

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0109094 (43) 공개일자 2008년12월16일
<p>(51) Int. Cl.  <i>A61K 39/145</i> (2006.01) <i>A61P 31/12</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7027929</p> <p>(22) 출원일자 2008년11월14일          심사청구일자 2008년11월14일          번역문제출일자 2008년11월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/067069          국제출원일자 2007년04월20일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/060669          국제공개일자 2008년05월22일</p> <p>(30) 우선권주장          60/793,804 2006년04월21일 미국(US)</p>		<p>(71) 출원인          다우 아그로사이언시즈 엘엘씨          미국 인디애나주 46268-1054 인디애나폴리스 자이언스빌 로드 9330</p> <p>(72) 발명자          웨브 스티븐 로버트          미국 아이옌 46074 웨스트필드 블룸필드 코트 15416          헨리 매튜 제이          미국 아이옌 46256 인디애나폴리스 비치 놀 8226</p> <p>(74) 대리인          김익환, 신창준</p>

전체 청구항 수 : 총 9 항

#### (54) 조류 인플루엔자 백신 및 이용방법

#### (57) 요약

본 발명은 인플루엔자 백신 및 특히 조류 인플루엔자 백신(AIV)에 관한 것이다. 본 발명은 백신 조성물 제조에 사용되는 특이한 상동성을 지닌 공지의 HA1 폴리펩티드를 발현하는 형질주입 식물세포들을 제조하기 위한 방법들과, 개별, 동물, 포유류 또는 인간에 있어서 방어 면역을 유도하기 위한 방법들을 포함하고 있다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

조류 인플루엔자 바이러스(AIV) 균주에 대해 동물 또는 인체 내에서 면역방어반응을 유도하는 방법으로서;

- a) 감염(challenge) 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 70% 내지 90% 사이의 상동성을 가지는 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드를 포함하는 DNA 서열을 식물세포 내에서 발현시키는 단계;
- b) 상기 식물세포 내에서 발현된 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드를 이용하여 백신 조성물을 제조하는 단계; 및
- c) 상기 백신 조성물을 동물 또는 인체에 투여하여 상기 동물 또는 인체 내에서 방어 면역반응이 유도되는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 2

식물 유래 AIV 백신을 제조하기 위한 방법으로서;

- a) 감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 70% 내지 90% 사이의 상동성을 가지는 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리펩티드를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 식물세포를 형질전환시키는 단계;
- b) 상기 식물세포를 상기 공지의 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 배양시키는 단계;
- c) 상기 공지의 폴리펩티드를 회수하는 단계; 및
- d) 상기 공지의 폴리펩티드를 약학적으로 허용가능한 부형제 및 희석제와 혼합하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 3

감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 70% 내지 90% 사이의 상동성을 가지는 공지의 헤마글루티닌 1 (HA1) 가변부위 폴리펩티드를 포함하는 식물 유래 AIV 백신으로서, 상기 식물 유래 백신을 동물 또는 인체에 투여시 상기 70% 내지 90% 상동성 감염 균주에 대하여 상기 동물 또는 인체 내 방어 면역반응을 유도하는 백신.

### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 적어도 70%, 및 87.0%, 86.5%, 86.0%, 85.5%, 85.0%, 84.5%, 84.0%, 83.5%, 83.0%, 82.5%, 82.0%, 81.5%, 81.0%, 80.5%, 80.0%, 79.5%, 79.0%, 78.5%, 78.0%, 77.5%, 77.0%, 76.5%, 76.0%, 75.5%, 75.0%, 74.5%, 74.0%, 73.5%, 73.0%, 72.5%, 72.0%, 71.5% 또는 71.0% 이하의 상동성을 가지는 것인 방법.

### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 70%, 및 71.0%, 71.5%, 72.0%, 72.5%, 73.0%, 73.5%, 74.0%, 74.5%, 75.0%, 75.5%, 76.0%, 76.5%, 77.0%, 77.5%, 78.0%, 78.5%, 79.0%, 79.5%, 80.0%, 80.5%, 81.0%, 81.5%, 82.0%, 82.5%, 83.0%, 83.5%, 84.0%, 84.5%, 85.0%, 85.5%, 86.0%, 86.5% 또는 87.0% 사이의 상동성을 가지는 것인 방법.

### 청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 70%, 및 71.0%, 71.5%, 72.0%, 72.5%, 73.0%, 73.5%, 74.0%, 74.5%, 75.0%, 75.5%, 76.0%, 76.5%, 77.0%, 77.5%, 78.0%, 78.5%, 79.0%, 79.5%, 80.0%, 80.5%, 81.0%, 81.5%, 82.0%, 82.5%, 83.0%, 83.5%, 84.0%, 84.5%, 85.0%, 85.5%, 86.0%, 86.5% 또는 87.0% 사이의 상동성을 가지는 것인 방법.

### 청구항 7

제 3 항에 있어서, 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 적어도 70%, 및 87.0%, 86.5%, 86.0%, 85.5%, 85.0%, 84.5%, 84.0%, 83.5%, 83.0%, 82.5%, 82.0%, 81.5%, 81.0%, 80.5%,

80.0%, 79.5%, 79.0%, 78.5%, 78.0%, 77.5%, 77.0%, 76.5%, 76.0%, 75.5%, 75.0%, 74.5%, 74.0%, 73.5%, 73.0%, 72.5%, 72.0%, 71.5% 또는 71.0% 이하의 상동성을 가지는 것인 식물 유래 AIV 백신.

#### 청구항 8

제 3 항에 있어서, 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 70%, 및 71.0%, 71.5%, 72.0%, 72.5%, 73.0%, 73.5%, 74.0%, 74.5%, 75.0%, 75.5%, 76.0%, 76.5%, 77.0%, 77.5%, 78.0%, 78.5%, 79.0%, 79.5%, 80.0%, 80.5%, 81.0%, 81.5%, 82.0%, 82.5%, 83.0%, 83.5%, 84.0%, 84.5%, 85.0%, 85.5%, 86.0%, 86.5% 또는 87.0% 사이의 상동성을 가지는 것인 식물 유래 AIV 백신.

#### 청구항 9

제 3 항에 있어서, 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 70%, 및 71.0%, 71.5%, 72.0%, 72.5%, 73.0%, 73.5%, 74.0%, 74.5%, 75.0%, 75.5%, 76.0%, 76.5%, 77.0%, 77.5%, 78.0%, 78.5%, 79.0%, 79.5%, 80.0%, 80.5%, 81.0%, 81.5%, 82.0%, 82.5%, 83.0%, 83.5%, 84.0%, 84.5%, 85.0%, 85.5%, 86.0%, 86.5% or 87.0% 사이의 상동성을 가지는 것인 식물 유래 AIV 백신.

### 명세서

#### 기술분야

<1> 본 출원은 2006년 4월 21일자로 출원된 미국 가특허출원 제60/793,804호에 대한 우선권을 주장하고, 상기 출원의 모든 개시 내용은 그림, 표, 아미노산 서열 또는 핵산 서열을 포함한 본 출원에 참조로서 병합된다.

#### 배경기술

- <2> 헤마글루티닌(haemagglutinin (HA))의 공개된 서열에 대해 베트남 H5N1 균주(strain)로부터 최근 조사한 바에 따르면, 이들 고병원성 균주들이 예전에 관찰된 것보다 훨씬 다양하다고 한다. 따라서 감염 균주(challenge strain)와 90% 미만 상동성을 지닌 백신들은 증상을 효과적으로 제어하거나 발산(shedding)을 줄이는 것을 기 대하기 어렵다.
- <3> 공개된 전체 아미노산 서열 기록을 조사하였는바, 혈청형 H5 내 상기 헤마글루티닌(HA) 바이러스 단백질의 HA1 부위의 서열 상동성이 칠면조 위스콘신 68 균주(Turkey Wisconsin 68 Strain)에 대해 아미노산 수준에서 100% 내지 83% 일치한다는 사실을 발견하였다.
- <4> 스웨인 외.(Swayne *et al.*)의 최근 공개문헌 (*Vet Micro*, 2000, 74:165-172)에 의하면, 87% 이상의 아미노산 상동성을 가진 HA1이 포함된 AIV 균주를 가지고 한 이형 감염 실험(heterotypic challenge experiment)에서, 면역 백신과 비교할 때, 계두(fowl pox) 백터를 이용한 HA계 AIV 백신이 감염을 예방할 수 있음을 밝혔다. 저자들은 병원균 HA1과 90% 미만 상동성을 가진 백신들은 호흡기 관으로부터의 AI 감염 또는 야생 바이러스 발산(shedding)에 있어서 일관성있게 감소하는 결과를 낳을 가능성이 높은 것으로 결론지었다.

#### 발명의 상세한 설명

- <5> 본 발명은 조류 인플루엔자 바이러스(AIV)에 대하여 동물 또는 인체 내 면역방어반응을 유도하는 방법으로서,
- <6> a) 감염 균주(challenge strain) HA1 가변부위 폴리펩티드와 약 70% 내지 약 90% 사이의 상동성을 가지는 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드를 포함하는 핵산 서열을 식물세포 내에서 발현하는 단계;
- <7> b) 상기 식물세포 내에서 발현된 상기 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드를 이용하여 백신 조성물을 제조하는 단계; 및
- <8> c) 상기 백신 조성물을 동물 또는 인체에 투여하여 상기 동물 또는 인체 내에서 면역방어반응이 유도되는 단계를 포함하는 방법.
- <9> 본 발명은 또한 상기 방법을 구현하기 위한 벡터, 숙주세포, 및 신규한 백신 조성물을 제공한다. 상기 백신 조성물에는 동물 또는 인체에 투여시 감염 균주에 비해 90% 미만 상동성 수준의 방어 면역성을 제공하는 식물 유래 공지의 HA1 폴리펩티드 서열이 포함된다.

<10> 서열의 간단한 설명

- <11> 인플루엔자 A/칠면조/위스콘신/68 서열의 조류 인플루엔자 HA 단백질이 하기에 나타나 있다. 이러한 HA 단백질은 568개 아미노산을 포함하며, 5개의 개별 도메인(distinct domain), 즉, 신호 펩티드 (아미노산 1-16); H1 단편의 가변 헤드부위 (아미노산 17-323 [여기서는 HA1로 칭하기도 함]); H2 단편의 불변 염기 부위 (아미노산 324-527); 막관통 도메인(transmembrane domain) (아미노산 528-557); 및 세포내 티오에스테르 지질 단편 (intracellular thioester lipid fragment)(아미노산 558-568)을 보유한다.
- <12> 전장 서열(full length sequence) 및 상기 식별된 단편들이 하기에 나타난다:
- <13> 전장 조류 인플루엔자 HA 단백질 (서열번호: 1):
- <14> MERIVIALAIISVVKGDQICIGYHANNSTKQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKEHNGKLCSLKGVRLILKDCSVAGWLLGNPMCDEFLNVPESYIVEKDNPTNGLCYPGDFNDYEELKYLMSNTNHFKEIQIIPRNSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRNVVWL IKKSNAIPTIKRTYNNTNVEDLLILWGIHHPNDAAEQTELYQNSNTYVSVGTSTLNQRSIPEIATRPKVNQSGRIEFFWTILRPNDIAISFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMRSELEYGNCCTKQTPVGAINSSMPFHNHPLTIGECKPKYVKSDDLVLATGLRNPQRETRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGITNKVNSIIDKMNTQFEAVGKEFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSYVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEESRLNREEIDGVKLESMGTQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSFWMCSNGSLQCRICI;
- <15> 신호 펩티드 (서열번호: 2): MERIVIALAIISVVKG;
- <16> H1 가변 헤드부위 단편 (HA1) (서열번호: 3):
- <17> DQICIGYHANNSTKQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKEHNGKLCSLKGVRLILKDCSVAGWLLGNPMCDEFLNVPESYIVEKDNPTNGLCYPGDFNDYEELKYLMSNTNHFKEIQIIPRNSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRNVVWL IKKSNAIPTIKRTYNNTNVEDLLILWGIHHPNDAAEQTELYQNSNTYVSVGTSTLNQRSIPEIATRPKVNQSGRIEFFWTILRPNDIAISFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMRSELEYGNCCTKQTPVGAINSSMPFHNHPLTIGECKPKYVKSDDLVLATGLRNPQRETR;
- <18> **H2 염기 불변 단편** (서열번호: 4):
- <19> GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGITNKVNSIIDKMNTQFEAVGKEFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSYVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEESRLNREEIDGVKLESMGTQ;
- <20> 막관통 앵커 (서열번호: 5): QILSIYSTVASSLALAIMVAGLSFWMCS; 및
- <21> 세포내 티오에스테르 지질 단편 (서열번호: 6): NGLQCRICI.
- <22> 또 다른 조류 인플루엔자 HA 단백질 서열, A/청둥오리/펜실바니아/10218/84 (H5N2; ACCESSION AAF04720)가 하기에 보여진다. 전장 서열 및 상기 식별된 단편들이 하기에 보여진다:
- <23> 전장 HA 단백질 (서열번호: 7):
- <24> MERIVIALAIISVVKGDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKEHNGKLCSLKGVRLILKDCSVAGWLLGNPMCDEFLNVPESYIVEKDNPTNGLCYPGDFNDYEELKHLMSSTNHFKEIQIIPRSSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRNVVWL IKKNNAIPTIKRTYNNTNVEDLLILWGIHHPNDAAEQTKLYQNSNTYVSVGTSTLNQRSIPEIATRPKVNQSGRMEFFWTILRPNDIAISFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKQTPVGAINSSMPFHNHPLTIGECKPKYVKSDDLVLATGLRNPQRETRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGITNKVNSIIDKMNTQFEVVGKEFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVRNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEESRLNREEIDGVKLESMGTQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSFWMCSNGSLQCRICI;
- <25> 신호 펩티드 (서열번호: 8): MERIVIALAIISVVKG;
- <26> H1 가변 헤드부위 단편 (HA1) (서열번호: 9):
- <27> DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKEHNGKLCSLKGVRLILKDCSVAGWLLGNPMCDEFLNVPESYIVEKDNPTNGLCYPGDFNDYEELKHLMSSTNHFKEIQIIPRSSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRNVVWL IKKNNAIPTIKRTYNNTNVEDLLILWGIHHPNDAAEQTKLYQNSNTYVSVGTSTLNQRSIPEIATRPKVNQSGRMEFFWTILRPNDIAISFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKQTPVGAINSSMPFHNHPLTIGECKPKYVKSDDLVLATGLRNPQRETR;
- <28> H2 염기 불변 단편 (서열번호: 10):
- <29> GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGITNKVNSIIDKMNTQFEVVGKEFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFH

- <30> DSNVRNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEYHKCDNECMESVRNGTY;
- <31> 막관통 앵커 (서열번호: 11): QILSIYSTVASSLALAIMVAGLSF; 및
- <32> 세포내 티오에스테르 지질 단편 (서열번호: 12): NGSQCRCICI.
- <33> 발명의 상세한 설명
- <34> 기존 백신은 백신 제조에 사용된 폴리펩티드 서열에 대해 90% 내지 100% 상동성을 지닌 인플루엔자 균주에 의한 감염에 대해 방어기능을 제공할 것이라고 예상된다. 식물 유래 백신의 경우, 70% 내지 90% 사이 상동성을 갖는, 보다 광범위한 인플루엔자 균주들을 제어하는, 예상하지 않은 특성으로 인해 더 많은 이형 인플루엔자 종류들을 제어하고 백신의 효능이 높아지게 된다.
- <35> 식물 유래 백신 소단위 항원들은 아쥘반트(adjuvant) 역할을 하는 세포막의 세포 기질과 식물의 당 성분들 속으로 융합되기 때문에, 기존에 제조된 소단위 항원들보다 우수한 것으로 알려져 있다. 상기 식물 유래 항원은 또한 비 식물 유래 플랫폼(platform)에 비해 특이한 식물 당 글루코실화 양상을 보유할 것이다.
- <36> 또한 식물의 글리칸 구조들이 교차 방어를 더욱 견고히 하는 데에 기여하고, 식물세포 또는 식물세포 기질 성분들로부터 완전히 정제되지 않는 항원들을 이용함으로써 여기서 언급된 HA1 폴리펩티드와 약 90% 내지 약 70% 사이의 상동성을 갖는 AIV 감염으로부터 개체를 보호하는 능력을 가졌을 수도 있다고 알려져 있다. 약 70%와 약 90% 사이 상동성 비율이 본 발명에서 매우 의도하는 바이다. 따라서, 알려진 HA1 가변부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변 부위 폴리펩티드와 적어도 70%와 Y% 미만 상동성을 가질 수 있는바, 여기서 Y는 87.0%, 86.5%, 86.0%, 85.5%, 85.0%, 84.5%, 84.0%, 83.5%, 83.0%, 82.5%, 82.0%, 81.5%, 81.0%, 80.5%, 80.0%, 79.5%, 79.0%, 78.5%, 78.0%, 77.5%, 77.0%, 76.5%, 76.0%, 75.5%, 75.0%, 74.5%, 74.0%, 73.5%, 73.0%, 72.5%, 72.0%, 71.5% 또는 71.0%로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 알려진 HA1 가변 부위 폴리펩티드는 감염 균주 HA1 가변 부위 폴리펩티드와 70% 및 71.0%, 71.5%, 72.0%, 72.5%, 73.0%, 73.5%, 74.0%, 74.5%, 75.0%, 75.5%, 76.0%, 76.5%, 77.0%, 77.5%, 78.0%, 78.5%, 79.0%, 79.5%, 80.0%, 80.5%, 81.0%, 81.5%, 82.0%, 82.5%, 83.0%, 83.5%, 84.0%, 84.5%, 85.0%, 85.5%, 86.0%, 86.5% 또는 87.0% 사이에서 상동성을 가질 수 있다.
- <37> 본 발명에 따른 HA1 폴리펩티드는, 전문이 여기에 참고로 인용되어 있는 US 2004/0268442 와 WO 2004/098533에 설명된 것처럼 그 발현체계로부터 전체적으로 또는 부분적으로 정제될 수 있다. 따라서, 부분 정제된 HA1 폴리펩티드는 그 폴리펩티드가 만들어진 식물세포 발현체계의 다양한 부분들이나 부위들을 포함하는 성분에 존재할 수 있다. 예를 들면, HA1 폴리펩티드 생산에 식물의 발현체계를 이용하는 곳에서는, 여기서 동정된 상기 정제된 HA1 폴리펩티드를 포함하는 성분이 식물세포 성분들 (예, 세포벽, 식물세포막 세포기질, 탄수화물 등) 또는 식물세포 기질성분들을 포함할 수 있다.
- <38> 분리된 식물 균질액 속의 제조할 식물 유래 항원들에는 소형 생합성 중간물질과 이차 대사산물뿐만 아니라 세포벽 물질, 소형 탄수화물, 막, 지질 성분, 단백질, 핵산 등을 포함하는 다양한 식물 구조체들이 포함될 수도 있다. 그러한 식물 유래 백신 제제들은 균질하게 정제되었거나 기존의 체계에서 제조된 동일한 항원들보다 높은 역가로 면역 반응을 유도한다. 혈청 전환을 유발함에 있어서 제형화된 농화 식물세포-생산 항원에 의한 상기의 기대하지 않은 높은 반응은, 제형화된 원 재료 또는 종래 제조된 백신 항원들과 비교할 때, 가공, 제형화 및 저장 과정에서 개선된 항원 안정성뿐만 아니라 면역 체계 세포들의 특이한 항원 제공 때문인 것으로 판단된다.
- <39> 상기 항원 활성화에 대한 식물 기질 또는 성분들의 상승효과 내지는 아쥘반트(adjuvant) 유사 효과는 상기 식물 발현 플랫폼에 특이한 성질이며, 이러한 개선된 성질이 항원 투여량을 더 적게 하는 것을 가능하게 하고, 질병 감염으로부터 더 나은 방어를 가능하게 한다.
- <40> 여기서 설명된 제제들 속에 함유된 상기 식물 유래 항원들과 식물 세포 기질은 전문적인 항원 제시세포들(APCs)을 우선적으로 표적화함으로써, 동물들의 세포성 및 체액성 면역반응에 중대한 영향을 미친다. 이러한 우선적 표적화는 상기 식물 기질 및/또는 상기 식물 유래 항원, 특히 식물의 글리코실화 항원들이 APCs 상의 만노스 수용체들 및 관련 C-타입 렉틴 수용체들과 직접 상호작용하는 것에 의해 일어나는 것으로 생각된다. 이들 APCs는 상기 항원들을 가공하고, 그 표면 상의 기타 수용체들(예, 구조적적합복합체 II군)을 통해 다른 면역체계 성분들에 제시할 수 있으며, 체액성, 세포성 매개 면역반응 모두를 촉진할 수 있다. 1 및 2 T 보조(Th) 세포 군의 증폭은 상기 식물세포 기질의 주요부 및/또는 식물-글리코실화 항원으로서 제시된, 상기 APC 세포들과 직접 상호작용할 수 있는 항원들에 의해 엄청나게 증대된다. MR 또는 관련 렉틴 수용체들을 통해 APCs와 표적 작용하는

것이 강한 세포성 및 체액성 면역반응에서 중요한 역할을 하게 된다. CD8+ T세포 면역과 연관된 세포성 면역은 생 약독 병원균 접종에 의해서만 수행되어 왔는데, 리슈만편모충(*Leshmania spp*)과 바이러스 같은 세포내 병원균(*intracellular pathogen*) 제어에 매우 필요하다. (D. M. Pardoll, *Nat Med.* 1998. 4, 525-531.).

<41> 무수한 공지의 HA 폴리펩티드들의 가변부위들 중 아미노산 위치들은 서열번호: 1 과 서열번호: 7의 HA1 부위 중 아미노산 위치들과는 상이할 것이다; 하지만, 그 부위들은 당업계 기술자들에 의해 쉽게 식별 가능하다 (예를 들면 본 명세서에서 그 전문이 참조문헌으로 인용된 De BK; Brownlee GG; Kendal AP; Shaw MW. 1988, *Nucleic Acids Res.*, 16, 4181-4182, 참고). 자연 감염에서는, 불활성 HA는 기관지 상피세포에 의해 배출된 하나 이상의 트립신 유사, 아르기닌 특이성 엔도프로테아제에 의해 세포밖 HA1 과 HA2 내로 성숙된다. 이 같은 과정과 연관된 하나의 동정된 프로테아제가 트립타아제 클라라(*tryptase Clara*)이다. 숙주 조직으로의 감염의 정도는 HA에 의해 결정된다. 인플루엔자 바이러스들은 극성을 띤 상피세포들(예, 기관지 상피세포들)의 정단면(*apical surface*)에서 폐강 내로 발아(*budding*)하므로, 일반적으로 호흡기성이다. 상기 HA1 단편은 세포 표면에 있는 시알산(*sialic acid*)-함유 수용체들에 부착하여, 바이러스 입자의 세포 부착을 일으킨다. 또한 숙주 범위 한정 및 독성 결정에 있어서 중요한 역할을 한다. 상기 HA1 단편은 바이러스 융합 단백질 I 군이며, 세포 내로 흡수된 바이러스 입자의 막과 엔도솜의 막의 융합을 매개하는 것에 의해, 바이러스가 세포의 세포질 속으로 침입하도록 하는 역할을 한다. 엔도솜 내부의 낮은 pH는 HA2에 있어서의 불가역적 형태 변화를 유발하여, 융합 소수성 펩티드를 방출시킨다. 강력한 융합 공(*pore*)을 형성하면 다수의 삼합체(*trimer*)가 필요하다.

<42> 용어 "이종 조류 인플루엔자 바이러스" 또는 "이종 조류 인플루엔자 바이러스 군주(들)"은 상기 식물 유래 소단위 백신 항원의 아미노산 서열과 약 70% 내지 약 90% 사이의 서열 상동성을 나타내는 이종 또는 관련 HA1 폴리펩티드를 발현하는 조류 인플루엔자 바이러스 (또는 군주)로 해석되어야 한다.

<43> 이형 인플루엔자 군주에 의한 감염으로부터 방어하기 위해 백신이 보유할 수 있는 스펙트럼 활성을 결정하기 위해, 아미노산 서열에 대한 상동성 비교를 수행한다. 이러한 상동성 분석은 BLAST 법에 의해, 17 내지 323 아미노산 서열을 이용하여 H1의 가변 헤드부위 단편의 상동성을 비교하여 수행한다. 상기 블라스트 법은 다음과 같이 수행된다: NCBI 비반복 단백질 데이터베이스를 ftp 사이트 (<ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA>)에서 *nr.gz* 파일로서 리눅스 (Red Hat Enterprise Linux 3.2 ) 또는 유닉스 (Solaris 8)가 구동되는 컴퓨터에 다운로드한다. 압축 상태의 이 파일을 *gunzip* 유틸리티 프로그램으로 압축해제하고 나서, BLAST 사용을 위해 BLAST 설치와 연동된 *formatdb* 프로그램으로 포맷한다. 포맷된 *nr* 데이터베이스에 대해 시험 서열의 *blastp* 검색 (UNIX 용 2.2.4 버전 또는 Linux용 2.2.13 버전)을, 상기 검색이 500 이상의 현저한 히트(웹 제한) 결과를 가져오는지 여부 및 BLAST 분석 후에 수행되는 분석(*parsing*)에 따라, 웹 인터페이스를 통해서나 또는 명령어(*command line*) 상에서 BLAST 프로그램의 로컬 인스턴스(*local instance*)를 사용하여 수행한다. 상기 서열 데이터베이스에 등록된 인플루엔자 바이러스의 수는 현재 수천 단백질에 해당한다.

<44> 결과 분석에 따르면 참조 서열에 대해 통계학상 중요한 상동성을 갖는 서열들을 보고한다. 상기 통계학상 중요성은, 매치오류(*mismatch*)에 대한 벌(*penalty*)과 오차(*gap*)를 개방하고 확대하기 위한 비용뿐만 아니라, 사용된 계수 매트릭스와 선택된 예상치 등의 파라미터들을 셋팅하는 것에 의존한다. 사용된 상기 파라미터들은 상기 BLAST 프로그램의 디폴트(*default*) 파라미터들이었다.

<45> 또한 여기서 설명한 공지된 HA1 단편들을 포함하는 폴리펩티드들은 하나 이상의 이형 폴리펩티드 서열 (예, 본 발명 폴리펩티드들의 정제를 촉진하는 태그 (예를 들어, 여기에 그 전문이 병합 참조된 미국특허등록번호 6,342,362호; Altendorf *et al.* [1999-WWW, 2000] "Structure and Function of the F<sub>0</sub> Complex of the ATP Synthase from *Escherichia Coli*," *J. of Experimental Biology* 203:19-28, The Co. of Biologists, Ltd., G.B.; Baneyx [1999] "Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*," *Biotechnology* 10:411-21, Elsevier Science Ltd.; Eihauer *et al.* [2001] "The FLAG<sup>TM</sup> Peptide, a Versatile Fusion Tag for the Purification of Recombinant Proteins," *J. Biochem Biophys Methods* 49:455-65; Jones *et al.* [1995] *J. Chromatography* 707:3-22; Jones *et al.* [1995] "Current Trends in Molecular Recognition and Bioseparation," *J. of Chromatography A.* 707:3-22, Elsevier Science B.V.; Margolin [2000] "Green Fluorescent Protein as a Reporter for Macromolecular Localization in Bacterial Cells," *Methods* 20:62-72, Academic Press; Puig *et al.* [2001] "The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification," *Methods* 24:218-29, Academic Press; Sassenfeld [1990] "Engineering Proteins for Purification," *TibTech* 8:88-93; Sheibani [1999] "Prokaryotic Gene Fusion Expression Systems and Their Use in Structural and Functional Studies of Proteins," *Prep. Biochem. &*

*Biotechnol.* 29(1):77-90, Marcel Dekker, Inc.; Skerra *et al.* [1999] "Applications of a Peptide Ligand for Streptavidin: the Strep-tag", *Biomolecular Engineering* 16:79-86, Elsevier Science, B.V.; Smith [1998] "Cookbook for Eukaryotic Protein Expression: Yeast, Insect, and Plant Expression Systems," *The Scientist* 12(22):20; Smyth *et al.* [2000] "Eukaryotic Expression and Purification of Recombinant Extracellular Matrix Proteins Carrying the Strep II Tag", *Methods in Molecular Biology*, 139:49-57; Unger [1997] "Show Me the Money: Prokaryotic Expression Vectors and Purification Systems," *The Scientist* 11(17):20, 이들 각각이 여기에 그 전문이 병합 참조됨) 또는, STRATAGENE (La Jolla, CA), NOVAGEN (Madison, WI), QIAGEN, Inc., (Valencia, CA), 또는 InVitrogen (San Diego, CA) 등의 출처로부터의 상업용 태그 참고)에 융합될 수 있다. 예를 들면, 이형 서열들에는 전사된 서열, 비번역된 서열이 포함되는데, 이들은 리보솜 결합과 mRNA 안정성 등 전사, mRNA 가공단계에서 역할을 할 수도 있다. 이와 다르게는 상기 이형 서열들은 부수적인 기능을 제공하는 추가적인 코딩 서열을 포함할 수도 있다. 따라서, 융합된 폴리펩티드를 정제하거나 검출하는 것을 도와주는 펩티드를 암호화하는 서열 들의 태그 서열에, 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 융합될 수도 있다. 본 발명의 이러한 측면에서의 일부 실시예들에서는, 태그 아미노산 서열이 헥사-히스티딘 펩티드로서, pQE 벡터 (QIAGEN), 또는 다수의 추가적, 상업용 벡터에 제공된 태그 등과 같다. 예를 들면, 헥사-히스티딘이 상기 융합 단백질(그 공개 전문이 참조 병합되어 있는 Gentz *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Feb; 86(3):821-4 참조)의 편의 정제를 위해 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드들은 또한 면역글로불린들의 불변 도메인(constant domain), 또는 키메라 폴리펩티드들을 생산하는 그 일부분들(CH1, CH2, CH3, 전체 도메인들과 그들의 일부분들을 포함하는 그 조합형태)과 융합될 수도 있다. 이들 융합 단백질들은 정제를 촉진하고, 생체내에서 증가된 반감기를 나타낸다. 또 다른 실시예들에서는, 아쥬반트 활성(폴리펩티드 아쥬반트)을 갖는 이형 폴리펩티드 서열들에 여기에 설명되고 사용된 HA 폴리펩티드들이 융합될 수 있다. 이러한 폴리펩티드들의 한정되지 않은 예들에는 열충격단백질(hsp, heat shock protein)이 포함된다 (예를 들면, 그 전문이 여기에 병합 참조되는 미국등록특허 제6,524,825호를 참조함).

<46> 상기 조성물 제조에 있어서 유용한 아쥬반트들 또는 면역증강제 성분들에는 알루미늄염류, 미네랄 오일류, 마이코박테리아 산물 (예, 프로인트 완전 또는 불완전 아쥬반트(Freund's complete or incomplete adjuvants)) 또는, 케이지 유사 구조(cage-like structure) 위에서 다수의 단백질 사본을 수여하기 위한 수송체를 제공하는, 식물 글리코시드 사포닌, 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린의 혼합물 등의 수송체(vehicle)들이 포함되며, 이들에만 한정되는 것은 아니다. 본 실시예의 목적을 위해서, 아쥬반트는 면역원 또는 항원에 대한 면역반응을 증강, 증대, 완화, 또는 촉진시키는 물질이다. 아쥬반트들은 보통 체액성 및 세포성 면역반응 모두를 촉진하지만, 어느 하나의 반응이 없어도 다른 반응의 증대는 아쥬반트라고 하기에 적합하다. 더욱이, 아쥬반트들과 그들의 이용은 면역학자들에게 널리 알려져 있으며, 면역원의 투여량이 제한될 때, 면역원의 면역유발능이 미약할 때, 또는 투여 경로가 준최적일 때, 상기 면역반응을 촉진하는 데에 전형적으로 사용된다. 따라서 용어 '아쥬반트 양(adjuvanting amount)'는 주어진 면역원 또는 항원에 대한 면역반응을 촉진시킬 수 있는 아쥬반트의 양을 의미한다. '아쥬반트 양'과 동일한 mass는 가변적이고, 제한적이지 않지만 면역원의 특성, 투여된 면역원의 양, 숙주 종, 투여 경로, 및 면역원 투여 프로토콜 등의 다양한 요인에 좌우된다. '아쥬반트 양'은 특정한 일련의 조건이 주어진 일상 실험을 통해 쉽게 정량화할 수 있다. 이것은 통상의 기술을 가진 실험자의 영역범위 내에 주지되어 있으며, 투여한 면역원과 아쥬반트 양 변화에 대한 일상적인 투약 반응 결과의 이용을 적용하는 것이 일반적이다. 반응들은 혈청 항체가(serum antibody titer), 또는 효소면역측정법(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 혈구응집측정법(hemagglutination assay) 등의 방법을 사용하여 상기 면역원에 의해 유발된 세포-매개 반응을 결정하여 측정한다.

<47> 접종(Vaccination) 및 접종행위는 병원균에 대한 방어를 제공하는 수단으로 정의하는바, 즉 숙주를 면역 체제, 면역방어 입자, 또는 병원균체의 면역 체제, 또는 비-바이러스 형태 또는 그 일부분으로 접종하여 숙주 면역 체계가 자극받고, 상기 병원균의 이어지는 노출에 대한 숙주 반응과 연관된 이어지는 원치 않는 병원성을 예방하거나 감소하는 것에 의한다. 본 발명의 경우에, 본 발명 조성물에 의한 접종(Vaccination)으로 치사율 또는 사망 및/또는 호흡기관으로부터 바이러스 발산(shedding) 감소 결과를 가져온다.

<48> 투여(Administering) 또는 투여행위는 인간을 포함한 동물 체내로 물질의 유입으로 정의하는바, 구강, 비강, 안구, 직장, 질 및 비경구 경로를 포함한다. 제한적이지 않지만, 피하(subcutaneous (SQ)), 근육내(intramuscular (IM)), 정맥내(intravenous (IV)), 복막내(intraperitoneal (IP)), 진피내(intradermal (ID)), 비강, 안구 또는 구강 점막(oral mucosa (IN)), 또는 구강 경로를 포함한 투여 경로를 통해서 조성물을 단독으로 또는 다른 치료제와 조합 형태로 투여할 수 있다.

- <49> 또한 본 발명은 하기를 포함하는, 공지의 동정된, 재조합, 및/또는 정제된 폴리뉴클레오티드 서열을 이용하기 위한 방법을 제공한다:
- <50> a) 감염균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 약 70% 내지 약 90% 사이의 상동성을 가지는 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열;
- <51> b) 상기 (a)에서의 폴리뉴클레오티드에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- <52> c) 상기 (a) 또는 (b)에서의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전적 구성물(genetic construct);
- <53> d) 상기 (a), (b) 또는 (c)에서의 폴리뉴클레오티드 또는 유전적 구성물을 포함하는 벡터; 또는
- <54> e) 상기 (a), (b), (c) 또는 (d)에서의 폴리뉴클레오티드, 유전적 구성물 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- <55> 용어 "뉴클레오티드 서열", "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 서로 교차 사용가능하고, 본 발명에 따라서 이중나선 DNA, 단일나선 DNA 또는 상기 DNA 들의 전사 산물들 (예, RNA 분자들)을 의미하는 것으로 이해된다. 또한 본 발명은 자연적 환경 또는 자연적 상태에서의 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 핵산, 폴리뉴클레오티드, 또는 뉴클레오티드 서열들은, 제한적이지 않지만 이온교환 크로마토그래피, 분자 크기배제 크로마토그래피를 포함하는 분리 기법들, 또는 증폭, 감쇄 혼성결합법(subtractive hybridization), 클로닝, 서브클로닝 또는 화학 합성 등의 유전공학 기법들, 또는 이들 유전공학 기법들의 조합에 의해서 동정, 정제 (또는 부분 정제) 될 수 있다.
- <56> 단백질과 핵산 서열 모두의 상동성은 당분야에 공지되고, 공개적으로 접근가능한 데이터베이스(예, 월드와이드 웹 사이트: [ebi.ac.uk/fasta33/index.html](http://ebi.ac.uk/fasta33/index.html) (European Biotechnology Institute); 또는 [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (National Center for Biotechnology Information 참고)로 구할 수 있는 다양한 서열 비교 알고리즘들 및 프로그램들 중 어느 하나를 사용하여 평가할 수도 있다. 이러한 알고리즘들 및 프로그램들에는, 제한적이지 않지만 TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, CLUSTALW (Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(8):2444-2448; Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-410; Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.*, 22(2):4673-4680; Higgins *et al.*, 1996, *Methods Enzymol.*, 266:383-402; Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-410; Altschul *et al.*, 1993, *Nature Genetics*, 3:266-272)가 있다. 서열 비교는 공급자(vendor)가 제공한 디폴트(default) 파라미터들이나, 그 전문이 여기에 병합 참조되어 있는 참조문헌들에서 나타난 파라미터들을 사용하여 수행되는 것이 일반적이다.
- <57> 여기서 사용된 바와 같이, "상보적인" 폴리뉴클레오티드 서열은 일반적으로 이중나선 핵산 분자들 내의 특정한 퓨린과 특정한 피리미딘 사이에서의 수소결합으로부터 생겨난 서열을 가리킨다 (DNA-DNA, DNA-RNA, 또는 RNA-RNA). 주요 특이적 쌍 관계는 시토신과 구아닌, 티민 또는 우라실과 아데닌이다. "상보적인" 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 "안티센스" 폴리뉴클레오티드 서열이나 "안티센스 서열"을 가리키기도 한다.
- <58> 서열 상동성(Sequence homology) 및 서열 동일성(sequence identity)은 또한 높은 엄중성(high stringency), 중간 엄중성(intermediate stringency), 및/또는 낮은 엄중성(low stringency) 조건에서의 혼성화 연구에 의해 결정할 수 있다. 다양한 정도의 혼성화 엄중성이 이용될 수 있다. 상기 조건이 가혹해 질수록, 이중체 형성에 요구되는 상보성은 더욱 커진다. 조건들의 가혹한 정도는 온도, 프로브 농도, 프로브 길이, 이온 세기, 시간 등에 의해 조절될 수 있다. 바람직하게는 당분야 주지 기술, 예를 들어 Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY., pp. 169-170의 기술을 사용하여 낮은, 중간, 또는 높은 엄중성 조건들 하에서 혼성화가 이루어진다.
- <59> 예를 들면, 서던 블랏(Southern blot)에서 고정된 DNA의 <sup>32</sup>P-표식의 유전자-특이성 프로브와의 혼성화는 표준 방법 (Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)에 의해 수행될 수 있다. 일반적으로 혼성화 및 이후 세척들은 예시된 폴리뉴클레오티드 서열과 상동성을 가진 표적 서열을 검출할 수 있는 중간 내지 높은 엄중성 조건 하에서 이루어질 수 있다. 이중나선 DNA 유전자 프로브 경우에는, DNA 하이브리드의 녹는점(T<sub>m</sub>) 아래인 20-25°C에서 6X SSPE, 5X Denhardt 용액, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml 변성된 DNA에서 하룻밤 혼성화가 이루어질 수 있다. 상기 녹는점은 다음 식에 의해 설명된다 (Beltz *et al.*, 1983, *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave, eds. Academic Press, New York, 100:266-285).

- <60>  $T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 \log[\text{Na}^+] + 0.41(\%G+C) - 0.61(\text{포름아마이드}\%) - 600/\text{염기쌍 내 듀플렉스(duplex) 길이}$ .
- <61> 세척들은 다음과 같이 행해지는 것이 일반적이다:
- <62> (1) 1X SSPE, 0.1% SDS에서 실온에서 15분 동안 2회 (낮은 엄중성 세척);
- <63> (2) 0.2X SSPE, 0.1% SDS에서  $T_m - 20^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 1회 (중간 엄중성 세척).
- <64> 올리고뉴클레오타이드 프로브의 경우에는, 상기 하이브리드의 녹는점( $T_m$ ) 아래인  $10-20^{\circ}\text{C}$ 에서 6X SSPE, 5X Denhardt 용액, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml 변성된 DNA에서 하룻밤 혼성화가 이루어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 프로브에 대한  $T_m$ 은 다음 식에 의해 결정된다:
- <65>  $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(T/A \text{ 염기쌍 수}) + 4(G/C \text{ 염기쌍 수})$  (Suggs *et al.*, 1981, *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown, ed., Academic Press, New York, 23:683-693).
- <66> 세척들은 다음과 같이 행해질 수 있다:
- <67> (1) 1X SSPE, 0.1% SDS에서 실온에서 15분 동안 2회 (낮은 엄중성 세척);
- <68> (2) 1X SSPE, 0.1% SDS에서 상기 혼성화 온도에서 15분 동안 1회 (중간 엄중성 세척).
- <69> 일반적으로 염 및/또는 온도가 엄중성 변화를 위해 변경될 수도 있다. > 70 정도 길이의 염기로 된 표식된 DNA 단편으로, 다음 조건들이 사용될 수 있다:
- <70> 낮음: 1 혹은 2X SSPE, 실온
- <71> 낮음: 1 혹은 2X SSPE,  $42^{\circ}\text{C}$
- <72> 중간: 0.2X 혹은 1X SSPE,  $65^{\circ}\text{C}$
- <73> 높음: 0.1X SSPE,  $65^{\circ}\text{C}$ .
- <74> 또 다른 비한정적 예시에 의해서, 높은 엄중성 조건들을 이용하는 공정들이 다음과 같이 수행될 수 있다: DNA를 함유한 필터의 전-혼성화(Pre-hybridization)가, 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, 및 500 mg/ml 변성 연어정자 DNA로 된 완충용액에서  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간 내지 하룻밤 동안 수행된다. 필터는 100 mg/ml 변성 연어정자 DNA 및  $^{32}\text{P}$ -표지된 프로브  $5-20 \times 10^6$  cpm를 함유한 전-혼성화 혼합액에서 바람직한 혼성화 온도인  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 동안 혼성화된다. 이와 다르게는, 상기 혼성화 단계가 0.15M NaCl 및 0.05 M 시트르산나트륨에 대응하는 SSC 버퍼, 1X SSC 존재 하에서  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 수행될 수도 있다. 이후, 2X SSC, 0.01% PVP, 0.01% Ficoll, 및 0.01% BSA를 함유한 용액에서  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 필터 세척이 행해지고, 이어서 0.1X SS에서  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 45분간 세척될 수 있다. 이와 다르게는, 필터들이 2X SSC 및 0.1% SDS, 또는 0.5X SSC 및 0.1% SDS, 또는 0.1X SSC 및 0.1% SDS를 함유한 용액에서  $68^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 간격으로 씻겨질 수 있다. 상기 세척 단계들이 끝나면, 자기방사법(autoradiography)에 의해 상기 혼성화된 프로브들이 검출 가능해진다. 사용될 수 있는 높은 엄중성의 기타 조건들은 당업계에 주지되어 있으며, 여기에 그 전문들이 병합 참조되어 있는 Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., pp. 9.47-9.57; 및 Ausubel *et al.*, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.에서 인용한 바와 같다.
- <75> 중간 엄중성의 조건들을 이용하는 또 다른 비제한적 예시들은 다음과 같다: DNA를 포함하는 필터들이 전-혼성화 되고 나서,  $60^{\circ}\text{C}$  온도에서 5X SSC 버퍼와 표지된 프로브 존재 하에서 혼성화된다. 이후 필터들은 2X SSC를 함유한 용액에서  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 세척되고, 상기 혼성화된 프로브들은 자기방사법에 의해 검출 가능해진다. 사용될 수 있는 중간 엄중성의 기타 조건들은 당업계에 주지되어 있으며, 여기에 그 전문들이 병합 참조되어 있는 Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., pp. 9.47-9.57; 및 Ausubel *et al.*, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.에서 인용한 바와 같다.
- <76> 이중체 형성과 안정성은 하이브리드의 2개의 나선 사이의 실질적인 상보성에 의해 좌우되며, 상기에서 언급한 것처럼 어느 정도의 혼성 오류는 용인될 수 있다. 따라서, 본 발명의 프로브 서열들에는 돌연변이 (단일 및 복합 모두), 상기 언급한 서열들의 제거, 삽입, 및 그 조합형태가 해당되며, 여기서 상기 돌연변이, 삽입 및 제거는

표적 폴리뉴클레오티드와의 안정한 하이브리드 형성을 허용한다. 돌연변이, 삽입 및 제거는 주어진 폴리뉴클레오티드 서열에서 많은 방식으로 생산될 수 있고, 이들 방법들은 통상의 기술을 가진 자라면 알 수 있는 정도이다. 기타 방법들은 앞으로 알려지게 될 수도 있다.

- <77> 제한효소들이 본 DNA 서열들의 기능적 단편들을 얻기 위해 사용될 수 있다는 사실 또한 당업계에 널리 알려져 있다. 예를 들면, *Bal31* 엑소뉴클레아제는 DNA의 시간제어 제한된 소화(time-controlled limited digestion)를 위해 편리하게 이용 가능하다 (일반적으로 "erase-a-base" 공정으로 불린다). 예를 들면, Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Wei *et al.*, 1983, *J. Biol. Chem.*, 258:13006-13512를 참고할 것.
- <78> 또한 본 발명은 하기를 포함하는 유전적 구성물들을 제공한다: a) 감염균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 약 70% 내지 약 90% 사이의 상동성을 갖는 공지의 HA1 가변부위 폴리펩티드를 포함하는 (또는 구성되는) 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열. 본 발명의 유전적 구성물들은 또한 프로모터들 및 인핸서들 및, 선택적으로, 선택가능한 마커들과 같은 추가적인 조절인자들을 포함할 것이다.
- <79> 또한 본 발명의 범위 내에는 여기에 상술한 바와 같은 유전적 구성물들을 함유한 벡터들 또는 발현 카세트들, 또는 작동시에 조절인자들에 결합되는 폴리펩티드들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드들이 있다. 상기 벡터들과 발현 카세트들은 부가적으로 전사조절서열도 포함할 수도 있다. 상기 벡터들과 발현 카세트들은 선택가능한 마커들을 더 포함할 수도 있다. 상기 발현 카세트들은 작동시에 조절인자들에 결합되어 생물체 내로 공동 형질전환되는 최소한 1개의 추가 유전자를 포함할 수도 있다. 혹은, 상기 추가 유전자(들)와 조절인자(들)는 다중 발현카세트로 제공될 수도 있다. 이러한 발현 카세트들에는 본 발명의 서열들의 삽입을 목적으로 하고, 조절부위들의 전사 조절 하에 있는 무수한 제한부위가 제공된다. 상기 발현 카세트(들)는 작동시에 조절인자들에 결합되는 선택가능한 마커 유전자들을 추가 포함할 수도 있다.
- <80> 상기 발현 카세트들에는 5'-3' 전사 방향을 따라서 전사 및 번역 개시부위, 본 발명의 DNA 서열, 및 전사 및 번역 종결부위가 포함될 것이다. 상기 전사 개시부위인, 프로모터는 숙주 세포에 자생적이거나 유사하거나, 또는 외생적이거나 이형인 것일 수도 있다. 추가적으로, 상기 프로모터는 자생적 서열이거나 혹은 인위적 서열일 수도 있다. "외생적"이라는 것은 상기 전사 개시부위가 도입되는 원래의 식물 내에서 발견되는 것이 아닌 전사 개시부위를 의미하고자 사용한다. 여기서 사용된 바와 같이, 키메라 유전자는 작동시에 그 서열에 이형적인 전사 개시부위에 결합되는 코딩 서열을 포함한다.
- <81> 본 발명의 또 다른 측면에 의하면, 여기에 설명된 폴리뉴클레오티드 서열의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터가 제공된다. 본 발명의 벡터들에는 백신 벡터들이 포함되는데, 주어진 숙주 세포 내에서 상기 뉴클레오티드 서열들의 발현 및/또는 배출을 가능하게 하는데 필요한 인자들을 포함할 수도 있다. 상기 벡터는 전사 조절을 위해 적절한 부위뿐만 아니라, 프로모터, 즉 번역 개시 신호 및 종결 신호를 함유할 수 있다. 일부 실시예들에서는, 상기 벡터들이 숙주 세포 내에서 안정하게 유지될 수 있으며, 선택적으로, 번역된 단백질 배출을 유도하는 신호 서열들을 함유할 수도 있다. 이들 상이한 인자들은 사용된 숙주 세포에 따라서 선택되어진다. 벡터들은 숙주 세포 속으로 병합될 수도 있고, 또는 선택적으로, 자가적으로-복제하는 벡터들일 수도 있다.
- <82> 본 발명은 또한 폴리펩티드 발현을 가능하게 하고 선택적으로, 발현된 폴리펩티드를 복구하는 조건 하에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 숙주 세포의 배양을 포함하여, 여기에 개시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 발현에 대해 제공한다.
- <83> 상기 개시된 폴리뉴클레오티드 서열들은 또한 이차 핵산 서열에 의해 조절되고, 재조합 DNA 분자로 형질전환된 숙주 내에서 단백질 또는 펩티드가 발현될 수 있다. 예를 들어, 단백질 또는 펩티드의 발현은 당업계에 공지된 어떠한 프로모터/인핸서로도 제어 가능하다. 발현 조절을 위해 사용 가능한 프로모터에는 CMV-IE 프로모터, SV40 초기 프로모터 부위 (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus)의 3' 말단 반복부위에 포함된 프로모터(Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell*, 22:787-797), 단순헤르페스 티미딘 키아나제(herpes simplex thymidine kinase) 프로모터 (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:1441-1445), 금속티오네인(metallothionein) 유전자의 조절 서열 (Brinster *et al.*, 1982, *Nature*, 296:39-42); b-락타마제 프로모터 등의 원핵 벡터들(Villa-Kamaroff, *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-3731), 또는 *tac* 프로모터 (DeBoer, *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25); 또한 *Scientific American*, 1980, 242:74-94에서의 "Useful proteins from recombinant bacteria"도 참고할 것; 노팔린(nopaline) 합성효소 프로모터 부위(Herrera-Estrella *et al.*, 1983, *Nature*, 303:209-213) 또는 꽃양배추 모자이크바이러스 35S RNA 프로모터(Gardner, *et al.*, 1981, *Nucl. Acids Res.*,

9:2871), 및 광합성효소 리불로스 바이포스페이트 카르복실라제의 프로모터 (Herrera-Estrella *et al.*, 1984, *Nature*, 310:115-120)를 포함하는 식물 발현 벡터들; Gal 4 프로모터, ADC (알코올 데하이드로게나제) 프로모터, PGK (포스포글리세롤 키나아제) 프로모터, 및/또는 알칼라인 포스파타아제 프로모터 등 효모 또는 곰팡이 유래 프로모터 인자들이 있으나, 이에만 제한되는 것은 아니다.

<84> 본 발명에 따른 벡터들은, 예를 들면 플라스미드나 바이러스 유래 벡터들이다. 특정한 하나의 실시예에서, 작동시에 상기 개시된 폴리뉴클레오티드 서열들 속에 함유된 단백질 또는 펩티드-인코딩 핵산 서열에 결합되는 프로모터, 하나 이상의 복제 기점, 및, 선택적으로 하나 이상의 선택가능 마커(예, 항생제 내성 유전자)를 포함하는 벡터들을 사용한다. 발현 벡터들은 원하는 숙주 세포 내에서의 유전자 발현을 포함하는, 유전자 발현을 조절하는 조절 서열들을 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드들의 발현을 위한 예시적인 벡터들에는 pET-타입 플라스미드 벡터들 (프로메가) 또는 pBAD 플라스미드 벡터들 (인비트로젠) 또는 하기 예시들에서 제공된 것들이 해당된다. 더욱이, 본 발명에 따른 벡터들은 숙주 세포들을 형질전환시켜서 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열들을 클로닝하거나 발현하는 데에 유용하다.

#### <85> 형질주입 식물들(Transgenic plants)

<86> 상기에서 언급한 조성물들이나 면역화 프로토콜들을 생산하는 데에 유용한 폴리펩티드들은, 감염균주 HA1 가변부위 폴리펩티드와 약 70% 내지 약 90% 사이의 상동성을 갖는 공지된 HA1 가변부위 폴리펩티드를 포함하는(또는 이것으로 이루어진) 폴리펩티드를 발현하도록 유전적으로 조작된 형질주입 식물 세포로부터 유도되거나 획득될 수 있다.

<87> 여기서 형질주입 식물이란 식물세포배양, 식물세포주, 식물조직배양, 하등 식물, 선대식물, 단자엽 식물, 쌍자엽 식물, 또는 형질전환 식물세포 또는 원형질체로부터 유도된 그들의 자손으로 정의하며, 형질전환 식물의 개념은 실험 기술에 의해 도입되었으며 동일한 종의 원래의 비-형질주입 식물 세포에는 원래 존재하지 않는 외래 DNA를 포함하고 있다. 용어 "형질주입 식물" 및 "형질전환(된) 식물"은 때때로 당업계에서 그 DNA가 외래성 DNA 분자를 함유하는 식물을 의미하는 동의어로 사용되어져 왔다. 형질주입 식물들과 형질전환 식물들에는 그 개념이 안정적으로 형질전환되지 않았거나, 일시적으로 미국특허번호 5,550,360; 5,846,795; 4,885,248; 5,173,410; 5,602,242; 5,627,060; 5,804,439; WO 05/049839; WO 03/020938; WO 02/101006; WO 02/101060; WO 02/096192; WO 02/088369; WO 02/08386; WO 02/29068; WO 02/46440; 및 WO 02/068664에서 설명한 제조법 바이러스 벡터를 발현하는 방법들 및 식물들 또한 포함된다.

<88> 식물들 내에서 면역방어 항원들을 발현하기 위한 유전자 카세트를 구성하는 것은 Sambrook *et al.* (1989); 및 Ausubel *et al.*, (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, NY에 개시된 방법들과 같은 주지의 방법들을 활용하여 쉽게 이루어진다. 본 발명은 또한 면역방어 항원들을 인코딩하는 상기 개시된 서열들과 실질적 서열 상동성을 가짐으로써 발현에 있어서 상기 개시된 효과를 가질 수 있게 되는 DNA 서열들을 포함한다. 본 발명에서 사용된 것처럼, 용어 "실질적 서열 상동성"은 뉴클레오티드 서열 (DNA 또는 RNA의 경우)이나 아미노산 서열 (단백질 또는 폴리펩티드의 경우)이 다른 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 실질적, 기능적 또는 구조적 동질성을 구현하는 경우를 나타내기 위해 사용된다. 실질적 서열 상동성을 갖는 서열들 간에는 어떤 기능적이거나 구조적인 차이가 미미한 수준일 것이다; 즉 이들은 본 발명에서 지시된 것과 같이 작용하기 위한 서열의 능력에 영향을 미치지 않을 것이다. 여기에 개시된 서열들과 실질적 서열 상동성을 갖는 서열들은 돌연변이 등 개시된 서열의 변이체인 것이 일반적이며, 그렇지만 인위적 서열일 수도 있다.

<89> 본 발명의 구성물들을 제조함에 있어서, 적절한 방향과 적절한 리딩 프레임(reading frame)으로 된 DNA 서열들을 제공할 수 있도록, 다양한 DNA 단편들을 조작할 수도 있다. 상기 DNA 단편들을 연결하기 위해서 어댑터(adaptor)들 또는 링커들을 사용할 수도 있으며, 편의에 맞는 제한효소 부위들, 잔여 DNA의 제거, 제한효소 부위들의 제거 등을 위해서 기타 조작법들을 이용할 수도 있다.

<90> 다양한 단계들을 수행함에 있어서, 클로닝을 이용하여, 다음 단계에서 원하는 숙주 세포로 도입하기 위해서 목적하는 프로모터/유전자를 함유한 벡터를 증폭할 수 있다. 광범위한 클로닝 벡터들이 이용 가능한데, 상기 클로닝 벡터들에는 *E. coli*에서 기능을 갖는 복제 체계, 및 형질전환 세포들의 선별을 가능케 하는 마커가 포함된다. 이해를 돕기 위한 벡터들에는 pBR322, pUC 시리즈, pACYC184, Bluescript 시리즈 (Stratagene) 등이 포함된다. 따라서, 상기 서열을 적절한 제한효소 부위(들)에서 상기 벡터 내로 삽입할 수도 있으며, 그 결과 플라스미드가 상기 *E. coli* 숙주 (예, *E. coli* 균주 HB101, JM101 및 DH5a)를 형질전환하기 위해 사용되고, 상기 *E. coli* 가 적절한 영양배지에서 자라게 되고, 세포들이 배양되고 용균되고, 상기 플라스미드가 회수된다. 분석은 서열 분석, 제한 분석, 전기영동 기타가 연관된다. 각각의 조작 이후에는 최종 구성물에 사용할 상기 DNA 서

열이 제한되고, 차기 서열에 연결될 수도 있으며, 부분적 구성물들 각각은 동일하거나 상이한 플라스미드들에 클로닝될 수도 있다.

<91> 식물 세포들을 형질전환하기 위해 벡터들을 구할 수 있거나 쉽게 제조할 수 있다. 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 벡터들은 주어진 숙주 내에서 이형 DNA 서열의 유지와 발현에 필요한 모든 DNA 조절서열들을 함유해야 한다. 이러한 조절 서열들에는 일반적으로 리더 서열과 번역 개시-신호 코돈을 위해 코딩하는 DNA 서열, 번역 종결 코돈, 및 3' UTR 신호 조절 메신저 RNA 가공을 위해 코딩하는 DNA 서열이 포함된다. 어떠한 특정 종 내에서 발현을 최적화하기 위해 적정 인자들을 선별하는 것은 본 개시에 의한 교시를 활용하는 당업계 통상의 기술의 문제이다. 최종적으로 상기 벡터들은 바람직하게는 상기 벡터를 함유하는 숙주 세포들을 동정할 수 있는 표현형 특성을 제공할 수 있는 마커 유전자를 가져야 한다.

<92> 식물 세포들 내에 삽입된 외래 코딩 서열의 활성은 삽입체 근처의 내재성 식물 DNA의 영향에 의해 좌우된다. 일반적으로, 이형 유전자들의 삽입은 형질전환 기술을 이용하는 무작위로 나타난다; 하지만, 식물 세포들 내로 DNA의 자리 특이적 재조합을 갖는 식물들을 제공하는 기술이 현재 존재한다 (WO 91/09957 참고). 상기 프로모터의 조절 하에서 원하는 서열이나 서열들의 발현 결과를 가져오는 일 방법 또는 방법들의 조합 형태가 수용 가능하다.

<93> 본 발명은 식물 세포들을 형질전환하기 위한 특정한 일 방법에 제한되지 않는다. DNA를 식물 세포들 내로 도입하기 위한 기술은 당업계의 기술자들에게 주지하다. 외래 DNA를 식물 세포들 내로 운반하기 위한 네 개의 기초적인 방법들이 설명되어 왔다. 화학적인 방법들 (Graham and van der Eb, *Virology*, 54(02):536-539, 1973; Zatloukal, Wagner, Cotten, Phillips, Plank, Steinlein, Curiel, Birnstiel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:136-153, 1992); 미세주입을 포함한 물리적인 방법들 (Capecchi, *Cell*, 1980, 22(2):479-488), 전기천공법 (Wong and Neumann, 1982, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 107(2):584-587; Fromm, Taylor, Walbot, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(17):5824-5828; 미국특허번호 제5,384,253호) 및 유전자 총 (Johnston and Tang, 1994, *Methods Cell. Biol.*, 43(A):353-365; Fynan, Webster, Fuller, Haynes, Santoro, Robinson, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(24):11478-11482); 바이러스 방법들 (Clapp, 1993, *Clin. Perinatol.*, 20(1):155-168; Lu, Xiao, Clapp, Li, Broxmeyer, 1993, *J. Exp. Med.*, 178(6):2089-2096; Eglitis and Anderson, 1988, *Biotechniques*, 6(7):608-614; Eglitis, Kantoff, Kohn, Karson, Moen, Lothrop, Blaese, Anderson, 1988, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 241:19-27); 및 수용체-매개 방법들 (Curiel, Agarwal, Wagner, Cotten, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19):8850-8854; Curiel, Wagner, Cotten, Birnstiel, Agarwal, Li, Loechel, Hu, 1992, *Hum. Gen. Ther.*, 3(2):147-154; Wagner *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (13):6099-6103).

<94> 전기천공법에 의해 식물 세포들 내로 DNA 를 도입하는 것은 당업계 기술자들에게 주지하다. 상기 수용체 세포들을 전기천공에 의한 형질전환에 미처리된 세포들보다 더욱 감수성 있게 하기 위해서 펩틴-분해 효소들과 같은 식물 세포벽-분해 효소들을 사용한다. 전기천공법에 의한 형질전환에 영향을 주기 위해서는 세포 현탁 배양체와 같은 무른 조직들이든지, 배아 캘러스, 또는 미성숙 배아 또는 기타 기관화된 조직들을 직접 사용할 수도 있다. 목표 식물 재료의 세포벽들을 펩틴-분해 효소들로 부분 분해하거나, 제어된 방식으로 기계적으로 손상을 가하는 것이 일반적으로 필요하다. 이렇게 처리된 식물 재료는 외래 DNA를 전기천공에 의해 수용하기 쉬워진다.

<95> 식물 세포들 내로 외래 형질전환 DNA를 전달하기 위한 또 다른 방법은 미세입자 사출법(microprojectile bombardment)이다. 이 방법에서는 미세입자들을 외래 DNA로 코팅하고 프로펠러 힘에 의해 세포들 내로 전달시킨다. 이러한 미세입자들은 텅스텐, 금, 플래티늄, 및 유사 금속들로 만들어지는 것이 일반적이다. 미세입자 사출법의 장점은 원형질체들의 단리 (Cristou *et al.*, 1988, *Plant Physiol.*, 87:671-674,)라든지 아그로박테리아 감염에 대한 민감성이 필요하지 않다는 점이다. 가속화에 의해 수수(maize) 세포들 내로 DNA를 전달하기 위한 방법에 대해 이해를 돕기 위한 하나의 실시예는 유전자총 입자 전달 시스템(Biolistics Particle Delivery System)으로서, DNA로 코팅된 입자들 또는 세포들을 현탁액에 배양된 옥수수 세포들로 덮인 필터 표면 상에 있는 스크린을 통해 몰아내는 데에 이용할 수 있다. 상기 스크린은 상기 입자들을 분산시켜서 거대한 집락 형태로 수용체 세포들에 전달되지 않는다. 상기 사출법에 대해서는, 현탁액 내 세포들이 필터들 또는 고체 배지 상에 군집되는 것이 바람직하다. 혹은, 미성숙 배아들이나 기타 표적 세포들이 고체 배지 상에 배열될 수도 있다. 사출대상 세포들은 거대투사 증지 배지 하부의 적정 거리에 위치하게 된다. 사출 형질전환에 있어서는, 최대한의 안정한 형질전환체들을 수득하기 위해 사전-사출 배양 조건들과 사출 파라미터들을 최적화할 수도 있다. 이 기술에서는 사출을 위한 물리적 및 생물학적 파라미터들 모두가 중요하다. 물리적 인자들은 DNA/미세투사 침전물 조작과 연관된 것들이나, 미세투사물들의 비행(flight) 및 속도(velocity)에 영향을 미치는 것들이다. 생물학적

인자들에는 사출 전 및 직후 세포들의 조작에 연관된 모든 단계들, 사출 관련 트라우마 경감을 돕는 표적 세포들의 삼투 조절, 및 선을 이룬 DNA나 무결하게 수퍼코일된 플라스미드들과 같은 형질전환 DNA의 본질이 포함된다.

<96> 아그로박테리아-매개 전달은 식물 세포들 내로 외래 DNA를 도입하기 위해서 광범위하게 적용가능한 체계인데, 원형질체로부터 무손상(intact) 식물을 재생할 필요 없이 상기 DNA가 식물 조직들 전부 속으로 도입될 수 있기 때문이다. 식물 세포들 내로 DNA를 도입하기 위해서 아그로박테리아-매개 식물 편입 벡터들을 이용하는 기술은 당업계에 주지한 사실이다. 예를 들면, Fraley *et al.*, 1985, *Biotechnology*, 3:629; Rogers *et al.*, 1987, *Meth. in Enzymol.*, 153:253-277에서 설명된 기술들을 참고한다. 더욱이, Ti-DNA의 편입은 상대적으로 정교한 공정으로, 재배열을 거의 형성하지 않는다. 전달대상 DNA 부위는 경계 서열에 의해 정해지며, Spielmann *et al.*, 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 205:34; Jorgensen *et al.*, 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 207:471에서 설명한 대로 intervening DNA가 일반적으로 식물 게놈 속으로 삽입된다.

<97> 현대적인 아그로박테리아 형질전환 벡터들은 아그로박테리아 내에서 뿐만 아니라 *E. coli* 내에서도 복제능이 있어서, 편리한 조작을 가능하게 한다. 더욱이, 최근 아그로박테리아-매개 유전자 전달용 벡터에 대한 기술 발전으로 인해 상기 벡터 내에서의 유전자들과 제한효소 부위들의 배치가 개선되어, 다양한 단백질을 또는 폴리펩티드들을 발현할 수 있는 벡터들의 구성을 촉진해 왔다. 삽입된 폴리펩티드 코딩 유전자들의 직접 발현을 위해서 프로모터와 폴리아데닐화 부위로 측면 배치된 편리한 멀티-링커 부위들이 본 목적에 적합하다. 추가적으로, 암(arm)을 가진 것과 갖지 않은 Ti 유전자들 모두를 포함하는 아그로박테리아가 형질전환용으로 사용될 수 있다.

<98> 식물 원형질체들의 형질전환은 칼슘 포스페이트 침전, 폴리에틸렌 글리콜 처리, 전기천공, 및 이들 처리기술들의 조합 형태에 기초한 방법들을 이용하여 이루어질 수 있다. (예, Potrykus *et al.*, 1985, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183; Marcotte *et al.*, 1988, *Nature*, 335:454 참고). 다른 식물 종들에 이들 시스템을 적용하는 것은 원형질체들로부터 특정 종들을 재생성하는 것에 좌우된다.

<99> 일단 식물 세포들이 항원 발현을 위해 형질전환, 선별, 확인되면, 몇몇 경우들에서는 전체 비옥한 식물들을 재생산하는 것이 가능한데, 이는 상당부분 선택된 식물 종들에 의해 좌우될 것이다. 수많은 식물 종들을 재생산하는 방법들이 문헌에 보고되어 왔으며, 당업계 기술자들에게 주지하다. 본 발명의 실행을 위해서는, 통상적으로 장시간의 재생산 단계를 회피하여 신속하게 배양되고 규모 확대가 가능한 식물 세포주들을 형질전환하는 것이 바람직하다. 추가로, 식물 세포배양체들을 이용하면 개방된 현장 생산을 피할 수 있고, 유전자 이탈(escape)과 식량오염을 상당히 감소시킨다. NT-1 및 BY-2 (An, G., 1985, *Plant Physiol.*, 79:568-570) 등의 담배 현탁 세포 배양체들은 이들 세포주들이 배양을 다름에 있어서 특히 적절하기 때문에 바람직하고, 쉽게 형질전환되고, 안정적으로 편입 현상을 완성하며, 냉동보관이 용이하다.

<100> 담배 현탁 세포주, NT-1,가 본 발명을 실행함에 있어서 적합하다. NT-1 세포들은 원래 *Nicotiana tabacum* L.cv. bright yellow 2 기원이다. 상기 NT-1 세포주는 널리 사용되며 쉽게 수득가능하다; 비록, 어떠한 담배 현탁 세포주라도 본 발명의 실행과는 어울리지만. 하기 예시들에서 사용하기에 적합한 NT-1 세포들은 American Type Culture Collection under accession number ATCC No. 74840에서 구할 수 있다. 그 전문이 여기에 병합 참조되어 있는, 미국특허번호 제6,140,075를 참고한다.

<101> 다수의 식물 세포배양 기술들과, 실험실 규모 셰이커 플라스크에서 수천리터 생물반응기에 이르는 시스템들이 설명되어 왔고, 식물 세포배양 업계에 주지하다. 예를 들면, Fischer, R. *et al.*, 1999, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 109-112 and Doran, P., 2000, *Current Opinions in Biotechnology*, 11:199-204를 참고한다. 형질전환 식물 세포들이 원하는 양으로 배양된 후에는, 수거되고, 부드럽게 세척되고, 분해를 위해 적절한 완충액 속에 놓이게 된다. 다수의 상이한 완충액들이 본 발명과 양립 가능하다. 일반적으로 상기 완충액은 세포막을 용해하기 위해 사용 가능한 강한 세제들을 함유하지 않는, 중성 pH값 또는 그 근처의 수용성 등장 완충염 용액이다. 바람직한 완충액들에는 Dulbecco 포스페이트 완충염과, 1 mM EDTA 함유 PBS가 있다.

<102> 하나의 실시예에서, 세포들은 고주파분해(sonication)에 의해 파괴될 수 있다. 상기 세척된 세포들은 완충액 속에, 약 0.01 gm/ml 내지 약 5.0 gm/ml 범위 이내로, 바람직하게는 약 0.1 gm/ml 내지 약 0.5 gm/ml범위 이내로 놓인다 (완충액 부피 당 세척된 젖은 세포 중량). 많은 상업적으로 구할 수 있는 sonication 장비들이 본 발명과 부합되며, sonication 시간은 약 5 내지 약 20초, 바람직하게는 약 15 내지 약 20초 범위로 한다. 그 결과 수 마이크론 내지 수백 마이크론 크기 범위로 될 수도 있으며, 상기 HA1 폴리펩티드 또는 그 면역성 단편을 노출시킨다.

- <103> 용어 "포함하는", "이루어지는" 및 "필수적으로 이루어지는"은 그들의 표준 의미에 따라 정의된다. 각각의 용어와 연관된 특정 의미에 부합하기 위해서, 상기 용어들이 본 출원 전반에 걸쳐서 서로 교체 사용될 수도 있다. "단리된" 또는 "생물학적으로 정제된"은 원래의 상태로 발견됨에 따라 그 물질에 일반적으로 수반되는 성분들이 상당부분 또는 완전히 없는 물질을 가리키는 것으로 사용된다. 이와 같이, 본 발명에 따라 단리된 펩티드들은 바람직하게는 원래의 환경에서 이들 펩티드들과 연관되는 것이 보통인 물질들을 함유하지 않는다.
- <104> 여기에 참조되거나 인용된 모든 등록특허, 특허출원, 및 공개공보는 도면과 표 전체를 포함하여 그들의 전문이 본 명세서의 교시와 벗어나지 않는 범위까지 참조문헌으로 병합된다. 여기에 설명된 예시들 및 실시예들은 이해를 돕기 위한 목적에 한하며, 그러한 측면에서 다양한 변형들과 변화들이 당업계 기술자들에게 제시될 것이고, 본 출원의 사상 및 부속된 청구항들의 범위 내에 속하는 것으로 이해하여야 한다. 추가로, 여기에 개시된 발명이나 그 실시예의 어떤 요소들 또는 한정들도 다른 요소들 또는 한정들 중 어느 것 및/또는 전부(단독이든 어떤 조합이든), 또는 여기에 개시된 다른 어느 발명 또는 그 실시예와 조합될 수 있고, 그러한 조합 전부는 제한없이 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 해석된다.
- <105> 본 명세서가 조류 인플루엔자의 다양한 이형 균주들에 대해 기존에 생산된 백신들로서보다 더욱 확장된 교차 보호를 설명하고는 있지만, 식물 유래 백신 플랫폼과 여기에 설명된 개념들은 항원 결정기들을 변화시키는 능력을 가진 다른 병원균들에 의해 야기된 질병 제어에도 적용 가능하다.
- <106> 여기에 참조되거나 인용된 모든 등록특허, 특허출원, 가출원, 및 공개공보들은 도면과 표 전체를 포함하여 그들의 전문이 본 명세서의 교시와 벗어나지 않는 범위까지 참조문헌으로 병합된다.
- <107> 본 발명을 실시하기 위한 공정들을 설명하는 예시들이 하기와 같다. 이들 예시들은 제한하기 위한 의도로 해석되어서는 안된다. 달리 언급되지 않으면, 모든 백분율들은 중량%이며, 모든 용매 혼합물 비율은 부피 단위이다.

## 실시예

- <108> 실시예 1- 생쥐 이중 감염에서의 식물-세포에서 생산된 H5의 방어 효능
- <109> 이중 (<90% 상동성) 감염균주에 대항하는 식물-세포-생산 조류 인플루엔자 바이러스 (AIV) H5 항원의 효능을 확인하고 심도있게 이해하기 위해서, 생쥐 접종 및 AIV 감염균주 연구가 완성되었다. 칠면조 위스콘신 68 AIV 균주의 H5 항원 유전자가 식물-코돈 최적화되고, NT-1 식물 세포들 속으로 형질전환되고, 그 전문이 여기에 병합 참조되어 있는 미국특허번호 제7,132,291의 교시와 실질적으로 부합하도록 배양되었다.
- <110> 세포 용해.
- <111> H5 항원 발현을 위해 형질전환된 NT-1 식물 세포들을 200 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8, 2 mM dithiothreitol, 2% Na deoxycholate (Doc)으로 100g aliquot(얼음 위에서 Biospec<sup>TM</sup> bead beater 이용) 용해시켰다. H5 추출 보조를 위해 용해물을 4℃에서 하룻밤 교반시킨 다음, 원심분리하고 여과시켰으며 (0.45μm), 그런 다음 하기 설명한 대로 정제하였다. 한 부분을 H5 용으로 정량하고, 동결건조시키고, -20℃에서 보관하였다.
- <112> Mab(단일클론항체) 크로마토그래피.
- <113> 용해된 형질전환 NT-1 식물 세포들로부터 정제시킨 H5 항원 벌크를 다음과 같이 준비하였다. 상기에서 준비한 식물 세포 용해물을 Milli-Q<sup>TM</sup> water로 4 내지 1 희석시켜, 상기 Doc 농도를 0.5%로 감소시켰다. 희석시킨 식물 세포 용해물을 50 mM Tris pH 8로 평형을 이룬 약 125ml H5 Mab 친화성 컬럼에 통과시켰다. 상기 컬럼을 50 mM Tris pH 8로 바닥선까지 세척하였으며, 결합 단백질을 50 mM Tris pH 8, 2M NaSCN으로 용출시켰다. 상기 용출된 H5 단백질을 동결건조에 앞서 두 개의 대용량 이탄산암모늄 10.5mM (휘발성 완충액)에 대하여 투석하였다.
- <114> 항원 제조.
- <115> 1. 실시예 백신: 약 12.9μg의 H5 항원을 함유하는, 동결건조시킨 형질전환 NT-1 세포 용해물 케이크를 3.5ml 멸균수로 재수화시켜서, 37μg/ml 벌크 H5 항원 원액 농도를 갖는 식물 세포 용해물 원액을 얻었다. 상기 벌크 H5 항원 원액을 20분간 6000 X G 원심분리한 다음, 0.22 마이크론 필터를 통과시켜 멸균여과시켰다. 그런 다음, 이렇게 멸균여과시킨 벌크 H5 항원을 최종 실시예 백신 어셈블리용으로 보관하였다.
- <116> 2. 정제 백신: Mab 크로마토그래피 정제 H5 항원의 동결건조 바이알(vial)을 정제 백신을 제조하는 데에 사용하였다. 상기 동결건조 바이알 각각은 500μg의 H5 항원을 함유하였다. 바이알 각각을 5ml 멸균수로 재수화하여 최

중 농도 100 $\mu$ g/ml을 얻었다. 여기에는 원심분리나 멸균여과가 필요하지 않았으며, 최종 정제 백신 어셈블리용으로 보관하였다.

<117> 3. NT-1 블랭크 대조군: H5 항원을 발현하는 형질전환 NT-1 세포들 대신 비-형질전환 NT-1 식물 세포들이 사용되었다는 점을 제외하고는, 상기 실시예 백신 (1)에 이용한 것과 동일한 공정을 이용하여 NT-1 블랭크 대조군을 제조하였다.

<118> 제형화.

<119> 상기 최종 백신들 각각을 최종 H5 농도 26.7 ng/ml로 조립하였다. 실시예 백신 항원, 정제 백신 항원 또는 NT-1 블랭크 대조군 용해물을 멸균 50ml 원추형 원심분리 튜브에 첨가하였다. 멸균여과된 Quil A 원액 (50 mg/ml 멸균수, Brenntag, DK) 소정량을 상기 튜브에 첨가하여 최종 농도 40 ug/dose로 만들고, 멸균 로터 고정자 형 균질기를 이용하여 1분간 혼합시켰다. 콜레스테롤 원액 (18 mg/ml in EtOH) 소정량을 상기 튜브에 첨가하여 최종 농도 10 ug/dose로 만들고, 멸균 로터 고정자 타입 균질기를 이용하여 1분간 혼합시켰다. 미리 준비, 가압멸균한 레시틴 및 아크릴 폴리머 혼합물 (3:2 레시틴:카르보중합체) 소정량을 최종 농도 1 mg/dose로 만들고, 1분간 균질화시켰다. 멸균수 소정량을 상기 튜브에 첨가하고 혼합하였다.

<120> 그런 다음, 상기 조립된 백신을 멸균 혈청 바이알들 속에 무균상태로 옮기고, 봉입하고 표지하였다. 임상 시험 부위에 요구되는 바와 같이 상선될 때까지, 조립된 백신들의 바이알들을 4℃에서 보관하였다.

<121> 접종.

<122> 표 1에 나타난 바와 같이, 65마리 BALB/c 생쥐 (암컷; 5-6 주 연령)를 치료 제1군, 치료 제2군, 치료 제3군, 치료 제4군으로 지정하였다. 연구일 0, 14, 21일차에, 표 1에 나타난 바와 같이 생쥐들에 처방 치료제 150 $\mu$ l를 투여하여 접종하였다. 접종은 피하 투여경로로 이루어졌다. 제4군 생쥐들은 접종하지 않았다.

<123> 접종 후 분석.

<124> 35일차에, 모든 생쥐들을 ABSL3 시설로 옮기고, 새로운 시설에서 1주일간 순응시켰다. 42일차에, 5마리 생쥐를 제1군, 제2군, 제3군 각각으로부터 무작위 선별하고, 진정 상태에서 채혈하였다. 혈액을 혈청 내로 진행시키고,  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 에서 혈청 분석 목적으로 보관시켰다. 추가로, 42일차에, 제1군, 제2군, 제3군으로부터의 나머지 15마리 생쥐들을 대략  $1.5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> 조류 인플루엔자 바이러스 A/Vietnam/1203/04의 50 $\mu$ l로 감염시켰다. 상기 제4군으로부터 5마리는 인산 완충염(PBS)으로 가상 감염시켰다. 모든 감염들은 케타마인으로 마취한 상태에서 수행되었다.

<125> 45일차에, 제1군에서 5 마리, 제2군에서 5 마리, 제3군에서 5마리, 제4군에서 생쥐 전부 (5마리)를 희생하고, 폐와 뇌를 제거하였다. 폐와 뇌를 균질화하고, TCID<sub>50</sub> 정량분석에 의해 생바이러스용으로 실험하였다.

<126> 제1군, 제2군 및 제3군 내 남아 있는 10 마리는 56일 만기까지 임상 질병 신호 용으로 관찰하였다.

<127> 혈청분석.

<128> 42일차에, AIV의 칠면조 위스콘신 68 균주에 대항한 혈구응집 억제 및 A/Vietnam/1203/04에 대항한 혈청 중화를 제1군 및 제2군 생쥐에서 채취한 혈액 상에서 수행하였다.

<129> 혈구응집 억제 분석.

<130> 42일차에, 요막액에서 준비한 불활성 칠면조 위스콘신 68 균주에 대항한 혈구응집 억제(Hemagglutination Inhibition (HAI)) 혈청 분석을 혈청 샘플 상에서 수행하였다. 상기 불활성 바이러스를 희석하여 50 $\mu$ l 당 8 내지 16 혈구응집 (HA) 단위 사이를 얻었다. 상기 혈청 샘플들을 PBS 내에서 2배로 연속 희석시켰다. 상기 희석된 혈청 샘플들을 동량의 희석된 바이러스에 첨가하였다. 상기 혈청-바이러스 혼합물을 실온에서 60분간 인큐베이팅시켰다. 그런 다음, 1% 치킨 적혈구(cRBC) 용액을 상기 혈청-바이러스 혼합물에 첨가하고, 2-7℃에서 24시간 동안 인큐베이팅시켰다. 이후 혈구응집 (양성 결과) 또는 펠렛된 cRBC (음성 결과)인가에 대하여 평판들을 육안 관측하였다.

<131> HAI 역가는 바이러스가 상기 cRBC의 혈구응집을 일으키는 능력을 억제할 수 있는 혈청의 역 희석을 나타낸다.

<132> 혈청 중화 분석.

<133> 상기 혈청 중화 분석은 ABSL-3 실험실에서 수행되었다. ND<sub>50</sub>을 혈청 샘플들에 대해 다음과 같이 결정하였다. 각 샘플의 연속 2배 희석액을 EMEM(Eagle's Minimal Essential Medium) 배양배지를 사용하여 준비하였다. 조류 인플루엔자 바이러스 (Vietnam/1203/04)를 상기 희석된 혈청 샘플들에 첨가하였고, 이 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, MDCK 세포들과 최소한 90% 융합성을 갖는 96웰 배지들을 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 용액으로 행구고, 상기 웰들을 각각의 혈청-바이러스 희석액 100 $\mu$ l로 5중으로 접종하였다. 그런 다음 배지들을 습한 인큐베이터에서 약 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>조건으로 96 $\pm$ 6 시간 동안 인큐베이션시켰다. 배지들을 현미경의 도움으로 세포병리학적 효과(CPE) 용으로 등급화하였다. 상기 ND<sub>50</sub>는 상기 웰들 50% 에서 CPE가 없게 하는 희석액으로서 기록했고, Spearman Karber 방법을 사용하여 계산하였다.

<134> **폐 및 뇌로부터 생바이러스 역가측정.**

<135> 제1군, 제2군, 제3군 각각에 있는 5마리 생쥐들로부터 뇌와 폐를 제거하고, CMF-PBS에서 균질화하였다. 균질체들을 마이크로원심분리 튜브에 aliquot하고  $\leq$ -70℃에서 보관하였다. 뇌 및 폐 균질체 샘플들을 TCID<sub>50</sub>s를 사용하여 생바이러스 분석하였다. 폐 및 뇌를 제거하고, 1% 항생제 (페니실린 및 스트렙토마이신)로 조제한 PBS(인산 완충염) 1ml에서  $\leq$ -70℃에서 무손상 동결시켰다. 해동후, 폐 및 뇌를 균질화하고, 상기 샘플들을 TCID<sub>50</sub>s(tissue culture infectious dose 50, 조직배양감염량 50)에 의해 생바이러스 분석하였다. 간단하게는, 각 샘플의 연속 5배 희석액을 EMEM을 이용하여 준비하였다. 일단의 희석액 또한 양성 대조구 샘플(PC, 공지의 TCID<sub>50</sub> 역가를 지닌 양성 샘플) 및 음성 대조구 샘플(NC, 본래의 바이러스(naive of virus)로 알려짐) 용으로 준비했다. 그런 다음, MDCK 세포들과 최소한 90% 융합성을 갖는 96웰 배지들을 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 용액으로 행구고, 상기 웰들을 각각의 샘플 희석액 100 $\mu$ l로 5중으로 접종하였다. 그런 다음, 적어도 5 세포배양 컨트롤(CC, culture control) 웰 일단을 100ml EMEM으로 접종한 다음, 상기 PC 및 NC 샘플 용 희석액 일단을 별도의 96 웰 배지 상에 5중 접종하였다. 상기 양성 및 음성 컨트롤 모두가 5 CC 웰들을 각각 보유하고 있다. 그런 다음, 상기 배지들을 습한 인큐베이터에서 약 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>조건으로 96 $\pm$ 6 시간 동안 인큐베이션시켰다. 배지들을 현미경의 도움으로 세포병리학적 효과(CPE) 용으로 등급화하였다. 분석이 유용하게 고려될 수 있도록 하기 위해서는, 오염이 없어야 하고, 양호한 융합성 (>80%) 단일층을 위해 요구되는 각 배지 상에 적어도 5 CC 웰들 보유할 수 있도록 한다. 상기 TCID<sub>50</sub>는 상기 웰들 50% 에서 CPE가 없게 하는 희석액으로서 기록했고, Spearman Karber 방법을 사용하여 계산하였다.

<136> **결과.**

<137> 제1군, 제2군, 제3군 각각으로부터의 5 마리 생쥐들을 혈청검사를 위해 채혈하였다. 혈청검사 결과 (혈구응집 억제 및 혈청 중화)가 표 2에 보여진다. HA1 (혈구응집 억제 혈청검사)에 의해 입증된 것처럼, 제1군 (실시에 백신)으로부터의 상기 5 마리 생쥐 중에서 5 마리가 Turkey Wisconsin 68 (백신 내 H5 항원과 상동성)에 대항하여 항체를 발생시켰다. 제1군의 기하평균가(GMT)가 388이었다. 제2군 (정제 백신)으로부터의 상기 5 마리 생쥐 중에서 3 마리가 HA1 역가를 발생시켰다. 제2군의 GMT가 60.7이었다.

<138> 제3군 (NT-1 블랭크 대조군)으로부터의 어느 것도 Turkey Wisconsin 68에 대항하여 항체를 발생시키지 않았다. SN (혈청 중화 혈청검사)에 의해 입증된 것처럼, 제1군 (실시에 백신)으로부터의 상기 5 마리 생쥐 중에서 3 마리가 Vietnam/1203/04 (백신 내 HA와 이종)에 대항하여 항체를 발생시켰다. 제1군의 기하평균가(GMT)가 34.0이었다. 제2군으로부터의 상기 5 마리 생쥐 중에서 1 마리가 SN 역가 (GMT=3.1)를 발생시켰으며, 제3군으로부터의 상기 5 마리 생쥐 중에서 어느 것도 Vietnam/1203/04 에 대항하여 SN 항체를 발생시키지 않았다.

<139> 연구 45일차(감염 후 3일 경과)에 생 조류인플루엔자 바이러스를 제1군, 제2군, 제3군, 제4군 각각으로부터의 5 마리의 폐 및 뇌로부터 분리하였다. 제4군 속 5 마리 생쥐 전부 상기에서 설명한 것처럼 희생시켰으며, 따라서 표 4에는 나타나 있지 않다. 바이러스 분리결과를 표 3에 나타내었다. 4개 군 전부에서, 아무런 생바이러스도 뇌 조직으로부터 분리할 수 없었다. 제1군 (실시에 백신)에서, 5 마리 중에서 1 마리가 멸균 폐 조직 (바이러스 분리 불가능)을 가졌다. 제1군 폐에서 분리한 생바이러스의 GMT는  $3.31 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml이었다. 제2군 (정제 백신)에서, 5 마리 중 5 마리에서 생바이러스가 분리되었다. 제2군 폐에서 분리한 생바이러스의 GMT는  $2.19 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml이었다. 제3군 (NT-1 블랭크 대조군)에서, 폐에서 1log 더 높은 제1군 생쥐들에서 보다 더 많은 생 조류인플루엔자 바이러스를 가졌다. 제3군에서, 5 마리 생쥐 중에서 5 마리가 양성 분리결과를 가졌으며, 이 군의 GMT는  $8.72 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> /ml이었다. 제4군 생쥐들 (비-접종되고 PBS만으로 감염되었음)은 폐

조직으로부터 아무런 바이러스 분리결과를 보이지 않았다.

<140> 제1군, 제2군, 제3군 각각에 있는 10 마리를 감염한 날 (42일차)부터 감염 후 2주 (56일차)까지 임상적으로 관찰하였다. 표 4에서는, 제1군, 제2군, 제3군에 대한 감염 후 치사율을 나타내고 있다. 연구 중 인생주기의 최종 시점 (연구 56일차; 감염 후 14일 경과)에서, 제1군 (실시에 백신) 생쥐 중에서 100%가 감염에 대해 생존하였다. 제2군 (정제 백신) 생쥐 중에서 10%가 감염에 대해 생존하였다. 제3군 (블랭크 대조군) 생쥐 중에서 100%가 감염에 대해 치사하였다.

<141>

<142>

표 1: 생쥐 접종에 대한 치료 군 및 감염효능 연구				
군	치료	생쥐 수	투여	감염
1	실시에 백신	20	150ul SC, 3 회	Yes
2	정제 백신	20	150ul SC, 3 회	Yes
3	NT-1 블랭크 대조군	20	150ul SC, 3 회	Yes
4	비-접종 대조군	5	무	No 가상감염

<143>

표 2: 혈구응집 억제 역가 (HAI) 및 혈청 중화 역가 (SN) (연구 42일차)								
제1군			제2군			제3군		
생쥐	HAI*	SN**	생쥐	HAI*	SN**	생쥐	HAI*	SN**
7	512	0	1	<8	0	1	<8	0
10	256	459	3	64	0	5	<8	0
11	256	0	9	256	294	8	<8	0
13	512	283	19	1024	0	14	<8	0
15	512	348	20	<8	0	17	<8	0
GMT	388	34.0	GMT	60.7	3.1	GMT	<8	0
STD	140.2	208.2	STD	433	131	STD	0	0

<144> ?\*: HAI GMT 산출을 위해서, <8은 7로 산정하였음.

<145> ?\*\* SN GMT 산출을 위해서, 0은 1로 산정하였음.

<146>

표 3: 폐조직에서 생바이러스 분리 (TCID <sub>50</sub> )							
제1군		제2군		제3군		제4군	
생쥐	폐	생쥐	폐	생쥐	폐	생쥐	폐
1	7.93x10 <sup>3</sup>	5	3.16x10 <sup>4</sup>	3	2.0x10 <sup>5</sup>	1	0
6	2.0x10 <sup>4</sup>	6	5.01x10 <sup>4</sup>	7	1.26x10 <sup>5</sup>	2	0
14	0	7	5.01x10 <sup>4</sup>	10	7.94x10 <sup>4</sup>	3	0
18	7.94x10 <sup>4</sup>	11	3.16x10 <sup>4</sup>	12	1.26x10 <sup>5</sup>	4	0
19	3.16x10 <sup>4</sup>	14	2.0x10 <sup>4</sup>	18	2.0x10 <sup>4</sup>	5	0
GMT	3.31x10 <sup>3</sup>	GMT	2.19x10 <sup>4</sup>	GMT	8.72x10 <sup>4</sup>	GMT	0
STD	3.12x10 <sup>4</sup>	STD	2.01x10 <sup>4</sup>	STD	6.64x10 <sup>4</sup>	STD	0

<147>

표 4: 치사율 표 - 감염 후 치사율					
제1군		제2군		제3군	
생쥐	치사율	생쥐	치사율	생쥐	치사율
2	생존함	2	8	2	8
3	생존함	4	7	4	7

4	생존함	8	8	6	7
5	생존함	10	9	9	8
8	생존함	12	7	11	9
9	생존함	13	7	13	9
12	생존함	15	6	15	9
16	생존함	16	생존함	16	7
17	생존함	17	7	19	8
20	생존함	18	7	20	8

<148>

여기에 설명된 예시들 및 실시예들은 이해를 돕기 위한 목적일 뿐이며, 다양한 변형이나 경미한 변화가 업계 기술자에게 제시될 수 있고, 본 출원의 사상 및 범위, 및 부속된 청구항들의 범위 이내에서 포함될 수 있을 것으로 이해되어야 한다. 추가로, 여기에 개시된 발명이나 그 실시예의 어떤 요소들 또는 한정들도 다른 요소들 또는 한정들 중 어느 것 및/또는 전부(단독이든 어떤 조합이든), 또는 여기에 개시된 다른 어느 발명 또는 그 실시예와 조합될 수 있고, 그러한 조합 전부는 제한없이 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 해석된다.

## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Dow AgroSciences LLC  
Webb, Steven Robert  
Henry, Matthew

<120> Vaccine for Avian Influenza and Methods of Use

<130> DAS-132XC1

<150> US 60/793,804

<151> 2006-04-21

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 548

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 1

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
20 25 30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu  
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
130 135 140

Arg Ser Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Val Tyr Pro Thr Ile  
145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln  
180 185 190

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
210 215 220

Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
260 265 270

Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
325 330 335

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
340 345 350

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln  
355 360 365

Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys  
370 375 380

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
385 390 395 400

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
405 410 415

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
420 425 430

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Leu  
450 455 460

Glu Phe Ser His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn  
465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg  
485 490 495

Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
500 505 510

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
515 520 525

Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
530 535 540

Arg Ile Cys Ile  
545

<210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Avian influenza virus

<400> 2

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 3  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Avian influenza virus

<400> 3

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
 20 25 30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
 35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
 50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
 65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu  
 100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
 115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
 130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro Thr Ile  
 145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln  
180 185 190

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
210 215 220

Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
260 265 270

Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Thr Arg  
325

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 4

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly  
1 5 10 15

Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser  
20 25 30

Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile  
35 40 45

Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu  
50 55 60

Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu  
65 70 75 80

Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala  
85 90 95

Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp  
100 105 110

Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp  
115 120 125

Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys  
130 135 140

Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro  
145 150 155 160

Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val  
165 170 175

Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr  
180

<210> 5  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Avian influenza virus

<400> 5

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser  
20 25

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Avian influenza virus

<400> 6

Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile  
1 5 10

<210> 7  
<211> 564  
<212> PRT  
<213> Avian influenza virus

<400> 7

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val  
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
35 40 45

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
85 90 95

Glu Lys Asp Asn Pro Val Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Met Ser Ser Thr Asn His Phe Glu  
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Ser Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile  
165 170 175

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln  
195 200 205

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
210 215 220

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
340 345 350

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
355 360 365

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln  
370 375 380

Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys  
385 390 395 400

Met Asn Thr Gln Phe Glu Val Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
405 410 415

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
420 425 430

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
435 440 445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
450 455 460

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe  
465 470 475 480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn  
485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg  
500 505 510

Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 8

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 9

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val  
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
20 25 30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Val Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Met Ser Ser Thr Asn His Phe Glu  
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Ser Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile  
145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln  
180 185 190

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
210 215 220

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Thr Arg  
325

<210> 10  
<211> 157

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 10

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly  
1 5 10 15

Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser  
20 25 30

Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile  
35 40 45

Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu  
50 55 60

Val Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu  
65 70 75 80

Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala  
85 90 95

Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp  
100 105 110

Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp  
115 120 125

Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys  
130 135 140

Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr  
145 150 155

<210> 11

<211> 24

<212> PRT  
<213> Avian influenza virus

<400> 11

Gln	Ile	Leu	Ser	Ile	Tyr	Ser	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	

Ile	Met	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Phe
				20			

<210> 12  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Avian influenza virus

<400> 12

Asn	Gly	Ser	Leu	Gln	Cys	Arg	Ile	Cys	Ile
1				5					10