

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 4월 26일 (26.04.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/053856 A2

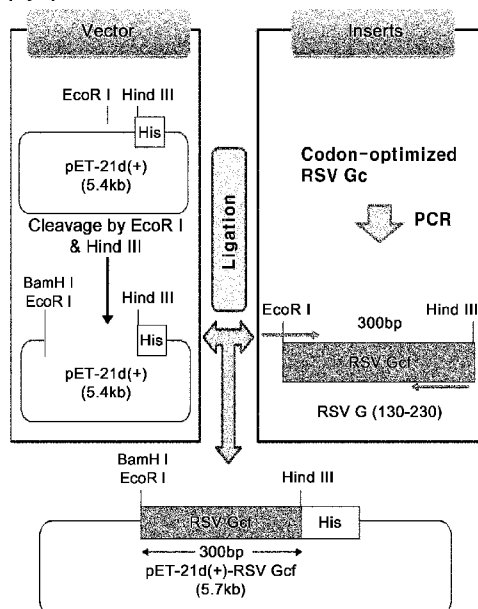
- (51) 국제특허분류: *A61K 38/08* (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/007882
- (22) 국제출원일: 2011년 10월 21일 (21.10.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0102976 2010년 10월 21일 (21.10.2010) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (EWha University - Industry Collaboration Foundation)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내, 120-750 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): **장준 (CHANG, Jun)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 연희동 대우아파트 103동 1203호, 120-733 Seoul (KR). **송만기 (SONG, Man Ki)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 북아현동 31-1, 120-190 Seoul (KR).
- (74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공향타워 6층 한일국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS VACCINE COMPOSITION AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭 : 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물 및 그의 제조방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a vaccine composition for preventing and treating respiratory diseases induced by respiratory syncytial virus (RSV), and a method for preparing same. More specifically, the present invention relates to a procaryotic cell expression vector for preparing a vaccine for treating or preventing respiratory diseases induced by RSV, the procaryotic cell expression vector comprising a nucleic acid sequence for coding a whole or a part of a peptide fragment having an amino acid 120th to 230th from an N-terminal of RSV G protein; a procaryotic cell transformant for preparing the vaccine for preventing and treating respiratory diseases induced by RSV, the procaryotic transformant being transformed by the expression vector; a method for preparing a peptide fragment of RSV G protein for the vaccine for preventing and treating respiratory diseases induced by RSV, the method using the procaryotic transformant; a vaccine composition for preventing and treating respiratory diseases induced by RSV, the vaccine composition comprising a whole or a part of the peptide fragment having an amino acid 120th to 230th from the N-terminal of the RSV G protein; and a method for preventing or treating respiratory diseases due to RSV infection, the method comprising a step for administering the vaccine composition to a subject. The vaccine comprising procaryotic cell expression RSV G protein fragment according to the present invention induces very high blood serum IgG and respiratory mucosa IgA from just two immunizations, and displays effective defense against RSV replication without showing eosinophilic immunopathological effect due to the vaccine at the time of an RSV infection. Also, the present invention has very high economic efficiency as the vaccine uses a protein purified from bacteria, and resolves the problem of stability that can result

from a virus vaccine by using a purified protein fragment as the vaccine having antigenicity, thereby making the present invention advantageous considering that the main subjects of RSV vaccine immunization are newborn and infants. Also, the present invention shows sufficient immunity even from sublingual administration, which has superior stability, and therefore, has an effect of increasing the stability of vaccine immunization.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2012/053856 A2

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120 번째 아미노산 내지 230 번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, RSV 에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 발현벡터, 상기 발현벡터에 의해 형질전환된, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 형질전환체를 이용한 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신용 RSV G 단백질의 펩티드 단편의 제조방법, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120 번째 아미노산 내지 230 번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 포함하는 RSV 에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물, 및 상기 백신 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 RSV 감염에 의한 호흡기 질환의 예방 및 치료방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 원핵세포 발현 RSV G 단백질 단편을 포함하는 백신은 두 번의 면역화로도 매우 높은 혈청 IgG 및 호흡기 점막 IgA 를 유도하며, RSV 감염시 백신으로 인한 호산구증대 면역병리 현상 없이 RSV 복제에 대한 효과적인 방어를 나타낸다. 또한, 박테리아에서 정제된 단백질을 이용한 백신으로서 경제성이 뛰어나고, 정제된 단백질 단편을 항원성을 가진 백신으로 사용함으로써 바이러스 백신에서 초래될 수 있는 안정성의 문제를 극복하였으며, 이는 RSV 백신의 주 접종 대상이 신생아 및 영아인 것을 감안할 때, 유리한 효과라 할 수 있다. 또한, 안정성 면에서 우수한 설하 투여로도 충분한 면역성을 나타내므로 백신접종의 안정성을 증대시키는 효과를 가진다.

명세서

발명의 명칭: 호흡기 신시치아 바이러스 백신 조성물 및 그의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 발현벡터, 상기 발현벡터에 의해 형질전환된, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 형질전환체, 상기 원핵세포 형질전환체를 이용한 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신용 RSV G 단백질의 펩티드 단편의 제조방법, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 포함하는 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물, 및 상기 백신 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 RSV 감염에 의한 호흡기 질환의 예방 및 치료방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 호흡기 신시치아 바이러스(RSV; Respiratory Syncytial Virus)에 의한 하기도감염은 폐렴과 기관지염을 일으키며, 미국, 유럽, 오스트레일리아 및 일본을 비롯하여 전 세계적으로 오랫동안 치명적인 문제점으로 여겨져 왔다. 특히, 미숙아, 아동 및 장년층, 중국에는 면역계가 약해진 모든 개체에서 문제를 일으킬 수 있다. 1세 미만의 유아 중 약 2/3 가량 및 1세에서 4세 사이의 거의 모든 유아는 최소한 한 번 RSV에 감염되고, 대부분은 의료적 지원 없이 회복되는 것으로 추정되고 있다. 그러나, 이들 중 5~10%에서는 중증 감염이 지속되는데, 특히 폐이형성증, 선천성 심장병, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 암 또는 다양한 면역결핍증을 가진 영유아 및 골수이식 전의 면역저하 상태의 성인 등에게 치명적인 감염이 일어날 수 있는 고위험군이다. 노인들의 경우에도 인플루엔자 바이러스와 비슷한 정도로 잘 감염되며 RSV 유행시에 초과 사망률(excess mortality)이 인플루엔자 유행시보다 더 많은 것으로 보고되었다. 미국의 경우 100,000명 내지 200,000명에 이르는 고위험군 환자들이 있으며, 매년 90,000건 이상의 RSV 감염으로 인한 입원이 발생하고, 이중 약 4,500명이 사망하는 것으로 보고되었다. 국내의 경우도 RSV가 매년 유행하여 소아병원에 입원하는 환자의 수가 많으며, 서울대 소아병원에서 분리되는 모든 바이러스성 하기도 감염의

60%가 RSV에 의한 것으로 나타나, 우리나라의 경우도 RSV 감염으로 인한 입원과 사망이 매우 많을 것으로 추측된다.

- [4] 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)는 비분절(non-segmented) RNA를 게놈으로 가지는 바이러스로 파라믹소비리데(paramyxoviridae)에 속한다. 크게 A 아형 및 B 아형으로 구분되며, A 아형이 일반적으로 우점종이다. RSV는 감염된 숙주세포에서 NS1, NS2, P, N, M, SH, G, F, M2 및 L 등의 10가지 단백질을 합성한다. RSV의 N(뉴클레오캡시드), P(인) 및 L(큰 폴리머라제 소단위) 단백질은 뉴클레오단백질 코어를 형성하는데, 이는 감염성의 최소 단위로 간주되며(Brown et al., J. Virol, 1:368-373, 1967), 바이러스 RNA 의존성 RNA 전사효소를 형성하여 RSV 게놈의 전사 및 복제를 담당한다(Yu et al., J. Virol. 69:2412-2419, 1995; Grosfeld et al., J. Virol. 69:5677-5686, 1995). M2 단백질은 바이러스 감염세포의 제거에 관여하는 세포독성 T 림프구에 의한(cytotoxic T lymphocyte) 면역반응을 유도하는 단백질로 알려져 있으며, 최근의 연구에 따르면 M2 유전자 생성물(M2-1 및 M2-2)이 전사에 관여하는 것으로 나타났다(Collins et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:81-85). 표면항원으로는 F 단백질 (융합단백질), G 단백질 및 SH 단백질이 있는데, 이 중 비교적 큰 분자량을 가지고 바이러스의 외막에 존재하는 G 단백질과 F 단백질은 당화가 많이 된 당단백질로서, RSV 감염의 면역과 항원성의 변이에 가장 중요한 역할을 한다. G 단백질은 감염될 숙주 세포에 부착하는데 관여하며, F 단백질은 거대세포의 형성과 바이러스의 침투 및 부착에 관여하며, F 단백질 및 G 단백질은 중화항체를 유발한다.
- [5] G 단백질은 MHC I 종-제한된(restricted) 에피토프를 갖고 있지 않아 CTL(cytotoxic T lymphocyte)에 의한 면역 반응을 유도하지는 않는다. 하지만 이 단백질은 아미노산 서열 183 에서 195 까지의 MHC II 분자인 I-E^d-제한 면역우성 에피토프 (immunodominant epitope)를 가지고 있으며 이는 V β 4을 발현하는 병리적 CD4 T 세포들을 많이 유도한다. 많은 연구 결과를 보면 RSV G 단백질로 면역화하고 다시 RSV를 감염시켰을 때 호흡기 호산구증(eosinophilia)을 동반한 Th2 타입 면역반응이 증강됨을 알 수 있다(Hancock et al., J Virol 70:7783-91, 1996; J Virol et al., 72:2871-80, 1998; Openshaw, et al., Int Immunol 4:493-500, 1992; Tebbey, et al., J Exp Med 188:1967-72, 1998).
- [6] 현재 RSV 감염에 대하여 사용가능한 백신이나 특이적인 치료제가 개발되어 있지 않다. 특히 포르말린 불활성화 백신(formalin-inactivated RSV vaccine, FI-RSV)이 과거 개발되어 임상시험이 진행되었으나, 당시 FI-RSV를 접종받은 소아 중 RSV 감염에 의해서 80% 내외가 입원했으며, 일부 환자는 이로 인해 사망하였으며, 폐에 심한 하기도 질환이 관찰되었다. 현재 승인된 치료제로는 리바비린(Ribavirin, Virazole)이 사용되고 있으나 임상적 효능이 크지 않고, 높은 독성을 나타내며, 에어로졸(aerosol) 형태로 분무해야 하는 불편함이 있어 일부 제한된 경우에만 사용되고 있다. 또한 미국을 포함한 여러 나라에서는

고위험군에서 심한 RSV 감염증을 예방하기 위하여 RSV 정맥 내 면역글로불린(RSV-IGIV, Respigam) 또는 RSV F 단백질에 대한 단일클론항체인 팔리비주맙(palivizumab, Synagis)을 사용하고 있고, 미국 특허 공개 2006/0018925는 G 단백질과 이의 수용체의 CX3C 영역의 상호 작용을 차단할 수 있는 항체와 소형 펩티드를 설명 및 청구하고 있으나, 이들은 RSV의 치료적 처치라기보다는 예방적 처치이고 비용이 비싸기 때문에 다수의 사람들에게 이용이 불가능하다. 따라서 RSV에 대한 치료제의 개발은 매우 시급한 실정이다.

- [7] RSV 백신 개발에 있어서는 몇 가지 중요하게 고려해야 할 점이 있다. 첫째로 RSV 백신의 주요 대상이 영아이기 때문에 안전해야 한다는 것이다. 둘째로 백신의 주접종 대상인 영아에 대해 간편한 투여가 가능해야 하며, 셋째로 모체의 항체로 인해 중화(neutralization)되지 않아야 한다는 점이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은, 보다 안전하고 경제적이며, 효과가 좋은 RSV 백신을 개발하고자 노력한 결과, RSV G 단백질의 일부 서열을 원핵세포, 특히 대장균에서 발현, 정제한 후 사용할 경우 호산구증과 같은 면역병리 현상을 일으키지 않으면서 RSV 감염에 대한 효과적인 방어를 나타낼 수 있고, 바이러스 벡터 상태로 감염시키는 것에 비하여 안전성이 증가한다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다. 또한, 통상적으로 면역관용을 유도하며 알레르기 반응과 같은 면역반응이 일어나지 않도록 하기 위하여 사용하는 설하 투여 방법을 이용하여 투여하는 경우, 안정성이 증가하고 영아에 대해 투여가 간편하며, RSV 감염에 대한 효과적인 면역반응을 나타낼 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 하나의 목적은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 발현벡터를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 발현벡터에 의해 형질전환된, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 원핵세포 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체로부터 발현된 펩티드를 분리 정제하는 단계를 포함하는 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신용 RSV G 단백질의 펩티드 단편의 제조방법을 제공하는 것이다.

- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 포함하는 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 백신 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 RSV 감염에 의한 호흡기 질환의 예방 및 치료방법을 제공하는 것이다.

[16]

발명의 효과

- [17] 본 발명에 따른 원핵세포 발현 RSV G 단백질 단편을 포함하는 백신은 두 번의 면역화로도 매우 높은 혈청 IgG 및 호흡기 점막 IgA를 유도하며, RSV 감염시 백신으로 인한 호산구증대 면역병리 현상 없이 RSV 복제에 대한 효과적인 방어를 나타낸다. 또한, 박테리아에서 정제된 단백질을 이용한 백신으로서 경제성이 뛰어나고, 정제된 단백질 단편을 항원성을 가진 백신으로 사용함으로써 바이러스 백신에서 초래될 수 있는 안정성의 문제를 극복하였으며, 이는 RSV 백신의 주 접종 대상이 신생아 및 영아인 것을 감안할 때, 유리한 효과라 할 수 있다. 또한, 안정성 면에서 우수한 설하 투여로도 충분한 면역성을 나타내므로 백신접종의 안정성을 증대시키는 효과를 가진다.

[18]

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 본 발명에 따른 RSV G 단백질 단편 발현 벡터 전체의 개열지도를 나타낸다.
- [20] 도 2는 RSV G 단백질 단편의 대장균에서의 발현 및 정제를 SDS-PAGE(A)와 웨스턴 블랏팅(B)을 통하여 확인한 결과를 나타낸다.
- [21] 도 3은 RSV G 단백질 단편 (Gcf) 설하투여(s.l.), RSV-Gcf/CT(Cholera toxin) 설하투여, 발바닥을 통한 FI-RSV의 근육내 투여(i.m.), RSV-Gcf 비강투여(i.n.), RSV-Gcf/CT 비강투여를 통해 면역화한 경우, 대조군(PBS)과 비교하여 혈청에서 IgG 유도 정도를 ELISA 방법으로 IgG 역가를 측정한 결과를 나타낸다.
- [22] 도 4는 도 3과 같은 조건에서 호흡기도의 IgA 유도 정도를 ELISA 방법으로 확인한 결과를 나타낸다.
- [23] 도 5는 대조군(PBS) 및 면역화 군에 대하여 4주 후 RSV A2 5 X 10⁶ PFU를 시험 감염시킨 후 4일 후 폐조직 내의 RSV 역가를 플라크 어세이 (plaque assay) 방법으로 측정한 결과를 나타낸다.
- [24] 도 6은 대조군(PBS) 및 면역화 군에 대하여 IFN- γ 염색을 통하여 G 단백질 특이적 CD4 T 세포 반응을 유도하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸다.
- [25] 도 7은 대조군(PBS) 및 면역화 군에 대하여 기관지폐포 세정액(BAL)에 포함된 호산구 수를 CD11c/Siglec-F 염색 후 유세포분석으로 측정한 결과를 나타낸다.

- [26] 도 8의 A는 시험관 내에서 야생형 Gcf 및 돌연변이 Gcf(Gcf Δ Cys4)에 대하여 세포 이동을 측정하여 Gcf에 의해 매개되는 주화성 활성을 측정한 결과를 나타내며, B는 생체 내에서 비강 투여시 주화성 활성을 측정한 결과를 나타낸다.
- [27] 도 9는 야생형 Gcf 및 돌연변이 Gcf(Gcf Δ Cys4)에 대하여 특이적 혈청 항체 역가를 측정한 결과를 나타낸다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 발현백터를 제공한다.
- [30] 본 발명에서, RSV의 G 단백질은 RSV의 주요 부착 단백질이며, RSV 감염 방어에 중요한 단백질로서, RSV G 단백질의 야생형 뉴클레오티드(서열번호 1) 및 아미노산 서열(서열번호 2)이 당해 분야에 공지되어 있다(Wertz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4075-4079, 1985; Satake et al., Nucl. Acids Res. 13(21): 7795-7810, 1985). G 단백질은 MHC I 종-제한된(restricted) 에피토프를 갖고 있지 않아 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)에 의한 면역 반응을 유도하지는 않는다. 하지만 이 단백질은 183번째 아미노산에서 195번째 아미노산까지의 I-E^d-제한된 면역우성 에피토프 (immunodominant epitope)를 가지고 있으며 이는 V β 4를 발현하는 CD4 T 세포들을 많이 유도한다.
- [31] 또한, 본 발명에서 사용하는 RSV G 단백질은, 야생형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 G 단백질의 변이체를 포함한다. G 단백질의 변이체란 G 단백질의 천연 야생형 아미노산 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 천연 야생형 아미노산 서열과 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 또한, RSV G 단백질은 항원 제시(presentation)를 증진시키고 항원의 항원 제시 세포에의 표적성을 향상시키는 분자를 포함하도록 유도체화 될 수 있다.
- [32] 본 발명에서 "RSV의 G 단백질 단편"은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 의미하고, "호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 일부"는 RSV G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산 서열 중 비연속적이거나 연속적인 일부 서열을 포함하는 펩티드 단편을 의미한다. 본 발명의 구체예에서 사용하는 RSV G 단백질 단편은 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 것(서열번호 3), 131번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는

것(서열번호 4)을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않고, RSV G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산 서열 중 비연속적이거나 연속적인 일부 서열을 포함하는 펩티드 단편을 모두 사용할 수 있다. RSV G 단백질 단편은 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부의 단량체 형태일 수도 있으나 면역원성을 더욱 증강시키기 위하여 상기 펩티드 단편의 전부 또는 일부가 둘 이상 연결된 다량체 형태를 취할 수 있다.

[33] 본 발명의 RSV G 단백질 단편을 코딩하는 핵산 서열은, RSV G 단백질 단편의 발현을 높이기 위하여 아미노산 번역 코돈을 최적화(optimization)시킬 수 있고, 본 발명의 구체예에서는 서열번호 5 또는 6의 핵산서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[34] 본 발명의 RSV의 G 단백질 단편은 원핵세포, 바람직하게는 대장균을 숙주로 이용하여 발현시킬 수 있다. 통상적으로 단백질 번역 후 수식과정이 단백질의 면역원성에 영향을 미치기 때문에 항원 단백질발현은 동물세포등 진핵세포에서 이루어져 왔다. 그러나 본 발명의 RSV G 단백질 단편은 원핵세포, 바람직하게는 대장균에서 발현시켜도 우수한 면역원성을 보유함을 본 발명자가 밝혀내었다. 따라서, 백신을 경제적으로 제조할 수 있고, 정제된 단백질 형태로 투여하기 때문에 바이러스 벡터 상태로 감염시키는 것에 비하여 안전하다.

[35] 본 발명에서 용어, “발현벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로서, 이러한 유전자 작제물을 제조하기 위해 표준 재조합 DNA 기술을 이용할 수 있다. 본 발명에서 용어, “작동가능하게 연결된(operably linked)”은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포의 각종 숙주세포에서 목적하는 유전자를 발현하고, 목적하는 단백질을 생산하는 기능을 하면 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 재조합 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 목적하는 단백질을 암호화하는 유전자, 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA, 오퍼레이터 서열, 목적하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비해독영역, 선별 마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. 개시 코돈 및 종결코돈은 일반적으로 면역원성 목적 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 일부로 간주될 수 있으며, 유전자 작제물이 도입되었을 때 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는

유도성일 수 있다.

- [36] 본 발명에서는 점막 및 혈청에서 RSV 특이적 중화면역반응을 유도하기 위하여 중화항체 에피토프가 집중된 G 단백질 단편을 코딩하는 핵산 서열을 대장균 발현벡터에 삽입하고 정제의 용이성을 위해 핵산 서열의 3'-말단에 태그를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [37] 본 발명에서 용어, "태그"(tag)란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 말하며, 플루오레세인과 같은 화학적 형광물질(Fluorescein), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩티드 형광물질을 포함한 형광분자일 수 있고, 믹(Myc)태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘(Histidine) 태그, 루신(Leucine) 태그, IgG 태그 및 스트렙타비딘(Streptavidin) 태그 등 에피토프(epitope) 태그일 수도 있다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기를 가지며, 통상적으로 약 8개 내지 50개의 아미노산 잔기를 가지는데, 본 발명에서는 6개의 히스티딘 태그를 사용하였다. 바람직하게는, 태그는 G 단백질 단편의 C 말단 부위에 존재한다.
- [38] 또한, 본 발명의 벡터는 G 단백질 단편의 C 말단 부위에 종결코돈을 추가로 포함할 수 있으며, 바람직한 벡터는 도 1의 개열지도로 나타나는 벡터일 수 있다.
- [39]
- [40] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 발현벡터에 의해 형질전환된, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 형질전환체, 및 상기 원핵세포 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체로부터 발현된 펩티드를 분리 정제하는 단계를 포함하는 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신용 RSV G 단백질의 펩티드 단편의 제조방법을 제공한다.
- [41] 본 발명에서, G 단백질 단편은 상기 발현벡터를 사용해서 숙주세포를 형질전환시킨 후 배양하여 수득할 수 있다. 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 문헌(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2판), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 74, 1989)에 기재된 인산칼슘법 또는 염화칼슘/염화루비듐법, 일렉트로포레이션법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법 등이 있다. 상기 벡터가 발현되는 형질전환체를 영양배지에서 배양하면 유용한 단백질을 대량으로 제조, 분리 가능하다. 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적당히 선택하여 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절하여야 한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포는 원핵 세포를 포함하며, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 세균, 예를 들어 에셰리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스와 같은 주지의 원핵 숙주들이 사용될 수 있는 숙주 세포의

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

- [42] 본 발명의 원핵세포, 바람직하게는 대장균 발현벡터에 의해 발현, 정제된 G 단백질 단편은 면역원성을 가질 수 있으므로, RSV 감염에 의한 호흡기 질환의 예방 및 치료용 백신 조성물에 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "면역원성"이란 세포성 면역 및 체액성 면역 반응 모두를 유도하여 이물질에 대해 대처하는 능력을 말하며, 이러한 면역반응을 유도하는 물질을 면역원이라 한다.
- [43]
- [44] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 포함하는 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물, 바람직하게는, 상기 방법으로 제조되는 RSV G 단백질의 펩티드 단편을 포함하는 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물을 제공한다.
- [45] 본 발명에서 용어, "예방"이란, 조성물의 투여로 RSV 감염에 의해 유발되는 호흡기 질환 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [46] 본 발명에서 용어, "치료"란, 조성물의 투여로 RSV 감염에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다. 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) 감염에 의해 유발되는 호흡기 질환은 기침, 재채기, 고열, 천명, 기관지염, 세기관지염, 폐렴, 천식, 크룹 및 호흡기 부전 등을 예로 들 수 있다.
- [47] 본 발명의 백신 조성물은 또한 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. "약학적으로 허용 가능한 담체"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 향원보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 향균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착지연제 등을 포함한다. 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨,

전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

- [48] 또한, 본 발명의 백신용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결 건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[49]

- [50] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 백신 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 RSV 감염에 의한 호흡기 질환의 예방 및 치료방법을 제공한다.

- [51] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명에서 용어, "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다. 예시적으로, 비강 투여는 면역원성이 높은 장점이 있으나 다만 비강 내의 후신경다발(olfactory bulb)을 통해서 투여물질이 중추신경계로 이동할 수 있고 이로 인한 염증반응 등으로 인해 부작용이 발생할 수 있다는 우려가 있는 약점이 있다. 이에 반해 설하 투여는 이러한 현상이 보고된 바 없고 오랜 기간 알려지에 대한 면역치료 방법으로 사용되어 왔기 때문에 인체에 대한 부작용의 우려가 매우 낮아 안전성 측면에서 유리한 장점이 있다. 본 발명에서의 용어, "설하 투여(sublingual administration)"란, 활성 성분의 국부적 또는 전신적 효과를 얻기 위하여 투약 제형을 혀 하부에 적용하는 투여 경로를 의미하며, "비강 투여(intranasal administration)"란, 활성 성분의 국부적 또는 전신적 효과를 얻기 위하여 투약 제형을 비강(nasal cavity) 하부에 적용하여 비점막으로 흡수시키는 투여 경로를 의미한다. 본 발명의 백신 조성물은 설하 투여 또는 비강 투여의 방법으로 투여될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 백신 조성물은 설하

투여 및 비강 투여의 경우에 전신 백신 접종에 비하여 국소적 점막 면역을 유도하는 우수한 효과가 있으며, 특히 설하 투여의 경우에 안전성 측면에서 유리하면서도 우수한 면역원성을 나타낸다. 설하 투여 또는 비강 투여에 적합한 제형은 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있다.

[52] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"이란 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 치료될 장애, 장애의 중증도, 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 제거 속도, 치료 지속 기간, 조합되거나 또는 동시에 사용되는 약물, 대상체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태, 및 의약 업계 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다.

[53] "약제학적으로 유효한 양" 결정시 고려되는 다양한 일반적인 사항들은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Gilman et al., eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990] 및 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990]에 기재되어 있다.

[54] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[55] 본 발명의 백신조성물은 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 하나 이상의 보조제 등을 포함할 수 있다. 적절한 보조제에는 펩티드, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 옥사이드 및 Marcol 52 같은 미네랄 오일 또는 식물성 오일 및 하나 이상의 유화제로 구성된 조성물 또는 리졸세스틴, 다가 양이온, 다가 음이온 같은 표면 활성물질 등이 포함된다.

[56] 본 발명의 백신 조성물은 1종 이상의 면역증강제를 추가로 포함할 수 있고, 바람직하게는 콜레라 독신(CT; cholera toxin), 알루미늄하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일 또는 생분해성(Biodegradable) 오일을 포함할 수 있다.

[57] 본 발명에서의 용어 "면역증강제"란, 일반적으로 항원에 대한 체액 및/또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질을 지칭한다. 전통적인 백신들은 죽은 병원성 미생물의 비가공 제제로 구성되어, 병원성 미생물의 배양액과 관련된 불순물들은 면역 반응을 향상시키기 위한 면역증강제로서 작용할 수 있으나, 정제된 단백질 서브유닛의 균질 제제를 백신접종을 위한 항원으로서 사용하는 경우, 상기와 같은 항원에 의해 발동된 면역성은 불충분하여 면역증강제로서 일부 외래물질의 첨가가 필요해 진다. 면역증강제를 사용함으로써 면역 반응을

자극하는데 보다 적은 용량의 항원이 요구될 수 있으며, 이에 의해 백신 생산 비용이 절감될 수 있다. 이러한 면역증강제는 그 원료(미네랄, 세균, 식물)와 성분(유제현탁액)에 따라 분류된다. 상업적으로 이용되어지는 면역증강제는 알루미늄하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일(미네랄오일) 또는 생분해성(Biodegradable) 오일 등이 있다.

[58] 본 발명에서의 용어 "콜레라 독신(CT)"이란, A 및 B 서브유니트로서 공지되어 있으며, 이질균, 독소생산성 대장균, 장관출혈성 대장균으로부터 생산되는 독소에서 나타나는 바와 같은 두 개의 단백질 서브유니트로 구성된 구조를 갖는다.

[59]

[60] 본 발명의 구체적인 실시예에서, RSV G 단백질 단편을 발현하도록 대장균 발현 벡터인 pET-21d(+)-RSV Gcf를 제작하여(도 1) 대장균에 형질전환시켜 발현을 유도한 결과 ~17 kDa 크기의 과발현된 RSV G 단백질 단편(RSV-Gcf)을 관찰할 수 있었고, 이를 금속이온 크로마토그래피를 통해 높은 순도로 정제할 수 있었다(도 2).

[61] 본 발명에 따른 원핵세포 발현벡터에 의해 발현된 G 단백질 단편이 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환의 예방 및 치료에 미치는 효과를 살펴보았다. 마우스에 대한 생체 내(*in vivo*) 실험에서, 내독소 없이 정제된 RSV G 단백질 단편 20 μ g을 단독, 혹은 면역증강제인 CT(Cholera toxin)와 혼합하여 설하 투여 또는 비강 투여를 통해 마우스에 면역화한 경우 2회 투여 후에 매우 높은 혈청 총 IgG (Immunoglobulin G) 반응을 유도해냄을 확인하였다(도 3). 특히, 면역증강제를 포함하지 않은 RSV G 단백질 단편을 단독으로 설하 투여 또는 비강 투여한 경우에도 RSV G 단백질 특이적 총 IgG 항체반응이 생성됨을 확인할 수 있었다. 그리고 2회의 설하 투여 또는 비강 투여 후에 타액(saliva)에 존재하는 RSV G 단백질 특이적인 분비 IgA (Immunoglobulin A)의 정도를 측정한 결과 RSV G 단백질 단편 단독 투여군 및 CT를 면역증강제로 투여한 군의 타액(saliva)에서 분비 IgA 반응이 관찰되었다(도 4). 결과적으로, 본 발명의 정제된 G 단백질 단편의 설하 또는 비강 면역이 강한 혈청 IgG 및 점막 IgA 반응을 유도하며, 특히 면역증강제를 포함하지 않는 경우에도 안전하고 효과적으로 면역 반응을 유도함을 확인하였다. 이와 관련하여, 본 발명자들은 추가적으로 G 단백질 단편이 시험관 내에서 강력한 주화성 활성을 가짐을 확인하였으며, G 단백질 단편의 4개의 시스테인 잔기(Cys-173, Cys-176, Cys-182 및 Cys-186)가 알라닌으로 치환된 돌연변이 Gcf(Gcf Δ Cys4)는 주화성 활성이 현저히 감소되었음을 확인하여 상기 주화성 활성이 상기 4개의 시스테인 잔기에 기인한 것임을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 정제된 G 단백질 단편이 면역 증강제 없이도 자가 면역증강 성질을 보이며, 그에 따라 효과적으로 면역 반응을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[62] 또한, 유도된 면역 반응의 방어특성을 알아보기 위하여 감염 후 방어효율을

RSV의 역가 측정을 통해 알아본 결과, 20 μ g의 정제된 RSV G 단백질 단편을 포함한 백신 조성물을 2회 설하 투여로 면역화한 경우, 방어 면역력이 획기적으로 증대되어, 생 RSV (live RSV) 시험 감염 후 복제 정도가 가장 높은 4일 후에도 폐조직에서 바이러스가 거의 검출되지 않음을 관찰하였다(도 5). 특히, RSV G 단백질 단편만 포함된 백신 조성물로 동일하게 면역화한 경우에도 생 RSV 면역화 군과 거의 유사한 방어면역 유도효과를 보여주었다.

- [63] 또한, RSV G 단백질 단편 투여가 G 단백질 특이적 CD4 T 세포를 유도하여 결과적으로 폐 호산구증을 유발할 가능성이 있는지에 대해 알아보고자, RSV G 단백질 단편 또는 포르말린으로 불활성화시킨 RSV(FI-RSV)로 면역화된 생쥐들을 4주 후 RSV로 감염시키고 4일 후에 폐의 면역세포들을 분리해내어 G 단백질 I-E^d-제한 면역우성 에피토프 (immunodominant epitope, 183-195) 펩티드로 자극하여준 후 IFN- γ (interferon-gamma) 생산 여부를 알아본 결과, RSV G 단백질 단편을 설하투여 경로를 통해 면역화한 생쥐들에서는 거의 IFN- γ 생산이 보이지 않았다(폐의 전체 CD4 T 세포 중 약 2.0% 미만). 그러나, 생 RSV로 면역화한 군에서는 폐의 전체 CD4 T 세포 중 3% 이상의 CD4 T 세포 반응을 나타내었다(도 6). 생 RSV, FI-RSV, 또는 RSV G 단백질 단편으로 각각 면역화시킨 생쥐를 3주 후에 RSV를 감염시킨 후 기관지폐포 세정액에 포함된 호산구(eosinophil) 개수를 CD11c-Siglec-F⁺ 표현형으로 측정하였을 때, FI-RSV로 면역화한 군에서는 눈에 띄게 증가한 CD11c-Siglec-F⁺ 호산구를 볼 수 있었던 반면 (도 7, 전체 BAL 세포의 ~45%), RSV-G 단백질 단편을 설하 투여로 면역화한 군에서는 전체 BAL(기관지폐포 세정액, Bronchoalveolar lavage) 세포에서 1% 미만으로 호산구가 관찰되었다(도 7). 이것은 생 RSV를 면역화했을 때와 비슷한 정도였다. 따라서, 본원 발명의 RSV G 단백질 단편을 설하투여로 사용한 경우에는 호산구 증대로 인한 폐의 병리현상이 거의 일어나지 않음을 알 수 있었다(도 7). 따라서, 본 발명은 호산구증과 같은 2차적인 면역병리(immunopatholgy) 현상을 일으키지 않고, RSV 백신의 주요 대상인 영아의 출생 초기에 한 번의 투여로 효과적인 보호 면역반응을 유도할 수 있는, 매우 효과적인 백신임을 알 수 있다.

[64]

발명의 실시를 위한 형태

- [65] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[66]

[67] 실시예 1: RSV 스톡 준비

- [68] RSV A2 균주는 3% 열불활성화(heat-inactivated) 소태아혈청(fetal calf Serum; FCS), 2 mM 글루타민, 20 mM 2-[4-(2-히드로시에틸)-1-피페라지닐]에탄술포산(HEPES) 및 비필수 아미노산이 첨가된 DMEM 배지 (Dulbecco's Modified Eagle

Medium; Life Technologies, Gaithersburg, MD)로 HEp-2 세포(ATCC, Manassas, VA)에서 배양하였다. 구체적으로 약 70% 컨플루언시(confluency)의 HEp-2 세포에 희석된 RSV A2 바이러스를 MOI=0.01의 빈도로 감염시키고 바이러스 복제에 의한 세포변성효과(Cytopathic effect)가 가장 많이 나타나는 72~96 시간 후에 배양액과 세포를 회수하였다. 반복 동결-해동으로 세포를 분쇄한 후 상층액을 모아 초고속 원심분리를 통해 바이러스를 침전시키고 적정량의 DMEM 배지에 현탁시켜 스톱을 제조하였다.

[69]

[70] 실시예 2 : RSV G 단백질 단편을 발현하는 대장균 발현백터의 제작, 발현 및 정제

[71] RSV G 단백질(RSV A2 strain)의 아미노산 서열 131~230에 해당하는 DNA 핵산 서열을 가장 사용빈도가 높은 코돈으로 대체시킨 333머(mer) 길이의 염기 뉴클레오티드 DNA를 합성 제작(서열번호 5)하였다 (Bioneer Corp., Daejeon, Korea). 이 DNA를 주형으로 이용하여 5': GGG CCC GAA TTC CCG TCA AGA CCA AAA ACA CAA CA (서열번호 7), 3': GGG CCC AAG CTT GGG CTT GGT GGT GGG TAC TTC (서열번호 8) 프라이머로 PCR을 통해 증폭시킨 후 EcoR I 과 Hind III (New England Biolabs, Beverly, MA) 제한효소로 절단한 후, 같은 제한효소로 절단한 pET21d vector (Novagen, Madison, WI)에 삽입하였다 (도 1). 또한, 4개의 시스테인 잔기(Cys-173, Cys-176, Cys-182, Cys-186)가 알라닌으로 치환된 돌연변이 DNA를 돌연변이 프라이머를 사용하여 mega-PCR 방법에 의하여 생산하였다. 제작된 pET-21d(+)-RSV G를 대장균(E. coli) BL21(DE3) (Novagen)에 넣은 후에 0.5M IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, Takara, Shiga, Japan)로 단백질 발현을 유도하였다. 원심분리 후 박테리아 세포를 결합 완충액(20mM Tris, 0.5M NaCl, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 분쇄하였다. 용해성 및 불용성 단백질은 40,000 $\times$ g 에서 20분간 원심분리하여 분리하였고, 투명한 상층액을 추가 정제에 사용하였다. 발현된 RSV G 단백질 절편(Gcf) 및 돌연변이 Gcf(Gcf Δ Cys4)는 HisTrap 컬럼(GE healthcare)을 사용하여 Ni-NTA 친화크로마토그래피 (affinity chromatography; Pepton, Daejeon, Korea) 방법으로 정제하였다. 20mM 이미다졸을 포함하는 결합 완충액을 가지고 세척한 후, 로딩된 단백질을 용출 완충액(500mM 이미다졸, 20mM Tris, 0.5 NaCl, pH 7.4)으로 용출하였다. 용출된 단백질 분획을 PBS(GE healthcare)와 평형시킨 후, Superdex-75 컬럼을 사용하여 추가로 정제하였다. 내독소(Endotoxin)를 제거하기 위하여 정제한 RSV G 단백질에 트리톤 (Triton) X-114가 1%가 되도록 넣고, 강하게 볼텍싱(vortexing)을 한 후, 4°C에서 흔들어주면서 30분간 배양하였다. 다음 37°C 워터배스(water bath) 에서 20분간 배양을 하고, 14,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 층을 분리하였다. 다음 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 위 과정을 5번 반복하였고, 메탄올로 세척한 SM-2 비드(Bio-Rad, Hercules, CA) 100 μ g을 위 튜브에 넣고 2시간 동안 로테이터(rotator)에서 배양하였다. 14,000

rpm에서 5분간 원심분리를 하였고, 상층액을 Spin-X(Corning Costar, Lowell, MA)를 이용하여 여과하였다. 다음 생물학적내독소시험(limulus ameobocyte lysate, LAL) 어세이 키트(Lonza, Switzerland)를 이용하여 내독소 수준을 측정하였다. 내독소 수준은 5EU/mg 보다 적었다.

- [72] 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 어세이(Bio-Rad Laboratories)에 의해 측정하였다. 원심분리 필터, Amicon® ultra (Millipore, Bedford, MA)를 추가적인 농축을 위해 사용하였다. 정제된 단백질은 15% SDS-PAGE를 한 후, 코마시 브릴리언트 블루 (Coomassie Brilliant Blue) 염색법으로 확인하였다. Gcf 백신의 순도는 RSV-특이적 염소 다클론항체 (US Biological) 및 HRP-결합 항-염소 Ig 항체 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA)를 사용한 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다. 정제된 단백질은 사용 전까지 -80°C에서 분획으로 보관하였다.
- [73] 그 결과, ~17KDa 크기의 과발현된 RSV G 단백질 단편(Gcf)을 확인할 수 있었으며, 이것으로 대장균(E. coli)에서의 RSV G 단백질 단편의 발현 정도와 정제과정을 알 수 있다(도 2).

[74]

[75] **실시예 3 : 면역화(Immunization)와 RSV 감염**

- [76] RSV G 단백질의 단편으로 구성된 백신조성물이 면역화되었을 때 생체 내에서 항원 특이적인 면역반응을 유도하는지 여부를 알아보기 위하여, 6주 내지 8주된 암컷 BALB/C 생쥐(Charles River Laboratories Inc. Yokohama, Japan)에 20 μ g의 정제된 G 단백질 단편을 각각 두번(0일째 및 14일째), 설하(sublingual, s.l.) 또는 비강(intranasal, i.n.) 경로를 통해서 면역화(immunization)시켰다. 설하 면역화를 위해, 생쥐를 케타민(ketamine)으로 복강주사하여 마취시키고 15 μ l의 RSV G 단백질 단편을 설하 부위를 통해 단독으로 투여하거나(이하 RSV-Gcf라 명명한다), 또는 면역증강제인 콜레라 독신 (CT; Cholera toxin) 2 μ g을 혼합하여 투여하였다. 비강 면역화를 위해서는, 생쥐를 아이소플루란(isoflurane)으로 마취시키고 왼쪽 콧구멍에 50 μ l의 백신 또는 PBS를 투여하였다. 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide)(Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)를 포함한 포르말린 (Formalin) 으로 불활성화시킨 FI-RSV(formalin-inactivated RSV)(1 $\times$ 10⁵ pfu in 50 μ l)를 마취된 생쥐의 발바닥 부위(foot pad)를 통해 투여하였다. 양성 대조군으로서, 생 RSV(1 $\times$ 10⁵ pfu)를 비강으로 투여하였다. 마지막 면역화 후 3 내지 4주 후에 생쥐에게 비강으로 1 $\times$ 10⁶ 또는 2 $\times$ 10⁶ PFU의 생 RSV A2를 처리하였다.

[77]

[78] **실시예 4 : IgG 유도효과 측정**

- [79] 실시예 3의 방법으로 각각 면역화된 생쥐의 안와후총(retroorbital plexus)에서 헤파린 처리 미세관(heparinized capillary tube)을 통해 혈액을 채취하여 원심 분리를 통해 혈청을 얻었으며, RSV G 단백질에 특이적인 항-RSV IgG 역가를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 확인하였다. 96-웰 플레이트를

BS에 희석된 2×10^3 PFU의 정제된 RSV A2 바이러스로 웰당 $100\mu\text{l}$ 으로 하룻밤 코팅하였고, 2% BSA 및 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS로 블로킹(blocking)하였다. 그 후, 혈청 또는 BAL 용액을 연속적인 희석물에 첨가하고, 2시간 배양하였다. 다음으로, PBST(Phosphate Buffered Saline Tween 20) 0.05%로 5번 플레이트를 세척하여 준 뒤 여러 농도의 HRP(horseradish-peroxidase)를 접합시킨 토끼 유래의 항-마우스 2차 항체인 (HRP-conjugated affinity-purified rabbit anti-mouse antibody) IgG(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)를 1시간 동안 붙여주었다. 그 뒤 3번 세척 후 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine)으로 발색시키고, 1M H_3PO_4 로 발색을 멈춘 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(Thermo ELISA plate reader)(도 3).

- [80] 상기와 같이, 면역조치 2주 후에 ELISA를 이용하여 G-특이적 IgG의 유도 정도를 측정한 결과, RSV G 단백질 단편 (RSV-Gcf) 설하투여, RSV-Gcf/CT(Cholera toxin) 설하투여, 발바닥을 통한 FI-RSV의 근육내 투여, RSV-Gcf 비강투여, RSV-Gcf/CT 비강투여를 통해 면역화한 군 각각의 경우, 대조군(PBS)과 비교하여 모두 혈청에서 IgG 유도가 많이 되는 것을 알 수 있었으며, 놀랍게도 면역증강제(CT)를 넣지 않은 RSV-Gcf 단독 설하투여군 또는 비강투여군에서도 두번의 투여에 의해 RSV G 특이적 IgG 항체반응이 생성됨을 확인할 수 있었다(도 3).
- [81] 따라서, 본 발명에 따른 RSV G 단백질 단편 백신조성물은 설하투여 또는 비강투여에 의해 IgG 반응을 잘 유도한다는 것을 알 수 있다.

[82]

[83] 실시예 5 : IgA 유도효과 측정

- [84] 점막에 존재하는 분비성(secretory) IgA는 숙주가 점막을 통해 침입하는 외부 병원체에 대해 방어하는 첫번째 최전방 기작이다. 그러므로 효과적인 RSV 백신은 바이러스 특이적인 분비성 IgA를 호흡기 점액성 영역에 잘 유도시킬 수 있어야 한다. RSV G 단백질 단편 백신조성물이 IgA 반응을 잘 유도해 내는지 조사하기 위해서 다음과 같은 실험을 수행하였다.

- [85] 실시예 3의 방법으로, RSV를 감염시킨 후 5일 후에 생쥐를 마취를 통해 희생시킨 후 기관(trachea)을 절개하여 1ml 주사기에 연결된 튜브를 삽입하여 폐와 기관지를 0.8 ml PBS로 3회 세척하였다. 기관지폐포 세정액(Bronchoalveolar lavagefluid; BAL)에 포함된 세포들을 원심분리로 모은 후 상층액으로 분비성(secretory) IgA 역가를 상기와 같이 ELISA 방법으로 측정하였다(도 4).

- [86] 상기와 같이 ELISA를 이용하여 특이적 IgA의 유도 정도를 측정한 결과, RSV G 단백질 단편 (RSV-Gcf) 설하투여, RSV-Gcf/CT(Cholera toxin) 설하투여, 발바닥을 통한 FI-RSV의 근육내 투여, RSV-Gcf 비강투여, RSV-Gcf/CT 비강투여를 통해 면역화한 군 각각의 경우, 대조군(PBS)과 비교하여 모두 호흡기도에서 IgA 유도가 많이 되는 것을 알 수 있었으며, RSV-Gcf 단독 설하투여군 또는

비강투여군에서도 분비 IgA 반응이 관찰되었다(도 4).

- [87] 따라서, RSV G 단백질 단편 백신 조성물이 호흡기 점액성영역에서 설하투여 또는 비강투여에 의해 분비성 IgA 반응을 잘 유도한다는 것을 알 수 있다.

[88]

[89] **실시예 6 : 생쥐 폐조직 내의 RSV 역가 측정**

- [90] 유도된 면역반응의 방어특성을 알아보기 위해 면역화된 생쥐를 4주 후에 호흡기를 통해 RSV A2를 5×10^6 PFU로 감염시킨 후 방어효율을 살펴보았다. 4일 후 생쥐를 마취시켜 죽인 후 폐조직을 떼어내어 변형이글배지(Eagle's modified essential medium)에 담았다. 이후 조직을 스틸 스크린에 갈아 단일세포 부유액으로 만들고 $70 \mu\text{m}$ 세포 스트레이너(BD Labware, Franklin Lakes, NJ)에 걸러내었다. 상층액을 모아서 플라크 분석법(plaque assay)을 통해 RSV 역가를 측정하였다(도 5).

- [91] 그 결과, 대조군 생쥐의 폐 조직에서는 살아있는 RSV가 발견된 반면, RSV G 단백질 단편을 설하경로 또는 비강경로로 면역화한 군에서는 RSV 복제가 억제되어 바이러스가 거의 발견되지 않았다(도 5). FI-RSV나 생 RSV A2를 감염시킨 뒤 RSV를 시험 감염한 군에서도 동일한 방어효과를 보였으나, FI-RSV 군의 경우에는 현저한 체중 감소 및 질병을 나타내었다. 이러한 결과는 설하점막 또는 비강점막을 통한 RSV G 단백질 단편 백신의 면역화가 RSV 감염에 대한 안정적이고 효과적인 방어 면역을 유도함을 보여준다.

[92]

[93] **실시예 7 : G 단백질 특이적 T 세포의 반응 측정**

- [94] 설하투여에 사용한 RSV G 단백질 단편은 알려진 I-E^d-제한된 CD4 T-cell 에피토프를 가지고 있기 때문에 우리는 RSV G 단백질 단편 투여가 G 단백질 특이적 CD4 T 세포를 유도하고 더불어 폐 호산구증을 유발하는지 아닌지 조사하였다. RSV-Gcf 또는 FI-RSV 로 면역화된 생쥐들을 4주 후 RSV로 감염시키고 4일 후에 폐의 면역세포들을 분리해내어 G 단백질 I-E^d-제한 면역우성 에피토프 (immunodominant epitope, 183-195) 펩티드로 자극하여준 후 IFN- γ 생산 여부를 염색해 알아보았다.

- [95] 면역세포를 분리하기 위한 방법은 다음과 같다. 생쥐 심장의 우심실에 10 U/ml 헤파린 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 함유한 5ml PBS를 25-게이지 바늘의 주사기를 통해 넣으면서 관류(perfusion)하였다. 그리고 폐를 적출하여 10% FBS(HyClone, Logan, UT)를 포함한 RPMI 배지 스틸 스크린(RPMI Medium steel screen)에 갈아 단일세포 부유액(single cell suspension)으로 만들고 $70 \mu\text{m}$ 세포 여과체(cell strainer; BD Labware, Franklin Lakes, NJ)에 걸러 내었다. 이후 세포를 원심분리기를 통해 분리하여 내고 PBS/3% FBS/0.09% NaN₃ 완충액에서 적절한 형광색소가 접합된(fluorochrome-conjugated) 항체로 염색하였다. 사용된 항체는 anti-CD3e (clone145-2C11), anti-CD4 (cloneRM4-5), anti-CD11b (clone M1/70), anti-CD11c (HL3), anti-CD14 (rmC5-3), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD80 (clone

16-10A1), 및 anti-Siglec F (clone E50-2440)로 모든 항체는 BD PharMingen (San Diego, CA)에서 구입하였다. 염색이 끝난 후 세포들을 PBS/2% (wt/vol) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시키고, FACSCalibur™ 유세포 분석기(flow cytometer; BD Biosciences, San Diego, CA)를 통해 분석하였다.

- [96] IFN- γ 를 분비해내는 세포를 분석하기 위해서 세포내 염색을 하였는데 방법은 다음과 같다. 2×10^6 의 폐세포를 배양튜브에 담고 $10 \mu\text{M}$ G 단백질 면역우성 에피토프 펩티드 (WAICKRIPNKKPG)를 넣고 5시간 동안 37°C 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 브레펠딘 A (Brefeldin A; Sigma-Aldrich) $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 또한 배양시간 동안 넣어주어 IFN- γ 이 세포 내에 축적 되도록 하였다. 그리고 세포표면의 마커를 염색, 세척, 고정시킨 후 0.5% 사포닌 (Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)이 첨가된 FACS 완충액로 침투시킨 뒤, IFN- γ (clone XMG1.2) 항체로 염색하였다. 죽은 세포들은 제외시키고, 데이터는 CELLQuest™ 소프트웨어 (BD Biosciences)을 통해 수집하고, CELLQuest™와 WinMDI 버전 2.9 소프트웨어 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA)를 통해 분석하였다(도 6).

- [97] 그 결과, 도 6과 같이 G 단백질-특이적 CD4 T 세포의 반응을 세포 내 IFN- γ 염색을 통해 보았을 때 RSV G 단백질 단편을 이용하여 설하 투여 경로를 통해 면역화한 생쥐들에서는 거의 보이지 않았다(폐의 전체 CD4 T 세포 중 약 1.4%). 반면에 Gcf/CT 및 생 RSV로 면역화한 군에서는 폐의 전체 CD4 T 세포 중 2.5 내지 3% 이상의 CD4 T 세포 반응을 나타내었다.

[98]

- [99] 실시예 8 : 호산구(eosinophil) 수 측정

- [100] FI-RSV로 면역화시킨 생쥐에 있어서 이후의 RSV 감염에 의한 호흡기의 호산구증(eosinophilia) 현상은 잘 알려진 사실이다. 실제로 RSV G 단백질 단편의 설하투여 면역화가 이차적 면역병리(immunopathology) 현상인 호산구 증대증을 일으키는지 여부를 조사하기 위하여, 면역화시킨 생쥐를 3주 후에 RSV를 감염시킨 후 5일 후에 생쥐를 마취를 통해 희생시킨 후 기관(trachea)을 절개하여 1ml 주사기에 연결된 튜브를 삽입하여 폐와 기관지를 0.8 ml PBS로 3회 세척하였다. 기관지폐포 세정액에 포함된 세포들을 원심분리로 모은 후 CD45R, CD11c, Siglec-F에 대한 형광항체로 염색한 후 유세포분석기로 CD45R+CD11c-Siglec-F+ 표현형의 호산구(eosinophil) 개수를 측정하였다(도 7).

- [101] 그 결과, 예상대로 FI-RSV로 면역화한 군에서는 눈에 띄게 증가한 호산구를 볼 수 있었던 반면(도 7, 전체 CD45R+ BAL 세포의 ~45%), RSV G 단백질 단편으로 면역화한 군에서는 전체 BAL 세포에서 약 2% 미만이 호산구로 관찰되었다. 이것은 생 RSV를 면역화했을 때와 비슷한 정도이다. 따라서, RSV G 단백질 단편 백신의 설하 경로 면역화는 호산구 증대로 인한 폐의 병리현상을 거의 일으키지 않는다고 볼 수 있다.

[102]

- [103] 실시예 9 : 재조합 Gcf의 주화성 활성

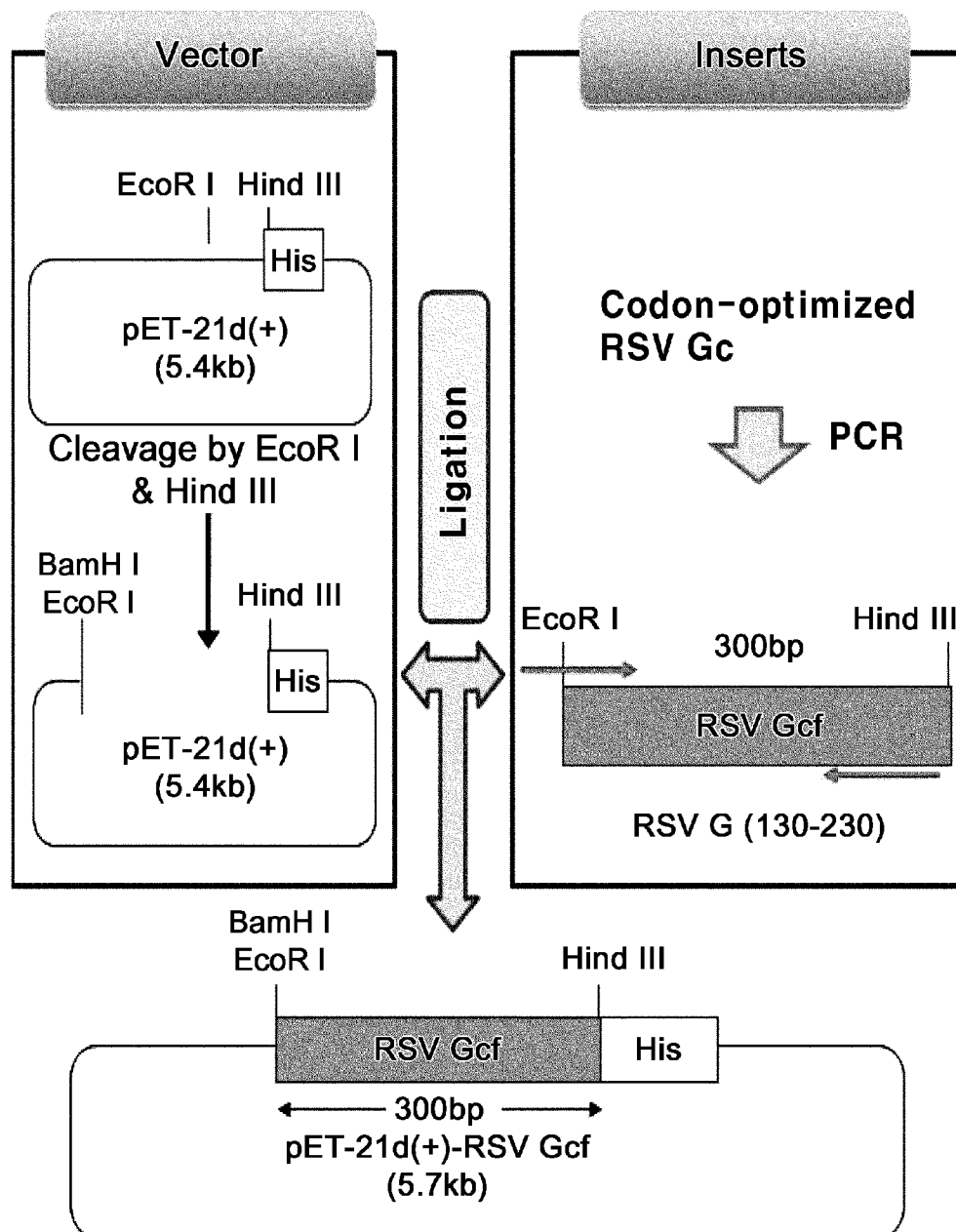
- [104] 면역 증강제 없이도 Gcf의 점막 면역이 강력한 체액성 반응을 일으킴에 착안하여, CX3C 모티프를 가지고 있는 Gcf의 시험관 내 주화성 검사(chemotaxis assay)를 통하여, 정제된 Gcf가 주화성 활성을 나타내는지 여부를 조사하였다. 대조군으로서, 4개의 시스테인이 알라닌으로 치환된 돌연변이 Gcf(Gcf Δ Cys4)를 사용하였다.
- [105] 주화성은 5 μ m 구멍 크기의 24-웰 조직-배양-처리된 트랜스웰 삽입 플레이트 (24-well tissue-culture-treated transwell insert plate, Costar, Corning, NY)를 이용하여 분석하였다. 1% BSA를 포함한 DMEM 배지에서 10 μ g의 Gcf 또는 Gcf Δ Cys4를 하부 챔버에 첨가하였고, 총 5 $\times$ 10⁵ THP-1 세포를 플레이트의 상위 챔버에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 4시간 동안 배양하고, 하부 챔버로 이동한 세포를 수거하여 블라인드 방식(blind manner)으로 카운트하였다. 3번의 실험을 실시하여 평균값을 나타내었다.
- [106] THP-1 세포의 배양시, 야생형 Gcf 및 10% FBS(양성 대조군) 군의 경우에는 이동하는 세포의 숫자가 각각 2.5 내지 3배 증가하였으나, 돌연변이 Gcf 군의 경우에는 야생형 Gcf에 비하여 현저히 감소된 주화성 활성을 나타내었다. 이것은 Gcf의 시스테인 잔기들이 Gcf-매개 주화성 활성화에 필요함을 암시하는 것이다.
- [107] 다음으로, 면역 증강제가 없는 Gcf 단독의 투여에 있어서, 생체내 주화성을 확인하기 위하여, Gcf 단독의 생체내 투여가 면역세포를 해당 위치에 도입시키는지 확인하였다. 도 8의 B에 나타난 바와 같이, Gcf의 비강 투여는 폐로의 CD11c^{hi}CD80⁺, CD11b^{hi}CD14⁺, and CD3⁺ 세포의 침윤을 현저하게 증가시켰으나, 돌연변이 Gcf Δ Cys4는 그렇지 않았다.
- [108] 마지막으로, 재조합 Gcf의 주화성 활성이 면역 증강제가 없는 Gcf 단독의 특이적 면역반응의 유도에 필요한지 여부를 확인하기 위하여, 비강 투여의 방법으로 생쥐를 야생형 Gcf 또는 돌연변이 Gcf Δ Cys4로 면역화시키고, 항체 반응을 확인하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, 특이적인 혈청 항체 반응은 돌연변이 Gcf Δ Cys4의 군에서는 음성 대조군보다 적은 수준으로 관찰되었다. 이러한 결과는 시스테인 잔기들과 Gcf의 주화성 활성화로 인하여 면역 증강제 부재 하에서도 높은 Gcf의 면역원성이 유지될 수 있음을 의미한다.
- [109]

청구범위

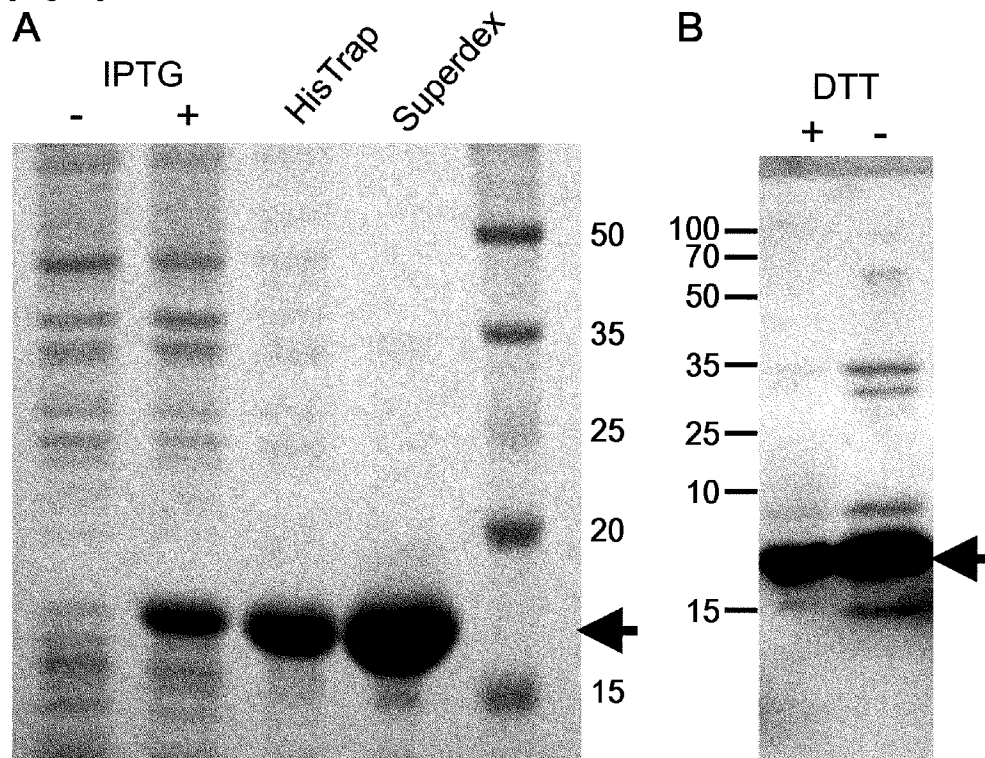
- [청구항 1] 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 발현백터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩티드 단편의 일부가 RSV G 단백질의 N-말단으로부터 131번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 것인 발현백터.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 펩티드 단편의 일부가 RSV G 단백질의 N-말단으로부터 173번째, 176번째, 182번째 및 186번째 아미노산에 시스테인 잔기를 포함하는 것인 발현백터.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 펩티드 단편의 전부 또는 일부가 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 가지는 것인 발현백터.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 핵산 서열이 서열번호 5 또는 6의 핵산 서열을 가지는 것인 발현백터.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 발현백터가 단백질 태그를 코딩하는 핵산 서열 및 종결코돈을 추가로 포함하는 것인 발현백터.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 도 1의 개열지도로 표시되는 발현백터.
- [청구항 8] 제1항의 발현백터에 의해 형질전환된, 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 제조용 원핵세포 형질전환체.
- [청구항 9] 제8항의 원핵세포 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체로부터 발현된 펩티드를 분리 정제하는 단계를 포함하는 호흡기 신시치아 바이러스(RSV)에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신용 RSV G 단백질의 펩티드 단편의 제조방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 원핵세포가 대장균인 것인 방법.
- [청구항 11] 호흡기 신시치아 바이러스(RSV) G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 펩티드 단편의 전부 또는 일부를 포함하는 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 펩티드 단편은 제9항의 방법으로 제조되는 것인 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 백신 조성물은 설하 투여 또는 비강 투여에 적합한 제형인 것인 조성물.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 백신 조성물은 1종 이상의 면역증강제를

- 추가로 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 면역증강제는 콜레라 독신, 알루미늄 하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일 또는 생분해성(Biodegradable) 오일인 것인 조성물.
- [청구항 16] 제11항의 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 RSV 감염에 의한 호흡기 질환의 예방 및 치료방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 투여는 설하 투여 또는 비강 투여인 것인 방법.

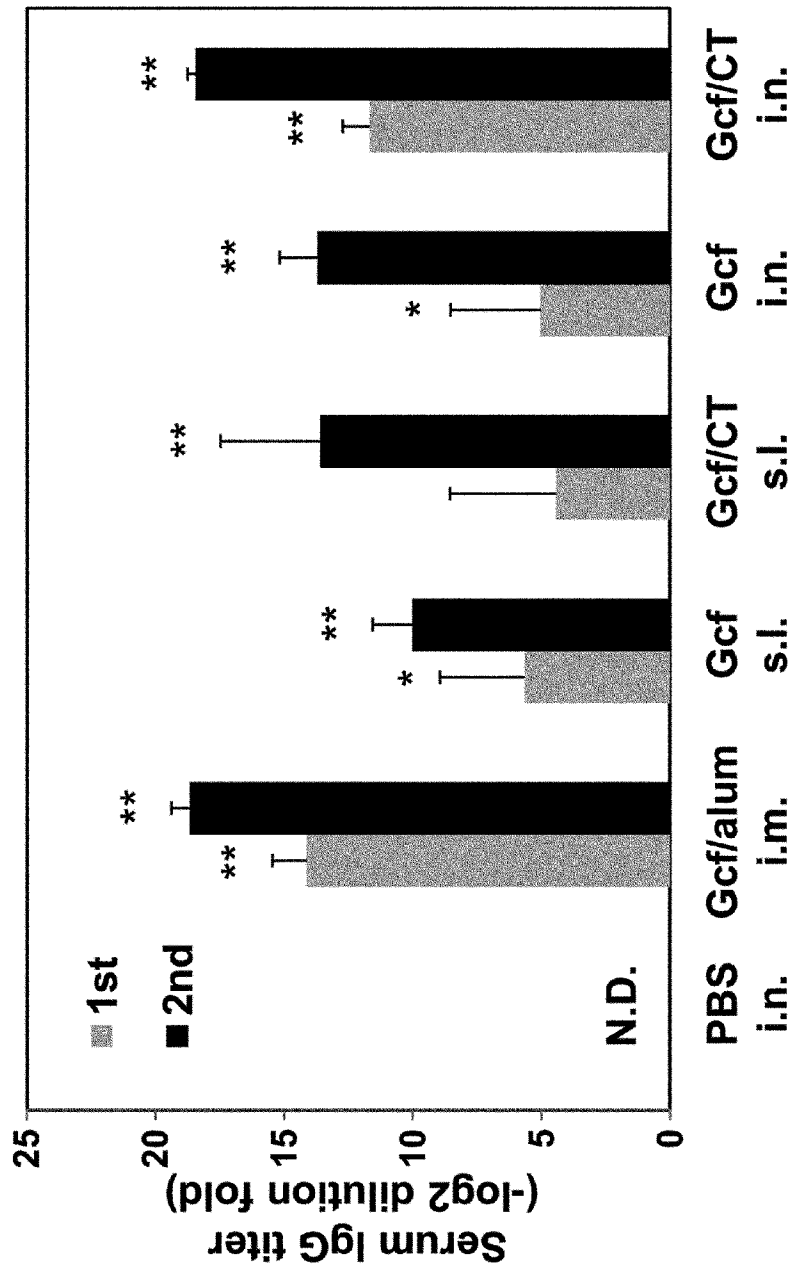
[Fig. 1]



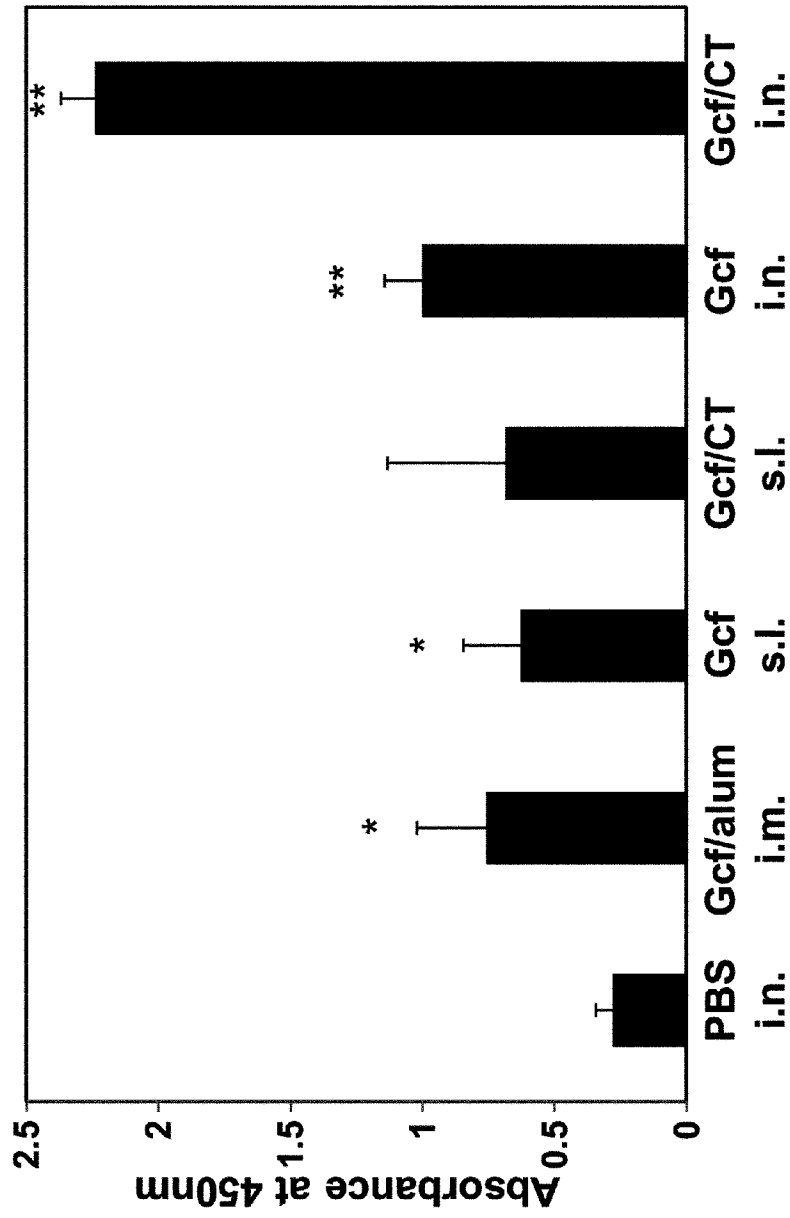
[Fig. 2]



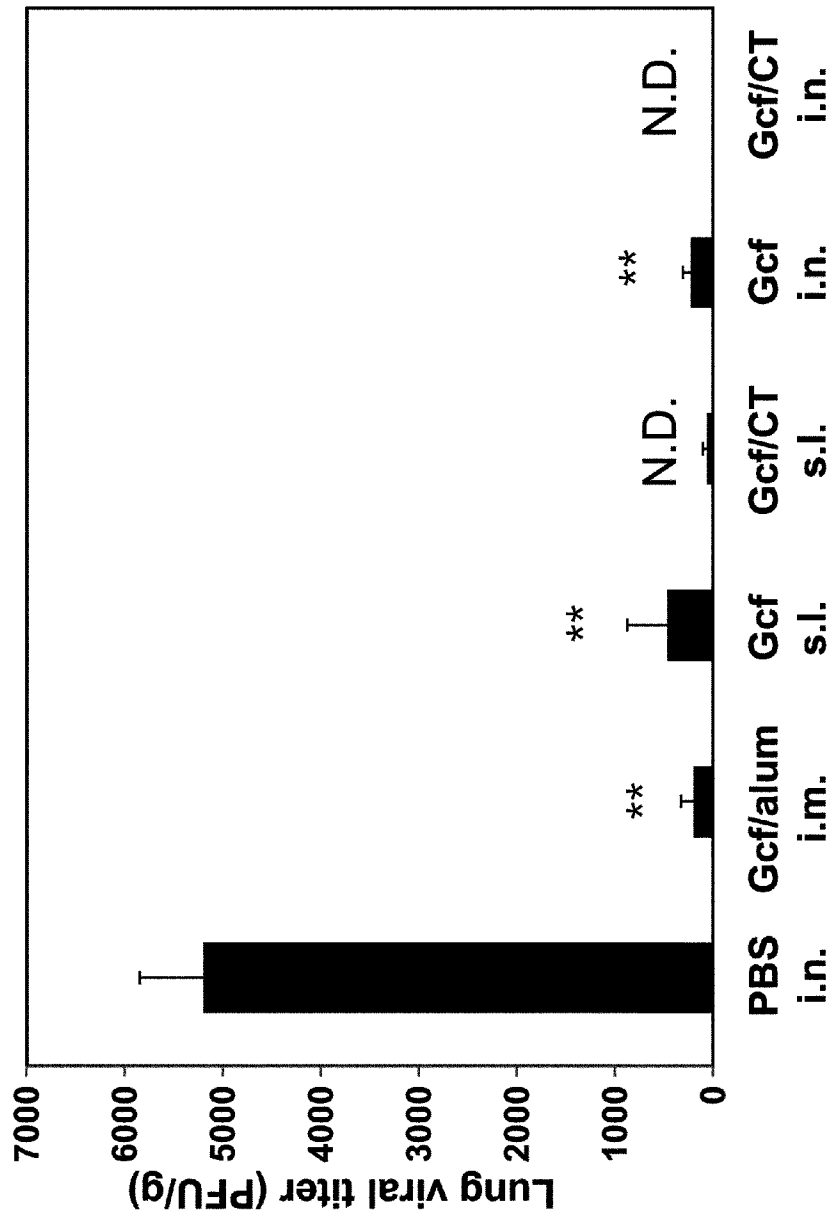
[Fig. 3]



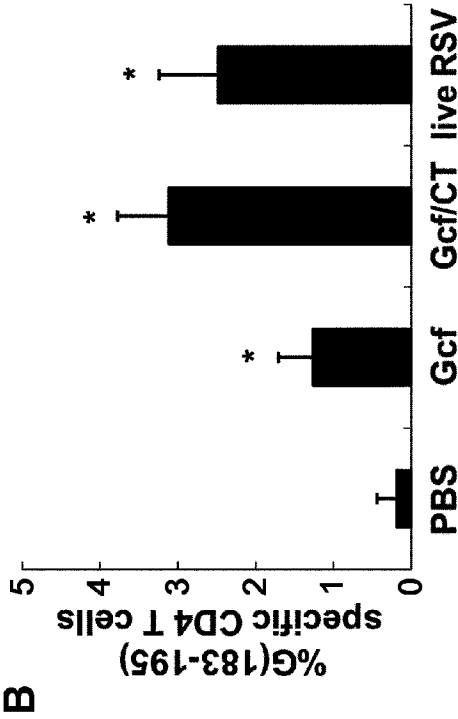
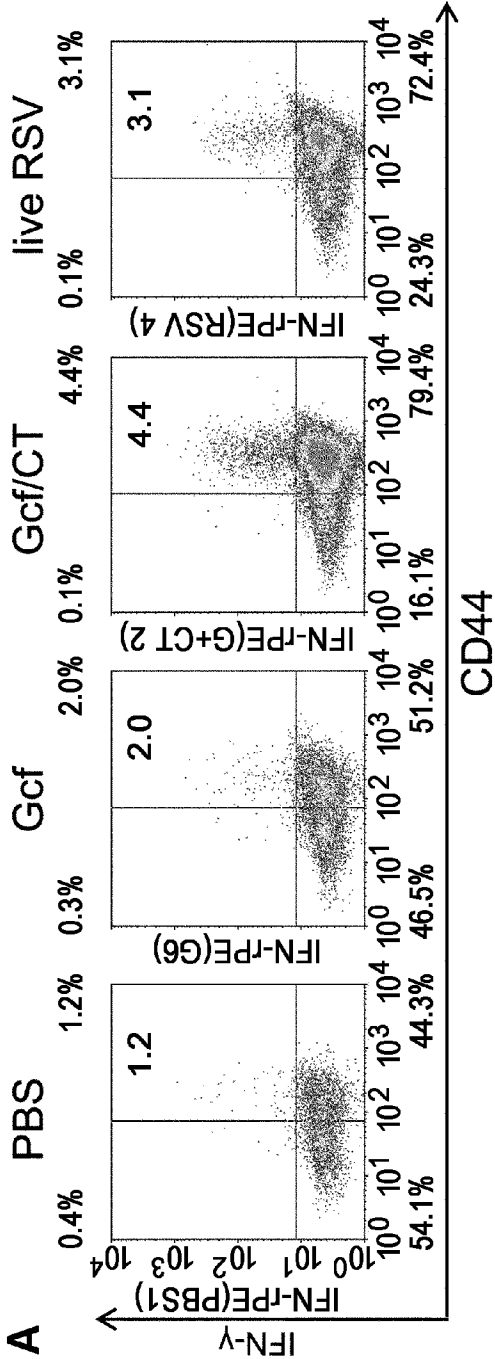
[Fig. 4]



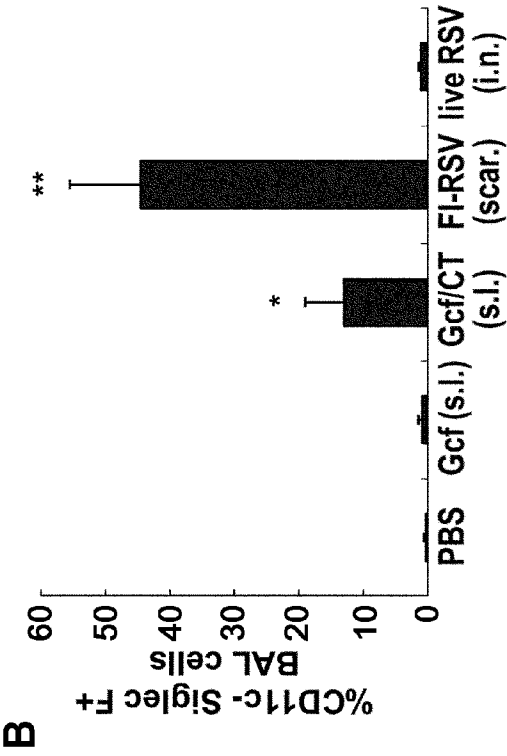
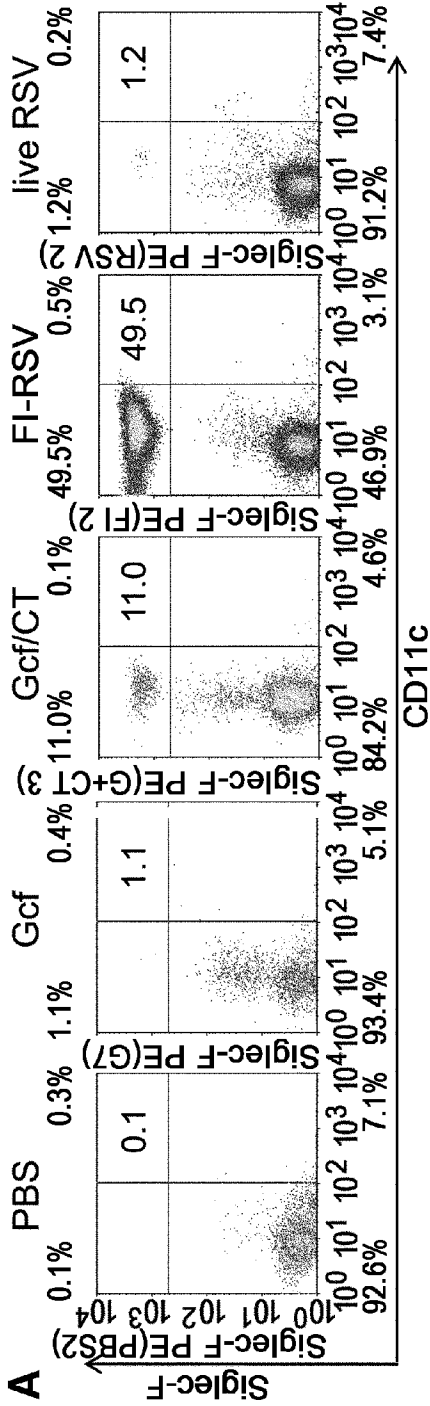
[Fig. 5]



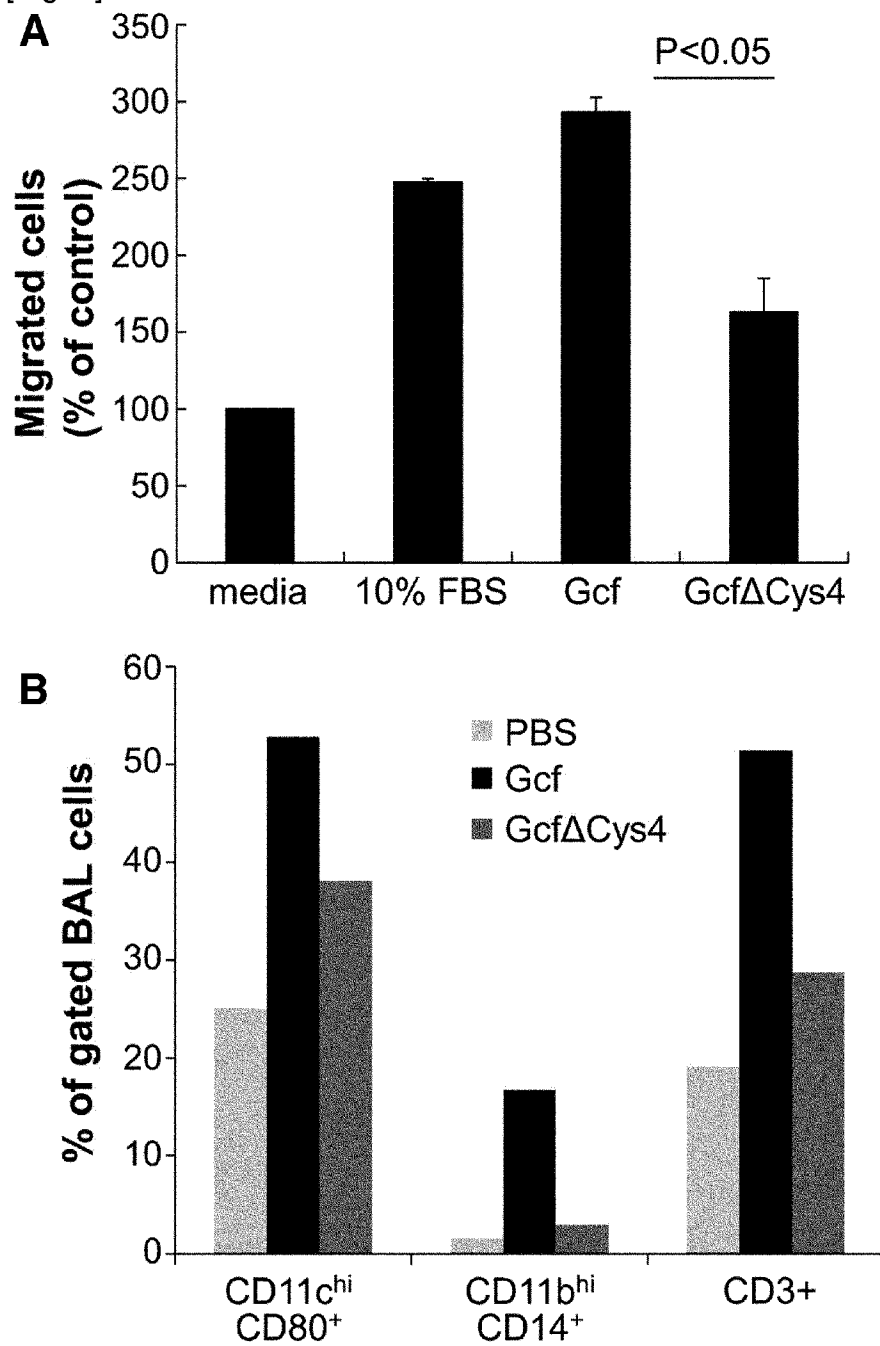
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

