



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월28일  
(11) 등록번호 10-2679227  
(24) 등록일자 2024년06월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/155 (2006.01)  
A61P 31/14 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/005 (2013.01)  
A61K 39/155 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7029758
- (22) 출원일자(국제) 2020년02월27일  
심사청구일자 2022년08월08일
- (85) 번역문제출일자 2021년09월15일
- (65) 공개번호 10-2021-0134670
- (43) 공개일자 2021년11월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2020/008187
- (87) 국제공개번호 WO 2020/175660  
국제공개일자 2020년09월03일
- (30) 우선권주장  
JP-P-2019-036206 2019년02월28일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2011528222 A\*  
JP2012530504 A\*  
US20140141037 A1  
US20150329597 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
케이엠 바이올로지스 가부시키가이샤  
일본 구마모토켄 구마모토시 기타쿠 오쿠보 1쵸메 6방 1고
- (72) 발명자  
야마유에, 료  
일본 구마모토 8691298 기쿠치-시 교쿠시 가와베 1314-1 기쿠치 리서치 센터 케이엠 바이올로지스 가부시키가이샤 내  
가마쿠라, 사토시  
일본 구마모토 8691298 기쿠치-시 교쿠시 가와베 1314-1 기쿠치 리서치 센터 케이엠 바이올로지스 가부시키가이샤 내  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 26 항

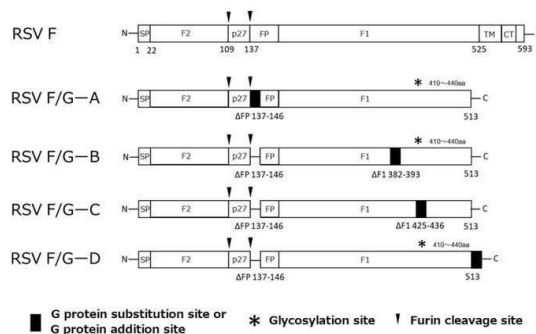
심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 RSV F/G 키메라 백신

(57) 요약

호흡기 합포체 바이러스(RSV)의 F 단백질만을 항원으로 하는 종래형 백신을 유효성 및/또는 안전성으로 상회하는, 신규한 RSV 감염증 예방을 위한 백신 항원을 창출한다. RSV F 단백질을 기본 골격으로 해서, 그 일부를 RSV G 단백질의 Conserved Central Domain서열의 전체 또는 그 일부로 치환한, 또는 당해 기본 골격에 당해 Conserved Central Domain서열의 전체 또는 그 일부를 부가한 RSV F/G 키메라 단백질을 항원으로 한 백신을 제작했다. 유효성 및 안전성의 양면으로부터 평가를 실시한 결과, 본 발명의 F/G 키메라 단백질을 항원으로 한 백신은 F 단백질만의 백신보다도 유효성 및/또는 안전성이 우수하다는 것이 확인되었다.

대표도



(52) CPC특허분류

**A61P 31/14** (2018.01)

**A61P 37/04** (2018.01)

**C12N 2760/18534** (2013.01)

(72) 발명자

**마츠오, 미호코**

일본 구마모토 8691298 기쿠치-시 교쿠시 가와베  
1314-1 기쿠치 리서치 센터 케이엠 바이올로지스  
가부시키키가이샤 내

**토리카이, 마사하루**

일본 구마모토 8691298 기쿠치-시 교쿠시 가와베  
1314-1 기쿠치 리서치 센터 케이엠 바이올로지스  
가부시키키가이샤 내

**모리, 히로아키**

일본 구마모토 8691298 기쿠치-시 교쿠시 가와베  
1314-1 기쿠치 리서치 센터 케이엠 바이올로지스  
가부시키키가이샤 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

호흡기 합포체 바이러스(RSV)의 F 단백질과 G 단백질의 키메라 단백질(RSV F/G 키메라 단백질)로서, RSV F 단백질의 일부를 RSV G 단백질의 CCD 서열의 일부로 치환하거나, RSV F 단백질에 RSV G의 CCD 서열의 일부를 부가해서 이루어지는 F/G 키메라 단백질로서,

여기서, RSV G 단백질의 CCD 서열의 일부로 치환되는 RSV F 단백질의 일부가 서열번호 1에 기재된 137~146번; 서열번호 1에 기재된 382~393번; 및 서열번호 1에 기재된 425~436번에 해당하는 위치로 구성되는 군으로부터 선택되고,

여기서 RSV F 단백질은 N-말단으로부터 차례로 SP 도메인, F2 도메인, p27 도메인, FP 도메인, F1 도메인으로 불리는 부위로 구성되며,

(1) 상기 치환 또는 부가되는 CCD 서열의 일부는 서열번호 2의 162~171번 위치의 서열, 187~197번 위치의 서열, 서열번호 2의 162~172번 위치의 서열과 187~199번 위치의 서열을 연결한 서열, 서열번호 2의 164~172번 위치의 서열과 187~197번 위치의 서열을 연결한 서열, 서열번호 2의 162~172번 위치의 서열과 187~199번 위치의 서열과 162~172번 위치의 서열을 연결한 서열, 및 서열번호 2의 162~172번 위치의 서열을 2~3개 연결한 서열로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나의 서열을 포함하거나, 또는

(2) 상기 치환 또는 부가되는 CCD 서열의 일부는 서열번호 11의 RSV G 단백질의 162~171번 위치의 서열, 서열번호 11의 RSV G 단백질의 164~172번 위치의 서열, 서열번호 11의 RSV G 단백질의 187~197번 위치의 서열, 서열번호 11의 162~172번 위치의 서열과 187~197번 위치의 서열을 연결한 서열, 서열번호 11의 164~172번 위치의 서열과 187~197번 위치의 서열을 연결한 서열, 서열번호 11의 162~172번 위치의 서열과 187~199번 위치의 서열을 연결한 서열, 및 서열번호 11의 162~172번 위치의 서열을 2~3개 연결한 서열로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나의 서열을 포함하는,

RSV F/G 키메라 단백질.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, RSV G 단백질의 CCD 서열의 일부로 치환되는 RSV F 단백질의 일부를 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~171번 위치로 치환하거나, RSV F 단백질에 RSV G 단백질의 162~171번 위치를 부가해서 이루어지는 키메라 단백질.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 137~146번에 해당하는 위치의 RSV F 단백질의 일부를 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~171번 위치로 치환해서 이루어지는 키메라 단백질.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 상, 137~146번 위치에 해당하는 RSV F 단백질의 서열을 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~171번 위치로 치환해서 이루어지는 키메라 단백질.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 당해 RSV F 단백질의 C 말단에 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~171번 위치를 부가해서 이루어지는 키메라 단백질.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, RSV F 단백질의 일부를 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 187~197번 위치로 치환하거나, RSV F 단백질에 RSV G 단백질의 187~197번 위치를 부가해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 137~146번에 상당하는 위치의 RSV F 단백질의 일부를 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 187~197번 위치로 치환해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 상, 137~146번 위치에 상당하는 RSV F 단백질의 서열을 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 187~197번 위치로 치환해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 당해 RSV F 단백질의 C 말단에 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 187~197번 위치를 부가해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 137~146번에 상당하는 위치의 RSV F 단백질의 일부를 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~172번 위치와 187~199번 위치의 서열을 링커로 연결한 서열로 치환해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 137~146번에 상당하는 위치의 RSV F 단백질의 일부를 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~172번 위치와 187~199번 위치의 서열을 GGGGS(서열번호 5) 또는 EAAAK(서열번호 6)에 의한 링커로 연결한 서열로 치환해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 당해 RSV F 단백질의 C 말단에 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~172번 위치와 187~199번 위치의 서열을 링커로 연결한 서열을 부가해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 당해 RSV F 단백질의 C 말단에 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~172번 위치와 187~199번 위치의 서열을 GGGGS(서열번호 5) 또는 EAAAK(서열번호 6)에 의한 링커로 연결한 서열을 부가해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 137~146번에 상당하는 위치의 RSV F 단백질의 일부를 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~172번 위치와 187~199번 위치의 서열을 연결한 서열로 치환해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 RSV F 단백질의 C 말단에 서열번호 2에 기재된 RSV G 단백질의 162~172번 위치와 187~199번 위치의 서열을 연결한 서열을 부가해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 상, 137~146번 위치에 상당하는 RSV F 단백질의 서열을 RSV G 단백질의 162~171번 위치로 치환하고, F 단백질에 K419N, K421T, 및 G430T의 아미노산 개변(modification)을 가해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 상, 137~146번 위치에 상당하는 RSV F 단백질의 서열을 RSV G 단백질의 162~171번 위치로 치환하고, F 단백질에 K419N, K421T, 및 T434N 및 S436T의 아미노산 개변을

가해서 이루어지는 키메라 단백질.

**청구항 18**

제1항 내지 5항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 개변에 의해, F 단백질의 siteIV 주변, 즉 서열번호 1의 419 ~468번 위치에 당쇄 부가 부위가 도입되어 있고, 당쇄 당쇄 부가 부위 도입을 위한 아미노산 개변이 하기 (1) 또는 (2)인 키메라 단백질;

(1) K419N, K421T, 및 G430T

(2) K419N, K421T, 및 T434N 및 S436T.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 F 단백질의 siteIV의 당쇄 부가 부위 도입을 위한 아미노산 개변이 K419N, K421T, 및 G430T인 키메라 단백질:

**청구항 20**

제18항에 있어서, 상기 F 단백질의 siteIV의 당쇄 부가 부위 도입을 위한 아미노산 개변이 K419N, K421T, 및 T434N 및 S436T인 키메라 단백질.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 기재된 키메라 단백질을 항원으로 하는 RSV 백신.

**청구항 22**

제21항에 있어서, RSV F 단백질보다도 낮은 RSV 감염 악화 경향을 가지는 RSV 백신.

**청구항 23**

제21항에 있어서, RSV F 단백질보다도 높은 보체 의존성 중화가를 가지는 RSV 백신.

**청구항 24**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 기재된 키메라 단백질을 코딩하는 프래그먼트 DNA.

**청구항 25**

제24항에 기재된 프래그먼트(fragment) DNA를 포함하는 발현 벡터.

**청구항 26**

제24항에 기재된 프래그먼트 DNA 또는 제25항에 기재된 발현 벡터를 트랜스펙션한, 인체 내의 세포를 제외한 세포.

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 호흡기 합포체 바이러스(RSV)의 백신에 관한 것이다. 더 상세하게는, RSV F 단백질을 기본 골격으로 해서, 당해 기본 골격의 일부를 RSV G 단백질의 Conserved Central Domain 서열의 전체 또는 그 일부로 치환, 또는 당해 기본 골격에 당해 Conserved Central Domain 서열의 전체 또는 그 일부를 부가한 재조합 F/G 키메라 단백질에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 의학:
- [0003] RSV의 감염경로는 비말전염 혹은 접촉감염으로, 2세까지 거의 100%의 인간이 감염한다. 통상은 콧물, 38~39℃의 발열, 기침 등의 감기 유사 증상이 나타난다. 한편, 이·고령자는 중증화되기 쉽다. 글로벌에서의 2015년 추정에서는, 5세 미만에서 3310만명이 RSV 감염증(RSV-Acute Lower Respiratory Infection)에 걸리고, 그중 320만명이 입원 치료를 필요로 하고, 11만 8200명이 사망하고 있다고 추정되고 있다(비특허문헌1). 치료법은 지지요법이 중심이고, 치료약으로서는 항바이러스약 Ribavirin(VIRAZOLE(등록상표))의 흡입이 미국에서 인가되어 있을 뿐이다. 유일한 예방약으로서 첫 감염에서는 세기관지염·폐렴으로 진전되는 경우가 많고아, 특히 6개월 미만의 젖먹 RSV의 엔벨로프 단백질에 결합하는 항체 의약품의 Palivizumab(Synagis(등록상표))이 인가되어 있지만, 투여 대상자가 하이 리스크자(미숙아, 만성 질환, 선천성 심질환 등)에 한정되고 있다(비특허문헌 7). 유아기에 RS 바이러스 감염증, 특히 세기관지염을 일으킨 아이는, 후년 기관지 천식을 발증되기 쉬운 것으로 여겨지고 있다. 그렇지만, 감염되지 않도록 하는 것은 불가능하기 때문에, 오랜 세월 유효한 백신개발이 기대되고 있지만, 전 세계에 인가되어 있는 RSV 백신은 존재하고 있지 않다.
- [0004] RSV F 단백질:
- [0005] RSV F 단백질은 RSV 엔벨로프 표면에 국재하고, 바이러스가 숙주의 세포에 침입하기 때문에 중요한 기능을 가진다. 구체적으로는, RSV F 단백질을 통해서, 숙주 세포막과 바이러스 엔벨로프를 융합함으로써 감염이 성립한다. 바이러스주 사이에서 돌연변이가 적기 때문에, RSV F 단백질을 백신 항원으로 하는 연구개발이 진행되어 왔다. 지금까지, RSV F 단백질은 3개의 형태(Prefusion F / Prefusion F / Postfusion F)을 취하고 있는 것이 보고되고 있다(특허문헌 1, 4, 5). 그 때문에 각각의 형태의 RSV F 단백질을 백신 항원으로 하는 연구개발이 실시되고, 복수의 임상시험이 이루어지고 있다(비특허문헌 2). RSV F 단백질은 약 60kDa이고, N말단으로부터 차례로, Signal Peptide(SP) 도메인, Fragment2(F2) 도메인, p27 도메인, Fusion Peptide(FP) 도메인, Fragment1(F1)도메인, Transmembrane(TM) 도메인, Cytoplasmic tail (CT) 도메인이라고 불리는 부위로 일반적으로 구성되는 기본 골격을 가진다.
- [0006] RSV G 단백질:
- [0007] RSV G 단백질은 RSV 엔벨로프 표면에 국재하고, 바이러스가 숙주의 세포에 접촉하기 때문에 중요한 기능을 가진다. 구체적으로는, 바이러스 표면의 RSV G 단백질을 통해서, 숙주세포의 리셉터와 접촉한다. RSV G 단백질의 서열은 바이러스주 사이에서 크게 다르고, 서열의 차이에 의해 A와 B의 서브 그룹으로 대별된다. RSV A2 strain의 G 단백질은 약 30kDa이고, N말단으로부터 차례로, Intravirion, transmembrane region(TM), Mucin-like region I, Conserved Central Domain(CCD), Mucin-like region II라 불리는 부위로 구성된다. CCD라 불리는 영역서열(아미노산 잔기158~199)은 바이러스주 사이에서도 변화가 적고, 고도로 보존되고 있으며, 케모카인 CX3C 모티브를 포함하고 있다. 이 CX3C 모티브가 리간드가 되는 세포표면의 CX3C Receptor 1(CX3CR1)과 결합하고, 바이러스와 세포가 접촉함으로써 감염이 촉진된다(비특허문헌 3). 그 후에 RSV F 단백질이 바이러스 엔벨로프와 세포막의 융합을 촉진되어 감염이 성립한다. RSV F 단백질과 함께 RSV G 단백질도 감염에 중요하기 때문에, RSV G 단백질을 백신 항원으로 하는 연구개발이 실시되고, 임상시험이 실시된 적이 있다(특허문헌 3).
- [0008] RSV F/G 키메라 단백질:
- [0009] RSV F/G 키메라 단백질로서, N말단으로부터 C 말단의 방향에서, (i) 제1 F 단백질 폴리펩타이드 도메인, (ii) G

단백질의 폴리펩타이드 도메인, 및 (iii)제2 F 단백질 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 호흡기 합포체 바이러스 (RSV) 폴리펩타이드의 공개정보가 있다 (특허문헌 6). 이 키메라 항원에 포함되는 G 단백질은 아미노산 잔기 183~203, 152~229, 149~229, 및 128~229 중 어느 하나가 되고 있다(특허문헌 6). 또, N말단으로부터 C 말단의 방향에서, (i) Furin 절단 사이트에서 절단되지 않도록 제1 F 단백질과 제2 F 단백질을 연결한 아미노산 서열과, (ii) G 단백질 폴리펩타이드의 일부를 포함해서 이루어지는, 키메라 RSV 폴리펩타이드의 공개정보도 있다(특허문헌 7). 이 키메라 항원에 포함되는 G 단백질은 아미노산 잔기 183~203, 152~229, 및 149~229 중 어느 하나가 되고 있다(특허문헌 7). 모두 RSV F/G 키메라 단백질이지만, RSV 야생형(RSV WT F) 단백질, RSV Postfusion F(RSV post F) 단백질 및 RSV pre F(RSV Prefusion F) 단백질과의 감염 방어능의 우위성이나 동등성 평가 및 저용량 투여에 의한 감염 악화의 검증이 이루어지지 않고 있다. 본 발명의 차이점은, 키메라 항원에 포함되는 G 단백질은 CCD 영역으로 한정하고 있는 것이다. 즉, 본 발명에서는 유효성 및 안전성에 중요한 영역: 아미노산 잔기 158-199로 한정하고 있다.

[0010] RSV F/G 키메라 단백질로서, N말단으로부터 C 말단의 방향에서, RSV F 단백질의 아미노산 잔기 1~526과 RSV G 단백질의 아미노산 잔기 69~298을 연결한 단백질의 보고가 있다(비특허문헌 5). 이 RSV F/G 키메라 단백질은 포르말린 불활성화 RSV와의 비교에서 감염 방어능 평가 및 부작용 평가에서 우위성이 인정되지만, RSV WT F 단백질, RSV post F 단백질 및 RSV pre F 단백질과의 비교에 있어서, 감염 방어능에서의 우위성이나 동등성 평가 및 저용량 투여에 의한 감염 악화의 검증이 이루어지지 않고 있다(비특허문헌 5). RSV F/G 키메라 단백질로서는 기초 연구가 이루어지고 있지만, 아직 임상연구가 실시된 경우는 없다. 본 발명의 차이점은, 키메라 항원에 포함되는 G 단백질은 CCD 영역으로 한정하고 있는 것이다. 즉, 본 발명에서는 유효성 및 안전성에 중요한 영역: 아미노산 잔기 158-199로 한정하고 있다.

[0011] 항RSV F 항체:

[0012] RSV F 단백질 특이적인 항체는 중화능을 가지는 것이 알려져 있다. RSV F 단백질의 복수 에피토프에 대해서, 각각 모노클로날 항체가 존재한다(비특허문헌 6). RSV F 단백질의 siteII라고 불리는 부위에 대하여 특이적인 항체에 하나는 항체 의약품의 Palivizumab(Synagis(등록상표))으로서 인가되고 있다. 이 의약품은 예방약으로서도 인가되고 있지만, 투여 대상자는 하이 리스크자(미숙아, 만성 질환, 선천성 질환 등)에 한정되고 있다(비특허문헌 7).

[0013] 항RSV G 항체:

[0014] RSV G 단백질 특이적인 항체는 항RSV F 항체와 마찬가지로 중화능을 가진다. 특히, RSV G 단백질의 CCD에 대한 항체가 복수 알려져 있다(비특허문헌 4). 그 중에서도 3D3라고 불리는 항체는 팔리비주맙과 상위해서 감염에 의한 기도염증 등의 증상악화를 일으키지 않는 효과가 BALB/c 마우스 모델에서 인정되었다고 보고되었다(특허문헌 2, 비특허문헌 8, 9). 또, 131-2G라고 불리는 항체는 RSV 감염 시에, T helper(Th)2에서 Th1으로의 시프트를 유도하는 효과가 BALB/c 마우스에서 획득되었다는 보고가 있다(비특허문헌 10).

[0015] 바이러스주 사이에서 고도로 보존되고 있는 RSV G 단백질의 CCD의 서열 중에서도, 특히 고도로 보존되고 있는 서열영역Central Conserved Region(CCR)이 존재하고, RSV G 단백질의 아미노산 잔기 164~176에 위치하고 있다(비특허문헌 11, 19). 이 CCR을 인식하는 모노클로날 항체인 3D3, 131-2G 및 2B11에는 폐의 염증을 억제하는 효과가 BALB/c 마우스 모델에서 인정되었다고 보고되었다(비특허문헌 11).

[0016] RSV 감염증의 악화 메커니즘:

[0017] 1960년대에 포르말린 불활성화 RSV 백신의 임상시험이 실시되었지만, RSV 첫 감염에서의 입원율이 비접종 그룹에서 2%, 백신 접종 그룹에서 80%이고, 추가로 접종 그룹에서는 2명이 사망하고 있다(비특허문헌 12). 백신 접종 후의 RSV 감염에 의해 증상악화가 일어난 원인으로, RSV G 단백질에 의한 Th2로의 면역 유도, 포르말린 처리에서 생성되는 카르보닐화 단백질에 의한 Th2로의 면역 유도, 백신에 의해 유도되는 항체의 결합활성(Avidity) 낮음 등이 거론되고 있다(비특허문헌 13~15).

[0018] RSV G 단백질과 악화 메커니즘과의 관련: 영유아는 특히 RSV 감염에서 중증화하는 것이 알려져 있다. 그 원인에 하나로서, 영유아의 면역은 염증성 세포가 많아지는 Th2로 시프트하고 있는 것이 언급되어 왔다. 또, RSV G 단백질의 CX3C 모티브의 리셉터인 CX3CR1을 통해서 RSV가 neonatal regulatory B lymphocytes(nBreg)에 감염하면, IL-10이 생산되어 Th1 응답이 저해된다는 것이 RSV 감염증의 인간에서 보고되고 있다(비특허문헌 16).

[0019] 저용량 투여에 의한 증상 악화:

[0020] 선행 개발품의 RSV post F 단백질(애주번트로서 Th1 유도형의 Glucopyranosyl Lipid Adjuvant-stable Emulsion 을 포함한다) 및 RSV pre F 단백질(애주번트로서 Th2 유도형 Aluminium hydroxide hydrate Gel을 포함한다)을 항원으로 한 백신을 저용량 투여한 후, RSV 감염시키면 폐포염 등의 Vaccine-Enhanced Disease가 코튼랫 모델에서 발생하였다는 보고가 있다(비특허문헌 17).

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0021] (특허문헌 0001) 일본 특허 제6162751호
- (특허문헌 0002) 일본 특허 제5808536호
- (특허문헌 0003) 일본특허 제4310184호
- (특허문헌 0004) WO 2016144675 A1
- (특허문헌 0005) 일본 공표특허공보 2016-519658
- (특허문헌 0006) 일본 공표특허공보 2010-522540
- (특허문헌 0007) 일본 공표특허공보 2011-528222
- (특허문헌 0008) 특허 제4150814호

**비특허문헌**

- [0022] (비특허문헌 0001) Shi T et al. Lancet. 2017 Sep 2;390(10098):946-958.
- (비특허문헌 0002) Mazur NI et al. Lancet Infect Dis. 2018 Oct;18(10):e295-e311.
- (비특허문헌 0003) Johnson SM et al. PLoS Pathog. 2015 Dec 11;11(12):e1005318
- (비특허문헌 0004) Fedechkin SO et al. Sci Immunol. 2018 Mar 9;3(21). pii: eaar3534.
- (비특허문헌 0005) Prince GA et al. J Virol. 2000 Nov;74(22):10287-92.
- (비특허문헌 0006) McLellan JS et al. Science. 2013 May 31;340(6136):1113-7.
- (비특허문헌 0007) 항 RS바이러스 인간화 모노클로날 항체 제제 Synagis R 근육 주사액 첨부문서
- (비특허문헌 0008) Han J et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 Jul;51(1):143-54.
- (비특허문헌 0009) <http://www.trellisbio.com/pipeline/viruses.html>
- (비특허문헌 0010) Boyoglu-Barnum S et al. J Virol. 2014 Sep;88(18):10569-83.
- (비특허문헌 0011) Caidi H et al. Antiviral Res. 2018 Jun;154:149-157
- (비특허문헌 0012) Kim HW et al. Am J Epidemiol. 1969 Apr;89(4):422-34.
- (비특허문헌 0013) Johnson TR et al. Pediatr Infect Dis J. 2004 Jan;23(1 Suppl):S46-57
- (비특허문헌 0014) Moghaddam A et al. Nat Med. 2006 Aug;12(8):905-7.
- (비특허문헌 0015) Delgado MF et al. Nat Med. 2009 Jan;15(1):34-41.
- (비특허문헌 0016) Zhivaki D et al. Immunity. 2017 Feb 21;46(2):301-314.
- (비특허문헌 0017) Schneider-Ohrum K et al. J Virol. 2017 Mar 29;91(8). pii: e02180-16.
- (비특허문헌 0018) N Elango et al. Nucleic Acids Res. 1985 Mar 11;13(5):1559-1574.
- (비특허문헌 0019) Sullender W et al. Virology. 1995 May 10;209(1):70-9.

(비특허문헌 0020) Yokoi H et al. Kansenshogaku Zasshi. 2012 Sep;86(5):569-76.  
 (비특허문헌 0021) Wu SJ et al. JGenVirol.2007Oct;88(Pt10):2719-23.  
 (비특허문헌 0022) McLellanJSetal.JVirol.2010Dec;84(23):12236-44.  
 (비특허문헌 0023) GilmanMSetal.SciImmunol.2016Dec16;1(6).  
 (비특허문헌 0024) TangAetal.NatCommun.2019Sep12;10(1):4153.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0023] 2세까지 거의 100%의 인간이 RSV에 감염하고, 통상은 감기 유사 증상이 나타난다. 한편, 첫 감염에서는 세기관지염·폐렴으로 진전되는 경우가 많고, 특히 젖먹이·고령자는 중증화되기 쉽다. 예방약으로서 Palivizumab(Synagis(등록상표))이 있지만, 투여 대상자는 하이 리스크자(미숙아, 만성 질환, 선천성 질환 등)에 한정된다. RSV 백신에 대해서는 임상시험 단계의 것이 다수 있을 뿐, 인가된 RSV 백신은 아직 전 세계에 존재하지 않는다. 1960년대의 임상시험에서, 포르말린 불활성화RSV 백신 접종 후의 자연감염으로 악화작용이 인정된 이래, 악화 리스크를 회피할 수 있는 RSV 백신개발이 요구되고 있다. 특히, 영유아에서는 악화작용이 염려되는 한편으로, 이 리스크를 회피할 수 있는 RSV 백신개발은 진행되고 있지 않다. 그러한 상황에서, 본 발명은 백신 접종 후의 악화 리스크를 회피할 수 있는 RSV 백신의 제공을 목적으로 하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0024] 본 발명자들은 놀랍게도, RSV F 단백질을 기본 골격으로 해서, 당해 기본 골격의 일부를 RSV G 단백질의 CCD 서열의 전체 또는 그 일부로 치환한, 또는 당해 기본 골격에 당해 CCD 서열의 전체 또는 그 일부를 부가하는 것에 의해 제작한 RSV F/G 키메라 단백질 항원이 post F 단백질 항원 및 pre F 단백질 항원의 저용량 접종 후에 RSV 감염시켰을 때에 인정되는 감염 악화 경향이 발생하기 어려운 것을 알아냈다. 또, 본 발명자들은 post F 단백질 항원과 비교해서 감염 방어능이 우수하는 것, pre F 단백질 항원과 비교해서 감염 방어능이 동등하다는 것을 증명했다. 부가해서, 본 발명자들은 RSV F 단백질에 당해 부가의 변형을 첨가하는 것에 의해, RSV F 단백질, 돌연변이한 아미노산 서열을 포함하는 RSV F 단백질 및 F/G 키메라 단백질의 발현량이 향상하는 것을 알아냈다.

[0025] post F 단백질 및 pre F 단백질을 백신 항원으로 하는 선형 개발품에서는 유도되는 항RSV F 항체가 감염 방어능을 가진다. 그렇지만, 항RSV F 항체의 혈중 농도가 낮아지면 중화능이 저하됨과 동시에, 항RSV F 항체를 포착한 세포를 통해서 감염이 조장되는 소위 항체 의존성 감염 증가 현상이 발생하고, 결과적으로 VED가 발생하는 것으로 추측된다.

[0026] 한편, RSV F/G 키메라 단백질을 투여하는 것에 의해, 항RSV F 항체에 부가해서 항RSV G 항체가 유도된다고 기대할 수 있다. 과거에 보고된 RSV F/G 키메라 단백질과 다른 본 발명의 특징은 키메라 항원에 포함시키는 G 단백질을 유효성 및 안전성에 중요한 CCD 영역(아미노산 잔기158-199)에 한정된 것이다. 따라서 RSV F/G 키메라 단백질을 면역함으로써 유도되는 항RSV G 항체는 항RSV F 항체와 같이 감염 방어능을 가진다. 또, RSV F/G 키메라 단백질은 G 단백질에 유래하는 CX3C 모티브 주변의 서열을 편입하고 있기 때문에, 면역 유도되는 항RSV G 항체는 바이러스 표면에 국재하는 G 단백질의 CX3C 모티브 부근에 결합한다. 그 결과, 바이러스 표면 G 단백질의 CX3C 모티브는 항RSV G 항체로 마스크된 상황이 되고, 숙주세포 표면에 국재하고 있는 CX3CR1에 대한 결합이 저해되는 것으로 추측된다. 따라서 CX3C-CX3CR1을 통한 Th1 응답 저해 시그널을 억제하는 것으로 기대된다. 즉, RSV F/G 키메라 단백질을 면역함으로써 유도되는 항RSV G 항체에 의해서 정상인 Th1 응답이 재촉되고, 결과적으로 감염 악화를 억제하는 것으로 시사된다.

[0027] 또, pre F 단백질 항원 및 RSV F/G 키메라 단백질을 마우스에 면역했을 때, 혈중에 유도된 항RSV F 항체의 서브클래스 해석을 실시했다. 그 결과, 보체 결합능이 있는 IgG2a 양이 pre F 단백질 항원과 비교해서 RSV F/G 키메라 단백질을 면역한 마우스 쪽이 증가 경향이였다. 따라서 pre F 단백질 항원과 비교해서 RSV F/G 키메라 단백질 항원 쪽이 더욱 유효한 보체계에 의한 감염 방어 효과를 기대할 수 있다.

[0028] 상기에 나타난 메커니즘 대로, 발명자들이 알아낸 RSV F/G 키메라 단백질을 투여함으로써, RSV F 단백질만을 항원으로 하는 백신 투여와 비교해서 감염 방어능이 향상하는 효과 및/또는 감염 악화를 방지하는 효과를 기

대할 수 있다.

- [0029] 본 발명은 이하의 [1]~ [25]를 제공한다.
- [0030] [1] 호흡기 합포체 바이러스(RSV)의 F 단백질과 G 단백질과의 키메라 단백질(RSV F/G 키메라 단백질)로서, RSV F 단백질을 기본 골격으로 해서, 당해 기본 골격의 일부를 RSV G 단백질의 CCD 서열의 전체 또는 그 일부로 치환한, 또는 당해 기본 골격에 당해 CCD 서열의 전체 또는 그 일부를 부가해서 이루어지는 RSV F/G 키메라 단백질.
- [0031] [2] 상기 [1]에서, 상기 F 단백질의 아미노산 서열이 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 키메라 단백질.
- [0032] [3] 상기 [1]에서, 상기 F 단백질의 아미노산 서열이 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 키메라 단백질.
- [0033] [4] 상기 [1] 내지 [3] 중 어느 하나에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부에 의한 치환 위치, 또는 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부의 부가 위치가 상기 F 단백질의 FP 도메인인 키메라 단백질.
- [0034] [5] 상기 [1] 내지 [3] 중 어느 하나에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부에 의한 치환 위치가 상기 F 단백질의 FP 도메인 및 p27 도메인인 키메라 단백질.
- [0035] [6] 상기 [5]에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부에 의한 치환 위치가 상기 F 단백질의 137~146번 위치인 키메라 단백질.
- [0036] [7] 상기 [1] 내지 [3] 중 어느 하나에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부에 의한 치환 위치, 또는 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부의 부가 위치가 상기 F 단백질의 F1 도메인인 키메라 단백질.
- [0037] [8] 상기 [7]에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부에 의한 치환 위치가 상기 F 단백질에 382~393번 위치 또는 425~436번 위치인 키메라 단백질.
- [0038] [9] 상기 [2] 또는 [3]에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부에 의한 부가 위치가 상기 F 단백질의 C 말단인 키메라 단백질.
- [0039] [10] 상기 [1] 내지 [9] 중 어느 하나에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부의 아미노산 서열이 서열번호 2의 158~199번 위치, 162~197번 위치, 164~190번 위치, 164~186번 위치, 164~176번 위치, 173~197번 위치, 187~197번 위치, 173~186번 위치, 162~171번 위치의 서열, 서열번호 2의 162~172번 위치의 서열과 187~199번 위치의 서열을 연결한 서열, 서열번호 2의 164~172번 위치의 서열과 187~197번 위치의 서열을 연결한 서열, 서열번호 2의 162~172번 위치의 서열과 187~199번 위치의 서열과 162~172번 위치의 서열을 연결한 서열, 및 서열번호 2의 162~172번 위치의 서열을 2~3개 연결한 서열로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나의 서열을 포함하는 키메라 단백질.
- [0040] [11] 상기 [10]에서, 상기 아미노산 서열의 연결에 링커를 사용하고 있는 키메라 단백질.
- [0041] [12] 상기 [1] 내지 [11] 중 어느 하나에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부에 의한 치환, 또는 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부의 부가에 링커를 사용하고 있는 키메라 단백질.
- [0042] [13] 상기 [11] 또는 [12]에서, 상기 링커의 아미노산 서열이 GGGGS(서열번호 5) 또는 EAAAK(서열번호 6)인 키메라 단백질.
- [0043] [14] 상기 [10] 내지 [13] 중 어느 하나에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부의 아미노산 서열이 당해 아미노산 서열과 75% 이상의 상동성을 가지는 키메라 단백질.
- [0044] [15] 상기 [10] 내지 [13] 중 어느 하나에서, 상기 CCD 서열의 전체 또는 그 일부의 아미노산 서열이 당해 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 키메라 단백질.
- [0045] [16] 상기 [1] 내지 [15] 중 어느 하나에서, 아미노산 개변에 의해, 상기 F 단백질에 당해 부가 부위를 도입하고 있는 키메라 단백질.
- [0046] [17] 상기 [16]에서, 상기 당해 부가 부위가 상기 F 단백질의 siteIV 주변 즉 서열번호 1의 419~468번 위치인 키메라 단백질.
- [0047] [18] 상기 [17]에서, 상기 siteIV 주변의 당해 부가 부위가 서열번호 1의 419~436번 위치 중 어느 하나인 키메

라 단백질.

- [0048] [19] 상기 [18]에서, 상기 siteIV의 당쇄 부가 부위 도입을 위한 아미노산 개변이 하기 (1) 내지 (7) 중 어느 하나인 키메라 단백질:
- [0049] (1) G430T/S
- [0050] (2) K419N, 및 K421T/S
- [0051] (3) K427N, 및 R429T/S
- [0052] (4) T434N, 및 S436T/S
- [0053] (5) K419N, K421T/S, 및 G430T/S
- [0054] (6) K419N, K421T/S, 및 K427N 및 R429T/S
- [0055] (7) K419N, K421T/S, 및 T434N 및 S436T/S
- [0056] [20] 상기 [16] 내지 [19] 중 어느 하나에서, 상기 당쇄 부가 부위에 당쇄를 부가하고 있는 키메라 단백질.
- [0057] [21] 상기 [1] 내지 [20] 중 어느 하나에 기재된 키메라 단백질을 항원으로 하는 RSV 백신.
- [0058] [22] 상기 [21]에서, RSV F 단백질보다도 낮은 RSV 감염 악화 경향을 가지는 RSV 백신.
- [0059] [23] RSV F 단백질의 아미노산 개변에 의해 당쇄 부가 부위를 도입해서 당쇄를 부가하는 것에 의해, 당쇄 F 단백질의 발현량을 향상시키는 방법.
- [0060] [24] 상기 [23]에서, 상기 F 단백질의 일부를 RSV G 단백질의 CCD 서열의 전체 또는 그 일부로 치환한, 또는 당쇄 F 단백질에 당쇄 CCD 서열의 전체 또는 그 일부를 부가한 방법.
- [0061] [25] 상기 [23] 또는 [24]에서, 상기 당쇄 부가 부위 도입을 위한 아미노산 개변이 하기 (1) 내지 (7) 중 어느 하나인 방법:
- [0062] (1) G430T/S
- [0063] (2) K419N 및 K421T/S
- [0064] (3) K427N 및 R429T/S
- [0065] (4) T434N 및 S436T/S
- [0066] (5) K419N, K421T/S 및 G430T/S
- [0067] (6) K419N, K421T/S 및 K427N 및 R429T/S
- [0068] (7) K419N, K421T/S 및 T434N 및 S436T/S

**발명의 효과**

- [0069] 본 발명에 의하면, RSV 감염 예방 효과를 가지는 백신, 및/또는 백신 접종 후의 RSV 감염 악화를 회피할 수 있는 백신, 게다가 RSV 감염 예방 효과를 가지는 동시에, 백신 접종 후의 RSV 감염 악화를 회피할 수 있는 백신의 제공이 가능하게 된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0070] 도 1은 RSV F/G 키메라 단백질의 서열 개략도이다.
- 도 2는 RSV F/G 키메라 단백질의 일부가 되는 RSV G 단백질 서열(No.1~9)의 개략도이다
- 도 3은 RSV F/G 키메라 단백질의 일부가 되는 RSV G 단백질 서열(No.10~14)의 개략도이다.
- 도 4는 RSV F/G 키메라 단백질의 일부가 되는 RSV G 단백질 서열(No.15~18)의 개략도이다.
- 도 5는 RSV F/G 키메라 단백질 발현량 일람이다.
- 도 6은 RSV F/G 키메라 단백질 발현량 일람이다.

- 도 7은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 8은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 9는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 10은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 11은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 12는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 13은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 14는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 15는 RSV F/G 키메라 단백질의 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 16은 RSV F/G 키메라 단백질의 전자현미경상이다.
- 도 17은 RSV F/G 키메라 단백질의 ELISA 시험결과이다.
- 도 18은 RSV F/G 키메라 단백질의 ELISA 시험결과이다.
- 도 19는 RSV F/G 키메라 단백질 면역 혈청의 중화 시험결과이다.
- 도 20은 RSV F/G 키메라 단백질 면역 혈청의 보체 의존성 중화시험 결과이다.
- 도 21은 RSV F/G 키메라 단백질 면역 혈청에 포함되는 항RSV F 단백질 항체의 서브클래스 해석결과이다.
- 도 22는 RSV F/G 키메라 단백질 면역에 의해 유도되는 항RSV G 단백질 항체의 평가이다.
- 도 23은 RSV F/G 키메라 백신의 감염 방어 시험 결과이다.
- 도 24는 RSV F/G 키메라 백신의 감염 방어 시험 결과이다.
- 도 25는 RSV F/G 키메라 백신의 감염 방어 시험 결과이다.
- 도 26은 RSV F/G 키메라 백신의 감염 억제율 평가 결과이다.
- 도 27은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 28은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 29는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 30은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 31은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 32는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 33은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 34는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 35는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 36은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 37은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 38은 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 39는 RSV F/G 키메라 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 40은 RSV F/G 키메라 단백질의 ELISA 시험결과이다.
- 도 41은 RSV F/G 키메라 단백질의 ELISA 시험결과이다.
- 도 42는 RSV F/G 키메라 단백질 면역 혈청의 보체 의존성 중화시험 결과이다.

도 43은 RSV F/G 키메라 백신의 감염 악화 평가 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0071] 정의:

[0072] 본 명세서에서, 용어 「감염 악화」는 항원을 면역하지 않고 RSV 감염시킨 control 그룹과 비교해서 항원을 면역 후에 RSV 감염시켰을 경우에 감염가 혹은 바이러스 카피수가 증가하는 것을 말한다.

[0073] 본 명세서에서, 용어 「RSV F/G-W-X-Y Z」는 RSV F/G 키메라 단백질의 특징에 의거하는 명칭이다. 「W」는 RSV F 단백질(기본 골격)에서의 G 단백질에 의한 치환 위치, 또는 G 단백질의 부가 위치를 알파벳 A~D로 나타낸 것이다(도 1). 알파벳 2문자의 경우에는, 2곳에 G 단백질에 의한 치환, 또는 G 단백질의 부가가 있는 것을 의미한다. 예를 들면 「AD」의 경우, A와 D의 위치에 치환, 또는 부가가 있는 것을 의미한다. 「X」는 기본 골격을 치환, 또는 기본 골격에 부가하는 RSV G 단백질 서열을 1~18의 번호로 나타낸 것이다(도 2~4). 번호가 2개 있는 경우에는 해당하는 G 단백질 서열 2개로 치환, 또는 부가가 있는 것을 의미한다. 예를 들면 「RSV F/G-AD-9/7」의 경우, 「A의 위치에 9」, 「D의 위치에 7」의 치환, 또는 부가가 있는 것을 의미한다. G 단백질에 의한 치환, 또는 G 단백질을 부가하지 않는 경우에는 0으로 나타낸다. 「Y」는 당쇄 변형을 수반하는 RSV F 단백질의 아미노산 개변을 0~4의 번호로 나타낸 것으로, 구체적으로는 「0: 개변없음, 1: K419N, K421T 및 G430T, 2: K419N, K421T, T434N 및 S436T, 3: K421N 및 G430T, 4: K419N, K421T, K427N, 및 R429T」를 의미한다. 여기에서 예를 들면 「K419N」이라는 표기는 RSV F 단백질에 419번 위치의 리신(K)이 아스파라긴(N)으로 치환되어 있는 것을 나타낸다. 또, 예를 들면 「K421T/S」라는 하는 표기는 421번 위치의 리신(K)이 트레오닌(T) 또는 세린(S)으로 치환되어 있는 것을 나타낸다. 또, 「Z」는 기타의 개변 혹은 링커의 개수나 종류를 나타낸다. 구체적으로는, 기타의 개변으로서 RSV F 단백질에 136아미노산을 결손시킨 것을 Δ136aa, 136번째의 아르기닌을 글루타민으로 치환한 것을 R136Q로 나타낸다. 링커의 개수는 「0개: 0, 1개: 1, 2개: 2, 3개: 3, 4개: 4」로 나타내고, 도 3의 No.12 및 13의 링커 삽입 위치 3곳의 좌측으로부터 차례로 링커의 개수를 나타낸다. 예를 들면, 0개 4개 0개라면 「040」으로 나타낸다. 또, 링커의 종류는 「GGGGS 링커: G, EAAAK 링커: E」로 나타내고, 도 3의 No.14, 도 4의 No.17 및 18의 링커 삽입 위치 3 혹은 4곳의 좌측으로부터 차례로 나타내고, 「/」을 사용해서 링커와 G 단백질 서열의 구분을 나타내고, 링커의 종류를 나타낸다. 그리고 명칭 말미에 아미노산 돌연변이, 예를 들면 「N191S」라고 하는 표기가 있으면, 서열번호 1의 191번째의 N이 S로 치환되어 있는 것을 나타낸다. 또, 명칭 말미에 있는 「Seq11」은 서열번호 11의 G단백 서열인 것을 나타낸다.

[0074] 이하, 본 발명이 호적한 실시형태에 대해서 이하에 상세하게 설명한다. 단, 본 발명은 이하의 실시형태에 한정되는 것은 아니다.

**(RSV F/G 키메라 백신)**

[0075] 본 실시형태에 따른 백신(RSV F/G 키메라 백신)은 RSV F 단백질을 기본 골격으로 해서, 당해 기본 골격의 일부를 RSV G 단백질의 CCD 서열의 전체 또는 그 일부로 치환, 또는 당해 기본 골격에 당해 CCD 서열의 전체 또는 그 일부를 부가한 재조합 RSV F/G 키메라 단백질을 항원으로 하는 제제이다. 여기에서, 「부가」에는 「삽입」의 의미가 포함되고, 「치환」 또는 「부가」는 기본 골격과의 사이에 링커를 통한 것 일 수도 있다. 링커의 아미노산 서열 일례로서, GGGGS(서열번호 5) 또는 EAAAK(서열번호 6)를 들 수 있다.

[0077] RSV F 단백질(기본 골격)에서의 G 단백질에 의한 치환 위치, 또는 G 단백질의 부가 위치로서는 F 단백질의 FP 도메인, F 단백질의 FP 도메인 및 p27 도메인(도 1의 RSV F/G-A), 구체적으로는, F 단백질의 137~146번 위치, F 단백질의 F1 도메인, 구체적으로는, F 단백질에 382~393번 위치(도 1의 RSV F/G-B) 또는 425~436번 위치(도 1의 RSV F/G-C), F 단백질의 C 말단(도 1의 RSV F/G-D)을 들 수 있다. 또, RSV F 단백질(기본 골격)에서의 G 단백질에 의한 치환 위치, 또는 G 단백질의 부가 위치로서는 단백질의 입체구조 상, 이미 알고 있는 에피토프로부터 떨어진 위치에 있는 장소일 수도 있고, 예를 들면 RSV F/G-A나 RSV F/G-D 등이 있다. 혹은, 단백질 항원으로서 눈에 띄는 위치(기지의 에피토프 등), 예를 들면 RSV F/G-B(Antigenic site I의 위치)나 RSV F/G-C(Antigenic site IV의 위치) 등일 수도 있다. 또, RSV F/G-B나 RSV F/G-C의 치환은 도 1에 기재된 아미노산 잔기 382-393, 425-436의 전체 또는 그 일부일 수도 있다.

[0078] RSV F/G 키메라 백신은 post F 단백질을 항원으로 하는 백신과 비교해서 뛰어난 감염 방어능을 가지고, pre F 단백질을 항원으로 하는 백신과 비교해서 동등 이상의 감염 방어능을 가진다. 놀랍게도, post F 단백질 및 pre F 단백질을 항원으로 하는 백신과 비교해서 상기 RSV F/G 키메라 단백질 백신은 백신 접종 후의 RSV 감염 악화

경향을 억제한다.

- [0079] 기본 골격으로 하는 RSV F 단백질의 서열은 공지 야생형 RSV주 혹은 임상 분리주 유래의 서열을 들 수 있다. 예를 들면, GenBank, European Bioinformatics Institute(EBI) 및 DNA Data Bank of Japan(DDBJ)의 데이터베이스에 등록된 서열일 수도 있다. RSV F 단백질이 대표적인 서열로서는 서열번호 1에 기재된 서열을 들 수 있다. RSV F 단백질은 N말단으로부터 차례로, SP도메인, F2도메인, p27 도메인, FP 도메인, F1 도메인, TM도메인, CT도메인으로 불리는 부위로 일반적으로 구성된다.
- [0080] RSV F/G 키메라 단백질의 일부가 되는 RSV G 단백질의 서열은 공지 야생형RSV주 혹은 임상 분리주 유래의 서열을 들 수 있다. 예를 들면, GenBank, European Bioinformatics Institute(EBI) 및 DNA Data Bank of Japan(DDBJ)의 데이터베이스에 등록된 서열일 수도 있다. RSV G 단백질이 대표적인 서열로서는 서열번호 2(Human respiratory syncytial virus A2, UniProtKB/Swiss-Prot: Accession No. P03423)에 기재된 서열을 들 수 있다. 또, RSV B주의 G단백 CCD가 대표적인 서열로서는 서열번호 11(Human respiratory syncytial virus B (strain B1), UniProtKB/Swiss-Prot: Accession No. O36633)에 기재된 서열 등이 있다.
- [0081] 본 발명에 의한 RSV F/G 키메라 단백질은 RSV F 단백질의 일부를 RSV G 단백질의 CCD 서열의 전체 또는 그 일부로 치환하거나, 또는 RSV F 단백질에 대해 CCD 서열의 전체 또는 그 일부를 부가하는 것에 의해 제작되지만, 여기에서 치환 또는 부가되는 RSV G 단백질의 CCD 서열의 전체 또는 그 일부는 RSV주 사이에서 고도로 보존되고 있는 RSV G 단백질의 CCD(RSV G 단백질의 아미노산 잔기 158~199)의 서열 중에서도, 특히 고도로 보존되고 있는 서열영역central conserved region(CCR) (RSV G 단백질의 아미노산 잔기 164~176)이나 CX3C 모티브(RSV G 단백질의 아미노산 잔기 182~186)을 포함하는 영역에 유래하는 서열, 예를 들면, RSV G 단백질의 아미노산 잔기 158~199에 유래하는 서열일 수 있다. 더 구체적으로는, 본 발명에서 CCD 서열의 전체 또는 그 일부는 예를 들면, 서열번호 2의 158~199번 위치의 서열, 162~197번 위치의 서열, 164~190번 위치의 서열, 164~186번 위치의 서열, 164~176번 위치의 서열, 173~197번 위치의 서열, 187~197번 위치의 서열, 173~186번 위치의 서열, 162~171번 위치의 서열, 162~172번 위치의 서열과 187~199번 위치의 서열을 연결한 것, 164~172번 위치의 서열과 187~197번 위치의 서열을 연결한 것, 162~172번 위치의 서열을 2~3개 연결한 것을 포함하는 것일 수도 있다(도 2~4). 본 발명에서 CCD 서열의 전체 또는 그 일부는, 상기 각종 서열을 포함하는 서열에 대해서, 75% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가지는 것 일 수도 있다. 또, F 단백질의 서열은 기지의 야생주에 따라서는 서열번호 1과 90% 정도 다른 것도 있다. 또, G 단백질의 CCD 서열은 바이러스주 사이에서 보존되고 있지만, CCD 서열 가운데 CCR 서열을 제외하는 부분은 기지의 야생주 및 임상 분리주 사이에서도 서열번호 2과 비교해서 75% 정도 다른 것도 있다. 또, RSV F 단백질은 N말단으로부터 차례로, SP 도메인, F2 도메인, p27 도메인, FP 도메인, F1 도메인, TM 도메인, CT 도메인으로 불리는 부위로 일반적으로 구성되지만, C 말단측의 TM 및 CT 도메인은 세포 외로 나와 있지 않는 영역이기 때문에 이것들의 도메인을 포함하지 않은 것일 수도 있다.
- [0082] 본 발명에 의한 RSV F/G 키메라 단백질은 또, RSV F 단백질에 당쇄 부가의 변형을 하는 것에 의해 발현량을 향상시킬 수 있다. 당쇄 부가의 변형은 아미노산 잔기 N (Asn)에 N형 당쇄가 부가, 아미노산 잔기T(Thr)/S(Ser)에 O형 당쇄가 부가하는 것일 수도 있다. 이 당쇄 부가의 변형을 위해서 RSV F 단백질에 개변(돌연변이)을 가할 수 있고, 개변 후의 아미노산 서열이, N(Asn)-a(Pro 이외의 아미노산)-T(Thr), 또는 N(Asn)-a(Pro 이외의 아미노산)-S(Ser)의 아미노산 서열 모티브를 포함하는 것일 수도 있다.
- [0083] 당쇄 부가의 변형을 위해서 RSV F 단백질에 개변(돌연변이)을 가하는 위치는, RSV F 단백질에 대한 모노클로날 항체 101F 등이 특이적으로 결합하는 siteIV span이라 불리는 RSV F 단백질의 422~468번 위치(비특허문헌 21, 22, 24)의 주변, 즉 RSV F 단백질의 419~468번 위치가 바람직하고, 더 바람직한 위치는 RSV F 단백질의 419~436번 위치의 어느 하나의 아미노산 잔기이다. 구체적으로는, 하기 (1) 내지 (7)의 어느 하나의 아미노산 잔기에 개변(돌연변이)을 가하는 것이 바람직하다:
- [0084] (1) G430T/S
- [0085] (2) K419N 및 K421T/S
- [0086] (3) K427N 및 R429T/S
- [0087] (4) T434N 및 S436T/S
- [0088] (5) K419N, K421T/S, 및 G430T/S

- [0089] (6) K419N, K421T/S, 및 K427N 및 R429T/S
- [0090] (7) K419N, K421T/S, 및 T434N 및 S436T/S
- [0091] 특히, 「K419N, K421T, K427N 및 R429T」, 「K419N, K421T 및 G430T」, 및 「K419N, K421T, T434N 및 S436T」의 돌연변이 도입에 의해 당체 부가의 변형을 가하는 것이 바람직하다.
- [0092] RSV F/G 키메라 백신은 대장균, 유산균, 효모, 식물세포, 곤충세포, 동물세포를 숙주로 하는 발현계 유래의 단백질 포함한다. 예를 들면, 대장균(*Escherichia coli*), 출아 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 효모(*Pichia pastoris*), 분열 효모(*Schizosaccharomyces pombe*), Sf9세포, Hi-5세포, Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포, Baby hamster kidney(BHK) 세포, C127 세포, NS0 세포, SP2 세포, MDCK 세포, EB66세포, Vero 세포, GL-37 세포, HT-1080 세포, HEK293 세포, 인간 림프아구 및 인간 정상 2배체 섬유아 세포를 숙주로 하는 발현계 유래의 단백질일 수 있다.
- [0093] RSV F/G 키메라 백신은 애주번트를 포함하는 것도 가능하다. 애주번트로서는 예를 들면, poly(I:C), MPL, RC529, GLA, E6020, 플라젤린, 이미퀴모드, R848, CpG ODN, QS21, TDB,  $\alpha$ -Galactosylceramide, 수산화 알루미늄, 인산 알루미늄, MF59, AS03, AF03, SE, 비로숨, AS01, AS02, AS04, AS15, GLA-SE, IC31, CAF01, ISCOMs 또는 그것들의 조합일 수 있다.
- [0094] RSV F/G 키메라 백신은 첨가제를 포함하는 것도 가능하다. 첨가제로서는 예를 들면, 아미노산, 당류, 계면활성제 또는 그것들의 조합일 수 있다.
- [0095] RSV F/G 키메라 백신의 제형은 예를 들면, 액상, 분말상(동결건조 분말, 건조 분말), 캡슐상, 정제 또는 동결 상태일 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0096] RSV F/G 키메라 백신은 의약으로서 허용될 수 있는 담체를 포함하는 것도 가능하다. 이러한 담체로서는 예를 들면, 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 등장 수성 완충액, 유화제, pH 조정제 또는 그것들의 조합일 수 있다.
- [0097] RSV F/G 키메라 백신의 투여방법은 시린지, 경피용 패치, 마이크로 니들, 이식 가능한 서방성 디바이스, 마이크로 니들이 장착된 시린지, 무바늘 장치, 경비용 스프레이, 경구, 또는 설하에 의해 투여하는 방법일 수 있다.
- [0098] RSV F/G 키메라 백신의 접종 대상이 되는 포유동물로서는 예를 들면, 마우스, 랫트, 모르모트, 햄스터, 토끼, 고양이, 개, 양, 돼지, 소, 말, 염소, 원숭이, 인간 등을 들 수 있다. 본 발명의 RSV F/G 키메라 백신은 인간에 대하여 사용하는 것이 가장 바람직하고, 성별을 가리지 않는 5세~64세의 사람에 부가해서, 임산부, 영유아, 5세 미만의 소아, 65세 이상의 성인에 대하여도 사용할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 RSV F/G 키메라 백신의 투여 횟수는 투여의 목적, 투여방법, 투여 대상의 상황(성별, 연령, 체중, 병세)에 따라 다르지만, 인간에 대하여 투여되는 경우, 1회, 2회 혹은 3회 투여될 수 있다.
- [0100] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이것들의 실시예에 조금도 한정되는 것은 아니다.
- [0101] **(실시예의 재료 및 방법)**
- [0102] **1. 클로닝, 플라스미드, 발현벡터의 구축**
- [0103] RSV F 단백질의 아미노산 잔기 1~524, flag 태그 및 his 태그를 포함하는 서열을 코딩하는 DNA 단편을 외주에 의해 작성했다. 이 프래그먼트 DNA를 주형으로 해서, 돌연변이 도입 프라이머 혹은 올리고 DNA 합성품을 사용해서 어셈블리 PCR을 실시하고, RSV WT F(비특허문헌 18에서 보고된 hRSV F 단백질의 아미노산 서열(CAA26143) 가운데, RSV F 단백질 1-513 아미노산 잔기를 사용해서 작성; 서열번호 1), RSV post F 단백질(특허문헌 4에 기재된 SEC ID No.1의 아미노산 서열 가운데, RSV F 단백질 1-513 아미노산 잔기를 사용해서 작성; 서열번호 3), RSV pre F 단백질(특허문헌 5에 기재된 SEC ID No.383의 아미노산 서열 가운데, RSV F 단백질 1-513 아미노산 잔기를 사용해서 작성; 서열번호 4. RSV pre F에 대해서는, 같은 특허문헌 기재된 서열에 포함되는 3량체화 서열, his 태그 서열 및 Strep 태그 서열을 포함하는 서열로 했다. 또, flag 태그 및 his 태그를 포함하는 서열을 포함하지 않는다.) 및 RSV F/G 키메라 단백질 각각을 포함하는 서열을 코딩하는 프래그먼트 DNA를 조제했다(RSV F 단백질은 서열번호 1을 골격으로 해서, RSV G 단백질의 서열번호 2의 CCD 또는 서열번호 11에 치환 또는 부가. 및 RSV F 단백질은 서열번호 1을 골격으로 해서, RSV G 단백질의 서열번호 2의 CCD의 일부 개변체에 치환 또는 부가). In-Fusion R HD Cloning Kit(Takara Bio Inc.)를 사용해서 프래그먼트 DNA와 SalI로 개열한

pCAGGS1.dhfr.neo 벡터(특허문헌 8, KM biologics Co., Ltd.)를 연결시키고, 동물세포 발현벡터를 제작했다. E. coli JM109 컴피던트 세포(TOYOBO사)를 사용해서 클로닝을 실시해 플라스미드 DNA 조제를 실시했다.

표 1

RSV WT F	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQEL DKYKNAVTELLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA KKTNTVLSKKRKRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEG EVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQL LPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT PVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS YSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNT KEGSNICLTRTDRGWFCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV FCDTMNSL.TLPSEVNL.CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNGCDYVSNKGV DTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL	서열번호1
----------	--	-------

[0104]

RSV G	MSKNKDQRTAKTLERTWDTLNLHLFISSCLYKLNLSVAQ ITLSILAMIHSTSLIAAIIFIASANHKVTPPTAJIQDATSQIKNT TPTYLTQNPQLGISPSNPSEITSQITILASTTPGVKSTLQST TVKTKNTTTTQTQPSKPTTKQRQNKPPSKPNDFHFEVF NFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTKPTKKPTLK TTKIDPKPQTTKSKEVPTTKPTEEPINTTKNIITLLTSN TTGNPELTSQMETFHSTSSSEGNPSPSQVSTTSEYPSQSSPP NTPRQ	서열번호2
RSV post F	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQEL DKYKNAVTELLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA KKTNTVLSKKRKRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEG EVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQL LPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT VSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYS IMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKE GSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC DTMNSL.TLPSEVNL.CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITS LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNGCDYVSNKGVDT VSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDA SISQVNEKINQSLAFIRKSDELL	서열번호3
RSV pre F	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQEL DKYKNAVTELLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA KKTNTVLSKKRKRFLGFLGVGSAIASGVAVCKVLHLEG EVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQL LPILNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT VSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYS IMCIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKE GSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC DTMNSL.TLPSEVNL.CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITS LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNGCDYVSNKGVDT VSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDA SISQVNEKINQSLAFIRKSDELL	서열번호4
GGGGS 링커	GGGGS	서열번호5
EAAAK 링커	EAAAK	서열번호6
RSVB G (158-199)	KPKDDYHFEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPSNKPKKKP T	서열번호11

[0105]

[0106]

2. 발현 및 정제

[0107] **2-1. 트랜스펙션**

[0108] Expi293 세포(Thermo Fisher Scientific)를  $7.5 \times 10^7$  viable cells이 되도록 튜브에 조제해서 원심 (1000rpm, 5분, 실온)을 실시했다. 상청액을 제거한 후, 미리 가온한 Expi293 Expression Medium 25.5ml에 현탁하고, 125 ml 플라스크에 세포를 옮겼다. 30 $\mu$ g의 플라스미드 DNA를 OPTI-MEM에 첨가해서 피펫팅에 의해 혼합한 용액과, 80  $\mu$ l의 ExpiFectamine293용액을 Opti-MEM에 첨가해서 실온에서 5분간 인큐베이션한 용액을 혼합하고, 실온에서 20 ~30분간 인큐베이션했다. 상기 DNA-Expi293 복합체를 전술의 Expi293 세포를 옮긴 플라스크에 적하했다. 37 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 8%, 125rpm의 조건하에서 CO2 인큐베이터(Thermo Fisher Scientific)를 사용해서 교반 배양했다. 트랜스펙션 으로부터 16~18시간 후, 150 $\mu$ l의 Transfection Enhancer1, 및 1.5ml의 Transfection Enhancer2를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 8%, 125rpm의 조건하에서 CO<sub>2</sub> 인큐베이터를 사용해서 교반 배양했다. 2~7일 배양 후에 하비스트 (harvest)하고, 원심 (2500rpm, 5분, 4 $^{\circ}$ C)한 후, 0.22 $\mu$ m 여과하고, 상청액 회수했다.

[0109] **2-2. 어피니티 정제**

[0110] Ni-NTA Agarose(QIAGEN N.V.)를 1ml 분주하고, D-PBS(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 5ml로 3회 세정했다. 상기 전처리를 한 Ni-NTA Agarose에 샘플을 첨가하고, 50ml 튜브에 회수했다. 4 $^{\circ}$ C에서 16~18시간 로테이트 (rotate)해서 칼럼으로 옮기고, D-PBS, Wash buffer 2(50mM Tris-HCl(pH7.4), 500mM NaCl, 25mM 이미다졸)로 세정했다. 그 후에 용출 버퍼(50mM Tris-HCl(pH7.4), 500mM NaCl, 25~500mM 이미다졸)을 첨가해서 용출한 분획을 회수했다. 단백 농도를 측정하고, 단백질 용출피크 샘플을 D-PBS로 투석 처리했다. 투석 회수 후, 0.22 $\mu$ m 필터로 여과했다.

[0111] **3. 애주번트**

[0112] 인산 알루미늄염인 Adju-Phos<sup>R</sup>(BRENNTAG)을 6 $\mu$ g/마리가 되도록 조제해서 사용했다.

[0113] **4. 세포**

[0114] Vero 세포, Hep-2 세포(CCL-23, ATCC), Expi293 세포(Expi293F<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific)는 제조업자 권장 의 방법으로 계대한 것을 각 시험 및 항원조제에 사용했다.

[0115] **5. 마우스**

[0116] SPF의 암컷 BALB/c 마우스(일본 SLC사)을 1주일 정도 순화시킨 후, 면역원성 시험 및 감염 방어 시험 등에 사용 했다.

[0117] **6. 바이러스**

[0118] RSV A2(VR-1540, ATCC)는 제조업자 권장의 방법으로 증식시켰다. 조제한 바이러스는 사용할 까지의 기간 -80 $^{\circ}$ C 에서 보관했다.

[0119] **7. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯**

[0120] **7-1. SDS-PAGE**

[0121] 샘플 버퍼와 DTT의 혼합액에 검체를 첨가하고, 가열처리(96 $^{\circ}$ C, 3~5분) 후, SDS-PAGE mini(TEFCO) 또는 BoltRBis-Tris겔(Thermo Fisher Scientific)로 SDS-PAGE를 실시했다. 전기영동 후, Bullet CBB Stain One(Nacalai Tesque, INC.)으로 염색하고, 탈이온수로 적당하게 탈색했다. LAS-3000(FUJIFILM Corporation) 또는 WSE-6100 LuminoGraphI(ATTO CORPORATION)로 겔을 촬영했다.

[0122] **7-2. 웨스턴 블롯**

[0123] 상기 방법으로 전기영동을 실시한 후, 멤브레인을 메탄올로 처리해서 Semi-Dry Blotting 장치를 사용해서 브로팅을 실시했다. 뽑아낸 멤브레인을 5% 스킴밀크로 30분간 블록킹했다. PBST로 세정한 후에, 희석한 항RSV F 항체와 멤브레인을 1시간 반응시켰다. PBST로 세정한 후에, 희석한 항 마우스 IgG 항체(Thermo Fisher Scientific)와 멤브레인을 1시간 반응시켰다. PBST로 세정한 후에, Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate(Takara Bio Inc.)와 멤브레인을 반응시켰다. LAS-3000(FUJIFILM Corporation)로 상기의 처리를 한 멤브레인을 촬영했다.

[0124] **8. 겔 여과 크로마토그래피(GFC)**

- [0125] 사이즈 배제 크로마토그래피를 사용해서 입자경 측정을 실시했다. Agilent 1200 Series(Agilent Technologies)의 시스템과 Superdex<sup>R</sup> 200 Increase 5/150 GL(GEhealth kea)의 칼럼을 사용해서 D-PBS로 희석 후 0.22 $\mu$ m 필터로 여과한 검체를 측정했다. 스탠더드는 Gel Filtration Standard(Bio-Red Laboratories, Inc.)를 사용하고, 분자량의 해석을 실시했다.
- [0126] **9. 동적 광산란법에 의한 입경 측정(DLS)**
- [0127] Zetasizer Nano(Malvern Panalytical)를 사용해서 각종 단백질의 입경 측정을 실시했다. 또, 측정방법은 메이커 설명서를 따라서 실시했다.
- [0128] **10. 전자현미경**
- [0129] 포화 초산 우라늄 및 2% PTA(인텟스텐산)에 의한 Negative 염색법으로 TecnaiG212 TWIN(FEI Company)을 사용해서 관찰을 실시했다.
- [0130] **11. ELISA**
- [0131] **11-1. 샌드위치 ELISA**
- [0132] D-PBS로 희석한 항RSV F 항체를 96well MAXSORP plate(Thermo Fisher Scientific)에 어플라이하고, 2~8℃에서 하룻밤 또는 37℃에서 1시간 정치(standing)했다. 항RSV F 항체를 고상화한 플레이트로부터 항체 희석액을 제거 후에 PBS로 세정하고, 1% BSA를 어플라이해서 1시간 정치했다. 블로킹액을 제거하고, 검체를 어플라이해서 밀폐한 후에 37℃에서 1시간 정치했다. 검체를 제거 후에 PBST로 플레이트를 세정하고, 1% BSA로 희석한 비오틴화 항RSV F 항체를 어플라이하고 밀폐한 후에 37℃에서 1시간 정치했다. 비오틴화 항RSV F 항체액을 제거 후에 PBST로 플레이트를 세정하고, 희석한 HRP표지 스트렙타아비딘(VECTOR Laboratories)을 어플라이해서 밀폐한 후에 37℃에서 1시간 정치했다. HRP표지 스트렙타아비딘 용액을 제거 후에 PBST로 세정하고, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate, Supersensitive, for ELISA-ready to use solution(Sigma-Aldrich Co., Ltd.)을 어플라이하고 실온에서 30분 정치했다. 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 플레이트에 어플라이하고, 발색을 정지한 후에 SPECTRAMAX190(Thermo Fisher Scientific)로 측정했다.
- [0133] **11-2. 간접 ELISA**
- [0134] D-PBS로 희석한 RSV F 단백질을 96well Pierce Nickel Coated Plate(Thermo Fisher Scientific)에 어플라이하고, 2~8℃에서 하룻밤 또는 37℃에서 1시간 정치했다. RSV F 단백질 희석액을 제거 후에 플레이트를 PBS로 세정하고, 1% BSA를 어플라이하고 1시간 정치했다. 블로킹액을 제거하고, 검체를 어플라이하고 밀폐한 후에 플레이트를 37℃에서 1시간 정치했다. 검체를 제거 후에 PBST로 플레이트를 세정하고, 1% BSA로 희석한 항 마우스 IgG HRP 표지항체 혹은 항 인간 IgG HRP 표지항체를 어플라이하고 밀폐한 후에 37℃에서 1시간 정치했다. HRP 표지항체 희석액을 제거 후에 플레이트를 PBST로 세정하고, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate, Supersensitive, for ELISA-ready to use solution(Sigma-Aldrich Co., Ltd.)을 어플라이하고 실온에서 30분간 정치했다. 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 플레이트에 어플라이하고, 발색을 정지한 후에 SPECTRAMAX190(Thermo Fisher Scientific)로 측정했다.
- [0135] **12. 리얼타임 PCR**
- [0136] **12-1. RNA 추출 및 cDNA 합성**
- [0137] 감염 방어 시험에서 회수한 BALF(기관지 폐포 세정액; Bronchoalveolar Lavage Fluid)를 원심(300g or 1500rpm) 후, 상청액을 회수했다. NucleoSpin R RNA Virus(MACHEREY-NAGEL)를 사용해서 상청액 150 $\mu$ l로부터 바이러스 RNA의 분리를 실시했다. 또 프로토콜은 제조업자 권장 방법으로 실시했다. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)을 사용해서 추출한 RNA로부터 cDNA 합성을 실시했다. 또 프로토콜은 제조업자 권장 방법으로 실시했다.
- [0138] **12-2. PCR**
- [0139] sense primer(RSVf-F, 서열번호 7), antisense primer(RSVf-R, 서열번호 8), MGB probe(RSVfA-TaqPf-FAM, [FAM] 및 [MGBEQ]의 변형을 포함하는 서열번호 9), Distilled Water(NIPPON GENE CO., LTD.) 및 검체를 혼합해서 검체용액으로 하고, standard DNA(서열번호 10)를 사용해서 102~107 copies가 되도록 조제해서 스탠더드 용액으로 했다. 또, 프라이머, 프로브 및 스탠더드 DNA는 비특히문헌 20을 참고로 해서 외주에 의해 제작했다. 리

얼타임 PCR은 <50℃, 2분>의 뒤, <95℃, 10분> → <95℃, 30초> → <60℃, 1분>의 사이클을 50회 실시했다. 스탠더드 용액의 증폭 곡선으로부터 검량선을 작성하고, 검체의 바이러스 카피 수를 산출했다.

표 2

sense primer (RSVf-F)	CARCAAAGTTAYTCTATCATGTC	서열번호7
antisense primer (RSVf-R)	GATCCTGCATTRTCACARTACCA	서열번호8
MGB probe (RSVfA-TaqPf-FAM)	TGTAGTACAATTRCCACT	서열번호9
standard DNA	TGTCCAACAATGTTCAAATAGTTAGACAGCAA AGTTACTCTATCATGTCCATAATAAAGAGGA AGTCTTAGCATATGTAGTACAATTACCACTAT ATGGTGTATAGATACACCCGTTGGAACTA CACACATCCCCCTATGTACAACCAACACAAA AGAAGGGTCCAACATCTGTTTAAACAAGAACTG ACAGAGGATGGTACTGTGACAATGCAGGATC AGTATCTTTCTTCCCACAAGCTGAAACATGTA	서열번호10
DNA 서열은 5' → 3' 방향으로 기재하고 있다. Y는 「C or T」, R은 「G or A」의 혼합염기를 나타낸다. 그리고, MGB probe(서열번호9)의 5'측에 표지 형광색소 [FAM], 3'측에 Minor Groove Binder(MGB)와 Eclipse 퀘차(EQ) [MGBEQ]가 수식되어 있다.		

[0140]

[0141] 13. 면역원성 시험

[0142] 6~7주령의 암컷 BALB/c에 5μg/마리가 되도록 조제한 검체를 3주 간격으로 2회 근육 내 투여한 후, 3주 후에 이소플루란 마취 하에서 전채혈했다. 혈청분리해서 혈청을 회수하고, 간접 ELISA에 의해 면역원성을 평가 후, 중화시험에서 중화능을 평가하고, 보체 의존성 중화시험에서 보체 의존성 중화능을 평가했다.

[0143] 14. 중화시험

[0144] Hep-2 세포를 2×10<sup>5</sup> cells/ml로 96 well plate에 파종하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 1일 배양했다. 배지에서 희석한 혈청과 RSV 희석액을 등량 혼합하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 1시간 정치했다. 플레이트의 배양 상층을 제거한 후, 혈청-RSV 반응액을 첨가하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 3~5일 배양했다. 반응액을 제거한 후, 플레이트를 PBS로 세정하고, 메탄올을 첨가해서 실온에서 30분간 정치했다. 메탄올을 제거해서 풍건한 후, 플레이트를 PBS로 세정하고, 항RSV F 항체 희석액을 어플라이한 후에 37℃에 1시간 정치했다. 항RSV F 항체 희석액을 제거한 후에 항 마우스 IgG Alexa488 표지항체(Abcam) 희석액을 어플라이하고 플레이트를 37℃에서 1시간 정치했다. 항 마우스 IgG Alexa488 표지항체(Abcam) 희석액을 제거한 후에 플레이트를 PBS로 세정하고, 희석한 Hoechst 33342 solution(DOJINDO LABORATORIES)을 어플라이하고 어두운 곳에서 10분간 정치했다. 핵염색제를 제거하고 PBS로 세정한 후, PBS를 플레이트에 어플라이하고 이미지 어날라이저로 해석했다. RSV만을 어플라이한 well의 감염율을 기준으로 해서, 혈청 희석 계열의 감염율을 바탕으로 피팅 가이드에 따라서 GraphPad Prism 7(GraphPad Software)을 사용해서 커브 피팅을 실시하고, 중화 항체가(IC50)를 산출했다.

[0145] 15. 보체 의존성 중화시험

[0146] 중화시험의 요령으로 세포를 조제한. RSV 희석에는 토기 혈청보체(Cedar lane) 1/50량을 포함하는 배지를 사용해서 조제한. 배지에서 희석한 혈청과 RSV 희석액을 등량 혼합하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 1시간 정치했다. 혈청-RSV 반응액을 첨가하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 1시간 배양한 후, 혈청-RSV 반응액을 제거해서 플레이트를 PBS로 세정하고, 보체를 첨가하지 않은 배지를 첨가하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 3~5일 배양했다. 기타의 조작 및 해석은 중화시험의 방법에 따라서 실시했다.

[0147] 16. 서브클래스 해석

- [0148] 2차 항체로서 항 마우스 IgG1 HRP 표지항체(Abcam) 및 항 마우스 IgG2a HRP 표지항체(Abcam)를 사용한 이외에는 간접 ELISA법과 동일한 순서로 실시했다.
- [0149] **17. 감염 방어 시험**
- [0150] 6~7주령의 암컷 BALB/c에 0.005~15 $\mu$ g/마리가 되도록 조제한 검체를 3주 간격으로 2회 근육 내 투여한 후, 3주 후에 이소플루란 마취 하에서 1 $\times$ 10<sup>5</sup> pfu/마리의 RSV를 경비 접종했다. 감염 3~4일 후, 이산화탄소 가스로 안락사시킨 후에 BALF를 회수했다. BALF로부터 RNA를 추출해서 cDNA를 합성하고, 리얼타임 PCR에 의해 바이러스 카피 수를 검출했다.
- [0151] **18. 감염 약화평가**
- [0152] 생리식염수를 면역해서 RSV 챌린지한 그룹의 BALF 중의 바이러스 카피 수의 기하 평균값을 기준으로 해서, 감염 약화 혹은 감염 억제율을 평가했다. 또, 생리식염수를 면역해서 수득된 혈청을 이입한 그룹을 기준으로 해서, RSV 챌린지한 그룹의 폐 중의 바이러스 카피 수의 기하 평균값을 평가했다. 또, 혈청 이입은 복강내 투여로 400 $\mu$ L/마리, 혈청은 미리 희석 계열을 작성해서 확인한 약화 피크가 되는 10<sup>8</sup> 희석한 각종 혈청을 사용했다. 혈청 이입 1일 후에, 이소플루란 마취 하에서 1 $\times$ 10<sup>5</sup> pfu/마리의 RSV를 경비 접종했다. 감염 3~4일 후, 이산화탄소 가스로 안락사시킨 후에 폐를 회수했다. 폐로부터 RNA를 추출해서 cDNA를 합성하고, 리얼타임 PCR에 의해 바이러스 카피수를 검출했다.
- [0153] **19. 통계해석**
- [0154] GraphPad Prism 7(GraphPad Software)을 사용해서 통계해석을 실시했다.
- [0155] **실시예 1**
- [0156] **RSV F/G 키메라 단백질의 조제**
- [0157] 도 1~4에 나타내는 각종 RSV F/G 키메라 단백질을 Expi293 세포로 발현시킨 뒤, 친화성 칼럼으로 정제했다. 각 단백질 수량을 도 5, 6에 나타냈다. 특정한 위치에 당쇄 부가하도록 돌연변이를 첨가한 단백질은, 당쇄 부가하지 않는 단백질과 비교해서 발현량이 높은 경향이 인정되었다. 구체적으로는, 「K419N, K421T 및 G430T」, 「K419N, K421T, T434N 및 S436T」 및 「K419N, K421T, K427N 및 R429T」의 돌연변이 도입에 의해 당쇄 부가한 F/G 키메라 단백질의 발현량이 증가했다.
- [0158] **실시예 2**
- [0159] **물성평가**
- [0160] **1. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯**
- [0161] 각 단백질을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯으로 해석한 결과를 도 7~15, 27~39에 나타냈다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯의 결과를 비교해서 메인 밴드가 RSV F/G 키메라 단백질인 것을 확인했다.
- [0162] RSV F/G 키메라 단백질 가운데, 바이러스주 사이에서 상동성이 높은 영역CCD의 서열 가운데, 특히 고도로 보존된 영역이며, 동시에 Cysteine noose(시스테인 잔기 173-186 사이 및 176-182 사이에서의 디설피이드 결합으로 형성되는 특징적인 구조)을 포함하지 않은 영역(164~171)을 포함하는 RSV G 단백질에 10아미노산 서열(162~171; 도 2의 No.9)로 치환한 RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2의 SDS-PAGE의 결과를 도 7에 나타낸다. 야생형 RSV F 단백질(593 aa)은 62kDa이고, 당 단백질인 RSV WT F 단백질(513 aa) 및 RSV post F 단백질(513 aa)이 추정 분자량 부근보다 높은 위치에 메인 밴드가 보이는 것을 확인했다. 또, RSV F/G 키메라 단백질(513 aa)의 메인 밴드가 WT 및 post F 단백질보다도 고위치에 위치하고 있는 것은 돌연변이 도입에 의해 당쇄 부가한 것에 의한 영향인 것으로 시사된다.
- [0163] 도 8~14에 각종 RSV F/G 단백질의 SDS-PAGE(비환원) 결과를 나타냈다. 발현량이 적기 때문에 어플라이량이 1 $\mu$ g/Lane 미만인 되어 있는 Sample에 대해서는 Lane No. 및 Sample를 회색으로 나타내고 있다. 도 1에 나타내는 위치에 당쇄 부가하는 돌연변이를 첨가하고 있지 않은 RSV F/G 키메라 단백질 가운데, RSV F/G-A-1-0, RSV F/G-A-2-0, RSV F/G-A-3-0, RSV F/G-A-4-0, RSV F/G-A-8-0, RSV F/G-A-5-0, RSV F/G-A-10-0, RSV F/G-A-11-0 및 RSV F/G-A-11/11-0은 메인 밴드를 확인할 수 없는, 강도가 낮은, 혹은 발현량이 낮다는 결과를 나타냈다. 또, 「K419N, K421T 및 G430T」의 돌연변이와 「K419N, K421T, T434N 및 S436T」의 당쇄 부가 돌연변이를 첨가한 RSV F/G-A-1-1, RSV F/G-A-1-2, RSV F/G-A-2-1, RSV F/G-A-2-2, RSV F/G-A-3-1, RSV F/G-A-3-2, RSV F/G-A-6-1,

RSV F/G-A-6-2, RSV F/G-A-7-1, RSV F/G-A-7-2, RSV F/G-A-8-1, RSV F/G-A-8-2, RSV F/G-A-5-1, RSV F/G-A-5-2, RSV F/G-A-9-1, RSV F/G-A-9-2, RSV F/G-A-10-1, RSV F/G-A-10-2, RSV F/G-A-11-1 및 RSV F/G-A-11-2는 메인 밴드 및 높은 발현량을 확인할 수 있었지만, 한편으로 「K421T 및 G430T」의 당쇄 부가 돌연변이를 첨가한 RSV F/G-A-1-3, RSV F/G-A-2-3, RSV F/G-A-9-3은 「K419N, K421T 및 G430T」의 돌연변이와 「K419N, K421T, T434N 및 S436T」의 당쇄 부가 돌연변이와 비교해서 메인 밴드 강도가 낮은, 혹은 발현량이 낮다는 결과를 나타냈다.

[0164] 2. 겔 여과 크로마토그래피 해석(GFC)

[0165] 겔 여과 크로마토그래피를 사용해서 각 단백질의 사이즈 해석을 실시했다. 표 3에 GFC의 결과를 나타냈다. RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2은 main peak로서 670kDa 이상의 사이즈(670kDa 이상이 되는 경우에는 외부 삽입값을 나타내고 있다), second peak로서 약 120 kDa의 사이즈의 단백질이 존재하고 있음을 알 수 있었다. 야생형 RSV F 단백질은 천연형 구조로서 3량체를 형성하는 것이 알려져 있고, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2도 동일하게 3량체를 형성하는 것으로 가정했을 경우, second peak의 분자량에 가깝기 때문에, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2도 동일하게 3량체를 형성하는 것이 시사되었다. 또, main peak가 670kDa 이상의 사이즈를 나타낸 것에 대해서는, 후술하는 전자현미경상과 같이, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2의 3량체가 로제트 유사 구조를 형성하는 것에 기인하는 것으로 시사된다.

표 3

GFC 결과 일람		
Sample	main peak (Mw.)	second peak
RSV pre F	307,507	1,086,954
RSV post F	1,219,027	—
RSV WT F	1,327,282	—
RSV F/G-A-1-0	1,150,389	—
RSV F/G-A-1-1	1,123,751	159,575

[0166]

RSV F/G-A-1-2	1,116,844	163,157
RSV F/G-A-1-3	1,170,420	—
RSV F/G-A-2-0	1,199,642	103,643
RSV F/G-A-2-1	1,211,534	140,716
RSV F/G-A-2-2	1,213,029	163,560
RSV F/G-A-2-3	1,141,909	137,627
RSV F/G-A-3-0	1,231,111	102,625
RSV F/G-A-3-1	1,238,725	—
RSV F/G-A-3-2	1,235,674	—
RSV F/G-A-3-3	1,205,574	135,606
RSV F/G-A-4-0	1,164,661	1,244
RSV F/G-A-4-1	1,170,420	1,118
RSV F/G-A-4-2	1,166,098	1,234
RSV F/G-A-6-0	1,070,990	112,291
RSV F/G-A-6-1	1,048,773	153,970
RSV F/G-A-6-2	1,055,259	151,896
RSV F/G-A-7-0	1,008,197	—
RSV F/G-A-7-1	1,076,285	139,163
RSV F/G-A-7-2	1,107,245	—
RSV F/G-A-8-0	1,156,077	2,204
RSV F/G-A-8-1	1,108,612	158,790
RSV F/G-A-8-2	1,119,601	158,595
RSV F/G-A-5-1	1,157,503	136,109
RSV F/G-A-5-2	1,151,808	138,821
RSV F/G-A-5-3	1,163,226	131,977
RSV F/G-A-9-0 Δ 136aa	1,177,658	122,263
RSV F/G-A-9-4 Δ 136aa	1,168,977	149,112
RSV F/G-A-9-1 Δ 136aa	1,147,555	166,202
RSV F/G-A-9-2 Δ 136aa	1,144,729	165,181
RSV F/G-A-9-3 Δ 136aa	1,158,931	157,620
RSV WT F-R136Q	1,158,931	127,184
RSV post F-R136Q	1,105,881	128,287
RSV F/G-A-9-0-R136Q	1,139,097	459,085
RSV F/G-A-9-0	1,182,022	100,126
RSV F/G-A-9-4	1,146,141	129,399
RSV F/G-A-9-3	1,176,207	139,507
RSV F/G-A-9-1	1,179,111	139,679
RSV F/G-A-9-2	1,167,537	139,335

[0167]

3. 동적 광산란법에 의한 입경 측정(DLS)

[0168]

[0169]

각 단백질을 동적 광산란법에서 입자경을 측정했다. 각 단백질의 평균 입자경을 표 4에 나타냈다.

표 4

DLS 결과 일람			
Sample	Peak	직경 (nm)	체적 (%)
RSV pre F	1	13.94	99.6
	2	491.5	0.2
	3	4668	0.2
RSV post F	1	37.31	99.0
	2	717.6	0.6
	3	4011	0.4
RSV F/G-A-9-1	1	29.81	99.7
	2	4013	0.3
	3	0.000	0.0
RSV F/G-A-9-2	1	29.58	99.8
	2	4190	0.2
	3	0.000	0.0

[0170]

[0171]

4. 전자현미경에 의한 해석

[0172]

RSV F/G 키메라 단백질의 형상을 전자현미경으로 관찰했다. 도 16에 RSV F/G-A-9-1, RSV F/G-A-9-2, RSV post F, RSV pre F의 전자현미경상을 나타냈다. RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2은 RSV post F와 동일한 로제트 유사 구조를 형성하는 것이 시사되었다.

[0173]

실시예 3

[0174]

항RSV F 항체와의 반응성 해석

[0175]

각 단백질과 항RSV F 항체와의 반응성(흡광도로 표시)을 간접 ELISA법에 의해 해석했다. RSV F 단백질의 site $\phi$ , siteI, siteII, siteIII, siteIV(비특허문헌 23) 각각의 부위에 특이적인 항RSV F 항체와의 해석결과를 도 17, 18, 40, 41에 나타냈다. 치환한 RSV G 단백질 서열 및 당쇄 부가의 돌연변이에 의해, 각종 항체와의 반응성에 차이가 인정되었다. siteIV 주변에 당쇄 부가의 돌연변이를 첨가한 단백질 중에는, 항RSV F siteIV 항체와의 반응성의 저감이 인정되었다. 우연하게도, RSV G 단백질로 치환한 RSV F/G 키메라 단백질 중에는 RSV WT F와 비교해서 RSV pre F 특이적인 항체와의 반응성이 증가한 것이 복수 인정되었다.

[0176]

실시예 4

[0177]

중화시험

[0178]

각 단백질을 면역해서 혈청을 취득하고, 중화시험을 실시했다. 또, 인산 수산화 알루미늄 애주번트인 Adju-Phos<sup>R</sup>(BRENNTAG)을 사용한 투여 그룹과 애주번트 없음 그룹을 설정해서 중화시험을 실시했다. 도 19에 중화시험 결과를 나타냈다. RSV G 단백질 서열을 포함하는 RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2는 RSV G 단백질 서열을 포함하지 않은 점만이 다른 RSV F/G-A-0-1 및 RSV F/G-A-0-2와 비교해서 중화 항체가(IC50, 기하 평균값)가 높은 경향이 인정되었다. 또, 중화 항체가(IC50, 기하 평균값)는 RSV pre F가 가장 높고, 이어서 RSV F/G-A-9-2, WT의 순이었다. RSV F/G-A-9-1은 RSV WT F와 동등 정도로, RSV F/G-A-0-1 및 RSV F/G-A-0-2은 RSV WT F를 하회하는 중화 항체가(IC50, 기하 평균값)를 나타냈다.

[0179]

실시예 5

[0180]

보체 의존성 중화시험

[0181]

실시예 4과 동일하게 해서 Adju-Phos<sup>R</sup>을 사용한 투여 그룹의 혈청을 취득하고, 보체 의존성 중화시험을 실시했다. 도 19에 나타내는 바와 같이, RSV pre F의 중화 항체가(IC50, 기하 평균값)는 RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2와 비교해서 높은 경향이 인정되지만, 도 20에 나타내는 보체 존재 하의 중화 항체가(IC50, 기하 평균값)에서는 반대로 RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2 쪽이, RSV pre F보다도 높은 결과였다. (Dunn의 다중비교검정, \*: p<0.05, n=5~8) 또, 도 42에 나타내는 바와 같이, RSV pre F와 비교해서 중화 항체가가 높은 RSV F/G

키메라 단백질이 다수 인정되었다.

[0182] 실시예 6

[0183] 서브클래스 해석

[0184] 실시예 4 및 실시예 5와 동일하게 해서 Adju-Phos<sup>R</sup>을 사용한 투여 그룹의 혈청을 취득하고, RSV pre F, RSV F/G-A-9-1, RSV F/G-A-9-2, 및 Saline 면역혈청 중에 존재하는 항RSV F 항체의 서브클래스 해석을 실시했다. 도 21에 서브클래스 해석결과를 나타냈다. RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2는 보체 결합능이 높은 IgG2a의 유도능이 높고, 한편 RSV pre F는 보체 결합능이 없는 IgG1의 유도능이 높다는 것을 알 수 있었다.

[0185] 실시예 7

[0186] 항RSV G 항체 유도능 평가

[0187] 실시예 4, 실시예 5 및 실시예 6와 동일하게 해서 Adju-Phos<sup>R</sup>을 사용한 투여 그룹의 혈청을 취득하고, RSV pre F, RSV F/G-A-9-1, RSV F/G-A-9-2, 및 Saline 면역혈청 중에 존재하는 항RSV G 항체의 유도능을 평가했다. 도 22에 항RSV G 항체 유도능 평가 결과를 나타냈다. RSV pre F 면역혈청과 비교해서 RSV F/G-A-9-1, RSV F/G-A-9-2 면역혈청 중에 RSV G 단백질과의 반응성이 높은 항체가 존재하는 것이 나타나고, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2에 의해 항RSV G 항체가 유도되는 것이 시사되었다.

[0188] 실시예 8

[0189] 감염 방어 시험

[0190] 각 단백질을 5 $\mu$ g/마리/회로 조제(애주번트 없음)해서 6주령의 암컷 BALB/c마우스에 3주 간격으로 2회 면역하고, 3주 후에 RSV에 감염시켰다. RSV 접종 3일 후에 BALF를 회수하고, RNA 추출 및 cDNA 합성을 실시하고, 리얼타임 PCR을 사용해서 바이러스 카피 수(기하 평균값)를 정량했다. 도 23에 RSV pre F, RSV WT F, RSV F/G-A-0-1 및 RSV F/G-A-0-2과 RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2과의 감염 방어 시험 결과를 나타냈다. RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2는 RSV pre F와 동등 정도의 바이러스 카피 수를 나타냈기 때문에, RSV pre F와 동일 정도의 감염 방어능이 있다고 시사되었다. 또, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2는 RSV G 단백질 서열을 포함하지 않은 RSV WT F, RSV F/G-A-0-1 및 RSV F/G-A-0-2과 비교해서 카피 수가 낮고, 감염 방어능이 높은 경향이 있다고 시사되었다(vs RSV pre F; Dunn의 다중비교검정, \*\*\*: p<0.002, \*: p<0.05, n=14~16). 도 24(좌)에 RSV post F와의 비교 결과, 도 24(우)에 FI-RSV와의 비교 결과를 나타냈다. RSV post F와의 비교에서는 15 $\mu$ g/마리/회의 면역 조건로 실시하고, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2가 RSV post F와 비교해서 유의하게 바이러스 카피수의 저감이 인정되었다(Dunn의 다중비교검정, \*\*\*: p<0.002, \*: p<0.05, n=8). FI-RSV와의 비교에서는 5 $\mu$ g/마리/회의 면역 조건으로 실시하고, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2가 FI-RSV와 비교해서 유의하게 바이러스 카피수의 저감이 인정되었다(Dunn의 다중비교검정, \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, n=7~8).

[0191] 실시예 9

[0192] 용량 의존성을 확인하기 위해서 RSV post F, RSV F/G-A-9-1, 및 RSV F/G-A-9-2의 면역 조건을 15, 5, 0.5, 0.05, 0.005 $\mu$ g/마리의 5용량으로 해서, 기타는 실시예 8과 동일한 방법으로 BALF 중의 바이러스 카피 수(기하 평균값)를 측정하고, 도 25에 결과를 나타냈다. RSV post F는 5 $\mu$ g/마리와 15 $\mu$ g/마리로 바이러스 카피 수가 변화되지 않은 것, 고용량역(15 $\mu$ g/마리)에서는 RSV F/G-A-9-1, 및 RSV F/G-A-9-2의 바이러스 카피 수가 RSV post F 보다도 저감하고 있고, 감염 방어능이 RSV post F를 상회하고 있는 것, 저용량 레인지(0.05, 0.005 $\mu$ g/마리)에서도, RSV F/G-A-9-1, 및 RSV F/G-A-9-2의 감염 방어능이 RSV post F를 상회하고 있는 것이 나타났다. 따라서 RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2의 최대 약효는 RSV post F를 상회하고, 최소 dose에서의 약효도 RSV post F를 상회하는 것이 시사되었다(에러 바: 95% 신뢰구간, n=8).

[0193] 실시예 10

[0194] 감염 억제율 평가

[0195] 감염 방어 시험의 결과로부터, Saline 그룹(항원을 면역하지 않는 control 그룹)의 바이러스 카피 수(기하평균)를 기준으로 해서, RSV F/G-A-9-1, RSV F/G-A-9-2, RSV post F, 및 RSV pre F의 감염 억제율을 산출했다(RSV F/G-A-9-1, RSV F/G-A-9-2 및 RSV post F의 면역 조건은 15, 5, 0.5, 0.05, 0.005 $\mu$ g/마리의 5용량, RSV pre F의 면역 조건은 0.5, 0.08, 0.008 $\mu$ g/마리의 3용량으로 실시). 도 26에 감염 억제율의 산출 결과를 나타낸

다. 악화 경향을 확인하기 위해서, 저용량 면역그룹을 설정한 바, Saline의 바이러스 카피 수와 비교해서, RSV pre F에서는 0.08 $\mu$ g/마리 이하, RSV post F에서는 0.005 $\mu$ g/마리로 높은 바이러스 카피수가 검출되어, 감염 악화 경향이 나타났다. 한편, RSV F/G-A-9-1 및 RSV F/G-A-9-2에서는 감염 악화 경향은 인정되지 않았다(에러 바: 95% 신뢰구간, n=4~8)

[0196] 실시예 11

[0197] 감염 악화평가

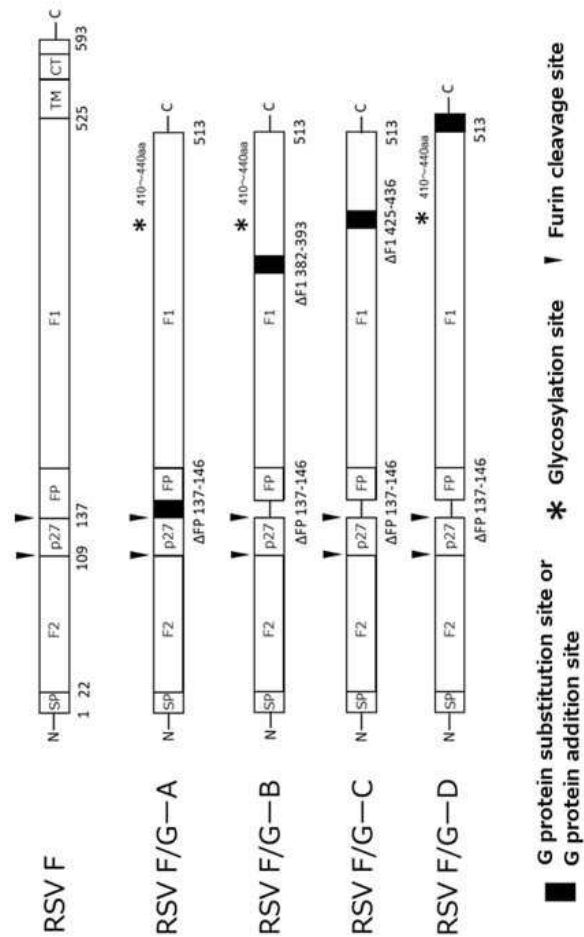
[0198] 면역혈청을 이입해서 수동 면역 후의 감염 악화를 평가했다. 도 43에 나타내는 바와 같이, RSV preF에서는 유의하게 감염 악화가 인정되었지만, RSV F/G-A-9-2에서는 감염 악화가 인정되지 않았다(Dunn의 다중비교검정, \*: p<0.05, 에러 바: 95% 신뢰구간, n=13).

[0199] (산업상의 이용 가능성)

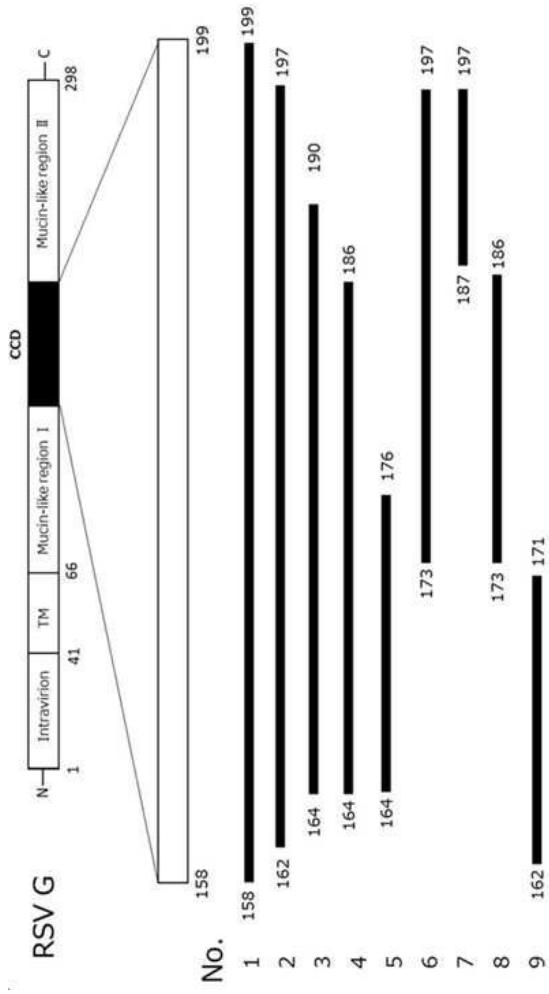
[0200] 본 발명은 의약품의 분야, 특히 백신의 분야에서 유용하다.

도면

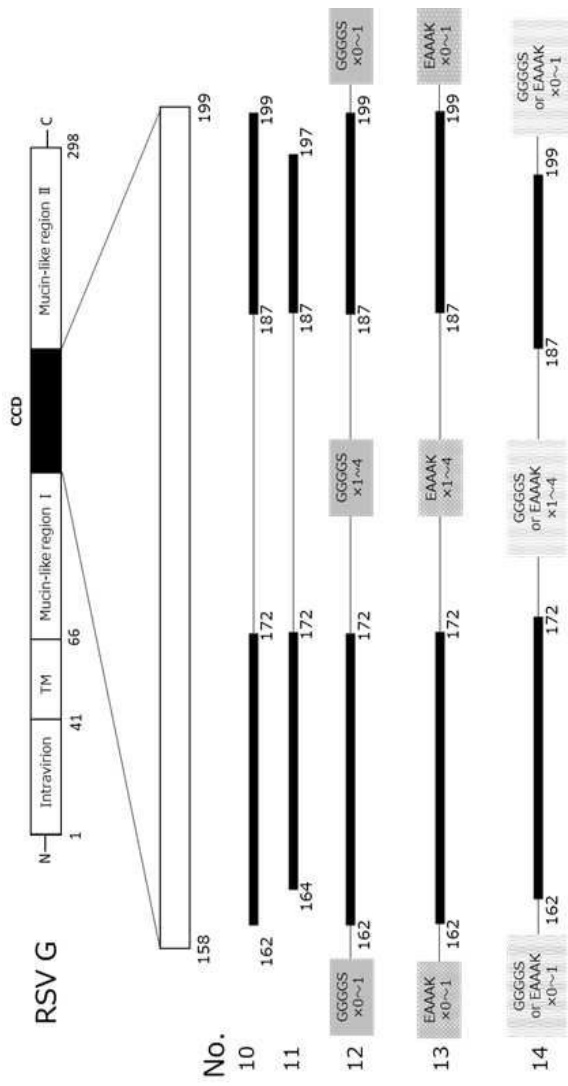
도면1



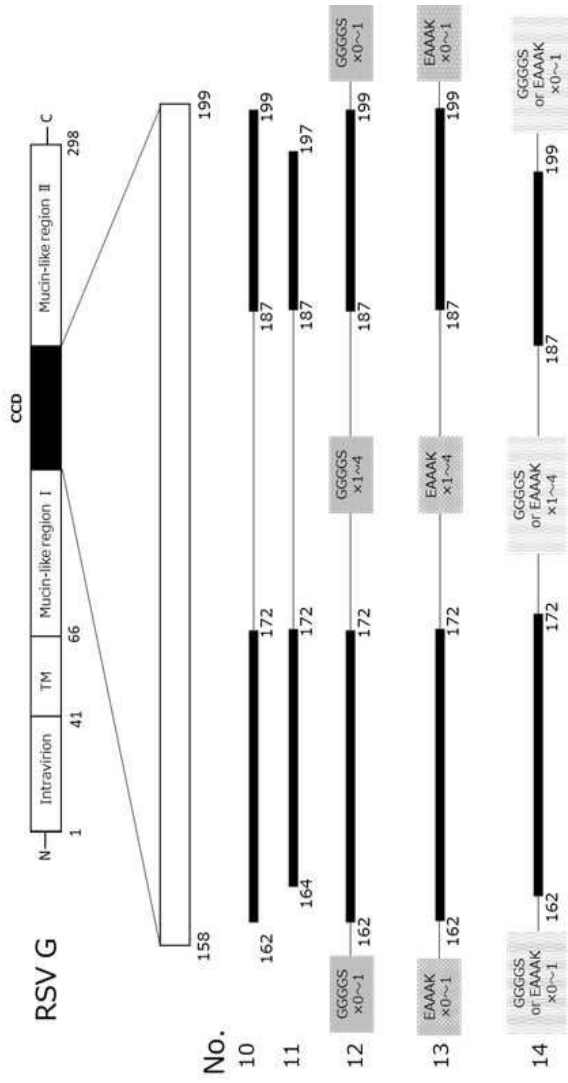
도면2



도면3



도면4



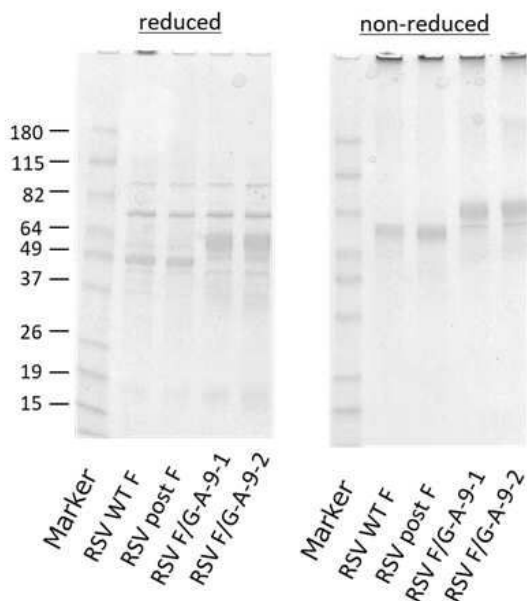
도면5

Protein names	Expression level (mg/L)
RSV F/G-A-1-0	1.67
RSV F/G-A-1-1	10.00
RSV F/G-A-1-2	9.00
RSV F/G-A-1-3	2.72
RSV F/G-A-2-0	3.50
RSV F/G-A-2-1	13.00
RSV F/G-A-2-2	10.00
RSV F/G-A-2-3	6.67
RSV F/G-A-3-0	10.50
RSV F/G-A-3-1	30.33
RSV F/G-A-3-2	29.33
RSV F/G-A-3-3	6.67
RSV F/G-A-4-0	0.55
RSV F/G-A-4-1	3.44
RSV F/G-A-4-2	2.12
RSV F/G-A-6-0	6.44
RSV F/G-A-6-1	23.23
RSV F/G-A-6-2	18.20
RSV F/G-A-7-0	10.40
RSV F/G-A-7-1	13.33
RSV F/G-A-7-2	15.47
RSV F/G-A-8-0	3.56
RSV F/G-A-8-1	18.23
RSV F/G-A-8-2	11.47
RSV F/G-A-5-0	0.67
RSV F/G-A-5-1	2.77
RSV F/G-A-5-2	1.40
RSV F/G-A-5-3	1.64
RSV F/G-A-9-0 Δ 136aa	7.33
RSV F/G-A-9-4 Δ 136aa	42.67
RSV F/G-A-9-1 Δ 136aa	35.67
RSV F/G-A-9-2 Δ 136aa	27.00
RSV F/G-A-9-3 Δ 136aa	4.17
RSV wt F R136Q	6.67
RSV post F R136Q	7.67
RSV F/G-A-9-0 R136Q	5.23
RSV F/G-A-9-0	2.47
RSV F/G-A-9-1	16.10
RSV F/G-A-9-2	14.30
RSV F/G-A-9-3	2.11
RSV F/G-A-9-4	15.80

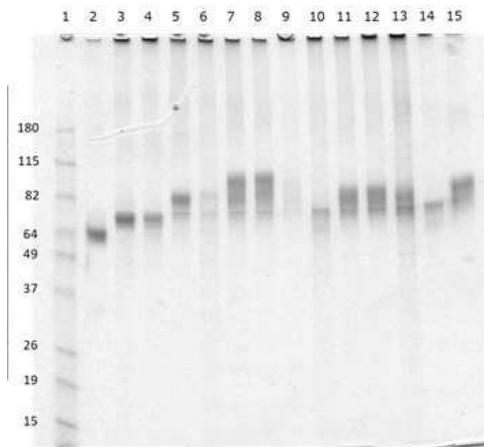
도면6

Protein names	Expression level (mg/L)
RSV F/G-A-10-0	3.64
RSV F/G-A-10-1	8.96
RSV F/G-A-10-2	11.85
RSV F/G-A-11-0	5.03
RSV F/G-A-11-1	11.14
RSV F/G-A-11-2	10.48
RSV F/G-A-10/10-0	2.44
RSV F/G-A-10/10-1	4.63
RSV F/G-A-10/10-2	3.50
RSV F/G-A-11/11-0	3.43
RSV F/G-A-11/11-1	7.00
RSV F/G-A-11/11-2	6.57
RSV F/G-A-12-0-010	8.57
RSV F/G-A-12-0-020	6.47
RSV F/G-A-12-0-030	9.14
RSV F/G-A-12-0-040	7.24
RSV F/G-A-13-0-020	9.50
RSV F/G-A-13-0-030	7.11
RSV F/G-A-13-0-040	4.43
RSV F/G-A-13-0-141	18.97
RSV F/G-A-12-0-111	7.71
RSV F/G-A-13-0-111	16.79
RSV F/G-A-14-0-G/EGE/G	8.64
RSV F/G-A-14-0-G/GEG/G	7.92
RSV F/G-A-14-0-G/EGEG/G	6.84
RSV F/G-A-14-0-G/GEEG/G	8.11
RSV F/G-A-14-0-E/GEG/E	9.72
RSV F/G-A-14-0-E/EGEG/E	11.00
RSV F/G-A-14-0-E/GEGE/E	9.50
RSV F/G-A-14-0-E/EGGE/E	15.32
RSV F/G-A-14-0-E/GEEG/E	18.20
RSV F/G-A-17-0-E/E/E/E	6.49
RSV F/G-A-17-0-E/G/G/E	5.60
RSV F/G-A-17-0-G/G/G/G	3.56
RSV F/G-A-18-0-G/E/E/G	2.07

도면7

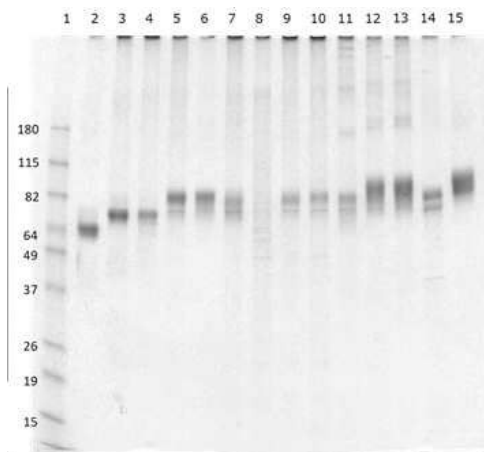


도면8



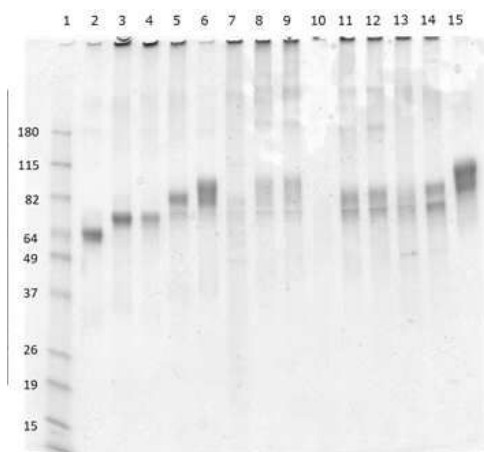
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV WT F
5	RSV F/G-A-9-2
6	RSV F/G-A-1-0
7	RSV F/G-A-1-1
8	RSV F/G-A-1-2
9	RSV F/G-A-1-3
10	RSV F/G-A-2-0
11	RSV F/G-A-2-1
12	RSV F/G-A-2-2
13	RSV F/G-A-2-3
14	RSV F/G-A-3-0
15	RSV F/G-A-3-1

도면9



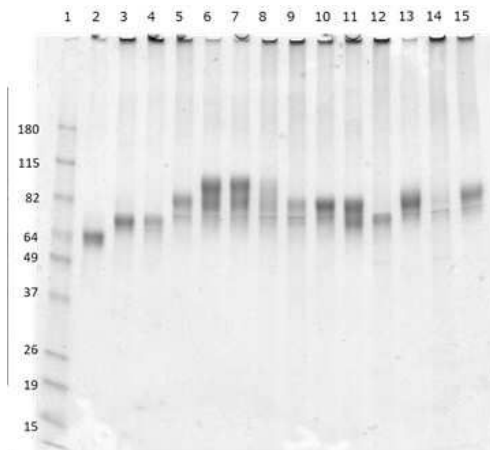
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV WT F
5	RSV F/G-A-9-2
6	RSV F/G-A-3-2
7	RSV F/G-A-3-3
8	RSV F/G-A-4-0
9	RSV F/G-A-4-1
10	RSV F/G-A-4-2
11	RSV F/G-A-6-0
12	RSV F/G-A-6-1
13	RSV F/G-A-6-2
14	RSV F/G-A-7-0
15	RSV F/G-A-7-1

도면10



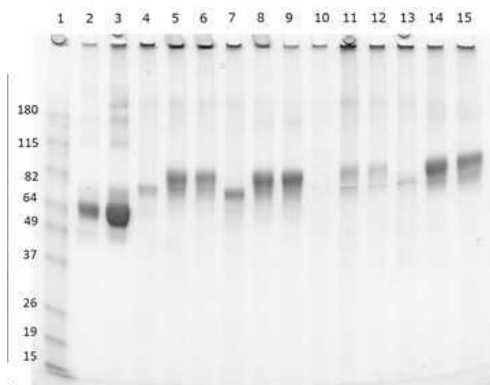
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV WT
5	RSV F/G-A-9-2
6	RSV F/G-A-7-2
7	RSV F/G-A-8-0
8	RSV F/G-A-8-1
9	RSV F/G-A-8-2
10	RSV F/G-A-5-0
11	RSV F/G-A-5-1
12	RSV F/G-A-5-2
13	RSV F/G-A-5-3
14	RSV F/G-A-9-0 Δ136aa
15	RSV F/G-A-9-4 Δ136aa

도면11



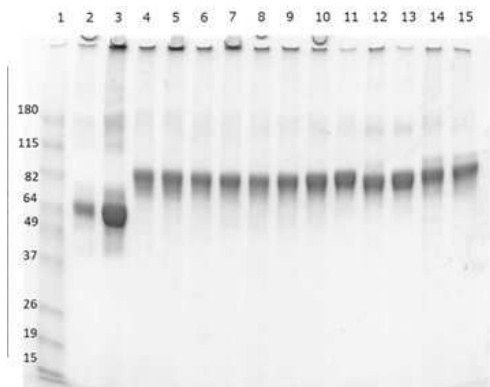
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV WT
5	RSV F/G-A-9-2
6	RSV F/G-A-9-1 Δ136aa
7	RSV F/G-A-9-2 Δ136aa
8	RSV F/G-A-9-3 Δ136aa
9	RSV WT F R136Q
10	RSV post F R136Q
11	RSV F/G-A-9-0 R136Q
12	RSV F/G-A-9-0
13	RSV F/G-A-9-4
14	RSV F/G-A-9-3
15	RSV F/G-A-9-1

도면12



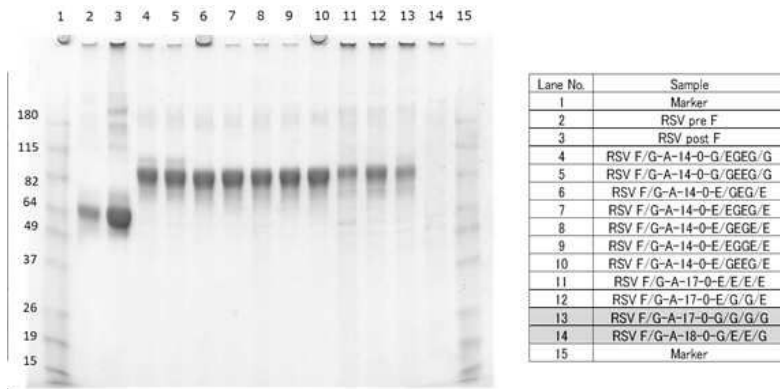
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-A-10-0
5	RSV F/G-A-10-1
6	RSV F/G-A-10-2
7	RSV F/G-A-11-0
8	RSV F/G-A-11-1
9	RSV F/G-A-11-2
10	RSV F/G-A-10/10-0
11	RSV F/G-A-10/10-1
12	RSV F/G-A-10/10-2
13	RSV F/G-A-11/11-0
14	RSV F/G-A-11/11-1
15	RSV F/G-A-11/11-2

도면13

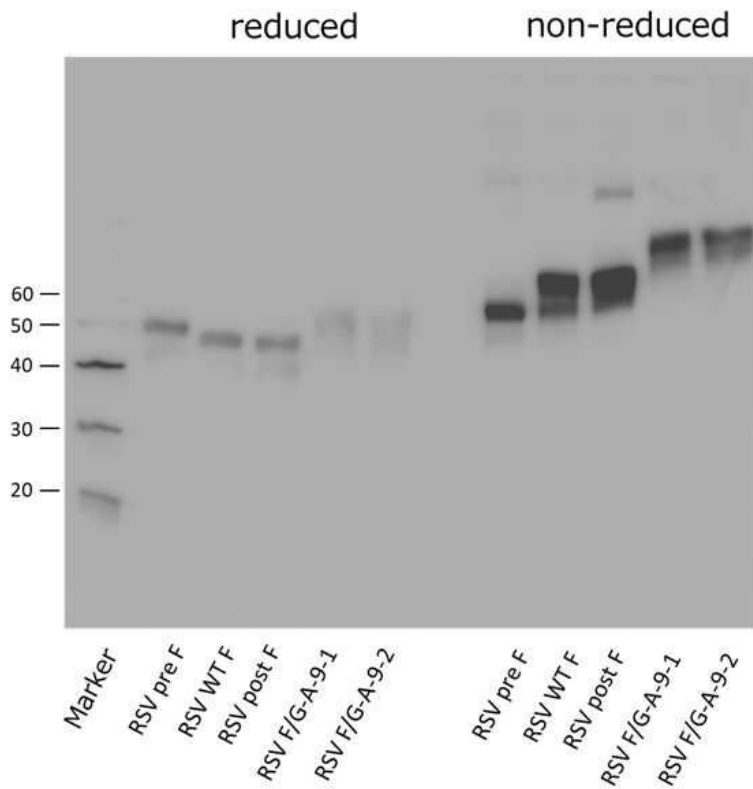


Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV-A-12-0-010
5	RSV-A-12-0-020
6	RSV-A-12-0-030
7	RSV-A-12-0-040
8	RSV-A-13-0-020
9	RSV-A-13-0-030
10	RSV-A-13-0-040
11	RSV-A-13-0-141
12	RSV-A-12-0-111
13	RSV-A-13-0-111
14	RSV-A-14-0-G/EGE/G
15	RSV-A-14-0-G/GEG/G

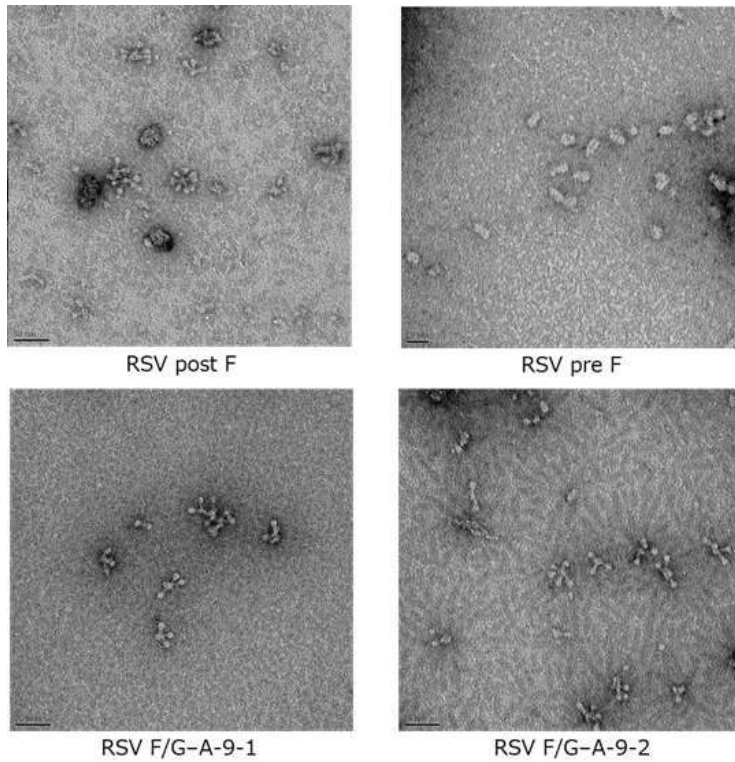
도면14



도면15



도면16



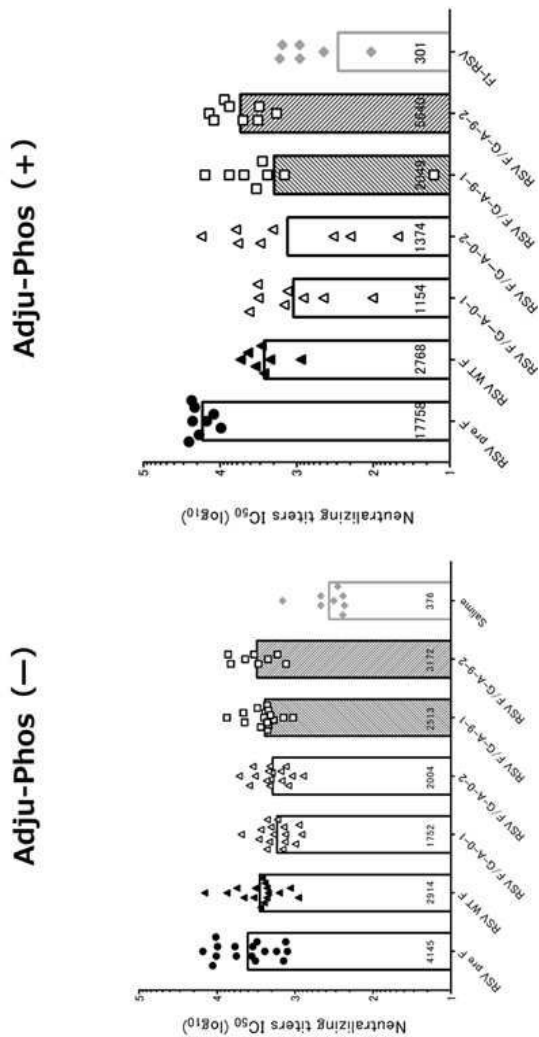
도면17

Protein names	Absorbance (antigeninc site mAbs)				
	site I	site II	site III	site IV	site V
RSV F/G-A-1-0	3.60	1.06	2.18	1.35	1.21
RSV F/G-A-1-1	3.43	1.75	2.94	1.82	0.68
RSV F/G-A-1-2	3.57	1.67	3.00	1.78	1.11
RSV F/G-A-1-3	3.37	0.37	1.34	1.18	0.07
RSV F/G-A-2-0	3.56	1.22	2.36	1.51	1.58
RSV F/G-A-2-1	2.90	1.59	2.88	1.70	0.07
RSV F/G-A-2-2	2.78	1.61	3.00	1.75	0.59
RSV F/G-A-2-3	3.46	0.79	2.46	1.48	0.10
RSV F/G-A-3-0	2.36	1.97	3.14	1.98	3.56
RSV F/G-A-3-1	2.01	1.96	2.98	1.84	0.06
RSV F/G-A-3-2	2.05	1.85	2.92	1.80	1.39
RSV F/G-A-3-3	1.53	1.00	1.97	1.35	0.05
RSV F/G-A-4-0	0.09	0.14	0.04	0.18	0.14
RSV F/G-A-4-1	0.20	1.04	1.44	0.47	0.05
RSV F/G-A-4-2	0.26	0.89	1.45	0.59	0.21
RSV F/G-A-6-0	3.63	1.98	3.36	1.66	3.52
RSV F/G-A-6-1	3.63	1.99	3.18	2.06	0.09
RSV F/G-A-6-2	3.53	1.82	3.26	1.95	1.45
RSV F/G-A-7-0	3.10	2.04	3.17	1.84	3.52
RSV F/G-A-7-1	3.06	1.85	3.24	1.91	0.07
RSV F/G-A-7-2	2.67	1.79	3.09	1.92	2.21
RSV F/G-A-8-0	2.21	0.78	0.93	1.05	1.32
RSV F/G-A-8-1	2.17	1.39	2.45	1.48	0.08
RSV F/G-A-8-2	2.02	1.32	2.19	1.25	0.49
RSV F/G-A-5-1	1.72	0.95	1.57	1.27	0.09
RSV F/G-A-5-2	1.72	0.79	1.64	1.16	0.29
RSV F/G-A-5-3	2.04	0.33	0.60	0.68	0.09
RSV F/G-A-9-0 Δ136aa	2.37	1.70	2.72	1.69	3.17
RSV F/G-A-9-4 Δ136aa	2.08	1.79	2.91	1.94	0.13
RSV F/G-A-9-1 Δ136aa	2.38	1.75	3.07	2.16	0.08
RSV F/G-A-9-2 Δ136aa	2.27	1.88	3.11	2.21	1.46
RSV F/G-A-9-3 Δ136aa	2.05	1.10	2.09	1.45	0.10
RSV wt F R136Q	1.84	1.00	1.30	1.57	1.80
RSV post F R136Q	0.25	1.87	2.61	2.15	3.52
RSV F/G-A-9-0 R136Q	3.51	2.09	3.37	2.30	3.68
RSV F/G-A-9-0	0.62	0.53	1.25	0.89	0.81
RSV F/G-A-9-4	1.19	1.44	2.10	1.51	0.09
RSV F/G-A-9-3	0.28	0.25	0.32	0.51	0.10
RSV F/G-A-9-1	0.42	1.51	2.05	0.98	0.10
RSV F/G-A-9-2	0.42	1.43	2.27	0.98	0.47
RSV pre F	3.75	1.30	3.65	2.65	3.57
RSV post F	0.15	1.85	2.28	1.92	2.21
RSV wt F	0.52	1.47		1.25	1.38
Saline	0.05	0.06		0.10	0.09

도면18

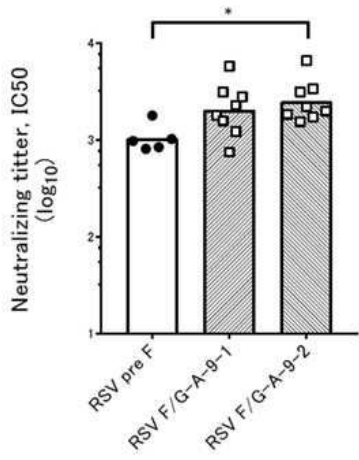
Protein names	Absorbance (antigeninc site mAbs)				
	site I	site II	site III	site IV	site V
RSV F/G-A-10-0	3.48	1.74	2.89	2.17	3.45
RSV F/G-A-10-1	3.56	2.06	3.13	2.16	0.09
RSV F/G-A-10-2	3.14	2.00	3.15	1.88	2.86
RSV F/G-A-11-0	3.45	2.38	3.09	2.15	3.64
RSV F/G-A-11-1	3.00	2.23	3.20	2.16	0.09
RSV F/G-A-11-2	2.96	2.15	3.21	1.92	3.46
RSV F/G-A-10/10-0	2.76	0.28	0.30	0.79	1.00
RSV F/G-A-10/10-1	3.48	1.12	2.09	1.83	0.10
RSV F/G-A-10/10-2	3.50	0.94	2.60	2.07	1.47
RSV F/G-A-11/11-0	3.47	1.40	2.40	2.07	3.37
RSV F/G-A-11/11-1	3.62	1.70	3.43	2.51	0.09
RSV F/G-A-11/11-2	3.49	1.67	3.40	2.55	3.33
RSV F/G-A-12-0-010	3.40	1.85	3.29	2.35	3.35
RSV F/G-A-12-0-020	3.30	1.69	3.33	2.26	3.35
RSV F/G-A-12-0-030	3.35	1.79	3.09	2.03	3.39
RSV F/G-A-12-0-040	3.39	1.86	3.18	2.07	3.32
RSV F/G-A-13-0-020	3.72	1.94	3.20	2.39	3.36
RSV F/G-A-13-0-030	3.61	2.01	3.07	2.32	3.94
RSV F/G-A-13-0-040	4.00	1.83	3.35	2.27	3.52
RSV F/G-A-13-0-141	3.55	1.76	3.36	2.00	3.44
RSV F/G-A-12-0-111	3.50	1.75	3.13	2.26	3.88
RSV F/G-A-13-0-111	3.73	2.00	3.17	2.13	3.54
RSV F/G-A-14-0-G/EGE/G	3.56	1.90	3.16	2.32	3.20
RSV F/G-A-14-0-G/GEG/G	3.51	2.05	3.24	2.48	3.72
RSV F/G-A-14-0-G/EGEG/G	3.68	1.91	3.06	2.22	3.49
RSV F/G-A-14-0-G/GEEG/G	3.66	2.02	3.00	2.32	3.55
RSV F/G-A-14-0-E/GEG/E	3.65	1.96	2.97	2.35	3.63
RSV F/G-A-14-0-E/EGEG/E	3.47	1.91	2.87	2.26	3.60
RSV F/G-A-14-0-E/GEGE/E	3.56	1.74	2.93	2.31	3.52
RSV F/G-A-14-0-E/EGGE/E	3.52	1.80	2.99	2.26	3.63
RSV F/G-A-14-0-E/GEEG/E	3.58	1.83	3.05	2.24	3.58
RSV F/G-A-17-0-E/E/E/E	3.55	1.55	2.66	2.23	2.65
RSV F/G-A-17-0-E/G/G/E	3.47	1.80	2.84	2.43	2.66
RSV F/G-A-17-0-G/G/G/G	3.74	1.21	2.45	2.39	2.60
RSV F/G-A-18-0-G/E/E/G	0.10	0.06	0.05	0.12	0.10
RSV pre F	3.58	1.65	3.04	2.77	3.82
RSV wt F	0.57	1.46	2.07	1.22	3.45
RSV post F	0.15	1.76	2.21	1.55	3.41
RSV F/G-A-9-2	0.73	1.31	1.82	1.19	1.00
Saline	0.08	0.10	0.06	0.13	0.11

도면19

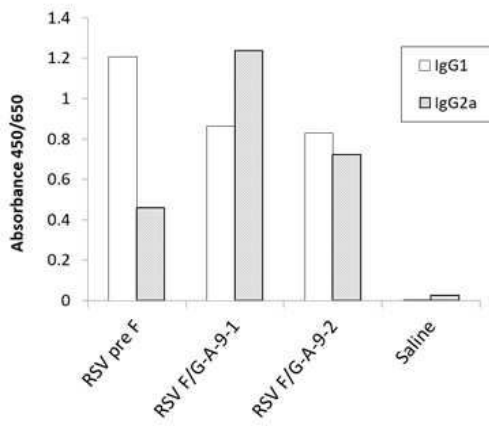


도면20

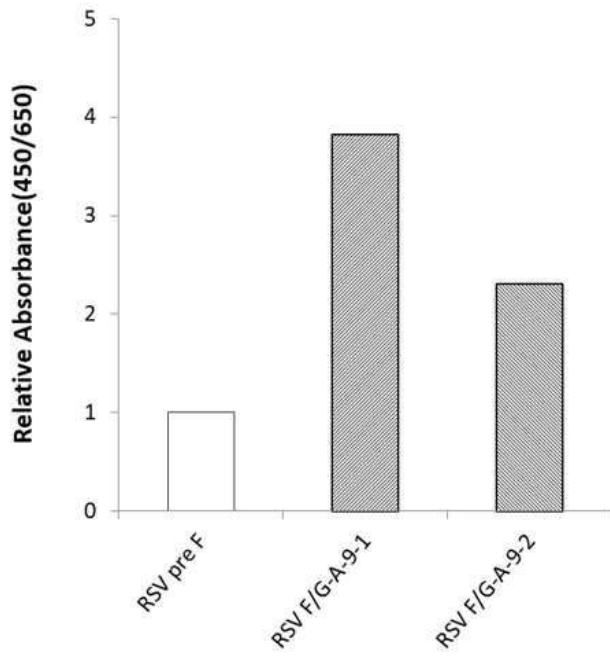
Neutralizing antibody value  
(in presence of complement)



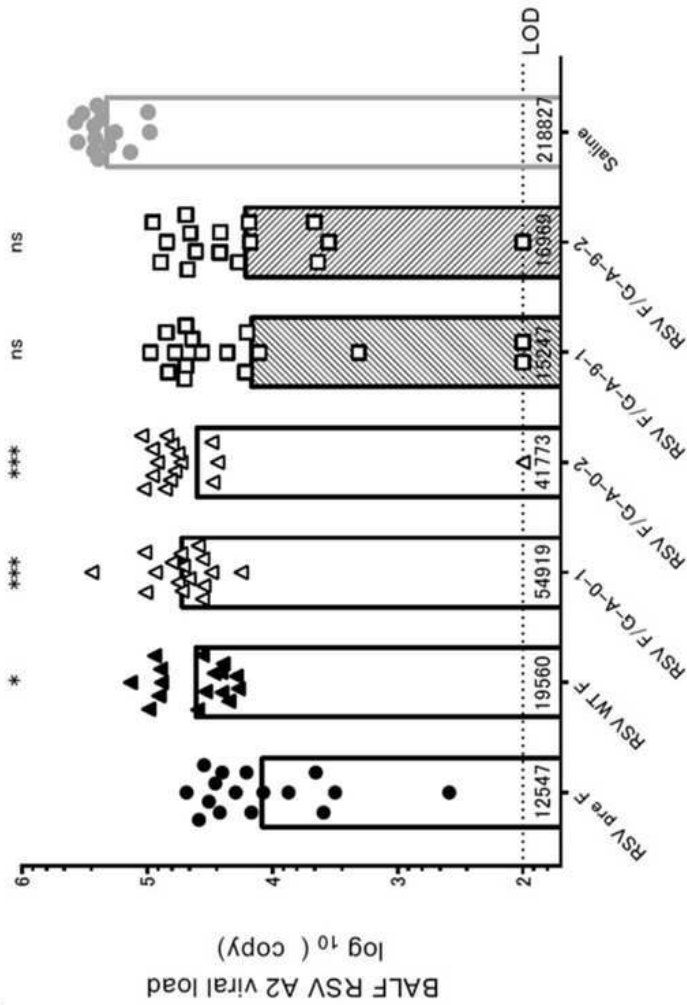
도면21



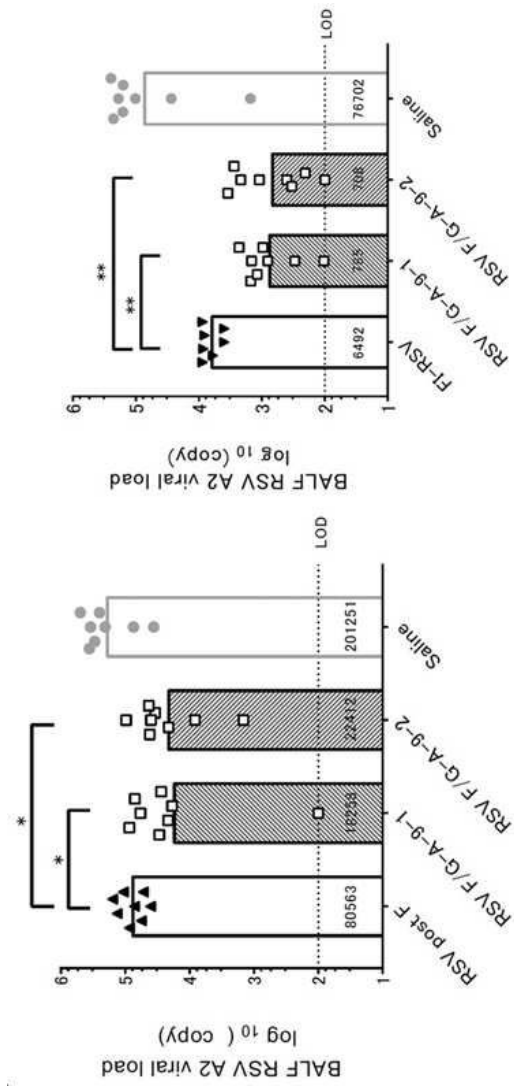
도면22



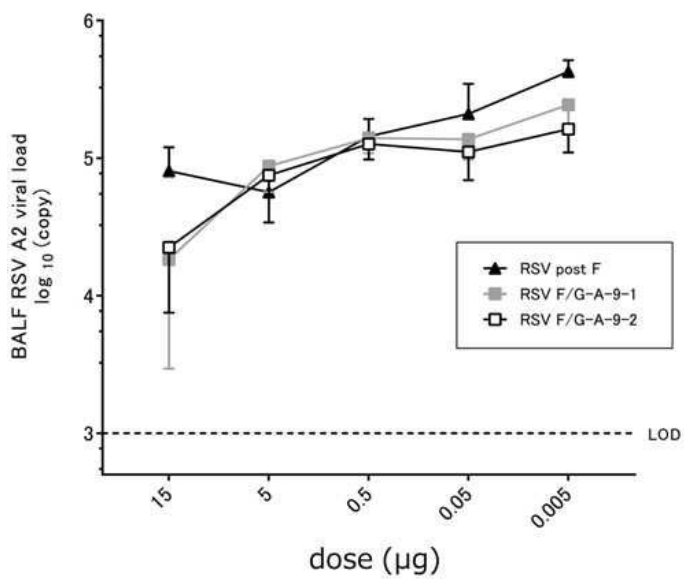
도면23



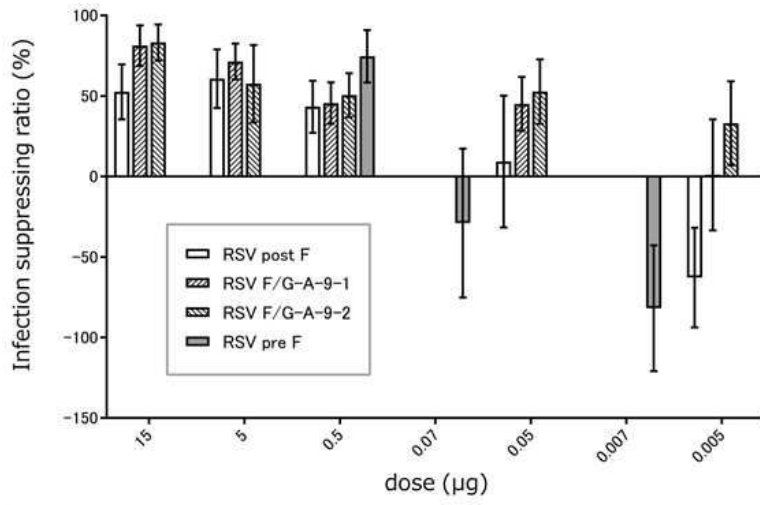
도면24



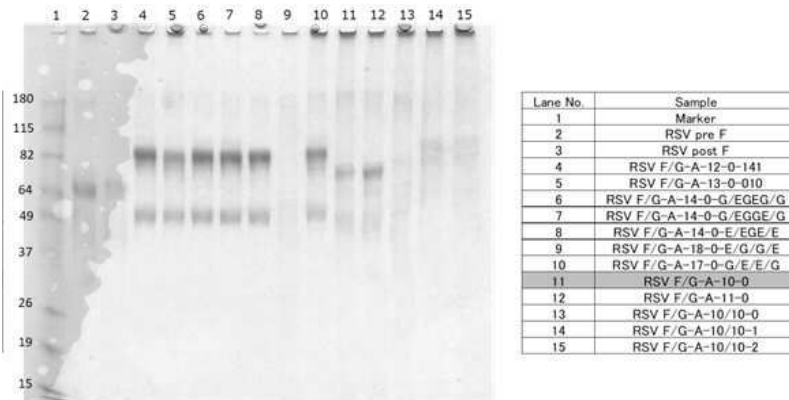
도면25



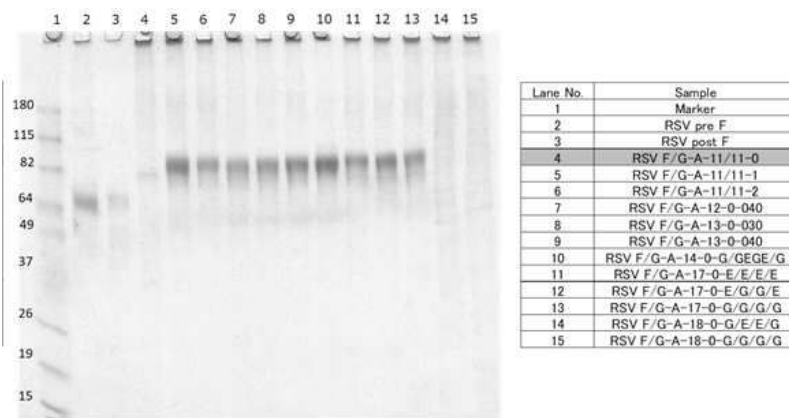
도면26



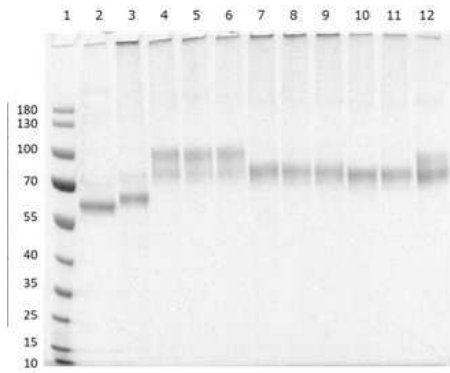
도면27



도면28

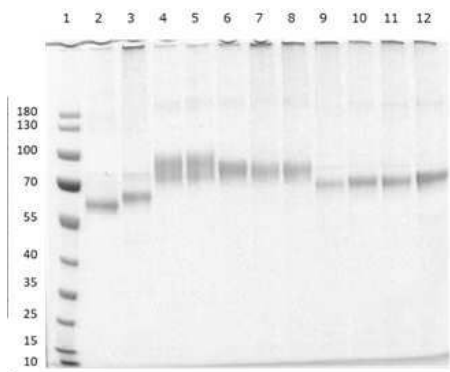


도면29



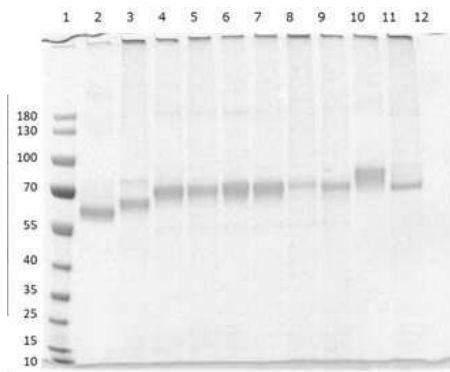
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-A-1-2 seq11
5	RSV F/G-A-1-2 N191S
6	RSV F/G-A-1-2 K197R
7	RSV F/G-A-2-2 seq11
8	RSV F/G-A-2-2 N191S
9	RSV F/G-A-2-2 K197R
10	RSV F/G-A-9-2 seq11
11	RSV F/G-A-9-2 D162H
12	RSV F/G-A-7-2 seq11

도면30



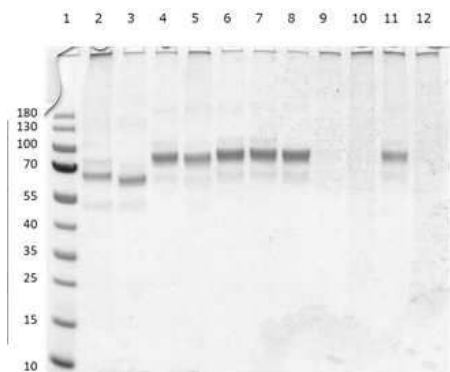
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-A-7-2 N191S
5	RSV F/G-A-7-2 K197R
6	RSV F/G-A-10-2 seq11
7	RSV F/G-A-10-2 D162H/N191S
8	RSV F/G-A-10-2 D162H/K197R
9	RSV F/G-A-12-0-010 seq11
10	RSV F/G-A-13-0-010 seq11
11	RSV F/G-A-12-0-111 seq11
12	RSV F/G-A-13-0-111 seq11

도면31



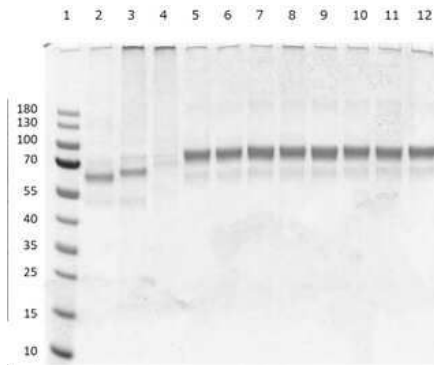
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-A-14-0-G/EGE/G seq11
5	RSV F/G-A-14-0-E/GEG/E seq11
6	RSV F/G-A-14-0-E/EGGE/E seq11
7	RSV F/G-A-14-0-E/GEEG/E seq11
8	RSV F/G-A-17-0-E/E/E/E seq11
9	RSV F/G-A-17-0-E/G/G/E seq11
10	RSV F/G-A-12-2-010 seq11
11	RSV F/G-D-1-0
12	-

도면32



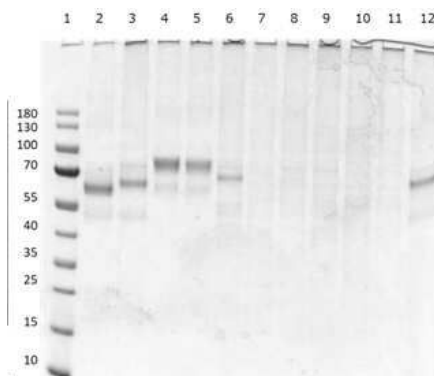
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-A-12-0-141
5	RSV F/G-A-13-0-010
6	RSV F/G-A-14-0-G/EGEG/G
7	RSV F/G-A-14-0-G/EGGE/G
8	RSV F/G-A-14-0-E/EGE/E
9	RSV F/G-A-18-0-E/E/E/E
10	RSV F/G-A-18-0-E/G/G/E
11	RSV F/G-A-17-0-G/E/E/G
12	RSV F/G-A-18-0-G/G/G/G

도면33



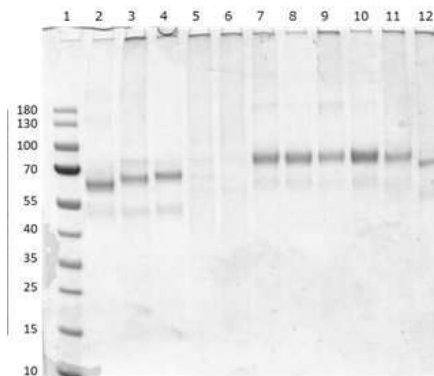
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-A-17-0-G/G/G seq11
5	RSV F/G-A-13-2-010 seq11
6	RSV F/G-A-12-2-111 seq11
7	RSV F/G-A-13-2-111 seq11
8	RSV F/G-A-14-2-G/EGE/G seq11
9	RSV F/G-A-14-2-E/GEG/E seq11
10	RSV F/G-A-14-2-E/EGGE/E seq11
11	RSV F/G-A-14-2-E/GEEG/E seq11
12	RSV F/G-A-17-2-E/E/E/E seq11

도면34



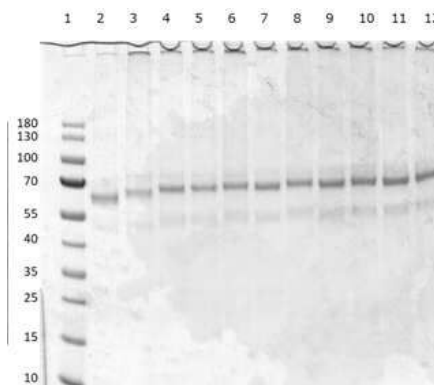
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-A-17-2-E/G/G/E seq11
5	RSV F/G-A-17-2-G/G/G/G seq11
6	RSV F/G-D-1-0 seq11
7	RSV F/G-D-2-0
8	RSV F/G-D-2-0 seq11
9	RSV F/G-D-3-0
10	RSV F/G-D-4-0
11	RSV F/G-D-5-0
12	RSV F/G-D-6-0

도면35



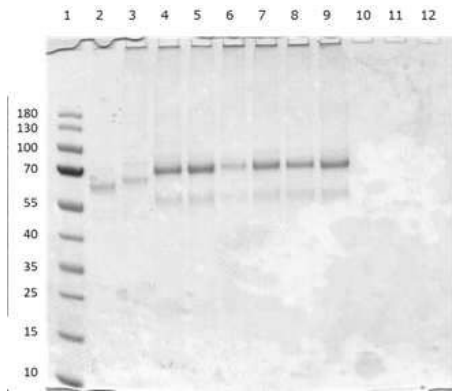
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-D-7-0
5	RSV F/G-D-8-0
6	RSV F/G-D-9-0
7	RSV F/G-D-1-2
8	RSV F/G-D-1-2 seq11
9	RSV F/G-D-2-2
10	RSV F/G-D-2-2 seq11
11	RSV F/G-D-9-2
12	RSV F/G-D-10-0

도면36



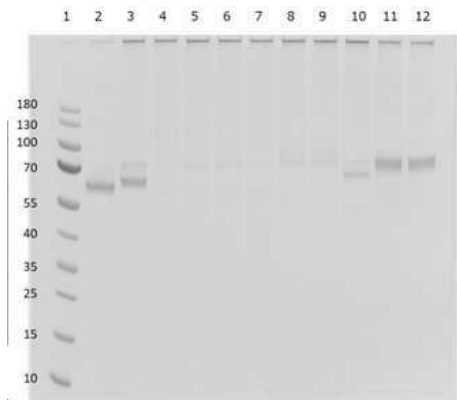
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-D-11-0
5	RSV F/G-D-12-0-010
6	RSV F/G-D-12-0-040
7	RSV F/G-D-13-0-010
8	RSV F/G-D-13-0-040
9	RSV F/G-D-14-0-G/G/G
10	RSV F/G-D-14-0-E/E/E
11	RSV F/G-D-14-0-G/GEG/G
12	RSV F/G-D-14-0-G/EGE/G

도면37



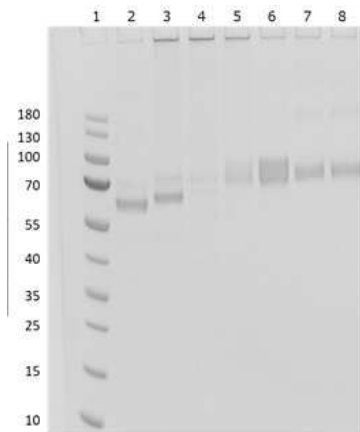
Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-D-14-0-E/EGE/E
5	RSV F/G-D-14-0-E/EGE/E
6	RSV F/G-D-14-0-E/EGE/E
7	RSV F/G-D-14-0-E/EGE/E
8	RSV F/G-D-14-0-E/EGE/E
9	RSV F/G-D-14-0-E/EGE/E
10	-
11	-
12	-

도면38



Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-AD-9/9-0
5	RSV F/G-AD-9/9-1
6	RSV F/G-AD-9/9-2
7	RSV F/G-AD-7/9-0
8	RSV F/G-AD-7/9-1
9	RSV F/G-AD-7/9-2
10	RSV F/G-AD-9/7-0
11	RSV F/G-AD-9/7-1
12	RSV F/G-AD-9/7-2

도면39



Lane No.	Sample
1	Marker
2	RSV pre F
3	RSV post F
4	RSV F/G-AD-7/7-0
5	RSV F/G-AD-7/7-1
6	RSV F/G-AD-7/7-2
7	RSV F/G-B-8-1
8	RSV F/G-B-8-2

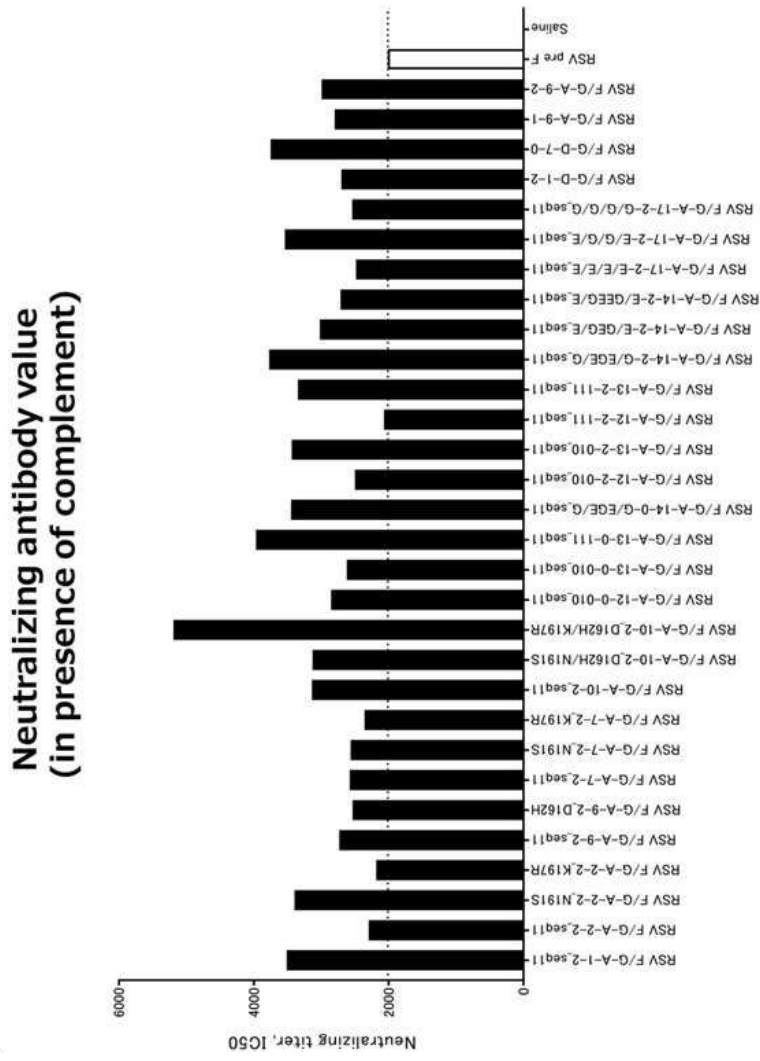
도면40

Protein names	Absorbance (antigenic site mAbs)				
	siteΦ	site I	site II	siteIII	siteIV
RSV F/G-A-1-2 seq11	0.84	0.99	2.47	1.36	0.77
RSV F/G-A-1-2 N191S	1.33	1.08	2.27	1.58	0.67
RSV F/G-A-1-2 K197R	1.54	1.07	2.31	1.45	0.62
RSV F/G-A-2-2 seq11	0.67	0.97	1.89	1.41	0.52
RSV F/G-A-2-2 N191S	0.88	0.82	1.91	1.25	0.36
RSV F/G-A-2-2 K197R	0.79	0.94	1.97	1.27	0.44
RSV F/G-A-9-2 seq11	0.26	0.79	1.73	0.94	0.35
RSV F/G-A-9-2 D162H	0.20	0.68	1.55	0.92	0.33
RSV F/G-A-7-2 seq11	1.03	1.55	2.99	1.78	1.77
RSV F/G-A-7-2 N191S	0.90	1.50	3.11	1.79	2.10
RSV F/G-A-7-2 K197R	1.12	1.49	3.09	1.80	2.25
RSV F/G-A-10-2 seq11	1.52	1.52	2.95	1.97	2.16
RSV F/G-A-10-2 D162H/N191S	0.93	1.27	2.38	1.44	0.79
RSV F/G-A-10-2 D162H/K197R	0.93	1.17	2.43	1.36	0.66
RSV F/G-A-12-0-010 seq11	1.33	1.33	2.39	1.62	3.12
RSV F/G-A-13-0-010 seq11	1.34	1.39	2.96	1.96	3.39
RSV F/G-A-12-0-111 seq11	2.22	1.69	2.54	1.25	3.19
RSV F/G-A-13-0-111 seq11	2.75	1.99	2.90	1.58	3.46
RSV F/G-A-14-0-G/EGE/G seq11	2.82	2.17	3.15	1.72	3.62
RSV F/G-A-14-0-E/GEG/E seq11	2.63	1.76	2.70	1.56	3.21
RSV F/G-A-14-0-E/EGGE/E seq11	2.66	1.74	3.09	1.70	3.26
RSV F/G-A-14-0-E/GEEG/E seq11	2.81	1.77	2.92	1.58	3.91
RSV F/G-A-17-0-E/E/E/E seq11	1.85	0.68	0.94	1.02	1.28
RSV F/G-A-17-0-E/G/G/E seq11	1.96	1.20	1.80	1.04	2.29
RSV F/G-A-17-0-G/G/G/G seq11	1.23	0.53	0.66	0.89	1.05
RSV F/G-A-12-2-010 seq11	1.41	1.60	2.74	1.14	1.67
RSV F/G-A-13-2-010 seq11	2.88	2.15	3.31	2.04	3.37
RSV F/G-A-12-2-111 seq11	2.38	1.96	3.26	1.72	2.75
RSV F/G-A-13-2-111 seq11	2.17	1.86	3.27	2.18	2.98
RSV F/G-A-14-2-G/EGE/G seq11	1.83	2.02	3.09	1.94	2.70
RSV F/G-A-14-2-E/GEG/E seq11	2.26	1.92	3.19	1.75	2.84
RSV F/G-A-14-2-E/EGGE/E seq11	2.00	1.94	3.32	1.75	3.20
RSV F/G-A-14-2-E/GEEG/E seq11	2.31	2.14	3.56	2.13	2.83
RSV F/G-A-17-2-E/E/E/E seq11	2.85	2.25	3.57	2.25	2.68
RSV F/G-A-17-2-E/G/G/E seq11	1.91	1.87	3.58	2.09	2.26
RSV F/G-A-17-2-G/G/G/G seq11	2.42	1.68	3.53	1.97	1.83
RSV pre F	3.62	1.48	3.60	2.83	3.62
RSV wt F	0.76	1.45	2.96	1.84	2.99
RSV post F	0.19	1.54	2.95	1.18	3.03
Saline	0.05	0.07	0.09	0.29	0.05

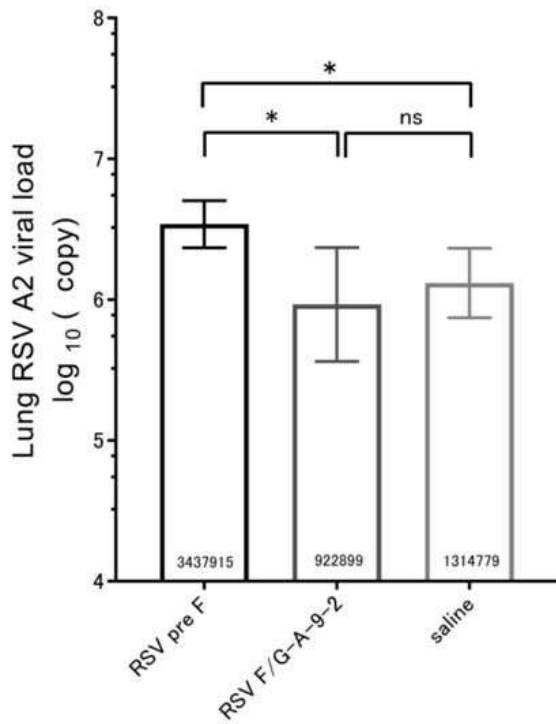
도면41

Protein names	Absorbance (antigenic site mAbs)				
	siteΦ	site I	site II	siteIII	siteIV
RSV F/G-D-1-0	1.55	2.03	3.44	0.74	2.99
RSV F/G-D-1-0 seq11	2.01	2.22	3.52	1.52	3.44
RSV F/G-D-2-0	0.41	0.70	0.52	0.33	1.23
RSV F/G-D-2-0 seq11	0.53	1.27	1.18	0.52	2.42
RSV F/G-D-3-0	0.43	0.65	0.35	0.28	0.58
RSV F/G-D-4-0	0.12	0.08	0.14	0.09	0.15
RSV F/G-D-5-0	0.23	0.15	0.13	0.22	0.20
RSV F/G-D-6-0	2.20	1.94	3.46	1.79	3.62
RSV F/G-D-7-0	1.22	2.23	3.40	2.57	3.65
RSV F/G-D-8-0	1.04	1.06	1.39	0.98	1.73
RSV F/G-D-9-0	0.21	0.23	0.09	0.09	0.11
RSV F/G-D-1-2	1.78	2.03	3.39	1.13	2.46
RSV F/G-D-1-2 seq11	1.91	2.22	3.49	1.54	2.70
RSV F/G-D-2-2	0.76	2.28	3.32	1.30	0.07
RSV F/G-D-2-2 seq11	1.98	2.08	3.53	1.06	0.08
RSV F/G-D-9-2	0.64	1.52	3.01	0.86	0.08
RSV F/G-D-10-0	0.91	2.12	3.53	1.55	3.46
RSV F/G-D-11-0	1.06	2.07	3.61	1.71	3.47
RSV F/G-D-12-0-010	1.04	1.85	3.57	1.67	3.55
RSV F/G-D-12-0-040	1.17	2.13	3.47	1.32	3.53
RSV F/G-D-13-0-010	1.16	1.97	3.54	1.96	3.41
RSV F/G-D-13-0-040	1.07	1.94	3.48	1.79	3.56
RSV F/G-D-14-0-G/G/G	1.68	2.18	3.52	2.01	3.64
RSV F/G-D-14-0-E/E/E	1.67	2.26	3.55	2.02	3.63
RSV F/G-D-14-0-G/GEG/G	1.59	2.16	3.55	1.85	3.64
RSV F/G-D-14-0-G/EGE/G	1.11	2.19	3.48	2.05	3.73
RSV F/G-D-14-0-E/EGE/E	1.20	2.13	3.49	1.86	3.53
RSV F/G-D-14-0-E/GEG/E	1.28	2.20	3.33	1.99	3.49
RSV F/G-D-14-0-E/EGEG/E	0.34	2.01	3.29	1.06	3.61
RSV F/G-D-14-0-E/GEEG/E	0.97	2.02	3.39	1.81	3.54
RSV F/G-D-14-0-E/EGGE/E	0.89	2.48	3.52	1.68	3.46
RSV F/G-D-14-0-E/GEEG/E	1.23	2.35	3.48	2.03	3.45
RSV F/G-AD-9/9-0	0.05	0.05	0.07	0.07	0.07
RSV F/G-AD-9/9-1	0.07	0.06	0.09	0.08	0.09
RSV F/G-AD-9/9-2	0.10	0.08	0.10	0.11	0.10
RSV F/G-AD-7/9-0	0.32	0.09	0.13	0.18	0.20
RSV F/G-AD-7/9-1	1.30	0.46	1.08	0.62	0.10
RSV F/G-AD-7/9-2	1.39	0.66	1.56	0.69	0.38
RSV F/G-AD-9/7-0	1.42	0.93	1.70	1.28	2.88
RSV F/G-AD-9/7-1	1.04	1.23	2.61	1.39	0.10
RSV F/G-AD-9/7-2	0.76	1.30	2.09	1.05	0.59
RSV F/G-AD-7/7-0	1.59	1.03	1.41	1.06	2.31
RSV F/G-AD-7/7-1	1.78	1.42	2.81	1.36	0.09
RSV F/G-AD-7/7-2	1.87	1.96	3.36	1.94	2.77
RSV F/G-B-8-1	1.48	0.08	3.22	1.86	0.10
RSV F/G-B-8-2	1.25	0.07	3.30	1.76	1.31
RSV pre F	3.62	1.48	3.60	2.83	3.62
RSV wt F	0.76	1.45	2.96	1.84	2.99
RSV post F	0.19	1.54	2.95	1.18	3.03
Saline	0.05	0.07	0.09	0.29	0.05

도면42



도면43



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> KM Biologics Co., Ltd.

<120> RSV F/G chimeric vaccine

<130> P263990

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

<213> respiratory syncytial virus

<400> 1

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr

1                    5                                    10                                    15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe

20                                    25                                    30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu

35

40

45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
 50 55 60  
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
 65 70 75 80  
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
 85 90 95  
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
 100 105 110  
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr  
 115 120 125  
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
 130 135 140  
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
 165 170 175  
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
 180 185 190  
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
 195 200 205  
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
 210 215 220  
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
 260 265 270  
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
 275 280 285  
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro



<213> respiratory syncytial virus

<400> 2

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr

1                    5                    10                    15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys

                  20                    25                    30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met

                  35                    40                    45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser

                  50                    55                    60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr

65                    70                    75                    80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln

                  85                    90                    95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr

                  100                    105                    110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser

                  115                    120                    125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser

                  130                    135                    140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn

145                    150                    155                    160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys

                  165                    170                    175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys

                  180                    185                    190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu

                  195                    200                    205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu

                  210                    215                    220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys

225                    230                    235                    240  
 Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro  
    245                    250                    255  
 Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly  
    260                    265                    270  
 Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln  
    275                    280                    285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln  
    290                    295

<210> 3

<211> 513

<212> PRT

<213> respiratory syncytial virus

<400> 3

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
    20                    25                    30  
 Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
    35                    40                    45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
    50                    55                    60  
 Lys Lys Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
 65                    70                    75                    80  
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
    85                    90                    95  
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
    100                    105                    110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr  
    115                    120                    125  
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
    130                    135                    140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
                                  165                      170                      175  
  
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
                                  180                      185                      190  
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
                                  195                      200                      205  
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
                                  210                      215                      220  
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
 225                      230                      235                      240  
  
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
                                  245                      250                      255  
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
                                  260                      265                      270  
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
                                  275                      280                      285  
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
                                  290                      295                      300  
  
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
 305                      310                      315                      320  
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
                                  325                      330                      335  
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
                                  340                      345                      350  
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
                                  355                      360                      365  
  
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val  
                                  370                      375                      380  
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr

385                    390                    395                    400  
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
                                  405                    410                    415  
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
                                  420                    425                    430  
  
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp  
                                  435                    440                    445  
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
                                  450                    455                    460  
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
 465                    470                    475                    480  
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
                                  485                    490                    495  
  
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
                                  500                    505                    510  
 Leu  
  
 <210> 4  
 <211> 513  
 <212> PRT  
 <213> respiratory syncytial virus  
 <400> 4  
 Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
                                  20                    25                    30  
 Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
  
                                  35                    40                    45  
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
                                  50                    55                    60  
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
 65                    70                    75                    80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr  
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Cys Lys Val Leu His Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Phe Lys Val  
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Leu Asn  
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
275 280 285

Met Cys Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg



1                    5  
 <210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Linker 2  
 <400> 6  
 Glu Ala Ala Ala Lys  
 1                    5  
 <210> 7  
 <211>  
 > 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> sense primer - RSVf-F  
 <400> 7  
 carcaaagtt aytctatcat gtc                    23  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> antisense primer - RSVf-R  
 <400> 8  
 gatcctgcat trtcacarta cca                    23  
 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> MGB probe - RSVfA  
 <400> 9  
 tgtagtaciaa ttrccact                    18  
 <210> 10  
 <211> 255  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> standard DNA

<400> 10

tgtccaacaa tgttcaata gttagacagc aaagttactc tatcatgtcc ataataaaag	60
aggaagtctt agcatatgta gtacaattac cactatatgg tgttatagat acaccctgtt	120
ggaaactaca cacatccct ctatgtacaa ccaacacaaa agaagggtcc aacatctgtt	180
taacaagaac tgacagagga tggactgtg acaatgcagg atcagtatct ttcttccac	240
aagctgaaac atgta	255

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> respiratory syncytial virus

<400> 11

Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys	
1                    5                    10                    15	
Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile	
20                    25                    30	
Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr	
35                    40	