



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0117895
(43) 공개일자 2013년10월28일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 38/08</i> (2006.01)
 <i>A61K 38/10</i> (2006.01) <i>A61K 9/127</i> (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7026966(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2010년06월16일
 심사청구일자 2013년10월11일
 (62) 원출원 특허 10-2012-7001341
 원출원일자(국제) 2010년06월16일
 심사청구일자 2012년01월18일
 (85) 번역문제출일자 2013년10월11일
 (86) 국제출원번호 PCT/KR2010/003879
 (87) 국제공개번호 WO 2011/007961
 국제공개일자 2011년01월20일
 (30) 우선권주장
 1020090065495 2009년07월17일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 한림대학교 산학협력단
 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
 (72) 발명자
 권형주
 충청북도 청주시 상당구 용암동 현대3차아파트
 103동 506호
 (74) 대리인
 양부현</p> |
|---|---|

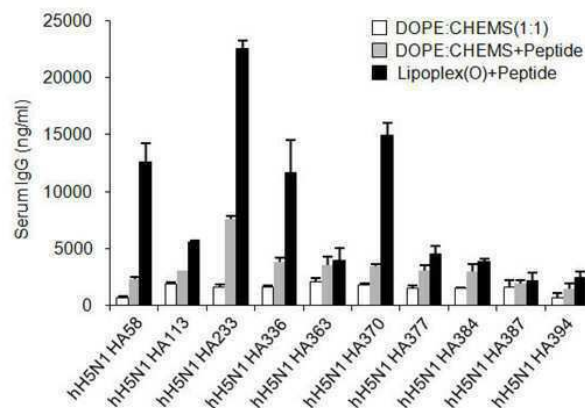
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 리포솜에 포집된 올리고뉴클레오타이드 및 에피토프를 포함하는 면역증강용 조성물

(57) 요약

본 발명은 면역증강용 조성물, 면역원성을 가지는 에피토프, 이들의 스크리닝 방법 및 이들의 제조방법과, 단백질 항원에 대한 항체, 이들의 스크리닝 방법 및 이들의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 면역강화를 통해 암, 인플루엔자 바이러스, C형 간염 바이러스, RSV(respiratory syncytial virus) 같은 다양한 면역-결핍 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	M1086102000208N610200210
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래원천기술개발사업
연구과제명	인간 TLR9의 리간드 발굴 및 선천성면역 조절기술 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2008.08.01 ~ 2010.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20090081761
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래원천기술개발사업
연구과제명	세포외기질 재구성 기전 규명에 근거한 면역반응조절 및 활용기술 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2009.05.01 ~ 2012.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A084411
부처명	보건복지가족부
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	에피통 분석에 근거한 효율적인 조류인플루엔자 백신 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2008.11.01 ~ 2010.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제1서열 내지 서열목록 제9서열, 그리고 서열목록 제19서열 내지 서열목록 제37서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 조류 인플루엔자 A 바이러스에 대한 펩타이드 백신 조성물.

청구항 2

서열목록 제1서열 내지 서열목록 제9서열, 그리고 서열목록 제19서열 내지 서열목록 제37서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 리포솜에 포집된 올리고뉴클레오타이드 및 에피토프를 포함하는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 에피토프-기초 펩타이드 백신은 B 세포 수용체(BCR), 그리고 B 세포 및 T 세포 에피토프로서의 MHC에 대한 결합 능력을 통한 면역반응을 유도하고 조절하는 중추로서, 감염성 및 악성 질환의 예방을 위해 활발하게 연구되고 있다(1-3). 화학적으로 불활성화된 백신은 임상에서 널리 사용되나, 백신은 바이러스의 재활성화의 위험, 백신 안정성의 유지를 위한 비용, 자가 면역 질환의 발생 및 일부 백신의 불충분한 예방 효과 등의 단점을 가진다(1, 3, 4). 이들 단점을 극복하기 위해, 지난 30년 간 B 세포 및 T 세포의 선택적인 반응을 유도하는 특정 서브셋의 림프구들을 자극하도록 디자인된 에피토프를 사용함으로써 면역 반응을 조절할 목적으로 합성 펩타이드가 개발되어 왔다. 그러므로, 펩타이드 백신은 항암 백신(5, 6), 그리고 인플루엔자 바이러스(3), 말라리아(7), B형 간염(8) 및 HIV(9)와 같은 감염성 질환에 대한 매우 강력하고 유용한 예방 및 치료제로서 주목받고 있다. 비록 펩타이드 백신은 다양한 동물 모델에 대해 활발히 연구되었으나, 이들의 인간에 대한 치료 효능을 제한적이다. 펩타이드 백신의 효능을 개선시키기 위해, 리포솜이 백신 운반체로서 제시되었고(10), 플라젤라(11) 및 CpG-DNA(12) 같은 면역보조제들이 면역반응의 강화를 위해 이용되었다.

[0003] 전달 운반체로서의 리포솜은 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 강화시키는 백신의 개발에 광범위하게 평가되어 왔다(10, 13). 포집된 리포솜은 전달물질을 주위 환경으로부터 보호하고 타겟 세포로 전달할 수 있다.

[0004] 한편, DOPE(dioleryl phosphatidylethanolamine; phosphatidyl- β -oleoyl- γ -palmitoyl ethanolamine)/CHEMS(cholesterol hemisuccinate) 같은 pH-민감성 리포솜은 내용물을 세포질로 분비하고 낮은 pH(5.0)에서 서로 지질-혼합되는 것이 특징이다(14). 여러 연구자들은 pH-민감성 리포솜이 세포질로의 항원 전달을 개선시켜 CTL 반응을 유도한다는 것을 보여줬다(15). 더 나아가, pH-민감성 리포솜에 포집된 한탄 바이러스의 뉴클레오펙시드 단백질(M6) 또는 인간 파필로마 바이러스 E7로부터 합성된 CTL 에피토프로 면역화된 마우스에서 효율적인 항원-특이적 CTL 반응들이 보고되었다(16). 대식세포 및 수지상세포에 의한 항원의 유입을 향상시키기 위해서, 양이온성 리포솜이 전달 운반체로써 이용되었다. CTL 반응 및 항체 생산은 리포펙타민, DC-Chol, DC-Chol/DOPE 및 EPC-SA/C 등의 양이온성 리포솜의 포집에 의해 강화된다(10).

[0005] 리포솜이 APCs(antigen presenting cells)에 항원을 전달하는 강력한 운반체이지만, 면역원성(immunogenicity)과 면역 보조능력(adjuvanticity)을 강화시키기 위한 목적으로도 연구되었다. CpG-DNA는 그 면역자극(immunostimulatory) 활성으로 인해 플라젤라, 지질 A, 사이토카인 같은 면역자극 인자들보다 더 유용한 잠재적 치료제로서 주목받아 왔다(17, 18). 여러 연구자들은 CpG-DNA가 APC의 활성화, Th1 면역 반응 및 면역글로블린(Ig) 아이소타입 스위칭을 증가시킨다는 사실을 밝혀냈다(19-21). 강력한 보조제로서의 면역자극 활성화는 리포솜-포집된 CpG-DNA에 의해 강화된다. Suzuki 등은 양이온성 리포솜에 포집된 CpG-DNA가 IL-12 및 IFN- γ 의

발현을 유도하고, OVA(ovalbumin)이 함께 포집된 CpG-DNA-리포솜은 OVA-발현 종양에 대해 강력한 세포독성을 가지는 OVA-특이적 CTL을 유도한다는 사실을 밝혀냈다(22). 또한, SSCL(sterically stabilized cationic liposomes)은 B 세포, 수지상세포 및 대식세포에 의한 유입(uptake)을 증가시키고, OVA와 CpG-DNA의 공동 포집은 항원-특이적 IFN- γ 및 IgG 생산을 증대시킨다(23). 더 나아가, Li 등은 DSPC/Chol 리포솜에 함께 포집된 CpG-DNA 및 HER-2/neu-유래된 펩타이드가 CTL 반응 및 IgG 생산을 증가시킨다는 것을 규명하였다(24).

[0006] 뉴클레아제 저항성을 가지고 세포에 효율적으로 유입시키기 위해 올리고뉴클레오타이드 백본(backbone) 내 비-브릿지 산소(nonbridging oxygens)가 황으로 치환된 포스포로티오에이트(phosphorothioate)-변형된 CpG-DNA(PS-DNA)는 임상 적용에 유용하게 이용되어 왔다(25). 그러나, 여러 연구결과들은 PS-DNA가 일과성 비장비대(transient splenomegaly), 림프소절 파괴(lymphoid follicle destruction) 및 관절염 같은 백본-관련 부작용을 유도한다는 것을 보여주었다(26-28). 그러므로, 연구자들은 심각한 부작용 없이 최적의 선천성 면역반응을 유도하기 위하여 포스포다이에스터 결합 CpG-DNA(PO-DNA)의 천연 카운터파트(counterpart)를 개발하였다. PS-DNA와 달리, PO-DNA에 의한 효과는 인간 세포에서 나타나지 않았다. 하지만, 리포솜(DOTAP 또는 리포펙틴)에 포집된 PO-DNA 및 비-CpG-DNA로 자극받은 인간세포에서 효과적인 면역 반응이 유도됨이 보고되었다(29, 30).

[0007] 이 전의 연구에서, 본 발명자들은 컴퓨터를 이용한 *M. bovis* 게놈 DNA의 분석을 통해서 천연의 포스포다이에스터 결합 CpG-DNA(PO-DNA)를 동정하고 면역자극 활성을 가지는 *M. bovis* 게놈 DNA 서열을 스크리닝하였다(31). 본 발명자들은 실험 분석을 통해 CpG 모티프를 포함하는 강력한 PO-DNA(MB-ODN 4531(0)로 명명됨)가 심각한 부작용 없이 항원-유도된 Th1 반응을 유도하는 강력한 보조제로서 작용한다는 사실을 밝혔다(31, 32). 본 발명에서, 본 발명자들은 인간 및 마우스 세포에서 면역반응을 자극하는 여러 리포솜들 내에 포집된 PO-DNA(MB-ODN 4531(0))의 항체생산능력을 비교하였다. 나아가, 본 발명자들은 DOPE:CHEMS 리포솜에 공동-포집된 PO-DNA(MB-ODN 4531(0)) 및 몇몇 펩타이드들이 펩타이드-특이적 IgG 생산을 증가시킨다는 것을 규명한다. 상술한 결과들은 DOPE/CHEMS 리포솜에 의한 수송 및 MB-ODN 4531(0)의 보조제 효과에 의해 펩타이드 백신의 효용성이 향상되어 감염성 질병의 전염, 치료 항체의 개발 및 생물학적 테러 무기의 노출 같은 분야에 즉각적으로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 다양한 암 및 감염성 질병 등에 대한 예방 및 치료를 가능하게 하는 신규한 면역보조제(immunoadjuvant)를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 단백질 항원의 펩타이드 에피토프를 동정하였고, 상기 펩타이드 에피토프 및 올리고 뉴클레오타이드를 특정 조성의 리포솜에 포집시킬 경우 크게 증가된 면역촉진 활성을 가진다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 면역반응 증강용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 면역원성을 가지는 에피토프의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 단백질 항원에 대한 항체의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 단백질 항원에 대한 항체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 인플루엔자 A 바이러스, 암, C형 간염 바이러스 또는 RSV(respiratory syncytial virus)에 대한 펩타이드 백신 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 음이온성 계면활성제 및 중성 인지질을 포함하는 리포솜에 포집된 (i) 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 에피토프를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다. 본 발명자들은 다양한 암 및 감염성 질병 등에 대한 예방 및 치료를 가능하게 하는 신규한 면역보조제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 단백질 항원의 펩타이드 에피토프를 동정하였고, 상기 펩타이드 에피토프 및 올리고 뉴클레오타이드를 특정 조성의 리포솜에 포집시킬 경우 크게 증가된 면역촉진 활성을 가진다는 사실을 확인하였다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "음이온성 계면활성제(anionic surfactants)"는 분자 내에 소수성 부분과 친수성 부분을 모두 포함하고 전체 분자에 음전하를 띄는 양친매성을 가지는 분자를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용될 수 있는 음이온성 계면활성제는 포스파티딜 글리세롤(phosphatidylglycerol), 카르디올리핀(cardiolipin), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 디아실포스파티딜세린(diacylphosphatidylserine), 디세틸포스페이트(dicetylphosphate), 포스파티딕 에시드(phosphatidic acid), 디아실포스파티딕 에시드(diacylphosphatidic acid), 올레인산(oleic acid), N-도데카노일 포스파티딜에타놀로아민(N-dodecanoyl phosphatidylethanolamine), NSPE(N-succinyl phosphatidylethanolamine), NGPE(N-glutaryl phosphatidylethanolamine), LPG(lysylphosphatidylglycerol) 및 CHEMS(cholesterylhemisuccinate)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 음이온성 계면활성제는 CHEMS(cholesterylhemisuccinate)이다.

[0018] 본 명세서에서 용어 "중성 인지질(neutral phospholipids)"은 분자 내 각 원자가 전하를 띄지 않는 인지질(phospholipid) 뿐 아니라 양쪽성 이온(zwitterions)처럼 일부 원자가 전하를 띄더라도 전체 분자의 총 전하(net charge)가 0인 인지질을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 중성 인지질은 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), DPPC(dipalmitoyl phosphatidyl choline), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC(dimyristoylphosphatidylcholine), 콜레스테롤, PEG-PE(polyethylene glycolphosphatidyl ethanolamine), DOPC(dioleoyl phosphatidyl choline) 및 DOPE(dioleoyl phosphatidyl ethanolamine)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 중성 인지질은 DOPE이다.

[0019] 본 명세서에서 용어 "리포솜(liposome)"은 지질 이중막을 형성함으로써 제조되는 지질 운반체를 의미한다. 일반적으로, 리포솜은 생체 친화적이며 양쪽 친매성을 가지고 있어 내부의 친수성 물질을 포함한 채로 소수성 막을 통과할 수 있다. 리포솜의 직경은 일반적으로 20-2,000 nm이나 이에 제한되지 않고, 제조 방법 및 운반될 뉴클레오타이드의 길이에 따라 다양한 크기일 수 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 리포솜은 CHEMS 및 DOPE의 혼합물이다.

[0021] 본 발명에서 사용하는 리포솜 내에서의 DOPE:CHEMS의 몰 비율은 바람직하게는 7:3-3:7이고, 보다 바람직하게는 4.5:5.5-5.5:4.5이며, 가장 바람직하게는 5.0:5.0이다.

[0022] 본 발명의 리포솜의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 유기용매-혼합 방법 또는 계면제-혼합 방법을 이용한다(미국 특허등록 제5,705,385호; 미국 특허출원 제08/660,025호). 보다 바람직하게는, 리포솜은 DOPE 및 CHEMS를 혼합하고, 이를 질소가스와 함께 증발시켜 무용매(solvent-free) 지질 필름을 만든 후, 알코올 용액에서 용해시켜 최종적으로 수용성 뉴클레오타이드 혼합물과 혼합하는 과정을 통해 제조한다.

[0023] 본 발명의 리포솜 제조를 유기용매 혼합을 통해 실시하는 경우, 이에 이용되는 유기용매는 클로로포름, 메탄올, 에탄올, n-프로판올 또는 부탄올을 포함한다. 바람직하게는, 상기 유기용매는 에탄올이다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "포집(encapsulation)"은 효율적인 인 비보 운반을 위해 운반될 물질을 상대적으로 안정한 셀 내로 가두는(enclosure) 것을 의미한다.

[0025] 본 명세서에서 용어 "면역자극(immunostimulatory)"은 초기 면역반응을 유도하거나 또는 항원에 대한 기존의 면역반응을 측정 가능할 정도로 증가시키는 것을 의미한다.

[0026] 본 발명에서 이용될 수 있는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 어떠한 면역자극 올리고뉴클레

오타이드도 포함한다. 예를 들어, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 헤어핀 이차 구조를 형성하는 팔린드롬, CpG 모티프, CpT 모티프 또는 다중 G 도메인을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 공지된 ISS(immunostimulatory sequence)일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 미국 특허출원공개 제20080045473호, WO 2006/063152 또는 WO 1998/18810에 개시된 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0027] 상기 CpG 모티프를 포함하는 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 구체적인 예는 WO 2006/080596에 개시된 본 발명자들에 의해 개발된 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 다음의 일반식으로 표현되는 CpG 올리고뉴클레오타이드가 본 발명에서 이용될 수 있다: HKCGTTCRTGCSGM[R은 A 또는 G; S는 C 또는 G; H는 A, T 또는 C; K는 G 또는 T; M은 C 또는 A].

[0028] 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 천연(natural-occurring) 뉴클레오타이드, 백본(backbone)-변형된 뉴클레오타이드(예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm, *et al.*, *Nature*, 365: 566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당-변형된 뉴클레오타이드(예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소오스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA), 및 염기-변형된 뉴클레오타이드(예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티릴-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴- 및 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), 이노신 및 디아미노퓨린)을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드이다.

[0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 포스포로다이에스테르 백본 또는 포스포로티오에이트 백본을 가진다.

[0030] 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 길이는 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 8-100 뉴클레오타이드 길이이고, 보다 바람직하게는 15-50 뉴클레오타이드 길이이며, 가장 바람직하게는 약 13-25 뉴클레오타이드 길이이다.

[0031] 바람직하게는, 본 발명의 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제14서열 내지 서열목록 제18서열로 구성된 군으로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드이다. 보다 바람직하게는 서열목록 제14서열의 올리고뉴클레오타이드이다.

[0032] 본 발명자들은 이전의 연구에서 실험적 분석에 의해 미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) 게놈 DNA로부터 유래된 잠재적 CpG-DNA가 Th1-반응성 면역보조물질로서의 기능하고 전사인자인 NF-κB를 활성화시킨다는 사실을 규명하였다(31).

[0033] 구체적으로, 본 발명에서 이용되는 올리고뉴클레오타이드는 미코박테리움 보비스 게놈 DNA 내 4531 위치의 20 bp-올리고뉴클레오타이드인 MB-ODN 4531(서열목록 제14서열), 상기 서열의 CG 디뉴클레오타이드(dinucleotide) 서열 하나가 GC 서열로 치환된 MB-ODN 4531(GC)(서열목록 제15서열), MB-ODN 4531 서열의 3'-말단의 7개 염기가 삭제되고 백본 내 브릿지 산소(bridging oxygen)가 황으로 치환된 MB-ODN 4531(S)T13(서열목록 제16서열), MB-ODN 4531 서열의 CG 디뉴클레오타이드 서열 하나가 CT 서열로 치환되고 백본의 브릿지 산소가 황으로 치환된 MB-ODN 4531(S)CT(서열목록 제17서열) 및 MB-ODN 4531 서열과 상보적이면서 백본의 브릿지 산소가 황으로 치환된 MB-ODN 4531(S)CS(서열목록 제18서열)이다. 본 발명자들의 실험적 분석을 통해 MB-ODN 4531 올리고뉴클레오타이드/펩타이드/리포솜 복합체의 투여가 다른 올리고뉴클레오타이드를 가지는 복합체의 투여보다 총 IgG의 레벨이 가장 높게 유도한다는 사실을 규명하였다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "에피토프(epitope)"는 항체와 상호작용하는 항원의 부위를 의미한다. 보다 자세하게는, 에피토프는 면역글로불린(immunoglobulin) 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위(determinant)를 의미한다. 또한, 본 발명의 에피토프는 면역반응을 증가시킬 수 있는 어떠한 분자 또는 물질을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 에피토프는 펩타이드, 이들 펩타이드를 인코딩하는 핵산 및 당단백질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 명세서에서 용어 "펩타이드(peptide)"는 아미노산 잔기들 간의 펩타이드 결합에 의해 형성된 선형의 분자를 의미하고, 본 명세서에서 용어 "펩타이드 에피토프(peptide epitope)"는 B 세포 및/또는 T 세포의 특이적 반응

을 유도할 수 있는 에피토프를 포함하는 펩타이드를 의미한다.

- [0036] 본 발명의 펩타이드 에피토프의 길이는 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 7-30 아미노산 길이이고, 보다 바람직하게는 10-25 아미노산 길이이며, 가장 바람직하게는 10-17 아미노산 길이이다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 에피토프는 서열목록 제1서열 내지 서열목록 제13서열 및 서열목록 제19서열 내지 서열목록 제46서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 에피토프이다.
- [0038] 본 발명자들은 에피토프의 스크리닝을 위해 조류 인플루엔자 A 바이러스의 HA 단백질, 돼지(swine) 인플루엔자 A 바이러스의 HA 단백질, H1N1 인플루엔자 A 바이러스의 HA 단백질, H7 인플루엔자 A 바이러스의 HA 단백질, H9 인플루엔자 A 바이러스의 HA 단백질, 인간 간암(hepatocarcinoma)의 hTM4SF5(human tetraspanin transmembrane 4 superfamily member 5) 단백질, 인간 인테그린 β 4(hIB4), C형 간염 바이러스(HCV)의 외피(envelope) 단백질, RSV(respiratory syncytial virus)의 부착 (G) 당단백질(hRSV-G) 및 RSV의 융합 단백질(hRSV-F)로부터 유래된 펩타이드들을 합성하였다. 이후, 투여 시에 면역반응을 증가시키는 펩타이드들을 선별하여 서열목록 제1서열 내지 서열목록 제13서열 및 서열목록 제19서열 내지 서열목록 제46서열을 얻었다. 그 결과, 서열목록 제1서열 내지 서열목록 제6서열 및 서열목록 제19서열 내지 서열목록 제37서열의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 면역 증강 효과를 가지고, 서열목록 제10서열 또는 서열목록 제11서열의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 간암에 대한 면역 증강 효과를 가지며, 서열목록 제42서열 내지 서열목록 제46서열의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 인간 인테그린 β 4에 대한 면역 증강 효과를 가지고, 서열목록 제12서열의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 C형 간염 바이러스에 대한 면역 증강 효과를 가지며, 서열목록 제13서열 및 서열목록 제38서열 내지 서열목록 제41서열의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 RSV에 대한 면역 증강 효과를 가진다.
- [0039] 본 발명의 조성물에는 기타 약물 또는 다른 면역 보조제가 포함되어 추가적인 면역 자극 효과를 제공할 수 있다. 면역보강제의 종류들은 당 분야에 널리 공지되어 있다(Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., and Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X). 바람직하게는, 본 발명의 조성물에 포함되는 면역보강제는 알루미늄 염 또는 칼슘 염(예를 들어, 하이드록사이드 또는 포스페이트)을 포함한다.
- [0040] 바람직한 면역보강제의 구체적 예는 다음과 같다: 알루미늄염 또는 칼슘염(하이드록사이드 또는 포스페이트), 수중유(oil-in-water) 에멀전(WO 95/17210, EP 0 399 843) 또는 리포솜과 같은 미립성 캐리어(WO 96/33739), 남아메리카 수목인 켈라자 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)로부터 유래된 면역학적으로 항원보강제 활성을 지닌 사포닌 분획(예를 들어, Quil A), 3 De-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A, 뮤라밀 디펩티드, 3D-MPL(3-O-데아실화된 모노포스포릴 지질 A)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 면역 증강용 조성물은 다양한 상태 또는 질환의 치료에 적용될 수 있으며, 상기 상태 또는 질환의 예는 다음과 같지만 이에 한정되는 것은 아니다:
- [0042] (i) 암(예컨대, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암);
- [0043] (ii) 바이러스(예컨대, 아테노바이러스, 헤르페스바이러스(예를 들어, HSV-I, HSV-II, CMV 또는 VZV), 폭스바이러스(예를 들어, 천연두(variola) 또는 백시니아 같은 진성두창바이러스(orthopoxvirus) 또는 물사마귀바이러스(molluscum contagiosum)), 피코르나바이러스(예컨대, 리노바이러스 또는 엔테로바이러스), 오르토믹소바이러스(예를 들어, H5N1 조류 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자바이러스), 파라믹소바이러스(예를 들어, 5-파라인플루엔자바이러스, 유행성 이하선염 바이러스(mumps virus), 홍역 바이러스 및 RSV(respiratory syncytial virus)), 코로나 바이러스(예를 들어, SARS), 파포바이러스(예컨대, 성기사마귀, 보통사마귀 또는 족저 사마귀를 유발하는 파필로마바이러스), 헤파드나바이러스(예를 들어, B형 간염 바이러스), 플라비바이러스(예를 들어, C형 간염 바이러스 또는 뎡기열바이러스(Dengue virus)) 또는 레트로바이러스(예를 들어, HIV와 같은 렌티바이러스))에 의해 유발되는 감염성 질환;
- [0044] (iii) 박테리아(예컨대, 에스케리시아, 엔테로박터, 살모넬라, 스탕필로코커스, 쉬겔라, 리스테리아, 에어로박터, 헬리코박터, 클레브시엘라, 프로테우스, 슈도모나스, 나이세리아, 클로스트리듐, 바실러스, 코리네박테리움, 마이코박테리움, 캄필로박터, 비브리오, 세라티아, 프로비덴시아, 크로모박테리움, 브루셀라,

에르시니아, 해모필러스 또는 보르데텔라 속)에 의해 유발되는 감염성 질환;

[0045] (iv) 클라미디아 같은 다른 감염성 질환, 칸디다증, 국균증, 히스토마플라스마증 및 크립토콕쿠스 뇌막염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 진균성 질병, 또는 말라리아, 뉴머시스터스성 폐렴, 리슈마니아증, 크립토스포리디움증, 톡소포자충증 및 트리파소노마 감염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 기생충성 질환;

[0046] (v) 아토피성 피부염 또는 습진, 호산구증가증, 천식, 알레르기, 알레르기비염 및 오멘 증후군과 같은 T_{H2}-매개된 아토피 질환;

[0047] (vi) 알로페시아 그레아타(alopecia greata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 아디슨 질환, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유전포창, 심근병증, 복강 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성 피로 면역이상 증후군, 만성염증성 탈수초 다발성 신경병증, 척-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 반흔성유전포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론병, 원판성 낭창, 복태성복합한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 켈레인 바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, IgA 신경염, 연소자성 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합성 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 타입 I 또는 면역-매개 당뇨병, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결정성 다발동맥염, 다발연골염, 자가면역성 다선 증후군, 류마티스 다발성근통, 다발성 근염과 피부근염, 일차성 무감마글로불린혈증, 일차성 담증성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증과 같은 자가면역질환;

[0048] (vii) 천식, 엔세팔리티스(encephilitis), 염증성 장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 알러지, 폐혈병성 쇼크증, 폐섬유증, 미분화 척추관절증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 그리고 만성 바이러스 또는 박테리아 감염에 의한 만성 염증을 포함하는 염증성 질환; 및

[0049] (viii) 만성 상처를 포함하는 켈로이드 및 다른 형태의 흉터 생성 억제 및 상처 치유의 촉진 같은 상처 치유와 관련된 질환.

[0050] 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 암, 바이러스 질환, 박테리아 질환, 감염성 질환 또는 자가면역 질환에 이용된다.

[0051] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0052] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0053] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-10,000 mg/kg(체중)이다.

[0054] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 면역원성을 가지는 에피토프의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0056] (a) 음이온성 계면활성제 및 중성 인지질을 포함하는 리포솜에 (i) 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 에

피토프 후보물질로서의 펩타이드를 포집시키는 단계;

[0057] (b) 상기 (i) 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 에피토프 후보물질로서의 펩타이드가 포집된 리포솜을 이용하여 인간을 제외한 동물을 면역화시키는 단계; 및

[0058] (c) 상기 면역화된 동물에서의 면역반응을 측정하는 단계.

[0059] 본 발명의 에피토프 또는 펩타이드, 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 리포솜은 상술한 본 발명의 면역 증강용 조성물에서 기재된 내용과 공통되므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0060] 리포솜-포집된 면역자극 올리고뉴클레오타이드 또는 펩타이드에 의해 면역화시키는 방법은 당업계에 알려진 다양한 면역 투여방법을 포함하며, 바람직하게는 비경구 투여이다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 이용되는 "인간을 제외한 동물(non-human animal)"은 당업계에서 일반적으로 이용되는 다양한 동물들을 포함하며, 바람직하게는 포유동물이고, 가장 바람직하게는 마우스, 토끼 또는 랫트이다.

[0062] 본 발명에서 면역화된 동물에서의 면역반응 측정은 예를 들어, 상기 선별된 리포솜-포집된 펩타이드를 투여한 대상 동물로부터 혈청을 채취하여 항-펩타이드 항체(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 역가를 측정하는 방법을 통해 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 항체의 역가를 측정하는 방법은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 측면이동분석법(Lateral flow test), MIA(Magnetic immunoassay) 및 면역침강법(Immunoprecipitation)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, ELISA 분석법이 이용될 수 있다.

[0063] 특정 펩타이드 서열이 항-펩타이드 항체의 역가를 증가시키는 경우, 상기 특정 펩타이드는 에피토프 또는 펩타이드 백신으로 간주된다.

[0064] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 단백질 항원에 대한 항체의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0065] (a) 음이온성 계면활성제 및 중성 인지질을 포함하는 리포솜에 (i) 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 에피토프 후보물질로서 상기 단백질 항원의 펩타이드를 포집시키는 단계;

[0066] (b) 상기 (i) 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 에피토프 후보물질로서의 펩타이드가 포집된 리포솜을 이용하여 인간을 제외한 동물을 면역화시키는 단계;

[0067] (c) 상기 면역화된 동물에서의 면역반응을 측정하여 면역원성을 나타내는 펩타이드 에피토프를 선별하는 단계;

[0068] (d) 상기 선별된 펩타이드 에피토프와 분석 대상의 항체를 접촉시키는 단계;

[0069] (e) 상기 단계 (e)의 결과물과 상기 단백질 항원을 접촉시키는 단계; 및

[0070] (f) 상기 단백질 항원과 상기 분석 대상의 항체의 결합을 분석하는 단계.

[0071] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 어세이(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.

[0072] 본 발명의 단백질 항원 또는 후보 항체는 검출가능한 표지(detectable label)로 표지화될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지는 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스레디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제, 퍼옥시다제, 루시페라제, β -갈락토시다제 및 β -글루코시다제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지(예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G, 로다민 B, TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM), 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.

[0073] 검출 가능하도록 표지화된 단백질 항원 또는 후보 항체를 이용하는 경우, 단백질 항원과 항체 사이의 결합은 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, BCIP(bromochloroindolylphosphate), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을

검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진, Pierce), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), OPD(o-phenylenediamine) 및 나프톨/파이로닌와 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

[0074] 택일적으로, 분석대상 항체의 단백질 항원과의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 분석대상의 항체가 단백질 항원에 결합하는 지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 세포가 그의 환경을 산성화하는 속도(acidifying rate)를 측정할 수 있는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 후보 항체와 단백질 항원 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(33).

[0075] 단백질 항원에 대한 후보 항체의 결합 능력은 실-시간(real-time) 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다(34, 35). BIA는 상호작용물(interactants; 예컨대, BIAcore™)의 레이블링 없이 실-시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술이다. 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실-시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

[0076] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 단백질 항원에 대한 항체의 제조방법을 제공한다:

[0077] (a) 음이온성 계면활성제 및 중성 인지질을 포함하는 리포솜에 (i) 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 에피토프 후보물질로서 상기 단백질 항원의 펩타이드를 포집시키는 단계;

[0078] (b) 상기 (i) 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 에피토프 후보물질로서의 펩타이드가 포집된 리포솜을 이용하여 인간을 제외한 동물을 면역화시키는 단계; 및

[0079] (c) 상기 면역화된 동물에서의 면역반응을 측정하여 면역원성을 나타내는 펩타이드 에피토프를 선별하는 단계;

[0080] (d) 상기 선별된 펩타이드 에피토프를 이용하여 인간을 제외한 동물을 면역화시켜 항체를 생산하는 단계.

[0081] 본 발명에 따르면, 본 발명의 방법에서 면역화된 대상 동물로부터 항체를 수득하는 단계는 당업계에 통상적으로 사용되는 에탄올 침전법, 이온교환수지 흡착크로마토그래피법, 또는 Protein A 또는 Protein G 컬럼을 이용한 크로마토그래피법을 포함하는 다양한 방법을 이용할 수 있다. 또한, 특이 항원-결합된 아가로스 비드 컬럼을 이용한 흡착크로마토그래피법을 이용하여 포유동물의 혈장으로부터 순수한 면역글로블린만을 분리할 수 있다. 한편으로는, 면역글로블린은 포유동물의 말초혈액 림프구 또는 B 세포로부터 얻어진 항체 단백질에 대한 유전 정보를 간직한 cDNA 라이브러리로부터 정보를 얻은 후에 이를 토대로 유전공학적으로 제조될 수도 있다. 상술한 방법에 의해 제조된 유전적(genetic) 재조합 면역글로블린 단백질은 포유동물의 면역글로블린의 아미노산 염기서열 또는 이를 일부 돌연변이시켜 인간화된(humanized) 유전적 재조합 면역글로블린 단백질을 포함한다 (Vaughan TJ, *et al.*, Human antibodies design. *Nature Biotech* 16: 535-539(1998)). 정제된 항체는 사용 시까지 냉장중의 얼음 상에서 저장할 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 방법은 상기 면역화된 동물로부터 B 세포를 분리하여 단일클론항체(monoclonal antibody), 인간화된 항체(humanized antibody) 또는 친화력 증가 항체(affinity matured antibody)를 생성시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0082] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열 내지 서열목록 제9서열, 그리고 서열목록 제19서열 내지 서열목록 제37서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 펩타이드 백신 조성물을 제공한다.

[0083] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제42서열 내지 제46서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 인간 인테그린 단백질 β4에 대한 펩타이드 백신 조성물을 제공한다.

[0084] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제10서열 및 제11서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 간암(hepatocarcinoma)에 대한 펩타이드 백신 조성물을 제공한다.

[0085] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제12서열의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 C형 간염 바이러스에 대한 펩타이드 백신 조성물을 제공한다.

- [0086] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제13서열 및 서열목록 제38서열 내지 서열목록 제41서열의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 RSV(respiratory syncytial virus)에 대한 펩타이드 백신 조성물을 제공한다.
- [0087] 본 발명의 펩타이드 백신은 상술한 본 발명의 면역 증강용 조성물에서 기재된 내용과 공통되므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0088] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 감염증, 압, 간염, C형 간염 바이러스 감염성 질환 또는 RSV(respiratory syncytial virus) 감염성 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0089] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0090] (a) 본 발명은 면역 증강용 조성물, 면역원성을 가지는 에피토프, 이들의 스크리닝 방법 및 이들의 제조방법, 그리고 단백질 항원에 대한 항체 및 이들의 스크리닝 방법 및 이들의 제조방법을 제공한다.
- [0091] (b) 본 발명의 조성물 및 방법은 면역강화를 통해 압, 인플루엔자 바이러스, C형 간염 바이러스, RSV(respiratory syncytial virus)를 비롯한 다양한 면역결핍 관련 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0092] 도 1a-1c는 리포솜(DOPE:CHEMS(1:1)과 HEL(hen egg lysozyme) 복합체에 의해 복강 면역화된 Balb/c 마우스의 체액반응을 보여주는 그림이다. HEL-MB-ODN 4531(0)-리포솜 복합체가 마우스 복강에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 투여되었다. 이후, IgG(도 1a), IgG1(도 1b), IgG2a(도 1c)의 생산을 측정함으로써, 총 IgG의 역가 및 Th1 면역반응과 연관된 IgG2a의 생산이 증가하였음을 확인하였다. 본 발명자들은 DOPE:CHEMS 복합체에 포집된 MB-ODN4531(0)를 Lipoplex(0)로 표기하였다.

도 2a-2e는 펩타이드-PO-DNA(MB-ODN4531(0))-리포솜 복합체를 제조하기 위해 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 조류 인플루엔자 A(H5N1)/베트남/2004 균주의 헤마글루티닌(HA)으로부터 선별된 에피토프 후보를 동정하기 위한 결과를 보여준다. 상기 선별된 에피토프 후보 10종(hH5N1 HA58, hH5N1 HA113, hH5N1 HA233, hH5N1 HA336, hH5N1 HA363, hH5N1 HA370, hH5N1 HA377, hH5N1 HA384, hH5N1 HA387 및 hH5N1 HA394)이 각각 펩타이드-PO-DNA(MB-ODN4531(0))-리포솜 복합체로 제조하여 BALB/c 마우스에 3회 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. IgG의 양을 분석한 결과, 각 펩타이드-특이적 총 IgG의 양(도 2a) 및 역가(도 2d), 그리고 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a(도 2c)의 생산이 증가하였다. 또한, 본 발명자들은 hH5N1 HA370 펩타이드-특이적 IgG(IgG2a)의 더 많은 양이 2차 반응 및 3차 반응으로 생산되었는지를 조사하였다(도 2e). A/베트남/1203/2004 hH5N1 HA 단백질의 아미노산 서열은 인간 H3 서열(A/Aichi/2/68)과의 정렬(alignment)에 기반하여 넘버링된다.

도 3a-3b는 다양한 리포솜(DOPE:CHEMS(6:4 비율), DOPE:CHEMS(1:1 비율), DOPE:CHEMS(1:0 비율), DOPE:CHEMS(0:1 비율), 리포펙틴, 리포펙타민, DOTAP 또는 폴록사머 407)과 복합된 PO-DNA(MB-ODN4531(0))와 펩타이드(H5N1 HA233)를 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 채취된 혈청에서 IgG의 양을 분석한 결과이다. DOPE:CHEMS의 물 비율이 1:1인 경우, H5N1 HA233 펩타이드 처리군에서 총 IgG의 양(도 3a) 및 역가(도 3b)가 가장 높았다.

도 4는 PO-DNA, PS-DNA 또는 다양한 비-CpG-DNAs와 복합된 펩타이드(H5N1 HA233)와 리포솜(DOPE:CHEMS(1:1))을 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 채취된 혈청에서 IgG의 양을 분석한 결과이다. 비-CpG-DNA보다 PO-DNA 4531(0) 또는 PS-DNA 4531(S)와 복합체를 이룬 H5N1 HA233 펩타이드 처리군에서 총 IgG의 양이 가장 높았다. H5N1 HA233 펩타이드-특이적 IgG 생산에 MB-ODN 4531의 보조 효과는 CC 서열-의존적이었고, 백본 변형-비의존적이었다.

도 5는 H1N1 스트레인 및 H5N1 스트레인에서 hH5N1 HA370 에피토프에 상응하는 보존 서열들 및 보존 서열-특이

적 IgG 생산을 보여주는 결과이다. A/베트남/1203/2004 스트레인의 hH5N1 HA370 에피토프에 상응하는 H1N1 스트레인 및 H5N1 스트레인 내 17개의 아미노산 보존 서열이 표 3 및 표 4에 기재된 바와 같이 합성되었다. DOPE:CHEMS(1:1 비율) 복합체에 공동-포집된 각 펩타이드(hH1N1-NY HA370, hH1N1-OH HA370, hH1N1-WSN HA370, A/H1N1-TX HA370, hH5N1 HA370 및 hH5N1-HK HA370; 50 μ g) 및 MB-ODN 4531(O)(50 μ g)(본원발명에서는 Lipoplex(O) + 펩타이드로 표시되어 있음)를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화하였다. 최종 면역화시키고 10일 후 채집된 항혈청(antiserum)에서, 항-각 펩타이드-특이적 총 IgG의 양(도 5a), 항-각 펩타이드-특이적 총 IgG1의 양(도 5b), 항-각 펩타이드-특이적 총 IgG2a의 양(도 5c), 그리고 항-각 펩타이드-특이적 IgG의 역가(도 5d)가 ELISA를 이용하여 어세이되었다.

도 6은 Lipoplex(O)와 hH5N1 HA233 에피토프에 상응하는 보존 서열의 복합체로 면역화된 마우스 혈청에서 IgG 생산 상의 효과를 측정하는 결과이다. A/베트남/1203/2004 스트레인의 hH5N1 HA233 에피토프에 상응하는 인플루엔자 A 바이러스 H5N1 스트레인(표 5) 및 다양한 인플루엔자 A 바이러스 아형들(subtypes; 표 6)에서 보여지는 14개의 아미노산 보존 서열이 합성되었다. DOPE:CHEMS(1:1 비율) 복합체에 공동-포집된 각 펩타이드(50 μ g) 및 MB-ODN 4531(O)(50 μ g)(본원발명에서는 Lipoplex(O) + 펩타이드로 표시되어 있음)를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화하였다. 최종 면역화시키고 10일 후 채집된 항혈청(antiserum)에서, 항-각 펩타이드-특이적 총 IgG의 양(도 6a 및 도 6d), 항-각 펩타이드-특이적 총 IgG1의 양(도 6b), 그리고 항-각 펩타이드-특이적 총 IgG2a의 양(도 6c)이 ELISA를 이용하여 어세이되었다.

도 7은 DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 hH5N1 HA370(또는 hH5N1 HA233) 에피토프에 상응하는 보존 서열과 MB-ODN 4531(O)의 IgG 생산 상의 효과를 측정하는 결과이다. A/베트남/1203/2004 스트레인의 hH5N1 HA370(또는 hH5N1 HA233) 에피토프에 상응하는 인플루엔자 A 바이러스 아형들(H7 및 H9; 각각 표 6 및 표 9)에서 보여지는 17개의 아미노산 보존 서열이 합성되었다. DOPE:CHEMS(1:1 비율) 복합체에 공동-포집된 각 펩타이드(50 μ g) 및 MB-ODN 4531(O)(50 μ g)(본원발명에서는 Lipoplex(O) + 펩타이드로 표시되어 있음)를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화하였다. 최종 면역화시키고 10일 후 채집된 항혈청(antiserum)에서, 항-각 펩타이드-특이적 총 IgG의 양이 ELISA를 이용하여 어세이되었다.

도 8a-8f는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233, hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 복합체 투여를 통해 생산된 항혈청에 의한 H5N1 HA 단백질 및 H1N1 HA 단백질의 특이적 인지를 나타내는 응집억제 분석 및 바이러스 중화 분석을 보여주는 결과이다. 도 8a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233, hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 복합체에 의해 생산된 각 항혈청이 재조합 H5N1 바이러스(rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo) 및 A/WSN/1933 바이러스에 의해 유도된 닭 적혈구의 응집반응을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 8b-8f는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233, hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 복합체에 의해 생산된 각 항혈청이 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo 및 A/WSN/1933 바이러스에 의한 MDCK 세포의 감염을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다.

도 9a-9d는 rH5N1 바이러스로 감염된 마우스에서 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-DOPE:CHEMS 복합체에 의한 백신화 예방 효과를 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 10LD50 rH5N1 바이러스(PR8/H5Lo)를 비강(nasal) 투여하였다. 도 9a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 투여한 마우스는 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 생존했다는 것을 보여주는 결과이다. 도 9b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 몸무게가 회복됨을 보여주는 결과이다. 도 9c는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드((hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여에도 폐 조직이 정상임을 보여주는 염색 사진이다. 도 9d는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드((hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여하고 3일 후 또는 6일 후에 폐 조직에서 바이러스가 감소되었음을 보여주는 결과이다.

도 10a-10d는 A/WSN/1933 H1N1 바이러스(mA/WSN/1933 바이러스)로 적응된 마우스에 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-DOPE:CHEMS 복합체 투여를 통한 백신화 예방 효능을 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 10LD50 mA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여하였다. 도 10a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 투여한 마우스는 10LD50 mA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여한 후에도 생존했다는 것을 보여주는 결과이다. 도 10b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA370)-리포좀 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 mA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여한 후에도 몸무게가 회복됨을 보여주는 결과이다.

다. 도 10c는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드((hH5N1 HA370)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여에도 폐 조직이 정상임을 보여주는 염색 사진이다. 도 10d는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드((hH5N1 HA370)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여하고 3일 후 또는 6일 후에 폐 조직에서 바이러스가 감소되었음을 보여주는 결과이다.

도 11a-11c는 rH5N1 바이러스로 감염된 마우스에서 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-DOPE:CHEMS 복합체에 의한 백신화 예방 효과를 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-리포솜 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 10LD50 rH5N1 바이러스(PR8/H5Lo)를 비강 투여하였다. 도 11a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스는 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 생존했다는 것을 보여주는 결과이다. 도 11b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 몸무게가 회복됨을 보여주는 결과이다. 도 11c는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드((hH5N1 HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여에도 폐 조직이 정상임을 보여주는 염색 사진이다.

도 12a-12d는 maA/WSN/1933 바이러스로 적응된 마우스에 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-DOPE:CHEMS 복합체 투여를 통한 백신화 예방 효능을 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-리포솜 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여하였다. 도 12a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여한 후에도 생존했다는 것을 보여주는 결과이다. 도 12b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여한 후에도 몸무게가 회복됨을 보여주는 결과이다.

도 13a-13c는 maA/WSN/1933 바이러스 또는 rH5N1 바이러스(PR8/H5Lo)로 감염된 마우스에 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-WSN HA233)-DOPE:CHEMS 복합체 투여를 통한 백신화 예방 효능을 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-WSN HA233)-리포솜 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스 또는 10LD50 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo를 비강 투여하였다. 도 13a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-WSN HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스 또는 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 생존했다는 것을 보여주는 결과이다. 도 13b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-WSN HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스 또는 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 몸무게가 회복됨을 보여주는 결과이다. 도 13c는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드((hH1N1-WSN HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스 또는 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여에도 폐 조직이 정상임을 보여주는 염색 사진이다.

도 14a-14c는 maA/WSN/1933 바이러스로 적응된 마우스에 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 복합체 투여를 통한 백신화 예방 효능을 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-HK HA233)-리포솜 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여하였다. 도 14a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-HK HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여한 후에도 생존했다는 것을 보여주는 결과이다. 도 14b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH1N1-HK HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여한 후에도 몸무게가 회복됨을 보여주는 결과이다. 도 14c는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드((hH1N1-HK HA233)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스 또는 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여에도 폐 조직이 정상임을 보여주는 염색 사진이다.

도 15a-15b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233, hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 복합체-투여된 마우스에서 10LD50 rH5N1 바이러스(PR8/H5Lo)(도 15a) 및 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스(도 15b)의 비강 투여 후에 채취된 항혈청에 의해 응집 억제 정도를 측정한 결과이다.

도 16a-16f는 각 에피토프의 IgG 및 IgA 항체의 생산 상의 영향을 보여주는 결과이다. 마우스에 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233, hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 복합체를 투여하여 면역화시키고 10LD50 rH5N1 바이러스 또는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강 투여한 후 채취된 혈청 및 BALF(bronchoalveolar lavage fluid)에서 IgG 및 IgA 항체의 생산이 현저하게 증가하였음을 보여주는 결과이다.

도 17a-17d는 rH5N1 바이러스로 감염된 마우스에 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-웹타이드(hH5N1 HA370)-DOPE:CHEMS 복합체 투여를 통한 백신화 예방 효능을 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포솜 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 10LD50 rH5N1 바이러스를 2달 전에 비강 투여하였다. 도 17a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포솜 복합체를 투여한 마우스는 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 생존했다는 것을 보여주는 결과이다. 도 17b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여한 후에도 몸무게가 회복됨을 보여주는 결과이다. 도 17c는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여에도 폐 조직이 정상임을 보여주는 염색 사진이다. 도 10d는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포솜 복합체를 투여한 마우스가 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강 투여하고 3일 후 또는 6일 후에 폐 조직에서 바이러스가 감소되었음을 보여주는 결과이다.

도 18a-18d는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-에피토프-DOPE:CHEMS 복합체를 이용한 에피토프-특이적 항체 생산이 바이러스를 이용한 생산보다 더욱 효과적이라는 것을 보여주는 결과이다. 도 18a는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-UV-불활성화시킨 rH5N1 바이러스-DOPE:CHEMS 복합체(Lipoplex(O))-불활성화된 PR8/H5Lo)로 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여된 마우스에서, 바이러스에 결합하는 총 IgG 및 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산량이 증가하였다는 것을 보여주는 결과이다. 도 18b는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-UV-불활성화된 rH5N1 바이러스-DOPE:CHEMS 복합체로 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여된 마우스에서, 총 IgG의 역가가 증가하였음을 보여주는 결과이다. 도 18c-18d는 PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-에피토프(hH5N1 HA233 또는 hH5N1 HA370)-DOPE:CHEMS 복합체를 이용하여 백신화된 혈청에서, 각 웹타이드에 결합하는 총 IgG의 역가가 증가하였음을 보여주는 결과이다.

도 19a-19d는 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-웹타이드-리포솜 복합체-기반된 백신을 개발하기 위해 소수성, 친수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 선별한 후보 에피토프 3종(표 10)에서 C형 간염 바이러스(HCV)-E1 단백질의 3개의 후보 에피토프로부터 에피토프 선별을 보여주는 결과이다. 상기 선택된 3개의 후보 에피토프(HCV-E1 57, HCV-E1 202, HCV-E1 269) 각각을 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-각 웹타이드-리포솜 복합체로 제조하여 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서 HCV-E1 57 웹타이드-특이적 총 IgG(도 19a)의 생산이 증가하였다. 또한, 총 IgG의 양(도 19a), 그리고 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 양 및 역가(도 19b 및 도 19c)는 HCV-E1 202 웹타이드로 백신화된 마우스 혈청에서 증가하였다. 나아가, 본 발명자들은 MB-ODN4531(O)과 웹타이드(HCV-E1 202)를 다양한 리포솜을 이용하여 각각 복합체를 제조하여 BALB/c 마우스에 3회 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서 HCV-E1 202 웹타이드-특이적 총 IgG의 역가는 DOPE:CHEMS의 비율이 1:1인 경우에 가장 높게 나타났다(도 19d).

도 20a-20c는 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-웹타이드-리포솜 복합체-기반된 백신을 개발하기 위해 소수성, 친수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 선별한 HRSV(Human respiratory syncytial virus) G 및 F 단백질에서 3개의 후보 에피토프(표 10)로부터 에피토프 선별을 보여주는 결과이다. 상기 선택된 3개의 후보 에피토프(HRSV-G1, HRSV-G150, HRSV-F99) 각각을 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-각 웹타이드-리포솜 복합체로 제조하여 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서 HRSV-G1 웹타이드-특이적 총 IgG(도 20a) 및 IgG2a(도 20b)의 생산이 증가하였다. 또한, HRSV-G1 웹타이드-특이적 총 IgG의 역가(도 20c) 및 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산(도 20b 및 도 20c)이 HRSV-G1 웹타이드로 백신화된 마우스 혈청에서 증가하였다.

도 21a-21c는 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-웹타이드-리포솜 복합체-기반된 백신을 개발하기 위해 소수성, 친수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 선별한 HRSV(Human respiratory syncytial virus) F 단백질에서 17개의 후보 에피토프(표 11 및 표 12)로부터 에피토프 선별을 보여주는 결과이다. 상기 선택된 17개의 후보 에피토프(HRSV-G1, HRSV-G150, HRSV-F99) 각각을 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-각 웹타이드-리포솜 복합체로 제조하여 BALB/c 마우스에 3회 또는 4회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서 4개의 후보 에피토프(HRSV-F3a, HRSV-F3a-2, HRSV-F7 및 HRSV-F9)에 특이적으로 결합하는 총 IgG(도 21a, 도 21b, 도 21c 및 도 21d) 및 IgG2a(도 21b, 도 21c 및 도 21d)의 생산이 증가하였다.

도 22a-22b는 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-웹타이드-리포솜 복합체-기반된 백신을 개발하기 위해 소수성, 친수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 선별한 인간 인테그린 $\beta 4$ (대부분의 암종 세포에서 발현됨)에서 6개의 후보 에피토프(표 13)로부터 에피토프 선별을 보여주는 결과이다. 상기 선택된 6개의 후보 에피토프 각각을 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-각 웹타이드-리포솜 복합체로 제조하여 BALB/c 마우스에 4회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈

청을 채취하였다. 혈청에서 4개의 후보 에피토프(hIB4-VWA-1-2, hIB4-VWA-1-3, hIB4-VWA-2, hIB4-VWA-3 및 hIB4-EGF-1)에 특이적으로 결합하는 총 IgG의 양(도 22a) 및 역가(도 22b)가 증가하였다.

도 23a-23f는 소수성, 친수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 간암에 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 hTM4SF5(human tetraspanin transmembrane 4 superfamily member 5) 단백질에서 6개의 후보 에피토프(표 10)로부터 에피토프 선별을 보여주는 결과이다. 상기 선택된 6개의 후보 에피토프(hTM4SF5R1, hTM4SF5R2-1, hTM4SF5R2-2, hTM4SF5R2-3, hTM4SF5R2-4 및 hTM4SF5R2-5) 각각을 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-각 펩타이드-리포솜 복합체로 제조하여 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서 hTM4SF5R2-3 펩타이드- 및 hTM4SF5R2-5 펩타이드-특이적 총 IgG(도 22a) 및 IgG2a(도 22b)의 생산이 증가하였다. 또한, 총 IgG의 역가(도 22b) 및 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산(도 22b)이 hTM4SF5R2-3 펩타이드로 백신화된 마우스 혈청에서 증가하였다. 나아가, 본 발명자들은 MB-ODN4531(O)과 펩타이드(hTM4SF5R2-3)를 다양한 리포솜을 이용하여 각각 복합체를 제조하여 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서 hTM4SF5R2-3-특이적 총 IgG의 역가는 DOPE:CHEMS의 비율이 1:1인 경우에 가장 높게 나타났다(도 22c).

또한, 본 발명자들은 hTM4SF5R2-3-CpG-DNA(MB-ODN4531(O)), MB-ODN4531GC(O) 또는 MB-ODN4531(S)와 리포솜(DOPE:CHEMS(1:1))과 복합체를 제조하여 마우스에 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 총 IgG의 역가는 MB-ODN4531(O)에서 가장 높게 나타났다(도 22d). 한편, 본 발명자들은 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-hTM4SF5R2-3 펩타이드-DOPE:CHEMS 복합체를 제조하여 TLR9 넋아웃 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다(도 22e-22f). 상기 TLR9 넋아웃 BALB/c 마우스는 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 총 IgG의 역가는 측정되지 않았는데, 이는 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-hTM4SF5R2-3 펩타이드-DOPE:CHEMS 복합체에 의한 항체 생산이 TLR9에 의존적이라는 것을 의미한다.

도 24a-24f는 DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 에피토프와 MB-ODN4531(O) 면역화에 의한 IgG 생산 상에 MHC 클래스 II-매개된 제시(presentation) 및 Th1 분화의 효과를 분석한 결과이다. 도 24a는 DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드와 MB-ODN4531(O)에 대한 반응으로 IgG 생산의 동력학(kinetics)을 보여주는 결과이다. DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드와 MB-ODN4531(O)를 세 마리의 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하였다. 혈청은 면역화 시기에 대해 상대적인 하루 전에 복강에서 4회에 걸쳐서 채취되었으며, 펩타이드-특이적 총 IgG, IgG1, IgG2a 및 IgM의 양이 ELISA를 이용하여 어세이되었다. 도 24b는 CD4⁺ 세포의 일시적 결핍이 DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드와 MB-ODN4531(O)를 이용한 면역화에 의한 IgG 생산을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 마우스 당 GK1.5(항-CD4 항체) 100 μ g이 면역화 시기에 대해 상대적으로 3일 또는 하루 전, 그리고 하루 또는 3일 후에 복강에서 4회에 걸쳐서 투여되었다. 0일 켜(투여)에, DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드와 MB-ODN4531(O)(Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3으로 표현됨)이 3마리의 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 투여되었다. 상기 마우스에서 혈청이 채취되어 펩타이드-특이적 총 IgG의 양이 ELISA를 이용하여 어세이되었다. 정상 IgG가 대조군으로 이용되었다(도 24c 및 도 24d). DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 HCVE2-202 펩타이드와 MB-ODN4531(O) 면역화에 의한 IgG 생산에 있어서, MHC 클래스 II 및 MHC 클래스 II-제한된 T 세포 활성화가 필요하다. DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 HCVE2-202 펩타이드(50 μ g)와 MB-ODN4531(O)(50 μ g)(Lipoplex(O)+HCVE2-202로 표현됨)이 C57BL/6 마우스, C57BL/6 MHC 클래스 넋아웃 마우스(MHC-II KO; 도 23c) 또는 C57BL/6 OT-II 트랜스제닉 마우스(OT-II TG; 도 23d)(n=3)에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여되었다. 상기 마우스에서 혈청이 채취되어 HCVE2-202 펩타이드-특이적 총 IgG, IgG1 및 IgG2a의 양이 ELISA를 이용하여 어세이되었다(도 24e 및 도 24f). DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드(50)와 MB-ODN4531(O)(50) 면역화에 의한 IgG 생산에 있어서, STAT6가 아니라 STAT4가 필요하다. DOPE:CHEMS 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드(50 μ g)와 MB-ODN4531(O)(50 μ g)(Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3으로 표현됨)이 C57BL/6 마우스, C57BL/6 STAT4 넋아웃 마우스(STAT4 KO; 도 23e) 또는 C57BL/6 STAT6 넋아웃 마우스(STAT6KO; 도 23f)(n=3)에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여되었다. 상기 마우스에서 혈청이 채취되어 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 총 IgG, IgG1 및 IgG2a의 양이 ELISA를 이용하여 어세이되었다. 상술한 실험들은 2회 또는 3회에 걸쳐서 실시되어 유사한 결과를 나타냈다.

도 25a-25e는 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 항체가 간암세포의 TM4SF5 단백질을 인식하고 간암세포(hepatocarcinoma cells)의 기능을 조절함을 보여주는 결과이다. TM4SF5의 발현이 RT-PCR을 통해 Huh-7 및 SNU-761 세포에서 관찰되었다(도 25a). hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 단일클론항체가 Huh-7 및 SNU-761 세포 내 TM4SF5를 인식할 수 있다는 것을 FACS로 확인하였다(도 25b). 도 25c는 간암세포에 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 단일클론항체를 처리한 경우 TM4SF5를 발현하는 Huh-7(간암세포)의 성장이 억제되는 것을 MTT 어세이를

통해 확인한 결과이다. 도 25d는 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 단일클론항체 처리에 의해 Huh-7 세포의 S-기가 감소한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 25e는 TM4SF5를 발현하는 간암세포(Huh-7)에 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 단일클론항체를 처리한 경우 액틴의 모양이 TM4SF5를 발현하지 않는 세포에서 보여지듯이 넓게 펼쳐진 다각형 형태(overspread polygonal shape)를 지지하는 스트레스 섬유의 명확한 윤곽(outline)을 나타낸다는 것을 보여주는 결과이다. 비정상적인 액틴의 다발화는 hTM4SF5를 발현하는 간암세포에서 관찰되는 것으로 알려져 있는 반면, 넓게 펼쳐진 다각형 형태를 지지하는 뚜렷한 윤곽의 스트레스 섬유가 hTM4SF5를 발현하지 않는 세포에서 액틴 염색에 의해 검출된다. 항-hTM4SF5 R2-3 항체를 처리한 hTM4SF5-발현 세포(Huh-7)는 hTM4SF5(SNU-739)를 발현하지 않는 세포의 액틴 형태와 유사한 뚜렷한 윤곽의 스트레스 섬유를 강하게 유도하였다. 상술한 결과들은 상기 항체가 hTM4SF5-발현 세포로 타게팅된다는 것을 의미한다.

도 26a-26c는 hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 항체가 인간 간암세포 성장을 인 *비보*에서 억제한다는 것을 나타내는 결과이다. 이종이식을 통해 Huh-7 세포를 가지는 흉선없는 누드 마우스에 10 mg/Kg hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 항체를 7일 째에 3일 간격으로 5번에 걸쳐서 처리된 후, 종양 이식을 실시하였다(도 26a). 종양 크기가 $\pm 2,000 \text{ mm}^3$ 에 달했을 때, 상기 마우스를 희생시키고 종양의 무게를 측정하였다(도 26b).

도 27a-27b는 BNL-HCC 세포로 감염된 동종 이식 간암세포 모델에서 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-hTM4SF5R2-3 펩타이드-DOPE:CHEMS 복합체에 의한 백신화 예방 효능을 보여주는 결과이다. PO-DNA(MB-ODN 4531(O))-hTM4SF5R2-3 펩타이드-리포좀 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하여 면역화시킨 후, 50% 마트리젤을 포함하는 BNL-HCC 세포(5×10^6)를 등 부위의 오른쪽 옆구리(dorsal right flank)에 피하로 접종하였다. 상기 마우스를 종양세포 이식 후 7주째에 희생시키고 종양의 무게를 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0094] 실시예

[0095] 실시예 1: 올리고디옥시뉴클레오타이드 및 시약

[0096] 올리고디옥시뉴클레오타이드(ODNs)는 Samchully Pharm(Seoul, Korea)에서 합성하였다. MB-ODN 4531은 3개의 CpG 모티프(밑줄로 표시)를 포함하는 20 염기로 이루어졌다: AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT. 본 발명에서 사용된 MB-ODN 4531 서열은 포스포다이에스터 백본(O)일 수도 있고 포스포로티오에이트-변형된 백본(S)일 수도 있다. MB-ODN 4531(O)의 포스포로티오에이트 형태는 MB-ODN 4531(S)이다. MB-ODN 4531GC는 CG 서열 중 하나가 GC 서열로 순서가 역전된(밑줄로 표시) MB-ODN 4531의 유도체이다: AGCAGGCTTCGTGTCGGCCT. 형광물질 또는 바이오틴 태그(tags)은 각 ODN의 3'-말단에 컨쥬게이션되었다. ODNs의 엔도톡신의 함량은 리몰루스 아메보사이트(*Limulus ameboycte*) 어세이(Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD, USA)에 의해 측정된 바대로 ODN 1 mg 당 1 ng 이하이다.

표 1

합성 ODN 유도체.

ODNs	서열	변형
MB-ODN 4531(O)	AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT	없음
MB-ODN 4531(GCO)	AGCAGGCTTCGTGTCGGCCT	없음
MB-ODN 4531(S)	AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT	S
MB-ODN 4531(S)T13	AGCAGCGTTCCTTG	S
MB-ODN 4531(S)CT	AGCAGCGTTCCTGTCGGCCT	S
MB-ODN 4531(S)CS	AGGCCGACAAGAACGCTGCT	S

[0098] CG 디뉴클레오타이드 서열의 GC 또는 CT 서열로의 변화는 밑줄친 굵은 글씨체로 표시된다. MB-ODN 4531(S)CS는 MB-ODN 4531에 상보적인 서열이다. 변형: 없음, 포스포다이에스터 백본 연결; 및 S, 포스포로티오에이트 백본 변형.

[0099] 실시예 2: 후보 에피토프의 선별 및 펩타이드 합성

[0100] 에피토프 스크리닝을 위한 펩타이드 서열은 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 지표(antigenicity index) 및 양친매성(amphipathicity)에 근거하여 선별하였다. 에피토프-기반된 펩타이드들의 효과를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 여러 인플루엔자 A 스트레인의 HA 단백질(표 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9), 간암의 hTM4SF5(human tetraspanin transmembrane 4 superfamily member 5) 단백질, HCV의 외피(envelope) 단백질, RSV의 부착 (G) 당단백질(G(hRSV-G))(표 10), RSV의 융합 단백질 F(HRSV-F)(표 11 및 표 12) 및 인간 인테그린 β 4(hIB4)(표 13)로부터 14개 또는 17개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 합성하였다. 인플루엔자 A 바이러스 HA 단백질의 아미노산 서열은 인간 H3 서열(A/Aichi/2/68)과의 정렬에 기반하여 넘버링된다. 펩타이드는 자동 펩타이드 합성기(Peptron III-R24, Peptron, Daejeon, Korea)를 이용하여 Fmoc 고체-상(solid-phase) 방법으로 합성하였다. 합성된 펩타이드들에서 레진 보호막을 걷어낸 후, 펩타이드를 90% 이상 순도로 정제하고 Vydac C8 분석 RP 컬럼을 이용한 역상(reverse-phase) HPLC(Prominence HPLC, SHIMADZU Corp., Tokyo, Japan)로 분석하였다. 상기 합성된 펩타이드들은 질량분석기(HP 1100 Series LC/MSD, Hewlett-Packard, Roseville, USA)를 이용하여 동정하였다.

표 2

[0101] A/베트남/1203/2004 hH5N1의 HA단백질의 후보 에피토프.

스트레인	서열	위치	약어
A/베트남/1203/2004 H5N1	ILEKKHNGKLC	58-68	hH5N1 HA58
	CYPGDFNDYEELK	113-125	hH5N1 HA113
	IATRSKVNQSGRM	233-246	hH5N1 HA233
	LRNSPQRERRRKKRG	336-350	hH5N1 HA336
	VDGWYGYHHSNEQSGYA	363-380	hH5N1 HA363
	HHSNEQSGYAADKEST	370-386	hH5N1 HA370
	SGYAADKESTQKAIDGVT	377-394	hH5N1 HA377
	ESTQKAIDGVTNKVNSII	384-401	hH5N1 HA384
	QKAIDGVTNKVNSI	387-408	hH5N1 HA387
	TNKVNSIIDKMNTQ	394-407	hH5N1 HA394

[0102] 본 발명의 에피토프 스크리닝 방법에 이용되는 펩타이드 서열들은 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 지표 및 양친매성에 근거하여 A/베트남/1203/2004 H5N1 HA 단백질(NCBI 데이터베이스, AAW80717)로부터 선택되었다(<http://tools.immuneepitpoe.org/main/index.html>). A/베트남/1203/2004 H5N1 HA 단백질의 아미노산 서열은 인간 H3 서열(A/Aichi/2/68)과의 정렬에 기반하여 넘버링된다.

표 3

[0103] 인플루엔자 A H5N1 스트레인 및 H1N1 스트레인 내 hH5N1 HA370 에피토프에 상응하는 서열의 보존성.

스트레인(아형)	접근번호	약어	서열
A/베트남/1203/2004(H5N1)	AAW80717	hH5N1 HA370	HHSNEQSGGYAADKEST
A/Hong Kong/485/97(H5N1)	AAD52043	hH5N1-HK HA370	HHSNEQSGGYAADQEST
A/WSN/1933(H1N1)	AAA43209	hH1N1-WSN HA370	HHQNEQSGGYAADQKST
A/New York/604/1995(H1N1)	ABE11867	hH1N1-NY HA370	HHQNEQSGGYAADKKST
A/Ohio/3559/1988(H1N1)	ABU80400	hH1N1-OH HA370	HHQNEQSGGYAADRKST

[0104] 인플루엔자 A 바이러스 HA 단백질의 아미노산 서열은 인간 H3 서열(A/Aichi/2/68)과의 정렬에 기반하여 넘버링

된다.

표 4

[0105] 돼지-기원 인플루엔자 A H1N1 스트레인들 내 hH5N1 HA370 에피토프에 상응하는 서열의 보존성.

스트레인(분리 넘버)*	접근번호	약어	서열
A/베트남/1203/2004(H5N1)	AAW80717	hH5N1 HA370	HHSNEQGSYGAAADKEST
A/Texas/05/2009(H1N1)(1749/1750)	ACP41934	A/H1N1-TX HA370	HHQNEQGSYGAAADLKST
A/San Antonio/PR922/2009(H1N1)(1/1750)	ACU29959	A/H1N1-SA HA370	HHQNEQGSYGAAADMKST

[0106] (분리 넘버)*는 현재까지 분리된 돼지-기원 인플루엔자 A H1N1 바이러스 1,750개의 스트레인들 중 특이 서열을 포함하는 스트레인 넘버를 나타낸다.

표 5

[0107] A/베트남/1203/2004로부터 얻어진 hH5N1 HA233 에피토프와 다른 H5N1 스트레인들로부터 얻어진 상응하는 서열들 간의 서열 정렬(sequence alignment).

스트레인/분리(분리 넘버)*	접근번호	약어	서열
A/베트남/1203/2004(229)	AAW80717	hH5N1 HA233	IATRSKVNGQSGRM
A/Hong Kong/482/97 (20)	AAC32100	hH5N1 HA233-1	IATRPKVNGQSGRM
A/Hong Kong/213/03 (9)	BAE07201	hH5N1 HA233-2	IATRSKVNGQNGRM
A/Indonesia/TLL007/2006 (4)	ABW74707	hH5N1 HA233-3	MATRSKVNGQSGRM
A/Viet Nam/JP4207/2005 (3)	ABO10183	hH5N1 HA233-4	IATRSKVNGQSGRI
A/Hong Kong/483/97 (2)	AAC32099	hH5N1 HA233-5	IATRPKVNGQSGRI
A/Egypt/14724-NAMRU3/2006 (2)	ABM54179	hH5N1 HA233-6	IATRSKINGQSGRI
A/Viet Nam/CL100/2004 (2)	ABE97630	hH5N1 HA233-7	IATRSKINGQSGRM
A/Anhui/2/2005 (2)	ABD28181	hH5N1 HA233-8	IATRSKVNGRSGRM
A/Egypt/0636-NAMRU3/2007 (1)	ABM92273	hH5N1 HA233-9	IAARSKVNGQSGRM
A/Thailand/1(KAN-1A)/2004 (1)	ABL10088	hH5N1 HA233-10	IATRSEVNGQSGRM
A/Egypt/2289-NAMRU3/2008 (1)	ACI06181	hH5N1 HA233-11	IATRSKVNGQIGRM
A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 (1)	ACI06185	hH5N1 HA233-12	IATRSKVNGQSGRV
A/Anhui/T2/2006 (1)	ABU80630	hH5N1 HA233-13	IATRTKVNGQSGRM
A/Indonesia/CDC1032N/2007 (1)	ABM90489	hH5N1 HA233-14	TATRSKVNGQSGRM

[0108] (분리 넘버)*는 현재까지 분리된 인간 H5N1 바이러스 279개의 스트레인들 중 특이 서열을 포함하는 스트레인 넘버를 나타낸다.

표 6

[0109] 인플루엔자 A 바이러스 아형들 내 H5N1 HA233 에피토프에 상응하는 서열의 보존성.

스트레인/분리(아형)	접근번호	약어	서열
A/베트남/1203/2004(H5N1)	AAW80717	hH5N1 HA233	IATRSKVNGQSGRM
A/WSN/1933 (H1N1)	AAA43209	hH1N1-WSN HA233	IAARPKVKDQHGRM
A/Hong Kong/1131/1998 (H1N1)	AAK70451	hH1N1-HK HA233	IAKRPKVRDQEGRI
A/Thailand/271/2005 (H1N1)	ABK57093	hH1N1-Thai HA233	IAKRPKVRGQAGRM
A/Texas/05/2009 (H1N1)	ACP41934	A/H1N1-TX HA233	IAIRPKVRDQEGRM
A/Michigan/2/2003 (H1N2)	AB196104	hH1N2 HA233	ITKRPKVRDQEGRI

A/mallard/Alberta/202/96 (H2N5)	AAT65325	mH2N5 HA233	IATRPKVNGQGGRM
A/Hong Kong/1143/99 (H3N2)	AAK62039	hH3N2 HA233	IGSRPWVRGVSSRI
A/equine/Jilin/1/1989 (H3N8)	AAA43151	eH3N8 HA233	IGSRPWVRGQSGRV
A/Tern/South Africa/61(H5N3)	ABI84970	tH5N3 HA233	IATRPKVNGQSGRV
A/Canada/rv504/2004 (H7N3)	ABI85000	hH7N3 HA233	PGARPVNGQSGRI
A/England/268/1996(H7N7)	AAC40998	hH7N7 HA233	PGARPVNGQSGRI
A/Hong Kong/1074/99 (H9N2)	CAB95857	hH9N2 HA233	IGRPPLVNLQGR I
A/mallard/Astrakhan/263/1982 (H14N5)	ABI84453	mH14N5 HA233	IGSRPRVRNQSGRI
A/shelduck/WA/1756/1983 (H15N2)	ABB90704	sH15N2 HA233	PGARPKVNGQAGRI

표 7

현재까지 보고된 H1N1 스트레인들 내 H5N1 HA233 에피토프에 상응하는 서열의 보존성.

스트레인(분리 넘버)*	접근번호	서열
A/Hong Kong/1131/1998 (1896)	AAK70451	IAKRPKVRDQEGRI
A/Brazil/11/1978 (68)	ABO38065	-----G-----
A/Chile/1/1983 (67)	ABO38340	-----N-----
A/Iowa/1943 (29)	ABO38373	--E-----G-A---
A/Nagoya/27/1995 (23)	BAC82887	-T-----
A/South Australia/26/2000 (17)	ABK79970	--R-----
A/Puerto Rico/8/34 (15)	AAA43194	--E-----A--M
A/Hickox/1940 (13)	ABI20826	--E-----G-A--M
A/Kyoto/1/1995 (11)	BAC82881	-----I-----
A/Fukushima/2/1988 (10)	AAA43170	-----R-----
A/Hong Kong/470/1997 (8)	CAD29932	-V-----
A/Ohio/3559/1988 (4)	ABU80400	--T-----A--M
A/Maryland/2/1980 (3)	ABO33006	-S-----
A/WSN/1933 (3)	ACF54598	--A---K-H--M
A/Fort Worth/50 (3)	ABD61735	-----P--M
A/Kojiya/1/1952 (2)	BAA96113	-----G-P--M
A/Malaysia/54 (2)	ABD60966	--E-----G-P--M
A/Texas/UR06-0502/2007 (1)	ABV29612	V-----
A/Texas/UR06-0502/2007 (1)	ABO38021	M-----
A/Hong Kong/1134/1998 (1)	AAK70459	-V-----R----
A/Switzerland/8808/2002 (1)	CAD57618	-VA-----E-A---
A/Wisconsin/10/1998 (1)	AA088265	-TT-----A--M
A/New York/626/1996 (1)	ABG47829	-T-----N-----
A/Georgia/5/2003 (1)	ABI96112	-T-----G-----
A/Memphis/2/1983 (1)	ABG88344	-S-----N-----
A/Memphis/1/1983 (1)	ABG88333	-S-----G-----
A/Albany/20/1978 (1)	ABP49448	-SE-----G-----
A/Lackland/7/1978 (1)	ABO32992	-SE-----K----
A/Texas/AF1960/2008 (1)	ACH69241	--Q-----
A/South Africa/42/2000 (1)	ABO21724	-----P-----
A/Saga/2/1957 (1)	BAA96117	-----G-S--M
A/Thailand/271/2005 (1)	ABK57093	-----G-A--M
A/Kentucky/UR06-0339/2007 (1)	ABW91526	-----E-----
A/Denver/57 (1)	ABD15258	-----S--M
A/Singapore/03/1990 (1)	AAA16778	-----R----
A/Austria/404738/2008 (1)	ACA03766	-----G----
A/New Caledonia/V77245/2007 (1)	ABQ52695	-----RKN
A/RiodeJaneiro/404/01 (1)	AAV42121	-----G-
A/Texas/06/2007 (1)	ABW23325	-----B-----
A/Kamata/69/1996 (1)	BAA96123	-----I-N-----

A/Milan/11/2006 (1)	ABZ85909	----L-----
A/Kamata/85/1987 (1)	BAA96118	--I-----
A/Huston/43 (1)	AAM76691	--G-----G-A--M
A/Phila/1935 (1)	ABO38384	--E-----T--M
A/Arizona/14/1978 (1)	ABN59423	--E-----
A/Lackland/3/1978 (1)	ABO32981	--E-----A---
A/Henry/1936 (1)	ABO38351	--E-E----A--M
A/Wisconsin/301/1976 (1)	ABV45838	--A-----G-A--M
A/Wilson-Smith/33 (1)	ABD77796	--A-----P--M
A/Wilson-Smith/1933 (1)	ABF21278	--A-----H--M
A/Brevig_Mission/1/18 (1)	AAD17218	--A-----A--M
A/London/1/1919 (1)	AAO65769	--A---I-G-A--M

[0111] (분리 넘버)*는 현재까지 분리된 인간 H1N1 바이러스 2,209개의 스트레인들 중 H5N1 HA233 에피토프에 상응하는 특이 서열을 포함하는 스트레인 넘버를 나타낸다.

표 8

[0112] 현재까지 보고된 돼지-기원 인플루엔자 A H1N1 스트레인들 내 H5N1 HA233 에피토프에 상응하는 서열의 보존성.

스트레인(분리 넘버)*	접근번호	서열
A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1)	AAW80717	IATRSKVNQSGRM
A/Texas/05/2009 (1608/1751)	ACP41934	--I-P--RD-E---
A/Almati/01/2009 (48/1751)	ACU56931	--I-P--RE-E---
A/Argentina/HNRG16/2009 (29/1751)	ADA83595	--I-P--R-E---
A/California/12/2009 (14/1751)	ACT36662	--I-P--RDxE---
A/Ekaterinburg/01/2009 (10/1751)	ACU56924	--I-P--RDRE---
A/Finland/614/2009 (9/1751)	ACZ81656	--I-P--RX-E---
A/Malaysia/8860/2009 (8/1751)	ADD14139	--I-P--RN-E---
A/Pennsylvania/14/2009 (3/1751)	ACV67237	-XI-P--RD-E---
A/South Carolina/09/2009 (2/1751)	ACR49284	--I-P--RB-E---
A/Texas/04/2009 (2/1751)	ACR49285	--I-P--RXXE---
A/Singapore/9061364 (2/1751)	ACZ04992	--I-P--RD-E-X-
A/Singapore/GP2641/2009 (2/1751)	ACY46823	--I-P--XXX-XX-
A/Singapore/GP2695/2009 (2/1751)	ACY46873	--I-P--XD-E---
A/Ancona/04/2009 (1/1751)	ACT83739	----P--RD-E---
A/Argentina/HNRG15/2009 (1/1751)	ADA83591	-SI-P--RD-E---
A/Argentina/HNRG42/2009 (1/1751)	ADA83664	T-I-P--RD-E---
A/Hiroshima/201/2009 (1/1751)	ACX31934	-TI-P--RG-E---
A/Novgorod/01/2009 (1/1751)	ADA83043	--I-P--RERE---
A/Santo Domingo/WR1057N/2009 (1/1751)	ACY77693	-TI-P--RD-E---
A/Singapore/GP2316/2009 (1/1751)	ACY46813	X-I-P--RD-EXX-
A/Singapore/GP2687/2009 (1/1751)	ACY46863	--I-P--XD-E-X-
A/Singapore/ON1187/2009 (1/1751)	ACY46782	--I-P--XX-X-X-
A/Singapore/ON141/2009 (1/1751)	ACY46123	--I-P--GD-E---
A/Singapore/ON2081/2009 (1/1751)	ACY46843	--I-P--XD-XXX-
A/Wisconsin/629-S0339/2009 (1/1751)	ACZ16840	--I-T--RD-E---

[0113] (분리 넘버)*는 현재까지 분리된 돼지-기원 인플루엔자 A H1N1 바이러스 1,751개의 스트레인들 중 H5N1 HA233 에피토프에 상응하는 특이 서열을 포함하는 스트레인 넘버를 나타낸다.

표 9

[0114] 현재까지 보고된 인플루엔자 A 바이러스 아형들 내 A/H1N1 HA370 에피토프에 상응하는 서열의 보존성.

스트레인	접근번호	약어	서열
A/Texas/05/2009 (H1N1)	ACP41934	A/H1N1-TX HA370	HHQNEQSGSYAADLKST
A/San Antonio/PR922/2009 (H1N1)	ACU29959	A/H1N1-SA HA370	HHQNEQSGSYAADLKST
A/WSN/1933 (H1N1)	AAA43209	hH1N1-WSN HA370	HHQNEQSGSYAADLKST
A/New York/604/1995 (H1N1)	ABE11867	hH1N1-NY HA370	HHQNEQSGSYAADLKST
A/Ohio/3559/1988 (H1N1)	ABU80400	hH1N1-OH HA370	HHQNEQSGSYAADLKST
A/Adachi/2/1957 (H2N2)	BAG72216	hH2N2 HA370	HHSDQSGSYAADLKST
A/New York/61A/2003 (H3N2)	AAX11455	hH3N2 HA370	RHQNSEGTGQAADLKST
A/New York/356/2004 (H3N2)	AAZ74419	hH3N2 HA370-1	RHQNSEGTGQAADLKST
A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1)	AAW80717	hH5N1 HA370	HHSEQSGSYAADLKST
A/Hong Kong/485/97 (H5N1)	AAD52043	hH5N1-HK HA370	HHSEQSGSYAADLKST
A/England/268/1996(H7N7)	AAC40998	hH7N7 HA370	RHQNAQEGTAADYKST
A A/Shantou/239/98(H9N2)	AAL32476	hH9N2-ST HA370	QHSKYQGVGMAADRDST
A/Hong Kong/1074/99(H9N2)	CAB95857	hH9N2-HK HA370	QHSNDQGVGMAADRDST

표 10

[0115] 인간 간암의 hTM4SF5, HCV의 외피 단백질(E protein; HCV-E) 그리고 인간 RSV의 부착 당단백질 G(hRSV-G) 및 융합 단백질(HRSV-F)의 후보 에피토프들.

단백질	펩타이드	서열	위치	길이(mer)
hTM4SF5	TM4SF5R1	NGETSWTNTNHL	32-45	14
	TM4SF5R2-1	RNGPRCLMNGEWGY	113-126	14
	TM4SF5R2-2	GEWGYHFEDTAGAY	122-135	14
	TM4SF5R2-3	NRTLWDRCEAPPRV	138-151	14
	TM4SF5R2-4	WDRCEAPPRVVPWN	142-155	14
	TM4SF5R2-5	GAYLLNRTLWDRCEA	133-147	15
HCV	HCVE1 57	TRDGKLPPTQLRR	57-69	13
	HCVE2 202	CFRKHPPEATYSR	202-213	12
	HCVE2 269	CDLEDNRSELSP	269-281	13
HRSV-G	HRSVG1	MSKHKNQRTARTLEKTD	1-18	18
	HRSVG150	PRLKNPPKKPKDDY	150-163	14
HRSV-F	HRSVF99	NTPAANNRAREAPQYM	99-115	17

표 11

[0116] hRSV A 긴 스트레인 F 단백질(hRSV A strain long F protein)의 후보 에피토프들.

스트레인	서열	위치	약어	변이체
hRSV A 긴 스트레인 F 단백질 (hRSV A strain long F protein)	CFASSQNITEEFYQ	21-34	HRSV-Fa1	5 type
	IKENKNGTDAKVKL	64-78	HRSV-Fa2	2 type
	KVKLIKQELDKYKNA	75-89	HRSV-Fa3	4 type
	TSPLCTTNTKEGSNI	318-332	HRSV-F1	2 type
	GCDYASNGVDTVSV	438-452	HRSV-F2	3 type
	LVFPSDEFDASISQV	481-495	HRSV-F3	1 type
	SDEFDASISQVNEKI	485-499	HRSV-F4	1 type
	RSTPVTLSKDQLSGI	553-567	HRSV-F5	3 type
	TDRGWYCDNAGSVSF	337-351	HRSV-F6	1 type
	AGSVSFFPQAETCKV	346-360	HRSV-F7	3 type
	YGKTKCTASKNRGI I	417-432	HRSV-F8	2 type
	CKIMTSKTDVSSSVI	393-407	HRSV-F9	3 type

[0117] 에피토프 스크리닝을 위한 펩타이드 서열들이 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 지표 및 양친매성에 근거하여

hRSV A 긴 스트레인 F 단백질로부터 선택되었다.

표 12

[0118] hRSV A 긴 스트레인들 내 후보 에피토프들의 서열 변이성.

약어	긴 스트레인 서열	다른 서열	약어
HRSV-Fa1	CFASSQNITEEFYQ	CFASGQNITEEFYQ YLTSSQNITEEFYQ	
HRSV-Fa2	IKENKCNGTDAKVKL	IKETKCNGTDTKV	
HRSV-Fa3	KVKLIKQELDKYKNA	KVKLMQELDKYKNA KVKLIKQELDKYKSA KVKLINQELDKYKNA	HRSV-Fa3-1 HRSV-Fa3-2 HRSV-Fa3-3
HRSV-Fa4	TPAANNRARRE	TPAANSRARRE TSAANNRARRE TTAANNRARRE TPATNNRARRE TPPTNNRARRE	
HRSV-F1	TSPLCTTNTKEGSNI	TSPLCTTNIKEGSNI	
HRSV-F2	GCDYASNKGVDTVSV	GCDYVSNKGVDTVSV GCDYASNKGMDTVSV	
HRSV-F3	LVFPSDEFDASISQV	없음	
HRSV-F4	SDEFDASISQVNEKI	없음	
HRSV-F5	RSTPVTLSKDQLSGI	RNTPVTLSKDQLSGI KSTPVTLSKDQLSGI	
HRSV-F6	TDRGWYCDNAGSVSF	없음	
HRSV-F7	AGSVSFFPQAETCKV	AGSVSFFPLAETCKV AGSVSFFPQADTCKV	HRSV-F7-1 HRSV-F7-2
HRSV-F8	YGKTKCTASNKNRGI I	YGKTKCTASNKDRGI I	
HRSV-F9	CKIMTSKTDVSSSVI	CKIMTSKADVSSSVI CKIMTSKTDISSSVI	

표 13

[0119] 인간 인테그린 베타4(hIB4)의 후보 에피토프들.

단백질	서열	위치	약어	길이
인간 인테그린 β4	DKVSVPTQDMRPEKL	176-190	hIB4-VWA-1-1	15
	KEPWPNSDPPFSFKN	191-205	hIB4-VWA-1-2	15
	PQTDMRPEKLKEPWPNSDP	181-199	hIB4-VWA-1-3	19
	LTEDVDEFNRKLQGERISGN	209-228	hIB4-VWA-2	20
	LDTTGTYTQYRTQDYPVPT	290-309	hIB4-VWA-3	20
	LQKEVRSARCSFNGD	459-473	hIB4-EGF-1	15

[0120] 실시예 3: CpG-DNA-펩타이드(또는 단백질)-리포솜 복합체의 제조

[0121] 본 발명에서 이용된 리포솜들은 다음과 같다: CHEMS, Chol, DOPE 및 DSPC는 Sigma로부터 구입하였다. DC-Chol 및 PEG-PE는 Avanti-Polar Lipids(Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다. CpG-DNA 및 단백질(또는 펩타이드)는 제조자의 설명서에 따라 DOTAP(Roche, Indianapolis, IN, USA), 리포펙타민(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 또는 리포펙틴(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 복합체로 제조되었다. DOPE/CHEMS, DSPC/Chol, DSPC/CHEMS/PEG-PE, Chol/DOPE/PEG-PE 또는 Dc-Chol/DOPE/PEG-PE에 공동-포집된 CpG-DNA 및 단백질(또는 펩타이드)로 구성된 리포솜 복합체는 이전에 보고된 방법에 따라 제조되고(14, 23) 변형되었다. 간략하게 살펴보면, DOPE 및 CHEMS를 1:1의 몰 비율로 혼합하고 혼합물을 질소가스와 함께 증발시켜 무용매(solvent-free) 지질 필름을 만들었다. 그 후, 에탄올(최종농도 10%)에서 혼합하여, 동일한 부피의 수용성 CpG-DNA 및 단백질(또는

펩타이드) 혼합물에 재혼탁하여 30분 동안 상온에서 강하게 휘저었다. pH를 7.0으로 조정 한 후, 상기 리포플렉스 용액을 초음파분해기로 30초 동안 약하게 초음파 분해시켰다. 이후, 0.22 μ m 필터로 여과하고 액체질소에서 냉동-해동(freeze-thawed)을 3번 반복하였다(14, 23).

[0122]

[0123] 실시예 4: CpG-DNA-펩타이드(또는 단백질)-리포좀 복합체에 의한 체액성 면역반응 유도

[0124] <4-1> 면역화(immunization)

[0125] 마우스는 특정 병원균이 없는 조건에서 사육하였다. 4주령의 수컷 Balb/c 마우스(H-2^b)를 Central Lab. Animal Inc.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 본 발명자들의 동물실험은 한림대학교 동물실험위원회의 승인을 받았다.

[0126] 4주령의 Balb/c 마우스에 HEL(hen egg lysozyme)(50 μ g/마우스)과 MB-ODN 4531(O)(50 μ g/마우스) 혼합물 또는 HEL-MB-ODN4531-리포좀 복합체를 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 내 투여하였다. 10일 경과 후, 심장 펀칭(heart punching) 방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구 세포를 침전시켜 혈청을 획득하였다. 획득한 혈청으로부터 항-HEL 항체들(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 역가를 ELISA로 확인하였다.

[0127] <4-2> ELISA

[0128] 상기 마우스를 주입 후 10일 쯤에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 혈청을 획득하여 -70℃에 보관하였다. IgG, IgG1 및 IgG2a 역가를 측정하기 위해, 본 발명자들은 HEL(10 μ g/ml)로 96-웰 면역플레이트(immunoplates; Nalgen Nunc International)를 코팅한 후, 1% BSA를 포함하는 PBST로 상기 플레이트를 블랏킹하였다. 상기 혈청이 각 플레이트의 위쪽 열에 첨가된 후, 상기 혈청과 PBST를 1:3으로 혼합하여 연속적으로 희석한 혈청 희석액들을 아래 열에 첨가하였다. 본 발명자들은 상온에서 4시간 동안 플레이트에서 반응시키고 PBST로 세척하였다. 다음으로, 본 발명자들은 호스래디쉬 퍼옥시다제와 컨쥬게이션된 염소 항-마우스 IgG 항체, 항-마우스 IgG1 항체 또는 항-마우스 IgG2a 항체를 첨가하여 2시간 동안 플레이트에서 반응시켰다. 본 발명자들은 1-Step ABTS(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 발색 어세이(colorimetric assay)를 실시하였고 Labsystems Multiskan 마이크로플레이트 판독기(GMI Inc., Ramsey, MI, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(19).

[0129] HEL-MB-ODN4531 및 리포좀 복합체를 복강 내에 주사하여 면역화된 BALB/c 마우스의 체액성 면역반응을 조사하였다. HEL 단독 또는 HEL-MB-ODN4531 혼합물, HEL-리포좀 복합체를 주사하는 것에 비하여 HEL-MB-ODN4531-리포좀 복합체를 주사하였을 때 HEL에 대한 항체의 양이 현저하게 증가하였는데, 이는 체액성 면역반응에서 MB-ODN4531-리포좀 복합체의 면역 보조제 효능을 보여주는 것이다. 프로인트 불완전 보조제(Incomplete Freund's adjuvant)는 60년 전부터 현재까지 사용되고 있는 대표적인 면역보조제이다. 그러나, 상기 면역보조제의 문제는 세포성 면역증강이 이루어 지지 않고 인간에게 사용할 수 없다는 점이다. MB-ODN4531-리포좀 복합체는 면역세포 자극을 통해 세포성 면역반응을 유도할 뿐 아니라, 체액성 면역능을 증가시키는 면역보조제로서 기능을 가진다. 또한, MB-ODN4531-리포좀 복합체는 Th1 면역반응-특이적 IgG2a의 항체 생산에 효과적이다.

[0130]

[0131] <4-3> 마우스와 면역화

[0132] 마우스는 특정 병원균이 없는 조건에서 사육하였다. 4주령의 수컷 Balb/c 마우스(H-2^b)를 Central Lab. Animal Inc.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 본 발명자들의 동물실험은 한림대학교 동물실험위원회의 승인을 받았다.

[0133] 상기 마우스에 펩타이드(50 /마우스)-CpG-DNA(MB-ODN 4531(O))-리포좀 복합체를 10일 간격으로 3회 또는 4회에 걸쳐서 복강 내 투여하였다.

[0134] <4-4> 항원-특이적 Ig ELISA

[0135] 상기 마우스를 주입 후 10일 쯤에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 얻어진 혈청은 PBS/0.2% 소듐 아자이드와

1:10으로 혼합하여 희석된 후, -20℃에 보관하였다. IgG, IgG1 및 IgG2a의 총 양을 측정하기 위해, 본 발명자들은 각 펩타이드(10 μ g/ml)로 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)를 코팅한 후, 1% BSA 및 0.05% Tween 20을 포함하는 PBST로 상기 플레이트를 블랏킹하였다. 상기 혈청과 PBST를 1:400으로 혼합하여 희석한 후, 상기 혈청 희석액을 각 플레이트의 웰에 첨가하였다.

[0136] 총 IgG, IgG1 및 IgG2a를 검출하기 위해, 본 발명자들은 바이오틴-컨쥬게이션된 래트 항-마우스 IgG 항체, 래트 항-마우스 IgG1 항체 및 래트 항-마우스 IgG2a 항체(BD Pharmingen, SanDiego, CA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 사용하였다.

[0137] IgG, IgG1 및 IgG2a의 역가를 측정하기 위해, 본 발명자들은 각 단백질 또는 펩타이드(10 /ml)로 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)를 코팅한 후, 1% BSA를 포함하는 PBST로 상기 플레이트를 블랏킹하였다. 상기 혈청이 각 플레이트의 위쪽 열에 첨가된 후, 상기 혈청과 PBST를 1:3으로 혼합하여 연속적으로 희석한 혈청 희석액들을 아래 열에 첨가하였다. 본 발명자들은 상온에서 2시간 동안 플레이트에서 반응시키고 PBST로 세척하였다. 다음으로, 본 발명자들은 바이오틴-컨쥬게이션된 래트 항-마우스 IgG 항체, 래트 항-마우스 IgG1 항체 또는 래트 항-마우스 IgG2a 항체를 첨가하여 2시간 동안 플레이트에서 반응시켰다. 3번에 걸친 세척 후, 본 발명자들은 스트렙타비딘-컨쥬게이션된 HRP(horseradish peroxidase)를 각 플레이트에 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 발색 여세이는 TMB 용액(KPL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 실시하고 분광광도계(spectrophotometer; Spectra Max250, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0138] **실시예 5: CpG-DNA-H5N1(또는 다른 인플루엔자 스트레인들) HA 단백질 펩타이드-리포솜 복합체를 이용한 에피토프 스크리닝**

[0139] <5-1> CpG-DNA-H5N1(또는 다른 인플루엔자 스트레인들) HA 펩타이드-리포솜 복합체의 면역화

[0140] 후보 에피토프들(표 2 내지 표 9)은 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 다양한 인플루엔자 A 바이러스의 HA(hemagglutinin) 단백질을로부터 선별하여 상기 실시예 3에서와 같이 CpG-DNA-펩타이드-리포솜 복합체를 제조하였다. 상기 제조된 CpG-DNA-펩타이드-리포솜 복합체(50 μ g/마우스)를 Balb/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하였다. 마지막 투여 후 10일 경과 시, 심장 편칭 방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시켜 혈청을 획득하였다. 상기 획득한 혈청으로부터 항-펩타이드 항체(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 역가 및 양을 ELISA로 측정하였다.

[0141] <5-2> ELISA

[0142] 상기 마우스를 주입 후 10일 째에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 얻어진 혈청은 PBS/0.2% 소듐 아자이드와 1:10으로 혼합하여 희석된 후, -20℃에 보관하였다. 본 발명자들은 각 펩타이드(10 μ g/ml; 소듐 바이카보네이트 완충액, pH 9.6)를 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)에 첨가한 후, 16시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이후, 각 펩타이드에 특이적으로 결합하는 총 IgG(도 2a, 2d, 2e, 5a, 5d, 6a, 6d 및 7), IgG1(도 2b, 2e, 5b, 6b 및 7) 및 IgG2a(도 2c, 2e, 5c, 6c 및 7)의 양 및 역가가 실시예 <4-4>에 기재된 바와 같이 분석되었다.

[0143] 조류 인플루엔자 A H5N1/베트남/2004 스트레인의 HA 단백질로부터 얻어진 펩타이드들 중에서 hH5N1 HA58, hH5N1 HA233, hH5N1 HA336 및 hH5N1 HA370 펩타이드가 총 IgG(도 2a 및 도 2d) 및 IgG2a(도 2c)의 양 및 역가를 증가시켰다. hH5N1 HA370 펩타이드에 상응하는 H1N1 펩타이드(hH1N1-NY HA370, hH1N1-OH HA370, hH1N1-WSN HA370), A/H1N1-TX HA370) 및 H5N1 바이러스에 존재하는 hH5N1-HK HA370 펩타이드(표 3 및 표 4)가 총 IgG(도 5a 및 도 5d)의 양 및 역가를 증가시켰다. 또한, Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산이 증가함을 확인할 수 있었다(도 5c). 더 나아가, hH5N1 HA233 펩타이드에 상응하는 H5N1 바이러스 스트레인에 존재하는 hH5N1 HA233-1, hH5N1 HA233-2, hH5N1 HA233-3, hH5N1 HA233-4, hH5N1 HA233-6, hH5N1 HA233-7, hH5N1 HA233-9 및 hH5N1 HA233-11 펩타이드들(표 5), 그리고 hH5N1 HA233 펩타이드에 상응하는 다양한 인플루엔자 A 바이러스 스트레인에 존재하는 hH1N1-WSN HA233, hH1N1-HK HA233, hH1N1-Thai HA233, A/H1N1-TX HA233, mH2N5 HA233, hH7N7 HA233, hH9N2 HA233 및 sH15N2 HA233 펩타이드들(표 6)도 총 IgG의 양을 증가시켰다(도 6d).

[0144] 또한, hH5N1 HA370 펩타이드에 상응하는 H7N7 및 H9N2 바이러스에 존재하는 hH7N7 HA370, hH9N2-ST HA370 및

hH9N2-HK HA370 펩타이드(Table 9)도 총 IgG의 양을 증가시켰다(도 7a). hH5N1 HA233 펩타이드에 상응하는 H7N7 및 H9N2 바이러스에 존재하는 hH7N7 HA 233 및 hH9N2 HA233(표 6)도 총 IgG의 양을 증가시켰다(도 7b).

- [0145] 실시예 6: CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체에 의한 체액성 면역반응 유도에서 리포좀 종류 및 CpG-DNA 종류에 따른 영향 평가
- [0146] MB-ODN 4531-펩타이드(hH5N1 HA233)를 여러 종류의 리포좀(DOPE:CHEMS(6:4, 1:1, 1:0 및 0:1), 리포펙틴, 리포펙타민, DOTAP 및 폴록사머 407)으로 상기 실시예 3에서처럼 각각 복합체를 제조하여 상기 실시예 <4-3>에서처럼 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. hH5N1 HA233 펩타이드-특이적 총 IgG(도 3a)의 양을 측정된 결과, 상기 혈청에서 DOPE:CHEMS의 비율이 1:1에서 총 IgG의 양이 가장 높게 나타났다. 또한, DOPE:CHEMS의 비율이 1:1에서 H5N1 HA233 펩타이드-특이적 총 IgG의 역가가 가장 높게 나타났다(도 3b).
- [0147] 펩타이드(H5N1 HA233)-리포좀(DOPE:CHEMS(1:1))과 표 1에 제시된 여러 종류의 PO-DNAs, 또는 PS-DNAs로 상기 실시예 3에서처럼 각각 복합체를 제조하여 상기 실시예 <4-3>에서 처럼 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 상기 실시예 <4-4>에서와 같이 혈청에서 H5N1 HA233 펩타이드-특이적 총 IgG의 양을 확인한 결과, PO-DNA MB-ODN 4531(O)와 PS-DNA MB-ODN 4531(S)을 이용한 복합체에서 가장 높게 나타났다(도 4). 상술한 결과들은 CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체에서 PO-DNA 또는 PS-DNA의 CG서열이 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다.
- [0148] 실시예 7: CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체에 의해 생산된 항체의 혈구응집반응 억제 및 바이러스 중화 작용 분석
- [0149] <7-1> 재조합 H5N1 바이러스
- [0150] A/베트남/1203/2004(H5N1) 및 A/푸에르토리코/8/34(PR8)(H1N1) 인플루엔자 바이러스의 유전자 절편들(segments)이 바이러스 레스큐(rescue)를 위해 플라스미드로 클로닝되어 8개의 플라스미드 역방향 유전학적(reverse genetics) 방법을 이용하여 유전자 재편성(reassortment)되었다(36). 상기 플라스미드로부터 유래된 바이러스들이 10일된 배아 닭 에그의 요막강(allantoic cavities)에 군집하였다. 상술한 재편성 바이러스들은 "PR8/H5Lo"를 포함하며, 이는 조류계(avian-lineage) A/베트남/1203/2004(H5N1)의 HA 유전자 절편 및 PR8 내 7개의 유전자 절편에 상응하는 유전자 절편들을 가진다.
- [0151] <7-2> 혈구응집반응 억제 어세이
- [0152] 혈구응집반응-억제 어세이는 공지된 방법에 따라 실시되었다(37). 간략하게는, 바이러스를 4 HA 유니트로 희석하여 동일한 부피의 두배-희석된 수용체-파괴효소(receptor-destroying enzyme)를 처리한 혈청 시료와 함께 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 동일한 부피의 0.5 % 닭 적혈구를 웰에 첨가하고 30분 동안 배양하여 HI 역가를 측정하였다.
- [0153] <7-3> 바이러스 중화 어세이
- [0154] MDCK 세포에 대해 바이러스 중화 어세이를 공지된 방법으로 실시하였다(38). 약 100 PFU(plaque forming unit)/ml의 인플루엔자 바이러스들(rH5N1 바이러스 및 A/WSN/1933)을 동일 부피의 2배 순차 희석된 열-불활성화된 혈청 시료와 함께 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 배양 후, 상기 혼합물을 10% FBS 및 TPCK(L-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone, 1 μg/ml)-처리된 트립신으로 보충된 최소 배지(minimum essential medium, MEM)에서 MDCK 세포의 컨플루언트 단일막에 첨가하였다. 상기 세포들을 세포변성(cytopathic) 효과를 측정하기 전에 세포들을 72시간 동안 배양하였다. 중화 백분율은 다음의 방정식을 이용하여 계산하였다: 중화(%), 억제율) = [(바이러스만 처리된 구의 플라크 수 순차적으로 희석된 혈청-혼합된 바이러스 처리구의 플라크 수) / 바이러스만 처리된 구의 플라크 수] × 100.
- [0155] PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233 or hH1N1-HK HA233)-리포좀(DOPE:CHEMS)으로 상

기 실시예 <3>에서처럼 각각 복합체를 제조하여 상기 실시예 <4-3>에서처럼 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. 혈청에서의 hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233 또는 hH1N1-HK HA233 펩타이드-특이적 항체가 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo 및 A/WSN/1933에 의해 유도된 혈구응집 반응을 억제시킴을 확인할 수 있었다(도 8a).

[0156] PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233, hH1N1-HK HA233 또는 A/H1N1-TX HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)으로 상기 실시예 3에서처럼 각각 복합체를 제조하여 상기 실시예 <4-3>에서처럼 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후 혈청을 채취하였다. hH5N1 HA233 펩타이드-특이적 항체를 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo 및 A/WSN/1933(도 8b)에 미리 반응 시킨 후 MDCK 세포에 감염시켰을 때 혈청에서의 바이러스 역가가 낮게 나타남을 확인하여, hH5N1 HA233 펩타이드-특이적 항체가 바이러스를 중화시키는 기능을 한다는 사실을 확인하였다.

[0157] hH5N1 HA370 펩타이드-특이적 항체를 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo 및 A/WSN/1933(도 8c)에 미리 반응 시킨 후 MDCK 세포에 감염시켰을 때 혈청에서의 바이러스 역가가 낮게 나타남을 확인하여, hH5N1 HA370 펩타이드-특이적 항체가 바이러스를 중화시키는 기능을 한다는 사실을 확인하였다.

[0158] PO-DNA-펩타이드(hH1N1-WSN HA230 또는 hH1N1-HK HA230)-리포솜(DOPE:CHEMS)을 투여한 혈청이 마우스에 적응된 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo 및 A/WSN/1933과 미리 반응 시킨 후 MDCK 세포에 감염시켰을 때 바이러스 역가가 낮게 나타남을 확인하여, 각 펩타이드-특이적 항체가 바이러스의 중화작용을 하는 것을 확인하였다(도 8d 및 도 8e).

[0159] 더 나아가, PO-DNA-펩타이드(A/H1N1-TX HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)을 투여한 혈청이 마우스에 적응된 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo 및 A/WSN/1933과 미리 반응 시킨 후 MDCK 세포에 감염시켰을 때 바이러스 역가가 낮게 나타남을 확인하여, A/H1N1-TX HA233 펩타이드에 대한 항체가 바이러스의 중화작용을 하는 것을 확인하였다(도 8f).

[0160] 실시예 8: CpG-DNA-펩타이드-리포솜 복합체의 백신효능 평가

[0161] <8-1> 백신접종 및 바이러스 챌린지 실험

[0162] 4주령된 BALB/c 마우스에 DOPE/CHEMS 리포솜에 포집된 50 μ g의 MB-ODN 4531(O)에 첨가한 50 μ g의 펩타이드를 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 주사하였다. 2번째 면역화하고 10일 후, 마우스에 비강흡입의 방법으로 통해 10LD50 maA/WSN/1933 또는 10LD50 rH5N1 바이러스로 챌린지하였다.

[0163]

[0164] <8-2> 바이러스 챌린지 후 체중 및 생존율(survival rate)의 측정

[0165] 감염 후, 마우스의 임상적 증상과 체중을 매일 관찰하였다. 10LD50 rH5N1 바이러스의 비강 감염 후 3일 제부터, 마우스의 체중이 감소하기 시작하여 12일 후에 모두 죽는 것을 관찰하였다. 그러나, PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA370, hH5N1 HA233 또는 hH1N1-WSN HA230)-리포솜(DOPE:CHEMS)을 2회에 걸쳐서 접종하고 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강에 감염시켰을 때, 9일까지는 체중이 감소하다 이후에 점차 회복되어 생존함을 알 수 있었다(도 9a, 도 9b, 도 11a, 도 11b, 도 13a 및 도 13b).

[0166] 그리고 PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA370, hH5N1 HA233, hH1N1-WSN HA233 또는 hH1N1-HK HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)를 2회에 걸쳐서 접종하고 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강에 감염시켰을 때, 몸무게가 처음엔 감소하다 이후에 점차 회복되어 생존함을 알 수 있었다(도 10a, 도 10b, 도 12a, 도 12b, 도 13a, 도 13b, 도 14a 및 도 14b).

[0167] 또한, PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)을 2회에 걸쳐서 접종하고 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강에 감염시켰을 때, 생존율은 50%임을 알 수 있었다(도 12a).

[0168] 그리고, PO-DNA-펩타이드(hH1N1-WSN HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)을 2회에 걸쳐서 접종하고 rH5N1 바이러스 PR8/H5Lo를 비강에 감염시켰을 때, 생존율은 38%임을 알 수 있었다(도 13a).

[0169] <8-3> 폐 조직 염색

[0170] 마우스를 지정된 시간에 디에틸에테르 흡입 마취에 의해 사망시키고 전체 폐 조직을 수득하였다. 병리조직학적 조사를 위해, 상기 폐 조직을 4% 완충 포르말린 용액에서 고정시키고 전통적인 방법에 따라 파라핀에 넣어 4

μ m 두께로 잘랐다. 표본을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA233 또는 hH5N1 HA370)-리포솜(DOPE:CHEMS)으로 2회에 걸쳐서 접종된 마우스에 10LD50 rH5N1 바이러스 또는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강에 감염시켰을 때, 상기 폐 조직이 정상 상태로 회복됨을 관찰하였다(도 9c, 도 10c, 도 11c).

[0171] 더 나아가, PO-DNA-펩타이드(hH5N1-WSN HA233 또는 hH5N1-HK HA233)-리포솜 복합체로 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 접종된 마우스에 10LD50 rH5N1 바이러스 또는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강에 감염시켰을 때, 상기 폐 조직이 정상 상태로 회복됨을 관찰하였다(도 13c 및 도 14c).

[0172] <8-4> 마우스 조직에서 바이러스 역가의 측정

[0173] 마우스를 10LD50 rH5N1 바이러스 또는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스의 비강 감염 후 3일 및 6일 쯤에, 폐 조직을 분리하여 1 ml PBS에 균질화시켜 바이러스의 역가를 분석하였다. 바이러스 또는 폐 조직 균질액의 순차적으로 10배-희석된 현탁액이 6-웰 플레이트 내 MDCK 세포의 컨플루언트 단일막에 첨가된 후, 흡수를 위해 상온에서 1시간 동안(10분 마다 흔들어줌) 반응시켰다. 상기 현탁액을 제거하고 세포에 2% 옥소이드(oxid) 아가, 5% NaHCO₃, 1% DEAE 텍스트란 및 TPC(1 μ g/ml)-처리된 트립신을 포함하는 MEM를 첨가하였다. 상기 디쉬를 37℃에서 3일 동안 반응시킨 후, 상기 디쉬 내 세포를 1 ml의 크리스탈 바이올렛으로 15분 동안 염색하여 플라크(plaques)를 시각화시켰다. 상기 플라크의 수가 바이러스의 역가를 결정하기 위해 카운팅되었다. PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA370)-리포솜(DOPE:CHEMS)으로 2회에 걸쳐서 접종된 후 10LD50 rH5N1 바이러스 또는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강에 감염시킨 마우스에서 폐 조직의 바이러스 역가가 감소되었다(도 9d 또는 도 10d).

[0174] <8-5> 혈구응집반응 억제 어세이

[0175] PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233 또는 hH1N1-HK HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)으로 2회에 걸쳐서 접종된 후 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강에 감염시킨 마우스에서, 생산된 항체에 의해 유도된 혈구응집반응의 억제가 현저하게 증가하였다(도 15a).

[0176] PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233 또는 hH1N1-HK HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)으로 2회에 걸쳐서 접종된 후 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강에 감염시킨 마우스에서, 생산된 항체에 의해 유도된 혈구응집반응의 억제가 뚜렷하게 증가하였다(도 15b).

[0177] <8-6> 항체 측정

[0178] 마우스를 PO-DNA-펩타이드(hH5N1 HA233, hH5N1 HA370, hH1N1-WSN HA233 또는 hH1N1-HK HA233)-리포솜(DOPE:CHEMS)으로 2회에 걸쳐서 접종시킨 후 10LD50 rH5N1 바이러스 또는 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스를 비강에 감염시켰다. 상기 감염 후 6일 쯤에 마우스로부터 혈청을 수득하였다. 또한, BALF(Bronchoalveolar lavage fluid)을 분리하여 hH5N1 HA229 또는 hH5N1 HA371 펩타이드-특이적 항체(총 IgG 및 IgA)의 양을 측정하였다. 10LD50 rH5N1 바이러스로 감염시킨 경우, 혈청 내 총 IgG의 양 및 BALF 내 IgA의 양이 현저하게 증가하였다(도 16a, 16c 및 16f). 10LD50 maA/WSN/1933 바이러스로 감염시킨 경우, 혈청 내 총 IgG의 양 및 BALF 내 IgA의 양이 뚜렷하게 증가하였다(도 16b, 16d, 16e 및 16f).

[0179] 실시예 9: CpG-DNA-펩타이드-리포솜 복합체의 백신화의 메모리 효능 평가

[0180] <9-1> 백신접종 및 바이러스 챌린지 실험

[0181] 4주령된 BALB/c 마우스에 DOPE/CHEMS 리포솜에 포집된 50 μ g의 MB-ODN 4531(O)에 첨가한 50 μ g의 펩타이드를 10일 간격으로 2회에 걸쳐서 복강 주사하였다. 2번째 면역화하고 2달 후, 마우스에 비강흡입의 방법으로 통해 10LD50 rH5N1 바이러스로 챌린지하였다.

- [0182] <9-2> 바이러스 켈린지 후 체중 및 생존율의 측정
- [0183] 감염 후, 마우스의 임상적 증상과 체중을 매일 관찰하였다. 10LD50 rH5N1 바이러스의 비강 감염 후 3일 제부터, 마우스의 체중이 감소하기 시작하여 14일 후에 모두 죽는 것을 관찰하였다. 그러나, PO-DNA-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포좀(DOPE:CHEMS)을 2회에 걸쳐서 접종하고 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강에 감염시켰을 때, 11일까지는 체중이 감소하다 이후에 점차 회복되어 생존함을 알 수 있었다(도 17a 및 도 17b).
- [0184] <9-3> 폐 조직 염색
- [0185] 마우스를 지정된 시간에 디에틸에테르 흡입 마취에 의해 사망시키고 전체 폐 조직을 수득하였다. 병리조직학적 조사를 위해, 상기 폐 조직을 4% 완충 포르말린 용액에서 고정시키고 전통적인 방법에 따라 파라핀에 넣어 4 μ m 두께로 잘랐다. 표본을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. PO-DNA-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포좀(DOPE:CHEMS)으로 2회에 걸쳐서 접종된 마우스에 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강에 감염시켰을 때, 상기 폐 조직이 정상 상태로 회복됨을 관찰하였다(도 17c).
- [0186] <9-4> 마우스 조직에서의 바이러스 역가 측정
- [0187] 마우스를 10LD50 rH5N1 바이러스 또는 10LD50 rH5N1 바이러스의 비강 감염 후 3일 및 6일 제에, 폐 조직을 분리하여 1 ml PBS에 균질화시켜 바이러스의 역가를 분석하였다. 바이러스 역가는 실시예 <8-4>에서처럼 플라크 어세이를 통해 측정하였다. PO-DNA-웹타이드(hH5N1 HA370)-리포좀(DOPE:CHEMS)으로 2회에 걸쳐서 접종된 후 10LD50 rH5N1 바이러스를 비강에 감염시킨 마우스에서 폐 조직의 바이러스 역가가 감염 후 6일 제에 현저하게 감소되었다(도 17d).
- [0188] **실시예 10: CpG-DNA-웹타이드-리포좀 복합체를 이용한 에피토프 효능 평가**
- [0189] <10-1> 재조합 조류 인플루엔자 A 바이러스의 불활성화
- [0190] 바이러스를 불활성화시키기 위해, rH5N1 바이러스(PR8/H5Lo)가 254 nm의 UV 파장에 5분 동안 5 cm의 거리에서 노출되었다. 바이러스 감염성(infectivity)의 불활성화는 플라크 어세이로 확인하였다.
- [0191] <10-2> 면역화
- [0192] 4주령의 Balb/c 마우스에 불활성화된 rH5N1 바이러스 또는 불활성화된 rH5N1 바이러스와 리포좀 복합체 혼합물 또는 불활성화된 rH5N1 바이러스-MB-ODN4531(50 μ g/마우스)-리포좀 복합체를 복강 내 투여하였다. 동량의 불활성화된 rH5N1 바이러스와 MB-ODN4531 혼합물을 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 투여하였다. 10일 경과 후, 심장 펀칭 방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시켜 혈청을 획득하였다. 상기 획득한 혈청으로부터 항-재조합 H5N1 바이러스 항체들(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 양 및 역가를 확인하기 위해 실시예 <4-4> 방법으로 ELISA를 수행하였다.
- [0193] <10-3> ELISA
- [0194] 상기 마우스를 주입 후 10일 제에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 얻어진 혈청은 PBS/0.2% 소듐 아자이드와 1:10으로 혼합하여 희석된 후, -20℃에 보관하였다. 본 발명자들은 각 선택된 웹타이드(rH5N1 HA233 또는 rH5N1 HA370) 또는 불활성화된 rH5N1 바이러스(10 μ g/ml; 소듐 바이카보네이트 완충액, pH 9.6)를 96-웰 면역 플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)에 첨가한 후, 16시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이후, H5N1 바이러스 또는 각 웹타이드에 특이적으로 결합하는 총 IgG, IgG1 및 IgG2a(도 18)의 생산이 실시예 <4-4>에 기재된 바와 같이 분석되었다.
- [0195] 총 IgG의 양 및 역가(도 18a 및 도 18b), 그리고 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산이 불활성화된 rH5N1 바이러스로 접종된 혈청에서 증가함을 확인할 수 있었다.
- [0196] 조류 인플루엔자 A H5N1/베트남/2004 스트레인의 HA 단백질들 중에서, hH5N1 HA233 및 hH5N1 HA370 웹타이드

가 각 펩타이드-특이적 총 IgG의 역가를 증가시키는 반면에, 불활성화된 rH5N1 바이러스로 면역화된 혈청에서는 rH5N1 HA233 또는 rH5N1 HA370 펩타이드-특이적 항체의 역가는 변함이 없었는데(도 18c 및 도 18d), 이는 rH5N1 HA233 또는 rH5N1 HA370 펩타이드-특이적 항체가 MB-ODN 4531(O)-각 펩타이드-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체로 면역화된 혈청에서 증가한다는 것을 나타낸다.

[0197] 실시예 11: CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체를 이용한 HCV의 에피토프 스크리닝

[0198] <11-1> CpG-DNA-HCV 펩타이드-리포좀 복합체의 면역화

[0199] HCV E1 및 E2 단백질 중에서, 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 3개의 후보 에피토프(표 10)를 선별하여 상기 실시예 3에서와 같이 CpG-DNA-HCV 펩타이드-리포좀 복합체를 제조하였다. 상기 제조된 CpG-DNA-HCV 펩타이드-리포좀 복합체(50 μ g/마우스)를 상기 실시예 <4-3>에서처럼 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하였다. 마지막 투여 후 10일 경과 후, 심장 펀칭 방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 상기 획득한 혈청으로부터 항-펩타이드 항체(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 역가를 ELISA로 확인하였다.

[0200] <11-2> ELISA

[0201] 상기 마우스를 주입 후 10일 째에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 얻어진 혈청은 PBS/0.2% 소듐 아자이드와 1:10으로 혼합하여 희석시킨 후, -20℃에 보관하였다. 본 발명자들은 각 선택된 펩타이드(10 μ g/ml; 소듐 바이카보네이트 완충액, pH 9.6)를 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)에 첨가한 후, 16시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이후, 각 펩타이드에 특이적으로 결합하는 총 IgG(도 19a), IgG1 및 IgG2a(도 19b 및 도 19c)의 생산이 실시예 <4-4>에 기재된 바와 같이 분석되었다.

[0202] 총 IgG의 역가(도 19c), 그리고 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산이 HCV-E2 단백질로부터 선택된 HCV-E2 202 펩타이드로 면역화된 혈청에서 증가함을 확인할 수 있었다.

[0203] <11-3> CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체-유도된 체액성 면역반응 유도에서 리포좀 종류에 따른 영향 평가

[0204] MB-ODN 4531-펩타이드(HCV-E1 202)를 여러 종류의 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1), DSPC:Chol(1:1), DSPC:CHEMS:PEG-PE(1:1:1), Chol:DOPE:PEG-PE(1:1:1), Dc-Chol:DOPE:PEG-PE(1:1))으로 상기 실시예 3에서처럼 각각 복합체를 제조하여 상기 실시예 <4-4>에서처럼 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후, 혈청을 채취하였다. 상기 혈청에서 HCV-E2 202 펩타이드-특이적 총 IgG 역가를 확인한 결과, DOPE:CHEMS의 비율이 1:1에서 HCV-E2 202 펩타이드-특이적 총 IgG의 역가가 가장 높게 나타났다(도 19d).

[0205] 실시예 12: CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체를 이용한 hRSV의 에피토프 스크리닝

[0206] <12-1> CpG-DNA-hRSV 펩타이드-리포좀 복합체의 면역화

[0207] RSV의 G 단백질 및 F 단백질 중에서, 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 20개의 후보 에피토프(표 10, 표 11 및 표 12)를 선별하여 상기 실시예 3에서와 같이 CpG-DNA-각 hRSV 펩타이드-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체를 제조하였다. 상기 제조된 CpG-DNA-각 hRSV 펩타이드-리포좀 복합체(50 μ g/마우스)를 상기 실시예 <4-3>에서처럼 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하였다. 마지막 투여 후 10일 경과 후, 심장 펀칭 방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 상기 획득한 혈청으로부터 항-펩타이드 항체(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 역가를 ELISA로 확인하였다.

[0208] <12-2> ELISA

[0209] 상기 마우스를 주입 후 10일 째에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 얻어진 혈청은 PBS/0.2% 소듐 아자이드와 1:10으로 혼합하여 희석시킨 후, -20℃에 보관하였다. 본 발명자들은 각 선택된 펩타이드(10 μ g/ml; 소듐 바이카보네이트 완충액, pH 9.6)를 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)에 첨가

한 후, 16시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이후, 각 펩타이드에 특이적으로 결합하는 총 IgG(도 20a 및 도 21), IgG1 및 IgG2a(도 21b 및 도 21c)의 생산이 실시예 <4-4>에 기재된 바와 같이 분석되었다.

[0210] 총 IgG의 역가(도 20a, 도 21a 및 도 21d), 그리고 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산(도 20b, 도 20c, 도 21b, 도 21c 및 도 21d)이 hRSV G 단백질 및 F 단백질로부터 선택된 HRSV-G1, HRSV-Fa3, HRSV-Fa3-2, HRSV-F7 및 HRSV-F9 펩타이드로 면역화된 혈청에서 증가함을 확인할 수 있었다.

[0211] 실시예 13: CpG-DNA-펩타이드-리포솜 복합체를 이용한 인간 인테그린 $\beta 4$ 의 에피토프 스크리닝

[0212] <12-1> CpG-DNA-hIB4 펩타이드-리포솜 복합체의 면역화

[0213] 대부분의 암종 세포에서 발현되는 인간 인테그린 $\beta 4$ 단백질(hIB) 중에서, 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 6개의 후보 에피토프(표 13)를 선별하여 상기 실시예 3에서와 같이 CpG-DNA-각 hIB4 펩타이드-리포솜(DOPE:CHEMS) 복합체를 제조하였다. 상기 제조된 CpG-DNA-각 hIB4 펩타이드-리포솜 복합체(50 μ g/마우스)를 상기 실시예 <4-3>에서처럼 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회 또는 4회에 걸쳐서 복강 투여하였다. 마지막 투여 후 10일 경과 후, 심장 편칭 방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 상기 획득한 혈청으로부터 항-펩타이드 항체(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 역가를 ELISA로 확인하였다.

[0214] <12-2> ELISA

[0215] 상기 마우스를 주입 후 10일 쯤에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 얻어진 혈청은 PBS/0.2% 소듐 아자이드와 1:10으로 혼합하여 희석시킨 후, -20℃에 보관하였다. 본 발명자들은 각 선택된 펩타이드(10 μ g/ml; 소듐 바이카보네이트 완충액, pH 9.6)를 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)에 첨가한 후, 16시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이후, 총 IgG의 양(도 22a) 및 역가(도 22b)가 실시예 <4-4>에 기재된 바와 같이 분석되었다.

[0216] 총 IgG의 양(도 22a) 및 역가(도 22b)가 hIB4 단백질로부터 선택된 hIB4-VWA-1-2, hIB4-VWA-1-3, hIB4-VWA-2, hIB4-VWA-3 및 hIB4-EGF-1 펩타이드로 면역화된 혈청에서 증가함을 확인할 수 있었다.

[0217] 실시예 14: CpG-DNA-펩타이드-리포솜 복합체를 이용한 간암-특이적 TM4SF5 단백질의 에피토프 스크리닝

[0218] <14-1> CpG-DNA-TM4SF5 펩타이드-리포솜 복합체의 면역화

[0219] 간암 세포의 TM4SF5 단백질 중에서, 친수성, 소수성, 2차 구조, 항원성 및 양친매성을 고려하여 6개의 후보 에피토프(표 10)를 선별하여 상기 실시예 3에서와 같이 CpG-DNA-TM4SF5 펩타이드-리포솜(DOPE:CHEMS) 복합체를 제조하였다. 상기 제조된 CpG-DNA-각 TM4SF5 펩타이드-리포솜 복합체(50 μ g/마우스)를 상기 실시예 <4-3>에서처럼 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하였다. 마지막 투여 후 10일 경과 후, 심장 편칭 방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 상기 획득한 혈청으로부터 항-펩타이드 항체(총 IgG, IgG1 및 IgG2a)의 역가를 ELISA로 확인하였다.

[0220] <14-2> ELISA

[0221] 상기 마우스를 주입 후 10일 쯤에 희생시켰다. 상기 마우스로부터 얻어진 혈청은 PBS/0.2% 소듐 아자이드와 1:10으로 혼합하여 희석시킨 후, -20℃에 보관하였다. 본 발명자들은 각 선택된 펩타이드(10 μ g/ml; 소듐 바이카보네이트 완충액, pH 9.6)를 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)에 첨가한 후, 16시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이후, 각 펩타이드에 특이적으로 결합하는 총 IgG(도 23a), IgG1 및 IgG2a(도 23b)의 양이 실시예 <4-4>에 기재된 바와 같이 분석되었다.

[0222] 총 IgG의 역가(도 23a), 그리고 Th1 면역반응과 관련된 IgG2a의 생산(도 23b)이 TM4SF5 단백질로부터 선택된 TM4SF5 R2-3 또는 TM4SF5 R2-5 펩타이드로 접종된 혈청에서 증가함을 확인할 수 있었다.

- [0223] <14-3> CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체-유도된 체액성 면역반응에서 리포좀 종류에 따른 영향 평가
- [0224] MB-ODN 4531-펩타이드(TM4SF5)를 여러 종류의 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1), DSPC:Chol(1:1), DSPC:CHEMS:PEG-PE(1:1:1), Chol:DOPE:PEG-PE(1:1:1), Dc-Chol:DOPE:PEG-PE(1:1))으로 상기 실시예 3에서처럼 각각 복합체를 제조하여 상기 실시예 <4-4>에서처럼 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후, 혈청을 채취하였다. 상기 혈청에서 TM4SF5 R2-3 펩타이드-특이적 총 IgG 역가를 확인한 결과, DOPE:CHEMS의 비율이 1:1에서 TM4SF5 R2-3 펩타이드-특이적 총 IgG의 역가가 가장 높게 나타났다(도 23c).
- [0225] <14-4> CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체-유도된 체액성 면역반응 유도에서 CpG-DNA 종류에 따른 영향 평가
- [0226] TM4SF5 R2-3 펩타이드-리포좀(DOPE:CHEMS(1:1))과 표 1에 제시된 여러 종류의 PO-DNA(MB-ODN4531(O), MB-ODN 4531(GC)) 또는 PS-DNA(MB-ODN 4531(S))로 상기 실시예 3에서처럼 각각 복합체를 제조하여 상기 실시예 <4-4>에서 처럼 BALB/c 마우스에 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후, 혈청을 채취하였다. 상기 실시예 <4-4>에서와 같이 혈청에서 TM4SF5 R2-3 펩타이드-특이적 총 IgG의 역가를 확인한 결과, PO-DNA(MB-ODN4531(O)) 또는 PS-DNA(MB-ODN 4531(S))을 이용한 복합체에서 가장 높게 나타났다(도 23d).
- [0227] <14-5> CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체에 의한 체액성 면역반응에서 TLR9의 영향 평가
- [0228] DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드 및 MB-ODN4531(O)이 주입된 마우스로부터 항체 생산 상에 TLR9의 기능을 조사하기 위해, 본 발명자들은 BALB/c TLR9 넋아웃 마우스 및 야생형 마우스를 이용하여 IgG 생산을 분석하였다. 예상한 대로, DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드 및 MB-ODN4531(O)이 주입된 TLR9 넋아웃 마우스는 전혀 IgG를 생산하지 않았기 때문에, DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드 및 MB-ODN4531(O)의 IgG-생산능은 TLR9에 절대적으로 의존적이었다(도 23e). 이와 대조적으로, IFA와 조합된 HEL의 주입은 야생형 마우스 및 TLR9 넋아웃 마우스에서 IgG 생산을 증가시켰다(도 23f).
- [0229] <14-5> CpG-DNA-펩타이드-리포좀 복합체-유도된 체액성 면역반응에서 MHC 클래스 II-매개된 제시 및 Th1 분화상의 영향 평가
- [0230] DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 에피토프 및 MB-ODN4531(O)에 의한 면역화에 대한 반응으로 항체 생산의 동력학(kinetics)을 평가하기 위해, 본 발명자들은 DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 및 MB-ODN4531(O)를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여하였다. 상기 BALB/c 마우스는 2차 및 3차 반응에서 매우 많은 양의 펩타이드-특이적 IgG(IgG2a)를 생산하였다(도 24a). 다음으로, 본 발명자들은 DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 및 MB-ODN4531(O)에 대한 반응으로 IgG 생산에 있어 MHC 클래스 II-매개된 제시(presentation)의 필요성을 조사하였다. 도 24b에서 볼 수 있듯이, 항-CD4 항체가 BALB/c 마우스에 복강 투여되어 유도된 CD4⁺ 세포의 결핍은 펩타이드-특이적 IgG의 생산을 현저하게 감소시켰다. 또한, 본 발명자들은 DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 및 MB-ODN4531(O)에 의한 면역화에 대한 반응에서 MHC 클래스 II 넋아웃 마우스 및 OT-II 트랜스제닉 마우스에서 IgG 및 IgG2a의 생산 감소를 확인하였다(도 24c 및 도 24d). 더 나아가, 본 발명자들은 DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 및 MB-ODN4531(O)에 의한 면역화에 대한 반응으로 IgG 생산에 있어 Th1 분화의 연관성(involverment)을 조사하였다. 본 발명자들은 STAT4 넋아웃 마우스에서 IgG 및 IgG2a의 생산 감소(도 24e)를 확인하였는데, 이는 DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 및 MB-ODN4531(O)에 의한 면역화에 대한 반응에서 STAT4가 T 세포의 Th1 세포로의 분화를 촉진한다는 것을 의미한다. 하지만, DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 및 MB-ODN4531(O)-유도된 IgG 생산은 STAT6 넋아웃 마우스에서는 관찰되지 않았다(도 24f). 상술한 결과들은 DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 B 세포 에피토프 및 MB-ODN4531(O) 면역화에 대한 반응으로 IgG(IgG2a) 생산은 CD4⁺ 세포 MHC 클래스 II-매개된 제시 및 Th1 분화를 필요로 한다는 것을 의미한다.
- [0231] 실시예 15: 마우스 항-hTM4SF5 단일클론 항체(mAbs)의 생산

- [0232] 본 발명자들은 DOPE:CHEMS 리포솜 복합체에 공동-포집된 hTM4SF5R2-3 펩타이드(50 μ g) 및 MB-ODN4531(O)(50 μ g)를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 투여한 후, 표준 하이브리도마 기술에 따라 항-hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포(hybridoma cells)를 스크리닝하였다(39). 상기 항-hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 단일클론 항체(IgG2a)가 단백질 A 컬럼 크로마토그래피(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 복수액(ascites fluid)으로부터 정제되었다.
- [0233] **실시예 16: CpG-DNA-TM4SF5 펩타이드-리포솜 복합체에 의해 생산된 단일클론 항체의 TM4SF5 단백질 인식 분석**
- [0234] <16-1> 인간 간암 세포주들에서 TM4SF5 발현 분석
- [0235] 인간 간암 세포주(Human hepatocarcinoma cell lines; Huh-7)는 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 인간 간세포주(Human hepatic cell lines; SNU-398, SNU-423, SNU-739 및 SNU-761)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 상기 Huh-7, SNU-398, SNU-423, SNU-739 및 SNU-761 세포들은 10% FBS(fetal bovine serum; Hyclone, Logan, UT, USA)를 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 인간 정상 간세포(Promo Cell, Heidelberg, Germany)는 판매자의 설명서대로 배양하였다. 모든 세포들은 95% 공기와 5% CO₂의 대기 상태에서 37°C로 배양하였다. hTM4SF5 mRNA의 발현을 분석하기 위하여, RT-PCR을 실시하였다. 총 RNA를 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Germantown, MD, USA)을 이용하여 추출하였고, cDNA 제조는 공지의 방법으로 실시하였다(40). 표준 PCR 반응은 다음의 프라이머 세트를 이용하여 25 사이클을 수행하였다: 인간 β -액틴, 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3' 및 5'-CCTTAATGTCACGCACGATT-3'(500 bp); hTM4SF5. 상기 Huh-7 및 SNU-761 세포주에서 TM4SF5 mRNA의 발현이 높게 나타남을 RT-PCR을 통하여 확인하였다(도 25a).
- [0236] <16-2> TM4SF5 R2-3 펩타이드를 인식하는 단일클론 항체의 TM4SF5 단백질 인식 확인(FACS 분석)
- [0237] 항체 결합 분석에 있어, 간암 세포를 0.1% BSA를 포함하는 PBS로 세척한 후, Fc 수용체와의 결합을 블로킹하기 위하여 10 μ g/ml의 인간 IgG(Sigma)와 함께 4°C에서 20분 동안 반응시켰다. 블로킹 이후, 세포들을 정제된 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체<실시예 15>와 함께 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 나서, 세포들을 0.1% BSA를 포함하는 PBS로 세척한 후 FITC-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 IgG 항체(BD Biosciences)와 함께 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. RT-PCR을 통하여 TM4SF5의 mRNA 발현이 확인된 Huh-7 및 SNU-761에 정제한 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체가 결합함을 FACS 분석을 통하여 확인하였다(도 25c).
- [0238] **실시예 17: CpG-DNA-TM4SF5 펩타이드-리포솜 복합체에 의해 생산된 항체의 간암 세포의 성장억제 효능 평가**
- [0239] <17-1> 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 단일클론 항체에 의한 세포성장 억제
- [0240] 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체(10 μ g/ml)를 72시간 동안 처리한 후 MTT 어세이를 통하여 인간 간암 세포주(Huh-7 및 SNU-739)의 성장을 분석하였다.
- [0241] 간암 세포를 48-웰 플레이트에서 72시간 동안 배양시킨 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma) 용액을 각 플레이트에 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 더 반응시켰다. 배지를 제거한 후에, 포르마잔 크리스탈을 DMSO에 가용화(solubilize)시켰다. 색깔의 변화는 분광광도계(SpectraMax250; Molecular Devices, Downingtown, PA, USA)를 이용하여 650 nm의 기준파장(reference wavelength) 하에서 570 nm의 파장을 모니터링하였다. TM4SF5를 발현하는 Huh-7 세포주의 성장이 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체 처리에 의해 억제된다는 사실을 MTT 어세이를 통해 확인하였다(도 25d). 이와 대조적으로, TM4SF5를 발현하지 않는 세포주(SNU-739)는 영향을 받지 않았다(도 25d).
- [0242] <17-2> 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체에 의한 세포주기 조절
- [0243] 간암 세포주(Huh-7 및 SNU-739)에 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체(10 μ g/ml)를 72시간 동안 처리한 후 세포주기를 관찰하였다. 본 발명자들은 상기 세포를 RNase(200 μ g/ml)-포함 PBS에 녹인 프로피디움 아이오다이드(PI; 20 μ g/ml) 용액과 반응시킴으로써 DNA 함량을 분석하였다. 세포들을 상온에서 30분 동안 염색하여 FACScan 유

세포분석기(BD Biosciences)로 분석하였다. 세포주기의 분포 데이터는 ModFit LT 3.0 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0244] 각 군에서 세포주기 단계의 분포를 비교하였다. TM4SF5를 발현하는 Huh-7 세포주에서 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체를 처리를 통해 S기가 어레스트된다는 것을 관찰하였다. 대조적으로, TM4SF5를 발현하지 않는 SNU-739 세포주에서는 세포주기에 영향이 없었다(도 25d).

[0245] <17-3> 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체에 의한 간암세포의 기능저해 분석

[0246] TM4SF5를 발현하는 간암 세포가 세포-세포 접촉 억제 능력을 상실하여 간암세포로 성장하는 것이 알려져 있었다(41). TM4SF5를 발현하는 간암 세포는 비정상적인 액틴 다발(actin bundling)을 가지는 반면에, TM4SF5를 발현하지 않는 세포는 넓게 펼쳐진 다각형 형태(overspread polygonal shape)를 지지하는 스트레스 섬유(stress fiber)의 명확한 윤곽(outline)을 나타낸다(41). 따라서, 본 발명자들은 간암 세포주(Huh-7 및 SNU-739)에 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체(10 μ g/ml)를 72시간 동안 처리한 후 세포의 액틴을 관찰하였다.

[0247] 세포를 항-hTM4SF5 항체(10 μ g/ml)로 처리하기 하루 전에 12-웰 플레이트 내 유리 커버슬립에서 배양하였다. 세포들을 상기 항체로 72시간 동안 처리한 후, 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고 0.1% Triton X-100으로 가 투과화(permeabilize)시켰다. 이후, 로다민(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)-컨쥬게이션된 팔로이딘(phalloidin; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)으로 염색하였다. 핵은 Hoechst No. 33258으로 염색하였다. 상기 마운팅된 시료는 LSM 510 META NLO(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 스캔하였다.

[0248] hTM4SF5를 발현하는 간암 세포(Huh-7)에 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드-특이적 항체를 처리한 경우에, hTM4SF5를 발현하지 않는 세포에서처럼 액틴이 넓게 퍼진 다각형 형태를 지지하는 뚜렷한 윤곽의 스트레스 섬유로 검출되는데, 이는 상기 항체가 hTM4SF5-발현 세포로 타겟된다는 것을 의미한다(도 25f). 상술한 결과들은 DOPE:CHEMS 리포좀 복합체에 공동-포집된 MB-ODN4531(0) 및 hTM4SF5R2-3(50 μ g)에 의해 발생된 항체가 hTM4SF5 단백질의 검출에 유용하게 이용될 수 있으며 세포 내에서의 항체-매개된 hTM4SF5 타겟팅이 간암세포의 기능적 변화와 연관되어 있는데, 상기 변화는 세포 기능의 다양성을 변화시킬 수 있는 세포 성장을 크게 감소시킬 수 있다는 것을 의미한다.

[0249] **실시예 18: hTM4SF5R2-3 펩타이드-특이적 항체에 의한 인 비보 간암 세포 성장 억제 효능 평가**

[0250] <18-1> 누드 마우스(nude mice)에서 이종이식(xenograft) 실험

[0251] 5 $\times 10^6$ 개의 인간 간암 세포주(Huh-7)를 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하주사 하였다. 암의 직경이 5 mm까지 자란 후에, 시료들은 3가지 군[PBS, 정상 IgG 및 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체 처리군(n = 5/처리군)]으로 나누었다. 각처리군은 PBS 및 각 항체(100 mg/Kg 마우스)를 3일 간격으로 5회에 걸쳐서 상기 암 조직(5 mm)에 주입하였다. 5주 동안 관찰하면서 암의 총 양(volume; 직경)을 칼리퍼스(calipers)를 이용하여 측정하였다. 이종이식 실험의 분석을 통해, 종양 성장을 인 비보에서 감소시키는 데 간암 세포로의 항-TM4SF5 R2-3 펩타이드 항체 타겟팅만으로 충분하다는 것을 규명하였다(도 26a 및 도 26b).

[0252] **실시예 19: MB-ODN 4531(0)-hTM4SF5R2-3 펩타이드-리포좀 복합체에 의한 백신화를 통해 인 비보 간암 세포 성장 억제 효능 평가**

[0253] <19-1> 마우스 종양 자가이식(allograft) 실험

[0254] 4주령된 BALB/c 마우스에 MB-ODN 4531(0)-hTM4SF5R2-3 펩타이드-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체를 10일 간격으로 3회에 걸쳐서 복강 주입하였다. 3번째 면역화시키고 10일 후에, 50% 마트릭셀을 포함하는 BNL-HCC 세포(5×10^6 개)를 BALB/c 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하주사 하였다. 7주 동안 관찰하면서 암의 총 양(volume; 직경)을 칼리퍼스(calipers)를 이용하여 측정하였다. MB-ODN 4531(0)-hTM4SF5R2-3 펩타이드-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체로 면역화된 마우스는 처리되지 않은 마우스와 비교하여 종양 성장(tumor volume)이 현저하게 감소하였다(도 27a 및 도 27b).

[0255] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

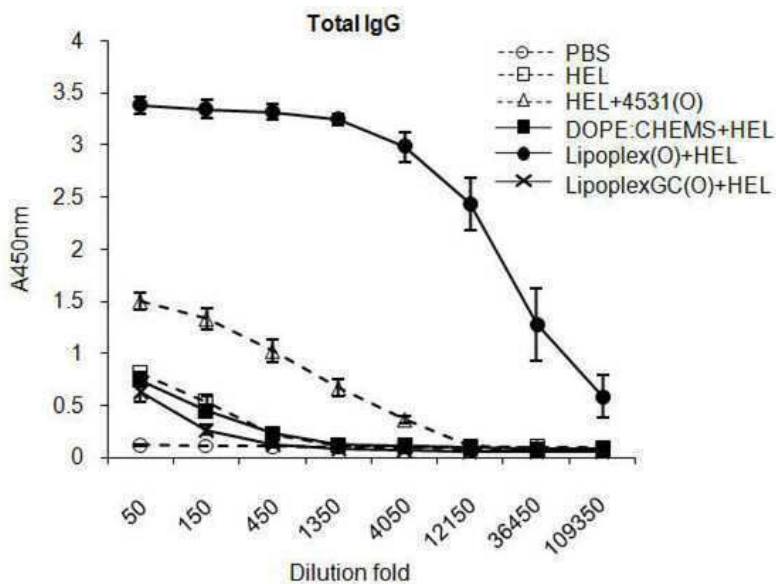
[0256] **참고문헌**

- [0257] 1. Ben-Yedidia, T., et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 442-448 (1997).
- [0258] 2. Bijker, M. S., et al., *Expert Rev. Vaccines* 6: 591-603 (2007).
- [0259] 3. Ben-Yedidia, T., et al., *Expert Rev. Vaccines* 6: 939-948 (2007).
- [0260] 4. Castilow, E. M., et al., *Immunol. Res.* 39: 225-239 (2007).
- [0261] 5. Rosenberg, S. A., et al., *Nat. Med.* 10: 909-915 (2004).
- [0262] 6. Zhao, L., et al., *Expert Rev. Vaccines* 7: 1547-1555 (2008).
- [0263] 7. Kashala, O., et al., *Vaccine* 20: 2263-2277 (2002).
- [0264] 8. Engler, O., et al., *Mol. Immunol.* 38: 457-465 (2001).
- [0265] 9. Pinto, L. A, et al., *AIDS* 13: 2003-2012 (1999).
- [0266] 10. Chikh, G., et al., *Bioscience Reports* 22: 339-353 (2002).
- [0267] 11. Ben-Yedidia, T., et al., *Int. Immunol.* 11: 1043-1051 (1999).
- [0268] 12. Speiser, D. E., et al., *J. Clin. Invest.* 115: 739-746 (2005).
- [0269] 13. Felnerova, D., et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 518-529 (2004).
- [0270] 14. Simoes, S., et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56: 947-965 (2004).
- [0271] 15. Collins, D. S., et al., *J. Immunol.* 148: 3336-3341 (1992).
- [0272] 16. Chang, J., et al., *Vaccine* 19: 3608-3614 (2001).
- [0273] 17. Krieg, A. M. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 709-760 (2002).
- [0274] 18. Klinman, D. M., et al., *Immunological Reviews* 199: 201-216 (2004).
- [0275] 19. Chu, R. S., et al., *J. Exp. Med.* 186: 1623-1631 (1997).
- [0276] 20. Carson, D. A., et al., *J. Exp. Med.* 186: 1621-1622 (1997).
- [0277] 21. Davis, H. L., et al., *J. Immunol.* 160: 870-876 (1998).
- [0278] 22. Suzuki, Y., et al., *Cancer Res.* 64: 8754-9760 (2004).
- [0279] 23. Gursel, I et al., *J. Immunol.* 167: 3324-3328 (2001).
- [0280] 24. Li, W. M., et al., *Vaccine* 21: 3319-3329 (2003).
- [0281] 25. Krieg, A.M. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5: 471-484 (2006).
- [0282] 26. Sparwasser, T., et al., *J. Immunol.* 162: 2368-2374 (1999).
- [0283] 27. Deng, G. M., et al., *Nat. Med.* 5: 702-705 (1999).
- [0284] 28. Ronaghy, A., et al., *J. Immunol.* 168: 51-56 (2002).
- [0285] 29. Yasuda, K., et al., *J. Immunol.* 174: 6129-6136 (2005).
- [0286] 30. Magnusson, M., et al., *J. Immunol.* 179: 31-35 (2007).

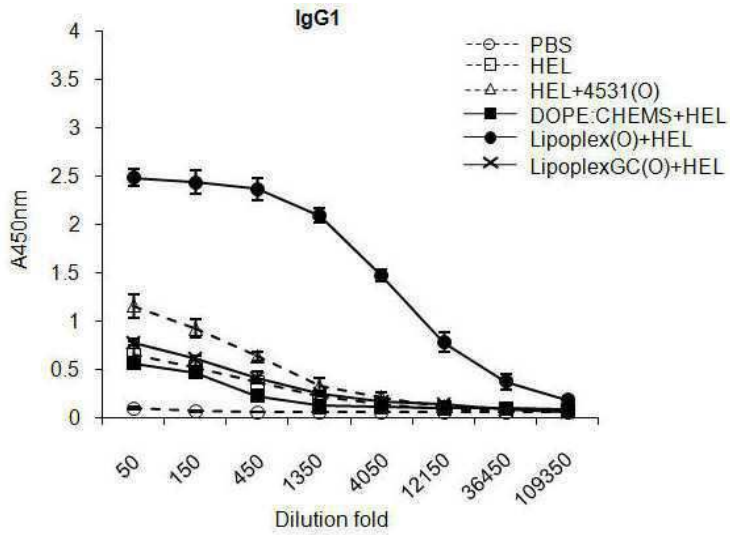
- [0287] 31. Lee, K.W., et al., *Mol. Immunol.* 43: 2107-2118 (2006).
- [0288] 32. Kim, D., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 362-367 (2009).
- [0289] 33. McConnell, H. M., et al., *Science* 257:19061912 (1992).
- [0290] 34. Sjolander, S., et al., *Anal. Chem.* 63:23382345 (1991).
- [0291] 35. Szabo, A., et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699705 (1995).
- [0292] 36. Hoffmann, E., et al., *Vaccine* 20: 3165-3170 (2002).
- [0293] 37. Palmer, D. F., et al., *Immunol. Ser.* 6: 51-52 (1975).
- [0294] 38. Kida, H., et al., *Virology* 122: 38-47 (1982).
- [0295] 39. Yokoyama, W. M. Production of monoclonal antibody, p.2.5.1-2.5.17. In J.E. Ciligan, A.M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, & W. Strober (eds.), *Current protocols in Immunology*, John Wiley & Sons. Inc., Newcastle, United Kingdom. (2001).
- [0296] 40. Kim, D., et al., *Immunol. Invest.* 38: 132-152 (2009).
- [0297] 41. Lee, S. A., et al., *J. Clin. Invest.* 118: 1354-1365 (2008).

도면

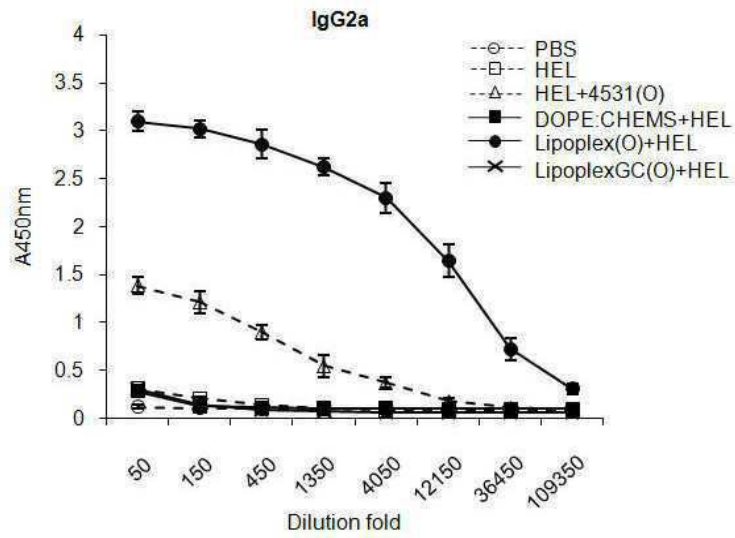
도면1a



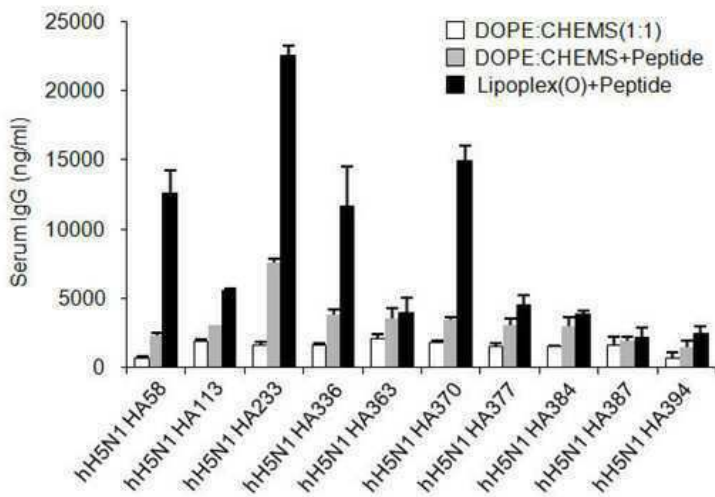
도면1b



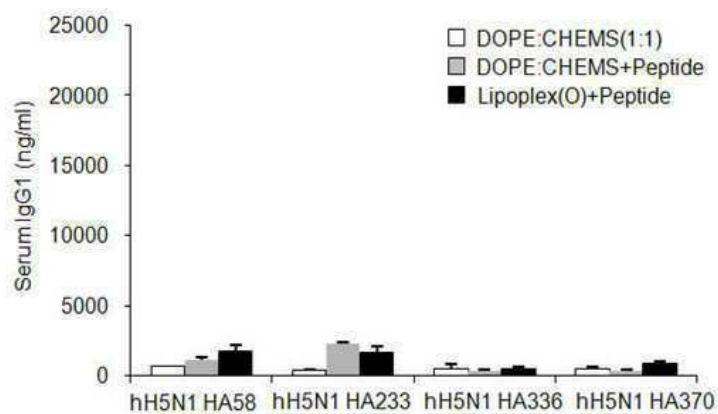
도면1c



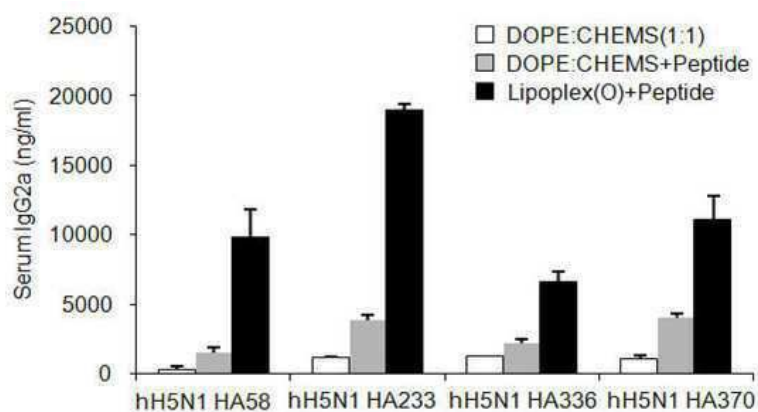
도면2a



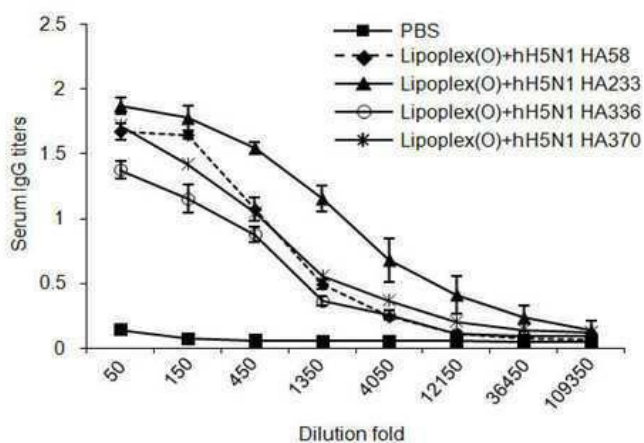
도면2b



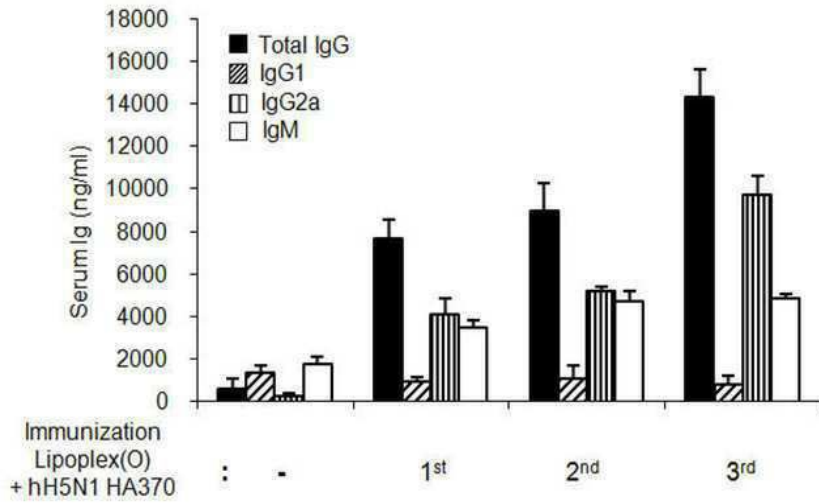
도면2c



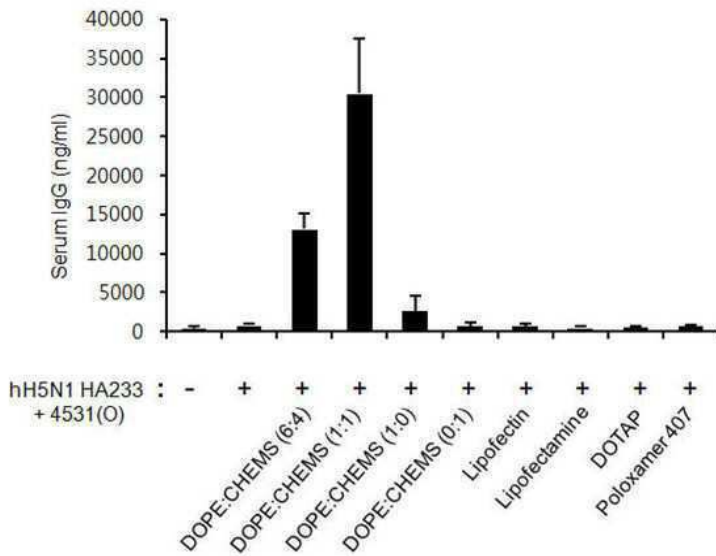
도면2d



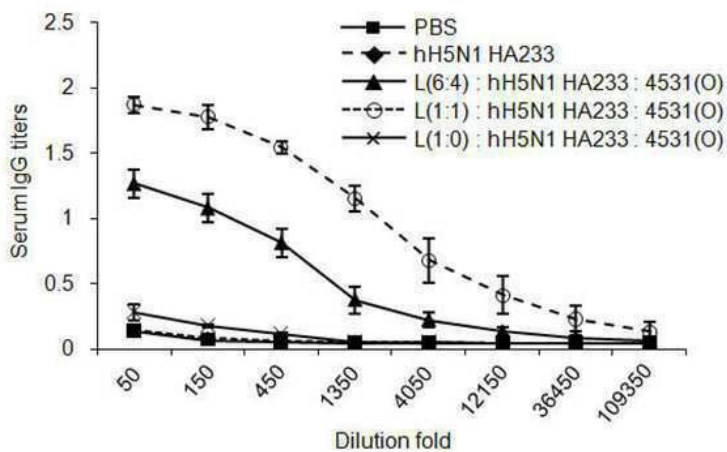
도면2e



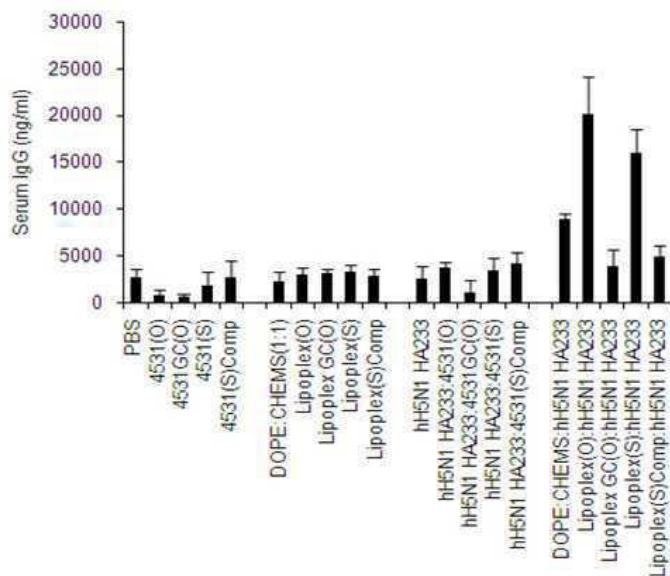
도면3a



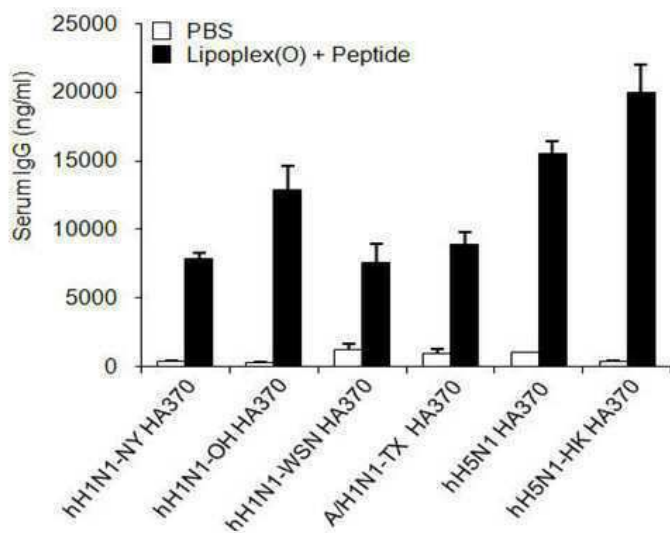
도면3b



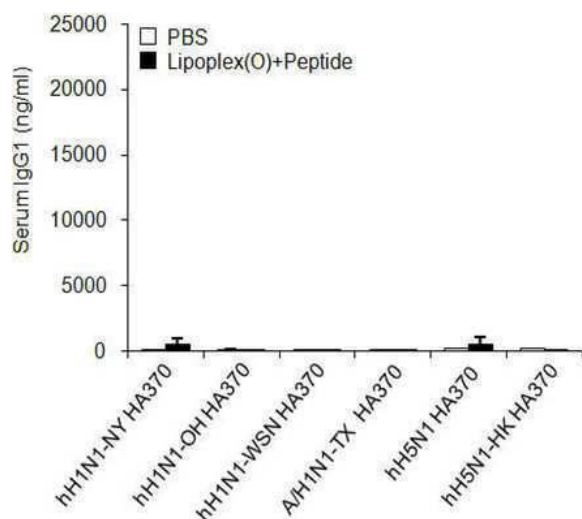
도면4



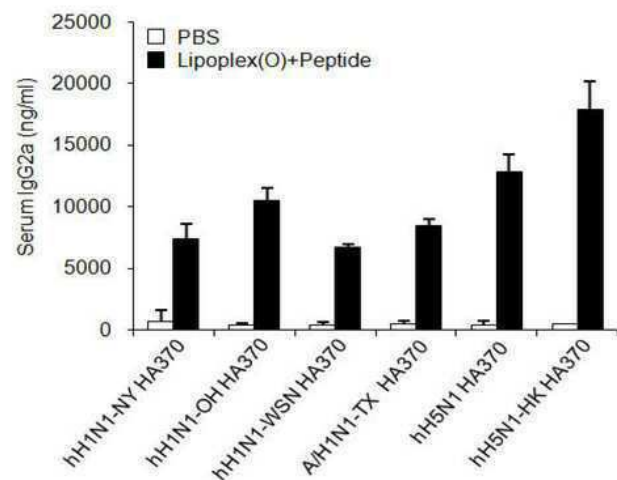
도면5a



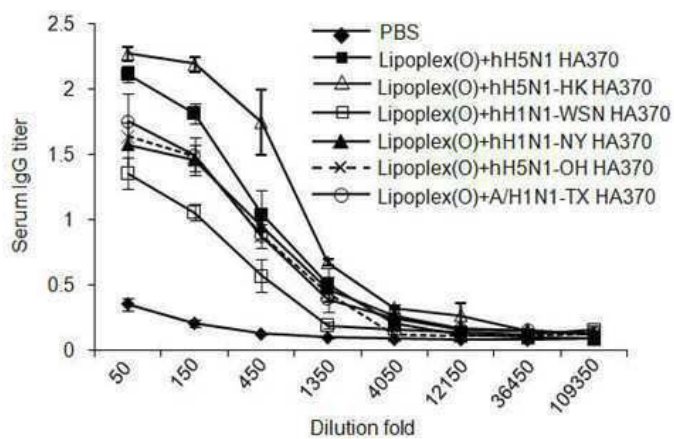
도면5b



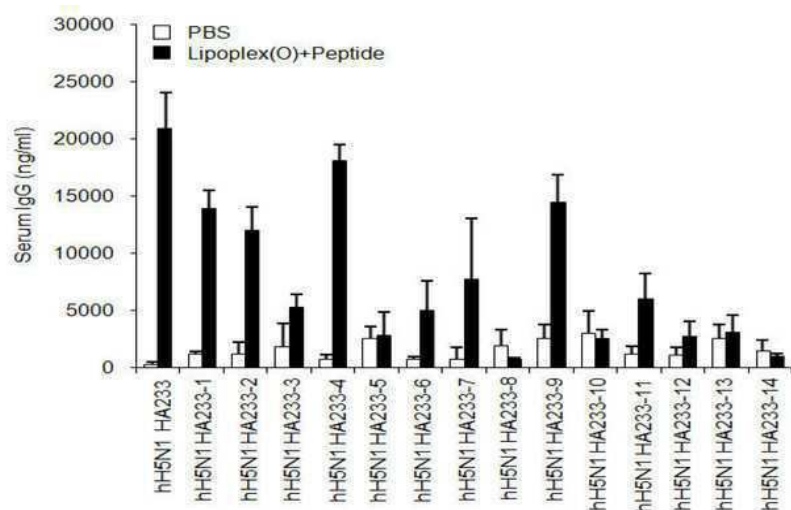
도면5c



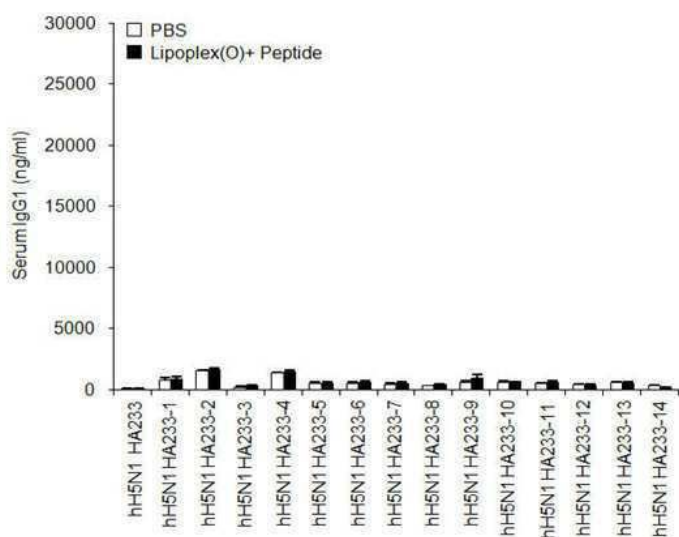
도면5d



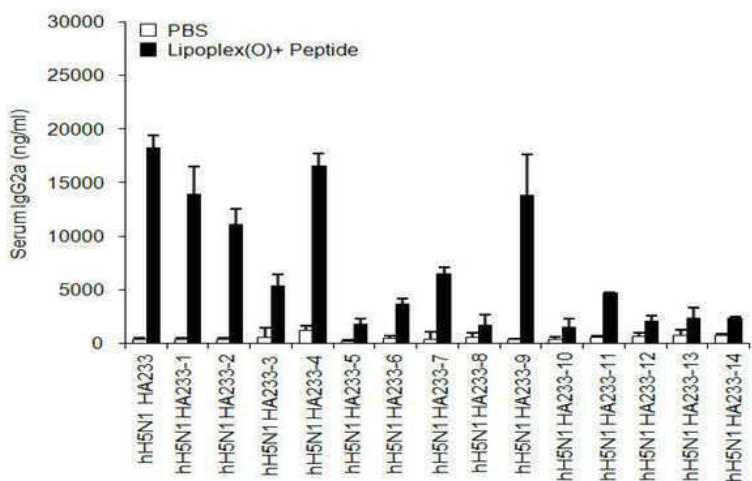
도면6a



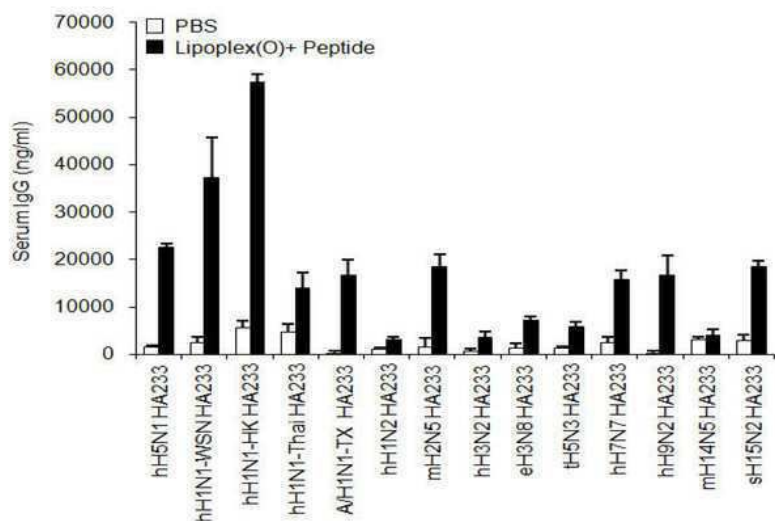
도면6b



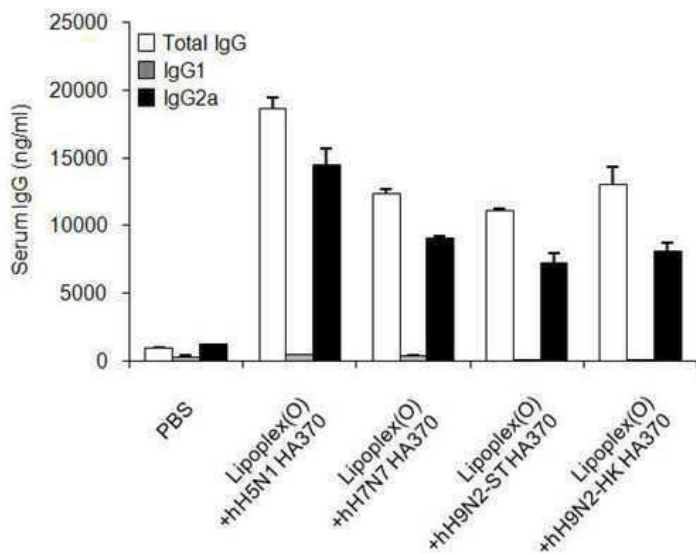
도면6c



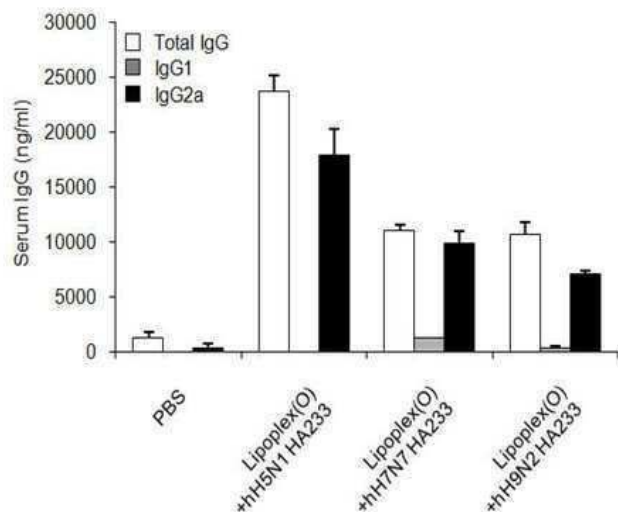
도면6d



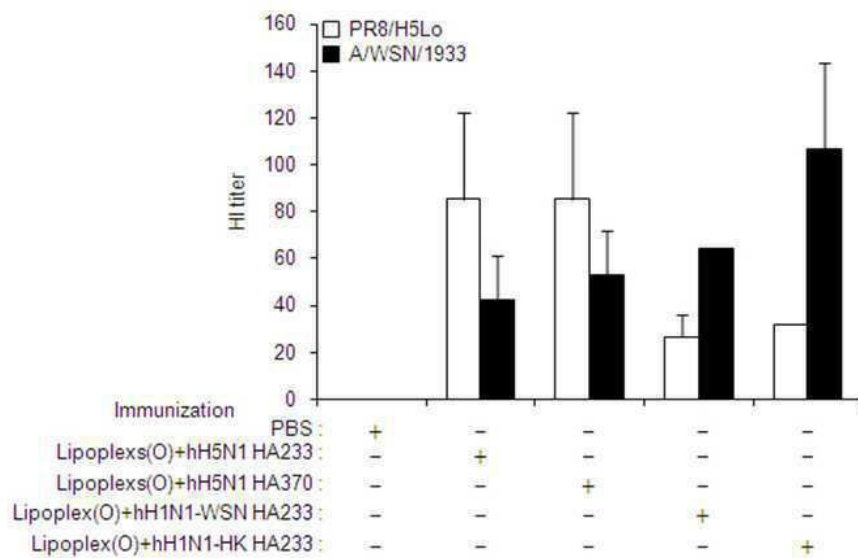
도면7a



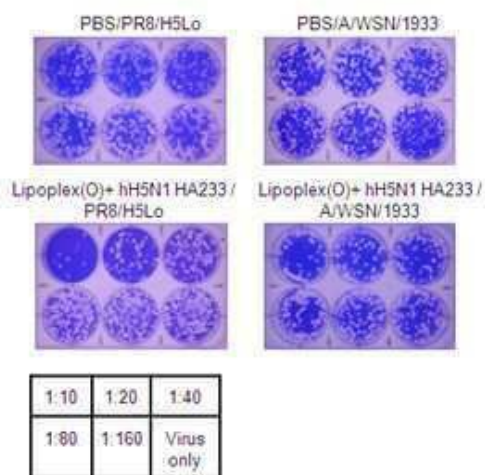
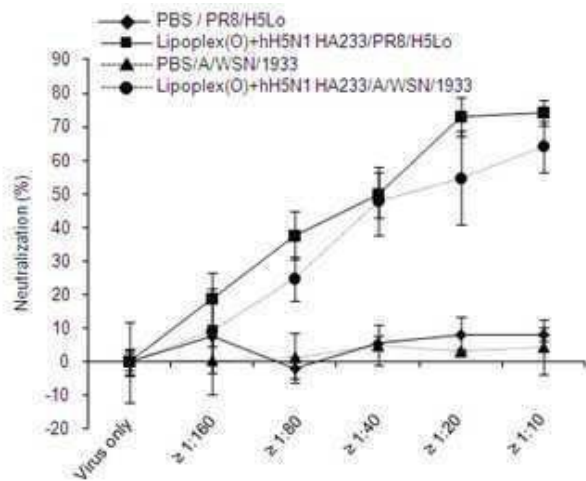
도면7b



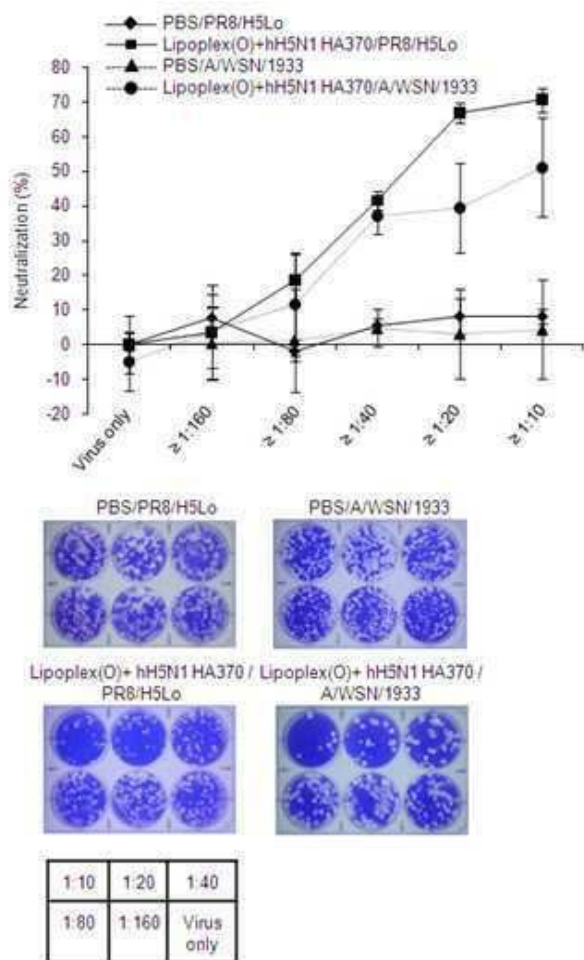
도면8a



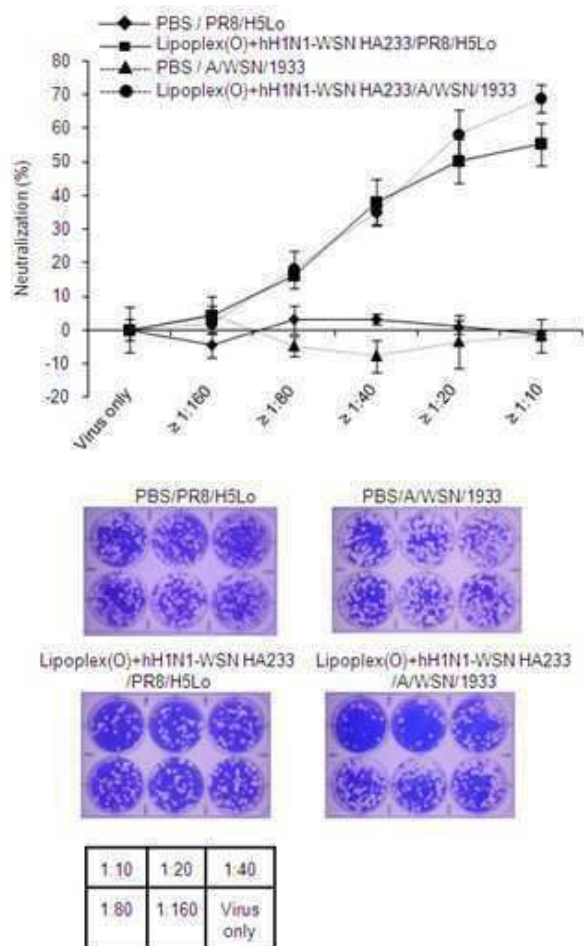
도면8b



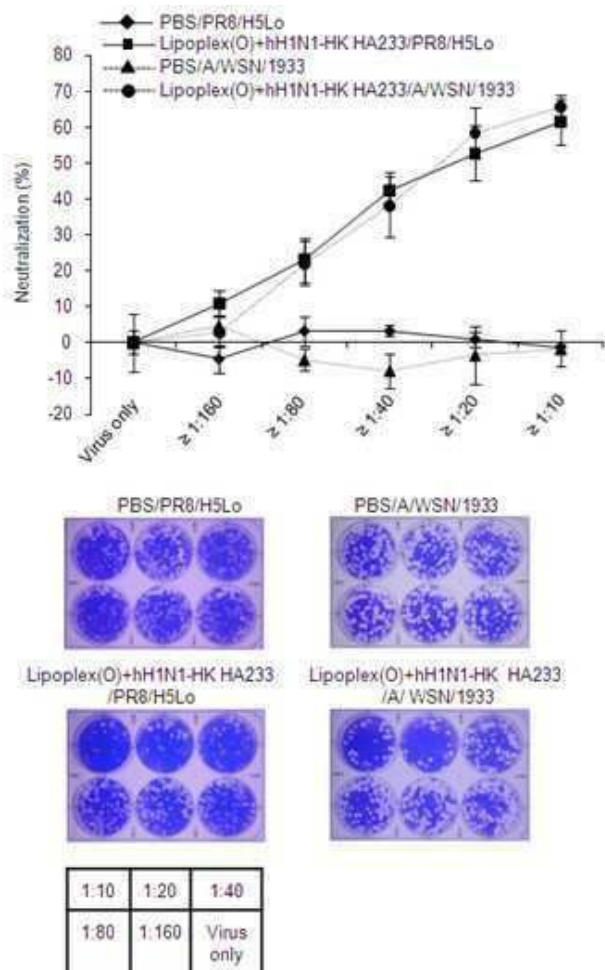
도면8c



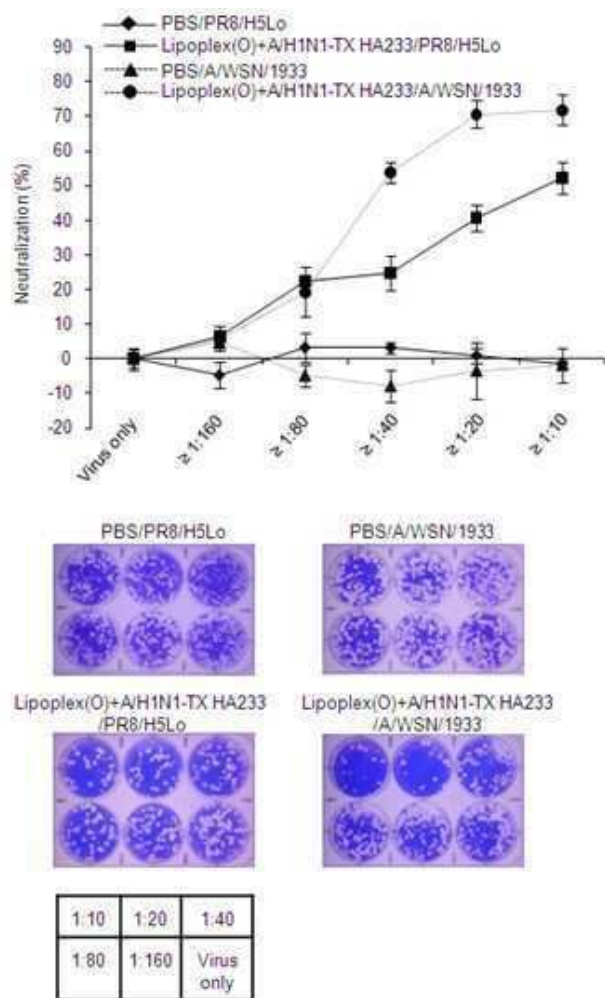
도면8d



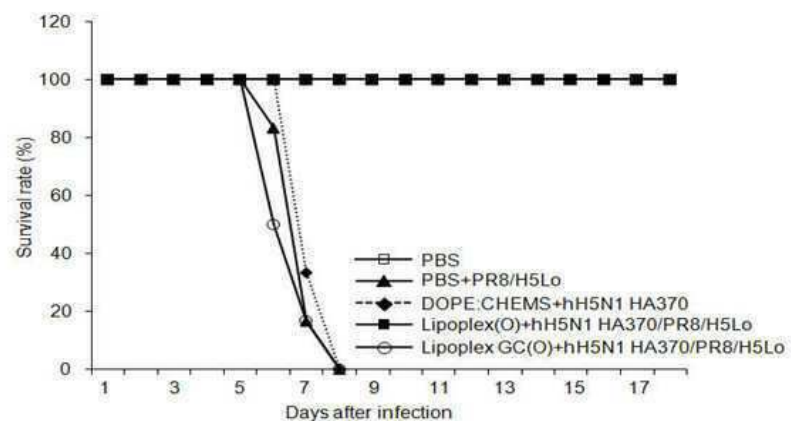
도면8e



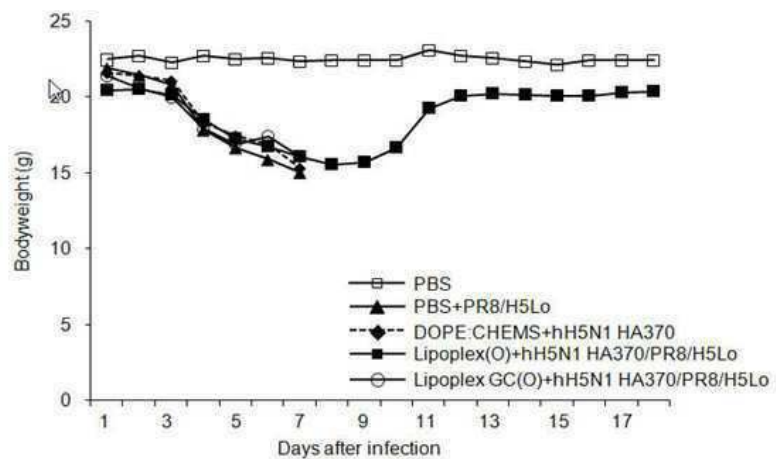
도면8f



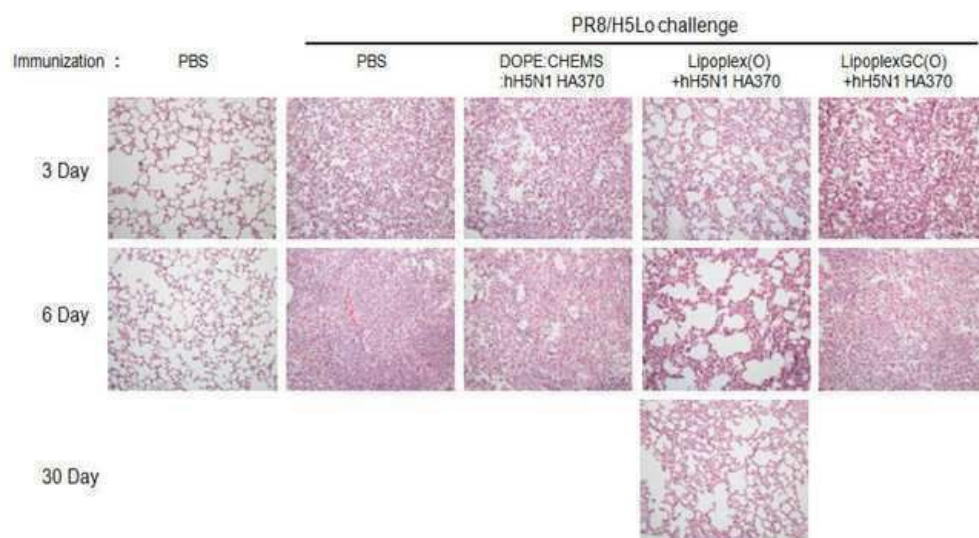
도면9a



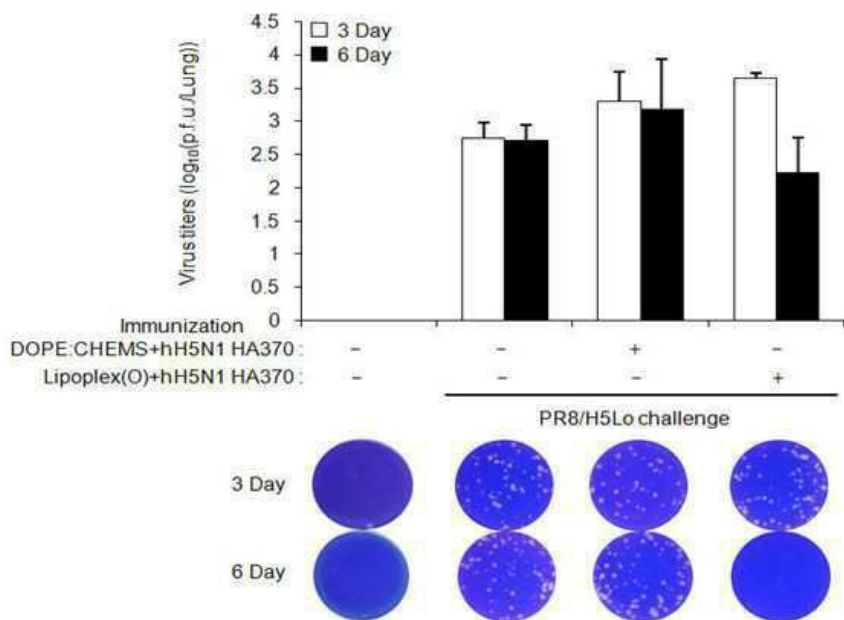
도면9b



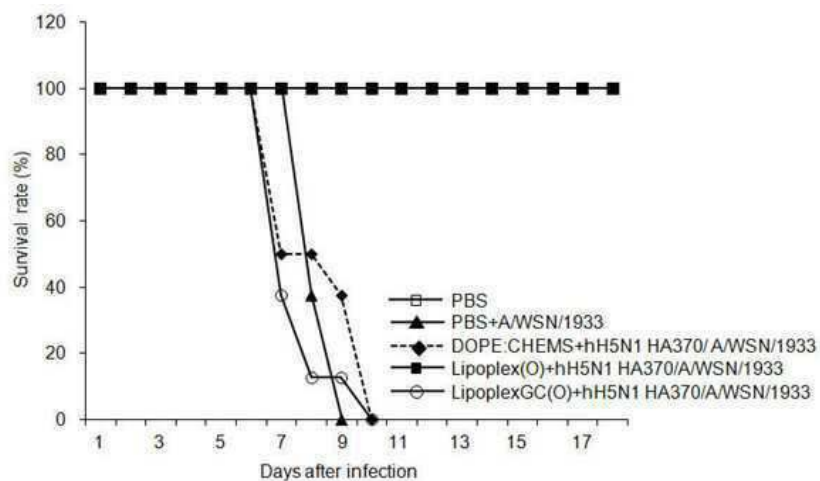
도면9c



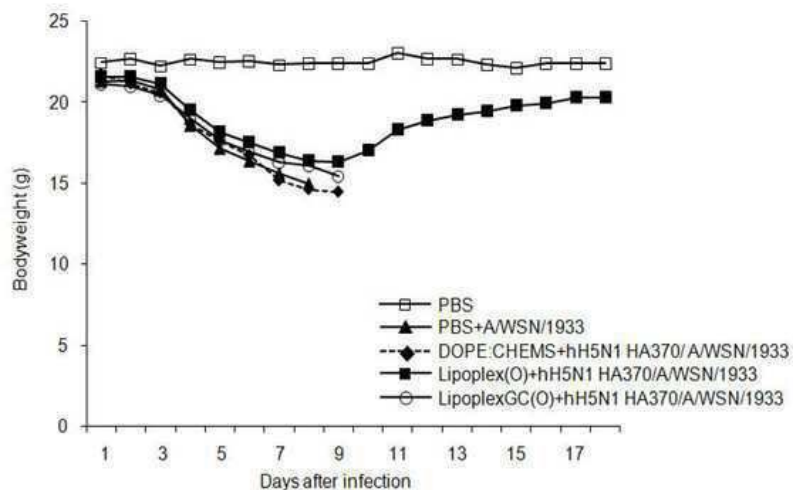
도면9d



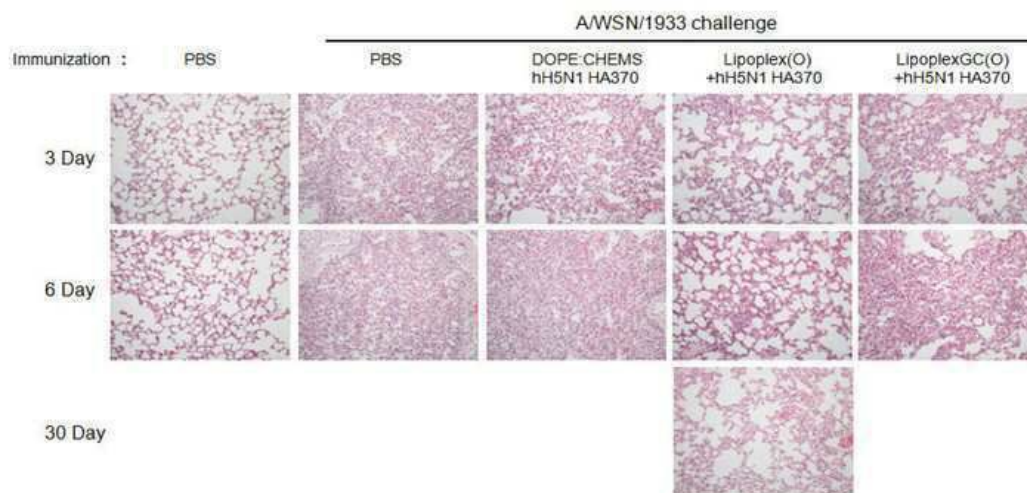
도면10a



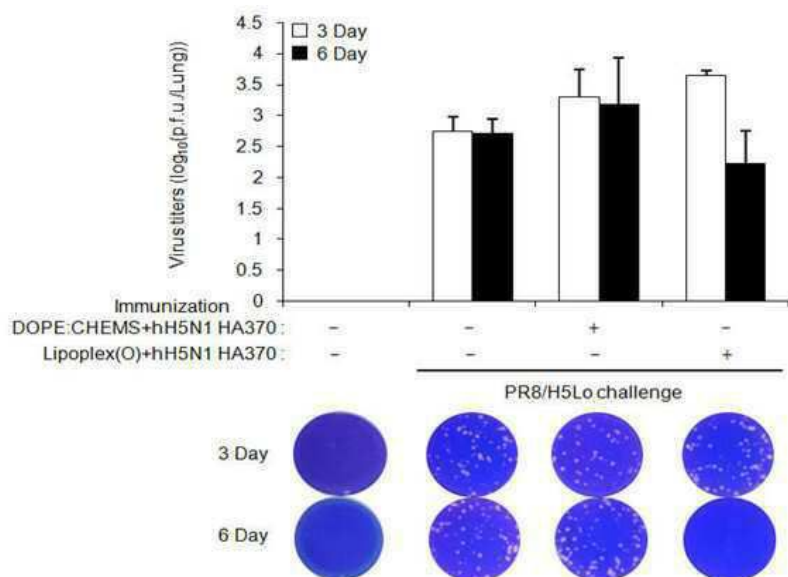
도면10b



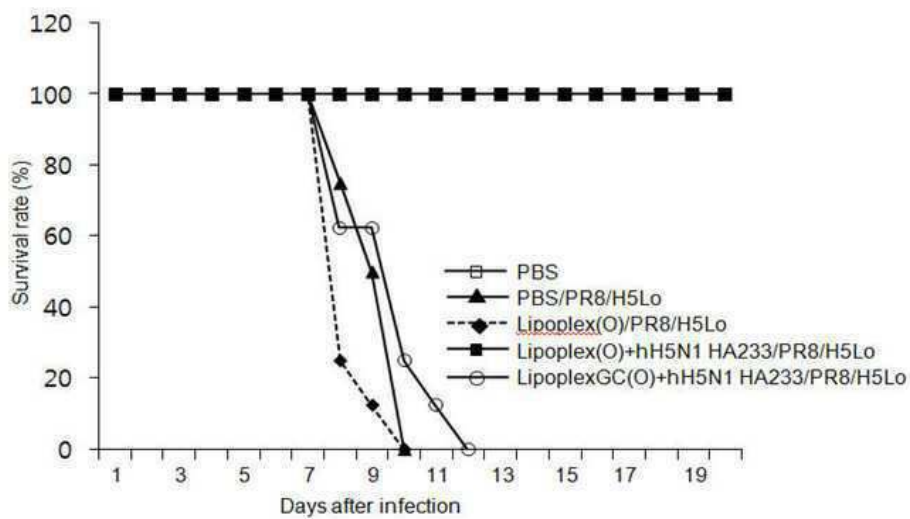
도면10c



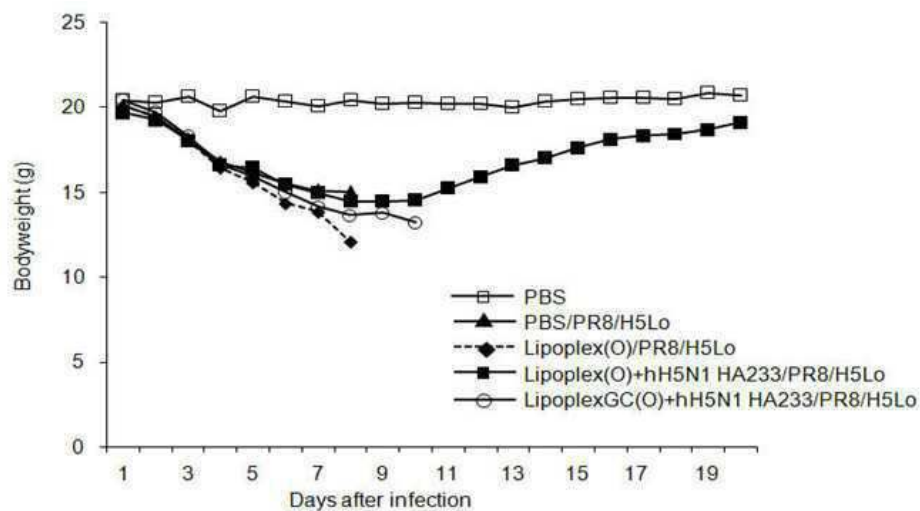
도면10d



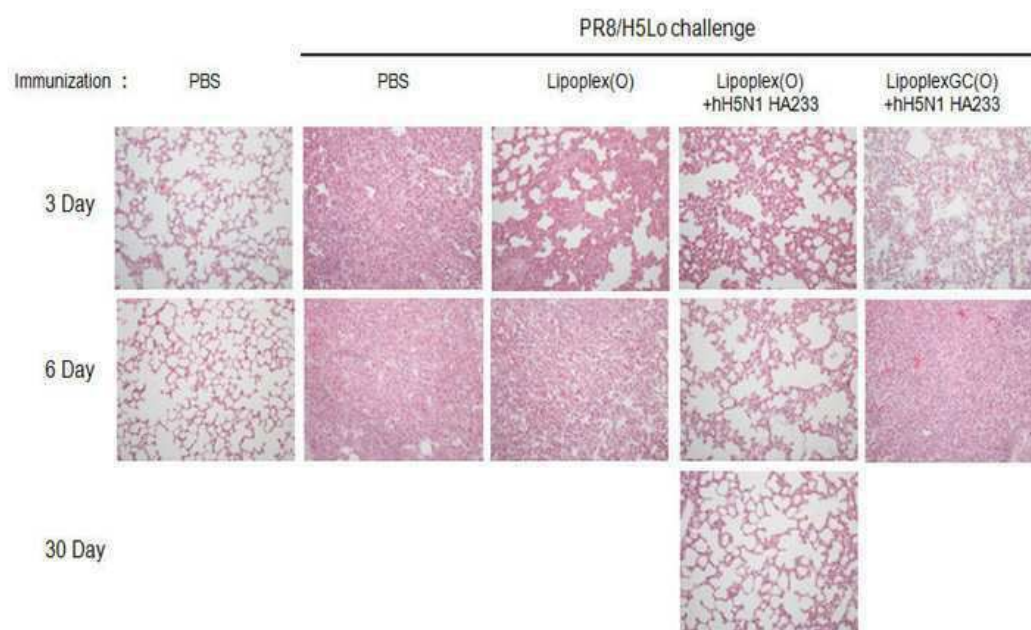
도면11a



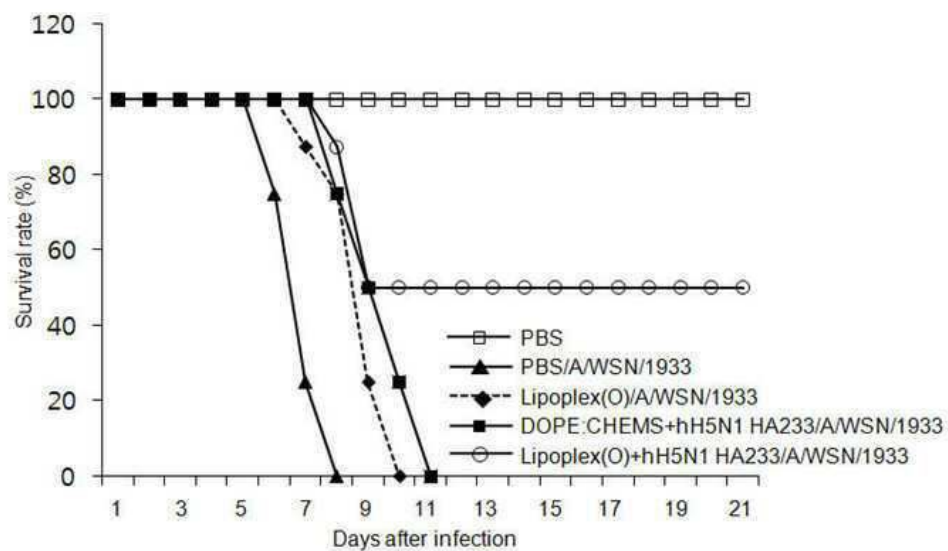
도면11b



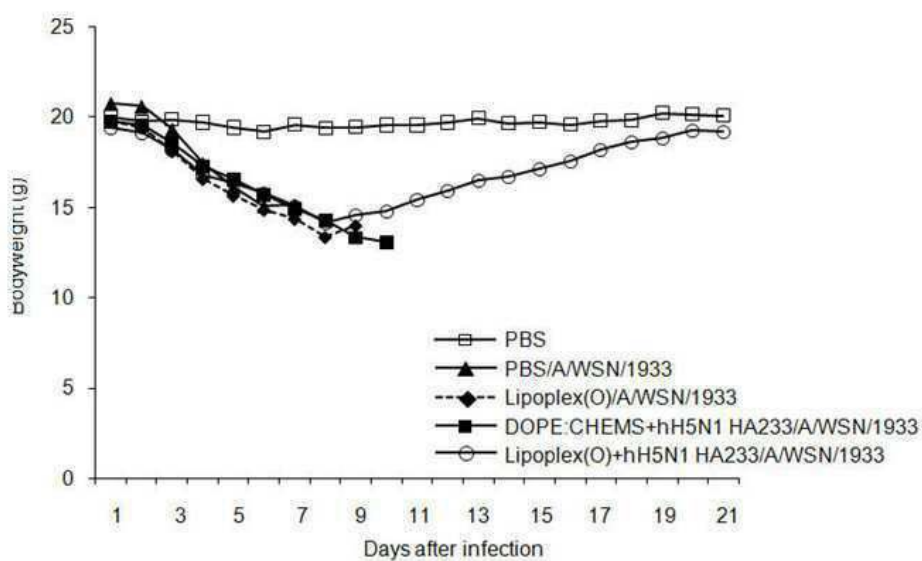
도면11c



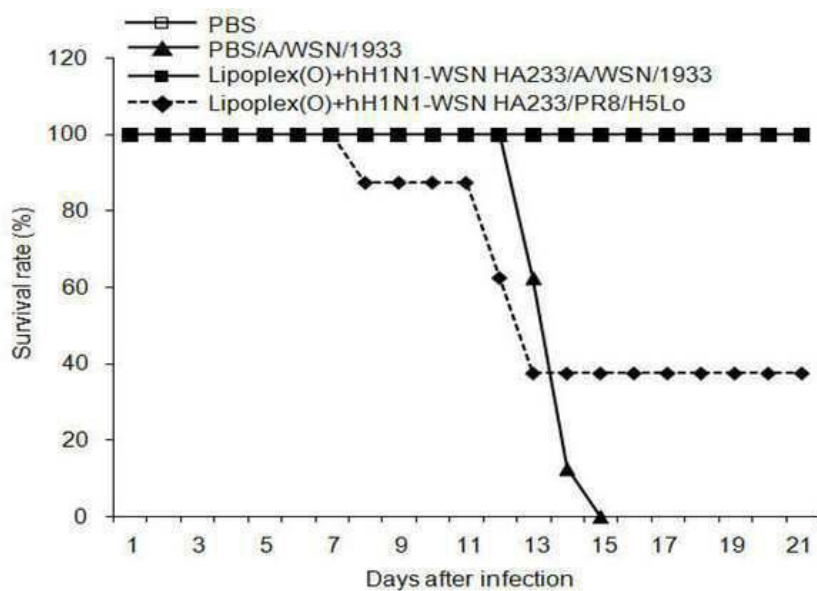
도면12a



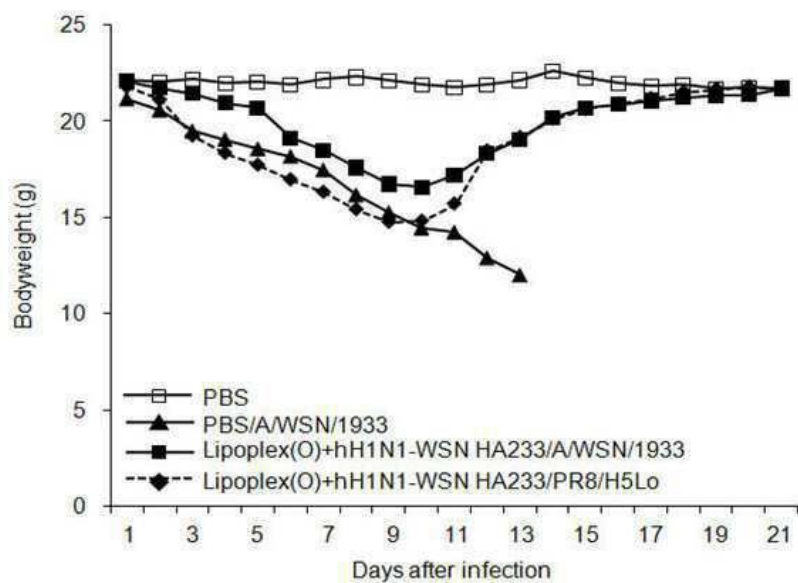
도면12b



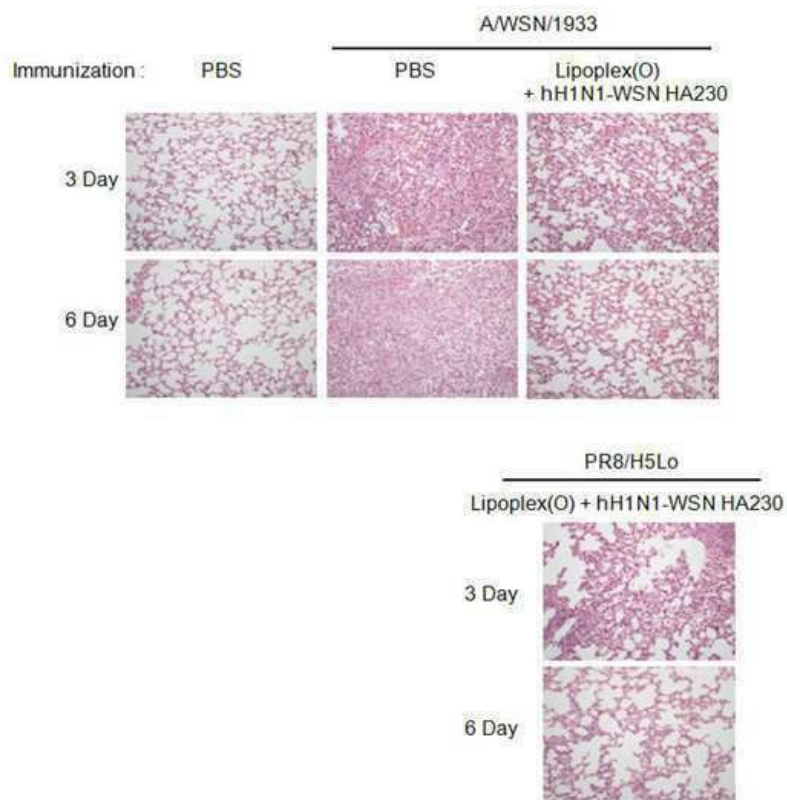
도면13a



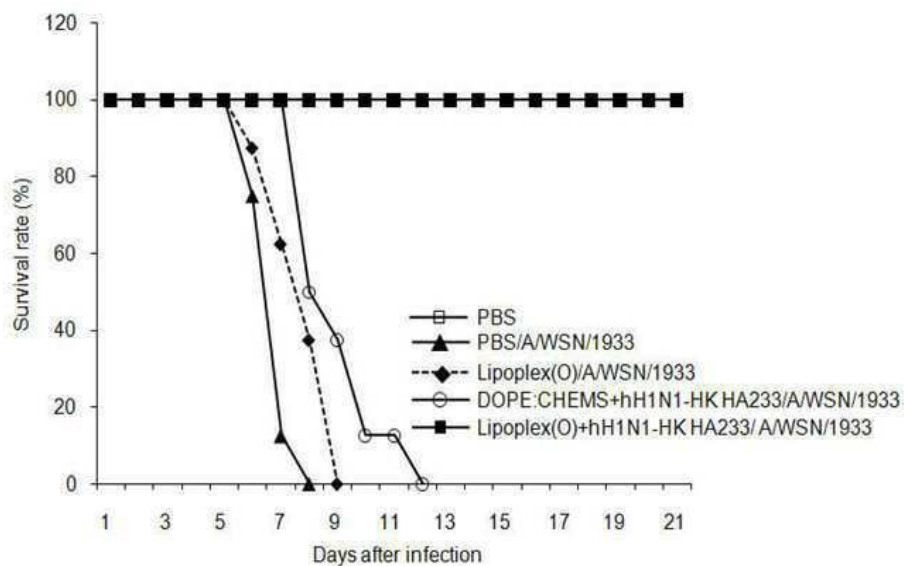
도면13b



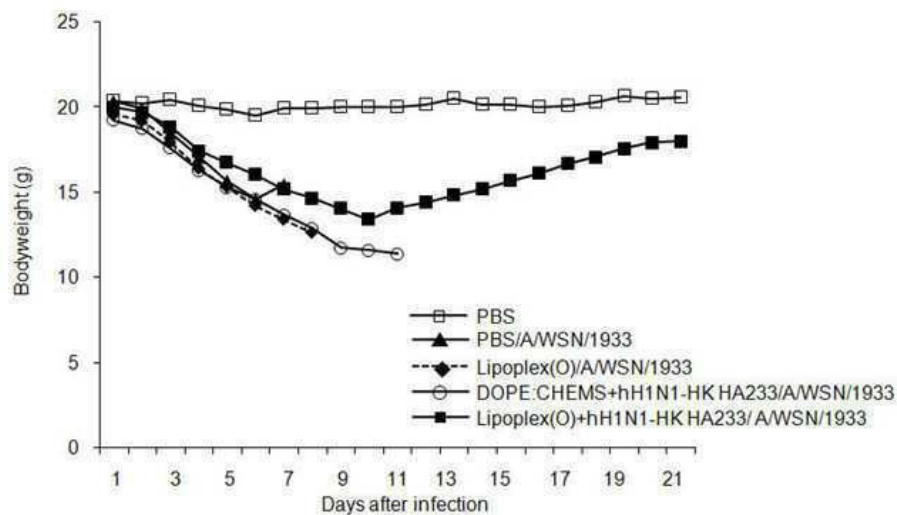
도면13c



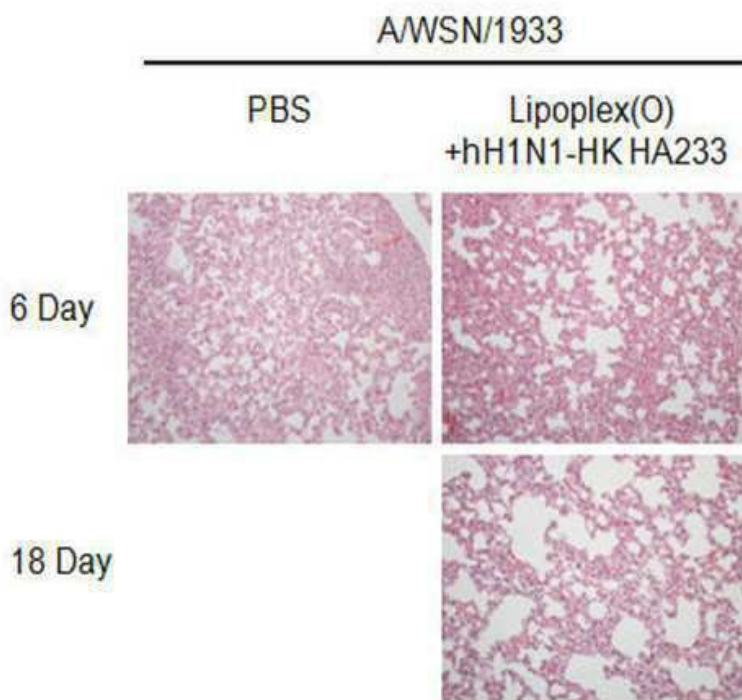
도면14a



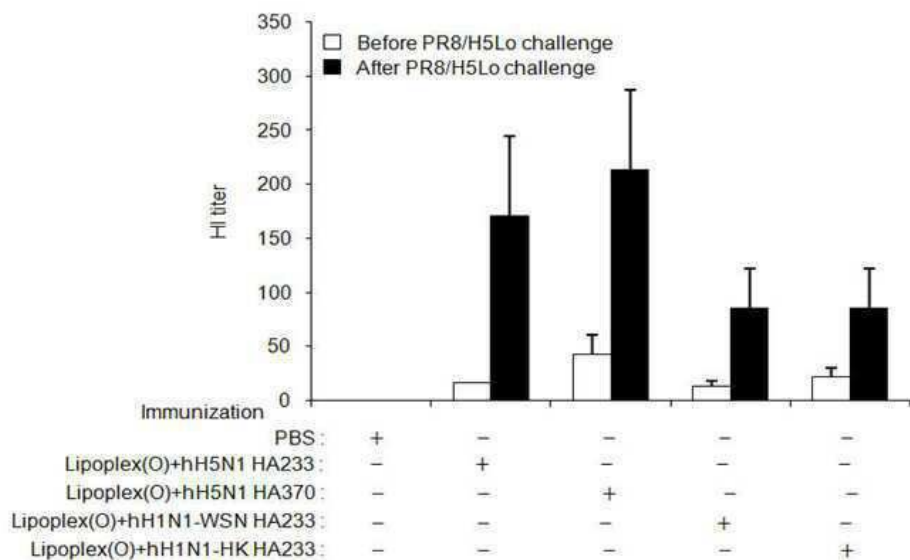
도면14b



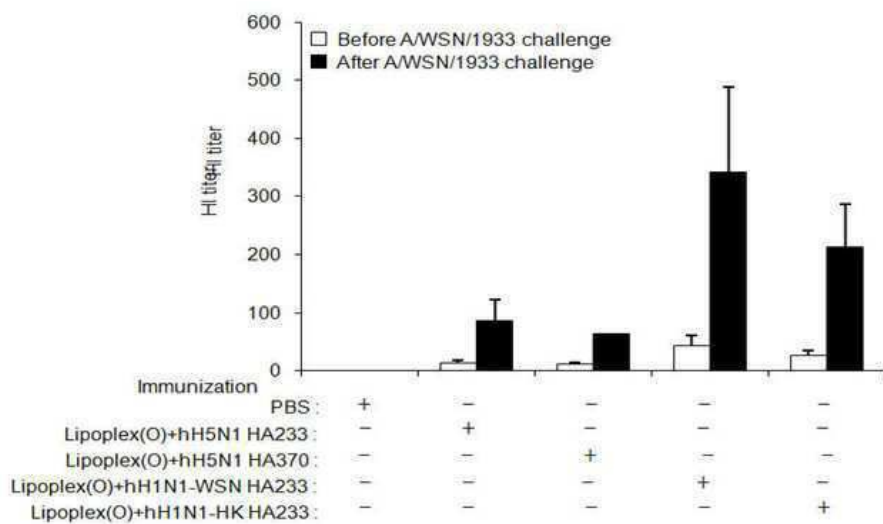
도면14c



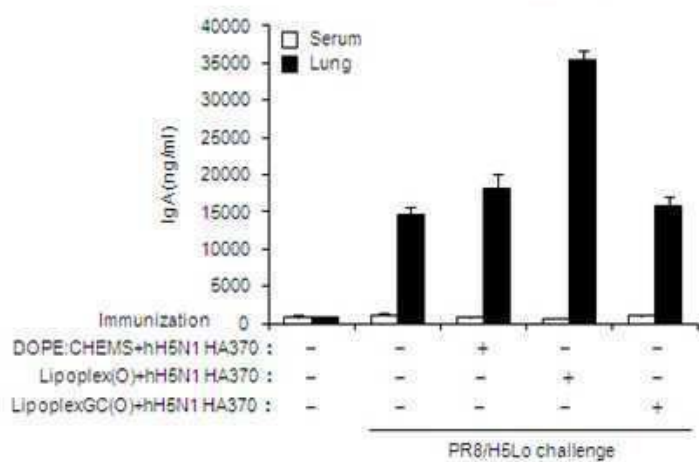
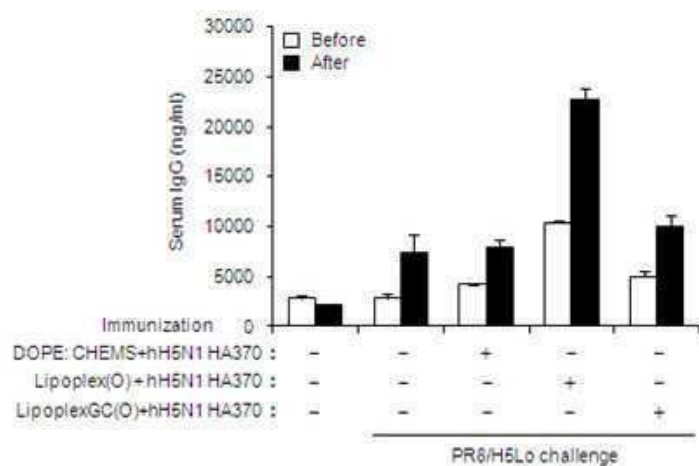
도면15a



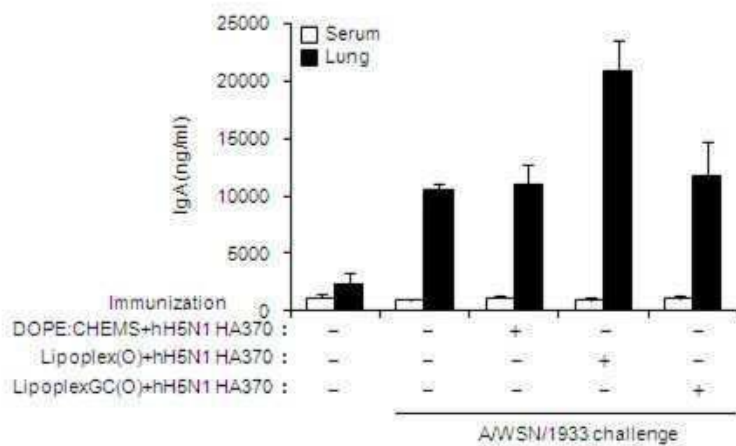
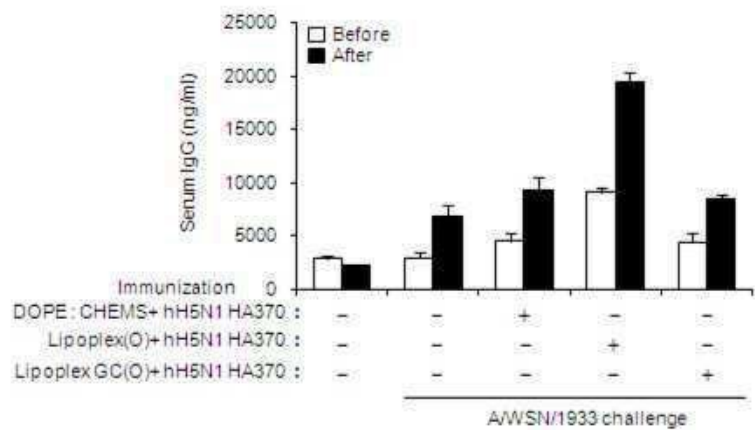
도면15b



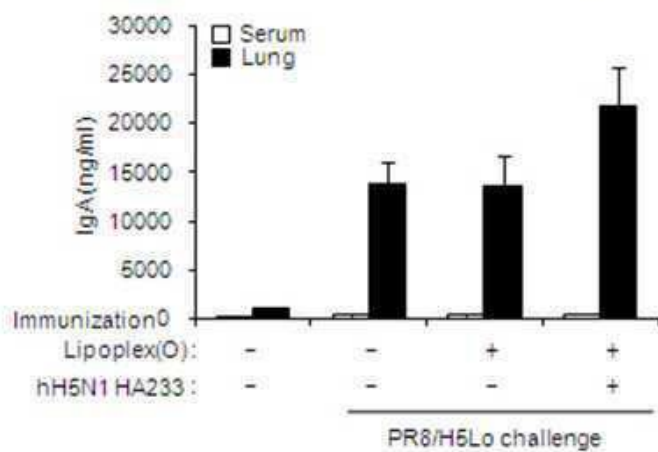
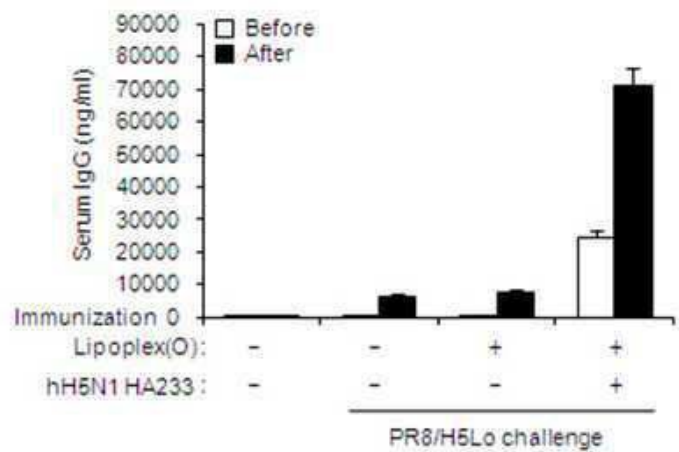
도면16a



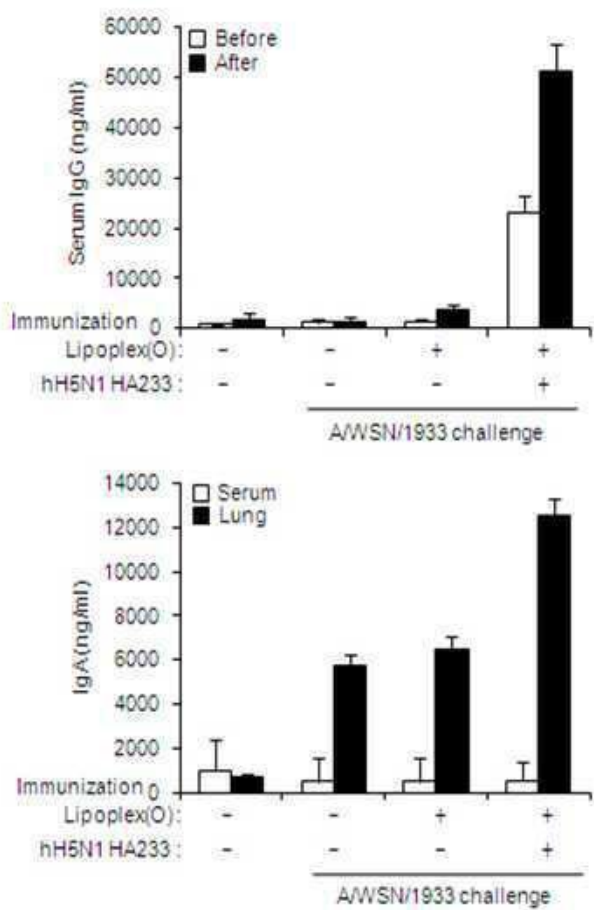
도면16b



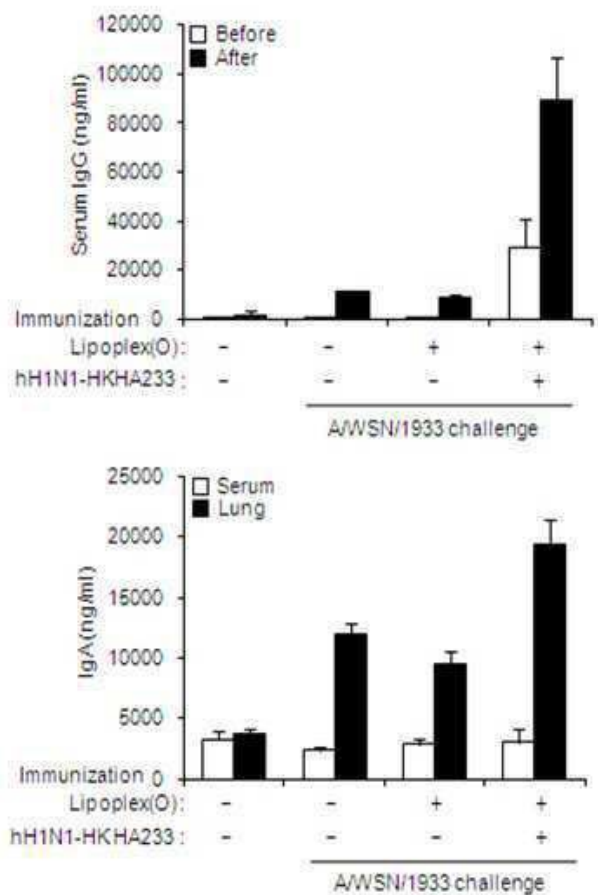
도면16c



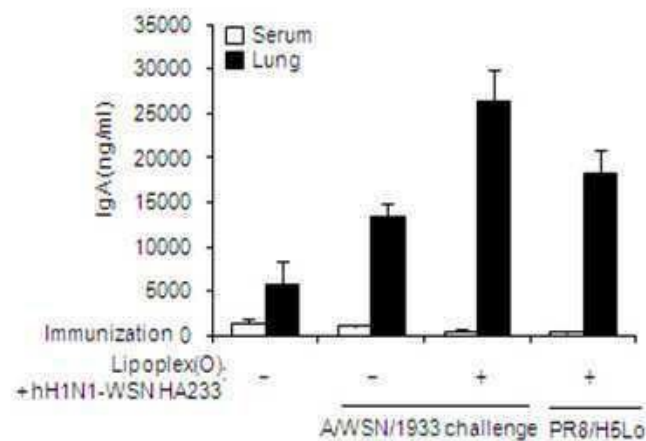
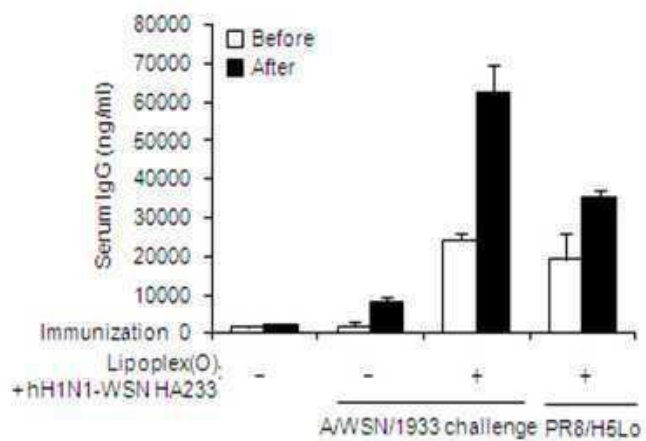
도면16d



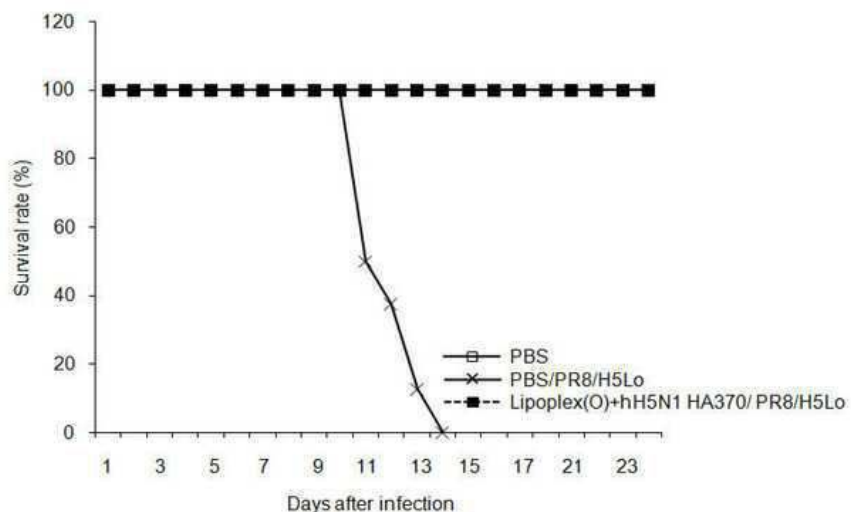
도면16e



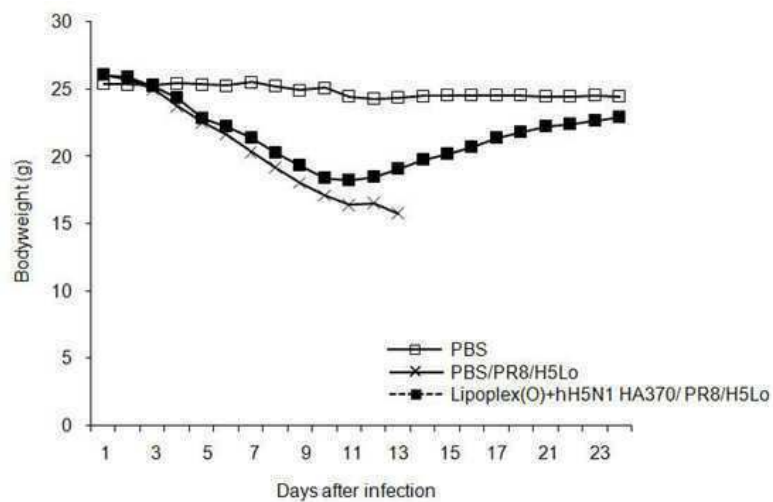
도면16f



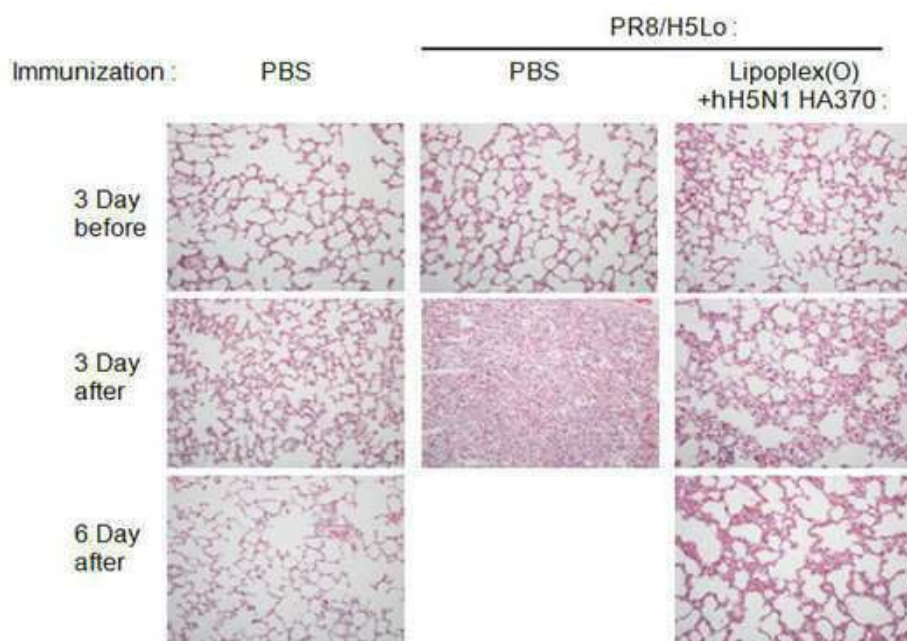
도면17a



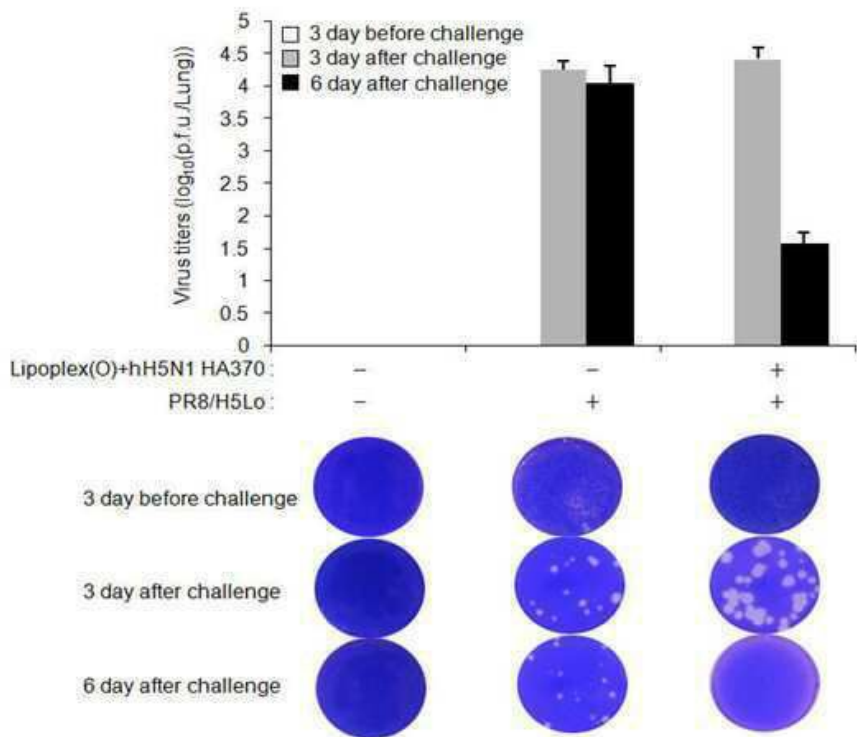
도면17b



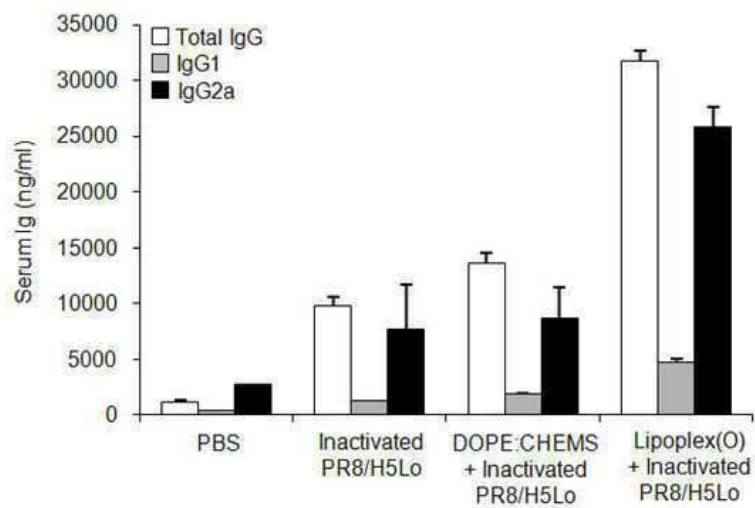
도면17c



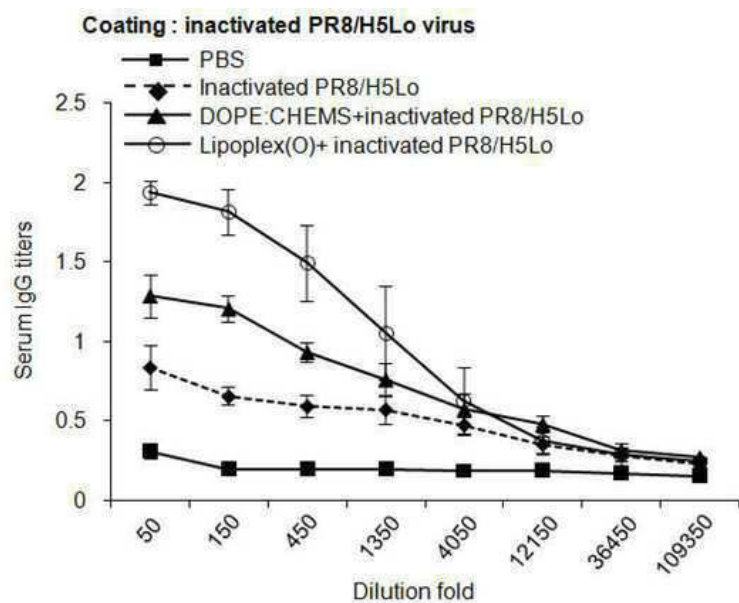
도면17d



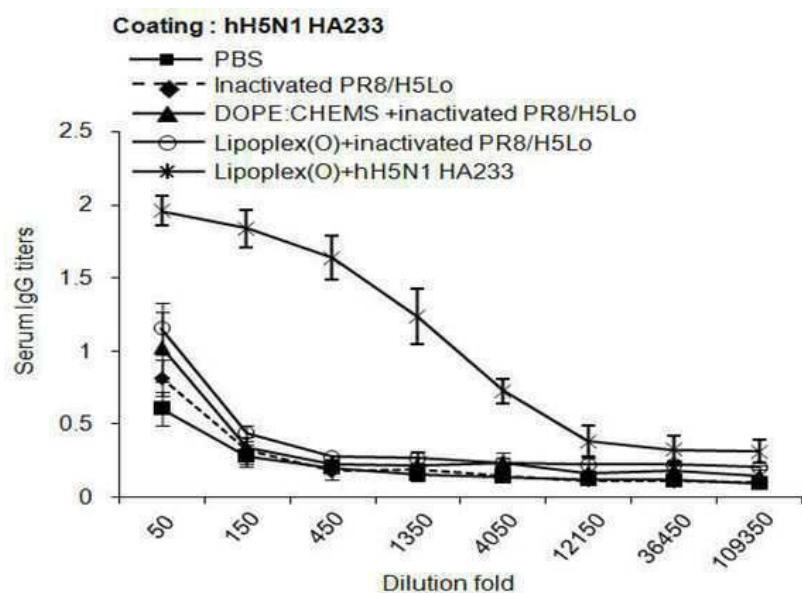
도면18a



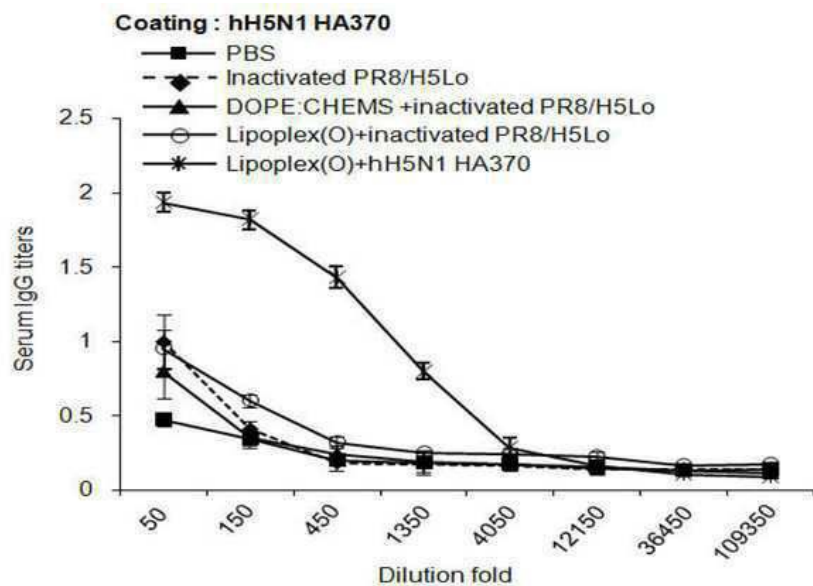
도면18b



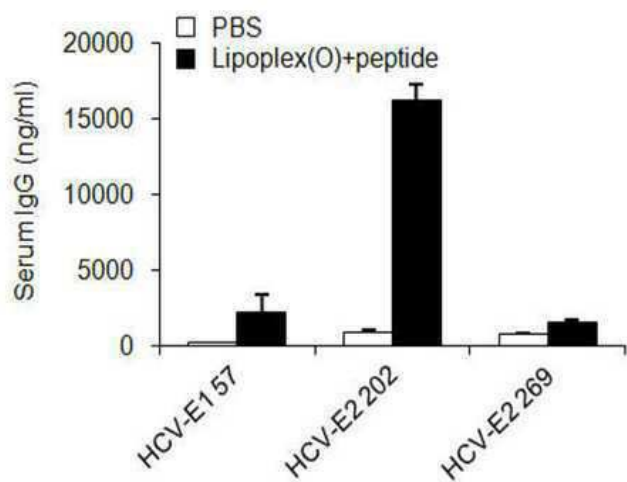
도면18c



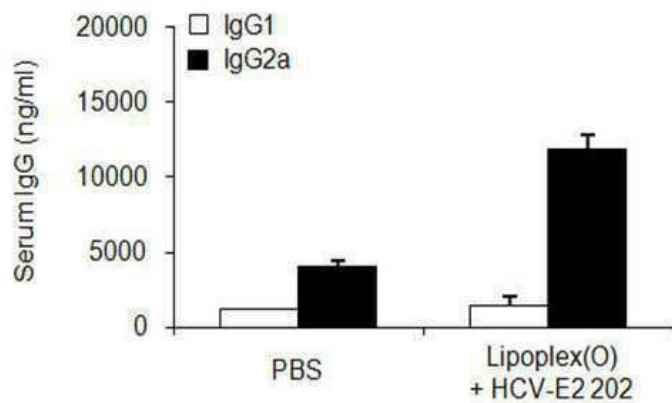
도면18d



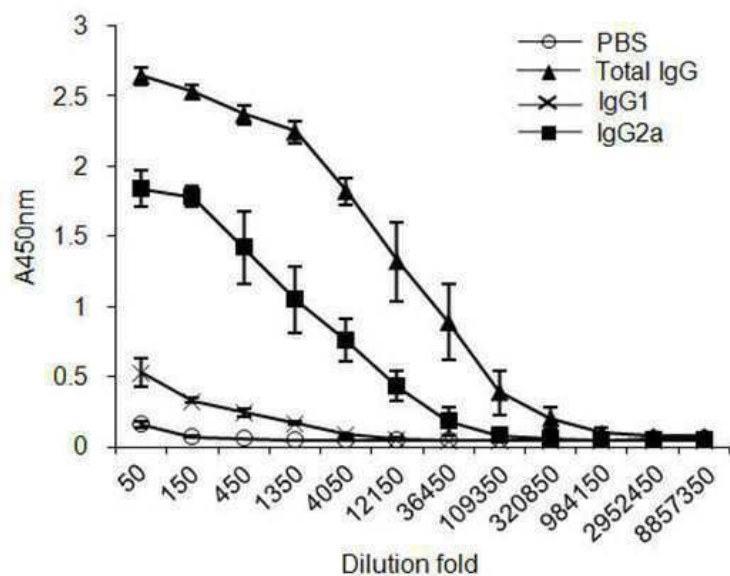
도면19a



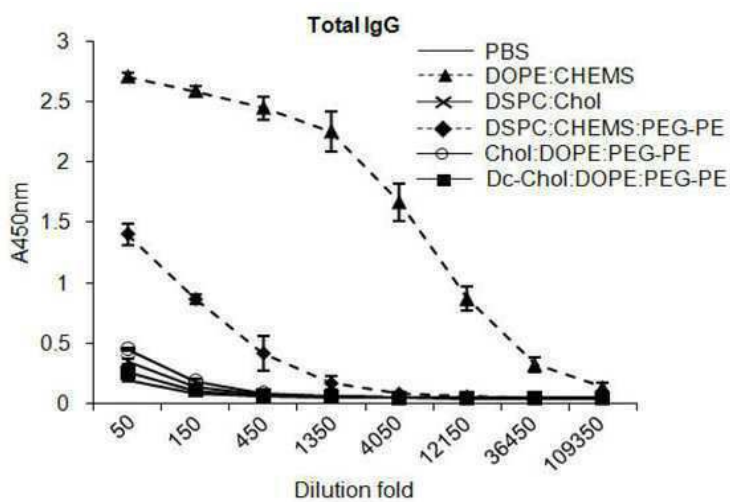
도면19b



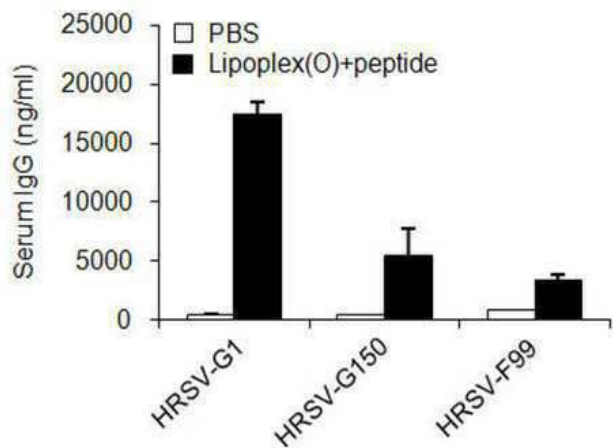
도면19c



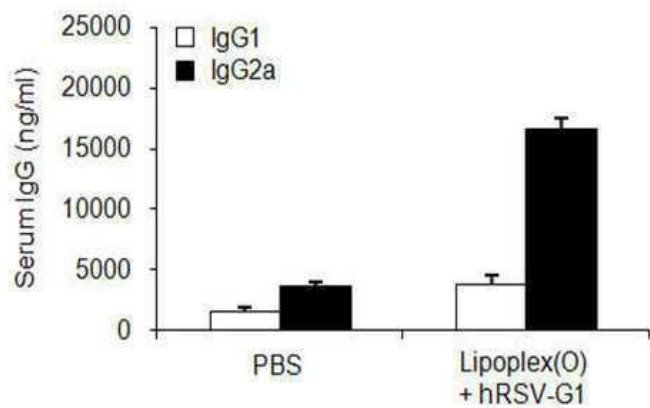
도면19d



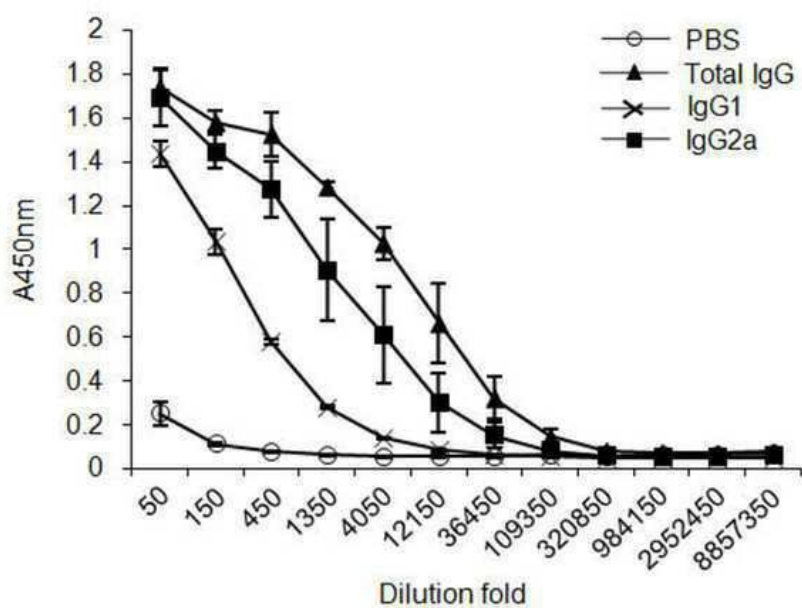
도면20a



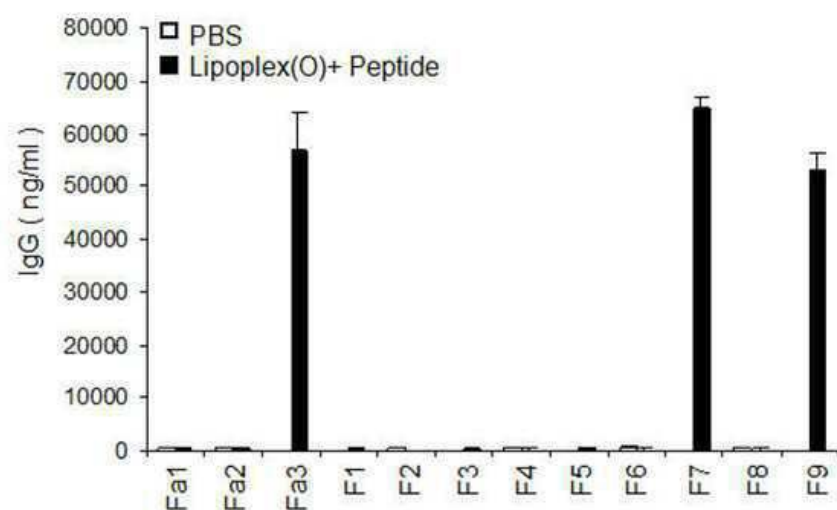
도면20b



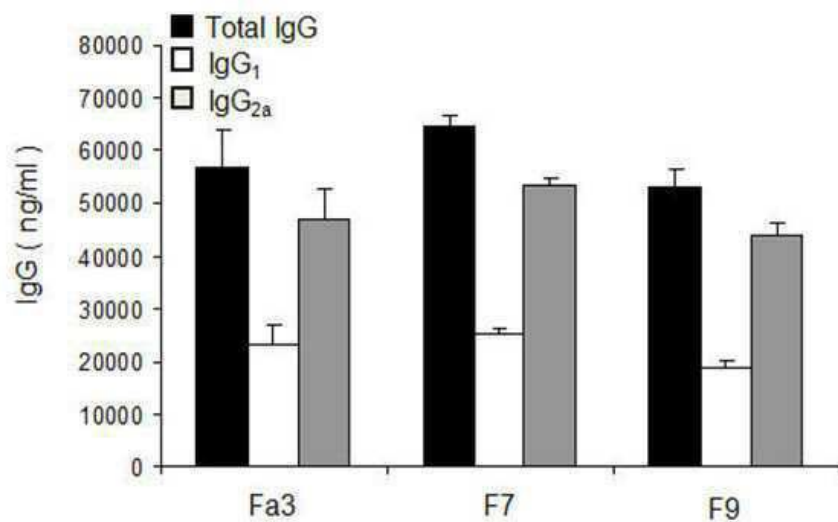
도면20c



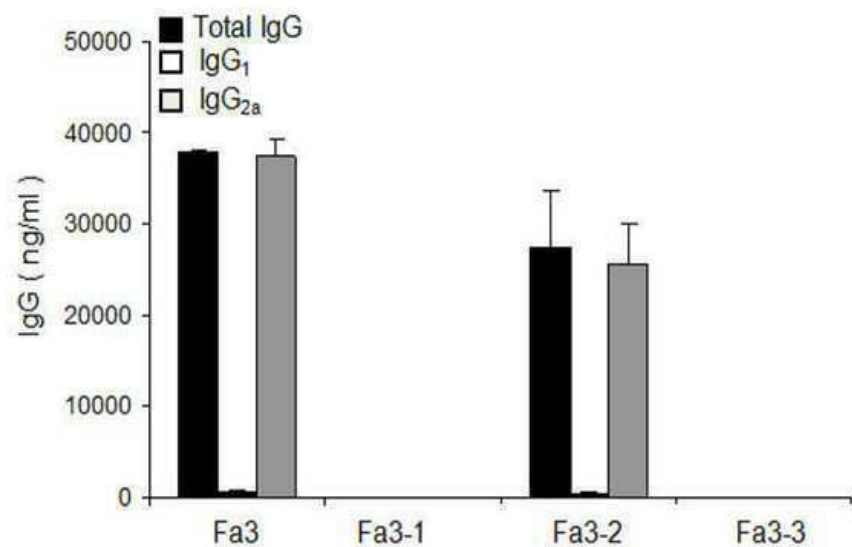
도면21a



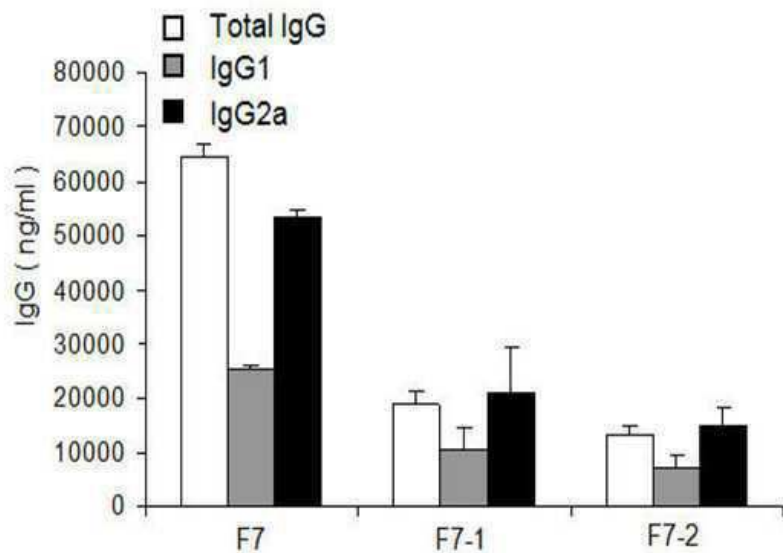
도면21b



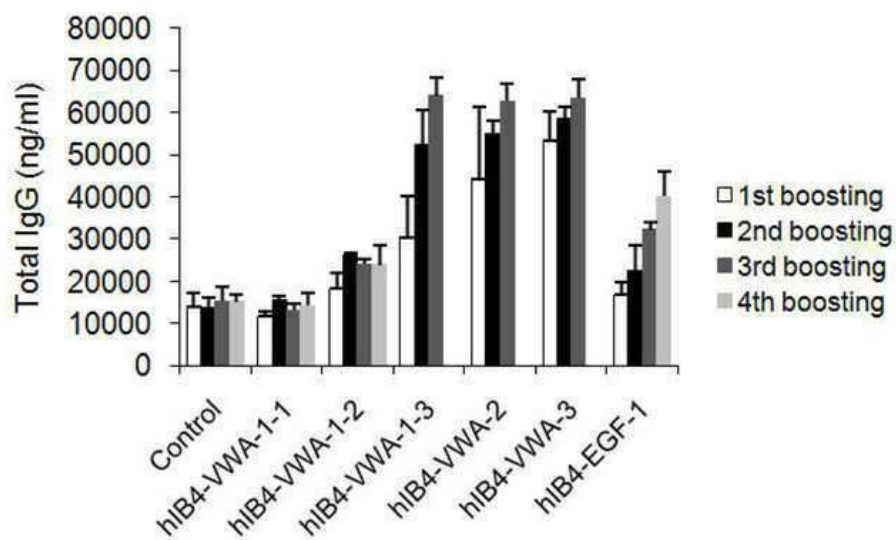
도면21c



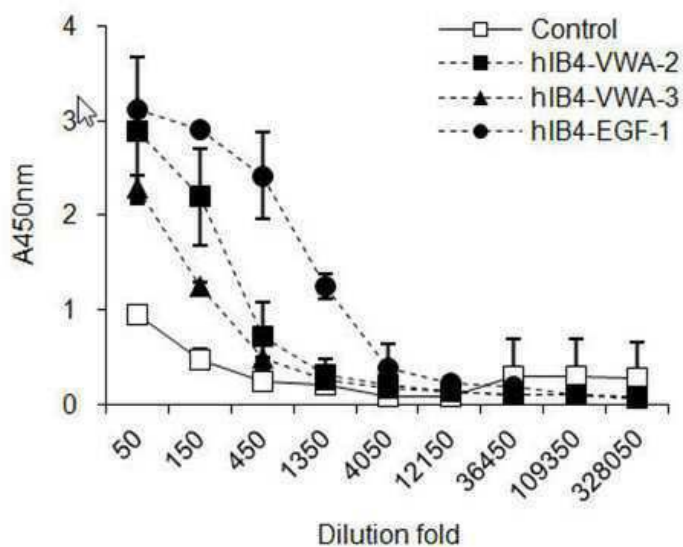
도면21d



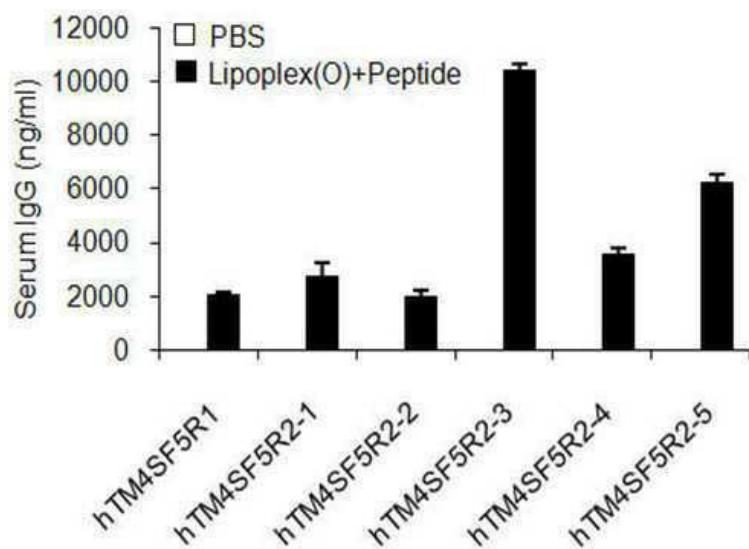
도면22a



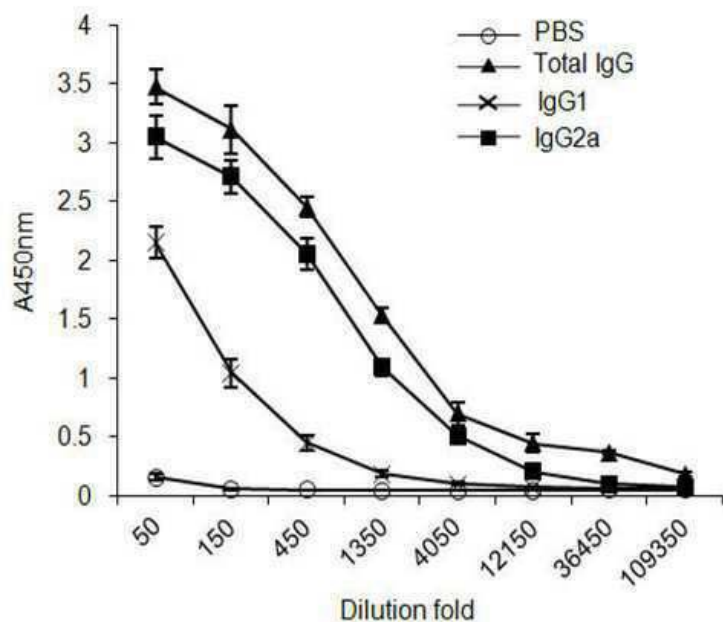
도면22b



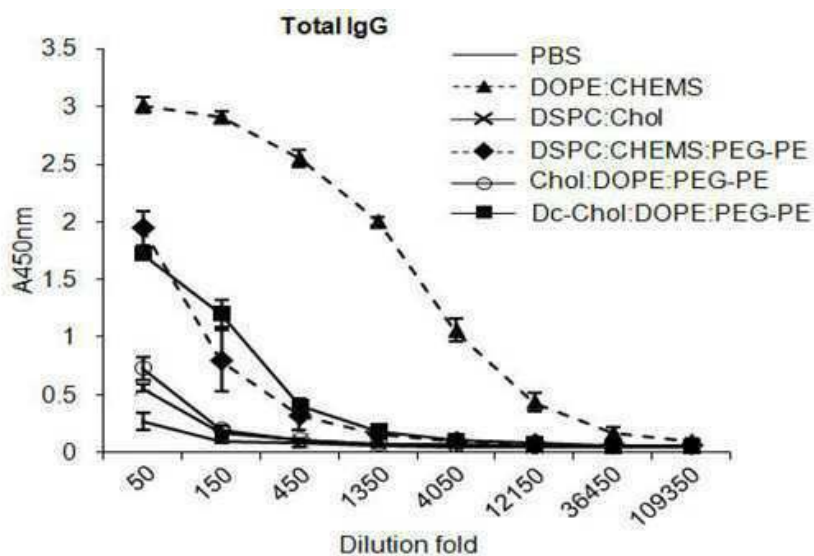
도면23a



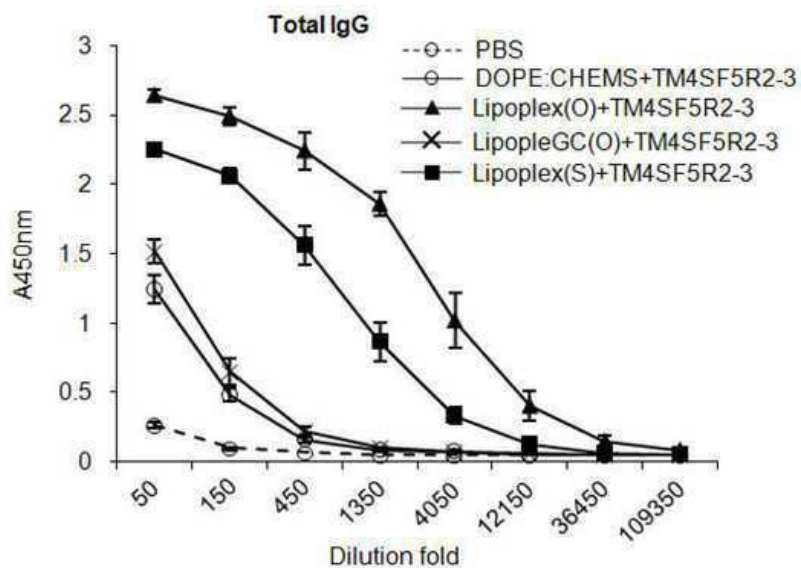
도면23b



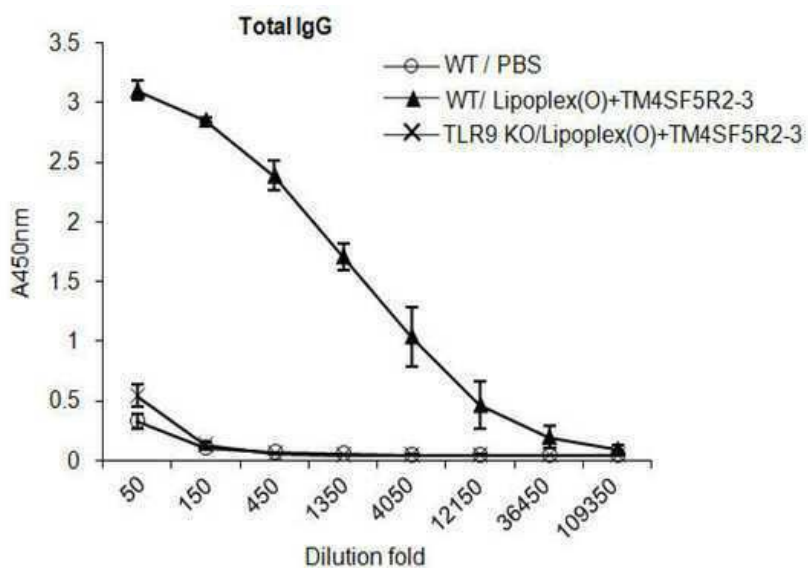
도면23c



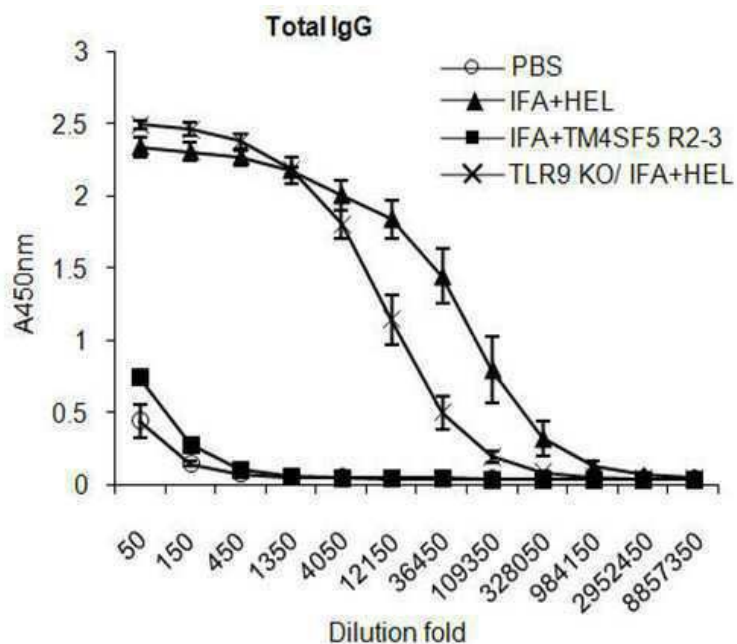
도면23d



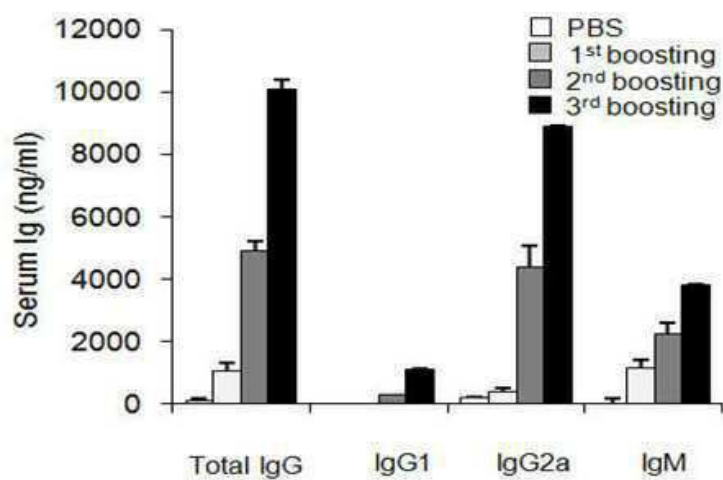
도면23e



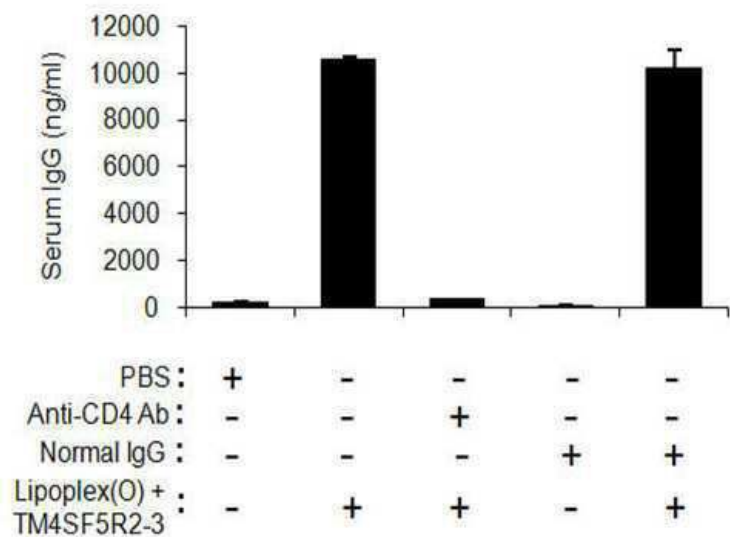
도면23f



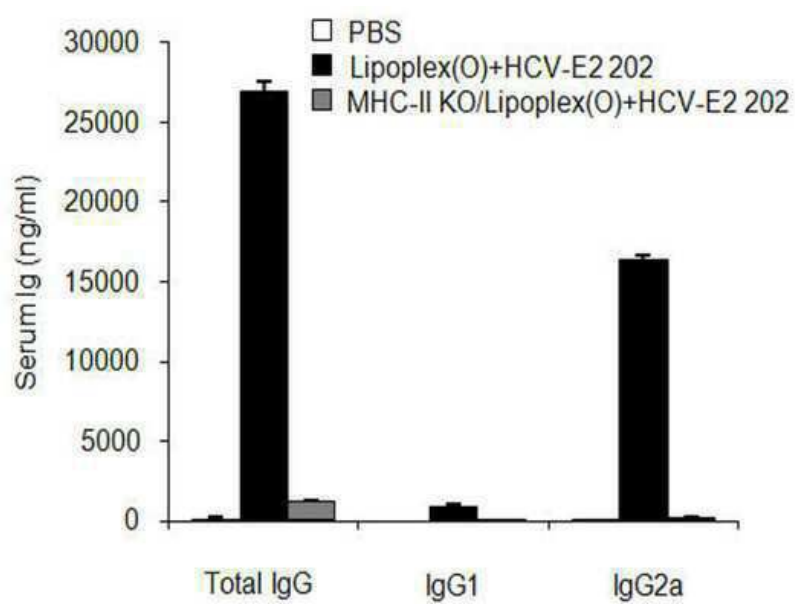
도면24a



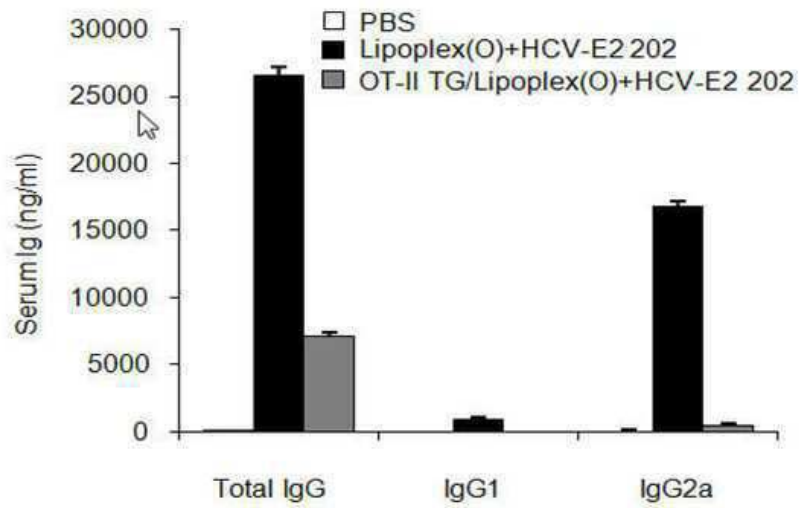
도면24b



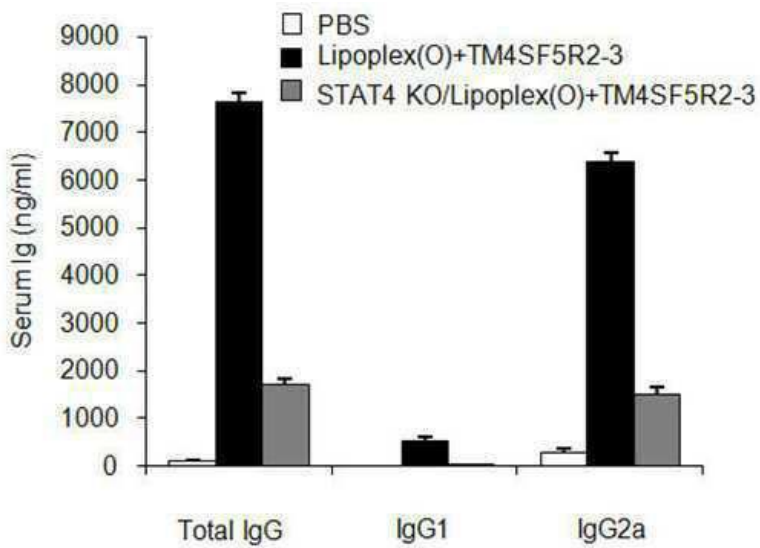
도면24c



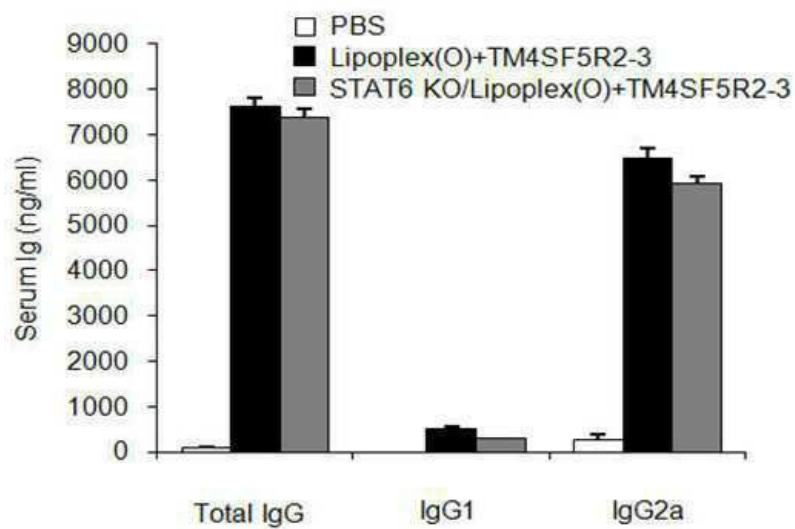
도면24d



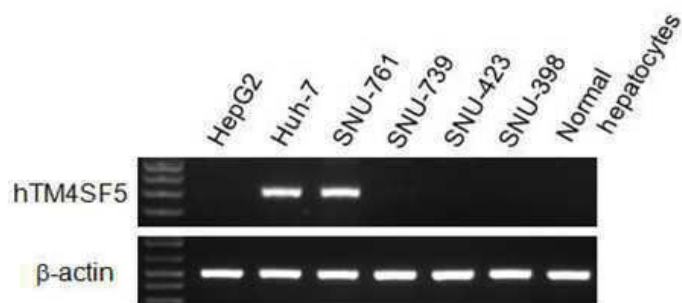
도면24e



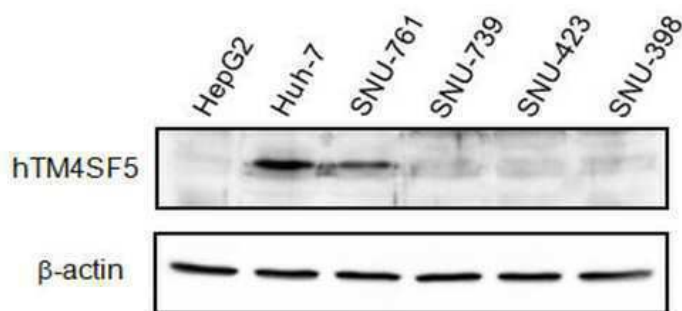
도면24f



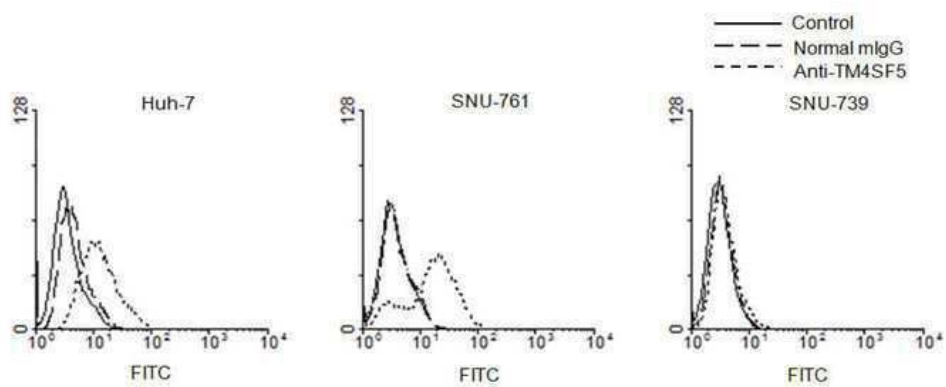
도면25a



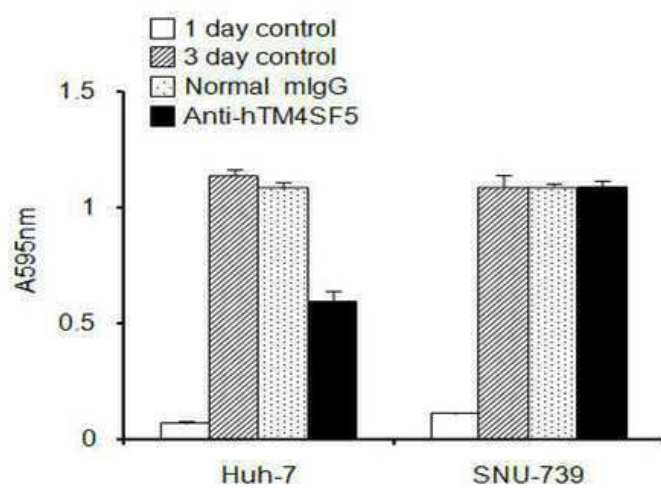
도면25b



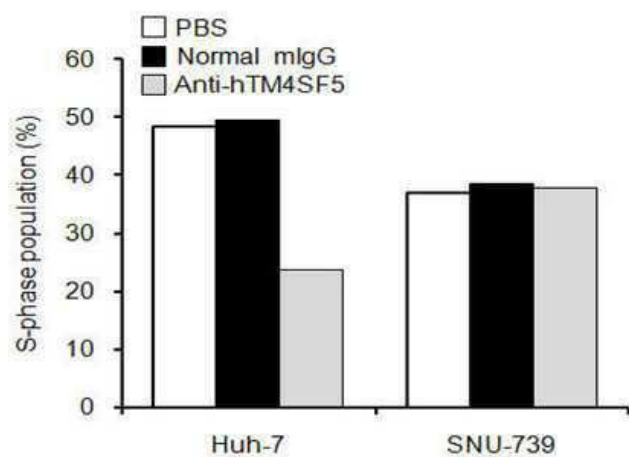
도면25c



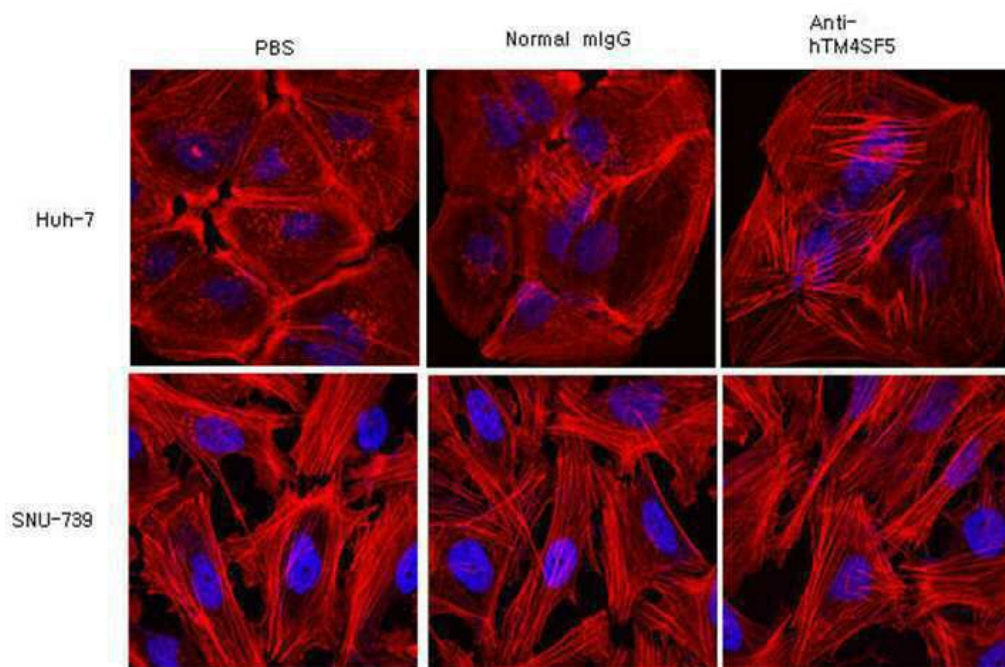
도면25d



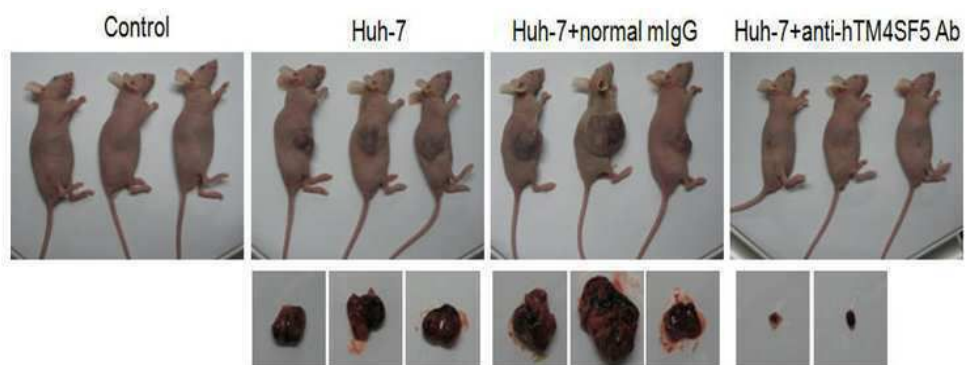
도면25e



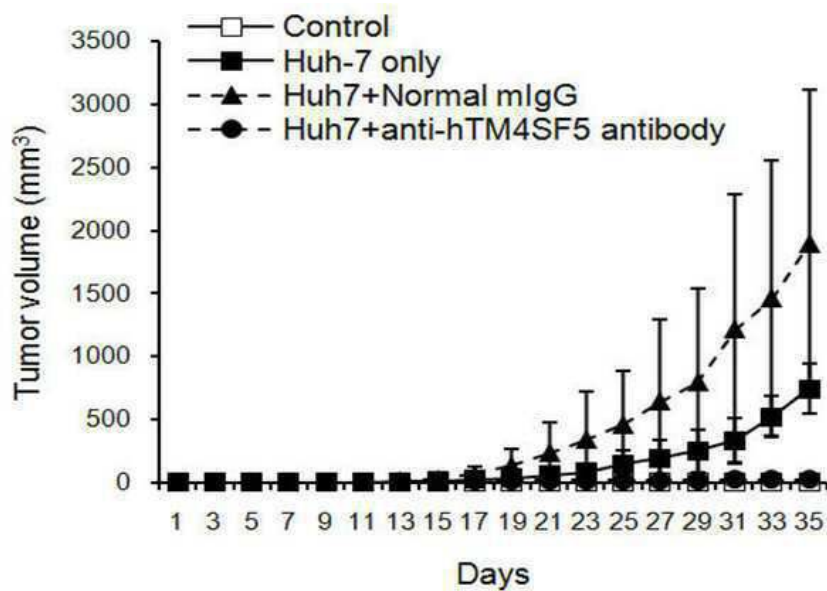
도면25f



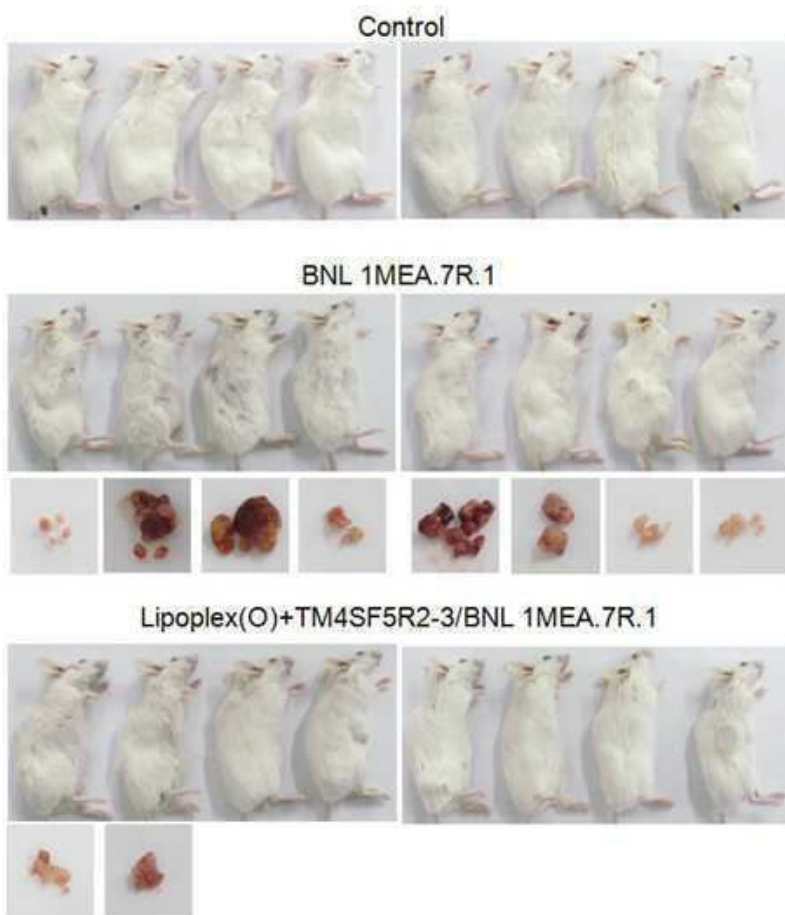
도면26a



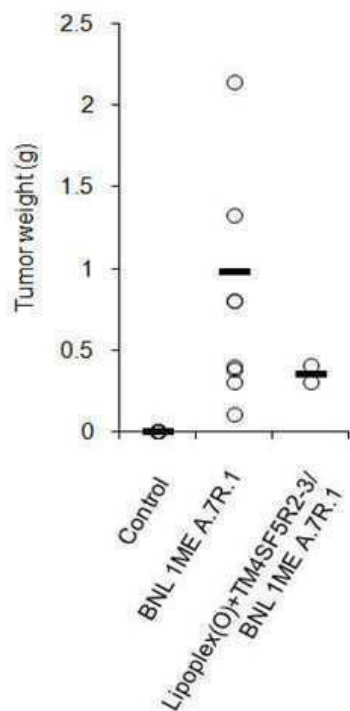
도면26b



도면27a



도면27b



서 열 목 록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University
- <120> Peptide Vaccine Comprising Liposome-encapsulated Oligonucleotides and Peptides
- <130> PP100018US
- <150> KR 10-2009-0065495
- <151> 2009-07-17
- <150> PCT/KR2010/003879
- <151> 2010-06-16
- <160> 46
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Influenza A virus
- <400> 1

Ile Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys

1 5 10

- <210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 2

Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met

1 5 10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 3

Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly

1 5 10 15

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 4

His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 5

Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile

1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 6

Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Lys Asp Gln His Gly Arg Met

1 5 10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 7

Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Met

1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 8

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 9

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asn Arg Thr Leu Trp Asp Arg Cys Glu Ala Pro Pro Arg Val

1 5 10
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Gly Ala Tyr Leu Leu Asn Arg Thr Leu Trp Asp Arg Cys Glu Ala

1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Hepatitis C virus
 <400> 12

Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg

1 5 10
 <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> respiratory syncytial virus
 <400> 13

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

1 5 10 15
 Trp Asp

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium bovis
 <400> 14

agcagcggttc gtgtcggcct

20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MB-ODN 4531(O)GC

<400> 15

agcaggcttc gtgtcggcct 20

<210> 16

<211> 13

<212> DNA

<213> Mycobacterium bovis

<400> 16

agcagcgcttc ttg 13

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MB-ODN 4531(S)CT

<400> 17

agcagcgcttc ttgtcggcct 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MB-4531(S)CS

<400> 18

aggccgacaa gaacgtgct 20

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH5N1-HK HA370

<400> 19

His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Glu Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH5N1 HA 233-1

<400> 20

Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met

1 5 10

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH5N1 233-2

<400> 21

Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly Arg Met

1 5 10

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH5N1 HA233-3

<400> 22

Met Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met

1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH5N1 HA233-4

<400> 23

Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile

1 5 10

<210> 24

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hH5N1 HA233-6
 <400> 24
 Ile Ala Thr Arg Ser Lys Ile Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile
 1 5 10

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hH5N1 HA233-7
 <400> 25
 Ile Ala Thr Arg Ser Lys Ile Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met
 1 5 10

<210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hH5N1 HA233-9
 <400> 26
 Ile Ala Ala Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met
 1 5 10

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> hH5N1 HA233-11
 <400> 27

Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ile Gly Arg Met
 1 5 10

<210> 28
 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH1N1-NY HA370

<400> 28

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Lys Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH1N1-OH HA370

<400> 29

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Arg Lys Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH1N1-Thai HA233

<400> 30

Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln Ala Gly Arg Met

1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mH2N5 HA233

<400> 31

Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Gly Gly Arg Met

1 5 10
 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hH7N7 HA233
 <400> 32

Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile

1 5 10
 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hH7N7 HA370
 <400> 33

Arg His Gln Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser

1 5 10 15
 Thr
 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hH9N2 HA233
 <400> 34

Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Gln Gly Arg Ile

1 5 10
 <210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hH9N2-ST HA370
 <400> 35

Gln His Ser Lys Tyr Gln Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hH9N2-HK HA370

<400> 36

Gln His Ser Asn Asp Gln Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser

1 5 10 15

Thr

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sH15N2 HA233

<400> 37

Pro Gly Ala Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly Arg Ile

1 5 10

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HRSV-Fa3

<400> 38

Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala

1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HRSV-Fa3-2

<400> 39

Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala

1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HRSV-F7

<400> 40

Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val

1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HRSV-F9

<400> 41

Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile

1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIB4-VWA-1-2

<400> 42

Lys Glu Pro Trp Pro Asn Ser Asp Pro Pro Phe Ser Phe Lys Asn

1 5 10 15

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIB4-VWA-1-3

<400> 43

Pro Gln Thr Asp Met Arg Pro Glu Lys Leu Lys Glu Pro Trp Pro Asn

1 5 10 15

Ser Asp Pro

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIB4-VWA-2

<400> 44

Leu Thr Glu Asp Val Asp Glu Phe Arg Asn Lys Leu Gln Gly Glu Arg

1 5 10 15

Ile Ser Gly Asn

20

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIB4-VWA-3

<400> 45

Leu Asp Thr Thr Gly Thr Tyr Thr Gln Tyr Arg Thr Gln Asp Tyr Pro

1 5 10 15

Ser Val Pro Thr

20

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIB4-EGF-1

<400> 46

Leu Gln Lys Glu Val Arg Ser Ala Arg Cys Ser Phe Asn Gly Asp

1 5 10 15