



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0031053
(43) 공개일자 2009년03월25일

(51) Int. Cl.

C12N 15/861 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0096859

(22) 출원일자 2007년09월21일

심사청구일자 2007년09월21일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

장준

경기 과천시 교하읍 현대1차아파트 107동 1601호

유재량

서울 강남구 개포동 경남아파트 9동 107호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

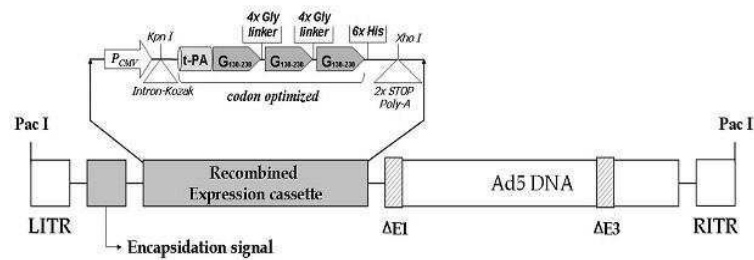
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 호흡기 신시치아 바이러스 백신

(57) 요약

본 발명은 RSV G 단백질의 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 코딩하는 염기서열을 포함하는 아데노바이러스 발현벡터 및 상기 벡터를 포함하는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김솔

서울 서대문구 창천동 4-134 연세빌라 C동 501호

이지봉

서울 강북구 미아9동 3-486

특허청구의 범위

청구항 1

RSV G 단백질의 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 코딩하는 염기서열을 포함하는 아데노바이러스 발현벡터.

청구항 2

제 1항에 있어서, RSV G 단백질의 130번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 코딩하는 염기서열을 포함하는 아데노바이러스 발현벡터.

청구항 3

제 1항에 있어서, RSV G 단백질의 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 코딩하는 염기서열이 세 번 반복된 염기서열을 포함하는 벡터.

청구항 4

제 3항에 있어서, RSV G 단백질의 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 코딩하는 염기서열과 반복되는 염기서열 사이에 링커 서열을 포함하는 벡터.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 링커 서열은 글라이신(glycine)임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 6

제 1항에 있어서, RSV G 단백질의 아미노 말단에 분비신호서열을 추가로 포함하는 벡터.

청구항 7

제 1항에 있어서, RSV G 단백질의 카르복실 말단에 단백질 태그 및 정지 코돈을 추가로 포함하는 벡터.

청구항 8

제 1항에 있어서, 도 1의 개열지도로 표시되는 벡터.

청구항 9

제 1항의 벡터를 포함하는 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, RSV F 단백질을 발현하는 아데노바이러스 벡터 및 RSV M2 단백질을 발현하는 아데노바이러스 벡터로부터 선택되는 1종 또는 2종의 벡터를 추가로 포함하는 백신 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 RSV G 단백질의 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 코딩하는 염기서열을 포함하는 아데노바이러스 발현벡터 및 상기 벡터를 포함하는 백신에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 호흡기 신시치아 바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV)는 비분절(non-segmented) RNA를 게놈으로 가지는 바이러스로 파라믹소비리데(paramyxoviridae)에 속한다. 크게 A 아형 및 B 아형으로 구분되며, A 아

형이 일반적으로 우점종이다. RSV는 감염된 숙주세포에서 NS1, NS2, P, N, M, SH, G, F, M2 및 L등의 10가지 단백질을 합성한다. RSV의 N(뉴클레오캡시드), P(인) 및 L(큰 폴리머라제 소단위) 단백질은 뉴클레오단백질 코어를 형성하는데, 이는 감염성의 최소 단위로 간주되며(Brown et al., J.Virol, 1:368-373, 1967), 바이러스 RNA 의존성 RNA 전사효소를 형성하여 RSV 게놈의 전사 및 복제를 담당한다(Yu et al., J. Virol. 69:2412-2419, 1995; Grosfeld et al., J. Virol. 69:5677-5686, 1995). M2 단백질은 바이러스 감염세포의 제거에 관여하는 세포독성 T 림프구에 의한(cytotoxic T lymphocyte) 면역반응을 유도하는 단백질로 알려져 있으며, 최근의 연구에 따르면 M2 유전자 생성물(M2-1 및 M 2-2)이 전사에 관여하는 것으로 나타났다(Collins et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:81-85). 표면항원으로는 F 단백질 (융합단백질), G 단백질 및 SH 단백질이 있는데, 이 중 비교적 큰 분자량을 가지고 바이러스의 외막에 존재하는 G 단백질과 F 단백질은 당화가 많이 된 당단백질로서, RSV 감염의 면역과 항원성의 변이에 가장 중요한 역할을 한다. G 단백질은 감염된 숙주 세포에 부착하는데 관여하며, F 단백질은 거대세포의 형성과 바이러스의 침투 및 부착에 관여하며, F 단백질 및 G 단백질은 중화항체를 유발한다.

<3> RSV는 소아 하기도 감염의 주된 병원체로써 폐렴과 기관지염을 일으킨다. 특히 폐이형성증, 선천성 심장병, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 암 또는 다양한 면역결핍증을 가진 영유아 및 골수이식 전의 면역저하 상태의 성인 등에게 치명적인 감염이 일어날 수 있는 고위험군이다. 노인들의 경우에도 인플루엔자 바이러스와 비슷한 정도로 잘 감염되며 RSV 유행시에 초과 사망률(excess mortality)이 인플루엔자 유행시보다 더 많은 것으로 보고되었다. 미국의 경우 100,000명 내지 200,000명에 이르는 고위험군 환자들이 있으며, 매년 90,000건 이상의 RSV 감염으로 인한 입원이 발생하고, 이중 약 4,500명이 사망하는 것으로 보고되었다. 국내의 경우도 RSV가 매년 유행하여 소아병원에 입원하는 환자의 수가 많으며, 서울대 소아병원에서 분리되는 모든 바이러스성 하기도 감염의 60%가 RSV에 의한 것으로 나타나, 우리나라의 경우도 RSV 감염으로 인한 입원과 사망이 매우 많은 것으로 추측된다.

<4> 이와 같은 심각한 문제점에도 불구하고 현재 사용가능한 백신이나 특이적인 치료제가 개발되어 있지 않다. 특히 포르말린 불활성화 백신(formalin-inactivated vaccine, FI-vaccine)이 과거 개발되어 임상시험이 진행되었으나, 당시 FI-백신을 접종받은 소아 중 RSV 감염에 의해서 80% 내외가 입원했으며, 일부 환자는 이로 인해 사망하였으며, 폐에 심한 하기도 질환이 관찰되었다. 현재 승인된 치료제로는 리바비린(Ribavirin, Virazole)이 사용되고 있으나 임상적 효능이 크지 않고, 높은 독성을 나타내며, 에어로졸(aerosol) 형태로 분무해야 하는 불편함이 있어 일부 제한된 경우에만 사용되고 있다. 또한 미국을 포함한 여러 나라에서는 고위험군에서 심한 RSV 감염증을 예방하기 위하여 RSV 정맥내 면역글로불린(RSV-IGIV, Respigam) 또는 RSV 단일클론항체인 팔리비주맙(palivizumab, Synagis)를 사용하고 있으나, 이들은 RSV의 치료적 처치라기보다는 예방적 처치이고 비용이 비싸기 때문에 다수의 사람들에게 이용이 불가능하다. 따라서 RSV에 대한 치료제의 개발은 매우 시급한 실정이다.

<5> RSV 백신 개발에 있어서는 몇 가지 중요하게 고려해야 할 점이 있다. 첫째로 백신에 의해 유도되는 면역병리(immunopathology) 현상이 없어야 한다는 것이다. 둘째로 RSV 백신의 주요 대상이 영아이기 때문에 출생 초기에 한 번의 투여로 효과적인 보호 면역반응을 유도할 수 있어야 하며, 셋째로 모체의 항체로 인해 중화(neutralization)되지 않아야 한다는 점이다.

<6> RSV 의 백신 후보로써 연구되고 있는 G 단백질은 MHC I 중-제한된(restricted) 에피톱을 갖고 있지 않아 CTL(cytotoxic T lymphocyte)에 의한 면역 반응을 유도하지는 않는다. 하지만 이 단백질은 아미노산 서열 183 에서 195 까지의 I-E_d-제한된 면역우성 에피톱 (immunodominant epitope)을 가지고 있으며 이는 V β 4을 발현하는 CD4 T 세포들을 많이 유도한다. 많은 연구 결과를 보면 RSV G 로 면역화하고 다시 RSV를 감염시켰을 때 호흡기 호산구증(eosinophilia)을 동반한 Th2 타입 면역반응이 증강됨을 알 수 있다(Hancock et al., J Virol 70:7783-91, 1996; J Virol et al., 72:2871-80, 1998; Openshaw, et al., Int Immunol 4:493-500, 1992; Tebbey, et al., J Exp Med 188:1967-72, 1998).

<7> 이에 본 발명자들은, 보다 안전하고 효과가 좋은 RSV 백신을 개발하고자 노력한 결과, RSV G 단백질의 일부 서열을 아데노바이러스 발현벡터로 발현시킬 경우 호산구증과 같은 면역병리 현상을 일으키지 않으면서 RSV 복제에 대한 효과적인 방어를 나타낼 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명의 하나의 목적은, RSV G 단백질의 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 코딩하는 염기서열을 포함하는 아데노바이러스 발현벡터를 제공하는 것이다.
- <9> 본 발명의 다른 목적은, 상기 아데노바이러스 발현벡터를 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <10> 하나의 양태로서, 본 발명은 RSV G 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 아데노바이러스 발현벡터를 제공하는 것이다.
- <11> 본 발명에서, RSV 의 G 단백질은 RSV의 주요 부착 단백질이며 RSV 감염 방어에 중요한 단백질로서, RSV G 단백질의 야생형 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열이 당해 분야에 공지되어 있다(Wertz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4075-4079, 1985; Satake et al., Nucl. Acids Res. 13(21): 7795-7810, 1985). G 단백질은 MHC I 중-제한된(restricted) 에피톱을 갖고 있지 않아 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)에 의한 면역 반응을 유도하지는 않는다. 하지만 이 단백질은 183번째 아미노산 에서 195번째 아미노산까지의 I-E_d-제한된 면역우성 에피톱 (immunodominant epitope)을 가지고 있으며 이는 V β 4을 발현하는 CD4 T 세포들을 많이 유도한다. 본 발명에서 사용하는 RSV G 단백질은 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하고, 보다 바람직하게는 130번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함한다.
- <12> 또한, 본 발명에서 사용하는 RSV G 단백질은, 야생형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체를 포함한다. G 단백질의 변이체란 G 단백질의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 또한, G 단백질은 글리코실화되거나 리피드화(lipidated)될 수 있으며, 항원 제시(presentation)를 증진시키고 항원의 항원 제시 세포의 표적을 향상시키는 분자를 포함하도록 유도체화 될 수 있다.
- <13> RSV G 단백질은 N-말단으로부터 120번째 아미노산 내지 230번째 아미노산, 또는 130번째 아미노산 내지 230번째 아미노산을 포함하는 단량체 형태일 수도 있으나 면역원성을 더욱 증강시키기 위하여 상기 아미노산 서열이 2개 이상, 바람직하게는 3개 내지 8개, 보다 바람직하게는 3개 내지 6개가 연결된 다량체 형태를 취할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 3개가 연결된 삼량체를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 양태에서는, RSV G 단백질 조각은 연이어 세 번 반복되도록 제작하였다. 본 발명에서는 RSV G 단백질 조각 (130 번째 내지 230 번째 아미노산)의 백신으로서의 효능을 높이기 위해서 아미노산 번역 코돈을 최적화(optimization) 시켜 RSV G 단백질 단편의 발현을 높였고(서열번호 1), RSV G 단편을 3개를 연달아(tandem repeat) 붙여 면역원성을 높였다.
- <14> RSV G 단백질이 다량체의 형태를 취하는 경우, 단량체를 형성하는 아미노산 서열은 직접적으로나 또는 링커를 통해 공유결합으로 연결될 수 있다. 링커를 통해 연결되는 경우 아미노산 예를 들어, 글라이신, 알라닌, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌산을 1개 내지 5개씩 사용하여 연결시킬 수 있으며, 바람직하게는 발린, 루이신, 아스파르트산, 글라이신, 알라닌 및 프롤린을 예시할 수 있다. 보다 바람직하게는 유전자 조작의 용이성을 고려하여 글라이신, 발린, 루이신, 아스파르트산 등 중에서 선택되는 아미노산을 여러개 연결하여 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 양태에서는, RSV G 단백질 부분을 연이어 연결하기 위해서 RSV G 단편 사이에는 중간에 네 개의 글라이신(glycine) 잔기로 이루어진 링커(linker) 서열을 포함시켜 RSV G 단백질이 세 번 반복되어 발현되도록 조작하였다.
- <15> 본 발명의 구체적인 실시예에서, RSV G 단백질 조각을 하나만 삽입하여 제작한 아데노바이러스 벡터 rAd/1xG의 경우 HEp-2 세포 상층액에서 특이적인 밴드가 관찰되지 않았으나, RSV G 단백질 조각을 세 번 반복하여 삽입한 아데노바이러스 벡터 rAd/3xG의 경우 약 20kDa 에서 30kDa 사이에 여러 개의 밴드를 볼 수 있었는데 (도 2), 이러한 결과는 rAd/3xG에 의해 RSV G 조각 항원의 발현이 특이적으로 일어나고 있고 또한 세포 밖으로 분비되는 조각 항원의 발현 효율이 높아졌음을 보여준다. 또한, rAd/3xG를 호흡기와 근육 내를 통해 마우스에 면역화한 경우 단 한 번의 투여를 통해서도 매우 높은 혈청 총 IgG 반응을 유도해 내었으나, 같은 용량의 rAd/1xG를 면역화한 경우에는 대조군 이상의 IgG 반응은 보이지 않아 (도 3), RSV G 단백질 조각은 연이어 세 번 반복되도록 제작했을 때 면역기능이 더 효과적임을 확인할 수 있었다.
- <16> 본 발명에서 용어, “발현벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 제조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- <17> 본 발명에서 용어, “작동가능하게 연결된(operably linked)”은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예

를 들어 프로모터와 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

<18>

<19> 본 발명에서 용어, "아데노바이러스 발현벡터"는 폴리펩티드를 코딩하는 자신의 게놈에 삽입된 외인성 DNA를 포함하는 임의의 아데노바이러스 벡터를 나타낸다. 아데노바이러스 벡터는 바이러스 DNA의 복제를 보조하는 데 필요한 각각의 말단 반복부를 하나 이상 (바람직하게는, 전체 ITR 서열의 약 90% 이상) 함유하며, 게놈을 바이러스 캡시드로 캡슐화하는 데 필요한 DNA를 함유하는 것이 바람직하다. 다수의 적합한 아데노바이러스 벡터는 당 업계에 기재되어 있다 (미국 특허 제6,440,944호; 제6,040,174호 참조 (복제되지 않는 E1 결실된 벡터 및 분화된 패키징 세포주)). 바람직한 아데노바이러스 발현벡터는 정상 세포에서 복제되지 않는, 복제불능 (replication-defection) 벡터이다.

<20>

본 발명의 벡터는 항원 특이적 면역반응을 증대시키기 위하여 G 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 N-말단에서 분비신호서열을 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "분비신호서열(signal sequence)"("신호 서열", "신호 펩티드", "리더 서열" 또는 "리더 펩티드"로도 명명됨)이란, 폴리펩티드의 N-말단에서 합성된 약 20 내지 30개의 아미노산을 포함하는 짧은 펩타이드 서열 (본원에서는 일반적으로 소수성)을 나타내며, 이에 연결되는 단백질의 이동(transport)을 지시하는 펩타이드를 의미한다. 진핵세포 분비 신호 서열은 아데노바이러스 발현벡터의 외인성 유전자 생성물 분비를 유도하는 데 바람직하다. 상기 적합한 서열로 다양한 서열이 당 업계에 공지되어 있으며, 인간 성장 호르몬, 이뮤노글로불린 카파 쇄 등의 분비 신호 서열을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 인간 조직 플라스미노겐 활성화제(human tissue plasminogen activator; t-PA)에서 유래한 분비신호서열(signal sequence) (5'-ATGGACGCCATGAAGAGGGGCTGTGCTGCTGCTGCTGTCGCGCCGCTGTTTGAGCCCCAGCGCT -3')을 사용하였다. 상기 핵산은 인위적으로 합성 또는 유전적 재조합 방법을 통하여 제조할 수 있으며, 이를 발현할 수 있는 벡터에 작동적으로 연결시켜 제공된다.

<21>

또한, 본 발명의 벡터는 G 단백질의 검출을 용이하게 하기 위하여, 임의로 엔도펩티다아제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "태그"(tag)란 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 말하며, 플루오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluorscer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광분자일 수 있고, Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그 및 스트렙타비딘 태그 등 에피토프 태그일 수도 있다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기를 가지며, 통상적으로 약 8개 내지 50개의 아미노산 잔기를 가지는데, 본 발명에서는 6개의 히스티딘 태그를 사용하였다. 바람직하게는, 태그는 G 단백질의 C 말단 부위 내에 존재한다.

<22>

또한, 본 발명의 벡터는 G 단백질의 C 말단 부위에 종결코돈을 추가로 포함할 수 있으며, 바람직한 벡터는 도 1의 개열지도로 나타나는 벡터이다.

<23>

이 외에도 본 발명의 발현벡터는 적합한 발현벡터가 일반적으로 가지고 있는 요소로서 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트를 포함한다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 번역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

<24>

본 발명의 구체적인 실시예에서, rAd/3xG, RSV F 단백질(rAd/Fco) 및 RSV M2 단백질(rAd/M2) 아데노바이러스 백신을 혼합하여 면역화한 경우(rAd/Mix) 방어면역력이 혼합 백신과 같은 용량의 rAd/3xG 백신으로 면역화한 경우와 유사하게 증대하는 것을 관찰하였다(도 11). 그러나 RSV F 단백질(rAd/Fco)이나 RSV M2 단백질(rAd/M2)을 발현하는 재조합 아데노바이러스 백신을 단독 면역화하였을 때에는 방어효능이 낮음을 확인할 수 있었다 (도 11). 이는 G 단백질을 포함하는 아데노바이러스 벡터가 다른 RSV 단백질을 포함하는 벡터와는 달리 RSV 관련 질환 백신으로서 현저한 예방 및 치료 효과를 가질 수 있음을 알려주는 것이다.

<25>

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

<26>

본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여로 RSV 감염에 의한 질환 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행

위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여로 RSV 감염에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다. 호흡기 신시치아 바이러스 감염에 의한 증세 및 질환은 기침, 재채기, 고열, 천명, 기관지염, 세기관지염, 폐렴, 천식, 기관기관지염, 크룹 및 호흡기 부전 등을 예로 들 수 있다.

- <27> 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 백신으로 투여되어 RSV 감염에 의한 호흡기 질환에 대한 면역성을 유도할 수 있다. 바이러스 벡터는 제약상 허용되는 담체와 함께 적절하게 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 봉해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 주사제는 생리식염액 및 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스텔(예, 올레인산에칠 등) 및 알코올류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 분사제의 경우에는 적합한 분사제, 예컨대, 압축공기, 질소, 이산화탄소, 또는 탄화수소 기반 낮은 끓는점 용매 등을 사용하여 가압팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 제시체의 형태로 편리하게 전달될 수 있다.
- <28> 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- <29> 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- <30> 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 인체 또는 수의용으로 제형화되어 다양한 경로로 투여된다. 바이러스 벡터는 비경구 경로, 예컨대 혈관내, 정맥내, 동맥내, 근육내 또는 피하 등의 경로로 투여될 수 있다. 또한, 경구, 비강, 직장, 경피 또는 에어로졸을 통한 흡입 경로로 투여될 수도 있다. 바이러스 벡터는 볼루스로 투여하거나 또는 서서히 주입할 수 있다. 벡터는 피하 경로로 투여되는 것이 바람직하다.
- <31> 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"이란 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 치료될 장애, 장애의 중증도, 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 바이러스 벡터 제거 속도, 치료 지속 기간, 바이러스 벡터와 조합되거나 또는 동시에 사용되는 약물, 대상체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태, 및 의학 업계 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다. "치료상 유효량" 결정시 고려되는 다양한 일반적인 사항들은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Gilman et al., eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990] 및 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990]에 기재되어 있다. 아데노바이러스 벡터를 투여하는 경우, 1회 투여시 투여되는 입자수는 통상적으로 약 1×10^7 내지 1×10^{11} 개, 보다 바람직하게는 1×10^8 내지 5×10^{10} 개, 보다 더 바람직하게는 5×10^8 내지 2×10^{10} 개의 범위이다.
- <32> 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- <33> 본 발명의 백신 조성물은 RSV F 단백질 전부 또는 일부를 포함하는 아데노바이러스 발현벡터를 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 백신 조성물은 RSV M2 단백질 전부 또는 일부를 포함하는 아데노바이러스 발현벡터를 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 백신 조성물은 RSV F 단백질 전부 또는 일부 및 RSV M2 단백질 전부 또는 일부를 포함하는 아데노바이러스 발현벡터를 추가로 포함할 수 있다.
- <34> RSV F 단백질은 바이러스 중화(neutralization)에 관여하는 항원 중의 하나로 여겨진다. 그리고 RSV M2는 바이러스 감염세포의 제거에 관여하는 세포독성 T 림프구에 의한(cytotoxic T lymphocyte) 면역반응을 유도하는 단백질로 알려져 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, rAd/3xG, RSV F 단백질(rAd/Fco) 및 RSV M2 단백질(rAd/M2) 아데노바이러스 백신을 혼합하여 면역화한 경우(rAd/Mix) 방어면역력이 혼합 백신과 같은 용량의 rAd/3xG 백신으로 면역화한 경우와 유사하게 증대하는 것을 관찰하였다(도 11). 그러나 RSV F 단백질(rAd/Fco)이나 RSV M2 단백질(rAd/M2)을 발현하는 재조합 아데노바이러스 백신을 단독 면역화하였을 때에는 방어효능이

낮음을 확인할 수 있었다 (도 11). 따라서, rAd/3xG 백신을 rAd/Fco, rAd/M2 백신과 혼합하였을 때에는 rAd/3xG 단독으로 혼합백신과 같은 용량을 사용한 경우와 동일하거나 혹은 더 나은 방어면역을 유도할 수 있음을 나타낸다.

<35> 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 아데노바이러스 발현백터가 RSV에 의해 유발되는 호흡기 질환의 예방 및 치료에 미치는 효과를 살펴보았다.

<36> 마우스에 대한 생체 내(in vivo) 실험에서, 본 발명에 따른 재조합 복제불능(replication-defective) 아데노바이러스 백신(rAd/3xG)은 한 번의 면역화를 통해 매우 높은 혈청 IgG와 호흡기 점막 IgA를 유도하며(도 3 및 도 5), 이미 면역을 가지고 있는 경우에도 충분한 양의 IgG 및 IgA를 유도하였다(도 6). 또한, rAd/3xG를 호흡기로 면역화한 그룹에서는 RSV 복제가 억제되어 바이러스가 거의 발견되지 않았다(도 9).

<37> 또한, 생 RSV, RSV G를 발현하는 백신니아 바이러스 발현백터(Vaccinia virus; vvG) 및 rAd/3xG 로 각각 면역화시킨 생쥐를 3주 후에 RSV를 감염시킨 후 기관지폐포 세정액에 포함된 호산구(eosinophil) 개수를 측정하였더니, vvG 로 면역화한 그룹에서는 눈에 띄게 증가한 호산구를 볼 수 있었던 반면 (도 8, 전체 BAL 세포의 15 ~25%) rAd/3xG 로 면역화한 그룹에서는 전체 BAL cell에서 1~3% 만이 호산구로 관찰되었다. 이것은 생 RSV를 면역화했을 때와 비슷한 정도였다. 따라서, 백신니아 바이러스 발현백터를 사용한 경우에는 호산구증 감소 효과를 전혀 기대할 수 없지만, 본원 발명과 같은 아데노바이러스 발현백터를 사용한 경우에는 호산구 증대로 인한 폐의 병리현상이 거의 일어나지 않음을 알 수 있었다. 또한, rAd/3xG 로 면역화한 생쥐들은 vvG로 면역화한 생쥐들과 비교했을 때 RSV에 대한 방어효과는 그대로 가지고 있으면서 면역병리에 의한 몸무게 감소나 질병 정도가 현저히 줄어들음을 볼 수 있었다(도 10).

<38> 따라서, 본 발명은 호산구증과 같은 2차적인 면역병리(immunopatholgy) 현상을 일으키지 않고, RSV 백신의 주요 대상인 영아의 출생 초기에 한 번의 투여로 효과적인 보호 면역반응을 유도할 수 있는, 매우 효과적인 백신임을 알 수 있다.

효 과

<39> 본 발명에 따른 재조합 복제불능(replication-defective) 아데노 바이러스 백신(rAd/3xG)은 한 번의 면역화를 통해 매우 높은 혈청 IgG 및 호흡기 점막 IgA를 유도하며, RSV 감염시 백신으로 인한 면역병리의 악화 현상 없이 RSV 복제에 대한 효과적인 방어를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<40> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<41> 실시예 1 : RSV 스톡 준비

<42> RSV A2 균주는 3% 열불활성화(heat-inactivated) 소태아혈청(fetal calf serum; FCS), 2 mM 글루타민, 20 mM 2-[4-(2-히드로시에틸)-1-피페라지닐]에탄술포산 (HEPES) 및 비필수 아미노산이 첨가된 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life Technologies, Gaithersburg, MD)로 HEp-2 세포(ATCC, Manassas, VA)에서 배양하였다. 구체적으로 약 70% 컨플루언시(confluency)의 HEp-2 세포에 회석된 RSV A2 바이러스를 MOI=0.01의 빈도로 감염시키고 바이러스 복제에 의한 세포변성효과(Cytopathic effect)가 가장 많이 나타나는 72~96 시간 후에 배양액과 세포를 회수하였다. 반복 동결-해동으로 세포를 분쇄한 후 상층액을 모아 초고속 원심분리를 통해 바이러스를 침전시키고 적정량의 DMEM 배지에 현탁시켜 스톡을 제조하였다.

<43> 실시예 2 : RSV G 단백질을 발현하는 복제불능 아데노바이러스의 제작

<44> RSV G 단백질(RSV A2 strain) 의 아미노산 서열 130~230에 해당하는 DNA 염기서열을 가장 사용빈도가 높은 코돈으로 대체시킨 333mer 길이의 염기 뉴클레오티드 DNA를 제작하였다 (Bioneer Corp., Daejeon, Korea). 이 DNA를 주형으로 이용하여 5': GCTAGC TACCCCTAC GAC GTG CCC GAC TAC GCC GTG AAG ACC AAA AAC ACC(서열번호 2), 3': GGATCC GCCGCTCCGCC AGG CTT GGT GGT GGG CAC(서열번호 3) 프라이머로 PCR을 통해 증폭시킨 후 다시 합성된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 여섯 개의 히스티딘을 코딩하는 염기서열과 연속된 두 개의 종결 코돈(stop codon)을 3' 말단에 붙였다. 여기에 RSV G 단백질 부분을 연이기 위해서 적당한 제한효소 인식부위가 들어있는 올리고뉴클레오티드 프라이머로 증폭시키고 중간에 네 개의 글라이신 잔기 링커(linker)를 포함시켜 세 번 반복되어 발현되도록 조작하였다(도 1). 그리고 개시 코돈(start codon)과

인간 조직 플라스미노겐 활성화제(human tissue plasminogen activator; t-PA)에서 유래한 분비신호서열(signal sequence) (5'-ATGGACGCCATGAAGAGGGGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCGGCGCCGTGTTTGTGAGCCCCAGCGCT -3'; 서열번호 4)을 N-말단에 붙였다. 그리고 개시 코돈부터 종결 코돈까지의 전체 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 제한 효소 Kpn I/Xho I 를 이용하여 pShuttle-CMV vector로 옮겼다. 이 재조합 서열 벡터 플라스미드(shuttle vector plasmid)를 일렉트로컴피턴트 세포인(electrocompetent cell) BJ5183 세포에서 pAdEasy-1 아데노바이러스 스 지노믹 DNA 와 전기천공법(electroporation)을 통해 재조합시켜 재조합 아데노바이러스 DNA를 얻었다.

<45> 이렇게 만들어진 재조합 아데노바이러스 DNA를 다시 HEK293 세포에 형질감염(transfection)시켜 복제불능(replication-defective) 아데노바이러스 발현벡터 (rAd/3xG)를 만들었다. 대조군 아데노바이러스는 아무것도 넣지 않은 pShuttle-CMV 벡터를 가지고 같은 방법을 통해 만들었다. 대조군 바이러스와 rAd/3xG 바이러스를 HEK293 세포에서 증폭시켜 CsCl 구배 원심분리(CsCl gradient 를 CsCl 구배 원심분리라고 해석했는데 맞는지요?)를 이용하여 정제하였고 HEK293 세포를 이용해 바이러스 스톱의 50% 조직배양 감염용량 (TCID₅₀; Tissue Culture Infectious Dose 50%) 을 측정하였다. 복제불능 아데노바이러스 (rAd/3xG)에 의한 RSV G 단편의 발현은 동일한 바이러스를 HEp-2 세포에 감염시키고 상층액을 얻은 후 G 단백질에 특이적인 단일클론항체 (clone No. 131-2G)와 HRP(Horseradish peroxidase)가 부착된 스트렙타비딘(HRP-conjugated streptavidin, Zymed Laboratories, San Francisco, CA)을 써서 웨스턴 블랏(Western blotting) 방법으로 확인하였다 .

<46> 그 결과, rAd/3xG를 HEp-2 세포에 감염시킨 상층액에서는 약 20kDa에서 30kDa 사이에 여러 개의 밴드를 볼 수 있었고 rAd/control 이나 rAd/1xG 를 감염시킨 HEp-2 세포 상층액에서는 특이적인 밴드가 관찰되지 않았다 (도 2). 이러한 결과는 rAd/3xG에 의해 RSV G 조각 항원의 발현이 특이적으로 일어나고 있고 또한 세포 밖으로 분비되는 조각 항원의 발현 효율이 높아졌음을 보여준다.

<47> 실시예 3 : 면역화(Immunization)와 RSV 감염

<48> rAd/3xG 백신이 생체 내에서 항원 특이적인 면역반응을 유도하는지 여부를 알아보기 위하여, 6주 내지 8주된 암컷 BALB/C 생쥐 (Charles River Laboratories Inc.Yokohama, Japan) 를 여러 용량의 복제불능 아데노바이러스로 호흡기, 근육 내 주사 또는 구강 경로를 통해서 면역화(immunization)시켰다. 호흡기 면역화를 위해서는 에테르(ether) 또는 클로로포름(chloroform)으로 마취시킨 생쥐의 비강을 통해 5×10^7 PFU/50 μ l 의 rAd/3xG를 주입하였다. 근육내(intramuscular) 면역화에서는 생쥐의 대퇴부 근육에 5×10^7 PFU/100 μ l 의 rAd/3xG를 주사하였다. 구강 면역화는 주입 2-3 시간 전 생쥐를 절식 시키고 200 μ l 의 PBS 에 5×10^7 PFU rAd/3xG를 희석시켜 마우스용 피딩 니들(mouse feeding needle)로 근위부 식도(proximal esophageal) 삼관을 통해 행하였다. RSV G를 발현하는 백신니아 바이러스(Vaccinia virus; vvG)의 경우 BALB/c 생쥐의 꼬리 밑둥 (tail base) 부위에 5×10^7 PFU/5 μ l 의 바이러스를 26-게이지 주사바늘을 이용하여 난절(scarification)하였다. 면역화 4~12주 후에 생쥐를 에테르 또는 클로로포름으로 마취시킨 후 비강을 통해 1×10^6 PFU 의 RSV A2 바이러스에 노출시켰다.

<49> 실시예 4 : IgG 유도효과 측정

<50> 실시예 3의 방법으로 각각 면역화된 생쥐의 안와후총(retroorbital plexus) 에서 헤파린처리 미세관(heparinized capillary tube)을 통해 혈액을 채취하여 원심 분리를 통해 혈청을 얻었으며 RSV G 단백질에 특이적인 항-RSV IgG 역가를 ELISA를 통해 확인하였다. 96 well plate를 100 μ l/well 의 108 μ g/ml RSV A2 Ag(US Biological, Swampscott, MA) 이나 RSV 2×10^4 PFU로 코팅하고 아침까지 4℃에서 배양하였다. 이후 2% BSA PBS로 2시간 차단(blocking) 하고 혈청이나 세정액(lavage fluid)을 1% BSA PBST(Phosphate Buffered Saline Tween 20)로 연속적으로 희석(serial dilution) 하여 실온에서 2시간 배양하였다. 이후 PBST 0.05%로 5번 플레이트를 세척하여 준 뒤 여러 농도의 HRP를 접합시킨 토끼 유래의 항-마우스 2차 항체인 (HRP-conjugated affinity-purified rabbit anti-mouse antibody) IgG, IgG1, IgG2a 및 IgA 2차 항체(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)를 1시간 동안 붙여주었다. 그 뒤 5번 세척 후 3,3',5,5'- 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine)으로 발색시키고 1M H₃PO₄ 로 발색을 멈춘 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<51> 그 결과, rAd/3xG를 호흡기와 근육 내를 통해 면역화한 것은 단 한번의 투여를 통해서도 매우 높은 혈청 총 IgG 반응을 유도해 내었다(도 3). 구강을 통해 주입한 경우에는 호흡기와 근육 내 주입과 비교 시 상대적

으로 낮은 RSV 특이적 혈청 IgG 반응을 나타내었다 (도 3). 그러나 호흡기를 통해 같은 용량의 rAd/1xG를 면역화했을 때는 control 이상의 IgG 반응을 보이지 않았다(도 3). rAd/ 3xG 로 면역시킨 생쥐(호흡기)에서 혈청 IgG 반응 정도가 생 RSV를 통해 유도되는 정도와 비슷하다. 이는 rAd/3xG 백신이 in vivo에서 생 RSV와 유사하게 매우 효력 있는 면역원성을 유도한다는 것을 의미한다.

<52> **실시예 5 : IgA 유도효과 측정**

<53> 점막에 존재하는 분비성(secretory) IgA 는 숙주가 점막을 통해 침입하는 외부 병원체에 대해 방어하는 첫번째 최전방 기작이다. 그러므로 효과적인 RSV 백신은 바이러스 특이적인 분비성 IgA 를 호흡기 점액성 영역에 잘 유도시킬 수 있어야 한다. rAd/3xG 백신이 호흡기도 안에 IgA 반응을 잘 유도해 내는지 조사하기 위해서 우리는 다음과 같은 실험을 수행하였다.

<54> RSV를 감염시킨 후 4일 후에 생쥐를 마취를 통해 희생시킨 후 기관지(trachea)를 절개하여 1ml 주사기에 연결된 튜브를 삽입하여 폐와 기관지를 0.8 ml PBS로 3회 세척하였다. 기관지폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; BAL) 에 포함된 세포들을 원심분리로 모은 후 상층액으로 분비성(secretory) IgA 역가를 ELISA 방법으로 측정하였다.

<55> 그 결과, 도 4와 같이 면역화 후 21일 후 BAL을 테스트 해보았을 때 분비 IgA 는 다른 어떤 그룹보다도 호흡기를 통해 면역화 한 그룹에서 가장 높게 측정되었다. 근육 내와 구강을 통해 rAd/ 3xG를 면역화 한 그룹의 쥐들에서는 기저 레벨의 IgA 반응을 보였다. 우리는 또한 RSV 감염 후 4일째 폐에서 RSV 특이적 IgA 레벨을 체크해 보았다. rAd/3xG 와 생 RSV 면역화 생쥐들은 대조군에 비해 주목할 만큼 높은 IgA 레벨을 보여주었다 ($p < 0.01$; 도 5). rAd/3xG 그룹이 약간 높은 레벨을 보임에도 불구하고 rAd/3xG 면역화 그룹과 생 RSV 그룹 상에는 통계학적으로 큰 차이를 보이지 않았다.

<56> **실시예 6 : 이미 면역성을 가지고 있는 경우 IgG 및 IgA 유도효과 측정**

<57> 아데노바이러스 벡터에 대해서 이미 면역을 가지고 있을 때의 백신 효능을 알아보기 위해서 우리는 rAd/control을 미리 노출시킨 생쥐에 3주 후에 rAd/3xG 백신을 면역화 했다. 결과적으로 아데노바이러스 벡터를 1×10^7 PFU의 용량으로 노출시킨 그룹과 노출시키지 않은 그룹을 사이에는 항 RSV IgG 항체 형성에 큰 차이를 보이지 못했다 (도 6). 더욱이 특이한 것은 BAL 액에서 분비되는 항 RSV 분비 IgA의 레벨은 다른 그룹에서와 별다른 차이를 나타내지 않았다는 것이다. 그리고 면역화하고 4주 후 RSV를 감염시켰을 때 모든 그룹의 생쥐들에서 완벽한 보호(protection) 효과를 볼 수 있었다. 위의 결과들로 보아 호흡기를 통한 rAd/3xG 백신의 일회 면역화(single immunization)가 이미 항 아데노바이러스 면역성이 있을 때에도 혈청 IgG와 호흡기도 IgA 유도에 있어서 충분하고 더 효과적이라는 것을 알 수 있다.

<58> **실시예 7 : 호산구(eosinophil) 수 측정**

<59> **7-1. G 단백질 특이적 T 세포의 반응 유도 여부 측정**

<60> RSV G 발현 백신이나 바이러스 (vvG)로 면역화시킨 생쥐에 있어서 G 단백질 특이적 CD4 T 세포와 이후의 RSV 감염에 의한 호흡기의 호산구증(eosinophilia)현상은 잘 알려진 사실이다. rAd/3xG 백신에 의해 발현되는 G 단백질 조각은 알려진 I-E_d-restricted CD4 T-cell 에피톱을 가지고 있기 때문에 우리는 rAd/3xG 면역화가 G 단백질 특이적 CD4 T 세포를 유도하는지 아닌지 조사하였다. rAd/3xG 또는 vvG 로 면역화된 생쥐들을 RSV로 감염시키고 4일 후에 폐의 면역세포들을 분리해내어 I-E_d-제한된 G(183-195) 에피톱 펩타이드로 자극하여준 후 IFN- γ 생산 여부를 염색해 알아보았다.

<61> 면역세포를 분리하기 위한 방법은 다음과 같다. 생쥐 심장의 우심실에 10 U/ml 헤파린 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 함유한 5ml PBS를 25-게이지 바늘의 주사기를 통해 넣으면서 관류(perfusion) 하였다. 그리고 폐를 적출하여 10% FBS(HyClone, Logan, UT) 를 포함한 RPMI 배지 스틸 스크린(RPMI Medium steel screen)에 갈아 단일세포 부유액(single cell suspension)으로 만들고 70 μ m 세포 여과체(cell strainer; BD Labware, Franklin Lakes, NJ)에 걸러 내었다. 이후 세포를 원심분리기를 통해 분리하여 내고 PBS/3% FBS/0.09% Na₃ 완충액에서 적절한 형광색소가 접합된(fluorochrome-conjugated) 항체로 염색하였다. 사용된 항체는 anti-CD3e (clone 145-2C11), anti-CD4 (clone RM4-5), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD49d (clone R1-2), 및 anti-V β 14 TCR (clone 14-2)로 모든 항체는 BD PharMingen (San Diego, CA)에서 구입하였다. 염색이 끝나면 세포들을 PBS/2% (wt/vol) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시키고 FACSCalibur™ 유세포 분석기(flow

cytometer; BD Biosciences, San Diego, CA)를 통해 분석하였다.

<62> IFN- γ 를 분비해내는 세포를 분석하기 위해서 세포내 염색을 하였는데 방법은 다음과 같다. 2×10^6 의 폐세포를 배양튜브에 담고 $10 \mu\text{M}$ G(183-195) 펩타이드(WAICKRIPNKKPG)를 넣고 5시간 동안 37°C 5% CO_2 인큐베이터에서 배양한다. 브레펠딘 A (Brefeldin A; Sigma-Aldrich)) $5 \mu\text{g/ml}$ 을 또한 배양시간 동안 넣어주어 IFN- γ 이 세포 내에 축적 되도록 하였다. 그리고 세포표면의 마커를 염색, 세척, 고정시킨 후 0.5% 사포닌 (Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)이 첨가된 FACS 완충액로 침투시킨 뒤, IFN- γ (clone XMGI.2) 항체로 염색하였다. 죽은 세포들은 forward 와 side light scatter patterns으로 제외시켰다. Data 는 CELLQuest™ 소프트웨어 (BD Biosciences)을 통해 수집하고 CELLQuest™ 와 WinMDI 버전 2.9 소프트웨어 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA)를 통해 분석하였다.

<63> 그 결과, 도 7과 같이 G 특이적 T 세포의 반응을 세포 내 IFN- γ 염색을 통해 보았을 때 rAd/3xG로 면역화한 생쥐들에서는 거의 보이지 않았다(폐의 전체 CD4 T 세포 중 약 0.2% 미만). 반면에 vvG로 면역화한 그룹에서는 V β 14+IFN γ + 세포를 포함한 강한 CD4 T 세포 반응을 나타내었다(폐의 전체 CD4 T 세포 중 10% 이상).

<64> 앞선 보고들에 따르면 RSV G 아미노산 서열 183 에서 195까지 의 I-E_d-제한된 면역우성 에피토프 (immunodominant epitope)에 의해 나타나는 CD4 T 세포 면역반응은 RSV 감염 후에 악화된 병리현상을 나타내기 에 충분하다. 우리의 결과들을 보면 rAd/3xG는 G 특이적 CD4 T 세포들을 거의 유도하지 않는다. 그러므로 이것 을 통해 rAd/3xG 면역화가 G 특이적 CD4 T 세포들로 인한 백신유도(vaccine-enhanced) 호산구증을 보이지 않을 것임을 예측할 수 있다.

<65> 7-2. 호산구(eosinophil) 수 측정

<66> 실제로 rAd/3xG 면역화가 이차적 면역병리(immunopathology) 현상을 일으키는지 여부를 조사하기 위하여, 면역화시킨 생쥐를 3주 후에 RSV를 감염시킨 후 5일 후에 생쥐를 마취를 통해 희생시킨 후 기관지(trachea)를 절개하여 1ml 주사기에 연결된 튜브를 삽입하여 폐와 기관지를 0.8 ml PBS로 3회 세척하였다. 기관지폐포 세정액에 포함된 세포들을 원심분리로 모은 후 사이토스핀(Cytospin)을 통해 슬라이드에 부착시킨 후 H&E(hematoxylin-eosin) 염색 후 현미경으로 호산구(eosinophil) 개수를 측정하였다.

<67> 그 결과, 예상대로 vvG 로 면역화한 그룹에서는 눈에 띄게 증가한 호산구를 볼 수 있었던 반면 (도 8, 전체 BAL 세포의 15 ~25%) rAd/3xG 로 면역화한 그룹에서는 전체 BAL 세포에서 1~3% 만이 호산구로 관찰되었다. 이것은 생 RSV를 면역화했을 때와 비슷한 정도이다. 그러므로 rAd/3xG 는 호산구 증대로 인한 폐의 병리현상이 거의 일어나지 않는다고 볼 수 있다

<68>

<69> 실시예 8 : 생쥐 폐조직 내의 RSV 역가 측정

<70> 유도된 면역반응의 방어특성을 알아보기 위해 점막과 비장관을 통해 rAd/3xG를 면역화시키고 호흡기를 통해 RSV를 감염시킨 후 방어효율을 살펴보았다. 생쥐를 면역화시키고 4 주 후에 RSV A2를 5×10^6 PFU로 감염 하였다. 4일 후 생쥐를 마취시켜 죽인 후 폐조직을 떼어내어 변형이글배지(Eagle's modified essential medium)에 담았다. 이후 조직을 스틸 스크린에 갈아 단일세포 부유액으로 만들고 $70 \mu\text{m}$ 세포 스트레이너(BD Labware, Franklin Lakes, NJ)에 걸러내었다. 상층액을 모아서 플라크 분석법(plaque assay)을 통해 RSV 역가를 측정하였다.

<71> 그 결과 대조군 생쥐의 폐 조직에서는 살아있는 RSV가 발견된 반면 rAd/3xG를 호흡기로 면역화한 그룹에서는 RSV 복제가 억제되어 바이러스가 거의 발견되지 않았다(도 9). 생 RSV A2를 감염시킨 뒤 RSV를 감염한 그룹에서도 동일한 방어효과를 보였다. 하지만 rAd/3xG를 근육 내로 면역화한 그룹에서는 바이러스 복제가 최고 조인 지점(4일 후)에서 반정도의 부분적인 방어효과만 나타내었다. 또한 rAd/3xG로 면역화한 생쥐들은 vvG로 면역화한 생쥐들과 비교했을 때 RSV에 대한 방어효과는 그대로 가지고 있으면서 면역병리(immunopathology)에 의한 몸무게 감소나 질병 정도가 현저히 줄어들음을 볼 수 있었다(도 10). 이러한 결과를 종합해볼 때 점막을 통한 비강 내 rAd/3xG 백신접종(vaccination)은 병리적인 CD 4 T 세포 반응이나 백신으로 인한 호산구증을 동반한 이차적인 면역병리 없이 효과적인 방어 면역을 유도함을 보여준다.

<72> 실시예 9 : rAd/3xG를 포함한 혼합 백신의 효능

<73> 좀 더 적은 용량의 rAd/3xG 백신을 사용하였을 때도 방어 효능을 유지할 수 있는지 알아보기 위하여 1×10^7 PFU 용량으로 비강 내 면역화 후 RSV 감염을 시도하였고, 4일 후 폐조직 내의 RSV 역가를 조사한 결과 1×10^8 PFU 용량으로 면역화한 경우(도 9)에 비해 방어효능이 약간 감소함을 확인하였다(도 11).

<74> 또한, rAd/3xG, rAd/Fco, 및 rAd/M2 아데노바이러스 백신을 각각 1×10^7 PFU 용량씩 혼합하여 면역화한 경우(rAd/Mix) 방어면역력이 rAd/3xG 백신을 1×10^8 PFU 용량으로 면역화한 경우와 유사하게 증대하는 것을 관찰하였다(도 11). 그러나 RSV F 단백질(rAd/Fco)이나 RSV M2 단백질(rAd/M2)을 발현하는 재조합 아데노바이러스 백신을 1×10^7 PFU 용량으로 비강 내 단독 면역화하였을 때 RSV 감염 4일 후 방어효능이 낮음을 확인할 수 있다 (도 11). 이러한 결과는 rAd/3xG 백신을 rAd/Fco, rAd/M2 백신과 혼합하였을 때에는 rAd/3xG 단독으로 1×10^8 PFU 용량을 사용한 경우와 동일하거나 혹은 더 나은 방어면역을 유도할 수 있음을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

<75> 도 1은 본 발명에 따른 아데노바이러스 발현 벡터 전체의 개열지도를 나타낸다.

<76> 도 2는 RSV G 단백질의 아미노산 서열이 세 번 반복되어 삽입된 아데노바이러스 발현벡터(rAd/3xG), RSV G 단백질의 아미노산 서열이 한 번 삽입된 아데노바이러스 발현벡터(rAd/1xG) 및 RSV G 단백질의 아미노산 서열이 삽입되지 않은 아데노바이러스 발현벡터(rAd/control)의 G 단백질 발현 정도를 웨스턴 블랏(Western blotting) 방법을 통하여 확인한 것이다.

<77> 도 3은 rAd/3xG를 호흡기, 근육 내, 구강을 통해 각각 면역화한 경우 혈청 IgG 유도정도를 IgG 역가측정을 통해 확인한 것이다.(Preimmune:면역화하지 않은 경우, i.n.:호흡기내 투여, i.m.:근육 내 투여, oral:구강투여)

<78> 도 4는 rAd/3xG를 호흡기, 근육 내 및 구강을 통해 각각 면역화한 경우 호흡기도의 IgA 유도정도를 ELISA를 통해 확인한 것이다.

<79> 도 5는 대조군(rAd/control), rAd/3xG 및 생 RSV를 각각 면역화한 경우 호흡기도의 IgA 유도정도를 ELISA를 통해 확인한 것이다.

<80> 도 6은 아데노바이러스 벡터에 대해서 이미 면역을 가지고 있는 경우에 IgG 및 IgA 유도정도를 IgG 역가측정 및 ELISA를 통해 확인한 것이다.

<81> 도 7은 대조군(rAd/control), rAd/3xG 및 RSV G 단백질을 발현하는 백시니아바이러스 벡터(vvG)를 각각 면역화한 경우 IFN- γ 염색을 통하여 G 특이적 T 세포 반응을 유도하는지 여부를 확인한 것이다.

<82> 도 8은 rAd/3xG 및 vvG를 각각 면역화한 경우 기관지폐포 세정액에 포함된 호산구 수를 측정한 결과이다.

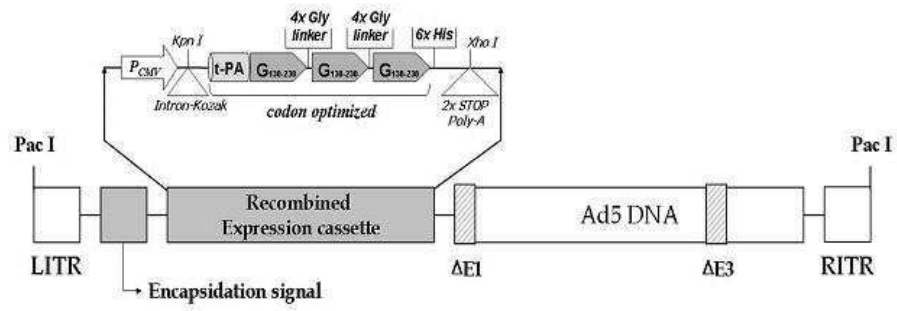
<83> 도 9는 대조군(rAd/control), rAd/3xG를 호흡기로 면역화한 그룹(i.n.), rAd/3xG를 근육 내로 면역화한 그룹(i.m.) 및 생 RSV를 감염한 그룹에 있어서 폐조직 내의 RSV 역가를 측정한 결과이다.

<84> 도 10은 대조군(rAd/control), rAd/3xG를 면역화한 그룹, 및 생 RSV를 감염한 그룹에 있어서 면역병리에 의한 몸무게 감소 정도를 측정한 결과이다.

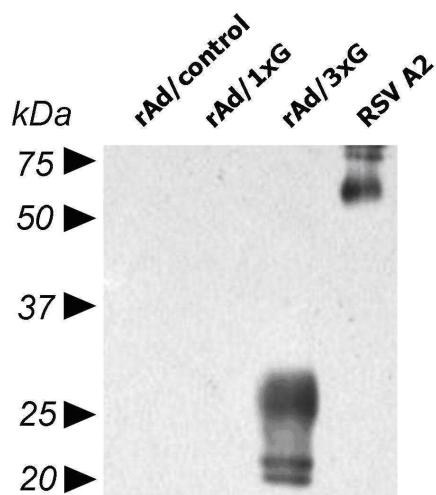
<85> 도 11은 대조군(rAd/control), rAd/3xG, RSV F 단백질에 대한 아데노바이러스 발현벡터(rAd/Fco), RSV M2 단백질에 대한 아데노바이러스 발현벡터(rAd/M2) 및 rAd/3xG, rAd/Fco 및 rAd/M2의 혼합백신(rAd/Mix)을 각각 면역화한 경우 폐조직 내의 RSV 역가를 측정한 결과이다.

도면

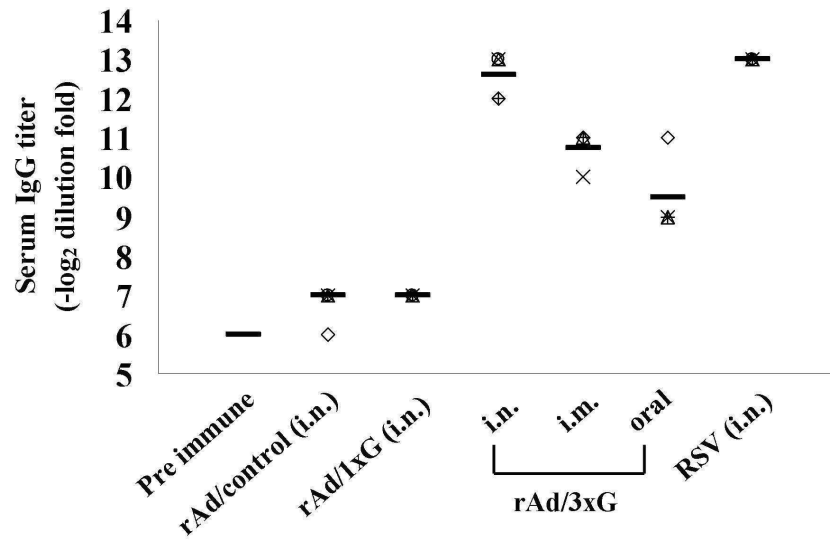
도면1



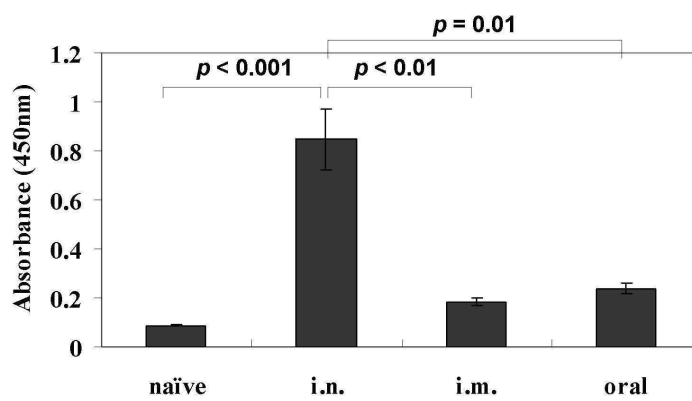
도면2



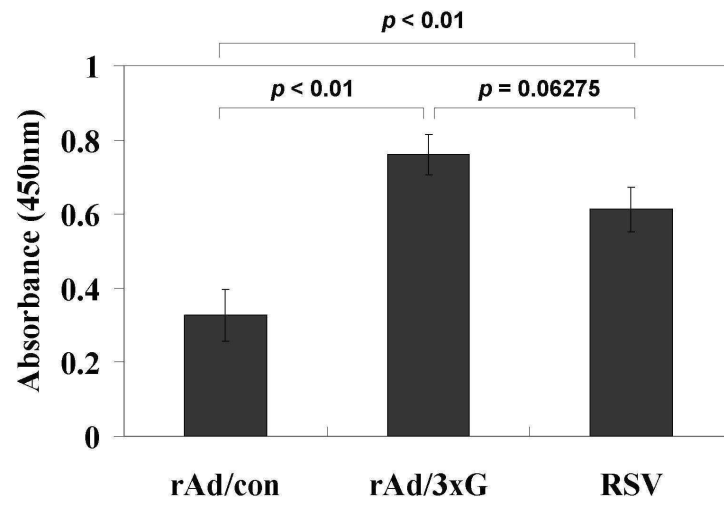
도면3



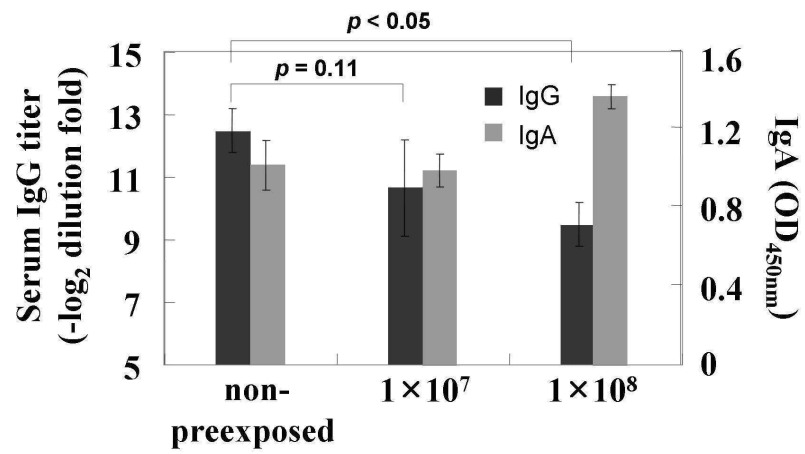
도면4



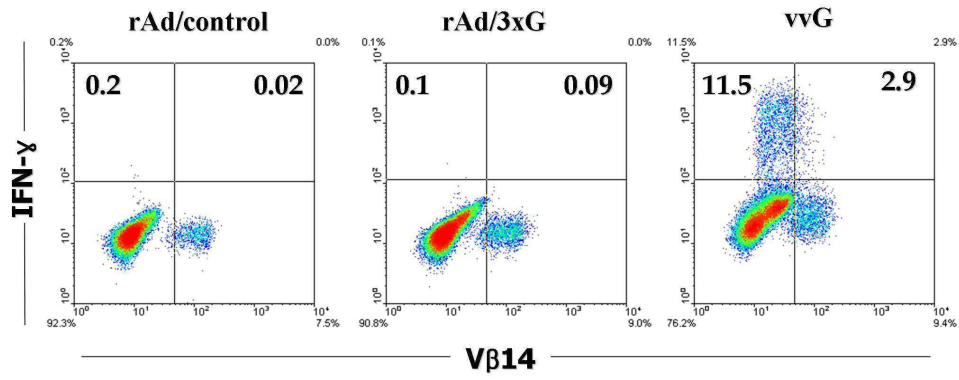
도면5



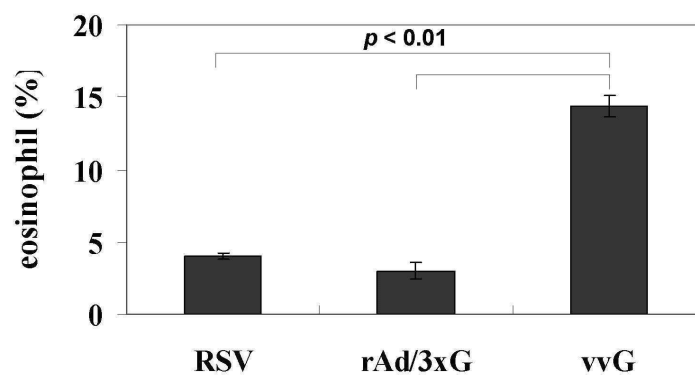
도면6



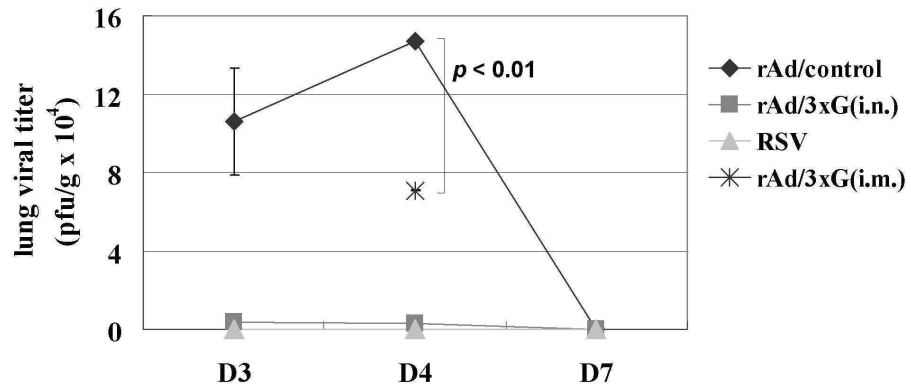
도면7



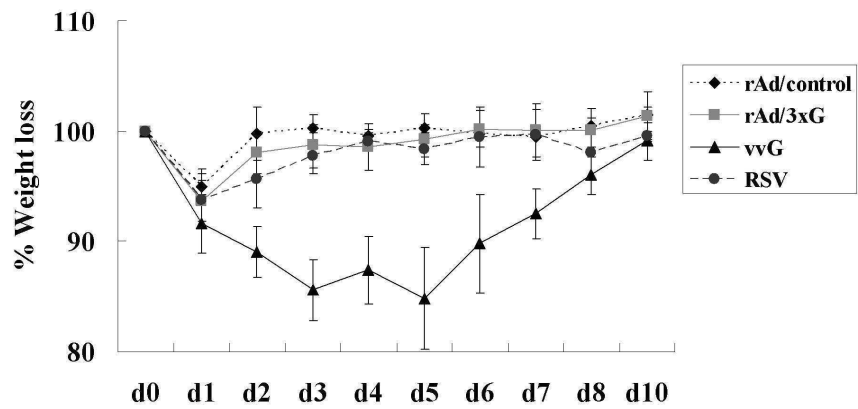
도면8



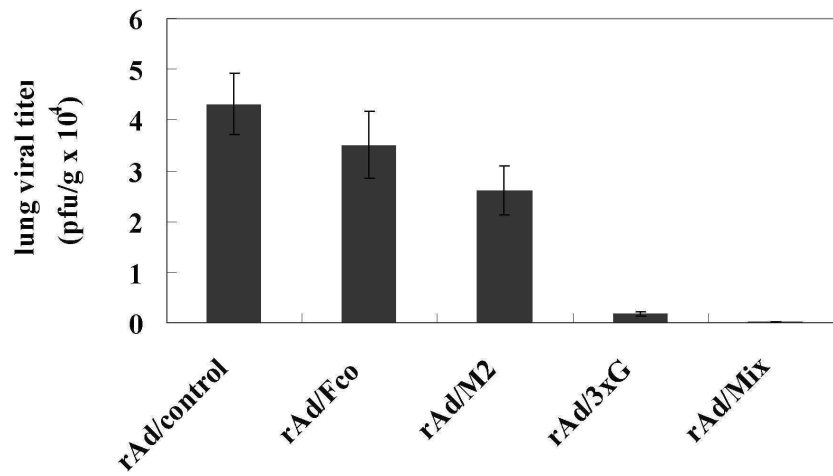
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> ewha university industry collaboration foundation

<120> Respiratory Syncytial Virus Vaccine

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 300

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RSV G optimized sequence

<400> 1

gtgaagacca aaaacaccac cactacacaa acccagccga gcaagccac caccaaacag 60

cgccagaata agccccatc caagcccaac aacgacttc acttcagagt attcaatttc 120

gtgccctgtt ccatctgttc aaacaatccc acctgctggg ccatctgcaa gcggattccc 180

aataagaagc cggcaagaa gaccacgacc aagcccacga agaagcctac gctgaagacc 240

accaaaaaag accctaagcc ccagaccacg aagtccaagg aggtgccac caccaagcct 300

300

<210> 2
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for RSV G gene amplification

<400> 2
gctagctacc cctacgacgt gcccgactac gccgtgaaga ccaaaaacac c 51

<210> 3
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for RSV G gene amplification

<400> 3
ggatccgccg cctccgccag gcttggtggt gggcac 36

<210> 4
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> signal sequence of t-PA

<400> 4

atggacgcca tgaagagggg cctgtgctgc gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgtttgtg 60

agccccagcg ct 72