(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0029868
(43) 공개일자 2025년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/245 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/245 (2013.01)
A61P 31/22 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7000397
(22) 출원일자(국제) 2023년06월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년01월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/067805
(87) 국제공개번호 WO 2024/003239
국제공개일자 2024년01월04일
(30) 우선권주장
22181968.3 2022년06월29일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
버베리안 노딕 에이/에스
덴마크 헬레루프 필립 헤이만 알레 3 (우: 2900)
(72) 발명자
슈타이거발트, 로빈
독일 80469 뮌헨 클렌제슈트라쎄 97
메디나 에헤베르츠, 호세
독일 81669 뮌헨 세인트 카예탄슈트라쎄 23
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹

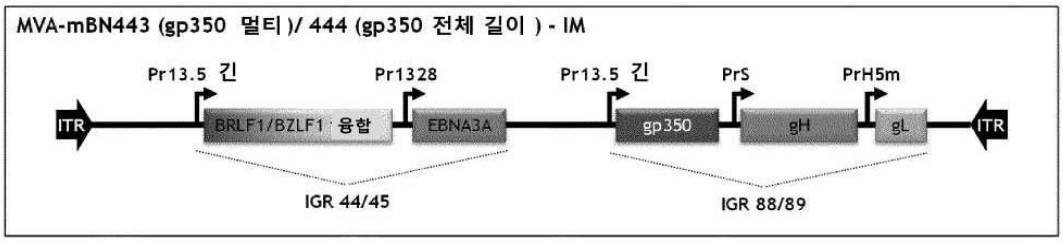
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 변형 saRNA (VRP) 및 백시니아 바이러스 안카라 (MVA) 프라임-부스트 요법**

(57) 요 약

본 발명은 인간에서 면역원에 대한 보호 면역을 유도하기 위한 조성물, 백신 및 방법을 제공한다. 보호 면역 반응은 saRNA, 특히 VRP 벡터를 프라임으로 사용하고 MVA를 부스트하여 얻는다. 구체적으로, 본 발명은 EBV와 같은 감염성 바이러스의 항원 결정인자를 인코딩하는 적어도 하나의 이종 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조작된(재조합) VRP 및 MVA 벡터에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 2039/545 (2013.01)
C12N 2710/10343 (2013.01)
C12N 2710/16222 (2013.01)
C12N 2710/16234 (2013.01)
C12N 2710/24143 (2013.01)
C12N 2770/36143 (2013.01)
(72) 발명자
하이세케, 알렉산더
독일 81241 뮌헨 글라이히만슈트라쎄 9
베니르, 소니아
독일 82131 가우팅 하우프트슈트라쎄 26
볼크만, 아리안
독일 82346 안덱스 반베크 11
하우스만, 위르겐
독일 79194 군델핑엔 알테 분데스슈트라쎄 130

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 백신 조합:

(c) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

(d) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 제1 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 백신 조합.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 제2 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 백신 조합.

청구항 4

청구항 1-3 중 어느 하나에 있어서, 항원 단백질은 감염성 질환 항원 또는 종양-관련 항원인 백신 조합.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 항원 단백질은 감염성 질환 항원인 백신 조합.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 항원 단백질은 바이러스 항원인 백신 조합.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 바이러스 항원은 엡스타인-바 바이러스("EBV")에서 유래되는 백신 조합.

청구항 8

청구항 1-7 중 어느 하나에 있어서, 항원성 단백질은 EBV의 구조 및 비구조 단백질 중 하나인 백신 조합.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 항원성 단백질은 gp350, gH, gL, EBNA3A 및 BRLF1/BZLF1 융합체로부터 선택되는 백신 조합.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 4에 의해 인코딩되는 백신 조합.

청구항 11

청구항 1-10 중 어느 하나에 있어서, saRNA는 VRP이고, 바람직하게는 알파바이러스를 기반으로 하고,

더 바람직하게는 VEEV를 기반으로 하고, 훨씬 더 바람직하게는 TC83을 기반으로 하는 백신 조합.

청구항 12

청구항 1-10 중 어느 하나에 있어서, MVA는 MVA-BN인 백신 조합.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 제1 조성물의 VRP는 gp350, gH 및 gL로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 백신 조합.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 및 SEQ ID NO: 3에 의해 인코딩되는 백신 조합.

청구항 15

청구항 1-14 중 어느 하나에 있어서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제1 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 백신 조합.

청구항 16

청구항 1-14 중 어느 하나에 있어서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제2 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 백신 조합.

청구항 17

청구항 1-16 중 어느 하나에 있어서, 부스팅 조성물은 부스팅 조성물의 벡터의 2회 이상의 복용량을 포함하는 백신 조합.

청구항 18

다음을 포함하는 키트:

(c) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

(d) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 제1 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 키트.

청구항 20

청구항 18에 있어서, 제2 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 키트.

청구항 21

청구항 18-20 중 어느 하나에 있어서, 항원 단백질은 감염성 질환 항원 또는 종양-관련 항원인 키트.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 질병-관련 항원은 감염성 질병 항원인 키트.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원인 키트.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 바이러스 항원은 엡스타인-바 바이러스("EBV")에서 유래되는 키트.

청구항 25

청구항 18-24 중 어느 하나에 있어서, 항원성 단백질은 EBV의 구조 및 비구조 단백질 중 하나인 키트.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 항원성 단백질은 gp350, gH, gL, EBNA3A 및 BRLF1/BZLF1 융합체로부터 선택되는 키트.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 4에 의해 인코딩되는 키트.

청구항 28

청구항 18-27 중 어느 하나에 있어서, saRNA는 VRP이며, 바람직하게는 알파바이러스를 기반으로 하고, 더 바람직하게는 VEEV를 기반으로 하고, 더 바람직하게는 TC83을 기반으로 하는 키트.

청구항 29

청구항 18-27 중 어느 하나에 있어서, MVA는 MVA-BN인 키트.

청구항 30

청구항 28에 있어서, 제1 조성물의 VRP는 gp350, gH 및 gL로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 키트.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 및 SEQ ID NO: 3에 의해 인코딩되는 키트.

청구항 32

청구항 18-31 중 어느 하나에 있어서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제1 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 키트.

청구항 33

청구항 18-31 중 어느 하나에 있어서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제2 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 키트.

청구항 34

청구항 18-33 중 어느 하나에 있어서, 부스팅 조성물은 부스팅 조성물의 벡터의 2회 이상의 복용량을 포함하는 키트.

청구항 35

청구항 1-14 중 어느 하나에 따른 백신 조합, 청구항 15-17 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 백신

조합, 청구항 18-31 중 어느 하나에 따른 키트, 청구항 32-34 중 하나에 따라 사용하기 위한 키트로서, 재조합 바이러스를 생성하는 데 사용된 MVA는 MVA-BN 바이러스 또는 닭 배아 섬유아세포(CEF) 세포에서 시험관 내 생식 복제 능력을 갖는 유도체이지만, 인간 각질세포 세포주 HaCat, 인간 골육종 세포주 143B, 인간 배아 신장 세포주 293, 및 인간 자궁경부 선암 세포주 HeLa에서는 생식 복제 능력이 없다.

청구항 36

청구항 1-14 중 어느 하나에 따른 백신 조합, 청구항 15-17 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 백신 조합, 청구항 18-31 중 어느 하나에 따른 키트, 청구항 32-34 중 하나에 따라 사용하기 위한 키트로서, 여기서 재조합 바이러스를 생성하는 데 사용된 MVA는 유럽 동물 세포 배양 컬렉션(ECACC)에 등록 번호 V00083008로 기탁된 MVA-BN이다.

청구항 37

감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제학적 조성물 또는 약물을 제조하기 위한 청구항 1-14 중 어느 하나에 따른 백신 조합 또는 청구항 18-31 중 어느 하나에 따른 키트의 용도.

청구항 38

청구항 1-14에 따른 백신 조합 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 첨가제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 39

대상자에게 바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로, 상기 방법은 대상자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 방법:

(c) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

(d) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 제1 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 방법.

청구항 41

청구항 39에 있어서, 제2 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되는 방법.

청구항 42

청구항 39-41 중 어느 하나에 있어서, 질병-관련 항원은 감염성 질환 항원 또는 종양-관련 항원인 방법.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 질병-관련 항원은 감염성 질병 항원인 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원인 방법.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 바이러스 항원은 엡스타인-바 바이러스("EBV")에서 유래되는 방법.

청구항 46

청구항 39-45 중 어느 하나에 있어서, 항원성 단백질은 EBV의 구조 및 비구조 단백질 중 하나인 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 항원성 단백질은 gp350, gH, gL, EBNA3A 및 BRLF1/BZLF1 융합체로부터 선택되는 방법.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 4에 의해 인코딩되는 방법.

청구항 49

청구항 39-48 중 어느 하나에 있어서, saRNA는 VRP이며, 바람직하게는 알파바이러스를 기반으로 하고, 더 바람직하게는 VEEV를 기반으로 하고, 더 바람직하게는 TC83을 기반으로 하는 방법.

청구항 50

청구항 39-48에 있어서, MVA는 MVA-BN인 방법.

청구항 51

청구항 49에 있어서, 제1 조성물의 VRP는 gp350, gH 및 gL로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 및 SEQ ID NO: 3에 의해 인코딩되는 방법.

청구항 53

청구항 39-52 중 어느 하나에 있어서, 부스팅 조성물은 프라이밍 조성물을 투여한 후 1-12주 후에 투여되는 방법.

청구항 54

청구항 39-53 중 어느 하나에 있어서, 부스팅 조성물은 대상자에게 2회 이상 투여되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **발명의 분야**

[0002] 본 발명은 인간 대상자에서 EBV와 같은 감염성 질환에 대항하여 자가-증폭 RNA(saRNA), 특히 재조합 변형 알파바이러스 레플리콘(VRP) 및 백시니아 바이러스 안카라-기반 (MVA)백신을 포함하는 대상자의 면역 반응을 증강시키기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 백신접종 방법, 특히 이종 프라임-부스트 백신접종 요법에 관한 것으로, 두 가지 바이러스 벡터 조성물을 사용한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 이종 프라임-부스트 백신접종 요법에서 사용하기 위한 재조합 VRP 및 재조합 MVA에 관한 것이다. 본 발명은 또한 예를 들어 대상자에서 보호 면역 반응을 유도하는 데 적합한 제품, 방법 및 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] **발명의 배경**

[0004] 많은 백신이 성공하려면 여러 차례의 면역접종이 필요한 것은 드문 일이 아니다. 소아 인구의 경우, 출생 후 처음 6개월 동안 3회 접종하고, 생후 2년차에 4차 접종을 한 다음, 4 내지 6세 사이에 최종 부스트를 받아야 하는 디프테리아, 파상풍 및 백일해(DTP) 백신처럼, 최대 5회의 면역접종이 필요할 수 있다. 그래도 일부 백신은 이미 전체 면역접종 시리즈를 접종한 성인에게도 추가 부스트가 필요하며, 예를 들어, 파상풍-디프테리아(Td) 백신은 평생 10년마다 부스트가 권장된다. 일부 백신이 다른 백신보다 더 많은 면역접종이 필요한 이유는 확실히 알 수 없지만, 가장 성공적인 백신에도 여러 차례의 면역접종(즉, "프라임-부스트")이 필수적이라는 것은 널리 알려져 있다. 이러한 원리는 약독화 생백신(예: 경구 소아마비 백신), 불활성화 백신(예: A형 간염 백신), 재조합 단백질 서브유닛 백신(예: B형 간염 백신) 및 폴리사카라이드 백신(예: *헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenzae)* b형 백신)에 적용된다. 이러한 백신의 경우, 프라임-부스트는 "동종"인데 왜냐하면 이전의 프라이밍 면역접종에서 투여받은 동일한 백신이 후속 부스트 면역접종에 사용되기 때문이다.

[0005] 지난 10년 동안의 연구에 따르면, "이종" 프라임-부스트 형식으로 동일한 항원을 사용하면서도 다른 백신 투여 방법으로 프라임-부스트 면역접종을 제공할 수 있음이 밝혀졌다. 가장 흥미롭고 예상치 못한 발견은, 많은 경우에, 이종 프라임-부스트가 "동종" 프라임-부스트 방식보다 효과적이라는 것이다. DNA 백신 및 바이러스 벡터-기반 백신과 같은 새로운 백신접종 접근 방식의 급속한 발전은 확실히 이종 프라임-부스트 백신접종의 범위를 더욱 확대했다(Excler JL, Plotkin S. The prime-boost concept applied to HIV preventive vaccines. *Aids.* 1997;11(Suppl A): S127-S137; Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today.* 2000; 21:163-165; Lu S. Combination DNA plus protein HIV vaccines. *Springer Semin Immunopathol.* 2006; 28:255-265.

[0006] 1992년의 획기적인 Science 보고서는 비인간 영장류 모델에서 이종 프라임-부스트 면역접종 기술을 사용한 최초 중 하나였다(Hu SL, Abrams K, Barber GN, Moran P, Zarling JM, Langlois AJ, Kuller L, Morton WR, Benveniste RE. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science.* 1992;255:456-459. AIDS 백신 개발 맥락에서, 이종 프라임-부스트 백신접종 접근 방식 사용에 대한 최초의 주요 보고서). 그 연구에서, Macaca fascicularis를 먼저 SIVmne gp160 항원을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스로 면역접종을 한 다음 바큘로바이러스-감염 세포에서 생성된 gp160 단백질로 부스트했다. 동물은 SIVmne 바이러스의 정맥 내 도전으로부터 보호되었고 이는 초기 HIV 백신 개발 노력에서 가장 유망한 보호 결과 중 하나가 되었다.

[0007] 위 연구를 주도한 과학자인 Shiu-Lok Hu와 그의 협력자들은 이전에 설치류에서, 살아있는 재조합 바이러스로 프라이밍하고 서브유닛 재조합 단백질로 부스팅하는 것이 어느 한 면역원만을 사용한 면역접종보다 더 효과적임을 입증했다(Hu SL, Klaniecki J, Dykers T, Sridhar P, Travis BM. Neutralizing antibodies against HIV-1 BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1 (BRU) envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1991; 7:615-620).

[0008] 별도의 연구에서, Girard 등은 재조합 백시니아 바이러스로 프라이밍되고 재조합 HIV-1 단백질 또는 합성 펩타이드의 혼합물로 여러 번 부스트된 침팬지에서 항체 역가가 상당히 증가했다고 보고했다(Girard M, Kieny MP, Pinter A, Barre-Sinoussi F, Nara P, Kolbe H, Kusumi K, Chaput A, Reinhart T, Muchmore E, et al. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:542-546). 또한 거의 같은 시기에, 아마도 이종 프라임-부스트 면역접종의 첫 번째 인체 시험에서, 파리의 피에르 마리 퀴리 대학의 Daniel Zagury는 HIV-1 Env 유전자를 함유하는 재조합 백시니아 바이러스로 자신에게 접종을 했고 나중에 재조합 Env 단백질을 사용하여 부스트 접종을 했다(Zagury D, Bernard J, Cheynier R, Desportes I, Leonard R, Fouchard M, Reveil B, Ittele D, Lurhuma Z, Mbayo K, et al. A group specific anamnestic immune reaction against HIV-1 induced by a candidate vaccine against AIDS. *Nature.* 1988; 332:728-731). HIV가 아닌 다른 분야에서의 초기 작업에는 Eckhart Wimmer의 그룹이 수행한 소동물 연구가 포함되는데, 이 그룹은 합성 펩타이드와 불활성화된 소아마비 바이러스를 사용하여 프라임-부스트 면역접종을 시행했다(Emini EA, Jameson BA, Wimmer E. Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature.* 1983; 304:699-703).

[0009] HIV-1 백신 개발을 위한 이종 프라임-부스트 면역접종 접근법을 사용하는 초기 노력은 다음과 같은 근거를 기초로 했다:

[0010] 재조합 외피(Env) 당단백질은, 격리된 특이적 중화 항체 반응을 유발할 수 있지만, 세포독성 T 세포 반응을 유

발할 수 없었고, 반면에, HIV-1 항원을 발현하는 재조합 백신으로 면역접종하면 좋은 T 세포 반응을 유발할 수 있지만 높은 수준의 보호 항체는 유발할 수 없었다. 따라서, 이 두 가지 유형의 백신을 모두 포함하는 복합 면역접종은 어느 한 면역원만을 사용하는 것보다 더 효과적일 수 있다(Hu SL, Klaniecki J, Dykers T, Sridhar P, Travis BM. Neutralizing antibodies against HIV-1 BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1 (BRU) envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1991; 7:615-620).

[0011] 이러한 진술은 이종 프라임-부스트 면역접종 사용에 대한 핵심 원칙을 확립했는데, 즉, 체액성 및 세포-매개 면역 반응을 모두 유발한다. 현대 면역학은 이러한 균형 잡힌 면역 반응이 바이러스 감염뿐만 아니라 다른 유형의 병원체에 대한 보호에도 중요하다는 것을 확립했다. 특히 불활성화 및 하위단위 백신과 같은 기존 백신은 T 세포 반응을 유발하는 데 그다지 효과적이지 않다. 이러한 요구 사항은 HIV 백신 개발에 훨씬 더 중요하다. 이상적인 HIV 백신은 HIV-1이 숙주의 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 게놈에 통합되면 바이러스가 제거하기 어려운 감염을 일으키는 것을 방지하기 위해 "살균 항체"를 생성할 수 있어야 한다.

[0012] 동시에, T 세포 면역 반응은 감염 규모를 제어하는 데 중요한 역할을 하며, 이는 숙주의 장기 사망률과 이환율에 영향을 미칠 수 있다.

[0013] 지난 몇 년 동안, 백신 연구에서 이종 프라임-부스트 접근법을 사용하는 것은 광범위한 병원균에 대해 상당한 추진력을 얻었다. 이러한 추세에 대한 몇 가지 특징이 분명해졌다.

[0014] 첫째, 다른 백신접종 접근법의 실패로 인해 말라리아와 결핵을 포함한 가장 어려운 백신 개발 목표 중 일부를 해결하기 위해 이종 프라임-부스트 접근법을 사용하는 것이 일반적이다. 아이디어는 특정 중요 항원에 초점을 맞추고 T 세포 면역 반응의 다양한 하위 집합을 포함하는 고품질 면역 반응을 유도하는 것이다. 트롬보스폰딘 관련 접착 단백질을 인코딩하는 DNA 프라임-MVA 부스트 백신은 말라리아에 걸리지 않은 건강한 성인을 플라스모디움 말라리아(*Plasmodium falciparum*) 포자충 도전으로부터 부분적으로 보호했다(Dunachie SJ, Walther M, Epstein JE, Keating S, Berthoud T, Andrews L, Andersen RF, Bejon P, Goonetilleke N, Poulton I, et al. A DNA prime-modified vaccinia virus ankara boost vaccine encoding thrombospondin-related adhesion protein but not circumsporozoite protein partially protects healthy malaria-naive adults against Plasmodium falciparum sporozoite challenge. *Infect Immun.* 2006; 74:5933-5942). 이 연구는 또한 면역 보호를 위한 항원 선택의 중요성을 강조하는데, 이는 트롬보스폰딘 관련 접착 단백질 대신 포자체 단백질을 사용한 동일한 복합 백신접종에서는 그러한 보호를 얻지 못했다는 사실을 통해 명확히 드러났다.

[0015] 결핵 백신 개발을 위해 재조합 BCG(Bacille Calmette-Guerin) 프라임을 받은 리서스 원숭이에서 Ag85A, Ag85B 및 TB104로 구성된 융합 단백질을 발현하는 아데노바이러스 35 벡터 부스트를 받은 후 질적 및 양적으로 다른 세포 면역 반응이 유발되었다(Magalhaes I, Sizemore DR, Ahmed RK, Mueller S, Wehlin L, Scanga C, Weichold F, Schirru G, Pau MG, Goudsmit J, et al. rBCG induces strong antigen-specific T cell responses in rhesus macaques in a prime-boost setting with an adenovirus 35 tuberculosis vaccine vector. *PLoS ONE.* 2008;3:e3790). 혹은 BCG는 DNA 백신 프라임 후 부스트로 사용될 수도 있다. 송아지에서 수행된 한 연구에서는 Ag85B, MPT64 및 MPT83 항원을 사용한 DNA 프라임과 BCG 부스트 투여가 BCG만을 투여했을 때보다 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) 감염에 대해 더 높은 면역 반응과 더 나은 보호 효과를 이끌어낼 수 있었다(Cai H, Yu DH, Hu XD, Li SX, Zhu YX. A combined DNA vaccine-prime, BCG-boost strategy results in better protection against Mycobacterium bovis challenge. *DNA Cell Biol.* 2006;25:438-447).

[0016] 두 번째, 잘 설계된 이종 프라임-부스트 접근법은 면역 반응의 범위를 확장할 수 있다. ESAT6를 발현하는 DNA 백신으로 마우스를 프라이밍한 후 나중에 재조합 단백질 형태로 동일한 항원을 부스트했을 때 Th1 유형 사이토카인 생성이 상당히 증가했으며 IgG2 대 IgG1 비율도 증가했다(Wang QM, Sun SH, Hu ZL, Yin M, Xiao CJ, Zhang JC. Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine.* 2004;22:3622-3627). 또 다른 쥐 연구에서는, Th1 유형 세포 면역 반응을 우선적으로 유도하는 단순포진 바이러스 2형(HSV-2)의 gD 항원을 발현하는 DNA 백신으로 프라이밍하고, 주로 Th2 편향 반응을 유도하는 재조합 gD 단백질로 부스트하여 항체, T 세포 증식 및 Th1 사이토카인 생성을 상당히 증가시켰다(Sin JI, Bagarazzi M, Pachuk C, Weiner DB. DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD vaccine model. *DNA Cell Biol.* 1999;18:771-779).

[0017] 셋째, 프라임-부스트 백신 접종 방식은 기존 백신의 효과를 개선할 수도 있다. 한 가지 예는 불활성화된 광견병

백신을 나중에 접종한 동물에서 항체 반응 수준을 증가시키는 DNA 프라임으로 사용하는 것이다(Biswas S, Reddy GS, Srinivasan VA, Rangarajan PN. Preexposure efficacy of a novel combination DNA and inactivated rabies virus vaccine. *Hum Gene Ther.* 2001;12:1917-1922). 마찬가지로 DNA 프라임은 재조합 PA 항원으로 면역접종된 동물의 과면역 혈청의 역가와 수명을 증가시킬 수 있다(Herrmann JE, Wang S, Zhang C, Panchal RG, Bavari S, Lyons CR, Lovchik JA, Golding B, Shiloach J, Lu S. Passive immunotherapy of Bacillus anthracis pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization. *Vaccine.* 2006;24:5872-5880). DNA 프라임을 추가한 후, 허가받은 B형 간염 표면 단백질 백신을 접종한 쥐는 재조합 단백질만 접종한 그룹과 비교했을 때 연구 그룹에서 더 강하고 동질적인 항체 반응을 생성할 수 있었다. 비장세포에서도 더 높은 IL-12 및 IFN-γ 분비가 관찰되었다(Xiao-wen H, Shu-han S, Zhen-lin H, Jun L, Lei J, Feng-juan Z, Ya-nan Z, Ying-jun G. Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HBsAg by protein boosting. *Vaccine.* 2005;23:1649-1656).

[0018] 마지막으로, 프라임-부스트 접근법은 광범위한 공중 보건에 영향을 미치는 백신을 다루는 데 중요한 실제적 응용을 가질 수 있다. 인플루엔자 감염에 대한 경험이 없는 동물 모델에서, 이종성 일회성 DNA 프라임과 일회성 불활성화 인플루엔자 백신 부스트가 DNA 또는 불활성화 인플루엔자 백신만을 사용하여 두 번 투여한 동종성 프라임-부스트보다 면역원성이 더 높은 것으로 나타났다(Wang S, Parker C, Taaffe J, Solorzano A, Garcia-Sastre A, Lu S. Heterologous HA DNA vaccine prime--inactivated influenza vaccine boost is more effective than using DNA or inactivated vaccine alone in eliciting antibody responses against H1 or H3 serotype influenza viruses. *Vaccine.* 2008;26:3626-3633). 이 발견은 전염병성 조류 인플루엔자에 대한 대비에 매우 유용할 수 있다. 인플루엔자 백신 개발에 직면한 핵심 문제 중 하나는 기존 인플루엔자 백신을 생산하는 데 필요한 제한된 용량과 긴 주기이다. 일반적으로 조류 인플루엔자 백신에는 두 번의 면역 접종이 필요하다. 대상 집단이 예상치 못한 전염병이 발생하기 훨씬 전에 조류 인플루엔자 DNA 백신 프라임을 먼저 접종할 수 있으므로 전염병성 독감이 발병할 때 필요한 백신의 양이 크게 줄어든다. 이 접근 방식은 인간 및 돼지 인플루엔자 바이러스를 포함한 다른 형태의 인플루엔자에도 유용할 수 있다. 현재 3가 인플루엔자 백신에 새로운 백신 균주를 추가하려면 상당한 추가 리소스와 시간이 필요하다. 다가 DNA 프라임은 훨씬 낮은 비용으로 광범위한 미래의 잠재적 바이러스 균주를 포괄할 수 있다.

[0019] 다른 새로운 백신 형태와 마찬가지로 이종 프라임-부스트 접근 방식도 암에 대한 잠재적 치료법으로 연구되었다. 최근 확인된 전립선의 6개 막관통 상피 항원(STEAP)을 사용하고, 이종 DNA 프라임과 베네수엘라 말뇌염 바이러스 유사 레플리콘 입자(VRP) 부스트를 통해 INF-감마, TNF-알파, IL-12를 포함하여 STEAP에 대한 더 나은 면역 반응을 이끌어낼 수 있었으며, 이는 두 백신 방식만 단독으로 투여했을 때와 비교했을 때이다. 이 백신접종 요법은 생후 31일된 마우스의 종양 성장을 약간이지만 상당히 지연시켰다(Garcia-Hernandez Mde L, Gray A, Hubby B, Kast WM. In vivo effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate: a candidate antigen for treating prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67:1344-1351).

[0020] 근본적이지만 여전히 신비한 질문은 왜 이종 프라임-부스트가 동일한 백신 구성 요소를 각각 사용하더라도 동종 프라임-부스트보다 더 효과적인가이다. 이 질문을 연구하는 한 가지 방법은 이종 프라임-부스트 백신의 투여 순서의 중요성을 결정하는 것이다. 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) 모델을 사용하여 BCG 및 Hsp65, Hsp70 및 Apa를 인코딩하는 DNA 백신으로 신생 송아지에 대한 초회-추가 예방 접종 순서가 소 결핵에 대한 보호 강화에 중요하지 않다는 것이 입증되었다(Skinner MA, Wedlock DN, de Lisle GW, Cooke MM, Tascon RE, Ferraz JC, Lowrie DB, Vordermeier HM, Hewinson RG, Buddle BM. The order of prime-boost vaccination of neonatal calves with Mycobacterium bovis BCG and a DNA vaccine encoding mycobacterial proteins Hsp65, Hsp70, and Apa is not critical for enhancing protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 2005;73:4441-4444). 다른 모델에서 쥐 HSV-2 gD 항원을 사용한 DNA 프라이밍-단백질 부스트를 통해 역전된 단백질 프라이밍-DNA 부스트 요법이 동종 단백질-단백질 백신접종 후와 유사한 항체 수준을 생성하고 Th 세포 증식 반응이나 사이토카인 생성을 더 이상 향상시키지 못했기 때문에 DNA 프라이밍이 중요하다는 것이 분명해졌다(Sin JI, Bagarazzi M, Pachuk C, Weiner DB. DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD vaccine model. *DNA Cell Biol.* 1999;18:771-779). 간염 C E2를 모델 항원으로 사용하여 훨씬 더 자세한 분석에서 DNA 프라임-아데노바이러스 벡터 부스트는 동일한 백신을 사용한 역전된 아데노바이러스 프라임-DNA 부스트나 동종 프라임-부스트와 비교했을 때 가장 높은 수준의 Th1 CD4+ T 세포 반응을 유발하는 것으로 나타났다. 더욱 흥미로운 점은 DNA 프라임-아데노바이러스 벡터 부스트 요법은 다른 세 가지 가능한 프라임-부스트 조합 중 어느 것도 세 가지 E2 특정 에피토프에 대한 CTL 반응을 유발하지 않았으며 그 중 하나는 면역 우성이었다(Park SH, Yang SH,

Lee CG, Youn JW, Chang J, Sung YC. Efficient induction of T helper 1 CD4+ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost. *Vaccine.* 2003;21:4555-4564. DNA 및 아데노바이러스 벡터 백신을 사용한 프라임-부스트 순서는 HCV E2 항원에 대한 세포 매개 면역 반응 유도에 중요하다).

[0021] 시애틀 워싱턴 대학교의 Shiu-lok Hu 박사가 남아프리카 공화국 케이프타운에서 열린 2008년 AIDS 백신 컨퍼런스에서 발표한 광범위한 비인간 영장류 연구에서, 백신 바이러스 벡터 또는 DNA 프라임에 이어 단백질 부스트를 실시한 것이 DNA 또는 다양한 바이러스 벡터 백신을 부스팅하는 것보다 더 나은 항체 반응을 생성했다. 단백질 부스트 구성 요소를 포함하지만 다른 조합은 포함하지 않는 이 두 가지 이종 프라임-부스트 요법은 면역된 동물의 ~40%에서 $SHIV_{sf162.p4}$에 의한 고용량 직장 내 도전에 대해 더 나은 중화 항체와 살균 면역을 이끌어낼 수 있었고, 주변 CD4+ T-세포 고갈로부터 동물을 보호했다.

[0022] 일부 연구에 따르면 DNA 프라임이 단백질 기반 백신에서 유발된 항체 반응의 활성도를 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다(Richmond JF, Lu S, Santoro JC, Weng J, Hu SL, Montefiori DC, Robinson HL. Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J Virol.* 1998;72:9092-9100; Wang S, Arthos J, Lawrence JM, Van Ryk D, Mboudjeka I, Shen S, Chou TH, Montefiori DC, Lu S. Enhanced immunogenicity of gp120 protein when combined with recombinant DNA priming to generate antibodies that neutralize the JR-FL primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2005;79:7933-7937). DNA 백신은 생체 내에서 항원을 생성하기 때문에 DNA 백신으로 프라이밍하면 항원의 민감한 형태 도메인에 특이적인 기억 B 세포가 생성될 수 있다. 토끼 연구에서 DNA 프라임-단백질 부스트 접근 방식을 사용하여 기본 HIV-1 gp120 항원을 전달했지만 재조합 gp120 단백질 단독 백신은 그렇지 않았는데. 이는 HIV-1 바인(Vaine)을 중화하는 데 잠재적으로 중요한 형태 의존성 CD4 결합 부위 항체를 유발할 수 있었다(M, Wang S, Crooks ET, Jiang P, Montefiori DC, Binley J, Lu S. Improved induction of antibodies against key neutralizing epitopes by human immunodeficiency virus type 1 gp120 DNA prime-protein boost vaccination compared to gp120 protein-only vaccination. *J Virol.* 2008;82:7369-7378. Including a DNA priming immunization was able to elicit conformation sensitive antibody responses when compared to protein alone HIV-1 Env vaccine).

[0023] 이종 프라임-부스트의 면역원성은 백신의 효과를 더욱 촉진하거나 향상시킬 수 있는 다른 요소를 포함시킴으로써 더욱 개선될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 사이토카인과 집락 자극 인자를 포함하면 DNA 프라임 바이러스 벡터 부스팅 HIV-1 백신의 면역원성을 향상시킬 수 있다(Barouch DH, McKay PF, Sumida SM, Santra S, Jackson SS, Gorgone DA, Lifton MA, Chakrabarti BK, Xu L, Nabel GJ, et al. Plasmid chemokines and colony-stimulating factors enhance the immunogenicity of DNA priming-viral vector boosting human immunodeficiency virus type 1 vaccines. *J Virol.* 2003;77:8729-8735). DNA 백신의 효능은 미립자 기반 제형을 사용한 후 단백질을 첨가하여 더욱 강화할 수 있다(Otten GR, Schaefer M, Doe B, Liu H, Srivastava I, Megede J, Kazzaz J, Lian Y, Singh M, Ugozzoli M, et al. Enhanced potency of plasmid DNA microparticle human immunodeficiency virus vaccines in rhesus macaques by using a priming-boosting regimen with recombinant proteins. *J Virol.* 2005;79:8189-8200). 그러나 단백질 백신에 다른 보조제를 부스트로 사용하면 차이가 생길지 여부는 명확하지 않다.

[0024] 기존 및 새로운 면역 접근 방식을 모두 사용하는 이종 프라임-부스트 백신접종은 독특한 면역 반응을 유도하여 면역원성 및/또는 보호력을 개선할 수 있는 흥미로운 기회를 제공한다. 연구에 따르면 이종 프라임-부스트는 다양한 형태를 취할 수 있으며 프라임-부스트 투여 순서가 중요할 수 있지만 항원에 따라 다를 수 있으며 숙주 종과 달성해야 할 면역 반응 유형에 영향을 받을 수 있다. 향후 연구에서는 이종 프라임-부스트 백신접종 방식의 메커니즘에 더 집중하고 백신 비용 및 현재 확인되지 않은 안전 문제를 포함하여 2성분 백신과 관련된 실질적인 문제를 해결해야 한다.

[0025] 다양한 바이러스에 대한 면역 반응을 유도하고 이종 프라임-부스트 백신접종 요법을 활용한 개선된 백신에 대한 충족되지 않은 요구가 여전히 있다.

발명의 내용

[0026] **발명의 간단한 개요**

[0027] 본 발명에서는 복제 불능 벡터의 다양한 프라임-부스트 조합이 감염성 질환, 특히 EBV 감염에 대한 효과적인 면

역 보호를 생성한다는 것이 개시된다.

[0028] 따라서 본 발명의 한 가지 일반적인 측면은 다음을 포함하는 백신 조합에 관한 것이며:

[0029] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0030] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0031] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0032] 추가 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 키트에 관한 것이며:

[0033] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0034] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0035] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0036] 추가적 측면에서, 본 발명은 대상자에게 바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 대상자에게 다음을 투여하는 것을 포함하며:

[0037] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0038] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0039] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0040] 특정 구체예에서, 제1 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되거나 그 반대의 경우이다.

[0041] 특정 구체예에서, 본 발명은 감염성 질환을 유발하는 바이러스의 두 개 이상의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 변형 백시니아 바이러스(MVA) 벡터 및 VRP 벡터에 관한 것이다.

[0042] 바람직한 구체예에서, 항원 단백질은 EBV의 구조적 및 비구조적인 것 중 하나이다. 바람직한 구체예에서, 항원 단백질은 gp350, gH, gL, EBNA3A, BRLF1/BZLF1 융합에서 선택된다.

[0043] 다른 구체예에서, VRP는 VEEV TC83이고 MVA는 MVA-BN이다.

[0044] 또 다른 구체예에서, 제1 조성물의 VRP 벡터는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 및 SEQ ID NO: 3으로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0045] 또 다른 구체예에서, 제2 조성물의 MVA 벡터는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 4로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 백신 조합에 관한 것이며:

[0047] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0048] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0049] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0050] 감염성 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되는데, 여기서 제1 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용되거나 그 반대의 경우이다.

[0051] 부스팅 조성물은 부스팅 조성물의 벡터의 2회 이상의 복용량을 포함할 수 있다.

[0052] 추가 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 백신 조합 또는 키트의 용도에 관한 것이며:

[0053] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0054] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0055] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0056] 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제학적 조성물 또는 약물을 제조하기 위한 것이다.

[0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 백신 조합을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다:

[0058] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0059] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0060] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이며, 그리고 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 첨가제.

[0061] 본 발명의 이러한 목적 및 기타 목적은 본 발명의 상세한 설명과 관련하여 더 자세히 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] **도면의 간단한 설명**

본 명세서에 통합되어 이 명세서의 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 여러 실시예를 예시하고 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명하는 데 사용된다.

도 1A는 MVA-mBN443의 구조와 유전적 조직을 나타낸다. **도 1B**는 VRP-BN011의 구조와 유전적 구성을 나타낸다. UTR = VEEV의 5' 또는 3' 비번역 영역; nsp = 비-구조적 단백질인 SUBG에 대한 코딩 영역, PROM = VEEV의 하위 유전체 프로모터; EBV gp350 멀티머: EBV gp350 = GCN4 멀티머화 도메인의 C-말단 융합을 가진 엡스타인 바르 바이러스 당단백질 gp350 아미노산 2-434; T2A = 2a 펩타이드 서열; RKRR = 푸린 절단 부위; P2A = 2a 펩타이드 서열; gH = EBV의 당단백질 H; gL = EBV의 당단백질 L

도 2는 그룹 당 Gp350-특이적 IgG 반응을 나타낸다. 동물(n=3)은 각각 프라임-부스트 요법으로 1일차와 29일차에 2회 IM 투여되었으며 이는 도면 설명에 각각의 색상 코드로 표시되어 있고 표 1에 기재된다. 투여 이전(투여 전)과 29일차와 43일차에 혈액을 채취했다. 혈청을 멀티플렉스 ELISA를 사용하여 검사했다. 이 그래프에서, gp350-특이적 IgG 농도의 기하 평균과 기하 표준 편차를 EU로 표시했다.

도 3은 그룹 당 중화 항체를 나타낸다. 동물(n=3)은 각각 프라임-부스트 요법으로 1일차와 29일차에 2회 IM 투여되었으며 이는 도면 설명에 각각의 색상 코드로 표시되어 있고 표 1에 기재된다. 투여 이전(투여 전)과 29일차와 43일차에 혈액을 채취하고 유세포분석-기반 중화 시험을 사용하여 혈청을 검사했다. 이 그래프에서는, 기하 평균과 기하 표준 편차가 표시된다.

도 4는 그룹 당 Gp350-특이적 T 세포 반응을 나타낸다. 동물(n=3)은 각각 프라임-부스트 요법으로 1일차와 29일차에 2회 IM 투여되었으며 이는 도면 설명에 각각의 색상 코드로 표시되어 있고 표 1에 기재된다. 투여 이전(투여 전)과 8일차와 36일차에 혈액을 채취하고 ELISPOT 분석을 사용하여 PBMC를 검사했다. 이 그래프에서는, $1x10^6$ PBMC 당 점 형성 단위(SFU) 수의 평균과 평균의 표준 오차(SEM)가 제시된다.

도 5는 부스트 2주 후 비장세포의 IFN-γ ELISPOT 반응을 나타낸다. 마우스는 0일차에 TNE(완충액 대조군), MVA-EBV 또는 VRP-EBV로 근육내(IM) 면역접종을 받았고 21일차에 동종 또는 이종인 동일한 검사 물질로 부스트되었다. 부스트 2주 후에, 비장세포를 분리하여 ELISPOT 분석에서 세 개의 gp350 펩타이드(EBV 펩타이드 #1 (MEAALLVCQYTIQSL); EBV gp350 펩타이드 #25 (LGAGELALTMRSKKL) 및 EBV 펩타이드 #26 (ELALTMRSKKLPINV))로 재자극하였다. IFN-γ 양성반점을 세었다. 모든 수는 백그라운드를 뺀 것이다(매질 대조군 자극). 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다;

도 6은 부스트 면역접종 5일 후 혈액에서 OVA-특이적 CD8 T 세포 반응을 나타낸다. 마우스는 0일차에 TNE(완충액 대조군), MVA-OVA 또는 VRP-OVA로 피하(SC) 면역접종을 받았고 21일차에 동종 또는 이종인 동일한 검사 물질로 부스트되었다. 부스트 5일 후, 혈액을 채취하고 SIINFEKL-덱스트라머를 사용하여 유세포분석으로 OVA-특이적 CD8 T 세포를 결정했다. 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. N = 그룹 당 5마리 마우스

도 7은 부스트 면역접종 4주 후 비장에서 OVA-특이적 CD8 T 세포 반응을 나타낸다. 마우스는 0일차에 TNE(완충액 대조군), MVA-OVA 또는 VRP-OVA로 피하(SC) 면역접종을 받았고 21일차에 동종 또는 이종인 동일한 검사 물질로 부스트되었다. 부스트 면역접종 4주 후 비장세포를 분리하여 OVA257-264 펩타이드 또는 OVA55-62 펩타이드로 6시간 동안 재자극했다. 사이토카인 생성 세포를 유세포 분석법으로 검출했다. 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. N = 그룹 당 5마리 마우스

도 8은 이종 VRP/MVA 면역접종에 따른 OVA-특이적 혈청 전체 IgG 역가를 나타낸다. 마우스는 0일차에 TNE(완충액 대조군), MVA-OVA 또는 VRP-OVA로 피하(SC) 면역접종을 받았고 21일차에 동종 또는 이종인 동일한 검사 물질로 부스트되었다. 14일차와 35차에 혈액을 채취하고 혈청을 분리했다. OVA-특이적 전체 IgG 역가를 ELISA로 결정했다. 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. N = 그룹 당 5마리 마우스

도 9는 부스트 2주 후 비장세포의 IFN-γ ELISPOT 반응을 나타낸다. 마우스는 0일차에 TNE(완충액 대조군), MVA-EBV 또는 SFV-VRP-EBV로 근육내(IM) 면역접종을 받았고 21일차에 동종 또는 이종인 동일한 검사 물질로 부스트되었다. 부스트 2주 후에, 비장세포를 분리하여 ELISPOT 분석에서 세 개의 gp350 펩타이드(EBV 펩타이드 #1 (MEAALLVCQYTIQSL); EBV gp350 펩타이드 #25 (LGAGELALTMRSKKL) 및 EBV 펩타이드 #26 (ELALTMRSKKLPINV))로 재자극하였다. IFN-γ 양성반점을 세었다. 모든 수는 백그라운드를 뺀 것이다(매질 대조군 자극). 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다;

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] **서열의 간단한 설명**

[0064] **SEQ ID NO: 1** gp350 멀티머(1455개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열을 묘사한다.

[0065] **SEQ ID NO: 2** gH(2121개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열을 묘사한다.

[0066] **SEQ ID NO: 3** gL(414개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열을 묘사한다.

[0067] **SEQ ID NO: 4** BZLF1-BRLF1(2283개 뉴클레오타이드)의 서열로 만들어진 융합 유전자의 핵산 서열을 묘사한다.

[0068] **SEQ ID NO: 5** EBNA3A(2892개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열을 묘사한다.

[0069] **SEQ ID NO: 6** loxPV 부위 하나의 DNA 서열을 묘사한다.

[0070] **SEQ ID NO: 7** Pr13.5 긴 프로모터의 핵산 서열을 묘사한다.

[0071] **SEQ ID NO: 8** PrS 프로모터의 핵산 서열을 묘사한다.

[0072] **SEQ ID NO: 9** PrH5m 프로모터의 핵산 서열을 묘사한다.

[0073] **SEQ ID NO: 10** Pr1328 프로모터의 핵산 서열을 묘사한다.

[0074] **SEQ ID NO: 11** 2A 펩타이드(T2A)의 핵산 서열을 묘사한다.

[0075] **SEQ ID NO: 12** 2A 펩타이드(P2A)의 핵산 서열을 묘사한다.

[0076] **SEQ ID NO: 13** 링커 GCN4의 핵산 서열을 묘사한다.

[0077] **발명의 상세한 설명**

[0078] saRNA, 특히 VRP를 프라임 백신으로, MVA를 부스터 백신으로 사용하는 이종 프라임-부스트 요법이 gp350-특이적 IgG 및 중화 항체 측면에서 매우 면역원성이 높은 반면, MVA 또는 VRP를 사용하는 동종 백신접종 요법 또는 Ad를 부스터 백신으로 투여하는 것이 가장 면역원성 효과가 낮았다는 것은 선행 기술에서 가르치고 달성한 바에서 예상할 수 없었다.

[0079] 이종 프라임-부스트 요법은 비인간 영장류에게 바이러스 감염, 특히 EBV에 대한 보호를 제공하는 면역 반응을 생성한다. 물론, 본 발명자들이 생성한 데이터와 그들의 관찰을 통해, 백신 요법이 인간에게도 면역 반응을 유

도하고 EBV에 대해서만 특이적으로 유도하는 것이 아니라 감염성 질환 항원이나 종양-관련 항원을 포함한 다른 질환 관련 항원에 의해 유발되는 다른 질환에 대해서도 면역 반응을 유도한다는 결론을 내리는 것은 매우 합리적이고 타당하다. 실제로, FDA는 비인간 영장류 모델을 이러한 비인간 영장류에서 보호 효과를 제공하는 백신이 인간에게도 적합하다는 증거로 받아들인다.

[0080] 특히, 본 발명자들은 또한 VRP를 프라임 백신으로 포함하는 백신접종 요법이 MVA를 프라임 백신으로 사용하는 것보다 더 높은 gH/gL/gp42-복합체 및 gH-특이적 IgG 반응을 초래한다는 것을 발견했다. gH/gL/gp42 또는 gH에 대한 기존 면역이 있는 NHP에 MVA 또는 VRP를 사용한 한 번의 백신접종은 gH/gL/gp42-복합체 및 gH-특이적 IgG 반응만 부스트한 반면, 두 번째 투여는 부가적인 부스트 효과가 전혀 없거나 거의 없었다.

[0081] 따라서 본 발명은 예를 들어 EBV에 의한 감염성 질환 항원 또는 종양-관련 항원에 대한 보호를 부여하는 면역 반응을 생성하는 데 사용되는 백신 또는 백신 조합 및 상기 항원에 대한 백신을 제조하는 데 사용될 수 있는 백신 또는 백신 조합을 제공한다.

[0082] **정의**

[0083] 본 발명을 아래에서 자세히 설명하기 전에, 본 발명이 여기에 설명된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약에 국한되지 않는다는 점을 이해해야 하며, 이는 다양할 수 있다. 또한, 여기에 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하는 목적일 뿐이며, 첨부된 청구항에 의해서만 제한되는 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니라는 점을 이해해야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 해당 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0084] 여기에 사용된 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명확히 달리 표시되지 않는 한 복수형 참조를 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서 예를 들어, "구조 단백질"에 대한 언급은 하나 이상의 구조 단백질을 포함하고 "방법"에 대한 언급은 본 명세서에 설명된 방법을 수정하거나 대체할 수 있는 해당 분야의 통상의 기술자에게 알려진 동등한 단계 및 방법에 대한 언급을 포함한다.

[0085] 달리 명시되지 않는 한, 일련의 요소 앞에 있는 "적어도"라는 용어는 일련의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해해야 한다. 해당 분야의 통상의 기술자는 일상적인 실험 이상을 사용하지 않고도 본 명세서에 설명된 발명의 특정 구체예에 대한 많은 동등한 것을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등한 것은 본 발명에 포함되도록 의도되었다.

[0086] 수치 값과 관련하여 사용되는 용어 "약"은 문맥상 명확히 달리 표시되지 않는 한, 하한이 표시된 수치 값보다 5% 작고 상한이 표시된 수치 값보다 5% 큰 범위 내의 수치 값을 포함하는 것을 의미한다.

[0087] 여기에서 사용되는 여러 개의 언급된 요소 사이의 접속사 "및/또는"은 개별 옵션 및 결합된 옵션을 모두 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 두 요소가 "및/또는"으로 연결된 경우, 첫 번째 옵션은 두 번째 요소 없이 첫 번째 요소의 적용 가능성을 나타낸다. 두 번째 옵션은 첫 번째 요소 없이 두 번째 요소의 적용 가능성을 나타낸다. 세 번째 옵션은 첫 번째 요소와 두 번째 요소를 함께 적용할 수 있음을 나타낸다. 이러한 옵션 중 어느 하나가 이러한 의미에 포함되는 것으로 이해되므로 여기에서 사용되는 용어 "및/또는"의 요구 사항을 충족한다. 두 개 이상의 옵션을 동시에 적용하는 것도 이러한 의미에 포함되는 것으로 이해되므로 "및/또는"의 요구 사항을 충족한다.

[0088] 본 명세서와 이어지는 청구항 전체에서 문맥상 달리 요구되지 않는 한, "포함하다"라는 단어와 "포함한다" 및 "포함하는"과 같은 변형어는 명시된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계 그룹을 포함하는 것을 의미하지만 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계 그룹을 제외하는 것은 아니다. 여기에서 "포함하는"이라는 용어는 "포함하는" 또는 "포함하는"이라는 용어로 대체될 수 있으며, 때때로 여기에서 "가지는"이라는 용어로 사용될 수 있다. 본 발명의 측면 또는 실시예의 맥락에서 여기에서 사용될 때마다 상기 언급된 용어(포함하는, 포함하는, 포함하는, 갖는)는 "구성되는"이라는 용어로 대체될 수 있지만 덜 선호된다.

[0089] 본 명세서에서 "구성되는"은 청구항 요소에 명시되지 않은 모든 요소, 단계 또는 성분을 제외한다. 본 명세서에서 "본질적으로 구성되는"은 청구항의 기본적이고 새로운 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계를 제외하지 않는다.

[0090] "항원"이라는 용어에는 특정 화합물, 조성물 또는 물질의 모든 관련 에피토프가 포함된다. "에피토프" 또는 "항원 결정인자"라는 용어는 B-세포 및/또는 T-세포가 단독으로 또는 예를 들어 주요 조직 적합성 복합체("MHC") 단백질 또는 T-세포 수용체와 같은 다른 단백질과 함께 반응하는 항원의 부위를 말한다. 에피토프는 연속 아미

노산 또는 단백질의 2차 및/또는 3차 접힘에 의해 병치된 비연속 아미노산 모두에서 형성될 수 있다. 연속 아미노산에서 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매에 노출되어도 유지되는 반면, 3차 접힘으로 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매로 처리하면 손실된다. 에피토프는 일반적으로 고유한 공간적 형태로 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 아미노산을 포함하지만 일반적으로 20개 미만의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 형태를 결정하는 방법에는 예를 들어 x-선 결정학 및 2차원 핵자기 공명이 있다. 예를 들어 "Epitope Mapping Protocols" in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)를 참조하라.

[0091] 항원은 조직-특이적(또는 조직-관련) 항원 또는 질병-특이적(또는 질병-관련) 항원일 수 있다. 이러한 용어는 상호 배타적이지 않으며, 조직-특이적 항원은 질병-특이적 항원일 수도 있기 때문이다. 조직-특이적 항원은 제한된 수의 조직에서 발현된다. 조직-특이적 항원에는 예를 들어 전립선-특이적 항원(prostate-specific antigen, "PSA")이 포함된다. 질병-특이적 항원은 질병 과정과 동시에 발현되며, 항원 발현은 특정 질병의 발병과 상관관계가 있거나 이를 예측한다. 질병-특이적 항원에는 예를 들어 특정 유형의 유방암과 관련된 HER-2, 또는 전립선암과 관련된 PSA가 포함된다. 질병-특이적 항원은 T-세포 또는 B-세포가 인식하는 항원일 수 있다.

[0092] 구조적 분화의 특징적인 손실을 겪은 특정 신체 조직에서 발생하는 악성 종양은 일반적으로 세포 분열 능력 증가, 주변 조직 침윤 및 전이 능력을 수반한다. 종양은 양성이거나 악성일 수 있다. 예를 들어, 전립선암은 전립선 조직에서 발생하는 악성 신생물이고, 난소암은 난소 조직에서 발생하는 악성 신생물이고, 대장암은 대장 조직에서 발생하는 악성 신생물이고, 폐암은 폐 조직에서 발생하는 악성 신생물이다. 잔류암은 암을 줄이거나 근절하기 위해 대상자에게 치료를 한 후에도 대상자에게 남아 있는 암이다. 전이성 암은 전이성 암이 유래된 원래(원발성) 암의 기원 부위가 아닌 신체의 한 부위 이상에서 발생하는 암이다.

[0093] "보존적" 변형은 단백질 또는 단백질의 항원성 에피토프의 활성 또는 항원성에 실질적으로 영향을 미치거나 감소시키지 않는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 변형 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 일반적으로 보존적 치환은 특정 아미노산이 동일하거나 유사한 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환되는 치환이다. 예를 들어, 라이신과 같은 염기성 아미노산을 아르기닌 또는 글루타민과 같은 다른 염기성 아미노산으로 대체하는 것은 보존적 치환이다. 보존적 변형이라는 용어에는 치환되지 않은 모 아미노산 대신 치환된 아미노산을 사용하는 것도 포함되며, 치환된 폴리펩타이드에 대해 생성된 항체도 치환되지 않은 폴리펩타이드와 면역 반응을 일으키고/하거나 치환된 폴리펩타이드가 치환되지 않은 폴리펩타이드의 기능을 유지하는 경우에 한한다. 비보존적 치환은 특정 아미노산을 다른 화학적 특성을 갖는 아미노산으로 대체하고 일반적으로 단백질 또는 단백질의 항원성 에피토프의 활성 또는 항원성을 감소시키는 치환이다.

[0094] 보존적 치환의 구체적이고 제한적이지 않은 예는 다음과 같다:

[0095] 최초 잔기 보존적 치환

[0096] Ala Ser

[0097] Arg Lys

[0098] Asn Gln, His

[0099] Asp Glu

[0100] Cys Ser

[0101] Gln Asn

[0102] Glu Asp

[0103] His Asn; Gln

[0104] Ile Leu, Val

[0105] Leu Ile; Val

[0106] Lys Arg; Gln; Glu

[0107] Met Leu; Ile

[0108] Phe Met; Leu; Tyr

[0109] Ser Thr

[0110] Thr Ser

[0111] Trp Tyr

[0112] Tyr Trp; Phe

[0113] Val Ile; Leu

[0114] "질병-관련 항원"은 특정 질병 과정과 동시에 발현되며, 항원 발현은 해당 질병의 발병과 상관관계가 있거나 예측한다. 질병-관련 항원에는 예를 들어 특정 유형의 유방암과 관련된 HER-2, 또는 전립선암과 관련된 전립선-특이적 항원("PSA")이 포함된다. 질병-관련 항원은 T-세포 또는 B-세포가 인식하는 항원일 수 있다. 일부 질병-관련 항원은 조직-특이적일 수도 있다. 조직-특이적 항원은 제한된 수의 조직에서 발현된다. 조직-특이적 항원에는 예를 들어 전립선-특이적 항원 PSA가 포함된다.

[0115] 질병-관련 항원은 예를 들어 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원 또는 기생충 항원일 수 있다.

[0116] 용어 "종양 항원"은 종양 조직에서만 발현되거나, 종양 조직과 연관되거나, 종양 조직에서 과발현되는 항원을 말한다. 예시적인 종양 항원에는 비제한적으로 다음이 포함된다: 5-α-환원효소, α-태아단백질("AFP"), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자("BAGE"), β-카테닌, Bcl12, bcr-abl, 브라키우리, CA-125, 카스파제-8("CASP-8", 또한 "FLICE"로 알려져 있음), 카텝신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/$F_c\varepsilon$RII, CD33, CD35/보체 수용체 1("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원("LCA"), CD46/막 보조인자 단백질("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/붕괴 촉진 인자("DAF"), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 암배아 항원("CEA"), c-myc, 사이클로옥시게나아제-2("cox-2"), 대장암 유전자("DCC")에서 삭제됨, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파네실 전이효소, 섬유아세포 성장 인자-8a("FGF8a"), 섬유아세포 성장 인자-8b("FGF8b"), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리("GAGE-패밀리"), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 갱글리오사이드 2("GD2")/갱글리오사이드 3("GD3")/갱글리오사이드-모노시알산-2("GM2"), 생식선자극호르몬 방출 호르몬("GnRH"), UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2 [GlcNAc - Man(α1-6)] β1,6-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V("GnT V"), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/티로신-관련 단백질-1("gp75/TRP-1"), 인간융모막 성선자극호르몬("hCG"), 헤파라나제, Her2/neu, 인간 유방 종양 바이러스("HMTV"), 70 킬로달톤 열-충격 단백질("HSP70"), 인간 텔로머라제 역전사효소("hTERT"), 인슐린-유사 성장 인자 수용체-1("IGFR-1"), 인터루킨-13 수용체("IL-13R"), 유도성 일산화질소 합성효소("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-인코딩 패밀리("MAGE-패밀리", 최소한 MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, 및 MAGE-4 포함), 맘마글로빈, MAP17, T-세포에 의해 인식되는 멜라닌-A/흑색종 항원-1("MART-1"), 메조텔린, MIC A/B, MT-MMP, 뮤신, 고환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), μPA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이에틴, 전립선-특이적 항원(PSA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 전립선 산성 인산가수분해효소(PAP), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파(TGF-α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β), 티모신-베타-15, 종양괴사인자-알파(TNF-α), TP1, TRP-2, 티로시나아제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), ZAG, p16INK4, 및 글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST).

[0117] "바이러스 항원"이라는 용어는 질병-관련 병원성 바이러스에서 유래된 항원을 말한다. 예시적인 질병 관련 바이러스 항원에는 비제한적으로 다음에서 유래된 항원이 포함된다: 아데노바이러스, 아르보바이러스, 아스트로바이러스, 코로나바이러스, 콕사키바이러스, 크림콩고 출혈열 바이러스, 거대세포바이러스("CMV"), 뎅기열 바이러스, 에볼라 바이러스, 엡스타인-바 바이러스("EBV"), 구제역 바이러스, 과나리토 바이러스, 헨드라 바이러스, 단순포진 바이러스 1형("HSV-1"), 단순포진 바이러스 2형("HSV-2"), 인간 헤르페스 바이러스 6형("HHV-6"), 인간 헤르페스 바이러스 8형("HHV-8"), A형 간염 바이러스("HAV"), B형 간염 바이러스("HBV"), C형 간염 바이러스("HCV"), D형 간염 바이러스("HDV"), E형 간염 바이러스("HEV"), 인간 면역 결핍 바이러스("HIV"), 인플루엔자 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 주닌 바이러스, 라사 바이러스, 마추포 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 전염성 연속종 바이러스, 이하선염 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 니파 바이러스, 노로바이러스, 노워크 바이러스, 인간 유두종 바이러스("HPV"), 파라인플루엔자 바이러스, 파보바이러스, 소아마비 바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스("RSV"), 라이노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 사비아 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 바이러스("SARS"), 수두대상포

진 바이러스, 천연두 바이러스, 서나일 바이러스, 및 황열병 바이러스.

[0118] "박테리아 항원"이란 용어는 질병-관련 병원성 바이러스에서 유래된 항원을 의미한다. 예시적인 박테리아 항원에는 비제한적으로 다음에서 유래된 항원이 포함된다: *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis), 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis), 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi), 브루셀라 아보르투스(Brucella abortus), 브루셀라 캐니스(Brucella canis), 브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis), 브루셀라 수이스(Brucella suis), 부르크홀데리아 말레이(Burkholderia mallei), 부르크홀데리아 슈도말레이(Burkholderia pseudomallei), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 클라미디아 뉴모니애(Chlamydia pneumoniae), 클라미디아 트라코마티스(Chlamydia trachomatis), 클라미도필라 시타시(Chlamydophila psittaci), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 클로스트리듐 퍼프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리듐 테타니(Clostridium tetani), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diptheriae), 엔테로코쿠스 패칼리스(Enterococcus faecalis), 엔테로코쿠스 패시움(Enterococcus faecium), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장독소성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장병원성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli)157:H7, 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenza), 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 렙토스피라 인터로간스(Leptospira interrogans), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 레프래(Mycobacterium leprae), 마이코박테리움 터버컬로우시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코플라스마 누모니애(Mycoplasma pneumoniae), 나이세리아 고노르회애(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메닌자이타이즈(Neisseria meningitides), 수더모우너즈 에어루지노우서(Pseudomonas aeruginosa), 리케치아 리케치아(Rickettsia rickettsia), 살모넬라 티피(Salmonella typhi), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 시겔라 소네이(Shigella sonnei), 스태필러코커스 아우레어스(Staphylococcus aureus), 스태필러코커스 에퍼더머디스(Staphylococcus epidermidis), 스태필러코커스 샙러피티커스(Staphylococcus saprophyticus), 스트렙토코커스 아갈락티아에(Streptococcus agalactiae), 스트렙터코커스 누모니애(Streptococcus pneumoniae), 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 트레포네마 팔리둠(Treponema pallidum), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 및 여시니아 페스티스(Yersinia pestis).*

[0119] "진균 항원"이란 용어는 질병-관련 병원성 진균에서 유래된 항원을 의미한다. 예시적인 진균 항원에는 비제한적으로 다음에서 유래된 항원이 포함된다: *아스페르길루스 클라바투스(Aspergillus clavatus), 아스페르길루스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스페르길루스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus), 아스페르길루스 니둘란스(Aspergillus nidulans), 아스페르길루스 니제르(Aspergillus niger), 아스페르길루스 테레우스(Aspergillus terreus), 블라스토미세스 더마리티디스(Blastomyces dermatitidis), 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 칸디다 더블리니엔시스(Candida dubliniensis), 칸디다 글라브라타(Candida glabrata), 칸디다 파라필로시스(Candida parapsilosis), 칸디다 루고사(Candida rugosa), 칸디다 트로피칼리스(Candida tropicalis), 크립토코커스 알비두스(Cryptococcus albidus), 크립토코커스 가티이(Cryptococcus gattii), 크립토코커스 로랑티(Cryptococcus laurentii), 크립토코커스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 히스토플라즈마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum), 마이크로스포룸 캐니스(Microsporum canis), 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii), 뉴모시스티스 지로베치(Pneumocystis jirovecii), 스포로트릭스 쉔키이(Sporothrix schenckii), 스타크보트리스 차르타룸(Stachbotrys chartarum), 티네아 바베(Tinea barbae), 티네아 캡티스(Tinea captitis), 티네아 코퍼리(Tinea corporis), 티네아 크루리스(Tinea cruris), 티네아 파시에이(Tinea faciei), 티네아 인코그니토(Tinea incognito), 티네아 니그라(Tinea nigra), 티네아 버시컬러(Tinea versicolor), 트리코피톤 루브럼(Trichophyton rubrum) 및 트리코피톤 톤수란(Trichophyton tonsurans).*

[0120] "기생충 항원"이란 용어는 질병-관련 병원성 기생충에서 유래된 항원을 의미한다. 예시적인 기생충 항원에는 비제한적으로 다음으로부터 유래된 항원이 포함된다: *아니사키스 에스피피(Anisakis spp.) 바베시아 에스피피(Babesia spp.), 베일리스카리스 프로시오니스(Baylisascaris procyonis), 크립토스포리디움 에스피피(Cryptosporidium spp.), 사이클로스포라 카예타넨시스(Cyclospora cayetanensis), 디필로보트리움 에스피피(Diphyllobothrium spp.), 드라쿤큘러스 메디넨시스(Dracunculus medinensis), 엔타메바 히스토리티카(Entamoeba histolytica), 지아르디아 두오데나리스(Giardia duodenalis), 지아르디아 인테스티나리스(Giardia intestinalis), 지아르디아 람블리아(Giardia lamblia), 레이시매니아 에스피(Leishmania sp.), 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 쉬스토소마 만소니(Schistosoma mansoni), 쉬스토소마 히머토우비엄(Schistosoma haematobium), 쉬스터소마 저파너컴(Schistosoma japonicum), 태니어 에스피피(Taenia spp.), 톡소플라즈마 곤디이(Toxoplasma gondii), 트리키넬라 스피랄리스(Trichinella spiralis), 및 트리파노소마 크루*

지(Trypanosoma cruzi).

[0121] "엡스타인-바 바이러스", "EBV", "인간 헤르페스 바이러스 4" 및 "HHV-4"는 발암성 인간 헤르페스 바이러스를 서로 교환적으로 지칭한다. EBV는 급성 전염성 단핵구증(AIM, 선열이라고도 함)의 원인이다. 또한 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma)과 같은 특정 형태의 암과 관련이 있다. 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 비인두 암, 및 예컨대 모낭성 백반증 및 중추 신경계 림프종과 같은 인간 면역 결핍 바이러스(HIV)와 관련된 질환이다. EBV는 면역 체계의 B 세포와 상피 세포를 감염시킨다. 바이러스의 초기 용해성 감염이 통제되면, EBV는 교대 잠복 용해 단계를 포함하는 복잡한 수명 주기로 인해 개인의 B 세포에서 잠복적으로 지속된다.

[0122] "EBV 감염 증상"에는 급성 전염성 단핵구증(AIM, 선열이라고도 함) 및/또는 EBV 관련 암의 존재가 포함된다. "EBV-관련 암"은 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 비인두암, 자궁경부암, 모성 백반증 및 중추 신경계 림프종과 같이 적어도 부분적으로 EBV 감염에 의해 발생 및/또는 악화되는 암을 말한다.

[0123] "항원", "면역원", "항원성", "면역원성", "항원적으로 활성" 및 "면역학적으로 활성"이라는 용어는 분자와 관련하여 언급될 때 특정 체액성 및/또는 세포 매개 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 물질을 말한다. 특정 구체예에서, 항원은 적어도 일부 또는 외측도메인(ectodomain)을 포함한다.

[0124] "EBV 항원"은 "gB, gH, gL, gp350/220"과 같은 EBV의 항원과 종양 관련 EBV 항원을 말한다.

[0125] "EBV 외피 당단백질"이라는 용어에는 gp350, gB, gp42, gH, gL, gM, gN, BMRF2, BDLF2, BDLF3, BILF1, BILF2, BARF1이 포함된다. "T 세포 항원"이라는 용어는 EBNA1, EBNA2, EBNA3a, EBNA3b, EBNA3c, EBNA-리더 단백질, LMP2를 말한다.

[0126] "gp350/220"이라는 용어는 우세한 EBV 외피 단백질이다. B-세포에서 EBVgp350/220과 보체 수용체 유형 2(CR2)CD21 및/또는 (CR1)CD35 사이의 상호작용은 세포 부착 및 잠복 감염 개시에 필요하(SEQ ID NO:1).

[0127] 용어 "gH"는 인간 헤르페스 바이러스 4의 당단백질 gp85 전구체를 지칭하며, SEQ ID NO:2, NCBI 참조 시퀀스: YP_401700.1에 예시되어 있다.

[0128] 용어 "gL"과 "BKRF2"는 상호 교환적으로 사용되며, SEQ ID NO: 3, NCBI 참조 시퀀스: YP_001129472.1에 예시되어 있다.

[0129] 용어 "BZLF1-BRLF1 융합"은 EBV 초기 유전자의 전사 활성화제를 지칭하며, SEQ ID NO: 4에 예시되어 있다.

[0130] "EBNA-3A"는 SEQ ID NO: 5, NCBI 참조 시퀀스: YP_401677.1에 예시되어 있다.

[0131] "종양-관련 EBV 항원"은 EBV에 감염된 대상자의 종양과 관련된 EBV 항원이다. 예시적 종양-관련 EBV 항원에는 EBNA1, LMP1, LMP2 및 BARF1이 포함되며, 이는 다음문헌에 개시되어 있다: Lin et al. "CD4 and CD8 T cell responses to tumor-associated Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients." Cancer Immunol Immunother. 2008 July; 57(7):963-75; Kohrt et al. "Dynamic CD8 T cell responses to tumor-associated Epstein-Barr virus antigens in patients with Epstein-Barr virus-negative Hodgkin's disease," Oncol Res. 2009; 18(5-6):287-92; Parmita et al., "Humoral immune responses to Epstein-Barr virus encoded tumor associated proteins and their putative extracellular domains in nasopharyngeal carcinoma patients and regional controls," J Med Virol. 2011 April; 83(4):665-78.

[0132] "보조제"는 항원성을 강화하는 매개체를 의미한다. 보조제는 다음을 포함할 수 있다: (1) 항원이 흡착된 미네랄(명반, 수산화 알루미늄 및/또는 인산염)의 현탁액; (2) 항원 용액이 미네랄 오일에 유화되어 있는 유중수 에멀전(water-in-oil emulsion)(프로인트 불완전 보조제), 때때로 항원 분해를 억제하고/또는 대식세포 유입을 유발하여 항원성을 더욱 향상시키기 위해 사멸된 결핵균(프로인트 완전 보조제)을 포함함; (3) 올리고뉴클레오타이드를 비제한적으로 포함하는 면역 자극 물질, 예를 들어, CpG 모티프를 포함하는 것도 보조제로 사용될 수 있음(예: 미국 특허 제6,194,388호 및 미국 특허 제6,207,646호 참조); 및 (4) 보조 자극 분자(예: B7-1, ICAM-1, LFA-3 및 GM-CSF)와 같은 정제된 또는 재조합 단백질.

[0133] 본 명세서에서 사용되는 "면역 반응에 영향을 미치는 것"에는 재조합 MVA 또는 VRP 및/또는 발명의 재조합 MVA 및 VRP를 포함하는 조성물 및/또는 백신에 의해 생성된 단백질 및/또는 폴리펩타이드에 대한 체액성 및/또는 세포성 면역 반응의 대상자에서의 발달이 포함된다. 이 용어가 해당 기술 분야에서 잘 알려져 있듯이, "체액성" 면역 반응은 항체를 포함하는 면역 반응을 의미하고, 이 용어가 해당 기술 분야에서 잘 알려져 있듯이, "세포성" 면역 반응은 T-림프구 및 기타 백혈구, 특히 HLA-제한된 세포용해성 T-세포, 즉 "CTL"에 의한 면역원-

특이적 반응을 포함하는 면역 반응을 의미한다. 조작된 면역원, 즉 펩타이드 단편이 주요 조직적합성 복합체와 함께 표시될 때 세포성 면역 반응이 발생한다.

[0134] 본 명세서에서 사용되는 용어 "알파바이러스"는 해당 기술 분야에서 통상적인 의미를 가지며, 다양한 종류의 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV), 서부 말 뇌염 바이러스(western equine encephalitis virus, WEEV), 동부 말 뇌염 바이러스(eastern equine encephalitis virus, EEEV)를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "말 뇌염 바이러스(Equine encephalitis virus, EEV)"에는 VEEV, WEEV 및 EEEV와 그 균주 및 분리주가 포함된다.

[0135] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현", "발현", "발현" 등은 교환적으로 사용할 수 있으며, 관심 서열의 전사만을 의미할 뿐만 아니라 전사와 번역을 모두 의미한다. 따라서 DNA 형태로 존재하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 언급할 때, 이 발현에서 생성되는 생성물은 RNA(발현될 서열의 전사만을 의미함) 또는 폴리펩타이드 서열(발현될 서열의 전사와 번역을 모두 의미함)일 수 있다. 따라서 "발현"이라는 용어에는 RNA와 폴리펩타이드 생성물이 모두 해당 발현에서 발생하여 동일한 공유 환경에서 함께 유지될 가능성도 포함된다. 예를 들어, mRNA가 폴리펩타이드 생성물로 번역된 후에도 지속되는 경우가 여기에 해당한다.

[0136] 본 명세서에서 "발현 카세트"라는 용어는 일반적으로 클로닝 및/또는 형질전환에 사용되는 벡터 또는 재조합 바이러스의 일부로 정의된다. 발현 카세트는 일반적으로 a) 하나 이상의 코딩 시퀀스(예: 오픈 리딩 프레임(ORF), 유전자, 단백질 및/또는 항원을 인코딩하는 핵산), 및 b) 하나 이상의 코딩 시퀀스(예: 프로모터)의 발현을 제어하는 시퀀스로 구성된다. 또한, 발현 카세트는 3' 비번역 영역(예: 백신 전사 종결자와 같은 전사 종결자)을 포함할 수 있다. "발현 카세트"는 용어 "전사 단위"와 교환적으로 사용할 수 있다.

[0137] "제형"은 활성 약제학적 또는 생물학적 성분(예: 본 발명의 재조합 MVA)과 하나 이상의 추가 성분을 포함하는 조성물을 말한다. "제형"이라는 용어는 여기에서 용어 "약제학적 조성물", "백신 조성물" 및 "백신 제형"과 교환적으로 사용된다. 제형은 액체 또는 고체(예: 동결 건조)일 수 있다.

[0138] "유전자"라는 용어는 생물학적 기능과 관련된 폴리뉴클레오타이드의 모든 단편을 나타내는 데 광범위하게 사용된다. 따라서 유전자에는 게놈 서열에서와 같이 인트론과 엑손이 포함되거나 cDNA 또는 바이러스 RNA에서와 같이 코딩 서열만 포함되거나 발현에 필요한 조절 서열이 포함된다. 예를 들어, 유전자는 mRNA 또는 기능적 RNA를 발현하거나 특정 단백질을 인코딩하는 핵산 단편을 의미하며, 여기에는 조절 서열이 포함된다.

[0139] 본 명세서에서 사용되는 "이종" 유전자, 핵산, 항원 또는 단백질은 야생형 폭스바이러스 게놈(예: MVA 또는 MVA-BN)에 존재하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열로 이해된다. 통상의 기술자는 MVA 또는 MVA-BN과 같은 폭스바이러스에 존재하는 "이종 유전자"가 폭스바이러스 게놈에 통합되는데, 이는 재조합 폭스바이러스가 숙주 세포에 투여된 후 해당 이종 유전자 생성물로서, 즉 "이종 항원" 및/또는 "이종 단백질"로서 발현되는 방식으로 이루어진다는 것을 이해한다. 발현은 일반적으로 폭스바이러스에 감염된 세포에서 발현을 허용하는 조절 요소에 이종 유전자를 작동적으로 연결하여 달성된다. 바람직하게는, 조절 요소에는 천연 또는 합성 폭스바이러스 프로모터가 포함된다.

[0140] 용어 "면역원성 조성물" 또는 "면역학적 조성물"은 MVA에서 발현되는 관심 항원에 대한 면역 반응을 유발하는 조성물을 포함한다. 용어 "백신 또는 백신 조성물"은 관심 항원에 대한 보호 면역 반응을 유도하거나 관심 항원에 대해 효과적으로 보호하는 모든 조성물을 포함하며, 예를 들어, 동물 또는 인간에게 투여 또는 주사한 후 항원에 대한 보호 면역 반응을 유발하거나 MVA 벡터에서 발현되는 항원에 대한 효과적인 보호를 제공한다. 조성물은 단독으로 투여되거나 다른 조성물 또는 치료 조성물과 순차적으로 투여되어 조합 조성물, 칵테일 또는 두 개 이상, 바람직하게는 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 조성물의 다가 혼합물을 제공할 수 있다.

[0141] 용어 "핵산", "뉴클레오타이드 서열", "핵산 서열" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 교환적으로 사용할 수 있으며 선형 또는 분지형, 단일 또는 이중 가닥 또는 이들의 하이브리드인 RNA 또는 DNA를 말한다. 이 용어는 또한 RNA/DNA 하이브리드를 포함한다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 모든 서열의 분리된 DNA, 모든 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체, 우라실, 기타 당 및 플루오로리보스 및 티올레이트와 같은 연결기, 뉴클레오타이드 분지와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 중합 후, 예를 들어 접합을 통해, 표지 성분과 함께 추가로 변형될 수 있다. 이 정의에 포함된 다른 유형의 변형은 캡, 하나 이상의 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드를 유사체로 대체하는 것, 폴리뉴클레오타이드를 단

백질, 금속 이온, 표지 성분, 기타 폴리뉴클레오타이드 또는 고체 지지체에 부착하기 위한 수단의 도입이다. 폴리뉴클레오타이드는 화학적 합성을 통해 얻거나 미생물에서 유래할 수 있다.

[0142] 용어 "오픈 리딩 프레임"(ORF)은 아미노산으로 번역될 수 있는 뉴클레오타이드 시퀀스를 말한다. 일반적으로 이러한 ORF에는 시작 코돈이 포함되고, 후속 영역은 일반적으로 길이가 3개의 뉴클레오타이드의 배수이지만 주어진 리딩 프레임에 종료 코돈(TAG, TAA, TGA, UAG, UAA 또는 UGA)은 포함되지 않는다. 일반적으로 ORF는 자연적으로 발생하거나 인공적으로, 즉 유전자 기술 수단으로 구성된다. ORF는 단백질을 코드화하며 여기서 번역될 수 있는 아미노산은 펩타이드-연결 사슬을 형성한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "필수 ORF"는 예컨대 MVA에서 실험적으로 부분적으로 또는 완전히 삭제될 때, MVA 바이러스 복제, 성장 또는 복제와 성장이 둘 모두가 감소되는(예컨대, 삭제되지 않은 MVA에 비해 돌연변이에서 적어도 15배) ORF를 의미한다. MVA 바이러스 복제 및 바이러스 성장을 결정하는 방법은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 방법들은 Vaccinia Virus and Poxvirology, Methods and Protocols, Volume 269 *Ed.* By Stuart N. Isaacs에 개시되어 있다(Humana Press (2004), 예컨대, Chapter 8, Growing Poxviruses and determining Virus Titer, Kotwal and Abrahams 참조). MVA의 바이러스 성장률은 예를 들어 Orubu et al. (2012) PLOS One 7:e40167에 기술된 바와 같이 GFP 형광을 통해 결정될 수 있으며, 예를 들어 CEF 세포를 사용하거나 Hornemann et al. (2003), Journal of Virology 77:8394-8407에 기술된 바와 같은 방법을 사용할 수 있다.

[0143] 본 명세서에서 사용되는 "작동적으로 연결된"은 설명된 구성 요소들이 서로 관계하여 의도한 방식대로 예컨대 프로모터를 작동시켜 핵산이 발현되도록 전사하는 것을 가능하게 하는 것을 의미한다. 첫 번째 핵산 서열이 두 번째 핵산 서열과 기능적 관계에 배치될 때 첫 번째 핵산 서열은 두 번째 핵산 서열에 작동적으로 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사를 지시할 수 있는 위치에 배치되면 프로모터가 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 작동적으로 연결된 DNA 서열은 인접해 있으며, 두 개의 단백질 코딩 영역을 결합하는 데 필요한 경우 동일한 판독 프레임에 있다.

[0144] 여기에 설명된 핵산 서열과 관련된 "백분율(%) 서열 상동성 또는 동일성"은 후보 서열의 뉴클레오타이드가 참조 서열(즉, 이것이 유래된 핵산 서열)의 뉴클레오타이드와 동일한 백분율로 정의되며, 필요한 경우 서열을 정렬하고 갭을 도입하여 최대 백분율 서열 동일성을 달성하고, 서열 동일성의 일부로 보존적 치환은 고려하지 않는다. 뉴클레오타이드 서열 동일성 또는 상동성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, ALIGN 또는 메갈라인 (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 사용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것과 같이 해당 기술 분야의 기술 범위 내에 있는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 해당 기술 분야의 통상의 기술자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하는 데 적합한 매개변수를 결정할 수 있다.

[0145] 예를 들어, 핵산 서열에 대한 적절한 정렬은 Smith and Waterman, (1981), Advances in Applied Mathematics 2:482- 489의 국지적 동질성 알고리즘에 의해 제공된다. 이 알고리즘은 Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA에 의해 개발되고, Gribskov (1986), Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763에 의해 일반화된 스코어링 매트릭스를 사용하여 아미노산 서열에 적용될 수 있다. 이러한 알고리즘을 사용하여 시퀀스의 동일성 백분율을 결정하는 예시적인 구현예는Genetics Computer Group (Madison, Wis.)에 의해 "BestFit" 유틸리티 애플리케이션에서 제공된다. 이 방법에 대한 기본 매개변수는 Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, Wis.로부터 입수 가능)에 개시된다. 본 발명의 맥락에서 동일성 백분율을 설정하는 바람직한 방법은 John F. Collins와 Shane S. Sturrok이 개발하고 IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, Calif)에서 배포하고 에든버러 대학교(University of Edinburgh)의 저작권이 있는 MPSRCH 프로그램 패키지를 사용하는 것이다. 이 패키지 모음에서 Smith-Waterman 알고리즘을 사용할 수 있으며, 여기서 기본 매개변수가 스코어링 표에 사용된다(예: 갭 오픈 페널티 12, 갭 확장 페널티 1, 갭 6). 생성된 데이터에서 "Match" 값은 "시퀀스 동일성"을 반영한다. 동일한 내용이 "아미노산 동일성 백분율(%)"에도 준용된다. 서열 간의 동일성 백분율 또는 유사성을 계산하는 데 적합한 다른 프로그램은 일반적으로 해당 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 또 다른 정렬 프로그램은 기본 매개변수와 함께 사용되는 BLAST이다. 예를 들어, BLASTN 및 BLASTP는 다음 기본 매개변수를 사용하여 사용될 수 있: 유전 코드=표준; 필터=없음; 가닥=둘 다; 컷오프=60; 기대=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50개 서열; 정렬 기준=높은 점수; 데이터베이스=중복되지 않음, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+ GenBank CDS 번역+스위스 단백질+Spupdate+PIR. 이러한 프로그램의 세부 정보는 다음 인터넷 주소에서 확인할 수 있다: http:// http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/.

[0146] 용어 "약제학적", "약제학적 조성물" 및 "의약품"은 질병의 예방 또는 치료에 사용되는 물질 및/또는 물질의 조

합을 지칭하며 여기에서 교환적으로 사용된다.

[0147] "약제학적으로 허용되는"은 사용된 용량 및 농도에서 담체 또는 부형제가 투여되는 대상자에게 원치 않는 또는 해로운 효과를 일으키지 않는다는 것을 의미한다.

[0148] "약제학적으로 허용되는 담체"는 예컨대 다음문헌에 개시되어 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; and Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000). 이들은 본 명세서에 공개된 벡터 및 조성물의 투여에 적합한 기존의 약제학적으로 허용되는 담체를 사용하여 조성물 및 제형을 설명한다. 일반적으로, 사용되는 담체의 특성은 사용되는 특정 투여 방식에 따라 달라진다. 예를 들어, 비경구 제형은 일반적으로 물, 생리식염수, 균형 염 용액, 수성 덱스트로스, 글리세롤 또는 이와 유사한 약제학적 및 생리학적으로 허용되는 유체를 운반체로 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물(예: 분말, 알약, 정제 또는 캡슐)의 경우, 기존의 무독성 고체 담체에는 예를 들어, 약제학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분 또는 스테아르산 마그네슘이 포함된다. 약제학적 조성물에는 또한 습윤제 또는 유화제, 방부제, 그리고 예를 들어, 아세트산 나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트와 같은 pH 완충제 등과 같은 소량의 무독성 보조 물질이 포함될 수 있다.

[0149] 본원에서 사용되는 "예방", "예방하는", "예방" 또는 "예방"은 대상자(예: 인간 또는 동물)에서 그러한 질병이 발생하는 것을 예방하는 것을 의미한다.

[0150] "프라임-부스트 백신접종"이라는 용어는 특정 항원을 표적으로 하는 백신의 첫 번째 프라이밍 주사를 사용한 후 간격을 두고 동일한 백신의 하나 이상의 부스팅 주사를 사용하는 백신접종 전략을 말한다. 프라임-부스트 백신접종은 동종 또는 이종일 수 있다. 동종 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 모두에 동일한 면역원과 벡터를 포함하는 백신을 사용한다. 이종 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 모두에 동일한 면역원을 포함하지만 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사에는 다른 벡터를 사용하는 백신을 사용한다. 예를 들어, 동종 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 모두에 알파바이러스 항원을 발현하는 동일한 핵산을 포함하는 재조합 MVA 벡터를 사용할 수 있다. 이와 대조적으로, 이종 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사에 하나의 알파바이러스 단백질을 발현하는 핵산을 포함하는 재조합 MVA 벡터와 프라이밍 주사에 포함되지 않은 두 번째 알파바이러스 단백질을 발현하는 또 다른 재조합 MVA 벡터를 사용할 수 있거나, 또는 그 반대의 경우이다. 이종 프라임-부스트 백신접종은 또한 예를 들어, 프라이밍 주사에서 면역원을 인코딩하는 플라스미드를 사용하고 하나 이상의 부스팅 주사에서 동일한 면역원을 인코딩하는 재조합 MVA를 사용하거나, 프라이밍 주사에서 재조합 단백질 면역원을 사용하고 하나 이상의 부스팅 주사에서 동일한 단백질 면역원을 인코딩하는 재조합 MVA 벡터를 사용하는 것과 같은 다양한 조합을 포함한다.

[0151] 여기서 사용되는 용어 "프로모터"는 발현될 핵산의 서열 상류에 위치한 핵산, 일반적으로 DNA의 조절 영역을 의미하며, 여기에는 특정 DNA 서열 요소가 포함되어 있으며, 예를 들어, 프로모터되는 유전자의 코딩 영역에서 RNA를 합성하는 단백질 전사 인자 및 중합효소에 의해 인식되고 결합된다. 프로모터는 일반적으로 문제의 유전자에 바로 인접해 있으므로, 프로모터의 위치는 전사 시작 부위를 기준으로 지정되며, 여기서 DNA 전사는 특정 유전자에 대해 시작된다(즉, 상류 위치는 -1에서 거꾸로 세는 음수이며, 예를 들어 -100은 상류 100개 염기쌍 위치이다). 따라서 프로모터 서열은 위치 -1까지 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 그러나, 위치 +1부터 뉴클레오타이드는 프로모터의 일부가 아니며, 즉 이와 관련하여 번역 개시 코돈(ATG 또는 AUG)이 프로모터의 일부가 아니라는 점에 유의해야 한다. 따라서 SEQ ID NO: 7 또는 8은 본 발명의 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오타이드이다. 본원에서 사용되는 "천연 폭스바이러스 프로모터"는 폭스바이러스 게놈의 내인성 프로모터를 의미한다. "합성 폭스바이러스 프로모터"는 폭스바이러스(예: CEF 세포의 MVA)가 발현할 핵산의 직접 전사를 활성화하는 재조합 엔지니어링 프로모터를 의미한다. "26S 프로모터"라는 용어는 통상의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 일반적으로 단일 오픈 리딩 프레임(예: VEEV의 캡시드-E3-E2-6K-E1)에 포함된 알파바이러스의 26S RNA의 서브게놈 프로모터를 말한다. EEV(예: VEEV)의 구조 단백질을 인코딩하는 mRNA는 일반적으로 복제 중간체와 26S 서브게놈 RNA 프로모터에서 전사된다.

[0152] "단백질", "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "폴리펩타이드 단편"이라는 용어는 여기에서 모든 길이의 아미노산 잔기의 폴리머를 나타내는 데 교환적으로 사용된다. 폴리머는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 변형된 아미노산

또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있으며, 아미노산 이외의 화학적 모이어티에 의해 중단될 수 있다. 이 용어는 또한 자연적으로 또는 개입에 의해 변형된 아미노산 폴리머를 포함하며; 예를 들어, 이황화물 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 표지 또는 생물학적 활성 성분과의 접합과 같은 기타 조작 또는 변형이다.

[0153] 핵산, 벡터, 예를 들어, MVA 등에 적용될 때 "재조합"이라는 용어는 핵산, 벡터 또는 핵산 서열의 두 개 이상의 이종 세그먼트의 인공적 조합에 의해 만들어진 핵산, 벡터 또는 핵산 서열의 두 개 이상의 이종 세그먼트의 그러한 인공적 조합을 포함하는 핵산, 벡터를 말한다. 인공적 조합은 잘 확립된 유전 공학 기술을 사용하여 분리된 핵산 단편의 인공적 조작을 통해 가장 일반적으로 달성된다. 일반적으로, 본 명세서에서 설명하는 "재조합" MVA는 표준 유전자 조작 방법을 통해 생산된 MVA를 말하며, 즉, 본 발명의 MVA는 유전자 조작되거나 유전자 변형된 MVA이다. 따라서 용어 "재조합 MVA"에는 게놈에 안정적으로 통합된 재조합 핵산, 바람직하게는 전사 단위의 형태가 있는 MVA(예: MVA-BN)가 포함된다. 전사 단위에는 프로모터, 인핸서, 터미네이터 및/또는 사일런서가 포함될 수 있다. 본 발명의 재조합 MVA는 조절 요소의 유도 시 이종 항원 결정인자, 폴리펩타이드 또는 단백질(항원)을 발현할 수 있다.

[0154] 여기서 사용되는 용어 "보호 면역" 또는 "보호 면역 반응"은 백신접종을 받은 대상자가 백신접종이 이루어진 병원체로 인한 감염을 제어할 수 있다는 것을 의미한다. 일반적으로 "보호 면역 반응"이 나타난 대상자는 경미하거나 중간 정도의 임상 증상만 나타나거나 전혀 증상이 나타나지 않는다. 감염이 대책 없이 치명적일 것으로 예상되는 경우, 특정 물질에 대한 "보호 면역 반응" 또는 "보호 면역"을 가진 대상자는 해당 물질에 의한 감염으로 사망하지 않는다.

[0155] 본 명세서에서 사용되는 용어 "참조 샘플"은 관심 샘플과 실질적으로 동일한 방식으로 분석되고, 관심 샘플의 정보와 비교되는 샘플을 말한다. 따라서 참조 샘플은 관심 샘플에서 얻은 정보를 평가할 수 있는 표준을 제공한다. 참조 샘플은 교환, 누락 또는 추가될 수 있는 한 가지 구성 요소를 제외하고는 관심 샘플과 동일할 수 있다.

[0156] EEV의 용어 "구조 단백질"은 EEV의 RNA에 의해 인코딩된 구조 단백질/폴리프로테인을 말한다(예: 본 명세서에 설명된 WEEV, VEEV 또는 EEEV 중 하나). 구조 단백질은 일반적으로 바이러스에 의해 5가지 단백질, 즉 C, E3, E2, 6k 및 E1의 구조적 폴리프로테인으로 생성되며 문헌에서는 일반적으로 C-E3-E2-6k-E1로 표현된다. E3 및 6k는 또한 두 당단백질인 E2 및 E1에 대한 막 전위/수송 신호로 설명된다. 본 명세서에서 사용되는 "구조 단백질"을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바이러스 게놈의 캡슐화(예: 패키징)에 필요한 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 의미하며, 캡시드 단백질, E1 당단백질 및 E2 당단백질을 포함한다. EEV의 "구조 다단백질"은 EEV의 다단백질인 C-E3-E2-6k-E1을 말한다.

[0157] 본 명세서에서 사용되는 특정 프로모터와 관련된 "전사 수준" 또는 "단백질 수준"이라는 용어는 특정 시점에서 신체 또는 샘플에 존재하는 유전자/핵산 생성물의 양을 말한다. 전사 또는 단백질 수준(예: mRNA로서의 핵산 전사 또는 mRNA로부터 번역된 단백질 양)은 예를 들어 본 발명의 재조합 MVA에 의해 인코딩된 것과 같이 유전자/폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 mRNA 또는 단백질을 통해 결정, 측정 또는 정량화될 수 있다. 유전자 발현은 단백질 생성으로 이어질 수 있는데, RNA 중합효소가 유전자를 전사하여 동일한 단백질 인코딩 정보를 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 생성하고, 리보솜이 mRNA를 번역하여 단백질을 생성한다. "전사된" 또는 "전사"라는 용어는 DNA를 템플릿으로 사용하여 RNA 중합효소가 유전자의 DNA 서열을 mRNA로 복사하는 과정을 말한다. "번역" 또는 "번역"이라는 용어는 mRNA에 포함된 정보를 청사진으로 사용하여 단백질을 합성하는 과정을 말한다. 예를 들어 전사 또는 단백질 수준은 샘플에 존재하는 mRNA 또는 관심 단백질의 양을 동일한 샘플 또는 참조 샘플(예: 동일한 샘플에서 동시에 채취)에 있는 동일한 범주의 유전자 생성물(mRNA 또는 총 단백질)의 총량으로 정규화하여 정량화할 수 있다. 전사는 해당 분야에 알려진 모든 방법, 예를 들어 관심 유전자 생성물을 간접적으로 검출하고 측정하는 방법을 통해 측정 또는 검출할 수 있으며, 이는 일반적으로 관심 유전자 생성물을 관심 유전자 생성물에 특정한 하나 이상의 다른 분자 또는 검출 수단(예: 프라이머, 프로브, 항체, 단백질 스캐폴드)과 결합시켜 작동한다. 이러한 방법에는 예를 들어 RT-PCR 및/또는 정량적 PCR이 포함된다. 단백질 수준의 결정은 통상의 기술자에게 알려진 모든 알려진 방법, 예를 들어 웨스턴 블롯, ELISA 또는 질량 분석법을 통해 측정 또는 검출할 수 있다.

[0158] 본원에서 사용되는 "전사 종결자"는 RNA 중합효소에 의한 RNA 전사체의 특정 종결에 관여하는 DNA 서열로 구성된다. MVA RNA 중합효소를 포함하는 백시니아 바이러스는 신생 RNA에서 RNA 신호(DNA 수준에서 UUUUUNU, TTTTTNT 또는 T5NT)의 하류에서 전사를 종결한다(Earl et al. (1990), J. Virol. 64:2448-2451). "전사

종결자"는 문헌에서 때때로 "종결 신호"로 지칭되므로 상호 교환하여 사용할 수 있다.

[0159] 본 명세서에서 사용된 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질병, 예컨대 EEV로 인한 질병의 예방, 감소, 개선, 부분적 또는 완전한 완화 또는 치유를 의미한다. 이는 질병의 심각성을 감소시키거나, 치료되는 질병의 특징적인 증상의 발달을 제한하거나 예방하거나, 치료되는 질병의 특징적인 증상의 악화를 억제하거나, 이전에 질병을 앓았던 대상자의 질병 재발을 제한하거나 예방하거나, 대상자의 증상 재발을 제한하거나 예방하는 것 중 하나 이상이 될 수 있다.

[0160] 본 명세서에서 사용된 "3가"는 백신 또는 재조합 MVA와 함께 사용되며, 백신 또는 재조합 MVA가 세 가지 다른 바이러스에 대해 결합가를 갖고 해당 다른 바이러스의 항원(예: 구조 단백질 또는 구조 다단백질)에 대한 보호 면역 반응을 생성한다는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명의 3가 MVA 백신의 맥락에서 3가는 항원이 MVA 백신, 또는 항원을 인코딩하는 핵산을 발현하는 재조합 MVA를 포함하는 백신에 의해 인코딩되는 3개의 서로 다른 바이러스에 대한 가치(valence)를 의미하며, 여기서 항원은 예를 들어, VEEV, WEEV 및 EEEV의 구조 단백질 또는 구조 다단백질이다. 3가의 의미에 포함되는 3가의 또 다른 예는 3개의 서로 다른 바이러스가 서로 다른 바이러스 균주, 예를 들어, VEEV 또는 EEEV 균주에 더하여 예를 들어 71V-1658 및 플레밍과 같은 두 개의 WEEV 균주라는 것이다. 후자의 경우, 본 발명의 재조합 MVA는 예를 들어 WEEV 71V-1658, WEEV 플레밍 및 EEEV 균주, 예를 들어 EEEV V105-00210의 단백질(예: 구조 단백질, 구조 다단백질, 외피 단백질)을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 비교에서 "단가"는 백신 또는 재조합 MVA가 특정 종의 바이러스 하나에 대해서만 가치를 가지고, 예를 들어 VEEV만, WEEV만 또는 EEEV만 가지고, 한 바이러스의 구조 단백질 또는 구조 다단백질 하나에 대해서만 보호 면역 반응을 생성한다는 것을 의미한다. 그러나 여러 밀접하게 관련된 바이러스 하위 유형에 대한 보호 면역 반응의 생성을 배제하지는 않는다. 따라서 "2가"는 백신 또는 재조합 MVA가 두 바이러스에 대해 가치를 가지고 있다는 것을 의미한다.

[0161] "벡터"는 시험관 내 또는 생체 내에서 표적 세포에 전달되는 이종 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 DNA 또는 RNA 플라스미드 또는 바이러스를 말한다. 이종 폴리뉴클레오타이드는 예방 또는 치료 목적으로 관심 있는 서열을 포함할 수 있으며, 선택적으로 발현 카세트 형태일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 벡터는 최종 표적 세포 또는 대상자에서 복제할 수 있어야 할 필요는 없다. 이 용어에는 클로닝 벡터와 바이러스 벡터가 포함된다.

[0162] 본 발명의 맥락에서 사용되는 용어 "바이러스 레플리콘"은 전사 및 운반된 RNA의 세포질 증폭 및 이종 핵산 서열의 하위 게놈 RNA 발현을 위하여 필수적인 49S 바이러스 게놈 RNA의 일부를 포함하는 RNA 또는 DNA를 지칭하는 데 사용된다. 따라서 레플리콘은 바이러스 RNA의 세포질 증폭에 필요한 바이러스 비구조적 단백질을 인코딩하고 발현한다.

[0163] 본 발명의 맥락에서 용어 "바이러스" 또는 "재조합 바이러스"는 바이러스 게놈을 포함하는 감염성 또는 비감염성 바이러스를 지칭한다. 이 경우 본 명세서에 언급된 핵산, 프로모터, 재조합 단백질 및/또는 발현 카세트는 해당 재조합 바이러스의 바이러스 게놈의 일부이다. 재조합 바이러스 게놈은 패키징되고, 획득된 재조합 바이러스는 세포 및 세포주 감염, 특히 인간을 포함한 살아있는 동물 감염에 사용될 수 있다.

[0164] 용어 "$TCID_{50}$"는 "조직 배양 감염량"의 약어로, 접종된 세포 배양의 50%에서 병리학적 변화를 일으키는 병원체의 양을 $TCID_{50}$/ml로 표현한 것이다. $TCID_{50}$을 결정하는 방법은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, WO 03/053463의 실시예 2에 설명되어 있다.

[0165] 여기서 사용되는 용어 "대상자"는 예를 들어 인간, 비인간 포유류 및 (비인간) 영장류를 포함한 살아있는 다세포 척추동물이다. 용어 "대상자"는 여기서 용어 "동물"과 상호 교환하여 사용될 수 있다.

[0166] **자가-증폭 RNA**

[0167] 현재 두 가지 유형의 합성 RNA 백신이 있다: 기존 mRNA와 자가 증폭 RNA(saRNA). 감염성 질환과 암에 대한 기존 mRNA 전략(비복제 또는 비증폭 mRNA라고도 함)의 사용은 여러 전임상 및 임상 시험에서 조사되었다. 바이러스 항원을 인코딩하는 시험관 내 전사 mRNA는 백신으로 탐색되었고, 항체나 면역 조절제와 같은 치료용 단백질을 인코딩하는 mRNA는 면역 요법으로 고려되었다. 화학적 변형 뉴클레오타이드, 서열 최적화 및 다양한 정제 전략을 통합하면 mRNA 번역 효율이 향상되고 내재적 면역원성이 감소한다. 그러나 항원 발현은 백신접종 중에 성공적으로 전달된 기존 mRNA 전사본의 수에 비례한다. 따라서 보호 또는 면역 조절을 위한 적절한 발현을 달성하려면 대량 또는 반복 투여가 필요할 수 있다. 자가-복제 단일 가닥 RNA 바이러스에서 파생된 유전자 조작된 레플

리콘인 saRNA 백신은 이러한 한계를 해결한다. 이들은 바이러스 입자에 패키징된 saRNA를 갖는 바이러스 레플리콘 입자(VRP)로 전달되거나, 또는 시험관 내 전사 후 생성된 완전히 합성된 saRNA로 전달될 수 있다. 복제 결함 VRP를 생성하기 위해, 외피 단백질은 생산 중에 결함이 있는 헬퍼 구조체로서 트랜스(trans)로 제공된다. 따라서 생성된 VRP는 첫 번째 감염 후 감염성 바이러스 입자를 형성하는 능력이 없으며, RNA만이 추가 증폭이 가능하다. VRP는 양성 및 음성 RNA 바이러스에서 모두 유래될 수 있지만, 후자는 더 복잡하고 VRP를 구출하기 위해 역유전학이 필요하다. 유전자 치료와 마찬가지로 백신 개발을 위한 바이러스 벡터 사용에는 몇 가지 문제가 있다. 여기에는 벡터 자체의 면역원성이 포함되며, 이는 바람직하지 않은 면역 반응을 유발하고 동일한 벡터를 사용하여 후속 부스터 투여를 방지할 수 있다. 바이러스 벡터에 대한 기존 면역도 백신을 무효화할 수 있다. 약독화 생백신(live-attenuated vaccine)과 마찬가지로 복제가 가능한 알파바이러스 벡터도 바이러스 재활성화의 위협을 가한다. 이를 피하기 위해 saRNA 백신은 기존 mRNA 백신과 유사한 방식으로 생산 및 전달될 수 있다. saRNA 백신 설계에 일반적으로 사용된 양성-센스 알파바이러스 게놈에는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEE), 신드비스 바이러스(SINV), 셈리키 숲 바이러스(SFV)가 포함된다. 알파바이러스 복제효소 유전자는 합성 전사본을 현장에서 증폭하는 RNA-의존성 RNA 중합효소(RdRP) 복합체를 인코딩한다. 항원성 또는 치료적 서열은 별도의 개체로 높은 수준으로 발현되며 면역원의 추가 단백질 분해 처리가 필요하지 않다. 자가-복제 활동의 결과로, saRNA는 기존 mRNA 백신보다 낮은 농도로 전달되어 비슷한 항원 발현을 달성할 수 있다.

[0168] 위에서 언급했듯이, saRNA 구조체는 역사적으로 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 셈리키 숲 바이러스(SFV) 또는 신드비스 바이러스와 같은 알파바이러스에서 전달되었다. 이러한 saRNA 구조체에는 4가지 비구조 단백질, 하위 게놈 프로모터 및 관심 유전자(바이러스 구조 단백질 대체)가 포함된다. 바이러스 구조 단백질을 삭제하면, RNA가 감염성 바이러스를 생성할 수 없다. 비구조 단백질은 세포질에 전달된 후 게놈 RNA(전체 RNA 가닥)와 하위 게놈 RNA(관심 유전자)를 모두 복제하는 RNA-의존성 RNA 중합효소(RDRP)를 형성한다. 4가지 비구조 단백질은 각각 복잡하고 다단계 과정인 RDRP 형성에 역할을 한다. 이러한 RNA 복제는 복제되지 않는 mRNA보다 항원 발현이 더 높아지는 결과를 낳는다.

[0169] **EEV 바이러스, 단백질 및 뉴클레오타이드 서열**

[0170] EEV는 토가바이러스과에 속하는 알파바이러스이다. EEV는 해당 분야에서 잘 알려진 작은 포괄 양성-가닥 RNA 바이러스이다. 바이러스 뉴클레오캡시드는 숙주 유래 지질 막으로 둘러싸여 있으며, 여기에는 E1 및 E2 헤테로다이머의 외피 단백질 트라이머가 포함되어 있다. 뉴클레오캡시드는 단일-가닥 RNA 게놈을 둘러싼 캡시드 단백질(C)로 구성된다. EEV 바이러스의 RNA 게놈(49S RNA)은 길이가 약 11-12kb이고 5' 캡과 3' 폴리아데닐화 꼬리를 포함하며 세포에 유입되는 즉시 번역된다. 게놈의 5' 영역은 4개의 비구조 단백질(NSP1, NSP2, NSP3 및 NSP4)을 인코딩한다. 게놈의 3´영역은 26S 서브게놈 RNA에서 구조 다단백질로 발현되는 5가지 구조 단백질(C, E3, E2, 6k, E1)을 인코딩한다. 구조 단백질을 인코딩하는 mRNA는 복제 중간체와 26S 서브게놈 프로모터로부터 전사된다. 다단백질의 프로테아제 절단은 성숙한 구조 단백질 C, E3, E2, 6k, E1을 생성한다. 뉴클레오캡시드(C) 단백질은 리보솜이 C와 E3 단백질 코딩 서열스 사이의 접합부를 통과한 직후 전구체 단백질로부터 C 단백질을 절단하는 자가-단백질분해 활성을 가지고 있다. 그 후, 외피 당단백질 E2와 E1은 단백질 분해 절단에 의해 유도되고 헤테로다이머를 형성한다. E2는 처음에 감염된 세포에 전구체인 pE2로서 나타나며, 이는 E3와 E2로 구성된다. 당화되고 소포체와 골지체를 통과한 후, E3는 절단 부위에서 푸린 유사 프로테아제 활동에 의해 E2로부터 절단된다.

[0171] 약독화 생백신은 미국 군대와 실험실 근로자에게 사용되었으며, 포르말린 불활성화 백신은 말에서 사용할 수 있다.

[0172] 이러한 약독화 생백신 중 하나는 원래 미국 육군에서 백신용으로 개발한 TC-83이다(Pittman et al., 1996). TC-83은 기니피그 심장 세포에서 트리니다드 당나귀 VEEV 균주를 연속적으로 계대하여 만들어졌다(Alevizatos et al., 1967). E2와 5' 비번역 영역의 점 돌연변이는 TC-83의 약화된 표현형에 대한 책임이 있다(Kinney et al., 1993). TC-83은 인간의 질병을 예방하는 데 효과적인 것으로 알려져 있지만 백신 접종자의 15-37.5%가 발열 증상을 보이고(Berge et al., 1961; McKinney et al., 1963; Alevizatos et al., 1967; Pittman et al., 1996) 백신 접종자의 82%만이 백신접종 후 혈청 전환을 한다. 5-8년 동안 플라크 감소 중화 역가가 ≥1:20으로 유지될 확률은 60%였다. TC-83은 조사용 백신으로만 사용할 수 있고 사용 가능한 인구가 제한되어 있기 때문에 시간 경과에 따른 인간에서의 백신의 면역원성을 평가하기 위한 추가 연구는 없다. 이 연구에서 흥미로운 점은 VEEV-TC-83 백신 균주로 비강 감염시킨 후 C57BL/6(WT) 마우스가 사망률 없이 높은 감염 역가를 가진 뇌의 전파성 감염을 일으킨다는 것이다(Hart et al., 1997; Steele et al., 1998; Julander et al., 2008; Taylor et al.,

2012).

[0173] 위에서 언급한 WEEV, EEEV 및/또는 VEEV의 모든 조합도 여기에 설명된 모든 실시예에 포함된다는 것을 이해해야 한다.

[0174] **변형 백시니아 바이러스 안카라 (MVA)**

[0175] 인공 약독화 변형 백시니아 바이러스 안카라("MVA")는 융모막백혈병 백시니아 바이러스 안카라 (CVA) 균주의 닭 배아 섬유아세포에서 570회 이상의 연속 계대를 통해 생성되었다(검토를 위해 Mayr, A., et al. Infection 3, 6-14(1975) 참조). 이러한 장기 계대의 결과로 생성된 MVA 바이러스의 게놈은 이전 CVA와 비교하여 약 27킬로베이스의 게놈 서열이 삭제되었고, 따라서 조류 세포로의 복제에 대해 숙주 세포가 매우 제한적이라고 설명되었다(Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 (1991), Meisinger et al. J. Gen. Virol 88, 3249-3259 (2007)). 다양한 동물 모델에서 생성된 MVA가 완전히 복제 가능한 시작 물질과 비교했을 때 무독성이라는 것이 밝혀졌다(Mayr, A. & Danner, K., Dev. Biol. Stand. 41: 225-34 (1978)).

[0176] 본 발명의 실시에 유용한 MVA 바이러스는 비제한적으로 다음을 포함한다: MVA-572(1994년 1월 27일 ECACC V94012707로 기탁됨); MVA-575(2000년 12월 7일에 ECACC V00120707로 기탁됨), MVA-I721(Suter et al., Vaccine 2009에서 참조됨), NIH 클론 1(2003년 3월 27일에 ATCC®PTA-5095로 기탁됨) 및 MVA-BN(2000년 8월 30일에 유럽 세포 배양 컬렉션(ECACC)에 V00083008 번호로 기탁됨).

[0177] 더욱 바람직하게는 본 발명에 따라 사용되는 MVA는 MVA-BN 및 MVA-BN 유도체를 포함한다. MVA-BN은 국제 PCT 공개 WO 02/042480에 기술되어 있다. "MVA-BN 유도체"는 본 명세서에 기술된 바와 같이 MVA-BN과 본질적으로 동일한 복제 특성을 나타내지만 게놈의 하나 이상의 부분에서 차이를 나타내는 모든 바이러스를 말한다.

[0178] MVA-BN 및 MVA-BN 유도체는 복제 불능이며, 즉 생체 내 및 시험관 내에서 생식적으로 복제하지 못하는 것을 의미한다. 보다 구체적으로 시험관 내에서 MVA-BN 또는 MVA-BN 유도체는 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 생식적 복제가 가능하지만 인간 각질세포 세포주 HaCat(Boukamp et al (1988), J. Cell Biol. 106:761-771), 인간 골육종 세포주 143B(ECACC 기탁 번호 91112502), 인간 배아 신장 세포주 293(ECACC 기탁 번호 85120602), 및 인간 자궁경부 선암 세포주 HeLa(ATCC 기탁 번호 CCL-2)에서는 생식적 복제가 가능하지 않은 것으로 설명되었다. 또한, MVA-BN 또는 MVA-BN 유도체는 Hela 세포 및 HaCaT 세포주에서 MVA-575보다 바이러스 증폭 비율이 최소 2배, 더 바람직하게는 3배 적다. MVA-BN 및 MVA-BN 유도체의 이러한 특성에 대한 시험 및 검정은 WO 02/42480(미국 특허 출원 번호 2003/0206926) 및 WO 03/048184(미국 특허 출원 번호 2006/0159699)에 설명되어 있다.

[0179] 이전 단락에서 설명한 바와 같이 시험관 내 인간 세포주에서 "생식 복제가 불가능하다" 또는 "생식 복제가 불가능하다"는 용어는 예를 들어 WO 02/42480에 설명되어 있으며, 이는 또한 위에서 언급한 바와 같이 원하는 특성을 갖는 MVA를 얻는 방법을 교시한다. 이 용어는 감염 후 4일째에 시험관 내 바이러스 증폭 비율이 WO 02/42480 또는 미국 특허 제6,761,893호에 기술된 검정법을 사용하여 1 미만인 바이러스에 적용된다.

[0180] 이전 단락에서 설명한 대로 시험관 내 인간 세포주에서 바이러스의 증폭 또는 복제는 일반적으로 감염된 세포에서 생성된 바이러스(출력)와 처음에 세포를 감염시키는 데 사용된 양(입력)의 비율로 표현되며, 이를 "증폭 비율"이라고 한다. "1"의 증폭 비율은 감염된 세포에서 생성된 바이러스의 양이 처음에 세포를 감염시키는 데 사용된 양과 동일한 증폭 상태를 정의하며, 이는 감염된 세포가 바이러스 감염 및 번식에 허용된다는 것을 의미한다. 반면, 1 미만의 증폭 비율, 즉 입력 수준에 비해 출력이 감소한 것은 생식 복제가 부족하고 따라서 바이러스가 약화되었음을 나타낸다.

[0181] **MVA로의 통합 부위**

[0182] 하나 이상의 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바이러스 또는 바이러스 벡터의 모든 적합한 부분, 특히 재조합 MVA의 바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 재조합 MVA의 적합한 부분은 MVA 게놈의 비필수 부분이다. MVA 게놈의 비필수 부분은 유전자 간 영역 또는 MVA 게놈의 알려진 삭제 부위 1-6일 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 재조합 MVA의 비필수 부분은 바이러스 성장에 필수적이지 않은 MVA 게놈의 코딩 영역일 수 있다. 그러나, 삽입 부위는 MVA 게놈의 이러한 바람직한 삽입 부위에 제한되지 않는데, 왜냐하면 본 발명의 범위 내에서, 본 명세서에 설명된 바와 같이 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 단백질을 인코딩하는 프로모터, 발현 카세트 및/또는 뉴클레오타이드는 닭 배아 섬유아세포(CEF 세포)와 같이 적어도 하나의 세포 배양 시스템에서 증폭되고 증식될 수 있는 재조합체를 얻을 수 있는 한 바이러스 게놈의 어디에나 삽입될 수 있기 때문이다. 바람직하게는, 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 MVA의 하나 이상의 유전자간 영역(IGR)에 삽입될 수 있다. 용어 "유전자간 영역"은 바람직하게는 MVA 바이러스 게놈의 두 개의 인접

한 오픈 리딩 프레임(ORF) 사이, 바람직하게는 MVA 바이러스 게놈의 두 개의 필수 ORF 사이에 위치한 바이러스 게놈의 부분을 말한다. 특정 구체예에서, IGR은 IGR 07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 및 IGR 148/149 중에서 선택된다. 특정 구체예에서, 재조합 MVA의 5 미만, 4 미만, 3 미만 또는 2개 미만의 IGR은 하나 이상의 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나 이상의 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 MVA의 삽입 부위의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 그 이상일 수 있다. 특정 구체예에서, 뉴클레오타이드 서열은 4, 3, 2개 또는 그 이하의 삽입 부위에 삽입된다. 바람직하게는, 2개의 삽입 부위, 바람직하게는 IGR 44/45 및 IGR 88/89가 사용된다. 특정 구체예에서, 3개의 삽입 부위가 사용된다. 바람직하게는, 재조합 MVA는 2개 또는 3개의 삽입 부위에 삽입된 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 유전자를 포함한다.

[0183] 뉴클레오타이드 서열은 추가적으로 또는 대안적으로 하나 이상의 알려진 삭제 부위, 즉 MVA 게놈의 삭제 부위 I, II, III, IV, V 또는 VI에 삽입될 수 있다. 용어 "알려진 삭제 부위"는 MVA가 유래된 부모 바이러스, 특히 부모 융모막요막염 백시니아 바이러스 안카라(CVA)의 게놈과 관련하여 516번째 통로에서 특성화된 CEF 세포에서 지속적인 통과를 통해 삭제된 MVA 게놈의 부분을 말하며, 예를 들어, eisinger-Henschel et al. (2007), Journal of General Virology 88:3249-3259에 개시되어 있다. 특정 구체예에서, 재조합 MVA의 알려진 삭제 부위 중 5 미만, 4 미만, 3 미만 또는 2개 미만은 본 명세서에 설명된 바와 같이 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0184] 본 명세서에 제공된 재조합 MVA 바이러스는 해당 기술 분야에 알려진 일상적인 방법으로 생성할 수 있다. 재조합 MVA를 얻거나 MVA 게놈에 외인성 코딩 서열을 삽입하는 방법은 해당 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, DNA 클로닝, DNA 및 RNA 분리, Western blot 분석, RT-PCR 및 PCR 증폭 기술과 같은 표준 분자 생물학 기술에 대한 방법은 Molecular Cloning, A laboratory Manual 2nd Ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))에 설명되어 있으며, 바이러스 취급 및 조작 기술은 Virology Methods Manual (B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996))에 설명되어 있다. 마찬가지로, MVA의 취급, 조작 및 유전자 조작을 위한 기술과 노하우는 Molecular Virology: A Practical Approach (A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993), 예컨대, Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors 참조) 및 Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Son, Inc. (1998), 예컨대, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector 참조)에 설명되어 있다.

[0185] 여기에 공개된 다양한 재조합 MVA를 생성하기 위해, 해당 분야의 통상의 기술자에게 알려진 다양한 방법을 적용할 수 있다. 바이러스에 삽입할 DNA 서열은 MVA의 DNA 섹션과 상동하는 DNA가 삽입된 *E. coli* 플라스미드 구조에 배치할 수 있다. 별도로, 삽입할 DNA 서열을 프로모터에 연결할 수 있다. 프로모터-유전자 연결은 플라스미드 구조에 위치하며 이에 따라 프로모터-유전자 연결이 비필수적 위치를 포함하는 MVA DNA 영역을 둘러싼 DNA 서열과 상동성인 DNA에 의해 양쪽 끝에 인접하게 된다. 생성된 플라스미드 구조는 *E. coli* 내에서 증식하여 증폭되고 분리될 수 있다. 삽입될 DNA 유전자 서열을 포함하는 분리된 플라스미드는 세포 배양물, 예컨대 닭 배아 섬유아세포(CEF)에 형질감염될 수 있으며, 동시에 배양물이 MVA로 감염된다. 플라스미드와 바이러스 게놈에서 각각 상동 MVA DNA 간의 재조합은 이종 DNA 서열의 존재에 의해 변형된 MVA를 생성할 수 있다.

[0186] 바람직한 구체예에 따르면, 예를 들어 CEF 세포와 같은 적합한 세포 배양의 세포는 MVA로 감염될 수 있다. 감염된 세포는, 이어서, 바람직하게는 발현 제어 요소의 전사 제어 하에 있는 외래종 또는 이종 유전자 또는 유전자들을 포함하는 첫 번째 플라스미드 벡터로 형질감염될 수 있다. 위에서 설명한 바와 같이, 플라스미드 벡터는 또한 외인성 서열을 MVA 게놈의 선택된 부분으로 삽입하도록 지시할 수 있는 서열을 포함한다. 선택적으로, 플라스미드 벡터는 또한 포크스바이러스 프로모터에 작동 가능하게 연결된 마커 및/또는 선택 유전자를 포함하는 카세트를 포함한다. 적합한 마커 또는 선택 유전자는 예를 들어 녹색 형광 단백질, β-갈락토시다제, 네오마이신-포스포리보실트랜스퍼라제 또는 다른 마커를 인코딩하는 유전자이다. 선택 또는 마커 카세트를 사용하면 생성된 재조합 MVA의 식별 및 분리가 간소화된다.

[0187] 그러나 재조합 MVA는 PCR 기술로도 식별할 수 있다. 그 후, 상기 설명한 대로 얻은 재조합 MVA로 추가 세포를 감염시키고, 두 번째 외래종 또는 이종 유전자 또는 유전자들을 포함하는 두 번째 벡터로 형질감염시킬 수 있다. 이 유전자가 MVA 게놈의 다른 삽입 부위에 도입되는 경우, 두 번째 벡터는 두 번째 외래종 유전자 또는 유전자들을 MVA 게놈으로 통합하도록 지시하는 MVA-상동 서열에서도 다르다. 상동 재조합이 발생한 후, 두 개 이상의 외래종 또는 이종 유전자를 포함하는 재조합 바이러스를 분리할 수 있다. 재조합 바이러스에 추가 외래종 유전자를 도입하기 위해, 감염 및 형질감염 단계를 이전 단계에서 분리한 재조합 바이러스를 감염에 사용하

고, 형질감염을 위해 추가 외래종 유전자 또는 유전자들을 포함하는 추가 벡터를 사용하여 반복할 수 있다.

[0188] 대신에, 상기 설명한 감염 및 형질감염 단계는 상호 교환이 가능하며, 즉, 적합한 세포는 먼저 외래종 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터에 의해 형질감염된 다음 MVA로 감염될 수 있다. 또 다른 대안으로, 각 외래종 유전자를 다른 바이러스에 도입하고, 획득한 모든 재조합 바이러스로 세포를 공동 감염시키고, 모든 외래종 유전자를 포함하는 재조합을 스크리닝하는 것도 가능하다. 세 번째 대안은 시험관 내에서 DNA 게놈과 외래종 서열을 연결하고 헬퍼 바이러스를 사용하여 재조합된 백시니아 바이러스 DNA 게놈을 재구성하는 것이다. 네 번째 대안은 박테리아 인공 염색체(BAC)로 복제된 백시니아 바이러스 게놈과, 백시니아 바이러스 게놈에서 원하는 통합 부위를 둘러싼 서열과 상동성이 있는 DNA 서열로 둘러싸인 선형 외래종 서열 사이에서 *E. coli* 또는 또 다른 박테리아 종에서의 상동 재조합이다.

[0189] **항원성 단백질의 발현**

[0190] 특정 구체예에서, 예를 들어, 여기서 기술한 EBV 바이러스의 단백질(질병-관련 항원)을 인코딩하는 하나 이상 또는 모든 뉴클레오타이드 서열의 발현은 하나 이상의 폭스바이러스 프로모터의 제어를 받는다. 본 발명에 따른 프로모터는 임의의 합성 또는 천연 폭스바이러스 프로모터일 수 있다. 특정 구체예에서, 폭스바이러스 프로모터는 Pr13.5 프로모터, PrHyb 프로모터, Pr7.5 프로모터, 하이브리드 초기/후기 프로모터, PrS 프로모터, PrS5E 프로모터, Pr1328, PrH5m, 합성 또는 천연 초기 또는 후기 프로모터, 또는 우두 바이러스 ATI 프로모터이다. 적합한 프로모터는 WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611 및 WO 2014/063832에 추가로 설명되어 있다.

[0191] 질병-관련 항원을 인코딩하는 핵산은 발현 제어 서열에 작동적으로 연결될 수 있다. 코딩 서열에 작동적으로 연결된 발현 제어 서열은 코딩 서열의 발현이 발현 제어 서열과 호환되는 조건에서 달성되도록 결합된다. 발현 제어 서열에는 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 단백질 인코딩 오픈 리딩 프레임의 시작 부분에 있는 시작 코돈, 인트론의 스플라이싱 신호, 및 프레임 내 종료 코돈이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 적합한 프로모터에는 비제한적으로 SV40 초기 프로모터, 레트로바이러스 LTR, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 인간 CMV 즉각 초기 I 프로모터, 및 다음의 백시니아 바이러스 또는 MVA 유래 프로모터를 비제한적으로 포함하는 다양한 폭스바이러스 프로모터가 포함된다: 30K 프로모터, I3 프로모터, sE/L 프로모터, Pr7.5K, 40K 프로모터, C1 프로모터, PrSynIIm 프로모터, PrLE1 프로모터, PrH5m 프로모터, PrS 프로모터, 하이브리드 초기/후기 프로모터, PrS5E 프로모터, PrA5E 프로모터, Pr4LS5E 프로모터; 우두 바이러스 ATI 프로모터, 또는 다음의 우두-유래 프로모터: Pr7.5K 프로모터, I3 프로모터, 30K 프로모터 또는 40K 프로모터.

[0192] 특정 구체예에서, 폭스바이러스 프로모터는 PrS 프로모터(SEQ ID NO: 8), Pr1328(SEQ ID NO: 10), PrH5m(SEQ ID NO: 9.) 및 Pr13.5 프로모터(SEQ ID NO: 7)로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0193] **항원 결정인자/단백질**

[0194] 용어 "항원 결정인자" 또는 "항원 단백질"은 세포 반응이든 체액 항체 반응이든 항원-특이적 면역 반응을 일으키도록 숙주의 면역 체계를 자극하는 모든 분자를 말한다. 항원 결정인자는, 숙주에서 면역 반응을 유발하고 항원의 일부를 형성하는 단백질, 폴리펩타이드, 항원성 단백질 단편, 항원 및 에피토프; 단백질, 폴리펩타이드 및 항원성 단백질 단편, 항원 및 에피토프의 동족체 또는 변이체 이는 예를 들어 당화된 단백질, 폴리펩타이드, 항원성 단백질 단편, 항원 및 에피토프를 포함함; 그리고 이러한 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 따라서 단백질, 폴리펩타이드, 항원성 단백질 단편, 항원 및 에피토프는 특정한 천연 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열에 국한되지 않고, 천연 서열과 동일한 서열은 물론, 결실, 추가, 삽입 및 치환과 같은 천연 서열의 변형도 포함한다.

[0195] "에피토프"라는 용어는 B-세포 및/또는 T-세포가 단독으로 또는 예를 들어 주요 조직 적합성 복합체("MHC") 단백질 또는 T-세포 수용체와 같은 다른 단백질과 함께 반응하는 항원의 부위를 말한다. 에피토프는 연속 아미노산 또는 단백질의 2차 및/또는 3차 접힘에 의해 병치된 비연속 아미노산 모두에서 형성될 수 있다. 연속 아미노산에서 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매에 노출되어도 유지되는 반면, 3차 접힘으로 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매로 처리하면 손실된다. 에피토프는 일반적으로 고유한 공간적 형태로 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 아미노산을 포함하지만 일반적으로 20개 미만의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 형태를 결정하는 방법에는 예를 들어 x-선 결정학 및 2차원 핵자기 공명이 있다. 예를 들어 "Epitope Mapping Protocols" in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)를 참조하라.

[0196] 바람직하게는, 동족체 또는 변이체는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 수준에서 참조된 단백질, 폴리펩타이

드, 항원성 단백질 단편, 항원 및 에피토프와 약 50% 이상, 약 60% 또는 65% 이상, 약 70% 또는 75% 이상, 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% 또는 89% 이상, 보다 일반적으로 약 90%, 91%, 92%, 93% 또는 94% 이상, 더욱 일반적으로 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상, 가장 일반적으로 약 99% 이상의 동일성을 갖는다.

[0197] 일부 구체예에서, 이종 핵산은 전체 항원성 단백질이 아닌 항원성 도메인 또는 항원성 단백질 단편을 인코딩한다. 이러한 단편은 항원성 또는 면역원성이 될 만큼 충분한 길이일 수 있다. 단편은 적어도 8개 아미노산 길이, 바람직하게는 10-20개 아미노산 길이일 수 있지만, 예를 들어 적어도 50, 100, 200, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000개 아미노산 길이 또는 그 사이의 길이와 같이 더 길 수 있다.

[0198] 일부 구체예에서, 항원성 단백질 단편 또는 그 면역원성 폴리펩타이드를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 단편이 본 발명의 바이러스 벡터에 삽입된다. 다른 구체예에서, 서로 다른 항원성 단백질을 인코딩하는 약 2-6개의 서로 다른 핵산이 하나 이상의 바이러스 벡터에 삽입된다. 일부 구체예에서, 다양한 단백질의 다중 면역원성 단편 또는 서브유닛이 사용될 수 있다. 예를 들어, 단일 단백질의 다른 부위에서 유래된 여러 개의 다른 에피토프나 동일 균주의 다른 단백질, 또는 다른 균주의 단백질 오솔로그에서 유래된 여러 개의 다른 에피토프가 벡터에서 발현될 수 있다.

[0199] **면역원성 조성물 및 질병-관련 항원**

[0200] 한 측면에서, 본 명세서에서는 재조합 폭스바이러스, 예를 들어 변형 백시니아 바이러스 안카라(MVA)를 포함하는 면역원성 조성물이 제공되며, 이는 이종 질병-관련 항원을 인코딩하는 핵산 서열뿐만 아니라 이를 인코딩하는 VRP를 포함한다.

[0201] 특정 구체예에서, 이종 질병-관련 항원은 감염성 질병 항원 또는 종양-관련 항원이다. 특정 구체예에서, 이종 질병-관련 항원은 종양-관련 항원이다. 특정 구체예에서, 종양-관련 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 5-α-환원효소, α-태아단백질("AFP"), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자("BAGE"), β-카테닌, Bcl12, bcr-abl, 브라키우리, CA-125, 카스파제-8("CASP-8", 또한 "FLICE"로 알려져 있음), 카텝신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/$F_c\varepsilon$RII, CD33, CD35/보체 수용체 1("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원("LCA"), CD46/막 보조 인자 단백질("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/붕괴 촉진 인자("DAF"), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 암배아 항원("CEA"), c-myc, 사이클로옥시게나아제-2("cox-2"), 대장암 유전자("DCC")에서 삭제됨, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파네실 전이효소, 섬유아세포 성장 인자-8a("FGF8a"), 섬유아세포 성장 인자-8b("FGF8b"), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리("GAGE-패밀리"), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 갱글리오사이드 2("GD2")/갱글리오사이드 3("GD3")/갱글리오사이드-모노시알산-2("GM2"), 생식선자극호르몬 방출 호르몬("GnRH"), UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2 [GlcNAc to Man(α1-6)] β1,6-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V("GnT V"), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/티로신-관련 단백질-1("gp75/TRP-1"), 인간융모막성선자극호르몬("hCG"), 헤파라나제, Her2/neu, 인간 유방 종양 바이러스("HMTV"), 70 킬로달톤 열-충격 단백질("HSP70"), 인간 텔로머라제 역전사효소("hTERT"), 인슐린-유사 성장 인자 수용체-1("IGFR-1"), 인터루킨-13 수용체("IL-13R"), 유도성 일산화질소 합성효소("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-인코딩 패밀리("MAGE-패밀리", 최소한 MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, 및 MAGE-4 포함), 맘마글로빈, MAP17, T-세포에 의해 인식되는 멜라닌-A/흑색종 항원-1("MART-1"), 메조텔린, MIC A/B, MT-MMP, 뮤신, 고환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), μPA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이에틴, 전립선-특이적 항원(PSA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 전립선 산성 인산가수분해효소(PAP), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파(TGF-α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β), 티모신-베타-15, 종양괴사인자-알파(TNF-α), TP1, TRP-2, 티로시나아제, 혈관내피 성장 인자(VEGF), ZAG, p16INK4, 및 글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST). 특정 구체예에서, 종양-관련 항원은 브라키우리(brachyury)이다. 특정 구체예에서, 종양-관련 항원은 PSA이다. 특정 구체예에서, 종양-관련 항원은 CEA이다. 특정 구체예에서, 종양-관련 항원은 MUC-1이다. 특정 구체예에서, 종양-관련 항원은 CEA 및 MUC-1이다.

[0202] 특정 구체예에서, 이종 질병-관련 항원은 감염성 질병 항원이다. 특정 구체예에서, 감염성 질병 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원, 또는 기생충 항원이다.

[0203] 특정 구체예에서, 감염성 질병 항원은 바이러스 항원이다. 특정 구체예에서, 바이러스 항원은 다음으로 구성된

그룹에서 선택된 바이러스에서 유래된다: 아데노바이러스, 아르보바이러스, 아스트로바이러스, 코로나바이러스, 콕사키바이러스, 크림콩고 출혈열 바이러스, 거대세포바이러스("CMV"), 뎅기열 바이러스, 에볼라 바이러스, 엡스타인-바 바이러스("EBV"), 구제역 바이러스, 과나리토 바이러스, 헨드라 바이러스, 단순포진 바이러스 1형("HSV-1"), 단순포진 바이러스 2형("HSV-2"), 인간 헤르페스 바이러스 6형("HHV-6"), 인간 헤르페스 바이러스 8형("HHV-8"), A형 간염 바이러스("HAV"), B형 간염 바이러스("HBV"), C형 간염 바이러스("HCV"), D형 간염 바이러스("HDV"), E형 간염 바이러스("HEV"), 인간 면역 결핍 바이러스("HIV"), 인플루엔자 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 주닌 바이러스, 라사 바이러스, 마추포 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 전염성 연속종 바이러스, 이하선염 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 니파 바이러스, 노로바이러스, 노워크 바이러스, 인간 유두종 바이러스("HPV"), 파라인플루엔자 바이러스, 파보바이러스, 소아마비 바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스("RSV"), 라이노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 사비아 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 바이러스("SARS"), 수두대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 서나일 바이러스, 및 황열병 바이러스.

[0204] 특정 구체예에서, 감염성 질병 항원은 박테리아 항원이다. 특정 구체예에서, 박테리아 항원은 다음에서 유래된 항원으로 구성된 그룹에서 선택된다: *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis), 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis), 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi), 브루셀라 아보르투스(Brucella abortus), 브루셀라 캐니스(Brucella canis), 브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis), 브루셀라 수이스(Brucella suis), 부르크홀데리아 말레이(Burkholderia mallei), 부르크홀데리아 슈도말레이(Burkholderia pseudomallei), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 클라미디아 뉴모니애(Chlamydia pneumoniae), 클라미디아 트라코마티스(Chlamydia trachomatis), 클라미도필라 시타시(Chlamydophila psittaci), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 클로스트리듐 퍼프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리듐 테타니(Clostridium tetani), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diptheriae), 엔테로코쿠스 패칼리스(Enterococcus faecalis), 엔테로코쿠스 패시움(Enterococcus faecium), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장독소성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장병원성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli))157:H7, 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenza), 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 렙토스피라 인터로간스(Leptospira interrogans), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 레프래(Mycobacterium leprae), 마이코박테리움 터버컬로우시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코플라스마 누모니애(Mycoplasma pneumoniae), 나이세리아 고노르회애(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메넌자이타이즈(Neisseria meningitides), 수더모우너즈 에어루지노우서(Pseudomonas aeruginosa), 리케치아 리케치아(Rickettsia rickettsia), 살모넬라 티피(Salmonella typhi), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 시겔라 소네이(Shigella sonnei), 스태필러코커스 아우레어스(Staphylococcus aureus), 스태펄러코커스 에퍼더머디스(Staphylococcus epidermidis), 스태펄러코커스 샙러피티커스(Staphylococcus saprophyticus), Streptococcus agalactiae, 스트렙터코커스 누모니애(Streptococcus pneumoniae), 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 트레포네마 팔리둠(Treponema pallidum), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 및 여시니아 페스티스(Yersinia pestis).* 특정 구체예에서, 박테리아 항원은 *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis)*에서 유래되었다.

[0205] 특정 구체예에서, 감염성 질병 항원은 진균 항원이다. 특정 구체예에서, 진균 항원은 다음에서 유래된 항원으로 구성된 그룹에서 선택된다: *아스페르길루스 클라바투스(Aspergillus clavatus), 아스페르길루스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스페르길루스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus), 아스페르길루스 니둘란스(Aspergillus nidulans), 아스페르길루스 니제르(Aspergillus niger), 아스페르길루스 테레우스(Aspergillus terreus), 블라스토미세스 더마리티디스(Blastomyces dermatitidis), 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 칸디다 더블리니엔시스(Candida dubliniensis), 칸디다 글라브라타(Candida glabrata), 칸디다 파라필로시스(Candida parapsilosis), 칸디다 루고사(Candida rugosa), 칸디다 트로피칼리스(Candida tropicalis), 크립토코커스 알비두스(Cryptococcus albidus), 크립토코커스 가티이(Cryptococcus gattii), 크립토코커스 로랑티(Cryptococcus laurentii), 크립토코커스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 히스토플라즈마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum), 마이크로스포룸 캐니스(Microsporum canis), 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii), 뉴모시스티스 지로베치(Pneumocystis jirovecii), 스포로트릭스 쉔키이(Sporothrix schenckii), 스타크보트리스 차르타룸(Stachbotrys chartarum), 티네아 바베(Tinea barbae), 티네아 캡티스(Tinea captitis), 티네아 코퍼리(Tinea corporis), 티네아 크루리스(Tinea cruris), 티네아 파시에이(Tinea faciei), 티네아 인*

코그니토(Tinea incognito), 티네아 니그라(Tinea nigra), 티네아 버시컬러(Tinea versicolor), 트리코피톤 루브럼(Trichophyton rubrum) 및 *트리코피톤 톤수란(Trichophyton tonsurans).*

[0206] 특정 구체예에서, 감염성 질병 항원은 기생충 항원이다. 특정 구체예에서, 기생충 항원은 다음에서 유래된 항원으로 구성된 그룹에서 선택된다: *아니사키스 에스피피(Anisakis spp.) 바베시아 에스피피(Babesia spp.), 베일리스카리스 프로시오니스(Baylisascaris procyonis), 크립토스포리디움 에스피피(Cryptosporidium spp.), 사이클로스포라 카예타넨시스(Cyclospora cayetanensis), 디필로보트리움 에스피피(Diphyllobothrium spp.), 드라쿤큘러스 메디넨시스(Dracunculus medinensis), 엔타메바 히스토리티카(Entamoeba histolytica), 지아르디아 두오데나리스(Giardia duodenalis), 지아르디아 인테스티나리스(Giardia intestinalis), 지아르디아 람블리아(Giardia lamblia), 레이시매니아 에스피피(Leishmania sp.), 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 쉬스토소마 만소니(Schistosoma mansoni), 쉬스토소마 히머토우비엄(Schistosoma haematobium), 쉬스터소마 저파너컴(Schistosoma japonicum), 태니어 에스피피(Taenia spp.), 톡소플라즈마 곤디이(Toxoplasma gondii), 트리키넬라 스피랄리스(Trichinella spiralis),* 및 *트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi).*

[0207] **엡스타인-바-바이러스 (EBV)**

[0208] 엡스타인-바-바이러스(EBV; 인간 헤르페스 바이러스 4, HHV-4라고도 함)는 인간 헤르페스 바이러스이다. 외피 dsDNA 바이러스는 타액이나 생식기 분비물을 통해 구강 경로를 통해 전염되며 상피 세포와 B 세포를 감염시킬 수 있으며, 이 경우 복잡한 조절에 의해 조정되는 용해 및 휴면 단계로 구성된 2상 수명 주기에 들어간다. 젊고 이전에 순진했던 청소년에게 발생하는 용해 단계는 전염성 단핵구증(전립선열)으로 이어질 수 있다. 전염성 단핵구증은 후기 단계에서 암이 발병할 위험 요소이다. EBV는 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 위암 및 비인두암과 같은 특정 형태의 암과 관련이 있다. 또한 EBV와 자가면역 질환 간의 연관성에 대한 증거가 발견되었다.

[0209] **비재조합 및 재조합 폭스바이러스 생산 방법**

[0210] MVA와 같은 재조합 폭스바이러스를 얻거나 폭스바이러스(예: MVA) 게놈에 외인성 코딩 서열을 삽입하는 방법은 해당 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, DNA 클로닝, DNA 및 RNA 분리, Western blot 분석, RT-PCR 및 PCR 증폭 기술과 같은 표준 분자 생물학 기술에 대한 방법은 Molecular Cloning, A laboratory Manual 2nd Ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))에 설명되어 있으며, 바이러스 취급 및 조작 기술은 Virology Methods Manual (B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996))에 설명되어 있다. 마찬가지로, 폭스바이러스의 취급, 조작 및 유전자 조작을 위한 기술과 노하우는 Molecular Virology: A Practical Approach (A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993), 예컨대, Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors 참조); Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Son, Inc. (1998), 예컨대, Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector 참조); 및 Genetic Engineering, Recent Developments in Applications, Apple Academic Press (2011), Dana M. Santos, 예컨대 Chapter 3: Recombinant-mediated Genetic Engineering of a Bacterial Artificial Chromosome Clone of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) 참조)에 설명되어 있다. 재조합 MVA의 구성 및 분리는 또한 Methods and Protocols, Vaccinia Virus and Poxvirology, ISBN 978-1-58829-229-2 (Staib et al.), Humana Press (2004)에 기술되어 있으며, 예컨대 Chapter 7을 참조하라.

[0211] 본 발명에 따른 바이러스 벡터 및/또는 바이러스와 같은 바이러스 기반 물질을 생산 및 정제하는 방법은 해당 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 이 방법에는 적합한 세포 배양(예: 닭 배아 섬유아세포(CEF 세포) 또는 DF-1, 오리, MDCK, 메추라기 또는 닭 유래 세포주 및 EB66 세포와 같은 세포주)을 감염시키고, 통상의 기술자에게 잘 알려진 적합한 조건에서 바이러스를 증폭시키는 것이 포함된다. 무혈청 배양 조건(예: 배지)과 혈청-함유 배양 방법은 바이러스 생산에 사용될 수 있지만, 동물이 없는 물질(예: 세포 배양 배지)을 사용하는 방법이 더 선호된다. 용어 "무혈청" 배지는 동물 또는 인간 유래의 혈청을 포함하지 않는 세포 배양 배지를 말한다. 본 명세서에서 사용되는 "동물이 없는"은 살아있는 유기체의 동물 세포에서 또는 동물 세포에 의해 생성되지 않은 화합물 또는 화합물 집합을 의미한다(바이러스 기반 물질을 생산하고 정제하는 데 사용된 세포 또는 세포 계통은 제외). 적합한 세포 배양 배지는 해당 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 이러한 배지는 염, 비타민, 완충액, 에너지원, 아미노산 및 기타 물질을 포함한다. CEF 세포의 무혈청 배양에 적합한 배지의 예로는 배지 199(Morgan, Morton and Parker; Proc Soc. Exp. Biol. Med. 1950 Jan; 73(1):1-8; Life Technologies에서 구입 가능) 또는 선호되는 VP-SFM(Invitrogen Ltd.)이다. CEF 세포에서 바이러스 배양 및 바이러스 증폭을 위한 무혈청 방법은 예를 들어 WO 2004/022729에 설명되어 있다. 바이러스 물질의 생산 및 정제를 위한 상류 및 하류

공정은 WO 2012/010280에 예시적으로 설명되어 있다. 본 출원의 바이러스를 정제하는 데 유용한 추가 방법은 WO 03/054175, WO 07/147528, WO 2008/138533, WO 2009/100521 및 WO 2010/130753에 설명되어 있다. 비제한적으로 EB66 세포와 같은 오리 배아-유래 세포에서 재조합 폭스바이러스를 증식 및 정제하는 데 적합한 방법은 Leon et al.에 설명되어 있다(Leon et al. (2016), The EB66 cell line as a valuable cell substrate for MVA-based vaccines production, Vaccine 34:5878-5885).

[0212] **saRNA 생산 방법**

[0213] 기존 saRNA 백신과 합성 saRNA 백신은 본질적으로 동일한 방식으로 생산된다. 간단히 말해, DNA 의존성 RNA 중합효소 프로모터(일반적으로 T7, T3 또는 SP6 박테리오파지에서 유래)와 RNA 백신 후보를 인코딩하는 mRNA 발현 플라스미드(pDNA)는 시험관 내 전사를 위한 템플릿으로 설계되었다. 유전자 합성 플랫폼의 유연성은 주요 이점이다. 기존 mRNA 백신의 경우 항원성 또는 면역 조절 서열은 5' 및 3' 비번역 영역(UTR)으로 둘러싸여 있다. 폴리(A) 꼬리(poly(A) tail)는 pDNA 템플릿의 3' 말단에서 통합되거나 시험관 내 전사 후 효소적으로 첨가될 수 있다. saRNA 백신 pDNA 템플릿에는 추가 알파바이러스 레플리콘 유전자와 보존된 서열 요소가 포함되어 있다. 비구조 단백질 1, 2, 3 및 4(nsP1-4)는 RdRP 복합체를 형성하기 때문에 레플리콘 활동에 필수적이다. 시험관 내 전사는 일반적으로 선형화된 pDNA 템플릿 또는 선형 DNA 단편에서 수행되며, 일반적으로 T7 DNA 의존성 RNA 중합효소와 함께 수행되어 RNA 전사본의 여러 사본이 생성된다. 효율적인 번역을 위해 5' 말단을 캡핑한다. 이는 일반적으로 합성 캡 유사체를 사용한 공동 전사 캡핑 또는 전사 후 효소 캡핑을 통해 수행할 수 있다. RNA가 5' 말단에서 캡핑되고 정제되면 제형화 및 전달을 위한 준비가 된다. saRNA의 경우 일반적으로 캡 유사체로 공동-전사 캡핑하는 단계가 선호되는데, 5' 캡은 기존 mRNA와 다르기 때문이다.

[0214] 그런 다음 RNA 생성물은 정제 과정을 거치는데, 여기에는 이중 가닥 dsRNA 형태로 시험관 내 전사의 부산물을 제거하는 단계가 포함될 수 있다. 예를 들어 이중 가닥 특정 효소 RNase 또는 특정 dsRNA 친화성을 가진 물질을 사용하는 크로마토그래피를 통해 제거할 수 있다. 추가 크로마토그래피 또는 기타 정제 단계를 사용하여 RNA 생성물의 순도와 품질을 높일 수 있으며, 예컨대 친화성 정제, 여과이다. 친화성 정제에는 전체 길이 및 폴리아데닐화된 RNA를 풍부하게 하고 불완전한 짧은 부산물을 제거하기 위한 폴리A-특이적 수지도 포함될 수 있다.

[0215] **백신 및 약제학적 조성물**

[0216] 본 명세서에 설명된 재조합 MVA 바이러스는 복제가 매우 제한되어 있고, 따라서 매우 약독화되어 있기 때문에 인간 및 심지어 면역이 손상된 인간을 포함한 광범위한 포유류의 치료에 이상적인 후보이다. 따라서 인간을 포함한 살아있는 동물의 신체에서 면역 반응을 유도하기 위한 약제학적 조성물 및 백신이 본 명세서에 제공된다. 또한 EBV 당단백질의 항원 결정인자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 MVA 벡터가 제공되어 EBV로 인한 질병의 치료 및/또는 예방에 사용된다.

[0217] 백신은 바람직하게는 10^4 내지 10^9 $TCID_{50}$/ml, 10^5 내지 $5x10^8$ $TCID_{50}$/ml, 10^6 내지 10^8 $TCID_{50}$/ml, 또는 10^7 내지 10^8 $TCID_{50}$/ml의 농도 범위에서 용액으로 제형화된 본 명세서에 설명된 재조합 MVA 바이러스를 포함한다. 인간에게 바람직한 백신 접종량은 10^6 내지 10^9 $TCID_{50}$이며, 여기에는 10^6 $TCID_{50}$, 10^7 $TCID_{50}$, 또는 10^8 $TCID_{50}$의 용량이 포함된다.

[0218] 여기에 제공된 약제학적 조성물은 일반적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용되거나 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 방부제, 보조제, 희석제 및/또는 안정제를 포함할 수 있다. 이러한 보조 물질은 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 또는 이와 유사한 물질일 수 있다. 적합한 담체는 일반적으로 단백질, 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집물, 또는 이와 유사한 물질과 같은 크고 느리게 대사되는 분자이다.

[0219] 백신을 제조하기 위해, 여기에 제공된 재조합 MVA 바이러스는 생리학적으로 허용되는 형태로 전환될 수 있다. 이는 H. Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99:2386-2392 (1974)에 기술된 바와 같이 천연두에 대한 예방 접종에 사용되는 폭스바이러스 백신 제조에 대한 경험에 근거하여 수행될 수 있다.

[0220] 예를 들어, 정제된 바이러스는 약 10 mM Tris, 140 mM NaCl pH 7.4에서 제형화된 $5x10^8$ $TCID_{50}$/ml의 역가로 -80 ℃에서 보관될 수 있다. 백신 접종을 위해, 예를 들어 10^2-10^8 또는 10^2-10^9 바이러스 입자를 2% 펩톤과 1% 인간 알부민이 포함된 100ml의 인산완충 식염수(PBS)에서 동결 건조하여 앰플, 바람직하게는 유리 앰플에 넣을 수 있

다. 대신에 백신 접종은 제형에서 바이러스를 단계적으로 동결 건조하여 생산할 수 있다. 이러한 제형에는 만니톨, 덱스트란, 설탕, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 추가 첨가제 또는 항산화제 또는 불활성 가스, 안정제 또는 생체 내 투여에 적합한 재조합 단백질(예: 인간 혈청 알부민)과 같은 기타 보조제가 포함될 수 있다. 그런 다음 유리 앰플을 밀봉하여 4º와 실온 사이에서 몇 달 동안 보관할 수 있다. 그러나 필요하지 않은 한 앰플은 바람직하게는 -20℃ 이하의 온도에서 보관된다.

[0221] 예방접종이나 치료를 위해 동결건조물을 수용액, 바람직하게는 생리식염수나 트리스 완충액에 녹여 전신 또는 국소적으로 투여할 수 있으며, 즉, 비경구, 피하, 정맥 주사, 근육 주사, 비강 주사 또는 숙련된 의사가 알고 있는 다른 투여 경로를 통해 투여할 수 있다. 투여 방식, 용량 및 투여 횟수는 해당 분야의 숙련자가 알려진 방식으로 최적화할 수 있다. 그러나 가장 일반적으로 환자는 첫 번째 백신 접종 후 약 1개월에서 6주 후에 두 번째 주사를 맞는다.

[0222] **이종 프라임-부스트 요법을 사용한 조합 백신**

[0223] 본 명세서에 설명된 조합 백신 및 방법은 이종 프라임-부스트 요법의 일부로 사용될 수 있다. 이종 프라임-부스트에서, 첫 번째 프라이밍 백신접종이 제공된 후 하나 이상의 후속 부스팅 백신접종이 이어진다.

[0224] 본 발명에 따른 MVA 및 VRP 재조합 바이러스 벡터는 또한 이종 프라임-부스트 요법에서 사용될 수 있으며, 여기서 하나 이상의 초기 프라임 백신접종은 본 명세서에 정의된 MVA 또는 VRP 벡터로 수행되고 하나 이상의 후속 부스팅 백신접종은 프라임 백신접종에 사용되지 않은 폭스바이러스 벡터로 수행되며, 예를 들어, 본 명세서에 정의된 MVA 벡터가 프라임 부스트에서 제공되는 경우 후속 부스팅 백신접종은 VRP 벡터가 되고 그 반대의 경우도 마찬가지다.

[0225] 바람직한 실시예에서 프라임 백신접종은 VRP 벡터로 수행되고 부스팅 백신접종은 MVA로 수행된다. 따라서, 본 발명의 한 측면은 다음을 포함하는 조합 백신에 관한 것이다:

[0226] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 VRP 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0227] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0228] 여기서 제1 조성물은 프라이밍 조성물이고 제2 조성물은 부스팅 조성물이며, 바람직하게는 부스팅 조성물은 부스팅 조성물의 벡터의 2회 이상의 용량을 포함한다.

[0229] **재조합 MVA 및 saRNA(VRP) 바이러스를 포함하는 백신 및 키트**

[0230] 또한, 본 명세서에는 본 명세서에 설명된 재조합 VRP 및/또는 MVA 중 하나 이상을 포함하는 백신 및 키트가 제공된다. 키트는 재조합 MVA 또는 VRP의 하나 또는 여러 개의 용기 또는 바이알과 함께 감염성 질환의 위험이 있는 대상자에게 재조합 MVA 및 VRP를 투여하기 위한 지침이 포함될 수 있다. 특정 구체예에서, 대상자는 인간이다. 특정 구체예에서, 지침은 재조합 MVA가 대상자에게 단일 용량으로 또는 다중(즉, 2, 3, 4 등) 용량으로 투여됨을 나타낸다. 특정 구체예에서, 지침은 재조합 MVA 또는 VRP 바이러스가 순진하거나 순진하지 않은 대상자에게 첫 번째(프라이밍) 및 두 번째(부스팅) 투여됨을 나타낸다. 바람직하게는, 키트는 재조합 VRP를 포함하는 프라임/부스트 면역접종을 위한 적어도 두 개의 바이알을 포함하며, 이는 첫 번째 바이알/용기에서 첫 번째 접종("프라이밍 접종")을 위해, 그리고 재조합 MVA를 포함하는 두 번째 및/또는 추가 바이알/용기에서 적어도 두 번째 및/또는 세 번째 및/또는 추가 접종("부스팅 접종")을 위해 여기에 설명된 바와 같다.

[0231] 본 발명의 다른 실시예는 본 명세서에 공개된 본 발명의 명세서 및 실시를 고려하면 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 명세서 및 실시예는 단지 예시로 간주되어야 하며, 본 발명의 진정한 범위 및 정신은 첨부된 청구항에 의해 표시된다.

[0232] **구체예**

[0233] 구체예 1은 다음을 포함하는 백신 조합이며

[0234] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0235] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담

체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0236] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0237] 구체예 2는 구체예 1에 따른 백신 조합으로서, 제1 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0238] 구체예 3은 구체예 1에 따른 백신 조합으로서, 제2 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0239] 구체예 4는 구체예 1-3 중 어느 하나에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 감염성 질환 항원 또는 종양-관련 항원이다.

[0240] 구체예 5는 구체예 4에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 감염성 질환 항원이다.

[0241] 구체예 6은 구체예 5에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원, 또는 기생충 항원이다.

[0242] 구체예 7은 구체예 6에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 바이러스 항원이다.

[0243] 구체예 8은 구체예 7에 따른 백신 조합으로서, 바이러스 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 바이러스에서 유래된다: 아데노바이러스, 아르보바이러스, 아스트로바이러스, 코로나바이러스, 콕사키바이러스, 크림콩고 출혈열 바이러스, 거대세포바이러스("CMV"), 뎅기열 바이러스, 에볼라 바이러스, 엡스타인-바 바이러스("EBV"), 구제역 바이러스, 과나리토 바이러스, 헨드라 바이러스, 단순포진 바이러스 1형("HSV-1"), 단순포진 바이러스 2형("HSV-2"), 인간 헤르페스 바이러스 6형("HHV-6"), 인간 헤르페스 바이러스 8형("HHV-8"), A형 간염 바이러스("HAV"), B형 간염 바이러스("HBV"), C형 간염 바이러스("HCV"), D형 간염 바이러스("HDV"), E형 간염 바이러스("HEV"), 인간 면역 결핍 바이러스("HIV"), 인플루엔자 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 주닌 바이러스, 라사 바이러스, 마추포 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 전염성 연속종 바이러스, 이하선염 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 니파 바이러스, 노로바이러스, 노워크 바이러스, 인간 유두종 바이러스("HPV"), 파라인플루엔자 바이러스, 파보바이러스, 소아마비 바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스("RSV"), 라이노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 사비아 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 바이러스("SARS"), 수두대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 서나일 바이러스, 및 황열병 바이러스.

[0244] 구체예 9는 구체예 6에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 박테리아 항원이다.

[0245] 구체예 10은 구체예 9에 따른 백신 조합으로서, 박테리아 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 박테리아로부터 유래된다: *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis), 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis), 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi), 브루셀라 아보르투스(Brucella abortus), 브루셀라 캐니스(Brucella canis), 브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis), 브루셀라 수이스(Brucella suis), 부르크홀데리아 말레이(Burkholderia mallei), 부르크홀데리아 슈도말레이(Burkholderia pseudomallei), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 클라미디아 뉴모니애(Chlamydia pneumoniae), 클라미디아 트라코마티스(Chlamydia trachomatis), 클라미도필라 시타시(Chlamydophila psittaci), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 클로스트리듐 퍼프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리듐 테타니(Clostridium tetani), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diptheriae), 엔테로코쿠스 패칼리스(Enterococcus faecalis), 엔테로코쿠스 패시움(Enterococcus faecium), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장독소성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장병원성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli))157:H7, 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenza), 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 렙토스피라 인터로간스(Leptospira interrogans), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 레프래(Mycobacterium leprae), 마이코박테리움 터버컬로우시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코플라스마 누모니애(Mycoplasma pneumoniae), 나이세리아 고노르회애(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메넌자이타이즈(Neisseria meningitides), 수더모우너즈 에어루지노우서(Pseudomonas aeruginosa), 리케치아 리케치아(Rickettsia rickettsia), 살모넬라 티피(Salmonella typhi), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 시겔라 소네이(Shigella sonnei), 스태필러코커스 아우레어스(Staphylococcus aureus), 스태필러코커스 에퍼더머디스(Staphylococcus epidermidis), 스태필러코커스 샙러피티커스(Staphylococcus saprophyticus), 스트렙토코커스 아갈락티아에(Streptococcus agalactiae), 스트렙터코커스 누모니애(Streptococcus pneumoniae), 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes),*

트레포네마 팔리둠(Treponema pallidum), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 및 여시니아 페스티스(Yersinia pestis).

[0246] 구체예 11은 구체예 6에 따른 백신 조합으로서, 감염성 질환 항원은 진균 항원이다.

[0247] 구체예 12는 구체예 11에 따른 백신 조합으로서, 진균 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 진균으로부터 유래된다: *아스페르길루스 클라바투스(Aspergillus clavatus), 아스페르길루스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스페르길루스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus), 아스페르길루스 니둘란스(Aspergillus nidulans), 아스페르길루스 니제르(Aspergillus niger), 아스페르길루스 테레우스(Aspergillus terreus), 블라스토미세스 더마리티디스(Blastomyces dermatitidis), 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 칸디다 더블리니엔시스(Candida dubliniensis), 칸디다 글라브라타(Candida glabrata), 칸디다 파라필로시스(Candida parapsilosis), 칸디다 루고사(Candida rugosa), 칸디다 트로피칼리스(Candida tropicalis), 크립토코커스 알비두스(Cryptococcus albidus), 크립토코커스 가티이(Cryptococcus gattii), 크립토코커스 로랑티(Cryptococcus laurentii), 크립토코커스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 히스토플라즈마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum), 마이크로스포룸 캐니스(Microsporum canis), 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii), 뉴모시스티스 지로베치(Pneumocystis jirovecii), Sporothrix schenckii, Stachbotrys chartarum, 티네아 바베(Tinea barbae), 티네아 캡티스(Tinea captitis), 티네아 코퍼리(Tinea corporis), 티네아 크루리스(Tinea cruris), 티네아 파시에이(Tinea faciei), 티네아 인코그니토(Tinea incognito), 티네아 니그라(Tinea nigra), 티네아 버시컬러(Tinea versicolor), 트리코피톤 루브럼(Trichophyton rubrum) 및 트리코피톤 톤수란(Trichophyton tonsurans).*

[0248] 구체예 13은 구체예 6에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 기생충 항원이다.

[0249] 구체예 14는 구체예 13에 따른 백신 조합으로서, 기생충 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 기생충에서 유래된다: *아니사키스 에스피피(Anisakis spp.) 바베시아 에스피피(Babesia spp.), 베일리스카리스 프로시오니스(Baylisascaris procyonis), 크립토스포리디움 에스피피(Cryptosporidium spp.), 사이클로스포라 카예타넨시스(Cyclospora cayetanensis), 디필로보트리움 에스피피(Diphyllobothrium spp.), 드라쿤큘러스 메디넨시스(Dracunculus medinensis), 엔타메바 히스토리티카(Entamoeba histolytica), 지아르디아 두오데나리스(Giardia duodenalis), 지아르디아 인테스티나리스(Giardia intestinalis), 지아르디아 람블리아(Giardia lamblia), 레이시매니아 에스피(Leishmania sp.), 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 쉬스토소마 만소니(Schistosoma mansoni), 쉬스토소마 히머토우비엄(Schistosoma haematobium), 쉬스터소마 저파너컴(Schistosoma japonicum), 태니어 에스피피(Taenia spp.), 톡소플라즈마 곤디이(Toxoplasma gondii), 트리키넬라 스피랄리스(Trichinella spiralis), 및 트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi).*

[0250] 구체예 15는 구체예 4에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 종양-관련 항원이다.

[0251] 구체예 16은 구체예 15에 따른 백신 조합으로서, 종양-관련 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 5-α-환원효소, α-태아단백질("AFP"), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자("BAGE"), β-카테닌, Bcl12, bcr-abl, 브라키우리, CA-125, 카스파제-8("CASP-8", 또한 "FLICE"로 알려져 있음), 카텝신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/$F_c\varepsilon$RII, CD33, CD35/보체 수용체 1("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원("LCA"), CD46/막 보조 인자 단백질("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/붕괴 촉진 인자("DAF"), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 암배아 항원("CEA"), c-myc, 사이클로옥시게나아제-2("cox-2"), 대장암 유전자("DCC")에서 삭제됨, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파네실 전이효소, 섬유아세포 성장 인자-8a("FGF8a"), 섬유아세포 성장 인자-8b("FGF8b"), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리("GAGE-패밀리"), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 갱글리오사이드 2("GD2")/갱글리오사이드 3("GD3")/갱글리오사이드-모노시알산-2("GM2"), 생식선자극호르몬 방출 호르몬("GnRH"), UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2 [GlcNAc - Man(α1-6)] β 1,6-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V("GnT V"), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/티로신-관련 단백질-1("gp75/TRP-1"), 인간융모막성선자극호르몬("hCG"), 헤파라나제, Her2/neu, 인간 유방 종양 바이러스("HMTV"), 70 킬로달톤 열-충격 단백질("HSP70"), 인간 텔로머라제 역전사효소("hTERT"), 인슐린-유사 성장 인자 수용체-1("IGFR-1"), 인터루킨-13 수용체("IL-13R"), 유도성 일산화질소 합성효소("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-인코딩 유전자1("MAGE-1"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 2("MAGE-2"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 3("MAGE-3"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 4("MAGE-4"), 맘마글로빈, MAP17, T-세포에 의해 인식되는 멜라닌-A/흑색종 항원-1("MART-1"), 메조텔린, MIC A/B, MT-MMP, 뮤신, 고환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), μPA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이에틴, 전립선-특이적 항원(PSA), 전립선-특이적

막 항원(PSMA), 전립선 산성 인산가수분해효소(PAP), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파(TGF-α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β), 티모신-베타-15, 종양괴사인자-알파(TNF-α), TP1, TRP-2, 티로시나아제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), ZAG, p16INK4, 및 글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST).

[0252] 구체예 17은 구체예 1-8 중 어느 하나에 따른 백신 조합으로서, 항원성 단백질은 EBV의 구조 및 비구조 단백질 중 하나이다.

[0253] 구체예 18은 구체예 17에 따른 백신 조합으로서, 항원성 단백질은 gp350, gH, gL, EBNA3A 및 BRLF1/BZLF1 융합체로부터 선택된다.

[0254] 구체예 19는 구체예 18에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 4에 의해 인코딩된다.

[0255] 구체예 20은 구체예 1-19 중 어느 하나에 따른 백신 조합으로서, saRNA는 VRP, 바람직하게는 VEEV, 더 바람직하게는 TC83이다.

[0256] 구체예 21은 구체예 1-19 중 어느 하나에 따른 백신 조합으로서, MVA는 MVA-BN이다.

[0257] 구체예 22는 구체예 20에 따른 백신 조합으로서, 제1 조성물의 VRP는 gp350, gH 및 gL로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0258] 구체예 23은 구체예 22에 따른 백신 조합으로서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 및 SEQ ID NO: 3에 의해 인코딩된다.

[0259] 구체예 24는 구체예 1-23 중 어느 하나에 따른 백신 조합으로서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제1 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0260] 구체예 25는 구체예 1-23 중 어느 하나에 따른 백신 조합으로서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제2 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0261] 구체예 26은 구체예 1-25 중 어느 하나에 따른 백신 조합으로서, 부스팅 조성물은 부스팅 조성물의 벡터의 2회 이상의 복용량을 포함한다.

[0262] 구체예 27은 다음을 포함하는 키트이며:

[0263] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0264] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0265] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0266] 구체예 28은 구체예 27에 따른 키트로서, 제1 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0267] 구체예 29는 구체예 27에 따른 키트로서, 제2 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0268] 구체예 30은 구체예 27-29 중 어느 하나에 따른 키트로서, 항원 단백질은 감염성 질환 항원 또는 종양-관련 항원이다.

[0269] 구체예 31은 구체예 30에 따른 키트로서, 질병-관련 항원은 감염성 질병 항원이다.

[0270] 구체예 32는 구체예 31에 따른 키트로서, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원, 또는 기생충 항원이다.

[0271] 구체예 33은 구체예 32에 따른 키트로서, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원이다.

[0272] 구체예 34는 구체예 33에 따른 키트로서, 바이러스 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 바이러스에서 유래

된다: 아데노바이러스, 아르보바이러스, 아스트로바이러스, 코로나바이러스, 콕사키바이러스, 크림콩고 출혈열 바이러스, 거대세포바이러스("CMV"), 뎅기열 바이러스, 에볼라 바이러스, 엡스타인-바 바이러스("EBV"), 구제역 바이러스, 과나리토 바이러스, 헨드라 바이러스, 단순포진 바이러스 1형("HSV-1"), 단순포진 바이러스 2형("HSV-2"), 인간 헤르페스 바이러스 6형("HHV-6"), 인간 헤르페스 바이러스 8형("HHV-8"), A형 간염 바이러스("HAV"), B형 간염 바이러스("HBV"), C형 간염 바이러스("HCV"), D형 간염 바이러스("HDV"), E형 간염 바이러스("HEV"), 인간 면역 결핍 바이러스("HIV"), 인플루엔자 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 주닌 바이러스, 라사 바이러스, 마추포 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 전염성 연속종 바이러스, 이하선염 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 니파 바이러스, 노로바이러스, 노워크 바이러스, 인간 유두종 바이러스("HPV"), 파라인플루엔자 바이러스, 파보바이러스, 소아마비 바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스("RSV"), 라이노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 사비아 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 바이러스("SARS"), 수두대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 서나일 바이러스, 및 황열병 바이러스.

[0273] 구체예 35는 구체예 32에 따른 키트로서, 감염성 질환 항원은 박테리아 항원이다.

[0274] 구체예 36은 구체예 35에 따른 키트로서, 박테리아 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 박테리아로부터 유래된다: *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis), 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis), 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi), 브루셀라 아보르투스(Brucella abortus), 브루셀라 캐니스(Brucella canis), 브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis), 브루셀라 수이스(Brucella suis), 부르크홀데리아 말레이(Burkholderia mallei), 부르크홀데리아 슈도말레이(Burkholderia pseudomallei), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 클라미디아 뉴모니애(Chlamydia pneumoniae), 클라미디아 트라코마티스(Chlamydia trachomatis), 클라미도필라 시타시(Chlamydophila psittaci), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 클로스트리듐 퍼프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리듐 테타니(Clostridium tetani), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diptheriae), 엔테로코쿠스 패칼리스(Enterococcus faecalis), 엔테로코쿠스 패시움(Enterococcus faecium), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장독소성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장병원성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli))157:H7, 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenza), 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 렙토스피라 인터로간스(Leptospira interrogans), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 레프래(Mycobacterium leprae), 마이코박테리움 터버켈로우시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코플라스마 누모니애(Mycoplasma pneumoniae), 나이세리아 고노르회애(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메넌자이타이즈(Neisseria meningitides), 수더모우너즈 에어루지노우서(Pseudomonas aeruginosa), 리케치아 리케치아(Rickettsia rickettsia), 살모넬라 티피(Salmonella typhi), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 시겔라 소네이(Shigella sonnei), 스태필러코커스 아우레어스(Staphylococcus aureus), Staphylococcus epidermidis, 스태펄러코커스 샙러피티커스(Staphylococcus saprophyticus), 스트렙토코커스 아갈락티아에(Streptococcus agalactiae), 스트렙터코커스 누모니애(Streptococcus pneumoniae), 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 트레포네마 팔리둠(Treponema pallidum), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 및 여시니아 페스티스(Yersinia pestis).*

[0275] 구체예 37은 구체예 32에 따른 키트로서, 감염성 질환 항원은 진균 항원이다.

[0276] 구체예 38은 구체예 37에 따른 키트로서, 진균 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 진균으로부터 유래된다: *아스페르길루스 클라바투스(Aspergillus clavatus), 아스페르길루스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스페르길루스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus), 아스페르길루스 니둘란스(Aspergillus nidulans), 아스페르길루스 니제르(Aspergillus niger), 아스페르길루스 테레우스(Aspergillus terreus), 블라스토미세스 더마리티디스(Blastomyces dermatitidis), 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 칸디다 더블리니엔시스(Candida dubliniensis), 칸디다 글라브라타(Candida glabrata), 칸디다 파라필로시스(Candida parapsilosis), 칸디다 루고사(Candida rugosa), 칸디다 트로피칼리스(Candida tropicalis), 크립토코커스 알비두스(Cryptococcus albidus), 크립토코커스 가티이(Cryptococcus gattii), 크립토코커스 로랑티(Cryptococcus laurentii), 크립토코커스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 히스토플라즈마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum), 마이크로스포룸 캐니스(Microsporum canis), 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii), 뉴모시스티스 지로베치(Pneumocystis jirovecii), 스포로트릭스 첸키이(Sporothrix schenckii), 스타크보트리스 차르타룸(Stachbotrys chartarum), 티네아 바베(Tinea barbae), 티네아 캡티스(Tinea captitis), 티네아 코퍼리(Tinea corporis), 티네아 크루리스(Tinea cruris), 티네아 파시에이(Tinea faciei), 티네아 인코그니토(Tinea*

incognito), 티네아 니그라(Tinea nigra), 티네아 버시컬러(Tinea versicolor), 트리코피톤 루브럼(Trichophyton rubrum) 및 *트리코피톤 톤수란(Trichophyton tonsurans).*

[0277] 구체예 39는 구체예 32에 따른 키트로서, 감염성 질환 항원은 기생충 항원이다.

[0278] 구체예 40은 구체예 39에 따른 키트로서, 기생충 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 기생충에서 유래된다: *아니사키스 에스피피(Anisakis spp.) 바베시아 에스피피(Babesia spp.), 베일리스카리스 프로시오니스(Baylisascaris procyonis), 크립토스포리디움 에스피피(Cryptosporidium spp.), 사이클로스포라 카예타넨시스(Cyclospora cayetanensis), 디필로보트리움 에스피피(Diphyllobothrium spp.), 드라쿤큘러스 메디넨시스(Dracunculus medinensis), 엔타메바 히스토리티카(Entamoeba histolytica), 지아르디아 두오데나리스(Giardia duodenalis), 지아르디아 인테스티나리스(Giardia intestinalis), 지아르디아 람블리아(Giardia lamblia), 레이시매니아 에스피(Leishmania sp.), 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 쉬스토소마 만소니(Schistosoma mansoni), 쉬스토소마 히머토우비엄(Schistosoma haematobium), 쉬스터소마 저파너컴(Schistosoma japonicum), 태니어 에스피피(Taenia spp.), 톡소플라즈마 곤디이(Toxoplasma gondii), 트리키넬라 스피랄리스(Trichinella spiralis),* 및 *트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi).*

[0279] 구체예 41은 구체예 30에 따른 키트로서, 질병-관련 항원은 종양-관련 항원이다.

[0280] 구체예 42는 구체예 41에 따른 키트로서, 종양-관련 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 5-α-환원효소, α-태아단백질("AFP"), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자("BAGE"), β-카테닌, Bcl12, bcr-abl, 브라키우리, CA-125, 카스파제-8("CASP-8", 또한 "FLICE"로 알려져 있음), 카텝신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/$F_c\varepsilon$RII, CD33, CD35/보체 수용체 1("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원("LCA"), CD46/막 보조 인자 단백질("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/붕괴 촉진 인자("DAF"), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 암배아 항원("CEA"), c-myc, 사이클로옥시게나아제-2("cox-2"), 대장암 유전자("DCC")에서 삭제됨, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파네실 전이효소, 섬유아세포 성장 인자-8a("FGF8a"), 섬유아세포 성장 인자-8b("FGF8b"), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리("GAGE-패밀리"), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 갱글리오사이드 2("GD2")/갱글리오사이드 3("GD3")/갱글리오사이드-모노시알산-2("GM2"), 생식선자극호르몬 방출 호르몬("GnRH"), UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2 [GlcNAc - Man(α1-6)] β1,6-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V("GnT V"), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/티로신-관련 단백질-1("gp75/TRP-1"), 인간융모막성선자극호르몬("hCG"), 헤파라나제, Her2/neu, 인간 유방 종양 바이러스("HMTV"), 70 킬로달톤 열-충격 단백질("HSP70"), 인간 텔로머라제 역전사효소("hTERT"), 인슐린-유사 성장 인자 수용체-1("IGFR-1"), 인터루킨-13 수용체("IL-13R"), 유도성 일산화질소 합성효소("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-인코딩 유전자1("MAGE-1"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 2("MAGE-2"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 3("MAGE-3"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 4("MAGE-4"), 맘마글로빈, MAP17, T-세포에 의해 인식되는 멜라닌-A/흑색종 항원-1("MART-1"), 메조텔린, MIC A/B, MT-MMP, 뮤신, 고환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), μPA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이에틴, 전립선-특이적 항원(PSA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 전립선 산성 인산가수분해효소(PAP), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파(TGF-α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β), 티모신-베타-15, 종양괴사인자-알파(TNF-α), TP1, TRP-2, 티로시나아제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), ZAG, p16INK4, 및 글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST).

[0281] 구체예 43은 구체예 27-34 중 어느 하나에 따른 키트로서, 항원 단백질은 EBV의 구조 및 비구조 단백질 중 하나이다.

[0282] 구체예 44는 구체예 43에 따른 키트로서, 항원성 단백질은 gp350, gH, gL, EBNA3A 및 BRLF1/BZLF1 융합체로부터 선택된다.

[0283] 구체예 45는 구체예 44에 따른 키트로서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 4에 의해 인코딩된다.

[0284] 구체예 46은 구체예 27-45 중 어느 하나에 따른 키트로서, saRNA는 VRP, 바람직하게는 VEEV, 더 바람직하게는 TC83이다.

[0285] 구체예 47은 구체예 27-45 중 어느 하나에 따른 키트로, MVA는 MVA-BN이다.

[0286] 구체예 48은 구체예 46에 따른 키트로서, 제1 조성물의 VRP는 gp350, gH 및 gL로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0287] 구체예 49는 구체예 48에 따른 키트로서, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 및 SEQ ID NO: 3에 의해 인코딩된다.

[0288] 구체예 50은 구체예 27-49 중 어느 하나에 따른 키트로서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제1 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0289] 구체예 51은 구체예 27-49 중 어느 하나에 따른 키트로서, 감염성 질환 또는 종양-관련 질환에 대한 보호 면역 반응을 생성하는 데 사용되며, 여기서 제2 조성물은 상기 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0290] 구체예 52는 구체예 1-51 중 어느 하나에 따른 키트로서, 부스팅 조성물은 부스팅 조성물의 벡터의 2회 이상의 복용량을 포함한다.

[0291] 구체예 53은 구체예 1-23 중 어느 하나에 따른 백신 조합, 구체예 24-26 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 백신 조합, 구체예 27-49 중 어느 하나에 따른 키트, 구체예 50-52 중 하나에 따라 사용하기 위한 키트로서, 재조합 바이러스를 생성하는 데 사용된 MVA는 MVA-BN 바이러스 또는 닭 배아 섬유아세포(CEF) 세포에서 시험관 내 생식 복제 능력을 갖는 유도체이지만, 인간 각질세포 세포주 HaCat, 인간 골육종 세포주 143B, 인간 배아 신장 세포주 293, 및 인간 자궁경부 선암 세포주 HeLa에서는 생식 복제 능력이 없다.

[0292] 구체예 54는 구체예 1-23 중 어느 하나에 따른 백신 조합, 구체예 24-26 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 백신 조합, 구체예 27-49 중 어느 하나에 따른 키트, 구체예 50-52 중 하나에 따라 사용하기 위한 키트로서, 여기서 재조합 바이러스를 생성하는 데 사용된 MVA는 유럽 동물 세포 배양 컬렉션(ECACC)에 등록 번호 V00083008로 기탁된 MVA-BN이다.

[0293] 구체예 55는 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제학적 조성물 또는 약물을 제조하기 위한 구체예 1-23 중 어느 하나에 따른 백신 조합 또는 구체예 27-49 중 어느 하나에 따른 키트의 용도이다.

[0294] 구체예 56은 구체예 1-23에 따른 백신 조합 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 첨가제를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0295] 구체예 57은 대상자에게 바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로, 상기 방법은 대상자에게 다음을 투여하는 것을 포함한다:

[0296] (a) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 saRNA의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제1 조성물; 및

[0297] (b) 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 MVA 벡터의 면역학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 포함하는 제2 조성물;

[0298] 여기서 조성물 중 하나는 프라이밍 조성물이고 다른 조성물은 부스팅 조성물이다.

[0299] 구체예 58은 구체예 57에 따른 방법으로, 제1 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제2 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0300] 구체예 59는 구체예 57에 따른 방법으로, 제2 조성물은 면역 반응을 프라이밍하는 데 사용되고 제1 조성물은 상기 면역 반응을 부스팅하는 데 사용된다.

[0301] 구체예 60은 구체예 57-59 중 어느 하나에 따른 방법으로, 질병-관련 항원은 감염성 질환 항원 또는 종양-관련 항원이다.

[0302] 구체예 61은 구체예 60에 따른 방법으로, 질병-관련 항원은 감염성 질병 항원이다.

[0303] 구체예 62는 구체예 61에 따른 방법으로, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원, 또는 기생충 항원이다.

[0304] 구체예 63은 구체예 62에 따른 방법으로, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원이다.

[0305] 구체예 64는 구체예 63에 따른 방법으로, 바이러스 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 바이러스에서 유래

된다: 아데노바이러스, 아르보바이러스, 아스트로바이러스, 코로나바이러스, 콕사키바이러스, 크림콩고 출혈열 바이러스, 거대세포바이러스("CMV"), 뎅기열 바이러스, 에볼라 바이러스, 엡스타인-바 바이러스("EBV"), 구제역 바이러스, 과나리토 바이러스, 헨드라 바이러스, 단순포진 바이러스 1형("HSV-1"), 단순포진 바이러스 2형("HSV-2"), 인간 헤르페스 바이러스 6형("HHV-6"), 인간 헤르페스 바이러스 8형("HHV-8"), A형 간염 바이러스("HAV"), B형 간염 바이러스("HBV"), C형 간염 바이러스("HCV"), D형 간염 바이러스("HDV"), E형 간염 바이러스("HEV"), 인간 면역 결핍 바이러스("HIV"), 인플루엔자 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 주닌 바이러스, 라사 바이러스, 마추포 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 전염성 연속종 바이러스, 이하선염 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 니파 바이러스, 노로바이러스, 노워크 바이러스, 인간 유두종 바이러스("HPV"), 파라인플루엔자 바이러스, 파보바이러스, 소아마비 바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스("RSV"), 라이노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 사비아 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 바이러스("SARS"), 수두대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 서나일 바이러스, 및 황열병 바이러스.

[0306] 구체예 65는 구체예 62에 따른 방법으로, 감염성 질환 항원은 박테리아 항원이다.

[0307] 구체예 66은 구체예 65에 따른 방법으로, 박테리아 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 박테리아로부터 유래된다: *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis), 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis), 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi), 브루셀라 아보르투스(Brucella abortus), 브루셀라 캐니스(Brucella canis), 브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis), 브루셀라 수이스(Brucella suis), 부르크홀데리아 말레이(Burkholderia mallei), 부르크홀데리아 슈도말레이(Burkholderia pseudomallei), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 클라미디아 뉴모니애(Chlamydia pneumoniae), 클라미디아 트라코마티스(Chlamydia trachomatis), 클라미도필라 시타시(Chlamydophila psittaci), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 클로스트리듐 퍼프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리듐 테타니(Clostridium tetani), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diptheriae), 엔테로코쿠스 패칼리스(Enterococcus faecalis), 엔테로코쿠스 패시움(Enterococcus faecium), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장독소성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 장병원성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli))157:H7, 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenza), 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 렙토스피라 인터로간스(Leptospira interrogans), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 레프래(Mycobacterium leprae), 마이코박테리움 터버컬로우시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코플라스마 누모니애(Mycoplasma pneumoniae), 나이세리아 고노르회애(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메넌자이타이즈(Neisseria meningitides), 수더모우너즈 에어루지노우서(Pseudomonas aeruginosa), 리케치아 리케치아(Rickettsia rickettsia), 살모넬라 티피(Salmonella typhi), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 시겔라 소네이(Shigella sonnei), 스태필러코커스 아우레어스(Staphylococcus aureus), 스태필러코커스 에퍼더머디스(Staphylococcus epidermidis), 스태필러코커스 샙러피티커스(Staphylococcus saprophyticus), 스트렙토코커스 아갈락티아에(Streptococcus agalactiae), 스트렙터코커스 누모니애(Streptococcus pneumoniae), 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 트레포네마 팔리둠(Treponema pallidum), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 및 여시니아 페스티스(Yersinia pestis).*

[0308] 구체예 67은 구체예 62에 따른 방법으로, 감염성 질환 항원은 진균 항원이다.

[0309] 구체예 68은 구체예 67에 따른 방법으로, 진균 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 진균으로부터 유래된다: *아스페르길루스 클라바투스(Aspergillus clavatus), 아스페르길루스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스페르길루스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus), 아스페르길루스 니둘란스(Aspergillus nidulans), 아스페르길루스 니제르(Aspergillus niger), 아스페르길루스 테레우스(Aspergillus terreus), 블라스토미세스 더마리티디스(Blastomyces dermatitidis), 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 칸디다 더블리니엔시스(Candida dubliniensis), 칸디다 글라브라타(Candida glabrata), 칸디다 파라필로시스(Candida parapsilosis), 칸디다 루고사(Candida rugosa), 칸디다 트로피칼리스(Candida tropicalis), 크립토코커스 알비두스(Cryptococcus albidus), 크립토코커스 가티이(Cryptococcus gattii), 크립토코커스 로랑티(Cryptococcus laurentii), 크립토코커스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 히스토플라즈마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum), 마이크로스포룸 캐니스(Microsporum canis), 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii), 뉴모시스티스 지로베치(Pneumocystis jirovecii), 스포로트릭스 쉔키이(Sporothrix schenckii), 스타크보트리스 차르타룸(Stachbotrys chartarum), 티네아 바베(Tinea barbae), 티네아 캡티스(Tinea captitis), 티네아 코퍼리(Tinea*

corporis), 티네아 크루리스(Tinea cruris), 티네아 파시에이(Tinea faciei), 티네아 인코그니토(Tinea incognito), 티네아 니그라(Tinea nigra), 티네아 버시컬러(Tinea versicolor), 트리코피톤 루브럼(Trichophyton rubrum) 및 *트리코피톤 톤수란(Trichophyton tonsurans).*

[0310] 구체예 69는 구체예 62에 따른 방법으로, 감염성 질환 항원은 기생충 항원이다.

[0311] 구체예 70은 구체예 69에 따른 방법으로, 기생충 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 기생충에서 유래된다: *아니사키스 에스피피(Anisakis spp.) 바베시아 에스피피(Babesia spp.), 베일리스카리스 프로시오니스(Baylisascaris procyonis), 크립토스포리디움 에스피피(Cryptosporidium spp.), 사이클로스포라 카예타넨시스(Cyclospora cayetanensis), 디필로보트리움 에스피피(Diphyllobothrium spp.), 드라쿤큘러스 메디넨시스(Dracunculus medinensis), 엔타메바 히스토리티카(Entamoeba histolytica), 지아르디아 두오데나리스(Giardia duodenalis), 지아르디아 인테스티나리스(Giardia intestinalis), 지아르디아 람블리아(Giardia lamblia), 레이시매니아 에스피(Leishmania sp.), 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 쉬스토소마 만소니(Schistosoma mansoni), 쉬스토소마 히머토우비엄(Schistosoma haematobium), 쉬스터소마 저파너컴(Schistosoma japonicum), 태니어 에스피피(Taenia spp.), 톡소플라즈마 곤디이(Toxoplasma gondii), 트리키넬라 스피랄리스(Trichinella spiralis),* 및 *트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi).*

[0312] 구체예 71은 구체예 60에 따른 방법으로, 질병-관련 항원은 종양-관련 항원이다.

[0313] 구체예 72는 구체예 71에 따른 방법으로, 종양-관련 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 5-α-환원효소, α-태아단백질("AFP"), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자("BAGE"), β-카테닌, Bcl12, bcr-abl, 브라키우리, CA-125, 카스파제-8("CASP-8", 또한 "FLICE"로 알려져 있음), 카텝신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/$F_c\varepsilon$RII, CD33, CD35/보체 수용체 1("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원("LCA"), CD46/막 보조 인자 단백질("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/붕괴 촉진 인자("DAF"), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 암배아 항원("CEA"), c-myc, 사이클로옥시게나아제-2("cox-2"), 대장암 유전자("DCC")에서 삭제됨, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파네실 전이효소, 섬유아세포 성장 인자-8a("FGF8a"), 섬유아세포 성장 인자-8b("FGF8b"), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리("GAGE-패밀리"), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 갱글리오사이드 2("GD2")/갱글리오사이드 3("GD3")/갱글리오사이드-모노시알산-2("GM2"), 생식선자극호르몬 방출 호르몬("GnRH"), UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2 [GlcNAc - Man(α1-6)] β1,6-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V("GnT V"), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/티로신-관련 단백질-1("gp75/TRP-1"), 인간융모막성선자극호르몬("hCG"), 헤파라나제, Her2/neu, 인간 유방 종양 바이러스("HMTV"), 70 킬로달톤 열-충격 단백질("HSP70"), 인간 텔로머라제 역전사효소("hTERT"), 인슐린-유사 성장 인자 수용체-1("IGFR-1"), 인터루킨-13 수용체("IL-13R"), 유도성 일산화질소 합성효소("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-인코딩 유전자1("MAGE-1"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 2("MAGE-2"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 3("MAGE-3"), 흑색종 항원-인코딩 유전자 4("MAGE-4"), 맘마글로빈, MAP17, T-세포에 의해 인식되는 멜라닌-A/흑색종 항원-1("MART-1"), 메조텔린, MIC A/B, MT-MMP, 뮤신, 고환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), μPA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이에틴, 전립선-특이적 항원(PSA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 전립선 산성 인산가수분해효소(PAP), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파(TGF-α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β), 티모신-베타-15, 종양괴사인자-알파(TNF-α), TP1, TRP-2, 티로시나아제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), ZAG, p16INK4, 및 글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST).

[0314] 구체예 73은 구체예 57-64 중 어느 하나에 따른 방법으로, 항원 단백질은 EBV의 구조 및 비구조 단백질 중 하나이다.

[0315] 구체예 74는 구체예 73에 따른 방법으로, 항원성 단백질은 gp350, gH, gL, EBNA3A 및 BRLF1/BZLF1 융합체로부터 선택된다.

[0316] 구체예 75는 구체예 74에 따른 방법으로, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 4에 의해 인코딩된다.

[0317] 구체예 76은 구체예 57-75 중 어느 하나에 따른 방법으로, saRNA는 VRP, 바람직하게는 VEEV, 더 바람직하게는 TC83이다.

[0318] 구체예 77은 구체예 57-75에 따른 방법으로, MVA는 MVA-BN이다.

[0319] 구체예 78은 구체예 76에 따른 방법으로, 제1 조성물의 VRP는 gp350, gH 및 gL로 구성된 그룹에서 선택된 항원 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0320] 구체예 79는 구체예 78에 따른 방법으로, 항원 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 및 SEQ ID NO: 3에 의해 인코딩된다.

[0321] 구체예 80은 구체예 57-79 중 어느 하나에 따른 방법으로, 부스팅 조성물은 프라이밍 조성물을 투여한 후 1-12주 후에 투여된다.

[0322] 구체예 81은 구체예 57-81 중 어느 하나에 따른 방법으로, 부스팅 조성물은 대상자에게 2회 이상 투여된다.

[0323] 이제 본 발명의 예시적인 구체예에 대해 자세히 언급할 것이며, 그 실시예는 첨부 도면에 도시되어 있다.

[0324] **실시예**

[0325] 다음에 나오는 자세한 실시예는 본 발명에 대한 더 나은 이해에 기여하고자 한다. 그러나 본 발명은 실시예에 의해 제한되지 않는다. 본 발명의 다른 구체예는 본 명세서에 공개된 본 발명의 명세서 및 실시를 고려하면 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0326] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0327] **재조합 MVA, VRP(알파바이러스 레플리콘 입자) 및 아데노바이러스의 구축**

[0328] 다음 섹션에서는 엡스타인-바 바이러스 EBV 당단백질 및/또는 추가 EBV 단백질의 항원 결정인자를 발현하는 하나 이상의 이종 핵산을 포함하는 재조합 MVA, Ad 및 VRP의 구축을 설명한다. 여기에 설명된 다른 모든 구성물은 유사한 방법을 사용하여 만들어진다.

[0329] **MVA-mBN443B(MVA-BN-EBV)의 구축**

[0330] MVA-BN-EBV(MVA-mBN443B)는 변형 백시니아 안카라-바이에른 노르딕(Modified Vaccinia Ankara-Bavarian Nordic, MVA-BN®)벡터를 기반으로 하며 비구조 단백질 EBNA3A 그리고 초기 전사 활성화제 BRLF1/BZLF1의 융합체 뿐만 아니라 구조 당단백질(gp) gH 및 gL 그리고 유연한 링커와 멀티머 형성을 위한 GCN4 멀티머화 도메인을 갖춘 잘린 가용성 형태의 gp350(아미노산 2-434)을 인코딩한다. 뉴클레오타이드 서열은 코돈 최적화되고 합성되었으며 여기에는 프로모터 서열과 클로닝에 필요한 서열이 포함되었다. 개별 EBV 유전자는 해당 삽입 부위, 즉 유전자 간 영역(IGR 44/45 및 IGR 88/89)이 상동 재조합을 통해 삽입을 목표로 하는 경우 주변 MVA 서열과 상동한 서열을 갖는 전이 플라스미드에 복제되었다.

[0331] **VRP-BN011(알파바이러스 레플리콘 입자 기반 재조합 백신)의 구축**

[0332] 재조합 알파바이러스 레플리콘 입자 VRP-BN011은 3개의 EBV 항원을 인코딩하는 다가 재조합 VRP이다. VRP-BN011은 멀티머 형성을 위한 GCN4 멀티머화 도메인, gH 및 gL 단백질을 갖는 가용성 절단된 gp350(아미노산 2-434)을 발현하는 VEEV TC83 약독화 균주에서 유래된 레플리콘으로 구성된다. 기본은 VEEV의 TC83 백신 균주의 서열이며, 여기서 VEEV 바이러스 쉘 캡-env 다단백질 서열은 삭제되고 나열된 EBV 유전자로 대체된다. 세 개의 EBV 유전자는 개별 서열 사이에 2A 펩타이드가 있는 다단백질에 인코딩된다. T2A 및 P2A 펩타이드 서열은 세 개의 EBV 코딩 서열(종료 코돈이 없는 EBV gp350-GCN4 및 gH) 사이에 삽입되어 연장 단백질 사슬에서 누락된 펩타이드 링크를 유도하는 별도의 단백질을 생성한다. 또한 성숙 gH 단백질의 C-말단으로부터 P2A 서열을 절단하기 위해 gH 코딩 서열 바로 하류에 삽입된 퓨린 절단 부위가 있다.

[0333] 서열은 코돈 최적화 및 합성되었으며 VRP 스톡을 클로닝하는 데 필요한 시퀀스는 HEK293T 세포에 세 개의 플라스미드 (CMV 프로모터 구동 패키징 플라스미드, cap 또는 env를 코딩하고, 플라스미드에 EBV 유전자가 있는 CMV에서 발사된 재조합 레플리콘)를 형질전환하여 준비되었다. 상층액을 수확하여 자당 쿠션 정제에 적용했다. VRP 스톡은 감염에 의해 Vero 세포에서 여러 희석 단계를 거쳐 적정되었으며, 이후 이중 가닥 RNA dsRNA 복제 중간체를 dsRNA 특이적 마우스 단일클론 항체(J2, Jena Bioscience)로 염색하고 FACS로 분석했다.

[0334] **AdC68gp350(아데노바이러스 벡터 기반 재조합 백신) 구축**

[0335] 아데노바이러스 벡터(AdC68)는 유연한 링커와 멀티머 형성을 위한 멀티머화 도메인을 갖춘 잘린 가용성 형태의 EBV gp350 단백질을 발현한다(AdC68gp350).

[0336] **루미넥스(Luminex)의 다중 효소-결합 면역흡착 검사(ELISA)**

[0337] EBV 항원 gp350, gH/gL/gp42 복합체 및 gH에 대한 IgG 항체는 다중 ELISA를 통해 NHP 혈청 샘플에서 정량화된다. 이러한 목적을 위해, 루미넥스 마그네틱 마이크로스피어스(Luminex Magnetic Microspheres)는 제조업체의 지침(xMAP®Antibody Coupling Kit, Luminex)에 따라 gp350 단백질, gH/gL 복합체 또는 gH 단백질과 결합된다. 각 마이크로구는 고유하게 주소 지정이 가능하므로, 동일한 웰에서 동일한 샘플로 여러 면역 검사를 동시에 수행할 수 있다. 간단히 말해, EBV 항원 gp350, gH/gL/gp42 복합체 및 gH에 대한 NHP IgG 항체를 검출하기 위해 혈청을 항원-결합 마이크로구와 함께 배양한다. 다양한 혈청 희석액이 예상 항체 수준(1:200 - 1:20000)에 따라 테스트된다. 또한 분석에 표준이 포함된다(BioIVT에서 구매한 인간 혈청, lot# BRH1079042). 세척 단계 후, 검출 시약(검출 항체: 염소 F(ab')2 항-인간 IgG-Fc, PE 접합, 사전 흡수, Abcam, 카탈로그 번호 98596)을 항체-결합 마이크로구와 함께 배양한다. 추가 세척 단계 후 Multiplex ELISA 플레이트를 Luminex®200™ 시스템과 Luminex Xponent 3.1 소프트웨어를 사용하여 각각 측정하고 분석한다.

[0338] **중화 테스트**

[0339] NHP 혈청 샘플의 EBV-특이적 중화 항체는 유세포 분석 기반 중화 테스트로 정량화된다. 간단히 말해서, 테스트 혈청의 2배 연속 희석액을 준비하고 각 혈청 희석액에 정의된 양의 EBV를 첨가한다. 1시간 후, 혈청-바이러스 혼합물을 라모스(Ramos) 세포에 첨가한다. 감염된 라모스 세포는 EBV 단백질을 발현한다. 다음 날, 세포는 DAPI 및 단일 클론 EBV-특이 항체로 염색된다. EBV-양성 세포의 백분율은 LSR 포테사(Fortessa) 유세포 분석기를 사용하여 분석한다. 중화 항체가 포함된 혈청 샘플은 EBV 양성 세포의 백분율이 감소한다. 반대로, 중화 항체가 포함되지 않은 혈청 샘플은 항-EBV 염색 세포의 백분율이 가장 높다. 감염되지 않은 "세포 전용" 웰은 EBV 양성에 대한 게이트를 설정하는 데 사용된다. EBV 양성 세포의 백분율은 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 IC50 역가를 계산하는 데 사용된다.

[0340] **효소-결합 면역 흡착 검사(ELISA)**

[0341] 혈청 OVA-특이적 IgG를 결정했다. ELISA는 96웰 플레이트를 5㎍/ml OVA로 코팅한 다음 5% FCS/0.05% 트윈 20(Tween20)이 포함된 PBS로 차단하여 수행했다. HRP-접합 항체를 사용하여 IgG를 검출한 다음 TMB 기질을 검출했다. 흡광도를 450nm에서 측정했다. ELISA 역가는 선형 회귀 분석을 사용하여 결정되었고 Log10 역가를 계산했다.

[0342] **실시예 2: 실험 설계**

[0343] 본 분석의 목적은 사이노몰구스 원숭이(*Macaques fascicularis*)에게 4주 간격으로 2회 근육(IM) 투여한 MVA-BN-EBV, VRP-BN011 및 AdC68gp350을 이용한 다양한 프라임-부스트 백신접종 요법에 의해 유도된 EBV-특이적 IgG 및 중화 항체를 혈청에서 평가하고 비교하는 것이었다.

[0344] 12마리의 암컷 사이노몰구스 원숭이에게 투여 단계의 1일차와 29일차에 근육 주사(오른쪽 허벅지)를 통해 세 가지 다른 백신을 투여했다. 최종 부검을 6주 후에 실시했다.

[0345] 각 백신 투여에 대한 주요 연구 설계는 표 1에 요약되어 있다. 항체와 관련하여 면역원성을 확인하기 위해, EBV 항원 gp350에 대한 EBV-특이적 IgG 및 EBV 중화 항체를 각각 멀티플렉스(Multiplex) ELISA 및 유세포 분석 기반 검정법을 사용하여 확인했다. 투여-전, 2차 투여 전 및 2차 투여 2주 후(29일차, 43일차)의 비인간 영장류(NHP) 혈청 샘플을 분석했다.

[0346] **표 1**: 주요 연구 설계 및 그룹 과제.

표 1

그룹 번호	시험항목				투여경로	암컷 수	6 주 후 부검
	투여/ 1st 투여 1 일차	투여 부피	투여/ 2nd 투여 29 일차	투여 부피			
1	MVA-BN-EBV ($5x10^8$ $TCID_{50}$)	0.5 mL	MVA-BN-EBV ($5x10^8$ $TCID_{50}$)	0.5 mL	IM	3	3
2	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	MVA-BN-EBV ($5x10^8$ $TCID_{50}$)	0.5 mL	IM	3	3
3	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	IM	3	3
4	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	AdC68gp350 ($1x10^{11}$ vp)	0.5 mL	IM	3	3

[0347]

[0348] **실시예 3: 결과 및 결론**

[0349] 이후 섹션에서는 다음 약어를 사용했다:

AdC68gp350	아데노바이러스 벡터(AdC68)는 유연한 링커와 멀티머 형성을 위한 멀티머화 도메인을 갖춘 잘린 가용성 형태의 EBV gp350 단백질을 발현한다
EBV	엡스타인-바 바이러스
ELISA	효소 결합 면역흡착 검사
GCN4 gH gH/gL/gp42 복합체	효모 단백질 GCN4 유래 류신 지퍼 기반 멀티머화 도메인 EBV의 당단백질 H EBV gH/gL/gp42 복합체
gL gp350	EBV의 당단백질 L EBV 당단백질 350(여기서는 아미노산 2-434를 포함하는 가용성 버전을 사용했음)
Inf.U	감염 단위
IgG	면역글로불린 G
IC50	최대 억제 농도의 절반
IM	근육 내
LLOQ	정량 하한
MVA-BN	변형된 백시니아 안카라-바이에른 노르딕
MVA-BN-EBV	비구조 단백질 EBNA3A 그리고 초기 전사활성제 BRLF1/BZLF1의 융합체 뿐만 아니라 구조 당단백질(gp) gH 및 gL 그리고 유연한 링커와 멀티머 형성을 위한 멀티머화 도메인을 갖춘 잘린 가용성 형태의 gp350(아미노산 2-434)을 인코딩하는 MVA-BN 벡터
NHP	비인간 영장류
SOP	표준 운영 절차
VRP-BN011	VEEV-TC83 유래 레플리콘을 포함하고 유연한 링커와 멀티머 형성을 위한 GCN4 멀티머화 도메인을 갖춘 EBV 가용성 gp350(아미노산 2-434), gH 및 gL을 인코딩하고 VEEV-TC83 유래 외피 및 캡시드 단백질과 함께 패키징되는 재조합 VRP-BN
TU	전환 단위

[0350]

[0351] **실시예 4: NHP에서 Gp350-특이적 IgG 항체 반응**

[0352] EBV gp350-특이적 그룹 기하 평균 농도(GM)는 표 2와 도 2에 제시된다. 정량 하한(LLOQ)은 40 EU로 정의되었다. 40 EU 미만의 혈청 샘플은 20 EU로 음성으로 보고되었으며, 이는 LLOQ의 절반에 해당한다.

[0353] 모든 그룹(그룹 1 내지 4)의 투약 전 혈청 샘플은 음성이었다.

[0354] 29일차(첫 번째 투여 후 4주)에, 멀티플렉스 ELISA로 결정된 완전한 혈청 전환이 거의 모든 그룹의 NHP에서 감지되었다. 그룹 1(MVA/MVA)의 경우 3마리 중 1마리만 측정 가능한 gp350-특이적 IgG를 생성했다. 29일차에 그룹 2(VRP/MVA)와 그룹 4(VRP/Ad)에서 GM이 각각 3563, 3891 및 3731인 가장 높은 gp350-특이적 IgG 농도가 측정되었다.

[0355] 43일차(두 번째 투여 후 2주)에, 그룹 1(MVA/MVA)에서도 완전한 혈청 전환이 관찰되었다. 2차 투여는, 29일차의 각 항체 농도와 비교했을 때, gp350-특이적 항체 반응을 그룹 3(VRP/VRP)에서 4배 그리고 그룹 2(VRP/MVA)에서 7배 높였다. 그룹 2는 GM이 26.626(개별 농도 범위 14.406 내지 71453)으로 가장 높은 gp350-특이적 IgG 반응을 보였고, 그 뒤를 그룹 3(VRP/VRP)과 4(VRP/Ad)가 각각 GM이 4800(개별 농도 범위 1180 내지 15.032)이고 GM이 6090(개별 농도 범위 5179 내지 7225)이었다.

[0356] 이러한 결과는 Ad 또는 MVA를 부스트 백신접종으로 이종 조합한 경우에서 VRP가 gp350-특이적 항체 반응을 크게 증가시켰고 그리고 MVA 또는 VRP의 동종 조합은 gp350-특이적 항체 유도 측면에서 면역원성 효과가 가장 적었음

을 나타낸다.

[0357] **표 2:** 멀티플렉스 ELISA로 결정된 gp350-특이적 IgG 항체 농도 요약

표 2

[0358]

	그룹 1			그룹 2			그룹 3			그룹 4		
	MVA/MVA			VRP/MVA			VRP/VRP			VRP/Ad		
시간	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]
투여전	0	20	3	0	20	3	0	20	3	0	20	3
29 일차	100	40	3	100	3891	3	100	1110	3	100	3731	3
43 일차	100	2072	3	100	26626	3	100	4800	3	100	6090	3

[0359] [1]: % 혈청 전환율, [2]: 기하 평균 농도, [3]: NHP 수

[0360] **실시예 5: NHP에서 EBV-특이적 중화 항체 반응**

[0361] EBV-특이적 중화 항체 반응은 각 그룹의 모든 투약 전, 29일차 및 43일차 혈청 샘플에서 유세포 분석 기반 중화 시험을 통해 측정되었다. 중화 그룹 기하 평균 농도(GM)가 표 3과 도 3에 제시된다. LLOQ는 30의 최대 억제 농도 절반(IC50)으로 정의되었다. IC50이 30 미만인 혈청 샘플은 IC50이 15로 음성으로 보고되었으며, 이는 LLOQ의 절반에 해당한다.

[0362] 모든 그룹(그룹 1 내지 4)의 투약 전 혈청 샘플은 음성이었다.

[0363] 29일차(첫 번째 투여 후 4주)에 그룹 2(VRP/MVA)와 그룹 3(VRP/VRP)의 3마리 중 2마리에 대한 혈청 전환을 측정했고 그룹 4(VRP/Ad)에서 100% 혈청 전환이 감지되었다. 그룹 1(MVA/MVA) 동물은 이 시점에서 혈청 전환이 일어나지 않았다. 일반적으로, 각각의 주요 백신 접종과 무관하게 혈청 전환된 모든 동물의 중화 항체 농도는 29일차에 낮았다(GM < 50).

[0364] 43일차(2차 투여 후 2주)에 그룹 1(MVA/MVA)을 제외한 모든 그룹에서 완전한 혈청 전환이 관찰되었고, 3마리 중 2마리만이 측정 가능한 중화 항체를 생성했다.

[0365] 2차 투여가 부스팅되어 그룹 2(VRP/MVA)에서 중화 항체 수치를 14배 증가시켰다. 가장 낮은 부스트 효과는 그룹 1(MVA/MVA; 3배), 그룹 3(VRP/VRP; 4배), 그룹 4(VRP/Ad; 4배)에서 나타났다. GM이 605(개별 농도 범위 372 내지 1572)인 가장 높은 중화 농도는 그룹 2(VRP/MVA)에서 측정되었다. 그룹 4(VRP/Ad), 그룹 3(VRP/VRP) 및 그룹 1(MVA/MVA)은 각각 GM이 176(개별 농도 범위 145 내지 219), GM이 118(개별 농도 범위 31 내지 256), GM이 49(개별 농도 범위 15 내지 214)로 가장 낮은 중화 항체 수치를 보였다.

[0366] 이러한 결과는 멀티플렉스 ELISA로 측정한 gp350-특이적 IgG 반응과 상관관계가 있다: VRP는 이종 프라임-부스트 조합에서 중화 항체 반응을 크게 증폭했다. MVA 또는 VRP를 사용한 동종 프라임-부스트 요법은 면역원성이 가장 낮았다.

[0367] **표 3:** 중화 항체의 요약

표 3

[0368]

	그룹 1			그룹 2			그룹 3			그룹 4		
	MVA/MVA			VRP/MVA			VRP/VRP			VRP/Ad		
시간	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]
투여전	0	15	3	0	15	3	0	15	3	0	15	0
29 일차	0	15	3	67	42	3	67	29	3	100	48	100
43 일차	67	49	3	100	605	3	100	118	3	100	176	100

[0369] [1]: % 혈청 전환율, [2]: 기하 평균 농도, [3]: NHP 수

[0370] 요약하면, VRP를 프라임 백신접종으로, MVA를 부스터 백신접종으로 사용한 이종 프라임-부스트 요법은 gp350-특이적 IgG 및 중화 항체 측면에서 매우 면역원성이 높았고, MVA 또는 VRP를 사용한 동종 백신접종 요법은 면역원성이 가장 낮았다. 백신 후보와 무관하게 단일 백신접종은 강력한 중화 항체 반응을 유도하기에 충분하지 않았다.

[0371] **실시예 6: NHP에서 EBV-특이적 T 세포 반응**

[0372] EBV-특이적 T 세포 반응은 각 그룹의 모든 투약 전, 29일차 및 43일차 혈액 PBMC 샘플에서 ELISPOT을 통해 측정되었다. 도 4에는 $1x10^6$ PBMC 당 점 형성 단위(SFU)가 나와 있다.

[0373] 그룹(그룹 1 내지 3)의 투약 전 혈청 샘플은 그룹 4를 제외하고 LLOQ 미만이었다.

[0374] 첫 번째 투여 후 8일차에 모든 4개 그룹에서 검출 가능한 Gp350-특이적 T 세포 반응이 나타났으며 그룹 간에 큰 차이는 없었다. 두 번째 백신접종은 그룹 1(MVA/MVA), 그룹 3(VRP/VRP) 및 그룹 4(VRP/Ad)에서 Gp350-특이적 T 세포 반응을 더 이상 향상시키지 않았지만 그룹 2(VRP/MVA)는 $1x10^6$ PBMC 당 SFU가 더 증가했다(도 4). 이 데이터는 VRP/MVA의 이종 면역접종이 항체 유도에서 뛰어났을 뿐만 아니라 가장 높은 EBV-특이적 T 세포 반응을 가져왔다는 것을 보여준다.

[0375] **실시예 7: 마우스에서 EBV특이적 T 세포 반응**

[0376] T 세포 면역원성을 평가하기 위해, 마우스는 동종 또는 이종 조합의 MVA-EBV 또는 VRP-EBV를 사용하여 0일차와 21일차에 프라임/부스트 면역접종을 받았다(표 4 참조). 실험은 부스트 후 2주 후에 종료되었다.

[0377] **표 4:** 마우스에서의 VRP-EBV/MVA-EBV 프라임/부스트 연구 설계

표 4

[0378]

프라임 (0 일차)	부스트 (21 일차)
PBS	PBS
MVA-EBV	MVA-EBV
VRP-EBV	MVA-EBV
VRP-EBV	VRP-EBV

[0379] 이 실험 이전에 Gp350 내의 면역 우성 펩타이드는 펩타이드 라이브러리 스크리닝 접근법을 사용하여 식별되었다. 이를 통해 3개의 펩타이드(펩타이드 1, 펩타이드 25 및 펩타이드 26이라고 함)가 면역접종 후 T 세포에 의해 효율적으로 인식되는 것으로 확인되었다(데이터 미표시). 따라서 이 3개의 펩타이드가 다음에 보고된 실험에서 ELISPOT 및 6시간 재자극 검정에 사용되었다. 도 5는 MVA/MVA 또는 VRP/VRP의 동종 면역접종이 EBV에 대한 T 세포 반응을 거의 유도하지 않았음을 보여준다. 이와 대조적으로, VRP 다음에 MVA가 후속되는 이종 면역접종은 이 면역접종 요법에 의한 강력한 EBV-특이적 T 세포 유도를 나타내는 $SFU/1x10^6$ 비장세포의 수를 크게 증가시켰다. 주목할 점은 펩타이드 25와 26이 펩타이드 1보다 우세했다는 것이다.

[0380] **실시예 8: 마우스에서 OVA-특이적 T 세포 반응**

[0381] VRP와 MVA 플랫폼의 이종 조합의 이점이 EBV가 아닌 다른 항원에도 확장되는지 조사하기 위해 또 다른 실험이 설정되었다. 이 실험에서는 모델 항원 오발부민(OVA)이 선택되었고 그에 따라 MVA-OVA와 VRP-OVA가 면역접종에 사용되었다(표 5 참조). T 세포 면역원성을 평가하기 위해, 마우스는 동종 또는 이종 조합의 MVA-OVA 또는 VRP-OVA를 사용하여 0일차와 21일차에 프라임/부스트 면역접종을 받았다(표 5 참조). 실험은 부스트 후 2주 후에 종료되었다.

[0382] **표 5:** 마우스에서의 VRP-OVA/MVA-OVA 프라임/부스트 연구 설계

표 5

프라임 (0 일차)	부스트 (21 일차)
PBS	PBS
MVA-OVA	MVA-OVA
VRP-OVA	VRP-OVA
VRP-OVA	MVA-OVA

[0383]

[0384] 주요 판독 결과는 부스트 면역접종 5일 후 말초 혈액에서 CD8 T 세포 반응이었고, OVA의 우성 및 준우성 에피토프에 대한 비장세포의 펩타이드 재자극은 생쥐 희생 당일(부스트 4주 후)에 수행되었다.

[0385] 부스트 5일 후, 그룹이 동종 및 이종 처리로 나뉘었을 때, 이종 처리가 가장 강한 반응을 보였다(그림 6). 이 시점에서 VRP-OVA를 사용한 동종 처리가 동종 MVA-OVA 처리(MVA/MVA)보다 더 높은 반응을 보이는 경향을 보였지만, 이는 통계적으로 유의미하지 않았다. 이와 대조적으로, MVA-OVA 면역접종으로 초기 VRP-OVA 면역접종을 부스트한 경우 혈액에서 부스트 5일 후 MVA/MVA 처리와 VRP/VRP 처리에 비해 OVA-특이적 CD8 T 세포가 상당히 더 강하게 확장되었다(그림 6).

[0386] 부스트 4주 후에 비장세포에서 초기 기억 반응을 테스트했다. 이를 위해 비장세포는 OVA257-264 SIINFEKL 펩타이드와 OVA55-62 아우세 펩타이드로 재자극되었다. 도 7에서 볼 수 있듯이 VRP-OVA 프라임 면역접종과 MVA-OVA 부스트 면역접종을 조합하면 OVA257-264 펩타이드와 OVA55-62 펩타이드 모두에 대해 가장 강한 반응이 나타났다.

[0387] 흥미롭게도, 모든 치료 조합이 단독으로 OVA257-264 펩타이드 특이적 반응을 유도할 수 있는 반면, 준우성 OVA55-62 펩타이드에 대한 반응은 이종 조합 그룹에서만 감지할 수 있었다. 이는 VRP-OVA 프라이머 면역접종과 MVA-OVA 부스트 면역접종을 결합하면 더 강력하고 광범위한 면역 반응이 나타나는데, 이는 동일한 치료법 자체로는 달성하기 힘든 결과임을 나타낸다.

[0388] **실시예 9: 마우스에서의 OVA 특이적 CD8 T 세포 반응**

[0389] 또한, VRP-OVA와 MVA-OVA 플랫폼의 동종 또는 이종 조합에 의해 유도된 OVA 특이적 항체 생성을 테스트했다. 항체 면역원성을 평가하기 위해, 마우스는 동종 또는 이종 조합의 MVA-OVA 또는 VRP-OVA를 사용하여 0일차와 21일차에 프라임/부스트 면역접종을 받았다(표 5 참조). 항체 생성은 프라임 및 부스트 면역접종 후 각각 14일차과 35일차, 14일차에 혈청에서 측정했다. 도 8에서 볼 수 있듯이, 14일차에 가장 높은 총 IgG 역가와 완전한 혈청 전환은 VRP-OVA로 면역접종했을 때 달성되었지만, MVA-OVA 면역접종된 마우스는 항체 반응이 약간 약했다. 부스트 면역화(35일차) 후, 모든 치료군에서 OVA-특이적 항체 수치가 증가했고 완전한 혈청 전환을 보였지만, VRP-OVA 프라임 면역접종을 MVA-OVA 면역접종으로 부스트하는 데는 분명한 이점이 있었다.

[0390] 요약하면, VRP-OVA 프라임 면역접종과 MVA-OVA 부스트 면역접종을 조합하면 말초 혈액에서 항원 특이 CD8+ T 세포 확장이 향상되고 우성 및 반우성 OVA 에피토프에 대한 항원-특이적 CD8+ T 세포 정성적 반응이 증가한다. 이종 VRP/MVA 면역접종의 이점은 항체 유도 측면에서도 관찰되었다.

[0391] **실시예 10: 마우스에서 Gp350-특이적 T 세포 반응**

[0392] 지금까지 위의 실험은 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV)를 기반으로 하는 VRP로 수행되었다. 그러나 VRP는 다른 알파바이러스를 기반으로 할 수도 있다. 따라서 셈리키 숲 바이러스(Semliki Forest Virus, SFV) 기반 VRP를 생성하여 이 유형의 VRP도 면역 반응을 강력하게 유도할 수 있는지 또는 VEEV 기반 VRP보다 면역원성이 더 강한지 조사했다. 이를 위해 EBV 항원 gp350, gH 및 gL(SFV-VRP-EBV)을 발현하는 SFV 기반 VRP의 면역원성을 테스트했다.

[0393] T 세포 면역원성을 평가하기 위해, 마우스는 동종 또는 이종 조합의 MVA-EBV 또는 SFV-VRP-EBV를 사용하여 0일

차와 21일차에 프라임/부스트 면역접종을 받았다(표 6 참조). 실험은 부스트 후 2주 후에 종료되었다.

[0394] **표 6:** 마우스에서의 SFV-VRP-EBV/MVA-EBV 프라임/부스트 연구 설계

표 6

[0395]

프라임 (0 일차)	부스트 (21 일차)
PBS	PBS
MVA-EBV	MVA-EBV
SFV-VRP-EBV	MVA-EBV
SFV-VRP-EBV	SFV-VRP-EBV

[0396] 이 실험 이전에 Gp350 내의 면역 우성 펩타이드는 펩타이드 라이브러리 스크리닝 접근법을 사용하여 식별되었다. 이를 통해 3개의 펩타이드(펩타이드 1, 펩타이드 25 및 펩타이드 26이라고 함)가 면역접종 후 T 세포에 의해 효율적으로 인식되는 것으로 확인되었다(데이터 미표시). 따라서 이 3개의 펩타이드가 다음에 보고된 실험에서 ELISPOT 및 6시간 재자극 검정에 사용되었다. 도 9는 MVA/MVA의 동종 면역접종이 EBV에 대한 T 세포 반응을 거의 유도하지 않았음을 보여준다. 이와 대조적으로 SFV-VRP는 EBV에 대한 높은 EBV 특이적 T 세포 반응을 유발했다(도 9). 중요한 점은, SFV-VRP 다음에 MVA가 후속하는 이종 면역접종은 이 면역접종 요법에 의한 강력한 EBV-특이적 T 세포 유도를 나타내는 SFU/1x10^6 비장세포의 수를 크게 증가시켰다. 주목할 점은 펩타이드 25와 26이 펩타이드 1보다 우세했다는 것이다.

[0397] 결론적으로, 베네수엘라 말뇌염 바이러스(VEEV)나 셈리키 숲 바이러스(SFV)를 기반으로 하는 VRP의 이종 면역접종은 백신으로 인코딩된 항원에 특이적인 T 세포의 강력한 유도제이다.

[0398] **서열**

[0399] **SEQ ID NO: 1** gp350 멀티머(1455개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열.

[0400] atggaagcagctctgctcgtgtgccagtacaccatccagagcctgatccacctgacaggagaggatcctggcttcttcaacgtggaaatcccagagtttccc
ttctaccctacctgcaacgtgtgcacagccgacgtgaacgtgaccatcaacttcgacgttggaggcaagaagcaccagctggacctggatttcggacagctg
acacctcacaccaaggctgtgtatcagcctagaggagcctttggtggcagcgagaacgccaccaacctgtttctgctggaactgcttggagctggcgagctc
gcactgaccatgagaagcaagaaactgcccatcaatgtgaccacaggcgaggaacagcaggtgtccctggaaagcgtggacgtgtactttcaagacgtgttc
ggcaccatgtggtgccaccacgccgagatgcagaaccctgtgtacctgatcccagagacagtgccctacatcaagtgggacaactgcaacagcaccaacatc
acagccgtcgtgagagctcagggactggatgtgacactgcctctgagcctgcctaccagtgcccaggacagcaacttcagcgtgaagaccgagatgctgggc
aacgagatcgacatcgagtgcatcatggaagatggcgagatcagccaggtgctgcctggcgacaacaagttcaacatcacatgcagtggctacgagagccac
gtgccatctggaggcatcctgaccagcacaagcccagtggccacacccatccctggcacaggctacgcctacagcctgagactgacacccagacccgtgtcc
agattcctgggcaacaacagcatcctgtacgtgttctactctggcaacggacccaaggcctctggtggcgattactgtatccagagcaacatcgtgttcagc
gacgagatccctgccagccaggacatgccaaccaataccaccgacatcacctacgtgggagacaatgccacctacagcgtgcccatggtcacctccgaggac
gccaacagccctaatgtgaccgtgacagccttctgggcatggcctaacaacaccgagacagacttcaagtgcaagtggaccctgacctctggcacacctagt
ggctgcgagaatatcagcggagccttcgccagcaaccggaccttcgatatcaccgtgtctggccttggcacagctcccaagaccctgatcatcaccaggact
gccaccaatgccacaaccacaacccacaaagtgatcttcagcaaggctcctgagagcaccacaactagtcctacactgcctaagcccagcacacctcctggc
agctcttgtggaggcatgaaagtgaagcagctggtggacaaggtggaagaactgctgagcaagaactaccacctcgtgaatgaggtggcacggctcgtgaag
ctcgtgggagaaagaggtggctgatag

[0401] **SEQ ID NO: 2** gH(2121개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열.

[0402] atgcagctgctgtgcgtgttctgcctggtgctgctgtgggaagtgggagctgccagcctgagcgaagtgaagctgcacctggacatcgagggccacgccagc
cactacaccatcccttggacagagctgatggccaaggtgcctggactgtctcctgaagctctgtggcgagaagccaacgtgaccgaggatctggcttccatg
ctgaaccggtacaagctgatctacaagaccagcggaaccctgggaatcgctctggcagagcctgtggatatccctgctgtgtctgagggcagcatgcaggtg
gacgccagcaaagtgcacccaggagtgatcagcggactgaatagtcctgcctgtatgctgagcgctcctctggaaaagcagctgttctactacatcggcacc
atgctgcctaacaccagaccccacagctacgtgttctaccagctgcggtgccacctgagctacgtcgctctgagcatcaacggagacaagttccagtacacc

ggagctatgaccagcaagttcctgatgggtacctacaagagagtgaccgagaagggagacgaacacgtgctgagcctggtgttcggcaagaccaaggacctg
cctgacctgagaggacccttcagctaccctagcctgacaagcgctcagagcggagactacagcctcgtgatcgtgaccaccttcgtgcactacgccaacttc
cacaactacttcgtgcccaacctgaaggacatgttcagcagagccgtgaccatgacagctgccagctacgccagatacgtgctgcagaaactggtgctgctg
gaaatgaagggaggatgcagagagcctgagctggacaccgagacactgacaaccatgttcgaggtgtccgtggccttcttcaaagtgggacacgctgtggga
gagacaggcaatggctgtgtggacctgagatggctggccaagagcttcttcgagctgaccgtgctgaaggatatcattggcatctgctacggagccaccgtg
aagggcatgcagagctacggactggaaagactggcagctatgctgatggctaccgtgaagatggaagaactgggacacctcaccacagagaagcaggaatac
gctctgagactggccaccgtgggctatcctaaagctggagtgtactccggactgatcggtggagctacaagcgtgctgctgagtgcctacaaccgacaccct
ctgttccagcctctgcacaccgtgatgagagagacactgttcatcggaagccacgtggtgctgcgagagctgagactgaatgtgaccacacagggacctaac
ctggctctgtatcagctgctgagcaccgctctgtgtagcgctctggagatcggagaggtgctgagaggactggctctgggcacagagagcggactgttcagc
ccttgctacctgagcctgagattcgacctgaccagagacaagctgctgtccatggctcctcaggaagccacactggatcaggcagccgtgtccaacgctgtg
gatggctttctgggacgactgtcactggaaagagaggacagggacgcctggcatctgcctgcctataagtgcgtggaccgactggacaaggtgctgatgatc
attcccctgatcaatgtgaccttcatcatcagctccgaccgagaggtgcgaggcagtgccctgtatgaagccagcaccacatacctgagcagcagcctgttc
ctgagccctgtgatcatgaacaagtgcagccagggagctgtggctggagagcctagacagatccccaagatccagaacttcacccgaacccagaagtcctgc
atcttctgtggcttcgctctgctgtcctacgacgagaaagagggactggaaaccaccacctacatcaccagccaggaagtgcagaacagcatcctgtccagc
aattacttcgacttcgacaacctgcatgtgcactacctgctgctgaccacaaacggcacagtgatggaaatcgctggactgtacgaggaacgagctcatgtg
gtgctggccatcatcctgtactttatcgcctttgctcttgggatcttcctggtgcacaagatcgtgatgttcttcctgtga

[0403] **SEQ ID NO: 3** gL(414개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열.

[0404] atgagagccgtgggagtgttcctggccatctgcctcgtgaccatcttcgtgctgcccacctggggtaactgggcttacccttgttgccacgtgacccagctg
agagcccagcatctgctggcactggagaacatcagcgacatctacctggtgtccaaccagacctgcgacggcttcagcctggcatccctgaacagtcccaag
aacggcagcaatcagctcgtgatctccagatgtgccaacggactgaacgtggtgtccttcttcatctccatcctgaagcggagcagcagcgctctgacaggc
cacctgagagagctgctgaccaccctggaaaccctgtacggcagcttcagcgtggaagatctgttcggagccaacctgaacagatacgcctggcacagagga
ggctga

[0405] **SEQ ID NO: 4** BZLF1-BRLF1(2283개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열.

[0406] atgagcctggtgtccgactactgcaacgtgctgaacaaagagttcacagctggcagcgtggaaatcactctgcggagctacaagatctgcaaggccttcatc
aacgaggccaaggctcatggcagagaatggggtggactgatggccaccctgaacatctgcaatttctgggctatcctgcggaacaacagagtgagacggaga
gccgagaacgctggcaatgatgcctgctctatcgcctgtcctatcgtgatgagatacgtgctggaccacctgatcgtcgtgaccgaccggttcttcatccaa
gctcccagcaatagagtgatgattcctgccaccatcggcacagccatgtacaagctgctgaagcacagtagagtgagagcctacacctacagcaaggtgctg
gagtggacagagcagccatcatggctagtggcaaacaggtggtggaacacctgaaccggatggagaaagagggactgctgagcagcaagttcaaggccttc
tgcaagtgggtgttcacctaccctgtgctggaagagatgttccagaccatggtgtccagcaagacaggacacctgaccgacgacgtgaaagatgtgagagct
ctgatcaagacactgcccagagccagctacagctctcacgcaggtcagagaagctacgtgtcaggcgtgctgcctgcatgtctgctgtccaccaagagcaag
gctgtggaaacacccatcctggtgtctggagccgacagaatggacgaagaactgatgggcaacgacggtggagccagccatacagaggccagatactctgag
tctggccagttccacgccttcaccgacgagctggaaagcctgcctagccctaccatgcctctgaaacctggagcccagtctgccgactgtggcgatagctcc
tcttcaagcagtgacagtggcaacagcgataccgagcagagcgagagagaagaggctagagccgaagctcctagactgagagcacccaagagcagaagaacc
agcagacccaacagaggacagacaccctgtccttctaacgctgcagagcctgagcagccttggattgctgccgtgcaccaggaaagcgacgagagacctatc
ttcccacatcccagcaagccaaccttcctgatgttcgatcctgctcctgaggcaggctctgccatctccgatgtgttcgagggacgggaagtgtgccagccc
aagcggatcagacccttccatcctcctggaagcccttgggctaacagacctctgccagcctctcttgctccaacacctacaggacctgtgcacgagcctgtg
ggcagcctgacaccagctccagtgcctcagcctctggatccagctcctgccgtgacacctgaggccagccatctgctggaagatcccgacgaagagacaagc
caggcagtgaaggccctgagagagatggctgatacagtgatcccacagaaagaagaggcagccatttgtggccagatggacctgtctcaccctccacctaga
ggccacctggatgagctgaccacaaccctggaatccatgaccgaggacctgaacctggacagccctctgactcccgagctgaacgagatcctggacacctttt
ctgaacgacgagtgcctgctgcacgccatgcacatcagcaccggagacagcatcttcgacaccagcctgttcatgatggaccctaacagcaccagcgaggac
gtgaagttcactcccgacccttaccaggtgcccttcgtgcaggccttcgatcaggccaccgagaatgcctgcagaagtgcctacaagcaggacgaccagcac
tacagagagcctgagcctctgcctcagggacagctgacagcctaccacgtgtcacagcctgcacccgagaacgcctaccaggcctatgctgcacctcagctg
tttcccgtgtccgacatcacccagaaccaacagaccaaccaggctggaggcgaagctcctcagcctggcgataatagcaccgtgcagacagctgcagctgtg
gtgtttgcttgccctggagctaatcagggtcagcagctggcagatattggcgtgccacagccagcacctgtggctgctcctgccagaaggaccagaaagcct
cagcaacccgagagcctggaagagtgcgacagcgaactggaaatcaagcggagcgagaacgacagactggaactgctgctgaaacagatgtgtcccagcctg
gacgtggactccatcatccctagaacacccgactgataa

[0407] **SEQ ID NO: 5** EBNA3A(2892개 뉴클레오타이드)의 핵산 서열.

[0408] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgacaaggacagacctggaccacctgccctggacgacaac

atggaagaggaagttcccagcaccagcgtggtgcaggaacaggtgtcagctggcgactgggagaacgtgctgatcgagctgagcgacagcagcagcgagaaa
gaggctgaggacgcacatctggaacctgctcagaaaggcaccgtggaccatgatgctggaggctctgctccagccagacctatgctgcctcctcagcctgat
ctgcctggcagagaggccatcctgagaagattcccactggacctgcggaccctgctgcaggctattggagcagctgccacacggatcgacaccagagccatc
gaccagttcttcggcagccagatcagcaacaccgagatgtacattatgtacgccatggccatcagacaggccattagggatcaggccaaatggaggctgcag
acactggctgcaggctggccgatgggttaccaggcctacagcagctggatgtacagctacaccgaccaccagaccacacccaccttcgtgcatctgcaagca
gcagctggagctactggagggagaagatgccacgtgacattcagtgctggcaccttcaagctgcccagatgcacacctggagacagacagtggctgtacgtg
cagtctagcgtgggcaacatcgtgcagagctgcaaccctcggtacagcatcttcttcgactacatggccattcaccggtctctgaccaagatctgggaagag
gtgctgacaccagaccagagagtgtcctttatggaattcctgggcttcctgcagcggaccgacctgagctacatcaagagcttcgtgtccgacgctctgggc
accaccagcatccagactccctggatcgacgacaaccctagcacagaaacagctcaggcttggaacgcaggcttcctgagaggcagagcctacggcatcgac
ctgctgagaacagagggagagcatgtggaaggagctaccggtgaaaccagagaggaaagcgaggacaccgagagcgacggagacgacagactgctgctgatg
accgagcaaggcaaagaagtgctggagaaggccagaggctccacctacggcacacctagacctcctgtgcccaagcctagacctgaggtgccacagagcgac
gagacagccacatctcacggctctgcccaggtgcctgagccacctacaattcatctggcagctcagggcatggcctacccactgcatgaacagcacggcatg
gctccttgtcctgtggctcaggcacctcctacacctctgcctcctgtgtctcctggcgatcagctgcctggcgtgttcagcgacggaagagtggcctgtgct
cctgttcctgcacctgcaggaccaattgtgagaccttgggagcctagcctgacacaggctgcaggacaggcctttgctccggtgagacctcagcacatgcct
gtggaacctgtgccagtgcctaccgttgccctggaaagacccgtgtaccctaagcctgtgaggccagctccacccaagattgccatgcagggacctggtgag
acaagtggcatttggaggcctgctccttggacacccaatccacctagaagcccttcgcagatgagcgtgctgagagccgaggcacaagtgaagcaggccagc
gtggaagtgcagccacctcagctgactcaggtgtcacctcagcagcccatggagggacctctggtacctgagcagcagatgtttcctggtgctccttcagc
caggtggctgatgtcgtgagggctcctggcgtgccagctatgcagccacagtacttcgacctgcctctgatccagcccatcagccagggagcaccagtggct
cctctgagagcctctatgggacctgtgcctccagtgccagcaacccagcctcagtatttcgatatccctctgaccgagcctatcaatcagggagcctctgca
gcacacttcctgccacagcagcctatggagggaccactggtgcctgaacaatggatgttcccaggagctgctctgagccagtctgtgagaccaggcgtggca
cagagccagtactttgatctgcctctgacacagccaatcaaccacggagcacctgctgctcactttctgcaccaacctccaatggaaggtccttgggtacca
gagcagtggatgtttcagggagctcctcctagccagggcaccgatgtggtgcagcatcagctggacgctctgggctacacactgcacggactgaatcatcca
ggtgtgccagtgtctccagccgttaatcagtaccacctgagccaggctgccttcggcctgcccattgatgaggatgagagcggagagggcagcgacacatct
gagccttgcgagatccacggcagaccctgtcctcaggcaccagaatggccagttcaggaagaaggaggccaggacgccaccgagattcacggaaggcctaga
cccagaactcctgagtggccagtgcagggagagggtggacagaatgtggctggtcctgagactagacgggtggtggtgtctgctgtggtgcacatgtgtcag
gacgacgagttccctgacctgcaggatcctcctgatgaggccggaggggggtggctctggtgggggagggtccggcggaggcggttcagctgtgggccaggac
acgcaggaggtcatcgtggtgccacactccttgccctttaaggtggtggtgatctcagccatcctggccctggtggtgctcaccatcatctccctttatcatc
ctcatcatgctttggcagaagaagccacgttgataa

[0409] **SEQ ID NO: 6** loxPV 부위 하나의 핵산 서열.

[0410] ATAACTTCGTATAGGATACTTTATACGAAGTTAT

[0411] **SEQ ID NO: 7** Pr13.5 긴 프로모터의 핵산 서열.

[0412] taaaaatagaaactataatcatataatagtgtaggttggtagtattgctcttgtgactagagactttagttaaggtactgtaaaaatagaaactataatcat
ataatagtgtaggttggtagta

[0413] **SEQ ID NO: 8** PrS 프로모터의 핵산 서열.

[0414] aaaaattgaaattttatttttttttttttggaatataa

[0415] **SEQ ID NO: 9** PrH5m 프로모터의 핵산 서열.

[0416] taaaaattgaaaataaatacaaaggttcttgagggttgtgttaaattgaaagcgagaaataatcataaataatttcattatcgcgatatccgttaagtttgt
atcgta

[0417] **SEQ ID NO: 10** Pr1328 프로모터의 핵산 서열.

[0418] tatattattaagtgtggtgtttggtcgatgtaaaatttttgtcgataaaaattaaaaaataacttaatttattattgatctcgtgtgtacaaccgaaatc

[0419] **SEQ ID NO: 11** 2A 펩타이드(T2A)의 핵산 서열.

[0420] AGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCT

[0421] **SEQ ID NO: 12** 2A 펩타이드(P2A)의 핵산 서열.

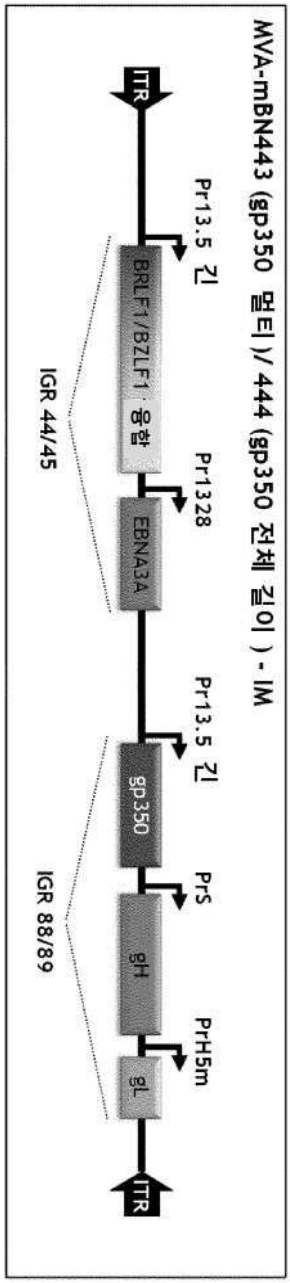
[0422] GGATCCGGCGCCACCAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGATGTGGAAGAGAATCCAGGCCCT

[0423] SEQ ID NO: 13 유연한 링커와 GCN4 다중화 도메인의 핵산 서열.

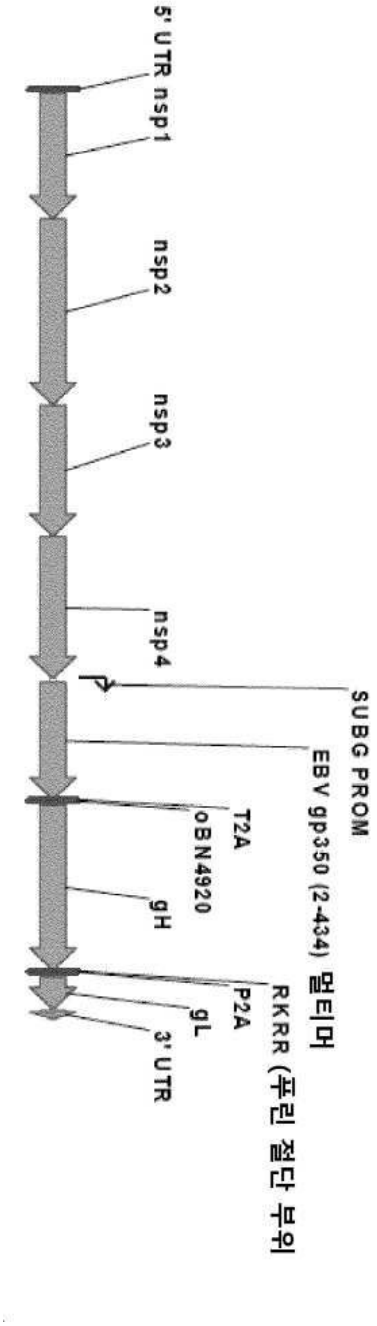
[0424] CCTAAGCCCAGCACACCTCCTGGCAGCTCTTGTGGAGGCATGAAAGTGAAGCAGCTGGTGGACAAGGTGGAAGAACTGCTGAGCAAGAACTACCACCTCGTG
AATGAGGTGGCACGGCTCGTGAAGCTCGTGGGAGAAAGAGGTGGC

도면

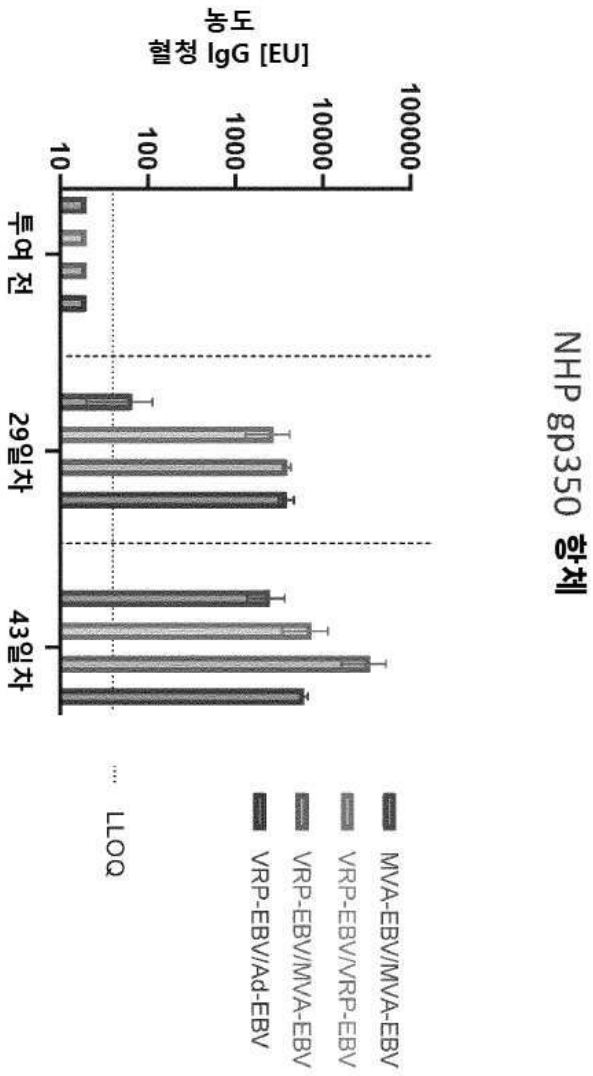
도면1a



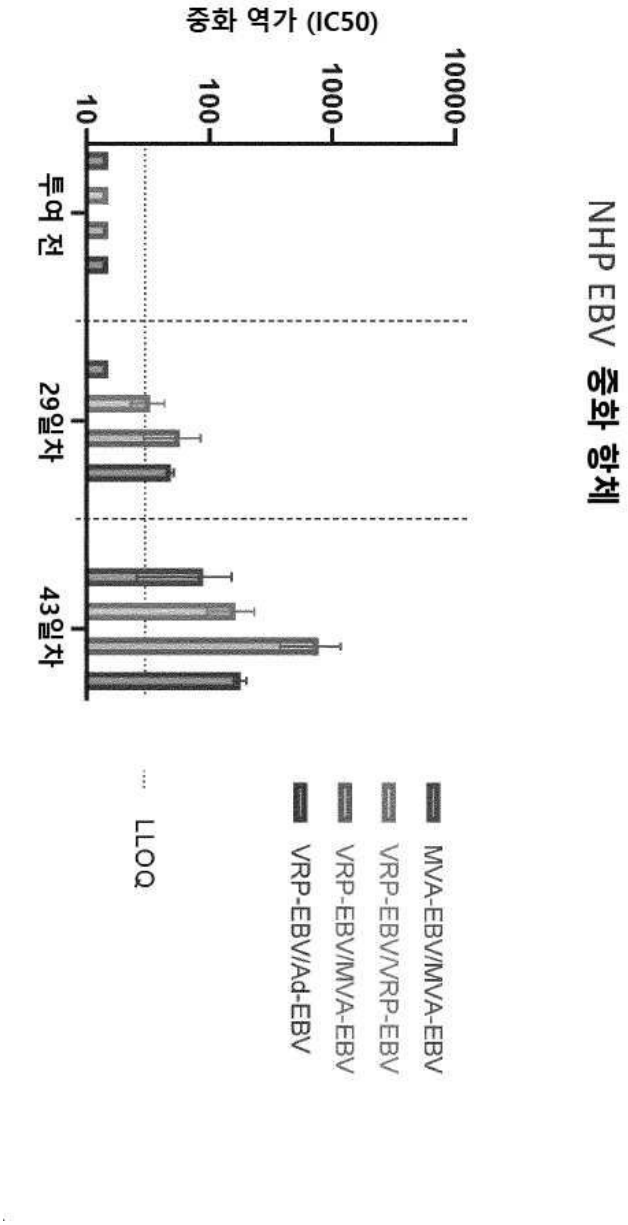
도면1b


5' UTR
nsp1
nsp2
nsp3
nsp4
SUBG PROM
EBV gp350 (2-434) 멀티머
T2A
oBN4920
gH
P2A
RKRR (퓨린 절단 부위)
gL
3' UTR

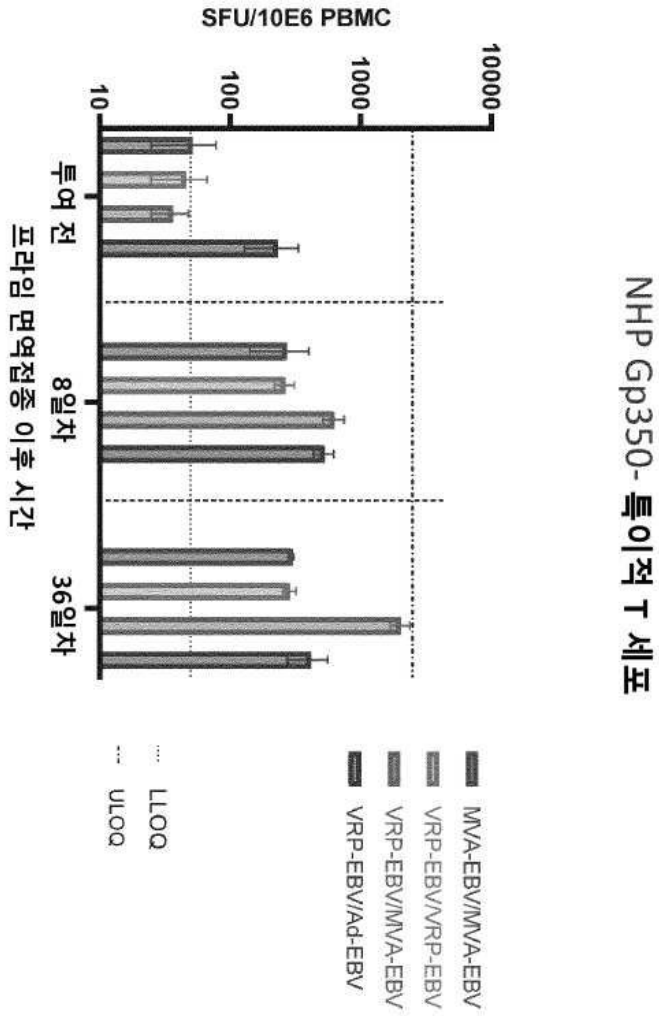
도면2


NHP gp350 항체
농도
혈청 IgG [EU]
100000
10000
1000
100
10
투여 전
29일차
43일차
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/VRP-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/Ad-EBV
LLOQ

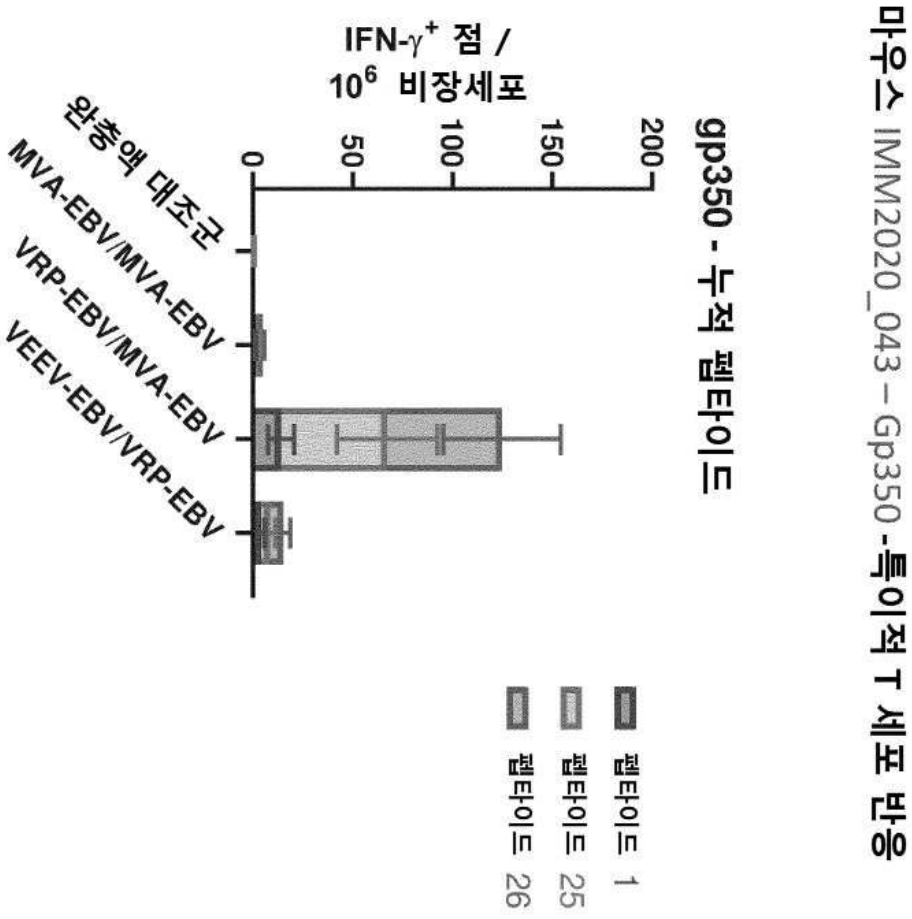
도면3


NHP EBV 중화 항체
중화 역가 (IC50)
10000
1000
100
10
투여 전
29일차
43일차
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/VRP-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/Ad-EBV
LLOQ

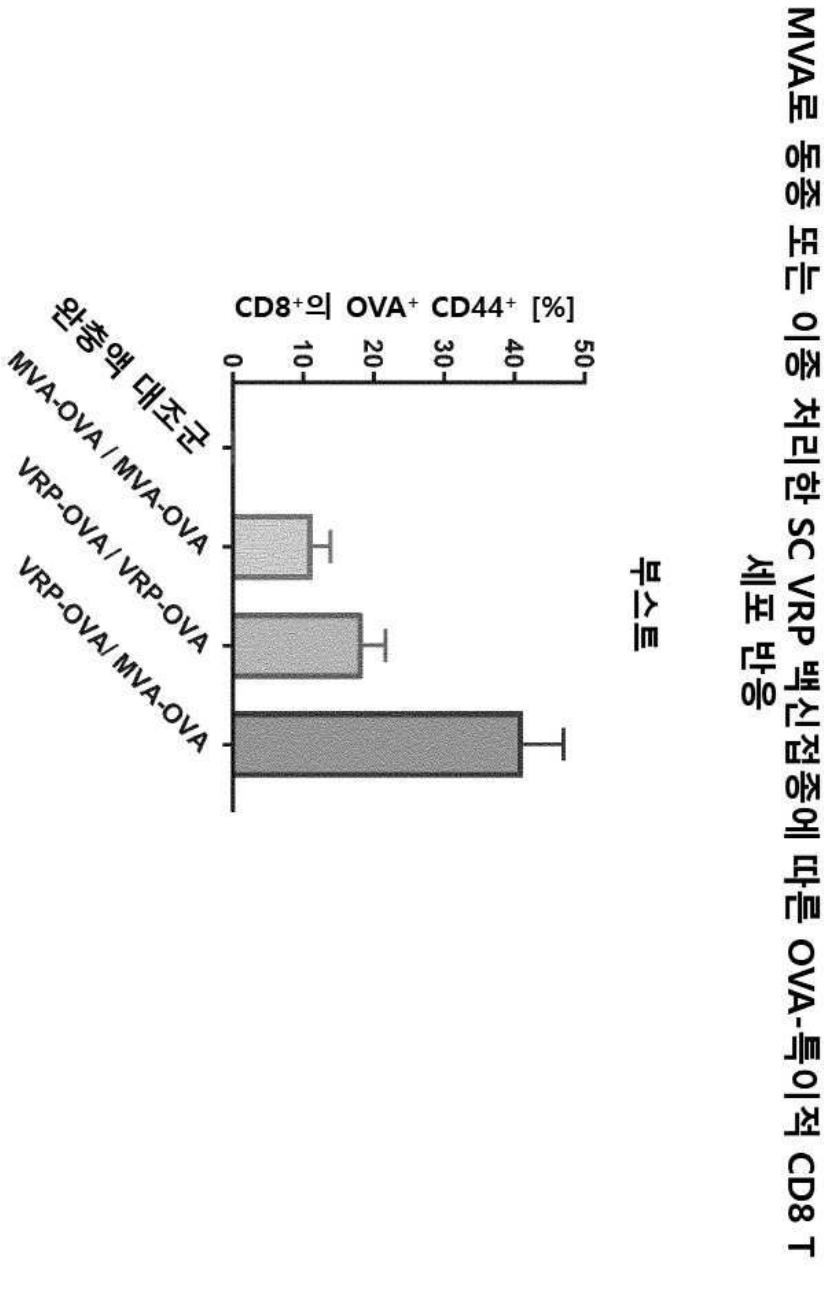
도면4


NHP Gp350- 특이적 T 세포
SFU/10E6 PBMC
10000
1000
100
10
투여 전
8일차
36일차
프라임 면역접종 이후 시간
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/VRP-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/Ad-EBV
LLOQ
ULOQ

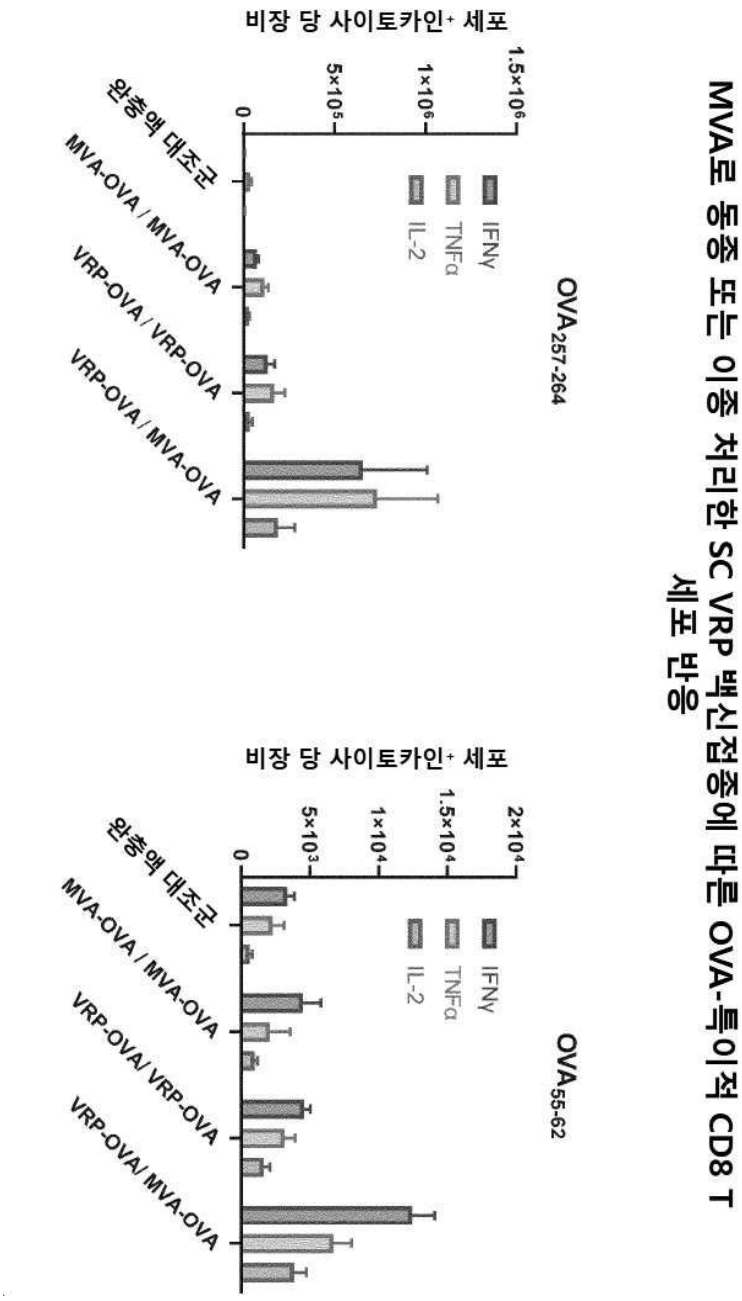
도면5


마우스 IMM2020_043 – Gp350 -특이적 T 세포 반응
gp350 - 누적 펩타이드
IFN-γ+ 점 / 10^6 비장세포
0
50
100
150
200
완충액 대조군
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VEEV-EBV/VRP-EBV
펩타이드 1
펩타이드 25
펩타이드 26

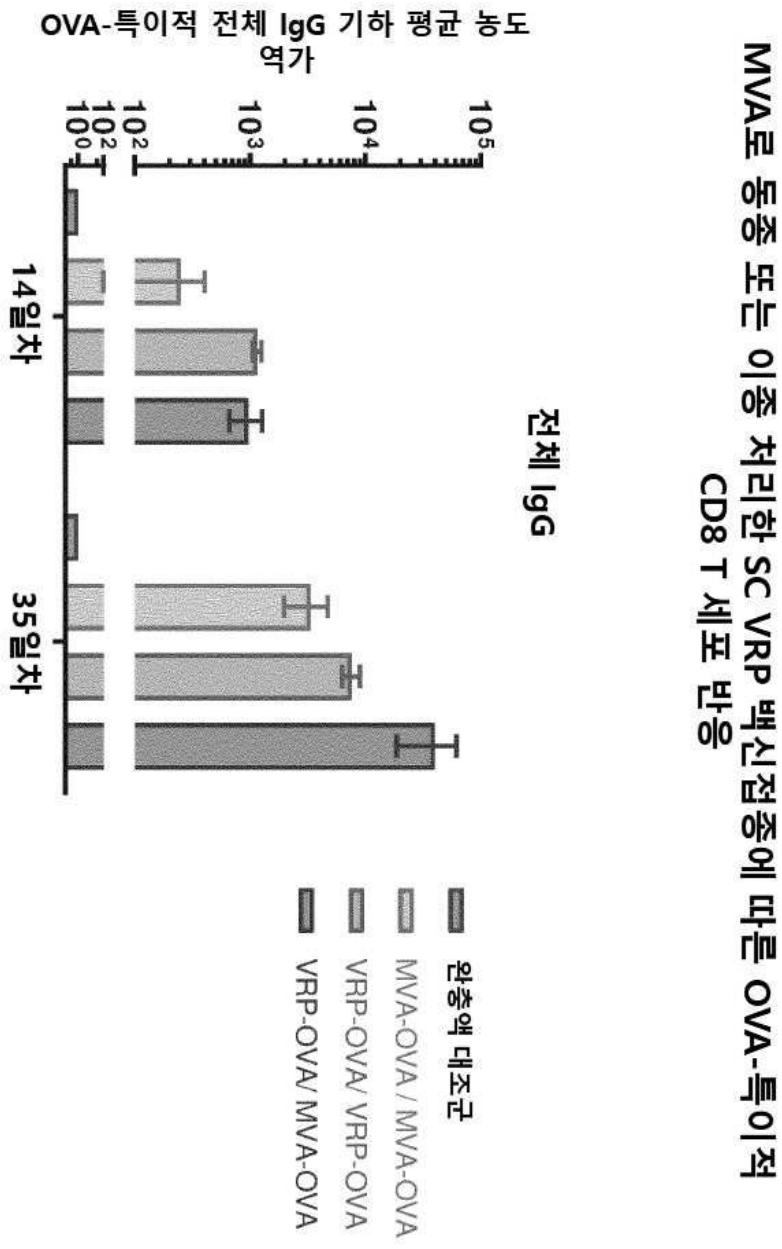
도면6


MVA로 동종 또는 이종 처리한 SC VRP 백신접종에 따른 OVA-특이적 CD8 T 세포 반응
부스트
CD8+의 OVA+ CD44+ [%]
0
10
20
30
40
50
완충액 대조군
MVA-OVA / MVA-OVA
VRP-OVA / VRP-OVA
VRP-OVA/ MVA-OVA

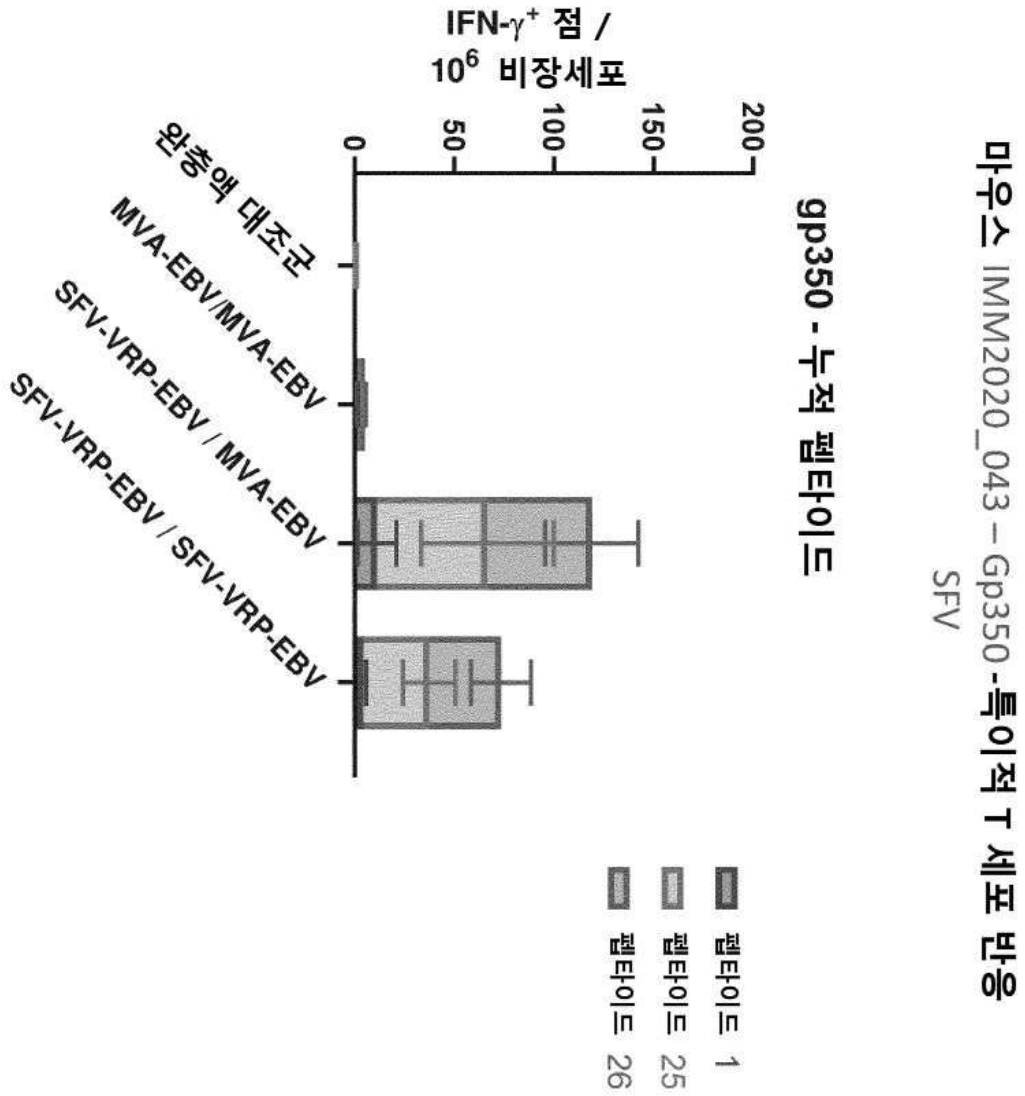
도면7


MVA로 동종 또는 이종 처리한 SC VRP 백신접종에 따른 OVA-특이적 CD8 T 세포 반응
비장 당 사이토카인+ 세포
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
IFNγ
TNFα
IL-2
OVA257-264
완충액 대조군
MVA-OVA / MVA-OVA
VRP-OVA / VRP-OVA
VRP-OVA / MVA-OVA
비장 당 사이토카인+ 세포
2×10^4
1.5×10^4
1×10^4
5×10^3
0
IFNγ
TNFα
IL-2
OVA55-62
완충액 대조군
MVA-OVA / MVA-OVA
VRP-OVA/ VRP-OVA
VRP-OVA/ MVA-OVA

도면8


MVA로 동종 또는 이종 처리한 SC VRP 백신접종에 따른 OVA-특이적
CD8 T 세포 반응
OVA-특이적 전체 IgG 기하 평균 농도
역가
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
14일차
35일차
전체 IgG
완충액 대조군
MVA-OVA / MVA-OVA
VRP-OVA/ VRP-OVA
VRP-OVA/ MVA-OVA

도면9


마우스 IMM2020_043 – Gp350 -특이적 T 세포 반응
SFV
gp350 - 누적 펩타이드
IFN-γ+ 점 / 10^6 비장세포
0
50
100
150
200
완충액 대조군
MVA-EBV/MVA-EBV
SFV-VRP-EBV / MVA-EBV
SFV-VRP-EBV / SFV-VRP-EBV
펩타이드 1
펩타이드 25
펩타이드 26

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.