



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월27일
 (11) 등록번호 10-1345205
 (24) 등록일자 2013년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 39/12 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
 C12N 7/02 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0076878(분할)
 (22) 출원일자 2012년07월13일
 심사청구일자 2012년11월12일
 (65) 공개번호 10-2012-0083263
 (43) 공개일자 2012년07월25일
 (62) 원출원 특허 10-2009-0099982
 원출원일자 2009년10월20일
 심사청구일자 2009년10월20일
 (30) 우선권주장 1020090055179 2009년06월19일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌 EP01410805 A1*
 KR100740237 B1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자 아이진 주식회사
 서울특별시 마포구 상암동 1580 디엠씨 첨단산업센터 414호
 (72) 발명자 김홍진
 서울특별시 동작구 흑석동 중앙대학교 약학대학 약품미생물학실
 이나경
 서울특별시 광진구 광장동 577 현대아파트 1002-404
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인 양부현, 김승진

전체 청구항 수 : 총 1 항

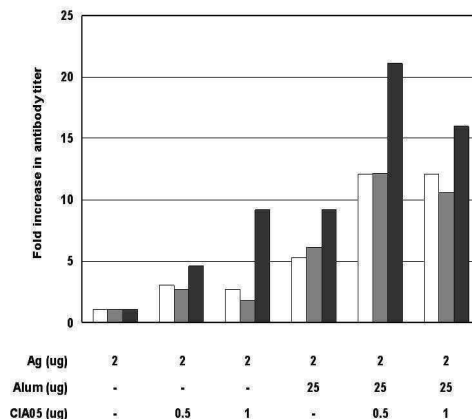
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 자궁경부암 백신

(57) 요약

본 발명은 (a) (i) 인간 파필로마 바이러스(HPV) 타입 16의 L1 바이러스-유사 입자(VLP), HPV 타입 18의 L1 VLP 또는 이의 조합; 및 (ii) 대장균으로부터 분리된 천연형 LPS(Lipopolysaccharide) 보다 당 사슬의 길이가 짧은 5,000-10,000 Da의 분자량을 갖는 LPS의 지질 A의 탈아실화에 의한 3,000-4,000 Da의 분자량을 갖는 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide); 그리고 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 인간 자궁경부암 백신 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도12b



(72) 발명자

조양제

서울특별시 용산구 이촌동 강촌아파트 102-1707

장진욱

서울특별시 마포구 상암동 월드컵파크2단지
203-404

김형진

서울특별시 동작구 흑석동 중앙대학교 약학대학 약
품미생물학실

김광성

경기도 하남시 신장2동 에코타운 306-2103

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A085139-0912-0000100

부처명 보건복지가족부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 신규면역보조제의 대량생산 및 자궁경부암 백신의 비임상 임상시험

기여율 1/1

주관기관 아이진(주)

연구기간 2009.11.01 ~ 2010.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) (i) 인간 파필로마 바이러스(HPV) 타입 16의 L1 바이러스-유사 입자(VLP), HPV 타입 18의 L1 VLP 또는 이의 조합; 및 (ii) 대장균으로부터 분리된 천연형 LPS(Lipopolysaccharide) 보다 당 사슬의 길이가 짧은 3,500-10,000 Da의 분자량을 갖는 LPS의 지질 A의 탈아실화에 의한 2,000-4,000 Da의 분자량을 갖는 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide); 그리고,
- (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 인간 자궁경부암 백신 약제학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 자궁경부암 백신 약제학적 조성물, 인간 자궁경부암 예방 방법 및 인간 파필로마 바이러스(HPV) L1 바이러스-유사 입자(VLP)의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간 파필로마 바이러스(Human Papillomavirus: HPV)는 현재 80종 이상이 알려져 있으며, 대략 30종이 성적인 접촉으로 자궁경부에 감염을 일으키고, 이중 반 정도가 자궁경부암과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Zur Hausen H, (1988) Mol. Carcinogenesis 8: 147-150). 또한 HPV 중 특히 HPV 타입 16과 18에 감염된 여성의 암 발생률이 비감염자의 500배나 높으며, 이들은 생식기의 상피세포를 통해 감염된 후, 자궁경부암(cervical cancer)으로 악성 전환(malignant transformation)되는 것으로 알려져 있다(Zur Hausen H, (1988) Mol. Carcinogenesis 8: 147-150; Hausen, Biochemica. Biophysica. Acta. 1288: 55-78, 1996).

[0003] 현재 개발된 자궁경부암의 예방백신은 고위험 타입의 HPV 바이러스-유사 입자(VLPs)를 이용하여 개발되었다. VLP는 HPV의 주 캡시드 단백질(L1 단백질, 약 55 kDa)로 다른 바이러스 유전자 산물 없이도 VLP로 자가정렬 되는 성질을 가지고 있으며, 이는 천연 HPV 바이리온과 거의 유사하다. 또한 면역능은 오래 지속되며, 유전자형에 특이(Type-specific)하여 백신 후보로서 높은 효율을 기대할 수 있는 장점이 있다.

[0004] 이러한 VLP를 이용 머크사의 ‘가다실’은 가장 흔하게 발생하는 4가지 HPV 타입 6, 11, 16 및 18 각각의 항원에 일반적으로 이용되는 면역보조제인 ‘Alum’을 사용하여 개발된 백신이다. 글락소스미스클라인사의 ‘써베릭스’는 가장 대표적인 자궁경부암 유발 인자인 HPV 타입 16 및 18에 독자적으로 개발한 면역보조제인 ‘AS04’를 사용하여 개발된 백신이다.

[0005] ‘가다실’에서 사용된 면역보조제인 Alum은 디프테리아, 파상풍 및 B형 간염 백신 등에 사용되고 있으며 이는 항원의 안정성을 증가시키고 사이토카인의 방출을 유도한다는 보고가 있었으나, 백신의 동결건조나 동결을 불가능하게 하고 모든 항원에 대해 효과적이지 못하며 체액성 면역반응만을 촉진시킴에 따라 용도가 제한되어 있다는 큰 단점이 있다.

[0006] GSK의 Cervarix에 포함되는 AS04는 강력하고 지속적인 면역반응을 유도하기 위한 목표로 개발되었으며 알루미늄 하이드록사이드 및 모노포스포릴리피드 A(MPL)로 구성되어 있다. MPL이란 핵심적인 면역기전을 직접 활성화시킬 수 있는 면역촉진 물질로서, 궁극적으로 백신에 포함된 항원에 대한 면역반응을 강화하는 역할을 하게 된다.

[0007] 최근 면역보조제가 새롭게 주목 받고 있으며 자궁경부암 백신과 더불어 독감백신 등 다양하게 사용되고 있다. 이러한 면역보조제중 박테리아 DNA는 1960년대부터 항암제로서 주목 받았으며, 현재까지 계속 연구가 되고 있으나 효능이 미흡하여 단독으로 항암제로 사용되지는 못하고 있다(Glick, J. L. The specificity of inhibition of tumor cell viability by DNA. *CancerRes.*27:2338,1967). 그러나 박테리아 DNA는 큰 부작용 없이 다양한 면역세포를 활성화 시키는 것으로 알려져 있으며, 특히 어쥬번트로 많은 장점이 있음이 확인되었다(McCluskie MJ, *etal.*. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *JImmunol.*Nov1;161(9):4463-6.1998).

- [0008] 박테리아 DNA의 이러한 효과에 대해서 일본의 Yamamoto 등은 CG를 포함한 서열이 중요한 역할을 한다고 주장하였고, 미국의 Krieg 등의 연구에 의해 널리 알려졌다(Yamamoto S. et al. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* 148:4072, 1992 ; Krieg AM, Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr. Oncol. Rep.* Mar; 6(2):88-95, 2004). 특히 1990년대 중반 이후에는 CPG 사 관련 연구의 결과로 DNA 항암제의 관심이 unmethylated CG를 포함한 합성 DNA(CpG-ODN)의 가능성이 확인되었으며, 특히 짧은 합성 DNA의 분해를 억제하기 위한 다이에스테르 결합에서의 S 치환 등이 연구되었다. 이러한 노력을 통해 CpG-ODN 관련 제품은 어썬트뿐 아니라 항암제로서도 임상시험 될 수 있게 하였다.(<http://www.coleypharma.com>).
- [0009] 그러나 CpG-ODN의 다이에스테르 결합의 S 치환에 대한 면역원성 문제 및 여전히 미흡한 항암효과 등은 해결해야 할 문제로 남아 있다. 현재 임상에 사용중인 CPG 7909는 anti-DNA Ab를 유발하는 포스포포티오에이트 올리고뉴클레오타이드이며(Clin Immunol. 2001 Aug;100(2):157-63), 이는 SLE(systemic lupus erythematosus) 등 자가면역질환과 밀접한 관계가 있다(J Clin Immunol. 1986 July;6(4):292-8). 또한 포스포포티오에이트 구조는 TI Ag로 작용하여 감염에 대한 면역방어기능에 혼란을 주는 것으로 알려져 있다(Mol Immunol. 1998 Dec;35(18):1161-70).
- [0010] 1950년대부터 항암효과가 알려진 LPS의 경우, ng 수준의 오염으로도 폐혈증에 의한 사망을 초래할 수 있는 독성으로 인해 사용이 어려웠다. 특히 LPS와 DNA의 결합은 심각한 독성을 나타낸다는 것이 일반적인 의견이었고, DNA 관련 의약품에서 LPS의 제거는 매우 중요한 과정으로 이해되었다(Gao JJ. et. al, Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF-alpha through a post-transcriptional mechanism. *J Immunol* 166(11):6855-60, 2001). 효능 면에서 LPS에 의한 면역증가는 DNA에 의한 것 보다 훨씬 강력하지만 항암에 중요한 Th1 타입이 아니라 Th2 타입이므로 항암제로 적합하지 못하다고 생각되었다(Lebman DA et al Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med.* Sep 1;168(3):853-62. 1988). 특히 Th2 타입 면역 활성화는 Th1 타입 면역 활성을 억제하기 때문에 LPS의 이러한 특성은 LPS를 항암제로 이용하기에 더욱 힘들게 하였다(Rengarajan J et al. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today.* Oct;21(10):479-83. 2000).
- [0011] LPS에 대한 약독화 시도는 꾸준히 연구되었으며 특히 폴리사카라이드 체인의 제거 또는 리피드 A의 탈아실기화를 통하여 독성을 감소시키는데 성공할 수 있었다 (Katz SS et al Deacylation of lipopolysaccharide in whole Escherichia coli during destruction by cellular and extracellular components of a rabbit peritoneal inflammatory exudate. *J Biol Chem.* Dec 17;274(51):36579-84 1999). 특히 LPS의 폴리사카라이드 체인을 제거하여 얻은 리피드 A의 인산화를 통하여 얻은 모노포스포릴 리피드 A(MPL)의 경우 LPS의 독성을 제거한 면역항암제로 개발되었으나 그 효과가 미미한 것으로 알려져 있다(<http://www.corixa.com>).
- [0012] 이에 본 출원인은 상기의 면역보조제들의 단점을 보완한 신규한 면역보조제를 이미 개발한 바 있다(대한민국 특허등록 제0740237호 (2007.07.10)).
- [0013] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명자들은 상술한 종래의 자궁경부암 백신의 문제점을 해결할 수 있는 신규한 백신을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 HPV 16 또는 18의 L1 VLP를 이용하는 면역화 과정에서 면역보조제로서 지질 A에서 일부 지방산이 제거된 비독성 LOS(Lipopolysaccharide)를 면역보조제로 이용하는 경우에는 종래의 VLP-기반 백신보다 크게 개선된 HPV 면역반응을 유도하여 자궁경부암 예방을 위한 우수한 백신이 될 수 있음을 확인함으

로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 인간 자궁경부암 백신 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) (i) 인간 파필로마 바이러스(HPV) 타입 16의 L1 바이러스-유사 입자(VLP), HPV 타입 18의 L1 VLP 또는 이의 조합; 및 (ii) 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide); 그리고, (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 인간 자궁경부암 백신 약제학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 약제학적 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 인간 자궁경부암 예방 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명자들은 상술한 종래의 자궁경부암 백신의 문제점을 해결할 수 있는 신규한 백신을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 HPV 16 또는 18의 L1 VLP를 이용하는 면역화 과정에서 면역보조제로서 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 면역보조제로 이용하는 경우에는 종래의 VLP-기반 백신보다 크게 개선된 HPV 면역반응을 유도하여 자궁경부암 예방을 위한 우수한 백신이 될 수 있음을 확인하였다.

[0020] 본 발명의 약제학적 조성물에 이용되는 VLP는 HPV 타입 16 L1 또는 HPV 타입 18 L1으로부터 유래된다. HPV 타입 16 또는 HPV 타입 18은 고위험성 HPV로 알려져 있으며, 자궁경부암을 유발하는 대표적인 HPV이다.

[0021] 본 발명의 명세서에서 용어 HVP L1 단백질은 HPV의 L1 유전자로부터 발현되는 것으로서 HPV의 캡시드(capsid)를 구성하는 주요(major) 단백질을 의미한다. L1 단백질은 캡시드를 구성하는 다른 마이너(minor) 단백질인 L2 단백질과 함께 또는 L1 단백질 단독으로 적합한 조건하에서 바이러스 유사 입자(VLP)로 자기조립(self-assemble)되는 특성을 갖는다.

[0022] 본 발명에서 이용되는 VLP는 HPV 타입 16 또는 HPV 타입 18의 L1 단백질의 자연-유래(natural occurring) 총 서열 및 이의 기능적 L1 단백질 유도체를 포함한다. 용어 "HPV L1 기능적 유도체"는 자연-유래 HPV L1 총 서열과 동일하지 않지만 VLP를 형성할 수 있고 면역반응을 유도할 수 있는 자연-유래 HPV L1 단백질의 유도체를 의미한다. 예를 들어, 상기 HPV L1 기능적 유도체는 핵위치화 시그널(nuclear localization signal)이 제거된 절단형(truncated) L1 단백질이다. 예컨대, HPV 타입 16 L1의 경우 C-말단의 34개 아미노산이 제거된 형태, HPV 타입 18 L1의 경우 C-말단의 35개 아미노산이 제거된 형태가 본 발명에서 이용될 수 있는 HPV L1 기능적 유도체이다. 본 발명에서 이용되는 HPV 16 및 18의 L1 VLP의 예시적인 아미노산 서열은 각각 서열목록 제2서열 및 제4서열에 나타나 있다.

[0023] 본 발명의 자궁경부암 백신 약제학적 조성물에서 면역반응을 유발하는 항원으로서, HPV 16 L1 VLP 또는 HPV 18 L1 VLP가 이용되며, 바람직하게는 HPV 16 L1 VLP 및 HPV 18 L1 VLP 둘 모두가 이용된다.

[0024] 선택적으로, 항원으로서, HPV 16 L1 VLP 및 HPV 18 L1 VLP 이외에, HPV 타입 31, HPV 타입 45, HPV 타입 6a, HPV 타입 6b, HPV 타입 11, HPV 타입 33, HPV 타입 35, HPV 타입 39, HPV 타입 51, HPV 타입 52, HPV 타입 56, HPV 타입 58 및 HPV 타입 68의 L1 VLPs로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1개의 L1 VLP를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0025] 선택적으로, 본 발명에서 이용되는 L1 VLP는 다른 단백질 예컨대 L2 단백질과 융합될 수도 있다.

[0026] 본 발명의 백신 조성물에서 가장 큰 특징은 면역보조제로서 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 이용하는 것이다. 본 명세서에서 처음으로 채택되는 용어 "LOS(Lipooligosaccharide)"는 LPS(lipopolysaccharide)의 변형체로서 천연(natural occurring) LPS보다 짧은 당쇄를 가지고 있어 분자량이 작은 것을 의미한다. 탈아실화 전 LOS는 바람직하게는 분자량이 5,000-10,000 Da이다. 용어 "탈아실화 LOS"는 이러한 LOS에서 지질 A의 글루코사민에 -C(O)O- 결합으로 결합된 지방산이 제거되어 LPO와 비교하여 독

성이 크게 감소된 것을 의미한다. 지질 A의 글루코사민에 지방산은 -C(O)O- 결합 및 -C(O)NH- 결합을 통하여 결합되어 있다. 본 발명의 탈아실화 LOS는 지질 A의 탈아실화에 의해 -C(O)O- 결합으로 결합된 지방산이 제거된 것을 나타낸다.

- [0027] 탈아실화 비독성 LOS는 다양한 방법을 통하여 제조될 수 있으나, 본 발명자들의 선행특허인 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; 및 WO 2006/121232에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, LPS에 강염기(예컨대, 2 N NaOH)을 처리하여 탈아실화 하여 지질 A로부터 일부 지방산을 제거하여 탈독소화 한다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 면역보조제로 이용되는 탈아실화 비독성 LOS는 LPS에 알칼리 처리하여 탈아실화 하여 비독성화 된 것이다. 상기 알칼리의 바람직한 예는 NaOH, KOH, Ba(OH)₂, CsOH, Sr(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH, RbOH 를 Mg(OH)₂를 포함하며, 보다 바람직하게는 NaOH, KOH, Ba(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH 및 Mg(OH)₂이고, 보다 더 바람직하게는 NaOH, KOH 및 Mg(OH)₂이며, 가장 바람직하게는 NaOH이다.
- [0029] LPS의 독성 정도는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 분석할 수 있다. 예를 들어, LPS가 처리된 THP-1(Acute monocytic leukemia)에 분비되는 TNF- α (tumor necrosis factor- α)의 양을 측정하여 독성을 분석할 수 있다. 본 발명의 탈아실화 비독성 LOS는 종래의 LPS와 비교하여 상대적으로 적은 양의 TNF- α 분비를 유도한다.
- [0030] 본 발명에서 이용되는 면역보조제인 탈아실화 비독성 LOS의 또 다른 특징은 분자량이 일반적으로 종래에 이용되는 LPS와 비교하여 작다는 것이다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 탈아실화 비독성 LOS는 1,500-10,000 Da, 보다 바람직하게는 2,000-5,000 Da, 보다 더 바람직하게는 2,000-4,000 Da, 보다 더욱 더 바람직하게는 3,000-4,000 Da, 가장 바람직하게는 3,200-3,7000 Da의 의 분자량을 갖는 것이다. 이러한 분자량은 당업계의 통상적인 방법 예를 들어 MALDI-MASS를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 면역보조제 탈아실화 비독성 LOS는 대장균(*E. coli*)로부터 유래된 것이며, 가장 바람직하게는 본 발명자들의 독자적인 균인 *E. coli* EG0021(KCCM 10374)으로부터 유래된 것이다.
- [0032] 본 발명에서 이용되는 탈아실화 비독성 LOS는 면역촉진(immunostimulatory) 효능이 종래의 면역보조제와 비교하여 우수할 뿐만 아니라 독성도 훨씬 감소되어 있어, 본 발명의 백신 조성물에 매우 적합하다. 하기의 실시예에서 입증한 바와 같이, LPS의 독성을 제거하기 위하여 LPS의 폴리사카라이드 체인을 제거하여 얻은 리프드 A의 인산화를 통하여 얻은 모노포스포릴 리프드 A(MPL) 보다 본 발명의 탈아실화 비독성 LOS는 독성이 훨씬 적다.
- [0033] 또한, 하기 실시예(도 12a 및 12b 참조)에 나타난 바와 같이, 본 발명의 탈아실화 비독성 LOS를 HPV L1 VLP와 함께 투여한 경우 Th1 타입 면역반응(세포성 면역)과 관련된 IgG2a뿐만 아니라 Th2 타입 면역반응(체액성 면역)에 관련된 IgG1 레벨도 증가하여, 탈아실화 비독성 LOS가 HPV L1 VLP와 함께 상승적인 면역반응을 유도하고 있음을 알 수 있다.
- [0034] 본 발명의 백신 조성물은 그의 기본적인 조성, 즉 HPV 16 L1 VLP, HPV 18 L1 VLP 또는 그의 조합과 탈아실화 비독성 LOS만으로도 충분한 면역반응을 유도하여 자궁경부암 예방 효능을 발휘할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 백신 조성물은 다른 면역보조제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 예를 들어 Mg, Ca, Sr, Ba 및 Ra으로 구성된 균으로부터 선택되는 제2족 원소, Ti, Zr, Hf 및 Rf로 구성된 균으로부터 선택되는 제4족 원소 또는 알루미늄의 염 또는 그의 수화물을 포함할 수 있다. 상기 염은 바람직하게는 옥사이드, 피옥사이드, 하이드록사이드, 카보네이트, 포스페이트, 파이로포스페이트, 하이드로겐포스페이트, 다이하이드로겐포스페이트, 설페이트 또는 실리케이트와 함께 형성된다. 예를 들어, 본 발명의 백신 조성물에서 추가적으로 이용될 수 있는 면역보조제는 마그네슘 하이드록사이드, 마그네슘 카보네이트 하이드록사이드 펜타하이드레이트, 티타늄 다이옥사이드, 칼슘 카보네이트, 바륨 옥사이드, 바륨 하이드록사이드, 바륨 피옥사이드, 바륨 설페이트, 칼슘 설페이트, 칼슘 파이로포스페이트, 마그네슘 카보네이트, 마그네슘 옥사이드, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트 및 수화된 알루미늄 포타슘 설페이트(Alum)를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 백신 조성물에서 추가적으로 이용될 수 있는 면역보조제는 알루미늄 하이드록사이드이다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, HPV 타입 16 또는 18의 L1 VLP는 (i) HPV 타입 16 또는 18의 L1-코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이스트(yeast)를 배양하는 단계; (ii) 상기 배양된 이스트를 용해(lysis)하는 단

계; (iii) 상기 이스트 용해물(lysate)에 대하여 암모늄 설페이트 침전을 실시하여 불순물을 제거하는 단계; (iv) 상기 불순물이 제거된 결과물에 대하여 헤파린 크로마토그래피(heparin chromatography) 또는 양이온 교환 크로마토그래피(cation-exchange chromatography)를 수행하는 단계를 포함하는 정제과정을 통하여 수득한 것이다.

[0036] 본 발명의 백신 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-1000 mg/kg(체중)이다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 액스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 자궁경부암 백신 조성물은 종래의 자궁경부암 백신인 Cervarix™ 와 Gardasil™ 보다 HPV에 대한 면역 반응을 크게 유도하여 자궁경부암 예방 효능이 더 우수할 뿐만 아니라 면역보조제로 이용되는 탈아실화 비독성 LOS의 독성이 거의 없어 안전성 측면에서도 매우 우수하다.

[0041] 특히, 본 발명의 자궁경부암 백신 조성물은, 하기의 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명의 백신 조성물을 투여한 경우 Th1 타입 면역반응(세포성 면역)과 관련된 인터페론- γ , IgG2a 및 IgG2b의 레벨이 Cervarix™ 와 Gardasil™ 보다 높으며, 또한 Th2 타입 면역반응(체액성 면역)에 관련된 IgG1 레벨도 Cervarix™ 와 Gardasil™ 보다 높다. 즉, 본 발명의 자궁경부암 백신 조성물은 HPV에 대한 면역에서 Th1 타입 면역반응(세포성 면역)과 Th2 타입 면역반응(체액성 면역) 둘 모두에서 Cervarix™ 와 Gardasil™ 보다 우수하다.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0043] (a) 본 발명의 자궁경부암 백신 조성물은 항원으로서 HPV 16 L1 VLP, HPV 18 L1 VLP 또는 HPV 16 L1 VLP 및 HPV 18 L1 VLP를 이용하고 면역보조제로서 탈아실화 비독성 LOS를 이용한다.

[0044] (b) 면역보조제인 탈아실화 비독성 LOS는 HPV에 대한 면역반응에서 매우 우수한 면역촉진효능을 발휘할 뿐만 아니라 독성이 거의 없어 안전성이 매우 우수하다.

[0045] (c) 또한, 탈아실화 비독성 LOS는 HPV L1 VLP에 의해 유도되는 면역반응에서 Th1 타입 면역반응(세포성 면역)과 Th2 타입 면역반응을 모두 증가시켜, HPV에 대한 상승적인 면역반응을 유도한다.

[0046] (d) 본 발명의 자궁경부암 백신 조성물은 HPV에 대한 면역에서 Th1 타입 면역반응(세포성 면역) 과 Th2 타입 면역반응(체액성 면역) 둘 모두에서 Cervarix™ 와 Gardasil™ 보다 우수하여, 자궁경부암 백신으로서 우수한 효능을 발휘한다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1a-1b는 HPV 타입 16 및 18 L1 VLP 단백질을 발현하는 YEG(yeast expression vector)에 대한 유전자 지도이다. AmpR는 암피실린 내성 유전자, AmpR는 암피실린 내성 유전자, Ura3는 orotidine 5-phosphate decarboxylase 합성 유전자이고, 2-micron은 복제원점이며, 나머지 기호는 제한효소 위치를 표시한다.

도 1c는 HPV 16 L1과 HPV 18 L1의 정제 과정의 모식도이다. 암모늄 설페이트 침전 후 낮은 농도의 NaCl 조건에서 불용성으로 변화된 단백질을 제거한 시료는 두 종류의 방법을 통해 정제되었다. 본 발명의 크로마토그래피법에서 헤파린 크로마토그래피(method 1) 또는 양이온-교환 크로마토그래피(method 2)를 사용하였다.

도 2a-2c는 HPV 16 L1의 정제결과이다. 도 2a는 불용성 불순물을 제거하는 과정을 거치지 않고 헤파린 크로마토그래피를 진행한 후의 SDS-PAGE 결과이다. 도 2b는 도 1c의 방법 1 (Method 1)에서 헤파린 크로마토그래피의 SDS-PAGE 결과이다. 도 2c는 1차 헤파린 크로마토그래피의 웨스턴 블롯팅 결과이다. 레인 1과 2는 로딩 시료와 비결합 시료이며 레인 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 및 16은 각각 분획 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 및 48을 나타낸다. 화살표는 L1 단백질의 분자량을 나타낸다.

도 3a-3b는 HPV 16 L1의 정제결과이다. 도 3a는 도 1c의 방법 2 (method 2)에서 양이온-교환 크로마토그래피의 SDS-PAGE 결과이다. 도 3b는 양이온-교환 크로마토그래피의 웨스턴 블롯팅 결과이다. 레인 1과 2는 로딩 시료와 비결합 시료이며 레인 3은 wash를 나타낸다. 레인 4, 5, 6, 7, 8, 9는 분획 1, 2, 3, 4, 5, 6 을 나타낸다. 분획 1, 2, 3은 각각 0.6, 0.7, 0.8 M NaCl이 포함된 버퍼로 용출되었으며 분획 4, 5, 6는 1 M NaCl이 포함된 버퍼로 용출되었다. 화살표는 L1 단백질의 분자량을 나타낸다.

도 4는 HPV 16 L1의 정제 결과로 헤파린 크로마토그래피와 양이온-교환 크로마토그래피의 L1 분획을 모은 후 50-100 kDa을 cut-off 시킬 수 있는 멤브레인 필터를 사용하여 농축한 결과이다. 패널 A는 SDS-PAGE 결과이며 B는 웨스턴 블롯팅 결과이다. 레인 1, 2, 3은 각각 BSA, 방법 1로 정제된 HPV 16 L1, 방법 2로 정제된 HPV 16 L1을 나타낸다. 각각의 샘플은 bradford assay로 정량되었으며 200 ng씩 동일양이 로딩 되었다.

도 5a 와 5b는 각각 도 1c의 방법 1과 방법 2로 정제된 HPV 16 L1 단백질의 전자현미경 사진이다. 정제된 HPV 16 L1 단백질은 카본-코팅된 구리 그리드(grid)에 흡착시키고 포스포텅스텐산(phosphotungstic acid)로 염색한 후 투과전자현미경으로 검사하였다. 확대배율은 41,000 X 이고, 막대(bar)는 100 nm를 나타낸다.

도 6a-6c는 HPV 18 L1의 정제결과로 도 6a는 불용성 불순물을 제거하는 과정을 거치지 않고 헤파린 크로마토그래피를 진행한 후의 SDS-PAGE 결과이다. 도 6b는 도 1c의 방법 1 (Method 1)에서 헤파린 크로마토그래피의 SDS-PAGE 결과이다. 도 6c는 헤파린 크로마토그래피의 웨스턴 블롯팅 결과이다. 레인 1과 2는 로딩 시료와 비결합 시료이며 레인 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16은 분획 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48을 나타낸다. 화살표는 L1 단백질의 분자량을 나타낸다.

도 7a-7b는 HPV 18 L1의 정제결과이다. 도 7a는 도 1c의 방법 2 (method 2)에서 양이온-교환 크로마토그래피의 SDS-PAGE 결과이다. 도 7b는 양이온-교환 크로마토그래피의 웨스턴 블롯팅 결과이다. 레인 1과 2는 로딩 시료와 비결합 시료이며 레인 3은 wash를 나타낸다. 레인 4, 5, 6, 7, 8, 9는 분획 1, 2, 3, 4, 5, 6 을 나타낸다. 분획 1, 2, 3은 각각 0.6, 0.7, 0.8 M NaCl이 포함된 버퍼로 용출되었으며 분획 4, 5, 6는 1 M NaCl이 포함된 버퍼로 용출되었다. 화살표는 L1 단백질의 분자량을 나타낸다.

도 8은 HPV 18 L1의 정제결과로 헤파린 크로마토그래피 와 양이온-교환 크로마토그래피의 L1 분획을 모은 후 50-100 kDa을 cut-off 시킬 수 있는 멤브레인 필터를 사용하여 농축한 결과이다. 패널 A는 SDS-PAGE 결과이며 패널 B는 웨스턴 블롯팅 결과이다. 레인 1, 2, 3은 각각 BSA, 방법 1로 정제된 HPV 18 L1, 방법 2로 정제된 HPV 18 L1을 나타낸다. 각각의 샘플은 bradford assay로 정량되었으며 200 ng씩 동일양이 로딩 되었다.

도 9a 와 9b는 각각 도 1c의 방법 1과 방법 2로 정제된 HPV 18 L1 단백질의 전자현미경 사진이다. 정제된 HPV 18 L1 단백질은 카본-코팅된 구리 그리드(grid)에 흡착시키고 포스포텅스텐산(phosphotungstic acid)로 염색한 후 투과전자현미경으로 검사하였다. 확대배율은 41,000 X 이고, 막대(bar)는 100 nm를 나타낸다.

도 10a 와 10b는 각각 헤파린 크로마토그래피 및 양이온-교환 크로마토그래피로 정제된 HPV 16 및 18 L1의 중화 활성 측정 결과이다. 정제된 각각의 L1 단백질을 마우스에 3주 간격 3회 면역하였으며 혈청 내 중화항체가 SEAP-기반 중화항체 활성 측정법으로 측정되었다. X축의 control, heparin 및 cation-exchange는 각각 면역 보조제만 면역한 그룹, 헤파린 크로마토그래피로 정제된 L1과 면역보조제로 면역한 그룹, 양이온-교환 크로마토

그래피로 정제된 L1과 면역보조제로 면역한 그룹을 나타낸다. Y축의 숫자는 혈청의 희석배율을 나타낸다.

도 11은 신규 면역보조제(CIA05)가 MPL 보다 세포독성(TNF- α 분비)이 낮음을 보여주는 그래프이다.

도 12a-12b는 신규면역보조제 CIA05, HPV 16 L1 VLP 및 알루미늄 하이드록사이드(Alum)의 농도별 혼합에 따른 항체 타이터(도 12a) 및 항체 타이터 변화의 배수(도 12b)를 보여주는 그래프이다. 빈 막대는 총 IgG, 사선의 막대는 IgG1 및 채워진 막대는 IgG2a에 대한 것이다.

도 12c는 신규면역보조제 CIA05, HPV 16 L1 VLP 및 알루미늄 하이드록사이드(Alum)의 농도별 혼합에 따른 비장 세포로부터의 인터페론- γ 분비 정도를 분석한 결과이다. 사선의 막대는 HPV 16 L1 VLP 처리 기간이 2일, 채워진 막대는 3일에 해당하는 것이다.

도 13a-13b는 신규면역보조제 CIA05, HPV 16/18 L1 VLP 및 알루미늄 하이드록사이드(Alum)의 농도별 혼합에 따른 혈청 총 IgG 타이터를 분석한 결과이며, 도 13a는 HPV 16 L1 VLP 및 도 13b는 HPV 18 L1 VLP에 대한 총 IgG 타이터를 분석한 결과이다.

도 14a-14b는 신규면역보조제 CIA05, HPV 16/18 L1 VLP 및 알루미늄 하이드록사이드(Alum)의 농도별 혼합에 따른 HPV 16 L1 VLP에 대한 혈청 내 IgG1 타이터(도 14a), IgG2a 타이터(도 14b)를 분석한 결과이다.

도 15는 신규면역보조제 CIA05, HPV 16/18 L1 VLP 및 알루미늄 하이드록사이드(Alum)의 농도별 혼합에 따른 비장세포로부터의 인터페론- γ 분비 정도를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] **실시예**

[0050] **실시예 1: 인간 파필로마바이러스 타입 16 및 18 VLP L1 단백질 생산 및 정제**

[0051] HPV 타입 16 및 18의 L1 단백질을 생산하는 제조합 이스트 발현 시스템 구축

[0052] HPV 타입 16 및 18의 L1 DNA 서열의 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*)에서의 코돈/발현 최적화를 실시하여, 서열목록 제1서열의 HPV 타입 16 L1 DNA 서열 및 서열목록 제3서열의 HPV 타입 18 L1 DNA 서열을 얻었고, “Synthesis in BHB Standard Vectors” 서비스(www.blueheronbio.com)를 이용하여 DNA를 각각 합성하였다(참조: 서열목록 제1서열 및 제3서열). 이때 최적화된 DNA 서열의 앞과 뒤에 *Hind*III(AAGCTT)와 *Cla*I(ATCGAT) 제한효소 위치를 연결하였다. 이후 클로닝 과정을 거쳐 본 발명에 사용될 제조합 HPV16L1 및 HPV18L1 단백질을 발현할 수 있는 제조합 플라스미드 DNA를 이스트 발현 벡터(YEG)를 사용하여 구축하여, YEG α -HPV16L1-ORS 및 YEG α -HPV18L1-ORS를 얻었다(도 1a). 클로닝 과정은 다음과 같다: 서열목록 제1서열의 HPV 타입 16 L1 DNA 서열 또는 서열목록 제3서열의 HPV 타입 18 L1 DNA 서열이 삽입된 pUCminusMCS 벡터(Invitrogen) 및 이스트 발현 벡터인 YEG-MCS 벡터를 *Hind*III와 *Cla*I으로 절단하였다. 절단된 DNA를 각각 전기 영동한 후 젤 추출 키트(HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit(#YDF100, RBC))를 사용하여 추출하였다. HPV 타입 16 및 18의 DNA와 벡터로 사용될 YEG-MCS 벡터를 리가아제(DAKARA, 2011a)를 이용하여 접합 시킨 후 dam(-) E.coli competent 세포(TAKARA, 9129)에 형질전환시켰다. 형질전환 후 형성된 콜리니를 계수하여 각각 배양한 후 플라스미드를 추출하고 효소로 절단하여 크기를 확인하였다. 크기가 확인된 플라스미드를 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*)에 형질전환시키고 SD(-ura) 플레이트에 스프레딩 하였다. 콜로니가 생성되면, 25개씩 콜리니를 피킹하여 접종하였다. (280 rpm, 30°C, shaking, 2일간). SD(-ura) 배지에서 잘 자란 것들만 선별하여 YPD배지에 접종하였다. 배양이 완료되면 배양시 O.D 값, 세포파쇄시 총 단백질 양, 정제(하기의 방법으로 정제) 후 ELISA 및 Westernblot 분석을 통하여 가장 우수한 균주를 선정하였다.

[0053] 제조합 HPV16L1 및 HPV18L1이 도입된 YEG α -HPV16L1-ORS 및 YEG α -HPV18L1-ORS 벡터로 각각 형질전환된 균주를 기탁기관 한국미생물보존센터에 2009년 10월 8일자로 기탁하고, 각각 기탁번호 KCCM11036P 및 KCCM11037P을 부여 받았다(KCCM11036P - *Saccharomyces cerevisiae* EG0216; KCCM11037P - *Saccharomyces cerevisiae* EG0218).

- [0054] 세포의 배양
- [0055] 방해판(baffle)이 부착된 플라스크에 우라실(uracil)이 없는 합성 완전 배지 SD-ura(Clontech)에 상기 제조한 이스트 균주 세포를 접종하고, 30℃에서 진탕 배양하였다. GAL10 프로모터로부터 HPV16 L1 및 HPV18 L1 단백질을 발현시키기 위해, YPDG 배지를 사용하였다. 모든 배지에 1% 효모추출액(DIFCO Laboratories, USA) 및 2% 펩톤(DIFCO Laboratories, USA)을 첨가하였으며 1%의 글루코오스와 3% 갈락토오스가 포함되게 하였다. YPDG 배지 3 L에 플라스미드 상기 형질전환된 이스트 균주를 접종한 후 30 ℃에서 48 시간 동안 진탕 배양하였다.
- [0056] 세포 용해물(Cell Lysate)의 제조
- [0057] 배양한 세포들을 펠릿으로 수득하고, 수득된 세포 펠릿을 70℃에서 냉동시켰다. 모든 후속 과정은 4℃에서 수행하였다. 세포 펠릿을 녹이고 얼음-냉각시킨 100 ml 브레이크 버퍼(break buffer)(20 mM sodium phosphate, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1.7 mM EDTA, 0.01% Tween 80)에 재현탁시키고, 프로테아제 저해제 콕테일 정제(Roche, USA)를 첨가하였다. 세포들을 유리 비드(Sigma, USA)와 함께 비드-비터(Bead-Beater)(Biospec Products, USA)의 챔버로 옮기고, 5 분간 vortex한 후에, 용해물(lysate)들을 4 ℃에서 10 분간 10000 g에서 수차례 원심분리하여 맑게 제거하였다.
- [0058] 암모늄 설페이트 침전
- [0059] 맑게 제거된 세포 용해물에 암모늄 설페이트(Sigma, USA)를 첨가하여 HPV L1 단백질을 회수하였다. 회수 효율(recovery efficiency)을 평가하기 위해, 암모늄 설페이트를 43% 또는 45% 농도로 첨가한 후, 각각 4℃에서 30분간 교반하고, 12,000g에서 10 분간 원심분리하여 단백질 펠릿을 수득하였다. 암모늄 설페이트로 침전된 펠릿을 PBS + 0.01% Tween 80 완충액으로 재현탁한 후 NaCl을 추가로 첨가하여 최종 NaCl 농도가 0.5 M 이상이 되게 하였다. 그 후 4℃에서 적어도 12시간 이상 인큐베이션 하였다.
- [0060] 저농도 NaCl 인큐베이션을 통한 불순물 제거
- [0061] 상기의 고농도 NaCl로 인큐베이션 된 용액을 PBS + 0.01% Tween 80 완충액으로 투석한 후 소듐 포스페이트 pH 7.2 완충액에 0.15 M NaCl과 0.01% Tween 80이 포함된 용액으로 희석하여 최종 단백질 농도가 2-5 mg/ml이 되게 하였다. 이 용액을 상온에서 2시간 이상 방치하여 비용해성 상태의 단백질이 생성되게 하였다. 생성된 비용해성 단백질은 10000 g에서 10분간 원심분리하여 제거하였다.
- [0062] 헤파린 크로마토그래피 (heparin chromatography)
- [0063] 상기의 저농도 NaCl로 인큐베이션된 샘플을 원심분리한 후 상층액을 결합 버퍼(binding buffer; PBS + 0.2 M NaCl pH 7.0, 0.01% Tween 80)로 투석하였다. 헤파린 레진(5 ml 또는 20 ml)으로 충전된 컬럼(GE healthcare, USA) 또한 결합 버퍼를 레진 부피의 5배를 흘려주어 평형을 유지하였다. 투석이 완료된 용액은 헤파린 컬럼을 통과시켜 결합시킨 후 결합 버퍼를 레진 부피의 5배로 흘려주어 세척하였다. 용출법은 NaCl 농도가 0.33 M에서 0.66 M 까지 35분간 상승하도록 선형 농도구배를 주어 불순물을 용출시킨 후 NaCl 농도가 0.66 M에서 2 M 까지 선형 농도구배를 주어 L1 단백질을 용출시켰다.
- [0064] 양이온 교환 크로마토그래피(cation-exchange chromatography)
- [0065] 상기의 저농도 NaCl로 인큐베이션된 샘플을 원심분리한 후 상층액을 결합 버퍼(binding buffer; PBS + 0.37 M NaCl pH 7.2, 0.01% Tween 80)로 투석하였다. P-11 셀룰로오스 포스페이트 레진(Whatman, UK)으로 충전된 8 cm X 4 cm Poly-Prep 컬럼(Bio-Rad Lab., USA)은 상기의 결합버퍼를 레진 부피의 5배로 흘려주어 평형 상태를 유지하였다. 투석이 완료된 용액은 P-11 컬럼을 통과시켜 결합시킨 후 결합 버퍼를 레진 부피의 5배로 흘려주어

세척하였다. 세척 후 결합 버퍼에 0.6 M, 0.7 M, 0.8 M과 1 M NaCl이 포함된 용출 버퍼를 각각 4-5 ml씩 흘려주어 L1 단백질을 용출시켰다.

[0066] 멤브레인 필터를 이용한 VLP 농축

[0067] 상기 헤파린 크로마토그래피 (heparin chromatography) 또는 양이온 교환 크로마토그래피(cation-exchange chromatography) 과정에 의해 얻은 HPV 16 L1 또는 HPV 18 L1의 분획을 모은 후 0.1-0.325 M NaCl을 포함하는 PBS + 0.01% Tween 80 에 투석하였다. 투석이 완료된 샘플은 amicon ultra YM-50 또는 YM-100 (Millipore, USA)을 사용하여 제조자가 제공하는 방법에 따라 농축하였다.

[0068] SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅

[0069] Laemmli의 방법에 따라 소듐 도데실 설페이트의 존재 하에서 12.5% PAGE에 의해 모든 샘플들을 분석하였다 (M.P. McCarthy, W.I. White, F. Palmer-Hill, S. Koenig, J.A. Suzich, J Virol 72 (1998) 32-41). HPV 16 L1 또는 HPV 18 L1를 포함하는 샘플들을 200 mA에서 120 분간 PVDF 막(Q-Biogene, USA)으로 전달시키고, L1 단백질을 1차 항체로서 래빗 항-HPV 16 L1 또는 항-HPV 18 L1 항체(PIERCE, USA)로, 2차 항체로서 고우트(goat) 항-래빗 IgG-HRP 컨쥬게이트(PIERCE, USA)를 사용하여 검출하였다. 단백질들은 웨스턴 블로팅 루미놀 시약 (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 사용하여 시각화하였다.

[0070] 전자 현미경 관찰

[0071] 정제한 HPV L1 단백질을 카본-코팅된 그리드에 흡착시킨 후, 2% 포스포텅스텐산(phosphotungstic acid)으로 네가티브 염색하였다. 투과 전자 현미경 사진은 41,000 X의 최종배율에서 TEM200CX를 사용하여 촬영하였다(S.N. Kim, et al., J. Virol. Methods 139 (2007) 24-30).

[0072] 슈도바이러스 제작

[0073] HPV 타입 16 및 18의 L1 단백질과 L2 단백질을 발현하는 플라스미드인 p16SheLL(National Cancer Institute 분양)과 p18SheLL(National Cancer Institute 분양)을 리포터 유전자를 포함하는 플라스미드인 pYEAP(National Cancer Institute 분양)과 같이 293TT 세포(National Cancer Institute 분양)에 Lipofectamine 2000(Invitrogen, USA)을 사용하여 각각 공동-형질전환시켰다. 형질전환된 293TT 세포를 72시간 배양 후 파쇄 버퍼(PBS + 0.5% Brij58, 0.2% Benzonase, 0.2% plasmid-safe ATP-dependent Dnase)를 사용하여 파쇄 하였다. 파쇄된 세포의 세포 데브리스는 12000 g에서 10분간 원심분리하여 제거하였으며 상층액은 중화항체가 측정에 사용하였다.

[0074] 마우스 면역

[0075] 헤파린 크로마토그래피 및 양이온-교환 크로마토그래피로 각각 정제된 2 µg의 L1 단백질로 6주령 자성 Balb/c 마우스를 3주 간격 3회 피하로 면역하였다. 1차 면역은 프루이드 완전 어쥬번트(Freund's complete adjuvant, Sigma)를 사용하였으며, 1, 2차 부스팅은 프루이드 불완전 어쥬번트(Freund's incomplete adjuvant, Sigma)를 사용하여 실시하였다. 대조군은 프루이드 완전 어쥬번트와 프루이드 불완전 어쥬번트에 PBS를 동일 비율로 희석하여 투여하였다. 각 그룹의 마우스에 대하여 2차 부스팅 10일후 꼬리 정맥을 통해 혈청이 채취되었으며, 얻어진 혈청은 중화항체가 측정에 사용되었다.

[0076] SEAP-based 중화항체가 측정

[0077] 293TT cell을 96 웰 플레이트에 3×10^4 cells/well로 씨딩한 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 4시간 배양하였다. HPV 타입 16 및 18의 L1 단백질로 면역된 마우스 혈청을 1/100부터 10,000,000 까지 연속 희석한 후, 상기에서와 같이 준비된 HPV 타입 16 및 18의 슈도바이러스와 1:4 비율로 희석하였다. 희석된 혼합액을 4°C에서

1 시간 반응시킨 후 96 웰 플레이트에 준비된 293TT 세포에 첨가한 후 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 72시간 배양 후 배양배지 내 SEAP 발현정도는 p-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (Sigma, USA)를 기질로 하여 확인하였다. 마우스 혈청 내 중화항체가는 슈도바이러스만 적용된 웰의 OD 값의 절반 값으로 결정하였다.

[0078] 실험 결과

[0079] 1. HPV 16 L1 정제 결과

[0080] 헤파린 크로마토그래피(heparin chromatography)

[0081] 헤파린 크로마토그래피에서 HPV 16 L1 단백질의 분리능을 조사하였다. 본 결과는 도 1c Method 1의 heparin chromatography 결과이다. 도 2a에서 보는 바와 같이, 저 농도 NaCl 조건에 인큐베이션하여 불용성 불순물을 제거하는 단계를 거치지 않은 샘플의 경우 헤파린 크로마토그래피 시 많은 양의 불순물을 포함하였다. 반면 저 농도의 NaCl 조건에서 불용성 불순물을 제거한 샘플은 헤파린 크로마토그래피 시 L1 단백질의 순도가 크게 향상되었다(도 2b). 헤파린 컬럼에 결합된 단백질을 0.325 M부터 0.66 M NaCl까지 경사구배로 1차 용출시킨 후 연이어 0.66 M부터 2 M NaCl까지 농도구배로 2차 용출시킨 결과 불순물은 0.325 M부터 0.5 M NaCl 농도에서 대부분 용출되었으며(도 2b), HPV 16 L1은 0.5 M부터 1.3 M NaCl 농도에서 용출되었다(도 2c). 이 결과는 저 농도 NaCl 조건에서 불용성 불순물을 제거하는 것이 헤파린 크로마토그래피에서 L1 단백질의 순도를 크게 증가시켜 준다는 것을 의미하며 불용성 불순물이 제거된 샘플을 헤파린 크로마토그래피에 적용 시 효과적으로 L1 단백질을 정제할 수 있음을 보여준다.

[0082] 양이온-교환 크로마토그래피(cation-exchange chromatography)

[0083] 양이온-교환 크로마토그래피를 통한 HPV 16 L1 단백질의 분리능을 조사하였다. 본 결과는 도 1c Method 2의 cation-exchange chromatography 결과이다. 도 3에서 보는바와 같이, 대부분의 불순물은 컬럼에 부착되어 제거되었으며(도 3a), NaCl을 사용한 용출시 HPV 16 L1은 0.7 M에서 1 M NaCl 농도에서 용출되었다(도 3b). 이 결과는 저 농도의 NaCl 조건에서 불용성 단백질을 제거할 경우 양이온-교환 크로마토그래피를 통해 순도가 높은 L1을 얻을 수 있음을 보여준다.

[0084] 정제된 HPV 16 L1의 순도

[0085] 상기에서 정제된 L1 단백질의 분획을 모아 50-100 kDa을 cut-off 할 수 있는 멤브레인(YM-50 또는 YM-100)으로 농축하였다. 도 4에서 보는 바와 같이 L1 단백질의 순도는 상업적으로 판매되는 BSA 표준물질(96% 이상의 순도)와 비슷한 순도를 나타냄을 확인하였다(도 4 패널 A). 웨스턴 블롯팅 결과 SDS-PAGE 상에서 관찰되는 55 kDa의 모노머가 검출 되었으며 BSA의 밴드는 나타나지 않았다(도 4의 패널 B). 이 결과는 상기의 정제 공정을 통해 높은 순도의 HPV 16 L1이 정제되었음을 보여준다.

[0086] 정제된 HPV 16 L1 단백질의 자기 조립성(self-assembly)

[0087] 도 5a와 도 5b에서 보여지는 바와 같이, 상기의 두 공정에 의해 정제된 HPV 16 L1 단백질은 HPV VLPs의 크기와 동등한 크기인 35 nm 내지 64 nm의 직경(평균 직경 49 nm)을 갖는 VLPs 로 자기조립 되었다(K.A. Aires, et al., Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 745-752). 따라서, 상기의 두 정제 방법은 L1 단백질의 자기 조립성에 아무런 영향을 미치지 않았고, 이는 상기의 두 방법 모두 HPV 16 L1 단백질의 정제에 적합하다는 것을 의미한다.

[0088] 샌드위치 ELISA를 통해 단계별 회수율을 측정된 결과, 세포 파쇄 후 암모늄 설페이트 침전, 저 농도 NaCl 조건에서 불용성 단백질을 제거하는 단계까지 불순물은 평균 80% 제거되었으며, 이 단계까지 L1 단백질의 평균 회수율은 81%였다(표 1, 표 2). L1 단백질의 순도는 세포 파쇄단계에서 0.2% 였으나 암모늄 설페이트 침전과 불용성 불순물을 제거하는 단계 후 0.8- 1%로 향상되어 4-5배 정도 순도가 향상되었다(표 1, 표 2).

표 1

단계	총 단백질 (mg)	총 L1 (mg)	회수율 (%)	정제도 (%)
세포 용해물	3199.7	7.9	100	0.2
암모늄 설페이트 침전	1914	7.2	92	0.4
불용성 단백질 제거	642.1	6.7	84	1
헤파린 크로마토그래피	6	6.6	83	109
막 여과를 이용한 농축	5	5	64	100

[0089]

표 2

단계	총 단백질 (mg)	총 L1 (mg)	회수율 (%)	정제도 (%)
세포 용해물	3199.7	7.9	100	0.2
암모늄 설페이트 침전	1914	7.2	92	0.4
불용성 단백질 제거	713.5	5.7	72	0.8
양이온-교환 크로마토그래피	5.1	4.9	62	96
막 여과를 이용한 농축	4.8	4.9	62	101

[0090]

[0091] 한편, 헤파린 크로마토그래피를 거쳐 정제된 L1 단백질의 회수율(recovery)은 64%였으며 (표 1), 양이온-교환 크로마토그래피를 거쳐 정제된 L1 단백질의 전체 회수율은 62%였다(표 2). 상기의 64%와 62%의 회수율은 지금까지 보고된 회수율 중 가장 높은 값이다.

[0092] 2. HPV 18 L1 정제 결과

[0093] 헤파린 크로마토그래피(heparin chromatography)

[0094] 헤파린 크로마토그래피에서 HPV 18 L1 단백질의 분리능을 조사하였다. 본 결과는 도 1c Method 1의 헤파린 크로마토그래피 결과이다. 도 6a에서 보는 바와 같이 저 농도 NaCl 조건에 인큐베이션 하여 불용성 불순물을 제거하는 단계를 거치지 않은 샘플의 경우 헤파린 크로마토그래피 시 많은 양의 불순물을 포함하는 것을 알 수 있다. 반면 저 농도의 NaCl 조건에서 불용성 상태로 변화된 불순물을 제거한 샘플은 헤파린 크로마토그래피 시 L1 단백질의 순도가 크게 향상된 것을 확인할 수 있다(도 6b). 헤파린 컬럼에 부착된 단백질을 0.325 M부터 0.66 M NaCl까지 경사구배로 1차 용출시킨 후 연이어 0.66 M부터 2 M NaCl까지 경사구배로 2차 용출시킨 결과 대부분의 불순물은 0.325 M부터 0.5 M NaCl 농도에서 용출되었으며 (도 6b) HPV 18 L1은 1.2 M부터 1.3 M NaCl 농도에서 용출되었다 (도 6c). 이 결과는 HPV 16 L1과 마찬가지로 헤파린 크로마토그래피를 통해 HPV 18 L1을 효과적으로 정제할 수 있음을 보여준다.

[0095] 양이온-교환 크로마토그래피(cation-exchange chromatography)

[0096] 양이온-교환 크로마토그래피를 통한 HPV 18 L1 단백질의 분리능을 조사하였다. 본 결과는 도 1c Method 2의 양이온-교환 크로마토그래피 결과이다. 도 7a에서 보는바와 같이 대부분의 불순물은 컬럼에 결합되어 제거되었으며, NaCl을 사용한 용출시 HPV 18 L1은 0.8 M에서 1 M NaCl 농도에서 용출되었다(도 7b). 이 결과는 저 농도의 NaCl 조건에서 불용성 단백질을 제거할 경우 양이온-교환 크로마토그래피를 통해 순도가 높은 L1을 얻을 수 있음을 보여준다.

[0097] 정제된 HPV 18 L1의 순도

[0098] 상기에서 정제된 L1 단백질의 분획을 모아 50-100 kDa을 cut-off 할 수 있는 멤브레인 (YM-50 또는 YM-100)으로 농축하였다. 도 8에서 보는 바와 같이 농축 완료 후 분자량이 작은 불순물이 제거된 것을 확인하였으며 L1 단백질의 순도는 상업적으로 판매되는 BSA 표준물질(96% 이상의 순도)와 비슷한 순도를 나타냄을 확인하였다

(도 8 패널 A). SDS-PAGE 상에서 보여지는 55 kDa의 L1 단백질은 웨스턴 블롯팅 결과에서 동일하게 검출되었으며 대조군인 BSA에서는 밴드가 검출되지 않았다 (도 8의 패널 B). 이 결과는 상기의 두 정제 방법을 통해 높은 순도의 HPV L1 단백질을 얻을 수 있음을 보여준다.

[0099] 정제된 HPV 18 L1 단백질의 자기조립성(self-assembly)

[0100] 도 9a와 도 9b에서 보여 지는 바와 같이, 상기의 두 공정에 의해 정제된 HPV 18 L1 단백질은 HPV VLPs의 크기와 동등한 크기인 35 nm 내지 64 nm 의 직경(평균 직경 49 nm)을 갖는 VLPs 로 자기조립되었다(K.A. Aires, et al., Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 745-752). 따라서, 상기의 두 방법에 의해 정제된 L1 단백질은 VLP 형성에 아무런 영향을 받지 않았고, 이는 상기의 두 방법 모두 HPV 18 L1 단백질의 정제에 적합하다는 것을 의미한다.

[0101] 결론적으로, 복잡한 단계와 많은 시간이 요구되는 수쿠로오스 쿠션이나 크기-배제 크로마토그래피 등의 방법을 거치지 않고도 높은 순도와 높은 회수율로 HPV 16 L1 과 HPV 18 L1 단백질의 정제가 가능함을 실험적으로 확인하였다.

[0102] 3. 정제된 HPV 타입 16 및 18의 L1 단백질의 중화활성능

[0103] 상기 방법으로 정제된 HPV 타입 16과 타입 18의 L1 단백질을 마우스에 면역하여 중화항체를 측정하였다. 그 결과, 헤파린 크로마토그래피 및 양이온-교환 크로마토그래피로 정제된 HPV 타입 16의 L1은 평균 1/18,000 희석 배율까지 중화항체를 나타내었다(도 10a). HPV 타입 18의 L1의 경우, 헤파린 크로마토그래피로 정제된 L1은 경우 평균 1/5,000, 양이온-교환 크로마토그래피로 정제된 L1은 평균 1/170,000 희석배율까지 중화항체를 나타내었다 (도 10b). 이 결과는 상기의 방법으로 정제된 HPV 타입 16 및 18의 L1 단백질이 높은 수준으로 중화항체를 유도할 수 있음을 보여준다.

[0104] 실시예 2: 신규면역보조제로서의 매우 짧은 리포폴리사카라이드(LPS) CIA05의 생산

[0105] 본 발명자들은 건강한 인간의 장에 사는 대장균으로부터 리포폴리사카라이드 당 사슬의 길이가 매우 짧은 LPS를 갖는 균주(*E. coli* EG0021)를 이미 발굴하였으며, 이 균주를 기탁기관 한국미생물보존센터에 2002년 5월 2일자로 기탁하고 기탁번호 KCCM 10374를 부여받았다(참조: 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; WO 2006/121232). 상기 균주로부터 LPS 정제는 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; 및 WO 2006/121232에 개시된 방법에 따라 실시하였다. 정제된 LPS의 분자량을 MALDI-MASS(Shimadzu사, Axima-LNR V 2.3.5(Mode Liner, Power: 106))로 측정하였으며, 측정 결과 약 3천 5백 Da의 분자량을 가짐을 확인하였다. 정제된 LPS를 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; 및 WO 2006/121232에 개시된 방법에 따라 개시된 프로토콜에 따라 탈독소화 하였다. 간단하게, 3 mg/ml의 상기 정제된 LPS에 2 N NaOH를 1:1 볼륨으로 섞은 후 60°C에서 10 분마다 한 번씩 흔들며 140분간 탈아실화시키고, 초기 0.2 N NaOH 볼륨의 약 1/5 정도의 1 N 아세트산을 넣어 pH 7.0으로 적정하였다. pH 적정 후 에탄올 침전하여 비독성 리포폴리사카라이드(CIA05)를 수득하였다.

[0106] 실시예 3: 신규면역보조제인 CIA05와 종래 면역보조제 MPL과의 독성 비교 실험

[0107] 본 발명의 자궁경부암 백신에서 면역보조제로 이용되는 상기 실시예에서 제조한 CIA05와 기존의 자궁경부암 백신에 사용하고 있는 MPL(Monophosphoryl lipid A)의 독성을 비교 분석하였다. 건강한 인간의 혈액을 제공받아 PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell)를 분리하고 이를 24-웰 배양 디쉬에 5×10^5 cell/ml의 농도로 씨딩하였다. 이때 배양액은 RPMI 1640(Gibco)에 10% FBS(Gibco)를 혼합한 것을 사용하며 한 웰 당 용량은 1 ml로 균등하게 하였다. 준비된 디쉬에 아래와 같은 조건으로 각각 처리하였다: 1) 음성대조군: BSS(Balanced salt solution) 100 μ l; 2) 탈아실화 비독성 LOS(CIA05) 10 μ g/100 μ l; 3) MPL(*E. coli* F583 MPL) 10 μ g/100 μ l.

[0108] 12시간 후 처리된 배양액을 모아서 원심분리하고 효소면역측정법(ELISA)을 이용하여 THP-1(Acute monocytic leukemia)에서 분비되는 염증성 단백질인 TNF- α 의 양을 ELISA kit(R&D system, DY210)을 사용하여 각각 측정하였다. 실험 결과, 도 11에서 보는 바와 같이, 기존의 자궁경부암 백신 보조제로 사용하고 있는 MPL 보다 약 1/3 가량의 독성이 작음을 확인하였다.

[0109] **실시예 4 : 본 발명의 자궁경부암 백신의 효능탐색**

[0110] *마우스를 이용한 면역화*

[0111] 상기 실험을 통해 정제한 단백질 항원과 신규면역보조제 CIA05를 이용하여 마우스에서 면역반응을 유도하였다. 6주령의 웅성 Balb/c 마우스(SLC, Japan)를 이용하였고, 실험 군 당 마우스를 랜덤하게 5마리씩 할당하였다. 상기 마우스에, CIA05 단독, Alum(알루미늄 하이드록사이드; Brenntag, Germany) 단독 또는 이 둘의 혼합물과 함께, HPV16 L1 VLP 2 μ g(도 12a-12c), HPV16/18 L1 VLP 1 μ g 또는 4 μ g(각 타입 0.5 μ g 또는 2 μ g)(도 13a-도 15)을 2주 간격으로 3회 근육내 주사하여 면역화 시켰다. 대조군 마우스는 PBS를 투여하였다. 비교 실험을 위하여, 기존 시판제품인 CervarixTM와 GardasilTM을 인간 기준 1/10 용량으로 마우스에 투여 하였다. 마우스의 혈청은 3차 접종 후 5주째에 채취하여, anti-L1 VLP IgG 타이터를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다.

[0112] *엔드포인트 ELISA을 이용한 면역효능의 분석(IgG 타이터 분석)*

[0113] 100 μ l의 코팅버퍼(50 mM 카보네이트, pH 9.6, 4 $^{\circ}$ C)에 상기 실시예에서 제조된 HPV 타입 16 또는 18 VLP L1 항원을 0.5 μ g/ml의 농도로 희석하여 96 웰 ELISA 마이크로플레이트(Nalge Nunc International, USA)에 코팅한 후 하루밤 동안 4 $^{\circ}$ C에서 코팅하였다. 다음 날, 워싱버퍼(0.05% Tween20이 녹아 있는 PBS)를 이용하여 각 웰을 3회 세척하였으며, 블로킹 버퍼(1%의 BSA가 녹아 있는 PBS)를 각 웰 당 300 μ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 한 시간 동안 블로킹 하였다. 이후 워싱버퍼(0.05% Tween 20이 녹아 있는 PBS)를 이용하여 각 웰을 3회 세척하고, 채취한 마우스 시료를 1/2 단계 희석법을 이용하여 희석한 후 코팅된 마이크로플레이트에 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 두 시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 마이크로플레이트를 워싱버퍼를 이용하여 2회 세척하고 HRP(horseradish peroxidase)가 결합되어 있는 염소 항-마우스 IgG(Zymed, 81-6520) 또는 염소 항-마우스 IgG1(Serotec, STAR81P) 또는 염소 항-마우스 IgG2a(Serotec, STAR82P)를 실험에 따라 100 μ l씩 마이크로플레이트에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 두 시간 동안 반응 시켰다. 이후 워싱버퍼를 이용하여 2회 세척하고 HRP와 반응하여 발색을 하는 시약인 TMB(tetramethylbenzidine, BD Bio science, 55555214)를 100 μ l 씩 마이크로플레이트에 넣고 발색시켰다. 상온, 어두운 곳에서 약 10분가량 발색시킨 후 발색 반응 종료를 위하여 1N H₂SO₄ 100 μ l를 바로 첨가하였으며, 이렇게 반응이 끝난 96 웰 마이크로플레이트를 마이크로플레이트 리더(BioTek, USA)에 넣고 450 nm의 파장에서 각 웰의 발색 정도(농도)를 측정하였다. 엔드포인트 타이터는 0.1의 커-오프 값을 갖는 비면역 혈청의 2배 흡광도를 야기하는 가장 높은 혈청 희석으로 정의되었으며, 평균 \pm SD로 나타내었다.

[0114] 도 12a-12b에서 확인할 수 있듯이, HPV16 L1 VLP 항원에 CIA05를 추가한 경우 총 IgG, IgG1 및 IgG2a 타이터 모두 크게 증가하였으며, 특히 타이터의 증가배수(fold increase)로 나타낸 도 12b에서 보면 이러한 증가 패턴이 명확하다. 또한, alum 보다는 CIA05의 면역촉진 효과가 더 우수하였다. 따라서, 본 발명의 백신의 기본적인 조성인 HPV L1 VLP 항원과 CIA05에 의해 HPV에 대한 면역화가 매우 우수하게 달성될 수 있음을 알 수 있다.

[0115] 또한, 도 13a-13b에서 볼 수 있듯이, HPV16/18 L1 VLP 특이 총 IgG 타이터는 CIA05 면역보조제와 Alum을 복합 투여한 경우 Alum 단독투여보다 매우 높게 나타났고, 종래의 CervarixTM와 GardasilTM로 면역화한 그룹보다도 월등한 수치를 나타내었다.

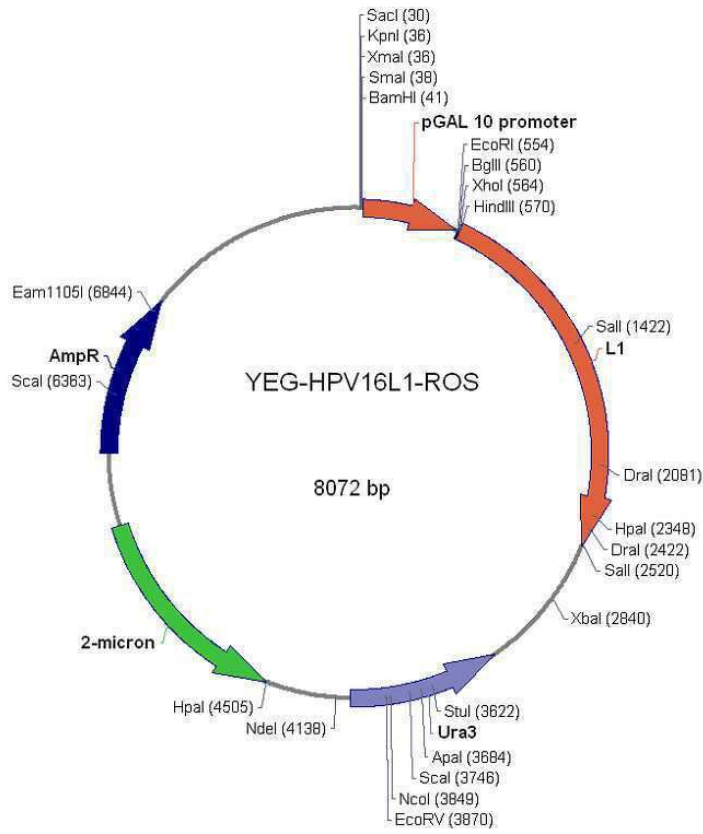
[0116] 한편, IgG의 아형으로 분석한 도 14a-14b에서 볼 수 있듯이, HPV16 L1 VLP 특이 IgG1은 CIA05 면역보조제와 Alum을 복합 투여한 경우 Alum 단독투여보다 높게 나타났고 종래의 CervarixTM와 GardasilTM로 면역화한 그룹보다 조금 높게 나타났다(도 14a). IgG2a의 경우에는, CIA05 면역보조제와 Alum을 복합 투여한 경우 Alum 단독 투여보다 매우 높게 나타났고, 종래의 CervarixTM와 GardasilTM로 면역화한 그룹보다도 월등한 수치를 나타내었

다(도 14b).

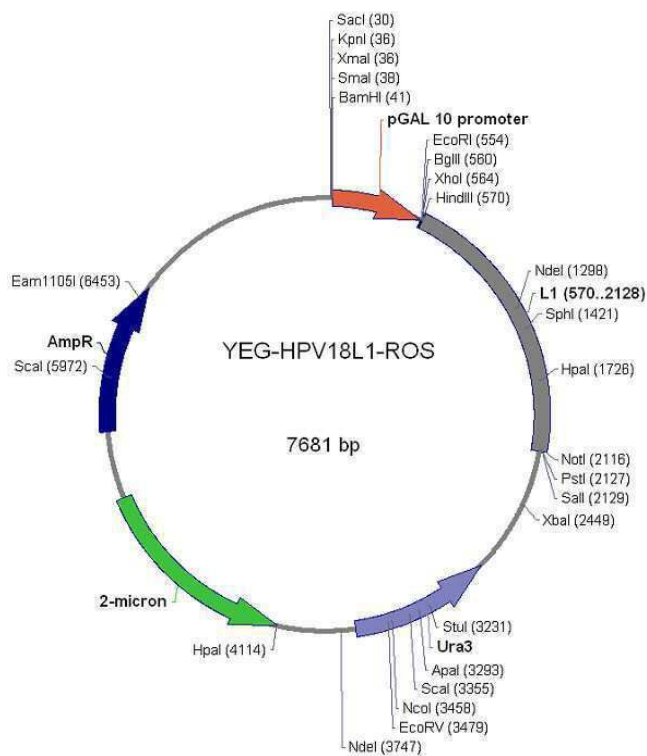
- [0117] *마우스 비장세포를 이용한 인터페론- γ 농도 분석*
- [0118] 상기한 방법으로 면역화한 마우스로부터 최대한 무균적으로 비장을 추출하고 PBS로 세척하였다. 배양액(50 μ M β -mercaptoethanol, 1 M HEPES buffer, 10% FBS, 1 x 항생제가 첨가된 RPMI1640) 안에서 5 ml 주사기를 이용하여 비장에 10개의 구멍을 뚫었다. 주사기에 배양액을 빨아들인 후 세게 뽑기를 여러 회 반복하여 비장세포를 분리하였으며, 이렇게 분리된 비장세포를 모아 배양액과 함께 1500 rpm, 4°C 에서 10 분동안 원심분리 하였다. 배양액을 제거하고 10% FBS 100 μ g/ml 스트렙토마이신 그리고 50 mM β -머캅토에탄올이 포함된 RPMI1640 배지를 이용하여 재현탁 하였다. 이어, 비장 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰에 분주하고 15 μ g/ml 의 농도로 HPV16 L1 VLP를 첨가한 후 37°C에서 48시간 동안 72시간 동안 배양하였다. 마우스 비장세포로부터 분리된 인터페론- γ 의 농도를 ELISA(BD OptEIA mouse ELISA kit)로 측정하였다.
- [0119] 도 12c에서 볼 수 있듯이, HPV16 L1 VLP 항원에 CIA05를 추가한 경우 인터페론- γ 의 농도가 크게 증가하였고, alum 보다는 CIA05의 면역촉진 효과가 더 우수하였다. 따라서, 본 발명의 백신의 기본적인 조성인 HPV L1 VLP 항원과 CIA05에 의해 HPV에 대한 면역화가 매우 우수하게 달성될 수 있음을 알 수 있다.
- [0120] 또한, 도 15에서 볼 수 있듯이, 비장세포에 의해 분비되는 인터페론- γ 의 농도는 CIA05 면역보조제와 Alum을 복합 투여한 경우 Alum 단독투여보다 매우 높게 나타났고, 종래의 CervarixTM 와 GardasilTM로 처리된 그룹보다도 월등한 수치를 나타내었다.
- [0121] 한편, 도 13a-14b에서 본 발명의 백신 조성물은 HPV 타입 16 및 18의 L1 VLPs, 알루미늄 하이드록사이드 및 CIA05를 포함하는 데, 이는 GSK의 Cervarix에서 MPL 대신에 CIA05가 대체된 것으로 볼 수 있다. 즉, 본 발명에서 이용하는 CIA05는 MPL 보다 독성 측면뿐만 아니라, HPV에 대한 면역촉진능에서도 훨씬 우수함을 알 수 있다.
- [0122] 결론적으로, 상기 실험결과 HPV16 L1 VLP 및 HPV18 L1 VLP 모두 본 발명자들이 개발한 면역보조제 CIA05를 혼합한 실험군이 기존의 자궁경부암 백신으로 면역화한 실험군보다 월등한 면역효과를 보임을 알 수 있다. 이는 현재 개발된 자궁경부암 백신이 지속효과에 대한 논란이 있는 것을 감안하면 본 발명이 면역보조제의 첨가를 통한 면역력 강화는 이 문제를 해결할 수 있는 독창적이고 진보한 발명이라고 할 수 있다.

도면

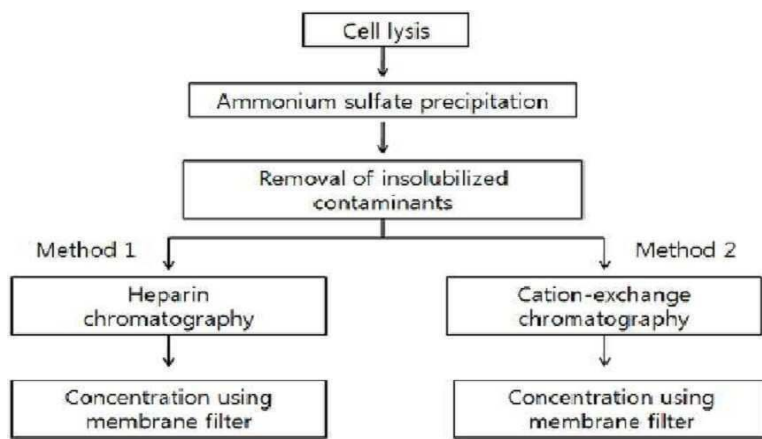
도면1a



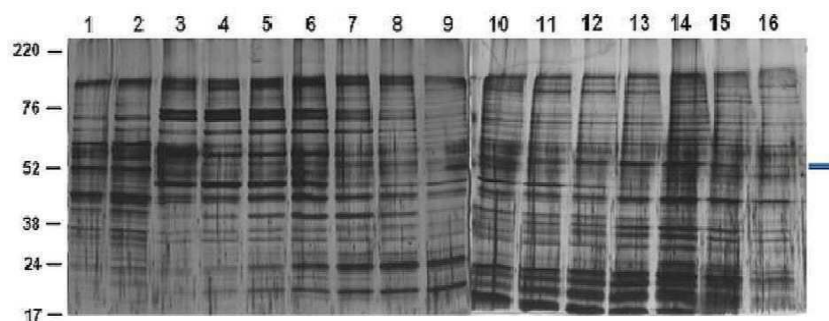
도면1b



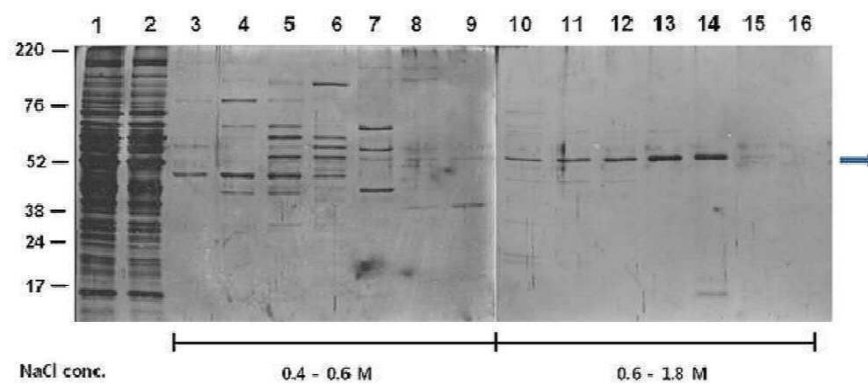
도면1c



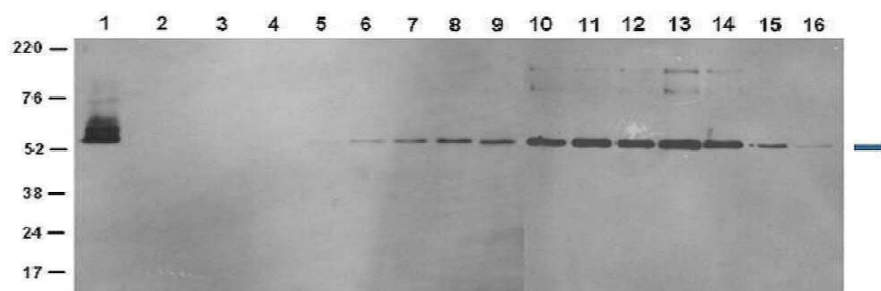
도면2a



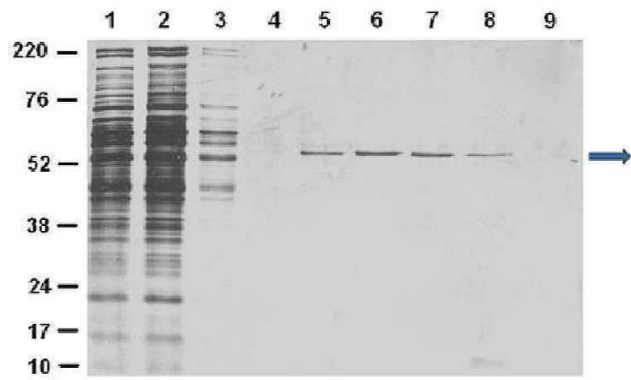
도면2b



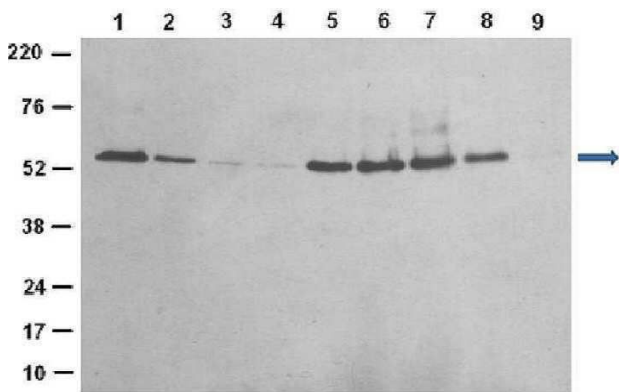
도면2c



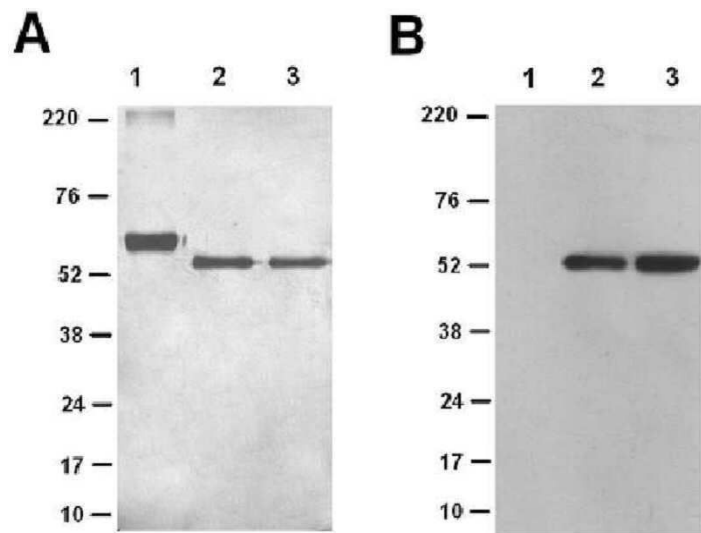
도면3a



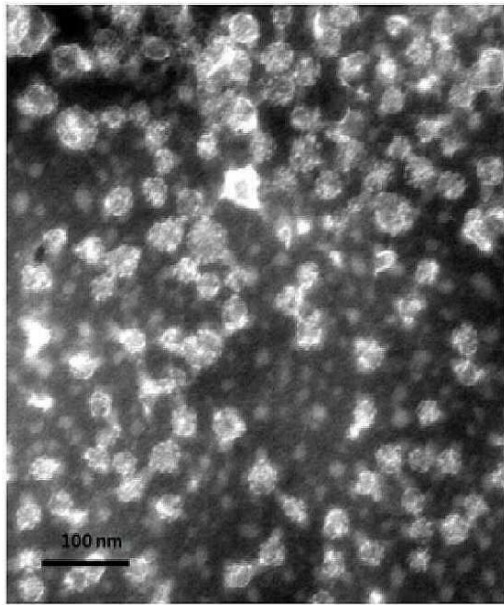
도면3b



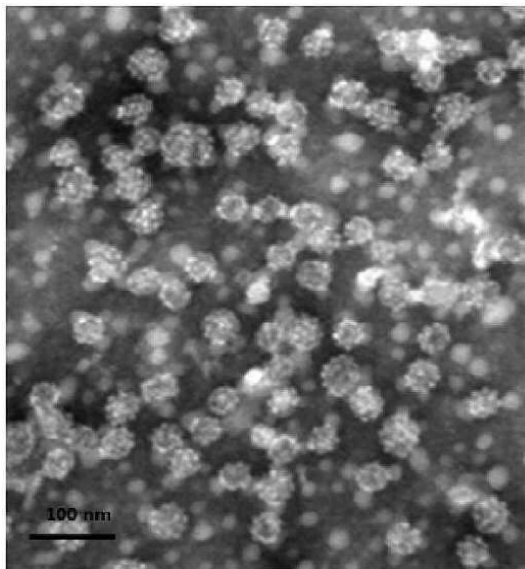
도면4



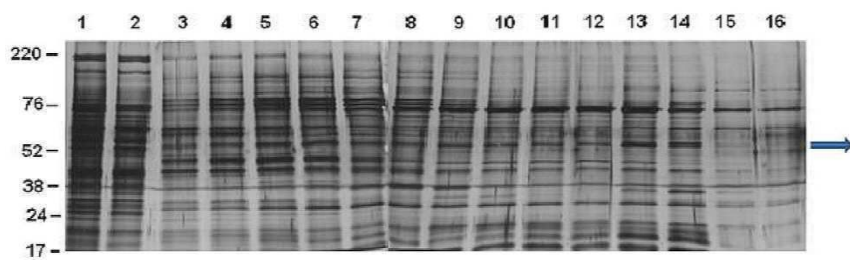
도면5a



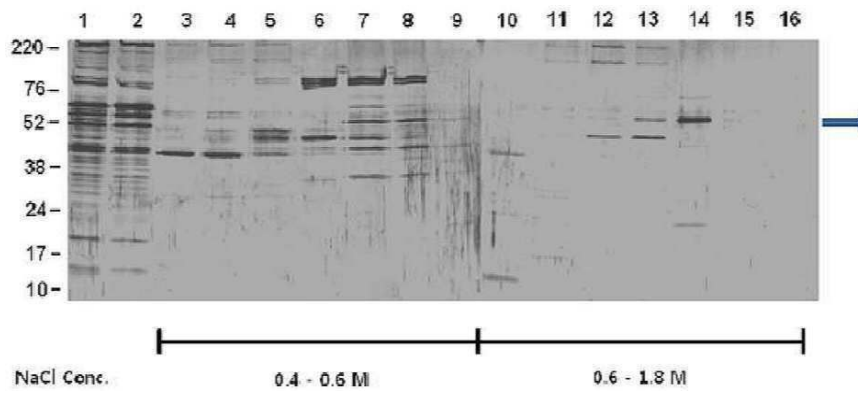
도면5b



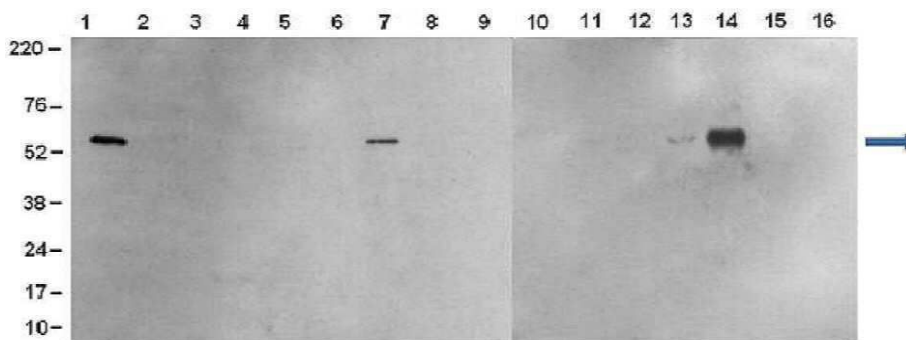
도면6a



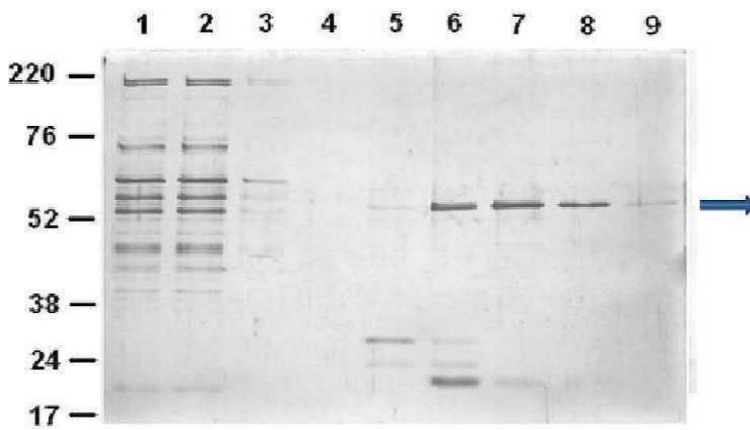
도면6b



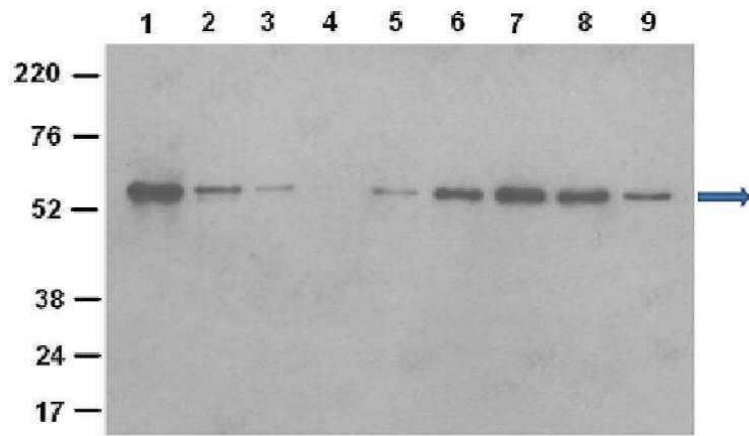
도면6c



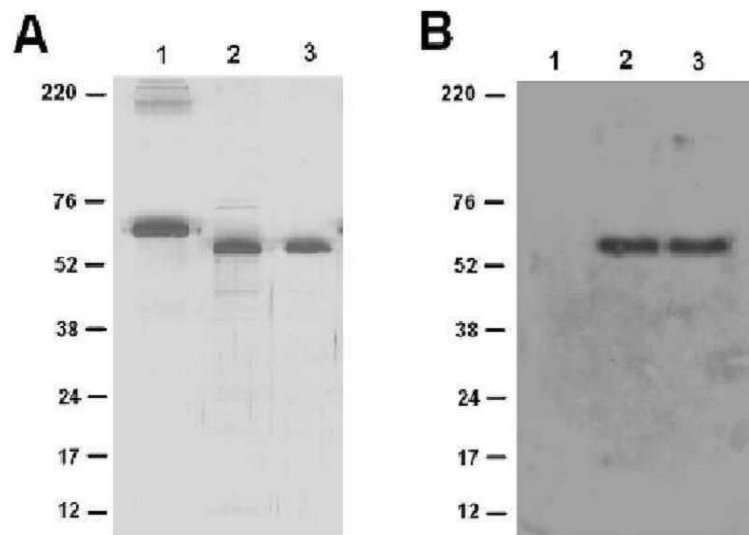
도면7a



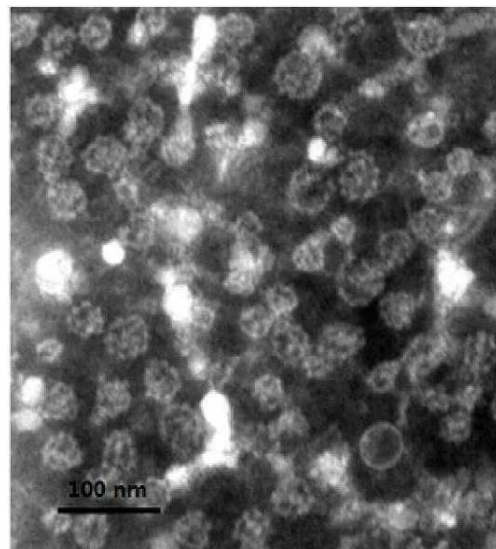
도면7b



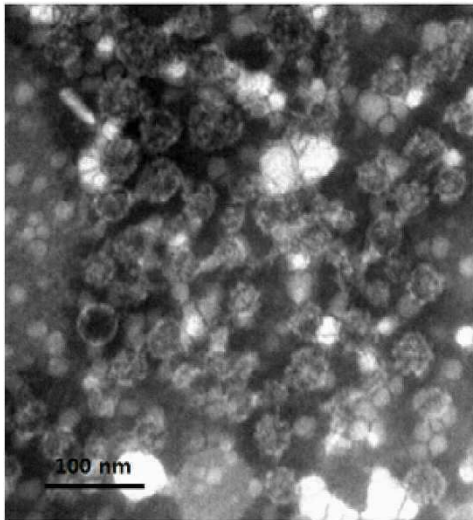
도면8



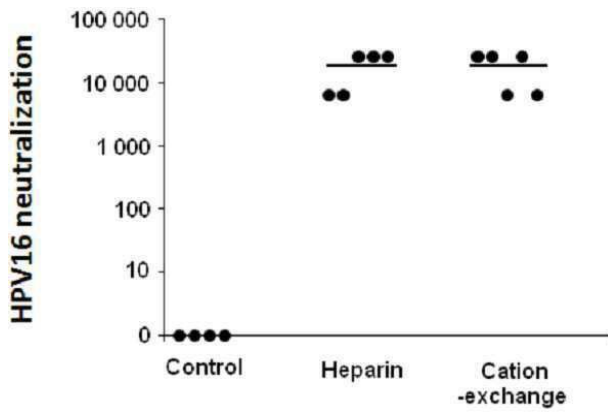
도면9a



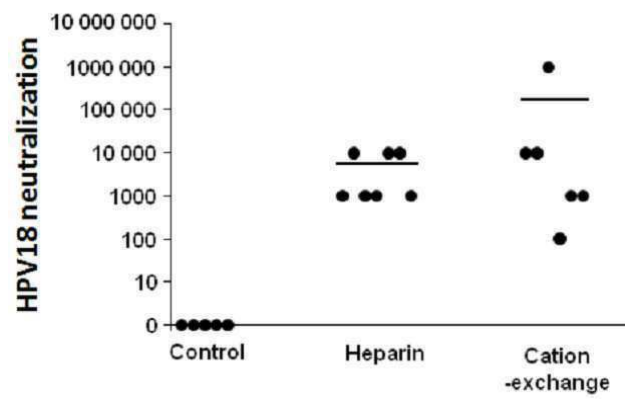
도면9b



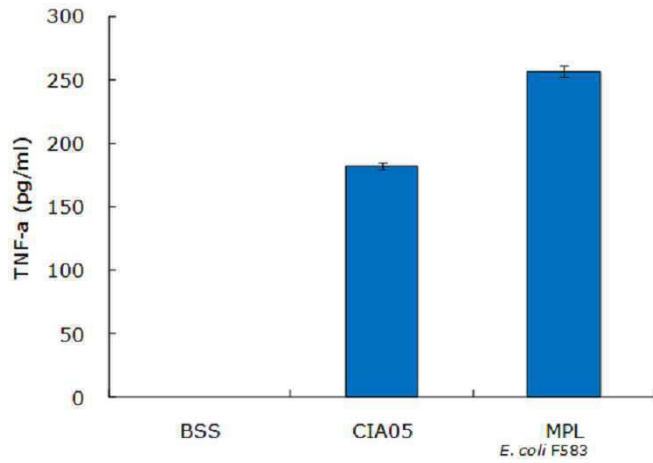
도면10a



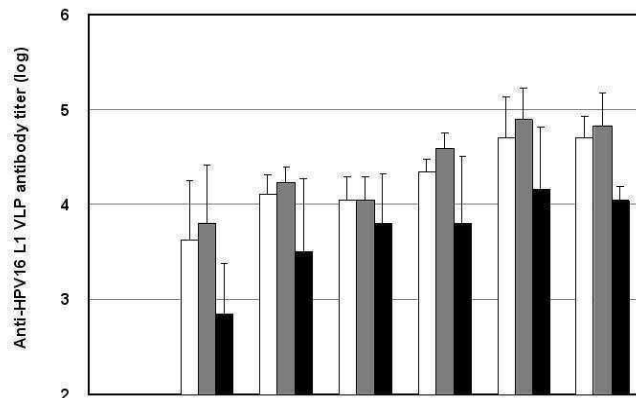
도면10b



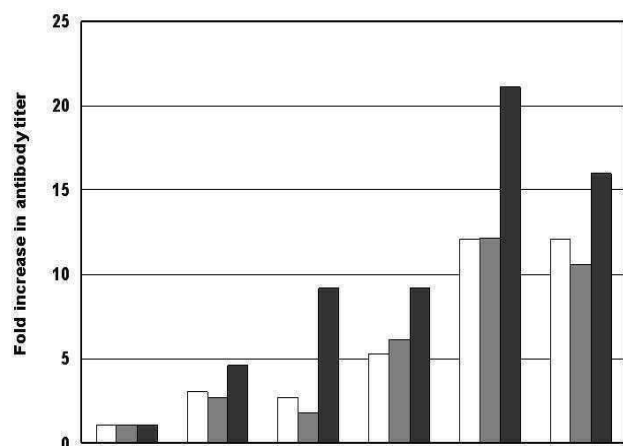
도면11



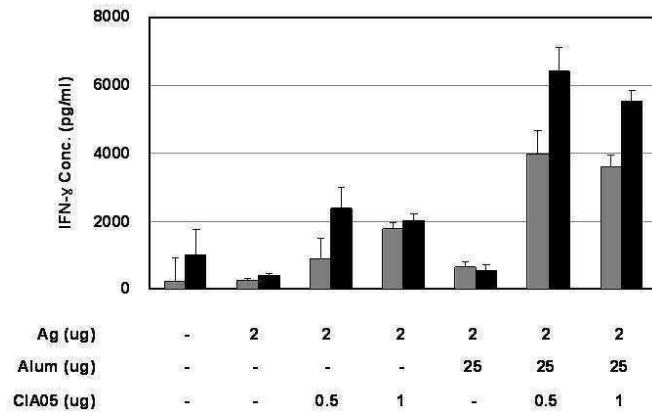
도면12a



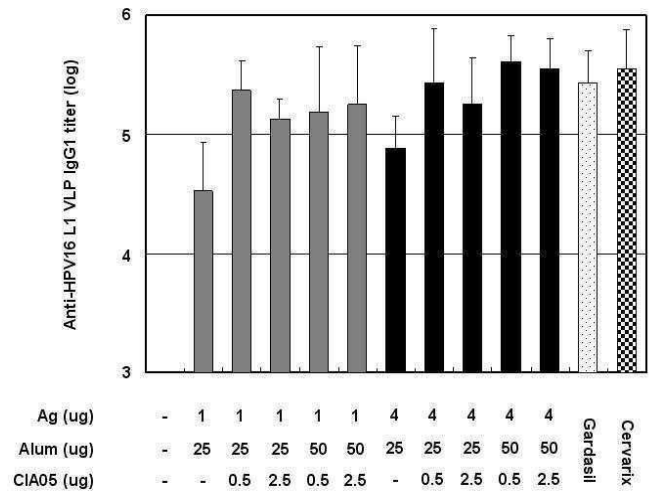
도면12b



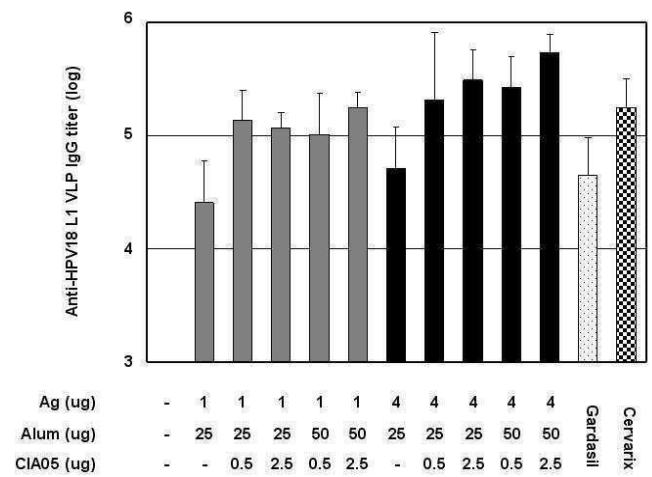
도면12c



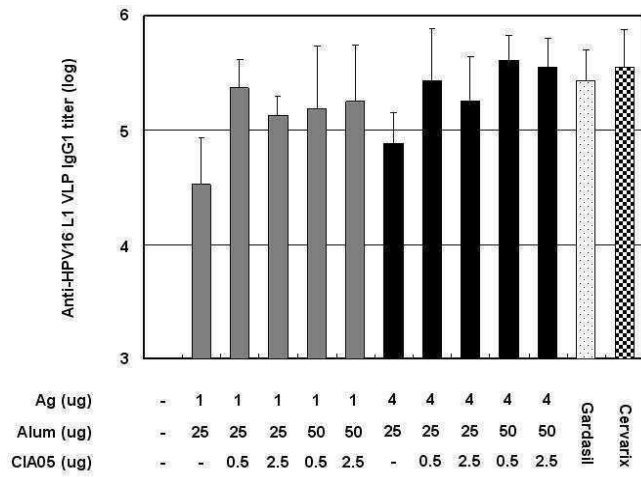
도면13a



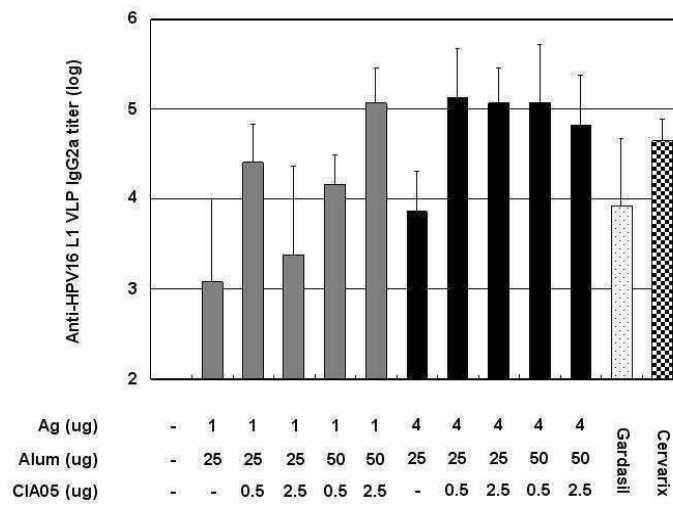
도면13b



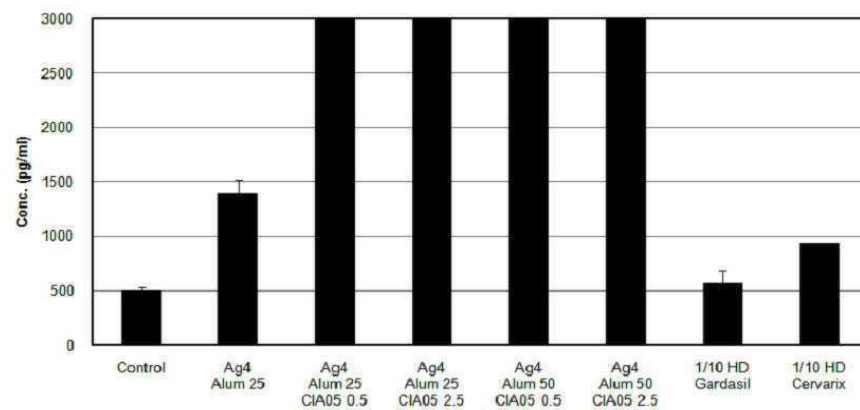
도면14a



도면14b



도면15



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)