



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0110242
(43) 공개일자 2021년09월07일

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/25 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61P 25/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/25 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0027772
(22) 출원일자 2021년03월02일
심사청구일자 없음</p> <p>(30) 우선권주장
1020200025608 2020년02월28일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
(주)셀트리온
인천광역시 연수구 아카데미로 23 (송도동)</p> <p>(72) 발명자
류동균
인천광역시 연수구 아카데미로 23
김판경
인천광역시 연수구 아카데미로 23
(뒷면에 계속)</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

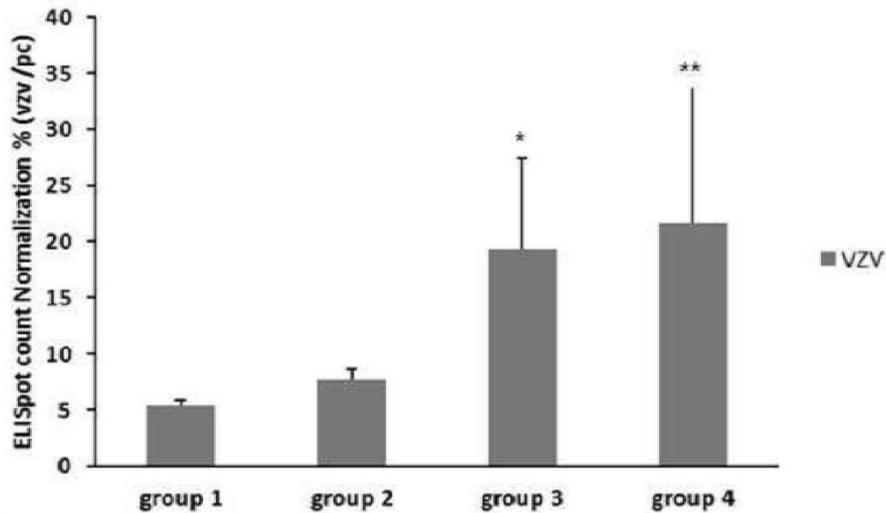
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **수두 대상포진 바이러스 융합 단백질 및 이를 포함하는 면역원성 조성물**

(57) 요약

본 발명은 수두 대상포진 바이러스 융합 단백질 및 이를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 수두 대상포진 바이러스(Varicella Zoster Virus, VZV)의 당단백질 E(glycoprotein E, gE) 및 면역글로불린 분자의 불변부를 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 수두 대상포진 바이러스-특이적 세포-매개 면역 반응을 현저히 증가시킬 뿐만 아니라, 기존 백신 대비 면역 반응을 신속하고 강하게 일어나도록 하고, 장기간 지속 가능한 효과를 나타내므로, 수두대상포진 관련 질환을 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/6811 (2017.08)
A61P 25/00 (2018.01)
A61K 2039/555 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C12N 2710/16022 (2013.01)
C12N 2710/16034 (2013.01)

(72) 발명자

노한미

인천광역시 연수구 아카데미로 23

박근수

인천광역시 연수구 아카데미로 23

이수영

인천광역시 연수구 아카데미로 23

심은영

인천광역시 연수구 아카데미로 23

김민수

인천광역시 연수구 아카데미로 23

나완근

인천광역시 연수구 아카데미로 23

명세서

청구범위

청구항 1

수두 대상포진 바이러스(Varicella Zoster Virus, VZV)의 당단백질 E(glycoprotein E, gE) 및 면역글로불린 분자의 불변부를 포함하는 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E는 C-말단 앵커 영역이 제거되도록 트렁케이드(truncated)됨을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E는 서열번호 1의 서열을 가짐을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 면역글로불린은 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 면역글로불린은 IgG임을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1 중쇄의 불변부임을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1의 힌지(hinge) 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1의 CH1 도메인을 추가로 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 면역글로불린 분자의 불변부는 Fc 부위를 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 Fc 부위는 Fc 수용체와 결합하여 면역원성을 증진시킴을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 Fc 부위는 Fc 변이체를 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 Fc 변이체는 G236A, S239D, A330L, 및 I332E로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 변이를 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 Fc 변이체는 G236A/S239D/A330L/I332E 변이를 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 Fc 부위는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 서열을 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 Fc 변이체는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열을 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 18

제17항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 19

제18항의 발현 벡터가 형질전환된 숙주 세포.

청구항 20

- i) 제18항의 발현 벡터를 동물세포 발현 시스템에 도입하는 단계; 및
- ii) 융합 단백질의 발현을 수행하는 단계를 포함하는, 융합 단백질을 제조하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서,
상기 융합 단백질은 모노머(monomer)임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서,
상기 융합 단백질은 다이머(dimer)임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서,
상기 다이머는 두 융합 단백질의 힌지(hinge) 영역에서 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 이루어짐을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서,

애주번트를 추가로 포함함을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 애주번트는 TLR4(Toll-like receptor 4) 작용제, 알루미늄염, 사포닌(saponin) 및 리포솜으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 TLR4(Toll-like receptor 4) 작용제는 MPL(Monophosphoryl Lipid A) 및 3D-MPL로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서,

상기 알루미늄염은 알루미늄 히드록사이드(Aluminium hydroxide), 알루미늄 포스페이트(phosphate) 및 알루미늄 설페이트(sulphate)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 29

제26항에 있어서,

상기 사포닌(saponin)은 QS21, QS17 및 QuilA으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 30

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 포함하는 키트.

청구항 31

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 투여하여 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 32

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 투여하여 수두 대상포진 또는 대상포진 후 신경통을 예방하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 수두 대상포진 바이러스 융합 단백질 및 이를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 수두 대상포진 바이러스(Varicella Zoster Virus, VZV)의 당단백질 E(glycoprotein E, gE) 및 면역글로불

[0001]

린 분자의 불변부를 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 수두 대상포진 바이러스(Varicella Zoster Virus, VZV)는 바리셀로바이러스 (varicellovirus) 속 (genus)의 인간 알파 헤르페스바이러스(human alphaherpesvirus) 중의 하나이며, 수두(varicella, chickenpox)와 대상포진(zoster, shingles)의 원인이 된다. 수두 대상포진 바이러스의 일차 감염은 상기도 점막(upper respiratory mucosa)의 상피세포(epithelial cell)에서 일어나며 10 내지 21일의 잠복기를 거쳐 전신 피부에 수포성 발진(vesicular rash)을 특징으로 하는 수두(chickenpox)를 일으킨다. 초기 감염(primary infection) 동안, 수두 대상포진 바이러스는 감염된 피부 또는 혈액으로부터 축삭수송(axonal transport)에 의해 숙주의 신경절(ganglia)의 감각신경세포(sensory nerve cell)로 진입하여 수년 동안 잠복감염(latent infection)을 일으킬 수 있다. 신경절에 잠복한 수두 대상포진 바이러스는 숙주의 면역력이 저하되면 재활성화(reactivation)되어 대상포진 질환을 발생시킬 수 있다. 대상포진은 신경절이 분포한 피부분절(dermatome)에 심한 통증과 수포형 피부 발진을 동반하고, 적절한 치료를 하지 못한 경우, 대상포진후 신경통(post-herpetic neuralgia, PHN) 등 심각한 후유증을 유발하는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 수두 대상포진 바이러스 유전체(genome)는 선형의 이중 나선의 DNA 구조로 약 125,000 bp 길이이고, 최소 71개의 오픈 리딩 프레임(ORF, open reading frame)과 프로모터(promoter)를 인코딩한다. 그 중 9개는 바이러스 외피의 표면 당단백질(gB, gC, gE, gH, gI, gK, gL, gN 및 gM)을 구성하고, 바이러스 복제 및 진입에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0005] 현재 대상포진 예방에 사용되고 있는 백신은 크게 약독화생백신(live attenuated vaccine) 또는 면역증강제가 포함된 재조합단백질 백신이 있다. 약독화생백신은 약독화된 살아있는 바이러스를 사용하는 초기의 방식이고 면역증강제가 포함된 재조합단백질 백신은 단백질 항원에 면역증강제를 포함시킨 방식이다.
- [0006] 면역증강제를 포함한 재조합단백질 백신 방식은 기존 약독화생백신 방식의 단점을 하기와 같이 보완하기 위한 것으로서 약독화생백신의 경우, 대상포진과 대상포진후 신경통 예방에 대한 효력이 비교적 낮고, 연령 증가에 따라 그 효력이 크게 감소하는 단점이 있으나, 면역증강제가 포함된 재조합단백질 백신은 임상시험을 통해 연령과 무관하게 높은 효력 및 방어력을 보여주는 것이 확인된 바 있다. 또한, 약독화생백신은 바이러스의 병원성을 제거하였다 하더라도, 여전히 살아있는 바이러스를 이용하여 제조하기 때문에 면역력 저하자에게는 사용할 수 없다는 단점이 있으나, 면역증강제가 포함된 재조합단백질 백신은 면역력 저하자에게도 사용이 가능하다는 장점을 갖고 있다.
- [0007] 이러한 면역증강제가 포함된 재조합단백질 백신은 약독화생백신의 효력 및 안전성 측면에서 개선된 백신이다. 그러나 이 백신의 대상포진 예방률은 대략 90% 수준이고, 사포닌 계열의 면역증강제를 사용하기 때문에 국소적인 통증을 유발하는 경우가 있다. 아울러, 대상포진 및 대상포진후 신경통 예방을 위해서는 수두 대상포진 바이러스 항원에 대한 체액성 면역 반응(humoral immune response)의 유도뿐만 아니라, 세포 매개 면역원성(cell-mediated immunity, CMI)의 활성화가 예방에 직접적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 따라서, 약독화생백신과 사포닌 계열의 면역증강제가 포함된 재조합단백질 백신의 단점을 갖지 않고, 보다 안전하면서 세포 매개 면역원성을 선택적으로 증가시킬 수 있는 새로운 대상포진 백신 조성물의 개발이 필요한 실정이다.
- [0010] 예를 들어, 현재 전세계에서 널리 접종 되고 있는 대상포진 백신인 조스타박스(Zostavax)는 대표적인 약독화생백신으로, OKA라고 하는 백신바이러스 주를 사용하여 동물세포배양 및 정제 공정을 거쳐 제조된다. 이러한 형태의 백신은 효력이 낮고, 특히 연령에 따라 효력이 급격히 떨어지고 면역 저하자에 사용할 수 없는 단점이 있다. 또한, 널리 사용되고 있는 대상포진 백신인 싱그릭스(Shingrix)는 면역증강제가 포함된 대표적인 재조합단백질 백신으로, gE 당단백질은 동물세포 배양 및 정제 공정으로 제조되며, 여기에 AS01 면역증강제(리포솜, MPL 및 QS21 포함)가 포함된다. 효력은 대략 90%이며, 면역증강제에 의한 국소 통증의 부작용 등이 보고된다.
- [0012] 상기와 같은 종래 백신들은 효력 및 안전성의 문제가 있어 예방의 효과가 다소 제한적이고 국소통증을 유발하는

등의 문제점이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 이에, 본 발명자들은 백신투여에 의한 부작용을 줄이면서도 효력을 크게 개선한 새로운 백신 조성물의 효능을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0016] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 수두 대상포진 바이러스(Varicella Zoster Virus, VZV)의 당단백질 E(glycoprotein E, gE) 및 면역글로불린 분자의 불변부를 포함하는 융합 단백질을 제공하는 것이다.
- [0018] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기의 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공하는 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기의 발현 벡터가 형질 전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기의 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기의 융합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기의 면역원성 조성물을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기의 면역원성 조성물을 투여하여 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0032] 아울러, 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 상기의 면역원성 조성물을 투여하여 수두 대상포진 또는 대상포진 후 신경통을 예방하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0034] 상기의 과제를 해결하고자, 본 발명은 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E(gE) 및 면역글로불린 분자의 불변부를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 따른 융합 단백질에 있어서, 상기 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E는 C-말단 앵커 영역이 제거 되도록 트렁케이드(truncated)된 것일 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 당단백질 E는 서열번호 1로 기재되는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 융합 단백질에 있어서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부(예, Fc 부위)는 Fc 수용체와 결합하여 면역원성을 증진시키는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질의 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 면역글로불린 중쇄 불변 부위일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgM, IgA, IgD

및 IgA으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린은 IgG일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1 중쇄의 불변부일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1의 힌지(hinge) 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함할 수 있으며, 다른 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1의 CH1 도메인을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 Fc 부위를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 Fc 부위는 Fc 수용체와 결합하여 면역원성을 증진시킬 수 있다.

[0038] 일 구체예에서, 상기 Fc 부위는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 Fc 변이체는 Fc 수용체와의 결합력을 증진시킬 수 있는, 하나 이상의 Fc 변이를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 Fc 변이체는 Fc 수용체와의 결합력을 증진시켜 면역원성을 증진시킬 수 있는, 하나 이상의 Fc 변이를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 Fc 변이체는 G236A, S239D, A330L, 및 I332E로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 변이를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 Fc 변이체는 G236A/S239D/A330L/I332E 변이를 모두 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 Fc 부위는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 서열을 포함할 수 있으나, 이 서열에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 Fc 변이체는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열을 포함할 수 있으나, 이 서열에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서, 동물실험을 위해 마우스의 Fc 또는 마우스의 Fc 변이체를 사용하였으나, 당업자는 목적에 따라 인간 Fc 또는 인간 Fc 변이체로 치환하여 사용할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0044] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0046] 또한, 본 발명은,

[0047] i) 상기 발현 벡터를 동물세포 발현 시스템에 도입하는 단계; 및

[0048] ii) 융합 단백질의 발현을 수행하는 단계

[0049] 를 포함하는, 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0051] 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 융합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.

[0053] 일 구체예에서, 상기 융합 단백질은 모노머(monomer)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 일 구체예에서, 상기 융합 단백질은 다이머(dimer)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 여기서, 상기 다이머는 두 융합 단백질의 힌지(hinge) 영역에서 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 애주번트를 추가적으로 포함할 수 있고, 상기 애주번트는 TLR4(Toll-like receptor 4) 작용제, 알루미늄염, 사포닌(saponin) 및 리포솜(liposome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0057] 상기 TLR4(Toll-like receptor 4) 작용제는 MPL(Monophosphoryl Lipid A) 및 3D-MPL로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 상기 알루미늄염은 알루미늄 히드록시드(Aluminium hydroxide), 알루미늄 포스페이트(phosphate) 및 알루미늄 설페이트(sulphate)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 사포닌(saponin)은 QS21, QS17 및 QuilA으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 또한, 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 면역원성 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0065] 또한, 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 면역원성 조성물을 투여하여 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0067] 아울러, 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 면역원성 조성물을 투여하여 수두 대상포진 또는 대상포진 후 신경통을 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0069] 본 발명에 따른 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E(gE) 및 면역글로불린 분자의 불변부를 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 면역원성 조성물은 수두 대상포진 바이러스-특이적 세포-매개 면역 반응을 현저히 증가시킬 수 있다. 이에, 본 발명에 따른 융합 단백질은 기존 백신 대비 면역 반응이 신속하고 강하게 일어날 뿐만 아니라, 장기간 지속 가능한 효과를 나타내므로, 수두대상포진 관련 질환을 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1은 gE-Fc + MPL + alum 조합의 수두 대상포진 바이러스 항원에 특이적으로 인터페론 감마를 분비하는 면역 세포의 수를 나타낸다.
- 도 2는 gE-Fc + MPL + alum 조합의 수두 대상포진 바이러스의 표면 당단백질 E에 특이적인 IgG1 및 IgG2a 항체의 생성량을 나타낸다.
- 도 3은 gE-Fc' + MPL + alum 조합의 수두 대상포진 바이러스 항원에 특이적으로 인터페론 감마를 분비하는 면역 세포의 수를 나타낸다.
- 도 4는 gE-Fc' + MPL + alum 조합의 수두 대상포진 바이러스의 표면 당단백질 E에 특이적인 IgG1 및 IgG2a 항체의 생성량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0072] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 본 기재는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 상세한 설명에 기재된 사항들에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명의 범위는, 이하 설명되는 내용에 의해 제한되지 않으며, 특히, 이하의 실시예 등에 기재된 실험 조건 등에 따라 가변될 수 있는 일체의 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 범위는 첨부된 청구항에 의해 제한될 것이므로, 오직 추가의 이해를 위해 본 명세서에서 사용된 용어는, 본 발명의 상세한 실시예를 설명하는 목적을 위한

것일 뿐, 본 발명의 범위가 이에 제한하여서는 안된다.

- [0076] 본 명세서에서 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 그리고 과학 용어는 당업계에서 통상적인 지식을 가진 자에게 일반적으로 이해되는 용어와 동일한 의미로 해석된다. 본 명세서에 언급된 모든 참조 문헌은, 이들의 공개된 전체의 내용이 본 명세서의 발명을 설명하기 위한 참조된 내용으로 본 발명의 명세서의 내용으로써 통합된다.
- [0078] 본 발명은 수두 대상포진 바이러스(Varicella Zoster Virus, VZV)의 당단백질 E(glycoprotein E, gE) 및 면역글로불린 분자의 불변부를 포함하는 융합 단백질에 관한 것으로서, 좀 더 구체적인 예로서, 수두 대상포진 바이러스의 표면 당단백질 E의 카르복시 말단(Carboxyl terminus)에 면역글로불린 중쇄불변부 부분(fragment crystalizable, Fc)의 아미노 말단(Amino terminus)이 펩티드 결합을 통해 연결된 Fc-융합단백질을 제공한다.
- [0080] 상기 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E는 C-말단 앵커 영역이 제거되도록 트렁케이드(truncated)된 것일 수 있다. 이때, 상기 당단백질 E는 서열번호 1의 서열로 기재되는 것일 수 있다.
- [0082] 상기 면역글로불린은 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgA으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린은 IgG일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1 중쇄의 불변부일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1의 힌지(hinge) 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함할 수 있으면, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 IgG1의 CH1 도메인을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 분자의 불변부는 Fc 부위를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 Fc 부위는 Fc 수용체와 결합하여 면역원성을 증진시킬 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 Fc 부위는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 서열을 포함할 수 있으나, 이 서열에 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 또한, 상기 Fc 부위는 Fc 변이체를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 Fc 변이체는 G236A, S239D, A330L, 및 I332E로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 변이를 포함할 수 있다. 상기 Fc 변이체는 G236A/S239D/A330L/I332E 변이를 모두 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 Fc 변이 위치의 넘버링 방식은 EU 방식을 따르나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 Fc 변이체는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열을 포함할 수 있으나, 이 서열에 한정되는 것은 아니다.
- [0086] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0088] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0090] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0092] 또한, 본 발명은,
- [0093] i) 상기 발현 벡터를 동물세포 발현 시스템에 도입하는 단계; 및
- [0094] ii) 융합 단백질의 발현을 수행하는 단계

- [0095] 를 포함하는, 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0097] 또한, 본 발명은 상기의 융합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0099] 일 구체예에서, 상기 융합 단백질은 모노머(monomer)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 일 구체예에서, 상기 융합 단백질은 다이머(dimer)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 여기서, 상기 다이머는 두 융합 단백질의 힌지(hinge) 영역에서 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0101] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 애주번트를 추가적으로 포함할 수 있고, 상기 애주번트는 TLR4(Toll-like receptor 4) 작용제, 알루미늄염, 사포닌(saponin) 및 리포솜(liposome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0103] 상기 TLR4(Toll-like receptor 4) 작용제는 MPL(Monophosphoryl Lipid A) 및 3D-MPL로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0105] 상기 알루미늄염은 알루미늄 히드록사이드(Aluminium hydroxide), 알루미늄 포스페이트(phosphate) 및 알루미늄 설페이트(sulphate)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0107] 상기 사포닌(saponin)은 식물 및 해양 동물계에 널리 분포된 트리페르텐 글리코시드 물질로서, 당업계에서 주로 용인되는 애주번트이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 사포닌은 QS21, QS17 및 QuilA로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 바람직하게는 QS21일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. QS21은 퀴라자 사포나리아(Quillaja saponaria)의 껍질로부터 유래한 추출물을 HPLC 정제하여 사용하며, 아실화된 3, 28-bisdesmodic triterpene glycosides (1,3)으로도 표기된다.
- [0109] 상기 리포솜(Liposome)은 인지질 이중층으로 형성된 지질 기반의 타원형 구조체로서, 통상적으로 백신 조성물 또는 약학적 조성물 등에 포함되어 약물전달운반체로서 역할을 수행한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 리포솜은 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DDA), 1,2-디올레오일-3-트리메틸 암모늄프로페인(DOTAP), 3β-[N-(N',N' -디메틸아미노에테인 카바모일 콜레스테롤(3β-[N-(N,N-dimethylaminoethane) carbamoyl cholesterol, DC-Chol), 1,2-디올레오일옥시-3-디메틸암모늄프로페인(DODAP), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리에틸 암모늄 프로페인(1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane, DOTMA), 1,2-디미리스토크레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-ethyl phosphocholine, 14:1 Ethyl PC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, 16:0-18:1 Ethyl PC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-snglycero-3-ethylphosphocholine, 18:1 Ethyl PC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin, 18:0 Ethyl PC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, 16:0 Ethyl PC), 1,2-디미리스토크레오일-sn-글리세로-3-에틸 포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, 14:0 Ethyl PC), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin, 12:0 Ethyl PC), N1-[2-((1S)-1-[(3-아미노프로필)아미노]-4-[디(3-아미노-프로필)아미노]부틸카복사미도)에틸]-3,4-디[올레일옥시]-벤자마이드(N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl) amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyl oxy]-benzamide, MVL5), 1,2-디미리스토크레오일-3-디메틸암모늄-프로페인(1,2-dimyristoyl-3-dimethylammonium-propane, 14:0 DAP), 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로페인(1,2-dipalmitoyl-3-dimethyl ammonium-propane, 16:0 DAP), 1,2-디스테아로일-3-디메틸암모늄-프로페인(1,2-distearoyl-3-dimethylammonium-propane, 18:0 DAP), N-

(4-카복시벤질)-N,N-디메틸-2,3-비스(올레오일옥시)프로판-1-아미늄(N-(4-carboxybenzyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(oleoyloxy)propan-1-aminium, DOBAQ), 1,2-스테아로일-3-트리메틸암모늄-프로페인(1,2-stearoyl-3-trimethylammonium-propane, 18:0 TAP), 1,2-디팔미토일-3-트리메틸암모늄-프로페인(1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane, 16:0 TA), 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄-프로페인(1,2-dimyristoyl-3-trimethyl ammonium-propane, 14:0 TAP) 및 N4-콜레스테릴-스퍼민(N4-Cholesteryl-Spermine, GL67)으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0111] 또한, 상기 리포솜은 추가적으로 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린([0020] 1,2-Dimyristoyl-snglycero-3-phosphorylcholine, DMPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디리노레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilinoeoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 포스파티딜세린(PS), 포스포에탄올라민(PE), 포스파티딜글리세롤(PG), 포스포릭시드(PA) 및 포스파티딜콜린(PC)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나의 중성 지질을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0113] 또한, 본 발명은 상기의 면역원성 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0115] 또한, 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 면역원성 조성물을 투여하여 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0117] 아울러, 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 면역원성 조성물을 투여하여 수두 대상포진 또는 대상포진 후 신경통을 예방하는 방법을 제공한다.

[0119] 본원에 기재된 상기 각 특징들은 조합되어 사용될 수 있으며, 상기 각 특징들이 특허청구범위의 서로 다른 종속항에 기재된다는 사실은 이들이 조합되어 사용될 수 없음을 나타내는 것은 아니다.

[0121] **실시예 1. 바이러스 항원 및 Fc 부위 융합 단백질 제조방법**

[0122] 우선, 하기와 같은 방법으로 gE-Fc 융합 단백질을 제조하였다.

[0123] 수두 대상포진 바이러스의 표면 당단백질 E(gE, 항원)의 DNA를 합성하여 동물세포 발현벡터(expression vector)인 pCT146 벡터에 클로닝하였다. 합성한 gE DNA를 2종의 제한효소(restriction enzyme), 즉 *NheI*과 *PmeI*으로 절단하고, pCT146 벡터도 동일한 제한효소로 절단하였다. 절단된 gE DNA와 벡터 DNA를 T4 연결효소(ligase)를 이용하여 연결하였다. 클로닝된 pCT146 DNA를 대장균(*E. coli*)에 형질전환(transformation) 하고, 콜로니(colony)를 분석하여 pCT146 벡터에 gE 유전자가 삽입된 박테리아 클론(bacteria clone)을 선별하였다. 이 벡터를 pCT430으로 명명하였다.

[0124] gE-Fc 융합 단백질을 제조하기 위해 pCT430의 gE 유전자의 종결코돈(stop codon)을 제거하는 클로닝을 먼저 진행하였다. pCT430 vector의 gE 유전자를 *NheI* 인식 서열(recognition sequence)을 포함하는 포워드(forward) 프라이머(primer)와 *PmeI* 인식 서열을 포함하면서 종결코돈이 제외된 리버스(reverse) 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기술로 증폭하였다. *NheI*과 *PmeI* 제한효소를 이용하여, 종결코돈이 제거된 gE DNA가 클로닝된 pCT430 벡터를 제조하였다.

[0125] 인간 IgG1의 Fc 유전자 서열과 마우스(쥐) IgG2a의 Fc 유전자 서열을 각각 제한효소 *PmeI*의 인식 서열을 포함하는 포워드, 리버스 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응 기술로 각각 증폭하고, 제한효소 *PmeI*으로 절단하였다. 마우스(쥐) IgG2a의 Fc는 인간 IgG1의 Fc와 기능적으로 대응함이 당업계에서 잘 알려져 있다(Falk

Nimmerjahn et al. Nat Rev Immunol. 2008 Jan;8(1):34-47). 본 출원 명세서 내에 인간 IgG1의 Fc 아미노산 서열 및 마우스 IgG2a의 Fc 아미노산 서열을 각각 서열번호 2 및 3으로 특정하였다.

[0126] 상기 gE 유전자의 종결코돈이 제거된 pCT430 벡터를 동일한 제한효소로 절단한 다음 상기와 같은 방법으로 DNA 연결반응을 수행하여, 항체의 Fc 유전자가 gE 유전자의 카르복실기 말단(carboxyl terminal)에 삽입된 벡터를 확보하고, 각각의 벡터를 pCT486 및 pCT487로 명명하였다.

[0127] 다음으로, 선별된 콜로니를 배양하여 DNA를 정제하였다. 중국 햄스터 난소 세포주(Chinese hamster ovary cell line, CHO) 중 하나인 CHO-K1 동물세포에 정제된 고순도의 DNA를 이용하여 형질전환하였다. 이 CHO-K1세포에 선별마커(selection marker)인 디히드로엽산 환원효소(dihydrofolate reductase, DHFR)의 저해제인 MTX (methotrexate)를 첨가하고, 계대배양을 통해 형질전환된 세포주를 선별하였다. 세포 밖으로 배출되는 gE-Fc 단백질은 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 단백질 크기 차이를 이용한 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 정제하였다.

[0129] **실시예 2. MPL 및 알루미늄 히드록시드의 준비**

[0130] 다음으로, 본 발명의 면역원성 조성물 실험을 위해, 애주번트(면역증강제)로서 MPL 및 알루미늄 히드록시드를 하기와 같은 방법으로 준비하였다.

[0131] MPL 또는 MPLA 로도 알려져 있는 모노포스포릴 지질A(Monophosphoryl Lipid A)는 인비보젠(InvivoGen)사의 MPLA-SM VacchiGrade™(Catalog code: vac-mpla) 제품을 제조사의 방법에 따라 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)로 분주한 뒤, 영하 20℃에서 냉동 보관하여 사용하였다.

[0132] MPL은 살모넬라 미네소타(*Salmonella Minnesota*) R595 균주의 Re 돌연변이 (Re mutant)로부터 생산된 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로부터 추출되는데, 지질 A(lipid A)는 LPS의 내독소 활성(endotoxic activity)에 주로 관여하며, 지질 A에서 phosphate group 하나가 제거된 것이 MPL 로서, 독성은 줄고, 면역증강 효과는 그대로 유지된 물질을 일컫는다(Infect Immun. 71 (5): 2498-507, Int Immunol. 14(11):1325-32, J. Biol. Chem. 257(19): 11808-15, Infect Immun. 79(9): 3576-3587). LPS와 마찬가지로 MPL은 톨유사수용체 4의 작용제(Toll-like receptor 4, TLR4 agonist)로 기능하여, Th1 면역 반응을 강하게 유도한다고도 알려져 있다(Science 316(5831):1628-32, Infect Immun. 75(12): 5939-46).

[0133] 다음으로, 알루미늄 히드록시드로서 인비보젠(InvivoGen)사의 알하이드로겔 애주번트 2%(Alhydrogel® adjuvant 2%, catlog# vac-alu-250) 제품을 분주하여 사용하였다.

[0134] 알루미늄계열의 애주번트는 항원제시세포(antigen presenting cells, APCs)의 항원 흡수를 증가시키고, Th2 면역 반응을 유도하고 Th1 면역 반응은 유도하지 않는 것으로 알려져 있다(Immunity 33(4): 492-503).

[0135] 상기 실시예 1에서 준비한 gE-Fc 용합 단백질에 MPL 및 알루미늄 히드록시드를 PBS 용액(phosphate-buffered saline)을 사용하여 특정 농도로 혼합하여 본 발명의 조성물을 제조하였다.

[0137] **실험예 1. ELISPOT 실험**

[0138] 상기 실시예 2에서 제조된 조성물의 효능을 평가하기 위해, 하기와 같은 방법으로 실험을 진행하였다.

[0139] 대상포진은 수두감염을 통해 신경절에 잠복하고 있던 수두 대상포진 바이러스가 주로 면역력이 저하된 사람에게서 재활성화되어 발병하는 병리학적 특징이 있으므로, 우선 수두감염을 동물에서 모방하고자 생백신(live attenuated vaccine)을 열불활성화(heat inactivation)한 후 BALb/c 마우스(쥐) 암컷에 1회 피하주사하여 감작 면역접종(priming immunization)을 수행하였다.

[0140] 감작 면역접종으로부터 약 5주(36 일)후, 수두 대상포진 바이러스 표면 당 단백질 E(gE)와 마우스(쥐) IgG2a 항체의 Fc 부위가 결합된 용합 단백질 항원과 애주번트가 포함된 다양한 조건의 조성물을 2회 4주 간격으로 근육 주사(intramuscular injection) 하여 면역접종하였다. 백신조성물에 의한 수두 대상포진 바이러스 특이적 체액성 및 세포성 면역원성(humoral and cellular immunity)을 측정하기 위해 2차 면역접종으로부터 약 4주(28일) 후에 마우스의 후대정맥으로부터 전혈(whole blood)을 채취하였고, 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리하였다.

[0141] 조성물의 세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune response)을 평가하기 위한 실험디자인을 하기 표 1에 나타내었다. 표 1의 'gE-Fc'는 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E(gE)와 마우스 IgG2a 항체의 Fc가 융합된 항원, 'MPL'은 애주번트(면역증강제)로써의 모노포스포릴 지질A, 'alum'은 알루미늄 히드록시드를 의미한다(실시예 1 및 2 참조). 또한, 'Shingrix(싱그릭스)'는 재조합된 수두대상포진용 백신(GSK 사)으로서, 리포솜 기반의 수두 대상포진 바이러스의 표면 당단백질 E에 MPL 및 QS21이 포함된 상업화된 백신(liposome-based gE + MPL + QS21 조합)을 의미한다. 또한, 그룹 1 내지 4 내 각 조성물의 최종 볼륨은 100 μ l씩 맞추어 투여하였다.

표 1

그룹	백신조성물	감작접종 (Day 0)	1차 면역접종 (5주)	2차 면역접종 (9주)	샘플채취 (13주)
1	PBS	SC	IM	IM	Serum, PBMC
2	Shingrix	SC	IM	IM	Serum, PBMC
3	gE-Fc (30 μ g)+ MPL + alum	SC	IM	IM	Serum, PBMC
4	gE-Fc (90 μ g)+ MPL + alum	SC	IM	IM	Serum, PBMC

[0145] 본 조성물의 세포성 면역 반응을 평가하기 위해 2차 면역접종으로부터 4주후, 분리한 말초혈액단핵세포를 이용하여 인터페론 감마(Interferon gamma, IFN γ) ELISPOT(Enzyme-linked ImmunoSpot) 분석을 수행하였다. 이를 위해, 마우스의 PBMC 샘플을 RBC 제거 용액(red blood cell lysis buffer)을 이용하여 잔존 RBC를 제거하고, Mouse IFN- γ ELISPOT plus(MABTECH, Catalog number 3321-4AST)을 이용하여 준비한 림프구에 수두대상포진항원(Varicella Zoster antigen, microbix Biosystems Inc, Catalog number EL-03-02) 또는 콘카나발린 A(Concanavalin A, Sigma, Catalog number C5275)를 처리하여 반응시키고, 림프구로부터 분비된 인터페론 감마 단백질을 검출하여 spot forming cells(SFC)을 계수(count)하여 평가하였다.

[0146] 각 그룹의 림프구의 활성을 양성대조군(positive control, PC)인 콘카나발린 A(concanavalin A)에 의한 세포-매개 면역 반응(cell-mediated immune response)의 활성으로 표준화하여 대상포진항원-특이적(VZV-specific) 림프구의 세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune response)을 도 1에 나타내었다. 도 1의 VZV는 수두대상포진항원-특이적 세포-매개 면역 반응을 의미하며, * 또는 **는 그룹 1에 대한 p value가 <0.05 이며, 통계적으로 유의미한 차이를 나타낸다.

[0147] 그 결과, gE-Fc 융합 단백질과 MPL/alum 애주번트가 포함된 조성물이 PBS(음성대조군) 대비, 수두대상포진항원-특이적 세포-매개 면역 반응을 통계적으로 유의미하면서 현저한 면역 반응을 유도하고, 싱그릭스 백신과 비교하였을 때 최소 동등 이상의 세포성 면역 반응을 유도하는 것을 확인하였다(도 1).

[0148] 도 1에서 확인한 바와 같이 gE-Fc + MPL + alum 조합은 저농도(30 μ g)에 비해 고농도(90 μ g)에서 더 높은 세포성 면역 반응을 보였다.

[0150] **실험예 2. ELISA 실험**

[0151] 상기 실험예 1 조합(그룹 1 내지 4)의 조성물 효능을 평가하기 위해, 하기와 같은 방법으로 추가 실험을 진행하였다.

[0152] 2차 면역접종으로부터 약 4주 후, 마우스의 혈액으로부터 분리한 혈청을 이용하여 백신 조성물에 의해 유도된 IgG1 항체와 IgG2a 항체생성량을 ELISA 분석법으로 측정하였다.

[0153] VZV gE 항원(2 μ g/ml)을 코팅 용액(coating buffer, carbonate/bicarbonate buffer, Sigma, catalog number C3041-100CAP)을 이용하여 96웰 플레이트(96-well plate)에 4 $^{\circ}$ C 조건에서 16 내지 18시간 동안 코팅(coating)하였다. 희석액(Diluent, Teknova, catalog# 2D5120-1L; 1% BSA, 0.05% Tween-20, 1X PBS로 구성됨)을 이용하여 3회 세척하고, 희석액을 이용하여 플레이트를 1시간 동안 상온에서 블로킹(blocking)하였다. 3회 세척 후,

준비한 혈청 샘플을 플레이트에 넣고 1시간 30분에서 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 3회 세척 후, 검출 항체: i) horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG1 (BioRad, Catalog# STAR132P) 또는 ii) horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG2a (BioRad, Catalog# STAR133P)을 넣고 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 6회 세척한 후, TMB(3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma, Catalog# T0440)을 플레이트에 넣고 5분간 반응하였고, 황산용액(H₂SO₄, Merck, Catalog# 109072) 넣어 반응을 중지하였다. 플레이트 리더(plate reader)을 이용하여 각 샘플의 흡광도(optical density)를 측정하였다. 그리고 해당 시험의 결과인 수두 대상포진 바이러스 표면 당단백질 E(gE) 즉, 수두 대상포진 바이러스 특이적인 IgG1와 IgG2a 항체의 생성량을 측정하여 하기 표 2, 표 3 및 도 2에 나타내었다. IgG1 생성량은 체액성 면역 반응의 산물을 의미하며, 반면 IgG2a 생성량은 세포성 면역 반응의 산물을 의미한다.

[0154] 그 결과, 표 2에 나타낸 바와 같이, gE-Fc + MPL + alum 조합이 PBS 대비 gE 특이적 IgG2a 항체를 생성시키는 효과가 뛰어남을 확인하였으며, 이는 세포성 면역 반응의 증가를 나타낸다. 또한, 표 3에 나타낸 바와 같이, gE-Fc + MPL + alum 조합이 PBS 대비 gE 특이적 IgG1 항체를 생성시키는 효과가 뛰어남을 확인하였고, 이는 체액성 면역 반응의 증가를 나타낸다(도 2).

[0155] 아울러, 앞서 도 1에서 확인한 바와 같이 gE-Fc + MPL + alum 조합은 싱그릭스 백신 대비 유사한 수준의 체액성 및 세포성 면역 반응의 유도 능력을 가짐을 최종적으로 확인하였다.

[0156] 이에, 본 발명의 조성물이 음성대조군 대비하여 IgG1 및 IgG2a 항체 생성을 현저하게 증가시키는 것을 확인하였고, 싱그릭스 대비 유사한 정도의 세포성 및 체액성 면역 반응을 유도함을 최종적으로 확인하였다(표 2 및 표 3).

표 2

그룹	백신조성물	IgG2a 항체가			평균	fold	log2 평균	log2 표준편차
1	PBS	0	0	0	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Shingrix	125000	125000	25000	91667	5.0	16.5	1.3
3	gE-Fc (30 µg)+ MPL + alum	25000	25000	5000	18333	1.0	14.2	1.3
4	gE-Fc (90 µg)+ MPL + alum	25000	25000	25000	25000	1.4	14.6	0.0

표 3

그룹	백신조성물	IgG1 항체가			평균	fold	log2 평균	log2 표준편차
1	PBS	0	0	0	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Shingrix	125000	125000	125000	125000	1.0	16.9	0.0
3	gE-Fc (30 µg)+ MPL + alum	625000	625000	625000	625000	5.0	19.3	0.0
4	gE-Fc (90 µg)+ MPL + alum	625000	625000	625000	625000	5.0	19.3	0.0

[0162] 실시예 3. 바이러스 항원 및 Fc 부위 융합 변이 단백질의 제조방법

[0163] 우선, 하기와 같은 방법으로 gE-Fc 융합 변이 단백질(gE-Fc')을 제조하였다.

[0164] 수두 대상포진 바이러스의 표면 당단백질 E(gE, 항원)와 마우스(쥐) IgG2a의 Fc (G236A/S239D/A330L/I332E) 변이(mutation)부위가 결합된 융합단백질의 DNA를 합성하여 동물발현세포 발현 벡터(expression vector)인 pCT146 벡터에 클로닝 하였다. 합성한 gE-Fc' DNA를 2종의 제한효소(restriction enzyme), 즉 *NheI*과 *PmeI*으로

절단하고, pCT146 벡터도 동일한 제한효소로 절단하였다. 절단된 gE-Fc' DNA와 벡터 DNA를 T4 연결효소(ligase)를 이용하여 연결하였다. 클로닝된 pCT146 DNA를 대장균(*E. coli*)에 형질전환(transformation) 하고, 콜로니(colony)를 분석하여 pCT146 벡터에 gE-Fc' 유전자가 삽입된 박테리아 클론(bacteria clone)을 선별하였다. 이 벡터를 pCT664로 명명하였다. 본 실시예에서 사용된 마우스 IgG2a의 Fc (G236A/S239D/A330L/I332E) 변이 아미노산 서열을 서열번호 5로 특정하였다. 그리고 본 실시예에서는 사용되지 않았으나, 본 발명에서 다른 구체예로 사용 가능한 인간 IgG1의 Fc (G236A/S239D/A330L/I332E) 변이 아미노산 서열을 서열번호 4로 특정하였다.

[0166] 다음으로, 선별된 콜로니를 배양하여 DNA를 정제하였다. 중국 햄스터 난소 세포주(Chinese hamster ovary cell line, CHO) 중 하나인 ExpiCHO-S 동물세포에 정제된 고순도의 DNA를 이용하여 형질 전환(Transient Transfection) 하였다. 이 ExpiCHO-S 세포를 유가식 배양 (fed-batch culture) 방법을 진행하여 gE-Fc' 융합단백질을 생산 하였다. 세포 밖으로 배출되는 gE-Fc' 단백질은 단백질 A 친화성 크로마토그래피 (Protein A affinity chromatography)를 이용하여 정제하였다.

[0168] **실험예 3. ELISPOT 실험**

[0169] 상기 실시예 2 및 실시예 3에서 제조된 조성물의 효능을 평가하기 위해, 하기와 같은 방법으로 실험을 진행하였다.

[0170] 우선 수두감염을 동물에서 모방하고자 생백신(live attenuated vaccine)을 C57BL/6 마우스(쥐) 암컷에 1회 피하 주사하여 감작 면역접종(priming immunization)을 수행하였다.

[0171] 감작 면역접종으로부터 약 5주(36 일)후, 수두 대상포진 바이러스 표면당 단백질 E(gE)와 마우스(쥐) IgG2a 항체의 Fc 부위가 결합된 융합 단백질 항원과 애주번트가 포함된 다양한 조건의 조성물을 2회 4주 간격으로 근육 주사(intramuscular injection) 하여 면역접종하였다. 백신조성물에 의한 수두 대상포진 바이러스 특이적 체액성 및 세포성 면역원성(humoral and cellular immunity)을 측정하기 위해 2차 면역접종으로부터 약 4주(28일) 후에 마우스의 후대정맥으로부터 전혈(whole blood)을 채취하였고, 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리하였다.

[0172] 조성물의 세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune response)을 평가하기 위한 실험디자인을 하기 표 4에 나타내었다. 표 4의 'gE-Fc'는 수두 대상포진 바이러스의 당단백질 E(gE)와 마우스 IgG2a 항체의 Fc가 융합된 항원, 'MPL'은 애주번트(면역증강제)로써의 모노포스포릴 지질A, 'alum'은 알루미늄 히드록시드를 의미한다(실시예 1, 2 및 3 참조). 또한, 'Shingrix(싱그릭스)'는 재조합된 수두대상포진용 백신(GSK 사)으로서, 리포솜 기반의 수두 대상포진 바이러스의 표면 당단백질 E에 MPL 및 QS21이 포함된 상업화된 백신(liposome-based gE + MPL + QS21 조합)을 의미한다. 또한, 그룹 1 내지 4 내 각 조성물의 최종 볼륨은 50 μ l씩 맞추어 투여하였다.

표 4

그룹	백신조성물	감작접종 (Day 0)	1차 면역접종 (5주)	2차 면역접종 (9주)	샘플채취 (13주)
1	PBS	SC	IM	IM	Serum, PBMC
2	Shingrix	SC	IM	IM	Serum, PBMC
3	gE-Fc (10 μ g)+ MPL + alum	SC	IM	IM	Serum, PBMC
4	gE-Fc' (10 μ g)+ MPL + alum	SC	IM	IM	Serum, PBMC

[0176] 본 조성물의 세포성 면역 반응을 평가하기 위해 2차 면역접종으로부터 4주후, 분리한 말초혈액단핵세포를 이용하여 인터페론 감마(Interferon gamma, IFN γ) ELISPOT(Enzyme-linked ImmunoSpot) 분석을 수행하였다.

[0177] 각 그룹의 림프구의 활성을 양성대조군(positive control, PC)인 콘카나발린 A(concanavalin A)에 의한 세포-

매개 면역 반응(cell-mediated immune response)의 활성화로 표준화하여 대상포진항원-특이적(VZV-specific) 림프구의 세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune response)을 도 3에 나타내었다. 도 3의 VZV는 수두대상포진항원-특이적 세포-매개 면역 반응을 나타낸다.

[0178] 그 결과, gE-Fc 융합 단백질과 MPL/alum 애주번트가 포함된 조성물이 PBS(음성대조군) 대비, 현저한 수두대상포진항원-특이적 세포-매개 면역 유도하였고, 싱그릭스 백신과 비교하였을 때 우월한 세포성 면역 반응을 유도하는 것을 확인하였다(도 3). 마찬가지로 gE-Fc' 융합 변이단백질과 MPL/alum 애주번트가 포함된 조성물이 PBS(음성대조군) 대비, 수두대상포진항원-특이적 세포-매개 면역 반응에서 현저한 면역 반응을 유도하고, 싱그릭스 백신과 비교하였을 때 유사 동등한 세포성 면역 반응을 유도하는 것을 확인하였다(도 3).

[0180] **실험예 4. ELISA 실험**

[0181] 상기 실험예 3 조합(그룹 1 내지 4)의 조성물 효능을 평가하기 위해, 하기와 같은 방법으로 추가 실험을 진행하였다.

[0182] 2차 면역접종으로부터 약 4주 후, 마우스의 혈액으로부터 분리한 혈청을 이용하여 백신 조성물에 의해 유도된 IgG1 항체와 IgG2a 항체생성량을 ELISA 분석법으로 측정하였다.

[0183] 그 결과, 표 5에 나타낸 바와 같이, gE-Fc + MPL + alum 조합이 PBS 대비 gE 특이적 IgG2a 항체를 생성시키는 효과가 뛰어남을 확인하였으며, 이는 세포성 면역 반응의 증가를 나타낸다. 또한, 표 6에 나타낸 바와 같이, gE-Fc' + MPL + alum 조합이 PBS 대비 gE 특이적 IgG1 항체를 생성시키는 효과가 뛰어남을 확인하였고, 이는 체액성 면역 반응의 증가를 나타낸다. (도 4)

[0184] 아울러, 앞서 도 3에서 확인한 바와 같이 gE-Fc + MPL + alum 조합은 싱그릭스 백신 대비 우월한 수준의 체액성 및 세포성 면역 반응의 유도 능력을 가짐을 최종적으로 확인하였다.

[0185] 또한, 표 5에 나타낸 바와 같이, gE-Fc' + MPL + alum 조합이 PBS 대비 gE 특이적 IgG2a 항체를 생성시키는 효과가 뛰어남을 확인하였으며, 이는 세포성 면역 반응의 증가를 나타낸다. 또한, 표 6에 나타낸 바와 같이, gE-Fc' + MPL + alum 조합이 PBS 대비 gE 특이적 IgG1 항체를 생성시키는 효과가 뛰어남을 확인하였고, 이는 체액성 면역 반응의 증가를 나타낸다. (도 4)

[0186] 아울러, 앞서 도 3에서 확인한 바와 같이 gE-Fc' + MPL + alum 조합은 싱그릭스 백신 대비 유사한 수준의 체액성 및 세포성 면역 반응의 유도 능력을 가짐을 최종적으로 확인하였다.

[0187] 이에, 본 발명의 조성물이 음성대조군 대비 IgG1 및 IgG2a 항체 생성을 현저하게 증가시키는 것을 확인하였고, 싱그릭스 대비 유사한 정도의 세포성 및 체액성 면역 반응을 유도함을 최종적으로 확인하였다. (표 5 및 표 6).

표 5

[0189]

그룹	백신조성물	IgG2a 항체가			평균	fold	log2 평균	log2 표준편차
1	PBS	0	0	0	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Shingrix	2500	2500	2500	2500	1.5	11.3	0.0
3	gE-Fc (10 µg)+ MPL + alum	2500	2500	100	1700	1.0	10.7	10.4
4	gE-Fc'(10 µg)+ MPL + alum	100	2500	0	867	0.5	9.8	10.5

표 6

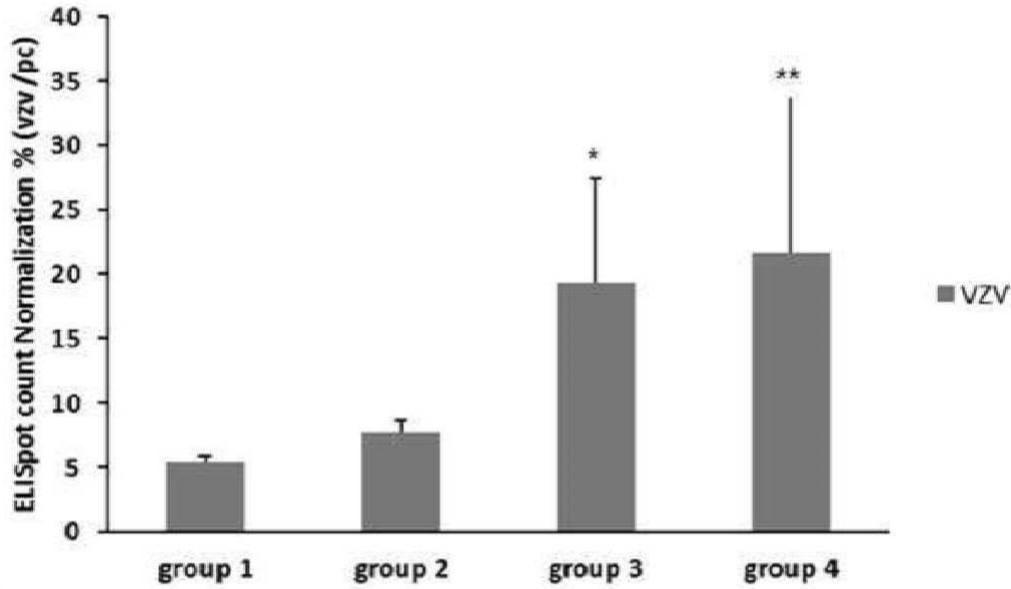
[0191]

그룹	백신조성물	IgG1 항체가			평균	fold	log2 평균	log2 표준편차
1	PBS	0	0	0	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Shingrix	312500	312500	312500	312500	1.0	18.3	0.0

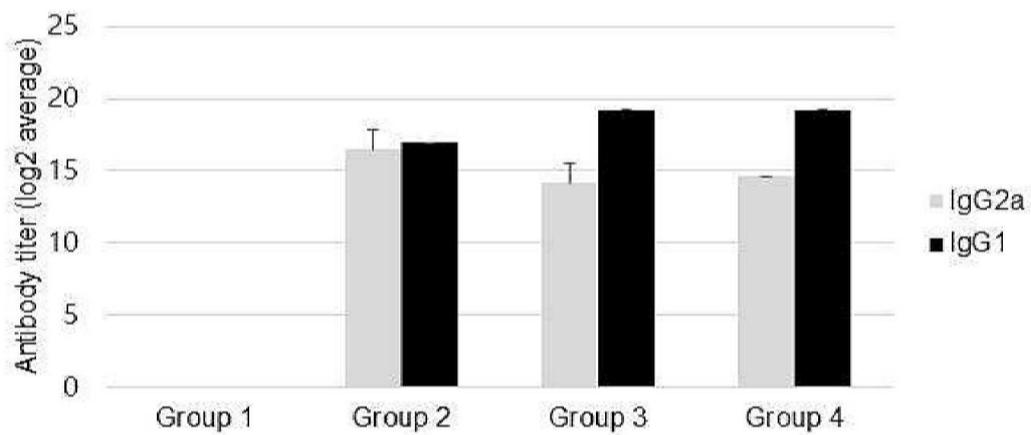
3	gE-Fc (10 μg)+ MPL + alum	1562500	1562500	1562500	1562500	5.0	20.6	0.0
4	gE-Fc' (10 μg)+ MPL + alum	1562500	1562500	1562500	1562500	5.0	20.6	0.0

도면

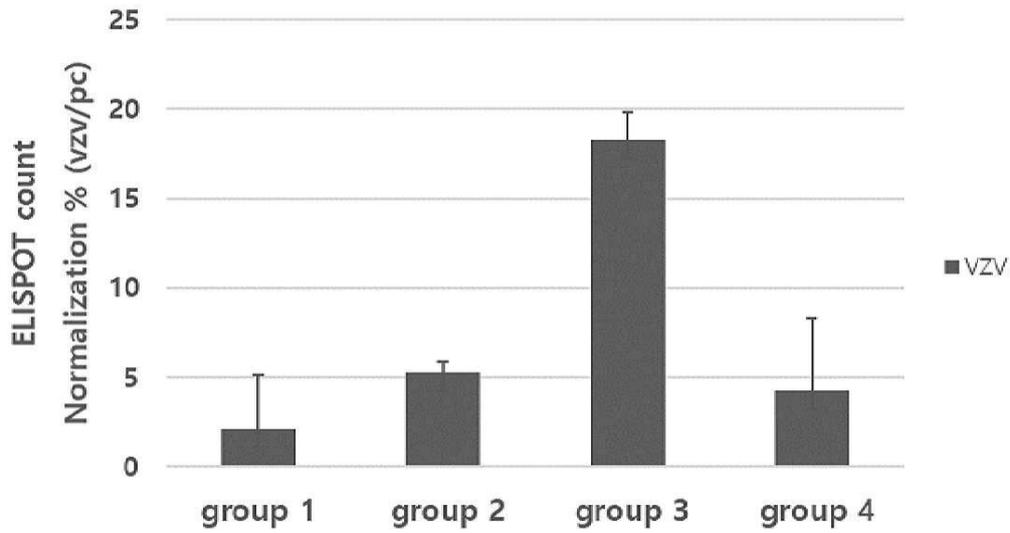
도면1



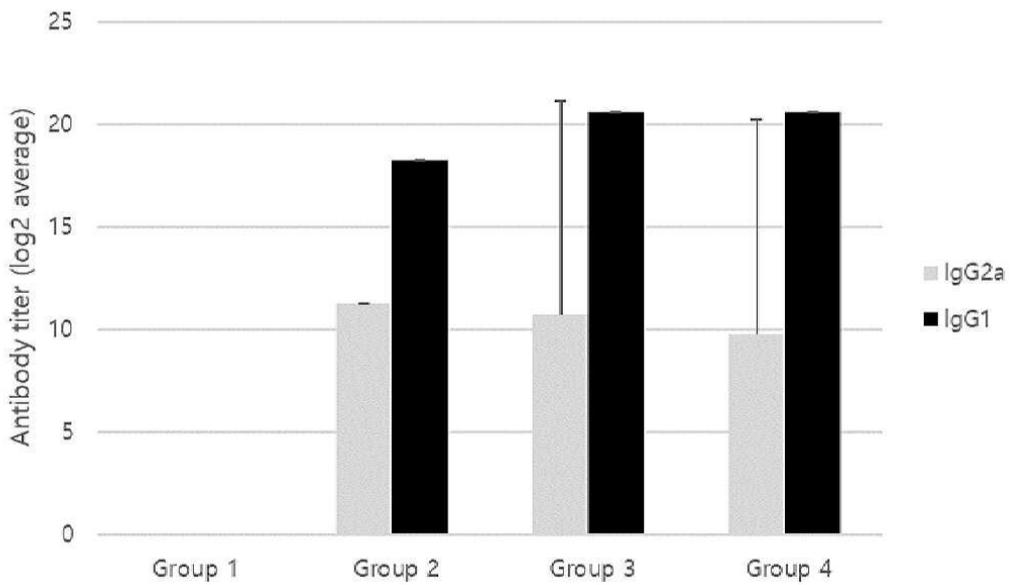
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> CELLTRION, INC.
- <120> Fusion Protein of Varicella Zoster Virus and Immunogenic Composition Comprising the Same
- <130> CPD2021007KR
- <150> KR 10-2020-0025608
- <151> 2020-02-28
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 546
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VZV_truncated gE
 <400> 1
 Met Gly Thr Val Asn Lys Pro Val Val Gly Val Leu Met Gly Phe Gly
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Gly Thr Leu Arg Ile Thr Asn Pro Val Arg Ala Ser Val
 20 25 30
 Leu Arg Tyr Asp Asp Phe His Thr Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Asn
 35 40 45
 Ser Val Tyr Glu Pro Tyr Tyr His Ser Asp His Ala Glu Ser Ser Trp
 50 55 60
 Val Asn Arg Gly Glu Ser Ser Arg Lys Ala Tyr Asp His Asn Ser Pro
 65 70 75 80
 Tyr Ile Trp Pro Arg Asn Asp Tyr Asp Gly Phe Leu Glu Asn Ala His
 85 90 95
 Glu His His Gly Val Tyr Asn Gln Gly Arg Gly Ile Asp Ser Gly Glu
 100 105 110
 Arg Leu Met Gln Pro Thr Gln Met Ser Ala Gln Glu Asp Leu Gly Asp
 115 120 125
 Asp Thr Gly Ile His Val Ile Pro Thr Leu Asn Gly Asp Asp Arg His
 130 135 140
 Lys Ile Val Asn Val Asp Gln Arg Gln Tyr Gly Asp Val Phe Lys Gly
 145 150 155 160
 Asp Leu Asn Pro Lys Pro Gln Gly Gln Arg Leu Ile Glu Val Ser Val
 165 170 175
 Glu Glu Asn His Pro Phe Thr Leu Arg Ala Pro Ile Gln Arg Ile Tyr
 180 185 190
 Gly Val Arg Tyr Thr Glu Thr Trp Ser Phe Leu Pro Ser Leu Thr Cys
 195 200 205
 Thr Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ile Gln His Ile Cys Leu Lys His Thr

Phe Val Asp Thr Pro Glu Ser Leu Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Val
 465 470 475 480
 Tyr Phe Asn Gly His Val Glu Ala Val Ala Tyr Thr Val Val Ser Thr
 485 490 495
 Val Asp His Phe Val Asn Ala Ile Glu Glu Arg Gly Phe Pro Pro Thr
 500 505 510
 Ala Gly Gln Pro Pro Ala Thr Thr Lys Pro Lys Glu Ile Thr Pro Val
 515 520 525

 Asn Pro Gly Thr Ser Pro Leu Leu Arg Tyr Ala Ala Trp Thr Gly Gly
 530 535 540
 Leu Ala
 545
 <210> 2
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fc(human IgG1)
 <400> 2
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 3
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fc(mouse IgG2a)
 <400> 3
 Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
 20 25 30
 Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 50 55 60
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln

85 90 95

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val

115 120 125

Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr

130 135 140

Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr

165 170 175

Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr

195 200 205

Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys

210 215 220

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

225 230

<210> 4

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG1 Fc (mutant)

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

1 5 10 15
 Pro Asn Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
 20 25 30
 Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 50 55 60
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
 100 105 110
 Leu Pro Leu Pro Glu Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
 115 120 125
 Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
 145 150 155 160

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

 225 230