



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0005899
(43) 공개일자 2023년01월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/245 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61P 31/22 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/245 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7040909
- (22) 출원일자(국제) 2021년04월28일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년11월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2021/050385
- (87) 국제공개번호 WO 2021/217206
국제공개일자 2021년11월04일
- (30) 우선권주장
2020901334 2020년04월28일 오스트레일리아(AU)
- (71) 출원인
더 카운실 오브 더 퀸즐랜드 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스톤 허스톤 로드 300
- (72) 발명자
카나 라지브
오스트레일리아, 퀸즐랜드 4006, 허스톤, 300 허스톤 로드
다사리 비자엔드라
오스트레일리아, 퀸즐랜드 4006, 허스톤, 300 허스톤 로드
- (74) 대리인
특허법인한얼

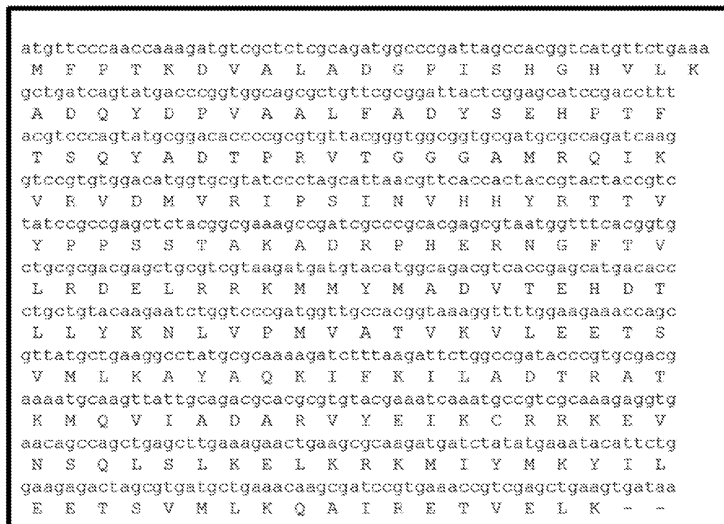
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 인간 사이토메갈로바이러스 폴리에피토프 백신 조성물

(57) 요약

인간 헤르페스바이러스 번역요법을 개시한다. 더욱 특히, 다중 인간 사이토메갈로바이러스 항원으로부터 유래된 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 이상의 재조합 단백질, CMV 외피 당단백질, 및 TLR 효능제를 포함하는 조성물을 개시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/22 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

A61K 2039/57 (2013.01)

A61K 2039/575 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C12N 2710/16122 (2013.01)

C12N 2710/16134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 복수 개의 에피토프(epitope)를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질(isolated protein)로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;
- (b) CMV 외피 단백질(envelope protein), 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및
- (c) TLR9 효능제(agonist)를 포함하는 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 조성물이, 대상체(subject)에게 투여되는 경우, 체액성 면역 반응(humoral immune response) 및 세포 매개 면역 반응, 예컨대, 세포독성 T-림프구 면역 반응을 유도 또는 유발할 수 있는 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질이 2개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터의 복수 개의 에피토프 중 2개 이상을 포함하는 폴리토프(polytope) 단백질이거나, 또는 이를 포함하는 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 폴리토프 단백질이 적어도 2개의 상기 에피토프 사이에 개재(intervening) 아미노산 서열을 포함하고, 여기서, 개재 아미노산 서열이 프로테아좀 유리(liberation) 아미노산 서열을 포함하는 제약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 프로테아좀 유리 아미노산 또는 아미노산 서열이 AD, K 및/또는 R을 포함하는 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프가 HLA 클래스 I 특이성 HLA-A1, -A2, -A3, -A11, -A23, -A24, -A26, -A29, -A30, -B7, -B8, -B18, -B27, -B35, -B38, -B40, -B41, -B44, -B51, -B57, -B58 및/또는 -CW6에 의해 제한되는 제약 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프가 pp50, pp65, pp150, DNase 및/또는 IE-1로부터 유래되는 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 에피토프가 표 1의 서열 번호: 1-20에 제시된 아미노산 서열, 이의 단편, 변이체 또는 유도체 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질이 서열 번호: 1-20에 제시된 각각의 에피토프 아미노산 서열을 포함하는 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질이 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질이 스무 개 (20) 이하의 에피토프를 포함하는 제약 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체(carrier), 희석제, 또는 부형제(excipient)를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, CMV 외피 단백질이 CMV 당단백질 B, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체인거나, 또는 이를 포함하는 제약 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, TLR9 효능제가 CpG ODN1018 및/또는 CpG ODN2006이거나, 또는 이를 포함하는 제약 조성물.

청구항 15

CMV에 대한 방어 면역 반응(protective immune response)을 유발하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 제약 조성물을 포함하는 백신(vaccine).

청구항 16

대상체에게 치료 유효량의,

- (a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2 개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;
- (b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및
- (c) TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물을 투여함으로써, 대상체에서 CMV 감염을 예방 또는 치료하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 17

대상체에게 치료 유효량의,

- (a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2 개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;
- (b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및
- (c) TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물을 투여함으로써, 대상체에서 CMV 항원에 대한 면역 반응을 유발하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 항원에 대한 면역 반응을 유발하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 면역 반응이 체액성 면역 반응 및 세포 매개 면역 반응, 예컨대, 세포독성 T-림프구 면역 반응이거나, 또는 이를 포함하는 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 대상체에서 CMV 또는 CMV 감염에 대한 방어 면역 반응을 유발하는 방법.

청구항 20

대상체에게 치료 유효량의,

- (a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2 개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;

(b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및

(c) TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물을 투여함으로써, 대상체에서 CMV 감염에 대한 면역을 유도하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 감염에 대한 면역을 유도하는 방법.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제약 조성물이 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 것인 방법.

청구항 23

서열 번호: 1-20에 제시된 각각의 에피토프 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체를 포함하는 단리된 단백질.

청구항 24

제23항에 있어서, 단리된 단백질이 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 단리된 단백질.

청구항 25

제23항 또는 제24항의 단리된 단백질을 코딩하는(encoding) 단리된 핵산.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2020년 4월 28일 출원된 오스트레일리아 가출원 번호 2020901334 (발명의 명칭: "Pharmaceutical Composition")를 우선권 주장하고, 상기 가출원의 전체 내용 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 발명은 인간 헤르페스바이러스 면역요법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은, 면역요법에서 사용될 때, 제한 없이, 방어 및 지속가능한 체액성 및 세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있는, 다중 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 항원으로부터 유래된 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 이상의 재조합 단백질, CMV 외피 당단백질, 및 TLR 효능제를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] **본 발명의 배경**

[0006] 건강한 개체에서 1차 CMV는 일반적으로 무증상이며, 때때로 재활성화되고, 점막 표면으로부터 배출되는 잠복 상태를 확립한다. 일부 경우에, 1차 CMV 감염은 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스에 의해 유발되는 것과 유사한 단핵구증(mononucleosis) 유사 질병의 임상 증상을 동반한다. CMV가 심각한 이환율과 사망률을 유발하는 두 가지 중요한 임상 환경이 있다. 이는 선천적 1차 감염 및 면역억제된 성인에서 바이러스의 1차 또는 재활성화를 포함한다.

[0007] CMV의 면역학, 병리학 및 분자 생물학에 대한 최근의 이해에 따르면, CMV 관련 질환으로부터의 방어는 체액성 및 세포성 면역, 둘 모두에 의해 매개되는 바, CMV에 대한 이상적인 백신(vaccine)은 체액성 및 세포성 반응, 둘 모두를 유도해야 하는 것으로 제안되었다. 불행하게도, CMV 백신을 개발하고자 하는 최근의 시도는 제한된 성공을 보여주었다. 이러한 CMV 백신 전략법은 당단백질 B (gB), pp65 및 IE-1을 잠재적 표적으로 평가했으며, 약독화된 CMV Towne 균주 (문헌 [Jacobson, Sinclair et al. 2006]), 전장 항원 및 에피토프를 코딩하는(encoding) 재조합 바이러스 벡터 (문헌 [Bernstein, Reap et al. 2009], [Zhong and Khanna 2009], [La Rosa, Longmate et al. 2017]), DNA (문헌 [Wloch, Smith et al. 2008]), 치밀 소체 (문헌 [Pepperl-Klindworth,

Frankenberg et al. 2002]), 서브유닛 (문헌 [Drulak, Malinoski et al. 2000]) 백신 및 가장 최근, AD169 균주로부터 유래된 조건부 복제 결함 CMV 백신 (문헌 [Adler, Lewis et al. 2019])을 비롯한, 수많은 전달 플랫폼에 의해 전달되었다. 수년에 걸쳐, 방어 CD8 세포독성 T 세포 반응을 유발하기 위해서는 바이러스 항원은 외인성 전달 단백질이 아닌 핵산 형태로 (예컨대, 바이러스 벡터 전달 시스템 또는 DNA 플라스미드를 사용하여) 전달되어 발현된 폴리펩티드가 적절하게 프로세싱되고, T 세포에 제시될 수 있게 하여야 한다고 믿어져 왔다. 그러나, 이러한 백신 전달 플랫폼들은 대부분, 특히, 약독화 생백신 및 바이러스 벡터 기반 백신은 예컨대, 장기간 이론적으로 인지되는 건강상 위험 및 기존 면역과 같은 몇 가지 규제 문제를 제기하였다 (문헌 [Lee, Markham et al. 2012]).

[0008] 따라서, 면역원성 및 이의 안전성 문제를 비롯한, 선행 기술의 백신이 갖는 하나 이상의 결함을 극복하는, CMV 감염 및 재활성화를 예방하기 위한 백신 제제가 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0009] **요약**

[0010] 본 발명은 지속가능한 방어 면역 반응(protective immune response)을 유발할 수 있는 안전한 전달 기술을 이용하는 헤르페스바이러스, 및 특히 CMV, 면역요법 개발에 대한 필요를 해결한다. 본 발명은 발육 중인 태아, 및 면역상 손상된 개체, 예컨대, 고형 장기 및 조절 줄기 세포 이식체 수용자 및 진행성 HIV 질환 환자에서의 CMV 연관 손상 위험을 감소시키는 것에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 놀랍게도, 개체에게 투여된, 톨-유사 수용체를 활성화시키는, 다중 인간 CMV 항원을 함유하는 폴리토프 단백질, CMV 외피 당단백질 및 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함하는 백신 조성물이 지속가능한 방어 체액성 및 세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있다는 발견으로부터 이루어지게 되었다.

[0012] 따라서, 본 발명은 광범위하게 2개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터의 복수 개의 에피토프(epitope), 예컨대 세포독성 T-림프구 (CTL) 에피토프를 포함하는 하나 이상의 단리된 단백질(isolated protein), CMV 외피 단백질(envelope protein) 및 TLR 효능제를 포함하는 약제학적 조성물, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0013] 제1 측면에서, 본 발명은

[0014] (a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;

[0015] (b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및

[0016] (c) TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0017] 한 실시양태에서, 조성물은 대상체에게 투여되는 경우, 체액성 면역 반응(humoral immune response) 및 세포 매개 면역 반응, 예컨대 세포독성 T-림프구 면역 반응을 유도, 또는 유발할 수 있다. 이와 관련하여, 복수 개의 에피토프 중 하나 이상의 것은 CTL 에피토프일 수 있거나, 또는 이를 포함할 수 있다.

[0018] 적합하게, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질은 2개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 복수 개의 에피토프 중 2개 이상을 포함하는 폴리토프(polytope) 단백질이거나, 또는 이를 포함한다. 폴리토프 단백질은 개재(intervening) 아미노산 또는 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리토프 단백질은 프로테아좀 유리(libération) 아미노산 또는 아미노산 서열, 예컨대, AD, K 및/또는 R을 포함하는 상기 에피토프 중 적어도 둘 사이에 개재 아미노산 또는 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 적합하게, 에피토프는 인간 집단을 광범위하게 커버할 수 있도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 HLA 클래스 I 특이성 HLA-A1, -A2, -A3, -A11, -A23, -A24, -A26, -A29, -A30, -B7, -B8, -B18, -B27, -B35, -B38, -B40, -B41, -B44, -B51, -B57, -B58 및/또는 -CW6에 의해 제한된다. 더욱 특히, 에피토프는 HLA 클래스 I 특이성 HLA-A1, -A2, -A3, -A11, -A23, -A24, -B7, -B8, -B18, -B27, -B35, -B40, -B44, -B57, -B58 및/또는 -CW6에 의해 제한될 수 있다.

[0020] 적합하게, 에피토프는 하나 이상의 CMV 감염 단계, 예컨대, 감염, 복제 및/또는 패키징을 표적화하도록 선택된다. 한 실시양태에서, 에피토프는 pp50, pp65, pp 150, DNase 및/또는 IE-1로부터 유래되는 것이다. 더욱 특히, 에피토프는 표 1에 제시된 것 (즉, 서열 번호: 1-20)으로부터 선택되는 아미노산 서열, 이의 단편, 변이체 또는 유도체 또는 이의 임의의 조합을 가질 수 있다. 한 구체적인 실시양태에서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질은 표 1에 제시된 각각의 에피토프 아미노산 서열 (즉, 서열 번호: 1-20)을 포함한다. 이와 관련하여,

적합하게는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질은 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함할 수 있다.

표 1

표 1

CMVpoly20PL-NH 에피토프 서열 및 HLA 제한

에피토프 서열	HLA 제한	HCMV 항원
FPTKDVAL <u>AD</u> *	HLA B35	pp65
GPISHGHV <u>LKAD</u>	HLA A11	pp65
QYDPVAALF <u>AD</u>	HLA A24	pp65
YSEHPTFTS <u>QYAD</u>	HLA A1	pp65
TPRV <u>TGGAMR</u>	HLA B7	pp65
QIKVR <u>VDMVR</u>	HLA B8	IE-1
IP <u>SINVHHR</u>	HLA B35	pp65
TTVYPP <u>SSTAKAD</u>	HLA A3	pp150
RP <u>HERNGFTVLR</u>	HLA B7	pp65
DELRRK <u>MMYMAAD</u>	B8/B18/B44	IE-1
VTEHD <u>TLLYK</u>	HLA A1	pp50
NLVPMVAT <u>VK</u>	HLA A2	pp65
VLEETS <u>VMLK</u>	HLA A2	IE-1
AYA <u>QKIFKILAD</u>	A23/A24	pp65
TRATKM <u>QVIAD</u>	CW6	pp65
ARVYE <u>IKCRR</u>	HLA B27	DNAse
KEVNSQL <u>SLK</u>	HLA B40	IE-1
ELKRK <u>MIYMK</u>	HLA B8	IE-1
YILEETS <u>VMLK</u>	HLA A2	IE-1
QAI <u>RETVELK</u>	B57/B58	pp65

밑줄로 표시된 아미노산 서열은 프로테아좀 유리 서열을 나타낸다.

[0021]

[0022]

특정 실시양태에서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질은 스무 개 (20) 이하의 에피토프를 포함한다.

[0023]

적합하게, CMV 외피 단백질은 당단백질 B (gB), 당단백질 H (gH), 당단백질 L (gL), 당단백질 M (gM), 당단백질 N (gN), 당단백질 O (gO), 이의 변이체, 단편 또는 유도체 및 이의 임의의 조합으로 구성된 균으로부터 선택된다. 한 구체적인 실시양태에서, CMV 외피 단백질은 CMV 당단백질 B, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체이거나, 또는 이를 포함한다.

[0024]

적합하게, TLR9 효능제는 CpG ODN1018 및/또는 CpG ODN2006을 포함한다. 한 특정 실시양태에서, TLR9 효능제는 CpG ODN1018이거나, 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, TLR9 효능제는 MPL, CpG ODN1826, CpG ODN2006, CpG ODN2216 및/또는 CpG ODN2336이 아니다.

[0025]

적합하게, 본 측면의 제약 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체(carrier), 희석제, 또는 부형제(excipient)를 추가로 포함한다.

[0026]

일부 실시양태에서, 약제학적 조성물 예컨대, TLR9 효능제(agonist) 이외에도 하나 이상의 면역자극성 분자 또는 애주번트(adjuvant)를 추가로 포함한다.

- [0027] 적합하게, 본 측면의 제약 조성물은 대상체에서 CMV 감염과 연관된 질환, 장애 또는 병태의 예방적 또는 치료학적 치료 또는 예방에 사용하기에 적합한 면역원성 조성물이다.
- [0028] 제2 측면에서, 본 발명은 CMV 또는 CMV 감염에 대한 방어 면역 반응을 유발하기 위한 제1 측면의 제약 조성물을 포함하는 백신을 제공한다.
- [0029] 제3 측면에서, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의
- [0030] (a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2 개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;
- [0031] (b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및
- [0032] (c) TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 CMV 감염을 예방 또는 치료하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0033] 제4 측면에서, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의
- [0034] (a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2 개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;
- [0035] (b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및
- [0036] (c) TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 면역 반응을 유발하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 항원에 대한 면역 반응을 유발하는 방법을 제공한다.
- [0037] 한 실시양태에서, 면역 반응은 체액성 면역 반응 및/또는 세포 매개 면역 반응, 예컨대, 세포독성 T-림프구 면역 반응이거나, 또는 이를 포함한다.
- [0038] 본 측면의 방법은 적합하게 대상체에서 CMV 또는 CMV 감염에 대한 방어 면역 반응을 유발한다.
- [0039] 제5 측면에서, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의
- [0040] (a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2 개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;
- [0041] (b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및
- [0042] (c) TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 CMV 감염에 대한 유도하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 감염에 대한 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0043] 본 측면의 방법은 적합하게 CMV 감염에 대한 방어 면역 반응을 유도한다.
- [0044] 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 적합하게 CMV 감염에 대한 체액성 면역 반응 및/또는 세포 매개 면역 반응, 예컨대, 세포독성 T-림프구 면역 반응을 유도한다.
- [0045] 적합하게, 상기 언급된 3개의 측면에 따라, 대상체는 포유동물이다. 더욱 바람직하게, 대상체는 인간이다.
- [0046] 제3, 제4 및 제5 측면의 방법을 참조하면, 제약 조성물은 적합하게는 제1 측면의 것이다
- [0047] 제6 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 1-20에 제시된 각각의 에피토프 아미노산 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 단리된 단백질에 관한 것이다.
- [0048] 적합하게, 단리된 단백질은 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성된다.
- [0049] 특정 실시양태에서, 단리된 단백질은 상기 언급된 3개 측면의 방법에서 사용하기 위한 것이다.
- [0050] 제7 측면에서, 본 발명은 제6 측면의 단리된 단백질을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0051] 제8 측면에서, 본 발명은 제7 측면의 단리된 핵산을 포함하는 유전자 작제물(construct)에 관한 것이다.
- [0052] 제9 측면에서, 본 발명은 제7 측면의 단리된 핵산 및/또는 제8 측면의 유전자 작제물을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0053] 제10 측면에서, 본 발명은 (i) 제9 측면의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)에서 배양된 상기 숙주

세포로부터 상기 단리된 단백질을 단리시키는 단계를 포함하는, 제6 측면의 단리된 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0054] 본원에서 사용되는 바, '하나'('a' 및 'an')라는 부정관사는 본원에서 단수 또는 복수의 요소들 또는 특징들을 지칭하거나, 또는 포함하는 것으로 사용되며, "하나" 또는 "단일" 요소 또는 특징을 의미하거나, 또는 정의하는 것으로 간주되어서는 안된다. 예를 들어, "하나"의 단백질은 한 단백질, 하나 이상의 단백질 또는 복수 개의 단백질을 포함한다.

[0055] 문맥상 달리 요구하지 않는 한, "포함하다(*comprise*)", "포함하다(*comprises*)" 및 "포함하는(*comprising*)"이라는 용어, 또는 유사 용어들은 비배타적 포함을 의미하며, 요소들 또는 특징들의 언급된 목록은 언급 또는 열거된 요소들만을 포함하는 것이 아니라, 언급 또는 열거되지 않은 다른 요소들 또는 특징들도 포함할 수 있다.

[0056] 아미노산 서열, 예컨대, 단리된 단백질과 관련하여 "본질적으로 ~으로 구성됨"이란, N- 또는 C-말단에서 추가의 1개, 2개 또는 3개의 아미노산을 함께 갖는 언급된 아미노산 서열을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도면의 간단한 설명

본 발명이 보다 쉽게 이해되고, 실제 효과가 발휘될 수 있도록 하기 위해, 본 발명의 바람직한 실시양태는 단지 예로서 첨부 도면을 참조하여 설명될 것이다.

도 1: CMVpoly20PL-NH 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열.

도 2: CMVpoly20PL-NH 단백질 발현, 세포 용해, 봉입체 세척 및 단백질 정제의 SDS-PAGE 겔 분석: CMVpoly20PL-NH를 코딩하는 DNA 서열을 IPTG 유도성 플라스미드 pJexpress 404에 클로닝하고, 단백질 발현을 위해 화학적으로 적격한 *E. coli*(*E. coli*) BL21-codonPlus (DE3) RP 숙주로 형질전환하였다. CMVpoly20PL-NH 단백질 발현은 mM/mL의 IPTG를 4시간 동안 첨가하여 수행하였다. 4시간 후, SDS-PAGE에서 비-유도 (ui) 및 유도 (ind) 샘플을 분석하여 단백질 유도 발현 수준을 측정하였다 (a). CMVpoly20PL-NH의 용해도를 측정하기 위해, 세포를 용해하고, 상청액 및 펠릿 분획을 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하였다 (b). 단백질이 봉입체 (IB)에 존재하기 때문에, 단백질을 TE 완충제로, 이어서, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 4M 우레아 pH 7.5를 함유하는 완충제로 3회 세척하고 (W1 내지 W3), 단백질을 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8M 우레아 pH 5.5 완충제 중에 가용화시킨 후, 이어서, 상청액 (sup) 및 펠릿 분획을 SDS-PAGE 상에서 분석하였다 (c). IB 가용화 후, SP-세파로스(Sepharose) 및 Q-세파로스 크로마토그래피 기술을 이용하여 CMVpoly20PL-NH 단백질을 정제한 후, 정제된 단백질을 25 mM 글리신 pH 3.8 완충제에 대해 투석하고, 무스탕(Mustang) E 막 (D & E)을 통해 통과시켰다.

도 3: CMVpoly20PL-NH의 단백질 무손상 질량 분석: 단백질 샘플을 2% 아세트니트릴 및 0.1% 포름산을 이용하여 대략 0.25 ug/uL 농도로 희석시켰다. 샘플 (5 μ l)을 칼럼에 주입하였다. 칼럼에서 단백질을 탈염하고, 선형 용매 구배 (A: 99.9% 물 + 0.1% 포름산; B: 99.9% 아세트니트릴 + 0.1% 포름산)를 사용하여 칼럼으로부터 용출시켰다. 17,500 분해능으로 600 m/z에서 3800 m/z까지 스캐닝된 Q 이그제큐티브(Q Exactive)에서 용리체에 대해 양이온 전자분무 MS 분석을 수행하였다. 단백질 액체 크로마토그래피 용출 프로파일에 대해 단백질 ESI 스펙트럼 평균을 구하였다. 다중 하전된 단백질 스펙트럼을 써모 프로테인 디컨볼루션 2.0(Thermo Protein Deconvolution 2.0) 소프트웨어에 의해 디컨볼루션하였다.

도 4: CMVpoly20PL-NH 시험관내(in vitro) 면역원성 평가: 대수증식기(log phase)에서의 CMVpoly 단백질 T1 (HLA A2) 세포의 면역원성을 측정하기 위해, 혈청 무함유 RPMI 배지로 배양물을 세척한 후, 1시간 동안 25 μ g의 CMVpoly20PL-NH 단백질을 펄싱(pulsing)하였다. CMVpoly20PL-NH 펄싱된 T1 세포를 세척한 후, 10% FCS를 함유하는 RPMI 중에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 세포를 세척하고, 1 CD8+ T 세포 : 1 APC 및 4 CD8+ T 세포 : 1APC 비로 CMV HLA A2 제한 에피토프 NLVPMVATV(NLV)-특이적 CD8+ T 세포에 노출시키고, 4시간 동안 인큐베이션시켰다. ICS 분석에 의해 세포내 IFN- γ 발현을 측정하였다. NLV 펩티드로 펄싱된 T1 세포 및 펄싱되지 않은 T1 세포를 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용하였다.

도 5: 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 CpG 1018 단독으로, 또는 다양한 형태의 MPLA와 함께 이용하여 제제화된 CMV 백신의 면역원성 평가: CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g) 단백질을 PHAD (25 μ g) 및 CpG 1018 (50 μ g) (G1V), 3D-PHAD (25 μ g) 및 CpG 1018 (50 μ g) (G2V), 3D(6-아실)-PHAD (25 μ g) 및 CpG 1018 (50 μ g) (G3V)과 혼합하여 또는 CpG 1018 (50 μ g) 단독으로 (G4V) CMV 백신 제제를 제조하였다. 본 발명자들은 양성

대조군으로서 MPL (25 μ g) 및 CpG 1826 (50 μ g) (G5V)과 함께 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g) 단백질을 제제화하였고, 본 발명자들은 음성 대조군으로서 애주번트 단독으로 (G6C 내지 G10C) 제제화하였다. 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 0일째 피하로(subcutaneously) 면역화하고, 21일째 동일한 백신 제제 (V) 또는 애주번트 단독으로 (C) 부스팅한 후, 28일째 희생시켜 ICS 검정법을 이용하여 CMV-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응 및 ELISA를 이용하여 체액성 면역 반응을 평가하였다 (a). 28일째 비장세포를 제조한 후, 브레펠딘 A의 존재하에 각 CMV CD8+ T 세포 펩티드 (HLA A24 제한 펩티드-QYD & AYA)로 또는 224개의 펩티드 (11개의 aa가 중첩되는 15 mer) 풀로 구성된 CMV gB pepmix로 자극시키고, ICS 검정법을 이용하여 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD4+ T 및 CD8+ T 세포를 측정하였다. (b)는 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 CMV CD8+ T 세포 펩티드로의 자극 후의 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 생체의(ex vivo) 비율(%)을 보여주는 것이다. 28일째, 백신접종된 마우스 및 대조군 마우스로부터의 비장세포를 HLA A24 제한 펩티드로 자극시킨 후, 10일 동안 배양하였다. 10일째, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다. (c)는 시험관내 CMV HLA A24 제한 CD8+ T 세포 펩티드로의 자극 후 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이고, (d)는 CMV 백신 제제로 면역화된 HLA A24 마우스로부터의 시험관내 확장된 CMV-특이적 CD8+ T 세포에 의한 IFN- γ , TNF- α , CD107a 및 IL-2 사이토카인의 발현을 보여주는 것이다. (e 및 f)는 CMV 백신으로 또는 애주번트 단독으로 면역화한 후, IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 및 CD8+ T 세포의 생체의 비율(%)을 보여주는 것이다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ns= 비유의적(not significant) (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 6: 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 CMV-특이적 체액성 면역 반응 평가: 0일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g) 단백질을 PHAD (25 μ g) 및 CpG 1018 (50 μ g) (G1V), 3D-PHAD (25 μ g) 및 CpG 1018 (50 μ g) (G2V), 3D(6-아실)-PHAD (25 μ g) 및 CpG 1018 (50 μ g) (G3V), CpG 1018 (50 μ g) 단독 (G4V), MPL (25 μ g) 및 CpG 1826 (50 μ g) (G5V)과 함께 또는 애주번트 단독으로 (G6C 내지 G10C) 백신접종하고, 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 부스터 용량을 제공하였다. 이어서, 28일째 마우스를 희생시켜 ELISA를 사용하여 체액성 면역 반응을 평가하였다. (a 및 b)는 21일째 (1차 면역화) 및 28일째 (부스터)의 A24 트랜스제닉 마우스의 혈청 샘플 중의 CMV gB-특이적 항체 역가를 보여주는 것이고, (c)는 21 및 28일째, HLA A24 마우스로부터 수득된 풀링된 혈청 샘플 중 CMV gB-특이적 항체 이소타입 (IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 우세도를 보여주는 것이다.

도 7: CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제로의 다중 HLA 트랜스제닉 마우스의 백신접종 후 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응 평가. 0일째 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스 (HLA A1, HLA 2, HLA A24, HLA B8 및 HLA B35)를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째, 마우스 꼬리를 출혈시키고, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28일째, 마우스를 희생시켜 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서의 CMV-특이적 CD8+ T 세포 면역 반응을 평가하였다 (a). 28일째, 마우스를 희생시키고, 비장세포를 제조한 후, 이어서, 브레펠딘 A의 존재하에 각 CMV CD8+ T 세포 펩티드 (HLA A1-VTE & YSE; HLA A2-NLV, VLE & YIL; HLA A24-QYD & AYA; HLA B8-QIK, ELR & ELK; HLA B35-FPT & IPS)로 자극시키고, ICS 검정법을 이용하여 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포를 측정하였다. (b)는 CMV CD8+ T 세포 펩티드로의 자극 후, IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 생체의 비율(%)을 보여주는 것이다. 시험관내 자극받은 비장세포에서의 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응 평가. 면역화 후, 비장세포를 시험관내에서 각 CMV CD8+ T 세포 펩티드로 자극시키고, 세포를 10일 동안 배양하였다. 10일째, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다. (c)는 CMV CD8+ T 세포 펩티드로의 시험관내 자극 후, IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (d)는 HLA 트랜스제닉 마우스 1마리로부터의 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포 (생체의 및 시험관내 확장)의 빈도의 대표적인 FACS 플롯을 보여주는 것이다. (e)는 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제로 면역화된 HLA 트랜스제닉 마우스로부터의 생체의 및 시험관내 확장된 CMV-특이적 CD8+ T 세포에 의한 IFN- γ , TNF- α , CD107a 및 IL-2 사이토카인의 발현을 보여주는 것이다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타낸다. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ns= 비유의적 (스튜던트 t 검정에 의해 결정).

도 8: CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제로의 다중 HLA 트랜스제닉 마우스의 백신접종 후의 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 반응 평가. 0일째, 인간 HLA 트랜스제닉 마우스 (HLA A1, HLA 2, HLA A24, HLA B8 및 HLA B35)를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째, 마우스 꼬리를 출혈시키고, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28일째, 마우스를 희생시켜 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서의 CMV gB-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 면역 반응을 평가하였다 (a). 28일째, 마우스를 희생시키고, 비장세포를 제조한 후, 이어서, 브레펠딘 A의 존재하에 224개의 펩티드 (11개의 aa가 중첩되는 15 mer) 풀로 구성된 CMV gB pepmix로 자극시키고, ICS 검정법을 이용하여 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+

T 세포를 측정하였다. (a)는 다양한 HLA 트랜스제닉 마우스에서의 CMV gB pepmix로의 자극 후, IFN- γ 생산 CD4+ T 세포의 생체의 비율(%)을 보여주는 것이다. 시험관내 자극받은 비장세포에서의 CMV gB-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응 평가. 면역화 후, 비장세포를 시험관내에서 224개의 펩티드 (11개의 aa가 중첩되는 15 mer) 풀로 구성된 CMV gB pepmix로 자극시키고, 세포를 10일 동안 배양하였다. 10일째, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다. (b)는 CMV gB pepmix로의 시험관내 자극 후, IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (c)는 HLA 트랜스제닉 마우스 1마리로부터의 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 (생체의 및 시험관내 확장)의 빈도의 대표적인 FACS 플롯을 보여주는 것이다. (d)는 생체의 및 시험관내 확장된 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포에 의한 IFN- γ , TNF- α , CD107a 및 IL-2 사이토카인의 발현을 보여주는 것이다. (e)는 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제로 면역화된 모든 HLA 트랜스제닉 마우스로부터의 시험관내 확장된 CMV gB-특이적 CD8+ T 세포의 IFN γ 단독 발현 (막대 그래프) 또는 IFN- γ , TNF- α , CD107a 및 IL-2 사이토카인 발현 (파이 차트) 또는 FACS 플롯을 보여주는 것이다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ns= 비유의적 (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 9: 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서의 CMV-특이적 체액성 면역 반응 평가. 0일째 인간 HLA 트랜스제닉 마우스 (HLA A1, HLA 2, HLA A24, HLA B8 및 HLA B35)를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PLNH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째, 마우스 꼬리를 출혈시키고, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28일째, 마우스를 희생시켜 ELISA를 사용하여 CMV gB-특이적 체액성 면역 반응을 평가하였다. (a 및 b)는 21일째 (1차 면역화) 모든 인간 HLA 트랜스제닉 마우스의 혈청 샘플 중 CMV gB-특이적 항체 역가 및 풀링된 혈청 샘플 중 CMV gB-특이적 항체 이소타입 (IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 우세도를 보여주는 것이다. (c 및 d)는 28일째 모든 인간 HLA 트랜스제닉 마우스의 혈청 샘플 중 CMV gB-특이적 항체 역가 및 풀링된 혈청 샘플 중 CMV gB-특이적 항체 이소타입 (IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 우세도를 보여주는 것이다. (e 및 f)는 섬유모세포의 AD 169 감염 및 성체 망막 색소 상피 세포 (ARPE-19)의 TB40/E 감염을 중화시키는, 인간 HLA 트랜스제닉 마우스의 면역화 후 유도된 50% 중화 항체 역가를 보여주는 것이다. 28일째, 개체 군으로부터의 혈청을 풀링하고, 연속 희석하고, CMV AD169 또는 TB40/E 균주와 함께 사전 인큐베이션 시켰다. MRC-5 또는 ARPE 19 세포를 혈청 처리된 바이러스로 감염시키고, IE-1/IE-2 미세중화 검정법을 이용하여 바이러스 감염도를 측정하였다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타낸다.

도 10: HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기 간 지속가능한 CMV 특이적 면역 평가. 0일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째, 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28일째 및 42일째 및 210일째 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 CMV-특이적 T 세포 및 체액성 면역 반응을 평가하였다.

도 11: HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기 간 지속가능한 CMV 특이적-CD8+ T 세포 면역 평가: 0일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21 및 42일째, 마우스 꼬리를 출혈시키고, 21 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 종단 분석을 수행하여 CMV-특이적 CD8+ T 세포 면역 반응을 평가하였다. 희생 당일, 비장세포를 제조한 후, 이어서, 브레펠딘 A의 존재하에 각 CMV CD8+ T 세포 펩티드 (HLA A24-QYD & AYA)로 자극시키고, ICS 검정법을 이용하여 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포를 측정하였다. 시험관내 자극받은 비장세포에서의 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응 평가. 면역화 후, 비장세포를 시험관내에서 각 CMV CD8+ T 세포 펩티드 (HLA A24-QYD & AYA)로 자극시키고, 세포를 10일 동안 배양하였다. 10일째, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다. (a 및 b)는 CMV CD8+ T 세포 펩티드로의 생체의 및 시험관내 자극 후, IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (c)는 다양한 조합의 IFN γ ⁺/TNF⁺/IL2⁺ 사이토카인으로 구성된 반응 비율을 생성하는 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 심플리파이드 프리젠테이션 오브 인크레더블리 콤플렉스 이벨루이션스(simplified presentation of incredibly complex evaluations: SPICE) 분석을 보여주는 것이다. Arc는 개별 사이토카인: IFN γ (적색), TNF (녹색) 및 IL2 (청색)를 생산하는 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 비율을 나타낸다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ns= 비유의적 (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 12: HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기 간 지속가능한 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 면역 평가. 0일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50

μg)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μg) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μg)로 면역화시켰다. 21일째, 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 면역 반응을 평가하였다. 희생 당일, 비장세포를 제조한 후, 이어서, 브레펠딘 A의 존재하에 224개의 펩티드 (11개의 aa가 중첩되는 15 mer) 풀로 구성된 CMV gB pepmix로 자극시키고, ICS 검정법을 이용하여 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포를 측정하였다. 시험관내 자극 후 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 반응 평가. 면역화 후, 비장세포를 시험관내에서 224개의 펩티드 (11개의 aa가 중첩되는 15 mer) 풀로 구성된 CMV gB pepmix로 자극시키고, 세포를 10일 동안 배양하였다. 10일째, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다. (a 및 b)는 생체의 및 시험관내 자극 후, IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (c)는 다양한 조합의 IFN γ^+ /TNF $^+$ /IL2 $^+$ 사이토카인으로 구성된 반응 비율을 생성하는 CMV-특이적 CD4+ T 세포의 SPICE 분석을 보여주는 것이다. Arc는 개별 사이토카인: IFN γ (적색), TNF (녹색) 및 IL2 (청색)를 생산하는 CMV-특이적 CD4+ T 세포의 비율을 나타낸다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ns= 비유의적 (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 13: HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 배증심 B 세포 반응 평가: 0일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μg)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μg) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μg)로 면역화시켰다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 종단 분석을 수행하여 배증심 B 세포 반응 면역 반응을 평가하였다. 희생 당일, 비장 및 림프절로부터 단일 세포 현탁액을 제조한 후, PE 접합된 항-B220, FITC 접합된 항-GL7 및 APC 접합된 항-CD95 항체로 염색하였다. 세포를 FACS에서 분석하여 배증심 B 세포의 빈도를 측정하였다. (a)는 비장에서 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 CMV 백신 또는 CpG 1018 단독으로 백신접종된 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 배증심 B 세포의 빈도를 보여주는 것이다. (b)는 28 및 49일째 한 백신접종 및 대조군 마우스로부터의 대표적인 FACS 플롯을 보여주는 것이다. (c)는 림프절에서 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 CMV 백신 또는 CpG 1018 단독으로 백신접종된 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 배증심 B 세포의 빈도를 보여주는 것이다. (d)는 28 및 49일째 한 백신접종 및 대조군 마우스로부터의 대표적인 FACS 플롯을 보여주는 것이다.

도 14: HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 CMV gB-특이적 항체 분비 B 세포 반응 평가: 0일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μg)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μg) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μg)로 면역화시켰다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 CMV gB-특이적 항체 분비 B 세포 면역 반응을 평가하였다. 희생 당일, 비장세포를 제조한 후, 이어서, ELISpot 검정법을 이용하여 gB-특이적 항체를 분비할 수 있는 이의 능력에 대해 평가하였다. a 및 b는 생체의 및 기억 B 세포 ELISpot 분석에 따른, 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 CMV 백신 제제 (V) 또는 CpG 1018 (C) 대조군으로 면역화된 마우스에서 3 x 10⁵개의 비장세포당 항체 분비 B 세포의 개수를 보여주는 것이다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ****, P < 0.0001 ns = 비유의적 (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 15: HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 CMV gB-특이적 항체 반응 평가. 0일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μg)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μg) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μg)로 면역화시켰다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 ELISA를 이용하여 CMV gB-특이적 항체 반응을 평가하였다. 희생 당일, 혈청 샘플을 수집하고, ELISA를 이용하여 분석하여 gB-특이적 항체 역가를 측정하였다. (a)는 21, 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 CMV 백신 (V) 또는 CpG 1018 단독 (C)으로 면역화된 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스의 혈청 샘플에서의 CMV gB-특이적 항체 역가의 선 그래프를 보여주는 것이다. (b)는 21, 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 CMV 백신 제제 또는 위약으로의 면역화 후에 유도된 CMV-gB 특이적 면역글로불린 이소타입 (폴링된 혈청 샘플 중) (IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 우세도를 보여주는 것이다. (c 및 d)는 21, 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 CMV 백신 제제 또는 위약으로의 면역화 후에 유도된 50% 중화 항체 역가를 보여주는 것이다. 섬유모세포에서 CMV AD 169 균주, 및 ARPE 19 세포에서 CMV TB40/E 균주에 대한 IE-1 염색에 의해 중화 항체 반응을 측정하였다. (e 및 f)는 CMV AD169 균주로 감염된 섬유모세포에 결합하는 CMV 백신 또

는 위약으로의 면역화 후에 유도된 gB-특이적 항체의 빈도의 유세포 분석법에 의한 분석을 보여주는 것이다.

도 16: HLA A1 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 CMV 특이적 면역 확인: 0일째 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 49 및 84일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 CMV-특이적 T 세포 및 체액성 면역 반응을 평가하였다.

도 17: HLA A1 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 CMV 특이적-CD8+ T 세포 면역 평가. 0일째 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 49, 84, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 CMV-특이적 CD8+ T 세포 면역 반응을 평가하였다. 희생 당일, 단일 세포 현탁액을 제조한 후, 브레펠딘 A의 존재하에 각 CMV CD8+ T 세포 펩티드 (HLA A1-VTE & YSE)로 자극시키고, ICS 검정법을 이용하여 IFN- γ 생산 CMV 특이적 CD8+ T 세포를 측정하였다. 시험관내 자극 후 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응 평가. 면역화 후, 비장세포를 시험관내에서 각 CMV CD8+ T 세포 14개의 펩티드 (HLA A1-VTE & YSE)로 자극시키고, 세포를 10일 동안 배양하였다. 10일째, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다. (a 및 b)는 생체의 이후의 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (c) CMV CD8+ T 세포 펩티드로의 시험관내 자극 후 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (d)는 CMV CD8+ T 세포 펩티드로의 시험관내 자극 후 유세포 분석법 및 세포내 사이토카인 염색에 의해 측정된 다중 사이토카인 (CD107a⁺, IFN γ ⁺, TNF⁺ 또는 IL2⁺)을 분비할 수 있는 CMV-특이적 CD8+ T 세포의 능력을 보여주는 것이다. 파이 차트는 49, 84, 203 및 217일째 4개의 사이토카인 (담청색), 3개의 사이토카인 (적색), 2개의 사이토카인 (녹색) 및 1개의 사이토카인 (보라색)을 나타낸다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, P < 0.05. ns= 비유의적 5 (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 18: HLA A1 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 면역 평가. 0일째 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 49 및 84일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 면역 반응을 평가하였다. 희생 당일, 비장세포를 제조한 후, 이어서, 브레펠딘 A의 존재하에 224개의 펩티드 (11개의 aa가 중첩되는 15 mer) 풀로 구성된 CMV gB pepmix로 자극시키고, ICS 검정법을 이용하여 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD4+ T 세포를 측정하였다. 시험관내 자극받은 비장세포에서의 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 반응 평가. 면역화 후, 비장세포를 시험관내에서 224개의 펩티드 (11개의 aa가 중첩되는 15 mer) 풀로 구성된 CMV gB pepmix로 자극시키고, 세포를 10일 동안 배양하였다. 10일째, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다. (a 및 b)는 생체의 후, IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (c)는 CMV gB pepmix로의 시험관내 자극 후 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD4+ T 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. (d)는 CMV gB pepmix로의 비장세포의 시험관내 자극 후 유세포 분석법 및 세포내 사이토카인 염색에 의해 측정된 다중 사이토카인 (CD107a⁺, IFN γ ⁺, TNF⁺ 또는 IL2⁺)을 분비하는 CMV-특이적 CD4+ T 세포의 능력을 보여주는 것이다. 파이 차트는 49, 84, 203 및 217일째 4개의 사이토카인 (담청색), 3개의 사이토카인 (적색), 2개의 사이토카인 (녹색) 및 1개의 사이토카인 (보라색)을 나타낸다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, P < 0.05. ns= 비유의적 5 (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 19: HLA A1 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 배중심 및 항체 분비 B 세포 반응의 평가: 0일째 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g)로 면역화시켰다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 28 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 49 및 84일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 백신 유도성 배중심 B 세포 및 CMV gB30 특이적 항체 분비 B 세포 반응을 평가하였다. 희생 당일, 비장으로부터 단일 세포 현탁액을 제조한 후, PE 접합된 항-B220, FITC 접합된 항-GL7 및 APC 접합된 항-CD95 항체로 염색하였다. 세포를 FACS에서 분석하여 배중심 B 세포의 빈도를 측정하였다. (a 및 b)는 비장에서 49, 84, 204 및 217일째 CMV 백신 (V) 또는 CpG 1018 단독 (C)으로 백신접종된 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스에서의 배중심 B 세포의 빈도를 보여주는 것이다. (b)는 49 및 84일째 한 백신접종 및 대조군 마우스로부터의 대표적인 FACS 플롯을 보여주는 것이다. (c 및 d)는 생체의 B 세포 ELISpot 분석에 따른, 49, 84 203 및 217일째

CMV 백신 제제 (V) 또는 CpG 1018 (C) 대조군으로 면역화된 마우스로부터의 3×10^5 개의 비장세포당 항체 분비 B 세포의 개수를 보여주는 것이다. 항체 분비 기억 B 세포를 측정하기 위해, 비장세포를 시험관내에서 4일 동안 재조합 마우스 IL2 및 R848로 자극시킨 후, CMV gB-특이적 항체를 분비할 수 있는 이의 능력을 측정하였다. (e 및 f)는 기억 B 세포 ELISpot 분석에 따른, 49, 84, 203 및 217일째 CMV 백신 제제 (V) 또는 CpG 1018 (C) 대조군으로 면역화된 마우스로부터의 3×10^5 개의 비장세포당 항체 분비 B 세포의 개수를 보여주는 것이다. 오차 막대는 평균 \pm SEM을 나타내고, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$ ns = 비유의적 (스튜던트 t 검정에 의해 결정)인 것을 나타낸다.

도 20: HLA A1 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 CMV gB-특이적 항체 반응 평가. 0일째 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 (50 μ g)과 함께 제제화된 CMV gB (5 μ g) 및 CMVpoly20PL-NH (30 μ g) 로 면역화시켰다. 21 및 42일째, 마우스 꼬리를 출혈시키고, 21 및 42 및 210일째, 동일한 백신 제제로 부스팅하였다. 49, 84, 203 및 217일째 마우스를 희생시켜 종단 분석을 수행하여 ELISA를 이용하여 CMV gB-특이적 항체 반응을 평가하였다. 희생 당일, 혈청 샘플을 수집하고, ELISA를 이용하여 분석하여 gB-특이적 항체 역가를 측정하였다. (a)는 21, 28, 42, 49, 84, 203 및 217일째 CMV 백신 (V) 또는 CpG 1018 단독 (C)으로 면역화된 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스의 혈청 샘플에서의 CMV gB-특이적 항체 역가의 선 그래프를 보여주는 것이다. (b)는 21, 28, 42, 49, 84, 203 및 217일째 CMV 백신 제제 또는 위약으로의 면역화 후에 유도된 CMV-gB 특이적 면역글로불린 (폴링된 혈청 샘플 중) 이소타입 (IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 우세도를 보여주는 것이다.

서열의 간단한 설명

서열 번호: 1 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA B35)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; FPTKDVALL).

서열 번호: 2 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA A11)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; GPISHGHVLLK).

서열 번호: 3 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA A24)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; QYDPVAALF).

서열 번호: 4 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA A1)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; YSEHPTFTSQY).

서열 번호: 5 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA B7)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; TPRVTGGGAM).

서열 번호: 6 = 표 1에서 IE-1 에피토프 (HLA B8)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; QIKVRVDMV).

서열 번호: 7 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA B35)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; IPSINVHHY).

서열 번호: 8 = 표 1에서 pp150 에피토프 (HLA A3)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; TTVYPPSSTAK).

서열 번호: 9 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA B7)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; RIPHERNGFTVL).

서열 번호: 10 = 표 1에서 IE-1 에피토프 (HLA B8/B18/B44)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; DELRRKMMYM).

서열 번호: 11 = 표 1에서 pp50 에피토프 (HLA A1)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; VTEHDTLLY).

서열 번호: 12 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA A2)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; NLVPMVATV).

서열 번호: 13 = 표 1에서 IE-1 에피토프 (HLA A2)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시;

VLEETSVML).

서열 번호: 14 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA A23/A24)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; AYAQKIFKIL).

서열 번호: 15 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA CW6)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; TRATKMQVI).

서열 번호: 16 = 표 1에서 DNase 에피토프 (HLA B27)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; ARVYEIKCR).

서열 번호: 17 = 표 1에서 IE-1 에피토프 (HLA B40)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; KEVNSQLSL).

서열 번호: 18 = 표 1에서 IE-1 에피토프 (HLA B8)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; ELKRKMIYM).

서열 번호: 19 = 표 1에서 IE-1 에피토프 (HLA A2)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; YILEETSVML).

서열 번호: 20 = 표 1에서 pp65 에피토프 (HLA B57/B58)의 아미노산 서열 (에피토프 서열 검정색으로 표시; QAIRETVEL).

서열 번호: 21 = 도 1에서 CMVpoly20PL-NH 폴리토프 단백질의 아미노산 서열.

서열 번호: 22 = 도 1에서 CMVpoly20PL-NH 폴리토프 단백질의 뉴클레오티드 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058]

본 발명의 상세한 설명

[0059]

본 발명은 적어도 부분적으로는 복수 개의 CMV 에피토프를 포함하는 단리된 단백질, CMV 외피 단백질 및 TLR9 효능제를 포함하는 단백질 기반 백신이 개체에게 투여될 때 그 안에서 방어 및 지속가능한 면역 반응을 유발할 수 있다는 예상 밖의 발견에 입각한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명의 백신 제제는 유리하게는 장수명 배종심 B 세포, 장기간 지속가능한 CMV-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포, 항체 분비 B 세포 반응 및 중화 항체 반응 생성을 유도한다.

[0060]

한 측면에서, 본 발명은

[0061]

(a) 복수 개의 에피토프를 포함하는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질로서, 여기서, 복수 개의 에피토프는 2 개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질;

[0062]

(b) CMV 외피 단백질, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체; 및

[0063]

(c) TLR 효능제, 예컨대, TLR9 효능제를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0064]

"단리된"이란, 자연 상태에서 제거되었거나 인간이 조작한 물질을 의미한다. 단리된 물질은 이의 자연 상태에서 일반적으로 동반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수 있거나, 이의 자연 상태에서 일반적으로 동반되는 성분과 함께 인공 상태가 되도록 조작될 수 있다.

[0065]

본 발명의 맥락에서, "외인성" 단백질 또는 폴리에피토프 단백질은 후속하여 투여 대상이 되는 동물의 외부에서 생산된 단백질이다. 효과적으로, 외인성 단백질은 동물에게 단백질을 코딩하는 핵산 또는 유전자 작제물 전달 한 후 동소에서(예컨대, 동물의 세포 또는 조직에 의해) 동물에 의해 생산되거나 발현되기보다는 동물에게 투여 되거나 투여될 수 있다. 바람직한 외인성 단백질은 박테리아 숙주 세포와 같은 생체외 단리된 숙주 세포에서 생산된 재조합 단백질이다.

[0066]

"단백질"은 당업계에 널리 공지된 천연 및/또는 비천연 아미노산, D- 또는 L-아미노산을 포함하는 아미노산 중합체를 의미한다.

[0067]

"펩티드"란, 오십 개 (50) 이하의 아미노산을 갖는 단백질이다.

[0068]

"폴리펩티드"란, 오십 개 (50) 초과 아미노산을 갖는 단백질이다.

- [0069] 이의 단편, 변이체 및 유도체를 포함한, 본원에 기술된 단리된 단백질은 화학적 합성, 제조합 DNA 기술 및 펩티드 단편을 생산하기 위한 단백질 분해 절단을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 생산될 수 있다.
- [0070] 화학적 합성에는 고체상 및 용액상 합성이 포함된다. 상기 방법은 당업계에 널리 공지되어 있지만, 문헌 [Chapter 9 of SYNTHETIC VACCINES Ed. Nicholson (Blackwell Scientific Publications) and Chapter 15 of CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)]에 제공된 바와 같은 화학적 합성 기술의 예를 참조한다. 이와 관련하여, 국제 공개 WO 99/02550 및 국제 공개 WO 97/45444 또한 참조한다.
- [0071] 제조합 단백질은 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989)], 특히 [Sections 16 and 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)], 특히 [Chapters 10 and 16; and CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)], 특히 [Chapters 1, 5 and 6]에 기술된 바와 같은 표준 프로토콜을 사용하여 당업자에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 전형적으로, 제조합 단백질 제조는 적합한 숙주 세포에서 단백질을 코딩하는 핵산의 발현을 포함한다.
- [0072] 본원에서 사용되는 바, 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 이의 단편, 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정기를 지칭한다.
- [0073] 특정 실시양태에서, 에피토프는 세포독성 T-림프구 (CTL) 에피토프이거나, 또는 이를 포함한다. "CTL 에피토프"는 적절한 MHC 클래스 I 분자의 맥락에서 에피토프를 제시하는 표적 세포를 인식하기 위해 세포독성 T 림프구를 자극하거나, 또는 활성화시킬 수 있는 펩티드 또는 펩티드의 아미노산 서열이다. 표적 세포의 인식은 사이토카인 생산 (예컨대, IFN- γ , IL-2, MIP-1 β 및/또는 TNF), 세포 표면 마커 발현 변경 (예컨대, CD107a) 및/또는 표적 세포의 용해 및/또는 사멸을 포함하거나, 또는 결과로 이를 초래할 수 있다. 이를 감안하면, 본원에 기술된 조성물은 대상체에게 투여되는 경우, 세포독성 T-림프구 면역 반응을 유도, 또는 유발할 수 있다.
- [0074] 또 다른 실시양태에서, 폴리에피토프 단백질을 비롯한 단리된 단백질은 하나 또는 복수 개의 CD4⁺ 헬퍼 T 세포 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프를 추가로 포함할 수 있다.
- [0075] 추가 실시양태에서, 폴리에피토프 단백질을 비롯한 단리된 단백질은 하나 또는 복수 개의 HLA 클래스 II 제한 CTL 에피토프를 추가로 포함할 수 있다.
- [0076] 추가로, 제약 조성물의 구성 에피토프의 특정 개수 및/또는 타입은 광범위한 HLA 클래스 I-제한 면역원성을 유지하면서 용이하게 변경될 수 있다는 것이 이해될 것이다.
- [0077] 전형적으로, 배타적이지는 않지만, 예컨대, CTL 에피토프와 같은 에피토프는 상응하는 CMV 항원의, 그로부터 유래되는, 그로부터 수득된, 또는 그에 기초한, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 연속된 아미노산을 포함한다.
- [0078] 당업자는 제약 조성물에 포함시키기 위해 선택된 에피토프는 임의의 집단, 인종 또는 다른 개체 군에 맞게, 적합화될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0079] 약제학적 조성물 내에 특정 에피토프를 포함시키기 위한 다른 기준은 (i) 서열 변이체를 최소로 갖거나, 또는 갖지 않는 것; (ii) 최소 서브타입을 갖는 HLA로부터 선택되는 것; 및 (iii) 건강한 혈청 양성 반응물에서 높은 빈도의 CTL 반응을 보이는 것을 포함한다.
- [0080] 본원에 기술된 폴리토프 단백질을 비롯한, 단리된 단백질은 바람직하게는 복수 개의 상이한 CMV 단백질 항원으로부터 유래되는 복수 개의 CMV 에피토프를 포함한다. 바람직하게, 에피토프는 pp50, pp65, pp150, DNase, IE-1 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 CMV 항원이다.
- [0081] 적합하게, 폴리토프 단백질을 비롯한, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질은 집단을 광범위하게 커버할 수 있도록 선택된, 에피토프, 예컨대, CTL 에피토프를 포함한다. 인간에서, 이들은 HLA 클래스 I 특이성 HLA-A1, -A2, -A3, -A11, -A23, -A24, -A26, -A29, -A30, -B7, -B8, -B18, -B27, -B35, -B38, -B40, -B41, -B44, -B51, -B57, -B58 및 -CW6을 포함한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 표 1에 제시된 바와 같이 HLA 클래스 I 특이성에 대해 제한된다. 따라서, 한 실시양태에서, 에피토프는 HLA-A1, -A2, -A3, -A11, -A23, -A24, -B7, -B8, -B18, -B27, -B35, -B40, -B44, -B57, -B58 및 -CW6으로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 HLA 클래스 I 특이

성에 의해 제한된다

- [0082] 특정 실시양태에서, 폴리토프 단백질을 포함하는 단리된 단백질은 표 1로부터 선택되는 복수 개의 HLA 클래스 I 제한 에피토프 (서열 번호: 1-20)를 포함한다. 한 특정 실시양태에서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질 또는 폴리토프 단백질은 서열 번호: 1-20에 제시된 각각의 에피토프 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함한다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 상기 복수 개의 에피토프는 총 서른 개 (30) 이하 (예컨대, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10개 등 또는 그 안의 임의의 범위)의 에피토프를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 복수 개의 에피토프는 총 스무 개 (20) 이하 (예컨대, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10개 등 또는 그 안의 임의의 범위)의 에피토프를 포함한다.
- [0084] 표 1에 제공된 것 이외의 다른 CMV 에피토프, 예컨대, 국제 공개 WO 03/000720 및 국제 공개 번호 WO2014/059489에 기술된 것도 사용될 수 있다는 것 역시 이해될 것이다.
- [0085] 특정 실시양태에서, 제약 조성물의 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질은, 각각의 것이 복수 개의 에피토프 중 단 1개만을 포함하는 것인, 복수 개의 별개의 단리된 단백질을 포함한다. 그러나, 본 발명은 복수 개의 에피토프 중 단 1개만을 포함하는 하나 이상의 단리된 단백질을 추가로 포함하거나, 또는 포함하지 않으면서, 동일함 또는 상이한 CMV 항원으로부터 유래되는 복수 개의 에피토프 중 2개 이상을 포함하는 하나 이상의 단리된 단백질을 포함하는 것을 고려한다는 것도 이해할 것이다.
- [0086] 따라서, 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질은 단리된 폴리에피토프 또는 폴리토프 단백질, 단리된 "CMV 폴리에피토프" 또는 단리된 "CMV 폴리에피토프 단백질"일 수 있거나, 또는 이를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 폴리토프 단백질은 적합하게는 본원 하기에서 기술되는 바와 같이, 2개 이상의 상이한 CMV 항원으로부터의 복수 개의 에피토프 중 2개 이상을 포함한다.
- [0087] 에피토프 이외에도, 폴리토프 단백질은 개재 아미노산 또는 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 개재 아미노산 또는 아미노산 서열은 적어도 2개의 에피토프 아미노산 서열 사이에, 또는 각 인접한 에피토프 아미노산 서열 사이에 존재할 수 있다.
- [0088] 적합하게, 개재 아미노산 또는 아미노산 서열은 프로테아좀 프로세싱이 가능하도록, 및 후속된 HLA-I 분자와의 제시를 위해 프로테아좀-생성 개별 에피토프 펩티드를 소포체 (ER) 내로 수송하기 위해 에피토프 아미노산 서열 기준으로 배치되거나, 또는 위치한다.
- [0089] 한 실시양태에서, 개재 아미노산 또는 아미노산 서열은 프로테아좀 유리(liberation) 아미노산 또는 아미노산 서열이다. 프로테아좀 유리 아미노산 또는 아미노산 서열의 비제한적인 예는 AD, K 또는 R이거나, 또는 이를 포함한다.
- [0090] 한 형태에서, CMV 에피토프는 폴리토프 단백질의 각각의 각 에피토프의 카르복실 말단에서 프로테아좀 유리 아미노산 서열에 의해 결합 또는 연결된다.
- [0091] 일단 투여되고 나면, 개재 아미노산 또는 아미노산 서열을 포함하는 폴리토프 단백질은 예컨대, 프로테아좀 경로에 의해 프로세싱된다. 이 결과로, 프로세싱된 CMV 에피토프는 HLA 클래스 I-의존적 방식으로 CD8⁺ 세포독성 T 세포에 제시된다.
- [0092] 폴리토프 단백질의 경우, 특정 에피토프의 포함은 에피토프 소수성 특성을 기반으로 할 수 있으며, 여기서, 개별 에피토프의 순차적인 순서는 소수성이 폴리에피토프의 길이를 따라 균일하게 분포하여 세포간 이동성을 돕도록 배열된다.
- [0093] 본 측면의 제약 조성물에 포함될 수 있는 전장의 연속된 폴리에피토프 단백질의 실시양태는 서열 번호: 21에 기재되어 있다. 예컨대, 국제 공개 번호 WO2014/059489 (이는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 것과 같은 다른 폴리토프 단백질도 본 측면의 제약 조성물에 포함될 수 있다는 것도 추가로 이해할 것이다.
- [0094] 적합하게, 본 측면의 제약 조성물은 또한 하나 이상의 CMV 외피 단백질을 포함한다. 이해되는 바와 같이, 바이러스 외피 단백질은 전형적으로 표적 세포에의 바이러스 결합 및/또는 감염성 바이러스의 표적 세포 내로의 진입에 참여한다. 용어 "CMV 외피 단백질"은 CMV 바이러스 뉴클레오캡시드를 둘러싸는 막에 매립된 단백질(들)을 지칭한다.
- [0095] 특정 실시양태에서, CMV 외피 단백질은 CMV 외피 당단백질이다. CMV 외피 당단백질은 바이러스 표면에 발현되

고, 방어 바이러스 중화 체액성 면역 반응을 유발할 수 있기 때문에, 관심의 대상이 되는 백신 후보물질을 나타낸다. 예시적인 CMV 외피 당단백질은 당단백질 B (gB), 당단백질 H (gH), 당단백질 L (gL), 당단백질 M (gM), 당단백질 N (gN) 및 당단백질 O (gO)를 포함한다. 한 특정 실시양태에서, CMV 외피 단백질은 당단백질 B이거나, 또는 이를 포함한다.

- [0096] 예컨대, 본원에서 앞서 기술되고, 당업계에서 공지된 것과 같은, gB의 단편, 변이체, 및 유도체 또한 본 측면의 약제학적 조성물 중에 포함시키는 데 적합한 것으로 구상된다. 예로서, CMV 당단백질 B 단백질은 변형된 세포 외 도메인 또는 변형된 내부단백질분해성 절단 부위를 포함할 수 있다. 추가로, CMV gB는 예컨대, 이의 막횡단 및/또는 세포질 도메인의 결실을 포함하는 C-말단에서의 말단절단과 같이 말단절단될 수 있다. CMV gB 변이체는 자연적으로 발생된 (예컨대, 대립유전자, 균주-특이적) 변이체, 오솔로그 (예컨대, 상이한 헤르페스 바이러스로부터의 것) 및 예컨대, 돌연변이유발 기술을 사용하여 시험관내에서 제조된 것과 같은 합성 변이체를 포함할 수 있다. 적합하게, gB의 상기 단편, 변이체 및 유도체는 대상체에게 투여되었을 때, 면역 반응, 예컨대, 세포 매개 및/또는 체액성 면역 반응을 유발할 수 있다. 이와 관련하여, gB의 단편, 변이체 및 유도체는 적합하게 하나 이상의 T 세포 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프를 포함한다.
- [0097] 상기에 기초하여, 본원에 기술된 폴리토프 단백질을 비롯한 하나 또는 복수 개의 단리된 단백질, 및/또는 CMV 외피 단백질은 본 발명의 개념을 벗어나지 않으면서, 추가 변형, 변이 및/또는 유도체화될 수 있다는 것도 이해할 것이다.
- [0098] 아미노산 서열의 변이는 CMV 에피토프 또는 CMV 외피 단백질에서의 자연적으로 발생된 서열 변이의 결과일 수 있다.
- [0099] 일부 아미노산은 단리된 단백질의 활성 성질을 변경시키지 않으면서 광범위하게 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 변이될 수 있다는 것 (보존적 치환)도 당업계에서 널리 이해되어 있다. 전형적으로, 보존적 치환은 예컨대, 전하, 친수성, 소수성 및/또는 측쇄 크기 또는 "별키성"과 같은 아미노산 특성이 유지되거나, 또는 적어도 최소한으로 변경되도록 이루어진다.
- [0100] 아미노산 치환의 도입은 펩티드 합성 동안, 또는 코딩 핵산의 돌연변이유발에 의해 쉽게 달성될 수 있다. 핵산 돌연변이유발 방법의 비제한적 예는 문헌 [Chapter 9 of CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel *et al.*, *supra*, Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** 10747], [Shafikhani *et al.*, 1997, Biotechniques **23** 304], [Jenkins *et al.*, 1995, EMBO J. **14** 4276-4287] 및 [Zaccolo *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. **255** 58]에 제공되어 있고, 키트, 예컨대, 키트, 예컨대, 퀵체인지™ 부위-지정 돌연변이유발 키트 (QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit) (스트라타젠(Stratagene)) 및 디버서파이™ 무작위 돌연변이유발 키트(Diversify™ random mutagenesis kit) (클론테크(Clontech))가 있다.
- [0101] 일반적으로, 본 발명은 단독으로, 또는 CMV 외피 단백질과 조합하여, 구성 에피토프 서열과 적어도 75%, 바람직하게, 적어도 80%, 더욱 바람직하게, 적어도 85% 또는 더욱더 바람직하게, 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질 변이체를 고려한다. 다른 실시양태에서, 이는 CMV 에피토프 또는 CMV 외피 단백질 중 한 개 (1), 두 개 (2) 또는 세 개 (3)의 아미노산 잔기의 보존적 변이 또는 치환을 포함할 수 있다.
- [0102] 본원에서 사용되는 바, "서열 동일성"이라는 용어는 가장 넓은 의미에서 표준 알고리즘을 사용하여 적절한 정렬을 고려하고, 비교 창에서 서열이 동일한 정도를 고려하여 정확한 아미노산 매치 개수를 포함한다. 서열 동일성은 예를 들어, 문헌 [Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res. **25** 3389]에 개시된 바와 같은 GAP, BESTFIT, FASTA 및 BLAST 프로그램 패밀리와 같은 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 서열 분석에 관한 상세한 논의는 문헌 [Unit 19.3 of CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.* (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999)]에서 살펴볼 수 있다.
- [0103] 본원에서 사용되는 바, "유도체"는 당업계에서 이해되는 바와 같이, 예를 들어, 다른 화학적 모이어티와의 접합 또는 착물화에 의해, 번역 후 변형 (예컨대, 인산화, 아세틸화 등), 글리코실화 변형 (예컨대, 예컨대, 부가, 제거 또는 변경), 지질화 및/또는 추가 아미노산 서열의 포함에 의해 변경된 단백질, 이의 단편 또는 변이체와 같은 분자이다.
- [0104] 추가의 아미노산 서열은 융합 단백질을 생성하는 융합 파트너 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예로서, 융합 파트너 아미노산 서열은 단리된 융합 단백질의 검출 및/또는 정제에 도움을 줄 수 있다. 비제한적인 예로는 금속-결합 (예컨대, 폴리히스티딘) 융합 파트너, 말토스 결합 단백질 (MBP), 단백질 A, 글루타티온 S-트랜스퍼라

제 (GST), 형광 단백질 서열 (예컨대, GFP), 에피토프 태그, 예컨대, myc, FLAG 및 헤마글루티닌 태그를 포함한다.

- [0105] 다른 추가 아미노산 서열은 예컨대, 국제 공개 WO2017/070735에 기술된 바와 같이, 캐리어 단백질, 예컨대, 디프테리아 독소이드 (DT) 또는 이의 단편, 또는 CRM 단백질 단편의 것일 수 있다.
- [0106] 본 발명에 의해 고려되는 다른 유도체로는 측쇄에 대한 변형, 펩티드 동안의 비천연 아미노산 및/또는 이의 유도체의 도입, 또는 단백질 합성 및 가교제의 사용 및 본 발명의 단리된 단백질에 입체형태적 제약을 부과하는 다른 방법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0107] 이와 관련하여, 당업자는 단백질의 화학적 변형과 관련된 보다 광범위한 방법에 대해서는 문헌 [Chapter 15 of CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan *et al.* (John Wiley & Sons NY 1995-2008)]을 참조한다.
- [0108] 본 측면의 제약 조성물은 적합하게는 대상체에의 투여를 위해 하나 이상의 TLR 효능제를 포함한다.
- [0109] 본원에서 사용되는 바, 용어 "TLR 효능제"는 내인성 또는 외인성 리간드의 생성을 통해 직접적으로 또는 간접적으로 리간드로서 TLR 신호전달 경로를 통해 신호전달 반응을 유발할 수 있는 분자를 지칭한다. TLR 수용체의 효능제 리간드는 TLR 수용체의 천연 리간드, 또는 TLR 수용체에 결합하고, 그 안에서 공동자극 신호를 유도할 수 있는 능력을 유지하는 이의 기능적으로 등가인 변이체일 수 있다. TLR 효능제는 또한 TLR 수용체, 및 더욱 특히, 상기 수용체의 세포외 도메인에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 수용체 및 연관된 단백질에 의해 제어되는 면역 신호의 일부를 유도할 수 있는, TLR 수용체에 대한 효능제 항체, 또는 이의 기능적으로 등가인 변이체일 수 있다. 결합 특이성은 인간 TLR 수용체 또는 상이한 종의 인간 동종성 TLR 수용체에 대한 것일 수 있다.
- [0110] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 TLR 효능제는 TLR4 효능제 및/또는 TLR9 효능제를 포함한다. 더욱 특히, TLR 효능제는 TLR9 효능제이거나, 또는 이를 포함한다.
- [0111] 예시적인 TLR4 효능제는 지질다당류 (LPS) 또는 LPS의 유도체 또는 성분이다. 이는 살모넬라 미네소타 (*Salmonella minnesota*)로부터 유래된 모노포스포릴 지질 A (MPL[®]) 및 합성 TLR4 효능제, 예컨대, 아미노알킬 글루코사미나이드 포스페이트 (AGP) 및 인산화된 핵사아실 이당류 (PHAD) 및 이의 유도체 (예컨대, 3D-PHAD, 3D(6-아실)-PHAD)를 포함한다. 바람직한 TLR4 효능제는 MPL이다.
- [0112] TLR9는 미생물 DNA를 포유동물 DNA와 구별하는 특정 비메틸화된 CpG 올리고뉴클레오티드 (ODN) 서열을 인식한다. CpG ODN 올리고뉴클레오티드는 특정 서열 콘텍스트 (CpG 모티프)에서 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 함유한다. 상기 CpG 모티프는 포유동물 DNA와 비교하여 박테리아 DNA에서 20배 더 높은 빈도로 존재한다. 타입 A, B 및 C인 3가지 타입의 자극 ODN이 기술되었다.
- [0113] TLR9 효능제의 비제한적인 예로는 이로 제한되는 것은 아니지만, CpG ODN1018, CpG ODN2006, CpG ODN2216, CpG ODN1826 및 CpG ODN2336을 포함한다. 일부 실시양태에서, TLR9 효능제는 CpG ODN1018 및/또는 CpG ODN2006이거나, 또는 이를 포함한다. 한 바람직한 실시양태에서, TLR9 효능제는 CpG ODN1018이다.
- [0114] 특정 실시양태에서, TLR 효능제는 MPL, CpG ODN1826, CpG ODN2006, CpG ODN2216 및/또는 CpG ODN2336이 아니다.
- [0115] 적합하게, 제약 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0116] "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제"는 전신 투여에 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 특정 투여 경로에 따라, 당업계에 널리 공지된 다양한 담체가 사용될 수 있다. 상기 담체는 당, 전분, 셀룰로스 및 이의 유도체, 맥아, 젤라틴, 활석, 황산칼슘, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 포스페이트 완충처리된 용액, 유화제, 등장성 염수 및 염, 예컨대, 히드로클로라이드, 브로마이드 및 술페이트를 비롯한 무기산 염, 예컨대, 아세테이트, 프로피오네이트 및 말로네이트와 같은 유기산 및 발열성 물질 제거수를 포함하는 균으로부터 선택될 수 있다.
- [0117] 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 부형제를 설명하는 유용한 참고문헌은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)] (이는 본원에서 참조로 포함된다)이다.
- [0118] 본 발명의 제약 조성물은 "면역상 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제"를 포함할 수 있다는 것을 상기 내용에

의해 이해할 수 있을 것이다.

- [0119] 유용한 담체는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 티로글로불린; 알부민 예컨대, 인간 혈청 알부민; 과산화물, 디프테리아, 백일해, 슈도모나스(*Pseudomonas*), E. 콜라이, 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*) 및 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*)로부터의 독소(toxin), 독소이드(toxoid) 또는 상기 독소의 임의의 돌연변이체 교차반응성 물질 (CRM); 폴리아미노산, 예컨대, 폴리(리신:글루탐산); 인플루엔자; 로타바이러스 VP6, 파르보바이러스 VP1 및 VP2; B형 간염 바이러스 코어 단백질; B형 간염 바이러스 재조합 백신 등을 포함한다. 대안적으로, 담체 단백질 또는 다른 면역원성 단백질의 단편 또는 에피토프가 사용될 수 있다. 예를 들면, 박테리아성 독소, 독소이드 또는 CRM의 T 세포 에피토프가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 미국 특허 번호 5,785,973 (이는 본원에서 참조로 포함된다)을 참조할 수 있다.
- [0120] "면역상 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제"는 당업계에 널리 공지된 바와 같이 이의 범주 내에 물, 비카르보네이트 완충제, 포스페이트 완충처리된 염수 또는 염수 및/또는 애주번트를 포함한다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, "애주번트"는 백신 조성물의 면역원성 및 효능을 증진시키는 하나 이상의 물질로 구성된 조성물을 의미한다.
- [0121] 따라서, TLR 효능제 이외에도, 약제학적 조성물, 본원에 기술된 면역원성 조성물 및/또는 백신은 대상체에의 투여를 위해 하나 이상의 추가의 면역자극성 분자 또는 애주번트를 포함할 수 있다.
- [0122] 적합한 면역자극성 분자 및 애주번트로는 추가의 TLR 효능제, 지질다당류 및 이의 유도체, 예컨대, MPL, 프로인트 완전 또는 불완전 애주번트, 스쿠알란 및 스쿠알렌 (또는 식물 또는 동물 기원의 다른 오일); 블록공중합체; 계면활성제, 예컨대, 트윈(Tween)®-80; 퀴(Quil)® A, 미네랄 오일, 예컨대, 드라케올(Drakeol) 또는 마르콜(Marcol), 식물성 오일, 예컨대, 땅콩유; 코리네박테리움(*Corynebacterium*)-유래 애주번트, 예컨대, 코리네박테리움 파르부름(*Corynebacterium parvum*); 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*)-유래 애주번트, 예컨대, 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acne*); 미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) (바실 칼메트 및 구에린(Bacille Calmette and Guerin) 또는 BCG); 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*) 항원; 테타누스 독소이드; 디프테리아 독소이드; 계면 활성 물질, 예컨대, 헥사데실아민, 옥타데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 리소레시틴, 디메틸 디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N',N'-비스(2-히드록실에틸-프로판디아민), 메톡시헥사데실글리세롤 및 플루로닉 폴리올; 폴리아민, 예컨대, 피란, 텍스트란솔페이트, 폴리 IC 카르보폴; 펩티드, 예컨대, 무라밀 디펩티드 및 유도체, 디메틸글리신, 투프트신; 오일 에멀전; 및 미네랄 겔, 예컨대, 인산알루미늄, 수산화알루미늄 또는 알룸; 인터루킨, 예컨대, 인터루킨 2 및 인터루킨 12; 모노카인, 예컨대, 인터루킨 1; 종양 괴사 인자; 인터페론, 예컨대, 감마 인터페론; 조합물, 예컨대, 사포닌-수산화알루미늄 또는 퀴-A 수산화알루미늄; 리포솜; ISCOM® 및 ISCOMATRIX® 애주번트; 미코박테리아 세포벽 추출물; 합성 글리코펩티드, 예컨대, 무라밀 디펩티드 또는 다른 유도체; 아브리딘(Avridine); 지질 A 유도체; 텍스트란 술페이트; DEAE-텍스트란 단독 또는 인산알루미늄과의 DEAE-텍스트란; 카르복시폴리메틸렌, 예컨대, 카르보폴(Carbopol)' EMA; 아크릴 코폴리머 에멀전, 예컨대, 네오크릴(Neocryl) A640 (예컨대, 미국 특허 번호 5,047,238); 유중수 유화제, 예컨대, 몬타니드(Montanide) ISA 720; 폴리오바이러스, 백신시아(vaccinia) 또는 동물 폭스바이러스 단백질; 또는 이의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0123] 서브유닛 백신과 관련하여, 상기 백신의 예는 예컨대, 국제 공개 W097/45444에 기술된 바와 같이 ISCOM으로 제화될 수 있다.
- [0124] 유중수 제제 형태의 백신의 예는 예컨대, 국제 공개 W097/45444에 기술된 바와 같이 몬타니드 ISA 720을 포함한다.
- [0125] 백신 조성물을 생산하기 위한 임의의 적합한 방법이 고려된다. 예시적인 방법은 예를 들어, 문헌 [New Generation Vaccines (1997, Levine *et al.*, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong)] (상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 것을 포함한다.
- [0126] 환자에게 본 발명의 조성물을 제공하기 위한 임의의 안전한 투여 경로가 사용될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장, 비경구, 설하, 협측, 정맥내, 관절내, 근육내, 진피내, 피하, 흡입, 안내, 복강내, 뇌실내 및 경피 투여가 사용될 수 있다.
- [0127] 투여 형태는 정제, 분산제, 현탁제, 주사제, 액제, 시럽, 트로키, 캡슐, 좌제, 에어로졸, 경피용 패치 등을 포함한다. 상기 투여 형태는 또한 이러한 목적을 위해 특별히 디자인된 방출 조절형 주사 또는 임플란트 장치 또는 이러한 방식으로 추가로 작용하도록 변형된 다른 형태의 임플란트를 포함할 수 있다. 치료제의 방출 조절은

이를 예를 들어, 아크릴 수지, 왁스, 고급 지방족 알콜, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 예컨대, 히드록시프로필메틸 셀룰로스와 같은 특정 셀룰로스 유도체를 포함하는 소수성 중합체로 코팅함으로써 수행될 수 있다. 추가로, 방출 조절은 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구체를 사용하여 수행될 수 있다.

- [0128] 바람직한 제약 조성물은 반드시 방어 면역 반응을 유발하지 않으면서, 체액성 및/또는 세포 매개 면역 반응을 유발하여 상기 면역요법에 대해 반응성인 CMV 감염 또는 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태의 예방적 및/또는 치료학적 치료를 제공하는 "면역원성 조성물"이다.
- [0129] 바람직한 형태에서, 면역원성 조성물은 CMV 감염으로부터 방어하거나, 또는 기존 CMV 감염 또는 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태를 치료하는, 인간 대상체에서 방어 B-림프구- 및/또는 CD8⁺ CTL-기반 면역 반응을 유발하기 위한 백신일 수 있다. 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 대상체에서 이의 투여 후 약 6개월 초과 (예컨대, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24개월 등 또는 그 안의 임의의 범위) 동안 CMV 감염으로부터 방어하는 지속가능한 면역 반응을 유발한다.
- [0130] 본원에서 일반적으로 사용되는 바, "면역화하다," "백신접종하다" 및 "백신"이라는 용어는 CMV에 대한 방어 면역 반응을 유발하여, CMV에 의한 후속 감염을 적어도 부분적으로 예방하거나, 또는 최소화하는 방법 및/또는 조성물을 지칭한다.
- [0131] 따라서, 상기 조성물은 비록 이에 대해 제한되는 것은 아니지만, 대상체에게 투여되는 경우, 신규, 기존 또는 잠복 여부에 관계없이, CMV 감염에 대한 적어도 부분적인 면역, 및 바람직하게, 방어 면역을 생성하기 위한 목적으로, 또는 CMV 감염에 대해 면역 반응, 바람직하게, 방어 면역 반응을 생성하기 위해 전달될 수 있다.
- [0132] "방어 면역"은 항원 또는 항원들에 대한 반응성이 상기 항원의 신속한 결합 및/또는 제거를 유도하고, 이로써, 동물, 예컨대, 인간 대상체에서 후속되는 CMV 감염을 적어도 부분적으로 호전시키거나, 또는 예방하기에 충분한 수준의 면역을 의미한다.
- [0133] "방어 면역 반응"은 동물, 예컨대, 인간 대상체에서 현재 및/또는 미래의 CMV 감염의 중증도(severity), 증상, 측면 또는 특징을 예방하거나, 또는 감소시키기에 충분한 수준의 면역 반응을 의미한다.
- [0134] 용어 "면역 반응"은 대상체(subject) (예컨대, 인간)의 면역계에 의한 항원 또는 항원 결정기에 대한 임의의 반응을 지칭한다. 예시적인 면역 반응은 체액성 면역 반응 (예컨대, 항원 특이적 항체 생산) 및 세포 매개 면역 반응 (예컨대, 항원 특이적 T 세포 생성)을 포함한다. 면역 반응을 평가하기 위한 검정법은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대, 항체 반응 및 지연형 과민 반응을 측정하기 위한 검정법과 같은 생체내 검정법을 포함할 수 있다. 예로서, 항체 반응을 측정하기 위한 검정은 B 세포 기능 뿐만 아니라, B 세포/T 세포 상호작용을 측정할 수 있다. 항체 반응 검정법의 경우, 항원 쉐린지 후 혈중 항체 역가를 비교할 수 있다. 시험관내 검정법은 면역 세포가 분열하는 능력, 또는 다른 세포가 분열하는 데 도움을 제공하거나, 림포카인 및 다른 인자를 방출하고, 활성화 마커를 발현하고, 표적 세포를 용해시키는 능력을 결정하는 것을 포함할 수 있다. T 림프구와 같은 면역 세포는 또한 미토겐 또는 특정 항원을 사용하여 증식할 수 있는 능력에 대해 시험관내에서 시험될 수도 있다. 특정 림포카인을 분비할 수 있는 능력을 정량화하기 위해 배 양된 면역 세포의 상청액 또한 시험될 수 있다. 추가로, 면역 세포는 배양물로부터 제거되고, 활성화 항원을 발현할 수 있는 이의 능력에 대해 시험될 수 있다. 이는 활성화 항원에 결합하는 항체 또는 리간드 및 활성화 항원을 코딩하는 RNA에 결합하는 프로브를 사용하는 비제한적인 예에서와 같이 적합한 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0135] 용어 "체액성 면역 반응"은 중화 항체를 비롯한 항체 생산 자극을 지칭한다. 체액성 면역 반응은 또한 T 헬퍼 세포 활성화 및 사이토카인 생산, 친화성 성숙 및 기억 세포 생성을 비롯한, 항체 생산을 동반하는 보조 단백질 및 이벤트를 지칭한다.
- [0136] 용어 "세포 매개 면역 반응"은 예컨대, 원래 항원을 발현하는 세포를 직접 용해시키고, 사이토카인 (예컨대, IFN-감마)를 분비할 때, 림프구에 의해 제공되는 면역학적 방어, 예컨대, 감작화된 T 림프구에 의해 제공되는 방어로서, 이는 대식세포 및 자연살해 (NK) 세포 이펙터 기능을 조정할 수 있고, T 세포 확장 및 분화를 증강시킬 수 있는 것을 지칭한다.
- [0137] 실시예에서 더욱 상세하게 기술되는 바와 같이, 본 측면의 제약 조성물은 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 CMV-특이적 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 반응, B 세포 반응 및 중화 항체 반응을 생성하는 데 고도로 효과적이다. 추가로, 제약 조성물은 장수명 CMV-특이적 배중심 B 세포 생성을 유도할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에 의해 생성된 면역 반응의 이러한 기능적 특징은 생성된 체액성 및 세포 매개 면역 반응의 효능 및 지속성, 및

따라서, 후속되는 바이러스 제거에 중요한 것으로 제안된다.

- [0138] 일반적으로, 본원에 기술된 억제학적 조성물, 면역원성 조성물, 백신 및/또는 예방 또는 치료학적 치료 방법은 본 발명의 조성물을 환자에게 제공하는 데 사용될 수 있는 임의의 안전한 투여 경로를 사용할 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장, 비경구, 설하, 협측, 정맥내, 관절내, 근육내, 진피내, 피하, 흡입, 안내, 복강내, 뇌실내, 경피 등이 사용될 수 있다. 근육내 및 피하 주사는 예를 들어, 면역원성 조성물, 단백질성 백신 및 DNA 백신의 투여에 적절하다.
- [0139] 본 측면의 제약 조성물은 동물, 바람직하게, 인간에서 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료학적 및/또는 예방적 치료에 유용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 제약 조성물은 (a) 대상체에서 CMV 감염을 치료 또는 예방하는 데; (b) 대상체에서 CMV 항원에 대한 면역 반응을 유발하는 데; 및/또는 (c) 대상체에서 CMV 감염에 대한 면역을 유도하는 데 사용하기 위한 것이다.
- [0140] 인간에서, CMV 감염은 발열이 지속되는 단핵구증 유사 증후군 및/또는 경증 감염을 유발할 수 있다. 특정 고위험군에서는 임신 중 태아가 감염되는 동안, 아동과 함께 일하는 사람, 및 예컨대, 노인, 장기 이식 수용자 및 인간 면역결핍 바이러스 (HIV)로 감염된 사람과 같이 면역손상된 사람에서 질환은 더 중증일 수 있다. CMV는 또한 예컨대, 신경교종과 같은 일부 암과도 연관될 수 있다. 따라서, 본 발명은 바람직하게는 인간에서 CMV 감염의 예방적 또는 치료학적 치료의 억제학적 조성물 및/또는을 제공한다.
- [0141] 따라서, 관련된 측면에서, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기술된 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 면역 반응을 유발하는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 유발하는 방법을 제공한다.
- [0142] 적합하게, 방법은 상기 대상체에서 면역 반응을 유발 또는 증진시켜 대상체에서 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태, 예컨대, CMV 감염을 예방하거나, 또는 예방적으로 또는 치료학적으로 치료한다. 더욱 특히, 제약 조성물의 투여는 적합하게는 대상체에서 CMV 또는 CMV 감염에 대한 방어 면역 반응을 유발한다.
- [0143] 한 실시양태에서, 면역 반응은 체액성 면역 반응 및/또는 세포 매개 면역 반응, 예컨대, 세포독성 T-림프구 면역 반응이거나, 또는 이를 포함한다.
- [0144] 추가 측면에서, 대상체에게 치료 유효량의, 언급된 제1 측면의 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 CMV 감염에 대한 면역을 유도하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 감염에 대한 면역을 유도하는 방법.
- [0145] 본 측면의 방법은 적합하게는 CMV 감염에 대한 방어 면역 반응을 유도한다. 이를 위해, CMV 또는 CMV 감염에 대한 면역 반응 또는 면역은 적합하게는 대상체가 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태에 걸리지 않게 예방한다.
- [0146] 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 적합하게는 CMV 감염에 대한 체액성 면역 반응 및/또는 세포 매개 면역 반응, 예컨대, 세포독성 T-림프구 면역 반응을 유도한다.
- [0147] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의, 언급된 제1 측면의 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 CMV 감염을 예방 또는 치료하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CMV 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0148] 본원에서 사용되는 바, "치료하는" (또는 "치료하다" 또는 "치료")이란, 이의 발병 후, CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태를 포함하는, CMV 감염의 징후 또는 증상을 호전시키는 치료학적 개입을 지칭한다. CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태와 관련하여 "호전시키는"이라는 용어는 치료의 임의의 관찰가능한 유의한 효과를 지칭한다. 치료가 대상체에게 절대적으로 유의할 필요는 없다. 유의한 효과는 일반 숙련자에게 공지된 임의의 방법 또는 표준을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0149] 본원에서 사용되는 바, "예방하는" (또는 "예방하다" 또는 "예방")이란, CMV 감염 또는 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태의 증상, 측면 또는 특징을 예방하거나, 또는 감소시키기 위해 상기 증상, 측면 또는 특징이 발병되기 이전에 개시되는 조치 (예컨대, 본 발명의 억제학적 조성물 투여)를 지칭한다. 상기 예방이 대상체에게 절대적으로 유의할 필요는 없다는 것을 이해하여야 한다. "예방적" 치료는 CMV 감염 또는 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태의 증상, 측면, 또는 특징이 발생할 위험을 감소시키기 위한 목적으로, CMV 감염 또는 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태의 징후를 보이지 않거나, 또는 오직 초기 징후만을 보이는 대상체에게 투여되는 치료이다.
- [0150] 용어 "치료 유효량"은 언급된 작용제, 예컨대, 본원에 기술된 제약 조성물로 치료받은 대상체에서 원하는 효과를 달성하는 데 충분한, 상기 작용제, 예컨대, 본원에 기술된 제약 조성물의 정량을 기술한다. 예를 들어, CMV 감염을 포함하는, CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태를 감소, 경감 및/또는 예방하는 데 필요한, 본원에 기술된

단리된 단백질, CMV 외피 단백질 및 TLR 효능제를 포함하는 조성물의 양일 수 있다. 일부 실시양태에서, "치료 유효량"은 CMV 감염 또는 CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태의 증상을 감소 또는 제거하는 데 충분하다. 다른 실시양태에서, "치료 유효량"은 원하는 생물학적 효과를 달성하는 데 충분한 양, 예를 들어, CMV 감염을 억제 또는 예방하기 위해 대상체에서 방어 면역 반응을 유발하는 데 충분한 양이다.

- [0151] 이상적으로, 작용제의 치료 유효량은 대상체에서 상당한 세포독성 효과를 유발하지 않으면서, 원하는 결과를 유도하는 데 충분한 양이다. CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태, 예컨대, CMV 감염을 감소, 경감 및/또는 예방하는 데 유용한 작용제의 유효량은 치료받는 대상체, 임의의 연관된 질환, 장애 또는 병태 타입 및 중증도 (예컨대, CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태 타입 및/또는 CMV 균주 타입), 및 치료 조성물의 투여 방식에 의존할 것이다.
- [0152] 본 발명과 관련하여, 'CMV 연관된 질환, 장애 또는 병태'란, 예컨대, 본원 상기 기술된 것과 같은, 사이토메갈로바이러스에 의한 감염으로부터 발생하는 임의의 임상 병리를 포함하는 임의의 CMV 감염을 의미한다.
- [0153] "투여하는" 또는 "투여"란, 본원에 개시된 조성물의 특정 선택된 경로에 의한 대상체 내로의 도입을 의미한다. 예컨대, 본원 상기 기술된 것과 같은, 임의의 안전한 투여 경로 및 투여 형태가 본 발명의 조성물을 환자에게 제공하기 위해 사용될 수 있다
- [0154] 본원에서 일반적으로 사용되는 바, 용어 "환자," "개체" 및 "대상체"는 본원에 개시된 치료 또는 조성물의 임의의 포유동물 수용자와 관련하여 사용된다. 따라서, 본원에 개시된 방법 및 조성물은 의학적 및/또는 수의학적 적용을 가질 수 있다. 바람직한 형태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0155] 추가 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 1-20에 제시된 각각의 에피토프 아미노산 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 단리된 단백질에 관한 것이다. 따라서, 단리된 단백질은 예컨대, 본원 상기 기술된 것과 같은 단리된 폴리에피토프 또는 폴리토프 단백질일 수 있거나, 또는 이를 포함할 수 있다.
- [0156] 에피토프 아미노산 서열 이외에도, 단리된 단백질은 예컨대, 상기 기술된 것과 같은, 개체 아미노산 또는 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 적합하게, 개체 아미노산 또는 아미노산 서열은 프로테아좀 프로세싱이 가능하도록, 및 후속된 HLA-I 분자와의 제시를 위해 프로테아좀-생성 개별 에피토프 펩티드를 소포체 (ER) 내로 수송하기 위해 에피토프 아미노산 서열 기준으로 배치되거나, 또는 위치한다.
- [0157] 추가로, 서열 번호: 21에 제시된 것과 같이, 단리된 단백질의 구성 에피토프 (즉, 서열 번호: 1-20)의 특정 배열 또는 순서는 광범위한 HLA 클래스 I-제한 면역원성을 유지하면서, 쉽게 변경될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0158] 본 측면의 단리된 단백질은 서열 번호: 1-20에 제공된 것 이외의 다른 에피토프 아미노산 서열, 예컨대, 국제 공개 WO 03/000720 및 국제 공개 번호 WO2014/059489에 기술된 것도 포함할 수 있다는 것도 이해할 것이다.
- [0159] 적합하게, 단리된 단백질은 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성된다.
- [0160] 특정 실시양태에서, 단리된 단백질은 본원에서 앞서 기술된 방법에서 사용하기 위한 것이다. 이를 위해, 단리된 단백질은 예컨대, 본원 상기 기술된 것과 같은 제약 조성물에 포함시키는 데 적합할 수 있다.
- [0161] 이의 단편, 변이체 및 유도체를 포함하는, 본 측면의 단리된 단백질은 화학적 합성, 재조합 DNA 기술 및 펩티드 단편을 생산하기 위한 단백질 분해 절단을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업계에서 공지된 임의의 수단에 의해 생산될 수 있다.
- [0162] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 측면의 단리된 단백질을 코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다.
- [0163] 본원에서 사용되는 바, 용어 "핵산"은 단일 또는 이중 가닥 mRNA, RNA, cRNA, RNAi, siRNA 및 cDNA, 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 및 게놈 DNA를 포함하는 DNA를 지칭한다.
- [0164] "폴리뉴클레오티드"는 팔십 개 (80) 이상의 연속된 뉴클레오티드를 갖는 핵산인 반면, "올리고뉴클레오티드"는 팔십 개 (80) 미만의 연속된 뉴클레오티드를 갖는다. "프라이머(primer)"는 일반적으로 상보성 핵산 "주형"에 어닐링할 수 있고, DNA 폴리머라제, 예컨대, Taq 폴리머라제, RNA-의존성 DNA 폴리머라제 또는 시퀀나제 (Sequenase)TM의 작용에 의해 주형 의존적 방식으로 연장될 수 있는, 바람직하게, 15-50개의 연속된 뉴클레오티드를 갖는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다. "프로브(probe)"는 예를 들어, 노던 또는 써던 블롯팅에서 상보

성 서열을 검출하기 위한 목적으로 적합하게 표지화된, 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

- [0165] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 서열 번호: 22에 제시된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 이로 구성된다.
- [0166] 단리된 핵산의 단편 및 변이체 또한 고려된다.
- [0167] 본 발명은 또한 단리된 핵산의 변이체 및/또는 단편을 제공한다. 변이체는 본 발명의 단리된 단백질을 코딩하는 임의의 뉴클레오티드 서열 (예컨대, 서열 번호: 22)과 적어도 70%, 적어도 75%, 바람직하게, 적어도 80%, 적어도 85%, 더욱 바람직하게, 적어도 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0168] 단편은 본원에 개시된 임의의 뉴클레오티드 서열에 존재하는 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95-99%의 연속된 뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 이로 구성될 수 있다.
- [0169] 단편은 본원에 개시된 임의의 뉴클레오티드 서열에 존재하는 최대 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 또는 660개의 연속된 뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 이로 구성될 수 있다.
- [0170] 본 발명은 또한 예컨대, 코돈 서열 중복성을 이용함으로써 변형된 핵산을 고려한다. 보다 특정한 예에서, 코돈 사용 빈도는 특정 유기체 또는 세포 타입에서 핵산의 발현을 최적화하도록 변형될 수 있다.
- [0171] 본 발명은 추가로 본 발명의 단리된 핵산에서 변형된 퓨린 (예를 들어, 이노신, 메틸이노신 및 메틸아데노신) 및 변형된 피리미딘 (예를 들어, 티오우리딘 및 메틸시토신)의 용도를 제공한다.
- [0172] 본 발명의 단리된 핵산은 예컨대, 문헌 [Chapter 2 and Chapter 3 of CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons NY, 1995-2008)]에 기술된 것과 같은, 표준 프로토콜을 사용하여 편리하게 제조될 수 있다는 것을 당업자는 잘 이해할 것이다.
- [0173] 추가의 또 다른 실시양태에서, 상보성 핵산은 고도로 엄격한 조건하에서 본 발명의 핵산에 하이브리드화하다.
- [0174] 본원에서 사용되는 바, "*하이브리드화하다* 및 *하이브리드화*"란, 적어도 부분적으로 상보성 뉴클레오티드 서열이 쌍을 형성하여 DNA-DNA, RNA-RNA 또는 DNA-RNA 하이브리드를 생성하는 것을 의미한다. 상보성 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하이브리드 서열은 염기쌍 형성을 통해 존재한다.
- [0175] 본원에서 사용되는 바, "*엄격도(stringency)*"는 하이브리드화 동안의 온도 및 이온 강도 조건, 및 특정 유기 용매 및/또는 계면활성제의 존재 또는 부재를 지칭한다. 엄격도가 높을수록, 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 요구되는 상보성 수준은 더 높아질 것이다.
- [0176] "*엄격한 조건*"은 상보적인 염기의 빈도가 높은 핵산만이 하이브리드화하게 되는 조건을 지정한다.
- [0177] 엄격한 조건은 예컨대, 문헌 [Chapters 2.9 and 2.10 of Ausubel *et al.*, 상기 문헌 동일] (상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 바와 같이, 당업계에 널리 공지되어 있다. 숙련된 수신인은 또한 다양한 인자는 하이브리드화의 특이성을 최적화하기 위해 조작될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 최종 세척의 엄격도를 최적화함에 따라 고도의 하이브리드화를 보장할 수 있다.
- [0178] 상보성 뉴클레오티드 서열은 전형적으로, 표지화된 프로브 또는 다른 상보성 핵산을 사용하는, 뉴클레오티드를 매트릭스 (바람직하게, 합성 막, 예컨대, 니트로셀룰로스)에 고정화시키는 단계, 하이브리드화 단계, 및 검출 단계를 포함하는 블롯팅 기술에 의해 확인할 수 있다. 써던 블롯팅은 상보성 DNA 서열을 확인하는 데 사용되고; 노던 블롯팅은 상보성 RNA 서열을 확인하는 데 사용된다. 도트 블롯팅 및 슬롯 블롯팅은 상보성 DNA/DNA, DNA/RNA 또는 RNA/RNA 폴리뉴클레오티드 서열을 확인하는 데 사용될 수 있다. 상기 기술은 당업자에 의해 널리 공지되어 있으며, 문헌 [Ausubel *et al.*, *supra*, at pages 2.9.1 through 2.9.20]에 기술되어 있다. 상기 방법에 따라, 써던 블롯팅은 겔 전기영동에 의해 크기에 따라 DNA 분자를 분리하고, 크기에 따라 분리된 DNA를 합성 막으로 옮기고, 막 결합 DNA를 상보성 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화하는 것을 포함한다. 대안적 블롯팅 단계는 예컨대, 플라크 또는 클로니 하이브리드화 공정을 통해 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리 중 상보성 핵산을 확인할 때 사용된다. 상기 방법의 다른 전형적인 예는 문헌 [Chapters 8-12 of Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989)]에 기술되어 있다.

- [0179] 고정화된 핵산에 하이브리드화된, 표지화된 핵산을 검출하는 방법은 당업계에 실무자에게 널리 공지되어 있다. 상기 방법은 방사능 사진 촬영술, 화학발광성, 형광성 및 비색 검출을 포함한다.
- [0180] 핵산은 또한 핵산 서열 증폭 기술을 사용하여 단리, 검출, 및/또는 재조합 DNA 기술의 대상이 될 수 있다.
- [0181] 열 및 등은 방법, 둘 모두를 커버하는 적합한 핵산 증폭 기술은 숙련된 수신인에게 널리 공지되어 있고, 이에 제한되는 것은 아니지만, 중합효소 연쇄 반응 (PCR); 가닥 변위 증폭(SDA); 롤링-서클 복제 (RCR); 핵산 서열-기반 증폭(NASBA), Q- β 레플리카제 증폭, 레콤비나제 폴리머라제 증폭 (RPA) 및 헬리카제 의존성 증폭을 포함한다.
- [0182] 본원에서 사용되는 바, "증폭 생성물"은 핵산 증폭에 의해 생성된 핵산 생성물을 지칭한다.
- [0183] 핵산 증폭 기술은 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 특정의 정량적 및 반-정량적 기술, 예컨대, qPCR, 실시간 PCR 및 경쟁적 PCR을 포함할 수 있다.
- [0184] 또 다른 추가 측면에서, 본 발명은 상기 측면의 단리된 핵산을 포함하는 유전자 작제물을 제공한다.
- [0185] 특정 실시양태에서, 유전자 작제물은 하나 이상의 다른 유전 성분에 작동가능하게 연결된 또는 이어진 단리된 핵산을 포함한다. 유전자 작제물은 숙주 세포에서 단리된 핵산의 치료학적 전달에, 또는 본 발명의 단리된 단백질의 재조합 생산에 적합할 수 있다.
- [0186] 광범위하게, 유전자 작제물은 당업계에서 널리 이해되는 바와 같이, 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드, 효모 또는 박테리아 인공 염색체의 형태이거나, 또는 이의 유전 성분을 포함할 수 있다. 유전자 작제물은 재조합 DNA 기술에 의한 조작 및/또는 본 발명의 핵산 또는 코딩된 단백질의 발현을 위해 박테리아 또는 다른 숙주 세포에서 단리된 핵산의 유지 및 증식에 적합할 수 있다.
- [0187] 숙주 세포의 발현을 위해, 유전자 작제물은 발현 작제물이다. 적합하게는, 발현 작제물은 발현 벡터에서 하나 이상의 추가 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 핵산을 포함한다. "발현 벡터"는 예컨대, 플라스미드와 같은 자가 복제 염색체의 벡터 또는 숙주 계놈에 통합되는 벡터일 수 있다.
- [0188] "작동가능하게 연결된"이란, 상기 추가의 뉴클레오티드 서열(들)이 본 발명의 핵산 기준으로 바람직하게는 전사를 개시, 조절, 또는 다르게는 제어할 수 있도록 배치되어 있다는 것을 의미한다.
- [0189] 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 발현에 사용된 숙주 세포에 적절할 것이다. 다양한 숙주 세포에 대한 많은 타입의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 당업계에 공지되어 있다.
- [0190] 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 전사 시작 및 종결 서열, 번역 시작 및 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성인자 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0191] 당업계에 공지되어 있는 바와 같은 구성적, 억제성 또는 유도성 프로모터가 본 발명에 의해 고려된다.
- [0192] 발현 작제물은 또한 재조합 단백질이 융합 단백질로서 발현되도록 (전형적으로, 발현 벡터에 의해 제공되는) 융합 파트너를 코딩하는 추가의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0193] 발현 작제물은 또한 이에 제한되는 것은 아니지만, 예컨대, amp^R, neo^R 또는 kan^R과 같은, 선별 마커를 코딩하는 추가의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0194] 특정 실시양태에서, 발현 작제물은 적합하게는 동물 세포에서 작동가능한 프로모터 (예컨대, CMV, A-결정형 또는 SV40 프로모터)를 포함하는 플라스미드 DNA 형태일 수 있다. 다른 실시양태에서, 핵산은 예컨대, 아데노바이러스, 백시니아, 렌티바이러스 또는 아데노 연관된 바이러스 벡터와 같은 바이러스 작제물 형태일 수 있다.
- [0195] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 핵산 분자 또는 유전자 작제물로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0196] 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵성 또는 진핵성 세포일 수 있다. 예를 들어, 적합한 숙주 세포는 포유동물 세포 (예컨대, HeLa, Cos, NIH-3T3, HEK293T, Jurkat 세포), 효모 세포 (예컨대, 사카로마이세스 세레비시아에 (*Saccharomyces cerevisiae*)), 배큘로바이러스 발현 시스템과 함께 사용되거나, 또는 그 부재하에 사용되는, 곤충 세포 (예컨대, Sf9, 트리코플러시아 니(*Trichoplusia ni*)), 식물 세포 (예컨대, 클라미도모나스 레인하티

(*Chlamydomonas reinhardtii*), 파에도닥틸룸 트리코르누툼(*Phaeodactylum tricornerutum*) 또는 박테리아 세포, 예컨대, E. 콜라이를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-2015)], 특히 [Chapters 9 and 16]에 기술되어 있는 바와 같이, (원핵성 또는 진핵성 세포인지와는 상관없이) 유전자 작제물의 숙주 세포 내로의 도입은 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0197] 본 발명의 관련된 측면은 (i) 상기 측면의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)에서 배양된 상기 숙주 세포로부터 상기 단리된 단백질을 단리시키는 단계를 포함하는, 본원에 기술된 단리된 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0198] 이와 관련하여, 재조합 단백질은 예컨대, 본원 상기 제공된 것과 같은 표준 프로토콜을 이용하여 당업자에 의해 편리하게 제조될 수 있다.

[0199] 본 발명이 용이하게 이해되고, 실제로 수행하기 위해, 이제 특정 실시양태는 하기 비제한적인 실시예에 의해 설명될 것이다.

[0200] 실시예

[0201] 본 실시예는 CMV 당단백질 B 및 TLR9 효능제 CpG 1018과 함께 광범위한 HLA 분자를 포함하는 5개의 상이한 CMV 항원으로부터 스무 개 (20)의 상이한 에피토프를 함유하는 폴리에피토프 단백질을 함유하는 백신 제제의 면역원성을 조사하였다.

[0202] **물질 및 방법**

[0203] **CMVpoly20PL-NH 단백질 발현 및 정제**

[0204] 화학적으로 적격한 E. 콜라이 BL21-codonPlus (DE3) RP 세포 (애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies))를 CMVpoly20PL-NH 발현 벡터 (pJ404-아툼 바이오(pJ404-Atum Bio))로 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 암피실린 (LB-Amp) 100 µg/mL로 보충된 루리아 베르타니(Luria Bertani: LB) 아가(agar)에 플레이팅하고, 플레이트를 37°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 단리된 콜로니를 채취하고, 100 µg/mL 암피실린을 함유하는 10 ml 테리픽 브로스 (TB-Amp 브로스)에 접종하고, 진탕기에서 37°C하에 200 rpm으로 밤새도록 성장시켰다. 밤새도록 성장시킨 배양물 소량을 50 mL TB-Amp 브로스에 접종하고, 12시간 동안 성장시켰다. 50 mL 배양물로부터의 배양물 중 약 1%를 3 L TB-Amp 브로스로 옮기고, 600 nm에서 0.6에 도달할 때까지 배양물을 성장시켰다. 1 mM/mL의 IPTG를 첨가하여 CMVpoly20PL-NH 유도를 수행하였다. 상기 세포를 추가로 4시간 동안 성장시키고, 12% 소듐도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)에서 비유도 및 유도된 샘플을 분석하여 단백질 발현 수준을 측정하였다.

[0205] 유도 단계 종료시, 15분 동안 13,000 rpm으로 원심분리하여 E. 콜라이 배양물을 수확하고, 세포 펠릿을 프로테아제 억제제 콕테일 (로슈(Roche: 독일 만하임))로 보충된, 100 mL 용해 완충제 (25 mM 트리스 pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5% 트리톤X 100, 0.5 mg/mL lysozyme) 중에 재현탁시키고, 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시킨 후, 초음파발생장치를 사용하여 세포를 용해시켰다. 각 사이클 사이에 10분의 휴식 시간을 포함하면서, 6 x 8분 사이클 (전원을 켜고, 끄는 데 1초)로 초음파처리를 수행하였다. 30분 동안 13,000 rpm으로 용해물을 원심분리하고, 상청액 및 펠릿 분획을 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하였다.

[0206] SDS-PAGE 분석 후, 단백질은 봉입체 (IB) 형태로 펠릿 중에서 발견되었고, 대략 2 그램 (습윤 중량)의 펠릿이 매 3 L의 유도된 배양물로부터 수득되었다. IB 세척, 가용화 및 정제 단계 모두 냉동 실험실에서 수행하였다. 숙주 단백질 오염물질을 제거하기 위해, 대략 500 밀리그램의 IB를 2 x 600 mL의 TE 완충제 (25 mM 트리스 및 5 mM EDTA pH 7.5 - 3 x 200 mL 세척)로 세척하였다. 균질 현탁액을 제조하기 위해, IB를 TE 완충제 중에 현탁시키고, 10분 동안 (전원을 켜고, 끄는 데 1초) 초음파처리한 후, 용액을 4°C에서 30분 동안 교반하면서, 인큐베이션시켰다. 매 세척 종료시, 용액을 13,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하였다. TE 완충제 세척 후, IB를 상기 언급된 바와 같이 2 x 200 mL의 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 4 M 우레아 pH 7.5 완충제로 세척하였다. 원심분리 후, 모든 세척으로부터 수득된 상청액을 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하여 CMVpoly20PL-NH 단백질 손실을 체크하였다. 마지막으로, IB를 4°C에서 48시간 동안 교반하면서, 300 mL의 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8 M 우레아 pH 5.5 완충제 중에 가용시켰다. 가용성 단백질을 13,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 정화시키고, 모든 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하였다. 정화된 상청액을 CMVpoly20PL-NH 정제에 사용하였다.

[0207] CMVpoly20PL-NH 단백질을 정제하기 위해, 7 mL의 SP-세파로스 매트릭스 (GE 헬스케어(GE healthcare))를 10 칼럼 부피의 증류수, 5 칼럼 부피의 1 M NaOH로 세척하고, 증류수로 중화시키고, 5 칼럼 부피의 1 M NaCl로 재생시킨 후, 5 칼럼 부피의 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8 M 우레아 pH 5.5 완충제로 평형화시켰다. 가용성 단백질을 4°C에서 45분 동안 500 mL 듀란(Duran) 병 중에서 평형화된 매트릭스와 혼합하였다. 이어서, 슬러리를 칼럼으로 옮기고, FT를 수집하였다. 비결합 단백질 및 불순물을 20 칼럼 부피의 세척 완충제; 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8 M 우레아 pH 6.5로 세척하였다. 결합된 단백질을 용출시키기 위해, 칼럼에 용출 완충제; 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8 M 우레아 pH 7.5를 로딩하고, 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 단백질을 6 x 7 mL 분획 중에서 용출시켰다. 추가로, 칼럼에 용출 완충제; 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8 M 우레아 pH 7.5를 로딩하고, 추가로 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 단백질을 추가의 6 x 7 mL 분획 중에서 용출시켰다. 모든 정제 단계로부터 수득된 샘플을 SDS-PAGE 상에서 분석하였다. 모든 정제된 단백질 분획을 함께 풀링하고, 최종 부피 50 mL로 농축시켰다.

[0208] 정제된 CMVpoly20PL-NH 단백질로부터 숙주 DNA 및 내독소 오염물을 제거하기 위해, 하이세린 Q-FF 세파로스 (HiScreen Q-FF Sepharose) (5 mL-GE 헬스케어)를 10 칼럼 부피의 증류수, 5 칼럼 부피의 1 M NaOH로 세척하고, 증류수로 중화시키고, 5 칼럼 부피의 1 M NaCl로 재생시킨 후, 5 칼럼 부피의 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8 M 우레아 pH 7.5 완충제로 평형화시켰다. 농축된 CMVpoly20PL-NH 단백질을 Q-FF 상에 로딩하고, 통과액을 수집하였다. 비용출된 단백질을 회수하기 위해, 칼럼을 2 칼럼 부피의 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM 트리스, 2.5 mM DTT, 8 M 우레아 pH 7.5 완충제로 세척하였다. 상이한 정제 단계의 모든 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하였다. SDS-PAGE 분석 후, 통과액 및 세액을 함께 조합하고; 단백질 샘플의 pH를 7.5에서 3.8로 감소시켰다. CMVpoly20PL-NH 단백질을 4°C에서 밤새도록 스네이크스킨(SnakeSkin) 투석 튜빙 10000 MWC (써모 사이언티픽(Thermo Scientific: 미국 록퍼드))를 사용하여 pH 3.8에서 25 mM 글리신 완충제에 대해 투석하였다. 투석 후, 단백질을 농축시키고, 무스탕 E 막 (PALL 코포레이션(PALL Corporation: 미국 뉴욕주))을 통과시켜 내독소 오염물질을 추가로 제거하고, 단백질을 0.22 μm 막 필터를 사용하여 여과 멸균시킨 후, BIO-RAD 브래드퍼드(Bradford) 단백질 검정 키트 및 280 nm에서의 UV 흡광도를 이용하여 전체 단백질을 추정하고, 정제된 단백질을 -70°C에서 보관하였다.

[0209] **단백질 무손상 질량 분석.**

[0210] 오스트랄리안 프로테오마 아날리시스 퍼실리티(Australian Proteome Analysis Facility)에서 단백질 무손상 질량 분석을 수행하였다. 간략하면, 단백질 샘플을 2% 아세토니트릴 및 0.1% 포름산을 이용하여 대략 0.25 μg/μl 농도로 희석한 후, 샘플 (5 μl)을 칼럼 (워터스(Waters), X브릿지(XBridge) BEH300 C4 3.5 μm 2.1 x 100 mm) 상에 주입하였다. 단백질을 칼럼 상에서 탈염시키고, 선형 용매 구배 (A: 99.9% 물 + 0.1% 포름산; B: 99.9% 아세토니트릴 + 0.1% 포름산)를 이용하여 칼럼으로부터 용출시켰다. 단백질 LC 용출 프로파일에 대해 단백질 전자분무-이온화 질량 스펙트럼 평균을 구하였다. 다중 하전된 단백질 스펙트럼을 써모 프로테인 디컨볼루션 2.0 소프트웨어에 의해 디컨볼루션하였다.

[0211] **시험관내 면역원성 평가.**

[0212] CMVpoly20PL-NH 단백질의 면역원성을 측정하기 위해, 인간 백혈구 항원 A2 (HLA A2)를 발현하는 대수기 T1 세포를 혈청 무함유 RPMI 배지로 세척한 후, 1시간 동안 25 μg의 CMVpoly20PL-NH 단백질을 펠싱하였다. CMVpoly20PL-NH 펠싱된 T1 세포를 세척한 후, 이어서, 5% FCS를 함유하는 RPMI 중에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 세포를 세척하고, 1 CD8+ T 세포: 1 APC 및 4 CD8+ T 세포 : 1 APC 비로 CMV HLA A2 제한 에피토프 NLVPMVATV-특이적 CD8⁺ T 세포에 노출시키고, 4시간 동안 인큐베이션시켰다. ICS 분석에 의해 세포내 IFN-γ 발현을 측정하였다. NLVPMVATV 펩티드로 펠싱된 T1 세포 및 펠싱되지 않은 T1 세포를 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용하였다.

[0213] **유세포 분석법에 의한 분석.**

[0214] 비장세포를 사용하여 세포내 사이토카인 염색 (ICS) 검정법을 수행하여 IFN-γ 및 다중 사이토카인을 평가하였다. FACS 분석에 의해 배중심 B 세포 반응을 측정하였다. 백신접종 후, 비장세포를 0.2 μg/mL의 HLA 매칭 CMV CD8+ T 세포 펩티드 (HLA A1-VTE & YSE; HLA A2-NLV, VLE & YIL; HLA A24-QYD & AYA; HLA B8-Q1K, ELR & ELK; HLA B35-FPT & IPS)로 자극시켜 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응을 측정하거나, 또는 0.2 μg/mL의 gB pepmix (gB

중첩 펩티드 - 11개의 aa가 중첩되는 15 mer)로 자극시켜 6시간 동안 골지플러그(GolgiPlug)[®] (BD 파마민젠(BD PharMingen)) 존재하에 CMV-특이적 CD4+ T 세포 반응을 검출하고, 세포를 2회 세척한 후, APC-접합된 항-CD3, FITC-접합된 항-CD4 및 PerCP 접합된 항-CD8과 함께 인큐베이션시켰다. 세포를 고정시키고, BD 사이토폭스/사이토펜(Cytofix/Cytoperm) 키트를 이용하여 투과시킨 후, PE 접합된 항-IFN- γ 와 함께 인큐베이션시켰다. 다중 사이토카인의 발현을 평가하기 위해, 세포를 PerCP 접합된 항-CD8 및 BV786 항-CD4 표면 마커로 염색한 후, 이어서, PE-접합된 항-IFN- γ , PE-Cy7 접합된 항-TNF, FITC 접합된 CD017a 및 APC 접합된 항-IL2로 세포내에서 염색하였다. 배중심 B 세포 반응을 평가하기 위해, 백신접종된 마우스로부터의 비장세포 또는 림프절로부터의 세포를 PE 접합된 항-B220, FITC 접합된 항-GL7 및 APC 접합된 항-CD95로 염색하였다. BD FACSCanto II 상에서 세포를 획득하고, FlowJo 소프트웨어 (트리 스타(Tree Star))를 사용하여 데이터를 분석하였다. 다중 사이토카인을 생산하는 CMV-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 분석을 심플리파이드 프리젠테이션 오브 인크레더블리 콤플렉스 이벨루션즈 (SPICE) 소프트웨어 버전 5.1을 이용하여 수행하였다.

[0215] **다양한 조합의 애주번트를 이용하여 제제화된 CMV 백신의 면역원성 평가.**

[0216] 모든 마우스 연구는 QIMR 버고퍼(QIMR Berghofer) 동물 윤리 위원회로부터 승인을 받았다. 모든 인간 HLA 트랜스제닉 마우스 (HLA A1, HLA A2, HLA A24, HLA B8 및 HLA B35)를 QIMR 버고퍼에서 육종하고, 무병원체 환경하에서 유지시켰다. 상기 트랜스제닉 마우스는 마우스 MHC 클래스 I 분자를 발현에 있어 결핍성을 보이고, 공통적으로 발현된 인간 HLA 클래스 I 분자의 트랜스진을 함유한다. CMVpoly20PL-NH 폴리펩티드 및 CMV 당단백질 B (gB)에 대한 면역원성 반응을 평가하기 위해, 단백질을 3개의 상이한 형태의 모노포스포릴 리피드 A (신테틱 (Synthetic)) (아반티 폴라 리피드(Avanti Polar Lipids)) 및 비메틸화된 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 1018 (CpG 1018) (트리링크 바이오테크놀로지즈(TriLink BioTechnologies)) 애주번트와 함께 이용하여 제제화하였다. 25 μ g의 PHAD 및 50 μ g의 CpG 1018, 25 μ g의 3D-PHAD 및 50 μ g의 CpG 1018, 25 μ g의 3D(6-아실)-PHAD 및 50 μ g의 CpG 1018 또는 50 μ g의 CpG 1018 단독으로 제제화된, 30 μ g의 CMVpoly20PL-NH 및 5 μ g의 gB 단백질을 함유하는 CMV 백신 제제를 이용하여 6 내지 8주령된 마우스를 꼬리 기저부에 100 μ l 부피로 피하로 (s.c.) 면역화시켰다. 25 μ g의 MPL 및 50 μ g의 CpG 1826 또는 애주번트 단독으로 제제화된, 30 μ g의 CMVpoly20PL-NH 및 5 μ g의 gB 단백질로 면역화된 마우스를 양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다. 21일째 마우스 꼬리를 출혈시키고, 부스터 용량을 제공하였다. 28일째 마우스를 희생시키고, 면역 반응에 대해 평가하였다. 대조군 마우스는 애주번트를 단독으로 주사하였다. CMV 백신 유도된 면역 반응의 장기간 지속성을 평가하기 위해, 0일째 HLA A24 및 HLA A1 인간 HLA 트랜스제닉 마우스를 50 μ g의 CpG 1018과 함께 제제화된 30 μ g의 CMVpoly20PL-NH 및 5 μ g의 gB 단백질을 함유하는 CMV 백신 제제로 면역화시킨 후, 이어서, 21 및 42 및 210일째, 부스터하였다. 대조군 마우스에는 CpG1018 애주번트를 단독으로 주사하였다. 마우스를 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 희생시켜 장기간 CMV-특이적 면역 반응을 평가하였다.

[0217] **IFN- γ , 다중 사이토카인, 배중심 B 세포 또는 T 세포 헬퍼 세포 반응을 평가하기 위한 세포내 사이토카인 염색**

[0218] 백신접종 후, 비장세포를 0.2 μ g/mL의 HLA 매칭 CMV CD8+ T 세포 펩티드 (HLA A1-VTE & YSE; HLA A2-NLV, VLE & YIL; HLA A24-QYD & AYA; HLA B8-QIK, ELR & ELK; HLA B35-FPT & IPS)로 자극시켜 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응을 측정하거나, 또는 0.2 μ g/mL의 gB pepmix (gB 중첩 펩티드 - 11개의 aa가 중첩되는 15 mer)로 자극시켜 6시간 동안 골지플러그[®] (BD 파마민젠) 존재하에 CMV-특이적 CD4+ T 세포 반응을 검출하고, 세포를 2회 세척한 후, APC-접합된 항-CD3, FITC-접합된 항-CD4 및 PerCP 접합된 항-CD8과 함께 인큐베이션시켰다. 세포를 고정시키고, BD 사이토폭스/사이토펜 키트를 이용하여 투과시킨 후, PE 접합된 항-IFN- γ 와 함께 인큐베이션시켰다. 다중 사이토카인의 발현을 평가하기 위해, 세포를 PerCP 접합된 항-CD8 및 BV786 항-CD4 표면 마커로 염색한 후, 이어서, PE-접합된 항-IFN- γ , PE-Cy7 접합된 항-TNF, FITC 접합된 CD017a 및 APC 접합된 항-IL2로 세포내에서 염색하였다. 배중심 B 세포 반응을 평가하기 위해, 백신접종된 마우스로부터의 비장세포 또는 림프절로부터의 세포를PE 접합된 항-B220, FITC 접합된 항-GL7 및 APC 접합된 항-CD95로 염색하였다. BD FACSCanto II 상에서 세포를 획득하고, FlowJo 소프트웨어 (트리 스타)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0219] **백신접종 후 CMV-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 시험관내 확장**

[0220] 백신접종 후, 면역화된 마우스로부터의 5 x 10⁶개의 비장세포를 단리시키고, 0.2 μ g/mL의 매칭 CMV CD8+ T 세포 펩티드 또는 gB pepmix (gB 중첩 펩티드 - 11개의 aa가 중첩되는 15 mer)로 자극시키고, 세포를 37°C, 10% CO₂ 하에 10일 동안 24 웰 플레이트에서 배양하였다. 배양물을 3 및 6 및 10일째 재조합 IL-2로 보충하고, ICS 검정법을 이용하여 T 세포 특이성을 평가하였다.

- [0221] **마우스 IgG ELISpot 검정법**
- [0222] 생체의 gB-특이적 항체 분비 세포를 측정하기 위해, PVDF ELISpot 플레이트 (밀리포어(Millipore))를 70% 에탄올로 처리하였다. 플레이트를 증류수로 5회 세척하고, 100 μl /웰 CMV gB 단백질 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 항-IgG 항체 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 코팅하고, 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 플레이트를 10% 혈청을 함유하는 DMEM로 차단하고, 각 마우스로부터의 300,000개의 세포/웰을 삼중으로 첨가한 후, 이어서, 37°C에서 5% CO₂하에 18시간 동안 습윤화된 인큐베이터에서 인큐베이션시켰다. 세포를 제거하고, 플레이트를 세척하였다. HRP에 접합된 검출 항체 항-IgG (MABTECH)를 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고; 스트렙타비딘-ALP를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 세척하고, 뚜렷이 발색될 때까지, BCIP/NBT (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))를 함유하는 기질 용액으로 플레이트를 처리하였다. 플레이트를 물로 세척하여 발색을 중단시키고, 건조시키기 위해 플레이트를 밤새도록 유지시켰다. 기억 B 세포 반응을 측정하기 위해, 비장 세포 (5 x 10⁵)를 24 웰 플레이트에서 5일 동안 R484 및 재조합 마우스 IL-2 혼합물로 활성화시킨 후, 상기 언급된 바와 같이 ELISpot를 수행하였다. ELISpot 판독기에서 스폿 개수를 계수하였다.
- [0223] **ELISA**
- [0224] 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA)에 의해 총 혈청 항-gB 항체 및 항체 이소타입 역가를 평가하였다. 간략하면, 50 μl 의 재조합 HCMV gB 단백질 (카르보네이트 완충제 중에서 희석된 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 gB 단백질)로 사전 코팅된 96 웰 플레이트 및 플레이트를 4°C에서 o/n에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 0.05% 트윈 20을 함유하는 포스페이트 완충제 염수 (PBST) 완충제로 세척한 후, 5% 스킵 밀크로 차단하였다. 연속 희석된 혈청 샘플 (21 또는 28일째)을 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. PBST로 세척한 후, 플레이트를 1시간 동안 HRP-접합된 양 항-마우스 Ig 항체 (전체 항체 반응 측정을 위해) 또는 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 IgG3 항체 (써던바이오테크(SouthernBiotech)) (항체 이소타입 측정을 위해)와 함께 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 세척하고, 10 min 동안 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 기질 용액과 함께 인큐베이션시킨 후, 이어서, 1 N HCl을 첨가하여 발색을 중단시켰다. ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서의 OD를 측정하였다.
- [0225] **미세중화 검정법**
- [0226] CMV의 AD169 및 TB40/E 균주에 대한 중화 활성을 측정하였다. 인간 섬유모세포 MRC-5 또는 성체 망막 색소 상피 (ARPE-19) 세포를 96 웰 바닥이 평평한 플레이트에 플레이트링하였다. 다음날, CMV 백신 제제로 백신접종된 마우스로부터의 혈청 샘플을 연속 희석시키고, 96 웰 U-바닥 플레이트에서 D0 (혈청 무함유 DMEM) 중에 희석된 표준 개수의 바이러스 입자 (웰당 1000 p.f.u.)에 첨가하고, 37°C 및 5% CO₂하에 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 양성 대조군으로서, 혈청 무함유 바이러스 및 음성 대조군인 바이러스 무함유 혈청 또한 본 시험에 포함시켰다. 이어서, 혈청/CMV 혼합물을 MRC-5 또는 ARPE-19 세포에 첨가하고, 37°C 및 5% CO₂하에 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 혼합물을 폐기하고, 10% FCS를 함유하는 DMEM (D10)로 세포를 5회에 걸쳐 부드럽게 세척하고, 최종 200 ml의 R10을 각 웰에 첨가한 후, 이어서, 37°C 및 5% CO₂하에 16-18시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 100 mL 냉 메탄올로 고정시키고, 실온에서 3시간 동안 퍼옥시다제 블럭(Peroxidase Block) (다코(Dako))과 함께, 이어서, 마우스 항-CMV IE-1/IE2 mAb (케미콘(Chemicon))와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 실온에서 3시간 동안 웰당 50 ml HRP-접합된 염소 항-마우스 Ig (PBS 중 1:200 희석)와 함께 인큐베이션시켰다. 세포를 실온에서 10 min 동안 웰당 20 μl 디아미노벤지딘 + 기질 (다코)로 염색하고, 암갈색으로 염색된 양성 핵을 계수하였다. IE-1/IE-2-발현 핵을 50% 억제시키는 혈청 희석률의 역수로서 중화 역가를 계산하였다.
- [0227] **CMV 감염된 섬유모세포 검정법에서의 세포 회합된 gB에 결합하는 CMV gB-특이적 항체.**
- [0228] 인간 섬유모세포 세포주인 MRC-5 세포를 T75 플라스크에서 50% 전면생장(confluency)까지 성장시켰다. 37°C 및 5% CO₂하에 2시간 동안 감염 다중도 (MOI) 2.0으로 세포를 CMV AD169 균주로 감염시켰다. 감염 후, 세포를 세척하고, 48시간 동안 10% FCS를 함유하는 DMEM와 함께 인큐베이션시켜 세포-세포 바이러스 스페어링을 허용했다. 감염된 세포를 PBS로 세척한 후, 트립신-EDTA를 이용하여 세포를 이탈시켰다. 세포를 세척하고, 계수한 후, 10⁶개의 생존가능한 세포/mL로 재현탁시켰다. 세포를 셀트레이스 바이올렛으로 염색하고, 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 세척한 후, 실온에서 10분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 세포를 2회 세척하고, 96 웰 V-바닥 플레이트 중 20,000/웰로 플레이트링하고, 세포를 원심분리하여 펠릿화하고, 상청액을 폐기하였다. 21, 28, 42, 49, 84, 133, 203 및 217일째 CMV 백신 또는 위약으로 면역화한 후, HLA A24

인간 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 마우스 혈청 샘플을 풀링한 후, 1:512로 희석시켰다. 희석된 혈청 샘플을 MRC-5 세포에 첨가하고, 37°C 및 5% CO₂하에 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 세척한 후, 4°C에서 30 분 동안 항-마우스 AF488 IgG (H+L)로 염색하였다. BD FACSCanto II 상에서 세포를 획득하고, FlowJo 소프트웨어 (트리 스타)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 생존가능한 AF 488 양성 세포의 비율(%)로부터 CMV 감염된 섬유모세포에 결합하는 CMV gB-특이적 항체의 비율(%)을 계산하였다.

[0229] **결과**

[0230] **CMVpoly20PL-NH 단백질 작제물 디자인, 단백질 발현, 정제 프로세스 개발, 단백질 특징화 및 시험관내 면역원성 평가**

[0231] CMV-특이적 면역 반응은 이전에 이해된 바와 같이 gB, pp65 및 IE-1 항원으로 제한되지 않지만, CMV 리딩 프레임 중 70% 초과에 대한 것이다 (문헌 [Elkington, Walker et al. 2003], [Elkington, Shoukry et al. 2004], [Manley, Luy et al. 2004], [Sylwester, Mitchell et al. 2005]). 따라서, 광범위한 레퍼토리의 바이러스 특이적 면역 반응을 유도할 수 있는 백신은 가능하게는 바이러스 연관된 발병기전에 대하여 더욱 효과적인 방어를 제공할 수 있다. 따라서, 광범위한 레퍼토리의 면역우세 CMV 항원을 표적화하기 위해, 다가 백신 (multivalent vaccine)이 1가 백신보다 더욱 긴 장수명의 면역을 제공할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 인간 화합성 애주번트(들)와 함께 CMV 당단백질 B (gB) 및 폴리에피토프 (CMVpoly20PL-NH) 재조합 단백질로 구성된 신규한 다가 백신을 디자인하였다. 본 백신 제제에서 사용된 CMV gB는 세포외 및 세포내 도메인으로 구성되고, 이는 중화 항체 및 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응에 대한 주된 표적이다. 또 다른 단백질은 CMV의 5개의 고도로 보존되는 면역우성 항원 (pp65, IE-1, pp150, pp50 및 DNase)으로부터의 다중 HLA 클래스 I 제한 CD8+ T 세포 에피토프를 코딩하도록 디자인된 CMVpoly20PL-NH이다. 폴리에피토프 서열은 각 에피토프의 카르복실 말단에서 프로테아좀 유리 아미노산 서열 (AD 또는 K 또는 R)에 의해 연결되는 방식으로 디자인되었다 (표 1). 본 발명자들의 이전 연구에서, 폴리에피토프 단백질의 프로테아좀 프로세싱을 증진시킴으로써 프로테아좀 유리 아미노산 서열이 면역원성 of CD8+ T 세포 에피토프를 개선시킨다는 것이 본 발명자들에 의해 밝혀졌다 (문헌 [Dasari, Smith et al. 2014]). E. 콜라이 코돈 사용빈도에 기초하여 CMVpoly20PL-NH 작제물의 아미노산 서열을 DNA 서열로 번역하고 (도 1), CMV 폴리에피토프 코딩 서열을 합성에 의해 구축하고, 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG) 유도성 프로모터하에 발현 플라스미드로 클로닝하였다. 합성에 의해 디자인된 CMVpoly20PL-NH 작제물을 화학적으로 적격한 E. 콜라이 DH5α 세포 내로 형질전환시킨 후, 이어서, 플라스미드를 단리시키고, 정제하였다.

[0232] CMVpoly20PL-NH 발현 벡터를 E. 콜라이 BL21-codonPlus (DE3) RP 단백질 발현 숙주 내로 형질전환시켰다. CMVpoly20PL-NH 발현 벡터를 E. 콜라이 내로 형질전환시킨 후, IPTG를 사용하여 CMVpoly20PL-NH 단백질 발현을 유도하였다. 유도 단계 종료시, E. 콜라이 배양물을 수확하고, 분석하여 단백질 발현 수준을 측정하였다. 상기 분석으로부터 수득된 데이터에 따르면, CMVpoly20PL-NH 발현 벡터는 고수준의 CMVpoly20PL-NH 단백질을 생산한 것으로 나타났다 (도 2a). CMVpoly20PL-NH 단백질을 정제하기 위해 세포 용해를 수행하고, SDS-PAGE를 사용하여 세포 용해물로부터의 상청액 및 펠릿 분획을 분석하였다. 선형 CD8+ T 세포 에피토프의 높은 소수성 성질에 기인하여 CMVpoly20PL-NH 단백질은 봉입체 (IB) 형태로 응집되었다 (도 2b). 숙주 세포 단백질 및 DNA 오염물을 제거하기 위해, IB를 TE 완충제로 세척한 후 (도 2c), 이어서, 가용화시켰다. 가용성 단백질을 SP-세파로스 칼럼을 이용하여 배치 모드로 정제하고, SP-세파로스 칼럼으로부터 용출된 CMVpoly20PL-NH 단백질을 Q-세파로스 칼럼 상에 로딩하여 숙주 DNA 및 내독소 오염물을 제거한 후, 정제된 CMVpoly20PL-NH 단백질을 25 mM 글리신 pH3.8 완충제에 대해 투석한 후, 모든 샘플을 SDS-PAGE 상에서 분석하였다 (도 2d 및 e). 잔류 내독소 오염물을 추가로 제거하기 위해, 투석된 단백질을 무스탕 E™ 0.22 μm 막을 통해 여과하였다. 3회의 실험으로부터 수득된 데이터 결과, CMVpoly20PL-NH 단백질은 성공적으로 발현될 수 있고, 박테리아 발현 시스템을 사용하여 균질하게 정제될 수 있는 것으로 나타났다. CMVpoly20PL-NH 단백질의 아이덴티티를 확인하기 위해, 본 발명자들은 단백질 무손상 질량 분석을 수행하였고, 정제된 폴리펩티드의 CMVpoly20PL-NH의 질량은 아미노산 서열에 의해 예측된 분자량 이론치와 일치한다 (도 3). CMVpoly20PL-NH 단백질의 면역원성을 측정하기 위해, 인간 림프모구성 세포주 (LCLs)를 밤새도록 CMVpoly20PL-NH 단백질로 펠싱한 후, 이어서, 세포내 IFN-γ 분석을 이용하여 CMV-특이적 CD8+ T 세포를 활성화시킬 수 있는 이의 능력에 대해 평가하였다. NLV 에피토프로 펠싱된 LCL로 펠싱된 LCL과 비교하여 CMVpoly20PL-NH로부터의 HLA A2-제한 pp65 에피토프, NLVPMVATV (NLV로 지칭)가 더욱 효율적으로 프로세싱되고, NLV-특이적 CD8+ T 세포에 제시되었다 (도 4).

[0233] **인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서의 CMV 백신 제제 개발 및 면역원성 평가**

[0234]

CMV의 면역학, 병리학 및 분자 생물학에 대한 최근의 이해에 따르면, CMV 관련 질환으로부터의 방어는 체액성 및 세포성 면역, 둘 모두에 의해 매개되는 바, CMV에 대한 이상적인 백신은 체액성 및 세포성 반응, 둘 모두를 유도해야 하는 것으로 제안되었다. 불행하게도, CMV 백신을 개발하고자 하는 최근의 시도는 제한된 성공을 보여주었다. 이러한 CMV 백신 전략법은 당단백질 B (gB), pp65 및 IE-1을 잠재적 표적으로 평가했으며, 약독화된 CMV Towne 균주 (문헌 [Jacobson, Sinclair et al. 2006]), 전장 항원 및 에피토프를 코딩하는 재조합 바이러스 벡터 (문헌 [Bernstein, Reap et al. 2009], [Zhong and Khanna 2009], [La Rosa, Longmate et al. 2017]), DNA (문헌 [Wloch, Smith et al. 2008]), 치밀 소체 (문헌 [Pepperl-Klindworth, Frankenberg et al. 2002]), 서브유닛 (문헌 [Drulak, Malinoski et al. 2000]) 백신 및 가장 최근, AD169 균주로부터 유래된 조건부 복제 결함 CMV 백신 (문헌 [Adler, Lewis et al. 2019])을 비롯한, 수많은 전달 플랫폼에 의해 전달되었다. 수년에 걸쳐, 방어 CD8 세포독성 T 세포 반응을 유발하기 위해서는 바이러스 항원은 외인성 전달 단백질이 아닌 핵산 형태로 (예컨대, 바이러스 벡터 전달 시스템 또는 DNA 플라스미드를 사용하여) 전달되어 발현된 폴리펩티드가 적절하게 프로세싱되고, T 세포에 제시될 수 있게 하여야 한다고 믿어져 왔다. 그러나, 이러한 백신 전달 플랫폼들은 대부분, 특히, 약독화 생백신 및 바이러스 벡터 기반 백신은 예컨대, 장기간 이론적으로 인지되는 건강상 위험 및 기존 면역과 같은 몇 가지 규제 문제를 제기하였다 (문헌 [Lee, Markham et al. 2012]). 면역원성 및 안전성 문제를 극복하기 위해, 본 발명자들은 상이한 CMV 감염 및 복제 단계에서 발현되는 6개의 항원에 대한 CMV-특이적 중화 항체 반응, CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 생성하는, 인간 화합성 애주번트 시스템을 이용한 신규한 다가 백신 플랫폼 기술을 개발하였다.

[0235]

CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질에 대한 강건한 면역 반응을 생성하기 위해, 본 발명자들은 CpG 1018 단독으로 또는 3개의 상이한 형태의 MPLA (PHAD, 3D-PHAD 및 3D(6-아실)-PHAD를 이용하여 상기 두 단백질을 제제화하였다. 0일째 인간 HLA 24 트랜스제닉 마우스를 상이한 CMV 백신 제제로 면역화하고, 21일째 상기 마우스 꼬리를 출혈시키고, 동일한 백신 제제로 부스터하였다. 28일째 면역화된 마우스를 희생시켜 CMV-특이적 면역 반응을 평가하였다 (도 5a). PHAD 및 CpG 1018, 3D-PHAD 및 CpG 1018, 3D(6-아실)-PHAD, CpG 1018 단독 또는 MPL 및 CpG 1826으로 제제화된, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질로 면역화한 결과, 애주번트 단독 대조군과 비교하여 강력한 생체의 IFN- γ 분비 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응 (HLA A24 제한 QYD 및 AYA 펩티드 특이적)이 일어났다. 그러나, 3D-PHAD 및 CpG 1018 또는 CpG 1018 단독으로 제제화된, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH로 면역화된 마우스에서 IFN- γ 분비 CD8+ T 세포 반응이 유의적으로 증진되었다 (도 5b). 추가로, 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서는 CD8+ T 세포 개수가 적기 때문에, 본 발명자들은 백신 유도된 CMV-특이적 CD8+ T 세포를 생체외에서 확장시킴으로써 모든 백신 제제의 면역원성을 추가로 확인한다. 흥미롭게도, 시험관내 확장 후, PHAD 및 CpG 1018, 3D-PHAD 및 CpG 1018, 3D(6-아실)-PHAD, CpG 1018 단독 또는 MPL 및 CpG 1826으로 제제화된, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질로 면역화된 마우스에서 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포가 적어도 20배 증가한 것으로 관찰되었다 (도 5c). IFN- γ 분비 외에도, 본 발명자들은 또한, 다기능성 T 세포가 CMV 감염을 제어하는 데 중요한 역할을 하기 때문에, 다중 사이토카인을 분비할 수 있는 이의 능력에 대하여 백신 유도된 CMV-특이적 CD8+ T 세포를 평가하였다 (문헌 [Crough, Beagley et al. 2012], [Gibson, Barysauskas et al. 2015]). PHAD 및 CpG 1018, 3D-PHAD 및 CpG 1018, 3D(6-아실)-PHAD, CpG 1018 단독 또는 MPL 및 CpG 1826으로 제제화된, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질로 백신접종된 마우스로부터의 비장세포의 생체의 확장 결과, 2 또는 3개의 매개인자 (IFN- γ , TNF 또는 IL-2)를 발현하는 CMV-특이적 CD8+ T 세포 집단이 상당한 수준으로 생성되었다 (도 5d). 다음 실험 세트에서, PHAD 및 CpG 1018, 3D-PHAD 및 CpG 1018, 3D(6-아실)-PHAD, CpG 1018 단독 또는 MPL 및 CpG 1826으로 제제화된, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질로 마우스를 면역화시키고, gB-특이적 항체 및 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 유도할 수 있는 이의 능력을 평가하였다. 생체외 분석 결과, 애주번트 단독 대조군과 비교하여 모든 백신 제제는 강력한 CMV-gB 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 유도하였지만; gB-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응의 유의적인 증진은 3D-PHAD 및 CpG 1018 또는 CpG 1018 단독으로 제제화된, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질로 백신접종된 마우스에서 관찰된 것으로 나타났다 (도 5e 및 5f). 이어서, 본 발명자들은 PHAD 및 CpG 1018, 3D-PHAD 및 CpG 1018, 3D(6-아실)-PHAD, CpG 1018 단독, MPL 및 CpG 1826 또는 애주번트 단독으로 제제화된, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질로 백신접종된 마우스의 혈청 샘플에서의 gB-특이적 항체 반응을 평가하였다. PHAD 및 CpG 1018, 3D-PHAD 및 CpG 1018, 3D(6-아실)-PHAD, CpG 1018 단독 또는 MPL 및 CpG 1826으로 제제화된, gB 및 CMVpoly20PL-NH는 1차 면역화 (21일째) 후 gB-특이적 항체 역가를 유도하였고, 상기 역가는 애주번트 단독으로 면역화된 마우스로부터 수득된 혈청과 비교하여 모든 군에서 28일째 부스터 투약 후 추가로 증가하였다 (도 6a 및 6b). 혈청 샘플 중 항-gB 항체의 이소타입 또한 평가하였다. PHAD 및 CpG 1018, 3D-PHAD 및 CpG 1018, 3D(6-아실)-PHAD, CpG 1018 단독 또는 MPL 및 CpG 1826으로 제제화된, CMV gB CMVpoly20PL-NH의 조합은 IgM, IgG1 (Th2 유사 Ig 이소타입), 및 IgG2b,

IgG2a, IgG3 (Th1 유사 Ig 이소타입)을 비롯한, 다중 이소타입을 포함한 CMV-gB-특이적 항체 반응을 유도하였다 (도 6c). 종합하면, 본 결과들을 통해 3D-PHAD 및 CpG 1018 또는 CpG 1018 단독으로 제제화된 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질이 3D-PHAD 및 CpG 1018 또는 3D(6-아실)-PHAD를 포함하는 제제와 비교하여 강건한 CMVpoly20PL-NH-특이적 CD8+ T 세포 반응 및 gB-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 및 항체 반응을 생성할 수 있다는 것이 입증되었다. 후속 실험에서 3D-PHAD 및 CpG 1018 또는 CpG 1018 단독으로 제제화되었을 때, CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질에 대해 생성된 면역 반응에 있어 유의적인 차이는 없었기 때문에, 본 발명자들은 CpG 1018 단독으로 제제화된 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질을 사용하여 CMV 백신 유도된 면역 반응의 면역원성 및 지속성을 시험하였다.

[0236] 다중 HLA 트랜스제닉 마우스에서의 CpG 1018 애주번트로 제제화된 CMV 백신의 확장된 임상적 평가

[0237] 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질에 대한 강건한 면역 반응이 관찰되었지만, 다른 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 gB 및 CMVpoly20PL-NH의 면역원성을 평가하는 것이 중요하다. 상기 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스는 다양한 인간 HLA 클래스 I 분자에 대한 CMVpoly20PL-NH 단백질 CD8+ T 세포 에피토프 제한의 면역원성을 평가하는 데 있어 더욱 큰 이점을 제공한다. CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 단백질의 면역원성을 평가하기 위해, 0일째 인간 HLA A1, A2, A24, B8 및 B35 트랜스제닉 마우스를 CpG 1018 단독 (백신 군) 또는 CpG 단독 (대조군)으로 제제화된 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH로 면역화하였다. 마우스 꼬리를 출혈시키고, 21일째 부스팅하고, 28일째 희생시켰다 (도 7a). 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 관찰된 면역원성 데이터와 일치하게, 생체의 분석 결과, CpG 1018 단독과 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH의 제제가 CpG 1018 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 모든 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 유의적으로 더 높은 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응 (HLA A1, A2, A24, B8 및 B35 에피토프에의 제한)을 유도한 것으로 명백히 나타났다 (도 7b 및 7d). 상기 생체의 면역 반응은 시험관내에서 백신접종된 마우스 비장세포를 각 펩티드로 자극시키고, 이를 10일 동안 배양함으로써 추가로 확인되었다. 흥미롭게도, 생체의 자극 결과, CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응이 유의적으로 확장되었다. 구체적으로, 시험관내 자극 후 생체의 반응과 비교하여, IFN- γ 분비 CD8+ T 세포는 40 내지 200 배 증가한 것으로 관찰되었다 (도 7c 및 7d). 추가로, CpG 1018 단독으로 제제화된 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH는 또한 다기능성 CMV-특이적 CD8+ T 세포를 유도하였고, 생체의에서 32% 내지 59% 범위로, 및 시험관내 69% 내지 98% 범위로 확장된 CMV-특이적 CD8+ T 세포는 적어도 2개의 사이토카인 (IFN- γ , TNF 또는 IL-2)을 분비한다 (도 7e). CpG 1018 단독으로 제제화된 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH는 또한 CpG 1018 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 HLA A1, A24, B8 및 B35 마우스에서 IFN- γ 생산 CMV-gB specific CD4+ T 세포를 유의적으로 더 높게 유도하였다 (도 8a 및 8c). gB pepmix로의 시험관내 확장 후 이루어진 후속 분석에서는 생체의 반응과 비교하여 HLA A1, A2, A24, B8 및 B35 트랜스제닉 마우스에서 IFN- γ 생산 CMV-gB 특이적 CD4+ T 세포의 확장은 20 내지 90배 증가하는 결과가 나타났다 (도 8b 및 8c). 놀랍게도, 생체의 및 시험관내 확장 분석 결과, CpG 1018 단독으로 제제화된 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH는 또한 모든 HLA 트랜스제닉 마우스에서 다기능성 gB-특이적 CD4+ T 세포 반응 또한 유도하였고, 특히, 적어도 43%의 생체의 및 62%의 gB-특이적 CD4+ T 세포가 적어도 2개의 사이토카인 (IFN- γ , TNF 또는 IL2)을 분비하는 것으로 나타났다 (도 8d). 추가로, CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 제제는 HLA A1, A24 및 B35 마우스에서 CMV gB-특이적 CD8+ T 세포 반응을 유도할 수 있는 이의 능력을 추가로 입증하였고, 상기 gB-특이적 CD8+ T 세포 중 상당부는 2개 이상의 사이토카인을 분비할 수 있는 것으로 나타났다 (도 8e). CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 제제가 강력한 CMV-특이적 세포 면역 반응 이외에도, 강건한 항체 반응도 촉진시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 본 발명자들은 모든 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 ELISA를 이용하여 혈청 항-gB 항체 역가를 평가하였다. CMVpoly20PL-NH, gB 및 CpG 1018 제제는 모든 인간 트랜스제닉 마우스에서 1차 면역화 (21일째) 후 gB-특이적 항체 역가를 유도하였지만, 낮은 항체 역가는 HLA A2, A24 및 B35 트랜스제닉 마우스와 비교하여 HLA A1 및 B8 트랜스제닉 마우스에서 관찰되었고, 1차 투약 후 21일째 우세한 항체 이소타입은 IgG2b (Th1 유사 Ig 이소타입)였다 (도 9a 및 9b). 그러나, 28일째 부스터 투약으로 모든 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 gB-특이적 항체 역가는 유의적으로 증진되었고 (도 9a 및 9b), 주요 항체 이소타입은 Th2 유사 IgM 및 IgG1 및 Th1 유사 IgG2b 및 IgG3이었다. 후속 분석에서, 본 발명자들은 미세중화 검정법에서 상기 항체의 기능성에 대해 시험하였다. CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 제제로 면역화된 모든 인간 HLA 트랜스제닉 마우스로부터의 혈청은 CpG 1018 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 HCMV AD169 균주에 대해 강력한 중화 항체 반응을 유도하였지만, HLA A24에서의 중화 항체 역가는 다른 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서보다 현저히 더 높았다 (도 9e).

[0238] 이어서, 본 발명자들은 ARPE-19 세포에서 상이한 CMV 균주 TB40/E에 대한 모든 인간 HLA 형질전환 마우스에서의 CMV 백신 유도된 중화 항체 반응의 능력을 조사하였다 (도 9f). 전체 중화 항체 역가는 AD 169 균주에 비해 낮았지만, CMV 백신으로 면역화한 후 모든 인간 HLA 형질전환 마우스로부터 수득한 혈청은 위약으로 면역화된 마

우스로부터 수득된 혈청과 비교하여 TB40/E 균주에 대해 강력한 중화 활성을 보였다. 흥미롭게도, HLA A1, B35 및 A24 마우스는 HLA A2 및 B8 마우스와 비교하여 더 높은 중화 항체 역가를 나타내었다. 종합하면, 상기 관찰 결과는 gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018로 제제화된 CMV 백신이 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 다중 CMV 균주 (AD 169 및 TB40/E)에 대하여 강력한 중화 항체 반응을 유도할 수 있다는 것을 제안하며, 이는 CMV 백신 효능을 결정하는 데 있어 종합적인 접근인 것으로 간주된다.

[0239] **CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제에 의해 유도된 장기간 지속가능한 면역 평가**

[0240] 기존 CMV 백신의 주요 문제점 중 하나는 백신 유도 면역의 지속성과 낮은 효능이다. 실제로, 지속가능한 백신-유도된 면역 반응은 다양한 병원체에 대한 백신의 약화 효과를 최소화하는 데 중요한 역할을 한다 (문헌 [Amanna, Carlson et al. 2007]). 따라서, CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제 유도된 면역 반응의 장기간 지속성 및 CMV에 대한 지속적인 면역 반응을 유지시키는 데 필요한 부스터 투약수를 시험하는 데 중요하다. 장기간 지속가능한 면역을 시험하기 위해, 본 발명자들은 21일째 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스를 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제 (백신 군) 또는 CpG 1018 단독 (대조군)으로 면역화하고, 28 및 42 일째 부스팅하였다. 백신 유도된 기존 CMV-특이적 면역 반응을 회상시키기 위해, 210일째 마우스 서브군에 3차 부스터를 제공하였다. 본 발명자들은 CMVpoly20PL-NH-특이적 CD4+ T 세포 반응, gB-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포, B 세포 및 항체 반응을 종단적으로 (28, 42, 48, 84, 133, 203 및 217일째) 측정하여 백신접종된 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 CMV-특이적 면역 반응을 모니터링하였다 (도 10).

[0241] 생체의 분석 결과, CpG 1018 단독을 이용한 백신접종과 비교하여 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제가 유의적으로 더 높은 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응을 유도하였고, 이러한 강건한 면역 반응은 모든 시점에서 유지되는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, 다른 시점과 비교하여 28, 49 및 217일째의 각 후속 백신접종으로 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포는 상당부 증가되었다 (도 11a). 210일째 3차 부스터 투약은 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포 반응을 추가로 즉각적으로 증가시켰다. 특히, 생체의인 것과 비교하여 CMV HLA A24 제한 펩티드로의 비장세포의 시험관내 자극 후, IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포에서 유사한 경향이 관찰되었고 (D133 제외), IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8+ T 세포는 적어도 20배 증가된 것으로 관찰되었다 (도 11b). 흥미롭게도, CMV 펩티드로의 비장세포의 생체의 및 시험관내 자극 후, 모든 시점에서 CMV-특이적 CD8+ T 세포는 다중 사이토카인을 분비할 수 있는 이의 능력을 보인 것으로 나타났다 (도 11c). 42일째 생체의 및 시험관내 확장을 제외하면, 더 큰 비율의 세포가 IFN- γ (적색 arc) 및 TNF (녹색 arc)를 분비할 수 있다. 추가로, 49일째부터 217일째까지 상당부의 생체의 CMV-특이적 CD8+ T 세포 집단 또한 3개의 사이토카인, IFN- γ (적색 arc), TNF (녹색 arc) 및 IL-2 (청색 arc)를 분비할 수 있는 이의 능력을 보였다.

[0242] 추가로, CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제는 또한 CpG 1018 단독 면역화와 비교하여 유의적인 빈도로 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포를 유도하였다. 28, 49 및 84일째의 각 후속 백신접종으로 생체의 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포는 상당부 증가되었고, 133 및 203일째 반응은 약간 감소하였고, 정체되었지만, 그럼에도 불구하고, 3차 부스터 후 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 반응의 급속한 증가가 관찰되었다 (도 12a). 추가로, 133 및 203일째 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포의 빈도가 낮음에도 불구하고, gB pepmix로의 비장세포의 시험관내 자극한 후 모든 시점에서 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포 반응의 더욱 큰 확장이 유도되었다 (도 12b).

[0243] IFN- γ 이외에도, CMV-특이적 CD4+ T 세포는 또한 생체의 및 시험관내 확장 후 다중 사이토카인 (IFN- γ , TNF 및 IL-2)을 분비할 수 있는 이의 능력을 보였다 (도 12c). 특히, 28일째부터 217일째까지 gB pepmix로의 생체의 자극 후 상당부의 CMV gB-특이적 CD4+ T 세포는 3개의 사이토카인 IFN- γ (적색 arc), TNF (녹색 arc) 및 IL-2 (청색 arc) 또는 IFN- γ (적색 arc) 및 TNF (녹색 arc)를 생산할 수 있다. 시험관내 확장 후, CMV gB-특이적 CD4+ T 세포는 대개 IFN- γ 및 TNF (28, 42, 49, 84, 203 및 217일째) 또는 TNF 및 IL-2 (133일째)를 분비하였다. 모두 종합해 보면, 상기 결과는 gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018로 제제화된 CMV 백신이 지속가능한 CMV-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 유도할 수 있고, 동시에 고빈도의 상기 세포가 다중 사이토카인을 분비할 수 있다는 것을 제안한다.

[0244] 배중심 (GC)은 장기간 혈청 면역에 필요한 고친화성 항체를 분비하기 위해 기억 B 세포 및 장수명 형질 세포를 유도하는 데 중요한 역할을 한다 (문헌 [McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams 2005]). 따라서, 본 발명자들은 백신 접종된 마우스 및 대조군 마우스의 비장에서 증가된 배중심 B 세포 반응을 유도할 수 있는 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제의 능력을 검증하였다. 본 발명자들은 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제로 백신접종된 마우스의 비장에서 28, 49 및 84일째 유의적으로 더 높은 비율의 배중심 B 세

포 (B220⁺GL7⁺Fas⁺)가 유도된 후, 이어서 감소되고, 정제되었지만 (도 13a 및 13b); CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제로 백신접종된 마우스의 림프절은 49 및 84일째 약간의 증가를 보였다는 것을 관찰하게 되었다 (도 13c 및 13d). 추가로, ELISpot 검정법에 의한 CMV gB-특이적 IgG 분비 형질 세포 평가 결과, CpG 1018 단독 면역화와 비교하여 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제는 유의적으로 더 높고, 지속가능한 형질 B 세포 반응을 유도한 것으로 나타났다. 본 발명자들은 또한 휴지기 B 세포의 생체의 폴리클로날 자극에 의한 장기간 기억 B 세포 반응을 평가하였고, 생체의와 비교하여 gB-특이적 IgG 분비 B 세포 반응이 상당부 증가하였고, 지속되었다는 것을 발견하였다. 흥미롭게도, 생체의 및 기억 B 세포 분석 결과, 3차 면역화가 IgG 분비 gB-특이적 B 세포의 개수에서 급속하게 증진시킨 것으로 나타났다 (도 14a 및 14b). 추가로, CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제가 gB 단백질에 대하여 강력한 항체 반응 또한 유도할 수 있는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 백신접종된 마우스 및 대조군 마우스로부터의 혈청 샘플을 시험하였다. CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제로 면역화된 마우스로부터의 혈청은 CpG 1018 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 유의적으로 더 높은 CMV gB-특이적 항체 역가를 보였고, 항체 역가는 28 및 49일째 매 부스터 투약으로 증가하였지만, 203일째에는 약간의 감소를 보였다. 그러나, 3차 부스터 후 gB-특이적 항체 역가는 최고치에 도달하였다 (도 15a).

[0245] 추가로, 항체 반응의 추가 특징화 결과, gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018로 제제화된 CMV 백신은 지속가능한 gB-특이적 다중 항체 Th1 및 Th2 유사 Ig 이소타입 (IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)을 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 28일째 1차 부스터, 49일째 2차 부스터, 및 217일째 3차 부스터 후, 항체 역가가 추가로 증진된 것이 관찰되었다 (도 15b). 비록 시점 21, 42, 84, 133 및 203일째에 항체 역가가 더 낮았지만, CMV gB-특이적 항체 농도는 연구 전 기간 동안에 걸쳐 검출가능한 수준으로 유지되었다. 본 발명자들은 미세중화 검정법으로 상기 항체를 추가로 특징화하여 섬유모세포의 CMV AD 169 균주 감염, 및 ARPE-19 세포의 CMV TB40/E 균주 감염에 대하여 중화시킬 수 있는 이의 능력에 대해 측정하였다. 위약과 비교하여, CMV 백신으로의 면역화는 CMV AD169 및 TB40/E 균주에 대하여 강력한 중화 항체 반응을 유도하였다. ELISA 항체 역가와 유사하게, 중화 항체 역가는 28일째 1차 부스터, 49일째 2차 부스터, 및 217일째 3차 부스터 후에 더 높았다. 마지막으로, 최근 공개문헌에서 세포 회합된 gB에 결합하는 혈청 IgG가 백신 효능의 면역 상관관계인 것으로 나타났다 (문헌 [Jenks et al., *Sci. Transl. Med.* 12, eabb3611 (2020)] 참조). 따라서, 후속 분석에서, 본 발명자들은 CMV AD169로 감염된 섬유모세포에 결합할 수 있는 마우스 혈청 항체의 능력을 측정하였다. 본 발명자들은 gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018로 제제화된 CMV 백신으로 면역화된 마우스로부터의 혈청 항체는 모든 시점에서 위약과 비교하여 CMV AD 169 균주로 감염된 섬유모세포 상의 세포 회합된 gB에 강력하게 결합한다는 것을 발견하였다. 그러나, 결합 강도는 21, 42, 84 및 133일째와 비교하여 28, 49 및 217일째 부스터 투약 후에 더 높았다. 종합하면, 상기 데이터는 gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018로 제제화된 CMV 백신이 지속가능하고, 정성적인 CMV-특이적 체액성 및 세포 면역 반응을 유도할 수 있는 이의 잠재능을 보였다는 것을 나타낸다.

[0246] **HLA A1 트랜스제닉 마우스에서의 장기간 지속가능한 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제 유도된 면역 반응 확인**

[0247] 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스 이외에도, 본 발명자들은 또한 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스에서의 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제 유도된 면역 반응의 장기간 지속성도 시험하였다. 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스를 21일째 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제 (백신 군) 또는 CpG 1018 단독 (대조군)으로 면역화하고, 28, 42 및 210일째 부스터하고, CMVpoly20PL-NH-특이적 CD4⁺ T 세포 반응, gB-특이적 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, B 세포 및 항체 반응을 종단적으로 (49, 84, 203 및 217일째) 측정하여 백신접종된 인간 HLA A1 트랜스제닉 마우스에서 CMV-특이적 면역 반응을 모니터링하였다 (도 16). 인간 HLA A24 트랜스제닉 마우스에서 관찰된 결과와 유사하게, CpG 1018 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제는 유의적으로 더 높고, 지속가능한 빈도로 IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8⁺ T 세포를 유도하였고 (도 17a 및 17b), 백신 유도된 항원 특이적 세포의 시험관내 자극 및 확장 후, IFN- γ 생산 CMV-특이적 CD8⁺ T 세포는 상당부 증가하였다 (도 17c). 흥미롭게도, CMV-특이적 CD8⁺ T 세포는 동시에 다중 사이토카인을 분비하였고, 상당부의 세포는 2개의 사이토카인 (IFN- γ 및 TNF)을 분비할 수 있다 (도 17d). 추가로, 본 발명자들은 또한 생체의 (도 18a 및 18b) 및 시험관내 자극 (도 18c) 후, 더 높은 빈도의 IFN- γ 생산 CMV gB-특이적 CD4⁺ T 세포 반응을 관찰하였다. 시험관내 확장 후, 높은 비율의 CMV gB-특이적 CD4⁺ T가 동시에 2개의 사이토카인 (IFN- γ 및 TNF)을 분비할 수 있는 이의 능력을 보였다 (도 18d). 배중심 B 세포 추가 평가 및 항원-특이적 IgG-분비 형질 B 세포 분석 결과, CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG1018 백신 제제는 CpG 1018 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 49일째 유의적으로 더 높은 비율로 배중심 B 세포 (B220⁺GL7⁺Fas⁺)를 유도하였고,

유의적으로 더 높고, 지속가능한 형질 세포 및 기억 B 세포 반응을 유도한 것으로 나타났다 (도 19a-19f). 마지막으로, gB-특이적 항체 반응을 유도할 수 있는 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 제제의 능력을 확인하기 위해, 본 발명자들은 백신접종된 마우스 및 대조군 마우스로부터의 혈청 샘플을 시험하였다. CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018로 면역화된 마우스로부터의 혈청은 대조군 마우스와 비교하여 유의적으로 더 높은 gB-특이적 항체 역가를 보였고, 28, 49 및 217일째 부스터 투약 후 항체 역가는 뚜렷이 증가하는 경향을 보였다 (도 20a). CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신은 또한 다중 항체 Th1 유사 (IgG2a, IgG2b 및 IgG3) 및 Th2 유사 (IgM 및 IgG1) 이소타입 (도 20b)을 유도하였다.

[0248]

종합하면, 상기 결과는 CMV gB 및 CMVpoly20PL-NH 재조합 단백질 및 CpG 1018 애주번트로 구성된 신규한 다가 CMV 백신 제제가 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 강건한 CMV-특이적 CD4+, CD8+ 및 중화 항체 반응을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 상기 백신은 전체 바이러스 또는 재조합 바이러스 백터와 연관된 안전성 문제를 극복하고, 백신 유도된 면역 반응의 지속성을 개선시키기 위해, 재조합 단백질 및 인간 화합성 애주번트를 기반으로 하여 개발된 제제인 바, 예컨대, 선천성 CMV 감염, 이식 및 교모세포종과 같은 예방적 및 치료학적인 임상적 환경에서 더욱 광범위한 임상적 의미를 가질 것이다. CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018는 다중 인간 HLA 트랜스제닉 마우스에서 고도로 면역원성이고, 상기 CMV 백신에 의해 생성된 면역 반응의 가장 주목할만한 특징은 장수명 배증심 B 세포 및 장기간 지속가능한 CMV-특이적 CD4+, CD8+ T 세포, 항체 분비 B 세포 반응 및 중화 항체 반응의 유도이다. 흥미롭게도, 매 부스터 면역화 후 CMV-특이적 CD4+, CD8+ 및 B 세포 반응 유도는 점진적으로 증가하였다. 추가로, 본 백신 제제에서 표적화된 항원 (gB, pp65, IE1, pp50, pp150 및 DNase)은 감염, 복제 및 패키징을 포함한, CMV 감염의 모든 단계에서 중요한 역할을 한다. 이들 항원은 대부분의 CMV 혈청 양성의 건강한 개체 및 이식 환자에서 널리 인식되고 있으며, 방어 면역을 발생시키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 모든 특성으로 인해 CMV gB, CMVpoly20PL-NH 및 CpG 1018 백신 제제는 기존 제제와 비교하여 우수한 백신 후보물질이 된다.

[0249]

참고문헌

- Adler, S. P., N. Lewis, A. Conlon, M. P. Christiansen, M. Al-Ibrahim, R. Rupp, T. M. Fu, O. Bautista, H. Tang, D. Wang, A. Fisher, T. Culp, R. Das, K. Beck, G. Tamms, L. Musey and V. S. Group (2019). "Phase 1 Clinical Trial of a Conditionally Replication-Defective Human Cytomegalovirus (CMV) Vaccine in CMV-Seronegative Subjects." *J Infect Dis* **220**(3): 411-419.
- Amanna, I. J., N. E. Carlson and M. K. Slifka (2007). "Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens." *N Engl J Med* **357**(19): 1903-1915.
- Bernstein, D. I., E. A. Reap, K. Katen, A. Watson, K. Smith, P. Norberg, R. A. Olmsted, A. Hoepfer, J. Morris, S. Negri, M. F. Maughan and J. D. Chulay (2009). "Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers." *Vaccine* **28**(2): 484-493.
- Crough, T., L. Beagley, C. Smith, L. Jones, D. G. Walker and R. Khanna (2012). "Ex vivo functional analysis, expansion and adoptive transfer of cytomegalovirus-specific T-cells in patients with glioblastoma multiforme." *Immunol Cell Biol* **90**(9): 872-880.
- Dasari, V., C. Smith, A. Schuessler, J. Zhong and R. Khanna (2014). "Induction of innate immune signatures following polyepitope protein-glycoprotein B-TLR4&9 agonist immunization generates multifunctional CMV-specific cellular and humoral immunity." *Hum Vaccin Immunother* **10**(4): 1064-1077.
- Drulak, M. W., F. J. Malinoski, S. A. Fuller, S. S. Stewart, S. Hoskin, A. M. Duliege, R. Sekulovich, R. Burke and S. Winston (2000). "Vaccination of seropositive subjects with CHIRON CMV gB subunit vaccine combined with MF59 adjuvant for production of CMV immune globulin." *Viral Immunol* **13**(1): 49-56.
- Elkington, R., N. H. Shoukry, S. Walker, T. Crough, C. Fazou, A. Kaur, C. M. Walker and R. Khanna (2004). "Cross-reactive recognition of human and primate cytomegalovirus sequences by human CD4 cytotoxic T lymphocytes specific for glycoprotein B and H." *Eur J Immunol* **34**(11): 3216-3226.
- Elkington, R., S. Walker, T. Crough, M. Menzies, J. Tellam, M. Bharadwaj and R. Khanna (2003). "Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers." *J Virol* **77**(9): 5226-5240.
- Gibson, L., C. M. Barysaukas, M. McManus, S. Dooley, D. Lilleri, D. Fisher, T. Srivastava, D. J. Diamond and K. Luzuriaga (2015). "Reduced frequencies of polyfunctional CMV-specific T cell responses in infants with congenital CMV infection." *J Clin Immunol* **35**(3): 289-301.

[0250]

Jacobson, M. A., E. Sinclair, B. Breddt, L. Agrillo, D. Black, C. L. Epling, A. Carvidi, T. Ho, R. Bains, V. Girling and S. P. Adler (2006). "Safety and immunogenicity of Towne cytomegalovirus vaccine with or without adjuvant recombinant interleukin-12." *Vaccine* **24**(25): 5311-5319.

La Rosa, C., J. Longmate, J. Martinez, Q. Zhou, T. I. Kaltcheva, W. Tsai, J. Drake, M. Carroll, F. Wussow, F. Chiuppesi, N. Hardwick, S. Dadwal, I. Aldoss, R. Nakamura, J. A. Zaia and D. J. Diamond (2017). "MVA vaccine encoding CMV antigens safely induces durable expansion of CMV-specific T cells in healthy adults." *Blood* **129**(1): 114-125.

Lee, S. W., P. F. Markham, M. J. Coppo, A. R. Legione, J. F. Markham, A. H. Noormohammadi, G. F. Browning, N. Ficorilli, C. A. Hartley and J. M. Devlin (2012). "Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses." *Science* **337**(6091): 188.

Manley, T. J., L. Luy, T. Jones, M. Boeckh, H. Mutimer and S. R. Riddell (2004). "Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8+ cytotoxic T-cell response in natural infection." *Blood* **104**(4): 1075-1082.

McHeyzer-Williams, L. J. and M. G. McHeyzer-Williams (2005). "Antigen-specific memory B cell development." *Annu Rev Immunol* **23**: 487-513.

Pepperl-Klindworth, S., N. Frankenberg and B. Plachter (2002). "Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles." *J Clin Virol* **25 Suppl 2**: S75-85.

Sylwester, A. W., B. L. Mitchell, J. B. Edgar, C. Taormina, C. Pelte, F. Ruchti, P. R. Sleath, K. H. Grabstein, N. A. Hosken, F. Kern, J. A. Nelson and L. J. Picker (2005). "Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects." *J Exp Med* **202**(5): 673-685.

Wloch, M. K., L. R. Smith, S. Boutsaboualoy, L. Reyes, C. Han, J. Kehler, H. D. Smith, L. Selk, R. Nakamura, J. M. Brown, T. Marbury, A. Wald, A. Rolland, D. Kaslow, T. Evans and M. Boeckh (2008). "Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects." *J Infect Dis* **197**(12): 1634-1642.

Zhong, J. and R. Khanna (2009). "Ad-gBCMVpoly: A novel chimeric vaccine strategy for human cytomegalovirus-associated diseases." *J Clin Virol*.

[0251]

[0252]

본 명세서 전역에 걸쳐, 본 발명을 어느 한 실시양태로 또는 특정의 특징 집단으로 제한하지 않으면서, 본 발명의 바람직한 실시양태를 기술하는 것이 목적이었다. 따라서, 본 개시내용에 비추어, 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서, 예시된 특정 실시양태에서 다양한 변형 및 변경이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0253]

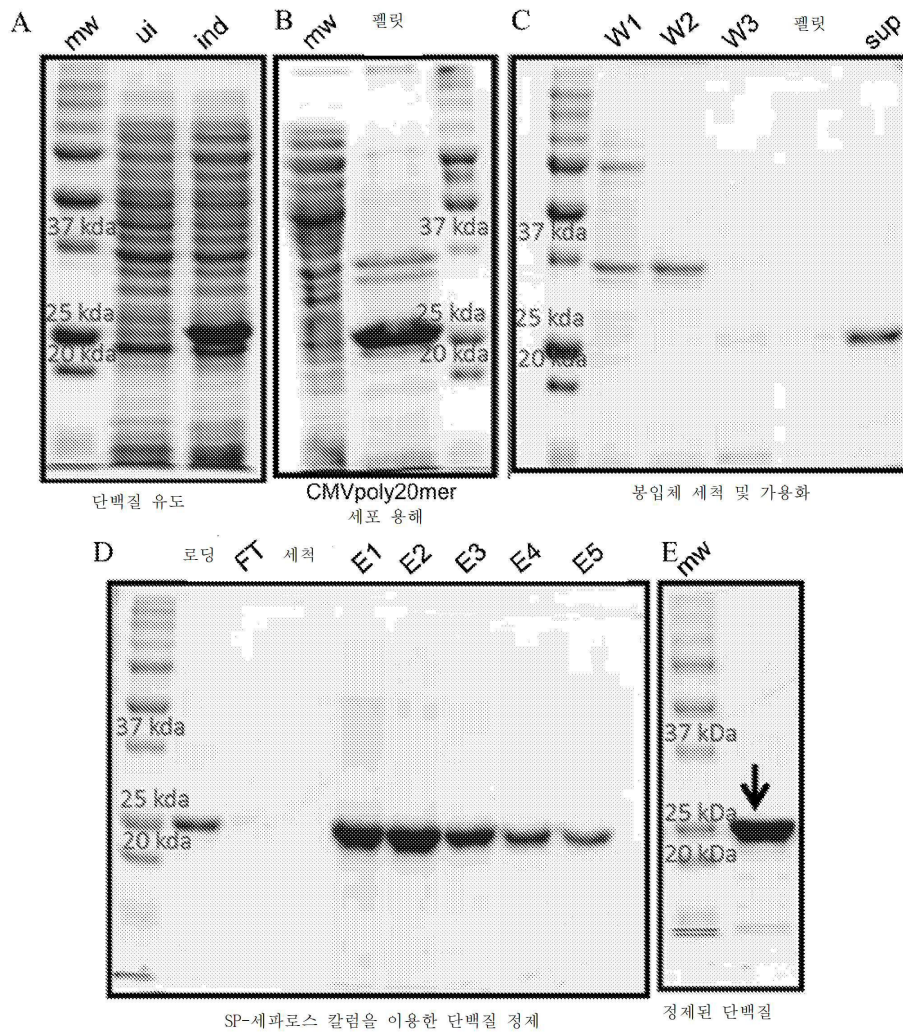
본원에서 언급된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리즘, 특허 및 과학 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

도면

도면1

```
atgttcccaaccaaaagatgtcgctctcgagatggcccgattagccacggtcacgttctgaaa
M F P T K D V A L A D G P I S H G H V L K
gctgatcagtatgaccgggtggcagcgctgttcgcggttactcggagcatccgacctt
A D Q Y D P V A A L F A D Y S E H P T F
acgtcccagtatgoggacaccccgggtgttacgggtggcggtgogtatgogccagatcaag
T S Q Y A D T P R V T G G G A M R Q I K
gtccgtgtggacatggtgctatccctagcattaacgttcaccactaccgtactaccgtc
V R V D M V R I P S I N V H H Y R T T V
tatccgcccagctctacggcgaaagccgatcgcccgcacgagcgtaatgggtttcacggtg
Y P P S S T A K A D R P B E R N G F T V
ctgcgcgacgagctgogtctgtaagatgatgtacatggcagacgtcacccagcatgacacc
L R D E L R R K M M Y M A D V T E H D T
ctgctgtacaagaatctggtcccgatgggttgcacggtaaggttttggaaganaccagc
L L Y K N L V P M V A T V K V L E E T S
gttatgctgaaggcctatgogcaaaaagatctttaagattctggccgataccogtgcgacg
V M L K A Y A Q K I F K I L A D T R A T
aaaatgcaagttattgcagacgcacoggtgtacgaatcaaatgccgtcgcaagaggtg
K M Q V I A D A R V Y E I K C R R K E V
aacagccagctgagcttgaagaactgaagcgcaagatgatctatatgaaatacattctg
N S Q L S L K E L K R K M I Y M K Y I L
gaagagactagcgtgatgctgaaaacaagcgatccgtgaaaccogtgcagctgaagtgataa
E E T S V M L K Q A I E E T V E L K - -
```

도면2ae



도면3

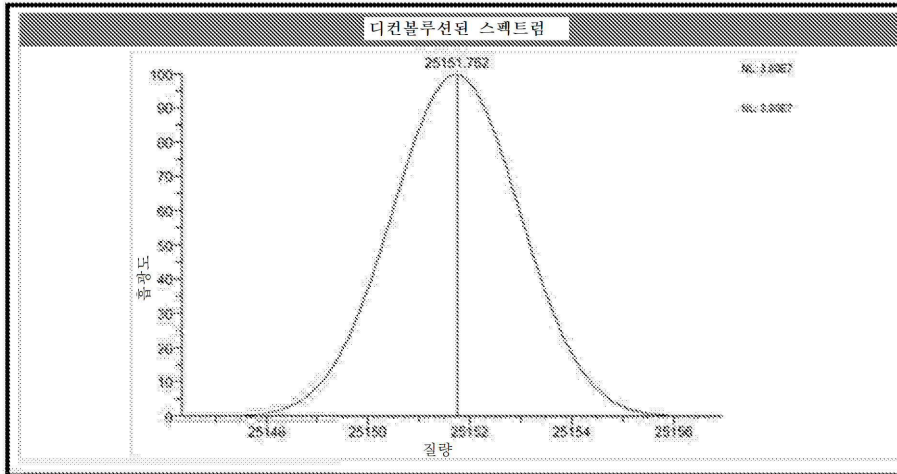
사용자 엔터링 시열에 대한 pI/Mw 이론치 (평균)

10 20 30 40 50 60
 MFPTKDVALA DGPISHGHVL KADQYDPVAA LFADYSEHPT FTSQYADTPR VTGGGAMRQI

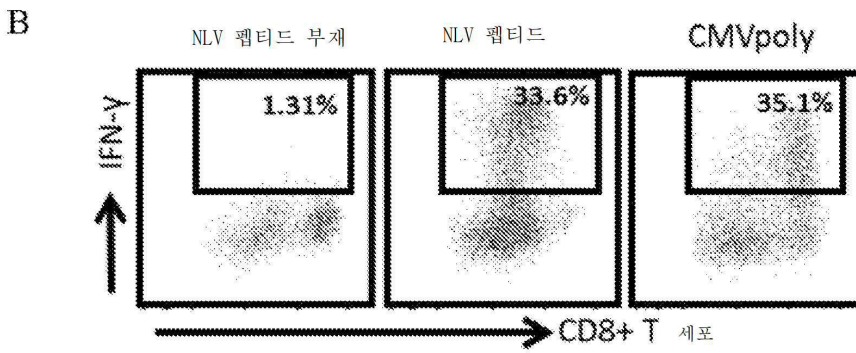
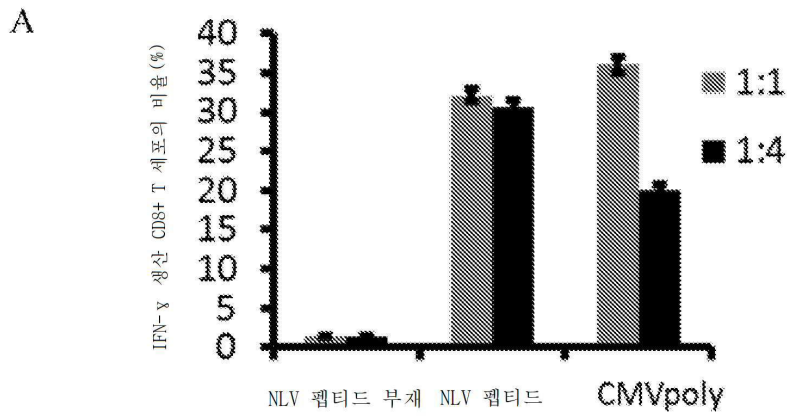
70 80 90 100 110 120
 KVRVDMVRIP SINVHHYRTT VYPPSSTAKA DRPHERNGFT VLRDELRRKM MYMADVTEHD

130 140 150 160 170 180
 TLLYKNLVPV VATVKVLEET SVMLKAVAQK IFKILADTRA TKMQVIADAR VYEKCRKE

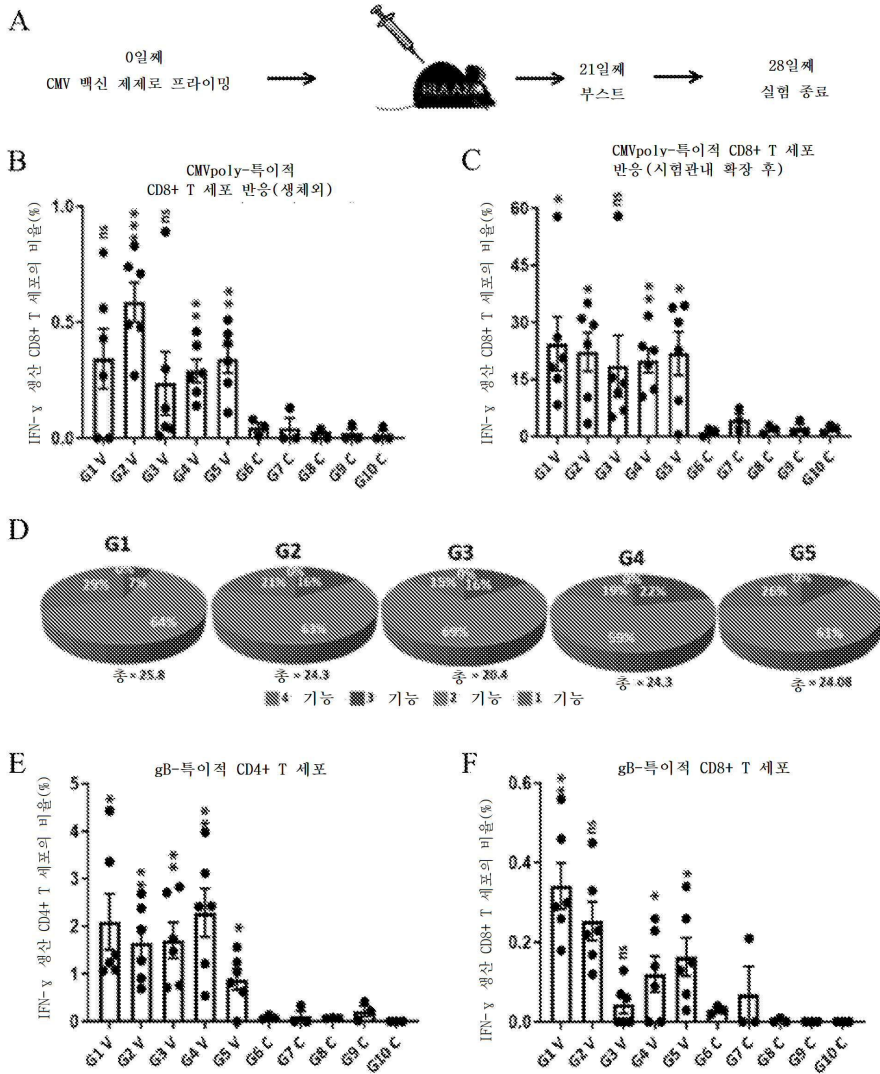
190 200 210
 VNSQLSLKEL KRKMIYMKYI LEETSVMLKQ AIRTVELK pI/Mw 이론치: 9.50 / 25152.36



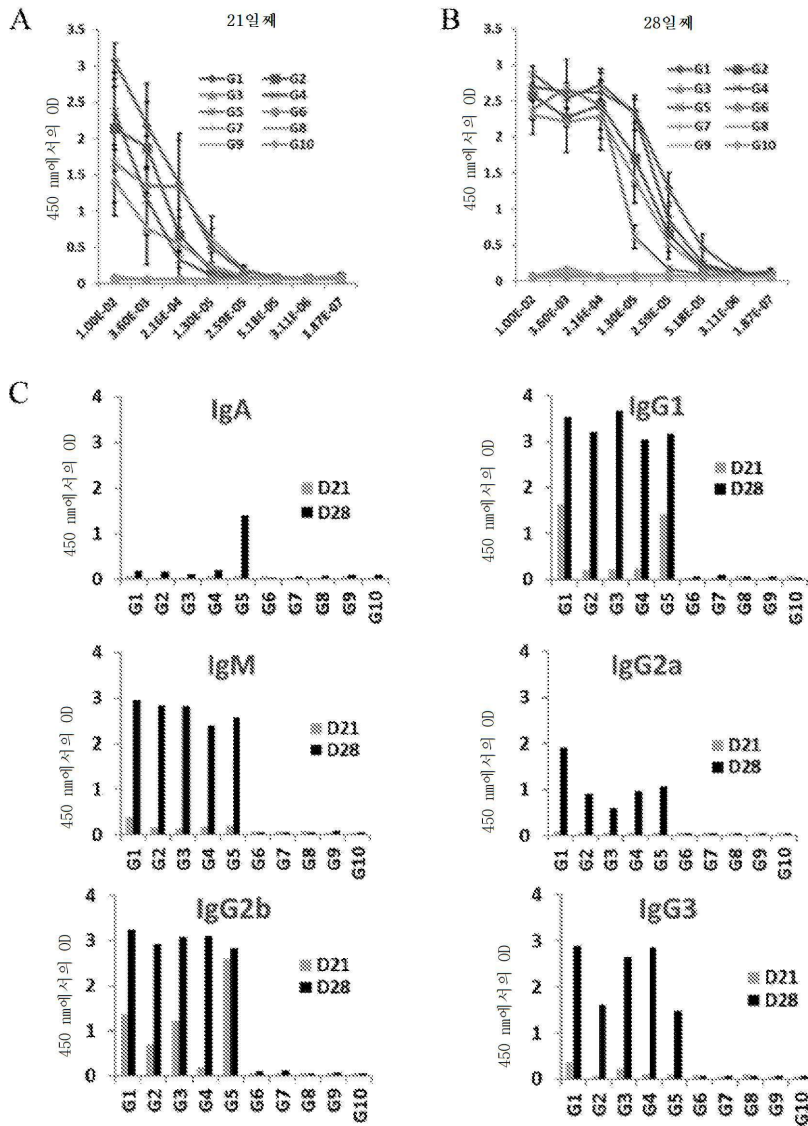
도면4ab



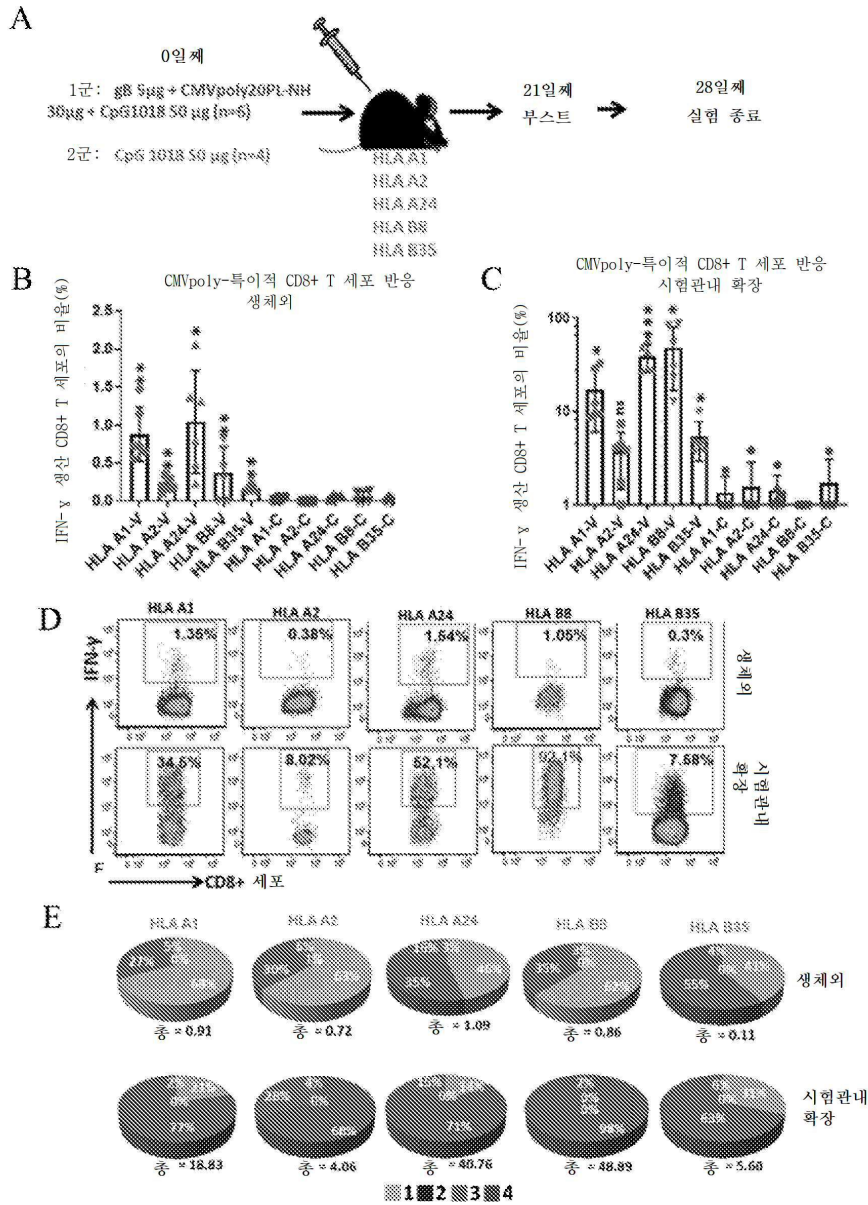
도면5af



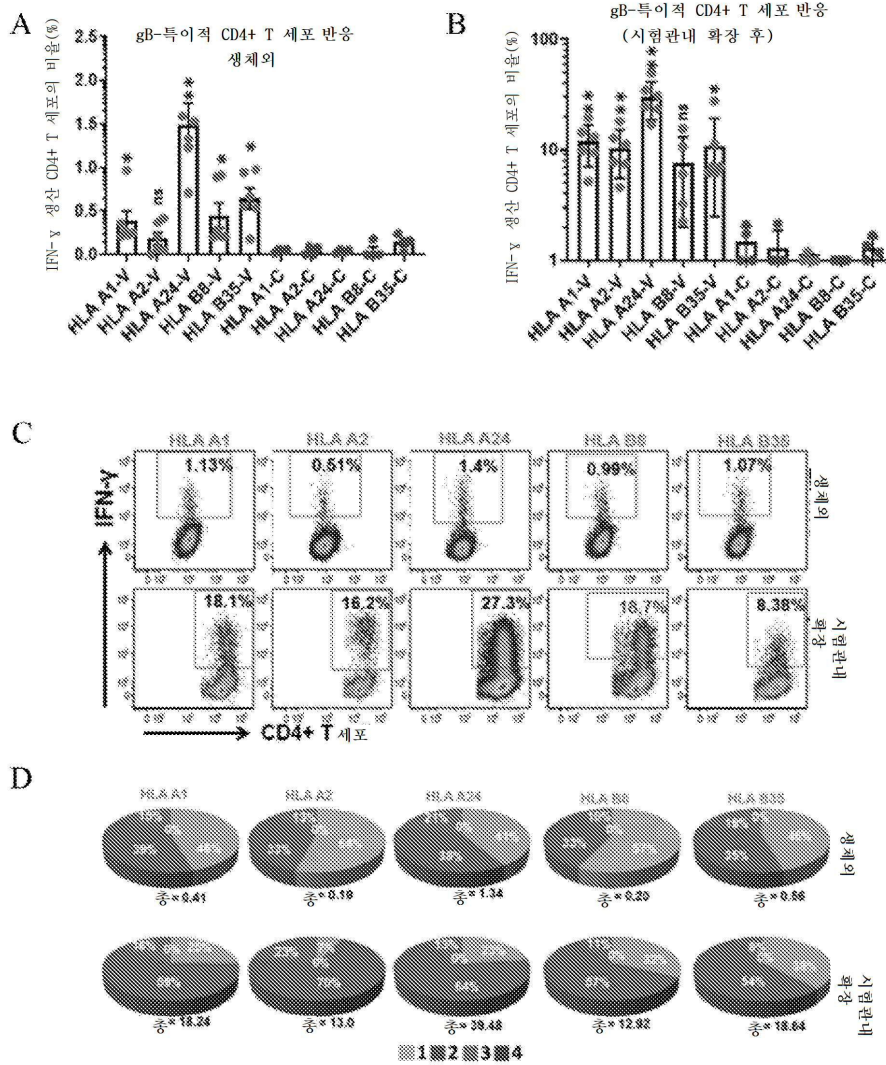
도면6ac



도면7ae

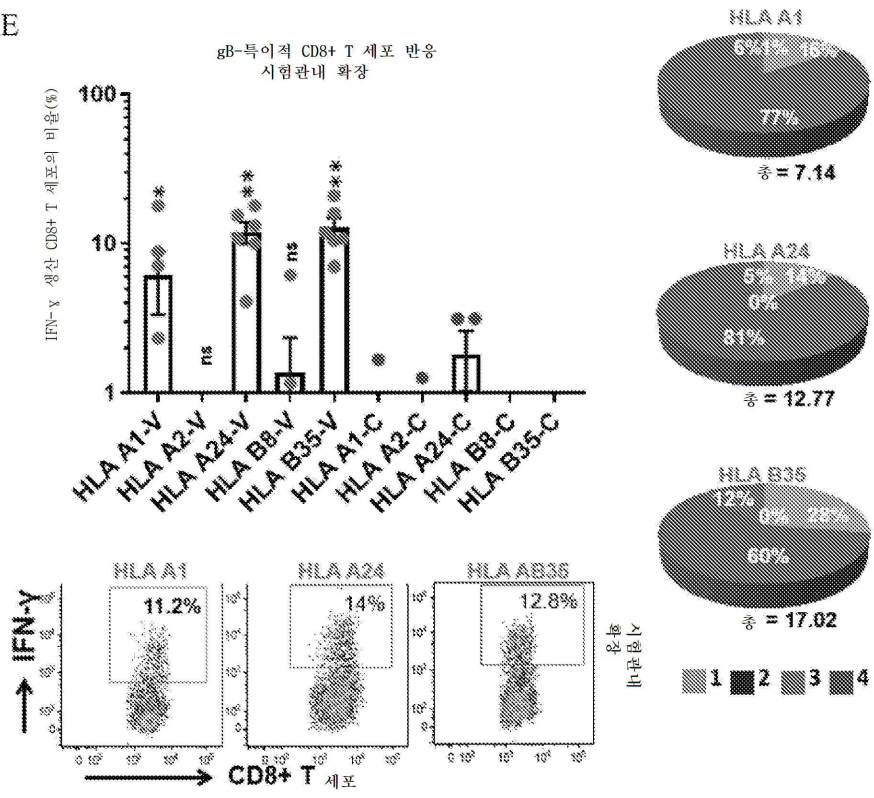


도면8ad

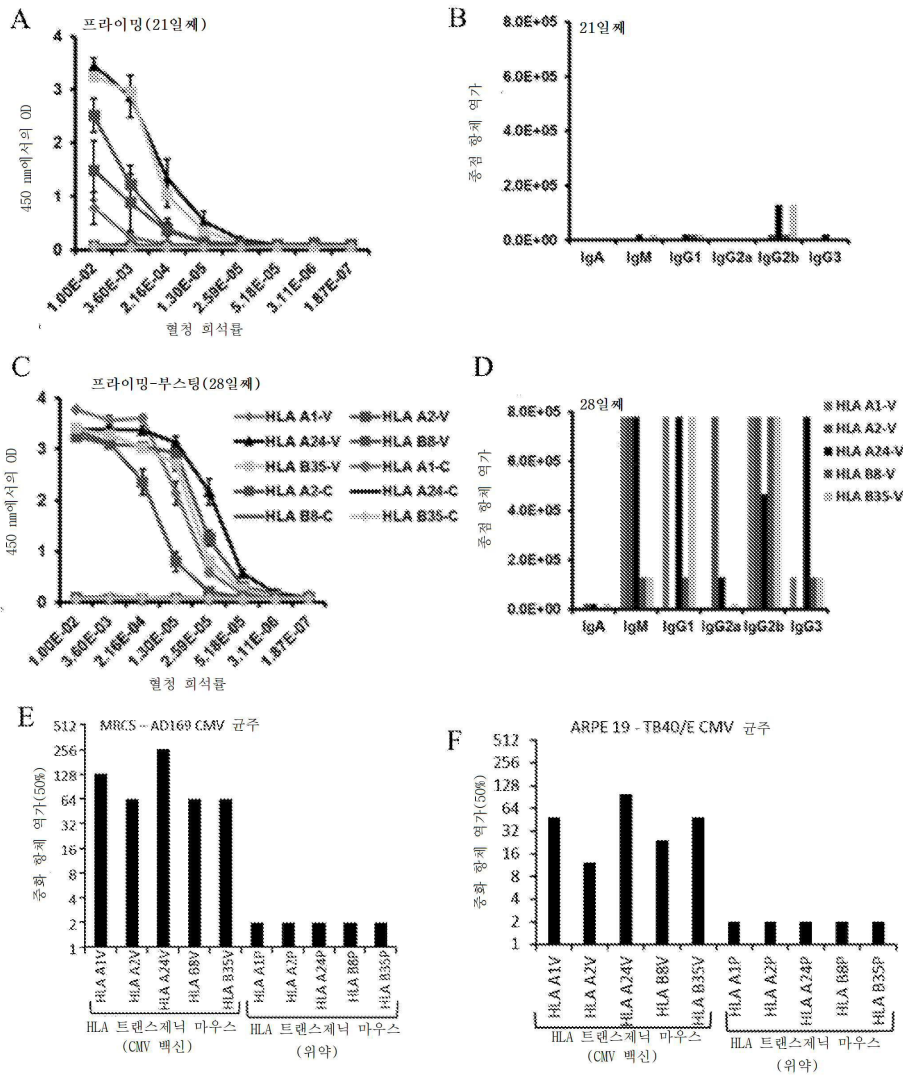


도면8e

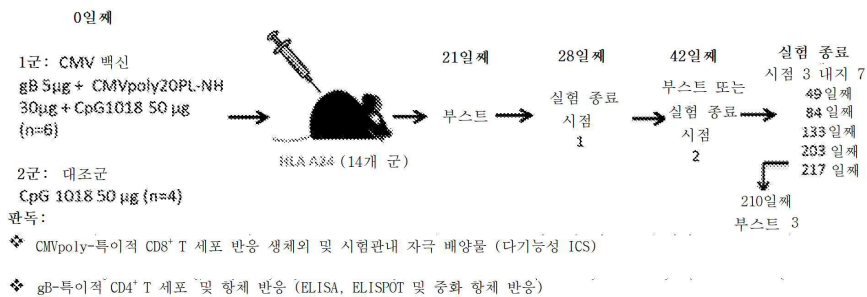
E



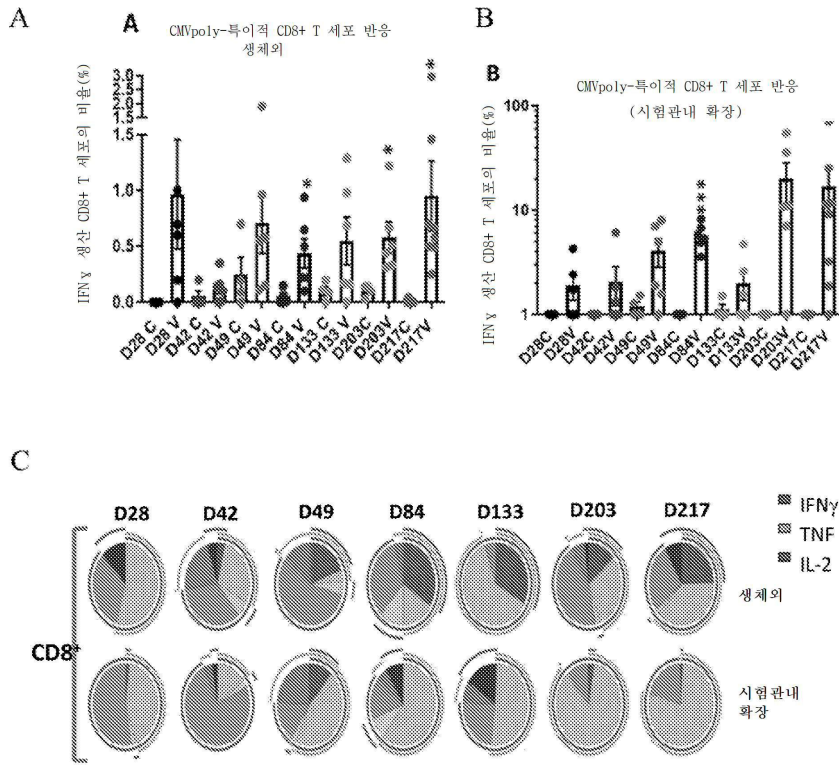
도면9af



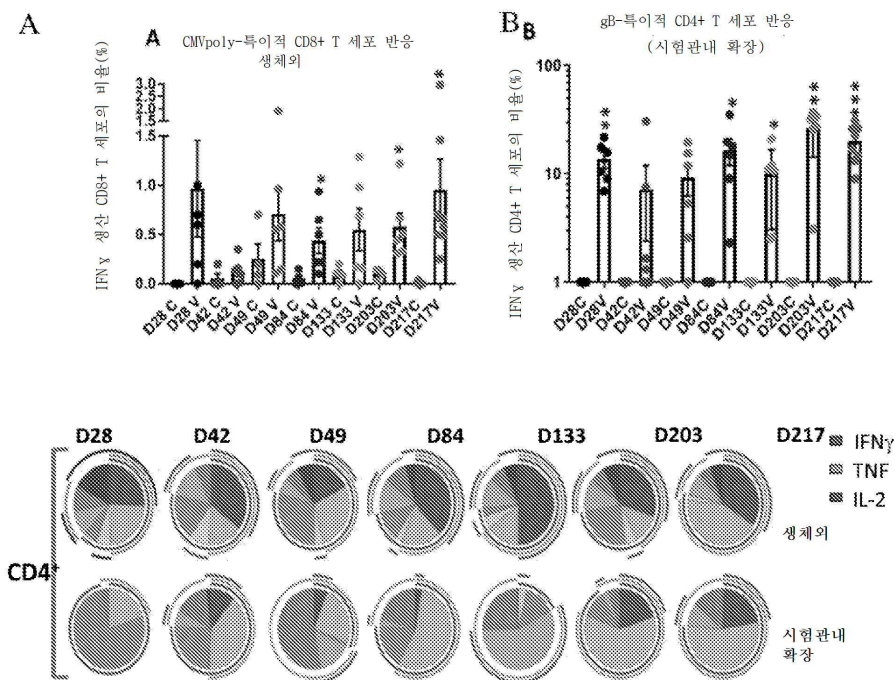
도면10



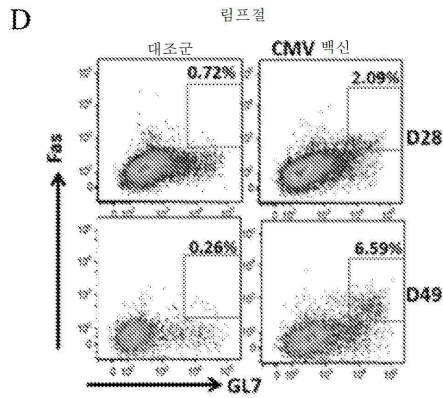
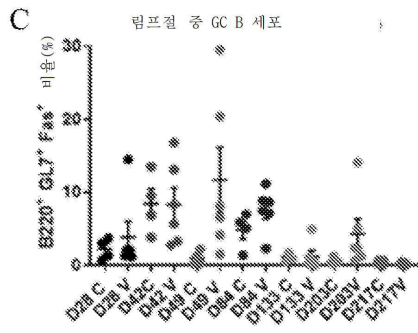
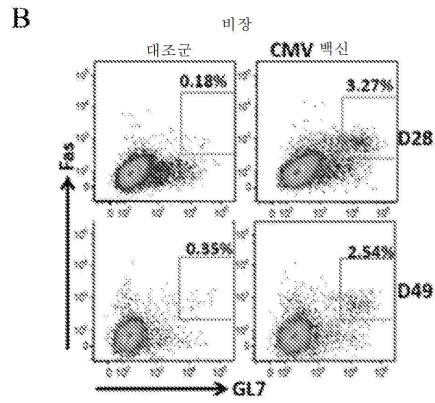
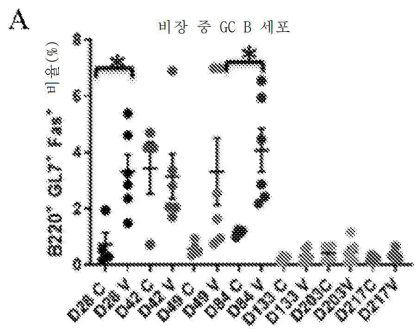
도면11ac



도면12ab



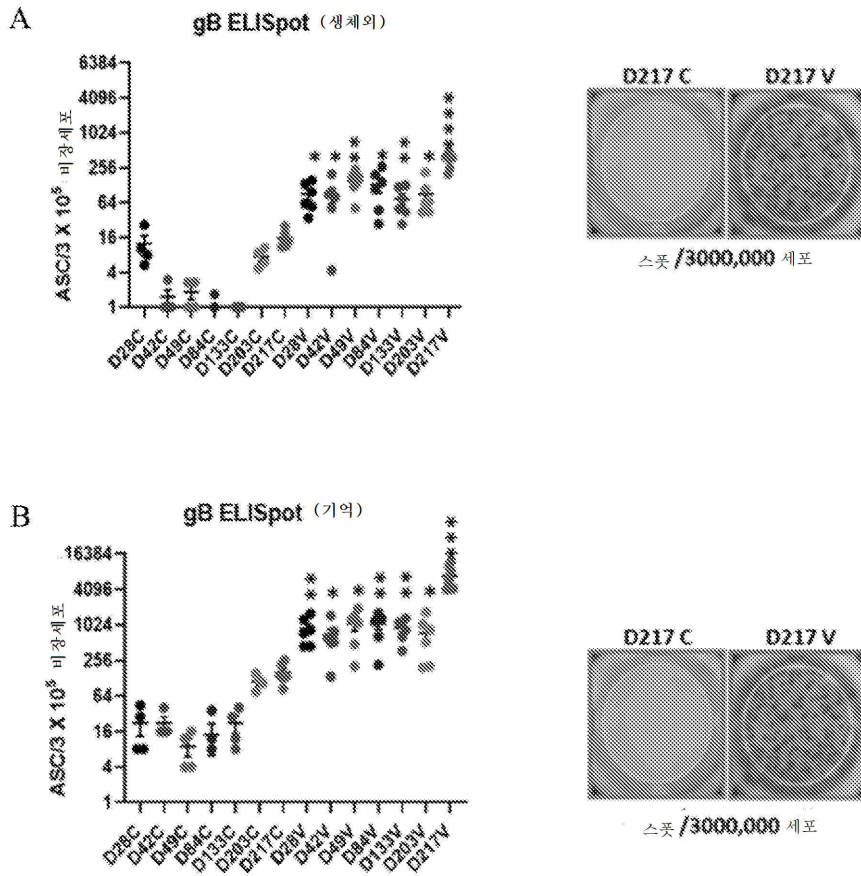
도면13ad



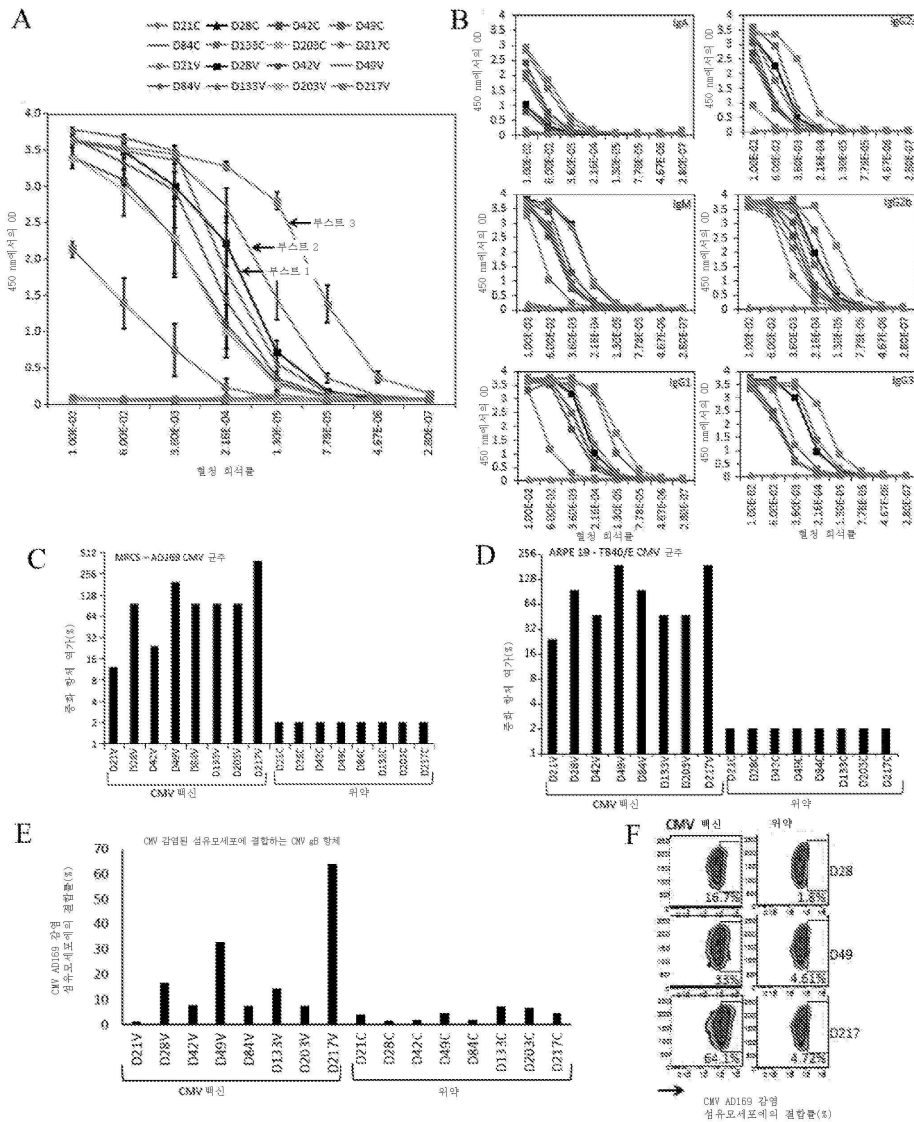
E

F

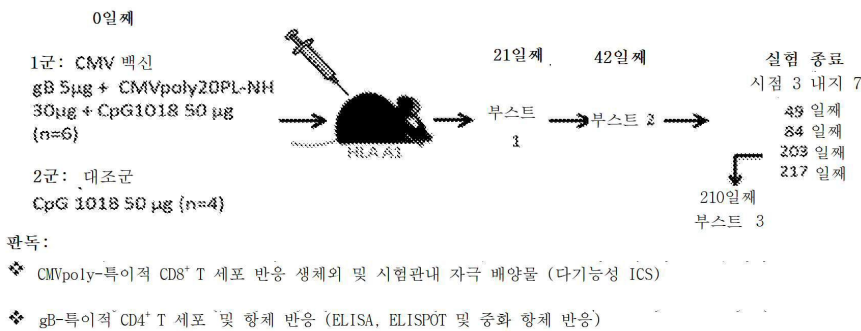
도면14ab



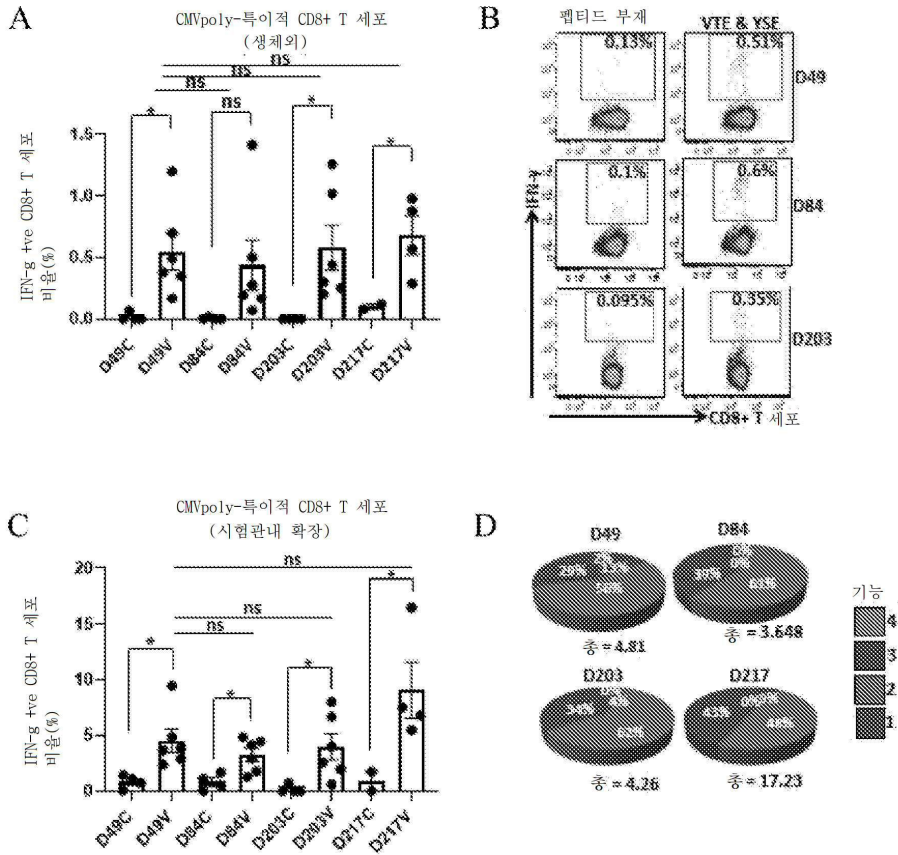
도면15af



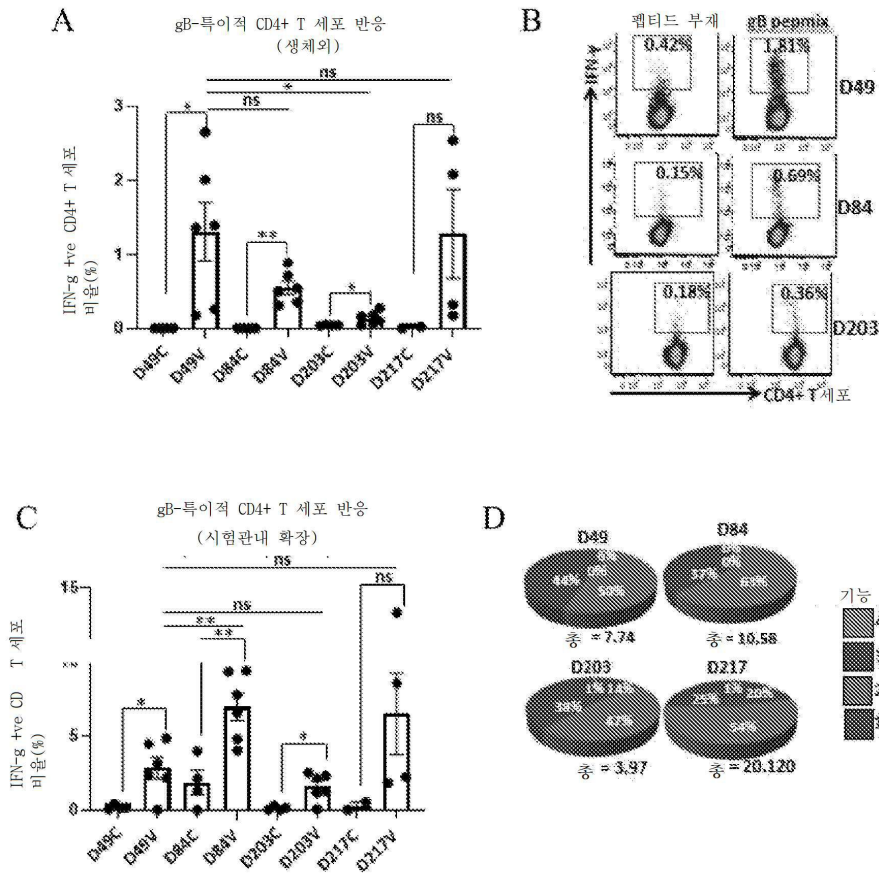
도면16



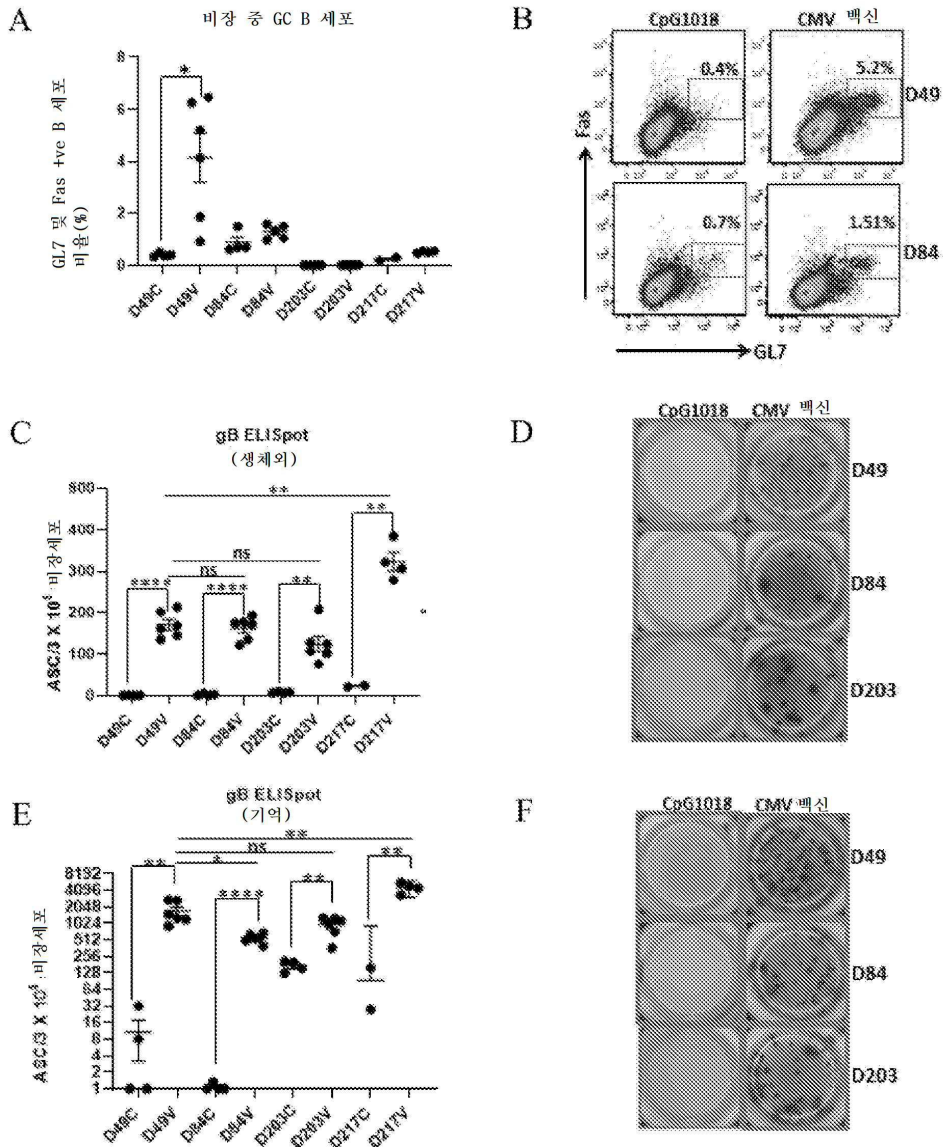
도면17ad



도면18ad



도면19af



도면20ab

