



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0049010  
(43) 공개일자 2016년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/235 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 39/12 (2013.01)  
A61K 39/235 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-7008956  
(22) 출원일자(국제) 2014년09월05일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2015년04월05일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/054234  
(87) 국제공개번호 WO 2015/035128  
국제공개일자 2015년03월12일  
(30) 우선권주장  
61/874,505 2013년09월06일 미국(US)

(71) 출원인  
알티문 인크.  
미합중국 메릴랜드주 20878 게이더스버그 스위트  
200 퍼스트필드 로드 19  
(72) 발명자  
탕, 드슈  
미국 앨라배마 35244 버밍햄 리버체이스 파크웨이  
웨스트 1163  
(74) 대리인  
차윤근

전체 청구항 수 : 총 18 항

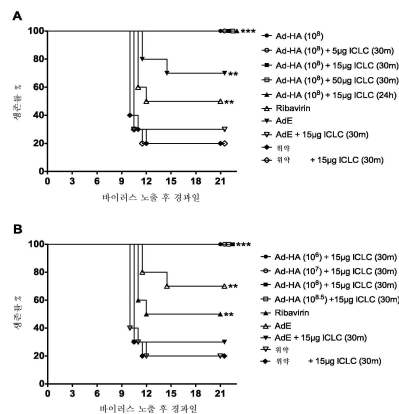
(54) 발명의 명칭 바이러스 벡터화된 백신을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

TLR3 작동제와 같은 보강제와 함께 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터) 백신을 비침습적 투여하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 이 방법은 예컨대 백신에 면역 반응의 증가, Ad-벡터 백신의 면역원성의 증가, 항원 예비 효과 및 개선된 안전성을 백신에 대한 효과적인 예방 면역 반응과 함께 제공한다.

대표도 - 도1

AdNI5로 백신접종 및 인플루엔자 A/Victoria/1203/04 바이러스로 항원공여 후 바이러스 생존율



(52) CPC특허분류

A61K 2039/5256 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

C12N 2710/10343 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

동물에서 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터) 백신의 면역원성을 증가시키는 방법으로써,

당해의 유전자를 함유하고 발현하는 상기 Ad-벡터를 동물에게 비침습적 방식으로 투여하는 단계; 및

Ad-벡터 백신을 투여하고 24시간 이내에 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제인 Ad-벡터 백신 보강제를 비침습적 방식으로 동물에게 투여하는 단계를 함유하고,

상기 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제의 투여가, 이 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제 없이 투여된 Ad-벡터 백신에 비해 Ad-벡터 백신의 면역원성을 증가시키는 것인, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, Ad-벡터 백신 보강제가 폴리-ICLC인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 면역원성의 증가가 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제 없이 투여된 Ad-벡터 백신에 비해, 항원에 대한 중화 항체의 증가를 통해 측정되는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, Ad-벡터 백신의 면역원성의 증가가 항원의 감염으로 인한 항원공격에 대하여 적어도 90% 보호를 제공하는 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, Ad-벡터 백신의 면역원성의 증가는, 약 적어도  $10^6$  ifu의 Ad 벡터가 동물에게 투여되어, 항원 감염으로 인한 항원공격에 대하여 최대 100% 보호를 제공하는 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, Ad-벡터 백신의 면역원성 증가가 항원 예비(sparing) 효과를 제공하는 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 비침습적 방식이 피부 투여, 점막 투여 또는 비내 투여를 함유하는 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 동물이 사람인 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 동물이 가축 동물인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 가축 동물이 닭, 칠면조, 오리 또는 돼지인 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, Ad-벡터가 인플루엔자 헤마글루티닌, 인플루엔자 핵 단백질, 인플루엔자 뉴라미니다제, 인플루엔자 M2, 인플루엔자 M1, 파상풍 독소 C-단편, 탄저병 보호 항원, 탄저병 치사 인자, 광견병 당단백질, HBV 표면 항원, HIV gp 120, HW gp 160, 말라리아 CSP, 말라리아 SSP, 말라리아 MSP, 말라리아 pfg, 결핵균 HSP 또는

이의 돌연변이체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 항원을 암호화하는 유전자를 발현하는 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, Ad-벡터가 E1/E3 결손형 아데노바이러스 혈청형 5(Ad5)인 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 약 5 $\mu$ g 내지 약 5mg의 폴리-ICLC가 동물에게 투여되는 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 약 1 내지 약 2mg의 폴리-ICLC가 동물에게 투여되는 방법.

#### 청구항 15

제5항에 있어서, 약 1 내지 약 2mg의 폴리-ICLC가 동물에게 투여되는 방법.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, TLR3 작동제가 폴리IC(12)U, 폴리IC(12)G 또는 폴리AU인 방법.

#### 청구항 17

보호 면역 반응을 필요로 하는 동물의 보호 면역 반응을 유도하는 비침습적 방법으로써,

당해의 항원을 함유하고 발현하는 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터) 백신을 비침습적 방식으로 동물에게 투여하는 단계; 및

상기 Ad-벡터 백신을 투여하고 24시간 이내에 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제인 Ad-벡터 백신 보강제를 비침습적 방식으로 동물에게 투여하는 단계를 함유하고, 상기 면역 반응의 유도가 항원 감염으로 인한 항원공격에 대하여 보호 효과를 제공하는 방법.

#### 청구항 18

동물에서 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터) 백신에 대한 면역반응률을 증가시키는 방법으로써,

당해의 항원을 함유하고 발현하는 상기 Ad-벡터 백신을 비침습적 방식으로 동물에게 투여하는 단계; 및

상기 Ad-벡터 백신을 투여하고 24시간 이내에 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제인 Ad-벡터 백신 보강제를 비침습적 방식으로 동물에게 투여하는 단계를 함유하고,

상기 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제의 투여가 이 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제 없이 투여된 Ad-벡터화된 백신에 비해 Ad-벡터 백신의 면역 반응을 증가시키는, 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원 및 참고 인용문

[0002] 본 출원은 2013년 9월 6일에 출원된 미국 가특허출원 일련번호 61/874,505의 우선권을 주장하는 출원이다.

[0003] 이 출원 인용 서류에 인용되거나 언급된 모든 서류, 및 본원에 인용되거나 언급된 모든 서류("본원에 인용된 서류"), 및 본원에 인용된 서류들에 인용되거나 언급된 모든 서류들은 본원에 언급되거나 또는 본원에 참고 인용된 모든 서류에 언급된 모든 산물들에 대한 임의의 제조업자의 지시, 설명, 제품 사양 및 제품 시트와 함께 본원에 참고 인용되고, 본 발명의 실시예에 이용될 수 있다. 더 구체적으로, 모든 인용 서류들은 각 개별 서류가 특별하고 개별적으로 참고 인용되는 것으로 표시된 것처럼 같은 정도로 참고 인용된 것이다.

[0004] 발명의 분야

[0005] 본 발명은 이종성 유전자를 함유하고 발현하는 아데노바이러스 벡터의 비침습적(non-invasive) 투여, 및 보강제(adjunct)의 투여를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0006] 백신 운반체(carrier)로써 재조합 Ad 백터를 이용하는 이유로는 주목할만한 여러 가지 이유가 있다. 그 이유로는 다음과 같은 것을 포함한다: 1) Ad 백터는 동일계에서 유사분열 세포 및 유사분열후 세포를 형질도입시킬 수 있다(Shi 1999); 2) 고 역가의 바이러스( $\text{ml 당 } 10^{12} \text{ pfu}$ (플라크 형성 단위) 초과)를 함유하는 스톡(stock)을 제조할 수 있어, 높은 감염다중도(MOI)로 동일계에서 세포의 형질도입을 가능하게 한다; 3) 이 백터는 백신으로써 장기간 사용을 근거로 할 때 안전하다; 4) 이 바이러스는 높은 수준의 돌연변이유전자(transgene) 발현을 유도할 수 있다(적어도 초기 버스트(burst)로써); 5) 이 백터는 다재다능함으로 인해 광범위하게 조작될 수 있다. 재조합 Ad 백터는 비내, 피부 위, 기관내, 복강내, 정맥내, 피하 및 근육내 경로를 통해 백신 운반체로써 이용되고 있다.
- [0007] Ad-백터화된 비측 백신은 DNA의 주입 또는 Ad의 국소 적용보다 면역 반응을 유도하는데 더욱 효과적인 것으로 나타난다(Shi et al.(2001) J.Virol.75:11474-11482). 이전에 보고된 결과들은 비측 백신 운반체로써 E1/E3 결손형 Ad5 백터의 효능이 Ad에 대한 기존 면역성에 의해 억제되지 않는다는 것을 보여주었다(Xiang et al.(1996) Virology 219(1) 220-7; Shi et al.2001).
- [0008] Ad제 백신은 자신의 능력으로 자연 감염의 효과를 모방하여 주 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 제한적 T 세포 반응을 유도하지만, 이 백터로부터 병원체 게놈의 부분단편(subfragment)만이 발현되기 때문에 다시 독성으로 복귀할 가능성은 없어진다. 이러한 "선택적 발현"은 백터에 의해 암호화된 것이 아닌 병원체의 특정 마커가 백신접종되었으나 미감염된 동물과 감염된 동물을 구별하는데 사용될 수 있기 때문에, 상기 두 동물을 구분하는 문제를 해결할 수 있다. 특히, 야생 샘플로부터 관련 항원 유전자가 직접 증폭 및 클로닝될 수 있기 때문에 백터화된 백신의 제조에 병원체의 전파는 필요하지 않다(Rajakumar et al., 1990). 이것은 H5N1과 같은 고독성 AI 균주의 생산에 특히 중요한데, 그 이유는 이 균주의 전파가 너무 위험하고 어렵기 때문이다(Wood et al., 2002).
- [0009] 미국 특허 4,349,538(Hilton B LEVY) 및 7,439,349(Andres M. Salazar)는 폴리(Poly)-ICLC의 제조 및 임상 용도에 관한 것이다. 폴리리신과 카르복시메틸셀룰로오스에 의해 안정화된 폴리이노신-폴리시티딜산(폴리-ICLC)은 수년 전에 단기 암 실험에서 인터페론 유도인자로써 고용량(최대 300 mcg/kg IV)으로 사용되었던 폴리리신과 카르복시메틸 셀룰로오스에 의해 안정화된, 폴리이노신산과 폴리시티딜산의 합성 복합체(이분쇄 RNA(dsRNA))이다. 이것은 중간 독성을 가진 혼합된 결과를 제공했고, 재조합 인터페론들이 입수용이해졌을 때 폴리-ICLC의 사용은 일반적으로 포기되었다. 하지만, 저용량(10 내지 50 mcg/kg)의 폴리-ICLC는 더 광범위한 숙주 방어 자극을 야기하고, 독성이 거의 없거나 전혀 없이 임상 활성을 증강시켰다. 이러한 경우, 이것은 특정 유기체 또는 종양을 표적으로 하는 종래의 항생제, 항바이러스제 또는 항암제와 반대로, 광범위 숙주-표적화된 치료제의 한 예를 나타낸다. (Salazar, Levy et al. 1996) (Ewel, Urba et al. 1992) (Levy and Salazar 1992) (Talmadge and Hartman 1985) (Maluish, Reid et al. 1985).
- [0010] 폴리-ICLC(HILTONOL®)는 적어도 5가지의 상호관련된 생물학적 작용이 있으며, 이들 모두(단독 또는 복합적으로)는 항바이러스 활성화에 역할을 하기도 한다. 이들은 1) 인터페론의 유도; 2) 광범위한 면역 증강 효과; 3) 특정 효소들, 예컨대 올리고아데닐레이트 합성효소(OAS) 및 p68 단백질 키나제(PKR)의 활성화; 4) 광범위한 유전자 조절 작용 및 5) TLR3을 포함한 하나 이상의 톨(toll)-유사 수용체의 활성화이다(Proc Natl Acad Sci USA. 2008 February 19; 105(7): 2574-2579).
- [0011] 또한, 폴리-ICLC는 항원에 대한 증가된 항체 및 세포 면역 반응을 나타내는, 백신-추가접종 또는 보강제 효과가 있다. 예를 들어, 원숭이에게 저용량의 폴리-ICLC를 돼지 독감 백신접종과 함께 투여 시, 항체 생산을 급격히 가속화시키고 증가시킨다. 이와 관련하여 dsRNA 및 인터페론의 복잡한 상호작용은 여전히 완전히 이해되는 것은 아니지만, 이것은 아마도 항바이러스제 및 면역 증강제로써 폴리-ICLC의 모순된 이중 역할이 바이러스 공격에 대하여 즉각적인 방어 시스템을 형성시키면서 동시에 장기간 면역성의 형성을 자극하는 기능이 있다는 것과 일치한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 하지만, 백신의 면역원성을 증가시키고 감염성 항원 공격에 대하여 보호 효과를 제공하는 아데노바이러스 백터

화된 백신 및 보강제의 비침습적 투여에 대한 필요성은 여전히 남아 있는 상태이다. 이 보강제의 또 다른 장점은 이 보강제의 항원 예비(sparing) 활성, 즉 백신 단독에 의해 달성할 수 있는 것보다 더 낮은 백신 용량에서 보호 백신 역가를 달성하는 능력일 수 있다.

[0013] 본 출원에서 임의의 서류의 언급 또는 표시는 이러한 서류가 본 발명에 대한 선행 기술로 이용할 수 있음을 인정하는 것은 아니다.

### 과제의 해결 수단

[0014] 특정 양태들에서, 본 발명은 당해의 유전자를 함유하고 발현할 수 있는 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터)를 비침습적(non-invasive) 방식으로 동물에게 투여하는 단계; 및 상기 Ad-벡터 백신을 투여하고 동시에(공동투여) 또는 24시간 내에 Ad-벡터 백신 보강제를 상기 동물에게 비침습적 방식으로 투여하는 단계를 함유할 수 있고, 상기 Ad-벡터 백신 보강제는 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제(agonist)이며, 이 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제의 투여가 이 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제 없이 투여된 Ad-벡터 백신에 비해 Ad-벡터 백신의 면역원성을 증가시키는 것인, 동물의 아데노바이러스 벡터 백신의 면역원성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0015] 추가 양태들에서, 본 발명은 당해의 항원을 함유하고 발현할 수 있는 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터)를 비침습적 방식으로 동물에게 투여하는 단계; 및 상기 Ad-벡터 백신을 투여하고 동시에(공동 투여) 또는 24시간 이내에 Ad-벡터 백신 보강제를 상기 동물에게 비침습적 방식으로 투여하는 단계를 함유할 수 있고, 이때 Ad-벡터 백신 보강제는 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제이고, 면역 반응의 유도가 항원의 감염으로 인한 공격에 대하여 보호 효과를 제공하는 것인, 보호 면역 반응을 필요로 하는 동물의 보호 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0016] 다른 양태들에서, 본 발명은 당해의 항원을 함유하고 발현할 수 있는 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터) 백신을 동물에게 비침습적 방식으로 투여하는 단계; 및 상기 Ad-벡터 백신을 투여하고 동시에(공동 투여) 또는 24시간 이내에 Ad-벡터 백신 보강제를 비침습적 방식으로 상기 동물에게 투여하는 단계를 함유할 수 있고, 상기 Ad-벡터 백신 보강제가 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제이고, 이 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제의 투여가 이 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제 없이 Ad-벡터화된 백신을 투여한 경우에 비해 Ad-벡터 백신에 대한 면역 반응률을 증가시키는 것인, 동물의 Ad-벡터 백신에 대한 면역 반응률을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0017] 따라서, 본 발명의 목적은 출원인들이 권리를 보존하기 위해 공지된 어떠한 물건, 이 물건을 제조하는 공정 또는 이 물건을 사용하는 방법에 대해서도 권리 주장을 하지 않는 것이며, 그에 따라 이전에 알려진 어떠한 물건, 공정 또는 방법에 대해 존속기간포기서를 개시한다. 또한, 본 발명은 출원인들이 권리를 보존하기 위해 본 발명의 범위 내에 USPTO(35 U.S.C. § 112, 첫 문단) 또는 EPO(EPC의 83조)의 명세서 기재 및 실시가능 요건을 충족시키지 않는, 임의의 물건, 물건의 제조 공정 또는 물건의 사용 방법을 권리 주장하지 않는데, 그에 따라 이전에 알려진 어떠한 물건, 이 물건의 제조 공정 또는 이 물건의 사용 방법에 대해 존속기간포기서를 개시한다는 점도 유념한다.

[0018] 본 명세서에서, 특히 청구범위 및/또는 문단들에서 "함유한다", "함유된", "함유하는"과 같은 용어들과 이의 유사 용어들은 미국 특허법에서 갖고 있다고 생각하는 의미를 가질 수 있고; 예컨대 이 용어들은 "포함한다", "포함된", "포함하는" 및 이의 유사어를 의미할 수 있으며; "본질적으로 이루어진" 및 "본질적으로 이루어진다"와 같은 용어는 미국 특허법에서 생각하는 의미인 것으로, 예컨대 분명하게 언급되지 않은 구성요소들을 허용하지만, 선행 기술에서 발견되거나 본 발명의 기본 또는 신규 특성들에 영향을 미치는 구성요소들은 배제한다는 점을 유의한다.

[0019] 이상의 양태들과 기타 양태들은 이하 상세한 설명에 개시되거나 자명하고 포괄되는 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0020] 본 명세서에 포함되고 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 하나 이상의 양태를 예시하며, 상세한 설명 및 실시예 부분들과 함께 본 발명의 원리 및 구현을 설명하는데 기여한다.

도 1은 항원공격 감염 28일 전에 1회 기회로 백신접종된 마우스 그룹의 캐플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 나타낸 것이다. Ad-VN.H5 백신  $10^8$  용량은 폴리 ICLC의 농도(5, 15 또는  $50\mu\text{g}$ 을  $10\mu\text{l}$  부피에 함유)에 상관없이, 항원공격 감염으로부터 100% 보호를 제공했다(도 1A). 또한, 총 4가지 용량의 Ad-VN.H5( $1.2 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^7$ ,  $1.2 \times 10^8$  또는  $3.5 \times 10^8$  ifu/ $50\mu\text{l}$ )는  $15\mu\text{g}$ 의 폴리-ICLC와 배합 시, 항원공격 감염으로부터 100% 보호를 제



공했다(도 1B). AdE를 받은 그룹도 유의적인 보호를 나타냈지만, 약간의 사망률이 관찰되었다(도 1A 및 1B).

도 2는 항원공격 감염 28일 전에 백신접종된 마우스 그룹의 평균 체중 변화를 도시한 것이다.  $10^8$  AdVN.H5 백신을 투여받은 모든 마우스는 유의적인 체중 손실로부터 보호되었다. 하지만, 최저 용량( $10\mu\text{L}$  부피 중에  $5\mu\text{g}$ )의 폴리-ICLC를 투여받은 그룹은 최상의 보호효과를 나타냈다(도 2A). 또한,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 함께  $10^6$  용량의 AdVN.H5로 백신접종을 받은 마우스는 체중 손실로부터 유의적인 보호를 나타냈다. 또한,  $10^7$  및  $10^8$  용량의 백신을 투여받은 그룹은 위약 그룹에 비해 평균 체중의 유의적인 차이를 나타냈다(도 2B).

도 3은 백신접종 후 14일째 혈청에 대한 혈구응집 억제(HAI) 분석의 결과를 도시한 것이다. 백신접종 후 24시간째 비-보강된  $10^8$  용량의 AdVN.H5 및 폴리-ICLC와 배합된  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 그룹은 백신접종 후 14일째 위약투여군 대비 유의적인 증가를 나타냈다(도 3A). 백신 용량 적정 결과는 최고( $10^{8.5}$ ) 용량의 AdVN.H5를 투여받은 그룹만이 위약투여군 대비 유의적인 차이를 보여주었음을 나타낸다(도 3B).

도 4는 백신접종 후 28일째 혈청에 대한 혈구응집 억제(HAI) 분석의 결과를 도시한 것이다.  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 모든 그룹은 백신접종 후 28일째 위약투여군 대비 유의적인 증가를 나타냈다(도 4A). 하지만, 용량 적정에서, 2가지 최고 용량의 AdVN.H5를 투여받은 그룹만은 HAI 역가의 유의적인 증가를 보여주었다(도 4B).

도 5는 백신접종 후 14일째 폐 세척액에 존재하는 sIgA의 수준을 도시한 것이다. 백신접종 후 14일째,  $50\mu\text{g}$  폴리-ICLC를 함유하는 AdVN.H5를 투여받은 그룹을 제외한  $10^8$  AdVN.H5를 투여받은 모든 그룹은 위약투여군 대비 유의적인 증가를 나타냈다(도 5A).  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 배합 시에는  $10^8$  및  $10^{8.5}$  용량의 백신을 투여받은 그룹들만이 IgA의 유의적인 증가를 나타냈다(도 5B). 또한,  $10^{8.5}$  AdVN.H5 백신에 의해 유도된 IgA의 수준은,  $15\mu\text{g}$ 의 폴리-ICLC와 배합되었을 때, 백신접종 후 14일째 다른 모든 백신 포물레이션들보다 훨씬 높았다.

도 6은 백신접종 후 28일째 폐 세척액에 존재하는 sIgA의 수준을 도시한 것이다. 백신접종 후 28일째,  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 모든 그룹들은 위약투여군 대비 유의적인 증가를 나타냈다(도 6A). 하지만,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 배합된  $10^8$  및  $10^{8.5}$  용량의 AdVN.H5 백신을 투여받은 그룹들만이 유의적인 증가를 나타냈다(도 6B). 또한, 백신접종 후 24h째 투여된  $15\mu\text{g}$ 의 폴리-ICLC와 배합된  $10^8$  AdVN.H5 백신에 의해 유도된 IgA의 수준은, 백신접종 후 28일째 다른 모든 백신 포물레이션들보다 훨씬 더 높았다.

도 7은 백신접종 후 28일째 폐 세척액으로부터 분리되어 배양된 IFN- $\gamma$  생산 세포의 수를 보여준다. 백신접종 후 14일째에는 백신접종 후 24시간째 폴리-ICLC와 배합된  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 그룹만이 IFN- $\gamma$  생산 세포 수의 유의적인 증가를 보여주었다(도 7A). 다른 용량의 AdVN.H5로 처리된 그룹들에서는 IFN- $\gamma$  생산 세포의 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(도 7B).

도 8은 백신접종 후 28일째 폐 세척액으로부터 분리 및 배양된 IFN- $\gamma$  생산 세포의 수를 보여준다. 백신접종 후 28일째, 폴리-ICLC와 배합된  $10^8$  AdVN.H5로 백신접종된 모든 그룹들은 IFN- $\gamma$  생산 세포의 유의적인 증가를 보여주었다(도 8A). 하지만,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 배합 시에는  $10^8$  및  $10^{8.5}$  용량의 AdVN.H5 백신을 투여받은 그룹들만이 유의적인 증가를 보여주었다(도 8B).

도 9는 백신접종 후 14일째 폐 세척액으로부터 분리 및 배양된 IL-4 생산 세포의 수를 보여준다. 백신접종 후 14일째,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 배합 시,  $10^8$  AdVN.H5를 투여받은 그룹만이 IL-4 생산 세포 수의 유의적인 증가를 보여주었다.

도 10은 백신접종 후 28일째 폐 세척액으로부터 분리 및 배양된 IL-4 생산 세포의 수를 보여준다. 백신접종 후 28일째, IL-4 생산 세포 수의 증가는 모든 그룹에서 관찰되었다. 따라서, 백신 그룹 간에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

본 발명은 아데노바이러스 벡터화된(Ad-벡터화된) 백신 및 보강제로써 이본쇄(ds) RNA 폴리뉴클레오타이드 또는 TLR 3 작동제(이하, "Ad-벡터 백신 보강제"라 지칭함)의 비침습적 투여 후, 병원체에 대한 보호 면역 반응을 이

를 필요로 하는 검체에서 유도하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 놀랍게도, 백신과 동일한 경로로 투여되고 백신과 동시에(공동 투여) 또는 백신 투여 후 24시간 내에(0 내지 24시간) 투여되는 보강제로써 공지된 항바이러스 활성을 가진 폴리 ICLC(HILTONOL®)와 같은 합성 dsRNA 폴리뉴클레오타이드를 사용하면, Ad-백터화된 백신의 면역원성이 유의적으로 증가했다. 이러한 백신 면역원성의 개선은 H5N1 인플루엔자 바이러스와 같은 생 바이러스에 의한 항원공격 감염 후 생존률의 개선을 초래한다.

[0022] 특정 양태들에서는 항원공격 감염에 대한 100% 보호가 관찰되었다. 도 1B 참조. 본원에 사용된  $10^6$  용량의 Ad-백터화된 백신은 본 발명의 보강제없이 사용되었을 때에는 생 바이러스에 의한 항원공격 감염 후 일반적으로 보호적이지 않다. 하지만, Ad-백터화된 백신 보강제의 공동투여(0 내지 24시간)는 최소 90% 보호를 초래하고, 특정 양태들에서는 감염성 항원공격에 대해 100% 보호를 제공한다.

[0023] 본원에 사용된, Ad-백터화된 백신은 인플루엔자 또는 탄저병 항원 또는 이의 단편과 같은 당해의 유전자를 함유하고 발현할 수 있다. 본 발명은 병원체에 대한 보호를 제공하기 위해 비침습적으로 투여되는 Ad-백터화된 백신의 사용 효과의 유의적인 개선, 예컨대 필요한 용량 저하를 제공한다.

[0024] 따라서, 한 양태에 따르면, 본 발명은 Ad-백터화된 백신이 비침습적으로 투여되고, 이와 동시에(공동 투여) 또는 24시간 이내에 Ad-백터화된 백신 보강제가 투여되어 Ad-백터화된 백신의 면역원성을 증가시키는 방법으로써, 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제(보강제로써)의 투여가 이것 없이 투여된 Ad-백터 백신에 비해, Ad-백터 백신의 면역원성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0025] 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Ad-백터화된 백신이 비침습적으로 투여되고, 이 백신 투여와 동시에(공동 투여) 또는 24시간 이내에 Ad-백터화된 백신 보강제가 투여되는, 보호 면역 반응을 필요로 하는 검체의 보호 면역 반응을 유도하는 방법으로써, 이 면역 반응의 유도가 항원의 감염성 항원공격에 대한 보호를 제공하는, 검체의 보호 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0026] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Ad-백터화된 백신이 비침습적으로 투여되고, 이 백신 투여와 동시에(공동 투여) 또는 24시간 이내에 Ad-백터화된 백신 보강제가 투여되고, 이 보강제로써 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제의 투여가 이것 없이 투여된 Ad-백터화된 백신에 비해 Ad-백터 백신에 대한 면역 반응률을 증가시키는 것인, 동물의 아데노바이러스 백신(Ad-백터) 백신에 대한 면역 반응률을 증가시키는 방법을 제공한다. 본원에 사용된, 반응률(rate)은 백신 투여와 면역 반응 유도 사이의 시간을 의미하고; 시간이 짧을수록 반응률은 더 빨라진다.

[0027] 실시예 1은 마우스에서 고병원성 A/Vietnam/1203/04(H5N1) 조류 인플루엔자 바이러스로의 항원공격 감염에 대한 Ad5-백터화된 인플루엔자 바이러스 HA 백신(Ad5-VN1203/04.H5)의 면역원성을 증가시키는 보강제로써 사용되는 합성 dsRNA 폴리-ICLC(Hiltonol®)의 용도를 제공한다. 여러 용량의 폴리-ICLC를 투여하기 30분 전 또는 24시간 전에 투여한 AdVN.H5 백신들의 비교에서,  $10^8$  용량의 Ad-VN.H5를 투여받은 모든 처리 그룹은 폴리-ICLC 농도에 상관없이 항원공격 감염으로부터 100% 보호를 제공했다. 또한,  $15\mu\text{g}$  폴리-ICLC를 투여하기 30분 전에 투여한 총 4가지 용량의 AdVN.H5( $1.2 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^7$ ,  $1.2 \times 10^8$ , 또는  $3.5 \times 10^8$  ifu/ $50\mu\text{l}$ ) 백신은 항원공격 감염으로부터 100% 보호를 제공했다. 또한, AdE(인플루엔자 항원 무함유)도 약간의 사망률이 관찰되었지만 유의적인 보호를 나타냈다. 빈 AdE 백신에 의해 제공된 보호는 놀라운 것이며, 이 특이적인 Ad5 백신의 작용 기전이 하나보다 많다는 것을 암시한다.

[0028]  $10^8$  용량의 Ad-VN.H5를 투여받은 모든 처리 그룹은 폴리-ICLC의 농도에 상관없이 유의적인 체중 손실로부터 마우스를 보호했다. 하지만,  $5\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC가 최고의 보호효과를 나타냈다. 4가지 용량의 AdVN.H5 백신을 비교할 때,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 배합된  $10^6$  용량의 AdVN.H5가 체중 손실로부터 최고의 보호 효과를 보여주었다. 즉, 생존률과 체중 손실 데이터는  $10^8$  용량의 AdVN.H5가 폴리-ICLC 농도에 상관없이 보호적이라는 것을 시사한다. 하지만, 이보다 훨씬 낮은 용량의 백신도 보강제와 배합된다면 보호적일 수 있다.

[0029] 본원에 사용된, 단수적 표현의 용어는 특허 문헌들에서 일반적인 것처럼, "적어도 하나" 또는 "하나 이상"의 임의의 다른 경우들 또는 용법들과 무관하게 하나 또는 하나보다 많은 것을 포함하는 것으로 사용된다.

[0030] 본원에 사용된, "또는"이란 용어는 비배타적인 것을 의미하는데 사용되거나, 또는 별다른 표시가 없는 한, "A 또는 B"는 "A이되 B는 아니고", "B이되 A는 아니고" 및 "A 및 B"를 포함하도록 사용된다.

[0031] 본원에 사용된, "약"이란 용어는 진술한 양과 동일하거나 대략, 거의, 대부분 또는 부근인 양, 예컨대 진술한



양 +/- 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1%인 양을 의미하는데 사용된다.

- [0032] 본원에 사용된, "보강제"란 용어는 다른 제제의 효과를 변경시키는, 예컨대 백신으로부터 공급된 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 약리학적 또는 면역학적 제제를 의미한다.
- [0033] 본원에 호환 사용되는 "Ad-백터 백신" 또는 "Ad-백터화된 백신"이란 용어는 항원을 암호화하는 당해의 유전자를 함유할 수 있는 아데노바이러스 백터를 의미한다. 아데노바이러스는 임의의 아데노바이러스, 예컨대 비제한적으로 사람 아데노바이러스, 소 아데노바이러스, 개 아데노바이러스, 사람을 제외한 영장류 아데노바이러스, 닭 아데노바이러스 또는 돼지 또는 멧돼지 아데노바이러스일 수 있다.
- [0034] 본원에 사용된, "Ad-백터 백신 보강제"란 용어는 ad-백터화된 백신과 공동투여했을 때 또는 24시간 이내에 투여했을 때 Ad-백터 백신의 면역 반응을 증강시키는 보강제로써 작용하는, 이분쇄(ds) RNA 폴리뉴클레오타이드 또는 TLR 3 작동제를 의미한다. 특정 양태에 따르면, Ad-백터 백신 보강제는 폴리-IC(폴리이노신-폴리시티딜 산), 폴리-ICLC, 폴리-IC(12)U 또는 폴리-IC(12)G이다. 다른 양태들에 따르면, Ad-백터 백신 보강제는 핵산 골격, 당 모이어티 또는 핵산 한 가닥 또는 양 가닥에 존재하는 다른 부위들에 대한 변형 또는 염기 변형을 보유하는 dsRNA 분자, 또는 리포좀 또는 중합체에 포함되고 이분쇄 RNA 패턴 인식 수용체(PRR), 예컨대 비제한적으로 Toll-유사 수용체 3(TLR3)와 상호작용을 통해 면역 세포에 결합하고(또는) 면역 세포를 활성화시키는 dsRNA 분자이다.
- [0035] 본원에 사용된, "사람 아데노바이러스"란 용어는 아데노비리데(Adenoviridae) 과의 모든 사람 아데노바이러스를 포함하는 것으로, 마스트아데노바이러스(Mastadenovirus) 속의 구성원들을 포함한다. 지금까지 51종 이상의 아데노바이러스 사람 혈청형이 동정되었다(예컨대, Fields et al., Virology 2, Ch.67(3d ed., Lippincott-Raven Publishers)). 아데노바이러스는 혈청그룹 A, B, C, D, E 또는 F로 나뉠 수 있다. 사람 아데노바이러스는 혈청형 1(Ad1), 혈청형 2(Ad2), 혈청형 3(Ad3), 혈청형 4(Ad4), 혈청형 5(Ad5), 혈청형 6(Ad6), 혈청형 7(Ad7), 혈청형 8(Ad8), 혈청형 9(Ad9), 혈청형 10(Ad10), 혈청형 11(Ad11), 혈청형 12(Ad12), 혈청형 13(Ad13), 혈청형 14(Ad14), 혈청형 15(Ad15), 혈청형 16(Ad16), 혈청형 17(Ad17), 혈청형 18(Ad18), 혈청형 19(Ad19), 혈청형 19a(Ad19a), 혈청형 19p(Ad19p), 혈청형 20(Ad20), 혈청형 21(Ad21), 혈청형 22(Ad22), 혈청형 23(Ad23), 혈청형 24(Ad24), 혈청형 25(Ad25), 혈청형 26(Ad26), 혈청형 27(Ad27), 혈청형 28(Ad28), 혈청형 29(Ad29), 혈청형 30(Ad30), 혈청형 31(Ad31), 혈청형 32(Ad32), 혈청형 33(Ad33), 혈청형 34(Ad34), 혈청형 35(Ad35), 혈청형 36(Ad36), 혈청형 37(Ad37), 혈청형 38(Ad38), 혈청형 39(Ad39), 혈청형 40(Ad40), 혈청형 41(Ad41), 혈청형 42(Ad42), 혈청형 43(Ad43), 혈청형 44(Ad44), 혈청형 45(Ad45), 혈청형 46(Ad46), 혈청형 47(Ad47), 혈청형 48(Ad48), 혈청형 49(Ad49), 혈청형 50(Ad50), 혈청형 51(Ad51) 또는 이의 조합일 수 있지만, 이러한 예들에 국한되는 것은 아니다. 특정 양태들에서, 아데노바이러스는 혈청형 5(Ad5)이다.
- [0036] 본원에 사용된 "비침습적 투여"란 용어는 국소 적용 및/또는 점막 및/또는 피부 및/또는 비내 투여를 통한 Ad-백터 백신의 투여를 의미한다.
- [0037] 본원에 사용된 "TLR3 작동제"란 용어는 수지상 세포 및 B 세포에서 TRIF 의존적 시그널링 경로를 활성화시키는 합성 toll-유사 수용체 3(TLR3) 리간드를 의미한다. TLR3은 바이러스의 이분쇄 RNA(dsRNA) 및 이의 합성 유사체 폴리이노신-폴리시티딜산(poly(I:C))을 인식한다. TLR3 작동제는 폴리-IC, 폴리-ICLC, 폴리-IC(12)U 및 폴리-AU를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명은 Ad-백터 백신 및 Ad-백터 백신 보강제(폴리-ICLC 및/또는 TLR 3 작동제)와 동물을 비침습적 방식(예, 동물의 피부/점막/비내 영역)으로 접촉시키는 단계를 함유할 수 있고, 상기 백신과 보강제의 양이 함께 동물의 보호 면역 반응을 유도하기에 효과적인 양인, 동물의 비침습적 유전자 면역화 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0039] 특정 양태들에서, 보호 면역 반응을 유도하는 Ad-백터 백신의 투여량은 본 발명의 Ad-백터화된 백신 보강제 없이 사용된 Ad-백터화된 백신에 비해 적다. 폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제와 함께 사용될 때 Ad-백터 백신의 투여량은 약  $10^6$  내지 약  $10^{12}$  ifu 또는 pfu 범위일 수 있다. 한 관점에서, 동물에게 투여되는 Ad-백터 백신의 용량은 약, 또는 적어도 약  $10^6$  ifu 또는 pfu이다. 다른 관점에서, 동물에게 투여되는 Ad-백터 백신의 용량은 약, 또는 적어도 약  $10^7$  ifu 또는 pfu이다. 또 다른 관점에서, 동물에게 투여되는 Ad-백터 백신의 용량은 약, 또는 적어도 약  $10^8$  ifu 또는 pfu이다. 다른 관점에서, 동물에게 투여되는 Ad-백터 백신의 용량은 약 또는 적어도 약  $10^9$  ifu 또는 pfu이다. 다른 관점에서, 동물에게 투여되는 Ad-백터 백신의 용량은 약, 또는 적어도 약  $10^{10}$  ifu

또는 pfu이다. 또 다른 관점에서, 동물에게 투여되는 Ad-벡터 백신의 용량은 약, 또는 적어도 약  $10^{11}$  ifu 또는 pfu이다. 다른 관점에서, 동물에게 투여되는 Ad-벡터 백신의 용량은 약, 또는 적어도 약  $10^{12}$  ifu 또는 pfu이다.

[0040] 당업자라면, 마우스(또는 예비임상 연구에 사용되는 임의의 동물)의 유효 용량이 사람과 같은 큰 동물을 위해 비례증량될 수 있다는 것을 알고 있다. 이러한 방식으로, 상대성장 척도(allometric scaling)(생물학적 척도라고도 함)를 통해, 예비임상 동물의 용량으로부터 사람의 용량을 외삽하여 동물의 체중 또는 체표면적을 기반으로 한 등가 용량을 수득할 수 있다. Ad-벡터 백신의 용량은 사람에서 약  $10^9$  내지 약  $10^{12}$  ifu 또는 pfu일 수 있다. 한 관점에서, 사람에게 투여되는 Ad-벡터 백신의 용량은 약 또는 적어도 약  $10^9$  ifu 또는 pfu이다. 한 관점에서, 사람에게 투여되는 Ad-벡터 백신의 용량은 약, 또는 적어도 약  $10^{10}$  ifu 또는 pfu이다. 다른 관점에서, 사람에게 투여되는 Ad-벡터 백신의 용량은 약 또는 적어도 약  $10^{11}$  ifu 또는 pfu이다. 또 다른 관점에 따르면, 사람에게 투여되는 Ad-벡터 백신의 용량은 약 또는 적어도 약  $10^{12}$  ifu 또는 pfu이다.

[0041] 특정 양태들에서, Ad-벡터 백신의 면역원성은 Ad-벡터화된 백신 보강제없이 사용된 Ad-벡터 백신에 비해 증가한다. 보호적 면역원성은 예컨대 중화 항체의 역가를 비교하여 측정할 수 있고, 이때 중화 항체 역가의 증가는 백신의 면역원성의 증가를 나타낸다. 또한, 면역원성의 증가는 항원 공격 후 보호율 또는 생존률에 의해 측정될 수도 있다. 한 관점에서, Ad-벡터 백신과 보강제의 조합은 항원공격으로부터 적어도 약 90% 보호를 제공한다. 다른 관점에서, Ad-벡터 백신과 보강제의 조합은 항원공격으로부터 적어도 약 95% 보호를 제공한다. 특정 양태들에서, Ad-벡터 백신과 보강제의 조합은 항원공격으로부터 약 100% 보호를 제공한다.

[0042] 다른 특정 양태에 따르면, Ad-벡터 백신의 안전성은 Ad-벡터화된 백신 보강제없이 사용된 Ad-벡터 백신에 비해 개선된다. 이 백신의 안전성 개선은, 예컨대 체중 손실을 통해 측정할 수 있고, 체중 손실의 개선(백신 및 보강제를 투여한 후에 체중 손실이 적다)은 백신의 안전성 개선을 나타낸다.

[0043] 다른 특정 양태들에서, Ad-벡터 백신의 투여에 대한 점막 면역 반응은 Ad-벡터화된 백신 보강제 없이 사용된 Ad-벡터화된 백신에 비해 증가한다. 점막 면역는 예컨대 분비성 IgA의 역가를 비교하여 측정할 수 있고, 여기서 sIgA의 증가는 점막 면역의 증가를 나타낸다.

[0044] 다른 특정 양태들에서, Ad-벡터 백신의 투여 후 면역 반응물은 본 발명의 Ad-벡터화된 백신 보강제없이 사용된 Ad-벡터화된 백신에 비해 증가한다. Ad-벡터화된 백신의 투여 후 면역 반응 시간은 예컨대 백신 접종 후 경과일을 따라 IFN $\gamma$ 과 분비 세포수를 비교하여 측정할 수 있고, 여기서 초기에 면역 세포의 증가는 Ad-벡터 백신의 투여에 대한 면역 반응물의 증가를 나타낸다.

[0045] Ad-벡터 백신 보강제(폴리-ICLC 또는 TLR3 작동제)는 Ad-벡터 백신과 공동투여되거나(시간 0), 또는 실행가능한 한 직후에, 또는 Ad-벡터 백신 투여 후 24시간을 포함한 24시간 이내의 임의의 시간에 투여될 수 있다. 특정 양태들에서, Ad-벡터 백신 보강제는 Ad-벡터 백신의 투여 후 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 45분, 1시간, 90분, 2시간, 2.5시간, 3시간, 3.5시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간에, 또는 이의 임의의 조합으로 투여한다. 보강제 용량은 한번에 투여할 수 있고, 또는 Ad-벡터 백신을 투여한 후 24시간 동안 여러 번으로 투여할 수 있다. 특정 양태에서, Ad-벡터 백신은 Ad-벡터 백신 보강제와 공동투여된다. 한 관점에서, Ad-벡터 백신은 Ad-벡터 백신 보강제로써 폴리-ICLC, 폴리-IC(12)U 또는 TLR3 작동제와 공동투여된다.

[0046] 보강제 용량은 Ad-벡터 백신과 함께 또는 후속으로 투여했을 때, 보강제 없이 Ad-벡터 백신만을 투여한 경우에 비해 증강된 보호 면역 반응을 유도한다. 특정 양태들에서, 보강제 용량은 약  $5\mu\text{g}$  내지 약  $50\mu\text{g}$ 을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 한 관점에서, 보강제 용량은 약  $5\mu\text{g}$  내지 약  $25\mu\text{g}$ 이다. 다른 관점에서, 보강제 용량은 약  $5\mu\text{g}$  내지 약  $15\mu\text{g}$ 이다. 한 관점에서, 보강제 용량은 약  $5\mu\text{g}$ 의 저용량이다. 다른 관점에서, 보강제 용량은 약 25 내지 약  $50\mu\text{g}$ 의 고용량이다. 또 다른 관점에서, 보강제 용량은 약  $15\mu\text{g}$ 의 중간 용량이다. 용량은 동물의 체중 또는 동물의 표면적을 기준으로 동물에게 투여된 최종 용량으로 나타낼 수 있다.

[0047] 당업자는 예비임상 동물에 사용된 용량이 더 큰 동물, 예컨대 사람에 대해 체중 또는 체표면적을 기반으로 한 상대성장 척도로 비례증량될 수 있다는 것을 이해한다. 이러한 경우에, 사람을 위한 보강제의 용량은 약 1mg 내지 약 5mg일 수 있다. 한 관점에서, 사람에게 투여되는 보강제의 양은 약 1mg, 약 1.5mg, 약 2mg, 약 2.5mg, 약 3mg, 약 3.5mg, 약 4mg, 약 4.5mg 또는 약 5mg일 수 있다. 각 환자에게 적당한 용량은 정확하게 계산되어 Ad-벡터 백신과 함께 투여될 수 있다.

- [0048] 당업자에게 공지되고, 비침습적 용도로 제조되고 면역원성 항원을 함유하고 발현할 수 있는 임의의 아데노바이러스 벡터(Ad-벡터)는 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 이러한 Ad-벡터들은 미국 특허 6,706,693; 6,716,823; 6,348,450; 또는 미국 특허공개번호 2003/0045492; 2004/0009936; 2005/0271689; 2007/0178115; 2012/0276138(본원에 전문이 참고 인용됨)에 개시된 임의의 벡터를 포함한다.
- [0049] 특정 양태들에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 비복제성이다. 특정 양태들에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 E1-결손형, E3-결손형, 및/또는 E4-결손형 아데노바이러스 벡터, 또는 모든 바이러스 유전자가 결실된 "무기력성(gutless)" 아데노바이러스 벡터를 포함할 수 있다. E1 돌연변이는 E1-결손형 아데노바이러스 돌연변이체가 증식불허(non-permissive) 세포에서 복제 불능성이기 때문에 이 벡터의 안전 한계를 상승시킨다. E3 돌연변이는 아데노바이러스가 MHC 클래스 I 분자를 억제조절하도록 기전을 파괴하여 항원의 면역원성을 증강시킨다. E4 돌연변이는 후기(late) 유전자 발현을 억제하여 아데노바이러스 벡터의 면역원성을 감소시키고, 이에 따라 동일 벡터를 이용한 반복된 재백신접종을 가능하게 할 수 있다. "무기력성" 아데노바이러스 벡터 복제는 헬퍼 바이러스 및 E1a 및 Cre를 모두 발현하는 특별한 사람 293 세포주, 천연 환경에 존재하지 않는 조건을 필요로 하고; 이 벡터는 모든 바이러스 유전자가 없어서, 이 벡터는 백신 운반체로써 비-면역원성이고 재백신접종을 위해 여러 번 접종될 수 있다. 또한, "무기력성" 아데노바이러스 벡터는 돌연변이유전자를 수용할 수 있는 36kb 공간을 함유하여, 다수의 항원 유전자를 세포 내로 공동전달할 수 있다. RGD 모티프와 같은 특이적인 서열 모티프들은 감염성 증강을 위하여 아데노바이러스 벡터의 H-I 루프(loop)에 삽입될 수 있다. 아데노바이러스 재조합체는 이하에 기술된 바와 같은 임의의 아데노바이러스 벡터에 특이적인 돌연변이유전자 또는 돌연변이유전자의 단편을 클로닝하여 작제할 수 있다. 아데노바이러스 재조합 벡터는 면역화제로써 사용하기 위해 척추동물의 표피 세포에 비침습적 방식으로 형질도입시키는데 사용된다.
- [0050] 다른 양태들에 따르면, 아데노바이러스 벡터의 조합이 제공된다. 예를 들면, 빈 Ad-벡터(삽입체 없이 E1/E3이 결실됨)는 이를 필요로 하는 환자에게 E1/E3이 결실되고 본원에 기술된 바와 같은 외인성 및/또는 이종성 유전자와 같은 삽입체가 있을 수 있는 Ad-벡터와 같은 다른 벡터와 함께 연속해서 또는 동시에 투여될 수 있다. 이론적으로 제한됨이 없이, 빈 Ad-벡터(삽입체 없이 E1/E3이 결실됨)는 초기에 빠른 면역 반응을 유도해낼 수 있어, 항원 또는 에피토프와 같은 외인성 및/또는 이종성 유전자를 발현하는 벡터가 추가 보호 반응을 유도해낼 수 있다.
- [0051] 특정 양태에 따르면, Ad-벡터의 비침습적 투여는 피부 및/또는 비내 및/또는 점막 및/또는 경설상(perlingual) 및/또는 협측 및/또는 경구 및/또는 구강 투여로의 국소 적용을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. Ad-벡터 백신을 적용하기 위한 투여량 형태로는 액체, 연고, 분말 및 스프레이를 포함할 수 있다. 활성 성분은 멸균 조건 하에서 생리학적으로 허용성 담체 및 필요로 할 수 있는 임의의 보존제, 완충액, 추진제 또는 흡수 증강제와 혼합될 수 있다.
- [0052] 비측 또는 호흡기(점막) 투여가 바람직하다면, 조성물은 하나의 형태로 존재할 수 있고 압착 스프레이 분배기, 펌프 분배기, 다용량 분배기, 적가형 분배기 또는 에어로졸 분배기에 의해 분배될 수 있다. 이러한 분배기들은 경구 또는 구강(예, 협측 또는 경설상) 점막으로 조성물을 전달하는 데에도 이용될 수 있다. 에어로졸은 일반적으로 탄화수소에 의한 압력하에 있다. 펌프 분배기는 바람직하게는 계량된 용량, 또는 특별한 입자 크기를 가진 용량을 분배할 수 있다.
- [0053] 비침습적 전달은 보강제를 포함한 모든 투여 사례에 바람직하지만, 이 방법들은 침습적 전달들과 함께 사용될 수도 있다; 그리고 이 방법들은 초회-추가접종(prime-boost) 요법의 일부로써 일반적으로 사용될 수 있다. 예컨대, 이 방법들은 비침습적인 본 발명의 방법이 동일하거나 다른 면역학적 또는 치료적 성분의 다른 비침습적 또는 침습적 투여와 같은 다른 투여 전에, 또는 후에 또는 동시에 투여되는 초회-추가접종 요법의 일부로써 사용될 수 있고, 예컨대 비침습적 투여 전, 중에 또는 후에, 당해의 항원 또는 에피토프가 비침습적 투여에서의 벡터에 의해 발현되는 동일 또는 유사 병원체를 위한 전(whole) 백신 또는 서브유닛 백신 또는 면역학적 조성물과 같은 동일 또는 유사 병원체의 다른 백신 또는 면역학적 조성물을 주사로 투여한다.
- [0054] 본원에 사용된 면역학적 유효량은 당해의 유전자를 암호화하는 Ad 벡터의 양 또는 농도를 의미하는 것으로, 검체에게 투여했을 때 당해의 유전자 산물(Ad-벡터 백신)에 대한 면역 반응을 산출한다. 본 발명의 Ad-벡터 백신은 단독으로 또는 면역학적 조성물의 일부로써 동물에게 투여될 수 있다.
- [0055] 면역원성 조성물은 특히 경구(또는 협측 또는 경설상)으로 투여된다면 더욱 호감이 가게 하는 약학적 허용성 향료 및/또는 색을 함유할 수 있고; 이러한 조성물들은 입에서 용해하거나 또는 깨물어서 협측 또는 경설상으로 흡수를 위한 액체를 방출하는(니트로글리세린 또는 니페디덴과 같은 협심증을 위한 경구, 경설상 또는 협측 약

제와 유사) 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다. 점성 조성물은 겔, 로션, 연고, 크림 형태 및 이의 유사형태일 수 있고(예컨대, 국소용 및/또는 점막용 및/또는 비측용 및/또는 경구용 및/또는 구강용 및/또는 경설상용 및/또는 협측 투여용), 일반적으로 점도가 약 2500 내지 6500 cps이도록 충분한 양의 점증제를 함유할 것이지만, 최대 10,000 cps와 같이 더욱 점성의 조성물이 이용될 수도 있다.

[0056] 액체 제제는 일반적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조하기가 더 쉽다. 또한, 액체 조성물은 동물, 아동, 특히 소아 및 알약, 정제, 캡슐 등을 삼키는데 어려움이 있을 수 있는 자에게, 특히 경구, 협측 또는 경설상으로, 또는 다회용량 상황으로 투여하기에 다소 더 편리하다. 한편, 점성 조성물은 점막, 예컨대 위 내막 또는 비측 점막과 더 긴 접촉 기간을 제공하기에 적당한 점도 범위 또는 경설상 또는 협측 또는 구강 흡수에 적당한 점도 범위로 조제될 수 있다.

[0057] Ad-백터는 숙주에게 부합하게 될 수 있고, 또는 동물에서 당해의 이종성 또는 외인성 유전자 산물 및 동종 유전자 산물을 모두 발현할 수 있어서, 숙주 또는 동물에 대해 이용하기에 유익한 백터일 수 있다; 예컨대 수의학적 이용분야에서는 동물과 관련된 백터를 이용하는 것이 유용할 수 있고, 예컨대 개의 경우에는 개의 아테노바이러스를 이용할 수 있고; 또는 더욱 일반적으로 백터는 본 방법이 수행되는 숙주 또는 동물의 약독화된 또는 불활화된 천연 병원체일 수 있다. 당업자는 본 명세서의 정보 및 당업계의 지식을 이용하여 과도한 실험없이 숙주 또는 동물에 백터가 부합되게 할 수 있다.

[0058] 따라서, 본원에 기술된 사람 백신 외에도, 본 발명의 방법은 동물 가축(stock)을 면역화하는데 사용될 수 있다. 동물이란 용어는 사람을 비롯한 모든 동물을 의미한다. 동물의 예로는 사람, 소, 개, 고양이, 염소, 양, 새 및 돼지 등을 포함한다. 모든 척추동물의 면역계는 유사하게 작동하므로, 기술된 이용예들은 모든 척추동물계에서 수행될 수 있다.

[0059] 특정 양태들에서, 동물은 포유동물, 조류, 파충류, 양서류 또는 어류와 같은 척추동물; 사람, 또는 애완 또는 가축 또는 식품 생산용 또는 사료 생산용 또는 가축 또는 게임이나 레이싱용 또는 스포츠용 동물, 예컨대 소, 개, 고양이, 염소, 양, 돼지 또는 말, 또는 칠면조, 오리 또는 닭과 같은 가금이다. 특정 양태에 따르면, 척추동물은 사람이다. 다른 특정 양태에 따르면, 척추동물은 조류이다.

[0060] 특정 양태에 따르면, Ad-백터는 인플루엔자 항원, 호흡기합포체 바이러스(RSV) 항원, HIV 항원, SIV 항원, HPV 항원, HCV 항원, HBV 항원, CMV 항원 또는 스타필로코커스 항원을 암호화하는 유전자를 발현한다. 인플루엔자는 돼지 인플루엔자, 계절성 인플루엔자, 조류 인플루엔자, H1N1 인플루엔자 또는 H5N1 인플루엔자일 수 있다.

[0061] 다른 양태들에서, Ad-백터는 인플루엔자 헤마글루티닌, 인플루엔자 핵 단백질, 인플루엔자 M2, 인플루엔자 뉴라미니다제, 과상풍 독소 C 단편, 탄저병 보호 항원, 탄저병 치사 인자, 광견병 당단백질, HBV 표면 항원, HIV gp 120, HW gp 160, 말라리아 CSP, 말라리아 SSP, 말라리아 MSP, 말라리아 pfg, 결핵균 HSP 또는 이의 돌연변이체를 암호화하는 유전자를 발현한다.

[0062] 특정 양태들에서, 동물의 보호 면역 반응은 동물 세포에서 당해의 항원을 암호화하는 유전자를 발현하는 유전자 백터에 의해 유도된다. 다른 특정 양태들에서, 동물 세포는 표피 세포이다. 다른 양태에서, Ad-백터는 예방 백신 또는 치료 백신으로 사용된다. 다른 양태에서, 유전자 백터는 동물 세포에서 당해의 항원을 발현할 수 있는 유전자 백터를 함유할 수 있다.

[0063] 특정 양태에서, Ad-백터는 추가로 공동 자극 유전자 및 사이토킨 유전자로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유전자를 함유할 수 있다. 이때, 유전자는 GM-CSF 유전자, B7-1 유전자, B7-2 유전자, 인터루킨-2 유전자, 인터루킨-12 유전자 및 인터페론 유전자로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0064] 본 발명의 재조합 Ad-백터 및 방법은 다양한 호흡기 병원체의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 이러한 병원체로는 인플루엔자 바이러스, 중증급성호흡기 증후군-관련 코로나바이러스(SARS-CoV), 사람 리노바이러스(rhinovirus)(HRV) 및 호흡기합포체바이러스(RSV)를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0065] 또한, 본 발명의 방법들은 하나 이상의 인플루엔자 균주 및/또는 혼성체에 대한 면역원성 반응을 자극하거나 조절하는 다가 백신 또는 면역원성 조성물을 제공하도록 하나의 재조합 백터에서 함께 전달되거나 또는 별도의 재조합 백터로 전달되는, 본 발명의 Ad-백터 및 방법에 사용되는 하나보다 많은 치료 리간드, 면역원 또는 항원의 용도를 포함한다. 또한, 본 발명의 방법은 별도의 재조합 백터로 전달되거나 또는 하나의 재조합 백터로 함께 전달되는, 본 발명의 백터 및 방법에 사용되는 하나보다 많은 병원체 유래의 치료 리간드, 면역원 또는 항원의 용도를 포함한다.



- [0066] 본 발명의 방법은 예방적 백신접종으로써 질환을 예방하거나 또는 치료적 백신접종으로써 질환을 치료하는데 적당하게 적용될 수 있다.
- [0067] 본 발명은 증강된 보호 면역 반응을 필요로 하는 동물에서 증강된 보호 면역 반응을 유도하기 위한 보강제(Ad-백터 백신 보강제)로써 사용되는, Ad-백터 백신과 폴리뉴클레오타이드 또는 TLR3 작동제의 용도에 관한 것이다. 이때, 폴리뉴클레오타이드는 리보핵산(RNA)의 뉴클레오타이드의 분자 사슬이다. 이 폴리뉴클레오타이드는 세포 또는 바이러스 기원일 수 있고, 또는 합성될 수 있다. 개체/검체/환자/동물에게 투여 시, Ad-백터 백신 보강제는 적어도 4가지의 중요한 기능을 하는 것으로 나타난다. 첫째, 면역 자극 효과가 있고(예컨대, 항원에 대한 중화 항체의 역가를 증가시킴), 둘째, 점막 면역성을 증가시키며(예컨대, 분비성 IgA를 증가시킴), 셋째, 인터페론 감마 생산 세포를 증가시키고(선천 면역)(인터페론은 바이러스 감염 시 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다), 넷째, 체중 손실의 감소로 측정되는 것과 같은 Ad-백터 백신의 안전성을 증가시킨다.
- [0068] 인터페론은 사이토키인으로 알려진 당단백질의 큰 클래스에 속한다. 인터페론은 바이러스, 기생충 및 종양 세포와 같은 외부 인자들에 의한 공격에 대응하여 면역계 세포들에 의해 생산되는 천연 단백질이다. 인터페론은 바이러스 감염의 핵심 지표인자인 이본쇄 RNA의 존재에 대응하여 다양한 세포들에 의해 생산된다. 인터페론은 숙주 세포 내에서 바이러스 복제를 억제하고, 천연 킬러 세포 및 대식세포를 활성화시키며, 림프구에 항원 제시를 증가시키고, 바이러스 감염에 대한 숙주 세포의 내성을 유도하여 면역 반응을 보조한다. 항원이 부합성 T 세포 및 B 세포에 제시될 때, 이 세포들은 복제하고, 감염 인자를 공격하여 분해한다. 이 항원(Ad-백터 백신을 통해)의 투여 24시간 이내에 Ad-백터 백신 보강제의 투여는 인터페론의 생산 유도 외에도 면역 반응을 강화시킨다.
- [0069] 특정 양태에 따르면, 임의의 수의 공지된 바이러스 또는 세균 인자들로부터 추출된 천연 dsRNA 폴리뉴클레오타이드가 사용된다. 그러한 인자들로는 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스, 센다이(Sendai) 바이러스, 이.콜리(E.coli) 등을 포함한다. 추출 방법, 폴리머라제 사슬 반응(PCR)을 이용한 증폭 방법, 및 천연 폴리뉴클레오타이드의 정제 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 또한, 합성 폴리뉴클레오타이드도 사용될 수 있다. 합성 폴리뉴클레오타이드는 폴리이노신산과 폴리시티딜산(폴리-IC), 폴리아데닐산과 폴리우리딜산(폴리-AU), 폴리이노신산 유사체와 폴리시티딜산, 폴리이노신산과 폴리시티딜산 유사체, 폴리이노신산 유사체와 폴리시티딜산 유사체, 폴리아데닐산 유사체와 폴리우리딜산, 폴리아데닐산과 폴리우리딜산 유사체, 및 폴리아데닐산 유사체와 폴리우리딜산 유사체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 이본쇄 핵산이다.
- [0070] 폴리뉴클레오타이드 사슬은 사슬에 다른 염기들을 특정 간격으로 치환시키거나(예컨대, 폴리IC(12)U 또는 폴리IC(12)G), 또는 뉴클레오타이드 사슬에 폴리-L-리신 카르복시메틸셀룰로오스와 같은 추가 화합물을 부착시켜 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 폴리-IC는 폴리-L-리신을 첨가하여 폴리-ICLC라 불리는 새로운 폴리뉴클레오타이드를 형성시킴으로써 안정화될 수 있다.
- [0071] 본 발명 및 이의 장점은 상세하게 설명했지만, 다양한 변화, 치환 및 변경이 후속 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 및 영역 안에서 이루어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0072] 본 발명은 이하 실시예들에서 더 상세히 예시될 것이지만, 이 실시예들은 오로지 예시만을 위한 것으로, 본 발명을 어떠한 식으로 제한하려는 것이 아니다.
- [0073] **실시예**
- [0074] 이하 실시예는 본 발명의 실행을 예시하기 위한 것이다. 따라서, 본 발명의 전 범위를 제한하거나 한정하려는 것이 아니다.
- [0075] **실시예 1**
- [0076] **재료 및 방법**
- [0077] 동물: 6주된 BALB/c 암컷 마우스는 찰스 리버 레보레이토리즈(Charles River Laboratories)에서 입수했다. 이 마우스는 사용 전 72시간 동안 격리했고, 유타주 대학의 실험 동물 연구 센터에서 테크래드 설치류 식이(Teklad Rodent Diet)(Harlan Teklad) 및 수돗물로 유지시켰다.
- [0078] **바이러스:** 인플루엔자 A/Vietnam/1203/2004(H5N1)는 질병관리센터(조지아 애틀란타 소재)에서 입수했다. 바이러스 전파 및 분석은 매딘-다바이(Madin-Darby) 개 신장(MDCK) 세포(미국 모식균 배양수집소, 버지니아 마나사스 소재)에서 수행했다. 모 바이러스는 즉시 전파시켜 항원공격 풀(pool)을 제조했다. 이 항원공격 풀을 그 다음 사용 전에 MDCK 세포에서 적정했다. 세포는 항생제 없이 5% 소 태아 혈청(Hyclone, Logan, UT) 및 0.18% 중탄

산나트륨을 함유하는 MEM에서 5% CO<sub>2</sub> 항온배양기에서 증식시켰다.

[0079] 백신: Ad5-VN1203/04.H5(A/Vietnam/1203/04 H5 헤마글루티닌 유전자를 암호화함) 및 빈 벡터 AdE를 미국 특허 공개번호 2012/0276138(본원에 전문이 참고 인용됨)에 기술된 바와 같이 제조했다. AdVN.H5의 바이러스 역가는  $7 \times 10^9$  감염형성단위(ifu)/ml ( $3.5 \times 10^8$  ifu/0.05ml)였고, AdE는  $2.4 \times 10^9$  ifu/ml( $1.2 \times 10^8$  ifu/0.05ml)였다. 이 백신들은 한번에 50 $\mu$ l 부피로 비내 경로를 통해 투여했다. Hiltonol<sup>®</sup>(합성 dsRNA 폴리-ICLC, Oncovir, Inc.)을 백신 보강제로써 사용했고, 폴리-ICLC의 제법은 미국 특허 7,439,349(본원에 전문이 참고 인용됨)에 기술되어 있다. 보강제는 백신을 투여한 후 30분째 또는 24시간째 10 $\mu$ l 부피로 한번에 비내 경로를 통해 투여했다(실험 설계 참조).

[0080] 실험 설계: 동물 수와 연구 그룹은 표 1과 2에 제시했다. 마우스 그룹은 연구 0일째 비내 경로를 통해 백신접종했다. 위약 그룹은 동일한 경로로 50 $\mu$ l 멸균생리식염수(PSS)를 공급받았다. 추가 대조군으로, 빈 벡터(AdE)를 백신접종한 마우스를 포함시켰다. 인플루엔자 바이러스 공격을 위해, 마우스를 케타민/자일라진(50mg/kg//5mg/kg)을 복강내 주입하여 마취시킨 다음, 마우스당 약 5 플라크 형성 단위( $1 \times LD_{50}$ )인 인플루엔자 A/Vietnam/1203/2004(H5N1) 50 $\mu$ l를 사용하여 비내 공격했다. 연구 28일째에는 모든 마우스에게 바이러스 항원공격이 투여되었다. 항원공격 후 모든 마우스에서는 항원공격 후 21일이 지나서 체중 손실 및 사망률이 관찰되었다.

### 표 1

[0081] 혈청학적 분석 및 사이토킨 분석에 사용된 연구 그룹

번호/ 케이지	그룹 번호	백신 용량(50 $\mu$ l 중의 IFU) (Ad5-VN1203/04.H5)	보강제 (10 $\mu$ l 중의 Hiltonol <sup>®</sup> [ $\mu$ g])	보강제 투여	관찰/시험
5	2	위약(PSS)	-	-	D14에 마우스 2마리 사망 및 D28에 마우스 3마리 사망
5	4	위약(PSS)	50	30분	
13	6	*AdE( $1.2 \times 10^8$ )	-	-	14일째, 폐 세척액, 비장 및 혈청 샘플을 위하여 마 우스 5마리 제거.
13	8	*AdE( $1.2 \times 10^8$ )	50	30분	
13	10	$1.2 \times 10^8$	-	-	
13	12	$1.2 \times 10^8$	5	30분	
13	14	$1.2 \times 10^8$	15	30분	28일째, 폐 세척액, 비장 및 혈청 샘플을 위하여 마 우스 8마리 제거.
13	16	$1.2 \times 10^8$	50	30분	
13	18	$1.2 \times 10^8$	50	24hr	
13	20	$1.2 \times 10^6$	50	30분	
13	22	$1.2 \times 10^7$	50	30분	
13	24	$3.5 \times 10^8$	50	30분	

[0082] \* PSS 중의 빈 벡터.

[0083] 통계적 분석: कैफल-마이어 생존 곡선을 작도하고 Log-순위(Mantel-Cox) 시험으로 비교한 다음, Prism 5.0d(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA)에서 제한-브레슬로-윌콕슨(Gehan-Breslow-Wilcoxon) 시험으로 쌍 비교했다. 평균 체중은 분산분석(ANOVA) 뒤, Prism 5.0d를 이용한 터키 다중 비교로 분석했다. 또한, 혈청학적 분석 결과(HAI, IgA 및 아데노바이러스 중화) 및 ELISpot 분석은 분산분석(ANOVA) 후 Prism 5.0d를 이용한 터키 다중 비교 시험으로 분석했다.

[0084] 혈구응집억제(HAI) 시험: 혈청 샘플은 96웰 둥근바닥 마이크로역가 판(Fisher Scientific, Pittsburg, PA)에서 PBS로 희석했다. 혈청을 희석한 후, 8 HA 단위/웰의 인플루엔자 A/Vietnam/1203/2004 $\times$ Ann Arbor/6/60 혼성 바이러스(Vietnam H5 및 N1 표면 단백질 및 Ann Arbor 코어) 및 닭 적혈구 세포(Lampire Biological Laboratories, Pipersville, PA)를 첨가하고(각각 50 $\mu$ l/웰), 순간 혼합하고, 실온에서 60분 동안



항온배양했다. 혈청 샘플의 HAI 역가는 혈구응집이 완전히 억제되는 최고 혈청 희석율의 역수로 기록한다.

표 2

[0085]

번호/ 케이지	그룹 번호	감염 Y 또는 N	백신 용량 (50 $\mu$ l 중의 IFU) (Ad5-VN1203/04.H5)	보강제 (10 $\mu$ l 중의 Hiltonol <sup>®</sup> [ $\mu$ g])	보강제 투여	관찰/시험
10	1	Y	위약(PSS)	-	-	항원공격 21일 후 체 중 손실 및 사망률 관 찰됨
10	3	Y	위약(PSS)	50	30분	
10	5	Y	*AdE(1.2 $\times$ 10 <sup>8</sup> )	-	-	
10	7	Y	*AdE(1.2 $\times$ 10 <sup>8</sup> )	50	30분	
10	9	Y	1.2 $\times$ 10 <sup>8</sup>	-	-	
10	11	Y	1.2 $\times$ 10 <sup>8</sup>	5	30분	
10	13	Y	1.2 $\times$ 10 <sup>8</sup>	15	30분	
10	15	Y	1.2 $\times$ 10 <sup>8</sup>	50	30분	
10	17	Y	1.2 $\times$ 10 <sup>8</sup>	50	24hr	
10	19	Y	1.2 $\times$ 10 <sup>6</sup>	50	30분	
10	21	Y	1.2 $\times$ 10 <sup>7</sup>	50	30분	
10	23	Y	3.5 $\times$ 10 <sup>8</sup>	50	30분	
10	25	Y	리바비린(75mg/kg)	bid $\times$ 5일, 12시간 간격, 항원공 격후 4시간째 시작		
10	27**	Y	3.5 $\times$ 10 <sup>8</sup>	50	항원공격 3일 전	
5	26	N	정상 대조군에서는 체중 증가가 관찰됨			

[0086]

\* PSS 중의 빈 백터.

[0087]

IgA ELISA: 마우스의 폐 세척 샘플에 존재하는 총 IgA 수준은 마우스 IgA 효소 면역분석(EIA) 키트(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 측정했다. 간략히 설명하면, 마이크로역가 판(Nunc MaxiSorp C; Fisher Scientific, Pittsburg, PA)에 결합된 염소 항마우스 IgA를 사용하여 실온에서 1h 동안 세척액 샘플로부터 항체를 포획하고, 그 다음 양고추냉이 퍼옥시다제에 결합된 염소 항마우스 IgA를 결합된 항체를 검출하는데 사용했다. 항체 농도는 IgA 항체에 대해 보정된, 수집된 마우스 혈청(Bethyl Laboratories)을 사용하여 작도한 표준 곡선으로부터 관독했다.

[0088]

IFN- $\gamma$  및 IL-4의 ELISpot 분석: 마우스 IFN- $\gamma$  및 IL-4를 위한 ELISpot 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN)는 제조업자의 지시에 따라 사용했다. 간략히 설명하면, 폐 세척 샘플을 0.2mM Pefabloc SC Plus(Hyclone, Logan, UT)를 함유하는 1.0ml 멸균 PBS를 사용하여 수거했다. 폐 세척 샘플 유래의 세포를 96웰 세포 배양판에 2% FBS를 보유한 RPMI-1640 100 $\mu$ l에 현탁된  $1.0 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 첨가했다. 인플루엔자 A/California/04/2009는 약 1000 CCID<sub>50</sub>/ml로 희석하고, 각 평판에 100 $\mu$ l씩 첨가하여 사이토킨의 생산을 자극하도록 100 CCID<sub>50</sub>/웰을 달성했다. 평판을 37 $^{\circ}$ C에서 약 24시간 동안 항온배양했다. 세척 후, 검출 항체 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가했고, 28 $^{\circ}$ C에서 밤새 항온배양했다. 세척 후, Streptavidin-AP 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 항온배양했다. 항온배양 후, 발색제 BCIP/NBT 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온배양했다. 항온배양 후, 발색제 용액을 제거하고, 평판을 탈이온수로 세척했다. 평판 바닥은 종이 타월로 공기 건조하고, 사이토킨을 능동적으로 생산하는 세포를 나타내는 반점을 해부현미경으로 육안으로 계수했다.

[0089]

항-Ad5 중화 항체 분석: HEK-293 세포는 사용하기 24시간 전에 10% FBS를 함유하는 RPMI(Hyclone, Logan, UT)에서 웰당  $1 \times 10^4$  세포로 96웰 평판에 접종했다. 다음 날, 각 혈청 샘플의 2배 연속 희석물을 1:10 희석율로부터 1:1280의 희석율까지 무혈청 배지로 제조했다. 각 혈청 희석물을  $1 \times 10^4$  CCID<sub>50</sub>/ml의 야생형 아데노바이러스

타입 5(미국 모식균배양수집소(ATCC), Manassa, VA)를 함유하는 무혈청 배지와 1:1(0.1ml)로 혼합했다. 실온에서 1h 동안 항온배양 후, 혈청-Ad5 혼합물(0.2ml)을 293 세포 함유 웰로 전달하고 2h 동안 항온배양했다. 항온배양 후, 혈청-Ad5 혼합물을 제거하고, 0.5% FBS 및 젠타마이신을 함유하는 RPMI 0.1ml로 교체한 뒤, 3일 동안 항온배양했다. 항-Ad 중화 항체는 세포변성 효과(CPE) 억제로 측정했다. CPE는 감염후 3일째 293 세포 단층을 광학현미경으로 조사하여 이반복 샘플로부터 기록했다.

[0090] 백신접종 후 면역 반응의 평가는 혈구응집 억제 분석에 의한 혈청 항체 수준 및 폐 세척액 중의 분비성 IgA(sIgA) 수준의 측정을 포함했다. 도 3 내지 6 참조. 세포 면역성은 ELISpot 분석으로 IFN- $\gamma$  및 IL-4를 방출하는 폐 세척액 중의 세포를 정량분석하여 평가했다. 도 7 내지 10 참조.

[0091] 이 연구는 마우스에서 고 병원성 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 조류 인플루엔자 바이러스로 항원공격 감염에 대하여 Ad5-백터화된 인플루엔자 바이러스 HA 백신(Ad5-VN1203/04.H5)의 면역원성을 증가시키는 보강제로 사용되는 합성 dsRNA 폴리-ICLC(Hiltonol<sup>®</sup>)의 용도를 기술한다. 여러 용량의 폴리-ICLC를 투여하기 30분 전 또는 24시간 전에 투여한 AdVN.H5 백신들의 비교에서,  $10^8$  용량의 Ad-VN.H5를 투여받은 모든 처리군은 폴리-ICLC의 농도에 상관없이 항원공격 감염으로부터 100% 보호를 제공했다. 또한,  $15\mu\text{g}$  폴리-ICLC를 투여하기 30분 전에 투여한 총 4가지 용량의 AdVN.H5( $1.2 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^7$ ,  $1.2 \times 10^8$ , 또는  $3.5 \times 10^8$  ifu/ $50\mu\text{l}$ ) 백신은 항원공격 감염으로부터 100% 보호를 제공했다. 또한, AdE도 약간의 사망률이 관찰되었지만 유의적인 보호를 나타냈다. 빈 AdE 백터에 의해 제공된 보호는 놀라운 것이었고, 이 특이적인 Ad5 백터의 작용 기전이 하나보다 많다는 것을 암시한다.  $10^8$  용량의 Ad-VN.H5를 투여받은 모든 처리 그룹은 폴리-ICLC의 농도에 상관없이 유의적인 체중 손실로부터 마우스를 보호했다. 하지만,  $5\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC가 최고의 보호효과를 나타냈다. 4가지 용량의 AdVN.H5 백신을 비교할 때에는,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 배합된  $10^6$  용량의 AdVN.H5가 체중 손실로부터 최고의 보호를 보여 주었다. 따라서, 생존률과 체중 손실 데이터는  $10^8$  용량의 AdVN.H5가 폴리-ICLC 농도에 상관없이 보호적이라는 것을 시사한다. 하지만, 이보다 훨씬 낮은 용량의 백신도 보강제와 배합된다면 더욱 안전하고 동등한 보호성으로 투여될 수 있다.

[0092] 백신접종 후 면역 반응의 평가는 혈구응집억제 분석에 의한 혈청 항체 수준 및 폐 세척액 중의 분비성 IgA(sIgA) 수준의 측정을 포함했다. 세포 면역성은 폐 세척액 중의 IFN- $\gamma$  및 IL-4를 방출하는 세포를 ELISpot 분석으로 정량분석하여 평가했다. 아데노바이러스-특이적 면역성은 백신접종된 마우스 유래의 혈청을 이용하여 아데노바이러스 중화로 평가했다.

[0093] 백신접종 후 14일 및 28일째 면역학적 반응은 다음과 같이 정리된다:

[0094]  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 모든 그룹은 백신접종후 14일째 폐 세척 샘플에서 유의적인 수준의 sIgA를 유도했다. 하지만,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC는  $10^8$  용량의 AdVN.H5 단독보다 높은 sIgA 역가를 초래했다. 백신접종 후 28일째,  $10^8$  용량의 AdVN.H5 및 백터 후 30분째 또는 24시간째 투여된 폴리-ICLC  $15\mu\text{g}$ 은  $10^8$  용량의 AdVN.H5 단독보다 높은 sIgA 역가를 초래했다.

[0095] 백신접종 후 14일째,  $15\mu\text{g}$  용량의 폴리-ICLC와 함께  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 그룹만이 폐 세척액에서 분리 및 배양된 IFN- $\gamma$  생산 세포의 수를 유의적으로 증가시켰다. 하지만, 28일까지는  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 모든 그룹은 IFN- $\gamma$  생산 세포의 유의적인 수준을 나타냈다. 따라서, 폴리ICLC의 유입은 면역 반응물을 증가시켰다.

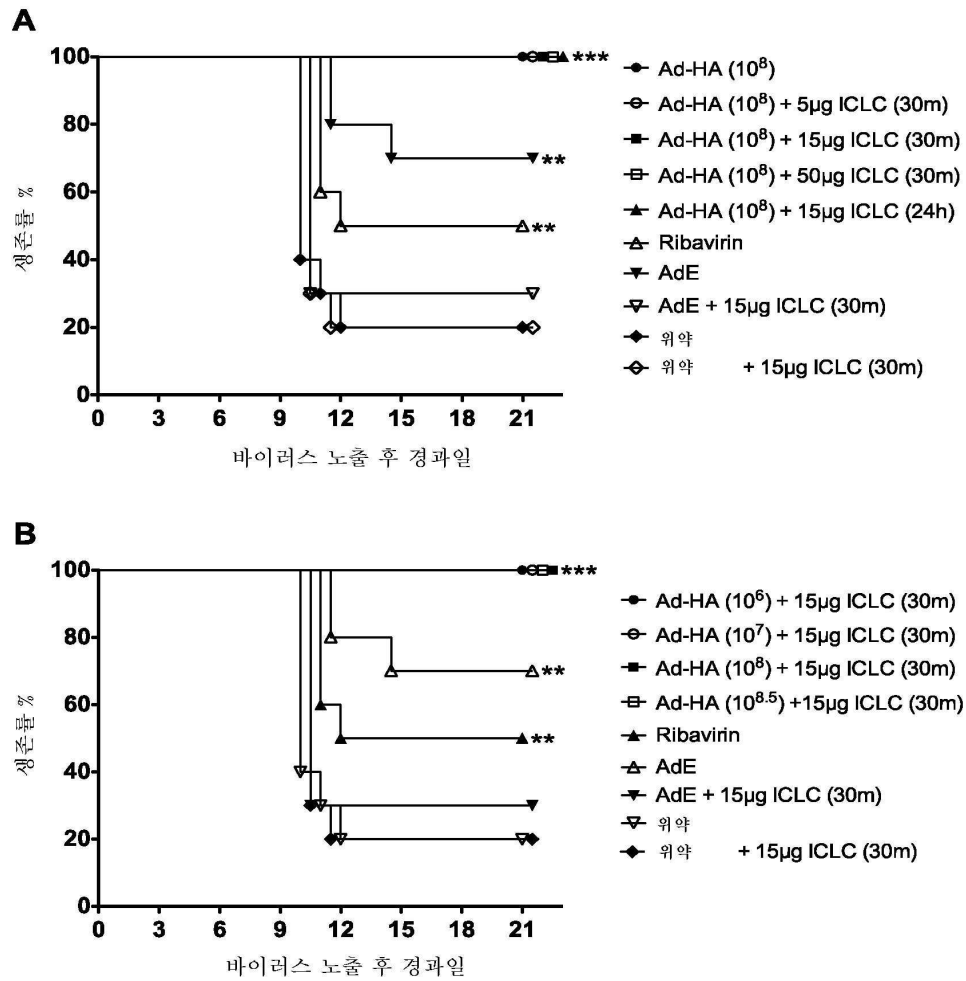
[0096] 14일째, 폴리-ICLC  $15\mu\text{g}$  용량과 함께  $10^8$  용량의 AdVN.H5를 투여받은 처리 그룹만이 IL-4 생산 세포수를 유의적으로 증가시켰다. 백신접종 후 28일째, 모든 처리 그룹은 IL-4 생산 세포 수의 증가를 나타냈다. 따라서, 폴리ICLC의 유입은 면역반응물을 증가시켰다.

[0097] 이상, 본 발명의 바람직한 양태들을 상세하게 설명했지만, 상기 문단들에 의해 정의된 본 발명은 본 발명의 취지 또는 범위 안에서 많은 분명한 변형이 가능한바, 상기 명세서에 제시된 특별한 구체예들에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

# 도면

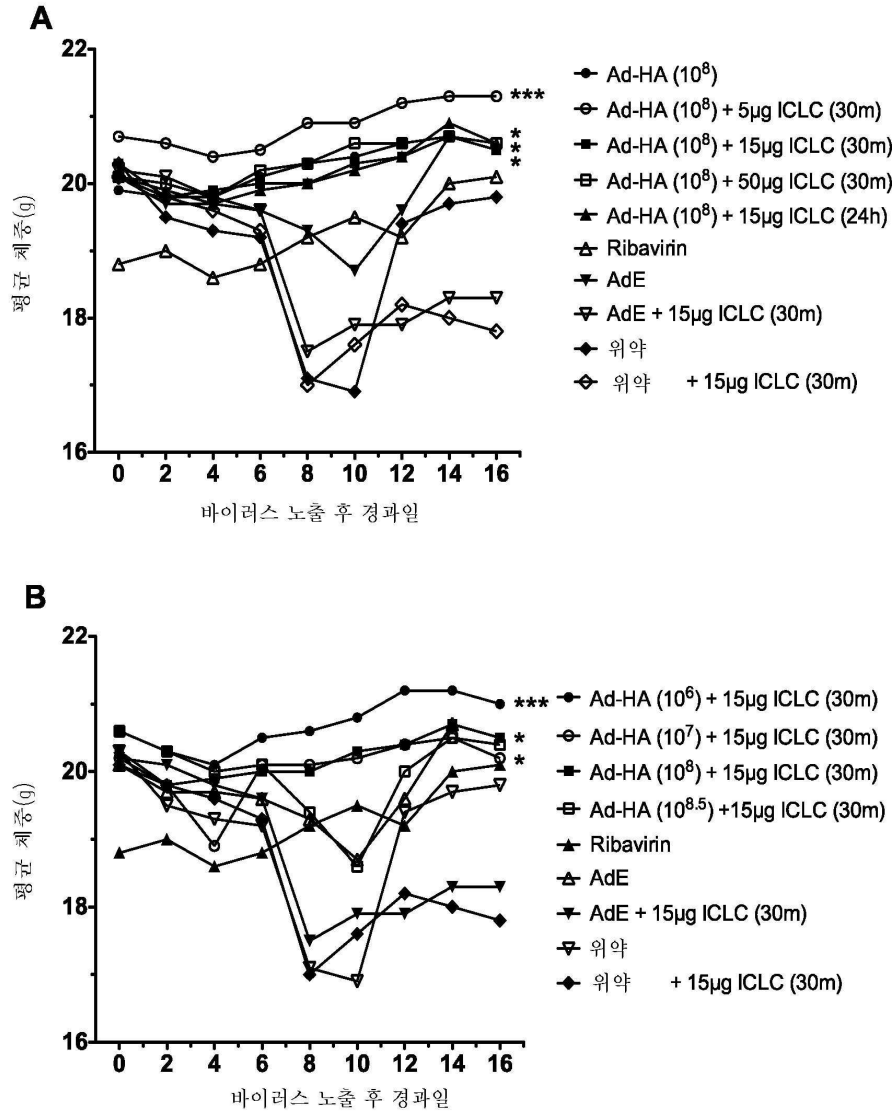
## 도면1

AdVN.H5로 백신접종 및 인플루엔자 A/Vietnam/1203/04 바이러스로 항원공격 후  
마우스 생존률



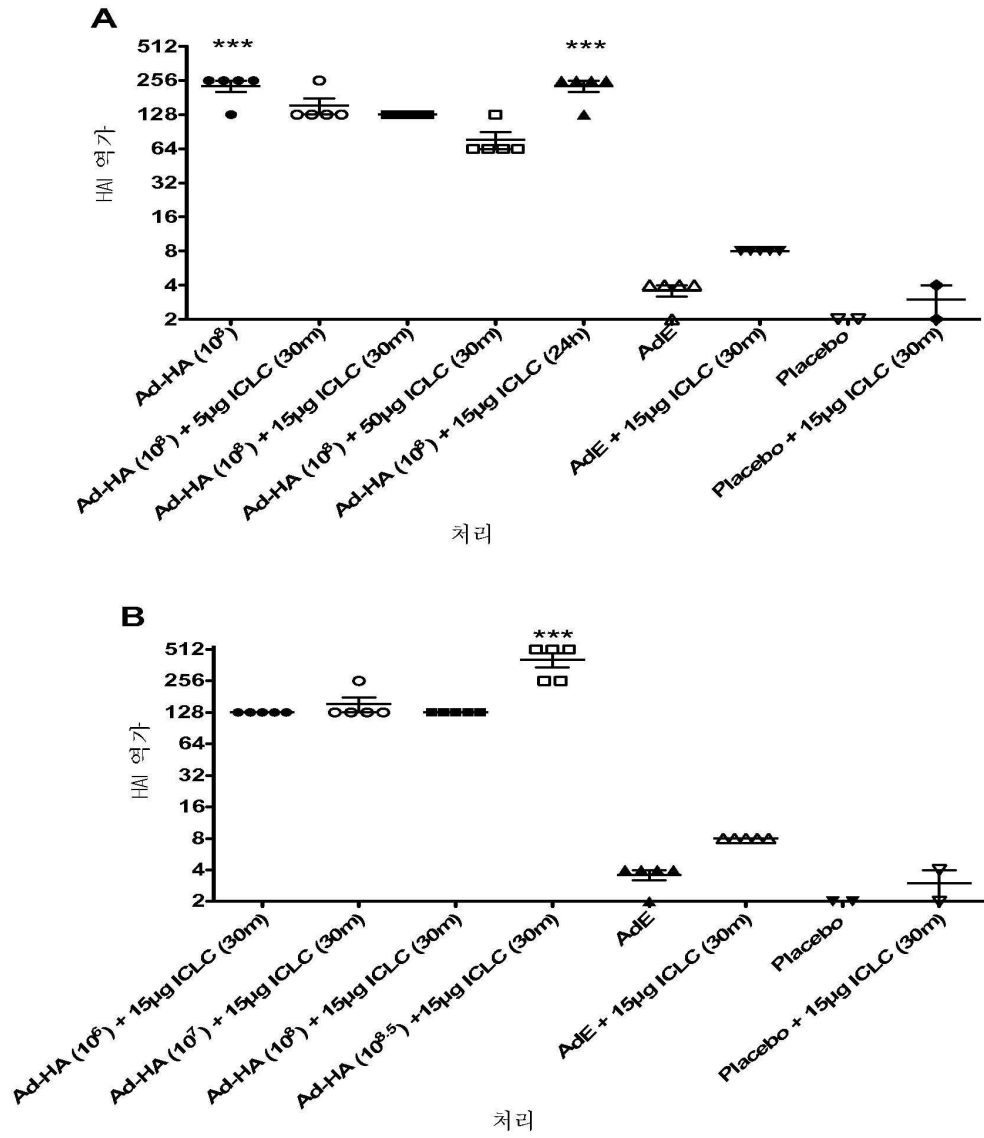
도면2

AdVN.H5로 백신접종 및 인플루엔자 A/Vietnam/1203/04 바이러스로 항원공격 후  
마우스의 평균 체중



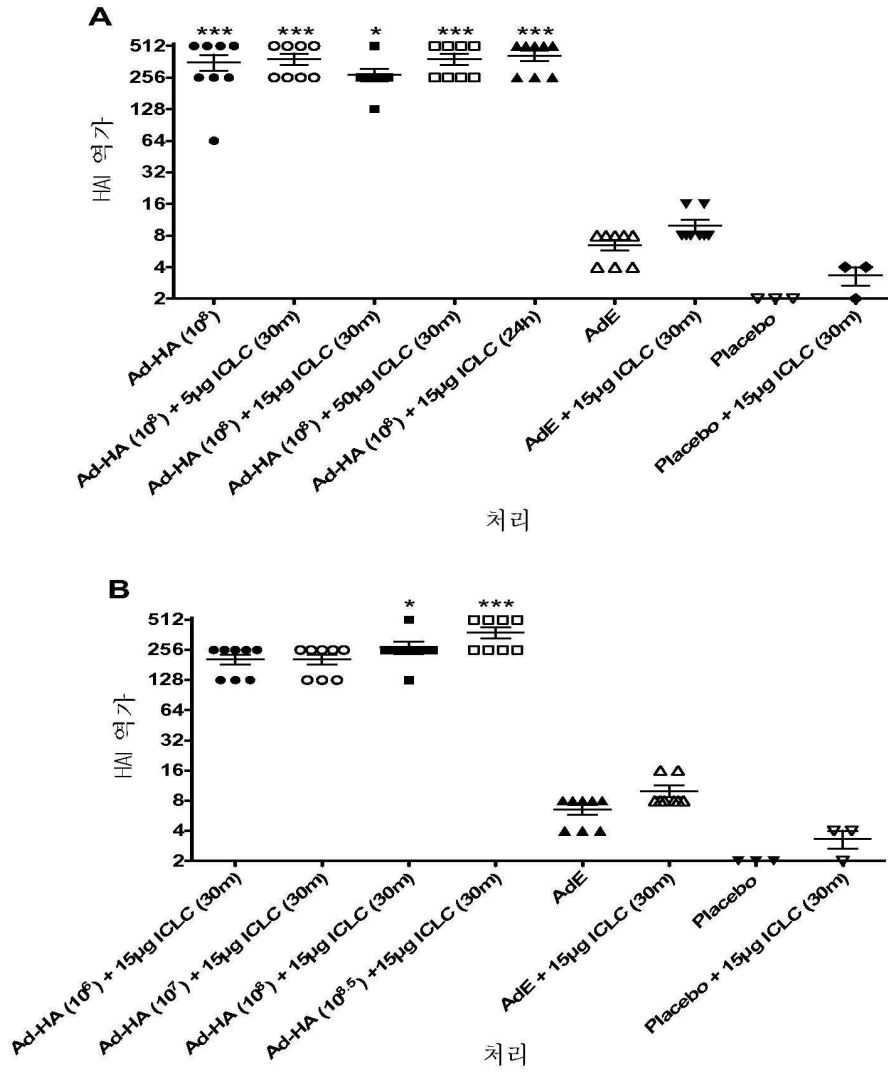
도면3

AdVN.H5로 백신접종 후 14일째 마우스 혈청에 존재하는 혈구응집억제(HAI) 역가



도면4

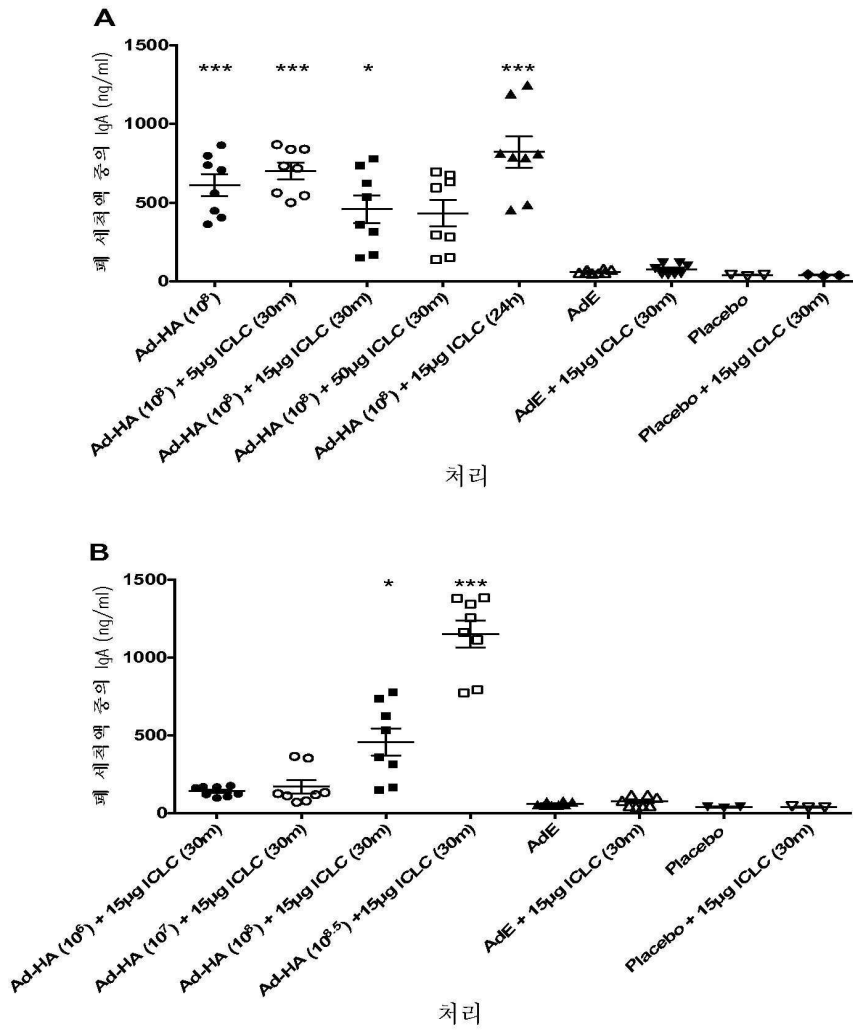
AdVN.H5로 백신접종 후 28일째 마우스 혈청에 존재하는 혈구응집 억제(HAI) 역가





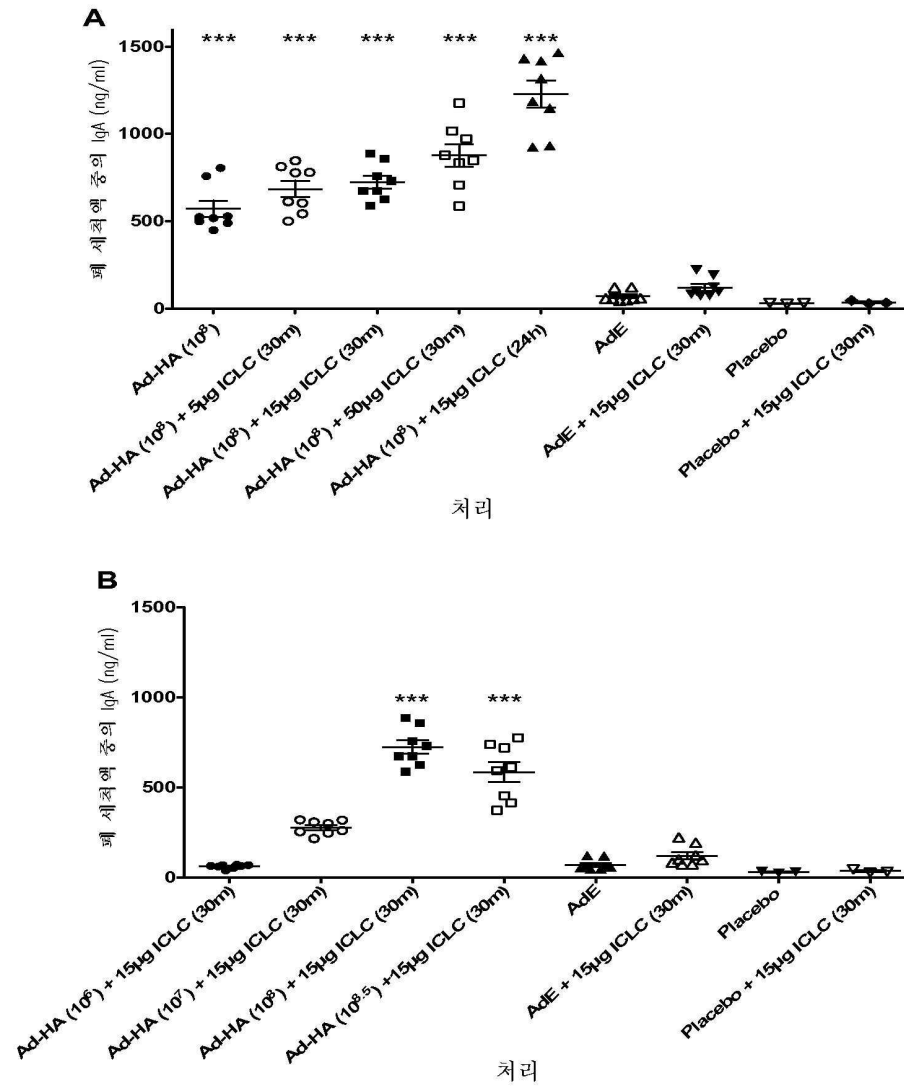
도면5

AdVN.H5로 백신접종 후 14일째 마우스의 폐 세척액에 존재하는 분비성 IgA



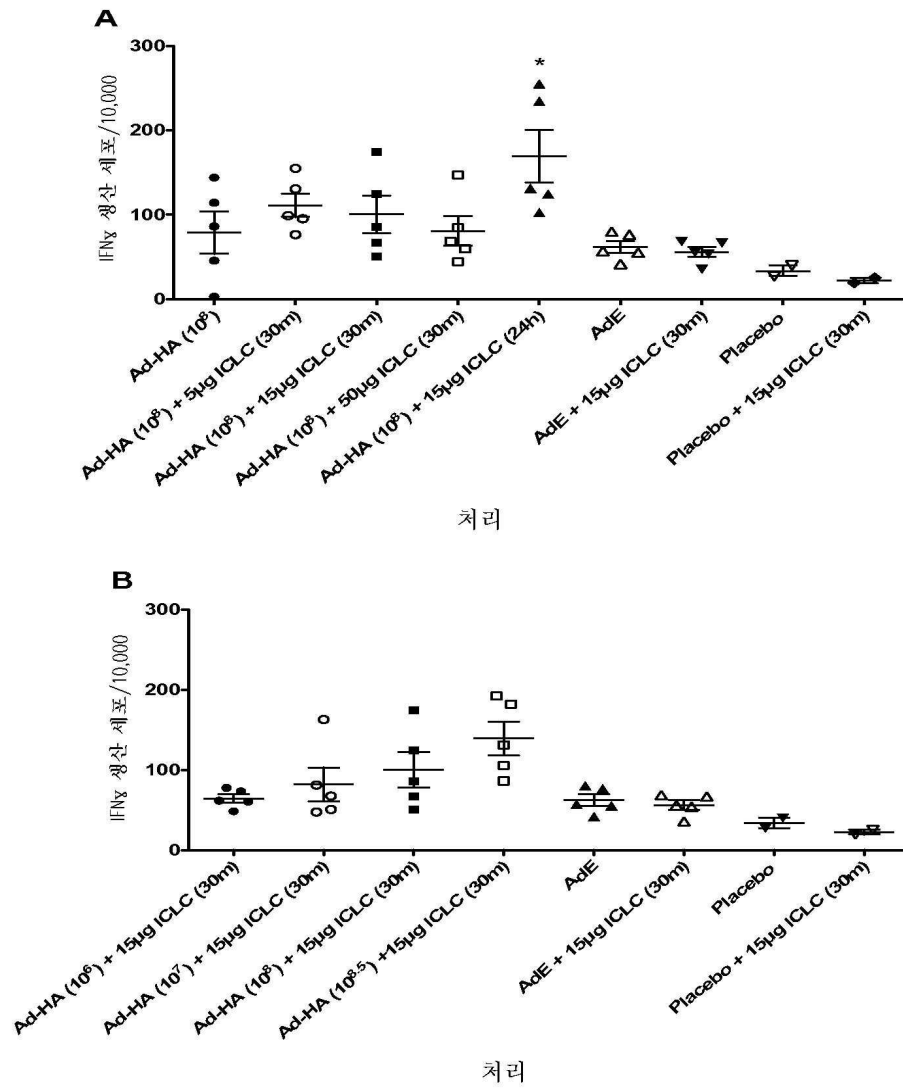
도면6

AdVN.H5로 백신접종 후 28일째 마우스의 폐 세척액에 존재하는 분비성 IgA



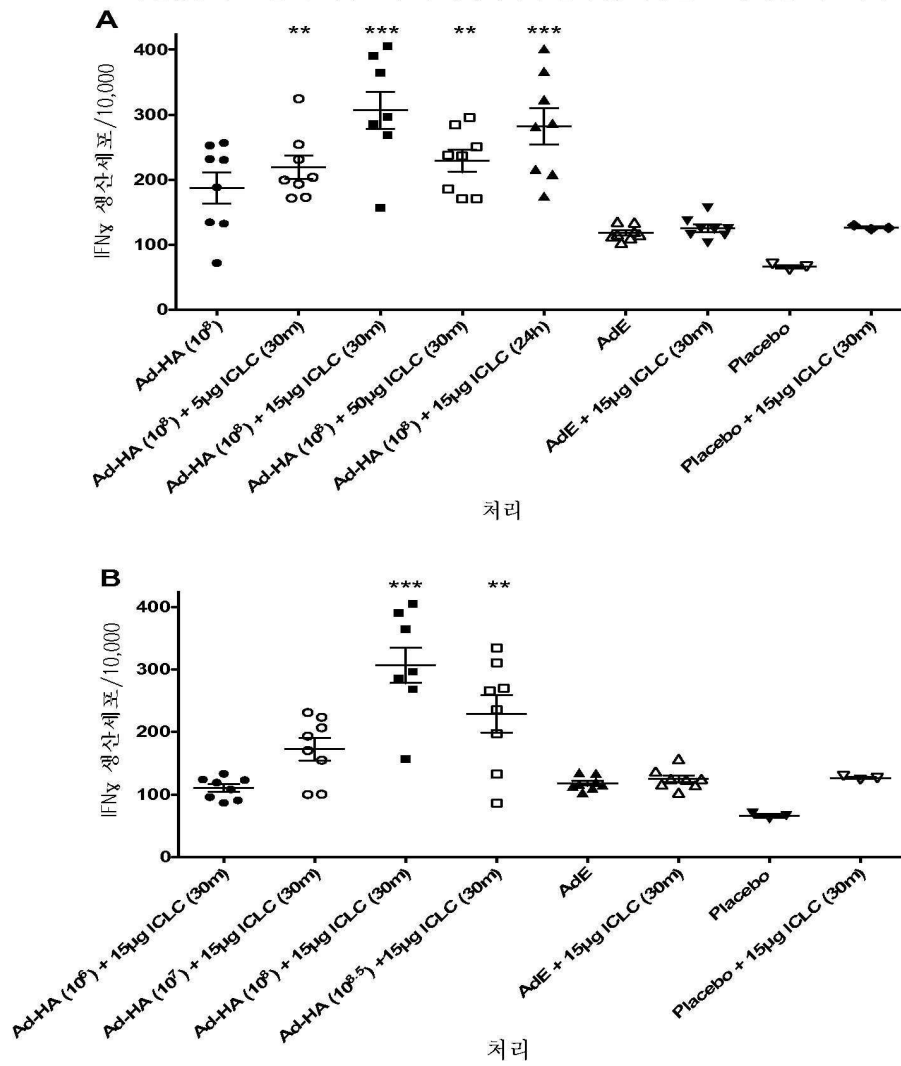
도면7

AdVN.H5로 백신접종 후 14일 쯤 마우스의 폐 세척액에서 분리 및 배양된 IFN- $\gamma$  생산 세포의 수



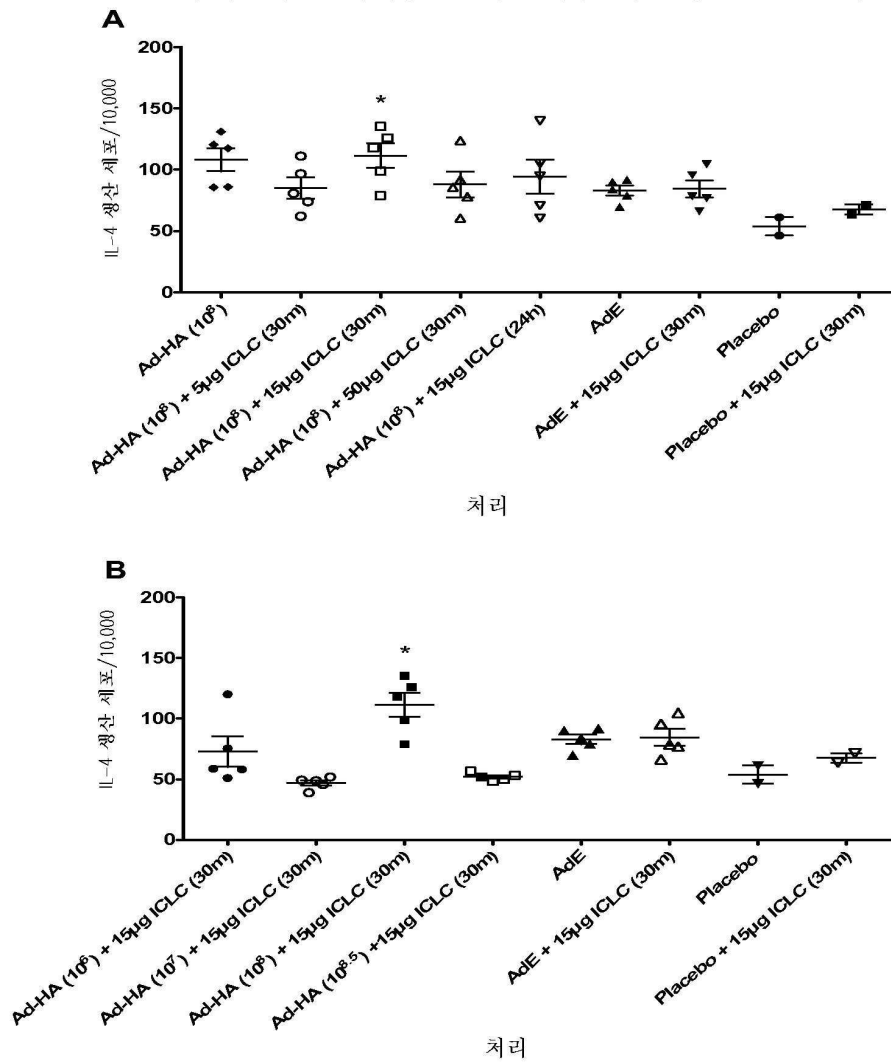
도면8

AdVN.H5로 백신접종 후 28일 제 마우스의 폐 세척액에서 분리 및 배양된 IFN- $\gamma$  생산 세포의 수



도면9

AdVN.H5로 백신접종 후 14일째 마우스 폐 세척액에서 분리 및 배양된 IL-4 생산세포 수



도면10

AdVN.H5로 백신접종 후 28일째 마우스 폐 세척액에서 분리 및 배양된 IL-4 생산세포 수

