

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
 A61K 38/02

(45) 공고일자 2005년06월20일
 (11) 등록번호 10-0457647
 (24) 등록일자 2004년11월08일

(21) 출원번호	10-1998-0706339	(65) 공개번호	10-1999-0082601
(22) 출원일자	1998년08월14일	(43) 공개일자	1999년11월25일
번역문 제출일자	1998년08월14일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1997/000828	(87) 국제공개번호	WO 1997/30721
국제출원일자	1997년02월21일	국제공개일자	1997년08월28일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 오스트레일리아, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 에스토니아, 헝가리, 이스라엘, 일본, 대한민국, 리투아니아, 라트비아, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 터키, 우크라이나, 미국,

AP ARIPO특허 : 캐나다, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드,

EA 유라시아특허 : 벨라루스, 카자흐스탄, 러시아,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 펠란드, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼,

(30) 우선권주장	196 07 044,9	1996년02월24일	독일(DE)
	196 38 313,7	1996년09월19일	독일(DE)
	196 48 687,4	1996년11월25일	독일(DE)

(73) 특허권자
 베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하
 독일 55216 인겔하임 빙거 슈트라쎄 173

(72) 발명자
 슈미트 발터
 오스트리아연방공화국 아-1030 빈 스타인가세 2아/16

빈스타일 맥스
 오스트리아연방공화국 아-1080 빈 스코다가세 14-16/15

스타인라인 피터
 오스트리아연방공화국 아-1020 빈 렘브란트스트라세 10/4

부슬 미카엘
 오스트리아연방공화국 아-2345 브룬/제버게 히틀스트라세 35/1/1

슈바이코파 타마스
 오스트리아연방공화국 아-1180 빈 콜로레도가세2/4

(74) 대리인
 김석중
 최규팔

심사관 : 장진아

(54) 웹티드및애쥬번트에기초한면역조절용약제학적조성물

요약

본 발명은 애쥬번트와 함께 적어도 하나의 면역조절 웨პ티드 또는 단백질(절편)을 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 웨პ티드는 병원체 또는 종양 항원으로부터 유래한다. 애쥬번트는 치료되는 개체의 세포에 대한 웨პ티드의 결합을 증가시키거나 세포에 의한 웨პ티드의 흡수를 증가시키고 웨პ티드의 면역조절 효과를 증강하는 능력을 갖는다. 바람직한 애쥬번트는 세포성 리간드, 예를 들면 탄수화물 그룹이나 트랜스페린과 임의로 결합하는, 폴리아르기닌 또는 폴리리신과 같은, 염기성 폴리아미노산이다. 조성물은 특히 백신, 예를 들면 종양 백신으로 사용된다.

내용도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 면역조절 분야에 관한 것이다. 본 발명은 하기 조건에 필수적으로 의존하는 종양 세포에 기초한 치료용 백신의 개발이다: 종양 세포 및 정상 세포간에는 정성적 또는 정량적 상이점이 있다; 면역 체계는 기본적으로 이 상이점을 인지할 수 있다; 면역 체계는 자극받을 수 있어 - 백신을 이용한 능동적 특이 면역화에 의하여 - 이들 상이점에 의하여 종양세포를 인지하고 그것들이 거부되도록 한다.

배경기술

항-종양 반응을 얻기 위하여, 적어도 두가지 조건이 충족되어야 한다: 첫째, 종양 세포가 정상 세포에서는 발생하지 않거나, 면역 체계가 정상 및 종양 조직을 정량적으로 구별할 수 있는 범위로만 발생하는 항원을 발현하여야만 한다. 둘째, 면역 체계가 이 항원들과 반응하기 위하여 알맞게 활성화되어야만 한다. 종양의 면역 치료요법에 있어서 심각한 장애는, 특히 인체에서의, 낮은 면역원성이다.

최근, 그러한 네오-에피토프(neo-epitopes)를 구성하고 따라서 면역 체계에 의한 공격의 잠재적 표적을 구성하는 종양-관련 및 종양-특이 항원이 발견되었다. 그럼에도 불구하고 면역 체계가 이들 네오-에피토프를 발현하는 종양을 제거하는데 성공하지 못하는 사실은 네오-에피토프의 부재에 기인하는 것이 아니라 이들 네오-에피토프에 대한 면역 반응이 부적절하다는 사실에 자명하게 기인한다.

세포 기초의 암 면역치료요법을 위하여, 두가지 일반적 전략이 개발되어 왔다: 한편으로는, 종양-반응성 T-림프구의 인비트로(*in vitro*) 증폭 및 환자로의 그것들의 재도입을 이용하는 선택 면역치료요법; 다른 한편으로는, 이것이 종양 항원에 대한 신규하거나 더욱 강력한 면역 반응을 유발할 것이라는 기대하에 종양 세포를 사용하여, 전신 종양 반응에 이르게 하는 능동 면역치료요법.

능동 면역치료요법에 기초한 종양 백신은 다양한 방법으로 제조되어 왔다; 일례는 종양 항원에 대한 면역 반응을 유발하기 위하여 코리네박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*) 또는 바실러스 칼메트 구에린(*Bacillus Calmette Guerin*)(BCG)과 같은 면역자극 애쥬번트와 혼합한 방사선 조사된 종양 세포로 이루어진다(문헌[Oettgen and Old, 1991]).

근년에, 특히, 유전적으로 변이된 종양 세포들이 암에 대한 능동 면역치료요법에 사용되어 왔다. 종양 세포가 다양한 유전자의 도입에 의하여 더욱 강력한 면역원성을 위하여 이질화된(alienised) 이 상이한 접근들의 개요가 문헌[Zatloukal et al., 1993]에 의해 제공된다. 여기에서 사용된 전략 중 하나는 사이토카인을 생산하기 위하여 유전적으로 변이된 종양 세포를 사용한다.

종양 항원 및 종양-관련 항원(TAs) 또는 그들로부터 유래된 웨პ티드의 동정 및 분리(예를 들면 문헌[Wolfel et al., 1994 a 및 1994 b]; 문헌[Carrel et al., 1993], 문헌[Lehmann et al., 1989], 문헌[Tibbets et al., 1993] 또는 국제공개특허 WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031, WO 95/00159에 기재된 바와 같이)는 단백질 형태 또는 웨პ티드 형태 모두, 종양 백신에 대한 면역원과 같은 종양 항원을 사용하는 또다른 전략을 위한 필요조건이 있다. 문헌[Boon et al., 1992]; 문헌[Boon et al., 1994], 문헌[Boon et al., 1995]; 문헌[Van Peel et al., 1995]; 문헌[van der Eynde, 1995]의 업적으로부터, 악성 흑색종(melanoma)이 MHC-I 컨텍스트(context)에서 종양 항원-유래 웨პ티드를 나타내는 것이 공지되어 있다. 그러나 그러한 종양 항원 형태의 종양 백신은 종양 항원을 수반하는 종양 세포를 제거하는데 필요한 세포 면역 반응을 유발하는데 충분히 면역원적이지는 않다(문헌[Marchand et al., 1995]). 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs)가 그 표면상에 한정된 웨პ티드 항원을 제시하는 것을 확실하게 하기 위하여 웨პ티드를 "펄스(pulse)"하는 것이 제안되었으나, 이것은 웨პ티드로의 세포의 비효율적인 로딩(loader)을 유발하였다(문헌[Tykocinski et al., 1996]); 애쥬번트의 공동-투여 또한 면역 반응을 증강시키는데 제한적인 성공만을 갖는 것으로 나타났다(문헌[Oettgen and Old, 1991]).

종양 백신의 효능을 증가시키기 위한 능동 면역치료요법을 위한 제 3의 전략은 자기(autologous) 종양 세포를 이종화(xenogenised)(이질화(alienised))시키는 것이다. 이 개념은 면역 체계가 외래 단백질을 발현하는 종양 세포와 반응하고, 이 반응 동안, 면역 반응 또한 백신의 종양 세포에 의해 제시된 종양 항원에 대하여 유발된다는 가정에 기초한 것이다.

주요 기능은 T-세포-항원 수용체, MHC(주요조직항원복합체(Major Histocompatibility Complex)) 분자 및 단백질로부터 유래된 웨პ티드 절편인 그 리간드의 성분들로 이루어진 삼분자 복합체에 의한 특이적 면역 반응의 조절에서 행해진다.

MHC 분자들(또는 상응하는 인체 분자, HLAs)은 엄격한 특이성으로, 수많은 상이한 리간드의 결합을 가능하게 하는 웨티드 수용체이다. 이를 위한 필수조건은 하기 특이성 기준을 갖는 대립형질-특이적 웨티드 모티프(allele-specific peptide motifs)에 의해 제공된다: 그 웨티드는 MHC 하플로타입(haplotype)에 따라, 한정된 길이를 가지며, 이 길이는 MHC-I 하플로타입에서 일반적으로 8 내지 10 아미노산 그룹이다. 전형적으로, 아미노산 위치 중 두 개는 단일 아미노산 또는 밀접하게 관련된 측쇄를 갖는 아미노산 그룹에 의해 점유될 수 밖에 없는 소위 "앵커(anchor)"이다. 앵커 아미노산의 웨티드내의 정확한 위치 및 그 성질에 대한 요구는 MHC-하플로타입에 따라 변화한다. 웨티드 리간드의 C-말단은 빈번하게 지방족 또는 하전된 그룹이다. 그러한 MHC-I-웨티드-리간드 모티프는 지금까지 특히 H-2K^d, K^b, K^k, K^{kml}, D^b, HLA-A*0201, A*0205 및 B*2705 하플로타입에 대해 알려져 있다.

세포 내부에서의 단백질 전환의 범위내에서, 정상, 축퇴(degenerated) 및 외래(foreign) 유전자 산물, 예를 들면, 바이러스 단백질 또는 종양 항원은 소(小) 웨티드로 분해된다; 그들의 일부는 MHC 분자에 대한 잠재적인 리간드를 구성한다. 이것은 MHC-분자에 의한 그들의 제시를 위한 필수조건 및, 결과적으로, 비록 어떻게 웨티드가 세포내에서 MHC 리간드로서 생산되는지 지금까지 명확하게 설명되지 않았을지라도, 세포 면역 반응의 유발을 제공한다. 외래 또는 이종화 단백질 및 그 절편은 또한 체액성 면역 반응을 구성하는 면역글로불린에 의해 인지, 결합 및 제거될 수 있다. 이것은 또한 모든 종양 항원들에 있어서 사실이다: 종양 연관 항원의 예 MUC1, CEA 및 HER2/neu를 이용하여 이를 단백질에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린이 단백질-수반 세포를 인지 및 사멸시킬 수 있음이 나타났다. 따라서 종양 항원-특이적 체액성 면역 반응을 유발하기 위하여, 동물 모델 및 예비 임상 시험에서 다양한 형태의 MUC1 및 CEA가 면역원으로 시도되었다(예를 들면, 재조합 폭스벡터(poxvector); 문헌[Bronte et al., J. Immunol. 154: 5282 1995]).

본 발명의 범위내에서, 세포성 종양 백신의 개발에서 상정되는 일부 착상들이 추구되었다: 양성 정상 체세포는 면역 체계에 의해 내성을 갖고, 예를 들면, 바이러스 감염의 결과로서, 이 세포가 신체에 대해 이질적인 단백질을 합성하면 신체가 면역 반응에 의해 정상 세포에 대해 반응한다. 이것의 이유는 MHC 분자가 외래 단백질로부터 기원하는 외래 웨티드를 제시하기 때문이다.

결과적으로, 면역 체계는 바람직하지 못하며 이질적인 무엇인가가 이 세포에 일어났음을 등록하는 것이다. APCs(이것들은 매크로파아지(macrophage), 수상 세포(dendritic cells), 랑게르ハン스 세포(Langerhans cells), B-세포 및 가능하게는 최근에 발견된 B-세포 및 매크로파아지 양자의 성질을 갖는 이표현형(biphenotypic) 세포를 포함한다; 문헌[Tykocinski et al., 1996])는 활성화되고, 새로운 특이적 면역이 유발되며 세포는 제거된다.

종양 세포는 당해 종양-특이 종양 항원을 인정하는 바와 같이 함유하지만 그들의 낮은 면역원성의 결과로 그것들이 면역 체계에 의해 간파되기 때문에 비효과적인 백신이다. 만약 종양 세포가 외래 단백질이 아니라 외래 웨티드로 차징(charging)된다면, 외래 웨티드에 부가하여, 세포 자신의 종양 항원은 이 세포에 의해 외래로 인지될 것이다. 그 의도는 웨티드를 이용한 이종화에 의해 종양 항원에 대한 외래 웨티드에 의해 유발되는 세포성 면역 반응을 유도하는 것이다.

종양 세포의 낮은 면역원성의 이유는 질(質)이 아니라 양의 문제일 것이다. 종양 항원으로부터 유래된 웨티드에 대하여, 이것은 그것이 MHC 분자에 의해 사실상 제시되지만 세포성 종양-특이적 면역 반응을 유발하기에는 너무 저농도에 있다는 것을 의미할 것이다. 따라서 종양 세포상의 종양-특이적 웨티드 수의 증가는 종양 세포의 이종화를 또한 유발할 것이고, 세포성 면역 반응을 유발할 것이다. 국제공개 WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031 및 WO 95/00159에 기재된 바와 같이, 종양 항원 또는 그것으로부터 유래된 웨티드를 그것을 당해 단백질 또는 웨티드를 암호화하는 DNA로 형질감염(transfection)시킴으로써 세포 표면상에 제시하는 것이 제안되었다.

독일 특허출원 P 195 43 649.0은 활성 성분으로서 하나 또는 그 이상의 웨티드로 차징된 종양 세포를 함유함으로써 웨티드의 컨텍스트에서 종양 세포가 환자의 면역 체계에 의해 외래로 인지되고 세포성 면역 반응을 유발하는 세포성 백신을 개시한다. 웨티드의 필수적인 특징은 그것들이 환자의 MHC-하플로타입에 대한 리간드라는 것이다. 웨티드는 따라서 그것들이 한편으로, "외래 웨티드" 또는 "이종 웨티드"일 수 있기 때문에, 즉 그것들은 환자의 세포에 의해 발현되는 단백질로부터 유래된 웨티드와 상이한 웨티드이기 때문에 환자의 면역 체계에 의해 외래로 인지된다. 또 다른 카테고리의 웨티드는 환자 세포에 의해 발현되는 종양 항원으로부터 유래된다. 이것들은 그것들이 환자의 종양 세포상의 동일한 웨티드의 농도보다 고농도로 백신의 종양 세포들상에 제시된다는 사실에 의해 면역원성의 증가를 일으킨다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은 면역조절 활성을 갖는 신규한 약제학적 조성물, 특히 백신을 제공하는 것이다.

독일 특허 출원 P 195 43 649.0에 개시된 세포성 백신의 개념을 발전시켜, 세포성 및/또는 체액성, 바람직하게는 병원체에 대한 전신적, 면역 반응 또는 항-종양 반응을 유발 또는 증강시키거나 자가면역 활성을 갖는 단백질에 대한 내성을 유발하기 위하여, 세포 컨텍스트에서 아니라 애쥬번트와 함께 면역조절 효과를 갖는 웨티드를 함유하는 약제학적 조성물이 본 발명의 범위내에서 개발되었다.

놀랍게도, 특정 애쥬번트, 예를 들면, 1965년으로 거슬러 올라가 세포내로의 단백질의 수송을 증가시키는 것으로 최초로 나타난, 폴리양이온(polyacations)(문헌[Ryser et al., 1965]; 문헌[Ryser et al., 1978]; 문헌[Shen et al., 1981])이 웨티드의 면역원성을 증가시킨다는 것이 밝혀졌다.

본 발명은 애쥬번트와 함께 면역조절 효과를 갖는 하나 또는 그 이상의 웨티드, 단백질 또는 단백질 절편을 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 애쥬번트가 치료되는 개체의 세포에 대한 웨티드 또는 단백질 또는 단백질 절편의 결합을 증가시키거나 웨티드의 세포내로의 침입을 촉진하고 웨티드 또는 단백질 또는 단백질 절편의 면역조절 효과의 증가를 일으키는 능력을 갖는 것을 특징으로 한다.

일반적으로, 단순화시키기 위하여, 상기에서 언급한 면역조절 효과를 갖는 웨პ티드, 단백질 또는 단백질 절편의 예는 이하 "웨პ티드"로 언급될 것이다. 용어 "웨პ티드"는 리간드에 대해 특별히 언급하지 않을 때에는 더 큰 단백질 절편 또는 웨პ티드가 유래된 단백질, 또는 세포 분해 산물을 또한 가리킨다.

용어 "면역조절 효과"는 한편으로, 세포성 및/또는 체액성, 바람직하게는 전신적, 면역 반응의 유발 또는 증강을 의미한다. 이 예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 백신으로 작용한다.

바람직한 예에서, 웨პ티드는 치료되는 개체에 의해 발현되는 적어도 하나의 MHC 분자에 대한 리간드이다.

인체 MHC 분자는 국제 협정에 따라 이하 HLA(인체 류코사이트 항원(Human Leucocyte Antigen))라 한다.

용어 "세포성 면역 반응"은 특히 세포독성 CD8-양성 T-세포 및 CD4-양성 헬퍼-T-세포의 생성 결과, 종양 세포 또는 병원체에 의해 공격받은 세포의 파괴를 일으키는 세포독성 T-세포 면역성을 의미한다.

표현 "체액성 면역 반응"은 종양 세포 또는 병원체로부터 유래된 구조물을 선별적으로 인지하고 결과적으로, 예를 들면, 보체(complement), ADCC(항체 의존적 세포독성(antibody dependent cytotoxicity)) 또는 식균작용(phagocytosis)과 같은 기타 체계들과 함께, 이들 종양 세포 또는 병원체에 의해 공격받은 세포의 파괴를 일으키는 면역글로불린의 생성을 의미한다.

백신에 함유된 웨პ티드는 항원으로부터 유래되거나, 또는 단백질의 경우, 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 야기하는 항원이다. 이것은 질병-유발제 또는 항원을 함유하는 종양 세포를 인지하는 T-세포 또는 기타 세포독성 효과 세포(cytotoxic effector cell), 및/또는 항체가 생성되는 것을 증명한다.

세균, 바이러스 및 기생체와 같은 질병의 병원체에 대한 면역화를 위하여, 당해 병원체 및 병원체들의 단백질을 구성하거나 그들로부터 유래된 단백질 또는 웨პ티드가 사용된다. 특히 이들 병원체의 높은 일반적 돌연변이율에 의해 영향을 받지 않는 단백질이 적합하다. 공개된 예는 HPV16/18(인체 파필로마 바이러스(Human Papilloma Virus); 문헌[Feltkamp et al., 1995]), 헤파티티스 B 바이러스 코어 항원(Hepatitis B Virus Core Antigen)(문헌[Vitiello et al., 1995]), 플라스모듐 베르게이(Plasmodium Berghei)(문헌[Widmann et al., 1992]), 인플루엔자 바이러스 핵단백질(influenza virus nucleoprotein) 및 헤파티티스 C 바이러스(hepatitis C virus)를 포함한다.

본 발명의 일례에서, 항-종양 반응을 유발하는 목적을 갖는, 단백질, 또는 종양 항원 또는 그 웨პ티드는 종양 항원으로부터 유래되고 그 약제학적 조성물은 종양 백신으로 사용된다. 이 경우에 있어서, 백신이 치료용으로 사용될 때, 그 웨პ티드는 환자의 종양 세포에 의해 발현되는 종양 항원으로부터 유래된다. 이들 종양 항원은 예를 들면, 너무 낮은 농도로 환자에 의해 발현되어 그 결과 종양 세포가 외래로 인지되지 못하게 되는 것들이다.

환자의 종양 항원은 표준 방법에 의해 진단 및 치료 계획을 수립하는 과정에서 결정되어질 수 있다: 종양 항원은 항체를 이용한 면역조직화학에 의해 용이하게 검출될 수 있다. 만약 종양 항원이 효소, 예를 들면, 티로시나아제(tyrosinase)라면, 그것들은 효소 분석에 의해 검출될 수 있다. 공지된 서열을 갖는 종양 항원의 경우, RT-PCR 법을 사용할 수 있다(문헌[Boon, T. et al., 1994]; 문헌[Coulie, P.G. et al., 1994]; 문헌[Weynants, P. et al., 1994]). 기타 검출방법들은 검출될 종양 항원에 대하여 특이성을 갖는 CTLs에 기초한 분석법들이다. 이들 분석법은 예를 들면, 문헌[Herin et al., 1987]; 문헌[Coulie et al., 1993]; 문헌[Cox et al., 1994]; 문헌[Rivoltini et al., 1995]; 문헌[Kawakami et al., 1995]에 의해 기재되었으며; WO 94/14459에 기재되어 있다; 이를 참조들은 또한 본 발명의 범위내에 적합한 다양한 종양 항원 및 그들로부터 유래된 웨პ티드 에피토프를 개시한다. 적합한 종양 항원의 예는 또한 문헌[Rosenberg, 1996] 및 문헌[Henderson and Finn, 1996]에 의해 최근 공개된 요약 논문에서 주어진다. 본 발명에서 사용될 수 있는 종양 항원에 대하여 본 발명은 어떠한 제한도 받지 않는다.

종양 항원 또는 종양 항원으로부터 유래된 웨პ티드를 함유하는 종양 백신은 치료용으로 뿐만 아니라 예방용으로도 사용될 수 있다. 예방적 용도를 위하여, 공통적으로 발생하는 종양 항원들의 대표들로부터 유래된 웨პ티드들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 종양 백신을 치료용으로 사용할 때, 환자의 종양 항원에 함유된 것으로 예측되는 하나 또는 그 이상의 웨პ티드가 사용된다.

본 발명에 따른 종양 백신은 자기 종양 세포에 기초한 세포성 백신에 비하여 세포성 백신을 생산하기에 비효율적인 종양 세포를 갖는, 질환의 상대적인 초기(단계 I 및 II)에 있는 환자에 대해서 조차 치료용으로 유용하다는 장점을 갖는다.

본 발명의 바람직한 예에서 세포성 면역 반응을 유발하는 목적을 갖는, 웨პ티드는 백신접종되는 환자의 MHC-I 또는 MHC-II-서브타입에 해당한다: 웨პ티드는 따라서 그것이 MHC-분자에 결합하는 것을 확실하게 하는 서열을 갖거나 함유한다.

또 다른 예에서, 종양 백신으로서의 형태의 약제학적 조성물은 또한 면역자극 효과를 갖는 폴리웨პ티드, 특히 사이토카인을 함유한다. 본 발명의 바람직한 예에서, 사용되는 사이토카인은 인터류킨 2(IL-2) 또는 GM-CSF, 예를 들면, 약 1000 유닛의 용량으로; 사이토카인의 다른 예들은 IL-4, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , TNF- α 및 그들의 조합, 예를 들면, IL-2+IFN- γ , IL-2+IL-4, IL-2+TNF- α 또는 TNF- α + TNF- γ .

본 발명의 바람직한 예에서 약제학적 조성물은 자가면역-유도 질환을 유발하는 단백질 또는 그 절편에 대한 내성을 부여하는데, 즉 자가면역 질환을 치료하는데 기여한다. 본 발명의 예에서 사용되는 웨პ티드는 자가면역 질환을 유발하는 단백질로부터 유래된다.

펩티드가 원래의 단백질(종양 항원 또는 병원체의 단백질)의 부분에 펩티드가 "원래의 항원"으로 인지되는 정도로 실질적으로 일치하는 본 발명의 종양 백신으로서 또는 병원체에 대한 백신으로서의 적용과 반대로, 본 발명이 자가면역 질환의 치료에 적용되는 경우, 특히 일부 결정적 측면에서 원래의 단백질의 아미노산 서열과 상이한 펩티드가 사용된다. 이들 펩티드는 그들의 앵커 위치의 결과 실제로 MHC-분자에 결합하지만, 그것들은 이를 펩티드가 활성화된 특이적 T-세포를 다시 스위치 오프(switch off)시키는 길항제로서 작용하도록 하는 서열내에 돌연변이를 갖는다(문헌[Kersh and Aleen, 1996]).

적당한 펩티드 길항제는 바이러스에서 발견된 "자연" 길항제 및 체계적 연구에 의해, 예를 들면, 펩티드 라이브러리를 스크리닝함으로써, 발견된 길항제이다.

펩티드 길항제의 예는 미엘린(myelin) 염기성 단백질에 대해 특이적인 T-세포를 스위치 오프시킬 수 있는 펩티드이다; 이들은 동물 실험에서 그들의 유효성에 대해 시험되었다(Brocke 등, 1996).

세포성 면역 반응을 유발하는 것으로 추측되는 펩티드는 MHC-분자와 결합할 수 있어야만 한다. 환자에서 면역 반응이 유발되기 위하여, 치료되는 개체는 따라서 그들의 목록(repertoire)에 상응하는 HLA-분자를 가져야만 한다. 환자의 HLA-서브타입의 결정은 따라서 세포성 면역 반응을 얻기 위한 관점에서, 환자로의 펩티드의 효과적인 투여를 위한 가장 중요한 필수조건 중의 하나를 구성한다.

환자의 HLA 서브타입은 마이크로-림프독성 시험(micro-lymphotoxicity test)(문헌[Practical Immunol., 1989])과 같은 표준 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 이 시험은 항혈청 또는 래빗 보체(rabbit complement)(C)의 존재하에 특이적 HLA 분자에 대한 모노클로날 항체를 갖는 환자의 혈액으로부터 최초 분리된 림프구를 혼합하는 원리에 기초한 것이다. 양성 세포는 용균(lysis)되어 지시약을 흡수하는 반면, 비손상 세포는 염색되지 않은 상태로 남는다.

RT-PCR은 또한 환자의 HLA-I 또는 HLA-II-하플로타입을 결정하는데 사용될 수 있다(문헌[Curr. Prot. Mol. Biol. Chapters 2 및 15]). 이것을 행하기 위하여, 환자로부터 혈액을 채취하고 RNA를 그것으로부터 분리한다. 처음에 이 RNA는 역전사되어 환자로부터 cDNA의 형성에 이르게 한다. cDNA는 특정 HLA-하플로타입을 나타내는 DNA 절편의 증폭을 특이적으로 일으키는 프라이머 쌍을 이용하는 중합 효소 연쇄반응에 대한 매트릭스로 사용된다. 만약 아가로스 겔 전기영동 후 DNA 밴드가 나타나면, 환자는 상응 HLA 분자를 발현한다. 밴드가 나타나지 않으면, 환자는 그것에 대해 음성이다.

HLA-분자에 의해 본 발명에 따라 사용되는 펩티드의 정의는 그들의 앵커 아미노산 및 그들의 길이의 관점에서 그들을 한정한다; 한정된 앵커 위치 및 길이는 그 펩티드가 당해 HLA 분자의 펩티드 결합 포크(peptide binding fork)에 적합하다는 것을 확실하게 한다. 이것은 면역 체계가 자극되고 만약 종양 항원으로부터 유래된 펩티드가 사용되었다면, 세포성 면역 반응이 환자의 종양 세포에 대하여 유발될 것이라는 것을 의미한다.

본 발명의 목적에 적합한 펩티드는 광범위하게 입수 가능하다. 그들의 서열은 자연적으로 발생하는 면역원성 단백질 또는 그 세포 분해 산물, 예를 들면, 바이러스 또는 세균 펩티드로부터 또는 종양 항원으로부터 유래될 수 있을 것이며, 자가면역 질환을 유도하는 단백질로부터 유래된 펩티드에 대한 길항제일 수 있다.

적합한 펩티드는 예를 들면, 문헌으로부터 공지된 펩티드 서열을 기초로 하여 선택될 수 있다.

세포성 면역 반응을 유발하기 위하여, 펩티드는 다양한 HLA-서브타입 분자의 결합 포크에 맞는, 상이한 HLA 모티프를 위하여, 문헌[Rammensee et al., 1993], 문헌[Rammensee et al., 1995], 문헌[Falk et al., 1991]에 의해 기재된 펩티드로서, 다양한 기원의 면역원성 단백질로부터 유래된 펩티드에 의해 한정될 수 있다. 면역원 활성을 갖는 단백질의 일부 서열을 갖는 펩티드에 대해, 어떤 펩티드가 이미 공지되거나 HLA-특이적 요구조건을 고려한 서열 비교에 의해, 가능하게는 여전히 확립된 폴리펩티드 서열에 의해 적절한 후보인지를 확립하는 것이 가능하다. 적합한 펩티드의 예는 예를 들면, 문헌[Rammensee et al., 1993], 문헌[Falk et al., 1991], 및 문헌[Rammensee et al., 1995] 및 WO 91/09869(HIV 펩티드), 종양 항원으로부터 유래된 펩티드가 특히 국제공개특허 WO 95/00159 및 WO 94/05304에 기재되어 있다. 이로써 펩티드와 관련하여 이들 참조문헌과 그곳에 인용된 논문의 내용을 참조로 한다. 바람직한 후보는 면역원성이 이미 증명된 펩티드, 즉, 바이러스 또는 세균 단백질과 같은 공지의 면역원으로부터 유래된 펩티드이다.

MHC-I 또는 MHC-II 분자의 결합 포크에 맞는 원래 펩티드, 즉 자연 단백질로부터 변화되지 않도록 유래된 펩티드를 사용하는 대신에, 이들 변이가 MHC 분자에 대한 결합 친화성 및 T-세포 수용체를 자극하는 능력을 구성하는 펩티드의 유효한 면역원성을 손상시키지 않을 뿐 아니라 증진시키는 경우, 원래 펩티드 서열에 기초하여 특정화된, 앵커 위치 및 길이에 관한 최소 요구조건을 사용하여, 요구되는 바와 같이 변이를 수행하는 것도 가능하다. 이 경우에, 따라서, MHC-I 분자에의 결합에 관한 요구조건에 따라 설계된 합성 펩티드가 본 발명에 따라 사용된다. 따라서, 예를 들면, H2-K^d-리간드 Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile(LFEAIEGFI)로부터 출발하여 서열 Phe Phe Ile Gly Ala Leu Glu Glu Ile(FFIGALEEI)의 펩티드를 수득하는 방식으로 앵커 아미노산이 아닌 아미노산을 변화시키는 것이 가능하다; 더욱이, 9번 위치의 앵커 아미노산 Ile는 Leu으로 교체될 수 있다. MHC-I 또는 MHC-II-리간드의 에피토프 또는 그 변이체의 결정은 예를 들면, 문헌[Rammensee et al., 1995]에 의해 기재된 원리를 사용하여, 수행될 수 있다. 펩티드의 길이는 바람직하게는 필요한 앵커 아미노산과 함께, MHC-I 분자에 결합하는데 요구되는 8 내지 10 아미노산의 최소 서열에 상응한다. 9 아미노산을 초과하는 MHC-II-결합 모티프는 앵커 위치에 고도의 축퇴를 갖는다. MHC-II 결합 모티프, 그를 기초로 하여, 펩티드 서열에서의 변이의 신속한 분석을 허용하는 방법들이 MHC-II 분자의 X-레이 구조 분석으로부터 출발하여 개발되어 왔다(문헌[Rammensee et al., 1995], 및 그곳에 인용된 원 문헌).

원한다면, 펩티드는 또한 이 연장이 MHC 분자와 결합하는 능력을 저해하지 않는 경우, 즉 연장된 펩티드가 최소 서열로 세포 수준에서 가공될 수 있는 경우, C-및/또는 N-말단에서 연장될 수 있다. 본 발명의 일례에서, 펩티드는 음전하로 하전

된다. 이 예에서, 펩티드는 음전하로 하전된 아미노산으로 연장될 수 있거나, 음전하로 하전된 아미노산이 펩티드로, 바람직하게는, 특정 CTLs에 의한 인지를 위하여 또는 앵커 아미노산으로서 필수적이지 않은 위치에서, 폴리리신과 같은 폴리양이온성(polycationic) 애쥬번트에 대한 펩티드의 정전기적 결합을 이루기 위하여, 삽입될 수 있다.

본 발명의 일례에서, 항원은 펩티드 형태 뿐만 아니라 단백질 또는 단백질 절편 또는 단백질로서 또는 단백질 절편의 혼합물로서 사용된다.

본 발명의 범위내에서, 환자 APCs의 적용 후, MHC-분자와 맞는 펩티드로 가공되는 것이 확실한 더 큰 단백질 절편 또는 전체 단백질도 적당하다.

단백질은 가공 후 수득된 절편이 유래된 항원 또는 종양 항원이다. 이 예에서, 애쥬번트는 종양 항원 또는 절편을 갖는 세포, 특히 주상 세포 또는 매크로파아지와 같은 APCs의 차징("트랜스로딩(transloading)")을 가능하게 하거나 증진시키는데 기여한다. 흡수된 단백질 또는 단백질 절편은 따라서 세포에 의해 가공되고 그런 다음 MHC 컨텍스트에서 면역 효과 세포에 대해 제시되고 따라서 면역 반응을 유발시키거나 증강시킨다(문헌[Braciale and Braciale, 1991]; 문헌[Kovacsovics Bankowski and Rock, 1995]; 문헌[York and Rock, 1996]).

단백질 또는 더 큰 단백질 절편이 항원으로 사용되는 본 발명의 예는 단백질이 수많은 절편으로 가공되고 따라서 펩티드의 "알맞은 형태"에 관하여 더 큰 변이성이 있기 때문에, HLA-타입에 대해 덜 의존적이라는 장점을 갖는다.

만약 단백질 또는 단백질 절편이 투여되면, 가공된 최종 산물의 동정은 화학 분석(가공된 절편의 애드민 분해 또는 질량 분광분석; 문헌[Rammensee et al., 1995]에 의한 요약 논문 및 그곳에 인용된 원 문헌 참조) 또는 생물학적 분석(가공 절편에 대해 특이적인 T-세포를 자극하는 APCs의 능력)에 의해 증명될 수 있다.

원론적으로, 세포성 면역 반응을 생성하는데 적합한 펩티드 후보는 몇몇 단계에서 선별된다: 일반적으로, 후보는 첫째 MHC 분자에 대한 그들의 결합능에 대해, 바람직하게는 일련의 시험에 의해 시험된다.

하나의 적합한 조사방법은 예를 들면 문헌[Stuber et al., 1994] 및 문헌[McIntyre et al., 1996]에 의해 기재된 바와 같이, 공(空) MHC-분자를 안정화시키는 펩티드의 능력에 기초한다. 펩티드는 당해 MHC-분자를 발현할 수 있지만 유전적 결합 때문에 MHC-컨텍스트에서 내생성 펩티드에 결합하지 못하는 세포에 대해 적용된다. 이 타입의 적당한 세포주는 RMA-S(마우스) 및 T2(인체) 및 그 형질감염 변이체이다. 그러면 당해 펩티드에 의해 안정화된 MHC-분자만이 바람직하게는 플로우 사이토메트리(flow cytometry)(문헌[Flow Cytometry, 1989]; 문헌[FACS Vantage TM User's Guide, 1994; CELL Quest™ User's Guide, 1994])에 기초한 FACS 분석에 의해 검출가능하다. 안정한 MHC 분자들은 적당한 항-MHC 항체 및 형광 염료, 예를 들면 FITC(풀루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate))로 표지된 제 2의(예를 들면, 폴리클로날) 항체로 검출된다. 플로우에서, 개개 세포는 특정 과장의 레이저에 의해 여기된다; 발산된 형광은 측정되고 세포에 결합된 펩티드의 양에 의존한다.

결합된 펩티드의 양을 결정하는 또 다른 방법은 문헌[Sette et al., 1994]에 의해 기재된 바와 같은, 스캣차드 블랏(Scatchard blot)이다. 예를 들면, 125 I로 표지된 펩티드가 이를 위하여 사용되고 다양한 결정된 농도의 펩티드와 함께 4°C에서 분리 또는 재조합적으로 제조된 MHC 분자와 함께 반대 배양된다. 펩티드의 비-특이적 상호작용을 결정하기 위하여, 과량의 비표지 펩티드를 일부 표본에 첨가하여 표지된 펩티드의 비-특이적 상호작용을 방지한다. 그런 다음 비-특이적으로 결합된 펩티드를 예를 들면, 젤 크로마토그래피에 의해 제거한다. 그런 다음 결합된 펩티드의 양은 발산되는 방사성을 이용하는 섬광계수기에서 결정된다. 그렇게 하여 수득한 데이터는 표준적인 방법에 의해 평가된다.

본 발명의 범위내에서 사용될 수 있는 MHC/펩티드 상호작용을 특징화하는 방법, MHC-리간드의 분석 및 펩티드-결합 분석의 요약은 문헌[Rammensee et al., 1995]에 의해 제공된다.

제 2 단계에서, 양호한 결합 성질을 갖는 펩티드 후보는 그 면역원성에 대해 시험된다:

세포성 면역 반응의 유발은 예를 들면, 문헌[Current Protocols in Immunology, Chapter 3] 또는 문헌[Blomberg et al., 1993]에서 펩티드-특이적 CTLs를 검출함으로써 확인될 수 있다. 세포성 면역 반응 존재의 또다른 표시는 T-세포의 부재하에, 실험 동물에서 아무런 면역 반응이 없을 때(동물은 CD4- 또는 CD8- 세포를 제거한 항체로 처리함으로써 얻어짐)(문헌[Current Protocols in Immunology, Chapter 3]), 제공된다.

세포성 면역 반응은 또한 면역 동물에서 "지속형 과민증(delayed-type hypersensitivity(DTH))"을 검출함으로써 증명되어질 수 있다. 이 목적을 위하여, 펩티드는 마우스의 발바닥에 주사되고, 주사 위치의 부종(swelling)이 측정된다(문헌[Grohman et al., 1995; Puccetti et al., 1994]).

개체에 대해 외래 항원인 펩티드 또는 치료되는 개체에 의해 저농도로 발현되는 항원에 의한 체액성 면역 반응의 유도는 혈청내의 특이적 항체를 검출함으로써 결정될 수 있다. 혈청내의 항체 수준의 적당한 검출방법은 효소-결합 면역분석법(enzyme-linked immunoassay(ELISA))이다. 특이적 항체는 염색 반응에 의하여, 면역화에 사용된 펩티드에 결합된 후, 검출된다. 대체적 방법은 웨스턴 블랏이다. 이것에 있어서, 특이적 혈청 항체는 막상에 고정된 펩티드에 결합한다. 결합 항체는 염색 반응으로 다시 최종 검출된다(양 방법에 대한 참조: 문헌[Current Protocols in Immunology. Editors: Coligan et al., 1991]).

특히 예를 들면, 바이러스 기원의, 외래 항원을 이용한 면역화 후, 항체의 생성이 예측된다. 그러나 특이적 항체가 세포성 종양 항원으로부터 유래된, 돌연변이되거나 과량발현된 펩티드에 대해서도 형성될 수 있다는 것을 배제할 수 없다. 그러한

항체에 의한 종양 파괴는 예를 들면, 보체, 항체-의존적 세포독성(ADCC) 또는 매크로파아지에 의한 식균작용과 같은 면역 체계의 기타 성분에 의한 종양 세포에 대한 항체 결합 후 발생할 것이다(문헌[Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. Immunology, Churchill Livingstone]).

면역원 활성이 알려져 있지 않은 단백질로부터 유래된 웨პ티드에 의한 세포성 면역 반응의 유발은 예를 들면, 문헌[Rivoltini et al., 1995] 또는 문헌[Kawakami et al., 1994a]에 의해 기재된 바와 같이, 시험될 수 있다. 이 목적을 위하여, MHC-분자에 의해 제시된 원하는 웨პ티드를 인지할 수 있는 T-세포를 필요로 한다. 종양 세포로부터 기원된 웨პ티드의 경우, 상응하는 T-세포는 문헌[Kawakami et al., 1994b]에 의해, 기술된 바와 같이 종양-침투 림프구(tumour-infiltrating lymphocytes(TILs)로부터 수득된다; 외래 웨პ티드의 경우, 이 종류의 T-세포는 말초 혈액으로부터 유사하게 수득된다. T-세포는 당해 웨პ티드와 혼합된 T2(문헌[Alexander et al., 1989]) 또는 RMA-S(문헌[Karre et al., 1986])과 같은 세포주와 함께 배양되고, 그것이 면역원성 웨პ티드라면 그것들을 용균한다.

MHC-결합 웨პ티드 후보를 면역원성에 대해 시험하기 위한 또 다른 가능한 방법은 T2 세포에 대한 웨პ티드의 결합을 조사하는데 있다. 그러한 방법의 하나는 TAP 웨პ티드 수송 기작에서 결합이 있고 MHC 컨텍스트에서 제시된 웨პ티드에 대해 적용될 때만 안정한 MHC-분자를 제시하는 T2 세포(문헌[Alexander et al., 1989]) 또는 RMA-S-세포(문헌[Karre et al., 1986])의 특이적 성질에 기초한다. HLA 유전자, 예를 들면, HLA-A1 및/또는 HLA-A2 유전자로 안정하게 형질감염된 T2 세포 또는 RMA-S 세포는 그 시험을 위하여 사용된다. 세포가 면역 체계에 의해 외래로 인지되는 것과 같은 방식으로 HLA 컨텍스트에서 제시됨으로써, 우수한 HLA-리간드인 웨პ티드와 혼합되면, 이들 웨პ티드는 세포 표면상에 HLA 분자의 다양 출현을 야기한다. 예를 들면, 모노클로날 항체에 의한, 세포 표면상의 HLAs의 검출은 적당한 웨პ티드의 동정을 가능하게 한다(문헌[Malnati et al., 1995]; 문헌[Sykulev et al., 1994]). 여기에서 또한, 우수한 HLA-결합능을 갖는 것으로 알려진 표준 웨პ티드가 적절하게 사용된다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물의 최광의 가능한 적용을 위하여, 각각이 다른 MHC-분자, 바람직하게는 가장 일반적으로 발생하는 두세개의 MHC-서브타입의 하나에 결합할 수 있는, 수개의 웨პ티드 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 이를 하플로타입에 결합할 수 있는 웨პ티드 혼합물에 기초한 백신은 광범위한 군집의 환자를 커버하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 일례에서, 백신은 상이한 서열의 수많은 웨პ티드를 가질 수 있다. 이 경우에 있어서, 사용되는 웨პ티드는 한편, 그들이 상이한 HLA 서브타입에 결합할 수 있다는 점에서 상이할 수 있다. 이 방식으로, 환자 또는 더 큰 그룹의 환자들의 수개 또는 모든 HLA 서브타입을 검출하는 것이 가능하다.

또다르게는, 가능하게는 부가적으로, 사용 웨პ티드에 대한 가변성은 일정 HLA 서브타입에 결합하는 웨პ티드가 예를 들면, 동일한 병원체의 상이한 단백질 또는 상이한 병원체로부터 유래되어, HLA 결합에 결정적이지 않은 서열에 있어서 상이하다는 사실에 있을 것이다. 이 종류의 가변성은 면역 반응의 자극을 강화시키거나 다양한 병원체에 대한 면역성을 부여할 것으로 기대된다.

본 발명에 따른 조성물의 유효 웨პ티드의 양은 광범위하게 변화할 수 있다. 웨პ티드의 양은 예를 들면, 투여방법 및 사용되는 특정 제제에 의존한다. 웨პ티드의 투여량은 복용량 당 약 1.0 μ g 내지 약 5000 μ g, 일반적으로 1.0 μ g 내지 약 1000 μ g, 특히 약 10 μ g 내지 약 500 μ g일 수 있다. 일회 또는 수회 투여될 수 있으며, 만약 수회 투여된다면, 바람직하게는 적어도 3회 투여된다. 치료 용도를 위하여, 특히, 웨პ티드는 환자의 특이적 면역 상태 또는 질병의 진전에 의해 결정되는 원하는 기간의 시간에 걸쳐 간격을 두고(예를 들면, 1주에 1회 내지 1개월에 1회) 투여될 수 있다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물은 또한 엑스 비보(ex vivo)에서 사용될 수 있다: 가능한 엑스 비보 투여의 원리는 APCs, 예를 들면 수상 세포를 엑스 비보에서 배양하고, 본 발명에 따른 조성물과 함께 세포 배양물을 배양하고 이제 MHC-컨텍스트에서 웨პ티드를 제시하는 APCs를 치료되는 개체에 투여하는데 있다. 예를 들면 문헌[Porgador and Gilboa, 1995]; 문헌[Young and Inade, 1996]에 의해 기재된 바와 같은, 문헌으로부터 알려진 방법이 이 유형의 적용에 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 조성물에 함유된 애쥬번트는 세포로의 웨პ티드의 진입을 보조하거나 환자의 세포에 웨პ티드를 결합시키고 웨პ티드의 면역원성을 증가시키는 성질을 갖는다. 애쥬번트는 예를 들면, 웨პ티드가 투과할 것으로 예상되는 표적 세포의 막을 이 방법으로 웨პ티드가 세포로 운반되는 것을 가능하게 하기 위하여 적어도 단시간 동안 투과성으로 만든다. 전기 음성의 웨პ티드와 폴리아이온성 애쥬번트간의 정전기적 상호작용에 의해, 웨პ티드가 애쥬번트에 결합하는 것이 바람직하나, 절대적으로 필요한 것은 아닐 것이다. 세포로의 웨პ티드의 진입은 또한 애쥬번트가 그것을 투과성으로 만드는 즉시, 웨პ티드가 그곳에 대한 공간적 근접성을 기초로 하여 세포막을 관통할 수 있다는 사실에 의해 달성될 수 있다. 애쥬번트의 영향은 또한 세포로의 흡수에 결정적이며 웨პ티드의 세포로의 식균작용 또는 액체 수송(음(飲)작용(pinocytosis))을 유발하는 세포 표면상 웨პ티드의 농도를 증가시킨다는 사실에 기초할 수 있다.

놀랍게도, 애쥬번트의 존재는 웨პ티드의 세포로의 흡수를 증가시킬 뿐만 아니라 MHC-분자에 의한 웨პ티드의 정확한 제시에 기인하는 것으로 보이는, 웨პ티드의 면역조절 효과의 증강을 일으킨다.

일례에서, 애쥬번트는 예를 들면, 이론적으로 모두 세포로 핵산을 수송하는데 사용되는 막-투과화 물질(membrane-permeabilising substances)이 될 수 있다; 이와 관련하여, 그러한 물질을 언급하고 있는 WO 93/19768을 참조로 한다.

본 발명의 바람직한 예에서, 애쥬번트는 염기성 폴리아미노산 또는 염기성 폴리아미노산의 혼합물이다.

폴리아미노산의 중합도는 광범위하게 변화할 수 있다. 그것은 약 5 내지 약 1000, 더욱 특히 약 15 내지 500일 수 있다.

바람직하게는, 폴리아르기닌이 본 발명의 범위내의 애쥬번트로 사용된다.

본 발명의 목적을 위한 또 다른 바람직한 애쥬번트는 폴리리신이다.

기타 적절한, 특히 폴리양이온성인, 유기 화합물(염기성 폴리아미노산)의 예는 폴리오르니틴, 히스톤, 프로타민, 폴리에틸렌이민 또는 그 혼합물이다.

애쥬번트는 세포성 리간드(예를 들면, 트랜스페린(transferrin), gp120, LDL(저밀도 지단백질), α -페튜인(α -fetuin), EGF(Epidermal Growth Factor) 웨티드 또는 WO 93/07283에서 수용체-매개 엔도시토시스(receptor-mediated endocytosis)에 의한 DNA의 수송을 위하여 기재된 기타 세포성 리간드의 대표), 만노스 또는 퓨코스(fucose)와 같은 탄수화물 잔기(매크로파아지를 위한 리간드) 또는 세포 표면 단백질에 대한 항체 또는 항체 절편과 임의로 결합된다. 임의로, 세포성 리간드와 임의로 결합된, 폴리아르기닌 또는 폴리리신과 같은 폴리양이온성 애쥬번트는 DNA와의 복합체의 성분으로서, 예를 들면 플라스미드 DNA의 형태로 발생한다. DNA는 기능적 웨티드를 암호화하는 서열이 없을 수도 있으며, 이 경우 DNA는 공(空) 플라스미드이다.

본 발명의 일례에서, DNA는 면역조절 단백질, 특히 IL-2, 인터페론 및 GM-CSF와 같은 사이토카인을 암호화하는 서열을 함유한다.

염기성 폴리아미노산에 의해 매개되는 웨티드 수송 기작을 연구하기 위하여, 락테이트 디하이드로게나아제(lactate dehydrogenase(LDH))의 방출을 본 발명의 범위내에서 측정하였다. 폴리아르기닌-처리 표본에서 방출 LDH의 농도는 사실상 검출불가능하였던 반면, 폴리리신으로의 배양후 고 LDH 농도가 세포 상등액에서 검출되었다. 이들 결과는 폴리리신의 효과가 세포막의 투과화에 기인하는 것이 분명하다는 결론에 이르게 한다.

이론에 구속되는 것을 원치 않으면서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 효과는 애쥬번트의 도움으로 웨티드가 표적 세포를 투과하거나 피부의 내피 부위에 발생하는 세포에 결합한다는 사실에 있는 것으로 보인다. 표적 세포는 예를 들면 웨티드가, 임의로 가공 후, B- 및/또는 T-세포에 제시되는 것에 의한 항원-제시 세포를 포함한다. 표적 세포의 예는 매크로파아지, 섬유아세포(fibroblasts), 케라티노사이트(keratinocytes), 랑게르한스 세포, 수상 세포 또는 B-세포이다.

본 발명의 범위내에서, 연구를 수행함으로써 염기성 폴리아미노산 또는 폴리양이온의 글리코실화 형태의 존재하에 소 웨티드가 매크로파아지-유사 항원-제시 세포(APCs)에 의해 큰 정도로 흡수되는지 여부를 밝혀내고자 하였다. 사용된 당 찬기에 관하여, 그것들은 수용체 매개 엔도시토시스를 사용하여 매크로파아지에 의해 흡수되는 것이 알려져 있다(APCs에 관하여, 인 비보(*in vivo*)에서 그것들은 웨티드를 흡수하고 기타 면역 세포를 제시하는 세포 타입을 이루는 것이 추정된다. APCs 엔도시토스가 시험 애쥬번트의 존재하에 웨티드 항원의 양을 증가시키는 것을 나타내는 인 비트로 시험의 결과는 애쥬번트가 또한 백신에 함유된 표적에 대한 전체적인 더욱 강력한 면역 반응에 이르게 하는, 웨티드의 세포독성 효과 세포에 대한 웨티드의 제시의 강화 및 그의 활성화에 적합하다는 표시이다).

사용되는 애쥬번트는 또한 임의로 상기한 애쥬번트에 부가하여, 입자 형태의 성분이 될 수 있다. 입자는 이론적으로 생리적으로 허용가능하고 세포에 진입하기에 충분한 소입자가 생산된다면, 웨티드 합성을 위한 칼립 물질을 생산하는데 사용되는 모든 물질, 예를 들면 실리카겔 또는 합성수지가 될 수 있다. 입자 형태의 애쥬번트를 사용하여 세포에 흡수되는 것을 더욱 용이하게 하는, 고 국부 농도의 웨티드를 얻는 것이 가능하다.

사용되는 애쥬번트의 타입, 세포성 리간드를 갖는 그의 변형의 적합성 또는 DNA의 첨가 및 웨티드에 관련한 애쥬번트의 필요량은 실험적으로 결정될 수 있는 바, 예를 들면 이론적으로는 광범위하게 변화될 수 있는 선택된 애쥬번트에 대한 웨티드의 특정 비율은 적정(titration)에 의해 결정될 수 있다.

이론상 애쥬번트는 많은 단계로, 웨티드와 동일한 방법에 의해 시험될 수 있다:

APCs에 대한 웨티드의 결합 및/또는 내재화를 증가시키는 애쥬번트의 능력은 예를 들면, 제 1 단계에서 APCs를 형광-표지된 웨티드 및 애쥬번트와 함께 배양함으로써 측정될 수 있다. 애쥬번트에 의해 증가된 흡수 또는 결합은 쓰로우플로우 사이토메트리(throughflow cytometry)에 의해 웨티드 자체와 혼합된 세포와 비교함으로써 결정될 수 있다.

제 2 단계에서, 시험되는 애쥬번트는 그것의 존재가 APCs에 대한 웨티드의 제시를 일으키는지 여부 및 그 정도를 알아보기 위하여 인 비트로에서 조사될 수 있으며, 상기 웨티드를 시험하는데 사용되는 방법은 세포상에서 MHC-농도를 측정하는데 사용될 수 있다.

애쥬번트의 효율을 시험하는 또다른 가능한 방법은 인 비트로 모델 체계를 이용하는 것이다. 여기에서, APCs를 애쥬번트 및 웨티드와 함께 배양하고 사용한 웨티드를 특이적으로 인지하는 T-세포 클론의 상대적 활성화를 측정하였다(문헌[Coligan et al., 1991; 문헌[Lopez et al., 1993]])

제제의 효율은 또한 면역 동물에서 지속성 과민증(DTH) 반응을 결정함으로써 세포성 면역 반응에 의해 결정될 수 있다.

최종적으로, 제제의 면역조절 효과는 동물 실험에서 측정된다. 면역 세포에 의해 인지되는 웨티드 서열을 이용하여, 확립된 종양 모델을 사용할 수 있다. 웨티드 및 애쥬번트를 함유하는 백신을 애쥬번트에 대한 웨티드의 양 및 총량에 대하여 가변적인 비율로 투여한다. 종양 성장으로부터의 보호는 종양 백신의 유효성의 측정이다.

약제학적 조성물은 비경구로, 국소로, 경구 또는 국부로 투여될 수 있다. 그것은 바람직하게는 비경구로, 예를 들면 피하, 내피 또는 근육내 경로로, 표적 세포로서 특히 피부 세포(케라티노사이트, 섬유아세포), 수상 세포, 랑게르한스 세포 또는 매크로파아지에 도달하기 위하여, 바람직하게는 피하 또는 내피 경로로 투여된다. 종양 치료의 범위내에 종양 백신은 또한 종양내 경로에 의해 투여될 수 있다.

비경구 투여를 위한 본 발명에 따른 조성물은 일반적으로 허용 가능한 담체, 바람직하게는 수성 담체내의 웨პ티드 및 애쥬번트의 용액 또는 혼탁액 형태이다. 사용될 수 있는 수성 담체의 예는 물, 완충수, 식염수(0.4%), 글리신 용액(0.3%), 히아루론산(hyaluronic acid) 및 유사한 공지의 담체를 포함한다. 수성 담체와 별도로 디메틸설폐사이드, 프로필렌글리콜, 디메틸포름아미드 및 그 혼합물과 같은 용매를 사용하는 것도 가능하다. 조성물은 또한 정상적인 삼투암 및/또는 효과적인 동결건조를 이루기 위하여 완충 물질 및 무기염과 같은 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 함유할 수 있다. 그러한 첨가제의 예는 나트륨 및 칼륨염, 예를 들면 염화물 및 인산염, 슈크로스, 글루코스, 단백질 가수분해물, 텍스트란, 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리에틸렌글리콜이다. 조성물은 통상적인 방법, 예를 들면 멸균 여과에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 이 형태로 직접 따르거나(decant) 동결건조되고 사용전에 멸균수와 혼합될 수 있다.

일례에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 예를 들면 피부 또는 경피 적용을 위한 국소 제제의 형태이다. 약제학적 조성물은 예를 들면, 표준 연고제 DAB 8(50% PEG 300, 50% PEG 1500)과 같이, 예를 들면, 담체로서 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 갖는, 연고제로서, 또는 유액으로서, 특히 임의로 첨가된 리포좀을 갖는, 특히 수중유 또는 유중수에 기초한 마이크로에멀젼으로서, 폴리아크릴산 또는 폴리아크릴아미드(Dolobene^R, 머클)에 기초한 하이드로겔의 형태를 띨 수 있다. 적절한 투과 가속화제(동조인자(entraining agents))는 피롤리돈, 예를 들면, 2-피롤리돈, N-메틸-2-피롤리돈, 2-피롤리돈-5-카르복실산 또는 생분해성 N-(2-하이드록시에틸)-2-피롤리돈 및 그 지방산 에스테르, 도데실우레이, 1,3-디도데실우레이 및 1,3-디페닐우레이와 같은 우레이 유도체, 테르펜(terpene), 예를 들면 D-리모넨(D-limonene), 멘톤(menthone), a-테르페놀(a-terpinol), 카볼, 리모넨 옥사이드(limonene oxide) 또는 1,8-시네올(1,8-cineol)뿐만 아니라, 디메틸설폐사이드(DMSO) 또는 데실메틸설폐사이드(데실-MSO)과 같은 설폐사이드 유도체 및 트랜スク루톨(transcitol)(디에틸렌글리콜모노에틸에테르(diethyleneglycolmonoethyl ether))또는 사이클로텍스트린을 포함한다.

다른 제제는 예를 들면 비강 분무제로서 투여용 또는 흡입용 에어로졸이다.

본 발명에 따른 조성물은 또한 유액, 포음, 미셀, 불용성 단일층, 인자질 분산액, 라벨라 층 등의 형태를 띨 수 있는 리포좀에 의해 투여될 수 있다. 이것들은 웨პ티드를 그 표적인 특정 조직, 예를 들면 램프계 조직 또는 종양 조직으로 웨პ티드를 운반하기 위한 담체로 작용하여 웨პ티드의 반감기를 증가시킨다.

만약 본 발명에 따른 조성물이 국소 제제의 형태라면, 예를 들면, 제제가 흑색종에 대해 예방용으로 사용될 때, 예를 들면, 태양 보호 크림으로 작용하기 위하여, UV-흡수제를 함유할 수 있다.

당해 기술분야의 당업자는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences", 1990]과 같은 표준 작업에서 적절한 제제 및 애쥬번트를 발견할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1: 웨პ티드 KYQAVTTT을 이용한 비만세포종(mastocytoma) P815에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

도 2: 웨პ티드 SYFPEITHI를 이용한 비만세포종 P815에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

도 3: 웨პ티드 SYFPEITHI를 이용한 비만세포종 P815에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

도 4: 웨პ티드 혼합물을 이용한 흑색종 M-3에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

도 5: 국소 적용에 의한 흑색종 M-3에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

도 6: 흑색종 M-3 전이암에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

도 7: 웨პ티드 혼합물로의 백신접종 후 M-3 미세전이암을 갖는 마우스의 치료

도 8: 티로시나아제를 이용한 세포의 폴리리신-매개 차징

도 9: 치료용 모델에서 백신접종 후 T-세포의 활성화(M-3 세포에 대한 반응과 같은 백신접종 동물의 자라 세포로부터의 IFN-γ 방출)

도 10: 인플루엔자 누클레오캡시드 웨პ티드 ASNENMETM 및 애쥬번트로서의 퓨코실화 폴리리신에 의한 항바이러스 면역성의 유도(CTL 활성화)

도 11: 염기성 폴리아미노산에 의한 APCs에 대한 웨პ티드 결합의 강화

도 12: 염기성 폴리아미노산에 의한 세포막의 투과화(세포의 폴리리신 또는 폴리아르기닌 처리 후 LDH 방출)

도 13: 폴리아르기닌에 의한 웨პ티드의 내재화

도 14: 항원-제시 콜수 세포로의 웨პ티드의 수송

도 15: 폴리양이온성 폴리아미노산 및 히스톤에 의한 항원-제시 세포로의 웨პ티드의 수송의 증가

도 16: 염기성 아미노산의 중합 정도의 함수로서의 수송 효율

도 17: 저분자량의 폴리아르기닌을 이용한 펩티드의 수송

도 18: 펩티드 차징의 함수로서의 수송 효율에 대한 영향

실시예

하기하는 실시예에서, 다르게 언급하지 않는 경우 하기 재료 및 방법을 사용하였다.

A) 세포

a) 세포주

쥐(murine) 흑색종 세포주 클로드만(Cloudman) S91(클론 M-3; ATCC No. CCL 53.1), 비만세포종 세포주 P815(ATCC No. TIB 64) 및 모노사이트 매크로파아지 세포주 P388D1(ATCC TIB 63)을 ATCC로부터 수득하였다. 10% FCS, 2mM L-글루타민 및 20 μ g/ml의 젠타마이신이 보충된 고 글루코스 함량을 갖는 DMEM 배지(고 글루코스 DMEM, 라이프 테크놀로지)에서 세포를 배양하였다. 마이코플라스마(mycoplasma) 오염의 부재에 대해 세포를 보편적으로 시험하였다(PCR-마이코플라스마 검출 키트, 스트라타진).

쥐 세포주 RMA/S(쥐 림프종)는 문헌[Karre et al., 1986] 및 문헌[Ljunggren et al., 1990]에 의해 기재되었다.

b) 골수로부터의 항원-제시 세포

첫째로, DBA/2 마우스로부터의 대퇴골을 헹구었다. 200유닛/ml의 쥐 GM-CSF(문헌[Li et al., 1989; Genzyme, Cambridge, MA, USA])의 존재하에 10% FCS, 5% 말 혈청, 2mM L-글루타민 및 20 μ g/ml의 젠타마이신을 함유하는 고 글루코스 DMEM 배지에서 골수 세포를 배양하였다. 최초 5일 동안 배지의 3분의 2를 24시간 마다 교체하여 비부착 과립구 및 세포를 제거하였다(문헌[Inaba et al., 1992]). PBS/5mM EDTA로의 배양에 의해 8 내지 10일 사이에 부착 및 약하게 부착된 세포를, 8-웰 현미경 슬라이드(엔유엔시, 로스킬드, 덴마크)상에서, 웨л당 3x10⁴세포의 세포 밀도로 수확하였다. 90% 이상의 세포가 항체 F4/80(엔도젠, 캠브리지, MA, USA)와 양성 반응을 나타내었다.

B) 펩티드 합성

Fmoc 방법(HBTU 활성화, FastmocTM, 스케일 0:25mmol)을 사용하여 고체 상으로서 텐타겔(TentaGel) S PHB(알에 피피, 투빈젠)를 사용하여 펩티드 합성기(피드백 모니터를 갖는 모델 433 A, 어플라이드 바이오시스템, 포스터 시티, 캐나다)에서 합성하였다. 1M TEAA, pH 7.3에서 펩티드를 용해시키고 Vydac C 18 칼럼상의 역 크로마토그래피에 의해 정제하였다. MAT 레이저매트(피니칸, 쎈 조스, 캐나다)상의 플라이트 타임 매스 스펙트로메트리(flight time mass spectrometry)에 의해 서열을 확인하였다.

C) 사용 펩티드의 목록

펩티드명	서열	관련 항원	단백질에서 아미노산 넘버링	MHC-하플로타입
kpep117	SYFPEITHI	티로신-키나제 JAK1	355-363	H2-K ^d
kpep118	KYQAVTTTL	Tum-P198	14-22	H2-K ^d
kpep162	GPPHSNNFGY	Tum-P35B	4-13	H2-D ^d
kpep163	ISTQNHRAL	P91A	12-20	H2-L ^d
kpep164	LPYLGWLVF	P815	35-43	H2-L ^d
kpep143	RYAEDYEEL	trp-1		H2-K ^d
kpep145	PYLEQASRI	티로시나아제		H2-K ^d
kpep146	YYVSRDTLL	티로시나아제		H2-K ^d
kpep150	YYSVKKTFL	trp-1		H2-K ^d
	ASNENMETM	인플루엔자 누클레오캡시드 펩티드		H2-K ^b

펩티드 혼합물:

M-3 흑색종 백신용 펩티드 혼합물 I: kpep143, kpep145, kpep146, kpep150.

비만세포종 P815 백신용 펩티드 혼합물 III: kpep117, kpep188, kpep162, kpep163, kpep164

D) 백신의 제조

D1) 개개의 펩티드 백신

a) PBS에서 1mg/ml 농도의 펩티드를 흡수함으로써 애쥬번트를 갖지 않는 개개의 펩티드 대조 백신을 제조하였다. 주사까지의 배양 기간은 실온에서 4시간이었다.

b) HBS에서 특정량으로 펩티드와 폴리리신을 혼합함으로써 애쥬번트로서 폴리리신을 갖는 개개의 폴리펩티드(다르게 언급되지 않는 한 200 쇄 길이를 갖는 폴리리신을 사용하였다)를 제조하였다. 주사까지의 배양 시간은 실온에서 4시간이었다.

i) 16 μ g의 유효 펩티드를 함유하는 백신을 수득하기 위하여, 11.8 μ g의 폴리리신을 총부피 1ml의 HBS에서 160 μ g의 펩티드 kpep117과 혼합하였다.

ii) 100 μ g의 유효 펩티드를 함유하는 백신을 수득하기 위하여, 74 μ g의 폴리리신을 총부피 1ml의 HBS에서 1mg의 펩티드 kpep117과 혼합하였다.

c) 특정량으로 펩티드 및 IFA를 유화함으로써 불완전 프로인트 애쥬번트(Incomplete Freund's adjuvant)(IFA)를 갖는 개개의 펩티드 대조군 백신을 제조하였다. 주사까지의 배양시간은 실온에서 30분이었다.

i) 16 μ g의 활성 펩티드를 함유하는 대조 백신을 위하여, 192 μ g의 펩티드 kpep117을 600 μ l의 IFA와 함께 600 μ l의 HBS에 유화시켰다.

ii) 100 μ g의 활성 펩티드를 함유하는 대조 백신을 위하여, 1.2mg의 펩티드 kpep117을 600 μ l의 IFA와 함께 600 μ l의 HBS에 유화시켰다.

D2) 백신으로서의 펩티드 혼합물

a) 애쥬번트를 갖지 않는 대조 백신으로서 펩티드 혼합물 I은 총부피 1ml의 PBS내에 250 μ g의 각각의 펩티드 kpep143, kpep145, kpep146 및 kpep150을 함유하였다.

b) 애쥬번트를 갖지 않는 대조 백신으로서 펩티드 혼합물 III은 총부피 1ml의 PBS내에 250 μ g의 각각의 펩티드 kpep117, kpep118, kpep162, kpep163 및 kpep164를 함유하였다.

c) HBS내에서 1mg의 웨프티드 혼합물 I(250 μ g의 각 웨프티드 함유)을 74 μ g의 폴리리신과 혼합함으로써 애쥬번트로 폴리리신을 갖는 백신으로서의 웨프티드 혼합물 I을 제조하였다. 주사까지의 배양 시간은 실온에서 4시간이었다.

d) HBS내에서 1.25mg의 웨프티드 혼합물 III(250 μ g의 각 웨프티드 함유)을 93 μ g의 폴리리신과 혼합함으로써 애쥬번트로 폴리리신을 갖는 백신으로서의 웨프티드 혼합물 III을 제조하였다. 주사까지의 배양 시간은 실온에서 4시간이었다.

e) 600 μ l의 HBS내에 600 μ l의 IFA와 함께 1.2mg의 웨프티드 혼합물 I(300 μ g의 각 웨프티드 함유)을 유화시킴으로써 불완전 프로인트 애쥬번트를 갖는 대조 백신으로서의 웨프티드 혼합물 I을 제조하였다. 주사까지의 배양 시간은 실온에서 30분이었다.

f) 600 μ l의 HBS내에 600 μ l의 IFA와 함께 1.5mg의 웨프티드 혼합물 III(300 μ g의 각 웨프티드 함유)을 유화시킴으로써 불완전 프로인트 애쥬번트를 갖는 대조 백신으로서의 웨프티드 혼합물 III을 제조하였다. 주사까지의 배양 시간은 실온에서 30분이었다.

g) 애쥬번트로서 폴리리신을 갖는 국소 적용을 위하여, 총부피 400 μ l의 HBS 내에 4시간 동안 1mg의 웨프티드 혼합물 I(250 μ g의 각 웨프티드 함유)을 74 μ g의 폴리리신과 함께 배양하였다. 수득한 혼합물을 교반하여 1.6g의 하이드로겔 DOLOBEN(머클)이 되게 하였다.

h) 애쥬번트를 갖지 않는 대조 백신의 국소 투여를 위하여, 총부피 200 μ l의 HBS내에 1mg의 웨프티드 혼합물 I(250 μ g의 각 웨프티드 함유)을 교반하여 1.8g의 하이드로겔 DOLOBEN(머클)이 되게 하였다.

i) 문헌 [MacBroom et al., 1992]에 의해 기재된 방법을 사용하여 퓨코스-결합 폴리리신(쇄 길이: 240)의 제조를 수행하여, 약 40%의 치환을 이루었다(출발물질 β -L-퓨코피라노실페닐-이소티오시아네이트 및 폴리리신을 시그마로부터 입수하였다).

j) 트랜스페린/폴리리신 컨쥬케이트(WO 93/07283에 기재된 바와 같이 제조된)를 사용할 때, 양을 조절하여 폴리리신의 절대량이 웨프티드 mg 당 75 μ g이 되도록 하였다. 플라스미드 DNA(공 플라스미드 pSP65, LPS-결핍, 베링거 만하임)를 복합체내에 삽입하였을 때, 비율은 37.5 μ g의 DNA/75 μ g의 폴리리신/1mg의 웨프티드였다. 1mg의 웨프티드 대신 160 μ g을 사용하였을 때, 다른 성분의 양을 동일한 인자로 감소하였다(6.25)

E) 백신의 주사

피하 주사전에 마우스를 8마리까지 그룹으로 하여 고립된 공기 챔버에서 마취시켰다. 3.5분의 할로탄(halothane)처리 후(O_2 내 4%, 유속 4), 마우스를 약 1분 동안 마취시켰다; 이 시간 동안 백신을 피하로 투여하였다.

사전 마취 없이 복강내 주사를 행하였다. 주사의 부피는 동물당 100 μ g의 개개의 웨프티드 또는 웨프티드 혼합물 I에 상응하는, 동물당 각 백신 100 μ l이었다. 웨프티드 혼합물 III의 경우, 각 마우스에 대한 웨프티드 총량은 125 μ g이었다.

F) 백신의 국소 적용

각 마우스에 대하여, 100 μ g의 웨프티드 또는 웨프티드 혼합물 I 또는 125 μ g의 웨프티드 혼합물 I을 함유하는 200mg의 연고를 면도한 동물의 피부에, 등과 귀에 걸쳐 모든 부분에, 문질렀다. 정확한 양은 눈금자를 이용하여 모니터링하였다.

G) 마우스 모델에서 종양 성장에 대한 백신의 용도

예방용 또는 치료용 마우스 모델에서 암 백신의 효능을 시험하는 과정은 다르게 언급하지 않으면, 마우스 모델로 DBA/2 모델을 사용하여, WO 94/21808에 기재된 원리와 일치한다.

실시예 1

비만세포종 P815에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

H2-K^d의 리간드, 문헌[Lethe et al., 1992]에 의해 기재된 종양 항원 P815로 부터 유래된 서열 KYQAVTTTL(kpep118)의 웨프티드 160 μ g을 500 μ l의 HBS내에서 11.8 μ g의 폴리리신 300과 혼합하고 실온에서 4시간 동안 배양하였다. 그런 다음 500 μ l의 EBSS(Earl's buffered saline)을 첨가하였다. 결과 혼합물의 100 μ l 부분을 일주일 간격으로 8 마우스에 대해 피하 투여하였다. 이 예비면역화 후, 일주일이 더 지난 후, 각 마우스의 반대측에 100 μ l의 EBSS 내 5×10^4 세포의 비만세포종 세포주 P815(ATCC No. TIB 64; 이들 세포는 웨프티드 P815로부터 유래된 종양 항원을 발현한다)를 주사함으로써, 종양을 셋팅하였다. 이들 시험의 결과를 도 1에 나타내었다(검은 네모).

비교 실험에서, 200 μ g의 웨프티드를 500 μ l의 HBS와 혼합한 다음 500 μ l의 프로인트 애쥬번트로 유화시켰다. 8 마우스를 100 μ l의 결과 유화액으로 예비-면역시킨 다음 상기한 바와 같이 종양을 P815 세포로 셋팅하였다(도 1: 검은 원).

또다른 비교 실험에서, 세포성 종양 백신을 하기와 같이 제조하였다.

160 μ g의 펩티드 kpep118을 500 μ l의 HBS 완충액내에서 3 μ g의 트랜스페린-폴리리신(TfpL), 10 μ g의 pL 및 6 μ g의 플라스미드 psp65(LPS 결합)와 혼합하였다. 실온에서 30분 후에 상기 용액을 20ml의 DMEM 배지(10% FCS, 20mM 글루코스)내에 1.5x 10⁶ 세포의 알로제닉(allogenic) 섬유아세포 세포주 NIH3T3(ATCC NO. CRL 1658)와 함께 T 75 세포 배양 플라스크에 첨가하고 37°C에서 배양하였다. 3시간 후에, 세포를 15ml의 신선한 배지와 혼합하고 37°C, 5% CO₂에서 밤새 배양하였다. 투여 4시간 전에, 세포를 20Gy로 조사하였다. 백신을 WO 94/21808에 기재된 바와 같이 제조하였다. 이 백신을 이용한 예비-면역화를 10⁵ 세포로 일주일 간격으로 수행하였다; 또 일주일 후, 종양을 상기한 바와 같이 셋팅하였다(도 1: 검은 세포). 폴리리신과 결합된 펩티드를 함유하는 백신이 종양 생성에 대하여 마우스에 대한 가장 우수한 보호를 제공함을 확인하였다.

실시예 2

단일 펩티드 백신을 이용한 비만세포종 P815에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

a) PBS내에 펩티드 kpep117 자체(도 2a), IFA에 유화된 펩티드 kpep117(도 2b) 또는 애쥬번트로 폴리리신(쇄 길이: 240)을 갖는 펩티드 kpep117(도 2c)을 함유하는 세 단일 펩티드 백신을 P815 종양 공격에 대한 보호 효과에 대해 시험하였다. 상기 D 절에 기재한 바와 같이 백신을 제조하였다. 주사 부피는 각 경우에 100 μ l였다; 주사는 피하로(sc) 또는 복강내로(ip)로 주어졌다. 비투약(naive) 마우스를 음성 대조로 사용하였고, GM-CSF를 분비하는 P815 세포로 이루어진 전체 세포 백신(P815-GM-CSF; 100 μ l내의 10⁵ 세포는 각 동물에 피하 주사되었다)은 양성 대조였다. 각 실험군은 8 동물로 이루어졌고 3 면역화(sc)를 7일 간격으로 수행하였다. 최종 면역화로부터 1주 후, 동물에게 5x 10⁴ P815 세포의 반대측 종양 공격을 주었다. 동물들을 매일 관찰하고 모든 종양의 외관을 일주일 간격으로 모니터링하였다.

애쥬번트로 폴리리신을 갖는 펩티드 kpep117은 100 μ g이 각 동물에게 피하 주사되었을 때 가장 우수한 항종양 효과를 생산하였다(8마리 중 3마리가 보호되었다). 이 효과는 거의 전체 세포 백신으로 얻은 것(8마리 중 4마리가 보호되었다) 만큼 우수한 것이었다. 동물 당 폴리리신과 함께 16 μ g의 펩티드는 덜 효과적이었지만(2마리가 보호됨), PBS내의 100 μ g의 펩티드 보다는 훨씬 우수하였다(도 2a, 보호 효과 없음). 또한 IFA에 유화되었을 때 펩티드는 폴리리신과 함께 이론 활성을 이루지 못하였다(도 2c).

b) P815 비만세포종에 대한 또 다른 실험에서, 상이한 쇄 길이의 두 비변성 폴리리신을 16 리신 그룹을 갖는 짧은 것(pL16)과 240 그룹을 갖는 긴 것(pL240), 서로를 비교하였다. 대조군에 있는 동물을 PBS에 용해되거나 IFA에 유화된, 100 μ g의 펩티드로 주사하였다. 하나의 백신은 안정하게 형질전환된 P815 세포로부터 수득한 것이고 두 번째 백신은 문헌 [Wagner et al., 1992(AVET)]에 의해 기재된 방법을 사용하여 일시적 형질감염에 의해 수득한 것인, 두 GM-CSF-분비 세포성 대조군 백신을 양성 대조군(cf. a))으로 사용하였다. 두 전체 세포 백신은 총 8마리 중 4 또는 5마리에 대해 보호를 부여하였다. 그 자체의 펩티드 또는 IFA에 유화된 펩티드로 이루어진 펩티드-기초 백신은 어떠한 보호 효과도 나타내지 않았다; 모든 동물은 종양 공격 후 신속하게 종양을 발현하였다. 그러나 만약 펩티드를 폴리리신과 함께 투여하면, 펩티드 백신은 동물을 종양 공격으로부터 보호하였다; 긴 폴리리신(pL240)을 사용하였을 때 8마리 중 2마리가 보호되었고, 짧은 폴리리신의 경우 8마리 중 4마리가 보호되었다. 도 3에 나타낸, 이 결과는 애쥬번트로서 폴리리신과 함께 투여되었을 때, 단일 펩티드는 항종양 면역화의 표준으로 문헌(Dranoff et al., 1993); 문헌(Schmidt et al., 1995)에 언급된 가장 효과적인 사이토카인-분비 전체-세포 백신중의 하나에 견줄만한 효율적인 항종양 보호를 제공한다.

실시예 3

P815 단일 펩티드 또는 P815 펩티드의 혼합물을 함유하는 종양 백신을 이용한 비만세포종 P815에 대한 DBA/2 마우스의 백신접종

하기 펩티드를 백신을 제조하는데 사용하였다:

kpep118(주사 당 100 μ g)

펩티드 혼합물 III(kpep117, kpep118, kpep162, kpep163, kpep164): 이 펩티드 혼합물은 지금까지 알려진 모든 P815 펩티드를 함유한다; 25 μ g의 각 펩티드를 각 주사에서 투여하였다).

GM-CSF 분비 P815 세포를 양성 대조로 사용하였다.

예비 시험에서, 100 μ g의 펩티드를 폴리리신과 함께 사용하였을 때 (표준 비율에 해당하는, 7.5 μ g의 폴리리신/100 μ g의 펩티드; 폴리리신: 쇄 길이=200) kpep117이 P815 종양 셋팅에 대한 가장 우수한 보호 효과를 갖는 펩티드임이 증명되었다. 소량의(16 μ g) kpep117은 덜 효과적이었다. 이 실시예에서 폴리리신만을 (그룹 B), 그 다음 트랜스페린-폴리리신(그룹 C) 및 다시 트랜스페린-폴리리신/DNA(그룹 D)를 갖는 경우, 100 μ g의 kpep118을 각 동물에 주사하였다. IFA를 갖는 kpep118을 대조로 사용하였다. 이 실험에서, kpep118 그 자체는 종양 셋팅에 대해 어떠한 보호 효과도 나타내지 않았다.

실시예 4에서 수행되는 실험에서, 흑색종 펩티드의 혼합물을 함유하는 백신은 흑색종에 대해 보호 효과를 가졌다. 따라서 펩티드 혼합물의 개념이 P815에 대해서도 적당한지 여부를 시험하는데 이 실시예를 사용하였다.

펩티드 혼합물 III을 단지 폴리리신과 함께 일회(그룹 E), 트랜스페린-폴리리신과 함께 일회(그룹 F) 및 트랜스페린-폴리리신/DNA(그룹 G)와 함께 일회 투여하였다. IFA내의 펩티드 혼합물 III을 대조로 사용하였다. 비투약 마우스를 음성 대조로 사용하였다; GM-CSF-형질감염된 P815 세포를 양성 대조로 사용하였다(마우스 당 10⁵세포).

이 실시예에서 수행된 실험은 다른 실험과 비교할 때, 약간 비전형적인 것으로 증명되었다: 양성 대조군에서(GM-CSF 분비 세포) 모든 동물이 종양 셋팅 후 즉시 종양을 발현하였고, 이 종양의 대다수는 생성되자 마자 사라졌다. 이것에 대한 가능하 하나의 설명은 종양이 파괴되기 전에 일시적으로 성장하였다는 것이다. 두번째 가능한 설명은 종양으로 진단된 부종이 종양 성장으로부터 기원되지 않았지만 강력한 면역 세포 침투(과립종)의 결과라는 것이다. 동물을 해부하지 않았기 때문에 그 이유를 명확하게 규명할 수는 없었다; 어쨌든, 생성된 종양은 최종적으로 파괴되었다. 또 다른 흥미로운 결과는 동물이 웨티드 혼합물 III 및 폴리리신의 혼합물로 처리된 그룹 G에서 얻어졌다. 모든 동물은 종양을 발현하였지만, 2마리의 동물에서, 종양 부종(또는 면역 세포 침투)의 크기가 상대적으로 작았고, 증가하지 않았으며, 마우스는 병든 것으로 보이지 않았다. 이 두 마리는 죽지 않았고 관찰 하에 두었다. 놀랍게도, 이전에 관찰된 바 없는 결과인, 종양 셋팅으로부터 9주 후, 종양이 겸출되지 않았다. 최종적으로, 8마리 중 2마리가 종양을 파괴하였다. 종양의 파괴는 16 μ g의 kpep117로 8마리 중 2마리가 보호되고 100 μ g의 kpep117로 8마리 중 3마리가 보호된, 실시예 2와 유사한, 웨티드 혼합물내에서 kpep117의 함유의 결과인 것으로 보인다. 그러나 보호 효과는 또한 혼합물에서 하나 이상의 웨티드에 의해 생산될 수 있다.

실시예 4

웨티드 혼합물을 함유하는 종양 백신을 이용한 예비-면역에 의한 흑색종 M-3에 대한 DBA/2 마우스의 보호

흑색종 웨티드의 혼합물(웨티드 혼합물 I, D2 문단)을 함유하는 예방용 백신을 사용하였다.

백신을 이용한 예비-면역화 및 종양 셋팅의 과정은 종양 셋팅이 M3 세포(동물 당 10⁵ 세포)로 수행되는 것을 제외하고는, 실시예 2에 기재된 과정과 일치한다. 사용된 대조 백신은 최적량의 IL-2(10⁵ 세포 당 1000-2000유닛)를 분비하는 M-3 세포로부터의 전체 세포 백신이었으며 문헌[Schmidt et al. 1995]에 의해 기재된 바와 같이 제조되었다. 사용된 시험 조건 하에서, 이 백신은 100% 보호를 달성하였다(도4). 4 그룹의 실험 동물에게 웨티드 혼합물을 갖는 백신을 주었다. 두 그룹에게는 IFA에 유화된 웨티드를 s.c. 또는 i.p.로 주었다. 나머지 두 그룹은 폴리리신(pL240)과 함께 웨티드를 s. c. 또는 i.p.로 주었다.

도 4는 애쥬번트로 폴리리신(pL240)을 갖는 웨티드 백신의 보호 효과를 나타낸다; 고체 종양이 신속하게 발현된 비처리 동물과 비교하여, 50%의 처리 마우스가 M-3 종양 공격으로부터 보호되었다. 이 효과는 웨티드-폴리리신 백신이 하이드로겔로 피하로 주사되거나 피부에 적용되는 경우 얻을 수 있었다(도 5). 웨티드/폴리리신 백신을 i.p.로 또는 IFA내의 웨티드로 처리한, 나머지 3 대조군에서, 백신은 필연적으로 비효과적이었다. 여기에서, 종양 셋트가 거부되지 않았으며, 종양은 비처리 대조 동물과 비교하여 약간 느리게 성장하였다. 이들 결과는 폴리리신을 함유하는 경우 웨티드 혼합물을 함유하는 백신이 항종양 보호 효과를 이룬다는 사실을 나타낸다. 선택된 시험 조건 하에서, 최근 나타난 보고(문헌[Zatloukal, 1993], 문헌[Zatloukal, 1995])와 일치하여, 이 웨티드 백신은 세포성 IL-2-백신의 절반 만큼만 효과적이었으며, 10⁵ 생M3 세포의 종양 공격에 대해 100%의 동물까지 보호하였다.

실시예 5

M-3 전이암에 대한 DBA/2 마우스의 보호

a) 흑색종 웨티드의 혼합물(D2 문단에 기재된 웨티드 혼합물 I)을 함유하는 치료용 백신을 사용하였다. 3 백신접종(sc)이 일주일 간격으로 주어졌다. 제 1 면역화는 전이암의 셋팅으로부터 5일 후 주어졌고 결과적으로 면역화가 5일 전이암에 대해 주어졌다. WO 94/21808 및 문헌[Schmidt et al., 1996]에 기재된 과정을 이용하여 1.2x 10⁴ M-3 세포를 전이암 셋팅 동안 주사하였다.

사용된 백신은 애쥬번트를 갖지 않는(웨믹스1 PBS), 애쥬번트로서 IFA를 갖는(IFА 웨믹스1) 또는 퓨코스-변성 폴리리신(fpL 웨믹스1)을 갖는: 웨티드 혼합물 I이었다. 대조군은 백신을 주지 않거나(비투약) 실시예 4에 언급된 IL-2를 생산하는 M-3 전체 세포 백신이었다. 도 6은 애쥬번트로서 퓨코스-변성 폴리리신을 갖는 웨티드 혼합물 1로 처리한 그룹에서 가장 우수한 보호가 이루어졌음을 나타낸다. 50%의 마우스가 전이암을 거부할 수 있었다(4/8). 이 처리는 단지 33%의 마우스만을 보호한 전체 세포 백신 보다 더욱 효과적이었다(3/9). IFA를 갖거나 애쥬번트를 갖지 않는 웨티드 백신은 전이암의 종양으로의 성장을 지연시킬 뿐이었다(도 6b).

b) 또 다른 실험에서, 웨티드 혼합물 I을 함유하고 피하로 투여된 백신의 보호 효과를 치료용 모델에서 시험하였다. 대조군에게는 PBS내의(애쥬번트가 없는) 또는 IFA와 함께의 웨티드 혼합물을 주었다. 비변형 폴리리신 240을 애쥬번트로 사용하였다. 부가적으로, 퓨코스-변성 폴리리신 200(fpL 200)을 애쥬번트로 사용하였다. 대조는 IL-2를 발현하는 세포성 백신을 갖는 일군의 동물로 이루어졌다. 도 7a에 나타낸 바와 같이, 웨티드/폴리리신 백신은 M3-전이암의 치료에 효과적이다. 퓨코스-변성 폴리리신만으로 이 실험에서 상당한 치료율을 얻었다. 이 처리로, 이 경우 70%의 동물을 치료한, IL-2 백신과 비교하여, 우수한 결과인, 50%의 동물이 전이암을 거부하였다.

c) 또 다른 실험에서, 항종양 활성에 대한 폴리양이온에 대한 변화 및 변형의 효과를 치료용 모델에서 시험하였다. 비변형 및 퓨코스-변성 폴리리신 200에 부가하여, 짧은 비변성 폴리리신 pL16, 긴 폴리리신 pL450 및 다른 폴리양이온, 즉 폴리아르기닌(pArg720)을 시험하였다. 최적량(10⁵ 세포 당 ≥10ng)의 GM-CSF를 분비하는 세포성 M3 백신을 양성 대조로 사용하였다(문헌[Schmidt, 1995]). 이 실험에서, 또한, 대조군에게 IFA내의 또는 어떠한 애쥬번트도 갖지 않는 웨티드 혼합물을 주었다. 실시예 5b)에서와 같이, 퓨코스-폴리리신을 애쥬번트로 사용하였을 때 가장 우수한 효과를 얻었다(도 7b). 짧은 폴리리신 pL16을 갖는 그룹에서 30%와 비교하여, 이들 그룹에서, 40%의 동물이 전이암을 거부하였다. 폴리아르기닌과 함께 웨티드를 준 그룹과 별도로, 웨티드 백신이 주어진 다른 그룹의 동물은 종양이 생성되기 전에 약간의 지연만을 보였다. 비변성 폴리아르기닌은 이 시험에서 퓨코스-변형된 폴리리신만큼 효과적이었으며 10마리 중 4마리에서 전이암의 거부에 이르게 하였다.

도 7c는 독립적인 실험에서 폴리아르기닌으로 얻어진 이 효과의 반복을 나타낸다. 여기에서 다시, 폴리아르기닌을 갖는 웨티드 혼합물로의 백신접종이 8마리의 처리 동물 중 4마리에서 항종양 활성을 나타내었다.

실시예 6

애주번트로 폴리리신을 이용한 티로시나아제로의 세포의 트랜스로딩(transloading)

이 실시예는 세포 예로 사용된 M-3 세포를 이용하여, 폴리리신이 단백질 절편 또는 전체 단백질로 세포를 로딩하는 애주번트로 적합함을 보여주기 위한 실험이었다.

세포를 로딩하기 위하여, 무엇보다도 $160\mu\text{g}$ 의 FITC-표지 티로시나아제(EC 1.14.18.1; 시그마)를 $3\mu\text{g}$ 의 폴리리신(pL240)과 혼합하고 실온에서 3시간 동안 배양하였다. 그런 다음 수득한 용액을 2×10^6 M-3 세포와 함께 T 75 세포 배양 플라스크에 위치시키고 37°C에서 배양하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 2회 세척하고, PBS/2mM EDTA로 분리하고 FACS 분석을 위하여 1ml PBS/5% FCS내에 휴지하였다. 도 8은 티로시나아제로의 M-3 세포의 로딩을 나타낸다(좌측 곡선은 대조를 나타내고, 우측 곡선은 티로시나아제로의 로딩을 나타낸다).

실시예 7

치료용 모델에서 면역화 후 T-세포 활성화의 결정

웨티드/폴리양이온 백신이 치료용 모델에서 명확하게 효과를 나타낸 후, 이 처리가 T-세포의 활성화도 일으키는지 알아보기 위하여 연구를 수행하였다. 이를 위하여, 마커로서 모(母) M3 세포를 갖는 백신접종 동물로부터의 지라 세포와 함께 공동-배양한 후 사이토카인 분비를 사용하였다(문헌[Kawakami et al., 1994b]).

단일-세포 지라 혼탁액을 백신접종 및 비처리 동물로부터 제조하고, 이어서 저장성 완충액($0.15\text{ NH}_4\text{Cl}$, 1m KHCO_3 , 0.1mM EDTA , pH 7.4)로 적혈구 용혈하였다. 37°C에서 90분 동안 페트리 접시에서 DMEM 배지(10% FCS) ml 당 3×10^6 지라 세포를 배양함으로써 부착 세포를 제거하였다. 조심스러운 피펫팅 및 다양한 비율의 1×10^3 의 모세포와 함께 공동-배양함으로써 공동-배양하였다. 세포를 96 월 평저 조직 배양 접시에서 $200\mu\text{g}$ 의 DMEM 배지(10% FCS), 2mM L-글루타민 및 $20\mu\text{g/ml}$ 의 케티마이신에서 배양하였다. 9일째에, $100\mu\text{l}$ 의 상등액을 수확하고 IFN-r의 함량을 상업적으로 이용 가능한 ELISA 키트(엔도젠, 캠브리지, MA, USA)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 측정하였다. 9일간의 배양 후 백신접종 동물로부터의 지라 세포만이 대량의 IFN-r를 배지로 분비하는 반면, 비처리 동물로부터의 지라 세포 및 M3 세포의 공동-배양물에서는 IFN-r를 거의 검출할 수 없었다. 이들 실험의 결과를 도 9에 나타내었다.

실시예 8

인플루엔자 웨티드 ASNENMETM 및 애주번트로서 퓨코실화 폴리리신에 의한 항바이러스 면역성의 유도

1mg 의 웨티드 ASNENMETM 당 $75\mu\text{g}$ 의 fpLys를 함유하는 백신을 사용하였다. 방법 절에서 기술한 바와 같이, 동물 당 $100\mu\text{g}$ 의 웨티드/ $7.5\mu\text{g}$ 의 fpLys를 주사하는, 단일 주사에 의해 백신을 투여하였다. 대조로서, $100\mu\text{g}$ 의 웨티드를 그 자체로 (PBS)로 주사하거나 주사를 전혀 하지 않았다(비투약 마우스).

$10\mu\text{g/ml}$ 의 웨티드 ASNENMETM과 26°C에서 혈청-결핍 배지에서 RMA-S 마우스 림프종 세포를 밤새 배양하였다. 백신접종 10일 후, 지라 세포를 백신접종 동물로부터 분리하고, 웨티드-부가 RMA-S 세포와 5:1의 비율로 혼합하고 5일간 더 배양하였다(문헌[Stuber et al., 1994]). 다양한 배양물에서 생존 효과 지라 세포의 수를 결정하고, 그런 다음, 표준 4H 유로퓸(europium) 방출 분석(문헌[Blomberg et al., 1993])에 의해 CTL 활성을 결정하기 위하여, 세포를 웨티드 ASNENMETM과 미리 결합하고 유로퓸 칼레이트와 결합한 RMA-S 세포와 다양한 비율로 혼합하였다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 이 시험에서 웨티드 및 fpLys로의 백신접종에 의해서만 특이적 면역성이 얻어졌고, 웨티드 자체만을 투여하였을 때에는 그렇지 못하였다.

실시예 9

APCs에 대한 웨티드의 내재화 및/또는 결합을 강화시키는 능력에 대한 다양한 염기성 폴리아미노산의 시험

이들 시험을 위하여 형광 분석법을 사용하였다: 서열 LFEAIEGFI의 모델 웨티드 항원(MHC Kd-제한)을 제조자의 지시에 따라(몰레큘라 프로브) 형광 염료 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)로 표지하였다. MHC Kd-제한 모노사이트 매크로파아지 세포주 P388D1에 의한 그 자체의("펄스") 또는 다양한 농도의 염기성 아미노산(쇄 길이 16 내지 490의 폴리리신, 쇄 길이 15 내지 720의 폴리아르기닌)과 함께의 FITC-표지 웨티드의 흡수 또는 결합을 쓰로우플로우 사이토메트리에 의해 결정하였다. 이것을 행하기 위하여, 37°C에서 30분 동안 그 자체의 또는 웨티드 및 폴리아미노산의 혼합물을 갖는 FITC-표지 웨티드 $5\mu\text{g}$ 과 함께 원심분리 시험관내 최종 부피 1ml의 배지(DMEM/10% FCS)내에서 1×10^6 P388D1 세포를 배양한 다음 이것을 모든 유리 웨티드를 제거하기 위하여 완전히 세척하였다. $5\mu\text{g}$ 의 FITC-표지 웨티드를 함유하는 폴리아미노산을 배지 ml 당 50, 25, 12, 6 및 $3\mu\text{g}$ 의 농도로 첨가하였다. 웨티드의 흡수 및/또는 결합의 효율을 추정하기 위하여 다양한 표본의 상대적 형광 강도를 비교하였다. 이들 시험의 결과를 도 11에 나타내었다; 시험은 $25\mu\text{g}$ 의 pL450 및 pArg450을 각각 이용하여 수행하였다. 사용 조건하에서, 폴리아르기닌은 폴리리신 보다 약 5배 더 효율적인 것으로 확인되었다.

실시예 10

펩티드가 APCs에 의해 흡수될 수 있는 기작의 연구

펩티드는 매크로피노시토시스 또는 수용체-매개 엔도시토시스와 같은 특이 기작에 의해 흡수될 수 있다(문헌 [Lanzavecchia, 1996]). 대체 기작은 폴리아미노산이 세포막을 투과성으로 만드는데에 있으며 이 방법으로 펩티드가 배지로부터 세포질로 확산되는 것을 가능하게 한다.

a) 세포막의 가능한 투과하는 상업적으로 이용가능한 키트(사이토톡스 96, 프로메가, 매디슨, 위스콘신, USA)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 등장성 조건 하에서 폴리아미노산(폴리리신 또는 폴리아르기닌)과 함께 P388D1 세포의 배양 후 세포질 효소 락테이트 디하이드로게나아제(LDH)의 방출을 측정함으로써 시험된다. 도 12a의 결과를 기초로 하여, pLys의 효과는 세포막을 투과성으로 만드는데 있으며, 이것은 등장성 조건 하에서 방출된 고농도의 세포질 효소로 발현된다. 반면, PArg 처리 후(도 12b), LDH는 거의 검출되지 않았다. 폴리아미노산 단독으로 처리한 표본과 비교할 때, 펩티드와 폴리리신 또는 폴리아르기닌의 혼합물로의 처리와 비교하여 LDH 방출에 있어서 어떠한 차이도 발견되지 않았다. 펩티드 자체로의 배양 후에는, 어떠한 측정가능한 LDH-활성이 검출되지 않았다.

b) 염기성 아미노산의 존재 또는 부재 하에서 FITC-표지 펩티드의 가능한 내재화를 문헌 [Midoux et al., 1993]에 의해 공개된 원리에 기초하여 연구하였다: 세포에 의해 내재화된 입자는 엔도솜(endosomes)으로 수송된다. 중성 pH 값을 갖는 세포질 또는 세포 배양 배지와 비교하여, 약 5의 pH를 갖는 이들 소기관은 산성이다. FITC에 의해 발산되는 형광은 강력한 pH-의존성이다. 엔도솜에서 발견된 것과 같은 pH 조건의 환경에서, 형광은 억제된다. 따라서, 세포에 의해 엔도솜으로 흡수된 FITC-표지 펩티드는 감소된 형광을 나타낸다. 모넨신(monensin)을 침가하였을 때, 엔도솜의 낮은 pH는 중화되어, 측정가능할 만큼 더욱 큰 내재화 FITC-표지 펩티드의 형광에 이르게 하였다.

4°C 또는 37°C에서 폴리아르기닌(평균 분자량 범위 100,000, 쇄 길이 490) 및 형광-표지 펩티드의 혼합물과 함께 세포를 배양하였다. 37°C에서 한 방울의 표본을 빼내어 쓰로우플로우 사이토메트리에 의한 분석 전에 50μM 모넨신으로 4°C에서 처리하였다.

폴리리신(pLys) 및 폴리아르기닌(pArg)과 같은 특정 염기성 폴리아미노산과 APCs의 배양이 APCs에 대한 펩티드의 흡수 또는 결합을 증강시키는 것이 밝혀졌다.

도 13으로부터 명백해지듯이, 펩티드 단독 또는 모넨신으로 처리한 세포에서 약간의 형광의 증가만이 관찰되었다. 반대로, 모넨신 및 폴리아르기닌 및 펩티드의 혼합물로 처리된 표본에서 형광 신호가 크게 증가되었다. 표본을 4°C에서 배양하였을 때, 펩티드의 흡수가 관찰되지 않았다. 모넨신 처리 후 형광의 상당한 증가는 pArg으로 야기된 펩티드의 로딩이 그것들이 세포내에 소포로 축적되도록 한다는 것을 나타낸다(문헌 [Midoux et al., 1993]; 도 13). 예기된 바와 같이, 폴리리신-부하 표본의 모넨신 처리 후, 형광의 약한 증가만이 관찰되었다. 4°C에서 폴리리신으로의 로딩은 측정할 수 있는 형광의 증가를 일으키는 바, 폴리리신의 효과가 세포막의 투과에 의해 주로 야기됨을 추가로 나타내는 것이다.

실시예 11

짧은 펩티드를 이용한 APCs의 로딩의 연구

골수로부터 GM-CSF와 함께 수득된 APCs를 형광-표지 펩티드와 폴리리신(pL200; 시그마)의 배합물과 함께 또는 펩티드 단독과 함께 형광 현미경에 의해 조사하였다. 펩티드 흡수의 현미경적 검출을 위하여, APCs를 슬라이드상에 살포하고 40μg의 풀루오레세인-표지 펩티드 LFEAIEGFI 자체와 함께 또는 50μg/ml의 폴리리신(pL200) 및 40μg/ml의 펩티드 LFEAIEGFI와 함께 37°C에서 30분간 배양하였다. 격렬한 세척 후, 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 항-페린트(anti-Fadent)(다코, 글로스트립, 덴마크)로 덮고 형광 현미경(제이스)에 노출시켰다. 핵을 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI; 시그마)로 대비염색하였다. 도 14의 형광 현미경 사진에 나타낸 바와 같이, 펩티드 및 폴리리신과 배양된 세포(A)가 펩티드 단독으로 처리된 세포(B) 보다 더 큰 펩티드의 흡수를 나타내었다. 펩티드 단독으로 처리(펄스)된 세포의 강력한 형광은 국소화되지 않았고 전체적으로 세포에 걸쳐 더욱 균일하게 분포되어 있었다.

실시예 12

쓰로우플로우 사이토메트리를 이용한 세포 로딩의 정량적 측정(트랜스로딩 분석)

a) 실시예 11에서 수행한 시험이 APCs가 소 펩티드로의 로딩에 대한 탁월한 표적 세포라는 것을 나타낸 후, 펩티드 백신을 위한 적당한 애쥬번트를 동정하기 위하여 FACS 분석이 인 비트로에서 수행되었다. 이 분석은 형광-표지 펩티드의 신속한 정량적 분석을 가능케 한다; 서열 LFEAIEGFI의 펩티드를 모델 펩티드로 사용하였다. 이들 시험에서, 쥐 세포주 P388D1을 APCs로 사용하였다. 1×10^6 세포를 최종 형광 농도 5nmol/ml에서 5μg 펩티드와 함께 37°C에서 30분 동안 최종 부피 1ml의 고 글루코스 DMEM 배지 및 10% FCS에서 배양하였다. 도 15에 나타낸 바와 같이, 세포를 펩티드 단독으로 또는 증가하는 농도(3 내지 50μg/ml)의 펩티드 및 폴리양이온 또는 펩티드 및 히스톤과 결합하여 처리하였다. 하기 화합물을 사용하였다:

A: 폴리오르니틴(평균 분자량 범위 110,000, 쇄 길이 580); B: 아르기닌-풍부 히스톤; C: 리신-풍부 히스톤; D: 폴리아르기닌(평균 분자량 범위 100,000, 쇄 길이 490); E: 폴리리신(평균 분자량 범위 94,000, 쇄 길이 450). 예비 시험에서, 30분의 배양 기간이 최대의 펩티드 흡수를 얻었다. 더 긴 처리(4 또는 8시간)는 형광 신호에서 어떠한 증가도 생산하지 않았다. 분석 전에 세포를 0.2% BSA를 함유하는 대량의 PBS로 5회 세척하였다. 세포를 1ml의 빙냉 PBS/0.2% BSA내에서 휴지하여 쓰로우플로우 사이토메트리에 의해 조사하였다(FACScan; 벡톤 디킨슨, CA, USA).

폴리아르기닌 및 폴리리신이 가장 효과적인 애쥬번트임이 증명되었다; 폴리오르니틴은 선택된 조건하에서 세포독성 효과를 나타내었다. 폴리아르기닌 및 폴리리신에 의해 야기된 웨პ티드 흡수의 증가는 농도와 상관 관계에 있다(도 15d, e); 흡수는 쇄 길이와 함께 증가한다(도 16).

대조와 비교하여 10의 3배율의 증가를 갖는, 폴리아르기닌이 10의 2배율 미만의 최대 증가를 나타내는 폴리리신 보다 더 광범위한 적정 농도 범위를 가지며, 사용된 모든 쇄 길이로 폴리리신 보다 단백질을 수송하는데 더욱 효과적인 것이 관찰되었다(도 16): 폴리아르기닌은 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 효율적인 수송을 가능하게 한 반면, 폴리리신에 대해서는 $>25\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도가 형광의 상당한 증가를 수득하기 위하여 필요하였다(도 15 d, e).

b) 웨პ티드 수송을 위한 쇄 길이의 하한이 있는지 여부를 확립하기 위하여, 상이한 쇄 길이(10-30그룹)의 폴리아르기닌을 합성하고 고농도의 폴리양이온에서 웨პ티드 수송을 증가시키는 능력에 대해 시험하였다(도 17). 이들 실험을 위하여 웨პ티드 LFEAIEGFI를 사용하고 시험된 폴리아르기닌 폴리머를 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하였다.

웨პ티드 수송에 있어서, 대략 작은 증가가 최단 시험 폴리아르기닌에서 조차 관찰되었다.

c) 염기성 아미노산은 양으로 하전된 분자이다. 따라서 음으로 하전된 웨პ티드가 정전기적 상호작용을 통하여 이들 폴리양이온에 결합할 수 있음으로써, 증가된 웨პ티드 흡수에 이르게 할 수 있음을 추정할 수 있다. 이 가설을 시험하기 위하여, P388D1 세포로의 전하의 함수로서의 짧은 웨პ티드를 흡수하는 양이온성 폴리아미노산의 능력을 비교하였다. 하기 표는 MHC-I 결합에 요구되는 모든 조건을 충족시키는, 사용 음하전된 웨პ티드를 나열한다(문헌[Rammensee et al., 1995]). 웨პ티드 1은 쥐 TRP(티로신 관련 단백질)로부터 유래되고, 웨პ티드 2는 인플루엔자 해마글루터닌으로부터 유래되고(문헌[Schmidt et al., 1996]), 웨პ티드 3은 쥐 티로시나아제로부터, 웨პ티드 4는 P198 종양 항원으로부터, 웨პ티드 5는 베타-갈락토시다아제로부터이다(문헌[Gavin et al., 1993]). ("Mr"은 분자량 범위를 의미하고, "fluor"은 플루오레세인을 의미한다).

표

서열	Mr	Mr Fluor	전하	전하+fluor
YAEDYEEL	1031	1389	4×음성	6×음성
LFEAIEGFI	1038	1396	2×음성	4×음성
IFMNGTMSQV	1127	1485	중성	2×음성
KYQAVTTTL	1024	1382	1×양성	1×음성
TPHPARIGL	961	1319	2×양성	중성

웨პ티드를 플루오레세인으로 표지하는데 사용한 방법 때문에, 두 개의 음 전하가 삽입되었다. 폴리아르기닌으로의 배양 후 최고 수의 음전하를 갖는 웨პ티드(표본 당 5nmol)가 P388D1 세포로 가장 효율적으로 수송되었는데, 웨პ티드와 폴리양이온의 이온성 상호작용이 세포로의 웨პ티드의 수송을 더욱 증가시킴을 가리킨다(도 18). 그러나 웨პ티드 단독으로 처리된 세포와 비교하여, 폴리양이온 존재하에 중성 웨პ티드의 경우 대량이 흡수되었다. 웨პ티드 단독으로의 처리는 모든 시험 웨პ티드와 거의 동일한 형광 신호를 낸는다; 대표의 이유로, 웨პ티드 LFEAIEGFI로 수득한 형광 신호를 도 18에 대표적 능력으로 "웨პ티드 단독"으로서 나타내었다.

문 헌

문헌 [Alexander, J. et al., 1989, *Immunogenetics* 29, 380]

문헌 [Allred, D.C. et al., 1992, *J. Clin. Oncol.* 10 (4), 599-605]

문헌 [Avrameas, A. et al., 1996, *Eur. J. Immunol.* 26, 394-400]

문헌 [Behr, J.P., 1994, *Bioconjug-Chem.*, Sept-Oct, 5(5), 382-9]

문헌 [Bertoletti, A. et al., 1994, *Nature* 369, 407-410]

문헌 [Biologic Therapy of Cancer, Editors: DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown]

문헌 [Blomberg, K. and Ulfstedt, A.C., 1993, *J. Immunol. Methods* 160:27-34]

문헌 [Boon. T., 1992, *Adv Cancer Res* 58, 177-210]

문헌 [Boon. T., 1993, *Spektrum der Wissenschaft* (May), 58-66]

문헌 [Boon. T., et al., 1994, *Annu. Rev Immunol.* 12, 337-65]

문헌 [Boon T., and van der Bruggen, P., 1996 *J Exp Med* 183, 725-729]

문헌 [Braciale, T. J. and Braciale, V.L., 1991, *Immunol. Today* 12, 124-129]

문헌 [Brocke, S. et al., 1996, *Nature* 379 (6563), 343-346]

문헌 [Bronte, et al , 1995, *J. Immunol.* 154, 5282]

문헌 [Carrel, S. and Johnson, J.P., 1993. *Current Opinion in Oncology* 5, 383-389]

문헌 [Coligan, J.E., et al., 1991, *Nature* 351, 290-296]

문현 [Coligan, J.E., et al., 1991, *Current Prot. in Immunol.*, Wiley, New

York]

문현 [Coulie, P.G., et al., 1992, *Int. J. Cancer*, 50, 289-297]

문현 [Coulie, P.G., et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7976-80]

문현 [Coulie, P.G. et al., 1994, *J. Exp. Med.* 180, 35-42]

문현 [Cox, A. L. et al., 1994, *Science* 264, 5159, 716-9]

문현 [Current Protocols in Molecular Biology, 1995. Editor: Ausubel F.M., et al., John Wiley & Sons, Inc.]

문현 [Dranoff, G. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3539-3543]

문현 [Dranoff, G. and Mulligan, R. C., 1995, *Advances in Immunology* 58, 417]

문현 [Falk, K. et al., 1991, *Nature* 351, 290-296]

문현 [Felgner, J.H. et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561]

문현 [Feltkamp, M.C. et al., 1995, *Eur. J. Immunol.* 25(9), 2638-2642]

문현 [Fenton, R. G. et al., 1993, *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 16, 1294-302]

문현 [Fisk, B. et al., 1995, *J. Exp. Med.* 1881, 2109-2117]

문현 [Flow Cytometry, Acad. Press, Methods in Cell Biology, 1989, Vol. 33, Editor: Darzynkiewicz, Z. and Crissman, H.A.]

문현 [Gedde Dahl, T. et al., 1992, *Hum Immunol.* 33, 4, 266-74]

문현 [Grohmann, U. et al., 1995, *Eur. J. Immunol.* 25, 2797-2802]

문현 [Guarini, A. et al., 1995, *Cytokines and Molecular Therapy* 1, 57-64]

문현 [Han, X.K. et al., 1995, PNAS 92, 9747-9751]

문현 [Handbook:FACS Vantage™ User's Guide, April 1994, Becton Dickinson]

문현 [Handbook:CELL Quest™ Software User's Guide, June 1994, Becton Dickinson]

문현 [Henderson, R. A., and finn, O. J.. 1996, Advances in Immunology 62, 217-256]

문현 [Herin M. et al., 1987, Int. J. Cancer, 39, 390]

문현 [Hock, H. et al., 1993, Cancer Research 53, 714-716]

문현 [Houbiers, J. G., et al., 1993; Eur J Immunol 23, 2072-7.]

문현 [Huang, A. Y. C., and Pardoll, D. M. (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93, 9730-5]

문현 [Inaba, K., et al., 1992, J. Exp Med 176, 1693-1702]

문현 [Jung, S. et al., 1991, J. Exp. Med. 173, 1, 273-6]

문현 [Kawakami, Y. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-62]

문현 [Kawakami, Y. et al., 1994a, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9, 3515-9]

문현 [Kawakami, Y. et al., 1994b, J. Exp. Med. 180, 1, 347-52]

문현 [Kawakami, Y. et al., 1995, The Journal of Immunol. 154, 3961-3968]

문현 [Karre, K. et al., 1986, Nature 319, 20. Fed., 675]

문현 [Kersh, G.J. et al., 1996, Nature 380(6574), 495-498]

문현 [Kovacsovics Bankowski, M. and Rock, K.L., 1995, Science 267, 243-246]

문현 [Lanzavecchia, A., 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8, 348-354]

문현 [Lehmann, J.M. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 9891-9895]

문현 [Lethe, B. et al., 1992, *Eur. J. Immunol.* 22, 2283-2288]

문현 [Li, H., et al., 1989, *J Exp Med* 169, 973-986]

문현 [Lill, N. L., Tevethia, M. J., Hendrickson, W. G., and Tevethia, S. S. (1992). *J Exp Med* 176, 449-57]

문현 [Ljunggren, H.G., et al., 1990, *Nature* 346:476-480]

문현 [Loeffler, J.-P. et al., 1993, *Methods Enzymol* 217, 599-618]

문현 [Lopez, J. A., et al., 1993, *Eur. J. Immunol.* 23, 217-223]

문현 [NacBroom, C.R. et al., 1972, *Meth. Enzymol.* 28, 212-219]

문현 [Mackiewicz, A. et al., 1995, *Human Gene Therapy* 6, 805-811]

문현 [Malnati, M.S. et al., 1995, *Science* 267, 1016-1018]

문현 [Mandelboim, O. et al., 1994, *Nature* 369, 5. May, 67-71]

문현 [Mandelboim, O. et al., 1995, *Nature Medicine* 1, 11, 1179-1183]

문현 [Marchand, M., et al., 1995, *Int J of Cancer* 63, 883-5]

문현 [McIntyre, C.A., et al., 1996 *Cancer Immunol. Immunother.* 42:246-250]

문현 [Midoux, P., et al., 1993, *NATO ASI Series H67*, 49-64]

문현 [Morishita, R, et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91. 6, 2580-5]

문현 [Nabel, G.J. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90, 11307-11311]

문현 [Noguchi, Y. et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3171-3175]

문헌 [Oettgen, H.F. and Old, L.J., 1991, *Biologic Therapy of Cancer*, Editors:

DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B. Lippincott
Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown, 87-119]

문헌 [Ostrand-Rosenberg, S., 1994, *Current Opinion in Immunology* 6, 722-727]

문헌 [Pardoll, D.M., 1993, *Immunology Today* 14, 6, 310].

문헌 [Practical Immunology, Editors: Leslie Hudson and Frank C. Hay,
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston,
Melbourne]

문헌 [Peace, D.J. et al., 1991, *J Immunol.* 146, 6, 2059-65]

문헌 [Peoples, G.E. et al., 1994, *J. Immunol.* 152, 10, 4993-9]

문헌 [Plautz, G.E. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4645-4649]

문헌 [Porgador, A., Gilboa, E., 1995, *J. Exp. Med.* 182, 255-260]

문헌 [Puccetti, P. et al., 1995, *Eur. J. Immunol.* 24, 1446-1452]

문헌 [Rammensee, H.G. et al., 1993, *Annu Rev Immunol* 11, 213-44]

문헌 [Rammensee, H.G. et al., 1993, *Current Opinion in Immunology* 5, 35-44]

문헌 [Rammensee, H.G. et al., 1995, *Current Biology* 7, 85-96]

문헌 [Rammensee, H.G. 1995, *Current Opinion in Immunology* 7, 85-96]

문헌 [Rammensee, H.G. et al., 1995, *Immunogenetics* 41, 178-228]

문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. edition 1990, Mack Publishing
Company, Easton, Penn. 1990]

문헌 [Remy, J.S. et al., 1994, *Bioconjug-Chem.*, Nov-Dec, 5(6), 647-54]

문헌 [Rennie J, and Rusting, R., 1996, *Scientific American September*, 28-30]

문헌 [Rivoltini, L. et al., 1995, *The Journal of Immunology* 154, 5 2257-2265]

문헌 [Robbins, P.F., et al., 1994, *Cancer Res* 54, 3124-6]

문헌 [Robbins, P.F., et al., 1995, *J Immunol* 154, 5944-50]

문헌 [Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A., 1996, *Journ. Exp. Med.* 183, 1185-92.]

문헌 [Robbins, P.F., and Kawakami, Y., 1996, *Curr Opin Immunol* 8, 628-636]

문헌 [Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. *Immunology*, Churchill LivingStone]

문헌 [Rosenberg, S.A., 1996, *Annual Reviews of Medicine*, 47, 481-491]

문헌 [Ryser, H.J. and Hancock, R., 1965, *Science* 150, 501-503]

문헌 [Ryser, H.J. and Shen, W.C., 1978, *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 3867-3870]

문헌 [Schmidt, W., et al., May 1995, *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 92, 4711-4714]

문헌 [Schmidt, W., et al., 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9759-63]

문헌 [Sette, A. et al., 1994, *Mol. Immunol.* 31(11):813-822,]

문헌 [Shen, W.C. and Ryser, H.J., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1872-1876]

문헌 [Shen, W.C. and Ryser, H.J., 1979, *Mol. Pharmacol.* 16, 614-622]

문헌 [Shen, W.C. and Ryser, H.J., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78,

7589-7593]

문헌 [Skipper, J., and Stauss, H.J., 1993, *J. Exp. Med.* 177, 5, 1493-8]

문헌 [Slingluff, C.L. et al., 1994, *Current Opinion in Immunology* 6, 733-740]

문헌 [Stein, D. et al., 1994, *EMBO Journal*, 13, 6, 1331-40]

문헌 [Stuber, G. et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24, 765-768]

문헌 [Sykulev, Y. et al., 1994, *Immunity* 1, 15-22]

문헌 [Theobald, M., Levine, A.J., and Sherman, L.A. (1995) *PNAS* 92, 11993-7]

문헌 [Tibbets, L.M. et al., 1993, *Cancer*, Jan. 15., Vol. 71, 2, 315-321]

문헌 [Tykocinski, M.L. et al., 1996, *Am. J. Pathol.* 148, 1-16]

문헌 [Van der Bruggen, P. et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24, 9, 2134-40 ISSN: 0014-2980]

문헌 [Van der Eynde, B. and Brichard, V.G., 1995, *Current Opinion Immunol.* 7, 674-81]

문헌 [Van Pel, A. and Boon, T., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4718-4722]

문헌 [Van Pel, A., et al., 1995, *Immunological Reviews* 145, 229-250]

문헌 [Vitiello, A. et al., 1995, *J. Clin. Inv.* 95, 1, 341-349]

문헌 [Wagner, E., et al., 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3410-4]

문헌 [Wagner, E., et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6099-103]

문헌 [Wang, R.F., et al., 1995, *J Exp Med* 181, 799-804]

문헌 [Weynants, P. et al., 1994, Int. J. Cancer 56, 826-829]

문헌 [Widmann, C. et al., 1992, J. Immunol. Methods 155(1), 95-99]

문헌 [Wolfel, T. et al., 1994 a), Int. J. Cancer 57, 413-418]

문헌 [Wolfel, T. et al., 1994 b), Eur. J. Immunol. 24, 759-764]

문헌 [York, I.A. and Rock, K.L., 1996, Ann. Rev. Immunol. 14, 369-396]

문헌 [Yoshino, I. et al., 1994 a), J. Immunol. 152, 5, 2393-400]

문헌 [Yoshino, I. et al., 1994 b), Cancer Res., 54, 13, 3387-90]

문헌 [Young, J.W., Inaba, K., 1996, J. Exp. Med., 183, 7-11]

문헌 [Zatloukal, K. et al., 1993, Gene 135, 199-20]

문헌 [Zatloukal, K. et al., 1995, J. Immun. 154, 3406-3419]

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 개체에 의해 발현되는 MHC 분자의 결합 그루브(groove)에 맞거나(fit) 결합하는 항원성 펩티드 또는 펩티드들, 및

(b) 개체의 항원-제시 세포에 대한 펩티드 또는 펩티드들의 결합이나 펩티드 또는 펩티드들의 항원-제시 세포로의 진입을 증가시켜 펩티드 또는 펩티드들의 면역조절 활성을 증가시킬 수 있는,

- i. 폴리아르기닌,
- ii. 폴리리신,
- iii. 폴리오르니틴,
- iv. 히스톤,
- v. 프로타민,
- vi. 폴리에틸렌이민, 및
- vii. 이들의 혼합물

로 구성된 그룹으로부터 선택되는 애쥬번트를 함유하는, 개체에서 면역반응을 조절하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 펩티드 또는 펩티드들이 개체에 의해 발현되는 MHC 분자 또는 분자들에 대한 리간드인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3.

제2항에 있어서, 펩티드 또는 펩티드들이 MHC-I 분자에 대한 리간드인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4.

제2항에 있어서, 펩티드 또는 펩티드들이 MHC-II 분자에 대한 리간드인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 병원체의 단백질로부터 유래된 펩티드를 함유하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6.

제5항에 있어서, 펩티드가 세균 단백질로부터 유래된 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7.

제5항에 있어서, 펩티드가 바이러스 단백질로부터 유래된 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 8.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 또는 펩티드들이 종양 항원 또는 항원들로부터 유래된 것을 특징으로 하는 종양 백신으로 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 9.

제8항에 있어서, 종양 항원 또는 항원들이 개체에 의해 발현되는 종양 항원들로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 치료용으로 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 10.

제8항에 있어서, 종양 항원(들)이 흑색종 항원들인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 11.

제8항에 있어서, 사이토카인을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 12.

제11항에 있어서, 사이토카인인 IL-2, IL-4, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , TNF- α , GM-CSF 또는 그 혼합물 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 13.

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 개체의 상이한 MHC-서브타입에 결합하는 점에 있어서 상이한 복수의 펩티드들을 함유하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 14.

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 자연적으로 발생하는 면역원성 단백질 또는 종양 항원, 또는 그 세포 분해 산물로부터 유래된 하나 이상의 웨티드를 함유하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 15.

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 자연적으로 발생하는 면역원성 단백질(들) 또는 종양 항원(들) 또는 그 세포 분해 산물(들)로부터 유래된 웨티드들과 상이한 하나 이상의 웨티드를 함유하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 16.

제1항에 있어서, 웨티드가 자가면역 질환을 유발하는 단백질로부터 유래된 웨티드의 길항제인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 17.

제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 웨티드가 음전하를 띠는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 18.

제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 애쥬번트가 폴리아르기닌인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 19.

제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 애쥬번트가 폴리리신인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 20.

제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 애쥬번트가 세포성 리간드와 컨쥬게이트된 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 21.

제20항에 있어서, 리간드가 탄수화물 그룹인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 22.

제21항에 있어서, 리간드가 퓨코스인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 23.

제20항에 있어서, 리간드가 트랜스페린인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 24.

제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 기능성 단백질을 암호화하는 서열을 갖지 않는 DNA를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 25.

제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 면역조절 단백질을 암호화하는 DNA를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 26.

제25항에 있어서, 면역조절 단백질이 IL-2, IL-4, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , TNF- α 또는 GM-CSF 그룹으로부터의 사이토카인인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 27.

제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물.

청구항 28.

제27항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체내에 펩티드 및 애쥬번트의 용액 또는 혼탁액의 형태를 띠는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 29.

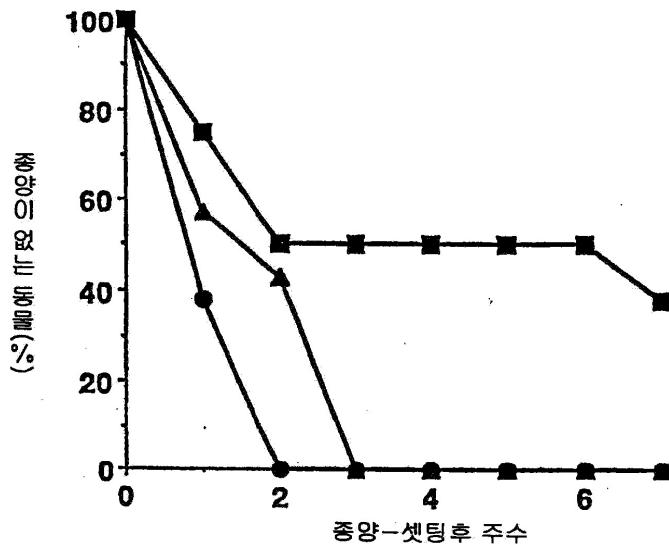
제1항 내지 제4항 및 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 국소 적용을 위한 약제학적 조성물.

청구항 30.

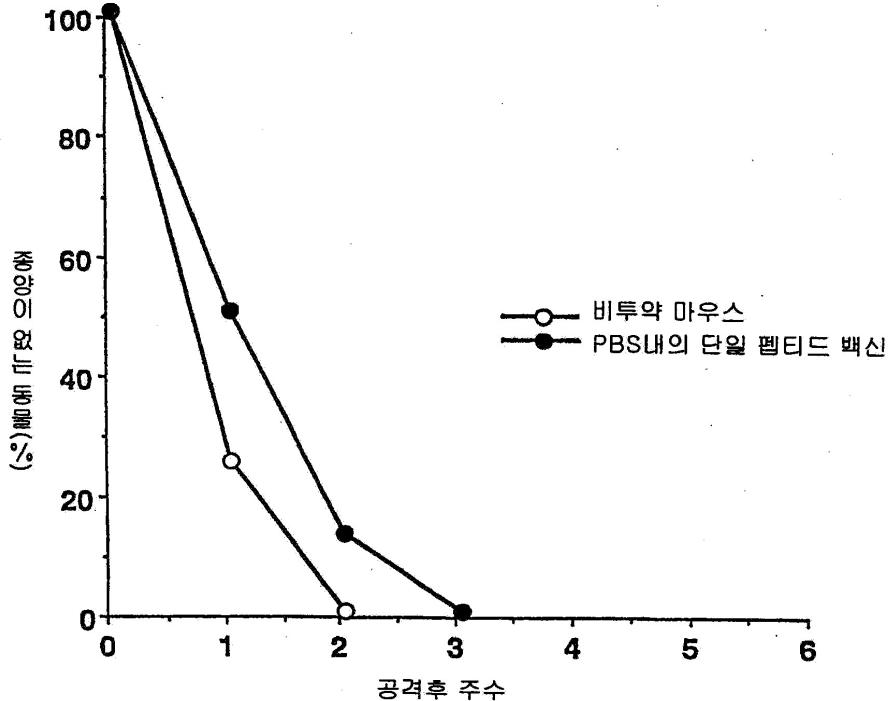
제29항에 있어서, 하이드로겔 형태의 약제학적 조성물.

도면

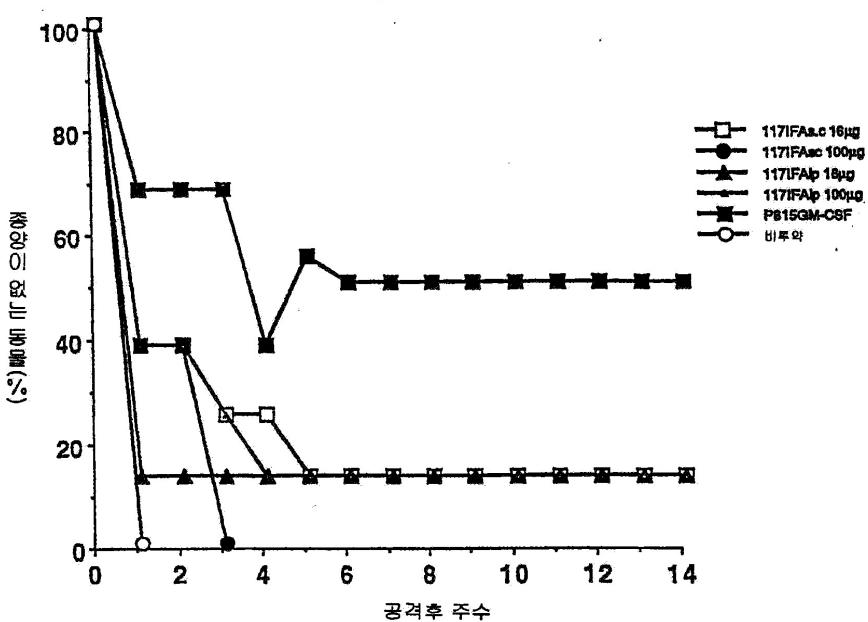
도면1



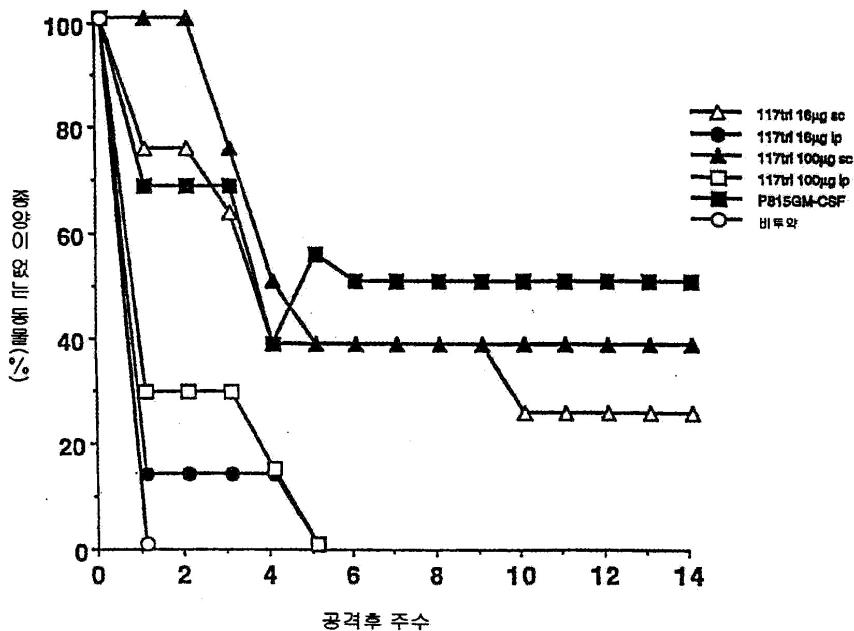
도면2a



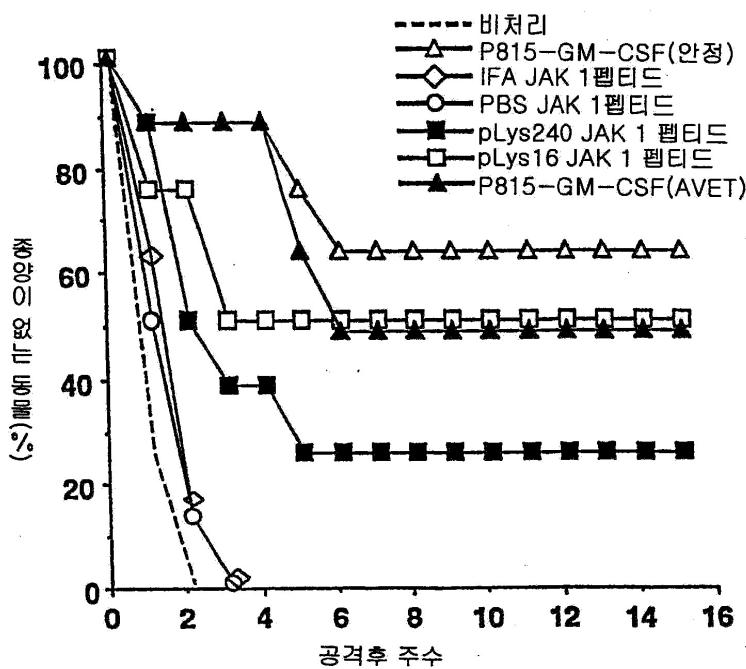
도면2b



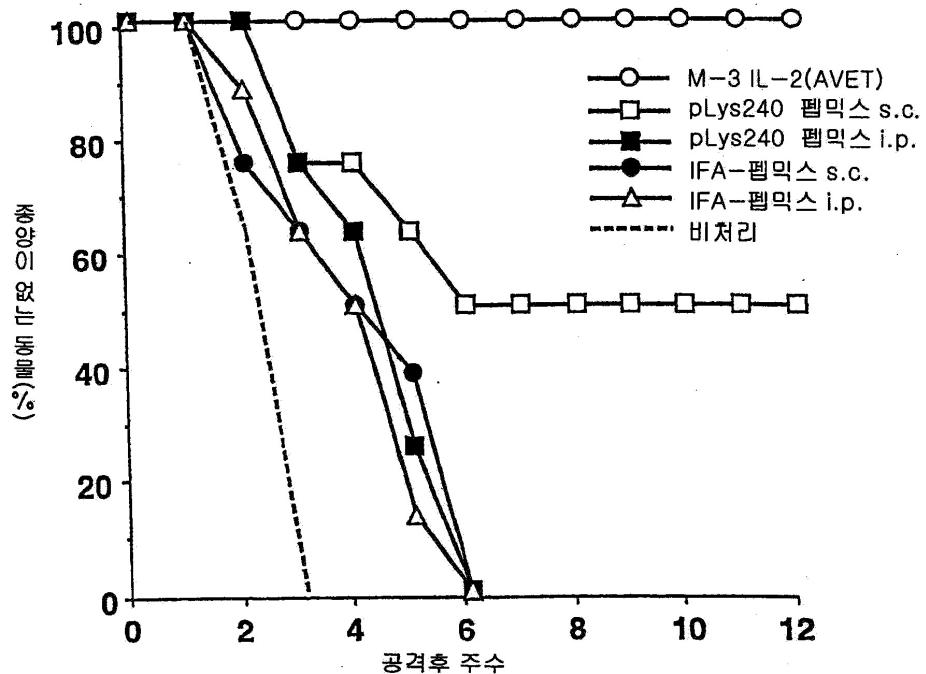
도면2c



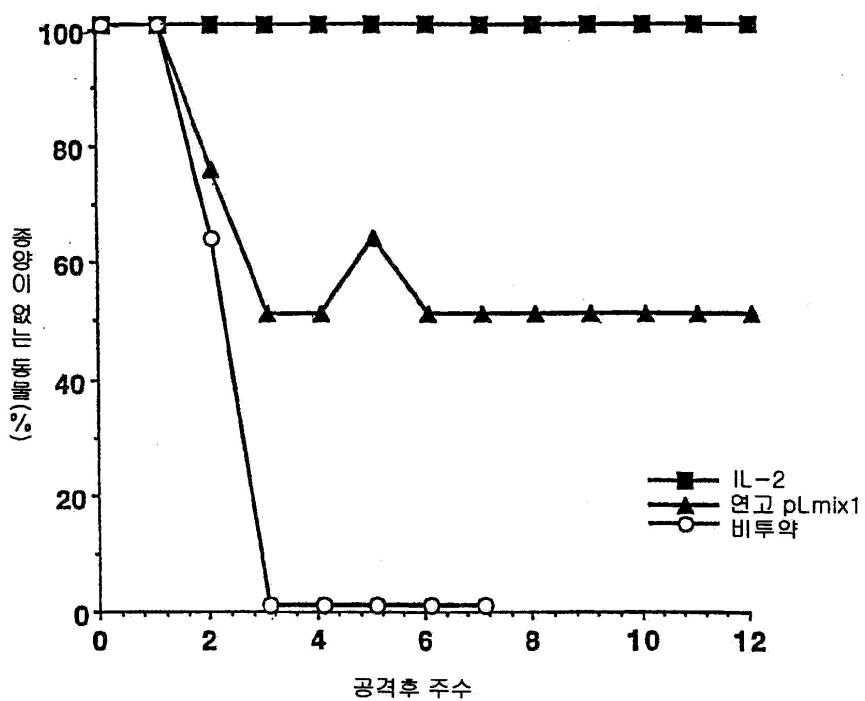
도면3



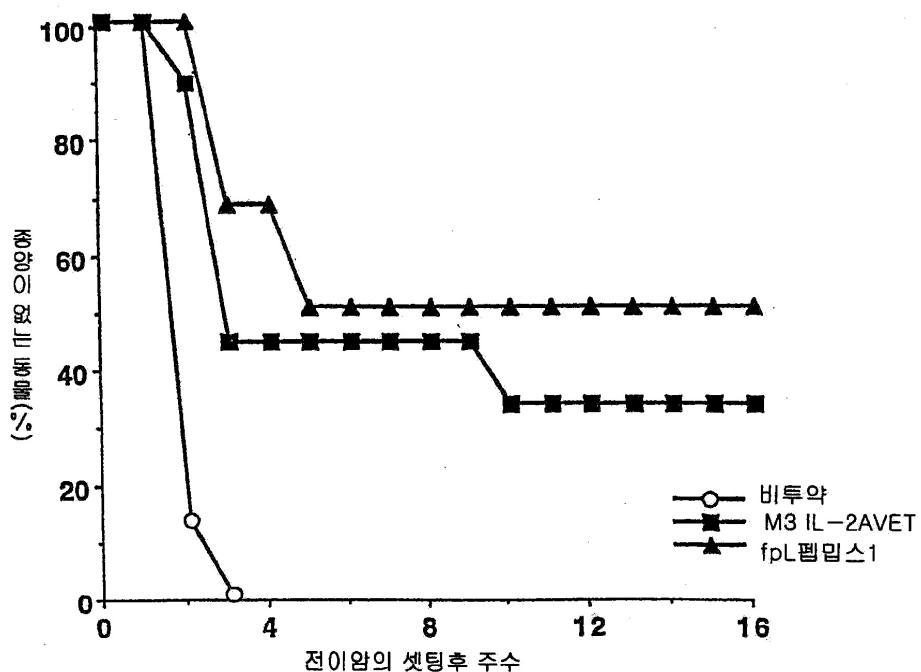
도면4



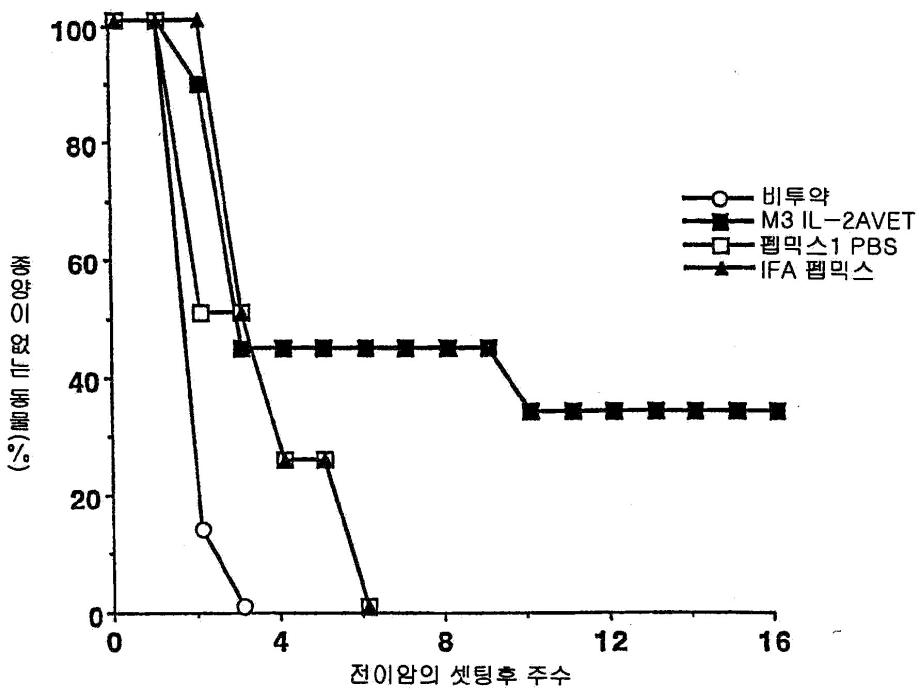
도면5



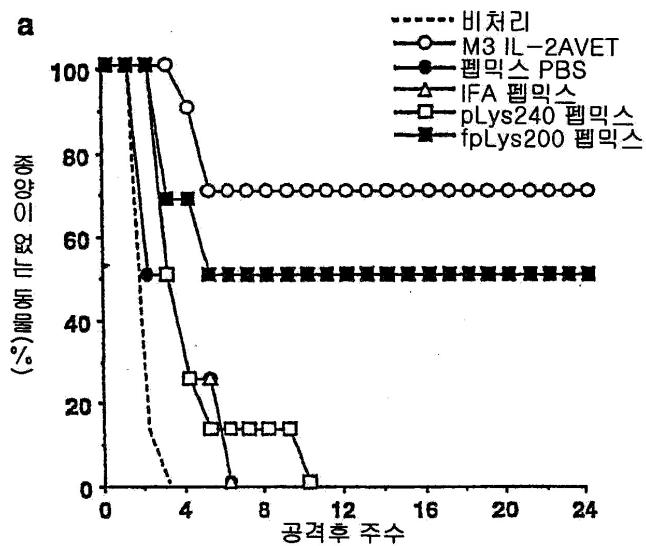
도면6a



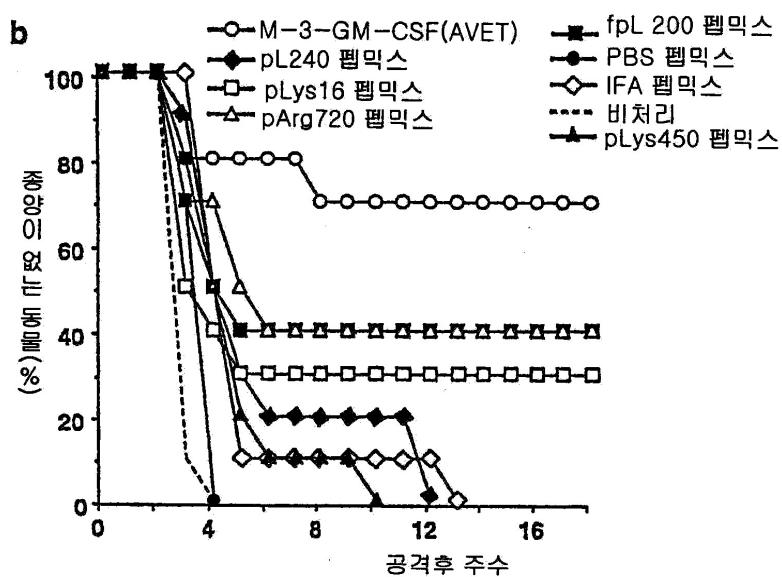
도면6b



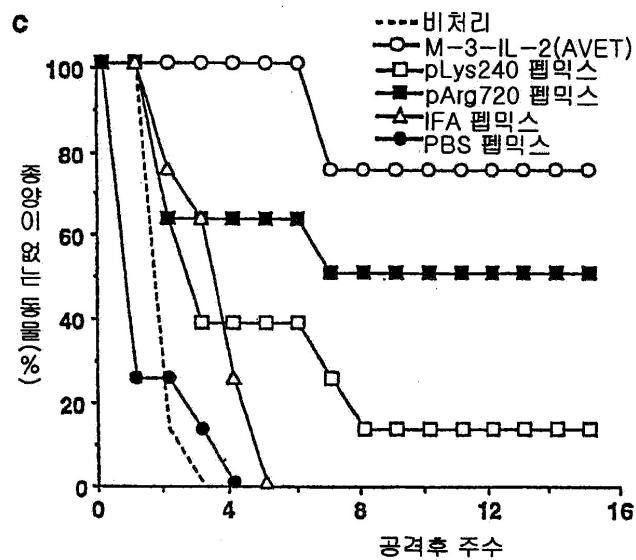
도면7a



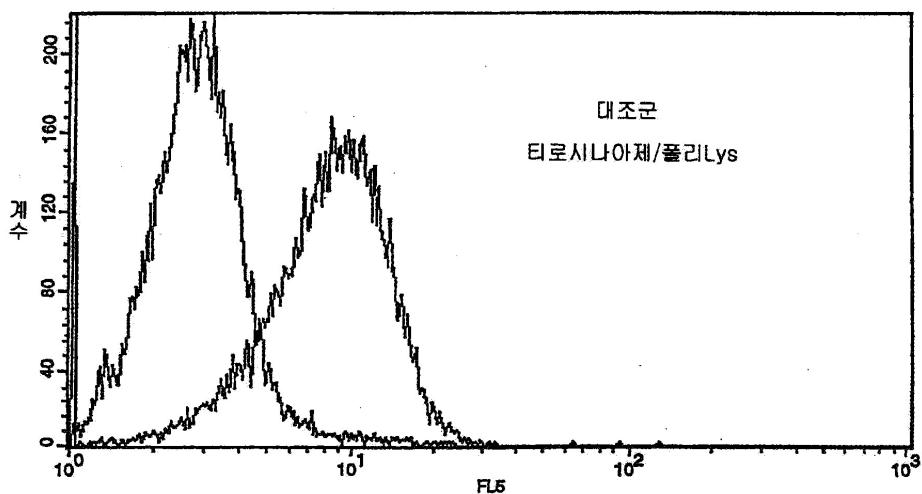
도면7b



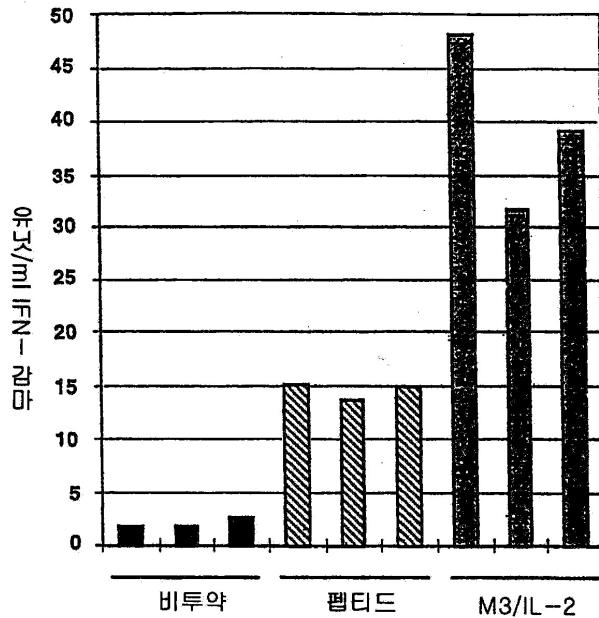
도면7c



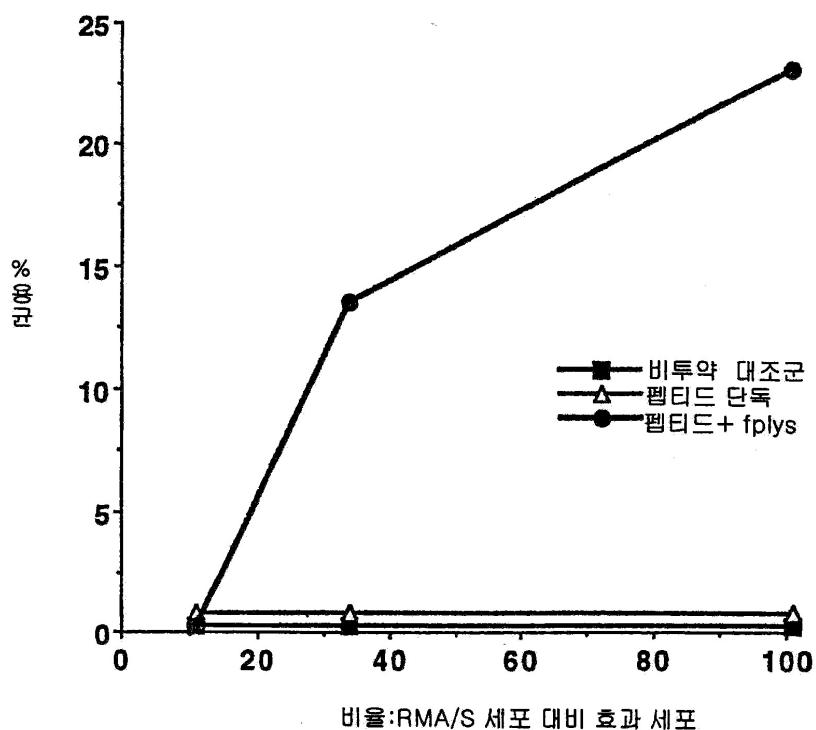
도면8



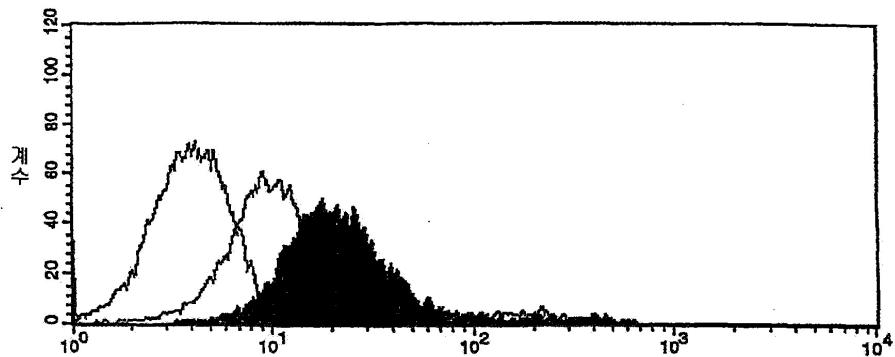
도면9



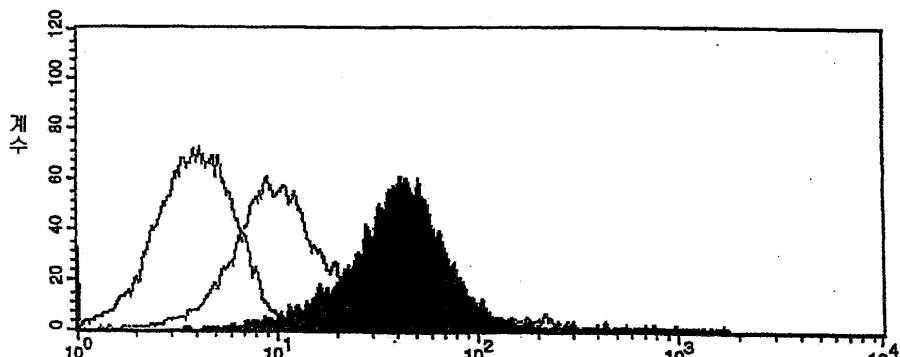
도면10



도면11



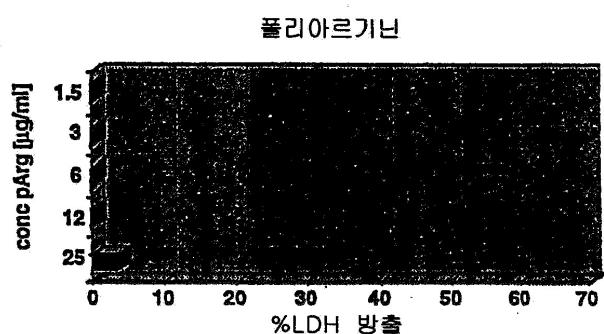
로그 혼합
폴리리신



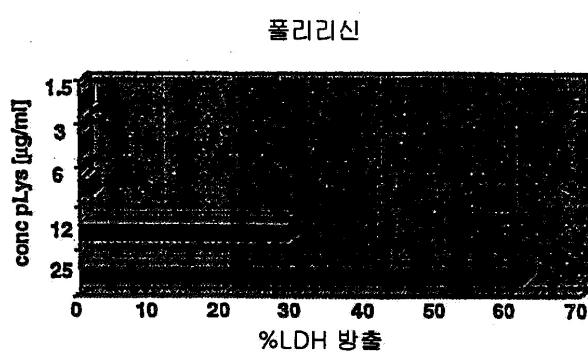
로그 혼합
폴리아르기닌

도면12

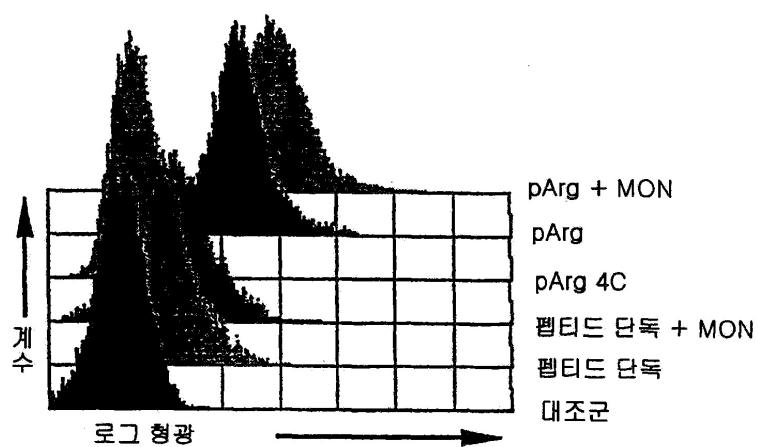
A



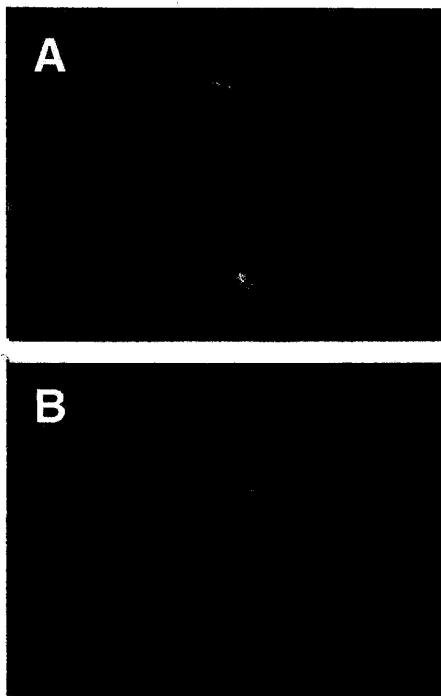
B



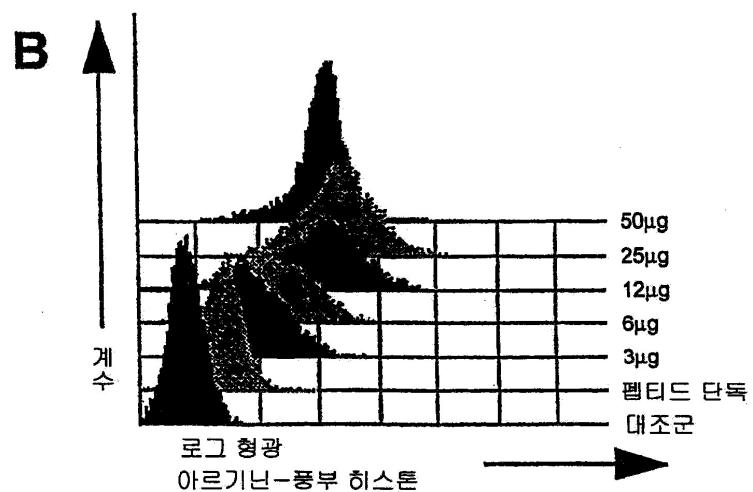
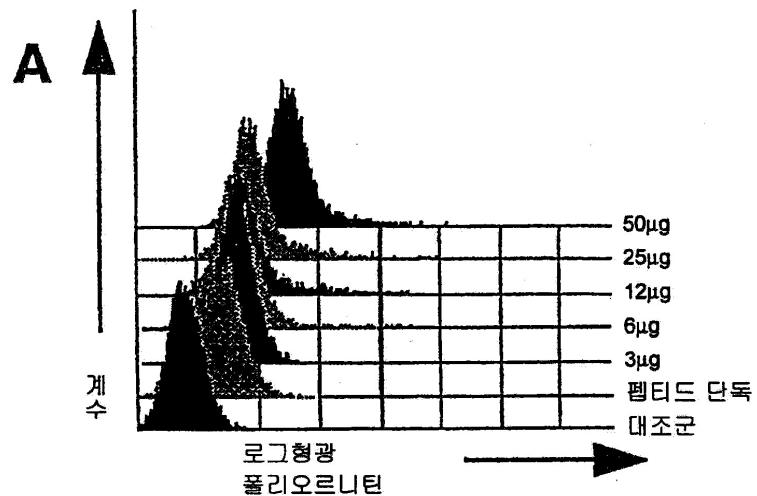
도면13



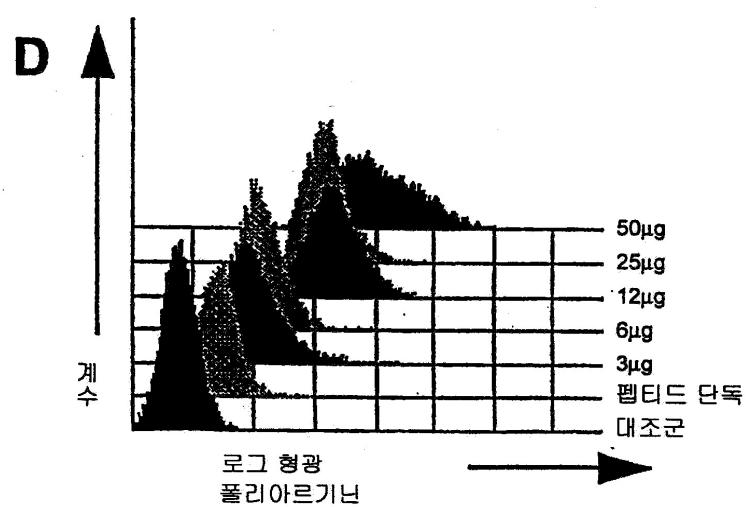
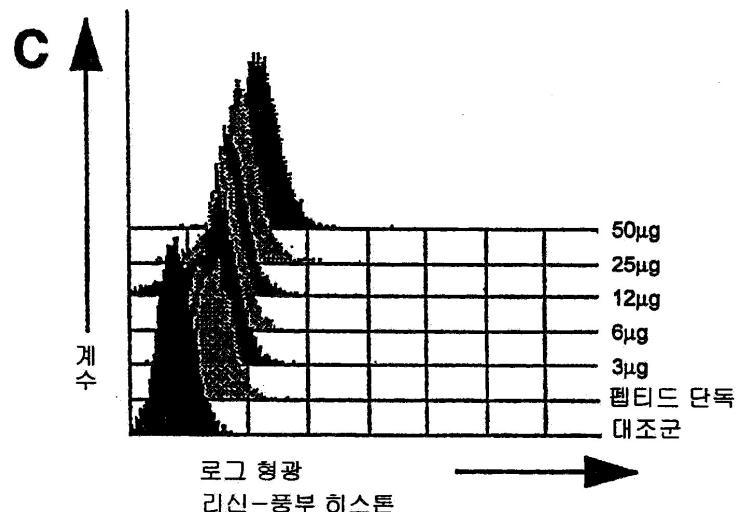
도면14



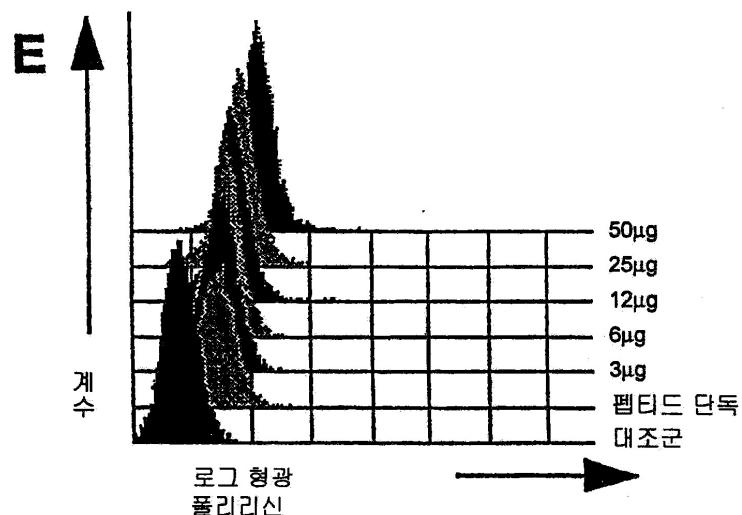
도면15a



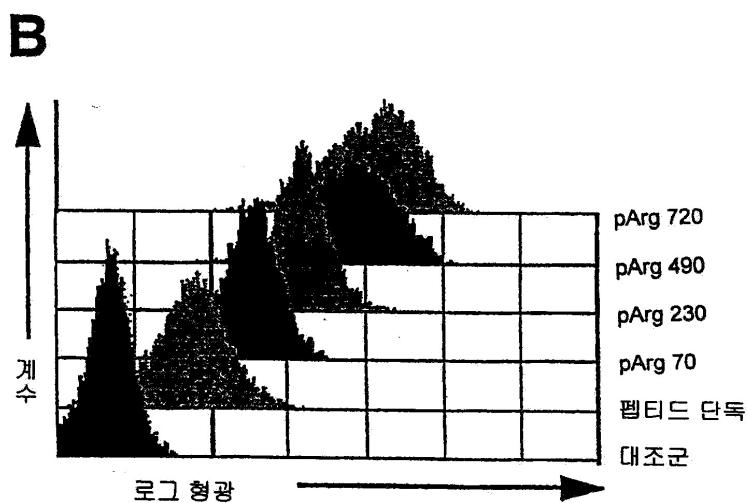
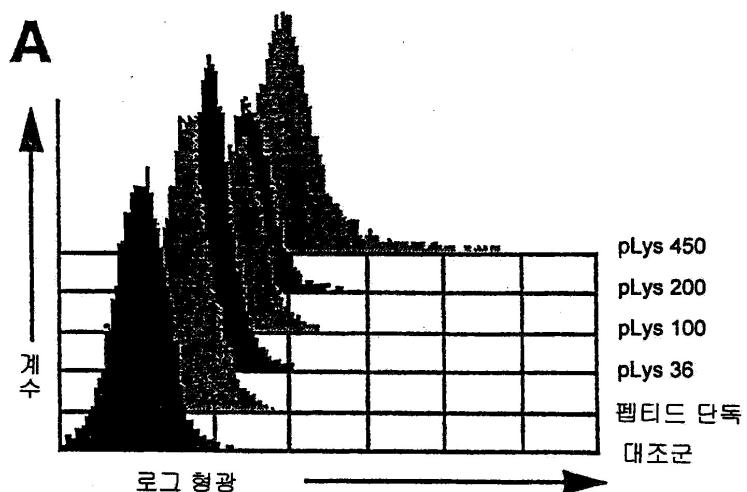
도면15b



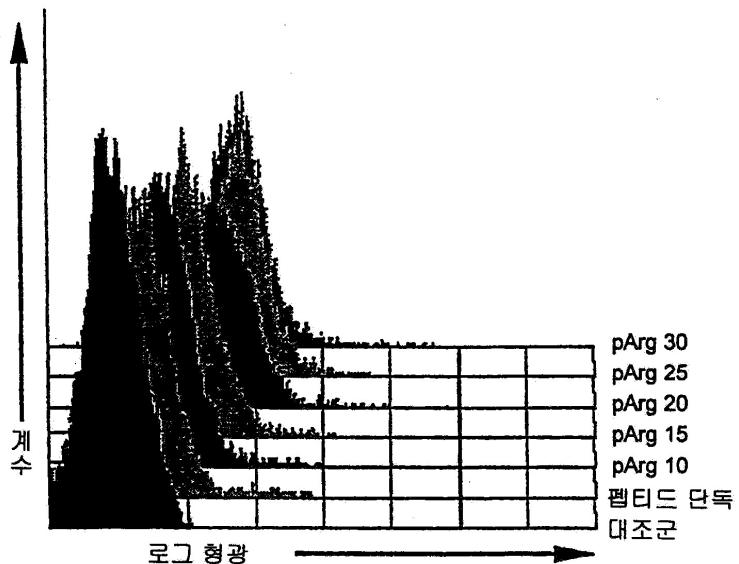
도면15c



도면16



도면17



도면18

