(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월13일
(11) 등록번호 10-2674807
(24) 등록일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/54 (2024.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/5434 (2013.01)
A61K 38/208 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7031904(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년12월11일
심사청구일자 2022년10월14일
(85) 번역문제출일자 2022년09월15일
(65) 공개번호 10-2022-0132652
(43) 공개일자 2022년09월30일
(62) 원출원 특허 10-2021-7021512
원출원일자(국제) 2012년12월11일
심사청구일자 2021년07월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/069017
(87) 국제공개번호 WO 2013/090296
국제공개일자 2013년06월20일
(30) 우선권주장
61/569,600 2011년12월12일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
PNAS, vol. 100, no. 3, p.1163~1168(2003)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨빅 센터 불러바드 3600
(72) 발명자
위너, 데이비드, 비
미국 19066 펜실베니아주 메리온 비컴 레인 717
모로우, 매튜, 피
미국 19004 펜실베니아주 발라 신위드 메이플 애비뉴 7
양, 지앙
미국 19083 펜실베니아주 하버타운 클래마 애비뉴 213
(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

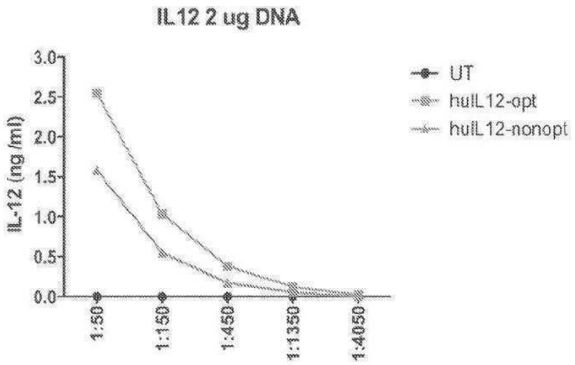
전체 청구항 수 : 총 46 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **개선된 IL-12 유전적 컨스트럭트 및 백신을 포함하는 조성물, 면역치료제 및 이를 이용하는 방법**

(57) 요 약

IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열 및/또는 IL-12 p40 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자 및 조성물이 개시된다. 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 핵산 분자 및 조성물이 또한 개시된다. 면역 반응을 조절하는 방법 및 면역원에 대항하여 면역 반응을 유도하는 방법이 개시된다. 치료적 및 예방적 예방접종 방법이 또한 개시된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 38/2086 (2013.01)
A61K 39/00114 (2023.05)
A61P 31/04 (2018.01)
C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C12N 2710/10043 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 상기 단편은 IL-12 p35 시그널 펩타이드가 결핍된 상기 IL-12 p35 서브유닛인, 상기 최적화된 핵산 서열, 및

b) L-12 p40 서브유닛 또는 그의 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 상기 단편은 IL-12 p40 시그널 펩타이드가 결핍된 상기 IL-12 p40 서브유닛인, 상기 최적화된 핵산 서열

을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 조성물로서,

상기 IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하거나, 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2의 단편에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 단편이고;

상기 IL-12 p40 서브유닛 또는 그의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하거나, 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4의 단편에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 단편인,

조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하고,

IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 것인, 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하고,

상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 것인, 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2를 인코딩하고,

상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4를 인코딩하는 것인, 조성물.

청구항 5

청구항 2에 있어서,

상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하고,

상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 것인, 조성물.

청구항 6

청구항 2에 있어서,

상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:2를 인코딩하고,

IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:4를 인코딩하는 것인, 조성물.

청구항 7

청구항 2에 있어서,

상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 95% 동일한 단백질을 인코딩하고,

상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 95% 동일한 단백질을 인코딩하는 것인, 조성물.

청구항 8

청구항 2에 있어서,

상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:2를 인코딩하고,

IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:4를 인코딩하는 것인, 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 전기천공을 사용하여 개체에 전달하기 위해 제형된, 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 핵산 분자 상에 있고, 상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 상이한 핵산 분자 상에 있는 것인, 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 플라스미드 상에 있고 상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 상이한 플라스미드 상에 있는 것인, 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열 및 상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 동일한 핵산 분자 상에 있는 것인, 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열 및 상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 동일한 플라스미드 상에 있는 것인, 조성물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열 및 상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 동일한 핵산 분자 상에 있고 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 조성물.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열 및 상기 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 동일한 플라스미드 상에 있고 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 조성물.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 17

청구항 1에 있어서, HIV, HPV, HCV, 인플루엔자, 천연두, 치쿤군야, 발 및 입 질환 바이러스, 말라리아, 인간 사이토메갈로바이러스, 인간 호흡 신사이티알 바이러스, 및 MRSA로 이루어진 그룹으로부터 선택된 병원체로부터의 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 18

청구항 1에 있어서, 상기 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열 및 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 바이러스 입자에 통합되는 것인, 조성물.

청구항 19

청구항 1에 있어서, IL-15 및 IL-28로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 이상의 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 20

청구항 1에 있어서,

a) 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2의 단편에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p35의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열, 및

b) 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4의 단편에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p40의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

a) 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2의 단편에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p35의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열, 및

b) 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4의 단편에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p40의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 22

청구항 20에 있어서,

a) 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2의 단편을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p35의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열, 및

b) 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4의 단편을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p40의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 23

청구항 20에 있어서,

a) 서열번호:1에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:2의 단편을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p35의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열, 및

b) 서열번호:3에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:4의 단편을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p40의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 24

청구항 20에 있어서,

a) 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 IL-12 p35 서브유닛 신호 펩타이드의 코딩 서열이 없는 서열번호:2의 단편에 대해 적어도 95% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p35의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열,

및

b) 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 IL-12 p40 서브유닛 신호 펩타이드의 코딩 서열이 없는 서열번호:4의 단편에 대해 적어도 95% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p40의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 25

청구항 20에 있어서,

a) 서열번호:1에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:2의 단편을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p35의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열, 및

b) 서열번호:3에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:4의 단편을 인코딩하는 핵산 서열인, IL-12 p40의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 26

청구항 1에 있어서,

a) IL-12 p35 서브유닛 신호 펩타이드의 코딩 서열이 없고 비(non)-IL-12 p35 신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 연결하는 서열번호:1의 단편, 및/또는

b) IL-12 p40 서브유닛 신호 펩타이드의 코딩 서열이 없고 비(non)-IL-12 p40 신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 연결하는 서열번호:3의 단편

을 포함하는, 조성물.

청구항 27

청구항 20에 있어서,

a) IL-12 p35 서브유닛 신호 펩타이드의 코딩 서열이 없고 비(non)-IL-12 p35 신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 연결하는 서열번호:1의 단편, 및/또는

b) IL-12 p40 서브유닛 신호 펩타이드의 코딩 서열이 없고 비(non)-IL-12 p40 신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 연결하는 서열번호:3의 단편

을 포함하는, 조성물.

청구항 28

개체에서 면역 반응을 유도하는데 효과적인 양으로 면역원을 인코딩하는 핵산 서열과 조합된 청구항 1의 조성물을 포함하는, 면역원에 대항하여 면역 반응을 유도하기 위한 조성물.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 30

청구항 28에 있어서, 면역 반응이 치료적 또는 예방적인 조성물.

청구항 31

청구항 29에 있어서, 면역 반응이 치료적 또는 예방적인 조성물.

청구항 32

a) IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 상기 단편은 IL-12 p35 시그널 펩타이드가 결핍된 상기 IL-12 p35 서브유닛인, 상기 최적화된 핵산 서열, 및

b) L-12 p40 서브유닛 또는 그의 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 상기 단편은 IL-12 p40 시그널 펩타이드가 결핍된 상기 IL-12 p40 서브유닛인, 상기 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 핵산 분자로서,

상기 IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하거나, 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2의 단편에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 단편이고;

상기 IL-12 p40 서브유닛 또는 그의 상기 단편을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열은 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하거나, 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4의 단편에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 단편인,

핵산 분자.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 92% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 34

청구항 32에 있어서, 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 35

청구항 32에 있어서, 서열번호:1에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:2를 인코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호:3에 대해 적어도 92% 동일하고 서열번호:4를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 36

청구항 32에 있어서, 서열번호:1에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호:3에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 93% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 37

청구항 32에 있어서, 서열번호:1에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:2를 인코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호:3에 대해 적어도 93% 동일하고 서열번호:4를 인코딩하는핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 38

청구항 32에 있어서, 서열번호:1에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:2에 대해 적어도 95% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호:3에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:4에 대해 적어도 95% 동일한 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 39

청구항 32에 있어서, 서열번호:1에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:2를 인코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호:3에 대해 적어도 95% 동일하고 서열번호:4를 인코딩하는핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 40

청구항 32에 있어서,

a) 상기 단편 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 비(non)-IL-12 p35 신호 펩타이드를 인코딩하는 코딩 서열을 추가로 포함하는, 상기 최적화된 핵산 서열; 및/또는,

b) 상기 단편 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 비(non)-IL-12 신호 펩타이드를 인코딩하는 코딩 서열을 추가로 포함하는, 상기 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 41

청구항 32에 있어서,

a) 상기 단편 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 서열번호:5를 인코딩하는 코딩 서열을 추가로 포함하는, 상기 최적화된 핵산 서열, 및/또는,

b) 상기 단편 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 핵산 서열로서, 서열번호:5를 인코딩하는 코딩 서열을 추가로 포함하는, 상기 최적화된 핵산 서열

을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 42

청구항 32에 있어서, 전기천공을 사용하여 개체에게 전달하기 위해 제형된 핵산 분자.

청구항 43

청구항 32에 있어서, 상기 핵산 분자는 플리스미드 내에 통합되는 것인, 핵산 분자.

청구항 44

청구항 32에 있어서, 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 핵산 분자.

청구항 45

청구항 32에 있어서, HIV, HPV, HCV, 인플루엔자, 천연두, 치쿤군야, 발 및 입 질환 바이러스, 말라리아, 인간 사이토메갈로바이러스, 인간 호흡 신사이티알 바이러스, 및 MRSA로 이루어진 그룹으로부터 선택된 병원체로부터의 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 핵산 분자.

청구항 46

청구항 32에 있어서, 상기 핵산 분자는 바이러스 입자에 통합되는 것인, 핵산 분자.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 IL-12를 인코딩하는 개선된 유전적 컨스트럭트 및 이를 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인간 I1-12를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 개선된 발현 벡터, 백신 및 면역치료제 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역요법은 바람직한 치료 효과를 부여하기 위해 사람의 면역 반응을 조절하는 것을 지칭한다. 면역치료제는, 개체에게 투여될 때, 궁극적으로 바람직하지 않은 면역 반응과 연관된 증상을 줄이거나 궁극적으로 바람직한 면역 반응을 증가시킴으로써 증상을 완화시키는데 충분한 개체의 면역계를 조절하는 조성물을 지칭한다. 일부 경우에서, 면역요법은 개체에게 백신에 투여되는 백신접종 프로토콜의 일부로서, 개체가 노출되는 경우 개체가 면역반응을 생성하는 면역원에 개체를 노출시키고, 면역치료제는 면역 반응을 증가시키고/거나 특정 상태, 감염 또는 질환을 치료하거나 예방하는데 바람직한 면역 반응의 일부(예컨대 세포성 팔 또는 체액성 팔)를 선택적으로 향상시킨다.

[0003] 백신을 설계하는데 있어서, 백신접종된 개체의 세포에서 표적 항원을 생산하는 백신이 면역계의 세포성 팔을 유도하는데 효과적이라는 것이 인식되어 왔다. 구체적으로, 약독화 생백신, 무병원성 벡터를 이용하는 재조합 백신 및 DNA 백신은 각각 백신접종된 개체의 세포에서 항원의 생산을 야기하며 그 결과 면역계의 세포성 팔을 유도한다. 반면, 사멸되거나 불활성화된 백신, 및 단백질만을 포함하는 서브-유닛 백신은, 이들이 효과적인 체액성 반응을 유도함에도 불구하고, 우수한 세포성 면역 반응을 유도하지는 않는다.

[0004] 세포성 면역 반응은 병원체 감염, 암 또는 자가면역 질환의 치료를 위해 병원체 감염에 대해 보호를 제공하고 효과적인 면역-매개 요법을 제공하는데 종종 필요하다. 따라서, 약독화 생백신, 무병원성 벡터를 사용하는 재조합 백신 및 DNA 백신과 같이, 백신접종된 개체의 세포에서 표적 항원을 생산하는 백신이 종종 바람직하다.

[0005] 인간에서 강한 T 세포 및 B 세포 면역력을 유도할 수 있는 백신 접근법이 요구된다. 다수의 다른 사안들 중에, HIV STEP 시험에서 관찰된 바와 같이, 약독화에 대한 최근 우려, 백신 제조 복잡성, 혈청학적 개입이 이 중요 사안을 강조하는 역할을 한다. 비-인간 영장류 모델 및 인간 임상시험에서, 백신 플랫폼으로서 간단한 플라스미드 DNA는 상업적 개발 노력이 지원될만한 만족스러운 수준의 면역원성을 유도하지 않았다. 직접 비교에서, 일부 네이키드 플라스미드-기반 백신들은, 통상적으로 사용되는 아데노바이러스 혈청형 5 (Ad5) 플랫폼을 포함하는, 그들의 바이러스 벡터 대응물에 의해 유도된 것과 대등한 세포성 또는 체액성 반응을 유도하지 않았다.

[0006] 백신접종의 독립형 방법으로서 DNA 백신 기술의 개발뿐만 아니라 현 프라임-부스트 플랫폼에서의 그의 유용성은, 그의 면역 효능을 향상시키는 전략의 개발에 이익을 얻을 것이다. 코돈 및 RNA 인코딩 서열의 조작뿐만 아니라 선도 서열에서의 변화가 플라스미드-인코딩된 면역원의 발현을 향상시키는 것으로 보고되었다. 또한, 공통 면역원의 구축이 부분적으로 바이러스 다양성의 원인이 되는 광범위한 면역학적 범위에 대한 필요성을 다루려고 시도한다.

[0007] 또한, 제형 및 장치 중심 기술을 개선함으로써 DNA 플라스미드의 물리적 전달을 개선하는데 초점을 맞춘 다른 전략들이 이용되어 왔다. 전기천공(EP)에 의해 전달된 DNA 백신들은 히말라야 원숭이에서 플라스미드 DNA의 면역화 후 항원-특이적 인터페론-γ(IFNγ) 생산을 향상시키는 것으로 보고되어 왔다.

[0008] 백신-유도된 반응을 증가시키는 플라스미드-인코딩된 분자 아쥬반트의 공동-전달은 이 특정 조사의 또 다른 중요한 영역이다. 비-인간 영장류에서 가장 잘 규명된 분자 아쥬반트 중 하나는 미처리 $CD8^+$ T 세포의 효율적인 활성화 및 항원-특이적 확장에 필요한 "제3 신호"를 제공함으로써 CTL 반응을 추진하는 T_H1 극성화 사이토카인인, IL-12이다. IL-12는 두 개의 서브유닛, p35 및 p40을 함유하는 헤테로다이머이다. 그것은, DNA 백신으로 조작될 때 CD8 특히 T 세포를 추진하기 위한, 가장 인상적인 면역 향상 사이토카인인 것으로 나타났다. 짧은꼬리원숭이에서, IL-12는 다수의 항원을 표적으로 하는 DNA 백신의 세포성 면역 효능을 확장시키기 위한 매우 강력한 아쥬반트인 것으로 나타났다. 짧은꼬리원숭이 및 인간 모두에서, 상기 DNA 백신 아쥬반트는 DNA 백신에 의해 유도된 면역 반응을 현저히 개선할 수 있다.

[0009] 본원에 참고로 통합되어 있는, 미국 특허 제5,723,127호는 백신 아쥬반트로서 IL-12를 개시한다. 본원에 참고로 통합되어 있는, PCT 출원 제PCT/US1997/019502호 및 대응 US 출원 제08/956,865호는 IL-12 코딩 서열을 포함하는 DNA 백신 및 DNA 컨스트럭트를 개시한다.

[0010] 개선된 백신 및 면역치료제가 여전히 요구된다. 향상된 면역 반응을 초래하는 조성물 및 방법이 요구된다. 마찬가지로, 일부 면역치료제가 환자에서 면역 반응을 조절하는데 유용하지만, 개선된 면역치료적 조성물 및 방법이 여전히 요구된다. IL-12를 인코딩하고 DNA 백신 전략의 일부로서 사용될 수 있는 개선된 컨스트럭트가 여전히 요구된다. IL-12를 인코딩하고 면역치료제로서 사용될 수 있는 개선된 컨스트럭트가 여전히 요구된다. IL-12를 인코딩하고 IL-12의 높은 수준의 발현을 달성하는데 사용될 수 있는 개선된 컨스트럭트가 여전히 요구된다.

발명의 내용

[0011] **발명의 요약**

[0012] IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열 및 IL-12 p40 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물이 제공된다. IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 1에 대해 적어도 98% 상동이고 서열번호: 2에 대해 적어도 98% 상동인 단백질을 인코딩할 수 있다. IL-12 p35 서브유닛의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 1에 대해 적어도 98% 상동이고 서열번호: 2의 기능적 단편에 대해 적어도 98% 상동인 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 단편일 수 있다. IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 3에 대해 적어도 98% 상동이고 서열번호: 4에 대해 적어도 98% 상동인 단백질을 인코딩할 수 있다. IL-12 p40 서브유닛의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 3에 대해 적어도 98% 상동이고 서열번호: 4의 기능적 단편에 대해 적어도 98% 상동인 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 단편일 수 있다. 조성물은 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0013] 면역 반응을 조절하는 방법이 또한 제공된다. 상기 방법은 IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열 및 IL-12 p40 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0014] 면역원에 대해 면역 반응을 유도하는 방법이 또한 제공된다. 상기 방법은 유효량의 면역원을 인코딩하는 핵산 서열과 조합된, IL-12 p35 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열 및 IL-12 p40 서브유닛 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 면역원에 대해 면역 반응을 유도하는 방법은 치료적 면역 반응을 유도하는 방법 또는 예방적 면역 반응을 유도하는 방법의 일부일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1a 및 1b는 2 μg HuIL12-opt 또는 HuIL12-nonopt (도 1a) 또는 4 μg HuIL12-opt 및 HuIL12-nonopt (도 1b)로 형질감염된 세포에서 인간 IL-12의 발현 수준을 비교한 그래프를 보여준다.

도 2는 히말라야 원숭이에서 향상된 PSA 및 PSMA-특이적 세포성 면역 반응을 보여준다.

도 3은 히말라야 원숭이에서 향상된 HBV 코어 및 표면 항원-특이적 세포성 면역 반응을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] **바람직한 구현예의 상세한 설명**

[0017] 본 발명의 일 측면에서, 개선된 IL-12 컨스트럭트가 하기 중 하나 이상을 갖는 것을 포함하는, 개선된 전사 및 번역을 제공하는 것이 바람직하다: 전사를 증가시키는 낮은 GC 함량 선도 서열; mRNA 안정성 및 코돈 최적화; 가능한 시스-작용 서열 모티프 (즉, 내부 TATA-박스) 대부분을 제거하는 것.

[0018] 본 발명의 일부 측면에서, 백신 조성물의 일부로서, 또는 백신 면역원에 대해 광범위한 면역을 생성하기 위해 백신과 함께 공동작용할 수 있는 방식으로 전달된 별개의 조성물로서, 개선된 IL-12 컨스트럭트를 백신 요법 내로 통합하는 것이 바람직하다. 본 발명의 일부 측면에서, 개체에서 면역 반응을 조절하는데 사용될 수 있는 면역치료제로서 개선된 IL-12 컨스트럭트를 제공하는 것이 바람직하다. 본 발명의 일부 측면에서, 높은 수준의 IL-12 발현을 달성하는데 사용될 수 있는 발현 벡터를 제공하기 위해 개선된 IL-12 컨스트럭트를 제공하는 것이 바람직하다.

[0019] 더 높은 효능 IL-12 유전자 아쥬반트가 본원에 제공된다. 이들 새로운 아쥬반트들은 과거의 IL-12 분자에 비해 몇 가지 이점을 갖는다. 상기 분자의 분비를 용이하게 할뿐만 아니라 리보솜 로딩을 개선함으로써 이들 아쥬반트의 충격을 확장시키고 발현을 증가시키는 향상된 선도서열이 제공된다. RNA 서열에 대한 유의한 변화는 천연 IL-12 서열에 대해 상동성을 더 제거함으로써 전달된 아쥬반트와 숙주시스템 간의 간섭을 막을뿐만 아니라 숙주

IL-12 서열 및 유전자 전달된 분자 간의 가능한 해로운 상호작용을 낮춘다. 더욱이 새로운 컨스트럭트의 더 높은 효능은 용량 요건을 낮춤으로써 제조뿐만 아니라 상기 아쥬반트와 연관된 전달 사안을 개선한다. 마지막으로 이들 분자들은 더 높은 생물활성을 가지므로, 이들은 *생체내*에서 백신의 성능을 개선한다. 동시에, 이들은 백신뿐만 아니라 면역 치료 적용을 위한 중요한 새로운 도구이다.

[0020] **1. 정의**

[0021] 본 발명에서 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 설명하기 위한 것이며 제한하고자 하는 것은 아니다. 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 달리 명확히 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.

[0022] 본원에서 수치적 범위의 설명을 위해, 동일한 정도의 정확성으로 이들 사이에 각각 개재하는 숫자가 명백하게 고려된다. 예를 들면, 6-9의 범위의 경우, 6 및 9 외에도 숫자 7 및 8이 고려되며, 범위 6.0-7.0의 경우, 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6,9, 및 7.0이 명백하게 고려된다.

[0023] **a. 아쥬반트**

[0024] 본원에서 사용된 바와 같이 "아쥬반트"는 DNA 플라스미드 또는 백신에 의해 인코딩된 하나 이상의 항원의 항원성을 향상시키기 위해, DNA 플라스미드 백신 또는 다른 백신에 첨가된, 면역조절 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산분자, 및 이하에서 기재된 아쥬반트 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 분자를 의미할 수 있다.

[0025] **b. 항체**

[0026] "항체"는 Fab, F(ab')2, Fd, 및 단쇄 항체, 디아바디, 이중특이적 항체, 이작용기 항체 및 그의 유도체를 포함하는, 클래스 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE, 또는 단편의 항체, 이의 단편 또는 유도체를 의미할 수 있다. 상기 항체는 포유동물의 혈청 샘플로부터 분리된 항체, 폴리클로날 항체, 친화도 정제된 항체, 또는 원하는 에피토프 또는 이들로부터 유래된 서열에 대해 충분한 결합 특이성을 나타내는 그의 혼합물일 수 있다.

[0027] **c. 코딩 서열**

[0028] 본원에서 사용된 바와 같이 "코딩 서열" 또는 "인코딩 핵산"은 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 (RNA 또는 DNA 분자)을 지칭하는 것을 의미할 수 있다. 상기 코딩 서열은 핵산이 투여되는 개체 또는 포유동물의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종료 신호를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] **d. 보체**

[0030] 본원에서 사용된 바와 같이 "보체" 또는 "상보적"은 핵산이 핵산 분자의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 사이의 왓슨-크릭 (*예를 들면*, A-T/U 및 C-G) 또는 후그스틴 염기 짝짓기를 의미할 수 있다.

[0031] **e. 정전류**

[0032] 본원에서 사용된 바와 같이 "정전류"는 조직에 전달된 전기적 펄스의 지속시간 동안, 조직 또는 상기 조직을 한정하는 세포가 받거나 경험하는 전류를 정의한다. 상기 전기적 펄스는 본원에서 기재된 전기천공 장치로부터 전달된다. 본원에 제공된 전기천공 장치가 바람직하게는 즉각적인 피드백을 갖는 피드백 요소를 갖기 때문에, 이 전류는 전기적 펄스의 존재 동안 상기 조직에서 일정한 암페어수를 유지한다. 상기 피드백 요소는 펄스의 지속시간 내내 조직(또는 세포)의 저항성을 측정할 수 있고 전기천공 장치가 그의 전기적 에너지 출력을 변경하게 할 수 있어서 (예를 들면, 전압 증가), 동일한 조직 내의 전류는 전기 펄스 내내 (대략 마이크로초), 및 펄스 내내 일정하게 유지된다. 일부 구현예에서, 상기 피드백 요소는 컨트롤러를 포함한다.

[0033] **f. 전류 피드백 또는 피드백**

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이 "전류 피드백" 또는 "피드백"는 상호교환적으로 사용될 수 있고 제공된 전기천공 장치의 활성 반응을 의미할 수 있으며, 이는 전극 사이의 조직 내 전류를 측정하고, 전류를 일정한 수준으로 유지하기 위해 EP 장치에 의해 전달된 에너지 출력을 변경하는 것을 포함한다. 이 일정한 수준은 펄스 시퀀스 또는 전기적 처리의 개시 전에 사용자에 의해 미리 조정된다. 상기 피드백은, 내부의 전기적 회로가 전극 사이의 조직 내 전류를 지속적으로 모니터링하고 상기 모니터링된 전류 (또는 조직 내의 전류)를 미리 조정된 전류와 비교하고 상기 모니터링된 전류를 미리 조정된 수준으로 유지시키기 위해 에너지-출력을 지속적으로 조절하므로,

상기 피드백은 상기 전기천공 장치의 전기천공 성분, 예컨대 컨트롤러에 의해 달성될 수 있다. 상기 피드백 루프는, 아날로그 폐루프 피드백이므로, 즉각적일 수 있다.

[0035] **g. 분산된 전류**

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이 "분산된 전류"는 본원에서 기재된 전기천공 장치의 다양한 바늘 전극 어레이로부터 전달된 전기적 전류의 패턴을 의미할 수 있으며, 여기서 상기 패턴은 전기천공될 조직의 임의의 영역 상에서 전기천공 관련된 열 스트레스의 발생을 최소화하거나 바람직하게는 제거한다.

[0037] **h. 전기천공**

[0038] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "전기천공," "전기-투과화," 또는 "전기-동력학 향상"("EP")은 바이오-막에 현미경적 경로 (기공)를 유도하기 위해 막통과 전기장을 사용하는 것을 지칭할 수 있으며, 이들의 존재는 플라스미드, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 약물, 이온, 및 물과 같은 생체분자가 세포성 막의 한쪽 면으로부터 다른 쪽 면으로 지나가게 한다.

[0039] **i. 피드백 기전**

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이 "피드백 기전"은 소프트웨어 또는 하드웨어 (또는 펌웨어)에 의해 수행되는 공정을 지칭할 수 있고, 이 공정은 원하는 조직의 임피던스를 받고, 이를 현재의 값, 바람직하게는 전류와 비교하고(에너지의 펄스의 전달 전, 동안, 및/또는 이후), 미리조정된 값을 달성하기 위해 전달된 에너지의 펄스를 조절한다. 피드백 기전은 아날로그 폐루프 회로에 의해 수행될 수 있다.

[0041] **j. 단편**

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이 "단편"은 비-단편과 실질적으로 유사한 포유동물에서 면역 반응을 유발할 수 있는 폴리펩타이드를 인코딩하는 일부 또는 핵산을 의미할 수 있다. 상기 단편은 서열번호: 1의 단편, 서열번호: 1에 대해 적어도 98% 상동이고 서열번호: 2에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열의 단편; 서열번호: 3의 단편, 및 서열번호: 3에 대해 적어도 98% 상동이고 서열번호: 4에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열의 단편으로부터 선택된 DNA 단편일 수 있다.

[0043] 서열번호: 1의 DNA 단편, 서열번호: 1에 대해 적어도 98% 상동이고 서열번호: 2에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열의 단편은 서열번호 2 또는 서열번호 2에 적어도 98% 상동인 단백질의 50 이상의 길이의 아미노산, 55 이상, 60 이상, 70 이상, 75 이상, 80 이상, 85 이상, 90 이상, 95 이상, 100 이상, 105 이상, 110 이상, 115 이상, 120 이상, 125 이상, 130 이상, 135 이상, 140 이상, 145 이상, 150 이상, 155 이상, 160 이상, 165 이상, 170 이상, 175 이상, 180 이상, 185 이상, 190 이상, 195 이상, 200 이상, 205 이상, 210 이상의 길이 또는 215 이상을 인코딩할 수 있다. 서열번호 1의 DNA 단편, 서열번호 1에 대해 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 2 또는 서열번호: 2에 적어도 98% 상동인 단백질의 53 미만, 58 미만, 63 미만, 68 미만, 73 미만, 78 미만, 83 미만, 88 미만, 93 미만, 98 미만, 103 미만, 108 미만, 113 미만, 118, 123 미만, 128 미만, 133 미만, 138 미만, 143 미만, 148 미만, 153 미만, 158 미만, 163 미만, 168 미만, 173 미만, 178 미만, 183 미만, 188 미만, 193 미만, 198 미만, 203 미만, 208 미만, 213 미만 또는 218 미만의 아미노산 길이인 단백질의 기능적 단편을 인코딩할 수 있다. 일부 구현예에서, 서열번호: 1에 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 2에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 1에 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 2에 적어도 99% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 1에 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 2의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 1에 적어도 99% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 2에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 1에 적어도 99% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 2에 적어도 99% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 1에 적어도 99% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 2의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 상기 단편은 서열번호: 2의 기능적 단편을 인코딩하는 서열번호: 1의 단편이다.

[0044] 서열번호: 3의 DNA 단편, 서열번호: 3에 적어도 98% 상동이고 서열번호: 4에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4 또는 서열번호: 4에 적어도 98% 상동인 단백질의 50 이상 아미노산 길이, 55 이상, 60 이상, 65 이상, 70 이상, 75 이상, 80 이상, 85 이상, 90 이상, 95 이상, 100 이상, 105 이상, 110 이상, 115 이상, 120 이상, 125 이상, 130 이상, 135 이상, 140 이상, 145 이상, 150 이상, 155 이상, 160 이상, 165 이상, 170 이상, 175 이상, 180 이상, 185 이상, 190 이상, 195 이상, 200 이상, 205 이상, 210 이상, 215 이상, 220 이상, 225 이상, 230 이상, 235 이상, 240 이상, 245 이상, 250 이상, 255

이상, 260 이상, 265 이상, 270 이상, 275 이상, 280 이상, 285 이상, 290 이상, 295 이상, 300 이상, 305 이상, 310 이상, 315 이상, 320 이상, 또는 325 이상 아미노산 길이를 인코딩할 수 있다. 서열번호: 3의 DNA 단편 및 서열번호: 3에 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4 또는 서열번호: 4에 적어도 98% 상동인 단백질보다 53 미만, 58 미만, 63 미만, 68 미만, 73 미만, 78 미만, 83 미만, 88 미만, 93 미만, 98 미만, 103 미만, 108 미만, 113 미만, 118 미만, 123 미만, 128 미만, 133 미만, 138 미만, 143 미만, 148 미만, 153 미만, 158 미만, 163 미만, 168 미만, 173 미만, 178 미만, 183 미만, 188 미만, 193 미만, 198 미만, 203 미만, 208 미만, 213 미만, 218 미만, 223 미만, 228 미만, 233 미만, 238 미만, 243 미만, 248 미만, 253 미만, 258 미만, 263 미만, 268 미만, 273 미만, 278 미만, 283 미만, 288 미만, 293 미만, 298 미만, 303 미만, 308 미만, 313 미만, 318 미만 또는 328 미만인 기능적 단편을 인코딩할 수 있다. 일부 구현예에서, 서열번호: 3에 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 3에 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4에 적어도 99% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 3에 적어도 98% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 3에 적어도 99% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4에 적어도 98% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 3에 적어도 99% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4에 적어도 99% 상동인 단백질의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 3에 적어도 99% 상동인 핵산 서열의 단편은 서열번호: 4의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 상기 단편은 서열번호: 4의 기능적 단편을 인코딩하는 서열번호: 3의 단편이다.

[0045] DNA 단편은 IL-12 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열이 없을 수 있다. DNA 단편은 IgE 또는 IgG 신호 펩타이드 서열과 같은 면역글로불린 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들면, IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 DNA 단편은 서열번호: 2의 아미노산 1-22을 인코딩하지 않으며, 일부 그러한 구현예에서, IgE 신호 펩타이드 서열 (서열번호: 5) 또는 IgG 신호 펩타이드 서열과 같은 면역글로불린 신호 펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다.

[0046] "단편"은 또한 전장 폴리펩타이드와 실질적으로 유사한 기능을 할 수 있는 폴리펩타이드 단편을 지칭할 수 있다. IL-12 p35의 단편은 서열번호: 2의 단편 또는 서열번호: 2의 단편에 적어도 98% 상동인 폴리펩타이드의 단편일 수 있다. IL-12 p35의 단편은 서열번호: 2의 단편에 적어도 99% 상동인 폴리펩타이드의 단편일 수 있다. IL-12 p35의 단편은 상기에서 기재된 바와 같은 단편일 수 있다. IL-12 p40의 단편은 서열번호: 4의 단편 또는 서열번호: 4의 단편에 적어도 98% 상동인 폴리펩타이드의 단편일 수 있다. IL-12 p40의 단편은 서열번호: 4의 단편에 적어도 99% 상동인 폴리펩타이드의 단편일 수 있다. IL-12 p40의 단편은 상기에서 기재된 바와 같은 단편일 수 있다.

[0047] "기능적 단편"은 완전한 p35보다 적고/적거나 완전한 p40 서열보다 적고 전장 p35 또는 p40과 실질적으로 유사하게 기능할 수 있는 IL-12의 단편을 지칭하는 것을 의미한다. 그러한 실질적으로 유사한 기능은 전장 p35 또는 p40과 실질적으로 동일한 방식으로 다른 단백질, 서브유닛 및 수용체들과의 상호작용 및 헤테로다이머의 형성을 허용하는 방식으로 전달될 때 IL-12 p35/p40 헤테로다이머와 실질적으로 동일한 효과를 야기하는 것을 포함한다.

[0048] **k. 유전적 컨스트럭트**

[0049] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "유전적 컨스트럭트"는 하나 또는 둘의 IL-12 서브유닛 또는 표적 단백질 또는 또 다른 (비-IL-12) 면역조절 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 상기 코딩 서열은 핵산 분자가 투여될 개체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종료 신호를 포함한다.

[0050] **l. 과증식**

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "과증식 질환"은 세포의 과증식을 특징으로 하는 질환 및 장애를 지칭하는 것을 의미하고, 용어 "과증식-연관 단백질"은 과증식 질환과 연관된 단백질을 지칭하는 것을 의미한다.

[0052] **m. 동일한**

[0053] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 문맥에서 본원에서 사용된 바와 같이, "동일한" 또는 "동일성"은 상기 서열이 지정된 영역에 대해 동일한 지정된 백분율의 잔기를 갖는다는 것을 의미할 수 있다. 상기 백분율은 두 서열을 최적으로 정렬하고, 지정된 영역에 대해 두 서열을 비교하고, 두 서열에서 동일한 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치된 위치의 수를 산출하고, 상기 일치된 위치의 수를 지정된 영역 내의 위치의 총 수

로 나누고, 상기 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 두 서열이 상이한 길이이거나 상기 정렬이 하나 이상의 어긋난(staggered) 말단을 생성하고 비교하는 상기 지정된 영역이 단지 하나의 서열을 포함하는 경우, 하나의 서열의 잔기들이 분모에 포함되지만 계산의 분자에 포함되지 않는다. DNA 및 RNA를 비교할 때, 티민 (T) 및 우라실 (U)은 동등한 것으로 간주될 수 있다. 동일성은 수작업으로 또는 BLAST 또는 BLAST 2.0과 같은 컴퓨터 서열 알고리즘을 이용하여 수행될 수 있다.

[0054] **n. 임피던스**

[0055] 본원에서 사용된 바와 같이 "임피던스"는 피드백 기전을 논의할 때 사용될 수 있으며, 옴 법칙에 따라 전류 값으로 변환될 수 있어서 미리 조정된 전류와 비교할 수 있다.

[0056] **o. 면역 반응**

[0057] 본원에서 사용된 바와 같이 "면역 반응"은 제공된 DNA 플라스미드 백신을 통해 하나 이상의 RSV 공통 항원의 도입에 반응한, 숙주의 면역계의 활성화, 예컨대 포유동물의 면역계의 활성화를 의미할 수 있다. 상기 면역 반응은 세포성 또는 체액성 반응, 또는 둘 모두의 형태일 수 있다.

[0058] **p. 세포내 병원체**

[0059] 본원에서 사용된 바와 같이, "세포내 병원체"는 숙주 세포 내에서 그의 복제 또는 생명 주기의 적어도 일부가 존재하며 그 안에서 병원성 단백질을 생산하거나 이들이 생산되게 야기하는 바이러스 또는 병원성 유기체를 지칭하는 것을 의미한다.

[0060] **q. 핵산**

[0061] 본원에 사용된 바와 같이 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 함께 공유결합된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 의미할 수 있다. 단일 가닥의 묘사는 또한 상보적 가닥의 서열을 정의한다. 따라서, 핵산은 또한 묘사된 단일 가닥의 상보적 가닥을 포함한다. 핵산의 많은 변이체들이 주어진 핵산과 동일한 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 보체를 포함할 수 있다. 단일 가닥은 엄격한 혼성화 조건 하에서 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 프로브를 포함한다.

[0062] 핵산은 단일가닥 또는 이중가닥이거나, 이중가닥 및 단일가닥 서열의 일부을 함유할 수 있다. 상기 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA 모두, RNA, 또는 하이브리드일 수 있으며, 여기서 핵산은 데옥시리보- 및 리보-뉴클레오타이드의 조합, 및 우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 이노신, 잔틴 하이포잔틴, 이소시토신 및 이소구아닌을 포함하는 염기들의 조합을 함유할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0063] **r. 작동가능하게 연결된**

[0064] 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자를 지칭할 때 본원에서 사용된 바와 같이 "작동가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 그것이 공간적으로 연결된 프로모터의 제어 하에 있도록 하는 두 구성요소의 연결을 지칭한다. 프로모터는 그 제어 하에 있는 유전자의 5' (상류) 또는 3' (하류)에 위치할 수 있다. 프로모터와 유전자 간의 거리는 프로모터가 유도된 유전자 내에서 그것이 제어하는 프로모터와 유전자 간의 거리와 대략 동일할 수 있다. 당해기술에 공지된 바와 같이, 이 거리의 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 조절될 수 있다. 단백질에 작동가능하게 연결된 신호 펩타이드를 지칭할 때, 상기 용어는 그것이 신호 펩타이드로서 기능할 수 있는 방식으로 단백질의 일부로서 혼입되는 신호 펩타이드를 갖는 단백질을 지칭한다. 단백질을 인코딩하는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 신호 펩타이드를 인코딩하는 코딩 서열을 지칭할 때, 상기 용어는 코딩 서열의 번역이 그것이 신호 펩타이드로서 기능할 수 있는 방식으로 단백질의 일부로서 혼입되는 신호 펩타이드를 갖는 단백질을 생산하도록 배열된 코딩 서열을 지칭한다.

[0065] **s. 프로모터**

[0066] 본원에서 사용된 바와 같이 "프로모터"는 세포에서 핵산의 발현을 부여하거나, 활성화하거나 향상시킬 수 있는 합성 또는 천연적으로-유도된 분자를 의미할 수 있다. 프로모터는 발현을 더 향상시키고/거나 이의 공간 발현 및/또는 일시적 발현을 변경하는 하나 이상의 특이적 전사 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 원위(distal) 인핸서 또는 억제자 요소를 포함할 수 있고, 이는 전사 개시 부위로부터 수천 염기쌍 정도에 위치할 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충, 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 발현이 일어나는 세포, 조직 또는 장기와 관련하여, 또는 발현이 일어나는 발달 단계와 관련하

여, 또는 생리적 스트레스, 병원체, 금속 이온, 또는 유도제와 같은 외부 자극에 대한 반응으로, 항시적으로, 또는 차별적으로 유전자 구성요소의 발현을 조절할 수 있다. 프로모터의 대표적인 예는 박테리오파아지 T7 프로모터, 박테리오파아지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 오퍼레이터-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 초기 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, SV40 초기 프로모터 또는 SV40 후기 프로모터 및 CMV IE 프로모터를 포함한다.

[0067] **t. 엄격한 혼성화 조건**

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이 "엄격한 혼성화 조건"은 핵산의 복합 혼합물에서와 같이, 제1 핵산 서열 (예를 들면, 프로브)이 제2 핵산 서열 (예를 들면, 표적)에 혼성화하는 조건을 의미할 수 있다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며 상이한 상황에서 상이할 것이다. 엄격한 조건은 규정된 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대한 열 용융점 (Tm)보다 약 5-10 ℃ 더 낮도록 선택될 수 있다. T_m은 표적에 상보적인 프로브 중 50%가 평형에서 표적 서열에 혼성화하는(표적 서열이 T_m에서 과잉으로 존재하기 때문에, 프로브 중 50%가 평형에서 점거됨) 온도 (규정된 이온 강도, pH, 및 핵산 농도 하에)일 수 있다. 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01-1.0 M 나트륨 이온 농도 (또는 다른 염)과 같이, 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온 미만이고, 온도가 짧은 프로브 (예를 들면, 약 10-50 뉴클레오타이드)의 경우 적어도 약 30 ℃이고 긴 프로브 (예를 들면, 약 50 뉴클레오타이드 초과)의 경우 적어도 약 60 ℃인 조건일 수 있다. 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 탈안정화제의 첨가로 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화를 위해, 양성 신호가 배경 혼성화의 적어도 2 내지 10배일 수 있다. 예시적인 엄격한 혼성화 조건은 하기를 포함한다: 65 ℃에서 0.2x SSC, 및 0.1% SDS에서 세척과 함께, 50% 포름아미드, 5x SSC, 및 1% SDS, 42℃에서 배양, 또는, 5x SSC, 1% SDS, 65 ℃에서 배양.

[0069] **u. 실질적으로 상보적**

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이 "실질적으로 상보적"은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 영역에 대해 제1 서열이 제2 서열의 보체에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 또는 상기 두 서열이 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 것을 의미할 수 있다.

[0071] **v. 실질적으로 동일한**

[0072] 본원에서 사용된 바와 같이 "실질적으로 동일한"은, 만약 제1 서열이 제2 서열의 보체에 실질적으로 상보적이면, 제1 및 제2 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 영역에 대해 또는 핵산에 대해, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다는 것을 의미할 수 있다.

[0073] **w. 표적 단백질**

[0074] 본원에서 사용된 바와 같이 "표적 단백질"은 백신의 일부이거나 또는 면역 반응을 위해 표적 단백질로서 작용하는 DNA 백신의 유전자 컨스트럭트에 의해 인코팅된 펩타이드 및 단백질을 지칭하는 것을 의미한다. 용어들 "표적 단백질" 및 "면역원"는 상호교환적으로 사용되고 면역 반응이 유발될 수 있는 단백질을 지칭한다. 표적 단백질은 병원체 또는 바람직하지 않은 세포 유형, 예컨대 암 세포 또는 면역 반응이 바람직한 자가면역 질환과 연관된 세포 유래의 단백질과 적어도 에피토프를 공유하는 면역원성 단백질이다. 표적 단백질에 대해 지향된 면역 반응은 표적 단백질이 연관된 특정 감염 또는 질환에 대해 개체를 보호하고/거나 개체를 치료할 것이다.

[0075] **x. 변이체**

[0076] 핵산과 관련하여 본원에 사용된 "변이체"는 (i) 참조된 뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 단편; (ii) 참조된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부의 보체; (iii) 참조된 핵산 또는 이의 보체와 실질적으로 동일한 핵산; 또는 (iv) 참조된 핵산, 이의 보체, 또는 이에 실질적으로 동일한 서열에 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 핵산을 의미할 수 있다.

[0077] 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 대한 "변이체"는 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 상이하지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산을 갖는 참조된 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 아미노산을 유사한 특성(예를 들면, 친수성, 전하를 띠는 영역의 정도 및 분포)의

상이한 아미노산으로 치환하는 것은 전형적으로 사소한 변화를 수반하는 것으로 당해 기술분야에서 인식된다. 이들 사소한 변화는 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, 아미노산의 수치요법 지수(hydropathic index)를 고려함으로써, 일부 확인될 수 있다(Kyte 등, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982)). 상기 아미노산의 수치요법 지수는 그의 소수성 및 전하의 고려에 기초한다. 유사한 수치요법 지수의 아미노산이 치환될 수 있고 여전히 단백질 기능을 보유한다는 것이 당해기술분야에 공지되어 있다. 일 측면에서, ±2의 수치요법 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 야기할 치환을 밝히는데 사용될 수 있다. 펩타이드의 문맥에서 아미노산의 친수성의 고려는 항원성 및 면역원성과 상관관련이 있다고 보고된 유용한 수단인 상기 펩타이드의 가장 큰 국소적 평균 친수성의 계산을 가능하게 한다. 완전히 참고로 본원에 통합된, 미국 특허 제4,554,101호. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은, 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, 생물학적 활성, 예를 들면 면역원성을 보유하는 펩타이드를 야기할 수 있다. 치환은 서로 ±2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산을 이용하여 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값은 상기 아미노산의 특정한 측쇄에 의해 영향을 받는다. 상기 관찰과 일치하게도, 생물학적 기능과 양립가능한 아미노산 치환은 아미노산의 상대적 유사성, 및 특히 소수성, 친수성, 전하, 크기, 및 다른 특성에 의해 밝혀진 바와 같이, 상기 아미노산의 측쇄에 좌우되는 것으로 이해된다.

[0078] **v. 벡터**

[0079] 본원에 사용된 "벡터"는 복제 기점을 함유하는 핵산 서열을 의미할 수 있다. 벡터는 플라스미드, 박테리오파아지, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자가-복제 염색체외 벡터 또는 호스트 게놈 내로 통합되는 벡터 중 하나일 수 있다.

[0080] **2. IL-12**

[0081] 인간 IL-12 p35 (α 서브유닛) 및 p40 (β 서브유닛)을 인코딩하는 합성 컨스트럭트가 본원에 제공된다. 인간 IL-12 p35 서브유닛 (서열번호: 2)은 아미노산 1-22에서 신호 펩타이드 및 위치 23-219에서 성숙한 단백질 서열을 포함하는 219 아미노산 단백질이다. 인간 IL-12 p40 서브유닛 (서열번호: 4)은 아미노산 1-22에 있는 신호 펩타이드 및 위치 23-328에 있는 성숙한 단백질 서열을 포함하는 328개의 아미노산 단백질이다. 인간 IL-12 p40 서브유닛 중 아미노산 40-90은 면역글로불린 도메인으로서 지칭되며; 인간 IL-12 p40 서브유닛 중 아미노산 125-217은 사이토카인 인터루킨-12 p40 C-말단 도메인으로서 지칭된다.

[0082] 일부 구현예에서, IL-12 p35 서브유닛은 하나의 플라스미드 상에 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트에 의해 인코딩되고 IL-12 p40 서브유닛은 상이한 플라스미드 상에 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, IL-12 p35 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트 및 IL-12 p40 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트는 동일한 플라스미드 상에 있지만 각각의 컨스트럭트는 그들의 자체 프로모터를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-12 p35 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트 및 IL-12 p40 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트는 동일한 플라스미드 상에 있고 단일 프로모터의 제어 하에 있으며 IRES 서열에 의해 분리된다. 일부 구현예에서, IL-12 p35 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트 및 IL-12 p40 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트는 동일한 플라스미드 상에 있고 단일 프로모터의 제어 하에 있으며 단백분해 절단 부위에 대한 코딩 서열에 의해 분리된다. 일부 구현예에서, IL-12 p35 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트 및 IL-12 p40 서브유닛 코딩 서열을 포함하는 컨스트럭트는 동일한 플라스미드 상에 있고 단일 프로모터의 제어 하에 있으며 상기 서브유닛은 이들이 단일 사슬 단백질로서 활성이 되게 하는 링커에 의해 분리된다

[0083] HuIL12-opt 서열은 인간 IL-12 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 서열이다 상기 서열은 RNA 구조를 변화시키고 잠재적 조절 서열을 피하기 위해 호스트 게놈과 더 낮은 상동성을 갖는다. 상기 서열은 개선된 mRNA 안정성 및 발현을 제공한다.

[0084] 인간 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 코딩 서열인 HuIL12-opt 서열이 서열번호: 1에 개시되어 있다. 그렇게 함으로써 인코딩된 219개의 아미노산 IL-12 p35 서브유닛 아미노산 서열인 HuIL12-opt 서열번호 2로서 개시되어 있다. 아미노산 1-22는 신호 펩타이드에 해당한다. 아미노산 23-219는 성숙한 단백질 영역에 해당한다.

[0085] 인간 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 코딩 서열인 HuIL12-opt 서열이 서열번호: 3으로서 개시되어 있다. 그렇게 함으로써 인코딩된 328개의 아미노산 IL-12 p40 서브유닛 아미노산 서열인 HuIL12-opt 서열이 서열번호 4로서 개시되어 있다. 아미노산 1-22는 IL-12 신호 펩타이드에 해당하고 아미노산 23-328은 성숙한 단백질을 구성한다. 붉은털원숭이 IL-12에 대한 유사한 서열은 붉은털원숭이 IL-12 서브유닛을 인코딩하는 최적화된 서열인 RhIL12-opt 서열이다.

[0086] 일부 구현예에서, IL-12 p35 또는 p40 서브유닛 또는 둘의 IL-12 신호 펩타이드는 상이한 신호 펩타이드 예컨대 또 다른 면역글로불린 신호 펩타이드, 예를 들면 IgG 또는 IgE (서열번호: 5)로 대체될 수 있다. IL-12 p35 또는 p40 서브유닛 또는 둘의 IL-12 신호 펩타이드를 인코딩하는 코딩 서열은 상이한 신호 펩타이드 예컨대 또 다른 면역글로불린 신호 펩타이드, 예를 들면 IgG 또는 IgE (즉 서열번호: 5를 인코딩하는 코딩서열)를 인코딩하는 코딩서열로 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, IL-12 p35 신호 펩타이드는 상이한 신호 펩타이드 예컨대 또 다른 면역글로불린 신호 펩타이드, 예를 들면 IgG 또는 IgE (서열번호: 5)로 대체될 수 있다. 서열번호 2의 기능적 단편은 IL-12 p35 신호 펩타이드 서열이 없을 수 있다. 일부 구현예에서, IL-12 p35 신호 펩타이드를 인코딩하는 코딩 서열은 상이한 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열 예컨대 또 다른 면역글로불린 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열, 예를 들면 IgG 또는 IgE의 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열 (즉, 서열번호: 5를 인코딩하는 코딩서열)로 대체될 수 있다. 서열번호: 1의 단편인 핵산 서열은 IL-12 p35 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열이 없을 수 있다. 서열번호 4의 기능적 단편은 IL-12 p40 신호 펩타이드 서열이 없을 수 있다. 일부 구현예에서, IL-12 p40 신호 펩타이드를 인코딩하는 코딩 서열은 상이한 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열 예컨대 또 다른 면역글로불린 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열, 예를 들면 IgG 또는 IgE의 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열 (즉, 서열번호: 5를 인코딩하는 코딩 서열)로 대체될 수 있다. 서열번호: 3의 단편인 핵산 서열은 IL-12 p40 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열이 없을 수 있다. IL-12 p35 신호 펩타이드 또는 IL-12 p40 신호 펩타이드 각각을 인코딩하지 않는 코딩 서열에서 서열번호: 1 또는 서열번호: 3에 대한 상동성을 계산하는데 있어서, 상기 계산은 IL-12 p35 신호 펩타이드를 인코딩하는 서열번호: 1의 일부 또는 IL-12 p40 신호 펩타이드를 인코딩하는 서열번호: 3의 일부를 배제하고 서열번호: 1 또는 서열번호: 3을 비교하는 것에 기초한다.

[0087] **3. 플라스미드**

[0088] 포유동물 내 면역 반응을 조절하는데 효과적인 양으로 포유동물의 세포에서 IL-12 컨스트럭트를 발현할 수 있는 벡터가 본원에 제공된다. 각각의 벡터는 하나 또는 두 가지 서브유닛을 인코딩하는 이종기원 핵산을 포함할 수 있다. 상기 벡터는 플라스미드일 수 있다. 상기 플라스미드는 IL-12를 인코딩하는 핵산으로 세포를 형질감염시키는데 유용할 수 있으며, 상기 형질전환된 숙주세포는 IL-12의 발현이 일어나는 조건 하에서 배양되고 유지된다.

[0089] 상기 플라스미드는 하나 이상의 항원을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 상기 플라스미드는 코딩 서열의 상류에 있을 수 있는 개시 코돈, 및 코딩 서열의 하류에 있을 수 있는 정지 코돈을 추가로 포함할 수 있다. 상기 개시 및 종료 코돈은 코딩 서열와 틀이 맞을 수 있다.

[0090] 상기 플라스미드는 또한 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터는 유인원 바이러스 40 (SV40), 마우스 유선 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 프로모터 예컨대 소 면역결핍 바이러스 (BIV) 긴 말단 반복 (LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스 프로모터, 조류 백혈증 바이러스 (ALV) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 예컨대 CMV 전초기 프로모터, 엡슈타인 바르 바이러스 (EBV) 프로모터, 또는 루(Rous) 육종 바이러스 (RSV) 프로모터 유래의 프로모터일 수 있다. 상기 프로모터는 인간 유전자, 예컨대 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 또는 인간 메탈로티오네인 유래의 프로모터일 수 있다. 상기 프로모터는 또한 천연 또는 합성의 조직 특이적 프로모터, 예컨대 근육 또는 피부 특이적 프로모터일 수 있다. 그러한 프로모터의 예는 그 내용 전체가 참고로 본원에 통합되어 있는 US 특허 출원 공개 제US20040175727호에 기재되어 있다.

[0091] 상기 플라스미드는 또한 코딩 서열의 하류에 있을 수 있는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 상기 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호, LTR 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬 (bGH) 폴리아데닐화 신호, 인간 성장 호르몬 (hGH) 폴리아데닐화 신호, 또는 인간 β-글로빈 폴리아데닐화 신호일 수 있다. SV40 폴리아데닐화 신호는 pCEP4 플라스미드 (Invitrogen, San Diego, CA) 유래의 폴리아데닐화 신호일 수 있다.

[0092] 상기 플라스미드는 또한 코딩 서열의 상류에 인핸서를 포함할 수 있다. 상기 인핸서는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 또는 바이러스 인핸서, 예컨대 CMV, FMDV, RSV 또는 EBV일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 기능 인핸서는, 각각의 내용이 전체가 참조로써 본원에 통합되어 있는, 미국 특허 번호 5,593,972호, 제5,962,428호, 및 WO94/016737호에 기술되어 있다.

[0093] 상기 플라스미드는 또한 플라스미드를 염색체밖에 유지시키고 세포 내에서 플라스미드의 다중 카피를 생산하기 위해 포유동물 복제 기점을 포함할 수 있다. 상기 플라스미드는 Invitrogen (San Diego, CA)사의 pVAX1, pCEP4 또는 pREP4일 수 있으며, 이는 엡슈타인 바르 바이러스 복제 기점 및 핵 항원 EBNA-1 코딩 영역을 포함할 수 있고, 이는 통합 없이 높은 카피 에피솜 복제를 생산할 수 있다. 상기 플라스미드의 뼈대는 pAV0242일 수 있다.

상기 플라스미드는 복제 결함 아데노바이러스 유형 5 (Ad5) 플라스미드일 수 있다.

[0094] 상기 플라스미드는 또한 조절 서열을 포함할 수 있으며, 이는 플라스미드가 투여되는 세포 내에서의 유전자 발현에 적합할 수 있다. 상기 코딩 서열은 숙주세포에서 코딩 서열의 보다 효율적인 전사를 가능하게 할 수 있는 코돈을 포함할 수 있다.

[0095] 상기 코딩 서열은 또한 Ig 선도 서열을 포함할 수 있다. 상기 선도 서열은 코딩 서열의 5'일 수 있다. 이 서열에 의해 인코딩된 공통 항원은 N-말단 Ig 리더 다음으로 공통 항원 단백질을 포함할 수 있다. 상기 N-말단 Ig 리더는 IgE 또는 IgG일 수 있다.

[0096] 상기 플라스미드는 *에스케리치아 콜리* (E.coli)에서 단백질 생산에 사용될 수 있는, pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있다. 상기 플라스미드는 또한 효모의 사카로마이세스 세레비시애 균주에서의 단백질 생산에 사용될 수 있는, pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있다. 상기 플라스미드는 또한 곤충 세포에서의 단백질 생산에 사용될 수 있는, MAXBAC™ 완전한 배큘로바이러스 발현 시스템 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있다. 상기 플라스미드는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포와 같은 포유동물 세포에서의 단백질 생산에 사용될 수 있는, pcDNA I 또는 pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있다.

[0097] **4. 백신**

[0098] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 면역원을 인코딩하는 핵산 서열과 조합된, IL-12 또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 서열의 개체로의 전달은 면역원에 대한 면역 반응을 향상시킨다. 면역원 및 IL-12를 인코딩하는 핵산 분자가 개체의 세포에 의해 흡수될 때, 면역원 및 IL-12가 세포에서 발현되고 이로써 상기 단백질은 개체에게 전달된다. 본 발명의 측면은 단일 핵산 분자에 면역원 및 IL-12의 코딩 서열을 전달하는 방법, 상이한 핵산 분자에 면역원 및 IL-12의 코딩 서열을 전달하는 방법 및 재조합 백신의 일부로서 그리고 약화된 백신의 일부로서 단백질의 코딩 서열을 전달하는 방법을 제공한다.

[0099] 본 발명의 일부 측면에 따라, 병원체 또는 비정상인 질환-관련 세포에 대해 개체를 예방적으로 및/또는 치료적으로 면역화하는 조성물 및 방법이 제공된다. 상기 백신은 임의의 유형의 백신, 예컨대, 약독화 생백신, 재조합 백신 또는 핵산 또는 DNA 백신일 수 있다. 면역원 및 IL-12 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 전달함으로써 백신에 의해 유도된 면역 반응이 조절될 수 있다. IL-12 컨스트럭트는 예컨대 플라스미드의 일부 또는 재조합 벡터 또는 약독화된 병원체 또는 세포의 게놈으로서와 같이, 면역원을 인코딩하는 핵산 분자와 조합으로 전달될 때 특히 유용하다. IL-12 컨스트럭트는 감염되지 않거나 질환이 없는 개체에서 보호 면역 반응을 유도하기 위해 예방적으로 백신에 사용될 수 있다. IL-12 컨스트럭트는 인간에서 보호 면역 반응을 유도하기 위해 전달될 때 특히 유용하다. IL-12 컨스트럭트는 감염된 또는 병든 개체에서 면역 반응을 유도하기 위해 치료적으로 백신에 사용될 수 있다. IL-12 컨스트럭트는 인간에서 치료적 면역 반응을 유도하기 위해 전달될 때 특히 유용하다. 일부 구현예에서, IL-12 컨스트럭트를 포함하는 핵산 분자가 무세포 조성물에서 전달된다. 일부 구현예에서, IL-12 컨스트럭트를 포함하는 핵산 분자가 암 세포가 없는 조성물에서 전달된다. 일부 구현예에서, IL-12 컨스트럭트를 포함하는 핵산 분자는 임의의 다른 사이토카인이 없이 투여된다.

[0100] 병원체, 질환과 연관된 세포에서 발현된 면역원 및 면역 반응이 요구되는 다른 면역원에 대해 포유동물에서 면역 반응을 생성할 수 있는 백신이 본원에 제공된다. 상기 백신은 상기에서 논의된 바와 같은 각각의 플라스미드를 포함할 수 있다. 상기 백신은 복수의 플라스미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 백신은 치료적 또는 예방적 면역 반응을 유도하기 위해 제공될 수 있다.

[0101] 유전적 컨스트럭트는 유전자 발현에 필요한 조절 요소에 작동가능하게 연결된 표적 단백질 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 따라, 표적 단백질을 인코딩하는 발현가능한 형태의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하나의 컨스트럭트 및 면역조절 단백질을 인코딩하는 발현가능한 형태의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하나의 컨스트럭트를 포함하는 유전자 컨스트럭트의 조합이 제공된다. 유전자 컨스트럭트들의 조합을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자(들)의 살아 있는 세포로의 전달은 DNA 또는 RNA의 발현 및 표적 단백질 및 하나 이상 면역조절 단백질의 생산을 야기한다. 표적 단백질에 대한 향상된 면역 반응이 야기된다.

[0102] 본 발명은 병원체, 예컨대 바이러스, 원핵생물 및 병원성 진핵 유기체, 예컨대 단세포 병원성 유기체 및 다세포 기생충에 대해 개체를 면역화하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 세포를 감염시키는 병원체 및 바이러스, 및 원핵생물, 예컨대 임질, 리스테리아 및 시겔라와 같이 피포성이 아닌 병원체에 대해 개체를 면역화하는데 특히 유용하다. 또한, 본 발명은 이들이 세포내 병원체인 수명 주기 내의 단계를 포함하는 원생동물 병원체에 대해 개

체를 면역화시키는데 또한 유용하다. 표 1은 본 발명에 따른 백신이 제조될 수 있는 일부 바이러스 패밀리 및 속의 목록을 제공한다. 표에 열거된 항원과 같은 병원체 항원 상에 디스플레이된 에피토프와 동일하거나 실질적으로 유사한 에피토프를 적어도 포함하는 펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 컨스트럭트가 백신에 유용하다. 게다가, 본 발명은 원핵 및 진핵 원생동물 병원체뿐만 아니라 표 2에 열거된 것과 같은 다세포 기생충을 포함하는 다른 병원체에 대해 개체를 면역화시키는데 또한 유용하다.

[0103] **표 1 - 바이러스**

[0104] 피코나바이러스 패밀리

[0105] 아과:

[0106] 리노바이러스: (의학) 일반 감기의 ~50% 사례를 담당함.

[0107] 에테로바이러스: (의학) 폴리오바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스, 및 A형 감염 바이러스와 같은 인간 엔테로바이러스를 포함함.

[0108] 아프타바이러스: (수의학) 이들은 구제역 바이러스임.

[0109] 표적 항원: VP1, VP2, VP3, VP4, VPG

[0110] 칼시바이러스 패밀리

[0111] 아과:

[0112] 노르워크 그룹의 바이러스: (의학) 이들 바이러스는 유행성 위장염의 중요한 원인 인자임.

[0113] 토가바이러스 패밀리

[0114] 아과:

[0115] 알파바이러스: (의학 및 수의학) 예는 신드비스 바이러스, 로스리버 바이러스 및 베네주엘라 이스턴 & 웨스턴 말 뇌염 바이러스를 포함함.

[0116] 레오바이러스: (의학) 풍진 바이러스.

[0117] 플라비비리대 패밀리

[0118] 예는 하기를 포함한다: (의학) 뎅기열, 황열병, 일본 뇌염, 세인트 루이스 뇌염 및 진드기 매개 뇌염 바이러스. 웨스트 나일 바이러스 (유전자은행 NC001563, AF533540, AF404757, AF404756, AF404755, AF404754, AF404753, AF481864, M12294, AF317203, AF196835, AF260969, AF260968, AF260967, AF206518 및 AF202541)

[0119] 대표적인 표적 항원: E NS5 C

[0120] C형 감염 바이러스: (의학) 이들 바이러스는 하나의 패밀리에 아직 위치하지 않지만 토가바이러스 또는 플라비바이러스 중 하나인 것으로 여겨짐. 토가바이러스 패밀리와 가장 유사함.

[0121] 코로나바이러스 패밀리: (의학 및 수의학)

[0122] 감염성 기관지염 바이러스 (가금)

[0123] 돼지 전염성 위장 바이러스 (돼지)

[0124] 돼지 혈구응집성 뇌척수염 바이러스 (돼지)

[0125] 고양이 감염성 복막염 바이러스 (고양이)

[0126] 고양이 장의 코로나바이러스 (고양이)

[0127] 개 코로나바이러스 (개)

[0128] SARS 연관된 코로나바이러스

[0129] 인간 호흡 코로나바이러스는 일반 감기의 약 40%의 사례를 일으킴. EX. 224E, OC43 Note - 코로나바이러스는 비-A, B 또는 C 간염을 일으킬 수 있음

[0130] 표적 항원: E1 - M 또는 매트릭스 단백질 E2로도 불림 - S 또는 스파이크 단백질 E3로도 불림 - BE 또는 헤마글

루틴-엘테로스 당단백질 (모든 코로나바이러스 내에 존재하지는 않음) N - 뉴클레오캡시드로 불림

[0131] 랩도바이러스 패밀리

[0132] 아과:

[0133] 수포성바이러스, 리사바이러스:(의학 및 수의학) 광견병

[0134] 표적 항원: G 단백질, N 단백질

[0135] 필로비리대 패밀리: (의학)

[0136] 마버그 및 에볼라 바이러스와 같은 출혈열 바이러스

[0137] 파라믹소바이러스 패밀리:

[0138] 아과:

[0139] 파라믹소바이러스: (의학 및 수의학) 볼거리 바이러스, 뉴캐슬 질환 바이러스 (닭에서 중요한 병원체)

[0140] 모빌리바이러스: (의학 및 수의학) 홍역, 개 홍역

[0141] 뉴모바이러스: (의학 및 수의학) 호흡 신사이티알 바이러스

[0142] 오르토믹소바이러스 패밀리 (의료) 인플루엔자 바이러스

[0143] 분야바이러스 패밀리

[0144] 아과:

[0145] 분야바이러스: (의학) 캘리포니아 뇌염, 라크로스

[0146] 플레보바이러스: (의학) 리프트밸리 열

[0147] 한타바이러스: 푸레말라는 헤마하긴열 바이러스

[0148] 나이르바이러스 (수의학) 나이로비 양 질환

[0149] 또한 많은 비할당된 분가바이러스

[0150] 아레나바이러스 패밀리 (의학) LCM, 라사열 바이러스

[0151] 레오바이러스 패밀리

[0152] 아과:

[0153] 레오바이러스: 가능한 인간 병원체

[0154] 로타바이러스: 소아에서의 급성 위장염

[0155] 오르비이러스: (의학 및 수의학) 콜로라도 진드기 열병,

[0156] Lebombo (인간) 말 뇌염, 청설

[0157] 레트로바이러스 패밀리

[0158] 아과:

[0159] 온코리비리날: (수의학) (의료) 고양이 백혈병 바이러스, HTLVI 및 HTLVII

[0160] 렌티비리날: (의학 및 수의학) HIV, 고양이 면역결핍 바이러스, 말 감염, 빈혈 바이러스

[0161] 스푸마비리날 파포바바이러스 패밀리

[0162] 아과:

[0163] 폴리오마바이러스: (의학) BKU 및 JCU 바이러스

[0164] 아과:

[0165] 파필로마바이러스: (의학) 암 또는 유두종의 악성 진행과 연관된 많은 바이러스 유형.

[0166] 아데노바이러스 (의학) EX AD7, ARD., O.B. - 호흡 질환을 일으킴 - 275와 같은 일부 아데노바이러스는 장염을 일으킴

[0167] 파보바이러스 패밀리 (수의학)

[0168] 고양이 파보바이러스: 고양이 장염을 일으킴

[0169] 고양이 범백혈구감소증바이러스

[0170] 개 파보바이러스

[0171] 돼지 파보바이러스

[0172] 헤르페스바이러스 패밀리

[0173] 아과:

[0174] 알파헤르페스바이러스과

[0175] 아과:

[0176] 심플렉스바이러스 (의학)

[0177] HSVI (유전자은행 X14112, NC001806),

[0178] HSVII (NC001798)

[0179] 수두 대상포진: (의학 수의학)

[0180] 가성광견병

[0181] 수두 대상포진

[0182] 아과

[0183] 베타헤르페스바이러스과

[0184] 아과:

[0185] 사이토메갈로바이러스 (의학)

[0186] HCMV

[0187] 무로메갈로바이러스

[0188] 아과:

[0189] 감마헤르페스바이러스과

[0190] 아과:

[0191] 림포크립토바이러스 (의학)

[0192] EBV - (버킷 림프종)

[0193] 폭스바이러스 패밀리

[0194] 아과:

[0195] 코도폭스바이러스과 (의학 - 수의학)

[0196] 아과:

[0197] 두창 (천연두)

[0198] 우두 (Cowpox)

[0199] 파라폭시바이러스 - 수의학

[0200] 아우이폭스바이러스 - 수의학

[0201] 카프리폭스바이러스

[0202] 레포리폭스바이러스

[0203] 돼지두창바이러스

[0204] 아과:

[0205] 엔테모폭스비리대

[0206] 헤파드나바이러스 패밀리

[0207] B형 간염 바이러스

[0208] 미분류된 간염 델타 바이러스

[0209] **표 2**

[0210] 박테리아 병원체

[0211] 병원성 그람-양성 구균은 하기를 포함한다: 폐렴구균; 포도상구균; 및 연쇄상구균.

[0212] 병원성 그람-음성 구균은 하기를 포함한다: 수막염균; 및 임균.

[0213] 병원성 장내 그람-음성 바실러스는 하기를 포함한다: 엔테로박테리아케애; 슈도모나스, 아시네토박테리아 및 에이케넬라, 멜리오이도시스; 살모넬라; 쉬겔로시스; 헤모필루스; 찬크로이드; 브루셀로시스; 툴라레미아; 예르시니아 (파스튜렐라); 스트렙토바실러스 모르틸리포르미스 및 스피릴룸; 리스테리아 모노사이토게네스; 에리시펠로트릭스 루시오파티애; 디프테리아, 콜레라, 안트락스; 도노바니아증 (그라눌로마 인구이날레); 및 바르토넬로시스.

[0214] 병원성 혐기성 박테리아는 하기를 포함한다: 테타누스; 보툴리즘; 다른 클로스트리듐; 투버쿨로시스; 레프로시; 및 다른 미코박테리아.

[0215] 병원성 스피로케탈 질환은 하기를 포함한다: 매독; - 트레포네마병: 매종, 열대 백반성 피부병 및 풍토병성 매독; 및 렙토스피라병.

[0216] 고병원성 박테리아 및 병원성 진균에 의해 야기되는 다른 감염은 하기를 포함한다: 방선균증; 노카르디아증; 효모균증, 블라스토마이세스병, 히스토플라마증 및 콕시디오이데스 진균증; 캔디다증, 아스페르길루스증, 및 털곰팡이증; 스포로트리쿰증; 파라콕시디오이드진균증, 페트리엘리디오시스, 톨루롭소시스증, 균종, 및 색소효모균증; 및 피부사상균증.

[0217] 리케차 감염은 리케차 및 리케차병을 포함한다.

[0218] 마이코플라스마 및 클라미디알 감염의 예는 하기를 포함한다: 마이코플라스마 폐렴; 성병 림프육아종; 앵무새병; 및 출산전후 클라미디알 감염.

[0219] 병원성 진핵생물

[0220] 병원성 원생동물 및 연충 및 이에 의한 감염은 하기를 포함한다: 아메바증; 말라리아; 라이쉬마니증; 트라파노소마증; 톡소포자충증; 주폐포자충; 바베스열원충증; 람블편모충증; 선모충증; 사상충증; 주혈흡충증; 선충; 흡충 또는 흡충; 및 촌충류 (촌충) 감염.

[0221] 병원체 감염을 예방하는 유전적 백신을 생산하기 위해, 보호 면역 반응이 증가될 수 있는 면역원성 단백질을 인코딩하는 유전적 물질이 표적에 대한 코딩 서열로서 유전적 컨스트럭트 내에 포함되어야 한다. DNA 및 RNA는 상대적으로 작고 상대적으로 쉽게 생산될 수 있기 때문에, 본 발명은 다수의 병원체 항원을 이용한 백신접종을 허용하는 추가 이점을 제공한다. 유전적 백신에 사용되는 유전적 컨스트럭트는 많은 병원체 항원을 인코딩하는 유전적 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 몇 개의 바이러스 유전자들이 단일 컨스트럭트 내에 포함됨으로써 다수의 표적을 제공할 수 있다.

[0222] 표 1 및 2는 감염으로부터 개체를 보호하기 위해 유전적 백신이 제조될 수 있는 일부 병원성 제제 및 유기체의 목록을 포함한다.

[0223] 일부 구현예에서, 백신은 각각 본원에 참고로 통합되어 있는 하기 특허 문서에서 제시된 하나 이상의 DNA 백신

컨스트럭트와 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 PCT 출원 PCT/US07/74769호 및 대응 미국 특허 출원 제12/375,518호에 개시된 바와 같은 (인간 면역결핍 바이러스) HIV 백신, (C형 감염 바이러스) HCV 백신, 인간 유두종 바이러스 (HPV) 백신, 인플루엔자 백신 또는 hTERT-표적화된 암 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 PCT 출원 PCT/US08/83281호 및 대응 미국 특허 출원 제12/269,824호 또는 PCT 출원 PCT/US11/22642호 및 대응 미국 특허 출원 제12/694,238호에 개시된 인플루엔자 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 PCT 출원 PCT/US08/081627호 및 대응 미국 특허 출원 제13/127,008호에 개시된 HCV 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 PCT 출원 PCT/US10/21869 호 및 대응 미국 특허 출원 제 12/691,588호 또는 미국 가출원 제61/442,162호에 개시된 HPV 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 PCT 출원 PCT/US09/045420 호 및 대응 미국 특허 출원 제12/473634호에 개시된 천연두 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 PCT 출원 PCT/US09/039656호 및 대응 미국 특허 출원 제12/936,186호에 개시된 치쿤군야 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 PCT 출원 PCT/US10/55187호에 개시된 구제역 바이러스 (FMDV) 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 미국 가출원 제 61/386,973호에 개시된 말라리아 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 미국 가출원 제61/413,176호 또는 미국 가출원 제61/417,817호에 개시된 전립선 암 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 미국 가출원 제61/438,089호에 개시된 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV) 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 각각 전체가 참조로써 통합되어 있는 미국 가출원 제61/569,727호(2011년 12월 12일 출원, 명칭 "PROTEINS COMPRISING MRSA PBP2A AND FRAGMENTS THEREOF, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE SAME, AND COMPOSITIONS AND THEIR USE TO PREVENT AND TREAT MRSA INFECTIONS" 및 지정된 변리사 목록 번호 133172.04000 (X5709)) 및 미국 가출원 제61/569,727호에 대해 우선권을 주장하는 그의 대응 PCT 출원(이와 함께 제출된 출원과 동일자로 출원됨)에 개시된 메티실린-내성 *스타필로코쿠스 아우레우스* (MRSA) 백신과 조합된 최적화된 IL-12를 포함한다. 본원에 개시된 모든 특허 및 특허 출원은 그 전체가 참고로써 본원에 통합되어 있다.

[0224] 본 발명의 또 하나의 측면은 과증식 질환의 특징인 과증식 세포에 대해 보호 면역 반응을 부여하는 방법 및 과증식 질환으로부터 고통받는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 과증식 질환의 예는 모든 형태의 암 및 건선을 포함한다.

[0225] 면역원성 "과증식 세포"-연관된 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전적 컨스트럭트를 개체의 세포 내로 도입하는 것이 개체의 백신접종된 세포에서 상기 단백질의 생산을 야기하는 것으로 발견되었다. 과증식 질환에 대해 면역화하기 위해, 과증식 질환과 연관된 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전적 컨스트럭트가 개체에게 투여된다.

[0226] 과증식-연관된 단백질이 효과적인 면역원성 표적이 되도록 하기 위해, 그것은 정상 세포와 비교하여 과증식 세포에서 배타적으로 또는 더 높은 수준으로 생산되는 단백질이어야 한다. 표적 항원은 그러한 단백질, 그의 단편 및 펩타이드를 포함하며; 이는 적어도 그러한 단백질 상에서 발견되는 에피토프를 포함한다. 일부 경우, 과증식-연관된 단백질은 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이의 산물이다. 상기 돌연변이된 유전자는 정상 단백질 상에서 발견되지 않는 상이한 에피토프를 야기하는 약간 상이한 아미노산 서열을 갖는 것을 제외하면 정상 단백질과 거의 동일한 단백질을 인코딩한다. 그러한 표적 단백질은 myb, myc, fyn과 같은 종양유전자, 및 전좌 유전자 bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk 및 EGRF에 의해 인코딩된 단백질을 포함한다. 표적 항원으로서 종양유전자 산물 외에도, 항암 치료 및 보호 요법을 위한 표적 단백질은 B 세포 림프종에 의해 만들어진 항체의 가변 영역 및 T 세포 림프종의 T 세포 수용체의 가변 영역을 포함하며, 이는, 일부 구현예에서, 자가면역 질환을 위한 표적 항원으로도 사용된다. 모노클로날 항체 17-IA 및 폴레이트 결합 단백질 또는 PSA에 의해 인식되는 단백질을 포함하는 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발견되는 단백질과 같은 다른 종양-연관된 단백질이 표적 단백질로서 사용될 수 있다.

[0227] 본 발명이 암의 몇 가지 형태 중 하나 이상에 대해 개체를 면역화하는데 사용될 수 있음에도 불구하고, 본 발명은 특정 암을 생기기 쉽거나 암을 가졌던 이력이 있고 그에 따라 재발되기 쉬운 개체를 예방적으로 면역화하는데 특히 유용하다. 유전학 및 기술뿐만 아니라 전염병학의 발달은 개체에서 암 성장에 대한 가능성의 결정 및 위험성 평가를 가능하게 한다. 유전자 스크리닝 및/또는 가족 건강 내력을 이용하여, 특정 개체가 몇 가지 유형의 암 중 어느 하나에 걸릴지에 대한 가능성을 예측할 수 있다.

[0228] 유사하게, 이미 암에 걸린 개체 및 암을 제거하기 위해 치료받은 개체 또는 그렇지 않은 경우 차도가 있는 개체들은 특히 재발되기 쉽다 치료 요법의 일부로서, 그러한 개체들은 이들이 재발을 방지하기 위해 가지고 있었던

것으로 진단받았던 암에 대해 면역화될 수 있다. 따라서, 개체가 한 가지 유형의 암을 가지고 있었고 재발 위험성이 있다고 알려지면, 그들은 그들의 면역계가 어떠한 암의 미래의 출현을 막도록 준비하기 위해 면역화될 수 있다.

[0229] 본 발명은 과증식 질환으로부터 고통받는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 그러한 방법에서, 유전적 컨스트럭트의 도입은 개체의 면역계가 표적 단백질을 생산하는 과증식 세포와 싸우도록 지시하고 촉진하는, 면역치료제로서 작용한다. 암을 치료하거나 예방하는데 있어서, 세포가 없는 구현예가 특히 유용하다.

[0230] 본 발명은 세포 수용체 및 "자가"-지향된 항체를 생산하는 세포를 포함하는 자가면역과 연관된 표적에 대해 광범위한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질환 및 장애로부터 고통받는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0231] T 세포 매개된 자가면역 질환은 류마티스성 관절염 (RA), 다발성 경화증 (MS), 쇼그렌 증후군, 유육종증, 인슐린 의존적 진성 당뇨병 (IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직 척추염, 경피증, 다발성 근염, 피부근염, 건선, 혈관염, 베게너 육아종증, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다. 이들 각각의 질환은 내인성 항원에 결합하고 자가면역 질환과 연관된 염증성 캐스케이드를 개시하는 T 세포 수용체를 특징으로 한다. T 세포의 가변 영역에 대한 백신접종은 CTL을 포함하는 면역반응을 유발하여 상기 T 세포를 제거할 것이다.

[0232] RA에서, 질환과 연관된 T 세포 수용체 (TCR)의 몇 가지 특정 가변 영역이 규명되어 왔다. 이들 TCR은 Vβ-3, Vβ-14, 20 Vβ-17 및 Vα-17을 포함한다. 따라서, 이들 단백질 중 적어도 하나를 인코딩하는 DNA 컨스트럭트의 백신접종은 RA와 연관된 T 세포를 표적으로 할 면역 반응을 유발할 것이다. 각각이 참고로써 본원에 통합되어 있는 문헌[Howell, M. D., 등, 1991 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:10921-10925; Piliard, X., 등, 1991 Science 253:325-329; Williams, W. V., 등, 1992 J Clin. Invest. 90:326-333]을 참고한다. MS에서, 질환과 연관된 TCR의 몇 가지 특정 가변 영역이 규명되어 왔다. 이들 TCR은 Vβ-7, 및 Vα-10을 포함한다. 따라서, 이들 단백질 중 적어도 하나를 인코딩하는 DNA 컨스트럭트의 백신접종은 MS와 연관된 T 세포를 표적으로 할 면역 반응을 유발할 것이다. 각각이 참고로써 본원에 통합되어 있는 문헌[Wucherpfennig, K. W., 등, 1990 Science 248:1016-1019; Oksenberg, J. R., 등, 1990 Nature 345:344-346]을 참고한다.

[0233] 경피증에서, 질환과 연관된 TCR의 몇 가지 특정 가변 영역이 규명되어 왔다. 이들 TCR은 Vβ-6, Vβ-8, V β-14 및 Vα-16, Vα-3C, Vα-7, Vα-14, Vα-15, Vα-16, Vα-28 및 Vα-12를 포함한다. 따라서, 이들 단백질 중 적어도 하나를 인코딩하는 DNA 컨스트럭트의 백신접종은 경피증과 연관된 T 세포를 표적으로 할 면역 반응을 유발할 것이다.

[0234] T 세포 매개된 자가면역 질환, 특히 TCR의 가변 영역이 아직 규명되지 않은 질환으로부터 고통받는 환자를 치료하기 위해, 활막 생검이 수행될 수 있다. 존재하는 T 세포의 샘플을 취할 수 있고 상기 TCR의 가변 영역은 표준 기술을 이용하여 확인될 수 있다. 유전적 백신은 이 정보를 이용하여 제조될 수 있다.

[0235] B 세포 매개된 자가면역 질환은 낭창 (SLE), 그레이브스병, 중증 근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소증, 천식, 한성글로불린혈증, 일차 담낭 경화증 및 악성 빈혈을 포함한다. 이들 각각의 질환은 내인성 항원에 결합하고 자가면역 질환과 연관된 염증성 캐스케이드를 개시하는 항체를 특징으로 한다. 항체의 가변 영역에 대한 백신접종은 CTL을 포함하는 면역 반응을 유발하여 상기 항체를 생산하는 B 세포를 제거할 것이다.

[0236] B 세포 매개된 자가면역 질환으로부터 고통받는 환자를 치료하기 위해, 자가면역 활성과 연관된 항체의 가변 영역이 확인되어야 한다. 생검을 수행할 수 있고 염증 부위에 존재하는 항체의 샘플을 취할 수 있다. 상기 항체의 가변 영역은 표준 기술을 이용하여 확인될 수 있다. 유전적 백신은 이 정보를 이용하여 제조될 수 있다.

[0237] SLE의 경우에, 하나의 항원은 DNA인 것으로 여겨진다. 따라서, SLE에 대해 면역화될 환자에서, 그들의 혈청을 대상으로 항-DNA 항체가 스크리닝될 수 있고 혈청에서 발견된 상기 항-DNA 항체의 가변 영역을 인코딩하는 DNA 컨스트럭트를 포함하는 백신이 제조될 수 있다.

[0238] TCR 및 항체 모두의 가변 영역 간의 공통된 구조적 특징들은 잘 알려져 있다. 특정 TCR 또는 항체를 인코딩하는 DNA 서열은 참고로써 본원에 통합되어 있는 문헌[Kabat, 등 1987 Sequence of Proteins of Immunological Interest U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda Md.]에 기술된 것과 같은 잘 알려진 방법에 따라 일반적으로 발견될 수 있다. 또한, 항체로부터 기능적 가변 영역을 클로닝하는 일반적인 방법은 본원에 참고로 통합되어 있는 문헌 [Chaudhary, V. K., 등, 1990 Proc. Natl. Acad Sci. USA 87:1066]에서 발견될 수 있다.

[0239] 유전적 백신을 개선하기 위해 면역조절 단백질 코딩 서열의 발현가능한 형태들을 이용하는 것 이외에도, 본 발명은 항원을 인코딩하는 외부 유전자를 전달하는 재조합 벡터를 이용하는 개선된 약독화 생백신 및 개선된 백신에 관한 것이다. 약독화 생백신 및 외래 항원을 전달하는 재조합 벡터를 이용한 것의 예는, 각각 본원에 참고로 통합되어 있는, 미국 특허 번호: 제4,722,848호; 제5,017,487호; 제5,077,044호; 제5,110,587호; 제5,112,749호; 제5,174,993호; 제5,223,424호; 제5,225,336호; 제5,240,703호; 제5,242,829호; 제5,294,441호; 제5,294,548호; 제5,310,668호; 제5,387,744호; 제5,389,368호; 제5,424,065호; 제5,451,499호; 제5,453,364호; 제5,462,734호; 제5,470,734호; 및 제5,482,713호에 기재되어 있다. IL-12 컨스트럭트 또는 그의 기능적 단편의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 컨스트럭트가 제공되며, 여기서 상기 뉴클레오타이드 서열은 백신에서 발현이 일어나게 하는 기능을 할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 상기 유전자 컨스트럭트는 약독화 생백신 및 재조합 백신 내에 통합되어 본 발명에 따른 개선된 백신을 생산한다.

[0240] 상기 백신은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 부형제는 비히클, 보조제, 담체, 또는 희석제로서 기능적 분자일 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 부형제는 형질감염 촉진제일 수 있으며, 이는 계면 활성제, 예컨대 면역-자극 복합체 (ISCOMS), 프로인트 불완전한 아쥬반트, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 뮤라밀 펩타이드, 퀴논 유사체, 소포 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 히알루론산, 지질, 리포좀, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 폴리음이온, 폴리양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 공지된 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다.

[0241] 상기 형질감염 촉진제는 폴리음이온, 폴리-L-글루타메이트 (LGS)를 포함하는 폴리양이온, 또는 지질이다. 상기 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트이며, 더욱 바람직하게는, 상기 폴리-L-글루타메이트는 6 mg/ml 미만의 농도로 백신 내에 존재한다. 상기 형질감염 촉진제는 계면 활성제 예컨대 면역-자극 복합체 (ISCOMS), 프로인트 불완전한 아쥬반트, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 뮤라밀 펩타이드, 퀴논 유사체 및 소포, 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 및 히알루론산을 포함할 수 있고, 히알루론산이 상기 유전적 컨스트럭트와 함께 투여되어 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, DNA 플라스미드 백신은 또한 형질감염 촉진제, 예컨대 지질, DNA-리포좀 혼합물 (예를 들면 WO9324640 참고)로서 레시틴 리포좀 또는 본 기술분야에 공지된 다른 리포좀을 포함하는 리포좀, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중음이온, 폴리양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 공지된 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 형질감염 촉진제는 폴리음이온, 폴리-L-글루타메이트 (LGS)를 포함하는 폴리양이온, 또는 지질이다. 백신 내의 형질감염제의 농도는 4 mg/ml 미만, 2 mg/ml 미만, 1 mg/ml 미만, 0.750 mg/ml 미만, 0.500 mg/ml 미만, 0.250 mg/ml 미만, 0.100 mg/ml 미만, 0.050 mg/ml 미만, 또는 0.010 mg/ml 미만이다.

[0242] 약제학적으로 허용가능한 부형제는 하나 이상의 부가적인 보조제일 수 있다. 보조제는 동일한 플라스미드 또는 대안적인 플라스미드로부터 발현되거나, 백신 내의 상기 플라스미드와 조합된 단백질로서 전달되는 다른 유전자일 수 있다. 상기 하나 이상의 보조제는 단백질이고/거나 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 인코딩하는 핵산 분자일 수 있다: α-인터페론 (IFN-α), β-인터페론 (IFN-β), γ-인터페론, 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF), TNFα, TNFβ, GM-CSF, 표피 성장 인자 (EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인 (CTACK), 상피 흉선-발현된 케모카인 (TECK), 점막-연관된 상피 케모카인 (MEC), 신호 서열 또는 결실된 신호 서열을 인코딩하는 코딩 서열을 갖고 선택적으로 IgE 유래의 것과 같은 상이한 신호 펩타이드 또는 IgE, IL-28, MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IL-8, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, 아포1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, 아포3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, Ox40, Ox40 리간드, NKG2D, 마이카, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 그의 기능적 단편 유래의 것과 같은 상이한 신호 펩타이드를 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 IL-15를 포함하는 IL-15, 또는 이들의 조합. 일부 구현예에서, 부가적인 보조제는 하나 이상의 단백질 및/또는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 인코딩하는 핵산 분자일 수 있다: IL-15, IL-28, CTACK, TECK, MEC 또는 RANTES. IL-15 컨스트럭트 및 서열의 예는 PCT 출원 제PCT/US04/18962호 및 대응 US 출원 제10/560,650호, 및 PCT 출원 제PCT/US07/00886호 및 대응 미국 출원 제12/160,766호, 및 PCT 출원 제PCT/US10/048827호에 개시되어 있다. IL-28 컨스트럭트 및 서열의 예는 PCT 출원 제PCT/US09/039648호 및 대응 미국 출원 제12/936,192호에 개시되어 있다. RANTES 및 다른 컨스트럭트 및 서열

의 예는 PCT 출원 제PCT/US1999/004332호 및 대응 미국 출원 제09/622452호에 개시되어 있다. RANTES 컨스트럭트 및 서열의 다른 예는 PCT 출원 제PCT/US11/024098호에 개시되어 있다. RANTES 및 다른 컨스트럭트 및 서열의 예는 PCT 출원 제PCT/US1999/004332호 및 대응 미국 출원 제09/622452호에 개시되어 있다. RANTES 컨스트럭트 및 서열의 다른 예는 PCT 출원 제PCT/US11/024098호에 개시되어 있다. 케모카인 CTACK, TECK 및 MEC 컨스트럭트 및 서열의 예는 PCT 출원 제PCT/US2005/042231호 및 대응 미국 출원 제11/719,646호에 개시되어 있다. OX40 및 다른 면역조절물질의 예는 미국 출원 제10/560,653호에 개시되어 있다. DR5 및 다른 면역조절물질의 예는 미국 출원 제09/622452호에 개시되어 있다.

[0243] 상기 백신은 완전히 참고로 통합되어 있는, 미국 출원 제021,579호(1994년 4월 1일 출원)에 기재된 바와 같은 유전적 백신 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0244] 상기 백신은 약 1 나노그램 내지 100 밀리그램; 약 1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 또는 바람직하게는 약 0.1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 또는 더 바람직하게는 약 1 밀리그램 내지 약 2 밀리그램의 양의 공통 항원 및 플라스미드를 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 350 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 250 마이크로그램, 약 100 내지 약 200 마이크로그램, 약 1 나노그램 내지 100 밀리그램; 약 1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 약 0.1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 약 1 밀리그램 내지 약 2 밀리그램, 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램, 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램, 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램, 약 1 내지 약 350 마이크로그램, 약 25 내지 약 250 마이크로그램, 약 100 내지 약 200 마이크로그램의 이의 공통 항원 또는 플라스미드를 함유한다.

[0245] 상기 백신은 사용될 투여 방식에 따라 제형화될 수 있다. 주사가능한 백신 약제학적 조성물은 멸균되고, 발열물질이 없고 미립자가 없을 수 있다. 등장성 제형 또는 용액이 사용될 수 있다. 등장성을 위한 첨가제는 염화나트륨, 덱스트로오스, 만니톨, 소르비톨, 및 락토오스를 포함할 수 있다. 상기 백신은 혈관수축제를 포함할 수 있다. 등장성 용액은 인산완충염수를 포함할 수 있다. 백신은 젤라틴 및 알부민을 포함하는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. LGS 또는 폴리양이온 또는 폴리음이온과 같은 안정화제는 상기 백신 제형에 대해 연장된 기간 동안 상온 또는 주위 온도에서 제형을 안정화시킬 수 있다.

[0246] **5. 백신을 전달하는 방법**

[0247] 백신 면역원에 대해 효과적인 면역 반응을 생산하는 IL-12 컨스트럭트를 포함하는 백신을 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 백신을 전달하는 방법 또는 백신접종은 치료적 및 예방적 면역 반응을 유도하기 위해 제공될 수 있다. 백신접종 공정은 포유동물에서 면역원에 대한 면역 반응을 생성할 수 있다. 상기 백신은 포유동물의 면역계의 활성을 조절하고 면역 반응을 향상시키기 위해 개체에게 전달될 수 있다. 백신의 전달은 하나 이상의 핵산 분자 상에 면역원 및 IL-12 컨스트럭트를 인코딩하는 서열의 형질감염일 수 있다. 상기 코딩 서열은 세포에서 발현되고 면역계가 인식하는 세포의 표면으로 전달되어 세포성, 체액성, 또는 세포성 및 체액성 반응을 유도한다. 백신의 전달은 상기에서 논의된 바와 같은 백신을 포유동물에게 투여함으로써 면역원에 대해 포유동물에서 면역 반응을 유도하거나 유발하는데 사용될 수 있다. IL-12 컨스트럭트의 혼입은 보다 효과적인 면역 반응을 야기한다.

[0248] 백신 및 플라스미드를 포유동물의 세포 내로 전달할 때, 형질감염된 세포는 백신으로부터 주입된 플라스미드에 인코딩된 면역원 및 IL-12를 발현하고 분비할 것이다. 이들 면역원은 면역계에 의해 외래의 것으로 인식될 것이고, 항체가 이들에 대해 만들어질 것이다. 이들 항체는 면역계에 의해 유지될 것이고 차후의 감염에 대해 효과적인 반응을 허용할 것이다. IL-12 컨스트럭트에 의해 인코딩된 IL-12의 존재는 더 큰 면역 반응을 야기한다.

[0249] 상기 백신은 포유동물에게 투여되어 포유동물에서 면역 반응을 유발할 수 있다. 상기 포유동물은 인간, 영장류, 비-인간 영장류, 젖소, 소, 양, 염소, 영양, 들소, 물소, 들소, 소과, 사슴, 헤지혹, 코끼리, 라마, 알파카, 마우스, 랫트, 및 닭일 수 있다.

[0250] **a. 병용 치료**

[0251] IL-12 컨스트럭트는 하나 이상의 α-인터페론, γ-인터페론, 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF), TNFα, TNFβ, GM-CSF, 표피 성장 인자 (EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인 (CTACK), 상피 흉선-발현된 케모카인 (TECK), 점막

-연관된 상피 케모카인 (MEC), IL-15 (신호 서열이 결실되고 선택적으로 IgE 유래의 신호 펩타이드를 포함하는 IL-15를 포함함), MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-28, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IL-8, RANTES, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, 아포-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, 아포-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, Ox40, Ox40 리간드, NKG2D, 마이카, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 그의 기능적 단편을 인코딩하는 기타 단백질 또는 유전자 또는 이들의 조합과 병용으로 투여될 수 있다.

[0252] 상기 백신은 경구로, 비경구로, 설하로, 경피로, 직장으로, 점막관통으로, 국소로, 흡입을 통해, 구강 투여를 통해, 늑막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내 척추강내, 및 관절내 또는 이들의 조합을 포함하는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 수의학적 용도를 위해, 상기 조성물은 일반적인 수의학적 관례에 따라 적합하게 허용가능한 제형으로서 투여될 수 있다. 수의사는 특정 동물에 가장 적절한 복용 요법 및 투여 경로를 쉽게 결정할 수 있다. 백신은 전통적 주사기, 무바늘 주사 장치, "미세투사 충격 고운 건(microprojectile bombardment gone guns)", 또는 전기천공 ("EP"), "유체역학적 방법", 또는 초음파와 같은 다른 물리적 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0253] 백신의 플라스미드는 생체내 전기천공을 이용하여 그리고 이를 이용하지 않고 DNA 주사 (또한 DNA 백신접종으로도 불림), 리포좀 매개된, 나노입자 촉진된, 재조합 벡터, 예컨대 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 연관된 바이러스 및 재조합 우두를 포함하는 널리 공지된 몇 가지 기술에 의해 포유동물에게 전달될 수 있다. 공통 항원은 DNA 주사를 통해 그리고 생체내 전기천공과 함께 전달될 수 있다.

[0254] **b. 전기천공**

[0255] 백신의 플라스미드의 전기천공을 통한 백신의 투여는 가역적 기공이 세포막에 형성되게 하는데 효과적인 에너지의 펄스를 포유동물의 원하는 조직에 전달하도록 구성될 수 있는 전기천공 장치를 이용하여 달성될 수 있고, 바람직한 에너지의 펄스는 사용자에 의해 입력된 미리 조정된 전류와 유사한 정전류다. 상기 전기천공 장치는 전기천공 구성요소 및 전극 어셈블리 또는 핸들 어셈블리를 포함할 수 있다. 상기 전기천공 구성요소는 하기를 포함하는, 전기천공 장치의 다양한 요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 컨트롤러, 전류 파형 발전기, 임피던스 테스터, 파형 로거(logger), 입력 요소, 상태 보고 요소, 통신 포트, 메모리 구성요소, 전원, 및 전원 스위치. 상기 전기천공은 플라스미드에 의해 세포의 형질감염을 촉진하는 생체내 전기천공 디바이스, 예를 들면 CELLECTRA EP 시스템 (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA) 또는 Elgen 전기천공기 (Genetronics, San Diego, CA)를 이용하여 달성될 수 있다.

[0256] 상기 전기천공 구성요소는 전기천공 장치의 하나의 요소로서 기능할 수 있고, 다른 요소들은 전기천공 구성요소와 통신하는 별개의 요소들(또는 구성요소들)이다. 상기 전기천공 구성요소는 전기천공 장치의 하나를 초과하는 요소로서 기능할 수 있고, 이는 상기 전기천공 구성요소와 구별되는 전기천공 장치의 또 다른 요소와 통신할 수 있다. 하나의 전기기계적 또는 기계적 장치의 일부로서 존재하는 전기천공 장치의 요소들은, 상기 요소들이 하나의 장치로서 또는 서로 통신하는 별개의 요소로서 기능할 수 있으므로, 제한되지 않을 수 있다. 상기 전기천공 구성요소는 원하는 조직에서 정전류를 생산하는 에너지의 펄스를 전달할 수 있으며, 피드백 기전을 포함한다. 전극 어셈블리는 공간 배열 내에 복수의 전극을 갖는 전극 어레이를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 전극 어셈블리는 전기천공 구성요소로부터 에너지의 펄스를 받고 전극을 통해 원하는 조직에 이를 전달한다. 복수의 전극 중 적어도 하나는 에너지의 펄스가 전달되는 동안 중성이고, 원하는 조직에서 임피던스를 측정하고 전기천공 구성요소에 임피던스를 전달한다. 상기 피드백 기전은 측정된 임피던스를 받을 수 있고 전기천공 구성요소에 의해 전달된 에너지의 펄스가 정전류를 유지하도록 조절할 수 있다.

[0257] 복수의 전극은 분산된 패턴으로 에너지의 펄스를 전달할 수 있다. 복수의 전극은 프로그램된 순서 하에 전극의 제어를 통해 분산된 패턴으로 에너지의 펄스를 전달할 수 있고, 상기 프로그램된 순서는 사용자에 의해 전기천공 구성요소에 입력된다. 상기 프로그램된 순서는 순서로 전달된 복수의 펄스를 포함할 수 있으며, 여기서 복수의 펄스 중 각각의 펄스는 임피던스를 측정하는 하나의 중성 전극을 갖는 적어도 2개의 활성 전극에 의해 전달되고, 여기서 복수의 펄스 중 차후의 펄스는 임피던스를 측정하는 하나의 중성 전극을 갖는 적어도 2개의 활성 전국 중 상이한 하나에 의해 전달된다.

[0258] 상기 피드백 기전은 하드웨어 또는 소프트웨어 중 하나에 의해 수행될 수 있다. 상기 피드백 기전은 아날로그 폐-루프 회로에 의해 수행될 수 있다. 상기 피드백은 50 μs, 20 μs, 10 μs 또는 1 μs마다 일어나지만, 바람직하게는 실시간 피드백 또는 즉각적이다 (즉, 반응 시간을 결정하는 이용가능한 기술에 의해 결정된 바와 같이 실질적으로 즉각적임). 중성 전극은 원하는 조직 내의 임피던스를 측정할 수 있고, 상기 임피던스를 피드백 기전에 전달하고, 상기 피드백 기전은 임피던스에 반응하여 에너지의 펄스를 미리 조정된 전류와 유사한 값으로 정전류를 유지시킨다. 상기 피드백 기전은 에너지의 펄스의 전달 동안 연속적으로 그리고 즉각적으로 정전류를 유지할 수 있다.

[0259] 본 발명의 DNA 백신의 전달을 촉진할 수 있는 전기천공 장치 및 전기천공 방법의 예는, 이들의 내용 전체가 본원에 참조로써 통합되어 있는, 미국 특허 제7,245,963호(Draghia-Akli, 등,), 미국 특허공개 제2005/0052630호(Smith, 등에 의해 제출됨)에 기술된 것을 포함한다. DNA 백신의 전달을 촉진하는데 사용될 수 있는 다른 전기천공 장치 및 전기천공 방법은, 제60/852,149호(2006년 10월 17일 출원), 및 제60/978,982호(2007년 10월 10일 출원)에 대해 35 USC 119(e) 하에 우선권을 주장하는, 공동계류중이고 공동소유인 미국 특허 출원 제11/874072호(2007년 10월 17일 출원)에 제공된 것을 포함하며, 이들 모두는 그 전체가 참고로써 본원에 통합되어 있다.

[0260] 미국 특허 제7,245,963호(Draghia-Akli, 등)는 몸 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 용이하게 하기 위한 모듈식 전극 시스템 및 그의 용도를 기술하고 있다. 상기 모듈식 전극 시스템은 복수의 바늘 전극; 피하 주사침; 프로그램가능한 정전류 펄스 컨트롤러로부터 복수의 바늘 전극까지 전도성 링크를 제공하는 전기적 커넥터; 및 전원을 포함할 수 있다. 작업자는 지지 구조 상에 올려진 복수의 바늘 전극을 붙잡아 몸 또는 식물에서 선택된 조직 내로 이들을 단단하게 삽입할 수 있다. 생체분자는 이후 선택된 조직 내로 피하 주사침을 통해 전달된다. 프로그램가능한 정전류 펄스 컨트롤러가 활성화되고 정전류 전기 펄스가 복수의 바늘 전극에 적용된다. 상기 적용된 정전류 전기 펄스는 복수의 전극 사이에 있는 세포 내로 생체분자의 도입을 용이하게 한다. 미국 특허 제7,245,963호의 전체 내용은 참고로 본원에 통합되어 있다.

[0261] 미국 특허 공개 제2005/0052630호(Smith, 등에 의해 출원됨)는 몸 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 효과적으로 촉진하는데 사용될 수 있는 전기천공 장치를 기술한다. 상기 전기천공 장치는 작업이 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 지정되는 전기-동력학 장치 ("EKD 장치")를 포함한다. EKD 장치는 사용자 제어 및 펄스 파라미터의 입력에 기초한 어레이 내의 전극 사이에 일련의 프로그램가능한 정전류 펄스 패턴을 생산하고, 전류 파형 데이타의 저장 및 취득을 허용한다. 전기천공 장치는 또한 바늘 전극, 주사 바늘용 중심 주사 통로, 및 제거가능한 가이드 디스크의 어레이를 갖는 교체가능한 전극 디스크를 포함한다. 미국 특허 공개. 제2005/0052630호의 전체 내용은 참고로 본원에 통합되어 있다.

[0262] 미국 특허 제7,245,963 및 미국 특허 공개 제2005/0052630호에 기재된 전극 어레이 및 방법은 근육과 같은 조직뿐만 아니라 다른 조직 또는 기관 내로 깊이 침투시키는데 조정될 수 있다. 전극 어레이의 배치 때문에, 주사 바늘 (선택한 생체분자를 전달함)은 또한 표적 장기 내로 완전히 삽입되며, 주사는 전극에 의해 미리 기술된 영역 내에서, 표적 조직에 수직으로 전달된다. 미국 특허 제7,245,963호 및 미국 특허 공개 2005/005263에 기술된 전극은 바람직하게는 20 mm 길이 및 21 게이지이다.

[0263] 또한, 전기천공 장치 및 이의 사용을 포함하는 고려된 일부 구현예에서, 하기 특허들에 기재된 것들인 전기천공 장치가 고려된다: US 특허 제5,273,525호(1993년 12월 28일 발행), US 특허 제6,110,161호(2000년 8월 29일 발행), 제6,261,281호(2001년 7월 17일 발행), 및 제6,958,060호(2005년 10월 25일 발행), 및 US 특허 제6,939,862호(2005년 9월 6일 발행). 더욱이, 임의의 다양한 장치를 이용하여 DNA를 전달하는 것에 관한, US 특허 제6,697,669호(2004년 2월 24일 발행), 및 DNA를 주사하는 방법에 관한, US 특허 제7,328,064호(2008년 2월 5일 발행)에서 제공된 주제를 다루는 특허들이 본원에 고려된다. 상기-특허들은 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있다.

[0264] **c. DNA 플라스미드를 제조하는 방법**

[0265] 본원에 논의된 DNA 컨스트럭트 및 백신을 포함하는 DNA 플라스미드를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 상기 DNA 플라스미드는, 포유동물 발현 플라스미드 내로의 최종 서브클로닝 단계 후, DNA 플라스미드가 본 기술분야에 공지된 방법을 이용하여, 대규모 발효 탱크 내에서 세포 배양물을 접종하는데 사용될 수 있다.

[0266] 본 발명의 EP 장치를 사용하기 위한 DNA 플라스미드는 공지된 장치 및 기술의 조합을 이용하여 제형화되거나 제조될 수 있지만, 바람직하게는 이들은 라이센스된, 공동계류중인 미국 가출원 제60/939,792호(2007년 5월 23일 출원)에 기재된 최적화된 플라스미드 제조 기술을 이용하여 제조된다. 일부 예에서, 이들 연구에 사용된 DNA 플

라스미드는 10 mg/mL 이상의 농도로 제형화될 수 있다. 제조 기술은 또한 라이센스된 특허, US 특허 제7,238,522호(2007년 7월 3일 발행)에서 기재된 것을 포함하여, 미국 출원 제60/939792호에 기재된 것 이외에도, 당해분야의 숙련자에게 통상적으로 공지된 다양한 장치 및 프로토콜을 포함한다. 상기-참조된 출원 및 특허, US 출원 제60/939,792호 및 US 특허 제7,238,522호는 각각 그 전체가 참조로써 본원에 통합되어 있다.

[0267] **6. 면역조절 조성물 및 방법**

[0268] 일부 구현예에서, IL-12 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열은 면역원을 인코딩하는 핵산 서열의 첨가없이 전달된다. 그러한 방법에서, IL-12 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열은, 기능적 IL-12를 생산하기 위해 발현될 때, 개체에게 원하는 면역조절 효과를 부여하는 면역치료제로서 사용된다. IL-12 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열이 제공되며 이는 면역원을 인코딩하는 핵산 서열을 배제하는 것을 제외하면 상기 기술된 대로 전달된다. 그러한 방법에서, IL-12 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열은 면역치료제 단독으로서 또는 병용 치료라는 명칭의 섹션에서 상기 기술된 것과 같은 다른 면역조절 단백질과 병용하여 사용될 수 있다.

[0269] **실시예**

[0270] 본 발명은 하기 실시예에 더 예시된다. 이들 실시예는, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내긴 하지만, 단지 예시를 위해 제공되는 것으로 이해되어야 한다. 상기 논의 및 이들 실시예로부터, 당해분야의 숙련가는 본 발명의 본질적인 특징을 확인할 수 있고, 이의 정신 및 범주로부터 벗어나지 않고, 그것을 다양한 용법 및 조건에 맞추기 위해 본 발명을 다양하게 변화 및 변형시킬 수 있다. 따라서, 본원에 제시되고 기술된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형들은 전술한 설명으로부터 당해분야의 숙련가에게 자명할 것이다. 그러한 변형은 또한 첨부된 청구항의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0271] **실시예 1**

[0272] **phuIL12-opt이 발현 수준을 phuIL12-nonopt와 비교하는 것.**

[0273] 중요한 코돈/RNA 최적화 전략이 고안된 합성 IL-12의 발현 수준/보조 효과를 증가시킬 수 있다는 것을 보여주기 위해, phuIL12-opt와 phuIL12-nonopt의 발현 수준의 비교를 수행하였다.

[0274] 제조사의 설명에 따라 FuGene6 형질감염 시약 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)을 이용하여, 2 또는 4 μg의 huIL12-opt 또는 huIL12-nonopt 각각을 이용하여 6-웰 플레이트에서 293T 세포 (7.5×10^5)를 형질감염시켰다. DNA 및 FuGene6 형질감염 시약을 1 μg DNA:3 μl FuGene6 시약의 DNA:FuGene6 비율로 무혈청 배지에 순서대로 첨가하였다. 무혈청 배지의 부피를 전체 혼합물의 총 부피를 200 μl로 만드는데 필요한 양에 의해 결정하였다. 상기 혼합물을 세포의 각 웰에 첨가하고 5% CO2 환경에서 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 인큐베이션의 끝에, 상청액 샘플을 ELISA 검정을 위해 수집했다.

[0275] 고 단백질 결합 플레이트 (Nunc, Rochester, NY)를 인간 IL-12 ELISA 키트 (Mabtech, Mariemont, OH)로부터 100 μl/웰의 모노클로날 항체 MT86/221로 코딩하고 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 배양 후, 상기 플레이트를 PBST (0.1% Tween 20을 갖는 DPBS)로 2회 세척하고 0.05% Tween 20 및 0.1% BSA가 보충된 200 μl/웰의 DPBS 용액으로 1시간 동안 차단하였다. 이후에 플레이트를 PBST로 세척하였다. 제조자의 지침을 이용하여, 양성 표준을 hIL-12 p70 (Mabtech, Mariemont, OH)을 이용하여 제조하였다. 양성 표준 및 상청액 샘플을 1:50, 1:150, 1:450, 1:1350, 및 1:4050의 희석으로 100 μl/웰의 부피로 2개의 웰에 첨가하였다. 샘플 및 양성 표준을 상기 블로킹 용액을 이용하여 희석하였다. 이후, 상기 플레이트를 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 이후, 상기 플레이트를 PBST로 세척하고 100 μl/웰의 mAB MT618-바이오틴 (Mabtech, Mariemont, OH)으로 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 플레이트를 다시 세정하고 블로킹 완충액에서 1:1000으로 희석된 100 μl/웰의 스트렙타비딘-HRP로 1시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 PBST로 다시 세정하고 TMB 및 2N H_2SO_4를 이용하여 현상하였다. 플레이트를 광분광기를 이용하여 450 nm에서 판독하였다.

[0276] 도 1a 및 1b에 나타낸 바와 같이, huIL12-opt 플라스미드는 huIL12-nonopt와 비교하여 더 높은 수준의 IL-12의 발현을 나타낸다. 명확히, 코돈/RNA 최적화 전략은 IL-12의 발현을 개선한다.

[0277] **실시예 2**

[0278] **pMacIL12-opt를 이용한 백신접종에 의해 유발된 향상된 PSA 및 PSMA-특이적 세포성 면역 반응.**

[0279] 히말라야 원숭이를 0.04 mg의 pMacIL-12-opt와 병용된 1 mg의 PSA 및 PSMA로 근육내로 면역화시킨 다음 Inovio Pharmaceuticals 사의 Cellectra 장치를 이용하여 전기천공하였다. 각 면역화 2주 후, 히말라야 원숭이를 채혈

하고 PSA 및 PSMA-특이적 IFN-γ ELISpot 검정을 위해 PBMC를 분리하였다. pMacIL12-opt를 받는 동물군은 pMacIL12-opt를 받지 않은 동물군과 비교하여 최대 반응에서 약 3배 증가를 나타내었다 (도 2).

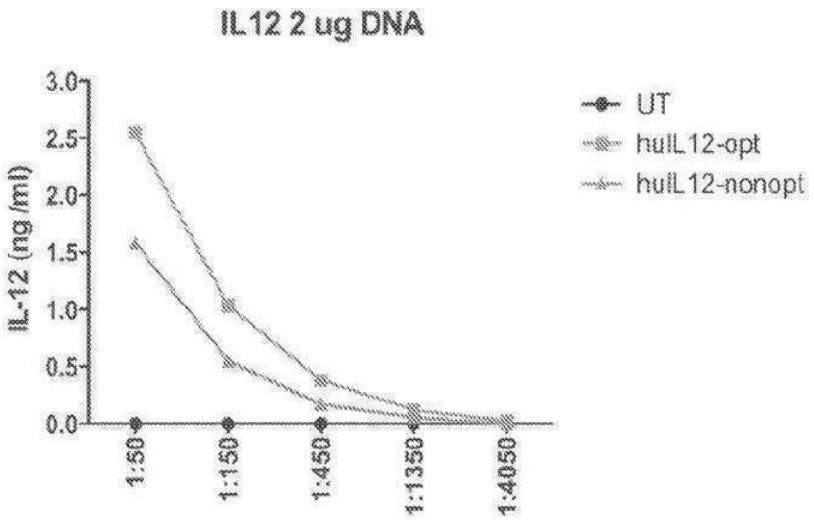
[0280] **실시예 3**

[0281] **pMacIL12-opt를 이용한 백신접종에 의해 유발된 향상된 HBV 코어 및 표면 항원-특이적 세포성 면역 반응.**

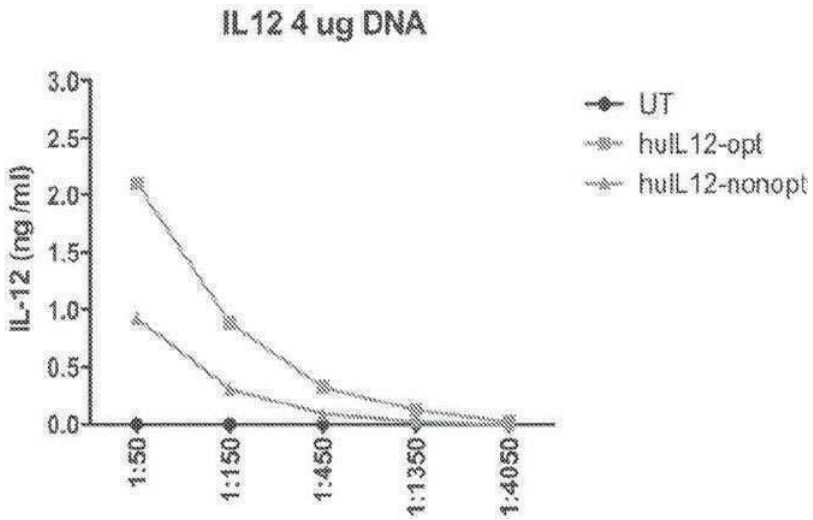
[0282] 히말라야 원숭이를 0.04 mg의 pMacIL-12-opt와 병용된 1 mg의 코어 및 표면 항원으로 근육내로 면역화시킨 다음 Inovio Pharmaceuticals 사의 Cellectra 장치를 이용하여 전기천공하였다. 각 면역화 2주 후, 히말라야 원숭이를 채혈하고 코어 및 표면 항원-특이적-IFN-γ ELISpot 검정을 위해 PBMC를 분리하였다. pMacIL12-opt를 받는 동물군은 pMacIL12-opt를 받지 않는 동물군과 비교하여 증가된 규모 및 폭의 세포 반응을 나타내었다 (도 3).

도면

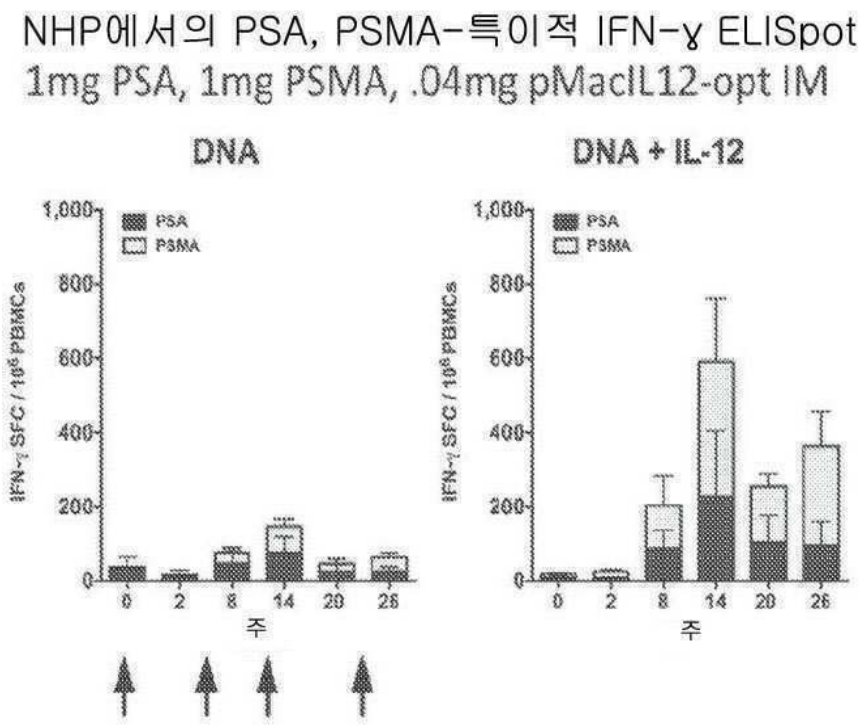
도면1a



도면1b

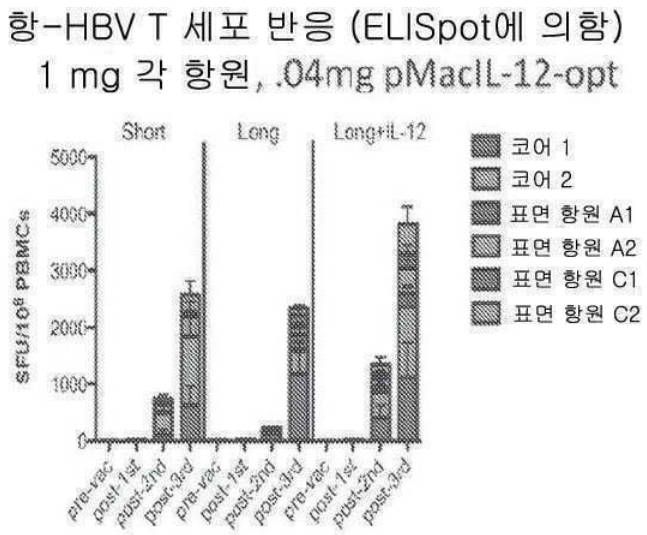


도면2



pMacIL12-opt를 이용하여 최대 반응에서 3배 증가

도면3



pMacIL-12-opt를 이용한 코어 및 표면 항원에 대한 반응의 증가된 규모 및 확장

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Turstees of the University of Pennsylvania

Yan, Jian

Weiner, David B.

Morrow, Matthew P.

<120> COMPOSITIONS COMPRISING IMPROVED IL-12 GENETIC CONSTRUCTS AND VACCINES, IMMUNOTHERAPEUTICS AND METHODS OF USING THE SAME

<130> 133172.4102

<150> US 61/569,600

<151> 2011-12-12

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12 Optimized p35 subunit nucleic acid

<400> 1

atgtgccccg ctcggtccct gctgctggtc gctaccctgg tcctgctgga tcacctgtca 60

ctggctcgaa atctgcctgt cgctaccccc gatcctggca tgttcccctg cctgcaccat 120

agccagaacc tgctgcgggc cgtgtccaat atgctgcaga aagctagaca gacactggag 180

ttttaccctt gtacttctga ggaaatcgac cacgaggata ttactaagga caaaacctcc 240

acagtcgaag cctgcctgcc actggagctg accaagaacg aatcatgtct gaatagcagg 300

gagacttcct tcatcaccaa cgggtcttgc ctggctagtc gcaagaccag cttcatgatg 360

gcactgtgcc tgagctccat ctacgaggat ctgaagatgt atcaggtgga attcaaaacc 420

atgaacgcta agctgctgat ggaccctaaa cgacagatct ttctggatca gaatatgctg 480

gcagtgattg acgagctgat gcaggccctg aacttcaata gcgaaaccgt cccacagaag 540

tctagtctgg aggaacccga cttttataag acaaaaatca agctgtgcat tctgctgcat 600

gcctttcgga ttcgggctgt cactattgat cgggtcatgt catacctgaa cgcttcctaa 660

<210> 2

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12 Opt p35 subunit amino acid

<400> 2

Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
20 25 30
Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
35 40 45
Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
50 55 60
Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser
65 70 75 80

Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
85 90 95
Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
100 105 110
Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
115 120 125
Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
130 135 140

Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
145 150 155 160
Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
165 170 175
Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
180 185 190
Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr
195 200 205

Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
210 215

<210> 3

<211> 987

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12 Opt p40 subunit nucleic acid

<400> 3

atgtgccatc agcagctggt catctcttgg tttagtctgg tgtttctggc ttctccactg 60

gtcgctatct gggaactgaa aaaggatgtg tacgtggtcg agctggactg gtatccagat 120

gcacccggag aaatggtggt cctgacctgc gacacacccg aggaagatgg catcacttgg 180

accctggacc agagctccga ggtgctggga tctggcaaga cactgactat tcaggtcaaa 240

gaattcgggg atgccggaca gtacacatgt cacaagggcg gggaggtgct gagtcactca 300

ctgctgctgc tgcataagaa agaagacggc atctggtcta ctgacattct gaaggatcag 360

aaagagccta agaacaaaac cttcctgaga tgcgaagcta agaattatag tgggaggttt 420

acctgttggt ggctgaccac aatctcaact gacctgacct ttagcgtgaa atctagtagg 480

gggtcaagcg atccacaggg agtgacctgc ggagcagcta cactgagcgc cgagcgggtg 540

agaggagaca acaaggagta cgaatatagt gtcgagtgcc aggaagattc agcctgtccc 600

gcagccgagg aatccctgcc tatcgaagtg atggtggacg ctgtgcacaa gctgaaatac 660

gaaaactaca catcctcttt ctttattcgc gacatcatta agccagatcc ccctaaaaac 720

ctgcagctga agcccctgaa aaattcccga caggtggagg tctcttggga ataccctgat 780

acatggagca ctccacattc ttatttcagt ctgacttttt gcgtgcaggt ccagggcaag 840

agcaaaaggg agaagaaaga ccgcgtgttc accgataaga catccgctac tgtcatctgt 900

cgaaaaaacg caagcatttc cgtgcgggca caggataggt attattccag cagttggtct 960

gagtgggctt ccgtcccttg tagttga 987

<210> 4

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12 Opt p40 subunit amino acid

<400> 4

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln

50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys

65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val

85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp

100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe

115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp

130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser

165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu

180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile

195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr

210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn

225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp

245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr

260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg

275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala

290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser

305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser

325

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgE leader

<400> 5

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser