

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/00
C07K 14/16

(11) 공개번호 특2000-0070865
(43) 공개일자 2000년11월25일

(21) 출원번호	10-1999-7007130		
(22) 출원일자	1999년08월06일		
번역문제출일자	1999년08월06일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/02293	(87) 국제공개번호	WO 1998/34640
(86) 국제출원출원일자	1998년02월03일	(87) 국제공개일자	1998년08월13일
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 말라위 수단 스와질랜드 우간다 케냐 레소토 짐바브웨 가나 감비아		
	EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄		
	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드		
	OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		
	국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 키르기즈 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 리투아니아 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드 토바고 우크라이나 미국 우즈베키스탄 베트남 기네비소 시에라리온 인도네시아 유고슬라비아 폴란드 루마니아 러시아 싱가포르 아제르바이잔		
(30) 우선권주장	60/037,854 1997년02월07일 미국(US)		
	9705040.5 1997년03월12일 영국(GB)		
(71) 출원인	머크 앤드 캄파니 인코포레이티드 폴락 돈나 엘.		
(72) 발명자	미국 뉴저지 07065 라웨이 이스트 링컨 애브뉴 126 쉬버존더블유.2세		
	미국뉴저지주07065라웨이이스트링컨애브뉴126		
	데이비스메리-엘렌엠.		
	미국뉴저지주07065라웨이이스트링컨애브뉴126		
	프리드대니얼씨.		
	미국뉴저지주07065라웨이이스트링컨애브뉴126		
	류마가렛에이.		
	미국뉴저지주07065라웨이이스트링컨애브뉴126		
	페리헬렌씨.		
	미국뉴저지주07065라웨이이스트링컨애브뉴126		
(74) 대리인	이병호		

심사청구 : 없음

(54) 합성 HIV gag 유전자

요약

HIV gag 및 변형된 HIV gag를 암호화하는 합성 DNA 분자를 제공한다. 합성 분자의 코돈은 계획된 숙주 세포가 선호하는 코돈으로 구성된다. 합성 분자를 폴리뉴클레오타이드 백신으로 이용하여 중화 항체 및 세포-매개된 면역성을 자극함으로써 HIV 감염에 대한 효과적인 면역예방을 제공한다.

대표도

도 1

색인어

HIV gag, HIV 단백질, 항-HIV 중화 항체, T-세포 면역 반응 및 보호 면역 반응

영세서

기술분야

본 발명은 HIV 백신에 관한 것이다.

배경기술

사람 면역결핍 바이러스-1(HIV-1)은 후천성 사람 면역결핍 증후군(AIDS)과 관련된 질환의 병인성 물질이다. HIV-1은 레트로비리다에 부류의 RNA 바이러스로서, 모든 레트로바이러스는 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' 구조를 가진다. 또한, HIV-1은 tat 및 rev 유전자를 포함하는 조절 또는 기능이 알려지지 않은 유해한 유전자로 구성된다. env-유전자는 바이러스성 엔벨로프 당단백질을 암호화하여, 160kDa 전구물질(gp160)로 해독된 다음, 세포 프로테아제에 의해 절단되어 120-kDa인 외래 엔벨로프 당단백질(gp120)과 트랜스막 41kDa인 엔벨로프 당단백질(gp41)이 된다. gp120과 gp41는 계속 결합되어 있고, 바이러스 입자와 HIV-감염된 세포의 표면에 나타난다. gp120은 헬퍼-T-임파구, 대식세포 및 다른 표적 세포의 표면에 있는 CD4 수용체에 결합한다. gp120가 CD4에 결합한 후에는 gp41이 바이러스의 침입에 관여하는 융합과정을 매개하게 된다.

바이러스 입자에 있는 gp120이 T4 임파구 또는 다른 표적 세포의 표면에 있는 CD4에 결합함으로써 감염이 시작된다. 결합된 바이러스는 표적 세포와 합쳐지고, RNA 게놈으로부터 세포의 이본체 DNA로 역전사된다. 바이러스 DNA는 세포 핵에 있는 유전 물질에 결합되는데, 이때 바이러스 DNA는 새로운 바이러스성 RNA, 바이러스성 단백질, 및 새로운 바이러스성 입자를 생산하게 된다. 새로운 입자는 표적 세포막으로부터 발생하여 다른 세포를 감염시킨다.

면역 방어에 중요한 T4 임파구를 파괴하면, 면역기능에 점차적으로 이상이 생겨 HIV 감염의 특징이 된다. 표적 세포가 손상되면, 인체는 대부분의 침입자와 싸울 능력을 잃게 되고, 바이러스, 곰팡이, 기생충 및 미코박테리아를 포함하는 특정 박테리아에 대한 방어 기작에 특히 심각한 타격을 받게 된다.

HIV-1은 세포에서 복제되고, 세포로부터 뿜어나와 세포막을 손상시켜 감염된 세포를 죽인다. HIV-1은 감염된 세포 표면에서 작용하는 바이러스성 gp120을 이용하여 간접적으로 표적 세포를 죽일 수 있다. T 세포에서 CD4 수용체는 gp120에 대한 강력한 친화력을 가지는데, CD4 수용체를 발현시키는 건강한 세포는 gp120에 결합할 수 있고, 감염된 세포와 융합하여 합포체 세포를 형성한다.

HIV-1은 또한 감염된 세포에 대해 정상적인 세포 면역 방어 기작을 유도할 수 있다. 항체의 도움을 받지 아니면 못받더라도, 세포독성 방어 세포는 세포 표면에 바이러스성 단백질을 발현시키는 감염된 세포를 파괴할 수 있다. 마지막으로, 자유 gag 및 gp120 단백질은 HIV-1 감염된 개체의 혈액에서 순환하게 된다. 자유 gp120 단백질은 비감염된 세포의 CD4 수용체에 결합하여, 개체가 감염되도록 하고, 면역 반응을 일으킨다.

HIV-1에 의한 감염은 거의 언제나 치명적이고, 현재까지는 HIV-1 감염에 대한 치료법은 없다. HIV-1 감염을 예방하는데 효과적인 백신은 아직 없다. 역전 또는 감염 위험 때문에, 살아있는 약독화 바이러스를 백신으로 이용할 수 없다. HIV 감염을 예방하는데 있어서 대부분 아단위 백신 방법도 성공을 하지 못하였다. 일부 감염자의 생명을 연장시키기는 하지만 HIV-1 감염 치료를 할 경우에는 심각한 부작용이 있다. 따라서, 이와 같은 치명적인 감염을 물리칠 수 있는 효과적인 치료 및 백신이 절실히 요구된다.

백신화는 질병 예방에 가장 효과적인 형태로써, 다양한 유형의 바이러스 감염에 대해서 성공하였다. 보호성 체액 및 세포 면역 반응을 유도하기 위해 사람 면역계에 대해 HIV-1 항원을 제공하는 방법을 결정하는 것은 힘든 작업이다. 현재까지, 효과적인 HIV 백신을 만드려는 시도는 성공하지 못하였다. AIDS 환자의 경우에, 자유 바이러스만이 소량 존재한다. 융합 및 합포체 세포 형성을 통한 세포-세포간 상호작용에 의해 HIV-1의 전달이 강화된다. 그러므로, 자유 바이러스 또는 바이러스성 아단위에 대해 발생된 항체는 일반적으로 바이러스 감염된 세포를 제거하는데 효과적이지 못하다.

백신은 신체가 항원을 기억하는('remember') 능력을 이용한다. 주어진 항원에 처음 대면한 후에 면역계는 세포가 개인의 일상동안에 항원에 대한 면역학적 기억을 보유한다. 항원에 연속적으로 노출시키면 면역 반응을 자극하게 되어, 병원균을 제거하거나 활성을 없애도록 한다.

면역계는 두 가지 방식, 즉 체액 반응 및 세포-매개된 반응으로 병원균을 다루게 된다. 체액 반응에서는 임파구가 항원에 결합하여 병원균을 불활성화시키는 특정 항체를 만든다. 세포-매개된 반응에서는 감염된 세포를 특이적으로 공격하여 파괴하는 세포독성 및 헬퍼 T 임파구가 관련된다.

HIV-1 바이러스를 이용한 백신 개발에는 현재 문제가 있는데, 그 이유는 HIV-1은 면역계에서 백신의 활성화에 필요한 동일한 세포(T4 임파구)의 일부에 감염되기 때문이다. 면역계가 손상되기 전에 HIV를 불활성화시키는 백신을 개발하는 것이 바람직하다. 적합한 특정 타입의 HIV 백신은 HIV 변이균을 인지하는

항-HIV 면역 반응을 일으키고, 이는 HIV 감염이 시작되는 HIV-양성 개체에서 작용할 수 있다.

바이러스 특히, 사람 면역결핍 바이러스와 같은 돌연변이 비율이 높은 바이러스에 대해, 중화 및 보호성 면역 반응을 일으킬 수 있는 백신을 개발하는데 주된 장애요인은 여러 가지 다른 바이러스성 분리물 또는 균주중에 바이러스성 엔벨로프 단백질이 다양하다는데 있다. 쥐와 사람 모두에서 세포독성 T-림프구(CTL)는 바이러스내 보존된 단백질에서 유도된 에피토프를 인지할 수 있어, 바이러스에 대한 면역 반응에 중요한 것으로 보이기 때문에, 여러 가지 다른 바이러스 균주에 대해 이중 보호를 제공할 수 있는 CTL 백신을 개발하는 방향으로 심혈을 기울이고 있다.

CD8⁺ CTL은 T 세포 수용체가 MHC-I 분자와 결합된 바이러스성 펩타이드를 인지하게 되면 바이러스에 감염된 세포를 죽이는 것으로 알려져 있다. 바이러스성 펩타이드는 바이러스내에 단백질의 위치 및 기능에는 무관하게 합성된 바이러스 단백질 내부에서 유도된다. 따라서, 바이러스성 보존 단백질에서 에피토프를 인지함으로써, CTL은 균주간에 보호를 제공할 수 있다. CTL을 인지하기 위해 MHC-I과 결합할 수 있는 펩타이드는 세포질 또는 망상내피에 존재하거나 이를 통과하는 단백질로부터 기인한 것이다. 일반적으로, 엔도솜 프로세싱 경로에 들어가는 외래 단백질(MHC-II 분자에 의해 제공되는 항원의 경우)은 CD8⁺ CTL 반응을 유도하지 못한다.

CTL 반응을 발생시키는 대부분의 시도는 세포내에서 백터를 복제시켜 단백질 항원을 만드는데 이용되거나, 세포질내에 펩타이드를 도입시키는데 있다. 이와 같은 방법은 백신으로 이들의 이용성을 감소시키기 때문에 한정된다. 레트로바이러스 백터는 융합 단백질로 발현될 수 있는 폴리펩타이드의 크기 및 구조에 제한을 두지만 재조합 바이러스의 복제 능력을 유지하고 있으며, 연속하여 면역화를 위한 종두와 같은 백터의 효과는 백터 자체에 대한 면역 반응에 의해 완화된다. 또한, 바이러스성 백터 및 변형된 병인균은 고유의 위험 요소를 가지기 때문에, 사람에게 이용하지 못한다. 또한, 개체의 MHC 항원의 구조에 따라 제공할 펩타이드 에피토프가 선택되기 때문에, 펩타이드 백신은 이중교배 모집단에서 MHC 반수체의 다양성으로 인하여 효과가 제한된다.

문헌[참조: Benvenisty, N., and Reshef, L. [PNAS 83, 9551-9555, (1986)]은 마우스 복막(i.p.), 정맥(i.v.), 근육(근육내)을 통하여 도입된 CaCl₂-침전시킨 DNA가 발현되었다는 것을 보여주었다. 마우스에서 CaCl₂ 처리하지 않고 DNA 발현 백터를 근육내 주사하면 근육 세포가 DNA를 수용하여, DNA에 의해 암호화된 단백질이 발현된다. 플라스미드는 에피솜에 유지되지만, 복제되지는 않는다. 연속하여, 래트, 물고기, 양장류의 골격근 및 래트의 심장 근육에 근육내 DNA 주사하면 지속적으로 발현된다는 것이 관찰되었다. 치료제로 핵산을 이용하는 기술이 W090/11092(4 October 1990)에서 보고되고 있는데, 이때 네이키드-폴리뉴클레오타이드를 이용하여 척추동물에 백신 주사하였다.

근육내로 면역화하는 방법이 반드시 성공하지는 않는다. 마우스의 피부에 사람 성장 호르몬(HGH)을 암호화하는 DNA가 피복된 금 미소발사물을 도입하면 마우스에서 항-HGH 항체가 생산된다. 제트 인젝터를 이용하여 살아있는 동물의 피부, 근육, 지방, 유방 조직에 형질도입시킨다. 핵산을 도입하는 다양한 방법이 재고되었다. 마우스에서 DNA:양이온 리포솜 복합체를 정맥 주사하여 클로닝된 트랜스유전자를 전신 발현시키는 방법이 문헌[참조: Zhu et al., Science 261:209-211(9 July, 1993)]에 설명되어 있다. 문헌[참조: Ulmer et al., Science 259: 1745-1749, (1993)]는 인플루엔자 바이러스 단백질을 암호화하는 DNA를 근육으로 주사하여 인플루엔자 바이러스 감염에 대해 이중 보호를 한다는 것을 보고한 바 있다.

본 발명은 병인균 및 종양 항원에 대해 목적하는 면역 반응을 유도할 수 있는 특정한 치료학적 및 예방학적 물질이 필요하다는 요구를 충족시킨다. 이와 같은 치료학적 방식에 특히 중요한 것은 항원 유전자를 얻은 균주에 이중성인 바이러스 균주에 의한 감염 또는 질병을 예방할 수 있는 T-세포 면역 반응을 유도할 수 있다는 것이다. 이와 같은 바이러스로써 HIV는 신속하게 돌연변이되고, 많은 유독성 분리물이 확인된 것(245개 별개의 HIV 분리물이 확인됨)으로 특히 관심을 받고 있다[참조: LaRosa et al., Science 249:932-935(1990)]. 이와 같은 인지도된 다양성에 반응하여, 연구자들은 펩타이드 면역화에 기초한 CTL을 생성하려는 시도를 하였다. 따라서, 문헌[참조: Takahashi et al., Science 255:333-336 (1992)]은 HIV 엔벨로프(gp160) 결정기를 인지하는 광범위한 교차-반응성 세포독성 T-세포를 유도하는 것에 대해 보고하였다. 그러나, 이들 연구자들은 실제 교차-반응성이 있는 CTL 반응을 얻는데 어려움이 있다는 것을 인지하여, 매우 엄격한 것으로 알려진 T 세포를 프라임 또는 다시 자극시키는 것과 이미 자극을 받은 CTL로부터 세포독성을 포함하는 효능기 기능을 유도하는 것으로 이분되어 있다고 제시한 바 있다.

문헌[참조: Wang et al.]은 클론된 게놈(비스플라이싱된) HIV 유전자를 근육내에 접종하여 HIV에 대해 마우스에서 면역 반응을 유도하는 것에 대해 보고하였다. 그러나, 이와 같은 연구에서 얻은 면역 반응 수준은 매우 낮았다. 문헌[참조: Wang et al.]에 추가하여, DNA 작제물은 인접하는 Tat/rev-gp160-Tat/rev 암호화 서열을 암호화하는 HIV 게놈 조각을 기본적으로 이용한다. 하기에서 상세하게 설명하겠지만, 이것은 gp160을 고도로 발현시킬 수 있는 차선택이다. 카포시 육종의 진행에는 Tat 발현이 관련되기 때문에 위험요소 또한 내포하고 있다.

WO 93/17706는 바이러스에 대해 동물을 백신화하는 방법에 대해 설명을 하고 있는데, 이때 캐리어 입자는 유전자 작제물로 피복되어 있고, 피복된 입자는 동물의 세포로 신속하게 들어간다. HIV에 대해, 긴 말단 반복체를 뺀 기본적인 전체 게놈을 이용할 것을 제안하고 있다. 이 방법은 실질적으로 수용자에게 위험이 있다. 일반적으로 HIV 작제물은 HIV 게놈의 50% 미만을 포함하는 경우에 안정한 백신으로 간주하는데, 이는 기능이 알려지지 않은 또는 잘 모르는 대부분의 효소 부분, 바이러스성 조절 단백질이 제거되었기 때문이다. 따라서, 유용한 사람 HIV 백신이 유전자-전달 기술에서 발생하는 경우에 상당수 문제가 남아있게 된다.

본 발명은 살아있는 조직에 폴리뉴클레오타이드를 도입하여 단백질 발현을 유도하는 공지 방법을 고려한다. 그러나, 이 방법은 HIV 및 다른 단백질을 항원 프로세싱 경로에 도입하여 효과적으로 HIV-특이적인 CTL 및 항체를 발생시키는 새로운 면역원을 제공하는 것이다. 세포 및 체액 항-HIV 및 HIV 중화 면역 반응을 유도할 수 있는 백신이 약제학적으로 효과적이다. 본 발명에서는, 상기에 기술한 문제에 대해 동물에게 폴리뉴클레오타이드 면역원을 도입시켰을 때 이들 방법에 수반되는 위험없이 HIV 단백질 및 에피토프

프의 효과적인 발현에 관계하는 폴리뉴클레오타이드 번역원을 제공함으로써 해결하였다. 따라서, 발생한 번역 반응은 HIV를 인지하는데, HIV 복제를 저해하는데, 및 HIV에 감염된 세포를 확인하여 죽이는데 효과적이고, 많은 HIV 균주에 대해 교차 반응을 할 수 있다.

유기체의 코돈 짝짓기는 매우 일정하나, 유기체간에는 다르다. 이와 같은 정보를 이용하여, 목적하는 수준의 해독 효과를 가지는 변형된 또는 합성된 유전자를 작제하여 발현시키며; 계놈에 있는 어느 영역이 단백질 암호화 영역인지를 확인하고; 이중 유전자에 해독 중지 부위를 도입시키고; 뉴클레오타이드 서열의 관계 및 조상의 기원을 확인할 수 있다.

형질전환된 유기체에서 외래 이중 유전자를 발현시키는 것은 현재 일상적인 기술이 되었다. 쥐 및 사람 유전자를 포함하는 다수의 포유류 유전자를 단일 세포 유기체에 도입시키는데 성공하였다. 이와 관련된 표준 기술은 플라스미드 또는 파야지와 같은 벡터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 도입시키고, 벡터를 이용하여 유기체에 유전자를 삽입시키는 것이다. 이와 같은 유전자의 천연 프로모터는 통상적으로 유전자가 삽입되는 속주에 필적할 수 있는 강력한 프로모터로 대체된다. 단백질 서열화 기술을 이용하면 매우 소량의 천연 단백질이라도 아미노산 서열을 확인할 수 있다. 확인된 아미노산 서열로부터, 이들 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 추정할 수 있다. DNA 합성법은 급속히 발전하는 기술 분야로써, 이와 같은 추정된 DNA 서열에 상응하는 합성 유전자를 바로 작제할 수 있다.

발현 시스템 및 재조합 DNA에 대해 다양한 지식이 발전됨에도 불구하고, 유기체에서 외래 또는 합성 유전자를 발현시키고자 할 때 상당한 장애가 여전히 남아있다. 예를 들면, 많은 천연 활성 단백질은 외래 속주에서 발현되었을 경우와는 다른 방식으로 글리코실화된다. 이와 같은 이유로 많은 포유류 유전자를 발현시키는 박테리아 속주로서는 효모와 같은 진핵 속주가 적절하다. 글리코실화 문제는 지속적인 연구 과제이다.

더욱 이해가 되지 않은 또 다른 문제가 있다. 강력한 프로모터와 결합하여 이용하더라도, 합성된 유전자의 해독 효과가 예상한 것보다 효과가 훨씬 적을 수도 있다. 발현 유기체에 이질적인 외래 유전자의 경우도 마찬가지이다. 충분히 효과적인 방법으로 유전자가 전사되어 회수할 수 있을 정도의 해독 생성물의 양이 생성되더라도, 단백질은 활성이 없거나 또는 천연 단백질과는 다른 단백질이 될 수 있다.

후자의 경우는 다양한 유기체에서 단백질 폴딩 방식이 다르기 때문이다. 이 문제를 해결하는 것은 쉬운 일이 아니며, 단백질 폴딩을 제어하는 기작에 대해서는 거의 알려진 바가 없다.

해독 효과와 관련된 문제는 코돈 구성(context) 영향과 관련이 있는 것으로 보인다. 모든 유기체의 유전자의 단백질 암호화 영역은 매우 다양한 기능상 제한을 받는데, 이들중 일부는 적절한 기능 단백질을 암호화하는 요건 및 적절한 해독 개시 및 종결 시그널에 따라 달라진다. 그러나, 단백질 암호화 영역의 일부 특징이 밝혀졌으나, 이들 제한에 대해서는 아직 완전하게 이해되지 않았다. 이와 같은 특징중 두 가지 중요한 것은 코돈 이용 및 코돈 구성과 관련된다.

코돈 이용은 다른 유기체간에 상당히 다양하고, 매우 편중된 것으로 알려져있다. 코돈 이용 패턴은 tRNA 이소수용체(isoacceptors)가 상대적으로 풍부한 것과 관련이 있는 것으로 보인다. 매우 풍부한 것과 매우 빈약한 단백질을 암호화하는 유전자는 이들의 코돈 선호도에서 차이가 나타난다. 펩타이드 신장 비율을 변경시키는 코돈 이용에서 편중될 가능성에 대해서는 광범위하게 논의된 바 있다. 코돈 이용에서의 차이는 해독 속도의 차이와 관계되고, 해독에서 코돈 선택의 직접적인 영향에 대해서는 설명하기가 어렵다. 코돈 이용 패턴에 있어서, 제시되는 다른 제한으로는 해독 신뢰성을 최대화시키고, 단백질 합성의 역학적인 효과를 최적화하는 것을 포함한다.

코돈의 일정한 이용과는 별개로, 코돈/안티코돈 인지는 코돈 자체 외부의 서열에 의해 영향을 받는다는 것을 증명할 수 있는 상당한 자료가 있는데, 이와 같은 현상을 '코돈 구성(codon context)'이라고 한다. 넨센스 코돈 및 미스센스 코돈의 억제 효과에는 인접한 뉴클레오타이드가 강력하게 영향을 준다. 분명한 것은, 천연 박테리아 모집단에서 억제인자의 활성이 풍부한 것과 셀레노시스틴 및 포스포세린을 암호화하는 '종결' 코돈을 이용하면, 이와 같은 종결이 코돈 구성에 따라 달라진다는 것이다. 유사한 코돈 구성 효과가 해독 신뢰성 뿐만 아니라 해독 개시 효과에도 영향을 주는 것으로 나타났다.

이. 콜라이(E. coli)의 단백질 암호화 영역을 통계학적으로 분석한 것에 따르면, 또 다른 '코돈 구성'을 설명한다. 특정한 위치에서 특정 코돈이 존재함으로써 인접하는 코돈의 특정 뉴클레오타이드의 발생 빈도에 상당한 영향을 주고, 이와 같은 구성 제한은 많이 발현되는 유전자와 적게 발현되는 유전자간에 상당한 차이가 있다는 것이다. 구성 효과에 대해 인지하고 있지만, 코돈에 인접한 선호하는 뉴클레오타이드에 관계하는 통계학적인 규칙에 대한 예상치는 상대적으로 낮다. 따라서, 목적하는 해독 효과 수준을 얻기 위한 코돈을 선택하는데 있어서 이러한 뉴클레오타이드 선호도를 이용하는 것에 제한을 받는다.

다양한 유기체에 대해 매우 많은 서열 데이터를 이용하는 자동화된 뉴클레오타이드 서열화 장비가 도입되었다. 이들 데이터를 이해하는 것이 실제 용이한 것은 아니다. 예를 들면, 유전자 서열 데이터를 단백질 서열과 연관시키기 위해서는 계놈의 암호화 영역을 확인하는 것이 중요하다. 또한, 특정 유기체의 계놈 가계도 실제로 흥미가 있다. 일부 유기체의 계놈은 혼합 가계형이다. 바이러스 기원의 일부 서열은 현재 진핵 유기체 계놈내로 안정하게 도입되었다. 바이러스 서열 그 자체는 실제로 무관한 또다른 종으로부터 기인되었다. 유전자의 가계를 이해하는 것은 관련 유전자와 다른 유기체에 있는 이들의 해독 생성물간의 상동성을 적절히 추정하는데 중요하다.

해독에서 코돈 구성 효과를 더욱 이해할 필요가 있고, 임의로 목적하는 해독 효과를 위해 적절한 코돈을 결정하는 방법이 필요하다. 뉴클레오타이드 서열 데이터로부터 계놈의 암호화 영역을 확인할 수 있는 방법이 또한 필요하다. 단백질 폴딩을 조절하는 방법 및 속주에서 외래 유전자가 발현되었을 때 적절한 폴딩을 보장하는 방법이 또한 필요하다. 목적하는 해독 효과에 따라 변형된 또는 작제된 유전자는 매우 가치가 있다.

산업적으로 또는 약제학적으로 관심이 있는 단백질을 미생물을 이용하여 발현시키는 재조합 DNA 기술을 실행하는데 있어서, 또 다른 목표는 '코돈 선호도' 현상이다. 처음에 언급된 바와 같이, 유전적으로 형

질 전환된 숙주 세포에서 유전자 발현을 위한 기존의 기작은 주어진 목적하는 생성물을 작제하도록 '작동'할 것이고, 미생물에서 수득되는 발현 수준은 삽입된 외래 유전자에 존재하는 아미노산-특이적 유전자 코드의 형태에 따라 부분적으로 상당히 달라진다. 4개 뉴클레오타이드 염기의 '삼문자' 코돈은 64개 변이체 형태로 존재한다. 이와 같은 많은 형태가 단지 20개의 다른 아미노산(뿐만 아니라 전사 개시 및 종결)에 대한 메시지만을 제공하기 때문에, 이는 일부 아미노산의 경우에는 한개 이상의 코돈에 의해 암호화된다는 것을 의미한다. 또한, 일부 아미노산은 최고 6개의 다른 '풍부한' 코돈을 가지는 반면에, 일부 다른 아미노산은 한개의 필수 코돈만을 가진다. 이 이유에 대해서는 완전하게 이해되지는 않았지만, 또 다른 코돈은 다른 형태의 세포의 내인성 DNA에 전부 균일하게 존재하지는 않으며, 다양한 천연 등급 또는 특정 세포 형에서는 특정 코돈을 '선호'하는 것으로 보인다.

예를 들면, 아미노산 루이신은 CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, 및 TTG(이는 각 mRNA 코돈 CUA, CUC, CUG, CUU, UUA, 및 UUG에 상응함)을 포함하는 6개의 DNA 코돈 중 어느 하나에 의해 특정된다. 미생물에서 계승 코돈 빈도를 분석한 결과에 따르면, 이. 콜라이(E. coli)의 내인성 DNA에서는 CTG-루이신 특이적 코돈이 가장 풍부하였고, 효모 및 점액 곰팡이 DNA에는 TTA-루이신 특이적 코돈이 가장 많았다. 이와 같은 관계로 볼 때, 이. 콜라이 숙주(E. coli)에 의한 루이신이 풍부한 폴리펩타이드를 고도로 발현시키는 환경은 이용되는 코돈의 빈도에 따라 어느 정도 달라진다는 것이다. 예를 들면, TTA 코돈이 풍부한 유전자는 이. 콜라이(E. coli)에서 발현될 가능성이 희박하고, CTG가 풍부한 유전자는 폴리펩타이드를 고도로 발현시킨다. 유사하게, 루이신이 풍부한 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 효모 세포를 계획된 형질전환 숙주 세포로 이용할 경우에, 삽입된 DNA에서 사용하기 위해 선호되는 코돈은 TTA가 될 것이다.

재조합 DNA 기술에서 코돈 선호 현상의 관계는 명확한 것으로, 이 현상으로 기존 연구에서 형질전환이 성공한 숙주 유기체에서 외래 유전자를 고도로 발현시키지 못한 실패 요인을 다음과 같이 설명할 수 있다: '선호도'가 약한 코돈이 반복적으로 삽입된 유전자에 존재함으로써, 발현에 이용되는 숙주 세포 기작이 효과적으로 작동하지 못한다는 것이다. 이와 같은 현상은 외래 유전 물질에 사용하고자 하는 숙주 세포가 선호하는 계획된 코돈을 합성 유전자에 포함시키도록 고안하는 것이 재조합 DNA 기술을 실행하는데 있어서 바람직하다는 것을 제시한다.

진핵 세포를 대표하는 기능의 다양성은 이들 세포막 경계에 있는 구조적인 분류에 기인한다. 이와 같은 구조를 만들고 유지하기 위해서는, 망상 내피에 있는 이들의 합성 부위로부터 세포를 통하여 단백질이 예정된 위치로 전달되어야 한다. 이를 위해서는 소개 단백질은 주요 소개 경로로 들어가는 입구에 위치한 경로를 선택하는 것을 알고 있는 분자 기작이 인지할 수 있는 분류 시그널을 가져야 한다. 대부분 단백질에 대한 분류 결정은 단백질이 생합성 경로를 통과할 때에만 이루어져야 하는데, 이는 이들의 최종 목적지, 단백질이 기능을 하는 세포 위치가 이들의 영원한 위치가 되기 때문이다.

세포내 통합의 유지는 선택적인 분류 및 정확한 위치로 단백질을 정확하게 수송하는 것에 부분적으로 의존한다. 과거 수년간 단백질을 표적화하고, 국소화시키는 분자 기작에 대한 연구가 활발하게 이루어졌다. 단백질상에서 '주소 표지(address labels)'로 기능하는 한정된 서열의 모티프를 확인하였다. 조직-특이적인 플라스미노겐 활성화인자 단백질인 tPA와 같은 리더 또는 시그널 펩타이드는 망상 내피 및 골지체를 통하여 세포 분비 경로로 단백질을 전달하는 작용을 한다. 리소좀 구획으로 단백질을 유도하는 di-루이신 아미노산 모티프 또는 티로신계 서열과 같은 막 단백질의 세포질 도메인에 결합된 여러 가지 분류 시그널이 확인되었다. HIV의 경우에, 세포로부터 전달되고 압출되는 바이러스 입자는 gag 아미노산 말단에서 두 번째 글리신 잔기의 미리스톨화에 따라 달라진다.

발명의 요약

HIV gag 및 HIV gag의 변형체를 암호화하는 합성 DNA 분자를 제공한다. 합성 분자의 코돈에는 표적으로 하는 숙주 세포가 선호하는 코돈을 포함한다. 합성 분자는 적절한 형태의 외래 유전자 물질을 제공한다. 합성 분자를 폴리뉴클레오타이드 백신으로 이용하여, 중화 항체 및 세포 매개된 면역반응을 통하여 HIV-감염에 대해 면역학적 예방 효과를 제공한다. 본 발명은 생체내에서 영장류 및 사람과 같은 포유류를 포함하는 척추동물에 직접 제공하였을 경우에, 동물내에서 암호화된 단백질의 발현을 유도할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 HIV gag DNA에 감염된 후에, 293 세포주 형질감염체에서 gag와 tPA gag의 상대적인 발현을 나타낸다.

도 2는 마우스에서 가장 적합한 HIV gag 및 tPA-gag DNA 백신에 의해 매개되는 혈청 항-gag 반응을 나타낸다.

도 3은 최적화된 HIV gag 또는 tPA-gag DNA로 백신화 처리한 후에, 마우스로부터 수득된 비장 세포의 항-gag CTL 반응을 나타낸다.

도 4는 최적화된 HIV gag 또는 tPA-gag DNA로 백신화 처리한 후에 마우스로부터 수득한 비장 세포의 gag 항원-특이적인 사이토킨 분비를 나타낸다.

도 5는 HIV p55 gag DNA로 백신화를 처리한 마우스에서 항-HIV gag CTL를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

HIV gag를 암호화하는 합성 DNA 분자 및 변형된 형태의 HIV gag를 암호화하는 합성 DNA 분자를 제공한다. 합성 분자 코돈은 계획된 숙주 세포가 선호하는 코돈을 이용하도록 하였다. 합성 분자를 폴리뉴클레오타이드 백신으로 이용하여, 중화 항체 및 세포-매개된 면역반응을 통하여 HIV 감염에 대해 효과적인 면역예방을 제공한다. 합성 분자를 면역원성 조성물로 이용할 수 있다. 본 발명은 영장류 및 사람을 포함하는

포유류등의 척추동물에 생체내로 직접 도입시킬 경우에, 동물내에서 암호화된 단백질의 발현을 유도할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

여기에서 이용된 것과 같이, 폴리뉴클레오타이드는 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산으로서, 살아있는 척추동물 세포로 도입되었을 경우에, 세포 기작이 직접 폴리뉴클레오타이드로 구성된 유전자에 의해 암호화된 해독 생성물을 생산하도록 할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 폴리데옥시리보핵산이고, 전사 프로모터에 작동가능하게 연결된 한개 이상의 HIV 유전자로 구성된다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 폴리뉴클레오타이드 백신(PNV)은 한개 이상의 HIV 유전자를 암호화하는 폴리리보핵산을 포함하는데, 이때 HIV 유전자는 진핵 세포 기작(리보솜, tRNAs 및 다른 해독 인자)에 의해 해독될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 단백질은 질병이 없는 동물에서는 정상적으로 발생되지 않는 것(이중 단백질)으로써, 이때 단백질은 사람 면역결핍 바이러스(HIV), 후천성 면역결핍증(AIDS)의 병원 물질과 관련되고, 동물의 면역계가 활성화되어 보호성 면역 반응을 개시한다. 이와 같은 외래 단백질이 동물의 조직에서 생산되기 때문에, 발현된 단백질은 관련 유기체에서 실질적인 감염(HIV)이 일어났을 경우와 유사한 방식으로 주요 조직적합성 시스템, MHC에 의해 처리된다. 본 명세서에서 볼 수 있는 바와 같이, 그 결과는 같은 종류의 병원균에 대한 면역 반응을 유도하게 된다.

따라서, 본 발명자들은 생물학적 시스템에 핵산을 도입하였을 경우에, HIV 단백질 및 에피토프의 발현을 유도할 수 있는 핵산을 제조하였다. 이와 같은 유도된 항체 반응은 발현된 HIV 단백질에 특이적이고, 또한 HIV를 중화시킨다. 또한, HIV-감염된 세포를 특이적으로 인지하고 파괴하는 세포독성 T-임파구를 유도하였다.

본 발명은 포유류 조직에 도입하였을 경우에 단일 세포에서 생체내로 별도의 유전자 생성물의 발현을 유도하는 폴리뉴클레오타이드를 이용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 rev-독립성 유전자를 얻기 위해, rev-의존성 HIV 유전자를 여러 가지 조작을 하지 않아도 되는 다른 방법을 제공한다. 여기에서 설명하는 rev-독립성 발현 시스템은 자체로 유용하고, 이를 이용하여 단일 세포에서 생체내로 목적하는 단일 유전자-생성물을 발현시키는 시스템이다.

본 발명은 항-바이러스성 백신화에 다양하게 이용될 수 있기 때문에, 폴리뉴클레오타이드는 흔히 폴리뉴클레오타이드 백신 또는 PNV라고 부른다. 이는 면역 자극 및 항-종양 치료에 있어서 이들 폴리뉴클레오타이드를 추가로 이용하더라도 본 발명의 범위를 벗어나지 않는다는 것을 의미한다.

본 발명의 한 양태에서, HIV 유전자 생성물을 암호화하는 유전자는 발현 벡터에 도입된다. 벡터는 진핵 RNA 폴리머라제에 의해 인지되는 전사 프로모터, 및 HIV 유전자 암호화 서열의 말단에 있는 전사 터미네이터를 포함한다. 바람직한 양태에서, 프로모터는 인트론 A 서열(CMV-intA)을 가지는 사이토메갈로바이러스 프로모터이지만, 당업자는 강한 면역로블린과 같은 여러 가지 공지된 다른 프로모터 또는 다른 진핵 유전자 프로모터를 이용할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 바람직한 전사 터미네이터는 소 성장 호르몬 터미네이터이다. CMVintA-BGH 터미네이터를 복합하여 사용하는 것이 특히 바람직하다.

원핵 세포에서 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 것을 지원하기 위해, 진핵 프로모터의 전사 조절하에 발현 벡터내에 항생제 내성 마커를 포함시켜, 진핵 세포에서는 항생제가 발현되지 않도록 하는 것이 바람직하다. 암피실린 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자 및 다른 억제학적으로 허용되는 항생제 내성 마커를 이용할 수 있다. 원핵 유기체에서 발효에 의해 다량의 폴리뉴클레오타이드를 생산하기 위해서는 벡터가 원핵세포의 복제 기원을 포함하고 다수의 복사체로 이루어지는 것이 유리하다. 상업적으로 이용할 수 있는 다수의 원핵세포 클로닝 벡터는 이와 같은 장점을 가진다. 비-필수 DNA 서열은 제거하는 것이 바람직하고, 벡터는 진핵 세포에서는 복제를 할 수 없는 것이 바람직하다. 이렇게 함으로써, 폴리뉴클레오타이드 백신 서열이 수용자의 게놈으로 들어가는 위험을 최소화할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 발현을 특정 세포형에 한정시키는 것이 바람직한 경우에, 조직-특이적인 프로모터 또는 인핸서를 이용한다.

한 양태에서, 발현 벡터 pRSV를 이용하는데, 이때 라우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus; RSV) 긴 말단 반복단위(LTR)를 프로모터로 이용한다. 또 다른 양태에서, V1, 돌연변이된 pBR322 벡터(CMV 프로모터 및 BGH 전사 터미네이터가 클론된 벡터)를 이용한다. 또 다른 양태에서, V1 및 pUC19 요소를 배합시켜 V1J으로 명명한 발현 벡터를 제조한다. V1J 또는 또 다른 바람직한 발현 벡터에는 gp120, gp41, gp160, gag, pol, env와 같은 HIV 유전자 또는 항-HIV 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 다른 HIV 유전자가 클로닝된다. 또 다른 양태에서, V1로부터 암피실린 내성 유전자를 제거하고, 네오마이신 내성 유전자로 치환시켜, V1J-neo를 만들어 본 발명에 따라 이용할 수 있는 다른 HIV 유전자를 클로닝시킬 수 있다. 또 다른 양태에서, V1Jns를 벡터로 이용하는데, 이는 V1J-neo의 2114 위치에 있는 단일 KpnI 위치에 독특한 SfiI 제한 효소 부위를 삽입한 것을 제외하고는 V1J-neo와 동일하다. 사람 게놈 DNA에 SfiI 부위가 발생하는 비율은 매우 낮다(100,000 염기당 약 1개 부위). 따라서, 이 벡터는 추출된 게놈 DNA를 SfiI으로 분해하여 간단하게, 숙주 DNA에 발현 벡터가 결합되었는지를 모니터할 수 있다. 또 다른 양태에서는 V1R를 벡터로 이용하였다. 이 벡터는 가능한 많은 비-필수 DNA를 벡터로부터 정리하여('trimmed') 매우 압축된 벡터를 생성한다. 이 벡터는 V1Jns의 유도체이다. 이 벡터는 더 큰 삽입체를 이용하게 하는데, 목적하지 않는 서열이 암호화되었는지 세포에 의한 흡수를 최적화하는지 등에 상관없이 이용하도록 한다.

본 발명의 한 양태는 IIIB 또는 CAM-1와 같은 실험실에서 채택한 HIV 균주로부터 HIV gag를 암호화하는 유전자를 이용하였다. 당업자는 HIV-1 유전자와 유사한 기능을 가지는 HIV-1 또는 HIV-2 균주 등의 다른 균주의 유전자를 이용하여도 본원에서 설명하는 HIV-1 작제물과 유사한 면역 반응을 일으킬 수 있다고 기대할 수 있을 것이다. 이와 같은 유전자를 수득하는 클로닝 및 조작 방법은 당업자에게 공지된 것이다.

많은 HIV 균주의 많은 유전자에 대한 서열은 GENBANK에서 공개적으로 이용할 수 있고, 이와 같은 HIV의 주요 필드 분리물은 이와 같은 균주를 이용할 수 있도록 하기 위해, 퀄리티 바이올로지컬 인코포레이티드 [참조: Quality Biological, Inc., 7581 Lindbergh Drive, Gaithersburg, Maryland 20879]와 계약한 내셔널 인스티튜트 오브 알러지 앤드 인페క్షious 디지즈[National Institute of Allergy and Infectious Diseases; NIAID]에서 이용할 수 있다. 이와 같은 균주는 또한 세계 보건 기구(World Health Organization; WHO)[HIV 분리 및 특징화에 대한 네트워크, 백신 개발 단위, AIDS에 대한 국제적인 프로그램

램, CH-1211 Geneva 27, Switzerland]에서도 구할 수 있다. 이와 같은 작업에서, 당업자는 본 발명의 한 가지 용도가 생체내뿐만 아니라 시험관내에서 시험 및 분석 시스템을 제공하여, HIV 중화의 혈액학과 HIV 서열 다양성의 상관관계 및 다른 변수와의 관계를 수득할 수 있음을 인지할 것이다. HIV 균주의 1차 분리물로부터 유전자를 도입시켜 바이러스 임상 분리물에 대해 면역 반응을 유도할 수 있는 면역원을 제공함으로써, 이 분야에서 아직 미해결된 요구에 부응한다. 또한, 유독성 분리물이 변화되면, 면역원을 변형하여 필요에 따라 새로운 서열을 반영되도록 한다.

용어의 일관성을 유지하기 위해, 폴리뉴클레오타이드 면역원 작제물을 설명하는데 있어서, 다음 사항을 준수한다; '백터 명칭-HIV 균주-유전자-추가 요소'. 작제물에 부가되는 추가 요소는 하기에서 추가로 상세히 설명한다. 바이러스의 병원성 균주가 변화함에 따라, 약제에 도입시키기에 적합한 정확한 유전자도 변화될 수 있다. 그러나, 하기에서 설명하겠지만, 이종 균주에 대해 보호할 수 있을 CTL 반응이 유도되기 때문에, 전체 바이러스 또는 아단위 폴리펩타이드계 백신과 비교하였을 때, 본 발명의 백신 및 면역원에서는 균주의 다양성이 그렇게 중요하지는 않다. 또한, 새로운 유전자를 삽입시키는 것이 약제학적으로 용이하기 때문에, 이것은 분자생물학의 표준 기술에 의해 용이하게 조절할 수 있다.

본원에서 사용된 용어 '프로모터'는 RNA 폴리머라제가 결합되는 DNA 본쇄에 있는 인지 부위를 말한다. 프로모터는 RNA 폴리머라제와 초기 복합체를 형성하여 전사 활성을 개시하고 유도한다. 복합체는 '인핸서(enhancers)'라고 하는 활성화 서열에 의해 또는 '사이렌서(silencers)'라는 억제 서열에 의해 변형될 수 있다.

본원에서 사용된 용어 '리더(leader)'는 유전자와 함께 전사되는 구조 유전자의 5' 말단에 있는 DNA 서열을 말한다. 리더는 통상 프로서열이라 불리는 N-말단 펩타이드 신장 부위를 가지는 단백질이 된다. 단백질이 세포외 배지 또는 막으로 분비되어야 하는 경우에, 일반적으로 소수성인 이러한 시그널 서열은 단백질을 망상내피로 유도하여 적절한 지정 부위로 향하게 한다.

본원에서 사용된 용어 '인트론(intron)'은 유전자 생성물에서 아미노산을 암호화하지 않는 유전자의 중간 부분에 있는 DNA 일부분을 말한다. 인트론의 전구물질 RNA가 분해되어, mRNA로 전사되지 않거나 또는 단백질로 해독되지 않는다.

'카세트(cassette)'는 발현될 핵산 서열을 포함하는 본 발명의 서열을 말한다. 카세트는 카세트 테이프의 개념과 비슷하다. 각 카세트에는 고유의 서열을 가지고 있다. 따라서, 카세트를 교환함으로써 백터는 다른 서열을 발현할 수 있을 것이다. 5' 및 3' 말단에 제한효소 부위 때문에, 카세트를 용이하게 삽입, 제거 또는 다른 카세트로 대체할 수 있다.

'3' 비해독된 영역' 또는 '3' UTR'은 유전자와 함께 통상 전사되는 구조 유전자의 3' 말단에 있는 서열을 말한다. 이와 같은 3' UTR 영역에는 통상적으로 polyA 서열을 포함한다. 3' UTR이 DNA로부터 전사되지만, 단백질로 해독되기 전에 분해된다.

용어 '비-암호화 영역(Non-Coding Region)' 또는 'NCR'은 구조 유전자의 3' UTR 영역에 인접한 영역을 말한다. NCR 영역에는 전사 종결 시그널이 포함된다.

용어 '제한 부위(restriction site)'는 제한 엔도뉴클레아제의 서열 특이적 절단 부위를 말하는 것이다.

용어 '백터(vector)'는 숙주 유기체 또는 숙주 조직으로 DNA 단편을 도입시키는 일부 수단을 말한다. 플라스미드, 박테리오파아지 및 코스미드를 포함하는 다양한 타입의 백터가 있다.

용어 '유효량'이란 적정 수준의 폴리펩타이드를 생산하기 위해 제공해야 하는 충분한 양의 PNV를 말한다. 당업자는 이 수준이 다양하게 변화될 수 있음을 인지할 것이다.

본 발명을 설명하기 위해, HIV에 대한 배경을 다음과 같이 제공한다. 사람 면역결핍 바이러스는 리보핵산(RNA) 계통을 가진다. 이와 같은 RNA 계통은 당분야에 공지된 방법에 따라 역전사되어, 본원에서 설명하는 방법에 따라 클로닝 및 조작을 위한 cDNA 복사체를 수득할 수 있다. 계통의 각 말단에는 프로모터로 작용할 수 있는 긴 말단 반복단위를 가진다. 이들 말단 사이에서, 다양한 리딩 프레임에서 계통은 주요 유전자 생성물으로써 gag-pol-env를 암호화하는데; gag는 특이적인 항원 그룹이고; pol은 역전사 효소 또는 폴리머라제이고; 또다른 리딩 프레임에서 이 영역에 의해 전사된 후 프로세싱을 담당하는 바이러스성 프로테아제가 암호화되는데, 예를 들어 gp160은 gp120 및 gp41로 프로세싱되고; env는 엔벨로프 단백질이고; vif는 비리온 감염성 인자이고; rev는 비리온 단백질 발현의 조절인자이고; nef는 음성 조절 인자이고; vpu는 비리온 생산성 인자 'u'이고; tat는 트랜스-전사 활성화인자이고; vpr는 바이러스성 단백질 r이다. 이들 각 요소의 기능은 설명된 바 있다.

본 발명의 한 양태에서, HIV gag 단백질을 암호화하는 유전자는 전사 프로모터에 직접 연결된다. 그러나, 비-스플라이싱된 유전자의 핵으로부터 방출되는 것이 없기 때문에, rev가 없는 경우에는 gag 발현이 억제된다. 이와 같은 시스템을 이해하기 위해서는 HIV의 생명 과정에 대한 상세한 설명이 선행되어야 한다.

HIV의 생명 과정에서, 숙주 세포가 감염될 때, HIV RNA 계통은 프로바이러스성 DNA로 역전사되고, 단일 전사 단위로 숙주 계통 DNA에 통합된다. LTR은 5'에서 3' 방향으로 HIV 유전자(gag, pol, env)를 전사하여 비스플라이싱된 전체 계통 전사 단위를 형성하는 프로모터를 제공한다. 비스플라이싱된 전사물은 mRNA로 작용하여 gag 및 pol을 해독하고, env 암호화된 유전자의 해독을 위해서는 제한된 스플라이싱이 일어나야 한다. 발현될 조절 유전자 생성물 rev의 경우에, 한번 이상의 스플라이싱이 일어나야 하는데, 이는 도 1에 나타난 것과 같이 rev와 env가 계통성 세팅내에서 중첩되어 있기 때문이다. env가 전사하기 위해서는, rev 전사가 중단되어야 하며, 그 반대의 경우에도 마찬가지이다. 또한, 핵으로부터 비스플라이싱된 RNA를 방출하기 위해서는 rev의 존재가 필요하다. 그러나, 이와 같은 방식으로 rev가 기능을 하기 위해서는 전사물에 rev 반응성 요소(RE)가 존재해야 한다[참조: Malim et al., Nature 338:254-257 (1989)].

본 발명의 폴리뉴클레오타이드 백신의 경우에, 완전하게 스플라이싱된 유전자를 제공함으로써 특정 HIV

유전자의 필수적인 스플라이싱을 피할 수 있다(즉, 리딩 프레임에서 스위치 없이 또는 비-암호화 영역을 제거함으로써) 목적하는 유전자 생성물의 완전한 오픈 리딩 프레임을 제공하고; 당업자는 특정 유전자를 스플라이싱할 때, 기능상으로 암호화 서열이 수득되는 한 정확한 서열에 어느 정도의 변화가 허용된다는 것을 인지할 것이다). 따라서, 한 양태에서, 각 유전자 생성물의 간헐적인 발현을 요구하지 않도록, gag의 전체 암호화 서열을 스플라이싱시킨다.

모집단내에 돌연변이되는 HIV 성질 및 감염된 개체내에서 돌연변이되는 HIV 성질이 있는 경우에, 본 발명에 따라 생성된 체액 및 세포 이중 면역 반응은 HIV 감염을 저해하는데 특히 중요하다. HIV에 대한 효과적인 보호 백신을 제조하기 위해서는, gp160(env는 US 인구에서 유행성 균주인 다양한 HIV-1, 클레이드 B 균주에 대해 약 80% 보존되어 있다)에 대한 다가 항체 반응 및 HIV에 대한 주요 중화 표적을 생성할 뿐만 아니라 gp160의 보존된 부분에 반응성이 있는 세포독성 T 세포, gag에 의해 암호화되는 내부 바이러스성 단백질을 생성하는 것이 바람직하다. 본 발명자들은 통상적인 실험실 균주; 감염된 모집단에서 발견되는 우성의 주요 바이러스성 분리물; 균주간에 중화 항체 에피토프를 차단하지 못하도록 고안된 돌연변이된 gp160; 및 gag 및 pol 유전자(HIV 분리물간에 약 95% 보존됨)와 같은 HIV의 다른 대표적인 유전자로부터 선별한 gp160 유전자로 구성된 HIV 백신을 제조하였다.

면역결핍증 상태로 진전되지 않은 실제의 모든 HIV 혈청-양성 반응을 가지는 환자는 항-gag CTL을 가지고 있으며, 이들 환자의 60%는 균주간 gp160-특이적 CTL을 가진다. 그러나, AIDS로 알려진 질병으로 발전된 감염 개체에서 볼 수 있는 HIV-특이적 CTL의 양은 상당히 낮은 것으로 나타났는데, 이는 균주간 CTL 반응을 유도할 수 있다는 본 발명자들의 발견의 중요성을 설명한다.

마우스와 영장류에서 본 발명의 env 및 gag 폴리뉴클레오타이드 백신 작제물에 의해 유도되는 면역 반응을 입증하였다. 마우스에서 env에 대한 항체 생산을 모니터링함으로써 주어진 작제물이 면역원으로 적절하다는 것을 확인할 수 있는데, 예를 들면 백신화된 대부분의 동물이 항체 반응을 나타낸다. 본 발명의 작제물을 이용하여 CTL 반응 유도를 시험하는데 적합한 가장 쉬운 동물 모델이 마우스이기 때문에, 이를 이용하여 특정 작제물이 이와 같은 활성을 나타내는지를 확인한다. 원숭이(아프리카 녹색 원숭이, 붉은털 원숭이, 침팬지)는 설치류가 아닌 더 큰 동물에서 항체를 평가하기 위해 영장류를 포함한 추가 종을 제공한다. 이와 같은 종은 마우스의 혈청에서 관찰되는 레트로바이러스에 대한 내인성 중화 활성의 수준이 높기 때문에 항혈청 중화 검정에서는 마우스보다 바람직하다. 이와 같은 데이터를 보면, 본 발명의 백신에 의해 유도되는 충분한 면역원성으로 이 시스템에 대한 중화 항체의 공지된 보호 수준에 기초하여 침팬지/HIV_{111B} 도전 모델의 실험에서 보호를 받을 수 있다는 것을 증명한다. 그러나, 과학 분야에서 보호에 대해 최근에 나타나고 수용되는 범위가 확대되는 정의는 질병을 예방하기 위해 HIV 감염으로부터 완전하게 보호를 한다는 의미의 소위 '멸균 면역성'과는 멀어지고 있다. 이와 같은 목적에 다수의 상관되는 것으로서는 혈액의 바이러스 역가(PCR에 의해 측정하였을 때)를 줄이는 것, 혈청 샘플의 감염성에 의한, p24의 ELISA 검사에 의한 HIV 역전사효소 활성 또는 혈중 다른 HIV 항원 농도, 증가된 CD4⁺ T-세포 농도, 증가된 생존 비율 등을 포함한다[참조: Cohen, J., Science 262:1820-1821, 1993; 항-HIV 백신 효능의 관련 정의를 언급함]. 또한 본 발명의 면역원은 HIV의 감염성(임상적, 1차 분야) 분리물에 대한 중화 면역 반응을 발생시킨다.

ELISA 검정을 이용하여 분비된 tPA-gag 또는 천연 gag를 발현시키는 최적 gag 백신 벡터가 gag-특이적 항체를 생산하는데 효과적인지를 결정한다. 본 발명의 백신화 벡터에 의한 초기의 시험관내 gag 발현 특징은 최적화된 gag 형질감염된 세포 용해물의 면역블롯 분석으로 제공된다. 이와 같은 데이터를 확인하고, 항-HIV 항혈청을 이용하여 형질감염된 세포의 gag 발현을 가시화하기 위해 gag 발현을 정량한다.

CTL 반응의 생성

세포내에서 합성된 바이러스성 단백질은 MHC I-제한된 CTL 반응을 유도한다. 이들 각 단백질은 혈청양성 환자에서 CTL을 유도한다. 또한, 본 발명의 백신은 마우스 및 붉은털 원숭이에게 CTL을 유도한다. 인플루엔자 NP로 설명된 것과 같은 마우스 균주의 면역유전학이 이와 같은 연구에 도움이 된다[참조: Ulmer et al., Science 259:1745-1749, 1993]. Balb/c 마우스에서 HIV 단백질 env, rev, nef, 및 gag에 대해 몇 가지 에피토프가 확인되어[참조: Frankel, F.R., et al., J. Immunol. 155, 4775-82(1995)], 시험관내 CTL 배양 및 세포독성 검정을 실행하였다. gp160, gp120, pol, 또는 gag를 암호화하는 전체 유전자를 이용한다. 이 주제에 대해 추가로 참고하려면, 문헌[참조: HIV Molecular Immunology Database 1995, Korber et al. eds., Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA]을 이용하라. 본원에서 이용된 것과 같이, T-세포 효과기 기능은 성숙한 T-세포 표현형, 예를 들면, 세포독성, B-세포 활성화를 위한 사이토킨 분비 및/또는 대식세포 또는 호중구의 보충 또는 자극 등과 관련된다.

T_H 활성의 측정

제조할 단백질 또는 펩타이드 에피토프를 부가하여, 백신화된 동물에서 유도된 비장 세포 배양물을 특정 항원에 대해 기억하는 능력에 대해 시험하였다. 비장 항원 제공 세포, APCs와 수반하여 제공되는 이와 같은 항원에 의한 T 세포의 활성화는 이들 배양물의 증식 또는 사이토킨 생산으로 모니터링할 수 있다. 사이토킨 생산 패턴으로 T_H 반응을 타입 1 또는 타입 2로 분류할 수 있다. 우성 T_H2 반응은 면역결핍된 혈청양성 환자에서 세포 면역성의 배제와 관련이 있는 것으로 보이기 때문에, 환자에서 주어진 PNW에 의해 제공되는 반응 형태를 정의하는 것이 가능하고, 이 반응은 생성된 면역 반응의 조절을 허용한다.

상기 면역학적 연구에 기초하여, 본 발명의 백신이 유독성 HIV에 의한 도전에 대해 척추동물에서 효과적이라는 것을 예측할 수 있다. HIV_{111B}/침팬지 도전 모델에서 이들 동물을 PNW 작제물 또는 PNW 작제물 각 테일(gp160_{111B}, gag_{111B}, nef_{111B}, REV_{111B}로 구성됨)로 충분히 백신화한 후에 이와 같은 연구를 실행할 수 있다. 이점에서 111B 균주는 침팬지의 치사량에 대한 역가가 정립되었기 때문에 유용하다. 그러나, HIV

의 임의 다른 균주, 주어진 균주에 특이적인 또는 이중인 에피토프를 이용하여 동일한 연구를 할 수 있다. 침팬지에 추가하여, 두 번째 백신화/도전 모델은 scid-hu PBL 마우스이다. 이 모델을 이용하면, 사람 임파구 면역 체계를 시험할 수 있고, 마우스 숙주에서 연속하여 HIV 도전으로 본 발명의 백신을 시험할 수 있다. 이와 같은 시스템은 임의의 HIV 균주를 이용하는 것이 용이하다는 장점을 가지고, 다수 균주의 HIV의 주요 분리에 대한 보호 증거를 제공한다. 세 번째 도전 모델로는 하이브리드 HIV/SIV 바이러스(SHIV)를 이용하는데, 이들중 일부는 붉은털 원숭이에게 감염되어, 면역결핍 질환을 유도하여 죽게 한다는 것이다[참조: Li, J., et al., J. AIDS 5:639-646, 1992]. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 백신 작제물로 붉은털 원숭이를 백신화하면, 치사량의 SHIV로 도전을 받는 경우에도 보호를 받을 수 있다.

포유류 세포에서 발현시키기 위해 최적화된 코돈을 이용하지 않는 바이러스 및 박테리아 유도된 유전자가 많이 있다. 그 이유로는 이들 미생물들은 자신의 유전자 생성물을 전사 및 해독하기 위해 이들 자신의 폴리머라제를 제공하거나 특이적 단백질 또는 인자를 제공하기 때문이다. 박테리아의 경우에, 특이적 tRNAs에 대한 풍부함이 상당히 다르다. 분명한 것은 DNA 백신과 관련하여 이와 같은 유전자의 생체내 발현은 실질적으로 다르다는 것이다.

대표적인 작제물 성분에는 HIV env, HIV gag, HIV pol, HIV rev, HIV vpr, 및 HIV nef를 포함하나 이에 국한시키지는 않는다. 항원을 암호화하는 유전자는 HIV이외의 병원균에 의해 발현되는데, 예를 들면, 인플루엔자 바이러스 핵단백질, 헤마글루티닌, 매트릭스, 뉴라미니다제 및 다른 항원성 단백질; 헤르페스 심플렉스 바이러스 유전자; 사람 파필로마바이러스 유전자; 결핵 항원; 간염 A, B, C 바이러스 항원 등을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다.

본 발명의 비-복제 플라스미드 DNA로 면역화하여 후속의 바이러스 도전에 대해 폴리뉴클레오타이드 HIV 면역원의 보호 효과를 설명할 수 있다. 감염성 물질이 관련되지 않기 때문에, 바이러스 입자의 조립이 요구되지 않고, 결정기 선택이 허용되기 때문에 유익하다. 또한, gag 서열, 프로테아제 및 몇몇 다른 바이러스성 유전자 생성물이 다양한 HIV 균주간에 보존되기 때문에, 클론된 유전자를 수득한 균주와 상동성인 것 뿐만 아니라 이중성인 독성 HIV 균주에 의해서도 후속 도전에 대해 보호를 할 수 있다.

본 발명은 자체 복제하는 물질 또는 어쥬번트를 요구하지 않고서 균주간에 보호성 면역성을 유도할 수 있는 수단을 제공한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 이용한 면역화는 다른 여러 가지 장점을 제공한다. 백신화에 이용하는 이와 같은 방법은 종양 및 감염성 물질에도 사용할 수 있는데, 그 이유는 CD8⁺ CTL 반응이 이들 두 가지 병리생리학적 과정에 중요하기 때문이다[참조: K. Tanaka et al, Annu. Rev. Immunol. 6, 359 (1988)]. 따라서, 형질전환 과정에 중요한 단백질에 대해 면역 반응을 유도하는 것이 암 보호 또는 면역치료에 효과적인 수단이 된다. 바이러스성 단백질 및 사람 생장 호르몬 DNA를 주사한 후에 발현된 단백질에 대해 고역가의 항체가 발생되면, 별도로 항체계 백신을 제조하는 용이하고 효과적인 수단이 된다는 것과 보존된 항원에 대해 표적이 되는 세포독성 T-임파구 백신과 배합하여 항체계 백신을 제조하는 용이하고 효과적인 수단이 된다는 것을 시사한다.

DNA 작제물을 제조하고, 정제하고, 복합 백신을 제조하는데 있어서의 용이성은 통상의 단백질 정제 방법과 비교할 수 있다. 따라서, gp160, gp120, gp41, gag 또는 다른 HIV 유전자를 암호화하는 다중 작제물을 제조하고, 혼합하고, 공동 투여할 수 있다. 단백질 발현이 DNA 주사후에도 유지되기 때문에, B- 및 T-세포 기억이 지속적으로 강화되어 생명력이 더 긴 체액 및 세포-매개된 면역성을 제공한다.

DNA 작제물을 제조하고 정제하는 분자생물학의 표준 기술은 본 발명의 DNA 면역원을 제조할 수 있게 한다. 분자생물학의 표준 기술로 본 발명의 생성물을 충분히 생산할 수 있기 때문에, 본원에서 설명하는 특정 작제물은 신규한 폴리뉴클레오타이드 면역원을 제공하여, 표준 불활성화된 전체 바이러스 또는 아단위 단백질 백신으로는 지금까지 얻을 수 없었던 놀라운 균주간 주요 HIV 중화 분리물을 생성한다.

백신 수용자에게 도입되는 발현가능한 DNA 또는 전사된 RNA의 양은 이용되는 전사 및 해독 프로모터의 강도 및 발현된 유전자 생성물의 면역원성에 따라 달라진다. 일반적으로, 면역학적으로 또는 예방학적으로 효과적인 용량인 약 1ng 내지 100mg, 바람직하게는 약 10 μ g 내지 300 μ g를 근육 조직에 직접 투여한다. 피하 주사, 경피 도입, 피부를 통한 각인 및 복막, 정맥, 흡입 전달 등과 같은 다른 투여 경로도 또한 고려할 수 있다. 부스터 백신화도 고려할 수 있다. HIV 폴리뉴클레오타이드 면역원으로 백신화한 후에, gp160, gp120, 및 gag 유전자 생성물과 같은 HIV 단백질 면역원으로 부스터시키는 것도 고려할 수 있다. 인터루킨-12 단백질을 정맥, 근육내, 피하 또는 다른 투여 수단과 같이 비경구 투여하면서 동시에 또는 연속하여 본 발명의 PNV를 비경구 도입시키는 것이 바람직하다.

폴리뉴클레오타이드는 임의 단백질, 어쥬번트 또는 수용자의 면역계에 영향을 줄 수 있는 다른 물질이 결합되지 않은 네이키드가 된다. 이 경우에, 폴리뉴클레오타이드는 열균 염수 또는 열균 완충된 염수와 같은 생리학적으로 허용되는 용액에 포함되는 것이 바람직하나, 이용되는 염 용액은 이에 한정시키지는 않는다. 또는, DNA는 레시틴 리포솜 또는 당분야에 공지된 다른 리포솜과 같은 리포솜에 결합되어 DNA-리포솜 혼합물로 존재할 수 있고, 또는 DNA는 부스터 면역 반응을 위해 당분야에 공지된 어쥬번트, 예를 들면 단백질 또는 다른 캐리어와 결합될 수 있다. DNA를 세포가 수용하는데 도움을 주는 물질, 예를 들어 칼슘 이온 등을 이용하는 것이 유익하다. 이와 같은 물질은 일반적으로 형질감염 촉진 물질 및 약제학적으로 허용되는 캐리어로서 본원에서 언급한다. 폴리뉴클레오타이드를 마이크로주사물로 피복하는 기술은 당분야에 공지된 것으로 본 발명에 유용하다.

다음의 실시예는 본 발명을 설명하는 방법을 제공하는 것으로 어떠한 방식으로건 본 발명을 이에 한정시키지는 않는다.

실시예

실시예 1

HIV 후기(Late) 유전자의 이종 발현

env 및 gag와 같은 HIV 구조 유전자는 전체 길이 단백질을 효과적으로 생산하기 위하여 HIV 조절 유전자인 rev를 요구한다. 본 발명자들은 gag의 rev 의존성 발현은 단백질 생산 수준이 낮고, rev 자체도 세포에 독성이 있다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 시험관내에서 gp160의 rev-의존성 발현을 상대적으로 높은 수준으로 달성할 수 있으나, rev/gp160 DNA로 생체내 면역화한 후에 이 백신에 의해 유도되는 gp160에 대한 항체의 발현 수준은 낮았다. 이는 rev의 공지된 세포 독성 효과 및 수백개의 핵을 포함하는 근세관에서 rev 기능을 획득하는데 어려움이 가중되기 때문이다(gag 또는 env 단백질 발현의 경우에 rev-의존성 전사가 일어나기 때문에, 동일한 핵에 rev 단백질이 필요하다). 그러나, env 유전자를 선택적으로 변형시켜 rev와 독립적으로 발현시킬 수도 있다.

일반적으로, 본 발명의 백신을 이용하여 본 발명자들이 제조한 백신 벡터인 V1Jns내에서 주요 HIV(111B, MN 또는 CAM-1) env 및 gag 유전자의 발현을 최적화시킬 수 있는데, 이때 V1Jns는 CMV 즉시-초기(IE) 프로모터, BGH 폴리아데닐화 부위, 및 pUC 골격으로 구성된다. 천연 분비 리더 펩타이드를 조직-특이적인 플라스미노겐 활성화인자(tPA) 유전자로 대체하고, CMVIE 프로모터와 CMV 인트론 A 뒤에 있는 생성된 키메라 유전자를 발현시켜, 얼마나 긴 유전자 단편을 이용하느냐에 따라(예를 들어, gp120 vs. gp160) env에 대해 rev-독립성 발현의 효과를 다양하게 할 수 있다.

이미 언급한 바와 같이, 본 발명자들은 본 프로그램으로 성공할 기회를 최대화하는데 필수적인 다음 목표의 실현을 염두에 두고 있다; (1) 영양류에서 더 강력한 중화 항체 반응을 생성할 수 있는 env계 벡터; (2) CTL에 의해 특징화되는 강력한 T-임파구 반응을 유도할 수 있는 gag 및 env 벡터와 영양류에서 기능을 하는 헬퍼 효능제; (3) 본 발명의 백신에 임상적으로 관련이 있는 HIV-1 균주로부터 gag 및 env 유전자의 이용 및 이들이 유도하는 면역학적 반응의 특성화, 특히 주요 분리물의 중화반응; (4) 적절히 최적화된 백신을 이용하여 침팬지/HIV(111B) 또는 붉은털 원숭이/SHIV와 같은 동물 도전 모델에서 보호의 입증; (5) 임상적으로 이용하기에 적합한 면역 반응의 기간 결정. 처음 세 가지의 목적은 상당한 진전이 있고, 본 발명의 gp160과 gag에 대한 백신 작제물이 초기 결과를 개선시킬 수 있는지에 대한 실험이 진행 중이다.

실시예 2

백신 생산을 위한 벡터

A. V1Jneo 발현 벡터

대규모 발효기에서는 암피실린을 이용할 수 없기 때문에, V1J를 가지는 박테리아에서 항생제를 선택하는데 이용되는 amp^r 유전자를 제거해야 한다. V1J의 pUC 골격에서 SspI 및 Eam1105I 제한효소로 분해하여 amp^r 유전자를 제거한다. 나머지 플라스미드는 아가로즈 겔 전기영동으로 정제하고, T4 DNA 폴리머라제를 이용하여 평활-말단화시키고, 이어서 송아지 장 알칼리 포스파타제로 처리한다. 트랜스포존 903에서 유도된, pUC4K 플라스미드에 포함된 시판되는 kan^r 유전자는 PstI 제한 효소를 이용하여 분해하고, 아가로즈 겔 전기영동으로 정제한 후에 T4 DNA 폴리머라제를 이용하여 평활-말단화시킨다. 이 단편은 V1J 골격에 결합시키면, 어느 방향으로건 kan^r 유전자를 가지는 플라스미드가 유도되는데 이들을 각 V1Jneo #'s 1 및 3으로 명명한다. 이들 각 플라스미드는 제한효소 분해 분석, 접합 영역의 DNA 서열분석에 의해 확인할 수 있고, V1J와 같이 유사한 양을 생산하는 것으로 나타났다. 이종 유전자 생성물의 발현은 이들 V1Jneo 벡터의 경우에 V1J와 필적할 정도이다. 본 발명자들은 임의로 V1Jneo#3를 선택하여 이하 V1Jneo로 명명하는데, 여기에는 발현 작제물로서 V1J에 있는 amp^r과 동일한 방향의 kan^r 유전자를 포함하고 있다.

B. V1Jns 발현 벡터

V1Jneo에 Sfi I 부위를 추가하여, 통합 연구를 하였다. 시판되는 13개 염기쌍 Sfi I 링커(New England BioLabs)를 벡터의 BGH 서열에 있는 Kpn I 부위에 추가한다. Kpn I을 이용하여 V1Jneo를 선형화시키고, 겔 정제한 후에, T4 DNA 폴리머라제로 평활-말단화하고, 평활 말단을 가지는 Sfi I 링커에 결합시킨다. 제한효소 지도로 클론 분리물을 선택하고, 링커를 통한 서열분석으로 증명한다. 새로운 벡터는 V1Jns로 명명한다. V1Jns(+ Sfi I)에서 이종 유전자의 발현은 V1Jneo(+ Kpn I)에 동일한 유전자의 발현과 필적할 정도이다.

C. V1Jns-tPA

분비되는 및/또는 막 단백질에 이종 리더 펩타이드 서열을 제공하기 위해서, V1Jns를 변형시켜 사람 조직-특이적 플라스미노겐 활성화인자(tPA) 리더를 포함시킨다. 두 개의 합성된 상보적인 올리고머를 어닐링하고, BglII로 분해된 V1Jns에 결합시킨다. 이와 같은 올리고머는 BglII-절단된 서열에 결합시키는데 적합한 과량의 염기를 가진다. 결합 후에, 상류 BglII 부위는 파괴되나 하류 BglII는 후속 결합을 위해 남아있게 된다. 두 개의 결합 부위 뿐만 아니라 전체 tPA 리더 서열은 DNA 서열분석에 의해 확인된다. 또한, 본 발명의 콘센서스 최적화된 벡터 V1Jns (=V1Jneo + Sfi I 부위)에 맞도록 하기 위해, Sfi I 제한 부위를 V1Jns-tPA의 BGH 터미네이터 영역내의 KpnI 부위에 위치하는데, 그 방법은 KpnI 부위를 T4 DNA 폴리머라제로 평활 말단화시키고, Sfi I 링커(참조: 카탈로그 #1138, New England Biolabs)로 결합하면 된다. 이와 같이 변형된 것은 제한효소 분해 및 아가로즈 겔 전기영동을 통하여 확인할 수 있다.

D. 벡터 V1R 제조

본 발명의 기초 백신화용 벡터를 최적화시키기 위한 지속적인 노력의 일환으로, V1R이라고 명명되는

V1Jns 유도체를 제조하였다. 이 벡터 작제의 목적은 불필요한 DNA 서열없이 크기를 최소화한, V1J 및 V1Jns가 제공하는 높은 플라스미드 수율 및 전반적으로 최적화된 이종 유전자 발현 특징을 보유한 백신을 수득하는데 있다. 본 발명자들은 문헌 뿐만 아니라 다음의 실험에 의해 결정하였는데; (1) 이. 콜라이 (E. coli) 복제 기원을 포함하는 pUC 골격내의 영역은 박테리아로부터 플라스미드 수율에 영향을 주지 않고 제거될 수 있고; (2) 카나마이신 오픈 리딩 프레임후에 kan^r 유전자의 3'-영역은 이 장소에 박테리아 터미네이터를 삽입하는 경우에 제거될 수 있고; (3) BGH 터미네이터의 3' 절반의 ~300bp는 이의 조절 기능에 영향을 주지 않고서 제거될 수 있다(BGH 요소내에 원래의 KpnI 제한 효소 부위가 이어진다).

V1R은 PCR을 이용하여 작제되어, V1Jns로부터 세 개의 DNA 단편을 합성하는데, 단편은 CMVintA 프로모터/BGH 터미네이터, 복제 기원, 카나마이신 내성 요소를 나타낸다. 각 단편에 독특한 제한 효소를 PCR 올리고머를 이용하여 각 단편 말단에 부가하고, CMVintA/BGH에는 SspI 및 XhoI를 이용하고; kan^r 유전자에는 EcoRV 및 BamHI를 이용하고; ori^r에는 BclI 및 SalI를 이용한다. 각 부위의 연속적인 손실을 갖는 PCR-유도된 각 DNA 단편의 방향성 결찰을 허용하는 이와 같은 효소 부위를 선택하였다; EcoRV 및 SspI는 결찰에 적합한 평활-말단화된 DNA를 만들고, BamHI 및 BclI는 SalI와 XhoI처럼 상보적인 오버행(overhang)을 만든다. PCR에 의해 이들 단편을 수득한 후에, 각 단편은 상기에서 지정한 적절한 제한 효소로 분해하고, 그 다음 세가지 모든 DNA 단편을 포함하는 단일 반응 혼합물에서 함께 결찰시킨다. ori^r의 5'말단에는 이 영역에서 흔히 볼 수 있는 T2 rho 독립성 터미네이터 서열을 포함하도록 하여, 카나마이신 내성 유전자에 종결 정보를 제공하도록 한다. 제한효소 절단(>8 효소) 및 결찰 부분의 DNA 서열 분석으로 결찰된 생성물을 확인한다. V1R내에 바이러스성 유전자를 이용하여, DNA 플라스미드 수율 및 이종 발현은 V1Jns와 유사하게 나타난다. 전체적으로 감소된 벡터 크기는 1346bp(V1Jns=4.86kb; V1R=3.52kb)이다.

실시예 3

gag 유전자 발현의 증가를 위한 합성 유전자 단편의 고안

문헌[참조: R. Lathe in a research article from J. Molec. Biol. Vol. 183, pp. 1-12 (1985) entitled 'Synthetic Oligonucleotide Probes Deduced from Amino Acid Sequence Data: Theoretical and Practical Considerations']에서 정의한 바와 같은 또 다른 코돈을 이용하여 동일하게 전사된 서열을 가지는 서열로 유전자 단편을 변환시킨다. HIV gag 유전자 단편의 발현을 증가시키기 위해 아래에서 설명하는 방법은 포유류 세포에서 이 유전자를 효과적으로 발현시키지 못하는 것이 전반적인 전사 조성물의 영향 때문이라는 본 발명자들의 가설에 기초한다. 따라서, 동일한 단백질 서열을 암호화하는 또 다른 코돈을 이용하면, gag의 발현에 대한 제한을 제거할 수 있다. 이용된 특정 코돈 치환 방법은 아래에서 설명하는 것과 같다:

1. 적절한 오픈 리딩 프레임에 대한 코돈 위치 확인.
2. 사람 유전자가 이용하는 관찰된 빈도에 대한 야생형 코돈의 비교.
3. 코돈이 가장 빈번하게 이용되는 것이 아닐 경우에, 사람 세포에서 고도로 발현되는 최적 코돈으로 대체.
4. 전체적인 유전자 단편이 치환될 때까지 이 과정의 반복.
5. 이들 치환 코돈에 의해 발생하는 목적하지 않는 서열에 대한 새로운 유전자 서열을 조사하고(예를 들어, 'ATTTA' 서열은 인트론 스플라이싱 인지 부위, 목적하지 않는 제한 효소 부위등이 우연하게 생성되게 함), 이들 서열을 제거하는 코돈으로 대체.
6. 합성된 유전자 단편을 조립하고, 발현이 개선되었는지를 확인.

이와 같은 방법을 이용하여 발현에 이용할 수 있는 전체적으로 최적 코돈으로 구성된 HIV gag의 합성 유전자 단편을 제조한다. 상기 과정은 DNA 백신을 위한 최적 코돈을 가진 유전자를 고안하기 위한 본 발명의 방법을 요약하여 설명한 것으로, 당업자는 방법상의 약간의 변화 또는 서열상에 약간의 변화를 주어도 유사한 백신 효과 및 유전자 발현 증가를 달성할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

실시예 4

1. HIV gag 백신 작제물

이는 최적의 코돈으로 구성된 완전한 HIV-1(CAM1) gag orf이다.

```

1  AGATCTACCA TGGGTGCTAG GGCTTCTGTG CTGTCTGGTG GTGAGCTGGA
51  CAAGTGGGAG AAGATCAGGC TGAGGCCTGG TGGCAAGAAG AAGTACAAGC
101 TAAAGCACAT TGTGTGGGCC TCCAGGGAGC TGGAGAGGTT TGCTGTGAAC
151 CCTGGCCTGC TGGAGACCTC TGAGGGGTGC AGGCAGATCC TGGGCCAGCT
201 CCAGCCCTCC CTGCAAACAG GCTCTGAGGA GCTGAGGTCC CTGTACAACA
251 CAGTGGCTAC CCTGTACTGT GTGCACCAGA AGATTGATGT GAAGGACACC
301 AAGGAGGCCC TGGAGAAGAT TGAGGAGGAG CAGAACAAGT CCAAGAAGAA
351 GGCCAGCAG GCTGCTGCTG GCACAGGCAA CTCCAGCCAG GTGTCCCAGA
401 ACTACCCCAT TGTGCAGAAC CTCCAGGGCC AGATGGTGCA CCAGGCCATC
451 TCCCCCGGA CCCTGAATGC CTGGGTGAAG GTGGTGGAGG AGAAGGCCTT
501 CTCCCCTGAG GTGATCCCCA TGTCTCTGC CCTGTCTGAG GGTGCCACCC
551 CCCAGGACCT GAACACCATG CTGAACACAG TGGGGGGCCA TCAGGCTGCC
601 ATGCAGATGC TGAAGGAGAC CATCAATGAG GAGGCTGCTG AGTGGGACAG
651 GCTGCATCCT GTGCACGCTG GCCCCATTGC CCCCAGCCAG ATGAGGGAGC
701 CCAGGGGCTC TGACATTGCT GGCACCACCT CCACCCTCCA GGAGCAGATT
751 GGCTGGATGA CCAACAACCC CCCCATCCCT GTGGGGGAAA TCTACAAGAG
801 GTGGATCATC CTGGGCCTGA ACAAGATTGT GAGGATGTAC TCCCCACCT
851 CCATCCTGGA CATCAGGCAG GGCCCCAAGG AGCCCTTCAG GGACTATGTG
901 GACAGGTTCT ACAAGACCCT GAGGGCTGAG CAGGCCTCCC AGGAGGTGAA
951 GAACTGGATG ACAGAGACCC TGCTGGTGCA GAATGCCAAC CCTGACTGCA
1001 AGACCATCCT GAAGGCCCTG GGCCCTGCTG CCACCCTGGA GGAGATGATG
1051 ACAGCCTGCC AGGGGGTGGG GGGCCCTGGT CACAAGGCCA GGGTCTGGC
1101 TGAGGCCATG TCCCAGGTGA CCAACTCCGC CACCATCATG ATGCAGAGGG
1151 GCAACTTCAG GAACCAGAGG AAGACAGTGA AGTGCTTCAA CTGTGGCAAG
1201 GTGGGCCACA TTGCCAAGAA CTGTAGGGCC CCCAGGAAGA AGGGCTGCTG
1251 GAAGTGTGGC AAGGAGGGCC ACCAGATGAA GGACTGCAAT GAGAGGCAGG

1301 CCAACTTCCT GGGCAAATC TGGCCCTCCC ACAAGGGCAG GCCTGGCAAC
1351 TTCCTCCAGT CCAGGCCTGA GCCCAGGCC CCTCCCAGG AGTCCTTCAG
1401 GTTTGGGGAG GAGAAGACCA CCCCAGCCA GAAGCAGGAG CCCATTGACA
1451 AGGAGCTGTA CCCCCTGGCC TCCCTGAGGT CCCTGTTTGG CAACGACCCC
1501 TCCTCCAGT AAAATAAAGC CCGGCAGAT CT

```

(서열 1)

실시에 5

시험관내에서 gag 백신의 발현

이들 작제물에 대해 형질감염된 사람 횡문근육종(RD) 또는 293 세포에서 시험관내 발현을 시험하였다. 형질감염된 293 세포에서 gag를 정량한 결과 V1Jns-opt-gag 및 V1Jns-tPA-opt gag 벡터가 분비된 gag를 생산하는 것을 볼 수 있다.

실시예 6

HIV-gag 세포독성 T-임파구에 대한 검정

이 단락에서 설명하는 방법은 백신화된 마우스에 이용된 것과 같은 검정법이다. 영장류에서도 기본적으로 유사한 검정을 이용하는데, 단 자가 B 세포는 각 동물에서 표적 세포로 이용하기 위해 정립되어야 한다. 사람의 경우에는 엡스타인-바르 바이러스를 이용하고, 붉은털 원숭이의 경우에는 헤르페스 B 바이러스를 이용하여 정립하였다.

새로 뽑은 혈액에서 또는 비장에서 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 유도하여, FicoII-Hypaque 원심분리를 이용하여 백혈구 세포로부터 적혈구 세포를 분리하였다. 마우스의 경우에, 림프절을 이용할 수 있다. IL-2(20 U/ml) 및 콘카나발린 A(2 μ g/ml)에서 6-12일간 시험관내 배양하거나 동수의 조사된 항원 제공 세포를 이용하는 특정 항원을 이용함으로써 PBMC로부터 효능제 CTL를 제조한다. 특이적 항원은 이용된 동물의 MHC 반수체의 CTL 인지를 위한 공지의 에피토프인 합성 펩타이드(통상 9-15개 아미노산)으로 구성되거나 적절한 항원을 발현하도록 조작된 백신이나 바이러스 작제물이다. 표적 세포는 선천성 또는 MHC 반수체가 매치된 세포주일 수 있는데, 이들 세포주는 시험관내에서 CTL 자극을 위해 설명한 것과 같이 적절한 항원을 제공하도록 처리된다. Balb/c 마우스의 경우에, 문헌[참조: Paterson; J. Immunol., 1995]의 gag 펩타이드를 10 μ M 농도로 이용하여, 조사된 선천성 비세포를 이용하여 시험관내에서 CTL를 다시 자극하고, 이를 이용하여 세포독성 검정 동안에 표적 세포를 감작화시키는데, 이 검사전에 약 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 1-10 μ M 농도로 배양하여 실시한다. H-2^d MHC 반수체 마우스의 경우에, 쥐의 비만세포종 세포주, P815는 우수한 표적 세포를 제공한다. 항원-감작화된 표적 세포에 Na⁵¹CrO₄를 적하하는데, 이는 37 $^{\circ}$ C에서 1-2시간 동안 표적물을 배양한 후에(0.2mCi, $\sim 5 \times 10^6$ 세포) 표적 세포를 수회 세척하면 CTL에 의해 사멸될 때 표적 세포의 내부로부터 방출된다. CTL 모집단은 효능제에 대한 표적의 비율을 다양하게 하여(예를 들어, 100:1, 50:1, 25:1) 표적 세포와 혼합하고, 함께 펠렛화하고, 4-6시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 상청액을 수득하여, 감마 카운터를 이용하여 방사능활성 방출을 검사한다. 세포독성은 표적 세포(0.2% Triton X-100 처리한 것)로부터 총 방출된 카운터에서 표적 세포로부터 자발적으로 방출되는 것을 뺀 비율로 나타낸다.

실시예 7

HIV gag 특이적 항체의 검정

기질 항원으로 특이적 재조합 p24 gag 단백질을 이용하여 HIV에 대해 발생된 항체를 ELISA로 검출한다. 96웰 마이크로적정 플레이트는 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 재조합 항원(2 μ g/ml PBS(인산완충염수) 용액, 로킹 플랫폼용상에서 웰당 50 μ l)으로 피복한다. 항원은 재조합 p24 gag(Intracell)로 구성된다. 플레이트는 세척 완충액(PBS/0.05% Tween 20)으로 4회 세척하고, 200 μ l/웰의 차단 완충액(PBS중의 1% Carnation milk 용액/0.05% Tween-20)을 첨가하여 1시간 동안 실온에서 흔든다. pre-혈청과 면역-혈청은 차단 완충액으로 목적하는 범위로 희석하고, 웰당 100 μ l를 첨가한다. 플레이트는 실온에서 1시간 동안 흔들면서 배양하고, 이어서 세척 완충액으로 4회 세척한다. 1:2000 차단 완충액으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다제(anti-rhesus Ig, Southern Biotechnology Associates; anti-mouse and anti-rabbit Igs, Jackson Immuno Research)가 접합된 2차 항체를 각 샘플에 웰당 100 μ l씩 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 흔들면서 배양한다. 플레이트는 세척 완충액으로 4회 세척하고, 웰당 100 μ l의 o-페닐렌디아민(o-PD, Calbiochem) 용액(농도는 100mM 구연산 완충액중의 1mg/ml, pH 4.5)을 첨가하여 성장시키고, 450nm에서 운동성(반응의 처음 10분)와 종결점 10, 30분에서 흡광도를 판독한다[참조: Thermo-max microplate reader, Molecular Devices].

실시예 8

T 세포 증식 검정

PBMC를 수득하고, PBMC 모집단에서 증식에 의해 측정된 것과 같이 특이적 항원에 대한 기억 반응을 시험하였다. 수거하기전 배양 마지막 18-24시간 동안에 세포 배양물에 ³H-티미딘을 첨가하여 증식을 모니터하였다. 세포 수거기에는 증식이 일어난 경우에 필터에 동위원소를 포함하는 DNA를 보유하고 있고, 활동을 하지 않는 세포는 동위원소를 도입시키지 않아 유리 형태로 필터에 남아있지 않는다. 설치류 또는 영장류에서 4×10^5 세포를 총 200 μ l의 완전 배지(RPMI/10% 태아 송아지 혈청)에서 96웰 마이크로적정 플레이트에 도말한다. PBMC와 배지만을 이용하여 배경 증식 반응을 측정하고, 1-5 μ g/ml 농도의 피토헤마글루틴(PHA) 또는 콘카나발린 A(ConA)와 같은 레시틴을 이용하여 비특이적 반응을 발생시켜 양성 대조군으로 이용한다. 특이적 항원은 공지의 펩타이드 에피토프, 정제된 단백질 또는 불활성화된 바이러스 등으로 구성된다. 항원 농도는 펩타이드의 경우에 1-10 μ M이고, 단백질의 경우에는 1-10 μ g/ml이다. 레시틴-유도된 증식은 세포 배양하는 동안에 3-5일에서 피크가 나타나고, 항원-특이적 반응은 5-7일에서 피크가 나타난다. 방사능 카운터가 배지 배경에 비해 적어도 3배 이상이 될 때 특이적 증식이 일어나는데, 이를 배경에 대한 비율 또는 자극 지수(SI)로 나타낸다.

실시예 9

본 발명자들이 이용하는 전략은 HIV, 주로 HIV gag (~95% 보존됨) 및 env(gp160 또는 gp120; 70-80% 보존됨) 유전자 생성물에서 검출되는 세포독성 T 림프구(CTL) 및 중화 항체 반응을 유도하는 것이다. gp160은 HIV 입자상에 공지의 중화 항체 에피토프만을 포함하지만, 항-env 및 항-gag CTL 반응의 중요성은 중화 항체가 나타나기 전에 발생하는 감염 후 1차 바이러스 혈증을 제거하는 세포 면역 개시의 공지된 결합 및 질병이 없는 상태를 유지하는데 있어서 CTL의 역할로 집중되었다[참조: Koup et al., J. Virol. 68: 4650 (1994)]. HIV가 유전학적으로 다양하다는 것을 잘 알려진 사실이지만, 본 발명자들은 임상 분리물 및 gp41 (~90% 보존됨; 더욱 보존된 2F5 중화 에피토프를 포함)로부터 유도된 몇 가지 대표적인 env 유전자를 포함하여 더 큰 폭의 중화 항체를 수득할 수 있다고 보며, 고도로 보존된 gag 유전자는 광범위한 균주 간 CTL 반응을 발생시킨다. 이와 같은 백신 전략은 HIV(사람이 아닌 영장류에서)에 대해 강력한 체액 및 세포 면역성을 발생시키기 때문에, 이와 같은 방법은 HIV에 대해 다른 이용가능한 백신화 전략과 비교하였을 때 독특한 장점을 제공한다.

A. HIV-1 gag 폴리뉴클레오타이드 백신 개발

사람에서의 발현에 가장 적합한 코돈으로 구성된 유전자를 이용하여 HIV env 유전자 발현을 위한 본 발명의 실험에 기초하여, 가장 적합한 코돈을 포함하도록 합성 p55 gag 유전자(opt gag)를 고안하고, ~350 침묵 돌연변이(총 1500nt 중에서)를 가지도록 합성하여, 이를 V1R에 클로닝하였다. opt gag 벡터의 두 번째 형태는 HIV env에서 설명한 것과 유사하게 NH₂ 말단에서 tPA 시그널 펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하도록 작제하고, 야생형 유전자에서 이 위치에 위치하는 핵 국소화 서열 모티프를 제거한다. 이와 같이 변형된 것은, ER/골지 분비 경로로 향하는 gag의 정상적인 세포내 소개 경로를 바꾸면, gag DNA 백신의 면역원성이 바뀌는지에 대해 시험하기 위해 고안되었다. gag에 tPA 리더 펩타이드를 추가하면, 더 많은 양의 gag가 분비되고, 분비된 단백질은 gag의 분자량과 비교하였을 때, 분자량이 더 큰 형태로 이동된다. 이는, tPA 리더 펩타이드에 의한 변형으로 인하여, 해독 후 변형, 아마도 글리코실화가 일어났음을 의미한다.

p55 gag 작제물(V1R-opt gag ± tPA 리더) 또는 V1R-gag(야생형) 중 하나로 면역화시킨 마우스를 1회 주사(백신 용량 = 10, 3.3, 1μg/마우스)한 후에 항-gag 펩타이드 CTL 반응에 대해 조사하였다. 모든 용량에서 V1R-tPA-opt gag와 V1R-opt gag DNA는 높은 수준의 항-gag CTL 반응을 생성시켜, 최고의 특이적인 사멸을 제공한다(~85% @ E/T = 1μg 용량에서 3). 각 DNA 용량에서 세포독성 곡선을 비교하면, V1R-tPA-opt gag 백신화는 V1R-gag(야생형)의 CTL 반응보다 약 ~100배 강한 CTL 반응을 나타낸다는 것을 알 수 있다. 전반적으로, 세 가지 백신 그룹에 대한 면역 반응에서는 CTL, T 헬퍼, 항체 반응에 대해 동일한 상대적인 효능을 나타내었다(가장 큰 반응에서 가장 낮은 반응 순으로); V1R-tPA-opt gag > V1R-opt gag > V1R gag (야생형). 요약하면, opt gag 작제물에서, 특히 tPA 리더가 있는 작제물에서는 CTL, 체액 및 헬퍼 T 세포 반응이 훨씬 더 크다.

실시예 10

치료 방법

사람 면역결핍 바이러스의 감염에 면역학적 또는 예방학적 면역화를 요하는 사람에게 env, gag, pol 유전자의 전부 또는 일부 및 이의 배합물을 암호화하는 HIV DNA를 주사한다. 주사는 복강내, 근육내 또는 경피를 통하여 주사할 수 있다. HIV DNA를 면역 반응의 프라이머로 이용하거나 면역 반응의 부스터로 이용한다. DNA는 불활성화된 HIV, 약독화된 HIV 및 HIV-유도된 단백질을 포함하는 조성물 또는 이의 배합물로 구성된 약제학적 조성물을 주사하기 전에 또는 주사와 동시에 또는 주사한 후에 주사할 수 있다.

실시예 11

치료 방법

사람 면역결핍 바이러스의 감염에 대해 치료를 요하는 사람을 항-HIV 항바이러스성 약제 또는 이의 배합물로 치료한다. 치료된 개체는 본 명세서에서 설명하는 HIV DNA 약제학적 조성물로 주사한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

포유류 숙주에서의 발현을 위해 최적화된 코돈을 포함하는, 비-포유류 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 합성 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 단백질이 HIV 단백질, HSV 단백질, HAV 단백질, HBV 단백질, HCV 단백질, HPV 단백질, HSV 단백질, 플라즈모디움(Plasmodium) 단백질, 미코박테리움(Mycobacterium) 단백질, 보렐리아(Borrelia) 단백질 및 로타바이러스(rotavirus) 중에서 선택되는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 단백질이 HIV 단백질인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 하기 DNA 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드.

```

1  AGATCTACCA TGGGTGCTAG GGCTTCTGTG CTGTCTGGTG GTGAGCTGGA
51  CAAGTGGGAG AAGATCAGGC TGAGGCCTGG TGGCAAGAAG AAGTACAAGC
101 TAAAGCACAT TGTGTGGGCC TCCAGGGAGC TGGAGAGGTT TGCTGTGAAC
151 CCTGGCCTGC TGGAGACCTC TGAGGGGTGC AGGCAGATCC TGGGCCAGCT
201 CCAGCCCTCC CTGCAAACAG GCTCTGAGGA GCTGAGGTCC CTGTACAACA
251 CAGTGGCTAC CCTGTACTGT GTGCACCAGA AGATTGATGT GAAGGACACC
301 AAGGAGGCCC TGGAGAAGAT TGAGGAGGAG CAGAACAAGT CCAAGAAGAA
351 GGCCAGCAG GCTGCTGCTG GCACAGGCAA CTCCAGCCAG GTGTCCCAGA
401 ACTACCCCAT TGTGCAGAAC CTCCAGGGCC AGATGGTGCA CCAGGCCATC
451 TCCCCCGGA CCCTGAATGC CTGGGTGAAG GTGGTGGAGG AGAAGGCCTT
501 CTCCCCTGAG GTGATCCCCA TGTTCTCTGC CCTGTCTGAG GGTGCCACCC
551 CCCAGGACCT GAACACCATG CTGAACACAG TGGGGGGCCA TCAGGCTGCC
601 ATGCAGATGC TGAAGGAGAC CATCAATGAG GAGGCTGCTG AGTGGGACAG
651 GCTGCATCCT GTGCACGCTG GCCCCATTGC CCCCAGCCAG ATGAGGGAGC
701 CCAGGGGCTC TGACATTGCT GGCACCACCT CCACCCTCCA GGAGCAGATT
751 GGCTGGATGA CCAACAACCC CCCCATCCCT GTGGGGGAAA TCTACAAGAG
801 GTGGATCATC CTGGGCCTGA ACAAGATTGT GAGGATGTAC TCCCCCACCT
851 CCATCCTGGA CATCAGGCAG GGCCCCAAGG AGCCCTTCAG GACTATGTG
901 GACAGGTTCT ACAAGACCCT GAGGGCTGAG CAGGCCTCCC AGGAGGTGAA
951 GAACTGGATG ACAGAGACCC TGCTGGTGCA GAATGCCAAC CCTGACTGCA
1001 AGACCATCCT GAAGGCCCTG GGCCCTGCTG CCACCCTGGA GGAGATGATG
1051 ACAGCCTGCC AGGGGGTGGG GGGCCCTGGT CACAAGGCCA GGGTCTGGC
1101 TGAGGCCATG TCCCAGGTGA CCAACTCCGC CACCATCATG ATGCAGAGGG
1151 GCAACTTCAG GAACCAGAGG AAGACAGTGA AGTGCTTCAA CTGTGGCAAG
1201 GTGGGCCACA TTGCCAAGAA CTGTAGGGCC CCCAGGAAGA AGGGCTGCTG
1251 GAAGTGTGGC AAGGAGGGCC ACCAGATGAA GGACTGCAAT GAGAGGCAGG

1301 CCAACTTCCT GGGCAAATC TGGCCCTCCC ACAAGGGCAG GCCTGGCAAC
1351 TTCCTCCAGT CCAGGCCTGA GCCCACAGCC CCTCCCGAGG AGTCCTTCAG
1401 GTTTGGGGAG GAGAAGACCA CCCCAGCCA GAAGCAGGAG CCCATTGACA
1451 AGGAGCTGTA CCCCCTGGCC TCCCTGAGGT CCCTGTTTGG CAACGACCCC
1501 TCCTCCAGT AAAATAAAGC CCGGCAGAT CT

```

(서열 1)

청구항 5

제3항에 있어서, 생체내에서 사람 조직을 포함하는 척추동물 조직에 도입되었을때 항-HIV 중화 항체, HIV 특이적 T-세포 면역 반응 또는 보호 면역 반응을 유도하며, HIV gag, gag-프로테아제, 또는 env 유전자 생성물을 암호화하는 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제1항에 따른 폴리뉴클레오타이드 1ng 내지 100mg을 척추동물 조직에 도입함을 포함하여, 척추동물에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 약독화된 병인균, 사멸된 병인균, 아단위 백신, 단백질 백신 및 이들의 배합물을 투여함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제3항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 약제학적으로 허용되는 담체, 및 임의로 보조제를 포함하는, HIV 감염에 대해 면역 반응을 유도하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 9

제3항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 영장류 조직에 도입하고, 이와 동시에 사이토킨을 비경구 투여함을 포함하여, 영장류에서 항-HIV 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 10

제3항에 따른 폴리뉴클레오타이드에 척추동물의 세포를 생체내 노출시킴을 포함하여, HIV 항원에 특이적인 림포카인 분비를 포함하는 효능제 기능을 항원 제공 세포에 유도하여 세포독성 및 헬퍼 T-세포 증식을 자극하는 방법.

청구항 11

제3항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 항-HIV 항바이러스제와 배합하여 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여, 상기 환자를 치료하는 방법.

청구항 12

제1항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물.

도면

도면1

세포 펠렛



▶ p55 gag

▶ 플라스미드

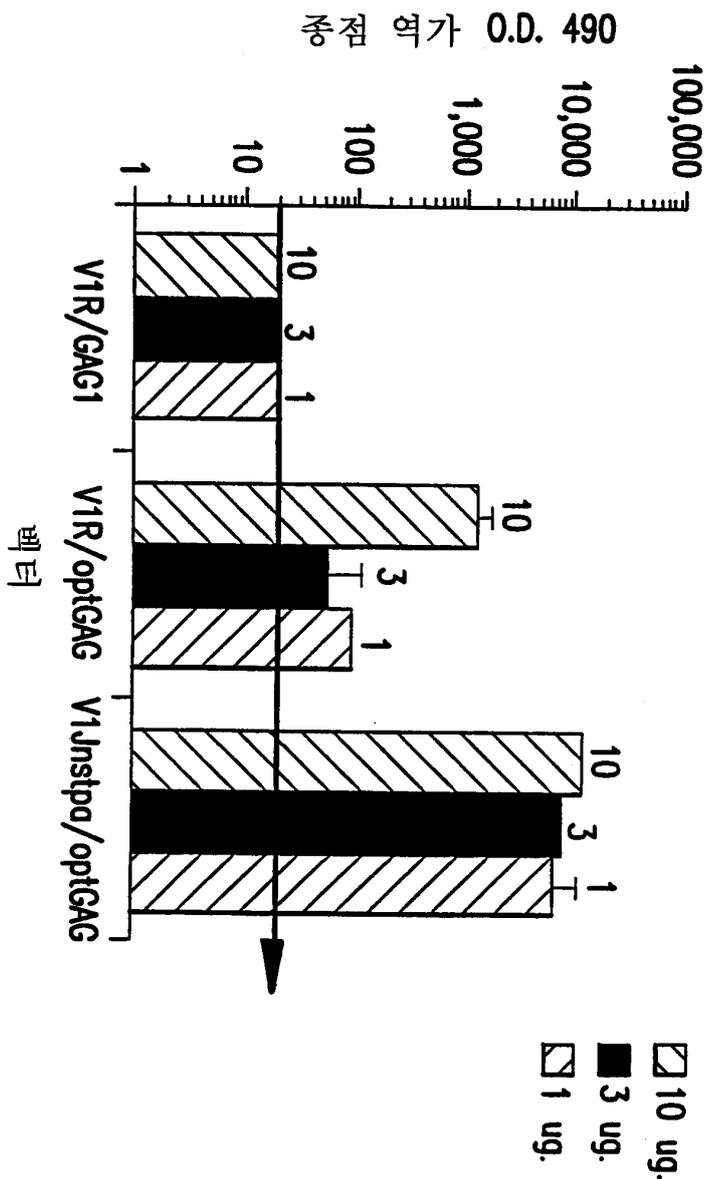
모의

p55(INCI/VIR)

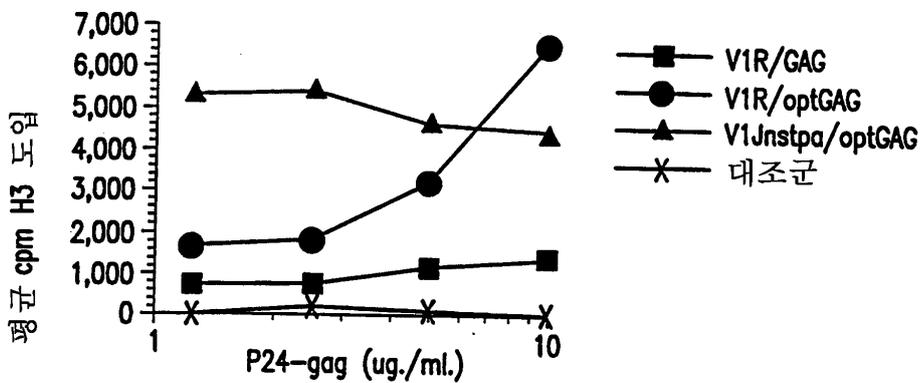
p55 gag OPT

1PA-p55 gag OPT

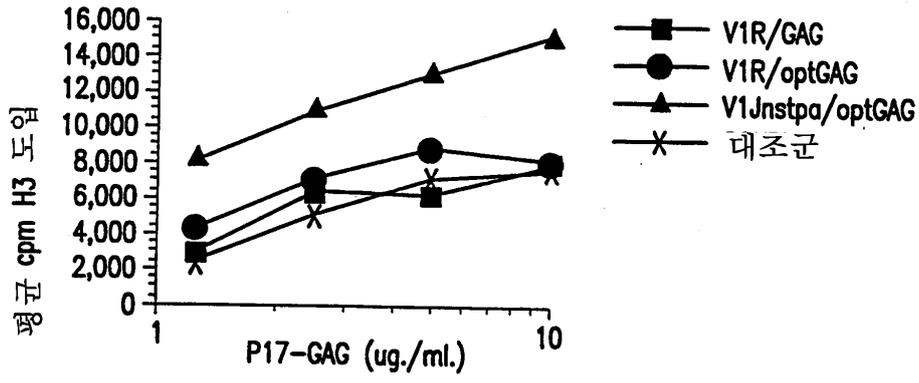
도면2



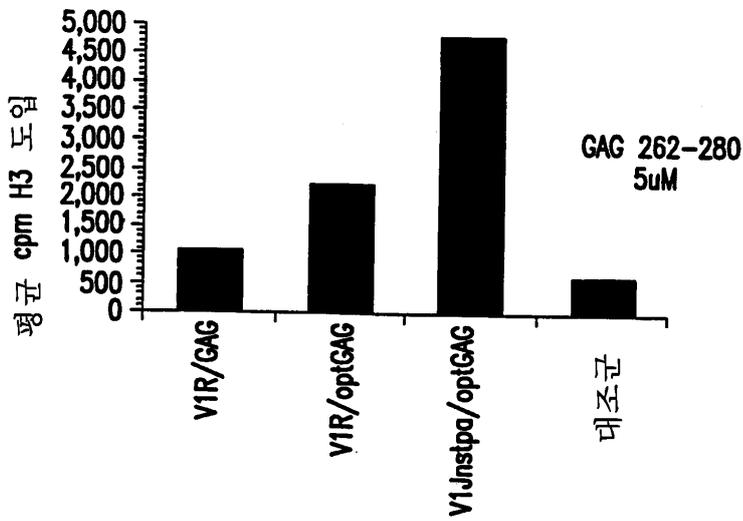
도면3A



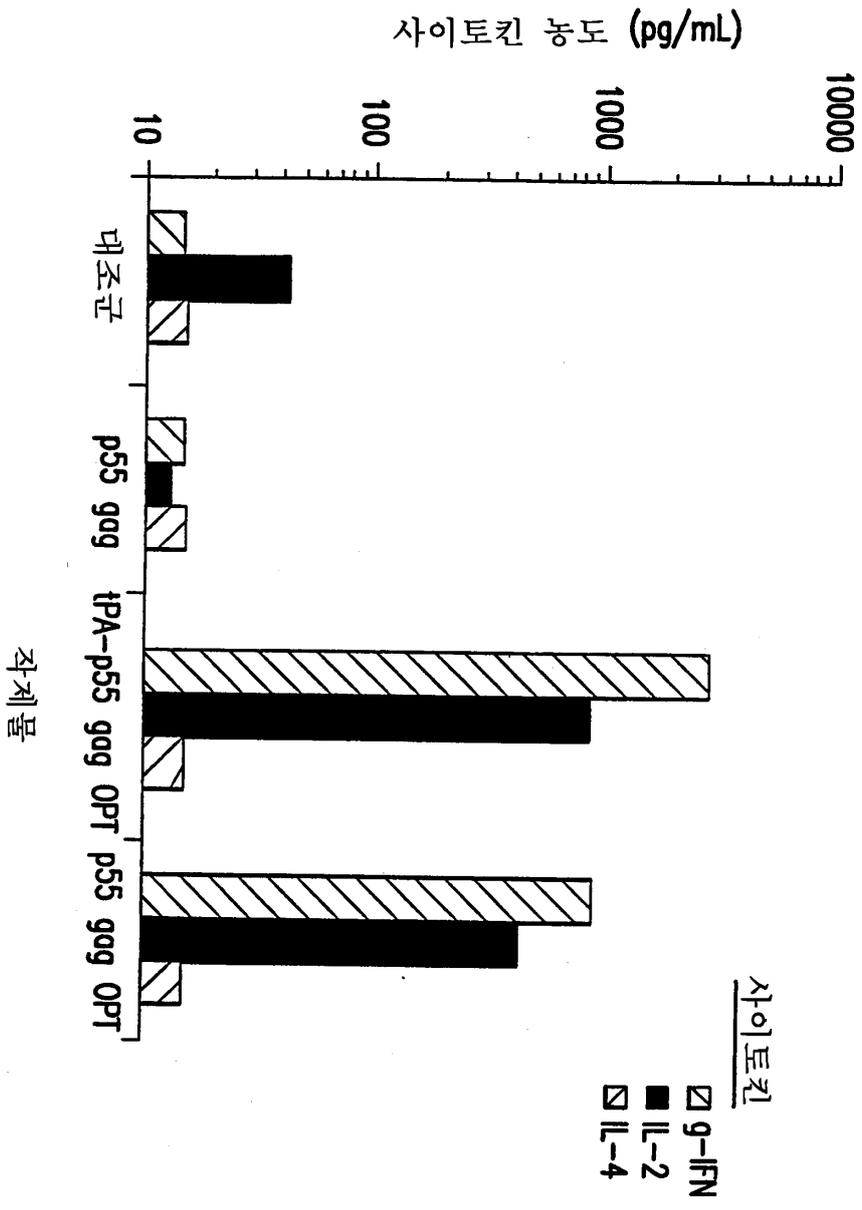
도면3B



도면3C



도면4



도면5

