- γ , TNFa, IL-2, IL-12, IL-18 등은 투여된 항원에 대한 세포 매개 면역 반응의 유도를 촉진시키는 경향이 있다. 대조적으로, 고수준의 Th-2형 사이토카인(예로서, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10)은 체액성 면역 반응의 유도를 촉진시키는 경향이 있다. 인터페론-감마(IFNg) 유도 인자로도 공지되어 있는 인터루킨-18(IL-18)은 질환(예: 암)에 대하여 환자 자신의 면역계를 자극시키는 면역 조절 효과를 갖는다면발현성 사이토카인으로서 기술되어 있다. IL-18은 면역 반응 초기에 발현되고, 체액성 및 세포성 면역 반응 둘 모두에 작용하고 우수한 TH-1형 프로파일에 대한 반응을 유발한다. 활성화된 항원-제시 세포에 의해 생산되고, 수개의 생체활성을 갖고, 구체적으로, 순수한(naive) CD4 T 세포의 Th1 세포로의 분화를 촉진시키고, 자연살(NK) 세포, 자연살 T(NKT) 세포를 자극시키고, 활성화된 T 세포, 현저하게는 감마 인터페론(IFN-감마)을 분비하는 세포독성 T 세포(CD8+ 표현형)의 증식을 유도하는 것으로 보고되어 있다 (Okamura H. et al. 1998, Adv. Immunol. 70:281-312). IL-18은 또한 Fas-유도성 종양 사멸을 매개하고, IL-1a 및 GMCSF의 생산을 촉진시키고, 항-혈관형성 활성을 갖는다.

IL-18은 선천성 면역 및 Th1-및 Th2-매개 반응 둘 모두를 자극시키는 능력을 갖는다. IL-12의 존재하에, IL-18은 Th1 세포, 비분극화된 T 세포, NK 세포, B 세포 및 가지 세포에 작용하여 IFNg를 생산할 수 있다. IL-12의 도움 없이도, IL-18은 T 세포, NK 세포, 비만 세포 및 호염기구에서 IL-4 및 IL-13의 생산을 유도하는 능력을 갖는다.

IL-18은 내인성 및 사이토카인-유도성의 항종양 면역 반응의 중요한 성분인 IFN-감마의 생산을 통해 종양의 퇴행을 유도하는 것으로 나타났다. 효능은 상이한 종양을 앓는 동물 모델에서 입증되었다(Jonak Z et al. 2002, J. Immunother. 25, S20-S27; Akamatsu S; et al. 2002, J. Immunother. 25, S28-S34). 다른 약제와 함께 조합된 IL-18, 특히, 화학요법 제와 조합된 IL-18을 포함하는 조성물이 기술되어 있다(US 6,582,689). IL-18은 또한 백신용 애주번트로서 작용하는 것으로서 기술되어 있다(WO 99/56775; WO 03/031569).

사포닌은 (Lacaille-Dubois, M and Wagner H.(1996. A review of the biological and pharmacological activities of Saponines. Phytomedicine vol 2 pp 363-386))에 교시되어 있다. 사포닌은 식물계 및 해양동물계에 널리 분포되어 있는 스테로이드 또는 트리테르펜 글리코시드이다. 사포닌은 진탕시 기포를 형성하는, 물중 콜로이드성 용액을 형성하고, 콜레스테롤을 침전시키는 것으로 주지되어 있다. 사포닌이 세포막에 가까이 존재할 때 이는 막이 파열되도록 하는 막중 유사포어 구조를 형성한다. 적혈구의 용혈이 이러한 현상의 일례이며, 이는 모든 사포닌이 아닌 특정 사포닌의 성질이다.

사포닌은 전신 투여용 백신에서 애주번트로서 공지되어 있다. 각개 사포닌의 애주번트 및 용혈 활성을 본 분야에서 광범위하게 연구되어 왔다(Lacaille-Dubois and Wagner, 상기와 동일). 예를 들면, Quil A(사우쓰 아메리카 트리 쿠라자 사포나리아 모리나(South American tree Quillaja Saponaria Molina)의 나무껍질로부터 유래), 및 그의 분획이 US 5,057,540 및 ["Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug carrier Syst, 1996, 12(1-2): 1-55]; 및 EP

0 362 279 B1에 기술되어 있다. Quil A 또는 그의 분획을 포함하는, 소위 면역 자극 캠플렉스(Immune Stimulating Complexes)(ISCOMS)로 명명되는 특정 구조물이 백신 제조에 사용되어 왔다(Morein, B., EP 0 109 942 B1). 상기 구조물은 애주번트 활성을 갖는 것으로 보고되었다(EP 0 109 942 B1; WO 96/11711). 용혈성 사포닌 QS21 및 QS17(HPLC에 의해 정제된 Quil A의 분획)은 효능 있는 전신용 애주번트로서 기술되었고, 그의 생산 방법은 US 특허 번호 5,057,540 및 EP 0 362 279 B1에 기재되어 있다. 전신 백신용의 효능 있는 애주번트로서 작용하는 QS7(Quil-A의 비용혈성 분획)의 용도 또한 이를 참고 문헌에 기술되어 있다. QS21의 용도는 추가로 [Kensil et al. (1991. J. Immunology vol 146, 431-437)]에 기술되어 있다. QS21 및 폴리소르베이트 또는 사이클로덱스트린의 조합물 또한 공지되어 있다(WO 99/10008). QS21 및 QS7과 같은 Quil A 분획을 포함하는 특별한 애주번트 시스템이 WO 96/33739 및 WO 96/11711에 기술되어 있다.

전신 백신화 연구에 사용했던 다른 사포닌은 안개꽃(Gypsophila) 및 사포나리아(Saponaria)와 같은 다른 식물 종으로부터 유래된 것을 포함한다(Bomford et al., vaccine, 10(9): 572-577, 1992).

사포닌은 면역 반응의 유도에서 다양한 성공을 이루어 낸 점막 적용 백신 연구에서도 사용되어 온 것으로 공지되어 있다. 항원이 비강내 투여될 경우 Quil-A 사포닌은 면역 반응 유도에 대하여 어떤 효과도 갖지 않는 것으로 이미 제시된 바 있다(Gizurarson et al. 1994. Vaccine Research 3, 23-29). 동시에, 다른 저자들도 상기 애주번트를 사용하여 성공을 이루었다(Maharaj et al., Can. J. Microbiol, 1986, 32(5): 414-20; Chavali and Campbell, Immunobiology, 174 (3): 347-59). Quil A 사포닌을 포함하는 ISCOMs를 위내 및 비강내 백신 제형물에서 사용하였고, 이는 애주번트 활성을 나타내었다(Mcl Mowat et al., 1991, Immunology, 72, 317-322; Mcl Mowat and Donacie, Immunology Today, 12, 383-385). Quil A의 비독성 분획인 QS21는 또한 경구 또는 비강내 애주번트로서도 기술되어 있다(Sumino et al., J. Virol., 1998, 72 (6): 4931-9; WO 98/56415).

본 발명은 IL-18과 같은 TH-1 사이토카인, 및 제한하는 것은 아니지만, QS-21과 같은 사포닌 애주번트 및 항원을 포함하는 면역원성 조성물의 병용 투여는 고도로 효능이 있고, 감염 질환, 원발성 및 전이 종양성 질환(즉, 암), 자가면역 질환 및 관련 이상에 대한 유효하고 충분한 내성을 갖는 예방 방법 또는 치료 방법을 제공하고, 종양 관련 항원을 발현시키는 인간 암 세포의 증식을 저해하는데 특히 유효하다는 놀라운 발견에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 설명

따라서, 환자에게 안전하고 유효한 양으로 i) 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물, 특히 백신, 및 ii) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체를 투여하는 것을 포함하여, 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 유도 방법을 제공한다. 또 다른 일면에서, 본 발명은 안전하고 유효한 양의 i) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 ii) 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물, 특히 백신을 그를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법으로서, 앞서 확립된 종양(원발성 종양 및 전이성 종양)의 치료 또는 암 재발의 예방을 포함하는, 환자에서 암의 중증도를 저하시키는 방법을 제공한다.

일면에서, IL-18 폴리펩티드는 뮤린 또는 인간 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편 또는 변이체이다. 또 다른 일면에서, 항원은 종양 관련 항원이다. 또 다른 일면에서, 사포닌은 Quil A의 비독성 분획, 예를 들면 QS-17 또는 QS-21이다. 일례로, 사포닌은 QS21이다. 따라서, 일면으로, 본 발명은 i) 종양 관련 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 QS-21을 포함하는 면역원성 조성물, 특히, 백신, 및 ii) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체를 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하여, 앞서 확립된 종양(원발성 종양 및 전이성 종양)의 치료 또는 암 재발의 예방을 포함하는, 환자에서 암, 특히, 유방암종, 폐암종(특히, 비소세포폐암종), 흑색종, 결장직장암종, 난소암종, 전립선암종, 방광암종, 두경부 편평암종, 위암종 및 다른 GI(위장관) 암종, 특히 식도암종의 중증도를 저하시키는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 감염 질환, 원발성 종양 및 전이성 종양을 포함하는 암, 자가면역 질환 및 관련 이상을 치료 및/또는 예방하기 위해 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 사용하기 위한 활성 성분으로서 하기의 각각 성분: (1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 (2) 항원 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하는 조합 제조물에 관한 것이다. 일면에서, 조합 제조물 중 면역원성 조성물은 콜레스테롤, 3D-MPL, 면역자극성 올리고누클레오티드, 수산화 알루미늄, 인산알루미늄, 토코페롤, 및 수중유 에멀젼을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 추가의 면역자극성 화학물질 또는 2개 이상의 상기 애주번트들의 조합물을 포함한다. 예를 들면, 추가의 애주번트는 면역자극성 올리고누클레오티드일 수 있다.

관련 일면으로, 본 발명은 또한 감염 질환, 원발성 종양 및 전이성 종양을 포함하는 암, 및 자가면역 질환을 치료 및/또는 예방하기 위해 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 사용하기 위한 활성 성분으로서 하기의 각개 성분: (1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 (2) 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하는 약제학적 키트를 제공한다.

본 발명은 추가로 환자에게 2개의 성분을 안전하고 유효한 양으로 투여하여 환자에서 질환의 중증도를 저하시키거나 보호 면역 반응을 달성하기 위한 약제의 제조에서 (1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 (2) 항원 또는 그의 면역원성 유도체 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다.

본 발명은 추가로 상기 면역원성 조성물의 제조 방법, 질환, 특히 암 예방 및/또는 치료용 조성물의 용도, 및 인간을 포함하는 포유 동물에서 종양 또는 암성 세포의 증식을 저해하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

상세한 설명

본 발명의 한 형태로 면역원성 조성물중 사포닌 애주번트는 Quil A의 비독성 분획, 예를 들면 QS-17 또는 QS-21, 예를 들면 QS-21이다. 항원은 감염성 유기체로부터 유래된 항원, 예를 들면, 종양 관련 항원 또는 면역원성 유도체 또는 그의 유도체일 수 있다. 일면에서, TH-1 사이토카인은 뮤린 또는 인간 IL-18 또는 그의 생체활성 단편이다. 면역원성 조성물 및 IL-18은 항원-특이성 항체의 유도에서 상승 작용을 하고, 통상적으로 TH-1형 면역계와 관련된 체액성 또는/및 세포성 면역 반응을 유도하거나 증진시키는데 효능을 가질 수 있다. 체액성 및/또는 세포 매개 면역 반응, 또는 종양의 크기 및/또는 부하량의 감소에 의해 측정되는 바, 면역 반응의 전체적인 증가는 면역 반응 증진을 의미한다. 상승 작용이란 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편 또는 변이체가 본 발명의 면역원성 조성물과 함께 병용 요법으로 투여될 때 면역 반응을 유도할 수 있고, 상기 면역원성 조성물의 존재가 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편 또는 변이체의 효능을 증진시킬 수 있다는 것을 의미한다. 면역 반응 유도 결과는 예방, 질환의 중증도 저하(암인 경우, 앞서 확립된 종양(원발성 또는 전이성)의 저하, 암 재발의 예방), 및/또는 치료일 수 있다.

따라서, 일면에서, i) 감염성 유기체로부터 유래된 항원, 또는 종양 관련 항원 및 QS-21을 포함하는 유효량의 면역원성 조성물 및, ii) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체를 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는, 포유 동물에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 일면에서, 상기 요법의 2개의 성분 둘 모두를 순차적으로 제공한다. 즉, 면역원성 조성물을 사용하여 IL-18의 투여에 의해 초기감작된(primed) 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 증가시킨다. 다르게는, 또다른 일면에서, 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 사용하여, 차후 IL-18을 투여받는 개체에서 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 초기감작시킨다. 또다른 일면에서, 상기 요법의 2개의 성분은 2개의 상이한 부위에 공-투여되거나, 동일한 제조물내에서 혼합되어 동시에 제공된다. 기술자는 면역원성 조성물 및 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편 또는 변이체 둘 모두를 1회 또는 반복적으로 제공할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

본 발명의 범주내에서 의도하는 병용 요법은 성분을 단독으로 사용할 때와 비교하여 적어도 동등한 효능, 예를 들면, 증가된 효능을 갖는다. 특히, 각각 부가 방식으로 작동하는, 예를 들면, 상이한 작용기전을 통해 상승적으로 인간 종양 세포에 대한 세포독성 반응을 증진시키는 2개의 항암제를 조합하기 때문에 병용 요법이 유리하다.

관련 일면에서, 감염 질환, 및 암의 예방 및/또는 치료를 위해 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 사용하기 위한 활성 성분으로서 하기의 각개 성분: (1) IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 (2) 항원 및 사포닌 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하는 조합 제조물(예를 들면, 약제학적 다중바이알 팩)을 제공한다.

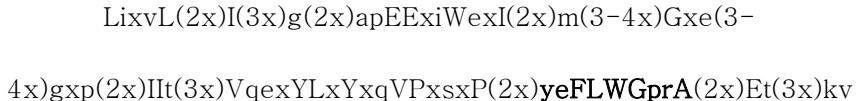
조합 제조물은 약제학적 제조물, 또는 활성 성분을 포함하는 하나 이상의 단위 제형을 포함할 수 있는 약제학적 (다중바이알) 팩 또는 디스펜서 장치를 의미한다. 팩은 예를 들면, 금속 또는 플라스틱 호일, 예로서, 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 투여용 설명서를 수반할 수 있다. IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체 및 면역원성 조성물은 예를 들면, 다중바이알 팩의 형태로 존재할 수 있는 2개의 별개의 조성물로서 상기를 투여하고자 한다. 본 발명에 따라 동시에 또는 별개로, 또는 순차적으로 투여되는 활성 성분은 공지된 약제의 단순한 응집체를 나타낼 뿐만 아니라, IL-18 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편 또는 변이체를 사용하여 NK 세포 활성화 및 T 세포 매개 면역 반응 및 사이토카인 생산을 포함하는 선천성 및 적응성의 면역계 성분 둘 모두를 자극시킴으로써 면역원성 조성물의 효능을 증가시킨다는 놀라울 만한 유용한 성질을 갖는 신규한 조합물도 나타낸다. 이로써 신규하고 유효한 요법을 얻게 된다. 키트-오브-파트로서도 디자인되는 조합 제조물은 별개로 또는 순차적으로 적용되어 사용될 수 있도록 하기 위하여 필수적으로 조합 제조물의 성분들이 유니온, 예로서 조성물로서 제시될 필요는 없다는 것을 이해하여야 한다. 따라서, 키트-오브-파트라는 표현은 성분들이 물리적으로 분리되다는 점과 관련하여 실제로 조합물일 필요는 없다.

조합 제조물은 암 치료 또는 예방, 특히 암의 중증도 저하 또는 암 재발 예방을 위해 사용될 수 있다. 본 원에 기술된 병용 요법으로부터 이득을 얻을 수 있는 암은 비조절 세포 성장 및 증식, 프리네오플라스 병변, 원발성 종양 및 전이성 종양성 병변으로 특징화된 질환을 포함하고, 제한하는 것은 아니지만, 유방암종, 폐암종(특히, 비소세포폐암종), 흑색종, 결장직장암종, 난소암종, 전립선암종, 방광암종, 두경부 편평암종, 위암종 및 다른 GI(위장관)암종, 특히 식도암, 백혈병, 림프종, 골수종 및 형질세포종을 포함한다.

펩티드(즉, 약 50개 미만의 아미노산)를 포함하는 항원 또는 그의 유도체 및 단편의 예는 (정소)암 항원으로 공지되어 있는 MAGE(흑색종 항원-코딩 유전자(Melanoma Antigen-encoding Genes)) 패밀리에 의해 코딩되는 항원을 포함한다 (Gaugler B. et al. J. Exp. Med., 1994, 179: 921; Weynants P. et al. Int. J. Cancer, 1994, 56: 826; Patard J. J. et al. Int. J. Cancer, 1995, 64:60). MAGE 단백질을 발현시키는 암은 MAGE-관련 종양으로서 공지되어 있다. MAGE 유전자는 밀접한 관련 유전자 패밀리에 속하고, 즉, X 염색체상에 위치하고, 그의 코딩 서열과 서로 64 내지 85%의 상동성을 공유하는 MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3(흑색종 항원-코딩 유전자-3), MAGE 4, MAGE 5, MAGE 6, MAGE 7, MAGE 8, MAGE 9, MAGE 10, MAGE 11, MAGE 12를 포함한다(De Plaen E. et al., Immunogenetics, 1994, 40, 360-369). 상기는 때때로 MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12(MAGE A 패밀리)로도 공지되어 있다. 다른 2개의 단백질 그룹은 상기보다 관련성이 다소 덜 하지만, 이 또한 MAGE 패밀리의 일부분이다. 상기는 MAGE B 및 MAGE C 그룹이다. MAGE B 패밀리는 MAGE B1(MAGE Xp1, DAM 10으로도 공지되어 있음), MAGE B2(MAGE Xp2 및 DAM 6으로도 공지되어 있음), MAGE B3 및 MAGE B4를 포함하고-MAGE C 패밀리는 현재 MAGE C1 및 MAGE C2를 포함한다. 일반적으로, MAGE 단백질은 단백질의 C-말단을 향해 위치하는 코어 서열 시그네처(signature)를 포함하는 것으로서 정의될 수 있다(예를 들면, MAGE A1과 관련하여, 309 아미노산 단백질인 코어 시그네처는 아미노산 195-279에 상응한다).

코어 시그네처의 공통 패턴을 하기와 같이 기재한다(여기에서, x는 아미노산을 나타내고, 소문자 잔기는 보존되고(보존적 변이체 허용됨) 대문자 잔기는 완전하게 보존된다).

코어 서열 시그네처:



보존 치환은 잘 공지되어 있고 일반적으로 서열 정렬 컴퓨터 프로그램에서 내정값 점수 행렬로서 셋업된다. 상기 프로그램은 PAM250(Dayhoff M. O. et al., 1978, "A model of evolutionary changes in Proteins", In "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M. O. Dayhoff(ed.), 345-352), National Biomedical Research Foundation, Washington, and Blosum 62(Steven Henikoff & Jorja G. Henikoff(1992), "Amino Acid substitution matrices from protein blocks"), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(Biochemistry): 10915-10919을 포함한다.

일반적으로 하기 그룹중 치환은 보존 치환이지만, 그룹들 사이의 치환은 비-보존적인 것으로 이해된다. 상기 그룹은

- i) 아스파테이트/아스파라긴/글루타메이트/글루타민
- ii) 세린/트레오닌
- iii) 리신/아르기닌
- iv) 페닐알라닌/티로신/트립토판
- v) 류신/이소류신/발라닌/메티오닌
- vi) 글리신/알라닌

일반적이며 본 발명과 관련하여 MAGE 단백질은 MAGE A1의 아미노산 195 내지 279와 코어 부위에서 대략 50% 일치할 것이다.

MAGE-3은 69%의 흑색종에서 발현되고(Gaugler B. et al. J. Exp. Med., 1994, 179: 921), 44%의 NSCLC(Yoshimatsu T. J Surg Oncol., 1998, 67, 126-129), 75%의 소세포 폐암(SCLC)(Traversari C. et al., Gene Ther. 1997, 4: 1029-1035), 48%의 두경부 편평 세포암종, 34%의 담낭 이행 세포암종, 57%의 식도암종, 32%의 결장암 및 24%의 유방암(Van Pel A. et al., Immunol. Rev., 1995, 145: 229; Inoue H. et al. Int. J. Cancer, 1995, 63: 523; Nishimura S et al., Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 1997, Apr, 20(2): 95-101)에서 검출될 수 있다. 수개의 CTL 에피토프는 각각 I형 MHC 분자 HLA.A1, 또는 HLA.A2(Van der Bruggen P. et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 3038-3043) 및 HLA.B44 (Herman, J. et al., Immunogenetics, 1996, 43, 377-383) 대립유전자에 대한 특이적인 결합 모티프를 갖는 MAGE-3 단백질상에서 확인되었다.

MAGE-3이 흑색종, 폐 및 식도암에서 검출되었지만 MAGE-관련 종양을 앓는 환자에서 환원의 발현 수준은 면역 인식 역치로 제한되거나 그 이하로 나타난다(Weiser T. S. et al., Ann. Thorac. Surg. 2001, 71: 295-302).

다른 항원 또는 그로부터 유래된 유도체 또는 단편의 예로서 WO 99/40188에 기재되어 있는 MAGE 항원, PRAME(WO 96/10577), BAGE, RAGE, LAGE 1(WO 98/32855), LAGE 2(NY-ESO-1로서 공지됨, WO 98/14464), XAGE(Liu et al., Cancer Res, 2000, 60: 4752-4755; WO 02/18584) SAGE, 및 HAGE(WO 99/53061) 또는 GAGE(Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research(submitted 1997); Correale et al. (1997), Journal of the National Institute 89, p293)을 포함한다. 실제로, 상기 항원은 흑색종, 폐암종, 육종 및 방광암종과 같은 광범위한 종양 타입에서 발현된다.

일면에서, 전립샘 항원, 예로서, 전립샘 암 항원 또는 전립샘 특이 분화 항원(PSA), PAP, PSCA(PNAS 95(4) 1735-1740 1998), PSMA 또는 프로스타제로서 공지된 항원을 사용한다.

또다른 일면에서, 전립샘 항원은 P501S 또는 그의 단편이다. 프로스테인(Xu et al., Cancer Res. 61, 2001, 1563-1568) 로도 공지되어 있는 P501S는 WO 98/37814의 서열번호 113으로서 공지되어 있고, 553 아미노산 단백질이다. 20개 또는 적어도 20, 50 또는 적어도 50, 또는 100 또는 적어도 100개의 인접 아미노산을 포함하는 면역원성 단편 및 그의 일부분은 상기 인용된 특허 출원서에 기술되어 있고 특히 본 발명에서 주시되고 있다. 사용할 수 있는 단편은 WO 98/50567 (PS108 항원)에 기술되어 있고, 전립샘 암-관련 단백질(WO 99/67384의 서열번호: 9)로서 기술되어 있다. 사용할 수 있는 다른 단편은 전장의 P501S 단백질의 아미노산 51-553, 34-553 또는 55-553이다. 특히, 작품물 1, 2 및 3(참조, 도 2, 서열번호 27-32)을 주시할 수 있고, 효소 시스템에서 발현될 수 있고, 예를 들면, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열은 효소 시스템에서 발현될 수 있다.

프로스타제는 잠정적 분비 작용을 암시하는 아미노-말단 프리-프로펩티드 서열 및 보존적 세린 프로테아제 촉매성 삼조체(catalytic triad) H-D-D를 갖고, 길이가 254개의 아미노산으로 되어 있는 전립샘-특이 세린 프로테아제(트립신-양)이다(P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Linas, L. Hood & K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of Prostase, an androgen-regulated Serine protease with Prostate restricted expression, In Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999)96, 3114-3119). 추정의 글라이코실화 부위는 기술되어 있다. 예측 구조는 다른 공지 세린 프로테아제와 매우 유사하고, 이는 성숙한 폴리펩티드는 단일 영역으로 폴딩된다는 것을 나타낸다. 성숙한 단백질의 길이는 224개의 아미노산으로 되어 있고, 자연발생적으로 프로세싱되는 것으로 보여지는 적어도 하나의 A2 에피토프를 갖는다. 프로스타제 누클레오티드 서열 및 추정의 폴리펩티드 서열 및 상동체는 Ferguson 등의 [(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119)] 및 국제 특허 출원 번호 WO 98/12302(및 상응하는 등록 출원 US 5,955,306), WO 98/20117(및 상응하는 등록 출원 US 5,840,871 및 US 5,786,148)(전립샘-특이 칼리크레인) 및 WO 00/04149(P703P)에 기술되어 있다.

다른 전립샘 특이 항원은 WO 98/37418, 및 WO/004149에 공지되어 있다. 또한, STEAP(PNAS 96 14523 14528 7-12 1999)가 존재한다.

본 발명과 관련하여 유용한 다른 종양 관련 항원은 Plu-1(J Biol. Chem 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, HASH-2(Alders, M. et al., Hum. Mol. Genet. 1997, 6, 859-867), 크립토(Salomon et al Bioessays 199, 21 61-70, US Patent 5654140), CASB616(WO 00/53216), 크립틴(US 5,981,215)을 포함한다. 추가로, 특히, 암 요법에서 백신에 적절한 항원은 또한 티로시나아제, 텔로머라아제, P53, NY-Br1.1(WO 01/47959) 및 그의 단편, 예로서, WO 00/43420에 기술된 것, B726(WO 00/60076, 서열번호 469 및 463; WO 01/79286, 서열번호 474 및 475), P510(WO 01/34802 서열번호 537 및 538) 및 서바이빈을 포함한다.

본 발명은 또한 유방암 항원, 예로서, Her-2/neu, 맘마글로빈(US 특허 5,668,267), B305D(WO00/61753 서열번호 299, 304, 305 및 315), 또는 WO00/52165, WO 99/33869, WO 99/19479, WO 98/45328에 기술된 것과 배합될 때 유용하다. Her-2/neu 항원은 그 중에서도 US 특허 5,801,005에 기술되어 있다. Her-2/neu는 전체 세포외영역(대략 아미노산 1-645 포함) 또는 그의 단편 및 대략 C 말단의 580 아미노산을 포함하는 전체 세포내 영역 또는 그의 면역원성 부위를 포함할 수 있다. 특히, 세포내 부위는 인산화 영역 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 상기 작제물은 WO 00/44899에 기술되어 있다. 사용할 수 있는 첫번째 작제물은 ECD-PhD로서 공지되어 있고, 두번째는 ECD 엘타PhD로 공지되어 있으며(참조, WO00/44899), dHer2로도 명명된다. 본 원에서 사용되는 Her-2/neu는 예를 들면, 래트, 마우스 또는 인간으로부터 유래할 수 있다.

특정 종양 항원은 작은 웹티드 항원(즉, 약 50개 미만의 아미노산)이다. 웹티드의 예로서 뮤신-유래된 웹티드, 예로서, MUC-1(참조, 예를 들면 US 5,744,144; US 5,827,666; WO 88/05054, US 4,963,484)을 포함한다. 특히, MUC-1 웹티드의 적어도 하나의 반복 유닛, 또는 적어도 2개의 반복을 포함하고, SM3 항체에 의해 인식되는 MUC-1 유래된 웹티드가 주시되고 있다(US 6,054,438). 다른 뮤신 유래된 웹티드로서 MUC-5로부터 유래된 웹티드를 포함한다.

다르게는, 항원은 인터루킨, 예로서, IL13 및 IL14일 수 있다. 또는, 항원은 다수의 암 치료 또는 면역적 거세에 유용하고, 길이가 10개의 아미노산으로 되어 있는 단쇄 웹티드인 자가 웹티드 호르몬, 예로서, 전장의 성선자극호르몬 방출호르몬(GnRH, WO 95/20600)일 수 있다. 다른 종양-특이 항원으로서, 제한하는 것은 아니지만, 종양-특이 강글리오사이드, 예로서, GM2, 및 GM3을 포함한다.

항원은 또한 인간에서 발병원인 것, 예로서, 인간 면역결핍 바이러스 HIV-1 (예로서, tat, nef, 역전사 효소, gag, gp120 및 gp160), 인간 단순해르페스 바이러스, 예로서, gD 또는 그의 유도체 또는 조기 발현 단백질, 예로서, HSV1 또는 HSV2로부터의 ICP27, 시토메갈로바이러스((esp 인간) (예로서, gB 또는 그의 유도체), 로타바이러스(생-약독화된 바이러스 포함), 엡스타인 바 바이러스(예로서, gp350 또는 그의 유도체), 바리셀라 조스터 바이러스(예로서, gpI, II 및 IE63), 또는 간염 바이러스, 예로서, B형 간염 바이러스(예를 들면, B형 간염 표면 항원 또는 그의 유도체), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스, 다른 바이러스성 병원체, 예로서, 파라믹소바이러스: 호흡기 합포체 바이러스(예로서, F 및 G 단백질 또는 그의 유도체), 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 인간 유두종 바이러스(예를 들면, HPV6, 11, 16, 18, ..), 플라비바이러스(예로서, 황열 바이러스, 맹기 바이러스, 진드기-매개뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스) 또는 인플루엔자 바이러스(알 또는 MDCK 세포에서 배양된 전체 생 또는 불활성화된 바이러스, 분리 인플루엔자 바이러스, 또는 전체 플루 바이로솜(R. Gluck에 의해 [Vaccine, 1992, 10, 915-920]에 기술됨) 또는 그의 정제된 단백질 또는 재조합 단백질, 예로서, HA, NP, NA, 또는 M 단백질, 또는 그의 조합물), 또는 박테리아 병원체, 예로서, 네이세리아 종(*Neisseria spp.*)(*N. 고노르헤아(N. gonorrhoea)* 및 *N. 메닝기티디스(N. meningitidis)*(예를 들면, 협막성 폴리사카라이드 및 그의 컨쥬게이트, 트랜스페린-결합 단백질, 락토페린 결합 단백질, PiIC, 부착소) 포함); *S. 피오겐(S. pyogenes)*(예를 들면, M 단백질 또는 그의 단편, C5A 프로테아제, 리포테이콘산), *S. 아갈락티아에(S. agalactiae)*, *S. 뮤탄스(S. mutans)*; *H. 두크레이(H. ducreyi)*; 모라셀라 종(*Moraxella spp.*)(브란하멜라 카라트할리스(*Branhamella catarrhalis*)로도 공지된 *M. 카타르할리스(M. catarrhalis)*(예: 고분자 및 저분자 아데하신 및 인바신) 포함); 보르데텔라 종(*Bordetella spp.*)(*B. 페르투스시스(B. pertussis)*(예: 페르탁틴, 페르투스시스 독소 또는 그의 유도체, 선형 해마글루틴, 아데닐레이트 사이클라제, 펌브리아에), *B. 파라페르투스시스(B. parapertussis)* 및 *B. 브론치셉티카(B. bronchiseptica)* 포함); 마이코박테리움 종(*Mycobacterium spp.*)(*M. 투베르콜로시스(M. tuberculosis)*(예: ESAT6, 안티젠 85A, -B, 또는 -C), *M. 보비스(M. bovis)*, *M. 레프라에(M. leprae)*, *M. 아비움(M. avium)*, *M. 파라튜베르콜로시스(M. paratuberculosis)*, *M. 스메그마티스(M. smegmatis)* 포함); 레지오넬라 종(*Legionella spp.*)(*L. 뉴모필라(L. pneumophila)* 포함); 에스체리치아 종(*Escherichia spp.*)(장독성 *E. 콜라이(E. coli)*(예: 집락형성 인자, 열민감독소 또는 그의 유도체, 열저항독소 또는 그의 유도체), 장출혈성 *E. 콜라이(E. coli)*, 장병원성 *E. 콜라이(E. coli)*(예: 시가 독소-양독소 또는 그의 유도체) 포함); 비브리오 종(*Vibrio spp.*)(*V. 콜레아(V. cholera)*(예: 콜레라 독소 또는 그의 유도체) 포함); 시겔라 종(*Shigella spp.*)(*S. 손네이(S. sonnei)*, *S. 디센테리아에(S. dysenteriae)*, *S. 플렉스네리아(S. flexnerii)* 포함); 에르시니아 종(*Yersinia spp.*)(*Y. 엔테로코리티카(Y. enterocolotica)*(예: Yop 단백질), *Y. 페스티스(Y. pestis)*, *Y. 슈도튜베르콜로시스(Y. psedotuberculosis)* 포함); 캄피로박터 종(*Campylobacter spp.*)(*C. 제주니(C. jejuni)*(예: 독소, 부착소 및 인바신) 및 *C. 콜라이(C. coli)* 포함); 살모넬라 종(*Salmonella spp.*)(*S. 티피(S. typhi)*, *S. 파라티피(S. paratyphi)*, *S. 콜레라에수이스(S. choleraesuis)*, *S. 엔테리티디스(S. enteritidis)* 포함); 리스테리아 종(*Listeria spp.*)(*L. 모노사이토제네스(L. monocytogenes)* 포함); 헬리코박터 종(*Helicobacter spp.*)(*H. 피로리(H. pylori)*(예: 우레아제, 카탈라아제, 공포형성 독소) 포함); 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp.*)(*P. 아에루기노사(P. aeruginosa)* 포함); 스타필로코쿠스 종(*Staphylococcus spp.*)(*S. 아우레우스(S. aureus)*, *S. 에피데미디스(S. epidermidis)* 포함); 엔테로코쿠스 종(*Enterococcus spp.*)(*E. 파에카리스(E. faecalis)*, *E. 파에시움(E. faecium)* 포함); 클로스트리디움 종(*Clostridium spp.*), *C. 테타니(C. tetani)*(예: 과상풍 독소 및 그의 유도체), *C. 보툴리눔(C. botulinum)*(예: 보툴리눔 독소 및 그의 유도체),

C. 디피실(*C. difficile*)(예: 파상풍 독소 A 또는 B 및 그의 유도체 포함); 바실러스 종(*Bacillus spp.*)(B. 안트라시스(*B. anthracis*)(예: 보툴리눔 독소 및 그의 유도체 포함); 코리네박테리움 종(*Corynebacterium spp.*)(C. 디프테리아에(*C. diphtheriae*)(예를 들면, 디프테리아 독소 및 그의 유도체 포함); 보르렐리아 종(*Borrelia spp.*)(B. 부르그도르페리(*B. burgdorferi*)(예를 들면, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 가리니이(*B. garinii*)(예를 들면, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 아프제리이(*B. afzelii*)(예를 들면, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 안데르소니이(*B. andersonii*)(예를 들면, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 헤름시이(*B. hermsii* 포함); 에를리키오시스 종(*Ehrlichia spp.*)(E. 애쿠이(*E. equi* 포함) 및 인간 과립성 애를리히아증의 인자; 리켓타시아 종(*Rickettsia spp.*)(R. 리켓타시이(*R. rickettsii* 포함); 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*)(C. 트라코마티스(*C. trachomatis*)(예를 들면, MOMP, 헤파린-결합 단백질), C. 뉴모니아에(*C. pneumoniae*)(예를 들면, MOMP, 헤파린-결합 단백질), C. 시파시(*C. psifffaci* 포함); 렙토스피라 종(*Leptospira spp.*)(L. 인터로간(*L. interrogans* 포함); 트레포네마 종(*Treponema spp.*)(T. 팔리둠(*T. pallidum*)(예를 들면, 희귀 외막 단백질), T. 덴티콜라(*T. denticola*), T. 히오디센테리아에(*T. hyodysenteriae* 포함); 또는 기생충, 예로서, 플라스모디움 종(*Plasmodium spp.*)(P. 팔시파리(*P. falciparum* 포함); 특소플라스마 종(*Toxoplasma spp.*)(T. 곤디이(*T. gondii*)(예를 들면, SAG2, SAG3, Tg34) 포함); 엔타모에바 종(*Entamoeba spp.*)(E. 히스토리티카(*E. histolytica* 포함); 바베시아 종(*Babesia spp.*)(B. 미크로티(*B. microti* 포함); 트리파노소마 종(*Trypanosoma spp.*)(T. 크루지(*T. cruzi* 포함); 기아르디아 종(*Giardia spp.*)(G. 람블리아(*G. lamblia* 포함); 레스마니아 종(*Leshmania spp.*)(L. 메이저(*L. major* 포함); 뉴모사이스티스 종(*Pneumocystis spp.*)(P. 카리니이(*P. carinii* 포함); 트리코모나스 종(*Trichomonas spp.*)(T. 바지나리스(*T. vaginalis* 포함); 스키소스토마 종(*Schisostoma spp.*)(S. 만소니(*S. mansoni* 포함), 또는 효모, 예로서, 칸디다 종(*Candida spp.*)(C. 알비칸스(*C. albicans* 포함); 크립토코쿠스 종(*Cryptococcus spp.*)(C. 네오포르만스(*C. neoformans* 포함)로부터 유래될 수 있다.

M. 투베르콜로시스(*M. tuberculosis*)에 대한 다른 항원은 예를 들면, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 및 hTCC1(WO 99/51748)이다. M. 투베르콜로시스(*M. tuberculosis*)에 대한 단백질은 또한 M. 투베르콜로시스(*M. tuberculosis*)의 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 폴리펩티드가 거대 단백질로 융합된 융합 단백질 및 그의 변이체를 포함한다. 융합의 예로서, Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI를 포함한다(WO 99/51748).

클라미디아에 대한 항원은 예를 들면, 고분자 단백질(High Molecular Protein(HWMP)(WO 99/17741), ORF3 (EP 366 412), 및 추정의 막 단백질(Pmps)을 포함한다. 백신 제형물의 다른 클라미디아 항원은 WO 99/28475에 기술된 그룹으로부터 선택될 수 있다.

박테리아 항원은 *S. 뉴모니아에*(*S. pneumoniae*)를 포함하는 스트렙토코쿠스 종(*Streptococcus spp.*)(예를 들면, 협막성 폴리사카라이드 및 그의 컨쥬게이트, PsaA, PspA, 스트렙토리신, 콜린-결합 단백질) 및 단백질 항원 뉴모리신(Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogeneis, 25, 337-342), 및 그의 뮤틴트 해독화된 유도체(WO 90/06951; WO 99/03884)로부터 유래할 수 있다. 다른 박테리아 항원은 B형 H. 인플루엔자에(*H. influenzae* type B)를 포함하는 해모필루스 종(*Haemophilus spp.*)(예를 들면, PRP 및 그의 컨쥬게이트), 난-타입페블(non-typeable) H. 인플루엔자에(*H. influenzae*), 예를 들면 OMP26, 고분자 부착소, P5, P6, 단백질 D 및 지단백질 D, 및 펌브린 및 펌브린 유도성 웹티드(US 5,843,464) 또는 그의 다중 복사 변이체 또는 융합 단백질로부터 유래한다.

B형 간염 표면 항원의 유도체는 본 분야에 잘 공지되어 있고, 그 중에서 유럽 특허 출원 EP-A-414 374; EP-A-0304 578, 및 EP198-474에 기술되어 있는 PreS1, PreS2 S 항원을 포함한다. 일면에서 HBV 항원은 HBV 폴리머라제(Ji Hoon Jeong et al, 1996, BBRC 223, 264-271; Lee H. J. et al, Biotechnol. Lett. 15, 821-826)이다. HIV-유래 항원 또한 주시되고 있고, 예를 들면, CHO 세포에서 발현될 경우, 이는 HIV-1 항원 gp120이다.

본 발명의 면역원성 조성물은 인간 유두종 바이러스로부터 유래된 항원(HPV 6a, 6b, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68), 특히 성기 사마귀의 원인이 되는 것으로 판단되는 HPV 혈청형으로부터 유래된 것(HPV 6 또는 HPV 11 등), 및 자궁경부암의 원인이 되는 HPV 바이러스로부터 유래된 것(HPV 16, HPV 18 등)을 포함할 수 있다. 적절한 HPV 항원은 E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 및 L2이다. 성기 사마귀의 예방용, 또는 치료용 융합체 형태의 일례는 L1 입자 또는 캡소미어, 및 HPV 6 및 HPV 11 단백질 E6, E7, L1, 및 L2로부터 선택되는 하나 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 융합 단백질의 예는 WO 96/26277에 기술된 L2E7, 및 WO 99/10375에 기술된 단백질D(1/3)-E7이다. HPV 자궁경부 감염 또는 암의 예방용, 또는 치료용 백신 조성물은 HPV 16 또는 18 항원을 포함할 수 있다. 예를 들면, L1 또는 L2 항원 단량체, 또는 L1 또는 L2 항원은 함께 바이러스 유사 입자(VLP)로서 제시되거나, L1 단백질만이 단독으로 VLP 또는 캡소미어 구조로 제시된다. 상기 항원, 바이러스 양 입자 및 캡소미어는 그 자체로서 공지되어 있다. 참조, 예를 들면, WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792, 및 WO 93/02184.

추가의 조기 단백질은 단독으로 또는 융합 단백질, 예로서, E7, E2 또는 E5로서 포함될 수 있고; 다른 일면에서 L1E7 융합 단백질을 포함하는 VLP를 포함한다(WO 96/11272). HPV 16 항원은 단백질 D 담체와 융합되어 HPV 16으로부터 단백질 D-E6 또는 E7 융합체를 형성하는 조기 단백질 E6 또는 E7, 또는 그의 조합물; 또는 L2와 E6 또는 E7의 조합물을 포함할 수 있다(WO 96/26277).

다르게는, HPV 16 또는 18 조기 단백질 E6 및 E7은 단일 분자, 예를 들면 단백질 D-E6/E7 융합체로 제시될 수 있다. 다른 융합체는 임의로 HPV 18로부터 E6 및 E7 단백질 중 어느 하나, 또는 둘 모두를, 예를 들면, 단백질 D-E6 또는 단백질 D-E7 융합 단백질 또는 단백질 D-E6/E7 융합 단백질의 형태로 포함한다. 융합체는 다른 HPV 균주, 예를 들면, 균주 HPV 31 또는 33으로부터의 항원을 포함할 수 있다.

말라리아를 유발시키는 기생충으로부터 유래된 항원 또한 주시되고 있다. 예를 들면, 플라스모디아 팔시파럼(*Plasmodia falciparum*)으로부터의 항원은 RTS, S 및 TRAP를 포함한다. RTS는 B형 간염 표면 항원의 preS2 부위의 4개의 아미노산을 통해 B형 간염 표면(S) 항원에 연결된 P. 팔시파럼(*P. falciparum*)의 포자소체(CS) 단백질의 모든 C-말단 부위를 실질적으로 포함하는 하이브리드 단백질이다. 그의 전체 구조는 WO 93/10152에 기술되어 있다. 효모에서 발현될 때 RTS는 지단백질 입자로 생산되고, HBV로부터의 S 항원과 함께 공발현될 때, RTS, S로서 공지된 혼합 입자로서 생산된다. TRAP 항원은 WO 90/01496에 공지되어 있다. 본 발명의 일면은 항원 제조물이 RTS, S 및 TRAP 항원의 조합물을 포함하는 융합체이다. 융합체의 성분으로서 후보 물질이 될 수 있는 다른 플라스모디아 항원은 P. 팔시파럼(*P. falciparum*) MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 시퀴스트린, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pf25, Pf28, PFS27/25, Pf16, Pf48/45, Pf230 및 플라스모디움 종(*Plasmodium spp.*)에서 그의 유사체이다.

본 원에서 용어 "면역원성 조성물"은 넓은 의미로 사용되는 바, 환자에게 투여될 때 환자의 면역 반응에 긍정적으로 작용하는 조성물을 의미한다. 면역원성 조성물은 전신 또는 국소 면역 반응, 세포성 면역 반응, 예로서, CTL 또는 체액 면역 반응을 증진시키고, 예로서, 항체를 유도하게 된다. 특히, 본 발명의 면역원성 조성물은 유효량의 항원 폴리펩티드/단백질, 예를 들면, 종양 관련 항원, 및 면역원성 그의 유도체, 예를 들면, 그의 단편, 또는 코딩 폴리누클레오티드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제형물을 언급할 수 있다. 안전하고 유효한 양은 필요한 경우 아주번트와 함께 인간에 투여될 경우, 검출가능한 면역 반응, 예로서, 체액성 반응(항체) 또는 세포성 반응을 유발하거나, 전형적인 백신의 현저한 부작용은 유발하지 않고 면역계를 면역 조절시키는 능력을 갖는 단백질의 양을 의미한다. 상기 양은 사용하는 특정 면역원의 종류 및 제시 방법에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 각 투여량으로 1-5000 μ g의 단백질, 예를 들면, 1-1000 μ g의 단백질, 예를 들면, 1-500 μ g, 예를 들면, 1-100 μ g, 예를 들면, 1 내지 50 μ g을 포함할 것이다. 대상자에서 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 특정 백신에 대한 최적량을 확인할 수 있다. 최초 백신화 후, 적절한 간격을 두고 대상자에게 하나 또는 수개의 추가 면역화를 제공할 수 있다. 백신 제조물은 일반적으로 Vaccine Design("The subunit and adjuvant approach"(eds. Powell M. F. & Newman M. J. (1995) Plenum Press New York)에 기술되어 있다. 리포좀 내로의 캡슐화는 Fullerton에 의해 US 특허 4,235,877에 기술되어 있다.

면역원성 항원 폴리펩티드는 면역분석법(예로서, ELISA 또는 T-세포 자극화 분석)에서 폴리펩티드를 발현시키는 환자로부터의 T-세포 및/또는 항혈청과 검출가능하게 반응하는 폴리펩티드를 언급한다. 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 기술을 사용하여 면역원성 활성에 대한 스크리닝을 실시할 수 있다. 예를 들면, [Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]에 기술된 것과 같은 방법을 사용하여 스크린을 실시할 수 있다. 일례로, 폴리펩티드를 고형 지지체상에 고정시키고 환자의 혈청과 접촉시켜 혈청내 항체를 고정화된 폴리펩티드와 결합시킬 수 있다. 이어서, 결합하지 못한 혈청을 제거하고, 예를 들면, ¹²⁵I-표지된 단백질 A를 사용하여 결합한 항체를 검출할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드 항원은 SDS PAGE에 의해 가시화되는 바와 같이, 예를 들면, 적어도 80% 순수, 예를 들면, 90% 순수하다. 폴리펩티드 항원은 SDS PAGE에 단일 밴드로서 출현할 수 있다.

면역원성 유도체, 예로서, 항원의 면역원성 단편 또는 일부분, 예를 들면, 종양 관련 또는 종양 특이 항원의 면역원성 단편 또는 일부분 또한 본 발명에 포함된다. 본 원에서 사용되는 바, "면역원성 단편"은 폴리펩티드를 인식하는 B-세포 및/또는 T-세포 표면 항원 수용체와 그 스스로 면역학적으로 반응성(즉, 특이적으로 결합)인 단편이다. 면역원성 일부분은 잘 공지되어 있는 기술, 예로서, [Paul, Fundamental Immunology, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993)] 및 본 원에서 참고 문헌으로서 인용되는 것에 요약되어 있는 것을 사용하여 확인할 수 있다. 상기 기술은 항원-특이 항체, 항혈청 및/또는 T-세포주 또는 클론과 반응할 수 있는 능력에 대하여 폴리펩티드를 스크리닝하는 것을 포함한다.

본 원에서 사용되는 바, 항혈청 및 항체가 특이적으로 항원에 결합한다면(즉, ELISA 또는 다른 면역분석법에서 단백질과 반응하지만, 관련없는 단백질과는 검출가능하게 반응하지 못한다) "항원-특이성"이다. 상기 항혈청 및 항체는 잘-공지되어 있는 기술을 사용하고, 본 원에 기술되어 있는 바와 같이 제조될 수 있다.

일면에서, 폴리펩티드의 면역원성 일부분은 실질적으로 전장의 폴리펩티드의 반응성보다 낮지 않은 수준으로 항혈청 및/또는 T-세포와 반응하는 일부분이다. 면역원성 일부분의 면역원성 활성 수준은 전장의 폴리펩티드에 대한 면역원성의 적어도 약 50%, 적어도 약 70%, 또는 약 90% 초과일 수 있다. 몇몇 경우, 면역원성 일부분은 상응하는 전장의 폴리펩티드의 것을 초과하는 면역원성 활성 수준, 예로서, 약 100% 또는 150% 이상의 면역원성 활성을 초과하는 면역원성 활성 수준을 갖는 것으로 확인될 것이다. 특정의 다른 일면에서, 일례의 면역원성 일부분은 N-말단 리더 서열 및/또는 막 영역이 결실된 펩티드를 포함할 수 있다. 다른 일례의 면역원성 일부분은 성숙한 단백질에 비하여 작은 N- 및/또는 C-말단 결실(예로서, 약 1-50개의 아미노산, 약 1-30개의 아미노산, 약 5-15개의 아미노산)을 포함할 것이다.

또다른 일면에서, 일례의 면역원성 조성물, 예로서, 본 발명의 백신 조성물은 상기 기술된 바와 같은 하나 이상의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하여 폴리펩티드가 동일 계내에서 생성될 수 있도록 한다. 폴리뉴클레오티드를 다양한 공지 전달 시스템내에서 투여할 수 있다. 실제로, 예로서, [Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15: 143-198, 1998] 및 본 원에서 인용된 참고 문헌에 기술된 것과 같은 다수의 유전자 전달 기술이 잘 공지되어 있다. 물론, 적절한 폴리뉴클레오티드 발현 시스템은 환자에서의 발현을 위해 필요한 조절자 DNA 조절자 서열(예로서, 적절한 프로모터 및 종결 시그날)을 포함할 것이다. 다르게는, 박테리아 전달 시스템은 그의 세포 표면상에 폴리펩티드의 면역원성 일부분을 발현시키거나 상기 에피토프를 분비하는 박테리아(예로서, 바실러스-캘메트-구에린(*Bacillus-Calmette-Guerrin*)의 투여를 포함할 수 있다.

본 발명의 일면에서, 폴리뉴클레오티드는 "네이키드(naked)" DNA, 예를 들면, [Ulmer et al., *Science* 259:1745-1749, 1993]에 기술된 것 및 [Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993]에 리뷰된 것으로서 투여/전달된다. 생체분해성 비드상에 DNA를 코팅시켜 세포내로 효율적으로 전달될 수 있도록 하여 네이키드 DNA의 흡수를 증가시킬 수 있다. 일면에서, 조성물은 진피내로 전달된다. 특히, 조성물은 예를 들면, [Haynes et al, *J Biotechnology* 44:37-42(1996)]에 기술된 것과 같이, 벡터를 비드(예: 골드)상에 코팅시킨 후 고압하에 표피내로 투여하는 것을 포함하는 유전자 총(gene gun)(특히, 입자 충격요법)에 의해 전달된다.

일례로, 가스-구동(gas-driven) 입자 가속화는 Powderject Pharmaceuticals PLC(Oxford, UK) 및 Powderject Vaccine Inc.(Madison, WI)에 의해 제조된 장치로서, 그중 일부는 U. S. 특허 번호 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; 및 EP 특허 번호 0500 799에 기술되어 있는 것을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 방법은 미립자, 예로서, 폴리뉴클레오티드의 견조 분말 형태를 핸드헬드 장치에 의해 생성되는 헬륨 가스 분출물내로 고속으로 가속화시켜 관심의 대상이 되는 표적 조직, 전형적으로 피부로 입자를 분사시키는 바늘이 없는 전달 접근법을 제공한다. 입자는 지름이 0.4-4.0 μm , 0.6-2.0 μm 인 골드 비드일 수 있고, DNA 컨쥬게이트를 그 위에 코팅시킨 후, "유전자 총"내로 위치시키기 위한 카트리지 또는 카세트에 집어 넣을 수 있다.

관련된 일면으로, 본 발명의 조성물의 가스-구동의 바늘이 없는 주입에 유용할 수 있는 다른 장치 및 방법은 Bioject, Inc. (Portland, OR)에 의해 제공된 것을 포함하고, 그의 일례는 U. S. 특허 번호 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 및 5,993,412에 기술되어 있다.

따라서, 특정 일면에서 본 원에 기술된 면역원성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현에 적절한 포유 동물 속주 세포내로 다수의 공지 바이러스-기초 시스템을 사용하여 도입한다. 예시적인 일례로, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리하고 유효한 플래폼을 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 선택된 뉴클레오티드 서열을 본 분야에 공지된 기술을 사용하여 벡터내로 삽입하거나 레트로바이러스 입자로 패킹할 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스를 분리하고 대상자에게 전달할 수 있다. 다수의 예시적인 레트로바이러스 시스템이 기술되어 있다(예: U. S. 특허 번호 5,219,740; Miller and Rosman(1989) *Bio Techniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109).

추가로, 다수의 예시적인 아데노바이러스-기초-시스템 또한 기술되어 있다. 숙주 계놈으로 통합되는 레트로바이러스와 달리, 아데노바이러스는 염색체외에 잔존함으로써 삽입 돌연변이와 관련되는 위험을 최소화시킨다(Haj-Ahmad and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1:51-58;

Berkner, K. L. (1988) Bio Techniques 6:616-629; and Rich et al. (1993) Human Gene Therapy 4:461-476). 인간은 때때로 통상의 인간 아데노바이러스 혈청형, 예로서, AdHu5,에 의해 감염되기 때문에 상당수의 사람들은 아데노바이러스에 대한 중화 항체 반응을 갖고, 이는 재조합 백신 기초 시스템에서 이질성 항원에 대한 면역 반응을 초래할 수 있다. 비인간형 영장류 아데노바이러스 벡터, 예로서, 침팬지 아데노바이러스 68(AdC68, Fitzgerald et al. (2003) J. Immunol 170 (3):1416-22)은 종래의 중화 항체 반응에 대한 단점을 갖지 않는 대체 아데노바이러스 시스템을 제공할 수 있다.

다양한 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터 시스템 또한 폴리누클레오티드 전달을 위해 개발되고 있다. 본 분야에 잘 공지되어 있는 기술을 사용하여 AAV 벡터를 용이하게 제작할 수 있다. 참조, U. S. 특허 번호 5,173,414 및 5,139,941; 국제 공개 번호 WO 92/01070 및 WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccine 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169; 및 Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 유전자 전달에 의해 전달하기에 유용한 추가의 바이러스 벡터는 폭스바이러스과, 예로서, 백시니아 바이러스 및 조류 폭스바이러스로부터 유래된 것을 포함한다. 일례로, 신규한 분자를 발현시키는 백시니아 바이러스 재조합체는 하기와 같이 제작될 수 있다. 먼저, 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 백시니아 프로모터에 인접시키고 백시니아 DNA 서열, 예로서, 티미딘 키나제(TK)를 코딩하는 서열의 측면에 위치하도록 적절한 벡터내로 삽입한다. 이어서, 상기 벡터를 사용하여, 동시에 백시니아로 감염된 세포를 형질감염시킨다. 동종 재조합을 통해 백시니아 프로모터 및 관심의 대상이 되는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 바이러스 게놈내로 삽입시킨다. 5-브로모데옥시우리딘의 존재하에 세포를 배양하고 그에 대하여 내성인 바이러스 플라크를 선택하여 생성된 TK. sup.(-) 재조합체를 선별 할 수 있다.

백시니아-기초 감염/형질감염 시스템을 용이하게 사용하여 유기체의 숙주 세포에서 본 원에서 기술된 하나 이상의 폴리펩티드의 유발가능, 일과성 발현 또는 공발현을 제공할 수 있다. 특정 시스템에서, 먼저 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제를 코딩하는 백시니아 바이러스 재조합체를 사용하여 세포를 시험관내에서 감염시킨다. 상기 폴리머라제는 T7 프로모터를 수반하는 주형만을 전사시킨다는 점에서 효과적인 특이성을 나타낸다. 감염시킨 후, T7 프로모터에 의해 유도되는, 관심의 대상이 되는 폴리누클레오티드 또는 폴리누클레오티드들을 사용하여 세포를 형질감염시킨다. 백시니아 바이러스 재조합체로부터 세포질에서 발현되는 폴리머라제는 형질감염된 DNA를 RNA로 전사시키고, 이어서, 상기 RNA는 숙주 해독 방법에 의해 폴리펩티드로 해독된다. 상기 방법을 통해 다양한 RNA를 세포질내에서 고수준으로 일과성으로 생산하고 그의 해독 산물도 생산한다. 참조, 예로서, [Elroy-Stein and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126].

다르게는, 아비폭스바이러스, 예로서, 파울폭스 및 카나리폭스 바이러스도 사용하여 관심의 대상이 되는 코딩 서열을 전달 할 수 있다. 포유 동물의 병원체로부터 면역원을 발현시키는 재조합 아비폭스 바이러스는 비조류 종에 투여될 때 방어면역을 제공하는 것으로 공지되어 있다. 아비폭스 속 구성원들은 감염되기 쉬운 오직 조류 종에서만 증식적으로 복제할 수 있고, 따라서, 포유 동물 세포에서는 비감염성이기 때문에 아비폭스 벡터의 사용은 특히 인간 및 다른 포유 동물 종에서 바람직할 수 있다. 재조합 아비폭스바이러스의 생산 방법은 본 분야에 공지되어 있고 백시니아 바이러스 생산과 관련하여 상기 기술된 유전자 재조합법을 사용한다. 참조, 예로서, WO 91/12882; WO 89/03429; 및 WO 92/03545.

다수의 알파바이러스 벡터 또한 본 발명의 폴리누클레오티드 조성물 전달에 사용될 수 있고, 예로서, U. S. 특허 번호 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 및 6,015,694에 기술된 벡터를 포함한다. 베네주엘라 말 뇌염(VEE)에 기초하는 벡터 또한 사용할 수 있고, 그의 예시적 일례는 U. S. 특허 번호 5,505,947 및 5,643,576에서 찾아볼 수 있다.

항원 웹티드를 코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 예방학적 또는 치료학적 유효량과 같은 양으로 투여한다. 투여하고자 하는 양은 입자-매개 전달에 대하여 1 피코그램 내지 16 밀리그램, 1 피코그램 내지 10 마이크로그램 범위, 누클레오티드의 다른 경로에 대하여 용량당 10 마이크로그램 내지 16 밀리그램 범위일 수 있다. 정확한 양은 면역화시키고자 하는 환자의 체중 및 투여 경로를 고려하여 달리할 수 있다.

네이키드 폴리누클레오티드 또는 벡터를 환자에 도입시키는 적절한 기술은 적절한 비허클을 사용하는 국소 적용을 포함한다. 핵산은 피부, 또는 점막 표면으로, 예를 들면, 비강내, 경구, 질내 또는 직장내 투여를 통해 국소 투여될 수 있다. 네이키드 폴리누클레오티드 또는 벡터는 약제학적 허용가능한 부형제, 예로서, 인산염 완충처리된 염수(PBS)와 함께 존재할 수

있다. DNA 흡수는 별도의 또는 DNA 제형내 포함된 촉진제, 예로서 부피바카인을 사용하여 추가로 촉진될 수 있다. 핵산을 직접 수용체에게 투여하는 다른 방법은 US 5,697,901에 기술된 미세접종법(microseeding), 전기 천공법, 전기 자극법 및 초음파 방법을 포함한다.

핵산 작제물의 흡수는 수개의 공지된 형질감염 기술, 예를 들면, 형질감염제의 사용을 포함하는 것에 의해 증진될 수 있다. 상기 약제의 예로서, 양이온제, 예를 들면, 인산칼슘 및 DEAE-덱스트란 및 리포펙틴트, 예를 들면, 리포펙탐 및 트랜스펙팀을 포함한다. 투여하고자 하는 핵산의 투여량은 변경될 수 있다.

또다른 일면에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 항체, 또는 혈청, 또는 항체 영역, 예로서, Fab 및 F(ab')2 단편을 포함한다. 항체는 모노클로날 항체 또는 그의 단편일 수 있다. 유효량은 전형적으로, 환자 체중 1kg당 100 μ g 내지 500 mg, 예를 들면 1 mg 내지 50 mg이다. 따라서, 본 발명의 방법은 수동적 면역치료법 또는 수동적 면역예방법을 포함한다.

본 발명의 면역원성 조성물 및 IL-18 폴리펩티드는 다수의 경로, 예로서, 근육내, 피하, 복강내 또는 정맥내로 전달될 수 있다.

본 발명에 따른 IL-18 폴리펩티드 또는 생체활성 단편은 주로 Th1형의 면역 반응을 유도하는 것이다. 고수준의 Th1형 사이토카인(예로서, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-12, IL-18 등)은 투여된 항원에 대한 세포 매개 면역 반응을 촉진시키는 경향을 갖는다. 대조적으로, 고수준의 Th2형 사이토카인(예로서, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10)은 체액 면역 반응을 촉진시키는 경향을 갖는다. 사이토카인 패밀리에 대한 리뷰를 위해 [Mosmann and Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989]를 참조하라. "IL-18" 또는 "IL-18 폴리펩티드"는 EP 0692536, EP 0712931, EP 0767178 및 WO 97/2441에 기술된 바와 같은 IL-18 폴리펩티드를 의미한다. IL-18 폴리펩티드 유도체 또는 변이체는 전장의 서열번호: 6 및 서열번호: 7, 각각에 대하여 도 1에 도시한 서열번호: 6(인간 IL-18) 또는 서열번호: 7(뮤린IL-18)의 것과 적어도 70% 일치, 적어도 80% 일치, 적어도 90% 일치, 적어도 95% 일치, 적어도 97-99% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 포함한다. 상기 폴리펩티드는 서열번호: 6 및 서열번호: 7, 각각의 아미노산을 포함하는 것을 포함한다. IL-18 폴리펩티드는 서열번호: 6 및 서열번호: 7에 기술한 아미노산 서열일 수 있다. IL-18의 생물학적(항원성 또는 면역원성) 활성, 예로서, IFN- γ 의 유도를 나타낼 수 있는 IL-18의 단편으로서 IL-18 단편 또한 주시되고 있다. IL-18 생체활성 단편을 사용할 수 있고, IL-18 면역원성 단편을 사용할 수 있다.

IL-18 폴리펩티드는 성숙한 단백질 형태일 수 있거나, 거대 단백질, 예로서, 용합 단백질의 일부분일 수 있다. 잔기가 유사성질(like characteristics)을 갖는 또다른 것에 의해 치환된 보존 아미노산 치환을 통해 변이된 폴리펩티드로서 IL-18 변이체 또한 주시되고 있다. 전형적인 치환은 Ala, Val, Leu 및 Ile중; Ser 및 Thr중; 산성 잔기 Asp 및 Glu중; Asn 및 Gin중; 염기성 잔기 Lys 및 Arg; 또는 방향족 잔기 Phe 및 Tyr중에 있다. 예를 들면, 수개의, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 또는 1개의 아미노산이 조합되어 치환, 결실 또는 첨가된 변이체를 포함한다. IL-18 생체활성 단편 또한 주시되고 있다. "생체활성 단편"은 실질적으로 전장의 IL-18과 동일한 생체활성을 보유하고 있는 IL-18의 단편을 의미한다. 생체활성은 하기의 성질을 의미한다: 자연살(NK) 세포 활성 및 Th1 세포 반응 강화(NK; NKT 세포의 활성화, 활성화된 T 세포의 증식 유도), 항-혈관형성 활성, 활성화된 NK, NKT 세포 및 T 세포상의 Fas 리간드 발현 증진, 활성화된 NK, NKT 세포 및 T 세포, IFNg, GM-CSF 및 다른 사이토카인, 예를 들면, Th1형의 생산 증가, 선천성 면역 및 Th1-및 Th2-매개 반응 둘 모두를 자극시키는 능력.

특히, IL-18의 생체활성 단편은 시험관내에서 KG-1 분석 시스템에 의해 측정되는 바, IFNg의 생산을 증가시키는 능력을 보유하고 있는 단편이다. 인간 IL-18 수용체를 발현시키는 인간 골수단핵구 세포주(KG-1)는 IFNg의 생산(분비)(ELISA에 의해 측정) 및 NfKB의 활성화를 증가시켜 IL-18을 사용하는 치료에 대하여 반응할 것이다(Matsuko Taniguchi et al. J. Immunological Methods, 1998, 217, 97-102).

본 발명에 따른 IL-18 폴리펩티드는 적절한 방식으로 제조될 수 있다. 분리된 자연발생 폴리펩티드, 재조합 또는 합성적으로 생산된 폴리펩티드 등을 포함한다. 제조 방법은 본 분야에서 잘 이해되고 있다.

본 발명에 따른 면역원성 조성물은 유리하게 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다. 담체 분자는 수개 형태로 담체 유기체, 예로서, 생 박테리아 베터 또는 박테리아 담체 균주, 물, 염수, 또는 면역자극성 화학물질을 포함할 수 있다. 담체는 물, 염수, 또는 다른 완충처리된 생리학적 용액일 수 있다. 담체 분자는 또한 다공성 폴리머 입자, 예로서, 마이크로비드 또는 나노입자, 및 금속 염 입자, 예로서, 수산화알루미늄, 인산알루미늄 또는 인산칼슘, 또는 인산마그네슘, 인산철, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 황산칼슘, 수산화마그네슘, 또는 이중 염, 예로서, 인산암모늄철, 인산칼륨철, 인산칼슘철, 탄산칼슘마그네슘, 또는 상기 염의 믹스를 포함할 수 있다.

본 원에서 제공하는 바와 같은 조합 제조물 투여시 환자는 Th1- 및 Th-2형 반응을 포함하는 면역 반응을 지원할 것이다.

본 발명에 따른 면역원성 조성물 및 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 생체활성 단편 또는 변이체는 예로서, 근육내, 피하, 복강내 또는 정맥내의 다수의 경로를 통해 전달될 수 있다.

항원성 펩티드를 코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 백터는 예방학적 또는 치료학적 유효량으로 투여된다. 투여하고자 하는 양은 일반적으로 1 피코그램 내지 16 밀리그램, 예를 들면, 입자-매개 전달에 대하여 1 피코그램 내지 10 마이크로그램 범위, 누클레오티드의 다른 경로에 대하여 용량당 10 마이크로그램 내지 16 밀리그램 범위이다. 정확한 양은 면역화시키고자 하는 환자의 체중 및 투여 경로를 고려하여 달리할 수 있다.

네이키드 폴리누클레오티드 또는 백터를 환자에 도입시키는 적절한 기술은 적절한 비히클을 사용하는 국소 적용을 포함한다. 핵산은 피부, 또는 점막 표면으로, 예를 들면, 비강내, 경구, 질내 또는 직장내 투여를 통해 국소 투여될 수 있다. 네이키드 폴리누클레오티드 또는 백터는 약제학적으로 허용가능한 부형제, 예로서, 인산염 완충처리된 염수(PBS)와 함께 존재할 수 있다. DNA 흡수는 별도의 또는 DNA 제형내 포함된 촉진제, 예로서, 부피바카인을 사용하여 추가로 촉진될 수 있다. 핵산을 직접 수용체에게 투여하는 다른 방법은 US 5,697,901에 기술된 미세접종법, 전기 천공법, 전기 자극법 및 초음파 방법을 포함한다.

핵산 작제물의 흡수는 수개의 공지된 형질감염 기술, 예를 들면, 형질감염제의 사용을 포함하는 것에 의해 증진될 수 있다. 상기 약제의 예로서, 양이온체, 예를 들면, 인산칼슘 및 DEAE-덱스트란 및 리포펙坦트, 예를 들면, 리포펙坦 및 트랜스펙팀을 포함한다. 투여하고자 하는 핵산의 투여량은 변경될 수 있다.

본 발명에 따른 IL-18 폴리펩티드 또는 생체활성 단편은 주로 Th1의 면역 반응을 유도하는 것이다. 고수준의 Th1형 사이토카인(예로서, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-12, IL-18 등)은 투여된 항원에 대한 세포 매개 면역 반응을 촉진시키는 경향을 갖는다. 대조적으로, 고수준의 Th2형 사이토카인(예로서, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10)은 체액 면역 반응을 촉진시키는 경향을 갖는다. 사이토카인 패밀리에 대한 리뷰를 위해 [Mosmann and Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989]를 참조하라. 표준 에세이를 사용하여 이들 사이토카인의 수준을 용이하게 평가할 수 있다. "IL-18" 또는 "IL-18 폴리펩티드"는 EP 0692536, EP 0712931, EP0767178 및 WO 97/2441에 기술된 바와 같은 IL-18 폴리펩티드를 의미한다. IL-18 폴리펩티드 유도체 또는 변이체는 전장의 서열번호: 1 및 서열번호: 2, 각각에 대하여 도 1에 도시한 서열번호: 1(인간 IL-18) 또는 서열번호: 2(뮤린IL-18)의 것과 적어도 70% 일치, 적어도 80% 일치, 적어도 90% 일치, 적어도 95% 일치, 적어도 97-99% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 포함한다. 상기 폴리펩티드는 서열번호: 1 및 서열번호: 2, 각각의 아미노산을 포함하는 것을 포함한다. IL-18 폴리펩티드는 서열번호: 1 및 서열번호: 2에 기술한 아미노산 서열일 수 있다. IL-18의 생물학적(항원성 또는 면역원성) 활성, 예로서, IFN- γ 의 유도를 나타낼 수 있는 IL-18의 단편으로서 IL-18 단편 또한 주시되고 있다. IL-18 생체활성 단편을 사용할 수 있고, IL-18 면역원성 단편을 사용할 수 있다.

IL-18 폴리펩티드는 성숙한 단백질 형태일 수 있거나, 거대 단백질, 예로서, 융합 단백질의 일부분일 수 있다. 잔기가 양성질을 갖는 또 다른 것에 의해 치환된 보존 아미노산 치환을 통해 변이된 폴리펩티드로서 IL-18 변이체 또한 주시되고 있다. 전형적인 치환은 Ala, Val, Leu 및 Ile중; Ser 및 Thr중; 산성 잔기 Asp 및 Glu중; Asn 및 Gin중; 염기성 잔기 Lys 및 Arg; 또는 방향족 잔기 Phe 및 Tyr중에 있다. 예를 들면, 수개의, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 또는 1개의 아미노산이 조합되어 치환, 결실 또는 첨가된 변이체를 포함한다.

본 발명에 따른 IL-18 폴리펩티드는 적절한 방식으로 제조될 수 있다. 분리된 자연발생적 폴리펩티드, 재조합 또는 합성적으로 생산된 폴리펩티드 등을 포함한다. 제조 방법은 본 분야에서 잘 이해되고 있다.

본 원에서 제공하는 바와 같은 조합 제조물 투여시 환자는 Th1- 및 Th-2형 반응을 포함하는 면역 반응을 지원할 것이다.

본 발명의 일면에서, 면역원성 조성물은 추가로 또다른 애주번트, 예를 들면, 주로 Th1형의 면역 반응을 유도하는 것을 포함한다. TH-1 유도성 애주번트는 리포폴리사카라이드 유도 애주번트, 예로서, 엔테로박테리아 리포폴리사카라이드(LPS), 3D-MPL, 콜레스테롤, 및 CpG 올리고누클레오티드 또는 2개 이상의 상기 애주번트의 혼합물을 포함하는 애주번트 그룹으로부터 선택될 수 있다. 주로 Th1형 반응을 유도하는 애주번트는 예를 들면, 알루미늄 염과 모노포스포릴 지질 A, 예를 들면, 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A의 조합물을 포함할 수 있다. MPLs 애주번트는 Corixa Corporation(Seattle, WA; 참조, 예를 들면, US 특허 번호 4,436, 727; 4,877,611; 4,866,034 및 4,912,094)로부터 이용 가능하다.

일면에서, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 추가로 면역자극성 CpG 올리고누클레오티드를 포함한다.

CpG-포함 올리고누클레오티드(CpG 디누클레오티드는 비메틸화되어 있다)도 주로 Th1 반응을 유도한다. 상기 올리고누클레오티드는 잘 공지되어 있고 예를 들면, WO 96/02555, WO 99/33488 및 U. S. 특허 번호 6,008,200 및 5,856,462에 기술되어 있다. 면역자극성 DNA 서열 또한 예를 들면, [Sato et al., *Science* 273:352, 1996]에 기술되어 있다.

CpG's는 전신 및 점막 경로에 의해 투여될 때 아주번트인 것으로서 공지되어 있다(WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., *J.Immunol*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie and Davis, *J.Immunol*, 1998, 161(9):4463-6). CpG는 DNA에 존재하는 시토신-구아노신 디누클레오티드 모티프에 대한 약어이다. 실제, BCG의 DNA 분획이 항-종양 효과를 발휘하는 것으로 관찰되었다. 추가의 연구에서, BCG 유전자 서열로부터 유도된 합성 올리고누클레오티드는 면역자극성 효과를 유도할 수 있는 것으로 나타났다(시험관내 및 생체내). 상기 연구의 담당자는 중심 CG 모티프를 포함하는 특정 앞뒤역순 상동 서열(palindromic sequence)이 상기 활성을 수반한다고 결론지었다. 이후, 면역자극화에서의 CG 모티프의 주요 역할이 Krieg에 의해 [Nature 374, p546, 1995]의 공개 문헌에서 입증되었다. 상세한 분석을 통해 CG 모티프는 특정 서열 문맥으로 존재하여야 하고, 상기 서열은 박테리아 DNA에는 보편화되어 있지만, 척추 동물의 DNA에서는 희귀한 것임을 알게 되었다. 면역자극성 서열은 주로 푸린, 푸린 C, G, 피리미딘, 피리미딘(여기에서, 디누클레오티드 CG 모티프는 메틸화되지 않고, 다른 메틸화되지 않은 CpG 서열은 면역자극성인 것으로 공지되어 있고 본 발명에서 사용될 수 있다)이다.

6개의 누클레오티드의 특정 조합물에서 앞뒤역순 상동서열이 존재한다. 한개의 모티프의 반복으로서 또는 상이한 모티프의 조합물로서 수개의 모티프가 동일한 올리고누클레오티드에 존재할 수 있다. 올리고누클레오티드를 포함하는 하나 이상의 면역자극성 서열의 존재가 자연살 세포(인터페론 γ 를 생산하고 세포융해 활성을 갖는다) 및 마크로파지를 포함하는 다양한 면역 서브세트를 활성화시킬 수 있다(Wooldridge et al Vol 89 (no. 8), 1977). 현재, 이 공통 서열을 갖지 않는 서열을 포함하지 않는 다른 메틸화되지 않은 CpG이 면역조절성인 것으로 밝혀졌다.

본 발명에 따라 사용하기 위한 올리고누클레오티드는 적어도 3개, 적어도 6개 이상의 누클레오티드에 의해 분리되는 2개 이상의 디누클레오티드 CpG 모티프를 포함할 수 있다. 본 발명의 올리고누클레오티드는 데옥시누클레오티드일 수 있다. 일면에서, 포스포디에스테르 및 다른 인터누클레오티드 결합이 혼합형 인터누클레오티드 결합을 포함하는 본 발명의 범주 내에 포함되지만 올리고누클레오티드 중 인터누클레오티드는 포스포로디티오에이트, 또는 포스포로티오에이트 결합이다. 포스포로티오에이트 올리고누클레오티드 또는 포스포로디티오에이트의 생산 방법은 US 5,666,153, US 5,278,302 및 WO 95/26204에 기술되어 있다.

올리고누클레오티드의 일례는 하기 서열을 갖는다. 서열은 포스포로티오에이트 변형된 인터누클레오티드 결합을 포함할 수 있다.

올리고 1 (서열번호: 3): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

올리고 2 (서열번호: 4): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

올리고 3 (서열번호: 5): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

올리고 4 (서열번호: 6): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 7909으로도 공지되어 있는 CpG 2006)

올리고 5 (서열번호: 7): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

대체 CpG 올리고누클레오티드는 그에 대한 하찮은(inconsequential) 결실 또는 첨가를 갖는다는 점에서 상기 서열을 포함할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 CpG 올리고누클레오티드는 본 분야에 공지되어 있는 방법(예: EP 468520)에 의해 합성될 수 있다. 통상적으로 상기 올리고누클레오티드는 자동 합성기를 사용하여 합성될 수 있다.

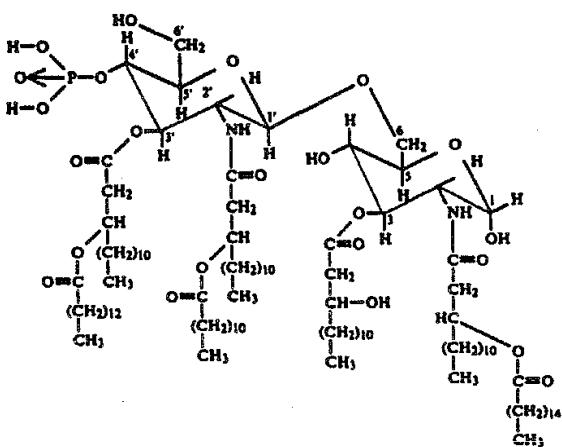
본 발명에서 사용되는 올리고누클레오티드는 데옥시누클레오티드일 수 있다. 일면에서, 포스포디에스테르가 본 발명의 범주내에 포함되지만, 올리고누클레오티드 내 인터누클레오티드 결합은 포스포로디티오에이트, 또는 포스포로티오에이트 결합이다. 상이한 인터누클레오티드 결합을 포함하는 올리고누클레오티드, 예로서 혼합형 포스포로티오에이트 포스포디에스테르가 주시되어 있다. 올리고누클레오티드를 안정화시키는 다른 인터누클레오티드 결합을 사용할 수 있다.

백신으로 제형화될 때 CpG는 일반적으로 유리 항원과 함께 유리 용액으로 투여되거나(WO 96/02555; McCluskie and Davis, 상기와 동일) 항원에 공유결합으로 컨쥬게이션되거나(PCT 공개 번호 WO 98/16247), 담체, 예로서, 수산화알루미늄과 제형화된다((간염 표면 항원) Davis et al. 상기와 동일; Brazolot-Millanet al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95 (26), 15553-8).

증강 제형은 사포닌 유도체와 CpG-포함 올리고누클레오티드의 조합물, 특히, WO 00/09159 및 WO 00/62800에 기술되어 있는 CpG 및 QS21의 조합물을 포함할 수 있다. 상기 제형은 추가로 수중유 에멀젼 및 토코페롤을 포함할 수 있다. 따라서, 추가의 일면에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 임의로 수중유 에멀젼에서 제형화된 CpG 올리고누클레오티드 및 사포닌, 예를 들면 QS21의 조합물을 포함할 수 있다. 제형은 임의로 추가적으로 3D-MPL® 애주번트를 포함할 수 있다. WO 96/33739에 기술된 바와 같이, QS-21은 콜레스테롤에 의해 억제된 반응원성이 감소된 조성물중에서 제공될 수 있다.

또 다른 일면에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 추가로 엔테로박테리아 리포폴리사카라이드 유도 애주번트, 예를 들면, 모노포스포릴 지질 A, 예를 들면, 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A를 포함한다.

엔테로박테리아 리포폴리사카라이드(LPS)는 그의 독성 효과에 의해 애주번트중 그의 사용이 감축되지만, 상기는 면역계의 효능있는 자극제라고 오래전에 공지되었다. 환원-말단 글루코사민으로부터 포스페이트 및 코어 카보하이드레이트 그룹의 제거를 통해 생산된 LPS의 비독성 유도체인 모노포스포릴 지질 A(MPL)는 Ribi 등(1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419)에 의해 기술되었고 상기는 하기 구조를 갖는다:

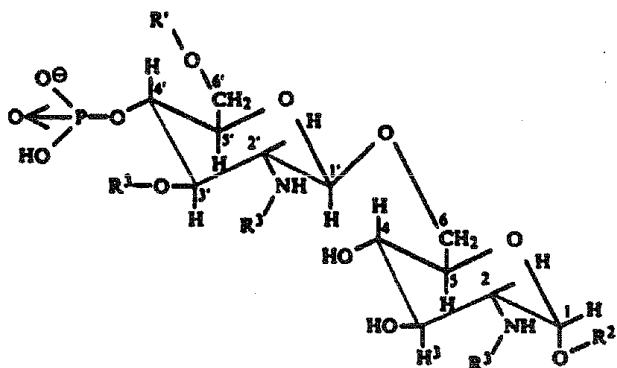


디사카라이드 백본의 3번 위치로부터 아실 사슬을 제거하여 MPL의 추가적인 해독화된 버전을 수득하고, 상기는 3-O-탈아실화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)로 명명된다. GB 212220 4B에 교시된 방법에 의해 정제하고 제조할 수 있고, 상기 문헌에는 디포스포릴 지질 A, 및 그의 3-O-탈아실화된 변이체의 제조 방법 또한 기술되어 있다. 3D-MPL은 지름이 0.2 μm 미만인 작은 입자 크기를 갖는 에멀젼의 형태로 존재할 수 있고, 제조 방법은 WO 94/21292에 기술되어 있다. 모노포스포릴 지질 A 및 계면활성제를 포함하는 수성 제형은 WO 98/43670 A2에 기술되어 있다.

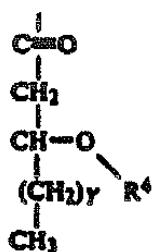
본 발명의 애주번트 조합물로 제형화되는 박테리아 리포폴리사카라이드 유도 애주번트를 박테리아 소스로부터 정제하고 프로세스할 수 있거나, 다르게는, 합성물일 수 있다. 예를 들면, 정제된 모노포스포릴 지질 A는 [Ribi et al., 1986 (상기와 동일)]에 기술되어 있고, 살모넬라 종(*Salmonella spp.*)로부터 유래된 3-O-탈아실화된 모노포스포릴 또는 디포스포릴 지질 A는 GB 2220211 및 US 4912094에 기술되어 있다. 다른 정제된 리포폴리사카라이드 및 합성 리포폴리사카라이드는 기술되어 있다(WO 98/01139; US 6,005,099 및 EP 0 729 473 B1; Hilgers et al., 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4):392-6; Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1):141-6; 및 EP 0 549 074 B1). 박테리아 리포폴리사카라이드 애주번트는 US 6,005,099 및 EP 0 729 473 B1에 기술된 3D-MPL 및 $\beta(1-6)$ 글루코사민 디사카라이드를 포함할 수 있다.

따라서, 본 발명에서 사용할 수 있는 LPS 유도체는 구조상 LPS 또는 MPL 또는 3D-MPL의 것과 유사한 면역자극물질이다. 본 발명의 또 다른 일면에서, LPS 유도체는 상기 MPL 구조의 하위 부분인 아실화된 모노사카라이드일 수 있다.

디사카라이드 애주번트의 일례는 하기 화학식의 정제되거나 합성된 지질 A이다:



(상기 식에서, R^2 는 H 또는 PO_3H_2 일 수 있고; R^3 은 아실 사슬 또는 β -하이드록시미리스토일 또는 하기 화학식을 갖는 3-아실옥시아실 잔기이고:



여기에서, $R^4 = -C(=O)-(CH_2)_X-CH_3$ 이고;

X 및 Y는 0 내지 약 20 이하의 값을 갖는다).

3D-MPL 및 퀴라자 사포나리아 모리나(Quillaja Saponaria molina)의 나무껍질로부터 유래된 사포닌 애주번트의 조합물이 EP 0 761231B에 기술되어 있다. WO 95/17210에는 면역자극물질 QS21과 함께, 임의로 3D-MPL과 함께 제형화되는, 스쿠알렌, α-토코페롤, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(TWEEN 80)에 기초한 애주번트 에멀젼 시스템이 기술되어 있다.

따라서, 또다른 일면에서, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 (1) 항원 또는 그의 면역원성 단편 및 (2) 예를 들면, 콜레스테롤로 약화(quench)된 형태의 QS21과 같은 사포닌과 예를 들면, CpG 면역자극성 올리고누클레오티드, 3D-MPL, 및 수중유 에멀젼을 포함하는 리스트로부터 선택되는 하나 이상의 애주번트의 조합물을 포함한다.

일면에서, 면역원성 조성물은 모노포스포릴 지질 A와 사포닌 애주번트의 조합물, 예로서, 3D-MPL® 애주번트와 WO 94/00153에 기술된 바와 같은 QS21, 또는 WO 96/33739에 기술된 바와 같은, QS21이 콜레스테롤로 약화된 반응성이 감소된 조성물과의 조합물을 포함한다. 다른 제형은 QS-21외에 수중유 에멀젼 및 토코페롤을 포함할 수 있다. 수중유 에멀젼 중 QS21, 3D-MPL® 애주번트 및 토코페롤의 조합물을 사용하는 또다른 제형은 WO 95/17210에 기술되어 있다. 따라서, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 3D-MPL® 애주번트와 함께 항원, 예를 들면, 종양 관련 항원, 사포닌 애주번트, 예를 들면, QS-21을 포함하고, 임의로 QS-21외에 수중유 에멀젼 및 토코페롤을 포함한다. 예를 들면, QS21은 콜레스테롤로 약화된다.

또다른 제형은 WO 00/09159 및 WO 00/62800에 기술되어 있는 CpG 및 QS21의 조합물과 같은 사포닌 유도체와 CpG-포함 올리고누클레오티드의 조합물을 포함한다. 상기 제형은 추가로 수중유 에멀젼 및 토코페롤을 포함할 수 있다. 따라

서, 추가의 일면에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 임의로 수중유 에멀젼중에서 제형화된 사포닌, 예를 들면 QS21, 및 CpG 올리고누클레오티드의 조합물을 포함할 수 있다. 제형은 임의로 추가적으로 3D-MPL® 애주번트를 포함할 수 있다. QS-21은 WO 96/33739에 기술된 바와 같이, 콜레스테롤로 약화되어 반응성이 감소된 조성물에서 제공될 수 있다.

다르게는, 본 발명에 따른 면역원성 조성물중 사포닌 애주번트는 키토산 또는 다른 다중양이온 폴리머로 구성된 백신 비히클, 폴리락타이드 및 폴리락타이드-코-글리콜라이드 입자, 폴리-N-아세틸 글루코사민-기초 폴리머 매트릭스, 폴리사카라이드 또는 화학적으로 변형된 폴리사카라이드로 구성된 입자, 리포좀 및 지질-기초 입자, 글리세롤 모노에스테르로 구성된 입자 등과 함께 조합될 수 있다. 사포닌을 또한 콜레스테롤의 존재하에 제형화시켜 리포좀 또는 ISCOM과 같은 미립자 구조를 형성할 수 있다. 추가로, 사포닌은 폴리옥시에틸렌 에테르 또는 에스테르와 함께, 비-미립자 용액 또는 혼탁제로, 또는 미립자 구조, 예로서, 소충판(paucilamellar) 리포좀 또는 ISCOM으로 제형화될 수 있다. 사포닌을 또한 Carbopol®과 같은 부형제와 함께 제형화하여 점성을 증가시키거나, 락토즈와 같은 분말 부형제를 사용하여 건조 분말 형태로 제형화시킬 수 있다.

백신 및 면역원성 조성물은 단위-투여 또는 다중-투여 용기, 밀봉된 앰플 또는 바이알에 존재할 수 있다. 상기 용기를 밀폐시켜 사용시까지 제형의 멸균성을 보존시킬 수 있다. 일반적으로, 제형을 혼탁제, 용액 또는 유성 또는 수성 비히클중 에멀젼로서 저장할 수 있다. 다르게는, 백신 또는 면역원성 조성물을 사용직전 멸균 액상 담체의 첨가만을 요하는 냉동-건조 상태에서 저장할 수 있다.

면역원성 조성물 및 백신에서 다양한 전달 비히클을 사용하여 종양 세포를 표적화하는 항원-특이 면역 반응의 유발을 촉진시킬 수 있다. 본 발명의 일면에 따라, 본 원에 기술된 면역원성 조성물은 항원 제시 세포(APCs), 예로서, 가지 세포, 마크로파지, B 세포, 단핵구 및 유효한 APCs로 공학처리될 수 있는 다른 세포를 통해 숙주로 전달된다. APCs 세포는 필요로 하지는 않지만, 유전적으로 변형되어 항원 제시 능력을 증가시킬 수 있고, T 세포의 활성화 및/또는 유지를 개선시킬 수 있고, 그 자체로 항-종양 효과를 갖고/거나 수용체와 면역학적으로 적합성(즉, 적합성 HLA 일배체형(haplotype))일 수 있다. APCs는 일반적으로 다양한 생물학적 체액 및 장기, 예로서 종양 및 종양 주변 조직으로부터 분리될 수 있고, 자가, 동종이형, 동계 또는 이종 세포일 수 있다.

본 발명의 특정 일면에서 항원-제시 세포로서 가지 세포 또는 그의 전구세포를 사용한다. 가지 세포는 고도의 효능을 갖는 APCs이고(Banchereau J. & Steinman R. M., Nature, 1998, 392:245-251) 예방학적 또는 치료학적 항종양 면역을 유도하는 생리학적 애주번트로서 효능이 있는 것으로 나타났다(참조, Timmerman J.M. and Levy R., Ann. Rev. Med, 1999, 50:507-529). 일반적으로, 가지 세포는 그의 전형적인 성상(동일계내에서 별 모양, 시험관에서 가시화될 수 있는 현저한 세포질 돌기(가지돌기) 포함), 고도한 효율성으로 항원을 흡수하고, 처리하고 제시하는 능력 및 순수한(naive) T 세포 반응을 활성화시키는 능력에 기초하여 확인할 수 있다. 가지 세포는 물론 생체내 또는 생체외의 가지 세포상에서 통상 발견되지 않는 특이 세포-표면 수용체 또는 리간드를 발현시키도록 공학처리될 수 있고, 상기 변형된 가지 세포는 본 발명에 의해 주시되고 있다. 가지 세포의 대체 물질로서, 분비된 소포체 항원-로딩 가지 세포(액소솜으로 명명됨)가 백신 내에서 사용될 수 있다(참조, Zitvogel L. et al., Nature Med., 1998, 4:594-600). 따라서, 면역자극물질 제형물, 예를 들면, 본 원에 기술된 바와 같이 시험관내에서 폴리펩티드가 로딩되어 변형되거나, 본 원에 기술된 바와 같이 시험관내에서 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 유전자적으로 변형된 유효량의 가지 세포 또는 항원 제시 세포, 및 약제학적으로 유효한 담체를 제공한다.

가지 세포 및 전구세포를 말초 혈액, 골수, 종양-침윤성 세포, 종양 주위 조직-침윤성 세포, 림프절, 지라, 피부, 제대혈 또는 다른 적절한 조직 또는 체액으로부터 수득할 수 있다. 예를 들면, 사이토카인, 예로서, GM-CSF, IL-4, IL-13 및/또는 TNF α 의 조합물을 말초 혈액으로부터 채취된 단핵구 배양물에 가하여 가지 세포를 생체외에서 분화시킬 수 있다. 다르게는, 배양 배지에 GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 리간드, 리포폴리사카라이드 LPS, fit3 리간드 및/또는 가지 세포의 분화, 성숙 및 증식을 유도하는 다른 화합물(들)의 조합물을 가하여 말초 혈액, 제대혈 또는 골수로부터 채취된 CD34 양성 세포를 분화시킬 수 있다. 가지 세포는 통상 "미성숙" 및 "성숙" 세포로서 분류되고, 이는 2개의 잘 특징화된 표현형 사이를 식별할 수 있는 단순한 방법이다. 그러나, 이러한 명명법은 가능한 모든 중간 단계의 분화를 제외하여서는 안된다. 미성숙 가지 세포는 항원 흡수 및 프로세싱에 대한 고도의 수용능을 갖는 APC로서 특징화되고, 이는 Fc γ 수용체 또는 만노스 수용체의 고도한 발현과 관련된다. 성숙한 표현형은 전형적으로 이를 마커의 발현은 낮지만, T 세포 활성화의 원인이 되는 세포 표면 분자, 예로서, I형 및 II형 MHC, 부착 분자(예로서, CD54 및 CD11) 및 공자극성 분자(예로서, CD40, CD80, CD86 및 4-1BB)는 고도로 발현시키는 것으로써 특징화된다.

APCs를 일반적으로 종양 단백질(예: MAGE-3, Her2/neu, 또는 그의 유도체)을 코딩하는 폴리누클레오티드로 형질감염시켜 종양 폴리펩티드, 또는 그의 면역원성 일부분을 세포 표면상에서 발현되도록 한다. 생체외에서 형질감염될 수 있고,

이어서 상기의 형질감염된 세포를 포함하는 조성물 또는 백신을 본 원에 기술된 바와 같이 치료적 목적을 위해 사용할 수 있다. 다르게는, 가지 또는 다른 항원 제시 세포를 표적하는 유전자 전달 비히클을 환자에게 투여하여 생체내에서 형질감염될 수 있도록 할 수 있다. 생체내 및 생체외에서 가지 세포의 형질감염은 일반적으로 예를 들면, 본 분야에 공지되어 있는 방법, 예로서, WO 97/24447에 공지되어 있는 것, 또는 [Mahvi D.M. et al., Immunology and Cell Biology, 1997, 75:456-460]에 기술된 유전자 총 접근법을 사용하여 실시할 수 있다. 가지 세포 또는 전구 세포를 종양 폴리펩티드, DNA (네이키드 또는 플라스미드 벡터내) 또는 RNA; 또는 항원-발현 재조합 박테리아 또는 바이러스(예로서, 백시니아, 파울폭스, 아데노바이러스 또는 렌티바이러스 벡터)와 함께 배양하여 가지 세포의 항원 로딩을 실시할 수 있다.

다른 적절한 전달 시스템은 항원 물질을 생체분해성 폴리머/마이크로스피어내로 혼입하거나 그와 컨쥬케이션시켜 항원 물질이 적절한 약제학적 담체와 혼합될 수 있고 백신으로서 사용할 수 있는 마이크로스피어를 포함한다. 용어 "마이크로스피어"는 실질적으로 구형이고 그의 지름 범위가 10nm 내지 2mm인 콜로이드성 입자를 기술하기 위하여 통상 사용된다. 광범위한 천연 및 합성 폴리머로부터 제조되는 마이크로스피어는 다양한 생의학적 적용에서 사용될 수 있다. 전달 시스템은 특히, 효능을 제공하기 위해서 다중 요법을 요하는 생체내에서 짧은 반감기를 갖거나, 그의 상대적 높은 분자량 때문에 생물학적 체액중에서 불안정하거나 전체적으로 위장관으로부터 흡수되지 않는 단백질에 대하여 잇점을 갖는다. 수개의 폴리머는 단백질 방출을 위한 매트릭스로서 기술되어 있다. 적절한 폴리머는 젤라틴, 콜라겐, 알기네이트, 텍스트란을 포함한다. 전달 시스템은 생체분해성 폴리(DL-락트산)(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜라이드)(PLG), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(ϵ -카프로락톤)(PCL), 및 코폴리머 폴리(DL-락트-코-글리콜산)(PLGA)를 포함할 수 있다. 다른 시스템은 이종 하이드로겔, 예로서, 친수성 폴리-(에틸렌 글리콜) (PEG) 및 소수성 폴리(부틸렌 테레프탈레이트)(PBT), 또는 폴리(에틸렌 글리콜)-테레프탈레이트/폴리(-부틸렌 테레프탈레이트)(PEGT/PBT)에 기초한 반복 블록을 포함하는 폴리(에테르 에스테르) 멀티블록 코폴리머를 포함할 수 있다(Sohier et al. Eur. J. Pharm and Biopharm, 2003, 55, 221-228). 시스템, 예로서, PLGA, PLA 및 PEGT/PBT는 1 내지 3개월동안 지효성 방출을 제공할 수 있다.

치료 요법은 관심의 대상이 되는 환자의 종 및 크기, 투여하는 핵산 백신 및/또는 단백질 조성물의 양, 투여 경로, 사용하는 애주번트 화합물의 효능 및 투여량 및 의사진에게 자명한 다른 요소에 따라 현저하게 달라질 것이다.

추가로 하기의 비제한적인 실시예를 참고하여 본 발명을 설명한다:

실시예

실시예 I

QS-21-기초 면역원성 조성물을 사용하는 백신 제조

I.1.-수중유 에멀젼중 QS21 & 3 테-O-아실화 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)를 포함하는 면역원성 제조물(AS02 제형):

애주번트 시스템 AS02는 앞서 WO 95/17210에 기술되어 있다.

3D-MPL은 그람(-) 박테리아 살모넬라 민네소타(*Salmonella minnesota*)의 리포폴리사카라이드(LPS)로부터 유래된 면역자극물질이다. MPL은 탈아실화되고 지질 A 부위상에는 포스페이트 그룹이 결여되어 있다. 상기 화학적 요법은 면역자극성 성질을 유지시키면서 독성을 현저하게 감소시킨다(Ribi, 1986). Ribi Immunochemistry는 MPL을 생산하여 SB-Biologicals에 공급한다.

QS21은 남미 나무 퀴라자 사포나리아 모리나(*Quillaja Saponaria molina*)의 나무껍질로부터 추출된 천연 사포닌 분자이다. 나무껍질의 미정제 추출물로부터 각개의 사포닌을 분리하기 위하여 개발된 정제 기술을 통해 모 성분과 비교하여 독성이 저하되고 애주번트 활성이 강화된 것으로 입증된 트리테르펜 글리코시드인 특정의 사포닌, QS21을 분리할 수 있다. QS21은 I형 MHC 제한 CTLs를 수개의 서브유닛으로 활성화시키고, Ag 특이 림프구 성장을 자극시키는 것으로 제시되었다(Kensil, 1992). Aquila(이전 Cambridge Biotech Corporation)는 QS21을 생산하여 SB-Biologicals에 공급한다.

유/수 에멀젼은 2개의 오일(토코페롤 및 스쿠알렌)로 구성된 유기상, 및 유화제로서 Tween 80을 포함하는 PBS의 수성상으로 구성되어 있다. 에멀젼은 5% 스쿠알렌 5% 토코페롤 0.4% Tween 80으로 구성되고 그의 평균 입자 크기는 180nm이고 SB62로도 공지되어 있다(참조, WO 95/17210).

에멀젼 SB62의 제조(2배 농축):

Tween 80을 인산염 완충처리된 염수(PBS)에 용해시켜 PBS중 2%의 용액을 수득하였다. 100ml의 2배 농축 에멀젼을 제공하기 위하여, 5g의 DL 알파 토코페롤 및 5ml의 스쿠알렌을 와동시켜 철저하게 혼합하였다. 90ml의 PBS/Tween 용액을 가하고 철저하게 혼합시켰다. 이어서, 생성된 에멀젼을 주사기를 통해 통과시키고 마지막으로 M110S 미세유체화 기기를 사용하여 미세유체화시켰다. 생성된 오일 소적의 크기는 대략 180nm이었다.

제법:

유/수 에멀젼중 3D-MPL 및 QS21을 포함하는 통상의 제법을 하기와 같이 실시하였다: 임의로 CpG 올리고누클레오티드 (100 μ g) 및 방부제로서의 1 μ g/ml 티오메르살을 포함하여, SB62(50 μ l), MPL(20 μ g), QS21(20 μ g)을 연속적으로 가하기 전에 20 μ g-25 μ g C-LytA P2-P501S를 10배 농축된 PBS pH 6.8 및 H₂O중에서 희석시켰다. 각 성분의 양은 필요에 따라 달라질 수 있다. 모든 인큐베이션은 교반시키면서 실온에서 수행하였다.

I.2.-리포좀 제형중 QS21 & CpG를 포함하는 면역원성 제조물(AS15 애주번트):

애주번트 시스템 AS15은 앞서 WO 00/62800에 기술되어 있다.

AS15는 2개의 애주번트 시스템, AS01B 및 AS07A의 신규한 조합물이다. AS01 B는 3D-MPL 및 QS21을 포함하는 리포좀으로 구성되고, AS07A는 인산염 완충처리된 염수중 CpG 7909(CpG 2006으로 공지됨)로 구성되어 있다.

QS-21은 상기 기술된 바와 같다.

CpG: CpG ODN 7909는 길이가 24개의 염기로 되어 있는 합성 단일 가닥 포스포로티오에이트 올리고데옥시-누클레오티드(ODN)이다. 5'-TCGTCGTTTG-TCGTTTGTCGTT-3'인 염기 서열을 인간 면역계 자극을 위해 최적화시켰다. CpG DNA 또는 CpG를 포함하는 합성 ODN이 가지 세포, 단핵구 및 마크로파지를 활성화시켜 TH1-유사 사이토카인을 분비시키고 세포용해 T 세포의 생성을 포함하는 TH1 T 세포 반응을 유도하고 NK 세포를 자극시켜 IFNg를 분비하고 그의 용균 활성을 증가시키고, B 세포를 활성화시켜 종식시킨다(Krieg A et al. 1995 Nature 374:546, Chu R et al. 1997 J. Exp. Med. 186:1623). CpG 7909는 인간 게놈의 공지 서열에 대한 안티센스는 아니다. CpG 7909는 Coley Pharmaceutical Group, Inc.(MA, US)에 의해 개발되고 그를 대신하여 생산되는 사유의 애주번트이다.

CpG와의 제형화:

주사 당일 제형화를 실시하였다. 1마리의 마우스에 대한 주사량은 50 또는 100 μ l이었다. 리포좀중 CpG, 3D-MPL 및 QS21을 포함하는 통상의 제형화를 하기와 같이 실시하였다: 20 μ g-25 μ g의 항원을 H₂O 및 등장력을 위해 PBS(pH 7.4)로 희석하였다. 5분 후, 중량비 1/5의 QS21/콜레스테롤 중 리포좀과 혼합된 QS21(0.5 μ g)(DQ로서 언급됨)을 제형에 가하였다. 30분 후, 방부제로서 1 μ g/ml의 티오메르살을 첨가하기 30분 전에 10 μ g의 CpG(ODN 2006)를 가하였다. 교반시키면서 실온에서 인큐베이션시켰다.

실시예 II

E7-Tg 마우스 및 비 E7-Tg 마우스의 TC1 치료학적 모델에서 AS02로 애주번트화된 HPV16 단백질 D-E7과 조합된 mIL18의 효능

II. 1. 실험 디자인

7개 그룹의 5마리의 암컷 E7 Tg(C. Ledent et al. PNAS (USA) 1990, 87: 6176-6180) 또는 비 Tg C57B1/6(Iffa Credo) 마우스를 0일째 200 μ l 중 10e6 TC1 세포(SC)로 종양 시험감염시켰다.

HPV16 E7 단백질을 발현시키는 트랜스제닉 마우스:

IRIBHN(ULB)에서 M. Parmentier 및 C. Ledent에 의해 트랜스제닉 마우스 균주를 제조하였다. (Ref: PNAS (USA) 1990, 87: 6176-6180). 트랜스제닉 마우스는 출생시부터 E7 HPV16 유전자와 함께 살고 있기 때문에 상기 유전자에 대하여 "내성"인 것으로 판단되고: 이러한 상황하에서 HPV 16로부터의 E7은 "자가 항원"으로서 판단된다. 트랜스진의 발현

은 티로글로불린 프로모터에 의해 추진시켰다. 티로글로불린은 구조적으로 갑상샘에서만 발현되기 때문에 E7을 갑상샘에서 발현시켰다. 이러한 발현의 결과로서, 갑상샘 세포는 증식되고, 마우스는 6개월 내지 1년 후 침윤성 암으로 발달할 수 있는 갑상샘종 및 결절을 발생시켰다.

종양 세포주 TC1:

C57BL/6 마우스로부터의 원발성 폐 상피 세포를 HPV 16 E6 및 E7에 의해 무한증식시킨 후, 활성화된 ras 온코진으로 형질전환시켜 E6 및 E7를 발현시키는 종양성 세포주를 생산하였다(Lin KY et al. 1996). 마우스 항-HPV 16 E7 Mab (Triton Corp. Alameda, CA)를 사용하여 고정 및 침투성(permeabilised) TC1 세포의 FACS 분석에 의해 E7 발현을 확인하였다.

백신: WO 99/10375에 기술된 바와 같이 제조된, AS02B 애주번트(1/5th의 인간 투여량(MPL 20 μ g/QS21 20 μ g/SB62 50 μ l))를 포함하는 QS-21에서 애주번트화된 5 μ g의 PD1/3E7(PDE7 배취 02/025)을 포함하는 백신을 7일 및 14일째 근육내(IM)에 투여하였다.

표준 IL18-mIL-18(배취_SB-528775 lot MJG-28800-176, 1mg/ml)을 3주동안(7일째 개시) 매일 100 μ l으로 S.C. 투여하였다.

II. 2. 생체내 종양 성장:

시험관내 배양액에서 증식된 TC1 세포를 트립신으로 처리하고 무혈청 배지에서 2회 세척하고 마우스의 우측 측복부에 S.C. 주사하였다. 확립된 종양의 치료를 평가하기 위하여 TC1 세포를 1 X 10e6 세포/마우스의 용량으로 주사하였다. 종양 세포 주사 후 1 및 2주째, 마우스를 WO 99/10375에 기술된 바와 같이 제조된, AS02 애주번트를 포함하는 QS-21에서 애주번트화된 5 μ g의 protD 1/3 E7 His를 100 μ l로 또는 PBS만으로 마우스를 IM 백신화시켰다. 각 그룹당 5마리의 마우스를 사용하였다.

마우스 그룹

-gr1: PBS

-gr2: PDE7 AS02B

-gr3: PDE7 AS02B + 100 μ g mIL-18

-gr4: PDE7 AS02B + 1 μ g mIL-18

-gr5: PDE7 AS02B + 0.1 μ g mIL-18

-gr6: 1 μ g mIL18

-gr7: 0.1 μ g mIL 18

5주(35일째까지)동안 생체내 종양 성장에 대하여 마우스를 2주에 한번 관찰하였다. 35일째 혈청학(Ig tot 및 이소형)을 분석하였다. 평균 종양 질량/그룹(각 그룹 5마리에 대하여 mm²로 표시함)을 도 2(대조군 비 Tg 마우스) 및 도 3(E7 Tg 마우스)에 제시한다. 도 2A는 1 μ g의 IL-18을 사용하여 수득한 결과를 나타내고, 도 2B는 100 μ g의 IL-18을 사용하여 수득한 결과를 나타낸다. 도 3A는 1 μ g의 IL-18을 사용하여 수득한 결과를 나타내고, 도 3B는 100 μ g의 IL-18을 사용하여 수득한 결과를 나타낸다.

하기 표 1에 IL-18의 반복적 주사와 함께 병용하여 백신화시켰을 경우 또는 병용하지 않고 백신화시켰을 경우 그의 종양을 완전하게 거부하는 마우스의 퍼센트를 요약하고, 이로써 백신 및 고투여량의 IL 18을 조합하는 것에 대한 잇점을 제시한다.

표 1

마우스 그룹	완전 퇴행율(%) 대조군 마우스	완전 퇴행율(%) E7Tg 마우스
PBS	0	0
PDE7 + AS02B	20	0
PDE7 + AS02B 0.1 μ g IL 18	20	0
PDE7 + AS02B 1 μ g IL 18	0	0
PDE7 + AS02B 100 μ g IL 18	100	100
0.1 μ g mIL 18	0	0
1 μ g mIL 18	0	0
100 μ g mIL 18 (이전 실시예로부터)	20	0

II. 3. 결론

본 실험을 통해 수득한 결과는 하기를 입증한다:

- 대조군의 비 트랜스제닉 및 E7Tg 마우스 둘 모두에서는 QS21-포함 AS02B로 애주번트화된 E7 백신과 IL-18을 조합하는 것이 종양 퇴행에 대하여 효능을 갖는다.
- 시험 감염 후 종양이 없는 상태인 유일한 마우스 그룹은 백신 및 IL18 둘 모두를 투여받은 것이다.
- 조합에 대한 효능 또한 투여량에 의존적이다.

II. 4 혈청학-면역학적 해독

항체 반응 및 이소형 프로파일(혼주혈청상에서)을 Elisa에 의해 하기 기술되는 바와 같은 코팅 항원으로서 PD1/3E7-16 (02/025)을 사용하여 측정하였다. 장기 채취시 동일한 시점에 각개의 혈청을 채취하고 간접 ELISA를 수행하였다. 2 μ g/ml의 정제된 E7 단백질을 코팅된 항원으로서 사용하였다. 37°C에서 1시간동안 PBS 0. 1% tween 20 1% BSA중에서 포화 시킨 후, 혈청을 포화 완충액중에서 연속 흐석시키고(1/100에서 개시) 37°C에서 90분동안 인큐베이션시켰다. PBS Tween 20 0.1%에서 세척한 후, 바이오티닐화된 염소 항 마우스 Ig(1/5000) 또는 염소 항-마우스Ig 서브클래스(총 IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) 항혈청(1/5000)을 제 2 항체로서 사용하고, 37°C에서 90분동안 인큐베이션시킨 후, 페옥시다제에 커플링된 스트렙타비딘을 가하고 TMB(테트라-메틸-벤지딘/페옥사이드)를 기질로서 사용하였다. 10분 후, 반응을 0.5M H₂SO₄로 종결시키고 O.D.450를 측정하였다. 도 4에 대조군의 비 Tg 마우스로부터 수득한 결과를 나타내고, 도 5에는 E7 Tg 마우스로부터 수득한 결과를 나타낸다.

II. 5 결론

IL-18만을 투여받은 대조군 마우스에서는, 예상했던 바와 같이 E7-특이 항체가 검출되지 않았다. 그룹과 상관없이 전체 Ig 반응에서는 어떠한 차이도 발견되지 않았다. IL-18의 첨가는 특히 백신과의 조합될 때 고투여량에서 TH1 이소형 프로파일을 개선시키는 경향을 갖고 있다.

E7Tg 마우스에서는 IL-18 투여량과 E7에 대한 항체 수준 사이에 역(inverse) 관계가 존재하는 것처럼 보였다. IL-18의 첨가는 이소형 프로파일에 대하여 중요한 효과를 나타내지 않았다.

II. 6. 전체적인 결론

- IL-18은 그 스스로 투여량 의존 방식으로 TC1 종양 성장에 대하여 작용을 하고;
- 대조군 및 E7Tg 마우스 둘 모두에서, 특히, 고투여량의 mIL-18(100 μ g)을 조합하여 주사하고 E7 + AS02B 백신화와 병용하는 것이 TC1 종양 성장에 대하여 효능을 갖고;

· IL-18은 백신화에 의해 유도되는 항체 반응에 대하여 조금 작용을 한다(대조군 마우스에 우수한 TH1 이소형 프로파일 및 E7Tg 마우스에서 우수한 역가).

실시예 III

TC1 Her2 치료학적 모델에서 AS15로 애주번트화된 Her2/neu 백신과 조합된 mIL18의 효능

III. 1. 실험 디자인

백신

Her-2/neu 백신은 ECD-PhD이고 전체 세포외영역(아미노산 1-645 포함) 및 인산화 영역을 포함하는 세포내 영역중 면역원성 부위를 포함한다. 상기 백신 작제물은 WO 00/44899에 기술되어 있고 dHER2로 명명된다.

H₂O, 사카로스 및 NaH₂PO₄/K₂HP0₄의 믹스중 항원을 희석하여 dHER2 단백질을 CpG와 함께 동결건조시켰다. 5분 후, 동결건조시키기 전에, CpG ODN 7909을 가하여 625μ g/ml의 Her2neu, 1250μ g/ml의 CpG, 3.15% 사카로스 및 5 mM PO₄(pH 7)를 포함하는 최종 벌크를 수득하였다. 3일 주기에 따라 최종 벌크를 동결건조시켰다. 즉석 제조를 위해 CpG 및 항원을 포함하는 동결건조된 케이크를 100μg/ml의 MPL 및 DQ를 포함하는 625μl의 AS01B 희석제로 재현탁시켰다.

동물에 25μg의 Her2/neu, 50μg의 CpG 및 5μg의 MPL 및 DQ를 포함하는 50μl의 것을 주사하였다.

HER-2/neu를 발현시키는 종양 모델

본 실험에서 종양 모델을 사용하였다: HER-2/neu를 코딩하는 재조합 레트로바이러스로 TC1 세포(Dr T. C. Wu John's Hopkins University Baltimore 제공)를 레트로바이러스 형질도입시켜 TC1 HER2를 제조하였다. 각각의 클론을 분리하고 증식시키고 HER-2/neu의 안정성 및 I형 MHC 발현을 유세포분석에 의해 확인하였다.

마우스 그룹:

4개 그룹의 5마리의 암컷 CB6F1 마우스에 0일째 2x10e6 TC1 Mage3 세포를 피하로(SC) 시험감염시킨 후,

-gr1: PBS

-gr2: 7일 내지 27일동안 매일 100μg의 mIL18(뮤린) 주사(SC)

-gr3: 7일 내지 14일째 AS15중 25μg의 dHER2 단백질(IM)

-gr4: 백신 및 mIL18의 조합물로 백신화시켰다.

II. 2. 생체내 종양 성장 및 사망율

결과를 도 6 및 표 2에 나타낸다.

표 2: TC1HER2 종양 시험감염 후 27일째 종양이 제거된 마우스의 퍼센트

PBS	0%
mIL 18	20%(사망률: 2/5)
dHER2/AS15	0%
dHER2/AS15 mIL 18	60%(2/50에서 소량의 종양이 발생)

II.3. 결론

백신 조성물 또는 IL-18만을 사용한 백신화 전략법과 비교할 때 뮤린 재조합체 IL-18의 반복 주사와 병용하여 애주번트(AS15)중에서 제형화된 정제된 재조합 HER-2/neu 단백질(dHER2)을 사용하는 것에 기초한 백신 전략법이 HER2/neu 항원을 발현시키는 사전-확립된 종양에 대한 개선된 결과를 초래하였다. 앞서, AS15 애주번트 중에서 제형화된 재조합 dHER 단백질에 기초한 백신화는 HER2/neu 항원을 발현시키는 종양 세포를 사용한 시험감염에 대하여 마우스를 매우 효과적으로 보호하는 것으로 나타났다. 상기 보호는 HER2/neu 항원에 대하여 특이적이고 장기간의 면역 기억을 유도하는 것과 관련된다. 종양이 사전-확립된 더욱 엄격한 치료적 모델에서 백신화는 성장성 종양에 대하여 오직 제한된 효과만을 갖는 바, 효능이 보다 적은 것으로 나타났다(마우스는 상기 조건에서 종양을 완전하게 거부시키지 못했다). 그러나, 놀랍게도, 양 치료법을 동시에 수행할 경우, 상승 효과가 관찰되었고, 60%의 마우스에서는 완전하게 종양이 없는 상태였고, 단지 40%에서만 소량의 종양이 발생되었다. 결론적으로, 표 2에 나타낸 바와 같이 IL-18 및 백신을 조합하는 것이 확실히 이롭다. 백신에 의한 HER2/neu 특이 T 세포 반응의 유도 및 IL-18의 반복적 주사에 의해 면역계의 활성화가 종양을 퇴행시키는데 중요하다는 것을 의미할 수 있다.

실시예 IV

TC1 Mage3 치료학적 모델에서 애주번트화된 MAGE-3 백신과 조합된 mIL18의 효능

III. 1. 실험 디자인

백신

Mage3을 코딩하는 DNA 플라스미드(PcDNA3 Mage3)의 통상의 형질감염을 통해 TC1 모 세포를 유전적으로 변형시켜 Mage3 종양 항원을 발현시키는 종양 모델을 생산하였다(TC1 Mage3). 상기 종양 모델은 모 TC1 세포(T. C. Wu at John's Hopkins University, Baltimore에 의해 제공됨)를 Mage3을 코딩하는 PcDNA3 플라스미드로 형질감염시켜 생산할 수 있다. 키트 제공자의 권고에 따라 리포펙타민을 사용하여 형질감염을 실시하였다(Gibco BRL Life Technologies, cat no 18324-012).

상기 세포는 종양발생성이고 2 10e6 TC1 Mage3 세포로 시험감염된 100%의 마우스가 종양을 발생시켰다.

4개 그룹의 5마리의 암컷 C57BL/6 마우스에 0일째 2x10e6 TC1 Mage3 세포를 피하로(SC) 시험감염시킨 후,

-gr1: PBS

-gr2: 7일 내지 27일동안 매일 100 μ g의 mIL18(뮤린)을 주사(SC)

-gr3: 7일 내지 14일째 AS15중 10 μ g의 Mage3 단백질(IM)

-gr4: 백신 및 mIL18의 조합물로 백신화시켰다.

AS15중 Mage3의 백신화, IL18 주사 및 병용 요법의 종양 퇴행을 유도하는 능력을 평가하였다. 면역 파라미터에 대한 백신화 및/또는 IL18 요법의 효능(림프세포증식, 사이토카인 생산...) 또한 평가하였다.

도면

도면1A

IL-18 폴리펩티드

1A 인간 IL-18 폴리펩티드 서열

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Asp Ile Ile Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

도면1B

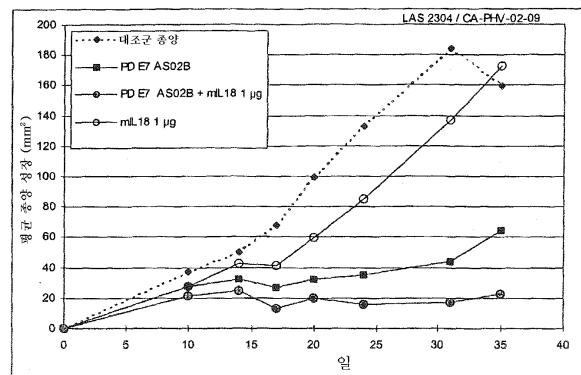
1B 뮤린 IL-18 폴리펩티드 서열

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80
 Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95
 Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
 100 105 110
 Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
 115 120 125
 Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
 130 135 140
 Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 145 150 155

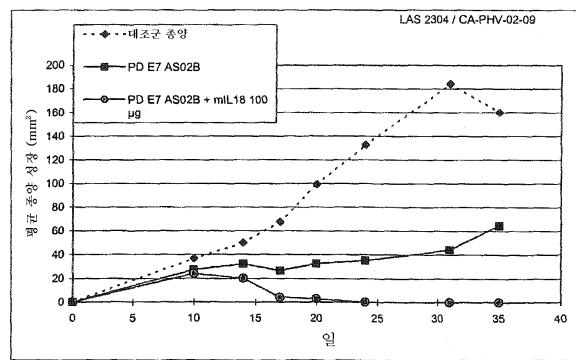
도면2

대조군 비 Tg 마우스에서 생체내 종양 성장

2A - IL-18 1 µg + E7 + AS02 으로 백신화



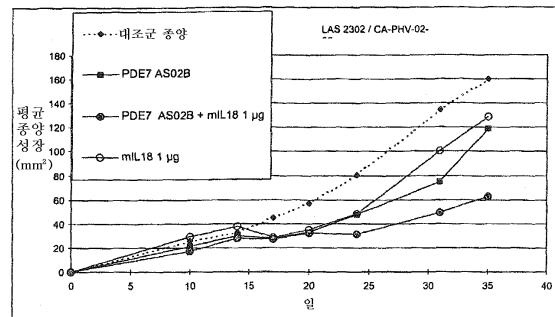
2B - IL-18 100 µg + E7 + AS02 으로 백신화



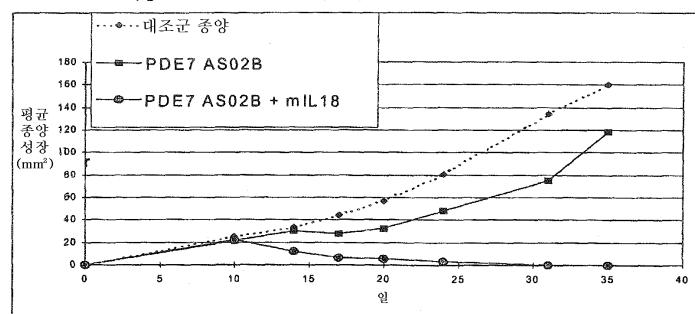
도면3

E7 Tg 마우스에서 생체내 종양 성장

3A - IL-18 1 µg + E7 + AS02으로 백신화



3B - IL-18 100 µg + E7 + AS02으로 백신화

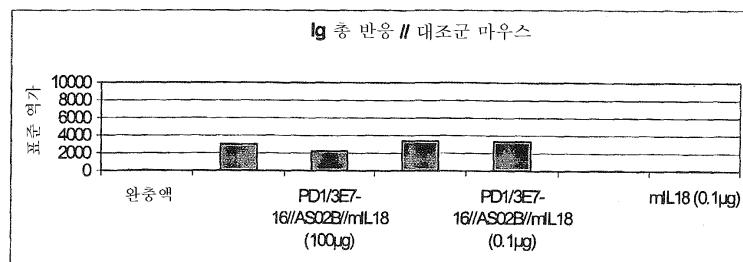


도면4

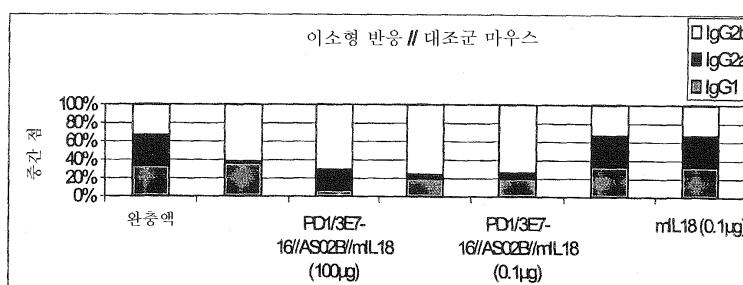
대조군 비 Tg 마우스에서 항체 반응 및 이소형 프로파일

4A - 항체 반응

총 Ig 반응 (표준 역가는 EU/ml로 표시됨)

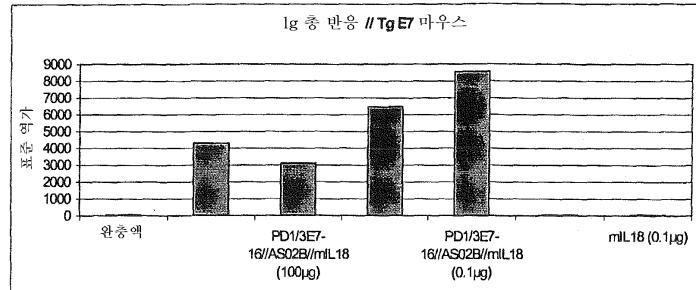


4B - 이소형 프로파일

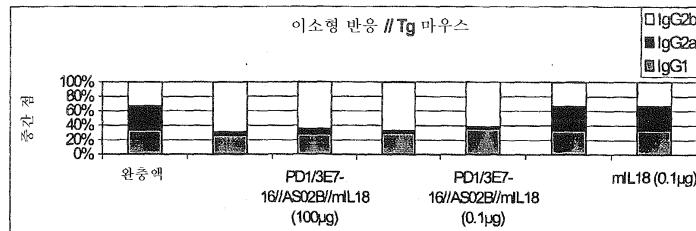


도면5

E7 Tg 마우스에서 항체 반응 및 이소형 프로파일

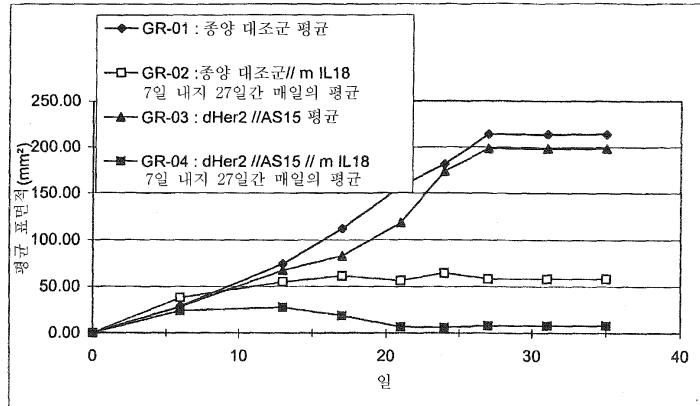
5A - 항체 반응
총 Ig 반응 (표준 역가는 EU/ml로 표시됨).

5A - 이소형 프로파일



도면6

TCI Her2 치료 모델에서 생체내 종양 성장



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

Bruck, Claudine

Gerard, Catherine

Jonak, Zdenka

<120> Immunogenic compositions

<130> vb60528

<140> PCT/EP2004/011620

<141> 2004-10-11

<150> GB0323965.4

<151> 2003-10-13

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 157

<212> PRT

<213> homo sapiens IL-18

<400> 1

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1															

5															

10															

15															

Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
20															

25															

30															

Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
35															

40															

Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
50															

55															

60															

Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65															

70															

75															

80															

Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
85															

90															

95															

Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
100														

105															

110															

Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
115														

120															

Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
130															

135															

140															

Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp
145												

150												

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn
155															

1	5	10	15												
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met
20				25								30			
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile
35				40							45				
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser
50				55					60						
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile
65				70				75				80			
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser
	85				90						95				
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu
	100				105						110				
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu
	115				120						125				
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
	130				135						140				
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser			
	145				150						155				

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CpG 1826

<400> 3
tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CpG 1758

<400> 4
tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CpG sequence

<400> 5

accgatgacg tcgcccgtga cggcaccacg	30
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG 2006 also known as CpG 7909	
<400> 6	
tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt	24
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG 1668	
<400> 7	
tccatgacgt tcctgatgct	20