

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0038953 (43) 공개일자 2016년04월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/16 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)	
(21) 출원번호 10-2014-0130984	(72) 발명자 장준 서울 서대문구 연희로 38-20, 103동 1203호 (연희동, 대우아파트)	
(22) 출원일자 2014년09월30일 심사청구일자 2014년09월30일	(74) 대리인 손민	

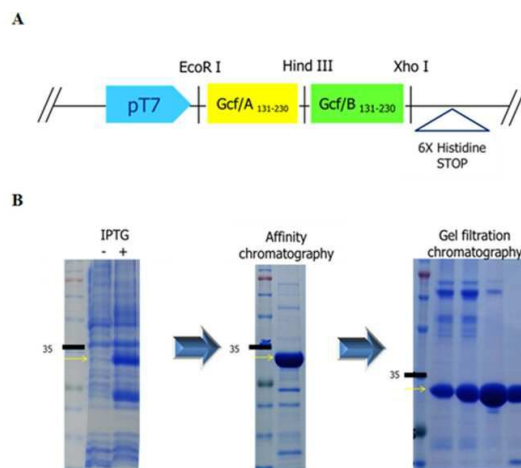
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **호흡기 신시치아 바이러스 범용 백신**

(57) 요약

본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물, 상기 백신 조성물을 제조 방법, 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 보호 면역을 증가시키는 방법 및 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 의한 호흡기 감염 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 백신 조성물의 유효성분이 아쥬반트를 포함하지 않고, 융합 단백질로 구성되는 경우에도 RSV A 및 B에 대한 보호 면역 효과를 나타내는 것이 특징인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질의 호흡기 신시치아 바이러스 A 아형의 Gcf 단백질 및 호흡기 신시치아 바이러스 B 아형의 Gcf 단백질은 링커(linker)로 서로 연결된 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 이의 N-말단, C-말단 또는 둘 다에 단백질 태그를 추가로 포함하는 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 호흡기 신시치아 바이러스 A 아형의 Gcf 단백질은 서열번호 5로 표시되는 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 호흡기 신시치아 바이러스 B 아형의 Gcf 단백질은 서열번호 6으로 표시되는 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 7 또는 9로 표시된 서열을 포함하는 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물은 RSV A 아형 및 RSV B 아형에 대한 보호 면역 효과를 모두 나타내는 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물은 아쥬반트를 추가로 포함하는 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 아쥬반트는 콜레라 독신, 알루미늄 하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일 및 생분해성(Biodegradable) 오일로 구성되는 군으로부터 선택된 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 백신 조성물은 점막 또는 근육 내 투여를 위한 것인, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물.

청구항 12

서열번호 5의 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 서열번호 6의 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 융합 단백질은 이의 N-말단, C-말단 또는 둘 다에 단백질 태그를 추가로 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 7 또는 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 15

제12항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제15항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 17

제16항의 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오

[0001]

티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물, 상기 백신 조성물을 제조 방법, 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 보호 면역을 증가시키는 방법 및 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 의한 호흡기 감염 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 호흡기 신시치아 바이러스(human RSV)는 뉴모바이러스 속(genus *Pneumovirus*) 및 파라믹소바이러스 과(family *Paramyxoviridae*)에 속하는 음성극성(negative-sense), 비분절화(non-segmented) RNA 바이러스이다. RSV는 유아 및 노인에게 심각한 상부 및 하부 기도에 대한 호흡기 질환의 중요한 원인이다. 이에 효과적인 RSV 백신을 개발하기 위하여 많은 노력이 있었으나, RSV 미접촉 유아 및 어린이에게 안전하고, 효과적이며, 허가된 RSV 백신은 아직까지 없다. 1960년대에는 FI-RSV(formalin-inactivated RSV)가 임상 연구되었으나, FI-RSV는 어린이들에게 심각한 질환을 야기하여, 두 명이 사망하고, FI-RSV를 접종한 개체의 약 80%가 병원에서 치료를 받았다. 지금까지 정제된 RSV F, G 및 M 단백질이 서브유닛 백신으로서 개발되었고, RSV G 당단백질이 RSV 바이러스 감염에 대한 중화 항체를 나타내어, 보호 항원 중 하나로서 알려져 왔다. 또한, RSV F 및 G 단백질은 수많은 임상 시험의 대상이 되어 왔다. 예를 들어, BBG2Na는 RSV A G 단백질의 중심 보존된 부분(G2Na)이 연쇄상구균 G 단백질의 알부민 결합 도메인(BB)의 C-말단에 융합된 형태의 재조합 융합 단백질로서, RSV 서브유닛 백신 후보자로서 폐 면역병리 유도 없이 보호 면역 반응을 유발할 수 있음이 알려져 있으나, 임상 3상에서 BB 요소에 의하여 타입 III 과민반응을 야기하는 것이 보고된 바 있다(Polack et al., The Pediatric infectious disease journal 23, S65-S73, 2004).

[0003] RSV G 단백질의 비당화 부위는 지금까지 알려진 A 및 B 균주 간에 보존된 13개의 아미노산 펩타이드에 해당한다. G 단백질의 헤파린 결합 도메인은 일차 감염 동안 세포 표면에 위치한 글리코사미노글리칸(GAGs)과의 초기 상호작용에 중요한 역할을 담당하고, G 단백질의 CX3C 케모카인 모티프인 182-186 아미노산 부위는 CX3CR1과 상호작용하여 기능한다. RSV G 단백질 또는 펩타이드 면역화와 관련된 많은 연구들은 RSV G 단백질의 백신 접종이 백신에 의한 폐 호산구증(eosinophilia) 및 Th2-타입의 우세 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13 및 이오탁신) 생산과 관련되어 있다고 보고하고 있다. 여기서, RSV G 단백질에 매개되는 폐 호산구증은 RSV G 단백질의 184-193 아미노산 잔기를 포함하는 보조 T 세포 에피토프와 관련된 것으로 알려진 바 있다. 다만, RSV F(F51-66)의 CD4+ T 세포 에피토프 및 185 번 및 188번 아미노산 잔기의 알라닌 치환을 포함하는 mGcf의 융합 단백질인 Th-mGcf는 백신 매개 폐 호산구증 또는 심각한 체중 감소를 유발하지 않으면서도 높은 RSV G-특이적 항체 반응을 유도하며, 바이러스 제거 효과를 보이는 것으로 알려진 바 있다. 또한, 설하 투여 경로를 통하여 콜레라 독소와 RSV B Gcf를 마우스에 백신화한 경우, RSV B 특이적 항체 반응을 나타내면서도 기도에 심각한 폐 호산구 유도를 야기하지 않은 것으로 알려진 바 있다. 이러한 이유로, RSV G 단백질은 지금까지도 유망한 백신 후보로서 여겨지고 있다.

[0004] 한편, RSV는 항체의 인지 패턴 및 G 단백질의 서열 차이를 바탕으로 A 및 B의 두 가지 아형으로 구분된다. 상기 두 가지 아형이 RSV 유행병에서 모두 발견되며, 1 내지 2년 주기로 유행하는 RSV 균주의 우위가 이동한다. 또한, 일생 동안 RSV의 재감염이 발생하며, 상기 두 가지 주요 항원성 서브그룹 간의 G 단백질 항원성 차이를 통하여 기 존재하던 숙주의 면역 반응 회피가 촉진되는 것으로 알려져 있다. 이는, RSV의 국한된 기질 및 다른 유전형의 기존 감염에 의해 생산된 기 존재하는 지역 면역을 회피하기 위한 RSV의 능력과 관련되어 있을 것이다. 이러한 점이 RSV 발병도에 영향을 줄 수 있으며, 더 많은 질병 발생 및 반복되는 감염을 야기할 수 있다. 따라서, 어떠한 RSV 아형이 우세할지 염려되는 상황에서 RSV 아형 모두에 면역을 부여할 수 있는 범용 RSV 백신의 개발이 요구되는 상황이다.

[0005] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 범용 RSV 백신을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질을 서로

결합시킨 융합 단백질의 경우, 아쥘반트가 없는 경우에도 RSV A 및 B 아형 모두에 대한 면역 반응을 효과적으로 유도하면서도 몸무게 감소 등의 부작용이 없어, RSV 범용 백신으로서 유용하게 사용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 하나의 목적은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 보호 면역을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 의한 호흡기 감염 질환의 예방 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명에서 용어, "RSV의 G 단백질"은 RSV 주요 부착 단백질로서, 본 발명에서는 이의 일 부분이 호흡기 신시치아 바이러스 백신 면역원의 구성 성분으로 사용된다. 상기 RSV의 G 단백질 및 이를 코딩하는 유전자의 정보는 미국 국립 보건원 유전자 은행과 같은 공지의 데이터 베이스를 통하여 취득할 수 있으며, 구체적으로 RSV A의 G 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있으며, RSV B의 G 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 본 발명에서 용어, "RSV의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment)"은 RSV G 단백질의 중심 보존된 도메인(central conserved domain) 부위에 대한 아미노산 서열로 구성된 단백질을 말한다.
- [0013] 상기 RSV A 아형의 Gcf 단백질은 그 예로 RSV A 아형의 G 단백질의 120 내지 230번 부위, 130 내지 230번 부위, 131 내지 230번 부위로 구성된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않으며, RSV A 아형에 대한 면역 효과를 나타낼 수 있는 한, 상기 부위의 단편 형태도 포함한다.
- [0014] 상기 RSV A 아형의 종류는 특별히 이에 제한되지 않으나, RSV Long 또는 A2 또는 A 아형에 속하는 임상분리주일 수 있으며, 구체적으로는 RSV A2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 RSV A2 Gcf 단백질로서, 서열번호 5로 구성된 단백질을 사용하였다. 상기 서열번호 5의 Gcf 단백질은 서열번호 1로 표시되는 RSV A2 G 단백질의 131 내지 230 부위에 해당한다.
- [0015] 또한, 상기 RSV B 아형의 Gcf 단백질은 그 예로 RSV B 아형 G 단백질의 120 내지 230번 부위, 120 내지 231번 부위, 129 내지 230번 부위, 129 내지 231번 부위, 130 내지 230번 부위, 130 내지 231번 부위, 131 내지 230번 부위, 또는 131 내지 231번 부위로 구성된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않으며, RSV B 아형에 대한 면역 효과를 나타낼 수 있는 한, 상기 부위의 단편 형태도 포함한다.

- [0016] 상기 RSV B 아형의 종류는 특별히 이에 제한되지 않으나, RSV B1, BA, 또는 RSV B 아형에 속하는 임상분리주 등이 있으며, 구체적인 종류로는 HRSV-B에 속하는 KR/B/10-12 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 RSV B1 Gcf 단백질로서, 서열번호 6으로 구성된 단백질을 사용하였다. 상기 서열번호 6의 Gcf 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 RSV B1 단백질의 129 내지 231번 아미노산 부위에 해당한다.
- [0017] 또한, 본 발명에서 상기 RSV G 단백질 또는 RSV의 Gcf 단백질은, 야생형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 변이체를 포함한다. G 단백질의 변이체란 G 단백질의 야생형 아미노산 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 야생형 아미노산 서열과 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다.
- [0018] 또한, 상기 RSV G 단백질 또는 RSV의 Gcf 단백질은 상기 서열로 기재한 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 Gcf 부위가 RSV A 또는 B 바이러스에 대한 면역원성을 나타낼 수 있다면, 본 발명의 범주에 제한 없이 포함된다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "상동성"은 주어진 단백질 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0를 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있다.
- [0020] 본 발명은, 상기 RSV의 G 단백질 중 Gcf 단백질 부위를 백신 면역원의 제조에 이용한다. 본 발명에서 상기 RSV A 아형의 G 단백질의 Gcf 부위를 Gcf/A로 명명되며, RSV B 아형의 G 단백질의 Gcf 부위를 Gcf/B로 명명된다.
- [0021] 본 발명의 일 양태에 따르면, Gcf/A 및 Gcf/B를 융합하여 백신 면역원으로 사용하는 경우, Gcf/A 및 Gcf/B의 혼합물을 사용하는 경우에 비해서도 RSV A 및 B 아형 모두에 대한 우수한 면역원성을 나타낼 수 있다.
- [0022] 따라서, 본 발명의 백신 조성물은 RSV에 대한 높은 면역원성을 나타낼 수 있도록, 상기 Gcf/A 및 Gcf/B의 융합 단백질을 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물의 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 융합 단백질은 본 발명에서 Gcf/AB로 명명된다. 상기 융합 단백질은 서열번호 7 또는 9로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 융합 단백질은 상기에서 기술한 서열 외에도 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 RSV A 및 B 바이러스에 대해 면역원성을 나타낼 수 있다면, 본 발명의 범주에 제한 없이 포함된다. 또한, 이의 변이체도 본 발명의 범위에 포함됨은 당업자에게 자명하다.
- [0024] 또한, 특별히 이에 제한되지는 않으나, 상기 융합 단백질에 포함되는 Gcf/A 및 Gcf/B에서, RSV G 단백질의 173번, 176번, 182번 및 186번 아미노산의 시스테인 잔기가 보존된 것이 바람직하다.
- [0025] 상기 4가지 아미노산 잔기는 보존된 시스테인 잔기를 가짐으로써, RSV에 대한 면역원성을 효과적으로 나타낼 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 상기 융합 단백질의 Gcf/A 및 Gcf/B는 직접 연결된 형태이거나, 링커(linker)로 서로 연결된 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어, "링커"는 두 개의 서로 다른 융합 파트너를 서로 연결할 수 있는 연결체를 말한다. 상기 링커는 바람직하게는 펩타이드 링커일 수 있으며, 그 예로 G4S 링커 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 또한, 상기 융합 단백질의 Gcf/A 및 Gcf/B는 Gcf/A의 C-말단에 Gcf/B가 연결되거나, Gcf/B의 C-말단에 Gcf/A가 연결된 형태일 수 있으나, 이에 결합 형태가 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 또한, 상기 융합 단백질은 이의 N-말단, C-말단 또는 둘 다에 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.

- [0030] 상기 단백질 태그(tag)의 예로는, 플루오레세인과 같은 화학적 형광물질(Fluorescein), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩티드 형광물질을 포함한 형광분자일 수 있고, T7 태그, 믹(Myc) 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘(Histidine) 태그, 루신(Leucine) 태그, IgG 태그 및 스트렙타비딘(Streptavidin) 태그 등 에피토프(epitope) 태그일 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기를 가지며, 통상적으로 약 8개 내지 50개의 아미노산 잔기를 가지나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 또한, 상기 융합 단백질은 Gcf/A 및 Gcf/B의 융합 단백질의 제조 과정에서 포함되는 제한 효소 절단 위치 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 특정 두 단백질의 융합 단백질 제조에 융합하고자 하는 단백질의 서열 외에도 상기와 같이 융합 단백질의 제조 과정에 필요한 서열이 최종적으로 제조된 융합 단백질에 포함될 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0032] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 융합 단백질을 포함하는 백신 조성물은 RSV A 및 B에 대한 면역 효과를 모두 나타낸다. 따라서, 상기 융합 단백질을 포함하는 본 발명에 따른 백신 조성물은 RSV 범용 백신으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 융합 단백질을 포함하는 백신 조성물은 아췌반트를 포함하지 않고도 RSV A 및 B에 대한 우수한 면역 효과를 나타낸다.
- [0033] 단백질을 유효성분으로 포함하는 백신, 즉 단백질 또는 펩티드 백신의 경우, 그 자체로 충분한 면역반응의 유도가 어려워 백신 조성물에 아췌반트를 포함하는 것이 일반적이다. 그러나, 본 발명의 백신 조성물은 아췌반트를 포함하지 않고 상기 융합 단백질만을 사용하더라도 RSV A 및 B에 대한 보호 면역 효과를 효과적으로 나타낼 수 있다. 아췌반트의 경우, 면역원성을 위해 포함되는 것이 불가피한 경우가 많으나 이에 의하여 또 다른 부작용이 야기될 위험이 있다. 따라서, 본 발명의 백신 조성물에 아췌반트를 포함시키지 않고 상기 융합 단백질로 구성된 유효성분을 포함시키는 경우, 보다 높은 안정성을 제공할 수 있으나, 상기 기술한 바에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 범주가 상기 기술한 바에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 백신 조성물은 추가로 아췌반트를 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 아췌반트는 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 포함될 수 있는 성분으로, 그 예로 콜레라 독신(CT), 알루미늄 하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일 또는 생분해성(Biodegradable) 오일이 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 백신조성물은 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 하나 이상의 보조제 등을 포함할 수 있다. 적절한 보조제에는 펩티드, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 옥사이드 및 Marcol 52 같은 미네랄 오일 또는 식물성 오일 및 하나 이상의 유화제로 구성된 조성물 또는 리졸세스틴, 다가 양이온, 다가 음이온 같은 표면 활성물질 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 용어, "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다. 상기 백신 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 점막 또는 근육 내 투여될 수 있다.
- [0038] 상기 점막 투여는 바람직하게는 비강 투여(intranasal administration)를 통한 것일 수 있다. "비강 투여(intranasal administration)"란, 활성 성분의 국부적 또는 전신적 효과를 얻기 위하여 투약 제형을 비강(nasal cavity) 하부에 적용하여 비점막으로 흡수시키는 투여 경로를 의미한다.
- [0039] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0040] 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"이란 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 치료될 장애, 장애의 중증도, 유효성분의 활성, 투여 경로, 제거 속도, 치료 지속 기간, 조합되거나 또는 동시에 사용되는 약물, 대상체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태, 및 의약 업계 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다.
- [0041] "약제학적으로 유효한 양" 결정시 고려되는 다양한 일반적인 사항들은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Gilman et al., eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990] 및 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton,

Pa., 1990]에 기재되어 있다.

- [0042] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 백신 조성물은 호흡기 신시치아 바이러스에 의해 유발되는 호흡기 질환의 예방 또는 치료를 가져올 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 용어, "예방"이란, 조성물의 투여로 호흡기 신시치아 바이러스 감염에 의해 유발되는 호흡기 질환 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0045] 본 발명에서 용어, "치료"란, 조성물의 투여로 호흡기 신시치아 바이러스 감염에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0046] 호흡기 신시치아 바이러스 감염에 의해 유발되는 호흡기 질환은 기침, 재채기, 고열, 천명, 기관지염, 세기관지염, 폐렴, 천식, 크룹 및 호흡기 부전 등을 예로 들 수 있다.
- [0047] 본 발명의 백신 조성물은 또한 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. "약학적으로 허용 가능한 담체"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착지연제 등을 포함한다. 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토스, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명의 백신용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결 건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 실시예에서는, RSV A 아형의 대표적인 Gcf 단백질인, 서열번호 5의 Gcf 단백질 및 RSV B 아형의 대표적인 Gcf 단백질인, 서열번호 6의 Gcf 단백질의 융합 단백질을 제조하였다(실시예 1). 그 다음, 상기 융합 단백질의 효과를 확인하기 위하여 아쥘반트의 부재 하에서 Gcf/AB를 비강 또는 근육 내 투여하여 점막 또는 전신 면역을 유도하였고, 또한, 이의 효과를 비교하기 위하여 Gcf/A, Gcf/B, 및 Gcf/A 및 Gcf/B의 혼합 투여(Gcf/A + Gcf/B) 역시 각각 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 Gcf/AB를 투여한 군은 투여 경로와 무관하게 다른 군 모두에 비해서도 가장 높은 RSV A2 및 B1 특이적 항체를 유발하였다. 특히, 본 발명의 Gcf/AB 군은 Gcf/A + Gcf/B 군에 비해서도 같은 분자수의 Gcf/A 및 Gcf/B를 포함함에도 혈청 IgG를 유도하는 정도가 높았으며, 특히 B 세포 에피토프에 대한 항체 유도 효과의 경우, 본 발명의 Gcf/AB 군에서만 높은 정도로 유도되었다(도 2 및 3). 또한, 상기 Gcf/AB의 백신화가 RSV A 및 B에 대한 보호 면역 효과를 유도할 수 있는지 확인한 결과, 상기 Gcf/AB 투여군의 경우, Gcf/A 투여군, Gcf/B 투여군, 및 Gcf/A + Gcf/B 투여군 모두에 비하여 현저히 낮은 폐 바이러스 역가를 나타내면서도, 몸무게 감소를 가져오지 않았다(도 4 및 5). 이러한 결과들은 Gcf/A 및 Gcf/B를 융합 단백질 형태로 포함함으로써, Gcf/A 및 Gcf/B의 면역원성을 현저히 높일 수 있음을 나타내는 것이다. 특히, 아쥘반트를 포함하지 않고도 높은 면역원성을 나타내므로, 안전성이 높은 RSV 범용 백신으로서 사용될 수 있음을 시사하였

다.

- [0050] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0051] 상기 백신 조성물에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0052] 상기 개체는 호흡기 신시치아 바이러스가 감염될 수 있는 유기체라면 제한 없이 포함하며, 구체적으로는 호흡기 질환이 발병할 수 있다는 특성상 호흡기관을 포함하는 고등 척추동물이 될 수 있고, 더욱 구체적으로는 포유동물이 될 수 있으며, 더욱더 구체적으로는 영장류가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0053] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 백신 조성물을 호흡기 신시치아 바이러스에 대한 면역이 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스에 의한 호흡기 감염 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0054] 상기 백신 조성물, 개체, 질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0055] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) A 아형의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment) 및 호흡기 신시치아 B 아형의 Gcf 단백질의 융합 단백질을 제공한다.
- [0056] 상기 융합 단백질 및 이를 구성하는 요소들에 대한 설명은 앞서 기술한 바와 같다.
- [0057] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체를 제공한다.
- [0058] 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은, 융합 단백질의 발현을 높이기 위하여 아미노산 번역 코돈을 최적화(optimization)시킬 수 있다. 구체적으로, 코돈의 축퇴성으로 인하여, 또는 목적 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호하는 코돈을 고려하여, 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 대한 다양한 변형이 이루어질 수 있다.
- [0059] 본 발명의 융합 단백질을 발현시킬 수 있다면, 숙주세포의 종류는 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로는 원핵세포, 예컨대 대장균을 숙주세포로 이용하여 발현시킬 수 있다. 통상적으로 단백질 번역 후 수식과정이 단백질의 면역원성에 영향을 미치기 때문에 항원 단백질발현은 동물세포 등 진핵세포에서 이루어져 왔다. 그러나 본 발명의 융합 단백질은 원핵세포, 바람직하게는 대장균에서 발현시켜도 우수한 면역원성을 보유함을 본 발명자가 밝혀내었다. 따라서, 백신을 경제적으로 제조할 수 있고, 정제된 단백질 형태로 투여하기 때문에 바이러스 벡터 상태로 감염시키는 것에 비하여 안전하다.
- [0060] 본 발명에서 용어, "발현벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로서, 이러한 유전자 작제물을 제조하기 위해 표준 재조합 DNA 기술을 이용할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 각종 숙주세포에서 목적하는 유전자를 발현하고, 목적하는 단백질을 생산하는 기능을 하면 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터일 수 있다. 재조합 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 목적하는 단백질을 암호화하는 유전자, 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다.

그 외에 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA, 오퍼레이터 서열, 목적하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비해독영역, 선별 마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. 개시 코돈 및 종결코돈은 일반적으로 번역원성 목적 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 일부로 간주될 수 있으며, 유전자 작제물이 도입되었을 때 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0062] 본 발명에서, 상기 융합 단백질은 상기 발현벡터를 사용해서 숙주세포를 형질전환시킨 후 배양하여 수득할 수 있다. 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 문헌(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2판), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 74, 1989)에 기재된 인산 칼슘법 또는 염화칼슘/염화루비듐법, 일렉트로포레이션법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법 등이 있다.

[0063] 상기 벡터가 발현되는 형질전환체를 영양배지에서 배양하면 유용한 단백질을 대량으로 제조, 분리 가능하다.

[0064] 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적당히 선택하여 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절하여야 한다.

[0065] 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포는 원핵 세포를 포함하며, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 세균, 예를 들어 에세리키아(*Escherichia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)와 같은 주지의 원핵 숙주들이 사용될 수 있는 숙주 세포의 예이다. 본 발명의 일 실시예에서는 대장균을 사용하였다.

[0066] 단백질의 발현은 유도인자, 예컨대 IPTG 등을 사용하는 방법으로 발현을 유도할 수 있고, 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절할 수 있다. 본 발명에서, 재조합적으로 생산된 펩티드는 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 펩티드 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리, 정제 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deucher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 면역흡착 친화력 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 및 복합 방법을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

발명의 효과

[0067] 본 발명에 따른 융합 단백질은 RSV A 및 B 아형 모두에 대한 면역을 효과적으로 유도하므로, RSV 범용 백신의 면역원으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은, 재조합 Gcf/AB 단백질을 발현하는 컨스트럭트의 구조 및 상기 단백질의 정제에 관한 것이다. (A) pET-21d-Gcf/AB 발현 벡터를 모식도로 나타내었다. Gcf/AB는 RSV A2 및 RSV B1 G 단백질 각각의 129번 내지 231번 아미노산 단편을 수 번의 클로닝 과정을 통하여 유전공학적으로 서로 연결하여 제조하였다. (B) 발현된 Gcf/AB를 친화성 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 통하여 정제한 다음, SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2a 내지 c는 Gcf/AB 백신화에 의해 유도되는 RSV-A 특이적 항체 반응에 관한 도이다.

도 2a는 면역화 및 공격 접종에 대한 실험적 과정을 모식도로 나타낸 것이다. Balb/C 마우스에 20 μ g Gcf/AB, 10 μ g Gcf/A, 10 μ g Gcf/B, 또는 Gcf/A 및 Gcf/B가 각 10 μ g씩 혼합된 혼합물(Gcf/A + Gcf/B)을 도에 표시

한 경로로 두 차례 면역화하였다.

도 2b는 부스팅 백신접종 14일 후 ELISA로 RSV A2 특이적 혈청 항체 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2c는 부스팅 백신접종 14일 후 RSV A2 G 174-187 펩타이드 특이적 혈청 항체 역가를 ELSIA로 측정한 결과를 나타낸다.

상기 도 2b 및 c의 실험 결과는 두 번의 독립적인 실험에 대한 대표적인 결과이다. OD는 광학 밀도(optical density)를 의미하며, 에러 바(bar)는 표준 편차를 나타낸다. PBS에 대한 결과와의 유의적 차이는 **, $P < 0.05$ ***, $P < 0.005$ 로 나타내었다.

도 3a 및 b는 Gcf/AB 백신접종에 의한 RSV-B-특이적 항체 반응에 관한 도이다. Balb/C 마우스에 20 μ g Gcf/AB, 10 μ g Gcf/A, 10 μ g Gcf/B, 또는 Gcf/A 및 Gcf/B가 각 10 μ g씩 혼합된 혼합물(Gcf/A + Gcf/B)을 표 시한 경로로 두 차례 면역화하였다.

도 3a는 부스팅 백신접종 14일 후 RSV KR/B/10-12(HRSV B에 속함) 특이적 혈청 항체 역가를 ELISA로 측정한 결 과를 나타낸다.

도 3b는 부스팅 백신접종 14일 후 RSV B G 174-187 펩타이드 특이적 혈청 항체 역가를 ELSIA로 측정한 결과를 나타낸다.

상기 도 3a 및 b의 실험 결과는 두 번의 독립적인 실험에 대한 대표적인 결과이다. OD는 광학 밀도(optical density)를 의미하며, 에러 바(bar)는 표준 편차를 나타낸다. PBS에 대한 결과와의 유의적 차이는 **, $P < 0.05$ ***, $P < 0.005$ 로 나타내었다.

도 4a 및 b는 Gcf/AB의 점막 또는 전신 백신 접종에 의한 RSV A2 바이러스에 대한 보호 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4a는 각 군의 마우스에 면역화한 지 4주 후 1×10^6 PFU RSV A2를 공격 접종한 다음, 폐 균질 혼합물을 제조 하고, RSV A2 바이러스 증식 수준을 플라크 어세이를 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다. 검출 한계는 200 PFU/폐 무게(g)였고, N.D.는 검출되지 않았음을 나타낸다.

도 4b는 각 군의 마우스에 RSV A2 바이러스를 공격 접종하고, 매일 몸무게를 측정한 결과를 나타낸 것이다. 결 과값은 각 군의 4개의 마우스의 평균 $\pm$ 표준 오차로 나타내었다.

도 5a 및 b는 Gcf/AB의 점막 또는 전신 백신 접종에 의한 KR/B/10-12(HRSV-B에 속함) 바이러스에 대한 보호 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5a는 각 군의 마우스에 면역화한 지 4주 후, 2 또는 4×10^6 PFU의 KR/B/10-12를 공격 접종하였고, 폐 균질 혼합물을 준비하였고, 바이러스 증식 수준을 플라크 어세이를 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다. 검출 한계 는 200 PFU/폐 무게(g)였고, N.D.는 검출되지 않았음을 나타낸다. PBS 결과와 유의한 차이는 *, $P < 0.05$ 로 나 타내었다.

도 5b는 각 군의 마우스에 KR/B/10-12 바이러스를 공격 접종하고, 매일 몸무게를 측정한 결과를 나타낸 것이다. 결과값은 각 군의 4개의 마우스의 평균 $\pm$ 표준 오차로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명 의 범위가 하기 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0070] 실시예 1: 실험방법

[0071] (1) RSV 스톡의 제조

[0072] RSV A2 또는 KR/B/10-12의 제조 및 분리는 Kim et al (PloS one 7, e32226, 2012) 또는 Jang et al (PloS one

6, e23797, 2011)에 기술한 방법대로 수행하였다. 요약하면, 단층으로 배양된 Hep-2 세포(ATCC, Manassas, VA)를 포함하는 30개의 150 mm 배양접시에 0.01의 MOI로 스톡 바이러스를 감염시켰다. 60 내지 80%의 세포 변성 효과(cytopathic effect)가 관찰될 때, 대개 3 내지 4일 후에 얼음 위에서 세포 배양 상등액 및 세포를 수집하였다. 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후, 세포 펠렛을 솔비톨을 10% 최종 농도로 포함하는, 수집된 세포 배양 상등액 25ml에 재현탁하였고, 재현탁된 용액을 항온수조 초음파 파쇄기를 이용하여 초음파 파쇄하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 수집하였고, 남은 배양 상등액과 합쳤다. 25,000rpm에서 60분간 원심분리한 다음, 희끄무레한 색의 바이러스 펠렛을 700 µl 차가운 무혈청 MEM에 재현탁하였다. 모든 바이러스 펠렛을 15초 인터벌(interval)로 2분간 초음파 분쇄한 다음, 25-게이지 바늘을 사용하여 주사기로 재현탁하였다. RSV A2 또는 KR/B/10-12 바이러스 스톡을 나눈 다음(aliquoted), -70° C에 보관하였다. 역가는 일반적인 플라크 어세이를 사용하여 측정하였다.

[0073] (2) RSV A 및 B 아형 유래 G 중심 단편(G core fragment)의 융합 컨스트럭트의 제조

[0074] Gcf/A 및 Gcf/B에 대한 발현 플라스미드(각각 pET-21d-GcfA, pET-21d-GcfB)는 Kim et al (PloS one 7, e32226, 2012) 또는 Cheon et al(PloS one 9, e94269, 2014)에 기술되어 있다.

[0075] Gcf/AB 발현 플라스미드의 제조를 위하여 RSV B1 바이러스의 RSV G 단백질 129 내지 231번 아미노산 잔기 부분을 cDNA로부터 정방향 프라이머(5' -AAA AGC TTA CAA CCG CCC AGA CC-3' , 서열번호 11) 및 역방향 프라이머(5' -CCC TCG AGG GGG TTT GTG GTT GTT-3' , 서열번호 12)를 사용하여 PCR 증폭하였고, 증폭된 DNA 단편은 아가로스 전기영동을 통하여 분리하였다. 그 다음, 분리된 DNA 단편을 pGEM-T 이지 벡터에 연결하였다. 형질전환 콜로니는 IPTG 및 X-gal (파란색 및 하얀색을 이용한 스크리닝)을 포함한 LB 배지에서 암피실린(50 µg/mL)을 이용하여 선별하였고, 양성 제조합 콜로니를 스크리닝하였고, T7 프라이머(5' -TAATACGACTCACTATAGG-3' , 서열번호 13) 및 SP6 프라이머(5' -TATTTAGGTGACACTATAG-3' , 서열번호 14)를 이용한 서열분석 및 제한효소 절단을 통하여 규명하였다. RSV B1 바이러스의 G 단백질의 129번 내지 231번 부위를 코딩하는 서열을 포함하는 pGEM-Teasy - Gcf/B 플라스미드를 적합한 제한 효소인 HindIII 및 XhoI으로 절단하였고, 상기 129번 내지 231번 부위에 대한 DNA 단편은 아가로스 전기영동으로 분리하였다. 그 다음, 상기 DNA 단편을 pET-21d-Gcf/A 플라스미드의 Hind III 및 Xho I 사이트에 연결하여, pET21d-GcfAB 벡터를 제조하였다(도 1의 A). pET21d-GcfAB 벡터는 HindIII 및 XhoI 효소(New England Bio labs, Beverly, MA)를 사용하여 이중 절단(double digestion)한 후 정제하였다. 그 다음, 이를 대장균 DH5a 컴피턴트 세포에 형질전환하였고, 형질전환 콜로니를 LB 배지에서 암피실린(50 µg/mL)을 사용하여 선별하였다. 그 다음, 제조합 콜로니를 제한효소 절단 및 서열분석하여 보다 구체적으로 규명하였다.

[0076] 상기와 같이 제조한 GcfAB는 서열번호 9의 아미노산 서열(서열번호 10의 핵산 서열)로 구성되며, Met-T7 태그-클로닝 사이트(서열번호 9에서 1 내지 16번 잔기), Gcf/A 부위(서열번호 9에서 17번 내지 116번 부위), HindIII 제한효소 절단위치(서열번호 9에서 117-118번 부위), Gcf/B 부위(서열번호 9에서 119번 내지 221번 부위; RSV B G 단백질의 129번 내지 231번 부위에 해당), XhoI 제한효소 절단위치(서열번호 9에서 222-223번 부위) 및 6x히스(His) 태그(서열번호 9에서 224번 내지 229번 부위)의 순서로 구성된다.

[0077] (3) RSV G 중심 단편의 발현 및 정제

[0078] RSV A2 바이러스 G 단백질의 131 내지 230 부위를 포함하는 정제된 pET-21d-Gcf/A 플라스미드 및 RSV B1 바이러스 G 단백질의 129 내지 231 부위를 포함하는 pET-21d-Gcf/B 플라스미드는 Kim et al (PloS one 7, e32226, 2012) 또는 Cheon et al(PloS one 9, e94269, 2014)에 기술되어 있는 바와 같이 발현시키고, 정제하였다.

[0079] Gcf/A (a.a. 131-230) 및 Gcf/B (a.a. 129-231)가 인프레임(in-frame)으로 존재하는 pET-21d-Gcf/AB 플라스미드는 대장균 BL21(DE3) 컴피턴트 세포에 일반적인 열 충격 방법을 이용하여 형질전환하였다. 형질전환 후, 단일 콜로니를 가져와 50 µg/ml의 암피실린을 포함하는 LB 배지에 접종하였고, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 밤새 배양한 세포 배양액 0.5ml을 적합한 항생제를 포함하는 새로운 500ml LB 배지에 이동하였고, OD600 값이 0.5에

이를 때까지(약 2시간가량이나 형질전환된 플라스미드의 종류에 따라 차이가 남) 강하게 혼합시켜 배양하였다. IPTG는 최종 농도가 1mM가 되도록 첨가하였고, 세포 배양액은 4시간 동안 인큐베이션하였다. $6,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리한 다음, 리터 배양액의 세포 펠렛을 40ml 결합 완충액(20 mM KPO₄, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole; pH 7.4)에 재현탁하였고, 얼음 위에서 초음파 분쇄시켰다. $15,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리한 다음 수득한 세포 배양 상등액을 결합 완충액으로 전-평형화한 니켈-나이트릴로트라이아세트산 (Ni-NTA) 레진 컬럼에 로딩하였다. 그 다음, 상기 컬럼을 세척하고 용출 완충액(20 mM KPO₄, 500 mM NaCl, 1M imidazole)을 사용하여 용출시켰다. 용출된 목적 단백질을 포함하는 분획을 수집하고, Centrifugal Filter 디바이스 (Centricon 15 mL, 30-kDa MWCO, Millipore, USA)를 이용하여 농축하였고, 완충액을 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 교환하였다.

[0080] 농축된 시료의 앨리콧(aliquot)을 PBS로 평형화된 Superdex™75 10/300GL 컬럼에 로딩하였다. 다량체 및 단량체 피크 분획을 각각 수집하였고, 이를 4° C에서 centrifugal filter 디바이스를 이용하여 1 내지 3mg/mL의 농도로 농축하였다.

[0081] 상기 단백질 시료의 엔도톡신 수준을 ϵ -폴리-L-라이신 엔도톡신 제거 레진 (Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 감소시켰다. 단백질의 엔도톡신 수준은 LAL(limulus amebocyte lysate) 어세이를 사용하여 측정하였으며, 0.6 EU/ μ g 이하인 것을 확인하였다.

[0082] 단백질의 쿠마시 블루 염색을 위하여 농축된 단백질을 디티오프레이톨(Dithiothreitol)을 포함하는 4 X SDS(sodium dodecyl sulfate) 샘플 로딩 완충액으로 1:3 (vol:vol)의 비율로 희석시켰다. 그 다음, 이를 95 ° C에서 5분간 변성시켰고, 12% 불연속적인 SDS-PAGE로 분리시켰다. 분리된 단백질은 CBB(Coomassie Brilliant Blue) R-250로 염색하여 시각화하였다. Gcf/AB의 대략적인 분자량은 34kDa였다(도 1의 B). 정제된 목적 단백질 (Gcf/AB, Gcf/A, 및 Gcf/B)의 단량체 분획을 각각 준비하고, 이를 마우스에 면역화하였다.

[0083] (4) 마우스 면역화 및 바이러스 공격 접종(challenge)

[0084] 6내지 7주령이고, 특정 병원체 부재인 암컷 BALB/c 마우스를 찰스 리버 래보라토리즈(Charles River Laboratories, Orient Bio, Korea)에서 구입하였다. RSV G 중심 단편을 0일 및 14일 두 번에 걸쳐 마우스의 비강 내 또는 근육 내로 접종하였다.

[0085] 비강 면역화를 위하여, BALB/c 마우스(4/그룹)을 아이소플레인으로 흡입마취시키고 20 μ g의 Gcf/AB, 10 μ g의 Gcf/A, 10 μ g의 Gcf/B, 또는 각 10 μ g의 Gcf/A 및 Gcf/B가 혼합된 혼합물(20 μ g, Gcf/A + Gcf/B)를 50 μ l PBS(pH 7.4)에 용해시켜 면역화하였다. Gcf/AB(34 kDa)의 분자량이 Gcf/A(17 kDa) 또는 Gcf/B(17 kDa)에 비해 두 배 가량 크기 때문에, 면역화하는 Gcf/AB의 양은 각 분자가 전달되는 Gcf/A 및 Gcf/B 각 분자와 동등한 분자 수가 전달되도록 조절하였다.

[0086] 근육 내로 면역화하기 위하여, 마우스를 적절하게 누르고 대퇴근육에 주사기를 사용하여 주입하였다. 최종 면역화하고 3 내지 4주 후, 마우스에 비강 내 투여로 1×10^6 PFU/RSV A2 마우스 또는 $2 - 4 \times 10^6$ PFU/KR/B/10-12 마우스로 공격 접종하였다. 모든 동물 실험은 이화여자대학교 동물윤리위원회의 승인을 받았다(승인 ID: 2010-9-4).

[0087] (5) ELISA

[0088] 면역화하고 2주 후, 면역화한 BALB/c 마우스의 레트로-오비탈 정맥(retro-orbital vein)으로부터 채취된 처리된

모세관 튜브를 사용하여 혈액을 채취하였고, 1.5ml 마이크로 튜브에 수집하였다. 5,600rpm에서 20분간 원심분리한 다음, 혈청을 수집하였고, 사용 전까지 -20°C 에서 보관하였다. RSV G에 특이적인 항체 역가는 ELISA를 이용하여 측정하였다. 요약하면, 96-웰 MaxiSorp 플레이트(Nunc, Roskilde, Denmark)에 20 mg/ml 스트렙타아비딘 (in PBS)을 웰 당 200ng이 되도록 밤새 코팅하였다. 그 다음, 상기 플레이트를 PBST (0.05% tween 20 in PBS)으로 다섯 차례 세척하였고, 0.1% 무지방 우유에 포함된 PBS에 존재하는 바이오틴이 부착된 G 펩타이드 400ng을 해당하는 웰 위치에 첨가하고, 2시간 동안 상온에서 인큐베이션하였다. 4시간 후 세척하고, 마우스 혈청을 1% 스킴-밀크/PBST에 1:64의 비율로 희석한 것을 2배 희석하여 캡처된 펩타이드를 포함하는 플레이트의 각 웰에 첨가하고 2시간 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 그 다음, 플레이트를 PBST로 5차례 세척하고, 1:1000 희석한 HRP(horseradish peroxidase)-컨쥬게이션된 항-마우스 IgG (Abcam, Cambridge, UK) (in 1% skim-milk/PBST)로 한 시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 플레이트를 5차례 세척하였고, 그 다음 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 퍼옥시다제 기질 (KPL, Gaithersburg, MD)을 첨가하여 전개하였고, 상기 반응을 1M H3PO4로 중지시켰다. 그 다음, Thermo ELISA 플레이트 리더로 450nm에서 측정하였다.

[0089] (6) 폐 조직에서의 RSV 역가(titer) 측정

바이러스 챌린지 4일 후, 희생시킨 마우스의 폐 조직에 10U/ml 헤파린(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 포함하는 PBS 5ml를 25-게이지 바늘을 장착한 주사기를 사용하여 우심실을 통하여 관류시켰고, MEM(Minimum Essential Medium) 3ml에서 균질화하였다. 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거한 다음, $70\text{-}\mu\text{m}$ 세포 스트레이너 (BD Labware, Franklin Lakes, NJ)에 통과시켜 미세 물질을 제거하였다. 상등액은 10배 계열 희석하였고, SF-MEM을 사용하여 6-웰 플레이트에서 HEp-2 세포를 접종하기 위해 사용하였다. 15 내지 30분 마다 웨이킹하며 37°C 에서 접종하였고, 세포를 10% MEM/1% 아가로스 3 ml/웰로 덮었다. 4일 후, 1% 아가로스/MEM 용액에 포함된 Neutral Red 2ml을 각 웰에 첨가하였다. 24시간 추가적인 인큐베이션 후, 폐의 RSV 바이러스 역가를 살아있는 Neutral Red가 염색된 세포로 둘러싸인 희끄무레한 지역으로 나타나는 플라크를 계수함으로써 산정하였다. 상기 데이터는 폐 조직 그램(gram) 당 PFU로 표시하였고, 검출 한계값은 200 PFU/폐g였다.

[0091] (7) 통계 분석

통계 분석은 마이크로소프트 엑셀에 포함된 데이터 분석을 사용하여 수행하였다. 스튜던트 t-분포는 모든 분석에 사용하여 표시하였다. $P < 0.05$ 인 경우, 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

[0093] 실시예 2: 점막 또는 전신 면역에 의해 유도되는 RSV A 아형에 대한 항체 반응

RSV는 G 단백질의 중심(core) 비당화 부위에 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하고 있다. RSV A 바이러스 및 RSV B 바이러스에 감염된 인간 개체의 혈청을 사용하여 다양한 RSV G 에피토프에 대한 혈청 면역원성을 분석하였을 때, RSV G 단백질의 중심 보존된 부위에 대한 동형 및 아형 IgG 반응이 증가하는 것이 알려진 바 있다. 또한, 보호 면역반응이 기대되는 다양한 Gcf 단편들은 RSV A 및/또는 B의 보존된 B 세포 에피토프를 포함한다. B 세포 에피토프 중 하나인 펩타이드는 RSV G 단백질의 174번 내지 187번 아미노산 서열로 구성된다.

이에, RSV 바이러스뿐만 아니라 G 단백질의 중심 비당화 부분에 있는 B 세포 에피토프에 대한 항체 반응 유발 여부를 조사하였다.

구체적으로, 6주령의 BALB/c 마우스에 20 μg Gcf/AB, 10 μg Gcf/A, 10 μg Gcf/B, 또는 각 10 μg Gcf/A 및 10 μg Gcf/B의 혼합물을 비강 내 또는 근육 내 경로로 두 차례 면역화하였다(도 2a). 마지막 면역화 2주 후, 항원-특이적 IgG 항체 반응을 RSV A2 또는 RSV A2 G 174-187 펩타이드에 대한 ELISA로 측정하고, 그 결과를 도 2b 및 2c에 각각 나타내었다. 또한, 본 발명자들은 재조합 아데노바이러스 기반의 RSV 백신인 rAd/3xG를 비강 내로 단일 투여한 경우, 강한 G-특이적 혈청 IgG 반응을 유발하며, RSV에 대한 보호 면역을 야기함을 확인한 바 있다(Yu et al., Journal of virology 82, 2350-2357). 따라서, rAd3xG로 면역화한 마우스의 혈청을 양성 대조

군으로 사용하였다.

[0097] 그 결과, 도 2b 및 2c에 나타난 바와 같이, Gcf/A 및 Gcf/B를 모두 포함하는 Gcf/AB의 비강 내 또는 근육 내 면역화는 PBS 면역화 군에 비교하여 RSV A2 또는 RSV A2 G 174-187 펩타이드에 특이적인 항체 반응이 매우 높았다. 특히, Gcf/AB를 근육 내 투여한 경우, 비강 내 투여한 경우에 비하여 RSV A2 또는 RSV A2 G174-187 펩타이드에 특이적인 항체 반응이 조금 더 높은 결과를 보였다.

[0098] Gcf/A 및 Gcf/B를 혼합한 군(Gcf/A + Gcf/B 군)의 비강 내 또는 근육 내 면역화는 rAd3XG를 비강 내로 단일 면역화한 군과 비교하였을 때, RSV A2 바이러스 입자에 대한 유사한 항체 반응을 유도하였다. 그러나, Gcf/A + Gcf/B 군을 비강 내 투여한 경우, RSV A2 G 174-187 특이적 항체 반응을 매우 낮은 수준으로 유도하는 결과를 나타낸 반면, 근육 내 투여한 경우에는 보통 수준의 항체 반응을 야기하였다.

[0099] 기존의 연구에 따르면, 20 µg의 Gcf/A를 콜레라 독신 아류반트 유무와 관계 없이 설하, 비강 또는 근육 내 투여하여 면역화하였을 때, G 특이적 항체 반응이 유도될 수 있음이 알려졌다(Kim et al., PloS one 7, e32226). 그러나, 본 발명에 따르면, Gcf/A 또는 Gcf/B 단독을 10 µg의 양으로 비강 또는 근육 투여하는 것은 유의한 RSV A2 또는 RSV A2 G 174-187 펩타이드에 특이적인 항체 반응을 야기하지 못하는 결과를 보였다.

[0100] 상기 결과를 모두 종합하면, Gcf/A 및 Gcf/B를 융합 단백질 형태로 모두 포함하는 Gcf/AB를 비강 내 또는 근육 내 면역화하는 경우, 아류반트의 사용 없이도 RSV-A 아형-특이적 항체 반응을 전신에서 성공적으로 유도할 수 있음을 시사한다.

[0101] 실시예 3: 점막 또는 전신 면역에 의해 유도되는 RSV B 아형에 대한 항체 반응

[0102] 본 발명에 따른 Gcf/AB의 RSV B 아형에 대한 효능을 검증하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 20 µg Gcf/AB, 10 µg Gcf/A, 10 µg Gcf/B, 또는 각 10 µg의 Gcf/A 및 Gcf/B의 혼합군(Gcf/A + Gcf/B)을 비강 내 또는 근육 내 면역화한 다음, RSV B1 또는 RSV B1 G 174-187 펩타이드에 대한 특이적 항체 반응 유발 여부를 조사하였다. 마지막 면역화 2주 후, 혈청에 포함된 항원-특이적 IgG 항체 역가를 ELISA로 측정하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0104] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 대조군을 제외한 나머지 군의 경우, RSV B 아형-특이적 항체 반응이 효과적으로 유발되었다. 특히, 도 3b에 확인할 수 있듯, Gcf/A 및 Gcf/B를 융합 단백질 형태로 모두 포함하는 본 발명에 따른 Gcf/AB의 경우, 비강 내 또는 근육 내 면역화하는 경우, PBS 군에 비하여 RSV B1 또는 RSV B1 G 174-187에 특이적인 항체 반응이 가장 높은 결과를 나타내었다.

[0105] 반면, Gcf/A + Gcf/B 군의 경우, 비강 투여 또는 근육 투여군 모두 RSV B1 또는 RSV B1 G 174-187에 대한 낮은 혈청 IgG 항체 값을 나타내었다(도 3a 및 b). RSV CH18537 G 단백질의 131 내지 230 아미노산 잔기에서 유래한 RSV B Gcf의 경우, 2 µg의 CT (List Biological Lab. Inc. Campbell, CA)와 함께 설하 투여한 마우스한 마우스에서 RSV B 특이적 혈청 IgG를 높은 수준으로 나타내었다(Cheon, PloS one 9, e942691, 2014). 그러나, 본 발명에 따르면 Gcf/B 백신화는 비강 내 또는 근육 내 투여 경로는 RSV B1 또는 RSV B1 G 174-187 펩타이드에 대한 항체 반응을 검출가능한 정도로 유도하지 못하였다.

[0106] 상기와 같은 결과를 종합하면, 접종 루트와 무관하게 본 발명에 따른 Gcf/AB의 면역화는 RSV B에 특이적인 항체 반응을 가장 강하게 유도함을 나타내는 것이다.

[0107] 실시예 4: RSV A2의 비강 내 공격 접종 후 보호 효과 확인

[0108] 점막 또는 전신 Gcf/AB 백신화가 RSV A2 바이러스에 대한 보호 효과를 유도할 수 있는지를 알아보기 위하여, 마지막 면역화를 한 지 4주 후, 면역화한 마우스에 RSV A2를 1×10^6 PFU로 비강 내로 공격 접종하였다. 개별적인 마우스 폐의 바이러스 증식을 비교하기 위하여, 바이러스 증식이 정점에 이르는 공격 접종 4일 후(day 4 post-challenge)에 폐 균질 분쇄물을 준비하여, 이를 이용하여 플라크 어세이를 수행하였고, 그 결과를 도 4a에 나타

내었다.

[0109] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, Gcf/AB 및 Gcf/A 면역화한 마우스의 폐 균질 분쇄물에서는 RSV 증식이 검출되지 않아, Gcf/AB 및 Gcf/A의 비강 내 또는 근육 내 면역화는 RSV A2 바이러스 감염에 대한 보호 효과가 우수함을 나타내었다. 또한, RSV 공격 접종 후 바이러스 양(viral load)은 Gcf/AB 또는 Gcf/A를 비강 및 근육 투여 경로로 두 번 면역화한 경우에는 3000배 이상 감소하는 결과를 나타내었다. 그러나, Gcf/B의 비강 또는 근육 투여는 바이러스 증식 감소를 가져오지 않았다.

[0110] 몸무게 감소는 백신에 의한 면역 병리 현상의 기본적인 측정 방법이다. 따라서, RSV A2 바이러스 감염 후 Gcf/AB, Gcf/A, Gcf/B 및 Gcf/A + Gcf/B 투여 군의 몸무게를 매일 측정하였고, 그 결과를 도 4b에 나타내었다.

[0111] 그 결과, Gcf/AB 또는 Gcf/A 면역 마우스의 경우, RSV A2 바이러스 공격 후에도 유의적인 몸무게 감소가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 아쥬반트를 포함하지 않는 경우에도 Gcf/AB 백신화가 효과적으로 보호 면역을 제공함을 시사하는 결과이다.

[0112] 실시예 5: RSV B 아형에 속하는 KR/B/10-12로 비강 내 공격 접종 후 보호 효과 확인

[0113] RSV는 이의 단백질의 항원 속성(antigenic properties)에 따라 RSV A 및 B의 두 가지 아형으로 분류되며, 많은 경우, 두 아형 모두가 입원한 영아 및 노년층에서 순환하는 것으로 알려져 있다. 따라서, RSV B 바이러스 감염에 대한 보호 면역을 조사하기 위하여 Gcf/AB, Gcf/A+ Gcf/B, Gcf/A, 또는 Gcf/B를 비강 및 근육 투여 경로로 0일 및 14일에 두 차례 면역화하였고, RSV-B 아형에 속하는 RSV KR/B/10-12를 2 또는 4×10^6 PFU로 비강 내 접종하였다.

[0114] RSV KR/B/10-12 분리균은 한국의 소아 환자의 비인두 시료로부터 수집하였고, Hep-2 세포주에 적용하였다. 상기 기술한 바와 같이, 폐 균질 분쇄물을 공격 접종 4일 후에 준비하였고, 이를 이용하여 바이러스 플라크 어세이를 수행하여 그 결과를 도 5a에 나타내었다.

[0115] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 비강 및 근육 투여 경로로 Gcf/AB로 두 차례 면역화한 폐에서 RSV KR/B/10-12 접종한 후 바이러스 양(viral load)이 1400배 이상 감소한 결과를 나타내었다. 반면, Gcf/A, Gcf/A + Gcf/B 군의 경우, 비강 내 면역화한 경우 각각 약 73% 및 74%까지 감소하였고, 근육 내 면역화한 경우 각각 60% 및 63%까지 감소하여, 상기 군의 경우 부분적인 보호 효과만을 나타낼 뿐이었다.

[0116]

[0117] 또한, Gcf/B 단독 투여군(비강 내 또는 근육 내 면역화)의 경우, 바이러스 증식을 유의하게 감소시키지 못하는 결과를 나타내었다.

[0118] 또한, RSV KR/B/10-12 바이러스 감염한지 4일 후 상기 모든 군의 몸무게를 매일 측정하였고, 그 결과를 도 5b에 나타내었다.

[0119] 그 결과, 도 5b에 나타난 바와 같이, 상기 모든 군에서 유의한 몸무게 변화는 나타나지 않았다.

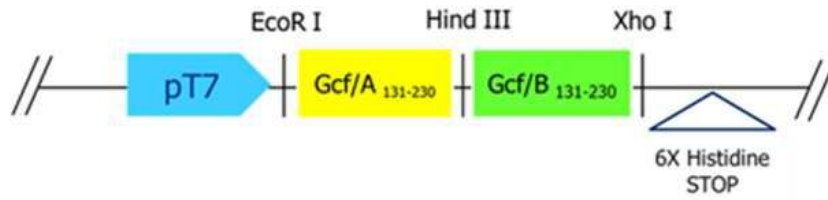
[0120] 상기 결과를 모두 종합하면, 본 발명에 따른 Gcf/AB의 점막 및 전신 백신화는 RSV B 바이러스 공격 접종에 대한 보호 효과를 나타냄을 시사하는 것으로, 특히 아쥬반트와 같은 백신 강화 면역병리 없이도 우수한 보호 효과를 나타냄을 시사하였다.

[0121] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허 청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

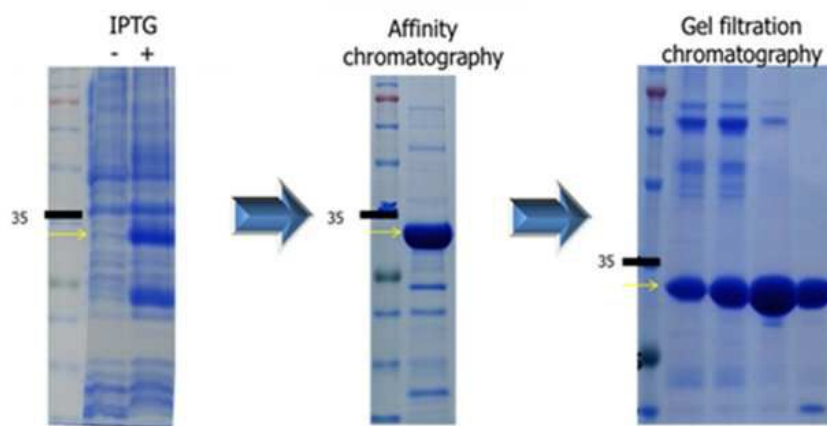
도면

도면1

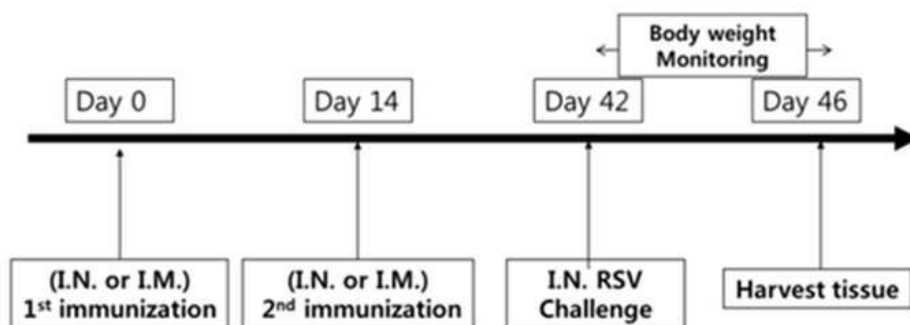
A



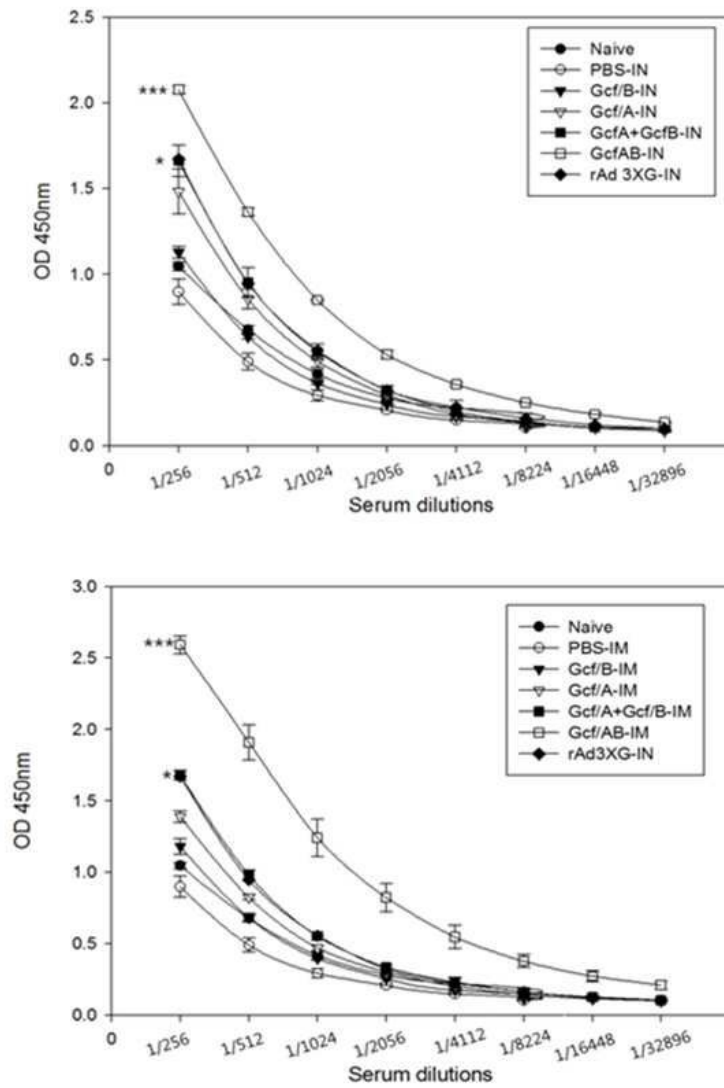
B



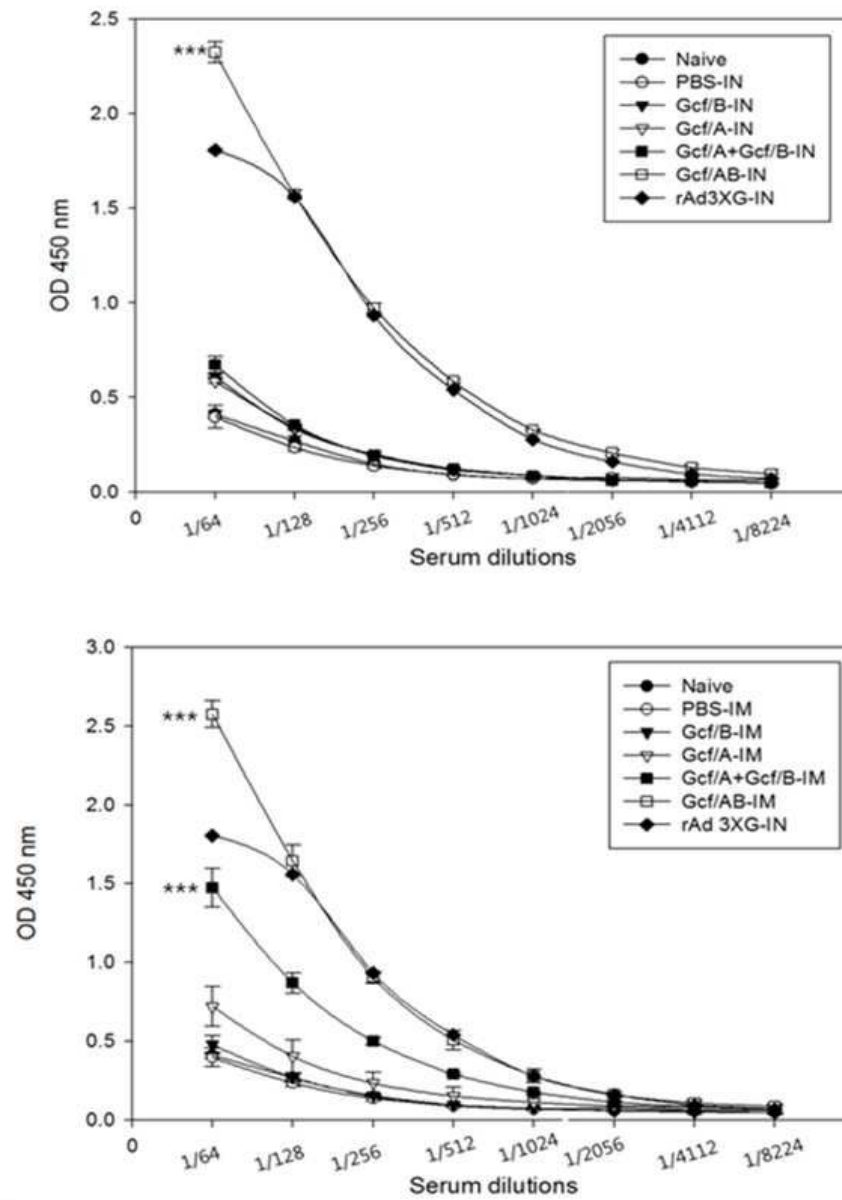
도면2a



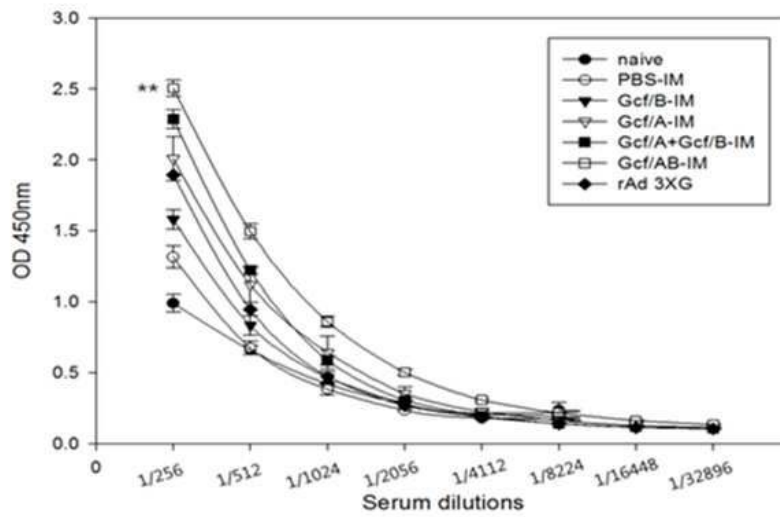
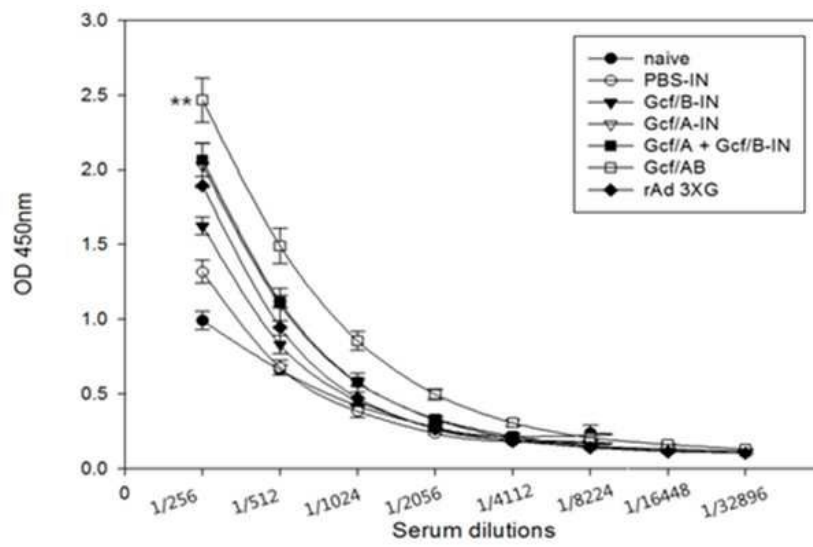
도면2b



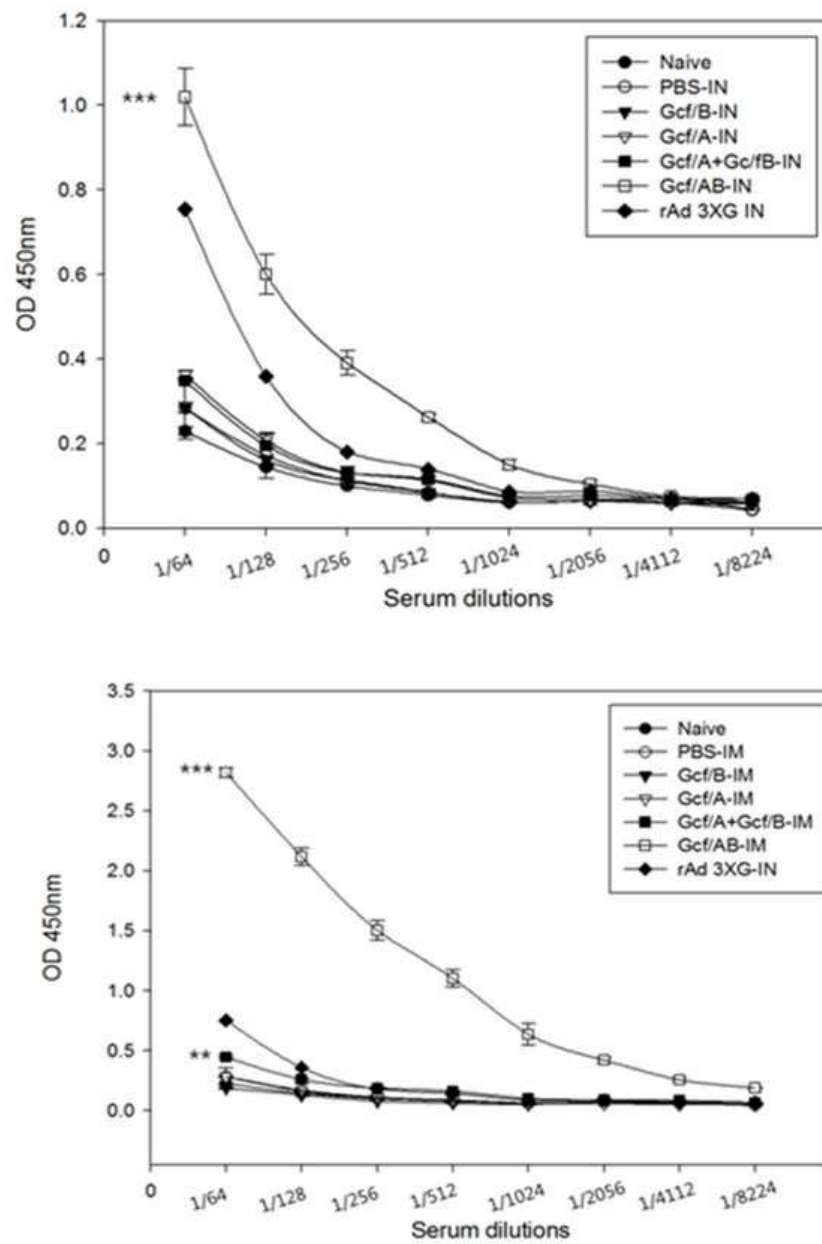
도면2c



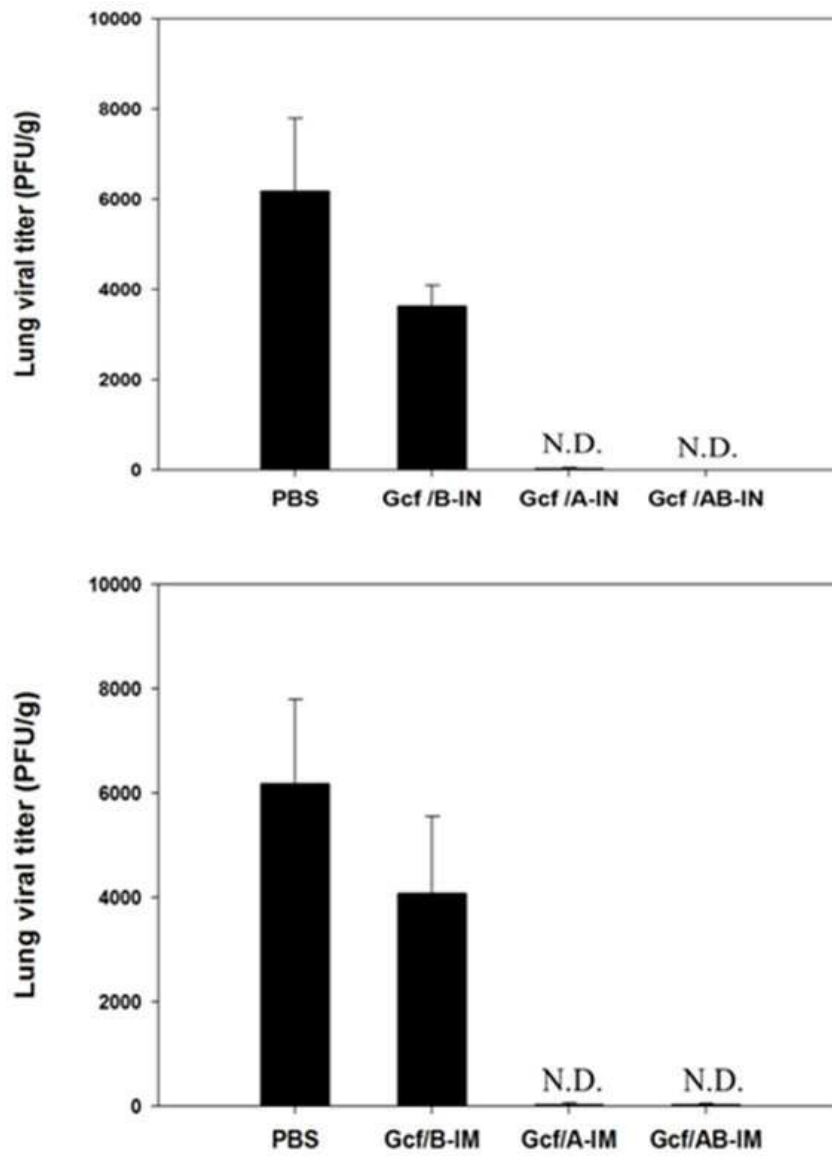
도면3a



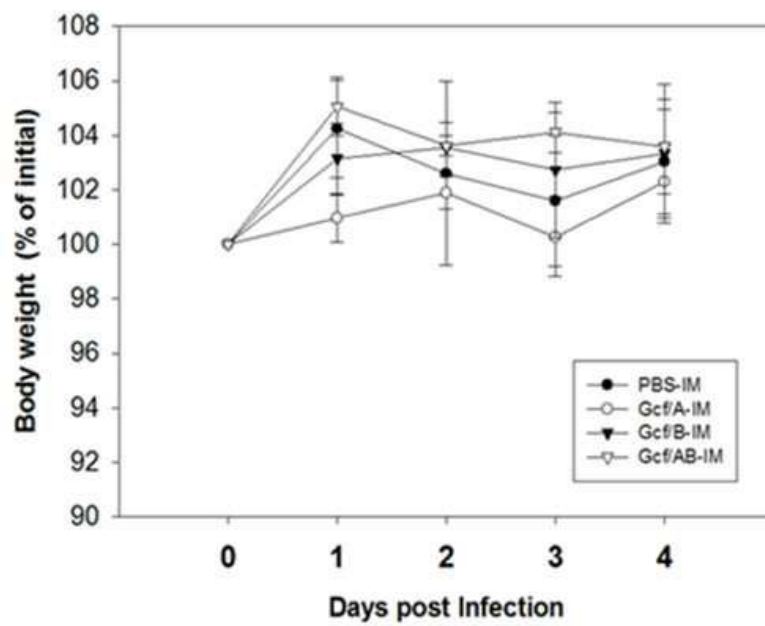
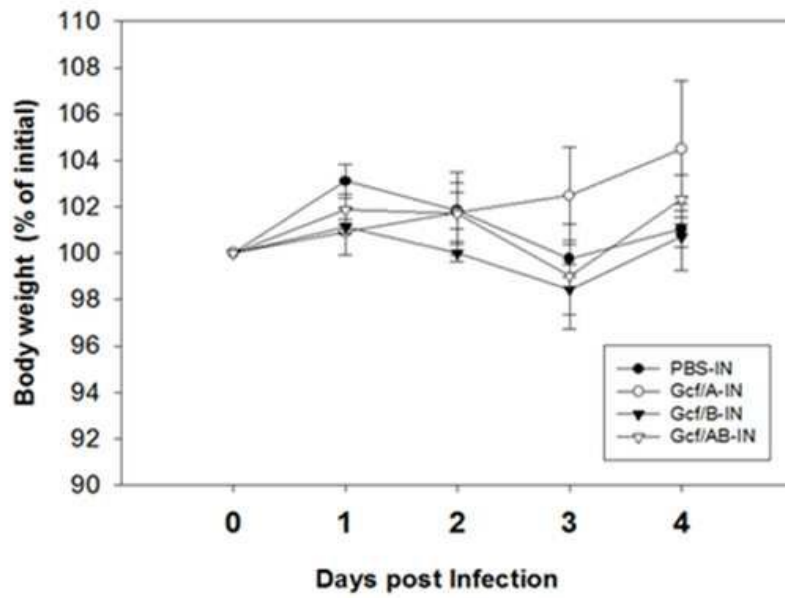
도면3b



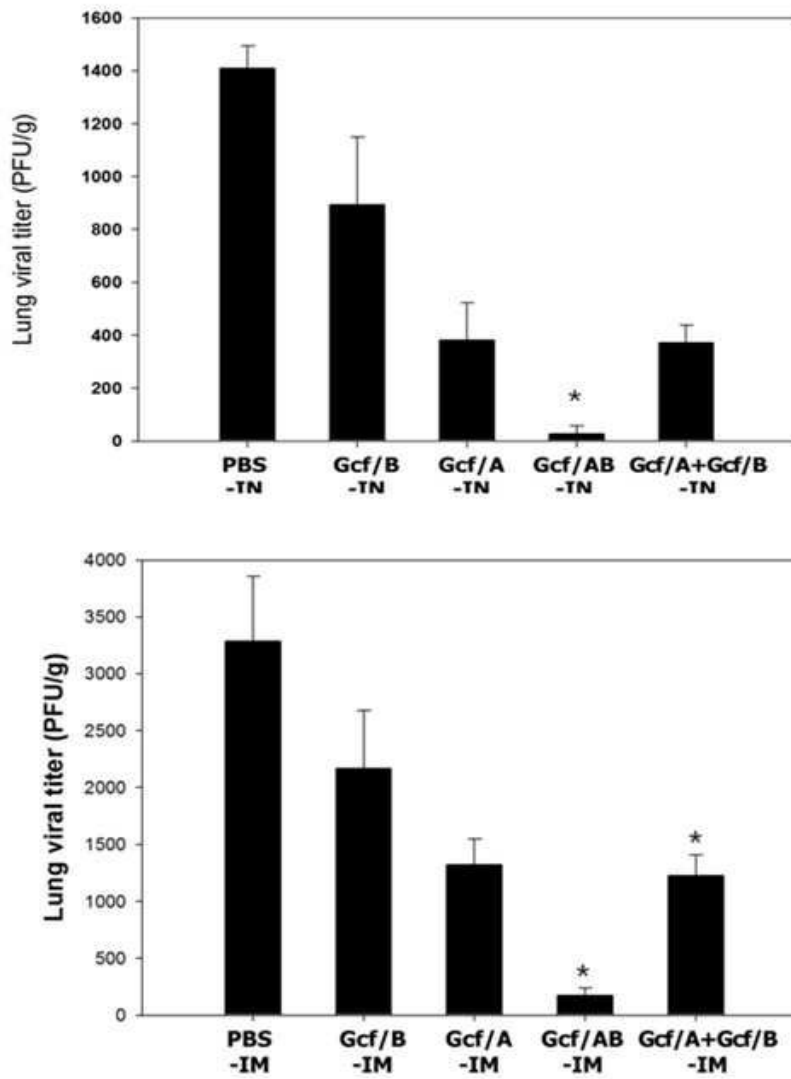
도면4a



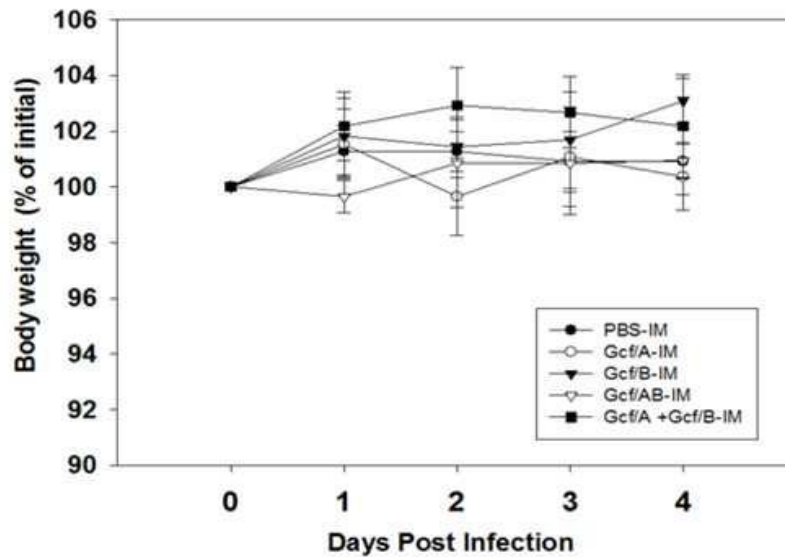
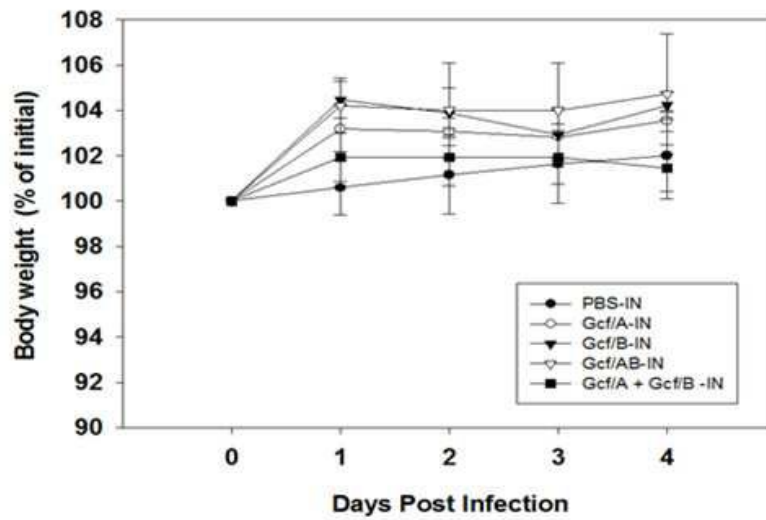
도면4b



도면5a



도면5b



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Respiratory syncytial virus universal vaccine
- <130> KPA140780-KR
- <160> 14
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 298
- <212> PRT
- <213> Respiratory syncytial virus A
- <400> 1

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr
1 5 10 15
Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
20 25 30
Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
35 40 45
Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
50 55 60
Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65 70 75 80
Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
85 90 95
Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr
100 105 110
Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
115 120 125
Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
130 135 140
Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn
145 150 155 160
Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190
Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
195 200 205
Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu
210 215 220
Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240
Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro

245	250	255	
Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly			
260	265	270	
Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln			
275	280	285	
Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln			
290	295		
<210>	2		
<211>	897		
<212>	DNA		
<213>	Respiratory syncytial virus A		
<400>	2		
atgtccaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacattag aaaggacctg ggacactctc		60	
aatcatttat tattcatatc atcgtgctta tataagttaa atcttaaate ttagcacaaa		120	
atcacattat ccattctggc aatgataatc tcaacttcac ttataattgc agccatcata		180	
ttcatagcct cggcaaacca caaagtcaca ccaacaactg caatcataca agatgcaaca		240	
agccagatca agaacacaac cccaacatac ctacccaga atcctcagct tggaatcagt		300	
ccctctaate cgictgaaat tacatcacia atcaccacca tactagcttc aacaacacca		360	
ggagtcaagt caacctgca atccacaaca gtcaagacca aaacacaaac aacaactcaa		420	
acacaacca gcaagccac caaaaaaca cgccaaaaca aaccaccaag caaaccaat		480	
aatgattttc actttgaagt gttcaacttt gtaccctgca gcatatgcag caacaatcca		540	
acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccactacc		600	
aagcccacaa aaaaaccaac cctcaagaca accaaaaaag atcccaaacc tcaaaccact		660	
aatcaaagg aagtaccac caccaagccc acagaagagc caaccatcaa caccacaaa		720	
acaaacatca taactacact actcacctcc aacaccacag gaaatccaga actcacaagt		780	
caaatggaaa ccttccactc aacttcctcc gaaggcaatc caagcccttc tcaagtctct		840	
acaacatcgg agtaccatc acaaccttca tctccacca acacaccag ccagtag		897	
<210>	3		
<211>	299		
<212>	PRT		
<213>	Respiratory syncytial virus B		
<400>	3		

Met Ser Lys His Lys Asn Gln Arg Thr Ala Arg Thr Leu Glu Lys Thr
1 5 10 15
Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Ile Val Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Arg
20 25 30
Leu Asn Leu Lys Ser Ile Ala Gln Ile Ala Leu Ser Val Leu Ala Met
35 40 45
Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ile Ser
50 55 60
Ala Asn His Lys Val Thr Leu Thr Thr Val Thr Val Gln Thr Ile Lys
65 70 75 80
Asn His Thr Glu Lys Asn Ile Thr Thr Tyr Leu Thr Gln Val Pro Pro
85 90 95
Glu Arg Val Ser Ser Ser Lys Gln Pro Thr Thr Thr Ser Pro Ile His
100 105 110
Thr Asn Ser Ala Thr Thr Ser Pro Asn Thr Lys Ser Glu Thr His His
115 120 125
Thr Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Thr Thr Thr Ser Thr Gln Thr Asn
130 135 140
Lys Pro Ser Thr Lys Pro Arg Leu Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro Lys
145 150 155 160
Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175
Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn
180 185 190
Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr Thr
195 200 205
Lys Thr Thr Asn Lys Arg Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Thr Thr Lys
210 215 220
Lys Glu Thr Thr Thr Asn Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu Thr Thr Thr
225 230 235 240
Glu Arg Asp Thr Ser Thr Ser Gln Ser Thr Val Leu Asp Thr Thr Thr
245 250 255

Leu Glu His Thr Ile Gln Gln Gln Ser Leu His Ser Thr Thr Pro Glu
260 265 270

Asn Thr Pro Asn Ser Thr Gln Thr Pro Thr Ala Ser Glu Pro Ser Thr
275 280 285

Ser Asn Ser Thr Gln Asn Thr Gln Ser His Ala
290 295

<210> 4

<211> 900

<212> DNA

<213> Respiratory syncytial virus B

<400> 4

atgtccaaac acaagaatca acgcactgcc aggactctag aaaagacctg ggatactctc 60
aatcatctaa ttgtaatatc ctcttgttta tacagattaa atttaaaatc tatagcacia 120
atagcactat cagtcttgge aatgataatc tcaacctctc tcataattgc agccataata 180

ttcatcatct ctgccaatca caaagttaca ctaacaacgg tcacagttca aacaataaaa 240
aaccacactg aaaaaaacat caccacctac ctactcaag tcccaccaga aagggttagc 300
tcatccaaac aacctacaac cacatcacca atccacacaa attcagccac aacatcaccc 360
aacacaaagt cagaacaca ccacacaaca gcacaaacca aaggcagaac caccacctca 420
acacagacca acaagccgag cacaaaacca cgcctaaaaa atccacaaa aaaaccaaaa 480
gatgattacc attttgaagt gttcaacttc gttccctgta gtatatgtgg caacaatcaa 540
ctttgcaaat ccatctgtaa aacaatacca agcaacaac caaagaagaa accaaccatc 600

aaaccacaa acaaaccaac cacaaaaacc acaacaaaa gagaccaaa aacaccagec 660
aaaacgacga aaaaagaac taccaccaac ccaacaaaa aaccaaccct cagaccaca 720
gaaagagaca ccagcacctc acaatccact gtgctcgaca caaccacatt agaacacaca 780
atccaacagc aatccctcca ctcaaccacc cccgaaaaca cacccaactc cacacaaaca 840
cccacagcat ccgagccctc tacatcaaat tccacccaaa ataccaatc acatgcttag 900
900

<210> 5

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSV A Gcf (131-230 of RSV A G protein)

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Thr Lys Pro

100

<210> 6

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSV B Gcf (129-231 of RSV B G protein)

<400> 6

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

1 5 10 15

Lys Pro Ser Thr Lys Pro Arg Leu Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro Lys

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn

50 55 60

Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr Thr

65 70 75 80

Lys Thr Thr Asn Lys Arg Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Thr Thr Lys
 85 90 95
 Lys Glu Thr Thr Thr Asn Pro
 100
 <210> 7
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gcf/AB fusion protein
 <400> 7
 Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro
 1 5 10 15
 Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn Asn Asp
 20 25 30

 Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn
 35 40 45
 Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro
 50 55 60
 Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu Lys Thr
 65 70 75 80
 Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu Val Pro
 85 90 95
 Thr Thr Lys Pro Lys Leu Thr Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Thr Thr
 100 105 110
 Thr Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Pro Arg Leu Lys Asn
 115 120 125
 Pro Pro Lys Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
 130 135 140
 Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys
 145 150 155 160
 Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro
 165 170 175

Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Thr Asn Lys Arg Asp Pro Lys Thr

180 185 190

Pro Ala Lys Thr Thr Lys Lys Glu Thr Thr Thr Asn Pro

195 200 205

<210> 8

<211> 615

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gcf/AB fusion protein

<400> 8

gtcaagacca aaaacacaac aacaactcaa acacaacca gcaagccac cacaaaacaa 60

cgccaaaaca aaccaccaag caaacccaat aatgattttc actttgaagt gttcaacttt 120

gtaccctgca gcatatgcag caacaatcca acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca 180

aacaaaaaac caggaaagaa aaccactacc aagcccacaa aaaaaccaac cctcaagaca 240

accaaaaaag atcccaaacc tcaaaccact aaatcaaagg aagtaccac caccaagccc 300

aagcttaca cgcaccagac caagggcaga accacaacca gcaccagac caacaagccc 360

agcaccaagc ccagactgaa gaaccctccc aagaagccca aagacgacta ccacttcgag 420

gtgttcaact tcgtgccctg cagcatctgc ggcaacaacc agctgtgcaa gagcatctgc 480

aagaccatcc ccagcaacaa gcccaagaag aaaccaccca tcaagccac caacaagccc 540

acaaccaaga ccacaaacaa gagagacccc aagaccccg ccaagacaac aaagaaagag 600

acaaccacaa acccc 615

<210> 9

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gcf/AB fusion protein

<400> 9

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Ile Arg Ile Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn
50 55 60
Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro
65 70 75 80
Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu Lys Thr
85 90 95
Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu Val Pro

100 105 110
Thr Thr Lys Pro Lys Leu Thr Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Thr Thr
115 120 125
Thr Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Pro Arg Leu Lys Asn
130 135 140
Pro Pro Lys Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
145 150 155 160
Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys
165 170 175

Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro
180 185 190
Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Thr Asn Lys Arg Asp Pro Lys Thr
195 200 205
Pro Ala Lys Thr Thr Lys Lys Glu Thr Thr Thr Asn Pro Leu Glu His
210 215 220
His His His His His

225

<210> 10

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gcf/AB fusion protein

<400> 10

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcggatcc gaattccgt caagacaaa

60

aacacaacaa caactcaaac acaaccagc aagcccacca caaaacaacg caaaaacaaa 120
ccaccaagca aaccaataa tgattttcac tttgaagtgt tcaactttgt accctgcagc 180
atatgcagca acaatccaac ctgctgggct atctgcaaaa gaatacaaaa caaaaaacca 240
ggaaagaaaa ccaactacca gcccaaaaa aaaccaaccc tcaagacaac caaaaaagat 300
cccaaacctc aaaccactaa atcaaaggaa gtaccacca ccaagccca gcttacaacc 360
gcccagacca agggcagaac cacaaccagc acccagacca acaagcccag caccaagccc 420

agactgaaga accctccaa gaagcccaa gacgactacc acttcgaggt gttcaacttc 480
gtgccctgca gcatctgagg caacaaccag ctgtgcaaga gcatctgcaa gaccatcccc 540
agcaacaagc ccaagaagaa acccaccatc aagcccacca acaagcccac aaccaagacc 600
acaacaaga gagaccccaa gacccccgcc aagacaacaa agaaagagac aaccacaaac 660
ccctcgagc accaccacca ccaccactga 690

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11
aaaagcttac aaccgcccag acc 23

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12
ccctcgaggg gggtttgtgtg tgtt 24

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 13
taatacgact cactatagg 19

<210> 14

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 14
tatttagtg acactatag

19