



등록특허 10-2269491



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월25일  
(11) 등록번호 10-2269491  
(24) 등록일자 2021년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/165* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/12* (2006.01) *A61K 39/285* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 39/165* (2013.01)  
*A61K 39/12* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7029515
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월14일  
심사청구일자 2019년02월21일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월14일
- (65) 공개번호 10-2015-0129027
- (43) 공개일자 2015년11월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/000693
- (87) 국제공개번호 WO 2014/139687  
국제공개일자 2014년09월18일

(30) 우선권주장  
61/788,722 2013년03월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR100910297 B1\*

WO2009152969 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

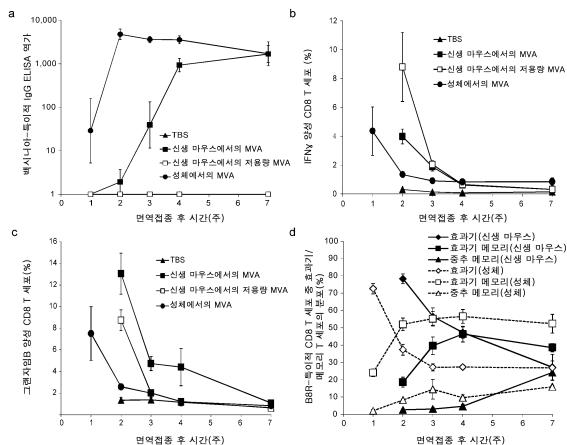
전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 정혜진

(54) 발명의 명칭 단회 고용량의 MVA가 신생아 및 영아에서 보호 면역 반응을 유도

**(57) 요약**

본 발명은 인간 신생아 또는 6월령 미만의 영아에서 폭스 바이러스에 대한 보호 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 인간 신생아 또는 6월령 미만의 영아에 단회 고용량의 MVA 투여를 포함하며, 여기서 상기 투여는 인간 신생아 또는 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응을 유도한다.

**대 표 도 - 도1**

(52) CPC특허분류

**A61K 39/285** (2013.01)  
*A61K 2039/545* (2013.01)  
*A61K 2039/55* (2013.01)  
*A61K 2039/70* (2013.01)  
*C12N 2710/24034* (2013.01)  
*C12N 2710/24043* (2013.01)  
*C12N 2760/18434* (2013.01)

(72) 발명자

**샤플린, 파울**

독일 82166 그래펠팡 발트슈트라쎄 11아

---

**슈터, 마르크**

스위스 체하-6006 루체른 카푸치너베크 11

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

적어도  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량의 개질 백시니아 앙카라(Modified Vaccinia Ankara, MVA)를 포함하는, 인간 신생아 또는 6월령 미만의 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 면역 반응을 유도하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 상기 인간 신생아 또는 영아에게 투여되고, 상기 투여는 MVA의 2차 투여의 부재 하에 6월령 전의 상기 인간 신생아 또는 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응들을 유도하는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 투여는 2월령 미만의 인간 영아에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 투여는 인간 신생아에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 투여는 출생 후 72시간 내에 인간 신생아에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 투여는 천연두에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응들을 유도하는 약학 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 MVA는 재조합 MVA인 약학 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 투여는 상기 재조합 MVA에 의해 인코딩되는 이종 항원에 대한 T- 및 B-세포 반응들을 유도하는 약학 조성물.

#### 청구항 8

적어도  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량의 개질 백시니아 앙카라(Modified Vaccinia Ankara, MVA)를 포함하는, 인간 신생아 또는 6월령 미만의 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 면역 반응을 유도하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 상기 인간 신생아 또는 영아에게 투여되고, 상기 투여는 상기 투여의 2주 내에 상기 인간 신생아 또는 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응들을 유도하는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 투여는 2월령 미만의 인간 영아에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 투여는 인간 신생아에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 11

제8항에 있어서, 상기 투여는 출생 후 72시간 내에 인간 신생아에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 12

제8항에 있어서, 상기 투여는 천연두에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응들을 유도하는 약학 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 MVA는 재조합 MVA인 약학 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 투여는 상기 재조합 MVA에 의해 인코딩되는 이종 항원에 대한 T- 및 B-세포 반응들을 유도하는 약학 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 신생아에 적어도  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량의 MVA를 투여하는 것을 포함하는 인간 신생아 또는 6월령 미만의 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 면역 반응의 유도 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 출생 시 면역접종을 위해 세계적으로 허가받은 백신은 하기 3가지뿐이다: 결핵을 예방하기 위한 칼메트-게랑 균(BCG), 경구 폴리오 백신(OPV), 및 B형 간염 백신(HBV). (Sanchez-Schmitz 등, *Sci. Transl. Med.* 3, 90ps27 (2011)). BCG는 냉동 건조된 생-소결핵균의 1회용 백신이다(상기 문현). OPV는 생-약독화된 폴리오바이러스의 1회용 백신이다(상기 문현). HBV 백신은 출생 시 시작하여 3회 용량으로 백반과 함께 투여되는 효모에서 발현된 재조합 B형 간염 표면 항원이다(상기 문현). 따라서 이들 중 2가지는 살아있고 복제하는 백신이며, 나머지 하나

가 3회 용량으로 제공되는 재조합 단백질이다.

[0003] 신생아에서 면역계의 미성숙은 상기 연령에서 안전하고 효과적인 백신을 개방하는데 있어서 큰 병목이 되어 왔다. 모든 경우 높은 보호 수준을 유도하기 위해 영아기/유아기 동안 여러 백신접종이 요구됨에도 불구하고, 영아를 위한 현재의 백신접종 일정 하에서는 B형 간염 백신만이 출생 시 권장되며 나머지는 영아기 동안 이후에 제공되거나(최초 12개월, 예로 로타바이러스, 불활화 폴리오바이러스 백신) 또는 12월령 이후에만 권장된다(예로 홍역/볼거리/풍진 백신). Sanchez-Schmitz 등, *Sci.*에 따르면, 백신에 의해 예방될 수 있는 질환에 대해 증가된 감수성을 갖는 출생 후 6 내지 9개월의 시기가 존재한다(상기 문헌). 천연두, AIDS, 말라리아, 결핵 및 다른 질환은 어린 아이들에서 빠르게 그리고 종종 중증의 질환으로 진행되며 일어난다. RSV 또는 홍역과 같은 유아기 질환에 있어서도 백신이 존재하지 않거나 9월령 전에는 투여될 수 없다. 결과적으로 신생아(최초 4주 내)의 백신접종 및/또는 영아에서 감소되거나 더욱 효과적인 접종 일정은 감염성 질환에 연관된 유병률 및 사망률 감소에 있어 주요한 진보가 될 것이다.

[0004] 일반적으로 신생아는 주로 Th2 편향된 T-세포 반응을 일으키며 제한된 친화도를 갖는 항체를 생산하지 않거나 저수준만 생산하는 것으로 받아들여진다. 또한, 이를 반응은 성인에서보다 그 기간이 짧다(Adkins 등, *Nat. Rev. Immunol.* 4, 553-564 (2004); Marshall-Clarke 등, *Immunol. Today* 21, 35-41 (2000); Siegrist,C.A., *Vaccine* 19, 3331-3346 (2001)).

[0005] 그러나 특정 상황 하에서, 예컨대 패턴 인식 수용체의 활성화 또는 특정 바이러스 감염 동안, 신생 마우스는 경시적으로 보호 T-세포 반응을 일으킬 수 있어서 신생아 면역접종에 대한 가능성을 시사한다(Forsthuber 등, *Science* 271, 1728-1730 (1996); Sarzotti 등, *Science* 271, 1726-1728 (1996)).

[0006] 기존 백신을 개선하는 보강제의 개발과 더불어(Gracia 등, *Vaccine* 29, 1595-1604 (2011); Kamath 등, *PLoS One.* 3, e3683 (2008)), DNA 백신과 같은 새로운 항원 전달 시스템(Hassett 등, *J. Virol.* 74, 2620-2627 (2000); Rigato 등, *Virology* 406, 37-47 (2010)) 및 3가지 약독화된 복제 바이러스 계통 살모넬라 엔테리크 (*Salmonella enteric*)(Ramirez 등, *Vaccine* 28, 6065-6075 (2010)), 리스트리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)(Kollmann 등, *J. Immunol.* 178, 3695-3701 (2007)), 및 BCG(Nascimento 등, *Microbes. Infect.* 10, 198-202 (2008); Ranganathan 등, *Vaccine* 28, 152-161 (2009))는 1주령 마우스에 또는 심지어 출생 시 투여되는 경우 효율적인 면역 반응을 유도하는 것으로 나타났다. 그러나 생-약독화 백신만 치사 감염에 대한 보호를 유도하였고 일반적으로 수회 면역접종 후에만, 따라서 진행된 면역학적 성숙 단계에서만 효과적이었다. 따라서 복제 백신은 성공적인 보호를 유도하기 위해 상당한 시간을 필요로 하며, 생-약독화 복제 백신의 조절되지 않은 파종성 감염의 위협이 여전히 주된 제약으로 나타낸다(Galen 등, *Immuno. Cell Biol.* 87, 400-412 (2009); Johnson 등, *Microbiol. Immunol.* 55, 304-317 (2011); Li 등, *Zhonghua Er. Ke. Za Zhi.* 48, 65-68 (2010); Liu 등, *Immuno. Rev.* 239, 62-84 (2011)).

[0007] 개질 백시니아 바이러스 앙카라(Modified Vaccinia virus Ankara, MVA)는 임의의 합병증 없이 천연두 박멸 캠페인 동안 100,000명이 넘는 개인에게 투여되어 왔다. 그러나 MVA는 여전히 상이한 수준의 약독화 및 면역원성을 갖는 복잡한 바이러스 혼합물로 나타난다(Suter 등, *Vaccine* 27, 7442-7450 (2009)). Bavarian Nordic에서 개발한 플라크-정제 MVA(MVA-BN)는 인간을 포함하는 포유류에서 전혀 복제하지 못하며, 면역-손상된 숙주에서 조차 안전하다(상기 문헌). 그 뛰어난 안전성 프로필에 더하여, MVA는 인간에서 고도로 면역원성이며(Vollmar 등, *Vaccine* 24, 2065-2070 (2006)) 그 유효성이 몇몇 천연두 동물 모델, 예컨대 엑트로멜리아 바이러스 (*Ectromelia virus*, ECTV), 래빗폭스 또는 뭉키폭스에서 입증되었다(Garza 등, *Vaccine* 27, 5496-5504 (2009); Samuelsson 등, *J. Clin. Invest.* 118, 1776-1784 (2008); Stittelaar 등, *J. Virol.* 79, 7845-7851 (2005)). MVA의 또 다른 주요 장점은 다른 감염성 질환 또는 암에 대한 보호를 동시에 유도할 수 있는 몇몇 항원의 유전적 삽입을 지원하는(Timm 등, *Vaccine* 24, 4618-4621 (2006)) 그 능력에 있다(Harrer 등 *Antivir. Ther.* 10, 285-300 (2005); Mandl 등, *Cancer Immunol. Immunother.* (2011); Meyer 등, *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 453-467 (2005)).

[0008] 마우스에서의 ECTV(마우스폭스의 원인 제제)는 인간 폭스바이러스 감염에 대한 우수한 모델 시스템이다(Esteban 등, *Journal of General Virology* (2005), 86, 2645-2659). 진입 경로, 저용량에서의 높은 감염성, 바이러스혈증의 발생, 제한된 숙주 범위 및 지연되지만 치명적인 결과를 포함하는 질환 경과가 마우스폭스 및 천연두에 있어 매우 유사하다. 따라서 마우스폭스는 인간 천연두에 대한 귀중한 소동물 모델로서, 그리고 일반적으로 급성의 치명적 바이러스 질환에 대한 모델로서 간주될 수 있다(Lauterbach 등, *PLoS ONE*, Volume 5(3) : e9659 (2010)).

[0009] 편재된 복제 및 전신 전파를 포함하는 마우스에서의 ECTV 감염의 발병기전은 인간에서 바리올라(Variola) 바이러스의 발병기전과 유사하다(Chapman 등, Vet Pathol 2010; 47: 852 (2010)). VACV-WR 및 ECTV로 감염된 마우스에서 단기 및 노출 후 보호의 비교는 ECTV 감염이 인간 천연두와 보다 밀접하게 유사함을 제시하였다(Paran 등, The Journal of Infectious Diseases; 199:39-48 (2009)).

[0010] 출생 시 MVA를 이용한 마우스의 백신접종은 안전하며 FLT3 리간드의 증가를 유도하여 형질세포양 수지상 세포(pDC)의 가속화된 발생 및 통상적(c) DC의 활성화를 야기하여 이종 바이러스 감염에 대해 개선된 내성을 일으킨다(Franchini 등, J. Immunol. 172, 6304-6312 (2004), Vollstedt 등, Eur J Immunol. 34: 1849-1860 (2004) Vollstedt 등, Eur J Immunol. 36: 1231-1240 (2006)).  $2.5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>의 MVA를 이용한 1일 또는 2일령 마우스의 백신접종은 백신접종 후 7-8일에 치사 용량의 단순 헤르페스 바이러스 1(HSV-1)을 이용한 유발접종에 대해 대부분의 마우스를 보호하였고, 마우스가 성체가 된 것으로 여겨졌을 때 면역접종 후 4주째에 치사 용량의 백시니아 Western Reserve(VV-WR)를 이용한 유발접종에 대해 대부분의 마우스를 보호하였다(WO 03/088994A2). CD11c+ 세포의 최대 유도에 필요한 바이러스 용량을 결정하기 위해, 등급화된 용량의 MVA를 평가하였다. 최대수의 CD11c+ 세포가  $2.5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>의 바이러스 처리 후 검출된 반면, 그 미만이나 초과 용량은 덜 효과적이었다(상기 문현). 따라서  $2.5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> 이 신생아 백신접종을 위한 MVA의 최적 용량으로 간주되었다.

[0011] 결과적으로, 강한 T-세포 및 항체 반응 그리고 병원체에 대한 보호를 달성하기 위한 신생아의 백신접종을 위한 조성물 및 방법에 대한 필요성이 당분야에 존재한다. 본 발명은 상기 필요성을 충족시킨다.

### 발명의 내용

[0012] 본 발명은 인간 신생아 또는 6월령 미만의 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 면역 반응의 유도를 위한 조성물 및 방법을 포괄한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 인간 신생아 또는 6월령 미만의 영아에 적어도  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량의 MVA를 투여하는 것을 포괄하며, 여기서 상기 투여는 6월령 전의 인간 신생아에서, 바람직하게는 투여 2주 내에 폭스바이러스에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응을 유도한다. 가장 바람직하게는, 면역 반응은 MVA의 이차 투여의 부재 하에 유도된다.

[0013] 다양한 구현예에서, 상기 투여는 인간 신생아 또는 2월령 미만 또는 출생 후 72시간 내에 영아에 투여된다.

[0014] 바람직하게는, 상기 투여는 폭스바이러스에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응을 유도한다. 가장 바람직하게는, 상기 투여는 천연두에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응을 유도한다.

[0015] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 MVA의 하나 이상의 추가접종 투여를 투여하는 것을 포괄한다.

[0016] 일부 구현예에서, 상기 MVA는 재조합 MVA이다. 일부 구현예에서, 상기 투여는 상기 재조합 MVA에 의해 인코딩되는 이종 항원에 대한 T- 및 B-세포 반응을 유도한다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1a-d는 단회 MVA-BN 백신접종 후 신생 마우스 대 성체 마우스에서 백시니아-특이적 면역 반응의 비교를 나타낸다. 신생 또는 성체 C57BL/6 마우스에 고용량( $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>) 또는 저용량( $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)의 MVA를 면역접종하였다. 동물을 채혈하고, 면역접종-후 1, 2, 3, 4 또는 7주째에 희생시켰다. (a) 혈청 중 백시니아-특이적 IgG를 ELISA로 측정하였다. 기하 평균 역가 +/- 평균의 표준 오차(GMT +/- SEM)를 나타낸다. (b) 비장 중 B8R-특이적 IFN γ-분비 CD8+ T-세포의 백분율을 유세포 측정으로 결정하였다. 평균 백분율 +/- 평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다. (c) 비장 중 그랜자임 B-발현 CD8+ T-세포의 백분율을 유세포 측정으로 결정하였다. 평균 백분율 +/- 평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다. (d) 비장에서 단리된 B8R-특이적 CD8+ T-세포 모집단 내 효과기(CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup>), 효과기 메모리(CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup>) 및 중추 메모리(CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup>) 세포의 분포(%)를 유세포 측정으로 측정하였다. 평균 백분율 +/- 평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다. 상기 분포는 상이한 두 용량의 MVA-BN으로 면역접종한 신생 마우스에서 동일하였으며,  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량만 나타낸다. 1주령 마우스에서의 분석은 비장 중 CD8+ T-세포의 수가 불충분하여 불가능하였다.

도 2a-d는  $10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA를 이용한 신생 마우스의 면역접종이 ECTV 유발접종에 대한 완전 보호를 유도함을 나타낸다. C57BL/6 마우스에 출생 시 고용량( $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>) 또는 저용량( $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)의 MVA를 면역접종하거나 TBS를 투여하였다. 면역접종 후 4주째에, 마우스를  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV로 유발접종하였다. (a) 생존 및 (b) 상대 체중 변화%(평균 +/- SEM)를 21일 동안 모니터링하였다. 유사하게,  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA로 출생 시 면역접종한 마우스를 면역접종 후 7주째에 (c)  $3 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV로 또는 면역접종 후 2주째에 (d)  $1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> ECTV로 유발접종하였다.

도 3a-d는 보호가 T- 및 B-세포 면역 반응에 의존함을 나타낸다. (a, b) FLT3 또는 (c, d) TCRβ δ 녹아웃 마우스를  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA로 출생 시 면역접종하고, 이후 4주째에  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>의 ECTV로 유발접종하였다. (a, c) 생존을 21일 동안 모니터링하였다. (b, d) 사망 시 또는 관찰 기간 말기에, 폐를 부검하고, 균질화하고, 폐 별 ECTV 역가를 플라크 분석으로 결정하였다(GMT +/- SEM).

도 4a-d는 T- 및 B-세포 반응이 모두 완전 보호를 위해 필요함을 나타낸다. (a, b) β2m 녹아웃 또는 (c, d) T11 μMT 유전자삽입 마우스를 출생 시  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA로 면역접종하고 이후 4주째에  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>의 ECTV로 유발접종하였다. (a, c) 생존을 21일 동안 모니터링하였다. (b, d) 사망 시 또는 관찰 기간 말기에, 폐를 부검하고, 균질화하고, 폐 별 ECTV 역가를 플라크 분석으로 결정하였다(GMT +/- SEM).

도 5a-b는 신생 및 성체 마우스에서 재조합 MVA-홍역 백신의 면역원성을 나타낸다. (a, b) 신생 또는 성체 BALB/c 마우스를 3주 간격으로  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA-홍역으로 2회 면역 접종하였다. (a) 또한 일부 신생 마우스는 출생 시에만 면역 접종하였다. 성체 마우스는 최초 면역접종 후 2, 3, 4 및 5주째에 채혈한 반면, 신생 마우스는 출생 후 3주째에만 채혈할 수 있었다. 이어서 혈액을 2주마다(4회) 그리고 마우스를 희생시킬 때(신생 마우스의 면역접종 후 15주째) 다시 채혈하였다. 홍역-특이적 IgG를 ELISA로 측정하였다(GMT +/- SEM). (b) 이차 면역접종 후 2주째에, 홍역-특이적 T-세포를 뉴클레오팩시드-특이적 웨티드로 비장세포의 시험관 내 자극 후 측정하고, IFN γ-분비 세포를 ELISpot으로 검출하였다(자극 지수의 평균 +/- SEM).

도 6은 MVA 또는 UV-처리 MVA를 이용한 단회 백신접종 후 신생 마우스에서 장기 백시니아-특이적 B-세포 반응을 나타낸다. 신생 C57BL/6 마우스를  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA 또는  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 UV-처리 MVA로 면역접종하였다. 동물을 채혈하고, 면역접종 후 1, 2, 3, 4, 7 또는 16주째에 희생시켰다. 혈청 중 백시니아-특이적 IgG를 ELISA로 측정하였다. 기하 평균 역가 +/- 평균의 표준 오차(GMT +/- SEM)를 나타낸다.

도 7은 단회 MVA 또는 UV-처리 MVA 백신접종 후 신생 마우스에서 장기 백시니아-특이적 T-세포 반응을 나타낸다. 신생 C57BL/6 마우스를  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA 또는  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 UV-처리 MVA로 면역접종하였다. 동물을 면역접종 후 1, 2 또는 16주째에 희생시켰다. 백시니아-특이적 T-세포를 B8R-특이적 웨티드로 비장세포의 시험관 내 자극 후 측정하고, IFN γ-분비 세포를 ELISpot으로 검출하였다(자극 지수의 평균 +/- SEM).

도 8은 성체 마우스 대비 신생 마우스에서의 CD8+ T-세포의 빈도를 나타낸다. 1-, 2-, 3-, 4- 및 7-주령 신생 마우스에 있어서, 비장 중 CD8+ T-세포의 백분율을 유세포 측정으로 결정하고 성체 마우스와 비교하였다. 평균 백분율 +/- 평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다.

도 9a-b는 면역글로불린 클래스 전환이 바이러스 제거를 위해 필요함을 나타낸다. 활성화-유도된 시티딘 탈아미 노효소(AID) 녹아웃 마우스를 출생 시  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA로 면역접종하고 이후 4주째에  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>의 ECTV로 유발접종하였다. (a) 생존을 21일 동안 모니터링하였다. (b) 사망 시 또는 관찰 기간 말기에, 폐를 부검하고, 균질화하고, 폐 별 ECTV 역가를 플라크 분석으로 결정하였다(GMT +/- SEM).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 잠재적인 바이오텐더 공격의 위협 또는 인간 모집단에서 인수공통 폭스바이러스의 출현은 현재 USA에서 허가된 천연두 백신인 ACAM2000™이 금기된 위험 모집단에 적합하고 더 안전한 3세대 천연두 백신을 개발하기 위한 몇

몇 시도를 촉발하였다. 그러나 위험 모집단에는 HIV 환자와 같은 면역손상된 개인이나 아토피성 피부염과 같은 피부 장애를 겪는 개인뿐만 아니라 면역계 미성숙으로 인해 1세 미만의 어린이도 포함된다. 복제 결핍 생-바이러스로서 뛰어난 안전성 프로필을 갖는 MVA-BN은 마우스의 생후 최초 1주에서 바이러스 감염에 대해 광범위 스펙트럼 내성을 개선하는 것으로 이전에 나타났다(Franchini, J. *Immunol.* 172, 6304-6312 (2004)).

[0019] 미감작 신생아는 출생 직후 치명적인 감염에 대해 보호하는 것이 불가능하지 않다면 어려운 것으로 간주된다. 그러나 백신접종 용량을  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량의 개질 백시니아 앙카라(MVA)로 증가시킴으로써, 출생 시 마우스의 단회 면역접종이 치사 오르소폭스바이러스 유발접종에 대해 완전한 보호를 신속히 부여하는 완전히 기능적인 T- 및 B-세포 반응을 유도하는 것으로 나타났다. 놀랍게도 보호는 2주 내에 유도되며, 주로 T-세포 의존적이다. 또한 지속되는 면역학적 T-세포 메모리 및 중화 항체가 상기 단회 백신접종으로 수득되었다. 따라서 출생 시와 같이 조기에 투여된 MVA는 치명적인 질환에 대해 즉각적이고 장기적인 보호를 유도하며, 초기 유아기 백신에 대한 플랫폼으로서 매력적인 것으로 나타났다.

[0020] 출생 시 MVA를 이용한 마우스의 단회 백신접종은 선천성 면역반응뿐만 아니라 효과기 및 장기 메모리 T-세포를 포함하는 적응 면역 반응과 함께 중화 항체 반응도 유도한다. 중요하게는 백신접종 후 2주 내에 적응 면역 반응이 마우스를 ECTV를 이용한 치사 비강내 유발접종에 대해 완전히 보호한다.

[0021] 여기서, T-세포에 있어서의 중요한 역할이 신생 마우스에 존재함이 나타난다. 저용량의  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> MVA로 면역접종되는 경우, 강한 세포독성 T-세포 반응이 유도되었고, 이는 검출 가능한 항체 반응의 부재 하에 ECTV 유발접종의 부분적 보호로 이어졌다. 완전 보호는 B-세포 반응도 유도하는 용량인 고용량의  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA를 이용한 백신접종 후에만 달성되었다. 이는 T11 $\mu$ MT 유전자삽입 마우스에서 확인되었으며, 여기서 부분적 보호는 출생 시 MVA를 이용한 단회 백신접종 후 완전 보호를 달성하기 위해 B-세포도 필요함을 나타내었다.

[0022] 본 발명은 인간 신생아 또는 영아에서 폭스바이러스에 대해 보호 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법을 포괄한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 인간 신생아 또는 영아에 적어도  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량의 MVA를 투여하는 것을 포괄한다. MVA는 면역계의 완전 성숙 전에 인간 신생아 또는 영아에 투여될 수 있다.

[0023] 본 발명은 인간 신생아 또는 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 면역 반응의 유도에 이용하기 위한 MVA를 추가로 포괄한다.

[0024] 본 발명은 또한 인간 신생아 또는 영아의 백신접종에 이용하기 위한 MVA를 포괄한다. 본 발명은 또한 인간 신생아 또는 영아를 치료하기 위한 백신으로서의 MVA의 용도 및 인간 신생아 또는 영아를 치료 또는 백신접종하기 위한 백신 또는 약제의 제조에서 MVA의 용도를 포괄한다.

## 인간 신생아 및 영아

[0026] 본 발명의 문맥 내에서, "인간 신생아"라는 용어는 1월령 미만의 신생아 인간을 나타내며, "인간 영아"라는 용어는 출생부터 1세까지의 인간을 나타낸다. 바람직하게는, 인간 신생아는 4주령 미만, 3주령 미만, 2주령 미만, 또는 1주령 미만이다. 보다 바람직하게는, 인간 신생아는 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1일령 미만이다.

[0027] 하나의 구현예에서, MVA 용량이 인간 신생아에 투여된다. 다양한 구현예에서, MVA 용량이 4주령 미만, 3주령 미만, 2주령 미만, 또는 1주령 미만의 인간 신생아에 투여된다. 다양한 구현예에서, MVA 용량이 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1일령 미만의 인간 신생아에 투여된다. 바람직한 구현예에서, MVA 용량이 출생 3, 2 또는 1일 내에 인간 신생아에 투여된다.

[0028] 하나의 구현예에서, MVA 용량이 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1월령 미만의 인간 영아에 투여된다. 다양한 구현예에서, MVA 용량이 8주령 미만, 7주령 미만, 6주령 미만, 또는 5주령 미만의 인간 영아에 투여된다. 바람직한 구현예에서, MVA 용량이 2월령 미만의 인간 영아에 투여된다.

## 개질 백시니아 앙카라(MVA) 바이러스

[0030] 본 발명은 임의의 모든 MVA 바이러스를 포괄한다. 바람직한 MVA 바이러스에는 MVA 변이체 균주, 예컨대 MVA-BN(2000. 8. 30. European Collection of Animal Cell Cultures, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom(ECACC)에 기탁됨, 접근 번호 V00083008), MVA-

575(2000. 12. 7. ECACC에 기탁됨, 접근 번호 V00120707), 및 MVA-572(1994. 1. 27. ECACC에 기탁됨, 접근 번호 V94012707)가 포함된다. 기탁 균주의 유도체도 바람직하다.

[0031] 바람직하게는, MVA는 시험관 내 닦 배아 섬유아세포(CEF) 또는 다른 조류 세포주에서 또는 생체 내 수정란에서 생식 복제능을 갖지만, MVA 575 또는 MVA 572가 생식 복제할 수 있는 인간 세포에서는 생식 복제능이 없다. 가장 바람직하게는, MVA는 인간 각질세포 세포주 HaCaT, 인간 배아 신장 세포주 293(또한 HEK293으로 나타냄), 인간 뼈 골육종 세포주 143B, 및 인간 경부 선암종 세포주 HeLa에서 생식 복제능을 갖지 않는다.

[0032] 바람직한 구현예에서, 개질 백시니아 바이러스 앙카라(MVA) 바이러스는 시험관 내 닦 배아 섬유아세포(CEF)에서 생식 복제능을 가지며, 인간 각질세포 세포주 HaCaT, 인간 뼈 골육종 세포주 143B, 및 인간 경부 선암종 세포주 HeLa에서는 MVA-575에 비해 더 약독화됨을 특징으로 한다. 바람직하게는, MVA 바이러스는 CEF 세포에서 500 초과의 증폭비가 가능하다. 바이러스의 "증폭비"는 감염 세포로부터 생산된 바이러스(아웃풋) 대 최초에 세포를 감염시키는데 원래 이용한 양(인풋)의 비이다. 아웃풋 및 인풋 간 "1"의 비는 감염 세포로부터 생산된 바이러스의 양이 세포를 감염시키기 위해 최초 이용한 양과 동일한 증폭 상태를 정의한다.

### 재조합 MVA

[0034] 본 발명은 임의의 모든 MVA 바이러스로 생성되는 재조합 MVA 바이러스를 포함한다. 하나의 구현예에서, 재조합 MVA 바이러스는 재조합 MVA-BN 바이러스이다. 재조합 MVA 바이러스는 적어도 하나의 이종 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 문맥에서, "이종" 핵산 서열이라는 용어는 MVA에서 자연적으로 발견되지 않는 핵산 서열을 나타낸다.

[0035] 바람직하게는, 이종 핵산 서열은 적어도 하나의 항원, 항원성 에피토프, 및/또는 치료 화합물을 코딩하는 서열이다. 항원성 에피토프 및/또는 항원은 감염성 제제의 항원성 에피토프 및/또는 항원일 수 있다. 감염성 제제는 바이러스, 진균, 병원성 단세포 진핵생물 또는 원핵생물 개체, 및 기생충 개체일 수 있다. 일부 구현예에서, 감염성 제제는 임의의 하기로부터 선택되는 바이러스이다: 로타바이러스, 루벨라 바이러스, 폴리오바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스(특히 뎅기 바이러스 및 황열병 바이러스), 파라믹소바이러스(특히 홍역 바이러스, 불거리 바이러스, 및 호흡기 융합 바이러스(RSV)), 간염 바이러스(특히 A, B 및 C형 간염 바이러스), 인간 면역결핍 바이러스(특히 HIV-1), 웰로바이러스(특히 에볼라 바이러스 및 마르부르크 바이러스) 또는 출혈열을 일으키는 다른 바이러스. 일부 구현예에서, 감염성 제제는 임의의 하기로부터 선택되는 박테리아이다: 바실러스 안트라시스, 메닝고코커스, 뉴모코커스, 해모필리스 인플루엔자, 코리네박테리움 디프테리애, 클로스트리디움 테타니, 부르크홀데리아, 프란시셀라 툴라렌시스, 콕시엘라 부르네티아, 또는 보르데텔라 퍼투시스.

[0036] T-세포 반응을 유도하는 것들을 포함하는 임의의 항원이 본 발명의 재조합 MVA에 의해 발현될 수 있다. 바이러스, 박테리아, 진균 및 암 항원이 바람직하다. 바람직한 항원은 상술된 임의의 바이러스 또는 박테리아의 항원이다. HIV-1 항원, 뎅기 바이러스 항원, 안트라스 항원, 홍역 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 피코나바이러스 항원, 코로나바이러스 항원 및 호흡기 융합 바이러스 항원이 특히 바람직한 항원이다. 바람직하게는, 항원은 외래 항원 또는 신생항원이다. 본 발명의 문맥 내에서, "신생항원"이라는 용어는 폭스바이러스 백터에 의해 자연적으로 발현되지 않는 항원을 나타낸다.

[0037] 일부 구현예에서, 투여는 재조합 MVA에 의해 인코딩되는 이종 항원에 대한 T- 및/또는 B-세포 반응을 유도한다. T-세포 반응은 효과기 및/또는 장기 메모리 T-세포 반응일 수 있다. B-세포 반응은 중화 항체 반응일 수 있다.

### 투여

[0039] 본 발명은 임의 경로를 통한 인간 신생아 또는 영아에 MVA 용량의 투여를 포함한다. 바람직한 투여 경로에는 피하(s.c.), 피내(i.d.), 근육내(i.m.), 골수내(i.bm.) 또는 정맥내(i.v.) 주사, 경구 투여 및 점막 투여, 특히 비강내 투여 또는 흡입이 포함된다. 투여될 양(투여량)은 다른 것들 중에서 환자의 상태, 개인의 면역계 상태, 투여 경로 및 숙주의 체격을 고려하여 치료될 대상체에 의존한다.

[0040] 본 발명은 인간 신생아 또는 영아의 백신접종을 위한 약학 조성물 또는 백신으로서 이용하기 위한 MVA, 인간 신생아 또는 영아를 치료하기 위한 약학 조성물 또는 백신으로서의 MVA의 용도, 및 인간 신생아 또는 영아를 치료 또는 백신접종하기 위한 약학 조성물 또는 백신 또는 약제의 제조에서의 MVA의 용도를 추가로 포함한다.

[0041] 약학 조성물, 백신 또는 약제에는 일반적으로 하나 이상의 보조 성분, 예컨대 약학적으로 허용가능한 및/또는 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 보존제, 보강제, 희석제 및/또는 안정화제가 포함될 수 있다. 이러한 보조 성분은 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 오일, 수화제 또는 유화제, pH 완충 성분 등일 수 있다. 적합한 담체는 전형

적으로 크고 느리게 대사되는 분자, 예컨대 단백질, 다당류, 다중락트산, 다중글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집물 등이다.

[0042] 약학 조성물 또는 백신 또는 약제의 제조를 위해, 본 발명에 따른 MVA는 생리적으로 허용 가능한 형태로 전환될 수 있다. 이는 천연두에 대한 백신접종을 위해 이용되는 폭스바이러스 백신 제조에서의 경험에 기반하여 수행될 수 있다(Stickl 등, 1974에 기재된 바와 같음). 정제된 바이러스는 -20°C, 또는 -80°C에서, 액체 중 냉동되어 보관될 수 있다. 바람직하게는, 바이러스는  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml의 역가를 가지며, 예를 들어 10mM Tris, 140mM NaCl(pH 7.4) 중 완충 용액에서 제형화될 수 있다.

[0043] 바이러스 제형물은 추가 첨가제, 예컨대 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐파롤리돈 또는 다른 보조 성분, 예컨대 항산화제 또는 불활성 기체, 안정화제 또는 재조합 단백질(예로, 인간 혈청 알부민 또는 HSA)로 생체내 투여에 적합한 것들을 함유할 수 있다.

[0044] 대안적으로, 백신은 제형물 중 바이러스의 단계식 냉동 건조에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 10<sup>8</sup> 입자의 바이러스는 앰플, 바람직하게는 유리 앰플 중 2% 웨톤 및 1% HSA의 존재 하에 1ml의 인산염 완충 식염수(PBS)로 100 μl 중 동결건조할 수 있다. 이어서 유리 앰플을 밀봉하고 몇 달 동안 4°C 내지 실온에 보관할 수 있다. 그러나 필요하지 않은 한, 앰플은 바람직하게는 -20°C 미만 온도에 보관한다.

[0045] 백신접종 또는 치료를 위해, 바이러스를 전신 또는 국소, 즉, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 비강내 또는 당분야 숙련가에게 공지된 임의의 다른 투여 경로로 투여할 수 있다.

#### 용량

[0047] 본 발명은 인간 신생아 또는 영아에 투여되는 적어도 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> 용량의 MVA를 포함한다. 바람직하게는, 용량은 적어도 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 2 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 3 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 4 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 5 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 6 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 7 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 8 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 9 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 또는 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub>의 MVA이다. 특히 바람직한 용량은 2 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 3 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 4 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 5 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 6 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 7 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 8 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 9 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 또는 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub>의 MVA이다. 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>의 용량이 특히 바람직하다.

[0048] 인간 신생아 또는 영아는 임의의 추가("추가접종") 투여의 부재 하에 MVA의 단회 투여로 백신접종될 수 있다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 추가접종 투여가 투여된다. 하나의 구현예에서, 이차 투여는 최초 백신접종 투여 후 4주 내지 8주째에 제공된다. 바람직하게는, 이차 투여는 최초 투여 후 2, 4, 6 또는 8주째에 제공된다. 다른 구현예에서, 3차, 4차, 5차, 6차, 7차, 8차, 9차, 10차, 또는 추가 투여가 제공된다.

[0049] 추가접종 투여는 초기 반응이 감퇴하는 경우 면역 반응을 증가시키기 위해 또는 초기 반응을 추가 증가시키기 위해 투여될 수 있다. 따라서 일부 구현예에서, 원하는 수준의 면역 반응을 증강시키거나 재확립하기 위해 추가 접종 투여가 제공된다.

[0050] 최초 및 이차 투여 간 그리고 투여 및 후속 투여 간 시간은 변할 수 있다. 하나의 구현예에서, 투여 간 시간은 2 내지 6주이다. 다양한 구현예에서, 투여 간 시간은 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 30, 또는 52주이다. 다양한 구현예에서, 투여 간 시간은 적어도 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 또는 48개월이다. 다양한 구현예에서, 투여 간 시간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10년이다.

#### 보호 면역 반응

[0052] 본 발명은 인간 신생아 또는 영아에 MVA 용량의 투여에 의해 폭스바이러스에 대한 보호 면역 반응의 유도를 포함한다. 바람직하게는 상기 투여는 인간 신생아 또는 6월령 전의 영아에서 폭스바이러스에 대한 보호 T- 및 B-세포 반응을 유도한다. 가장 바람직하게는, 면역 반응은 MVA의 이차 투여의 부재 하에 유도된다. 본 발명의 문맥 내에서, "면역 반응은 MVA의 이차 투여의 부재 하에 유도된다"는 어구는 면역 반응이 MVA의 이차(즉, 추가접종) 용량의 투여에 의존하지 않음을 의미한다. 면역 반응은 최초 투여에 의해 유도된다. 따라서 본 발명의 문맥 내에서, "면역 반응은 MVA의 이차 투여의 부재 하에 유도된다"는 어구는 이차 투여가 투여되지 않음을 의미하지는 않는다; 이는 보호 면역 반응을 유도하기 위해 이차 투여가 필요하지 않다는 것만을 의미한다. 일부 구현예에서, 이차 또는 후속 투여가 투여된다. 이차 또는 후속 투여는 면역 반응의 수준 및/또는 면역 반응의 수명을

증가시킬 수 있다.

[0053] 보호 면역 반응은 MVA가 투여되는 신생아 또는 영아를 사망 및/또는 질환 증상으로부터 적어도 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 보호할 수 있다.

[0054] 바람직하게는, 보호 면역 반응은 폭스바이러스, 특히 오르소폭스바이러스에 대한 것이다. 일부 구현예에서, 폭스바이러스는 백시니아 바이러스 또는 바리올라 바이러스이다. 가장 바람직하게는, 보호 면역 반응은 천연두에 대한 것이다.

[0055] 바람직하게는, 보호 면역 반응은 인간 신생아 또는 6월령 전의 영아에서 유도된다. 보다 바람직하게는, 보호 면역 반응은 인간 신생아 또는 5, 4, 3, 2 또는 1월령 전의 영아에서 유도된다. 가장 바람직하게는, 보호 면역 반응은 인간 신생아 또는 영아에서 투여 4, 3 또는 2주 내에 유도된다.

#### 조성물

[0057] 본 발명은 보호 면역 반응을 유도하기 위해 영아 또는 신생아에 투여하기 위해 적어도  $10^8$  TCID<sub>50</sub>의 MVA를 포함하는 약학 조성물 및 백신을 포함한다. 바람직하게는, 조성물은  $10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $3 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $4 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $6 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $7 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $8 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $9 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>, 또는  $10^9$  TCID<sub>50</sub>의 MVA를 포함한다. 특히 바람직한 용량은  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $3 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $4 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $6 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $7 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $8 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $9 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>, 또는  $10^9$  TCID<sub>50</sub>의 MVA이다.  $10^8$  TCID<sub>50</sub>의 용량이 특히 바람직하다.

#### 실시예

[0059] 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시할 것이다. 당분야 숙련가는 제공된 실시예가 결코 본 발명에 의해 제공되는 기술의 적용 가능성을 이 실시예로 제한하는 방식으로 해석될 수 없음을 잘 이해할 것이다.

#### 실시예 1: 마우스

[0061] 연령을 맞춘 C57BL/6J 및 BALB/c 자성 마우스는 Harlan Winkelmann에서 입수한 반면, C57BL/6 배경 상의 B-세포 수용체/T11 μMT 유전자 삽입, 활성화-유도 시티딘 탈아미노효소-결핍(AID-결핍), MHC 클래스 I/β2m-결핍, T-세포 수용체 β6 결핍 및 FLT3-결핍 마우스는 취리히 대학의 동물 시설 또는 Bavarian Nordic-Munich에서 입수하였다. 한배 새끼는 성별이 섞여 있었다. 새끼는 4주째에 이유식을 시작하였다.

#### 실시예 2: 백신 및 유발접종 바이러스.

[0063] 사용한 MVA는 Bavarian Nordic에서 개발하고 ECACC에 접근 번호 V00083008 하에 기탁한 MVA-BN이었다(상기 참고). 재조합 MVA-홍역 백신 MVA-mBN85B는 3 홍역 유전자: 융합-, 헤마글루터닌- 및 뉴클레오-단백질을 인코딩한다. 유전자 서열은 홍역 균주 Khartoum SUD/34.97(유전형 B3)의 RNA에서 유도되었다. 두 바이러스를 모두 11일령의 수정된 무병원체 계란에서 제조한 일차 닦 배아 섬유아세포 상에서 증식 및 적정하고(Charles River, Massachusetts, USA) RPMI-1640 배지 중에 배양하였다. ECTV 균주 Moscow는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 접근 번호 VR-1372 하에 입수하고, 항생제를 포함하지 않고 10% FCS가 보강된 Dulbecco's Modified Eagle 배지(DMEM; Invitrogen) 중에 유지된 Vero C1008 세포(ECACC 접근 번호 85020206) 상에서 증식 및 적정하였다. 모든 바이러스를 수크로오스 쿠션을 통해 정제하였다.

#### 실시예 3: 면역접종 및 유발접종.

[0065] 마우스를 출생 후 6-24시간 내에 50 μl의 바이러스 혼탁액으로 피하 면역접종하였다. 8-주령 동물을 신생 마우스 대 성체의 대조를 위해 이용하였다(즉, 성체가 8주령이었음). 더 적은 용량( $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) 또는  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>의 UV-불활성화된 MVA를 수여받은 일부 동물을 제외하고,  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA 또는 MVA-mBN85B를 적용하였다(Samuelsson 등, *J. Clin. Invest.* 118, 1776-1784 (2008)). 대조군 동물은 TRIS-완충 식염수(pH 7.7)로 처리하였다. MVA-mBN85B에 있어서, 마우스를 3주 간격으로 2회 면역접종하였다. 면역원성 연구를 위해, 동물을 채혈하고 상이한 시점에 희생시키고 비장을 유세포 측정 분석을 위해 처리하였다.

[0066] ECTV 유발접종을 위해, 마우스를 케타민/자일라민으로 마취하고 12.5 μl 부피의 바이러스를 수여받은 2주령 동

물을 제외하고 바이러스를  $25\text{ }\mu\text{l}$  부피로 비강내 적용하였다. 각각의 연령군 및 마우스 계통에 있어서, 2주 내에 100% 사망을 유도하고 부검한 폐에서 대략  $8\text{ Log}_{10}\text{pfu}$ 의 바이러스 부하를 갖는 최적 용량을 결정하였다. 29-일령 마우스에 있어서, 최적 용량은  $1\times 10^4\text{ TCID}_{50}$ (성체 C57BL/6J 마우스에 대해 결정된 LD<sub>50</sub>의 4배; Samuelsson 등, *J. Clin. Invest.* 118, 1776-1784 (2008))였고, 단 FLT3-결핍 및 TCR $\beta$  δ-마우스는 제외된다. 이를 고도 감수성 마우스에서는  $1\times 10^3\text{ TCID}_{50}$ 의 ECTV가 충분하였다. 2주령 및 7주령 마우스에 있어서, 유발접종 용량은 각각  $1\times 10^2\text{ TCID}_{50}$  및  $3\times 10^4\text{ TCID}_{50}$ 이었다. 유발접종 후, 체중 감소 질병 및 사망을 21일 동안 매일 모니터링하였다. 각 군에는 5 내지 7마리 새끼가 포함되었고, 데이터는 2 또는 3 실험의 대표값이다.

#### [0067] 실시예 4: ECTV 플라크 분석.

ECTV 플라크 분석을 이용하여 부검한 폐에서의 바이러스 부하를 결정하였다. 폐를 균질화하고, 1:100에서 시작하여 4배 연속 희석을 이용하여 Vero C1008 세포에서 적정하였다. 인큐베이션 및 크리스털 바이올렛 염색(Sigma Aldrich) 3일 후, 평균 플라크 수  $\leq 150$ 을 보이는 최초 희석 단계로부터 역가를 계산하였다.

#### [0069] 실시예 5: ELISA.

백시니아-특이적 혈청 IgG 역가를 전술된 바와 같이 직접적 ELISA로 측정하였다(Garza 등, *Vaccine* 27, 5496-5504 (2009)). 간략하게, 96-웰 플레이트를 MVA 항원으로 하룻밤 동안 코팅하였다. 평가 혈청을 1:50에서 시작하는 2배 연속 희석을 이용해 적정하였다. 양 항-마우스 IgG-HRP(AbD Serotec)를 검출 항체로 이용하였다. 항체 역가를 선형 회귀로 계산하고, OD<sub>450</sub>에서 광학 밀도 0.30을 제공하는 혈청 희석도로 정의하였다. 흥역-특이적 혈청 IgG 역가를 Enzygnost® ELISA 키트(Dade Behring)로, 그러나 홀스래디쉬 폐록시다아제에 콘주게이트된 양 항-마우스 IgG를 이용해서 측정하였다.

#### [0071] 실시예 6: 플라크 환원 중화 평가(PRNT) 분석.

백시니아-기반 PRNT 분석을 Garza 등, *Vaccine* 27, 5496-5504 (2009)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게, 열-불활성화된 혈청을 연속 희석하고, 백시니아 바이러스 Western Reserve(Advanced Biotechnologies Inc.)와 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 혼합물이 70분 동안 Vero 세포 상에 흡착되게 하였다. 이어서, 오버레이 배지를 첨가하고, 플레이트를 24시간 동안 인큐베이션하였다. 크리스털 바이올렛으로의 염색 후, 중화 역가를 성숙 바이러스의 50%를 중화할 수 있는 혈청 희석도로 결정하였다.

#### [0073] 실시예 7: 유세포 측정 및 ELISpot.

적혈구 용해 후, 일부 비장세포를 B8R-펩티드(Tscharke 등, *J. Exp. Med.* 201, 95-104 (2005)) ( $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  B8R<sub>20-27</sub>, Coring)를 포함하거나 포함하지 않고 5시간 동안 GolgiPlug™(BD Biosciences)의 존재 하에 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 항-CD8+eFluor™-450, 항-CD4+eFluor™-780, 항-CD44-FITC, 항-CD62L-PercP-Cy5.5, 항-CD127-APC, 항-IFN γ -PE-Cy7(모두 eBioscience) 및 항-그랜자임 B-PE(Invitrogen)로 염색하였다. 세포내 염색을 고정/투과화 후 수행하였다(BD Cytofix/Cytoperm™, BD Biosciences). 유세포 측정 분석을 LSR II(BD Biosciences)를 이용해서 수행하였다. 데이터를 FlowJo(Tree Star)로 분석하였다. 나머지 비장세포를 B8R/백시니아- 또는 N/흥역-특이적(Halassy 등, *Vaccine* 24, 185-194 (2006); Bergen 등, PLoS one 5(4):e10297, 2010) 펩티드( $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; aa 335-345; N)를 포함하거나 포함하지 않고 20시간 동안 자극하고, IFN γ -분비 세포를 ELISpot 분석(BD Biosciences)으로 검출하였다. 자극 지수는 특이적 자극으로 수득된 스팟의 수로부터 자극받지 않은 세포로부터의 비특이적 스팟의 수를 빼서 수득하였다.

#### [0075] 실시예 8: 중화 항체뿐만 아니라 효과기 및 장기 메모리 T-세포가 신생 마우스에서 MVA에 의해 유도됨.

신생 마우스를 신생 마우스에서 이전에 이용한 고용량( $1\times 10^8\text{ TCID}_{50}$ ) 또는 저용량( $2\times 10^6\text{ TCID}_{50}$ ) MVA로 출생 시 면역접종하였다(Franchini 등, *J. Immunol.* 172, 6304-6312 (2004)). 백시니아-특이적 IgG 항체 반응을 면역접종 후 1, 2, 3, 4 및 7주째에 수행한 효소-연관 면역흡착 분석(ELISA)으로 결정하였다(도 1a). 성체 마우스에서, 백시니아-특이적 항체는  $1\times 10^8\text{ TCID}_{50}$ 의 MVA를 이용한 단회 면역접종 후 7일째에 검출 가능하였고, 1주 후 편평기에 도달하였다. 놀랍게도, 출생 시 단회 고용량 면역접종 후 특이적 IgG 반응은 1-2주의 지연에도 불구하고 상당한 항체 수준에 도달하였다(도 1a). 신생 동물의 면역계 미성숙에도 불구하고 백시니아-중화 항체

가 유도되지만, 완전 혈청 전환은 관찰되지 않았고 역가는 성체 마우스에 비해 약 10배 더 낮았다(표 1).

[0077] 표 1: 백시니아-특이적 중화 항체 반응

표 1

연령군	처리	면역접종 후 주수	1	2	3	4	7
신생	TBS	혈청전환 <sup>a</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		역가 <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	$2 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> MVA	혈청전환 <sup>a</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		역가 <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub> MVA	혈청전환 <sup>a</sup>	0.0	16.7	33.3	66.7	66.7
		역가 <sup>b</sup>	1.0	1.3	2.6	11.6	5.7
	성체	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub> MVA	혈청전환 <sup>a</sup>	33.3	100.0	66.7	100.0
			역가 <sup>b</sup>	1.8	18.9	11.5	163.7
							37.9

[0079] <sup>a</sup> 백분율 <sup>b</sup> 기하 평균 역가

[0080] 출생 시 MVA-BN을 이용한 단회 면역접종으로 유도된 B-세포 반응은 면역접종 후 16주째에도 여전히 검출 가능하였고(도 6) 출생 후 3 또는 4주째의 이차 면역접종으로 추가접종할 수 있었다. B-세포 반응에서와 같이, 출생 시 MVA를 이용한 면역접종으로 유도된 CD8+ T-세포 반응에서 약간의 지연이 관찰되었다. 신생 마우스의 면역접종 2주 후 IFN-γ 세포내 염색으로 측정된 백시니아-특이적 T-세포 반응은 면역접종 1주 후 관찰된 성체 마우스에서의 피크 반응과 유사하였다(도 1b). 저용량 MVA를 이용한 백신접종 후 항체 반응은 검출될 수 없었지만(도 1a), 동일하거나 심지어 더 높은 수준의 T-세포 반응이 저용량 백신접종으로 유도되었다(도 1b). 출생 시 MVA 백신접종으로 유도된 백시니아-특이적 T-세포의 존재는 면역접종 후 1주째에 이미 백시니아-특이적 IFN-γ 생산 세포를 검출하는 효소 연관 면역스팟(ELISpot) 분석에 의해 확인되었다(도 7). 1주령 마우스의 비장 내 소수의 CD8+ T-세포를 고려하면, 이처럼 빠른 시점이 더욱 더 놀랍다(도 8). T-세포 활성화는 또한 CD8+ T-세포 모집단에서 그랜자임 B 발현의 분석에 의해 확인되었다. 세포독성 T-세포의 상기 효과기 분자는 두 용량의 MVA를 이용한 출생 시 면역접종으로 1주 지연되는 하지만 성체에서 나타난 것과 유사한 발현 수준으로 유도되었다(도 1c). 보다 상세한 분석을 위해, 백시니아-특이적 CD8+ T-세포를 Kaech 등, *Nat. Immunol.* 4, 1191-1198 (2003)에 기재된 바와 같이 CD44, CD62L 및 CD127의 상이한 발현에 기반하여 효과기, 효과기 메모리 및 중추 메모리 세포로 하위 구분하였다. 예상되는 바와 같이, 대부분의 백시니아-특이적 T-세포가 신생 및 성체 마우스에서 모두 T-세포 반응의 피크에서의 효과기 세포였다(도 1d). 후속 수축상 동안, 이들은 두 연령군에서 모두 유사한 효과기 메모리 또는 중추 메모리 표현형을 획득하였다(도 1d). B-세포 반응에 있어서, MVA 특이적인 T-세포는 신생 면역접종 후 16주째에도 여전히 검출 가능하였다(도 7). 항원-특이적 B- 및 T-세포 반응이 면역접종 전 MVA의 UV 처리 후 유도되지 않았으므로(도 6 및 7), 복제하지 않는 MVA의 전사 및 단백질 합성을 위한 요건이 드러났다. UV 처리 후 항원-특이적 B- 및 T-세포 반응의 부재는 이전에 헤르페스 단순 바이러스에 대해 나타났다(Franchini 등 *J. Virol.* 75, 83-89 (2001)).

[0081] 실시예 9: MVA는 2주령 마우스에서 치사 ECTV 유발접종에 대한 보호를 유도함.

[0082] 출생 시 MVA 면역접종으로 유도되는 T- 및 B-세포 반응의 기능성을 더욱 더 연구하기 위해, 이런 마우스에 비강내 ECTV 유발접종 모델을 채용하였다. 저용량 또는 고용량 MVA를 이용한 신생 면역접종 후 4주째에 동물에  $10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV를 이용한 비강내 경로로 유발접종하였다. 위약(Tris-완충 식염수, TBS pH 7.7; 1.21mg/ml TRIS-(히드록시메틸)-아미노-메탄, 8.18mg/ml 염화나트륨)으로 처리한 모든 대조군 마우스는 이들 폐에 대략 8 Log<sub>10</sub> ECTV 플라크 형성 단위(pfu)를 가지며 유발접종 후 9 내지 12일째에 사망한 반면(도 2a),  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA 용량으로 처리한 모든 마우스는 다른 경우 치사 유발접종에서 생존하고 약간의 일시적 체중 감소 후 완전 회복

되었다(도 2a 및 2b). 모든 백신접종 마우스에서는 이들의 폐에서 ECTV가 제거되어 완전 보호를 확인시켰다. 상기 군에서 유발접종 전에 항체가 아닌 T-세포 반응만 검출될 수 있었다는 사실에도 불구하고, 저용량 MVA를 이용한 면역접종은 마우스의 80%에서 보호를 제공하였다(도 2a). 감소된 생존율에 부가하여, 저용량으로 면역접종된 마우스는  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> 용량의 MVA로 백신접종한 마우스에 비해 증가된 질환 증상 및 체중 감소를 나타내었다(도 2b). MVA-BN을 이용한 신생 마우스의 면역접종 후 B- 및 T-세포 반응에 대해 관찰된 수명(도 6 및 7)은 성체기의 장기 보호로 반영되었다: 마우스는 평가된 최근 시점에, 즉, 신생 마우스의 면역접종 후 7주째에 치사 용량의  $3 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV를 이용한 유발접종으로부터 완전 보호되었다(도 2c). 반면, 동물 체격으로 인해 ECTV 유발접종이 기술적으로 가능한 가장 빠른 시점인 신생 마우스의 면역접종 후 2주째만큼 빠르게 보호가 이미 나타날 수 있다. 상기 연령에서  $10^2$  TCID<sub>50</sub>의 ECTV는 6 내지 8일 내에 미감작 마우스를 사망시킨 반면, 출생 시 MVA 면역접종은 100% 보호를 부여하였다(도 2d).

#### [0083] 실시예 10: 치사 ECTV 유발접종에 대한 보호는 적응 면역 반응에 의존함.

[0084] 출생 시 MVA의 주사는 FLT3 리간드(FLT3-L)의 증가를 통해 pDC 및 백혈구 전구체의 조기 개발을 증강시키며, 이는 생애 첫 주에 바이러스 감염에 대해 증가된 내성으로 이어짐이 이전에 나타났다(Franchini 등, *J. Immunol.* 172, 6304-6312 (2004); Vollstedt 등, *Eur. J. Immunol.* 36, 1231-1240 (2006)). 따라서 치사 ECTV 유발접종에 대한 보호에서 FLT3-L의 역할을 FLT3-L 녹아웃 마우스를 이용해서 연구하였다. 이들 마우스는 C57BL/6 야생형 마우스에 비해 약 10배 더 적은 pDC를 가지며, pDC를 상향 조절할 수 없다. 또한, 이들 마우스에는 선천성 면역계의 다른 세포 유형이 없다(Vollstedt 등, *Eur. J. Immunol.* 36, 1231-1240 (2006)). FLT3-L 녹아웃 마우스에 출생 시 MVA를 면역접종하고, 4주 후  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ECTV로 유발접종하였다. 모든 백신접종 마우스는 감염에서 살아남았고(도 3a) 이들의 폐에서 ECTV가 완전 제거된 반면(도 3b), 모든 백신접종되지 않은 마우스는 감염으로 사망하였다. FLT3-L 녹아웃 마우스는 바이러스 감염에 더 민감하므로, 더 저용량의  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ECTV를 선택하였다(도 3a). 2주령 FLT3-L 녹아웃 마우스에서 유사한 결과를 수득하였다. B- 및 T-세포 면역 반응은 모두 감소된 수준의 pDC 및 다른 선천성 세포의 부재로 의해 영향받지 않았으므로, 선천성 면역계가 MVA에 의해 유도되는 유일한 보호 기전이 아님이 뚜렷이 시사된다.

[0085] 신생 마우스의 면역접종에 의해 부여되는 보호에서 적응 면역 반응의 역할을 연구하였다. T-세포 수용체  $\beta\delta$  (TCR  $\beta\delta$ ) 녹아웃 마우스에는 T-세포가 없고, 또한 T-헬퍼 세포의 부재로 인해 백시니아-특이적 B-세포 반응을 일으킬 수 없다. 출생 시 MVA로 백신접종한 TCR  $\beta\delta$  녹아웃 마우스는  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ECTV를 이용한 비강내 유발접종 후 11 내지 12일에 죽어서, 보호를 위한 적응 면역 반응의 필요성을 나타내었다(도 3c). FLT3-L 녹아웃 마우스와 유사하게, 바이러스 감염에 대한 TCR  $\beta\delta$  녹아웃 마우스의 급성 감수성에 기반하여 더 작은 유발접종 용량을 선택하였다. 사망 시, 미쳐리 및 MVA 면역접종 마우스는 모두  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV로 유발접종한 미감작 야생형 마우스에 필적하는 이들의 폐 내 바이러스 부하를 가졌다(도 3d). 이들 두 녹아웃 마우스 모델을 이용하여, 신생 마우스의 면역접종으로 부여되는 보호가 추가접종된 선천성 면역에 의해 부여되는 비특이적 내성에 기인하는 것이 아니라 상대적으로 개발되지 않은 면역계에 의해 일어나는 백시니아-특이적 적응 면역 반응에 의해 부여되었음이 나타났다.

#### [0086] 실시예 11: T- 및 B-세포 반응이 모두 완전 보호를 위해 필요함

[0087] 보호에 있어서 세포성 대체액성 면역 반응의 역할을 조사하였다. 2주령 마우스가 T-세포 반응이 검출될 수 있지만 항체는 거의 검출될 수 없는 시기에 보호되었다는 사실은 신생 마우스의 보호에서 T-세포에 있어서의 주요 역할에 대한 개념으로 이어졌다. 실제로  $\beta2m$  녹아웃 마우스에서 CD8+ T-세포의 부재 하에 MVA를 이용한 면역접종은 항체 반응이 영향받지 않았음에도 불구하고 보호를 유도하지 않았다(도 4a 및 b). 백시니아-특이적 B-세포에 대한 필요성을 평가하기 위해, T11  $\mu$ MT 유전 조작 마우스를 이용하였다. 이들 마우스는 VSV 바이러스에 대해 특이적인 재배열 중쇄 유전자를 가지며, 이에 따라 MVA를 이용한 백신접종 시 특이적 항체를 생성할 수 없다. 백시니아-특이적 B-세포 반응의 부재 하에, MVA로 면역접종된 한 마리의 T11  $\mu$ MT 마우스는 관찰 기간 말기 2일 전에 ECTV 감염으로 사망하였고(도 4c) 마우스의 2/3에서만 21일 관찰 기간 말기에 이들의 폐에서 ECTV가 제거되었다(도 4d). IgM 반응만을 일으킬 수 있는 AID 녹아웃 마우스에서 유사한 관찰이 얻어졌다(도 9). 종합하면, 이들 결과는 출생 시 MVA 백신접종으로 유도되는 완전 보호를 부여하기 위해 항체에 의한 뒷받침이 필요한 세포

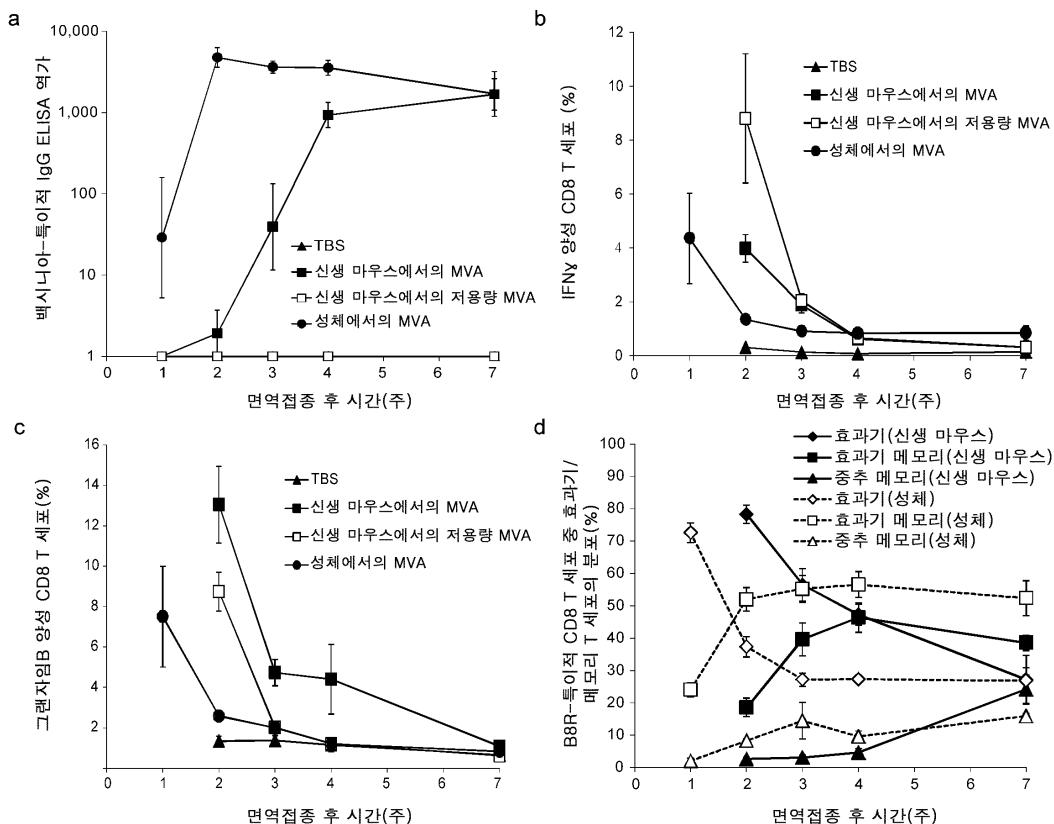
독성 T-세포에 있어서의 주요 역할을 드러낸다.

#### [0088] 실시예 12: 유아기 질환에 대한 백신용 벡터로서의 재조합 MVA

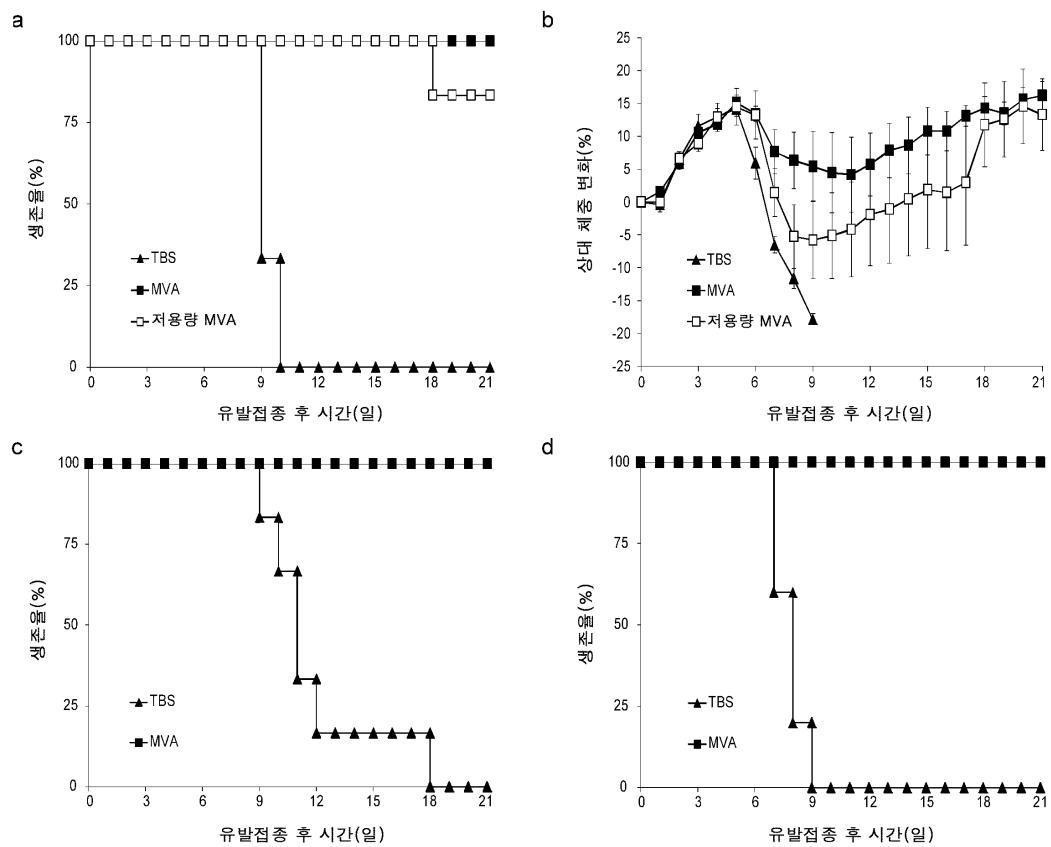
출생 시 MVA를 이용한 단회 면역접종이 단기 및 장기 보호 면역성을 유도한다는 사실은 유아기 백신을 개발하기 위한 바이러스 벡터로서의 그 이용에 대한 기회를 제시한다. 따라서 유아기 질환에 대한 백신으로서의 재조합 MVA의 가능성을 신생 마우스 모델에서 MVA-홍역을 이용해서 분석하였다. MVA-홍역은 MVA 골격 내에 3가지 상이한 홍역 바이러스 단백질: 숙주 세포와의 결합 및 융합에 관여되는 헤마글루티닌- 및 융합-단백질뿐만 아니라 바이러스 단일쇄 RNA에 연관되는 뉴클레오팝시드-단백질을 인코딩 한다. MVA를 이용한 신생 마우스의 백신접종에서 나타난 것처럼, 재조합 MVA-홍역은 또한 출생 시 면역접종 및 3주 후 추가접종 후 강력한 백시니아-특이적 B- 및 T-세포 반응을 일으켰다. 보다 중요하게는, 홍역-특이적 B- 및 T-세포 반응도 쉽게 검출할 수 있었다(도 5a 및 5b). 반응의 크기는 MVA-유도된 백시니아 반응에서 나타난 것과 같은 항체 반응의 동일한 1-2주 지연에도 불구하고, 동일한 일정을 이용하여 MVA-홍역으로 백신접종된 성체 마우스에서 나타난 것과 필적하였다. 또 다시, 출생 시 MVA-홍역을 이용한 단회 백신접종은 추가 백신접종을 수여받은 마우스에서 관찰된 것에 비해 단지 약간 더 낮은 수준의 강력하고 지속되는 홍역-특이적 항체 반응으로 이어졌다(도 5a).

#### 도면

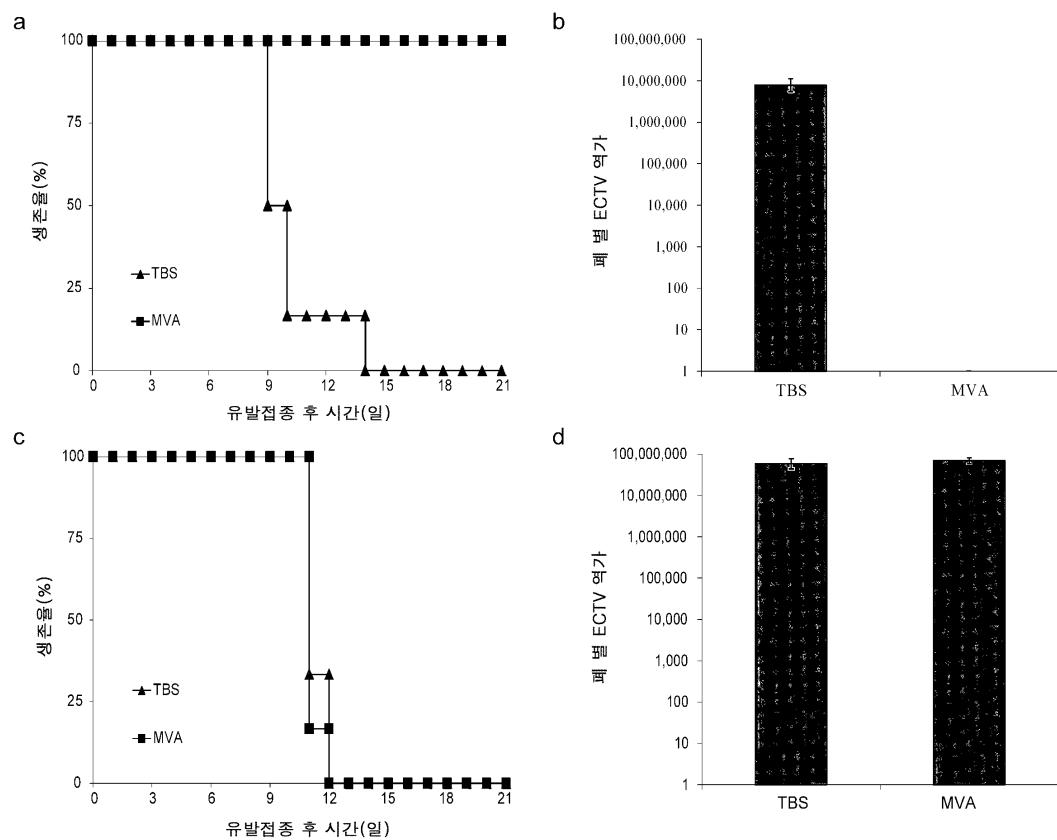
##### 도면 1



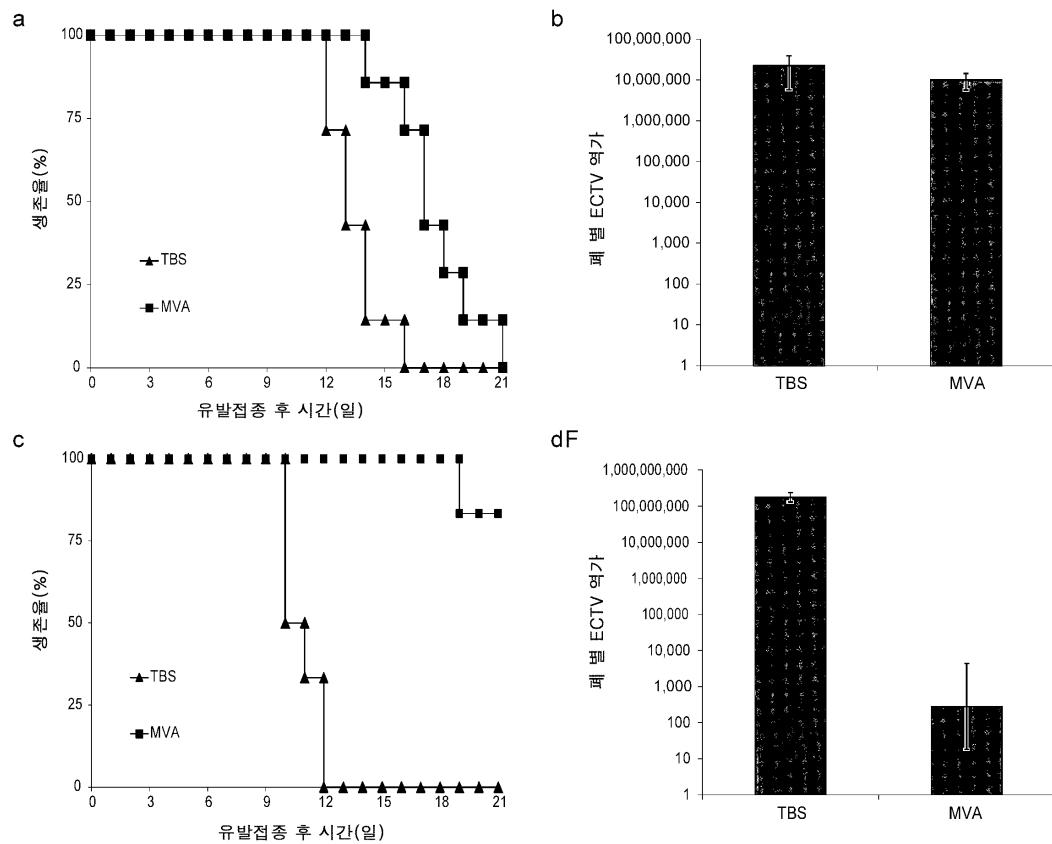
## 도면2



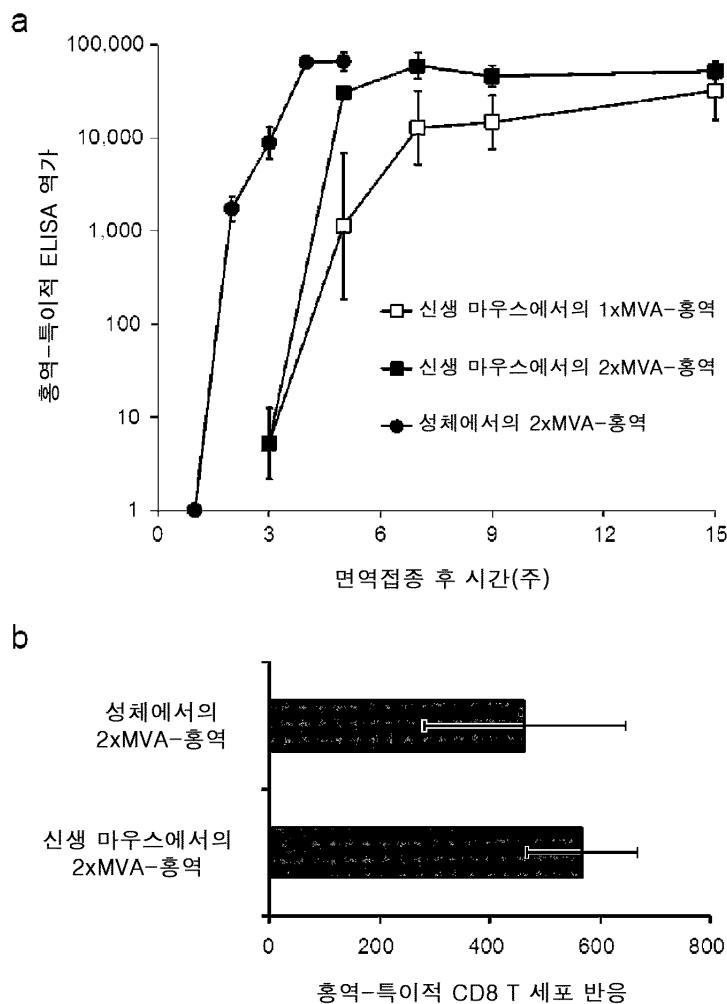
## 도면3



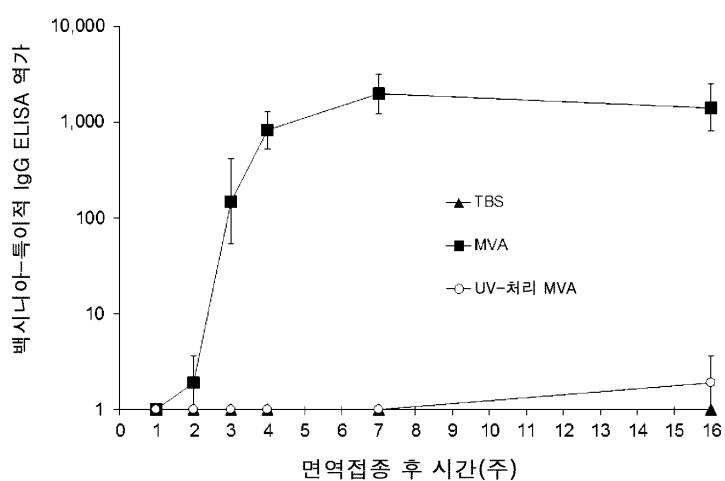
## 도면4



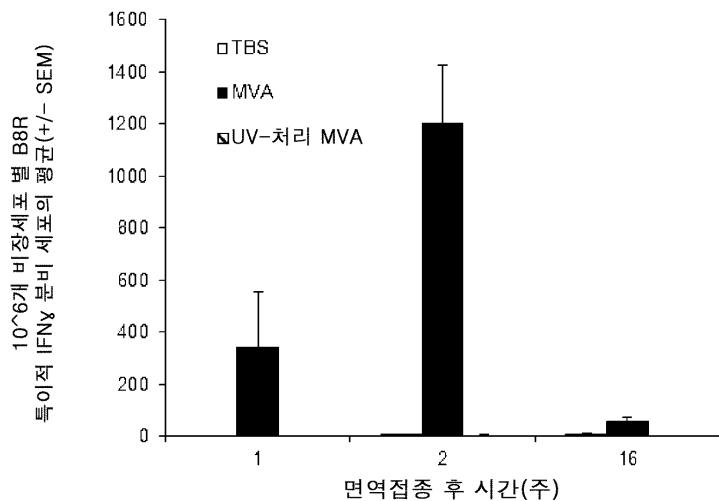
## 도면5



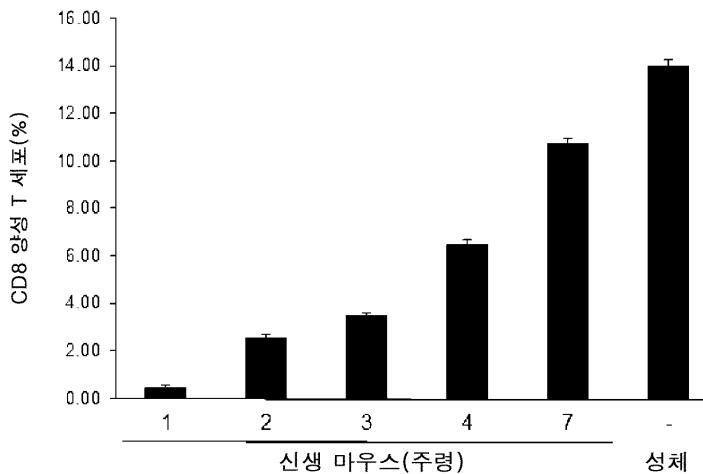
## 도면6



도면7



도면8



도면9

