



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0087814
(43) 공개일자 2016년07월22일

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/275 (2006.01)
C12N 15/117 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/275 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7013453
(22) 출원일자(국제) 2014년11월25일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년05월20일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/075522
(87) 국제공개번호 WO 2015/078856
국제공개일자 2015년06월04일</p> <p>(30) 우선권주장
13005541.1 2013년11월28일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
버베리안 노딕 에이/에스
덴마크 크비스트가르드 헤이레스코브베이 10에이
(우:3490)</p> <p>(72) 발명자
하우즈만, 위르겐
독일 79194 군텔핑엔 안테 분테스슈트라쎄 130
볼퍼슈테터, 미하엘
독일 81737 뮌헨 알프레드-노이만-양거 8</p> <p>(74) 대리인
특허법인 남앤드남</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

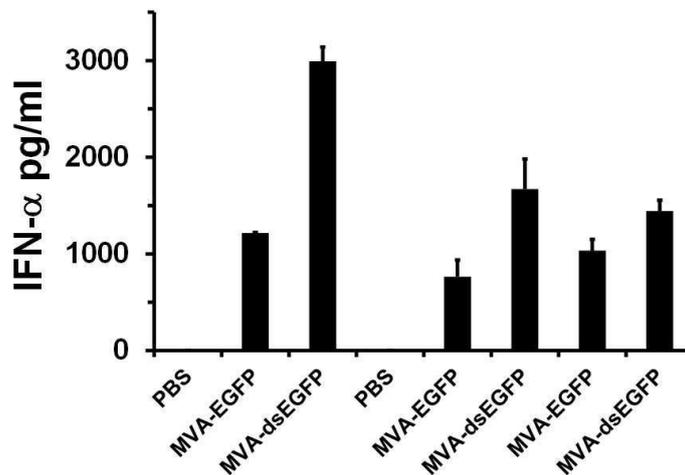
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **폭스바이러스 벡터를 이용하여 증강된 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 명세서에서 감염의 초기의 과량의 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 구체화하는 이중성 또는 천연 핵산을 포함하고, 하나 이상의 공자극 분자를 암호화하는 이중성 핵산 및/또는 하나 이상의 감염성 질환-연관 항원 또는 종양-연관 항원을 암호화하는 이중성 핵산을 추가로 포함하는 제조합 폭스바이러스뿐만 아니라 이러한 제조합 폭스바이러스를 포함하는 약제학적 조성물 및 이의 방법 및 용도가 제공된다. 본 명세서에 제공된 제조합 폭스바이러스는 과량의 초기 dsRNA를 구체화하는 이중성 또는 천연 전사 단위가 없는 동일한 제조합 폭스바이러스에 비해 대상체에서 선천성 및 적응성 면역 활성화를 증강시킨다.

대표도 - 도13a



(52) CPC특허분류

C12N 15/117 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2310/17 (2013.01)

C12N 2310/53 (2013.01)

C12N 2330/51 (2013.01)

C12N 2710/24043 (2013.01)

C12N 2710/24063 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

감염의 초기에 과량의 이중-가닥 RNA(double-stranded RNA: dsRNA)를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서, 하나 이상의 공자극 분자를 암호화하는 이중성 서열을 더 포함하는, 재조합 폭스바이러스.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 공자극(costimulatory) 분자는 TRICOM(B7-1, ICAM-1 및 LFA-3)인, 재조합 폭스바이러스.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 박테리아, 바이러스, 진균, 기생충 또는 종양 항원을 암호화하는 이중성 서열을 더 포함하는, 재조합 폭스바이러스.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폭스바이러스는 오소폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스 또는 몰리스씨폭스바이러스인, 재조합 폭스바이러스.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 오소폭소바이러스는 백시니아 바이러스, 우두 바이러스 및 원숭이 폭스 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 폭스바이러스.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 백시니아 바이러스-웨스턴리저브(vaccinia virus-Western Reserve), 백시니아 바이러스-코펜하겐, 드라이악스(Dryvax)(백시니아 바이러스-와이어스(vaccinia virus-Wyeth)로도 알려짐), 백시니아 바이러스 리스트에르(Lister), 백시니아 바이러스 아캄비스(Acambis) 2000 및 3000, 래빗폭스 바이러스, 버팔로폭스 바이러스, 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA) 및 변형된 백시니아 바이러스 양카라-마바리안 노르딕(MVA-BN)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 폭스바이러스.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중성 핵산 생성 dsRNA는 상보적 RNA 전사체를 부분적으로 또는 완전히 암호화하는 서열을 포함하되, 상기 RNA 전사체의 상보적 부분은 dsRNA를 형성하는 전사 후에 어닐링되는, 재조합 폭스바이러스.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 상보적 RNA 전사체는 단백질-암호화 오픈 리딩 프레임(ORF) 또는 비-단백질-암호화 유전자를 포함하는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 RNA 전사체의 상기 상보적 부분은 50개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 RNA 전사체의 상기 상보적 부분은 50 내지 700개의 뉴클레오타이드를 포함하는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 RNA 전사체의 상기 상보적 부분은 700개 초과 뉴클레오타이드를 포함하는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 상보적 RNA 전사체를 완전히 또는 부분적으로 암호화하는 이중성 핵산은 상기 상보적 영역 내에서 동일하거나, 또는 상기 상보적 영역 내에서 99% 초과, 95% 초과, 90% 초과, 80% 또는 70% 초과 유사성을 갖는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 14

제13항에 있어서, 상보적 전사체를 부분적으로 또는 완전히 암호화하는 상기 두 동일한 또는 고도로 유사한 서열은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자에 의해 분리되는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 15

제14항에 있어서, 센스 전령 RNA(mRNA)는 두 동일한 또는 고도로 유사한 서열 중 하나로부터 전사되고, 안티-센스 mRNA는 다른 동일한 또는 고도로 유사한 서열로부터 전사되는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 16

제15항에 있어서, 센스 및 안티센스 RNA는 동일한 이중성 서열 삽입물의 가닥 둘 다로부터 전사되는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 17

제15항에 있어서, 센스 및 안티센스 RNA는 천연 폭스 바이러스 서열, 바람직하게는 초기 유전자, 더 바람직하게는 급속초기 유전자의 가닥 둘 다로부터 전사되는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상보적 RNA 전사체를 암호화하는 서열의 발현은 각각 폭스 바이러스 프로모터에 의해 지시되는, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 폭스 바이러스 프로모터는 초기 프로모터 또는 급속초기 프로모터인, 재조합 폭스 바이러스.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 초기 dsRNA의 발현에 의해 표준 복제-적격 백시니아 바이러스 균주 및 초르도폭스 바이러스아과 서브패밀리로부터 유래된 다른 종을 약독화시키는 방법.

청구항 21

선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법으로서,

제19항의 재조합 폭스 바이러스를 척추동물 대상체에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 투여는 상기 대상체에서 I형 인터페론(I형 IFN), 사이토카인 및 케모카인의 생성을 증강시키는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, I형 IFN의 생성은 인터페론-베타(IFN-β)-암호화 전령 RNA(mRNA)의 전사를 포함하되, IFN-β

mRNA의 전사는 적어도 2배만큼 증가되는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, IFN-β-암호화 mRNA의 전사는 적어도 10배만큼 증가되는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, IFN-β-암호화 mRNA의 전사는 적어도 50배만큼 증가되는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, I형 IFN의 생성은 IFN-β 단백질의 분비를 포함하되, IFN-β 단백질의 분비는 적어도 2배만큼 증가되는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, IFN-β 단백질의 분비는 적어도 4배만큼 증가되는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, IFN-β 단백질의 분비는 적어도 10배만큼 증가되는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 28

제21항에 있어서, 투여가 상기 사이토카인 IFN-α, IFN-γ, IL-6, 및 IL-18의 생성을 증강시키는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 29

제21항에 있어서, 투여가 상기 케모카인 CXCL1, CCL2 및 CCL5의 생성을 증강시키는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 30

제21항에 있어서, 투여가 백터-특이적 CD8 T 세포의 생성을 적어도 10%만큼, 바람직하게는 25%만큼, 더 바람직하게는 50% 초과만큼 증강시키는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법.

청구항 31

제19항에 있어서, 닭 섬유아세포 세포주 DF-1(ATCC(등록상표)CRL-12203)에서 생성되는, 폭스바이러스.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감염에서 초기에 이중-가닥 RNA(double-stranded RNA: dsRNA)를 형성하는 상보적 RNA를 암호화하는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스에 관한 것이다. 초기 dsRNA는 또한 재조합 폭스바이러스의 천연 유전자의 가닥 둘 다를 전사시킴으로써 생성될 수 있다. 본 명세서에 제공된 재조합 폭스바이러스는 하나 이상의 공자극(costimulatory) 분자를 암호화하는 이중성 핵산 및/또는 하나 이상의 감염성 질환-관련 항원 또는 중앙 관련 항원을 암호화하는 이중성 핵산을 추가로 포함할 수 있다. 이들 재조합 폭스바이러스는 초기 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산이 없는 동일한 재조합 폭스바이러스에 비해 대상체에서 선천성 및 적응성 면역 활성화를 증강시킨다. 또한 본 명세서에서 제공되는 임의의 재조합 폭스바이러스를 포함하는 억제학적 조성물뿐만 아니라 이러한 재조합 폭스바이러스의 방법 및 용도가 본 명세서에서 제공된다.

배경 기술

[0002] 면역계는 병원균-연관 분자 패턴(pathogen-associated molecular pattern: PAMP)을 검출하는 패턴 인식 수용체

(pattern recognition receptor: PRR)에 의해 바이러스를 포함하는 다양한 병원균을 인식한다. PRR은 톨-유사 수용체(Toll-like receptor: TLR), RIG-유사 헬리카제(RIG-like helicase: RLH), NOD-유사 수용체(NOD-like receptor: NLR) 및 다른 지금까지 잘 알려지지 않은 PRR의 패밀리를 포함한다(Iwasaki (2012), *Annu. Rev. Microbiol.* **66**:177-196; Desmet & Ishii (2012), *Nat. Rev. Immunol.* **12**:479-491; Melchjorsen (2013), *Viruses.* **5**:470-527). PRR의 활성화는 수지상 세포(dendritic cell: DC), 및 선천성 및 적응성 면역 반응의 중국적 유도를 포함하는 다양한 면역 세포의 활성화를 야기한다. PRR 활성화는 또한 IFN-알파(IFN- α) 및 IFN-베타(IFN- β)를 포함하는 I형 인터페론(IFN)의 유도 및 작용뿐만 아니라 아직 비감염 숙주 세포로서 알려지고 있고, 면역 반응에 협력하는 다른 사이토카인 및 케모카인의 유도 및 작용을 통해 비면역 세포에서 항바이러스 상태의 유도를 야기한다. I형 IFN은, 예를 들어, MHC 클래스 I 및 II 발현, DC의 교차-제시 및 활성화를 상향조절함으로써 선천성 병원균 내성 메커니즘뿐만 아니라 항체 생성 및 T-세포 활성화를 포함하는 면역 반응의 다양한 양상을 조절한다(Iwasaki & Medzhitov (2010), *Science* **327**:291-295; Desmet & Ishii (2012), *Nat. Rev. Immunol.* **12**:479-491).

[0003] 바이러스 존재를 검출하기 위한 유기체에 대한 중요한 방법은 정상 세포와 면역 세포 둘 다에 의한 바이러스 RNA 또는 DNA의 인식이다. TLR3, TLR7/8, TLR9 및 TLR13은 이중-가닥 RNA(dsRNA), 단일-가닥 RNA(ssRNA), DNA, 및 리보솜 RNA(rRNA) 각각에 대한 수용체로서 동정되었다. 이중-가닥 DNA(dsDNA) 게놈 유사 헤르페스바이러스, 아데노바이러스 및 폭스바이러스를 지니는 바이러스는 TLR9-의존적 및 TLR9-독립적 경로에 의해 인식된다(Hochrein et al. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:11416-11421; Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* **118**:1776-1784). 이전의 작업은 폭스바이러스가 dsDNA 인식의 TLR9-의존적 경로와 TLR9-독립적 경로를 둘 다 강하게 저해한다는 것을 나타내었다.

[0004] TLR9를 통해 면역 세포에 의한 폭스바이러스 DNA의 검출은 I형 인터페론(즉, IFN- α/β) 및 III형 인터페론(즉, IFN- λ)뿐만 아니라 다른 사이토카인 및 케모카인의 생성을 야기한다(Lauterbach et al. (2010), *J. Exp. Med.* **207**:2703-2717; Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* **118**:1776-1784). 형질세포모양 DC (plasmacytoid DC: pDC)는 TLR7/8- 또는 TLR9-의존적 자극에 반응하여 다량의 IFN-I 및 IFN-III를 생성하는데 선택적으로 적격이다. pDC에서, TLR9-의존적 자극은 IFN-I 및 IFN-III 생성을 야기한다. DNA와 다른 바이러스 핵산은 둘 다 감염된 세포의 세포질에 의해 인식됨으로써 해당 세포가 IFN-I 및 IFN-III, 특히 사이토카인을 생성하도록 알린다. 폭스바이러스 인식의 TLR9-독립적 경로는 전통적인 수지상 세포(conventional conventional: cDC)의 다양한 서브세트에 의해 주로 사용된다(Hochrein & O'Keefe (2008), *Handbook Exp Pharmacol* **183**:153-179).

[0005] 바이러스 감염의 다른 중요한 특징은 RNA 바이러스에 의한 세포의 감염 동안 생성될 뿐만 아니라 dsDNA 게놈을 갖는 폭스바이러스에 의해 생성되는 dsRNA이다. 폭스바이러스 감염에서 dsRNA는 dsDNA 게놈의 상부 가닥과 하부 가닥 둘 다에 위치한 유전자로부터의 전사에 의해 중복됨으로써 생성된다. 특히, 중간 및 후기 유전자 전사의 종결은 이질적 길이의 긴 3' 비번역 영역(3' UTR)을 지니는 바이러스 mRNA를 야기하는 완전히 조절된 현상은 아니다(Cooper, Wittek, and Moss (1981), *J. Virol.* **39**:733-745; Xiang et al. (1998), *J. Virol.* **72**:7012-7023). 이러한 전사체가 반대의 배향으로 두 이웃하는 유전자로부터 유래될 때(즉, 서로에 대해 전사됨), 전사는 서로에 대해 또는 초기 전사에 의해 어닐링됨으로써 dsRNA를 형성하는 중복된, 상보적 mRNA 신장을 생성한다(Boone, Parr, and Moss (1979), *J Virol.* **30**:365-374). 바이러스 dsRNA의 생성은 폭스바이러스 복제 주기의 후기 상에 대부분 갇혀있는 것으로 나타난다(Colby & Duesberg (1969), *Nature* **222**:940-944; Duesberg & Colby (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **64**:396-403; Moss (2007), **5**:2905-2945). 바이러스 전사체로부터의 dsRNA 감염의 초기에 발견될 수 있는 것이 이미 보고되었다(Boone, Parr, and Moss (1979), *J Virol.* **30**:365-374; Lynch et al. (2009), *Virology* **391**:177-186; Willis et al. (2009), *Virology* **394**:73-81; Willis, Langland, and Shisler (2011), *J. Biol. Chem.* **286**:7765-7778). 그러나, 예를 들어 반대 방향으로 전사된 인접한 초기 유전자의 효율적인 전사 종결을 고정시킴으로써, 세포의 인식 시스템을 촉발하기 위한 충분한 양의 초기 dsRNA의 생성을 방지하는 선택적 압력이 존재하는 것으로 나타난다(Smith, Symons, and Alcamì (1998), *Seminars in Virology* **8**:409-418). 폭스바이러스는 이 서열의 하류의 초기 전사 20 내지 50개 뉴클레오타이드를 종결시키는 암호 가닥 상에서 서열 TTTTNT를 지니는 특이적 초기 종결 신호를 발달시켰다(Yuen & Moss (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **84**:6417-6421). 서로에 대해 전사된 초기 유전자는 전형적으로 다수의 종결 신호를 포함하는데, 감염에서 초기에 상보적 RNA의 생성을 피하기 위한 이러한 유전자의 짧은 초기 전사 종결의 엄격한 제어가 바이러스 적합성에 중요한 것으로 나타난다는 것을 표시한다.

[0006] 숙주 세포 및 유기체는 바이러스 감염을 검출하기 위한 dsRNA의 다양한 인식 수용체를 창안하였다. TLR3은 면역 세포에서 주로 발현되고 세포밖 dsRNA를 감지할 수 있지만, RIG-I, MDA-5, DDX1/DDX21/DHX36, 단백질 키나제

R(PKR), 및 2'-5'-올리고아데닐레이트 합성효소(2'-5'-OAS)와 같은 대부분의 다른 dsRNA 센서는 숙주의 기관 및 세포 유형에서 편재해서 발현되고 세포질 내에서 국소화된다. IFN I형 유도에 대해, RIG-I 및 MDA-5는 바이러스 감염을 검출하기 위한 가장 중요한 사이토졸 dsRNA 센서를 나타내는 것으로 고려된다(Melchjorsen (2013), *Viruses*, **5**:470-527). 다른 중요한 dsRNA 센서인 dsRNA-활성화 단백질 키나제 R(PKR)은 세포 및 바이러스 번역의 폐쇄를 야기함으로써 바이러스 복제를 제한하는 번역 신장 인자 eIF2 α 의 인산화를 통해 주로 그의 항바이러스 역할을 발휘하는 것으로 생각된다. (Garcia et al. (2006), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:1032-1060; Williams (1999), *Oncogene* **18**:6112-6120). 또한 PKR이 I형 IFN의 유도에서 어떤 역할을 한다는 증거가 있다. (Barry et al. (2009), *J Gen. Virol.* **90**:1382-1391; Gilfoy & Mason (2007), *J Virol.* **81**:11148-11158).

[0007] dsRNA에 의해 촉발되는 항바이러스 효과를 저해하기 위해, 폭스바이러스는 중요한 dsRNA 센서 PKR의 저해에 대해 적어도 2개의 단백질, 즉, E3 및 K3에 전념하였다. 바이러스 단백질은 둘 다 광범위하게 연구되었다. 특히, E3은 중심이 되는 것으로 나타난다. E3은 dsRNA와 결합하고 이를 격리시키며, PKR 활성화를 저해한다. E3L 유전자 없는 백신시니아 바이러스(VACV) 돌연변이체(VACV- Δ E3L)는 제한된 숙주 범위를 가지며, 다수의 세포 유형에서 세포자멸사를 유도하는데(Hornemann et al. (2003), *J. Virol.* **77**:8394-8407; Kibler et al. (1997), *J Virol.* **71**:1992-2003), 이는 PKR-매개 세포자멸사가 VACV-감염 세포에서 PKR 활성화의 주된 결과라는 것을 시사한다. 그러나, IFN1 처리에 대한 VACV- Δ E3L의 더 높은 민감성(Beattie, Paoletti, and Tartaglia (1995), *Virology* **210**:254-263) 및 E3-결실 VACV 돌연변이체로 감염된 세포자멸사 전의 세포에서 더 높은 IFN- α/β 유도가 또한 보고되었다(Hornemann et al. (2003), *J. Virol.* **77**:8394-8407). 본 명세서에서, 본 발명자들은 검출가능한 세포사 또는 세포자멸사를 유발하지 않지만, 다량의 IFN- α/β 및 다른 케모카인 및 사이토카인의 방출을 촉발시키는 변형된 백신시니아 바이러스 양카라(MVA) 및 용모요막 백신시니아 바이러스 양카라(CVA)로 감염된 세포 내 PKR 활성화를 유도하는 방법을 기재한다. 이는 DNA 복제의 개시 전에 감염의 초기에 dsRNA를 발현시킴으로써 달성되었다. 재조합 유전자의 두 독립적 삽입으로부터 두 상보적 mRNA의 전사에 의해 dsRNA의 안정한 발현을 달성하였다. CVA의 경우에, I형 IFN 유도는 마우스에서 대부분의 비병원성 감염을 야기하였고, 해당 결과는 기능성 I형 IFN 시스템의 존재에 의존한다.

[0008] MVA는 닭 배아 섬유아세포 상에서 완전한 복제-적격 천연두 백신 바이러스주 용모요막 백신시니아 바이러스 양카라(CVA)의 570회 초과에 의해 개발되었다(Meisinger-Henschel et al. (2007), *J. Gen. Virol.* **88**:3249-3259). 복제-적격 CVA는 불량하게 IFN-I을 유도하는 것으로 나타난 반면, 복제-제한 MVA는 오히려 IFN-I를 효율적으로 유도하였다(Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* **118**:1776-1784). IFN-I 생성의 CVA 저해는 B19R 유전자에 의해 암호화된 폭스바이러스 IFN-I-결합 단백질(IFN-IR)에 의해 부분적으로 매개되었다. B19 단백질은 IFN- α 에 결합하고, 따라서, 그의 생활성을 저해한다. 추가로, I형 인터페론에 대한 B19의 결합은 또한 항체-기반 분석 기법에 의한 IFN- α/β 의 검출을 막는데, 이는 B19 단백질이 또한 인간 IFN- β 에 결합한다는 것을 나타낸다. 인간 시스템과 대조적으로, B19는 마우스 IFN- β 에 결합하지 않는다. B19R ORF에 의해 암호화되는 폭스바이러스 IFN-I-결합 단백질의 상동체는 다수의 폭스바이러스 중에 존재하는데, 이는 IFN-I 활성을 저해하기 위한 이런 메커니즘이 폭스바이러스에서 더 일반적으로 보존된다는 것을 시사한다. 예를 들어, 도 17 참조.

[0009] B19의 IFN I형 결합 활성은 IFN-I 효과기 기능 또는 유도를 억제하기 위해 폭스바이러스에 의해 사용되는 유일한 저해 메커니즘이 아니다. 폭스바이러스는 그들의 숙주의 인터페론 I형 시스템을 뒤집는 다수의 인자를 암호화한다. 인터페론은 그들이 IFN 수용체-발현 세포에서 항바이러스 상태를 유도하고 숙주의 선천성 및 적응성 면역 반응을 조절하기 때문에 항바이러스 방어에서 중추적이다. 인터페론 시스템에 대응하는 공지된 폭스바이러스 인자 중에서 I형 및 II형 인터페론에 각각 결합하고 이들을 중화시키는 분비된 수용체-유사 단백질 B19 및 B8이 있다. 다른 폭스바이러스 단백질, 예컨대 VACV E3, K7, C6, N1, C7, K1, K3 및 H1은 I형 인터페론의 유도를 저해하거나 또는 인터페론 신호전달 및 효과기 경로를 차단한다. 폭스바이러스가 인터페론 시스템과 대응하는 이러한 다수의 단백질을 암호화한다는 사실은 감염된 숙주 유기체에 의한 폭스바이러스의 제어 및 종국적 클리어런스를 위한 선천성 면역 방어의 이런 시스템의 중요성을 강조한다. 인터페론 시스템과는 별도로, 오쏘폭스바이러스는 IL-1 β , IL-18과 같은 사이토카인의, 그리고 VACV B16R, WR013, C23L/vCCI를 비롯한 케모카인의 유도 또는 기능을 방해하는 다른 면역-조절 단백질을 암호화한다. 이들 사이토카인은 또한 병원균 확산을 제한함에 있어서 그리고 중증의 병원균-유도 손상으로부터 숙주를 보호함에 있어서 중요하다. 패턴 인식 경로를 전복시키는 폭스바이러스 단백질은 IFN의 유도뿐만 아니라 다른 사이토카인 및 케모카인을 좌절시킴에 있어서 보편적으로 효율적이다.

[0010] 따라서, 세포의 dsRNA 센서에 의한 폭스바이러스의 인식을 증강시킬뿐만 아니라 MVA에 의해 유도되는 선천성 면역 활성화를 증가시키는데 본 발명의 1차적 목적이 있다. 게놈 내 2개의 별개의 위치에서 2개의 부분적으로 동

일한 DNA를 삽입함으로써 감염의 초기에 dsRNA를 생성하도록 공학 처리된 재조합 폭스바이러스가 본 명세서에서 개시된다. 해당 DNA는 하나의 DNA가 '센스' 전사체를 생성하고 다른 하나가 상보적 '안티센스' 전사체를 생성하도록 배향된 강한 초기 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 2개의 부분적으로 또는 완전히 상보적인 전사체는 후속적으로 어닐링되어 dsRNA를 생성한다. 선천성 면역 활성화의 중요한 마커인 IFN-β의 효율적인 유도는 넓은 크기 범위에 걸쳐 초기 dsRNA에 의해 관찰되었고, 상보적 전사체가 50 bp에 이를 때까지 단축됨에 따라 효율은 감소되었다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명은 감염의 초기에 과량의 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 재조합 폭스바이러스를 척추동물 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 선천성 면역 활성화를 증강시키는 방법을 포함하되, 상기 투여는 대상체에서 I형 인터페론(I형 IFN), 사이토카인 및 케모카인의 생성을 증강시킨다.
- [0012] 추가 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 천연 폭스바이러스 서열, 바람직하게는 초기 유전자, 더 바람직하게는 급속초기 유전자의 가닥 둘 다로부터 센스 및 안티센스 RNA를 전사한다.
- [0013] 추가 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 이중성 서열의 가닥 둘 다로부터 센스 및 안티센스 RNA로서 이중성 핵산을 전사시킨다.
- [0014] 추가 실시형태에서, 본 발명은 과량의 초기 dsRNA의 발현에 의해 표준 복제-적격 백시니아 바이러스 균주 및 초르도폭스바이러스아과로부터 유래된 다른 종을 약독화시키는 방법을 포함한다.
- [0015] 다양한 실시형태에서, 폭스바이러스는 하나 이상의 공자극 분자를 암호화하는 이중성 서열을 추가로 포함한다.
- [0016] 다양한 실시형태에서, 폭스바이러스는 하나 이상의 박테리아, 바이러스, 진균, 기생충, 또는 중앙 항원을 암호화하는 이중성 서열을 추가로 포함한다.
- [0017] 다양한 실시형태에서, 폭스바이러스는 오소폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 또는 몰러스씨폭스바이러스이다. 오소폭스바이러스는 백시니아 바이러스, 우두 바이러스, 및 원숭이 폭스 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 백시니아 바이러스는 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA), 예를 들어, 변형된 백시니아 바이러스 양카라 바바리안 노르딕(modified vaccinia virus Ankara Bavarian Nordic: MVA-BN)일 수 있다.
- [0018] 다양한 실시형태에서, dsRNA를 생성하는 이중성 또는 내인성 핵산은 부분적으로 또는 완전한 상보적 RNA 전사체를 암호화하는 서열을 포함하되, RNA 전사체의 상보적 부분은 dsRNA를 형성하기 위한 전사 후에 어닐링된다.
- [0019] 다양한 실시형태에서, 완전한 또는 부분적으로 상보적인 RNA 전사체를 암호화하는 이중성 핵산은 상보적 영역 내에서 동일하거나, 또는 상보적 영역 내에서 99% 초과, 95% 초과, 90% 초과, 80% 초과, 또는 70% 초과 유사성을 가진다.
- [0020] 본 발명의 추가적인 목적 및 이점은 다음의 설명에서 부분적으로 제시될 것이고, 부분적으로 설명으로부터 분명하게 되거나, 또는 본 발명의 실행에 의해 습득될 수 있다. 본 발명의 목적 및 이점은 특히 첨부되는 청구범위에서 지시되는 구성요소 및 조합에 의해 실현 및 달성될 것이다.
- [0021] 앞서 언급한 일반적 설명과 다음의 상세한 설명은 둘 다 단지 예시적이고 설명적이며 청구된 본 발명을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0022] 본 명세서의 부분에 포함되고 본 명세서의 부분을 구성하는 수반하는 도면은 본 발명의 하나의(몇몇) 실시형태(들)를 예시하고, 설명과 함께 본 발명의 원칙을 설명하는 작용을 한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 초기 dsRNA 및 대응하는 제어 돌연변이체를 과발현시키는 CVA 돌연변이체의 개략적 표현을 도시한 도면. 박스는 ORF B14R과 B20R 사이의 게놈 영역에서 CVA ORF를 나타내고, 일정한 비율로 도시하지 않는다. B15 ORF의 CVA 버전을 나타내는 박스는 검정색으로 나타내는 반면, B15R의 MVA 버전은 다이아몬드 패턴으로 표시한다. 빗금친 박스는 B19R ORF를 나타낸다. 모든 다른 ORF는 회색 박스로서 나타낸다. 다양한 결실 돌연변이체에서 CVA ORF를 대체하는 박테리아 선택 마커(neo^r 및 zeo^r)는 특이적 마커의 표시를 지니는 더 작은 박스로서 나타낸다.

도 2는 BALB/c 마우스에서 CVA-dsneo- Δ B15 및 관련된 CVA 돌연변이체의 독력을 도기한 도면. 3 내지 5마리의 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스 그룹을 표시된 CVA 돌연변이체의 정제된 저장액의 5×10^7 (A, B 우측 패널) 또는 10^7 TCID₅₀ (B 좌측 패널, C)을 함유하는 50 μ l 접종물로 정맥내로 감염시켰다. A) 및 B)는 CVA 돌연변이체의 상이한 세트를 사용하는 독립적 실험의 결과를 나타낸다. 동물을 매일 검사하고 나서, 표시한 날에 체중을 잴다. 체중 데이터를 제0일에 초기 평균 체중으로부터 각각의 그룹의 평균 체중 +/- SEM의 백분율로서 표현한다. 단검 표시는 각각의 일자에 죽은 동물의 수를 나타낸다. C) 표시한 바이러스의 정제된 저장액의 10^7 TCID₅₀으로 비강내로 감염시킨 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 폐를 감염후 6일에 회수하였다. 폐를 균질화시키고, 바이러스 역가를 CV-1 세포를 이용하여 표준 TCID₅₀ 분석에 의해 결정하였다. 바이러스 당 총 8마리 마우스로부터 2회의 독립적 실험의 폐에서의 총 바이러스 역가의 평균을 나타낸다. 스튜던트 t검정에 의해 *** = p < 0.001.

도 3은 IFNAR^{0/0} 마우스에서 CVA-dsneo- Δ B15의 독력을 도기한 도면. A) 두 성별의 9 내지 18주령 C57BL/6-IFNAR^{0/0} 마우스의 표시한 수를 조절의 바이러스 저장액의 2×10^6 TCID₅₀ 또는 CVA 및 CVA-dsneo- Δ B15 저장액의 10^7 TCID₅₀를 함유하는 50 μ l 접종물로 비강내로 감염시켰다. 동물을 매일 검사하고 표시한 날에 체중을 잴다. 체중 데이터를 제0일에 초기 평균 체중으로부터 각각의 그룹의 평균 체중 +/- SEM의 백분율로서 표현한다. B) A)에서 나타난 마우스의 생존.

도 4는 CVA-dsneo- Δ B15에 의한 DC 내 IFN- α 및 IFN- λ 유도를 도기한 도면. 야생형 C57BL/6 마우스로부터의 FL-DC를 18시간 동안 표시 MOI에서 표시 바이러스로 감염시켰다. DC 배양 상청액을 ELISA에 의해 IFN- α 및 IFN- λ 에 대해 분석하였다. CVA 및 CVA- Δ B15는 IFN- α 의 검출가능한 양을 유도하지 않았다.

도 5는 neo 카세트 삽입물의 역할 및 이에 의한 A31 세포 내 CVA-dsneo- Δ B15에 의한 IFN- β mRNA 유도의 역학을 도기한 도면. A) 무린 BALB/3T3 A31 세포를 모의-감염시키거나(mock-infect) 또는 표시한 시간 동안 MOI 10에서 BAC-유래 MVA 또는 CVA 야생형 및 CVA 돌연변이체 CVA-dsneo- Δ B15 및 CVA- Δ B15의 정제된 저장액으로 감염시켰다. 세포를 용해시키고 나서, 퀴아젠(QIAGEN) RNeasy 키트를 이용하여 세포 용해물로부터의 RNA를 준비하였다. 퀴아젠사로부터의 DNA 제거(gDNA) 칼럼 다음에 37°C에서 1시간 동안 터보-DNase(엠비온(Ambion))를 이용한 추가적인 DNase 처리 및 65°C에서 10분 동안 DNase의 후속적 열 불활성화를 이용하여 게놈 DNA의 오염을 제거하였다. 무린 IFN- β (독일 님슈타트에 소재한 어플라이드 바이오시스템즈)에 대해 상업적 유전자 발현을 이용하여 IFN- β mRNA 수준을 결정하였다. IFN- β mRNA에서 배수적 증가로서 표현한 모의-감염 세포에서 IFN- β mRNA 수준에 대해 감염 세포에서 IFN- β 전사체 수준을 나타낸다. B) A31 세포를 모의-감염시키거나 또는 6시간 동안 MOI 10에서 CVA 및 표시한 CVA 돌연변이체의 조절의 저장액으로 감염시켰다(검토를 위해 도 1 참조). IFN- β mRNA의 정량화의 RNA 제조를 A)에서 기재한 바와 같이 수행하였다. IFN- β mRNA에서 배수 증가로서 표현한 모의-감염 세포에서 IFN- β mRNA 수준에 대한 감염 세포 내 IFN- β 전사체 수준을 나타낸다. 1: CVA; 2: CVA-dsneo- Δ B15/B19; 3: CVA-dsneo- Δ B15; 4: CVA- Δ B15; 5: CVA-zeo- Δ B15; 6: CVA-Dp_{B15}-neo- Δ B15; 7: 모의.

도 6은 dsRNA-생성 MVA 돌연변이체의 EGFP 및 neo 삽입의 개략적 표현을 도기한 도면. pS, pHyb 또는 pB15R 프로모터에 의해 제어된 neo 및 EGFP 암호 서열의 전사 방향(검정색 화살표)을 표시한다. ORF 및 모든 다른 구성요소를 일정한 비율로 도시하지 않는다. a) neo ORF는 BAC 카세트 내에서 neo-IRES-EGFP 선택 카세트의 부분이다(Meisinger 2010). 후자는 유전자간 영역(IGR) I3L/I4L(MVA064/065) 내로 삽입된다. neo-IRES-EGFP 카세트를 pS 프로모터(화살표로 표시)의 제어 하에 전사시킨 반면, B15R 좌위 내 neo/rpsL 카세트를 B15R 프로모터의 제어 하에서 역 배향으로 전사시킨다. 하나의 MVA 작제물 내에서 Neo ORF는 하나의 단일 미스매치를 지니는 792 nt(회색 박스로 표시)에 의해 중복된다. MVA-dsneo- Δ B15/DBAC에서, IGR I3L/I4L 내 완전한 BAC 카세트를 Cre/lox 재조합을 통해 결실시켰다. b) b)의 모든 MVA-dsEGFP 작제물은 BAC 카세트 내의 neo-IRES-EGFP 카세트가 결실된 MVA 재조합체에 기반한다. MVA-EGFP에서, neo-IRES-EGFP 카세트를 neo 유전자에 의해 대체하였다. MVA-EGFP에서 센스 배향으로 전사된 EGFP ORF를 ORF A25L 내지 A26L(MVA136/137) 사이의 IGR에 삽입한 반면, 안티센스에서 전사된 EGFP ORF를 IGR J2R/J3R(MVA086/087)에 삽입한다. 중복되는 상보적 EGFP 전사체에 의해 형성된 잠재적 dsRNA 신장을 회색 막대에 의해 표시한다. 이웃하는 ORF를 MVA-EGFP 및 MVA-dsEGFP에 대해서만 표시한다. 안티센스 EGFP 전사체의 3' 말단에서 lacZ α 서열을 MVA-dsEGFP에서 유일하게 삽입하며, MVA-dsneo- Δ B15에서 상보적 neo 전사체의 무리에 매칭되는 비-상보적 3' 돌출부로서 작용한다. MVA-EGFP는 EGFP ORF의 박테리아 프로모터 하류의 제어 하에서 FRT 부위에 축적되는 추가적인 neo 삽입물을 함유한다. 이 선택 마커

는 FLP/FRT 재조합에 의해 모든 MVA-dsEGFP 작제물에서 제거되었다.

도 7은 dsRNA-생성 MVA 돌연변이체에 의한 IFN-β mRNA의 유도 및 무린 A31 세포의 단백질 발현을 도시한 도면. 무린 BALB/3T3 A31 세포를 모의-감염시키거나 또는 MVA-wt의 조질의 바이러스 제제 또는 neo(A, B) 또는 EGFP(C, D)의 단일 또는 중복 전사체를 발현시키는 MVA의 표시된 돌연변이체로 감염시켰다. A) 및 C)의 세포를 IFN-β 전사체 분석을 위한 채취 전 5시간(검정색 막대) 및 7시간(회색 막대) 동안 감염시켰다. CVA-dsneo-ΔB15 감염에 의한 IFN-β 유전자 유도는 A)에서 나타낸 기준이다. 세포 용해물로부터의 RNA를 퀴아젠 RNeasy 키트를 이용하여 준비하였다. 퀴아젠사로부터의 DNA 제거(gDNA) 칼럼 다음에 1시간 동안 37°C에서 터보-DNase(Turbo-DNase)(엠펜)를 이용하는 추가적인 DNase 처리 다음에 10분 동안 65°C에서 후속적 열 불활성화를 이용하여 오염 DNA를 제거하였다. 무린 IFN-β에 대한 상업적 유전자 발현 분석(어플라이드 바이오시스템즈)을 이용하는 RT-qPCR에 의해 IFN-β mRNA 수준을 결정하였다. 오염 DNA의 부재는 RT 효소가 RT 반응에서 생략되었을 때 음의 RT-qPCR 결과에 의해 입증되었다. 모의-감염 세포에서 IFN-β mRNA 수준에 대해 감염 세포에서 IFN-β 전사체 수준을 나타낸다. IFN-β Ct 값을 세포의 18S rRNA에 대한 Ct 값을 이용하여 정규화시켰다. IFN-β 단백질 수준을 18시간(B) 또는 23시간(D) 동안 감염시킨 세포의 상청액에서 결정하였다. 상청액을 채취하고 나서, 상업적으로 입수가 가능한 ELISA(PBL)를 이용하여 무린 IFN-β에 대해 분석하였다. A 및 C에서 나타낸 감염은 하나의 실험으로부터 유래된 반면, 실험 B) 및 D)는 독립적이었다. A) 1: MVA wt; 2: MVA-dsneo-ΔB15; 3: MVA-dsneo-ΔB15/-DBac; 4: MVA-ΔB15, 5: CVA-dsneo-ΔB15; 6: 모의. B) 1: MVA wt; 2: MVA-dsneo-ΔB15; 3: MVA-DB15; 4: 모의, 5: medium. C) 1: MVA-EGFP; 2: MVA-dsEGFP; 3: 모의. D) 1: MVA-EGFP; 2: MVA-dsEGFP; 3: 모의.

도 8은 dsRNA 생성의 시간에 따라서 MVA-dsEGFP에 의한 IFN-β mRNA 발현 유도를 도시한 도면. "IFN-β mRNA의 배수적 증가"로서 표현한 모의-감염 세포 내 IFN-β mRNA 수준에 대한 감염 세포 내 IFN-β 전사체 수준을 나타낸다. A) Wt-MEF를 모의-감염시키거나 또는 MOI 10에서 5시간 동안 MVA-EGFP(기준 바이러스, 센스 전사체를 생성하는 단지 하나의 EGFP 삽입물을 함유), 양성 대조군으로서 MVA-dsEGFP-2, 또는 MVA-ΔE3L(바이러스 dsRNA 결합 단백질 E3을 암호화하는 유전자의 결여)의 정제된 저장액으로 감염시켰다. 세포를 바이러스 DNA 복제를 차단하고 초기 상에서 감염을 저지하는, 40μg/ml 최종 농도의 사이토신 아라비노사이드(AraC, 백색 막대)로 처리하거나 또는 비처리(검정색 막대)로 두었다. 세포 용해물로부터의 RNA를 준비하고, 도 7에 대한 범례에 기재한 바와 같이 IFN-β mRNA 수준에 대해 RT-qPCR에 의해 분석하였다. B) Wt-MEF를 모의-감염 또는 5시간 동안 바바리안 노르딕에 의해 발생시킨 강하고 배타적인 후기 프로모터(SSL)의 제어 하에서 안티센스 EGFP 카세트 발현시키는 MVA-EGFP, MVA-dsEGFP, 또는 MVA-dsEGFP-후기의 조질 저장액으로 감염시켰다. 세포 용해물로부터의 RNA를 준비하고 나고, 도 7에 대한 범례에서 기재한 바와 같이 IFN-β mRNA 수준에 대해 RT-qPCR에 의해 분석하였다.

도 9는 A31 세포에서 MVA-dsneo-ΔB15 및 MVA-dsEGFP에 의한 PKR의 활성화를 나타낸다. 무린 A31 세포를 MOI 10에서 표시한 바이러스의 조질 저장액을 파종한 후 제1일에 감염시켰다. 표시된 시간의 감염 후에 준비한 세포 용해물 중의 eIF2α의 인산화(P-eIF2α)를 1:100 희석에서 eIF2α의 포스포-에피토프 Ser51에 대한 항체(항체 #9721, 미국 매사추세츠주 덴버스에 소재한 셀 시그널링 테크놀로지 인코포레이티드(Cell Signaling Technology Inc.)를 이용하는 면역블롯에 의해 분석하였다. 장입 대조군으로서, 마우스 β-튜블린 아이소타입 I을 검출하는 항체를 이용하여 면역블롯 막의 별개의 부분을 발생시켰다. **도 10**은 MEF에서 MVA-dsEGFP에 의한 IFN-β mRNA의 증가된 유도가 PKR에 의존한다는 것을 나타낸다. Wt-MEF 및 PKR-결여(PKR^{0/0}) MEF를 모의-감염시키거나 또는 MOI 10에서 5시간 동안 MVA-EGFP 또는 MVA-dsEGFP의 정제된 저장액을 이용하여 감염시켰다. 상업적으로 입수가 가능한 센다이 바이러스(SeV) 제제의 1ml의 1:100 희석물을 PKR-독립적이지만 dsRNA-의존적 IFN-β 유도에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. A) 세포 용해물로부터의 RNA를 준비하고 나서, 도 7에 대한 범례에서 기재한 바와 같은 IFN-β mRNA 수준에 대해 RT-qPCR에 의해 분석하였다. "IFN-β mRNA의 증가 배수"로서 표현한 모의-감염 세포에서 IFN-β mRNA 수준에 대한 IFN-β 전사체 수준을 나타낸다. 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-dsEGFP; 4: SeV; 5: 모의. B) IFN-β 단백질 수준을 24시간 동안 감염시킨 세포의 상청액에서 결정하였다. 상청액을 채취하고 나서, 상업적으로 입수가 가능한 ELISA(PBL)를 이용하여 무린 IFN-β에 대해 분석하였다. 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-dsEGFP; 4: SeV; 5: 모의.

도 11은 dsRNA-생성 MVA 재조합체에 의한 IFN-β의 PKR-의존적 유도의 길이 필요조건을 도시한 도면. Wt-MEF 및 PKR^{0/0}-MEF를 모의-감염시키거나 또는 37°C에서 5시간(A, C) 또는 24시간(B) 동안 MOI 10에서 점진적으로 단축된 EGFP ORF 중복을 갖는 표시된 EGFP-dsRNA 돌연변이체 또는 MVA-EGFP의 조질의 저장액으로 감염시켰다(도 6b 참조). 상업적으로 입수가 가능한 센다이 바이러스(SeV) 제제의 1:100 희석물 1ml를 dsRNA-의존적이지만 PKR-독립적

IFN-β 유도에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 모의에 따른 IFN-β mRNA 유도 배수를 도 7에 대한 범례에 기재한 바와 같은 세포로부터 단리한 총 RNA를 이용하여 RT-qPCR에 의해 결정하였다. IFN-β mRNA에 대한 Ct 값은 내인성 대조군으로서 작용하는 18S rRNA에 대한 Ct 값과 상관관계가 있었다. **B)** IFN-β 단백질 수준을 표시한 MVA 재조합체에 따라 24시간 동안 감염시킨 wt MEF 및 PKR^{0/0}-MEF의 상청액에서 결정하였다. 상청액을 채취하고 나서, 상업적으로 입수가능한 ELISA(PBL)를 이용하여 뮤린 IFN-β에 대해 분석하였다. MVA-ΔB15를 추가적인 기준으로서 포함하였다. A) 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-dsEGFP; 4: MVA-dsEGFP-2; 5: MVA-dsEGFP-3; 6: MVA-dsEGFP-4; 7: MVA-dsEGFP-5; 8: SeV; 9: 모의. B) 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-ΔB15; 4: MVA-dsEGFP; 5: MVA-dsEGFP-2; 6: MVA-dsEGFP-3; 7: MVA-dsEGFP-4; 8: MVA-dsEGFP-5; 9: SeV; 10: 모의. C) 1: MVA-EGFP; MVA-dsEGFP; 3: MVA-dsEGFP-6; 4: 모의.

도 12는 MVA-dsEGFP의 복제 및 표현형 안정성을 도기한 도면. **A)** MVA-EGFP 및 MVA-dsEGFP의 복제 거동의 분석을 위해, 10⁶개 2차 CEF 세포의 단일층을 MOI 0.025에서 3회(다중-순환 분석)로 감염시켰다. 표시한 시간에 바이러스 결과를 플롯팅하고, 각각의 데이터 지점은 3개의 독립적 웰로부터의 결과를 나타낸다. **B)** 10⁶ 인간 HeLa 및 HaCaT 세포, 및 원숭이 CV-1 세포의 단일층을 MVA-EGFP 또는 MVAds-EGFP를 이용하여 MOI 0.025에서 3회 중복하여 감염시켰다. 감염 후 3일에 바이러스 결과 대 웰 당 5x10⁴ TCID₅₀의 유입의 비를 플롯팅한다. 각각의 데이터 지점은 3개의 독립적 웰로부터의 단일 적정 결과를 나타낸다. **C)** 2차 CEF 세포의 단일층을 본문에서 기재한 바와 같은 DF-1 세포 내에서 1회(P1) 또는 10회(P10) 계대시킨 표시한 바이러스를 이용하여 5시간 동안 MOI 10에서 감염시켰다. 모의 이상으로 감염시킨 세포에서 IFN-β mRNA의 유도 배수를 도 7에 대한 범례에서 기재한 바와 같은 세포로부터 단리한 총 RNA를 이용하여 RT-qPCR에 의해 결정하였다. 1: MVA-EGFP-P1; 2: MVA-EGFP-P10; 3: MVA-dsEGFP P1; 4: MVA-dsEGFP P10; 5: 모의.

도 13은 C57BL/6 wt, IPS-1^{0/0} 및 PKR^{0/0} 마우스에서 돌연변이체 MVA-dsEGFP에 의한 사이토카인 발현의 유도를 도기한 도면. 8 내지 12주령의 표시한 바이러스주(B6 = C57BL/6 wt)의 5마리 마우스의 그룹을 마우스 당 10⁸ TCID₅₀ 용량에서 표시한 바이러스를 이용하여 정맥내로 감염시켰다. 동물을 감염 후 6시간에 출혈시키고, 혈청을 벤더 메드시스템즈사(Bender Medsystems)로부터의 비드-기반 유세포분석을 이용하여 표시한 바와 같은 선택 사이토카인 농도에 대해 분석하였다. **a)** IFN-α. **b)** IFN-γ. **c)** IL-6. **d)** IL-18. **e)** CXCL1. **f)** CCL2. **g)** CCL5.

도 14는 마우스에서 MVA-EGFP 및 돌연변이체 MVA-dsEGFP에 의한 MVA-특이적 CD8 T 세포의 유도를 도기한 도면. A) 8주령의 3 내지 5마리 C57BL/6 마우스의 그룹을 10⁸ TCID₅₀/마우스의 용량에서 표시한 바이러스를 이용하여 1회 정맥내로(A) 감염시켰다. 비장을 감염후 제7일에 채취하고 나서, 단일 세포 비장세포 현탁액을 사용하여, B8₂₀₋₂₇ 에피토프-특이적 텍스트라머를 이용하는 MHC 클래스 I 텍스트라머 염색에 의해 MVA-특이적 CD8 T 세포를 정량화하였다. 2개의 독립적 실험으로부터의 조합된 결과를 나타낸다. 별표는 양측검정, 독립 스튜던트 t검정으로 0.05 미만의 p-값을 표시한다.

도 15는 MVA-dsEGFP 돌연변이체에 의한 인간 MRC-5 세포에서 IFN-β mRNA 발현의 유도를 도기한 도면. 6-웰 플레이트에서 MRC-5 세포(인간 이배체 폐 섬유아세포)를 모의-감염시키거나 또는 MVA wt 및 점진적으로 단축된 EGFP ORF 증복을 지니는 표시된 MVA-dsEGFP 재조합체에 대응하는 MVA-EGFP의 조질의 저장액을 이용하여 감염시켰다. MVA-dsneo-ΔB15 및 MVA-ΔB15를 추가로 사용하고 나서, 모의 이상으로 IFN-β mRNA의 유도 배수를 도 7에 대한 범례에서 기재한 바와 같은 5시간 후-감염에서 세포로부터 단리시킨 총 RNA를 이용하는 RT-qPCR에 의해 결정하였다. 내인성 대조군으로서 작용하는 세포의 18S rRNA에 대한 Ct 값을 이용하여 IFN-β Ct 값을 정규화시켰다. "IFN-β mRNA의 유도 배수"로서 표현한 모의-감염 세포에서 IFN-β mRNA 수준에 대한 감염 세포 내 IFN-β 전사체 수준을 나타낸다. 1: MVA; 2: MVA-EGFP; 3: MVA-dsneo-ΔB15; 4: MVA-ΔB15; 5: MVA-dsEGFP; 6: MVA-dsEGFP-2; 7: MVA-dsEGFP-3; 8: MVA-dsEGFP-4; 9: MVA-dsEGFP-5; 10: 모의.

도 16은 MVA-dsE3L에 의한 MVA-dsE3L 및 IFN-β 유전자 유도의 개략적 표현을 도기한 도면 **A)** 돌연변이체 MVA-dsE3L의 개략적 도면. 천연 pE3L 및 삽입된 pH5m 프로모터에 의한 E3L 암호 서열(검정색 화살표)의 전사 방향을 표시한다. 초기 전사 종결 신호(Early transcription termination signal: ETTS's)는 수직 회색 막대에 의해 표시하였다. 회색 화살촉은 ETTS가 잠재적으로 활성인 전사 방향을 표시한다. E3L ORF에서 안티센스 ETTS는 E3 아미노산 서열을 변화시키는 일 없이 코돈 내에서 위블(wobble) 위치의 부위-지정 돌연변이유발에 의해 불활성화되었다. 두 상보적 E3L 전사체에 의해 형성된 잠재적 dsRNA 신장은 회색 막대에 의해 표시된다. **B)** 6-웰 플레

이트 내 MEF를 모의-감염시키거나 또는 MOI 10에서 표시 바이러스의 조절 저장액으로 감염시켰다. MVA-EGFP는 MVA wt에 대응한다. 모의 이상으로 IFN-β mRNA의 유도 배수를 감염 후 5시간에 세포로부터 단리시킨 총 RNA를 이용하여 RT-qPCR에 의해 결정하였다. IFN-β mRNA에 대한 Ct 값은 내인성 대조군으로서 작용하는 18S rRNA에 대한 Ct 값에 의해 보정되었다. 1: MVA-EGFP; MVA-dsEGFP; 3: MVA-dsEGFP-5; 4: MVA-dsEGFP-후기; 5: MVA-dsE3L.

도 17은 B19R 유전자의 아미노산 서열이 다수의 폭스바이러스에 걸쳐 보존된다는 것을 도시한 도면. a), b), c) 및 d) 디폴트 설정 클러스탈로(Clustal0), 버전 1.2.0에 의해 생성한 원숭이 폭스 바이러스(서열번호 1), 백시니아 바이러스-웨스턴리저브(vaccinia virus-Western Reserve)("백시니아-WR")(서열번호 2), 백시니아 바이러스-코펜하겐(서열번호 3), 옴모요막 백시니아 바이러스-앙카라("CVA")(서열번호 4), 엑트로멜리아바이러스(서열번호 5), 우두 바이러스(서열번호 6), 카멜폭스 바이러스(서열번호 7), 돼지 폭스 바이러스(서열번호 8), 및 타나폭스 바이러스(서열번호 9)에 의해 암호화된 B19R 유전자 및/또는 이들의 상동체의 아미노산 서열 정렬. e)는 a), b), c) 및 d)에서 부분적으로 정렬된 B19R 서열 및/또는 이들의 상동체에 대한 쌍별 아미노산 서열 동일성을 나타낸 표.

서열의 간단한 설명

서열번호 1[수탁 번호 Q5IXK2: IFN-알파/베타-수용체-유사 분비 당단백질; 원숭이 폭스 바이러스]:

MMKMKMMVRIYFVSLSLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTPAKDSKWLNPVCMFGGTMNDMAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKDYVVKWERLEKNRRRQVSNKRKVKHGDLWIANYTSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGVVRSVHWKPPSSCIPKTYELGTYDKYIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDFKYSQAGKELIHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKLILDPKINVTIGEPANITCSAVSTSLFVDDVLEIWKPNPSGWIIGLDFGVYSILTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYTCRGNHYFDKTLTTTVVLE

서열번호 2[수탁 번호 P25213: 가용성 인터페론 알파/베타 수용체 B19; 백시니아 바이러스, 바이러스주 웨스턴 리저브]:

MTMKMMVHIYFVSLLLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTPAKDSKWLNPACMFGGTMNDIAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKDYVVKWERLEKNRRRQVSNKRKVKHGDLWIANYTSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGVIRSHIRKPPSCIPKTYELGTHDKYIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGKELIHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLIDVLEIWEWNPNGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKCRGNHYFEKTLTTTVVLE

서열번호 3[수탁 번호 Q5CAD5: IFN-알파-베타-수용체-유사 분비 당단백질; 백시니아 바이러스, 바이러스주 코펜 하겐]:

MTMKMMVHIYFVSLLLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTPAKDSKWLNPACMFGGTMNDIAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKDYVVKWERLEKNRRRQVSNKRKVKHGDLWIANYTSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGVIRSHIKKPPSCIPKTYELGTHDKYIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGKELIHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLIDVLEIWEWNPNGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKCRGNHYFEKTLTTTVVLE

서열번호 4[수탁 번호 A9J168: 가용성 및 세포 표면 인터페론-알파/베타 수용체; 백시니아 바이러스, 바이러스주 앙카라(CVA)]:

MKMTMKMMVHIYFVSLLLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTPAKDSKWLNPACMFGGTMNDIAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKDYVVKWERLEKNRRRQVSNKRKVKHGDLWIANYTSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGVIRSHIKKPPSCIPKTYELGTHDKYIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGKELIHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLIDVLEIWEWNPNGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKCRGNHYFEKTLTTTVVLE

서열번호 5[수탁 번호 Q9JFS5: IFN-알파/베타 결합 단백질; 엑트로멜리아 바이러스]:

MMKMTMKMMVRIYFVSLSLSLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMRDTPAKDSKWLNPSCMFGGTMNDMAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYNDKDNVNVWEKIGKTRRPLNRRVKNGDLWIANYTSNDSHRRYLCTVTTKNGDCVQGVIRSHIRKPPSCIPETYELGTHDKYIDLYCGILYAKHYNNITWYKNNQELIDGT KYSQSQNL IHNPELEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLVDDVLEIWEWNPNGWIIGLDFGVYSILTSSGGITEATLYFENVTEEYIGNTYTCRGNHYFDKTLTTTVVLE

서열번호 6[수탁 번호 Q5CAC3: 가용성 인터페론-알파/베타 수용체; 우두 바이러스]:

MKMTMKMMVHIYFVSLSLSLLLFHSYAIDIENEITEFFNKMKDTPAKDSKWLNPACMFGGTMNDMAAIGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKDKDNVNVWEKIGKTRRPLNRRVKNGDLWIANYTSNDSRRRYLCTVITKNGDCIQGVIRSHVRKPPSSCIPYELGTHDKYIDLYCGIYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGKELIHNPALEDSGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVIPSQDHRFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLVDDVLEIWEWNPNGWLIGFDFDVYSVLT SRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKCRGNHYFEKTLTTTVVLE

서열번호 7[수탁 번호 Q5CA87: 가용성 인터페론-알파/베타 수용체; 카렐폭스 바이러스]:
 MKMTMKMMVHIYFVSLSLSLLLFHSYAIDIENEITDFFNKMKIDLPTKDSKWLNPACMFGGTTNDMAAIGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKNKDNVNVWEKIG
 KTKRPLNRRVKNGLDWIANYSNSDRRRYLCTAITKNGDCIQGIRSHVRKPPSSCIPEIYELGTHDKYGDLYCGIYAKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYS
 QTGKELIHNPALEDGRYDCYVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVTPSQDHRFKLILDPKINVTIGEPANITCTAVSTSLLVDDVLIEWENPSGWLIGFDFDV
 YSVLTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKCRGHNYFEKTLTTTVLLE

서열번호 8[수탁 번호 Q8V3G4: IFN-알파/베타-유사 결합 단백질; 돼지폭스 바이러스, 바이러스주 돼지/네브라스카/17077-99/1999]:

MISIKKYNILLFIIISFYCSADNDIDSLYEGYKEFLDPKQLKFLNDNCTYRGYRDFLYNEEPANIKCPLLNDILLRQKYHNYTILWKKLGERSRLNTHG
 SIFLDFFPYKSELRGSVYECMIILNNTCDQFILKLNDIRSNPVCYHNDYKVHTNIEIFCNVINLQYDYITWYKNNSEIIDGKYNSQSRLLVYNTTYNDS
 GIYYCNAVTTGKNTYISRRCSVSISHSYDFYIEHINNITYIDPSENTQIYCKAISYSNSSYILYWEDEYGGYIYDNGIYQYDNIITLIGNEKVYMSI
 LVLEKSAYRYVNNFTCLATSVYVEKKTITTLVIKKT

서열번호 9[수탁 번호 A7XCS4: I형 IFN 수용체; 타나폭스 바이러스]:
 MKITYIILLICKEICDNSGDDMYDIANGNIDYLKTDNDIINLVNKNCSFREIKTTLAKENEVLMKCPQLDNYILPWKYMNRSEYTVTWNISNSTEYN
 NTRIEENMLMFFPFYNLQAGSKYLCTVSTNKSCDQSVIVKKSFYSNMCLSEAKENDNFEIYCGILHAKYNTIKWFKEEKEITNNYKYTKLGGYVKGINN
 VTYSDSGKYVCEGYIDVLKNIYTAKRVCNLTVIPNTYDFDIVDIPNVYAKNNKLEVNCTSFVDINSYDYILTSWLYNGLYPLGVRVRYQLYSTDIFF
 ENFIYRTSTLVFENVDISDDNKTFECEALSVTLKKIKYTTIKVEK

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이제 예시적 실시형태에 대해 상세하게 언급할 것이며, 이것의 예는 수반하는 도면에서 도시한다.
- [0025] **정의**
- [0026] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서의 기술적 용어는 분자 생물학의 당업자에 의한 전통적인 어구에 따라 사용된다. 분자 생물학에서 통상적인 용어에 대해, 전통적인 어구는, 예를 들어, 문헌[*Genes V* by Benjamin Lewin, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.); *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 및 *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference* edited by Robert A. Meyers, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]과 같은 표준 교재에서 발견될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 단수 형태는 내용에 달리 명확하게 표시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "에피토프"에 대한 언급은 하나 이상의 에피토프에 대한 언급을 포함하고, "방법"에 대한 언급은 동등한 단계에 대한 언급 및 본 명세서에 제공된 방법을 변형 또는 대체할 수 있는 당업자에게 공지된 방법을 포함한다.
- [0028] 달리 표시되지 않는 한, 일련의 구성요소에 선행하는 용어 "적어도"는 시리즈 내 모든 구성요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 일상적인 실험만을 이용하여 본 명세서에 제공된 본 발명의 구체적 실시형태에 대한 다수의 동등물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 동등물은 본 발명에 의해 포함된다.
- [0029] 본 명세서 및 다음의 청구범위 전체적으로 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 변형, 예컨대 "포함하다" 및 "포함하는"은 "포함하다"를 의미하며, 따라서, 언급된 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 그룹을 포함하고, 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 그룹을 제외한다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "포함하는"은 용어 "함유하는", "포함하는" 또는 "갖는"으로 대체될 수 있다. 임의의 앞서 언급한 용어(포함하는, 함유하는, 포함하는, 갖는)는 본 발명의 양상 또는 실시형태와 관련하여 본 명세서에서 사용될 때 용어 "이루어지는"으로 대체될 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서 사용될 때 용어 "이루어지는"은 청구범위에서 구체화되지 않은 임의의 구성요소, 단계 또는 구성성분을 제외한다. 본 명세서에서 사용될 때 "본질적으로 이루어지는"은 생성물의 "기본적이고 신규한 특징에 영향을 미치는" 임의의 물질들 또는 단계들 또는 청구범위의 나머지에서 정해지는 방법을 제외한다. 문헌[*Water Techs. Corp. v. Calco Ltd.*, 7 U.S.P.Q.2d 1097, 1102 (Fed. Cir. 1988)].
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 다양한 인용 구성요소 사이의 접속어 "및/또는"은 개개의 그리고 조합된 선택사항을 둘 다 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 두 구성요소가 "및/또는"에 의해 함께 조합되는 경우, 제1 선택사항은 제2의 선택사항 없이 제1 구성요소의 적용가능성을 지칭한다. 제2 선택사항은 제1 선택사항 없이 제2 구성요소의 적용가능성을 지칭한다. 제3 선택사항은 제1 및 제2 구성요소의 적용가능성을 함께

지칭한다. 이들 선택사항 중 임의의 하나는 의미 내에 속하며, 따라서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "및/또는"의 필요조건을 충족시키는 것으로 이해된다. 선택사항 중 하나 이상의 동시 적용가능성은 또한 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 따라서 용어 "및/또는"의 필요조건을 충족시킨다.

[0032] 본 명세서에서 언급되는 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 언급된 참고문헌은 그들의 전문이 참고로 포함된다. 상충되는 경우에, 모든 정의를 포함하는 본 명세서로 제어할 것이다.

[0033] **애주번트.** 항원성을 증강시키기 위해 사용되는 비히클. 애주번트는 다음을 포함할 수 있다: (1) 항원이 흡착되는 광물질의 현탁액(명반, 수산화알루미늄 또는 인산염); (2) 항원 용액이 광유 중에서 에멀전화되는 유중수 에멀전(프로인트 불완전 애주번트), 때때로 항원 분해를 저해하고/하거나 대식세포의 유입을 야기하고/하거나 면역 세포를 활성화시킴으로써 항원성을 추가로 향상시키기 위해 사멸된 마이코박테리아를 포함함(프로인트 완전 애주번트); (3) 면역자극 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, CpG 모티프를 포함하는 것은 또한 애주번트로서 사용될 수 있음(예를 들어, 미국 특허 제6,194,388호; 및 미국 특허 제6,207,646호 참조); 및 (4) 정제 또는 재조합 단백질, 예컨대 공자극 분자. 예시적인 애주번트는 B7-1, ICAM-1, LFA-3 및 GM-CSF을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0034] **항원; 항원성 결정소; 에피토프.** 동물에 주사 또는 흡수되는 조성물을 포함하는, 동물에서 항체 또는 CD4+ 또는 CD8+ T-세포 반응의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질. 항원은 항원-특이적 체액성 또는 세포성 면역 반응을 생성하는 면역계와 반응한다. 용어 "항원"은 특정 화합물, 조성물 또는 물질의 모든 관련된 에피토프를 포함한다. 용어 "에피토프" 또는 "항원성 결정소"는 B- 및/또는 T-세포가 단독으로 또는 다른 단백질, 예를 들어, 구조적 복합체("MHC") 단백질 또는 T-세포 수용체와 함께 반응하는 항원 상의 부위를 지칭한다. T 세포 에피토프는 8 내지 ~20개의 아미노산의 인접한 신장으로부터 형성된다. B 세포 에피토프는 단백질의 2차 및/또는 3차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로부터 형성된 B 세포 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 대한 노출 시 보유되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 의한 처리 시 상실된다. B 세포 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 입체구조에서 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산(그러나 일반적으로는 20개 미만의 아미노산)을 포함한다. 에피토프의 공간적 입체형태를 결정하는 방법은, 예를 들어, x-선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명을 포함한다. 예를 들어, 문헌["Epitope Mapping Protocols" in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)] 참조.

[0035] 항원은 조직-특이적(또는 조직-연관) 항원 또는 질환-특이적(또는 질환-연관) 항원일 수 있다. 해당 용어는 상호 배타적이지 않은데, 조직-특이적 항원은 또한 질환-특이적 항원일 수 있기 때문이다. 조직-특이적 항원은 제한된 수의 조직에서 발현된다. 조직-특이적 항원은, 예를 들어, 전립선-특이적 항원(prostate-specific antigen: "PSA")을 포함한다. 질환-특이적 항원은 항원 발현이 특정 질환과 상관관계가 있거나 또는 특정 질환의 발생을 예측하는 경우, 질환 과정과 동시 발생적으로 발현된다. 질환-특이적 항원은, 예를 들어, 특정 유형의 유방암과 연관된 HER-2, 또는 전립선암과 연관된 PSA를 포함한다. 질환-특이적 항원은 T-세포 또는 B-세포에 의해 인식되는 항원일 수 있다. 조직- 및/또는 질환-특이적 항원은 박테리아 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 또는 종양-연관 항원, 또는 바이러스 항원을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0036] **박테리아 항원.** 하나 이상의 박테리아 종 또는 이들의 균주, 예를 들어, 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 보르데텔라 페르투스(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*), 브루셀라 카니스(*Brucella canis*), 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*), 브루셀라 수이스(*Brucella suis*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미도필라 시타시(*Chlamydomonas psittaci*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 코리네박테리움 디프테리예(*Corynebacterium diphtheriae*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 장독소성 에스케리키아 콜라이, 장병원성 에스케리키아 콜라이, 에스케리키아 콜라이)157:H7, 프란시셀라 투라렌시스(*Francisella tularensis*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 렙토스피라 인터로간스(*Leptospira interrogans*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 마이코박테리움 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코플라스마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumoniae*), 네이세리아 고노로이애(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitidis*), 슈도모나스 아에루기

노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 리케차 리케차(*Rickettsia rickettsia*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 쉬겔라 손네이(*Shigella sonnei*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스타필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스타필로코커스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*), 스타필로코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*), 스타필로코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*) 및 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)로부터 유래된 항원.

[0037] **진균 항원.** 하나 이상의 진균종 또는 이들의 균주, 예를 들어, 아스퍼질러스 클라바투스(*Aspergillus clavatus*), 아스퍼질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아스퍼질러스 푸미가투스, 아스퍼질러스 니들란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 블라스토타마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 두블리니엔시스(*Candida dubliniensis*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 루고사(*Candida rugosa*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 크립토키크스 알비두스(*Cryptococcus albidus*), 크립토키크스 가티(*Cryptococcus gattii*), 크립토키크스 라우렌티(*Cryptococcus laurentii*), 크립토키크스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 마이코스포룸 카니스(*Microsporium canis*), 뉴모시스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*), 뉴모시스티스 이베로치(*Pneumocystis jirovecii*), 스포트릭스 쉐키(*Sporothrix schenckii*), 스타치보트리 차르타룸(*Stachbotrys chartarum*), 티네아 바르바에(*Tinea barbae*), 티네아 카프티티스(*Tinea capitis*), 티네아 코르포리스(*Tinea corporis*), 티네아 크루리스(*Tinea cruris*), 티네아 파시에이(*Tinea faciei*), 티네아 인코그니토(*Tinea incognito*), 티네아 니그라(*Tinea nigra*), 티네아 베르시컬러(*Tinea versicolor*), 트리코피톤 루브룸(*Trichophyton rubrum*) 및 트리코피톤 톤수란스(*Trichophyton tonsurans*)로부터 유래된 항원.

[0038] **기생충 항원.** 하나 이상의 기생충 종 또는 이들의 균주, 예를 들어, 아니사키스 종(*Anisakis spp.*) 바베시아 종(*Babesia spp.*), 베이리사카리스 프로시오니스(*Baylisascaris procyonis*), 크립토스포리디움 종(*Cryptosporidium spp.*), 사이클로스포라 카에타넨시스(*Cyclospora cayetanensis*), 디필로보트리움 종(*Diphyllobothrium spp.*), 드라쿤쿨루스 메디넨시스(*Dracunculus medinensis*), 엔타모에바 히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*), 지아르디아 듀오덴الی스(*Giardia duodenalis*), 지아르디아 인테스티날리스(*Giardia intestinalis*), 지아르디아 람블리아(*Giardia lamblia*), 레이쉬마니아 종(*Leishmania sp.*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 슈스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 슈스토소마 하에마토비움, 슈스토소마 자포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 타에니아 종(*Taenia spp.*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 트리키넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*) 및 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*)로부터 유래된 항원.

[0039] **종양-연관 항원.** 특정 종양 유형, 예를 들어, 5- α -환원효소, α -태아단백질("AFP"), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자("BAGE"), β -카테닌, Bcl12, bcr-ab1, 브라큐리(Brachyury), CA-125, 카스파제-8("CASP-8"), 또한 "FLICE"로서 알려짐), 카텡신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/Fc ϵ R II, CD33, CD35/보체 수용체 1("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원(leucocyte common antigen: "LCA"), CD46/막 보조인자 단백질("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/붕괴 촉진 인자(decay accelerating factor: "DAF"), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 태아성 암 항원("CEA"), c-myc, 사이클로옥시게나제-2("cox-2"), 직장결장암 유전자에서의 결실(deleted in colorectal cancer gene: "DCC"), DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파르네실 트랜스퍼라제, 섬유아세포 성장인자-8a("FGF8a"), 섬유아세포 성장인자-8b("FGF8b"), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리("GAGE-패밀리"), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 강글리오사이드 2("GD2")/강글리오사이드 3("GD3")/강글리오사이드-모노시알산-2("GM2"), 성선자극호르몬 방출 호르몬(gonadotropin releasing hormone: "GnRH"), UDP-GlcNAc:R₁인간(α 1-6)R₂[인간(α 1-6)에 대한 GlcNAc] β 1,6-N--아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V("GnT V"), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/타이로신-관련 단백질-1("gp75/TRP-1"), 인간 융모막성 성선자극호르몬("hCG"), 헤파라나제, Her2/neu, 인간 유방 종양 바이러스("HMTV"), 70 킬로달톤 열-충격 단백질("HSP70"), 인간 텔로머라제 역전사효소("hTERT"), 인슐린-유사 성장인자 수용체-1("IGFR-1"), 인터류킨-13 수용체("IL-13R"), 유도성 산화질소 합성효소("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-암호화 유전자 1("MAGE-1"), 흑색종 항원-암호화 유전자 2("MAGE-2"), 흑색종 항원-암호화 유전자 3("MAGE-3"), 흑색종 항원-암호화 유전자 4("MAGE-4"), 맘마글로빈, MAP17, 멜란-A/T-세포-1에 의해 인식되는 흑색종 항원("MART-1"), 메소텔린, MIC A/B, MT-MMP, 뮤신,

고환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자("PDGF"), μ PA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이에틴, 전립선-특이적 항원("PSA"), 전립선-특이적 막 항원("PSMA"), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파("TGF- α "), 형질전환 성장 인자-베타("TGF- β "), 티모신-베타-15, 종양 괴사 인자-알파("TNF- α "), TP1, TRP-2, 티로시나제, 혈관내피 성장 인자("VEGF"), ZAG, p16INK4 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제("GST") 상에서 주로 과발현 또는 발현되는 항원.

[0040] **바이러스 항원.** 하나 이상의 바이러스 유형 또는 이의 단리물, 예를 들어, 아데노바이러스, 콕사키바이러스, 크립-콩고 출혈열 바이러스, 거대세포바이러스(cytomegalovirus: "CMV"), 탱기열 바이러스, 에볼라 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus: "EBV"), 파나리토 바이러스, 단순 포진 바이러스-1형("HSV-1"), 단순 포진 바이러스-2형("HSV-2"), 인간 헤르페스 바이러스-8형("HHV-8"), A형 간염 바이러스("HAV"), B형 간염 바이러스("HBV"), C형 간염 바이러스("HCV"), D형 간염 바이러스("HDV"), E형 간염 바이러스("HEV"), 인간 면역결핍 바이러스("HIV"), 인플루엔자 바이러스, 주닌 바이러스, 라싸 바이러스, 마추포 바이러스, 마부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 볼거리 바이러스, 노위크 바이러스, 인유두종바이러스("HPV"), 파라인플루엔자 바이러스, 파코바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스("RSV"), 리노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 사비아 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군("SARS"), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스("MERS-CoV"), 대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 및 황열 바이러스로부터 유래된 항원.

[0041] **cDNA(상보적 DNA).** 전사 개시 및 종결의 시간 및 위치를 결정하는 내부 비-암호 세그먼트(인트론) 및 조절 서열이 없는 DNA 조각. cDNA는 세포로부터 추출된 전령 RNA("mRNA")의 역전사에 의해 실험실 내에서 합성될 수 있다.

[0042] **보존적 변이체.** "보존적" 변이체는 단백질 또는 이의 항원성 에피토프의 활성 또는 항원성에 실질적으로 영향을 미치지 않거나 또는 감소시키지 않고 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 변이체 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 일반적으로 보존적 치환은 특정 아미노산이 동일 또는 유사한 화학적 특징을 갖는 다른 아미노산으로 치환되는 것이다. 예를 들어, 라이신과 같은 염기성 아미노산을 아르기닌 또는 글루타민과 같은 다른 염기성 아미노산으로 대체하는 것은 보존적 치환이다. 용어 보존적 변이체는 또한 비치환 모 아미노산 대신 치환된 아미노산의 사용을 포함하며, 단, 치환된 폴리펩타이드에 대해 상승된 항체는 또한 비치환 폴리펩타이드와 면역 반응하고/하거나 치환된 폴리펩타이드는 비치환 폴리펩타이드의 기능을 보유한다. 비-보존적 치환은 상이한 화학적 특징을 갖는 특정 아미노산을 대체하는 것이며, 전형적으로 단백질 또는 이의 항원성 에피토프의 활성 또는 항원성을 감소시킨다.

[0043] 보존적 치환의 구체적, 비제한적 예는 다음의 예를 포함한다:

본래의 잔기	보존적 치환
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0044]

[0045] **CD4.** MHC 클래스 II 분자와의 상호작용을 매개하는 T-세포 표면 단백질인 분화 인자 4의 클러스터. "CD4+" 세포

로서 지칭되는 CD4를 발현시키는 세포는 종종 헬퍼 T(예를 들어, "T_H", "T_H1" 또는 "T_H2") 세포이다.

- [0046] **CD8.** MHC 클래스 I 분자와 상호작용을 매개하는 T-세포 표면 단백질인 분화 인자 8의 클러스터. "CD8+" 세포로서 지칭되는 CD8을 발현시키는 세포는 종종 세포독성 T("CTL") 세포이다.
- [0047] **공자극 분자.** T-세포 활성화는 전형적으로 T-세포 수용체("TCR")의 펩타이드-MHC 복합체와의 결합뿐만 아니라 공자극 분자의 그의 리간드와의 상호작용을 통해 전달된 제2 신호를 필요로 한다. 공자극 분자는 그들의 리간드에 결합될 때, T-세포 활성화를 필요로 하는 제2 신호를 전달하는 분자이다. T-세포 상에서 가장 잘 알려진 공자극 분자는 B7-1 또는 B7-2 중 하나에 결합하는 CD28이다. 또한 T-세포의 활성화에 필수적인 제2 신호를 제공할 수 있는 다른 공자극 분자는 세포내 부착 분자-1("ICAM-1"), 세포내 부착 분자-2("ICAM-2"), 백혈구 기능 연관 항원-1("LFA-1"), 백혈구 기능 연관 항원-2("LFA-2"), 및 백혈구 기능 연관 항원-3("LFA-3")을 포함한다. B7-1, ICAM-1 및 LFA-3의 조합은 "공자극 분자의 TRIad"에 대해 "TRICOM"으로서 지칭된다.
- [0048] **수지상 세포(DC).** 수지상 세포는 1차 면역 반응에 수반된 주요 항원 제시 세포(antigen presenting cell: "APC")이다. 수지상 세포는 형질세포모양 수지상 세포 및 골수성 수지상 세포를 포함한다. 그들의 주요 기능은 조직 내에서 항원을 얻는 것이며, 림프기관으로 이동되며, T-세포를 활성화시키기 위해 항원을 제시한다. 미숙 수지상 세포는 골수 내에서 유래되며, 미숙 세포로서 주변부에 존재한다.
- [0049] **이중-가닥 RNA(dsRNA).** 본 발명의 임의의 실시형태에 따른 증가된 수 또는 양의 dsRNA를 발현시키는(예를 들어, 과량의 dsRNA를 발현시키는) 이중성 또는 천연 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스는 사이토카인, 케모카인, 효과기 분자의 방출 및/또는 공자극 분자의 증가된 발현을 촉발시키거나, 하나 이상의 패턴 인식 수용체(들)(PRR)를 활성화시키고/시키거나 세포(예를 들어, 수지상 세포, 대식세포, B 세포 또는 다른 유형의 면역 세포)를 활성화시키고, 따라서 바람직하게는 향상된 선천성 면역 반응을 촉발 또는 유도한다. 과량의 dsRNA는 임의의 적합한 방법에 의해, 바람직하게는 증강된 선천성 면역 반응을 결정하기 위한 방법 또는 실시예에 기재된 방법, 바람직하게는 실시예 16에 따른 방법을 이용함으로써 결정될 수 있다. 바람직하게는, 과량의 dsRNA는 본 발명의 재조합 폭스바이러스 벡터를 이용할 때 증강된 선천성 면역 반응을 생성하는 감염에서 초기에 dsRNA의 양으로서 정의될 수 있다. 더 바람직하게는, 과량의 dsRNA는 대조군에 비해 dsRNA를 발현 또는 생성하는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스에 의한 바이러스 감염의 초기 상 동안 전사된 dsRNA의 양으로서 정의될 수 있다. 과량의 dsRNA는 초기 활성을 지니는 폭스바이러스 프로모터(예를 들어, 급속초기, 초기 또는 초기/후기 폭스바이러스 프로모터)를 이용함으로써 길이로 바람직하게는 적어도 100bp의 동일 또는 중복되는 서열 신장을 지니는 센스 및 안티센스 RNA의 전사를 유도함으로써 생성될 수 있다. 과량의 dsRNA를 결정하는 다른 방법은 하나 이상의 PRR(들), 예를 들어, 실시예 7에 나타난 바와 같은 PKR 기질(예를 들어, 위치 세린-51에서 eIF2 α)의 증가된 인산화에 의해 결정된 바와 같은 PKR의 증강된 활성화를 결정하는 것이다. 바람직하게는 PKR 기질(예를 들어, 위치 세린-51에서 eIF2 α)의 증가된 인산화는 대조군에 비해 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 15-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.
- [0050] **감염의 초기.** 폭스바이러스의 유전자 발현은 캐스케이드 방식으로 조절된다. 바이러스 유전자의 초기 전사는 새로 감염된 세포 내로 바이러스 입자와 함께 운반된 바이러스 전사 기작에 의해 유발되고, 초기 바이러스 전사 복합체에 의해 인식되는 초기 바이러스 프로모터의 제어 하에 있다. 일단 비리온 및 숙주 막이 융합되고 바이러스 코어가 세포질 내로 방출되었다면, 내인성 RNA 중합효소 및 바이러스 유전자 발현을 포함하는 캡슐화된 전사 인자는 초기 프로모터의 제어 하에서 바이러스 mRNA를 합성하는 초기 바이러스 유전자 발현의 제1 캐스케이드를 시작하는 것은 잘 알려져 있다. 보통 감염의 초기, 예를 들어, 초기 상은 게놈 복제 전에 약 1 내지 2시간 지속된다. 바람직하게는, 감염의 초기는 숙주 세포에 대한 바이러스 입자(예를 들어, 재조합 폭스바이러스)의 결합과 바이러스 게놈 복제(예를 들어, 재조합 폭스바이러스 게놈 복제)의 개시 사이의 시간 확장이다. 초기 단백질 증에서, 바이러스 dsDNA 게놈의 복제 및 바이러스 게놈 복제의 개시 후에만 시작할 수 있는 즉시로 칭해지는 다음 전사 단계를 위한 전사 인자이다. 바람직하게는, 감염의 초기는 30분 내, 감염 1시간 또는 2시간 또는 접종 후이며, 바람직하게는 바이러스 코어가 세포의 세포질 내로 방출된 후이다.
- [0051] **발현 제어 서열.** 이중성 핵산 서열이 작동가능하게 연결된 이중성 핵산 서열의 발현을 조절하는 핵산 서열. 발현 제어 서열은, 발현 제어 서열이 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 제어하고 조절할 때 핵산 서열에 대해 작동가능하게 연결된다. 따라서, 용어 "발현 제어 서열"은 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 시작 코돈, 인트론을 위한 스플라이싱 신호, 및 정지 코돈을 포함한다. 용어 "제어 서열"은 이것의 존재가 이중성 핵산 서열의 전사 및/또는 번역에 영향을 미칠 수 있고 또한 존재가 유리한 추가적인 구성성분, 예를 들어 리더 서열 및 융합 상

대 서열을 포함할 수 있는 최소의 구성성분을 포함한다.

- [0052] 용어 "**발현 제어 서열**"은 프로모터 서열을 포함한다. 프로모터는 상동성 또는 이종성 유전자의 전사를 지시하는데 충분한 최소 서열이다. 또한 외부 신호 또는 제제에 의해 프로모터-의존적 유전자 발현 세포-유형 특이적, 조직-특이적, 또는 유도성을 제공하는데 충분한 해당 프로모터 구성요소가 포함되며; 이러한 구성요소는 유전자의 5' 또는 3' 영역에 위치될 수 있다. 용어 "프로모터"는 구성적 프로모터와 유도성 프로모터를 둘 다 포함한다. 예를 들어, 문헌[Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516-544 (1987)] 참조. 예시적 프로모터 서열은 레트로바이러스 긴 말단 반복부(long terminal repeat: "LTR"), 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터("Pr7.5"), 백시니아 바이러스 합성 초기/후기 프로모터("sE/L"), PrSynIIIm 프로모터, PrLE1 프로모터, PrH5m 프로모터, PrS 프로모터, 혼성 초기/후기 프로모터, 또는 우두 바이러스 ATI 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다른 적합한 프로모터는 SV40 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 인간 CMV 급속초기 I 프로모터, 및 백시니아 바이러스 또는 MVA-유래 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 폭스바이러스 프로모터: 30K 프로모터, I3 프로모터, sE/L 프로모터, Pr7.5K 프로모터, 40K 프로모터, C1 프로모터, PrSynIIIm 프로모터, PrLE1 프로모터, PrH5m 프로모터, PrS 프로모터, 혼성 초기/후기 프로모터 PrHyb, PrS5E 프로모터, PrA5E 프로모터, Pr13.5-긴 프로모터, 및 Pr4LS5E 프로모터; 우두 바이러스 ATI 프로모터, 또는 다음의 계두(fowlpox)-유래 프로모터: Pr7.5K 프로모터, I3 프로모터, 30K 프로모터, 또는 40K 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0053] **이종성**. 별도의 유전자 공급원 또는 종으로부터 유래. 예를 들어, 박테리아 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 중앙-연관 항원, 또는 바이러스 항원과 같은 MVA 계놈 내에 포함되지 않은 핵산으로부터 유래된 변형된 백시니아 바이러스 양카라("MVA")에 대해 이종성인 폴리펩타이드. 상기 용어는 RNA를 암호화하는 임의의 비-천연 핵산 또는 MVA 계놈에 의해 정상적으로 암호화되지 않는 단백질 또는 이러한 비-천연 핵산에 의해 암호화된 임의의 비-천연 단백질을 포함하는 것으로 넓게 해석된다.
- [0054] **상동체; 변이체**. 유전자 또는 단백질 서열을 지칭할 때 용어 "상동체" 또는 "변이체"는 당해 유전자 또는 단백질의 천연 아미노산 서열을 포함하며, 단백질 단편은 여전히 숙주뿐만 아니라 예를 들어 글리코실화된 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 및 단백질 단편의 상동체 또는 변이체 내에서 면역 반응을 유발할 수 있다. 따라서, 단백질 및 폴리펩타이드는 특정 천연 아미노산 서열로 제한되지 않지만, 천연 서열에 대해 동일한 서열뿐만 아니라 천연 서열에 대한 변형, 예컨대 결실, 첨가, 삽입 및 치환을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 상동체 또는 변이체는 기준 단백질 또는 폴리펩타이드와 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% 또는 89%, 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93% 또는 94%, 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 약 100% 아미노산 서열 동일성을 가진다. 용어 상동체 또는 변이체는 또한 절단, 결실 또는 달리 변형된 뉴클레오타이드 또는 단백질 서열을 포함한다.
- [0055] 용어 상동체 또는 변이체는 또한 천연 서열의 축퇴 변이체를 포함한다. 축퇴 변이체는 천연 또는 야생형 유전자 서열과 상이하지만 동일한 아미노산 서열을 여전히 구체화하는 코돈을 함유하는 서열을 포함하는 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드이다. 유전자 암호는 20개의 천연 아미노산을 구체화하며, 이의 대부분은 하나 이상의 코돈에 의해 암호화된다. 따라서, 이는 중복(redundant) 또는 축퇴 암호이다. 모든 축퇴 뉴클레오타이드 서열은 본 명세서에 포함되며, 단, 축퇴 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 단백질의 아미노산 서열은 변하지 않은 채로 남아있다.
- [0056] 아미노산 서열 사이의 서열 상동성을 결정하기 위한 기법은 당업계에 공지되어 있다. 2 이상의 서열은 그들의 "백분율 동일성"을 결정함으로써 비교될 수 있다. 두 서열의 백분율 동일성은 두 정렬된 서열 사이의 정확한 매치의 수를 더 짧은 서열의 길이로 나누고 100을 곱한 것이다.
- [0057] 본 명세서에 기재된 단백질, 폴리펩타이드, 항원성 단백질 단편, 항원 및 에피토프에 대한 "아미노산 서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 필요하다면, 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 그리고 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않는, 기준 서열 내의 아미노산 잔기(즉, 그것이 유래된 단백질, 폴리펩타이드, 항원성 단백질 단편, 항원 또는 에피토프)와 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당업자의 수준 내에서, 예를 들어 BLAST, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 당업자는 비교될 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다.
- [0058] **숙주 세포**. 박터가 번식되고 그의 DNA가 발현될 수 있는 세포. 세포는 원핵세포(예를 들어, 박테리아) 또는 진

핵세포(예를 들어, 포유류 또는 인간)일 수 있다. 상기 용어는 또한 모든 자손이 모 세포와 동일하지 않을 수 있다고 해도, 복제 동안 일어나는 돌연변이가 있을 수 있기 때문에 본래의 숙주 세포의 자손을 포함한다.

[0059] **면역 반응.** 자극에 대한 면역계 세포, 예컨대 B-세포, T-세포, 또는 단핵구의 적응 반응. 적응 반응은 특정 항원에 대한 반응이며, 따라서, "항원-특이적"으로서 기재된다. 적응성 면역 반응은 B-세포에 의한 특정 항원에 대한 항체의 생성, CD4⁺ 헬퍼 T-세포에 의한 T-세포 도움, 항원-특이적 CD8⁺ T-세포(세포독성 T 림프구, "CTL")의 집단의 확장, 특정 항원을 발현시키는 세포에 대해 지시된 CD8⁺ T-세포의 세포독성 활성화, 또는 또 다른 유형의 항원-특이적 면역 반응을 포함할 수 있다.

[0060] **면역원성 조성물.** 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "면역원성 조성물"은 초기 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 조성물을 지칭한다. 상기 용어는 또한 초기 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산 및 이중성 질환-연관 항원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폭스바이러스를 포함한다. 특정 실시형태에서, 이중성 질환-연관 항원은 감염성 질환-연관 항원 또는 종양-연관 항원이다. 특정 실시형태에서, 질환-연관 항원은 감염성 질환 항원이다. 특정 실시형태에서, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원 또는 기생충 항원이다. 재조합 폭스바이러스는 선택적으로, 예를 들어, 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같은 하나 이상의 공자극 분자를 암호화하는 추가적인 핵산을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 선택적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화된 재조합 폭스바이러스를 포함할 수 있다.

[0061] **"이것이 필요한".** 본 명세서에 제공된 면역 반응을 증강시키는 방법 및 재조합 폭스바이러스, 면역원성 조성물 및 약제학적 조성물에 대해 사용될 때, "이것이 필요한" 대상체는, 예를 들어, 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충 감염으로부터 초래된 의학적 병태에 대해 또는 신생물 병태(즉, 암)에 대해 진단된 적이 있거나 또는 이전에 치료받은 적이 있는 개체일 수 있다. 예방에 대해, 이것이 필요한 대상체는 또한 의학적 병태가 발생할 위험에 있는(예를 들어 병태의 가족력, 병태에 대한 위험을 나타내는 생활-양식 인자 등을 갖는) 대상체일 수 있다.

[0062] **림프구.** 신체의 면역 방어에 수반된 백혈구 세포의 유형. 2가지 주요 유형의 림프구(B-세포 및 T-세포)가 있다.

[0063] **주조직적합성 복합체("MHC").** 인간 백혈구 항원("HLA")을 포함하는 상이한 종에서 기재한 주조직적합성 항원 시스템을 포함하는 것을 의미하는 일반적 표기.

[0064] **포유류.** 이 용어는 인간과 비인간 포유류를 둘 다 포함한다. 유사하게, 용어 "대상체"는 인간과 수의과적 대상체를 둘 다 포함한다.

[0065] **오픈 리딩 프레임("ORF").** 폴리펩타이드를 생성하기 위해 번역될 수 있는 임의의 내부 종결 코돈이 없는 일련의 아미노산을 구획화하는 진행생물 시작코돈(ATG) 다음의 일련의 뉴클레오타이드 코돈, 또는 RNA 분자, 예를 들어, 리보솜 RNA(rRNA) 또는 전달 RNA(tRNA)를 생성하기 위해 전사될 수 있는 임의의 내부 종결 코돈이 없는 일련의 뉴클레오타이드.

[0066] **작동가능하게 연결된.** 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과의 기능적 관계에 위치될 때 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 암호 서열의 전사를 지시할 수 있는 위치에 위치된다면, 프로모터는 암호 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 동일한 리딩 프레임 내의 2개의 단백질-암호 영역을 결합하는데 필요한 경우, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접해있다.

[0067] **약제학적으로 허용가능한 담체.** 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체" 또는 "약제학적으로 적합한 담체" 등은 추출물과 유해하게 반응하지 않는 장 또는 비경구 적용에 적합한 약제학적 부형제, 예를 들어, 약제학적으로, 생리학적으로, 허용가능한 유기 또는 무기 담체 물질을 지칭한다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)]은 본 명세서에 개시된 벡터 및 조성물의 투여에 적합한 전통적인 약제학적으로 허용가능한 담체를 이용하는 조성물 및 제형을 기재한다. 일반적으로, 사용된 담체의 특성은 사용 중인 투여의 특정 방식에 의존한다. 예를 들어, 비경구 제형은 보통 비히클로서 약제학적으로 그리고 생리학적으로 허용가능한 유체, 예컨대 물, 생리학적 식염수, 평형염류용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등을 포함하는 주사가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물(예컨대, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐)에 대해, 전통적인 비-독성 고체 담체는, 예를 들어, 만니톨, 락토스, 전분, 또는 스테아르산마그네슘의 약제학적 등급을 포함한다. 약제학적 조성물은 또한 소량의 비-독성 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제, pH-완충제 등, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 솔비탄 모노라

우레이트를 함유할 수 있다.

- [0068] **"약제학적 유효량", "치료적 유효량", "유효량".** 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 해당 용어(및 이의 동의어)는 구체화된 병태(예를 들어, 의학적 병태, 질환, 감염 또는 장애) 또는 그의 증상 중 하나 이상에 대해 목적으로 하는 약학적 및/또는 생리학적 효과를 야기하고/하거나 병태 또는 그의 증상의 발생을 완전히 또는 부분적으로 방지하는 양을 지칭하고/하거나 병태 및/또는 병태에 기인하는 유해한 효과의 부분적 또는 완전한 치유에 대해 치료적일 수 있는 양을 지칭한다. "약제학적 유효량" 또는 "치료적 유효량"은 투여 중인 조성물, 치료/예방될 병태, 치료 또는 예방될 병태의 중증도, 개체의 연령 및 상대적 건강상태, 투여 경로 및 형태, 담당 의사 또는 수의사의 판단 및 본 명세서에 제공된 교시를 고려하여 당업자에 의해 인식되는 다른 인자에 따라 다를 것이다.
- [0069] **폴리뉴클레오타이드; 핵산.** 용어 폴리뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드(즉, RNA) 또는 데옥시리보뉴클레오타이드(즉, DNA 또는 cDNA)로 구성되고 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화할 수 있거나 또는 암호화할 수 없는 적어도 300개의 염기 길이의 핵산 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 DNA의 단일- 및 이중-가닥 형태를 포함한다.
- [0070] **폴리펩타이드 또는 단백질.** 용어 폴리펩타이드 또는 단백질은 적어도 100개 아미노산 길이, 일반적으로 길이로 30개 초과 아미노산의 중합체를 지칭한다.
- [0071] **폭스바이러스.** 용어 "*폭스바이러스*"는 폭스바이러스과의 두 서브패밀리(초르도폭스바이러스아과 및 엔토모폭스바이러스아과) 중 하나를 지칭한다. 초르도폭스바이러스아과 서브패밀리의 구성원은 척추동물을 감염시킨다. 엔토모폭스바이러스아과 서브패밀리의 구성원은 곤충(즉, 무척추동물)을 감염시킨다. 용어 "*폭스바이러스*"는 또한 인간을 감염시킬 수 있는 4종(오쏘폭스 바이러스, 파라폭스 바이러스, 야타폭스 바이러스, 및 몰루시폭스 바이러스)을 비롯한 초르도폭스바이러스아과(예를 들어, 아비폭스 바이러스, 카프리카폭스 바이러스, 레포리폭스 바이러스, 몰루시폭스 바이러스, 오쏘폭스 바이러스, 파라폭스 바이러스, 수이폭스바이러스, 및 야타폭스 바이러스)의 임의의 속의 구성원, 생산적이든 아니든, 바람직하게는 오쏘폭스 및/또는 아비폭스 바이러스를 지칭한다. 용어 "*폭스바이러스*"는 엔토모폭스바이러스아과의 임의의 속의 구성원(예를 들어, 알파-엔토모폭스 바이러스, 베타-엔토모폭스 바이러스, 및 감마-엔토모폭스 바이러스)을 지칭한다.
- [0072] *아비폭스 바이러스*는 카나리아 두창 바이러스, 계두 바이러스, 미나폭스(mynahpox) 바이러스, 구두(pigeonpox) 바이러스, 및 쿠아일폭스(quailpox) 바이러스를 포함한다. *카프리카폭스 바이러스*는 양두 바이러스, 산양 두창 바이러스, 및 괴피병 바이러스를 포함한다. *레포리폭스 바이러스*는 점액종 바이러스, 쇼프(Shope) 섬유종 바이러스(또한 토끼 섬유종 바이러스로서 알려짐), 토끼(hare) 섬유종 바이러스, 및 다람쥐 섬유종 바이러스를 포함한다. *몰루시폭스 바이러스*는 무사마귀 바이러스를 포함한다. *오쏘폭스 바이러스*는 버팔로폭스 바이러스, 카멜폭스 바이러스, 우두 바이러스, 엑트로메리아바이러스, 원숭이 폭스 바이러스, 라쿤폭스 바이러스, 두창바이러스(또한 천연두 바이러스로서 알려짐), 및 백시니아 바이러스를 포함한다. 용어 "*백시니아 바이러스*"는, 예를 들어, 백시니아 바이러스-웨스턴리저브, 백시니아 바이러스-코펜하겐, 드라이악스(Dryvax)(또한 백시니아 바이러스-와이어스로서 알려짐), ACAM2000, 용모요막 백시니아 바이러스 양카라(CVA), 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA), 및 변형된 백시니아 바이러스 양카라-바바리안 노르딕("MVA-BN")을 포함하는, 야생형 백시니아 바이러스 및 임의의 다양한 약독화된 바이러스주 또는 후속적으로 단리된 단리물을 둘 다 지칭한다. *파라폭스 바이러스*는 소 구진성 구내염 바이러스, ORF 바이러스, 뉴질랜드 붉은 사슴의 파라폭스바이러스, 및 가성 우두 바이러스를 포함한다. *수이폭스 바이러스*는 돼지 폭스 바이러스를 포함한다. *야타폭스 바이러스*는 타나폭스 바이러스 및 야바 원숭이 종양 바이러스를 포함한다.
- [0073] 용어 "*변형된 백시니아 바이러스 양카라*" 또는 "*MVA*"는 닭 배아 섬유아세포에 대해 진피 백시니아 바이러스주 양카라[용모요막 백시니아 바이러스 양카라 바이러스(CVA); 검토를 위해 문헌[Mayr et al. (1975), *Infection* 3:6-14]을 참조]의 570회 이상의 연속적 계대에 의해 생성된 바이러스를 지칭한다. CVA는 여러해 동안 터키 양카라에 소재한 백신학 연구소(Vaccination Institute)에서 유지되었고, 인간의 백신접종을 위한 기반으로 사용되었다. 그러나, 종종 백시니아 바이러스와 관련된 중증의 백신접종 후 합병증 때문에, 더 약독화되고, 더 안전한 천연두 백신을 생성하기 위한 몇몇 시도가 있었다.
- [0074] 1960 내지 1974년의 기간 동안, 안톤 마이어 교수(Prof. Anton Mayr)는 CEF 세포에서 570회 초과 연속적 계대에 의해 CVA를 약독화시킴에 있어서 성공하였다[Mayr et al. (1975)]. 이는 얻어진 MVA가 독성이 없는 다양한 동물 모델에서 나타났다[Mayr, A. & Danner, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41:225-234]. 전-천연두 백신으로서 MVA의 초기 개발의 부분으로서, 중두증으로부터의 유해 반응에 대한 위협에 있는 대상체에서 리스터 엘스트리(Lister Elstree)[Stickl (1974), *Prev. Med.* 3:97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), Munich

Med. Wochenschr. 113:1149-1153]와 협동하여 MVA-517을 이용하는 임상 시험이 있었다. 1976년에, MVA-571 종축(571^{번째} 계대에 대응)으로부터 유래된 MVA는 2-단계 비경구 천연두 백신접종 프로그램에서 프라이머 백신으로서 독일에서 등록되었다. 후속적으로, 다수의 대상체가 천연두와 관련된 합병증의 고위험이 있는 집단 중에 있다고 해도, MVA-572는 중증의 부작용이 보고되지 않은 대략 120,000명의 백인 개체(대부분의 소아는 1 내지 3세)에서 사용하였다(Mayr et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol.* (B) 167:375-390). MVA-572는 ECACC V94012707로서 유럽 동물 세포 배양물 보존기관(European Collection of Animal Cell Cultures)에 기탁되었다.

[0075] MVA를 약독화시키기 위해 사용한 계대의 결과로서, CEF 세포의 계대 수에 따라서 다수의 상이한 균주 또는 단리물이 있다. 예를 들어, MVA-572는 천연두 근절 프로그램 동안 독일에서 사용되었고, MVA-575는 수의과 백신으로서 광범위하게 사용되었다. MVA-575는 유럽 동물 세포 배양물 보존기관(ECACC)에서 기탁 번호 V00120707로 2000년 12월 7일에 기탁되었다. 약독화된 CVA-바이러스 MVA(변형된 백시니아 바이러스 양카라)를 1차 닭 배아 섬유아세포에 대한 CVA의 연속적 증식(570회 초과)의 계대에 의해 얻었다.

[0076] 마이어와 동료들이 1970년대 동안 MVA는 인간과 동물에서 고도로 약독화되고 독성이 없다는 것을 입증하였음에도 불구하고, 특정 조사자들은 잔여 복제가 이들 세포에서 일어날 수 있기 때문에 MVA가 포유류 및 인간 세포에서 완전히 약독화되지 않는다는 것을 보고하였다[Blanchard et al. (1998), *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167; Carroll & Moss (1997), *Virology* 238:198-211]; 미국 특허 제5,185,146호; 문헌[Ambrosini et al. (1999), *J. Neurosci. Res.* 55: 569]. 이들 간행물에서 보고한 결과는 MVA의 다양한 공지된 바이러스주에 의해 얻어진 것으로 추정되는데, 사용된 바이러스는 그들의 특성, 특히 다양한 세포주에서의 그들의 성장 거동이 본질적으로 다르다. 이러한 잔여 복제는 인간에서의 사용과 관련하여 안전성 문제를 포함하는 다양한 문제에 대해 바람직하지 않다.

[0077] 백신 또는 약제와 같은 더 안전한 제품의 개발을 위한 안전성 프로파일의 증강된 MVA의 바이러스주가 바바리안 노르딕에 의해 개발되었다: MVA는 바바리안 노르딕에 의해 추가로 계대되었고, MVA-BN으로 표기된다. MVA뿐만 아니라 MVA-BN은 조상 CVA 바이러스에 비해 게놈의 대략 13%(주로 6개 영역으로부터 26.6 kb)를 결여한다. 결실은 다수의 독력 및 숙주 범위 유전자뿐만 아니라 A형 봉입체를 형성하는데 필요한 유전자에 영향을 미친다. 583회 계대시키는데 대응되는 MVA-BN의 샘플을 V00083008호 하에서 유럽 세포 배양물 보존기관(European Collection of Cell Cultures: ECACC)에서 2000년 8월 30일에 기탁하였다.

[0078] MVA-BN은 바이러스-암호화된 유전자가 매우 효율적으로 발견되는 경우 인간 세포에 부착 및 유입될 수 있다. 그러나, 자손 바이러스의 조립 및 방출은 일어나지 않는다. MVA-BN은 1차 닭 배아 섬유아세포(CEF) 세포에 강하게 적합하며, 인간 세포에서 복제되지 않는다. 인간 세포에서, 바이러스 유전자는 발현되고, 감염성 바이러스는 생성되지 않는다. MVA-BN은 미국의 질병관리본부(Centers for Disease Control and Prevention)에 따르면 생물안전 1등급(Biosafety Level 1) 유기체로서 분류된다. MVA-BN 및 유도체의 제조는 다수 유형의 동물에, 그리고 면역-결핍 개체를 포함하는 4000명 초과인 인간 대상체에 투여되었다. 모든 백신접종은 일반적으로 안전하고 잘 용인될 것으로 증명되었다. 그것의 높은 약동 및 감소된 독력에도 불구하고, 전임상 연구에서, MVA-BN은 종두증에 대해 그리고 MVA 게놈 내로 클로닝된 유전자에 의해 암호화된 이중성 유전자 산물에 대해 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 둘 다 유발하는 것으로 나타났다[E. Harrer et al. (2005), *Antivir. Ther.* 10(2):285-300; A. Cosma et al. (2003), *Vaccine* 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), *Hum. Gene Ther.* 14(14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10(16):5381-5390].

[0079] MVA의 용어 "유도체" 또는 "변이체"는 본 명세서에 기재된 바와 같은 MVA와 동일한 복제 특징을 본질적으로 나타내지만, 그들의 게놈의 하나 이상의 부분의 차이를 나타내는 바이러스를 지칭한다. MVA-BN뿐만 아니라 MVA-BN의 유도체 또는 변이체는 종종 면역 억제된 마우스에서조차 인간 및 마우스에서 생체내에서 생식적으로 복제하지 못한다. 더 구체적으로는, MVA-BN 또는 MVA-BN의 유도체 또는 변이체는 바람직하게는 또한 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 생식적 복제 능력을 갖지만, 인간 케라틴세포 세포주 HaCat[Boukamp et al (1988), *J. Cell. Biol.* 106: 761-771], 인간 뼈 골육종 세포주 143B(ECACC No. 91112502), 인간 배아 신장 세포주 293(ECACC No. 85120602), 및 인간 자궁경부 선암종 세포주 HeLa(ATCC No. CCL-2)에서 생식적 복제 능력이 없다. 추가적으로, MVA-BN의 유도체 또는 변이체는 바이러스 증폭비가 HeLa 세포 및 HaCaT 세포주에서의 MVA-575보다 적어도 2배 미만, 더 바람직하게는 3배 미만이다. MVA 변이체의 이들 특성을 분석하기 위한 시험 및 분석은 WO 02/42480(미국 특허 제2003/0206926호) 및 WO 03/048184(미국 특허 제2006/0159699호)에 기재되어 있으며, 이들 둘 다 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0080] 바이러스의 증폭 또는 복제는 "증폭비"로서 지칭되는 제1 위치(유입)에서 세포를 감염시키기 위해 본래 사용되

는 양에 대한 감염된 세포로부터 생성된 바이러스(산출)의 비로서 정상적으로 표현된다. 증폭비 "1"은 감염된 세포로부터 생성된 바이러스의 양이 세포를 감염시키기 위해 초기에 사용되는 양과 동일한 증폭 상태를 정의하며, 이는 바이러스 감염 및 재생성이 허용된다는 것을 의미한다. 대조적으로, 증폭비 1 미만, 즉, 유입 수준에 비한 산출의 감소는 생식적 복제의 결여를 나타내며, 따라서 바이러스의 약독화를 나타낸다.

[0081] MVA-기반 백신의 이점은 그들의 안전성 프로파일뿐만 아니라 대규모 백신 생성을 위한 이용가능성을 포함한다. 전임상 시험은 MVA-BN이 다른 MVA 바이러스주에 비해 우수한 약독화 및 효능을 입증한다는 것을 나타내었다(WO 02/42480). MVA-BN 바이러스주의 추가적인 특성은 DNA-프라임/백시니아 바이러스 부스트 요법과 비교할 때 백시니아 바이러스 프라임/백시니아 바이러스 부스트 요법에서 실질적으로 동일한 수준의 면역성을 유도하는 능력이다.

[0082] 본 명세서에서 기재되는 가장 바람직한 실시형태인 재조합 MVA-BN 바이러스는 포유류 세포 및 그들의 잘-확립된 약독화에서 그들의 별도의 복제 결핍 때문에 안전한 것으로 고려된다. 더 나아가, 그의 효능에 추가적으로, 산업적 규모 제조의 실현가능성이 유리할 수 있다. 추가적으로, MVA-기반 백신은 다중 이종성 항원을 전달할 수 있고, 체액성 면역 및 세포성 면역을 동시에 유도하게 한다.

[0083] 다른 양상에서, 재조합 바이러스를 생성하는데 적합한 MVA 바이러스주는 바이러스주 MVA-572, MVA-575 또는 임의의 유사하게 약독화된 MVA 바이러스주일 수 있다. 또한 돌연변이체 MVA, 예컨대 결실된 용모오막 *백시니아 바이러스 앙카라*(dCVA)가 적합할 수 있다. dCVA는 결실 I(del I), 결실 II(del II), 결실 III(del III), 결실 IV(del IV), 결실 V(del V) 및 결실 VI(del VI)로서 지칭되는 MVA 계통의 6개 결실 부위를 포함한다. 결실 부위는 다중 이종성 서열의 삽입에 특히 유용하다. dCVA는 인간 세포주(예컨대 인간 293, 143B, 및 MRC-5 세포주)에서 생식적으로 복제될 수 있고(10 초과 증폭비로), 이어서, 바이러스-기반 백신접종 전략에 유용한 추가적인 돌연변이 또는 약독화에 의해 최적화될 수 있다(예를 들어, WO 2011/092029 참조).

[0084] **프라임-부스트 백신접종.** 용어 "프라임-부스트 백신접종"은 특이적 항원을 표적화하는 백신의 제1의 프라이밍 주사 다음에 간격을 두고 동일한 백신 항원의 1회 이상의 부스팅 주사를 이용하는 백신접종 전략을 지칭한다. 프라임-부스트 백신접종은 백신 항원을 전달하는 백신 양상(RNA, DNA, 단백질, 벡터, 바이러스-유사 입자)에 대해 상동성 또는 이종성일 수 있다. 상동성 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 둘 다에 대해 동일한 면역원 및 벡터를 포함하는 백신을 이용한다. 이종성 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 둘 다에 대해 동일한 면역원을 포함하지만 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 둘 다에 대해 상이한 벡터를 포함하는 백신을 사용한다. 예를 들어, 상동성 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 둘 다에 대해 면역원 및 TRICOM을 발현시키는 핵산을 포함하는 MVA 벡터를 이용할 수 있다. 대조적으로, 이종성 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사에 대해 면역원 및 TRICOM을 발현시키는 핵산을 포함하는 MVA 벡터 및 하나 이상의 부스팅 주사에 대해 면역원 및 TRICOM을 발현시키는 핵산을 포함하는 계두 벡터를 사용할 수 있다. 이종성 프라임-부스트 백신접종은 또한 다양한 조합, 예를 들어 프라이밍 주사에서 면역원을 암호화하는 플라스미드의 사용 및 하나 이상의 부스팅 주사에서 동일한 면역원을 암호화하는 폭스바이러스 벡터의 사용 또는 프라이밍 주사에서 재조합 단백질 면역원의 사용 및 하나 이상의 부스팅 주사에서 동일한 단백질 면역원을 암호화하는 플라스미드 또는 폭스바이러스 벡터의 사용을 포함한다.

[0085] **재조합체; 재조합 핵산; 재조합 벡터; 재조합 폭스바이러스.** 핵산, 벡터, 폭스바이러스 등에 적용될 때, 용어 "재조합체"는 핵산 서열의 2 이상의 다른 이종성 세그먼트에 의해 만들어진 핵산, 벡터 또는 폭스바이러스, 또는 핵산 서열의 2 이상의 다른 이종성 세그먼트의 이러한 인공적 조합을 포함하는 핵산, 벡터 또는 폭스바이러스를 지칭한다. 인공적 조합은 잘 확립된 유전자 공학처리 기법을 이용하여 핵산의 단리된 세그먼트의 인공적 조작에 의해 가장 통상적으로 수반된다.

[0086] **서열 동일성.** 용어 "서열 동일성"은 핵산 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 정도를 지칭한다. 서열 동일성은 백분율 동일성(종종 서열 "유사성" 또는 "상동성"으로서 기재됨)에 대해 빈번하게 측정된다. 서열 동일성 백분율이 더 높을수록, 두 서열은 더 유사하다. 단백질 면역원의 상동체 또는 변이체는 표준 방법을 이용하여 정렬될 때 상대적으로 높은 정도의 서열 상동성을 가질 것이다.

[0087] 비교를 위해 서열을 정렬하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘은 문헌 [Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucl. Acids Res.* 16:10881, 1988; 및 Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988]에 기재되어 있다. 추가로, 문헌[Altschul et al., *Nature Genet.* 6:119, 1994]은 서열 정렬 방법 및 상동성 계산의 상세한

고려를 사항을 제시한다. NCBI 기본 지역 정렬 검색 도구(Basic Local Alignment Search Tool: BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990)는 서열 분석 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 관련된 사용을 위해, 미국 국가생물공학센터(National Center for Biotechnology Information: NCBI, Bethesda, MD; 또한 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 참조)를 포함하는 몇몇 공급원으로부터 입수가능하다.

- [0088] 단백질 면역원의 상동체 및 변이체는 전형적으로 디폴트 파라미터에 대한 blastp 설정을 이용하여 NCBI Blast v2.0으로 준비된 야생형 면역원을 아미노산 서열에 의한 전장 정렬에 걸쳐 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 동일성을 가진다. 약 30개 초과 아미노산의 아미노산 서열의 비교를 위해, 디폴트 파라미터에 대한 디폴트 BLOSUM62 매트릭스 설정을 이용하는 Blast 2 서열 기능이 사용된다 (갭 존재 코스트(cost) 11, 및 잔기 갭 당 코스트 1).
- [0089] **대상체.** 예를 들어, 인간, 비-인간 포유류 및 조류를 포함하는, 살아있는 다세포 척추동물 유기체. 용어 "대상체"는 본 명세서에서 용어 "포유류" 또는 "동물"과 상호 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0090] **T-세포.** 적응성 면역 반응에 대해 필수적인 림프구 또는 백혈구 세포. T-세포는 CD4⁺ T-세포 및 CD8⁺ T-세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. CD4⁺ T-세포는 "분화 클러스터 4"("CD4")로서 공지된 그의 표면 상에서 마커를 운반하는 면역 세포이다. 헬퍼 T-세포로서도 알려진 이들 세포는 항체와 CTL 반응을 둘 다 포함하는 면역 반응을 조직하게 한다. CD8⁺ T-세포는 "분화 클러스터 8"("CD8") 마커를 운반한다. CD8⁺ T-세포는 CTL, 기억 CTL과 억제 T-세포를 모두 포함한다.
- [0091] **치료적 활성 폴리펩타이드.** 임상 반응(예를 들어, CD4⁺ T-세포, CD8⁺ T-세포, 또는 B-세포의 증가, 단백질 발현 수준의 증가, 종양 크기의 측정가능한 감소 또는 전이 수의 감소)에 의해 측정되는 바와 같은 생물학적 효과 및/또는 적응성 면역 반응을 유도하는 단백질과 같은 아미노산으로 구성되는 작용제. 치료적 활성 분자는 또한, 예를 들어, 발현 제어 서열에 대해 작동가능하게 연결된 단백질 또는 단백질 면역원을 암호화하는 핵산을 포함하는 폭스바이러스 벡터와 같은 핵산으로부터 이루어질 수 있다.
- [0092] **치료적 유효량.** "치료적 유효량"은 치료될 대상체에서 목적으로 하는 치료적 또는 임상적 효과를 달성하기에 충분한 조성물 또는 세포의 양이다. 예를 들어, 발현 제어 서열에 대해 작동가능하게 연결된 단백질 또는 단백질 면역원을 암호화하는 핵산을 포함하는 폭스바이러스 벡터의 치료적 유효량은 생물학적 반응 또는 항원-특이적 면역반응을 유발하거나, 또는 질환 또는 장애를 갖는 환자 또는 환자의 집단에서 감염성 또는 다른 질환의 임상 징후 또는 증상을 감소 또는 제거하는데 충분한 양이다. 본 명세서에 제공된 폭스바이러스 벡터 및 폭스바이러스 벡터를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은 표적 항원을 발현시키는 세포에 대해 면역 반응을 일으키는데 충분한 양이다. 면역 반응은 표적화된 장애를 갖는 환자 또는 환자의 집단에서 질환의 임상 징후 또는 증상을 감소 또는 제거하기에 충분한 규모를 가져야 한다.
- [0093] **형질도입 또는 형질전환된.** 용어 "형질도입된" 또는 "형질전환된"은 재조합 핵산이 표준 분자 생물학적 방법에 의해 도입되는 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 형질도입은 핵산 분자가 바이러스 벡터에 의한 감염, 플라스미드 벡터에 의한 형질전환, 및 전기천공법, 리포펙션 또는 입자총 가속화에 의한 네이키드 DNA 도입을 포함하여 이러한 세포 내로 도입될 수 있는 모든 기법을 포함한다.
- [0094] **TRICOM.** 항원-특이적 면역 반응을 증가시키기 위해 특이적 항원을 발현시키는 재조합 바이러스 벡터(예를 들어, 폭스바이러스 벡터)에 통상적으로 포함되는, B7-1(또한 CD80로서 알려짐), 세포내 부착 분자-1(ICAM-1, 또한 CD54로서 알려짐) 및 림프구 기능-관련 항원-3(LFA-3, 또한 CD58로서 알려짐)으로 이루어진 공자극 분자의 3요소(Triad of Costimulatory Molecules). TRICOM의 개개 구성성분은 동일 또는 상이한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있고, 특이적 항원과 함께 동일한 벡터 상에서, 또는 별개의 벡터 상에서 제공될 수 있다. 예시적인 벡터는, 예를 들어, 문헌[Hodge et al., "A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation," *Cancer Res.* 59:5800-5807 (1999)] 및 미국 특허 제7,211,432 B2호에 개시되어 있으며, 이들 둘 다 본 명세서에 참고로서 포함된다.
- [0095] **벡터.** 숙주 세포 내로 관심 대상의 핵산 분자를 도입함으로써 형질도입 또는 형질전환된 숙주 세포를 생성하는 담체. 벡터는 일반적으로 숙주 세포 내에서 그들이 복제되게 할 수 있는 핵산, 예컨대 복제기점뿐만 아니라 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자, 발현 제어 서열, 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열, 프라이머 서열 및 당업계에 공지된 다양한 다른 유전자 구성요소를 포함한다. 통상적으로 사용된 벡터 유형은 박테리아(예를 들어, 이콜

라이(*E. coli*) 또는 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비시애(*S. cerevisiae*))에서 발현을 위한 플라스미드, 재조합 폭스바이러스를 구성하기 위한 서플렉스 벡터, 코스미드, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체 및 바이러스 벡터를 포함한다. 바이러스 벡터는 특히 폭스바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 바콜로바이러스 벡터, 신드비스 바이러스 벡터 및 폴리오바이러스 벡터를 포함한다.

[0096] 폭스바이러스 벡터는 오쏘폭스 바이러스, 아비폭스 바이러스, 파라폭스 바이러스, 야타폭스 바이러스, 및 몰루시폭스 바이러스, 바람직하게는 상기에 더 상세하게 정의한 바와 같은 오쏘폭스 및/또는 아비폭스 바이러스를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 오쏘폭스 바이러스는 두창바이러스(또한 천연두 바이러스로서 알려짐), 백시니아 바이러스, 우두 바이러스, 및 원숭이 폭스 바이러스를 포함한다. 아비폭스 바이러스는 카나리아 두창 바이러스 및 계두 바이러스를 포함한다. 용어 "백시니아 바이러스"는 야생형 백시니아 바이러스와, 예를 들어, 백시니아 바이러스-웨스턴리저브, 백시니아 바이러스-코펜하겐, 드라이악스(또한 백시니아 바이러스-와이어스로서 알려짐), ACAM2000, 변형된 백시니아 바이러스 양카라("MVA"), 및 변형된 백시니아 바이러스 양카라-바바리안 노르딕("MVA-BN")을 포함하는 임의의 다양한 약독화 바이러스주 또는 후속적으로 단리된 단리물을 모두 지칭한다.

[0097] **재조합 폭스바이러스**

[0098] 일 양상에서, 본 명세서에서 초기 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스가 제공된다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 감염 후 1 또는 2시간 내에 과량의 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에서 상기 재조합 폭스바이러스의 게놈 복제 전에 초기 또는 과량의 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스가 제공된다. 특정 실시형태에서, 감염 후 1 또는 2시간 내에 초기 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 가닥 둘 다 초기 dsRNA를 생성하도록 전사되는 단일 이중성 핵산을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 초기 전사 천연 폭스바이러스 유전자의 초기 안티센스 전사를 지시하고, 따라서 초기 dsRNA를 발현시키는 추가적인 프로모터를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 초기 dsRNA를 생성하는 재조합 폭스바이러스는 이중성 질환-연관 항원을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 하나 이상의 공자극 분자를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 공자극 분자는 TRICOM(즉, B7-1, ICAM-1 및 LFA-3)이다. 특정 실시형태에서, 이중성 질환-연관 항원은 감염성 질환-연관 항원 또는 중앙-연관 항원이다. 특정 실시형태에서, 이중성 질환-연관 항원은 감염성 질환 항원이다. 특정 실시형태에서, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원, 또는 기생충 항원이다.

[0099] 특정 실시형태에서, 감염성 질환 항원은 바이러스 항원이다. 특정 실시형태에서, 바이러스 항원은 아데노바이러스, 콕사키바이러스, 크립-콩고 출혈열 바이러스, 거대세포바이러스(CMV), 뎅기열 바이러스, 에볼라 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스(EBV), 과나리토 바이러스, 단순 포진 바이러스-1형(HSV-1), 단순 포진 바이러스-2(HSV-2), 인간 헤르페스 바이러스-8형(HHV-8), A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV), E형 간염 바이러스(HEV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인플루엔자 바이러스, 주니 바이러스, 라싸 바이러스, 마추포 바이러스, 마부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 볼거리 바이러스, 노워크 바이러스, 인유두종바이러스(HPV), 파라인플루엔자 바이러스, 파보바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 리노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 사비아 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 및 황열 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스로부터 유래된다.

[0100] 특정 실시형태에서, 감염성 질환 항원은 박테리아 항원이다. 특정 실시형태에서, 박테리아 항원은 바실러스 안트라시스, 보르데텔라 페르투스, 보렐리아 부르그도르페리, 브루셀라 아보르투스, 브루셀라 카니스, 브루셀라 멜리텐시스, 브루셀라 수이스, 캄필로박터 제주니, 클라미디아 뉴모니에, 클라미디아 트라코마티스, 클라미도필라 시타시, 클로스트리듐 보툴리눔, 클로스트리듐 디피실, 클로스트리듐 퍼프린젠스, 클로스트리듐 테타니, 코리네박테리움 디프테리예, 엔테로코커스 파에칼리스, 엔테로코커스 파에시움, 에스케리키아 콜라이, 장독소성 에스케리키아 콜라이, 장병원성 에스케리키아 콜라이, 에스케리키아 콜라이 157:H7, 프란시셀라 투라렌시스, 헤모필루스 인플루엔자, 헬리코박터 파일로리, 레지오넬라 뉴모필라, 렙토스피라 인테로간스, 리스테리아 모노사이토게네스, 마이코박테리움 레프라에, 마이코박테리움 투베르쿨로시스, 마이코플라스마 뉴모니에, 네이세리아 고노로이예, 네이세리아 메닝기티데스, 슈도모나스 아에루기노사, 리케차 리케차, 살모넬라 티피, 살모넬라 티피무리움, 쉬겔라 손네이, 스타필로코커스 아우레우스, 스타필로코커스 에피테르미디스, 스타필로코커스 사프로

피티쿠스, 스타필로코커스 아갈락티에, 스타필로코커스 뉴모니에, 스타필로코커스 피오게네스, 트레포네마 팔리둠, 비브리오 콜레라에 및 예르시니아 페스티스로 이루어진 균으로부터 선택된 박테리아로부터 유래된다.

[0101] 특정 실시형태에서, 감염성 질환 항원은 진균 항원이다. 특정 실시형태에서, 진균 항원은 아스퍼질러스 클라바투스, 아스퍼질러스 플라부스, 아스퍼질러스 푸미가투스, 아스퍼질러스 니들란스, 아스퍼질러스 니저, 아스퍼질러스 테레우스, 블라스토마이세스 더마티디스, 칸디다 알비칸스, 칸디다 두블리니엔시스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 파라프실로시스, 칸디다 루고사, 칸디다 트로피칼리스, 크립토코커스 알비두스, 크립토코커스 가티, 크립토코커스 라우렌티, 크립토코커스 네오포르만스, 히스토플라스마 캡슐라툼, 마이코스포룸 카니스, 뉴모시스티스 카리니, 뉴모시스티스 이베로지, 스포트릭스 쉐키, 스타치보트리 차르타툼, 티네아 바르바에, 티네아 카프티티스, 티네아 코르포리스, 티네아 크루리스, 티네아 파시에이, 티네아 인코그니토, 티네아 니그라, 티네아 베르시컬러, 트리코피툼 루브룸 및 트리코피툼 톤수란스로 이루어진 균으로부터 선택된 진균으로부터 유래된다.

[0102] 특정 실시형태에서, 감염성 질환 항원은 기생충 항원이다. 특정 실시형태에서, 기생충 항원은 아니사키스 종 바베시아 종, 베이리사카리스 프로시오니스, 크립토스포리디움 종, 사이클로스포라 카예타넨시스, 디필로보트리움 종, 드라쿰쿨루스 메디넨시스, 엔타모에바 히스틀리티카, 지아르디아 듀오데날리스, 지아르디아 인테스티날리스, 지아르디아 람블리아, 레이쉬마니아 종, 플라스모듐 팔시파룸, 쉬스토소마 만소니, 쉬스토소마 하에마토비움, 쉬스토소마 자포니쿰, 타에니아 종, 톡소플라스마 곤디, 트리키넬라 스피랄리스 및 트리파노소마 크루지오 이루어진 균으로부터 선택되는 기생충으로부터 유래된다.

[0103] 특정 실시형태에서, 이종성 질환-연관 항원은 종양-연관 항원이다. 특정 실시형태에서, 종양-연관 항원은 5- α -환원효소, α -태아단백질(AFP), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자(BAGE), β -카테닌, Bcl12, bcr-ab1, 브라큐리, CA-125, 카스파제-8(FLICE로서도 알려진 CASP-8), 카텡신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2(CR2), CD22/BL-CAM, CD23/Fc ϵ R II, CD33, CD35/보체 수용체 1(CR1), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원(LCA), CD46/막 보조인자 단백질(MCP), CD52/CAMPATH-1, CD55/붕괴 촉진 인자 (DAF), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 태아성 암 항원(CEA), c-myc, 사이클로옥시게나제-2(cox-2), 직장결장암 유전자에서의 결실(DCC), Dcr3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파르네실 트랜스퍼라제, 섬유아세포 성장인자-8a(FGF8a), 섬유아세포 성장인자-8b(FGF8b), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리(GAGE-패밀리), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 강글리오사이드 2(GD2)/강글리오사이드 3(GD3)/강글리오사이드-모노시알산-2(GM2), 성선자극호르몬 방출 호르몬(GnRH), UDP-GlcNAc:R1Man(α 1-6)R2[Man(α 1-6)]에 대해 GlcNAc; β 1,6-N-아세틸글루쿠사미닐트랜스퍼라제 V(GnT V), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/타이로신-관련 단백질-1(gp75/TRP-1), 인간 용모막성 성선자극호르몬(hCG), 헤파라나제, Her2/neu, 인간 유방 종양 바이러스(HMTV), 70 킬로달톤 열-충격 단백질(HSP70), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 인슐린-유사 성장 인자 수용체-1(IGFR-1), 인터튜킨-13 수용체(IL-13R), 유도성 산화질소 합성효소(iNOS), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-암호화 유전자 1(MAGE-1), 흑색종 항원-암호화 유전자 2(MAGE-2), 흑색종 항원-암호화 유전자 3(MAGE-3), 흑색종 항원-암호화 유전자 4(MAGE-4), 맘마글로빈, MAP17, T-세포-1에 의해 인식되는 멜란-A/흑색종 항원(MART-1), 메소텔린, MIC A/B, MT-MMPs, 뮤신, 교환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), μ PA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이에틴, 전립선-특이적 항원(PSA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파(TGF- α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF- β), 티모신-베타-15, 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), TP1, TRP-2, 티로시나제, 혈관내피 성장 인자(VEGF), ZAG, p16INK4, 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)로 이루어진 균으로부터 선택된다.

[0104] 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 서브패밀리 초르도폭스바이러스아과 또는 서브패밀리 엔토모폭스바이러스아과의 구성원이다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 서브패밀리 초르도폭스바이러스아과의 구성원이다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 아비폭스 바이러스, 카프리폭스 바이러스, 레포리폭스 바이러스, 몰루시폭스 바이러스, 오쏘폭스 바이러스, 파라폭스 바이러스, 수이폭스바이러스, 및 야타폭스 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택된 초르도폭스바이러스아과 속의 구성원이다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 아비폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 아비폭스 바이러스는 카나리아 두창 바이러스, 계두 바이러스, 마이나폭스 바이러스, 구두 바이러스, 및 쿠아일폭스 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 카프리폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 카프리폭스 바이러스는 양두 바이러스, 산양 두창 바이러스, 및 괴피병 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 레포리폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 레포리폭스 바이러스는 점액종 바이러스, 쇼프 섬유종 바이러스(또한 토끼 섬유종 바이러스로서 알려짐), 토끼 섬유종 바이러스, 및 다람쥐 섬유종 바이러스

스로 이루어진 균으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 몰루시폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 몰루시폭스 바이러스는 무사마귀 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 오쏘폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 오쏘폭스 바이러스는 베타로폭스 바이러스, 카멜폭스 바이러스, 우두 바이러스, 엑트로메리아바이러스, 원숭이 폭스 바이러스, 라쿤폭스 바이러스, 두창바이러스(천연두 바이러스로서도 알려짐), 및 백시니아 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 오쏘폭스 바이러스는 백시니아 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 백시니아 바이러스는 백시니아 바이러스-웨스턴리저브, 백시니아 바이러스-코펜하겐, 드라이웍스(백시니아 바이러스-와이어스로서도 알려짐), ACAM2000, 용모요막 백시니아 바이러스 앙카라("CVA"), 변형된 백시니아 바이러스 앙카라("MVA"), 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라-마바리안 노르딕("MVA-BN")로 이루어진 균으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 파라폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 파라폭스 바이러스는 소 구진성 구내염 바이러스, ORF 바이러스, 뉴질랜드 붉은 사슴의 파라폭스바이러스 및 가성 우두 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 수이폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 수이폭스 바이러스는 돼지 폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 재조합 폭스바이러스는 야타폭스 바이러스이다. 특정 실시형태에서, 야타폭스 바이러스는 타나폭스 바이러스 및 야마 원숭이 종양 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택된다.

[0105] 특정 실시형태에서, 초기 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산은 상보적 RNA 전사체를 암호화하는 서열을 포함하되, 상보적 RNA 전사체는 dsRNA를 생성하기 위한 전사 후에 어닐링된다. 특정 실시형태에서, 상보적 RNA 전사체는 단백질-암호화 오픈 리딩 프레임(ORF) 또는 비-단백질-암호화 유전자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상보적 RNA 전사체 또는 RNA 전사체의 상보적 부분은 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000개의 뉴클레오타이드만큼 중복된다. 특정 실시형태에서, 상보적 RNA 전사체는 50개 초과, 100개 초과, 150개 초과, 200개 초과, 250개 초과, 300개 초과, 350개 초과, 400개 초과, 450개 초과, 500개 초과, 550개 초과, 600개 초과, 650개 초과, 700개 초과, 750개 초과, 800개 초과, 850개 초과, 900개 초과, 950개 초과, 또는 1000개 초과 뉴클레오타이드만큼 중복된다. 특정 실시형태에서, 상보적 RNA 전사체는 100 내지 1000개, 200 내지 1000개, 300 내지 1000개, 400 내지 1000개, 500 내지 1000개, 600 내지 1000개, 700 내지 1000개, 800 내지 1000개, 900 내지 1000개, 200 내지 900개, 300 내지 800개, 400 내지 700개, 300 내지 750개, 300 내지 730개 또는 500 내지 600개 뉴클레오타이드만큼 중복된다.

[0106] 특정 실시형태에서, 이중성 핵산은 상보적 핵산 또는 상보적 서열, 바람직하게는 50, 60, 70, 80, 90, 100% 상보적 서열을 지니는 RNA로 전사된다. 특정 실시형태에서, 상보적 RNA 전사체를 암호화하는 이중성 핵산은 두 상보적 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상보적 서열은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자 또는 비-상보적 핵산에 의해 분리된다. 특정 실시형태에서, 상보적 전사체를 부분적으로 또는 완전히 암호화하는 동일 또는 고도로 유사한 서열은 하나 이상의 필수적 바이러스 유전자에 의해 분리된다. 특정 실시형태에서, 상보적 RNA 전사체를 암호화하는 이중성 핵산은 별도의 전사체 또는 핵산 상에서 2개의 상보적 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 센스 전령 RNA(mRNA)는 하나의 상보적 서열로부터 전사되고, 안티-센스 mRNA는 다른 상보적 서열로부터 전사된다. 특정 실시형태에서, 센스 전령 RNA(mRNA)는 2개의 동일 또는 고도로 유사한 서열 중 하나로부터 전사되고, 안티-센스 mRNA는 다른 동일 또는 고도로 유사한 서열로부터 전사된다. 특정 실시형태에서, 중복되는 상보적 RNA 전사체를 암호화하는 서열의 발현은 하나 이상의 폭스바이러스 프로모터에 의해 지시된다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 폭스바이러스 프로모터는 초기 프로모터 또는 급속초기 프로모터이다.

[0107] 특정 실시형태에서, 상보적 RNA 전사체 또는 RNA 전사체의 일부는 상이한 핵산 분자 상에서 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, RNA 전사체의 상보적 부분은 짧은 신장, 예를 들어, 21 내지 23개의 염기쌍의 siRNA 또는 상보적 RNA 전사체가 아닌 핵산을 포함한다.

[0108] 특정 실시형태에서, 폭스바이러스 프로모터는 초기 프로모터이다. 특정 실시형태에서, 초기 프로모터는 Pr7.5 프로모터, 및 PrS 프로모터로 이루어진 균으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 폭스바이러스 프로모터는 급속초기 프로모터이다. 특정 실시형태에서, 급속초기 프로모터는 I3L 프로모터, 30K 프로모터, 40K 프로모터, PrHyb 프로모터, PrS5E 프로모터, Pr4LS5E 프로모터, 및 Pr13.5-길이 프로모터로 이루어진 균으로부터 선택된다.

[0109] **조성물**

[0110] 다른 양상에서, 본 명세서에 제공된 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 임의의 재조합 폭스 바이러스, 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 면역원성 조성물이 본 명세서에서 제공된다. 특정 실시형태에서, 면역원성 조성물은 본 명세서에 제공된 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵

산을 포함하는 임의의 재조합 폭스바이러스를 포함하고, 본 명세서에 제공된 임의의 이중성 질환-연관 항원을 암호화하는 핵산 서열 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0111] 다른 양상에서, 본 명세서에서 본 명세서에 제공된 초기 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 임의의 재조합 폭스바이러스 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 제공된 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산을 포함하는 임의의 재조합 폭스바이러스를 포함하고, 본 명세서에 제공된 임의의 이중성 질환-연관 항원을 암호화하는 핵산 서열 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0112] 본 명세서에 제공된 면역원성 조성물 및 약제학적 조성물을 제조하기 위해 사용되는 재조합 폭스바이러스는 농도 범위가 10^4 내지 10^9 TCID₅₀/mL, 10^5 내지 5×10^8 TCID₅₀/mL, 10^6 내지 10^8 TCID₅₀/mL, 또는 10^7 내지 10^8 TCID₅₀/mL인 재조합 폭스바이러스 입자의 현탁액 또는 용액을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조성물은 10^6 내지 10^9 TCID₅₀를 포함하거나, 또는 10^6 TCID₅₀, 10^7 TCID₅₀, 10^8 TCID₅₀ 또는 5×10^8 TCID₅₀를 포함하는 단일 용량으로서 제형화된다. 본 명세서에 개시된 재조합 폭스바이러스는, 예를 들어, 문헌[H. Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99:2386-2392 (1974)]에 의해 기재된 바와 같은 천연두에 대한 백신접종을 위해 사용되는 폭스바이러스 백신 제조의 경험을 기반으로 한 생리학적으로 허용가능한 형태로 제공된다. 예를 들어, 정제된 폭스바이러스는 -80°C 에서 5×10^8 TCID₅₀/mL의 역가에서 저장되고, pH 7.7에서 약 10 mM 트리스, 140mM NaCl에서 제형화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 폭스바이러스 제제, 예를 들어, 10^2 내지 10^8 또는 10^2 내지 10^9 폭스바이러스 입자는 2%(w/v) 캡톤 및 1%(w/v) 인간 혈청 알부민(HSA)의 존재 하에 100mL의 인산염 완충 식염수(PBS) 중에서 동결건조되고, 유리 또는 다른 적합한 물질로 이루어진 앰플 내에 저장될 수 있다.

[0113] 대안적으로, 냉동-건조된 폭스바이러스 입자 제제는, 예를 들어, 10mM 트리스, 140mM NaCl, pH 7.7, 또는 PBS + 2%(w/v) 캡톤 및 1%(w/v) HSA과 같은 용액 중에서 제형화된 폭스바이러스 입자의 현탁액의 단계적 냉동-건조에 의해 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 용액은 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 하나 이상의 추가적인 첨가제를 함유한다. 특정 실시형태에서, 상기 용액은 생체내 투여에 적합한 다른 보조제, 예컨대 항산화제 또는 비활성 기체, 안정제 또는 재조합 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민, 또는 HSA)를 함유한다. 이어서, 용액은, 예를 들어 유리 앰플과 같은 적절한 저장 용기 내로 분취되고 나서, 저장 용기는 밀봉된다. 특정 실시형태에서, 면역원성 및/또는 약제학적 조성물은 수 개월 동안 4°C 내지 실온의 온도에서 저장된다. 특정 실시형태에서, 저장 용기는 -20°C 미만, -40°C 미만, -60°C 미만, 또는 -80°C 미만의 온도에서 저장된다.

[0114] 특정 실시형태에서, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 하나 이상의 첨가제, 항생제, 보존제, 에주번트, 희석제 및/또는 안정제를 포함한다. 이러한 보조 물질은 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등일 수 있다. 일반적으로, 사용되는 담체의 특성은 사용 중인 특정 투여 방식에 의존한다. 예를 들어, 비경구 제제는 보통 비히클로서 약제학적으로 그리고 생리학적으로 허용가능한 유체, 예컨대 물, 생리 식염수, 평형염류용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등을 포함하는 주사용 유체를 포함한다. 적합한 담체는 전형적으로 거대한, 서서히 대사되는 분자, 예컨대 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집물 등이다.

[0115] **방법 및 용도**

[0116] 다른 양상에서, 본 명세서에서 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물 또는 재조합 폭스바이러스 중 임의의 하나를 선천성 면역 활성화의 증강이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 선천성 면역 활성화의 증강 방법이 제공되며, 약제학적 조성물 또는 재조합 폭스바이러스는 대상체에게 투여될 때 선천성 면역 활성화를 증강시킨다. 다른 양상에서, 본 명세서에서 폭스바이러스에 의해 매개되거나 또는 이중성 질환-연관 항원에 의해 매개되는 병태의 치료 또는 예방을 위한 의학의 제조에서 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물 또는 재조합 폭스바이러스 중 임의의 하나의 용도가 제공된다. 다른 양상에서, 본 명세서에서 의학으로서 사용하기 위한 폭스바이러스 또는 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물 중 임의의 하나가 제공된다. 다른 양상에서, 본 명세서에서 선천성 면역 활성화를 증강시킴에 있어서 사용하기 위한 또는 폭스바이러스에 의해 매개되거나 또는 이중성 질환-연관 항원에 의해 매개된 병태의 치료 또는 예방을 위한 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물 중 임의의 하나의 폭스바이러스가 제공된다. 다른 양상에서, 본 명세서에서 폭스바이러스에 의해 매개되거나 또는 이중성 질환-연

관 항원에 의해 매개된 병태의 치료 또는 예방을 위한 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물 중 임의의 하나의 용도가 제공된다. 특정 실시형태에서, 대상체는 척추동물이다. 특정 실시형태에서, 척추동물은 포유류이다. 특정 실시형태에서, 포유류는 인간이다.

[0117] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 이중성 질환-연관 항원을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 임의의 약제학적 조성물은 대상체에 투여될 때, (재조합 폭스바이러스가 이중성 질환-연관 항원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하든 아니든) 과량의 초기 dsRNA를 발현시키는 이중성 핵산이 없는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 동일한 약제학적 조성물에 비해 선천성 면역 활성화를 향상시킨다. 특정 실시형태에서, 대상체는 척추동물이다. 특정 실시형태에서, 척추동물은 포유류이다. 특정 실시형태에서, 포유류는 인간이다.

[0118] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 약제학적 조성물은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 투여 경로에 의해 대상체에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 동결건조물로서 제공된다. 특정 실시형태에서, 동결건조물은 수용액 중에 용해된다. 특정 실시형태에서, 수용액은 생리 식염수, 인산염 완충 식염수, 또는 생리적 pH에서 트리스 완충제이다. 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 전신으로 투여된다. 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 국소로 투여된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 약제학적 조성물은 피하로, 정맥내로, 근육내로, 피부 내로, 비강내, 경구로, 국소로, 비강내로 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 투여 경로에 의해 투여된다. 투여 경로, 용량 및 치료 프로토콜은 당업자에 의해 최적화될 수 있다.

[0119] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 약제학적 조성물은 단일 용량에서 대상체에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 약제학적 조성물은 다회 용량으로 대상체에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 임의의 약제학적 조성물은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25회 이상의 용량으로 대상체에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 약제학적 조성물은 제1 프라이밍 용량 다음에 하나 이상의 추가적인 부스팅 용량의 투여로 투여된다(즉, '프라이밍-부스트' 백신접종 프로토콜에 의해 투여됨). 특정 실시형태에서, '프라이밍-부스트' 백신접종 프로토콜은 상동성 프라이밍-부스트 프로토콜이다. 특정 실시형태에서, '프라이밍-부스트' 프로토콜은 이중성 프라이밍-부스트 프로토콜이다. 특정 실시형태에서, 제1 또는 프라이밍 용량은 본 명세서에 제공된 임의의 재조합 폭스바이러스의 10^7 내지 10^8 TCID₅₀을 포함하는, 본 명세서에 제공된 임의의 약제학적 조성물의 용량을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 및 후속적 부스팅 용량은 본 명세서에 제공된 임의의 재조합 폭스바이러스의 10^7 내지 10^8 TCID₅₀을 포함하는, 본 명세서에 제공된 임의의 약제학적 조성물의 용량을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 또는 부스팅 용량은 제1 또는 프라이밍 용량 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 이상에 투여된다. 특정 실시형태에서, 제2 또는 부스팅 용량은 제1 또는 프라이밍 용량 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12주 이상에 투여된다. 특정 실시형태에서, 제2 또는 부스팅 용량은 제1 또는 프라이밍 용량 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월에 투여된다. 특정 실시형태에서, 제2 또는 부스팅 용량은 제1 또는 프라이밍 용량 후 1, 2, 3, 4, 5년 이상에 투여된다. 특정 실시형태에서, 후속적 부스팅 용량은 제1 부스팅 용량 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 이상에 투여된다. 특정 실시형태에서, 후속적 부스팅 용량은 제1 부스팅 용량 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12주 이상에 투여된다. 특정 실시형태에서, 후속적 부스팅 용량은 제1 부스팅 용량 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 이상에 투여된다. 특정 실시형태에서, 후속적 부스팅 용량은 제1 부스팅 용량 후 1, 2, 3, 4, 5개월 이상에 투여된다.

[0120] 특정 실시형태에서, 증강된 선천성 면역 반응은 I형 인터페론(I형 IFN), 사이토카인 및 케모카인의 증강된 생성을 포함한다.

[0121] 특정 실시형태에서, 증강된 선천성 면역 반응은 I형 IFN의 증강된 생성을 포함한다. 특정 실시형태에서, I형 IFN의 증강된 생성은 인터페론-베타(IFN-β)-암호화 전령 RNA(mRNA)의 증강된 전사를 포함한다. 특정 실시형태에서, IFN-β-암호화 mRNA의 전사는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, I형 IFN의 증강된 생성은 IFN-β-단백질의 증강된 분비를 포함한다. 특정 실시형태에서, IFN-β-단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0122] 특정 실시형태에서, I형 IFN의 증강된 생성은 인터페론-알파(IFN-α)-암호화 mRNA의 증강된 전사를 포함하고, IFN-α-암호화 mRNA의 전사는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-

배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, I형 IFN의 증강된 생성은 IFN- α -단백질의 증강된 분비를 포함하며, IFN- α -단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0123] 특정 실시형태에서, I형 IFN의 증강된 생성은 인터페론-감마(IFN- γ)-암호화 mRNA의 증강된 전사를 포함하고, IFN- γ -암호화 mRNA의 전사는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, I형 IFN의 증강된 생성은 IFN- α -단백질의 증강된 분비를 포함하고, IFN- γ -단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0124] 특정 실시형태에서, 증강된 선천성 면역 반응은 사이토카인의 증강된 생성을 포함한다. 특정 실시형태에서, 사이토카인의 증강된 생성은 인터류킨-6(IL-6)-암호화 mRNA의 증강된 전사를 포함하고, IL-6-암호화 mRNA의 전사는 적어도 1.8-배, 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, 사이토카인의 증강된 생성은 IL-6-단백질의 증강된 분비를 포함하고, IL-6-단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0125] 특정 실시형태에서, 사이토카인의 증강된 생성은 인터류킨-18(IL-18)-암호화 mRNA의 증강된 전사를 포함하고, IL-18-암호화 mRNA의 전사는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, 사이토카인의 증강된 생성은 IL-18-단백질의 증강된 분비를 포함하고, IL-18-단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0126] 특정 실시형태에서, 증강된 선천성 면역 반응은 케모카인의 증강된 생성을 포함한다. 특정 실시형태에서, 케모카인의 증강된 생성은 CXCL1-암호화 mRNA의 증강된 전사를 포함하고, CXCL1-암호화 mRNA의 전사는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, 케모카인의 증강된 생성은 CXCL1-단백질의 증강된 분비를 포함하고, CXCL1-단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0127] 특정 실시형태에서, 케모카인의 증강된 생성은 CCL2-암호화 mRNA의 증강된 전사를 포함하고, CCL2-암호화 mRNA의 전사는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, 케모카인의 증강된 생성은 CCL2-단백질의 증강된 분비를 포함하고, CCL2-단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0128] 특정 실시형태에서, 케모카인의 증강된 생성은 CCL5-암호화 mRNA의 증강된 전사를 포함하고, CCL5-암호화 mRNA의 전사는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다. 특정 실시형태에서, 케모카인의 증강된 생성은 CCL5-단백질의 증강된 분비를 포함하고, CCL5-단백질의 분비는 적어도 2-배, 적어도 4-배, 적어도 6-배, 적어도 8-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배 이상만큼 증가된다.

[0129] **실시예**

[0130] **실시예 1: B15가 없고 추가적인 *neo^r* 카세트를 함유하는 CVA 돌연변이체를 고도로 약독화시킨다**

[0131] 본 발명자들은 박테리아 인공 염색체(BAC)로서 클로닝한 CVA 게놈에 기반한 재조합 시스템을 이용하여 고도로 약독화된 CVA 돌연변이체를 동정하였고, 여기서 *neo/rpsL* 카세트는 CVA-BAC의 돌연변이유발 동안 양성/음성 선택 목적을 작용을 하였다(Meisinger-Henschel et al., 2010). CVA 야생형 바이러스는 ORF I3L과 I4L 사이의 유전자간 영역에서 BAC 제어 서열 및 추가적인 마커를 함유하여 박테리아 내 BAC로서 원형으로된 게놈을 증식시켰

다. 이들 서열은 폭스바이러스 pS 프로모터 하에서 발현된 폭스바이러스 pS 프로모터 하에서 발현된 *neo-IRES-EGFP* 카세트를 포함한다. 이 BAC-유래 CVA는 야생형 플라크-정제 CVA와 구별되지 않는 특성을 가진다는 것은 이미 입증되었다(Meisinger 2010). 따라서 BAC-유래 CVA는 야생형 CVA와 구별되지 않는 것으로 고려하며, 이하의 실시예에서 CVA wt로서 지칭한다.

[0132] 놀랍게도, B15R ORF 대신에 *neo/rpsL* 선택 카세트를 보유하는 돌연변이체 CVA(CVA-*dsneo*- Δ B15, 도 1 참조)를 BALB/c 마우스의 비강내 감염 시 고도로 약독화시킨 한편, *neo/rpsL* 선택 카세트가 없는 CVA- Δ B15 결실 돌연변이체를 단지 적당히 약독화시켰다(도 2A). 5×10^7 TCID₅₀의 용량을 지니는 마우스의 비강내 접종 후 조차, CVA-*dsneo*- Δ B15는 검출가능한 체중 손실(도 2A 및 도 2B)을 야기하지 않았고, 다른 질환 증상(데이터 미제시)을 야기하지 않는 반면, 야생형 CVA는 이 용량에서 대부분 치명적이다(도 2A 및 도 2B). B15R의 CVA 형태를 B15R의 MVA 형태로 대체하였을 때, 뒤이은 돌연변이체 CVA-B15_{MVA}의 약독화는 또한 중간이며(도 2B), CVA- Δ B15에 대해 관찰한 약독화와 비슷하였다(도 2B). B15 단백질은 그의 CVA 상동체보다 SDS-PAGE에서 약간 더 빠르게 이동된 CVA-B15_{MVA}에 의해 발현시켜서, CVA-B15_{MVA}가 6종의 아미노산이 없는 MVA로부터 유래된 적절한 B15 형태를 발현시켰다는 것을 확인하였다(데이터 미제시). 이들 결과는 6종의 아미노산의 신장의 내부 결실이 있는 B15의 MVA 형태가 비기능적이라는 최근에 공개된 관찰과 일치된다(McCoy et al. (2010), *J. Gen. Virol.* **91**:2216-2220). 따라서, CVA-B15_{MVA}는 대부분 B15 삭제 돌연변이체를 나타낼 가능성이 있다.

[0133] 백시니아 바이러스 약독화를 위한 기준으로서, 본 발명자들은 오소폭스바이러스의 분비된 IFN I형 수용체를 암호화하는 B19R 유전자를 결실시켰다. CVA- Δ B19는 CVA- Δ B15보다 약간 더 약독화되었지만, CVA-*dsneo*- Δ B15보다 상당히 더 적게 약독화되었다(도 2B).

[0134] 마우스의 폐에서 감염성 바이러스 역가를 1×10^7 TCID₅₀의 용량으로 비강내 감염시킨 후 분석하였다. CVA-*dsneo*- Δ B15로 감염시킨 마우스는 감염 후 6일에 폐에서 1×10^4 TCID₅₀ 미만의 매우 낮은 바이러스 역가를 나타낸 반면, CVA-감염 마우스의 폐에서 바이러스 역가는 1×10^7 TCID₅₀을 초과하였다(도 2C, 스튜던트 t검정에 의해 $p < 0.001$). CVA- Δ B19 및 CVA-B15_{MVA}로 감염시킨 마우스의 폐 내의 바이러스 역가는 CVA의 바이러스 역가에 비해 대략 10배만큼 감소되었는데($p < 0.001$)(도 2C), 이는 이들 바이러스의 감소되었지만 여전히 상당한 병원성을 반영한다(도 2B). 따라서, 비강내 감염 후 폐 내에서 감염성 바이러스 역가는 CVA 돌연변이체의 관찰된 병원성 패턴과 매우 상관관계가 있었고, CVA-*dsneo*- Δ B15의 강한 약독화를 확인하였다.

[0135] 중증의 약독화의 원인으로서 CVA-*dsneo*- Δ B15에서 원치않는 돌연변이를 제외하기 위해, 본 발명자들은 CVA-*dsneo*- Δ B15(202,615 뉴클레오타이드) 및 CVA- Δ B15(201,296 뉴클레오타이드)의 완전한 암호 영역의 뉴클레오타이드 서열을 결정하였다. 바이러스는 그들의 암호 영역 내로 의도적으로 도입한 예상된 돌연변이만을 보유하였다. 따라서, CVA-*dsneo*- Δ B15의 놀랍게 강한 약독화는 *neo/rpsL* 카세트의 존재에 의존하는 것으로 나타났다.

[0136] **실시예 2: IFN- α / β 수용체 결여 (IFNAR^{0/0}) 마우스에서 CVA-*dsneo*- Δ B15의 독력**

[0137] IFN I형 시스템이 마우스에서 CVA-*dsneo*- Δ B15의 강한 약독화에 기인하는지의 여부를 조사하기 위해, 기능적 IFN α/β 수용체가 없는 IFNAR^{0/0} 마우스를 CVA 및 CVA-*dsneo*- Δ B15의 등급화된 용량으로 감염시켰다. 5×10^7 TCID₅₀의 고용량에서, CVA-*dsneo*- Δ B15은 IFNAR^{0/0} 마우스(데이터 미제시)에 대해 일률적으로 치명적이었다. IFNAR^{0/0} 마우스의 서브세트는 1×10^7 의 CVA-*dsneo*- Δ B15의 중간체 용량으로 감염시킨 후에 생존하였고, 모든 마우스는 2×10^6 TCID₅₀의 용량으로 감염시켰을 때 생존하였다(도 3A 및 도 3B). 야생형 CVA로 감염시킨 IFNAR^{0/0} 마우스는 2×10^6 TCID₅₀의 가장 낮은 용량에서조차 일률적으로 사망하였다(도 3A 및 도 3B). 특히, CVA-*dsneo*- Δ B15는 20% 초과 상당한 체중 손실에 의해 증명된 바와 같이 2×10^6 TCID₅₀의 가장 낮게 사용된 용량에서조차 IFNAR^{0/0} 마우스에 대해 여전히 고도로 병원성이었다(도 3A).

[0138] 따라서, IFN I형 시스템은 CVA-*dsneo*- Δ B15의 강한 약독화에 연루된 중요한 인자가 되는 것으로 나타난다. CVA-*dsneo*- Δ B15의 2×10^6 및 1×10^7 TCID₅₀의 용량으로 감염시킨 IFNAR^{0/0} 마우스는 부분적으로 또는 완전히 생존한

반면, wt CVA로 감염시킨 모든 IFNAR^{0/0} 마우스는 사망하였다는 사실은 IFN I형-독립적 인자가 적은 정도로 CVA-dsneo-ΔB15의 약독화에 기여한다는 것을 시사하였다. B15는 VACV 감염 세포에서 NFκB 활성화의 저해제가 되는 것으로 앞서 보고되었다(Chen et al. (2008), *PLoS. Pathog.* **4**:e22-). 따라서, B15의 결여에 기인하는 증강된 NFκB 활성화의 항바이러스 효과는 IFNAR^{0/0} 마우스 내 CVA에 비해 CVA-dsneo-ΔB15의 중등증의 약독화를 초래할 수 있었다. 동일한 선을 따라서, 덜 효율적인 NFκB 저해는 또한 야생형 마우스에서 CVA-ΔB15의 중등증의 약독화에 대한 설명을 제공할 수 있는데(도 2), B15를 결여하기 때문이다. 그러나, CVA-dsneo-ΔB15의 대부분의 약독화를 초래하는 *neo/rpsL* 카세트가 또한 없기 때문에 이는 CVA-dsneo-ΔB15보다 훨씬 덜 약독화된다.

[0139] 실시예 3: CVA-dsneo-ΔB15에 의한 수지상 세포(DC) 내 IFN-α 및 IFN-λ 유도

[0140] DC는 I형 및 III형 IFN뿐만 아니라 다른 사이토카인의 효율적인 생산자이기 때문에, 본 발명자들은 fms-유사 타이로신 키나제 3 리간드(flt3-L 또는 FL) 배양 시스템을 이용하여 생성한 무린 골수-유래 DC에서 이들 IFN을 유도하기 위해 본 명세서에 제공된 다양한 CVA 작제물의 능력을 평가하였다. 무린 IFN-α(그러나 무린 IFN-β는 아님)는 오소포스바이러스 B19 단백질에 의해 결합된다. 이 결합은 IFN-α-특이적 ELISA에서 IFN-α의 결실을 부분적으로 또는 완전히 방지한다(데이터 미제시). CVA-dsneo-ΔB15의 IFN-α의 분석을 용이하게 하기 위해, B19R 유전자를 제오신 내성 유전자로 대체함으로써 추가적인 결실을 도입하였다(도 1). 감염된 마우스 폐의 바이러스 역가가 감염 후 6일에 훨씬 더 낮다는 것을 제외하고, 얻어진 CVA-dsneo-ΔB15/B19 이중 결실 돌연변이체의 약독화는 BALB/c 질환 모델의 CVA-dsneo-ΔB15의 약독화와 구별되지 않았다(데이터 미제시). IFN-α는 예상한 바와 같이 CVA-감염 FL-DC의 상청액 중에서 검출가능하지 않았지만, IFN-α의 CVA-ΔB19 유도 검출가능량(도 4)은 야생형 CVA가 B19에 의한 ELISA-기반 검출로부터 가려진 IFN-α의 중등증 수준을 유도할 수 있다는 것을 입증한다. 이중 결실 돌연변이체 CVA-dsneo-ΔB15/B19는 FL-DC에서 CVA-ΔB19보다 상당히 더 높은 수준의 IFN-α를 유도하였는데, 이는 MVA에 의해 유도되는 것과 비슷하였다(도 4). 이는 *neo-ΔB15* 돌연변이가 CVA에 대해 더 높은 인터페론 유도 능력을 부여하였다는 것을 입증하였다. B15는 CVA-ΔB15가 검출가능한 IFN-β를 유도하지 않았기 때문에 이 효과에 기여하지 않았고, 따라서 CVA wt와 같이 거동하였다.

[0141] 오소포스바이러스는 IFN-λ에 대해 결합 단백질을 발현시키지 않기 때문에, 본 발명자들은 FL-DC에 의해 IFN-λ 분비를 유도하는 그의 능력에 대해 돌연변이체 CVA-dsneo-ΔB15를 직접 분석할 수 있었다. CVA-dsneo-ΔB15는 CVA 또는 CVA-ΔB15보다 FL-DC의 상청액 중에서 상당히 더 높은 IFN-λ 수준을 유도하였다(도 4). CVA-dsneo-ΔB15에 의해 유도된 IFN-λ 수준은 MVA에 의해 유도된 것과 매우 유사하였다. 종합하면, 상기 결과는 CVA-dsneo-ΔB15가 다수의 면역조절자가 결여된 MVA와 비슷하게 IFN-α 및 IFN-λ의 강한 유도자이며(Antoine et al. (1998), *Virology* **244**:365-396; Meisinger-Henschel et al. (2007), *J. Gen. Virol.* **88**:3249-3259) 그의 조상 CVA에 비해 DC의 증가된 활성화를 초래한다는 것을 나타낸다(Samuelsson et al. (2008), *J. Clin. Invest* **118**:1776-1784).

[0142] 실시예 4: CVA 및 CVA-dsneo-ΔB15에 의한 무린 세포주에서 IFN-β 유도

[0143] CVA-dsneo-ΔB15의 증강된 I형 IFN-유도 능력이 DC로 국한되었는지의 여부를 나타내기 위해, 무린 BALB/3T3 클론 A31(A31) 섬유아세포를 다양한 CVA 작제물로 감염시키고 나서, IFN-β mRNA 수준을 정량적 역 전사효소 PCR(RT-qPCR)에 의해 결정하였다. CVA 및 CVA-ΔB15는 매우 낮은 IFN-β 유전자 발현만을 유도하였지만, CVA-dsneo-ΔB15 감염은 A31 세포에서 증가된 수준의 IFN-β 전사체를 자극하였다(도 5A). 감염 후 4시간에 CVA-dsneo-ΔB15에 의한 IFN-β mRNA의 유도는 이 시점에 MVA에 의해 얻은 것과 유사하였다(도 5A). MVA-감염 A31 세포 내 IFN-β 전사체의 수준은 보통 감염 후 4시간 후에 감소되는 반면, CVA-dsneo-ΔB15에 의해 유도된 IFN-β mRNA는 훨씬 더 증가되고, 감염 후 6시간 더 지나서 MVA에 의해 유도된 것을 명확하게 초과하였다(도 5A). IFNAR^{0/0} 마우스에서 CVA-dsneo-ΔB15의 약독화의 거의 완전한 반전과 함께 이들 데이터는 야생형 마우스에서 이 바이러스 돌연변이체의 약독화가 강하게 증강된 IFN I형 유도에 의해 야기될 가능성이 있었다는 것을 강하게 시사한다.

[0144] CVA-dsneo-ΔB15의 B15R 좌위에서 *neo* ORF가 제오신(*zeo*) 내성 카세트(CVA-*zeo-ΔB15*)에 의해 결실(CVA-ΔB15) 또는 대체되었을 때, 얻어진 돌연변이체 바이러스의 IFN-β 자극 능력은 거의 완전히 없었다(도 5B). 네오마이신 ORF는 강한 초기 B15R 프로모터(*p_{B15}*) 완전체를 남기는 B15R ORF 대신에 삽입되었기 때문에, 본 발명자들은 CVA-dsneo-ΔB15로부터 *p_{B15}*을 결실시켰다. 얻어진 돌연변이체 CVA-Δ*p_{B15}-neo-ΔB15*는 IFN-β 전사체의 CVA wt 수준만을 유도하였다(도 5B). 따라서, CVA-dsneo-ΔB15 돌연변이체 내 *neo* ORF의 전사는 IFN-β 자극 능력에 대해 필수적이 되는 것으로 나타났다. CVA-dsneo-ΔB15-감염 A31 세포 내 *Neo* 카세트 전사를 *neo/rpsL* 삽입물의

rpsL 일부를 표적화하는 RT-qPCR 분석에 의해 확인하였다(데이터 미제시). *neo* 및 *rpsL* ORF는 B15 프로모터에 대해 역 상보적 배향으로 삽입되었고, 매우 짧은 ORF만이 *neo* 카세트로부터 번역될 것으로 예측되며, 이 안티센스 RNA는 전혀 번역 기작에 의해 사용되지 않아야 한다.

[0145] CVA-*dsneo*- Δ B15 돌연변이체는 BAC 백본에서 EGFP/*neo* 카세트로부터의 초기/후기 프로모터의 제어 하에서 센스 방향으로 제2 *neo* 전사체를 발현시키기 때문에, 2개의 부분적으로 상보적인 전사체 내의 *neo* 서열은 부분적으로 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 형성할 수 있다. 이 dsRNA는 대부분 감염 세포 내 추가적인 PAMP로서 작용하여 I형 및 III형 IFN의 증가된 유도할 가능성이 있다.

[0146] **실시예 5: 외래 삽입물 쌍의 상보적 RNA를 발현시키는 MVA 벡터는 뮤린 세포 내 IFN- β 를 유도한다**

[0147] MVA에 대한 dsRNA 원칙의 적용가능성을 입증하기 위해, *neo* 또는 EGFP 유전자 중 하나의 두 상보적 전사체를 발현시키는 재조합 MVA 벡터의 두 쌍을 구성하였다. 이는 MVA 게놈 내의 서로 떨어진 부위에서 각각 폭스바이러스 초기/후기 프로모터의 제어 하에 *neo* 또는 EGFP ORF의 두 복제물을 삽입함으로써 달성되었다. BAC-유래 야생형 MVA는 BAC 백본 삽입물 내에서 *neo*/EGFP 카세트의 하나의 복제물을 이미 함유하였다(도 6a). *neo*/EGFP 카세트를 포함하는 BAC 카세트는 MVA의 특성을 변경시키지 않으며, 따라서 야생형 MVA에 대해 동등하다는 것은 이미 입증되었다(Meisinger-Henschel et al. (2010), *J. Virol.* **84**:9907-9919). MVA-*dsneo*- Δ B15는 *neo/rpsL* 카세트의 부분으로서 내인성 B15R 프로모터에 대해 역 배향으로 B15R 좌위에서 제2 *neo* ORF를 함유하였다(도 6a). 따라서 MVA-*dsneo*- Δ B15는 상기 기재한 CVA-*dsneo*- Δ B15 돌연변이체 내 *neo* 삽입물의 무리를 정확하게 복제하였다. MVA-*dsEGFP*의 구성을 위해, *neo*/EGFP 카세트를 MVA 야생형의 BAC-삽입물로부터 처음 결실시켰다. 재조합 MVA-*dsEGFP*를 얻기 위해, 이어서, EGFP ORF를 센스 또는 안티센스 EGFP RNA 중 하나의 전사를 지시하는 초기/후기 프로모터의 제어 하에 먼 부위에서 MVA 게놈 내로 2회 삽입하여, 720bp의 dsRNA 형성을 가능하게 하였다(도 6b). 단일 EGFP 삽입(MVA-EGFP)으로부터 센스 EGFP 전사체만을 발현시키는 MVA 작제물은 전체적으로 MVA-*dsEGFP* 작제물에 대한 기준으로서 작용한다(도 6b).

[0148] 두 삽입한 *neo* 항원의 상보적 전사체를 생성하는 MVA(MVA-*dsneo*- Δ B15)로 감염시킨 뮤린 A31 세포는 단일 *neo* 카세트를 지니는 BAC-유래 MVA wt 바이러스에 비해 증가된 IFN- β 유전자 전사를 나타내었다(도 7A). *neo* ORF를 함유하는 전체 BAC 카세트가 FRT-기반 재조합을 이용하는 MVA-*dsneo*- Δ B15로부터 결실되었을 때, 얻어진 MVA-*neo*- Δ B15/DBAC는 IFN- β mRNA의 야생형 수준만을 유도하였다(도 7A). B15R 유전자의 결실을 지니고(MVA- Δ B15) BAC 백본 내 센스 *neo* 카세트만을 함유하는 MVA 바이러스는 또한 야생형 IFN- β mRNA 수준을 유도하였다(도 7A). 이는 IFN- β 를 유도하는 MVA-*dsneo*- Δ B15의 증가된 능력이 센스와 안티센스 *neo* 발현 카세트 둘 다 존재에 의존하며, B15R 결실 그 자체에 의해 야기되지 않는다는 것을 입증하였다. MVA-*dsneo*- Δ B15뿐만 아니라 CVA-*dsneo*- Δ B15는 감염 5시간 후에 다량의 IFN- β mRNA를 유도하였다(도 7A). IFN- β mRNA 발현은 감염 후 5 내지 7시간에 감소된 MVA-*dsneo*- Δ B15에 의해 유도된 반면, CVA-*dsneo*- Δ B15는 감염 후 7시간에 IFN- β mRNA 수준이 높게 남아있도록 유도하였다(도 7A). 따라서, MVA-*dsneo*- Δ B15-유도 IFN- β 의 수준을 모든 추가 실험에서 감염 후 5시간에 결정하였다. MVA-*dsneo*- Δ B15 감염 A31 세포의 배양 상청액은 MVA wt 또는 단일-*neo* 카세트 MVA 작제물에 비해 감염 후 18시간에 증가된 양의 IFN- β 를 함유하였는데(도 7B), 이는 IFN- β mRNA 분석 결과를 확인하였다.

[0149] 상기 결과는 2개의 별개의 EGFP 삽입물로부터 상보적 초기 전사체의 생성을 지시하는 MVA 재조합체 세트를 이용하여 재현하였다. 강한 초기 프로모터의 제어 하에서 하나의 EGFP ORF는 EGFP-mRNA의 발현을 지시하였고, IGR136/137 내로 삽입하였다. 대응하는 단일-삽입 MVA 재조합 MVA-EGFP는 EGFP를 발현시켰고, 뮤린 A31 세포 내 IFN- β mRNA의 야생형 수준을 유도하였다(도 7C). pS 프로모터의 제어 하에 안티센스 EGFP 전사체의 초기/후기 발현을 유도하는 IGR86/87 내로 삽입한 추가적인 EGFP 카세트를 함유하는 MVA(Chakrabarti 1997)는 강하게 증가된 양의 IFN- β mRNA를 유도하였다(도 7C). 따라서, MVA 게놈 내에서 이중성 DNA 삽입물로부터 유래된 초기 dsRNA는 삽입물의 서열과 독립적인 IFN- β 분비를 자극하였다.

[0150] 후자의 관찰을 단백질 수준에 대한 IFN- β 유도의 분석에 의해 확인하였다. MVA-*dsneo*- Δ B15와 유사하게, MVA-*dsEGFP*는 대응하는 배양 상청액 내로 MVA-EGFP보다 상당히 더 다량의 IFN- β 의 분비를 자극하였다(도 7D). 다양한 MVA 재조합체로 감염시킨 A31 세포의 상청액 중의 IFN- β 의 양은 계대 수의 변화에 기인할 가능성이 있는 실험, 세포 밀도와 세포 상태 간에 상당히 달랐다.

[0151] **실시예 6: 초기 바이러스 전사는 MVA dsRNA 돌연변이체에 의해 증가된 IFN- β 수준을 유도하기에 충분하다**

[0152] dsRNA-매개 IFN- β 유도는 감염 동안 초기에 생성된 dsRNA에 주로 의존한다는 것을 상정하였다. 바이러스 게놈

의 복제를 차단하고 결과적으로 복제 후 (중간 및 후기) 유전자 발현을 차단하는 AraC에 의한 MVA-dsEGFP-2 감염 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 처리는 증강된 IFN- β 유전자 발현을 감소시키지 않았는데(도 8A), 이는 dsRNA의 초기 전사가 증강된 IFN- β 유도에 충분하다는 것을 입증한다. AraC로 처리한 MVA wt 감염 MEF에서 IFN- β 의 보통의 증가에 대한 이유는(도 8A) 불명확하다. 인식으로부터 dsRNA를 감추는 dsRNA 결합 단백질을 암호화하는 E3L 유전자가 결실된 MVA 돌연변이체는 CEF에서 이미 공개된 관찰로부터 예상되는 바와 같이 일정한 정도로 MEF 내 IFN- β 유도를 증강시켰다(Hornemann et al. (2003), *J. Virol.* **77**:8394-8407). AraC에 의한 MVA- Δ E3L-감염 세포의 처리는 IFN- β 유도를 명확하게 감소시켰다(도 8A). 이는 상당한 양의 바이러스 dsRNA가 감염 후 ~2시간 지나서부터 포스바이러스 생활사의 복제 후 단계에서만 자연적으로 생성되기 때문에 예상되었다. 이 생각과 일치되게, AraC-처리 MVA-E3L은 후기 유전자 발현이 AraC 처리에 의해 차단되었을 때 wt MVA보다 더 많은 IFN- β mRNA를 유도하지 않았다(도 8A).

[0153] 후기 프로모터 pSSL의 제어 하에서 안티센스 EGFP 전사체를 발현시키는 MVA 돌연변이체(MVA-dsEGFP-후기)는 MVA wt와 유사한 IFN- β mRNA 수준을 유도하였다(도 8B). 이는 DNA 복제의 개시 전에 감염 초기에 dsRNA 형성이 MVA-dsEGFP의 IFN 유도자 표현형에 대한 전제조건이며 또한 MVA-dsneo- Δ B15에 대해 고도로 가능성이 있다는 추가적인 증거를 제공하였다. 따라서, MVA의 dsRNA의 초기 발현은 감염 세포 내 IFN- β 를 유도하는데 필수적이고 충분하다. 매우 가능하게는, 동일한 원칙이 CVA-dsneo- Δ B15의 증가된 선천성 자극 능력의 기저를 이루고 있다.

[0154] **실시예 7: MVA-dsneo- Δ B15 및 MVA-dsEGFP는 단백질 키나제 R(PKR)을 활성화시킨다.**

[0155] PKR은 dsRNA에 대한 결합에 의해 활성화되는 불활성 키나제로서 보통의 수준으로 세포 내에서 구성적으로 합성된다. PKR 발현은 I형 IFN에 의해 상향조절된다. 활성화된 PKR의 한 가지 주된 기질은 PKR에 의해 인산화되는 번역 개시 인자 서브유닛 eIF2 α 이다. 감염 시 eIF2 α 의 인산화(P-eIF2 α)는 항바이러스 대책으로서 감염 세포 내에서 번역 중단을 야기하며, 또한 PKR-매개 세포자멸사 유도에 연루될 수 있다. eIF2 α 인산화를 뮤린 A31 세포 내 dsRNA에 의한 PKR 활성화를 위한 지표로서 분석하였다. 또한 dsRNA에 결합하고 격리하는 백시니아 바이러스 PKR 저해제 E3에 대한 유전자를 결여하는 MVA 돌연변이체(MVA- Δ E3L)는 양성 대조군으로서 작용하였다. MVA-dsneo- Δ B15 및 MVA-dsEGFP은 A31 세포 감염 후 1시간만큼 빨리 PKR을 활성화시킨 반면, MVA wt은 감염 내내 PKR을 검출가능하게 활성화시키지 못하였다(도 9). P-eIF2 α 의 양은 neo와 EGFP-기반 초기 dsRNA 생성자 돌연변이체 둘 다에 의해 감염된 세포 내 감염 후 4시간까지 추가로 증가되었다 (도 9). 감염 후 6시간에, MVA-dsneo- Δ B15 및 MVA-dsEGFP의 P-eIF2 α 감염 세포의 양은 감소되기 시작하였고, MVA-dsneo- Δ B15에 대해 감염 후 8시간에 거의 검출가능하지 않은 반면, P-eIF2 α 는 MVA-dsEGFP 감염 세포에서 이 시점에 여전히 약하게 검출가능하였다(도 9). 추가로, P-eIF2 α 신호는 MVA-dsneo- Δ B15 감염 세포에 비해 MVA-dsEGFP 감염 세포 내 감염의 처음 6시간에 걸쳐 상당히 더 강하였는데(도 9), 이는 MVA-dsneo- Δ B15에 비해 MVA-dsEGFP 활성의 다소 더 강한 PKR 활성화를 시사한다.

[0156] 초기 dsRNA 생성자 돌연변이체와 대조적으로, MVA- Δ E3L에 의해 유도된 P-eIF2 α 신호는 감염 후 2시간까지 검출가능하지 않았고, 감염 후 2시간 내지 3시간에 매우 급격하게 증가되고, 감염 후 8시간까지의 남은 관찰 기간에 대해 높게 남아있었다(도 9). MVA- Δ E3L은 감염 진행 후 4시간으로부터의 모든 돌연변이체의 가장 강한 P-eIF2 α 신호를 유도하였다(도 9). 이들 역학은 즉시 및 후기 바이러스 유전자로부터 부분적으로 상보적인 전사체의 어닐링에 의해 MVA 감염 동안 감염에서 후기에 형성되는 dsRNA와 일치된다. E3의 결여 때문에, 이 후기 dsRNA에 의해 유도된 PKR 활성화는 차단되지 않았다. 대조적으로, neo 또는 EGFP-dsRNA를 생성하는 MVA 재조합체에 의한 PKR 활성화의 역학은 감염 세포 내 dsRNA의 자극적 양의 매우 초기의 존재와 일치된다. 이들 재조합체가 E3 단백질을 발현시키기 때문에, PKR 활성화는 충분한 E3 단백질이 감염 세포 내에 축적되었을 때 감염에서 이후에 하향조절되는 것으로 나타난다.

[0157] **실시예 8: PKR은 세포 상청액 중에서 증가된 IFN- β mRNA 유도 및 IFN- β 의 축적을 필요로 한다.**

[0158] wt MEF에서, MVA-EGFP는 예상한 바와 같이 wt MVA와 매우 유사한 양의 IFN- β 전사체를 유도한 반면, MVA-dsEGFP는 증강된 IFN- β mRNA 합성을 유도하였다(도 10A). 대조적으로, MVA-dsEGFP는 PKR-결핍 MEF에서 증강된 IFN- β 유전자 발현을 유도하지 않았다(도 10A). MVA-dsEGFP 감염 MEF에 의한 IFN- β 단백질의 분비는 기능적 PKR에 강하게 의존할 가능성이 있었다(도 10B). PKR-독립적 경로를 통해 IFN- β 를 유도하는 것으로 알려진 음성 가닥 RNA인 센다이 바이러스(SeV)는 IFN- β 를 분비하기 위한 PKR-결핍 MEF의 적격성에 대한 양성 대조군으로서 역할을 하였다. 흥미롭게도, wt MEF는 SeV 감염에 반응하여 단지 소량의 IFN- β 를 분비하며, 분비한다고 하더라도, 반면에 SeV는 PKR^{0/0} MEF에서 IFN- β mRNA 및 단백질을 효율적으로 유도하는데, PKR^{0/0} MEF는 IFN- β 를 생성 및 분비하는데 완전히 적격이라는 것을 확인하였다(도 10A 및 도 10B). 종합하면, PKR은 MVA-dsEGFP에 의한

IFN-β의 증강된 유도에 수반된 중요한 세포 센서인 것으로 나타났다. wt MEF에서 MVA 및 MVA-EGFP(wt MVA에 대응)에 의한 IFN-β 유전자의 유도는 또한 PKR에 부분적으로 의존하는데(도 10A), 이는 적어도 MEF에서 MVA에 의한 선천성 면역 활성화를 위한 이 dsRNA 센서의 일반적 역할을 시사한다. 종합하면, MVA-dsEGFP에 의한 IFN-β의 증가된 유도는 dsRNA 센서 PKR에 적절하게 의존하였는데, 이는 MVA-dsEGFP에 의해 생성된 dsRNA가 선천성 면역 활성화의 관찰된 증가를 초래한다는 증거를 제공한다.

[0159] **실시예 9: 초기 dsRNA의 자극 효과를 위한 길이 필요조건**

[0160] 안티센스 EGFP 전사체의 3' 말단에서 박테리아 β-갈락토시다제(β-gal) 유전자로부터 유래된 비-상보적 돌출부를 포함하는 MVA-dsneo-ΔB15 작제물을 모방하도록 초기 MVA-dsEGFP 작제물을 설계하였다. 증강된 IFN-β 유도에 대한 dsRNA 길이 필요조건을 추가로 특성규명하기 위해, 720 내지 50 bp의 점진적으로 단축된 EGFP ORF 중복을 지니는 돌연변이체의 내재된 세트를 구성하였다(도 6b). MVA-dsEGFP-2 및 모든 다른 dsEGFP 돌연변이체는 안티센스 전사체에서 추가 3' 돌출부가 결실되었다(도 6b). wt-MEF에서, EGFP 중복 길이가 감소됨에 따라 상보적 EGFP 전사체를 발현시키는 MVA는 IFN-β mRNA 및 단백질 양의 감소를 유도하였다(도 11A 및 도 11B). wt MEF에서, β-gal-유래 3' 돌출부는 IFN-β 증강 효과에 필수적이지 않았다(도 11A). 100개 염기의 EGFP 전사체 중복(MVA-dsEGFP-5)은 MVA-dsEGFP보다 분명히 더 적은 IFN-β를 자극하였지만, 기준 MVA-EGFP에 비해 IFN-β 반응이 여전히 증강되었다(도 11A 및 도 11B). 또한, PKR^{0/0} MEF에서 IFN-β mRNA도 그리고 IFN-β 도 다양한 MVA 재조합체에 의해 거의 유도되지 않았다(도 11A 및 도 11B). 50 bp EGFP 삽입 중복을 지니는 MVA 재조합체는 검출 가능한 과량의 IFN-β 자극 능력을 갖지 않았다.

[0161] 따라서, 50 내지 100 bp의 두 상보적 재조합 전사체의 최소 중복은 MEF 내 증가된 IFN-β 유도를 필요로 하였다(도 11C).

[0162] **실시예 10: MVA-dsEGFP 복제 특성 및 유도자 표현형의 안정성**

[0163] 벌크 정제된 MVA-dsEGFP 제제를 얻기 위한 2차 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서의 MVA-dsEGFP의 증식은 MVA wt의 범위 내에서 정상 바이러스 수율을 나타내었다(데이터 미제시). 다단계 성장 분석은 MVA-dsEGFP가 인간 및 무린 세포에서 복제-제한 표현형을 보유하였지만(도 12B), wt MVA로서 CEF에서 약간 덜 효율적으로 복제되었다는 것을 입증하였다(도 12A). 이 약간 손상된 복제는 또한 CEF 세포로부터 얻은 MVA-dsEGFP의 바이러스 저장액의 평균 수율이 MVA-EGFP의 바이러스 저장액의 평균 수율과 관련되었을 때 관찰되었다. MVA-dsEGFP/MVA-EGFP의 수율의 비는 약 0.5였고(표 1) MVA-EGFP가 MVA-5 및 MVA-6의 수율과 비교하였을 때 약 0.1까지 추가로 감소되었다(표 1). MVA-dsEGFP-5 및 -6은 유도한다고 하더라도 단지 약간 더 많은 IFN-을 유도하기 때문에, 바이러스 복제에 대한 효과는 가용성 I형 IFN을 통해 매개되지 않을 가능성이 있었다. 바이러스 저장액의 생성을 위해 닭 DF-1 세포를 사용되었을 때, 더 짧은 EGFP-dsRNA가 발현되었을 때의 감소된 수율에 대한 경향은 없었다(표 1). 따라서, DF-1 세포는 CEF 세포보다 초기 dsRNA-과생성 MVA 돌연변이체의 증식을 위한 훨씬 더 적합한 세포 유형을 나타낸다.

[0164] MVA-dsEGFP의 증강된 IFN-β 자극 능력이 반복된 계대 후에 보존되었는지의 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 대략 0.01의 낮은 감염다중도(multiplicity of infection: MOI)를 사용하는 인터페론-적격 닭 세포주 DF-1에서 MVA-EGFP 및 MVA-dsEGFP의 10회 계대를 수행하였다. DF-1 세포 상에서 10회 계대시킨 MVA-dsEGFP는 DF-1 세포에서 단지 1회 계대시킨 시작 MVA-dsEGFP 바이러스의 그것과 비슷한 증강된 IFN-β 반응을 유도하였다(도 12C). MVA-EGFP의 기본적 IFN-β 유도는 또한 10회 DF-1 계대 후에 변용되지 않았다(도 12C). 따라서, MVA-dsEGFP의 증강된 인터페론 자극 능력은 DF-1 세포에서 다중 계대 후에 유지되었다. MVA도 MVA-dsEGFP도 또는 MVA-dsneo-ΔB15도 DF-1 세포 또는 CEF 세포에서 IFN-β 유전자 발현을 유도하지 않았다(데이터 미제시). 이는 강한 대항선택적 압력이 IFN-β 유도자 표현형의 관찰된 안정성을 위한 논쟁을 제공하는 MVA-dsEGFP 복제 동안 증강된 IFN I형 유도를 다시 제한하도록 DF-1 세포에서 조작되지 않는다는 개념을 뒷받침하였다. MVA-dsEGFP 돌연변이체의 손상되지 않은 수율과 종합해보면, DF-1 세포는 CDF 세포보다 초기 dsRAN-과생성 MVA 돌연변이체의 증식을 위한 훨씬 더 적합한 세포 유형을 나타낸다.

[0165] **실시예 11: 생체내 사이토카인의 증가된 유도**

[0166] MVA-dsEGFP를 이용하는 C57BL/6 마우스의 감염에 반응한 전신 사이토카인 수준을 감염 후 6시간에 분석하였다. MVA-dsEGFP 감염 후 혈액 내 IFN-α의 수준은 시험관내 관찰(도 9 및 도 10)과 유사하게 대조군(도 13a)에서보다 상당히 더 높았다. IFN-γ, 즉 염증성 사이토카인 IL-18 및 IL-6의 수준뿐만 아니라 케모카인 CXCL1, CCL2 및 CCL5의 수준은 MVA-dsEGFP-감염 마우스에서 상당히 증가되었다. 반응은 dsRNA 인식 수용체 RIG-I 및 MDA-5를

통한 IFN I형 및 사이토카인 유도에 필요한 신호전달 어댑터 분자 IPS-1의 존재에 적어도 부분적으로 의존하였다(도 13). 대조적으로, IFN- α , IFN- γ , IL-6, IL-18, CXCL1, CCL2 및 CCL5를 포함하는 사이토카인 및 케모카인의 유도에서 모든 관찰된 증가는 PKR에 의존하였다. MVA-EGFP에 의한 IFN- α , CXCL1 및 CCL2의 기저 유도는 PKR 결핍에 의해 강하게 영향받지 않은 반면, IFN- γ , IL-6, IL-18 및 CCL5의 기저 수준은 PKR-결핍 마우스에서 감소되는 것으로 나타났다(도 13). 이들 결과는 MVA에 의한 초기 dsRNA 생성이 배양 세포 내에서뿐만 아니라 배양 세포에서와 같은 유사한 패턴 인식 분자의 활성화에 기반한 생체내에서 IFN I형 반응뿐만 아니라 염증성 사이토카인 유도를 증강시켰다는 것을 입증한다. PKR뿐만 아니라 IPS-1을 통한 인식 수용체 신호전달은 생체내 MVA-dsEGFP에 의해 증강된 IFN I형 발현을 매개하는데 연루되었다.

[0167] **실시예 13: 마우스에서 MVA-dsEGFP에 의한 증강된 CD8 T 세포 반응**

[0168] C57BL/6 마우스는 MVA-dsEGFP에 의한 상이한 경로에 의해 면역화되었고, 각각의 균주 배경에서 면역우성 에피토프에 대한 CD8 T 세포 반응을 텍스트라머 염색을 이용하여 결정하였다. 백시니아 바이러스의 면역우성 B8R 에피토프에 대한 C57BL/6 마우스의 비장 내 CD8 T 세포의 수는 MVA-EGFP에 비해 MVA-dsEGFP에 의한 정맥내 면역화 후 7일에 상당히 증가되었다(도 14)(독립 양측검정 스튜던트 t 검정에 의해 $p=0.048$).

[0169] **실시예 14: 인간 세포에서 MVA-dsEGFP에 의한 증강된 IFN- β 유전자 유도**

[0170] 재조합 MVA에 의해 생성된 초기 dsRNA의 자극 효과는 무린 세포로 제한되지 않는다는 것을 입증하기 위해, 인간 이배체 폐 섬유아세포 세포주 MRC-5의 배양물을 초기 dsRNA를 생성하는 MVA 재조합체로 감염시켰다. MVA-EGFP에 의한 기저 IFN- β 유도가 인간 MRC-5 세포에서 때때로 검출가능하지 않은 반면에(도 15 및 데이터 미제시), MVA-dsneo- Δ B15 및 MVA-dsEGFP는 인간 MRC-5 세포에서 IFN- β mRNA 발현을 효율적으로 유도하였다(도 15). IFN- β 유전자 유도의 효율은 무린 세포에 의해 얻은 결과와 유사하게 점진적으로 단축된 EGFP ORF 중복에 의해 감소되었다(도 15). 300 및 100 nt에 대한 EGFP ORF 중복의 단축은 각각의 재조합체 MVA-dsEGFP-4 및 MVA-dsEGFP-5의 IFN- β 자극 활성을 강하게 감소시켰다(도 15). 따라서, MVA에 의한 감염 동안 초기에 생성된 dsRNA에 의한 증가된 IFN- β 유도는 무린 세포에 국한되지 않지만, 인간 세포에서 적어도 현저하였고, 따라서 또한 1차 인간 세포 및 조직에서만뿐만 아니라 상보적 RNA 전사체를 발현시키는 재조합 폭스바이러스로 백신접종한 인간 대상체에서 일어날 가능성이 크다.

[0171] **실시예 15: 천연 MVA 유전자로부터 초기 dsRNA를 생성하는 MVA-dsE3L에 의한 증강된 IFN- β 유도**

[0172] 본 발명자들은 안티센스 E3L RNA의 초기 발현을 지시하기 위해 MVA의 천연 초기 E3L ORF의 하류에 강한 초기 구성성분을 갖는 초기/후기 H5m 프로모터(Wyatt et al. (1996), *Vaccine* **14**:1451-1458)를 삽입하였다(도 16A). E3L ORF는 오쏘폭스바이러스 초기 전사 종결 신호(ETTS)의 T₅NT 공통 서열을 함유하는 안티센스 가닥 내에 동중중합체 T₇ 신장을 함유한다. E3L ORF에서 이 안티센스 ETTS는 완전한 E3L 전사체의 전체 ~650개 뉴클레오타이드 대신 대략 250 내지 300개의 뉴클레오타이드에 대해 초기 안티센스 전사체의 길이를 제한할 가능성이 있다. 따라서 본 발명자들은 E3의 암호화된 아미노산 서열을 변용시키는 일 없이 하나의 T 잔기를 A로 교환함으로써 이 ETTS를 돌연변이시켰다(도 16A). 초기 전장 안티센스 E3 전사체의 종결을 위한 적합한 안티센스 ETTS 서열은 E3L/E4L 유전자간 영역에서 자연적으로 존재한다(도 16A).

[0173] 얻어진 돌연변이체 MVA-dsE3L은 가장 이용가능한 dsRNA-기반 유도자, 즉, 양성 대조군(데이터 미제시)으로서 형질감염된(I:C)와 비슷하게 MEF에서 고수준의 IFN- β mRNA를 유도하였다(도 16B). MVA-dsE3L은 MVA-dsEGFP 보다 명확하게 더 높은 IFN- β mRNA 수준을 유도하는 것으로 나타났다(도 16B). MVA-dsEGFP-5 및 MVA-dsEGFP-후기는 기준 바이러스 MVA-EGFP와 함께 IFN- β mRNA 유도를 위한 음성 대조군으로서 작용하였다(도 16B). 따라서, MVA 벡터로부터의 초기 dsRNA의 생성은 또한 두 부분적으로 또는 완전히 동일한 이중성 서열을 삽입하는 대신 천연 초기 MVA 유전자로부터 초기 발현 안티센스 전사체의 생성에 의해 달성할 수 있다.

[0174] **실시예 16: EGFP dsRNA 형성**

[0175] MVA-dsEGFP-720(o) 감염 세포에서 EGFP 유전자의 센스 및 안티센스 전사체로부터 dsRNA의 형성을 입증하기 위해, 본 발명자들은 트리졸(Trizol)(등록상표) 방법을 이용하여 AraC-처리(40 μ g/ml) BALB/3T3-A31의 바이러스마다 2개의 6-웰로부터 총 RNA를 단리시키고 조합하였다. DNase-처리된 총 RNA 샘플을 37°C에서 1시간 동안 총 용적 20 μ l에서 단일 가닥-특이적 RNases A 및 T1(엠티온(Ambion))을 이용하거나 또는 RNase A/T1 + dsRNA-특이적 RNase V1(엠티온)을 이용하여 분해시켰다. 분해시킨 RNA 샘플 및 비처리 대조군 샘플(분해하지 않음)을 RNA 세정 및 농축기 키트(RNA Clean & Concentrator kit)(독일 프라이부르크에 소재한 자이모 리서치(Zymo

Research))를 이용하여 정제시키고 나서, 95°C에서 3분 동안 변성시켰다. 상업적으로 입수가 가능한 EGFP 태그면 (TaqMan)(등록상표) 분석(Mr04329676_mr, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)_를 사용하여 상기 기재한 바와 같이 역 전사 및 정량적 PCR을 수행하였다. 비분해 RNA 샘플의 2회 중복 qPCR 반응으로부터 모의 이상으로 EGFP RNA의 유도 배수 평균을 계산하고 나서, 100%로 설정하였다. MVA-EGFP 및 MVA-dsEGFP-720(o) 감염 세포로부터 얻은 A/T1 및 A/T1/V1 분해 후에 EGFP RNA의 유도값 배수를 사용하여 남아있는 EGFP RNA의 백분율을 계산하였다.

[0176] **실시예 17: 세포 및 바이러스**

[0177] 표준 절차에 의한 15-일령 C57BL/6-IFNAR^{0/0} 및 14-일령 C57BL/6-IPS-1^{0/0} 배아, 및 PKR^{0/0} MEF 및 대응하는 PKR-충분한 대조군 MEF로부터 IFNAR^{0/0} 및 IPS-1^{0/0} 마우스 배아 섬유아세포(MEF)를 준비하였다. 모든 세포주를 10% 소 태아 혈청(FCS, 독일 아이텐바흐에 소재한 판 바이오테크(Pan Biotech))으로 보충한 들베코 변형 이글 배지(DMEM, 독일 다름슈타트에 소재한 킵코/인비트로젠(Gibco/Invitrogen))에서 배양시켰다. 1차 닭 배아 섬유아세포(CEF) 세포를 11일령 배아가 있는 계란으로부터 준비하고 나서, 바이러스 저장 생성을 위해 VP-SFM(킵코)에서 또는 복제 분석을 위해 10% FCS로 보충한 DMEM에서 배양시켰다. GM-CSF(과립 대식세포 집락 자극인자)-의존적 수지상 세포(GM-DC)를 제조할 무렵 GM-CSF(독일 오펜바흐에 소재한 테부-바이오(tebu-bio))를 이용하는 배양에 의해 새로 준비한 무렵 골수로부터 생성하였다.

[0178] MVA 야생형(MVA) 및 MVA 돌연변이체를 CEF 또는 DF-1 세포 상에서 증식시키고, 문헌[(45)Meisinger-Hentschel et al., 2007. J Gen Virol.84:3249-3259]에 기재된 바와 같은 TCID₅₀ 방법을 이용하여 CEF 세포 상에서 적정하였다. CVA 야생형(CVA) 및 CVA 돌연변이체를 Vero 세포 상에서 증식시키고 CV-1 세포에 대해 TCID₅₀방법에 의해 적정하였다. 쇼프 섬유종 바이러스를 ATCC(VR-364)로부터 얻었고, 증식시키고 나서, 토끼 각막 SIRC 세포 상에서 적정하였다. 센다이 바이러스 바이러스주 칸텔(Cantell)을 2000 HA단위/ml로 찰스 리버 래버러토리즈(Charles River Laboratories)로부터 얻었다. 동물 실험에서 사용한 모든 바이러스를 36% 수크로스 쿠션을 통해 2회 정제하였다.

[0179] **실시예 18: 감염성 바이러스의 BAC 리컴바이너링(recombineering) 및 재활성화**

[0180] CVA 및 MVA-BAC의 구성은 이전에 기재되었다(Lee and Esteban, 1994. Virology 199:491-496). 센스 및 안티센스 EGFP mRNA를 발현시키는 MVA 재조합체 및 모든 대응하는 대조군의 생성을 위해, 이들 작제물의 BAC 백본 내 neo-IRES-EGFP 카세트를 박테리아 테트라사이클린 내성 카세트에 의해 대체하였다. MVA-EGFP 재조합체는 강한 초기/후기 pHyb 프로모터의 제어 하에 EGFP ORF 하류의 박테리아 카나마이신 내성 카세트(NPT I)을 함유하였다. 뉴클레오타이드 42697-43269(ORF MVA050L)를 이콜라이 내 상동성 재조합에 의해 NPT I 카나마이신 내성 카세트 로 대체함으로써 MVA-ΔE3L을 얻었다.

[0181] 감염성 바이러스의 재활성화를 위해, 106 BHK-21 세포를 퓨젠(Fugene)(등록상표) HD(독일 만하임에 소재한 프로메가(Promega))를 이용하여 3μg의 BAC DNA로 형질감염시키고, 60분 후에 필요한 헬퍼 기능을 제공하기 위해 쇼프 섬유종 바이러스로 감염시켰다. 재활성화된 바이러스를 단리시키고 나서, 헬퍼 바이러스를 앞서 기재한 바와 같이 제거하였다(Meisinger(Meisinger-Henschel et al. (2007), J. Gen. Virol. 88:3249-3259).

[0182] **실시예 19: 마우스 감염 실험**

[0183] 마우스 당 최종 용적 50μl로 PBS 중에서 희석시킨 CVA 및 CVA 돌연변이체의 2 x 10⁶, 1 x 10⁷, 및 5 x 10⁷ TCID₅₀을 이용한 비강내 감염 전에 케타민/자일라진 주사에 의해 마우스를 마취시켰다. 동물의 체중을 재고 나서 2주 동안 매일 검사하고, 질병의 징후를 0 내지 4의 임의의 규모로 스코어링하였다. 전신 사이토카인 수준의 분석을 위해, 마우스에 200μl의 각각의 바이러스 희석을 이용하여 정맥내로 주사하고 나서 6시간 후에 꼬리 정맥에 의해 출혈시켰다.

[0184] **실시예 20: 혈구계산 비드 분석에 의한 전신 사이토카인 수준 분석**

[0185] 정맥내 주사 후 6시간에 인출한 마우스 혈청 내 사이토카인 농도를 제조업자의 설명서에 따라 표시한 마우스 사이토카인에 대한 비드-기반 플로우사이토믹스(FlowCytomix) 분석(독일 프랑크푸르트에 소재한 이바이오사이언스(eBioscience))에 의해 결정하였다. 처리군 간의 차이에 대한 통계학적 유의도를 비모수적 맨-휘트니 U 검정을 이용하여 분석하였다. 전체 유의 수준(0.05)은 그룹의 수(예를 들어, B6129SF2/J 마우스에서 시험한 11 사이토카인 및 케모카인)로 나눔으로써 보정된 사후검정(Bonferroni)이었고, 즉, 전반적인 사후검정 보정 수준은

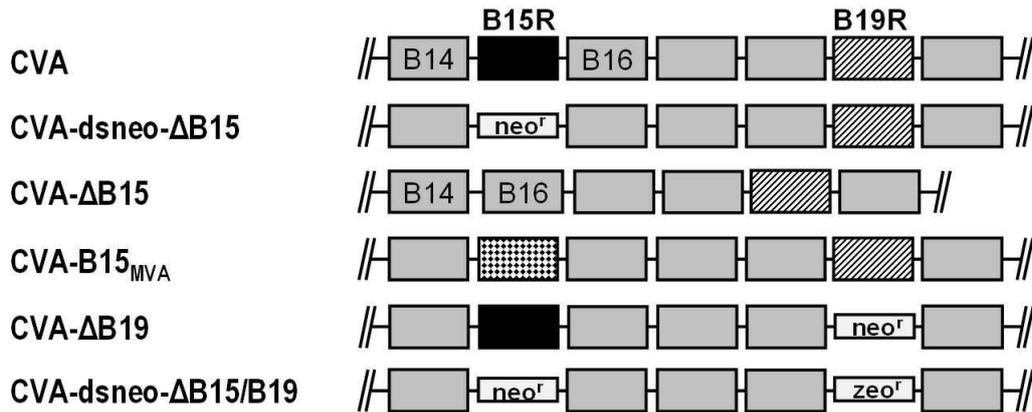
B6129SF/2 처리군 간의 비교를 위해 $0.05/11 = 0.00455$ 로 설정하였다.

[0186]

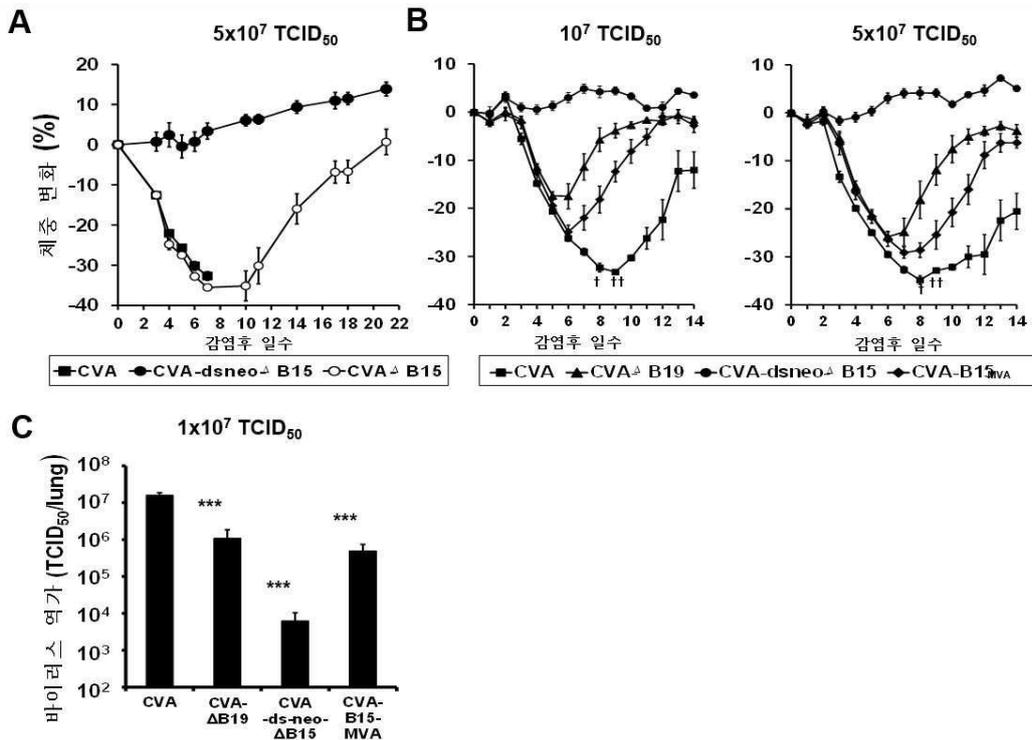
본 발명의 다른 실시형태는 본 명세서 및 본 명세서에 개시된 본 발명의 실행의 고려사항으로부터 당업자에게 명확할 것이다. 본 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 고려되며, 본 발명의 진정한 범주와 정신은 다음의 청구범위에 의해 나타내는 것으로 의도된다.

도면

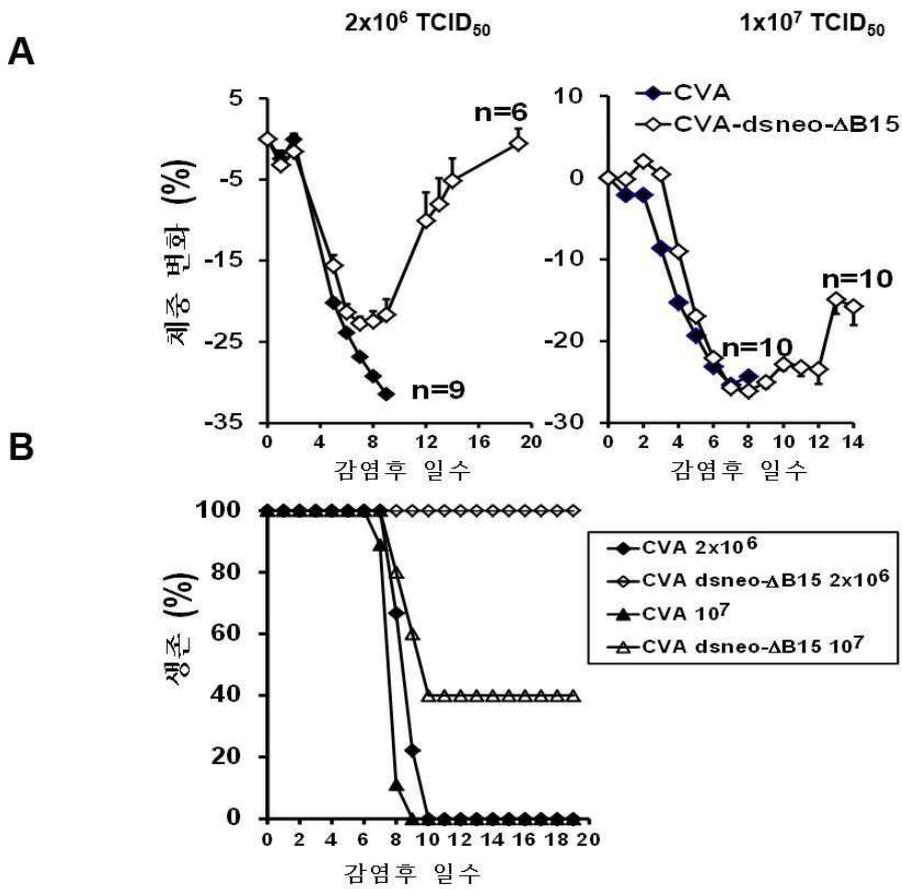
도면1



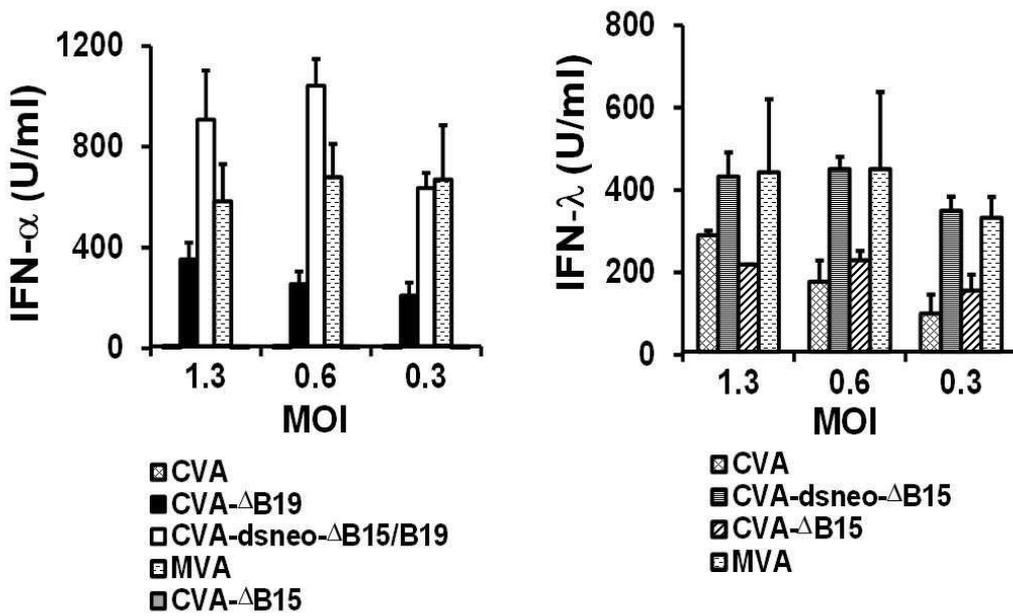
도면2



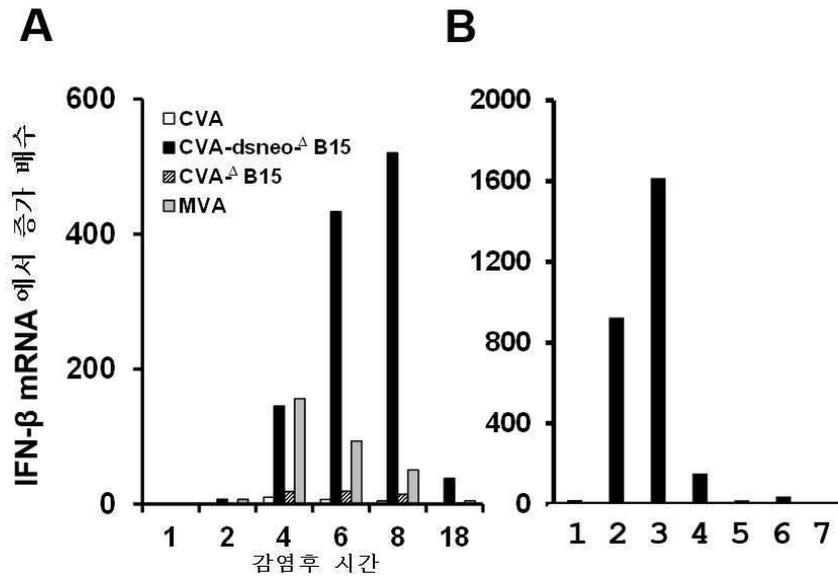
도면3



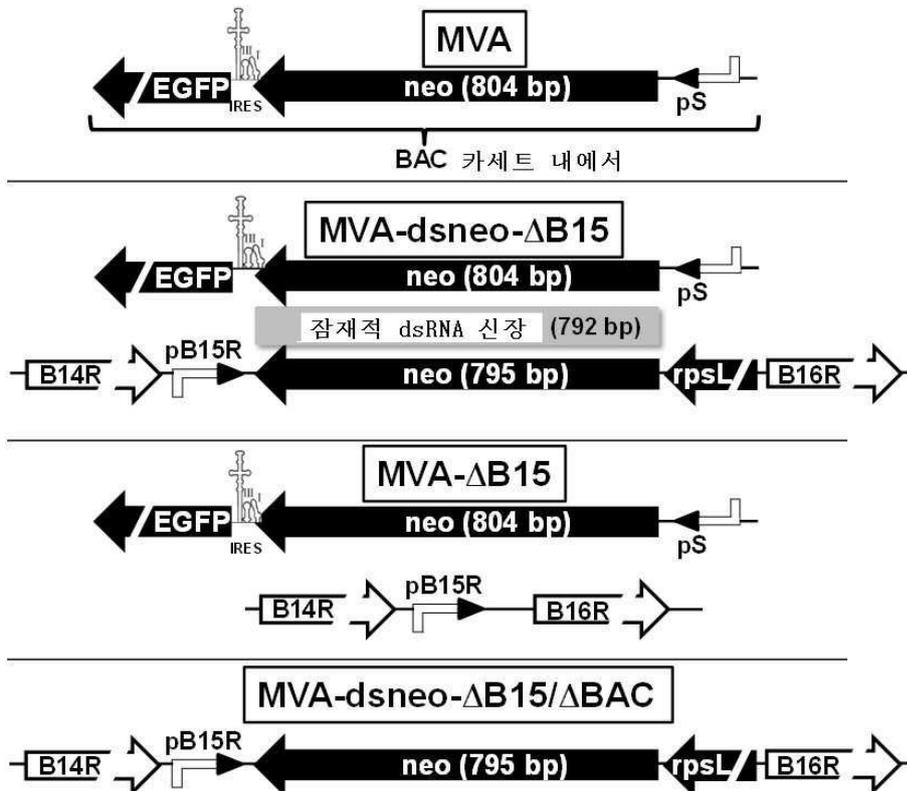
도면4



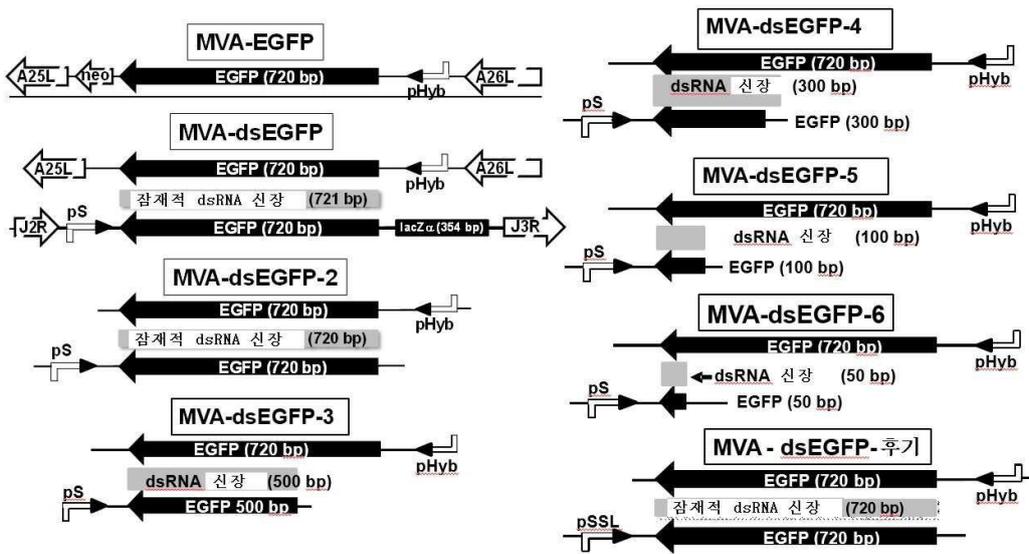
도면5



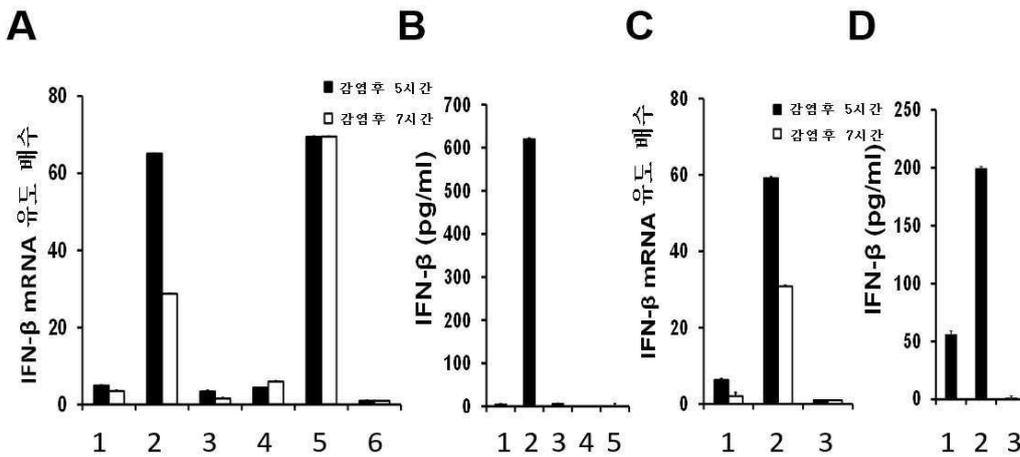
도면6a



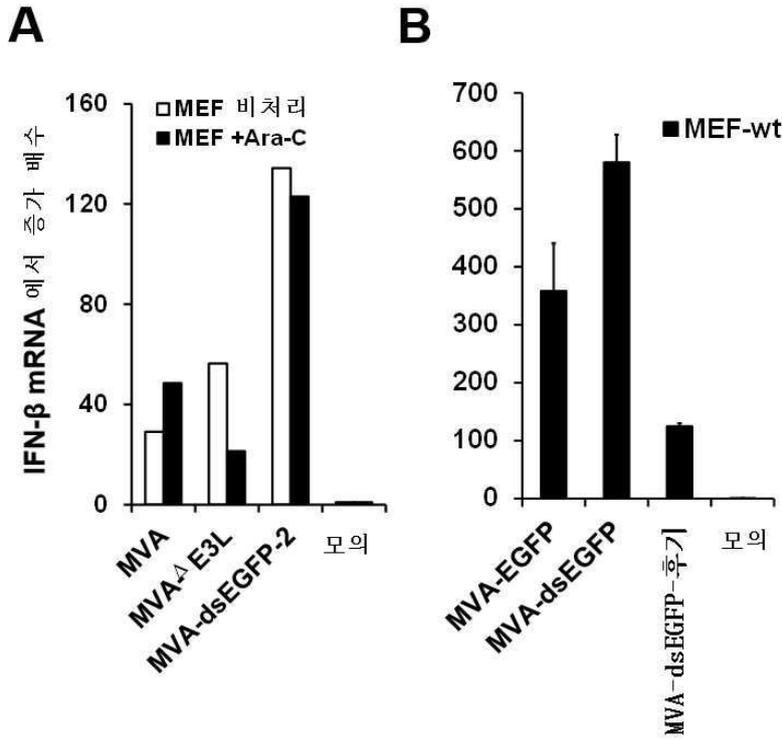
도면6b



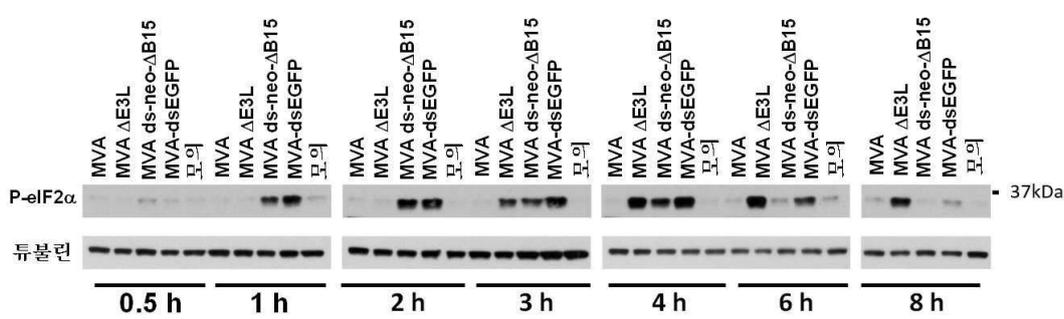
도면7



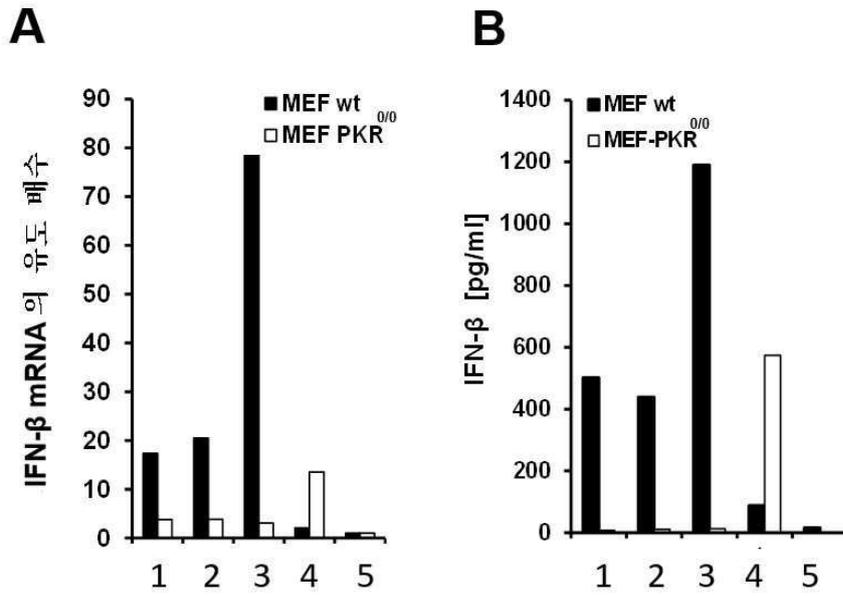
도면8



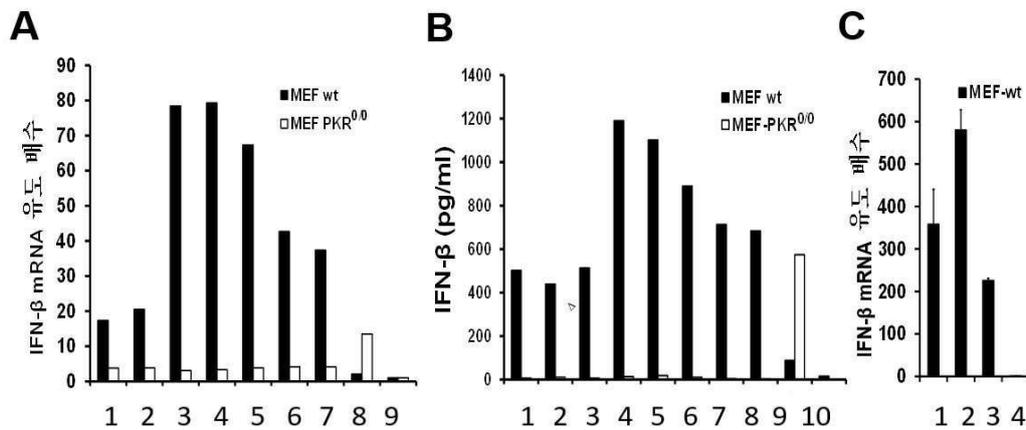
도면9



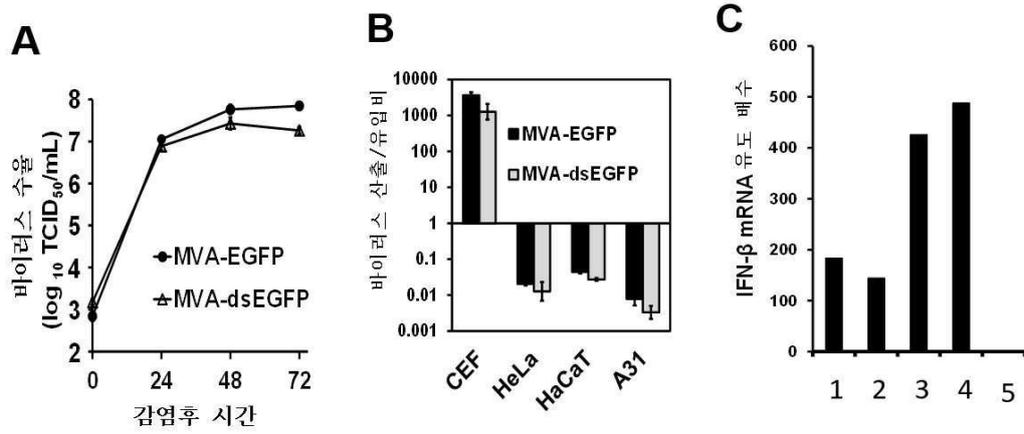
도면10



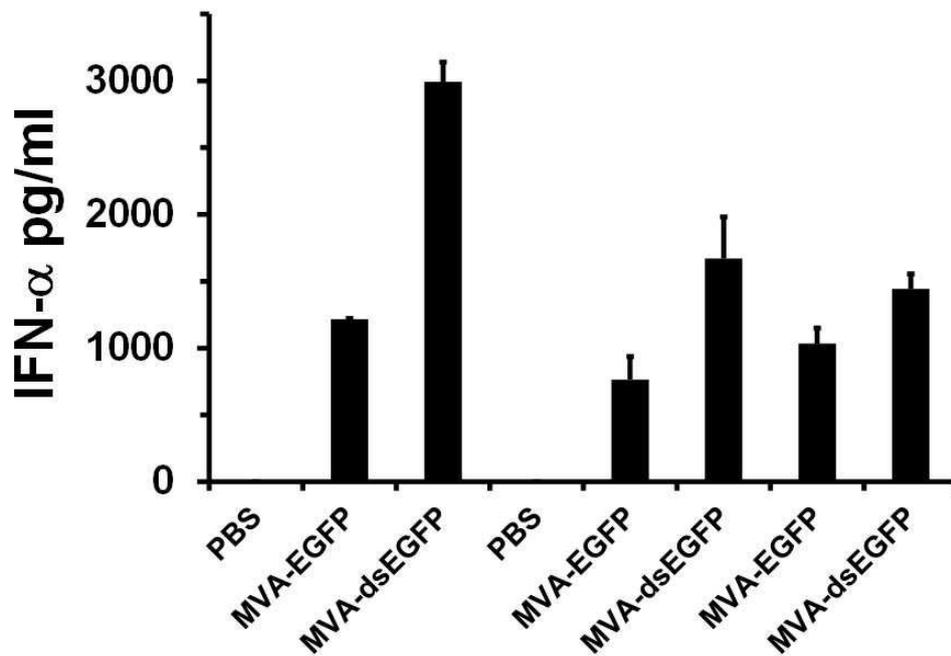
도면11



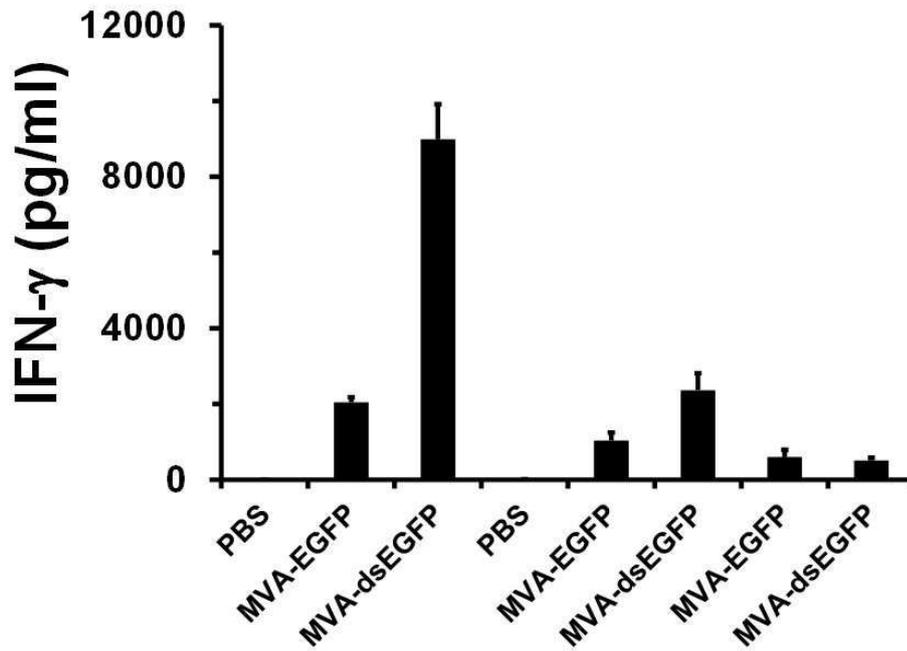
도면12



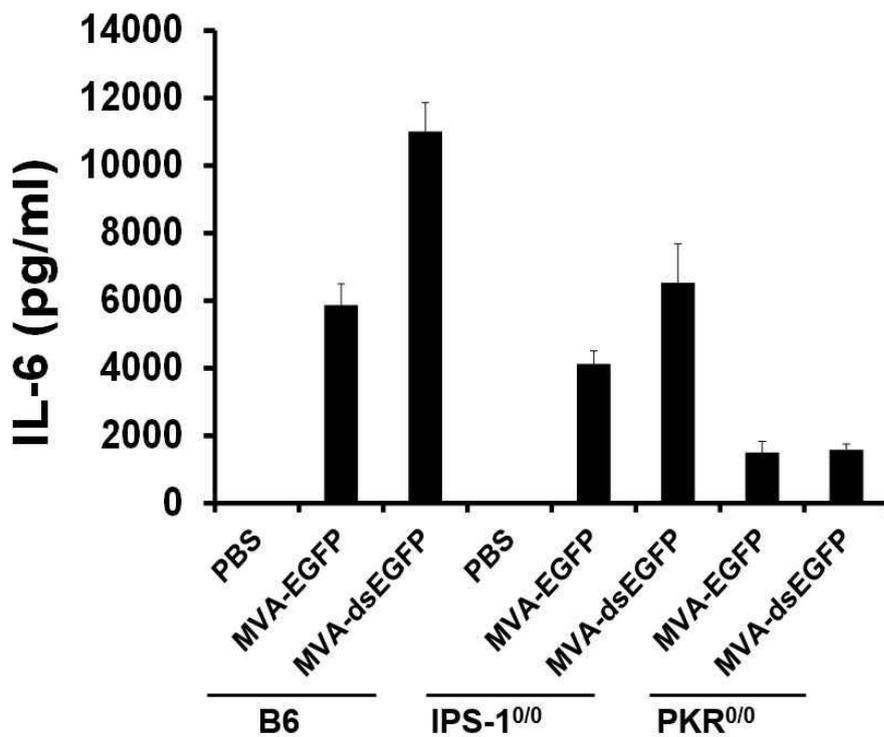
도면13a



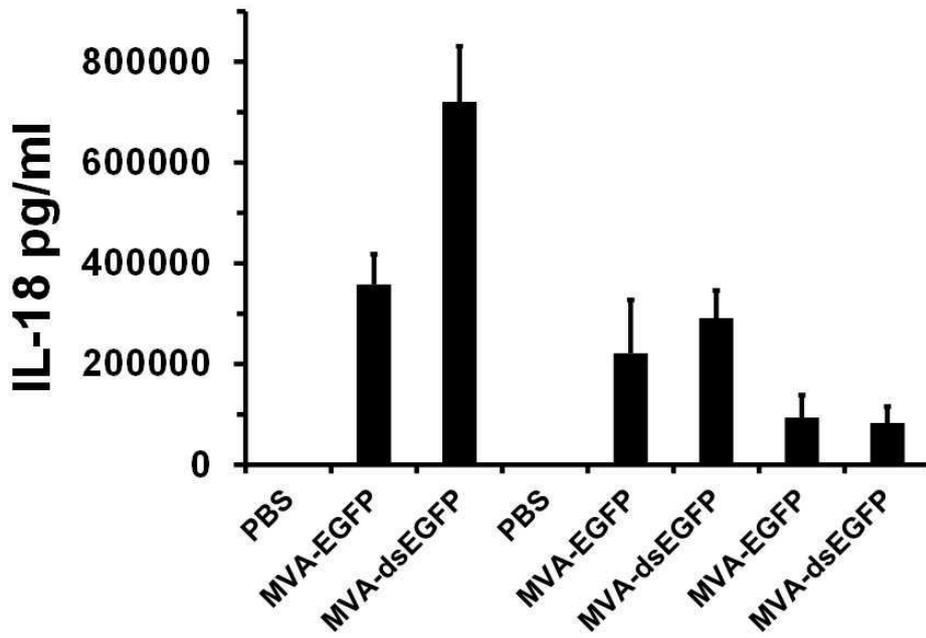
도면13b



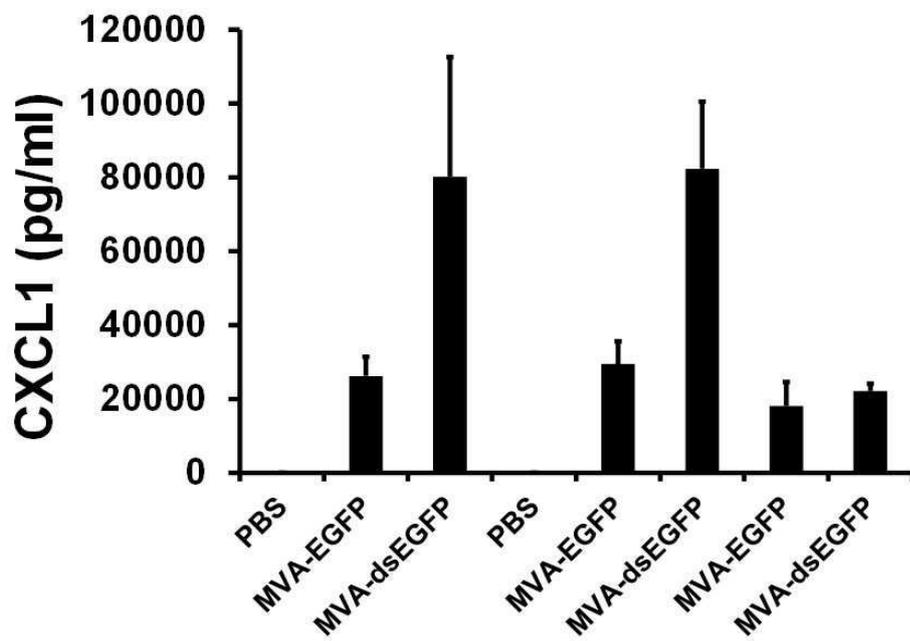
도면13c



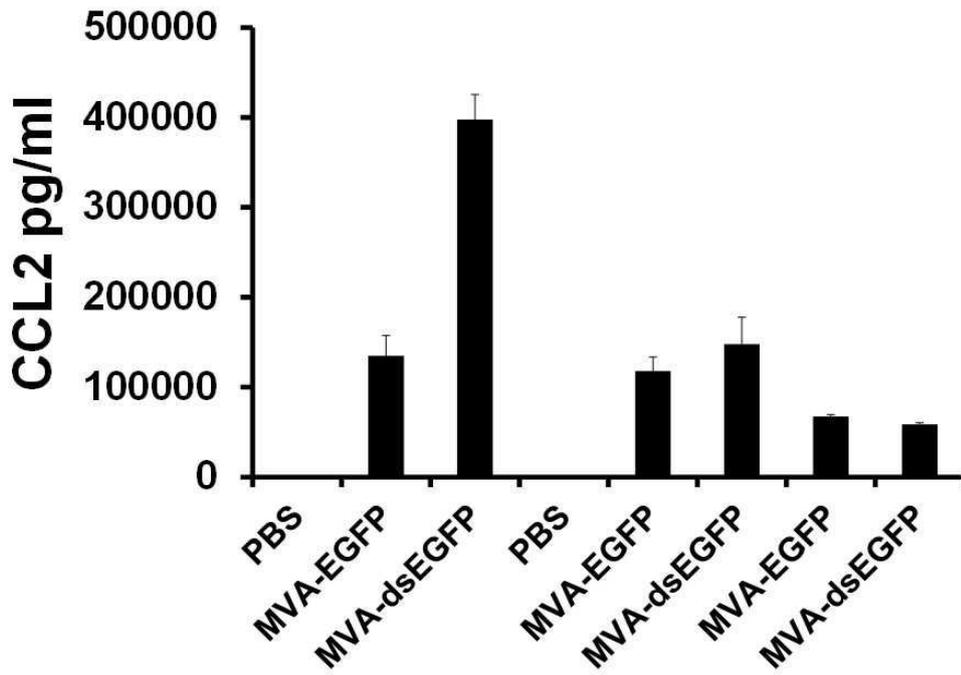
도면13d



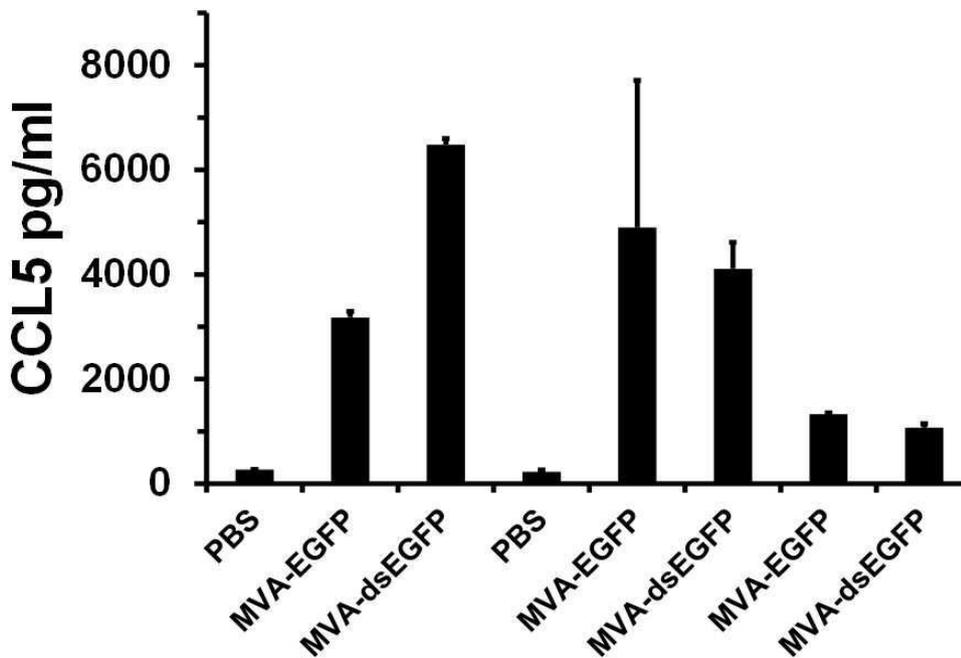
도면13e



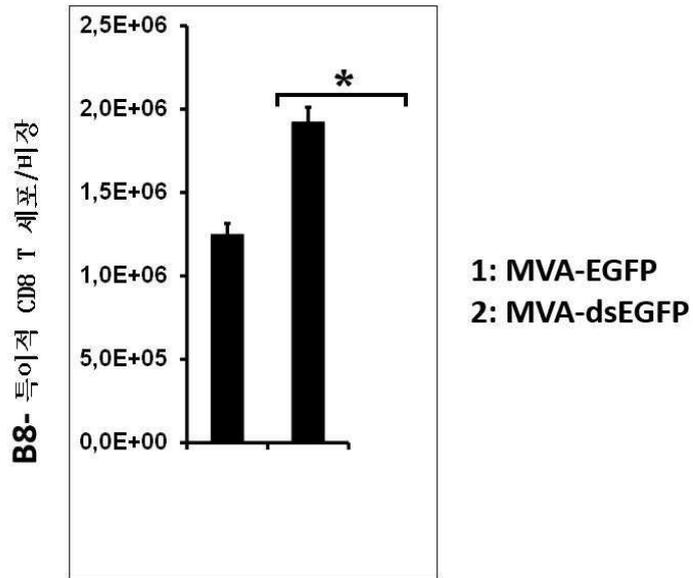
도면13f



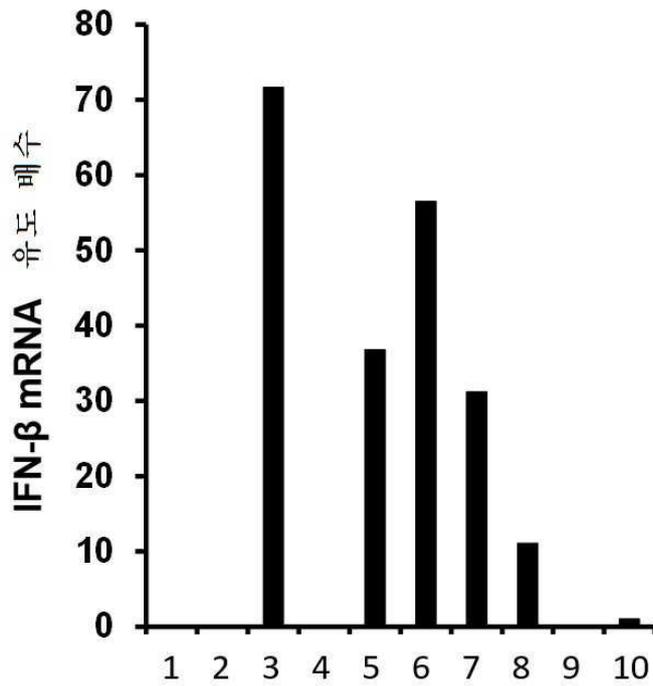
도면13g



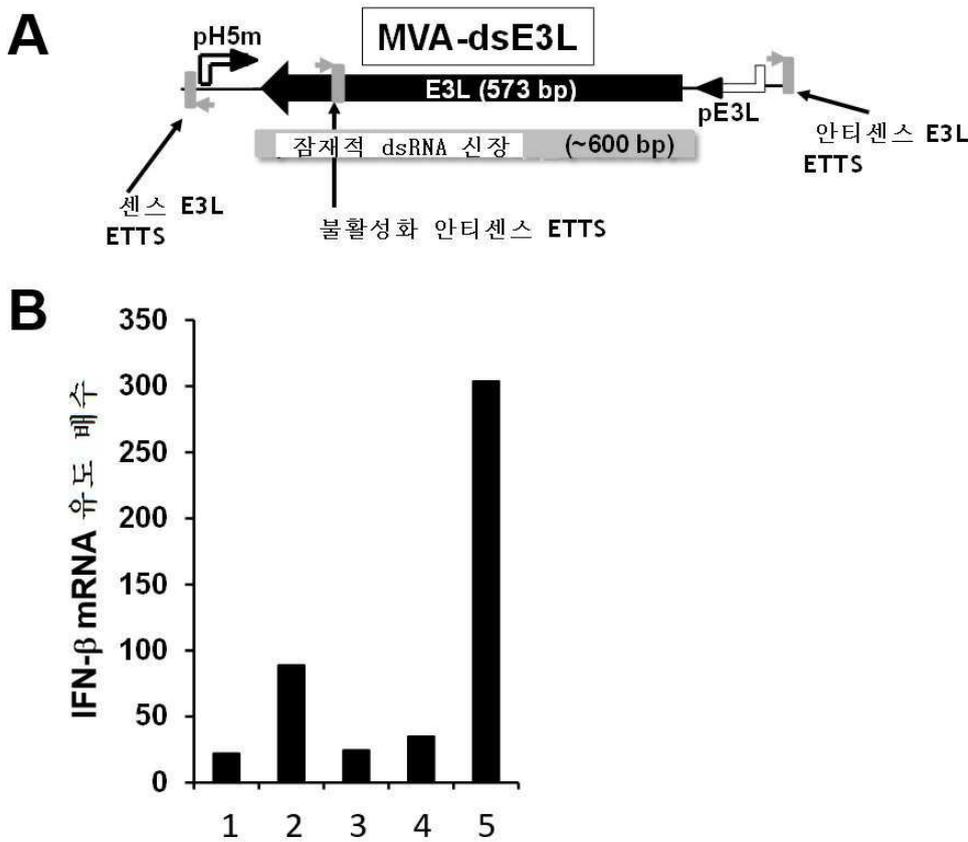
도면14



도면15



도면16



도면17a

원숭이 폭스	--MMKMKMMVRIYFVSL----SLLLFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTLPAKDSK
백시니아-WR	---MTMKMMVHIYFVSL----LLLLFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTLPAKDSK
백시니아-코펜하겐	---MTMKMMVHIYFVSL----LLLLFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTLPAKDSK
CVA	-MKMTMKMMVHIYFVSL----LLLLFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTLPAKDSK
엑트로메리아	MMKMTMKMMVRIYFVSLSLSLSLLFHSYAI---DIENEITEFFN---KMRDTLPAKDSK
우두	-MKMTMKMMVHIYFVSLSLSLSLLFHSYAI---DIENEITEFFN---KMKDTLPAKDSK
카멜 폭스	-MKMTMKMMVHIYFVSL--LSLLLFHSYAI---DIENEITDFFN---KMKDILPTKDSK
돼지 폭스	--MISIK---KYN-----ILLFIISFIYCSADND--IDSLYE---GYKEFLDPKIKQ
타나 폭스	----MK----ITY-----ILLICKEIICDMSGDDMYDIANGNIDYLKTIIDNDIIN
	:* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*
원숭이 폭스	WLNVPVCMFGGTMNDMAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
백시니아-WR	WLNPAACMFGGTMNDIAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
백시니아-코펜하겐	WLNPAACMFGGTMNDIAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
CVA	WLNPAACMFGGTMNDIAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYK---DYVVKWERLEKNRRRQVS
엑트로메리아	WLNPSCFMFGGTMNDMAALGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYNDK-DNVVNWEKIGKTRR--PL
우두	WLNPAACMFGGTMNDMAAIGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKDK-DNVVNWEKIGKTRR--PL
카멜 폭스	WLNPAACMFGGTTNDMAAIGEPFSAKCPPIEDSLLSHRYKKNK-DNVVNWEKIGKTRR--PL
돼지 폭스	FLNDNCTYRGRDFLYNEEPANIKCPLLNDILLRQKYH---NYTILWKKLGERSSR--L
타나 폭스	LVNKNCSEFREIKTTLAKENEVLMKCPQLDNYILPWKYMNRSEYTVTWKNISNSTEY--N
	:* * : : * *** : : * * : : * : : * : : *

도면17b

원숭이폭스	NKRVKHGDLWIANYSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGVVR-SHVWKPSSCIPKTYELGTY
백시니아-WR	NKRVKHGDLWIANYSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGIVR-SHIRKPPSCIPKTYELGTH
백시니아-코펜하겐	NKRVKHGDLWIANYSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGIVR-SHIKPPSCIPKTYELGTH
CVA	NKRVKHGDLWIANYSKFSNRRYLCTVTTKNGDCVQGIVR-SHIKPPSCIPKTYELGTH
엑트로메리아	NRVKNGLDWIANYSNDSHRRYLCTVTTKNGDCVQGVVR-SHIRKPPSCIPKTYELGTH
우두	NRVKNGLDWIANYSNDSHRRYLCTVITKNGDCIQGIVR-SHVRKPSSCIPEIYELGTH
카멜폭스	NRVKNGLDWIANYSNDSHRRYLCTAITKNGDCIQGIIR-SHVRKPSSCIPEIYELGTH
돼지폭스	LNTHGSI FLDFFPYKSELRGSVYECMI ILNN-TCDQFILKLNDRSNPVCYHNDYK----
타나폭스	NTRIENMLMFFPYNLQAGSKYLCTVSTNK-SCDQSVVIVKKSFYSNNCMLSEAK----

* : : . * * :: * * :: .. * . :

원숭이폭스	DKYGIDLKYLKHYNNITWYKDNKEINIDDFKYSQAGK--ELIHNPELEDSEGRYDC
백시니아-WR	DKYGIDLKYLKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGK--ELIHNPELEDSEGRYDC
백시니아-코펜하겐	DKYGIDLKYLKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGK--KLIHNPELEDSEGRYDC
CVA	DKYGIDLKYLKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGK--KLIHNPELEDSEGRYDC
엑트로메리아	DKYGIDLKYLKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGK--NLIHNPELEDSEGRYDC
우두	DKYGIDLKYLKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGK--ELIHNPELEDSEGRYDC
카멜폭스	DKYGIDLKYLKHYNNITWYKDNKEINIDDIKYSQTGK--ELIHNPELEDSEGRYDC
돼지폭스	VHTNIEIFCNVINL-QYDYITWYKNNSEIIDGYKYSNQSR--RLVYNTTYNDSEGIYVC
타나폭스	ENDNFEIYCGILHA-KYNTIKWFKEEKEITN-NYKYTKLGGYVKGINNVTVSDSGKYVC

. : : * * : : * : * . * : : * * : : * : * . * * * * *

도면17c

원숭이폭스	YVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCSAVSTSL
백시니아-WR	YVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
백시니아-코펜하겐	YVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
CVA	YVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
엑트로메리아	YVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
우두	YVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
카멜폭스	YVHYDDVRIKNDIVVSRCKILTVPISQDHRFKLILDPKINVTI--GEPANITCTAVSTSL
돼지폭스	NAYTTH--GKNTYISRRCSSVSIHSHSYDYFIEHINNITYIDPDSENTQIYCKA-ISYS
타나폭스	EGYYIDVLKNTITYTAKRCVNLTVIPNTYYDFIVDIPNVTYAKNNKLE-VNCTSFVDIN

: . : * * : : : * : : : . : : * . :

원숭이폭스	FVDDVLEIWKNP-SGWIIIGLDFGVYSI-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYTC
백시니아-WR	LIDDVLEIWKNP-SGWLIGFDFDVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
백시니아-코펜하겐	LIDDVLEIWKNP-SGWLIGFDFDVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
CVA	LIDDVLEIWKNP-SGWLIGFDFDVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
엑트로메리아	LVDVLEIWKNP-SGWIIIGLDFGVYSI-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYTC
우두	LVDVLEIWKNP-SGWLIGFDFDVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
카멜폭스	LVDVLEIWKNP-SGWLIGFDFDVYSV-----LTSRGGITEATLYFENVTEEYIGNTYKC
돼지폭스	NSSYILYWEDEYGGYIYDNGI--YQYDNITLIGNEKVMSILVLEKSAYRYVNNFTFC
타나폭스	SYDYILTSWLY--NGLYPLGVRIYQLYSTDIFENFIYRTSTLVFENVNDISDDNKTFC

. : * * * * . * . : . : : : : : : * : *

도면17d

원숭이폭스	RGHNYYFDKTLTTTVVLE--
백시니아-WR	RGHNYYFEKTLTTTVVLE--
백시니아-코펜하겐	RGHNYYFEKTLTTTVVLE--
CVA	RGHNYYFEKTLTTTVVLE--
엑트로메리아	RGHNYYFDKTLTTTVVLE--
우두	RGHNYYFEKTLTTTVVLE--
카멜폭스	RGHNYYFEKTLTTTVVLE--
돼지폭스	LATSVEVEKKTTLTVIKKT
타나폭스	EALSVTLKKIKYTTIKVEK-

. . . * * * : : :

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bavarian Nordic AS, BN

<120> COMPOSITIONS AND METHODS VECTORS FOR INDUCING AN ENHANCED IMMUNE RESPONSE USING POXVIRUS VECTORS

<130> WO/2015/078856

<140> PCT/EP2014/075522

<141> 2014-11-25

<150> EP13005541.1

<151> 2013-11-28

<160> 9

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 352

<212> PRT

<213> Monkeypox virus

<220><221> Accession No. Q5IXK2; IFN-alpha/beta-receptor-like secreted glycoprotein

<222> (1)..(352)

<400> 1

Met Met Lys Met Lys Met Met Val Arg Ile Tyr Phe Val Ser Leu Ser

1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe His Ser Tyr Ala Ile Asp Ile Glu Asn Glu Ile Thr

20 25 30

Glu Phe Phe Asn Lys Met Arg Asp Thr Leu Pro Ala Lys Asp Ser Lys

35 40 45

Trp Leu Asn Pro Val Cys Met Phe Gly Gly Thr Met Asn Asp Met Ala

50 55 60

Ala Leu Gly Glu Pro Phe Ser Ala Lys Cys Pro Pro Ile Glu Asp Ser

65 70 75 80

Leu Leu Ser His Arg Tyr Lys Asp Tyr Val Val Lys Trp Glu Arg Leu

85 90 95

Glu Lys Asn Arg Arg Arg Gln Val Ser Asn Lys Arg Val Lys His Gly
 100 105 110
 Asp Leu Trp Ile Ala Asn Tyr Thr Ser Lys Phe Ser Asn Arg Arg Tyr
 115 120 125

 Leu Cys Thr Val Thr Thr Lys Asn Gly Asp Cys Val Gln Gly Val Val
 130 135 140
 Arg Ser His Val Trp Lys Pro Ser Ser Cys Ile Pro Lys Thr Tyr Glu
 145 150 155 160
 Leu Gly Thr Tyr Asp Lys Tyr Gly Ile Asp Leu Tyr Cys Gly Ile Leu
 165 170 175
 Tyr Ala Lys His Tyr Asn Asn Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asn Lys Glu
 180 185 190

 Ile Asn Ile Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Ala Gly Lys Glu Leu Ile
 195 200 205
 Ile His Asn Pro Glu Leu Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Asp Cys Tyr Val
 210 215 220
 His Tyr Asp Asp Val Arg Ile Lys Asn Asp Ile Val Val Ser Arg Cys
 225 230 235 240
 Lys Ile Leu Thr Val Ile Pro Ser Gln Asp His Arg Phe Lys Leu Ile
 245 250 255

 Leu Asp Pro Lys Ile Asn Val Thr Ile Gly Glu Pro Ala Asn Ile Thr
 260 265 270
 Cys Ser Ala Val Ser Thr Ser Leu Phe Val Asp Asp Val Leu Ile Glu
 275 280 285
 Trp Lys Asn Pro Ser Gly Trp Ile Ile Gly Leu Asp Phe Gly Val Tyr
 290 295 300
 Ser Ile Leu Thr Ser Arg Gly Gly Ile Thr Glu Ala Thr Leu Tyr Phe
 305 310 315 320

 Glu Asn Val Thr Glu Glu Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Arg Gly
 325 330 335
 His Asn Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Leu Thr Thr Thr Val Val Leu Glu

Asn Ile Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Gln Thr Gly Lys Glu Leu Ile Ile

195 200 205

His Asn Pro Glu Leu Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Asp Cys Tyr Val His

210 215 220

Tyr Asp Asp Val Arg Ile Lys Asn Asp Ile Val Val Ser Arg Cys Lys

225 230 235 240

Ile Leu Thr Val Ile Pro Ser Gln Asp His Arg Phe Lys Leu Ile Leu

245 250 255

Asp Pro Lys Ile Asn Val Thr Ile Gly Glu Pro Ala Asn Ile Thr Cys

260 265 270

Thr Ala Val Ser Thr Ser Leu Leu Ile Asp Asp Val Leu Ile Glu Trp

275 280 285

Glu Asn Pro Ser Gly Trp Leu Ile Gly Phe Asp Phe Asp Val Tyr Ser

290 295 300

Val Leu Thr Ser Arg Gly Gly Ile Thr Glu Ala Thr Leu Tyr Phe Glu

305 310 315 320

Asn Val Thr Glu Glu Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Lys Cys Arg Gly His

325 330 335

Asn Tyr Tyr Phe Glu Lys Thr Leu Thr Thr Thr Val Val Leu Glu

340 345 350

<210> 3

<211> 351

<212> PRT

<213> Vaccinia virus, strain Copenhagen

<220><221> Accession No. Q5CAD5: IFN-alpha-beta-receptor-like secreted glycoprotein; Vaccinia virus, strain Copenhagen

<222> (1)..(351)

<220><221> Accession No. Q5CAD5: IFN-alpha-beta-receptor-like secreted glycoprotein

<222> (1)..(351)

<400> 3

Met Thr Met Lys Met Met Val His Ile Tyr Phe Val Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe His Ser Tyr Ala Ile Asp Ile Glu Asn Glu Ile Thr Glu
 20 25 30
 Phe Phe Asn Lys Met Arg Asp Thr Leu Pro Ala Lys Asp Ser Lys Trp
 35 40 45
 Leu Asn Pro Ala Cys Met Phe Gly Gly Thr Met Asn Asp Ile Ala Ala
 50 55 60

 Leu Gly Glu Pro Phe Ser Ala Lys Cys Pro Pro Ile Glu Asp Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Ser His Arg Tyr Lys Asp Tyr Val Val Lys Trp Glu Arg Leu Glu
 85 90 95
 Lys Asn Arg Arg Arg Gln Val Ser Asn Lys Arg Val Lys His Gly Asp
 100 105 110
 Leu Trp Ile Ala Asn Tyr Thr Ser Lys Phe Ser Asn Arg Arg Tyr Leu
 115 120 125

 Cys Thr Val Thr Thr Lys Asn Gly Asp Cys Val Gln Gly Ile Val Arg
 130 135 140
 Ser His Ile Lys Lys Pro Pro Ser Cys Ile Pro Lys Thr Tyr Glu Leu
 145 150 155 160
 Gly Thr His Asp Lys Tyr Gly Ile Asp Leu Tyr Cys Gly Ile Leu Tyr
 165 170 175
 Ala Lys His Tyr Asn Asn Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asn Lys Glu Ile
 180 185 190

 Asn Ile Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Gln Thr Gly Lys Lys Leu Ile Ile
 195 200 205
 His Asn Pro Glu Leu Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Asn Cys Tyr Val His
 210 215 220
 Tyr Asp Asp Val Arg Ile Lys Asn Asp Ile Val Val Ser Arg Cys Lys
 225 230 235 240
 Ile Leu Thr Val Ile Pro Ser Gln Asp His Arg Phe Lys Leu Ile Leu

Ser Leu Leu Ser His Arg Tyr Lys Asp Tyr Val Val Lys Trp Glu Arg
 85 90 95
 Leu Glu Lys Asn Arg Arg Arg Gln Val Ser Asn Lys Arg Val Lys His
 100 105 110
 Gly Asp Leu Trp Ile Ala Asn Tyr Thr Ser Lys Phe Ser Asn Arg Arg
 115 120 125
 Tyr Leu Cys Thr Val Thr Thr Lys Asn Gly Asp Cys Val Gln Gly Ile
 130 135 140
 Val Arg Ser His Ile Lys Lys Pro Pro Ser Cys Ile Pro Lys Thr Tyr
 145 150 155 160
 Glu Leu Gly Thr His Asp Lys Tyr Gly Ile Asp Leu Tyr Cys Gly Ile
 165 170 175
 Leu Tyr Ala Lys His Tyr Asn Asn Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asn Lys
 180 185 190
 Glu Ile Asn Ile Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Gln Thr Gly Lys Lys Leu
 195 200 205
 Ile Ile His Asn Pro Glu Leu Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Asn Cys Tyr
 210 215 220
 Val His Tyr Asp Asp Val Lys Ile Lys Asn Asp Ile Val Val Ser Arg
 225 230 235 240
 Cys Lys Ile Leu Thr Val Ile Pro Ser Gln Asp His Arg Phe Lys Leu
 245 250 255
 Ile Leu Asp Pro Lys Ile Asn Val Thr Ile Gly Glu Pro Ala Asn Ile
 260 265 270
 Thr Cys Thr Ala Val Ser Thr Ser Leu Leu Ile Asp Asp Val Leu Ile
 275 280 285
 Glu Trp Glu Asn Pro Ser Gly Trp Leu Ile Gly Phe Asp Phe Asp Val
 290 295 300
 Tyr Ser Val Leu Thr Ser Arg Gly Gly Ile Thr Glu Ala Thr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Phe Glu Asn Val Thr Glu Glu Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Lys Cys Arg

Ile Pro Glu Thr Tyr Glu Leu Gly Thr His Asp Lys Tyr Gly Ile Asp
 165 170 175
 Leu Tyr Cys Gly Ile Leu Tyr Ala Lys His Tyr Asn Asn Ile Thr Trp
 180 185 190
 Tyr Lys Asn Asn Gln Glu Leu Ile Ile Asp Gly Thr Lys Tyr Ser Gln
 195 200 205
 Ser Gly Gln Asn Leu Ile Ile His Asn Pro Glu Leu Glu Asp Ser Gly
 210 215 220
 Arg Tyr Asp Cys Tyr Val His Tyr Asp Asp Val Arg Ile Lys Asn Asp
 225 230 235 240
 Ile Val Val Ser Arg Cys Lys Ile Leu Thr Val Ile Pro Ser Gln Asp
 245 250 255
 His Arg Phe Lys Leu Ile Leu Asp Pro Lys Ile Asn Val Thr Ile Gly
 260 265 270
 Glu Pro Ala Asn Ile Thr Cys Thr Ala Val Ser Thr Ser Leu Leu Val
 275 280 285
 Asp Asp Val Leu Ile Asp Trp Glu Asn Pro Ser Gly Trp Ile Ile Gly
 290 295 300
 Leu Asp Phe Gly Val Tyr Ser Ile Leu Thr Ser Ser Gly Gly Ile Thr
 305 310 315 320
 Glu Ala Thr Leu Tyr Phe Glu Asn Val Thr Glu Glu Tyr Ile Gly Asn
 325 330 335
 Thr Tyr Thr Cys Arg Gly His Asn Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Leu Thr
 340 345 350
 Thr Thr Val Val Leu Glu
 355

<210> 6

<211> 357

<212> PRT

<213> Cowpox virus

<220><221> Accession No. Q5CAC3: Soluble interferon-alpha/beta receptor

<222> (1)..(357)

<400> 6

Met Lys Met Thr Met Lys Met Met Val His Ile Tyr Phe Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe His Ser Tyr Ala Ile Asp Ile
 20 25 30

 Glu Asn Glu Ile Thr Glu Phe Phe Asn Lys Met Lys Asp Thr Leu Pro
 35 40 45
 Ala Lys Asp Ser Lys Trp Leu Asn Pro Ala Cys Met Phe Gly Gly Thr
 50 55 60
 Met Asn Asp Met Ala Ala Ile Gly Glu Pro Phe Ser Ala Lys Cys Pro
 65 70 75 80
 Pro Ile Glu Asp Ser Leu Leu Ser His Arg Tyr Lys Asp Lys Asp Asn
 85 90 95

 Val Val Asn Trp Glu Lys Ile Gly Lys Thr Arg Arg Pro Leu Asn Arg
 100 105 110
 Arg Val Lys Asn Gly Asp Leu Trp Ile Ala Asn Tyr Thr Ser Asn Asp
 115 120 125
 Ser Arg Arg Arg Tyr Leu Cys Thr Val Ile Thr Lys Asn Gly Asp Cys
 130 135 140
 Ile Gln Gly Ile Val Arg Ser His Val Arg Lys Pro Ser Ser Cys Ile
 145 150 155 160

 Pro Glu Ile Tyr Glu Leu Gly Thr His Asp Lys Tyr Gly Ile Asp Leu
 165 170 175
 Tyr Cys Gly Ile Ile Tyr Ala Lys His Tyr Asn Asn Ile Thr Trp Tyr
 180 185 190
 Lys Asp Asn Lys Glu Ile Asn Ile Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Gln Thr
 195 200 205
 Gly Lys Glu Leu Ile Ile His Asn Pro Ala Leu Glu Asp Ser Gly Arg
 210 215 220

 Tyr Asp Cys Tyr Val His Tyr Asp Asp Val Arg Ile Lys Asn Asp Ile
 225 230 235 240

Val Val Ser Arg Cys Lys Ile Leu Thr Val Ile Pro Ser Gln Asp His
 245 250 255
 Arg Phe Lys Leu Ile Leu Asp Pro Lys Ile Asn Val Thr Ile Gly Glu
 260 265 270
 Pro Ala Asn Ile Thr Cys Thr Ala Val Ser Thr Ser Leu Leu Val Asp
 275 280 285

Asp Val Leu Ile Glu Trp Glu Asn Pro Ser Gly Trp Leu Ile Gly Phe
 290 295 300
 Asp Phe Asp Val Tyr Ser Val Leu Thr Ser Arg Gly Gly Ile Thr Glu
 305 310 315 320
 Ala Thr Leu Tyr Phe Glu Asn Val Thr Glu Glu Tyr Ile Gly Asn Thr
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Arg Gly His Asn Tyr Tyr Phe Glu Lys Thr Leu Thr Thr
 340 345 350

Thr Val Val Leu Glu
 355

<210> 7

<211> 355

<212> PRT

<213> Camelpox virus

<220><221> Accession No. Q5CA87: Soluble interferon-alpha/beta receptor

<222> (1)..(355)

<400> 7

Met Lys Met Thr Met Lys Met Met Val His Ile Tyr Phe Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe His Ser Tyr Ala Ile Asp Ile Glu Asn
 20 25 30
 Glu Ile Thr Asp Phe Phe Asn Lys Met Lys Asp Ile Leu Pro Thr Lys
 35 40 45
 Asp Ser Lys Trp Leu Asn Pro Ala Cys Met Phe Gly Gly Thr Thr Asn
 50 55 60
 Asp Met Ala Ala Ile Gly Glu Pro Phe Ser Ala Lys Cys Pro Pro Ile

Leu Tyr Phe Glu Asn Val Thr Glu Glu Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Arg Gly His Asn Tyr Tyr Phe Glu Lys Thr Leu Thr Thr Thr Val
 340 345 350
 Val Leu Glu
 355

<210> 8

<211> 344

<212> PRT

<213> Swinepox virus, strain Swine/Nebraska/17077-99/1999

<220><221> Accession No. Q8V3G4: IFN-alpha/beta-like binding protein

<222> (1)..(344)

<400> 8

Met Ile Ser Ile Lys Lys Tyr Asn Ile Leu Leu Phe Ile Ile Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Tyr Cys Ser Ala Asp Asn Asp Ile Asp Ser Leu Tyr Glu Gly Tyr
 20 25 30
 Lys Glu Phe Leu Asp Pro Lys Leu Lys Gln Phe Leu Asn Asp Asn Cys
 35 40 45

Thr Tyr Arg Gly Tyr Arg Asp Phe Phe Leu Tyr Asn Glu Glu Pro Ala
 50 55 60
 Asn Ile Lys Cys Pro Leu Leu Asn Asp Ile Leu Leu Arg Gln Lys Tyr
 65 70 75 80
 His Asn Tyr Thr Ile Leu Trp Lys Lys Leu Gly Glu Arg Ser Ser Arg
 85 90 95
 Leu Leu Asn Thr His Gly Ser Ile Phe Leu Asp Phe Phe Pro Tyr Lys
 100 105 110

Ser Glu Leu Arg Gly Ser Val Tyr Glu Cys Met Ile Ile Leu Asn Asn
 115 120 125
 Thr Cys Asp Gln Phe Ile Leu Lys Leu Asn Asp Ile Arg Ser Asn Pro
 130 135 140
 Val Cys Tyr His Asn Asp Tyr Lys Val His Thr Asn Ile Glu Ile Phe

145 150 155 160
 Cys Asn Val Ile Asn Leu Gln Tyr Asp Tyr Ile Thr Trp Tyr Lys Asn
 165 170 175

Asn Ser Glu Ile Ile Ile Asp Gly Tyr Lys Tyr Ser Asn Gln Ser Arg
 180 185 190

Arg Leu Leu Val Tyr Asn Thr Thr Tyr Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr
 195 200 205

Cys Asn Ala Tyr Thr Thr His Gly Lys Asn Thr Tyr Ile Ser Arg Arg
 210 215 220

Cys Ser Ser Val Ser Ile His Ser His Ser Tyr Tyr Asp Phe Tyr Ile
 225 230 235 240

Glu His Ile Asn Asn Ile Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ser Glu Asn Thr
 245 250 255

Gln Ile Tyr Cys Lys Ala Ile Ser Tyr Ser Asn Ser Ser Tyr Ile Leu
 260 265 270

Ile Tyr Trp Glu Asp Glu Tyr Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Asn Gly Ile
 275 280 285

Tyr Gln Tyr Asp Asn Ile Thr Leu Ile Gly Asn Glu Lys Val Tyr Met
 290 295 300

Ser Ile Leu Val Leu Glu Lys Ser Ala Tyr Tyr Arg Tyr Val Asn Asn
 305 310 315 320

Thr Phe Thr Cys Leu Ala Thr Ser Val Tyr Val Glu Lys Lys Thr Thr
 325 330 335

Thr Thr Leu Val Ile Lys Lys Thr
 340

<210> 9

<211> 351

<212> PRT

<213> Tanapox virus

<220><221> Accession No. A7XCS4: Type-I IFN receptor

<222> (1)..(351)

<400> 9

Met Lys Ile Thr Tyr Ile Ile Leu Leu Ile Cys Lys Glu Ile Ile Cys

1 5 10 15

Asp Asn Ser Gly Asp Asp Met Tyr Asp Tyr Ile Ala Asn Gly Asn Ile

 20 25 30

Asp Tyr Leu Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Ile Asn Leu Val Asn Lys

 35 40 45

Asn Cys Ser Phe Arg Glu Ile Lys Thr Thr Leu Ala Lys Glu Asn Glu

 50 55 60

Val Leu Met Leu Lys Cys Pro Gln Leu Asp Asn Tyr Ile Leu Pro Trp

65 70 75 80

Lys Tyr Met Asn Arg Ser Glu Tyr Thr Val Thr Trp Lys Asn Ile Ser

 85 90 95

Asn Ser Thr Glu Tyr Asn Asn Thr Arg Ile Glu Asn Asn Met Leu Met

 100 105 110

Phe Phe Pro Phe Tyr Asn Leu Gln Ala Gly Ser Lys Tyr Leu Cys Thr

 115 120 125

Val Ser Thr Asn Lys Ser Cys Asp Gln Ser Val Val Ile Val Lys Lys

130 135 140

Ser Phe Tyr Ser Asn Asn Cys Met Leu Ser Glu Ala Lys Glu Asn Asp

145 150 155 160

Asn Phe Glu Ile Tyr Cys Gly Ile Leu His Ala Lys Tyr Asn Thr Ile

 165 170 175

Lys Trp Phe Lys Glu Glu Lys Glu Ile Thr Asn Asn Tyr Lys Tyr Tyr

 180 185 190

Thr Lys Leu Gly Gly Tyr Val Lys Gly Ile Asn Asn Val Thr Tyr Ser

195 200 205

Asp Ser Gly Lys Tyr Val Cys Glu Gly Tyr Tyr Ile Asp Val Leu Lys

210 215 220

Asn Ile Thr Tyr Thr Ala Lys Arg Cys Val Asn Leu Thr Val Ile Pro

225 230 235 240

Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Phe Ile Val Asp Ile Pro Asn Val Thr Tyr

