

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 8월 30일 (30.08.2012)



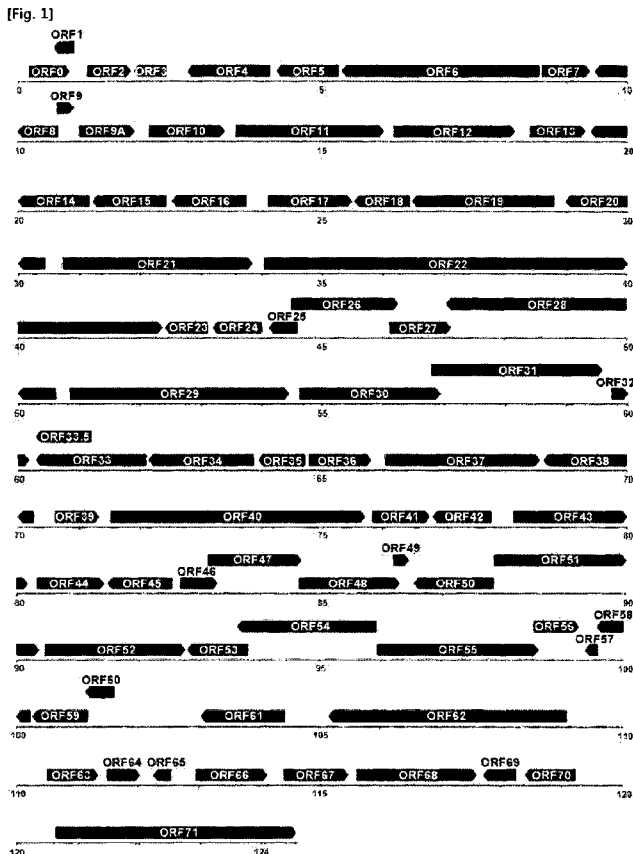
(10) 국제공개번호
WO 2012/115474 A2

- (51) 국제특허분류: C12N 15/33 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/25 (2006.01)
C07K 14/04 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001408
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 24일 (24.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 61/446,284 2011년 2월 24일 (24.02.2011) US
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **재단법인 목암생명공학연구소 (MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보정동 341, 446-799 Kyunggi-Do (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김근희 (KIM, Geun Hee)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보정동 341, 446-799 Kyunggi-Do (KR). **권시내 (KWON, Shi Nae)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보정동 341, 446-799 Kyunggi-Do (KR). **이찬희 (LEE, Chan Hee)** [KR/KR]; 충청북도 청주시 흥덕구 개신동 10 삼익아파트 107동 503호, 361-804 Chungbuk (KR). **윤엽 (YOON, Yeop)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보정동 341, 446-799 Kyunggi-Do (KR).
- (74) 대리인: **권오식 (KWON, Oh-Sig)** 등; 대전광역시 서구 둔산동 921 주은리더스텔 4층, 302-120 Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL VARICELLA-ZOSTER VIRUS STRAINS, AND CHICKEN POX AND HERPES ZOSTER VIRUS VACCINE USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 신규한 수두 대상포진 바이러스주 및 이를 이용한 수두 및 대상포진 바이러스 백신



(57) Abstract: The present invention relates to novel varicella-zoster virus strains and to a chicken pox and herpes zoster virus vaccine using same. More particularly, the present invention relates to genome DNA of VZV MVA06 (isolated from a Korean patient, to an open reading frame (ORF) thereof, to a protein coded by the genome DNA of VZV MVA06 and the ORF thereof, and to a vaccine composition which contains the protein as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 수두 대상포진 바이러스주 및 이를 이용한 수두 및 대상포진 바이러스 백신에 관한 것으로, 보다 상세하게는 한국인 환자로부터 분리된 VZV MVA06의 게놈 DNA 및 이의 오픈 리딩 프레임(open reading frame, 이하 'ORF'라 한다), 상기 VZV MVA06의 게놈 DNA 및 이의 ORF에 의해 코딩되는 단백질 및 상기 단백질을 유효성분으로 하는 백신 조성물에 관한 것이다.

WO 2012/115474 A2



MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 수두 대상포진 바이러스주 및 이를 이용한 수두 및 대상포진 바이러스 백신

기술분야

- [1] 본 발명은 신규 수두 대상포진 바이러스주 및 이를 이용한 수두 및 대상포진 바이러스 백신에 관한 것으로, 보다 상세하게는 한국인 환자로부터 분리하여 약독화한 VZV MAV06의 게놈 DNA 및 이의 오픈 리딩 프레임(open reading frame, 이하 ‘ORF’라 한다), 상기 VZV MAV06의 게놈 DNA 및 이의 ORF에 의해 코딩되는 단백질 및 상기 단백질을 유효성분으로 하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 수두 대상포진 바이러스주(Varicella Zoster virus, 이하 ‘VZV’라 한다)는 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)의 바이러스에 속하는 바이러스이고, 2가지 다른 증상을 나타내는 질환(수두 및 대상포진)의 원인이다.
- [3] 임상 검체로부터 분리된 수두 대상포진 바이러스주(Davison, A.J. and Scott, J. E, 1986)로서 Dumas 주(Dumas strain)는 최초로 완벽한 뉴클레오티드가 보고된 바 있다. 또한, 현재까지 parent Oka주, Oka 주 유래의 3개의 백신 바이러스주(약독화 vOKa주, 마리박스OKa주, 마릴릭스OKa주)를 포함하여, 총 23개의 수두 대상포진 바이러스주에 대한 완벽한 전체 뉴클레오티드가 NCBI Genbank 데이터베이스에 보고된 바 있다.
- [4] 현재는 백신 바이러스주와 임상 바이러스주의 전체 뉴클레오티드의 비교분석은 백신 주의 약독화를 위한 특정부위에 대한 연구를 가능하게 하였다(Argaw et al., 2000; Gomietal., 2002; Tillieuxetal., 2008; Yamanish,2008).
- [5] 한편, 녹색십자(Green Cross Crop.)에서는 1994년부터 수두에 대한 약독화 백신으로 주로 “SuduVax”을 생산하고 있다. 상기 SuduVax 생산에 사용되는 MAV06 바이러스주는 1989년 수두에 감염된 33개월 한국계 환자의 수포로부터 수두 바이러스를 분리하고, 인간 배아 폐세포에 초대배양하였으며, 여러 가지 수두 바이러스 특성 시험을 통하여 신규한 수두 대상포진 바이러스임을 확인하였다(Park et al., Propagation of Varicella-Zoster Virus isolated in Korea, J Kor Soc Virol 21, 1-9, 1991).
- [6] 상기 SuduVax는 1994년 이후 한국시장에서 상품화되었으며, 1998년부터 해외시장으로 확대되어 이용되고 있다. 그러나 SuduVax의 그 효능 및 안정성이 시장에서 입증되고는 있지만, 이에 대한 백신의 효능 및 약독화에 대한 메커니즘을 설명할 수 있는 분자생물학적 특성은 아직 보고된 바 없다.
- [7] 상기 분자생물학적 특성은 약독화 백신의 유효성, 안전성 및 동질성을 보장하고 보증하기 위한 품질관리 및 품질보증의 정확도를 증가시키기 위해

매우 중요하며, 이는 시급히 해결되어야 할 문제점이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 한국인 환자로부터 분리된 신규한 VZV MAV06의 게놈 서열을 밝혀내고, 이에 대한 ORF 분석 및 계통발생학적 분석을 포함한 분자생물학적 분석을 수행하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [9] 본 발명의 목적은 VZV MAV06의 게놈 DNA를 제공하기 위한 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF를 제공하기 위한 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF에 의해 코딩되는 단백질을 제공하기 위한 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 VZV MAV06의 게놈 DNA 또는 이의 ORF를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공하기 위한 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 VZV MAV06의 게놈 DNA 또는 이의 ORF를 포함하는 형질전환체를 제공하기 위한 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 VZV MAV06의 게놈 DNA 또는 이의 ORF에 의해 코딩되는 VZV MAV06의 단백질 제조방법을 제공하기 위한 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 VZV MAV06의 단백질을 유효성분으로 하는 백신 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

- [16] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 VZV MAV06의 게놈 DNA 및 이의 ORF를 제공한다.
- [17] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [18] 본 명세서에 사용된 용어 ‘오픈 리딩 프레임’ 또는 ORF는 아미노산 서열로 번역되는 DNA 염기서열로서, 번역개시 코돈(예: ATG)에서 종결 코돈(예: TGA, TAA, TAG)에 이르는 염기서열을 가리키는 것이다.
- [19] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 수두 대상포진 바이러스(Varicella-zoster virus, VZV) MAV06 게놈 DNA를 제공한다.
- [20] 본 발명은 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF를 제공한다. 보다 상세하게는 상기 ORF는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 ORF0, 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 ORF17, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 ORF29, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 ORF56, 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 ORF60으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [21] 본 발명은 상기 VZV MAV06 게놈 DNA, 이의 오픈 리딩 프레임에 의해 코딩되는 단백질을 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 VZV MAV06 게놈 DNA, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는

ORF0, 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 ORF17, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 ORF29, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 ORF56, 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 ORF60으로부터 선택되는 오픈 리딩 프레임에 의해 코딩되는 단백질을 제공한다.

- [22] 본 발명은 상기 VZV MAV06 게놈 DNA, 이의 오픈 리딩 프레임을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 VZV MAV06 게놈 DNA, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 ORF0, 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 ORF17, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 ORF29, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 ORF56, 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 ORF60으로부터 선택되는 오픈 리딩 프레임을 포함하는, 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [23] 본 발명에서 “재조합 벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명에서 “작동가능하게 연결된(operably linked)”는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 수행할 수 있다
- [24] 본 발명에서 사용될 수 있는 적합한 발현 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서(enhancer) 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 번역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 원핵 세포에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터가 있으나 이로 제한되지는 않는다. 진핵세포에는 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들면 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스 사코마 바이러스(RSV)프로모터 뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터가 있으나 이것으로 제한되지는 않는다. 상기 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제 (selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포만

생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터는 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다.

- [25] 본 발명에 따른 서열번호 1의 내지 6에서 선택되는 어느 하나에 염기서열에 의해 코딩되는 VZV MAV06의 단백질을 발현시키기 위해, 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열 등이 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC 벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 대장균(*Escherichia coli*)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10과 λ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2°C 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.
- [26] 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 삽입되어 형질전환체를 형성하는데, 적합한 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 슈조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다.
- [27] 또한 상기 숙주세포는 바람직하게는 식물, 포유동물로부터 유래할 수 있는데, 원숭이 신장 세포7(COS7 : monkey kidney cells) 세포, NSO 세포, SP2/0, 차이니즈 햄스터 난소(CHO : chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK : baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등이 이용가능하며, 이에 한정되지 않는다. 특히 바람직하게는 CHO 세포이다.
- [28] 본 발명에서 숙주세포로의 “형질 전환”은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는

전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

- [29] 제조합 벡터가 발현되는 형질전환된 숙주세포를 영양배지에서 배양함으로써 본 발명에 따른 서열번호 1의 내지 6에서 선택되는 어느 하나에 염기서열에 의해 코딩되는 VZV MAV06의 단백질을 대량으로 생산할 수 있으며, 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적당히 선택 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다. 상기와 같이 제조합적으로 생산된 서열번호 1의 내지 6에서 선택되는 어느 하나에 염기서열에 의해 코딩되는 VZV MAV06의 단백질은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리, 정제가 가능하다(Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deucher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)). 이에 는 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등), 등전점 포커싱 및 이의 다양한 변화 및 복합 방법 등이 이용가능하지만 이에 한정되지 않는다.

- [30] 본 발명은 서열번호 1의 내지 6에서 선택되는 어느 하나에 염기서열에 의해 코딩되는 VZV MAV06의 단백질을 유효성분으로 하는 백신 조성물을 제공한다. 이때 상기 백신 조성물에는 약학적으로 허용가능한 면역보조제(adjuvant) 또는 부형제가 추가적으로 포함될 수 있다. 면역보조제로는 체내에 주입시 항체 형성을 증진시키는 역할을 하여 본 발명에서의 목적 달성이 가능한 것이라면 어떤 것이라도 사용가능하며, 특히 알루미늄염($\text{Al}(\text{OH})_3$, ALPO_4), 스쿠알렌(squalene), 소르비탄 (sorbitane), 폴리소르베이트 80(polysorbate 80), CpG, 리포솜, 콜레스테롤, MPL(monophosphoryl lipid A) 및 GLA(glucopyranosyl lipid A)에서 선택된 하나 이상이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [31] 본 발명은 한국인 환자로부터 분리된 수두 대상포진 바이러스(Varicella-zoster virus, VZV) MAV06의 전체 게놈을 서열분석 하였고, 상기 VZV MAV06의 전체 서열과 23개의 VZV 바이러스주와의 염기서열의 비교를 통하여 반복 시퀀스 및 복제 개시점의 변형에 기인한 중간에 대한 게놈 길이의 다형성을 확인할 수 있었다. 또한, VZV MAV06 바이러스의 전체 서열은 나아가 생물정보학적 연구 및 비교 유전체 연구 등을 통해 약독화된 VZV 백신 바이러스주의 분자 특성을 이해하는데 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 본 발명에 따른 VZV MAV06(이하, 도면에서는 ‘SuduVax’라 표시한다.)의 ORF 지도를 보여주는 것이고,
- [33] 도 2는 전체 뉴클레오티드 서열에 기초한 24개의 VZV 바이러스주들의 계통수를 보여주는 것이며,
- [34] 도 3은 비코딩(non-coding) 뉴클레오티드 서열에 기초한 24개의 VZV 바이러스주들의 계통수를 보여주는 것이고,
- [35] 도 4는 백신 바이러스주들과 임상 바이러스주들 사이의 12개 ORF 구분을 기초한 백신 바이러스주들의 특징적인 계통수를 보여주는 것이며,
- [36] 도 5는 VZV 바이러스주들의 게놈 길이와 반복서열 사이의 상관 관계를 보여주는 것이고,
- [37] 도 6은 본 발명에 따른 VZV MAV06의 ORF0와 Oka 백신 바이러스주들 사이의 돌연변이를 보여주는 것이며,
- [38] 도 7은 본 발명에 따른 VZV MAV06의 ORF17에서 3 bp의 결실부위를 보여주는 것이고,
- [39] 도 8은 본 발명에 따른 VZV MAV06의 ORF56에서 3 bp의 결실부위를 보여주는 것이고,
- [40] 도 9는 본 발명에 따른 VZV MAV06의 ORF29에서 15 bp의 결실부위를 보여주는 것이고,
- [41] 도 10은 본 발명에 따른 VZV MAV06의 ORF60에서 3 bp의 삽입부위를 보여주는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [42] 이하 본 발명을 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [43] [실시예 1] 바이러스 및 DNA 시퀀싱
- [44] MAV06 바이러스주는 1989년 수두에 감염된 33개월 한국계 환자의 수포로부터 수두 바이러스를 분리하고, 인간 배아 폐세포에 초대배양하였다(Hwang, K.K., Park, S.Y., Kim, S.J., Ryu, Y.W. & Kim, K.H. (1991). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Varicella-Zoster Virus isolated in Korea. JKorSocViro121, 201-210.).
- [45] 상기 배양된 MAV06 바이러스주는 34°C ~ 36°C에서 사람 및 기니피그의 태아 정상 이배체 폐세포에서(embryonic diploid Lung cell) 55회 계대배양한 후에, 세포 감수성 및 온도 민감성 시험을 통해 약독화 되었음을 확인하였으며(Hwang et al., Marker test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea), 상기 약독화된 바이러스주를 ‘MAV06’라고 명명하고, 이를 SuduVax 생산에 사용하였다.

- [46] 상기 약독화 MAV06 바이러스주를 사람 태아 정상 이배체 폐세포에서 연속 계대 배양하여 마스터 바이러스주(virus seed)를 제작하였으며, 이로부터 연속 계대 배양하여 제조용 바이러스주(virus seed)를 생산하였다.
- [47] 그리고 최종 백신인 “SuduVax”는 제조용 바이러스 은행으로부터 계대배양된 것을 사용하여 생산하였으며, 서열분석은 5회 계대배양 된 바이러스를 이용하였다.
- [48] DNA를 QIAamp DNA 미니 키트(QIAGEN)로 MAV06 바이러스주 스타크로부터 5.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 농도로 추출하였다. DNA 서열을 고속대량 서열분석법인 퀴아젠(QIAGEN)에 의해 서비스되는 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics)의 게놈 시퀀서 FLX 스탠다드 시스템(Genome Sequencer FLX Standard System)에 의해 결정하였다.
- [49] 평균 길이 ~400 bp의 23,722 서열 단편을 얻었고, 이들을 Consed 프로그램(<http://bozeman.mbt.washington.edu/consed/consed.html>)을 이용하여 조합 및 가시화하였다. 서열 단편의 평균 퀄리티는 99.99%였다. 총 99.38%의 124,759 서열이 도출된 컨센서스 서열과 일치하였으며 포함 범위는 뉴클레오티드 당 83 리드(reads)였다. 이들을 두 개의 참조 바이러스주 Dumas(NC_001348) 및 VarilRix(DQ008354)에 대해 정렬하였으며, 콘텍(contig)들 사이의 공백은 인접한 콘텍들로부터 수득된 프라이머를 이용한 PCR 시퀀싱에 의해 채웠다.
- [50] MAV06 바이러스주의 완성된 전체 게놈 서열은 NCBI Genbank 데이터베이스에 2011년 8월 9일 등록(JF306641)하였고, 서열번호 1에 나타내었다. 서열번호 1에 나타낸 바와 같이, MAV06 바이러스주의 게놈은 124,759 bp 길이인 것으로 확인되었다.
- [51] [실시예 2] 오픈 리딩 프레임 분석
- [52] 두 개의 참조 바이러스주 Dumas(NC_001348) 및 VarilRix(DQ008354)에 대한 블라스트 서치(Blast search)에 의해 전체 게놈 서열에서 MAV06 바이러스주의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 위치를 찾았다. 결과 데이터는 MAV06 바이러스주 게놈에 있는 각 ORF의 첫 번째와 마지막 뉴클레오티드 위치와 ORF의 방향을 포함하는 것을 확인할 수 있었다.
- [53] ORF 정보를 CLC 시퀀스 뷰어(CLC Sequence Viewer)(version 6.1 <http://www.clcbio.com/index.php>) 및 NCBI에 의해 제공되는 ORF 파인더(ORF Finder)와 같은 ORF 확인 프로그램에 의해 검증하였다. 블라스트 서치 결과가 ORF 확인 프로그램의 결과와 일치하지 않는 경우, 해당 ORF의 뉴클레오티드 서열을 바이오에디트 시퀀스 얼라인먼트 에디터(BioEdit Sequence Alignment Editor)(Department of Microbiology, North Carolina State University, version 5.0.9 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)로 조사하고 수작업으로 편집하여 개시 및 종결 코돈의 위치를 찾아내었다. 최종적으로 모든 배치된 ORF를 번역된 아미노산 서열의 확인에 의해 확인하였다.
- [54] 상기 분석 결과를 아래 (1) 내지 (4)의 항목에 나타내었다.

- [55] (1) MAV06 바이러스주 게놈 구조 및 ORF 맵핑
- [56] MAV06 바이러스주 게놈의 구조는 게놈이 6 부위, TRL, UL, IRL, IRS, US 및 TRS로 나누어질 수 있다는 점에서 VZV 바이러스주의 전형적인 것이었으며, 각 부위의 길이는 각각 88 bp, 104,799 bp, 88 bp, 7,267 bp, 5,232 bp 및 7,276 bp였다.
- [57] MAV06 바이러스주 게놈의 G+C 함량은 대략 46.1%이고, 총 게놈 길이는 24개의 VZV 바이러스주와 매우 유사하였다. 하기 표 1에는 본원발명에서 분석한 VZV 바이러스주 및 이들의 진뱅크(Genbank) 등록번호, 게놈 길이 및 GC 함량을 나타내었다.
- [58]

[표 1] 본 발명에서 분석된 VZV 바이러스주에 대한 정보

Strain	Accession Number	Country	Length (bp)							%G+C
			Genome	TR1	UI	IR1	IRs	Us	TRs	
Dumas	NC001348	Netherlands	124,884	88	104,836	88	7,320	5,232	7,320	46.0
M2DR	DQ452050	Morocco	124,770	89	104,719	89	7,320	5,232	7,321	46.0
CA123	DQ457052	USA	124,771	100	104,698	98	7,322	5,232	7,321	46.0
SD	DQ479953	USA	125,087	88	104,787	88	7,446	5,232	7,446	46.1
Ke1	DQ479954	USA	125,374	88	104,857	88	7,555	5,232	7,554	46.2
11	DQ479955	Canada	125,370	88	104,906	88	7,529	5,232	7,527	46.2
22	DQ479956	Canada	124,868	88	104,689	88	7,386	5,232	7,385	46.0
03-500	DQ479957	Canada	125,239	88	105,299	88	7,266	5,232	7,266	46.1
36	DQ479958	Canada	125,030	88	104,850	88	7,387	5,232	7,385	46.1
49	DQ479959	Canada	125,041	88	104,916	88	7,358	5,232	7,359	46.1
8	DQ479960	Canada	125,451	89	105,020	88	7,510	5,232	7,512	46.2
32p5	DQ479961	USA	124,945	88	104,760	88	7,389	5,232	7,388	46.1
32p22	DQ479962	USA	125,084	88	104,791	88	7,443	5,232	7,442	46.1
32p72	DQ479963	USA	125,169	88	104,870	88	7,446	5,232	7,445	46.1
NH29_3	DQ674250	USA	124,811	87	104,766	87	7,320	5,230	7,321	46.0
SVETA	EU154348	Russia	124,813	87	104,772	87	7,319	5,230	7,318	46.0
MSP	AY548170	USA	124,883	88	104,848	88	7,313	5,232	7,314	46.0
BC	AY548171	Canada	125,459	88	105,326	88	7,363	5,231	7,363	46.2
IIJ0	AJ871403	Germany	124,928	89	104,752	89	7,335	5,230	7,433	46.0
pOka	AB097933	Japan	125,125	88	104,798	88	7,463	5,225	7,463	46.1
vOka	AB097932	Japan	125,078	88	104,822	88	7,427	5,232	7,421	46.1
VariIRix	DQ008354	Japan	124,821	88	104,761	88	7,326	5,231	7,327	46.1
VariVax	DQ008355	Japan	124,815	88	104,758	88	7,324	5,232	7,325	46.1
MAV06	This study	Korea	124,759	88	104,799	88	7,276	5,232	7,276	46.1

[59] MAV06 바이러스주는 74개의 ORF를 포함하고 있었다. 이들 중 64개는 UL 유전자, 4개는 US 유전자임을 확인하였다.

[60] IRS 내 3개의 유전자(ORFs 62-64)는 TRS(ORFs 69-71) 내에서 역방향으로 반복되어 존재하였고, 74개의 ORF 중 70개는 정방향으로, 34개는 역방향으로 존재하였다. 또한, ORF 방향은 VZV 균주에서 100% 보존되어 있었다. MAV06 바이러스주의 ORF 지도는 도 1(모든 도면에서는 ‘SuduVax’라 표시한다.)에

나타내었다.

- [61] (2) MAV06 바이러스주의 계통발생학적 분석
- [62] 상기 표 1의 바이러스주들의 전체 뉴클레오티드 서열에 기초하여 네이버-조이닝법을 이용하여 계통수를 제작하였다.
- [63] MAV06 바이러스주의 ORF 뉴클레오티드 서열을 ClustalW(ver 2.0.1)로 NCBI 진뱅크 데이터베이스에 등록된 상기 표 1의 24개의 VZV 바이러스주들의 뉴클레오티드 서열과 아미노산은 다중 정렬한 후 수작업으로 편집하였다.
- [64] 결과 출력 파일을 Phylip 패키지(version 3.69, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>)에 포함된 Dnadist 및 네이버 프로그램을 이용하여 계통수의 제작을 위해 사용하였다. 거리 매트릭스를 키무라-2-파라미터(Kimura-2-parameter)에 의해 획득하였다. 클러스터 분석을 네이버-조이닝 방법(neighbour-joining, NJ) 및 최대우도 추정법(maximum-likelihood, ML)에 의해 수행하고, 결과 트리 파일을 트리뷰(Treeview) 프로그램(version 1.6.6)에 의해 가시화하였다. 계통수의 유의성을 부트스트랩(bootstrap) 분석에 의해 검증하였다. 계통수를 Seqboot 프로그램에 의해 생성된 1000개의 레플리케이트(replicates)로부터 구축하고 컨센서스 트리를 컨센스(Consense) 프로그램에 의해 확인하였다.
- [65] 전체 뉴클레오티드 서열을 최대우도 추정법에 따라 계통수를 작성한 결과, 도 2에서도 확인할 수 있듯이, MAV06 바이러스주를 포함하는 4개의 약독화 생바이러스 백신의 바이러스주들(vOka, VarilRix, VariVax)과 클러스터를 형성하였고, M2DR 바이러스주와 8 바이러스주가 인접한 클러스터를 형성하였다. 또한, CA123 바이러스주는 단독으로 형성, 11, 22, 03-500, 및 HJ0 바이러스주가 클러스터를 형성, 나머지 임상 바이러스주들이 함께 클러스터를 형성하였다.
- [66] 비코딩 뉴클레오티드 서열에 기초한 최대우도 추정법에 따라 계통수를 작성한 결과, 도 3에서도 확인할 수 있듯이, 한국에서 분리한 MAV06 바이러스주와 일본에서 분리한 Oka 바이러스주는(Japan-Korean(J-K) cluster) 독특한 클러스터를 형성하였다. 전체 뉴클레오티드 서열 및 공통의 아미노산 서열을 기초한 24개의 VZV 바이러스주들과의 계통수에서는 pOka 바이러스주가 4개의 백신의 바이러스주들(vOka, Varilrix, Varivax, MAV06)과 19개의 임상 바이러스주 사이에 위치하는 반면, 비코딩 뉴클레오티드 서열을 기초한 24개의 VZV 바이러스주들과의 계통수에서는 백신 바이러스주들 사이에 묻혀 있었다. 즉 다시 말해, 4개의 백신의 바이러스주들(vOka, Varilrix, Varivax, MAV06)은 전체 뉴클레오티드 서열 및 공통의 아미노산 서열을 기초한 24개의 VZV 바이러스주들과의 계통수에서는 일본계 한국 주(Japan-Korean(J-K) cluster)내 하위 클러스터를 형성하는 것을 확인할 수 있었으나 비코딩 뉴클레오티드 서열을 기초한 24개의 VZV 바이러스주들과의 계통수에서는 그렇지 않았다.

- [67] 백신 바이러스주들과 임상 바이러스주들을 구분하기 위한 주요한 ORF를 확인하기 위하여, ORF에 따른 74개의 계통수를 작성하였으며, 이 중 12개의 ORF에서 도 4와 같이 백신 바이러스주 특징적인 계통수를 확인할 수 있었다. 이와 같은 계통수를 나타내는 ORF에는 ORF 0, 1, 6, 18, 31, 35, 39, 59, 62, 64, 69 그리고 71이 있다.
- [68] (3) 반복 시퀀스(Reiteration sequences)와 계통 길이의 다형성 분석
- [69] VZV 바이러스주들의 ORF의 길이는 거의 변화가 없었다. VZV 바이러스주들의 74 ORF 중 63번째는 바이러스주들 사이에 길이 차이는 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 3개의 ORF(ORF11, 14, 22)는 하기 표 2에서도 확인할 수 있듯이, 반복된 시퀀스의 길이 때문에 계통사이에 길이의 다형성이 비교적 높게 존재하는 것을 확인할 수 있었다.
- [70]

[표 2] VZV 바이러스주들의 반복 시퀀스

Strain	Length (bp)									Rank ⁴ (R)	Rank ⁴ (G)
	R1	R2	R3	R4a	R4b	R5	R ¹	G ²	G-R ³		
Dumas	303	326	72	146	146	200	1,193	124,884	123,691	9	10
M2DR	303	284	27	146	146	200	1,106	124,770	123,664	3	2
CA123	261	284	36	146	146	200	1,073	124,771	123,698	1	3
SD	258	326	72	281	281	200	1,418	125,087	123,669	16	17
Ke1	321	326	72	389	389	200	1,697	125,374	123,677	21	22
11	225	326	225	362	362	200	1,700	125,370	123,670	22	21
22	195	284	72	200	200	200	1,151	124,868	123,717	8	8
03-500	225	284	657	92	92	200	1,550	125,239	123,689	20	20
36	321	326	72	227	227	200	1,373	125,030	123,657	13	13
49	321	410	54	200	200	200	1,385	125,041	123,656	14	14
8	258	620	36	335	335	200	1,784	125,451	123,667	23	23
32p5	243	326	54	227	227	200	1,277	124,945	123,668	12	12
32p22	291	326	36	281	281	200	1,415	125,084	123,669	15	16
32p72	291	326	117	281	281	200	1,496	125,169	123,673	19	19
NIH29_3	258	326	51	146	146	200	1,127	124,811	123,684	4	4
SVETA	243	326	72	146	146	200	1,133	124,813	123,680	5	5
MSP	258	368	90	146	146	200	1,208	124,883	123,675	10	9
BC	258	326	612	200	200	200	1,796	125,459	123,663	24	24
HJO	225	326	72	146	254	200	1,223	124,928	123,705	11	11
pOka	225	326	36	281	281	312	1,461	125,125	123,664	18	18
vOka	258	326	27	254	254	312	1,431	125,078	123,647	17	15
VariRix	258	326	72	146	146	200	1,148	124,821	123,673	6	7
VariVax	258	326	72	146	146	200	1,148	124,815	123,667	6	6
MAV06	273	326	99	92	92	200	1,082	124,759	123,677	2	1
Avg	263.8	336.5	116.9	209.0	213.5	209.3	1,349	125,024	23,675		
Stdev	33.8	65.8	164.5	83.0	82.4	31.6	229.7	224.1	16.0		
CV	0.128	0.196	1.407	0.397	0.386	0.151	0.170	0.00179	0.00013		

¹ Sum of R sequences

² Length of the genome

³ Length of the genome after deletion of R sequences

⁴ Rank in the order of length from the shortest to the longest

[71] 즉, R1은 ORF11에 위치하고, 18 bp 요소(컨센서스: GGACGCGATCGACGACGA) 및 15 bp의 요소(컨센서스: GGGAGAGGCGGAGGA)의 여러 시퀀스의 조합으로 구성되어 있었다. MAV06 바이러스주는 ORF11 내 15 bp의 요소가 추가적으로 반복되기 때문에 Oka 백신 바이러스주와는 길이가 달랐다.

[72] 또한, R2는 ORF14에 위치하고, 다양한 42 bp의 요소(컨센서스:

ACCTCGGCCGCTT/aCCCGAAAG/taCCCGATCCCGCCGTCGCGCCC: 소문자는 합의 작은 편차를 나타냄)로 구성되며, 그의 부분적인 32 bp 요소가 더 추가되어 있다. MAV06 바이러스주는 Oka 백신 바이러스주와 같이 ORF11 내 42 bp의 요소가 7회 반복되어 있었다.

- [73] 또한, R3은 ORF22의 3' 말단의 중간에 위치하고, 9 bp의 요소가 반복적으로 복사되어 있다. 9 bp의 컨센서스 시퀀스는 GC/tCCGC/tG/cCA/g(소문자는 합의 작은 편차를 나타냄)이다. 반복 횟수(n)는 계통간에 매우 다르다. 03-500 바이러스주는 반복회수가 73회이고, vOka 바이러스주는 반복회수가 3회이다. MAV06 바이러스주는 9 bp의 요소가 11회 반복되어 있으며, 반면 VarilRix 및 Varivax 바이러스주는 8회 반복되어 있다.
- [74] 또한, R4와 R5는 비코딩(non-coding) 부위이다. R4는 27 bp의 요소(컨센서스: CCCCCCGATGGGGAGGGGGCGCGGTA)로 구성되며, 그의 부분적인 11 bp 요소가 더 추가되어 있다. R4(R4a)는 IRS 내 ORF 62와 63 사이에 위치하고 있고, 이는 상보적인 R4b의 위치는 TRS 내 ORF 70와 71 사이에 위치하고 있다. R4a의 길이는 R4b 길이와 같지만 HJ0 바이러스주의 경우는 R4a와 R4b의 길이가 차이가 있다. HJ0 바이러스주의 R4b의 길이는 27 bp의 요소가 4회 더 반복되어지기 때문에 R4a 보다 108 bp가 더 길다. VarilRix 및 VariVax 바이러스주의 경우는 27 bp의 요소가 5회 더 반복되어져 있다. MAV06 바이러스주는 27 bp의 요소가 3회 더 반복되어져 있다.
- [75] R5는 ORF 60과 61사이에 위치에 있으며, 24 bp의 요소가 포함된 88 bp의 요소로 구성되어 있다. 상기 2개의 요소는 다른 반복 시퀀스에서 보이는 바와 달랐다. 2개 타입의 반복 시퀀스가 존재하였다. MAV06 바이러스주는 대부분의 바이러스주들과 마찬가지로 2개의 88 bp의 요소 및 1개의 24 bp의 요소를 포함하고 있었지만 vOka 및 pOka 바이러스주는 3개의 88 bp 및 2개의 24 bp의 요소를 포함하고 있었다.
- [76] 24개의 VZV 바이러스주들의 계놈 시퀀스와 반복시퀀스의 길이 비교를 통하여 VZV 바이러스주들의 계놈의 길이의 다양성은 변수가 반복 시퀀스의 길이에 의한 것임을 확인하였다. BC 바이러스주는 가장 긴 계놈으로, 가장 긴 반복 시퀀스를 포함하고 있었고, 반면, MAV06 바이러스주는 가장 짧은 계놈으로 두 번째로 짧은 반복 시퀀스를 포함하고 있었다. 가장 긴 계놈과 가장 짧은 계놈 사이의 길이(700 bp)는 가장 긴 반복 시퀀스와 가장 짧은 반복 시퀀스의 차이(724 bp)와 거의 비슷하였다. 만약 반복 시퀀스가 계놈에서 제거된다면 CV(변동계수)의 변화와 같이 계놈의 길이는 짧아진다. 전체 계놈에서 반복 시퀀스가 제거되면 0.000129 값이 삭제되고, CV는 0.00179와 같이 계산된다.
- [77] 실제로 하기 도 5에서도 확인할 수 있듯이, 계놈의 길이 순서를 반복 시퀀스의 길이 순서로 하였을 때 상관 계수(r^2)는 0.9854의 값을 가지고, VZV 바이러스주들의 계놈과 반복 서열의 길이 사이가 거의 직선 관계가 되었다.
- [78] (4) 복제 개시점(Origin of replication)

[79] VZV 바이러스주들의 복제(origin of replication, ORI) 시퀀스는 ORF62와 ORF63사이에 위치하고 있었다. ORI 시퀀스의 길이는 36 바이러스주에서는 80 bp이고, HJ0 바이러스주에서는 ORI 시퀀스의 배열 중간에 TA와 GA의 디뉴클레오티드의 반복수가 차이가 있기 때문에 길이가 108 bp이었다.

[80] MAV06 바이러스주의 ORI 시퀀스는 하기 표 3에서도 확인할 수 있듯이, 게놈의 110,080과 110,183 사이에 위치하고 있으며, 15 텐덤(tandem) GA의 반복 염기가 15회에 이어 TA의 반복 염기가 11회 포함되어 있었다.

[81] [표 3]

Strain	Start	End	Length	(TA) ⁿ ¹	(GA) ^m ²
Dumas	110,166	110,263	98	15	8
M2DR	110,052	110,149	98	15	8
CA123	110,050	110,147	98	15	8
SD	110,250	110,337	88	11	7
Kel	110,431	110,514	84	9	7
11	110,455	110,538	84	8	8
22	110,075	110,180	106	13	14
03-500	110,580	110,667	88	11	7
36	110,262	110,341	80	7	7
49	110,300	110,379	80	7	7
8	110,541	110,632	92	13	7
32p5	110,171	110,254	84	9	7
32p22	110,256	110,339	84	9	7
32p72	110,335	110,420	86	10	7
NH29_3	110,094	110,191	98	15	8
SVETA	110,101	110,194	94	13	8
MSP	110,176	110,265	90	12	7
BC	110,708	110,795	88	11	7
HJ0	110,085	110,192	108	11	17
pOka	110,268	110,371	104	11	15
vOka	110,264	110,359	96	8	14
Var iIRix	110,096	110,191	96	8	14
Var iVax	110,093	110,190	98	8	15
MAV06	110,080	110,183	104	11	15

¹ TA 반복 염기의 수

² GA 반복 염기의 수

[82] 110,235의 게놈 내 반복 염기의 수는 차이가 있지만 Oka 백신 바이러스주와

MAV06 바이러스주는 일반적으로 참조 바이러스주인 Dumas 내 110,235의 해당 뉴클레오티드 위치에 GA 반복 중 하나가 A가 G로 치환되어 있다. ORI 시퀀스는 HJ0와 VarilRix 바이러스주를 제외하고는 정확하게 상호보완적인 형태로 ORF70과 ORF71사이에서 중복되어 있었다:(TA)₃(GA)₂는 HJo 바이러스주에서 결실되어져 있었고, VarilRix 바이러스주에서는 1개의 GA 반복 염기가 결실되어져 있었다.

[83] (5) MAV06 바이러스주 ORF의 특성분석

[84] MAV06 바이러스주의 ORF0 길이는 돌연변이 때문에 길이가 길었다. 종결 코돈인 TGA(뉴클레오티드 위치 388-390)가 아르기닌(Agr)을 코딩하는 CGA로 돌연변이 되어있었다. 종결 코돈으로 추정되는 TGA는 ORF1와 함께 겹쳐져 있는 하단부위에서 찾을 수 있었다. 확장된 ORF0는 221개의 아미노산 잔기를 가진 새로운 단백질을 인코드 하였다. 동일한 돌연변이는 다른 유사한 vOka, VarilRix, 및 VariVax 백신 바이러스주들에서도 확인할 수 있었다(도 6).

[85] 모든 임상 바이러스주들 중 pOka 바이러스주는 129개의 아미노산을 코딩하는 390 bp 길이의 ORF0를 포함하고 있었다.

[86] 참조 바이러스주인 Dumas와 비교하였을 때 MAV06 바이러스주의 ORF17(서열번호 3)과 ORF56(서열번호 5)의 길이는 각각 658 내지 660 위치의 TCT와 367 내지 369 위치의 TCA가 결실되어져 3 bp의 길이가 차이가 났다(도 7 및 도 8). 상기와 같은 모든 결실은 세린(Serine, S) 아미노산 잔기의 결실을 가져왔다. 반면 MAV06 바이러스주의 ORF60(서열번호 6)에는 28번째 위치에 3개의 뉴클레오티드 ATG가 삽입되어져 있었다(도 10). 흥미롭게도 pOka 바이러스주를 포함하는 모든 Oka 백신 바이러스주들에서 하나의 삽입과 둘의 결손을 찾을 수 있었다.

[87] 또한, Oka 백신 바이러스주 뿐만 아니라 MAV06 바이러스주에서 Dumas와 대부분의 임상 바이러스주들 보다 ORF29(서열번호 4)가 15 bp((AACATTTTCAGGGTCA)가 짧았다. 참조 바이러스주인 Dumas와 대부분의 임상 바이러스들은 15 bp의 시퀀스를 연속 반복적으로 포함하고 있었다. M2DR, CA123 및 8의 임상 바이러스주는 Oka 백신 바이러스주와 MAV06 바이러스주와 동일하게 ORF60의 길이가 동일하였다(도 9).

서열목록 Free Text

[88] 서열목록 1은 VZV MAV06 게놈 DNA이다.

[89] 서열목록 2는 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF0이다.

[90] 서열목록 3은 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF17이다.

[91] 서열목록 4는 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF29이다.

[92] 서열목록 5는 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF56이다.

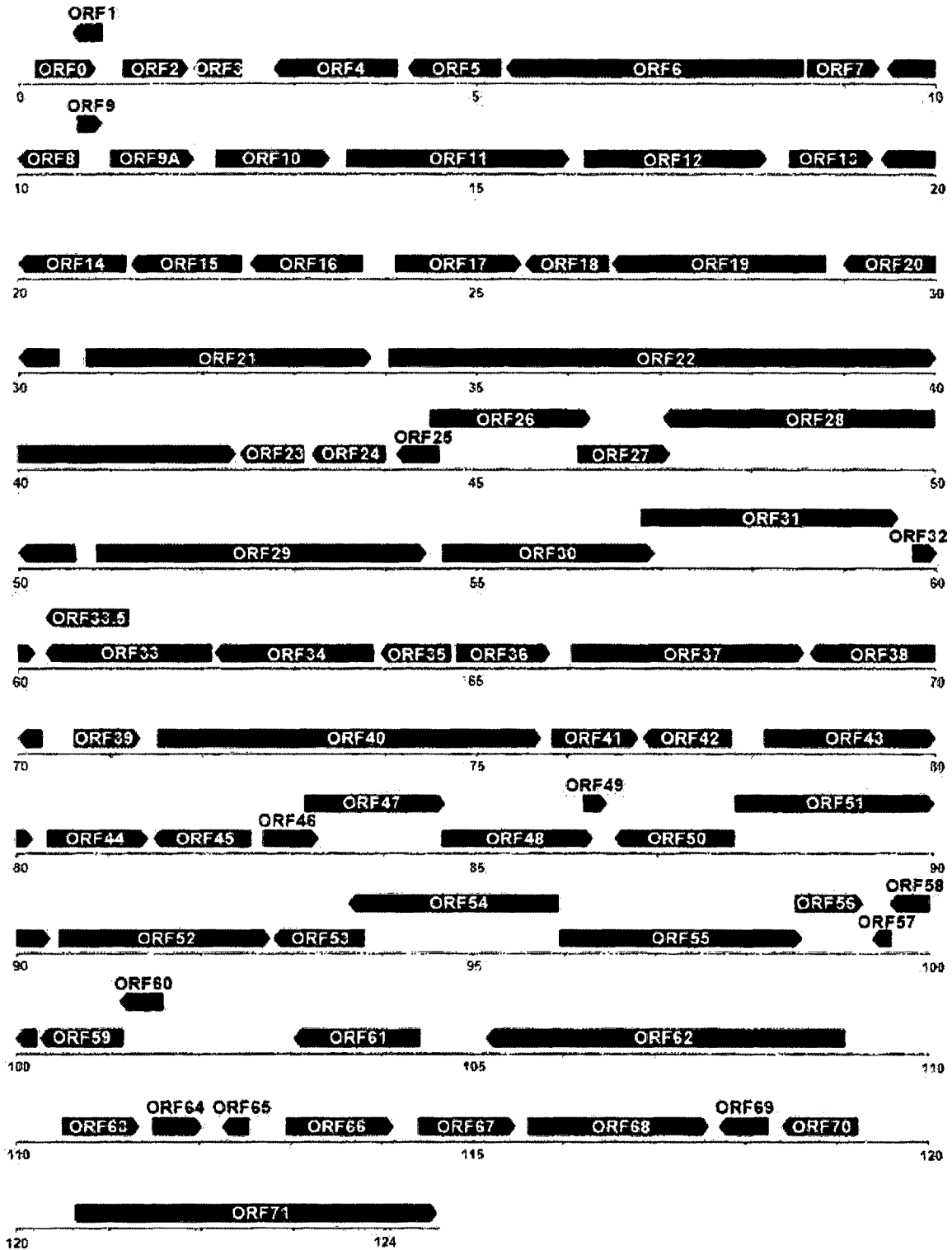
[93] 서열목록 6은 VZV MAV06 게놈 DNA의 ORF60이다.

청구범위

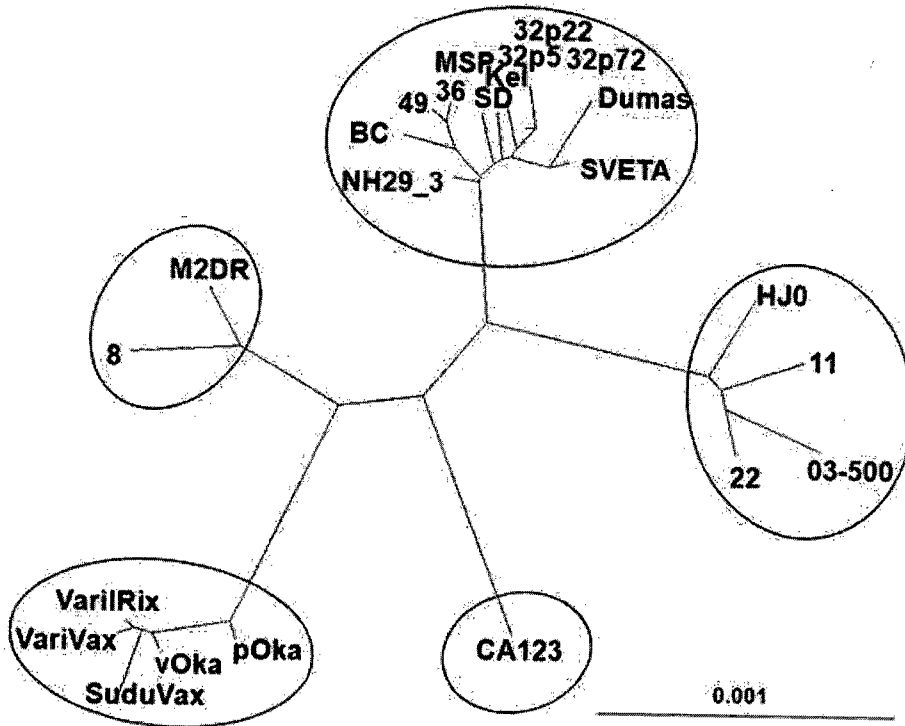
- [청구항 1] 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 수두 대상포진 바이러스(Varicella-zoster virus, VZV) MAV06 게놈 DNA.
- [청구항 2] 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 ORF0, 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 ORF17, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 ORF29, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 ORF56, 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 ORF60으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, VZV MAV06 게놈 DNA의 오픈 리딩 프레임(Open Reading Frame, ORF).
- [청구항 3] 제 2항 또는 제 3항에 따른 VZV MAV06 게놈 DNA의 오픈 리딩 프레임에 의해 코딩되는 단백질.
- [청구항 4] 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 VZV MAV06 게놈 DNA, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 ORF0, 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 ORF17, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 ORF29, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 ORF56, 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 ORF60으로부터 선택되는 오픈 리딩 프레임을 포함하는, 재조합 발현 벡터.
- [청구항 5] 제 4항에 따른 발현벡터로 형질전환된, 숙주세포.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 숙주세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균, 곤충세포에서 선택된 것임을 특징으로 하는 숙주세포.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 형질전환된 숙주세포는 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells)세포, NSO 세포, SP2/0 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO: chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 293 세포, 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.), 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비자에(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)에서 선택됨을 특징으로 하는 숙주세포.
- [청구항 8] 서열번호 1의 내지 6에서 선택되는 어느 하나에 염기서열에 의해 코딩되는 VZV MAV06의 단백질 제조방법.
- [청구항 9] 제 8항에 따른 VZV MAV06의 단백질을 유효성분으로 하는 백신

- 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서,
체내에 주입시 항체 형성을 증진시키는 역할을 하는 약학적으로 허용가능한 면역보조제(adjuvant)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 면역보조제는 알루미늄염($\text{Al}(\text{OH})_3$, ALPO_4), 스쿠알렌(squalene), 소르비탄(sorbitane), 폴리소르베이트 80(polysorbate 80), CpG, 리포솜, 콜레스테롤, MPL(monophosphoryl lipid A), GLA(glucopyranosyl lipid A)에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 백신 조성물.

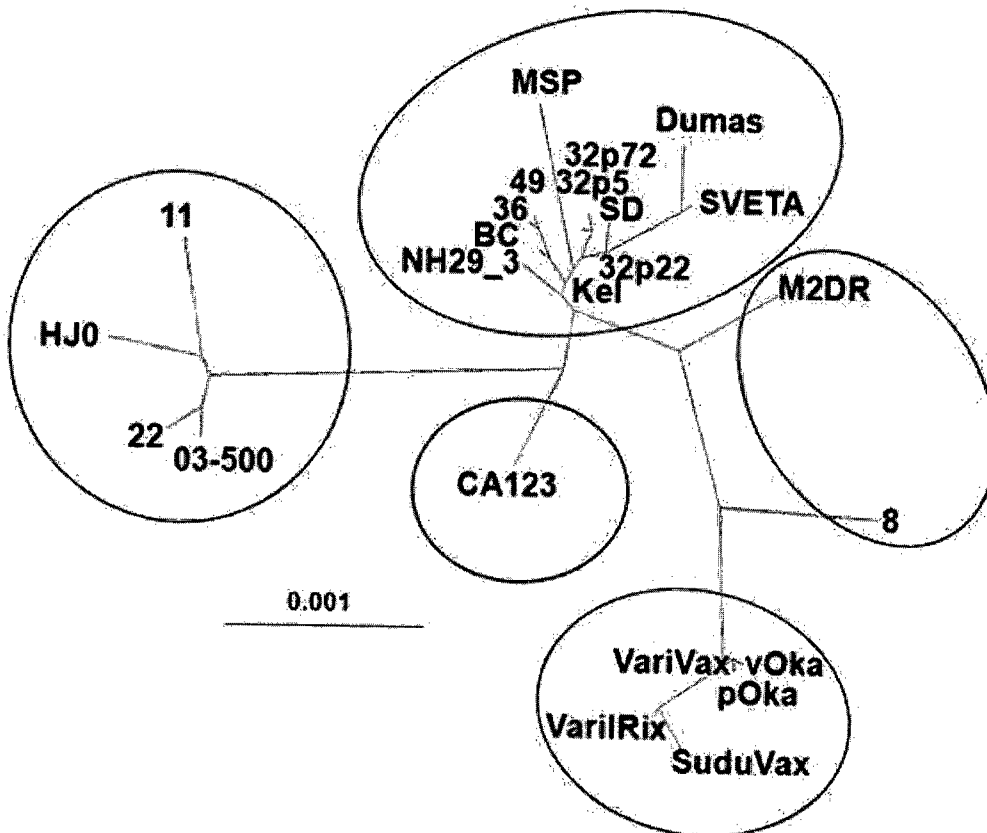
[Fig. 1]



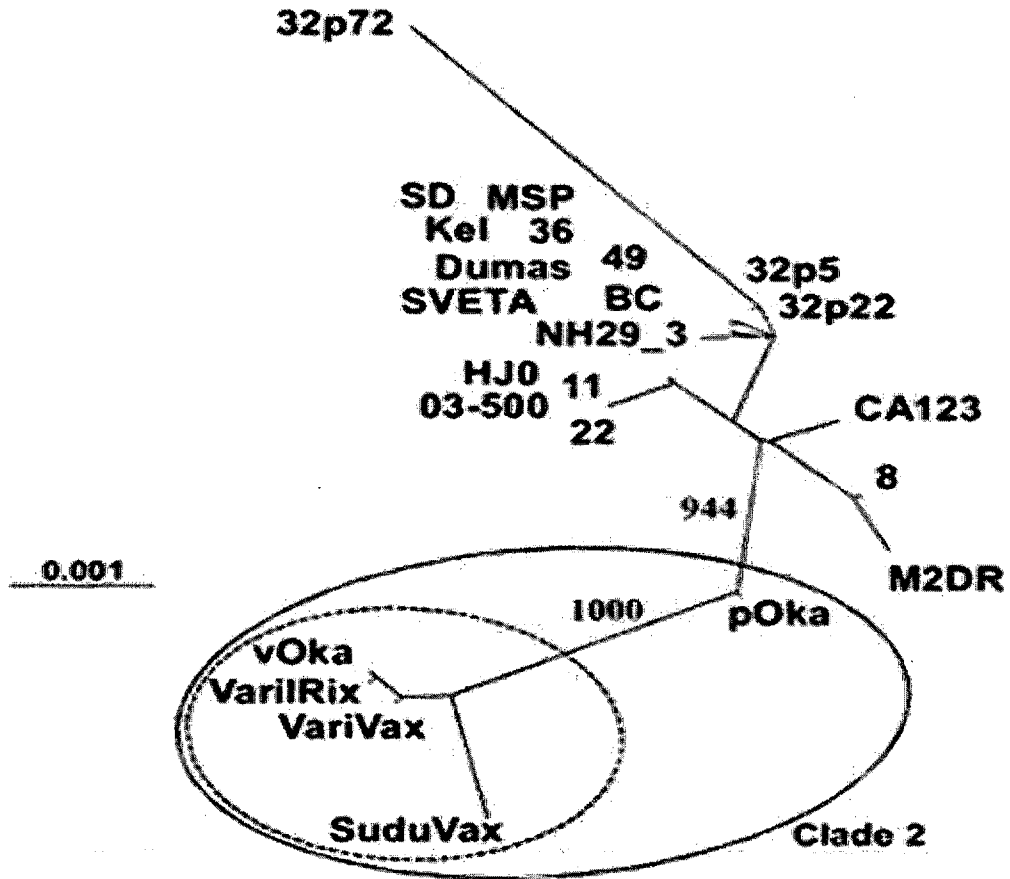
[Fig. 2]



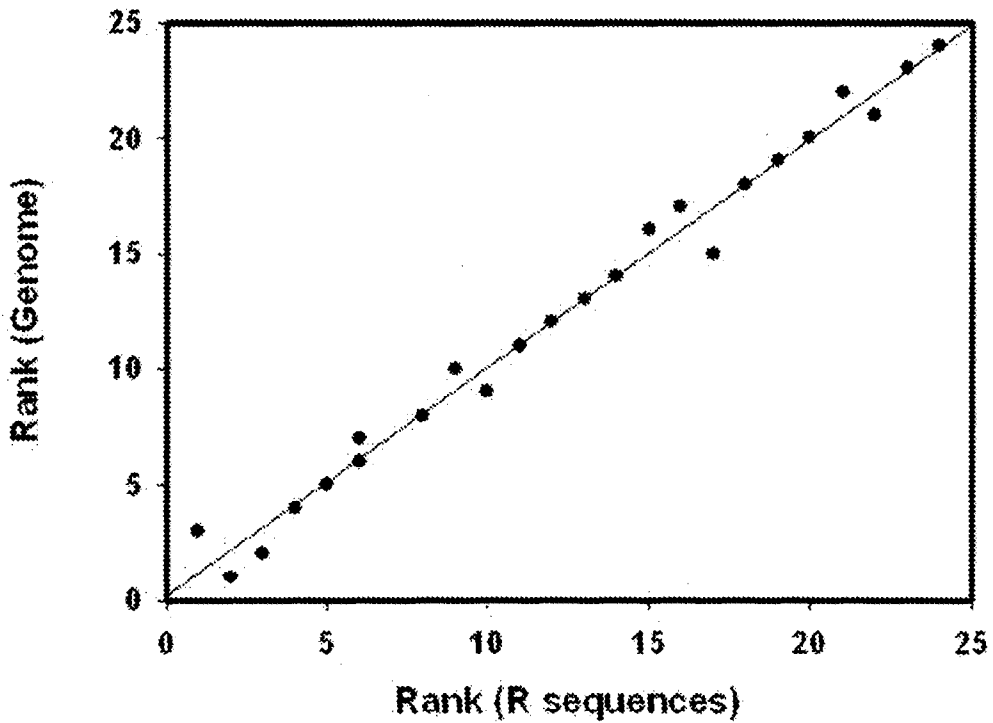
[Fig. 3]



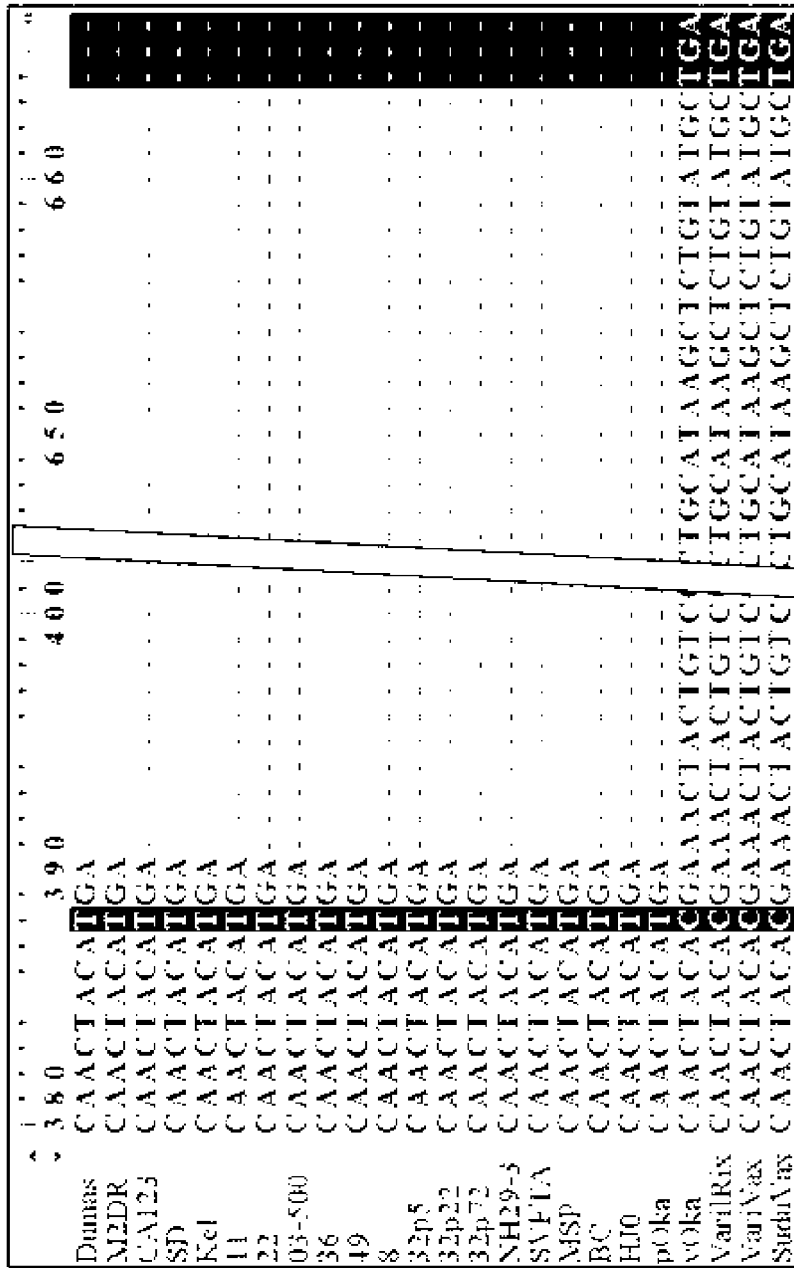
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

	Nucleotide										Amino acid									
	360	370		120																
Dumas	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
M2DR	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
CA123	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
SD	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
Kel	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
11	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
22	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
03-500	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
36	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
49	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
8	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
32p5	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
32p22	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
32p72	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
NH29-3	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
SVETA	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
MSP	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
BC	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
HJ0	ATCCAACACACA	TCAATGTTCTATC		LSSNT	SSIKY															
pOka	ATCCAACACACA	- - -		LSSNT	- - -															
vOka	ATCCAACACACA	- - -		LSSNT	- - -															
VariRix	ATCCAACACACA	- - -		LSSNT	- - -															
VariVax	ATCCAACACACA	- - -		LSSNT	- - -															
StuduVax	ATCCAACACACA	- - -		LSSNT	- - -															

[Fig. 10]

