

(52) CPC특허분류

A61K 47/30 (2013.01)

A61K 9/006 (2013.01)

A61K 2039/541 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711043727

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 면역바이오공학기반 아주번트 의약소재를 활용한 면역세포 맞춤형 활성화 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 성균관대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

점막부착성 아주번트 조성물 및 항원을 포함하고,

상기 점막부착성 아주번트 조성물은 음이온성 고분자, 톨-유사 수용체 아고니스트(toll-like receptor agonist), 및 사포닌의 복합체를 포함하는 것이고,

상기 항원은 서열번호 1 의 아미노산 서열을 갖는 sM2 항원 단백질과 A/EM/Korea/W149/06(H5N1) 바이러스의 HA2 항원단백질 내 아미노산 잔기 15-137 서열을 갖는 단백질이 결합된 것인,

인플루엔자 A 치료용 백신 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 인플루엔자 A 의 서브타입인 H5N1, H1N1, H5N2, H7N3 및 H9N2 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인플루엔자 A 서브타입에 대하여 교차-보호를 유도할 수 있는 것인,

인플루엔자 A 치료용 백신 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 음이온성 고분자는 폴리감마글루탐산, 히알루론산, 셀룰로오스, 폴리아크릴산, 다당류, 이들의 유도체 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인,

인플루엔자 A 치료용 백신 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 MPLA(Monophosphoryl lipid A), 이미퀴모드, 레시퀴모드, 플라겔린(flagellin), 시피지(CpG), 폴리아이시[poly(I:C)], 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인,

인플루엔자 A 치료용 백신 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 사포닌은 QS21, Quil A, QS7, QS17, β -에스킨, 디지토닌 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인,

인플루엔자 A 치료용 백신 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
상기 점막부착성 아주번트 조성물은 분말인 것인,
인플루엔자 A 치료용 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, 점막부착성 아주번트 조성물 및 항원을 포함하는, 인플루엔자 A 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 백신접종이 인플루엔자 및 이와 연관된 합병증을 예방하는 데에 가장 비용-효과적인 생의학적 접근법임에도 불구하고, 현재의 백신 제조 공정은 효율적이지 못하고, 이러한 백신의 투여는 여전히 간편하지 못하다.

[0003] 한편, 백신 균주는 반복되는 항원소변이(antigenic drift)에 기인하여 돌고 있는(circulating) 바이러스들에 대응하기 위하여 주기적으로 업데이트가 요구된다. 구체적으로, 계절에 따른 소변이 변이체(seasonal drift variants) 뿐만 아니라, 가끔씩 출현하는 재조합 바이러스에 대항하는 교차-보호의 포텐셜을 갖는 항-인플루엔자 백신의 개발은 필수적이다.

[0004] 상기 백신의 개발 후보군으로서, 인플루엔자 매트릭스 단백질 2, 구체적으로는 엑토도메인(M2e)은 인플루엔자 균주들 중에서 훌륭하게 보존된 것이고, 인플루엔자 A 서브타입에 대항하여 교차-보호를 유도하는 매력적인 타겟으로 고려되어진다. 이와 유사하게, 스타크 도메인(stalk domain), 구체적으로 헤마글루티닌(HA)의 융합 펩타이드(HA2)는 강력하게 보존된 또 다른 영역으로서, 인플루엔자 A 바이러스 특정의 서브타입 및 심지어 다양한 서브타입에 대하여 교차-보호와 함께 특이적 항체 반응을 유도할 수 있다. 그러나, 이러한 M2 및 HA2-기반 백신은 면역원성이 낮다는 단점을 가지며, 동물 실험에서 사망률(mortality)은 감소시켰지만 질병률(morbidity)은 감소시키지 못하였다.

[0005] 따라서, 많은 연구들은 다양한 백신 아주번트로 M2 및 HA2-기반 백신의 면역원성을 증가시키는 데에 주목해 왔다. 수백가지의 서로 다른 아주번트들을 신규한 백신에 대하여 지난 수 세대에 걸쳐서 시험하였지만, 대다수는 효능의 부족, 수인할 수 없을 정도의 국부적 또는 전신성인 독성, 제조의 어려움, 낮은 안정성, 및 과도한 비용을 포함하는 한계로 인하여 인간에 대한 사용이 승인되어지지 않았다. 상기와 같은 이유로, 지금까지, 인간 백신에 있어서 알루미늄-기반 미네랄 염이 아주번트로서 가장 널리 사용되었다. 그러나, 상기 아주번트는 서브유닛 단백질 항원에 대항하여 충분한 항체-특이적 체액성 면역을 유도하거나 세포-매개 면역을 자극할만큼 충분히 강력하지는 않다. 나아가, 상기 아주번트는 몇몇의 인간 대상에서 알러지 반응과 결합된 면역글로불린 E 항체 반응을 유도할 수 있다.

[0006] 상기 점막 표면, 구체적으로 호흡기 점막은 다수의 감염원의 주요한 출입 포인트이고, 감염에 대한 첫 번째 방어 역할을 하므로, 점막 백신은 점막 및 전신성 면역 각각에서의 보호 면역 반응을 유도할 수 있는 강력한 차세대 백신접종 전략으로서의 모습을 드러내고 있다. 점막 백신은 전신성 백신에 대하여 생산 및 조절의 관점에서 이점을 제공한다. 구체적으로, 점막 백신은 대량 백신접종에 실용적이며, 오염된 주사 바늘로 인해 발생하는 혈액을 통한(blood-borne) 감염의 위험을 발생시키지 않는다. 투여의 용이성, 의료적인 훈련 없이도 개인에 의한 전달의 가능성 및 준수의 개선은 점막 백신 전략 특히, 인플루엔자 바이러스 감염을 포함하는, 감염의 유행성 확산의 예방의 이점으로 여겨진다.

[0007] 그러나, 현재 상업적으로 입수가 가능한 점막 백신은 몇 안되며, 이는 효과적인 점막 백신접종이, 효과적인 점막 면역 생성의 어려움 및 안전하고 효과적인 점막 아주번트 및 전달 시스템의 부재 등으로, 상당히 까다롭기 때문이다(대한민국 공개특허 제10-2013-0044204호 참조).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원은, 점막부착성 아주번트 조성물 및 항원을 포함하고, 상기 점막부착성 아주번트 조성물은 음이온성

고분자, 톨-유사 수용체 아고니스트(toll-like receptor agonist), 및 사포닌의 복합체를 포함하는 것이고, 상기 항원은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 sM2 항원 단백질과 A/EM/Korea/W149/06(H5N1) 바이러스의 HA2 항원단백질 내 아미노산 잔기 15-137 서열을 갖는 단백질이 결합된 것인, 인플루엔자 A 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0009] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 기술한 과제로 제한되지 않으며, 기술되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본원의 일 측면은, 점막부착성 아주버트 조성물 및 항원을 포함하고, 상기 점막부착성 아주버트 조성물은 음이온성 고분자, 톨-유사 수용체 아고니스트(toll-like receptor agonist), 및 사포닌의 복합체를 포함하는 것이고, 상기 항원은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 sM2 항원 단백질과 A/EM/Korea/W149/06(H5N1) 바이러스의 HA2 항원단백질 내 아미노산 잔기 15-137 서열을 갖는 단백질이 결합된 항원 단백질을 포함하는 것인, 인플루엔자 A 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0011] 본원의 일 구현예에 의할 때, 상기 인플루엔자 A 치료용 백신 조성물은 상기 인플루엔자 A의 서브타입인 H5N1, H1N1, H5N2, H7N3 및 H9N2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인플루엔자 A 서브타입에 대항하여 교차-보호를 유도할 수 있다.

[0012] 본원의 일 구현예에 의할 때, 상기 인플루엔자 A 치료용 백신 조성물은 상기 점막부착성 아주버트 조성물이 분말일 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본원의 구현예들은 컨센서스 매트릭스 단백질-2 (sM2) 및 (HA2)의 스타크 도메인을 포함하는 재조합 융합 단백질 sM2HA2에 기반한 인플루엔자 백신에 대한 효율적인 점막 아주버트 시스템으로서, 폴리- γ -글루탐산 (γ -PGA)-기반의 신규한 인플루엔자 백신 조성물을 제공한다.

[0014] 본원의 구현예들은 재조합 융합 단백질 sM2HA2 및 점막부착성 γ -PGA/MPLA/QS21 아주버트에 기반한 신규한 점막 백신 조성물에 관한 것이다. 상기 신규한 점막 백신 조성물은 간편하고 강력한 전략에 의해 제조될 수 있고, 면역 반응을 증진시킬 수 있으며, 다양한 인플루엔자 서브타입 대항하여 광범위한 보호를 보장할 수 있다. 상기 신규한 점막 백신 조성물의 면역원성 및 효능은 쥐와 동물의 동물 모델로 평가하였다.

[0015] 본원은, 인플루엔자 백신에 대한 효율적인 점막 아주버트 시스템으로서, 컨센서스 매트릭스 단백질-2 (sM2) 및 HA (HA2)의 스타크 도메인을 포함하는 재조합 융합 단백질 sM2HA2, 및 폴리- γ -글루탐산(γ -PGA)에 기반하는 신규한 백신 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 폴리- γ -글루탐산 (γ -PGA)-기반 백신 아주버트 시스템은 sM2HA2의 점막부착성 전달 비히클로서 작용할 뿐만 아니라, 소수성 면역자극성 3-O-데스아실-4'-모노포스포릴 지질 A (MPLA) 및 QS21의 결합에 대한 강력한 전략으로 작용할 수 있다. 상기 sM2HA2 및 조합 아주버트 γ -PGA/MPLA/QS21 (CA-PMQ)의 비강내 공-투여(co-administration)는 고도의 보호성을 나타내는 점막의, 전신성, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있다. 상기 sM2HA2/CA-PMQ 면역화는 질병 증상을 예방할 수 있고, 다양한 인플루엔자 서브타입 (H5N1, H1N1, H5N2, H7N3 및 H9N2)에 의한 치사적 감염(lethal infection)에 대항하여 적어도 6달 동안 지속되는 완전한 보호를 부여할 수 있다.

[0017] 따라서, 본원은, CA-PMQ와 조합된 sM2HA2의 점막 투여는 광범위한 교차-보호성 인플루엔자 백신에 대한 강력한 전략이 될 수 있고, 점막 아주버트로서의 CA-PMQ는 효과적인 점막 백신에 대하여 사용될 수 있음을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1a는 본원의 일 실시예에 있어서 재조합 단백질 항원 (sM2HA2) 및 점막부착성 고분자 (γ -PGA)-기반 조합 아주버트 (CA-PMQ, γ -PGA/MPLA/QS21)의 조합을 이용한, 다양한 인플루엔자 바이러스에 대항하는 교차-보호에 대한 백신 시스템의 개략도를 나타낸 것이다: (A) γ -PGA, MPLA, QS21, 및 sM2HA2의 화학적 및 분자적 구조.

도 1b 는 항-바이러스성 점막 및 전신성 면역을 위한 CA-PMQ 기반의 백신접종을 나타낸 것이다: γ -PGA 는 sM2HA2 백신의 점막부착성 전달 비히클로서 작용할 수 있음.

도 2a 내지 2e 는, 본원의 일 실시예에 있어서 CA-PMQ 의 특성화 및 아주번트 특성을 나타낸 것이다.

도 3 은, 본원의 일 실시예에 있어서 1: OVA 단독 (20 μ g), 2: OVA + γ -PGA/MPLA/QS21 (PMQ), 3: OVA + CT (1 μ g) 로 백신화된 마우스 내에서 (A) 혈청 IgG, (B) 비강 세척 IgA 및 (C) 혈청 IgG 이소타입에 대한 항체-특이성의 유도 및 (D) IL-4 및 (E) IFN- γ 사이토카인의 생성을 나타낸 것이다.

도 4 는, 본원의 일 실시예에 있어서 CA-PMQ 가 재조합 sM2HA2 백신과 함께 전달될 때, sM2 및 HA2 에 대한 면역 반응을 증진시키는 것을 나타낸 것이다.

도 5 는, 본원의 일 실시예에 있어서 CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2 백신이 다양한 인플루엔자 서브타입 대항하여 개선된 교차-보호를 부여하는 것을 나타낸 것이다.

도 6 은, 본원의 일 실시예에 있어서 CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2 가, 다양한 인플루엔자 서브타입에 의한 치사적 감염에 대항하는 장기 지속되는 면역 반응 및 보호 효능을 유도하는 것을 나타낸 것이다.

도 7 은, 본원의 일 실시예에 있어서 높은 표지 효율을 갖는 ^{123} I-표지된 OVA (OVA(^{123} I)) 의 선별을 위하여 크기-배제 PD-10 탈염 컬럼을 사용하여 결정된, ^{123} I 활성 (막대) 및 OVA 용출 양 (4-2 의 노란색 부분): 의 프로파일 을 나타낸 것이다.

도 8 은, 본원의 일 실시예에 있어서 CA-PMQ 가 sM2 및 HA2 에 특이적인 IgG 아-강들(sub-classes)을 유도하는 것을 나타낸 것이다.

도 9 는, 본원의 일 실시예에 있어서 인플루엔자 바이러스 감염에 대항하여 sM2HA2 단백질의 적절한 투여량 및 효능을 결정하기 위한 예비 실험의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.
- [0021] 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0022] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시 될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0025] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는, "A 또는 B, 또는 A 및 B"를 의미한다.
- [0026] 본원 명세서 전체에서, 형질전환 숙주세포로 사용되는 미생물은 생체 적용시 독성이 없거나 약독화된 미생물이 라면 그람음성균인 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피미리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라 등을 사용할 수 있으며, 그람양성균인 바실러스, 락토바실러스, 락토코커스, 스테필로코커스, 리스테리아 모노사이토제네스, 스트렙토코커스 등을 어느 것이라도 사용 가능하며, 바람직하게는 식용이 가능한 미생물인 유산균을 사용할 수 있다. 또한 상기 유산균은 락토바실러스 속, 스트렙토코커스 속 및 비피도박테리움 속을 포함 할 수 있으며, 대표적으로 바실러스 속은 락토바실러스 아시도필러스, 락토바실러스 플란타룸, 락

토마실러스 퍼멘툼, 락토바실러스 텔브루엑키, 락토바실러스 존스니, 락토바실러스 료터리, 락코바실러스 불가리커스 및 락토바실러스 카제이; 스트렙토코커스 속은 스트렙토코커스 서모필러스; 비피도박테리움 속은 비피도박테리움 인판티스, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 룬검, 비피도박테리움 슈도룬검, 비피도박테리움 브레브, 비피도박테리움 락티스 및 비피도박테리움 아돌레센티스 등을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 락토바실러스 속 락토바실러스 카제이를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본원 명세서 전체에서, 용어 "백터"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 백터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환 되면, 백터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 백터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본원 명세서 전체에서 "플라스미드" 및 "백터"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 백터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 백터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 백터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 백터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 사용하면 백터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션할 수 있다. 라이게이션 후에, 백터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 형질전환은 Sambrook, et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(Neumann, et al., EMBO J., 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본원에 따른 항원의 세포표면 발현을 위하여 사용되는 백터는 당업계에 공지된 백터가 사용될 수 있다.

[0029] 한편, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절 서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합백터 내에 포함되게 된다.

[0030] 본원 명세서 전체에서, 용어 "형질전환" 은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다.

[0031] 본원 명세서 전체에서, 용어 "백신"은 질병에 대한 예방의 목적으로 생유기물을 사용하여 면역 시스템을 자극시키는 데 사용되는 약제를 의미한다. 면역 활성화는 유기체 내에서 항체 생성, T-림프구의 자극, 또는 다른 면역 세포(예: 대식세포)를 자극하여 항원을 효율적으로 제거하기 위한 과정을 의미한다. 상기에 대한 자세한 면역학의 개관은 당업계의 통상의 기술을 가진자들은 쉽게 이해된다 (Barrett, J.T., Textbook of Immunology, 1983). 항원으로서의 목적단백질을 발현하는 형질전환된 미생물 백신의 투여대상은 포유동물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0032] 본원 명세서 전체에서, 용어 "점막부착성"은 해당 물질이 상피세포의 점막층 당단백질의 히드록실기와 수소결합 등의 상호작용을 통하여 점막에 부착되는 특성을 유도하는 것을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0033] 본원 명세서 전체에서, 해당 분야의 통상의 기술자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 백터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 백터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 백터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 백터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 백터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

[0034] 본원의 일 측면은, 점막부착성 아주버트 조성물 및 항원을 포함하고, 상기 점막부착성 아주버트 조성물은 음이온성 고분자, 톨-유사 수용체 아고니스트(toll-like receptor agonist), 및 사포닌의 복합체를 포함하며, 상기 항원은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 sM2 항원 단백질과 A/EM/Korea/W149/06(H5N1) 바이러스의 HA2 항원 단백질 내 아미노산 잔기 15-137 서열을 갖는 단백질을 포함하는, 인플루엔자 A 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0035] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 인플루엔자 A 치료용 백신 조성물은, 상기 인플루엔자 A의 서브타입인 H5N1, H1N1, H5N2, H7N3 및 H9N2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인플루엔자 A 서브타입에 대항하여 교차-보호를

유도할 수 있다.

- [0036] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 sM2 단백질은 H5N1, H5N2, H1N1, H7N3 및 H9N2 인플루엔자 바이러스의 M2 단백질 보존서열을 변형시켜 합성한 것으로서, 트랜스멤브레인 도메인을 제거한 세포외 및 세포질 도메인 부분만을 포함하는 콘센서스 서열(consensus sequence)로 나타낼 수 있는 것이다(서열번호 1).
- [0037] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 HA2 단백질은 A/EM/Korea/W149/06(H5N1) 바이러스의 HA2 항원단백질 내 아미노산 잔기 15-137 서열을 갖는 단백질이다.
- [0038] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 sM2HA2 단백질은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 sM2 항원 단백질과 상기 A/EM/Korea/W149/06(H5N1) 바이러스의 HA2 항원단백질 내 아미노산 잔기 15-137 서열을 갖는 단백질을 결합한 것이다.
- [0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 음이온성 고분자는 카르복실기 및/또는 히드록시기를 함유하는 생체친화성 고분자로서, 폴리감마글루탐산, 히알루론산, 셀룰로오스, 폴리아크릴산, 다당류, 이들의 유도체, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 음이온성 고분자는, 난용성 면역활성화 물질이 계면활성제 없이 수용액에 용이하면서 재현성있게 분산될 수 있도록 한다. 상기 음이온성 고분자는 동결건조 안정제 역할을 함으로써, 상기 점막부착성 아주버트 조성물이 안정하게 분말 형태로 제조될 수 있도록 하나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 음이온성 고분자는 백신의 항원과 정전기적 인력 또는 친유성 결합을 통해 상호작용할 수 있다.
- [0041] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산(γ -PGA)은 미생물종(바실리)에 의하여 천연합성되며, 다양한 적용들(예를 들어, 식품, 화장품, 및 의약품)에 사용되는 고-음이온성 고분자이며, 우수한 생체적합성 및 비-세포독성을 나타낸다. 상기 γ -PGA는 재조합 단백질 항원을 위한 점막부착성 전달 비히클로서 작용할 수 있으며, 또한 3-O-데스아실-4'-모노포스포릴 지질 A (MPLA) 및 QS21 과 같은 소수성 면역자극성 화합물의 결합을 위한 간편하면서도 강력한 전략을 제공할 수 있다.
- [0042] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 MPLA(Monophosphoryl lipid A), 이미퀴모드, 레시퀴모드, 플라겔린(flagellin), 시피지(CpG), 폴리아이시[poly(I:C)], 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0043] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 MPLA는 살모넬라 미네소타(*Salmonella minnesota*)의 Re595 균주 유래의 지질 다당류(LPS)의 무독화된 유도체이며, 톨-유사 수용체(TLR) 패밀리의 멤버인 TLR4를 통하여 작용하는 것으로 입증되었다. 항원 표시 세포(APCs)로서 작용하는 MPLA-자극 수지상 세포는, 증가된 수준의 공-자극 분자를 발현하고, B- 및 T-세포의 활성화 및 분화에 중요한 사이토카인을 분비한다. 그러나, MPLA는 수용액 내에서 분산되기 어려운 난용성 화합물이다. 이에, 에멀전으로의 제형화, 적은 양의 계면활성제 또는 도움 지질(helper lipids)을 포함하는 수성 분산액으로의 제형화, 및 리포솜 내 함유를 포함하는, 용해성을 증가시키기 위한 다양한 접근법이 사용되고 있다.
- [0044] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 사포닌은 QS21, Quil A, QS7, QS17, β -에스킨, 디지토닌 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0045] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 점막부착성 아주버트 조성물은 분말 형태일 수 있다.
- [0046] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 음이온성 고분자, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트(toll-like receptor agonist), 및 상기 사포닌은 약 1 : 약 0.001 내지 약 1 : 약 0.01 내지 약 10 의 중량비, 예를 들어, 약 1 : 약 0.01 : 약 0.01 또는 약 1 : 약 1 : 약 1의 중량비로서 포함되는 것일 수 있다.
- [0047] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 점막부착성 아주버트 조성물은 수용액에 용해시켜 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0048] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 음이온성 고분자, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트 및 상기 사포닌을 용해시키는 용매는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 에탄올(ethanol), 아세톤(aceton), 디메틸포름아마이드(DMF), 클로로포름(chloroform), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 점막부착성 아주버트 조성물 및 항원은 약 1 : 약 0.1 내지 약 10 의 중량비로서 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0050] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스이다.
- [0051] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 백신은 경구용 또는 식용으로 섭취가 가능한 것이 바람직하며, 또한 비강 투여용인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 백신은 인체 및 동물 예방용인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 닭, 칠면조, 거위, 오리, 꿩, 메추라기, 비둘기, 타조 등과 같은 야생조류, 가금류, 돼지, 개 및 고양이 등의 예방용인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 도 1은, 본원의 일 구현예에 있어서, 음이온성 고분자로서 폴리감마글루탐산을 이용하여, MPLA/QS21/항원을 조합하여 백신 조성물을 구성하는 방법을 도식화한 것이다. 상기 γ -PGA 는 소수성 MPLA, QS21 및 단백질 항원의 결합에 대한 간편하고 강력한 전략을 제공한다. sM2HA2 단백질 및, 트랜스멤브레인 도메인을 제외하고 세포외 및 세포질 도메인의 잔기에 걸친 컨센서스 서열 sM2의 다이어그램이며, 상기 sM2는 pRSET A 벡터 내에서 A/EM/Korea/W149/06 (H5N1) 유래 융합 펩타이드 HA2 (잔기 15-137) 와 컨주게이트되어 있다. 원핵의 발현 시스템으로부터 정제된 sM2HA2 단백질은 SDS-PAGE 에 의해 검출된다. 쿠마시 브릴리언트 블루 염색 (왼쪽 패널) 은 상기 단백질이 25 kDa 의 분자량을 가지는 것을 나타낸다. 나아가, 단백질은 항-M2 (중간 패널) 및 항-HA2 항체 (오른쪽 패널) 를 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다: 레인 1: sM2HA2 유전자가 없는 pRSET A 벡터를 함유하는 E. coli 의 세포 용해물 전체; 레인 2: 정제된 sM2HA2 단백질.
- [0055] 이하, 본원의 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명하며, 본 실시예에 의하여 본원의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0057] **[실시예]**
- [0058] **윤리 선언**
- [0059] 동물을 사용한 모든 실험은 실험실 연구 동물의 관리 및 사용에 대한 한국 NIH 지침에 따라 실시하였다. 모든 마우스 실험과정은 동물 관리 및 사용은 바이오리더스 코포레이션(BioLeaders Corporation, 대한민국, 대전)의 동물 실험 위원회, 프로토콜 번호 BSL-ABSL-13-010에 의해 승인되었다. 바이오리더스의 IACUC는 대한민국의 농림축산검역본부(Animal and plant Quarantine Agency (QIA))에 등록된 곳이다. 동물들의 고통을 최소화하기 위하여 최선을 다하였다.
- [0061] **< γ -PGA/MPLA/QS21 복합체의 제조>**
- [0062] γ -PGA (Mw, 5 kDa)을 바이오리더스 코포레이션(대전, 대한민국)으로부터 준비하였다. MPL(Avanti Polar Lipids Inc), QS21(Desert King Chile Inc.) 및 OVA(Boryung Pharmaceutical Co.). MPLA (1 mg, 0.57 mmol) 및 QS21 (1 mg, 0.50 mmol) 를 DMSO 및 20% THF의 혼합 용매 각각 용해시켰다. 상기 두 용매를 γ -PGA (13.3 mg)와 혼합하였고, 실온에서 5 분 동안 강하게 교반하면서 10 mL 의 증류수에 용해시켰다.
- [0063] 상기 반응 이후에, 상기 용액을 25℃에서 24 시간 동안 흔들면서 배양하였다. 상기 용액을 동결건조하였고, 10 mL 증류수에 재-용해시켰다. 상기 용액을 3 일 동안 탈이온수에서 셀룰로오스 막 튜브 (MWC0 12-14 kDa)로 투석하였다.
- [0064] 이후, 상기 용액을 동결건조하여 최종 산물 (γ -PGA/MPLA/QS21 복합체)을 파우더로 수득하였다.
- [0066] **<상기 γ -PGA/MPLA/QS21 복합체의 특성화>**
- [0067] FTIR-ATR (Cary 630 FTIR Spectrometer, Agilent Technologies) 분석을 위하여, 상기 γ -PGA/MPLA 복합체(γ -PGA:MPLA (1:5 (w/w))를 DMSO-d₆ : D₂O (8:2(v/v))의 혼합 용액에 용해시켰다. 그리고, 상기 γ -PGA/QS21 복합체(γ -PGA:QS-21 (1:5 (w/w))를 또한 DMSO-d₆ : D₂O (8:2(v/v))의 혼합 용액에 용해시켰다.
- [0068] 상기 γ -PGA 복합체 샘플의 분자량 및 물 반경(molar radius)은 굴절률(RI) 및 MALLS(multi-angle laser light-scattering) 검출기를 구비한 SEC(size-exclusion chromatography)로 측정하였다. 스태틱 레이저 광-산

란 검출기(static laser light-scattering detectors)로 SEC 크로마토그램의 각 보유 시간을 측정하였다. 산란 강도는 각 보유 시간에서의 농도에 관련되어 있으며, 이는 별개의 농도-감응성의 RI 검출기에 의해 측정된 것이다. 상기 시스템은 점도 검출기가 첨부되었을 때 0.8 mL/min의 유속으로 용리되었다. 세 개의 연속되어 연결된 HPLC-SEC 컬럼(TSKgel GMPWXL, TOSHO)이 사용하였다.

이러한 특성화는 컬럼 오픈 내에서 40℃에서 실시하였다. 또한, 상기 γ -PGA 및 γ -PGA 복합체 (γ -PGA/MPLA/QS21 및 γ -PGA/MPLA/QS21+ OVA)를 SEC 분석에서 이동상인 0.1 M NaNO₃에 용해시켰으며, 여과하였고 (기공 크기 = 220 nm; Millex-GV), 그리고 주입하였다(200 μ l). 광 산란을 DAWN Heleos II MALLS 검출기로 측정하였다. RI 검출기로는 Viscotek VE3580 RI 검출기를 사용하였다. PBS에 재부유시킨 상기 γ -PGA/MPLA/QS21+OVA의 여기 및 형광 방출 스펙트럼은 형광 분광광도계 (FS-2, Scinco, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. γ -PGA의 부동 활성(antifreeze activities)은 DSC (Differential Scanning Calorimetry)를 이용하여 측정하였고, 계산된 값을 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

샘플	농도	융합 열	AF*)
DW	-	333	-
γ -PGA	2%	293	5.00
Glucose	2%	278	7.26

$$*) AF(\text{부동 활성}) = [\Delta H_{\text{water}}(1-w) - \Delta H_A] / \Delta H_{\text{water}}W$$

여기서, 상기 w는 용액 내 폴리머의 중량을 의미함.

ΔH_A , ΔH_{water} : 샘플(H_A) 및 물(H_{water})의 샘플에 대한 융합열

표 1은 γ -PGA/MPLA/QS21 내에서 γ -PGA의 부동 활성을 DSC로 측정된 후에 계산한 것이다.

<PGA/MPLA/QS21의 저장 안정성 및 아주번트 효과>

상기 γ -PGA/MPLA/QS21 (CA-PMQ) 복합체의 저장 안정성 및 아주번트 효과를 시험하기 위하여, 혈청 내에서의 상기 OVA 항원-특이적 IgG 반응을 4 달의 보관-수명(shelf-life) 저장 (22-29℃) 이후에 분석하였다. 상기 항체의 역가는 각 마우스 (n=5)의 혈청 샘플에 대하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하여 결정하였다.

우선, 96-웰 면역흡착 플레이트(눈크, Denmark)를 100 μ L의 각 항원(1 μ g mL⁻¹)으로 4℃에서 밤새 감작시켰다. 상기 플레이트를 차단시켜(PBST 중의 2 % BSA, 37℃에서 1 시간) 비특이 결합을 방지한 후, 차단 완충용액 내에 희석된, 100 μ L의 2 배 계열 희석된 시료를 상기 플레이트에 첨가(37℃에서 1 시간)한 후, 1:4000으로 희석된 HRP-결합 염소 항-마우스 IgG 항체(Southern Biotech)를 첨가하였다. 실온에서 1 시간 동안 배양한 후, 100 μ L의 퍼옥시다아제 기질 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB; BD Pharmingen)을 각 웰에 첨가하였다. 상기 반응을 2M의 H₂SO₄를 첨가하여 종료시켰다. 흡광도는 450 nm의 파장에서 ELISA 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale CA)로 기록하였다. 종점 역가는 0.2의 광학 밀도(O.D.) 컷오프 수치를 사용하여 결정하였다.

<in vivo SPECT/CT 이미징>

요오드 시험관 방법을 이용하여 OVA를 ¹²³I로 방사선표지하였다. 간략히, Na¹²³I을 요오드 시험관 (Pierce,

Rockford, IL, 미국)에 첨가하였고, 5 분 동안 서서히 교반하였다. 상기 용액에, 1 mL의 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)용해시킨 OVA 0.4 mg를 첨가하였고, Na^{123}I 와 실온에서 1 시간 동안 반응하게 하였다. 상기 방사선표지된 OVA (^{123}I)를 PD-10 컬럼 (Pierce)을 이용하여 정제하였고, 상기 산물을 원심 분리기(켓-오프: 10 kDa, Millipore, Billerica, MA, 미국)를 이용하여 응축시켰다 (도 7).

[0080] 그 후, 상기 OVA (^{123}I)를 PBS (대조군 용)와 혼합하거나 CA-PMQ를 PBS에 용해시킨 후에, 사용에 앞서 30 분 동안 반응하게 하였다. OVA (^{123}I) : CA-PMQ의 질량 비는 1:5 이었다. 대략 40 μL 의 샘플을 BALB/c 마우스 (생후 6 주, 대략 20 g)에 비강내 투여하였다. 동물 SPECT 및 CT를 대한민국 기초과학 오창 연구원 (청원, 대한민국)의 인비온 PET/CT/SPECT (Siemens, Knoxville, TN, 미국)에서 수행하였다. 투여 6 시간 및 12 시간 후에, 상기 마우스를 스캔하였다

[0082] <재조합 sM2HA2 융합 단백질의 제조>

[0083] 트랜스멤브레인 도메인을 제외한 세포외 및 세포질 잔기에 걸친 컨센서스 sM2를 데이터베이스 내에서 H5N1, H1N1 및 H9N2 서브타입 서열의 분석으로부터 획득하였다.

[0084] 기존의 연구들은, 상기 세포외 도메인은 인플루엔자 바이러스 서브타입 중에서도 특히 (아미노산이) 잘-보존되었고, 인플루엔자 바이러스 감염에 대해서 보호를 할 수 있는 단일클론 항체의 유도를 위한 에피토프로서 인식되고 있음을 나타내었다.

[0085] 상기 보존된 에피토프 (아미노산)의 역할을 고려하면서, 본원의 실시예에서 사용된 다른 서브타입과의 최적의 상동성을 보장하기 위하여, H5N1의 14 (E-G) 및 18 (R-K) 위치의 잔기를 변형하였다. 상기 컨센서스 주형을, 말단에 제한효소 사이트 (SecI 및 Eco RI)를 포함하는 특이적 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응 (PCR)으로 증폭하였다. 이후, 상기 유전자를 TA 클로닝 방법 (Promega, 미국)을 사용하여 pGEM-T 간편 벡터(Easy vector) 내로 클로닝하였다. 그 후, 상기 유전자 단편을 절단하였고, 플라스미드 pRSET A-sM2를 형성하기 위하여 대응 사이트를 이용하여 pRSET A 벡터 (인비트로젠, 미국)의 다중-클로닝 사이트 내로 프레임-내(in-frame) 삽입하였다.

[0086] 유사하게, A/EM/Korea/W149/06 (H5N1)로부터의 HA2 유전자 (잔기 15-137)를 5' 및 3' 말단 사이트 각각에 Eco RI 및 Hind III 사이트를 삽입함으로써 변형하였고, 타겟 단백질의 원핵의 발현에 대한 플라스미드 pRSET-A-sM2HA2를 형성하였다. 상기 플라스미드 구조체를 제한효소의 절단으로 확인하였고, 시퀀싱으로 입증하였다 (솔젠트, 대전, 대한민국).

[0087] E. coli BL21 (DE3) 세포를 열 충격 방법을 사용하여 pRSET-A-sM2HA2 플라스미드로 형질전환시켰다. 이후, 상기 콜로니를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 앰피실린 (고성능액체크로마토그래피(HPLC)에 따르면 96.9% 순도; 칼바이오켄, 미국) 및 35 mg/mL 의 클로람페니콜 (고성능액체크로마토그래피(HPLC)에 따르면 97% 순도; 칼바이오켄)이 공급된 5 mL의 LB 브로스에 부착(seeding)하였고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 교반하면서 재성장시켰다.

[0088] 그 후, 세포를 대용량 LB 배지에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 200 rpm으로 교반하면서 밤새 배양하였다. 상기 배양으로 0.6의 광학 밀도 (OD_{600})에 도달하였을 때, 2 mM의 이소프로필- β -D-티오갈락토피라노사이드 (99% 순도; 바이오 베이직, 온타리오, 캐나다)을 첨가한 후에 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 추가로 12 시간 동안 배양함으로써 타겟 단백질의 발현을 유도하였다. 배양물은 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 분 동안 6,000 $\times g$ 에서 원심분리하여 획득하였다. 이후, 세포 펠릿을 20 mM 트리스-HCl(Tris-HCl), 0.5 M NaCl, 10% 글리세롤 및 프로테아제 억제인자 (1 mM 페닐메틸술폰닐 플루오라이드, 시그마-알드리치, 서울, 대한민국)를 포함하는 20 Ml의 냉 완충액에서 재-부유하였다. 박테리아 용해를 25% 진폭으로 2-초 펄스 및 1 초 정지의 간격으로 3 분 동안의 초음파 처리로 수행하였고, 이후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리하였다 (12,000 $\times g$, 20 분).

[0089] 그 후, 상층액을 제거하였고, 잔여 펠릿은 봉입체 (IBs)로서 잔류하였다. 상기 봉입체를 변성 완충액 (20 mM 트리스-HCl, 0.5 M NaCl, 10% 글리세롤 및 6 M 우레아)에서 재-부유하였고, 1 분 동안 초음파처리하였으며 바로 전과 같이 원심분리하였다. 부유물 상층액을 제거하였고, 잔류 펠릿을 변성 완충액 II (20 mM 트리스-HCl, 0.5 M NaCl, 8 M 우레아, pH 8.0)에서 재-부유하였고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 교반하였다. 상기 펠릿을 초음파 처리하였고 바로 전과 같이 원심분리하였다.

[0090] 그 후, 상층액을 상기 봉입체로부터 레스큐된 단백질(rescued protein)로 분리하였고, His-태그 친화 크로마토그래피 (키아젠, 미국) 로 정제하였다. 이후, 4 ℃ 및 PBS 에서 상기 정제된 단백질을 투과 셀룰로오스 막 (분자 컷-오프: 12-14 kDa, 스펙트럼 연구소, 이스트 다마끼, 오클랜드, 미국) 을 사용하여 투석하였다.

[0091] 상기 타겟 단백질을 SDS-PAGE 로 확인하였고, 브래드포드 분석 (바이오-래드, 허큘리스, CA, 미국) 을 이용하여 농도를 측정하였다. 면역 검출을 위하여, 마우스 항-히스티딘 항체 (1:500, 인비트로젠, 칼스테드, CA, 미국) 및 토끼 항-M2 및 항-HA2 항체 (1:1000)를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 본 실험에서 사용된 상기 토끼 항-M2 및 항-HA2 항체는 KLH-컨쥬게이트된 M2 및 HA2 펩타이드를 2-주 간격으로 두 번 토끼에 근육 내 접종함으로써 획득하였다. 상기 정제된 단백질은 백신 항원으로 사용되었다.

[0093] <동물 그룹핑 및 백신접종>

[0094] SPF (specific pathogen free) BALB/c (생후 5 주) 마우스 (n=380) 를 삼타코 (서울, 대한민국) 에서 구입하였다. 상기 마우스를 SPF 환경에서 보관하였고 IACUC(대전, 대한민국)의 승인을 얻었다. 상기 마우스를 각각 5 군을 포함하는 5 실험 세트로 분리하였다. 5 세트 중에서, 3 세트는 각 군 당 14 개체의 마우스를, 2 세트는 각 군 당 17 개체의 마우스를 가졌다. 각 세트 중 3 개 군의 마우스를 20 μ L 의 sM2HA2 (2 μ g) 단독 또는, CA-PMQ 또는 CT 아주버트와 함께 1-주 간격으로 3 회 비강내 백신화하였다. 대조군으로서, 각 세트 중 2 개 군을 PBS 또는 CA-PMQ 단독으로 유사하게 처리하였다.

[0095] 모든 마우스를 접종 전에 에테르로 마취시켰고, 본 발명은 생물안전도수준(BSL)-2 실험실 시설에서 수행되었다. -1 (실험 전), 7 (첫 번째), 21(두 번째), 35(세 번째), 및 180 (장기 지속) 일 차에, 혈액 샘플을 안구-후면 (retro-orbital) 망상조직에서 획득하였고, 혈청을 원심분리로 분리하였으며, 추후의 분석을 위하여 -20 ℃ 에서 보관하였다. 최후 백신접종의 1 주 및 24 주 후에, 각 군의 3 마리의 마우스를 임의로 희생시켜 폐 및 창자로부터 샘플을 획득하였으며, 점막 IgA 연구를 위하여 70 ℃ 에서 보관하였다. CTL 반응을 분석하기 위하여, 35 일 차에 한 세트 중 임의로 3 마리의 마우스에서 비장을 무균으로 획득하였다.

[0097] <sM2 및 HA2에 특이적인 항체>

[0098] 이소타입 (IgG1 및 IgG2a), 및 점막 IgA (폐 및 창자) 를 포함하는 혈청 IgG 값은, 전술된 바와 같이 코팅 항원으로서의 sM2 및 HA2 단백질을 사용한 ELISA 를 이용하여 결정하였다. 본원의 실시예에서 사용된 상기 코팅 항원은 pRSET A-sM2 및 pRSET A-HA2 플라스미드의 E.coli 발현에 의해 획득하였으며, 전술된 바와 같이 His-태그 친화 크로마토그래피 (키아젠, 미국) 로 정제하였다. 96-웰 ELISA 플레이트 (눈크, 로스킬라이트, 덴마크) 를 4 ℃ 및 코팅 완충액 (pH 9.6) 에서 밤새 300 ng/웰 의 sM2 또는 HA2 단백질로 코팅하였다. 0.05% 트윈 20 (PBST) 을 함유하는 PBS 로 세척한 후에, 상기 플레이트를 300 μ L 의 10% 의 스킵 밀크로 블록하였다.

[0099] IgG, IgG1, IgG2a 의 검출을 위하여 2% 스킵 밀크를 함유하는 PBS 내에서 1:200 으로 희석된 마우스 혈청, 또는 국부 IgA (폐 및 창자)의 검출을 위한 균질화된 조직으로부터의 희석되지 않은 상층액을 지정된 웰에 넣어주고 37 ℃ 에서 2 시간 동안 배양하였다.

[0100] 그 후, 1:3,000 으로 희석된 호스래디쉬 퍼옥시데이즈-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG, IgG1, IgG2a 또는 IgA (시그마-알드리치, 세인트 루이스, 미국)를 첨가하였다. 37 ℃ 에서 2 시간 동안 배양한 이후, 테트라메틸벤지딘 (TMB, 밀리포어, 베드포드, MA) 을 함유하는 100 μ L 의 기질 용액을 플레이트에 첨가하여 반응을 10 분 동안 진행시켰다. 2N의 H₂SO₄ 첨가하여 반응을 종료시킨 후에, 450 nm 에서의 광학 밀도를 ELISA 자동 판독기 (Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

[0102] <sM2 및 HA2 에 특이적인 T-세포 ELISPOT>

[0103] 지라세포에서의 인터페론 (IFN)- γ 및 인터류킨 (IL)-4 ELISPOT 분석을 전술된 바와 같이, 마우스 IFN- γ 및 IL-4 ELISPOT 키트 (BD 바이오사이언스, 미국) 를 이용하여 수행하였다.

[0104] 간략하게는, BD ELISPOT 96-웰 플레이트를 4 ℃ 에서 밤새 PBS 내에서 항-마우스 IFN- γ 및 IL-4 포획 항체 (5 μ g/mL) 로 코팅하였다. 상기 항체를 제거한 후에, 플레이트를 10% 소태아 혈청 (인비트로젠, 칼스테드, CA, 미

국)를 함유한 완전한 RPMI 1640 배지를 포함하는 용액으로 블록하였고, 실온에서 2 시간 동안 배양하였다.

[0105] 백신화된 마우스로부터의 지라세포를 무균으로 분리하였고, sM2 또는 HA2 단백질 (1 µg/웰), 배지 단독 (음성 대조군), 아주번트 단독 또는 5 µg/mL 파이토헤마글루티닌 (양성 대조군, 인비트로젠, 칼스테드, CA, 미국)을 포함하는 배지에 5×10^5 세포/웰로 첨가하였다. 5% CO₂ 하의 37 °C 에서 24 시간 배양 후에, 플레이트를 비오틴이 부착된 항-마우스 IFN-γ 및 IL-4 항체, 스트렙타비딘-호스레디쉬 퍼옥시데이즈, 및 기질 용액으로 순차적으로 처리하였다.

[0106] 최종적으로, 스팟을 이뮤노스캔 엔트리(ImmunoScan Entry) 분석기 (셀룰러 테크놀로지, 셰이커 헤이즈, 미국)를 이용하여 카운팅하였다.

[0108] <바이러스 및 공격 접종 시험>

[0109] CA-PMQ 로 아주번트화된 sM2HA2 백신의 다양한 인플루엔자 바이러스 대항하는 보호 효능을 조사 및 비교하기 위하여, 마우스를 병원균 A/EM/Korea/W149/06(H5N1), A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Aquatic bird/Korea/W81/2005 (H5N2), A/Aquatic bird/Korea/W44/2005(H7N3) 또는 A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2) 인플루엔자 서브타입으로 감염시켰다. 본원의 실시예에서 사용된 모든 바이러스는 최영기 박사님(의과 대학 및 의학 연구소, 충북국립대학교, 청주, 대한민국)으로부터 제공받았다.

[0110] 마우스를 마취시켰고 최후 백신접종의 1 주 후에, 20 µL 의 PBS 내 함유된 MLD₅₀ 의 10 배의 마우스-적합화된 바이러스로 비강내 감염시켰다. 마우스를 13 일 동안 관찰하였고, 체중 감소 및 생존을 측정하기 위하여 시간 포인트를 고정시켰다. 폐에서의 바이러스 역가를 체크하기 위하여 각 군에서 6 마리의 마우스를 3 및 5 dpi 에서 희생시켰고, 각 군에서 5 마리의 마우스는 생존 시험에 사용하기 위해서 남겨 놓았다. 생존율은 사망 또는 동물을 안락사시키는 시점인 25% 체중 감소의 컷-오프에 근거하여 결정하였다. 고통을 최소화하기 위한 모든 노력을 하였고, 최종 관찰 후에 생존한 모든 마우스는 5 분 동안 CO₂ 를 흡입시켜 인도적으로 안락사시켰다.

[0112] <폐의 바이러스 역가 및 조직병리학적 분석>

[0113] 50% 조직 배양 감염 투여량 (TCID₅₀) 분석을 수행하여 전술된 바와 같이(33) 폐의 바이러스 역가를 결정하였다. 간략하게는, 폐 조직을 항균제 및 항진균제 (깁코, 그랜드 아일랜드, NY, 미국)를 포함하는 PBS 내에서 균질화하였고 세포성 부유물을 제거하기 위하여 12,000×g 로 원심분리하였다. 모든 샘플은 즉시 순차적으로 10-배 희석하였고, 37 °C 및 습한 대기하에서 1 시간 동안 컨플루언트(confluent) MDCK 세포와 배양하였다. L-1-토실 아마이드-2-페닐에틸 클로로메틸 케톤 (TPCK) 트립신 (썬도 퍼서 사이언티픽, 락포드, 미국)을 포함하는 중층 배지를 상기 감염된 세포에 첨가하였고, 72 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0114] 바이러스 역가는 세포 변성 효과 (cytopathic effect, CPE)를 관찰할 후에 헤마글루티닌 (HA) 테스트에 근거하여 결정하였고, 리드 및 멘치(Reed and Muench) 방법으로 계산하였으며, Log₁₀ TCID₅₀/폐 조직으로 나타내었다. 조직병리학 측면에서, 폐 조직은 5 dpi 에서 에테르 혼수-마취시킨 마우스로부터 수득하였다. 상기 조직을 즉시 10% 중성 완충된 포르말린으로 고정시켰고, 파라핀 왁스에 포매하였으며, 박편하였고, 슬라이드에 올려놓았으며, 에오신 염료로 염색하였다. 조직병리학적 변화는 전술된 바와 같이 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0116] <통계적인 분석>

[0117] 데이터는 평균±표준편차 (S.D.)로 나타내었고, 적어도 3 회의 독립적인 실험을 대표한다. 군 간의 차이는 분산 분석 (ANOVA)을 이용하여 분석하였으며, 평균들은 스튜던트 티-테스트로 비교하였다. <0.05 및 <0.01 의 P-값을 각각 중요한 수치 및 매우 중요한 수치로 간주하였다. 생존의 비교는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0 을 사용하여 로그-랭크 테스트로 수행하였다.

[0119] <sM2HA2 재조합 단백질 및 γ-PGA/MPLA/QS21 아주번트의 제조>

- [0120] 도 1 은, 본 실시예에 있어서 컨센서스 매트릭스 단백질-2 (sM2) 및 (HA2)의 스타르크 도메인을 포함하는 재조합 융합 단백질 sM2HA2 및 점막부착성 조합 아주번트 γ -PGA/MPLA/QS21 (CA-PMQ) 의 조합으로 구축될 수 있는 전반적인 백신 시스템을 나타낸 것이다.
- [0121] 도 1a 는, 본 실시예에 있어서 소수성 MPLA, QS21, 및, 음이온성 γ -PGA 를 사용하는 재조합 단백질의 동시 결합에 대한 간편하고 강력한 전략을 제시하는 것이다. 상기 백신 시스템은 γ -PGA 및 MPLA/QS21 사이의 수소-결합 및 소수성 상호작용-유도된 복합체의 형성 및 γ -PGA 및 단백질 항원 사이의 이온성 및 소수성 상호작용-유도된 복합체의 형성으로 제조될 수 있다 (도 1a, 위쪽 및 중간 패널). 인플루엔자 A 바이러스에 대항하는 보호의 범위를 개선하기 위하여, 우수하게-보존된 sM2 및 HA2 융합 구조체를 획득하였다 (도 1a, 아래쪽 패널). 상기 재조합 단백질 (sM2HA2) 은 E. coli 의 봉입체로부터 다시 접었고(refolded), His-태그 친화 크로마토그래피로 정제하였으며 투과 셀룰로오스 막을 이용하여 투석하였다. 상기 정제된 단백질을 SDS-PAGE 및, 토끼 항-M2 및 항-HA2 항체를 이용한 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 쿠마시 염색 및 면역블로팅을 통하여, 단백질은 예측한 바와 같이 25 kDa 의 분자량에서 관찰되었다 (도 1a, 아래쪽 패널).
- [0122] 상기 γ -PGA 내의 카르복시기의 존재는 점막층과의 강력한 상호작용 모이어티를 제공할 수 있다. 이러한 상호작용은 γ -PGA 및, 점액 당단백질 내의 양성자-받개 간의 수소 결합의 결과에 의한 것으로 생각된다. 따라서, CA-PMQ 는 sM2HA2 의 점막부착성 전달 비히클로 작용할 수 있으며, 강력한 점막 및 전신성인 항-바이러스 면역을 유도할 수 있다 (도 1b). γ -PGA 를 MPLA 및 QS21 과 혼합하였을 때, 비수용성 MPLA 및 양친성 QS21 은 수용액에 용이하게 분산될 수 있다. pH 5.5-7.4 에서 이온화된 카르복시기로부터의 정전기적 반발력으로 인하여, γ -PGA 의 코일링되지 않은 팽창된 상태는 MPLA 및 QS21 과의 수소 결합 및 2 차 상호작용을 더 용이하게 한다.
- [0123] 한편, 본 실시예에 있어서 FTIR-ATR 스펙트럼 결과는 도 2a 에 나타내었으며, 구체적으로는 γ -PGA, MPLA, QS21, γ -PGA/MPLA, γ -PGA/QS21 의 FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 도면 내의 원 표시는 γ -PGA (2,509.11 cm^{-1}) 의 감소된 카르복시산 양성자화(Protonation) 및 증가된 수소 결합 (3,435.31 cm^{-1})의 화학적 이동을 나타낸 것이다.
- [0124] 도 2a 에 나타낸 바와 같이, γ -PGA 의 MPLA 및 QS21 과의 수소-결합 상호작용을 뒷받침한다. 상기 γ -PGA 의 MPLA 및 QS21 과의 상호작용은 특성분석되었고, 주목할만한 두 부분이 나타났다 (예를 들어서, 2,509.11 cm^{-1} 에서의 카르복시산 피크, 3,416.31 cm^{-1} 에서의 수소 및 카르복시산염의 조합). 3416.31 cm^{-1} 포인트를 나타내는 상기 수소-결합은 γ -PGA 의 MPLA 및 QS21 과의 분자-간 수소 결합으로 증가하였다.
- [0125] 상기 카르복시산 피크 (2,509.11 cm^{-1} 에서의) 는 또한 γ -PGA 의 카르복시산 기들이 MPLA 및 QS21 과의 수소 결합을 형성하는 데에 사용됨에 따라서 복합체 제형화 이후에 감소하였다. 상기 γ -PGA 의 소수성 주 사슬은 또한 MPLA 및 QS21 의 소수성 알킬 사슬과 소수성 상호작용에 의하여 상호작용할 수 있다.
- [0126] 항원-특이적 면역 반응을 조사하기 위하여, OVA (오발부민), 단백질 항원 모델, 또한 γ -PGA 에 결합될 수 있다. γ -PGA 매트릭스 내 이온성 및 소수성 상호작용을 통한 OVA 의 효율적인 분산은 형광 분광광도법을 이용하여 연구하였다. 도 2b 에, 본 실시예에 따른 γ -PGA/OVA (FITC) 복합체의 여기 및 방출 스펙트럼을 나타내었으며, 상기 도 2b 에 나타낸 바와 같이, OVA (FITC) 를 γ -PGA 와 혼합하였을 때, OVA (FITC) 의 여기 및 방출 피크 모두가 증가하였다. 나아가, OVA (FITC) 의 방출 피크는 청색-편이를 나타낸 반면에, OVA (FITC) 의 여기 밴드는 적색-편이되었으며, 이는 γ -PGA 가 분산제로서 작용하고, OVA (FITC) 와 소수성 상호작용을 형성하여 OVA (FITC) 의 뭉침을 방해하는 것을 제시하는 것이다.
- [0127] 한편, 도 2c 에는 본 실시예에 따른 γ -PGA (검은색 사각형), γ -PGA/MPLA/QS21 복합체 (파란색 삼각형), 및 γ -PGA/MPLA/QS21-OVA 복합체 (붉은색 원)의 물 질량에 대한 물 반경의 GPC-MALLS 분석 ($\triangle R/\triangle Da \times 10^5$) 결과를 나타내었다. 상기 도 2c 에 나타낸 GPC-MALLS 데이터와 같이, γ -PGA 를 MPLA, QS21 및 OVA 와 혼합한 후에, 기울기 (물 반경을 물 질량으로 나눈 것) 가 감소하였음을 나타내었으며, 이는 γ -PGA, MPLA, QS21, 및 OVA 의 복합체가 형성되었음을 제시하는 것이다. MPLA 및 QS21 과의 결합 후에, CA-PMQ 복합체는, 백신 아주번트의 서로 다른 형태의 추후의 제형화 및 투여 전에 다양한 바이러스성 항원의 조합을 위한 중간 물질로 사용될 수 있는 파우더 형태로 보관될 수 있다 (입자-기반 또는 하이드로겔-타입 백신 아주번트). 동결건조된 CA-PMQ 복합체는 저장 안정성 측면에서 냉장(냉동) 보관을 요하는 액체 제형인 전통적인 아주번트에 비하여 이점을 갖는다.

- [0128] 나아가, CA-PMQ 복합체의 동결건조 공정에서, γ -PGA 는 MPLA 및 QS21 의 동해방지제로서 작용할 수 있다. 동결건조에 의한 샘플 제조 중에, 동결 및 해동 공정은 생물학적 활성 물질을 빈번하게 손상시킨다. 바실리에서 생성된 γ -PGA 는 높은 산성의 아미노산 조성으로 인하여 높은 부동 활성을 갖는 것으로 기대된다. γ -PGA 의 부동 활성을 DSC 로 측정하였고 계산하여 표 1 에 나타내었다. γ -PGA 의 부동 활성은 상당하였다 (표 1).
- [0129] 본 실시예에 있어서 동결건조된 CA-PMQ 복합체의 면역자극 활성을 제조-후 4 달 후에 체크하였고 그 결과를 도 2d 에 나타내었다: OVA 단독 (1), CA-PMQ 로 아주번트화된 직후의 OVA (2) 및 제형화한 지 4 달 후 (3) 에 시험한 OVA-특이적 항체 역가. 상기 도 2d 에 나타낸 바와 같이, 항체 역가 수치는 거의 동일하였다. 상기 실험의 결과는 γ -PGA-기반 물질이 간편하고 강력한 제조 전략에 의하여 소수성 면역자극성 물질의 결합에 사용될 수 있음을 제시한다.
- [0130] 본원의 실시예에서는 또한 OVA (항원 모델로서의) 및 CA-PMQ 로 구성된 조합 백신 시스템의 점막부착성 특성을 조사하였으며, SPECT/CT 를 이용하여 결정된 비강 내 OVA 항원의 체류 시간을 도 2e 에 나타내었다: CA-PMQ 의 존재 및 부재 하에 [^{123}I]-표지된 OVA (OVA (^{123}I)) 의 비강 투여 후 6 시간 및 12 시간 켜의 SPECT 이미지들(붉은색 점 원: 비강, 노란색 화살표: 갑상선). γ -PGA 의 점막부착성 특성을 조사하기 위하여, OVA 를 CA-PMQ 에 첨가하였고, 상기 혼합물을 비강내 투여하였다. 투여된 투여량의 인 비보(*in vivo*) 컨디션을 추적하기 위하여, OVA 를 요오드 (^{123}I) 로 표지하였고, 마이크로 SPECT/CT (single positron emission computed tomography/computed tomography) 이미지를 수행하였다. 구체적으로는, 각 4.5 mL 의 분획물에서 대략적으로 500 μL 를 얻은 후에 이를 응축시켰다. 상기 반응을 두 개의 회분조에서 동시에 수행하였고, 총 1 mL 의 OVA(^{123}I) 가 생성되었다.
- [0131] 도 2e에 나타낸 바와 같이, 마이크로 SPECT/CT 전신 이미지를 수행하는 것으로, CA-PMQ 와 함께 투여된 OVA (^{123}I) 의 강력한 SPECT 신호를 관찰하였다. 상기 신호는 12 시간 이후에도 강력하게 남아 있었다. 대조적으로, OVA (^{123}I) 가 단독으로 투여되었을 때의 신호는 점막 섬모의 청소 메커니즘에 의하여 6 시간 내에 급격하게 감소하였다.
- [0132] 이러한 실험적 결과는 γ -PGA 가 점막층 내로 동시-전달된 OVA 항원의 체류 시간을 증가시키고, 비강 상피 세포에 대한 통제된-방출 저장고로서 작용하는 것을 제시하는 것이다. 본원의 실시예를 통하여, γ -PGA 가 물리적 사슬 얽힘을 통하여 뮤신 분자와 상호작용하고, 올리고당 사슬의 당 잔기와의 수소 결합을 형성할 수 있는 것을 추측할 수 있다. 상기 γ -PGA 는 비강 분비물 (pH 6.0-6.5) 의 pH 에서 코일링되지 않은 팽창된 상태이기 때문에, 이온화된 관능기로부터 발생한 정전기적 반발력은 γ -PGA 가 점액의 당단백질과 기계적인 사슬 얽힘 및 2 차 상호작용을 용이하게 한다.
- [0133] CA-PMQ 의 면역 반응을 유도 효과를 결정하기 위하여, 단백질 항원 모델로서의 OVA 단백질을 CA-PMQ 와 함께 비강내 경로를 통하여 투여하였으며, 항체 역가는 ELISA 분석을 이용하여 결정하였다. CA-PMQ/OVA 군에 의해서 유도된 OVA-특이적 혈청 IgG 의 수준은 OVA 단독 군에 의해서 유도된 수준에 비하여 매우 높았다 (도 3A). 유사하게, 높은 수준의 OVA-특이적 IgA 역가가 점막 사이트에서 검출되었다 (도 3B). 추가적으로, OVA-특이적 IgG1 및 IgG2a 수준을 또한 검출하였으며, IgG1 및 IgG2a 모두는 CA-PMQ 또는 CT 와 함께 OVA 가 접종된 군에서, OVA 단독과 비교하였을 때, 매우 증가하였다 (도 3C).
- [0134] 세포성 면역 반응은 백신화된 마우스로부터의 지라세포 내에서의 (D) IL-4 및 (E) IFN- γ 사이토카인의 생성을 통해 분석하였다. OVA 펩타이드 (SIINFEKL, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 로 백신화된 마우스(n=5)의 지라세포를 자극하였고, ELISPOT 분석을 이용하여 결정하였다. OVA 만으로 면역화된 마우스 또는 대조군과 비교하여, CA-PMQ로 백신화된 마우스는 OVA 단백질로 자극된 비장에서 더 많은 IL-4 및 IFN- γ -분비 세포의 수를 나타내었다 (도 3D 및 3E). 상기 결과는 상기 CA-PMQ 시스템이, 강력한 점막 면역뿐만 아니라, 체액성 및 세포성 면역 반응 모두를 강력하게 유도할 수 있는 효과적인 아주번트로서 기능을 할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0135] 모든 데이터는 세 번 얻었으며, 평균 값 $\pm$ 표준편차 (SD) 로 나타내었다. 별표들은 OVA/PMQ, OVA/CT 와 대조군 간의 유의적인 차이를 나타낸다 (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$).
- [0137] - sM2HA2 를 CA-PMQ 와 함께 점막 백신접종하는 것은 sM2- 및 HA2-특이적 면역 반응을 유도하였다:

- [0138] CA-PMQ의 면역 반응을 유도하는 능력을 결정하기 위하여, 마우스의 군들을 2 μ g의 sM2HA2 단독 또는 CA-PMQ의 조합으로 비강내 면역화하였다. 상기 CA-PMQ의 성분은 실제로 일반적으로 안전하다고 인정(generally recognized as safe, GRAS)된 것이며, 이의 안정성 프로파일(safety profile)은 이미 측정되었다. CA-PMQ의 마우스 내 투여 이후, 체중 감소 및 호흡기 고통이 관찰되어지지 않았다. 잘 알려진 점막 아주번트 콜레라 독소(CT)와 CA-PMQ의 효과를 비교하기 위하여, 마우스 군들을 CT와 sM2HA2를 함께 사용하여 유사한 방법으로 면역화하였다.
- [0139] BALB/c 마우스는 0, 2 및 4주 차에 sM2HA2 단독, CA-PMQ 또는 CT 아주번트와 함께의 sM2HA2, CA-PMQ 단독, 또는 PBS로 면역화되었다. 혈청 샘플은 -1(전), 7(첫 번째), 21(두 번째) 및 35(세 번째)일 차에 채취하였다. 혈청 IgG, 폐 및 창자 IgA는 ELISA로 검출하였고 450nm의 흡광도를 측정하였다. sM2- 또는 HA2-특이적 전신성 및 국소적 항체의 측정을 위하여, ELISA 플레이트를 정제된 sM2 또는 HA2 단백질(3 μ g/mL)로 코팅하였다. (A) sM2에 특이적인 혈청 IgG 항체 (B) 폐(왼쪽 패널) 및 창자(오른쪽 패널) 내의 sM2에 특이적인 점막 IgA. (C) HA2에 특이적인 혈청 IgG 항체 및 (D) 폐(왼쪽 패널) 및 창자(오른쪽 패널) 내의 HA2에 특이적인 점막 IgA. 지라세포는 마지막 면역화의 10일 후에 수득하였다. 세포들을 sM2 또는 HA2 단백질로 인 비트로(*in vitro*) 재-자극하였고, 사이토카인-형성 세포 지점을 분석에 의해 결정하였다. 5×10^5 지라세포 당 IFN- γ 및 IL-4 지점-형성 세포를 결정하였다.
- [0140] sM2(도 4A) 및 HA2(도 4C)에 특이적인 혈청 IgG 반응은, CA-PMQ 아주번트와 함께한 sM2HA2 군에서는 sM2HA2 단독 군보다 매우 높은 수준으로 유도되었다. PBS 및 CA-PMQ 단독으로 백신접종된 대조군은, CA-PMQ 및 CT 없는 sM2HA2 군에서 보여진 것보다 높은 수준의 sM2- 또는 HA2-특이적 면역 반응을 유도하지 못하였고, 이는 상기 증가된 반응이 CA-PMQ 또는 CT에 의한 것이라는 것을 나타내는 것이다. 유사하게, sM2 및 HA2에 특이적인 높은 IgA 역가가 점막 및 비점막 사이트 모두에서 검출되었다.
- [0141] 도 4B 및 D(왼쪽 패널)에서 나타난 것과 같이, CA-PMQ 또는 CT 아주번트와 함께 sM2HA2를 사용하여 면역화된 마우스는, sM2HA2 단독 또는 상기 대조군을 사용하여 면역화된 마우스보다, 매우 높은 수준의 폐 점막 IgA를 나타내었다. 흥미롭게도, sM2HA2/CA-PMQ 또는 sM2HA2/CT를 이용한 백신접종은 창자에서도 높은 수준의 sM2- 및 HA2-특이적 IgA를 유도하였다(도 4B 및 4D, 오른쪽 패널).
- [0142] 추가적으로, sM2- 및 HA2-특이적인 IgG1 및 IgG2a 수준을 또한 측정하였다. 구체적으로는, BALB/c 마우스는 0, 2 및 4주 차에 sM2HA2 단독, CA-PMQ 또는 CT 아주번트 함께의 sM2HA2, CA-PMQ 단독 또는 PBS로 비강내 면역화되었다. 혈청 샘플은 -1(실험 전), 7(첫 번째), 21(두 번째) 및 35(세 번째)일 차에 채취하였다. sM2- 또는 HA2-특이적인 IgG1 및 IgG2a 항체의 측정을 위하여, ELISA 플레이트를 정제된 sM2 또는 HA2 단백질(3 μ g/mL)로 코팅하였다. 항체의 흡광도는 간접(indirect) ELISA를 이용하여 450 nm의 흡광도로 측정하였다.
- [0143] 도 8A는 sM2에 특이적인 IgG1(왼쪽 패널) 및 IgG2a(오른쪽 패널) 항체의 결과를 나타낸 것이고, 도 8B는 HA2에 특이적인 IgG1(왼쪽 패널) 및 IgG2a(오른쪽 패널) 항체의 결과를 나타낸 것이다.
- [0144] 도 8에 나타난 바와 같이, 면역화 증강 이후에 CA-PMQ 또는 CT와 함께 sM2HA2가 접종된 군에서, sM2HA2 단독 및 상기 대조군과 비교하였을 때, IgG1 및 IgG2a 모두 매우 높은 수준으로 증가하였다(도 8A 및 8B). IgG1은 IgG2a보다 더 뚜렷하게 관찰되었다.
- [0145] 종합하였을 때, 이러한 결과들은 sM2HA2/CA-PMQ를 이용하여 비강내 경로를 통하여 백신접종하였을 경우, sM2HA2 단독 또는 CA-PMQ보다 sM2- 및 HA2-특이적 IgG 및 IgA 반응을 더 효과적으로 유도하였음을 나타내는 것이고, 이는 강력한 점막 아주번트 CT와 비슷하거나 어느 정도 개선된 것이다. 추가적으로, sM2HA2/CA-PMQ가 마우스 내에서 상당한 수준의 IgG1 및 IgG2a를 유도하고, Th1 및 Th2 세포로 하여 각각 IgG2a 및 IgG1 항체의 생산을 증가시키기 때문에, 본원의 실시예를 통하여 새로이 도입된 백신 접근법이 채액성 및 세포 매개 면역을 효과적으로 유도할 수 있음을 제시한다.
- [0146] 바 표시는 군(n=5)의 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. 상기 데이터는 3개의 독립적인 실험들을 대표하는 것이다. 별표는 sM2HA2/CA-PMQ, sM2HA2/CT 군 및 대조군 간의 유의적인 차이를 나타내는 것이다 (**P<0.01; *P<0.05).
- [0148] - CA-PMQ는 sM2HA2 백신에 의해 유도된 sM2- 및 HA2-특이적 T-세포 반응을 증진시켰다:
- [0149] T-세포 반응은 효과적인 면역 반응의 조절에 있어서 중요하며, 광범위한 교차-보호 면역에 기여한다고 알려져 있다. 이러한 보호 면역 메커니즘을 조사하기 위하여, 지라세포 내 IFN- γ 및 IL-4-분비 세포의 유도를 최종

부스팅의 1 주 후에 ELISPOT 으로 검출하였다. IFN- γ 및 IL-4 를 생성하는 지라세포를 (도 4E) sM2 및 (도 4F) HA2 단백질로 자극하였다. CA-PMQ 로 백신화된 마우스는, sM2HA2 단독으로 면역화된 마우스 또는 대조군과 비교하여, sM2 및 HA2 단백질로 자극된 비장 내에서 매우 높은 수의 IFN- γ -분비 세포 개체수를 나타내었다 (도 4E 및 4F, 왼쪽 패널).

[0150] 또한, sM2HA2 가 CA-PMQ 와 함께 접종된 마우스의 비장 내에서는, sM2HA2 단독으로 백신화된 마우스 또는 대조군과 비교하여, 매우 증가된 수의 IL-4-분비 세포가 검출되었다 (도 4E 및 4F, 오른쪽 패널). 그러나, 대조군에서는 오로지 단독 배경 수준의 사이토카인-분비 세포가 검출된 것에 반하여, sM2HA2 제조합 단백질은 또한 어떠한 아주번트 없이도, sM2 및 HA2 단백질로 자극된 후에 비장 내에서, 검출될 수 있는 수준의 IFN- γ 및 IL-4-분비 세포 모두를 유도할 수 있었고 (도 4E 및 4F), 이것은 상기 융합 단백질 sM2HA2 자체로서 세포성 면역을 유도할 수 있고,

[0151] 상기 CA-PMQ 는 이러한 면역을 매우 증진시킬 수 있음을 나타내는 것이다. 중요한 것은, CT 와 함께 sM2HA2 로 백신화된 마우스는, sM2 및 HA2 단백질로 자극된 후에 비장 내에서 유사한 수준의 IFN- γ 및 IL-4-분비 세포를 나타내었다는 것이다. 이러한 결과는 CA-PMQ 와 함께 sM2HA2 로 비강내 면역화하는 것은, sM2- 및 HA2-특이적 T-세포 면역 반응을 강력한 점막 아주번트로 알려진 CT 의 사용과 유사한 수준으로 증진시킨다는 증거를 제공하는 것이다.

[0152] 바 표시는 군 (n=5) 의 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. 상기 데이터는 3 개의 독립적인 실험들을 대표하는 것이다. 별표는 sM2HA2/CA-PMQ, sM2HA2/CT 군 및 대조군 간의 유의적인 차이를 나타내는 것이다 (**P<0.01; *P<0.05).

[0154] - CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2 백신은 보호를 확실히 하고, 다양한 인플루엔자 서브타입에 의한 치사적 감염에 대하여 폐의 특성을 개선하였다:

[0155] 인플루엔자 바이러스에 의한 치사적 감염에 대하여 sM2HA2-유도된 면역 반응능을 평가하기 위하여, 백신화된 마우스를 10 LD₅₀ 의 마우스-적합화된 H5N1, H1N1, H5N2, H7N3 또는 H9N2 인플루엔자 A 서브타입으로 공격 접종하였다. 보호 효능을 생존율 및 체중 감소로 평가하였고, 감염-후 13 일 동안 매일 (dpi) 관찰하였다.

[0156] 구체적으로는, BALB/c 마우스는 0, 2 및 4 주 차에 sM2HA2 단독, CA-PMQ 또는 CT 아주번트와 함께의 sM2HA2, CA-PMQ 단독 또는 PBS 로 면역화되었다. 마우스는 마지막 부스팅의 2 주 후에 10 LD₅₀ 의 마우스-적합화된 인플루엔자 바이러스 서브타입으로 비강내 감염되었다. 폐 조직 내의 바이러스 역가를 3 및 5 dpi 에서의 MDCK 세포주 내의 TCID₅₀ 에 의해 결정하였다. 5 dpi 에서, 폐는 한 세트의 각 군으로부터 임의로 추출되었고, 광학현미경으로 관찰하기 전에 이를 고정시키고 예오신으로 염색하였다.

[0157] 도 5A 는, 본 실시예에 있어서 A/EM/Korea/W149/06(H5N1) 로 감염시킨 후의 체중 (위쪽 패널), 생존 (중간 패널, 로그-랭크(log-rank) 테스트, P= 0.00063) 및 폐 바이러스 역가 (아래쪽 패널) 의 변화를 나타낸 것이고, 도 5B 는 본 실시예에 있어서 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 로 감염시킨 후의 체중 (위쪽 패널), 생존 (중간 패널, 로그-랭크 테스트, P = 0.00063) 및 폐 바이러스 역가 (아래쪽 패널) 의 변화를 나타낸 것이며, 도 5C는 본 실시예에 있어서 A/Aquatic bird/Korea/W81/2005(H5N2) 로 감염시킨 후의 체중 (위쪽 패널), 생존 (중간 패널, 로그-랭크 테스트, P = 0.00063) 및 폐 바이러스 역가 (아래쪽 패널) 의 변화를 나타낸 것이고, 도 5D는 본 실시예에 있어서 A/Aquatic bird/Korea/W44/2005(H7N3)로 감염시킨 후의 체중 (위쪽 패널), 생존 (중간 패널, 로그-랭크 테스트, P = 0.00063) 및 폐 바이러스 역가 (아래쪽 패널) 의 변화를 나타낸 것이며, 도 5E는 본 실시예에 있어서 A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2) 로 감염시킨 후의 체중 (위쪽 패널), 생존 (중간 패널, 로그-랭크 테스트, P = 0.00063) 및 폐 바이러스 역가 (아래쪽 패널) 의 변화를 나타낸 것이다. 도 5F에 나타난 바와 같이, sM2HA2 또는 대조군으로 백신화된 마우스의 폐와 대조적으로, sM2HA2/CA-PMQ 로 백신화된 마우스의 폐는 염증성 세포의 침투가 없는 깨끗한 허파파리를 나타내었다.

[0158] 예측된 바와 같이, 대조군 내 면역화되지 않은 군의 마우스는 치사적 인플루엔자 감염에 대하여 생존하지 못하였다. CA-PMQ 또는 CT 없이 sM2HA2 로만 백신화된 마우스에서는 유의적인 체중 감소가 관찰되었고 (도 5A-5E, 위쪽 패널), 0-40% 의 개체가 다양한 서브타입의 치사적 감염에 대하여 생존하였다 (도 5A-5E, 중간 패널). 대조적으로, sM2HA2 를 CA-PMQ 와 함께 투여한 마우스는 H1N1, H5N1, H5N2 및 H9N2 의 치사적 감염에 대하여 100% 생존하였고 (도 5A-5C 및 5E, 중간 패널), H7N3 의 치사적 감염에 대하여 80% 생존하였다 (도 5D, 중간 패널). sM2HA2/CT 로 백신화된 마우스는, H1N1, H7N3 및 H9N2 인플루엔자 서브타입 의 치사적 감염에

대항하여 100% 생존하였고 (도 5B, 5D 및 5E, 중간 패널), H5N1 및 H5N2 인플루엔자 서브타입의 치사적 감염에 대항하여 각각, 60% (도 5A, 중간 패널) 및 80% (도 5C, 중간 패널) 생존하였다. sM2HA2/CT 로 면역화된 마우스가 sM2HA2/CA-PMQ 로 면역화된 마우스에 대하여 유사한 수준의 보호 (60-100%) 를 나타낸 반면에, sM2HA2/CT-백신화된 마우스의 경우에는 유의적인 체중 감소가 관찰되었으며 (도 5A-5E, 위쪽 패널),

[0159] 이것은 상기 CT-아주번트된 군에서는 치사적 감염에 대항하는 보호가 효과적으로 이루어지지 않음을 나타내는 것이다. 이러한 결과는, 3M2eC+CT 의 비강내 백신접종은 사망률(mortality)을 개선시킬 수 있지만 질병률(morbidity)까지는 개선시킬 수 없는 항체를 유도하는 것을 입증한 종전의 연구들과 일치하는 것이다. 대조적으로, sM2HA2 가 CA-PMQ 와 함께 투여된 마우스는 사소한 정도의 질병의 징후들을 나타내었고, 단지 일시적이고 경미한 체중의 감소를 나타내었다.

[0160] sM2HA2/CA-PMQ 백신에 의해 관찰되는 보호 효능을 보다 더 잘 이해하기 위하여, 공격 접종된 마우스의 폐의 바이러스 역가를 3 및 5 dpi 에서 측정하여 바이러스성 클리어런스를 평가하였다. 상기 sM2HA2/CA-PMQ-면역화된 마우스는, H5N2, H7N3 및 H9N2 바이러스가 공격 접종된 경우에, 3 일 차에는 감소된 폐의 바이러스 역가를 나타내었고, 5 일 차에는 감염을 완전히 클리어하였다 (도 5C-5E, 아래쪽 패널).

[0161] 유사하게, H5N1 및 H1N1 의 치사적 감염의 경우에, CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2 로 면역화된 마우스는 5 dpi 에서, sM2HA2 단독 면역화된 마우스 또는 대조군 마우스와 비교하여 폐의 바이러스 역가의 유의적인 감소 나타내었다 (도 5A 및 5B, 아래쪽 패널). 또한, sM2HA2/CT-면역화된 마우스의 폐의 바이러스 클리어런스는 다양한 인플루엔자 서브타입의 감염에 대한 생존 결과와 연관성이 있는 것으로 관찰되었다.

[0162] 폐의 바이러스 클리어런스와의 연관성을 밝히기 위하여 조직병리학적 검사를 수행하였다. H5N2 바이러스로 공격 접종된 마우스의 폐의 대표 샘플을 수득한 후에 광학 현미경을 이용하여 검사하였다. sM2HA2/CA-PMQ 로 면역화된 마우스는 폐 염증이 감소되거나 나타나지 않은 반면에, sM2HA2로 면역화된 마우스 또는 대조군의 폐에서는 심각한 정도의 폐 염증의 명백한 징후들이 관찰되었다 (도 5F).

[0163] 종합해보면, 이러한 결과들은 CA-PMQ 보존된 융합 단백질과 조합된 sM2HA2 는 다양한 인플루엔자 서브타입에 대항하는 보호 효능을 현저히 개선함을 나타내는 것이고, 상기 CA-PMQ 에 의하여 유도된 sM2- 및 HA2-특이적 면역 반응은 바이러스 복제를 효율적으로 통제하는데 기여하는 것임을 알 수 있다.

[0164] 오차 바(Error bars)는 체중의 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 별표는 군(n=5)들 간 체중의 유의적인 차이를 나타내는 것이다. 상기 데이터는 3 개의 독립적인 실험들을 대표하는 것이다. 폐 바이러스 역가에서, 별표는 5 dpi 에서 sM2HA2/CA-PMQ, sM2HA2/CT 및 대조군 간 유의적인 차이를 나타내는 것이다 (**P<0.01; *P<0.05).

[0166] - CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2에 의한 장기 지속되는 면역 반응 및 보호를 유도하였다:

[0167] 면역 반응 및 보호의 지속 기간은 효과적인 백신의 중요한 기준이다. 따라서, sM2HA2/CA-PMQ 에 의해 유도된 면역의 지속성을, 면역화의 6 달 후에 ELISA 에 의한 혈청 IgG 및 점막 IgA 의 검출을 통하여 조사하였다.

[0168] 구체적으로는, 마우스 세트들은 스케줄에 따라서 PBS, CA-PMQ, sM2HA2, sM2HA2/CA-PMQ 또는 sM2HA2/CT 로 비강내 백신화되었다. 혈청은 최종 백신접종의 0, 35, 및 180 일 후에 얻었다. 폐 및 창자 샘플은 180 일 차에 얻었다. 장기 지속되는 IgG, IgG1, IgG2a 및 IgA 의 장기 지속되는 항체 수준을 확인하기 위하여, 코팅 항원으로서 sM2 또는 HA2 단백질을 이용하여 ELISA를 세 번 수행하였다. 최종 백신접종의 6 달 후에 마우스를 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스 (10 MLD₅₀) 의 치사량으로 공격 접종하였다. 도 5A는, 본 실시예에 있어서 sM2 (왼쪽) 및 HA2 (오른쪽) 각각에 특이적인 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체 레벨을 나타낸 것이고, 도 5B는 본 실시예에 있어서 폐 (왼쪽) 및 창자 (오른쪽) 에서, sM2 (위쪽 패널) 및 HA2 (아래쪽 패널) 특이적인 IgA 항체 레벨을 나타낸 것이며, 도 5C는, 본 실시예에 있어서 H1N1 바이러스로 감염시킨 후의 초기 체중 (왼쪽) 및 생존 (오른쪽)의 % 변화량을 나타낸 것이다.

[0169] sM2HA2/CA-PMQ 로 면역화된 마우스에서는, 부스팅의 6 달 후에도 sM2 및 HA2 에 특이적인 혈청 IgG 뿐만 아니라 폐 및 창자 IgA 가 유사한 수준으로 검출되었다 (도 6A 및 6B). 유사하게, sM2HA2/CA-PMQ 를 이용한 최종 백신접종의 6 달 이후에도 T-헬퍼 세포 아형이 작용하는지의 여부를 결정하기 위하여, Th2 와 연관된 IgG1 및 Th1 과 연관된 IgG2a 와 같은 IgG 아형을 ELISA 를 이용하여 검출하였다. 흥미롭게도, sM2HA2/CA-PMQ 로 백신화된 마우스는 백신접종 이후에 sM2 및 HA2 모두에 특이적인 IgG1 및 IgG2a 를 유의적인 수준으로 나타내었고, 상기 IgG1 및 IgG2a 는 거의 동일한 수준으로 수준 검출되었다 (도 6A).

- [0170] 종합해보면, 이러한 결과는 sM2HA2/CA-PMQ 가 최종의 백신접종 이후 적어도 6 달까지 지속되는 채액성 및 세포-매개 면역 반응 모두를 유도하는 것을 나타내는 것이다. 보호의 지속기간을 결정하기 위하여, 면역화된 마우스를 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 헤테로서브타입으로 공격 접종하였다. 체중 변화 및 생존을 13 dpi 까지 관찰하였다. 상기 대조군 마우스는 >30% 체중 감소를 나타내었고 감염의 9 일 후에 사망하였다 (도 6C, 왼쪽 패널).
- [0171] 대조적으로, 상기 sM2HA2/CA-PMQ-백신화된 마우스가 예상치 못한 일정한 퍼센트의 체중 감소를 나타내었지만, 상기 체중은 13 dpi 까지 회복되었고, 마우스는 감염에 대항하여 100% 생존하였으며, 이는 백신접종 직후의 효능과 유사함을 나타내는 것이다 (도 6C, 오른쪽 패널). 나아가, sM2HA2 단독으로 면역화된 마우스는 급격한 체중의 감소를 나타내었고, 11 dpi 에 100% 마우스고 쓰러졌으며(succumbed), 이는 상기 CA-PMQ 가 장기 지속되는 면역에 기여함을 나타내는 것이다.
- [0172] 종합해보면, 이러한 결과는 상기 CA-PMQ 가 다양한 인플루엔자 서브타입에 대항하는 재조합 sM2HA2 백신의 면역 반응 및 보호 효능을 개선할 뿐만 아니라 면역의 장기 지속성을 보장하는 것을 나타내는 것이다.
- [0173] 바 표시는 평균 $\pm$ 표준편차를 나타내는 것이다. 별표는 sM2HA2/CA-PMQ, sM2HA2/CT 및 대조군 간 유의적인 차이를 나타내는 것이다. (**P<0.01; *P<0.05).
- [0175] 다양한 표면 항원에 기반한 현재의 인플루엔자 백신은, 예측하지 못한 유행성 인플루엔자의 발병에 대항하여 효과적인 보호를 제공하는 데에 적절하지 못하다. 지난 수 십년에 걸쳐서, 광범위한 교차-보호 뿐만 아니라 간편한 제조 및 투여를 제공할 수 있는 새로운 백신을 개발하기 위한 다양한 접근법들이 시도되었다. 특히, M2e 및 HA2 를 이용한 교차-보호를 유도하기 위한 연구들이 수행되었다. 상기의 연구 기록들을 고려하였을 때, 본원의 실시예를 통하여 sM2 및 HA2 (sM2HA2) 에 기반한 융합 백신이 유의적인 교차-보호를 일으킬 수 있다고 가설을 세웠다. 이에, 본원의 실시예는 상기 두 개의 유망한 타겟의 융합 플라스미드를 구성하였고, 상기 융합 플라스미드를 고도로 효율적인 미생물 발현 시스템 (E. coli) 에서 발현하였으며, 광범위한 교차-보호 면역에 대하여 시험하였다. 기능성 면역 반응을 자극할 수 있는 적절한 경로 및 아주번트의 선택은 서브유닛 백신 개발의 성공에 매우 중요하다.
- [0176] 이전의 연구들은 상기 비강내 점막 경로가 전신성 투여 보다 마우스 내의 교차-보호 면역을 유도한다는 데에 우월함을 나타내었다. 다른 연구들은 교차-보호를 개선시키기 위하여, 화학적 및 유전적 컨쥬게이트 (캐리어 분자 또는 바이러스 입자) 또는, 재조합 또는 생 인플루엔자 백신과 DNA 의 조합에 초점을 맞추어 왔다. 불행하게도, 이러한 백신들은 아주번트와 함께 투여되었음에도 불구하고 백신화된 동물들이 상당한 체중 감소를 나타낸 바와 같이, 완벽한 보호를 나타내지 못하였다.
- [0177] 본원의 실시예에서는, 교차-보호를 개선하기 위하여 신규한 조합 아주번트인 CA-PMQ 를 최초로 제조하였고 투여하였다. 더 중요한 것은, 본원의 실시예를 통하여 CA-PMQ 와 함께 2 개의 잘-보존된 융합 단백질 (sM2 및 HA2) 2 μ g 만으로 백신접종 하는 것은, 치사적 인플루엔자 A 서브타입의 상대적으로 높은 투여량의 공격 접종에 대항하여 광범위한 보호를 부여하는 것을 입증한 것이다.
- [0178] 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 sM2HA2 의 투여량 및 효능을 결정하기 위하여 예비 실험을 수행하였다. 구체적으로는, 마우스는 0, 2 및 4 주 차에 다양한 투여량 (2, 5 및 10 μ g)의 sM2HA2 단백질로 아주번트 없이 비강내 면역화되었고, 최종 부스팅의 2 주 후에 10 LD₅₀ 의 마우스-적합화된 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 서브타입으로 공격 접종되었다. H1N1 바이러스로 감염시킨 후의 (A) 초기 체중 및 (B) 생존의 % 변화를 나타내었다.
- [0179] 도 9 에 나타낸 바와 같이, sM2HA2 를 아주번트 없이 비강내 경로를 통하여 3 번 투여 (2 μ g/투여) 한 경우, H1N1 의 치사적 감염 대항하여 40% 생존 및 급격한 체중 감소를 나타내었다. 상기 결과를 바탕으로, CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2 를 투여할 경우, sM2HA2-특이적 항체의 수준을 증진시켰다. 상기 백신이 점막 경로를 통하여 전달되므로, 유의적인 수준의 점막 IgA 가 폐 및 창자 모두에서 관찰되었다. 나아가, 유의적인 수준의 혈청 IgG, 특별히 IgG1 및 IgG2a, 가 또한 상기 CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2 백신에 의하여 유도되었다. 일반적으로, Th2 세포가 마우스 내의 IgG1 항체를 유도하는 반면에, Th1 세포는 IgG2a 항체의 생산을 향상시킨다. IgG 아형 모두 강력한 중화능을 가짐에도 불구하고, IgG2a 는 보체 및 Fc 수용체와 유효하게 상호작용하는 것을 알려져 있고 바이러스 클리어런스에 기여할 수 있다.

- [0180] 따라서, 치사적 감염 이후의 sM2HA2/CA-PMQ-백신화된 마우스 폐의 바이러스 역가의 감소는, 바이러스 클리어런스에 있어서의 sM2- 및 HA2-특이적 IgG1 또는 IgG2a의 유도를 나타내는 것이다. 상기 세포성 면역 반응은 백신접종에서 중요한 역할을 한다. 본원의 실시예에서는 Th1-타입 (IFN- γ) 및 Th2-타입 (IL-4) 사이토카인 반응을 ELISPOT으로 관찰하였고, 아주번트화된 sM2HA2 면역화된 마우스 내 sM2 및 HA2 단백질 모두의 자극에 의한 반응에서 높은 수준의 IFN- γ 가 검출되었지만, sM2HA2 단독 또는 대조군 마우스에서는 그렇지 않았다. CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2로 면역화된 마우스 내 IL-4 역시 면역화되지 않은 마우스에 비하여 매우 높은 수준으로 관찰되었다. 이러한 결과들은 CA-PMQ-아주번트된 sM2HA2의 점막 백신 시스템이 강력한 세포성 면역 반응을 유도하고, 마우스를 계통군 1 (H1, H5, H9) 및 군 2 (H7)로부터의 굉장히 다양한 인플루엔자 서브타입으로부터 보호한다는 것을 나타내는 것이다.
- [0181] 추가적으로, 본원의 실시예는 CA-PMQ-아주번트된 재조합 sM2HA2가 심지어 최종 백신접종의 6달 후에도, 장기 지속되는 면역을 유도하였고, 다양한 인플루엔자 서브타입에 의한 치사 감염에 대항하는 보호를 부여하였음을 증명하였다(도 6). 이는 성공적인 백신이라면 중요한 것이다. 면역 아주번트는 거대한 이종 군이며, 2개의 아군으로 분류될 수 있다: 면역자극제 및 전달 시스템. 두 번째 타입은 점막 장애물을 극복하고 항원 흡수량을 증가시키는 것에 의해서 면역 반응을 증진시키는 것인 반면에, 첫 번째 카테고리의 아주번트는 특이적 수용체와 상호작용하는 것에 의해서 면역 시스템을 자극한다.
- [0182] 제약 산업에서, 동일한 물질의 새로운 제형화는 효과 및 성능에 매우 큰 영향을 미치므로, 새로운 물질로서 인식된다. 아주번트 제형화의 사용 및 생산의 편리성 또한, 생물학적 이용가능성을 개선시키는 데에 있어서 필수적이다. 본원의 실시예는, 점막부착성 고분자-기반 (예를 들어, γ -PGA) 항원 전달 시스템 및 난용성 면역자극제 화합물 (예를 들어, MPLA 및 QS21)의 결합에 대한 간편하고 강력한 제형화 전략을 제공한다. 이와 관련하여, 전달 시스템의 아주번트와 상기 γ -PGA/MPLA/QS21 복합체에 기반한 면역자극성 화합물의 신규한 조합은 강력한 면역 반응을 유도하는 강력한 후보군이다.
- [0183] 상기 비강 경로는 생리학적인 특성 및 면역학적인 특징으로 인하여, 주사바늘 없는 투여의 유망한 대안 형태이다. 실제로, 세계보건기구(WHO) 및 질병 관리 및 예방 본부와 같은 세계 보건 분야의 주요한 기관들은, 면역화 스케줄을 단순화시킬 수 있는 발전된 전달 기술을 개발하는 데에 연구 노력의 투자 필요성을 주창해 왔다. 이러한 목표의 달성은 특히, 개발도상국에서의 다수의 감염성 질병에 대한 백신접종의 범위를 개선시킬 수 있다. 점액 백신 전달 전략이 강력한 주사바늘 없는 백신 전달 방법으로 평가되지만, 점막 섬모의 청소 메커니즘이 면역 시스템의 항원의 전달을 저해하는 한계가 있었다.
- [0184] 따라서, 창자 및 비강 점막과 같은 항원의 생물학적인 장애물에 대한 통과를 개선할 수 있는 점액 백신 전달 시스템에 대한 새로운 접근법에 대한 요구가 높아지고 있다. 효과적인 점막 백신접종에 대한 과제는 효과적인 점막 면역을 발생시키는 것 및 안전하고 효과적인 점막 아주번트 및 전달 시스템의 부재의 어려움을 수반한다. 본원의 실시예에서 사용된 상기 CA-PMQ 시스템은 모두 체액성 및 세포성 면역을 증진시키는 천연 성분으로 구성된다. 미생물종 (바실리)에 의해 천연 합성되는 상기 γ -PGA는, 재조합 단백질 항원에 대한 점막부착성 전달 비히클로서 작용할 수 있고, 또한 소수성 MPLA 및 QS21를 결합시킬 수 있는 간편하고 강력한 전략을 제공할 수 있다.
- [0185] 본원의 실시예에서는 γ -PGA 내의 이온화되지 않은 카르복시기의 존재는 점액과의 강력한 상호작용에 핵심적이라는 것을 제시한다. 이러한 상호작용은 γ -PGA와 점액 당단백질 내의 양성자-받개 간의 수소 결합의 결과이다. 점막부착성 고분자는 뮤신 분자와 물리적 사슬 얽힘으로 상호작용할 수 있고, 뒤이어 올리고당 사슬 상의 당 잔기와 수소 결합 형성하여, 강화된 젤 네트워크를 형성하고, 따라서 상기 고분자를 연장된 기간의 시간 동안 부착성이 있는 상태로 유지시킨다는 결론에 도달하게 된다. 배지 pH (6.2)에서 상기 고분자가 이온화된 작용기로부터 발생한 정전기적 반발력으로 인한 코일링되지 않은 팽창된 상태이므로, 상기 고분자는 점액 당단백질과의 물리적 사슬 얽힘 및 2차 상호작용을 더 용이하게 할 수 있다. γ -PGA 내 다수의 카르복시기가 존재하므로, 상기 고분자는 다른 고분자들과 비교하였을 때, 자신의 수소-결합 기의 접근성을 증대시키는 데에 더 유리한 거대분자 형태를 띠게 된다.
- [0186] 지금까지, 백신의 개발에 종사하는 대부분의 연구자들은 타겟 질병 또는 병원균에 특이적인 항원의 발견 및 생산에 주목하여 왔다. 그들은 또한, 오로지 단일의 면역자극제를 활용할 수 있는, 몇 안되는 아주번트와 함께하였을 때의 항원의 항원성을 시험하였다. 최적의 예방 또는 치료 면역을 발생시키기 위하여, 유도된 면역의 강도 및 지속성은 질병의 유형에 따라 통제되어야 했다.
- [0187] 그러나, 면역자극제 및 전달 비히클을 포함하는 복합체 아주번트 시스템을 제형화하기에 부족한 지식 또는 역량

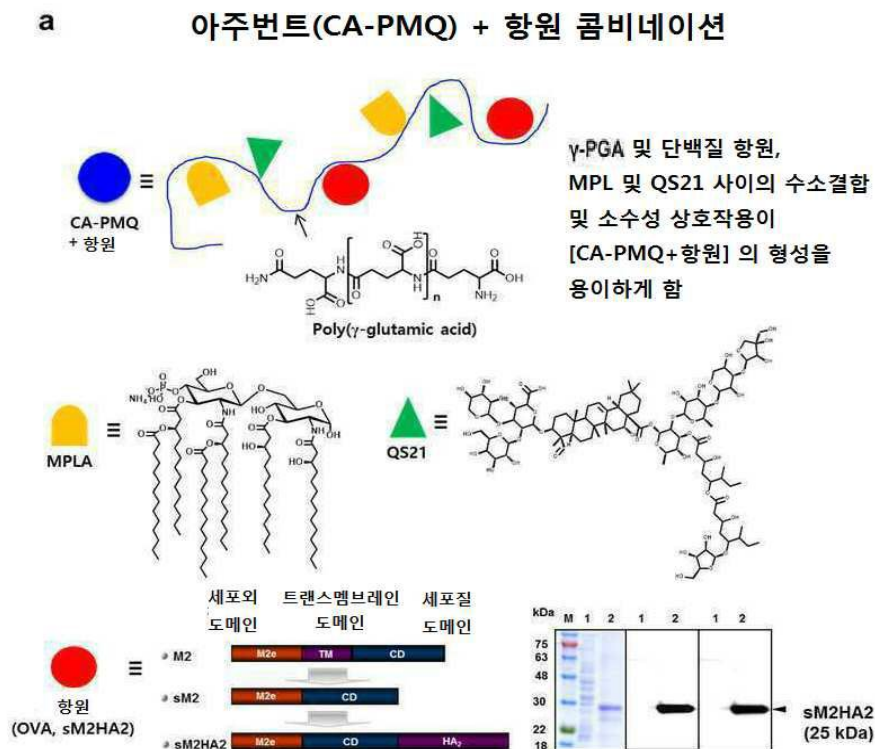
으로 효과적인 백신의 개발이 제한되었다. 본원의 실시예에서 개시하는 상기 CA-PMQ 아주번트는 아주번트의 조합으로 제형화되었고, 강력하고 장기 지속하는 체액성 및 세포성 면역 반응을 유도할 수 있다. 이러한 관점에서, 상기 CA-PMQ 는 감염성 질병뿐만 아니라 암 면역요법에 대한 백신 개발에 종사하는 연구자들에게 우수한 아주번트 후보군이 될 수 있다.

[0189] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0190] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

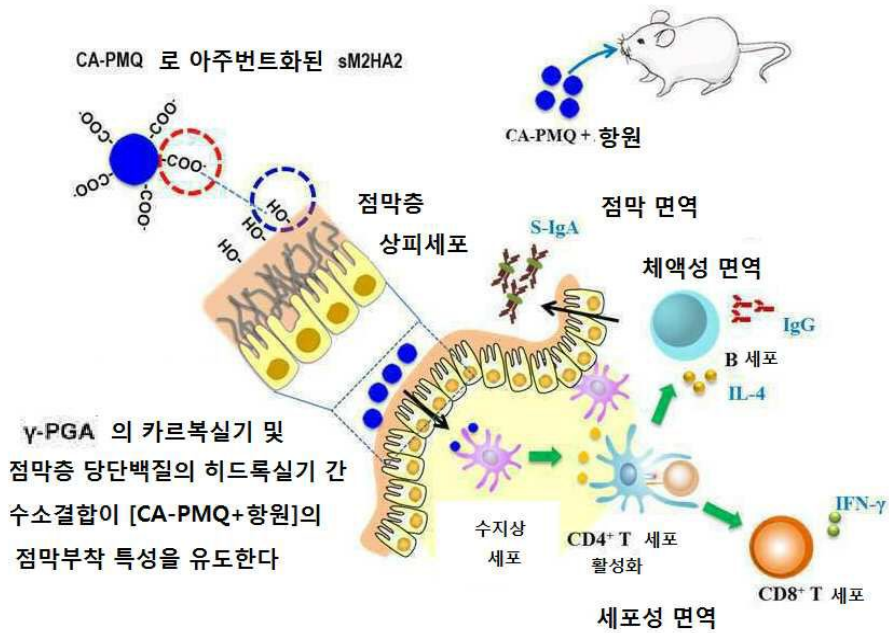
도면

도면1a

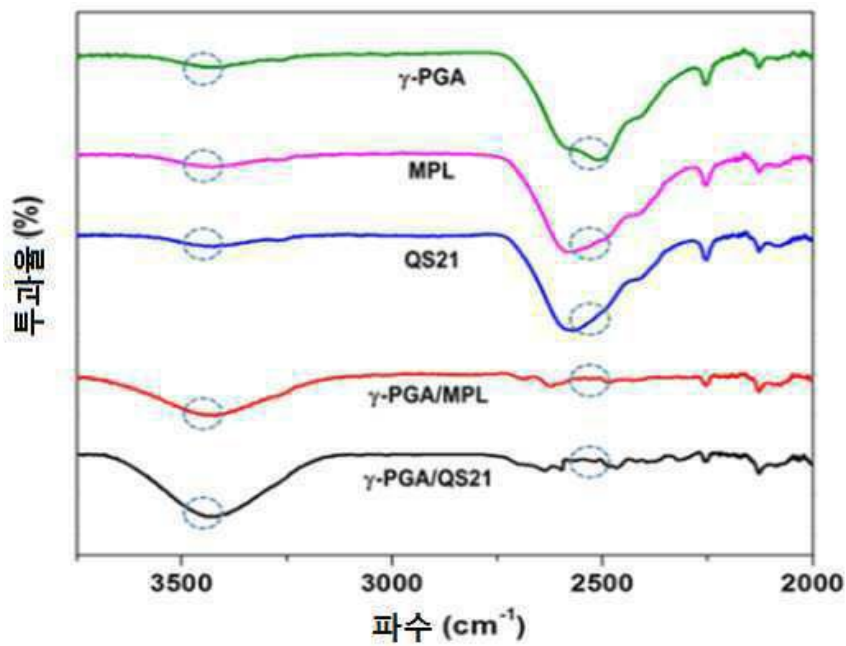


도면1b

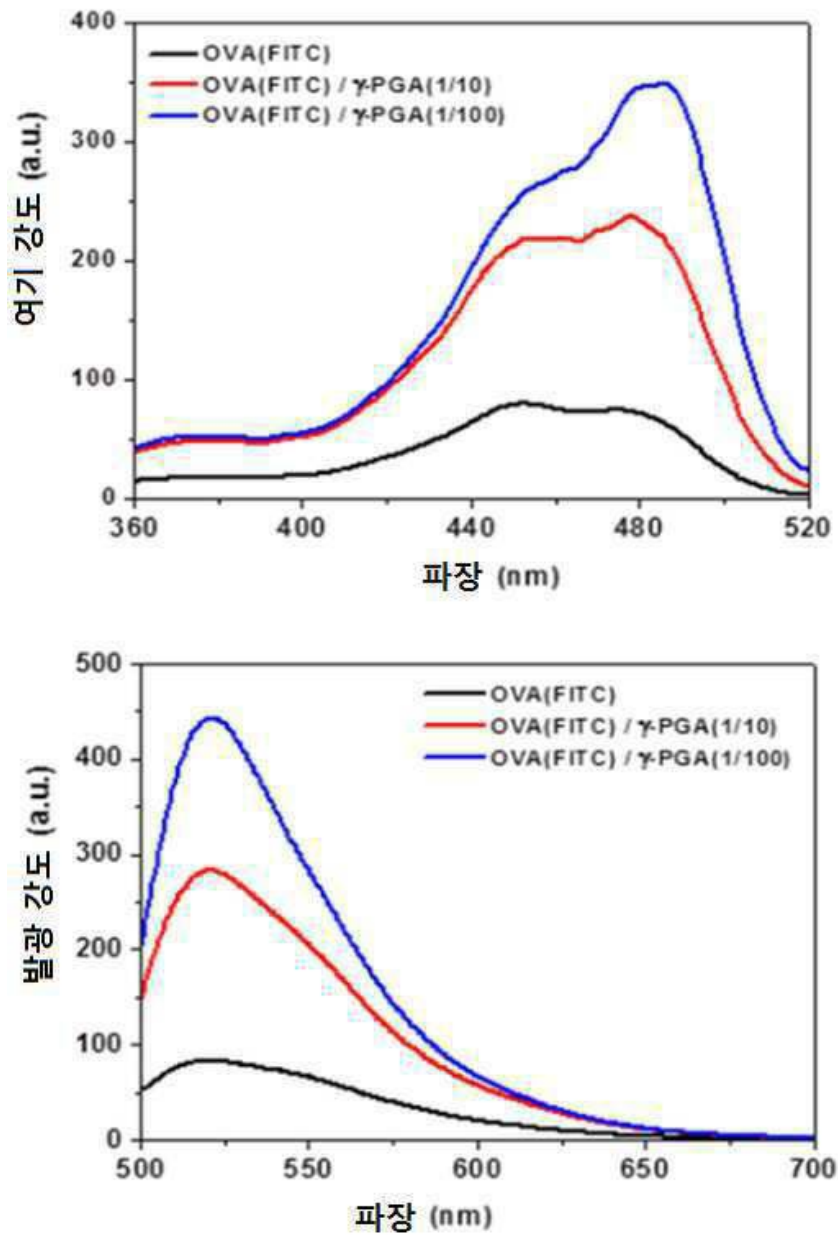
b CA-PMQ로 아주번트화된 바이러스 항원의 점막 전달



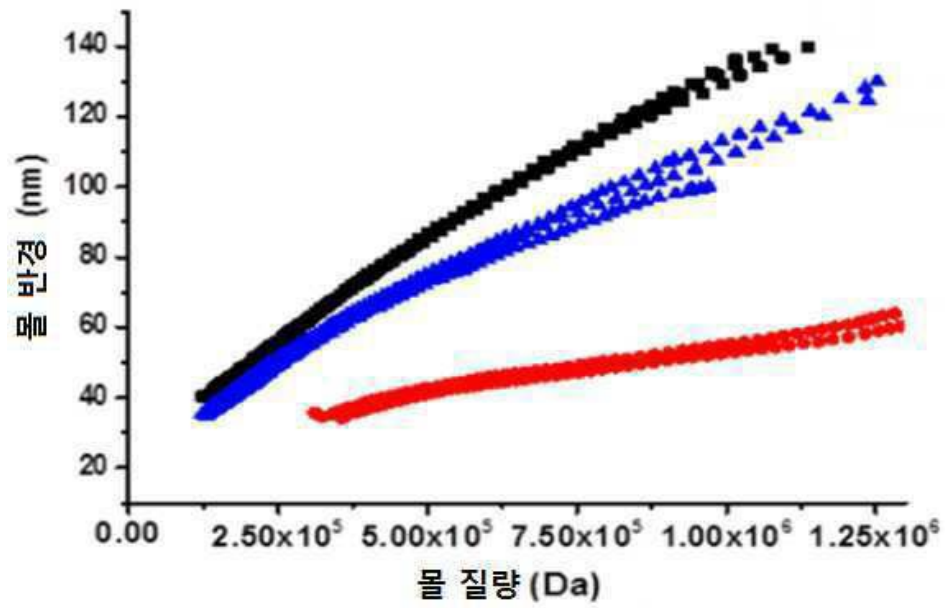
도면2a



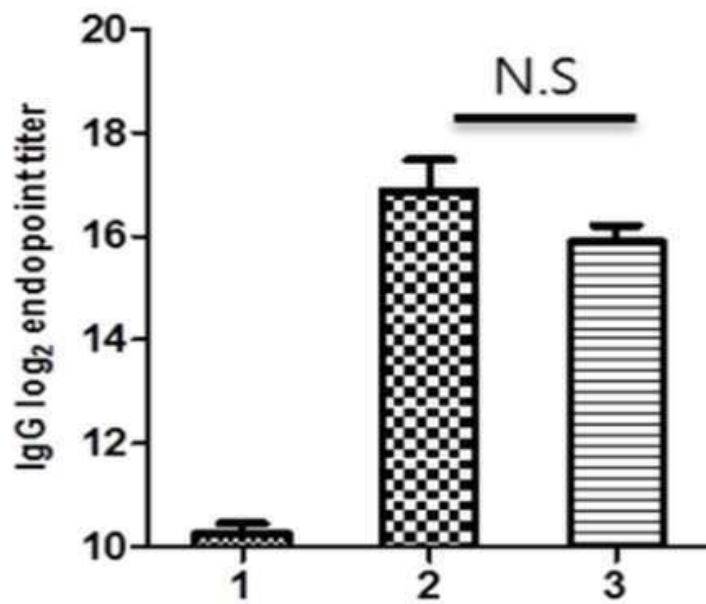
도면2b



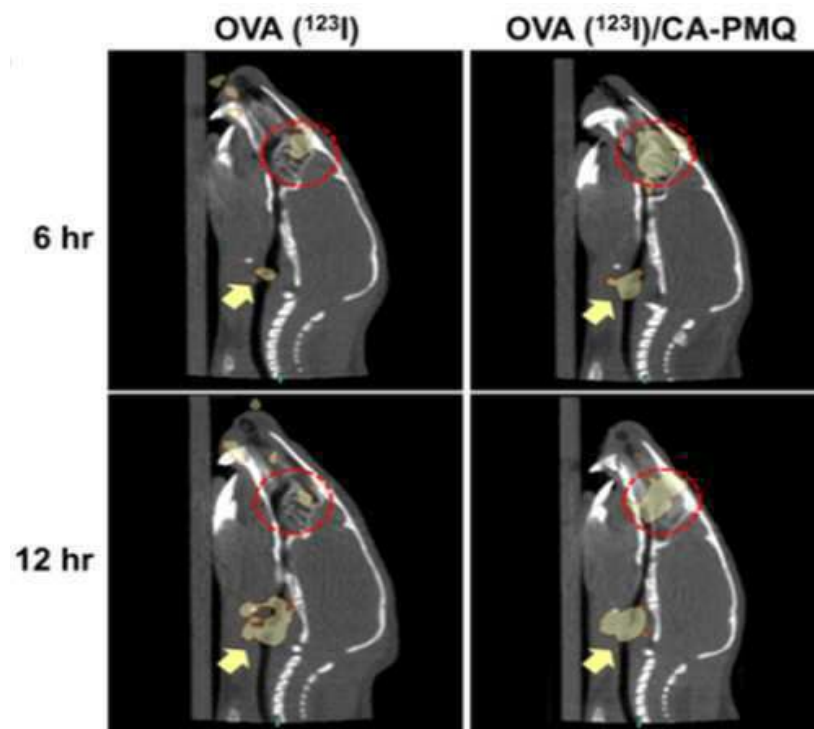
도면2c



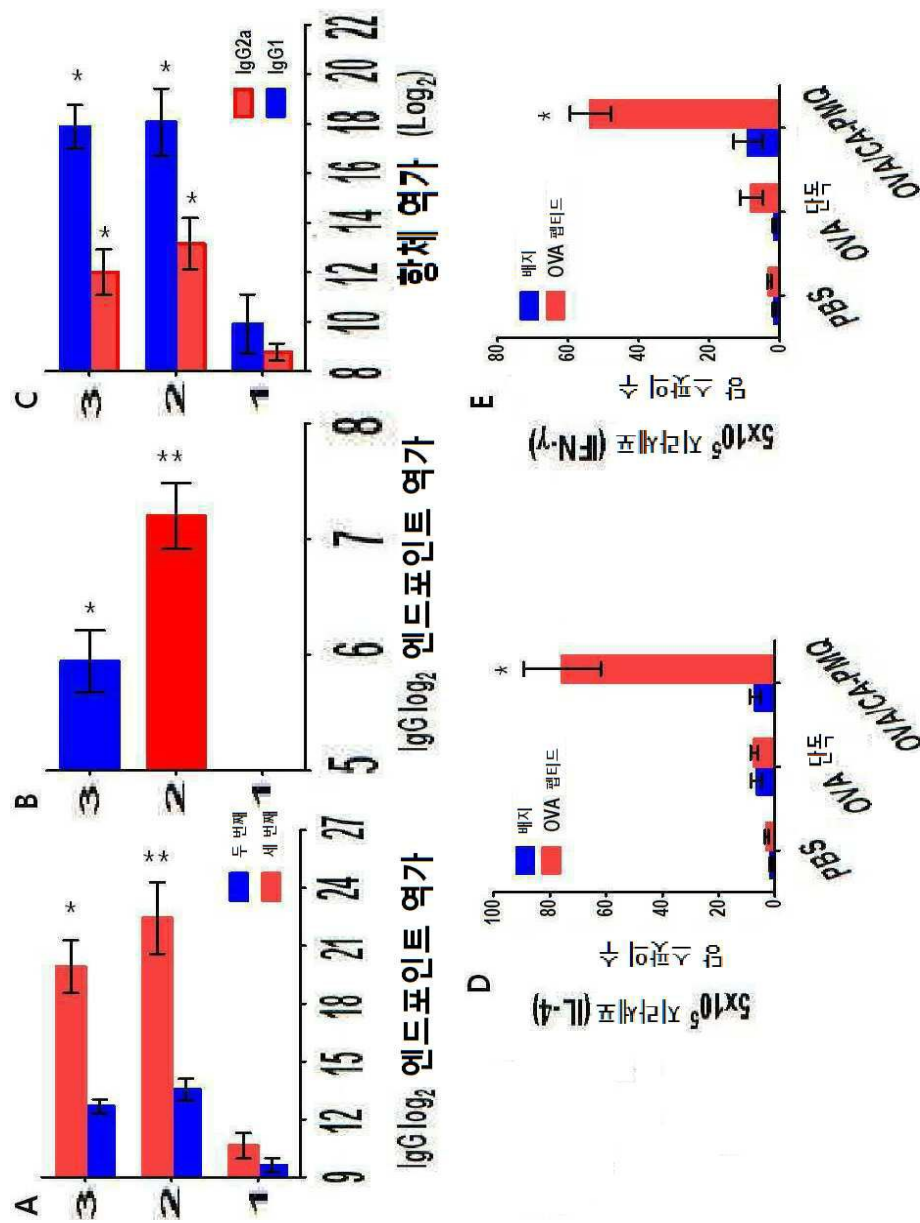
도면2d



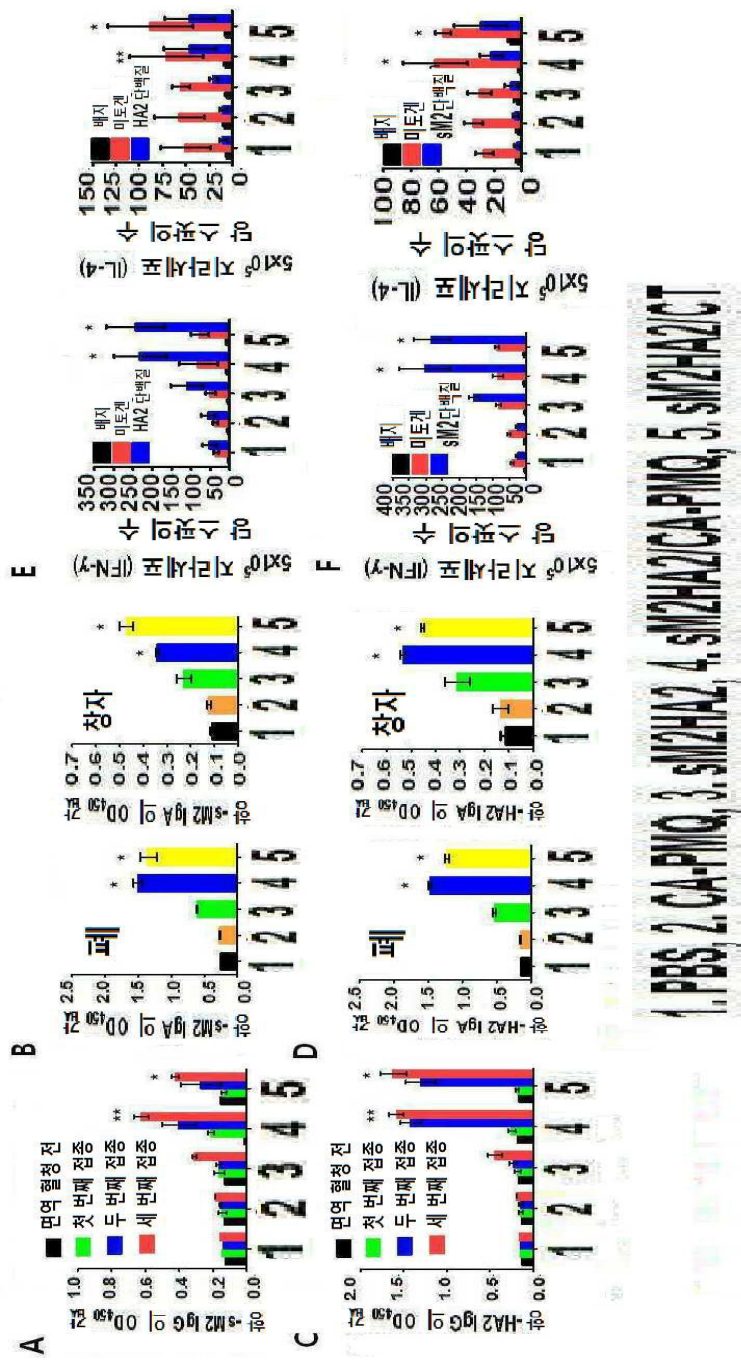
도면2e



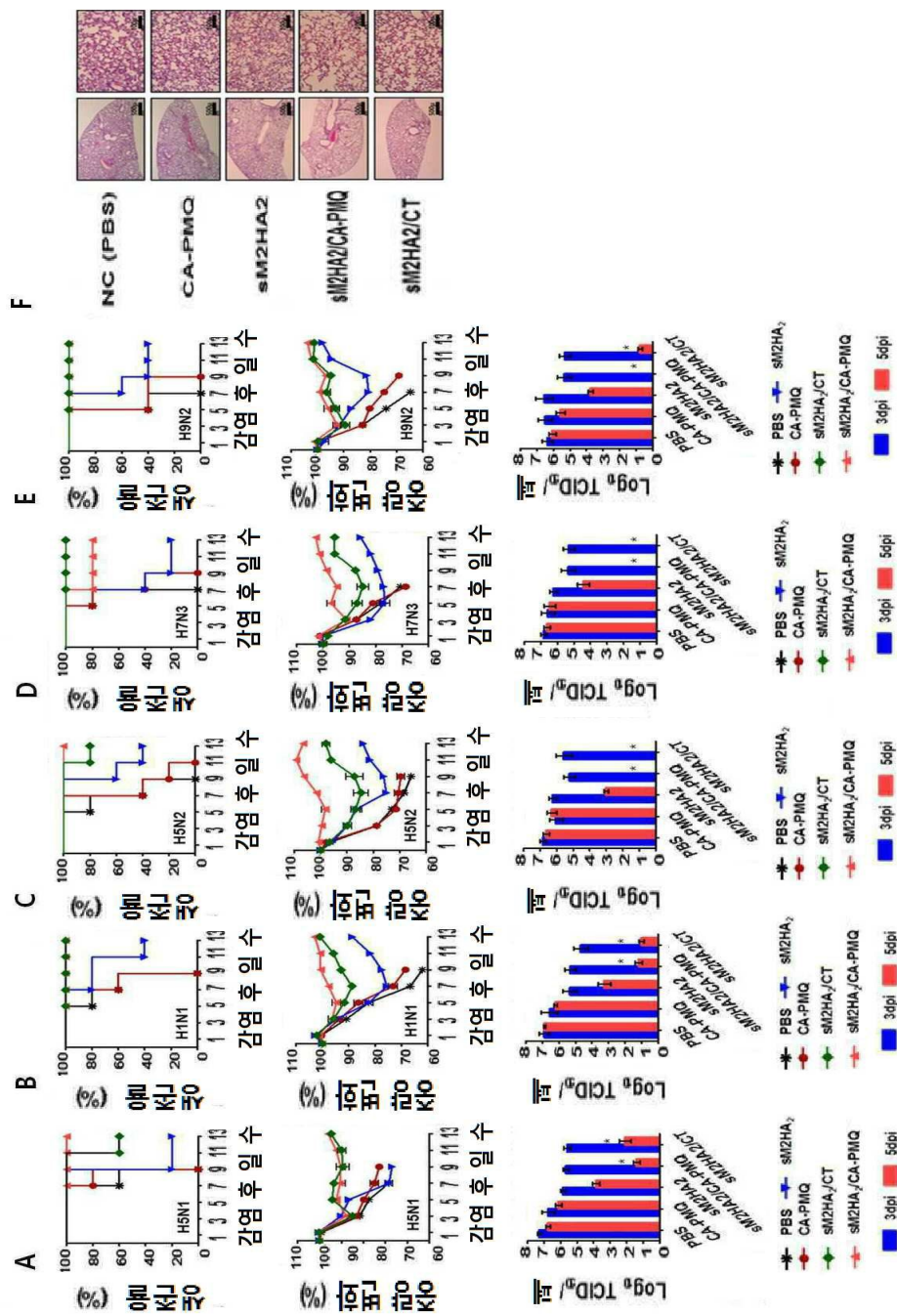
도면3



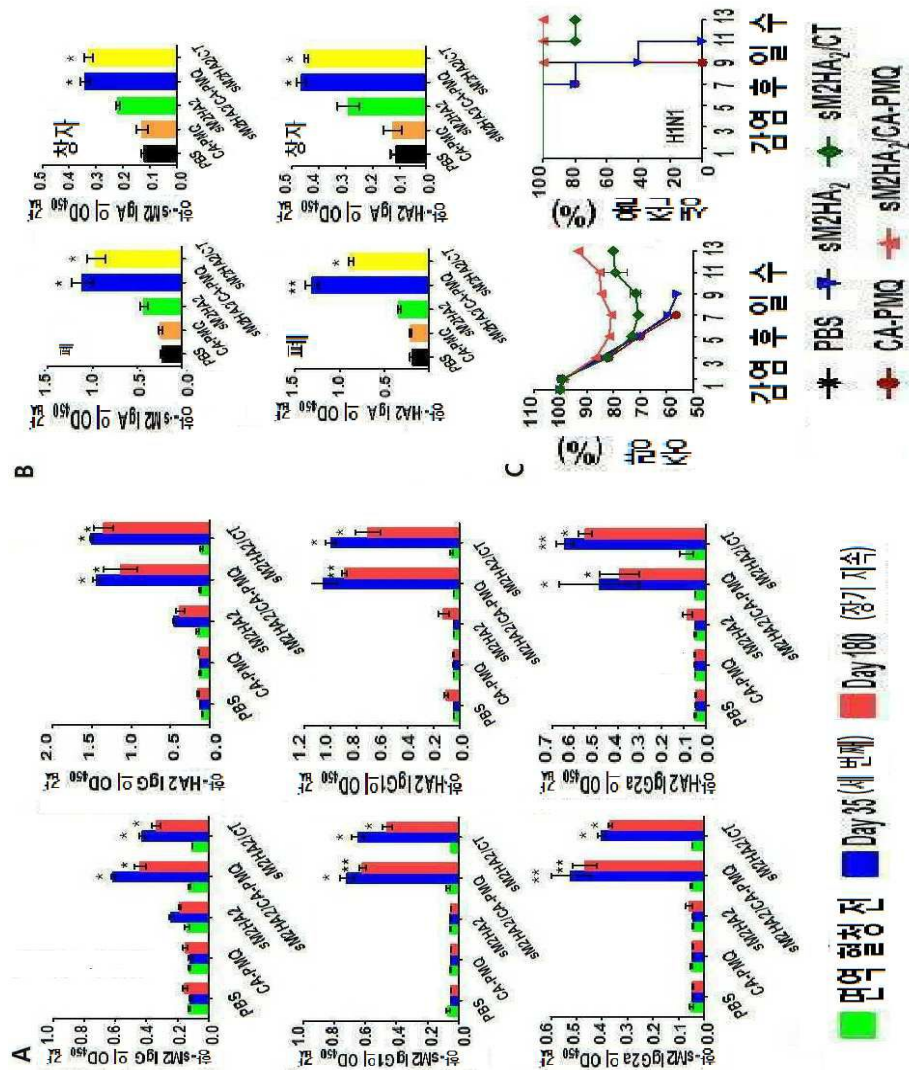
도면4



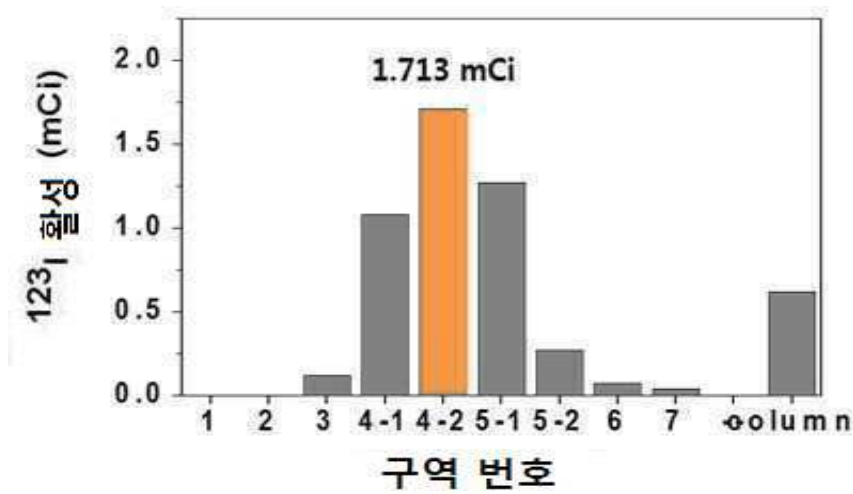
도면5



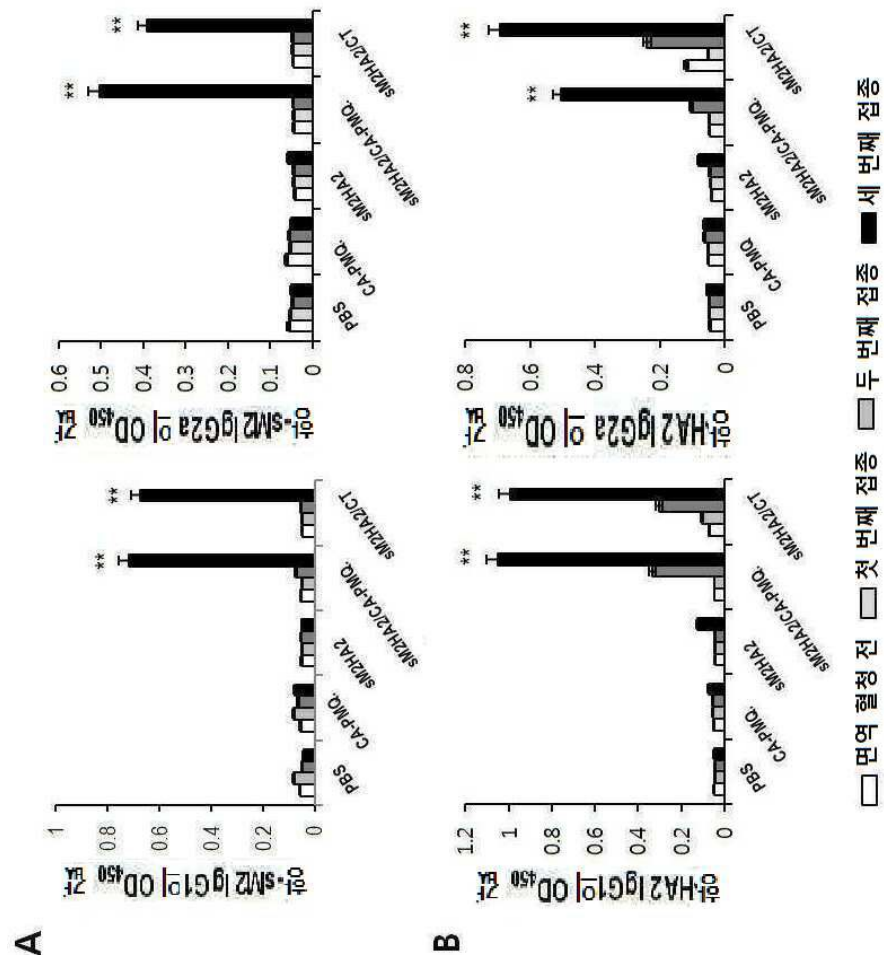
도면6



도면7

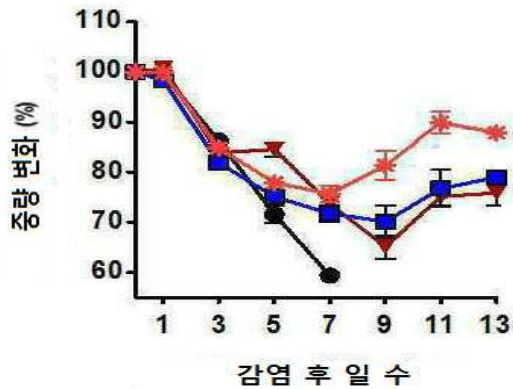


도면8

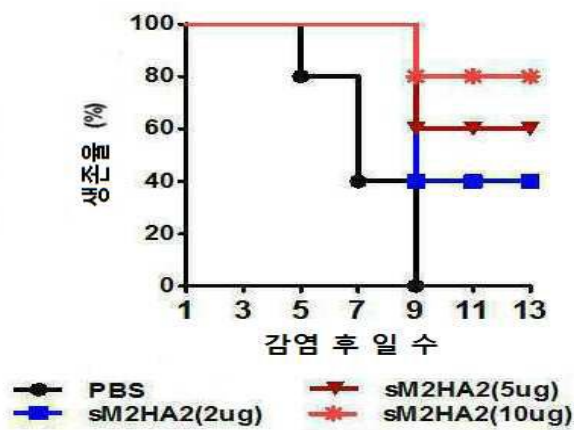


도면9

A



B



서열목록

- <110> Research & Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY
- The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> MUCOADHESIVE POLYMER ADJUVANT-BASED INFLUENZA VACCINE
- <130> DP20160351KR
- <150> KR 15/0102465
- <151> 2015-07-20
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 50
- <212> PRT
- <213> Influenza A Virus
- <400> 1

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro Asp Arg Leu Phe Phe Lys Cys
 20 25 30
 Ile Tyr Arg Arg Leu Lys Tyr Gly Leu Lys Arg Gly Pro Ser Thr Glu
 35 40 45
 Gly Val
 50