



등록특허 10-2135818



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월22일
(11) 등록번호 10-2135818
(24) 등록일자 2020년07월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
C12N 15/863 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7009206
- (22) 출원일자(국제) 2013년10월28일
심사청구일자 2018년08월13일
- (85) 번역문제출일자 2015년04월09일
- (65) 공개번호 10-2015-0079596
- (43) 공개일자 2015년07월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/003239
- (87) 국제공개번호 WO 2014/063832
국제공개일자 2014년05월01일

(30) 우선권주장
61/719,429 2012년10월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현
WO2006073431 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

전체 청구항 수 : 총 4 항

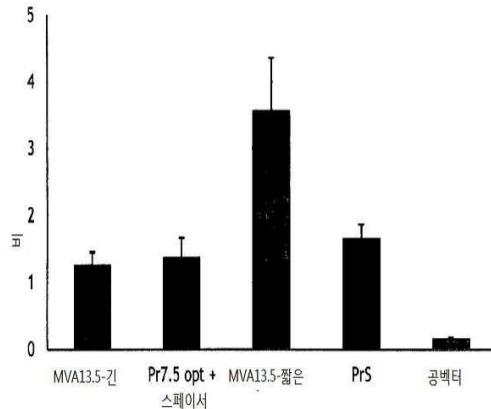
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 강력한 T-세포 및 항체 반응을 위한 PR13.5 프로모터

(57) 요약

본 발명은 항원을 코딩하는 뉴클레오파이드 서열에 작동적으로 연결된 Pr13.5 프로모터를 포함하는 재조합 폴스 바이러스, 바람직하게는 변형된 백시니아 앙카라(MVA) 바이러스 및 이의 용도를 포함한다. 본 발명은 포유동물, 바람직하게는 사람에게 재조합 MVA 바이러스의 1회 이상의 면역화를 실시함으로써 강력한 CD8 T 세포 및 항체 반응을 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/5256 (2013.01)

A61K 2039/572 (2013.01)

C12N 2710/24122 (2013.01)

C12N 2710/24143 (2013.01)

C12N 2830/60 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

신생항원을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 Pr13.5 프로모터를 포함하는 재조합 변형된 백시니아 양카라(modified Vaccinia Ankara)(MVA) 바이러스로서, 상기 Pr13.5 프로모터가 서열번호 1의 서열의 카피 적어도 2개를 포함하고, 상기 서열번호 1의 서열의 카피 적어도 2개는 30개 내지 40개의 뉴클레오타이드에 의해 분리되는, 재조합 MVA 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Pr13.5 프로모터가 서열번호 1의 서열의 카피 2개를 포함하는 재조합 MVA 바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Pr13.5 프로모터가 서열번호 2의 서열을 포함하는 재조합 MVA 바이러스.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 변형된 백시니아 양카라 바이러스를 사람에게 1회 이상 투여함을 포함하여, 사람에서 신생항원에 대한 강력한(robust) CD8 T 세포 반응을 유도하는데 사용되는, 재조합 MVA 바이러스.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001] MVA는 터키 앙카라의 백신접종 연구소에서 다년간 유지되었으며 사람의 백신접종을 위한 기초로서 사용된 진피 백시니아 주(株)(strain) 앙카라(Ankara)(음모요막 백시니아 앙카라(CVA) 바이러스)로부터 기원한다. 그러나, 백시니아 바이러스(VACV)와 연관된 흔한 종증의 백신접종후 합병증으로 인해서 보다 약독화되고 보다 안전한 천연두 백신을 제조하고자 하는 몇가지 시도가 있었다.

[0002] 1960년 내지 1974년의 기간 동안, 안톤 마이어(Anton Mayr) 교수는 CEF 세포에서 570회가 넘는 연속적 계대접종에 의해 CVA를 약독화시키는데 성공하였다[참조: Mayr et al., 1975, Passage History: Abstammung,

Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection 3: 6-14]. 전-천연두 백신으로서 MVA의 조기 개발의 일부로서, 백시니아로 인한 부작용의 위험에 처한 피험자에서 리스트er 엘스트리 (Lister Elstree)[참조: Stickl, 1974, Smallpox vaccination and its consequences: first experiences with the highly attenuated smallpox vaccine "MVA". Prev.Med. 3(1): 97-101 ; Stickl and Hochstein-Mintzel, 1971 , Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus"). Munch Med Wochenschr. 113: 1149-1153]와 함께 MVA-517(517번째 계대에 상응함)을 사용한 임상 시험이 있었다. 1976년에는 MVA-571 종자 스톡(571번째 계대에 상응함)으로부터 유래된 MVA가 독일에서 2기 비경구 천연두 백신 접종 프로그램에서의 프라이머 백신으로서 등록되었다. 이어서, MVA-572은 대다수가 1세 내지 3세의 아동인 약 120,000명의 백인들에서 사용되었으며, 비록 많은 피험자들이 종래의 백시니아 바이러스와 연관된 합병증의 위험이 높은 집단 중에 있었다 해도 중증 부작용은 보고되지 않았다[참조: Mayr et al., 1978, The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behaviour in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl). Zentralbl. Bacteriol. (B) 167: 375-390]. MVA-572는 영국 월트셔 SP4 OJG 솔즈베리 포턴 다운의 유럽 동물세포 배양물 기탁기관(European Collection of Animal Cell Cultures), 백신 연구 및 생산 실험실(Vaccine Research and Production Laboratory), 공중보건 연구 사업소(Public Health Laboratory Service), 응용 미생물 및 연구 센터(Centre for Applied Microbiology and Research)에 ECACC V9401 2707로서 기탁되었다.

[0003]

많은 계대접종을 사용하여 MVA를 약독화시켰기 때문에, CEF 세포에서의 계대 수에 따라서 수많은 상이한 주 또는 분리주(isolate)가 있다. 모든 MVA 주는 마이어 박사로부터 기원하며 대부분 천연두 근절 프로그램 동안 독일에서 사용된 MVA-572 또는 수의용 백신으로서 집중적으로 사용된 MVA-575로부터 유래한다. MVA-575는 2000년 12월 7일자로 유럽 동물세포 배양물 기탁기관(ECACC)에 기탁번호 V001 20707로서 기탁되었다.

[0004]

1차 닭 배아 섬유아세포 상에서 CVA의 일련의 증식(570회 초과의 계대접종)에 의해, 약독화된 CVA-바이러스 MVA(변형된 백시니아 바이러스 앙카라)가 수득되었다. MVA는 베베리안 노드(Bavarian Nordic)에 의해 추가 계대접종되었으며 MVA-BN로 지정되었다. MVA 뿐만 아니라 MVA-BN은 선조 CVA 바이러스와 비교해서 계놈의 약 13%(6개의 주요 결실 부위 및 다수의 작은 결실 부위로부터 26.5 kb)가 결여되어 있다. 결실은 다수의 발병성 및 숙주 범위 유전자 뿐만 아니라 A형 봉입 단백질(ATI)을 코딩하는 유전자의 큰 단편 및 성숙한 바이러스 입자를 A형 봉입체로 지시하는 구조 단백질을 코딩하는 유전자에 영향을 미친다. MVA-BN의 샘플은 2000년 8월 30일자로 유럽 세포 배양물 기탁기관(ECACC)에 번호 V00083008로 기탁되었다.

[0005]

MVA-BN은 사람 세포에 부착하여 진입할 수 있고, 여기서 바이러스-코딩된 유전자가 매우 효율적으로 발현된다. 그러나, 자손 바이러스의 조립 및 방출은 일어나지 않는다. MVA-BN 및 유도체의 제제는 면역 결핍 개체를 포함하는 많은 동물 유형 및 2000명이 넘는 사람 피험자에게 투여되었다. 모든 백신접종은 전반적으로 안정하고 내약성이 우수한 것으로 입증되었다.

[0006]

많은 상이한 문헌들로부터 인식은 모든 MVA 주가 동일하고 고도로 약독화된 안전한 생 바이러스 백터를 대표한다는 것이다. 그러나, 전임상 시험에서 MVA-BN은 다른 MVA 주와 비교해서 보다 우수한 약독화 및 효능을 나타낸다는 것이 밝혀졌다[참조:WO 02/42480]. 예를 들면, ECACC에 번호 V00083008로 기탁된 MVA 변이주 MVA-BN는 시험관내에서 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 번식 복제(reproductive replication)하는 능력을 갖지만, MVA 575 또는 MVA 572가 번식 복제할 수 있는 사람 세포에서는 번식 복제하는 능력을 갖지 않는다. 예를 들면, MVA-BN은 사람 각질형성 세포주 HaCaT, 사람 배아 신장 세포주 293, 사람 뼈 골육종 세포주 143B 및 사람 자궁경부 선암종 세포주 HeLa에서 번식 복제하는 능력을 갖지 않는다. 게다가, MVA-BN 주는 성숙한 B 및 T 세포를 생산 할 수 없고 이로써 심각하게 면역저하되고 복제성 바이러스에 대해 고도로 감수성인 마우스 모델에서 복제하지 못한다. MVA-BN 주의 추가의 또는 대안적 특성은 DNA-프라임(prime)/백시니아 바이러스 부스트(boost) 방식과 비교하여 백시니아 바이러스 프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식에서 적어도 실질적으로 동일한 수준의 면역을 유도하는 능력이다.

[0007]

"번식 복제할 수 없는"이란 용어는 본원에서 참조로 인용되는 WO 02/42480 및 미국 특허 제6,761,893호에 정의된 바와 같이 본 출원에서 사용된다. 따라서, 당해 용어는 미국 특허 제6,761,893호에 기술된 검정(상기 검정은 본원에서 참조로 인용된다)을 사용하였을 때 감염 후 4일째에 1 미만의 바이러스 증폭비를 갖는 바이러스에 적용된다. 바이러스의 "증폭비"는 제1 장소에서 세포를 감염시키기 위해 본래 사용된 양(인풋)에 대한 감염된 세포로부터 생산된 바이러스(아웃풋)의 비이다. 인풋과 아웃풋 사이의 "1"의 비는 감염된 세포로부터 생산된 바이러스의 양이 세포를 감염시키기 위해 처음에 사용된 양과 동일한 증폭 상태를 정의한다.

- [0008] MVA-BN 또는 이의 유도체는 일 양태에 따라서, DNA-프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식과 비교하여 백시니아 바이러스 프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식에서 적어도 실질적으로 동일한 수준의 면역성을 유도함을 특징으로 한다. 백시니아 바이러스는, WO 02/42480호에 기재된 바와 같이 "검정 1" 및 "검정 2" 중 하나, 바람직하게는 두 검정 모두로 측정된 CTL 반응이 DNA-프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식과 비교하여 백시니아 바이러스 프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식에서 적어도 실질적으로 동일한 경우, DNA-프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식과 비교하여 백시니아 바이러스 프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식에서 적어도 실질적으로 동일한 수준의 면역을 유도하는 것으로 간주된다. 보다 바람직하게는 백시니아 바이러스 프라임/백시니아 바이러스 부스트 투여 후의 CTL 반응은 DNA-프라임/백시니아 바이러스 부스트 방식과 비교하여 상기 검정 중 적어도 하나에서 더욱 높다. 가장 바람직하게는 CTL 반응은 두 검정 모두에서 더욱 높다.
- [0009] WO 02/42480는 MVA-BN의 특성들을 갖는 백시니아 바이러스를 수득하기 위한 방법을 개시하고 있다. 고도로 약독화된 MVA-BN 바이러스는 예를 들면 MVA-572 또는 MVA-575와 같은 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA)의 추가 계대접종에 의해 유도될 수 있다.
- [0010] 요컨대, MVA-BN은 다른 MVA 주와 비교해 가장 높은 약독화 프로파일을 갖는 것으로 나타났으며 심지어 심각하게 면역저하된 동물에서도 안전하다.
- [0011] 비록 MVA가 포유동물 세포에서 강력하게 약화된 복제를 나타낸다 해도, 이의 유전자는 효과적으로 전사되고, 바이러스 복제의 차단은 바이러스 조립 및 배출(egress)의 수준에서 이루어진다[참조: Sutter and Moss, 1992, Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89: 10847-10851; Carroll and Moss, 1997, Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. Virology 238: 198-211.]. 이의 높은 약독화 및 감소된 발병성에도 불구하고, 전임상 연구에서 MVA-BN는 VACV에 대해 그리고 MVA 계놈 내로 클로닝된 이종 유전자의 생성물에 대해 체액성 면역반응 및 세포성 면역반응 둘다를 유발한 것으로 나타났다[참조: Harrer et al., 2005, Therapeutic Vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. Antiviral Therapy 10: 285-300; Cosma et al., 2003, Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. Vaccine 22(1): 21-29; Di Nicola et al., 2003, Clinical protocol. Immunization of patients with malignant melanoma with autologous CD34(+) cell-derived dendritic cells transduced ex vivo with a recombinant replication-deficient vaccinia vector encoding the human tyrosinase gene: a phase I trial. Hum Gene Ther. 14(14): 1347-1 360; Di Nicola et al., 2004, Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34(+) -derived dendritic cell vaccination: a phase I trial in metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 10(16): 5381-5390.].
- [0012] MVA-BN 및 재조합 MVA-BN-기반 백신은 혈청 비함유 배지에서 배양된 CEF 세포에서 생성, 계대접종, 생산 및 제조될 수 있다. 많은 재조합 MVA-BN 변이체는 전임상 및 임상 개발을 위해 특징규명되었다. 약독화(사람 세포 주에서 복제의 결여) 또는 안정성(전임상 독성 또는 임상 연구) 측면에서 MVA-BN, 바이러스 백터 골격 및 각종 재조합 MVA-기반 백신 간에 차이는 관찰되지 않았다.
- [0013] VACV 백터에 의해 발현된 외래 유전자 생성물에 대한 강력한 체액성 및 세포성 면역반응의 유도는 외래 유전자 생성물이 특이적 항체 및 T 세포의 인식 및 유도에 대해서 VACV 백터의 150가지 초파의 항원 모두와 경쟁해야만 한다는 사실에 의해 방해를 받는다. 구체적 문제점은 외래 유전자 생성물에 대한 강력한 CD8 T 세포 반응의 유도를 방지하는 백터 CD8 T 세포 에피토프의 면역우성이다[참조: Smith et al., Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara. J. Immunol. 175:8431-8437, 2005.]. 이는 드라이백스(Dryvax)와 같은 복제성 VACV 백터 뿐만 아니라 NYVAC 및 MVA와 같은 비복제성 백터에도 적용된다.
- [0014] VACV에 의한 재조합 항원("신생항원")의 발현을 위해 오직 폭스바이러스-특이적 프로모터만이 사용될 수 있고, 통상의 전핵성 프로모터는 사용될 수 없다. 이러한 이유는 세포질 내에서 복제하고 전형적 전핵성 프로모터를 인식하지 않는 그 자체의 세포-자율성 전사 기작을 부여하는 폭스바이러스의 특수한 생물학 때문이다.
- [0015] 바이러스 복제 주기는 2회의 주요 단계, DNA 복제 전 감염 후 처음 2시간을 포함하는 초기 단계 및 감염 후 2시

간 내지 4시간째에 바이러스 DNA 복제가 개시될 때 시작하는 후기 단계로 나뉜다.

[0016] 후기 단계는 감염 후 약 2 내지 20시간부터 자손 바이러스가 감염된 세포로부터 방출될 때까지의 바이러스 복제 주기의 나머지를 포함한다. 프로모터가 활성적인 바이러스 복제 주기 내의 시간대에 따라 분류되고 명명되는 수많은 폭스바이러스 프로모터 유형이 있는데, 예를 들면, 초기(early) 및 후기(late) 프로모터가 있다[참조: 예를 들면, Davison and Moss, J. Mol. Biol. 210:771-784, 1989; Davison and Moss, J. Mol. Biol. 210:749-769, 1989; and Hirschmann et al., Journal of Virology 64:6063-6069, 1990, 이들 모두는 본원에서 참조로 인용된다].

[0017] 초기 프로모터는 감염의 후기에서도 활성적일 수 있지만, 후기 프로모터의 활성은 후기 단계로 국한된다. 즉 각적(intermediate) 프로모터로 명명되는 세번째 부류의 프로모터는 초기 단계에서 후기 단계로 이행시 활성적이며 바이러스 DNA 복제에 의존적이다. 이는 후기 프로모터에도 적용되만, 즉각적 프로모터로부터의 전사는 전형적 후기 프로모터로부터의 전사보다 일찍 시작하며 상이한 세트의 전사 인자를 필요로 한다.

[0018] 최근 몇 해에 걸쳐서 신생항원 발현을 위한 폭스바이러스 프로모터의 시간적 부류의 선택이 신생항원-특이적 면역반응의 강도와 질에 상당한 효과를 미친다는 것이 점차 명백해지고 있다. 후기 프로모터의 제어 하에 발현된 신생항원에 대한 T 세포 반응이 초기 프로모터 하에 발현된 동일한 항원으로 수득된 T 세포 반응보다 약한 것으로 밝혀졌다[참조: Bronte et al., Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A 94:3183-3188, 1997. Coupar et al., Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response. Eur. J. Immunol. 16:1479-1487, 1986.].

[0019] 더욱 명백하게도, VACV 뿐만 아니라 복제-결합 VACV 벡터 MVA로의 반복된 자가 면역화에서 오로지 후기 프로모터 하의 항원에 대한 CD8 T 세포 반응은 완벽하게 실패할 수 있다는 것이 최근에 밝혀졌다. 이러한 실패는 2차 면역화 후에 거의 검출불가능한 항원-특이적 CD8 T 세포 반응을 초래하였다[참조: Kastenmuller et al., Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. J. Exp. Med. 204:2187-2198, 2007.]

[0020] 따라서, VACV 벡터에 의한 신생항원의 초기 발현은 효과적 신생항원-특이적 CD8 T 세포 반응을 위해 결정적인 것으로 보인다. 또한, 초기-발현된 VACV 벡터 항원은 CD8 T 세포 반응에서 면역우성을 위해 나중에 발현된 항원 뿐만 아니라 다른 초기 항원과 경쟁한다는 것이 밝혀졌다[참조: Kastenmuller et al., 2007.]. 따라서, 폭스바이러스 프로모터의 초기 부분의 특수한 특성은 신생항원-특이적 T 세포 반응의 유도를 위해 매우 중요할 수 있다. 게다가, 보다 높은 양의 항원이 보다 강력한 항원-특이적 면역반응을 위해 이롭다는 것은 통상 갖는 견해이자 일반적 규칙이다[폭스바이러스 분야에 대해 예를 들면 다음을 참조한다: Wyatt et al., Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. Vaccine 26:486-493, 2008].

[0021] ATI 유전자로부터의 4가지 초기 프로모터 요소 및 후기 프로모터 요소를 결합한 프로모터는 이미 기술된 바 있고[참조: Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. J. Virol. 65:5584-5588, 1991 ; Wyatt et al., Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. Vaccine 26:486-493, 2008], 항원의 증가된 초기 발현을 지시하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 이러한 프로모터에 의해 유도된 항원에 의해 유발된 T 세포 반응은 오직 단일 면역화 후에만 분석되었고 이러한 환경에서 전형적 Pr7.5K 프로모터로 수득된 T 세포 반응과 명백히 상이하지 않았다[참조: Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. J. Virol. 65:5584-5588, 1991.].

[0022] 문헌[참조: Jin et al. Arch. Virol. 138:315-330, 1994]은 CAT 유전자에 작동적으로 연결된 돌연변이된 Pr7.5 프로모터의 반복 배열(tandem repeat)(2 내지 38개 카페)과 결합된 VACV ATI 프로모터로 이루어진 재조합 VACV 프로모터의 작제를 보고하였다. 돌연변이된 Pr7.5 프로모터의 최대 10회까지의 반복이 초기 유전자 발현을 증가시키는데 있어 효과적이었다. 추가 반복은 억제적인 것으로 보였다. 모든 작제물에 있어, 사이토신 아라비노사이드(AraC)(즉, 바이러스 복제 주기가 초기 단계에서 정지했을 때)의 존재하에 생산된 CAT 단백질의 양은 AraC의 부재하에 생산된 양의 1/10 미만이었다[참조: Jin et al. Arch. Virol. 138:315-330, 1994].

[0023] 최근에는, 강력한 초기 요소의 5개 카페를 함유하는 하이브리드 초기-후기 프로모터(pHyb)의 제어 하에 OVA를

발현하는 재조합 MVA로 마우스를 반복 면역화시키면 Pr7.5-유도된 OVA 및 PrS-유도된 OVA에 대한 급성 및 기억 CD8 T-세포 반응과 비교해 더욱 우세한 급성 및 기억 CD8 T-세포 반응이 초래되는 것으로 밝혀졌다[참조: Baur et al., Journal of Virology, Vol. 84 (17): 8743-8752 (2010)]. 게다가, pHb의 제어 하에 발현된 OVA는 상기한 바와 같은 3회 이상의 면역화 후 면역우성 CD8 T-세포 항원으로서 MVA-유도된 B8R 단백질을 대체하였다.

[0024] 아사슨(Assarsson) 등[참조: P.N.A.S. 105: 2140-45, 2008]은 감염 동안의 223개의 주석이 된(annotated) 백신이나 바이러스 유전자의 발현 수준을 동시에 측정하였고 게놈 타일링 어레이(genome tiling array) 접근법을 사용하여 이의 반응속도론을 측정하였다. 이들은 백신이나 바이러스의 WR 주의 많은 유전자들이 높은 전사율 갖는다는 것을 발견하였다. 아사슨 등은 고 발현된 유전자의 몇가지 예를 제공하였다: 즉각적-초기 VACWR-059 (이중 가닥 RNA-결합 단백질) 및 VACWR-184(공지되지 않음); 초기 VACWR-018(공지되지 않음); 초기/후기 VACWR-131(코어 단백질); 및 후기 VACWR-169(공지되지 않음). 아사슨 등은 이들 유전자의 특별히 높은 발현 수준 때문에 이들 유전자가 추후의 조사를 위한 특별한 관심대상이 될 수 있음을 시사하였으나, 이들 유전자의 전사를 개시하는 프로모터를 동정하지 못하였다.

[0025] 양(Yang) 등[참조: P.N.A.S. 107:11513-11518, 2010]은 심층 RNA 서열분석(deep RNA sequencing)을 사용하여 감염 후 시간 진행에 따른 백신이나 바이러스(VACV) 전사체를 분석하였다. 바이러스 DNA 복제 전에, 118개의 VACV ORF로부터의 전사체가 검출되었고, 복제 후에는 93개의 추가적 ORF로부터의 전사체가 특징규명되었다. 고해상도는 번역초과(read-through) 전사체 및 mRNA 시작 부위와 인접 프로모터의 위치를 포함하는 많은 mRNA의 정확한 경계를 정할 수 있도록 한다.

[0026] 오르부(Orubu) 등[참조: PLoS ONE 7(6):e40167, 2012]은 비기능적 또는 비필수적 MVA 오픈 리딩 프레임(ORF)의 발현을 유도하는 강력한 초기 프로모터가 재조합 항원의 면역원성 발현을 위해 이용될 수 있음을 제시하였다. C11R, F11L, A44L 및 B8R의 MVA 오르톨로그(ortholog)를 동일한 해독 개시 코돈을 사용하도록 위치된 모델 항원으로 정확하게 치환하는 것은 통상 사용되는 p7.5 또는 짧은 합성 프로모터에 의해 달성된 것과 유사하거나 이보다 다소 큰 초기 전이유전자 발현을 가능케하였다. 단일 주사 또는 아데노바이스-프라임, rMVA-부스트 백신 접종에 의해 마우스에서 유도된 항원-특이적 CD8+ T 세포의 빈도는 이의 진성 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터를 사용하였을 때 종래의 작제물과 비교하여 유사하게 동일하거나 아주 조금 향상되었다. p7.5를 사용하였을 때와 비교한 C11R 또는 F11L 프로모터를 사용하였을 때 관찰되는 면역원성의 향상은 p7.5를 사용하였을 때와 비교한 mH5 프로모터로 수득된 향상과 유사하였다.

[0027] 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩된 항원에 대한 강력한 T 세포 및 항체 반응은 백신 효능을 개선시킬 수 있다. 따라서, 당업계에서는 MVA와 같은 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩된 항원에 대한 강력한 T 세포 및 항체 반응을 달성할 수 있는 조성물 및 방법이 요구된다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시킨다.

발명의 내용

[0028] 발명의 요지

[0029] 본 발명은 신생항원을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 연결된 Pr13.5 프로모터를 포함하는 재조합 변형된 백신이나 앙카라(MVA) 바이러스 및 이의 용도를 포함한다. 일 양태에서, 본 발명은 사람을 포함하는 포유동물에게 MVA 바이러스의 1회 이상의 면역화를 실시함을 포함하여, 포유동물, 바람직하게는 사람에서 신생항원에 대한 강력한 CD8 T 세포 반응을 유도하는 방법을 포함한다.

[0030] 다양한 양태에서, Pr13.5 프로모터는 서열번호 1과 적어도 95%, 98% 또는 100% 동일성을 갖는 적어도 40개 염기의 핵산 서열의 카페 적어도 1개를 포함한다.

[0031] 다양한 양태에서, Pr13.5 프로모터는 서열번호 1과 적어도 95%, 98% 또는 100% 동일성을 갖는 적어도 31개 뉴클레오타이드의 제2 뉴클레오타이드 서열의 카페 적어도 1개를 포함한다.

[0032] 다양한 양태에서, Pr13.5 프로모터는 서열번호 1과 100% 동일성을 갖는 적어도 40개 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열의 카페 2개를 포함한다.

[0033] 다양한 양태에서, Pr13.5 프로모터는 서열번호 2를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 MVA013.5L 유전자(서열번호 3)의 상류 서열을 도시한 것이다. Pr13.5-짧은 프로모터 및 Pr13.5-긴 프로모터의 서열이 기재되어 있다. 파선: Pr13.5-긴 프로모터(위치 15878-15755). 실선: Pr13.5-짧은 프로모터(위치

15808-15755). 밑줄: MVA013.5의 ATG 출발 코돈(위치 15703-15701). MVA014L의 TAA 종결 코돈(위치 15878-15856). 아래로부터의 검은색 화살표: RACE PCR에 의해 한정된 전사 시작 부위(위치 15767 및 15747). 위로부터의 회색 화살표: 문헌[참조: Yang et al., 2010, suppl. data]에 의해 한정된 전사 시작 부위. 사각형 표시: 문헌[참조: Yang et al., 2010, suppl. data (Pos. 15913-15899)]에 의해 한정된 코어 프로모터. 진뱅크(GenBank) DQ983238.1에 따른 위치.

도 2는 MVA 계놈(서열번호 3) 내의 Pr13.5-긴 프로모터 및 Pr13.5-짧은 프로모터의 서열 및 위치를 도시한 것이다. MVA013.5 유전자의 상류 서열에는 44 bp 서열 반복부(직접 반복)가 있다. 사각형 표시: 사각형 표시된 부분은 36 bp 스페이서에 의해 분리된 13.5의 상류 서열 내의 44 bp 반복 서열이다. 파선: Pr13.5-긴 프로모터(위치 15878-15755). 실선: Pr13.5-짧은 프로모터(위치 15808- 15755). 밑줄: MVA013.5의 ATG 출발 코돈(위치 15703-15701). 진뱅크(GenBank) DQ983238.1에 따른 위치.

도 3은 표시된 감염후 시점에서 표시된 작제물로 감염된 HeLa 세포로부터의 오브알부민-mRNA를 측정하는 RT-qPCR을 도시한 것이다.

도 4는 표시된 감염후 시점에서 표시된 작제물로 감염된 HeLa 세포로부터의 평균 형광 강도(MFI)로서 FACS에 의해 측정된 Ova 단백질 발현을 도시한 것이다. 399 MFI에서의 wt의 평균(Ova 유전자는 포함되지 않았음)은 검정의 배경값을 반영한다.

도 5는 1차, 2차 및 3차 면역화 후 표시된 작제물로 백신접종된 마우스로부터의 Ova+/B8R+ 세포의 평균 비를 도시한 것이다.

도 6은 표시된 작제물로의 3차 면역화 후 10주째에서 마우스의 Ova+/B8R+ 세포 반응의 평균 비를 도시한 것이다.

도 7A 및 7B는 1차, 2차 및 3차 면역화 후 표시된 작제물로부터의 항체 생산을 도시한 것이다. A. 항체의 기하평균역가(GMT). B. PrS 프로모터와 비교한 GMT의 비. 프로모터 MVA50L + PrSSL 및 MVA170R + PrSSL은 오브알부민 유전자의 ATG의 바로 상류에서 합성의 짧은 강한 후기(Short Strong Late) 프로모터 PrSSL 프로모터의 5' 측면에 융합된 각각의 유전자의 MVA 프로모터이다(AATTCTTAATATATAA; 서열번호 7; PCT WO 2010/060632 A1).

도 8A 내지 8F는 각종 폭스바이러스 Pr13.5의 뉴클레오타이드 서열의 서열번호 1과의 BLAST 정렬을 도시한 것이다. 동일한 뉴클레오타이드는 점으로 도시되어 있고, 결실된 뉴클레오타이드는 -으로 도시되어 있고, 변화는 문자로 표시되어 있다.

도 9A 내지 9D는 도 8A 내지 8F의 정렬 내의 서열에 대한 기탁번호 및 명칭을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 발명의 상세한 설명

[0036] HeLa 세포를 MVA-BN으로 감염시키고 RNA를 제조하였다. 다양한 MVA ORF에 특이적인 프라이머를 제조하고 RACE-PCR(FirstChoice® RLM-RACE 키트, 제조원: 독일 다름슈타트 소재의 라이프 테크놀로지스(Life Technologies))을 사용하여 이들 ORF를 코딩하는 MVA RNA를 나타내는 PCR 생성물을 생성시켰다. 상기 PCR 생성물을 서열분석하여 전사 시작 부위를 동정하였다. 이러한 정보에 기초하여, 이들 ORF를 코딩하는 mRNA의 전사를 위한 프로모터를 동정하였다. 다음의 ORF에 대한 MVA 프로모터를 MVA 작제물 내로 삽입시켜 오브알부민(OVA) 유전자의 발현을 유도하였다: MVA13.5(CVA022; WR 018), MVA050L(E3L; WR 059), MVA022L(K1L; WR 032) 및 MVA170R (B3R; WR 185).

[0037] HeLa 세포를 시험관내에서 재조합 MVA 바이러스로 감염시키고 오브알부민 단백질 발현을 FACS 분석으로 검사하였다. MVA050L(E3L; WR 059), MVA022L(K1L; WR 032) 및 MVA170R(B3R; WR 185) 프로모터를 함유하는 작제물의 경우 오브알부민 단백질 발현은 감염 후 2시간 또는 심지어 4시간째에도 FACS 분석에 의해 검출되지 않았다. 대조적으로, 높은 수준의 오브알부민 발현이 이미 2시간 후 MVA13.5(CVA022; WR 018) 프로모터로 검출되었다.

[0038] MVA13.5L ORF에 대한 추정상의 프로모터 코어 요소는 이미 문헌[참조: 양(Yang) 등, 2010]에서 15 nt 코어 서열 및 177 nt의 비해독된 리더를 함유하는 것으로서 동정되었다. 그러나, 현재의 연구는 MVA13.5L ORF에 의해 사용되는 전사 시작 부위가 100개 초과의 뉴클레오타이드만큼 양 등에 의해 동정된 시작 부위의 하류에 있음을 나타냈다. 따라서, 본 발명자들에 의해 동정된 MVA13.5 프로모터는 양 등에 의해 동정된 프로모터 코어 요소와

상이하다.

[0039] 본 발명자들에 의해 동정된 MVA13.5 프로모터는 40개 뉴클레오타이드 초과의 반복부를 함유한다: TAAAAATAGAAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA(서열번호 1). 반복된 서열은 많은 다른 폭스바이러스, 예를 들면, 마두 바이러스, 원숭이수두(monkeypox) 바이러스, 우두 바이러스, 두창(variola) 바이러스, 백시니아 바이러스, 낙타수두(camelpox) 바이러스, 토끼수두(rabbitpox) 바이러스, 사지결손증 바이러스 및 타테라폭스(taterapox) 바이러스에서도 발견될 수 있다(도 8 및 9).

[0040] 2가지 MVA 작제물을 오브알부민(OVA) 유전자의 발현을 유도하는 반복부의 1개 카페(MVA13.5 짧은; 서열번호 1) 또는 2개 카페(MVA13.5 긴; 서열번호 2)를 함유하는 프로모터로 생성시켰다. 높은 수준 오브알부민 발현은 상기 작제물 둘다의 경우 시험관내에서 HeLa 세포를 감염시킨 후 검출되었다(도 4).

[0041] 시험관내에서 감염된 HeLa 세포에서의 다양한 프로모터에 의해 표시된 오브알부민 RNA 발현을 RT-qPCR에 의해 다양한 시점에서 측정하였다. MVA13.5 짧은 프로모터 및 MVA13.5 긴 프로모터 둘다는 높은 수준의 초기 RNA 발현을 나타냈고(도 3), MVA13.5 긴 프로모터는 가장 높은 수준의 초기 단백질 발현을 나타냈다.

[0042] 프로모터 PrS, Pr7.5 opt + 스페이서, Pr13.5 짧은 프로모터 및 Pr13.5 긴 프로모터의 제어 하에 재조합적으로 발현된 OVA에 대한 CD8 T 세포 반응을 마우스마다 재조합 MVA의 1회, 2회 및 3회 면역화 후에 마우스에서 측정하였다(도 5 및 6). OVA-특이적 및 B8R(바이러스)-특이적 CD8 T 세포 반응을 MHC 클래스 I 육량체에 특이적으로 결합하는 CD8 T 세포의 수를 평가하여 측정하였다. MHC 클래스 I 텍스트라미를 이의 각각의 H-2Kb 결합 웨타이드, 즉 OVA에 대한 SIINFEKL(서열번호 4) 또는 바이러스 B8R 웨타이드에 대한 TSYKFESV(서열번호 5)와 복합체화시켰다.

[0043] OVA-특이적 CD8 T 세포 대 B8R-특이적 CD8 T 세포의 평균 비는 3회의 면역화 후에 MVA13.5-긴 프로모터의 경우 약 2.5였다. 다른 3가지 작제물은 1 미만의 평균 비를 나타냈다. 따라서, 면역우성 계급의 역전은 신생항원의 발현을 위해 Pr13.5 긴 프로모터를 사용함으로써 달성될 수 있었으나, 다른 프로모터를 사용해서는 달성될 수 없었다.

[0044] 다양한 프로모터의 제어 하에 재조합적으로 발현된 OVA에 대한 항체 반응을 마우스마다 재조합 MVA의 1회, 2회 및 3회 면역화 후에 마우스에서 측정하였다(도 7A 및 7B). MVA13.5 긴 프로모터를 사용했을 때의 항체 반응은 재조합 MVA과 PrS 프로모터를 사용했을 때의 반응보다 상당히 높았다. 따라서, MVA로부터 신생항원 발현을 유도하기 위한 Pr13.5 긴 프로모터의 사용은 예상치 않게 우수한 결과를 제공한다.

Pr13.5 프로모터

[0045] 본 발명은 Pr13.5 프로모터를 포함하거나 이로 이루어진 분리된 핵산을 포함한다. 본 발명의 범주 내에서, "Pr13.5 프로모터"는 서열번호 1과 적어도 95% 동일성을 갖는 적어도 40개 염기의 핵산 서열의 카페 적어도 1개를 포함한다. 따라서, "Pr13.5 프로모터"는 다양한 양태에서 MVA 뉴클레오타이드 서열, 합성 서열 또는 MVA 이외의 폭스바이러스로부터의 유사한 폭스바이러스 서열을 지칭할 수 있다. 바람직하게는, Pr13.5 프로모터는 서열번호 1과 적어도 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 적어도 40개 염기의 핵산 서열의 카페 적어도 1개를 포함한다. 상기 핵산 서열은 바람직하게는 길이가 40, 41, 42, 43, 44 또는 45개 염기이다.

[0046] 동일성%는 가시적 검사 및 수학적 계산으로 측정할 수 있다. 또는, 두 핵산 서열의 동일성%는 테브루(Devereux) 등[참조: Nucl. Acids Res. 12:387, 1984]에 의해 기술되었고 위스콘신 대학 유전학 컴퓨터 그룹(University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG))으로부터 입수 가능한 GAP 컴퓨터 프로그램 버전 6.0을 사용하여 서열 정보를 비교함으로써 측정할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 바람직한 데폴트 파라메터는 다음을 포함한다: (1) 뉴클레오타이드용의 단항 비교 행렬(동일성의 경우 1의 값 및 비-동일성의 경우 0의 값 함유) 및 문헌[참조: Gribskov and Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, 슈바르츠(Schwartz) 및 다이호프(Dayhoff)에 의해 기술된 바와 같음, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979]의 가중 비교 행렬; (2) 각 갭(gap)에 대한 3.0의 폐널티 및 각 갭에서 각 기호에 대한 추가의 0.10 폐널티; 및 (3) 종결 갭에 대해서는 폐널티 없음. 서열 비교를 위해 당업자에 의해 사용되는 다른 프로그램이 사용될 수도 있다.

[0047] 바람직하게는, Pr13.5 프로모터는 이종 핵산 서열에 작동적으로 연결된다. 본 발명의 범주 내에서, "이종 핵산 서열"은 천연에서는 당해 프로모터가 연결되지 않은 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 범주 내에서, "작동적으로 연결된"은 프로모터가 폭스바이러스 감염된 세포에서 이종 핵산 서열의 발현을 유도할 수 있음을 의미한다. 이종 핵산 서열은 바람직하게는 신생항원을 코딩한다. 본 발명의 범주 내에서, 신생항원은 폭스바이러스 벡터에

의해 천연적으로 발현되지 않는 항원을 지칭한다.

이러스, 비둘기 폭스바이러스, 앵무새 폭스바이러스, 메추리 폭스바이러스, 공작 폭스바이러스, 펭귄 폭스바이러스, 참새 폭스바이러스, 찌르레기 폭스바이러스 및 칠면조 폭스바이러스가 포함된다. 바람직한 아비폭스바이러스 카나리아 폭스 바이러스 및 가금 폭스바이러스이다.

[0066] 바람직하게는, 폭스바이러스는 백시니아 바이러스, 가장 바람직하게는 MVA이다. 본 발명은 임의의 및 모든 MVA 바이러스로 생성된 재조합 MVA 바이러스를 포함한다. 바람직한 MVA 바이러스는 예를 들면 ECACC에 번호 V00083008로 기탁된 MVA 변이주 MVA-BN; 2000년 12월 7일자로 유럽 동물세포 배양물 기탁기관(ECACC)에 기탁번호 V001 20707로 기탁된 MVA-575; 및 유럽 동물세포 배양물 기탁기관에 ECACC V9401 2707로서 기탁된 MVA-572이다. 기탁된 주의 유도체도 또한 바람직하다.

[0067] 바람직하게는, MVA는 시험관내 닭 배아 섬유아세포 (CEF) 또는 기타 조류 세포주에서 또는 생체내 부화란에서 번식 복제하는 능력을 갖지만, MVA 575 또는 MVA 572가 번식 복제할 수 있는 사람 세포에서 번식 복제하는 능력을 갖지 않는다. 가장 바람직하게는, MVA는 사람 각질형성 세포주 HaCaT, 사람 배아 신장 세포주 293, 사람 뼈 골육종 세포주 143B 및 사람 자궁경부 선암종 세포주 HeLa에서 번식 복제하는 능력을 갖지 않는다.

[0068] 바람직한 양태에서, 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA) 바이러스는 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 번식 복제하는 능력을 갖고 사람 각질형성 세포주 HaCaT, 사람 배아 신장 세포주 293, 사람 뼈 골육종 세포주 143B 및 사람 자궁경부 선암종 세포주 HeLa에서 MVA-575보다 더 약독화되었음을 특징으로 한다. 바람직하게는, MVA 바이러스는 CEF 세포에서 500 초파의 증폭비로 복제할 수 있다.

[0069] T-세포 반응을 유도하는 항원을 포함하는 어떠한 항원이라도 본 발명의 재조합 MVA에 의해 발현될 수 있다. 바이러스, 세균, 진균 및 암 항원이 바람직하다. HIV-1 항원, 템기 바이러스 항원, 전립선-특이적 항원(PSA) 및 산성인산화효소(PAP) 항원, HER-2/Neu 항원, 탄저병 항원, 홍역 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스, 피코나바이러스, 코로나바이러스 및 호흡기합포체바이러스 항원이 특히 바람직한 항원이다. 바람직하게는, 항원은 외래 항원 또는 신생항원이다.

[0070] 본 발명은 이종 핵산 서열을 당해 이종 핵산 서열이 Pr13.5 프로모터에 작동적으로 연결되도록 폭스바이러스 내로 삽입함을 포함하는, 재조합 폭스바이러스의 제조방법을 포함한다.

[0071] 본 발명은 사람을 포함하는 포유동물의 감염 및 질환의 치료 또는 예방용 의약 또는 백신의 제조에서의 재조합 폭스바이러스의 용도를 포함한다.

[0072] 본 발명은 사람을 포함하는 포유동물의 감염 및 질환의 치료 또는 예방을 위한 본 발명의 재조합 폭스바이러스의 용도를 포함한다.

[0073] 본 발명은 특히, 사람을 포함하는 포유동물의 감염 및 질환의 치료 또는 예방을 위한 백신으로서의 본 발명의 재조합 폭스바이러스의 용도를 포함한다.

재조합 MVA를 포함하는 키트

[0075] 본 발명은 본 발명에 따르는 재조합 폭스바이러스 백터, 바람직하게는 MVA 바이러스를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 재조합 폭스바이러스 백터, 바람직하게는 MVA 바이러스의 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 이상의 용기 또는 바이알과 함께 사람을 포함하는 포유동물로의 상기 바이러스의 투여에 관한 지침서를 포함할 수 있다. 상기 지침서는 재조합 바이러스가 특정한 시점(예를 들면, 사전 투여 후 적어도 4주, 적어도 6주, 적어도 8주째에)에서 포유동물, 바람직하게는 사람에게 1회 또는 수회(즉, 2, 3, 4, 5, 6회 등) 투여량으로 투여됨을 나타낼 수 있다. 바람직하게는, 상기 지침서는 재조합 바이러스가 포유동물, 바람직하게는 사람에게 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회 또는 적어도 4회 투여량으로 투여될 것임을 나타낸다.

CD8 T 세포 및/또는 항체 반응을 유도하는 방법

[0077] 본 발명은 숙주에서 CD8 T 세포 및/또는 항체 반응을 유도하는 방법을 포함한다. 바람직한 양태에서, 당해 방법은 사람을 포함하는 포유동물에게 Pr13.5 프로모터를 포함하는 재조합 폭스바이러스, 바람직하게는 MVA의 적어도 1회, 2회, 3회, 4회 또는 5회 면역화를 실시함을 포함한다.

숙주로의 투여

[0079] 본 발명에 따른 재조합 폭스바이러스, 바람직하게는 MVA는 사람 및 심지어 면역저하된 사람을 포함하는 광범위한 포유동물의 치료를 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 사람을 포함하는 포유동물에서 면역반응을 유도하기 위한 약제학적 조성물 및 백신을 제공한다.

- [0080] 백신은 바람직하게는 재조합 폭스바이러스, 바람직하게는 MVA를 10^4 내지 10^9 TCID(조직 배양물 감염량)_{50/ml}의 농도 범위, 바람직하게는 10^5 내지 5×10^8 TCID_{50/ml}의 농도 범위, 보다 바람직하게는 10^6 내지 10^8 TCID_{50/ml}의 농도 범위, 가장 바람직하게는 10^7 내지 10^8 TCID_{50/ml}, 특히 10^8 TCID_{50/ml}의 농도 범위로 포함한다.
- [0081] 포유동물, 바람직하게는 사람에 바람직한 백신접종 투여량은 10^6 내지 10^9 TCID₅₀, 가장 바람직하게는 10^7 TCID₅₀ 또는 10^8 TCID₅₀, 특히 10^8 TCID₅₀의 투여량을 포함한다.
- [0082] 약제학적 조성물은 일반적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 및/또는 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 보존제, 어쥬번트, 희석제 및/또는 안정화제를 포함할 수 있다. 이러한 보조 물질은 물, 염수, 글리세롤, 에탄올, 오일, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등일 수 있다. 적합한 담체는 전형적으로 단백질, 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집체 등과 같은 크고 느리게 대사되는 분자이다.
- [0083] 백신의 제조를 위해, 본 발명에 따른 재조합 폭스바이러스, 바람직하게는 MVA는 생리학적으로 허용되는 형태로 전환될 수 있다. 이는 천연두에 대한 백신접종을 위해 사용되는 폭스바이러스 백신의 제조에서의 경험을 기초로 수행될 수 있다(스티클(Stickl) 등(1974)에 의해 기술된 바와 같음).
- [0084] 예를 들면, 정제된 바이러스는 약 10 mM Tris, 140 mM NaCl(pH 7.4) 중에서 제형화된 상태에서 5×10^8 TCID_{50/ml}의 역가로 -80°C에서 저장할 수 있다. 백신 주사의 제조를 위해, 예를 들면, 바이러스의 약 10^2 내지 10^8 개 입자들이 앰플, 바람직하게 유리 앰플에서 2% 펩톤 및 1% 사람 알부민의 존재하에서 $100\mu\text{l}$ 내지 1ml의 인산염-완충된 염수(PBS) 중에서 동결건조될 수 있다. 또는, 백신 주사는 제형 중에서 바이러스를 단계적으로 냉동건조시킴으로써 제조된다. 이러한 제형은 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐피로리돈과 같은 추가의 첨가제, 또는 생체내 투여에 적합한 항산화제 또는 불활성 가스, 안정화제 또는 재조합 단백질(예를 들면, 사람 혈청 알부민)과 같은 다른 보조제를 함유할 수 있다. 이어서, 상기 유리 앰플을 밀봉하고 4°C 내지 실온에서 수 개월 동안 저장할 수 있다. 그러나, 필요하지 않는 한, 앰플은 -20°C 미만의 온도에서 저장하는 것이 바람직하다.
- [0085] 백신접종 또는 치료요법을 위해, 동결건조물은 수용액, 바람직하게는 생리 식염수 또는 Tris 완충액 중에 용해될 수 있고, 전신 또는 국소, 즉, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 비강내 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 투여 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식, 투여량 및 투여 횟수는 당업자에 의해 공지된 방식으로 최적화될 수 있다. 그러나, 가장 통상적으로, 포유동물, 바람직하게는 사람은 1차 백신접종 투여한지 약 2주 내지 6주 후에 2차 투여로 백신접종된다. 3차, 4차 및 후속적 투여는 가장 통상적으로 사전 투여한지 약 2주 내지 6주 후에 이루어질 수 있다.
- [0086] 본 발명은 사람을 포함하는 포유동물을 면역화하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 래트, 토끼, 마우스 및 사람을 포함하는 피험체 포유동물은 재조합 MVA의 투여량을 포유동물, 바람직하게는 사람에게 투여함을 포함하여 면역화된다. 일 양태에서, 1차 투여량은 10^8 TCID₅₀의 재조합 MVA 바이러스를 포함하고, 2차 및 추가의 투여량(즉, 3차, 4차, 5차 등)은 10^8 TCID₅₀의 바이러스를 포함한다. 투여는 1차(초회자극(priming)) 투여량 및 2차 또는 추가의(부스팅(boosting)) 투여량(들)로 이루어질 수 있다.
- [0087] 면역화는 전신 또는 국소, 즉, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 비강내 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 투여 경로로 실시될 수 있다.
- [0088] CD8 T 세포 및 항체 반응
- [0089] 본 발명의 재조합 MVA로의 면역화는 강력한 CD8 T 세포 반응을 유도할 수 있다. 바람직한 양태에서, 1차, 2차, 3차, 4차, 5차 등의 면역화 후, 재조합 MVA는 포유동물, 바람직하게는 사람에서 면역우성 바이러스 CD8 T 세포에 피토프, 예를 들면, MVA 백터에 의해 코딩된 TSYKFESV(서열번호 5)에 대한 CD8 T 세포 반응보다 큰 코딩된 항원에 대한 강력한 CD8 T 세포 반응을 유도한다. 바람직하게는, 2차, 3차, 4차, 5차 등의 면역화 후, 코딩된 항원에 대한 면역우성 T 세포 반응이 포유동물, 바람직하게는 사람에서 유도된다. 바람직하게는, 2차, 3차,

4차, 5차 등의 면역화 후, 재조합 MVA는 포유동물, 바람직하게는 사람에서 전체 CD8 T 세포의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 35%인 코딩된 항원에 대한 CD8 T 세포 반응을 유도한다. 바람직하게는, 2차, 3차, 4차, 5차 등의 면역화 후, 재조합 MVA는 포유동물, 바람직하게는 사람에서의 코딩된 항원에 대한 CD8 T 세포 반응을 단일 투여 후의 코딩된 항원에 의한 CD8 T 세포 반응과 비교해서 적어도 2배, 3배, 4배, 5배 또는 10배(즉, 전체 CD8 T 세포의 1% 내지 2%, 3%, 4%, 5%, 또는 10%) 증가시키거나, 포유동물, 바람직하게는 사람에서의 코딩된 항원에 대한 CD8 T 세포 반응을 바이러스 항원(예: B8R)의 T 세포 반응과 비교해서 적어도 2배, 3배, 4배, 5배 또는 10배 증가시킨다. 바람직하게는, 재조합 MVA는 포유동물, 바람직하게는 사람에서의 코딩된 항원에 대한 CD8 T 세포 반응을 단일 투여 후의 바이러스 항원(예: B8R)의 T 세포 반응과 비교해서 적어도 2배, 3배, 4배, 5배 또는 10배로 생성시킨다. 가장 바람직하게는, 포유동물, 바람직하게는 사람에서의 코딩된 항원에 대한 CD8 T 세포 반응은 2차, 3차, 4차, 5차 등의 면역화에 의해서 바이러스 후기 항원(예: B8R)에 대한 반응보다 큰 정도로 증가한다.

[0090] CD8 T 세포 반응의 수준은 예를 들면, FACS/해파린 완충액 중에서 약 100 내지 $120\mu\text{l}$ 의 혈액을 수거함으로써 측정할 수 있다. PBMC는 적혈구를 RBC 용해 완충액으로 용해시켜 제조할 수 있다. 이어서, PBMC는 각각의 H-2Kb 결합 웨타이드, 즉 SIINFEKL(서열번호 4) 또는 TSYKFESV(서열번호 5)와 복합체화된 항-CD8 α -FITC, CD44-PerCP Cy5.5 및 MHC 클래스 I 텍스트라마를 사용하여 OVA-특이적 및 B8R-특이적 CD8 T 세포에 대한 단일 반응으로 공염색시킬 수 있다. MHC 클래스 I SIINFEKL-텍스트라마(서열번호 4)는 PE로 표지할 수 있고, TSYKFESV-텍스트라마(서열번호 5)는 APC로 표지할 수 있다. 염색된 세포를 BD 바이오사이언스(BD Biosciences) BD LSR II 시스템 상에서 유세포측정으로 분석할 수 있다. 샘플당 1만개의 CD8+ T 세포가 획득될 수 있다.

[0091] 또는, CD8 T 세포 반응의 수준은 면역화된 포유동물, 바람직하게는 사람으로부터 혈액을 수거하고 말초혈 단핵구(PBMC)를 분리하여 측정할 수 있다. 이것을 5 pg/ml 브레펠린 A(BFA, "GolgiPlug", BD 바이오사이언스)와 함께 면역우성 MVA 에피토프에 대한 웨타이드(즉, TSYKFESV; 서열번호 5)(B8R) 및 발현된 신생항원으로부터 유래된 웨타이드를 포함하는 1 μM 의 시험 웨타이드를 함유하는 성장 배지에 재현탁시킬 수 있다. 이어서, PBMC를 5% CO_2 에서 37°C에서 5시간 동안 항온처리하고 수거하고 3ml 냉 PBS/10% FCS/2 mM EDTA에 재현탁시키고, 4°C에서 밤새 저장할 수 있다. 다음날, PBMC를 항체 항-CD8 α -Pac-블루(클론 53-6.7), 항-CD62L-PE-Cy7, 항-CD44-APC-알렉사 750 및 항-CD4-PerCP-Cy5.5(모든 항체는 BD 바이오사이언스로부터 입수함)로 염색시킬 수 있다. PBMC는 암실에서 4°C에서 30분 동안 표시된 항체의 적당한 희석액과 함께 항온처리할 수 있다. 세척 후, Cytofix/CytopermTM Plus 키트(BD 바이오사이언스)를 제조업자의 지시에 따라서 사용하여 세포를 고정시키고 투과성이 되도록 할 수 있다. 세척 후, PBMC를 투과/세척 완충액(BD 바이오사이언스)에 희석된 FITC-접합된 항-IFN- γ 항체(BD 바이오사이언스)를 사용하여 세포내 인터페론- γ (IFN- γ)에 대해 염색할 수 있다. 염색된 세포는 유세포측정으로 분석할 수 있다.

[0092] 본 발명의 재조합 MVA로의 면역화는 강력한 항체 반응을 유도할 수 있다. 항체 반응은 ELISA로 측정될 수 있다.

[0093] 본 발명의 범주 내에서, "강력한 CD8 T 세포 반응"은 단일 면역화 후에 PrS 프로모터(5'AAAAATTGAAATTTATTTTTTTGGAAATATAA3'; 서열번호 6)를 함유하는 동일한 MVA 작제물로 생성된 신생항원-특이적 CD8 T 세포의 비율보다 높은 신생항원-특이적 CD8 T 세포의 비율을 의미한다. 일부 양태에서, CD8 T 세포 반응은 단일 면역화 후에 PrS 프로모터(서열번호 6)를 함유하는 동일한 MVA 작제물로 생성된 신생항원-특이적 CD8 T 세포보다 적어도 1.5배 또는 2배 높은 신생항원-특이적 CD8 T 세포를 보여준다.

[0094] 본 발명의 범주 내에서, "강력한 항체 반응"은 단일 면역화 후에 PrS 프로모터(서열번호 6)을 함유하는 동일한 MVA 작제물로 수득된 항체 역가보다 큰 항체 역가를 의미한다. 일부 양태에서, 항체 역가는 단일 면역화 후에 PrS 프로모터(서열번호 6)을 함유하는 동일한 MVA 작제물로 수득된 항체 역가보다 적어도 1.5배 또는 2배 크다.

[0095] 재조합 MVA가 신생항원에 대한 "강력한 CD8 T 세포 반응" 또는 "강력한 항체 반응"을 유도하는지 여부는 본원 실시예에 기술된 바와 같이 측정할 수 있다. 예를 들면, MVA13.5 짧은 프로모터 및 MVA13.5 긴 프로모터 둘다는 본원에 정의된 "강력한 CD8 T 세포 반응"을 유도한다. MVA13.5 긴 프로모터는 본원에 정의된 "강력한 항체 반응"을 유도한다.

[0096] 비록 당해 방법이 바람직하게는 백터의 단일 투여를 포함하지만, 일부 양태에서는 재조합 MVA의 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회 이상의 면역화가 포유동물, 바람직하게는 사람에게 실시될 수 있다.

[0097] 바람직한 양태에서, 코딩된 항원은 세균, 바이러스 또는 종양 항원이다. 바람직하게는, 항원은 사람을 포함하

는 포유동물에 대한 외래 항원이다.

[0098] 실시예

[0099] 실시예 1. MVA 재조합체의 생성

HeLa 세포를 10의 MOI(세포당 10 TCID₅₀)에서 MVA-BN로 감염시키고 전체 RNA를 감염 2시간 후 및 8시간 후에 제조하였다. 다양한 MVA ORF에 특이적인 프라이머를 생성시키고 RACE-PCR(FirstChoice® RLM-RACE 키트, 제조원: 독일 다름슈타트 소재의 라이프 테크놀로지스(Life Technologies))을 사용하여 이들 ORF를 코딩하는 MVA RNA를 나타내는 PCR 생성물을 생성시켰다. 상기 PCR 생성물을 서열분석하여 전사 시작 부위를 동정하였다. 이러한 정보에 기초하여, 프로모터를 이들 ORF를 코딩하는 mRNA의 전사에 대해 동정하였다. 다음의 ORF에 대한 MVA 프로모터를 MVA 작제물[참조: Baur et al., Journal of Virology, Vol. 84 (17): 8743-8752 (2010)] 내로 삽입시켜 오브알부민(OVA) 유전자의 발현을 유도하였다: MVA13.5(CVA022; WR 018), MVA050L(E3L; WR 059), MVA022L(K1L; WR 032) 및 MVA170R(B3R; WR 185).

[0100] 실시예 2. 시험관내에서의 프로모터-의존적 RNA 발현 수준

HeLa 세포를 냉장에서 1시간 동안 냉 바이러스 부착을 사용하여 10의 MOI에서 MVA 재조합 바이러스로 감염시켰다. 부착 후, 세포를 세척하고 0시간(0h) 시점을 수거하거나 세포를 다른 시점의 수거를 위해 37°C에서 항온처리하였다. 샘플을 0.5, 1, 2, 4 및 8시간 p.i.에서 수거하였다. 세포를 균질화시키고 전체 RNA를 추출하였다. 상기 RNA를 DNase 분해시키고, cDNA를 올리고(dT) 프라이밍을 사용하여 합성하였다. 수득된 cDNA 제제를 OVA와 액틴 cDNA의 동시 증폭을 위해 Taqman 기반 qPCR 반응에서 주형으로서 사용하였다. 샘플을 AB7500 사이클러(제조원: Applied Biosystem)에서 작동시켰다. 당해 결과는 도 3에 도시되어 있다.

[0101] 실시예 3. 시험관내 프로모터-의존적 단백질 발현 수준

HeLa 세포를 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 배양하였다. HeLa 세포를 10의 MOI(세포당 10 TCID₅₀)에서 재조합 MVA 바이러스로 감염시켰다. 감염된 세포를 1, 2, 4, 6, 8 및 24시간 p.i.에서 수거하고 고정시키고 투과성이 되도록 하였다. 각 샘플마다, 세포의 절반을 토끼 항-닭 OVA 항체를 사용하여 OVA에 대해 염색시키고, 나머지 절반을 토끼 항-VACV 폴리클로날 항체를 사용하여 MVA 항원에 대해 염색하였다. 샘플을 FACSCalibur 유세포측정 분석기(BD 바이오사이언스) 및 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 당해 결과는 도 4에 도시되어 있다.

[0102] 실시예 4. 마우스 면역화 및 채혈

마우스의 그룹(C57/Bl6)을 당해 연구를 위해 사용하였다. 각 그룹에게 총 3회의 면역화를 실시하였다. PBS-주사된 그룹은 면역반응에 대한 대조군으로서 이용하였다. 혈액을 연구 전반에 걸쳐서 면역반응의 분석을 위해 꼬리 정맥을 통해 취하였다.

마우스를 0주, 4주 및 8주에 PBS에 희석된 10⁸ TCID₅₀의 각각의 MVA 바이러스(총 용적 300μl)로 복강내 면역화시켰다. T 세포 분석을 위한 채혈을 각 면역화 후 1주째에 실시하고 항체 분석을 위한 채혈을 각 면역화 후 3주째에 실시하였다.

[0103] 실시예 5. T 세포 염색 및 항체 검출

마우스당 혈액 약 100 내지 120μl를 FACS/헤파린 완충액 중에 수거하였다. 적혈구를 RBC 용해 완충액으로 용해시켜 PBMC를 제조하였다. 이어서, PBMC를 각각의 H-2Kb 결합 웨타이드, 즉 SIINFEKL(서열번호 4) 또는 TSYKFESV(서열번호 5)와 복합체화된 항-CD8 α -FITC, CD44-PerCP Cy5.5 및 MHC 클래스 I 텍스트라마를 사용하여 OVA-특이적 및 B8R-특이적 CD8 T 세포에 대한 단일 반응으로 공염색시켰다. MHC 클래스 I SIINFEKL-텍스트라마(서열번호 4)를 PE로 표지하고 TSYKFESV-텍스트라마(서열번호 5)를 APC로 표지하였다. 염색된 세포를 BD 바이오사이언스 BD LSR II 시스템 상에서 유세포측정으로 분석하였다. 샘플당 1만개의 CD8+ T 세포가 획득되었다. 당해 결과는 도 5 및 6에 도시되어 있다.

전혈로부터 혈청을 제조하였다. 오브알부민 ELISA 및 MVA ELISA를 수행하여 특이적 항체를 검출하였다(독일 하이데세 소재의 제라문 디아그노스티카 게엠베하(Serum Diagnostika GmbH)의 세라자임(Serazym) 키트). 당해 결과는 도 7에 도시되어 있다.

도면

도면 1

15973 TAGCGACAT GATGCGGGAG GATCCATTG AGCTTACCG TTTATCACA CTCACGTTAG AATATGCA AATGTTTC TCGTAGGGT TCGTAGGGT

P13.5-[2]

15873 ATAGAGACTA TAATCATATA ATAGTGGGG TGGTTATAT TGGCTGTTG TGGTTAAGG TACGTAAA AATGAGADACTA TAATCATATA

P13.5-[2]

15773 ATAGTGAGG TIGGTAGG GGTACTCGTG ATTATTTTA TIGTTAAT TGTCTTAAG TCTTTATAT AATG

P13.5-[2]

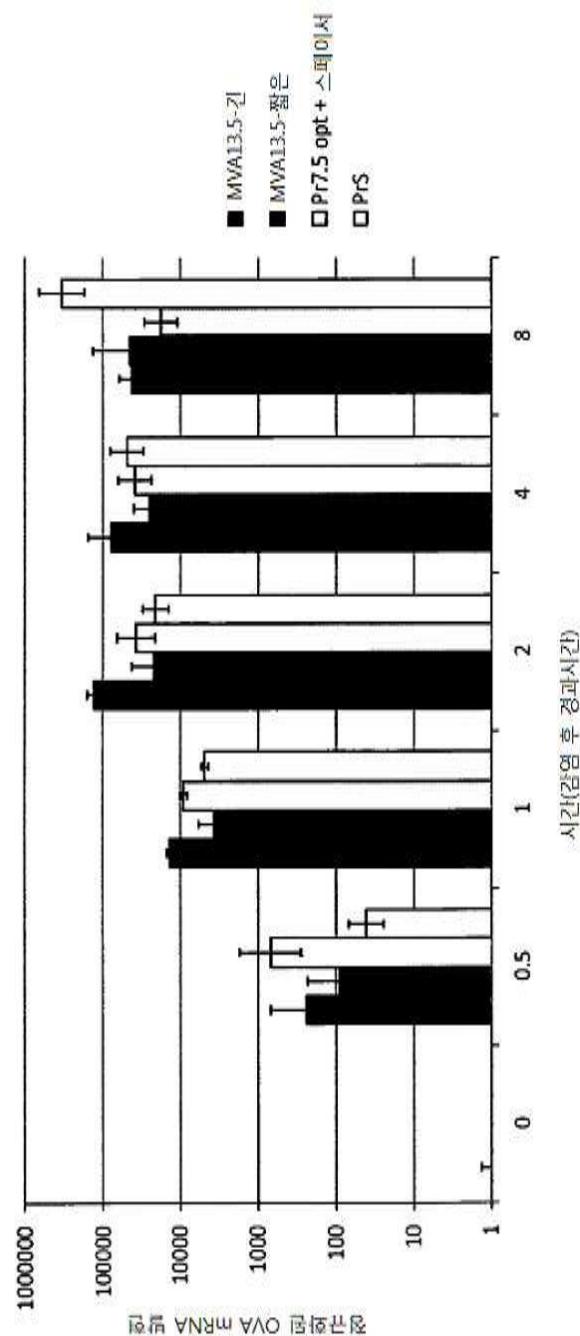
도면2

15973	TAGACGACT GATAGAGAG GTCGCCATT AGGATTCGG TTTATCACA CTACCGTTC ATTATGACA TTGTATTTC TCGTAGCGT TCGTATGAA
15873	ATAGAACATA TANTCATATA ATAGCTGG TGGCTGTT TGCCTCTG ACTTGAGCT TTGTAAAGG TACGTAAA ATAGAACATA TANTCATATA
15773	ATAGACTGG TTGGTGGG GSTACTCGTG ATTAAATTA TTGTAAACT TGTCCTTAAG TCCTTAAAT ATG

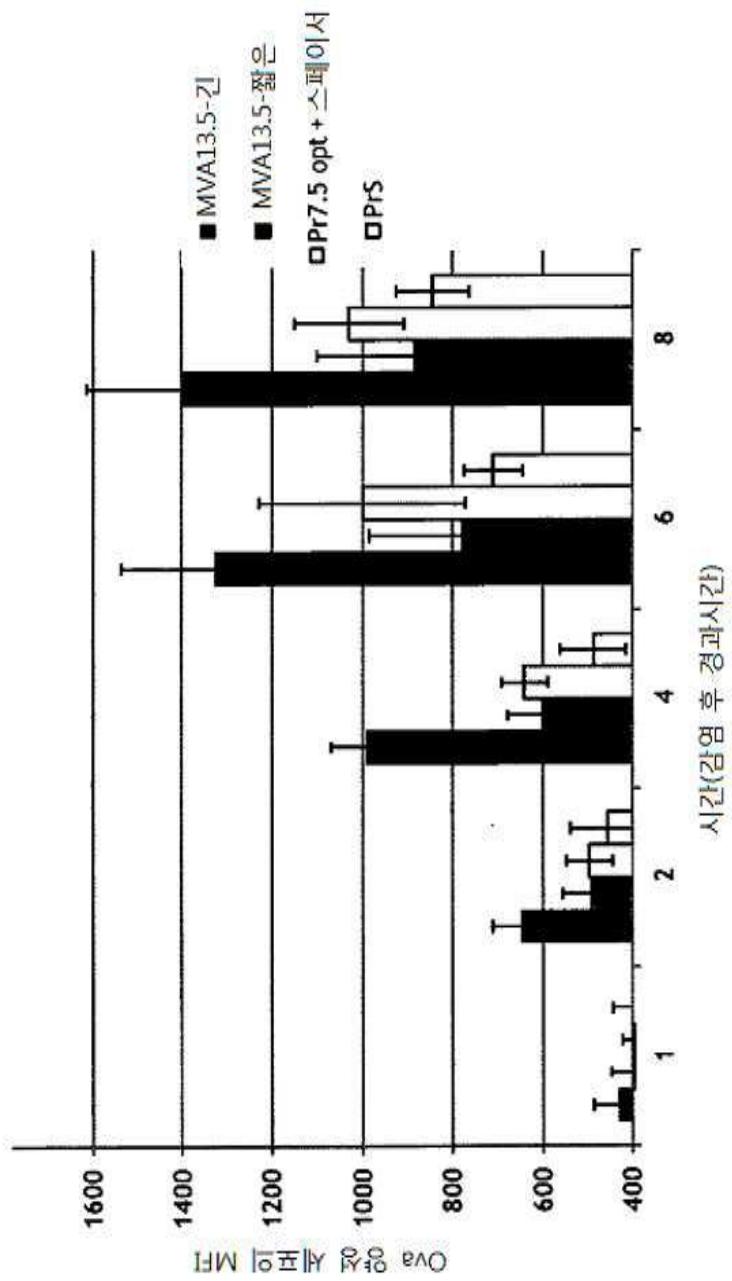
Pr13.5-2I

Pr13.5-월은

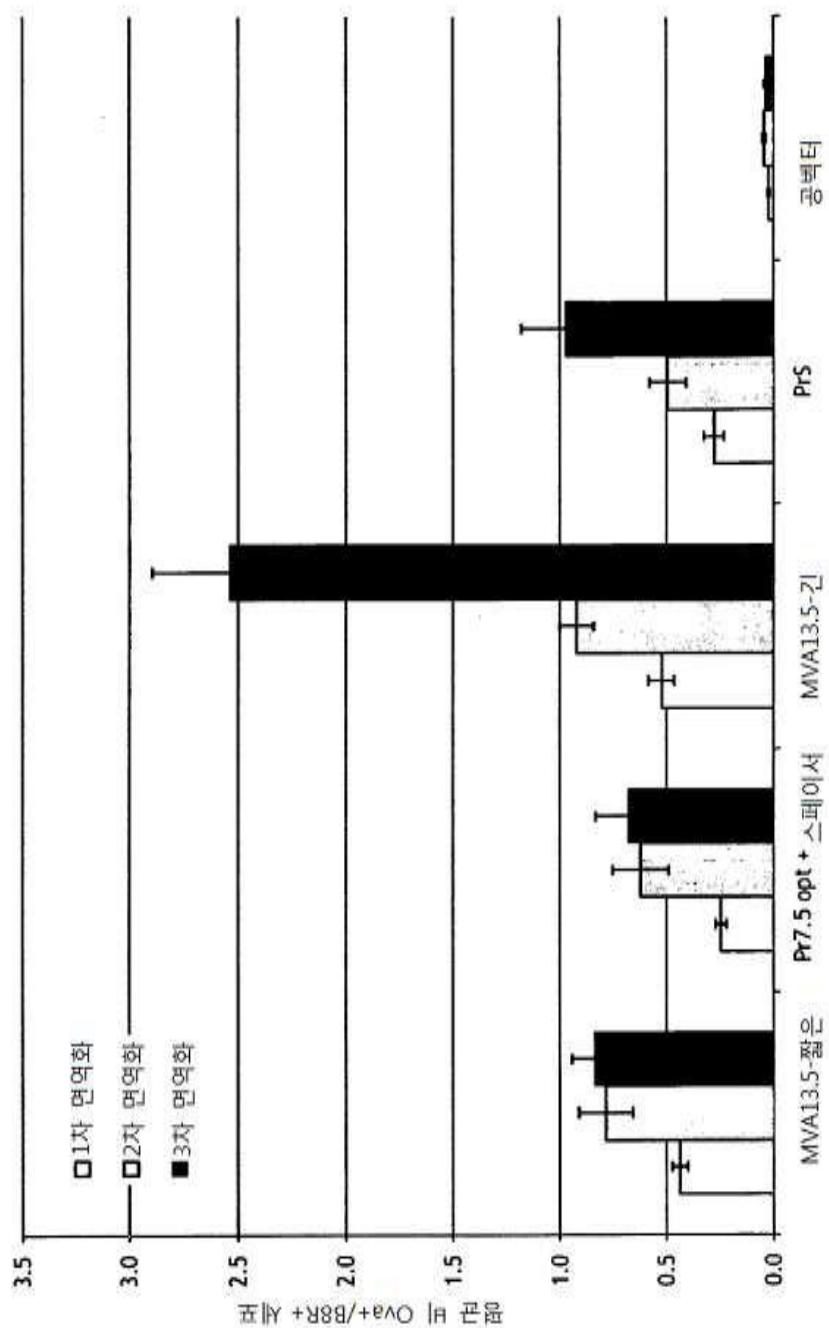
도면3



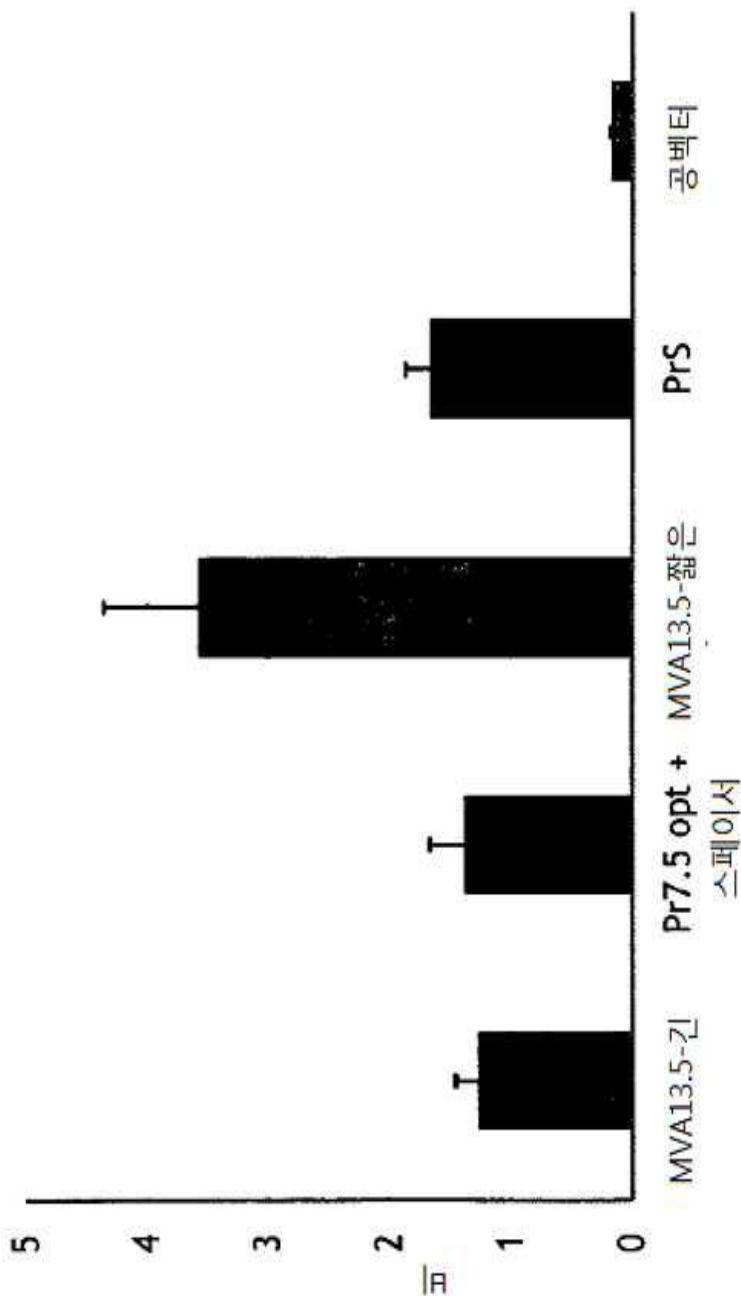
도면4



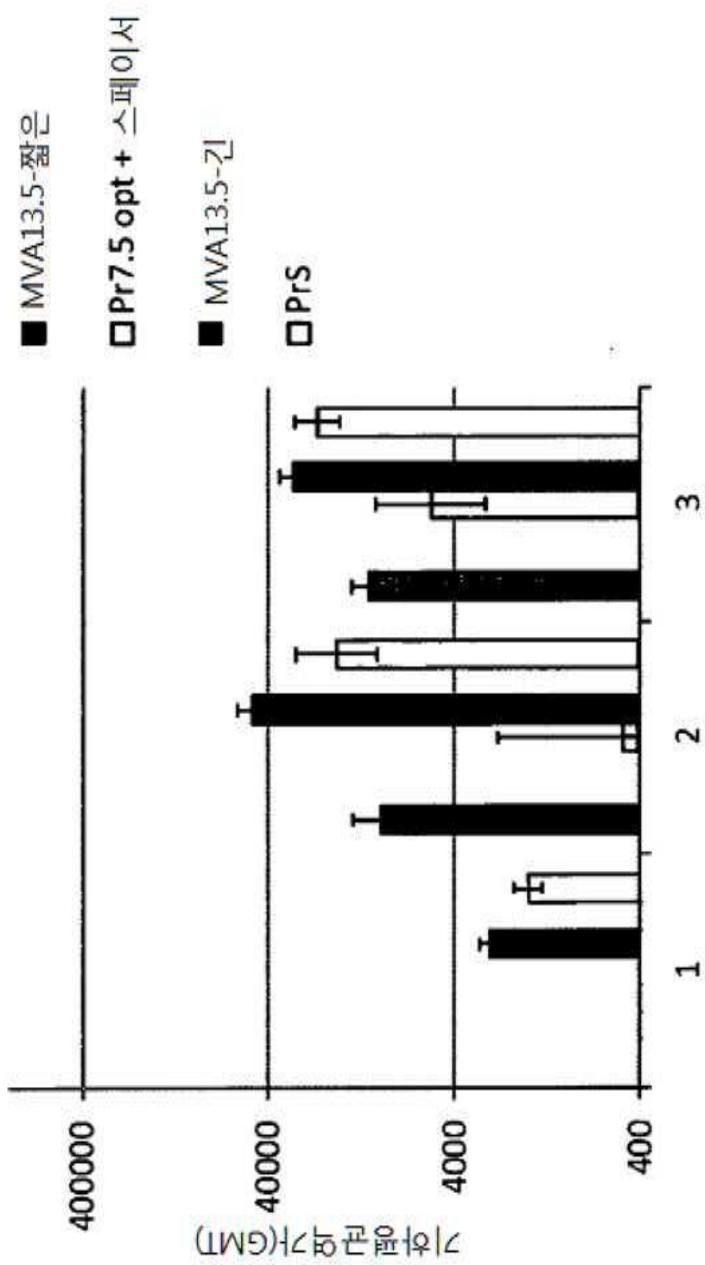
도면5



도면6



도면 7a



도면7b

프로모터	PS에 대한 배수		
	1차 면역화	2차 면역화	3차 면역화
PrS	1.0	1.0	1.0
Pr13.5-짧은	0.1	0.6	0.5
Pr13.5-긴	1.6	2.8	1.3
Pr7.5 opt + 스페이저	0.0	0.0	0.2
MVA50L + PrSSL	0.1	0.2	0.1
MVA170 + PrSSL	0.0	0.8	0.5

도면8a

Query	1	TAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA	44
<u>383866716</u>	20492	20449
<u>383866716</u>	20410	20369
<u>373449558</u>	15874	15831
<u>373449558</u>	15954	15911
<u>373449318</u>	15878	15835
<u>373449318</u>	15958	15915
<u>373449318</u>	182742	182785
<u>373449318</u>	182822	182865
<u>373449076</u>	15864	15821
<u>373449076</u>	15944	15901
<u>373449076</u>	182666	182709
<u>373449076</u>	182746	182789
<u>373448847</u>	15961	15918
<u>373448847</u>	16041	15998
<u>373448604</u>	15956	15913
<u>373448604</u>	16036	15993
<u>373448604</u>	182785	182828
<u>373448604</u>	182865	182908
<u>373448367</u>	15865	15822
<u>373448367</u>	15945	15902
<u>373448367</u>	182603	182646
<u>373448367</u>	182683	182726
<u>373448133</u>	15832	15789
<u>373448133</u>	15912	15869
<u>373447891</u>	15957	15914
<u>373447891</u>	16037	15994
<u>373447891</u>	182788	182831
<u>373447891</u>	182868	182911
<u>373447653</u>	15866	15823
<u>373447653</u>	15946	15903
<u>373447653</u>	182609	182652
<u>373447653</u>	182689	182732
<u>373447414</u>	15833	15790
<u>373447414</u>	15913	15870
<u>373447414</u>	182552	182595
<u>373447414</u>	182632	182675
<u>373447175</u>	15860	15817
<u>373447175</u>	15940	15897
<u>373447175</u>	182579	182622
<u>373447175</u>	182659	182702
<u>325558812</u>	28969	28926
<u>325558812</u>	28889	T.	28847
<u>325558595</u>	30006	29963
<u>325558595</u>	29924	29884
<u>325558381</u>	27900	27857
<u>325558381</u>	27817	C.	27777
<u>325558165</u>	30228	30185
<u>325558165</u>	30148	T.	30106
<u>325557951</u>	27554	27511
<u>325557951</u>	27472	C.	27432
<u>167412463</u>	12323	12280
<u>167412463</u>	12403	12360

도면8b

<u>160857876</u>	13468	.	.	13425
<u>160857876</u>	13548	.	.	13505
<u>149786253</u>	9445	.	.	9402
<u>149786253</u>	9525	.	.	9482
<u>119352440</u>	15780	.	.	15737
<u>119352440</u>	15860	.	.	15817
<u>90819652</u>	18373	.	.	18330
<u>90819652</u>	18453	.	.	18410
<u>115607420</u>	9159	.	.	9116
<u>115607420</u>	9239	.	.	9196
<u>115607419</u>	9159	.	.	9116
<u>115607419</u>	9239	.	.	9196
<u>115607418</u>	9359	.	.	9316
<u>115607418</u>	9439	.	.	9396
<u>115607417</u>	9359	.	.	9316
<u>115607417</u>	9439	.	.	9396
<u>111184157</u>	24167	.	.	24124
<u>111184157</u>	24247	T.	.	24204
<u>109726482</u>	7441	.	.	7398
<u>109726482</u>	7517	.	.	7474
<u>109726279</u>	7443	.	.	7400
<u>109726279</u>	7519	.	.	7476
<u>109726076</u>	7652	.	.	7609
<u>109726076</u>	7728	.	.	7685
<u>109725872</u>	7441	.	.	7398
<u>109725872</u>	7517	.	.	7474
<u>109725669</u>	7441	.	.	7398
<u>109725669</u>	7517	.	.	7474
<u>109725465</u>	7441	.	.	7398
<u>109725465</u>	7517	.	.	7474
<u>109725262</u>	7511	.	.	7468
<u>109725262</u>	7587	.	.	7544
<u>109725056</u>	7650	.	.	7607
<u>109725056</u>	7726	.	.	7683
<u>109724854</u>	7371	.	.	7328
<u>109724854</u>	7447	.	.	7404
<u>109724650</u>	7785	.	.	7742
<u>109724650</u>	7861	.	.	7818
<u>109724445</u>	7649	.	.	7606
<u>109724445</u>	7725	.	.	7682
<u>109724243</u>	7579	.	.	7536
<u>109724243</u>	7655	.	.	7612
<u>109724039</u>	7441	.	.	7398
<u>109724039</u>	7517	.	.	7474
<u>94490104</u>	7441	.	.	7398
<u>94490104</u>	7517	.	.	7474
<u>94489896</u>	7422	.	.	7379
<u>94489896</u>	7498	.	.	7455
<u>94489695</u>	7441	.	.	7398
<u>94489695</u>	7517	.	.	7474
<u>94489496</u>	7441	.	.	7398
<u>94489496</u>	7517	.	.	7474

도면8c

<u>94489293</u>	7372	7329
<u>94489293</u>	7448	7405
<u>94489094</u>	7581	7538
<u>94489094</u>	7657	7614
<u>94488894</u>	7443	7400
<u>94488894</u>	7519	7476
<u>94488693</u>	7722	7679
<u>94488693</u>	7798	7755
<u>94488492</u>	7653	7610
<u>94488492</u>	7729	7686
<u>94488292</u>	6666	6623
<u>94488292</u>	6742	6699
<u>94488092</u>	6666	6623
<u>94488092</u>	6742	6699
<u>94487887</u>	7441	7398
<u>94487887</u>	7517	7474
<u>94487685</u>	7444	7401
<u>94487685</u>	7520	7477
<u>94487484</u>	7443	7400
<u>94487484</u>	7519	7476
<u>94487278</u>	7449	7406
<u>94487278</u>	7373	A.....	..	7330
<u>94487078</u>	7442	7399
<u>94487078</u>	7518	7475
<u>94486875</u>	7579	7536
<u>94486875</u>	7655	7612
<u>94486673</u>	7430	7387
<u>94486673</u>	7507	7463
			A	
<u>94486471</u>	7431	7388
<u>94486471</u>	7508	7464
			A	
<u>94486268</u>	7442	7399
<u>94486268</u>	7519	7475
			A	
<u>94486065</u>	7442	7399
<u>94486065</u>	7519	7475
			A	
<u>94485863</u>	7441	7398
<u>94485863</u>	7517	7474
<u>94485659</u>	7441	7398
<u>94485659</u>	7517	7474
<u>94485457</u>	7863	7820
<u>94485457</u>	7939	7896

도면8d

94485254	7863		7820
94485254	7939		7896
94485053	7648		7605
94485053	7724		7681
94484855	7648		7605
94484855	7724		7681
94484657	7648		7605
94484657	7724		7681
94484460	7648		7605
94484460	7724		7681
94484252	7422		7379
94484252	7498		7455
94484050	7450		7407
94484050	7526		7483
94483847	7450		7407
94483847	7526		7483
94483641	7510		7467
94483641	7586		7543
90660453	12795		12752
90660453	12719	T.	12677
90660233	28919		28876
90660233	28837		28797
38348858	16052		16009
38348858	16132		16089
38348858	182942		182985
38348858	183022		183065
37551435	16065		16022
37551435	16145		16102
88900616	18618		18575
88900616	18698		18655
88900616	185511		185554
88900616	185591		185634
44971363	17722		17679
44971363	17802		17759
47088326	10008		9965
47088326	10088		10045
56713341	15689		15646
56713341	15769		15726
56713625	15689		15646
56713625	15769		15726
56713624	15612		15569
56713624	15692		15649
18482913	15989		15946
18482913	15911	T.	15869
22123748	22960		22917
22123748	22878	-G.	22837
19717929	14304		14261
19717929	14226	T.	14184
2772662	15798		15755
2772662	15878		15835
29692106	13086		13043
29692106	13166		13123

도면8e

5830555	6996	6953
5830555	7072	7029
885796	7223	7180
885796	7299	7256
885724	6996	6953
885724	7072	7029
885686	7012	6969
885686	7088	7045
456758	6964	6921
456758	7040	6997
6969640	12632	12589
6969640	12712	12669
623595	7664	7621
623595	7740	7697
335691	3950	3907
335691	4030	3987
335317	16234	16191
335317	16154	16119
325559026	27934	A.....	27891
325559026	27854	27813
325514012	27520	C.....	27477
325514012	27600	27559
325559238	28458	28418
325559238	28540	A.....	28500
30795158	29579	29539
30795158	29661	A.....	29621
325557737	28302	C.....	28260
325557737	28382	28343
68449479	15249	C.....	15206
68449479	15169	15154
68449280	15746	C.....	15703
68449280	15666	15651
68448677	15249	C.....	15206
68448677	15169	15154
59858806	15322	C.....	15279
59858806	15242	15221
58220470	14913	C.....	14870
58220470	14833	14818
51342166	15076	C.....	15033
51342166	14996	14981
30519405	29201	C.....	29159
30519405	29282	29243
323098609	13319	13289
323098609	13398	13356
323098410	13349	13318
323098410	13427	13385
300872625	13482	13452
300872625	13561	13519
56236951	7856	7826
56236951	7935	7893
68449077	13480	13450
68449077	13559	13517

도면8f

58448876	13500	13470
58448876	13579	13537
17529780	13356	13325
17529780	13435	13393

도면9a

g1 383866716	JQ410350.1	자지결손증 바이러스 배양물_컬렉션 ATCC:VR-1431, 완전한 계놈
g1 373449558	JN654986.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP21, 완전한 계놈
g1 373449318	JN654985.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP20, 완전한 계놈
g1 373449076	JN654984.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP19, 완전한 계놈
g1 373448847	JN654983.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP17, 완전한 계놈
g1 373448604	JN654982.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP16, 완전한 계놈
g1 373448367	JN654981.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP15, 완전한 계놈
g1 373448133	JN654980.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP13, 완전한 계놈
g1 373447891	JN654979.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP12, 완전한 계놈
g1 373447653	JN654978.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP11, 완전한 계놈
g1 373447414	JN654977.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP10, 완전한 계놈
g1 373447175	JN654976.1	백시니아 바이러스주 드라이백스 클론 DPP9, 완전한 계놈
g1 325558812	IHQ420898.1	우두 바이러스주 녹일_2002_MKY, 완전한 계놈
g1 3255585951	IHQ420897.1	우두 바이러스주 녹일_1998_2, 완전한 계놈
g1 325558381	IHQ420896.1	우두 바이러스주 녹일_1990_2, 완전한 계놈
g1 3255581651	IHQ420895.1	우두 바이러스주 녹일_1980_EP4, 완전한 계놈
g1 325557951	IHQ420894.1	우두 바이러스주 프랑스_2001_먼지, 완전한 계놈
g1 11674124631	EU410304.1	백시니아 바이러스 GLV-1h68, 완전한 계놈
g1 11608578761	AM501482.1	백시니아 바이러스 항카라 주 융모요막 백시니아 바이러스 앙카라 (CVA), 완전한 코딩 계놈
g1 149786253	EF675191.1	백시니아 바이러스주 MVATGN33.1 변형된 바이러스 앙카라, 완전한 계놈
g1 119352440	IQ0121394.1	백시니아 바이러스주 리스터 클론 VACV107, 완전한 계놈
g1 190819652	IQ0439815.1	백시니아 바이러스주 DUKE, 완전한 계놈
g1 115607420	IQ0983239.1	백시니아 바이러스주 AGR-MVA-572pre 계놈 서열
g1 115607419	IQ0983238.1	백시니아 바이러스주 MVA-BN 계놈 서열
g1 115607418	IQ0983237.1	백시니아 바이러스주 MVA-572 계놈 서열
g1 115607417	IQ0983236.1	백시니아 바이러스주 MVA-1721 계놈 서열
g1 111184167	IQ0792504.1	마두 바이러스 분리주 MNR-76, 완전한 계놈
g1 109726482	IQ0437592.1	두창 바이러스주 시리아 1972 V72-199, 완전한 계놈
g1 109726279	IQ0437591.1	두창 바이러스주 주마트라 1970 V70-222, 완전한 계놈
g1 109726076	IQ0437590.1	두창 바이러스주 조말리아 1977, 완전한 계놈
g1 109725872	IQ0437589.1	두창 바이러스주 파키스탄 1969 (라피그 라호레, 완전한 서열)
g1 109725669	IQ0437588.1	두창 바이러스주 네팔 1973, 완전한 계놈
g1 109725465	IQ0437587.1	두창 바이러스주 이란 1972 2602 타브리즈, 완전한 계놈
g1 109725262	IQ0437586.1	두창 바이러스주 인도 1964 7125 빌로르, 완전한 계놈

도면9b

g1 109725056 D0437585.1	두장 바이러스주 인도 1964 7124 벨로르, 완전한 계놈
g1 109724854 D0437584.1	두장 바이러스주 독일 1958 하이델베르크, 완전한 계놈
g1 109724650 D0437583.1	두장 바이러스주 풍고 1970, 완전한 계놈
g1 109724445 D0437582.1	두장 바이러스주 중국 호른 1948, 완전한 계놈
g1 109724243 D0437581.1	두장 바이러스주 방글라데시 1975 V75-550 바누, 완전한 계놈
g1 109724039 D0437580.1	두장 바이러스주 아프가니스탄 1970 바리올레이토르 4, 완전한 계놈
g1 94490104 D0441448.1	두장 바이러스주 유고슬라비아 1972 V72-164, 완전한 계놈
g1 94489896 D0441447.1	두장 바이러스주 영국 1952 베들러, 완전한 계놈
g1 94489695 D0441446.1	두장 바이러스주 영국 1947 히긴스(스태포드셔), 완전한 계놈
g1 94489496 D0441445.1	두장 바이러스주 영국 1946 힌넨(미들섹스), 완전한 계놈
g1 94489293 D0441444.1	두장 바이러스주 영국 1946 하베이, 완전한 계놈
g1 94489094 D0441443.1	두장 바이러스주 탄자니아 1965 캠플라, 완전한 계놈
g1 94488894 D0441442.1	두장 바이러스주 주마트라 1970 V70-228, 완전한 계놈
g1 94488693 D0441441.1	두장 바이러스주 수단 1947 (룸베크), 완전한 계놈
g1 94488492 D0441440.1	두장 바이러스주 수단 1947 (쥬바), 완전한 계놈
g1 94488292 D0441439.1	두장 바이러스주 소말리아 1977 (V77-1605), 완전한 계놈
g1 94488092 D0441438.1	두장 바이러스주 소말리아 1977 (V77-1252), 완전한 계놈
g1 94487887 D0441437.1	두장 바이러스주 시에라리온 1969 (V68-258), 완전한 계놈
g1 94487685 D0441436.1	두장 바이러스주 남아프리카 1965 (103 T'vaal, 넬스프루트), 완전한 계놈
g1 94487484 D0441435.1	두장 바이러스주 남아프리카 1965 (102 나탈, 잉그와부마), 완전한 계놈
g1 94487278 D0441434.1	두장 바이러스주 나제르 1969 (001, 나이지리아로부터 유입), 완전한 계놈
g1 94487078 D0441433.1	두장 바이러스주 쿠웨이트 1967 (K1629), 완전한 계놈
g1 94486875 D0441432.1	두장 바이러스주 한국 1947 (리, 마스터시드), 완전한 계놈
g1 94486673 D0441431.1	두장 바이러스주 일본 1951 (스틸웰, 마스터시드), 완전한 계놈
g1 94486471 D0441430.1	두장 바이러스주 일본 1951 (하퍼, 마스터시드), 완전한 계놈
g1 94486268 D0441429.1	두장 바이러스주 일본 1946 (야마다 MS-2(A) 도교), 완전한 계놈
g1 94486065 D0441428.1	두장 바이러스주 인도 1953 (뉴델리), 완전한 계놈
g1 94485863 D0441427.1	두장 바이러스주 인도 1953 (칼리부투 M50 마드라스), 완전한 계놈

도면9c

g1 94485659 D0441426.1	두장 바이러스주 기니 1969 (005), 완전한 계놈
g1 94485457 D0441425.1	두장 바이러스주 에티오피아 1972 (Ethi7 R14-IX-72 아디스), 완전한 계놈
g1 94485254 D0441424.1	두장 바이러스주 에티오피아 1972 (Ethi6 R14-IX-72 아디스), 완전한 계놈
g1 94485053 D0441423.1	두장 바이러스주 콩고 9 1970 (v74-227 기스펜), 완전한 계놈
g1 94484855 D0441422.1	두장 바이러스주 망글라데시 1974 (솔라이만), 완전한 계놈
g1 94484657 D0441421.1	두장 바이러스주 망글라데시 1974 (샤자만), 완전한 계놈
g1 94484460 D0441420.1	두장 바이러스주 브라질 1966 (v66-39 상파울루), 완전한 계놈
g1 94484252 D0441419.1	두장 바이러스주 보츠와나 1973 (v73-225), 완전한 계놈
g1 94484050 D0441418.1	두장 바이러스주 보츠와나 1972 (v72-143), 완전한 계놈
g1 94483847 D0441417.1	두장 바이러스주 베냉, 다흐메이 1968 (v68-59), 완전한 계놈
g1 94483641 D0441416.1	두장 바이러스주 베냉, 다흐메이 1968 (v68-59), 완전한 계놈
g1 90660453 D0437594.1	타테라ックス 바이러스주 다흐메이 1968, 완전한 계놈
g1 90660233 D0437593.1	우두 바이러스주 독일 91-3, 완전한 계놈
g1 38348858 AY313847.1	백시니아 바이러스주 아캡비스 클론 2000, 완전한 계놈
g1 37551435 AY313848.1	백시니아 바이러스주 아캡비스 클론 3, 완전한 계놈
g1 188900616 DQ377945.1	백시니아 바이러스주 3737, 완전한 계놈
g1 144971363 AY484669.1	토끼주두 바이러스, 완전한 계놈
g1 47088326 AY603355.1	백시니아 바이러스주 아캡비스 3000 변형된 바이러스 양카라 (MVA), 완전한 계놈
g1 56713341 AY678275.1	백시니아 바이러스주 LC16mB, 완전한 계놈
g1 56713625 AY678277.1	백시니아 바이러스주 LC16mO, 완전한 계놈
g1 56713624 AY678276.1	백시니아 바이러스주 리스터, 완전한 계놈
g1 18482913 AF438165.1	낙타주두 바이러스 M-96 카자흐스탄으로부터, 완전한 계놈
g1 22123748 AF012825.2	자자결존증 바이러스주 모스크바, 완전한 계놈
g1 19717929 AY009089.1	낙타주두 바이러스 CMS, 완전한 계놈
g1 2772662 U94848.1	백시니아 바이러스주 양카라, 완전한 계놈 서열
g1 29692106 AY243312.1	백시니아 바이러스 WR, 완전한 계놈
g1 58305551 Y16780.1	조두장 바이러스 완전한 계놈
g1 18857961 U18340.1	두장 바이러스 조말리아-1977 좌측 가면 영역
g1 18857241 U18338.1	두장 바이러스 가르시아-1966 좌측 말단-근처 영역
g1 18856861 U18337.1	두장 바이러스 콩고-1965 좌측 말단-근처 영역
g1 456758 X69198.1	두장 바이러스 DNA 완전한 계놈
g1 16969640 AF095689.1	백시니아 바이러스 (주 전단) 완전한 계놈
g1 6236951 L22579.1	대두장 바이러스 (주 망글라데시-1975) 완전한 계놈

도면9d

g1 335691 M22812.1	백시니아 바이러스 계놈, 좌측 말단
g1 335317 M35027.1	백시니아 바이러스 코펜하겐, 완전한 계놈
g1 325559026 H0420899.1	우두 바이러스주 노르웨이_1994_MAN, 완전한 계놈
g1 325514012 H0407377.1	우두 바이러스주 오스트리아 1999, 완전한 계놈
g1 325559238 H0420900.1	우두 바이러스주 UK2000_K2984, 완전한 계놈
g1 30795158 AF482758.2	우두 바이러스주 브라이튼 레드, 완전한 계놈
g1 325557737 H0420893.1	우두 바이러스주 필란드_2000_MAN, 완전한 계놈
g1 68449479 DQ011157.1	원숭이주두 바이러스주 USA_2003_039, 완전한 계놈
g1 68449280 DQ011156.1	원숭이주두 바이러스주 라이베리아_1970_184, 완전한 계놈
g1 68448677 DQ011153.1	원숭이주두 바이러스주 USA_2003_044, 완전한 계놈
g1 59858806 AY753185.1	원숭이주두 바이러스주 COP-58, 완전한 계놈
g1 58220470 AY741551.1	원숭이주두 바이러스 분리주 시에라리온, 완전한 계놈
g1 51342166 AY603973.1	원숭이주두 바이러스주 MPXV-WRAIR7-61, 완전한 계놈
g1 30519405 X94355.2	우두 바이러스주 GRI-90, 완전한 계놈
g1 323098609 H0857563.1	원숭이주두 바이러스주 D14L 낙아웃, 완전한 계놈
g1 323098410 H0857562.1	원숭이주두 바이러스주 V79-I-005, 완전한 계놈
g1 300872625 HM172544.1	원숭이주두 바이러스주 사이트 1979-005, 완전한 계놈
g1 56236951 AY743598.1	원숭이주두 바이러스주 콩고_-8, 부분적
g1 68449077 DQ011155.1	원숭이주두 바이러스주 사이트_1979-005, 완전한 계놈
g1 68448876 DQ011154.1	원숭이주두 바이러스주 콩고_2003_358, 완전한 계놈
g1 17529780 AF380138.1	원숭이주두 바이러스주 사이트-96-I-T6, 완전한 계놈

서 열 목 록

<110> BAVARIAN NORDIC A/S

<120> PR13.5 PROMOTER FOR ROBUST T-CELL AND ANTIBODY RESPONSES

<130> BN83PCT

<150> 61/719,429

<151> 2012-10-28

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 1

taaaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt agta 44

<210> 2

<211> 124

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 2

taaaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt agtattgctc ttgtgactag 60

agactttagt taaggactg taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt 120

agta 124

<210> 3

<211> 273

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 3

tagacgacat gatagaggag gtatccattg acgataatcg tttatcaaca ctaccgttag 60

aaatttagaca ttgtatccc tcgtacgcgt tcctataaaa atagaaacta taatcatata 120

atagtgtagg ttggtagtat tgctttgtg actagagact ttagttaagg tactgtaaaa 180

atagaaacta taatcatata atagtgtagg ttggtagtag ggtactcgtg attaattta 240

ttgttaact tgtcctaag tcttattaat atg 273

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OVA peptide

<400> 4

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B8R peptide

<400> 5

Thr Ser Tyr Lys Phe Glu Ser Val

1 5

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Promoter

<400> 6

aaaaattgaa atttatTTT tttttttgg aataaa

37

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Promoter

<400> 7

aatTTtaat atataaa

16