



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098585
 (43) 공개일자 2008년11월11일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C07K 14/05</i> (2006.01) <i>A61K 39/245</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/34</i> (2006.01) <i>A61K 39/295</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7016296
 (22) 출원일자 2008년07월04일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년07월04일
 (86) 국제출원번호 PCT/AU2006/001854
 국제출원일자 2006년12월06일
 (87) 국제공개번호 WO 2007/065215
 국제공개일자 2007년06월14일
 (30) 우선권주장
 2005906851 2005년12월06일 오스트레일리아(AU)</p> | <p>(71) 출원인
 새빈 테라퓨틱스 피티와이 엘티디
 호주 2122 뉴 사우쓰 웨일즈 이스트우드 피프쓰
 에비뉴 11</p> <p>(72) 발명자
 톰슨, 스코트, 앤쏘니
 호주 2582 뉴 사우쓰 웨일즈 머럼베이트맨 매킨토
 쉬 서킷 98
 더라이스와미, 제이, 쿠마르
 호주 4006 퀸스랜드 허스톤 브램스톤 테라스
 모스, 테니스, 제임스
 호주 4054 퀸스랜드 아라나 힐스 미첼 스트리트
 29</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 양영환</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 28 항

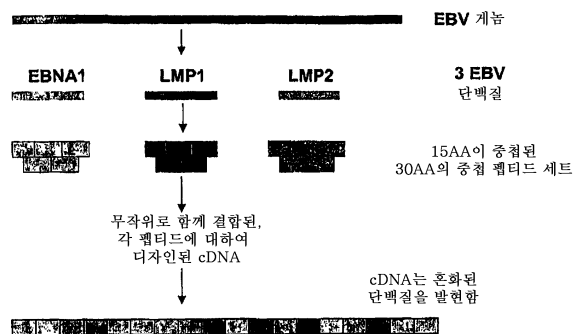
(54) 엡스타인-바르 바이러스 관련 질환의 치료

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 모 (parent) EBV 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편 (segment)을 포함하는 합성 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 상기 절편은, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된 것인 대상체에서의 EBV 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 백신에 관한 것이다.

대표도 - 도1

NPC SAVINE의 구축



특허청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 모 (parent) EBV 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편 (segment)을 포함하는 합성 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 상기 절편은, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된 것인, 대상체에서의 EBV 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드가 EBNA1, LMP1 및 LMP2를 포함하는 군 중에서 선택되는 백신.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, EBV 관련 질환이 암인 백신.

청구항 4

제3항에 있어서, 암이 비인두 암종 (NPC), 호지킨 림프종 (HL) 및 이식후 림프증식성 질환 (PTLD)을 포함하는 군 중에서 선택되는 백신.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 폴리펩티드가 단일 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편으로 본질적으로 이루어진 것인 백신.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 폴리펩티드가 복수 개의 상이한 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편으로 본질적으로 이루어진 것인 백신.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합성 폴리펩티드 중 절편이 상기 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 해당 절편의 순서 또는 배열과 비교해 상이한 순서 또는 배열로 순차적으로 결합된 백신.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절편 중 하나 이상이 하나 이상의 다른 상기 절편과 부분적 서열 동일성 또는 상동성을 포함하는 백신.

청구항 9

제8항에 있어서, 서열 동일성 또는 상동성이 상기 하나 이상의 절편의 한쪽 또는 양쪽 말단에 포함된 백신.

청구항 10

하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편을 포함하며, 여기서 상기 절편은 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된, 합성 폴리펩티드.

청구항 11

제10항의 합성 폴리펩티드를 암호화하는 합성 폴리뉴클레오티드.

청구항 12

제11항에 있어서, 서열 1에 제공된 서열을 포함하는 합성 폴리뉴클레오티드.

청구항 13

조절 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된 제11항 또는 제12항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 합성 구조체.

청구항 14

하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편을 암호화하는 복수 개의 핵산 서열을 동일한 리딩 프레임 내에 함께 결합시켜, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된 상기 절편을 암호화하는 서열을 갖는 합성 폴리뉴클레오티드를 형성하는 것을 포함하는, 제11항 또는 제12항의 합성 폴리뉴클레오티드의 제조 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 각각의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 단편으로 단편화하고 상기 단편을 상기 모 EBV 폴리펩티드 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합시키는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 단편이 무작위로 함께 결합되는 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 모 EBV 폴리펩티드 또는 이의 절편의 서열을 역 번역하여 상기 모 EBV 폴리펩티드 또는 상기 절편을 암호화하는 핵산 서열을 제공하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 모 EBV 폴리펩티드 서열의 아미노산이 역 번역되어 관심 세포에서 기타 동의적 (synonymous) 코돈보다 더 높은 번역 효율을 갖는 코돈을 제공하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 모 EBV 폴리펩티드 서열의 아미노산이 역 번역되어, 인접 또는 국소 서열 요소의 관계에서, 과제의 수행에 저항하는 바람직하지 않은 서열을 형성하는 경향이 더 낮은 코돈을 제공하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 바람직하지 않은 서열이 회문식 서열 또는 이중 서열인 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 과제가 폴리뉴클레오티드의 클로닝, 서열 분석, 안정성의 강화이거나 또는 생체 내 번역의 강화인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 백신, 제10항의 합성 폴리펩티드, 제11항 또는 제12항의 합성 폴리뉴클레오티드 및 제13항의 합성 구조체로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제를, 약학적 허용 담체와 함께 포함하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 아주반트를 더 포함하는 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 백신, 제10항의 합성 폴리펩티드, 제11항 또는 제12항의 합성 폴리뉴클레오티드, 제13항의 합성 구조체 또는 제22항 또는 제23항의 조성물로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제의 유효량을, 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, EBV 관련 질환에 대한 면역 반응의 조절 방법.

청구항 25

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 백신, 제10항의 합성 폴리펩티드, 제11항 또는 제12항의 합성 폴리뉴클레오티드, 제13항의 합성 구조체 또는 제22항 또는 제23항의 조성물로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제의

유효량을, 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, EBV 관련 질환의 치료 및/또는 예방 방법.

청구항 26

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 백신, 제10항의 합성 폴리펩티드, 제11항 또는 제12항의 합성 폴리뉴클레오티드, 제13항의 합성 구조체 또는 제22항 또는 제23항의 조성물의, 면역 반응의 조절을 위한 용도.

청구항 27

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 백신, 제10항의 합성 폴리펩티드, 제11항 또는 제12항의 합성 폴리뉴클레오티드, 제13항의 합성 구조체 또는 제22항 또는 제23항의 조성물의, EBV 관련 질환의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 용도.

청구항 28

EBV 관련 질환의 치료에 사용하기 위한, 제10항의 합성 폴리펩티드, 제11항 또는 제12항의 합성 폴리뉴클레오티드, 제13항의 합성 구조체 또는 제22항 또는 제23항의 조성물을 포함하는 백신.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 관련 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 방법, 백신, 면역학적 조성물 및 합성 폴리펩티드, 및 면역 반응을 조절하기 위한 관련 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> EBV 관련 질환에 대한 실질적으로 완전한 면역학적 적용 범위를 제공할 수 있는 안전하고 효과적인 백신 전략의 결핍은 중요한 문제이고, 몇몇 EBV 관련 질환, 예컨대 이식후 림프증식성 질환 (PTLD), 비인두 암종 (NPC) 및 호지킨 림프종 (HL)에 대한 치료에서의 진보를 방해하여 온 것이다.

<3> 상기 각 질환에 대하여, 세포독성 T 림프구 (CTL)는 EBV 감염의 콘트롤에 있어서 중요한 효과기 메커니즘이고, 진행중인 EBV 관련 악성 종양에서의 면역학적 조정의 가능성은, 자가 조직 림프아구양 세포주에 의한 시험관내 활성화된 EBV 특이적 CTL의 입양 전달(adoptive transfer)을 이용하여 이식편 수혜자에게서 때때로 발생하는 PTLD를 치료할 수 있다는 관찰연구에 의해, 최근 상당히 증진되어 왔다. 상기 경우, 입양 전달된 CTL 벌크 배양물은 면역지배적 EBV 핵 단백질, EBNA 3, 4 및 6에 대한 특이성을 갖는 효과기 세포에 의해 좌우된다.

<4> 그러나, 상기 전략을 NPC 및 HL에 대한 적용을 위해 확장시키는 선택은 상기 악성 종양에서 발견된 잠재적 바이러스 암호화된 표적, 즉 EBNA1, LMP1 및 LMP2의 더 제한된 범위에 의해 제한되고 있다. 이들 중, LMP1 및 LMP2가 오로지 잠재적 표적인데, 왜냐하면 EBNA1은 MHC 클래스 I 경로를 통해 바이러스 감염된 세포에 의해 불충분하게 프로세싱되어 불충분하게 제시되기 때문이다.

<5> NPC 및 HL에 대한 새로운 치료제를 체형화하는 추가의 어려움은, 건강한 개체에서의 상기 에피토프에 대한 낮은 전구체 빈도로 인하여 입양 전달을 위하여 효과기 세포를 팽창시키기 위하여 LMP1을 사용할 가능성이 제한되기 때문에 발생한다. 더욱이, 임상 환경에서 전장 LMP 단백질을 사용하는 것은, 상기 단백질이 정상 세포에서 발암 과정을 독립적으로 개시할 수 있기 때문에 제한된다.

<6> 본 발명은 혼화된 항원 백신 (scrambled antigen vaccine), 또는 "SAVINE"을 이용하여 EBV 관련 질환이 치료 및/또는 예방될 수 있다는 놀랍고 예기치 못한 발견에 기초한 것이다.

발명의 개요

<8> 본 발명의 제 1 측면에 따르면, 하나 이상의 모 (parent) EBV 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편 (segment)을 포함하는 합성 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 상기 절편은, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된 것인, 대상체에 있어서 EBV 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 백신이 제공된다.

<9> 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드는 EBNA1, LMP1 및 LMP2를 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다.

<10> EBV 관련 질환은 암일 수 있다.

- <11> 암은 비인두 암종 (NPC), 호지킨 림프종 (HL) 및 및 이식후 림프증식성 질환 (PTLD)을 포함하는 군 중에서 선택 될 수 있다.
- <12> 합성 폴리펩티드는 단일 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편으로 본질적으로 이루어질 수 있다.
- <13> 대안으로, 합성 폴리펩티드는 복수 개의 상이한 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편으로 본질적으로 이루어질 수 있다.
- <14> 상기 합성 폴리펩티드 중 절편은 상기 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 해당 절편의 순서 또는 배열에 대하여 상이한 순서 또는 배열로 순차적으로 결합될 수 있다.
- <15> 상기 절편 중 하나 이상은 하나 이상의 다른 상기 절편에 대한 부분적 서열 동일성 또는 상동성을 포함할 수 있다. 서열 동일성 또는 상동성은 상기 하나 이상의 절편의 한쪽 또는 양쪽 말단에 포함될 수 있다.
- <16> 본 발명의 제 2 측면에 따르면, 합성 폴리펩티드가 제공되는데, 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편을 포함하고, 상기 절편은 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된다.
- <17> 본 발명의 제 3 측면에 따르면, 제 2 측면의 합성 폴리펩티드를 암호화하는 합성 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- <18> 합성 폴리펩티드는 서열 1에 제공된 서열을 포함할 수 있다.
- <19> 본 발명의 제 4 측면에 따르면, 조절 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된 제 3 측면의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 합성 구조체가 제공된다.
- <20> 본 발명의 제 5 측면에 따르면, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편을 암호화하는 복수 개의 핵산 서열을 동일한 리딩 프레임 내에 함께 결합시켜, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된 상기 절편을 암호화하는 서열을 갖는 합성 폴리뉴클레오티드를 형성하는 것을 포함하는, 제 3 측면의 합성 폴리뉴클레오티드의 제조 방법이 제공된다.
- <21> 본 방법은 각각의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 단편으로 단편화하고 상기 단편을 상기 모 EBV 폴리펩티드 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합시키는 것을 더 포함할 수 있다.
- <22> 단편은 함께 무작위로 함께 결합될 수 있다.
- <23> 본 방법은 각각의 모 EBV 폴리펩티드의 서열 또는 이의 절편을 역 번역하여 상기 모 EBV 폴리펩티드 또는 이의 절편을 암호화하는 핵산 서열을 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.
- <24> 상기 모 EBV 폴리펩티드 서열의 아미노산은 역 번역되어 관심 세포에서 기타 동의적 (synonymous) 코돈보다 더 높은 번역 효능을 갖는 코돈을 제공할 수 있다.
- <25> 추가로 또는 대안으로, 상기 모 EBV 폴리펩티드 서열의 아미노산은 역 번역되어 코돈을 제공할 수 있고, 상기 코돈은, 인접 또는 국소 서열 요소의 관계에서, 과제의 수행에 저항하는 바람직하지 않은 서열을 형성하는 경향이 더 낮다.
- <26> 바람직하지 않은 서열은 회문식 서열 또는 이중 서열일 수 있다.
- <27> 과제는 폴리뉴클레오티드의 클로닝, 서열 분석, 안정성의 강화이거나 또는 생체내 번역의 강화일 수 있다.
- <28> 본 발명의 제 6 측면에 따르면, 제 1 측면의 백신, 제 2 측면의 합성 폴리펩티드, 제 3 측면의 합성 폴리뉴클레오티드 및 제 4 측면의 합성 구조체로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제를, 약학적 허용 담체와 함께 포함하는 조성물이 제공된다.
- <29> 조성물은 임의로 아주반트를 포함할 수 있다.
- <30> 본 발명의 제 7 측면에 따르면, 제 1 측면의 백신, 제 2 측면의 합성 폴리펩티드, 제 3 측면의 합성 폴리뉴클레오티드, 제 4 측면의 합성 구조체, 또는 제 6 측면의 조성물로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제의 유효량을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, EBV 관련 질환에 대한 면역 반응의 조절 방법이 제공된다.
- <31> 본 발명의 제 8 측면에 따르면, 제 1 측면의 백신, 제 2 측면의 합성 폴리펩티드, 제 3 측면의 합성 폴리뉴클레오티드, 제 4 측면의 합성 구조체, 또는 제 6 측면의 조성물로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제의 유효

량을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, EBV 관련 질환의 치료 및/또는 예방 방법이 제공된다.

- <32> 본 발명의 제 9 측면에 따르면, 면역 반응의 조절을 위한, 제 1 측면의 백신, 제 2 측면의 합성 폴리펩티드, 제 3 측면의 합성 폴리뉴클레오티드, 제 4 측면의 합성 구조체 및 제 6 측면의 조성물의 용도가 제공된다.
- <33> 본 발명의 제 10 측면에 따르면, EBV 관련 질환의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 제 1 측면의 백신, 제 2 측면의 합성 폴리펩티드, 제 3 측면의 합성 폴리뉴클레오티드, 제 4 측면의 합성 구조체 및 제 6 측면의 조성물의 용도가 제공된다.
- <34> 본 발명의 제 11 측면에 따르면, EBV 관련 질환의 치료에 사용하기 위한, 제 2 측면의 합성 폴리펩티드, 제 3 측면의 합성 폴리뉴클레오티드, 제 4 측면의 합성 구조체 또는 제 6 측면의 조성물을 포함하는 백신이 제공된다.

발명의 상세한 설명

<42> 정의

- <43> 본원에서 사용시, 용어 "포함하는"은 "주로 포함하나, 반드시 단독은 아님"을 의미한다. 더욱이, 단어 "포함하는"의 변형, 예컨대 "포함한다"는 상응하는 변화된 의미를 갖는다.
- <44> 본원에서 사용시, 용어 "치료하는" 및 "치료"는 상태 또는 증상을 치료하고, 상태 또는 질환의 확립을 예방하거나, 또는 상태 또는 질환 또는 기타 바람직하지 않은 증상의 진행을 어떠한 경우에서도 예방, 저지, 지연, 또는 역전시키는 임의 및 모든 용도를 일컫는다.
- <45> 본원에서 사용시, 용어 "유효량"은 소정의 효과를 제공하는 작용제 또는 화합물의 비독성이지만 충분한 양을 그 의미에 포함한다. 요구되는 정확한 양은 치료되는 중, 대상체의 나이 및 일반적 상태, 치료되는 상태의 심각성, 투여되는 특정 작용제 및 투여 방식 등과 같은 인자에 따라 대상체마다 다를 것이다. 따라서, 정확한 "유효량"을 명시하는 것은 가능하지 않다. 그러나, 임의의 주어진 경우에 있어서, 적절한 "유효량"은 단지 일상적 실험의 이용으로 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- <46> 본원에서 사용시, 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체 및 이의 단편, 변이체, 유사체, 오솔로그 (orthologue) 또는 상동체를 일컫기 위해 혼용하여 사용한다. 따라서, 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 합성 비-천연 발생 아미노산, 예컨대 해당 천연 발생 아미노산의 화학적 유사체인 아미노산 중합체, 뿐만 아니라 천연 발생 아미노산 중합체 모두에 적용된다.
- <47> 본원에서 사용시, 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 mRNA, RNA, cRNA, cDNA 또는 DNA 또는 이의 조합물을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.
- <48> 본원에서 사용시, 용어 "작동적으로 결합된"은 전사 및 번역 조절 폴리뉴클레오티드가 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 대하여, 폴리뉴클레오티드가 전사되고 폴리펩티드가 번역되는 방식으로 위치됨을 일컫는다.
- <49> 본원에서 사용시, 용어 "합성 폴리펩티드"는 폴리펩티드 또는 해당 폴리뉴클레오티드를 천연에서 일반적으로 발견되지 않는 형태로 조작함으로써 시험관내 형성된 폴리펩티드를 일컫는다. 예를 들어, 합성 폴리펩티드는 합성 폴리뉴클레오티드의 번역 생성물일 수 있다.
- <50> 본원에서 사용시, 용어 "합성 폴리뉴클레오티드"는 폴리뉴클레오티드를 천연에서 일반적으로 발견되지 않는 형태로 조작함으로써 시험관내 형성된 폴리뉴클레오티드를 일컫는다. 예를 들어, 합성 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터의 형태일 수 있다. 일반적으로, 상기 발현 벡터는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된 전사 및 번역 조절 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- <51> 본원에서 사용시, 용어 "EBV-관련 질환"은 엡스타인-바르 바이러스 (EBV)에 의해 야기되거나 이와 관련된 임의의 질환, 질환 상태 또는 장애, 비제한적인 예로서, 암, 예컨대 비인두 암종, 호지킨 림프종 또는 이식후 림프 증식성 질환을 의미한다.
- <52> 본원에서 사용시, 용어 "모 EBV 폴리펩티드"는 엡스타인-바르 바이러스 (EBV)로부터 단리 또는 유도되거나, 또는 이와 상동성인 폴리펩티드를 의미하고, 이는 합성 폴리펩티드의 제조에 사용된다. 모 EBV 폴리펩티드는 천연 발생 유전자에 의해 암호화되는 EBV 폴리펩티드일 수 있다. 대안으로, 모 EBV 폴리펩티드는 천연 발생이 아

나나 재조합 기술의 이용으로 조작된 EBV 폴리펩티드일 수 있다. 상기 경우, 모 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 동일한 폴리펩티드를 암호화하는 천연 유전자에 대하여 상이하나 동의적인 코돈을 포함할 수 있다. 대안으로, 모 EBV 폴리펩티드는 천연 폴리펩티드 서열에 상응하지 않을 수 있다. 예를 들어, 모 EBV 폴리펩티드는 복수 개의 폴리펩티드와 공통인 하나 이상의 공통 서열을 포함할 수 있다.

- <53> 본원에서 사용시, 용어 "조절하는"은 항원에 대한 면역 반응을, 직접적으로 또는 간접적으로, 증가시키거나 또는 감소시키는 것을 의미한다.
- <54> 본원에서 사용시, 용어 "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산이 폴리에피토프 사슬 (단백질의 1차 서열) 내부에 유사한 특성을 갖는 또다른 아미노산으로 치환 또는 대체되는 것을 일컫는다. 예를 들어, 하전 아미노산 글루탐산 (Glu)의 유사한 하전 아미노산 아스파르트산 (Asp)으로의 치환은 보존적 아미노산 치환이다.
- <55> 본원에서 사용시, 용어 "단백질", "폴리펩티드", "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"의 범위 이내에는 이의 단편 및 변이체, 비제한적인 예로서 폴리뉴클레오티드 및 핵산의 역 보체 및 안티센스 형태가 속한다.
- <56> 용어 "단편"은 전장 단백질 또는 유전자의 성분을 암호화하거나 이의 성분인 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열을 일컫는다. 폴리펩티드에 의해 단편은 전장 단백질과 공통인 정성적 생물 활성을 갖는다.
- <57> 본원에서 사용시 용어 "변이체"는 실질적으로 유사한 서열을 일컫는다. 일반적으로, 핵산 서열 변이체는 공통적인 정성적 생물 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화한다. 일반적으로, 폴리펩티드 서열 변이체도 공통적인 정성적 생물 활성을 갖는다. 또한, 상기 폴리펩티드 서열 변이체는 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 공유할 수 있다.
- <58> 또한, 변이체 폴리펩티드는 유사체를 포함할 수 있고, 여기서 용어 "유사체"는 개시된 폴리펩티드의 유도체인 폴리펩티드를 의미하고, 상기 유도체는, 폴리펩티드가 그것이 유래한 천연 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 기능을 보유하도록, 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실 또는 치환을 포함한다.

본 발명을 수행하는 최적의 방식

- <60> WO 01/90197 (그 개시내용은 본원에서 참고로 인용함)에 개시된 바와 같은 SAVINE ("혼화된 항원 백신")으로서 일컬어지는 최근의 기술 플랫폼은 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 관련 질환, 예컨대 비인두 암종 (NPC), 호지킨 림프종 (HL) 및 이식후 림프증식성 질환 (PTLD)의 신규한 치료와 관련하여 본 발명자에 의해 적용되어 왔다.
- <61> 전통적 EBV 치료 요법과 관련된 특별한 어려움은, EBNA1, LMP1 및 LMP2인 오로지 3 가지의 EBV 항원만이 EBV 유래의 NPC 세포에서 발현된다는 사실을 포함한다. EBV 종양 세포를 선택적으로 표적화하는 능력은 따라서 매우 제한된다. 또한, 3 가지 발현된 항원 중, EBNA1은 EBV 감염된 세포 및/또는 상기 세포의 자손의 표면 상에서 불충분하게 제시되며, 전장 LMP 단백질은 적절한 CTL 면역 반응의 유도에 사용될 수 없는데, 왜냐하면 상기 단백질은 독립적으로 발암성일 수 있기 때문이다. 또한, 입양 T 세포 전달을 이용하는 치료 요법을 위해 LMP1을 사용하여 효과기 세포를 팽창시키는 것은, LMP 에피토프에 특이적인 전구 세포의 낮은 빈도로 인하여 제한된다. 실제로, 입양 전달을 위해 시험관내 활성화된 EBV 특이적 CTL 집단은 종종 세포 표면 항원 EBNA1, LMP1 및 LMP2 보다 EBV 핵 단백질에 특이적인 CTL에 의해 지배된다.
- <62> EBV 관련 질환에 대하여 전통적 치료 요법, 예컨대 화학요법 및 방사선요법을 넘어선 혁신은 따라서 진전시키기가 어렵다. 실제로, 방사선요법 및 화학요법에 기초한 EBV 관련 질환, 예컨대 NPC 및 HL에 대한 현재 치료는 오로지 부분적으로 성공적이고 상당한 부작용을 수반한다. 중요하게, EBV에 대하여 백신에 기초한 접근법의 결핍은 임의의 방지/예방 수단의 결핍을 의미하여 왔다.
- <63> 따라서, 비록 EBV는 세계 인구의 95%를 넘게 감염시키지만, EBV 관련 질환인 비인두 암종 (NPC)에 대한 현재의 치료 프로토콜, 예컨대 방사선요법 및 화학요법은 약 80%의 환자에 대하여 오로지 5 년의 생존을 제공하며, 후기 사망률도 주요한 관심사이다.
- <64> 상기 어려움을 극복하기 위하여, 본 발명자는 EBV 관련 질환의 치료 뿐만 아니라 방지/예방을 위한 백신 접종 요법을 개발하여 왔다. 본 발명자는 중첩되는 30 개 아미노산 서열 (15 개 아미노산이 중첩됨) 중 EBV 세포 표면의 발현된 EBV 항원 EBNA1, LMP1 및 LMP2로부터 유도된 혼화된 DNA 서열을 갖는다. 상기 SAVINE 서열은 아데노바이러스 35 (Ad5F35)로부터의 섬유 단백질을 갖는 아데노바이러스 5에 기초한 복제 결핍 아데노바이러스 벡터에 삽입되어 왔다.
- <65> 상기 혼화된 항원 백신 접근법은 EBV 관련 질환의 잠재적 치료를 위한 신규한 수단으로서 이용되어 왔다. 따라

서, 본원에 개시된 본 발명은 (1) 바이러스 벡터 Ad5F35에 삽입된 EBV 항원 EBNA1, LMP1 및 LMP2로부터 유도된 혼화된 DNA 서열이 효과적으로 프로세싱되어 항원 특이적 T 세포에 제시될 수 있고, (2) SAVINE 특이적 CTL 반응이 EBV 면역 대상체로부터 유도될 수 있고, (3) CLT (프라이밍) 반응이 우두 또는 계두 SAVINE 구조체에 의한 후속 면역화에 의해 부스팅될 수 있으며, (4) 정의된 에피토프의 CTL 펩티드의 이용으로 이어서 시험관내 팽창되는 프라이밍-부스팅된 SAVINE CTL이 NPC 중앙 세포 성장에 저항하는 생체내 비장 세포의 활성화를 유도할 수 있음을 증명한다.

<66> 상기 SAVINE 구조체는 따라서 LMP1의 발암 능력을 제거하면서 동시에 EBNA1, LMP1 및 LMP2 내부에 모든 가능한 MHC 클래스 I 및 클래스 II 에피토프의 제시를 가능하게 하는 유의한 이점을 갖는다. 더욱이, 이의 현재 형태에서, EBNA1 내부의 모든 글리신/알라닌 반복 서열은 제거되었고, 따라서 전체 단백질의 T 세포 프로세싱을 저해하는 면역 억제 신호를 최소화한다.

<67> 따라서, 본 발명은 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편을 포함하는 합성 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 상기 절편은 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된 것인, 대상체에 있어서 EBV 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 백신을 제공한다.

<68> 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드는 EBNA1, LMP1 및 LMP2를 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다.

<69> EBV 관련 질환은 암일 수 있다.

<70> 암은 비인두 암종, 호지킨 림프종 및 이식후 림프증식성 질환을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다.

<71> 당업자는 합성 폴리펩티드가 단일 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편으로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 또는 대안으로, 합성 폴리펩티드가 복수 개의 상이한 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편으로 본질적으로 이루어질 수 있음을 용이하게 이해할 것이다.

<72> 또한 상기 합성 폴리펩티드 중 절편은 상기 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 해당 절편의 순서 또는 배열과 비교해 상이한 순서 또는 배열로 순차적으로 결합될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.

<73> 상기 절편 중 하나 이상은 하나 이상의 다른 상기 절편에 대하여 부분적 서열 동일성 또는 상동성을 포함할 수 있다. 서열 동일성 또는 상동성은 상기 하나 이상의 절편의 한쪽 또는 양쪽 말단에 포함될 수 있다.

<74> **합성 폴리펩티드**

<75> 본 발명자는 모 EBV 폴리펩티드의 구조를 충분히 파괴하여 모 EBV 폴리펩티드의 한 가지 이상의 기능을 방해, 폐기 또는 변형하면서, 동시에, 모 EBV 폴리펩티드의 상이한 절편을 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 융합, 커플링 또는 함께 결합시킴으로써, 모 EBV 폴리펩티드 중 존재하는 잠재적으로 유용한 에피토프의 파괴를 최소화할 수 있었다. 상기 관계 변화의 결과로서, 생성되는 합성 폴리펩티드 중 결합된 절편의 서열은 모 EBV 폴리펩티드 내부에 포함된 서열과 상이하다.

<76> 따라서, 본 발명은 합성 폴리펩티드를 제공하는데, 여기서 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편을 포함하고, 상기 절편은, 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된다.

<77> 본 발명에 따르면, 융합 단백질은 또한 폴리펩티드 또는 이의 변이체 또는 단편의 특징을 개선하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 모이어티 (moiety)가 폴리펩티드에 첨가되어 폴리펩티드의 안정성을 증가시킬 수 있다. 폴리펩티드에 대한 펩티드 모이어티의 첨가는 당업자에게 잘 공지된 일상적 기술이다.

<78> 본 발명의 합성 폴리펩티드는 면역증강제로서 유용하고 명세서의 다른 곳에서 혼화된 항원 백신, 초 약독화 백신 또는 "SAVINES"로서 일컬어진다.

<79> 당업자는 상기 합성 폴리펩티드 중 절편이 상기 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 중 해당 절편의 순서 또는 배열과 비교해 상이한 순서 또는 배열로 순차적으로 결합되는 것이 바람직하나 필수적이지는 않음을 이해할 것이다. 예를 들어, 4 개의 연속 또는 중첩 절편 A-B-C-D를 포함하는 모 EBV 폴리펩티드의 경우, 상기 절편은 23 개의 기타 가능한 순서로 결합되어 합성 폴리펩티드를 형성할 수 있다. 상기 순서는 하기로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다: A-B-D-C, A-C-B-D, A-C-D-B, A-D-B-C, A-D-C-B, B-A-C-D, B-A-D-C, B-C-A-D, B-C-D-A, B-D-A-C, B-D-C-A, C-A-B-D, C-A-D-B, C-B-A-D, C-B-D-A, C-D-A-B, C-D-B-A, D-A-B-C, D-A-C-B, D-B-A-C, D-B-C-A, D-C-A-B, 및 D-C-B-A. 절편의 재배열은 바람직하게는 무작위적이거나, 모 서열의 완전한 또는 부분적 재집합을 야기하는 재배열 (예를 들어, ADBC, BACD, DABC)을 배제하거나 최소화하는 것이 본질적으로 바람직하다. 그러

나, 상기 완전한 또는 부분적 재집합의 확률은 재배열에 대한 절편의 수가 증가함에 따라 감소함이 이해될 것이다.

- <80> 절편의 순서는, 폴리펩티드의 구조가 충분히 파괴되어 모 EBV 폴리펩티드와 관련된 한 가지 이상의 기능을 방해, 폐기 또는 변형하도록, 모 EBV 폴리펩티드 중 이들이 존재하는 순서에 대하여 적절히 섞이고, 재정리되거나 재배열된다. 바람직하게는, 모 EBV 폴리펩티드의 절편은 합성 폴리펩티드 중 무작위로 재배열된다.
- <81> 모 EBV 폴리펩티드는 적절하게는 질환 또는 상태와 관련된 폴리펩티드이다. 예를 들어, 모 폴리펩티드는 EBV에 의해, 또는 EBV 감염에 의해 야기되거나 이로부터 발생하거나 또는 이와 관련된 암 세포에 의해 발현된 폴리펩티드일 수 있다. 특히, 모 EBV 폴리펩티드는 EBNA1, LMP1 및 LMP2를 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다.
- <82> EBV에 의해 야기되거나, 이로부터 발생하거나 또는 이와 관련된 임의의 암 또는 종양의 치료가 본 발명에 의해 고려된다. 예를 들어, 암 또는 종양의 비제한적인 예로서 이식후 림프증식성 질환 (PTLD), 호지킨 림프종 및 비인두 암종 (NPC)을 들 수 있다.
- <83> 바람직한 실시양태에서, 절편은 크기에 기초하여 선택된다. 본 발명에 따른 절편은 모 EBV 폴리펩티드에 의해 암호화된 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 이용될 수 있는 임의의 적절한 크기일 수 있다. 다수의 인자가 절편 크기의 선택에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 절편의 크기는 이것이 T 세포 에피토프의 크기 및 이의 프로세싱 요건을 포함하거나, 또는 이에 해당하도록 바람직하게 선택되어야 한다. 당업자는 클래스 I 제한 T 세포 에피토프는 길이가 8 내지 10 개의 아미노산일 수 있고, 비천연 인접 잔기 옆에 위치되는 경우, 상기 에피토프는 이것이 효과적으로 프로세싱되고 제시되는 것을 보장하기 위하여 일반적으로 2 내지 3 개의 천연 인접 아미노산을 요구할 수 있음을 이해할 것이다. 클래스 II 제한 T 세포 에피토프는 길이가 12 내지 25 개의 아미노산의 범위일 수 있고, 효과적 단백질 분해 프로세싱을 위해 천연 인접 잔기를 요구하지 않을 수 있으나, 천연 인접 잔기가 역할을 할 수 있는 것으로 생각된다. 클래스 II 제한 에피토프의 또다른 중요한 특징은 이것이 일반적으로 중앙에 9 내지 10 개 아미노산의 핵을 함유하고 이는 서열 독립적 방식으로 클래스 II MHC 항원의 어느 한쪽 측면의 보존된 구조와 결합함으로써 결합을 안정화하는 상기 코어의 어느 한쪽 측의 인접 서열을 갖는 클래스 II MHC 분자에 특이적으로 결합한다는 점이다 (문헌 [Brown J. H., Jardetsky T. S., Gorga J. C., Stern L. J., Urban R. G., Strominger J. L., Wiley D. C.: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 1993, 364:33-3]). 따라서 클래스 II 제한 에피토프의 기능적 부위는 전형적으로 15 개 아미노산 미만의 길이이다. 선형 B 세포 에피토프의 크기 및 이의 프로세싱에 영향을 미치는 인자, 예컨대 클래스 II 제한 에피토프는 상당히 다양하나, 상기 에피토프는 종종 크기가 15 개 아미노산보다 더 작다. 상기로부터, 절편의 크기는 4 개 아미노산 이상이고, 바람직하게는 7 개 아미노산 이상이고, 더 바람직하게는 12 개 아미노산 이상이고, 더 바람직하게는 20 개 아미노산 이상이며, 더 바람직하게는 30 개 아미노산 이상인 것이 바람직하나, 필수적인 것은 아니다. 적절하게는, 절편의 크기는 2000 개 아미노산 미만이고, 더 바람직하게는 1000 개 아미노산 미만이고, 더 바람직하게는 500 개 아미노산 미만이고, 더 바람직하게는 200 개 아미노산 미만이고, 더 바람직하게는 100 개 아미노산 미만이고, 더 바람직하게는 80 개 아미노산 미만이고, 더욱 더 바람직하게는 60 개 아미노산 미만이며, 더더욱 더 바람직하게는 40 개 아미노산 미만이다. 이와 관련하여, 합성 폴리펩티드가 모 EBV 폴리펩티드의 구조에 대하여 상이한 구조를 기능적으로 채택하기 위하여, 절편의 크기는 가능한 작은 것이 바람직하다. 또한, T 세포 에피토프의 손실을 최소화하기 위하여, 절편의 크기는 충분히 큰 것이 바람직하다. 특히 바람직한 실시양태에서, 절편의 크기는 약 30 개 아미노산이다.
- <84> 선택적 스페이서가 이용되어 인접한 절편을 서로에 대하여 일정한 간격으로 둘 수 있다. 따라서, 선택적 스페이서는 절편의 일부 또는 전부 사이에 삽입될 수 있다. 스페이서는 적절하게는 단백질 분해 프로세싱 및/또는 인접 절편(들)의 제시를 변화시킨다. 상기 유형의 바람직한 실시양태에서, 스페이서는 단백질 분해 프로세싱 및/또는 인접 절편(들)의 제시를 촉진하거나 또는 강화시킨다. 바람직하게는, 스페이서는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 하나 이상의 아미노산은 적절하게는 중성 아미노산이다. 중성 아미노산은 바람직하게는 알라닌이다. 대안으로, 하나 이상의 아미노산은 시스테인이다.
- <85> 바람직한 실시양태에서, 절편은 이들이 하나 이상의 다른 절편과 부분적 서열 동일성 또는 상동성을 갖도록 선택된다. 적절하게는, 각 절편의 한쪽 또는 양쪽 말단에, 하나 이상의 다른 상기 절편의 내부에 포함된 아미노산 서열과 동일하거나, 또는 이와 상동성인, 4 개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 7 개 이상의 인접 아미노산, 더 바람직하게는 10 개 이상의 인접 아미노산, 더 바람직하게는 15 개 이상의 인접 아미노산, 및 더욱 더 바람직하게는 20 개 이상의 인접 아미노산이 포함된다. 바람직하게는, 각 절편의 말단 또는 각 말단에, 하나

이상의 다른 상기 절편의 내부에 포함된 아미노산 서열과 동일하거나, 또는 이와 상동성인, 500 개 미만의 인접 아미노산, 더 바람직하게는 200 개 미만의 인접 아미노산, 더 바람직하게는 100 개 미만의 인접 아미노산, 더 바람직하게는 50 개 미만의 인접 아미노산, 더 바람직하게는 40 개 미만의 인접 아미노산, 더욱 더 바람직하게는 30 개 미만의 인접 아미노산이 포함된다. 상기 서열 중첩 (또한 명세서의 다른 곳에서 "중첩 단편" 또는 "중첩 절편"으로도 일컬어짐)은, 프로세싱을 억제하는 아미노산 곁에 또는 근처에 위치되는 경우, 절편 경계에서 잠재적 에피토프가 손실되지 않음을 보장하고 절편 경계에서 또는 그 근처에서 에피토프가 효과적으로 프로세싱되는 것을 보장하기 위하여 바람직하다. 바람직하게는, 절편 크기는 중첩 크기의 약 2 배이다.

<86> 바람직한 실시양태에서, 절편이 그 사이에 부분적 서열 상동성을 갖는 경우, 상동성 서열은 적절하게 보존된 및/또는 비-보존된 아미노산 차이를 포함한다.

<87> 보존된 또는 비-보존된 차이는 해당 모 EBV 폴리펩티드의 다형에 상응할 것이다. 다형 폴리펩티드는 각종 병원성 유기체 및 암에 의해 발현된다. 예를 들어, 다형 폴리펩티드는 상이한 바이러스 균주 또는 클레이드에 의해 또는 상이한 개체에서의 암에 의해 발현될 수 있다.

<88> 각 절편 간의 서열 중첩은 모 EBV 폴리펩티드 중 이것이 존재하는 순서에 대하여 절편의 임의의 뒤섞임 또는 재배열로부터 발생할 수 있는 임의의 에피토프 서열의 파괴를 최소화하기 위해 바람직하다. 상기 기술한 중첩 절편이 이용되어 합성 폴리펩티드를 형성하는 경우, 상기 절편이 함께 결합된 순서를 해당 절편이 모 EBV 폴리펩티드 중 일반적으로 존재하는 순서에 대하여 변화시킬 필요는 없을 것이다. 이와 관련하여, 합성 폴리펩티드 중 함께 결합되는 경우 상기 중첩 절편은 모 EBV 폴리펩티드의 구조에 대하여 상이한 구조를 채택할 수 있고, 여기서 상이한 구조는 모 폴리펩티드와 관련된 한 가지 이상의 기능을 제공하지 않는다. 예를 들어, 각각 모 EBV 폴리펩티드의 30 개의 인접 아미노산에 걸쳐 있고 하나 이상의 인접 절편과 10 개 아미노산의 중첩 서열을 갖는 4 개의 절편 A-B-C-D의 경우, 합성 폴리펩티드는 이중의 10 개 아미노산 서열의 연결 절편 A-B, B-C 및 C-D를 가질 것이다. 상기 이중 서열의 존재는 상이한 구조를 제공하고 모 EBV 폴리펩티드에 대한 기능을 폐기 또는 변화시키기에 충분할 것이다.

<89> 바람직한 실시양태에서, 절편 크기는 약 30 개 아미노산이고 각 절편의 한쪽 또는 양쪽 말단에서의 서열 중첩은 약 15 개 아미노산이다. 그러나, 기타 적절한 절편 크기 및 서열 중첩 크기가 본 발명에 의해 고려되고, 이는 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있음이 이해될 것이다.

<90> 합성 폴리펩티드의 구축에 모 EBV 폴리펩티드의 모든 절편을 이용하는 것이 바람직하나 필요한 것은 아니다. 적절하게는, 30% 이상, 바람직하게는 40% 이상, 더 바람직하게는 50% 이상, 더욱 더 바람직하게는 60% 이상, 더욱 더 바람직하게는 70% 이상, 더욱 더 바람직하게는 80% 이상 및 더욱 더 바람직하게는 90% 이상의 모 EBV 폴리펩티드 서열이 합성 폴리펩티드의 구축에 사용된다. 그러나, 합성 폴리펩티드의 구축에 이용되는 모 EBV 폴리펩티드로부터의 서열 정보가 더 많을수록, 면역원으로서의 합성 폴리펩티드의 집단 적용 범위가 더 클 것이 이해될 것이다. 바람직하게는, 모 EBV 폴리펩티드로부터의 어떠한 서열 정보도 배제되지 않는다 (예를 들어, 면역학적 에피토프의 명백한 결핍으로 인하여).

<91> **합성 폴리펩티드의 제조**

<92> 당업자는 EBV 또는 EBV에 의해 야기되거나, 이로부터 발생하거나, 또는 이와 관련된 암에 대한 합성 폴리펩티드를 제조하는 경우, EBV 또는 암에 의해 발현되는 복수 개의 상이한 폴리펩티드로부터의 서열 정보를 이용하는 것이 바람직할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, 복수 개의 상이한 모 EBV 폴리펩티드로부터의 절편이 함께 결합되어 본 발명에 따른 합성 폴리펩티드를 형성한다. 이와 관련하여 합성 폴리펩티드의 구축에 있어서 특정 공급원으로부터, 또는 이와 관련된, 가능한 많은 모 EBV 폴리펩티드를 이용하는 것이 바람직하다. 특히, EBNA1, LMP1 및 LMP2 폴리펩티드를 이용하는 것이 바람직하다.

<93> 적절하게는, 모 EBV 폴리펩티드 내부의 임의의 초가변 서열은 합성 폴리펩티드의 구축으로부터 제외된다.

<94> 본 발명의 합성 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 임의의 적절한 절차에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는, 예를 들어, 문헌 [Atherton 및 Shephard (1989, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. IRL Press, Oxford)]의 제 9 장 및 [Roberge 등 (1995, Science 269: 202)]에 기술된 바와 같이 용액 합성 또는 고체상 합성의 이용으로 합성될 수 있다. 합성은, 예를 들어, t-부틸옥시카르보닐 (t-Boc) 또는 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐 (Fmoc) 화학 구조를 이용할 수 있다 (문헌 [Coligan 등, CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997]의 제 9.1 장; [Stewart 및 Young, 1984, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.]; 및 [Atherton 및 Shephard, 상동]을 참

고하라).

- <95> 대안으로, 폴리펩티드는 하기 단계를 포함하는 절차에 의해 제조될 수 있다:
- <96> (a) 합성 폴리펩티드를 암호화하는 합성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 합성 구조체를 제조하는 단계로서, 여기서 상기 합성 폴리뉴클레오티드는 조절 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합되고, 상기 합성 폴리펩티드는 모 폴리펩티드의 복수 개의 상이한 절편을 포함하고, 상기 절편은 모 EBV 폴리펩티드 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합되는 단계;
- <97> (b) 합성 구조체를 적절한 숙주 세포에 도입하는 단계;
- <98> (c) 숙주 세포를 배양하여 상기 합성 구조체로부터 합성 폴리펩티드를 발현시키는 단계; 및
- <99> (d) 합성 폴리펩티드를 단리하는 단계.
- <100> 따라서, 본 발명은 상기 기술한 합성 폴리펩티드를 암호화하는 합성 폴리뉴클레오티드, 뿐만 아니라 조절 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된 합성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 합성 구조체를 제공한다.
- <101> 합성 구조체는 바람직하게는 발현 벡터의 형태이다. 예를 들어, 발현 벡터는 자가 복제 염색체의 벡터, 예컨대 플라스미드, 또는 숙주 개념에 통합되는 벡터일 수 있다. 전형적으로, 조절 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예로서 프로모터 서열, 선도 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 정지 서열, 번역 개시 및 정지 서열 및 증강 인자 또는 활성 인자 서열을 들 수 있다. 당 분야에 공지된 항시적 또는 유도적 프로모터가 본 발명에 의해 고려된다. 프로모터는 천연 발생 프로모터, 또는 한 가지 초과 프로모터 요소를 조합하는 하이브리드 프로모터일 수 있다. 조절 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 발현에 이용되는 숙주 세포에 적절할 것이다. 다수의 유형의 적절한 발현 벡터 및 적절한 조절 폴리뉴클레오티드가 각종 숙주 세포에 대하여 당 분야에 공지되어 있다.
- <102> 바람직한 실시양태에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 선택성 마커 유전자를 포함한다. 선택 유전자는 당 분야에 잘 공지되어 있고 사용된 숙주 세포에 따라 다양할 것이다.
- <103> 발현 벡터는 또한 융합 파트너 (전형적으로 발현 벡터에 의해 제공됨)도 포함하여, 본 발명의 합성 폴리펩티드가 상기 융합 파트너와의 융합 폴리펩티드로서 발현되게 할 수 있다. 융합 파트너의 주요 이점은 이것이 상기 융합 폴리펩티드의 식별 및/또는 정제를 돕는다는 점이다. 상기 융합 폴리펩티드를 발현시키기 위하여, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 결합시켜 융합 파트너 및 폴리뉴클레오티드의 번역 리딩 프레임이 일치되게 할 필요가 있다.
- <104> 융합 파트너의 잘 공지된 비제한적인 예로서 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST), 인간 IgG의 Fc 부분, 말토오스 결합 단백질 (MBP) 및 핵사히스티딘 (HIS₆)을 들 수 있고, 이는 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 폴리펩티드의 단리에 특히 유용하다. 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 폴리펩티드의 정제의 목적을 위해, 친화성 크로마토그래피에 적절한 매트릭스는 각각 글루타티온-, 아밀로오스-, 및 니켈- 또는 코발트-퀴뉴케이션된 수지이다. 다수의 상기 매트릭스는 "키트" 형태, 예컨대 (HIS₆) 융합 파트너와 함께 유용한 퀴아익스프레스™ (QIAexpress™) 시스템 (퀴아겐 (Qiagen)) 및 파마시아 (Pharmacia) GST 정제 시스템으로 이용가능하다. 바람직한 실시양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드는 상업적 벡터 pFLAG™로 발현된다.
- <105> 당 분야에 잘 공지된 또다른 융합 파트너는 녹색 형광 단백질 (GFP)이다. 상기 융합 파트너는 본 발명의 융합 폴리펩티드가 형광 현미경 검사에 의해 또는 유식 세포 측정에 의해 식별되게 하는 것을 가능하게 하는 형광 "태그"로서 기능한다. 본 발명의 융합 폴리펩티드의 세포하 편제를 평가하는 경우, 또는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 발현하는 세포를 단리하기 위하여, GFP 태그가 유용하다. 유식 세포 측정법, 예컨대 형광 활성 세포 선별 (FACS)이 상기 후자의 적용에 특히 유용하다. 바람직하게는, 융합 파트너는 또한 프로테아제 절단 부위, 예컨대 인자 X_a의 경우, 트롬빈 및 인테인 (단백질 인트론)을 가져서, 이는 적절한 프로테아제가 본 발명의 융합 폴리펩티드를 부분적으로 소화시켜 이에 따라 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 그로부터 유리시키게 한다. 유리된 폴리펩티드는 그 후 잇따른 크로마토그래피 분리에 의해 융합 파트너로부터 단리될 수 있다. 본 발명에 따른 융합 파트너는 또한 이의 범위 내에 "에피토프 태그"를 포함하고, 이는 일반적으로 그에 대하여 특정 항체가 이용가능한 짧은 펩티드 서열이다. 특정 단클론 항체가 그에 대하여 용이하게 이용가능한 에피토프 태그의 잘 공지된 예로서 c-Myc, 인플루엔자 바이러스, 혈구응집소 및 FLAG 태그를 들 수 있다. 대안으로, 융합 파트너가 제공되어 기타 형태의 면역성을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 융합 파트너는 표적 항원 상의 입체형태 에피토프

와 또는 번역후 변형된 표적 항원에 대하여 면역 상호 작용하는 항원 결합 분자일 수 있다 (예를 들어, 글리코실화 표적 항원과 면역 상호 작용하는 항원 결합 분자).

<106> 합성 구조체를 숙주 세포에 도입하는 단계는 트랜스팩션, 및 형질전환을 비롯한 임의의 적절한 방법에 의해 수행될 수 있으며, 이의 선택은 이용되는 숙주 세포에 의존할 것이다. 상기 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다.

<107> 본 발명의 합성 폴리펩티드는 합성 구조체로 형질전환된 숙주 세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 단백질 발현에 적절한 조건은 발현 벡터 및 숙주 세포의 선택에 따라 다양할 것이다. 이는 일상적 실험을 통해 당업자에게 의해 용이하게 확인된다.

<108> 발현에 적절한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물일 수 있다. 본 발명에 따른 폴리펩티드의 발현에 대한 하나의 바람직한 숙주 세포는 박테리아이다. 사용되는 박테리아는 대장균일 수 있다. 대안으로, 숙주 세포는 곤충 세포, 예컨대, 예를 들어, 배콜로바이러스 발현 시스템에 이용될 수 있는 SF9 세포일 수 있다.

<109> 합성 폴리펩티드는 예를 들어 문헌 [Sambrook, 등, MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, 1989), 특히 단락 16 및 17]; [Ausubel 등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley & Sons, Inc. 1994-1998), 특히 제 10 및 16 장]; 및 [Coligan 등, CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), 특히 제 1, 5 및 6 장]에 기술된 표준 프로토콜의 이용으로 당업자에게 의해 편리하게 제조될 수 있다.

<110> 합성 폴리펩티드의 아미노산은 임의의 비-천연 발생 또는 임의의 천연 발생 아미노산일 수 있다. 펩티드 합성 동안 비천연 아미노산 및 유도체의 비제한적인 예로서 4-아미노 부티르산, 6-아미노헥산산, 4-아미노-3-히드록시-5-페닐펜탄산, 4-아미노-3-히드록시-6-메틸-헵탄산, t-부틸글리신, 노르류신, 노르발린, 페닐글리신, 오르니틴, 사르코신, 2-티에닐 알라닌 및/또는 아미노산의 D-이성체의 사용을 들 수 있다.

<111> 본 발명은 또한 통상의 분자 생물학 기술을 이용하여 본 발명의 합성 폴리펩티드를 변형하여 단백질 분해에 대한 이의 저항성을 변형시키거나 또는 용해성을 최적화하거나 또는 면역원성 체제로서 이를 더 적절하게 하는 것에 관한 것이다.

<112> **합성 폴리뉴클레오티드의 제조**

<113> 본 발명의 실시양태에 따르면, 개시된 폴리뉴클레오티드는 서열 목록에 제공된 뉴클레오티드 서열을 가지거나 또는 서열 목록에 제공된 뉴클레오티드 서열과 하이브리드 형성하도록 이와 충분한 서열 동일성을 나타낼 수 있다. 대안적 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열 목록에 제공된 뉴클레오티드 서열과 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 공유할 수 있다.

<114> 본 발명은 상기 기술한 합성 폴리펩티드를 암호화하는 합성 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 모 EBV 폴리펩티드의 절편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 임의의 적절한 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드는 용이하게 이용가능한 기계류의 이용으로 신생 합성될 수 있다. DNA의 연속적 합성은, 예를 들어, 미국 특허 제 4,293,652호에 기술되어 있다. 신생 합성 대신, 모 EBV 폴리펩티드의 하나 이상의 절편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 절단하는 제한 엔도뉴클레아제의 사용 및 모 폴리펩티드의 상이한 절편을 암호화하는 복수 개의 절단된 폴리뉴클레오티드를 틀에 함께 결합시키는 리가아제의 사용을 포함하는 재조합 기술이 이용될 수 있다. 적절한 재조합 기술은 예를 들어 본원에서 참고로 인용하는 문헌 [Ausubel, 등 (상동)] 및 [Sambrook, 등 (상동)]의 적절한 단락에 기술되어 있다. 바람직하게는, 합성 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 문헌 [Horton 등 (1990, Biotechniques 8(5): 528-535; 1995, Mol Biotechnol. 3(2): 93-99; 및 1997, Methods Mol Biol. 67: 141-149)]에 의해 기술된 바와 같이 중첩 확장 (SOEing)에 의한 스플라이싱 (splicing)의 이용으로 구축된다. 그러나, 본 발명은 합성 구조체의 구축을 위하여 임의의 하나의 특정 기술에 의존하지 않으며, 이에 관한 것이 아님이 주목되어야 한다.

<115> 합성 폴리뉴클레오티드에 대한 각종 변형이 세포내 안정성 및 반감기를 증가시키는 수단으로서 도입될 수 있다. 가능한 변형의 비제한적인 예로서 분자의 5' 및/또는 3' 말단에 대한 리보- 또는 데옥시-뉴클레오티드의 인접 서열의 첨가 또는 올리고데옥시리보뉴클레오티드 주쇄 내부의 포스포디에스테라아제 결합보다는 포스포로티오에이트 또는 2' O-메틸의 이용을 들 수 있다.

<116> 본 발명은 따라서 모 폴리펩티드의 상이한 절편을 암호화하는 2 개 이상의 핵산 서열을 동일한 리딩 프레임 내에 함께 결합시켜, 본 발명에 따른 합성 폴리펩티드를 암호화하는 합성 폴리뉴클레오티드를 형성하는 것을 포함

하는, 상기 광범위하게 기술한 합성 폴리뉴클레오티드의 제조 방법에 관한 것이다. 적절하게는, 모 폴리펩티드의 10 개 이상의 절편, 바람직하게는 20 개 이상의 절편, 더 바람직하게는 40 개 이상의 절편 및 더 바람직하게는 100 개 이상의 절편을 암호화하는 핵산 서열이 이용되어 합성 폴리뉴클레오티드를 제조한다.

- <117> 바람직하게는, 본 방법은 모 EBV 폴리펩티드의 절편을 선택하고, 선택된 절편을 역 번역하며 선택된 절편을 암호화하는 핵산 서열을 제조하는 것을 더 포함한다. 본 방법은 핵산 서열을 함께 무작위로 결합시켜 합성 폴리뉴클레오티드를 형성하는 것을 더 포함하는 것이 바람직하다. 핵산 서열은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- <118> 적절하게는, 절편은 크기에 기초하여 선택된다. 추가로, 또는 대안으로, 절편은 하나 이상의 다른 절편과 부분적 서열 동일성 또는 상동성 (즉, 서열 중첩)을 갖도록 선택된다. 다수의 인자가 상기 언급한 절편 크기 및 서열 중첩에 영향을 미칠 수 있다. 서열 중첩의 경우, 다량의 이중 핵산 서열은 때때로 상기 서열의 핵산 증폭 (예를 들어, 중합효소 연쇄 반응, PCR), 박테리아 숙주 중 재조합 플라스미드의 전파 동안 또는 상기 서열을 포함하는 재조합 바이러스의 증폭 동안 소실되는 핵산의 구역을 야기할 수 있다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 다른 암호화된 절편과 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 절편을 암호화하는 핵산 서열은 동일하거나 상동성인 서열이 인접하는 배열로 함께 결합되지 않는다. 또한, 중복 부위 중 특정 아미노산을 암호화하기 위해 상이한 코돈이 사용되는 것이 바람직하다. 본 문맥에서, 모 폴리펩티드 서열의 아미노산은 바람직하게는 역 번역되어 코돈을 제공하고, 이는, 인접 또는 국소 서열 요소의 관계에서, 과제 (예를 들어, 클로닝 또는 서열 분석)의 수행에 저항하는 바람직하지 않은 서열 (예를 들어, 이중 서열 또는 회문식 서열)을 형성하는 경향이 더 낮다. 대안으로, 절편은 이들이 카르복실 말단의 류신 잔기를 포함하거나 또는 상기 절편을 암호화하는 역 번역된 서열이 역 번역된 서열의 편리한 스플라이싱을 위한 제한 효소 부위를 포함하도록 선택될 수 있다.
- <119> 본 방법은 임의로 절편을 암호화하는 핵산 사이에 하나 이상의 스페이서 잔기를 암호화하는 스페이서 올리고뉴클레오티드를 결합시키는 것을 더 포함한다. 상기 스페이서 잔기(들)는 절편 내부의 에피토프가 프로세싱되고 효과적으로 제공되는 것을 보장하는 데 유리할 수 있다. 바람직하게는, 스페이서 올리고뉴클레오티드는 2 내지 3 개의 스페이서 잔기를 암호화한다. 스페이서 잔기는 적절하기는 중성 아미노산이고, 이는 바람직하게는 알라닌이다.
- <120> 임의로, 본 방법은 다른 암호화된 절편에 대하여 상동성이나 동일하지 않은 아미노산 서열을 갖는 변이체 절편을 암호화하는 하나 이상의 변이체 핵산 서열을 다른 절편을 포함하는 핵산 서열과 동일한 리딩 프레임 내에 결합시키는 것을 더 포함한다. 적절하게는, 변이체 절편은 하나 이상의 다른 암호화된 절편에 대하여 보존된 및/또는 비-보존된 아미노산 차이를 포함한다. 상기 차이는 상기 기술한 다형에 해당할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 축퇴 염기가 하나 이상의 변이체 핵산 서열에 고안되거나 구축되어 모든 소정의 상동성 서열을 발생시킨다.
- <121> 바람직하게는, 본 방법은 합성 폴리펩티드의 코돈 조성을 최적화하여 이것이 숙주 세포에 의해 효과적으로 번역되게 하는 것을 더 포함한다. 이와 관련하여, 상이한 코돈의 번역 효율은 유기체 간에 다양하고 코돈 사용에서의 상기 차이가 이용되어 특정 유기체 중 단백질 발현의 수준을 강화시킬 수 있음이 잘 공지되어 있다. 이와 관련하여, 문헌 [Seed 등 (국제 출원 공보 제 WO 96/09378호)]이 참고될 수 있고, 이는 모 EBV 폴리펩티드 중 존재하는 코돈을 동의적 코돈으로 대체하여 포유동물 숙주 세포 중 바이러스 폴리펩티드의 발현을 강화시키는 것을 개시한다. 이는 또한 폴리뉴클레오티드 암호화 절편을 안정화시키는 효과를 가질 수 있다. 바람직하게는, 첫번째로 또는 두번째로 가장 빈번하게 사용된 코돈이 코돈 최적화에 이용된다.
- <122> 본 발명에 따른 합성 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 상기 기술한 합성 구조체의 형태로 조절 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합될 수 있다. 본 발명의 합성 구조체는 특히 핵산 백신으로서의 이용가능성을 갖는다. 조절 폴리뉴클레오티드 및 합성 구조체의 선택은 목적하는 숙주에 의존할 것이다.
- <123> 본 발명에 따른 합성 폴리펩티드의 발현을 위한 대표적 발현 벡터의 비제한적인 예로서 아데노바이러스 35 (Ad5F35)로부터의 섬유 단백질을 갖는 아데노바이러스 5에 기초한 복제 결핍 아데노바이러스 벡터를 들 수 있다. 또한, 예를 들어, 문헌 [Allen 등 (2000, J. Immunol. 164(9): 4968-4978)]에 의해 기술된 바와 같은 변형된 양카라 우두 바이러스, 문헌 [Boyle 및 Coupar (1988, Virus Res. 10: 343-356)]에 의해 기술된 바와 같은 계두 바이러스 및 예를 들어 미국 특허 제 6,051,428호에서 Fong 등에 의해 기술된 단순 포진 앰프리콘 (amplicon)도 이용될 수 있다. 대안으로, 바람직하게는 다량의 DNA 또는 RNA 서열 정보를 수용할 수 있는, 앰스타인-바르 바이러스 벡터도 사용될 수 있다.

- <124> 합성 폴리펩티드의 발현에 이용될 수 있는 바람직한 프로모터 서열로서, 예를 들어, 문헌 [Kumar 및 Boyle. (1990, Virology 179:151-158)]에 의해 개시된 바와 같은 P7.5 또는 PE/L 프로모터, CMV 및 RSV 프로모터를 들 수 있다.
- <125> 합성 구조체는 임의로 면역자극 분자를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함한다. 면역자극 분자는 합성 폴리펩티드의 융합 파트너일 수 있다. 대안으로, 면역자극 분자는 합성 폴리펩티드와 별개로 번역될 수 있다. 바람직하게는, 면역자극 분자는 일반적 면역자극 펩티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 면역자극 펩티드 서열은 예를 들어 문헌 [Brett 등 (1993, Eur. J. Immunol. 23: 1608-1614)]에 의해 개시된 바와 같은 박테리아 예르시니아 종으로부터의 인베이션 단백질 (Inv)의 도메인을 포함할 수 있다.
- <126> 대안적 실시양태에서, 면역자극 분자는 면역자극 막 또는 적절하게는 T 세포 공동 자극 분자인, 가용성 분자를 포함할 수 있다. 바람직하게는, T 세포 공동 자극 분자는 B7 분자 또는 이의 생물 활성 단편, 또는 이의 변이체 또는 유도체이다. B7 분자의 비제한적인 예로서 B7-1 및 B7-2를 들 수 있다. 바람직하게는, B7 분자는 B7-1이다. 대안으로, T 세포 공동 자극 분자는 ICAM 분자, 예컨대 ICAM-1 및 ICAM-2일 수 있다.
- <127> 또다른 실시양태에서, 면역자극 분자는 사이토카인일 수 있고, 이의 비제한적인 예로서, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자 및 인터페론을 들 수 있다. 대안으로, 면역자극 분자는 예를 들어 Krieg에 의해 미국 특허 제 6,008,200호에 개시된 면역조절 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- <128> 적절하게는, 합성 폴리뉴클레오티드의 크기는 숙주 세포가 에피토프를 전사하고, 번역하거나 또는 단백질 분해 프로세싱하고 면역계에 제공하는 능력을 넘어서지 않는다. 당업자는 또한 합성 폴리뉴클레오티드의 크기가 숙주 세포 중 합성 폴리뉴클레오티드를 발현하는 발현 벡터의 능력에 영향을 미칠 수 있음을 이해할 것이다. 이와 관련하여, DNA 백신 접종의 효능은 20 kb 초과인 발현 벡터에 의해 감소되는 것으로 공지되어 있다. 상기 상황에서, 단일한 큰 합성 구조체보다는 더 다수의 더 작은 합성 구조체가 이용되는 것이 바람직하다.
- <129> **조성물 및 면역증강제**
- <130> 본 발명은 또한 상기 기술한 바와 같은 합성 폴리펩티드, 합성 폴리뉴클레오티드 및 합성 구조체로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제를 약학적 허용 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- <131> 면역증강제는 중성 또는 염 형태로서의 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적 허용염은 산 첨가염 (펩티드의 유리 아미노기와 함께 형성됨)을 포함하고 이는 무기산, 예컨대, 예를 들어, 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 말레산 등과 함께 형성된다. 유리 카르복실기와 함께 형성된 염은 또한 무기 성분, 예컨대, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 철 히드록시드, 및 유기 성분, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도될 수 있다.
- <132> 일반적으로, 적절한 조성물은 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있고, 약학적 허용 희석제, 아주반트 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 희석제, 아주반트 및 부형제는 조성물의 기타 성분과 친화성이고, 이의 수혜자에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용가능"해야 한다.
- <133> 약학적 허용 희석제의 예는 탈염수 또는 증류수; 식염수; 식물성 오일, 예컨대 땅콩유, 홍화유, 올리브유, 면실유, 옥수수유, 참기름, 예컨대 땅콩유, 홍화유, 올리브유, 면실유, 옥수수유, 참기름, 낙화생유 또는 야자유; 실리콘유, 예컨대 폴리실록산, 예컨대 메틸 폴리실록산, 페닐 폴리실록산 및 메틸페닐 폴리실록산; 휘발성 실리콘; 광유, 예컨대 액체 파라핀, 연질 파라핀 또는 스퀴알렌; 셀룰로오스 유도체, 예컨대 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 또는 히드록시프로필메틸셀룰로오스; 저급 알칸올, 예를 들어, 에탄올 또는 이소프로판올; 저급 아랄칸올; 저급 폴리알킬렌 글리콜 또는 저급 알킬렌 글리콜, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜 또는 글리세린; 지방산 에스테르, 예컨대 이소프로필 팔미테이트, 이소프로필 미리스테이트 또는 에틸 올레이트; 폴리비닐피리돈; 아가; 카라기닌; 검 트래저캔스 또는 검 아카시아 및 바셀린이다. 전형적으로, 담체 또는 담체들은 조성물의 1 중량% 내지 99.9 중량%를 형성할 것이다. 가장 바람직하게는, 희석제는 염수이다.
- <134> 주사액 또는 현탁액으로서 투여하기 위해, 비독성 비경구 허용가능한 희석제 또는 담체는 링거액, 중쇄 트리글리세라이드 (MCT), 등장성 염수, 인산 완충 식염수, 에탄올 및 1,2 프로필렌 글리콜을 포함할 수 있다.
- <135> 경구 사용에 적절한 담체, 희석제, 부형제 및 아주반트의 일부 예로서 땅콩유, 액체 파라핀, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 알기네이트, 검 아카시아, 검 트래저캔스, 텍스트로오스, 슈크로오스,

소르비톨, 만니톨, 젤라틴 및 레시틴을 들 수 있다. 또한 상기 경구 제형물은 적절한 향미제 및 착색제를 함유할 수 있다. 캡슐 형태로 사용되는 경우, 캡슐은 봉해를 지연시키는 화합물, 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트로 코팅될 수 있다.

- <136> 아주반트는 전형적으로 연화제, 유화제, 증점제, 보존제, 살균제 및 완충제를 포함한다.
- <137> 경구 투여용 고체 형태는 인간 및 수의 약학적 관행에서 허용가능한 결합제, 감미제, 붕해제, 희석제, 향미제, 코팅제, 보존제, 윤활제 및/또는 시간 지연제를 함유할 수 있다. 적절한 결합제로서 검 아카시아, 젤라틴, 옥수수 전분, 검 트래거캔스, 나트륨 알기네이트, 카르복시메틸셀룰로오스 또는 폴리에틸렌 글리콜을 들 수 있다. 적절한 감미제로서 슈크로오스, 락토오스, 글루코오스, 아스파테임 또는 사카린을 들 수 있다. 적절한 붕해제로서 옥수수 전분, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 구아 검, 잔탄 검, 벤토나이트, 알긴산 또는 아가를 들 수 있다. 적절한 희석제로서 락토오스, 소르비톨, 만니톨, 텍스트로오스, 카올린, 셀룰로오스, 탄산칼슘, 규산칼슘 또는 인산2칼슘을 들 수 있다. 적절한 향미제로서 박하유, 노르발폴의 오일, 체리, 오렌지 또는 라스베리 향미제를 들 수 있다. 적절한 코팅제로서 아크릴산 및/또는 메타크릴산 및/또는 이의 에스테르의 중합체 또는 공중합체, 왁스, 지방 알콜, 제인, 셀락 또는 글루텐을 들 수 있다. 적절한 보존제로서 나트륨 벤조에이트, 비타민 E, 알파-토코페롤, 아스코르브산, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤 또는 나트륨 비실파이트를 들 수 있다. 적절한 윤활제로서 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 나트륨 올레이트, 나트륨 클로라이드 또는 탈크를 들 수 있다.
- <138> 경구 투여용 액체 형태는, 상기 작용제에 추가하여, 액체 담체를 함유할 수 있다. 적절한 액체 담체로서 물, 오일, 예컨대 올리브유, 땅콩유, 참기름, 해바라기유, 홍화유, 낙화생유, 야자유, 액체 파라핀, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 글리세롤, 지방 알콜, 트리글리세라이드 또는 이의 혼합물을 들 수 있다.
- <139> 경구 투여용 현탁액은 분산제 및/또는 현탁화제를 더 포함할 수 있다. 적절한 현탁화제로서 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸-셀룰로오스, 폴리-비닐-피롤리돈, 나트륨 알기네이트 또는 아세틸 알콜을 들 수 있다. 적절한 분산제로서 레시틴, 지방산의 폴리옥시에틸렌 에스테르, 예컨대 스테아르산, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노- 또는 디-올레이트, -스테아레이트 또는 -라우레이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노- 또는 디-올레이트, -스테아레이트 또는 -라우레이트 등을 들 수 있다.
- <140> 경구 투여용 에멀전은 1종 이상의 유화제를 더 포함할 수 있다. 적절한 유화제로서 상기 예시한 분산제 또는 천연 검, 예컨대 아가 검, 검 아카시아 또는 검 트래거캔스를 들 수 있다.
- <141> 경구 투여 조성물의 제조 방법은 당업자에게 명백하며, 예를 들어, 본원에서 참고로 인용하는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.]에 더 상세히 기술되어 있다.
- <142> 조성물은 임의의 적절한 계면활성제, 예컨대 음이온성, 양이온성 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 소르비탄 에스테르 또는 이의 폴리옥시에틸렌 유도체를 도입할 수 있다. 현탁화제, 예컨대 나트륨 검, 셀룰로오스 유도체 또는 무기 물질, 예컨대 실리카성 (siliceous) 실리카, 및 기타 성분, 예컨대 라놀린도 포함될 수 있다.
- <143> 1종 이상의 면역증강제는 면역증강 조성물의 제조시 활성제로서 사용될 수 있다. 상기 제조는 당업자에게 공지된 일상적 방법을 이용한다. 전형적으로, 상기 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서의 주사 가능 물질로서 제조되며; 주사 이전에 액체에 용해, 또는 현탁시키기에 적절한 고체 형태도 제조될 수 있다. 제제는 또한 유화될 수 있다. 활성 면역원 성분은 종종 약학적으로 허용가능하고 활성 성분과 친화성인 부형제와 혼합된다.
- <144> **투여 경로**
- <145> 본 발명의 방법에 따르면, 화합물 및 조성물은 임의의 적절한 경로에 의해, 전신, 부위 또는 국소 투여될 수 있다. 임의의 주어진 상황에서 이용되는 특정 투여 경로는 다수의 인자, 예컨대 치료될 질환의 상태, 질환의 심각성 및 정도, 전달될 특정 화합물의 요구되는 투여량 및 화합물의 잠재적 부작용에 의존할 것이다.
- <146> 예를 들어, 적절한 농도의 소정의 화합물이 치료될 신체의 부위에 직접 전달되는 것이 요구되는 상황에 있어서, 투여는 전신보다는 부위적일 수 있다. 부위 투여는 소정의 화합물의 매우 높은 국소 농도를 요구되는 부위에 전달하는 능력을 제공하여 이에 따라 소정의 치료 또는 예방 효과를 달성하면서 신체의 기타 장기를 화합물에 노출시키는 것을 피하여 이에 따라 부작용을 잠재적으로 감소시키기에 적절하다.

- <147> 예로서, 본 발명의 실시양태에 따른 투여는 임의의 표준 경로, 예컨대 강내, 방광내, 근육내, 동맥내, 정맥내, 피하, 국소 또는 경구에 의해 달성될 수 있다. 강내 투여는 복막내 또는 흉막내일 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여는 정맥내 주입 또는 복막내 투여에 의한 것일 수 있다. 가장 바람직하게는, 투여는 정맥내 주입을 통한 것일 수 있다.
- <148> 필요에 따라, 지속적 또는 간헐적 방출에 적절한 면역증강제를 함유하는 장치 또는 조성물은, 사실상, 신체에 대한 상기 물질의 상대적으로 느린 방출을 위하여 신체에 이식되거나 또는 이에 국소적으로 도포될 수 있다.
- <149> 유전자 치료 구조체의 포유동물, 바람직하게는 인간에 대한 투여는 직접적 경구 섭취를 통한 전달, 전신 주사, 또는 선택된 조직(들) 또는 세포에 대한 전달, 또는 포유동물 또는 합당한 기증자로부터 단리된 세포에 대한 전달을 통한 간접적인 것을 포함할 수 있다. 후자의 접근법의 예는 줄기 세포 치료이고, 여기서 성장 및 분화에 대한 잠재성을 갖는 단리된 줄기 세포는 Sox 18 핵산을 포함하는 벡터로 트랜스펙션된다. 줄기 세포는 일정 기간 동안 배양된 후 치료될 포유동물에게 전달된다.
- <150> 핵산 기재 조성물에 있어서, 상기 조성물의 모든 전달 방식이 본 발명에 의해 고려된다. 상기 조성물의 동물의 세포 또는 조직으로의 전달은, 예를 들어, 미세분사 (microprojectile) 충격, 리포솜 매개의 트랜스펙션 (예를 들어, 리포펙틴 또는 리포펙타민), 전기천공, 인산칼슘 또는 DEAE-덱스트란-매개의 트랜스펙션에 의해 촉진될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 합성 구조체는 당 분야에 공지된 바와 같이 "네이키드 (naked) DNA"의 형태로 치료 또는 예방 조성물로서 사용될 수 있다. 적절한 전달 방법에 대한 기술은 문헌 [CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Eds. Ausubel 등; John Wiley & Sons Inc., 1997 Edition)]의 제 9 장에서 또는 인터넷 사이트 DNA vaccine.com에서 찾을 수 있다. 조성물은 진피내 (예를 들어, 판젯™ (panjet™) 전달을 이용하여) 또는 근육내 경로에 의해 투여될 수 있다.
- <151> 합성 폴리뉴클레오티드를 표적 세포에 도입하는 단계는 목적하는 용도 및 종에 따라 상이할 것이고, 예를 들어, 본원에서 참고로 인용하는 문헌 [Mulligan, R.C., (1993 Science 260 926-932)]에 기술된 바와 같이, 비-바이러스 및 바이러스 벡터, 양이온성 리포솜, 레트로바이러스, 및 아데노바이러스 중 하나 이상을 수반할 수 있다. 상기 방법은 예를 들어 하기를 포함할 수 있다:
- <152> A. 주사 (문헌 [Wolff 등, 1990, Science 247 1465-1468], 본원에서 참고로 인용함), 수술 이식, 설치 또는 임의의 기타 수단에 의한 합성 폴리뉴클레오티드의 국소 적용. 상기 방법은 또한 합성 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 단백질에 반응성인 세포의, 주사, 수술 이식, 설치 또는 임의의 기타 수단에 의한 국소 적용과 함께 이용되어 치료의 효과를 증가시킬 수 있다. 상기 방법은 또한 상기 단백질의 활성화에 요구되는 또다른 인자 또는 인자들의 주사, 수술 이식, 설치 또는 임의의 기타 수단에 의한 국소 적용과 함께 이용될 수 있다.
- <153> B. DNA (문헌 [Calabretta 등, 1993, Cancer Treat. Rev. 19 169-179], 본원에서 참고로 인용함), 또는 RNA를 단독으로 또는 리포솜 (문헌 [Zhu 등, 1993, Science 261 209-212], 본원에서 참고로 인용함), 바이러스 캡시드 또는 나노입자 (문헌 [Bertling 등, 1991, Biotech. Appl. Biochem. 13 390-405], 본원에서 참고로 인용함) 또는 임의의 기타 전달 매개 물질과 함께 주사함에 의한 일반적 전신 전달. 개선된 표적화는 합성 폴리뉴클레오티드를 표적화 분자에 결합시킴에 의해 (예를 들어, 항체를 이용하는 소위 "마법의 탄환" 접근법), 또는 상기 합성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 단백질, 또는 상기 단백질에 반응성인 세포의 활성화에 요구되는 또다른 인자 또는 인자들의 주사, 수술 이식 또는 임의의 기타 수단에 의한 국소 적용에 의해 달성될 수 있다.
- <154> C. 트랜스펙션 (예를 들어, 인산칼슘의 존재 하에: 문헌 [Chen 등, 1987, Mole. Cell Biochem. 7 2745-2752], 또는 양이온성 지질 및 폴리아민의: 문헌 [Rose 등, 1991, BioTech. 10 520-525], 상기 문헌은 본원에서 참고로 인용함), 감염, 주사, 전기천공 (문헌 [Shigekawa 등, 1988, BioTech. 6 742-751], 본원에서 참고로 인용함) 또는 임의의 기타 방식에 의해 생체의 변형되어 이들 세포 중 상기 합성 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시킨 세포의, 주사 또는 이식 또는 임의의 수단에 의한 전달. 변형은 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드, 바이러스 (예컨대, 아데노바이러스 또는 레트로바이러스; 문헌 [Mulligan, 1993, Science 260 926-932]; [Miller, 1992, Nature 357 455-460]; [Salmons 등, 1993, Hum. Gen. Ther. 4 129-141], 상기 문헌은 본원에서 참고로 인용함) 또는 기타 벡터, 또는 기타 변형 제제, 예컨대 리포솜 (문헌 [Zhu 등, 1993, Science 261 209-212], 본원에서 참고로 인용함), 바이러스 캡시드 또는 나노입자 (문헌 [Bertling 등, 1991, Biotech. Appl. Biochem. 13 390-405], 본원에서 참고로 인용함), 또는 임의의 기타 변형 매개 물질에 의해 매개될 수 있다. 유전자 또는 유전자 산물에 대한 전달 매개체로서의 세포의 이용은 문헌 [Barr 등, 1991, Science 254 1507-1512] 및 [Dhawan 등, 1991, Science 254 1509-1512]에 의해 기술되어 있고 상기 문헌은 본원에서 참고로 인용한다. 처리된 세포는 치료된 대상체에서의 이의 생존을 촉진할 임의의 영양분, 성장 인자, 기질 또는 기타

작용제와 함께 전달될 수 있다.

<155> 조성물은 또한 리포솜의 형태로 투여될 수 있다. 리포솜은 일반적으로 인지질 또는 기타 지질 물질 유래이고 수성 매질에 분산된 단층 또는 다층 수화 액정에 의해 형성된다. 리포솜을 형성할 수 있는 임의의 비-독성, 생리학적으로 허용가능하고 대사가 가능한 지질이 사용될 수 있다. 리포솜 형태의 조성물은 안정제, 보존제, 부형제 등을 함유할 수 있다. 바람직한 지질은 천연 및 합성 모두의, 인지질 및 포스파티딜 콜린 (레시틴)이다. 리포솜의 형성 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 이와 관련하여 그 내용을 본원에서 참고로 인용하는 특정 문헌 [Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N. Y. (1976), p. 33 이하 참조]이 참고된다.

<156> **투여량**

<157> 임의의 특정 대상체에 대해 투여되는 화합물의 유효 투여 수준은 하기를 포함하는 각종 인자에 의존할 것이다: 치료될 질환의 유형 및 질환의 단계; 이용되는 화합물의 활성; 이용되는 조성물; 나이, 체중, 일반적 건강, 성별 및 환자의 식이; 투여 시간; 투여 경로; 화합물의 제거 속도; 치료의 지속 기간; 의학에서 잘 공지된 기타 관련 인자와 함께, 치료와 함께 또는 동시에 사용되는 약물.

<158> 당업자는, 일상적 실험에 의해, 적용되는 상태를 치료하기 위해 요구되는 효과적, 비-독성 투여량을 결정할 수 있다. 이는 대개는 사항별로 기초하여 결정될 것이다.

<159> 중량을 기준으로, 환자에게 투여하기 위한 조성물의 치료 유효 투여량은 24 시간 당 체중 kg당 약 0.01 mg 내지 약 150 mg; 전형적으로는 24 시간당 체중 kg당 약 0.1 mg 내지 약 150 mg; 24 시간당 체중 kg당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg; 24 시간당 체중 kg당 약 0.5 mg 내지 약 100 mg; 또는 24 시간당 체중 kg당 약 1.0 mg 내지 약 100 mg의 범위일 것으로 예상된다. 더 전형적으로는, 유효 투여량의 범위는 24 시간당 체중 kg당 약 5 mg 내지 약 50 mg의 범위일 것으로 예상된다.

<160> 대안으로, 유효 투여량은 약 5000 mg/m² 이하일 수 있다. 일반적으로, 유효 투여량은 약 10 내지 약 5000 mg/m², 전형적으로는 약 10 내지 약 2500 mg/m², 약 25 내지 약 2000 mg/m², 약 50 내지 약 1500 mg/m², 약 50 내지 약 1000 mg/m², 또는 약 75 내지 약 600 mg/m²의 범위일 것으로 예상된다.

<161> 또한, 최적의 양 및 개별 투여의 간격은 치료될 상태의 특성 및 정도, 투여의 형태, 경로 및 부위, 및 치료될 특정 개체의 특성에 의해 결정될 것임이 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 상기 최적의 상태는 통상의 기술에 의해 결정될 수 있다.

<162> 또한 치료의 최적의 과정, 예컨대 단위 시간당 제공되는 조성물의 투여 횟수는 치료 결정 시험의 통상의 과정의 이용으로 당업자에 의해 확인될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.

<163> **치료 방법**

<164> 상기 기술한 바와 같은 백신, 합성 폴리펩티드, 합성 폴리뉴클레오티드, 합성 구조체, 또는 조성물로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제의 유효량을, 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, EBV 관련 질환에 대한 면역 반응의 조절 방법이 또한 본 발명에 포함된다.

<165> 더욱이, 본 발명은 또한, 상기 기술한 바와 같은 백신, 합성 폴리펩티드, 합성 폴리뉴클레오티드, 합성 구조체, 또는 조성물로 이루어진 군 중에서 선택되는 면역증강제의 유효량을, 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, EBV 관련 질환의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다.

<166> 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 면역증강 조성물은 암의 치료, 또는 이에 대한 예방에 적절하다. 본 발명의 수행에 따라 적절하게 치료될 수 있는 암으로서 비인두 암종, 호지킨 림프종 및 이식후 림프증식성 질환을 들 수 있다.

<167> 추가의 또는 대안적 실시양태에서, 면역증강 조성물은 바이러스 감염의 치료, 또는 이에 대한 예방에 적절하다. 본 발명에 의해 고려되는 바이러스 감염은 엡스타인-바르 바이러스에 의해 야기된 감염을 포함한다.

<168> **면역화 효능의 평가**

<169> 면역화의 효능은 임의의 적절한 기술의 이용으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 코팅된 펩티드 상의 자극된 비장 세포 또는 말초혈 단핵구 (PBMC) 또는 .sup.51Cr 표지된 표적 세포를 이용하는 재조합 바이러스 감염 세포를 이용하는 CTL 용해 어세이가 이용될 수 있다. 상기 어세이는 예를 들어, 영장류, 마우스 또는 인간 세포의 이용

으로 수행될 수 있다 (문헌 [Allen 등, 2000, J. Immunol. 164(9): 4968-4978] 또한 [Woodberry 등, 하기]).
 대안으로, 면역화의 효능은, 한 가지 이상의 기술, 비제한적인 예로서, 새로운 및 자극된 PBMC 모두의 HLA 클래스 I 4량체 염색 (예를 들어, 문헌 [Allen 등, 상동] 참고), 증식 어세이 (문헌 [Allen 등, 상동]), 엘리스팟™ (Elispot™) 어세이 및 세포내 INF-감마 염색 (문헌 [Allen 등, 상동]), 선형 B 세포에 대한 ELISA 어세이; 및 합성 폴리뉴클레오티드를 발현하는 세포 샘플의 웨스턴 블롯의 이용으로 모니터링될 수 있다.

<170> 합성 폴리펩티드의 디자인 및 제조

<171> 본 발명에 따른 합성 폴리펩티드 서열 또는 합성 폴리뉴클레오티드 서열의 디자인 또는 구축은 적절하게는, 특히 모 EBV 서열을 단편으로 단편화하고, 상기 단편을 모 EBV 서열 중 절편들의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합시키는 소프트웨어로 프로그래밍된 컴퓨터의 보조로 촉진된다. 본 발명에 따른 소정의 합성 분자의 구축을 위한 모 EBV 서열의 준비된 사용은 이것이 컴퓨터 판독가능한 포맷으로 저장될 것을 요구한다. 따라서, 본 발명에 따르면, 모 분자 (예를 들어, 모 폴리펩티드)와 관련된 서열 데이터는, 상기 데이터를 처리하여 모 분자의 서열을 단편으로 단편화하고 상기 단편을 모 분자 중 이의 결합에 대하여 상이한 관계로 함께 결합시킬 수 있는, 기계 판독가능한 저장 매체 중 저장된다.

<172> 따라서, 본원의 개시내용은 또한, 상기 데이터의 사용을 위한 지시에 의해 프로그래밍된 기계에 의해 사용시, 모 서열을 단편으로 단편화하고, 상기 단편을 모 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 결합시키는, 기계 판독가능한 데이터로 암호화된 데이터 저장 물질을 포함하는, 기계 판독가능한 데이터 저장 매체에 관한 것이다. 상기 유형의 바람직한 실시양태에서, 각 단편의 서열을 역 번역하여 단편을 암호화하는 핵산 서열을 제공하고 각 핵산 서열을 동일한 리딩 프레임 내에 함께 결합시켜 폴리펩티드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공할 수 있는 기계 판독가능한 데이터 저장 매체가 제공되며, 여기서 상기 단편은 모 폴리펩티드 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된다.

<173> 또다른 실시양태에서, 본 개시내용은 본 발명의 합성 폴리펩티드 및/또는 합성 폴리뉴클레오티드의 서열을 디자인하기 위한 컴퓨터를 포함하며, 여기서 상기 컴퓨터는 (a) 모 폴리펩티드의 서열을 포함하는 기계 판독가능한 데이터로 암호화된 데이터 저장 물질을 포함하는 기계 판독가능한 데이터 저장 매체; (b) 상기 기계 판독가능한 데이터의 처리를 위한 지시를 저장하기 위한 작업 메모리; (c) 상기 기계 판독가능한 데이터를 상기 합성 폴리펩티드 서열 및/또는 상기 합성 폴리뉴클레오티드로 처리하기 위한, 상기 작업 메모리 및 상기 기계 판독가능한 데이터 저장 매체에 연결된 중앙 처리 장치; 및 (d) 상기 합성 폴리펩티드 서열 및/또는 상기 합성 폴리뉴클레오티드를 수용하는, 상기 중앙 처리 장치에 연결된 출력 하드웨어.

<174> 더욱 또다른 실시양태에서, 본 개시내용은, 모 폴리펩티드의 서열을 입력으로서 수용하는 코드, 모 폴리펩티드의 서열을 단편으로 단편화하는 코드, 각 단편의 서열을 역 번역하여 단편을 암호화하는 핵산 서열 제공하는 코드, 각각의 상기 핵산 서열을 동일한 리딩 프레임 내에 함께 결합시켜 폴리펩티드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하는 코드로서, 상기 단편은 모 폴리펩티드 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합되는 코드 및 상기 코드를 저장하는 컴퓨터 판독가능한 매체를 포함하는, 본 발명의 합성 폴리뉴클레오티드의 서열을 디자인하기 위한 컴퓨터 프로그램 제품에 관한 것이다.

<175> 따라서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 합성 폴리펩티드의 서열을 디자인하기 위한 컴퓨터 프로그램 제품에 관한 것이다:

<176> (a) 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 입력으로서 수용하는 코드;

<177> (b) 각 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 단편으로 단편화하는 코드;

<178> (c) 상기 단편을 상기 모 EBV 폴리펩티드 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합시키는 코드; 및

<179> (d) 상기 코드를 저장하는 컴퓨터 판독가능한 매체.

<180> 본원의 개시내용은 또한 하기를 포함하는, 합성 폴리뉴클레오티드의 서열을 디자인하기 위한 컴퓨터 프로그램 제품에 관한 것이다:

<181> (a) 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 입력으로서 수용하는 코드;

<182> (b) 각 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 단편으로 단편화하는 코드;

<183> (c) 각 단편의 서열을 역 번역하여 상기 단편을 암호화하는 핵산 서열을 제공하는 코드;

- <184> (d) 각각의 상기 핵산 서열을 동일한 리딩 프레임 내에 함께 결합시켜 폴리펩티드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하는 코드로서, 여기서 상기 단편은 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합된 코드; 및
- <185> (e) 상기 코드를 저장하는 컴퓨터 판독가능한 매체.
- <186> 본원의 개시내용은 또한 합성 폴리펩티드의 서열을 디자인하기 위한 컴퓨터에 관한 것이고, 여기서 상기 컴퓨터는 하기를 포함한다:
- <187> (a) 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 포함하는 기계 판독가능한 데이터로 암호화된 데이터 저장 물질을 포함하는 기계 판독가능한 데이터 저장 매체;
- <188> (b) 상기 기계 판독가능한 데이터의 처리를 위한 지시를 저장하기 위한 작업 메모리;
- <189> (c) 상기 기계 판독가능한 데이터를 처리하여 상기 합성 폴리펩티드 서열을 제공하기 위한, 상기 작업 메모리 및 상기 기계 판독가능한 데이터 저장 매체에 연결된 중앙 처리 장치; 및
- <190> (d) 상기 합성 폴리펩티드 서열을 수용하는, 상기 중앙 처리 장치에 연결된 출력 하드웨어.
- <191> 상기 기계 판독가능한 데이터의 처리는 각각의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 단편으로 단편화하고 상기 단편을 상기 모 EBV 폴리펩티드의 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합시키는 것을 포함할 수 있다.
- <192> 본 개시내용은 추가로 합성 폴리뉴클레오티드의 서열을 디자인하기 위한 컴퓨터에 관한 것이고, 여기서 상기 컴퓨터는 하기를 포함한다:
- <193> (a) 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 포함하는 기계 판독가능한 데이터로 암호화된 데이터 저장 물질을 포함하는 기계 판독가능한 데이터 저장 매체;
- <194> (b) 상기 기계 판독가능한 데이터를 처리하기 위한 지시를 저장하기 위한 작업 메모리;
- <195> (c) 상기 기계 판독가능한 데이터를 처리하여 상기 합성 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하기 위한, 상기 작업 메모리 및 상기 기계 판독가능한 데이터 저장 매체에 연결된 중앙 처리 장치; 및
- <196> (d) 상기 합성 폴리뉴클레오티드 서열을 수용하는, 상기 중앙 처리 장치에 연결된 출력 하드웨어.
- <197> 상기 기계 판독가능한 데이터의 처리는 각각의 모 EBV 폴리펩티드의 서열을 단편으로 단편화하고, 각 단편의 서열을 역 번역하여 상기 단편을 암호화하는 핵산 서열을 제공하고 각각의 상기 핵산 서열을 동일한 리딩 프레임 내에 함께 결합시켜 폴리펩티드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하며, 여기서 상기 단편은 하나 이상의 모 EBV 폴리펩티드 서열 중 이의 결합과 비교해 상이한 관계로 함께 결합되는 것을 포함할 수 있다.
- <198> 본 발명은 하기 구체적 실시예를 참고로 하여 이제 더 상세히 기술될 것이며, 이는 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

실시예

<199> **실시예 1: 일반적 방법**

<200> **1.1 NPC SAVINE의 구축**

<201> 길이가 20 내지 100 bp로 다양한 서열 특이적 중첩 올리고뉴클레오티드를 이용하여 EBNA1, LMP1 및 LMP2 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 구축하였다 (도 1). 단계적 비대칭 PCR에 의해 서열을 함께 결합시켜 서브카세트 생성하였다. 제한 소화 및 PCR을 이용하여 상기 서브카세트를 함께 결합시켜 6.8 kb의 최종 NPC SAVINE 구조체를 생성하였다. 상기 구조체를 그 후 복제 결핍 아테노바이러스 벡터 Ad5F35로 클로닝하였다. SAVINE 구조체를 발현하는 재조합 아테노바이러스 (AdSAVINE)를 HEK293 세포로 트랜스펙션함으로써 획득하였다. 상기 SAVINE 구조체를 또한 우두 및 계두 바이러스 전달 벡터로 삽입하였다 (문헌 [Thomson S.A., Jaramillo A.B., Shoobridge M., Dunstan K.J., Everett B., Ranasinghe C., Kent S.J., Gao K., Medveckzy C.J., French R.A., Ramshaw I.A., Development Of A Synthetic Consensus Sequence Scrambled Antigen HTV-1 Vaccine Designed for Global Use (2005) Vaccine, 23(38) 4647-57]을 참고하라).

<202> **1.2 세포주의 확립 및 유지**

<203> EBV 형질전환된 림프아구양 세포주 (LCL)를 B95.8 바이러스 단리물을 이용하여 말초 B 세포의 외인성 바이러스 형질전환에 의해 혈청 반응 양성의 기증자로부터 확립하였다. 상기 세포주를 2 mM의 L-글루타민, 100 IU/ml의 페니실린 및 100 µg/ml의 스트렙토마이신 플러스 10%의 소 태아 혈청 (FCS)이 보충된 RPMI 1640 (캘리포니아주, 칼스바드 소재의 지브코 인비트로젠 코포레이션 (Gibco Invitrogen Corp.)) (성장 배지로서 일컬어짐) 중 일상적으로 유지하였다. 또한, HEK 293 세포주를 10%의 FCS를 함유하는 DMEM 중 유지하였다.

<204> **1.3 펩티드의 합성**

<205> 메리필드 (Merrifield) 고체상 방법에 의해 합성된 펩티드를 키론 미모톱스 (Chiron Mimotopes) (호주, 멜버른)로부터 구입하고, 디메틸 설펝시드에 용해시키며, 표준 CTL 어세이에 사용하기 위해 무혈청 RPMI 1640 배지에 희석시켰다. 상기 펩티드의 순도를 질량 분석법에 의해 시험하였고 >90%의 순도를 나타내었다.

<206> **1.4 인간 건강한 EBV 기증자로부터 LMP 특이적 CTL의 팽창**

<207> EBV 혈청 반응 양성의 HLA A2 건강한 개체로부터의 말초혈 세포를 LMP 폴리에피토프 제형물로 활성화하였다. 간략히, 2 x 10⁶ 개의 PBMC를, 50:1의 반응 인자 및 자극 인자의 비로 LMP 폴리에피토프 (MOI: 50:1)를 발현하는 재조합 아데노바이러스로 감염된 자가 조직 PBMC와 함께 24 웰 플레이트 중 공동 배양하였다. 3 일 이후, 성장 배지에 rhIL-2 (20 U/ml)를 보충하였다. 상기 배양물을, LMP 폴리에피토프를 발현하는 재조합 아데노바이러스로 감염된 자가 조직 LCL에 의해 매주 간격으로 재자극하고 rhIL-2를 보충하였다. LCL 자극을 위하여, 2 x 10⁶ 개의 PBMC를 자가 조직 LCL (조사됨, 8000 rad)과 함께 30:1의 반응 인자 대 자극 인자의 비로 공동 배양하고 LMP 특이적 T-세포 반응성을 ELISPOT 어세이 및 시험관내 세포독성 어세이에 의해 평가하였다.

<208> **1.5 시험관내 세포독성 어세이 및 ELISPOT 어세이**

<209> 3 회의 시험관내 자극 이후 6 일째, ELISPOT 및 ⁵¹Cr-방출 어세이를 이용하여 CTL 활성을 측정하였다. ELISPOT 어세이의 경우, 팽창된 CTL을, 항-마우스 IFN-γ mAb (스웨덴, 낙카 소재의 마브테크 AB (Mabtech AB))로 예비 코팅된 96 웰 혼합 셀룰로오스 에스테르 막 플레이트 (미국, 베드포드 소재의 밀리포어 (Millipore)) 중 적절한 펩티드 (10⁻⁵ M)와 함께 37°C에서 약 18 시간 동안 3 배 항온배양하였다. (항-인간 IFN-γ mAb 및 비오티닐화 항-인간 IFN-γ-mAb를 이용하여 팽창된 인간 CTL을 측정하였음). 항온배양 이후, 플레이트를 0.5%의 Tween 20을 함유하는 PBS로 광범위하게 세정하고 2차 비오티닐화 항-마우스 IFN-γ-mAb와 함께 항온배양하며, 이어서 스트렙타비딘-알칼리 포스파타아제를 첨가하였다. 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트 및 니트로 블루 테트라졸륨과의 반응 이후 자룻빛 스폿으로서 개별 IFN-γ 생성 세포를 검출하였다. 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 스폿을 자동적으로 계수하였다. 각 펩티드에 대한 CTL 전구체 빈도를 10⁶ 개의 배양된 세포당 스폿 형성 세포 (SFC)로서 계산하였다. IFN-γ 분비 T 세포의 수를 음성 대조군 (비관련 펩티드를 갖는 CTL 배양물)을 감함에 의해 계산하였다.

<210> 시험관내 세포독성 어세이에 대하여, 적절한 펩티드로 펄스된 (pulsed) HLA-A2 제한 인간 PHA 모세포를 표적 세포로서 사용하였다. 특이적 용해의 백분율을 하기와 같이 계산하였다:

<211>
$$100 \times \frac{(\text{실험 방출} - \text{자발적 방출})}{(\text{최대 방출} - \text{자발적 방출})}$$

<213> **1.6 마우스**

<214> Balb/c 누드 마우스 및 HLA A2/Kb 마우스 (캘리포니아주, 스크립스 조사 기관 (Scripps Research Institute)의, L. 웨르만 박사로부터의 친절한 선사품)를 호주, 웨스턴 오스트레일리아 소재의 동물 자원 센터 (ARC)로부터 구입하였다. HLA A2/K^b 트랜스제닉 마우스는 키메라 인간 (α 1 및 α 2 HLA A2 도메인) 및 뮤린 (α 3, 막관통 및 세포질 H-2/K^b 도메인) 클래스 I 분자를 발현한다. 6 ~ 8 주령의 암컷 HLA A2/K^b 및 누드 마우스를 모든 실험에 사용하였다. 모든 실험을 윤리 위원회에 의해 승인된 프로토콜 하에 수행하였다.

<215> **1.7 종양 모델**

<216> 면역결핍 누드 마우스에게 2 mm³의 인간 NPC 동종이식편 (C17로 불림, 파리, 귀스타브 후세이의 피에르 부송 박사에게 의해 친절히 제공됨)을 목의 등 쪽에 피하 이식하였다. C17은 NPC 환자의 전이 조직으로부터 최초로 유래

하였다 (HLA 유형의 종양 A2, B41, B45).

<217> **1.8 SAVINE에 의한 HLA A2/K^b 트랜스제닉 마우스의 면역화**

<218> HLA-A2/Kb 트랜스제닉 마우스 (n = 5)를 Ad SAVINE (10⁹ PFU)에 의해 피하 (s.c.) 면역화하였다. 2 주 이후, 상기 마우스에게 우두-SAVINE (10⁷ PFU) 또는 계두 SAVINE (2 x 10⁷ PFU)를 다시 주사하였다.

<219> **1.9 면역화된 HLA-A2/Kb 마우스의 비장으로부터 SAVINE 특이적 CTL의 시험관내 팽창**

<220> 면역화의 3 주 이후, 비장의 단세포 현탁액을, 조직을 나일론 막을 통해 가압하고, 이어서 ACK 용해 완충제를 이용하여 RBC를 용해시킴으로써 제조하였다. 세포를, 20 U/ml의 인간 IL-2와 함께 10%의 FBS, 100 μ/ml의 페니실린, 100 μg/ml의 스트렙토마이신, 2 mM의 L-글루타민 및 50 μM의 β-머캅토에탄올을 함유하는 RPMI 배지 (RPMI 1640 완전 배지) 내의 24 웰 플레이트 중 4 x 10⁶/웰로 평균 배양하였다. 비장 세포를, 4:1의 반응 인자 대 자극 인자의 비로 적절한 펩티드 (10⁻⁵ M로 37°C에서 1 시간 동안)로 감각된 자가 조직 조사된 (2000 rad) 비장 세포를 이용하여 자극하였다. 상기 배양물을 적절한 펩티드로 코팅된 동종이형 비장 세포를 이용하여 매주 간격으로 재자극하였다.

<221> **1.10 입양 전달**

<222> 면역결핍 누드 마우스에게 인간 NPC 동종이식편을 접종하고 종양 크기가 대략 0.2 cm³의 크기일 때 (종양 접종 이후 14 일), 종양을 갖는 누드 마우스의 각 군 (n = 6 마리의 마우스/군)에게 5 x 10⁶ 개의 Ad (프라이밍됨)-VV (부스팅됨) SAVINE-특이적 T 세포 또는 5 x 10⁶ 개의 Ad-FPV SAVINE-특이적 T 세포를 입양 전달하였다. 또 다른 누드 마우스 군에게 5 x 10⁶ 개의 Ad-FPV SAVINE-CTL을 주사하고 각 입양 전달 이후 1, 2 및 3일 제 인간 IL-5 (5 μg)의 복막내 (i.p.) 주사액으로 처리하였다. 포함된 대조군은 5 x 10⁶ 개의 LMP 폴리에피토프-특이적 CTL, 사이토메갈로바이러스 폴리에피토프 (CMV)-특이적 CTL, CD8 결실된 Ad-FPV SAVINE-CTL이 주사되거나 미처리된 마우스였다. SAVINE-특이적 T 세포의 치료 효능을 종양 퇴행의 정기적 모니터링에 의해 평가하고 크기가 >1.0 cm³인 종양 크기를 나타내는 마우스를 희생시켰다.

<223> **실시예 2: SAVINE 단백질을 암호화하는 DNA 서열**

<224> SAVINE 단백질을 암호화하는 혼화된 DNA 서열은 서열 1로서 개시되어 있다. 서열 1에 의해 암호화된 단백질은 EBNA1, LMP2 및 LMP1로부터의 무작위 중첩 아미노산 서열로 이루어진다. 암호화된 펩티드 서열은 15 개 아미노산이 중첩되는 상기 단백질로부터 유도된 30 개 아미노산이다. 상기 SAVINE 단백질은 Ad5/F35, 우두 바이러스 및 계두 바이러스 벡터에 삽입되었다.

<225> **실시예 3: 효과적으로 프로세싱되어 EBNA1, LMP1 및 LMP2 T 세포에 제시된 SAVINE 단백질 내부의 정의된 에피토프**

<226> SAVINE 단백질을 발현하는 우두, 계두 또는 아데노바이러스로 감염된 HLA-적합 섬유아세포는 EBNA1, LMP1 및 LMP2 펩티드 특이적 CTL에 대한 세포용해 활성을 나타낸 반면, 우두 TK-, 빈 아데노바이러스로 감염된 섬유아세포 또는 미감염된 섬유아세포는 용해되지 않았다 (도 2).

<227> 도 2는 EBNA1 (HPV, HLA-B35 제한됨), LMP1 (YLL 및 YLQ, HLA A2-제한됨; IAL, HLA B35-제한됨) 및 LMP2 (CLG, LTA 및 LLS, HLA A2-제한됨; PYL, HLA-A23-제한됨; IED, HLA-B40-제한됨) 항원 내부의 정의된 에피토프 특이적 CTL 다클론 주 또는 CTL 클론이 4 명의 EBV 혈청 반응 양성의 건강한 기증자로부터 생성되었음을 증명한다. 정의된 에피토프를 갖는 PHA 모세포에 대한 상기 CTL의 특이성을 세포용해 어세이로 시험하였다. 이어서, EBNA1, LMP1 및 LMP2 항원 내부에 정의된 에피토프가 내인적으로 프로세싱되는지의 여부를 알아내기 위하여, HLA-적합 섬유아세포를 먼저 우두, 계두 또는 아데노바이러스 벡터 발현 SAVINE 구조체 (MOI, 10:1)로 감염시켰다. 우두 TK-, 빈 아데노바이러스로 감염된 표적 섬유아세포 또는 미감염된 섬유아세포를 대조군으로서 이용하였다. 그 후, 상기 표적을 EBV 혈청 반응 양성의 건강한 기증자로부터 생성된 EBNA1, LMP1 및 LMP2 에피토프-특이적 CTL 다클론 주 또는 CTL 클론에 대한 세포용해 활성에 대하여 크롬 방출 어세이로 시험하였다. 10:1의 효과기:표적의 비를 상기 어세이에 이용한다. 우두, 계두 또는 아데노바이러스 벡터 발현 SAVINE 구조체로 감염된 HLA-적합 섬유아세포는 세포용해 활성을 나타낸 반면, 대조군 벡터로 감염된 섬유아세포는 용해되지 않았다.

<228> 상기 결과는 SAVINE 구조체 중 정의된 에피토프가 매우 효과적으로 프로세싱되고 표적 세포에 제시됨을 증명한다.

<229> **실시예 4: EBV 면역성 건강한 기증자로부터 SAVINE 특이적 CTL의 활성화**

<230> 건강한 인간 EBV 보균자로부터의 PBMC (ScBu 및 DoSc)를 AdSAVINE, AdPoly 또는 자가 조직 LCL (30:1)로 감염된 자가 조직 PBMC로 자극하였다 (2:1의 반응 인자 대 자극 인자의 비) (도 3(a) 및 (b)). 모든 배양물을 기실한 바와 같이 감염된 γ -조사된 자가 조직 LCL을 이용하여 매주의 간격으로 재자극하였다. 3 회의 재자극 이후 3 일째, 배양된 세포를 크롬 방출 어세이에서 펩티드 감염된 자가 조직 PHA 모세포에 대한 효과기로서 이용하였다. 배양된 세포를 또한 ELISPOT에 의해 시험하였고, 그 결과를 10^6 개의 CTL당 스폿 형성 세포 (SFC)로서 표현한다 (도 3(c)).

<231> 크롬 방출 어세이를 이용하는 효과기 기능 시험 및 ELISPOT 어세이에 의해, 자가 조직 LCL의 아데노바이러스 SAVINE을 이용한 건강한 기증자로부터의 PBMC의 자극은 따라서 SAVINE 활성화된 CTL이 LCL 활성화된 CTL보다 더 높은 특이적 용해를 나타냄을 보여준다.

<232> **실시예 5: SAVINE 구조체를 이용한 새로운 반응의 지도화**

<233> 전장 LMP1 항원의 아미노산 서열을 아시아인 EBV 균주, CAO (8 개의 잔기가 중첩되는 17 mer 길이의 32 개의 펩티드) 및 백인 원형 1 EBV 균주, B95.8 (8 개의 잔기가 중첩되는 17 mer 길이의 42 개의 펩티드) 모두로부터 유도하였다. 전장 LMP2 (10 개의 잔기가 중첩되는 20 mer 길이의 49 개의 펩티드) 및 EBNA1 (10 개의 잔기가 중첩되는 15 mer 길이의 69 개의 펩티드) 항원의 아미노산 서열을 백인 원형 1 EBV 균주, B95.8로부터 유도하였다. EBV 혈청 반응 양성의 건강한 기증자로부터 생성된 아데노바이러스-SAVINE 및 LCL-활성화된 CTL을 중첩 펩티드에 의한 자극 이후 IFN- γ 의 분비에 대하여 시험하였다. 정의된 CD8⁺ 뿐만 아니라 CD4⁺ T 세포 에피토프에 대한 특이적 T 세포 반응성을 관측하였다. 이미 정의된 펩티드에 대한 반응성 이외에, 상기 새로운 펩티드 풀 서열 중 4 개 (LMP1 및 LMP2로부터 각각 2 개)는 SAVINE 및 LCL 활성화된 CTL 모두에 의해 반응성을 나타내었고 상기 새로운 펩티드 풀 서열 중 4 개 (CAO LMP1, B95.8 LMP1 LMP2 및 EBNA1로부터 각각 1 개)는 SAVINE 활성화된 CTL에 의해 반응성을 나타내었다.

<234> EBNA1, LMP1 및 LMP2로부터의 펩티드의 패널에 의한 SAVINE 활성화된 CTL의 선별 (도 4(a), (b), (c) 및 (d))은 따라서 SAVINE 구조체가 3 가지 단백질 각각으로부터의 이미 정의된 CTL 에피토프를 활성화하였음을 보여준다. 또한, SAVINE은 4 개의 새로운 풀 펩티드 서열에 대한 반응성을 활성화하였다.

<235> **실시예 6: Ad5/F35 SAVINE 구조체는 마우스에서의 CTL 반응을 프라이밍할 수 있고, 이는 우두 SAVINE 또는 계두 SAVINE에 의해 부스팅될 있다.**

<236> HLA-A2/Kb 트랜스제닉 마우스의 2 개의 군 (n = 5)을 Ad SAVINE (10^9 PFU)로 피하 면역화하고 2 주 이후, 상기 마우스에게 우두-SAVINE (10^7 PFU) 또는 계두 SAVINE (2×10^7 PFU)를 다시 주사하였다. 2 주 이후, 비장 세포를 적출하고 CTL 반응을 ELISPOT 어세이에 의해 평가하며 그 결과를 10^6 개의 비장 세포당 스폿 형성 세포 (SFC)의 평균 + SE로서 표현한다 (도 5).

<237> 도 5는 따라서 Ad5/F35 SAVINE으로 면역화된 HLA A2 Kb 마우스가 특이적 CTL 반응을 프라이밍하고 상기 반응은 ELISPOT 어세이에 의해 비장 세포 중 생체의 측정될 수 있음을 증명한다. 이러한 CTL 반응의 프라이밍은 우두 SAVINE 또는 계두 SAVINE에 의한 면역화 이후 부스팅될 수 있다.

<238> **실시예 7: 시험관내 팽창된 SAVINE CTL의 치료 효능은 인간 NPC의 퇴행을 야기한다.**

<239> 면역결핍 누드 마우스를 인간 NPC 동종이식편으로 접종하고 종양 크기가 대략 0.2 cm³의 크기 (종양 접종 이후 14 일)일 때, 종양을 갖는 누드 마우스의 각 군 (n = 6 마리의 마우스/군)에게 5×10^6 개의 Ad (프라이밍됨)-VV (부스팅됨) SAVINE-특이적 T 세포 또는 5×10^6 개의 Ad-FPV SAVINE-특이적 T 세포를 입양 전달하였다. 또 다른 누드 마우스 군에게 5×10^6 개의 Ad-FPV SAVINE-CTL을 주사하고 각 입양 전달 1, 2, 및 3 일 이후 인간 IL-15 (5 μ g) 복막내 주사액으로 처리하였다. 포함된 대조군은 5×10^6 개의 LMP 폴리에피토프-특이적 CTL, 사이토메갈로바이러스 폴리에피토프 (CMV)-특이적 CTL, CD8 결실된 Ad-FPV SAVINE-CTL이 주사되거나 미처리된 마우스였다. SAVINE-특이적 T 세포의 치료 효능을 종양 퇴행의 정기적 모니터링에 의해 평가하고 크기가 >1.0 cm³

인 종양 크기를 나타내는 마우스를 희생시켰다. CMV T 세포 또는 CD8 결실된 Ad-FPV SAVINE-CTL을 투여받은 마우스인, 미처리 마우스는 종양 성장의 억제를 야기하지 않았고, 상기 마우스에서의 종양은 첫번째 T 세포 전달 이후 약 12 ~ 24 일째 1.0 cm³에 도달하였다. CD8 결실된 LMP-CTL을 투여받은 마우스를 첫번째 CTL 전달 이후 약 12 ~ 78 일째 희생시켰다. 90 일 이후, Ad-FPV SAVINE-CTL 단독을 투여받은 1/6 마우스 또는 Ad-FPV SAVINE-CTL 뿐만 아니라 IL15를 투여받은 마우스는 퇴행을 경험하였고 2/6 마우스에서의 퇴행은 Ad-VV SAVINE-CTL을 투여받은 마우스에 있어서 경험되었다 (도 6).

<240> 도 6은 따라서 도 5에서와 같이 프라임 부스팅되고 이어서 정의된 에피토프의 CTL 펩티드의 이용으로 시험관내 팽창된 마우스로부터의 SAVINE CTL이, 인간 NPC 세포가 내부에 성장중인 누드 마우스를 보호할 수 있음을 증명한다.

도면의 간단한 설명

<35> 본 발명은, 오로지 예로서, 하기 도면을 참고로 하여 이제 기술될 것이다.

<36> **도 1. 무작위로 함께 결합된 LMP1, LMP2 및 EBNA1 단백질에 걸친 중첩 펩티드 세트를 암호화하는 NPC SAVINE의 도식적 표시.** 길이가 20 내지 100 bp로 다양한 서열 특이적 중첩 올리고뉴클레오티드를 이용하여 상기 3 가지 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 구축하였다. 단계적 비대칭 PCR에 의해 서열을 함께 결합시켜 서브카세트 (subcassette)를 생성하였다. 제한 소화 및 PCR을 이용하여 상기 서브카세트를 함께 결합시켜 6.8 kb의 최종 NPC SAVINE 구조체를 생성하였다. 그 후, 상기 구조체를 복제 결핍 아데노바이러스 벡터 (Ad5F35)로 클로닝하였다. SAVINE 구조체를 발현하는 재조합 아데노바이러스 (AdSAVINE)를 HEK293 세포로 트랜스펙션함으로써 획득하였다. 상기 SAVINE 구조체를 또한 우두 및 계두 바이러스 전달 벡터로 삽입하였다 (문헌 [Thomson S.A., Jaramillo A.B., Shoobridge M., Dunstan K.J., Everett B., Ranasinghe C., Kent S.J., Gao K., Medveckzy C.J., French R.A., Ramshaw I.A.. Development Of A Synthetic Consensus Sequence Scrambled Antigen HIV-1 Vaccine Designed for Global Use (2005) Vaccine, 23(38) 4647-57]을 참고하라).

<37> **도 2. SAVINE 구조체 내부의 정의된 에피토프의 프로세싱 및 제시.** LMP1, LMP2 및 EBNA1-펩티드 특이적 CTL은 SAVINE로 감염된 표적을 사멸시킨다. EBNA1 (HPV, HLA-B35 제한됨), LMP1 (YLL 및 YLQ, HLA A2-제한됨; IAL, HLA B35-제한됨) 및 LMP2 (CLG, LTA 및 LLS, HLA A2-제한됨; PYL, HLA-A23-제한됨; IED, HLA-B40-제한됨) 항원 내부의 정의된 에피토프 특이적 CTL 다클론 주 또는 CTL 클론을 4 명의 EBV 혈청 반응 양성의 건강한 기증자로부터 생성하였다. 정의된 에피토프를 갖는 (loaded) PHA 모세포에 대한 상기 CTL의 특이성을 세포용해 어세이로 시험하였다. 이어서, EBNA1, LMP1 및 LMP2 항원 내부에 정의된 에피토프가 내인적으로 프로세싱되는지의 여부를 알아내기 위하여, HLA-매치 섬유아세포를 먼저 우두, 계두 또는 아데노바이러스 벡터 발현 SAVINE 구조체 (MOI, 10:1)로 감염시켰다. 우두 TK-, 빈 아데노바이러스로 감염된 표적 섬유아세포 또는 미감염된 섬유아세포를 대조군으로서 이용하였다. 그 후, 상기 표적을 EBV 혈청 반응 양성의 건강한 기증자로부터 생성된 EBNA1, LMP1 및 LMP2 에피토프-특이적 CTL 다클론 주 또는 CTL 클론에 대한 세포용해 활성에 대하여 크롬 방출 어세이로 시험하였다. 10:1의 효과기:표적의 비를 상기 어세이에 이용한다. 우두, 계두 또는 아데노바이러스 벡터 발현 SAVINE 구조체로 감염된 HLA-적합 섬유아세포는 세포용해 활성을 나타낸 반면, 대조군 벡터로 감염된 섬유아세포는 용해되지 않았다. 상기 결과는 SAVINE 구조체 중 정의된 에피토프가 프로세싱되어 표적 세포에 매우 효과적으로 제시됨을 증명한다.

<38> **도 3. EBV 혈청 반응 양성의 건강한 기증자로부터 SAVINE 및 LCL 자극된 CTL의 활성화.** (A) 및 (B) 건강한 인간 EBV 보균자로부터의 PBMC (ScBu 및 DoSc)를 AdSAVINE, AdPoly 또는 자가 조직 LCL (30:1)로 감염된 자가 조직 PBMC로 자극하였다 (2:1의 반응 인자 대 자극 인자의 비). 모든 배양물을 기술한 바와 같이 감염된 γ -조사된 자가 조직 LCL을 이용하여 매주의 간격으로 재자극하였다. 3 회의 재자극 이후 3 일째, 배양된 세포를 크롬 방출 어세이에서 펩티드 감각된 자가 조직 PHA 모세포에 대한 효과기로서 이용하였다. (C) 배양된 세포를 또한 ELISPOT에 의해 시험하였고, 그 결과를 10⁶ 개의 CTL당 스폿 형성 세포 (spot forming cell, SFC)로서 표현한다.

<39> **도 4. EBV 혈청 반응 양성의 건강한 기증자에 있어서 EBNA1, LMP1 및 LMP2 특이적 반응의 지도화.** 전장 LMP1 항원의 아미노산 서열을 아시아인 EBV 균주, CAO (8 개의 잔기가 중첩되는 17 mer 길이의 32 개의 펩티드) 및 백인 원형 1 EBV 균주, B95.8 (8 개의 잔기가 중첩되는 17 mer 길이의 42 개의 펩티드) 모두로부터 유도하였다. 전장 LMP2 (10 개의 잔기가 중첩되는 20 mer 길이의 49 개의 펩티드) 및 EBNA1 (10 개의 잔기가 중첩되는 15 mer 길이의 69 개의 펩티드) 항원의 아미노산 서열을 백인 원형 1 EBV 균주, B95.8로부터 유도하였다. EBV 혈

청 반응 양성의 건강한 기증자로부터 생성된 아데노바이러스-SAVINE 및 LCL-활성화된 CTL을 증첩 펩티드에 의한 자극 이후 IFN- γ 의 분비에 대하여 시험하였다. 정의된 CD8⁺ 뿐만 아니라 CD4⁺ T 세포 에피토프에 대한 특이적 T 세포 반응성을 관측하였다. 이미 정의된 펩티드에 대한 반응성 이외에, 상기 새로운 펩티드 풀 (pool) 서열 중 4 개 (LMP1 및 LMP2로부터 각각 2 개)는 SAVINE 및 LCL 활성화된 CTL 모두에 의해 반응성을 나타내었고 상기 새로운 펩티드 풀 서열 중 4 개 (CAO LMP1, B95.8 LMP1 LMP2 및 EBNA1로부터 각각 1 개)는 SAVINE 활성화된 CTL에 의해 반응성을 나타내었다.

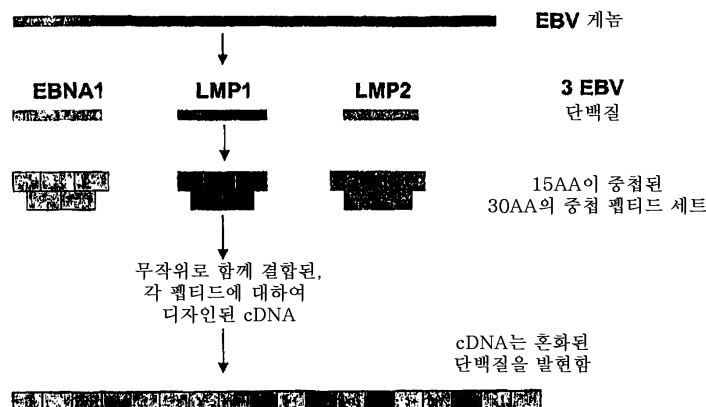
<40> **도 5. Ad SAVINE에 의한 프라이밍 (priming) 및 우두 SAVINE 또는 계두 SAVINE에 의한 부스팅 (boosting) 이후 특이적 CTL의 생체의 ELISPOT 분석.** HLA-A2/Kb 트랜스제닉 마우스의 2 개의 군 (n = 5)을 Ad SAVINE (10⁹ PFU)로 피하 면역화하고 2 주 이후, 상기 마우스에게 우두-SAVINE (10⁷ PFU) 또는 계두 SAVINE (2 x 10⁷ PFU)를 다시 주사하였다. 2 주 이후, 비장 세포를 적출하고 CTL 반응을 ELISPOT 어세이에 의해 평가하며 그 결과를 10⁶ 개의 비장 세포당 스폿 형성 세포 (SFC)의 평균 + SE로서 표현한다.

<41> **도 6. 아데노-SAVINE로 프라이밍되고 우두 또는 계두 SAVINE로 부스팅된 HLA 트랜스제닉 마우스의 비장 세포로부터의 시험관내 평창된 SAVINE-CTL의 치료적 입양 전달은 인간 NPC의 퇴행을 야기한다.** 면역결핍 누드 마우스를 인간 NPC 동종이식편으로 접종하고 종양 크기가 대략 0.2 cm³의 크기 (종양 접종 이후 14 일)일 때, 종양을 갖는 누드 마우스의 각 군 (n = 6 마리의 마우스/군)에게 5 x 10⁶ 개의 Ad (프라이밍됨)-VV (부스팅됨) SAVINE-특이적 T 세포 또는 5 x 10⁶ 개의 Ad-FPV SAVINE-특이적 T 세포를 입양 전달하였다. 또다른 누드 마우스 군에게 5 x 10⁶ 개의 Ad-FPV SAVINE-CTL을 주사하고 각 입양 전달 1, 2, 및 3 일 이후 인간 IL-15 (5 μ g) 복막내 주사액으로 처리하였다. 포함된 대조군은 5 x 10⁶ 개의 LMP 폴리에피토프 (polyepitope)-특이적 CTL, 사이토메갈로바이러스 폴리에피토프 (CMV)-특이적 CTL, CD8 결실된 Ad-FPV SAVINE-CTL이 주사되거나 미처리된 마우스였다. SAVINE-특이적 T 세포의 치료 효능을 종양 퇴행의 정기적 모니터링에 의해 평가하고 크기가 >1.0 cm³인 종양 크기를 나타내는 마우스를 희생시켰다. CMV T 세포 또는 CD8 결실된 Ad-FPV SAVINE-CTL을 투여받은 마우스인, 미처리 마우스는 종양 성장의 억제를 야기하지 않았고, 상기 마우스에서의 종양은 첫번째 T 세포 전달 이후 약 12 ~ 24 일째 1.0 cm³에 도달하였다. CD8 결실된 LMP-CTL을 투여받은 마우스를 첫번째 CTL 전달 이후 약 12 ~ 78 일째 희생시켰다. 90 일 이후, Ad-FPV SAVINE-CTL 단독을 투여받은 1/6 마우스 또는 Ad-FPV SAVINE-CTL 뿐만 아니라 IL15를 투여받은 마우스는 퇴행을 경험하였고 2/6 마우스에서의 퇴행은 Ad-VV SAVINE-CTL을 투여받은 마우스에 있어서 경험되었다.

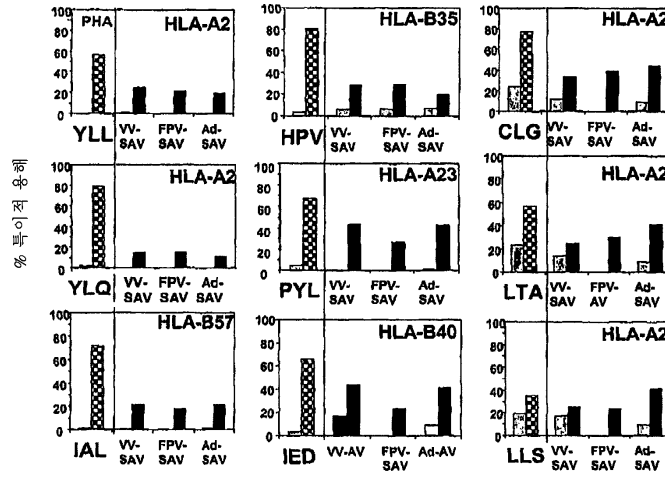
도면

도면1

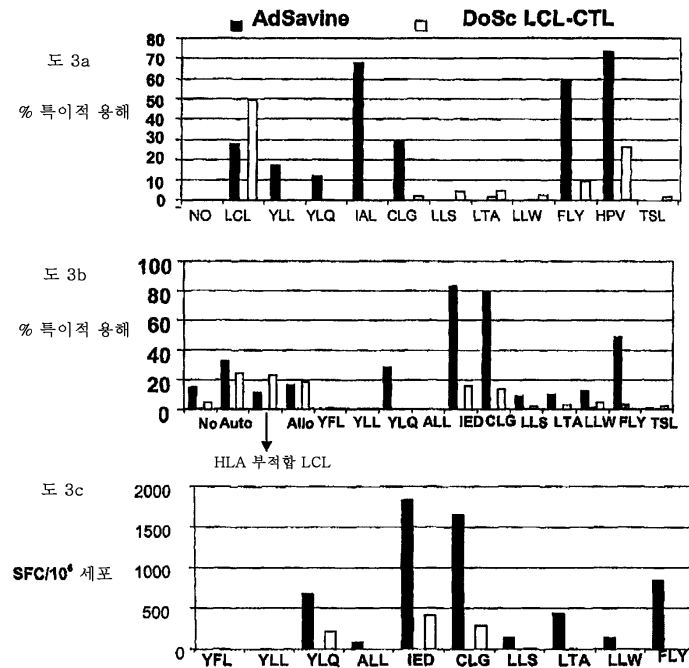
NPC SAVINE의 구축



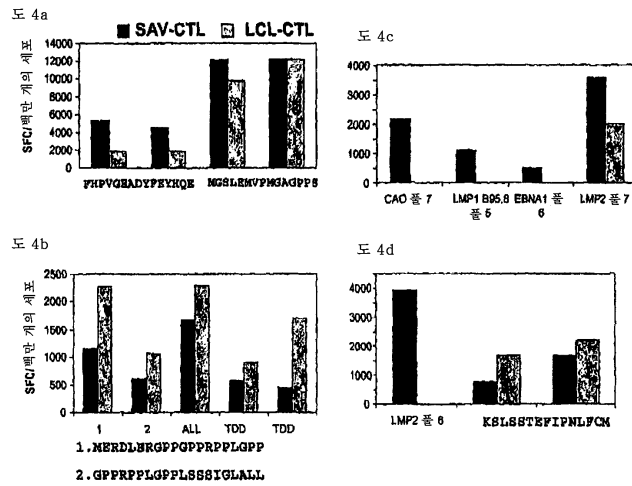
도면2



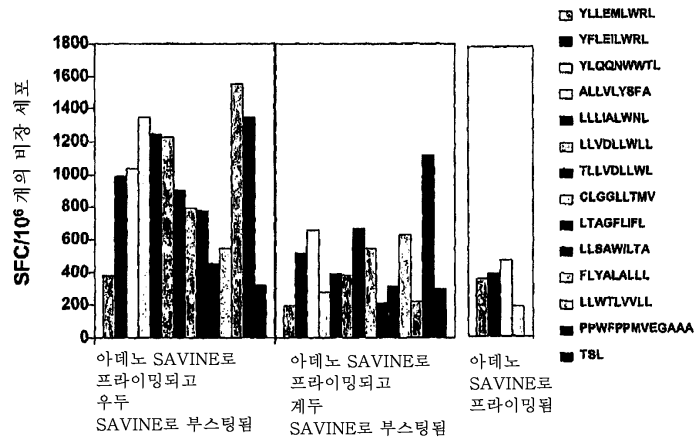
도면3



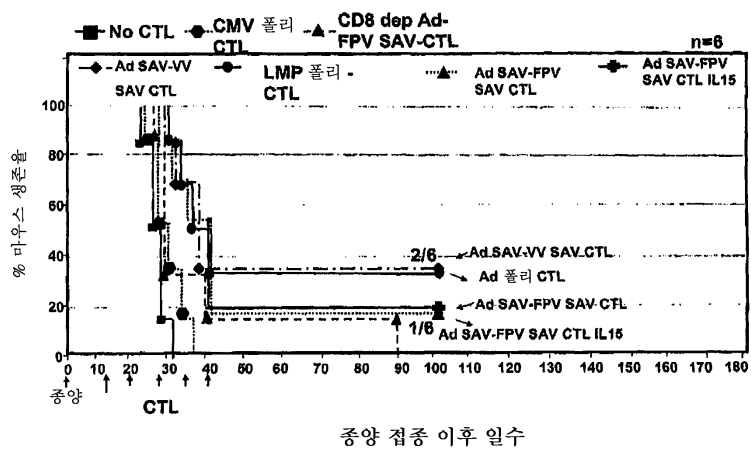
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Savine Therapeutics Pty Ltd

<120> Treatment for Epstein-Barr Virus-associated Diseases

<130> 30555066

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6875

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 1

ggcggatcct ctagaccacc atgggcgcta ccctctggcg actgctcgcc tttatcctcg	60
cttttttctt cgccattatc ctcttgatta tgctctgta tctgcaacag aatgcctca	120
tgctcatcat tatcattctg attatcttta tctttaggag agacctctg tgtcccctcg	180
gcggactggg actgctcctg ctggccctc acgatccct ccccataac cctagegata	240
gcgctggcaa tgacggaggc cctcccaatc tgacagagga agtggctaac aaaatccta	300
acctttctg tatgctcctg ctcatcgtcg ccggaatcct cttcattctg gctatcctca	360
ccgaatgggg aagcggaaac agaaggcctc ccctcgccc tcccctcagc tccagcatcg	420
gcctcgccct cctgctcctg ctctggctc tgctcttctg gctgtatac gctaccaac	480
ccctcggcac acaggatcag tcctgtatc tgggactgca acacgatggc aatgacggac	540
tgctccccc tcctatagc cctggcggag acagaggccc tcctccatg acagacggag	600

gcgaggcgga tcccacatctg cctacacctc tgcctggcac aagcggaagc ggagtggctg 660

gcgctgtgtg gctgacagtg atgagcaata ccctcctgtc cgctggatt ctaccgctg 720

gctttctgat tticctcatc ggaaagcctg ccctacctg taacattagg gtcaccgtct 780

gctccttcga tgacggagtg gatctgcctc cctggttccc tcccatggtg gaagccgctg 840

agaaaaggcc taggtcccc tccagccaaa gctccagctc cggtccccc cctaggagac 900

ccctccccg aaggagacc tttagcatga accctgtgtg tctgctgtg attgtggctc 960

cctatctgtt ttggctgcc gctatcgtg cctcctgctt taccgctagc gtctactgtc 1020

tgacactgga aagcgaagag agaccacctc cccttacgc tgctggaga aggtcaccg 1080

tctgcggagg cattatgttt ctggtttgcg tcttggctct gattgtggat gccgtcctgc 1140

aactgtcccc cctcctgttt atcctcgcca ttttgacaga gtggggctcc ggcaatagga 1200

catacggacc cgtcttcatg tgctcggcgc gactgtcac catggccgt gacaatggcc 1260

ctcaagacc cgataacaca gacgataacg gaccccatga ccctctgct cacaatccct 1320

ccgactccgc cggagagtc atcgtctgct atttcatggt gtttctgcaa acccatatct 1380

ttgccgaagt gctcaaggat gccattaagg atctggctcat gacaagcaca gtggtcaccg 1440

ctaccggact ggctctgtcc ctgctcctgc tcgccgtgt ggctagctcc tacgtgccg 1500

ctcagagaaa gctcggcgt atgggaagcc tcgagatggt gcctatggga gccggacccc 1560

ctagccctgg cggagaccct gacggatacg atggcgaaa caatggcgt gccgtgagg 1620

gagacgatgg cgatgacgga gacgaaggcg gagacggaga cgaaggcga gagggacagg 1680

aagccgctct gacaccgctc accgtctga cagccgtct gacattcttt gccatttgcc 1740

tcacctggag gattgaagac cccctttca atagcctga cgatagctcc cacgaaagcg 1800

atagcaatag caatgagga aggcatacc tctcgtcag cggagccgga gacggacccc 1860
 ctctgtgtgc cgctatgtcc gacgaaggcc ctggcacagg ccctggcaat ggcctcggcg 1920
 aaaagggaga cacaagcggg cccgaaggct ccggcggagg cggacccgat ggcgaacccg 1980
 atgtgctcc cggagccatt gagcaaggcc ctgccatga ccctggcga ggccttagca 2040
 caggccctct ggctgccgtc gcctccagct atgccctgc ccaaggaat ctgctcacc 2100
 ctgtgacagt gctcaccgt gtggcacct ttttcgtca gcatgacgga aacgatggcc 2160
 tccccctcc cccttactcc cccagagacg atagctccca gcatatctat gaggaagccg 2220
 gaaggggagt gctcgtgatg ctggctctgc tcatactcgc ctataggaga aggtggagga 2280
 gactgacagt gtgtggcggg atcatgttcc tcgctgtgg cggagcaaa acctccctgt 2340
 ataacctcag gagaggcaca gccctcgcca tcccccaatg cagactgaca ccctcagca 2400
 gactgcctca ccactgtctc gtgtccggcg ctggcgatgg ccctccctc tgctccaga 2460
 atctgggagc ccctggcggg ggccctgaca atggccctct gggagagaaa ggcgatacct 2520
 ccggccctga ggggaagcggg ggctccggcc ctcagagaag gggaggcgat aacctggca 2580
 gaggcagacc ctccccgga ggcgatcccg atggctatga cggaggcaat aactcccagc 2640
 atccctccgc ctccgctcc agcggaaaca cacccacaag gacaaccgat gagggaacct 2700
 ggggtgctgg cgtcttcgtc tacggaggct ccaagacaag cctctacaat ctgagaaggg 2760
 gaaccctgg cgatgacgat gacctcagc gacctcca gctcagctat tacgatgccg 2820
 ctctgctctg gacactggtc gtgctctga tttgctccag ctgtagctcc tgccctctgt 2880
 ccaagattct gctcgcaga ctgtttctgt atttctct gtggtgtcc agccctggcg 2940

gactgggaac cctcggcgct gccctcctga cactggetgc cgctctggct ctgctcgct 3000

ccacctatgg cctctgttt atgtgtctgg gagcctcct gacaatggc gccggagccg 3060

tctggctcac cgicatgtcc aacacactgc tcagcgaag ccctcccaga aggcctcccc 3120

ctggcagaag gcctttcttt caccctgtgg gaagatccga ggctgactat ttcgaatacc 3180

atcaggagtt ccatcccgtc ggcgaagccg attactttga gtatcaccaa gagggaggcc 3240

ctgacggaga gcctgacgtc cccctggcg ctatcgaag ggatctgctc tgcctctgg 3300

gaggcctcgg cctcctgctc ctgatgatca cactgctcct gattgccctc tggaaatctc 3360

atggccaaag gggacagga gacggaggca gaaggaaaaa gggaggctgg ttcgaaagc 3420

ataggggaca gggaggctcc aaccctaagt ttgagaatat gtccgactgg accggaggcg 3480

ctctgctcgt gctctactcc ttcgctctga tctgattat cattatcctc atcattttca 3540

ttttcagact gggagccgtc accgtcgtgt ccatgacact gctcctgctc gcctttgtgc 3600

tttgctcag ctccccggg ggcctcggca cactgggagt gctcgtgctc atcgtggacg 3660

ctgtctcca gctcagcct ctgctcggcg ctgtgacagt ggtcagcatg accctcctgc 3720

tcttgctcc ctatgaagac ccctattggg gaaacggaga cagacactcc gactatcagc 3780

ctctgggaac ccaagaccaa agcctctacc tcggcctcct gctcctgctc ctgctcggc 3840

tcctgttttg gctctacatt gtgatgagcg attggacagg cggagccctc ctggtcctgt 3900

atagctttga gcatcaccat gacgatagcc tccccatcc ccaacaggct accgatgact 3960

ccagccatga gtccgactcc aactccaacg aaggcagact ggctatccct cagtgtagc 4020

tcacctctet gtccagctc ccttttgca tggccctgg cctggccct cagcctggcc 4080

ctctgagaat gattaccctc ctgctcatcg ctctgtggaa cctccacgga cgggctctgt 4140

atctgggaat cgtcctgttt atctttggct gtctgtctcag ggatgactcc agccaacaca 4200

tttacgaaga ggctggcaga ggctecatga atcccgtctg ccttcccgtc atcgtcgccc 4260

cttacctcga cgatggcgtg gacctcccc cttggcttcc ccctatggtc gagggagccg 4320

ctgccgaagg cgatgacgga gacgatggcg atgaggaag ccaatacct agcgctagcg 4380

gaagctccgg caataccctt accctccca atgacgaaga gagagagtcc aacgaagggc 4440

ctccccctgg ctccggctcc ggccttaggc atagggatgg cgtcaggaga ccccaaaaga 4500

gacctcctg cattggctgt aaggaaccg ctgccttcgc tctgtttggc gtcacagat 4560

gctgtaggta ttgctgttac tattgctca cctcagatc cgaggaaagg cctcccacac 4620

cctatttcgc tgaggctctg aaagacgta tcaaagacct cgtgatgacc aaaccgctc 4680

ccacatgca taccagatg acagtgtgta gctttccccc taacgatgag gaaagggaaa 4740

gcaatgagga accccctccc ctttacgaag acccttactg gggcaatggc gataggcata 4800

gcgatccat tctgatttg atgtactatc acgggccag acacacagac gaacaccatc 4860

acgatgactc cctgcctcac cctcagcaag ccacaatctg tctgacatgg agaatcgaag 4920

accctccctt taactcctg ctcttcgctc tgctcggcg tgccggagc gtccaggaa 4980

tctatcagg acccgctgac gatcccgag agggacctc caccggacc agaggccaag 5040

gcgatggcgg aaggagaaag aaagcggat ggtttctgat tctgggaacc ctcaacctca 5100

ccacaatgtt tctgctcatg ctctgtgga cctcgtggt cctgctcacc ttagctcct 5160

gtcccgccg tatggaaagg gatctgaaa ggggaccccc tggcctccc agaccctc 5220

tgggacccc tctgtccagc tccatcggac tggctatcgc tgagggaactg agaccctec 5280

tggctaggtc ccacgtcgag agaaccacag acgaaggcac atgggtcgcc ggagtgtttg 5340
 tgtatgccct ctacctggc attgtgctct tcattttcgg atgcctcctg gtctctgggac 5400
 tgtggatcta tttcctcgag attctgtgga ggctcagcca aaacctggc gctcccggag 5460
 gcggaccga taacggacc caagacctg acaataccga tgccgctaac gatggcggac 5520
 ccctaacct caccgaagag gtcgccaata agggaggcga taggggacc cctagcatga 5580
 ccgatggcgg aggcggatgg tggacctcc tggtaggacct cctgtggctg ctctgttta 5640
 tggctatcct catctggatg tattaccatg gcctaggca taccgatgtg ctcgccctct 5700
 ggatttactt tctggaaatc ctctggagac tgggagccac actgtggcag ctctggctt 5760
 tcattctggc tttctttgcc ctgcctcc tgcctctggc tagcgtctg attgccggag 5820
 gtccatcct ccagacaaa tttaaagtc tgcagcac agagttttc ggaatggctc 5880
 ccggaccgg accccaacc ggaccctca gggaaagcat tgtgtgttac tttatggtct 5940
 tcctccagac acacattggc agaggcagag gcagaggcgg aggcagacc ggagccctg 6000
 gcggaagcgg aagcggacc agacacagag acggagtgag aaggcctagc tgtccctca 6060
 gcaaaatcct ctggctagg ctcttctct acgctctggc tctgctctg ctgcctccg 6120
 ccctcatgc tggcggagac cctcacctcc ccactgct cctgggaacc tccggtccg 6180
 gcggagacga tgacatccc catggcctg tgcaactgtc ctactattc tggctggctg 6240
 ccattgccg tagctgttc acagctccg gtccaccgt cgtgacagcc acagcctcg 6300
 ccctcagct cctgctctg tttgcctcc tggctgccg tggcggactg caaggcattt 6360
 acgtcctggt catgctctg ctctgattc tggcttacag aaggagagc aaacacagag 6420
 gccaaaggcg aagcaatccc aaattcgaac acattgccga aggcctcagg gctctgctcg 6480

ccagaagcca tgtggaaagc attctgcaaa ccaatttcaa aagcctcagc tccaccgagt	6540
tcattcccaa tctgttttgc atgtgctcc tgattgtggc tggcattgcc gctctgctca	6600
cctcgcgcgc tgcctcgcgc ctctggctca gcctcatcct cggcacactg aatctgacaa	6660
ccatgttctt ccgatgagc gcttggattc tgacagccgg attcctcacc tttctgattg	6720
gctttgccct ctccggagtg attaggtgtt gcagatactg ttgctatctg gctatcattc	6780
tgctcatcat tgcctctac ctccagcaaa actggtggac actgctcgtg gatctgctct	6840
ggctcctgct cttcatgtga tctagagaat tcgcc	6875