



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월22일

(11) 등록번호 10-1421745

(24) 등록일자 2014년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/54 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7019727

(22) 출원일자(국제) 2007년01월12일

심사청구일자 2012년01월12일

(85) 번역문제출일자 2008년08월12일

(65) 공개번호 10-2008-0094044

(43) 공개일자 2008년10월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/000886

(87) 국제공개번호 WO 2007/087178

국제공개일자 2007년08월02일

(30) 우선권주장

60/758,856 2006년01월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2004059556 A2*

WO2005118874 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아

미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너트스트리트 3160

(72) 발명자

웨이너, 레이비드, 비.

미국 19066 펜실베니아주 메리온 비콤 레인 717

쿠클러, 미셸

미국 18964 펜실베니아주 소더튼 펜 애비뉴 18

(74) 대리인

김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 코돈 죄적화된 IL-15를 사용하는 백신 및 면역치료제, 및 그의 사용 방법

(57) 요약

IL-15에 대한 천연 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자보다 더 높은 수준으로 단백질을 발현시키는, IL-15 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 분자를 개시한다. 예를 들면, IL-15 신호 서열에 대한 코딩 서열의 부재 및/또는 IL-15 비번역 서열의 부재 및/또는 비-IL-15 신호 서열의 포함과 같은 추가의 변형을 포함하는 핵산 분자 또한 개시한다. 상기 핵산 분자를 포함하는, 플라스미드 및 바이러스 벡터를 비롯한 벡터; 및 상기 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 개시할 뿐만 아니라, 상기 핵산 분자를 단독으로, 또는 상기 핵산 분자의 일부분 및/또는 상이한 핵산 분자의 일부분인 면역원을 코딩하는 핵산 서열과 조합하여 사용하는 방법도 개시한다. 융합 단백질을 코딩하는 재조합 백신 및 약독화된 생병원체, 및 상기를 사용하는 방법도 개시한다.

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호: 1을 포함하는 핵산 분자.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, IL-15 신호 서열에 대한 코딩 서열이 결핍되어 있는 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, IL-15 코작 영역, IL-15 5' 비번역 영역 또는 IL-15 3' 비번역 영역 중 하나 이상이 결핍되어 있는 핵산 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 비-IL-15 신호 서열에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, IgE 신호 서열에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 면역원에 대한 코딩 서열을 추가로 포함하는 핵산 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 면역원이 병원체 항원, 암-관련 항원 또는 자가면역 질환과 관련된 세포에 연관된 항원인 핵산 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 면역원이 HIV, HSV, HCV, 및 WNV로 구성된 군으로부터 선택되는 병원체로부터의 병원체 항원인 단리된 핵산 분자.

청구항 10

제1항에 있어서, 플라스미드인 단리된 핵산 분자.

청구항 11

제1항에 있어서, 바이러스 벡터 내로 혼입되는 핵산 분자.

청구항 12

제1항에 있어서, 약독화된 생병원체 내로 혼입되는 핵산 분자.

청구항 13

제1항의 핵산 분자 및 면역원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는, 병원체 감염, 암 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 위한 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 면역원이 병원체 항원, 암-관련 항원 또는 자가면역 질환과 관련된 세포에 연관된 항원인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 면역원이 HIV, HSV, HCV, 및 WNV로 구성된 군으로부터 선택되는 병원체로부터의 병원체 항원인, 바이러스 감염으로부터 대상체를 치료 또는 예방하기 위한 조성물.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자가 플라스미드인 조성물.

청구항 17

제1항의 핵산 분자를 포함하는, 병원체 감염, 암 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 위한 주사용 약제학적 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

면역원을 코딩하는 핵산 분자 및 제1항의 핵산 분자를 포함하는, 병원체 감염, 암 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 위한 재조합 백신.

청구항 20

제19항에 있어서, 면역원이 병원체 항원, 암-관련 항원 또는 자가면역 질환과 관련된 세포에 연관된 항원인 재조합 백신.

청구항 21

제20항에 있어서, 면역원이 HIV, HSV, HCV, 및 WNV로 구성된 군으로부터 선택되는 병원체로부터의 병원체 항원인, 병원체 감염을 치료 또는 예방하기 위한 재조합 백신.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 백시니아 백신인, 병원체 감염, 암 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 위한 재조합 백신.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

명세서**기술분야**

[0001]

본 발명은 IL-15 및 그의 단편을 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열, 면역원에 대해 개체를 예방학적으로 및/또는 치료학적으로 면역화시키기 위한 개선된 백신, 개선된 방법 및 개선된 면역치료학적 조성물 및 개선된 면역 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

면역치료는 인간의 면역 반응을 조절하여 원하는 치료 효과를 부여하는 것을 지칭한다. 면역치료제는 개체에 투여되는 경우, 개체의 면역계를 충분히 조절하여 궁극적으로 원치않는 면역 반응과 관련된 증상을 감소시키거나 원하는 면역 반응을 증가시켜 궁극적으로 증상을 완화시키는 조성물을 지칭한다. 몇몇 경우에, 면역치료는 개체를 면역원에 노출시켜 개체가 면역 반응을 생성하도록 하는 백신을 개체에 투여하는 백신 접종 프로토콜의 일부이다. 그러한 경우에, 면역치료제는 면역 반응을 증가시키고/거나 특정 증상, 감염 또는 질환을 치료하거나

나 예방하는데 원하는 면역 반응 (예를 들어, 세포성 무기화(arm) 또는 체액성 무기화)의 일부를 선택적으로 증진시킨다.

[0003] 백신은 예를 들어, 알레르겐, 병원체 항원 또는 인간 질환에 관여하는 세포와 관련된 항원과 같은 표적 항원에 대해 개체를 면역화시키는데 유용하다. 인간 질환에 관여하는 세포와 관련된 항원은 암-관련 종양 항원 및 자가면역 질환에 관여하는 세포와 관련된 항원을 포함한다.

[0004] 그러한 백신을 디자인하는데 있어서, 백신 접종된 개체의 세포에서 표적 항원을 생성하는 백신이 면역계의 세포성 무기화를 유도하는데 효과적인 것으로 인지되었다. 특히, 약독화된 생백신, 비독성 백터를 사용하는 재조합 백신 및 DNA 백신 각각은 백신 접종된 개체의 세포에서 항원을 생성시켜 면역계의 세포성 무기화를 유도한다. 한편, 사멸되거나 불활성화된 백신, 및 단백질만을 포함하는 하위-유니트 백신은 이들이 체액성 반응을 유도하지만, 우수한 세포성 면역 반응을 유도하지는 못한다.

[0005] 병원체 감염에 대한 보호를 제공하고, 병원체 감염, 암 또는 자가면역 질환의 치료를 위해 효과적인 면역-매개 치료를 제공하는 데 흔히 세포 면역 반응이 필요하다. 따라서, 예를 들어, 약독화된 생백신, 비독성 백터를 사용하는 재조합 백신 및 DNA 백신과 같은, 백신 접종된 개체의 세포에서 표적 항원을 생성시키는 백신이 종종 바람직하다.

[0006] 그러한 백신은 종종 병원체 감염 또는 인간 질환에 대해 예방학적으로 또는 치료학적으로 개체를 면역화시키는데 효과적이지만, 백신을 개선시킬 필요가 있다. 증진된 면역 반응을 생성시키는 조성물 및 방법이 필요하다.

[0007] 또한, 몇몇 면역치료제가 환자에서 면역 반응을 조절하는데 유용하지만, 면역치료학적 조성물 및 방법을 여전히 개선시킬 필요가 있다.

본 발명의 요약

[0009] 본 발명은 서열 번호: 1을 포함하는 IL-15 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0010] 본 발명은 IL-15 신호 서열에 대한 코딩 서열이 결핍되어 있고/있거나, IL-15 코작(Kozak) 영역 및/또는 IL-15 5' 비번역 영역 및/또는 IL-15 3' 비번역 영역이 결핍되어 있고/있거나, 비-IL-15 신호 서열에 대한 코딩 서열을 포함하는, 서열 번호: 1 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 서열 번호: 1을 포함하는 IL-15 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하고, 면역원에 대한 코딩 서열을 추가로 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 서열 번호: 1을 포함하는 핵산 서열, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자, 및 면역원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명은 추가로 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자를 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명은 추가로 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 백신에 관한 것이다.

[0015] 본 발명은 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자를 일부로서, 또는 면역원을 코딩하는 핵산 분자와의 조합물로, 또는 면역원과 조합하여 개체에 투여하는 것을 포함하는, 면역원에 대해 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

정의

[0018] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 단백질"은 면역 반응을 위한 표적 단백질로서 작용하는 본 발명의 유전자 작제물에 의해 코딩되는 웨티드 및 단백질을 지칭한다. 용어 "표적 단백질" 및 "면역원"은 상호교환적으로 사용되고, 그에 대해 면역 반응이 유발될 수 있는 단백질을 언급한다. 표적 단백질은 병원체, 또는 예를 들어, 암세포 또는 그에 대해 면역 반응이 요구되는, 자가면역 질환에 관여하는 세포와 같이 원치않는 세포 유형으로부터 기원하는 단백질과 1개 이상의 에피토프를 공유하는 면역원성 단백질이다. 표적 단백질에 대한 면역 반응

은 개체를 표적 단백질과 관련된 특이적 감염 또는 질환으로부터 보호하고/거나 치료할 것이다.

- [0019] 본원에서 사용되는 바, 용어 "유전자 작제물"은 표적 단백질 또는 면역조절 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 코딩 서열은 핵산 분자가 투여되는 개체의 세포에서 발현을 시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 비롯한, 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 포함한다.
- [0020] 본원에서 사용되는 바, 용어 "발현가능한 형태"는 표적 단백질 또는 면역조절 단백질을 코딩하는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 필요한 조절 요소를 포함하여 개체의 세포에 존재하는 경우, 코딩 서열이 발현되도록 하는 유전자 작제물을 지칭한다.
- [0021] 본원에서 사용되는 바, 용어 "에피토프의 공유"는 또 다른 단백질의 에피토프와 동일하거나 실질적으로 유사한 1개 이상의 에피토프를 포함하는 단백질을 지칭한다.
- [0022] 본원에서 사용되는 바, 용어 "실질적으로 유사한 에피토프"는 단백질의 에피토프와 동일하지는 않지만, 그럼에도 불구하고, 그러한 단백질과 교차 반응하는 세포성 또는 체액성 면역 반응을 유발하는 구조를 갖는 에피토프를 지칭하는 의미를 갖는다.
- [0023] 본원에서 사용되는 바, 용어 "세포내 병원체"는 그의 생식 주기 또는 생활 주기의 적어도 일부가 숙주 세포내에 존재하고, 여기에서 병원체 단백질을 생산하거나 생산되도록 하는 바이러스 또는 병원성 유기체를 지칭하는 의미를 갖는다.
- [0024] 본원에서 사용되는 바, 용어 "과증식 질환"은 세포의 과증식을 특징으로 하는 질환 및 질병을 지칭한다.
- [0025] 본원에서 사용되는 바, 용어 "과증식-관련 단백질"은 과증식 질환과 관련된 단백질을 지칭하는 의미를 갖는다.
- [0026] 본원에서 사용되는 바, 용어 "면역조절 단백질"은 면역조절 단백질이 전달되는 인간의 면역계를 조절하는 단백질을 지칭한다. 면역조절 단백질의 예로는 하기를 포함한다: IL-15, CD40L, TRAIL, TRAILrecDRC5, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, OX40, OX40 LIGAND, NKG2D, F461811 또는 MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, CD30, CD153 (CD30L), Fos, c-jun, Sp-1, Ap1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IKB, NIK, SAP K, SAP1, JNK2, JNK1B2, JNK1B1, JNK2B2, JNK2B1, JNK1A2, JNK2A1, JNK3A1, JNK3A2, NF-카파-B2, p49 스플라이스 형태, NF-카파-B2, p100 스플라이스 형태, NF-카파-B2, p105 스플라이스 형태, NF-카파-B 50K 쇄 전구체, NFkB p50, 인간 IL-1 α , 인간 IL-2, 인간 IL-4, 뮤린 IL-4, 인간 IL-5, 인간 IL-10, 인간 IL-15, 인간 IL-18, 인간 TNF- α , 인간 TNF- β , 인간 인터루킨 12, MadCAM-1, NGF IL-7, VEGF, TNF-R, Fas, CD40L, IL-4, CSF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, LFA-3, ICAM-3, ICAM-2, ICAM-1, PECAM, P150.95, Mac-1, LFA-1, CD34, RANTES, IL-8, MIP-1 α , E-셀렉톤, CD2, MCP-1, L-셀렉톤, P-셀렉톤, FLT, Apo-1, Fas, TNFR-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4(TRAIL), DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, ICE, VLA-1, 및 CD86 (B7.2).
- [0027] **개요**
- [0028] 본 발명은 천연 서열과 비교하여 단백질 발현을 개선시키는, IL-15를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 개선된 IL-15 코딩 서열은 2004년 6월 14일 출원된 PCT 출원 PCT/US04/18962, 2003년 6월 13일 출원된 미국 가출원 번호 60/478,210 및 2003년 6월 13일 출원된 미국 가출원 번호 60/478,205 (본원에서 참고로 인용된다)에 기재된 발견물, 특히, 비-IL-15 신호 웨티드, 특히, IgE 신호 웨티드에 연결된 IL-15 단백질 코딩 서열을 제공하는 것과 함께 조합하여 사용될 수 있으며, 면역조절 단백질로서 IL-15 단백질을 전달하기 위한 백신 및 작제물에서 그러한 작제물의 용도로 사용될 수 있다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호: 1의 뉴클레오티드 서열, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자를 포함하는, 백터, 백신 및 면역조절 조성물 및 방법을 제공한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, IL-15 신호 서열에 대한 코딩 서열이 결핍된, 및 더욱 바람직하게, IL-15 코작 영역 및 비번역 영역이 결핍된 상기와 같은 핵산 분자를 제공한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간 IgE 신호 서열에 대한 코딩 서열에 연결된, 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 백터, 백신 및 면역조절 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0029] IL-15를 코딩하는 천연 서열은 발현을 개선시키기 위하여 변형될 수 있다. 종전의 개선에서는, 발현을 개선시키기 위하여, IL-15 서열에 대한 코딩 서열 및 비번역 영역과 같이 요소들이 결실되었다. 이러한 종전의 개선안이 도입될 수 있고, 서열 번호: 1에 기재된 성숙 IL-15 단백질의 개선된 코딩 서열과 함께 사용될 수 있다.

바람직한 실시태양에서, 서열 번호: 1을 포함하는 핵산 분자에는 IL-15 신호 펩티드에 대한 코딩 서열이 결핍되어 있고, 바람직하게 또 다른 신호 단백질, 예를 들어, IgE 신호 단백질이 그 자리에 제공된다. 또한, IL-15 코작 영역 및 비번역 영역도 저해 요소를 소거하기 위해 제거된다. 바람직하게 작제물이 포함하는 유일한 IL-15 서열은 IL-15 신호 펩티드가 결핍된 성숙 IL-15 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 IL-15 서열이다.

[0030] 몇몇 실시태양에 따라, 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편에 의해 코딩되는 IL-15 단백질에 연결된 비-IL-15 신호 서열을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 분자에는 IL-15 신호 서열에 대한 코딩 서열이 결핍되어 있다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 융합 단백질은 인간에서 비-면역원성이다.

[0031] 몇몇 실시태양에 따라, 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 조성물을 제공하고, 임의로 상기 기술된 종전의 기타 개선안 또한 동일한 핵산 분자 또는 상이한 핵산 분자 상에 면역원을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 하기 논의되는 면역원은 알레르겐, 병원체 항원, 암-관련 항원 또는 자가면역 질환과 관련된 세포에 연관된 항원을 비롯한, 임의의 면역원성 단백질일 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 면역원은 병원체 항원, 가장 바람직하게는 HIV, HSV, HCV 및 WNV로 구성된 군으로부터 선택되는 병원체이다.

[0032] 몇몇 바람직한 실시태양에서, 핵산 작제물은 플라스미드이다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 핵산 분자는 예를 들어, 백시니아, 아데노바이러스, 아데노바이러스 관련 바이러스, 레트로바이러스, RSV, VSV, 폭스바이러스와 같은 바이러스 벡터 또는 백신으로서 유용한 임의의 기타 허용가능한 바이러스 벡터 또는 유전자 치료 벡터에 혼입된다.

[0033] 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 유전자 작제물은 본 발명의 몇몇 실시태양에 따라 약독화된 생병원체로 직접 혼입될 수 있다. 백신으로서 유용한 그러한 병원체의 예는 하기에 기재되어 있다. 바람직한 실시태양에서, 바람직하게 IL-15 신호 서열이 결핍된 인간 IL-15는 인간 IgE 신호 서열에 연결된다.

[0034] 면역원에 대한 코딩 서열을 포함하는 조성물이 백신으로서 유용하다. 면역원에 대한 코딩 서열을 포함하지 않는 조성물은 면역조절 조성물로서 유용할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 단백질 면역원은 또한 IL-15의 발현에 의해 증진되는 면역 반응을 위한 표적으로서 제공된다.

[0035] 몇몇 바람직한 실시태양에서, 핵산 작제물은 플라스미드이다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 핵산 분자는 예를 들어, 예를 들어, 백시니아, 아데노바이러스, 아데노바이러스 관련 바이러스, 레트로바이러스와 같은 바이러스 벡터 또는 백신으로서 유용한 임의의 기타 허용가능한 바이러스 벡터 또는 유전자 치료 벡터에 혼입된다.

[0036] 서열 번호: 1, 또는 IL-15의 기능성 단편을 코딩하는 그의 단편을 포함하는 유전자 작제물은 본 발명의 몇몇 실시태양에 따라 약독화된 생병원체로 직접 혼입될 수 있다. 백신으로서 유용한 그러한 병원체의 예는 하기에 기재되어 있다. 바람직한 실시태양에서, 바람직하게 IL-15 신호 서열이 결핍된 인간 IL-15는 인간 IgE 신호 서열에 연결된다.

[0037] 본 발명의 몇몇 실시태양에 따라, 본 발명의 조성물은 면역원 및/또는 면역원성 단백질에 대한 코딩 서열을 포함하는 유전자 작제물을 포함한다. 그러한 조성물은 개체에 전달되어 개체의 면역계의 활성을 조절함으로써 면역원에 대한 면역 반응을 증진시킨다. 면역조절 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 개체의 세포에 의해 흡수되는 경우, 면역조절 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 그러한 세포에서 발현되고 이로써 그러한 단백질이 개체에 전달된다. 본 발명의 측면은 재조합 백신의 일부로서 및 약독화된 백신의 일부로서 하나 이상의 다양한 전사 인자 또는 중간체 인자를 코딩하는 상이한 핵산 분자를 포함하는 조성물에서 단일 핵산 분자 상에 단백질의 코딩 서열을 전달하는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 몇몇 측면에 따라, 병원체 또는 비정상적인 질환-관련 세포에 대해 개체를 예방학적으로 및/또는 치료학적으로 면역화시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 백신은 예를 들어, 약독화된 생백신, 세포 백신, 재조합 백신 또는 핵산 또는 DNA 백신과 같은 임의의 유형의 백신일 수 있다.

[0039] 본 발명은 면역조절 단백질을 전달하는 조성물 및 상기를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0040] 핵산 분자는 DNA 주입 (또한 DNA 백신 접종으로서 언급됨), 예를 들어, 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 관련 바이러스 및 재조합 백시니아와 같은 재조합 벡터를 포함하는, 잘 알려져 있는 수개의 기술 중 임의의 것을 사용하여 전달될 수 있다.

- [0041] DNA 백신은 미국 특허 번호 제5,593,972호, 제5,739,118호, 제5,817,637호, 제5,830,876호, 제5,962,428호, 제5,981,505호, 제5,580,859호, 제5,703,055호, 제5,676,594호 및 이들에 인용된 우선권 출원(본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있다. 그러한 출원에 기재된 전달 프로토콜 이외에, DNA를 전달하는 대안 방법이 미국 특허 번호 제4,945,050호 및 제5,036,006호(상기 두개 모두 본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있다.
- [0042] 투여 경로는 국소, 경피적으로, 흡입 또는 좌제, 또는 예를 들어, 세척에 의한 절내, 직장내, 요도내, 협측 및 설하 조직과 같은 점막 조직으로 뿐만 아니라 근육내, 비강내, 복강내, 진피내, 피하내, 정맥내, 동맥내, 안구내 및 경구내를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 투여의 경로는 점막 조직, 근육내, 복강내, 진피내 및 피하 주사를 포함한다. 유전자 작제물은 통상적인 주사기, 바늘없는 주사 장치 또는 "미세주진 충격 유전자 총"을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 수단에 의해 투여될 수 있다.
- [0043] 세포에 의해 흡수되는 경우, 유전자 작제물(들)은 세포에서 기능성 염색체외 분자로서 잔류할 수 있고/거나, 세포의 염색체 DNA에 통합할 수 있다. DNA가 플라스미드 또는 플라스미드들의 형태로 세포내로 도입될 수 있고, 여기서 상기는 별도의 유전 물질로서 잔류한다. 별법으로, 염색체에 통합할 수 있는 선형 DNA는 세포로 도입될 수 있다. DNA를 세포로 도입하는 경우, 염색체로의 DNA 통합을 촉진하는 시약이 첨가될 수 있다. 통합 촉진에 유용한 DNA 서열 또한 DNA 분자에 포함될 수 있다. 별법으로, RNA가 세포에 투여될 수 있다. 동원체, 텔로미어 및 복제 기점을 포함하는 선형 소형염색체로서 유전자 작제물을 제공하는 것이 고려된다. 유전자 작제물은 약독화된 생 미생물 또는 세포에서 재조합 생 미생물 벡터에서 유전 물질의 일부로서 잔류할 수 있다. 유전자 작제물은 재조합 바이러스 백신의 계놈의 일부일 수 있고, 여기서, 유전 물질은 세포의 염색체로 통합하거나 염색체외부에 잔류한다. 유전자 작제물은 핵산 분자의 유전자 발현을 위해 필요한 조절 요소를 포함한다. 요소로는 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈, 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 추가로, 표적 단백질 또는 면역조절 단백질을 코딩하는 서열의 유전자 발현을 위해서는 종종 인핸서가 요구된다. 이들 요소는 원하는 단백질을 코딩하는 서열에 작동가능하게 연결될 필요가 있고, 그러한 조절 요소는 이들이 투여되는 개체에서 작동가능할 필요가 있다.
- [0044] 개시 코돈 및 정지 코돈은 일반적으로 원하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 일부인 것으로 사료된다. 그러나, 이들 요소는 유전자 작제물이 투여되는 개체에서 기능성일 필요가 있다. 개시 및 종료 코돈은 코딩 서열과 프레임 내에 있어야 한다.
- [0045] 사용되는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호는 개체의 세포 내에서 기능성이어야만 한다.
- [0046] 본 발명을 실시하는데, 특히 인간용 유전자 백신의 제조에 유용한 프로모터의 예는 시미안 바이러스 40(SV40)으로부터의 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(MV), 예를 들어, BIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스, ALV, 사이토메갈로바이러스(CMV), 예를 들어, CMV 조기 발현 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV), 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터 뿐만 아니라, 예를 들어, 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 혜모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 인간 메탈로티오네인과 같은 인간 유전자 기원의 프로모터를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 본 발명을 실시하는데, 특히 인간용 유전자 백신의 제조에 유용한 폴리아데닐화 신호의 예는 SV40 폴리아데닐화 신호 및 LTR 폴리아데닐화 신호를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특히, pCEP4 플라스미드(캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 인비트로젠(Invitrogen)) 내에 있는 SV40 폴리아데닐화 신호(SV40 폴리아데닐화 신호로서 언급됨)가 사용된다.
- [0048] DNA 발현에 필요한 조절 요소 이외에, 기타 요소 또한 DNA 분자에 포함될 수 있다. 그러한 추가의 요소는 인핸서를 포함한다. 그러한 인핸서는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 혜모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 및 예를 들어, CMV, RSV 및 EBV로부터의 인핸서와 같은 바이러스 인핸서를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0049] 유전자 작제물에는 포유동물 복제 기점이 제공되어 염색체외부에서 작제물이 유지되고 세포 내에서 다중 복제의 작제물이 생성될 수 있다. 인비트로젠(캘리포니아주 샌디에고 소재)으로부터 입수한 플라스미드 pVAX1, pCEP4 및 pREP4는 엡스타인 바 바이러스의 복제 기점 및 통합 없이 높은 복제수의 에피좀 복제를 생성시키는 핵 항원 EBNA-1 코딩 영역을 함유한다.
- [0050] 면역화 적용과 관련된 몇몇 바람직한 실시태양에서, 표적 단백질, 면역조절 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 추가로 그러한 표적 단백질에 대한 면역 반응을 추가로 증진시키는 단백질에 대한 유전자를 포함하는 핵산 분자(들)가 전달된다. 그러한 유전자의 예는 예를 들어, 알파-인터페론, 감마-인터페론, 혈소판 유래 성장

인자(PDGF), TNF, GM-CSF, 표피 성장 인자(EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 및 신호 서열이 결실되고 IgE의 신호 서열을 임의로 포함하는 IL-15를 포함하는 IL-15와 같은 기타 사이토카인 및 램포카인을 코딩하는 유전자들이다.

- [0051] 임의의 이유 때문에 유전자 작제물이 투여된 세포를 소거하는 것이 바람직할 경우, 세포 파괴를 위한 표적으로서 작용하는 추가의 요소가 첨가될 수 있다. 발현가능한 형태의 헤르페스 티미딘 키나제(tk) 유전자는 그러한 유전자 작제물에 포함될 수 있다. 약물 캥사이클로비르는 개체에 투여될 수 있고, 상기 약물은 tk를 생산하는 임의의 세포를 선택적으로 사멸시켜 유전자 작제물을 사용하여 세포를 선택적으로 파괴하기 위한 수단을 제공한다.
- [0052] 단백질 생산을 최대화하기 위해서는 작제물이 투여되는 세포에서 유전자 발현을 위해서도 적합한 조절 서열이 선택될 수 있다. 또한, 세포에서 보다 효율적으로 전사되는 코돈이 선택될 수 있다. 당업자는 세포에서 기능성인 DNA 작제물을 제조할 수 있다.
- [0053] 몇몇 실시태양에서, IgE 신호 웨티드에 연결된, 본원에 기술된 면역조절 단백질에 대한 코딩 서열을 제조하기 위해 유전자 작제물이 제공될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 한 방법은 근육내, 비강내, 복강내, 피하내, 진피내 또는 국소적으로 또는 흡입, 질내, 직장내, 요도내, 협측내 및 설하로 구성된 군으로부터 선택되는 세척에 의한 점막 조직으로 핵산 분자를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0055] 몇몇 실시태양에서, 핵산 분자는 폴리뉴클레오티드 기능성 인핸서 또는 유전자 백신 촉진제의 투여와 함께 세포로 전달된다. 폴리뉴클레오티드 기능성 인핸서는 미국 시리얼 번호 제5,593,972호, 제5,962,428호 및 1994년 1월 26일자로 출원된 국제 출원 시리얼 번호 PCT/US94/0089 (본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있다. 유전자 백신 촉진제는 1994년 4월 1일자로 출원된 미국 시리얼 번호 제021,579호에 기재되어 있다. 핵산 분자와 함께 투여되는 보조제는 핵산 분자와의 혼합물로서 투여되거나, 핵산 분자를 투여하기 전 또는 후에 별도로 동시에 투여된다. 추가로, 형질감염제 및/또는 복제 제제 및/또는 염증 제제로서 기능할 수 있고, GVF와 공-투여될 수 있는 기타 제제는 성장 인자, 사이토카인 및 램포카인, 예를 들어, α -인터페론, 감마-인터페론, GM-CSF, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNF, 표피 성장 인자(EGF), ILA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 및 IL-15 뿐만 아니라, 섬유아세포 성장 인자, 예를 들어, 면역-자극 복합체(ISCOMS)와 같은 표면 활성제, 프로인트 불완전 애주번트, 모노포스포릴 지질 A(WL)를 포함하는 LPS 유사체, 무라밀 웨티드, 퀴논 유사체 및 예를 들어, 스쿠알렌 및 스쿠알렌과 같은 소포체 및 하이알루론산 또한 유전자 작제물 투여와 함께 사용될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 면역조절 단백질은 GVF로서 사용될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 핵산 분자는 PLG와 함께 제공되어 전달/흡수가 증진된다.
- [0056] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약 1 ng 내지 약 2000 μ g의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약 5 ng 내지 약 1000 μ g의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 약제학적 조성물은 약 10 ng 내지 약 800 μ g의 DNA를 함유한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 내지 약 500 μ g의 DNA를 함유한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 350 μ g의 DNA를 함유한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 250 μ g의 DNA를 함유한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 약제학적 조성물은 약 100 내지 약 200 μ g의 DNA를 함유한다.
- [0057] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 사용되는 투여 방식에 따라 제제화된다. 약제학적 조성물이 주사가능한 약제학적 조성물인 경우에, 이들은 발열원 부재 및 입자 부재의 멸균성이다. 바람직하게 등장 제제가 사용된다. 일반적으로, 등장성을 위한 첨가제는 염화나트륨, 엑스트로스, 만넛톨, 소르비톨 및 락토스를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 예를 들어, 인산 완충 식염수와 같은 등장성 용액이 바람직하다. 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 혈관수축 제제가 상기 제제에 첨가된다.
- [0058] 본 발명의 몇몇 실시태양에 따라, 면역원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법은 본 발명의 조성물을 개체에 전달함에 의해 제공된다. 백신은 약독화된 생백신, 세포 백신, 재조합 백신 또는 핵산 또는 DNA 백신일 수 있다.
- [0059] 유전자 백신을 개선하기 위해 면역조절 단백질 코딩 서열의 발현가능한 형태를 사용하는 것 이외에, 본 발명은 개선된 약독화된 생백신 및 항원을 코딩하는 외래 유전자를 전달하기 위해 재조합 백터를 사용하는 개선된 백신에 관한 것이다. 약독화된 생백신의 예 및 외래 항원을 전달하는 재조합 백터를 사용하는 백신의 예는 미국 특허 번호: 제4,722,848호; 제5,017,487호; 제5,077,044호; 제5,110,587호; 제5,112,749호; 제5,174,993호; 제

5,223,424호; 제10 5,225,336호; 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 제5,482,713호 (각각은 본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있다. 면역조절 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 백신에서 작용하여 발현에 효과적일 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 작제물이 제공된다. 유전자 작제물은 약독화된 생백신 및 재조합 백신에 흔입되어 본 발명에 따른 개선된 백신을 생성한다.

[0060] 본 발명은 DNA 백신, 약독화된 생백신 및 재조합 백신을 포함하는 백신 조성물의 일부가 제공되는, 개체의 세포에 유전자 작제물을 전달하는 단계를 포함하는, 개체를 면역화시키는 개선된 방법에 관한 것이다. 유전자 작제물은 면역조절 단백질을 코딩하고 백신에서 작용하여 발현에 효과적일 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 개선된 백신은 증진된 세포 면역 반응을 유도한다.

[0061] 본 발명은 표적 단백질, 즉, 병원체, 알레르겐 또는 개체 자체의 "비정상" 세포와 특이적으로 관련된 단백질에 대한 증진된 면역 반응을 유도하는데 유용하다. 본 발명은, 병원체 단백질에 대한 면역 반응이 병원체로부터 방어 면역을 제공하도록 병원성 인자 및 유기체에 대하여 개체를 면역화하는데 유용하다. 본 발명은 과다증식 세포와 특이적으로 관련된 표적 단백질에 대한 면역 반응을 유도함으로써 예를 들어, 암과 같은 과다증식 질환 및 질병을 퇴치하는데 유용하다. 본 발명은 자가면역 질환과 관련된 세포와 특이적으로 관련된 표적 단백질에 대한 면역 반응을 유도함으로써 자가면역 질환 및 질병을 퇴치하는데 유용하다.

[0062] 본 발명의 몇몇 측면에 따라, 표적 단백질 및 면역조절 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 개체의 조직 세포 내로 도입하고, 여기서, 이는 발현되어 코딩된 단백질을 생성시킨다. 표적 단백질, 및 하나 또는 둘 모두의 면역 조절 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA 서열은 개체의 세포에서 발현에 필요한 조절 요소에 연결된다. DNA 발현을 위한 조절 요소로는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 추가로, 기타 요소, 예를 들어 코작 영역 또한 유전자 작제물에 포함될 수 있다.

[0063] 몇몇 실시태양에서, 표적 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열 및 면역조절 단백질 둘 모두를 코딩하는 발현가능한 형태의 서열이, 개체에게 전달된 동일한 핵산 분자 상에서 발견된다.

[0064] 몇몇 실시태양에서, 표적 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열은 하나 이상의 면역조절 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열을 함유하는 핵산 분자와는 별도의 핵산 분자 상에 존재한다. 몇몇 실시태양에서, 표적 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열 및 하나 이상의 면역조절 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열을 함유하는 핵산 분자와는 별도인 하나의 핵산 분자 상에 존재한다. 다수의 상이한 핵산 분자는 본 발명에 따라 생성되고 전달되어, 개체에게 전달될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 실시태양에서, 표적 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열은, 하나 이상의 면역조절 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열을 함유하는 핵산 분자와는 별도인 하나의 핵산 분자 상에 존재하는, 2개의 면역조절 단백질중 하나 이상을 코딩하는 발현가능한 형태의 서열을 함유하는 핵산 분자와는 별도인 하나의 핵산 분자 상에 존재한다. 이러한 경우, 3개의 분자 모두가 개체에게 전달된다.

[0065] 핵산 분자(들)는 재조합 백터의 핵산 분자인 플라스미드 DNA로서, 또는 약독화된 백신 또는 세포 백신 중에 제공되는 유전 물질의 일부로서 제공될 수 있다. 별법으로, 몇몇 실시태양에서, 표적 단백질 및/또는 둘 중 하나 또는 둘 모두의 면역조절 단백질은 이들을 코딩하는 핵산 분자에 추가하여 또는 이들을 코딩하는 핵산 분자 대신에 단백질로서 제공될 수 있다.

[0066] 유전자 작제물은 유전자 발현에 필요한 조절 요소에 작동가능하게 연결된 표적 단백질 또는 면역조절 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 따라서, 표적 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것과 면역조절 단백질을 코딩하는 발현가능한 형태의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 포함하는 유전자 작제물의 조합물이 제공되고 있다. 유전자 작제물의 조합물을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자(들)를 생세포 내로 흔입함으로써 DNA 또는 RNA를 발현시키고, 표적 단백질 및 하나 이상의 면역조절 단백질을 제조한다. 표적 단백질에 대한 면역 반응이 증진된다.

[0067] 본 발명은 모든 병원체, 예를 들어, 바이러스, 원핵생물 및 병원체성 진핵 유기체, 예를 들어, 병원체성 단세포 유기체 및 다세포 기생충에 대해 개체를 면역화하는데 사용될 수 있다. 본 발명은, 세포를 감염시키는 병원체로서, 예를 들어, 바이러스, 및 고노해아(*gonorrhoea*), 리스테리아(*listeria*) 및 쇠겔라(*shigella*)와 같은 원핵 생물처럼 캡슐화되지 않은 병원체에 대해 개체를 면역시키는데 특히 유용하다. 추가로, 본 발명은 본 발명은 자신이 세포내 병원체로 존재하는 곳에서 생활 주기 중 한 단계를 갖는 원생동물 병원체에 대해 개체를 면역화

시키는데도 유용하다. 표 1은 본 발명에 따른 백신이 제조될 수 있는 몇몇 바이러스과 및 속의 목록을 제공하고 있다. 표에 열거된 항원과 같은 병원체 항원 상에 나타나는 에피토프와 동일하거나 실질적으로 유사한 1개 이상의 에피토프를 포함하는 웨티드를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 작제물이 백신에 유용하다. 또한, 본 발명은 예를 들어, 표 2에 나열된 것과 같은 다세포 기생충 뿐만 아니라, 원핵 및 진핵 원생동물 병원체를 포함하는 다른 병원체에 대해 개체를 면역화하는 데에도 유용하다.

[0068] 병원체 감염으로부터 방어하기 위한 유전자 백신을 제조하기 위해서는, 방어 면역 반응을 유발시키는 면역원성 단백질을 코딩하는 유전 물질을 표적의 코딩 서열로서 유전자 작제물에 포함시켜야 한다. 병원체가 세포내로 감염시키든 (이 경우에 본 발명이 특히 유용함) 또는 세포외로 감염시키든, 모든 병원체 항원이 방어 반응을 유도하는 것은 아닐 것이다. DNA 및 RNA 둘 모두는 상대적으로 작고, 비교적 용이하게 제조될 수 있으므로, 본 발명은 다수의 병원체 항원으로 백신 접종할 수 있다는 추가의 이점을 제공한다. 유전자 백신에 사용되는 유전자 작제물은 다수의 병원체 항원을 코딩하는 유전 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 수개의 바이러스 유전자를 단일 작제물에 포함시킴으로써 다수의 표적을 제공할 수 있다.

[0069] 표 1 및 2는 몇몇 병원성 인자 및 유기체 중에서 이들에 의한 감염으로부터 개체를 방어하기 위해 이들에 대한 유전자 백신을 제조할 수 있는 것들 몇몇의 목록을 포함한다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 병원체에 대해 개체를 면역시키는 방법은 HIV, HSV, HCV, WNV 또는 HBV에 대한 것이다.

[0070] 본 발명의 또 다른 측면은 과다증식 질환을 특징으로 하는, 과다증식하는 세포에 대한 방어 면역 반응을 제공하는 방법 및 과다증식 질환을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 과다증식 질환의 예로는 모든 형태의 암 및 건선을 포함한다.

[0071] 면역원성 "과다증식 세포"-관련 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물을 개체의 세포내로 도입할 경우 백신 접종된 개체의 세포에서 이를 단백질이 생성된다는 것을 발견하게 되었다. 과다증식 질환에 대해 면역시키기 위해서, 과다증식 질환과 관련된 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물을 개체에게 투여한다.

[0072] 과다증식-관련 단백질을 효과적인 면역원성 표적으로 하기 위해서는 정상 세포와 비교하여 과다증식 세포에서 보다 높은 수준으로 또는 오로지 과다증식 세포에서만 생성되는 단백질이어야 한다. 표적 항원은 그러한 단백질, 그의 단편 및 웨티드를 포함한다; 이는 상기 단백질 상에서 발견된 1개 이상의 에피토프를 포함한다. 몇몇 경우, 과다증식-관련 단백질은 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이 산물이다. 돌연변이된 유전자는 정상 단백질상에서 발견되지 않는 상이한 에피토프를 야기하는 약간 상이한 아미노산 서열을 갖는다는 것을 제외하고는, 정상 단백질과 거의 동일한 단백질을 코딩한다. 그러한 표적 단백질에는 발암유전자, 예를 들어, *myb*, *myc*, *fyn* 및 전위 유전자 *bcr/abl*, *ras*, *src*, *P53*, *neu*, *trk* 및 *EGFR*에 의해 코딩된 단백질을 포함한다. 표적 항원으로서의 발암유전자 산물 이외에, 항암 치료 및 예방 요법을 위한 표적 단백질은 B 세포 림프종에 의해 생성된 항체의 가변 영역, 및 몇몇 경우에서 또한 자가면역 질환에 대한 표적 항원으로서도 사용되는 T 세포 림프종의 T 세포 수용체의 가변 영역을 포함된다. 다른 종양-관련 단백질은 예를 들어, 단일클론 항체 17-IA에 인지된 단백질 및 엽산 결합 단백질 또는 PSA를 비롯한, 종양 세포에서 보다 높은 수준으로 발견되는 단백질과 같은 표적 단백질로서 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명은 하나 이상의 수개 형태의 암에 대해 개체를 면역시키는데 사용되면서, 본 발명은 특정 암이 발생할 소인이 있거나, 암에 걸렸고 따라서 재발하기 쉬운 개체를 예방학적으로 면역시키는데 특히 유용하다. 역학에서 뿐만 아니라, 유전학 및 기술의 발달은 개체에서 암의 발병에 대한 확률 및 위험성 판단을 결정할 수 있게 한다. 유전자 스크리닝 및/또는 가계의 병력을 사용하여, 특정 개체에서 여러 유형의 암 중 어느 하나가 발병될 가능성을 예측할 수 있다.

[0074] 유사하게, 이미 암이 발병했거나, 암 퇴치를 위해 치료를 받았거나, 그렇지 않으면 완화된 개체들은 특히 재발 및 재발생하기 쉽다. 치료 요법의 일부로서, 이러한 개체들은 재발을 방지하기 위하여 이미 발병된 것으로 진단되는 암에 대해 면역화될 수 있다. 따라서, 소정의 암이 발병되었던 그리고 재발의 위험이 있는 개체는 그 사실이 알려지는 경우에, 미래에 임의의 암이 발현되는 것을 방지하는 그들의 면역계를 준비하기 위하여 면역화될 수 있다.

[0075] 본 발명은 과다증식 질환을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 그러한 방법에서, 유전자 작제물의 도입은 표적 단백질을 생성하는 과다증식 세포를 퇴치하도록 개체의 면역계에 지시되고 자극하는 면역치료제로서 작용한다.

- [0076] 본 발명은 세포 수용체 및 "자가"-지시된 항체를 생성하는 세포를 비롯한, 자가면역과 관련된 표적에 대한 광범위한 방어 면역 반응을 일으킴으로써 자가면역 질환 및 질병을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0077] T 세포 매개된 자가면역 질환으로는 류마티스 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 사르코이드증, 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM), 자가면역성 갑상샘염, 반응성 관절염, 강직성 척추염, 공피증, 다발성근염, 피부근염, 건선, 혈관염, 웨게너 육아종증, 크론병 및 케양성 대장염을 포함한다. 이들 질환 각각은 내인성 항원과 결합하여 자가면역 질환과 관련된 염증성 연쇄반응을 개시하는 T 세포 수용체를 특징으로 한다. T 세포의 가변 영역에 대한 백신 접종은 CTL을 포함하는 면역 반응을 유도하여 상기 T 세포를 제거한다.
- [0078] RA에서, 상기 질환에 관여하는 T 세포 수용체(TCR)의 수개의 특이적인 가변 영역을 특징으로 하고 있다. 이들 TCR은 $V\beta$ -3, $V\beta$ -14, 20 $V\beta$ -17 및 $V\alpha$ -17을 포함한다. 따라서, 1개 이상의 이러한 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 사용한 백신 접종은 RA에 관여하는 T 세포를 표적화하는 면역반응을 유도할 것이다. 문헌 ([Howell, M.D., et al, 1991 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:10921-10925]; [Piliard, X., et al, 1991 *Science* 253:325-329]; [Williams, W.V., et al., 1992 *J Clin. Invest.* 90:326-333] (각각이 본원에서 참고로 인용된다))을 참조한다. MS에서, MS 질환에 관여하는 TCR의 수개의 특이적 가변 영역을 특징으로 하고 있다. 이들 TCR로는 $V\beta$ 및 $V\alpha$ -10을 포함한다. 따라서, 1개 이상의 이들 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 사용한 백신 접종은 MS에 관여하는 T 세포를 표적화하는 면역반응을 유도할 것이다. 문헌 ([Wucherpfennig, K. W., et al., 1990 *Science* 248:1016-1019]; [Oksenberg, J.R., et al, 1990 *Nature* 345:344-346] (각각이 본원에서 참고로 인용된다))을 참조한다.
- [0079] 공피증에서는, 본 질환에 관여하는 TCR의 수개의 특이적 가변 영역을 특징으로 하고 있다. 이들 TCR은 $V\beta$ -6, $V\beta$ -8, $V\beta$ -14 및 $V\alpha$ -16, $V\alpha$ -3C, $V\alpha$ -7, $V\alpha$ -14, $V\alpha$ -15, $V\alpha$ -16, $V\alpha$ -28 및 $V\alpha$ -12를 포함한다. 따라서, 1개 이상의 이들 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 사용한 백신 접종은 공피증과 관련된 T 세포를 표적화하는 면역 반응을 유도할 것이다.
- [0080] T 세포 매개된 자가면역 질환을 앓고 있는 환자를 치료하기 위해서, 특히 TCR의 가변 영역 또한 특징으로 하는 환자에 있어서, 활막 생검을 수행할 수 있다. 존재하는 T 세포의 샘플을 채취하고, 이들 TCR의 가변 영역을 표준 기술을 사용하여 동정하였다. 그러한 정보를 사용하여 유전자 백신을 제조할 수 있다.
- [0081] B 세포 매개된 자가면역 질환으로는 루푸스(SLE), 그레이브스병, 중증근무력증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 혈소판감소증, 천식, 한랭글로불린혈증, 원발성 담즙성 경화증 및 악성 빈혈을 포함한다. 이들 각각의 질환은 내인성 항원에 결합하여 자가면역 질환과 관련된 염증성 연쇄반응을 개시하는 항체를 특징으로 한다. 항체의 가변 영역에 대한 백신 접종은 CTL을 포함하는 면역 반응을 유도하여 항체를 생성하는 이들 B 세포를 제거한다.
- [0082] B 세포 매개된 자가면역 질환을 앓고 있는 환자를 치료하기 위해서, 자가면역 활성에 관여하는 항체의 가변 영역을 동정해야 한다. 생검을 수행할 수 있고, 염증 부위에 존재하는 항체의 샘플을 채취할 수 있다. 이들 항체의 가변 영역을 표준 기술을 사용하여 동정할 수 있다. 그러한 정보를 사용하여 유전자 백신을 제조할 수 있다.
- [0083] SLE의 경우에서, 하나의 항원은 DNA인 것으로 여겨진다. 따라서, SLE에 대해 면역화된 환자에서, 이들의 혈청은 항-DNA 항체에 대하여 스크리닝될 수 있고, 혈청에서 발견된 상기 항-DNA 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA 작제물을 포함하는 백신을 제조할 수 있다.
- [0084] TCR 및 항체 둘 모두의 가변 영역 사이의 공통적인 구조적 특징은 잘 알려져 있다. 특정 TCR 또는 항체를 코딩하는 DNA 서열은 일반적으로 문헌 [Kabat, et al., 1987 *Sequence of Proteins of Immunological Interest* U. S. Department of Health and Human Services, Bethesda MD] (본원에서 참고로 인용된다)에 기재된 것과 같이 잘 알려져 있는 방법에 따라 발견할 수 있다. 추가로, 항체로부터 기능적 가변 영역을 클로닝하는 일반적 방법은 문헌 [haudhary, V.K., et al, 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1066] (본원에서 참고로 인용된다)에서 발견할 수 있다.

표 1a

[0085]

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--|
| 피코르나바이러스과 (Picornavirus) | 속 | 리노바이러스: (의학) 일반 감기 사례 ~50%의 원인이 된다. |
| | | 장바이러스: (의학) 폴리오바이러스, 콕삭키바이러스, 에코바이러스, 및 예를 들어, A형 간염 바이러스와 같은 인간 엔테로바이러스 |
| | | 아프토바이러스: (수의학) 구저병 바이러스이다. |
| | 표적 항원 | VP1, VP2, VP3, VP4, VPG |
| 칼시바이러스과 (Calicivirus) | 속 | 바이러스의 노르워크군: (의학) 이들 바이러스는 유행성 위장염의 중요한 원인 인자이다. |
| 토가바이러스과 (Togavirus) | 속 | 알파바이러스: (의학 및 수의학) 예를 들면, 세닐리스 바이러스, 로스리버 바이러스, 동부 & 서부 말 뇌염을 포함한다. |
| | | 레오바이러스: (의학) 루벨라 바이러스 |
| 플라리비리듀과 (Flariviridue) | | 예로는 (의학적) 뎅기열, 황열병, 일본 뇌염, 세인트루이스 뇌염 및 진드기-매개 뇌염 바이러스, 웨스트나일 바이러스(진뱅크 NC001563, AF533540, AF404757, AF404756, AF404755, AF404754, AF404753, AF481864, M12294, AF317203, AF196835, AF260969, AF260968, AF260967, AF206518 및 AF202541)를 포함한다. |
| | 대표적 표적 항원 | E NS5 C |
| C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus) | | (의학) 이들 바이러스는 아직 어느 과로 정해지지는 않았으나, 토가바이러스 또는 플라비바이러스 중 하나인 것으로 여겨진다. 토가바이러스과와 가장 유사하다. |
| 코로나바이러스과 (Coronavirus) | | (의학 및 수의학) 감염성 기관지염 바이러스(가금류) 돼지 전염성 위소장 바이러스(돼지) 돼지 적혈구응집성 뇌척수염 바이러스(돼지) 고양이 감염성 복막염 바이러스(고양이) 고양이 장 코로나바이러스(고양이) 개 코로나바이러스(개) SARS 관련 코로나바이러스 일반 감기 사례 ~40%의 원인인 인간 호흡기 코로나바이러스 EX. 224E, OC43 주지- 코로나바이러스는 비-A, B 또는 C형 간염을 유발할 수 있다. |
| | | E1 - 또한 M 또는 매트릭스 단백질로 불림 E2 - 또한 S 또는 스파이크 단백질로 불림 E3 - 또한 BE 또는 헤마글루틴-엘테로스 당단백질로 불림 (모든 코로나바이러스에 존재하는 것은 아님) N - 뉴클레오팩시드 |

표 1b

[0086]

| | | |
|------------------------------|---|---|
| 랍도바이러스과 (Rhabdovirus) | 속 | 베실리오바이러스 |
| | | 리사바이러스: (의학 및 수의학) 광견병 |
| | | G 단백질 N 단백질 |
| 필로비리듀과 (Filoviridue) | | (의학) 예를 들어, 마르버그 및 에볼라 바이러스와 같은 출혈열 바이러스 |
| 파라믹소바이러스과 (Paramyxovirus) | 속 | 파라믹소바이러스: (의학 및 수의학적) 면포스 바이러스, 뉴캐슬 병 바이러스 (닭에서 중요한 병원체) 모르빌리바이러스: (의학 및 수의학적) 홍역, 개홍역 뉴민바이러스: (의학적 및 수의학적) 호흡기 세포융합 바이러스 |

| | | |
|--------------------------------|----|--|
| 오르토믹소바이러스과 (Orthomyxovirus) | | (의학) 인플루엔자 바이러스 |
| 분가바이러스과 (Bunyavirus) | 속 | 분가바이러스: (의학) 캘리포니아 뇌염, LA 크로스 |
| | | 플레보바이러스: (의학) 리프트 벨리 열 |
| | | 한타바이러스: 푸레말라는 해마하긴 열 바이러스이다. |
| | | 나이어바이러스 (수의학) 나이로비 양 병 |
| 아레나바이러스과 (Arenavirus) | | 이외에 많은 정해지지 않은 분가바이러스 |
| 레오바이러스과 (Reovirus) | 속 | (의학) LCM, 라사 열 바이러스 |
| | | 레오바이러스: 가능성이 있는 인간 병원체 |
| | | 로타바이러스: 소아 급성 위소장염 |
| 레트로바이러스과 (Retrovirus) | | 오르비바이러스: (의학 및 수의학) 콜로라도 진드기 열, 레봄보(인간) 말뇌증, 청설병 |
| 파포바바이러스과 (Papovavirus) | 아과 | 온코리비리날(Oncorivirinal): (수의학) (의학) 고양이 백혈병 바이러스, HTLV1 및 HTLVII |
| | | 렌티비리날(Lentivirinal): (의학 및 수의학) HIV, 고양이 면역 결핍 바이러스, 말 감염증, 빈혈 바이러스 |
| | | 스푸마비리날(Spumavirinal) |
| 아데노바이러스과 (Adenovirus) | 아과 | 폴리오마바이러스: (의학) BKU 및 JCU 바이러스 |
| | 아과 | 파필로마바이러스: (의학) 암 또는 유두종의 악성 진행과 관련된 많은 바이러스 종류 |
| 아데노바이러스 (Adenovirus) | | (의학) EX AD7, ARD., O.B. - 호흡기 질환 유발, 예를 들어, 275와 같은 몇몇 아데노바이러스는 장염을 유발한다. |

표 1c

| | | |
|------------------------------|----|--|
| [0087] 파르보바이러스과 (Parvovirus) | | (수의학) |
| | | 고양이 파르보바이러스: 고양이의 장염을 유발 |
| | | 고양이 범백혈구감소증 바이러스 |
| | | 개 파르보바이러스 |
| | | 돼지 파르보바이러스 |
| 헤르페스바이러스과 (Herpesvirus) | 아과 | 알파 헤르페스 비리듐 |
| | 속 | 심플렉스바이러스 (의학) |
| | | HSV1 (진뱅크 X14112, NC001806), HSVII(NC001798) |
| | | 바리셀로바이러스: (의학-수의학) 가광견병-수두 대상포진 |
| | 아과 | 베타헤르페스 비리듐 |
| | 속 | 사이토메갈로바이러스 (의학) |
| | | HCMV |
| | | 뮤로메갈로바이러스 |
| | 아과 | 감마헤르페스 비리듐 |
| | 속 | 립포크립토바이러스 (의학) |
| | | EBV - (부르키츠 립포) |
| | | 라디노바이러스 |

| | | |
|-----------------------|-----------------------------|---|
| 폭스바이러스과 (Poxvirus) | 아과 | 코르도폭스바리류 (의학 - 수의학) |
| | 속 | 바리올라 (천연두) 백시니아 (우두) 파라폭시바이러스 - 수의학 오이폭스바이러스 - 수의학 카프리폭스바이러스 레포리폭스바이러스 수이폭스바이러스 |
| | 아과 | 엔테모폭스바리류 |
| | 해파드나바이러스과 (Hepadnavirus) | B형 간염 바이러스 |
| | 비분류 | 간염 델타 바이러스 |
| | | |

표 2

[0088]

| 세균성 병원체 |
|--|
| 병원성 그람 양성 콕시(<i>cocci</i>)로는: 뉴모코칼(<i>pneumococcal</i>); 스타필로코칼(<i>staphylococcal</i>); 및 스트렙토코칼(<i>streptococcal</i>)을 포함한다. 병원성 그람 음성 콕시로는 메닝고코칼(<i>meningococcal</i>); 및 고노코칼(<i>gonococcal</i>)을 포함한다. |
| 병원성 장내 그람 음성 바실리(<i>bacilli</i>)로는: 엔테로박테리아세아에(<i>enterobacteriaceae</i>); 슈도모나스(<i>pseudomonas</i>), 액시네토박테리아(<i>acinetobacteria</i>) 및 에이케넬라(<i>eikenella</i>), 멜리오이도시스(<i>melioidosis</i>); 살모넬라(<i>salmonella</i>); 쇠겔로시스(<i>shigellosis</i>); 헤모필러스(<i>hemophilus</i>); 찬크로이드(<i>chancroid</i>); 브루셀로시스(<i>brucellosis</i>); 투랄레미아(<i>tularemia</i>); 에르시니아(<i>yersinia</i>)(파스테렐라(<i>pasteurella</i>)); 스트렙토바실러스 모닐리포르미스(<i>streptobacillus moniliformis</i>) 및 스피릴룸(<i>spiroillum</i>); 리스테리아 모노사이토게네스(<i>listeria monocytogenes</i>); 에리시펠로트릭스 류지오파티아에(<i>erysipelothrix rhusiopathiae</i>); 디프테리아(<i>diphtheria</i>), 콜레라(<i>cholera</i>), 안트락스(<i>anthrax</i>); 도노바노시스(<i>donovanosis</i>); 그레눌로마 인구이날레(<i>granuloma inguinale</i>) 및 바르토넬로시스(<i>bartonellosis</i>)를 포함한다. |
| 병원성 혐기성 세균으로는: 테타누스(<i>tetanus</i>); 보툴리즘(<i>botulism</i>); 다른 클로스트리디아(<i>Clostridia</i>); 결핵균; 레프로시(<i>leprosy</i>) 및 다른 미코박테리아(<i>mycobacteria</i>)를 포함한다. 병원성 스피로해탈(<i>spirochetal</i>) 질병에는 토끼매독; 트레포네마증; 야스(<i>yaws</i>); 편타(<i>pinta</i>) 및 풍토성 매독; 및 렙토스파리병을 포함한다. |
| 고병원성 세균 및 병원성 진균에 의한 기타 감염으로는 방선균증; 노카르디아종; 효모균증, 블라스토미스진균증, 히스토플라스마증 및 콕시디오아이데스 진균증; 캔디다증, 아스페르길루스증 및 텔곰팡이증; 스포로트릭스증; 파라콕시디오아이데스진균증, 페트리엘리디오스(<i>petriellidiosis</i>), 토풀롭시스증, 균종 및 색소진균증; 및 백선증을 포함한다. |
| 리케치알 감염으로는 리케치아성 및 리케치아병을 포함한다. |
| 미코플라즈마 및 클라미디알 감염의 예로는 미코플라즈마 폐렴; 성병성 림프육아종; 앵무새병; 및 출생 전후 클라미디어 감염을 포함한다. |
| 진핵 병원체 |
| 병원성 원생동물 및 기생충 및 그에 의한 감염으로는: 아메바증; 말라리아; 리슈만편모충증; 파동편모충증; 특소포자충증; 폐포자충(<i>Pneumocystis carinii</i>); 바베스열원충증; 편모충증; 선모충증; 사상충증; 주혈흡충증; 선충; 흡충류(<i>trematodes</i>) 또는 흡충(<i>fluke</i>); 및 촌충(조충) 감염을 포함한다. |

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1 은 서열 번호: 1을 나타낸다.

도면

도면1

서열 번호 : 1

5 GAATTCCGCCACCATGGAATCGGACCTGGATCTGTTCCCTGGTGGCCGCCGCTACAAGAGTG
CACACCAACTGGGTGAACTGATCAGCGACCTGAAAGAATCGAGGACCTGATCCAGAGC
ATGCACATCGACGCCACCCCTGTACACCGAGAGCGATGTGACCCCTGAGCTGTAAGGTGAC
GCCATGAAAGTGCTTTCTGCCTGGAGCTGAGGTGATCAGCCTGGAGAGCGGCCGAGCGCCAGC
ATCCACGACACCGTGAGAACCTGATCATCTGGCCAACAACAGCTGAGCAGCAACGGC
AATGTGACCGAGAGCGGCTGTAAGGAGTGTGAGGGAGAAGAACATCAAGGAG
10 TTTCTGCAGAGCTTCGTCACATCGTGCAGATGTTCAACACCCAGCTGATGACTCGAG

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

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

<120> VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS USING CODON-OPTIMIZED IL-15 AND
 METHODS FOR USING THE SAME

<130> 133172.1909

<150> 60/758,856
 <151> 2006-01-13

<150> PCT/US07/00886
 <151> 2007-01-12

<160> 1

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IL-15 functional fragment 1

<400> 1
 gaattcgcca ccatggactg gacctggatc ctgttcctgg tggccggcgc tacaagagtg 60

cacagcaact gggtaaacgt gatcagcgac ctgaagaaga tcgaggacct gatccagagc 120

atgcacatcg acgccaccct gtacaccgag agcgatgtgc accccagctg taaggtgacc 180

gccatgaagt gcittctgct ggagctgcag gtgatcagcc tggagagcgg cgacgccagc 240

atccacgaca ccgtggagaa cctgatcatc ctggccaaca acagectgag cagcaacggc 300

aatgtgaccg agagcggctg taaggagtgt gaggagctgg aggagaagaa catcaaggag 360

tttctgcaga gcttcgtgca catcgtgcag atgttcatca acaccagctg atgactcgag 420