



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0149907
(43) 공개일자 2022년11월09일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7024295
(22) 출원일자(국제) 2020년12월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년07월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/066233
(87) 국제공개번호 WO 2021/127580
국제공개일자 2021년06월24일</p> <p>(30) 우선권주장
62/949,821 2019년12월18일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
진원생명과학 주식회사
서울특별시 영등포구 여의대로 108, 20층 파크원 NH 금융타워 (여의도동, 타워2)</p> <p>(72) 발명자
매슬로, 조엘
서울특별시 영등포구 여의대로 108, 20층 파크원 NH 금융타워 (여의도동, 타워2)</p> <p>정문섭
서울특별시 영등포구 여의대로 108, 20층 파크원 NH 금융타워 (여의도동, 타워2)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
최덕규</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **환자의 예방접종 및 치료를 위한 포와산(POWASSAN) 바이러스 항원 및 관련 조성물, 및 그의 용도**

(57) 요약

POWV에 대한 합성 공통 항원을 포함하는 면역원성 조성물이 본 명세서에서 제공된다. 또한, 면역원성 조성물을 대상체에 투여함으로써, 이를 필요로 하는 대상체에서 POWV에 의한 감염을 치료하는 방법이 본 명세서에 개시된다.

대표도 - 도2

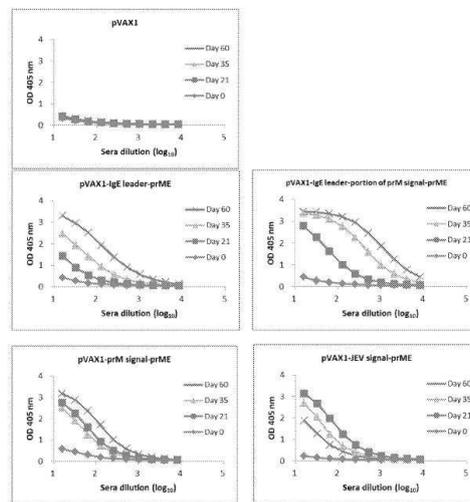


Fig. 2. ELISA analysis measuring binding antibody against POWV prME antigen in immunized mice

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 2039/53 (2013.01)

C12N 2770/24122 (2013.01)

C12N 2770/24134 (2013.01)

(72) 발명자

로버츠, 크리스틴

서울특별시 영등포구 여의대로 108, 20층 파크원
NH 금융타워 (여의도동, 타워2)

조영란

서울특별시 영등포구 여의대로 108, 20층 파크원
NH 금융타워 (여의도동, 타워2)

박, 영

서울특별시 영등포구 여의대로 108, 20층 파크원
NH 금융타워 (여의도동, 타워2)

명세서

청구범위

청구항 1

공통 POWV 항원을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 면역학적 조성물로서, 상기 공통 POWV 항원은 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2와 90% 이상 동일한 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 4와 90% 이상 동일한 아미노산 서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1과 90% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO: 3과 90% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 핵산 분자는 DNA 분자 및 RNA 분자로 이루어진 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 플라스미드를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 아쥘반트(adjuvant)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 면역학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 개시 코돈, IgE 리더 서열 및 정지 코돈으로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 조절인자 서열에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 바이러스 입자 내에 혼입된 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항의 면역학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 POWV 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 11

제12항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 전기천공, 에어로졸 투여, 유전자-총 투여, 미세바늘 주사, 또는 주사기 바늘 주사를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 POWV에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 전기천공을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1과 90% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열, 및 SEQ ID NO: 3과 90% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 15

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2와 90% 이상 동일한 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 4와 90% 이상 동일한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질.

발명의 설명

기술 분야

본원발명은 모든 면역학적 포와산 바이러스 항원을 포함하는 조성물, 하나 이상의 합성 항원을 생성하기 위한 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물, 및 그의 기능적 단편 및 그의 조합에 관한 것이다. 본원발명의 조성물은 포와산 바이러스에 대해 면역 반응을 유도하고, 예방 및/또는 치료 면역화를 위한 개선된 방법을 제공한다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 백신은 면역 체계가 유해 물질과 병든 세포를 인식하고 파괴하도록 훈련함으로써 신체가 질병과 싸우도록 돕는다. 백신은 크게 예방 백신과 치료 백신 두 가지로 나눌 수 있다. 예방 백신은 특정 질병의 발병을 예방하기 위해 건강한 사람에게 제공되고, 면역 요법이라고도 하는 치료 백신은 질병 진단을 받은 사람에게 제공된다.
- [0003] 핵산 기반 백신은 숙주의 세포 내에서 유전자의 작은 부분의 발현을 유도함으로써 작동하고, 이는 차례로, 숙주의 면역 체계가 감염 병원체를 제거하는 능력을 향상시킨다. 이와 같이, 바이러스 백신의 임상 반응은 높은 수준의 면역원성을 획득하고 장기간 발현을 지속하는 백신의 능력에 의존할 수 있다.
- [0004] 포와산 바이러스(POWV)는 플라비바이러스(flavivirus)이다. 포와산 바이러스는 북미에서 인간 병원성을 가진 유일한 진드기-매개 플라비바이러스로 알려져 있다. 포와산 바이러스는 또한 유라시아 전역의 따뜻한 기후에서 발견되고, 진드기-매개 뇌염 바이러스-복합체의 일부이다. 포와산 뇌염은 중증이고, 신경학적 후유증이 흔하다. 현재 POWV를 치료하거나 예방하기 위한 약물이나 백신이 없다. 포와산 바이러스에 감염된 사람들은 일반적으로 감염 후 1-3주에 증상을 보인다. 초기 증상에는 발열, 두통, 메스꺼움, 간헐적인 착란, 및 심약이 포함된다. 포와산 바이러스 감염의 신경학적 합병증에는: 발작, 실어증, 두개골 신경 마비, 마비 및 정신 상태 변화가 포함될 수 있다. POWV 뇌염 사례의 약 10%는 치명적이고 생존자의 절반은 뇌에 영향을 미치는 영구적인 증상을 보인다.
- [0005] 따라서, POWV 감염을 예방하기 위한 신규한 조성물 및 방법, 그리고 감염된 이들을 위해, POWV 감염을 치료하기 위한 신규한 조성물 및 방법을 발견할 필요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

- [0006] 요약
- [0007] 본원발명의 측면은 본원발명에 기재된 공통 POWV 항원을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 면역학적 조성물에 관한 것이다. 공통 POWV 항원은 prME인 아미노산 서열을 포함하고, JEV 신호, prM 신호 또는 prM 신호의 일부와 같은 신호 서열을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 IgE 리더와 같은 리더 서열을 포함할 수 있다.
- [0008] 본 발명의 일부 측면은 본 명세서에 제공된 면역학적 조성물을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 POWV 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 형질감염된 세포로부터의 POWV-prM 단백질 발현의 웨스턴 블롯의 이미지를 도시한다.
- 도 2는 다양한 구조체(pVAX1, pVAX1-IgE 리더-prME, pVAX1-IgE 리더-prM 신호의 부분-prME, pVAX1-prM 신호-prME, 또는 pVAX1-JEV 신호-prME) 면역된 마우스로부터의 혈청으로부터의 POWV prME 항원에 대한 항체 결합 측정을 예시하는 ELISA 분석 그래프를 도시한다.
- 도 3은 다양한 마우스 혈청(pVAX1, pVAX1 -IgE 리더-prME, pVAX1-IgE 리더-prM 신호의 부분-prME, pVAX1-prM 신호-prME, 또는 pVAX1-JEV 신호-prME 형질감염된 마우스) 간의 POWV prME에 대한 항체 결합을 비교하는 ELISA 분석의 그래프를 도시한다.
- 도 4는 각각의 구조체((pVAX1, pVAX1 -IgE 리더-prME, pVAX1 -IgE 리더-prM 신호의 부분-prME, pVAX1-prM 신호-prME, 또는 pVAX1-JEV 신호-prME)에 대한 POWV-E 특이적 항체에 대한 종말점 역가를 제공하는 그래프를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 정의:
- [0011] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상충하는 경우, 정의를 포함한 현재 명세서가 우선한다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 여기에 기재되어 있다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참조 문헌은 그 전체가 참조로 포함된다. 본 명세서에 개시된 재료, 방법, 및 예는 단지 예시적이고 제한하려는 의도가 아니다.

- [0012] 본 명세서에서 사용된 용어 "comprise(s)," "include(s)," "having," "has," "can," "contain(s)," 및 이의 변형은 추가적인 행위 또는 구조의 가능성을 배제하지 않는 개방형-전환 구, 용어, 또는 단어로 의도된다. 단수 형태 "a", "an", 및 "the"는 문맥에서 달리 특별히 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다. 본 명세서는 또한, 명시적으로 기술되든 그렇지 않든, 본 명세서에 제시된 구체에 또는 요소를 "포함하는", "이들로 구성되는", 및 "본질적으로 이들로 구성되는" 다른 실시예를 고려한다.
- [0013] 본 명세서에 사용된 "아주반트(Adjuvant)"는 항원의 면역원성을 향상시키기 위해 본 명세서에 기재된 면역원성 조성물에 첨가된 임의의 분자를 의미한다.
- [0014] 본 명세서에 사용된 "항원"은 면역계에 의해 인식될 수 있고, T-세포와 같은 면역 세포의 항체 또는 세포 표면 수용체에 보다 특이적으로 결합하는 분자를 의미한다. 바람직하게는, 항원은 체액성 또는 세포-매개 면역 반응을 유도하는 것과 같은 면역 반응을 유발한다. 항원은 일반적으로 단백질, 펩티드(아미노산 사슬) 및 다당류(단당류/단당 사슬)이지만 지질 및 핵산은 단백질 및 다당류와 결합할 때만 항원이 된다. 항원은 체내("자가-항원") 또는 외부 환경("비-자가")에서 유래할 수 있다.
- [0015] 본 명세서에 사용된 "암호화 서열" 또는 "암호화 핵산"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 의미한다. 코딩 서열은, 핵산이 투여되는 개체 또는 포유동물의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종료 신호를 추가로 포함할 수 있다.
- [0016] 본 명세서에 사용된 "상보적이다" 또는 "상보적인"은 핵산 분자의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체 간의 Watson-Crick(예: A-T/U 및 C-G) 또는 Hoogsteen 염기 쌍을 의미한다.
- [0017] 본 명세서에 사용된 "공통" 또는 "공통 서열"은 특정 항원의 다중 서브타입의 정렬 분석에 기초하여 구성된 핵산 서열, 또는 상응하는 폴리펩티드 서열을 의미할 수 있다. 서열은 특정 병원체의 다중 아형, 혈청형, 또는 균주에 대한 광범위한 면역을 유도하는 데 사용될 수 있다.
- [0018] 본 명세서에 사용된 용어 "발현 가능한 형태"는, 표적 단백질을 암호화하는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 필수 조절 요소를 함유하는 유전자 구조체를 말하고, 이로써 개체의 세포에 존재하는 코딩 서열이 발현될 것이다.
- [0019] 본 명세서에 사용된 "단편"은 포유동물에서 면역 반응을 유발할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 단편은 하기에 제시된 단백질 단편을 암호화하는 다양한 뉴클레오티드 서열 중 적어도 하나로부터 선택된 DNA 또는 RNA 단편일 수 있다.
- [0020] 폴리펩티드 서열과 관련하여 "면역원성 단편"은 전장 내인성 항원과 교차 반응하는 포유동물에서 면역 반응을 유발할 수 있는 폴리펩티드를 의미한다. 공통 단백질의 단편은 공통 단백질의 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 공통 단백질의 단편은 적어도 520개 아미노산 이상, 적어도 530개 아미노산 이상, 적어도 540개 아미노산 이상, 적어도 550개 아미노산 이상, 적어도 560개 아미노산 이상, 적어도 570개 아미노산 이상, 적어도 580개 아미노산 이상, 적어도 590개 아미노산 이상, 적어도 600개 아미노산 이상, 적어도 610개 아미노산 이상, 적어도 620개 아미노산 이상, 적어도 630개 아미노산 이상, 적어도 640개 아미노산 이상, 적어도 650개 아미노산 이상, 또는 적어도 660개 아미노산 이상의 공통 단백질을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 명세서에 사용된 용어 "유전적 구조체"는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 코딩 서열은 핵산 분자가 투여되는 개체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종료 신호를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "발현 가능한 형태"는, 개체의 세포에 존재할 때 코딩 서열이 발현될 수 있도록, 단백질을 암호화하는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 필수 조절 요소를 함유하는 유전자 구조체를 의미한다.
- [0022] 2 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 본 명세서에 사용된 "동일한" 또는 "동일성"은 서열이 특정 영역에 걸쳐 동일한 특정 백분율의 잔기를 갖는다는 것을 의미한다. 백분율은 2개의 서열을 최적으로 정렬하고, 지정된 영역에 대해 두 서열을 비교하고, 동일한 잔기가 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치된 위치의 수를 산출하고, 일치된 위치의 수를 지정된 영역의 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산할 수 있다. 두 서열의 길이가 다르거나 정렬이 하나 이상의 엇갈린 끝을 생성하고 지정된 비교 영역에 단일 서열만 포함되는 경우, 단일 서열의 잔기는 계산의 분자가 아닌 분모에 포함된다. DNA와 RNA를 비교할 때, 티민(T)과 우라실(U)은 동등한 것으로 간주될 수 있다. 식별은 수동으로 수행하거나

나 BLAST 또는 BLAST 2.0과 같은 컴퓨터 시퀀스 알고리즘을 사용하여 수행할 수 있다.

- [0023] 본 명세서에 사용된 "면역 반응"은 항원의 도입에 반응하여 숙주의 면역계, 예를 들어 포유동물의 면역계의 활성화를 의미한다. 면역 반응은 세포 또는 체액 반응 또는 둘 다의 형태일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에 사용된 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 함께 공유적으로 연결된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 의미한다. 단일 가닥의 묘사는 또한 상보적 가닥의 서열을 정의한다. 따라서, 핵산은 도시된 단일 가닥의 상보적 가닥도 포함한다. 핵산의 많은 변이체가 주어진 핵산과 동일한 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 상보체를 포함한다. 단일 가닥은 엄격한 혼성화 조건에서 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 엄격한 혼성화 조건하에서 혼성화하는 프로브를 포함한다.
- [0025] 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 이중 가닥 및 단일 가닥 서열의 일부를 함유할 수 있다. 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA 모두, RNA 또는 하이브리드일 수 있고, 여기서 핵산은 데옥시리보- 및 리보-뉴클레오타이드의 조합, 및 우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 이노신, 크산틴 하이포크산틴, 이소시토신 및 이소구아닌을 포함한 염기 조합을 함유할 수 있다.
- [0026] 본 명세서에 사용된 "작동 가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 그것이 공간적으로 연결된 프로모터의 제어하에 있음을 의미한다. 프로모터는 제어하에 있는 유전자의 5'(상류) 또는 3'(하류)에 위치할 수 있다. 프로모터와 유전자 사이의 거리는 그 프로모터와 프로모터가 유래된 유전자에서 조절하는 유전자 사이의 거리와 거의 동일할 수 있다. 모두에게 알려진 바와 같이, 이 거리의 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에 사용된 "펩티드", "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산의 연결된 서열을 의미할 수 있고 천연, 합성, 또는 천연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.
- [0028] 본 명세서에 사용된 "프로모터"는 세포에서 핵산의 발현을 부여, 활성화 또는 향상시킬 수 있는 합성 또는 천연-유래 분자를 의미한다. 프로모터는 발현을 추가로 향상시키고/시키거나 그의 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경하기 위해 하나 이상의 특이적 전사 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 전사의 시작 부위로부터 수천 염기 쌍만큼 위치할 수 있는 말단 인핸서 또는 리프레서 요소를 포함할 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충, 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 발현이 일어나는 세포, 조직 또는 기관과 관련하여, 또는 발현이 일어나는 발달 단계와 관련하여, 또는 생리적 스트레스, 병원체, 금속 이온, 또는 유도제와 같은 외부 자극에 대한 반응으로, 구성적으로 또는 차등적으로 유전자 성분의 발현을 조절할 수 있다. 프로모터의 대표적인 예는 박테리오파지 T7 프로모터, 박테리오파지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 오퍼레이터-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 초기 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, SV40 초기 프로모터 또는 SV40 후기 프로모터 및 CMV IE 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0029] "신호 펩티드" 및 "리더 서열"은 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용되고 본 명세서에 기재된 중앙 미세환경 단백질의 아미노 말단에서 연결될 수 있는 아미노산 서열을 의미한다. 신호 펩티드/리더 서열은 일반적으로 단백질의 국소화를 지시한다. 본 명세서에 사용된 신호 펩티드/리더 서열은 바람직하게는 단백질이 생산되는 세포로부터 단백질의 분비를 촉진한다. 신호 펩티드/리더 서열은 종종 세포에서 분비될 때 종종 성숙 단백질로 지칭되는 나머지 단백질로부터 절단된다. 신호 펩티드/리더 서열은 단백질의 N 말단에서 연결된다.
- [0030] 본 명세서에 사용된 "대상체"는 본 명세서에 기재된 면역원성 조성물이 투여될 수 있는 포유동물을 의미할 수 있다. 포유동물은, 예를 들어, 인간, 침팬지, 개, 고양이, 말, 소, 토끼, 그라운드호그, 다람쥐, 마우스, 래트, 또는 기타 설치류일 수 있다.
- [0031] 본 명세서에 사용된 "실질적으로 동일한"은 제1 및 제2 아미노산 서열이 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600개 이상의 아미노산 영역에 걸쳐 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%임을 의미할 수 있다. 실질적으로 동일하다는 것은 또한 제1 뉴클레오타이드 서열 및 제2 뉴클레오타이드 서열이 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100개 이상의 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%임을 의미할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에 사용된 "치료" 또는 "치료하는"은 질병을 예방, 억제, 진정 또는 완전히 제거하는 수단을 통해 질병으로부터 대상체를 보호하는 것을 의미할 수 있다. 한 실시예에서, 질병을 예방하는 것은 질병의 발병 전에 본 발명의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 실시예에서, 질병을 예방하는 것은 질병

의 재발 또는 추가 진행을 방지하기 위해 치료 후에 본 발명의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 질병을 억제(Suppressing)하는 것은 본 발명의 면역원성 조성물을 질병의 유도 후 그러나 그의 임상적 출현 전에 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 질병을 진정(Repressing)하는 것은 질병의 임상적 출현 후에 본 발명의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0033] 핵산과 관련하여 본 명세서에서 사용된 "변이체"는 (i) 참조된 뉴클레오티드 서열의 부분 또는 단편; (ii) 참조된 뉴클레오티드 서열의 상보체 또는 이의 부분; (iii) 참조된 핵산 또는 이의 상보체와 실질적으로 동일한 핵산; 또는 (iv) 엄격한 조건하에 참조된 핵산, 이의 상보체, 또는 이와 실질적으로 동일한 서열에 혼성화하는 핵산을 의미한다.

[0034] 변이체는 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 다르지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 펩티드 또는 폴리펩티드로 추가로 정의될 수 있다. "생물학적 활성"의 대표적인 예로는 특정 항체에 결합하거나 면역 반응을 촉진하는 능력이 있다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 아미노산 서열을 갖는 참조 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉 아미노산을 유사한 특성(예: 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 다른 아미노산으로 대체하는 것은 일반적으로 약간의 변화를 수반하는 것으로 인식된다. 이러한 사소한 변화는 부분적으로, 당 업계에서 이해되는 바와 같이 아미노산의 수치로(hydropathic) 지수를 고려함으로써 확인될 수 있다. Kyte et al., J. Mol. 바이올. 157:105-132(1982). 아미노산의 수치로 지수는 소수성과 전하를 고려하여 결정된다. 유사한 수치로 지수의 아미노산이 치환될 수 있고 여전히 단백질 기능을 유지할 수 있다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 한 측면에서, ± 2 의 수치로 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 단백질이 생물학적 기능을 유지하도록 하는 치환을 나타내는 데 사용될 수 있다. 펩티드와 관련하여 아미노산의 친수성을 고려하면 해당 펩티드의 최대 국소 평균 친수성을 계산할 수 있고, 이는 항원성 및 면역원성과 상관 관계가 있는 것으로 보고된 유용한 척도이다. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에서 이해되는 바와 같이 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 유지하는 펩티드를 생성할 수 있다. 서로 ± 2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 치환을 수행할 수 있다. 아미노산의 소수성 지수와 친수성 값은 모두 해당 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향을 받는다. 그 관찰과 일관되게, 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기, 기타 특성에 의해 밝혀진 바와 같이 아미노산, 특히 해당 아미노산의 측쇄의 상대적 유사성에 의존하는 것으로 이해된다.

[0035] 변이체는 전체 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 유전자 서열 또는 이의 단편의 전체 길이에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다. 변이체는 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전체 길이에 걸쳐 실질적으로 동일한 아미노산 서열일 수 있다. 아미노산 서열은 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전체 길이에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다.

[0036] 본 명세서에 사용된 "백터"는 복제 기점을 함유하는 핵산 서열을 의미한다. 백터는 바이러스 백터, 박테리오파지, 아데노-관련 바이러스(AAV), 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 백터는 DNA 또는 RNA 백터일 수 있다. 백터는 염색체 외 백터일 수 있고, 바람직하게는 DNA 플라스미드 또는 mRNA이다.

[0037] 본 명세서에서 수치 범위의 인용을 위해, 동일한 정도의 정밀도로 그 사이에 있는 각각의 개체 숫자가 명시적으로 고려된다. 예를 들어, 6-9 범위에 대해, 숫자 7 및 8이 6 및 9에 추가로 고려되고, 6.0-7.0 범위에 대해 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7이 명시적으로 고려된다.

[0038] 설명

[0039] 본 발명의 측면은 본 명세서에 기재된 공통 POWV 항원을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 면역학적 조성물에 관한 것이다. 공통 POWV 항원은 prME인 아미노산 서열을 포함하고, JEV 신호, prM 신호 또는 prM 신호의 일부와 같은 신호 서열을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 IgE 리더와 같은 리더 서열을 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일부 측면은 본 명세서에 제공된 면역학적 조성물을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 POWV 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 한 실시예에서, POWV 항원은 POWV-prME로 이루어진 균으로부터 선택된 항원을 포함한다. 일부 실시예에서, JEV 신호 또는 prM 신호, 또는 그의 단편일 수 있는 N-말단 신호 서열과 prME를 포함하는 뉴클레오티드 발현 구조체가 존재한다. 다른 구체예에서, 전술한 뉴클레오티드 중 하나 이상은 또한, 일부 실시예에서 IgE 리

더 서열일 수 있는, N-말단 리더 서열로 구성된다.

- [0042] 본 명세서 내용은 POWV 항원을 암호화하는 최적화된 공통 서열을 제공한다. 한 실시예에서, 최적화된 컨센서스에 의해 암호화된 POWV 항원은 포유동물에서 면역 반응을 유발할 수 있다. 한 실시예에서, 최적화된 공통 서열에 의해 암호화되는 POWV 항원은, 면역 반응이 유도될 수 있는 면역원으로서 특히 효과적이게 하는 에피토프(들)를 포함할 수 있다.
- [0043] 공통 서열은 2개 이상의 천연 POWV 핵산 서열로부터 유래될 수 있다. 공통 서열에 대한 변형은 코돈 최적화, RNA 최적화, 증가된 번역 개시를 위한 Kozak 서열의 추가, 및/또는 면역원성을 증가시키기 위한 면역글로불린 또는 기타 리더 서열의 추가를 포함할 수 있다. 암호화된 POWV 항원은 면역글로불린 신호 펩티드, 예를 들어 면역글로불린 E(IgE) 또는 면역글로불린(IgG) 신호 펩티드와 같은 신호 펩티드를 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. POWV 서열에 의해 암호화된 항원은 상응하는 천연 항원보다 더 강한 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 유도하도록 설계될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 한 실시예에서, 암호화된 POWV 항원은 하나 이상의 조절 요소에 작동 가능하게 연결된다. 한 실시예에서, 조절 요소는 리더 서열이다. 한 실시예에서, IgE 리더 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된 POWVDNA 서열은 SEQ ID NO: 6에 제시되어 있다. 한 실시예에서, 최적화된 공통-암호화된 POWV 항원은 IgE 리더 서열에 작동 가능하게 연결된다.
- [0045] 본 발명의 일부 실시예에서, POWV 항원은 하나 이상의 기능성 단백질의 면역원성 도메인이다. 일부 경우에, POWV 항원은 외피 단백질(E)의 D3 도메인이다. 일부 경우에, 본 발명의 뉴클레오티드 구조체는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)에서 반복되고 특히 3회 반복되는 E 단백질의 D3 도메인을 포함하여, 3개의 D3 도메인을 발현한다.
- [0046] 본 발명의 한 실시예에서, 조절 요소는 개시 코돈이다. 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1(pVAX1-IgE 리더-prME), SEQ ID NO: 2(pVAX1-IgE 리더-prM신호-prME), SEQ ID NO: 3(pVAX1-IgE 리더-prM신호의 부분-prME), SEQ ID NO: 4(pVAX1-prM 부분-prME), 또는 SEQ ID NO: 5(pVAX1-JEV 신호-prME)에 기재된 핵산 서열에 관한 것이다. 한 실시예에서, 본 발명은 N-말단에서 개시 코돈(예를 들어, 메티오닌)에 의해 암호화되는 아미노산에 작동 가능하게 연결된, SEQ ID NO: 7 prM 공통 또는 SEQ ID NO: 8에 E 공통에 기재된 아미노산 서열, 또는 그의 단편 또는 상동체에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 한 실시예에서, 조절 요소는 적어도 하나의 정지 코돈이다. 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은, 3' 말단에서 적어도 하나의 정지 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된, SEQ ID NO: 9(공통 prME)에 제시된 핵산 서열 또는 그의 단편 또는 상동체에 관한 것이다. 한 실시예에서, 뉴클레오티드 서열은 번역 종결의 효율을 증가시키기 위해 2개의 정지 코돈에 작동 가능하게 연결된다.
- [0048] 본 발명의 한 실시예에서, POWV 항원을 암호화하는 최적화된 공통 서열은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 암호화할 수 있다. 한 실시예에서, 최적화된 공통 서열은, 구조체 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 또는 5에서 삽입물의 일부인, SEQ ID NO:9에 제시된 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 서열은 SEQ ID NO: 9에 제시된 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 다른 실시예에서, 서열은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 일부 실시예에서, 최적화된 공통 POWV 항원은, SEQ ID NO: 9에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%를 갖는 DNA 서열로부터의 전사체인 RNA에 의해 암호화될 수 있다. 일부 실시예에서, 최적화된 공통 POWV 항원은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 RNA에 의해 암호화될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일부 실시예에서, 항원은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0050] SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 면역원성 단편은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 7 전체 길이의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 면역원성 단편은 IgE 리더와 같은 면역글로불린 리더와 같은 리더 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 면역원성 단편에는 리더 서열이 없다.
- [0051] 본 발명의 한 실시예에서, 핵산 서열은 본 명세서에 기재된 공통 POWV 면역원 서열을 암호화하는 RNA 서열을 포

함한다. 예를 들어, 핵산은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8 중 하나 이상을 암호화하는 RNA 서열, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0052] SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8의 면역원성 단편에 상동성인 아미노산 서열을 갖는 단백질의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 이러한 면역원성 단편은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8과 95% 상동성인 단백질을 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 포함할 수 있다. 일부 실시예는 본 명세서의 공통 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 90% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시예는 본 명세서의 공통 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 97% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시예는 본 명세서의 공통 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 98% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시예는 본 명세서의 공통 단백질 서열의 면역원성 단편과 99% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시예에서, 면역원성 단편은 IgE 리더와 같은 면역글로불린 리더와 같은 리더 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 면역원성 단편에는 리더 서열이 없다.

[0053] 일부 실시예는 SEQ ID NO: 9의 면역원성 단편에 관한 것이다. 면역원성 단편은 SEQ ID NO: 9의 전체 길이의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%일 수 있다. 면역원성 단편은 SEQ ID NO:9의 단편과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동일 수 있다. 일부 실시예에서, 면역원성 단편은 IgE 리더와 같은 면역글로불린 리더와 같은 리더 서열을 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 단편에는 리더 서열을 암호화하는 코딩 서열이 없다.

[0054] 면역원성 조성물

[0055] 항원 서열, 암호화된 항원, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합을 포함하는 면역원성 조성물, 예컨대 백신이 본 명세서에 제공된다.

[0056] 면역원성 조성물은 DNA 백신, RNA 백신, 펩티드 백신, 또는 조합 백신일 수 있다. 백신은 항원을 암호화하는 최적화된 공통 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 DNA, RNA, mRNA, cDNA, 이들의 변이체, 이들의 단편, 또는 이들의 조합일 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 또한 펩티드 결합에 의해 항원에 연결된 링커, 리더, 또는 태그 서열을 암호화하는 추가 서열을 포함할 수 있다. 펩티드 백신은 항원, 그의 변이체, 그의 단편, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. DNA 및 펩티드 조합 백신은 전술한 최적화된 공통 뉴클레오티드 서열 및 암호화된 항원을 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 백신은, 백신 자체가 질병이나 사망을 일으키지 않도록 안전하고; 질병에 대해 보호하고; 중화 항체를 유도하고; 보호 T 세포 반응을 유도하고; 그리고 투여 용이성, 적은 부작용, 및 생물학적 안정성을 제공하는 등 효과적인 백신에 요구되는 특징을 가질 수 있다.

[0058] 면역 반응

[0059] 면역원성 조성물은 조성물이 투여된 대상체에서 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0060] 면역원성 조성물은 근육 또는 피부와 같은 상이한 조직에 투여될 때 면역 반응을 추가로 유도할 수 있다. 면역원성 조성물은 전기천공 또는 주사를 통해, 또는 피하로, 또는 근육 내로 투여되는 경우 면역 반응을 추가로 유도할 수 있다.

[0061] 단편

[0062] 본 발명의 한 실시예에서, 면역원성 단편은 본 발명의 전장 항원의 면역원성 단편이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 면역원성 단편은 전장 서열의 것과 상당히 유사한 면역 반응을 유도할 수 있는 전장 핵산 또는 아미노산 서열의 단편이다. 한 실시예에서, 면역원성 단편은 전장 서열의 면역원성 에피토프를 포함한다. 한 실시예에서, 면역원성 단편은 전장 서열과 비교하여 적어도 약 0.7배, 적어도 약 0.8배, 적어도 약 0.9배, 적어도 약 1.0배, 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2.0배, 또는 2.0배 초과 면역 반응을 유도한다.

[0063] 면역원성 단편은 면역원성 단편이 투여된 대상체에서 체액성 면역 반응을 유도할 수 있다. 체액성 면역 반응은 면역원성 단편이 투여된 대상체에서 약 1.5배 내지 약 16배, 약 2배 내지 약 12배, 또는 약 3배 내지 약 10배까지 유도될 수 있다. 체액성 면역 반응은 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4.0배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5.0배, 적어도 약 5.5배, 적어도 약 6.0배, 적어도 약 6.5배, 적어도 약 7.0배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 8.0배, 적어도 약 8.5배, 적어도 약 9.0배, 적어도 약 9.5배, 적어도 약 10.0배, 적어도 약 10.5배, 적어도

도 약 11.0배, 적어도 약 11.5배, 적어도 약 12.0배, 적어도 약 12.5배, 적어도 약 13.0배, 적어도 약 13.5배, 적어도 약 14.0배, 적어도 약 14.5배, 적어도 약 15.0배, 적어도 약 15.5배, 또는 적어도 약 16.0배만큼 면역원성 단편이 투여된 대상체에서 유도될 수 있다.

[0064] 면역원성 단편에 의해 유도된 체액성 면역 반응은 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 증가된 수준의 IgG 항체를 포함할 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 IgG 항체의 수준은 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 약 1.5배 내지 약 16배, 약 2배 내지 약 12배, 또는 약 3배 내지 약 10배 증가될 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 회합된 IgG 항체의 수준은 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5.0배, 적어도 약 5.5배, 적어도 약 6.0배, 적어도 약 6.5배, 적어도 약 7.0배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 8.0배, 적어도 약 8.5배, 적어도 약 9.0배, 적어도 약 9.5배, 적어도 약 10.0배, 적어도 약 10.5배, 적어도 약 11.0배, 적어도 약 11.5배, 적어도 약 12.0배, 적어도 약 12.5배, 적어도 약 13.0배, 적어도 약 13.5배, 적어도 약 14.0배, 적어도 약 14.5배, 적어도 약 15.0배, 적어도 약 15.5배, 또는 적어도 약 16.0배 증가될 수 있다.

[0065] 유도된 세포 면역 반응은 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 증가된 CD8⁺ T 세포 반응을 포함할 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 CD8⁺ T 세포 반응은 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 약 2배 내지 약 30배, 약 3배 내지 약 25배, 또는 약 4배 내지 약 20배 증가될 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 CD8⁺ T 세포 반응은 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 4.0배, 적어도 약 5.0배, 적어도 약 6.0배, 적어도 약 6.5배, 적어도 약 7.0배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 8.0배, 적어도 약 8.5배, 적어도 약 9.0배, 적어도 약 9.5배, 적어도 약 10.0배, 적어도 약 10.5배, 적어도 약 11.0배, 적어도 약 11.5배, 적어도 약 12.0배, 적어도 약 12.5배, 적어도 약 13.0배, 적어도 약 13.5배, 적어도 약 14.0배, 적어도 약 14.5배, 적어도 약 15.0배, 적어도 약 16.0배, 적어도 약 17.0배, 적어도 약 18.0배, 적어도 약 19.0배, 적어도 약 20.0배, 적어도 약 21.0배, 적어도 약 22.0배, 적어도 약 23.0배, 적어도 약 24.0배, 적어도 약 25.0배, 적어도 약 26.0배, 적어도 약 27.0배, 적어도 약 28.0배, 적어도 약 29.0배, 또는 적어도 약 30.0배까지 증가될 수 있다.

[0066] 유도된 세포 면역 반응은 천연 항원에 대해 반응성인 CD107a/IFN γ /T-bet 삼중-양성 CD8 T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 CD107a/IFN γ /T-bet 삼중-양성 CD8 T 세포의 빈도는, 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여, 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 또는 20배 증가될 수 있다.

[0067] 유도된 세포 면역 반응은, 천연 항원에 대해 반응성인 CD107a/IFN γ 이중-양성 CD8 T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 CD107a/IFN γ 이중-양성 CD8 T 세포의 빈도는, 면역원성이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 또는 14배 증가될 수 있다.

[0068] 면역원성 단편에 의해 유도된 세포 면역 반응은 CD4⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 유도된 CD4⁺ T 세포 반응은 최적화된 공통 항원과 유전적으로 관련된 천연 항원과 반응성일 수 있다. 유도된 CD4⁺ T 세포 반응은 다작용성일 수 있다. 유도된 세포 면역 반응은 CD4⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 CD4⁺ T 세포는 IFN- γ , TNF- α , IL-2, 또는 IFN- γ 와 TNF- α 의 조합을 생성한다.

[0069] 유도된 세포 면역 반응은 IFN- γ 를 생산하는 CD4⁺ T 세포의 빈도 증가를 포함할 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 CD4⁺IFN- γ ⁺ T 세포의 빈도는, 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여, 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 또는 20배 증가될 수 있다.

[0070] 유도된 세포 면역 반응은 TNF- α 를 생성하는 CD4⁺ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 CD4⁺TNF- α ⁺ T 세포의 빈도는, 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여, 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 21배, 또는 22배 증가될 수 있다.

- [0071] 유도된 세포 면역 반응은 IFN- γ 및 TNF- α 둘 다를 생성하는 CD4⁺ T 세포의 빈도 증가를 포함할 수 있다. 면역 원성 단편이 투여된 대상체와 관련된 CD4⁺ IFN- γ ⁺ TNF- α 의 빈도는, 면역원성 단편이 투여되지 않은 대상체와 비교하여, 적어도 약 2배, 2.5배, 3.0배, 3.5배, 4.0배, 4.5배, 5.0배, 5.5배, 6.0배, 6.5배, 7.0배, 7.5배, 8.0배, 8.5배, 9.0배, 9.5배, 10.0배, 10.5배, 11.0배, 11.5배, 12.0배, 12.5배, 13.0배, 13.5배, 14.0배, 14.5배, 15.0배, 15.5배, 16.0배, 16.5배, 17.0배, 17.5배, 18.0배, 18.5배, 19.0배, 19.5배, 20.0배, 21배, 22배, 23배, 24배, 25배, 26배, 27배, 28배, 29배, 30배, 31배, 32배, 33배, 34배 또는 35배 증가할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 면역원성 단편은, 백신 자체가 질병이나 사망을 일으키지 않도록 안전하고; 바이러스나 박테리아와 같은 살아있는 병원체에 대한 노출로 인한 질병으로부터 보호하고; 중화 항체를 유도하여 세포의 발현을 방지하고; 세포 내 병원체에 대해 보호 T 세포를 유도하고; 그리고 투여 용이성, 적은 부작용, 생물학적 안정성, 및 용량당 낮은 비용을 제공하는 등 효과적인 백신에 요구되는 특징을 가질 수 있다.
- [0073] 면역원성 단편은 근육이나 피부와 같은 다른 조직에 투여될 때 면역 반응을 더 유도할 수 있다. 면역원성 단편은 전기천공 또는 주사를 통해, 또는 피하 또는 근육 내 투여될 때 면역 반응을 추가로 유도할 수 있다.
- [0074] 백터
- [0075] 상기 기재된 뉴클레오티드 구조체는 하나 이상의 백터에 배치될 수 있다. 하나 이상의 백터는 복제 기점을 함유할 수 있다. 하나 이상의 백터는 플라스미드, RNA, 바이러스, 예를 들어 수포성 구내염 바이러스, 홍역 바이러스, 변형된 백시니아 양카라 바이러스, 아데노바이러스, AAV, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 하나 이상의 백터는 자가-복제 추가 염색체 백터일 수 있다.
- [0076] 백터는 플라스미드, 발현 백터, 재조합 바이러스, 임의의 형태의 재조합 "네이키드 DNA" 백터 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. "백터"는 세포를 감염, 형질감염, 일시적 또는 영구적으로 형질도입할 수 있는 핵산을 포함한다. 백터는 네이키드 핵산, 또는 단백질 또는 지질과 복합된 핵산일 수 있음을 인지할 것이다. 백터는 선택적으로 바이러스 또는 박테리아 핵산 및/또는 단백질, 및/또는 막(예: 세포 막, 바이러스 지질 외피 등)을 포함한다. 백터에는 DNA 단편이 부착되어 복제될 수 있는 레플리콘(예: RNA 레플리콘, 박테리오파지)이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 따라서 백터는 RNA, 자율 자가-복제 원형 또는 선형 DNA 또는 RNA(예: 플라스미드, 바이러스 등, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,217,879 참조)를 포함하지만 이에 제한되지는 않고, 발현 및 비발현 플라스미드 모두 포함한다. 재조합 미생물 또는 세포 배양물이 염색체-외 원형 또는 선형 DNA일 수 있는 "발현 백터"를 호스팅하는 것으로 기재되는 경우, 백터가 숙주 세포에 의해 유지되는 경우, 백터는 자율 구조로서 유사분열 동안 세포에 의해 안정적으로 복제되거나 숙주의 게놈 내에 통합될 수 있다.
- [0077] 하나 이상의 백터는, 일반적으로 특정 유전자를 표적 세포 내로 도입하는 데 사용되는 플라스미드인, 발현 구조체일 수 있다. 일단 발현 백터가 세포 내부에 있으면, 유전자에 의해 암호화되는 단백질은 세포-전사 및 번역 기계 리보솜 복합체에 의해 생성된다. 플라스미드는 인핸서 및 프로모터 영역으로 작용하고 발현 백터에서 얻은 유전자의 효율적인 전사를 유도하는 조절 서열을 함유하도록 자주 조작된다.
- [0078] 백터는 강한 프로모터, 강한 종결 코돈, 프로모터와 클로닝된 유전자 사이의 거리 조절, 및 전사 종결 서열과 PITS(portable translation initiation sequence) 삽입 등의 발현 신호를 가질 수 있다.
- [0079] 발현 백터
- [0080] 백터는 원형 플라스미드 또는 선형 핵산일 수 있다. 원형 플라스미드 및 선형 핵산은 적절한 대상 세포에서 특정 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시할 수 있다. 백터는, 종결 신호에 작동 가능하게 연결될 수 있는, 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 항원에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 가질 수 있다. 백터는 또한 뉴클레오티드 서열의 적절한 번역에 필요한 서열을 함유할 수 있다. 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백터는 키메라일 수 있고, 이는 그의 구성요소 중 하나 이상이 그의 다른 구성요소 중 하나 이상에 대해 이종성임을 의미한다. 발현 카세트에서 뉴클레오티드 서열의 발현은 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있고, 이는 숙주 세포가 일부 특정 외부 자극에 노출될 때만 전사를 개시한다. 다세포 유기체의 경우, 프로모터는 또한 특정 조직 또는 기관 또는 발달 단계에 특이적일 수 있다.
- [0081] 플라스미드
- [0082] 하나 이상의 백터는 플라스미드일 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 구조체로 세포를 형질감염시키는데 유용할 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 구조체를 대상체 내에 도입하는 데 유용할 수 있다. 플라스미드는 또한,

플라스미드가 투여되는 세포에서의 유전자 발현에 매우 적합할 수 있는, 조절 서열을 포함할 수 있다.

[0083] 플라스미드는 또한 염색체 외에서 플라스미드를 유지하고 세포에서 플라스미드의 다중 카피를 생성하기 위해 포유동물 복제 기점을 포함할 수 있다. 플라스미드는, 통합 없이 높은 카피 에피솜 복제를 생성할 수 있는, Epstein Barr 바이러스 복제 기점 및 핵 항원 EBNA-1 코딩 영역을 포함할 수 있는 Invitrogen(San Diego, CA)의 pVAX1, pCEP4 또는 pREP4일 수 있다. 플라스미드의 골격(backbone)은 pAV0242일 수 있다. 플라스미드는 복제 결함 아데노바이러스 유형 5(Ad5) 플라스미드일 수 있다.

[0084] 플라스미드는 또한 pIDV 또는 pIDV-IL일 수 있다.

[0085] 플라스미드는 대장균(E.coli)에서 단백질 생산에 사용될 수 있는 pSE420(Invitrogen, San Diego, CA)일 수 있다. 플라스미드는 또한, 효모의 *Saccharomyces cerevisiae* 균주에서 단백질 생산을 위해 사용될 수 있는, pYES2(Invitrogen, San Diego, CA)일 수 있다. 플라스미드는 또한, 곤충 세포에서 단백질 생산에 사용될 수 있는, MAXBAC™ 완전 배칼로바이러스 발현 시스템(Invitrogen, San Diego, CA)일 수 있다. 플라스미드는 또한, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유동물 세포에서 단백질 생산에 사용될 수 있는, pcDNA1 또는 pcDNA3(Invitrogen, San Diego, CA)일 수 있다.

[0086] RNA

[0087] 본 발명의 한 실시예에서, 핵산은 RNA 분자이다. 한 실시예에서, RNA 분자는 본 명세서에 기재된 DNA 서열로부터 전사된다. 예를 들어, 일부 실시예에서, RNA 분자는 SEQ ID NO: 9에 대해 적어도 90% 상동성인 DNA 서열, 또는 그의 변이체 또는 그의 단편에 의해 암호화된다. 또 다른 실시예에서, 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8 중 하나와 적어도 90% 상동성인 폴리펩티드 서열 또는 그의 변이체 또는 그의 단편을 암호화하는 DNA 서열에 의해 전사된 RNA 서열을 포함한다. 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은 POWV 항원 중 하나 이상을 암호화하는 RNA 분자를 제공한다. RNA는 플러스-가닥일 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, RNA 분자는 역전사와 같은 임의의 개재 복제 단계를 필요로 하지 않고 세포에 의해 번역될 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자는 5' 캡(예를 들어, 7-메틸구아노신)을 가질 수 있다. 이 캡은 RNA의 생체 내 번역을 향상시킬 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자의 5' 뉴클레오티드는 5' 트리포스페이트 기를 가질 수 있다. 캡핑된 RNA에서 이것은 5'-to-5' 다리를 통해 7-메틸구아노신에 연결될 수 있다. RNA 분자는 3' 폴리-A 꼬리를 가질 수 있다. 또한 3' 말단 근처에 폴리-A 폴리머라제 인식 서열(예: AAUAAA)이 포함될 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자는 단일-가닥일 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자는 합성 RNA를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, RNA 분자는 네이키드 RNA 분자이다. 한 실시예에서, RNA 분자는 벡터 내에 포함된다.

[0088] 본 발명의 한 실시예에서, RNA는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 한 실시예에서, 5' UTR은 길이가 0 내지 3000개 뉴클레오티드이다. 코딩 영역에 추가될 5' 및 3' UTR 서열의 길이는, UTR의 상이한 영역에 어닐링하는(anneal) PCR 용 프라이머를 설계하는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 이 접근 방식을 사용하여, 당업자는 전사된 RNA의 형질감염 후 최적의 번역 효율을 달성하는 데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변형할 수 있다.

[0089] 5' 및 3' UTR은 관심 유전자에 대한 자연 발생, 내인성 5' 및 3'일 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열은 UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머 내에 통합함으로써 또는 주형의 임의의 다른 변형에 의해 추가될 수 있다. 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변형하는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열의 AU가 풍부한 요소는 RNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3' UTR은 당업계에 잘 알려진 UTR의 특성에 기초하여 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택되거나 설계될 수 있다.

[0090] 본 발명의 한 실시예에서, 5' UTR은 내인성 유전자의 Kozak 서열을 함유할 수 있다. 또는, 관심 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR이 상기 설명한 바와 같이 PCR에 의해 추가되는 경우, 5' UTR 서열을 추가하여 공통 Kozak 서열을 재설계할 수 있다. Kozak 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 모든 RNA가 효율적인 번역을 가능하게 하는 데 필요한 것으로 보이지는 않는다. 많은 RNA에 대한 Kozak 서열에 대한 요건은 당업계에 공지되어 있다. 다른 실시예에서, 5' UTR은, RNA 계층이 세포에서 안정한, RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 다른 실시예에서, RNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해 다양한 뉴클레오티드 유사체가 3' 또는 5' UTR에 사용될 수 있다.

[0091] 본 발명의 한 실시예에서, RNA는 세포 내 RNA의 리보솜 결합, 번역 개시 및 안정성을 결정하는 5' 말단에 캡 및

3' 폴리(A) 꼬리를 모두 갖는다.

- [0092] 본 발명의 한 실시예에서, RNA는 뉴클레오시드-변형된 RNA이다. 뉴클레오시드-변형된 RNA는 예를 들어 증가된 안정성, 낮거나 없는 선천성 면역원성, 및 향상된 번역을 포함하여 변형되지 않은 RNA에 비해 특정한 이점을 갖는다.
- [0093] 원형 및 선형 벡터
- [0094] 벡터는 표적 세포를 형질전환시킬 수 있고 염색체 외에 존재할 수 있는 원형 플라스미드일 수 있다(예를 들어, 복제 기점이 있는 자율 복제 플라스미드).
- [0095] 벡터는 pVAX, pcDNA3.0, 또는 provax, 또는 항원을 암호화하는 DNA를 발현할 수 있고 세포가 서열을 면역계에 의해 인식되는 항원으로 번역할 수 있게 하는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.
- [0096] 또한 대상체에게 효율적으로 전달되고 하나 이상의 원하는 항원을 발현할 수 있는 선형 핵산 면역원성 조성물, 또는 선형 발현 카세트("LEC")가 본 명세서에서 제공된다. LEC는 인산 골격(phosphate backbone)이 없는 선형 DNA일 수 있다. DNA는 하나 이상의 항원을 암호화할 수 있다. LEC는 프로모터, 인트론, 정지 코돈, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다. 항원의 발현은 프로모터에 의해 조절될 수 있다. LEC는 항생제 내성 유전자 및/또는 인산 골격을 함유하지 않을 수 있다. LEC는 원하는 항원 유전자 발현과 관련이 없는 다른 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않을 수 있다.
- [0097] LEC는 선형화될 수 있는 임의의 플라스미드로부터 유래될 수 있다. 플라스미드는 항원을 발현할 수 있다. 플라스미드는 pNP(Puerto Rico/34) 또는 pM2(New Caledonia/99)일 수 있다. 플라스미드는 pVAX, pVAX1 pcDNA3.0, pIDV, pIDV-II, 또는 provax, 또는 항원을 암호화하는 DNA를 발현할 수 있고 세포가 면역 시스템에 의해 인식되는 항원으로 서열을 번역할 수 있게 하는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.
- [0098] LEC는 pcrM2일 수 있다. LEC는 pcrNP일 수 있다. pcrNP 및 pcrMR은 pNP(Puerto Rico/34) 및 pM2(New Caledonia/99)에서 각각 유래될 수 있다.
- [0099] 프로모터, 인트론, 정지 코돈, 및 폴리아데닐화 신호
- [0100] 벡터는 프로모터를 가질 수 있다. 프로모터는 유전자 발현을 유도하고 단리된 핵산의 발현을 조절할 수 있는 임의의 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 DNA 의존성 RNA 중합효소를 통한 전사에 필요한 시스-작용 서열 요소이고, 이는 본 명세서에 기재된 항원 서열을 전사한다. 이중 핵산의 발현을 지시하는 데 사용되는 프로모터의 선택은 특정 적용에 따라 다르다. 프로모터는 자연 환경에서 전사 시작 부위로부터와 마찬가지로 벡터의 전사 시작으로부터 거의 동일한 거리에 위치할 수 있다. 그러나, 이 거리의 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.
- [0101] 프로모터는 전사체, 리보솜 결합 부위, 및 번역 종결의 효율적인 폴리아데닐화에 필요한 신호 및 항원을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 프로모터는 CMV 프로모터, SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터, 뮤린 유방 종양 바이러스 프로모터, CAG 프로모터, 라우스 육종(Rous sarcoma) 바이러스 프로모터, polyhedrin 프로모터, 또는 진핵 세포에서의 발현에 효과적인 것으로 나타난 또 다른 프로모터일 수 있다.
- [0102] 벡터는 기능적 스플라이스 공여체 및 수용체 부위를 갖는 인핸서 및 인트론을 포함할 수 있다. 벡터는 효율적인 종결을 제공하기 위해 구조 유전자의 하류에 전사 종결 영역을 함유할 수 있다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 획득될 수 있거나 상이한 유전자로부터 획득될 수 있다.
- [0103] 바이러스 벡터
- [0104] 본 발명의 한 실시예에서, 본 발명의 핵산을 세포에 전달할 수 있는 바이러스 벡터가 본 명세서에서 제공된다. 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 Sambrook et al. (2001), Ausubel et al. (1997), 그리고 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 설명되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 홍역 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 변형 백시니아 양카라 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능하는 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택 마커를 함유한다(예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193 참조).
- [0105] 다중 벡터

- [0106] 면역원성 조성물은 단일 플라스미드와 같은 단일 핵산 분자의 복수 카피, 또는 둘 이상의 상이한 플라스미드와 같은 둘 이상의 상이한 핵산 분자의 복수 카피를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역원성 조성물은 복수의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 상이한 핵산 분자를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 복수의 2, 3, 4, 5, 6, 또는 그 이상의 상이한 플라스미드를 포함할 수 있다.
- [0107] 면역원성 조성물은 POWV 항원에 대한 코딩 서열을 집합적으로 함유하는 플라스미드와 같은 핵산 분자를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은, 다수의 항원에 대한 코딩 서열을 집합적으로 함유하는 플라스미드와 같은, 핵산 분자를 포함할 수 있다. 한 실시예에서, 항원은 POWV 항원 및 하나 이상의 추가 보조제이다. 면역원성 조성물은 하나 이상의 항원 및 하나 이상의 보조제에 대한 코딩 서열을 집합적으로 함유하는 플라스미드와 같은 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0108] 방법
- [0109] 본 명세서에 기재된 하나 이상의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 POWV 관련 질병을 치료, 방지, 및/또는 예방하는 방법이 제공된다. 대상체에 대한 면역원성 조성물의 투여는 대상체에서 면역 반응을 유도하거나 유발할 수 있다.
- [0110] POWV에 대해 특히 효과적이게 만드는 에피토프를 포함하는 공통 항원의 유전자 구조체 및 단백질을 제공하기 위한 면역원성 조성물을 전달하는 방법이 본 명세서에서 제공된다. 치료 및 예방 면역 반응을 유도하기 위해 면역원성 조성물 또는 백신 접종을 전달하는 방법이 제공될 수 있다. 백신 접종 과정은 포유동물에서 POWV에 대한 면역 반응을 일으킬 수 있다. 면역원성 조성물은 포유동물의 면역계의 활성을 조절하고 면역 반응을 향상시키기 위해 개체에게 전달될 수 있다. 면역원성 조성물의 전달은 세포 내에서 발생되고 면역계가 인지하고 세포성, 체액성, 또는 세포성 및 체액성 반응을 유도하는 세포의 표면으로 전달되는 핵산 분자로서의 공통 항원의 형질감염일 수 있다. 면역원성 조성물의 전달은 상기 논의된 바와 같은 면역원성 조성물을 포유동물에 투여함으로써 POWV에 대한 포유동물의 면역 반응을 유도하거나 유발하기 위해 사용될 수 있다.
- [0111] 면역원성 조성물 및 플라스미드가 포유동물의 세포 내로 전달되면, 형질감염된 세포는 면역원성 조성물로부터 주입된 각각의 플라스미드에 대한 공통 항원을 발현 및 분비할 것이다. 이들 단백질은 면역 체계에 의해 이물질로 인식되고 이에 대한 항체가 만들어진다. 이들 항체는 면역 체계에 의해 유지되고 효과적인 반응을 허용한다.
- [0112] 면역원성 조성물은 포유동물에서 면역 반응을 유도하기 위해 포유동물에게 투여될 수 있다. 포유동물은 인간, 영장류, 인간이 아닌 영장류, 젖소, 소, 양, 염소, 영양, 물소, 들소, 소과의 동물(bovids), 사슴, 고슴도치, 토끼, 생쥐, 쥐, 마멋, 다람쥐, 기타 설치류, 및 닭일 수 있다.
- [0113] 유도된 면역 반응은 유도된 체액성 면역 반응 및/또는 유도된 세포성 면역 반응을 포함할 수 있다. 체액성 면역 반응은 약 1.5배 내지 약 16배, 약 2배 내지 약 12배, 또는 약 3배 내지 약 10배까지 유도될 수 있다. 유도된 세포 면역 반응은 CD8⁺ T 세포 반응을 포함할 수 있고, 이는 약 2배 내지 약 30배, 약 3배 내지 약 25배, 또는 약 4배 내지 약 20배 유도된다.
- [0114] 면역원성 조성물 용량은 1µg 내지 10mg 활성 성분/kg 체중/시간일 수 있고, 20µg 내지 10mg 성분/kg 체중/시간일 수 있다. 면역원성 조성물은 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31일마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료를 위한 면역원성 조성물 용량의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 수 있다.
- [0115] 면역원성 조성물은 약학 분야의 숙련자에게 잘 알려진 표준 기술에 따라 제형화될 수 있다. 이러한 조성물은 특정 대상체의 연령, 성별, 체중, 및 상태와 같은 인자, 및 투여 경로를 고려하여 의학 분야의 숙련자에게 공지된 투여량 및 기술에 의해 투여될 수 있다.
- [0116] 면역원성 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다. 예방적 투여에서, 면역원성 조성물은 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 면역원성 조성물은 치료 효과를 이끌어내기 위해 충분한 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 이를 달성하기에 적절한 양은 "치료 유효량"으로 정의된다. 이 용도에 유효한 양은 예를 들어, 투여된 면역원성 조성물 요법의 특정 조성, 투여 방식, 질병의 단계 및 중증도, 대상체의 일반적인 건강 상태, 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 것이다.
- [0117] 면역원성 조성물은 Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Feigner et al. (1996년 12월 3일에 허여된 미국 특허 제5,580,859호); Feigner(1997년 12월 30일에 허여된 미국 특허 제5,703,055호); 및 Carson et al. (1997년 10월 21일에 허여된 미국 특허 제5,679,647호)에 기재된 바와 같이 당업계에 잘 알려진

방법에 의해 투여될 수 있고, 이들 모두의 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

- [0118] 면역원성 조성물의 핵산은 예를 들어 백신 총(vaccine gun)을 사용하여 개체에게 투여될 수 있는 입자 또는 비드와 복합체를 형성할 수 있다. 당업자는 생리학적으로 허용가능한 화합물을 포함하는 약학적으로 허용가능한 담체의 선택이 예를 들어 발현 벡터의 투여 경로에 의존한다는 것을 알 것이다.
- [0119] 면역원성 조성물은 다양한 경로를 통해 전달될 수 있다. 전형적인 전달 경로는 비경구 투여, 예를 들어, 피내, 표피내, 근육내 또는 피하 전달을 포함한다. 다른 경로에는 경구 투여, 비강내, 및 질내 경로가 포함된다. 특히 면역원성 조성물의 핵산의 경우, 면역원성 조성물은 개체의 조직의 간질(interstitial) 공간으로 전달될 수 있다(Feigner et al., U.S. Pat. Nos. 5,580,859 및 5,703,055, 이들 모두의 내용이 전체적으로 참조로서 본 명세서에 포함됨). 면역원성 조성물은 또한 근육에 투여될 수 있거나, 피내 또는 피하 주사를 통해, 또는 경피, 예를 들어 이온삼투요법에 의해 투여될 수 있다. 면역원성 조성물의 표피 투여가 또한 사용될 수 있다. 표피 투여는 자극제에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 표피의 가장 바깥쪽 층을 기계적으로 또는 화학적으로 자극하는 것을 포함할 수 있다(Carson et al., 미국 특허 제5,679,647호, 이의 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함됨).
- [0120] 면역원성 조성물은 또한 비도(nasal passage)를 통한 투여를 위해 제형화될 수 있다. 담체가 고체인 비강 투여에 적합한 제형은, 코에 가까이 고정된 분말 용기로부터 비도를 통해 흡입함으로써, 코담배(snuff)를 취하는 방식으로 투여되는, 예를 들어 약 10 내지 약 500 마이크론 범위의 입자 크기를 갖는 거친 분말을 포함할 수 있다. 제형은 비강 스프레이, 비강 점적제, 또는 분무기에 의한 에어로졸 투여일 수 있다. 제형은 면역원성 조성물의 수성 또는 유성 용액을 포함할 수 있다.
- [0121] 면역원성 조성물은 현탁액, 시럽 또는 엘릭서와 같은 액체 제제일 수 있다. 면역원성 조성물은 또한 멸균 현탁액 또는 에멀전과 같은 비경구, 피하, 피내, 근육내 또는 정맥내 투여(예를 들어, 주사 가능한 투여)를 위한 제제일 수 있다.
- [0122] 면역원성 조성물은 리포솜, 미소구체 또는 기타 중합체 매트릭스에 혼입될 수 있다(Feigner et al., U.S. Pat. No. 5,703,055; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. Ito III (2nd ed. 1993), 그 내용은 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨)
- [0123] 리포솜은 인지질 또는 기타 지질로 구성될 수 있고, 상대적으로 만들고 투여하기 쉬운 무독성, 생리학적으로 허용 가능하고 대사 가능한 담체일 수 있다.
- [0124] 조합 치료
- [0125] 면역원성 조성물은 CCL20, α -인터페론, γ -인터페론, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, 표피 성장 인자(EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인(CTACK), 상피 흥선-발현 케모카인(TECK), 점막-연관 상피 케모카인(MEC), IL-12, 신호 서열이 결실된 IL-15를 포함하고 선택적으로 IgE 신호 펩티드와 같은 상이한 신호 펩티드를 포함하는 IL-15, MHC, CD80, CD86, IL-28, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, RANTES, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-18의 돌연변이 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 요인, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O \times 40, O \times 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이들의 기능적 단편 또는 이들의 조합을 암호화하는 기타 단백질 및/또는 유전자와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 면역원성 조성물은 하기 핵산 분자 및/또는 단백질 중 하나 이상과 조합하여 투여된다: CCL20, IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, MEC 및 RANTES 또는 이들의 기능적 단편 중 하나 이상을 암호화하는 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자로 이루어진 균으로부터 선택된 핵산 분자, 및 CCL20, IL-12 단백질, IL-15 단백질, IL-28 단백질, CTACK 단백질, TECK 단백질, MEC 단백질 또는 RANTES 단백질 또는 이들의 기능적 단편으로 이루어진 균으로부터 선택된 단백질.
- [0126] 투여 경로
- [0127] 백신 또는 약학 조성물은 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입, 협측 투여, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 척수강내, 피내, 표피내, 및 관절내 또는 이들의 조합을 비롯한 다양한

경로에 의해 투여될 수 있다. 수의학적 사용을 위해, 조성물은 정상적인 수의학적 관행에 따라 적절하게 허용되는 제형으로 투여될 수 있다. 수의사는 특정 동물에 가장 적합한 투여 요법과 투여 경로를 쉽게 결정할 수 있다. 백신은 종래의 주사기, 바늘 없는 주사 장치, 미세 바늘 장치, "미세 발사체 충격 유전자 총" 또는 전기천공("EP"), "유체역학적 방법" 또는 초음파와 같은 기타 물리적 방법으로 투여할 수 있다.

[0128] 백신의 벡터는 생체 내 전기천공, 리포솜 매개, 나노입자 촉진, 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 연관 바이러스 및 재조합 백시니아와 같은 재조합 벡터를 포함하거나 포함하지 않는 DNA 주사(DNA 백신접종이라고도 함)를 비롯한 여러 잘 알려진 기술에 의해 포유동물에 투여될 수 있다. 하나 이상의 POWV 구조체는 DNA 주입을 통해 투여될 수 있고, 선택적으로 자기천공, 초음파, 열, 전기천공, 먹물 뜨기(tattooing)와 같은 물리적 방법을 포함할 수 있는 세포 흡수를 향상시키는 방법을 동반할 수 있다.

[0129] 면역원성 조성물은 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입, 협측 투여, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 척수강내, 관절내 또는 이들의 조합을 포함하는 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0130] 면역원성 조성물은 종래의 주사기, 바늘 없는 주사 장치, "미세 발사체 충격 유전자 총", 에어로졸 충격 장치, 또는 전기천공("EP"), "유체역학적 방법", 또는 초음파와 같은 다른 물리적 방법에 의해 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 하나 이상의 포와산(powassan) 구조체로 인 시튜 세포를 형질감염시키기 위한 생체 내 전기천공을 수행할 수 있는 전기천공 장치는 임의의 상업적으로 이용가능한 전기천공 장치를 포함한다. 또한, 가역성 부재 기공이 세포의 생존력을 형성하고 유지하도록 하기 위해 원하는 전기천공을 수행하도록 장치를 구성할 때 공개적으로 설명된 다른 전기천공 장치를 사용할 수 있다. 전기천공 장치는 다음 회사에서 설명 및 제조 또는 활용하는 장치를 포함할 수 있다: Inovio Pharmaceuticals(Collectra), Collectis(Easy Vax), Ichor(Trigrid), IGEA(CliniPorator), BTX Harvard 등.

[0131] 면역원성 조성물의 플라스미드는 생체 내 전기천공, 리포솜 매개, 나노입자 촉진, 예를 들어 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 연관 바이러스 및 재조합 백시니아와 같은 재조합 벡터가 있거나 없는 DNA 또는 RNA 주사(핵산 백신이라고도 함)를 비롯한 여러 잘 알려진 기술에 의해 포유동물에 전달될 수 있다.

[0132] 시험관 내 및 생체 외 항원의 생성

[0133] 본 발명의 한 실시예에서, 최적화된 공통 POWV 항원은 시험관 내 또는 생체 외에서 생성된다. 예를 들어, 한 실시예에서, 최적화된 공통 POWV 항원을 암호화하는 핵산이 시험관 내 또는 생체 외 세포에서 도입되고 발현될 수 있다.

[0134] 유전자를 세포 내에 도입하고 발현시키는 방법은 모두 알려져 있다. 발현 벡터와 관련하여, 벡터는 당업계의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모, 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다.

[0135] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내에 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입, 전기천공법 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 Sambrook et al. (2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)를 참조한다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내에 도입하기 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염, 지질 나노입자, 및 실리카 나노입자이다.

[0136] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내에 도입하기 위한 생물학적 방법에는 DNA 및 RNA 벡터의 사용이 포함된다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포 내에 삽입하기 위해 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티 바이러스, 폭스 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, U.S. Pat. Nos. 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0137] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내에 도입하기 위한 화학적 수단은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드와 같은 콜로이드 분산 시스템 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관 내 및 생체 내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜(예를 들어, 인공 막 소포)이다.

[0138] 비-바이러스 전달 시스템이 사용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제형의 사용은 핵산을 숙주 세포 내로 도입하기 위해 고려된다(시험관 내, 생체 외 또는 생체 내). 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 연

관될 수 있다. 지질과 연관된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되고, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되어 있고, 리포솜 및 올리고뉴클레오타이드 둘 모두와 관련된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되고, 리포솜에 포획되고, 리포솜과 복합되고, 지질을 함유한 용액에 분산되고, 지질과 혼합되고, 지질과 결합되고, 지질에 현탁액으로 함유되고, 미셀과 함유되거나 복합되고, 또는 기타 지질과 관련될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련 조성물은 용액 내 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이중층 구조, 미셀, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 그들은 또한 용액에 단순히 산재되어, 크기나 모양이 균일하지 않은 집합체를 형성할 수 있다. 지질은 자연적으로 발생하거나 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질에는 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 방울(fatty droplet)뿐만 아니라 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 및 알데히드와 같은 장쇄 지방족 탄화수소 및 그 유도체를 함유하는 화합물 부류가 포함된다.

[0139] **실험적 실시예**

[0140] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더욱 상세하게 설명된다. 이러한 예는 설명의 목적으로만 제공되고, 달리 명시되지 않는 한 제한하려는 의도가 아니다. 따라서, 본 발명은 하기 실시예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되고, 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0141] 추가 설명 없이, 당업자는 선행 설명 및 하기 예시적인 실시예를 사용하여 본 발명을 제조하고 활용하고 청구된 방법을 실시할 수 있다고 믿어진다. 따라서, 다음의 실시예는 본 발명의 바람직한 실시예를 구체적으로 지적하고, 본 명세서의 나머지 부분을 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0142] 실시예

[0143] 실시예 1 플라스미드 골격의 기원

[0144] pVAX1(Invitrogen V260-20)은 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였고 마스터 세포 은행은 Escherichia coli 균주 DH10B-T1R에 설립되었다. 마스터 세포 은행에서 파생된 정제된 플라스미드 DNA는 하기에 설명된 5가지 포와산 바이러스(POWV) DNA 백신을 구성하기 위해 GenScript에 전달되었다.

[0145] 실시예 2 포와산 바이러스(POWV) DNA 백신의 구축

[0146] 5개의 POWV DNA 후보 백신이 동일한 항원 서열로 설계 및 구축되었고, 이는 상이한 신호 펩티드 서열이 있고 리더 서열이 있거나 없는 POWV 전막 및 외피(prME) 유전자를 암호화한다.

[0147] 공통 prME 단백질 코딩 서열은 MegAlign 소프트웨어(DNASTAR, Madison, WI)를 사용하여 22개의 상이한 POWV prM 단백질 서열 및 37개의 상이한 POWV E 단백질 서열로부터 생성되었다. 5개 구조체의 신호 펩티드 서열은 (1) IgE 리더 서열 단독, (2) IgE 리더 서열 + 20개 아미노산 공통 prM 신호 서열, (3) IgE 리더 + prM 신호 서열의 처음 12개 아미노산, (4) 20개 아미노산 공통 prM 신호 서열, 및 (5) JEV 신호 서열 각각 중 하나를 함유하였다. prM 신호 서열은 22개의 상이한 POWV prM 신호 펩티드 서열로부터 공통 서열로서 생성되었다.

[0148] 공통 외피(E) 시퀀스를 생성하는 데 사용되는 Genbank 액세스 번호는: AAL32141.1, AAL32142.1, AAL32143.1, AAL32144.1, AAL32145.1, AAL32146.1, AAL32147.1, AAL32148.1, AAL32149.1, AAL32150.1, AAL32151.1, AAL32152.1, AAL32153.1, AAL32154.1, AAL32169.1, AAK61347.1, ACD67873.1, ACD88752.1, ACF05267.1, ADK37752.1, ADK37753.1, ADK37754.1, ADK37755.1, ADK37756.1, ADK37757.1, AEN83681.1, AEN83682.1, AIG95651.1, ALP82430.1, ALP82431.1, AAA02739.1, AMY50382.1, AMZ80134.1, AMQ49162.1, AMQ49164.1, AMQ49165.1, AMQ49163.1이다.

[0149] 공통 전막(prM) 및 prM 신호 서열을 생성하는 데 사용되는 Genbank 액세스 번호는: AAL32169.1, AAK61347.1, ACD67873.1, ACD88752.1, ACF05267.1, ADK37752.1, ADK37753.1, ADK37754.1, ADK37755.1, ADK37756.1, ADK37757.1, AEN83681.1, AEN83682.1, AIG95651.1, ALP82430.1, ALP82431.1, AAA02739.1, AMY50382.1, AMQ49162.1, AMQ49164.1, AMQ49165.1, AMQ49163.1이다.

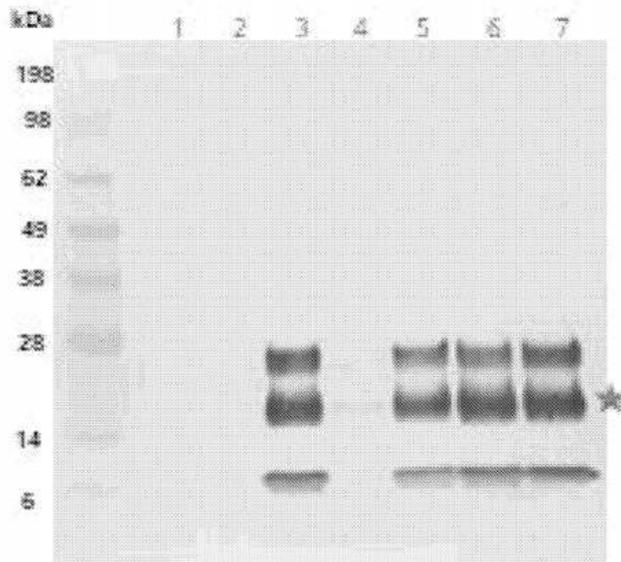
[0150] 일단 공통 prME 서열이 얻어지면, 5개의 구조체의 각 신호 펩티드 서열(리더 서열이 있고 없는)을 N-말단에 추가하여 발현 및 mRNA 수송을 용이하게 하고, 상류 Kozak 서열로 추가로 변형시켰다. 이 서열은 GenScript에 의해 코돈 최적화되고 합성되었다. 합성된 삽입물을 BamHI 및 XhoI 부위에서 pVAX1 내로 서브클로닝하여, 구조체를 생성하였다:

[0151] 후보 1 pVAX1-IgE-prME(SEQ ID NO: 1)

- [0152] 후보 2 pVAX1-IgE-prM신호-prME(SEQ ID NO: 2)
- [0153] 후보 3 pVAX1-IgE-prM신호의 부분-prME(SEQ ID NO: 3)
- [0154] 후보 4 pVAX1-prM신호-prME(SEQ ID NO: 4)
- [0155] 후보 5 pVAX1-JEV신호-prME(SEQ ID NO: 5)
- [0156] 실시예 3 형질감염된 세포에서 발현된 POWV prM 단백질의 검출
- [0157] 백신 후보의 발현을 평가하기 위해, HEK293T 세포를 X-fect 시약(Clontech, Takara Korea Biomedical, Inc., Seoul Korea)을 사용하여 각각 POWV DNA 백신으로 형질감염시키고 형질감염 48시간 후에 세포 상청액을 수집하였다. 총 단백질(20 µg)은 환원 조건에서 SDS-PAGE를 실시하고 POWV prM 다클론 항체(GeneTex Inc., Irvine, CA)를 사용하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 웨스턴 블롯 데이터는 5개의 POWV7 DNA 백신 중 4개가 약 18KDa를 갖는 POWV-prM 단백질을 발현함을 나타내었다. 2개의 완전한 신호 서열, 즉 IgE-리더 서열과 prM 신호 서열을 함유하는 하나의 백신 후보는 prM 발현의 증거를 나타내지 않았다(도 1).
- [0158] 실시예 4. POWV DNA 백신접종에 의한 마우스에서 POWV 특이적 결합 항체의 유도
- [0159] 면역화된 C57BL/6 마우스의 혈청 내 POWV prME 항원 특이적 결합 항체는 재조합 POWV-E(rPOWV-E)(Bioclone Inc., Sandiego, CA)를 코팅 항원으로 사용하는 ELISA에 의해 측정되었고 항체 면역 반응을 유도하는 POWV 백신의 능력은 그룹 간에 평가되었다. 각 그룹의 마우스는 2주 간격으로 3회 근육 내(i.m.) 전기천공에 의해 25 µg의 POWV DNA 백신으로 면역화되었다. 혈청은 0일(첫 번째 주사 1일 전), 21일(두 번째 주사 1주 후), 35일(세 번째 주사 1주 후), 및 60일(세 번째 주사 후 약 4주 후)에 수집되었다.
- [0160] POWV 특이적 항체 수준은 pVAX1 대조군을 제외하고 2차 면역화 1주 후인 21일째에 모든 그룹에서 유의하게 상승하였다. 그러나, pVAX1-JEV 신호-prME 그룹에서, POWV 특이적 체액성 반응은 3차 면역에 의해 추가로 증가되지 않았다(도 2)
- [0161] 시점별로 분류된 데이터는, 3차 접종 1주 후인 35일째에 pVAX1-IgE 리더-prM 신호의 부분-prME 그룹에서 rPOWV-E에 대한 결합 항체가 현저하게 증가하여, 4주간 더 유지되는 것으로 나타났다. 이 결과는 IgE 리더와 prM 신호 서열의 부분을 신호 펩티드 서열로 함께 갖는 POWV 백신이 POWV-E 특이적 결합 항체를 유도하는데 있어서 다른 그룹보다 더 강력함을 시사한다(도 3).
- [0162] 종말점 역가는 나이브(preimmunization) 평균의 4배 및 0.15 이상의 흡광도인 컷오프 값을 충족하는 혈청의 최고 희석액으로 결정되었다. 본 연구에 적용된 컷오프 값은 일반적으로 ELISA에서 사용되는 'mean +2 또는 3 SD' 또는 '2 또는 3 mean' 판독값보다 더 엄격하다.
- [0163] 도 4에 나타난 바와 같이, IgE 리더-prM 신호 서열의 부분을 갖는 POWV 백신으로 면역된 그룹은 35일 및 60일에 높은 종말점 역가 측면에서 다른 그룹과 구별되었다. 그리고 흥미롭게도, 두 그룹, pVAX1-IgE 리더-prME 및 pVAX1-IgE 리더-prM 신호의 부분-prME는 체액 반응의 시간 의존적 증가를 나타내고 높은 종말점 역가는 60일째에 있었다(도 4).
- [0164] 진술한 상세한 설명 및 첨부된 실시예는 단지 예시적이고 첨부된 청구범위 및 그 균등물에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다.
- [0165] 개시된 실시예에 대한 다양한 변경 및 변형은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 화학 구조, 치환체, 유도체, 중간체, 합성, 조성물, 제형, 또는 사용 방법과 관련된 것을 제한 없이 포함하는 그러한 변경 및 변형은 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다.

도면

도면1



Lane 1	DMEM (10% FBS, 1% P/S)
Lane 2	pVAX1
Lane 3	pVAX1-IgE leader-prME
Lane 4	pVAX1-IgE leader-prM signal (20 aa)-prME
Lane 5	pVAX1-IgE leader-portion of prM signal (12 aa)-prME
Lane 6	pVAX1-Met-prM signal (20 aa)-prME
Lane 7	pVAX1-JEV signal-prME

Fig. 1. Western Blot analysis of POWV-prM protein expressed from transfected cells

도면2

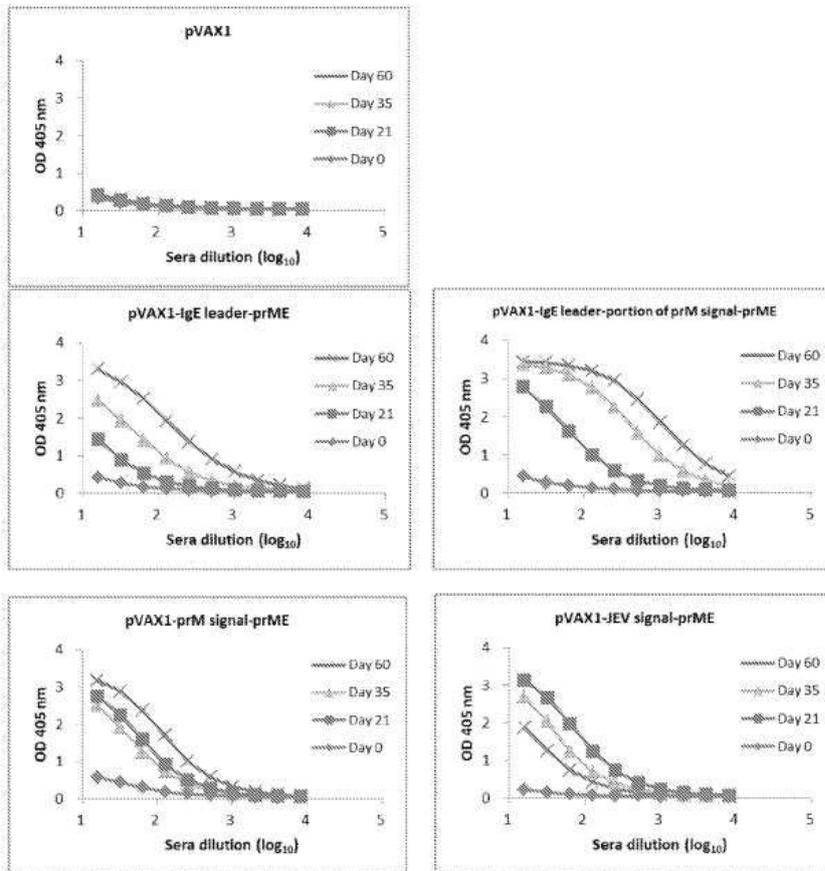


Fig. 2. ELISA analysis measuring binding antibody against POWV prME antigen in immunized mice

도면3

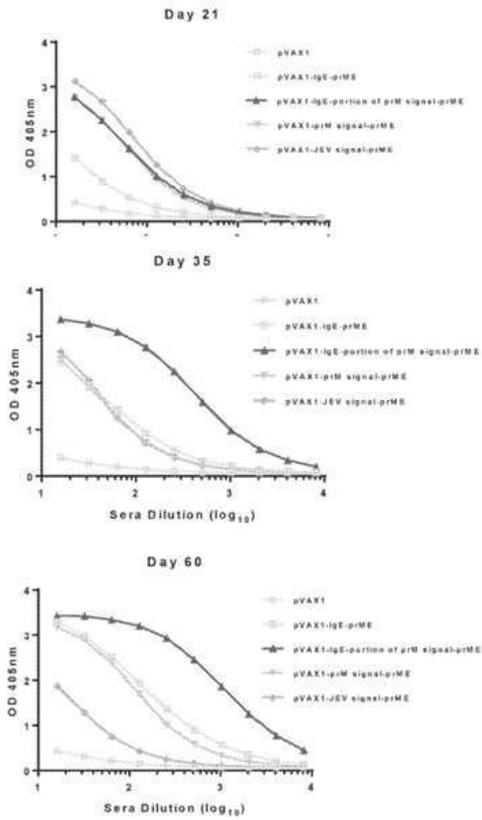


Fig. 3. Comparison of POWV specific binding antibody level between groups at each
Sheet 3 of 4

도면4

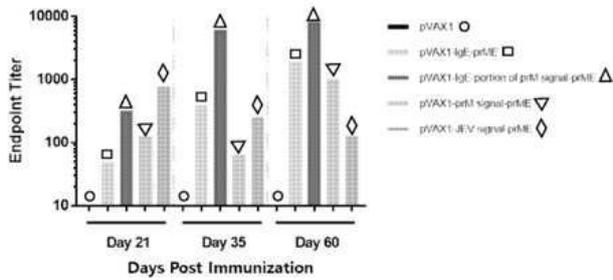


Fig. 4. Endpoint titers for POWV-E specific antibodies

서 열 목록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.