(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월29일
(11) 등록번호 10-1782451
(24) 등록일자 2017년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/125 (2006.01) *A61K 39/13* (2006.01)
A61K 39/135 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7015175
(22) 출원일자(국제) 2012년11월01일
심사청구일자 2014년06월03일
(85) 번역문제출일자 2014년06월03일
(65) 공개번호 10-2014-0096343
(43) 공개일자 2014년08월05일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/003114
(87) 국제공개번호 WO 2013/098655
국제공개일자 2013년07월04일
(30) 우선권주장
PI2011005318 2011년11월03일 말레이지아(MY)
(56) 선행기술조사문헌
Vaccine. Vol. 26, pp. 1855-1862 (2008)*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자
센티넥스트 테라퓨틱스 에쓰디엔 비에이취디
말레이시아 10050 페낭 55 잘란 술탄 아매드 샤 메나라 노덤 레벨 19 스윗 19-에이취
(72) 발명자
카르도사 매리 제인
말레이시아 93250 쿠칭 사라왁 로롱 스탬핀 텐가 5쥐2 리치몬드 힐 넘버 8
자미루딘 모하마드 파크루딘
말레이시아 11700 겔루고 페낭 로롱 선가이 두아 스리 사우자나 아파트 10-13-피2
하미드 샤리파 빈티
말레이시아 40460 샤 알람 셀랑고르 섹시엔 31 코타 케무닝 31/120 잘란 앙게릭 타이니아 넘버 39
(74) 대리인
유미특허법인

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 **인간 엔테로바이러스에 대한 백신**

(57) 요 약

본 발명은 피코르나비리대 과에 속하는 바이러스로부터 유래된 면역 활성 항원을 생산하기 위한 물질과 방법을 제공한다. 본 발명의 피코르나바이러스 항원은 피코르나바이러스 감염을 치료학적으로 치료 또는 예방을 위해 개체에게 투여되는 백신으로 사용하기 위한 형태일 수 있다. 본 발명의 피코르나바이러스 항원은 엔테로바이러스 감염을 예방하기 위해 투여되는 백신에 사용하기 위한 면역 조성물의 형태일 수 있다. 본 발명은 아울러 인간 엔테로바이러스 A, 인간 엔테로바이러스 B, 인간 엔테로바이러스 C, 인간 엔테로바이러스 D 항원을 포함하는 면역 조성물과, 엔테로바이러스 감염을 예방하기 위한 이들의 백신 용도에 관한 것이다.

(56) 선행기술조사문헌
Vaccine. Vol. 28, No. 43, pp. 6951-6957 (2010)
International Journal of Infectious Diseases. Vol. 12, No. Suppl.1, p. E254 (2008)
US4508708 A
US20060182762 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 엔테로바이러스 A 바이러스 유사 입자 (virus-like particle)를 포함하는 백신으로서,

상기 바이러스 유사 입자는 인간 엔테로바이러스 A VP0 폴리펩타이드, VP1 폴리펩타이드, VP2 폴리펩타이드, VP3 폴리펩타이드 및 VP4 폴리펩타이드를 포함하며,

상기 백신이 상기 인간 엔테로바이러스 A에 대해 예방적 및/또는 중화성 면역 반응을 발생시키는 것인, 백신.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간 엔테로바이러스 A가 인간 엔테로바이러스 71 및 콕사키바이러스 (*Coxsackievirus*) A16 으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 3

발현 카세트로서,

인간 엔테로바이러스 A P1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산, 뇌심근염 바이러스 (EMCV) 내부 리보솜 도입부 (IRES) 및 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산과 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하고,

상기 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제는 IRES 의 조절 하에 번역되 것인, 발현 카세트.

청구항 4

백신의 제조 방법으로서,

제3항에 따른 발현 카세트를 포함하는 숙주 세포를, 인간 엔테로바이러스 A P1 폴리펩타이드와 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제를 생산하기에 충분한 기간 동안 배양하여, 바이러스 유사 입자 및/또는 상기 바이러스 유사 입자의 응집체를 형성하는 단계를 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 숙주 세포 및/또는 배양 상층물로부터 상기 바이러스 유사 입자 및/또는 상기 바이러스 유사 입자의 응집체를 회수하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 백신의 제조 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 숙주 세포가 진핵생물 세포인 것을 특징으로 하는 백신의 제조 방법.

청구항 7

제4항 또는 제5항에 따른 방법에 따라 제조되는, 인간 엔테로바이러스 A VP0 폴리펩타이드, VP1 폴리펩타이드, VP2 폴리펩타이드, VP3 폴리펩타이드, 및 VP4 폴리펩타이드를 포함하는 인간 엔테로바이러스 A 바이러스 유사 입자를 포함하는 백신.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피코르나비리대 (*Picornaviridae*) 과 바이러스, 특히 이러한 바이러스에 의해 유발되는 감염을 예방 및 치료하는데 효과적일 수 있는 항원 및 백신에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피코르나바이러스는 일반적인 여러가지 질병을 야기하는 다양한 바이러스 패밀리이다. 피코르나비리대 과 중에서도, 엔테로바이러스 속 바이러스는 모두 매우 유사하며 이들이 유발하는 수많은 질병 때문에 중요하다.

[0003] 엔테로바이러스 속 바이러스는 전세계적으로 매해 수백만명의 사람들을 감염시키며, 종종 감염된 사람의 호흡기 분비물 (예, 타액, 가래 또는 코 점액)과 변에서 발견된다. 엔테로바이러스는 장을 감염시키므로, 근원인 "장"으로부터 그 이름이 유래되었다. 역사적으로, 엔테로바이러스, 즉 폴리오바이러스에 의해 유발되는 가장 심각한 질병은 소아마비이다. 인간에서 질병을 야기할 수 있는 비-폴리오성 엔테로바이러스는 62종이며, 이중 23종은 콕사키 (Coxsackie) A 바이러스이고, 6종은 콕사키 B 바이러스이고, 28종은 에코바이러스 (echoviruse)이고, 5종은 그외 엔테로바이러스이다. 폴리오바이러스 뿐만 아니라 콕사키 바이러스 및 에코바이러스는 변-구강 경로를 통해 전파된다. 감염은 경미한 호흡기 질병 (감기), 수족구병, 급성 출혈성 결막염, 무균성 수막염, 심근염, 중증 신생아 패혈증-유사 질병 및 급성 이완성 마비에 이르는 매우 다양한 증상을 발생시킬 수 있다.

[0004] 피코르나바이러스 중에서, 엔테로바이러스는 단일 가닥의 (+) 게놈 RNA를 특징으로 하는 다양한 그룹의 소형 RNA 바이러스들로 구성된 대규모 그룹의 속이다. 모든 엔테로바이러스는 약 7,500개의 염기로 이루어진 게놈을 가지고 있으며, 복제 정확성이 낮고 재조합이 자주 발생하기 때문에 돌연변이 발생율이 높은 것으로 알려져 있다. 숙주 세포를 감염시킨 후, 게놈은 cap-비의존적인 방식으로 단일 폴리단백질로 번역되며, 이후 바이러스에 의해 코딩되는 프로테아제에 의해 구조 캡시드 단백질과 바이러스의 복제에 주로 참여하는 비-구조성 단백질로 가공된다.

[0005] 엔테로바이러스는 수종의 인간 및 포유류 동물의 질병들과 연관되어 있다. 혈청 검사에서는 항체 중화 검사를 기준으로 66종의 인간 엔테로바이러스 혈청형들을 구분한다. 변이체 균주들 간의 감소된 또는 비가역적인 교차-중화를 토대로, 수종의 혈청형들에서 추가적인 항원 변이체들이 규명되었다. 인간과 동물에서 이들의 병인을 토대로, 엔테로바이러스는 처음에는 4가지 그룹, 폴리오바이러스, 콕사키 A 바이러스 (CA), 콕사키 B 바이러스 (CB) 및 에코바이러스로 분류되었지만, 여러가지 그룹들에서 바이러스의 생물학적 특성이 상당히 중복되어 있다는 것을 곧 알게 되었다.

[0006] 엔테로바이러스 속은 다음과 같은 10가지의 종을 포함한다:

[0007] ● *소 엔테로바이러스*

[0008] ● *인간 엔테로바이러스 A*

[0009] ● *인간 엔테로바이러스 B*

[0010] ● *인간 엔테로바이러스 C*

[0011] ● *인간 엔테로바이러스 D*

[0012] ● *인간 리노바이러스 A*

[0013] ● *인간 리노바이러스 B*

[0014] ● *인간 리노바이러스 C*

[0015] ● *돼지 엔테로바이러스 B*

[0016] ● *유인원 엔테로바이러스 A*

[0017] 이들 10종들에는 다양한 혈청형이 존재하며, 예를 들어:

[0018] 엔테로바이로스 혈청형 HEV71, EV-76, EV-89, EV-90, EV-91, EV-92 및 콕사키바이러스 A16은 인간 엔테로바이러스 A 종에서 확인된다.

[0019] 혈청형 콕사키 바이러스 B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5 (돼지 수포바이러스 [SVDV] 포함), CV-B6, CV-A9, 에코바이러스 1 (E-1; E-8 포함), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9 (CV-A23 포함), E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33, 엔테로바이러스 B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 (침팬지 유래) 및 유인원 엔테로바이러스 SA5는 인간 엔테로바이러스 B 종에서 확인된

다.

[0020] 혈청형 EV-95, EV-96, EV-99, EV-102, EV-104, EV-105 및 EV-109는 인간 엔테로바이러스 C 종에서 확인된다.

[0021] 혈청형 EV-68, EV-70, & EV-94는 인간 엔테로바이러스 D 종에서 확인된다.

[0022] 폴리오바이러스 혈청형 PV-1, PV-2 및 PV-3는 인간 엔테로바이러스 C 종에서 확인된다.

[0023] 엔테로바이러스 감염으로 유발되는 질병으로는 소아마비를 포함하며, 소아마비는 엔테로바이러스 감염으로 유발되는 가장 심각한 질병이다. 그러나, 비특이적인 열성 질병은 엔테로바이러스 감염의 가장 흔한 증상이다.

[0024] 엔테로바이러스는 어린이에서의 무균성 수막염의 가장 일반적인 요인이다. 미국에서, 엔테로바이러스는 30,000 - 50,000건의 수막염의 발생 원인이다. 뇌염은 엔테로바이러스 감염의 드문 증상으로서, 증상이 발생하였을 때 뇌염의 요인으로 가장 흔하게 확인되는 엔테로바이러스가 에코바이러스 9이다.

[0025] 엔테로바이러스에 의해 유발되는 흉막통증 (Pleurodynia)은 열과 더불어 가슴과 복부의 심각한 발작성 통증과, 때때로 메스꺼움, 두통 및 구토를 특징으로 한다.

[0026] 심낭염 (Pericarditis) 및/또는 심근염은 전형적으로 엔테로바이러스에 의해 유발된다. 부정맥, 심부전 및 심근경색도 보고되고 있다.

[0027] 급성 출혈성 결막염도 엔테로바이러스에 의해 유발될 수 있다.

[0028] 수족구병은 콕사키 A 바이러스 또는 HEV71의 감염에 의해 가장 많이 유발된다.

[0029] 2007년도 실험에서, 엔테로바이러스로 인한 급성 호흡기 또는 위장 감염이 만성 피로 증후군의 요인일 수 있는 것으로 제시되었다.

[0030] HEV71, 폴리오바이러스 및 콕사키바이러스 A16을 비롯하여 엔테로바이러스 속에 속하는 모든 구성원들은, 캡시드 단백질인 VP4, VP2, VP3 및 VP1과, 폴리단백질 P1을 각각의 캡시드 단백질 VP1, VP3 및 VP0로 절단하는 역할을 하며 VP0을 궁극적으로 VP2와 VP4로 절단하는 바이러스 프로테아제 3C 및 3CD 등의 수종의 비-구조 단백질들로 구성된, 폴리단백질 P1을 코딩하는, 단일 오픈 리딩 프래임을 포함하는, 단일 가닥의 (+) 센스 RNA 게놈을 가진다. 캡시드 단백질은 바이러스 유사 입자 (VLP: virus like particle))로 조립될 수 있다.

[0031] 인간 엔테로바이러스 71 (HEV71)과 콕사키바이러스 A16은 수족구병 (HFMD)의 주 원인 물질로서 유력한 엔테로바이러스 혈청형으로, HEV71은 중증 중추 신경계 질병과 때때로 관련있다. 1969년 캘리포니아에서 HEV71이 최초로 분리되었으며, 신경 질병의 원인으로 특정되었다. 지금까지, HEV71 감염에 대한 숙주의 분자 기전 반응에 대해서는 거의 알려져 있지 않지만, 케모카인을 코딩하는 mRNA, 단백질 분해에 관여하는 단백질, 보체 단백질 및 세포자살유발 단백질의 수준 증가가 제기되었다.

[0032] 수족구병 (HFMD)은 인간 콕사키바이러스 A16 (CVA16), 콕사키바이러스 A10 (CVA10) 및 인간 엔테로바이러스 A 71 (HEV71) 등의 A 엔테로바이러스 종 (피코르나비리대 과)에 속하는 군에 의해 유발되는, 어린이에게서 흔한 자기-제어적 질병이다. 바이러스는 변으로 배출되며, 또한 인두 분비물에서도 확인된다. 전파는 어린이들간의 밀접한 접촉과 관련있으며 환경 오염을 통해서도 이루어진다. 이 질병은 손바닥, 발바닥, 엉덩이, 무릎의 발진과 구강 점막의 수포를 동반한 급성 발열이 특징이며, 통상 7-10일내에 해소된다. HFMD에 걸린 어린이 환자들 중 일부만 중증 질병으로 진행된다.

[0033] 수막염, 뇌염, 급성 이완성 마비, 폐 부종 및 심부전 등의 증상들로 나타나는 주로 신경과 심장혈관계에 발병하는 중증 질병은 일반적으로 HEV71 감염시에만 발생한다. 아시아-태평양 지역에서, 가장 파괴적인 신경계 증후군은 뇌간 뇌염으로, 이로 인한 사망율이 40-80%에 달한다. 중증 HFMD에 걸린 어린이는 회복하는데 수개월이 걸릴 수 있으며, 일부 사례들에서는 신경 손상이 영구적일 수 있다. 현재, HFMD에 대한 특이적인 항-바이러스 치료제와 폴리오 이외의 엔테로바이러스 감염을 예방하기 위한 백신은 없는 실정이다.

[0034] HEV71은 1969년 캘리포니아에서 뇌염으로 사망한 어린이에서 최초로 분리되었으며, 1974년에 처음으로 보고되었다. 그 이후로 전세계적으로 바이러스가 검출되었지만, 아시아에서 HFMD의 최근 지역적인 유행성은 병원성이 더 강한 HEV71 형태가 그 지역에서 출현할 수 있다는 논란을 일으키고 있다. 사망자 수가 많은 HFMD 발병에 대한 최초의 인지는 1997년 말레이지아 사라왁이었다. 이 후, 발병과 관련된 바이러스는 HEV71이었다. 대만에서는 1998년에 유행하여 HFMD 발생 건수 129,106건이 보고되었으며, 중증 질병이 405건이었고, 사망자가 78명이었다. 싱가포르에서는 2000-2001년에 7명이 사망하였고, 9000건이 보고되었으며, 그 이후로 매 2년 내지 3년 마

다 유행이 되풀이되고 있다. 2008년 첫 8개월 동안, 싱가포르에서 19,530건이 보고되었고, 1명이 HFMD로 사망하였다. 이후, HEV71 발생은 싱가포르, 태국 말레이지아, 대만, 일본, 한국 및 베트남에서 정기적으로 보고되고 있다.

[0035] 2007년 중국에서 83,344건의 발생 건수와 17건의 사망건수가 보고되었으며, 2008년에는 안휘성의 푸양시에서 대규모로 발생하였으며 중국 대부분의 지역으로 전파되었다. 이러한 대규모 발병은, 전파 사슬을 끊기 위한 시도로, 공공 보건 부서들에 의한 학교와 보육 시설의 폐쇄로 인한 사회적 혼란과, 어린의의 건강에 대한 부모의 우려를 부각시킨, 언론에 의해 널리 다루어졌다. 이 이후로, 중국에서 매해 대규모 발병이 보고되고 있다.

[0036] 피코르나비리대 과의 다른 바이러스에 의해 야기되는 질병과 관련하여, 소아마비의 자연 감염과 유병률은 감염성 질병으로서 고대부터 인간에게만 발병하고 있다. 개발도상국에서는 매해 다수의 사람들이 여전히 소아마비에 감염되고 있다. 그래서, 소아마비의 근절은 진행 중인 과정이다.

[0037] 폴리오바이러스는 종래에는 피코르나비리디 과의 엔테로바이러스 속에 속하는 종으로 분류되었다. 폴리오바이러스 종은 엔테로바이러스 속에서 빠지게 되었다. 폴리오바이러스는 혈청형 인간 폴리오바이러스 1 (PV-1), 인간 폴리오바이러스 2 (PV-2) 및 인간 폴리오바이러스 3 (PV-3)로 분류되며, 피코르나비리대 과 엔테로바이러스 속 인간 엔테로바이러스 C 종의 서브타입으로 간주된다. 엔테로바이러스 속 타입의 종들은 2008년에 폴리오바이러스에서 인간 엔테로바이러스 C로 변경되었다.

[0038] 인간 엔테로바이러스 C 종들의 3가지 서브타입, 즉, PV-1, PV-2 및 PV-3는 약간 상이한 캡시드 단백질로 특정된다. 캡시드 단백질은 세포 수용체 특이성과 바이러스 항원성을 규정한다. PV-1은 자연에서 직면하는 가장 일반적인 형태이지만, 이들 3가지 형태들 모두 감염성이 강하며, 척추에 작용하여 소아마비를 초래할 수 있다.

[0039] 인간 엔테로바이러스 C의 감염은 전세계적으로 문제가 되어 왔는데, 전체 바이러스 불활화 백신이 대량 예방접종에 사용되고 있으며, 현재 이용가능한다. 양호한 성과는 Salk에서 개발하였으며 이후 여러가지 측면에서 개선된 방법에 따라 제조할 수 있는, 소아마비 불활화 백신으로 달성되었다. 일반적으로, 이들 백신은 Mahoney, MEF1 및 Saukett 균주들의 불활화된 폴리오 바이러스 혼합을 포함한다.

[0040] 약독화된 인간 엔테로바이러스 C가 생산되어 약독화된 경구 폴리오 백신으로 사용되고 있지만, 약독화된 인간 엔테로바이러스 C는 전체 바이러스를 투여하거나 또는 이와 접촉한 사람에서의 병원성 복구 가능성으로 인해, 위험할 수 있다. 그래서, 이러한 병원성이 없는 안전하고 유효한 폴리올 백신이 요구되고 있다.

[0041] 모든 엔테로바이러스들에서와 같이, 인간 엔테로바이러스 C에서도 외막/캡시드 폴리펩타이드 4종이 동정되어, VP1, VP2, VP3 및 VP4로 명명되었으며, 이들은 조립되어 20면체 바이러스 캡시드를 형성한다. 전형적으로, 인간 엔테로바이러스 C의 각각의 폴리펩타이드로 예방 접종하면, 개별 폴리펩타이드로는 인간과 동물에서 중화 항체를 만들 수 없는 것으로 확인되었다 (Meloen, et al., J. Gen. Virol. 45:761-763, 1979).

[0042] 미국 특허 4,508,708호는, 폴리오 바이러스 및 수족구병 바이러스의 개별 폴리펩타이드들, 즉 VP1, VP2, VP3 및 VP4가 인간과 동물에서 중화 항체를 만들 수 있으며, 수족구병 바이러스의 각 폴리펩타이드들 중에서 VP1만 이러한 능력을 가지고 있다고 개시하고 있다. 미국 특허 4,508,708호는, 인간 에테로바이러스 C 2형 MEF1 비리온 VP1, VP2 및 VP3 폴리펩타이드들 중에서, 항체 역가는 낮지만 VP3만 중화 항체를 유도할 수 있다고 개시하고 있다. 그러나, 피코르나바이러스의 복제를 선택적으로 저해하는 것으로 입증된 광범위한 항바이러스제인 아릴돈 (arildone)을 함유한 조제물로 예방 접종하였을 때에만, VP1, VP2 및 VP3가 중화 항체를 유도할 수 있는 것으로 확인되었다 (Langford, et al. 항미생물 Agents and Chemotherapy 28:578-580, 1985).

[0043] 따라서, 해결해야할 문제는 항바이러스 화합물을 사용하지 않고도 인간 엔테로바이러스 감염에 대해 예방적인 면역성을 제공하는 유효한 백신을 제조하는 것이다. 예방이 필요한 인간 엔테로바이러스는, 예를 들어, 콕사키바이러스 A16 및 인간 엔테로바이러스 71 등의 인간 엔테로바이러스 A; 콕사키바이러스 B 혈청형, 에코바이러스 및 엔테로바이러스 혈청형 등의 인간 엔테로바이러스 B; 인간 폴리오바이러스 1, 인간 폴리오바이러스 2 및 인간 폴리오바이러스 3 등의 인간 엔테로바이러스 C; 뿐만 아니라 EV 68 등의 인간 엔테로바이러스 D가 있다.

[0044] 본 발명에서, 백신은 당해 기술 분야의 당업자에게 숙지되어 있으며, 인간 개체나 동물에게 투여시, 이들 또는 관련 유기체로의 감염에 대해 활발한 면역성과 예방을 자극하게 되는 (즉, 예방 면역을 형성함), 한가지 이상의 병원성 유기체로부터 유래된 항원을 포함하는 예방학적 또는 치료학적 물질로서 추가로 정의할 수 있다.

[0045] 아울러, 당해 기술 분야의 당업자들은 예방 면역에 대해서도 잘 숙지하고 있을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 예방 면역은 바이러스를 중화하는 중화 항체 및/또는 T 세포 면역 반응의 유도 또는 발생을 적어도 포함한다.

[0046] 백신 분야에서, 병원체 유래 항원이 예방적 면역성을 형성하는지가 불명확하다는 것은 널리 알려진 사실이다. Ellis (Chapter 29 of vaccines, Plotkin, et al. (eds) WB Saunders, Philadelphia, at page 571,1998)는, "(백신 개발의) 문제를 해결하는 열쇠는 예방 항체의 생산을 스스로 유도할 수 있으며 따라서 병원체에 의한 공격으로부터 숙주를 보호하는 바이러스 또는 미생물 병원체의 단백질 성분을 동정하는 것이다"라는 말로 이 문제를 언급하였다.

[0047] 피코르나바이러스에 대한 개선된 백신을 제조하는 방법은, 전체 바이러스 사백신 (killed vaccine)의 이용시 형성되는 바와 같이, 예방 항체를 유도할 수 있는 바이러스 캡시드 구조나 이의 구성 성분을 모방하는 것일 것이다. 이러한 유형의 방법은, 복구 가능성이 없기 때문에, 사백신, 불활화 백신 또는 약독화 백신을 이용하는 방법들 보다 안전하다.

[0048] 피코르나바이러스들은 모두 P1 유전자내에 4개의 구조 유전자, VP1, VP2, VP3 및 VP4와, 3C 및 3D의 유전자내 바이러스 프로테아제를 비롯하여, 동일한 게놈 구조를 공유하고 있으며, VP2는 VP0로서 함께 발현된다. 바이러스 프로테아제는 P1 유전자를 절단하므로, 바이러스는 엔테로바이러스의 바이러스 유사 입자 (VLP), 바이러스 캡소머, 복합체 및/또는 항원으로 조립될 수 있다.

[0049] 백신은 성공과는 무관하게 제안되고 있다. 엔테로바이러스의 주 캡시드 단백질인 VP1을 포함하는 서브유닛 백신을, HEV71 감염 등의 엔테로바이러스 감염을 예방 및 치료하기 위한 백신의 베이스로서 사용하는 방법이 제안되었다 (Wu, et al., 2001).

[0050] 엔테로바이러스 감염 예방과 관련하여, 예방 항체를 유도하는 것으로 입증된, 바이러스 사 백신 방식을 고려할 수 있다. 달성되는 낮은 바이러스 역가로 인해, 일반적으로 이러한 엔테로바이러스 백신은 제조하기 어렵다.

발명의 내용

[0051] 본 발명은 피코르나비리대 과 바이러스의 항원성 외막/캡시드 단백질 등의 백신에 관한 것으로서, 이 백신에는 신경 병독성에 기여할 수 있는 바이러스 RNA가 전혀 존재하지 않는다. 본 발명의 백신은, 항원으로서, 엔테로바이러스에 대한 중화 항체를 유도하는, 폴리펩타이드 P1 또는 VP0, 또는 VP1, VP2, VP3 및/또는 VP4로 명명된 캡시드 단백질 (VP), 또는 면역학적으로 또는 생물학적으로 활성인 이의 단편을 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명은, 피코르나바이러스 항원이 한가지 이상의 피코르나바이러스 폴리펩타이드 형태로 존재하는, 특히 인간 엔테로바이러스 펩타이드 VP2, VP3 또는 VP0, 이의 면역학적 단편, 및/또는 이의 항원 결정기인, 백신에 관한 것이다. 피코르나바이러스 폴리펩타이드는 공지된 인간 엔테로바이러스 아미노산 또는 핵산 서열을 이용한 재조합 DNA 기법을 이용하거나 또는 화학 합성에 의해 수득할 수 있다.

[0053] VP0, VP1, VP2, VP3, VP4, 및 이의 면역 활성 단편으로부터 선택되는 한가지 이상의 인간 엔테로바이러스 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 면역 활성 항원을 포함하는 백신, 예컨대,

[0054] 인간 엔테로바이러스에 대해 예방적 및/또는 중화성 면역 반응을 일으키는 백신, 예컨대

[0055] 상기 인간 엔테로바이러스가 인간 엔테로바이러스 A, 인간 엔테로바이러스 B, 인간 엔테로바이러스 C 및인간 엔테로바이러스 D로부터 선택되는, 백신, 예컨대

[0056] 상기 인간 엔테로바이러스 A가 인간 엔테로바이러스 71 (HEV71) 및 콕사키바이러스 A16으로부터 선택되고, 상기 인간 엔테로바이러스 B가 콕사키바이러스 B 및 에코바이러스로부터 선택되고, 상기 인간 엔테로바이러스 C가 인간 폴리오바이러스 1, 인간 폴리오바이러스 2 및 인간 폴리오바이러스 3으로부터 선택되고, 상기 인간 엔테로바이러스 D가 EV 68인, 백신, 예컨대

[0057] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP0 폴리펩타이드를 포함하는 것인 백신, 예컨대

[0058] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP2 폴리펩타이드를 포함하는 것인 백신, 예컨대

[0059] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP3 폴리펩타이드를 포함하는 것인 백신, 예컨대

[0060] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP1 폴리펩타이드를 포함하는 것인 백신, 예컨대

[0061] 상기 백신이 하나 이상의 엔테로바이러스 종 또는 혈청형 유래의 폴리펩타이드를 포함하는 것인 백신, 예컨대

[0062] 상기 종 또는 혈청형이 HEV71 및 콕사키바이러스 A16으로부터 선택되는 인간 엔테로바이러스 A일 수 있는, 백신, 예컨대

[0063] 상기 종 또는 혈청형이 PV-1, PV-2 및 PV-3로부터 선택되는 인간 엔테로바이러스 C일 수 있는, 백신, 예컨대

[0064] 상기 VP0, VP1, VP2, VP3, VP4, 및 이의 면역학적 활성 단편로부터 선택되는 한가지 이상의 인간 엔테로바이러스 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 면역학적으로 활성인 항원이, 바이러스 유사 입자, 캡소머, 복합체 및/또는 응집체의 형태인, 백신, 예컨대

[0065] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP0 폴리펩타이드를 포함하는 백신, 예컨대

[0066] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP2 폴리펩타이드를 포함하는 백신, 예컨대

[0067] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP3 폴리펩타이드를 포함하는 백신, 예컨대

[0068] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP1 폴리펩타이드를 포함하는 백신, 예컨대

[0069] VP0, VP1, VP2, VP3, VP4 및 단편으로부터 선택되는 한가지 이상의 인간 엔테로바이러스 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 면역학적으로 활성인 항원을 포함하는 백신을, 개체에 투여하였을 때 예방 및/또는 중화 면역반응을 유발하는데 유효한 양으로, 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 엔테로바이러스 감염에 대해 개체를 예방 접종하는 방법, 예컨대

[0070] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP0 폴리펩타이드를 포함하는 것인, 방법, 예컨대

[0071] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP1 폴리펩타이드를 포함하는 것인, 방법, 예컨대

[0072] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP3 폴리펩타이드를 포함하는 것인, 방법, 예컨대

[0073] 상기 백신이 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP2 폴리펩타이드를 포함하는 것인, 방법, 예컨대

[0074] 상기 VP0, VP1, VP2, VP3, VP4 및 단편으로부터 선택되는 한가지 이상의 인간 엔테로바이러스 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 면역학적으로 활성인 항원이, 바이러스 유사 입자, 캡소머, 복합체 및/또는 응집체 형태인 것인, 방법, 예컨대

[0075] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP0 폴리펩타이드를 포함하는 것인 방법, 예컨대

[0076] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP2 폴리펩타이드를 포함하는 것인 방법, 예컨대

[0077] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP3 폴리펩타이드를 포함하는 것인 방법, 예컨대

[0078] 상기 바이러스 유사 입자가 면역학적으로 활성인 엔테로바이러스 VP1 폴리펩타이드를 포함하는 것인 방법, 예컨대

[0079] 상기 백신이 하나 이상의 엔테로바이러스 종 또는 혈청형 유래의 폴리펩타이드를 포함하는 것인 방법, 예컨대

[0080] 상기 엔테로바이러스 종 또는 혈청형이 HEV71 및 콕사키바이러스 A16으로부터 선택되는 인간 엔테로바이러스 A일 수 있는, 방법, 예컨대

[0081] 상기 엔테로바이러스 종 또는 혈청형이 PV-1, PV-2 및 PV-3로부터 선택되는 인간 엔테로바이러스 C일 수 있는, 방법, 예컨대

[0082] 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드, 내부 리보솜 도입부 (IRES) 및 인간 엔테로바이러스 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산을 코딩하는 핵산과 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트, 예컨대

[0083] 상기 폴리펩타이드가 인간 엔테로바이러스 P1인, 발현 카세트, 예컨대

[0084] 상기 인간 엔테로바이러스 3CD 프로테아제가 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드를 가공하는 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0085] 상기 가공된 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드들이 조립되어, 바이러스 유사 입자, 캡소머, 복합체 및/또는 응집체를 형성하는 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0086] 상기 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드가 VP0, VP1, VP2, VP3, VP4, 및 이의 면역학적 활성 단편으로부터 선택되는 폴리펩타이드들의 조합을 포함하는 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0087] 상기 인간 엔테로바이러스가 인간 엔테로바이러스 A 및 인간 엔테로바이러스 C로부터 선택되는 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0088] 상기 인간 엔테로바이러스 A가 HEV71 및 콕사키바이러스 A16으로부터 선택되는 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0089] 상기 인간 엔테로바이러스 C가 인간 폴리오바이러스 1 (PV-1), 인간 폴리오바이러스 2 (PV-2) 및 인간 폴리오바이러스 3 (PV-3)로부터 선택되는 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0090] 상기 IRES가 뇌심근염 바이러스 (EMCV)로부터 유래되는 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0091] 상기 뇌심근염 바이러스 (EMCV)로부터 유래되는 IRES가 IRES 활성을 낮추도록 유전자 변형된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0092] 상기 EMCV 유래 IRES는 JK 세그먼트에서 A6 분기 루프 (bifurcation loop)에 뉴클레오티드 (A7) 하나를 부가함으로써 유전자 변형된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0093] 상기 IRES가 인간 엔테로바이러스 유래인 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0094] 상기 프로모터가 진핵생물 프로모터인, 발현 카세트, 예컨대

[0095] 상기 진핵생물 프로모터가 폴리헤드린 프로모터인, 발현 카세트, 예컨대

[0096] 상기 프로모터가 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드, EMCV IRES 및 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0097] 상기 EMCV IRES가 IRES 활성을 낮추도록 돌연변이된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0098] 상기 프로모터가 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드, HEV71 IRES 및 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0099] 상기 프로모터가 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드, 인간 엔테로바이러스 C IRES 및 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0100] 상기 프로모터가 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리펩타이드, 인간 엔테로바이러스 C IRES 및 인간 엔테로바이러스 C 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0101] 상기 프로모터가 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리펩타이드, HEV71 IRES 및 인간 엔테로바이러스 C 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0102] 상기 프로모터가 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리펩타이드, EMCV IRES 및 인간 엔테로바이러스 C 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 카세트, 예컨대

[0103] 숙주 세포에 VLP 발현 카세트를 도입하는 단계, 상기 발현 카세트의 폴리펩타이드를 생산하기에 충분한 기간 동안 상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 상기 숙주 세포 및/또는 배양 상층물로부터 인간 엔테로바이러스 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 백신 제조 방법, 예컨대

[0104] 상기 숙주 세포가 진핵생물 세포인, 방법, 예컨대

[0105] 상기 진핵생물 세포가 곤충 세포, 포유류 동물 세포주 및 효모 세포로부터 선택되는 것인 방법, 예컨대

[0106] 상기 곤충 세포가 스포돕테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*), 트리코플루시아 니 (*Trichoplusia ni*), 초파리 및 에데스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*) 유래 모기 세포로부터 선택되는 것인, 방법, 예컨대

[0107] 상기 포유류 동물 세포주가 CHO, HEK 293, COS-1, HeLa, Vero 및 NIH3T3로부터 선택되는 것인, 방법.

도면의 간단한 설명

[0108] 도 1. HEV71 VLP 발현 카세트 [P1+IRES+3CD] 및 pSN01 플라스미드.

도 2. HEV71 VLP 발현 카세트 [P1+IRES+3C] 및 pSN03 플라스미드.

도 3. SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물에서의 VP1 발현.

도 4. 상층물과 세포 용혈물에서의 가공된 VP1.

도 5. VP1 및 VP0는 100 kDa 분자량 컷 오프 (MWCO) 막에서의 한외여과시 체류물 (retentate)에 존재한다.

도 6. 중화 항체를 생산하기 위한 면역화 스케줄.

도 7. 3번의 회수 시점에 VP0에 대한 토끼 다클론 항혈청으로 탐침한 면역블롯 (화살표).

도 8. SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물에 존재하는 올리고머 항원으로 면역화한 마우스로부터 유래된 중화 혈청 풀은 ELISA에서 재조합 VP2에 대해 높은 역가를 나타낸다.

도 9. SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물에 존재하는 올리고머 항원으로 면역화한 마우스로부터 유래된 중화 혈청 풀은 VP1 보다는 VP2 및 VP0에 대해 더 강하게 결합한다.

도 10. EMCV 게놈의 EMCV IRES (서열번호 1) 영역.

도 11. 3CD 프로테아제 코딩 서열과 EMCV 개시 코돈의 아웃 프래밍; 천연 IRES 서열 (서열번호 2) 대 돌연변이 IRES 서열 (서열번호 3).

도 12. 플라스미드 pSN01-M1.

도 13. 플라스미드 pSN01-M2

도 14. 플라스미드 pSN01-M3.

도 15. HEV71 VLP를 발현하기 위한, 여러가지 재조합 베큘로바이러스 디자인들의 발현 비교.

도 16. 플라스미드 pFastBac™ HT.

도 17. 인간 엔테로바이러스 A 및 인간 엔테로바이러스 C의 항원 융합 단백질용 원핵생물 발현 구조체.

도 18. SN07 체류물로 면역화한 마우스 유래 중화 혈청 풀의 항체는 HEV71의 모든 VLP 성분에 결합한다.

도 19. HEV71 VLP의 특정화, 배양 상층물로부터 HEV71 VLP의 풀-다운.

도 20. 친화성 컬럼 (AFC)으로 정제한 HEV71 VLP의 분석.

도 21. AFC로 정제한 HEV71 VLP의 전자 현미경 사진.

도 22. 인간 엔테로바이러스 C (폴리오바이러스-PV)의 VLP 발현.

도 23. 폴리오바이러스-VLP VP3-VP1 ELISA.

도 24. HEV71-IRES 및 HEV71 3CD 프로테아제를 구비한 HEV71 VLP 발현 카세트.

도 25. PV-IRES 및 HEV71 3CD 프로테아제를 구비한 HEV71 VLP 발현 카세트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109] 본 발명은, 면역 조성물로서, 피코르나비리대 과 바이러스 유래 항원의, 바이러스 유사 입자 (VLP), 바이러스 캡소머, 응집체 및 복합체, 및/또는 피코르나바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 백신을 제공한다. 예시적인 예로 엔테로바이러스, 콕사키 바이러스 및 폴리오바이러스를 포함할 수 있다.

[0110] 본 발명은, 다른 측면에서, 바이러스 단백질, 예컨대, P1 단백질, 또는 피코르나바이러스 VP0 단백질, VP1 단백질, VP2 단백질, VP3 단백질 및/또는 VP4 단백질의 조합, 또는 중화 항체를 유도하는, 이들의 면역 또는 생물활성 단편을 제공한다. 본 발명은 전술한 바이러스 단백질 및/또는 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함하며, 융합 단백질은 예방적인 중화 항체의 생산을 유도하기에 면역학적으로 활성이거나 또는 생물학적으로 활성이다.

[0111] 일 구현예에서, 엔테로바이러스 항원은 엔테로바이러스 외막/캡시드 단백질의 조합 또는 이의 면역학적으로 활성인 단편일 수 있다. 바이러스 외막/캡시드 단백질은 VP0, VP1, VP2, VP3 및/또는 VP4 단백질의 임의 조합일 수 있으며, 바이러스 유사 입자 (VLP), 캡소머, 복합체 및/또는 응집체의 형태를 취할 수 있다. 조합은 융합 단백질의 형태일 수 있다.

[0112] 본 발명은, 부가적인 측면으로, (i) 각각이 피코르나바이러스 단백질, 예를 들어, P1 단백질, 또는 피코르나바이러스 VP0 단백질, VP1 단백질, VP2 단백질, VP3 단백질 및/또는 VP4 단백질의 조합을 코딩하며 내부 리보솜

도입부 (IRES)에 작동가능하게 연결된, 하나 이상의 핵산을, 프로모터에 작동가능하게 연결되어 포함하는 발현 카세트를 구축하는 단계로서, 상기 IRES는 3C 또는 3CD 프로테아제에 작동가능하게 연결된 것인, 단계; (ii) 상기 발현 카세트를 적정 숙주 세포에 형질감염 또는 형질전환하는 단계; (iii) 바이러스 유사 입자 (VLP들), 캡소머, 및/또는 항원이 상기 카세트에 포함된 핵산의 발현 후 세포에서 생산되는 조건 하에서, 상기 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있는, 피코르나비리대 바이러스 유사 입자 (VLP), 캡소머, 복합체 및/또는 응집체의 생산 방법을 포함한다.

[0113] 핵산 또는 재조합 DNA 분자는, 콕사키바이러스 A16, HEV71, 인간 엔테로바이러스 C (인간 폴리오바이러스 PV1, PV2 및/또는 PV3), EV 68, 또는 임의의 다른 피코르나바이러스 단백질 및 프로테아제를 코딩하는 오픈 리딩 프래임을, 콕사키바이러스 A16, HEV71 또는 인간 엔테로바이러스 C 또는 임의의 다른 피코르나바이러스의 핵산 서열에 상보적인 적절하게 설계된 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 증폭시킴으로써, 수득할 수 있다. 적정 프라이머는, 콕사키바이러스 A16, HEV71 및 인간 엔테로바이러스 C 또는 임의의 다른 피코르나바이러스 등의 엔테로바이러스의 공개적으로 이용가능한 핵산 서열로부터 표준 기법에 따라 설계할 수 있다. 전체 게놈 서열은 유전자 은행에서 이용가능하며, 국립 생물공학 정보 센터 (NCBI)에서 입수할 수 있다.

[0114] 일 구현예에서, 피코르나바이러스 P1 단백질, 또는 임의의 엔테로바이러스 P1 단백질은 폴리펩타이드로 발현된 후, 3C 또는 3CD 프로테아제에 의해 VP0, VP1 및 VP3 바이러스 단백질, 또는 이들의 면역학적 또는 생물학적 활성 단편으로 절단되며, 엔테로바이러스 단백질은 엔테로바이러스에 대한 중화 항체를 유도한다. 바이러스 단백질은 엔테로바이러스 단백질의 VLP, 캡소머, 복합체 및/또는 응집체로 자가-조립될 수 있다. 아울러, 프로테아제 유전자는 VLP 발현 카세트의 동일 DNA 재조합 분자에 또는 다른 DNA 재조합 분자에 포함되거나, 및/또는 여러가지 프로모터 또는 번역 인자들로부터 발현되는 것으로 이해될 것이다.

[0115] VLP 발현 카세트의 재조합 DNA 분자 및 핵산은, 피코르나바이러스 구조 단백질 또는 프로테아제를 코딩하는 오픈 리딩 프래임을 인간 피코르나바이러스의 핵산 서열에 상보적인 적절하게 설계된 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 수득함으로써, 유래될 수 있다.

[0116] 다른 구현예에서, 재조합 DNA 분자는, 2 이상의 엔테로바이러스 구조 단백질 또는 이의 일부를 포함하며 단일한 폴리펩타이드 항원으로서 발현되는, 융합 단백질을 코딩할 수 있다.

[0117] 본 발명은, P1 단백질을 바이러스 캡시드 단백질로 가공하는데 필수적인 프로테아제 (3CD)와 엔테로바이러스 구조 단백질 (P1 영역)에 대한 유전자 서열을 보유하여 엔테로바이러스 VLP로 자가-조립할 수 있는, VLP 발현 카세트를 포괄한다. 발현 카세트는 엔테로바이러스 P1 단백질의 핵산 코딩 서열의 프로모터 상류를 이용하는 바이시스트론 벡터 (bicistronic vector)이다. P1 단백질을 코딩하는 시스트론의 하류는 내부 리보솜 도입부 (IRES) 서열이고, 그 다음으로 3CD 프로테아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 시스트론이 위치한다.

[0118] P1 영역과 3CD 프로테아제의 발현은 단일 바이시스트론 메시지로부터 이루어지며, 여기서 3CD 프로테아제 유전자는 IRES의 조절 하에 cap-비의존적인 방식으로 번역된다. 프로테아제 3CD의 발현은 약간의 독성을 야기하여 숙주 세포의 조기 사멸을 유도하므로써, 엔테로바이러스 캡시드 단백질과 VLP의 수율을 떨어뜨린다. 프로테아제의 활성은 카세트로부터 P1 단백질 발현을 높은 수준으로 유지하면서 감소시킬 수 있다. 돌연변이를 포함하는 여러가지 IRES들과 IRES 서열들을 발현 카세트에 삽입하여, 3CD 프로테아제의 발현/활성을 조절하고, 세포에 독성 없이 적절하게 P1을 가공하기 위한 효과적인 IRES를 동정하였다. VLP를 효율적으로 생산하기 위해, 전체 P1 코딩 서열과 여러가지 바이러스 종 또는 혈청형 유래 IRES의 통제 하에 발현되는 전체 3CD 프로테아제 코딩 서열을 포함하는 다수의 재조합 베큘로바이러스를 대상으로, 효율적인 VLP 생산을 테스트하였다.

[0119] 예를 들어, 본 발명의 발현 카세트는 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드, EMCV IRES 및 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다.

[0120] 본 발명의 발현 카세트는 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드, 인간 엔테로바이러스 C IRES 및 인간 엔테로바이러스 A 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다.

[0121] 본 발명의 발현 카세트는 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리펩타이드, HEV71 IRES 및 인간 엔테로바이러스 C 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다.

[0122] 아울러, 본 발명의 발현 카세트는 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리펩타이드, EMCV IRES 및 인간 엔테로바이러스 C 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다.

[0123] 아울러, 유효한 IRES를 포함하는 발현 카세트에서 3CD 프로테아제의 절단 (truncation) 및 돌연연이 제조는 VLP

의 수율 최대화를 달성할 수 있다. 예를 들어, 유전자은행 등재번호 DQ341362.1의 아미노산 1671인 HEV71 3C 프로테아제의 글리신을, 돌연변이 HEV71 3C의 발현과 후속적인 HEV71 P1 폴리펩타이드의 가공을 위해 부위 특이적인 돌연변이 유발을 이용하여 알라닌으로 치환한다.

[0124] 발현 카세트로부터 높은 수준으로의 단백질 발현과 활성을 달성하기 위한 목적과 관련하여, 당해 기술 분야의 통념과는 달리, 일 구현예에서, 본 발명은 단백질 수율 최대를 달성하기 위해 단백질의 활성을 실제 낮추고자 한다. 활성을 낮추기 위한 IRES 또는 3C 프로테아제 핵산에 대한 돌연변이는, 예상하지 못하게도, 엔테로바이러스 캡시드 단백질과 VLP의 수율 증가로 나타났다.

[0125] 백신용 항원의 발현 및 정제와, 엔테로바이러스 등의 피코르나바이러스에 대한 감염 예방을 위해, 발현 카세트를 적정 벡터에 클로닝하여, 적정 숙주 세포에 형질전환/형질감염할 수 있다.

[0126] 피코르나바이러스 항원을 코딩하는 발현 카세트는 진핵생물 숙주 세포로 형질감염하여 적절한 배양 조건 하에 발현시킬 수 있는 플라스미드에 포함시킬 수 있다. 적절한 진핵생물 발현 시스템은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있으며, 유도 발현 시스템 및 적절한 진핵생물 숙주 세포를 포함한다.

[0127] 본 발명의 발현 카세트를 포함하는 포유류 동물 세포의 발현 벡터는, 숙주 세포 및 세포주로 일시적으로 형질감염시킬 수 있는 것을 포함한다. 아울러, 포유류 동물 세포의 발현 벡터는 형질감염 후 숙주 세포내에서 안정적으로 유지되는 벡터일 수 있다.

[0128] 또한, 포유류 동물 세포의 발현 벡터는, 포유류 동물 숙주 세포, 또는 대상 단백질의 발현이 배양 배지에 유도제 첨가 후 유도되는 세포주에서, 안정적으로 또는 일시적으로 형질감염되는, 벡터를 포함할 수 있다. 포유류 동물 숙주 세포 및 세포주로는, 예를 들어, CHO, HEK 293, COS-1, HeLa, Vero 및 NIH3T3 세포를 포함한다. 또한, 그외 진핵생물 숙주 세포는 효소 세포 또는 그외 포유류 동물 세포주를 포함할 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0129] 발현 카세트는 숙주 세포를 형질감염시킬 수 있는 재조합 바이러스에 함유될 수 있다. 이러한 목적으로 사용될 수 있는 적합한 바이러스로는, 베큘로바이러스 백시니아, 신드비스 바이러스, SV40, 센다이 바이러스, 레트로바이러스 및 아데노바이러스를 포함한다. 적합한 숙주 세포는 상기한 바이러스와 혼용가능한 숙주 세포를 포함할 수 있으며, 곤충 세포, 예컨대, 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (예, Sf9 세포), 트리코플루시아 니 (*Trichoplusia ni*), CHO 세포, 닭 배아 섬유모세포, BHK 세포, 인간 SW13 세포, 초파리, 에데스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*) 유래 모기 세포를 포함한다.

[0130] 엔테로바이러스 핵산을 포함하는 발현 카세트는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 방식으로 적정 숙주 세포내로 도입할 수 있다. 숙주 세포는 엔테로바이러스 유전자 및 단백질의 발현을 허용하는 조건 하에 증식 및 배양한다.

[0131] 엔테로바이러스 VP2 단백질, 또는 엔테로바이러스에 대해 중화 항체를 유도하는, 이들의 면역학적 또는 생물학적 활성 단편을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터를 포함하는 플라스미드에 삽입하여, 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 생산되는 엔테로바이러스 VP2 단백질은, 분리하여, 백신으로 사용하기 위한 또는 진단 용도의 면역 조성물의 근원으로서 사용될 것이다.

[0132] 엔테로바이러스 VP4 단백질, 또는 엔테로바이러스에 대해 중화 항체를 유도하는, 이들의 면역학적 또는 생물학적 활성 단편을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터를 포함하는 플라스미드에 삽입하여, 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 생산되는 엔테로바이러스 VP4 단백질은, 분리하여, 백신으로 사용하기 위한 또는 진단 용도의 면역 조성물의 근원으로서 사용될 것이다.

[0133] 엔테로바이러스 VP0 단백질, 또는 엔테로바이러스에 대해 중화 항체를 유도하는, 이들의 면역학적 또는 생물학적 활성 단편을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터를 포함하는 플라스미드에 삽입하여, 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 생산되는 엔테로바이러스 VP0 단백질은, 분리하여, 백신으로 사용하기 위한 또는 진단 용도의 면역 조성물의 근원으로서 사용될 것이다.

[0134] 엔테로바이러스 VP0 단백질을 코딩하는 유전자는 적정 프로모터에 작동가능하게 연결되어 플라스미드내로 삽입될 수 있으며, 플라스미드는 적정 프로모터에 연결된 엔테로바이러스 프로테아제를 제시하여, 2중 재조합 (doubly recombinant) 플라스미드를 제공하며, 이중 재조합 플라스미드는 궁극적으로 진핵생물 또는 원핵생물의 세포 발현 시스템에서 발현될 수 있다.

[0135] 엔테로바이러스 폴리펩타이드 항원을 유전자 클로닝하고 발현하는데 적합한 벡터로는 코스미드 또는 플라스미드

를 포함한다. 적합한 발현 시스템으로는, 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 원핵생물 발현 시스템과, 원핵생물 세포에서 단백질을 발현하기 위해 코스미드 또는 플라스미드로 형질감염된 *E. coli* 등의 원색생물 숙주 세포를 포함한다.

[0136] 적합한 발현 시스템으로는, 당해 기술 분야에 공지된 진핵생물 발현 시스템과, 다양한 진핵생물 숙주 세포와 세포주에서 단백질을 발현하기 위해 플라스미드로 형질전환된 진핵생물 숙주 세포를 포함한다.

[0137] 아울러, 엔테로바이러스 폴리펩타이드 항원은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 수단에 의해 숙주 세포 또는 배양 상층물로부터 수득할 수 있다.

[0138] 엔테로바이러스 VLP, 캡소머, 항원, 이의 면역 활성 성분, 및/또는 이의 응집체는, 형질감염된 및/또는 형질전환된 숙주 세포, 또는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 적절한 정제 수단에 의한 숙주 세포 배양 배지, 상층물 및 세포 용혈물로부터 수득할 수 있다. 배양 배지로 분비되는 단백질의 분리는 엔테로바이러스 VLP, 캡소머, 항원 및/또는 응집체를 수득하는 손쉬운 방법이다. 엔테로바이러스 VLP, 캡소머, 항원, 이의 면역 활성 성분, 및/또는 이의 응집체는 추가로 농축하고, 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 수단으로 정제할 수 있다.

[0139] 본 발명은, 다른 측면에서, 피코르나바이러스 항원, 예컨대 엔테로바이러스 항원, VLP들 및/또는 캡소머를 적정 보강제와 조합하여 포함하는 백신을 포함한다. 피코르나바이러스 항원, 이의 면역 활성 단편, VLP들 및/또는 캡소머는 변형된 백시니아 바이러스, ISCOMS, alum, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 프로인트 불완전 또는 완전 보강제, Quil A 및 예를 들어 Vanselow (1987) S. Vet. Bull. 57 881-896에 기술된 다른 사포닌 또는 임의의 다른 보강제와 조합될 수 있다.

[0140] 용어 "알루미늄 포스페이트" 및 "알루미늄 하이드록사이드"는, 본원에서, 백신을 강화하는데 적합한 모든 형태의 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포스페이트를 포함하는 의미이다.

[0141] 아울러, 피코르나바이러스 항원은 인간 폴리오바이러스의 공개적으로 이용가능한 핵산 또는 단백질 서열을 기초로 폴리펩타이드를 화학 합성하거나 또는 화학적 합성에 의해 제조할 수 있다.

[0142] 일 측면에서, 본 발명은, 한가지 이상의 인간 엔테로바이러스 C 항원(들)을 포함하는 백신을 제공한다. 본원에서, "폴리오바이러스 항원" 또는 "인간 엔테로바이러스 C 항원"이라는 표현은 인간 엔테로바이러스 C에 대한 중화 항체를 자극할 수 있는 모든 항원을 지칭한다. 바이러스 항원은 외막/캡시드 단백질, 또는 이의 단편, 항원결정기 및/또는 그외 인간 엔테로바이러스 C 단백질을 포함할 수 있다.

[0143] 본 발명은, 일 측면에서, 항원으로서, 단일한 인간 엔테로바이러스 C 바이러스 외막/캡시드 단백질을 포함하는, 인간 엔테로바이러스 C 바이러스 서브유닛 백신을 포함한다. 보다 구체적으로, 본 발명은, 항원으로서, 단일한 인간 엔테로바이러스 C 바이러스 외막/캡시드 단백질을 포함하는, 인간 엔테로바이러스 C 바이러스 서브유닛 백신을 포함한다. 보다 구체적으로, 본 발명은, 항원으로서, 인간 엔테로바이러스 C VP2 외막/캡시드 단백질, 또는 이의 면역원성 단편을 포함하는 백신에 관한 것이다.

[0144] 본 발명은, 다른 측면에서, 인간 엔테로바이러스 C VP1, VP2, VP3 및/또는 VP4, 또는 VP0 단백질을 포함하는, 인간 엔테로바이러스 C 바이러스 유사 입자 (VLP들), 캡소머, 복합체 및/또는 응집체를 포함하는 백신을 포함한다.

[0145] 재조합 DNA 분자는, 인간 엔테로바이러스 C 구조 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프래임을 포함하는 핵산 또는 프로테아제를, 인간 엔테로바이러스 C의 핵산 서열에 상보적인 적절하게 명시된 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 수득함으로써, 수득할 수 있다. 적합한 프로모터는, 국립 생물공학 정보 센터 (NCBI)에서 입수가능하며 유전자은행에서 이용가능한 전체 게놈 서열 등의, 인간 엔테로바이러스 C의 공개적으로 이용가능한 핵산 서열로부터 표준 기법에 따라 설계할 수 있다. 인간 엔테로바이러스 C 폴리오바이러스 타입 I의 전체 게놈에 대한 등재번호로는 V01149와 V01150을 포함한다.

[0146] 본 발명의 발현 카세트는, 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. P1 폴리펩타이드는 발현 카세트의 IRES의 통제 하에 번역되는 3CD 프로테아제에 의해 가공(절단)되어, VP1, VP3 및/또는 VP0 폴리펩타이드가 된다. VP0, VP1 및 VP3의 조합물은 바이러스 유사 입자로 자가-조립될 수 있다.

[0147] 인간 엔테로바이러스 C 폴리펩타이드 항원은, 인간 엔테로바이러스 C 외막/캡시드 VP2 단백질, VP0의 추가로 가공된 산물을, 다른 폴리오바이러스의 VP0, VP1, VP3 및/또는 VP4 외막/캡시드 단백질과 조합하여 포함할 수 있다. 인간 엔테로바이러스 C 외막/캡시드 단백질의 조합은 바이러스 유사 입자 (VLP), 캡소머, 복합체 및/또는

응집체의 형태를 취할 수 있다.

[0148] 인간 엔테로바이러스 C 외막/캡시드 VP2 단백질을 코딩하는 유전자는 적합한 프로모터를 포함하는 플라스미드에 삽입하여 숙주 세포에서 발현시킬 수 있으며, 상기 단백질을 분리하여, 백신으로서 사용하기 위한 면역 조성물의 근원으로서 사용할 수 있다. 아울러, 인간 폴리오바이러스 VP2 단백질을 코딩하는 유전자를 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여 숙주 세포에서 발현시키고, 단백질을 분리하여 백신으로서 사용하기 위한 면역 조성물의 근원으로서 사용할 수 있다.

[0149] 인간 엔테로바이러스 C 외막/캡시드 VP4 단백질을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여 숙주 세포에서 발현시킬 수 있으며, 상기 단백질을 분리하여 백신으로서 사용하기 위한 면역 조성물의 근원으로서 사용할 수 있다. 아울러, 인간 폴리오바이러스 VP4 단백질을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여 숙주 세포에서 발현시킬 수 있으며, 상기 단백질을 분리하여 백신으로서 사용하기 위한 면역 조성물의 근원으로 사용할 수 있다.

[0150] 인간 엔테로바이러스 C 외막/캡시드 VP0 단백질을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여 숙주 세포에서 발현시킬 수 있으며, 상기 단백질을 분리하여 백신으로서 사용하기 위한 면역 조성물의 근원으로서 사용할 수 있다. 아울러, 인간 폴리오바이러스 VP0 단백질을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여 숙주 세포에서 발현시킬 수 있으며, 상기 단백질을 분리하여 백신으로서 사용하기 위한 면역 조성물의 근원으로 사용할 수 있다.

[0151] 본 발명은, 한가지 이상의 인간 엔테로바이러스 C의 VP0, VP1, VP2, VP3, VP4 폴리펩타이드, 및 이의 면역학적 활성 단편을 포함하는, 하나 이상의 면역학적 활성 항원을 포함하며, 인간 엔테로바이러스에 대한 예방 및/또는 중화성 면역 반응을 유발하는, 백신을 포함한다.

[0152] 일 구현예에서, 발현 카세트는, IRES의 통제 하에 위치한, 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리단백질, IRES 및 엔테로바이러스 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산으로 필수적으로 구성되며, 프로테아제는 인간 엔테로바이러스 C P1 폴리단백질을 구조 캡시드 단백질로 가공한다.

[0153] 다른 측면에서, 본 발명은, VP2, VP4 및/또는 VP0 단백질, 및/또는 이의 생물 또는 면역 활성 단편 등의, P1 폴리단백질로부터 유래된, 인간 엔테로바이러스 A 항원(들)을 포함하는 백신을 제공한다. 인간 엔테로바이러스 A 항원은 HEV71 및/또는 콕사키바이러스 A16으로부터 유래될 수 있다. HEV71 항원은 단일한 인간 엔테로바이러스 바이러스 외막/캡시드 단백질일 수 있다. 구체적으로, HEV71 항원은 HEV71 P1 폴리단백질, VP4, VP2 또는 VP0 폴리펩타이드, 또는 인간에게 투여시 면역 반응을 일으키는, 이들의 단편일 수 있다.

[0154] 일 구현예에서, 인간 엔테로바이러스 A 항원은 인간 엔테로바이러스 A 외막/캡시드 단백질의 조합 또는 이의 면역 활성 단편일 수 있다. 예를 들어, 인간 엔테로바이러스 A 항원은, 폴리오바이러스 VP2 단백질을, VP1, VP3 및/또는 VP4 폴리펩타이드로부터 선택되는 다른 폴리오바이러스 외막/캡시드 단백질과 조합하여, 포함할 수 있다. VP2 폴리펩타이드와 다른 폴리오바이러스 외막/캡시드 단백질의 조합은 바이러스 유사 입자 (VLP), 캡소머, 복합체 및/또는 응집체의 형태를 취할 수 있다. 이 조합은 융합 단백질의 형태일 수 있다.

[0155] 보다 구체적으로, 본 발명은, 항원으로서, 인간 엔테로바이러스 A VP2 외막/캡시드 단백질, 또는 이의 면역원성 단편을 포함하는, 백신에 관한 것이다.

[0156] 본 발명은, 다른 측면에서, VP1, VP2, VP3 및/또는 VP4, 또는 VP0 인간 엔테로바이러스 A 단백질을 포함하는 인간 엔테로바이러스 A 바이러스 유사 입자 (VLP들) 및/또는 캡소머를 포함하는, 백신을 포함한다.

[0157] 재조합 DNA 분자는, 인간 엔테로바이러스 A 구조 단백질 및/또는 프로테아제를 코딩하는 오픈 리딩 프래임을, 인간 엔테로바이러스 A의 핵산 서열과 상보적인 적절하게 설계된 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 증폭시켜, 수득할 수 있다. 적절하게 설계된 프라이머는 공개적으로 이용가능한 HEV71 핵산 서열로부터 표준 기법에 따라 설계할 수 있다. HEV71의 전체 게놈에 대한 등재 번호로는 DQ341362, AB204852, AF302996 및 AY465356을 포함한다.

[0158] 재조합 DNA 분자는, 인간 엔테로바이러스 A P1, VP1, VP2, VP3 및/또는 VP4, 또는 VP0 단백질, 및 이의 면역학적 활성 단편, 및 프로테아제를 코딩하는, 오픈 리딩 프래임을, 인간 엔테로바이러스 A의 핵산 서열과 상보적인 적절하게 설계된 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 수득함으로써, 수득할 수 있다.

[0159] 본 발명의 일 측면에서, 인간 엔테로바이러스 P1 단백질을 발현시켜 폴리단백질 또는 폴리펩타이드를 형성시키고, 이후 이를 3C 또는 3CD 프로테아제에 의해 VP0, VP1 및 VP3 단백질로 절단한다. VP0 단백질은 VP2 및 VP4

단백질로 추가로 절단할 수 있다. 엔테로바이러스 단백질은 엔테로바이러스 단백질의 VLP들, 캡소머, 복합체 및/또는 응집체로 자가-조립될 수 있다. 아울러, 비-구조 유전자 및 프로테아제 유전자를 동일한 DNA 재조합 분자 또는 상이한 DNA 재조합 분자에 포함시키거나, 및/또는 다른 프로모터 또는 번역 인자들로부터 발현시킬 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0160] 본 발명의 발현 카세트는 인간 엔테로바이러스 P1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. P1 폴리펩타이드는 발현 카세트의 IRES의 통제 하에 번역되는 3CD 프로테아제에 의해 가공(절단)되어, VP1, VP3 및 VP0 폴리펩타이드 및 이의 면역학적 활성 단편이 된다. VP0, VP1 및 VP3 폴리펩타이드들의 조합물은 바이러스 유사 입자로 자가-조립될 수 있다.

[0161] 인간 엔테로바이러스 A VP2 단백질, 또는 이의 면역 활성 단편을 코딩하는 유전자는 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여, 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 분리된 인간 엔테로바이러스 A 항원, 예를 들어, HEV71 VP2 단백질을 분리하여, 백신으로 사용하기 위한 또는 진단 용도를 위한 면역 조성물의 근원으로서 사용할 수 있다.

[0162] 인간 엔테로바이러스 A VP4 단백질, 또는 이의 면역 활성 단편을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여, 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 분리된 VP4 단백질을 분리하여, 백신으로 사용하기 위한 또는 진단 용도를 위한 면역 조성물의 근원으로서 사용할 수 있다.

[0163] 인간 엔테로바이러스 A VP0 단백질, 또는 이의 면역 활성 단편을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터가 포함된 플라스미드에 삽입하여, 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 분리된 VP0 단백질을 분리하여, 백신으로 사용하기 위한 또는 진단 용도를 위한 면역 조성물의 근원으로서 사용할 수 있다.

[0164] 인간 엔테로바이러스 A VP0 단백질, 또는 이의 면역 활성 단편을 코딩하는 유전자는, 적정 프로모터에 작동가능하게 연결하여, 플라스미드에 삽입할 수 있으며, 플라스미드는 적정 프로모터에 연결된 인간 엔테로바이러스 A 프로테아제를 제시하는 2중 재조합 플라스미드를 제공하며, 2중 재조합 플라스미드는 궁극적으로 진핵생물 또는 원핵생물 세포의 발현 시스템에서 발현시킬 수 있다.

[0165] 발현 카세트에 포함된, 인간 엔테로바이러스 A 유전자 및 핵산은, 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 수단에 의해 적절한 숙주 세포로 도입할 수 있다. 숙주 세포는 인간 엔테로바이러스 A 유전자와 단백질을 발현할 수 있는 조건 하에 증식 및 배양한다.

[0166] 본 발명은, 한가지 이상의 인간 엔테로바이러스 A VP0, VP1, VP2, VP3, VP4 폴리펩타이드, 및 이의 면역학적 활성 단편을 포함하는, 하나 이상의 면역 활성 항원을 포함하는 백신을 포괄하며, 백신은 인간 엔테로바이러스에 대해 예방적 및/또는 중화성 면역 반응을 유발한다.

[0167] 일 구현예에서, 발현 카세트는, IRES의 번역 통제 하에 위치한, 인간 엔테로바이러스 P1 폴리단백질, IRES 및 엔테로바이러스 3CD 프로테아제를 코딩하는 핵산을 필수적으로 포함하며, 프로테아제는 엔테로바이러스 P1 폴리단백질을 엔테로바이러스 구조 캡시드 단백질로 가공한다. 이 구조 단백질은 VLP들, 캡소머, 복합체 및/또는 응집체의 형태를 취할 수 있다.

[0168] 실제, 본원에 기술된, 엔테로바이러스 단백질들 중 하나 이상의 발현은, 항체를 발생시키는 항원을 제공하며, 이 항체는 기능성이며, 고 역가로 HEV71, 콕사키바이러스 A16, 인간 엔테로바이러스 C 또는 임의의 다른 피코르나바이러스로부터 선택되는 엔테로바이러스를 중화할 수 있다.

[0169] 하나 이상의 엔테로바이러스 단백질의 발현은, VP2 및/또는 VP0 폴리펩타이드가 중화 항혈청에 의해 인지되는 에피토프를 포함함을, 시사한다.

[0170] 이들 기능성 항체는, 놀랍게도, VP1 폴리펩타이드에 비해 엔테로바이러스 VP2 및 VP0 폴리펩타이드에 의해 더 강하게 발현하며, VP1 폴리펩타이드는 당해 기술 분야에서 중화 항체를 생산하는데 필수적인 주 캡시드 단백질인 것으로 이해되어진다. VP2 폴리펩타이드가 실제 HEV71 감염에 대한 중화 항체를 생산하는데 중요하다는 것은 예상하지 못한 일이다.

[0171] 따라서, 엔테로바이러스 VP2 폴리펩타이드가, 엔테로바이러스 감염에 대한 중화항체를 생산하기 위한, 캡시드 단백질의 우성 (dominant) 에피토프 또는 항원 결정기이라는 것은 놀라운 일이다. HEV71 VP2 폴리펩타이드는, 단독으로, 또는 다른 HEV71 캡시드 단백질, 예를 들어 VP0 폴리펩타이드와 조합하여, HEV71에 대한 중화 항체를 유발하는 우성 항원이다.

[0172] 본 발명의 일 측면에서, 엔테로바이러스 감염을 예방하기 위한 예방학적 예방 접종 (prophylactic vaccination)은, 백신이 인간 엔테로바이러스의 VP0 및/또는 VP2 구조 단백질을 면역 조성물에 병합하는 것을 고려한다. 면역 조성물 또는 백신은, HEV71 및 콕사키바이러스 A16, 또는 이들의 조합 등의, 인간 엔테로바이러스 A 유래의 VP0 또는 VP2 구조 단백질을 포함할 수 있다. 면역 조성물은 개체에게 투여하여, 인간 엔테로바이러스에 대한 중화 항체를 유도할 수 있다. 면역 조성물은, HEV71 및/또는 콕사키바이러스 A16 바이러스 등의 인간 엔테로바이러스 A에 의해 유발되는 수족구병을 예방하기 위해, 개체에게 투여하는 백신에 포함될 수 있다.

[0173] 본 발명의 다른 측면에서, 치료학적 예방 접종은, HEV71 및/또는 콕사키바이러스 A16 감염의 합병증, 예를 들어, 수막염, 뇌염, 급성 이완성 마비, 폐 부종 및 심부전 등의 증상들로서 나타나는, 신경 및 신혈관성 합병증을 예방 및/또는 경감하기 위해 제공된다.

[0174] 본 발명의 일 측면에서, 엔테로바이러스 감염을 예방하기 위한 예방학적 예방 접종은, 백신이 인간 엔테로바이러스 C 유래의 VP0 또는 VP2 구조 단백질, 예컨대 PV1, PV2, PV3 구조 단백질 또는 이들의 조합, 또는 이의 생물 또는 면역 활성 단편을 병합하는 것을 고려한다. 면역 조성물은, PV1, PV2 및 PV3 등의 인간 엔테로바이러스 C에 의해 유발되는 소아마비를 예방하기 위해 개체에게 투여되는 백신에 포함될 수 있다.

[0175] 아울러, 면역 조성물 또는 백신은 인간 엔테로바이러스 C 및 인간 엔테로바이러스 A로부터 유래되는 항원의 조합을 포함할 수 있다.

[0176] 첨부된 도면에 예시된 바와 같이 본 발명의 다양한 구현예를 참조할 수 있다. 이들 구현예들에서, 엔테로바이러스 VLP들, 캡소머, 항원 및 응집체, 및 DNA 재조합 분자들의 특정 구조체들이 예시적인 방식으로 제공됨에 유념하여야 한다.

[0177] 엔테로바이러스 VP2 폴리펩타이드가 중화 항체를 달성하는데 중요한 것으로 판단할 수 있다. VP2 폴리펩타이드는, 인간 엔테로바이러스 A, 타입 HEV71 및 콕사키바이러스 A16; 인간 엔테로바이러스 C 타입 1, 2 및 3: 및 인간 엔테로바이러스 D 타입 EV68 등의 피코르나바이러스 감염에 대한 백신을 제형화하는데 충분할 수 있다.

[0178] 본 발명의 일 측면에서, 피코르나바이러스 감염을 예방하기 위한 예방학적 예방 접종은, 바이러스의 적어도 VP0 및/또는 VP2 및 VP4 구조 단백질을 면역 조성물에 투입하는 것을 고려한다. 면역 조성물은 개체에게 투여하여, 피코르나바이러스에 대해 중화 항체를 유도할 수 있다. 면역 조성물은, 피코르나바이러스 감염을 예방하기 위해 개체에게 투여되는 백신에 포함될 수 있다.

[0179] 본 발명의 다른 측면에서, 치료학적 예방 접종을 제공하여, 피코르나바이러스 감염의 합병증, 예컨대, 수막염, 뇌염, 급성 이완성 마비, 폐 부종 및 심부전과 같은 증상들로서 나타나는 신경성 및 심혈관성 합병증들을 예방 및/또는 경감한다.

[0180] 본 발명의 다른 측면은, 약제로 이용하기 위한 본 발명에 따른 백신 조성물을 제공한다.

[0181] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 엔테로바이러스 VP0 및/또는 VP2 및/또는 VP4 항원을 포함하는, 2가 또는 다가 백신을 제공한다. 예를 들어, 인간 엔테로바이러스 A VP0 및/또는 VP2 및/또는 VP4 항원은 조합될 수 있다. 아울러, 여러가지 혈청형의 인간 엔테로바이러스 A로부터 유래된 전술한 항원, 예컨대 콕사키바이러스 A16 및 HEV71 유래 항원은, 백신, 예를 들어, 인간 수족구병에 대한 백신에서, 조합시킬 수 있다.

[0182] 2가 또는 다가 백신의 엔테로바이러스 항원은 본원에 기술된 발현 카세트로부터 생산할 수 있다. 엔테로바이러스 항원은 바이러스 유사 입자, 캡소머, 복합체 및/또는 응집체의 형태일 수 있다.

[0183] 또다른 측면에서, 본 발명은 엔테로바이러스 항원(들), 및 디프테리아 (D); 파상풍 (T); 백일해 (P); 헤모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*) b (Hib); A형 간염 (HA), B형 간염 (HB), 및 인간 엔테로바이러스 71 중 하나 이상의 병원체에 대해 면역성을 제공하는 항원을 포함하는, 2가 또는 다가 백신을 제공한다.

[0184] 소아 백신에는, 다른 혼용가능한 항원, 예를 들어, 수막염 B, 수막염 A 및 C, 중이염에 효과적인 것으로 알려진 항원도 포함시킬 수 있다.

[0185] 각 백신 투여량 (vaccine dose)에서의 피코르나바이러스 항원의 양은, 전형적인 백신에서 유의한 부작용없이, 면역 예방 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이 양은 특정 면역원이 사용되는지에 따라 달라질 것이다. 특정 백신에 대한 최적량은 항체 역가 관찰에 적용되는 표준 실험들과 개체에서의 기타 반응에 따라 확인할 수 있다. 1차 예방 접종 코스는, 면역예방적 반응을 제공하는데 최적의 간격으로, 백신의 2회 또는 3회 투여를 포함할 수 있다.

[0186] 따라서, 본 발명은, 전술한 본 발명의 임의 측면에 따른 백신을 면역학적 유효량으로 사용하여 이를 필요로 하는 인간 개체를 치료하는 단계를 포함하는, 인간에서 피코르나바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

[0187] 본원 및 청구항에서, 후술된 용어들과 표현들은 다음과 같은 의미를 가진다.

[0188] "항체"는, 인간 또는 다른 동물에서 항원 (면역원)에 의해 유발되는 특정 아미노산 서열을 가진 B 림프구 세포에 의해 생산되는 면역글로불린 분자를 지칭한다.

[0189] "항체 반응" 또는 "체액성 반응 (humoral response)"은, 항체가 항원 자극에 반응하여 B 림프구 세포에 의해 생산되어 혈액 및/또는 림프로 분비되는, 타입의 면역 반응을 지칭한다. 적절한 기능성 면역 반응에서, 항체는 세포의 표면 상의 항원 (예, 병원체)에 특이적으로 결합하여, 식균 세포 및/또는 보체-매개 기전에 의해 세포를 파괴시킨다.

[0190] "항원"은, 적정 세포와 접촉한 결과로서, 민감성 및/또는 면역 반응성 상태를 유도하며, 감작된 개체의 항체 및/또는 면역 세포와 생체내 또는 시험관내에서 입증가능한 방식으로 반응하는, 모든 물질을 지칭한다.

[0191] "에피토프"는 복합체 항원 분자 상의 가장 단순한 항원 결정기 형태를 지칭한다. 이는 면역글로불린 또는 T 세포 수용체에 의해 인지되는 항원의 특이 영역이다.

[0192] "융합 단백질"은, 여러가지 엔테로바이러스 구조 단백질들로부터 유래된 2 이상의 유전자 서열을 조합함으로써 제조된 폴리펩타이드를 발현함으로써 생성되는 단백질 항원을 지칭한다.

[0193] "면역 활성 단편" 또는 "생물 활성 단편"은 엔테로바이러스에 대한 중화 항체를 유도하는 엔테로바이러스 구조 단백질의 단편이다. 즉, 본 발명에서, 상기한 면역 활성 단편은, 특이적인 면역 반응에 영향을 미치거나 또는 더 바람직하게는 유도하여, 엔테로바이러스 감염으로부터 유기체를 예방 접종하거나 또는 예방학적으로 보호하기 위해, 유기체의 면역 시스템에 제시된다.

[0194] 중화 항체의 면역 반응은, 면역 시스템의 특수 세포가 이러한 이종의 단백질, 펩타이드 또는 에피토프의 제시를 인지하여, 특이적인 면역 반응을 착수하는 것이다.

[0195] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 백신 항원은 예방적인 면역 반응을 유도할 수 있다. 용어 "예방적 면역 반응" 및/또는 "중화성 면역 반응"은, 본원에서, 예방 접종한 개체가, 예방 접종을 행한 병원성 물질에 대한 감염으로부터 스스로 보호하거나 저항할 수 있다는 것을 의미한다.

[0196] "세포성 반응" 또는 "세포성 숙주 반응"은 바이러스 감염된 세포 또는 암성 세포를 직접 제거할 수 있는 특이적인 헬퍼 또는 살상 T 세포에 의해 매개되는 타입의 면역 반응을 지칭한다.

[0197] "항원-제시 세포"는, 항원을 처리하여 림프구에 제시함으로써, 일차적으로 기능하는, 항원 유발성 현상들의 보조 세포를 지칭한다. 항원 제시 세포 (APC)와 항원의 상호작용은, 림프구가 항원성 분자를 만나 이를 인지하여 활성화될 수 있기 때문에, 면역 유도에 필수 단계이다. APC의 예로는 대식세포, 랑게르한스-수지상 세포, 여포 수지상 세포 (Follicular dendritic cell) 및 B 세포를 포함한다.

[0198] "B 세포"는 항원과 상호작용하는 면역글로불린 또는 항체를 생산하는 타입의 림프구를 지칭한다.

[0199] "세포독성 T-림프구"는 바이러스 항원을 생산하는 감염성 물질로 감염된 외래 세포 및 숙주 세포를 파괴할 수 있는 특수 타입의 림프구이다.

[0200] "필수적으로 구성된"이라는 표현은, 정해진 구성 성분들 외에도, 다른 성분들이 조성물에 존재할 수 있지만, 단, 조성물의 근본적인, 기본적인 및/또는 새로운 특징들은 이들의 존재에 의해 실질적으로 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다.

[0201] "작동가능하게 연결된"이라는 표현은, 기술된 구성 성분들이 이들의 의도한 방식으로 기능하게 하는 관계에 있는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 핵산에 "작동가능하게 연결된" 프로모터는, 하나의 시스트론 또는 2 이상의 시스트론의 프로모터와 핵산이, 단일한 시스트론, 단일한 바이시스트론 또는 단일한 다중시스트론 메신저 RNA (mRNA)가 생성될 수 있는 방식으로 조합되는 것을 의미한다. 메신저 RNA의 단백질 발현은 핵산 서열의 전사/번역 인자들에 따라 조절할 수 있다. 발현 카세트에 시스트론의 상류 (5') 위치에 삽입되는 IRES 서열은, 상기 시스트론의 IRES 서열 및 핵산이 IRES의 통제 하에 시스트론 mRNA의 번역이 조절되는 방식으로 연결되는 것을 의미한다.

[0202] 이제, 첨부된 도면에 예시된 바와 같이 본 발명에 대한 다양한 구현예를 참조할 수 있다. 이들 구현예에서, 피

코르나바이러스 VLP들, 캡소머, 항원 및 응집체, 및 DNA 재조합 분자의 특정 구조체들은 예로서 제공됨에 유념하여야 한다.

[0203] 실시예 1. HEV71 VLP 발현 카세트 및 벡터에 대한 설명

[0204] 발현 카세트는 당해 기술 분야에서 이해되는 방식으로 구축할 수 있다.

[0205] 1.1 HEV71 VLP 발현 카세트 [P1+IRES+3CD]

[0206] 특징:

[0207] 카세트 크기: 5172 bp

[0208] prPs: 폭스 바이러스 강력한 초기/후기 합성 프로모터, 43 bp

[0209] P1: EV71-SB12736-SAR-03 유래 P1 단백질 코딩 서열

[0210] (유전자은행 등재번호: DQ341362) + 정지 코돈 첨가, 2588 bp

[0211] IRES: 내부 리보좀 결합부, 585 bp

[0212] 3CD: EV71-SB12736-SAR-03 (유전자은행 등재번호: DQ341362) 유래 P3의 C 및 D 단백질 코딩 서열 + ATG 개시 코돈 및 정지 코돈 부가, 1940 bp

[0213] Pac I: 카세트를 pSNX01 (MVA del3 병합 벡터)에 클로닝할 수 있는, 희귀 커터

[0214] 카세트를 pDONR221 게이트웨이 엔트리 벡터 (Invitrogen)에 클로닝하여, pSN01을 제조하였다.

[0215] 발현 카세트 및 pSN01 플라스미드의 개략도로 도 1을 참조한다.

[0216] 1.2 HEV71 VLP 발현 카세트 [P1+IRES+3C]

[0217] 특징:

[0218] 카세트 크기: 3773 bp

[0219] prPs: 폭스 바이러스 강력한 초기/후기 합성 프로모터, 43 bp

[0220] P1: EV71-SB12736-SAR-03 유래 P1 단백질 코딩 서열

[0221] (유전자은행 등재번호: DQ341362) + 정지 코돈 첨가, 2588 bp

[0222] IRES: 내부 리보좀 결합부, 585 bp

[0223] 3CD: EV71-SB12736-SAR-03 (유전자은행 등재번호: DQ341362) 유래 P3의 C 단백질 코딩 서열 + ATG 개시 코돈 및 정지 코돈 부가, 551 bp

[0224] Pac I: 카세트를 pSNX01 (MVA del3 병합 벡터)에 클로닝할 수 있는, 희귀 커터

[0225] 카세트를 pDONR221 게이트웨이 엔트리 벡터 (Invitrogen)에 클로닝하여, pSN03를 제조하였다.

[0226] 발현 카세트 및 pSN03 플라스미드의 개략도로 도 2를 참조한다.

[0227] 1.3 곤충 HEV71[P1+IRES+3CD] 또는 [P1+IRES+3C]를 포함하는 재조합 베큘로바이러스의 제조 방법

[0228] HEV71 P1 + 3CD의 소스 물질은 pSN01이었으며, P1 + 3C의 소스 물질은 pSN03였다. 목표는, pSN01 및pSN03 (Entry vectors) 유래의 HEV71-VLP 카세트를 베큘로바이러스 발현 플라스미드 pDEST8 (Destination vector)에 Invitrogen BAC-TO-BAC® 매뉴얼 (2009)의 지침서에 따라 LR CLONASE®를 이용한 attL/aaR 시험관내 재조합에 의해 도입하는 것이었다.

[0229] 2가지의 재조합 반응을 수행하였다:

[0230] 1. pSN01 (EV71-P1+3CD) x pDEST8, pSN07 제조;

[0231] 2. pSN03 (EV71-P1+3C) x pDEST8, pSN08 제조.

[0232] pSN07과 pSN08을 사용하여, Invitrogen BAC-TO-BAC® 매뉴얼에 기술된 바와 같이 DH10bac를 형질전환하여, 재조

합 벡스미드 bacSN07과 bacSN08을 제조하였다. 재조합 벡스미드를 Sf9 세포에 형질감염시켜, 재조합 베큘로바이러스 SN07 및 SN08을 회수하였다.

[0233] 가공된 캡시드 단백질의 발현을 평가하기 위해, 재조합 베큘로바이러스 SN07과 SN08을 이용하여, 6웰 플레이트에서 Sf9 세포에 추가로 감염시켰다. VP1에 특이적인 다클론 토끼 항혈청을 이용하여, 재조합 베큘로바이러스로 감염된 Sf9 세포의 세포 용혈물 및 상층물의 웨스턴 블롯에서 VP1 단백질을 동정하였다.

[0234] 1.4 SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물에서의 VP1의 발현

[0235] 감염된 Sf9 세포의 상층물을 감염 후 3일부터 7일까지 매일 수확하고, 12% SDS-PAGE 상에서 단백질을 분리시켜, 니트로셀룰로스 막에 이동시킨 다음, 다클론 토끼 항-VP1 항혈청 (1:4000 희석)으로 밤새 탐침한 후, HRP가 접합된 항-토끼 (1:1000 희석)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, TMB로 웨스턴 블롯을 현상하였다. 그 결과는 도 3에 나타낸다. HEV71 VP1이 가공되었으며, 단백질의 발현이 감염 후 3일 및 4일째에 상층물에서 관찰되었으며, 이후 VP1의 발현량이 감소되는 것으로 관찰되었다. Sf9 세포의 감염 시 재조합 베큘로바이러스 SN07은 항원을 생산하며, 이 항원은 상층물에서 확인된다.

[0236] 실시예 2. 상층물 및 세포 용혈물에서의 가공된 VP1

[0237] Sf9 세포에, SN07, SN08, 대조군 베큘로바이러스 bacGUS 및 모조 감염 (mock infected) 등의 여러가지 재조합 베큘로바이러스 분리물을 감염 다중도 (Multiplicity of Infection) (MOI) 10으로 감염시켰다. 감염 3일 및 4일째에 상층물과 세포 용혈물을 수확하고, 토끼 항-VP1 항혈청 (1:4000 희석)을 이용한 웨스턴 블롯으로 단백질 발현을 평가하여, SN07 및 SN08에서의 단백질 생산량을 비교하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 발현 구조체 SN07는 감염 후 3일 및 4일째에 상층물과 세포 용혈물 둘다에서 발현 구조체 SN08 보다 절단된 VP1을 더 많이 생산하였다.

[0238] 실시예 3. VP1 및 VP0는 100kD 분자량 컷 오프 (MWCO) 막으로 한외여과 후 체류물에 존재한다.

[0239] 감염 후 3일째에, SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물을 투명화한 후, 100 kDa MWCO의 AMICON® 필터 (Millipore Corp.)를 통과시켰다. 체류물에 대해 가공된 VP1 및 VP0의 존재를 테스트하였다. VP1의 분자량은 약 33 kDa이고, VP0의 분자량은 36 KDa이기 때문에, 이들 단백질은 올리고머 형태가 아닌 한 체류물에 잔류할 것으로 예상되지 않는다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 이들 항원은 100kDa MWCO 한외 여과를 통해 상층물을 통과시켰을 때 체류물에 잔존한다. 이는, 이 항원이 올리고머 형태로 조합되어 있다는 것을 시사해준다. 이에, VP1 및 VP0가 가공되어 다른 캡시드 단백질과의 올리고머 조합된 형태로 존재하는 것으로 결론내릴 수 있다.

[0240] 실시예 4. 체류물은 마우스를 면역화하였을 때 HEV71에 대한 강력한 중화 항체를 유발한다.

[0241] 비근교계의 백색 마우스 2 그룹을, 실시예 3에서 준비한 SN07로 감염된 Sf9의 상층물 농축물로 면역화하였다. 사용한 면역화 스케줄은 도 6에 도표로 나타낸다.

[0242] 면역화된 그룹의 마우스들 모두 표 1에 나타낸 바은 HEV71을 중화하는 항체를 생산하였다. 체류물은, 마우스를 면역화하는데 사용하였을 때, HEV71에 대한 강력한 중화 항체를 유발한다.

[0243] 표 1. HEV71에 대한 중화 항체.

표 1

[0244]

마우스 ID	중화 상호 역가 (neut reciprocal titre)
m1-1	160
m1-2	640
m1-3	>=2560
m1-4	640
m2-1	80
m2-2	640
m2-3	640
m2-4	160
대조군 1	<10
대조군 2	<10

[0245] 이에, 올리고머 단백질이 마우스에서 중화 항체를 유도할 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0246] 올리고머 단백질은 면역 조성물에 이용하거나 및/또는 투여용 백신 및 엔테로바이러스 감염의 예방제에 포함시킬 수 있다.

[0247] 실시예 5. VP0는 SN07로 감염된 Sf9 세포의 세포 용혈물로 발현된다.

[0248] Sf9 세포에 SN07을 감염시키고, 72, 96 및 120시간째에 세포 용혈물을 수확하였다. EV71 VP0에 대한 토끼 다클론 항혈청으로 면역블롯을 탐침하였고, VP0가 감염 후 72시간째에 발현되는 것으로 확인되었다. 도 7에 나타낸 바와 같이, VP0는 감염 후 96시간째에 시작하여 VP2로 부분적으로 절단되었다. 즉, VP0와 VP2 둘다 SN07로 감염된 세포의 세포 용혈물에 존재한다.

[0249] 실시예 6. SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물의 올리고머 항원으로 면역화한 마우스 유래 중화 혈청 풀은 ELISA에서 재조합 VP2에 대해 높은 역가를 나타낸다.

[0250] ELISA 플레이트를 동량의 재조합 VP1 및 VP2로 코팅하고, 이를 이용하여 중화 마우스 항혈청 풀을 테스트하였다. 도 8은, 상층물 체류물의 항원 조제물을 제공받은 마우스가 VP1 보다 VP2에 더 잘 결합할 수 있었음을 보여준다. 즉, 항체는 기능성이며, HEV71을 고 역가로 중화할 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0251] 실시예 7. SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물의 올리고머 항원으로 면역화한 마우스 유래 중화 혈청 풀은 VP1 보다 VP2 및 VP0에 더 강하게 결합한다.

[0252] 도 9에서, 웨스턴 블롯은, 결합된 마우스 중화 항혈청 풀이, 각 웰에 동량으로 총 단백질을 첨가하더라도, VP1 보다 VP2와 VP0에 더 강하게 결합한다는 것을 보여준다. 이는, VP2 및 VP0가 중화 항혈청에 의해 인지되는 에피토프를 포함하다는 것을 의미한다.

[0253] 이들 기능성 항체는, 놀랍게도, 중화 항체 생산에 필요한 주요 캡시드 단백질로 간주되는, VP1 보다 VP2와 VP0에 더 강하게 결합한다. 즉, VP2가 실제 중화 항체를 생산하는데 중요하다고 보는 것이 적절하다.

[0254] 백신 제형에 VP2의 존재가 중화 항체를 달성하는데 중요하다고 판단할 수 있다. VP2는, HEV71과, 인간 콕사키바이러스 A16, 에코바이러스 30 및 폴리오바이러스 타입 1, 2 및 3 등의 그외 A, B 및 C 타입의 엔테로바이러스에 대한 백신을 제형화하는데 충분할 수 있다.

[0255] 본 발명은 폴리오바이러스 항원을 포함하는 백신을 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 폴리오바이러스에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법을 발명의 범위에 포함하는 것으로, 또한 이해될 것이다.

[0256] 실시예 8. 중화 항체의 수준 비교

[0257] HEV71 VP1을 포함하는 면역 조성물을 사용하여 마우스를 면역화한다. 마찬가지로, HEV71 VP2 및/또는 VP0를 포함하는 면역 조성물을 사용하여 마우스를 면역화한다. HEV71 VP2 및/또는 VP0로 면역화한 마우스에서의 중화 항체의 수준을 HEV71 VP1으로 면역화한 마우스에서의 중화 항체 수준과 비교한다. HEV71 VP2 및/또는 VP0로 면역화한 마우스에서의 중화 항체의 수준은 HEV71 VP1으로 면역화한 마우스에서의 중화 항체의 수준 보다 유의하게 높다.

[0258] 실시예 9. 단일 바이시스트론 메시지로부터 인간 엔테로바이러스 C P1 영역과 프로테아제 3CD를 발현하기 위한, 재조합 베큘러바이러스 벡터의 구축.

[0259] 본 실시예는, 베큘로바이러스에 감염된 세포의 사멸을 매개하는 프로테아제 3CD를 감소시킴으로써, 인간 엔테로바이러스 C (폴리오바이러스)의 VLP들의 효율적인 생산을 유도하는 방법을 제공한다.

[0260] 단일한 바이시스트론 메시지로부터 P1 영역과 프로테아제 3CD를 발현하기 위한 재조합 베큘로바이러스 벡터의 구축은, 예를 들어 도 1에 도시된다. 3CD 프로테아제 유전자는 EMCV IRES의 통제 하에 cap-비의존적인 방식으로 번역된다. 이 시스템은, 프로테아제 3CD의 발현을 조절하기 위한 레버리지 (leverage)를 제공하며, 즉, P1 단백질 보다 프로테아제를 더 적은 양으로 생산하는 가장 약한 IRES를 찾기 위해 돌연변이 IRES 서열들을 평가한다.

[0261] 바이시스트론 벡터는, 플라스미드가 P1의 코딩 서열의 상류 폴리헤드린 프로모터를 포함하도록 구축된다. P1을 코딩하는 시스트론 하류는 뇌심근염 바이러스 (EMCV)의 내부 리보좀 도입부 (IRES) 서열 (GenBank accession number AF113968.2; 뉴클레오티드 1666에서 2251)과 그 다음으로 프로테아제 3CD를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 시스트론이 위치한다. 3CD를 가진 인간 엔테로바이러스 C P1의 소스 물질은 ATCC (American Type

Culture Collection)에서 입수할 수 있으며, 공지된 인간 엔테로바이러스 C 서열 (GenBank available through the National Center for Biotechnology Information (NCBI))로부터 합성할 수 있다.

[0262] 재조합 베큘로바이러스는 제조사 (Invitrogen)의 지침에 따라 BAC-TO-BAC® 시스템을 이용하여 제조한다. 간략하게는, LR CLONASE®를 사용하여, 인간 엔테로바이러스 C VLP 카세트를 베큘로바이러스 발현 플라스미드 pDEST8 (Destination using vector)에 attL/aaR 시험관내 재조합에 의해 도입한다. LR CLONASE® 반응은 1시간 동안 25℃에서 수행한 다음, 프로테아제 K와 인큐베이션한다. LR CLONASE® 반응 믹스를 Library Efficiency DH5α 컴피턴트 세포에 형질전환시켜, 발현 클론을 수득한다. 제조되는 콜로니들에서 DNA를 분리하고, 제한 효소 분석을 통해 인간 엔테로바이러스 C 카세트의 존재를 검증한다. DH10bac세포에 보유된 베큘로바이러스 게놈에 T7 전위 재조합효소에 의해 도입하여, 발현 카세트를 구축한다. 재조합 벡스미드는, 50 ㎍/ml 카나마이신, 7 ㎍/ml 젠타미신, 10 ㎍/ml 테트라사이클린, 100 ㎍/ml X-gal, 및 40 ㎍/ml IPTG가 첨가된 LB 아가 플레이트에서 백색 표현형에 의해 검증한다. PureLink HiPure 플라스미드 DNA 미니프렙 키트 (Invitrogen)를 사용하여, DH10Bac E. coli로부터 고품질의 벡스미드 DNA를 정제한다. 삽입체에 대한 M13 정방향, M13 역방향 및 내부 프라이머를 이용하여, 인간 엔테로바이러스 C 카세트의 존재를 검증한다. EFFECTENE® 형질감염 시약 (Qiagen)을 사용하여, DNA를 Sf9 곤충 세포에 형질감염시켜, 재조합 베큘로바이러스를 회수한다. 간략하게는 Sf9 세포를 T25 플라스크에 2백만개 접종하여, 28℃에서 6시간 동안 배양하여 부착시킨다. 재조합 벡스미드 DNA 1 ㎍을 DNA 축합 완충액 150 ㎕에 재현탁하고, 인핸서 용액 8 ㎕를 혼합한 다음 실온에서 5분간 인큐베이션한다. 그런 후, EFFECTENE® 시약 25㎕를 DNA 믹스에 첨가하여, 실온에서 10분간 인큐베이션한다. 배양 배지 1 ml을 형질감염 복합체가 든 관에 넣고, 세포 배양 플라스크로 옮긴 다음 균일하게 혼합한다. 3일째에, 5분간 500 g로 원심분리하여, 상층물을 회수한다. 형질감염 후, 고 역가의 바이러스 스톡을 준비한다. 고 역가의 바이러스 스톡이 수득되면, 이를 이용하여 타겟 단백질 발현의 최적 시간을 결정한다.

[0263] 실시예 10. 베큘로바이러스에 감염된 세포의 사멸을 매개하는 프로테아제 3CD의 저하 방법을 통한, HEV71 및 인간 엔테로바이러스 C의 VLP들의 생산.

[0264] 본 실험은 단일한 바이시스트론 메시지로부터 P1 영역과 프로테아제 3CD를 발현하기 위한 재조합 베큘로바이러스 벡터의 구축을 기술한다. 프로테아제 유전자 3CD는 도 10에 나타낸 EMCV IRES의 통제 하에 cap-비의존적인 양상으로 번역된다. 이 시스템은, 프로테아제 3CD의 발현을 조절하기 위한 레버리지 (leverage)를 제공하며, 즉, P1 단백질 보다 프로테아제를 더 적은 양으로 생산하는 가장 약한 IRES를 찾기 위해 돌연변이 IRES 서열들을 평가한다.

[0265] 바이시스트론 벡터는, 플라스미드가 P1의 코딩 서열의 상류 폴리헤드린 프로모터를 포함하도록 구축하였다. P1을 코딩하는 시스트론 하류는 뇌심근염 바이러스 (EMCV)의 내부 리보좀 도입부 (IRES) 서열과 그 다음으로 프로테아제 3CD를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 시스트론이 위치하며, 도 1을 참조한다. 실시예 1에 사용된 IRES는 변형된 형태들이 존재하는 바와 같이 천연 EMCV IRES를 포함한다. 도 10의 천연 EMCV IRES는 JK 세그먼트에 A6 분기 루프를 나타낸다. 뉴클레오티드, 예컨대 아데닌 (A7)의 부가는 발현을 감소시킨다. 또한, 실시예 1에서 사용된 구조체에서, 3CD 프로테아제는 아미노-말단에서 뇌심근염 바이러스 IRES와 융합된다. 중요하게는, EMCV 개시 코돈을 3CD 프로테아제 코딩 서열과 아웃 프래밍하면, 하류 유전자들의 발현은 현저하게 감소되어야 하며, 도 11을 참조한다. 도 12에 나타낸 바와 같이, pSNO1의 EMCV IRES에 이들 2가지 변형을 가하여 pSNO1-M1으로 명명하였으며, DNA2.0에 의해 합성하였다.

[0266] pSNO1-M1의 돌연변이 EMCV IRES로부터 발현되는 VLP들을 특정화하기 위한 실험을 고안하였다. BAC-TO-BAC® 시스템을 제조사의 지침 (Invitrogen)에 따라 사용하여, 제조합 베큘로바이러스를 제조하였다. 간략하게는, LR CLONASE®를 사용하여, HEV71 VLP 카세트를 베큘로바이러스 발현 플라스미드 pDEST8 (Destination using vector)에 attL/aaR 시험관내 재조합에 의해 도입하였다. LR CLONASE® 반응은 1시간 동안 25℃에서 수행한 다음, 프로테아제 K와 인큐베이션하였다. LR CLONASE® 반응 믹스를 Library Efficiency DH5α 컴피턴트 세포에 형질전환시켜, 발현 클론을 수득하였다. 제조되는 콜로니들에서 DNA를 분리하고, 제한 효소 분석을 통해 HEV71/폴리오바이러스 카세트의 존재를 검증하였다. pSNO7-M1의 발현 카세트를, DH10bac세포에 보유된 베큘로바이러스 게놈에 T7 전위 재조합효소에 의해 도입하여 bacSNO7-M1을 제조함으로써, 재조합 벡스미드를 구축한다. 재조합 벡스미드는, 50 ㎍/ml 카나마이신, 7 ㎍/ml 젠타미신, 10 ㎍/ml 테트라사이클린, 100 ㎍/ml

X-gal, 및 40 ㎍/ml IPTG가 첨가된 LB 아가 플레이트에서 백색 표현형에 의해 검증한다. PureLink HiPure 플라스미드 DNA 미니프렙 키트 (Invitrogen)를 사용하여, DH10Bac E. coli로부터 고품질의 벡스미드 DNA를 정제한다. 삽입체에 대한 M13 정방향, M13 역방향 및 내부 프라이머를 이용하여, HEV71/폴리오바이러스 카세트의 존재를 검증하였다. EFFECTENE® 형질감염 시약 (Qiagen)을 사용하여, DNA를 Sf9 곤충 세포에 형질감염시켜, 재조합 베큘로바이러스를 회수하였다. 간략하게는, Sf9 세포를 T25 플라스크에 2백만개 접종하여, 28℃에서 6시간 동안 배양하여 부착시켰다. 재조합 벡스미드 DNA 1 ㎍을 DNA 축합 완충액 150 ㎕에 재현탁하고, 인핸서 용액 8 ㎕를 혼합한 다음 실온에서 5분간 인큐베이션하였다. 그런 후, EFFECTENE® 시약 25㎕를 DNA 믹스에 첨가하여, 실온에서 10분간 인큐베이션하였다. 배양 배지 1 ml을 형질감염 복합체가 든 관에 넣고, 세포 배양 플라스크로 옮긴 다음 균일하게 혼합하였다. 3일째에, 5분간 500 g로 원심분리하여, 상층물을 회수하였다. 형질감염 후, 고 역가의 바이러스 스톡을 준비한다. 고 역가의 바이러스 스톡이 수득되면, 이를 이용하여 타겟 단백질 발현의 최적 시간을 결정한다. 대상 단백질을 분석하기 위해, 10% 그레이스 곤충 세포 배지 (Invitrogen)에서 배양한 Sf9 세포를 1% FBS Sf900-II SFM 배지 (Invitrogen)에 재현탁하여, 단일 세포를 수득하고, 이를 플라스크에 백만개/ml 밀도로 접종한 다음 28℃에서 4시간 배양하였다. 바이러스 스톡을 PBS로 헹군 세포에 MOI 10으로 첨가하여, 1시간 동안 부드럽게 흔들었다. 감염된 세포를 PBS로 3번 헹군 다음, 세포를 여러 시간대로 Sf900II-SFM에서 배양하였다. 플라스크를 실온에서 30분간 흔들어 세포를 저장성 douncing 완충액 / 1%TRITON® X-100 (TX-100) (1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM HEPES, 1% TX-100)으로 세포 용혈시킨 다음, 세포 용혈시킨 세포를 플라스크에서 수집하여 30분간 7000 rpm으로 4℃에서 원심분리하여, 세포 용혈물을 준비하였다. 세포 용혈물과 상층물의 성분들을 특이 항체를 이용한 면역블롯팅과 ELISA로 분석하였다.

[0267] 실시예 11. 베큘로바이러스에 감염된 세포의 사멸을 매개하는 프로테아제 3CD의 저하 방법을 통한, HEV71 및 인간 엔테로바이러스 C (폴리오바이러스)의 VLP들의 효율적인 생산.

[0268] 단일한 바이시스트론 메시지로부터 P1 영역과 프로테아제 3CD를 발현하기 위한 재조합 베큘로바이러스 벡터의 구축은 도 1에 도시되어 있다. 프로테아제 유전자 3CD는 도 10에 나타낸 EMCV IRES의 통제 하에 cap-비의존적인 양상으로 번역된다. 이 시스템은, 프로테아제 3CD의 발현을 조절하기 위한 레버리지 (leverage)를 제공하며, 즉, P1 단백질 보다 프로테아제를 더 적은 양으로 생산하는 가장 약한 IRES를 찾기 위해 돌연변이 IRES 서열들을 평가한다.

[0269] 바이시스트론 벡터는, 플라스미드가 P1의 코딩 서열의 상류 폴리헤드린 프로모터를 포함하도록 구축하였다. P1을 코딩하는 시스트론 하류는 뇌심근염 바이러스 (EMCV)의 내부 리보좀 도입부 (IRES) 서열과 그 다음으로 프로테아제 3CD를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 시스트론이 위치하며, 도 1을 참조한다. 실시예 1에 사용된 IRES는 변형된 형태들이 존재하는 바와 같이 천연 EMCV IRES를 포함한다. 천연 EMCV IRES 서열은, 실제, 발현을 감소시키는 것으로 공지된 뉴클레오티드 (A7) 하나를 부가함으로써, JK 세그먼트에 A6 분기 루프를 가지며, 도 10을 참조한다. A6 분기 루프는 pSNO1의 EMCV IRES 서열에서 A7으로 변형되었으며, pSNO1-M2로 명명되었으며, 도 13을 참조하며, 이는 DNA2.0에 의해 합성된다.

[0270] pSNO1-M2의 돌연변이 EMCV IRES로부터 발현되는 VLP들을 특정화하였다. BAC-TO-BAC® 시스템을 제조사의 지침 (Invitrogen)에 따라 사용하여, 제조합 베큘로바이러스를 제조하였다. 간략하게는, LR CLONASE®를 사용하여, HEV71 VLP 카세트를 베큘로바이러스 발현 플라스미드 pDEST8 (Destination using vector)에 attL/aaR 시험관내 재조합에 의해 도입하였다. LR CLONASE® 반응은 1시간 동안 25℃에서 수행한 다음, 프로테아제 K와 인큐베이션하였다. LR CLONASE® 반응 믹스를 Library Efficiency DH5α 컴피턴트 세포에 형질전환시켜, 발현 클론을 수득하였다. 제조되는 콜로니들에서 DNA를 분리하고, 제한 효소 분석을 통해 HEV71/폴리오바이러스 카세트의 존재를 검증하였다. pSNO7-M2의 발현 카세트를, DH10bac세포에 보유된 베큘로바이러스 게놈에 T7 전위 재조합효소에 의해 도입하여 bacSNO7-M2를을 제조함으로써, 재조합 벡스미드를 구축한다. 재조합 벡스미드는, 50 ㎍/ml 카나마이신, 7 ㎍/ml 젠타미신, 10 ㎍/ml 테트라사이클린, 100 ㎍/ml X-gal, 및 40 ㎍/ml IPTG가 첨가된 LB 아가 플레이트에서 백색 표현형에 의해 검증하였다. PureLink HiPure 플라스미드 DNA 미니프렙 키트 (Invitrogen)를 사용하여, DH10Bac E. coli로부터 고품질의 벡스미드 DNA를 정제하였다. 삽입체에 대한 M13 정방향, M13 역방향 및 내부 프라이머를 이용하여, HEV71/폴리오바이러스 카세트의 존재를 검증하였다. EFFECTENE® 형질감염 시약 (Qiagen)을 사용하여, DNA를 Sf9 곤충 세포에 형질감염시켜, 재조합 베큘로바이러스를 회수하였다. 간략하게는, Sf9 세포를 T25 플라스크에 2백만개 접종하여, 28℃에서 6시간 동안 배양하여 부

착시켰다. 재조합 벡스미드 DNA 1 ㎍을 DNA 축합 완충액 150 ㎕에 재현탁하고, 인핸서 용액 8 ㎕를 혼합한 다음 실온에서 5분간 인큐베이션하였다. 그런 후, EFFECTENE® 시약 25㎕를 DNA 믹스에 첨가하여, 실온에서 10분간 인큐베이션하였다. 배양 배지 1 ml을 형질감염 복합체가 든 관에 넣고, 세포 배양 플라스크로 옮긴 다음 균일하게 혼합하였다. 3일째에, 5분간 500 g로 원심분리하여, 상층물을 회수하였다. 형질감염 후, 고 역가의 바이러스 스톡을 준비하였다. 고 역가의 바이러스 스톡이 수득되면, 이를 이용하여 타겟 단백질 발현의 최적 시간을 결정하였다. 대상 단백질을 분석하기 위해, 10% 그레이스 곤충 세포 배지 (Invitrogen)에서 배양한 Sf9 세포를 1% FBS Sf900-II SFM 배지 (Invitrogen)에 재현탁하여, 단일 세포를 수득하고, 이를 플라스크에 백만개/ml 밀도로 접종한 다음 28℃에서 4시간 배양하였다. 바이러스 스톡을 PBS로 헹군 세포에 MOI 10으로 첨가하여, 1시간 동안 부드럽게 흔들었다. 감염된 세포를 PBS로 3번 헹군 다음, 세포를 여러 시간대로 Sf900II-SFM에서 배양하였다. 플라스크를 실온에서 30분간 흔들어 세포를 저장성 douncing 완충액 /1%TX-100 (1.5 mM MgCl2, 50 mM KCl, 20 mM HEPES, 1% TX-100)으로 세포 용혈시킨 다음, 용혈시킨 세포를 플라스크에서 수집하여 30분간 7000 rpm으로 4℃에서 원심분리하여, 세포 용혈물을 준비하였다. 세포 용혈물과 상층물의 성분들을 특이 항체를 이용한 면역블롯팅과 ELISA로 분석하였다.

[0271] 실시예 12. 베큘로바이러스에 감염된 세포의 사멸을 매개하는 프로테아제 3CD의 저하 방법을 통한, HEV71 및 인간 엔테로바이러스 C (폴리오바이러스)의 VLP들의 효율적인 생산.

[0272] 단일한 바이시스트론 메시지로부터 P1 영역과 프로테아제 3CD를 발현하기 위한 재조합 베큘로바이러스 벡터의 구축은 도 1에 도시되어 있다. 프로테아제 유전자 3CD는 도 10에 나타낸 EMCV IRES의 통제 하에 cap-비의존적인 양상으로 번역된다. 이 시스템은, 프로테아제 3CD의 발현을 조절하기 위한 레버리지 (leverage)를 제공하며, 즉, P1 단백질 보다 프로테아제를 더 적은 양으로 생산하는 가장 약한 IRES를 찾기 위해 돌연변이 IRES 서열들을 평가한다.

[0273] 바이시스트론 벡터는, 플라스미드가 P1의 코딩 서열의 상류 폴리헤드린 프로모터를 포함하도록 구축하였다. P1을 코딩하는 시스트론 하류는 뇌심근염 바이러스 (EMCV)의 내부 리보좀 도입부 (IRES) 서열과 그 다음으로 프로테아제 3CD를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 시스트론이 위치한다 (도 1). 실시예 1에 사용된 IRES는 변형된 형태들이 존재하는 바와 같이 천연 EMCV IRES를 포함한다. pSNO1 구조체에서, 3CD 프로테아제는 아미노 말단에서 뇌심근염 바이러스 폴리단백질과 융합된다. EMCV 개시 코돈을 3CD 프로테아제 코딩 서열과 아웃 프래밍하면, 하류 유전자들의 발현은 상당히 저해되어야 하며, 도 11을 참조한다. 이런 변형을 pSNO1의 EMCV IRES 서열에 가하였으며, pSNO1-M3로 명명하였고, 도 14를 참조하며, 이는 DNA2.0에 의해 합성된다.

[0274] pSNO1-M3의 돌연변이 EMCV IRES로부터 발현되는 VLP들을 분석하였다. BAC-TO-BAC® 시스템을 제조사의 지침 (Invitrogen)에 따라 사용하여, 제조합 베큘로바이러스를 제조하였다. 간략하게는, LR CLONASE®를 사용하여, HEV71 VLP 카세트를 베큘로바이러스 발현 플라스미드 pDEST8 (Destination using vector)에 attL/aaR 시험관내 재조합에 의해 도입하였다. LR CLONASE® 반응은 1시간 동안 25℃에서 수행한 다음, 프로테아제 K와 인큐베이션하였다. LR CLONASE® 반응 믹스를 Library Efficiency DH5α 컴피턴트 세포에 형질전환시켜, 발현 클론을 수득하였다. 제조되는 콜로니들에서 DNA를 분리하고, 제한 효소 분석을 통해 HEV71/폴리오바이러스 카세트의 존재를 검증하였다. pSNO7-M3의 발현 카세트를, DH10bac세포에 보유된 베큘로바이러스 게놈에 T7 전위 재조합효소에 의해 도입하여 bacSNO7-M3를을 제조함으로써, 재조합 벡스미드를 구축하였다. 재조합 벡스미드는, 50 ㎍/ml 카나마이신, 7 ㎍/ml 젠타미신, 10 ㎍/ml 테트라사이클린, 100 ㎍/ml X-gal, 및 40 ㎍/ml IPTG가 첨가된 LB 아가 플레이트에서 백색 표현형에 의해 검증하였다. PureLink HiPure 플라스미드 DNA 미니프렙 키트 (Invitrogen)를 사용하여, DH10Bac E. coli로부터 고품질의 벡스미드 DNA를 정제하였다. 삽입체에 대한 M13 정방향, M13 역방향 및 내부 프라이머를 이용하여, HEV71/폴리오바이러스 카세트의 존재를 검증하였다. EFFECTENE® 형질감염 시약 (Qiagen)을 사용하여, DNA를 Sf9 곤충 세포에 형질감염시켜, 재조합 베큘로바이러스를 회수하였다. 간략하게는, Sf9 세포를 T25 플라스크에 2백만개 접종하여, 28℃에서 6시간 동안 배양하여 부착시켰다. 재조합 벡스미드 DNA 1 ㎍을 DNA 축합 완충액 150 ㎕에 재현탁하고, 인핸서 용액 8 ㎕를 혼합한 다음 실온에서 5분간 인큐베이션하였다. 그런 후, EFFECTENE® 시약 25㎕를 DNA 믹스에 첨가하여, 실온에서 10분간 인큐베이션하였다. 배양 배지 1 ml을 형질감염 복합체가 든 관에 넣고, 세포 배양 플라스크로 옮긴 다음 균일하게 혼합하였다. 3일 후, 5분간 500 g로 원심분리하여, 상층물을 회수하였다. 형질감염 후, 고 역가의 바이러스 스톡을 준비하였다. 고 역가의 바이러스 스톡이 수득되면, 이를 이용하여 타겟 단백질 발현의 최적 시

간을 결정한다.

[0275] 대상 단백질을 분석하기 위해, 10% 그레이스 곤충 세포 배지 (Invitrogen)에서 배양한 Sf9 세포를 1% FBS Sf900-II SFM 배지 (Invitrogen)에 재현탁하여, 단일 세포를 수득하고, 이를 플라스크에 백만개/ml 밀도로 접종한 다음 28℃에서 4시간 배양하였다. 바이러스 스톡을 PBS로 헹군 세포에 MOI 10으로 첨가하여, 1시간 동안 부드럽게 흔들었다. 감염된 세포를 PBS로 3번 헹군 다음, 세포를 여러 시간대로 Sf900II-SFM에서 배양하였다. 플라스크를 실온에서 30분간 흔들어 세포를 저장성 douncing 완충액 /1%TX-100 (1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM HEPES, 1% TX-100)으로 세포 용혈시킨 다음, 용혈시킨 세포를 플라스크에서 수집하여 30분간 7000 rpm으로 4℃에서 원심분리하여, 세포 용혈물을 준비하였다. 세포 용혈물과 상층물의 성분들을 특이 항체를 이용한 면역블롯팅과 ELISA로 분석하였다.

[0276] 실시예 13. 돌연변이 IRES 구조체 M2가 상층물에서 VP1의 높은 수준으로 발현한다.

[0277] 야생형 또는 돌연변이 EMCV IRES의 통제 하에 HEV71 캡시드 단백질을 발현하는 재조합 베큘로바이러스를 대상으로, EMCV IRES로부터 HEV71 캡시드 단백질을 발현하는 수준에 대해 평가하였다. 베큘로바이러스는 실시예 1의 SN07로부터 야생형 EMCV IRES의 통제 하에, 그리고 실시예 10, 11 및 12 각각의 3종 돌연변이 IRES, 즉 M1, M2 및 M3의 통제 하에 발현되는, 베큘로바이러스에서 생산되는 VPL들을, 베큘로바이러스에서의 HEV71 캡시드 단백질 발현 수준에 대해 분석하였다. 여러가지 프로모터 (F) 하에 P1 및 3CD를 발현하는 재조합 베큘로바이러스와 bacGUS (G)를 발현하는 대조군 재조합 베큘로바이러스도 본 실험에 포함시켰다. Sf9 세포에 MOI 5로 감염시키고, 상기 실시예 10-12에 기술된 바와 같이, 3일째에 세포 용혈물과 상층물을 회수하였다. 세포 용혈물과 상층물을 항-VP1 항체로 탐침하여, HEV71 캡시드 단백질의 발현을 검출하였다.

[0278] 도 15의 면역블롯은, 세포 용혈물을 VP1에 대한 항체로 탐침하였을 때, 돌연변이 M1과 M2가 돌연변이 M3 또는 2개의 프로모터에 의해 구동되는 구조체 보다 VP1을 더 많이 발현한다는 것을 보여준다. 그러나, 돌연변이 M2는 상층물에서 VP1을 더 많이 생산하였다. 이들 데이타는 상단 패널에 나타낸다.

[0279] 도 15의 하단 패널은, 베큘로바이러스의 외막 단백질에 대한 대조군 항-gp64 항체로 탐침한 블롯을 도시한다. 면역블롯은, 동량의 베큘로바이러스가 각 샘플에서 생산됨을 보여준다.

[0280] 실시예 14. 베큘로바이러스 발현 시스템을 이용한 서브유닛 백신의 클로닝, 발현 및 정제.

[0281] 본 발명은, 예방 접종한 개체에서 예방적인 면역 반응을 도출하기 위해, 단일 면역원으로서 융합되는, 재조합 HEV71 및 폴리오바이러스 구조 단백질의 제작과 용도에 관한 것이다. 본 발명은, 일반적으로, HEV71 및/또는 폴리오바이러스 서브유닛 단백질, 또는 이의 면역원성 단편, 및 보강제를, 재조합 HEV71 및/또는 폴리오바이러스 서브유닛 융합 단백질과 조합하여 포함하는, 재조합 HEV71 및/또는 폴리오바이러스 융합 단백질 백신 조성물의 제조에 관한 것이다. HEV71과 폴리오바이러스 서브유닛 융합 단백질은 VP1, VP2, VP3, 및 VP4, 이들의 조합, 및 이들 면역원성 단편들의 조합으로부터 선택되는 캡시드 단백질을 포함할 수 있다. 이러한 구현예에 대한 일 측면에서, 재조합 HEV71 및/또는 폴리오바이러스 융합 단백질은, HEV71 또는 폴리오바이러스 서브유닛 단백질과 유전자 조합된 형태로, HEV71 또는 폴리오바이러스 서브유닛 단백질과 융합 파트너 단백질을 포함한다. 본 발명은, E. coli에서 다음과 같은 서브유닛 백신 뿐만 아니라 베큘로바이러스를 발현하기 위한 구조체를 제조하는 방법에 관한 것이다: VP0, VP4-VP2-VP3 융합체, VP2-VP3-VP1 융합체.

[0282] VP0, VP4-VP2-VP3 융합체, 또는 VP2-VP3-VP1을 코딩하는 HEV71 및/또는 폴리오바이러스로부터 cDNA를 제조하기 위해, 역전사/중합효소 연쇄 반응 (The High Pure nucleic acid Kit; Roche)을 정제한 게놈 바이러스 RNA를 이용하여 수행하였다. 유전자의 5' 말단과 3' 말단으로부터 정방향 및 역방향 프라이머를 제작하였으며, 프라이머에 개시 코돈과 정지 코돈을 삽입하였다. 증폭시킨 PCR 산물을 EcoRI 및 NotI 제한 효소로 절단하여, 도 16에 나타낸 바와 같이, pFastBac HT 벡터 (Invitrogen)에 클로닝하였다. 인비트로사의 BAC-TO-BAC® 발현 시스템을 상업적으로 구입할 수 있으며, 제조사의 지침에 따른 방법을 이용하였다. 융합 유전자를 pFastBac HT 공여 플라스미드에 클로닝하고, 재조합 단백질의 생산을 베큘로바이러스 발현 시스템 (Invitrogen)에 대한 BAC-TO-BAC®를 토대로 하였다. 융합 유전자를 보유한 pFastBac HT 공여 플라스미드를, T7 전위 재조합 효소에 의한 부위 특이적인 재조합을 통해 베큘로바이러스 셔틀 벡터 (벡스미드)에 이동시켰다. 이는 E. coli 균주 DH10Bac에서 달성하였다. DH10Bac 세포는, 카나마이신 내성을 부여하는 벡스미드와, 트랜스포자제를 코딩하며 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 헬퍼 플라미스드를 포함한다. 재조합 벡스미드를 제조하기 위한 전위를 위해, 대상 유전자를 가진 재조합 pFastBac HT 플라스미드를 DH10Bac 세포에 형질전환하였다. 형질전환된 세포

를 연속적으로 희석하고, 각 희석물을 50 ㎍/ml 카나마이신, 7 ㎍/ml 젠타미신, 10 ㎍/ml 테트라사이클린, 100 ㎍/ml X-gal 및 40 ㎍/ml IPTG가 첨가된 LB 아가 플레이트에 접종하여, 37℃에서 48시간 이상 인큐베이션하였다. 백색 콜로니를 취하여, 재도말하여, 백색 표현형에 의해 검증하였다. 재조합 벡스미드를 PureLink HiPure 플라스미드 DNA 미니프랩 키트 (Invitrogen)로 분리하고, DNA 샘플을 TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) 40㎕에 용해하여, 형질감염에 사용하였다.

[0283] 분리한 벡스미드 DNA에 대한 PCR에 의해 대상 삽입 유전자를 스크리닝하였다. EFFECTENE® 형질감염 시약 (Qiagen)을 이용하여, DNA를 Sf9 곤충 세포에 형질감염함으로써, 재조합 베큘로바이러스를 회수하였다. 간략하게는, Sf9 세포를 T25 플라스크에 2백만개 접종하여, 28℃에서 6시간 배양하여 부착시켰다. 재조합 벡스미드 DNA 1 ㎍을 DNA 축합 완충액 150 ㎕에 재현탁하고, 인핸서 용액 8 ㎕를 혼합한 다음 실온에서 5분간 인큐베이션하였다. 그런 후, EFFECTENE® 시약 25㎕를 DNA 믹스에 첨가하여, 실온에서 10분간 인큐베이션하였다. 배양 배지 1 ml을 형질감염 복합체가 든 관에 넣고, 세포 배양 플라스크로 옮긴 다음 균일하게 혼합하였다. 3일째에, 5분간 500 g로 원심분리하여, 상층물을 회수하였다. 형질감염 후, 고 역가의 바이러스 스톡을 준비하였다. 고 역가의 바이러스 스톡이 수득되면, 이를 이용하여 타겟 단백질 발현의 최적 시간을 결정하였다. 대상 단백질을 분석하기 위해, 10% 그레이스 곤충 세포 배지 (Invitrogen)에서 배양한 Sf9 세포를 1% FBS Sf900-II SFM 배지 (Invitrogen)에 재현탁하여, 단일 세포를 수득하고, 이를 플라스크에 백만개/ml 밀도로 접종한 다음 28℃에서 4시간 배양하였다. 바이러스 스톡을 PBS로 헹군 세포에 MOI 10으로 첨가하여, 1시간 동안 부드럽게 흔들었다. 감염된 세포를 PBS로 3번 헹군 다음, 세포를 여러 시간대로 Sf900II-SFM에서 배양하였다. 플라스크를 실온에서 30분간 흔들어 세포를 저장성 douncing 완충액 /1%TX-100 (1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM HEPES, 1% TX-100)으로 세포 용혈시킨 다음, 용혈시킨 세포를 플라스크에서 수집하여 30분간 7000 rpm으로 4℃에서 원심분리하여, 세포 용혈물을 준비하였다. 세포에서 이종 단백질의 발현은, SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)과 프로브로서 His Probe-HRP 항체 (Thermo Scientific)를 이용한 웨스턴 블롯으로 검증하였다. 베큘로바이러스의 생산과 단백질의 발현이 검증되면, 바이러스 스톡을 증폭시켜, 대상 유전자를 보유한 베큘로바이러스의 농축 스톡을 제조하였다. 곤충 세포에 감염시키는데 가장 적합한 바이러스 농도와 원하는 단백질을 생산하는 최적 시간대도 확립하였다. 변성 조건 하에 정제하기 위해, 세포를 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, pH 8.0 (세포 용혈 완충액) 중에 6M 구아니디늄-HCl이 포함된 세포 용혈 완충액에서 용혈시켰다. 상층물을 얼음 위에서 파워 60 와트에서 펄스 당 1분, 5회로 초음파 처리하고, 실온에서 1시간 혼합하였다. 세포 용혈물을 30분간 27k g로 원심분리하여, 세포 파편을 제거하였다. 상층물을 세포 용혈 완충액으로 미리-평형화한 HisTrap (GE healthcare life sciences) 컬럼에 주입하였다. 주입한 후, 컬럼을 100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris, 300 mM NaCl, 40 mM 이미다졸, pH 8.0 (세정 완충액 1) 중의 6 M 구아니디늄-HCl을 컬럼 부피의 20배로 사용하여 세척한 다음, 100 mM NaH2PO4,10 mM Tris, 300 mM NaCl, 40 mM 이미다졸, pH 8.0 중의 8 M 우레아 (세정 완충액 2)를 컬럼 부피의 20배로 사용하여 세척하였다. 결합된 단백질은 8 M 우레아, 100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris, 300 mM NaCl, 250 mM 이미다졸, pH 8을 포함하는 완충액 (용출 완충액)으로 용출하였다. 단백질이 포함된 분획들은 모아, PBS에설 밤새 4℃에서 투석하였다. 제조사의 지침에 따라 단백질을 정제한 후, 히스티딘 테그를 제거하기 위해 TEV 프로테아제를 사용하였다.

[0284] 실시예 15. E.coli에서 인간 엔테로바이러스 A 및 인간 엔테로바이러스 C (폴리오바이러스)의 발현 및 정제

[0285] Champion™ pET SUMO 발현 시스템 (Invitrogen)은 가용성 단백질을 E. coli에서 최고 수준으로 생산한다. 이 시스템은 발현된 융합 단백질의 용해성을 높이기 위해 소형 유비퀴틴-관련 개변제 (SUMO) 융합을 이용한다. 발현 후, 카르복시 말단에서 고특이적이며 활성인 SUMO (ULP-1) 프로테아제에 의해 11 kD SUMO 모이어티를 절단하여, 천연 단백질을 제조할 수 있다. 또한, 이 단백질은 단백질을 검출하고 정제하기 위한 N-말단 6x His를 포함한다.

[0286] 도 17에 나타낸 바와 같이, HEV71 및 폴리오바이러스의 항원성 융합 단백질에 대한 pET SUMO-VP0, pET SUMO-VP4-VP2-VP3 및 pET SUMO-VP2-VP3-VP1 발현 벡터의 구축은 다음과 같다. VP0의 단편, VP4-VP2-VP3 융합체 및 VP2-VP3-VP1 융합체를 HEV71 및 폴리오바이러스 서브유닛 백신을 위한 항원으로서 사용하였다. SUMO 모티프와 6x His 테그를 융합체의 N-말단에 접합하여, 단백질의 가용화와 단백질의 정제를 각각 보조하였다. 해당 단백질을 코딩하는 cDNA 서열을 발현 벡터에 클로닝하여 발현 벡터 pET SUMO- VP0, pET SUMO- VP0, pET SUMO- VP4-VP2-VP3 및 pET SUMO-VP2-VP3-VP1을 제조하는 단계를 포함하는, 유전자 클로닝 기법을 통해, 항원성 융합 단백질을 구축하였다. 융합 파트너를 코딩하는 DNA 단편을 각각 정방향 프라이머와 역방향 프라이머에 개시 코돈과 정지 코돈으로 구성된 특이 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. PCR 산물을 다음과 같이

라이게이션하였다: 막 준비한 PCR 산물, 10X 라이게이션 완충액, pET SUMO 벡터 (25 ng/㎕) 2 ㎕, 멸균수를 총 부피 9 ㎕로 넣고, 1 ㎕ T4 DNA 리가제 (4.0 Weiss units)를 첨가한 다음, 밤새 15℃에서 라이게이션 반응물을 인큐베이션한 다음, One Shot® Mach1™-T1R (Invitrogen) 컴피턴트 세포에 형질전환하였다. 콜로니 열개 (10)를 선별하고, PureLink™ HQ Mini 플라스미드 정제 키트 (Invitrogen)를 이용하여 이로부터 플라스미드 DNA를 분리하였다. 플라스미드를 제한효소 분석으로 분석하여, 삽입체의 존재와 바른 배위를 검증하였다. 재조합체들로부터, 먼저 플라스미드 DNA를 분리하고, 이 플라스미드를 BL21 (DE3) One Shot® 세포에 형질전환하였다. 형질전환체를 배양하고, 여러 시간대에 ITPG를 이용한 발현 유도를 수행하여, 발현의 최적 시간을 결정하였다. 각 시간대에, 유도 및 비-유도 배양물로부터 500 ㎕을 취하고, 각 세포 펠렛을 SDS-PAGE 샘플 완충액 80 ㎕에 재현탁하였다. 끓인 샘플을 원심분리한 후, 각 샘플 10 ㎕를 SDS-PAGE 겔에 로딩하여, 전기영동하였다.

[0287] HisTrap 니켈 컬럼 (GE Healthcare Life Sciences)을 이용한 재조합 융합 단백질의 정제 규모를 키우기 위해, 다음과 같이 공정을 수정하였다. 밤새 키운 배양물 (5%)을 100-300 ml LB + 50㎍/ml 카나마이신에 접종한 다음, 2시간 후 1 mM IPTG로 유도하였다. 2시간 후, 세포를 3000g로 10분간 원심분리하여 회수하였다. 펠렛을 (배양물 총 부피의) 10% 결합 완충액 (20 mM 소듐 포스페이트, 0.5M NaCl 및 20 mM 이미다졸, pH7.4)에 재현탁하였다. 세포를 얼음 바켓 안에서 1분 간격으로 1분 동안 5번 Misonic UltraSonicate Liquid 프로세서를 이용하여 초음파 처리하였다. 초음파 처리한 샘플을 4000 rpm으로 1시간 동안 4℃에서 원심분리하여 가용성 형태와 불용성 형태로 분리하였다. 불용성 분획은 6M 우레아가 첨가된 결합 완충액에 재현탁하였다. 가용성 분획과 불용성 분획 둘다 4000 rpm으로 1시간 동안 4℃에서 원심분리한 다음, 0.22 ㎛ 필터 유닛으로 여과하였다. HisTrap 컬럼을 결합 완충액으로 평황화한 다음, 여과한 샘플을 컬럼에 주입하였다. 다음으로, 컬럼을 40 mM 이미다졸이 첨가된 결합 완충액으로 세척하고, 0.5M 이미다졸 (불용성 분획의 경우에는 6M 우레아)이 첨가된 결합 완충액으로 재조합 단백질을 용출시켰다. 수집한 모든 샘플들은 단백질용 코마시 블루 염색 프로토콜을 이용하여 테스트하였다. 용출된 분획에 포함된 순수한 재조합 단백질을 Tris-HCl 완충액에서 Merck 터빙을 이용하여 투석하였다. 투석 후, 단백질 농도를 브래드포드 시약으로 추정하였다. 천연 단백질은, SUMO 프로테아제를 이용하여 6x His 테그와 SUMO가 포함된 N-말단 펩타이드를 제조사의 지침에 따라 절단함으로써, 수득하였다.

[0288] 실시예 16. SN07 체류물로 면역화한 마우스의 중화 혈청 풀로부터된 항체는 EV71VLP의 모든 구성 성분에 결합한다.

[0289] VP1, VP2 및 VP0의 코딩 서열을 실시예 15에 기술된 바와 같이 pET SUMO 벡터에 각각 클로닝하였다. 각 캡시드 단백질을 실시예 15에 기술된 바와 같이, E.coli에서 발현시켜, 정제하였다. 정제된 단백질 VP0, VP1, VP2 및 VP3를 웨스트 블롯을 수행하고, 실시예 4에서 사용된 중화 항체 풀을 1:1000 희석율로 사용하여 탐침하였다. 또한, 실시예 4에서 사용된 대조군 마우스 혈청도 실험에 포함시킨다.

[0290] 도 18의 웨스턴 블롯 결과, SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물내 존재하는 올리고머 항원으로 면역화한 마우스의 중화 혈청 풀이 VLP 모든 성분, 즉 VP0, VP1, VP2 및 VP3에 결합하는 것으로 확인된다.

[0291] 실시예 17. HEV71 VLP의 특정화 - 배양 상층물으로부터 HEV71 VLP의 풀-다운

[0292] 재조합 베큘로바이러스 SN07로 감염된 세포 상층물 20 ml을 단일클론 중화 항체 (EV18/4/D6-1/F1/G9) 10 ml과 혼합하여, 실온에서 1시간 두었다. 혼합물을, PBS로 미리 평형화한 아가로스 비드 크기가 85 ㎛인 MabSelect SuReTM (GE Health Care) 재조합 단백질 A 컬럼 1 ml을 통해 천천히 로딩한 다음, PBS 20 ml로 세척하고, 0.1M 글리신-HCl, pH3.0 0.5 ml로 용출시켰다. 분획들은 Tris-HCl, pH8.8 30㎕로 중화하였다. 용출 분획들을 SDS-PAGE로 전개시킨 다음 코마시 블루 염색과 탈염색을 수행하였다.

[0293] 도 19는, 모든 VLP 성분들 (VP0, VP1 및 VP3)이 코마시 블루로 염색한 SDS-PAGE 겔에서 확인됨을 보여준다.

[0294] 실시예 18. 친화성 컬럼 (AFC)으로 정제한 HEV71VLP들에 대한 분석.

[0295] 베큘로바이러스 SN07 상층물 체류물을 이용하여 개발한, 단일클론 중화 항체 (EV18/4/D6-1/F1/G9)를 이용하여 친화성 컬럼 (AFC)을 준비하였다. 용출 분획을 웨스턴 블롯으로 분석하였으며, 도 20에 나타낸다. 레인1 및 2의 용출 분획들은 항-VP1 항체로 탐침한 것으로, VP1이 AFC로 정제한 VLP에 존재하는 것으로 확인된다. 레인 3 및 4의 용출 분획들은 항-VP2 항체로 탐침한 것으로, VP2 역시 AFC로 정제한 VLP에 존재하는 것으로 확인된다. 레인 5 및 6의 용출 분획들은 항-VP2 항체로 탐침한 것으로, VP2가 AFC로 정제한 VLP에 존재하는 것으로 확인된다.

[0296] 실시예 19. AFC로 정제한 HEV71 VLP들의 전자 현미경

[0297] 실시예 18의 친화성 컬럼 (AFC)로 용출시킨 분획을 전자 현미경으로 평가하였다. AFC로 정제한 VLP들의 전자 현미경 사진을 도 21에 나타낸다. 전자 현미경으로 검경 결과, HEV71 구조 단백질이 VLP들로 조립된 것으로 확인된다.

[0298] 실시예 20. 체류물을 이용한 마우스 방어 실험

[0299] 사용한 항원은 전술한 바와 같이 준비한 재조합 베큘로바이러스 SN07의 20x 농축 조 체류물이었다. 임신임을 표시하는 질전이 교미 후 오전에 확인되었으며, 이를 배아 E0.5일로 지칭하였다. E3.5일에, 체류물 100 ㎕를 IMJECT® (alum)과 혼합하여 2번 임신한 동물에 i.p.로 투여하고, 체중 측정으로 임신이 확정되면, 2차 투여를 E17.5일에 실시하였다. 최초 채혈은 1차 백신 투여하기 전에 각 마우스로부터 실시하였으며, 이후 새끼의 바이러스 챌린지 후 14일까지 매주 샘플을 수집하였다. Balb/c 마우스 20마리로 구성된 그룹 3가지를 면역화한 다음 바이러스 기회 감염시키고 (마우스 20마리), 마우스 20마리는 모의-면역화한 후 기회 감염시키고 (마우스 20마리), 5마리는 면역화 및 기회 감염을 실시하지 않았다. 5일된 새끼에, MP-26M을 100 x HD_{50}로 포함하는 MP-26M 바이러스 50 ㎕을 감염시켰다. 감염된 동물들 모두 접종 후 14일째까지 질병에 대한 임상 신호를 매일 2번 관찰하였다. 이상 신호는 성장 이상; 체중 감소; 발육 부진; 우유의 허기 (stomach empty of milk); 무기력; 사경 (head tilt); 구부정한 자세; 헝클어진 털; 탈수증; 저체온증; 사지 마비를 포함한다. 마비는 아래 등급 시스템에 따라 점수를 매겼다:

[0300] 0 - 정상

[0301] 1 - 사지가 약하지만, 여전히 사지로 이동가능함

[0302] 2 - 아픈 사지로 이동할 수 없음

[0303] 3 - 사지 마지 즉. 사지를 움직일 수 없음

[0304] 3등급 마비를 앓고 있는 동물은 마취(HD_{50}) 하에 경추 파열로 안락사시켰다. 조직병리학적 검사를 다양한 타겟 장기로부터 수득한 섹션에 대해 수행하였다.

[0305] 방어 실험의 결과는 아래 표 2에 나타낸다.

[0306] **표 2. 수동적 방어(passive protection)에서 예방율 83%**

표 2

[0307]

백신	교미한 마우스의 수	임신한 마우스의 수	새끼/한배에서 태어난 새끼의 수	새끼의 총수	생존 새끼의 수	생존율	생존 중앙값 (일)
체류물	20	2	1,5	6	5*	83%	14
Alum/PBS	20	2	5,7	12	0	0%	5
백신 무/기회 감염 무	5+5	2+1	5,7,6	18	18	100%	14

[0308] VLP로 예방 접종한 모계들에서는 각각 마우스 2마리가 태어났다. 한 마우스 암컷에서는 새끼 5마리가 태어났으며, 양호한 모성 보호를 나타내었다. 2번째 암컷은 매우 약한 새끼 한마리를 출산하였으며, 양호한 모성 보호를 나타내지 않았다.

[0309] 면역화한 암컷으로부터 태어난 마우스의 83%가 바이러스 기회 감염으로부터 예방되는 것으로 판단할 수 있다.

[0310] 조직병리학적 검사 결과는 요약하여 표 3에 나타낸다.

[0311] **표 3. 조직병리학적 검사 요약**

[0312] (N = 이상 검출 안됨)

표 3

[0313]

백신	연령	P1 일	마우스	증상	비장	간	심장	골격근	척추	뇌
VLP	19	14	V87P4	감염의 임상 신호 없음	N	N(1)	N	0.5	N	N

	19	14	V87P5	감염의 임상 신호 없음	N	N(1)	N	0.5	N	N
	19	14	V87P6	감염의 임상 신호 없음	N	N(1)	N	N	N	N
ALUM/PBS	10	5	DC4	3등급 마비	N	N(2)	N	3	N	N
			DC5	3등급 마비	N	N(2)	N	3	N	N
			DC6	3등급 마비	N	N(2)	N	0.3	N	N
백신 무처리	19	NI	V116P4	감염의 임상 신호 없음	N	N(0.5)	N	N	N	N
			V116P5	감염의 임상 신호 없음	N	N(0.5)	N	N	N	N

[0314] 마우스 5마리가 새끼를 출산하였으며, 백신 예방 실험에 포함시켰다 (임신율 11%). 인도적 종료 시점 (humane endpoint) 값 (HD_{50})을 Reed and Muench, 1938에 따라 계산하였으며, MP-26M의 2.0 x 10^2 $TCID_{50}$ 으로 결정되었다. 면역화된 어미에서 태어난 마우스의 83%가 바이러스 기회 감염을 예방하였다.

[0315] 조직병리학적 검사 결과, HEV71-VLP로 면역화한 다음 HEV71 바이러스를 감염시킨 그룹에서는 암컷으로부터 태어난 마우스 3마리는 감염의 임상적인 신호를 보이지 않았다.

[0316] 그러나, 모의-면역화(Alum/PBS)한 다음 HEV71 바이러스를 감염시킨 그룹에서는 어미로부터 태어난 마우스 3마리가 감염으로 쓰러졌다. 면역화 및 바이러스 감염을 모두 하지 않은 그룹에서는 어미로부터 태어난 마우스 2마리 모두 감염의 임상적인 신호를 나타내지 않았다.

[0317] VLP 백신은 B3 유전자형의 마우스-HEV71 적응 균주 (adapted strain)를 이용한 치사 감염에 대해 한배 새끼 마우스들을 예방하였다 (면역화된 어미에서 태어난 새끼 6마리 중 5마리 대 모의-면역화한 어미에서 태어난 새끼 12 마리 중 0마리)

[0318] 실시예 21. 인간 엔테로바이러스 *C* (폴리오바이러스-PV) VLP 발현.

[0319] 폴리오바이러스 VLP들을 제작하기 위해 폴리오바이러스 발현 카세트에 대한 변형을 구축하였다. 발현 카세트들 모두 폴리오바이러스 P1 폴리펩타이드를 포함하고 있으며, IRES에 대해서만 차이가 있는데, IRES는 폴리오바이러스 3CD 프로테아제: (PV-P1+HEV71-IRES+PV-3CD); (PV-P1+EMCV-IRES+PV-3CD); (PV-P1+PV-IRES+PV-3CD)의 발현을 지시한다. 폴리오바이러스 VLP 발현 카세트를 보유한 재조합 베큘로바이러스를 테스트하였다. 베큘로바이러스로 감염된 세포의 세포 용혈물을 감염 3일째에 회수하여, 폴리오바이러스 VP3의 발현을 토끼 항-PVP3 항체 (1:2000)를 이용하여 평가하였다.

[0320] PV-IRES를 보유한 구조체만 예상된 크기의 VP3 단백질을 생산하였다. PV-IRES 구조체와는 달리, 폴리오바이러스 VP3 단백질은, 3CD 프로테아제가 HEV71-IRES 또는 EMCV-IRES의 통제 하에 있을 때에는 적절하게 가공되지 않아, 따라서 폴리오바이러스 VLP들의 생산에 부정적으로 작용하였다. 즉, PV-IRES를 보유한 폴리오바이러스 PV-VLP 발현 카세트가 폴리오바이러스 VLP를 생산하는데 매우 효과적이다.

[0321] 실시예 22. 폴리오바이러스 PV-VLP 조합을 확인하기 위한 ELISA.

[0322] PV-VLP 발현 카세트로부터 폴리오바이러스 VLP 생산을 입증하기 위해, PV-VLP 발현 카세트를 보유한 재조합 베큘로바이러스로부터 유래된 세포 용혈물과 상층물에 대해 2부위 ELISA를 수행하였으며, 상기 발현 카세트에서 PV-3CD 프로테아제는 폴리오바이러스 IRES의 통제 하에 위치한다. PV-IRES를 포함한 PV-VLP 발현 카세트를 가진 재조합 베큘로바이러스를 Sf9 세포에 감염시켰다. 세포 용혈물과 상층물을 감염 3일째에 회수하였다. 폴리오바이러스 VLP의 형성을 2부위 ELISA를 이용하여 평가하였다.

[0323] 2부위 ELISA 공정은, 포착 항체로서 단백질 A-정제한 토끼 항-폴리오바이러스 VP3를 준비하고, 코딩 완충액, 0.05M 카보네이트-바이카보네이트 완충액, pH 9.6에 50 ㎍/mL로 희석함으로써, 수행하였다. 항체 100 ㎕/웰을 NUNC 이뮤노플레이트에 배분하여, 4℃에서 밤새 보관하였다. PBST (0.05%)로 헹군 후, 이뮤노플레이트를 200 ㎕/웰의 차단 완충액, PBS 중의 1% 카제인 용액으로 실온에서 2시간 블록킹하였다. PV-3CD 프로테아제가 폴리오바이러스 IRES의 통제 하에 위치한 PV-VLP 발현 카세트를 보유한 재조합 베큘로바이러스로부터 유래된 세포 용혈물과 상층물 샘플들을 희석액, PBS 중의 0.2% 카제인 용액에 희석하여, 100 ㎕/웰로 분배한 다음, 실온에서 1시간 인큐베이션한 후 PBST (0.05%)로 헹구었다.

[0324] VLP를 검출하기 위해, 마우스 단일클론 항체, 항-VP1 (클론 5-D8/1; Dako)을 PBS 중의 0.2% 카세인 희석제에 1:250 비율로 희석하여 준비하였다. 희석한 검출용 단일클론 항체를 100 ㎕/웰로 분배한 다음 실온에서 1시간 인큐베이션하였다. HRP가 접합된 항-마우스 2차 항체를 PBS 중의 0.2% 카세인 희석제에 1:1000 비율로 희석하여 준비하였다. 플레이트를 PBST (0.05%)로 헹군 후, 희석한 2차 항체를 100 ㎕/웰로 분배하고, 플레이트를 실온에서 1시간 인큐베이션하였다. 그런 후, 플레이트를 세척 완충액, PBST (0.05%)으로 헹구었다. SureBlue™ TMB 1(KPL) 컴포넌트 마이크로웰 퍼옥시다제 기질을 100 ㎕/웰로 첨가하여, 현상을 위해 10분간 실온에서 인큐베이션하였다. 정지 용액 5 mM NaOH를 100 ㎕/웰로 첨가하여, 반응을 정지시켰다. 각 웰의 흡광도를 OD 650nm에서 판독하였다.

[0325] 도 23에 나타낸 2부위 ELISA 결과, VP1 및 VP3 단백질이 서로 조합하는 것으로 확인되었으며, 이는 VLP들이 PV-VLP 발현 카세트로부터 실제 형성됨을 의미한다.

[0326] 실시예 23. HEV71 IRES (P1+HEV71 IRES+3CD)를 가진 HEV71 VLP 발현 카세트의 구축

[0327] HEV71-IRES를 구비한 HEV71 VLP 카세트의 개략적인 구조도는 도 24에 나타나 있다. 이 발현 카세트는 실시예 1에 나타낸 구조체 (pSN01)와, 3CD 프로테아제가 EMCV IRES가 아닌 HEV71 IRES에 의해 구동된다는 점만 제외하고는 비슷하다. HEV71 IRES 서열은 유전자은행 등재번호 DQ341362.1; 1 - 747번 뉴클레오티드에서 확인된다. HEV71 발현 카세트가 포함된 벡터를 LR CLONASE®를 이용하여 Invitrogen BAC-TO-BAC® manual (2009)의 지침에 따라 attL/aaR 시험관내 재조합에 의해 베큘로바이러스 발현 플라스미드 pDEST8 (Destination vector)에 도입한다. 엔터리 벡터와 pDEST8 간의 재조합으로 발현 클론이 형성된다. 발현 클론은 Invitrogen BAC-TO-BAC® manual에 기술된 바와 같이 DH10bac를 형질전환함으로써 재조합 벡스미드로 만든다. 재조합 벡스미드를 Sf9 세포에 형질감염시켜, P1, HEV71 IRES 및 3CD를 보유한 발현 카세트를 가진 재조합 베큘로바이러스를 회수한다.

[0328] 회수한 재조합 베큘로바이러스를 이용한 가공된 캡시드 단백질의 발현을 6웰 플레이트에서 평가하기 위해, 추가적인 Sf9 세포 감염을 이용하였다. VP1, VP0 및 VP3에 특이적인 다클론 토끼 항혈청은 재조합 베큘로바이러스로 감염된 Sf9 세포의 세포 용혈물과 상층물에 대한 웨스턴 블롯을 통해 조립된 VLP들을 동정할 것이다.

[0329] 실시예 24. PV-IRES (P1+PV-IRES+3CD)를 구비한 HEV71 VLP 발현 카세트의 구축.

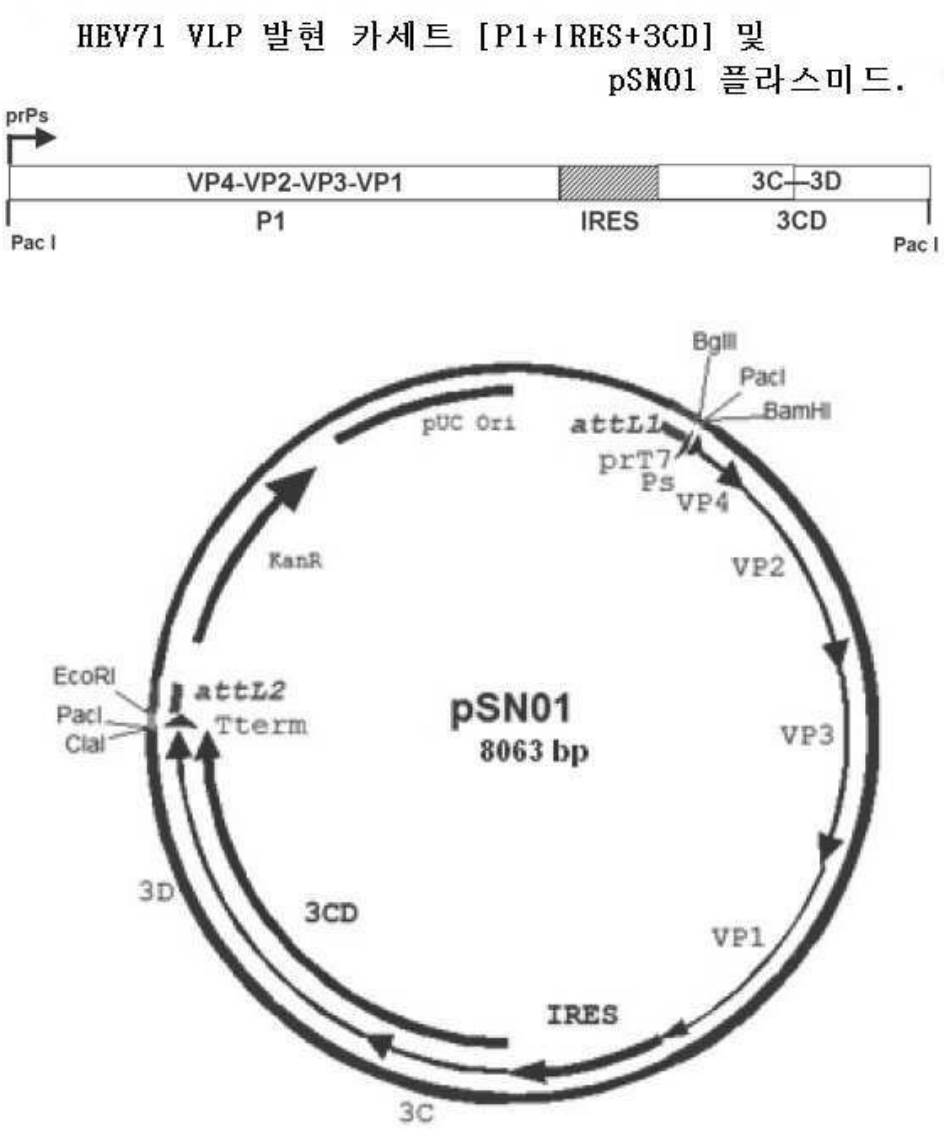
[0330] 발현 카세트는 실시예 24의 발현 카세트와, 3CD 프로테아제의 발현이 HEV71-IRES가 아닌 폴리오바이러스 IRES (PV-IRES)에 의해 구동된다는 점만 제외하고는 비슷하다. 폴리오바이러스 IRES 서열은 유전자은행 등재번호 V01150.12; 1 - 628번 뉴클레오티드에서 확인된다.

[0331] HEV71 발현 카세트가 포함된 벡터를 LR CLONASE®를 이용하여 Invitrogen BAC-TO-BAC® manual (2009)의 지침에 따라 attL/aaR 시험관내 재조합에 의해 베큘로바이러스 발현 플라스미드 pDEST8 (Destination vector)에 도입한다. 엔터리 벡터와 pDEST8 간의 재조합으로 발현 클론이 형성된다. 발현 클론은 Invitrogen BAC-TO-BAC® manual에 기술된 바와 같이 DH10bac를 형질전환함으로써 재조합 벡스미드로 만든다. 재조합 벡스미드를 Sf9 세포에 형질감염시켜, P1, PV IRES 및 3CD를 보유한 발현 카세트를 가진 재조합 베큘로바이러스를 회수한다.

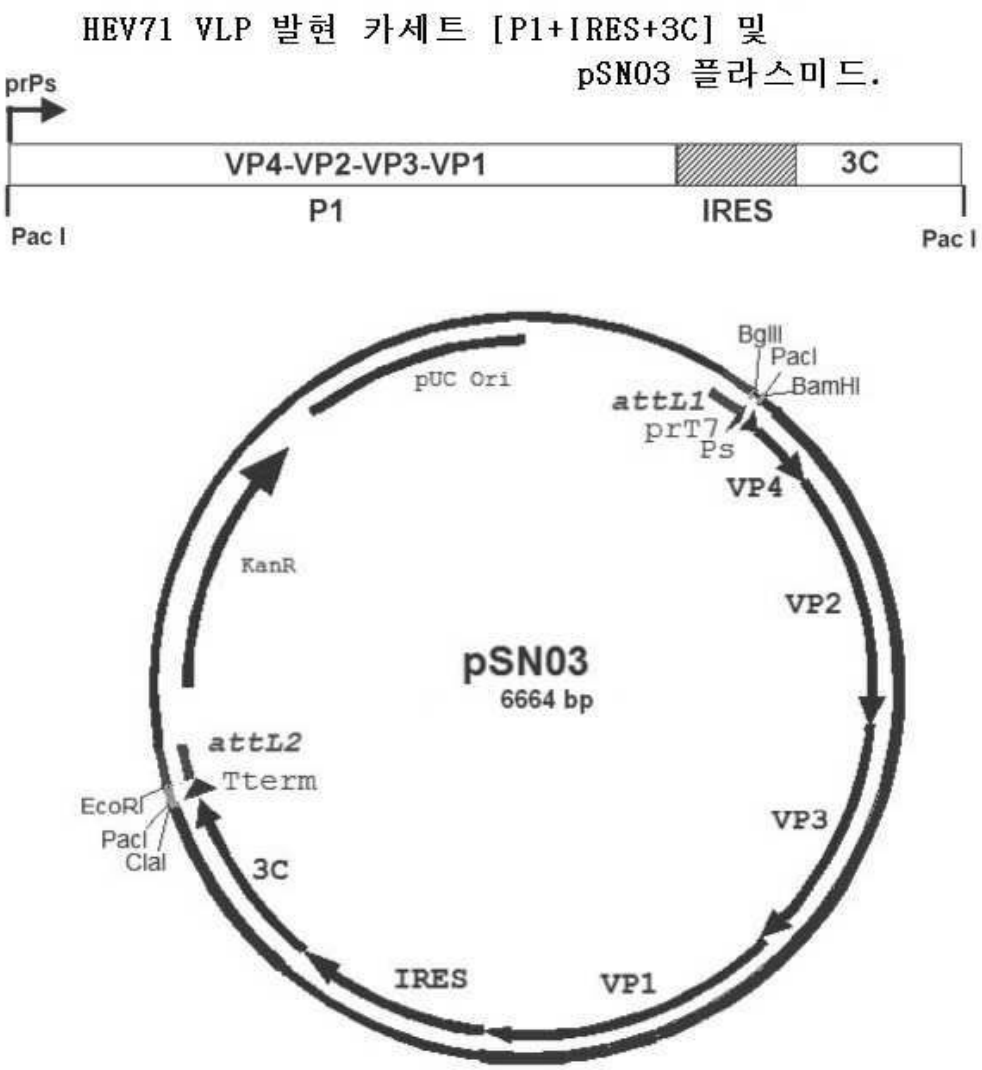
[0332] 회수한 재조합 베큘로바이러스를 이용한 가공된 캡시드 단백질의 발현을 6웰 플레이트에서 평가하기 위해, 추가적인 Sf9 세포 감염을 이용하였다. VP1, VP0 및 VP3에 특이적인 다클론 토끼 항혈청은 재조합 베큘로바이러스로 감염된 Sf9 세포의 세포 용혈물과 상층물에 대한 웨스턴 블롯을 통해 조립된 VLP들을 동정할 것이다.

도면

도면1

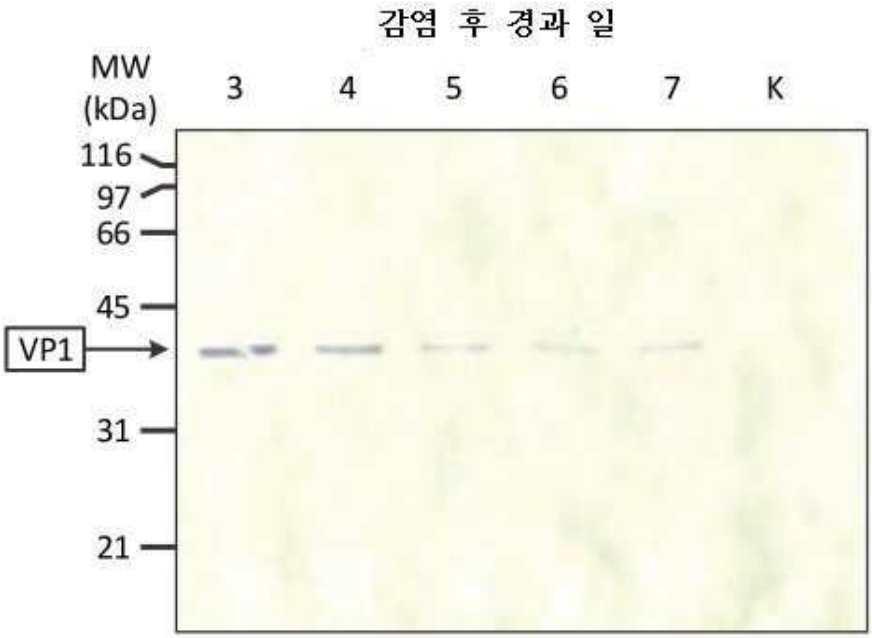

HEV71 VLP 발현 카세트 [P1+IRES+3CD] 및
pSN01 플라스미드.
prPs
VP4-VP2-VP3-VP1
3C
3D
P1
IRES
3CD
Pac I
Pac I
BglII
PacI
BamHI
pUC Ori
attL1
prT7
Ps
VP4
VP2
VP3
VP1
IRES
3C
3D
3CD
KanR
EcoRI
PacI
ClaI
attL2
Tterm
pSN01
8063 bp

도면2


HEV71 VLP 발현 카세트 [P1+IRES+3C] 및
pSN03 플라스미드.
prPs
VP4-VP2-VP3-VP1
3C
P1
IRES
Pac I
Pac I
pUC Ori
BglII
PacI
BamHI
attL1
prT7
Ps
VP4
VP2
KanR
pSN03
6664 bp
attL2
Tterm
EcoRI
PacI
ClaI
3C
VP3
IRES
VP1

도면3

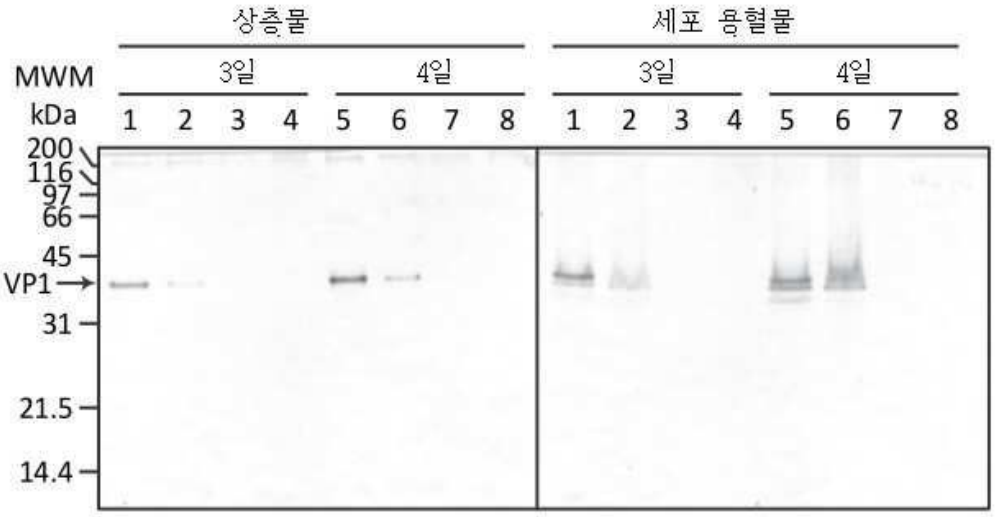
SNO7로 감염된 Sf9 세포의 상층물에서의 VP1의 발현.



도면4

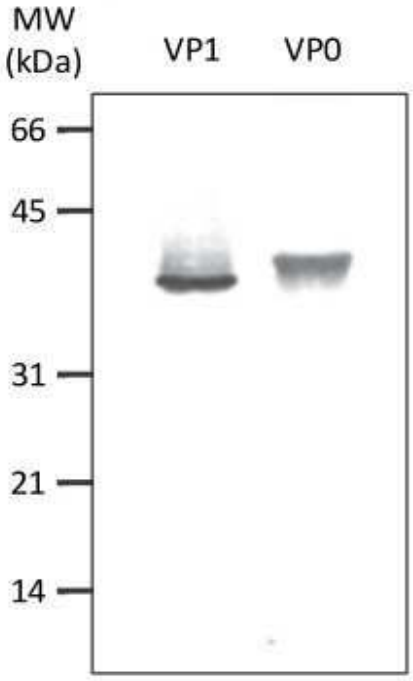
상층물과 세포 용혈물에서의 가공된 VP1.

레인 1 및 5: bacSNO7p3
레인 2 및 6: bacSNO8p3
레인 3 및 7: bacGUSd2
레인 4 및 8: Sf9 대조군



도면5

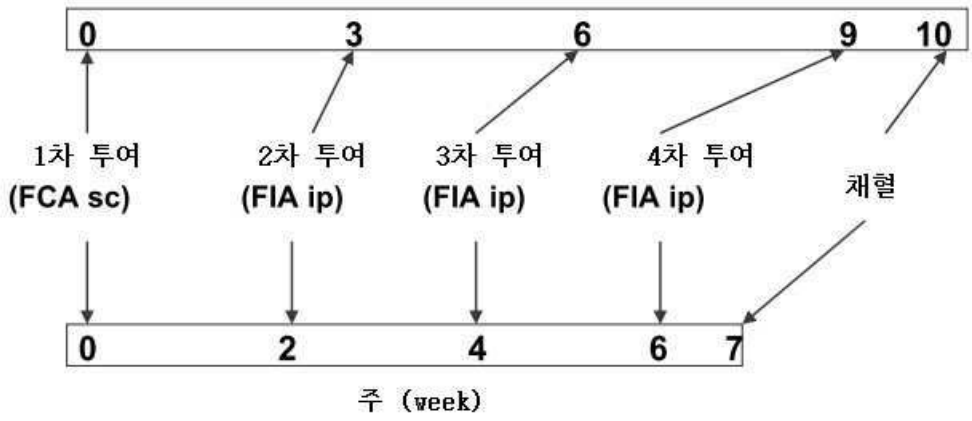
100 kDa 분자량 컷 오프 (MWCO) 막을 통한 한외여과시 VP1과 VP0는 체류물에 존재한다.



도면6

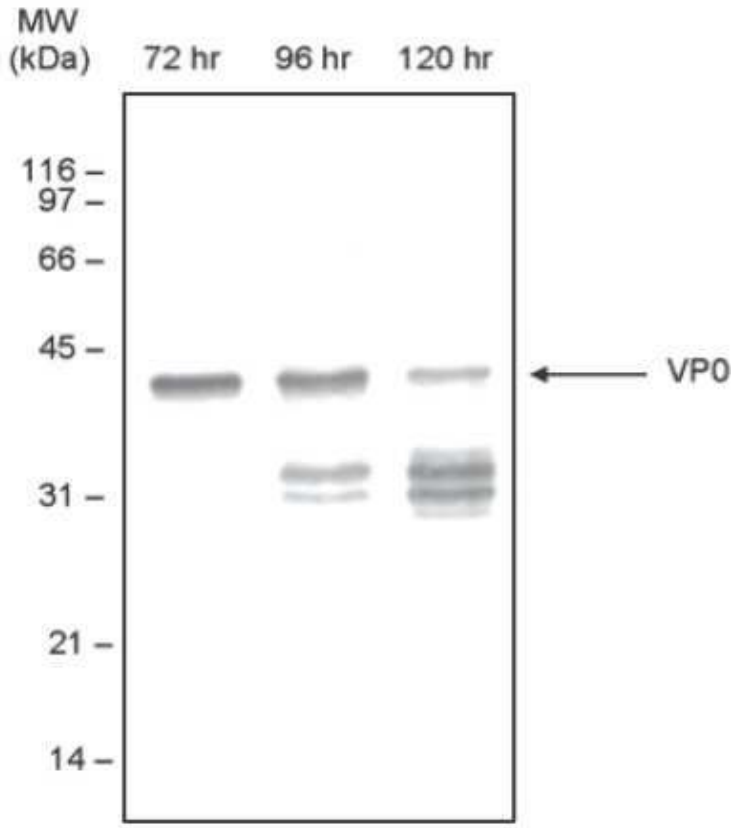
전략 컨셉에 대한 첫번째 증거: 2가지의 면역화 스케줄 (마우스 4/그룹).

면역원은 프로인트 완전 보강제 (FCA) 또는 프로인트 불완전 보강제 (FIA) 중에 조제하여, 피하 주사 (sc) 또는 복막내 주사 (ip)로 투여함.



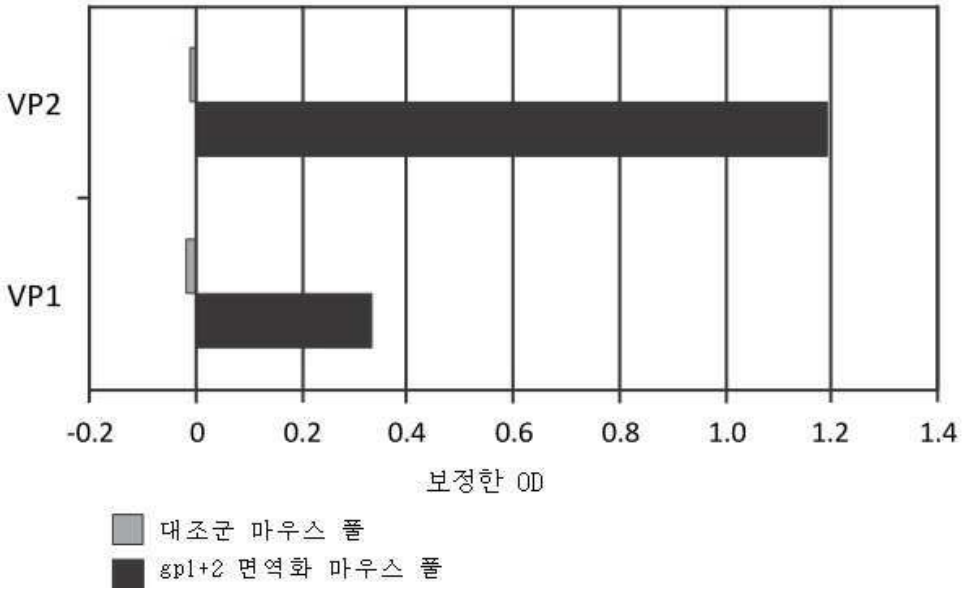
도면7

3번의 다른 회수 시점에 VP0 (화살표)에 대한
토끼 다클론 항혈청으로 탐침한 면역블롯



도면8

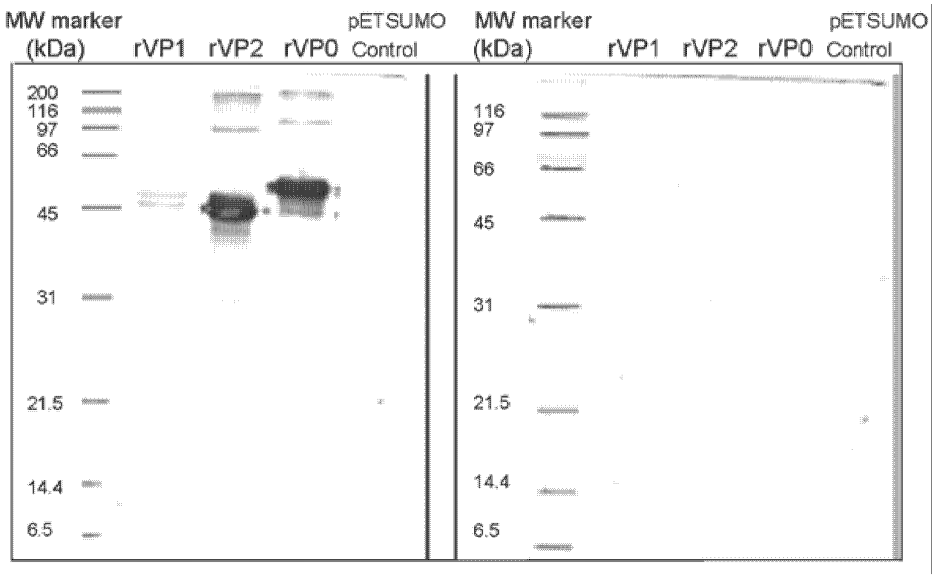
SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물에 존재하는 올리고머 항원으로 면역화한 마우스로부터 유래된 중화 혈청 풀은 ELISA에서 재조합 VP2에 대해 높은 역가를 나타낸다.



도면9

SN07로 감염된 Sf9 세포의 상층물에 존재하는 올리고머 항원으로 면역화한 마우스로부터 유래된 중화 혈청 풀은 VP1 보다는 VP2 및 VP0에 더 강하게 결합한다.

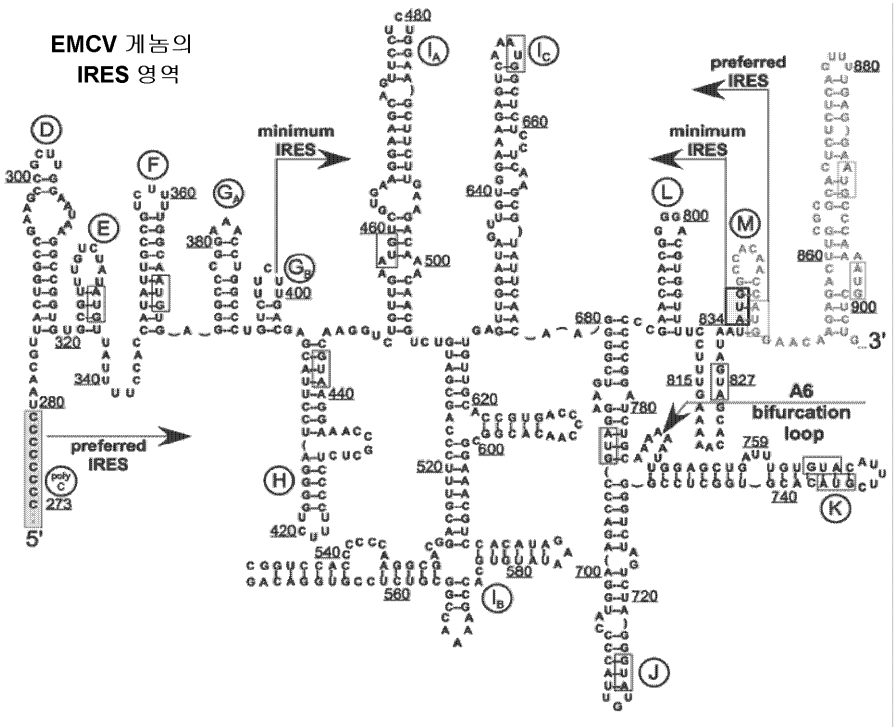
AB



A. 마우스 혈청 항-bacSN07p3 VLP로 탐침함, 1/2000 희석
B. 마우스 혈청 항-SF9 대조군 세포로 탐침함, 1/500 희석

도면10

EMCV 게놈의 EMCV IRES (서열번호 1) 영역. IRES 영역은
유전자은행 등재 번호 AF113968.2의 EMCV 게놈 서열임;
1666 - 2251 뉴클레오티드.



도면11

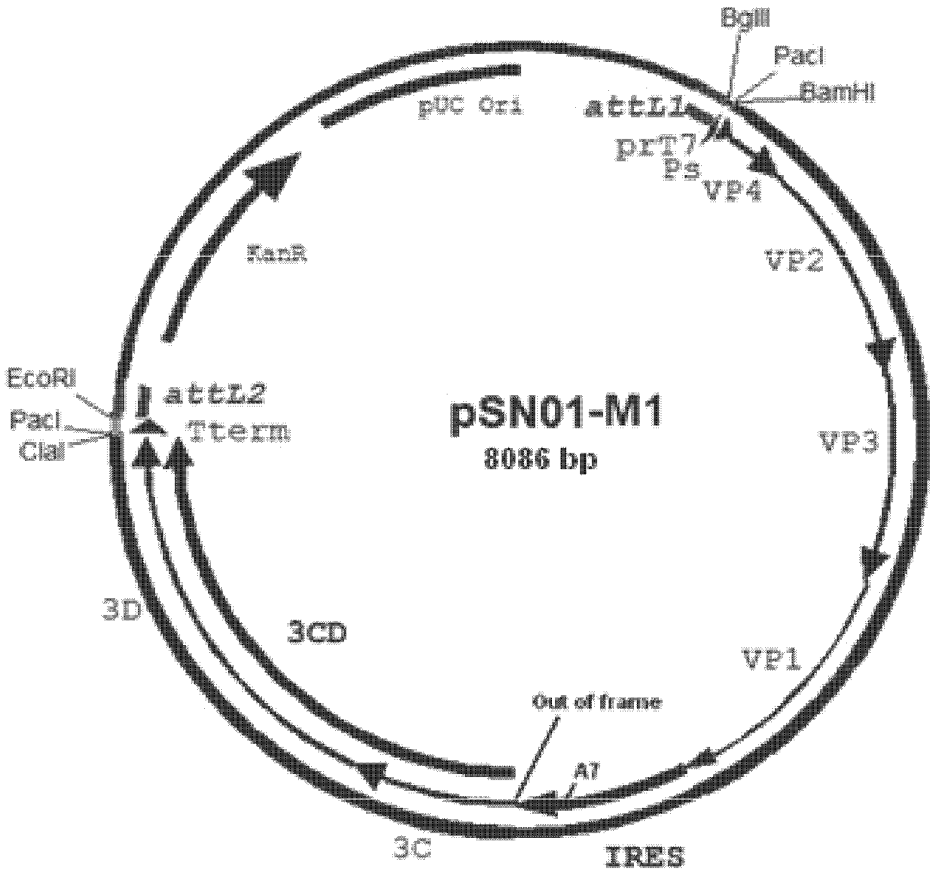
3CD 프로테아제 코딩 서열과 EMCV 개시 코돈의 아웃 프래밍;
천연 IRES 서열 (서열번호 2)을 돌연변이
IRES 서열 (서열번호 3) 과 비교함.

Native AUGAUAAU---**AUG** aCu uCg Aaa gUu uAu gAu cca gaa caa

Mutant AUGAUAAgcuugccacaacccgggauccucuagagucgac**AUG** acu ucg

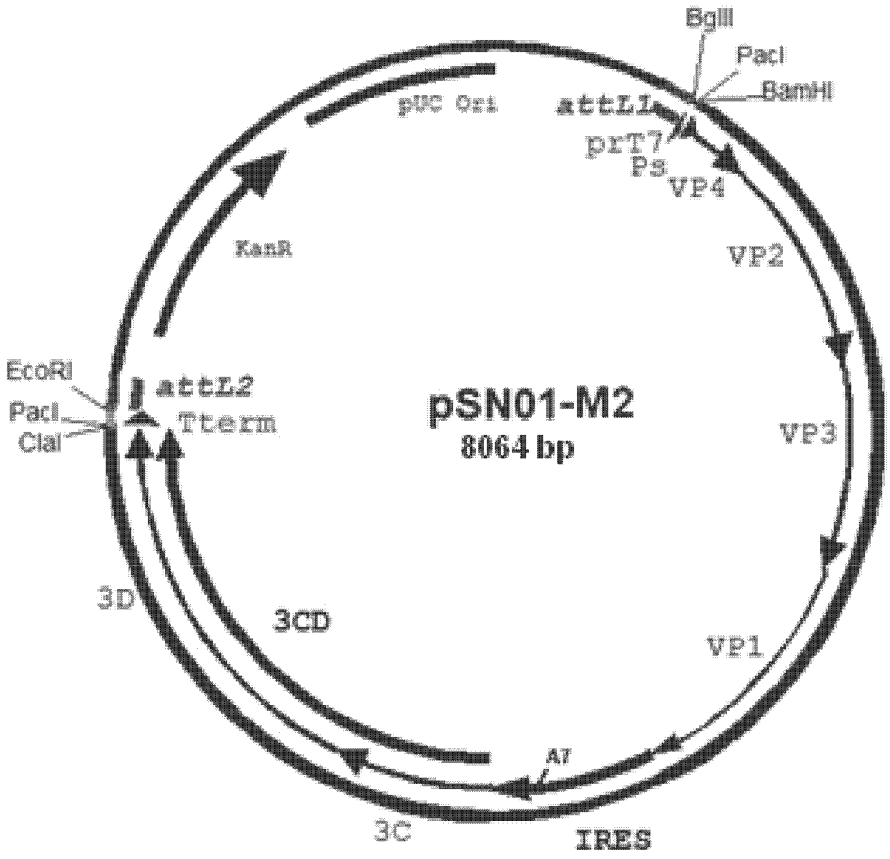
도면12

플라스미드 pSN01-M1.



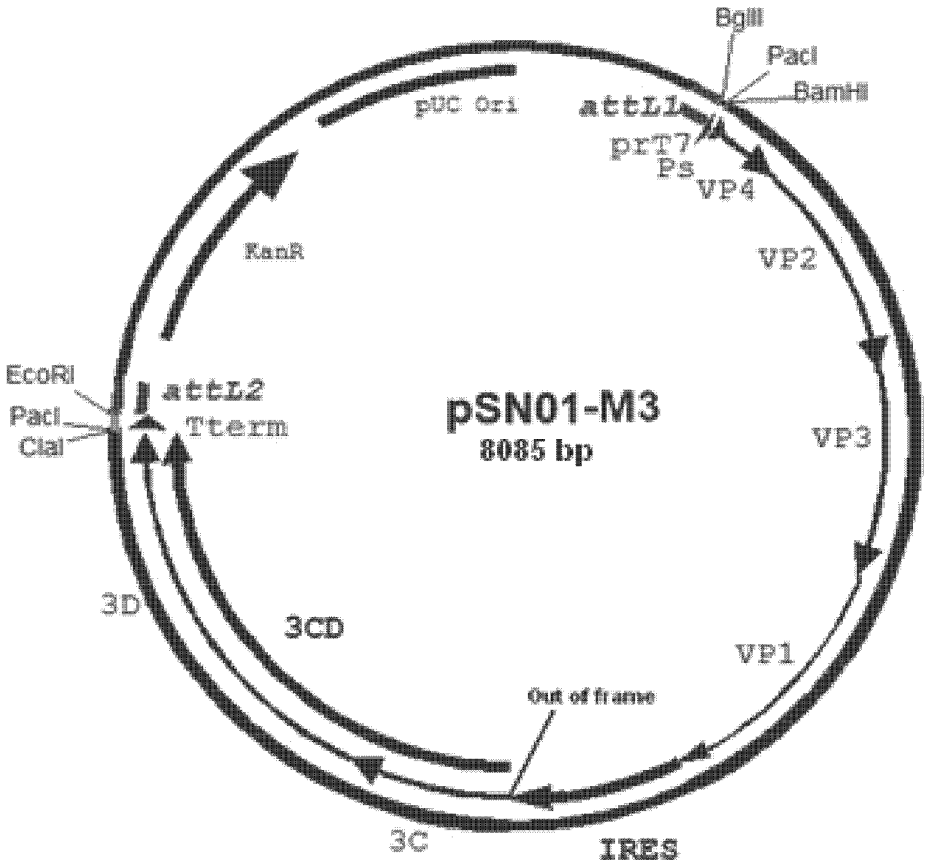
도면13

플라스미드 pSN01-M2.



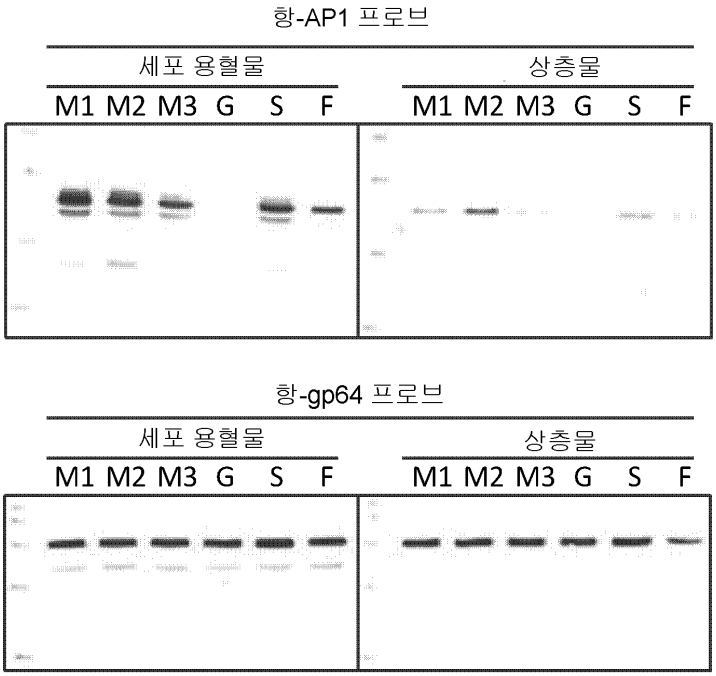
도면14

플라스미드 pSN01-M3.

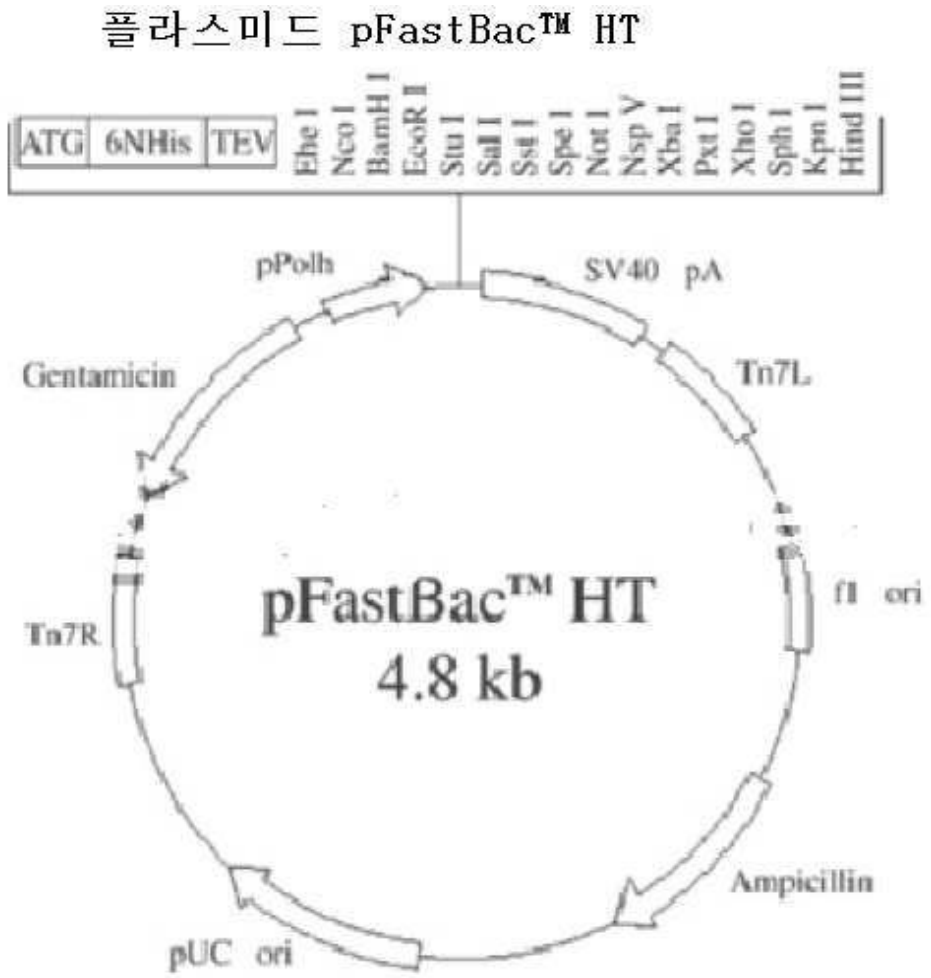


도면15

HEV71 VLP를 발현하기 위한, 여러가지 재조합 베큘로바이러스 디자인들의 발현 비교.

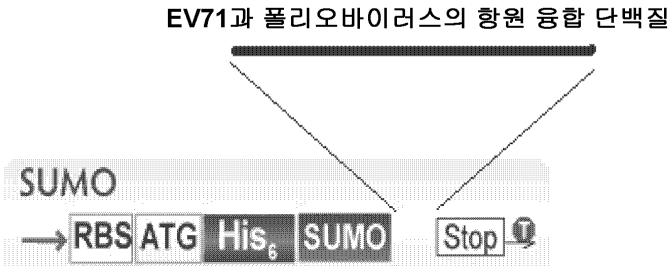


도면16



도면17

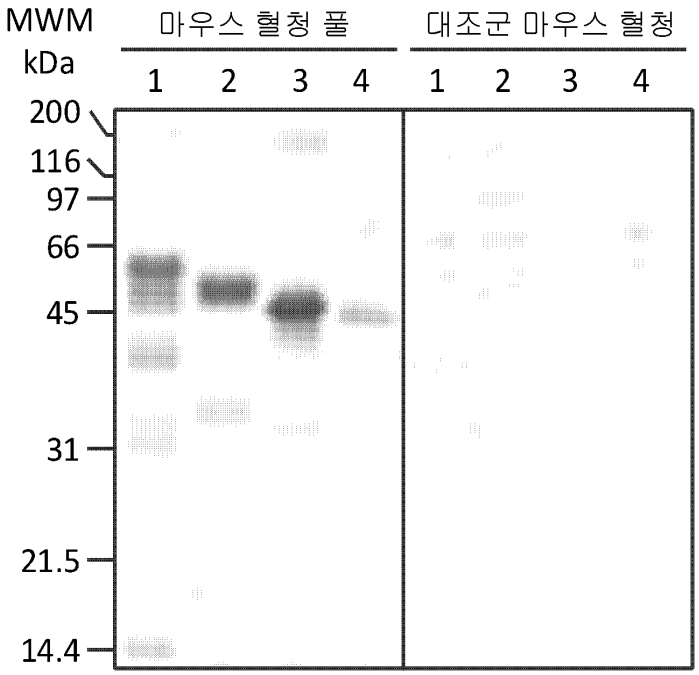
인간 엔테로바이러스 A 및 인간 엔테로바이러스 C의 항원 융합 단백질용 원핵생물 발현 구조체



도면18

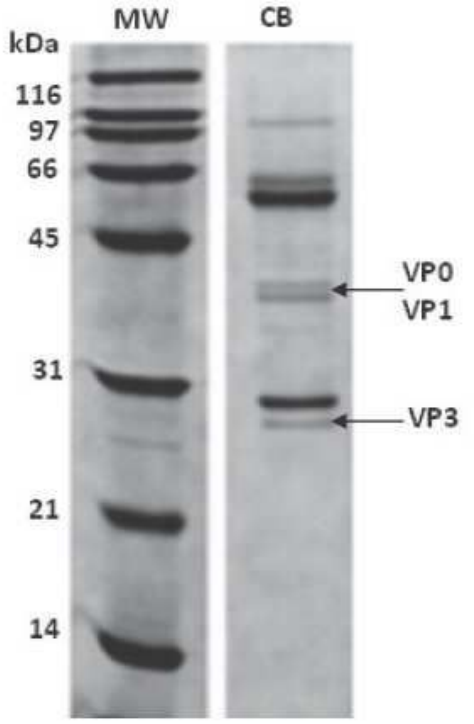
SN07 체류물로 면역화한 마우스 유래 중화 혈청 풀의 항체는
HEV71의 모든 VLP 성분에 결합한다.

rEV71-VP0 1 ug
rEV71-VP1 1 ug
rEV71-VP2 1 ug
rEV71-VP3 1 ug



도면19

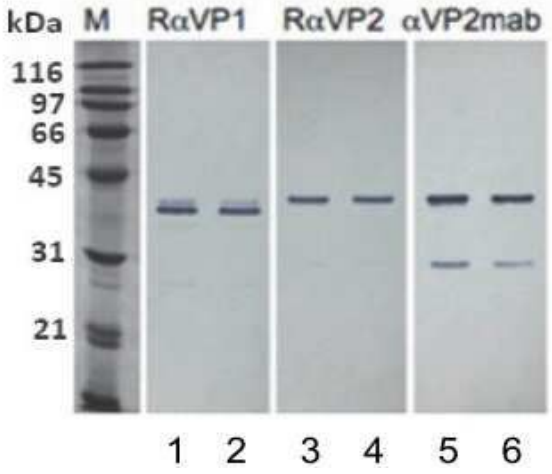
HEV71 VPL들의 특정화, 배양 상층물로부터 HEV71 VLP의 풀-다운. VLP 성분들 (VP0, VP1 및 VP3)은 코마시 염색한 SDS-PAGE 겔에서 확인됨.(MW - 분자량 마커; CB - 코마시 블루 염색)



도면20

친화성 컬럼 (AFC)으로 정제한 HEV71 VLP의 분석.

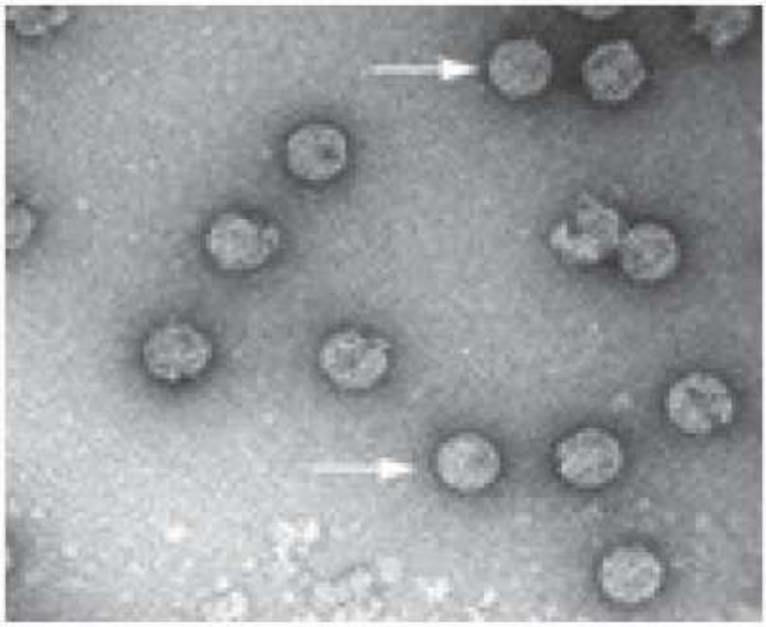
AFC는 단일클론 중화 항체 (EV18/4/D6-1/F1/G9)를 이용하여 준비하였으며, 단일클론 항체는 SNO7체류물을 이용하여 개발하였다. 용출 분획을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 레인1 및 2의 용출 분획들은 항-VP1 항체로 탐침한 것으로, VP1이 AFC로 정제한 VLP에 존재하는 것으로 확인된다. 레인 3 및 4의 용출 분획들은 항-VP2 항체로 탐침한 것으로, VP2 역시 AFC로 정제한 VLP에 존재하는 것으로 확인된다. 레인 5 및 6의 용출 분획들은 항-VP2 항체로 탐침한 것으로, VP2가 AFC로 정제한 VLP에 존재하는 것으로 확인된다.



도면21

AFC로 정제한 HEV71 VLP의 전자 현미경 사진.

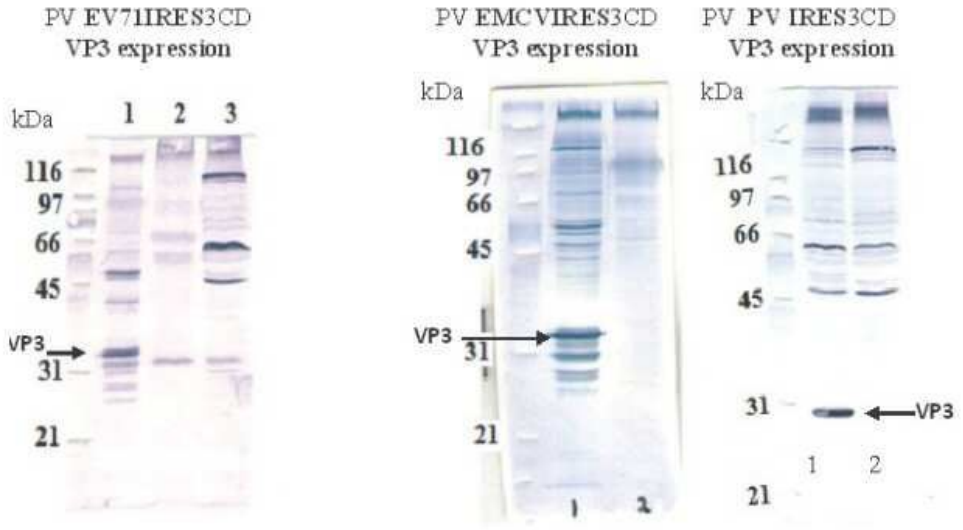
AFC는 단일클론 중화 항체 (EV18/4/D6-1/F1/G9)를 이용하여 준비하였으며, 단일클론 항체는 SNO7체류물을 이용하여 개발하였다. 용출 분획을 웨스턴 블롯 (도 20)과 전자 현미경 검경으로 분석하였다. 화살표는 바이러스 유사 입자를 표시한다.



도면22

인간 엔테로바이러스 C (폴리오바이러스-PV)의 VLP 발현.

폴리오바이러스 VLP를 만들기 위해 3가지 발현 카세트를 구축하였다. 발현 카세트들 모두 폴리오바이러스 P1 폴리펩타이드를 포함하고 있으며, IRES에 대해서만 차이가 있는데, IRES는 폴리오바이러스 3CD 프로테아제의 발현을 지시한다. 폴리오바이러스 VLP 발현 카세트를 보유한 재조합 베큘로바이러스를 테스트하였다. 베큘로바이러스로 감염된 세포의 세포 용혈물을 감염 3일째에 회수하여, 폴리오바이러스 VP3의 발현을 토끼 항-PVP3 항체 (1:2000)를 이용하여 평가하였다.



1. HEV71IRES-lysate
2. HEV71IRES-supernatant
3- bacGus-lysate

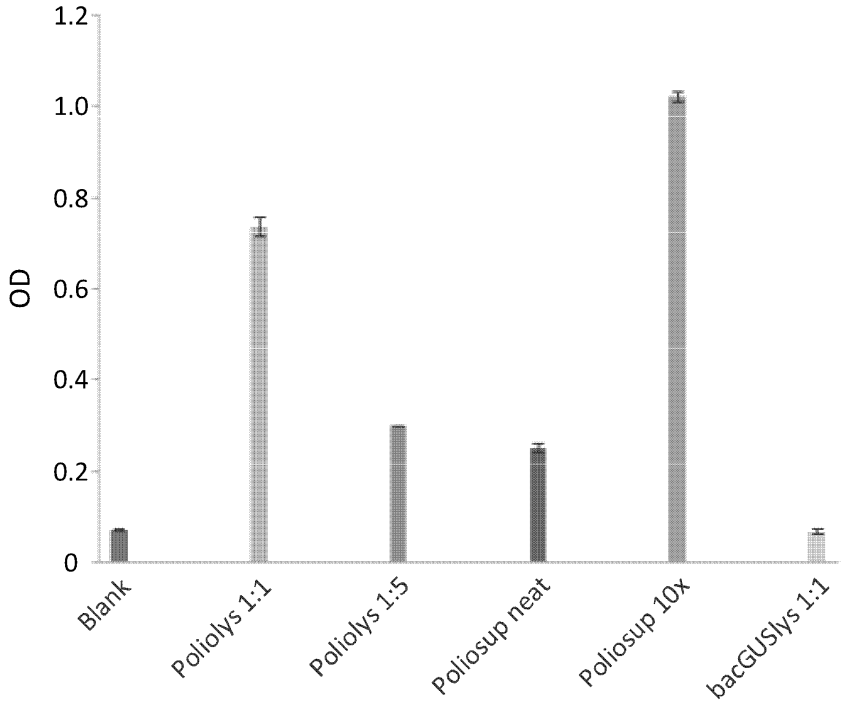
1. EMCV IRES-lysate
2. bacGus-lysate

1. PV IRES-lysate
2. bacGus-lysate

도면23

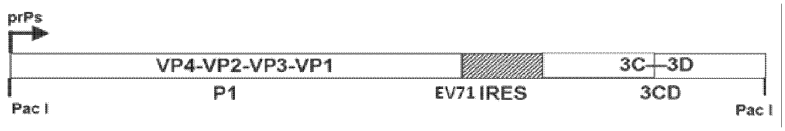
폴리오바이러스-VLP VP3-VP1 ELISA.

폴리오바이러스 VLP 생산을 입증하기 위해, 폴리오바이러스 3CD 프로테아제가 폴리오바이러스 IRES의 통제 하에 위치한, 폴리오바이러스 VLP 발현 카세트를 보유한 재조합 베큘로바이러스로부터 유래된 세포 용혈물과 상층물에 대해 2부위 ELISA를 수행하였다. 정제된 토끼 항-폴리오바이러스 VP3 항체를 포획 항체로 사용하였다. 폴리오바이러스 VLP는 마우스 항-VP1 단일클론 항체를 이용하여 검출하였다.



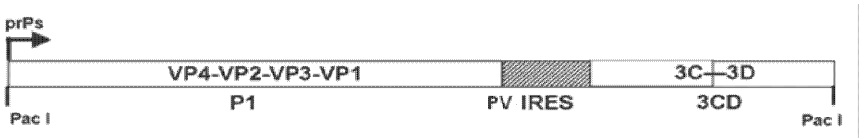
도면24

HEV71 IRES를 구비한 HEV71 VLP 발현 카세트(P1+HEV71 IRES+3CD).



도면25

폴리오바이러스 (PV) IRES를 구비한 HEV71 VLP 발현 카세트 (P1+PV IRES+3CD).



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Cardosa, Mary Jane

Jamiludden, Mohamad

Hamid, Sharifah Binti

<120> Antigens and Vaccines Directed Against Human Enteroviruses

<130> 3IPSN1.0001WO

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 586

<212> RNA

<213> Encephalomyocarditis virus

<220><221> misc_feature

<223> internal ribosome entry site

<400> 1

gccccucucc cucccccccc ccuaacguua cuggccgaag ccgcuuggaa uaaggccggu 60

guguguuugu cuauauguga uuuuccacca uauugccguc uuuuggcaau gugagggccc 120

ggaaaccugg cccugucuuc uugacgagca uuccuagggg ucuuuccccu cucgccaaag 180

gaaugcaagg ucuguugaau gucgugaagg aagcaguucc ucuggaagcu ucuugaagac 240

aaacaacguc uguagcgacc cuuugcaggc agcggaaccc cccaccuggc gacaggugcc 300

ucugcggcca aaagccacgu guauaagaua caccugcaaa ggcggcacaa ccccagugcc 360

acguugugag uuggauaguu guggaaagag ucaaauggcu cuccucaagc guagucaaca 420

aggggcugaa ggaugcccag aagguacccc auuguauggg aaucugaucu ggggccucgg 480

ugcacaugcu uuacaugugu uuagucgagg uuaaaaaaagc ucuaggcccc ccgaaccacg 540

gggacguggu uuuccuuuga aaaacacgau gauaagcuug ccacaa 586

<210> 2

<211> 38

<212> RNA

<213> Encephalomyocarditis virus

<400> 2

augauaauau gacuucgaaa guuuaugauc cagaacaa 38

<210> 3

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized mutation

<400> 3

augauaagcu ugccacaacc cgggauccuc uagagucgac augacuucg 49