



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월17일
(11) 등록번호 10-1879892
(24) 등록일자 2018년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/861 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/235 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7016833
(22) 출원일자(국제) 2011년12월14일
심사청구일자 2016년12월07일
(85) 번역문제출일자 2013년06월27일
(65) 공개번호 10-2014-0019304
(43) 공개일자 2014년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/064944
(87) 국제공개번호 WO 2012/082918
국제공개일자 2012년06월21일
(30) 우선권주장
61/422,954 2010년12월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2006040330 A2

(73) 특허권자
더 거버먼트 오브 더 유나이티드 스테이츠 오브
아메리카 에즈 레프리젠티드 바이 더 세크레터리
오브 더 디파트먼트 오브 헬스 앤드 휴먼 서비스즈
미국 메릴랜드 20852-3804 록빌 스위트 325 엑시큐
티브 블러바드 6011 오피스 오브 테크놀로지 트랜
스퍼 내쇼날 인스티튜츠 오브 헬스
얀센 백신스 앤드 프리벤션 비.브이.
네덜란드 엔엘-2333 씨엔 레이텐 아르키메데스웨
그 4
(72) 발명자
설리번, 낸시 제이.
미국 메릴랜드 20895 쉐닝톤 앰블러 드라이브
4408
네이벨, 개리 제이.
미국 디스트릭트 오브 콜롬비아 20008 워싱턴 뉴
욕 스트리트 30 2520
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김윤배

전체 청구항 수 : 총 11 항

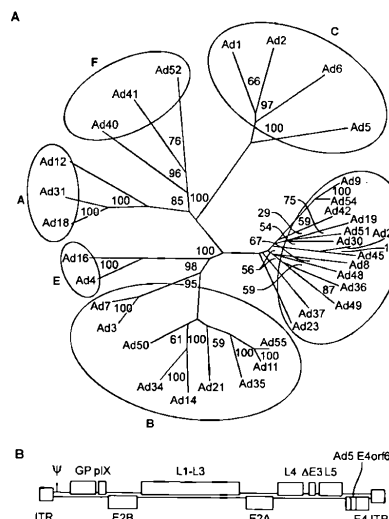
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 아데노바이러스 혈청형 26 및 혈청형 35 필로바이러스 백신

(57) 요약

본 발명은 필로바이러스 항원을 암호화하는 재조합 아데노바이러스 벡터(혈청형 26 및 혈청형 35)를 제공한다. 아데노바이러스 벡터는 필로바이러스 감염에 대한 방어면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

애쉬드, 클레멘트

미국 메릴랜드 20832 아파트 101 마크만 서클
18141

첵, 첵

미국 메릴랜드 20852 록빌 몬트로스 빌리지 테라스
12004

파우, 마리아 그라지아

네덜란드 엔엘-2333 씨더블류 라이덴 바르겔란 80

고드스미트, 제프

네덜란드 엔엘-1075 씨엑스 암스테르담 코닌기네웨
그 4

명세서

청구범위

청구항 1

면역학적으로 효과적인 양의 필로바이러스 항원 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 제1 재조합 아데노바이러스 벡터 및 면역학적으로 효과적인 양의 필로바이러스 항원 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 제2 재조합 아데노바이러스 벡터를 포함하는 개체에서 필로바이러스 항원에 대한 면역반응을 유도하기 위한 조성물로서, 여기서 제1 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 26 캡시드 단백질을 포함하는 rAd26 벡터이고, 제2 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 35 캡시드 단백질을 포함하는 rAd35 벡터이며, 제1 재조합 아데노바이러스 벡터를 개체에 투여하여 프라이밍 백신 접종하고, 프라이밍 백신 접종 후 2주 내지 2년 사이에 제2 재조합 아데노바이러스 벡터를 개체에 투여하여 부스팅 백신을 접종함으로써 개체에서 필로바이러스 항원에 대한 면역반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 아데노바이러스 벡터는 근육내 투여되는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 필로바이러스 항원단백질은 당단백질인 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 필로바이러스 항원단백질이 에볼라 바이러스로부터인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 에볼라 바이러스가 자이르(Zaire)종인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 필로바이러스 항원단백질이 SEQ ID NO: 1로 나타낸 폴리펩티드 서열에 의해 암호화되는 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 에볼라 바이러스가 수단/글루(Sudan/Gulu)종인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 필로바이러스 항원단백질이 SEQ ID NO:2로 나타낸 폴리펩티드 서열에 의해 암호화되는 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 필로바이러스 항원 단백질이 SEQ ID NO:3으로 나타낸 폴리펩티드 서열에 의해 암호화되는 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제4항에 있어서, 필로바이러스 항원단백질이 마르부르그 바이러스로부터인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 필로바이러스 항원단백질이 SEQ ID NO:4로 나타낸 폴리펩티드 서열에 의해 암호화되는

조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 필로바이러스 감염에 대한 보호를 유도하는 아데노바이러스 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 복제결함 아데노바이러스 벡터 (rAd)는 세포 면역 반응의 강력한 유도체이고 따라서 특히 렌티바이러스와 필로 바이러스에, 그리고 다른 비바이러스성 병원균에 대한 유전자-기반 백신에 대한 유용한 벡터로서 작용하여 왔다 (Shiver, *et al.*, (2002) *Nature* 415(6869): 331-5; (Hill, *et al.*, *Hum Vaccin* 6(1): 78-83. ; Sullivan, *et al.*, (2000) *Nature* 408(6812): 605-9; Sullivan *et al.*, (2003) *Nature* 424(6949): 681-4; Sullivan, *et al.*, (2006) *PLoS Med* 3(6): e177; Radosevic, *et al.*, (2007); Santra, *et al.*, (2009) *Vaccine* 27(42): 5837-45. 아데노바이러스-기재 백신은 이들이 GMP 조건하에서 높은 역가를 생산할 수 있고 인간에게 안전하고 면역원성이므로 인간 백신으로서 여러 이점을 갖는다 (Asmuth, *et al.*, *J Infect Dis* 201(1): 132-41; Kibuuka, *et al.*, *J Infect Dis* 201(4): 600-7; Koup, *et al.*, *PLoS One* 5(2): e9015. ; Catanzaro, *et al.*, (2006) *J Infect Dis* 194(12): 1638-49; Harro, *et al.*, (2009) *Clin Vaccine Immunol* 16(9): 1285-92. 초기 백신 작업의 대부분은 넓은 항체 및 CD8+ T 세포 반응을 유발하는 중요한 그들의 잠재력 때문에 rAd5를 사용하여 수행되고, 인간에서 rAd5에 대한 기존의 면역성은 효능을 제한할 수 있다 (Catanzaro, (2006); Cheng, *et al.*, (2007) *PLoS Pathog* 3(2): e25.; McCoy, *et al.*, (2007) *J Virol* 81(12): 6594-604.; Buchbinder, *et al.*, (2008) *Lancet* 372(9653): 1881-93). 이러한 속성은 에볼라바이러스 (EBOV) 및 마르부르그 바이러스 (MARV)를 포함하여 현재 개발중인 많은 백신에 대한 임상 적용에 rAd5의 사용을 제한할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] rAd5에 대한 이전 면역(pre-existing immunity)의 문제를 피하기 위해, 여러 대안적인 벡터들이 현재 조사 중이다. 이들에는 회귀 인간 혈청형으로부터 유래된 아데노바이러스 벡터와 침팬지와 같은 다른 동물로부터 유래된 벡터가 포함된다 (Vogels, *et al.*, (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71; Abbink, *et al.*, (2007) *J Virol* 81: 4654-63; Santra, (2009)). 동물-유래 아데노바이러스 벡터의 사용에 대한 연구는 비교적 초기이고, 반면 인간

아데노바이러스는 인간 세포에 대해 잘-특징된 생물학 및 친화성을 갖는 이점, 뿐만 아니라 문서화된 제조가능성을 갖는다 (Vogels, *et al.*, (2007) *J Gen Virol* 88(Pt 11): 2915-24.). 이들 백터의 면역원성 및 그들의 백신으로의 잠재력은 주로 이중기원 백터와의 프라임-부스트(prime-boost) 조합에 의해 동물 모델에서 증명되어왔다 (Abbink, *et al.*, 2007; Shott *et al.*, (2008) *Vaccine* 26:2818-23).

[0004] 아데노바이러스 혈청학적 유병률 빈도는 집단-의존적이거나 (Mast, *et al.*, (2010) *Vaccine* 28(4): 950-7), 시험된 51개 인간 아데노바이러스의 대부분의 그룹 중, Ad35 및 Ad11는 6 지리적 위치로부터 혈청에 의해 가장 드물게 중화되었다. rAd35 백신은 마우스, 영장류, 및 인간에서 면역원성일 것이고, 그리고 Ad5 면역을 피할 수 있을 것으로 나타났다 (Barouch, *et al.*, (2004) *J Immunol* 172(10): 6290-7; Nanda, *et al.*, (2005) *J Virol* 79(22): 14161-8; Ophorst, *et al.*, (2006) *Infect Immun* 74(1): 313-20; Thorner, *et al.*, (2006) *J Virol* 80(24): 12009-16.; Rodriguez, *et al.*, (2009) *Vaccine* 27(44): 6226-33). rAd35 백터는 임상-등급의 백신 생산에 적합한 세포주에서 높은 역가로 성장하고 (Havenga, *et al.*, (2006) *J Gen Virol* 87(Pt 8): 2135-43), 주사용으로 뿐만 아니라 안정한 흡입 분말로 제형화 되어왔다 (Jin, *et al.*, *Vaccine* 28(27): 4369-75). 이들 백터는 인간 수상돌기세포의 효율적인 형질도입을 나타내고 (de Gruijl, *et al.*, (2006) *J Immunol* 177(4): 2208-15; Lore, *et al.*, (2007) *J Immunol* 179(3): 1721-9), 그리고 따라서 높은 수준 항원 전달 및 존재를 중재할 수 있는 능력을 갖는다. 서브그룹 D로부터의 Ad26는 Ad5 이전면역을 피할 수 있는 능력을 위해 선택된 또 다른 아데노바이러스이다. 비록 Ad26 혈청학적 유병률이 성인 개체에서 중요할 수 있지만, Ad26 중화 항체 역가는 Ad5 중화 항체 역가보다 상당히 낮게 유지된다 (Abbink, *et al.*, 2007; Mast, *et al.*, 2010). 연구는 rAd26 이 대규모로 그리고 임상 등급에서 이들 백터를 제조하기에 적합한 Ad5 E1-보완 세포주에서 높은 역가로 성장될 수 있다는 것을 나타내고 (Abbink, *et al.*, 2007), 그리고 이 백터는 프라임-부스트 백신(prime-boost vaccine) 전략에서 채액 및 세포-매개 면역반응을 유도하는 것으로 나타났다 (Abbink, *et al.*, 2007; Liu, *et al.*, (2009) *Nature* 457(7225): 87-91).

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 적어도 부분적으로 rAd35 및 rAd26 백터가 단일 접종 및 이형 프라임-부스트 조합 후 필로바이러스 감염에 대한 방어면역 반응을 발생한다는 것을 기초로 한다.

[0006] 그러므로, 본 발명은 필로바이러스 항원을 암호화하는 핵산을 포함하는 단리된 제조합 아데노바이러스 백터를 제공하고, 여기서 아데노바이러스 백터는 아데노바이러스 26 캡시드 단백질 (예를 들면, rAd26 백터), 또는 아데노바이러스 35 캡시드 단백질 (예를 들면, rAd35 백터)를 포함한다. 아데노바이러스 백터는 통상적으로 복제 결함이다.

[0007] 필로바이러스 항원단백질은 일반적으로 에볼라 바이러스 또는 마르부르그 바이러스로부터의 당단백질이다. 에볼라 바이러스는 어느 종들, 예를 들면, 자이르 또는 수단/글루일 수 있다. 적절한 필로바이러스 항원을 암호화하는 예시적인 핵산을 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2에 나타내었다.

[0008] 본 발명은 또한 본 발명의 제조합 아데노바이러스를 암호화하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 핵산은 통상적으로 필로바이러스 항원단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 기능적으로 연결된 CMV 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 필로바이러스 항원단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2일 수 있다.

[0009] 본 발명은 추가로 본 발명의 단리된 아데노바이러스 백터를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 면역원성 조성물은 추가로 애쥬번트를 포함할 수 있다.

[0010] 또한, 환자에게서 필로바이러스에 대한 면역반응을 유도하는 방법이 제공된다. 본 방법은 환자에게 본 발명의 아데노바이러스 백터의 면역학적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다. 보통, 아데노바이러스 백터는 근육 내 투여된다.

[0011] 몇몇 구현예에서, 백터들은 부스팅 백신접종이 뒤따르는 프라이밍 백신접종에 의해 투여된다. 예를 들면, 프라이밍은 아데노바이러스 26 캡시드 단백질을 포함하는 아데노바이러스 백터의 투여이고 그리고 부스트는 아데노바이러스 35 캡시드 단백질을 포함하는 아데노바이러스 백터의 투여이다.

발명의 효과

[0012] "아데노바이러스 캡시드 단백질"은 특정 아데노바이러스의 혈청형 및/또는 친화성을 결정하는데 포함되는 아데

노바이러스 (예를 들면, Ad 26 또는 Ad35)의 캡시드 상의 단백질을 말한다. 아데노바이러스 캡시드 단백질은 통상적으로 섬유, 펜톤 및/또는 핵소 단백질질을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바에 따르면, "Ad26 캡시드 단백질" 또는 "Ad35 캡시드 단백질"은 예를 들면, Ad26 또는 Ad35 캡시드 단백질의 적어도 일부를 포함하는 키메라 캡시드 단백질일 수 있다. 특정 구현예에서, 캡시드 단백질은 Ad26 또는 Ad35의 전체 캡시드 단백질이다. 특정 구현예에서, 핵소, 펜톤 및 섬유는 Ad26 또는 Ad35이다.

[0013] 용어 "애주번트" 또는 "면역 촉진제"는 본 발명에서 상호교환가능하게 사용되고, 면역 시스템의 자극을 유발하는 하나 이상의 물질로 정의된다. 문맥에서, 애주번트는 본 발명의 아데노바이러스 벡터에 대한 면역반응을 강화하는데 사용된다.

[0014] 용어 "~에 상응하는"은 서열에서 아미노산 잔기의 위치에 적용될 때, 서열이 최적으로 배열되는 경우 다수의 서열에서 상응하는 위치를 의미한다.

[0015] 용어 "동일한" 또는 "동일성" 비율은, 두 개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열 (예를 들면, 본 발명의 아데노바이러스 캡시드 단백질과 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드)의 문맥에서, 같거나 또는 최대 상응하도록 비교하여 배열했을 때, 다음의 서열 비교 알고리즘들 중 하나를 사용하여 측정하거나 또는 육안 조사에 따라 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 특성의 비율이 같은 두 개 이상의 서열 또는 서브서열을 말한다.

[0016] "단리된" 핵산 분자 또는 아데노바이러스 벡터는 핵산 분자(예를 들면, DNA 또는 RNA) 또는 바이러스로, 그들의 천연 환경으로부터 제거된 것들이다. 예를 들면, 벡터에서 얻은 재조합 DNA 분자는 본 발명의 목적을 위해 단리된다고 간주된다. 단리된 DNA 분자의 추가의 예는 비상동성 숙주 세포에 유지되는 재조합 DNA 분자 또는 용액 중의 정제된 (부분적으로 또는 실질적으로) DNA 분자를 포함한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 DNA 분자의 인 비보 또는 인 비트로 RNA 전사체를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 핵산 분자는 추가로 합성에 의해 생산된 이와 같은 분자를 포함한다.

[0017] "기능적으로 연결된"은 두 개 이상의 DNA 분획이 그들의 의도된 목적으로 작용하도록 협력하여 연결된 것을 나타낸다. 예를 들면, 암호화 서열은 전사가 프로모터에서 개시되고 코딩 분획(들)이 터미네이터를 통해 진행되도록 정확한 해독틀에서 프로모터에 기능적으로 연결된다.

[0018] "폴리뉴클레오티드"는 통상적으로 5' 말단에서 3' 말단으로 해독되는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 염기의 단일- 또는 이중-가닥 폴리머이다. 폴리뉴클레오티드 RNA와 DNA를 포함하고, 그리고 천연 기원으로부터 단리되거나, 인 비트로 합성되거나 또는 천연 및 합성 분자의 조합으로 제조될 것이다. 용어가 이중 가닥 분자에 적용되는 경우, 이것은 전체 길이를 의미하는데 사용되고 용어 "염기쌍"과 동등하게 이해될 것이다.

[0019] "폴리펩티드"는 천연 또는 합성에 의해 생산된, 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 폴리머이다. 약 50 아미노산 잔기 미만의 폴리펩티드는 통상적으로 "올리고펩티드"로 불린다.

[0020] 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제의 결합 및 기능적으로 연결된 코딩 서열의 전사의 개시를 제공하는 DNA 서열을 함유하는 유전자의 일부를 말하는 설명하는 분야-인식된 의미를 위해 사용된다. 프로모터 서열은 통상적으로 유전자의 5' 비-암호 영역에서 발견된다.

[0021] "단백질"은 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 마크로 분자이다. 단백질은 또한, 탄수화물 기와 같은 비-펩티드 성분들을 포함할 수 있다. 탄수화물 및 기타 비-펩티드 치환체는 단백질이 생산되는 세포에 의해 단백질에 첨가될 수 있고, 그리고 세포의 유형에 따라 다를 것이다. 단백질은 본 명세서에서 그들의 아미노산 백본 구조에 따라 정의된다: 탄수화물 기와 같은 치환체는 일반적으로 특정되지 않지만, 존재할 수 있다.

[0022] 본 발명의 두 핵산들 또는 폴리펩티드들 (예를 들면, 아데노바이러스 캡시드 단백질 또는 필로바이러스 항원)의 문맥에서, "실질적으로 동일한"은 두 개 이상의 서열 또는 서브서열들이 다음의 서열 비교 알고리즘 중 하나로 측정하였을 때 또는 외관검사했을 때, 최대 상응하도록 비교하고 배열된 경우, 적어도 60%, 더욱 바람직하기는 65%, 더욱 바람직하기는 70%, 더욱 바람직하기는 75%, 더욱 바람직하기는 80%, 그리고 가장 바람직하기는 90~95% 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성을 말한다. 바람직하기는, 실질적으로 동일성은 길이가 적어도 약 50 잔기인 서열의 영역에 걸쳐, 더욱 바람직하기는 적어도 약 100 잔기에 걸쳐 존재하고, 가장 바람직하기는 적어도 약 150 잔기에 걸쳐 서열이 실질적으로 동일하다. 가장 바람직한 구현예에서, 서열은 암호화 영역의 전체 길이에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

[0023] 서열 비교를 위해, 통상적으로 하나의 서열은 참조로서 작용하고, 그것에 대해 시험 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 및 참고 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라, 서브서열 코디네이터를

지정하고, 그리고 서열 알고리즘 프로그램 계수를 지정한다. 그리고 나서 서열 비교 알고리즘을 지정된 프로그램 계수에 근거하여, 참고 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성 비율을 산출한다.

[0024] 비교를 위한 서열의 최적 배열은, 예를 들면, Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)의 국소적 상동성 알고리즘에 의해, Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)의 상동성 배열 알고리즘에 의해, Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)의 유사성 방법의 연구에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터에 의한 실행에 의해 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 외관검사에 의해 (일반적으로, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)) 수행될 수 있다.

[0025] 서열 동일성 비율과 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이들은 Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 and Altschuel *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402에 각각 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information를 통해 공개적으로 이용가능하다. 이 알고리즘은 쿼리 서열에서 길이 W의 단어 (short words)를 동정함에 의해 고득점 서열쌍(high scoring sequence pairs)을 우선 동정하는 것을 포함하는데, 이것은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 배열될 때 약간의 양의 값 역치 점수와 매치되거나 만족시킨다. T는 이웃 단어 점수 역치(neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, *supra*))라 불린다.

[0026] 이들 초기 이웃 단어 명중(hits)은 그들을 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 연구를 개시하는 씨앗으로 작용한다. 단어 명중은 그리고 나서 누적된 배열 점수가 증가될 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양쪽 방향으로 확장된다. 축적된 점수는 뉴클레오티드 서열의 경우, 계수 M(매칭 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 >0)과 N(매치되지 않은 잔기에 대한 벌칙 점수; 항상 <0)을 사용하여 산출된다. 아미노산의 경우, 점수 매트릭스는 축적 점수를 산출하는데 사용된다. 각각의 방향에서 단어 명중의 연장은: 축적된 배열 점수가 그것의 최대로 얻은 값에서 X 량 만큼 하락할 때; 축적 점수가 하나 이상의 음의 값 잔기 배열의 축적으로 인해 0 또는 그 이하가 될 때; 또는 서열의 어느 말단에 도달될 때 정지된다. BLAST 알고리즘 계수 W, T, 및 X는 배열의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램은 (뉴클레오티드 서열의 경우) 디폴트로서, 단어길이 (W) 11, 예상(E) 10, M=5, N=-4, 및 두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서, 단어길이 (W) 3, 예상 (E) 10 및 BLOSUM62 점수화 매트릭스를 사용한다 (Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989) 참조).

[0027] 서열 동일성 비율을 산출하는 것에 더하여, BLAST 알고리즘은 또한 두 서열간의 유사성의 통계적 분석을 수행한다 (예를 들면, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993) 참고). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 측정은 최소 합 확률(smallest sum probability: P(N))이고, 이것은 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 매치가 우연히 일어나는 확률의 징후를 제공한다. 예를 들면, 핵산은 참조 핵산에 대한 시험 핵산의 비교에서 최소 합 확률이 약 0.1 미만, 바람직하기는 약 0.01 미만, 그리고 가장 바람직하기는 약 0.001 미만인 경우, 참조 서열과 유사하다고 간주된다.

[0028] 본 발명의 두 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 추가의 징후는, 아래 기재된 바와 같이 첫 번째 핵산에 의해 암호화된 폴리펩티드가 두 번째 핵산에 의해 암호화된 폴리펩티드와 번역적으로 가교 반응성인 것이다. 그러므로, 폴리펩티드는 통상적으로 두 번째 폴리펩티드와 실질적으로 동일하고, 예를 들면, 두 펩티드는 오직 보존성 치환에 의해서만 다르다. 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 징후는 두 분자가, 하기와 같이 엄격한 조건하에서 서로 혼성화되는 것이다.

[0029] 본 발명의 캡시드 단백질 또는 필로바이러스 항원의 문맥에서, 용어 "실질적으로 유사한"은 폴리펩티드가 10~20 아미노산의 비교창에 걸쳐 참조 서열과 적어도 90%, 바람직하기는 적어도 95% 동일하다는 것을 나타낸다. 서열 동일성의 비율은 비교창에 걸쳐 두 개의 최적으로 배열된 서열을 비교에 의해 결정되고, 여기서 비교창의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열을 위한 참조 서열(이것은 추가 또는 결실을 포함하지 않는다)과 비교하여 추가 또는 결실 (즉, 틈)을 포함할 것이다. 비율은 매치된 위치의 수를 얻기 위해 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 둘 다의 서열에서 일어나는 위치의 수를 결정하고, 매치된 위치의 수를 비교창에서의 총 위치 수로 나누고, 그리고 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 비율을 얻는다.

도면의 간단한 설명

[0030]

도 1. 아데노바이러스 유전적 그룹화 및 벡터 조직화. (A) 아데노바이러스 핵소 서열의 관계를 나타내는 계통수. 다양한 서브그룹 A 내지 F를 표시하였고 인간 아데노바이러스 혈청형 26과 35는 강조하였다. 계통수는 ClustalX 패키지 (Larkin et al., 2007)의 이웃-연결법을 사용하여 구축되었고 그리고 Phylyp Phylogeny Inference 패키지 버전 3.68을 사용하여 그렸다. 신뢰도값은 1000배 부트스트랩(bootstrap)의 비율로 내부 분지(internal branch)에 나타내었다. (B) 재조합 Ad26과 재조합 Ad35 벡터의 계통의 개략도. 두 벡터 모두 E1의 완전 결실을 갖고 CMV 프로모터의 조절 하에 EBOV 글리코단백질을 함유하는 발현 카세트를 함유한다. 추가의 결실을 E3 영역에 만들었고 각각의 E4 orf6 서열을 Ad5 E4orf6 서열로 대체하여, PER.C6® 세포와 같은 Ad5 E1 보체 세포주 상에 이들 백신 벡터들의 복제가 용이하도록 하였다.

도 2. rAd35-GP (Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 사용) 백신-유도 면역 반응 및 EBOV 챌린지. (A) ELISA에 의해 측정된 rAd35-GP 백신접종된 필리핀 원숭이, Ad5-나이브(회색 바) 및 Ad5-면역(검은색 바)로부터 백신접종 후 3주에 얻은 플라즈마 샘플 중의 항-EBOV GP IgG의 양. (B,C) IL-2 (CD4) 또는 TNF- α (CD8)에 대한 ICS에 의한 메모리 세포 세브셋에 열거된 항원-특이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-림프구 반응의 빈도, 및 3주 포스트-백신 PBMC의 자극 후 세포 흐름에 의한 분석. (D) 1000 PFU ZEBOV에 의한 감염성 챌린지 후 rAd35-GP 백신접종 (청색, Ad5-나이브; 적색, Ad5-면역) 및 대조 (검은색) 필리핀 원숭이에서의 플라즈마 AST 간 효소 수준

도 3. (Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL을 사용한) 필리핀 원숭이에서 면역 반응의 rAd35-GP 유도에 대한 투여 반응. (A) rAd35-GP 벡터 (Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL) 각각의 10^{10} 또는 10^{11} 바이러스 입자로 백신접종 후 3주의 필리핀 원숭이로부터 얻은 플라즈마 중의 GP-특이 ELISA IgG 항체 역가 (EC90). (B, C) 도 2에서와 같은 ICS에 의해 평가된 항원-특이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포빈도. 회색 바, 10^{10} 바이러스 입자 rAd35-GP; 검은색 바, 10^{11} 바이러스 입자 rAd35-GP. (D, E) 1000 PFU ZEBOV로 챌린지 후 플라즈마 AST 간 효소 수준. 청색, 10^{10} rAd35-GP 바이러스 입자; 적색 10^{11} 바이러스 입자 rAd35-GP 및 검은색, 대조.

도 4. (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt을 사용한) 필리핀 원숭이에서 항원-특이 항체와 T-림프구 반응을 유도하기 위한 rAd26-GP 벡터의 능력. (A) ELISA IgG 항체 역가 (EC90), 및 (B, C) GP-특이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 빈도수, (D) 플라즈마 AST 간 효소를 두 분리된 연구에서 개별적인 필리핀 원숭이에 대해 나타난다. 연구 1 개체는 rAd26-GP 벡터 (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt)의 각각의 10^{10} 또는 10^{11} rAd26 바이러스 입자의 백신을 투여받음. 그리고 연구 2 개체는 rAd26-GP 벡터 (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt)의 각각의 10^{12} 바이러스 입자의 투여량을 받음.

도 5. (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt을 사용한) rAd26-GP 백신접종된 필리핀 원숭이에 대한 카플란-마이어 생존 곡선 (Kaplan-Meier survival curves). 비백신접종 대조와 rAd26-GP 백신접종된 동물을 도 4에 나타낸 바와 같이, 두 별도의 챌린지 실험에서 1000 PFU ZEBOV로 백신접종 후 4 주에 감염시켰다. 패널 A: 검은색 라인은 비백신접종 개체를 나타내고 진한 청색 라인은 표시된 투여량으로 Ad25-백신접종 개체를 나타낸다. 패널 B: rAd35-백신접종 개체(밝은 청색)의 한 그룹은 rAd26-GP 벡터들 (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt) 각각의 10^{11} 바이러스 입자의 투여량에서 Ad26과 잠재력 비교에 대해 나타낸다. 패널 C: rAd26-GP 벡터들 (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt) 각각의 10^{12} 바이러스 입자로 백신접종된 개체와 비교한 역사적 Ad5-백신접종 필리핀 원숭이 생존 (적색).

도 6. (Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt 이어서 Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL을 사용한) rAd26-GP/rAd35-GP 백신접종 후 프라임 및 부스트 면역 반응의 비교. (A) ELISA에 의해 측정된 rAd35-GP 백신접종된 필리핀 원숭이, Ad5-나이브(회색 바) 및 Ad5-면역(검은색 바)로부터 백신접종 후 3주에 얻은 플라즈마 샘플 중의 항-EBOV GP IgG의 양. (B,C) IL-2 (CD4) 또는 TNF- α (CD8)에 대한 ICS에 의한 메모리 세포 서브셋에 열거된 항원-특이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-림프구 반응의 빈도, 및 3주 포스트-백신 PBMC의 자극 후 세포 흐름에 의한 분석. (D, E) EBOV 챌린지 결과. 1000 PFU ZEBOV에 의한 감염성 챌린지 후 rAd26-GP/rAd35-GP 백신접종된 필리핀 원숭이에 대한 플라즈마 AST 간 효소 수준 (D), 및 카플란-마이어 생존 곡선 (E) (청색, rAd26-GP/rAd35-GP; 적색, Ad5-GP 및 검은색 백신접종되지 않은 대조군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명은 적어도 부분적으로 rAd35 및 rAd26 벡터가 단일 접종 후 뿐만 아니라 이형 프라임-부스트 조합 후, 필로바이러스 감염에 대해 방어면역 반응을 발생한다는 발견을 근거로 한다. 특히, 본 발명은 이형 프라임-부스트 조합 (특히, Ad26 프라임에 이어서 Ad35 부스트)이 방어면역 반응의 발생에 놀랍게도 효과적이라는 증거를 제공한다. 이들 프라임-부스트 조합의 놀라운 유효성은 본 발명의 시기에 예측할 수 없었다. 그러므로, 본 발명은 필로바이러스 항원을 발현하는 재조합 아데노바이러스 벡터 (rAd35 또는 rAd26)을 제공한다. 아데노바이러스 벡터는 백신으로 제제화될 수 있고 단독으로 또는 프라임-부스트 조합으로 필로바이러스 감염에 대해 방어면역을 유도하는데 사용될 수 있다.
- [0032] 필로바이러스 항원
- [0033] 에볼라 바이러스, 그리고 유전적으로 관련된 마르부르그 바이러스는 북아메리카, 유럽, 및 아프리카에서 인간과 영장류에서 매우 치명적인 출혈열의 발생과 관련된 필로바이러스이다 (Peters, C.J. et al. in: Fields Virology, eds. Fields, B.N. et al. 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Peters, C.J. et al. 1994 Semin Virol 5:147-154). 비록 여러 서브타입들이 확인되었지만, 이들 바이러스의 유전적 조직은 유사하고, 각각은 7개의 선형적으로 배열된 유전자를 함유한다. 바이러스 단백질 중에서, 외피 당단백질은, 50-70 킬로달톤 (kDa) 분비 단백질 (sGP) 및 바이러스 출입을 매개하는 RNA 편집에 의해 발생된 130 kDa 막관통 당단백질의, 두 종류의 선택적 형태로 존재한다 (Peters, C.J. et al. in: Fields Virology, eds. Fields, B.N. et al. 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Sanchez, A. et al. 1996 PNAS USA 93:3602-3607). 다른 구조적 유전자 산물은 뉴클레오단백질 (NP), 매트릭스 단백질 VP24 및 VP40, 추정 비구조적 단백질 VP30 및 VP35, 및 바이러스 폴리머라제를 포함한다 (reviewed in Peters, C.J. et al. in: Fields Virology, eds. Fields, B.N. et al. 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996).
- [0034] 핵산 분자는 어느 필로바이러스 종의 구조적 유전자 산물을 암호화할 수 있다. 에볼라 바이러스의 5종, 자이르 (종 유형, ZEBOV라고도 불림), 수단 (또한 SEBOV로 불림), 레스톤, 분디부교, 및 아이보리 코스트가 있다. 마르부르그 바이러스의 단일 종이 있다(또한 MARV로 불림).
- [0035] 본 발명의 벡터에 발현된 특정 항원은 본 발명의 중요한 면은 아니다. 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 다양한 필로바이러스 항원의 항원 결정인자를 포함하는 단백질을 발현하는데 사용될 수 있다. 통상의 그리고 바람직한 구현예에서, 본 발명의 벡터는 바이러스 당단백질 (GP)의 막투과 형태를 암호화하는 핵산을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 벡터는 바이러스 뉴클레오단백질 (NP), 또는 바이러스 당단백질 (SGP)의 분비형(secreted form)을 암호화할 수 있다.
- [0036] 당업자는 필로바이러스 항원단백질을 암호화하는 핵산 분자가 변형될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들면, 여기서 제시되는 핵산 분자는, 돌연변이 발현 단백질이 병원균 또는 질병에 대해 면역 반응을 나타내는 한, 돌연변이될 수 있다. 그러므로, 본 발명에 사용되는 바에 따르면, 용어 "필로바이러스 항원 단백질"은 상기 필로바이러스의 적어도 하나의 항원 결정인자를 포함하는 단백질을 말한다. 본 용어는 필로바이러스 항원 (즉, 필로바이러스의 유전 산물), 뿐만 아니라 하나 이상의 필로바이러스 항원 결정요인을 포함하는 재조합 단백질을 아우른다.
- [0037] 몇몇 구현예에서, 단백질은 세포에 독성이덜하도록 돌연변이 될 것이다 (예를 들면, WO/2006/037038 참조). 본 발명은 또한 핵산분자들의 조합을 포함하는 백신을 포함한다. 예를 들면, 그리고 제한 없이, 자이르, 수단 및 아이보리 코스트 에볼라 균주의 GP, SGP 및 NP를 암호화하는 핵산 분자는 하나의 백신 조성물로, 어느 조합으로 결합될 수 있다.
- [0038] 아데노바이러스 벡터
- [0039] 상기와 같이, 특정 아데노바이러스에 대한 노출은 특정 아데노바이러스 혈청형에 대한 면역 반응을 가져오고, 이것은 아데노바이러스 백신의 효능에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명은 두 가지 회귀 혈청형: Ad26과 Ad35로부터의 캡시드 단백질을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 통상의 구현예에서, 벡터는 rAd26 또는 rAd35 바이러스이다.
- [0040] 그러므로, 본 발명의 벡터는 Ad26 또는 Ad35 캡시드 단백질(예를 들면, 섬유, 펜톤 또는 핵소 단백질)을 포함한다. 당업자는 전체 Ad26 또는 Ad35 캡시드 단백질이 본 발명의 벡터에 사용된다는 것이 필요하지 않다는 것을 인식할 것이다. 그러므로, 적어도 일부의 Ad26 또는 Ad35 캡시드 단백질을 포함하는 키메릭 캡시드 단백질이 본 발명의 벡터에 사용될 수 있다. 본 발명의 벡터는 또한, 적어도 하나의 캡시드 단백질이 Ad26 또는 Ad35로부터 유래 되는 한, 섬유, 펜톤 및 핵소 단백질이 각각 다른 혈청형으로부터 유래된 캡시드 단백질을 포함할 수

있다. 바람직한 구현예에서, 섬유, 펜톤 및 핵산 단백질은 각각 Ad26으로부터 또는 각각 Ad35로부터 유래된다.

- [0041] 당업자는 다중 혈청형으로부터 유래된 요소들이 단일 재조합 아데노바이러스 벡터에서 결합될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 그러므로, 다른 혈청형으로부터 원하는 성질들을 결합한 키메라 아데노바이러스가 생산될 수 있다. 그러므로, 몇몇 구현예에서, 본 발명의 키메라 아데노바이러스는 Ad26 및 Ad35 혈청형의 이전면역의 부재를 온도 안정성, 조립, 정착(anchoring), 생산물, 전가된 또는 개선된 감염, 표적 세포에서의 DNA 안정성과 같은 특성과 결합시킬 수 있다.
- [0042] 특정 구현예에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터는 Ad35 또는 Ad26으로부터 주로 또는 전적으로 유래된다 (즉, 벡터는 rAd35 또는 rAd26 이다). 몇몇 구현예에서, 아데노바이러스는 복제결합이고, 예를 들면, 이것은 게놈의 E1 영역에 결실을 함유하기 때문이다. 본 발명의 아데노바이러스의 경우, Ad26 또는 Ad35로부터 유래되므로, 아데노바이러스의 E4-orf6 코딩 서열을 Ad5와 같은 인간 서브그룹 C의 아데노바이러스의 E4-orf6와 교환하는 것이 통상적이다. 이것은 예를 들면, 293 세포, PER.C6 세포 등과 같은 Ad5의 E1 유전자를 발현하는 공지의 보체 세포주에서 이와 같은 아데노바이러스가 증식하는 것을 허용한다 (예를 들면, Havenga *et al*, 2006, *J Gen Virol* 87: 2135-43; WO 03/104467 참조). 특정 구현예에서, 아데노바이러스는 항원을 암호화하는 핵산이 클론되어 있는 E1 영역에 결실을 갖고, Ad5의 E4 orf6 영역을 갖는 혈청형 35의 인간 아데노바이러스이다. 특정 구현예에서, 아데노바이러스는 항원을 암호화하는 핵산이 클론되어 있는 E1 영역에 결실을 갖고, Ad5의 E4 orf6 영역을 갖는 혈청형 26의 인간 아데노바이러스이다. Ad35 아데노바이러스의 경우, 예를 들면, pIX 개방형 해독틀 또는 *Bsu*36I 제한 부위에 의해 5' 말단에 표시된 pIX 개시 코돈의 243 bp 단편 바로 상류와 같이 이것을 포함하는 단편의 166 bp 바로 상류에서 아데노바이러스에 E1B 55K 개방형 해독틀의 3' 말단을 보유하는 것이 통상적인데, 이것은 pIX 유전자의 프로모터가 이 면적에 부분적으로 거주하므로 아데노바이러스의 안정성을 증가시키기 때문이다 (예를 들면, Havenga *et al*, 2006, *supra*; WO 2004/001032 참조).
- [0043] 재조합 아데노바이러스 벡터의 제조는 본 분야에 잘 알려져 있다. rAd26 벡터의 제조는 예를 들면, WO 2007/104792 및 Abbink *et al.*, (2007) *Virol* 81(9): 4654-63에 기재되어 있다. 예시적인 Ad26의 게놈 서열은 GenBank Accession EF 153474 및 WO 2007/104792의 SEQ ID NO:1에서 발견된다. rAd35 벡터의 제조는 예를 들면, US 특허 제7,270,811호 및 Vogels *et al.*, (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71에 기재된다. Ad35의 예시적인 게놈 서열은 GenBank Accession AC_000019에 기재된다.
- [0044] 통상적으로, 본 발명의 벡터는 전체 재조합 아데노바이러스 게놈을 포함하는 핵산을 사용하여 제조된다(예를 들면, 플라스미드, 코스미드, 또는 바큇로바이러스 벡터). 그러므로, 본 발명은 또한 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 암호화하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 핵산 분자는 클로닝에 의해 얻은 또는 합성에 의해 생산된 RNA의 형태이거나 또는 DNA 형태일 수 있다. DNA는 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 통상적으로 복제결합이다. 이들 구현예에서, 바이러스는 E1 영역과 같은, 바이러스의 복제에 중요한 영역의 결실 또는 비활성화에 의해 복제결합이 된다. 영역들은 실질적으로 예를 들면, (일반적으로 프로모터에 연결된) 관심의 유전자의 삽입에 의해 결실 또는 비활성화될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 벡터는 E2, E3, 또는 E4 영역과 같은 다른 영역에서의 결실 또는 프로모터에 링크된 이형 유전자의 삽입을 함유할 수 있다. E2- 및/또는 E-4 돌연변이 아데노바이러스, 일반적으로 E2- 및/또는 E4-보체 세포주가 재조합 아데노바이러스를 생성하는데 사용된다. 아데노바이러스의 E3 영역에서의 돌연변이는 세포주에 의해 보충될 필요가 없는데, E3가 복제에 필요하지 않기 때문이다.
- [0046] 패키징 세포주는 통상적으로 본 발명의 충분한 양의 아데노바이러스 벡터를 생산하는데 사용된다. 패키징 세포는 복제결합 벡터에서 결실되거나 또는 불활성화된 이들 유전자들을 포함하는 세포이고, 그러므로 세포에서 바이러스가 복제되도록 한다. 적절한 세포주는 예를 들면, PER.C6, 911, 293, 및 E1 A549를 포함한다.
- [0047] 위에서 설명된 바와 같이, 필로바이러스 항원 단백질의 다양성은 본 발명의 벡터에 발현될 수 있다. 필요에 따라, 필로바이러스 항원 단백질을 암호화하는 이형 유전자가 처리된 숙주(예를 들면, 인간)에서 적절한 발현의 보장을 위해 코돈-최적화될 수 있다. 코돈-최적화는 본 분야에 널리 적용되는 기술이다. 통상적으로 이형 유전자는 아데노바이러스 게놈의 E1 및/또는 E3 영역으로 클론된다.
- [0048] 이형 필로바이러스 게놈은 아데노바이러스-유래 프로모터 (예를 들면, Major Late Promoter)의 조절하에 있거나 또는 이형 프로모터의 조절하에 있을 수 있다. 적절한 이형 프로모터들의 예는 CMV 프로모터와 RSV 프로모터를 포함한다. 바람직하기는, 프로모터는 발현 카세트 내의 관심의 이형 유전자의 상류에 위치한다.
- [0049] 상기와 같이, 본 발명의 아데노바이러스는 본 분야의 당업자에게 알려진 다양한 필로바이러스 항원을 포함한다.

표 1은 본 발명의 예시적인 벡터들의 요약을 제공한다.

표 1

벡터 명칭	삽입을 위한 소스 플라스마의 VRC 번호	삽입물의 서열	설명
Ad5.Ebo.GP(Z)FL.wt	6001	SEQ ID NO: 1	ZEBOV GP 야생형
Ad5.Ebo.GP(S/G)FL.wt	6610	SEQ ID NO: 3	SEBOV GP 야생형
Ad5.Mar.GP(A)FL	6712	SEQ ID NO: 4	최적화된 MARV 앙골라 코돈
Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt	6001	SEQ ID NO: 1	ZEBOV GP 야생형
Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt	6610	SEQ ID NO: 3	SEBOV GP 야생형
Ad26.Mar.GP(A)FL	6712	SEQ ID NO: 4	최적화된 MARV 앙골라 코돈
Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt	6001	SEQ ID NO: 1	ZEBOV GP 야생형
Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL	6611	SEQ ID NO: 2	최적화된 SEBOV GP 앙골라 코돈
Ad35BSU.Mar.GP(A)FL	6712	SEQ ID NO: 4	최적화된 MARV 앙골라 코돈

면역원성 조성물

정제된 또는 부분적으로 정제된 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 본 분야에 잘 알려진 방법에 따라 백신(또한 면역원성 조성물로도 언급된다)으로 제제화하였다. 이와 같은 조성물은 면역반응을 강화하기 위한 애드juv언트를 포함할 수 있다. 제제화에서 각각의 성분들의 최적 비율은 본 분야의 당업자에게 잘 알려진 기술로 결정될 수 있다.

면역 조성물의 제조와 사용은 본 분야에 잘 알려져 있다. 액체 약제학적 조성물은 일반적으로 물, 석유, 동물성 또는 식물성 기름, 미네랄류 또는 합성유와 같은 액체 담체를 포함한다. 생물학적 살린 용액, 텍스트로스 또는 기타 다당류 용액 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜류가 포함될 수 있다.

조성물들은 단일 투여 또는 연속 투여에 적합하다. 연속 투여로 제공될 때, 초기(프라이밍) 투여에 이어지는 접종은 면역 반응을 부스트하기위해 제공되고 통상적으로 부스터 접종으로 불린다. 본 발명의 조성물은 다양한 프라이밍 조성물 중 어느 것을 사용하는 항원에 의해 제조된 부스팅 조성물로서 또는 프라이밍 조성물로서 사용될 수 있다. 그러므로, 본 발명의 한 면은 개인에게 항원에 대한 면역 반응을 프라이밍 및/또는 부스팅하는 방법을 제공하는 것이다. 예를 들면, 몇몇 바람직한 구현예에서, 본 발명의 하나의 아데노바이러스 벡터(예를 들면, rAd26)의 프라이밍 투여 후, 제2의 아데노바이러스 (예를 들면, rAd35)의 부스터 접종이 따른다.

부스팅 조성물의 투여 시간은 본 분야의 기술 내에 있다. 부스팅 조성물은 일반적으로 프라이밍 조성물의 투여 수주 후 또는 수 개월 후, 예를 들면, 약 2-3주 또는 4주, 또는 8주, 또는 16주, 또는 20주, 또는 24주, 또는 28주, 또는 32주, 또는 1 내지 2년에 투여된다.

본 발명의 조성물은 다른 필로바이러스 항원을 포함할 수 있고 또는 프라이밍 또는 부스팅 접종은 다른 항원을 포함할 수 있다. 본 발명의 아데노바이러스 벡터와 조합하여 사용되는 다른 항원은 본 발명에 중대하지 않고 예를 들면, 필로바이러스 항원, 그들을 발현하는 핵산, 바이러스 유사 입자(VLPs) 또는 선행기술의 바이러스 벡터 일 수 있다. 이와 같은 벡터는 예를 들면, 다른 아데노바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 계두(fowlpox) 또는 카나리아 두창 (canarypox)과 같은 조류пок스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 수포성 구내염 바이러스 벡터, 또는 알파바이러스 벡터를 포함한다. 당업자 중 한 명은 본 발명의 면역원성 조성물이 다중 항원 및 벡터를 포함할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

각각의 프라이밍 및 부스팅 조성물(그러나 많은 부스팅 조성물이 사용된다)에서 항원들은 동일할 필요는 없지만, 항원 결정요인은 공유해야 한다.

상기와 같이, 본 발명의 면역원성 조성물은 애드juv언트를 포함한다. 본 발명에 따른 공동-투여에 적합한 애드juv언트

는 QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL- 1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-I, GcMAF, B-aletine, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectin, Alum, 및 MF59을 포함하여, 인간에게 잠재적으로 안전하고, 잘 견디고 그리고 효과적인 것이어야 한다.

- [0059] 투여될 수 있는 다른 애주버트는 알파-인터페론, 감마-인터페론, 혈소판 유래 성장인자 (PDGF), 과립구집락형성 자극 인자(gCSF), 과립대식세포 집락자극인자(gMCSF), 종양 괴사 인자 (YNF), 표피 성장인자 ((EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, 및 IL-12 와 같은 렉틴, 성장 인자, 시토킨 및 림포카딘 또는 암호화 핵산을 포함할 수 있다.
- [0060] 상기와 같이, 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 본 분야의 당업자에게 잘 알려진 기타 재료를 포함할 수 있다. 이와 같은 재료는 비독성이어야 하고 그리고 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 담체 또는 기타 재료의 정확한 성질은 투여 경로, 예를 들면, 경구, 정맥 내, 피부 또는 피하, 점막내 (예를 들면, 거트), 비 내, 근육 내, 또는 복강내 경로에 따른다.
- [0061] 면역원성 조성물의 근육내 투여는 주사기를 사용하여 아데노바이러스 벡터의 현탁물을 주입함에 의해 달성될 수 있다. 선택적으로는, 조성물을 투여하기 위한 무바늘 주입 장비 (예를 들면, Biojector(TM)를 사용하는) 또는 백신을 함유하는 냉동-건조 분말이 사용된다.
- [0062] 정맥, 피부 또는 피하 주입 또는 통증 부위에서의 주입의 경우, 아데노바이러스 벡터는 발열물질-프리이고 그리고 적절한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용가능한 수용액 형태일 수 있다. 본 분야의 당업자는 예를 들면, 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 락테이트 링거 주사액과 같은 등장성 비히클을 사용하여 적절한 용액을 제조할 수 있다. 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 필요에 따라 포함될 수 있다. 느린-방출 제제가 또한 사용될 수 있다.
- [0063] 통상적으로, 투여는 감염 또는 증상의 발현 전에 필로바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위한 예방적 목적을 가질 것이다. 본 발명에 따라 처리되거나 또는 예방될 질병 및 질환은 면역 반응이 예방 또는 치료 역할을 하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 아데노바이러스는 사후 예방을 위해서도 투여될 수 있다.
- [0064] 아데노바이러스 벡터를 함유하는 면역원성 조성물이 개체에 투여되고, 개체에 항-필로바이러스 면역 반응을 일으킨다. 검출가능한 면역 반응을 유도하기에 충분한 조성물의 양은 "면역학적으로 유효한 투여량"으로 정의된다. 아래에 나타난 바와 같이, 본 발명의 면역 조성물은 체액뿐만 아니라 세포-매개 면역 반응을 유도한다. 통상의 구현예에서, 면역 반응은 방어면역 반응이다.
- [0065] 투여된 실제량, 및 투여 속도 및 시간 경로는 처리되는 것의 특성 및 심각성에 의존할 것이다. 치료의 처방, 예를 들면, 투여량에 대한 결정 등은 일반의와 기타 의사 또는 수의학적 문맥에서는, 의사의 책임이고, 그리고 통상적으로 처리될 질병, 개개의 환자의 병태, 전달 부위, 투여 방법 및 의사에게 알려진 다른 요인들을 고려한다. 상기 기술 및 프로토콜의 예는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980에서 확인할 수 있다.
- [0066] 아데노바이러스 벡터의 생산 및 이와 같은 입자들의 임의의 제제화 후, 아데노바이러스 벡터는 개개인에, 특히 인간 또는 다른 영장류에 투여될 수 있다. 투여는 인간 또는 다른 포유동물, 예를 들면, 마우스, 래트, 햄스터, 기니 피그, 토끼, 양, 염소, 돼지, 말, 소, 당나귀, 원숭이, 개 또는 고양이에게 이루어질 수 있다. 비-인간 포유동물에 대한 전달은 치료적 목적일 필요는 없으나, 실험적 문맥에서, 예를 들면, 아데노바이러스 벡터에 대한 면역 반응의 메커니즘의 연구에서 사용될 수 있다.
- [0067] 하나의 예시적인 요법에서, 아데노바이러스 벡터는 약 10^4 내지 10^{12} 바이러스 입자/ml의 농도를 함유하는, 약 100 μ l 내지 약 10 ml의 살린 용액으로 (예를 들면, 근육 내)투여된다. 통상적으로, 아데노바이러스 벡터는 1 회 투여 동안 인간 개체에게 약 10^9 내지 약 10^{12} 바이러스 입자 (vp)의 양으로, 그리고 더욱 바람직하기는 약 10^{10} 내지 약 10^{12} vp의 양으로 투여된다. 상기와 같이 초기 백신접종에 이어서 부스트가 이어질 수 있다. 필요에 따라, 조성물은 키트, 팩 또는 디스펜서에 존재할 수 있고, 이것은 활성성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있다. 키트는 예를 들면, 블리스터 팩과 같은, 금속 또는 플라스틱 포일을 포함할 수 있다. 키트, 팩 또는 디스펜서는 투여 지침이 수반될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 다른 치료와 조합하여 처리될 병태에 따라 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0069] 실시예

[0070] 다음의 실시예들은 설명을 위해 제공되며, 청구된 발명을 제한하는 것은 아니다. 즉시 면역 대 장기 면역에 대한 필요에 의존하는 단일 또는 프라임-부스트 면역과 관련된 독특한 이점이 면역화 요법의 최적화를 위해 고려되어야 한다. EBOV 및 다른 필로바이러스 발생은 갑자기 일어나고 의료 설비가 부족한 개체 중에서 신속히 확산되는 경향이 있다. 그러므로, 이러한 상황에서, 단일 백신 요법이 바람직하다. 이런 이유로, EBOV 당단백질(GP)과 뉴클레오단백질(NP)를 함유하는 rAd5 벡터를 사용한 단일 접종이 비-인간 유인원에게 개발되어 왔다 (Sullivan, *et al.*, 2006). 이와 같은 백신은 1개월 내에 강한 면역 반응을 이끌어내는 것으로 나타났고, 아마도 삽입물의 높은 발현 수준과 수지상 세포에 대한 Ad5의 친화성 때문이다. 다른 한편으로, 장기 방어면역은 내구성 있는 T-세포 메모리를 유도할 수 있는 2회 이상의 투여를 포함하는 프라임-부스트 백신 요법을 요구할 것이다. 그러므로, 본 발명자들은 단일 접종과 rAd35 및 rAd26 벡터를 사용하는 프라임-부스트 조합 둘 다에 대한 면역원성과 효능을 시험하기 위한 일련의 실험을 고안하였고, 연구 결과를 여기에 나타낸다.

[0071] 재료 및 방법

[0072] **rAd 에볼라 백신 생성.** 앞서 기재된 바와 같이, EBOV GP를 발현하는 저혈청 우세(seroprevalent) E1/E3-결실 rAd26 및 rAd35 백신 벡터를 구축하고, 성장시키고 정제하였다 (Abbink, *et al.*, 2007). 동일한 방법으로 EBOV GP를 발현하지 않는 Ad5 벡터를 구축하고, 성장시키고 그리고 정제하고, 그리고 각각의 실험에 표시된 바와 같이 선택된 동물에서 Ad5에 대한 면역성을 유도하는데 사용하였다. 자이르(SEQ ID NO:1) 및 수단/굴루(SEQ ID NO: 2)의 개방형 해독틀에 걸친 EBOV GP 삽입물을 인간 CMV 프로모터와 SV-40 폴리아데닐화 서열의 전사적 조절하에 Ad 게놈의 좌측 일부를 함유하는 플라스미드에 클론화하여, 좌측 ITS와 패키징 신호를 유도하였다. 이 플라스미드와 나머지 Ad 서열 (E3-결실)을 함유하는 코스미드를 PER.C6 세포에 공동-트랜스펙션하여 E1/E3-결실 복제결합 재조합 Ad26 또는 Ad35 백신 벡터를 생산하였다. PER.C6[®] 세포에서 rAd26 및 rAd35 벡터의 복제가 용이하도록, 천연 E4 orf6 영역을 Ad5 E4orf6 서열로 대체하였다 (Havenga, *et al.*, 2006). rAd 바이러스를 플라그 정제하였고, 각각의 하나의 플라그를 대략 2.4 L의 생산 규모까지 확대시켰다. 2 단계 염화세슘 구배 초원심 분리 과정을 사용하여 rAd EBOV 벡터를 정제하였다. 정제된 rAd EBOV 백신을 -65°C 이하에서 단일 사용 분획으로 저장하였다. 바이러스 입자 역가를 260 nm에서 광학 밀도를 측정하여 결정하였다 (Maizel, *et al.*, 1968 *Virology* 36(1): 115-25). 감염력을 911 세포를 사용하는 TCID50에 의해 평가하였다 (Fallaux, *et al.*, (1996) *Hum Gene Ther* 7(2): 215-22). 아테노바이러스-매개 EBOV GP 발현을 A549 세포의 감염과 이어서 웨스턴 블롯에서의 배양 용해물의 분석에 의해 평가하였다. 정제된 벡터의 동정을 PCR로 확인하고 그리고 플랜킹 서열을 포함하는 완전 유전자변환 영역을 DNA 서열화를 사용하여 점검하였다.

[0073] **계통발생적 분석.** 전장 아테노바이러스 핵소 아미노산 서열을 사용하여 계통수를 구축하였다. 아미노산 서열을 Clustal X programme (Larkin, *et al.*, (2007) *Bioinformatics* 23(21): 2947-8)을 사용하여 배열하고, 계통수를 Clustal X Neighbour-Joining 법을 사용하여 건설하고 계통수를 1000배 부트스트랩하였다. 계통수를 Phylogeny Inference package version 3.68의 Drawtree 프로그램을 사용하여 가시화시키고 플롯팅하였다.

[0074] **동물 챌린지 연구 및 안정성.** 동물 실험을 모든 관련 연방 지침 및 NIH 정책을 철저히 준수하며 수행하였다. 수령 3~5년 및 체중 2~3kg의 필리핀 원숭이(*Macaca fascicularis*)를 모든 연구를 위해 코반스로부터 얻었다. 원숭이들을 개별적으로 수용하였고 실험 동물의 관리와 사용을 위한 지침에서 추천하는 바에 따라 규칙적으로 풍부함을 제공하였다 (DHEW number NIH 86-23). 동물을 혈액을 샘플링하거나 백신접종 전에 케타민으로 마취시켰다. 이 연구에서 각각의 백신군은 3 마리의 필리핀 원숭이를 포함하였고, 각각의 대조군은 단일 필리핀 원숭이를 포함하였다. EBOV 백신접종 후 4주에, 동물들을 고도 밀폐실험실 (BSL-4)로 옮겨 근육내 경로에 의해 허벅지 꼬리로 전달된 자이르 EBOV 1,000 PFU의 표적 투여량으로 백신접종하였다. ZEBOV 챌린지 스톡을 이전 자이르에서 1995년 발생한 인간 사망자로부터 제조하였다. 동물들은 연구가 완료될 때까지 그곳에 남아 있었다. BSL-4 시설에서, 원숭이들을 사육하고 최소 하루 1회 검진하였다.

[0075] USAMRIID에서 BSL-4 생화학적 봉쇄(biocontainment)에서 수행된 동물 연구는 USAMRIID 동물실험 관리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 입증되었다. 동물 연구는 동물 복지법 및 동물과 동물을 포함하는 실험에 대한 기타 연방 법규에 따라 수행되었고 *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Research Council, 1996의 원칙을 따랐다. 사용 시설은 국제 실험실 동물 관리의 평가 및 승인을 위한 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)에 의해 모두 승인되었다.

- [0076] **동물 면역화.** 개체들에 각각의 실험에 표시된 투여량과 백터를 바늘과 주사기로 쌍방 삼각근에서 근육내 백신접종하였다. 각각의 실험에 표시된 바에 따라, 선택된 동물들을 Ad5 면역을 유도하기 위해 빈(empty) Ad5 백터 10^{11} PFU로 예비-면역화시켰다. Ad5 ELISA 항체 역가를 EBOV 백신접종에 앞서 이들 동물에 확립시켰다.
- [0077] **항-EBOV GP IgG ELISA.** 폴리염화비닐 ELISA 플레이트 (Dynatech, Vienna, VA, or Nunc, Rochester, NY)에 웰당 $100 \mu\text{l}$ 의 항원으로 코팅하고 4°C 에서 밤새도록 배양하였다. 이 후 실온에서 배양을 수행하였다. 293T 세포의 인산칼슘-매개 일시적 트랜스펙션에 의해 생성된 트랜스 맴브레인-결합 EBOV GP (EBOV GPDIM)는 항원으로 작용한다. 플레이트를 항원 코팅 후 Tween 20을 함유하는 PBS로 6회 세척하였다. 시험 혈청을 1:50 내지 1:50,000의 범위의 7 개의 농도로 연속적으로 희석하고, 60분 동안 항원-코팅 웰에 첨가하였다. 플레이트를 6회 세척하고 검출 항체, 양고추냉이 과산화물에 컨쥬게이트된 염소 항-인간 IgG (H+L; Chemicon/Millipore, Billerica, MA)와 배양하였다. 시그마 패스트 o-페닐렌디아민 디피드로클로라이드 (Sigma, St.Louis, MO) 기질을 웰에 첨가하고 광학 밀도를 측정하였다 (450 nm). 각각의 동물에 대한 예비백신접종 혈청 샘플을 분석이 수행된 매회 작동시켰다. 공지의 자이르 EBOV GP IgG 반응으로부터 양성 대조 혈청 샘플을 분석이 수행된 매회 작동시켰다. 배경이 공제된(background-subtracted) ELISA 역가를 상호 광학 밀도값인 EC90로 표현하였고, 이것은 항원 결합이 90% 감소된 희석물을 나타낸다.
- [0078] **세포내 사이토킨 착색.** 필리핀 원숭이의 전혈 샘플을 Ficoll에 대해 밀도 구배 원심분리를 하여 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. 대략 1×10^6 세포를 10% 불활성화 태아 송아지 혈청을 함유하는 RPMI 매질 $100 \mu\text{l}$ 에서 6 시간 동안 37°C 에서 항-CD28 (클론 CD28.2) 및 -CD49d (클론 L25) 항체 (BD Biosciences), Brefeldin-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 및 DMSO 또는 전체 자이르 EBOV GP 개방형 해독물을 스피닝하는 펩티드 폴로 자극하였다. 펩티드는 각각의 펩티드의 경우 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 신규의 살균 DMSO에 재구성된 11 아미노산에 의해 오버랩된 15-mers였다. 양성 대조로서 각각의 샘플 등량물에 대해 부분표본을 SEB로 자극하였다. 6시간 자극 후, PBMC를 혈통 마커들에 대한 항체들(CD3-Cy7-APC, 클론 SP34-2 (BD Biosciences), CD4-QD605 클론 M-T477 (BD Biosciences), CD8-TRPE 클론 RPA-T8, CD95 Cy5-PE, 클론 DX2 (BD Biosciences), CD45RA QD655, 클론 5H3)의 혼합물로 실온에서 20분 동안 착색하였다. CD45RA QD655 및 CD8-TRPE 항체들을 위에서 기재한 표준화 프로토콜에 따라 컨쥬게이트 하였다 (Koup et al., 2010 Priming Immunization with DNA Augments Immunogenicity of Recombinant Adenoviral Vectors for Both HIV-1 Specific Antibody and T-Cell Responses. PLoS One 5(2): e9015. doi:10.1371/ journal.pone.0009015). 2회 세척 후, 세포를 고정시키고 Cytotfix /Cytoperm (BD Biosciences)으로 투과시키고 이어서 사이토킨 TNF α -APC, 클론 MAb11 (BD Biosciences), 및 IL-2 PE, 클론 MQ17H12 (BD Biosciences)에 대한 항체로 착색시켰다. 생존 및 사멸 세포 간의 차이를 허용하도록 생존능력 염료 ViViD (Invitrogen)를 포함시켰다 (Perfetto, et al., (2006) *J Immunol Methods* 313(1-2): 199-208). 샘플을 LSR II 세포측정기(BD Biosciences)에서 얻고 최대 1,000,000 사상을 수집하고 FlowJo 9.1 and SPICE 5.0 software (Tree Star)를 사용하여 분석하였다. 사이토킨 양성 세포를 CD4^{+} 및 CD8^{+} T 세포 메모리 서브세트 내의 비율로 정의하였다. 메모리 서브세트를 $\text{CD45RA}^{\pm}/\text{CD95}^{+}$ 또는 $\text{CD28}^{\pm}/\text{CD95}^{+}$ 로 정의하였다. 후자의 경우, CD28 Alexa488 (클론 28.2, BioLegend)을 사용하여 컨쥬게이트되지 않은 CD28 mAb 대신 자극을 위해 사용하였다.
- [0079] **혈청 생화학.** 챌린지 연구를 위해, 혈액을 NHP로부터 자이르 EBOV 감염 후 제0일, 제3일, 제6일, 제10일, 제14일 및 제28일에 수집하였다. 총 백혈세포 계수, 백혈 세포 격차, 적혈세포 계수, 혈소판 계수, 헤마토크릿 값, 총 헤모글로빈, 평균 세포 용적, 평균 미립자 용적, 및 평균 미립자 헤모글로빈 농도를 레이저-기반 혈액 분석기(Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA)를 사용하여 EDTA를 함유하는 튜브에 수집된 혈액 샘플로부터 측정하였다. 혈청 샘플을 Piccolo Point-Of-Care Blood Analyzer (Abaxis, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여, 아스파르트산 아미노기전달효소 (AST)의 농도에 대해 시험하였다.
- [0080] **EBOV의 검출.** 바이러스 적정을 배로 세포에 대한 플라그 분석으로 수행하였다. 즉, 플라즈마 샘플을 10배 희석으로 증가시킨 것을 이중 웰에서 배로 단일층에 흡착시키고(0.2 ml/웰); 그러므로, 검출 한계는 25 pfu/ml 였다.
- [0081] **통계.** 항-GP ELISA IgG 역가의 비교 및 T 세포 메모리 서브세트에 의한 세포내 사이토킨 생산을 GraphPad Prism software에서 양측 (two-tailed) T 시험을 사용하여 수행하였다.
- [0082] **결과**
- [0083] **아데노바이러스 계통 발생과 백터 구축** EBOV에 대한 rAd5 유전 백신은 필리핀 원숭이에 강력한 방어면역을 제공

하고, 그리고 인간 임상 시험에서 안전성과 면역원성을 증명하였다 (Asmuth, *et al.*; Kibuuka, *et al.*; Harro, *et al.*, 2009;). 필리핀 원숭이와 인간에 대한 연구는 면역원성이 검출된 기존 벡터가 바이러스 벡터-기재 백신의 잠재력을 제한할 수 있다는 것을 나타내었다(McCoy, *et al.*, 2007; Buchbinder, *et al.*, 2008). 혈청학적 유병률 데이터는 전세계의 대부분의 인간은 백신 벡터로서 사용하기 위한 다른 아데노바이러스 혈청형을 평가하는 Ad5we에 의한 자연 감염의 경험이 있다는 것을 제안한다 (도 1A). Ad35, 그룹 B 및 Ad26, 그룹 D 아데노바이러스들은 유전적으로 rAd5, 그룹 C와 구분되고, 따라서 본 발명자들은 이들 혈청형으로부터 유래된 백신 벡터들은 영장류에서 Ad5 면역원성에 대해 덜 민감할 것이라고 가정하였다. 비록 Ad35 및 Ad26 벡터가 Ad5 용법과 구별되는 수용체를 사용하지만, 이들은 그럼에도 불구하고 단핵구-유래 수지상 세포의 효율적인 형질도입을 증명하고, 그리고 마우스에서의 Ad5 면역을 막는다. 그러므로, EBOV의 자이르 또는 수단/글루 종으로부터의 GP 삽입물은 인간 CMV 프로모터의 전사적 제어하에 rAd35 및 rAd26 벡터의 E1 영역으로 클론되었다 (도 1B). 둘 다의 벡터 계놈들은 E1 유전자에서 결실되어 이들이 복제결합 되도록 하고 백신접종된 개체에서 재조합을 위한 잠재력을 감소시킨다.

[0084] 필리핀 원숭이에서 rAd35 백신접종 및 면역반응 유도. 초기 연구는 Ad5 나이브 필리핀 원숭이에게서 면역 반응을 유도하는 rAd35 벡터의 능력을 시험하기 위해, 그리고 또한 Ad5에 대한 이전 면역의 문맥에서 벡터 잠재력을 평가하기 위해 자이르 에볼라바이러스(ZEBOV)로부터의 GP, GP(Z)를 암호화하는 단일 EBOV 종-백신으로 수행하였다. 6 마리 필리핀 원숭이(3 Ad5-나이브 및 3 Ad5-면역)를 각각 주사기를 사용하여 rAd35-GP(Z) (Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt) 10^{10} 입자로 근육 내 백신접종하였다. 백신접종 후 3주에, 항원-특이 항체와 T-세포 반응을 개별 주체로부터 얻은 말초혈액 샘플에서 평가하였다. ELISA에 의해 평가된 EBOV-GP(Z)에 대한 항체가 모든 개체에서 유도되었고, rAd35-GP(Z) 벡터가 표적 세포의 성공적인 인 비보 형질도입과 효과적인 항원 제시를 매개한다는 것을 증명하였다 (도 2A). Ad5-나이브 및 Ad5-면역 개체는 대략 1:700 내지 1:3000의 혈청 항체 역가를 발생시켰다. 이들 항체 수준은 GP(Z) 삽입물을 함유하는 Ad5-기재 백신에 대해 관찰된 범위이고, 이 필리핀 원숭이-Ad 백신 모델 (Sullivan, 2009)에서 EBOV 감염에 대한 방어면역과 연관된 최소값 (1:500)을 초과한다. 비록 모든 백신에서 충분한 항체 역가가 유도되었지만, 필리핀 원숭이에서 Ad5-GP 백신 벡터의 투여 후 100% 방어를 예상하는 역치 역가를 초과하는 개체는 아무것도 없었다. 그러나, Ad5-나이브 대 Ad5-면역 개체에서 항체 역가의 비교에서 이들 그룹 중 유발된 평균 역가에서의 중요한 차이는 없다는 것이 주목 할만 하고 (각각 1:1600 대 1:1800), 이것은 rAd35 벡터가 앞서 Ad5에 노출되었던 개체에서 효과적인 백신이라는 것을 제안한다.

[0085] 세포 면역 반응을 개체 PBMC를 EBOV GP(Z) 개방형 해독틀을 스피닝하는 오버래핑 펩티드로 자극 후 TNF- α (CD8⁺) 또는 IL-2 (CD4⁺)에 대해 세포내 사이토킨 착색(ICS)에 의해 평가하였다. CD45RA 및 CD95를 이용한 림프구의 표면 착색을 수행하여 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포의 메모리 부분 모집단에서의 항원-특이 면역 반응을 평가하였다 (도 2 B-C). 항체 반응에 대해 관찰된 바에 따르면, rAd35 벡터가 백신접종된 필리핀 원숭이는 EBOV-GP에 대한 세포 면역성을 발생시켰고, 그리고 항원-특이 T-세포의 빈도는 Ad5 면역 상태에 의해 영향을 받지 않았다. 비록 하나의 개체 V3에 대해 항원-특이 T-세포의 빈도는 검출 수준 보다 낮았지만, 개체를 가로지르는 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구에서 세포 반응의 랭크 순서 크기는 항체 반응과 유사하였다. 필리핀 원숭이에서의 선행 연구는 rAd5-기재 백신 벡터가 CD4⁺ 반응보다 우세한 CD8⁺ T 세포 빈도를 유도한다는 것을 나타낸다. 본 연구에서, rAd35-백신 접종된 개체는 유사한 빈도로 GP-특이 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구를 생성한다. 그러나, 시험된 개체의 비교적 작은 수가 제공되어, 차이가 존재한다 해도 드러나지 않을 가능성이 있다. 모두 함께 이들 결과는 rAd35-GP가 필리핀 원숭이에서 면역원성이고, 항원-특이 체액성 및 세포-매개 면역 반응의 유도를 위한 벡터 효능이 Ad5에 대한 이전 면역을 갖는 개체에서 감소되지 않았다는 것을 증명한다.

[0086] **rAd 35 백신접종된 필리핀 원숭이의 ZEBOV로의 챌린지**

[0087] 본 발명자들은 rAd35-GP를 사용한 백신접종이 ZEBOV 고투여량에 의한 감염성 챌린지에 대해 방어를 제공하는지 에 대하여 시험하였다. 위에 나타난 면역 반응의 평가 후 1주일, 6 마리 rAd35-GP 백신접종된 그리고 1마리의 나이브 필리핀 원숭이를 근육내 주입에 의해 ZEBOV의 1995 Kikwit 균주 1000 PFU에 노출시켰다. 간 효소를 염증성 챌린지 후 정기적으로 측정하였고 이들 마커에서의 상승은 필리핀 원숭이에서 생산적인 EBOV 감염의 특징이기 때문이다. 아스파르테이트 트랜스미타제 (AST)의 순환 수준을 실제 감염 기간 동안, 제10일 ~14일에 걸쳐 매 3-4일 마다 (도 2D) 그리고 28-일 후속 기간의 마지막 날에 평가하였다 (도시하지 않음). 플라스마 AST는 모든 개체에서 감염 후 제3일을 통해 기본 수준에서 유지되었고, 이것은 염증성 EBOV 챌린지 후 즉각적인 정상 간 기

능을 나타낸다. EBOV 노출 후 제6일까지, 비백신접종 개체는 효소 수준의 10배 증가를 나타냈고, 이것은 이 개체에서 활성 감염을 표시한다. Ad5-나이브/rAd35-백신접종 군에서 두 개체로부터의 혈액 샘플 (V1, V3)은 AST의 극적인 증가를 또한 나타내고, 반면 이와 같은 군, V2에서 제3의 개체는 기본 수준으로 돌아가는 해리에 앞서 단일 기점에서 오직 근소한 증가를 나타낸다. 유사하기는, Ad5-면역/rAd35-백신접종 그룹 (V4, V5)에서 3 개체 중 2개는 AST에서의 상승을 나타냈고, 비백신접종 대조군에서는 훨씬 낮았지만, 반면, 하나의 개체 V6은 이 감염 계수에 대해 정상을 유지하였다. 전체적으로, AST 수준은 Ad5-면역 백신접종된 개체보다 Ad5-나이브에서 높았다. 이러한 임상 관찰에서 정상을 유지한 각각의 개체는 가장 높은 예비챌린지, 항원-특이 $CD8^+$ 및 그것의 대표적인 백신 그룹 내의 항체 반응을 나타내었다는 것은 주목할 만하다. 플라즈마 바이러스 혈증 수준 (도 2E)은 상승된 AST를 나타내는 모든 동물에서 EBOV 감염을 확인한다.

[0088] 본 실험의 결과는 rAd35가 개체 당 10^{10} 입자의 투여량으로 투여되었을 때 면역원성을 나타낸다. 백신은 방어 면역 반응을 생성하지만, 이 투여량 및 식이요법은 모든 개체의 균일한 방어를 위한 차선택이었다. 백신 그룹 내에서 방어면역은 가장 높은 등급의 항원-특이 항체 및 $CD8^+$ T-세포 반응과 관련되었다.

[0089] rAd35-GP 투여량 반응은 방어면역에 영향을 미친다. 통상적으로, rAd-기체 벡터는 10^{10} 내지 10^{12} 입자 범위의 투여량으로 필리핀 원숭이에 투여된다. rAd5-GP에 의한 앞선 결과는 10^{10} 바이러스 입자가 EBOV 감염에 대한 필리핀 원숭이의 100% 방어를 달성하기 위한 최소 투여량임을 입증하였다 (Sullivan, 2006). 상기 연구 결과는 이 투여량 범위의 최저 말단에서 수행되었고 균일한 방어를 가져오지 않았기 때문에, rAd5 벡터의 결과와 비교하여 rAd35 벡터로 얻은 아주 조금 낮은 인 비보 항원 발현에도 차선의 면역 반응을 가져올 수 있다. 그러므로, 본 발명자들은 더 높은 백신 투여량의 투여가 더 큰 정도의 면역 방어를 끌어낼 수 있을 것으로 기대하였다. 본 실험에서의 백신은 또한 수단과 자이르 종 둘 다로부터의 GP를 포함하는 rAd5 백신들과의 이력 자료에 대한 효능을 비교하기 위해 수단 EBOV 중 (S/G)으로부터 GP를 발생하는 rAd35를 또한 포함한다. 본 발명의 연구에서, 필리핀 원숭이 (그룹 당 $n=3$)를 Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL 각각의 10^{10} 또는 10^{11} 바이러스 입자로 백신접종하였고 이전 실험에서 백신접종 후 3주 측정하였다.

[0090] GP-특이 항체들이 모든 개체에서 발생되었고(도 3A), 이것은 백신 투여량이 앞선 실험의 것과 비교하여 같거나 또는 높기 때문에 예상된 결과이다. 그러나 이 실험에서 10^{10} 입자로 백신접종된 두 개체 (V8, V9)에서의 역가는 각각 1: 340 및 1:500이었고, Ad5-GP 백신접종된 개체에서의 방어를 예측하기 위해 앞서 관찰된 최소 컷오프에 근접한 또는 바로 아래 수준이었다 (Sullivan, *et al.*, 2009). 관찰된 최대 항체 역가는, 도 2에 나타난 rAd35 개체에서 관찰된 최대 역가와 동일한, 1:2,900 (개체 V10)였다. 평균 항체 역가는 10^{11} 투여군에서 더 높았지만 (1:1500 대 1:700) 그 차이는 통계적 의미에는 도달하지 않았다 ($p=0.02$). 더 낮은 투여량 그룹에서 관찰된 바와 같이, 역가가 면역 방어를 위한 rAd5-GP 백신 컷오프에 가까운 개체가 하나 있었다 (개체 V11, 1:540).

[0091] $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포 반응이 백신접종 후 3주에 두 투여량 그룹 모두에서 존재하였다. $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포 반응에도 명백한 투여 반응은 없었다. 특히 이제 교배된 개체들 간에 세포 면역 반응의 반응속도가 다르기 때문에, 그리고 반응 측정은 항체 수준을 가짐에 따라 시간에 걸쳐 축적되지 않으므로, 그룹 경향은 때때로 단일 시점에서 포획하기 어렵다. 각 개인 내에서, 항원-특이 T-세포 빈도는 $CD4^+$ 의 경우가 $CD8^+$ 세포에서보다 높았지만, 첫번째 실험 결과와 결합하였을 때는 이들 실험에서 rAd35-GP 벡터에 의해 유도된 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 세포 우성에 대한 경향은 없었다.

[0092] 면역 반응 평가 후 1주에 모든 6 마리의 백신접종된 필리핀 원숭이와 한마리의 비백신접종 개체를 근육내 주사에 의해 1000 PFU ZEBOV에 노출시키고 증식성 감염의 신호에 대해 관찰하였다. EBOV 감염의 출혈성 발현은 일상적으로 감염된 필리핀 원숭이의 안면과 사지에 발구진 발진의 출현을 가져왔고; 개체는 또한 통상적으로 음식 섭취를 줄였고 탈수되었다. 두 마리 비백신접종 개체의 경우 최초 증상 출현은 EBOV 노출 후 제6일에 나타났고; 각각 제7일까지 증상의 완전한 발현(full constellation)을 나타낸다 (데이타는 도시하지 않음). 표 2는 rAd35 연구 둘 다에서의 비생존자에서의 감염성 챌린지 결과 및 사멸일을 나타낸다. 비백신접종 개체는 제9일 및 제8일(각각 실험 1 및 2)에 감염의 치사 효과에 굴복하였다. 죽은 백신접종 개체는 대조군, 대조보다 평균 2일 더 생존한 것을 제외한 비백신접종 개체와 유사하였고, 이것은 궁극적으로는 치사율이 관찰되었지만 백신접종의 강력한 부분적 면역 이점을 제안한다. 생존자의 수는 백신 투여량에 관계없이 GP(Z) 플러스 GP(S?G)를 수여받은 개체와 비교하여, rAd35-GP(Z) 만을 수여받은 개체에서 더 높았지만, 생존률의 차이는 두 챌린지 실험에서 어느

백신 그룹들에 중요한 어크로스는 없었다.

표 2

[0093]

실험	개체 ID	백신 그룹	증상	결과
1	V1	나이프/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d6	제7일 사망
	V2	나이프/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	거식증 d6	생존
	V3	나이프/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d6	제8일 사망
	V4	면역성 있음/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	발진 d7, 거식증 d6, 탈수 d7	제8일 사망
	V5	면역성 있음/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d7	제9일 사망
	V6	면역성 있음/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	거식증 d6	생존
2	V7	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, 각각 10^{10}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d6	제6일 사망
	V8	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, 각각 10^{10}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d9	제10일 사망
	V9	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, 각각 10^{10}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d6	제6일 사망
	V10	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, 각각 10^{11}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d7	제7일 사망
	V11	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, 각각 10^{11}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d7	제7일 사망
	V12	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL, 각각 10^{11}	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d6	제8일 사망
1	C1	없음	발진 d6, 거식증 d6, 탈수 d6	제9일 사망
2	C2	없음	발진 d7, 거식증 d6, 탈수 d6	제8일 사망

[0094]

비록, GP(Z)만을 또는 GP(S/G)와 조합하여 갖는 백신 벡터로서 rAd35를 사용한 연구는 항원 전달과 제시가 항원-특이 면역 반응을 생성하는데 충분하지만, 절대 면역 방어에 요구되는 수준보다는 낮다는 것을 보여준다. 더 낮은 방어면역은 방어에 중요하지 않은 rAd35 벡터를 사용하여 나타나는 것으로 이루어진 몇몇 동물에서 검출된 항체 수준과 관련되었다.

[0095]

rAd26-GP 백신 면역원성 및 EBOV 감염에 대한 방어 효능. 본 발명자들은 그 다음 재조합 Ad26-기재 백신, 그룹

D 아데노바이러스를 EBOV 감염에 대한 방어면역을 발생시키는 그들의 능력에 대해 평가하였다. 이 혈청형은 Ad35와 동일한 세포 수용체 (CD46)를 사용하지만, 프라이밍 백신 벡터로서 사용될 때 약간 더 높은 면역 반응을 생성하는 것을 나타낸다 (Liu, *et al.*, 2009). 이 연구를 위해, 투여량 단계적 확대를 두 별개의 감염성 켈린지 실험에서 세자리수 범위(three orders of magnitude)에 걸쳐 수행하였다. 처음 연구에서, 본 발명자들은 각각의 벡터 Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt에 대해 10^{10} 또는 10^{11} 입자의 투여량에서 백신을 시험하였고, 두번째 시험에서 본 발명자들은 각각 10^{12} 입자의 투여량을 사용하였다. 첫번째 연구는 rAd26이 rAd35와 같이 Ad5에 대한 이전 면역의 존재하에 항원-특이 면역 반응을 끌어낼 수 있는가를 평가하기 위해 Ad5-면역 필리핀 원숭이에서 백신을 시험하였다. 그룹당 4마리 Ad5-면역 필리핀 원숭이를 근육내 주사에 의해 백신접종시키고 그리고 EBOV GP에 대한 순환하는 채액 및 세포 면역 반응을 평가하기 위해 3주 후 혈액 샘플을 얻었다. 평균 순환하는 항-GP 항체 역가는 투여량 그룹에 대해 투여량 반응을 나타내었다; 10^{10} 백신의 경우 1:700 그리고 10^{11} 입자를 수여받은 개체의 경우 1:4500 ($p=0.06$). 10^{10} 투여량 군에서 4개 개체 중 3개에 대한 평균 역가는 rAd35-백신접종된 대체에서 면역 방어에 대한 최소 임계값 바로 위 (1:500)이지만, 개체 V16은 오직 미소한 항체 반응 1:100 만을 발생하고, 이것은 Ad5-GP 백신에 대한 예상되는 방어 컷오프보다 상당히 아래이다. 반대로, rAd26 백신의 10^{11} 입자로 백신접종된 개체 V19는 매우 높은 항체 역가 1:10,500를 생성하여 완전 면역 방어와 관련된 수준의 거의 3배를 초과하고, 반면 이 백신 그룹의 다른 것은 생존 결과를 결정적으로 예측하지 않는 중간값을 나타낸다. 두번째 연구에서, 4 개체는 각각 rAd26 벡터의 10^{12} 입자를 수용하였고 개체 역가의 대부분이 1:1000 ~ 1:4000이면서, 10^{11} 투여량 군에서의 역가와 매우 유사한 항체 반응을 생성하였다. 이 그룹에서 평균 항-GP 항체 역가는 1:3000이었다.

[0096] T-세포 면역 반응 (도 4B, C)을 rAd35 연구에서와 같이 ICS로 측정하였고 또한 연구에서 투여량 반응에 대해 하였지만, 10^{10} 및 10^{11} 투여량 그룹 간의 차이는 의미가 없었다 ($CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ 에 대해, 각각 $p=0.12$ 및 0.26). 평균 항원-특이 $CD4^{+}$ T-세포 빈도는 10^{10} 입자 rAd26-GP를 받은 백신에 대해 0.14%였고, 더 높은 백신 투여량에서는 0.24%였고, 더 낮은 투여량 군에서 하나의 백신, 개체 V14는 $CD4^{+}$ 반응의 검출이 불가능하였다 (도 4B). rAd26 백신은 $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ 영역 어느 것을 향해서도 세포 면역 반응을 왜곡하지 않았다: $CD8^{+}$ 빈도, 0.13% 및 0.25% (각각, 10^{10} 및 10^{11} 백신 투여량)는 본질적으로 $CD4^{+}$ 반응의 크기를 반영하였다. $CD8^{+}$ T 세포의 경우, 낮은 투여량 그룹에 항원-특이 반응이 검출불능의 두 개체 V13과 V14가 있었다 (도 4B, C). rAd26 연구에서 두 평균 항원-특이 $CD8^{+}$ 빈도(0.34%)는 $CD4^{+}$ 반응 (0.08%)보다 높았지만, 이러한 $CD8^{+}$ 반응에 대한 외형 외관은 우선 매우 높은 $CD8^{+}$ 빈도와 낮은 $CD4^{+}$ 반응을 갖는 단일 개체 V24에 의해 주어졌다. 한편, 전체적인 세포 면역 반응은 rAd26 연구에서 관찰된 것과 유사하였다.

[0097] 감염성 EBOV 켈린지를 rAd26 백신 연구 각각에 대한 백신접종 후 4주에 1000 PFU ZEBOV의 IM 주입에 의해 수행하였고, 질병을 모니터링 하기 위해 간 효소 수준을 측정하였다 (도 4D). 비백신접종 개체는 감염 제3일과 제6일 사이에 간 손상 징후를 나타내었다. 가장 낮은 투여량인 rAd26 백신 10^{10} 입자를 받은 모든 개체는, AST 수준이 느린 속도로 증가했지만 유사한 질병 신호를 나타냈다. 이 임상 지표로부터 예측된 바와 같이, 이 그룹의 모든 개체는 제8일 후 ZEBOV 켈린지에 의해 감염의 치사 효과에 굴복하였다 (도 5). 항체 및 T-세포 반응은 이 그룹의 몇몇 개체에서 낮거나 검출불능이었다. Ad26 연구의 투여량 그룹 (10^{10} 및 10^{11}) 사이의 면역 반응 크기의 차이는 일반적으로 생존률을 반영하고, rAd26-GP의 10^{11} 입자가 백신접종 개체에서 더 높은 생존, 4마리 중 2을 반영하였다 ($p=0.01$). 10^{11} 입자에서 Ad26는 낮은 투여량에서 뛰어날 뿐만 아니라 제형과 매칭될 때 rAd35-GP보다 더 큰 방어를 제공하였다 (도 5B). 최종적으로, 10^{12} 입자의 투여량으로 제공된 rAd26은 본 연구에서 시험된 어느 백신 식이요법에 대해서도 가장 높은 생존 수를 산출하였고(4마리 중 3) 그리고 면역 방어의 수준은 rAd5 벡터에서 앞에서 관찰되었던 것과 상당히 다르지 않았고 ($p=0.32$, 도 5C); 그러나, rAd5에서 보다 rAd26에 대해 더 높은 투여량, 각각 10^{12} 대 10^{10} 입자를 사용하여 얻었고, 이 생존률은 이 동물 모델에서 이들 벡터 사이의 잠재적 효능 차이를 제안한다.

[0098] rAd26 및 rAd35 벡터에 의한 이형 프라임-부스트 rAd26-GP-매개 면역 방어 및 10^{12} 벡터 입자를 사용한 높은 생

존 결과에 대한 투여량-반응 특징은 이 벡터가 GP-항원 발현을 효율적으로 유도한다는 것을 제안한다. 비인간 및 인간 모두에서 EBOV 및 다른 병원균에 대해 관찰되었기 때문에, 이형 프라임-부스트 백신접종은 단일 샷 면역화보다 더 나은 잠재적 면역을 이끌어낼 수 있고 (Sullivan Nature 2000; Sampra et al Vaccine 27 (2009) 5837-5845; Koup, et al, PLoS One 2010; Geisbert *et al.*, (2010) *Virology* 84(19): 10386-94), 본 발명자들은 rAd26-GP 면역 반응이 EBOV 감염에 대한 방어를 증가시키기 위해 이형 벡터로 부스트될 수 있는가를 질문하였다. 4마리 필리핀 원숭이를 각각 Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt 및 Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt의 10^{11} 입자로 백신접종하였다. 한 달 후, 모든 개체들을 동일 투여량의 Ad35BSU.Ebo. GP(Z)FL.wt 및 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL.를 사용하여 부스트 백신접종하였다. 면역 반응을 부스트 직전과 3주 후에 평가하였다. 도 6A는 EBOV-GP(Z)에 대한 항체 반응이 프라임링 백신접종에 의해 효율적으로 유도되었다는 것을 나타낸다. 개개의 개체들은 GP에 대한 EC90 항체 역가를 1:2700 내지 1:7100으로 발생시켰고, 그룹에 대한 평균 역가는 1:4000이었고, 단일 접종 백신으로서 10^{11} rAd26를 시험한 앞선 연구에서 관찰된 반응과 일치하였다 (1:4500). 이 연구는 비교를 위해, rAd5-GP(Z) 및 rAd5-GP(S/G)를 각각 10^{10} 입자 백신접종된 단일 개체를 포함하고, 그들의 후 백신 항체 역가는 1:6800이었다. rAd35-GP 벡터의 10^{11} 입자로 rAd26-GP-프라임된 개체의 순차적 면역접종은, 포스트-프라임 항체 역가가 특별히 높은 개체 V27을 제외하고, 평균 역가 1:32000으로 대부분의 백신수여에 대해 대략 한자리 수 (one order of magnitude)의 항원-특이 항체 수준을 부스트하였다. 흥미롭게도, 부스트 백신은 개체들에 걸쳐 더욱 균일한 역가를 발생하였고, 표준 편차는 개체들에 걸쳐 10%이하였고, 이에 비해 포스트 프라임 역가는 54%의 표준 편차를 나타낸다.

[0099] 세포 면역 반응은 또한 rAd26-백신접종된 필리핀 원숭이에 대한 rAd35-GP 투여에 의해 현저하게 부스트되었다 (도 6B, C). $CD4^+$ T 세포는 한 개체, V25를 제외하고 모두에서 부스트되었고; rAd35-GP 투여 후 평균 증가는 모든 개체에 걸쳐 2배였고 부스팅 전에 검출할 수 없었던 개체 rAd35-GP 27에서의 측정가능한 반응을 나타냈다. 최종적으로, 포스트-부스트 $CD4^+$ T-세포 빈도를 rAd5-GP 백신접종에 의해 생성된 것들과 비교하였다. 부스트 효과는 $CD8^+$ T 세포의 경우 가장 컸고 모든 개체들은, 두 개체 (V27 및 V28)에서, rAd5-GP 백신접종에 의해 발생하는 것을 초과하는 반응을 생산하는 이 세포 구획에서 부스트 효과를 나타내었다. ICS에 의해 측정된 GP-특이 $CD8^+$ T-세포 빈도는 주요 면역화 후 0.09%였고, rAd35-GP로 2차 백신접종 후 제3주에 0.41%로 4.7배 증가하였다.

[0100] 전체적으로, 면역원성 결과는 rAd35-GP 벡터가 rAd26-GP 프라임된 필리핀 원숭이를 부스팅하기에 강하다는 것을 나타낸다. 포스트-부스트 GP-지향 항체들은 rAd5-GP 백신접종된 영장류에서 100% 면역 방어를 위해 예측되는 수준보다 거의 로그(log) 더 높은 평균 수준을 유도하였다 (Sullivan, *et al.*, 2009). 중요하기는, rAd35-GP 부스트는 $CD8^+$ T-세포 빈도의 상당한 강화를 제공하고, 또한 EBOV 감염에 대한 면역 방어와 관련된 것을 나타낸다. 그러므로, 면역 반응의 평가 후 1주 (부스트 후 4-주) 모든 백신접종 개체들과 하나의 비백신접종 대조 필리핀 원숭이를 근육내 주사에 의해 ZEBOV 1000 PFU에 노출시켰다. 대조 개체는 EBOV 감염의 임상적 증상 특징을 나타내었고 켈린지 후 제6일에 치사 효과에 쓰러졌다 (도 6C,D). 반대로, 모든 백신접종 개체는 AST 수준을 순환하는 일반적인 상태를 유지하였고 (도 6C), 연구 종료시에 중대한 병리학적 평가에서 출혈성 질환의 증거를 나타내지 않았다 (도시하지 않음). 4마리의 모든 백신접종 개체들이 염증성 켈린지에서 생존하였고 연구 종료까지 28일간의 후속 주기를 통해 무-증상을 유지하였다. 이러한 결과는 이형 프라임 부스트 백신 요법으로 투여된 rAd26/rAd35 벡터가 ZEBOV 감염에 대해 균일한 면역 방어를 제공한다는 것을 나타내고, 그리고 결합 백신에 의한 부가적이거나 또는 시너지 결과를 달성하기 위한 이러한 접근의 강한 유용성을 증명한다.

[0101] 논의

[0102] 아데노바이러스는 다양한 바이러스 박테리아 및 기생하는 항원의 전달을 위한 백신 벡터로서 잘 수행한다 (Lasaro *et al.*, (2009) *Mol Ther* 17(8): 1333-9). 특히 rAd5 벡터는 본 발명자들이 EBOV-GP가 표적 항원일 때 관찰한 바에 따르면, 마우스, 비인간 영장류, 및 인간에서 강한 항원-특이 면역 반응을 생산한다. 그러나, 임상 전 및 인간 임상 연구는 rAd35-기재 벡터의 효능이, Ad5가 벡터에 대해 높은 수준의 면역성을 갖는다면, Ad5에 미리 노출된 개인에게 면역반응이 제대로 발휘하지 못할 수 있다(compromised)는 것을 제안한다. 본 발명의 연구 목적은 나이브 및 Ad5-면역 개체 둘 다에서 EBOV GP 항원을 전달할 수 있는 rAd 벡터를 동정하는 것이다. 어느 바이러스 벡터에 대한 이전 면역은 그것의 효능을 제한할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 혈청반응양성 개체의 유행 및/또는 중화 항체의 낮은 수준에 의해 표시되는 바에 따라, 비교적 인간이 거의 감염되지 않은 바이러

스에 초점을 맞추었다. 회귀한 인간 아데노바이러스 혈청형, Ad35 및 Ad26이 본 작업에서 백신 개발을 위해 선택되었다.

[0103] 필리핀 원숭이의 rAd35-GP 백신접종은 rAd5를 전달 벡터로 사용하였을 때 앞에서 관찰된 범위 내의 개별 개체에 서의 항원-특이 항체 및 T-세포 반응을 생성하였다. 모든 rAd35 백신접종자에 대한 평균 항-GP 항체 역가 (irrespective of dose), 1:1400는 10^{10} rAd5-GP로 백신접종된 모든 기왕의 개체들에 대한 평균(1:11,000, n=17) 보다 낮았고, 단, 초기 표시는 항체 역가가 rAd5 ENOV 백신에 대한 것과 rAd35에 대해 동일한 연관성을 갖는다면, 벡터 잠재력은 두 혈청형 사이에서 다를 수 있다는 것을 제공한다. $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포 반응은, 비록 절대값은 분석 브리징 대조에 대한 PMBC 샘플의 부재에서 이들 연구에 포함되지 않은 rAd5 백신접종자와 비교할 수 없었지만, 감염성 챌린지 전에 대부분의 개체에서 검출가능하였다.

[0104] rAd35 벡터를 사용한 백신접종은 rAd5-나이프 또는 rAd5-면역 개체 중 어느 것에서 항원-특이 항체와 T-림프구 면역 반응을 효과적으로 유도하였고, 회귀 혈청형 벡터 유전자가 이형 벡터-지향 면역성을 저항하는 통상의 혈 청형과 충분히 구별된다는 것을 제안한다. 벡터 성능의 이러한 특성은 천연 바이러스 감염뿐만 아니라 다른 병 원균에 대한 프라이밍 면역화 또는 백신접종에서 이형 벡터의 사용을 억제하는 이전 면역을 피하기 위해 중요할 것이다. 참으로, rAd35-GP 백신접종은 rAd26-GP로 프라이밍된 필리핀 원숭이에서 세포-매개 및 항체 반응 모두의 잠재적 부스트를 제공한다. 이 결과는 아주 흥미로운데, 이것은 2차 대 1차 면역 반응의 유도에 대한 벡터 효능 에서의 명백한 차이를 증명하고; 면역 반응을 부스트하는 rAd35-GP의 능력이 프라이밍 면역화 후 관찰된 반응의 크기로 예측되지 않기 때문이다. 이들 자료는 rAd35 및 다른 rAd 벡터가 최근, Lindsay *et al.*, *J Immunol* **185**(3): 1513-21 에서 제안된 바와 같이, 표적 수지상 세포의 특정 개체 또는 활성 상태에서 더 높은 형질도입 효능을 갖고, 즉 이 경우 2차 면역 반응 동안 더 풍부하거나 또는 접근가능하다는 것을 나타낼 수 있다.

[0105] rAd26은 EBOV 감염에 대한 단일 접종 백신으로서 rAd35보다 더 강력하다는 것이 증명되었고, 시험된 최고 투여 량에서 백신접종된 필리핀 원숭이의 최대 75%까지의 생존을 조정하였다. rAd26-GP 백신은 방어면역의 유도에 대 한 명백한 투여량-반응을 증명하고, 이것은 항원 발명에서의 미미한 개선이 본 발명에서 사용된 바와 같은 EBOV 챌린지의 고투여량에 대한 생성된 균일한 방어에 대한 rAd26-기재 백신의 효능을 증가시킬 수 있다는 것을 제안 한다. 놀랍게도, 더 높은 정도의 방어는 더 높은 ELISA 항-GP 역가와 관련된 매치된 투여량 (10^{11} 입자)에서의 rAd35-GP와 비교하여 rAd26-GP 벡터에 의해, 각각 1:4500 대 1:1400 제공되었다. 이들 자료는 예비챌린지 항체 역가가 rAd5-GP 백신에 대해 관찰된 바와 같은 벡터 그룹 내에 더하여 rAd 혈청형에 걸쳐 ZEBOV 감염에 대한 방 어의 면역 연관성으로 작용할 수 있는 가능성을 강조한다. 항체 반응의 유도에 대한 효능의 순서는 벡터 그룹을 거쳐 방어에 대한 랭크 순서를 예측한다.

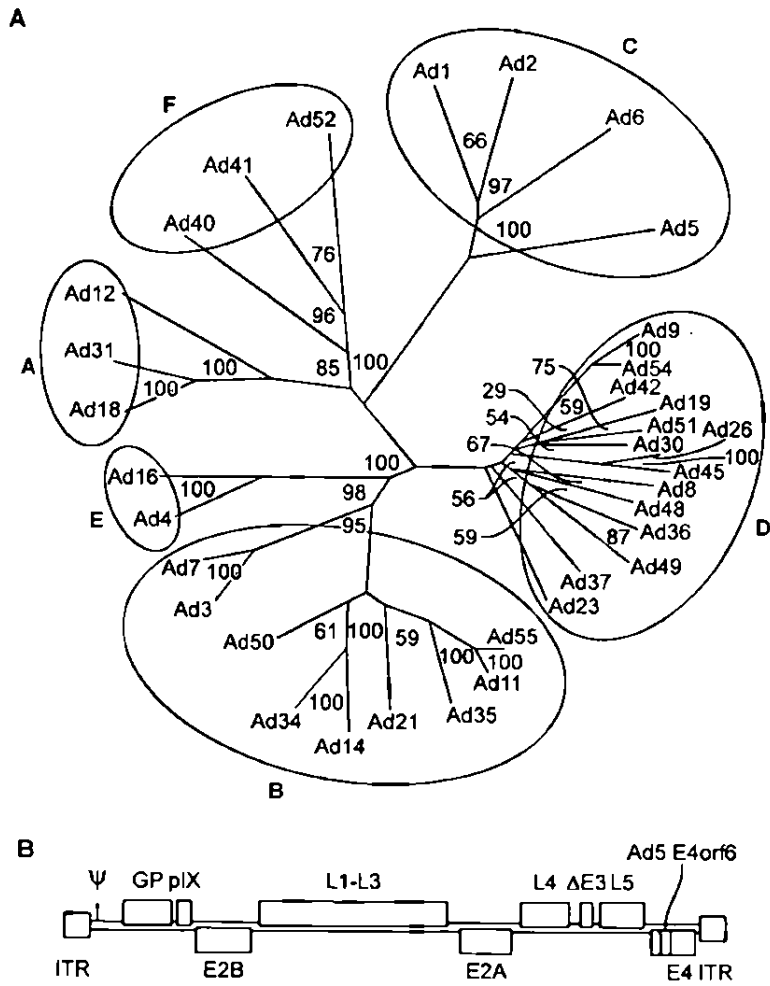
[0106] 본 연구는 단일과 조합을 비교하여 백신 벡터를 시험하였고 영양류에서 백신 벡터로 사용하기 위한 선택적인 혈 청형의 유용성을 증명한다. 그 결과는 이들 백신들이 프라이밍-부스트 조합에서 가장 유용하다는 것을 제안한다.

[0107] 이형 프라이밍-부스트에 의해 달성된 항원-특이 반응의 높은 규모로 인해, 장기간-면역은 rAd를 DNA로 프라이밍 하여 최적으로 달성될 수 있다는 것이 제안되었다 (Santra, *et al.*, (2005). *J Virol* 79(10): 6516-22). DNA 는 다중 프라이밍을 요구하고 rAd 벡터가 하는 것처럼 신속한 방어를 유도하지 않으므로, 이형 rAd 프라이밍-부스트 는 신속 유도와 장기간 지속 방어면역 사이의 균형을 생성하는 최적 기회를 제공할 것이다.

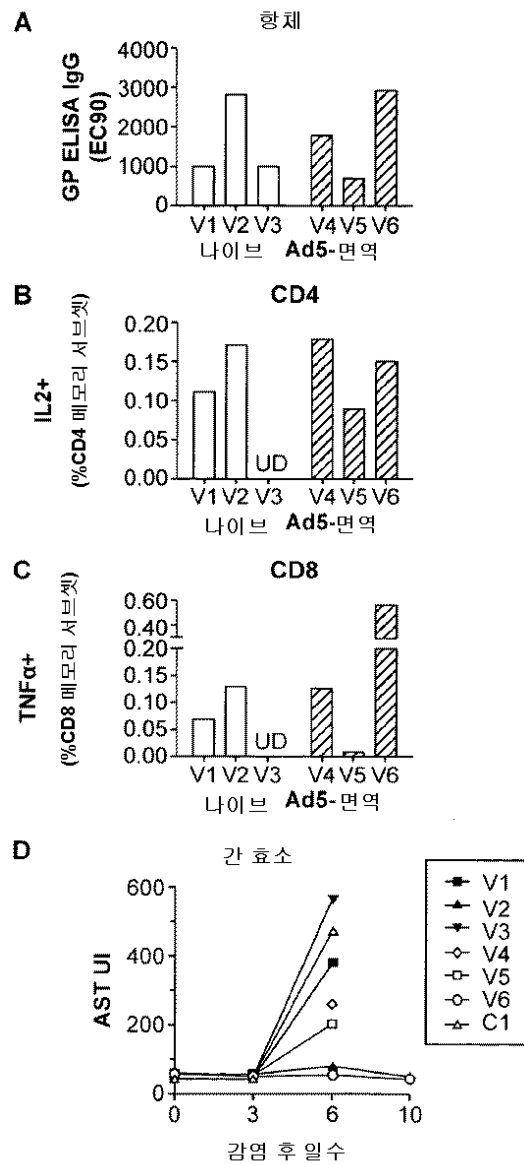
[0108] 본 명세서의 실시예 및 구현예들은 오직 설명을 목적으로 하며 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제안될 것 이고 본 출원의 의미 및 권한과 첨부된 청구항의 범위 내에 포함될 것이다. 본 명세서에 인용된 모든 문헌, 특 허 및 특허출원은 모든 목적에서 그 전체 내용이 참조로서 병합된다.

도면

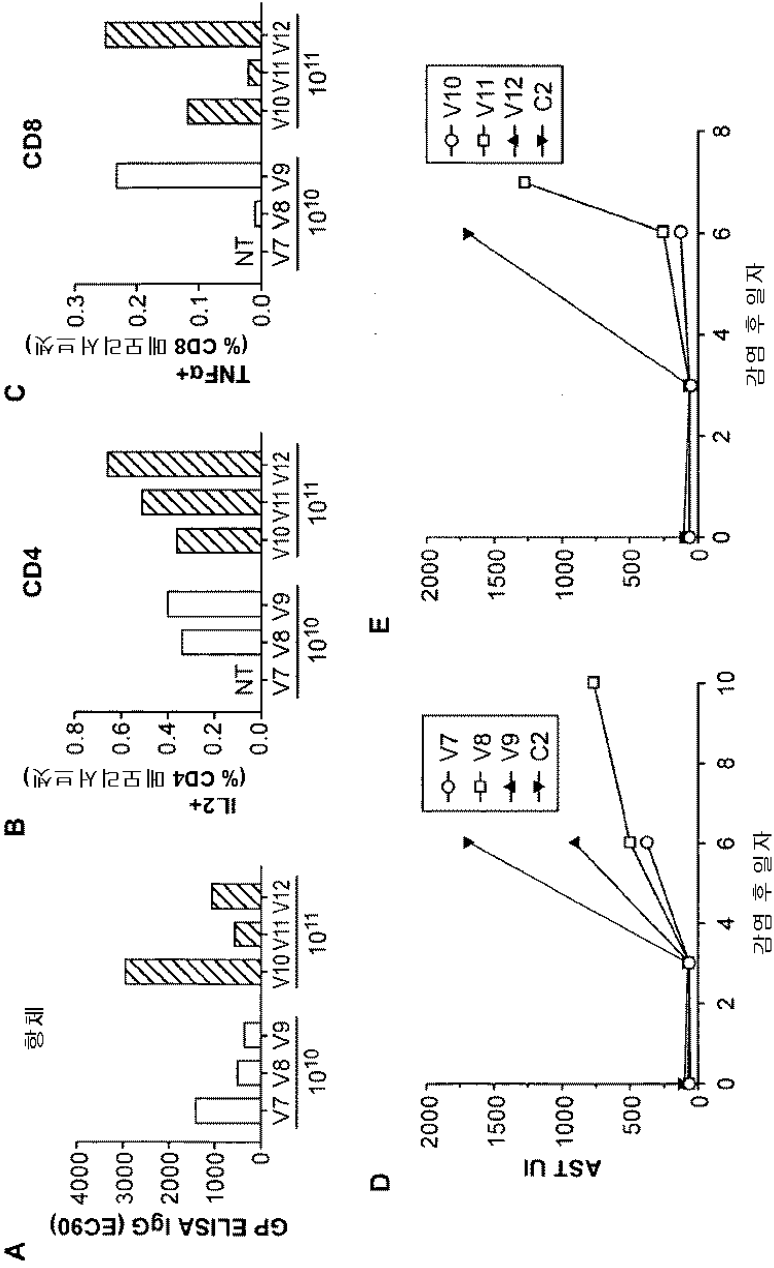
도면1



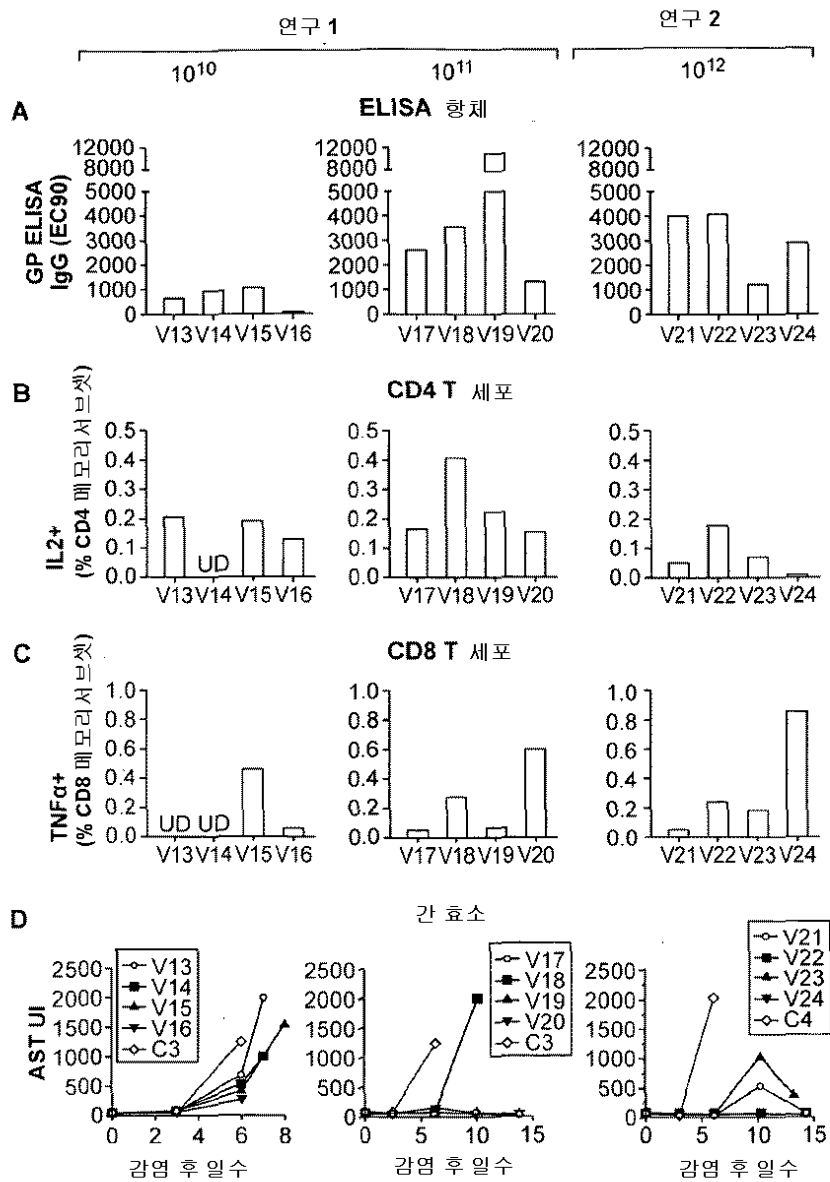
도면2



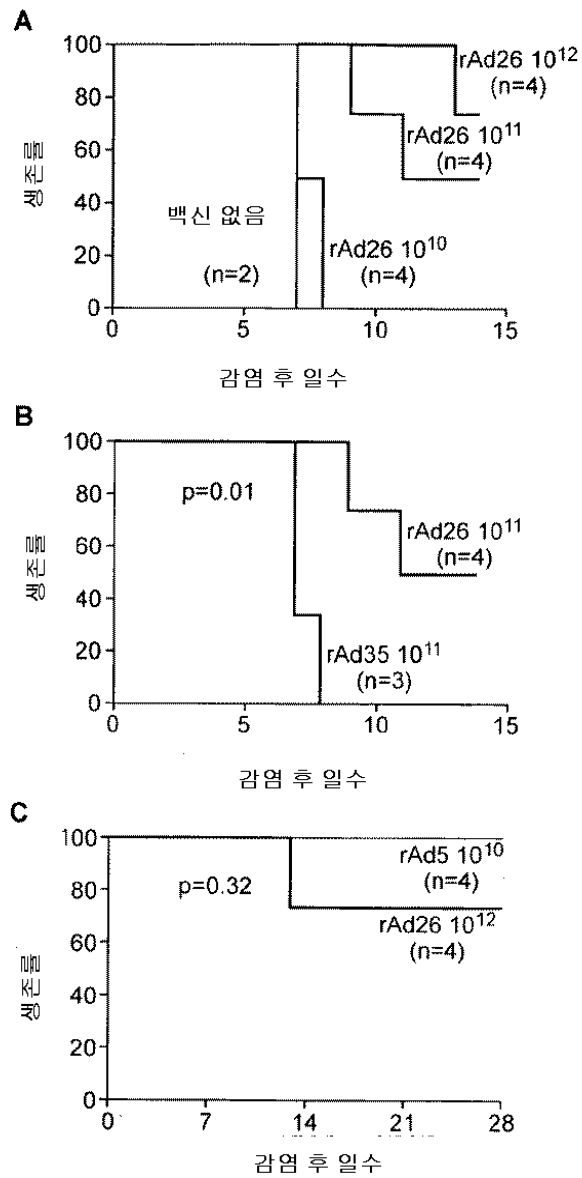
도면3



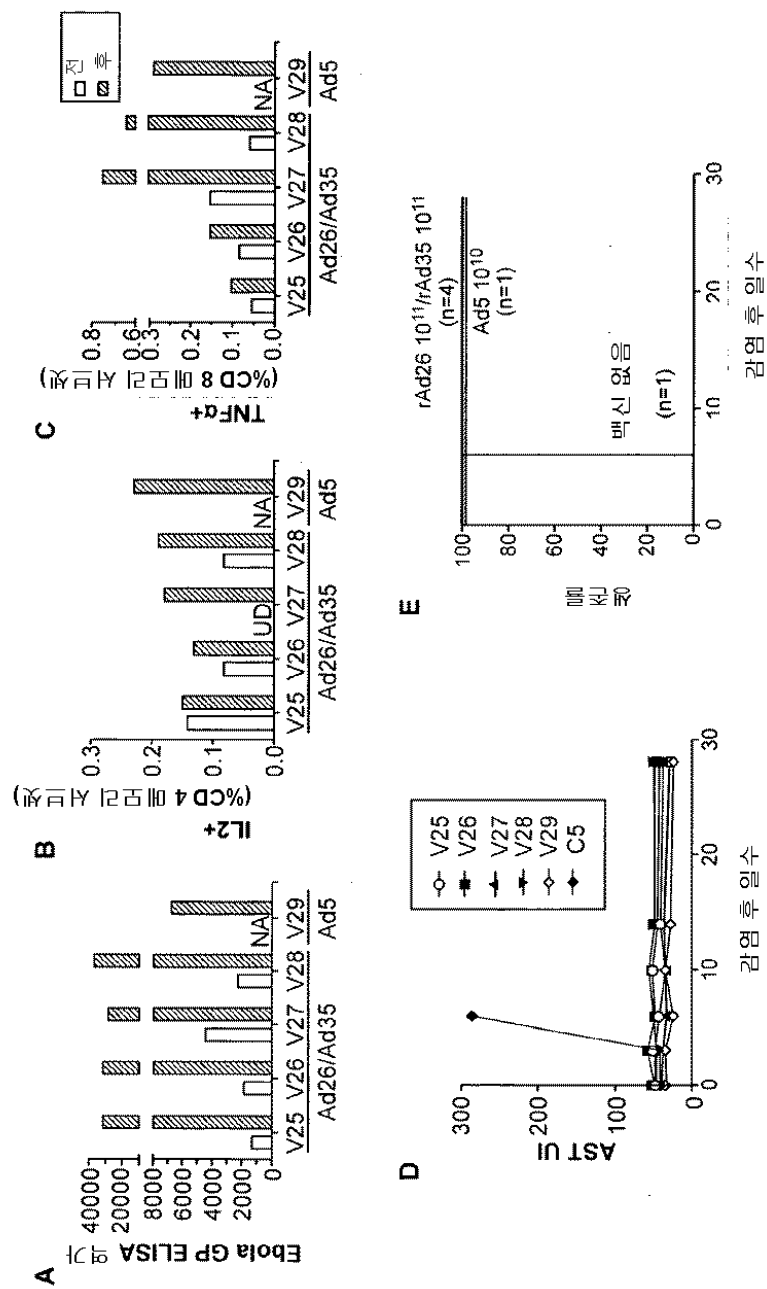
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sullivan, Nancy J.
Nabel, Gary J.
Asiedu, Clement
Cheng, Cheng
Pau, Maria Grazia
Goudsmit, Jaap
The Government of the United States of America

as represented by The Secretary of the
Department of Health and Human Services
Crucell Holland B.V.

<120> Adenovirus Serotype 26 and Serotype 35
Filovirus Vaccines

<130> 77867-827790

<140> WO PCT/US11/64944

<141> 2011-12-14

<150> US 61/422,954

<151> 2010-12-14

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2302

<212> DNA

<213> Ebola virus

<220>

<223> Ebola virus (EBOV) transmembrane envelope glycoprotein (GP)
Zaire type species (ZEBOV) wild type filovirus antigen

<400> 1

cgtcgtcgac acgtgtgac agatatcgcg gccgctctag accaggccct ggatcgatcc 60
aacaacacaa tggcggttac aggaatattg cagttacctc gtgatcgatt caagaggaca 120
tcattctttc ttgggtaat taccctttc caaagaacat ttccatccc acttgagatc 180

atccacaata gcacattaca ggtagtgat gtcgacaaac tagttgtcg tgacaaactg 240
tcaccacaa atcaattgag atcagttgga ctgaatctcg aagggaatgg agtggcaact 300
gacgtgcat ctgcaactaa aagatggggc ttcaggtccg gtgtcccacc aaagtggtc 360
aattatgaag ctggtgaatg ggctgaaaac tgctacaatc ttgaaatcaa aaaacctgac 420
gggagtgagt gtctaccagc agcgccagac gggattcggg gcttccccg gtgccggtat 480
gtgcacaaag tatcaggaac gggaccgtgt gccggagact ttgccttcca taaagagggt 540
gttttttcc tgtatgatcg acttgcttcc acagttatct accgaggaac gactttcgct 600
gaagggtgctg ttgcatttct gatactgccc caagctaaga aggacttctt cagctcacac 660

cccttgagag agccggtcaa tgcaacggag gacccttcta gtggctacta ttctaccaca 720

attagatatac aggtaccgg ttttgaacc aatgagacag agtacttggt cgaggttgac 780
aatttgacct acgtccaact tgaatcaaga ttcacaccac agtttctgct ccagctgaat 840
gagacaatat atacaagtgg gaaaaggagc aataccacgg gaaaactaat ttggaaggtc 900
aaccgcgaaa ttgatacaac aatcggggag tgggccttct gggaaactaa aaaaaacctc 960
actagaaaaa ttcgcagtga agagtgtgtc ttcacagttg tatcaaagg agccaaaaac 1020
atcagtggtc agagtccgc gcgaacttct tccgaccag ggaccaacac aacaactgaa 1080
gaccacaaaa tcatggcttc agaaaattcc tctgcaatgg ttcaagtga cagtcaagga 1140

aggaagctg cagtgtcgca tctaacaacc ctggccacaa tctccacgag tccccaatcc 1200
ctcacaacca aaccaggctc ggacaacagc acccataata caccgtgta taaacttgac 1260
atctctgagg caactcaagt tgaacaacat caccgcagaa cagacaacga cagcacagcc 1320
tccgacactc cctctgccac gaccgcagcc ggaccccaaa aagcagagaa caccaacacg 1380
agcaagagca ctgacttctt ggaccccgcc accacaacaa gtccccaaaa ccacagcgag 1440
accgttgga acaacaacac tcatcacaa gataccggag aagagagtgc cagcagcggg 1500
aagctaggct taattacaa tactattgct ggagtgcgag gactgatcac aggcggggaga 1560
agaactcgaa gagaagcaat tgtcaatgct caacccaaat gcaaccctaa ttacattac 1620

tggactactc aggatgaagg tgctgcaatc ggactggcct ggataccata tttcgggcca 1680
gcagccgagg gaatttacct agaggggcta atgcacaatc aagatggttt aatctgtggg 1740
ttgagacagc tggccaacga gacgactcaa gctcttcaac tgttcttgag agccacaact 1800
gagctacgca ctttttcaat cctcaaccgt aaggcaattg atttcttgct gcagcgatgg 1860
ggcggcacat gccacattct gggaccggac tctgttatcg aaccacatga ttggaccaag 1920
aacataacag aaaaattga tcagattatt catgattttg ttgataaaac cttccggac 1980
cagggggaca atgacaattg gtggacagga tggagacaat ggataccggc aggtattgga 2040
gttacaggcg ttgtaattgc agttatcgct ttattctgta tatgcaaatt tgtcttttag 2100

tttttcttca gattgttca tggaaaagct cagcctcaaa tcaatgaaac caggatttaa 2160
ttatatggat tacttgaatc taagattact tgacaaatga taatataata cactggagct 2220
ttaacatag ccaatgtgat tctaactcct ttaaaactcac agttaatcat aaacaagggt 2280
tgaggtaccg agctcgaatt ga 2302

<210> 2

<211> 2031

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Ebola virus (EBOV) transmembrane envelope glycoprotein
(GP) Sudan/Gulu type species (SEBOV) codon optimized filovirus
antigen

<400> 2

```

atggagggcc tgagcctgct gcagctgccc agggacaagt tcaggaagag cagcttcttc 60
gtgtgggtga tcatcctgtt ccagaaggcc ttcagcatgc ccctgggcgt ggtgaccaac 120
agcaccttgg aggtgaccga gatcgaccag ctggtgtgca aggaccacct ggccagcacc 180
gaccagtga agagcgtggg cctgaacctg gagggcagcg gcgtgagcac cgacatcccc 240
agcgccacca agaggtgggg cttcaggagc ggctgcctc ccaaggtggt gagctacgag 300
gccggcgagt gggccgagaa ctgctacaac ctggagatca agaagcccga cggcagcgag 360
tgctgcctc ctctctga cggcgtgagg ggcttcccca ggtgcagta cgtgcacaag 420

gccagggca cggcccttg ccccgccgac tacgccttc acaaggacgg cgccttcttc 480
ctgtacgaca ggctggccag caccgtgatc tacagggcg tgaacttcgc cgaggcgctg 540
atgccttcc tgatcctggc caagcccaag gagaccttc tgcagagccc tccatcagg 600
gaggccgtga actacaccga gaacaccagc agctactacg ccaccagta tctagagtac 660
gagatcgaga acttcggcgc ccagcacagc accacctgt tcaagatga caacaacacc 720
ttcgtgagge tggacaggcc ccacacctc cagtctctgt tccagctgaa cgacaccatc 780
cacctgcacc agcagctgag caacaccacc ggcaggctga tctggaccct ggacgccaac 840
atcaacgccg acatcgcgga gtgggccttc tgggagaaca agaagaacct gagcgagcag 900

ctgagggcg aggagctgag cttcagggcc ctgagcctga acgagaccga ggacgacgac 960
gccgccgca gcaggatcac caagggcagg atcagcgaca gggccaccag gaagtacagc 1020
gacctggtgc ccaagaacag ccccgcatg gtgcccctgc acatccccga gggcgagacc 1080
accctgccc gccagaacag caccgagggc aggagggtgg gcgtgaacac ccaggagacc 1140
atcaccgaga ccgccgccac catcatcggc accaacggca accacatgca gatcagcacc 1200
atcgcatca ggcccagcag cagccagatc cccagcagca gcccaccac cgccttagc 1260
cccgaggccc agacccccac caccacacc agcggacca gcgtgatggc caccgaggag 1320
cccaccacc ctcccgag cagccccga cccaccacc aggccctac cctgaccacc 1380

cctgagaaca tcaccaccgc cgtgaagacc gtgctgcccc aggagagcac cagcaacggc 1440
ctgatcacca gcaccgtgac cggcatcctg ggcagcctgg gcctgaggaa gaggagcagg 1500
aggcagacca acaccaaggc caccggcaag tgcaaccca acctgacta ctggaccgcc 1560
caggagcagc acaacgccgc cggcatcgcc tggattccct acttcggccc cggcgccgag 1620

```

ggcatctaca ccgagggcct gatgcacaac cagaacgccc tgggtgtcgg cctgaggcag 1680
ctggccaacg agaccacca ggccctgcag ctgttcctga gggccaccac cgagctgagg 1740
acctacacca tctgaacag gaagccatc gacttcctgc tgaggaggtg gggcggcacc 1800
tgcaggattc tgggccccga ctgctgcac gagccccacg actggaccaa gaacatcacc 1860

gacaagatca accagatcat ccacgacttc atcgacaacc ctctgcccac ccaggacaac 1920
gacgacaact ggtggaccgg ctggcggcag tggatactg ccggcatcgg catcacggc 1980
atcatcatcg ccatcatcgc tctgtgtgct gtgtgcaagc tgctgtgctg a 2031

<210> 3

<211> 2028

<212> DNA

<213> Ebola virus

<220>

<223> Ebola virus (EBOV) transmembrane envelope glycoprotein (GP)

Sudan/Gulu type species (SEBOV) wild type filovirus antigen

<400> 3

atggggggtc ttagcctact ccaattgcc agggacaaat ttcggaaaag ctctttcttt 60
gtttgggtca tcatcttatt caaaaggcc ttttccatgc ctttgggtgt tgtgactaac 120

agcactttag aagtaacaga gattgaccag ctagtctgca aggatcatct tgcacttact 180
gaccagctga aatcagttgg tctcaacctc gaggggagcg gagtatctac tgatatccca 240
tctgcaacaa agcgttgggg cttcagatct ggtgttcctc ccaagggtgt cagctatgaa 300
gcgggagaat gggctgaaaa ttgctacaat cttgaaataa agaagccgga cgggagcgaa 360
tgcttaccac caccgccaga tgggtgcaga ggctttccaa ggtgccgcta tgttcacaaa 420
gccaagga cggggccctg ccaggtgac tacgccttc acaaggatgg agctttcttc 480
ctctatgaca ggctggcttc aactgtaatt tacagaggag tcaatcttgc tgagggggta 540
attgcattct tgatattggc taaacaaaaa gaaacgttcc ttcagtcacc cccattcga 600

gaggcagtaa actacactga aaatacatca agttattatg ccacatccta cttggagtat 660
gaaatcgaaa attttggctc tcaacactcc acgaccttt tcaaaattga caataatact 720
tttgttcgtc tggacagccc ccacacgcct cagttccttt tccagctgaa tgataccatt 780
caccttcacc aacagttgag taatacaact gggagactaa tttggacact agatgcta 840
atcaatgctg atattggtga atgggctttt tgggaaaata aaaaaaatct ctccgaacaa 900
ctacgtggag aagagctgtc tttcgaagct ttatcgctca acgagacaga agacgatgat 960
gcggcatcgt cgagaattac aaagggaaga atctccgacc gggccaccag gaagtattcg 1020

gacctggttc caaagaattc ccctgggatg gttccattgc acataccaga aggggaaaca 1080

acattgccgt ctcaagaattc gacagaaggt cgaagagtag gtgtgaacac tcaggagacc 1140
attacagaga cagctgcaac aattataggc actaacggca accatatgca gatctccacc 1200
atcgggataa gaccgagctc cagccaaatc ccgagttcct caccgaccac ggcaccaagc 1260
cctgaggtc agacccccac aaccacaca tcaggtccat cagtgatggc caccgaggaa 1320
ccaacaacac caccgggaag ctccccggc ccaacaacag aagcaccac tctcaccacc 1380
ccagaaaata taacaacagc ggttaaaact gtctgccac aggagtccac aagcaacggt 1440
ctaataactt caacagtaac agggattctt gggagtcttg ggcttcgaaa acgcagcaga 1500
agacaaacta acaccaaagc cacgggtaag tgcaatcca acttacta ctggactgca 1560

caagaacaac ataatgctgc tgggattgcc tggatccgt actttggacc ggggtgcgaa 1620
ggcatataca ctgaaggcct gatgcataac caaatgcct tagtctgtgg acttaggcaa 1680
cttgcaaatg aaacaactca agctctgcag cttttcttaa gagccacaac ggagctgcgg 1740
acataacca tactcaatag gaagccata gatttccttc tgcgacgatg gggcgggaca 1800
tgcaggatcc tgggaccaga ttgttgcatg gagccacatg attggacaaa aaacatcact 1860
gataaaatca accaaatcat ccatgatttc atcgacaacc ccttacctaa tcaggataat 1920
gatgataatt ggtggacggg ctggagacag tggatccctg caggaatagg cattactgga 1980
attattattg caattattgc tcttctttgc gtttgcaage tgctttgc 2028

<210> 4

<211> 2043

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Marburg virus (MARV) transmembrane envelope
glycoprotein (GP) Angola type species codon optimized filovirus
antigen

<400> 4

atgaagacca cctgcctgct gatcagcctg atcctgatcc agggcgtgaa gacctgccc 60
atcctggaga tcgccagcaa catccagccc cagaacgtgg acagcgtgtg cagcggcacc 120
ctgcagaaga ccgaggacgt gcacctgatg ggcttcaccc tgagcggcca gaaggtggcc 180
gacagccctc tggaggccag caagaggtgg gccttcaggg ccggcgtgcc cccaagaac 240
gtggagtaca ccgagggcga ggaggccaag acctgctaca acatcagcgt gaccgacccc 300

agcggcaaga gcctgctgct ggaccctccc accaacaatca gggactaccc taagtgaag 360
 accatccacc acatccaggc ccagaacctt cagccccagg gcctgcctt gcacctgtgg 420
 ggcgcttctt tctgtacga caggatcgcc agcaccacca tgtacagagg aaaagtgttc 480
 acagaggga acatcgctgc tatgatctgt aacaagaccg tgcataagat gatcttcagc 540
 agacagggac agggatatag acatatgaac ctgacatcca caaacaagta ctggacaagc 600
 agcaacggaa cacagacaaa cgatacagga tgttttggaa cactgcagga atacaactcc 660
 accaagaacc agacatgtgc ccctagcaag aagcctctgc ctcctctac agctcatcct 720

 gaagtgaagc tgacatccac aagcacagat gccacaaagc tgaacacaac agatcctaata 780
 agcgacgacg aggatctgac aacaagcggg tccggatccg gagaacagga accttataca 840
 acaagcgacg ctgctacaaa acagggactg tctccacaa tgcctctac acctagccct 900
 cagcctagca cacctcagca gggaggcaac aacacaaacc attcccaggg agtggtgaca 960
 gaacctggaa agacaaacac aacagcccag cctagcatgc ctctcataa cacaacaaca 1020
 atcagcaca acaacacctc caagcacaat ctgagcacac ctagcgtgcc tattcagaat 1080
 gccaccaact acaacacaca gtccacagcc cctgaaaacg aacagacctc cgcccttcc 1140
 aaaacaacc tgctgcctac agaaaaccct acaacagcca agagcacaaa cagcacaaag 1200

 agccctacaa caacagtgc taacacaaca aacaagtata gcacaagccc tagccctaca 1260
 cctaattcca cagctcagca tctggtgtat tttagaagaa agagaacat cctgtggaga 1320
 gaaggagata tgttcccttt tctggatgga ctgatcaacg ctctatcga tttgatcct 1380
 gtgcctaaca caaagacaat ctttgatgaa agcagcagca gcggagcctc cgccgaagaa 1440
 gatcagcatg cctcccctaa catcagcctg aactgagct atttcctaa ggtgaacgaa 1500
 aacacagccc attccggaga aaacgaaaac gattgtgatg ccgaactgag aatctggagc 1560
 gtgcaggaag atgatctggc cgccggactg agctggatcc ctttttttgg gcccggaatt 1620
 gaaggactgt acaccgccgg cctgatcaag aaccagaaca acctggtgtg caggctgagg 1680

 aggtggcca accagaccgc caagagcctg gagctgctgc tgagggtgac caccgaggag 1740
 aggaccttca gctgatcaa caggcacgcc atcgacttcc tgctggctag gtggggcggc 1800
 acctgcaagg tgctgggccc cgactgctgc atcggcacg aggacctgag caggaaatc 1860
 agcgagcaga tcgaccagat caagaaggac gagcagaagg agggcaccgg ctggggcctg 1920
 ggccgcaagt ggtggaccag cgactgggga gtgctgacaa acctgggaat cctgctgctg 1980
 ctgagcattg ccgtgctcat tgctctgtcc tgtatctgta gaattttac caagtacatc 2040
 gga 2043

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

제2 재조합 아데노바이러스를

【변경후】

제2 재조합 아데노바이러스 벡터를