



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0032486
(43) 공개일자 2012년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/205 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7030778
(22) 출원일자(국제) 2010년06월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년12월22일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2010/000874
(87) 국제공개번호 WO 2010/142030
국제공개일자 2010년12월16일
(30) 우선권주장
61/184,959 2009년06월08일 미국(US)

(71) 출원인
더 유니버시티 오브 웨스트 온타리오
캐나다, 온타리오 엔6취 4엑스 8, 런던, 콜럼비아
클 100, 스위트 105, 더 고든 모간슨 빌딩
(72) 발명자
강, 철용
캐나다, 온타리오 엔6취 4엑스9, 런던, 글렌리지
크레센트 111
김, 경년
캐나다, 온타리오 엔6에이치 4피4, 런던, 아파트
714, 플래츠 레인 251
(74) 대리인
김순용

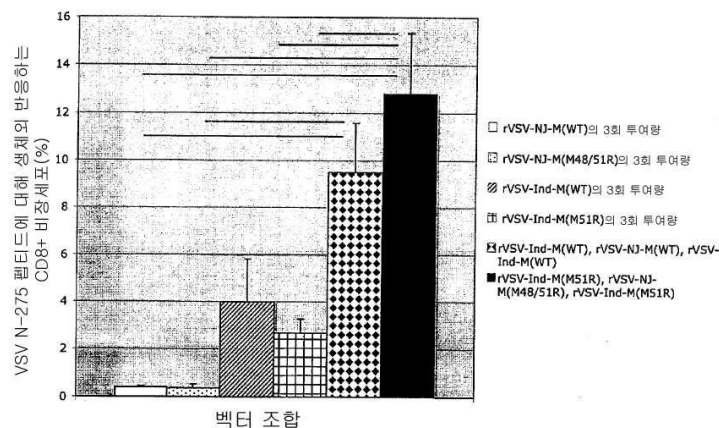
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 면역화 요법용 발현 벡터로서의 수포성 구내염 바이러스의 상이한 혈청형

(57) 요약

포유동물에서 면역 반응을 유도하고 포유동물에서 병원성 감염을 예방하거나 치료하기에 유용한 면역화 플랫폼, 면역화 요법 및 약제가 제공되며, 상기 면역화 플랫폼 및 약제는 하나의 혈청형의 재조합 수포성 구내염 바이러스(rVSV) 및 다른 혈청형의 rVSV를 포함하며, 프라임 부스트 면역화 요법에 사용된다. 본 발명의 양태에서, 하나의 VSV 혈청형은 인디애나이고, 다른 VSV 혈청형은 뉴저지이다.

대표도 - 도8a



특허청구의 범위

청구항 1

프라임 부스트 면역화 전략(prime boost immunization strategy)에 사용하기 위한 면역화 플랫폼에 있어서,

- (a) 하나의 혈청형의 재조합 수포성 구내염 바이러스(rVSV)를 포함하는 하나의 백신 또는 면역성 조성물; 및
- (b) 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 다른 백신 또는 면역성 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역화 플랫폼.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 하나의 혈청형이 인디애나이고, 상기 다른 혈청형이 뉴저지인 것을 특징으로 하는 면역화 플랫폼.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 2개의 rVSV 혈청형 각각은 돌연변이 기질 단백질(M) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역화 플랫폼.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 하나의 혈청형은 상기 다른 혈청형의 표면 당단백질(G) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역화 플랫폼.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 2개의 rVSV 혈청형은 해당되는 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 면역화 플랫폼.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 2개의 rVSV 혈청형은 하나 이상의 C형 간염 바이러스(HCV) 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 면역화 플랫폼.

청구항 7

면역화 요법에 있어서,

제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물의 프라임 투여량(prime dose)을 대상에 투여한 후, 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물의 부스트 투여량(boost dose)을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 부스트 투여량의 투여는 상기 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물의 적어도 1회 이상의 투여량 이후에 이루어지는 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 제 1 혈청형은 인디애나이고, 상기 제 2 혈청형은 뉴저지인 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 10

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 제 1 혈청형은 뉴저지이고, 상기 제 2 혈청형은 인디애나인 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형은 돌연변이 M 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 12

제 7 항에 있어서, 상기 제 2 rVSV 혈청형은 상기 제 1 rVSV 혈청형의 G 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 13

제 7 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형은 해당되는 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 14

제 7 항에 있어서, 상기 해당되는 하나 이상의 단백질은 HCV, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 한타바이러스(Hantavirus), 인플루엔자(influenza) 바이러스, 에볼라(Ebola) 바이러스, 뎅기 출혈열(Dengue hemorrhagic fever) 바이러스, 일본 뇌염(Japanese encephalitis) 바이러스 및 SARS 코로나바이러스(coronavirus)로 이루어진 군으로부터 선택된 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질인 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 15

제 7 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형은 하나 이상의 HCV 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 16

제 7 항에 있어서, 상기 제 1 혈청형은 인디애나이고, 상기 제 2 혈청형은 뉴저지이되, 상기 rVSV 인디애나 및 rVSV 뉴저지 둘 모두는 돌연변이 M 유전자를 포함하고, 상기 rVSV 인디애나 및 rVSV 뉴저지는 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 면역화 요법.

청구항 17

포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 있어서,

(a) 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 상기 포유동물에 투여하되, 상기 제 1 백신 또는 면역성 조성물이 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 단계; 및

(b) 제 2 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 상기 대상에 투여하되, 상기 제 2 백신 또는 면역성 조성물이 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 방법은 (c) 상기 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 상기 대상에 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 19

제 17 항 또는 제 18 항에 있어서, 상기 제 1 혈청형은 인디애나이고, 상기 제 2 혈청형은 뉴저지인 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 20

제 17 항 또는 제 18 항에 있어서, 상기 제 1 혈청형은 뉴저지이고, 상기 제 2 혈청형은 인디애나인 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 21

제 17 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형은 돌연변이 M 유전자를 포함하는 것으로 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 22

제 17 항에 있어서, 상기 제 2 rVSV 혈청형은 상기 제 1 rVSV 혈청형의 G 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 23

제 17 항에 있어서, 상기 면역 반응은 액성 및/또는 세포성 면역 반응을 포함하는 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 24

제 17 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형은 세포 매개 및/또는 액성 면역 반응을 유도하는 능력을 갖는 바이러스 유사 입자를 생성할 수 있는 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 25

제 17 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형은 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있고, 상기 면역 반응이 상기 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질에 대한 면역 반응을 더 포함하되, 상기 외생성 바이러스는 인간 HCV, HIV, 웨스트 나일 바이러스, 한타바이러스, 인플루엔자 바이러스, 에볼라 바이러스, 탕기 출혈열바이러스, 일본 뇌염 바이러스 및 SARS 코로나바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 26

제 17 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형은 하나 이상의 HCV 단백질을 발현할 수 있고, 상기 면역 반응은 상기 하나 이상의 HCV 단백질에 대한 면역 반응을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 VSV에 대한 면역 반응의 유도 방법.

청구항 27

병원균에 대한 면역 반응을 유도하는데 유용한 복합 약제에 있어서,

(a) 상기 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 하나의 혈청형의 rVSV를 포함하는 하나의 백신 또는 면역성 조성물; 및

(b) 상기 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 다른 백신 또는 면역성 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 약제.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 하나의 혈청형은 rVSV 인디애나이고, 상기 다른 혈청형은 rVSV 뉴저지이되, 상기 rVSV 인디애나 및 rVSV 뉴저지는 돌연변이 M 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 약제.

청구항 29

병원균에 의해 야기되는 감염을 예방하거나 치료하기 위한 방법에 있어서,

(a) 상기 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계; 및

(b) 상기 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 제 2 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 상기 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 병원균에 의해 야기된 감염의 예방 또는 치료 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 상기 방법은 (c) 상기 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 상기 대상에 투여하는 단

계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 병원균에 의해 야기된 감염의 예방 또는 치료 방법.

청구항 31

제 29 항 또는 제 30 항에 있어서, 상기 제 1 혈청형은 rVSV 인디애나이고, 상기 제 2 혈청형은 rVSV 뉴저지인 것을 특징으로 하는 병원균에 의해 야기된 감염의 예방 또는 치료 방법.

청구항 32

제 29 항 또는 제 30 항에 있어서, 상기 제 1 혈청형은 rVSV 뉴저지이고, 상기 제 2 혈청형은 rVSV 인디애나인 것을 특징으로 하는 병원균에 의해 야기된 감염의 예방 또는 치료 방법.

청구항 33

키트에 있어서,

(a) 하나의 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신의 유효량의 적어도 1회 투여량, 및

(b) 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신의 유효량의 적어도 1회 투여량을 포함하는 키트.

청구항 34

제 33 항에 있어서, (a) 및 (b)는 약학적으로 허용 가능한 담체에 제형화되는 것을 특징으로 하는 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 재조합 수포성 구내염 바이러스의 2개의 상이한 혈청형을 포함하는 백신 또는 면역성 조성물의 신규한 플랫폼(platform), 및 인간 병원균에 대한 예방 및 치료용 백신화 요법을 위한 조성물 및 방법에서의 신규한 플랫폼의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 본 명세서 전반에 걸쳐, 본 발명이 속하는 당해 기술분야를 더욱 상세하게 기술하기 위해 꺾쇠괄호([]) 안에 다양한 인용문헌이 인용되어 있다. 이들 인용문헌의 개시내용은 본 발명의 개시내용에서 참고로서 인용된다.

[0003] CD8+CTL을 프라이밍(priming)하는 최선의 방법은 바이러스성 또는 박테리아성 벡터를 이용하여 DNA 형질감염(transfection) 또는 감염에 의해 표적 항원을 합성하는 것이다. 바이러스성 백신 벡터로서의 요건은 광범위한 숙주의 범위 및 해당되는 유전자의 양호한 발현이다. 수포성 구내염 바이러스(VSV)는 대부분의 포유동물 세포를 감염시키며, 감염된 세포 내의 총 단백질의 최대 60%까지 바이러스성 단백질을 발현시킨다[Kim, G.N., and C.Y. Kang. Virology 357:41, 2007]. 사실상, VSV는 돼지, 소 및 말을 감염시키고, 구강 및 발 주변에서 수포성 질환을 야기한다. VSV에 의한 인간 감염이 보고되어 있을지라도, VSV는 임의의 심각한 증상을 야기하지 않는다[Fields, B.N., and K. Hawkins. N Engl J Med 277:989, 1967; Johnson, K. M. 등, Am J Trop Med Hyg 15:244, 1966].

[0004] VSV는 5개의 단백질, 즉 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질(N), 인단백질(P), 기질 단백질(M), 표면 당단백질(G) 및 RNA 의존적 RNA 폴리머라제(L)를 암호화하는 음성 가닥 RNA 바이러스이다. 상기 VSV의 N, P 및 L 단백질은 인간 C형 간염 바이러스(HCV) 단백질과 같은 해당되는 유전자뿐만 아니라 양성 센스(positive sense) 및 음성 센스(negative sense) 게놈성 RNA 및 mRNA의 합성을 위해 요구되며, 이들 RNA는 VSV 단백질의 합성에 필수적이다.

[0005] cDNA로부터 재조합 VSV를 생성하기 위한 VSV 역유전 시스템(reverse genetics system)의 개발[Lawson, N.D. 등, Proc Natl Acad Sci USA 92:4477, 1995; Whelan, S.P. 등, Proc Natl Acad Sci USA 92:8388, 1995] 이후로 VSV는 다양한 병원균의 면역화를 위한 바이러스성 백신 벡터로서 연구되어 왔다[Brandsma, J.L. 등, J Virol 81:5749, 2007; Daddario-DiCaprio, K.M. 등, J Virol 80:9659, 2006; Kohl, W. 등, J Gen Virol 88:157, 2007; Kuate, S. 등, Virology 362:26, 2007; Palin, A. 등, Vaccine 25:741, 2007; Schwartz, J.A. 등, Virology 366:166, 2007].

[0006] VSV가 빠르게 복제하는 바이러스일지라도, 결과적으로는 VSV에 대한 액성 및 세포성 면역 반응이 임의의 기타

바이러스성 백터와 같이 동물 숙주에서 유도될 것이다[Yewdell, J.W. 등, J Exp Med 163:1529-1938, 1986; Puddington, L. 등, J Virol 60:708- 717, 1986; Kalinke, U. 등, Immunity 5:639-652, 1996]. VSV로 감염된 동물은 중화 항체를 포함하여 1 또는 2주 이내에 면역 반응을 개시하며[Kalinke, U. 등, Immunity 5:639-652, 1996], 이는 동일한 백터에 의한 백신화로 인해 부스트 면역화(boost immunization)의 효율을 저해한다. VSV는 바이러스성 표면 당단백질(G)에 대한 혈청형 특이적 항체에 의해 중화된다. VSV의 2개의 상이한 혈청형인 VSV-인디애나(VSV-Indiana, VSV_{Ind}) 및 VSV-뉴저지(VSV-New Jersey, VSV_{NJ})는 당단백질에서 50% 아미노산 동일성을 나타낸다[Gallione, C.J., and Rose, J.K.J. Virol. 46:162-169, 1983]. VSV의 하나의 혈청형에 대해 증가된 항체는 VSV의 다른 혈청형을 중화시키지 못한다[Cartwright, B., and Brown, F.J. Gen. Virol. 16:391-398, 1972]. 따라서 이 외에도 바이러스성 백터에 대한 이러한 면역 반응에 의해 야기되는 문제점을 최소화하기 위해 당단백질이 VSV_{NJ}의 당단백질로 치환되어 있는 백신 백터로서 VSV_{Ind}가 사용되어 왔다[Rose, N.F. 등, J. Virol. 74:10903-10910, 2000; Rose, N.F. 등, Cell 106:539-549, 2001].

- [0007] VSV_{NJ} 혈청형의 G 단백질과 함께 VSV_{Ind}가 액성 면역 반응을 회피하는데 유용할지라도, 이는 N, P, M 및 L 단백질을 포함하는 기타 VSV 단백질에 의해 유발될 수 있는 세포성 면역 반응을 예방하지 못할 것이다. G 단백질이 아닌 VSV 단백질에 대한 세포성 면역 반응은 해당되는 항원에 대한 불완전한 면역 반응을 초래할 수 있다. 따라서 다른 혈청형으로부터 부가적인 재조합 VSV를 생성하는 경우에 살아있는 바이러스성 백신 백터로서의 VSV의 이용 효율이 증가될 수 있다.
- [0008] 흥미롭게도, 인디애나 혈청형과 뉴저지 혈청형 사이의 교차 반응성의 세포독성 T-림프구 반응에 대한 가능성으로 인해 불완전한 rVSV_{NJ} 혈청형 백터의 생성을 시도하지 않는 것으로 앞서 제안되었다[Clarke 등, Springer Semin Immun 28:239, 2006].
- [0009] 상기 배경기술의 견지에서, 액성 및 세포성 면역 시스템 둘 모두를 이용하여 면역예방법(immunoprophylaxis) 및 면역요법을 위한 접근법을 제공하는 것이 유리할 수 있다. 상기와 같이, 본 출원인은 감염원(infectious agent)에 대한 반응을 유도하는 백신의 조합을 포함하는 시스템을 개발하였다.
- [0010] 발명의 요약
- [0011] 일 양태에서, 본 발명은 프라임 부스트 면역화 전략(prime boost immunization strategy)에 사용하기 위한 면역화 플랫폼을 제공하며, 상기 면역화 플랫폼은 (a) 하나의 혈청형의 재조합 수포성 구내염 바이러스(rVSV)를 포함하는 하나의 백신 또는 면역성 조성물, 및 (b) 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 다른 백신 또는 면역성 조성물을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 본 발명의 하나의 양태에서, 면역화 플랫폼은 하나의 혈청형이 인디애나이고 다른 혈청형이 뉴저지인 것을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명의 다른 양태에서, 면역화 플랫폼은 2개의 rVSV 혈청형 각각의 돌연변이 기질 단백질(M) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명의 다른 양태에서, 면역화 플랫폼은 하나의 혈청형이 다른 혈청형의 표면 당단백질(G) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 다른 양태에서, 면역화 플랫폼은 2개의 rVSV 혈청형이 해당되는 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에서, 면역화 플랫폼은 2개의 rVSV 혈청형이 하나 이상의 C형 간염 바이러스(HCV) 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 면역화 요법을 제공하며, 상기 면역화 요법은 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물의 프라임 투여량(prime dose)을 대상에 투여한 후, 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물의 부스트 투여량(boost dose)을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 일 양태에서, 면역화 요법은 부스트 투여량의 투여가 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물의 적어도 1회 이상의 투여량 이후에 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 다른 양태에서, 면역화 요법은 제 1 혈청형이 인디애나이고, 제 2 혈청형이 뉴저지인 것을 특징으로 한다.
- [0020] 다른 양태에서, 면역화 요법은 제 1 혈청형이 뉴저지이고, 제 2 혈청형이 인디애나인 것을 특징으로 한다.

- [0021] 다른 양태에서, 면역화 요법은 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형이 돌연변이 M 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 다른 양태에서, 면역화 요법은 제 2 rVSV 혈청형이 제 1 rVSV 혈청형의 G 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 다른 양태에서, 면역화 요법은 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형이 해당되는 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 다른 양태에서, 면역화 요법은 상기 해당되는 하나 이상의 단백질이 HCV, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 한타바이러스(Hantavirus), 인플루엔자(influenza) 바이러스, 에볼라(Ebola) 바이러스, 뎅기 출혈열(Dengue hemorrhagic fever) 바이러스, 일본 뇌염(Japanese encephalitis) 바이러스 및 SARS 코로나바이러스(coronavirus)로 이루어진 군으로부터 선택된 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질인 것을 특징으로 한다.
- [0025] 다른 양태에서, 면역화 요법은 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형이 하나 이상의 HCV 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 다른 양태에서, 면역화 요법은 제 1 혈청형이 인디애나이고, 제 2 혈청형이 뉴저지이되, rVSV 인디애나 및 rVSV 뉴저지 둘 모두는 돌연변이 M 유전자를 포함하고, rVSV 인디애나 및 rVSV 뉴저지는 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 (a) 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 포유동물에 투여하되, 상기 제 1 백신 또는 면역성 조성물이 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 단계, 및 (b) 제 2 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하되, 상기 제 2 백신 또는 면역성 조성물이 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 일 양태에서, VSV에 대한 포유동물에서의 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 상기 방법이 (c) 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 혈청형이 인디애나이고, 제 2 혈청형이 뉴저지인 것을 특징으로 한다.
- [0030] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 혈청형이 뉴저지이고, 제 2 혈청형이 인디애나인 것을 특징으로 한다.
- [0031] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형이 돌연변이 M 유전자를 포함하는 것으로 특징으로 한다.
- [0032] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 제 2 rVSV 혈청형이 제 1 rVSV 혈청형의 G 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 면역 반응이 액성 및/또는 세포성 면역 반응을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형이 세포 매개 및/또는 액성 면역 반응을 유도하는 능력을 갖는 바이러스 유사 입자를 생성할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0035] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형이 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있고, 상기 면역 반응이 외생성 바이러스의 하나 이상의 단백질에 대한 면역 반응을 더 포함하되, 상기 외생성 바이러스는 인간 HCV, HIV, 웨스트 나일 바이러스, 한타바이러스, 인플루엔자 바이러스, 에볼라 바이러스, 뎅기 출혈열 바이러스, 일본 뇌염 바이러스 및 SARS 코로나바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0036] 다른 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 및 제 2 rVSV 혈청형이 하나 이상의 HCV 단백질을 발현할 수 있고, 상기 면역 반응이 하나 이상의 HCV 단백질에 대한 면역 반응을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은 병원균에 대한 면역 반응을 유도하는데 유용한 복합 약제를 제공하며, 상기 복합 약제는 (a) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 하나의 혈청형의 rVSV를 포함하는 하나의 백신 또는

면역성 조성물, 및 (b) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 다른 백신 또는 면역성 조성물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0038] 일 양태에서, 복합 약제는 하나의 혈청형이 rVSV 인디애나이고, 다른 혈청형이 rVSV 뉴저지이되, rVSV 인디애나 및 rVSV 뉴저지는 돌연변이 M 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0039] 본 발명의 또 다른 양태에서, 병원균에 의해 야기되는 감염을 예방하거나 치료하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계, 및 (b) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 제 2 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0040] 일 양태에서, 병원균에 의해 야기된 감염을 예방하거나 치료하기 위한 본 발명의 방법은 상기 방법이 (c) 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0041] 다른 양태에서, 병원균에 의해 야기된 감염을 예방하거나 치료하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 혈청형이 rVSV 인디애나이고, 제 2 혈청형이 rVSV 뉴저지인 것을 특징으로 한다.

[0042] 다른 양태에서, 병원균에 의해 야기된 감염을 예방하거나 치료하기 위한 본 발명의 방법은 제 1 혈청형이 rVSV 뉴저지이고, 제 2 혈청형이 rVSV 인디애나지인 것을 특징으로 한다.

[0043] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 하나의 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신의 유효량의 적어도 1회 투여량, 및 (b) 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신의 유효량의 적어도 1회 투여량을 포함하는 키트를 제공한다.

[0044] 일 양태에서, 본 발명의 키트는 (a) 및 (b)가 약학적으로 허용 가능한 담체에 제형화되는 것을 특징으로 한다.

[0045] VSV 및 VSV의 2개의 혈청형을 백신 벡터로 이용하는 이점은 하기와 같다:

[0046] (1) VSV의 2개의 혈청형의 이용은 VSV를 보다 유효한 백신 벡터로 만들 수 있는데, 이는 VSV의 하나의 혈청형(제 1 백신)이 VSV의 다른 혈청형(제 2 백신)을 중화시키지 않거나, 또는 VSV의 다른 혈청형으로 감염된 세포를 용이하게 죽이지 않을 것이기 때문이다.

[0047] (2) VSV는 인간에서 심각한 질병을 야기하지 않으며, 대부분의 감염된 사람들이 병든 동물을 다루고 있는 수의사이거나, 또는 VSV에 대해 연구하고 있는 과학자이다. 따라서 일반적인 인간 개체군에서의 혈청반응 양성율(seropositive rate)이 매우 낮으며, 이는 VSV를 매력적인 백신 벡터로 만든다.

[0048] (3) VSV는 감염된 개체에서 자기 제어 방식으로 복제하지만, 여전히 강력한 세포성 및 액성 면역 반응을 유도한다.

[0049] (4) VSV는 배양 시에 대부분의 포유동물 세포에서 잘 복제하며, 높은 바이러스성 적정농도(viral titer)를 수득한다.

도면의 간단한 설명

[0050] 본 발명은 본원에 개시된 상세한 설명 및 첨부된 도면으로부터 더욱 완전하게 이해될 것이며, 이들은 예시를 목적으로 제공되지만, 본 발명의 의도된 범주를 제한하지 않는다.

도 1은 수포성 구내염 바이러스(VSV), 인디애나(Ind) 혈청형 내열성(HR) 균주 및 뉴저지(NJ) 혈청형 헤이즐허스트(Hazlehurst) 균주(Haz)의 유전자 구성을 나타낸다.

도 2는 cDNA로부터 VSV의 회수를 위한 역유전 시스템을 나타낸다.

도 3은 해당되는 유전자가 없는 재조합 VSV의 성장 동역학을 나타낸다.

도 4는 재조합 VSV로 감염된 새끼 햄스터 신장 세포에서의 VSV 단백질의 발현을 나타낸다.

도 5는 1회의 바이러스 및 3회 투여량 계획의 VSV 백신을 투여 받은 Balb/c 마우스에서의 VSV 펩티드 특이적 CD8+ T 세포 반응을 나타낸다.

도 6은 뉴저지-인디애나-뉴저지의 순서로 VSV 백신의 연속적인 투여 계획으로 투여 받은 Balb/c 마우스에서의 VSV 펩티드 특이적 CD8+ T 세포 반응을 나타낸다.

도 7은 인디애나-뉴저지-인디애나의 순서로 VSV 백신의 연속적인 투여 계획으로 투여 받은 Balb/c 마우스에서의

VSV 펩티드 특이적 CD8+ T 세포 반응을 나타낸다.

도 8a는 VSV 백신의 하나 또는 2개의 혈청형을 투여 받은 Balb/c 마우스에서의 VSV 펩티드 특이적 CD8+ T 세포 반응을 비교한 것을 나타낸다.

도 8b는 VSV_{Ind}-M(M51R) + HCV-코어△ER, 이어 VSV_{NJ}-M(M48/51R) + HCV-코어△ER로 백신화되고, 3주 후에 추가적인 투여량으로 VSV_{Ind}-M(M51R) + HCV-코어△ER로 백신화된 일군의 마우스(n=2)에서 HCV MHC I형 펩티드에 의한 생체의 자극 이후에 CD8+ T 세포의 재활성화(패널 우측의 일 세트의 막대그래프)를 비교한 것을 나타낸다.

도 9는 결실 돌연변이의 유무에 따른 VSV_{NJ}의 cDNA 클론 내로의 HCV 코어 유전자의 클로닝(cloning)을 나타낸다.

도 10은 결실 돌연변이의 유무에 따른 VSV_{Ind}의 cDNA 클론 내로의 HCV 코어 유전자의 클로닝을 나타낸다.

도 11은 재조합 VSV_{NJ} M 야생형 및 M 돌연변이체로부터의 HCV 코어 단백질의 발현(A)을 나타낸다. 동일한 세포로부터의 VSV 단백질의 발현이 또한 도시되어 있다(B). 상기 발현은 코어 항체 또는 VSV_{NJ} 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)에 의해 결정되었다.

도 12는 재조합 VSV_{Ind} M 야생형 및 M 돌연변이체로부터의 HCV 코어 단백질의 발현을 나타낸다(A). 동일한 세포로부터의 VSV 단백질의 발현이 또한 도시되어 있다(B). 상기 발현은 코어 항체 또는 VSV_{NJ} 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정되었다.

도 13은 HCV 코어 유전자와 함께 rVSV_{NJ} 및 rVSV_{Ind}로부터의 HCV 코어의 발현을 나타낸다. HCV 코어 단백질은 3H-Leu를 이용하여 1시간 동안 감염된 세포를 표지(labeling)하고 HCV 코어에 대한 항체에 의해 코어 단백질을 면역 침전시킴으로써 검출되었다.

도 14는 rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}) 및 rVSV_{Ind}(M_{M51R})의 cDNA 클론 내로의 HCV NS3 유전자의 클로닝을 나타낸다.

도 15는 NS3을 발현하는 rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}) 및 rVSV_{Ind}(M_{M51R})의 회수를 나타낸다. NS3의 발현, 회수된 rVSV의 혈청형 및 M 표현형은 HCV NS3 항체 및 혈청형 특이적 VSV 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다.

도 16은 rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}) 및 rVSV_{Ind}(M_{M51R})의 cDNA 클론 내로의 HCV NS5A 및 NS5B 유전자의 클로닝을 나타낸다.

도 17은 NS5A를 발현하는 회수된 rVSV_{NJ}(M_{WT}) 및 rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R})을 나타낸다. NS5A의 발현, 회수된 rVSV의 혈청형 및 M 표현형은 HCV NS5A 항체 및 혈청형 특이적 VSV_{NJ} 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다.

도 18은 NS5A를 발현하는 회수된 rVSV_{Ind}(M_{WT}) 및 rVSV_{Ind}(M_{M51R})을 나타낸다. NS5A의 발현, 회수된 rVSV의 혈청형 및 M 표현형은 HCV NS5A 항체 및 혈청형 특이적 VSV_{Ind} 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다.

도 19는 NS5B를 발현하는 회수된 rVSV_{NJ}(M_{WT}) 및 rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R})을 나타낸다. NS5B의 발현, 회수된 rVSV의 혈청형 및 M 표현형은 HCV NS5B 항체 및 혈청형 특이적 VSV_{NJ} 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다.

도 20은 NS5B를 발현하는 회수된 rVSV_{Ind}(M_{WT}) 및 rVSV_{Ind}(M_{M51R})을 나타낸다. NS5B의 발현, 회수된 rVSV의 혈청형 및 M 표현형은 HCV NS5B 항체 및 혈청형 특이적 VSV_{Ind} 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 정의

본 명세서, 실시예 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 특정 용어 및 문구의 의미는 하기와 같이 제공된다. 달리 언급하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 과학적 용어는 본 발명이 속한 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 단수의 관사는 관사의 문법적

목적 중 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

- [0053] 본원에서 사용된 바와 같은 "동물" 및 "대상"이란 용어는 포유동물, 바람직하게는 인간을 포함한 동물계의 모든 멤버를 포함한다.
- [0054] 본원에서 사용된 바와 같은 "유효량"이란 용어는 목적하는 결과를 달성하기 위해 필요한 투여 회수 및 기간 동안에 상기 결과를 달성하기에 유효한 양을 의미한다.
- [0055] "인디애나" 및 "IND"란 용어는 VSV 혈청형 인디애나(VSV_{Ind})를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0056] "M_{WT}" 및 "M(WT)"는 야생형 M 유전자를 갖는 VSV를 지칭하기 위해 사용된다. "M51R"은 51번째 위치에서 메티오닌이 아르기닌으로 변경되어 있는 VSV_{Ind} 내의 M 유전자를 지칭하기 위해 사용된다. "M48R-M51R"은 48 및 51번째 위치에서 메티오닌이 아르기닌으로 변경되어 있는 VSV_{NJ} 내의 M 유전자를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0057] "뉴저지" 및 "NJ"란 용어는 VSV 혈청형 뉴저지(VSV_{NJ})를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0058] "Ind-M(M51 R)/NJ G"는 돌연변이 M 유전자를 가지면서 VSV 혈청형 뉴저지(VSV_{NJ}) G 단백질을 발현하는 VSV_{Ind}를 지칭하기 위해 사용된다. "Ind-M(WT)/NJ G"는 야생형 M 단백질을 가지면서 VSV_{NJ} G 단백질을 발현하는 VSV_{Ind}를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0059] "NJ-M(M48R-M51R)/Ind G"는 돌연변이체 M 유전자를 가지면서 VSV_{Ind} G 단백질을 발현하는 VSV_{NJ}를 지칭하기 위해 사용된다. "NJ-M(WT)/Ind G"는 야생형 M 유전자를 가지면서 VSV_{Ind} G 단백질을 발현하는 VSV_{NJ}를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0060] 본원에서 사용된 바와 같은 "단백질"이란 용어는, 일반적으로 정의된 서열을 갖는 아미노산 잔기의쇄로서 정의된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "단백질"이란 용어는 "펩티드" 및 "단백질"이란 용어를 포함한다. 또한 상기 용어는 변형되어 있는 아미노산 고분자를 포함한다. "rVSV"는 재조합 수포성 구내염 바이러스를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0061] **2. 개요**
- [0062] 본 발명은 대상에서 면역 반응을 유도하고 대상에서 병원성 감염을 예방하거나 치료하기에 유용한 면역화 플랫폼, 면역화 요법 및 약제를 특징으로 하며, 상기 플랫폼, 요법 및 약제는 하나의 혈청형의 재조합 VSV, 및 다른 혈청형의 재조합 VSV를 포함한다. 본 발명 이전에, 기타 연구 그룹은 프라임 바이러스(prime virus)에 의해 유도된 항체에 의한 부스터 바이러스(booster virus)의 중화를 방지하기 위한 제 2 면역화를 위해 표면 당단백질(G) 유전자-스위칭(switching)된 VSV를 이용하였다. 그러나 본 발명 이전에 어떠한 연구 그룹도 프라임 및 부스트 면역화 과정 또는 전략에서 rVSV의 2개의 상이한 혈청형을 이용하지 않았다.
- [0063] 따라서 일 양태에서, 본 발명은 프라임 부스트 면역화 전략에 사용하기 위한 면역화 플랫폼을 제공하며, 상기 면역화 플랫폼은 (a) 하나의 혈청형의 재조합 수포성 구내염 바이러스(rVSV)를 포함하는 하나의 백신 또는 면역성 조성물, 및 (b) 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 다른 백신 또는 면역성 조성물을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0064] 다른 양태에서, 본 발명은 병원균에 대한 면역 반응을 유도하는데 유용한 복합 약제를 제공하며, 상기 복합 약제는 (a) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 하나의 혈청형의 rVSV를 포함하는 하나의 백신 또는 면역성 조성물, 및 (b) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 다른 혈청형의 rVSV를 포함하는 다른 백신 또는 면역성 조성물을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0065] 본 출원인은 최초로 cDNA로부터 VSV_{NJ}를 회수하기 위해 역유전 시스템을 개발하였다[도 1 및 도 2 참조; Kim, G.N. and Kang, C.Y., Virology, 357:41-53, 2007 참조]. 재조합 VSV_{NJ}는 VSV_{Ind}와 함께 외래 유전자(즉, 외생성 바이러스의 유전자)의 발현을 위해 유효한 바이러스성 벡터이며, 상기 외래 유전자는 VSV 자체에 대한 기존의 면역 반응과 연관된 문제점을 최소화하기 위해 사용될 수 있다. VSV_{NJ} 벡터 시스템 이외에, 본 출원인은 부스트 면역화 이후에 VSV 벡터의 중화를 피하기 위해 발현 벡터로서 사용될 수 있는 VSV_{Ind}의 전장 클론(full length clone)(도 1)을 또한 생성하였다.

[0066] 일 양태에서, 본 출원인의 rVSV 면역화 플랫폼의 특징은 VSV의 2개의 상이한 혈청형의 사용을 포함하며, 다른 양태에서는 야생형 M 유전자 및 돌연변이 M 유전자를 갖는 VSV의 사용을 포함한다. 본 발명의 양태에서, 2개의 상이한 VSV 혈청형은 VSV_{Ind} 및 VSV_{NJ}이다.

[0067] VSV M 단백질은 세포성 단백질 합성을 매우 효과적으로 억제하지만, 메티오닌이 VSV_{Ind} M 내의 51번째 위치에서 아르기닌으로 변경되고, VSV_{NJ} M 내의 48 및 51번째 위치에서에서 아르기닌으로 변경되는 경우에 M 단백질은 숙주 세포성 단백질 발현에 대한 이들의 억제 효과를 상실하게 된다[Kim, G.N., and C.Y., Kang. Virology 357:41, 2007; Petersen, J. M. 등, Mol Cell Biol 20:8590, 2000; von Kobbe, C. 등, Mol Cell 6:1243, 2000]. 따라서 돌연변이 M 유전자를 갖는 rVSV는 야생형 M을 갖는 rVSV보다 양호한 발현 백터일 수 있는데, 이는 이들 백터가 항원 제시 세포(antigen presenting cell)에서 케모카인(chemokine)과 같은 면역 관련 단백질의 발현을 차단하지 않을 것이기 때문이다.

[0068] 3. 본 발명의 백신 또는 면역성 조성물

[0069] 또한 본 발명은 상술한 바와 같이 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물, 및 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 백신 또는 면역성 조성물을 특징으로 한다. 본 발명의 백신 또는 면역성 조성물은 생체 내에서 생물학적으로 양립 가능한 형태로 대상에 투여하기에 적합하다. 본원에서 사용된 바와 같은 "생체 내에서 투여하기에 적합한 생물학적으로 양립 가능한 형태"란 표현은 치료 효과가 임의의 독성 효과를 증가하는 투여될 물질의 형태를 의미한다. 상기 물질은 임의의 동물 또는 대상, 바람직하게는 인간에 투여될 수 있다. 본 발명의 백신은 냉동 건조된 제제로서 제공될 수 있다. 본 발명의 백신은 또한 수송을 위해 냉동될 수 있는 용액으로서 제공될 수 있다. 또한 백신은 글리세롤과 같은 적합한 보존제를 함유할 수 있거나, 보존제 없이 제형화될 수 있다. 적절한 경우(즉, 백신에서 VSV의 손상이 없는 경우), 상기 백신은 적합한 희석제, 조보제 및/또는 담체를 함유할 수도 있다.

[0070] 상기 백신의 투여량은 개체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 다를 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 조절될 수 있다. 또한 상기 백신의 투여량은 환경에 의존하여 최적의 예방적 투여량 반응(preventative dose response)을 제공하기 위해 변경될 수 있다.

[0071] 4. 사용 방법

[0072] 또한 본 발명은 대상에서 면역 반응을 유도하고 대상에서 병원성 감염을 예방하거나 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 백신 또는 면역성 조성물 조합의 유효량을 대상에 투여하는 단계를 포함한다. 상기와 같이, 일 양태에서 본 발명은 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 (a) 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 포유동물에 투여하되, 상기 제 1 백신 또는 면역성 조성물이 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 단계, 및 (b) 제 2 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하되, 상기 제 2 백신 또는 면역성 조성물이 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0073] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 병원균에 의해 야기되는 감염을 예방하거나 치료하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 (a) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 제 1 혈청형의 rVSV를 포함하는 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계, 및 (b) 병원균의 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있는 제 2 혈청형의 rVSV를 포함하는 제 2 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0074] 본 발명의 양태에서, 포유동물에서 VSV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 방법, 및 병원균에 의해 야기된 감염을 예방하거나 치료하기 위한 방법은 (c) 제 1 백신 또는 면역성 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 단계 (c)에서는 면역 반응의 유도 과정 및 예방 또는 치료 과정 동안에 1회 이상 대상에 투여될 수 있다.

[0075] 상기 개시내용은 일반적으로 본 발명을 기술하고 있다. 하기 특정의 실시예를 참조하여 더욱 완전한 이해를 구현할 수 있다. 이들 실시예는 예시를 목적으로만 개시되어 있으며, 본 발명의 범주를 제한하기 위해 의도된 것은 아니다. 환경이 적절히 제안되고 부여됨에 따라 형태의 변경 및 등가물의 치환이 고려된다. 특정 용어가 본원에서 사용되었을지라도 이 같은 용어는 설명의 측면에서 의도된 것이지 제한을 목적으로 의도된 것은 아니다.

[0076] **실시예**

[0077] 실시예는 예시를 목적으로 개시되어 있으며, 본 발명의 범주를 제한하기 위해 의도된 것은 아니다.

[0078] 실시예 1: 역유전(reverse genetics)에 의한 VSV의 회수

[0079] 본 출원인은 로즈(Rose) 및 베르츠(Wertz)에 의해 개별적으로 이전에 확립된 역유전 시스템을 이용하여 cDNA로부터 재조합 VSV를 생성하였다[Lawson, N.D. 등, Proc Natl Acad. Sci USA 92:4477, 1995; Whelan, S.P. 등, Proc Natl Acad Sci USA 92:8388, 1995]. 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제를 발현하는 새끼 햄스터 신장 세포, 즉 BHK-T7 세포[Buchholz, U.J. 등, J Virol 73:251, 1999]를 VSV, 인디애나 혈청형 또는 뉴저지 혈청형의 전장 게놈(full-length genome)을 암호화하는 DNA 플라스미드, 및 VSV N, P 및 L 유전자를 암호화하는 플라스미드로 형질 감염시켰다. 새로 생성된 바이러스를 함유하는 세포 배양 배지를 재조합 VSV에 의한 세포변성 효과(cytopathic effect)의 정도에 의존하여 형질감염 48 내지 72 시간 이후에 수확하였다. 도 2는 cDNA로부터 VSV를 회수하기 위한 역유전 시스템을 나타낸다.

[0080] 도 1은 본 출원인에 의해 생성된 VSV_{Ind} 및 VSV_{NJ}의 cDNA 클론을 나타낸다. 도 1의 도면에는 유전자 순서(N, P, M, G 및 L) 및 VSV 게놈의 전장 DNA 클론 내의 제한 효소 부위(Pac I, Not I, Kpn I 및 Spe I)가 도시되어 있으며, 상기 전장 DNA 클론은 해당되는 유전자를 VSV 게놈에 클로닝하기 위해 사용될 수 있다. VSV의 M 유전자에 도입된 돌연변이(VSV_{Ind}의 경우에 M51R 및 VSV_{NJ}의 경우에 M48R-M51R)가 또한 도시되어 있다.

[0081] 도 3을 참고하면, 재조합 VSV는 3회 연속 플라크 피킹(plaque picking)에 의해 정제되었으며, 새끼 햄스터 신장 세포에서 증폭되었다. 재조합 VSV의 복제 동역학을 결정하기 위해, 본 발명자들은 3의 감염 중복지수(multiplicity of infection)로 BHK 세포를 감염시키고, 감염 이후 10시간이 될 때까지 매 2시간 마다 감염된 세포로부터 세포 배양 배지를 수확하였다. 수확된 배양 배지 중의 바이러스성 적정농도는 플라크 검정(plaque assay)에 의해 결정되었다.

[0082] 실시예 2: 재조합 VSV로 감염된 새끼 햄스터 신장 세포에서의 VSV 단백질의 발현

[0083] 재조합 VSV(2개의 혈청형인 VSV_{Ind} 및 VSV_{NJ}, M 야생형 및 M 돌연변이체의 VSV, 및 G 유전자가 스위칭된 VSV)로부터 단백질의 발현은 VSV_{Ind} 및 VSV_{NJ}에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정되었다. VSV_{Ind} 및 VSV_{NJ}에 대한 본 발명의 항체는 VSV의 4개의 단백질(N, P, M 및 G)을 검출한다. 도 4는 3개의 단백질 밴드를 나타내는데, 이는 N 단백질 및 P 단백질이 SDS-PAGE 겔 상에서 동일한 크기의 단백질로서 이동하기 때문이다. VSV_{Ind} 또는 VSV_{NJ}에 대한 항체는 단일 혈청형으로부터 발현되는 VSV의 4개의 단백질인 N, P, M 및 G 모두를 검출할 수 있다. VSV_{Ind} 항체가 VSV_{Ind} NJG에서 G 유전자의 교환은 VSV_{NJ}의 G 단백질과 교차 반응을 하지 않았기 때문에 VSV_{Ind} 항체에 의한 G 단백질 검출의 결핍에 의해 확인되었다(2 및 4번 레인(lane)). VSV_{NJ} IG에서 G 유전자의 교환은 VSV_{Ind} G와 VSV_{NJ} G의 크기 차이에 의해 확인되었다. VSV_{Ind} G는 VSV_{NJ}의 G보다 약간 느리게 이동하며, 이는 6 및 8번 레인 상에 도시되어 있다. M 유전자에서의 돌연변이(VSV_{Ind} M 단백질의 경우에 M51R 및 VSV_{NJ} M 단백질의 경우에 M48R-M51R)는 M 단백질이 혈청형 둘 모두의 야생형 M 단백질보다 약간 빠르게 이동하게 하며, 이는 3, 4, 7 및 8번 레인에서 증명되었다. M 단백질의 이동 패턴(migration pattern)에 의해 돌연변이 VSV에서의 돌연변이가 확인된다.

[0084] 실시예 3: 바이러스 접종(viral inoculation)의 최고 조합을 찾기 위한 백신화 요법 및 과정

[0085] 도 5 내지 도 8 및 표 1을 참고하면, 본 출원인의 목표가 동물을 면역화시키기 위해 프라임 및 부스트 요법을 이용하는 것이기 때문에, 본 출원인은 프라임 및 부스트 면역화 과정을 위한 재조합 VSV 혈청형의 최고의 순서를 결정하였다. 본 출원인은 1) 2개의 상이한 혈청형(VSV_{Ind} 또는 VSV_{NJ})에 기초한 백신에 의한 백신화, 2) 대안적인 혈청형의 G 단백질을 발현하는 VSV 백신에 의한 백신화, 또는 3) 세포독성 야생형 또는 비-세포변형 돌연변이 VSV M 단백질에 의한 백신화가 VSV 특이적 CD8+ T 세포에 대해 임의의 이점을 제공하는지를 연구하였다. 표 1에는 모든 가능한 혈청형 조합이 예시되어 있다. 마우스 그룹은 3회 투여량의 백신화 계획에 따라 rVSV로

백신화되었다. 13개의 마우스 그룹으로 이루어진 이러한 백신화 연구에서, 목표는 VSV N 펩티드인 VSV N275(VSV N에서 아미노산 서열에 타겟팅(targeting)되는 MHC I H2d 특이적 펩티드)에 의한 자극 이후에 인터페론 감마($IFN\gamma$) 생성에 기초하여 VSV 뉴클레오캡시드 특이적 CD8⁺ T 세포를 가장 높은 비율(%)로 생성하는 재조합 VSV 백신 구조체(들)를 결정하는 것이다. 특히, 본 발명자들은 1) 2개의 상이한 혈청형(VSV_{Ind} 또는 VSV_{NJ})에 기초한 백신에 의한 백신화, 2) 대안적인 혈청형의 G 단백질을 발현하는 백신에 의한 백신화, 또는 3) 세포독성 야생형 또는 비-세포변형 돌연변이 VSV M 단백질에 의한 백신화가 VSV N 특이적 CD8⁺ T 세포의 생성에 대해 임의의 이점을 제공하는지를 연구하였다.

[0086] 각 그룹당 6마리의 6주령의 암컷 Balb/c 마우스(MHC 유형 H2d)는 제 1 투여량에 대해 1×10^6 pfu(플라크 형성 단위)의 rVSV를 투여 받았으며, 상기 rVSV를 넓적다리 뒤근육(posterior thigh muscle)에 근육내 주사에 의해 투여하고, 총 50 μ l 부피의 PBS로 희석하였다. 마우스는 제 2 투여량에 대해 1×10^6 pfu의 rVSV를 투여 받고, 제 3 투여량에 대해 5×10^6 pfu의 rVSV를 투여 받았다. 4주의 기간에는 제 1 및 제 2 투여량을 분리하고, 부가적인 10주의 기간에는 제 2 및 제 3 투여량을 분리하였다. 제 3 투여량 이후 7일째에 마우스를 마취시키고, VSV 뉴클레오캡시드 펩티드(VSV N275)에 특이적인 CD8⁺ T 세포의 검출을 위해 비장세포(splenocyte)를 수확하였다.

[0087] 비장세포의 단일 세포 현탁액을 완전한 RPMI에서 제조한 후, 1×10^6 개의 세포를 U형 바닥을 갖는 96 웰 플레이트(96 well plate)의 적절한 웰(well)로 옮겼다. VSV N 특이적 펩티드 VSV N275인 NH₂-MPYLIDFGL-COOH(뉴저지주 피스타웨이(Piscataway) 소재의 GenScript Corporation)과 공-자극제(co-stimulant)인 항-CD28(클론 37.51, 캘리포니아주 산호세(San Jose) 소재의 BD Biosciences)의 혼합물을 첨가하고, 혼합물을 2시간 동안 배양하였다. 브레펠딘 A(Brefeldin A, BD Biosciences)를 제조사의 지침서에 따라 첨가하여 사이토카인 분비를 차단하고, 세포를 부가적인 3시간 동안 배양하였다. 세포를 쥐 CD8(FITC-CD8a, BD Biosciences, 클론 53-6.7)을 인식하는 항체, 또는 적절한 아이소타입(isotype) 대조군 항체로 염색하였다. 세포를 세정한 후, 제조사의 지침서에 따라 사이토폭스/사이토펜(Cytofix/cytoperm) 키트 시약(BD Biosciences)으로 투과성으로 만들고, 이어 IFN γ (APC-IFN γ , BD Biosciences, 클론 XMGI.2)에 대해 염색하였다. FACSCalibur 유동 세포분석기(flow cytometer, BD Biosciences) 및 FlowJo 소프트웨어(오리건주 애쉬랜드(Ashland) 소재의 Tree Star Inc.)를 이용하여 염색된 세포를 확인하였다. 데이터는 각 백신에 대해 각 그룹당 4 내지 6마리의 마우스에서 평균 CD8⁺IFN γ + 비장세포(%)로서 나타나 있다. 통계적 유의성은 본페로니 교정(Bonferroni correction)을 갖는 일원 분산 분석(one-way ANOVA)(Prism 4.0 소프트웨어, 캘리포니아주 샌디에이고 소재의 GraphPad Software Inc.)을 이용하여 결정되었다.

[0088] 결과

[0089] 상기 결과에 따르면, 제 2 투여량에 대해 VSV 혈청형을 교호하는 것은 VSV N 특이적 CD8⁺ T 세포의 생성을 위한 단일 VSV 혈청형의 3회 투여량을 제공하는 것보다 양호한 것으로 명백히 나타나 있다. 본원에 제시된 결과의 견지에서, VSV N 특이적 CD8⁺ T 세포를 유도하기 위한 전략은 VSV_{Ind}-돌연변이 M의 제 1 투여량 투여 이후에 VSV_{NJ}-돌연변이 M의 투여량 및 마지막으로 VSV_{Ind}-돌연변이 M의 투여량의 투여이다(도 8a).

[0090] 실시예 4: HCV 단백질을 발현하는 재조합 VSV에 의한 면역화 연구

[0091] 배경기술

[0092] C형 간염 바이러스(HCV)는 인간에서 C형 간염의 원인 물질이다. C형 간염의 발생건수는 전 세계적으로 약 1억7천만 명인 것으로 추정된다. 세계 인구의 약 3%가 상기 바이러스에 만성적으로 감염되어 있다. 미국에서 약 3백만 명의 사람들이 HCV에 만성적으로 감염되어 있는 것으로 추정되며, 대부분의 감염이 30 내지 50세의 사람들 중에서 발생한다.

[0093] HCV에 의한 감염은 극도로 심각할 수 있다. 초기 감염은 어떠한 질병도 야기하지 않거나, 황달을 동반한 간염을 초래할 수 있지만, 전격성 간부전(fulminant liver failure)은 희귀하다. 그러나 대부분의 HCV 감염은 만성적으로 된다. 이러한 만성 감염은 일부는 내성을 가질지라도 간질환, 간경변(cirrhosis) 및 간세포성 암종(hepatocellular carcinoma)을 초래한다. 이들 만성적으로 감염된 환자는 거의 모든 새로운 감염의

공급원이다.

[0094] HCV 게놈이 10년 이전에 분리되어 시퀀싱(sequencing)되었을지라도, HCV 감염을 예방하거나 급성 또는 만성 HCV를 치료하기에 유효한 어떠한 백신도 개발되지 않았다. 이상적인 HCV 백신 또는 백신화 전략은 액성 및 세포성 면역 반응 둘 모두를 유도하는 것일 것이다. 따라서 2개의 상이한 VSV 혈청형을 이용하여 본 출원인에 의해 개발된 신규한 재조합 VSV 면역화 전략은 HCV 백신 시스템을 수득하기 위한 플랫폼을 제공한다.

[0095] **HCV 단백질을 발현하는 재조합 VSV의 생성**

[0096] 도 9 내지도 20을 참고하면, VSV 유전자내 접합 서열(VSV intergenic junction sequence)을 도입하기 위해 HCV 코어, NS3, NS5A 및 NS5B 유전자를 pBluescript II KS 벡터(Stratagen)에 먼저 클로닝하였으며, 상기 접합 서열은 업스트림 유전자(upstream gene)에서의 전사 종결 및 VSV의 다운스트림 유전자(downstream gene)에서의 전사 재개시(transcriptional reinitiation)와 관련이 있다. 핵 위치(nuclear localization) 및 ER 막 내로의 앵커링(anchoring)과 연관이 있는 영역에서의 결실을 갖는 전장 코어 및 4개의 HCV 코어 유전자를 pBluescript II KS 벡터에 클로닝하였다. 전장 NS3 유전자를 변형되지 않는 pBluescript II 벡터에 클로닝하였다. 전장 NS5A 및 NS5B, 및 ER 막 앵커링 영역에서의 결실을 갖는 NS5A 및 NS5B를 pBluescript II KS 벡터에 클로닝하였다. 각 클론에서 정확한 서열을 확인한 후, 전장 NS5B를 제외한 VSV 유전자 내부 접합 서열을 갖는 HCV 유전자를 제한 효소 Kpn I로 절단하고, pVSV_{NJ}-M(WT) 및 pVSV_{NJ}-M(M48R-M51R) 내에서 G 유전자와 L 유전자 사이에 클로닝하였다. VSV 유전자 내부 접합 서열을 갖는 HCV 유전자의 Pac I 절편을 pVSV_{Ind}-M(WT) 및 pVSV_{Ind}-M(M51R) 중의 G와 L 유전자 사이의 Pac I 부위에 클로닝하였다. 전장 NS5B를 pBluescript II 벡터로부터 Spe I에 의해 절단하여 클레노 단편(klenow fragment)으로 블런트 엔드(blunt end)를 갖게 하고, pVSV_{NJ}에 연결(ligation)하였으며, 이는 Kpn I로 절단하여 클레노 단편으로 블런트 엔드를 갖게 하였다. pVSV_{NJ} 내에 NS5B의 삽입은 Pac I를 갖는 플라스미드를 절단함으로써 확인되었으며, 상기 Pac I 부위는 NS5B 클론의 양 말단에 도입되었다. 코어 유전자 내에 하나의 부가적인 Kpn I 부위가 존재하므로 HCV 코어 유전자를 Kpn I로 부분적으로 절단하였다. pBluescript II 벡터 내의 동일한 클론을 제한 효소 Pac I로 절단하여 HCV 유전자, 코어, NS3, NS5A 및 NS5B를 pVSV_{Ind}-M(WT) 및 pVSV_{Ind}-M(M51R)에 클로닝하였다. pVSV 내로의 HCV 유전자의 삽입은 Kpn I 또는 Pac I로 플라스미드를 절단하고 DNA 시퀀싱함으로써 확인되었다.

[0097] HCV 코어(도 11, 도 12 및 도 13), NS3(도 15), NS5A(도 17 및 도 18), 및 NS5B(도 19 및 도 20)를 발현하는 재조합 VSV_{Ind} 및 VSV_{NJ}를 VSV 역유전을 이용하여 cDNA 클론으로부터 회수하였다. 3회 연속 플라크 피킹에 의해 재조합 바이러스를 정제하고, 0.1의 감염 중복지수로 BHK 세포를 감염시킴으로써 증폭하였다. 상기 바이러스로부터 HCV 단백질의 발현은 바이러스 감염 세포 용균액(cell lysate) 및 HCV 단백질 각각에 대한 항혈청을 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정되었다. VSV_{Ind} 및 VSV_{NJ}에 대한 항혈청을 이용한 동일한 세포 용균액의 웨스턴 블롯 분석에 의해 각각의 HCV 단백질을 발현하는 VSV 벡터의 혈청형 및 M 유전자 표현형이 결정되었다. VSV_{Ind}(M_{M51R}) 및 VSV_{NJ}(M_{M48R-M51R})의 돌연변이된 M 단백질은 SDS-PAGE 겔 상에서 야생형 M 단백질보다 약간 빠르게 이동한다.

[0098] **결과**

[0099] 도 8b를 참고하면, VSV Ind-M_{M51R} + HCV-코어△ER, 이어 VSV NJ-M_{M48/51R} + HCV-코어△ER로 백신화되고, 3주 후에 부가적인 투여량으로 VSV Ind-M_{M51R} + HCV-코어△ER로 백신화된 일군의 마우스(n=2)에서 HCV MHC I형 펩티드에 의한 생체의 자극 이후에 CD8+ T 세포의 강력한 재활성화가 관측되었다. VSV 벡터 단독으로 면역화된 대조군 마우스가 HCV 펩티드에 대해 특이적인 CD8+ T 세포를 나타내지 않았기 때문에 이러한 재활성화는 HCV 펩티드에 대해 특이적인 것으로 나타났다(패널 우측의 일 세트의 막대그래프). 2 VSV 뉴클레오키프(epitope)에 대해 특이적인 CD8+ T 세포의 재활성화는 모든 마우스에서 양성 대조군으로서 사용되었다.

표 1

마우스에서 가장 강력한 면역 반응을 유도하기 위해 바이러스 접종의 최고 조합을 찾기 위한 백신화

그룹 번호	제 1 투여량 (1×10^6 pfu/마우스, IM)	제 2 투여량 (제 1 투여량 4주 후, 1×10^6 pfu/마우스, IM)	제 3 투여량 (제 2 투여량 10주 후, 5×10^6 pfu/마우스, IM)	동물의 개체수
I-0	PBS	PBS	PBS	6
I-1	rVSVNJ-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	6
I-2	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	6
I-3	rVSVInd-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	6
I-4	rVSVInd-M(M51R)	rVSVInd-M(M51R)	rVSVInd-M(M51R)	6
I-5	rVSVNJ-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	6
I-6	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVInd-M(M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	2+6
I-7	rVSVInd-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	6
I-8	rVSVInd-M(M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVInd-M(M51R)	6
I-9	rVSVNJ-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)/Ind G	rVSVNJ-M(WT)	6
I-10	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)/Ind G	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	6
I-11	rVSVInd-M(WT)	rVSVInd-M(WT)/NJ G	rVSVInd-M(WT)	6
I-12	rVSVInd-M(M51R)	rVSVInd-M(M51R)/NJ G	rVSVInd-M(M51R)	6

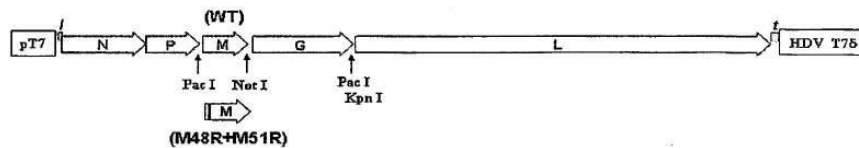
IM: 근육내 투여; Pfu: 플라크 형성 단위; wks: 시간(주)

[0100]

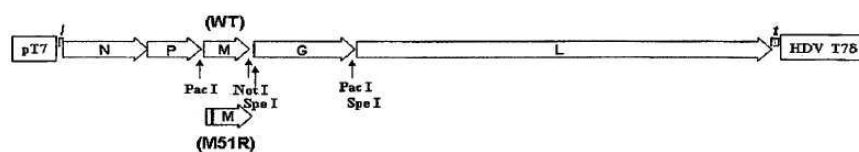
도면

도면1

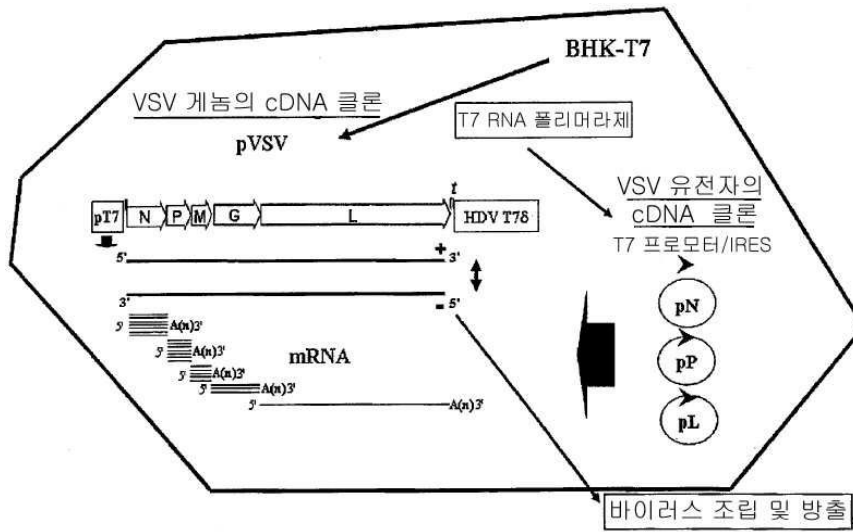
pVSV_{NJ}(Haz)



pVSV_{Ind}(HR)

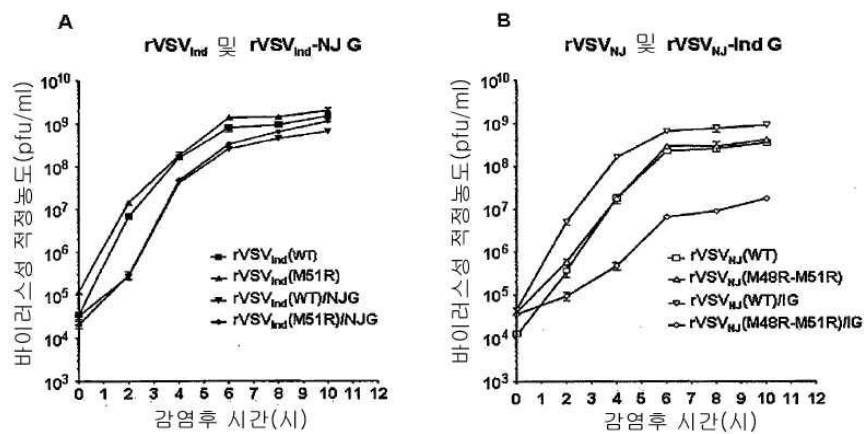


도면2

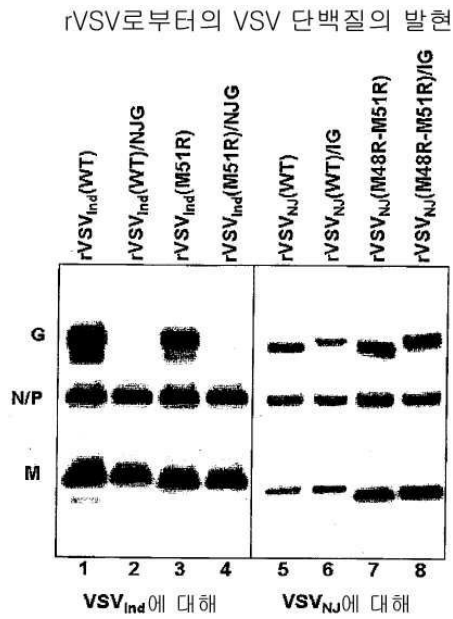


도면3

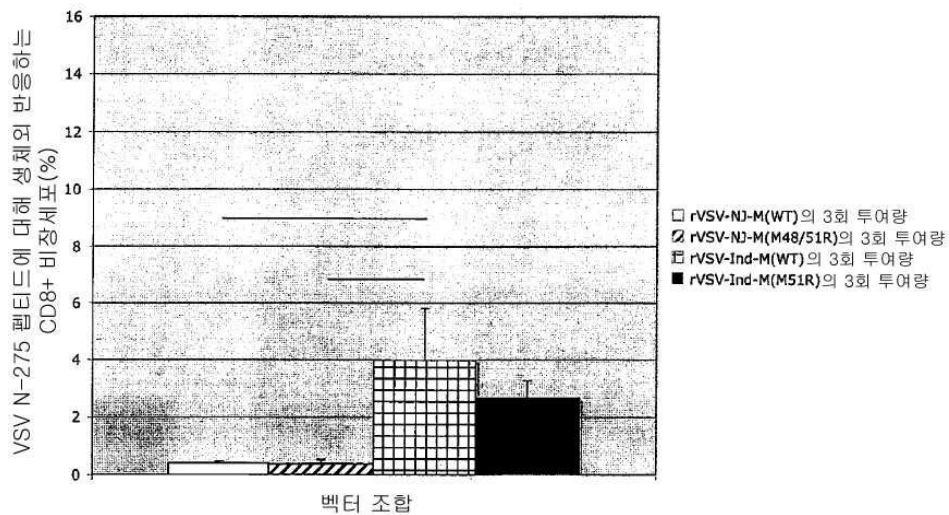
해당되는 유전자의 유무에 따른 rVSV의 성장 동력학



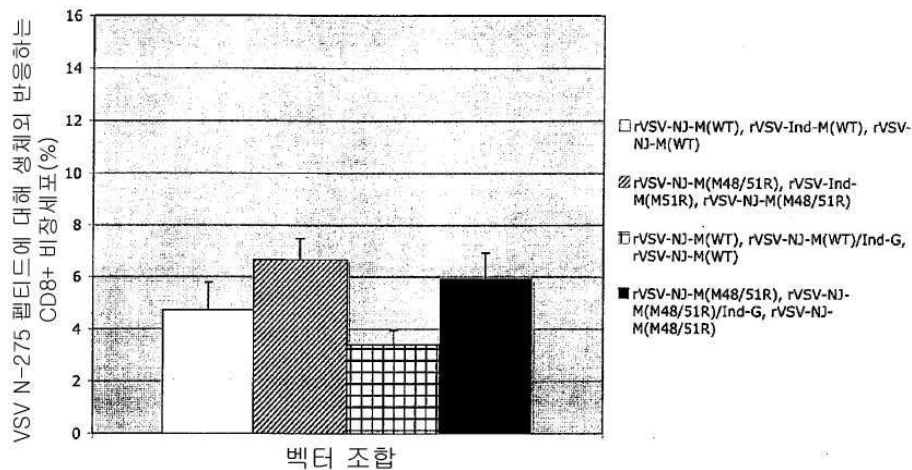
도면4



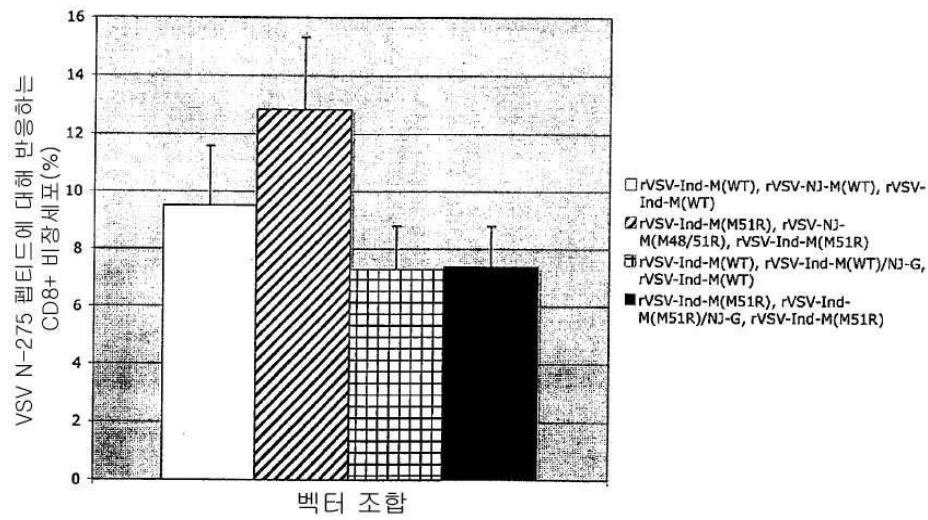
도면5



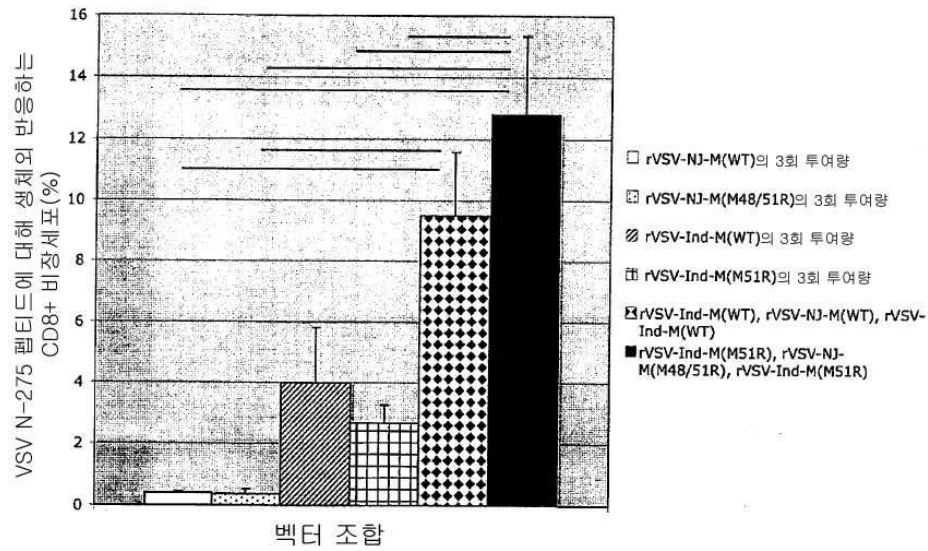
도면6



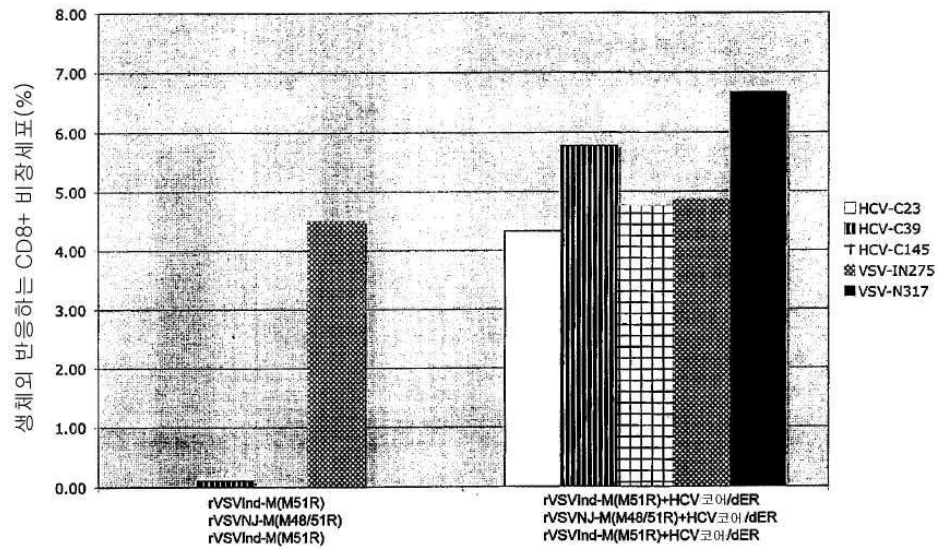
도면7



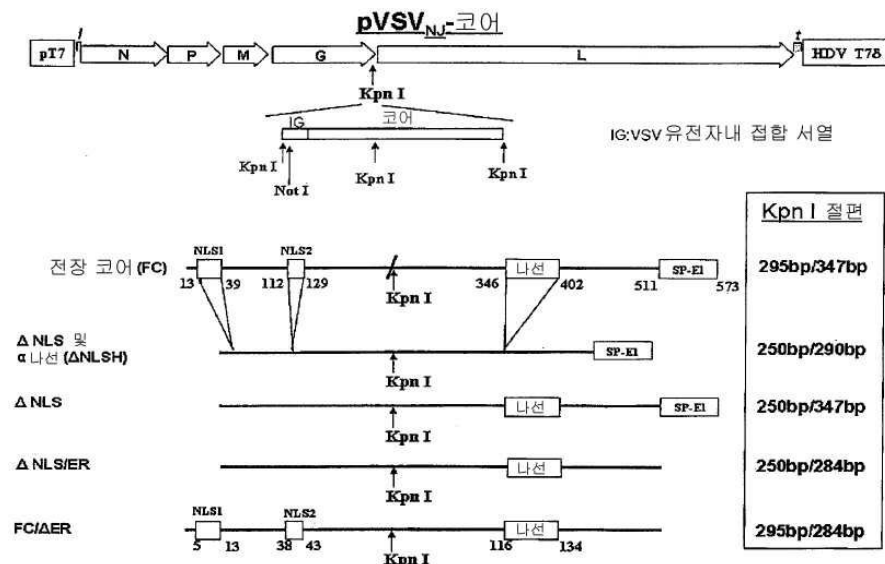
도면8a



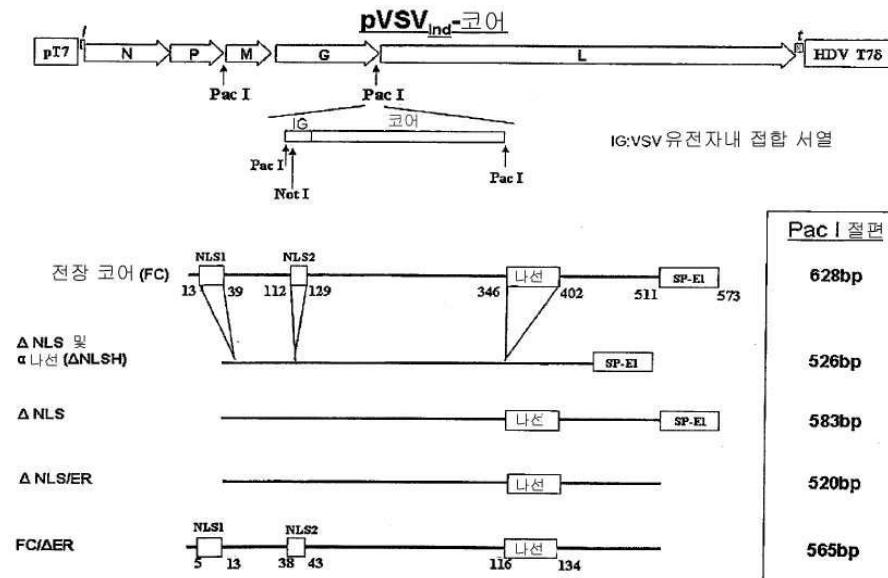
도면8b



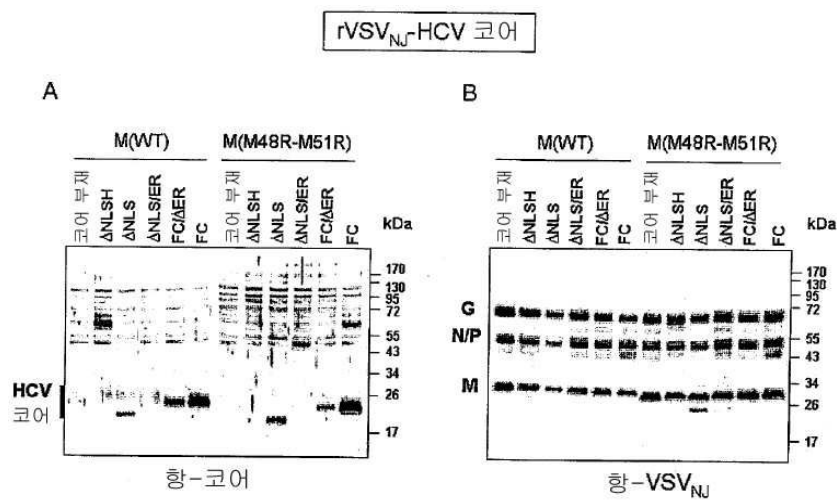
도면9



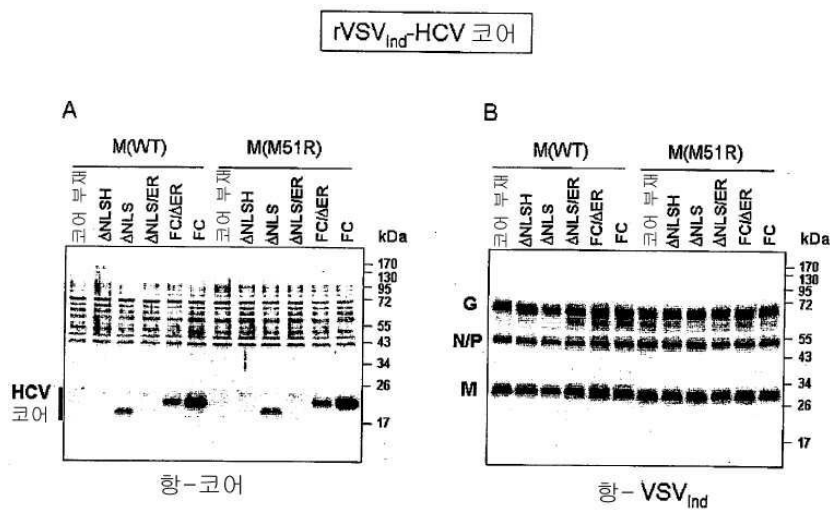
도면10



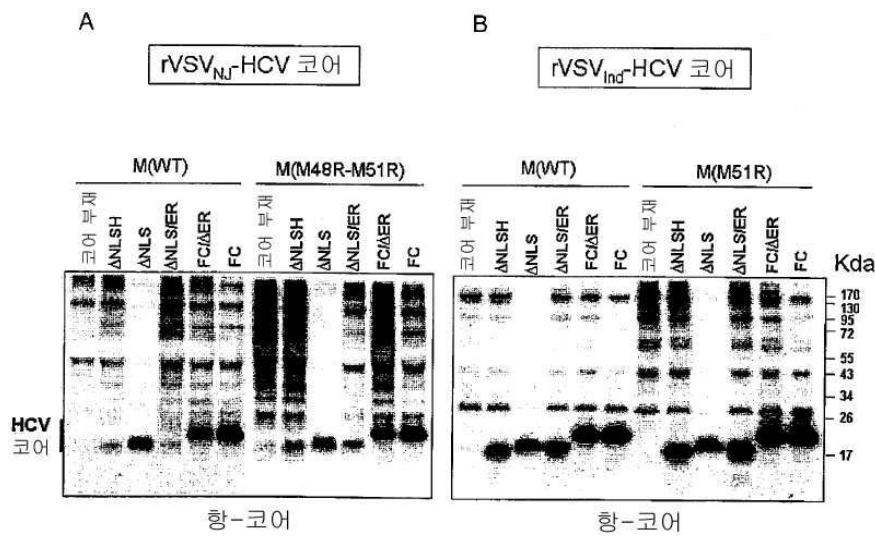
도면11



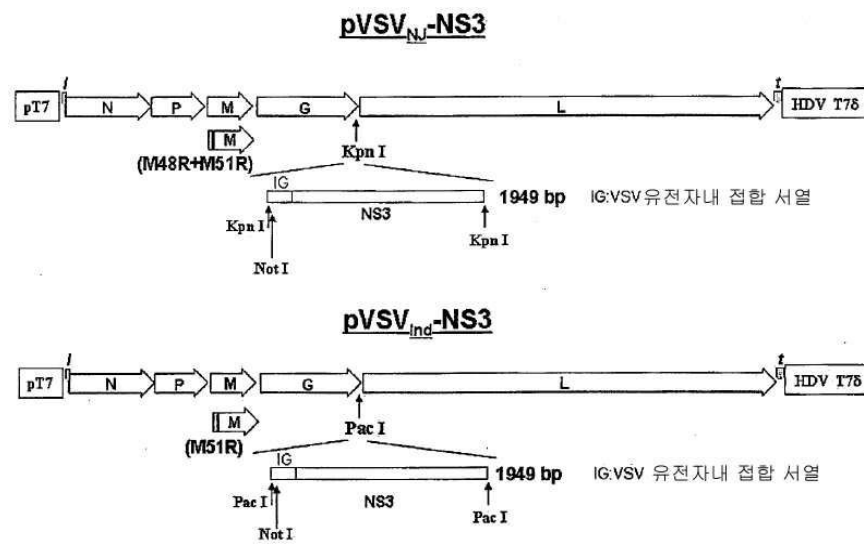
도면12



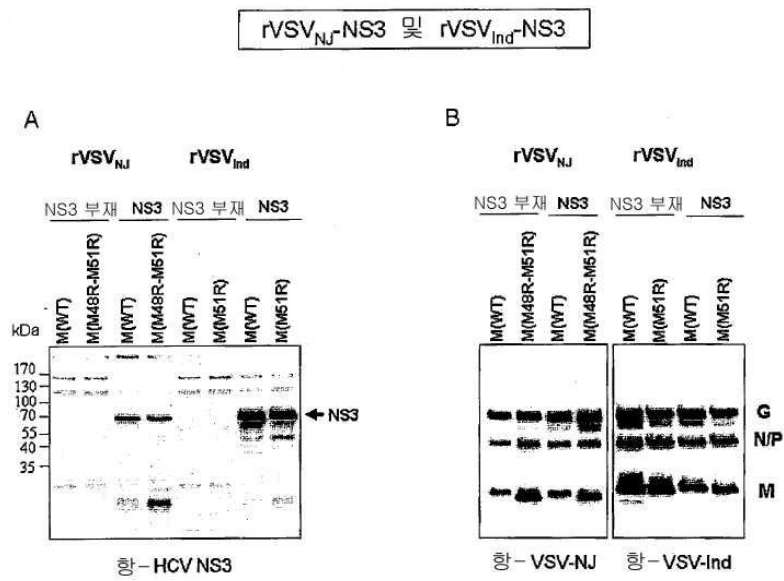
도면13



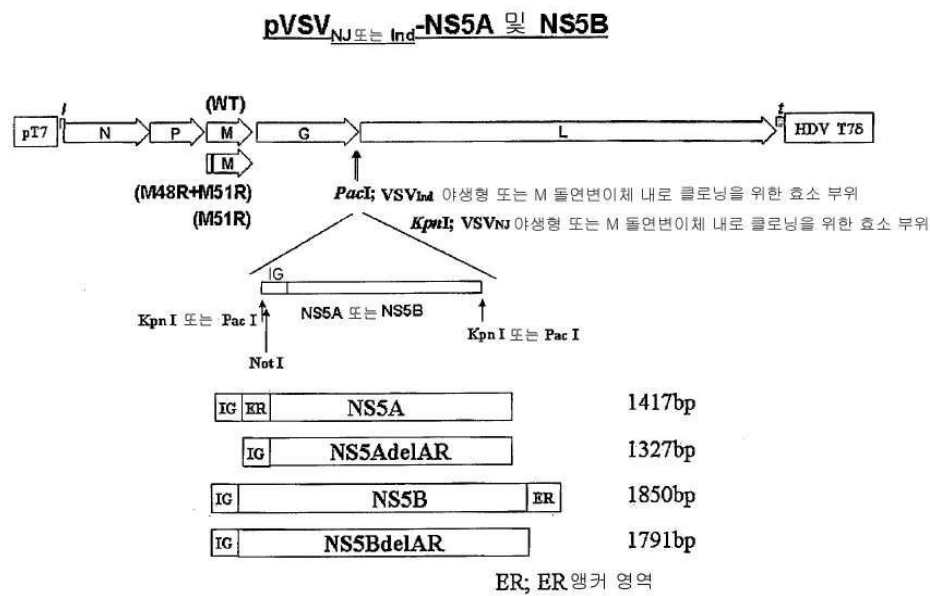
도면14



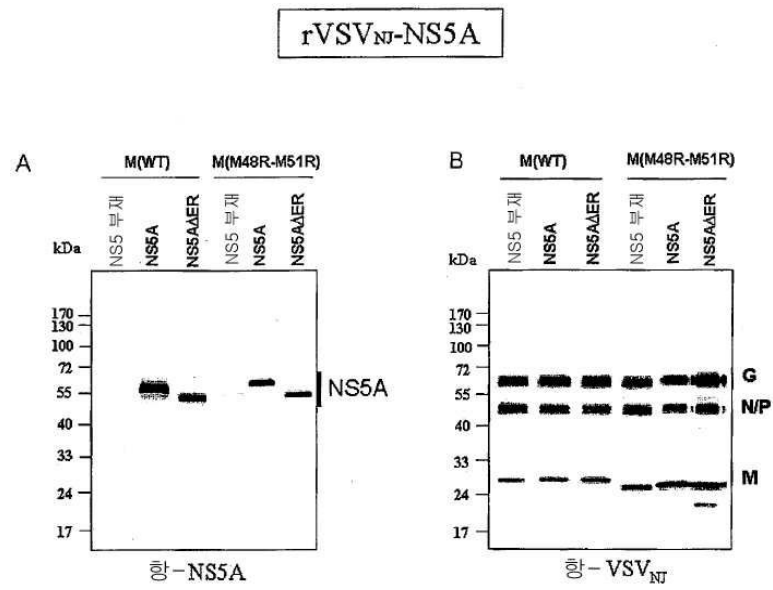
도면15



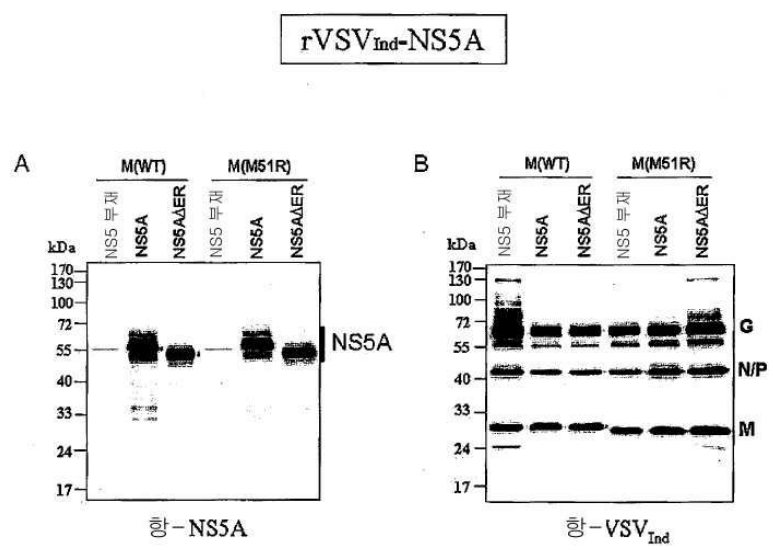
도면16



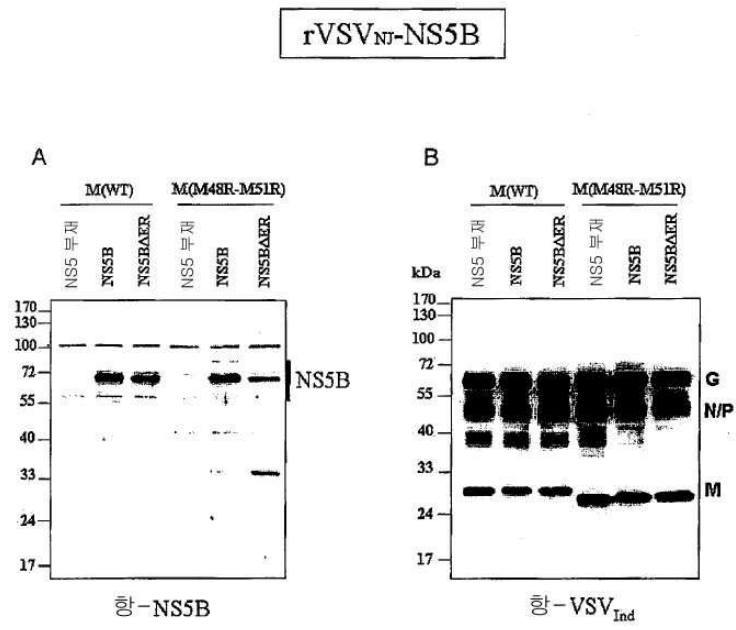
도면17



도면18



도면19



도면20

