

명세서

발명의 명칭: 복제가능 아데노바이러스를 포함하지 않는 신규 아데노바이러스 벡터 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 복제가능 아데노바이러스를 포함하지 않는 신규 아데노바이러스 벡터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 아데노바이러스는 다양한 표적 조직에서 매우 효과적인 유전자 전달 및 큰 트랜스진(transgene) 용량을 달성하는 능력으로 인해 재조합 아데노바이러스는 유전자 요법에서 및 백신 용도로 널리 사용되어 왔다.
- [3] 아데노바이러스 벡터는 복제에 필수적인 E1 유전자의 결손으로 이론적인 구조상 복제가 불가능하다. 하지만, 복제불능 아데노바이러스 벡터 생산과정 중 HEK293 세포주의 아데노바이러스 유래의 E1 유전자가 상동성 재조합 과정을 거쳐 복제 불가능한 아데노바이러스 벡터 유전자로 삽입되면 복제 가능 아데노바이러스 (Replication competent adenovirus, RCA)가 만들어질 수 있다. 아데노바이러스 벡터의 RCA 존재는 아데노바이러스 감염, 의도하지 않은 벡터의 복제, 환자의 염증 반응의 악화 등 안전성과 관련된 여러 가지 문제를 초래한다. KFDA, FDA 등의 규제기관은 RCA 관련 기준을 3×10^{10} 바이러스 입자 중 1 RCA 미만으로 규정하고 있으며, RCA 관련 규제는 아데노바이러스 벡터의 대량생산에 걸림돌로 작용하고 있다.
- [4] RCA 발생을 극복하기 위한 방안으로는 크게 아데노바이러스 증식용 세포주 개발 및 조작, 아데노바이러스 벡터 백본 조작이 있다. 구체적으로는 1) 아데노바이러스 벡터와 상동서열이 없는 E1 유전자 지역의 단백질 코딩부분만을 도입한 신규 세포주 개발 전략 (1세대 아데노바이러스 벡터), 2) E2A, E2B, E4 등 복제에 필수적인 아데노바이러스 유전자를 벡터에서 제거하고, 제거한 유전자의 단백질 코딩 지역을 세포주에 도입하여 보완하는 전략 (2세대 아데노바이러스 벡터), 3) HEK293 세포주 내 상동서열 제거하여 상동성 재조합을 차단하는 전략, 4) 상동서열이 적은 다른 종의 아데노바이러스 타입을 사용하는 전략, 5) 상동성재조합 과정을 거쳐 E1 유전자를 다시 획득하더라도 복제불능 아데노바이러스로 유지하는 전략이 알려져 있다.
- [5] 상동 서열이 없는 E1 유전자가 도입된 세포주 (1세대 아데노바이러스 벡터)는 현재까지 2종이 개발에 성공하여 상업적으로 사용되고 있다. Human embryonic retinoblasts (HER) 세포주에 E1 유전자(459-3510 nt)를 도입한 PER.C6 세포주와 Primary human amniocytes에 E1 유전자(505-3522nt)를 도입한 N52.E6(CAP-GT) 세포주이다. 하지만 이러한 세포주는 다계대, 대량생산 과정에서 RCA 발생의 완벽한 해결을 기대하기 어렵다고 볼 수 있다. E2A, E2B, E4 등 복제에 필수적인

유전자를 세포주에서 보완하는 전략 (2세대 아데노바이러스 벡터)은 1995-2000년도에 많은 연구와 개발이 진행되었으나, 1세대 아데노바이러스 벡터에 비해 생산성이 떨어지고, 도입 유전자 발현이 안정적이지 않아 상업화에 실패하였다. HEK293 세포주 내 유전자 조작은 293 세포주 게놈의 복잡성과 도입된 E1 유전자의 카피수 (7copy)로 인해 개발에 어려움이 있고, 다른 종의 아데노바이러스 타입 사용은 투여자에 대한 안전성이 위험요소로 작용할 수 있다. 마지막으로 항원 유전자를 E3 지역에 배치하여 상동성 재조합이 일어나더라도 아데노바이러스 게놈 크기 제한으로 RCA 출현을 막는 아데노바이러스 벡터 조작 전략은 현재 연구 수준에서만 이루어지고 있다.

- [6] 이에, 본 발명자들은 아데노바이러스 복제에 필수적인 E4 유전자를 결실시키고, 이를 E1 유전자 결실 위치에 재배치하여 상동 재조합이 일어나더라도 복제가능 아데노바이러스를 포함하지 않으면서도 생산성 및 항원 발현도는 기존의 아데노바이러스 벡터와 동등한 수준인 신규 아데노바이러스 벡터를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 복제가능 아데노바이러스를 포함하지 않는 신규 아데노바이러스 벡터 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 E1, E3 및 E4 유전자가 결실된 아데노바이러스에서 E4 유전자가 E1 유전자의 결실 위치에 삽입된 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 벡터에 코로나바이러스 스파이크 단백질을 코딩하는 서열이 삽입된, 코로나바이러스감염증 예방용 백신을 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명은 복제가능 아데노바이러스를 포함하지 않는 신규 아데노바이러스 벡터에 관한 것으로, 본 발명의 E1 유전자의 결실 위치에 항원 단백질 및 E4orf6 유전자가 삽입된 E1, E3 및 E4 유전자 결실 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 생산성, 항원 발현도, 중화 항체 생성량, 및 T 세포 유도능이 대조군과 유사하여 다양한 질병 백신 또는 항암 백신의 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 복제가능 아데노바이러스 발생 기전을 나타낸 개략도이다.
- [12] 도 2는 본 발명의 복제가능 아데노바이러스를 포함하지 않는 신규 아데노바이러스 벡터의 개략도이다.
- [13] 도 3은 Ad5의 E1 및 E3이 결실되고 E3이 결실된 위치에 Ad35의 knob 유전자가 삽입된 Ad5/35의 E1 결실 위치에 상동 재조합에 의해 E1 유전자를 획득한

복제가능 아데노바이러스 클론에 카나마이신 항생제 저항성 유전자와 pBR322 복제시작점 유전자 서열을 도입한 pRCA 및 E4orf6의 14bp(pRCA-E4dl355) 또는 1429bp(pRCA-E4dlO4-7)가 제거된 벡터를 나타낸 개략도이다.

- [14] 도 4는 E4 유전자 일부가 결손된 pRCA-E4dl355 및 E4orf4, E4orf6, E4orf6/7 유전자가 모두 결손된 pRCA-E4dlO4-7 벡터에서 세포 병변 효과가 나타나지 않아 아데노바이러스 생산성이 유지됨을 확인한 도이다.
- [15] 도 5는 E4 유전자 일부가 결손된 pRCA-E4dl355 및 E4orf4, E4orf6, E4orf6/7 유전자가 모두 결손된 pRCA-E4dlO4-7 벡터에서 아데노바이러스 유전자 복제가 일어나지 않음을 확인한 도이다.
- [16] 도 6은 E1 유전자가 제거되고, 그 지역에 SwaI 제한효소 표적 서열이 삽입된 pAdk35-E4dl355, pAdk35-E4dlO4-7 벡터를 나타낸 개략도이다.
- [17] 도 7은 스파이크 단백질을 발현하고, E4orf6 유전자가 E1 결손부위에 재배치된 아데노바이러스 벡터 12종을 나타낸 개략도이다.
- [18] 도 8은 스파이크 단백질 발현을 발현하고, E4orf6 유전자가 E1 결손부위에 재배치된 아데노바이러스 벡터의 제작 과정을 나타낸 개략도이다.
- [19] 도 9는 E4re#1, E4re#11의 재배치된 E4orf6 유전자의 프로모터를 변경한 E4 재배치 벡터 11종(E4re#13 내지 24)을 나타낸 개략도이다.
- [20] 도 10은 E1 결실 위치에는 E4re#13, 20 벡터에 사용된 항원 F2-Spike/E4orf6(mPGK), RF-Spike/E4orf6(RSV)를 도입하고 E4orf6 코딩지역의 C-말단 지역부터 -12, 27, 42, 57, 318, 421, 711bp 서열을 제거한 벡터의 개략도이다.
- [21] 도 11은 E4re#29 아데노바이러스 벡터의 RCA 부정시험 수행 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 12는 E4re#29 아데노바이러스 벡터의 계대 증가에 따른 RCA의 검출 여부 확인한 도이다.
- [23] 도 13a는 E4re#1, 13, 14 벡터에서 항원 발현도를 측정한 도이다.
- [24] 도 13b는 E4re#13, 19, 20 벡터에서 항원 발현도를 측정한 도이다.
- [25] 도 13c는 E4re#13, 29 벡터에서 항원 발현도를 측정한 도이다.
- [26] 도 14a는 E4re#1 벡터에서 중화 항체 생성량을 나타낸 도이다.
- [27] 도 14b는 E4re#13, 14 벡터에서 중화 항체 생성량을 나타낸 도이다.
- [28] 도 14c는 E4re#13, 20 벡터에서 중화 항체 생성량을 나타낸 도이다.
- [29] 도 14d는 E4re#13, 29 벡터에서 중화 항체 생성량을 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [30] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [31] 본 발명은 E1, E3 및 E4 유전자가 결실된 아데노바이러스에서 E4 유전자가 E1 유전자의 결실 위치에 삽입된 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다.

- [32] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론 유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 탑재하여 표적 세포로 운반하는 전달체를 의미한다.
- [33] 상기 재조합 아데노바이러스 벡터는 기존의 E1 및 E3 유전자가 결실된 아데노바이러스에서 추가적으로 E4 유전자를 결실시켜 복제가능 아데노바이러스(Replication-competent adenovirus)의 발생을 최소화시키면서도 기존의 아데노바이러스 E1 유전자가 게놈에 도입된 HEK 293 세포주를 그대로 이용할 수 있는 이점이 있다.
- [34] 상기 결실된 E4 유전자는 E4orf6(E4 open reading frame 6) 유전자인 것을 특징으로 한다.
- [35] 상기 결실된 E4 유전자는 E4orf6 유전자 영역의 10 내지 1,000bp 길이의 염기 서열인 것을 특징으로 하고, 바람직하게는 10 내지 800bp 길이의 염기 서열인 것을 특징으로 한다.
- [36] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 E4orf6 유전자 영역의 14bp 또는 711bp 길이의 염기 서열을 결실시키는 것이 바람직하다.
- [37] 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 2(Adenovirus serotype 2, Ad2), 아데노바이러스 혈청형 4(Adenovirus serotype 4, Ad4), 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus serotype 5, Ad5), 아데노바이러스 혈청형 11(Adenovirus serotype 11, Ad11), 아데노바이러스 혈청형 26(Adenovirus serotype 26, Ad26), 아데노바이러스 혈청형 35(Adenovirus serotype 35, Ad35), 침팬지 아데노바이러스 혈청형 68(Chimpanzee adenovirus serotype 68, ChAd68), 조류 아데노바이러스 혈청형 9(Fowl adenovirus serotype 9, FAd9) 또는 돼지 아데노바이러스 혈청형 3(Porcine Adenovirus serotype 3, PAd3) 일 수 있다.
- [38] 상기 아데노바이러스는 Ad5를 기본으로 하여 변형된 형태일 수 있다.
- [39] 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus serotype 5, Ad5)의 knob 유전자가 아데노바이러스 혈청형 35(Adenovirus serotype 35, Ad35)의 knob 유전자로 치환된 아데노바이러스(Ad5/35)일 수 있다.
- [40] 상기 결실된 E4 유전자는 E4orf6, E4orf6/7 또는 E4orf4 영역인 것을 특징으로 한다.
- [41] 상기 결실된 E4 유전자는 10 내지 1,500bp 길이의 염기 서열인 것을 특징으로 하고, 바람직하게는 14bp 또는 1,429bp인 것을 특징으로 한다.
- [42] 상기 E4orf6 유전자는 코작 서열(kozak sequence)이 제거된 것을 특징으로 한다.
- [43] 상기 E1 유전자의 결실 위치에는 항원 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있다.
- [44] 상기 항원 단백질을 코딩하는 서열은 E4orf6 유전자의 5' 위치 또는 3' 위치에 삽입될 수 있으나, 바람직하게는 E4orf6 유전자의 5' 위치에 삽입될 수 있다.
- [45] 상기 E4orf6 유전자는 정방향 또는 역방향으로 발현될 수 있고, 바람직하게는 정방향으로 발현되는 것이다.
- [46] 상기 E1 유전자의 결실 위치에 삽입된 E4 유전자는 EF-1a, mPGK, RSV, CMV,

- E4orf6의 -0.25kb, E4orf6의 -0.5kb 및 E4orf6의 -1.0kb 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 프로모터에 의해 발현되는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 상기 항원 단백질을 코딩하는 서열은 CMV(cytomegalovirus) 프로모터에 의해 발현되는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 상기 항원 단백질은 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질일 수 있다.
- [49] 상기 항원 단백질은 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질일 수 있다.
- [50] 상기 링커는 (GGGS)_n으로 구성되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [51] 상기 n은 1 내지 5의 정수인 것을 특징으로 한다.
- [52] 또한, 본 발명은 상기 재조합 아데노바이러스 벡터에 코로나바이러스 스파이크 단백질을 코딩하는 서열이 삽입된, 코로나바이러스감염증 예방용 백신을 제공한다.
- [53] 상기 코로나바이러스는 베타 코로나바이러스 속에 속하는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 한다.
- [54] 상기 SARS-CoV-2와 SARS-CoV의 유전체 상동성은 79.6%, SARS-CoV-2와 MERS-CoV의 유전체 상동성은 50%로 높은 것이 특징이다. 특히, SARS-CoV-2와 MERS-CoV는 상기 발명의 표적인 스파이크 단백질의 상동성이 35%로 유사한 반면, SARS-CoV-2와 SARS-CoV의 스파이크 단백질 상동성은 76%로 매우 높은 것을 특징으로 한다.
- [55] 상기 스파이크 단백질(Spike protein)은 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질인 것을 특징으로 한다.
- [56] 백신에서 항원은 다량 분비되는 것도 중요하지만, 다량으로 발현되더라도 초기에 분해되면 면역세포를 자극하여 면역반응을 충분히 유도하지 못하기 때문에, 발현된 항원의 안정성이 높은 것이 매우 중요하다. 본 발명의 S1 및 S2 사이에 링커 서열이 연결된 재조합 스파이크 단백질은 항원 발현도가 높을 뿐만 아니라 안정성이 향상되어 중화 항체 생성 능력 및 T 세포 반응성을 유도하는 능력이 뛰어나다.
- [57] 용어 "면역 반응"은, 이로 한정되는 것은 아니지만, 체액성 면역 반응 및 세포성 면역 반응, 예를 들어, CD4+ 또는 CD8+ 세포 활성화를 포함할 수 있다.
- [58] 상기 스파이크 단백질(Spike protein, S protein)은 코로나바이러스 입자의 표면을 덮고 있고, 코로나바이러스가 인체 세포에 침입할 때 이용하는 돌기 모양의 단백질로 S1와 S2의 서브유닛으로 구성되고 인체 세포의 안지오텐신변환효소-2(Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE-2) 수용체와 결합한 후 세포 속으로 침투해 유전 물질(RNA)를 밀어 넣어 자신을 복제하는

- 방식으로 인체를 감염시킨다.
- [59] 상기 재조합 단백질은 스파이크 단백질의 서브유닛인 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열(cleavage site)이 제거된 것을 특징으로 한다.
- [60] 상기 단백질은 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열로 연결되는 것을 특징으로 한다.
- [61] 상기 링커는 (GGGS) n 으로 구성되는 것을 특징으로 하고, 상기 n 은 1 내지 5의 정수이다.
- [62] 각 단백질을 구성하는 도메인들은 고유의 특성에 따라 상호 작용에 최적화된 거리(링커 서열의 길이)를 가지며, 링커 서열의 길이에 따라 단백질의 구조적 안정성이 발현된다. 따라서, 상기 단백질은 바람직하게는 n 은 1 또는 3일 수 있고, 가장 바람직하게는 n 은 1이다.
- [63] n 이 4를 초과하는 경우 반복적인 서열이 다수 발생하게 되어 의도하지 않은 상동 재조합에 의해 링커 서열이 삭제될 수 있을 뿐만 아니라, 단백질의 안정성이 감소 되는 결과를 초래한다.
- [64] 상기 링커 서열로 연결된 스파이크 단백질 항원은 안정성(stability)이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [65] 본 발명의 구체적인 실시예에서, E4 유전자 일부가 결손된 아데노바이러스 타입 5/35형(Ad5/35) 생산과정에서 발생한 E1 유전자를 다시 획득한 복제가능 아데노바이러스는 복제 불능성을 나타내고, E1 유전자를 상동 재조합에 의해 획득하더라도 E4orf6 유전자가 결손되면 아데노바이러스 복제가 일어나지 않음을 확인하고(도 4 참조), E1 유전자의 결실 위치에 항원 단백질 및 E4orf6 유전자가 i) 결손된 E4의 염기서열 개수, ii) 항원 단백질 및 E4orf6 유전자의 삽입 순서 및 방향성에 따라 삽입된 재조합 아데노바이러스 벡터를 제작하고 아데노바이러스 생산성을 평가한 결과, E4orf6의 14bp가 결실되고, 재배치한 E4orf6의 5' 위치에 항원 단백질이 연결되며, 상기 재배치한 E4orf6가 정방향으로 발현되는 벡터(E4re#1, E4re#11)가 아데노바이러스 생산성이 높음을 확인하였다(표 2).
- [66] 상기 E4re#1 및 E4re#11 벡터에서 재배치한 E4orf6을 발현하기 위한 프로모터의 종류를 변경한 재조합 아데노바이러스 벡터를 제작하고 아데노바이러스 생산성을 평가한 결과, 생산성이 증가한 5종의 벡터(E4re#13, E4re#14, E4re#18, E4re#19, E4re#20)를 확인하였다(표 3).
- [67] 생산성이 우수한 것으로 평가된 7종의 벡터(E4re#1, E4re#11, E4re#13, E4re#14, E4re#18, E4re#19, E4re#20)에 대해 생산성을 반복 실험한 결과, 대조군 벡터와 생산성이 유사한 5종의 벡터(E4re#13, E4re#14, E4re#18, E4re#19, E4re#20)를 확인하였다(표 4).
- [68] 상기 5종의 벡터 중 유전적 안정성을 저해할 가능성이 있는 E4re#18을 제외한 4종의 벡터(E4re#13, E4re#14, E4re#19, E4re#20)에서 E4orf6 코딩지역의 C-말단 지역부터 -12, 27, 42, 57, 318, 421, 711bp 서열을 제거한 벡터 중 E4orf6의 711

서열이 제거되고, E4re#13 항원이 도입된 E4re#29 벡터가 아데노바이러스 생산성이 높음을 확인하였다.

- [69] 5종의 벡터(E4re#13, E4re#14, E4re#19, E4re#20, E4re#29)에서 바이러스 원액 생산성을 평가한 결과, 대조군 대비 73 내지 98%의 생산성을 보이고(표 6), E4re#29 아데노바이러스 벡터를 가지고 세포 기반 RCA 부정시험을 수행한 결과, 복제가능 아데노바이러스(RCA)가 검출되지 않았으며(도 11), 바이러스 계대가 증가해도 RCA는 검출되지 않음을 확인하였다(도 12). 또한 6종의 벡터(E4re#1, E4re#13, E4re#14, E4re#19, E4re#20, E4re#29)에서 세포 내 항원 발현도를 평가한 결과, E4re#13, E4re#29 벡터가 세포 내 항원 발현도가 제일 높고(도 13a 내지 도 13c), 5종의 벡터(E4re#1, E4re#13, E4re#14, E4re#20, E4re#29)에서 중화항체 생성량이 대조군과 동일함을 확인하였다(도 14a 내지 도 14d).
- [70] 따라서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터는 다양한 질병 백신 또는 항암 백신의 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [71] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [72] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [73] <실시예 1> 복제가능 아데노바이러스 벡터(RCA) 및 E4orf6 결실 아데노바이러스 벡터(pRCA-E4dl355 및 pRCA-E4dlO4-7)의 제조
- [74] 아데노바이러스 타입 5/35형(Ad5/35) 생산과정에서 발생한 E1 유전자를 다시 획득한 복제가능 아데노바이러스(Replication competent adenovirus, RCA) 클론을 확보하고, 카나마이신 항생제 저항성 유전자와 pBR322 복제시작점 유전자 서열을 도입하여 pRCA(서열번호 1, 36,262 bp) 아데노바이러스 벡터를 제작하였다. pRCA는 아데노바이러스 혈청형 5(Ad5)를 기본으로 E3 유전자가 결실되어 있으며, 세포수용체 결합부위인 파이버(Fiber)를 아데노바이러스 혈청형 35(Ad35)의 파이버로 치환한 형태이다.
- [75] pRCA 벡터의 E4orf6 유전자 역방향 코딩서열의 일부를 CRISPR/Cas 효소와 Sequence and ligation independent cloning(SLIC) 기법을 사용하여 절단하고 pRCA-E4dl355(서열번호 2)(E4orf6 제거부위: 33,918-33,931, 14bp 제거) 벡터를 제작하였다. 또한, E4orf6 코딩서열 전체와 E4orf6 코딩서열 일부를 공유하는 E4orf4, E4orf6/7가 추가적으로 절단된 pRCA-E4dlO4-7(서열번호 3)(E4 제거부위: 33,238-34,666, 1,429bp제거) 벡터도 제작하였다.
- [76] <실시예 2> E4orf6 결실 아데노바이러스 벡터의 복제불능성(replication-defective) 확인
- [77] 대조군 벡터인 pRCA와 E4 유전자가 결손된 pRCA-E4dl355, pRCA-E4dlO4-7 벡터를 AD-293 세포주를 이용하여 생산하고, E4 유전자 결손 아데노바이러스가 복제불능인지 확인하고자 하였다.

- [78] 구체적으로, T25 플라스크에 약 80% 차 있는 AD-293 세포주에 20 μ l의 리포펙타민 2000(ThermoFisher, Cat. #: 11668027)과 함께 각 8 μ g의 벡터를 형질 전환시켜 초기 아데노바이러스 벡터를 생산했다. 형질 전환 2일 후에 T75 플라스크 2장으로 나누고, 형질 전환 후 6일에서 14일까지 배양하였다. 현미경으로 관찰했을 때 세포 병변 효과(CPE, Cytopathic effect)가 80% 이상의 세포에서 보이면 아데노바이러스가 충분히 생산되었다고 보고 세포를 수확하였다. 세포 병변 효과가 형질 전환 14일 차까지 보이지 않으면 트립신을 사용하여 세포를 떼어 수확하였다. 수확한 세포는 초저온 냉동고와 37°C 물 중탕 인큐베이터에서 얼리고 녹이는 과정을 3회 반복하여 세포를 파쇄하고 원심분리하여 아데노바이러스가 포함된 상등액을 확보하였다. 아데노바이러스 증폭을 위해 4 $\times$ 10⁶개의 AD-293 세포주를 T175 플라스크에 분주하고 이틀간 배양하였다. 이틀 후 각 아데노바이러스가 포함된 상등액을 T175 플라스크 당 2ml씩 감염하여 48시간 동안 추가배양 하였다. 세포 병변 효과가 나타났는 지를 현미경으로 관찰한 후 세포를 수확 및 파쇄하고, 원심분리하여 아데노바이러스가 포함된 상등액을 확보하였다. 그 중 일부를 High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) protocol을 참조하여 바이러스 게놈을 추출하였다. pRCA 벡터 내에 존재하는 세포수용체 결합부위인 Ad35 파이버(Fiber) 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭된 바이러스 카피수를 확인하였다.
- [79] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, E4 유전자 일부가 결손된 pRCA-E4dl355 및 E4orf4, E4orf6, E4orf6/7 유전자가 모두 결손된 pRCA-E4dlO4-7 벡터는 2 세대 아데노바이러스 생산과정 동안 세포 병변 효과가 나타나지 않았고, 도 5에 나타난 바와 같이, 아데노바이러스 유전자 복제가 일어나지 않았다. 상기 결과는 E1 유전자를 상등 재조합에 의해 획득하더라도 E4orf6 유전자가 결손되면 아데노바이러스 복제가 일어나지 않음을 제시한다.
- [80] <실시예 3> E4 유전자가 재배치된 아데노바이러스 벡터의 제작
- [81] <3-1> E1 유전자 제거 및 제한효소 서열 삽입
- [82] 복제불능인 pRCA-E4dl355, pRCA-E4dlO4-7 벡터의 E1 유전자를 제거하고, E4 유전자 재배치를 위한 SmaI 제한효소 지역을 삽입하고자 하였다.
- [83] 도 6에 나타난 바와 같이, PCR을 이용한 위치 특이적 돌연변이 (Site-directed mutagenesis)와 인퓨전 클로닝 라이게이션(in-fusion cloning ligation, Clontech, Cat. #: 639648) 방법을 사용하여 E1 유전자가 제거되고, 그 지역에 SmaI 제한효소 표적 서열이 삽입된 pAdk35-E4dl355(서열번호 4), pAdk35-E4dlO4-7(서열번호 5) 벡터를 제작하였다.
- [84] 구체적으로, 파이버(Fiber) 유전자 내에 있는 NheI 제한효소 지역과 E1 유전자 앞쪽 지역에 결합하는 프라이머 세트, 그리고 E1 유전자 뒤쪽과 pTP와 52K 유전자 사이에 있는 NheI 제한효소 지역에 결합하는 프라이머 세트를 사용하여 해당 지역들을 증폭하였다. E1 유전자 앞과 뒤쪽에 결합하는 프라이머에는 SmaI 제한효소 표적서열을 추가하였고, PCP 산물들의 양쪽말단은 15bp 서열이

검치도록 하였다. 두 PCR 산물들을 인퓨전 클로닝 라이게이션 방법을 사용하여 E1 유전자가 제거되고, *Swa*I 제한효소 표적 서열이 삽입된 중간단계 벡터를 제작하였다. 중간단계 벡터를 *Nhe*I 제한효소로 선형화를 시키고, 남은 아데노바이러스 벡터 지역을 PCR로 증폭하고 두 선형화된 벡터들을 인퓨전 라이게이션 클로닝 방법을 사용하여 pAdk35-E4d1355(서열번호 4), pAdk35-E4d1O4-7(서열번호 5) 벡터를 제작하였다.

- [85] **<3-2> E4 유전자 재배치와 항원(Spike) 유전자 도입을 위한 서틀벡터 및 E4 재배치 아데노바이러스 벡터 제작**
- [86] 복제불능인 pRCA-E4d1355, pRCA-E4d1O4-7 벡터의 E1 유전자가 제거된 부위에 E4orf6 및 항원 유전자를 도입한 벡터를 하기와 같이 제작하였다.
- [87] 구체적으로, 서틀벡터는 pSBbi-Pur 벡터를 사용하고, E4orf6 유전자 발현 카세트와 항원 유전자 발현 카세트를 순차적으로 도입하였다. 항원으로는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 사이의 절단 인지 서열을 링커 서열(GGGGS)로 치환한 단백질을 코딩하는 염기 서열을 사용하였다.
- [88] pRCA 벡터의 E4orf6 전체지역을 PCR로 증폭하고, 인퓨전 라이게이션 클로닝으로 pSBbi-Pur 벡터의 EF-1a 프로모터와 bGH polyA 서열 사이에 삽입하여 pSBbi-E4orf6 벡터를 제작하였다. 위치 특이적 돌연변이와 인퓨전 라이게이션 클로닝으로 pSBbi-E4orf6 벡터의 EF-1a 서열 앞쪽과 bGH poly 뒤쪽 부위에 항원(스파이크 단백질) 발현 카세트를 정방향과 역방향으로 삽입하여 4종의 서틀벡터를 제작하였다. 항원(스파이크 단백질) 발현 카세트는 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터와 테트라사이클린 오퍼레이터(Tetracycline Operator, Tet O), 스파이크 단백질 항원, SV40 poly A 서열을 순차적으로 포함한다. Spike/E4orf6 발현 카세트 증폭용 프라이머 세트를 사용하여 증폭한 다음, 제한효소 *Swa*I로 절단한 pAdk35-E4d1355, pAdk35-E4d1O4-7 벡터와 인퓨전 클로닝 라이게이션하여 도 7에 나타난 바와 같이, 스파이크 단백질 항원을 발현하고, E4orf6 유전자가 E1 결손부위에 재배치된 아데노바이러스 벡터 12종을 제작하였다. 12종 벡터의 차이는 1) E4 결손부위(E4orf6의 14bp 결실 또는 1.429bp 결실, 2) 스파이크 단백질 및 E4orf6 유전자의 위치(스파이크 단백질 및 E4orf6의 순서 또는 E4orf6 및 스파이크 단백질의 순서), 3) 방향성(정방향 또는 역방향)이 상이하다.

[89] [표1]

약식명	전체명칭	서열번호
4re#1	Adk35F2-Spike/E4orf6-E4dl355	서열번호 6
4re#2	Adk35R2-Spike/E4orf6-E4dl355	서열번호 7
4re#3	Adk35F2-E4orf6/Spike-E4dl355	서열번호 8
4re#4	Adk35R2-E4orf6/Spike-E4dl355	서열번호 9
4re#5	Adk35F2-Spike/E4orf6-E4dlO4-7	서열번호 10
4re#6	Adk35R2-Spike/E4orf6-E4dlO4-7	서열번호 11
4re#7	Adk35F2-E4orf6/Spike-E4dlO4-7	서열번호 12
4re#8	Adk35R2-E4orf6/Spike-E4dlO4-7	서열번호 13
4re#9	Adk35FR-Spike/E4orf6-E4dl355	서열번호 14
4re#10	Adk35FR-E4orf6/Spike-E4dl355	서열번호 15
4re#11	Adk35RF-Spike/E4orf6-E4dl355	서열번호 16
4re#12	Adk35RF-E4orf6/Spike-E4dl355	서열번호 17

- [90] <실시예 4> E4 유전자 재배치 벡터 12종의 아데노바이러스 생산성 측정
- [91] 상기 표 1의 E4 유전자 재배치 벡터 12종의 아데노바이러스 생산성을 293R 세포주를 이용하여 검증하였다.
- [92] 구체적으로, T175 플라스크에 약 80% 차 있는 293R 세포주에 100 μ l의 리포펙타민 2000 (ThermoFisher, Cat. #: 11668027)과 함께 각 50 μ g의 벡터를 형질 전환 시켜 초기 아데노바이러스 벡터를 생산했다. 형질 전환 2일 후에 T175 플라스크 4장으로 나누고, 형질 전환 후 6일에서 14일까지 배양하였다. 현미경으로 관찰했을 때 세포병변효과 (CPE, Cytopathic effect)가 80% 이상의 세포에서 보이면 아데노바이러스가 충분히 생산되었다고 보고 세포를 수확하였다. 세포 병변 효과가 형질 전환 14일 차까지 보이지 않으면 바이러스 생산성이 낮다고 판단하였다.
- [93] 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, E4re#1, E4re#11 벡터의 아데노바이러스가 충분히 생산되었음을 확인할 수 있었다. E4re#1, E4re#11 벡터는 1) pAdk35-E4dl355 벡터의 백본을 사용하고, 2) 재배치한 E4orf6 위치가 항원 유전자(스파이크 단백질)의 뒤쪽이며, 3) 정방향으로 발현되는 특징을 가지고 있다.

[94] [표2]

약식명	전체명칭	세포 병변 효과(Full CPE)	14일차의 세포 병변 효과(CPE)
E4re#1	pAdk35F2-Spike/E4orf6-E4dl355	10	N/A
E4re#2	Adk35R2-Spike/E4orf6-E4dl355	N/A	70%
E4re#3	Adk35F2-E4orf6/Spike-E4dl355	N/A	< 1%
E4re#4	Adk35R2-E4orf6/Spike-E4dl355	N/A	< 1%
E4re#5	Adk35F2-Spike/E4orf6-E4dlO4-7	N/A	60%
E4re#6	Adk35R2-Spike/E4orf6-E4dlO4-7	N/A	10%
E4re#7	Adk35F2-E4orf6/Spike-E4dlO4-7	N/A	< 1%
E4re#8	Adk35R2-E4orf6/Spike-E4dlO4-7	N/A	< 1%
E4re#9	Adk35FR-Spike/E4orf6-E4dl355	N/A	< 3%
E4re#10	Adk35FR-E4orf6/Spike-E4dl355	N/A	< 3%
E4re#11	Adk35RF-Spike/E4orf6-E4dl355	10	< 3%
E4re#12	Adk35RF-E4orf6/Spike-E4dl355	N/A	< 3%

- [95] <실시예 5> E4 유전자의 프로모터가 변경된 E4 유전자 재배치 벡터의 제작
- [96] 상기 실시예 4의 결과에 따르면, pAdk35-Spike 발현 벡터의 세포 병변 효과는 형질 전환 6 내지 7일 후에 90%에 도달한다. 반면 E4re#1, E4re#11 벡터는 형질 전환 10일 차에 90%에 도달하였다. 이는 해당 벡터의 아데노바이러스 게놈 복제 및 조립 효율이 낮거나, 조립속도가 느림을 나타낸 결과다. 상기 12종의 벡터에 재배치된 E4orf6 유전자는 EF-1a라는 강력한 프로모터에 의해 발현이 되고 있으므로, E4orf6 유전자 발현이 불필요하게 강하면 다른 아데노바이러스 복제관련 유전자의 발현에 영향을 미쳐 전체적인 복제 및 조립과정의 효율을 감소시킬 가능성이 있다. 따라서, E4re#1에 재배치된 E4orf6 유전자의 프로모터를 변경하여 E4orf6의 발현양을 조절함으로써 아데노바이러스 게놈의 복제 및 조립 효율을 증가시키고자 하였다.
- [97] 구체적으로, E4re#1, E4re#11의 Spike/E4orf6 발현 카세트가 들어있는 셔플벡터의 EF-1a 프로모터를 부위지향 돌연변이 유발 기법을 사용하여 제거하였다. EF-1a 프로모터가 제거된 셔플벡터에 PCR로 증폭된 mPGK, RSV,

CMV 프로모터, 그리고 E4orf6 -0.25kb, -0.5kb, -1kb 프로모터 예상 지역들을 각각 인퓨전 클로닝 라이게이션 기법으로 도입하였다. 최종적으로는 프로모터를 교체한 서플벡터 11종을 제작하고 이를 이용하여 Spike/E4orf6 발현 카세트를 증폭하고, SmaI 제한효소로 선형화된 pAdk35-E4dl355 벡터에 도입하여 하기 표 3 및 도 9에 나타난 바와 같이 E4 재배치 벡터 11종 (E4rc#13 내지 24)을 제작하였다.

- [98] E4 재배치 벡터 11종을 293R 세포주를 이용하여 세포 병변 효과를 관찰하여 생산성을 파악한 결과, mPGK, RSV, CMV 프로모터로 교체한 벡터의 세포 병변 효과가 2일 정도 앞당겨진 것을 확인할 수 있었다.

[99] [표3]

약식명	전체명칭	서열번호	세포 병변 효과(Fu II CPE)	14일차의 세포 병변 효과(CPE)
E4re#13	pAdk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl355	서열번호 18	8	N/A
E4re#14	pAdk35F2-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl355	서열번호 19	8	N/A
E4re#15	pAdk35F2-Spike/E4orf6(-0.25kb)-E4dl355	서열번호 20	N/A	50%
E4re#16	pAdk35F2-Spike/E4orf6(-0.5kb)-pE4dl355	서열번호 21	N/A	50%
E4re#17	pAdk35F2-Spike/E4orf6(-1kb)-E4dlO4-7	서열번호 22	N/A	50%
E4re#18	pAdk35F2-Spike/E4orf6(CMV)-E4dlO4-7	서열번호 23	8	N/A
E4re#19	pAdk35RF-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl355	서열번호 24	8	N/A
E4re#20	pAdk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl355	서열번호 25	8	N/A
E4re#21	pAdk35RF-Spike/E4orf6(-0.25kb)-E4dl355	서열번호 26	N/A	70%
E4re#22	pAdk35RF-Spike/E4orf6(-0.5kb)-E4dl355	서열번호 27	N/A	50%
E4re#23	pAdk35RF-Spike/E4orf6(-1kb)-E4dl355	서열번호 28	N/A	50%

[100] <실시예 6> 세포 병변 효과가 14일 이내로 관찰된 벡터의 생산성 비교

[101] 293R 세포주에서 세포 병변 효과가 14일 이내로 관찰된 벡터 7종 (E4re#1, 11, 13, 14, 18, 19, 20)을 T25 플라스크에서 12.5 μ g의 벡터를 각각 형질 전환하여 생산성을 비교하였다.

[102] 구체적으로, 293R 세포주의 세포 병변 효과가 90% 이상이 되면 세포를 수확 및 파쇄하여 바이러스를 확보하였다. 확보한 바이러스 2mL을 293R 세포주, T175

플라스크 1개 규모에 재감염하고 이틀간 배양하였다. 세포를 수확 및 파쇄하고, 바이러스 게놈을 추출한 후 k35 특이적인 프라이머를 사용하여 바이러스 게놈 카피수를 계산하고, 0.7을 곱하여 T175 플라스크에서 생산된 각 바이러스의 입자수를 계산하였다. 대조군 벡터로는 pAdk35-Spike를 사용하여 상대적인 생산량을 비교하였다.

- [103] 그 결과, 하기 표 4에 나타난 바와 같이, E4re#1, E4re#11은 대조군 벡터의 약 45% 생산량을 보였으며, 나머지 5종의 벡터들(E4re#13, 14, 18, 19, 20)은 83% 내지 109%의 생산량을 보였다. 5종의 벡터들은 반복실험을 통해 대조군 벡터와 유사한 79% 내지 99% 생산성을 보임을 확인하였다.

- [104] [표4]

배치	바이러스	농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	평균 cycle threshold(Cq)	전체 바이러스 입자(VP)	상대 %
#1	대조군	0.110	14.8	5.69E+12	100%
	E4re#1	0.104	15.7	2.64E+12	46%
	E4re#11	0.104	15.7	2.52E+12	44%
	E4re#13	0.089	14.8	4.71E+12	83%
	E4re#14	0.099	14.6	5.73E+12	101%
	E4re#18	0.095	14.5	6.19E+12	109%
	E4re#19	0.085	14.7	4.79E+12	84%
	E4re#20	0.098	14.7	5.26E+12	92%
#2	CLA-04	0.089	14.8	4.49E+12	100%
	E4re#13	0.085	14.8	4.43E+12	99%
	E4re#14	0.074	14.6	4.35E+12	97%
	E4re#18	0.074	14.7	4.07E+12	91%
	E4re#19	0.065	14.7	3.54E+12	79%
	E4re#20	0.065	14.7	3.57E+12	79%

- [105] <실시예 7> RCA 출현 가능성을 최소화하고 생산성을 유지하기 위한 최적화 과정 수행

- [106] 최종 5종의 벡터들 (E4re#13, 14, 18, 19, 20) 중 E4re#18은 스파이크 단백질을 발현하는 유전자와 E4orf6 재배치 유전자를 발현하는 데 있어 CMV 프로모터를 중복으로 사용하고 있다. 이는 여러번 계대 배양하여 대규모로 아데노바이러스를 생산할 때 유전적 안정성을 저해하는 요인으로 작용할 수 있어 후보 벡터에서 제외하였다.

- [107] 또한, pAdk35-E4dl355 벡터 백본은 생산성 측면에서 우수하지만 E4 결손부위가 중간 14개의 염기서열로써 E1 결손 지역에 재배치된 정상 서열의 E4orf6 유전자와 2개의 상동 서열 지역이 존재하게 된다. 바이러스 증식과정에서 벡터 내, 혹은 벡터 간 상동성 재조합이 일어나서 E4 결손부위가 다시 회복되고 RCA가 출현할 가능성이 있다. 따라서 E4 결손부위를 중간 14개의 염기서열이 아닌 C-말단 부위로 변경하여 RCA 출현 가능성을 최소화하고, 생산성을 최대한 유지하는 최적화 과정을 하기와 같이 진행하였다.
- [108] 구체적으로, 도 10에 나타난 바와 같이, E4orf6 코딩지역의 C-말단 지역부터 -12, 27, 42, 57, 318, 421, 711bp 서열을 제거하였다. 또한, E1 결실 위치에는 E4re#13, 20 벡터에 사용된 항원 F2-Spike/E4orf6(mPGK), RF-Spike/E4orf6(RSV)를 도입하였고, E4orf6 발현양을 더 감소시키고자 E4re#13 벡터에서 재배치한 E4orf6 유전자 앞에 코작 서열이 제거된 벡터를 제작하였다.
- [109] [표5]

약식명	전체명칭	서열번호
E4re#27	Adk35F2-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-711	서열번호 29
E4re#28	Adk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-711	서열번호 30
E4re#29	Adk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-711	서열번호 31
E4re#30	Adk35F2-Spike/E4orf6(CMV)-E4dl-711	서열번호 32
E4re#31	Adk35RF-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-711	서열번호 33
E4re#32	Adk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-12	서열번호 34
E4re#33	Adk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-27	서열번호 35
E4re#34	Adk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-42	서열번호 36
E4re#35	Adk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-57	서열번호 37
E4re#36	Adk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-318	서열번호 38
E4re#37	Adk35F2-Spike/E4orf6(mPGK)-E4dl-421	서열번호 39
E4re#38	Adk35F2-S04/E4O6(mPGK)(nokozak)-E4dl-355	서열번호 40
E4re#39	Adk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-12	서열번호 41
E4re#40	Adk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-27	서열번호 42
E4re#41	Adk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-42	서열번호 43
E4re#42	Adk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-57	서열번호 44
E4re#43	Adk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-318	서열번호 45
E4re#44	Adk35RF-Spike/E4orf6(RSV)-E4dl-421	서열번호 46

- [110] <실시예 8> 아데노바이러스 생산성 검증

- [111] E4re#13, 14, 19, 20, 29 벡터의 성숙한 아데노바이러스 생산성을 검증하고자 CellSTACK 10(CS10) 규모에서 아데노바이러스를 생산하고 세슘 클로라이드(CsCl)로 정제한 후, 이를 다시 293R 세포주에 CS10 규모에서 500 vp/세포로 재감염하였다. 세포를 수확, 파쇄, 정화하고, FPLC 기기로 아데노바이러스를 정제하고 HPLC로 바이러스 입자 함량을 측정하여 바이러스 원액 생산성을 확인하였다.
- [112] 그 결과, E4 재배치 벡터들은 대조군 벡터 대비 73% 내지 98%의 생산성을 보이는 것을 알 수 있었다.

[113] [표6]

시료	대조군 벡터		E4re#13	E4re#14	E4re#20	E4re#19	E4re#29-1	E4re#29-2
단위함량(VP/CS10)	3.0E+13	3.5E+13	3.24E+13	2.59E+13	3.05E+13	2.41E+13	2.01E+13	2.25E+13
생산성	100%		98%	79%	93%	73%	61%	68%

- [114] <실시예 9> E4re#29 아데노바이러스 벡터의 복제가능 아데노바이러스 출현 검증
- [115] E4re#29 아데노바이러스 벡터를 가지고 세포 기반 RCA 부정시험을 수행하였다. 4.14E+10 VP를 A549 세포 T175 플라스크 36장에 감염 후 수확하고 재감염을 4회 반복하였다. 마지막 감염 일주일 후, 현미경으로 세포 병변 효과를 확인하였다.
- [116] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 36장의 플라스크 모두에서 복제가능 아데노바이러스(RCA)는 검출되지 않았다.
- [117] E4re#29 아데노바이러스 벡터를 HEK293R 생산세포주에서 계대배양하여 계대4, 계대5, 계대6 바이러스를 확보하였다. 각 계대 바이러스를 3E+10VP씩 A549 세포주에 감염하고, 10일 뒤 바이러스 DNA를 추출하였다. E1 유전자 특이적인 프라이머로 정량 PCR하여 복제가능 아데노바이러스 존재유무를 확인하였다.
- [118] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 바이러스 계대가 증가해도 RCA는 검출되지 않음을 확인하였다.
- [119] <실시예 10> E4 재배치 벡터의 세포 내 항원 발현도 비교
- [120] 최종 4종의 벡터들 (E4re#13, 14, 19, 20, 29)의 생산성, 스파이크 단백질 항원 발현도 및 면역원성을 비교하기 위해, CellSTACK 10(CS10) 규모에서 2계대 바이러스를 생산, 분리, 정제하였다. 정제방법은 세슘 클로라이드(CsCl) 밀도 구배 원심분리법(cesium chloride density gradient centrifugation)을 사용하였고,

- 1차(1.2g/ml CsCl+1.4g/ml CsCl, 32,000 RPM, 90분)와 2차(1.35g/ml CsCl, 32,000 RPM, 18시간)에 걸쳐 정제하였고, 투석(20mM Tris-HCl, 25mM 염화나트륨, 2.5% 글리세롤)을 통해 완제 아데노바이러스를 생산하였다.
- [121] E4re#1, 13, 14, 19, 20, 29 백터의 세포 내 항원 발현도를 비교하기 위해 A549 세포주에서의 항원 발현도를 유세포 분석법(FACS)으로 측정하였다.
- [122] 구체적으로, 유세포 분석법은 96-웰 배양 접시에 A549 세포가 각 웰 당 2.5×10^5 세포가 되도록 분주한 후, 각 백터와 대조군인 CLA-04 백터를 500, 1000 또는 2000 vp/세포가 되도록 세포에 접종한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 웰의 세포를 각 1.5ml 튜브로 옮기고 FACS 버퍼 500 μ l를 넣고 원심분리(5000 rpm, 3분, 4°C)시켰다. 상층액을 제거한 후, 1:1000으로 희석한 생존도 지시염료 (eFluor™ 450, ebioscience, cat #:65-0863-14)를 각 50 μ l씩 넣고 4°C에서 30분 동안 표면염색을 수행하였다.
- [123] 세포 내부에서 발현하는 항원 검출을 위해, 세포 고정/투과 농축액(ebioscience, Cat. #: 00-5123-43)을 세포 고정/투과 희석액(ebioscience, Cat. #: 00-5223-56)에 1:4로 희석하여 각 100 μ l씩 넣고 4°C에서 30분 동안 세포 고정/투과를 진행했다. 스파이크 항원 염색은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항체(GeneTex, Cat. #: GTX632604)를 투과 버퍼(ebioscience, Cat. #: 00-8333-56)에 1:2500으로 희석한 용액(항체 농도: 0.4 μ g/ml)으로 4°C에서 1시간 동안 진행 후 워싱한 다음, 2차 항체인 APC Goat anti-mouse IgG antibody(Biolegend, Cat: 405308)를 1:100으로 희석한 용액(항체 농도: 2 μ g/ml)으로 항원 염색(4°C, 30분)했다. 염색 반응 후, 시료당 300 μ l 버퍼를 넣고 유세포 분석기(BD bioscience, LSRFORESSA)로 항원 발현 정도를 측정하였다.
- [124] 그 결과, 도 13a 내지 13c에 나타난 바와 같이, E4re#13, E4re#29 백터가 단백질을 생성하는 능력인 항원 발현도가 가장 높은 것을 확인하였다.
- [125] <실시예 11> E4 재배치 백터의 중화 항체 생성 비교
- [126] E4re#1, 13, 14, 20, 29 백터를 6~7주령 BALB/c 마우스에 각 그룹당 6마리씩 근육주사를 수행했다. 투여 후 마우스에서 2-3주차 시기에 안와 채혈로 약 300 μ l의 혈액 시료를 채취했다. 이후 원심분리(8000 rpm, 10분, 20°C)를 통해 혈장을 분리하여, 혈액 내에 존재하는 중화 항체의 양을 효소결합면역흡착검사(ELISA)를 통해 측정했다.
- [127] 구체적으로, 효소결합면역흡착검사는 96-웰 플레이트에 스파이크 단백질(Acro Biosystems, Cat. #: SPN-C52H84)을 PBSN(PBS 1 L + Sodium Azide 0.01 g)에 녹여 100 ng/웰로 코팅해준 다음, 16시간 동안 4°C에서 냉장 반응시켰다. 96-웰 플레이트 코팅 16시간 후 코팅 단백질을 제거하고 PBS로 3회 세척한 뒤, 150 μ l 차단 버퍼(Blocking buffer, PBSN+BSA 1%)를 각 웰에 넣고 반응(37°C, 90분)시켰다. 반응시간 동안 희석 버퍼(Dilution buffer. PBSN+0.1% BSA+0.05% Tween-20)에 혈장을 6400배 희석하고, 차단 반응이 끝난 후 플레이트를 PBS로 3회 세척 후 희석한 혈장 샘플을 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 3시간)시켰다. 반응

이후, PBS 3회 세척 및 2차 항체인 GAM-IgG-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1030-05), GAM-IgM-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1020-05)을 희석 버퍼에 1000배 희석하여 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 2시간)하였다. 이후 2차 항체를 제거하고 PBS 5회 세척 후, 발색 시약(TMB Peroxidase Substrate buffer, ROCKLAND, Cat. #: TMBE-1000)을 50 μ l씩 넣고 15분간 발색 시키고 0.25N HCl을 50 μ l 넣어 발색을 멈추고, 시료를 마이크로리더기로 450nm 파장에서 분석하였다.

- [128] 그 결과, 도 14a 내지 14d에 나타난 바와 같이, #1, 13, 14, 20, 29 벡터의 항체 생성량은 대조군 벡터인 CLA-04와 동등함을 알 수 있었다.

청구범위

- [청구항 1] E1, E3 및 E4 유전자가 결실된 아데노바이러스에서 E4 유전자가 E1 유전자의 결실 위치에 삽입된 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 E4 유전자는 E4orf6(E4 open reading frame 6) 유전자인 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 결실된 E4 유전자는 E4orf6 유전자 영역의 10 내지 1,000bp 길이의 염기 서열인 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 Ad2, Ad4, Ad5, Ad11, Ad26, Ad35, Ad5/35, ChAd68, FAd9 또는 PAd3인 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 결실된 E4 유전자는 E4orf6, E4orf6/7 또는 E4orf4 영역인 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 결실된 E4 유전자는 10 내지 1,500bp 길이의 염기 서열인 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 E1 유전자의 결실 위치에 삽입된 E4 유전자는 E4orf6 유전자인 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 E4orf6 유전자는 코작 서열(kozak sequence)이 제거된 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 E1 유전자의 결실 위치에 항원 단백질을 코딩하는 서열이 삽입된 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 항원 단백질을 코딩하는 서열은 E4orf6 유전자의 5' 위치에 삽입된 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 E4orf6 유전자는 정방향으로 발현되는 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 E1 유전자의 결실 위치에 삽입된 E4 유전자는 EF-1a, mPGK, RSV, CMV, E4orf6의 -0.25kb, E4orf6의 -0.5kb 및 E4orf6의 -1.0kb 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 프로모터에 의해 발현되는 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 항원 단백질을 코딩하는 서열은 CMV(cytomegalovirus) 프로모터에 의해 발현되는 것을 특징으로 하는, 재조합 아데노바이러스 벡터.
- [청구항 14] 제1항의 벡터에 코로나바이러스 스파이크 단백질을 코딩하는 서열이 삽입된, 코로나바이러스감염증 예방용 백신.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스감염증 예방용 백신.

- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 스파이크 단백질(Spike protein)은 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스감염증 예방용 백신.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 링커는 (GGGGS) n 으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스감염증 예방용 백신.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 n 은 1 내지 5의 정수인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스감염증 예방용 백신.