



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0079140
(43) 공개일자 2016년07월05일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01) C07K 14/115 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 39/145 (2013.01)
A61K 39/155 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7016831(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2008년11월25일
심사청구일자 2016년06월23일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2010-7013473
원출원일자(국제) 2008년11월25일
심사청구일자 2013년09월16일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년06월23일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2008/003580</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/068992
국제공개일자 2009년06월04일</p> <p>(30) 우선권주장
61/004,334 2007년11월26일 미국(US)
0810305.3 2008년06월05일 영국(GB)</p> | <p>(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35</p> <p>(72) 발명자
포다, 오디노
이탈리아 아이-53100 시에나 비아 피오렌티나 노바티스 백신즈
라푸올리, 리노
이탈리아 아이-53100 시에나 비아 피오렌티나 노바티스 백신즈</p> <p>(74) 대리인
송봉식, 정삼영</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 H5 인플루엔자 A 바이러스의 다수의 클레이드를 이용한 백신접종

(57) 요약

2003년부터 동물 및 인간으로부터 분리된 H5N1 인플루엔자 바이러스는 헤마글루티닌 아미노산 서열에 기반하여 별개의 클레이드로 분류된다. 본 발명에 따르면, 다수의 클레이드를 인플루엔자 면역화에 사용한다. 따라서 프라임-부스트 면역화 계획이 존재하며, 이때 피험체는 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드의 프라이밍 용량 및 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드의 부스팅 용량을 투여 받는다. 또한 H5 인플루엔자 A 바이러스의 하나 이상의 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물이 존재한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/11 (2013.01)

C07K 14/115 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로 면역화된 환자를 면역화하기 위한 조성물로서, 조성물은 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하고, 제1 클레이드와 제2 클레이드는 서로 상이하고, 조성물 중 하나 또는 두 개 모두는 보조제 첨가된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

(i) 피험체에 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계, 및 그 후 (ii) 피험체에 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의하여, 인플루엔자 바이러스에 대하여 환자를 면역화하기 위한 조성물로서, 제1 클레이드와 제2 클레이드는 서로 상이하고, 면역원성 조성물 중 하나 또는 두 개 모두는 인플루엔자 A 바이러스 뉴라미니다아제 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

인플루엔자 바이러스에 대하여 환자를 면역화하기 위한 조성물로서, 조성물은 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하고, 환자는 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 이전에 투여받았고, 제1 클레이드와 제2 클레이드는 서로 상이하고, 제2 클레이드 항원을 포함하는 조성물은 보조제 첨가되고 및/또는 인플루엔자 A 바이러스 뉴라미니다아제 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

(i) 피험체에 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계, 및 그 후 (ii) 피험체에 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의하여, 인플루엔자 바이러스에 대하여 환자를 면역화하기 위한 조성물로서, 제1 클레이드와 제2 클레이드는 서로 상이하고, 제1 클레이드는 클레이드 0이 아닌 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

(i) 피험체에 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계, 및 그 후 (ii) 피험체에 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의하여, 인플루엔자 바이러스에 대하여 환자를 면역화하기 위한 조성물로서, 제1 클레이드와 제2 클레이드는 서로 상이하고, 조성물 중 하나 또는 두개 모두는 용량 당 $\leq 15\mu\text{g}$ 의 H5 헤마글루티닌을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 클레이드는 클레이드 1이고 제2 클레이드는 클레이드 2인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 클레이드는 클레이드 2이고 제2 클레이드는 클레이드 1인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 클레이드는 클레이드 1이고 제2 클레이드는 클레이드 2가 아닌 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 클레이드는 클레이드 2이고 제2 클레이드는 클레이드 1이 아닌 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물 중 적어도 하나는 분할 비리온 바이러스인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물 중 적어도 하나는 인플루엔자 A 바이러스 뉴라미니다아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 클레이드 항원을 포함하는 조성물은 보조제 첨가된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 클레이드 항원을 포함하는 조성물은 보조제 첨가된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 클레이드 항원을 포함하는 조성물은 보조제 첨가되고 제2 클레이드 항원을 포함하는 조성물은 보조제 첨가된 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 특허 출원은 2007년 11월 26일에 출원된 미국 가출원 61/004334 및 2008년 6월 5일에 출원된 영국 특허 출원 0810305.3의 이익을 주장하며, 이들의 내용은 본원에 전체로 포함된다.

[0002] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 감염에 대하여 보호하기 위한, 특히 인플루엔자 유행병에 대하여 보호하기 위한 백신의 분야에 있다.

배경 기술

[0003] 백신에 사용하기 위한 인플루엔자 바이러스 균주는 계절마다 변화한다. 수년동안, 백신은 통상적으로 두개의 인플루엔자 A 균주(H1N1 및 H3N2) 및 하나의 인플루엔자 B 균주를 포함하였다. '항원소변이'를 다루기 위해서, 백신접종에 사용되는 정확한 균주는 매년 변화한다.

[0004] 항원소변이 보다 더욱 관심사항 중 하나는 '항원대변이'이며, 유행하는 인플루엔자 A 바이러스의 아형이 H1N1 및 H3N2으로부터 변화한다. 특히, 인플루엔자 A 바이러스의 H5 아형이 가까운 미래에 유행하게 될 수 있다는 것이 예상된다. 인간 집단이 새로운 헤마글루티닌 아형에 면역적으로 미경험이기 때문에, 이 항원대변이는 인플루엔자 감염의 유행 발생을 초래할 것이다. 유행 발생을 초래하는 잠재성을 부여하는 인플루엔자 균주의 특징은: (a) 현재 순환하는 인간 균주에서 헤마글루티닌에 비하여 새로운 헤마글루티닌, 즉 십년 동안 인간 집단에서 명백하지 않았거나, 또는 이전에 인간 집단에서 전혀 발견된 적이 없는 것을 함유; (b) 인간 집단에서 수평적으로 전달될 수 있음; 그리고 (c) 인간에게 병원성이라는 것이다.

[0005] H5 균주에 의해 유발되는 인플루엔자 유행에 대한 준비에서, 유행전 면역화 전략을 사용하는 것이 제안되었다 [1]. 환자들은 유행병이 발생할 때 동시에 발생할 수 있는 임의의 항원소변이에도 불구하고 얻어진 면역성이 유용할 것이라 희망을 가지고 현재 H5 균주(조류로부터)로 면역화된다.

[0006] 2006년 10월에, 사노피 파스퇴르는 그것의 후보 유행전 백신에 대한 결과를 발표하였으며, 다양한 항원 용량의

로 보조제 첨가된 형태 및 보조제 첨가되지 않은 형태로 테스트하였다. 2006년 11월에 노바티스 백신은 보조제 첨가된 유행전 백신에 대하여 유럽 규제 승인을 제출하였다는 것을 발표하였다. 2007년 6월에 GlaxoSmithKline은 H5N1 보조제 첨가된 유행전 백신 5천만 용량을 WHO에 기부하겠다는 의향을 발표하였으며, 2008년 2월에 그것의 PREPANDRIX™ 제품이 EMEA의 인체 의약품 위원회로부터 긍정적인 의견을 수신하였다. 3가지 제품 모두 H5N1/A/Vietnam/1194/04 균주에 기반하였다.

발명의 내용

- [0007] 2003년부터 동물 및 인간으로부터 분리된 H5N1 바이러스는 헤마글루티닌 아미노산 서열에 기반하여 밀접하게 관련된 바이러스의 다수의 별개의 클레이드(유전자 그룹)로 분류된다. H5N1/A/Vietnam/ 1194/04 균주는 클레이드 1로 분류된다.
- [0008] 본 발명에 따르면, 다수의 클레이드가 인플루엔자 면역화에 사용된다.
- [0009] 본 발명의 제1 양태에서, 프라이밍-부스터 면역화 계획이 사용되는데, 이때 피험체는 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드의 프라이밍 용량 및 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드의 부스팅 용량을 투여받는다. 예컨대, 환자는 클레이드 1 항원으로 프라이밍되고 클레이드 2로 부스팅될 수 있으며, 그 반대도 마찬가지이다.
- [0010] 유사하게, 부스터 면역화는 상이한 클레이드(예컨대 클레이드 2)로부터의 H5 백신을 사용함으로써 제1 클레이드(예컨대 클레이드 1)로부터의 H5 백신을 이미 투여받은 환자에게 제공될 수 있다. 환자는 대개 제1 클레이드 백신의 완전한 1차 과정(예컨대 2 용량)을 투여받았을 것이다.
- [0011] 제2 양태에서, 면역원성 조성물은 H5 인플루엔자 A 바이러스의 다수의 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함할 수 있으며, 다수의 H5 클레이드에 대하여 동시 면역화를 가능하게 한다.
- [0012] 따라서 본 발명은 (i) 피험체에게 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계, 및 그 후 (ii) 피험체에게 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 제1 클레이드와 제2 클레이드는 서로 상이한 인플루엔자 바이러스에 대하여 환자를 면역화하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 피험체에게 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 환자는 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 이전에 투여받았고, 제1 클레이드와 제2 클레이드는 서로 상이한 인플루엔자 바이러스에 대하여 환자를 면역화하는 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 H5 인플루엔자 A 바이러스의 하나 이상의 클레이드(예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6 상이한 클레이드)로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 H5 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 두개의 균주(예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6 상이한 균주)로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 이때 제1 H5 균주와 제2 H5 균주는 상이한 클레이드이다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1 및 2는 참고문헌 3 및 189에서 발체한 H5 균주의 계통 트리를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] **H5 클레이드**
- [0018] 본원에 사용되는 바이러스의 헤마글루티닌 항원은 H5 아형으로 분류되지만, H5 아형 내에서 이들은 상이한 클레이드로 분류된다.
- [0019] 조류 종을 순환하는 대다수의 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 (HA) 서열은 2003년 이후로 별개의 계통적 클레이드로 분류된다. 캄보디아, 태국 및 베트남에서 순환하는 클레이드 1 바이러스는 2004년 및 2005년에 이들 나라에서, 그리고 2006년에 태국에서 사람 감염의 원인이었다. 클레이드 2 바이러스는 2003년 이후 중국 및 인도네시아에서 조류에서 순환하였으며; 이들은 2005년 및 2006년 동안에 중동, 유럽 및 아프리카로 서쪽으로 전파되었다. 2005년 후반 이후, 클레이드 2 바이러스는 사람 감염의 주요 원인이었다. 클레이드 2의 다수의 서브클레이드는 지리적 분포가 다른 3가지 - 서브클레이드 1, 2 및 3 (도 1)로 구별되며, 지금까지 인간 병증에 주요 원

인이었다.

[0020] 2006년 8월 및 2007년 3월 사이에, 조류 중에서 순환을 계속하거나 재출현하였고 아프리카, 아시아 및 유럽에서 산발적 인간 감염과 관련된 대부분의 H5N1 바이러스의 HA 서열은 이전에 설계된 계통적 클레이드 및 서브클레이드로 분류된다. 클레이드 1 바이러스는 태국 및 베트남에서 새에서의 발병 및 태국에서 인간 감염의 원인이었다. 클레이드 2.1 바이러스는 가금류에서의 순환을 지속하며 인도네시아에서 인간 감염을 유발한다. 클레이드 2.2 바이러스는 아프리카, 아시아 및 유럽의 일부 국가에서 새에서 발병을 유발하였으며, 이집트, 이라크 및 나이지리아에서 인간 감염과 연관되어 왔다. 클레이드 2.3 바이러스는 아시아에서 산발적으로 분리되었고 중국 및 라오스에서 인간 감염의 원인이었다.

[0021] 또한, 이들 분류 이외의 약간의 바이러스들이 아시아에서 국한된 발병 동안 가축 가금류로부터 분리되었다. 이들은 A/goose/Guizhou/337/2006 (클레이드 4) 및 A/chicken/Shanxi/2/2006 (클레이드 7)으로 표시되는 신종 클레이드로 분류된다. 0에서 9로 번호가 매겨진 총 10개 클레이드가 현재 정의되어 있다.

[0022] 본원에서 참조를 위해, 각 클레이드에 대한 원형 균주는 그들의 헤마글루티닌 유전자의 암호화 서열과 함께 다음과 같다:

클레이드	균주	SEQ ID NO
1	A/HongKong/213/03	1
2	A/Indonesia/5/05	2
3	A/Chicken/Hong Kong/SF219/01	3
4	A/chicken/Guizhou/441/2006	4
5	A/duck/Guangxi/1681/2004	5
6	A/tree sparrow/Henan/4/2004	6
7	A/chicken/Shanxi/2/2006	7
8	A/Chicken/Henan/12/2004	8
9	A/duck/Guangxi/2775/2005	9
0	A/Hong Kong/156/97	10

[0023]

[0024] 본원에서 클레이드 1 H5 바이러스는 PhyIP 패키지에서 수행되는 DNADIST 알고리즘을 사용하여 평가하였을 때 [2](예컨대 Kimura 2-파라미터 간격 및 정방 행렬 사용), 계통적 관점에서 클레이드 0 및 2 내지 9 (SEQ ID NO: 2 내지 10) 중 어느 것으로부터의 암호화 서열보다 A/HongKong/213/03 균주 (SEQ ID NO: 1)로부터의 암호화 서열에 더욱 밀접하게 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 인플루엔자 A 바이러스로서 정의될 수 있다. 유사하게, 클레이드 2 바이러스는 클레이드 0, 1 및 3 내지 9 (SEQ ID NO: 1 및 3 내지 10) 중 어느 것으로부터의 암호화 서열보다 A/Indonesia/5/05 균주 (SEQ ID NO: 2)로부터의 암호화 서열에 더욱 밀접하게 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는다. 다른 클레이드는 유사하게 SEQ ID NO: 1 내지 10 중의 다른 서열보다 SEQ ID NO: 1 내지 10로부터의 관련 암호화 서열에 더욱 밀접하게 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열로 정의된다.

[0025] 본원에서 클레이드 1 바이러스는 핵산 서열 관점에서 SEQ ID NO: 2 내지 10 중 어느 것 보다 A/HongKong/213/03 균주 (SEQ ID NO: 1)에 대하여 더 큰 서열 동일성을 갖는 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 인플루엔자 A 바이러스로서 정의될 수 있다. 다른 클레이드는 유사하게 SEQ ID NO: 1 내지 10 중의 다른 서열보다 SEQ ID NO: 1 내지 10로부터의 관련 암호화 서열에 더욱 밀접하게 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열로 정의된다.

[0026] H5 바이러스는 본원에서 특징적인 HA 돌연변이와 관련하여 아미노산 서열 관점에서 특정 클레이드인 것으로서 정의될 수 있다 [3]. 예컨대, 클레이드 3 바이러스는 클레이드 1 및 2와 별개인 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상을 가질 수 있다: Asn-45; Ser-84; Asn-94; Asn-124; Leu-138; Ser-144; Glu-212; Ser-223; 및/또는 Arg-325. 클레이드 2 바이러스는 클레이드 1 및 3에서 보이지 않는 Asp-124를 가질 수 있다. 클레이드 1 바이러스는 클레이드 2 및 3과 별개인 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상을 가질 수 있다: Ser-124; Leu-129.

[0027] 클레이드 2 내에서, 적어도 3개의 서브클레이드가 인식된다: 2.1, 2.2 및 2.3(도 1). 클레이드 2.1 H5 바이러스는 본원에서 계통적 관점에서 A/Anhui/1/2005 균주 (SEQ ID NO: 11) 또는 A/turkey/Turkey/1/05 (SEQ ID NO: 12) 보다 A/Indonesia/5/05 균주 (SEQ ID NO: 2)에 더욱 밀접하게 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 것으로 정의될 수 있다. 유사하게, 클레이드 2.2 H5 바이러스는 본원에서 계통적 관점에서 A/Anhui/1/2005 (SEQ

ID NO: 11) 또는 A/Indonesia/5/05 균주 (SEQ ID NO: 2) 보다 A/turkey/Turkey/1/05 균주 (SEQ ID NO: 12)에 더욱 밀접하게 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 것으로서 정의될 수 있다. 마지막으로, 클레이드 2.3 H5 바이러스는 본원에서 계통적 관점에서 A/turkey/Turkey/1/05 (SEQ ID NO: 12) 또는 A/Indonesia/5/05 균주 (SEQ ID NO: 2) 보다 A/Anhui/1/05 균주 (SEQ ID NO: 11)에 더욱 밀접하게 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 것으로서 정의될 수 있다.

[0028] 일부 실시형태에서, 서브클레이드 2.2 중의 균주는 하기 서열 중 하나 이상을 포함하는 HA를 가질 수 있다: Ile-223; Ile-230; Ser-294; Ile-517; ΔSer-133; 서열 REGRRRKR(SEQ ID NO: 13)을 갖는 절단 부위; 서열 GERRRRKR (SEQ ID NO: 16)을 갖는 절단 부위. HA 유전자는 뉴클레오타이드: A-41; A-142; A-209; A-295; G-433; A-467; A-496; C-610; A-627; A-643; C-658; T-661; T-689; T-727; A-754; G-880; C-937; G-1006; T-1012; A-1019; T-1177; A-1235; T-1402; C-1415; T-1480; C-1510; T-1614; C-1615; A-1672; G-1708 (이들 중 어느 것은 관련 코돈에 대하여 암호화된 아미노산을 변경할 수 있거나 그렇지 않을 수 있음) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. NA 유전자는 뉴클레오타이드 A-743을 포함할 수 있으며, 이것은 관련 코돈에 대하여 암호화된 아미노산을 변화시키지 않을 것이다.

[0029] 본 발명의 일부 실시형태에서, 프라이밍 항원 및/또는 부스팅 항원은 클레이드 0으로부터가 아니고, 예컨대 균주 A/Hong Kong/156/97로부터가 아니다. 예컨대, 제2 항원이 클레이드 1(예컨대 A/Vietnam/1203/2004)로부터이면, 제1 항원은 클레이드 0(예컨대 A/Hong Kong/156/97)으로부터가 아닌 것이 바람직하다.

[0030] 클레이드 조합

[0031] 본 발명은 면역화를 위한 하나 이상의 H5 클레이드로부터 유래한 항원을 사용한다.

[0032] 예컨대, 환자는 제1 클레이드 중의 H5 바이러스로부터의 항원으로 프라이밍되지만, 그 다음 제2 클레이드 중의 H5 바이러스로부터의 항원으로 부스팅될 수 있다. 이 프라이밍/부스트 전략에서 유용한 클레이드 조합은 하기를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다:

프라이밍	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2.1	2.2	2.3
부스트	2	1	4	7	4	7	2.1	2.2	2.3	1	1	1

[0033]

[0034] 본 발명은 또한 제1 클레이드 중의 H5 바이러스로부터의 항원으로 미리 프라이밍된 환자를 위한 부스터 면역화를 제공하며, 이때 부스터는 제2 (상이한) 클레이드로부터 이다. 상기 조합은 또한 이 프라이밍/부스트 접근에 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명은 또한 적어도 두개의 상이한 클레이드 중의 H5 바이러스로부터의 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 두개의 클레이드의 유용한 조합은 하기를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다:

제1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
제2	2	3	4	5	6	7	8	9	4	7	2.1	2.2	2.3

[0036]

[0037] 인플루엔자 바이러스 항원

[0038] 본 발명에서 사용되는 백신은 H5 헤마글루티닌 아형을 갖는 인플루엔자 A 바이러스로부터의 항원을 포함한다. 백신은 적어도 하나의 H5 헤마글루티닌 에피토프를 포함하는 단백질을 포함할 것이며, 예컨대 백신은 H5 바이러스로부터의 바이러스 헤마글루티닌을 포함할 것이다.

[0039] 본 발명의 바람직한 백신은 또한 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 뉴라미니다아제 에피토프를 포함하는 단백질을 포함하며, 예컨대 백신은 H5 바이러스로부터의 바이러스 뉴라미니다아제를 포함할 것이다. 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 NA 아형 N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 또는 N9 중 하나 이상에 대하여 보호할 수 있지만, 이것은 대개 N1(즉 H5N1 바이러스) 또는 N3(즉 H5N3 바이러스)에 대하여 보호할 것이다. 제1 클레이드 및 제2 클레이드는 동일한 NA 아형(예컨대 모든 N1 또는 모든 N3) 또는 상이한 NA 아형(예컨대 N1 그 다음 N3, 또는 N3 그 다음 N1 등)을 가질 수 있다. 프라이밍 및 부스팅 용량 중 오직 하나만 뉴라미니다아제를 포함한다면, 이것은 프라이밍 용량일 수 있다.

[0040] 항원은 통상적으로 인플루엔자 비리온으로부터 제조될 것이지만, 대안적으로 헤마글루티닌 및 뉴라미니다아제와

같은 항원이 제조할 숙주로서 발현되고(예컨대 바클로바이러스 벡터를 사용하는 곤충 셀라인에서) 정제된 형태로 사용되거나 [4,5,6] 또는 바이러스-유사 입자의 형태일 수 있다(VLP; 예컨대 참고문헌 7 및 8 참조). 일반적으로, 그러나 항원은 비리온으로부터일 것이다.

[0041] 항원은 생 바이러스, 보다 바람직하게는 불활성화 바이러스의 형태를 취할 수 있다. 바이러스를 불활성화하기 위한 화학적 수단은 하기 제제 중 하나 이상의 유효량으로의 처리를 포함한다: 세척제, 포름알데히드, 포르말린, β -프로피오락톤 또는 UV광. 불활성화를 위한 추가의 화학적 수단은 메틸렌 블루, 프솔랄렌, 카르복시폴리린(C60) 또는 이들의 어떤 조합을 포함한다. 바이러스 불활성화의 다른 방법은 예컨대 이원 에틸아민, 아세틸 에틸렌아민 또는 감마 조사와 같이 기술분야에 알려져 있다.

[0042] 불활성화 바이러스를 사용하는 경우, 백신은 전체 비리온, 분할 비리온 또는 정제된 표면 항원(헤마글루티닌을 포함하고, 대개 뉴라미니다아제도 포함)을 포함할 수 있다. DARONRIX™ H5N1 제품은 전체 비리온 불활성화 백신이다. PREPANDRIX™ H5N1 제품은 분할 비리온 불활성화 백신이다. 분할 비리온 및 정제 표면 항원 (즉 서브 비리온 백신)이 특히 본 발명에 유용하다.

[0043] 비리온은 다양한 방법에 의해 바이러스-함유 액체로부터 수확될 수 있다. 예를 들어, 정제 공정은 비리온을 분해하기 위한 세척제를 포함하는 선형 수크로스 구배 용액을 사용하는 락스원심분리를 수반할 수 있다. 그 다음 항원은 선택적 회석 후에 정용여과에 의해 정제될 수 있다.

[0044] 분할 비리온은 비리온을 세척제(예컨대 에틸 에테르, 폴리소르베이트 80, 데옥시콜레이트, 트리-N-부틸 포스페이트, Triton X-100, Triton N101, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드, 터지톨 NP9 등)로 처리하여 서브비리온 제조물을 생성함으로써 얻어지며, 'Tween-ether' 분할 공정을 포함한다. 인플루엔자 바이러스를 분할하는 방법은 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대 참고문헌 9-14 등을 참조한다. 바이러스의 분할은 일반적으로 분할제의 분해 농도로 감염성이든지 비감염성이든지 전체 바이러스를 분해 또는 절편화함으로써 수행된다. 분해는 바이러스의 완전성을 변형하여 바이러스 단백질의 전체 또는 부분 용해화를 야기한다. 바람직한 분할제는 비이온성 및 이온성(예를 들어, 양이온성) 계면활성제, 예를 들어 알킬글리코시드, 알킬티오글리코시드, 아실, 당, 술포베타인, 베타인, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, N,N-디알킬-글루카미드, 헤카메그(Hecameg), 알킬페녹시-폴리에톡시에탄올, 4차 암모늄 화합물, 사르코실, CTAB(브롬화 세틸 트리메틸 암모늄), 트리-N-부틸 포스페이트, 세타블론(Cetavlon), 미리스틸트리메틸암모늄 염, 리포펙틴, 리포펙타민, 및 DOT-MA, 옥틸- 또는 노닐-페녹시 폴리옥시에탄올 (예를 들어, Triton X-100 또는 Triton N101과 같은 Triton 계면활성제), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(Tween 계면활성제), 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴리옥시에틸렌 에스테르 등이다. 한가지 유용한 분할 과정은 데옥시콜레이트 나트륨 및 포름알데히드의 연속 작용을 사용하고, 분할은 초기 비리온 정제 동안 (예를 들어, 수크로오스 밀도 구배 용액에서) 일어날 수 있다. 따라서 분할 과정은 비리온-함유 재료의 정화(비-비리온 재료를 제거하기 위해), 수확한 비리온의 농축(예컨대 CaHPO_4 흡착과 같은 흡착 방법 사용), 비-비리온 재료로부터 전체 비리온의 분리, 밀도 구배 원심분리 단계에서 분할제를 사용하여 비리온의 분할(예컨대 소듐 데옥시콜레이트와 같은 분할제를 함유하는 수크로스 구배 사용), 및 그 다음 여과(예컨대 한외여과)하여 원하지 않는 물질 제거를 포함할 수 있다. 분할 비리온은 소듐 포스페이트-완충 등장성 소듐 클로라이드 용액에 유용하게 재현탁될 수 있다. BEGPJVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ 및 FLUSHIELD™ 제품은 분할 백신이다.

[0045] 정제된 표면 항원 백신은 인플루엔자 표면 항원 헤마글루티닌 및 통상적으로 또한 뉴라미니다아제를 포함한다. 이들 정제 형태의 단백질 제조를 위한 공정은 잘 알려져 있다. FLUVIRIN™, AGRIPPAL™, FOCETRIA™ 및 INFLUVAC™ 제품은 서브유닛 백신이다.

[0046] 인플루엔자 항원은 또한 INFLEXAL V™ 및 INVAVAC™ 제품과 같이 비로솜의 형태로 존재할 수 있지만 [15] (핵산이 없는 바이러스-유사 리포솜 입자), 본 발명과 함께 비로솜을 사용하지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 일부 실시형태에서, 인플루엔자 항원은 비로솜의 형태가 아니다.

[0047] 바이러스가 제조되는 균주는 통상적으로 조류 인플루엔자 바이러스 또는 인간 인플루엔자 바이러스일 것이다. 대개 이것은 인간을 감염시킬 수 있지만, 일부 경우 인간을 감염시킬 수 없는 균주, 예컨대 인간을 감염시키는 능력을 나중에 획득할 수 있는 조류 균주를 사용할 수 있다. 균주는 HPAI (고도의 병원성 조류 인플루엔자) 균주일 수 있다 [16].

[0048] 인플루엔자 바이러스는 약독화될 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 온도에 민감할 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 냉적응될 수 있다. 그러나 이들 세가지 특징은 항원으로서 생 바이러스를 사용할 때 특히 유용하다.

[0049] 인플루엔자 바이러스는 항바이러스 요법에 내성이 있을 수 있다(예컨대 오셀타미비르 [17] 및/또는 자나미비르

에 내성).

- [0050] 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 H5 균주로부터의 항원을 포함한다면 인플루엔자 A 바이러스 및/또는 인플루엔자 B 바이러스를 포함하여 하나 이상(예컨대 1, 2, 3, 4 또는 그 이상) 인플루엔자 바이러스 균주로부터의 항원(들)을 포함할 수 있다. 따라서 조성물은 보통의 계절 백신을 특징으로 하는 하나 이상의 균주 플러스 적어도 하나의 H5 균주로부터의 항원을 포함할 수 있으며, 예컨대 3개의 인플루엔자 A 균주(H1N1 및 H3N2, 플러스 H5 균주, 예컨대 H5N1) 및 하나의 인플루엔자 B 균주를 갖는 4-가 백신이다. 다른 실시형태에서 적어도 2개의 H5 균주, 및 선택적으로 H1 균주 및/또는 H3 균주 및/또는 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터의 항원을 포함할 수 있다. 백신이 하나 이상의 인플루엔자 균주를 포함하는 경우, 상이한 균주는 통상적으로 분리하여 성장하고 바이러스를 수확하고 항원을 제조한 후 혼합된다. 따라서 본 발명의 과정은 하나 이상의 인플루엔자 균주로부터의 항원을 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0051] 인플루엔자 바이러스는 재배열 균주일 수 있고, 역유전학 기술에 의해 얻을 수 있다. 역유전학 기술[예컨대 18-22]은 플라스미드를 사용하여 원하는 게놈 분절을 갖는 인플루엔자 바이러스를 시험관내 제조하게 할 수 있다. 통상적으로, 이것은 (a) 예컨대 polI 프로모터로부터 원하는 바이러스 RNA 분자를 암호화하는 DNA 분자 및 (b) 예컨대 polII 프로모터로부터 바이러스 단백질을 암호화하는 DNA 분자를 발현하는 것을 포함하고, 따라서 세포에서 두 종류의 DNA 발현은 완전한 무손상 감염성 비리온의 조립을 유도한다. DNA는 바람직하게는 바이러스성 RNA 및 단백질의 모두를 제공하지만, 헬퍼 바이러스를 사용하여 RNA 및 단백질 중 일부를 제공할 수도 있다. 각 바이러스성 RNA를 제조하기 위해 분리된 플라스미드를 사용하는 플라스미드-기반 방법이 바람직하고 [23-25], 이들 방법은 또한 바이러스성 단백질의 전부 또는 일부(예컨대 단지 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질)를 발현하기 위한 플라스미드의 사용을 포함할 것이며, 일부 방법에서는 최대 12개 플라스미드가 사용된다. 개(canine)의 세포를 사용하는 경우, 개의 polI 프로모터를 사용할 수 있다 [26].
- [0052] 필요로 되는 플라스미드의 수를 감소시키기 위해, 한가지 접근[27]은 동일한 플라스미드(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 모든 8 인플루엔자 A vRNA 단편을 암호화하는 서열) 상에서 복수의 RNA 중합효소 I 전사 카세트(바이러스 RNA 합성을 위함), 및 다른 플라스미드(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 모든 8 인플루엔자 A mRNA 전사를 암호화하는 서열) 상에서 RNA 중합효소 II 프로모터를 갖는 복수의 단백질-암호화 영역을 조합한다. 참고문헌 27 방법의 바람직한 양태는 다음을 수반한다: (a) 단일 플라스미드 상의 PB1, PB2 및 PA mRNA-암호화 영역; 및 (b) 단일 플라스미드 상의 모든 8개 vRNA-암호화 단편. 한 개의 플라스미드 상에 NA 및 HA 단편을 포함하는 것 및 다른 플라스미드 상에 6개의 다른 단편을 포함하는 것은 또한 문제를 용이하게 할 수 있다.
- [0053] 바이러스 RNA 단편을 암호화하기 위해 polI 프로모터를 사용하는 것의 대안으로서, 박테리오파지 중합효소 프로모터를 사용하는 것이 가능하다[28]. 예를 들어, SP6, T3 또는 T7 중합효소에 대한 프로모터가 편리하게 사용될 수 있다. polI 프로모터의 종-특이성 때문에, 비록 세포가 또한 외인성 중합효소를 암호화하는 플라스미드로 트랜스펙션되어야 하더라도 박테리오파지 중합효소 프로모터는 많은 세포 형태(예를 들어, MDCK)에 대해 더욱 편리할 수 있다.
- [0054] 다른 기술에서, 바이러스 RNA 및 단일 주형으로부터의 발현가능한 mRNA를 동시에 암호화하기 위해 이중 polI 및 polII 프로모터를 사용하는 것이 가능하다[29,30].
- [0055] 인플루엔자 A 바이러스는 특히 바이러스가 난에서 성장한 경우 A/PR/8/34 바이러스로부터 하나 이상의 RNA 단편(일반적으로 A/PR/8/34로부터 6개의 단편, HA 및 N 단편은 백신 균주로부터 유래함, 즉 6:2 재배열)을 포함할 수 있다. 이는 또한 A/WSN/33 바이러스로부터, 또는 백신 제조를 위한 재배열 바이러스를 발생시키는데 유용한 다른 바이러스 균주로부터 하나 이상의 RNA 단편을 포함할 수도 있다. 일반적으로, 본 발명은 인간 대 인간 전염이 가능한 균주에 대해 보호하고, 따라서 균주의 게놈은 보통 포유동물(예를 들어, 인간) 인플루엔자 바이러스에서 기원하는 적어도 하나의 RNA 단편을 포함할 것이다. 이는 조류 인플루엔자 바이러스에서 기원된 NS 단편을 포함할 수 있다.
- [0056] 항원의 공급원으로서 사용되는 바이러스는 난 또는 세포 배양액에서 성장할 수 있다. 현재 인플루엔자 바이러스 성장을 위한 표준 방법은 무균(SPF) 자충포장란을 사용하고, 바이러스는 난 성분(요막액)으로부터 정제된다. 더욱 최근에는 그러나 바이러스가 속도 및 환자 알리지 때문에 동물 세포 배양액에서 성장하였으며, 이 성장 방법이 바람직하다. 만약 난-기반 바이러스 성장을 사용한다면 하나 이상의 아미노산이 바이러스와 함께 난의 요막액으로 도입될 수 있다 [14].

- [0057] 세포 배양액을 사용하는 경우, 바이러스 성장 기질은 일반적으로 포유동물 기원의 셀라인일 것이다. 적합한 포유동물 기원의 세포는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 햄스터, 소, 영장류(인간 및 원숭이를 포함), 및 개의 세포를 포함한다. 신장 세포, 섬유아세포, 망막 세포, 폐 세포 등과 같은 다양한 세포 형태가 사용될 수 있다. 적당한 햄스터 세포의 예는 명칭 BHK21 또는 HKCC를 갖는 셀라인이다. 적당한 원숭이 세포는 예를 들어, 베로(Vero) 셀라인에서와 같이 신장 세포와 같은 아프리카 그린 원숭이 세포이다. 적당한 개의 세포는, 예를 들어, MDCK 셀라인에서와 같이 신장 세포이다. 따라서 적당한 셀라인은, 이에 제한되는 것은 아니지만: MDCK; CHO; 293T; BHK; 베로; MRC-5; PER.C6; WI-38; 등을 포함한다. 성장 인플루엔자 바이러스에 대한 바람직한 포유동물 셀라인은: 개의 원위세뇨관(Madin Darby canine kidney)으로부터 유래한 MDCK 세포 [31-34]; 아프리카 그린 원숭이(*Cercopithecus aethiops*) 신장으로부터 유래한 베로 세포[35-37]; 또는 인간 배아 망막아세포로부터 유래한 PER.C6 세포 [38]를 포함한다. 이들 셀라인은, 예를 들어, American Type Cell Culture(ATCC) collection, Coriell Cell Repositories, 또는 European Collection of Cell Cultures(ECACC)으로부터 널리 이용가능하다. 예를 들어, ATCC는 카탈로그 넘버 CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 및 CRL-1587 하에서 다양한 상이한 베로 세포를 공급하고, 이는 카탈로그 넘버 CCL-34 하에서 MDCK 세포를 공급한다. PER.C6는 기탁 번호 96022940하에 ECACC로부터 이용가능하다. 포유동물 셀라인에 대한 덜 바람직한 대안으로서, 바이러스는 오리(예를 들어, 오리 망막)로부터 유래한 셀라인을 포함하여 조류 셀라인에서 성장할 수 있다 [예컨대 참고문헌 39-41]. 조류 셀라인의 예는 조류 배아 줄기 세포[39,42] 및 오리 망막 세포[40]를 포함한다. 적합한 조류 배아 줄기 세포는 닭 배아 줄기 세포로부터 유래하는 EBx 셀라인, EB45, EB14, 및 EB14-074를 포함한다[43]. 닭 배아 섬유아세포(CEF)도 사용할 수 있다.
- [0058] 인플루엔자 바이러스 성장에 가장 바람직한 셀라인은 MDCK 셀라인이다. 본래의 MDCK 셀라인은 CCL-34로서 ATCC로부터 이용가능하지만, 이 셀라인의 유도체가 사용될 수도 있다. 예를 들어, 참고문헌 31은 현탁 배양액 내 성장에 적합하게 된 MDCK 셀라인을 개시한다(DSM ACC 2219로서 기탁된 'MDCK 33016'). 유사하게, 참고문헌 44는 무혈청 배양액 내 현탁액에서 성장하는 MDCK-유래 셀라인을 개시한다(FERM BP-7449로서 기탁된 'B-702'). 참고문헌 45는 'MDCK-S'(ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101'(ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102'(ATCC PTA-6502) 및 'MDCK-SF103'(PTA-6503)를 포함하는 비발암성의 MDCK 세포를 개시한다. 참고문헌 46은 'MDCK.5F1' 세포(ATCC CRL-12042)를 포함하는 감염에 대해 고민감성을 갖는 MDCK 셀라인을 개시한다. 이들 MDCK 셀라인 중 어떤 것이 사용될 수 있다.
- [0059] 바이러스가 포유동물 셀라인에서 성장한 경우 조성물은 난 단백질(예컨대 오보알부민 및 오보뮤코이드) 및 닭 DNA가 없어 유리할 것이며, 이로써 알레르기 유발성이 감소한다.
- [0060] 바이러스가 셀라인에서 성장하는 경우 성장을 위한 배양액, 및 또한 배양을 시작하는데 사용되는 바이러스 접종은, 바람직하게는 단순 포진 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 3, SARS 코로나바이러스, 아데노바이러스, 리노바이러스, 레오바이러스, 폴리오마바이러스, 비르나바이러스, 시르코바이러스, 및/또는 파르보바이러스가 부재할 것이다(즉 이들에 의한 오염을 테스트하면 음성 결과가 얻어질 것이다)[47]. 단순 포진 바이러스의 부재가 특히 바람직하다.
- [0061] MDCK 세포와 같은 셀라인에서의 성장을 위해서, 바이러스는 현탁액[48-50] 또는 부착성 배양액에서 세포 상에서 성장할 수도 있다. 현탁액 배양을 위한 한가지 적절한 MDCK 셀라인은 MDCK 33016 (DSM ACC 2219로서 기탁됨)이다. 대안으로서, 마이크로담체 배양이 사용될 수 있다.
- [0062] 인플루엔자 바이러스 복제를 지원하는 셀라인은 바람직하게는 무혈청 배양 배지 및/또는 무단백질 배지에서 성장된다. 본 발명의 내용에서 배지는 인간 또는 동물 기원의 혈청으로부터 어떤 첨가물도 없는 무혈청 배지를 말한다. 무단백질은 단백질, 성장인자, 다른 단백질 첨가물 및 무혈청 단백질을 배제한 상태에서 세포의 증식이 일어나는 배양액을 의미하는 것으로 이해되며, 이것은 바이러스 성장에 필요할 수 있는 트립신 또는 다른 프로테아제와 같은 단백질을 선택적으로 포함할 수 있다. 이러한 배양액에서 성장하는 세포는 단백질 자체를 자연적으로 함유한다.
- [0063] 인플루엔자 바이러스 복제를 지원하는 셀라인은 바이러스 복제 동안 바람직하게는 37°C 이하[51], 예를 들어 30-36°C에서 성장한다.
- [0064] 배양된 세포에서 바이러스를 증식하는 방법은 일반적으로 배양된 세포를 배양될 균주로 접종하는 단계, 예를 들어 바이러스 역가 또는 항원 발현에 의하여 측정된 바이러스 증식을 위한 소망하는 시간(예를 들어, 접종 후 24 내지 168 시간) 기간 동안 감염된 세포를 배양하는 단계 및 증식된 바이러스를 수거하는 단계를 포함한다. 배양

된 세포는 바이러스(PFU 또는 TCID₅₀으로 측정)와 함께, 세포비가 1:500 내지 1:1, 바람직하게는 1:100 내지 1:5, 더 바람직하게는 1:50 내지 1:10이 되도록 접종할 수 있다. 바이러스는 세포의 현탁액에 첨가되거나 또는 세포의 단일층에 도포될 수 있으며, 바이러스는 25℃ 내지 40℃에서, 바람직하게는 28℃ 내지 37℃에서 적어도 60분 동안, 그러나 보통 300분 미만으로, 바람직하게는 90 내지 240분 동안 세포 상에서 흡수된다. 감염된 세포 배양물(예컨대 단일층)은 냉동-해동법 또는 수확된 배양 상청액의 바이러스 함량을 증가시키는 효소 작용에 의하여 제거될 수 있다. 수확된 유체를 불활성화 또는 냉동 저장한다. 배양된 세포는 감염다중도 ("m.o.i.") 약 0.0001 내지 10, 바람직하게는 0.002 내지 5, 더 바람직하게는 0.001 내지 2로 감염될 수 있다. 더욱 더 바람직하게는, 세포는 m.o.i가 약 0.01로 감염된다. 감염된 세포는 감염의 30 내지 60 시간 후 수확된다. 바람직하게는, 세포는 감염의 34 내지 48 시간 후 수확된다. 더욱 더 바람직하게는, 세포는 감염의 38 내지 40 시간 후 수확된다. 프로테아제(일반적으로 트립신)는 일반적으로 세포 배양 중에 첨가되어 바이러스 방출이 되도록 하며, 프로테아제는 배양 중 임의의 적합한 단계에서 첨가될 수 있다.

[0065] 헤마글루티닌(HA)은 불활성화 인플루엔자 백신에서 주요 면역원이며, 백신 용량은 HA 수준을 참조하여 표준화되고, 통상적으로 일원 방사 면역확산(SRID) 분석에 의해 측정된다. 어린이 또는 유행 상황에서는 더 낮은 투약량을 사용할 수 있지만, 현존하는 백신은 일반적으로 균주 당 약 15 μ g의 HA를 함유한다. 더 높은 용량을 가짐에 따라(예를 들어, 3x 또는 9x 용량 [54,55]) $^{1/2}$ (즉, 균주 당 7.5 μ g HA FOCETRIA™), $^{1/4}$ (즉 균주 당 3.75 μ g, PREPANDRIX™) 및 $^{1/8}$ 과 같은 분할 용량이 사용되어 왔다[52,53]. 따라서, 백신은 인플루엔자 균주 당 0.1 내지 150 μ g의 HA, 바람직하게는 0.1 내지 50 μ g, 예컨대, 0.1-20 μ g, 0.1-15 μ g, 0.1-10 μ g, 0.1-7.5 μ g, 0.5-5 μ g 등을 포함할 수 있다. 특정 용량은, 균주 당 예컨대 약 45, 약 30, 약 15, 약 10, 약 7.5, 약 5, 약 3.8, 약 3.75, 약 1.9, 약 1.5 등을 포함한다. 균주 당 동일한 HA 질량이 일반적이다. 상이한 H5 클레이드 중의 균주로부터 HA를 포함하는 조성물에 대하여, 균주 당 3.75 μ g, 7.5 μ g 또는 15 μ g를 포함하는 것이 유용하다 (예컨대 2 x 3.75 μ g, 통상적으로 수증 스쿠알렌 에멀전과 같은 보조제와 조합하여 총 7.5 μ g HA 제공). 본 발명과 같이 백신에 보조제가 존재하는 경우 더 적은 용량(즉 <15 μ g/용량)이 가장 유용하다. 90 μ g으로 높은 용량이 일부 연구에서 사용되었지만(예컨대 참고문헌 56), 본 발명의 조성물(특히 부스팅 용량)은 대개 15 μ g/용량 이하를 포함할 것이다.

[0066] 생 백신에 대하여, 용량은 HA 함량보다는 중간 조직 배양 감염성 용량(TCED₅₀)에 의해 측정되고, 균주 당 10⁶ 내지 10⁸ (바람직하게는 10^{6.5}-10^{7.5})의 TCID₅₀이 통상적이다.

[0067] 본 발명에서 사용된 HA는 바이러스에서 발견되는 것과 같은 천연 HA일 수 있고, 또는 변형된 것일 수도 있다. 예를 들어, 이것은 HA를 변형시켜서 조류 중에서 고도의 병원성인 바이러스를 유발하는 결정소(예를 들어, HA1과 HA2 사이의 절단 지점 주변과 같은 하이퍼 베이직 영역)를 제거하는 것으로 알려져 있는데, 이들 결정소는 바이러스가 난에서 성장하는 것을 달리 방지할 수 있기 때문이다.

[0068] 본 발명의 조성물은 특히 분할 또는 표면 항원 백신을 위해서 세척제, 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제('Tweens'으로 알려짐, 예컨대 폴리소르베이트 80), 옥토시놀(예컨대 옥토시놀-9(Triton X-100) 또는 10, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올), 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드('CTAB'), 또는 소듐 데옥시콜레이트를 포함할 수 있다. 세척제는 미량으로만 존재할 수 있다. 따라서 백신은 1mg/ml 미만의 옥토시놀-10, α -토코페릴 수소 숙시네이트 및 폴리소르베이트 80 각각을 포함할 수 있다. 다른 미량의 나머지 성분들은 항생물질을 포함할 수 있다(예컨대 네오마이신, 카나마이신, 폴리믹신 B).

[0069] 숙주 세포 DNA

[0070] 바이러스가 셀라인 상에서 성장하는 경우, DNA의 어떤 발암 활성을 최소화하기 위하여, 최종 백신 내의 잔류 셀라인 DNA의 양을 최소화하는 것이 표준적으로 실시된다. 따라서 바이러스가 셀라인에서 성장한 경우, 조성물은 미량의 숙주 세포 DNA가 존재할 수는 있지만, 용량 당 10ng 미만(바람직하게는 1ng 미만, 보다 바람직하게는 100pg 미만)의 잔류 숙주 세포 DNA를 함유하는 것이 바람직하다. 임의의 잔류 숙주 세포 DNA의 평균 길이는 500bp 미만, 예컨대 400bp 미만, 300bp 미만, 200bp 미만, 100bp 미만 등인 것이 바람직하다. 일반적으로, 본 발명의 조성물로부터 배제되는 것이 요망되는 숙주 세포 DNA는 100bp 보다 긴 DNA이다.

[0071] 잔류 숙주 세포 DNA의 측정은 현재 통상적인 생물학적 조절 요건이며 당업자의 일반적인 능력의 범위 내에 존재한다. DNA 측정에 사용되는 분석은 일반적으로 입증된 분석일 것이다[57,58]. 입증된 분석의 성능 특징은 수학

적 및 정량적인 용어로 설명될 수 있으며, 이들의 가능한 오차의 원인은 확인된다. 분석은 일반적으로 정확성, 정밀도, 특이성과 같은 특징에 대하여 테스트한다. 분석을 조정(예컨대, 공지된 숙주 세포 DNA의 표준량에 대하여) 및 테스트하면, 그 다음 정량적 DNA 측정을 통상적으로 수행할 수 있다. DNA 정량을 위해 3개의 주요 기구를 사용할 수 있다: 혼성화 방법, 예컨대 서던 블롯 또는 슬롯 블롯[59]; 면역분석 방법, 예컨대, Threshold™ 시스템[60]; 및 정량적 PCR[61]. 각 방법의 정확한 특징은 대상으로 하는 숙주 세포, 예컨대 혼성화용 프로브의 선택, 증폭을 위한 프라이머 및/또는 프로브의 선택 등에 달려있지만, 이들 방법은 당업자에게 익숙한 것이다. Molecular Devices의 Threshold™ 시스템은 총 DNA의 피코그램 수준에 대한 정량적 분석법이며, 생약학적 물질 내의 DNA 오염 수준을 모니터링하기 위하여 사용되어 왔다[60]. 일반적인 분석법은 바이오티닐화 ssDNA 결합 단백질, 우레아제-컨쥬게이트 항-ssDNA 항체, 및 DNA 간의 반응 복합체의 비-서열-특이적 형성을 수반한다. 모든 분석 성분은 제조자로부터 입수가 가능한 완전한 총 DNA 분석 키트 내에 포함되어 있다. 다양한 상업적 제조사들이 잔류 숙주 세포 DNA를 검출하기 위한 정량적 PCR 분석법을 제공하며, 예컨대 AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies 등이 있다. 인간 바이러스 백신의 숙주 세포 DNA 오염을 측정하기 위한 화학발광 혼성화 분석법과 총 DNA Threshold™ 시스템의 비교는 참고문헌 62에서 찾을 수 있다.

[0072] DNA의 오염은, 예컨대 크로마토그래피 등의 표준 정제 과정을 사용하여 백신 제조시 제거될 수 있다. 잔여 숙주 세포 DNA의 제거는, 예컨대 DNase를 사용함으로써 핵산분해효소 처리에 의하여 증진될 수 있다. 숙주 세포 DNA 오염을 감소시키는 편리한 방법은 참고문헌 63 및 64에 개시되어 있으며, 먼저 바이러스 성장시에 사용할 수 있는 DNase(예컨대, 벤조나아제), 및 그 다음 비리온 분열시 사용될 수 있는 양이온 세척제(예컨대, CTAB) 사용의 두 단계 처리를 수반한다. β -프로피오락톤과 같은 알킬화제 처리를 숙주 세포 DNA의 제거에 사용할 수 있으며, 비리온 불활성화에 유리하게 사용될 수도 있다[65].

[0073] 15 μ g의 헤마글루티닌 당 <10ng (예컨대, <1ng, <100pg) 숙주 세포 DNA를 함유하는 백신이 바람직하며, 따라서 0.25ml 부피 당 <10ng (예컨대, <1ng, <100pg) 숙주 세포 DNA를 함유하는 백신이다. 50 μ g의 헤마글루티닌 당 <10ng (예컨대, <1ng, <100pg) 숙주 세포 DNA를 함유하는 백신이 더 바람직하며, 따라서 0.5ml 부피 당 <10ng (예컨대, <1ng, <100pg) 숙주 세포 DNA를 함유하는 백신이다.

[0074] **보조제(들)**

[0075] 본 발명의 조성물은 조성물을 투여한 환자에게서 유발되는 (체액성 및/또는 세포성) 면역 반응을 증진시키기 위해서 보조제를 포함할 수 있다.

[0076] 제1 클레이드 백신 및 제2 클레이드 백신 모두 보조제가 첨가된 백신인 것이 바람직하다. 이들은 동일한 보조제 또는 상이한 보조제들을 사용할 수 있다. 만약 두개의 백신 중 하나만 보조제 첨가된다면 두번째인 것이 바람직하다.

[0077] 본 발명과 함께 사용하기 위한 적절한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다:

[0078] ● 칼슘 염 및 알루미늄 염(또는 그것의 혼합물)을 포함하는 미네랄 함유 조성물. 칼슘 염은 인산칼슘(예컨대, 참고문헌 66에서 개시되는 "CAP" 입자)을 포함한다. 알루미늄 염은 히드록시드, 포스페이트, 술페이트 등을 포함하며, 어떤 적당한 형태(예컨대, 겔, 결정형, 무정형 등)를 갖는다. 이들 염에 대한 흡착이 바람직하다. 또한 조성물을 함유하는 미네랄은 금속 염의 입자로서 제형될 수 있다[67]. 알루미늄 염 보조제는 하기에서 더욱 상세하게 설명된다.

[0079] ● 수중유 에멀전, 하기 더욱 상세히 설명됨.

[0080] ● 면역촉진 올리고뉴클레오타이드, 하기 더욱 상세히 설명됨.

[0081] ● 3-O-탈아실화 모노포스포릴 지질 A('3dMPL', 또한 'MPL'TM으로서 알려짐), 하기 더욱 상세히 설명됨.

[0082] ● 이미퀴모드("R-837")[68,69], 레시퀴모드("R-848") [70], 및 이들의 유사체와 같은 이미다조퀴놀린 화합물; 및 이것의 염(예를 들어, 염산염). 면역촉진 이미다조퀴놀린에 관한 다른 상세는 참고문헌 71 내지 75에서 찾을 수 있다.

[0083] ● 참고문헌 76에 개시되는 것과 같은 티오세미카르바존 화합물. 또한 활성 화합물의 제형화, 제조 및 스크리닝 방법은 참고문헌 76에서 설명된다. 티오세미카르바존은 TNF- α 와 같은 사이토카인의 제조를 위한 인간 말초 혈액 단핵 세포의 자극에서 특히 효과적이다.

[0084] ● 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어: (a) 이사토라빈(Isatorabine)(ANA-245; 7-티아-8-옥소구아노신):



[0085]

[0086] 및 이것의 프로드러그; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) 참고문헌 77 내지 79에서 개시되는 화합물; (f) 다음의 식을 갖는 화합물:



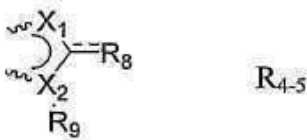
[0087]

[0088] 상기 식에서:

[0089] R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, 할로, -NR_aR_b, -OH, C₁₋₆ 알콕시, 치환된 C₁₋₆ 알콕시, 헤테로시클릴, 치환된 헤테로시클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, C₁₋₆ 알킬, 또는 치환된 C₁₋₆ 알킬이고;

[0090] R₃는 부재하거나, H, C₁₋₆ 알킬, 치환된 C₁₋₆ 알킬, C₆₋₁₀ 아릴, 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 헤테로시클릴, 또는 치환된 헤테로시클릴이고;

[0091] R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 H, 할로, 헤테로시클릴, 치환된 헤테로시클릴, -C(O)-R_d, C₁₋₆ 알킬, 치환된 C₁₋₆ 알킬이거나, 또는 함께 결합하여 R₄₋₅에서와 같이 5 원 환을 형성하고:



[0092]

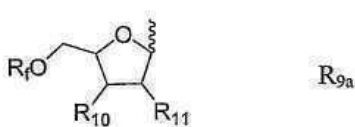
[0093] 결합은 ~~~~ 로 나타낸 결합에서 이루어짐

[0094] X₁ 및 X₂는 각각 독립적으로 N, C, O, 또는 S이고;

[0095] R₈은 H, 할로, -OH, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, -OH, -NR_aR_b, -(CH₂)_n-O-R_c, -O-(C₁₋₆ 알킬), -S(O)_pR_e, 또는 -C(O)-R_d이고;

[0096] R₉는 H, C₁₋₆ 알킬, 치환된 C₁₋₆ 알킬, 헤테로시클릴, 치환된 헤테로시클릴 또는 R_{9a}이고,

[0097] R_{9a}는:



[0098]

이고

[0099] 결합은 ~~~~ 로 나타낸 결합에서 이루어짐

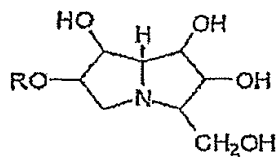
[0100] R₁₀ 및 R₁₁은 각각 독립적으로 H, 할로, C₁₋₆ 알콕시, 치환된 C₁₋₆ 알콕시, -NR_aR_b, 또는 -OH이고;

- [0101] 각각의 R_a 및 R_b 는 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, 치환된 C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_d$, C_{6-10} 아릴이고;
- [0102] 각각의 R_c 는 독립적으로 H, 포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, C_{1-6} 알킬, 또는 치환된 C_{1-6} 알킬이고;
- [0103] 각각의 R_d 는 독립적으로 H, 할로, C_{1-6} 알킬, 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 치환된 C_{1-6} 알콕시, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$ 알킬), $-NH$ (치환된 C_{1-6} 알킬), $-N(C_{1-6}$ 알킬)₂, $-N$ (치환된 C_{1-6} 알킬)₂, C_{6-10} 아릴, 또는 헤테로시클릴이고;
- [0104] 각각의 R_e 는 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{6-10} 아릴, 치환된 C_{6-10} 아릴, 헤테로시클릴, 또는 치환된 헤테로시클릴이고;
- [0105] 각각의 R_f 는 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, 치환된 C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_d$, 포스페이트, 디포스페이트 또는 트리포스페이트이고;
- [0106] 각각의 n 은 독립적으로 0, 1, 2, 또는 3이고;
- [0107] 각각의 p 는 독립적으로 0, 1, 또는 2이고; 또는
- [0108] 또는 (g) (a) 내지 (f) 중 어느 것의 약학적으로 허용가능한 염, (a) 내지 (f) 중 어느 것의 호변체, 또는 호변체의 약학적으로 허용가능한 염.
- [0109] ● 참고문헌 80에서 개시되는 것과 같은 트립타프린 화합물. 또한 활성 화합물의 제형화, 제조 및 스크리닝 방법은 참고문헌 80에서 설명된다. 티오세미카르바존은 TNF- α 와 같은 사이토카인의 제조를 위한 인간 말초 혈액 단핵 세포의 자극에서 특히 효과적이다.
- [0110] ● 록소리빈(Loxoribine)(7-알릴-8-옥소구아노신) [81].
- [0111] ● 다음을 포함하는 참고문헌 82에 개시된 화합물: 아실피페라진 화합물, 인돌레돈 화합물, 테트라히드라이소퀴놀린(THIQ) 화합물, 벤조시클로디온 화합물, 아미노아자비닐 화합물, 아미노벤즈이미다졸 퀴놀린(ABIQ) 화합물[83,84], 히드라프탈아미드 화합물, 벤조페논 화합물, 이속사졸 화합물, 스테롤 화합물, 퀴나질리논 화합물, 피롤 화합물[85], 안트라퀴논 화합물, 퀴녹살린 화합물, 트리아진 화합물, 피라잘로피리미딘 화합물, 및 벤즈아졸 화합물[86].
- [0112] ● 참고문헌 87에 개시된 화합물, 3,4-디(1H-인돌-3-일)-1H-피롤-2,5-디온, 스타우로스포린 유사체, 유도된 피리다진, 크로멘-4-온, 인돌리논, 퀴나졸린 및 뉴클레오시드 유사체 포함.
- [0113] ● RC-529와 같은 아미노알킬 글루코사미나이드 포스페이트 유도체[88,89].
- [0114] ● 예를 들어 참고문헌 90 및 91에서 설명한 바와 같은 폴리[디(카르복실레이토펜옥시)포스파젠] ("PCPP")과 같은 포스파젠.
- [0115] ● 다음과 같은 소분자 면역강화제(SMIP):
- [0116] N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조 [4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0117] N2,N2-디메틸-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조 [4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0118] N2-에틸-N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0119] N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-N2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0120] 1-(2-메틸프로필)-N2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0121] N2-부틸-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0122] N2-부틸-N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0123] N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-N2-펜틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0124] N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-N2-프로프-2-엔일-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0125] 1-(2-메틸프로필)-2-[(페닐메틸)티오]-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민;
- [0126] 1-(2-메틸프로필)-2-(프로필티오)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 ;

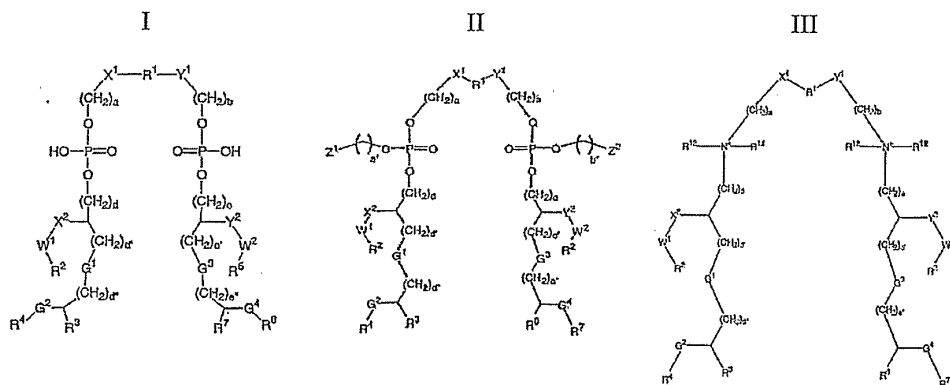
- [0127] 2-[4-아미노-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2-일](메틸)아미노)에탄올;
- [0128] 2-[4-아미노-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2-일](메틸)아미노)에틸 아세테이트;
- [0129] 4-아미노-1-(2-메틸프로필)-1,3-디히드로-2H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2-온;
- [0130] N2-부틸-1-(2-메틸프로필)-N4,N4-비스(페닐메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0131] N2-부틸-N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-N4,N4-비스(페닐메틸)-1H-이미다조[4,5- c] 퀴놀린-2,4-디아민;
- [0132] N2-메틸-1-(2-메틸프로필)-N4,N4-비스(페닐메틸)-1H-이미다조[4,5-c] 퀴놀린-2,4-디아민;
- [0133] N2,N2-디메틸-1-(2-메틸프로필)-N4,N4-비스(페닐메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민;
- [0134] 1-{4-아미노-2-[메틸(프로필)아미노]-1H-이미다조 [4,5-c] 퀴놀린-1-일}-2- 메틸프로판-2-올;
- [0135] 1-[4-아미노-2-(프로필아미노)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]-2-메틸프로판-2-올;
- [0136] N4,N4-디벤질-1-(2-메톡시-2-메틸프로필)-N2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2,4-디아민.
- [0137] ● 이종유래 그룹의 스테롤 글리코사이드 및 트리테르페노이드 글리코사이드로서 다양한 식물 종의 껍질, 잎, 줄기, 뿌리 및 심지어 꽃에서 발견되는 사포닌[참고문헌 133의 22장]. 장미과 퀴라야(*Quillaia saponaria Molina*) 나무 수피의 사포닌은 보조제로서 널리 연구되어 왔다. 또한 사포닌은 *Smilax ornata*(sarsapilla), *Gypsophilla paniculata*(brides veil), 및 *Saponaria officianalis*(soap root)로부터 얻을 수 있다. 사포닌 보조제 제제는 정제된 제제, 예컨대 QS21, 및 지질 제제, 예컨대 ISCOM를 포함한다. QS21은 StimulonTM으로 판매된다. 사포닌 조성물은 HPLC 및 RP-HPLC를 사용하여 정제되어 왔다. 이러한 기법을 사용한 특이적 정제 분획이 확인되어왔고, QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B 및 QH-C를 포함한다. 바람직하게는, 사포닌은 QS21이다. QS21의 생산 방법은 참고문헌 92에 설명되어 있다. 사포닌 제제는 스테롤, 예컨대 콜레스테롤을 포함할 수 있다 [93]. 사포닌과 콜레스테롤의 조합은 면역자극 복합체(ISCOM)라고 하는 독특한 입자를 형성하기 위하여 사용될 수 있다[참고문헌 133의 23장]. 또한 ISCOM은 일반적으로 포스파티딜에탄올아민 또는 포스파티딜콜린과 같은 인지질을 포함할 수 있다. 어떤 알려진 사포닌은 ISCOM에서 사용될 수 있다. 바람직하게는, ISCOM은 하나 이상의 QuilA, QHA & QHC를 포함한다. ISCOM은 참고문헌 93-95에서 더 설명된다. 선택적으로, ISCOMs는 추가 세척제가 결합될 수도 있다[96]. 사포닌계 보조제 개발의 개관은 참고문헌 97 & 98에서 발견할 수 있다.
- [0138] ● 박테리아 ADP-리보실화 독소(예컨대, *E.coli* 열 불안정 엔테로톡신 "LT", 콜레라 독소"CT", 또는 백일해 독소 "PT") 및 그것의 해독된 유도체, 예로써, LT-K63 및 LT-R72로서 알려진 돌연변이 독소 [99]. 해독된 ADP-리보실화 독소의 사용은 점액성 보조제로서 참고문헌 100에, 비경구적 보조제로서 참고문헌 101에 설명된다.
- [0139] ● 에스테르화된 히알루론산 마이크로스피어[102] 또는 키토산 및 그것의 유도체[103]와 같은 생체 부착성 및 점막부착성.
- [0140] ● 생분해성 및 비독성인 물질(예컨대, 폴리(α-히드록시산), 폴리히드록시부티르산, 폴리오르소에스테르, 폴리하이드라이드, 폴리카프로락톤 등)로부터 형성된 마이크로입자(즉, 직경 ~100nm 내지 ~150 μm, 더 바람직하게는 직경 ~200nm 내지 30 μm, 또는 직경 ~500nm 내지 ~10 μm의 입자), 폴리(락티드-코-글리콜리드)가 바람직함, 선택적으로 음으로 하전된 표면(예컨대, SDS로) 또는 양으로 하전된 표면(예컨대, CTAB와 같은 양이온성 세척제)을 가지도록 처리된다.
- [0141] ● 리포솜(참고문헌 133의 13 및 14 장). 보조제로서 사용에 적당한 리포솜 제제의 예는 참고문헌 104-106에 설명되어 있다.
- [0142] ● 폴리옥시에틸렌 에테르 및 폴리옥시에틸렌 에스테르[107]. 또한 이러한 제제들은 옥톡시놀과 조합하여 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제[108] 및 옥톡시놀과 같은 적어도 하나의 추가의 비이온성 계면활성제와 조합하여 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 또는 에스테르 계면활성제[109]를 포함한다. 바람직한 폴리옥시에틸렌 에테르는 다음의 군으로부터 선택된다: 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르(laureth 9), 폴리옥시에틸렌-9-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-8-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-35-라우릴 에테르, 및 폴리옥시에틸렌-23-라우릴 에테르.
- [0143] ● 무라밀 펩티드, 예로써 N-아세틸무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 ("thr-MDP"), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민(노르-MDP), N-아세틸글루크사민일-N-아세틸무라닐-L-Al-D-이소글루-L-알라-디팔미톡시 프

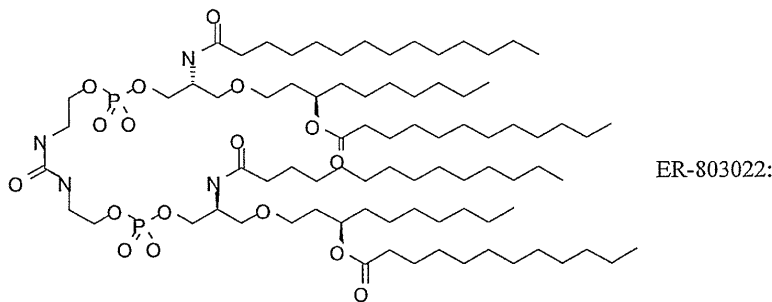
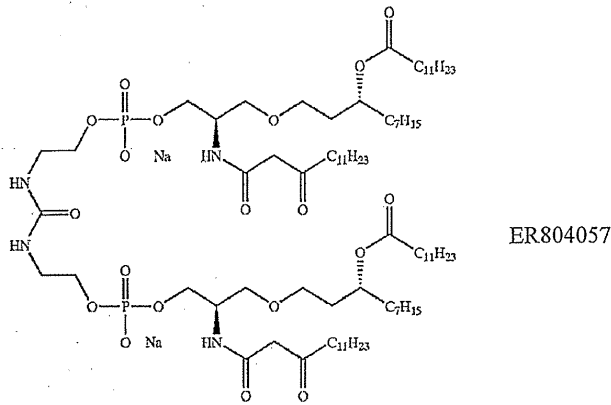
로필아미드("DTP-DPP", 또는 "TheramideTM"), N-아세틸무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민일-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민("MTP-PE").

- [0144] ● 1차 그람-음성 박테리아로부터 제조된 외막 단백질 프로테오솜 제조물과 2차 그람-음성 박테리아로부터 유도된 리포사카라이드 제조물의 조합, 여기서 외막 단백질 프로테오솜 및 리포사카라이드 제조물은 안정적인 비-공유 보조제 복합체를 형성한다. 이러한 복합체는 "IVX-908"를 포함하며, 복합체는 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 외막 및 LPS로 구성되어 있다. 이들은 인플루엔자 백신의 보조제로서 사용되어 왔다 [110].
- [0145] ● 폴리옥시도늄 폴리머[111,112] 또는 다른 N-산화된 폴리에틸렌-피페라진 유도체.
- [0146] ● 메틸 이노신 5'-모노포스페이트("MIMP")[113].
- [0147] ● 폴리히드록실화 피롤리딘 화합물[114], 예컨대 하기 화학식을 갖는 것:



- [0148]
- [0149] 여기서 R은 수소, 선형 또는 분지형, 미치환 또는 치환, 포화 또는 불포화 아실, 알킬 (예컨대, 시클로알킬), 알케닐, 알키닐 및 아릴 기, 또는 약학적으로 허용가능한 염 또는 이들의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다. 그 예에는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 카수아린, 카수아린-6- α -D-글루코피라노스, 3-*epi*-카수아린, 7-*epi*-카수아린, 3,7-*di*-*epi*-카수아린 등.
- [0150] ● CD1d 리간드, 예컨대 α -글리코실세라마이드 [115-122] (예컨대 α -갈락토실세라마이드), 피노스핑고신-함유 α -글리코실세라마이드, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-갈락토피라노실)-2-(N-헥사코사노일아미노)-1,3,4-옥타데칸트리올], CRONY-101, 3"-O-술포-갈락토실세라마이드 등.
- [0151] ● 감마 이눌린 [123] 또는 이들의 유도체, 예컨대 알가물린.
- [0152] ● 화학식 I, II 또는 III의 화합물, 또는 이들의 염:





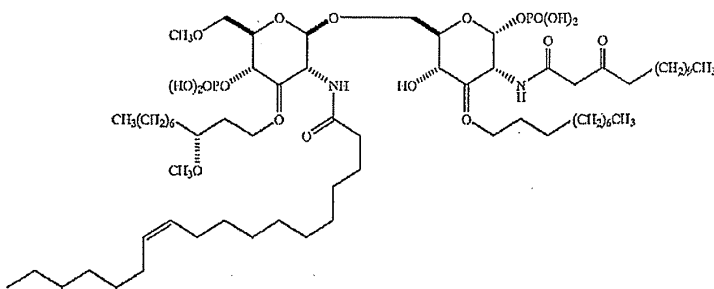
[0155]

[0156]

[0157]

[0158]

- *Escherichia coli*로부터의 지질 A의 유도체, 예컨대 OM-174 (참고문헌 125 및 126에 기재됨).
- 양이온 지질 및 (일반적으로 중성) 보조-지질의 제제, 예컨대 아미노프로필-디메틸-미리스트올레일옥시-프로판아미늄 브로마이드-디피타노일포스파티딜-에탄올아민 ("Vaxfectin™") 또는 아미노프로필-디메틸-비스-도데실 옥시-프로판아미늄 브로마이드-디올레오일포스파티딜-에탄올아민 ("GAP-DLRIE:DOPE"). (±)-N-(3-아미노프로필)-N,N-디메틸-2,3-비스(신-9-테트라데세닐옥시)-1-프로판아미늄 염을 함유한 제제가 바람직하다 [127].
- 포스페이트-함유 비환형 뼈대에 연결된 지질을 함유하는 화합물, 예컨대, TLR4 길항제 E5564[128,129]:



[0159]

[0160]

[0161]

[0162]

[0163]

[0164]

[0165]

이들 및 다른 보조제-활성 물질들은 참고문헌 133 및 134에 더욱 상세히 논의된다.

본 발명에서 사용하기 위한 보조제(들)는 톨-유사 수용체(Toll-Like Receptor(TLR))의 조절제 및/또는 작용제일 수 있다. 예를 들어, 그들은 인간 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, 및/또는 TLR9 단백질 중의 하나 이상의 작용제일 수 있다. 바람직한 물질은 TLR7(예를 들어, 이미다조퀴놀린) 및/또는 TLR9 (예를 들어, CpG 올리고 뉴클레오티드)의 작용제이다. 이들 물질은 선천면역 경로를 활성화시키는데 유용하다.

단일 백신은 상기 보조제 중 둘 이상을 포함할 수 있다.

조성물 중의 항원 및 보조제는 통상적으로 혼합물일 것이다.

알루미늄 염 보조제

알루미늄 히드록시드 및 알루미늄 포스페이트로 알려진 보조제를 사용할 수 있다. 이들 명칭은 통상적이지만 존재하는 실제 화학적 화합물의 정확한 설명이 아님에도 편의를 위하여 사용한다(예컨대, 참고문헌 133의 9장 참

조). 본 발명은 일반적으로 보조제로서 사용하는 어떤 "히드록시드" 또는 "포스페이트" 보조제 중 어떤 것을 사용할 수 있다.

[0166] "알루미늄 히드록시드"로 알려진 보조제는 일반적으로 알루미늄 옥시히드록시드 염이며, 대개 적어도 부분적으로 결정체이다. 식 $AlO(OH)$ 로 표시될 수 있는 알루미늄 옥시히드록시드는 적외선(IR) 분광법, 특히 $1070cm^{-1}$ 에서의 흡수 밴드 및 $3090-3100cm^{-1}$ 에서의 스트롱 숄더(strong shoulder)의 존재에 의해 다른 알루미늄 화합물, 예컨대 알루미늄 히드록시드 $Al(OH)_3$ 등과 구별될 수 있다[참고문헌 133의 9장]. 알루미늄 히드록시드 보조제의 결정도는 절반 높이에서의 회절 밴드 폭(WHH)에 의하여 반영되며, 열등한 결정 입자는 더 작은 결정크기로 인하여 더 큰 선 확장을 나타낸다. 표면적은 WHH가 증가함에 따라 증가하며, 높은 WHH 값의 보조제는 큰 항원 흡수능을 가지는 것으로 보인다. 섬유 형태(예컨대, 투과 전자 현미경으로 관찰)가 알루미늄 히드록시드 보조제에 일반적이다. 알루미늄 히드록시드 보조제의 pI는 일반적으로 약 11, 즉 보조제 자체는 생리학적 pH에서 양성 표면 전하를 띤다. 알루미늄 히드록시드 보조제에 대하여 pH 7.4에서 $mg\ Al^{+++}$ 당 1.8-2.6 mg 단백질의 흡수능이 보고되었다.

[0167] "알루미늄 포스페이트"로 알려진 보조제는 일반적으로 알루미늄 히드록시포스페이트이며, 때로는 소량의 술페이트(즉 알루미늄 히드록시포스페이트 술페이트)를 함유한다. 이들은 침전에 의하여 획득할 수 있으며, 침전시의 반응 조건 및 농도는 염 내의 히드록실에 대한 포스페이트의 치환도에 영향을 미친다. 히드록시포스페이트는 일반적으로 PO_4/Al 몰비가 0.3 내지 1.2이다. 히드록시포스페이트는 히드록실기의 존재에 의하여 완전한 $AlPO_4$ 와 구별될 수 있다. 예를 들어, $3164cm^{-1}$ 에서의 IR 스펙트럼 밴드(예컨대, $200^\circ C$ 로 가열시)는 구조적 히드록실의 존재를 나타낸다[참고문헌 133의 9장].

[0168] 알루미늄 포스페이트 보조제의 PO_4/Al^{3+} 몰비는 일반적으로 0.3 내지 1.2이며, 바람직하게는 0.8 내지 1.2, 더 바람직하게는 0.95 ± 0.1 이다. 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 무정형이며, 특히 히드록시포스페이트 염에서 그러하다. 일반적인 보조제는 무정형 알루미늄 히드록시포스페이트로서 PO_4/Al 몰비가 0.84 내지 0.92이며, 0.6 $mg\ Al^{3+}/ml$ 를 포함한다. 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 입자화된다(예컨대, 투과 전자 현미경으로 관찰시 판-유사 형태). 일반적인 입자의 직경은 어떠한 항원 흡착 후 0.5 내지 $20\mu m$ (예컨대, 약 5 내지 $10\mu m$) 범위 내이다. 알루미늄 포스페이트 보조제는 pH 7.4에서 $mg\ Al^{+++}$ 당 0.7 내지 1.5 mg 단백질의 흡착능이 보고되었다.

[0169] 알루미늄 포스페이트의 제로 전하점(PZC)은 히드록실에 대한 포스페이트의 치환도에 밀접하게 연관되어 있으며, 이 치환도는 침전에 의한 염 제조시 사용되는 반응물의 반응 조건 및 농도에 의존하여 달라질 수 있다. PZC는 용액 내의 유리 포스페이트 이온의 농도를 변화시키거나(포스페이트 증가 = 산성 PZC 증가) 또는 히스티딘 완충제와 같은 완충제의 첨가(PZC를 더욱 염기성화)에 의해 변화된다. 본 발명에 따라 사용된 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 PZC가 4.0 내지 7.0, 더 바람직하게는 5.0 내지 6.5, 예컨대 약 5.7이다.

[0170] 본 발명 조성물의 제조에 사용된 알루미늄 염의 현탁액은 완충제(예컨대, 포스페이트 또는 히스티딘 또는 Tris 완충제)를 함유할 수 있지만 항상 요구되는 것은 아니다. 현탁액은 바람직하게는 무균 및 무발열원이다. 현탁액은 유리 수성 포스페이트 이온을 포함할 수 있으며, 예컨대 1.0 내지 20 mM, 바람직하게는 5 내지 15 mM, 더 바람직하게는 약 10 mM 농도로 존재한다. 현탁액은 또한 염화나트륨을 포함할 수 있다.

[0171] 본 발명은 DARONRIX™과 같이 알루미늄 히드록시드와 알루미늄 포스페이트의 혼합물을 사용할 수 있다. 이 경우 히드록시드보다 알루미늄 포스페이트가 더 존재할 수 있으며, 예컨대 중량비로 적어도 2:1, 예컨대, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$ 등이다.

[0172] 환자 투여용 조성물 중의 Al^{+++} 의 농도는 바람직하게는 10mg/ml 미만, 예컨대 $\leq 5mg/ml$, $\leq 4mg/ml$, $\leq 3mg/ml$, $\leq 2mg/ml$, $\leq 1mg/ml$ 등이다. 바람직한 범위는 0.3 내지 1mg/ml이다. 최대 0.85mg/용량이 바람직하다.

[0173] 수중유 에멀전 보조제

[0174] 수중유 에멀전은 인플루엔자 바이러스 백신을 보조하는 용도에 특히 적합한 것으로 발견되었다. 다양한 이러한 에멀전은 공지되어 있으며, 그것들은 일반적으로 적어도 한가지의 오일과 적어도 한 가지의 계면활성제를 포함하며, 생분해성이고(물질대사가 가능한) 생체 적합한 오일(들)과 계면활성제(들)이다. 에멀전 내의 오일 방울은 일반적으로 직경이 $5\mu m$ 미만이며, 심지어 마이크로 이하의 직경을 가질 수도 있고, 이들 작은 크기는 마이크로

플루이다이저로 달성되어 적합한 에멀전을 제공한다. 220nm 미만 크기의 방울이 여과 멸균을 실시할 수 있어 바람직하다.

[0175] 본 발명은 동물성(예로써, 어류) 또는 식물성원으로부터의 것과 같은 오일과 함께 사용될 수 있다. 식물성 오일 원은 견과, 종자, 곡물을 포함한다. 가장 흔하게 이용가능한 땅콩 오일, 대두 오일, 코코넛 오일, 및 올리브 오일은 견과 오일의 예가 된다. 호호바 오일은, 예컨대, 호호바 열매로부터 획득되어 사용될 수 있다. 종자 오일은 홍화 오일, 면실 오일, 해바라기씨오일, 참깨씨 오일 등을 포함한다. 곡물군에서, 옥수수 오일이 가장 용이하게 이용가능하지만, 또한 밀, 귀리, 호밀, 쌀, 테프(teff), 라이밀 등과 같은 다른 곡류 곡물의 오일이 사용될 수도 있다. 종자오일에서 자연적으로 발생하지 않는 글리세롤 및 1,2-프로판디올의 6-10개의 탄소 지방산 에스테르는 견과 및 종자 오일로부터 출발하는 적합한 물질의 가수분해, 분리 및 에스테르화에 의해 제조될 수 있다. 포유동물 젖으로부터의 지방 및 오일은 물질대사가 가능하며, 따라서 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 동물성원으로부터 순수한 오일을 획득하는데 필요한 분리, 정제, 비누화 및 다른 필요한 수단은 당업계에 공지되어 있다. 대부분의 어류는 용이하게 회수될 수 있는 대사가 가능한 오일을 함유한다. 본원에서 사용될 수 있는 몇몇의 어류 오일은, 예를 들어, 대구간 오일, 상어간 오일 및 경뇌와 같은 고래 오일로 예시된다. 많은 분지쇄 오일은 5-탄소 이소프렌 단위에서 생화학적으로 합성되며, 일반적으로 테르펜으로서 언급된다. 상어간 오일은 스쿠알렌, 2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥사엔으로서 알려진 분지, 불포화 테르펜을 함유하고, 이는 본원에서 특히 바람직하다. 또한, 스쿠알렌, 스쿠알란에 대한 포화 유사체는 바람직한 오일이다. 스쿠알렌 및 스쿠알란을 포함하는 어류 오일은 시중의 공급원으로부터 용이하게 이용가능하거나 또는 당업계에 공지된 방법으로 획득될 수 있다. 다른 바람직한 오일은 토크페롤이다(하기 참조). 오일의 혼합물이 사용될 수 있다.

[0176] 계면활성제는 그것의 'HLB' (친수성/친유성 밸런스)에 의해 분류될 수 있다. 본 발명의 바람직한 계면활성제는 적어도 10, 바람직하게는 적어도 15, 및 더 바람직하게는 적어도 16의 HLB를 갖는다. 본 발명은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제(통상적으로 Tweens으로서 언급됨), 특히 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; 상표명 DOWFAXTM으로 판매되는 선형 EO/PO 블록 공중합체와 같은 에틸렌 옥사이드(EO), 프로필렌 옥사이드(PO) 및/또는 부틸렌 옥사이드(BO)의 공중합체; 반복하는 에톡시 (옥시-1,2-에탄디일) 기의 수가 다양한 옥토시놀, 옥토시놀-9 (Triton X-100, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올)가 특히 해당됨; (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올(IGEPAL CA-630/NP-40); 인지질, 예로써 포스파티딜콜린(레시틴); 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알코올로부터 유도되는 폴리옥시에틸렌 지방산 에테르(Brij 계면활성제로서 공지됨), 예로써 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르(Brij 30); 및 소르비탄 트리올레레이트 (SPAN 85) 및 소르비탄 모노라우레이트와 같은 소르비탄 에스테르(흔히 SPAN으로서 알려짐)를 포함하는 계면활성제들을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 에멀전에 포함되는 바람직한 계면활성제는 Tween 80 (폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트), SPAN 85 (소르비탄 트리올레레이트), 레시틴 및 Triton X-100이다.

[0177] 계면활성제의 혼합물은, 예컨대, Tween 80/SPAN 85 혼합물이 사용될 수 있다. 또한 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레레이트(Tween 80)와 같은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올(Triton X-100)과 같은 옥토시놀의 조합이 적당하다. 다른 유용한 조합은 laureth 9에 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및/또는 옥토시놀을 합한 것을 포함한다.

[0178] 바람직한 계면활성제의 양(중량%)은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(예로써, Tween 80) 0.01 내지 1%, 특히 약 0.1%; 옥틸 또는 노닐페녹시 폴리에톡시에탄올(예로써, Triton X-100, 또는 Triton 시리즈 중 다른 세척제) 0.001 내지 0.1 %, 특히 0.005 내지 0.02%; 폴리옥시에틸렌 에테르(예로써, laureth 9) 0.1 내지 20 %, 바람직하게는 0.1% 내지 10% 및 특히 0.1 내지 1% 또는 약 0.5%이다.

[0179] 본 발명에 유용한 특정한 수중유 에멀전 보조제는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다:

[0180] ● 스쿠알렌, Tween 80, 및 SPAN 85의 서브마이크론 에멀전. 부피 기준으로 에멀전 조성물은 약 5% 스쿠알렌, 약 0.5% 폴리소르베이트 80 및 약 0.5% SPAN 85가 될 수 있다. 중량 환산으로, 이들 비율은 4.3% 스쿠알렌, 0.5% 폴리소르베이트 80 및 0.48% SPAN 85이 된다. 이 보조제는 'MF59'로 알려져 있으며[130-132], 참고문헌 133의 10장 및 참고문헌 134의 12장에 보다 상세하게 설명되어 있다. MF59 에멀전은 시트레이트 이온, 예컨대 10mM 소듐 시트레이트 완충제를 포함하는 것이 유리하다.

[0181] ● 스쿠알렌, 토크페롤, 및 Tween 80의 에멀전. 에멀전은 포스페이트 완충 식염수를 포함할 수 있다. 또한 이는 SPAN 85 (예컨대 1%) 및/또는 레시틴을 포함할 수 있다. 이러한 에멀전은 2 내지 10% 스쿠알렌, 2 내지 10% 토크페롤 및 0.3 내지 3% Tween 80을 포함할 수 있으며, 스쿠알렌:토크페롤의 중량비로 더 안정적인 에멀전을 제

공하기 위하여 바람직하게는 ≤ 1 (예컨대 0.90)이다. 스쿠알렌과 Tween 80은 약 5:2의 부피비, 또는 약 11:5의 중량비로 존재할 수 있다. 이러한 하나의 에멀전은 Tween 80을 PBS에 용해시켜 2% 용액을 제공하고, 그 다음 90ml의 이 용액을 (5g의 DL- α -토코페롤 및 5 ml의 스쿠알렌)의 혼합물과 혼합한 뒤, 혼합물을 극소액체화하여 제조할 수 있다. 얻어진 에멀전은 예컨대 100 내지 250 nm, 바람직하게는 약 180 nm의 평균 직경의 서브마이크론 오일 방울을 가질 수 있다.

- [0182] ● 스쿠알렌, 토코페롤, 및 Triton 세척제(예컨대, Triton X-100)의 세척제. 이 에멀전은 3d-MPL를 포함할 수 있다(하기 참조). 에멀전은 포스페이트 완충제를 함유할 수 있다.
- [0183] ● 폴리소르베이트(예컨대, 폴리소르베이트 80), Triton 세척제(예컨대, Triton X-100) 및 토코페롤(예컨대, α -토코페롤 숙시네이트)을 포함하는 에멀전. 에멀전은 이들 세 성분을 약 75:11:10 (예컨대 750 μ g/ml 폴리소르베이트 80, 110 μ g/ml Triton X-100 및 100 μ g/ml α -토코페롤 숙시네이트)의 질량비로 포함할 수 있으며, 이들 농도는 항원으로부터 이들 성분의 어떤 부담분을 포함하여야 한다. 에멀전은 스쿠알렌을 포함할 수 있다. 에멀전은 또한 3d-MPL를 포함할 수 있다(하기 참조). 수성상은 포스페이트 완충제를 포함할 수 있다.
- [0184] ● 스쿠알렌, 폴리소르베이트 80 및 플록사머 401("PluronicTM L121")의 에멀전. 에멀전은 포스페이트 완충 식염수, pH 7.4에서 제형화될 수 있다. 이 에멀전은 무라밀 디펩티드를 위한 유용한 전달 비히클이고, "SAF-I" 보조제(0.05-1% Thr-MDP, 5% 스쿠알렌, 2.5% Pluronic L121 및 0.2% 폴리소르베이트 80) 내 트레오닐-MDP와 함께 사용되었다[135]. 또한 이는 "AF" 보조제에서와 같이 Thr-MDP 없이 사용될 수 있다 [136] (5% 스쿠알렌, 1.25% Pluronic L121 및 0.2% 폴리소르베이트 80). 마이크로유동화가 바람직하다.
- [0185] ● 스쿠알렌, 수성 용제, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제(예컨대 폴리옥시에틸렌 (12) 세토스테아릴 에테르) 및 소수성 비이온성 계면활성제(예컨대 소르비탄 모놀레이트 또는 'Span 80'와 같은 소르비탄 에스테르 또는 만니드 에스테르)를 포함하는 에멀전. 에멀전은 열가역적인 것이 바람직하고 및/또는 크기가 20nm 미만인 오일 액적을 적어도 90%(부피)를 갖는다[137]. 에멀전은 알디톨; 동결억제제 (예컨대 도데실말토사이드 및/또는 수크로스과 같은 당); 및/또는 알킬폴리글리코사이드 중 하나 이상을 포함할 수도 있다. 이러한 에멀전은 동결건조될 수 있다.
- [0186] ● 0.5-50%의 오일, 0.1-10%의 인지질, 및 0.05-5%의 비이온성 계면활성제를 갖는 에멀전. 참고문헌 138에서 설명되는 바와 같이, 바람직한 인지질 성분은 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아닐린, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딘산, 스펅고미엘린 및 카디올리핀이다. 서브마이크론의 방울 크기가 유리하다.
- [0187] ● 대사분해가능하지 않은 오일(예로써, 경광유)의 서브마이크론 수중유 에멀션 및 적어도 하나의 계면활성제(예로써, 레시틴, Tween 80 또는 SPAN 80). QuilA 사포닌, 콜레스테롤, 사포닌-친유성 결합(예로써, 참고문헌 139에서 설명되는 GPI-0100, 글루쿠론산의 카르복실기를 통해 데스아실사포닌에 방향족 아민의 첨가에 의해 제조됨), 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 및/또는 N,N-디옥타데실-N,N-비스(2-히드록시에틸)프로판디아민과 같은 첨가제가 포함될 수 있다.
- [0188] ● 사포닌(예컨대, QuilA 또는 QS21) 및 스테롤(예컨대, 콜레스테롤)이 나선형 마이셀로 회합된 에멀전[140].
- [0189] ● 미네랄 오일, 비이온성 친유성 에톡시화 지방 알콜 및 비이온성 친수성 계면활성제를 포함하는 에멀전(예컨대 에톡시화 지방 알콜 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체)[141].
- [0190] ● 미네랄 오일, 비이온성 친수성 에톡시화 지방 알콜 및 비이온성 친유성 계면활성제를 포함하는 에멀전(예컨대 에톡시화 지방 알콜 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체)[141].
- [0191] 바람직한 본 발명의 수중유 에멀전은 스쿠알렌을 포함한다.
- [0192] 에멀전은 송달시에 즉석에서 항원과 혼합될 수 있다. 따라서, 보조제 및 항원은 사용시 최종 제제를 위한 준비로, 패키징되거나 유통된 백신에서 분리하여 유지될 수 있다. 항원은 일반적으로 수성 형태로 존재하여, 백신은 최종적으로 2가지의 액체를 혼합함으로써 제조된다. 혼합을 위한 2가지 액체의 부피비는 다양할 수 있지만(예컨대, 5:1 내지 1:5), 일반적으로는 약 1:1이다. 에멀전 및 항원이 다중용량 키트에 분리하여 저장되면 제품은 2.5ml 에멀전을 함유하는 바이알 및 2.5ml 수성 항원을 함유하는 바이알로서 존재하며, 혼합을 위해 5ml 보조제 첨가된 백신, 예컨대 10 x 0.5ml 용량을 제공할 수 있다.
- [0193] 항원과 보조제를 혼합한 후, 헤마글루티닌 항원은 일반적으로 수성 용액으로 존재하지만 그 자체가 오일/물 계

면 주변에 분포할 수 있다. 일반적으로, 헤마글루티닌은 에멀전의 오일상으로 거의 유입되지 않을 것이다.

[0194] 조성물이 토크페를 포함하는 경우, 어떤 α , β , γ , δ , ϵ 또는 ζ 토크페가 사용되지만, α -토크페가 바람직하다. 토크페는 여러가지 형태, 예컨대 다른 염 및/또는 이성질체를 취할 수 있다. 염은, 숙시네이트, 아세테이트, 니코티네이트 등과 같은 유기 염을 포함한다. D- α -토크페 및 DL- α -토크페 둘 가지가 모두 사용될 수 있다. 토크페는 고령의 환자(예컨대, 60세 또는 그 이상)에서 사용하기 위한 백신에 유리하게 포함되며, 비타민 E가 이 환자 군의 면역 반응에 긍정적인 효과를 가지는 것으로 보고되었기 때문이다[142]. 그것들은 또한 에멀전을 안정화하는데 도움이 되는 항산화 특성을 가진다[143]. 바람직한 α -토크페는 DL- α -토크페이고, 이 토크페의 바람직한 염은 숙시네이트이다. 숙시네이트 염은 생체내에서 TNF-관련 리간드와 협력하는 것으로 발견되었다. 게다가, α -토크페 숙시네이트는 인플루엔자 백신과 양립가능하고, 수은 화합물의 대안으로서 유용한 보존제인 것으로 알려져 있다[13].

[0195] 면역자극 올리고뉴클레오타이드

[0196] 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 변성체/유사체, 예컨대 포스포로티오에이트 변성체를 포함할 수 있으며, 이중-가닥 또는 (RNA 제외) 단일-가닥일 수 있다. 참고문헌 144, 145 및 146에서는 가능한 유사체 치환, 예컨대 구아노신을 2'-데옥시-7-데아자구아노신으로 대체하는 것을 개시하고 있다. CpG 올리고뉴클레오타이드의 보조제 효과는 참고문헌 147-152에 더 설명되어 있다. CpG 서열은 TLR9, 예컨대 모티프 GTCGTT 또는 TTCGTT로 지시될 수 있다[153]. CpG 서열은 Th1 면역 반응, 예컨대 CpG-A ODN (올리고데옥시뉴클레오타이드)을 유도하는데 특이적일 수 있거나, 또는 B 세포 반응, 예컨대 CpG-B ODN을 유도하는데 더욱 특이적일 수 있다. CpG-A 및 CpG-B ODN은 참고문헌 154-156에 논의되어 있다. 바람직하게는, CpG는 CpG-A ODN이다. 바람직하게는, CpG 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단부가 수용체 인식을 위해 접근가능하도록 구성된다. 선택적으로, 두 CpG 올리고뉴클레오타이드 서열은 이들의 3' 말단에 결합하여 "이뮤노머(immunomers)"를 형성할 수 있다. 예를 들면, 참고문헌 153 및 157-159을 참고한다. 유용한 CpG 보조제는 ProMune™(Coley Pharmaceutical Group, Inc.)로서도 알려진 CpG7909이다.

[0197] CpG 서열을 사용하는 것의 대안으로서 또는 추가하여, TpG 서열이 사용될 수 있다[160]. 이들 올리고뉴클레오타이드는 비메틸화 CpG 모티프가 없어도 좋다.

[0198] 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 피리미딘이 풍부할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 연속적인 티미딘 뉴클레오타이드(예컨대, TTTT, 참고문헌 160에 개시됨)를 포함할 수 있으며, 및/또는 >25% 티미딘(예컨대, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, 등)을 갖는 뉴클레오타이드 조성물을 가질 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 연속적인 사이토신 뉴클레오타이드(예컨대, CCCC, 참고문헌 160에 개시됨)를 포함할 수 있으며, 및/또는 >25% 사이토신(예컨대, >35%, >40%, >50%, >60%, >80% 등)을 갖는 뉴클레오타이드 조성물을 가질 수 있다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 비메틸화 CpG 모티프가 없어도 좋다.

[0199] 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 적어도 20개 뉴클레오타이드를 포함할 것이다. 이들은 100개 미만의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

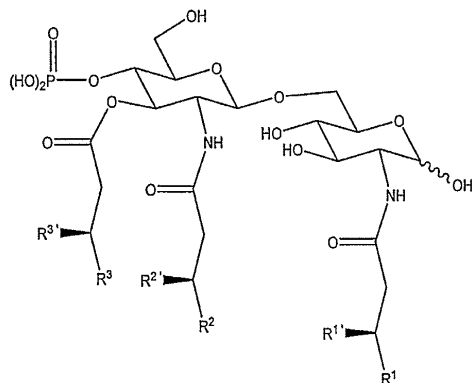
[0200] 면역촉진 올리고뉴클레오타이드에 기반한 특히 유용한 보조제는 IC31™로서 알려져 있다 [161]. 따라서 본 발명과 함께 사용되는 보조제는 (i) 적어도 하나의 (및 바람직하게는 다수의) CpI 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오타이드(예컨대 15-40 뉴클레오타이드), 및 (ii) 적어도 하나의 (및 바람직하게는 다수의) Lys-Arg-Lys 트리펩티드 서열(들)을 포함하는 올리고펩티드(예컨대 5-20 아미노산)와 같은 다중양이온 폴리머의 혼합물을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 26-mer 서열 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO: 14)을 포함하는 데옥시뉴클레오타이드일 수 있다. 다중양이온 폴리머는 11-mer 아미노산 서열 KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 15)을 포함하는 펩티드일 수 있다.

[0201] 3 탈-0-아실화 모노포스포릴 지질 A

[0202] 3dMPL (3 탈-0-아실화 모노포스포릴 지질 A, 또는 3-0-데사실-4'-모노포스포릴 지질 A로서 알려짐)은 모노포스포릴 지질 A에서 환원 말단 글루코사민의 위치 3이 탈-아실화된 보조제이다. 3dMPL은 살모넬라 미네소타 (*Salmonella Minnesota*)의 헵토스가 없는 돌연변이로부터 제조되며, 지질 A와 화학적으로 유사하나 산-불안정 포스포릴기 및 염기-불안정 아실기가 부족하다. 이는 단핵구/대식세포 계통의 세포를 활성화시키고, IL-1, IL-12, TNF- α 및 GM-CSF를 포함하는 여러 사이토카인의 방출을 자극한다 (참고문헌 162 참조). 3dMPL의 제조는 참고문헌 163에 본래 설명되어 있었다.

[0203] 3dMPL은 이들의 아실화에 의하여 변화하는 관련 분자의 혼합물의 형태를 취할 수 있다(예컨대, 서로 길이가 다

를 수 있는 3, 4, 5 또는 6개 아실쇄를 보유). 두 글루코사민(2-데옥시-2-아미노-글루코스로서도 알려짐) 단당류는 이들의 2-위치 탄소(즉, 위치 2 및 2')에서 N-아실화되며, 또한 3' 위치에서도 O-아실화된다. 탄소 2에 부착된 기는 식 $-NH-CO-CH_2-CR^1R^{1'}$ 이다. 탄소 2'에 부착된 기는 식 $-NH-CO-CH_2-CR^2R^{2'}$ 이다. 탄소 3'에 부착된 기는 화학식 $-O-CO-CH_2-CR^3R^{3'}$ 이다. 대표적인 구조는 다음과 같다:



[0204]

[0205]

기 R^1 , R^2 및 $R^{3'}$ 은 각각 독립적으로 $-(CH_2)_n-CH_3$ 이다. n 값은 바람직하게는 8 내지 16, 더 바람직하게는 9 내지 12이며, 가장 바람직하게는 10이다.

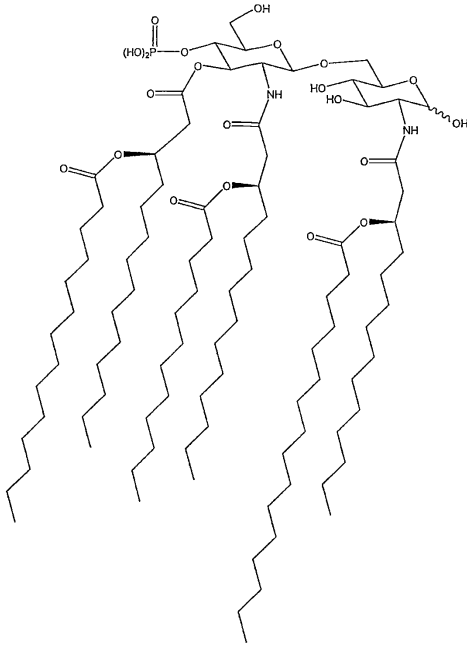
[0206]

기 $R^{1'}$, $R^{2'}$ 및 $R^{3'}$ 은 각각 독립적으로 (a) $-H$; (b) $-OH$; 또는 (c) $-O-CO-R^4$ 가 될 수 있고, 여기서 R^4 는 $-H$ 또는 $-(CH_2)_m-CH_3$ 이고, 여기서 m 값은 바람직하게는 8 내지 16, 더 바람직하게는 10, 12 또는 14이다. 2 위치에서, m 은 바람직하게는 14이다. 2' 위치에서, m 은 바람직하게는 10이다. 3' 위치에서, m 은 바람직하게는 12이다. 따라서 기 $R^{1'}$, $R^{2'}$ 및 $R^{3'}$ 은 바람직하게는 도데칸산, 테트라데칸산 또는 헥사데칸산으로부터의 $-O$ -아실기이다.

[0207]

$R^{1'}$, $R^{2'}$ 및 $R^{3'}$ 모두 $-H$ 인 경우, 3dMPL은 3개 아실쇄(각각 위치 2, 2' 및 3'에 하나)만을 보유한다. $R^{1'}$, $R^{2'}$ 및 $R^{3'}$ 중 둘만 $-H$ 인 경우, 3dMPL은 4개 아실쇄를 보유할 수 있다. $R^{1'}$, $R^{2'}$ 및 $R^{3'}$ 중의 하나만 $-H$ 인 경우, 3dMPL은 5개 아실쇄를 보유할 수 있다. $R^{1'}$, $R^{2'}$ 및 $R^{3'}$ 중의 어느 것도 $-H$ 가 아닌 경우 3dMPL은 6개 아실쇄를 보유할 수 있다. 본 발명에 따라 사용되는 3dMPL 보조제는 3 내지 6개 아실쇄를 지닌 이들 형태의 혼합물이 될 수 있지만, 혼합물 내에 6개 아실쇄를 보유한 3dMPL을 포함하는 것이 바람직하며, 헥사아실쇄 형태가 총 3dMPL의 중량부로 적어도 10%, 예컨대, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$ 또는 그 이상을 차지하도록 확보하는 것이 특히 바람직하다. 6개 아실쇄를 보유한 3dMPL은 대부분의 보조제-활성 형태로 발견된다.

[0208] 따라서, 본 발명의 조성물 내에 포함되는 가장 바람직한 형태의 3dMPL는 다음과 같다.



[0209]

[0210] 3dMPL이 혼합물의 형태로 사용되는 경우, 본 발명의 조성물 내의 3dMPL 양 또는 농도에 대한 기준은 혼합물 내에 조합된 3dMPL 종을 참조한다.

[0211]

수성 조건에서, 3dMPL은 예컨대 직경이 <150nm 또는 >500nm인 서로 다른 크기의 미셀 응집체 또는 입자를 형성할 수 있다. 이들 각각 또는 모두를 본 발명에서 사용할 수 있으며, 더 나은 입자를 기존의 분석에 의하여 선택할 수 있다. 더 작은 입자(예컨대, 3dMPL 수성 현탁액에 투명성을 부여할 정도로 작은)가 본 발명에 따른 사용에 바람직하며, 이는 이들의 유효한 활성 때문이다[164]. 바람직한 입자는 평균 직경이 220nm 미만, 더 바람직하게는 200nm 미만 또는 150nm 미만 또는 120nm 미만이며, 100nm 미만의 평균 직경을 보유할 수도 있다. 대부분의 경우, 그러나 평균 직경이 50nm보다 작지 않다. 이러한 입자는 여과 멸균에 적합할 정도로 충분히 작다. 직경은 평균 입자 직경을 측정하는 동적 광산란의 통상 기술로 측정할 수 있다. 입자의 직경을 x nm라고 하는 경우, 일반적으로 이 평균 부근에 입자가 분포할 것이며, 입자 수의 적어도 50% (예컨대, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, 또는 그 이상)는 직경이 $x \pm 25\%$ 범위 내일 것이다.

[0212]

3dMPL은 수중유 에멀전과 조합하여 사용되는 것이 유리하다. 실질적으로 모든 3dMPL이 에멀전의 수성상에 위치할 수 있다.

[0213]

3dMPL은 그 자체로 사용할 수 있거나, 또는 하나 이상의 추가의 화합물과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 3dMPL은 QS21 사포닌 [165] (수중유 에멀전 내에 포함 [166]), 면역자극 올리고뉴클레오타이드, QS21와 면역자극 올리고뉴클레오타이드, 알루미늄 포스페이트[167], 알루미늄 히드록시드[168], 또는 알루미늄 포스페이트 및 알루미늄 히드록시드와 조합하여 사용하는 것이 알려져 있다.

[0214]

약학적 조성물

[0215]

본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능하며 통상적으로 수성 형태이다. 이들은 항원 (및 적용가능한 경우 보조제) 이외의 성분들을 포함하고, 예컨대 이들은 일반적으로 하나 이상의 약학적 담체(들) 및/또는 부형제(들)를 포함한다. 이러한 성분의 완전한 논의는 참고문헌 169에서 입수가능하다.

[0216]

조성물은 티로메살 (예컨대 $10\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 2-페녹시에탄올과 같은 보존제를 포함할 수 있다. 그러나 백신은 수은 물질이 실질적으로 없는 것(즉 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만), 예컨대 티메로살이 없는 것이 바람직하다 [13,170]. 수은을 함유하지 않는 백신이 보다 바람직하다. 보존제가 없는 백신이 특히 바람직하다.

[0217]

장성을 조절하기 위해, 나트륨염과 같은 생리학적인 염을 포함하는 것이 바람직하다. 염화나트륨(NaCl)이 바람직하며, 이는 1 내지 $20\text{ mg}/\text{ml}$ 로 존재할 수 있다. 존재할 수 있는 다른 염은 염화칼륨, 인산이수소칼륨, 인산나트륨 이수화물, 염화마그네슘, 염화칼슘 등을 포함한다.

[0218]

조성물은 일반적으로 삼투질 농도가 $200\text{mOsm}/\text{kg}$ 내지 $400\text{mOsm}/\text{kg}$, 바람직하게는 $240\text{--}360\text{mOsm}/\text{kg}$ 일 것이며, 더

바람직하게는 290-310mOsm/kg의 범위 내일 것이다. 삼투질 농도는 백신화에 의해 야기되는 통증에 영향을 주지 않는 것으로 이전에 보고되었지만[171], 이 범위에서 삼투질 농도를 유지하는 것이 바람직하다.

[0219] 조성물은 하나 이상의 완충제를 포함할 수 있다. 일반적인 완충제는 포스페이트 완충제; Tris 완충제; 보레이트 완충제; 숙시네이트 완충제; 히스티딘 완충제(특히 알루미늄 히드록시드 보조제); 또는 시트레이트 완충제를 포함한다. 완충제는 일반적으로 5-20 mM의 범위로 포함된다.

[0220] 조성물의 pH는 일반적으로 5.0 내지 8.1, 더 일반적으로 6.0 내지 8.0, 예컨대 6.5 내지 7.5, 7.0 내지 7.8일 것이다. 본 발명의 과정은 따라서 패키징 전에 벌크 백신의 pH를 조절하는 단계를 포함할 수 있다.

[0221] 조성물은 멸균된 것이 바람직하다. 조성물은 비-발열성인 것이 바람직하고, 예컨대 용량 당 <1 EU (내독소 단위, 표준 척도), 바람직하게는 용량 당 <0.1 EU를 함유한다. 조성물은 글루텐이 없는 것이 바람직하다.

[0222] 조성물은 단일 면역화를 위한 물질을 포함할 수도 있고, 또는 다중 면역화를 위한 물질(즉, '다중용량' 키트, 예컨대 10 용량)을 포함할 수도 있다. 다중용량 장치에서는 보존제의 포함이 바람직하다. 다중용량 조성물에 보존제를 포함하는 것에 대한 대안으로서 (또는 추가하여), 조성물은 물질 제거를 위한 무균 어댑터를 갖는 용기에 함유될 수 있다.

[0223] 인플루엔자 백신은 예컨대 어린이(예컨대 최대 36개월)에게는 절반의 용량(즉, 약 0.25ml)이 투여될 수 있더라도, 일반적으로 약 0.5ml의 투여량 부피로 투여된다.

[0224] 조성물 및 키트는 2°C 내지 8°C에서 보관하는 것이 바람직하다. 이들은 동결되어서는 안된다. 이들은 직사광선을 피해 보관하는 것이 이상적이다.

[0225] 본 발명의 키트

[0226] 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 조성물, 예컨대 프라이밍 조성물 및 부스팅 조성물을 함유하는 키트를 포함한다. 두개의 키트 성분들은 분리하여 유지될 것인데, 이들은 환자에게 실질적으로 상이한 시간에 투여되기 때문이다.

[0227] 키트 내의 각 개별 백신은 사용을 위해 준비될 수 있거나, 전달시 즉석 제조를 위해 준비될 수 있다. 이 즉석 장치는 보조제 및 항원을 사용시까지 별도로 유지하게 하며, 이것은 특히 수중유 에멀전을 사용하는 경우 유용하다.

[0228] 백신이 즉석에서 제조되는 경우, 그것의 성분들은 서로 키트 내에서 물리적으로 분리되며, 이 분리는 다양한 방식으로 이루어질 수 있다. 예컨대, 두 성분은 바이알, 예컨대 항원 바이알 및 에멀전 바이알과 같은 두개의 분리된 용기에 존재할 수 있다. 그 다음 두 바이알의 내용물을 예컨대 하나의 바이알의 내용물을 이동시키고 이들을 다른 바이알에 첨가함으로써, 또는 두 바이알의 내용물을 별도로 이동시키고 이들을 제3의 용기에서 혼합함으로써 혼합할 수 있다. 바람직한 장치에서, 키트 성분 중 하나는 주사기에 존재하고 다른 것은 바이알과 같은 용기에 존재한다. 주사기를 사용하여(예컨대 바늘과 함께) 그것의 내용물을 혼합을 위한 제2 용기로 삽입시키고, 그 다음 혼합물을 주사기로 인출할 수 있다. 혼합된 주사기의 내용물은 그 다음 환자에게 통상적으로 새로운 멸균 바늘을 통해 투여될 수 있다. 주사기에 하나의 성분을 패키징하는 것은 환자에게 투여하기 위해 별도의 주사기를 사용할 필요성을 제거한다.

[0229] 또 다른 바람직한 장치에서, 백신의 두가지 성분을 동일한 주사기, 예컨대 참고문헌 172-179 등에 개시되어 있는 것과 같은 듀얼-챔버 주사기에서 함께 그러나 분리하여 유지한다. 주사기가 작동할 때(예컨대 환자에게 투여하는 동안) 두 챔버의 내용물이 혼합된다. 이 장치는 사용시 별도 혼합 단계에 대한 필요성을 피한다.

[0230] 백신이 즉석으로 제조되는 경우, 그것의 성분들은 일반적으로 수성 형태일 것이다. 일부 장치에서, 성분(통상적으로 보조제 성분보다는 항원 성분)은 건조 형태(예컨대 동결 건조 형태)이고, 다른 성분은 수성 형태이다. 두개의 성분을 혼합하여 건조 성분을 재활성화시키고 환자에게 투여하기 위한 수성 조성물을 제공할 수 있다. 동결건조된 성분은 통상적으로 주사기보다는 바이알 내에 위치할 것이다. 건조된 성분들은 락토스, 수크로스 또는 만니톨, 및 이들의 혼합물, 예컨대 락토스/수크로스 혼합물, 수크로스/만니톨 혼합물 등과 같은 안정화제를 포함할 수 있다. 한가지 가능한 장치는 미리 충전된 주사기 내의 수성 보조제 성분 및 바이알 내의 동결건조된 항원 성분을 사용한다.

[0231] 조성물 또는 키트 성분의 패키징

[0232] 본 발명의 조성물 (또는 키트 성분)을 위한 적절한 용기는 바이알, 주사기(예컨대 일회용 주사기), 비강 스프레

이 등을 포함한다. 이들 용기는 멸균되어야 한다.

- [0233] 조성물/성분이 바이알에 위치하는 경우, 바이알은 유리 또는 플라스틱 물질로 제조되는 것이 바람직하다. 바이알은 조성물이 첨가되기 전에 멸균되는 것이 바람직하다. 라텍스-민감성 환자의 문제를 피하기 위하여, 바이알은 라텍스가 없는 마개로 밀봉되는 것이 바람직하며, 모든 패키징 물질 내에 라텍스가 부재하는 것이 바람직하다. 바이알은 단일 용량 백신을 포함할 수 있거나, 또는 1회 용량 이상('다중용량' 바이알), 예컨대 10회 용량을 포함할 수 있다. 바람직한 바이알은 무색 유리로 제조된다.
- [0234] 바이알은 미리 충전된 주사기가 캡에 삽입될 수 있고, 주사기의 내용물이 바이알로 방출될 수 있으며(예컨대 그 안에서 동결건조된 물질이 재구성되도록), 바이알의 내용물이 주사기로 다시 이동될 수 있도록 적합하게 된 캡(cap)(예컨대, Luer lock)을 구비할 수 있다. 바이알로부터 주사기 제거 후 바늘을 부착하여 조성물을 환자에게 투여할 수 있다. 캡은 밀봉부 또는 덮개 내부에 위치하여, 밀봉부 또는 덮개는 캡이 접근할 수 있기 전에 제거되어야 한다. 바이알은 그 내용물의 항균 제거를 허용하는 캡, 특히 다중 투약 바이알용 캡을 구비할 수 있다.
- [0235] 조성물/성분이 주사기에 패키징되는 경우, 주사기는 이것에 부착된 바늘을 구비할 수 있다. 바늘이 부착되지 않은 경우, 별도의 바늘이 조립 및 사용을 위하여 주사기와 함께 공급될 수 있다. 이러한 바늘은 내장될 수 있다. 안전한 바늘이 바람직하다. 1-인치 23-게이지, 1-인치 25-게이지 및 5/8-인치 25-게이지 바늘이 일반적이다. 주사기는 기록 유지를 용이하게 하기 위해 내용물의 제품 번호, 인플루엔자 시기 및 유효 기간이 인쇄된 접착식 라벨과 함께 제공될 수 있다. 주사기의 플런저(plunger)는 흡인 동안 플런저가 사고로 제거되는 것을 예방하기 위하여 마개가 구비된 것이 바람직하다. 주사기는 라텍스 고무 캡 및/또는 플런저를 구비할 수 있다. 1회용 주사기는 단일 용량의 백신을 함유한다. 주사기는 바늘 부착 전에 팁을 밀봉하기 위하여 팁 캡(tip cap)을 구비하는 것이 일반적이며, 팁 캡은 부틸 고무로 제조되는 것이 바람직하다. 주사기 및 바늘이 별도로 패키징되면, 바늘을 부틸 고무 차단재로 막는 것이 바람직하다. 바람직한 주사기는 상표 "Tip-Lok"™로 판매되는 것이다. 부틸 고무 또한 예컨대 다중용량 키트에서 바이알의 마개에 적합한 물질이다.
- [0236] 용기는 절반-용량 부피를 표시하여 어린이에 대한 송달을 용이하게 할 수 있다. 예를 들면, 0.5ml 용량을 함유하는 주사기는 0.25ml 부피를 나타내는 표시를 한다.
- [0237] 유리 용기(예컨대, 주사기 또는 바이알)가 사용되는 경우, soda 라임 유리보다는 규산염 유리로 제조된 용기를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0238] 키트 또는 조성물은 백신의 상세, 예컨대 투여 설명서, 백신 내의 항원의 상세 등을 포함하는 인쇄물과(예컨대, 동일 박스에) 조합될 수 있다. 설명서에는 경고문, 예컨대 백신접종 후 과민성 반응의 경우 쉽게 입수 가능한 아드레날린 용액을 사용하라는 등의 경고문을 포함할 수 있다.
- [0239] **치료 방법 및 백신의 투여**
- [0240] 본 발명의 조성물은 인간 환자로의 투여에 적합하며, 본 발명은 본 발명의 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 면역 반응을 일으키는 방법을 제공한다.
- [0241] 본 발명은 또한 의약품에 사용하기 위한, 예컨대 환자에서 면역 반응을 발생시키는데 사용하기 위한 본 발명의 키트 또는 조성물을 제공한다.
- [0242] 본 발명은 또한 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원 및 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원을 제공하며, 이때 제1 클레이드와 제2 클레이드는 동시 분리 또는 순차 투여를 위해 서로 상이하다.
- [0243] 본 발명은 또한 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원 및 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원을 제공하며, 이때 제1 클레이드와 제2 클레이드는 요법에서 병용 사용하기 위해 서로 상이하다.
- [0244] 본 발명은 또한 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원 및 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원의 조합을 제공하며, 이때 제1 클레이드와 제2 클레이드는 요법에서 사용하기 위해 서로 상이하다.
- [0245] 본 발명은 또한 환자에서 면역 반응을 생성하기 위한 의약품의 제조에서 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원의 용도를 제공하며, 이때 의약품은 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원과 함께 투여하기 위해 제조되고 (또는 함께 투여되고), 이때 제1 클

레이드와 제2 클레이드는 서로 상이하다.

- [0246] 본 발명은 또한 (i) H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원 및 (ii) H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원의 용도를 제공하며, 이때 제1 클레이드 및 제2 클레이드는 환자에서 면역 반응을 발생시키기 위한 의약품의 제조에서 서로 상이하다.
- [0247] 본 발명은 또한 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원으로 이전에 면역화된 환자에서 면역 반응을 발생시키기 위한 의약품의 제조에서 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원의 용도를 제공하며, 이때 제1 클레이드와 제2 클레이드는 상이하다. 이들 미리-면역화된 환자는 다양한 방식으로, 예컨대 H5 헤마글루티닌으로의 재면역화에 반응하는 기억 B 세포의 존재에 의해 일반적인 집단과 구별된다.
- [0248] 본 발명은 또한 환자에서 면역 반응을 발생시키기 위한 의약품의 제조에서 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제1 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원의 용도를 제공하며, 이때 환자는 H5 인플루엔자 A 바이러스의 제2 클레이드로부터의 인플루엔자 바이러스 항원으로 후에 면역화될 것이며, 이때 제1 클레이드와 제2 클레이드는 상이하다.
- [0249] 본 발명에 따라 발생된 면역 반응은 일반적으로 항체 반응, 바람직하게는 보호 항체 반응을 포함할 것이다. 항체 반응의 평가, 중화 능력 및 인플루엔자 바이러스 백신접종 후 보호에 대한 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 인간 연구는 인간 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌에 대한 항체 역가가 보호와 연관되어 있다는 것을 보여주었다(약 30-40의 혈청 시료 적혈구응집-억제 역가는 동종 바이러스에 의한 감염으로부터 약 50% 보호를 제공)[180]. 항체 반응은 일반적으로 적혈구응집 억제, 미세중화법, 일원 방사 면역확산(SRID), 및/또는 일원 방사 용혈(SRH)에 의하여 측정된다. 이들 분석 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0250] 본 발명의 조성물은 다양한 방식으로 투여될 수 있다. 가장 바람직한 백신접종 경로는 근육내 주입(예컨대 팔 또는 다리)에 의한 것이나, 다른 이용가능한 경로는 피하조직 주입, 비강내[181-183], 구강[184], 진피내[185,186], 경피, 피부[187] 등을 포함한다.
- [0251] 본 발명의 백신은 성인 및 어린이 모두의 치료에 사용될 수 있다. 인플루엔자 백신은 현재 6개월령부터 소아 및 성인 면역화에 사용되도록 제안되고 있다. 따라서, 환자는 1세 미만, 1 내지 5세, 5 내지 15세, 15 내지 55세, 또는 적어도 55세일 수 있다. 백신 투여에 바람직한 환자는 고령(예컨대 50세 이상, 60세 이상, 및 바람직하게는 65세 이상), 유아(예컨대 5세 이하), 입원 환자, 건강관리 종사자, 군인 및 군사 요원, 임산부, 만성 환자, 면역결핍 환자, 백신 투여 전 7일 이내에 항바이러스 화합물(예컨대 오셀타미비르 또는 자나미비르 화합물; 하기 참조)을 투여한 환자, 난 알레르기가 있는 사람 및 해외여행자이다. 백신은 이들 그룹에 단독으로 적합하지는 않지만, 그러나 집단에서 보다 일반적으로 사용될 수 있다. 유행 군주에 대해서는, 모든 연령의 그룹으로의 투여가 바람직하다.
- [0252] 바람직한 본 발명의 조성물은 효능에 대한 CPMP 기준 중 1, 2 또는 3을 만족한다. 성인의 경우(18-60세), 이들 기준은: (1) $\geq 70\%$ 혈청방어율; (2) $\geq 40\%$ 혈청전환율; 및/또는 (3) GMT의 ≥ 2.5 배 증가이다. 고령자의 경우(>60세), 이들 기준은: (1) $\geq 60\%$ 혈청방어율; (2) $\geq 30\%$ 혈청전환; 및/또는 (3) GMT의 ≥ 2 배 증가이다. 이들 기준은 적어도 50명의 환자를 대상으로 한 공개 표식 연구에 기초한다.
- [0253] 본 발명의 프라임-부스트 실시형태에서, 환자는 다수의 용량 계획을 실시한다. 다수의 용량 계획에서 다양한 용량이 동일하거나 상이한 경로, 예컨대 비경구 프라임 및 점막 부스트, 점막 프라임 및 비경구 부스트 등에 의해 제공될 수 있다. 다수의 용량은 통상적으로 적어도 1주(예컨대 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 6주, 약 8주, 약 10주, 약 12주, 약 16주 등) 간격으로 투여될 것이다.
- [0254] 본 발명이 상이한 H5 클레이드에 대하여 이전에 면역화된 환자를 면역화(부스팅)하는 것을 포함하는 경우, 부스터 용량은 이전 용량 후 수개월, 예컨대 적어도 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 36개월, 48개월, 60개월 또는 그 이상에 제공될 수 있다.
- [0255] 조성물이 H5 인플루엔자 A 바이러스의 하나 이상의 클레이드로부터의 HA를 포함하는 실시형태에서, 이 조성물은 단일 용량 계획 또는 다수 용량 계획에 의해 투여될 수 있다. 1회 용량 이상의 투여(일반적으로 2회 용량)는 특히 면역학적으로 미경험 환자, 예컨대 인플루엔자 백신을 전에 투여받은 경험이 없는 사람, 또는 H5와 같은 신규의 HA 아형에 대한 백신화에 유용하다. 상기와 같이, 다수의 용량은 일반적으로 적어도 1주 간격(예컨대 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 6주, 약 8주, 약 10주, 약 12주, 약 16주 등)으로 투여될 것이다.

- [0256] 본 발명의 조성물은 다른 백신과 실질적으로 동시에, 예컨대 홍역 백신, 볼거리 백신, 풍진 백신, MMR 백신, 수두 백신, MMRV 백신, 디프테리아 백신, 파상풍 백신, 백일해 백신, DTP 백신, 컨주게이트된 *H. influenza* 타입 b 백신, 불활성화 폴리오바이러스 백신, B형 간염 바이러스 백신, 수막구균 컨주게이트 백신 (예컨대 4가 A-C-W135-Y 백신), 호흡기 세포융합 바이러스 백신, 폐렴구균 컨주게이트 백신 등과 실질적으로 동시에(예컨대 동일한 의학 자문 또는 의료 전문가나 예방접종 센터에 방문시에) 환자에 투여될 수 있다. 폐렴구균 백신 또는 수막구균 백신이 실질적으로 동시에 투여되는 것이 특히 노령의 환자에 유용하다.
- [0257] 유사하게, 본 발명의 조성물은 항바이러스 화합물, 특히 인플루엔자 바이러스에 대하여 활성인 항바이러스 화합물(예컨대, 오셀타미비르 및/또는 자나미비르)이 실질적으로 동시에(예컨대 동일한 의학적 자문 또는 의료 전문가 방문시에) 투여될 수 있다. 이들 항바이러스는 뉴라미다아제 억제제, 예컨대 (3R,4R,5S)-4-아세틸아미노-5-아미노-3-(1-에틸프로폭시)-1-시클로헥센-1-카르복시산 또는 5-(아세틸아미노)-4-[(아미노이미노메틸)-아미노]-2,6-안하이드로-3,4,5-트리데옥시-D-글리세로-D-갈락토논-2-에논산 및 이들의 에스테르(예컨대 에틸 에스테르) 및 이들의 염(예컨대 포스페이트 염)을 포함한다. 바람직한 항바이러스는 (3R,4R,5S)-4-아세틸아미노-5-아미노-3-(1-에틸프로폭시)-1-시클로헥센-1-카르복시산, 에틸 에스테르, 포스페이트(1:1)이며, 이는 오셀타미비르 포스페이트(TAMIFLU™)로도 알려져 있다.
- [0258] **다른 실시형태**
- [0259] 상기 실시형태에 더하여, 본 발명은 또한 (a) H5 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 하나의 균주(예컨대 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 상이한 균주)로부터의 헤마글루티닌 항원 및 (b) (i) H7 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 하나의 균주 및/또는 (ii) H9 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 하나의 균주로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 따라서 백신은 헤마글루티닌 H5+H7, H5+H9 또는 H5+H7+H9를 포함할 수 있다. H5 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 두개의 균주(예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6 상이한 균주)로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 것이 바람직하고, 이 경우 이들 균주는 본원에 설명된 바와 같이 상이한 클레이드인 것이 바람직하다. 오직 하나의 H5 균주와 하나의 H7 균주로부터의 헤마글루티닌과의 2가 조합은 바람직하지 않다 [188].
- [0260] 본 발명은 또한 (a) H5 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 하나의 균주(예컨대 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 상이한 균주)로부터의 헤마글루티닌 항원 및 (b) 인플루엔자 A 바이러스 아형 H2, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 및/또는 H16 중 적어도 두개로부터의 헤마글루티닌 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 하나 이상의 H5 균주로부터의 헤마글루티닌이 포함된다면 이들 균주는 본원에 설명된 바와 같이 상이한 클레이드인 것이 바람직하다.
- [0261] **일반**
- [0262] 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함(including)" 및 "구성된(consisting)"을 포괄하며 예컨대 X를 "포함하는" 조성물은 배타적으로 X로 구성될 수 있거나 또는 추가적인 무엇인가를 포함할 수 있으며, 예컨대 X + Y 이다.
- [0263] 단어 "실질적으로(substantially)"는 "완전히(completely)"를 배제하지 않으며, 예컨대 Y가 "실질적으로 부재한" 조성물은 Y가 완전히 부재할 수 있다. 필요한 경우, 단어 "실질적으로"는 본 발명의 정의에서 생략될 수 있다.
- [0264] 수치 x에 관한 용어 "약"은, 예를 들어 $x \pm 10\%$ 를 의미한다.
- [0265] 특별한 언급이 없다면, 둘 이상의 성분이 혼합되는 단계를 포함하는 방법은 특정 혼합 순서를 요하는 것이 아니다. 따라서 성분들은 어떠한 순서로 혼합될 수도 있다. 세 성분이 존재하는 경우, 두 성분이 서로 조합될 수 있고, 그 후 조합물이 제3 성분 등과 조합될 수 있다.
- [0266] 동물(및 특히 소) 물질이 세포 배양에 사용되는 경우, 감염성 해면상뇌증(TSE), 및 특히 소 해면상뇌증(BSE)이 부재한 공급원으로부터 획득하여야 한다. 전체적으로, 동물-유래된 물질이 전부 부재인 배양 세포가 바람직하다.
- [0267] 화합물이 조성물의 일부로서 신체에 투여되는 경우, 그 화합물은 적합한 프로드러그로 대안적으로 대체될 수 있다.
- [0268] 세포 기질이 재배열 또는 역유전학 절차에 사용되는 경우, 예컨대 Ph Eur general chapter 5.2.3에서와 같이 인간 백신 생산에 사용이 승인된 것이 바람직하다.

[0269] **본 발명을 행하기 위한 방식**

[0270] **인간 연구 I**

[0271] 환자를 H5N3 균주 A/duck/Singapore/1997 (클레이드 0)로부터 제조된 인플루엔자 백신으로 면역화하였다. 백신은 보조제 첨가되지 않았거나(그룹 2) 또는 MF59 수중유 에멀전(그룹 1)으로 보조제 첨가되었다. 환자의 제3 그룹(그룹 3)은 H5N3 백신을 투여하지 않았다.

[0272] 그 후의 인플루엔자 시즌(적어도 6년 후)에 환자를 H5N1 균주 (A/Vietnam/1194/2004 = 클레이드 1; 클레이드 2 또한 사용할 수 있음)로 제조된 인플루엔자 백신으로 면역화하였다. 두개의 용량을 0일 및 21일에 투여하였고, 두개 모두 7.5 μ g 헤마글루티닌 및 MF59 보조제를 함유한다. 항원적으로 다양한 H5 바이러스에 대한 면역화 전후 항체를 혈구응집-억제 (HAI), 항체 중화 (MN) 및 단일 방사 용혈 (SRH)에 의해 측정하였다.

[0273] 결과를 표 1에 나타낸다. 간략하게, 이전에 클레이드 0 백신으로 프라이밍된 환자는 프라이밍되지 않은 환자보다 새로운 클레이드에 대하여 더 우수하고 더욱 신속한 면역 반응을 갖추었다. 프라이밍된 그룹에서, 보조제 첨가된 프라이밍 용량을 투여받은 환자들은 보조제 첨가되지 않은 프라이밍 용량을 투여받은 환자보다 더 우수한 면역 반응을 갖추었다.

[0274] 기하 평균 항체 역가 및 혈청-반응은 프라이밍되지 않은 피험체보다 프라이밍된 피험체에서 현저하게 더 높았다. 한 용량의 백신 후 7일에, 그룹 1 환자의 $\geq 80\%$ 가 테스트한 모든 클레이드 1, 2.1, 2.2, 및 2.3 조류 H5 바이러스 변이체, 및 본래의 A/duck/Singapore/97 클레이드 0 항원에 대하여 $\geq 1:40$ 의 혈청보호 HAI 역가를 달성하였다. 또한, 프라이밍된 피험체가 그들의 프라이밍 항원에 우선적으로 반응한다는 것을 제안하는 증거는 없었으며, "최초 안티제닉신"에 대한 우려를 경감시킨다 [190].

[0275] 따라서 항원적으로 유전학적으로 거리가 먼 상이한 H5 클레이드 내의 균주로부터 제조된 백신으로 수년 전에 프라이밍된 개체에서 한 백신 용량 후 다양한 인플루엔자 H5N1 바이러스에 대한 보호 항체 반응을 신속하게 유도할 수 있다.

[0276] 이 임상 연구의 더욱 상세한 내용은 참고문헌 191에서 입수가 가능하다. 그곳에서 주지하는 바와 같이, 클레이드 1 균주 또는 클레이드 2.2 균주에 대한 항체의 기하 평균 역가는 프라이밍되지 않은 피험체(그룹 0) 중에서 보다는 프라이밍된 피험체(그룹 1 및 2) 중에서 현저하게 더 높았다. 14일 이후, 두 바이러스에 대한 항체의 역가는 순수-프라이밍된 그룹(그룹 2)에서 보다는 보조제-프라이밍된 그룹(그룹 1)에서 현저하게 더 높았다. 가장 높은 역가는 그룹 1에서 14일에 관찰되었다. 백신접종 후 역가와 이전 용량의 H5N3 백신 또는 그들의 항원 성분 간의 관계는 관찰되지 않았다. 7일째에, 그룹 1 환자의 적어도 80%가 혈구응집-억제 분석에서 테스트한 모든 야생형 바이러스에 대하여 적어도 1:40의 역가를 가졌다.

[0277] 유행병 전파의 모델링은 유행병의 발생 후 2주 내에 반응의 유도에 의해 바이러스 전달의 최대 감소가 달성된다는 것을 나타낸다. 두개 용량의 백신이 필요할 수 있기 때문에, 따라서 신속한 백신 전개가 어려울 것이다. 이 인간 연구는 그러나 H5 항원 (특히 보조제 첨가된 H5 항원)으로 개체를 프라이밍하는 것이 저용량 항원적으로 별개의 (상이한 H5 HA 클레이드) 백신의 투여 후 신속하게 발휘된, 장기 지속되는 면역 기억을 유도한다는 것을 나타낸다.

[0278] 다른 연구에서, A/Vietnam/1194/2004 클레이드 1 H5N1에 상호-반응성인 기억 B 세포가 기준선에서 모든 3개 환자 그룹의 혈액에서 필적하는 빈도로 검출되었다. 그럼에도 불구하고, 제1 부스터 용량 후 3주에 그룹 1의 환자들은 그룹 2 및 3보다 현저하게 더욱 H5N1-특이적 기억 B 세포를 나타내었으며, 이것은 이전의 보조제 첨가된 H5N3 백신으로의 프라이밍이 H5N1에 대하여 더 높은 상호 반응성을 갖는 기억 B 세포의 풀을 유도하였다는 것을 제안한다. 일관하여, 그룹 1의 환자들은 그룹 2 또는 3의 환자들 보다 더 빠르고 더 높은 항체 반응을 가졌고, 그룹 1 및 2의 환자들은 그룹 3의 환자들 보다 현저하게 더 우수하고 더 빠르게 반응하였다. 클레이드 1 백신의 한 용량 후 7일째에, 그룹 1의 모든 환자들이 클레이드 0, 1, 2.1.3, 2.2 및 2.3.4로부터의 여러 항원적으로 별개의 고도의 병원성 야생형 바이러스에 대하여 혈청전환을 달성한 반면, 그룹 2에서는 14일째에만 필적하는 혈청전환율이 관찰되었다. 반대로, 그룹 3 환자들에 대하여 클레이드 0 및 클레이드 1 바이러스에 대하여 80% 혈청전환율을 달성하기 위해 두개 용량의 클레이드 1 백신이 필요하였다.

[0279] **인간 연구 II**

[0280] 성인 및 고령의 환자들은 MF59로 보조제 첨가된 H5N1 백신의 두개 프라이밍 용량(0일 및 21일)을 투여받았다. 바이러스 균주는 A/Vietnam/1194/2004이었으며, 이것은 클레이드 1로 분류된다. 면역 반응을 43일에 평가하였으

며 모든 3가지 CPMP 기준을 만족하였다: 혈청보호 및 혈청전환 모두 적어도 80%이었고, GMT 증가는 적어도 5배였다.

[0281] 두개의 프라이밍 용량 후 약 18개월에, 60명 환자들에게 MF59로 보조제 첨가되었지만 클레이드 2로 분류되는 군주 A/turkey/Turkey/1/05 기반인 H5N1 백신의 추가용량을 제공하였다. 이 용량 직전 및 그 다음 7일과 21 후에 혈청 샘플을 수집한다. 혈청 샘플에 대하여 HI, SRH, 및 MN 테스트에 의해 면역성을 평가한다.

[0282] 인간 연구 III & IV

[0283] Trial NCT00703053은 클레이드 1 백신 (A/VietNam/1203/04) 및/또는 클레이드 2 백신 (A/Indonesia/05/05)을 사용한다. 이전에 H5 군주에 노출되지 않은 성인: (a) 0일에 클레이드 1 백신 및 28일에 클레이드 2 백신; (b) 0일에 클레이드 1 백신 및 180일에 클레이드 2 백신; 또는 (c) 0일 및 28일에 클레이드 1과 클레이드 2 백신의 조합을 투여받는다. 오직 클레이드 1 백신 또는 클레이드 2 백신을 투여하는 적절한 대조군이 포함되지만, 둘 모두는 아니다. 총 항원 용량은 매번 90 μ g HAS인데, 그룹 (a) & (b)를 위해서 단일 군주로부터 90 μ g 또는 그룹 (c)를 위해서 각 군주로부터 2x45 μ g이다. 연구는 보조제 첨가하지 않은 불활성화 서브비리온 백신을 사용한다. 연구는 2010년까지 완료되지 않을 것이다.

[0284] Trial NCT00680069는 이전에 클레이드 1 백신 (A/VietNam/1203/04)을 투여받은 환자에게 클레이드 2 백신 (A/Indonesia/05/05)의 단일 용량을 투여하는 것을 포함한다. 항원 용량은 불활성화 서브비리온 백신 15 μ g 또는 90 μ g이다. 연구는 2009년까지 완료되지 않을 것이다.

[0285] 마우스 연구 I & II (DNA 면역화; 참조를 위해)

[0286] 관련되지 않은 실험에서 [192], A/Vietnam/ 1203/04 (클레이드 1) 및 A/Indonesia/05/05 (클레이드 2) 바이러스로부터 HA를 발현하는 아데노바이러스 벡터가 구축되었다.

[0287] BALB/c 마우스를 면역화하기 위해 벡터를 모두 분리하고 그리고 조합하여 사용하였다. 총 용량은 10⁸ pfu 벡터였고, 조합 그룹은 각 벡터의 5x10⁷ pfu를 투여받았다. 4주 후에 마우스는 동일한 백신 구조체(들)를 함유하는 부스터를 투여받았고 3주 후 중화된 항체 및 혈구응집-억제 항체를 검출하기 위해 혈액을 획득하였다.

[0288] 마우스는 벡터 단독 생성된 헤마글루티닌화-억제 및 중성화 항체 중 하나로 백신화되었지만, 상호-반응성을 검출되지 않았다. 그러나, 두 벡터로 백신화된 마우스는 두 클레이드로부터의 바이러스에 대하여 보호 중화 항체 역가를 도출하였다.

[0289] 유사한 연구에서 [193] 마우스는 플라스미드 발현 벡터로서 5 또는 10 헤마글루티닌 DNA의 조합을 투여받았다. 5 HA의 제1 조합은 클레이드 0, 2.2 (3 군주) 및 2.5 내의 군주 유래였다. 5 HA의 제2 조합은 클레이드 0, 1, 2.1.3, 2.2 및 2.3.4 내의 군주 유래였다. 10-가는 이들 10 군주의 조합이었다. 백신은 HPAI H5N1의 다수의 군주를 중화하는 항체를 도출하였다.

[0290] 또한 이 종류의 3-가 DNA 백신을 사용하여 닭을 테스트하였다 [193]. 군주는 A/VietNam/1203/04 (클레이드 1), A/Anhui/1/05 (클레이드 2.3.4) 및 A/Indonesia/05/05 (클레이드 2.1.3)이었다. 닭이 질환에 대하여 보호되었다.

[0291] 마우스 연구 III

[0292] 참고문헌 8에 상세히 설명한 바와 같이, 마우스는 군주 A/VietNam/ 1203/2004 (클레이드 1) 또는 A/Indonesia/05/2005 (클레이드 2)로부터의 H5 헤마글루티닌을 포함하는 2가 백신을 투여받았다. 두 종류의 2가 백신을 테스트하였다: 하나는 재조합체 H5 헤마글루티닌에 기반하고 하나는 VLP에 기반함. 어떤 백신도 외재성 보조제를 포함하지 않았지만, 재조합 단백질과 비교하여, VLP는 그것의 특정 성질 때문에 내재성 보조제 효과를 제공할 수 있다. 각 일가 VLP를 대조구로서 사용하였다. 항원을 백미드(bacmid)로부터의 Sf9 곤충 세포에서 발현되었다. 2가 백신 중의 항원을 1:1 HA 중량비로 혼합하였다.

[0293] 정량적 ELISA 및 HAI에 의해 면역 반응을 분석하였다. 2가 VLP 혼합물로 백신접종된 모든 마우스는 VietNam/1203/2004 바이러스 (GMT 115 \pm 36) 및 Indonesia/05/2005 바이러스 (80 \pm 0) 모두에 대하여 HAI 항체를 도출하였다. 반대로, 보조제 첨가되지 않은 재조합 단백질로 백신화된 마우스의 33%만이 Indonesia/05/2005 바이러스 (36 \pm 12)에 대하여 HAI 역가를 가졌다.

[0294] 또한 치사 공격 연구에서 면역 반응을 분석하였다. 공격 군주는 두 백신 군주의 PR8/34 재배열체였다. 바이러스

로 공격된 백신접종되지 않은 마우스는 감염 6일 후에 본래 체중의 $\geq 20\%$ 를 손실하였다. 재조합체 HA 단백질의 2가 혼합물로 백신접종된 마우스는 클레이드 1 또는 클레이드 2 공격 균주에 의해 공격되었을 때 그들의 본래 체중의 $\sim 15\%$ 를 손실하였다. 클레이드 1 VLP, 클레이드 2 VLP, 또는 VLP 혼합물로 백신접종되고 그 다음 클레이드 1 바이러스로 공격된 마우스는 체중 손실이 없었으며 감염의 임상 징후가 없었다. 클레이드 1 VLP로 백신접종되고 그 다음 클레이드 2 바이러스로 공격된 마우스는 공격으로부터 보호되지 않았으며, 공격 6일 후 죽었다. 클레이드 2 VLP 또는 VLP 혼합물로 백신접종된 마우스는 모두 클레이드 2 바이러스 공격으로부터 보호되었다.

[0295] 따라서 클레이드 1 및 클레이드 2 VLP는 모두 마우스에서 면역원성이고 상동 균주로의 바이러스 공격에 대하여 보호되었다. VLP의 2가 혼합물을 사용하였다면 면역성이 유지되었다. 또한, 2가 VLP를 투여받은 마우스는 클레이드 1 또는 클레이드 2 바이러스에 의한 공격에 대하여 보호되었다. 참고문헌 8에 보고된 바와 같이: "이들 결과는 매우 현저하고 H5N1에 대한 다가 백신이 H5N1 인플루엔자의 클레이드 및 서브클레이드의 다양성과 싸우는 그럴듯한 전략이 되는 것으로 보이는 것을 입증한다."

[0296] 본 발명은 오직 예시의 방식으로 설명되었고 본 발명의 범위 및 본질 내에서 변형이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0297] [표 1]

측정	G 1	G 2	G 3
0 일에 HI 역가 ≥ 40 인 환자의 %	0	0	3
8 일에	75	56	12
15 일에	90	60	9
22 일에	75	58	13
43 일에	75	58	45
8 일에 혈청전환을 갖는 환자의 %	75	56	8
15 일에	90	60	10
22 일에	75	58	14
43 일에	75	58	45
1 일에 기하 평균 HI	4	4	4.9
8 일에	72	51	5.9
15 일에	256	79	7.3
22 일에	112	52	8.0
43 일에	95	44	26
8 일에 1 일에 대한 HI의 비율	18	13	1.3
15 일에	64	20	1.56
22 일에	28	13	1.8
43 일에	24	11	5.9
0 일에 MN 역가 ≥ 80 인 환자의 %	0	0	0
8 일에	9	5	1
15 일에	9	9	1
22 일에	12	9	1
43 일에	12	10	5
1 일에 기하 평균 MN 역가	10	10	10
8 일에	219	151	11
15 일에	1145	473	12
22 일에	375	324	12
43 일에	415	241	33
8 일에 1 일에 대한 MN의 비율	22	15	1.1
15 일에	115	47	1.2
22 일에	37	32	1.2
43 일에	41	24	3.3

참고문헌

- [1] Riley *et al.* (2007) *PLoS Med.* 4(6):e218.
- [2] Felsenstein (1989) *Cladistics* 5: 164-166.
- [3] *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.
- [4] WO96/37624.
- [5] WO98/46262.

[0298]

- [6] WO95/18861.
- [7] Bright *et al.* (2008) *PLoS ONE* 3:e1501.
- [8] Crevar & Ross (2008) *Virology Journal* 5:131.
- [9] WO02/28422.
- [10] WO02/067983.
- [11] WO02/074336.
- [12] WO01/21151.
- [13] WO02/097072.
- [14] WO2005/113756.
- [15] Huckriede *et al.* (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [16] WO2005/107797.
- [17] Herlocher *et al.* (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
- [18] Hoffmann *et al.* (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
- [19] Subbarao *et al.* (2003) *Virology* 305:192-200.
- [20] Liu *et al.* (2003) *Virology* 314:580-590.
- [21] Ozaki *et al.* (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
- [22] Webby *et al.* (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
- [23] WO00/60050.
- [24] WO01/04333.
- [25] US 6649372.
- [26] WO2007/002008.
- [27] Neumann *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.
- [28] WO2006/067211.
- [29] WO01/83794.
- [30] Hoffmann *et al.* (2000) *Virology* 267(2):310-7.
- [31] WO97/37000.
- [32] Brands *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [33] Halperin *et al.* (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [34] Tree *et al.* (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [35] Kistner *et al.* (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [36] Kistner *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [37] Bruhl *et al.* (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [38] Pau *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [39] WO03/076601.
- [40] WO2005/042728.
- [41] WO03/043415.
- [42] WO01/85938.
- [43] WO2006/108846.
- [44] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [45] WO2006/071563.
- [46] WO2005/113758.
- [47] WO2006/027698.
- [48] WO97/37000
- [49] WO03/023021
- [50] WO03/023025
- [51] WO97/37001.
- [52] WO01/22992.
- [53] Hehme *et al.* (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.
- [54] Treanor *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
- [55] Keitel *et al.* (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
- [56] Zangwill *et al.* (2008) *J Infect Dis.* 197(4):580-3.
- [57] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.

[0299]

- [58] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
- [59] Ji *et al.* (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [60] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7-12.
- [61] Lahijani *et al.* (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173-80.
- [62] Lokteff *et al.* (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- [63] EP-B-0870508.
- [64] US 5948410.
- [65] WO2007/052163.
- [66] US patent 6355271.
- [67] WO00/23105.
- [68] US 4,680,338.
- [69] US 4,988,815.
- [70] WO92/15582.
- [71] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [72] Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res*. 64(2):79-83.
- [73] Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol*. 204(1):64-74.
- [74] US patents 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.
- [75] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [76] WO2004/060308.
- [77] US 6,924,271.
- [78] US2005/0070556.
- [79] US 5,658,731.
- [80] WO2004/064759.
- [81] US patent 5,011,828.
- [82] WO2004/87153.
- [83] US 6,605,617.
- [84] WO02/18383.
- [85] WO2004/018455.
- [86] WO03/082272.
- [87] WO2006/002422.
- [88] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [89] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [90] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [91] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [92] US 5,057,540.
- [93] WO96/33739.
- [94] EP-A-0109942.
- [95] WO96/11711.
- [96] WO00/07621.
- [97] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [98] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [99] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [100] WO95/17211.
- [101] WO98/42375.
- [102] Singh *et al*] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [103] WO99/27960.
- [104] US 6,090,406

[0300]

- [105] US 5,916,588
- [106] EP-A-0626169.
- [107] WO99/52549.
- [108] WO01/21207.
- [109] WO01/21152.
- [110] WO02/072012.
- [111] Dyakonova et al. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
- [112] FR-2859633.
- [113] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
- [114] WO2004/064715.
- [115] De Libero et al, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496.
- [116] US patent 5,936,076.
- [117] Oki et al, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640
- [118] US2005/0192248
- [119] Yang et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822
- [120] WO2005/102049
- [121] Goff et al, *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603
- [122] WO03/105769
- [123] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
- [124] WO03/011223.
- [125] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [126] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [127] US-6586409.
- [128] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [129] US2005/0215517.
- [130] WO90/14837.
- [131] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [132] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [133] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [134] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [135] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [136] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [137] US-2007/014805.
- [138] WO95/11700.
- [139] US patent 6,080,725.
- [140] WO2005/097181.
- [141] WO2006/113373.
- [142] Han et al. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference*, Paris, 9-10 June 2005.
- [143] US- 6630161.
- [144] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [145] WO02/26757.
- [146] WO99/62923.
- [147] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [148] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [149] WO98/40100.
- [150] US patent 6,207,646.
- [151] US patent 6,239,116.
- [152] US patent 6,429,199.
- [153] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.

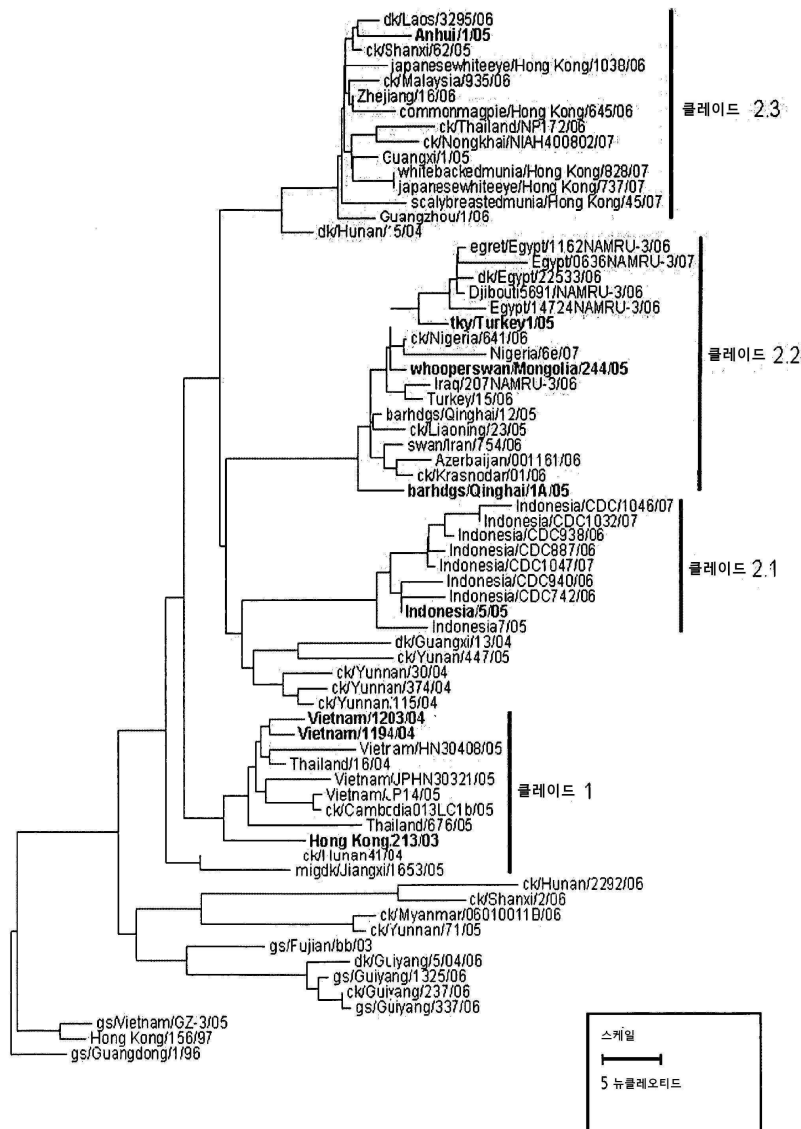
[0301]

- [154] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [155] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [156] WO01/95935.
- [157] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [158] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [159] WO03/035836.
- [160] WO01/22972.
- [161] Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
- [162] Thompson *et al.* (2005) *J Leukoc Biol* 78:1273-80.
- [163] UK patent application GB-A-2220211.
- [164] WO 94/21292.
- [165] WO94/00153.
- [166] WO95/17210.
- [167] WO96/26741.
- [168] WO93/19780.
- [169] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [170] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
- [171] Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [172] WO2005/089837.
- [173] US patent 6,692,468.
- [174] WO00/07647.
- [175] WO99/17820.
- [176] US patent 5,971,953.
- [177] US patent 4,060,082.
- [178] EP-A-0520618.
- [179] WO98/01174.
- [180] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.
- [181] Greenbaum *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
- [182] Zurbriggen *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
- [183] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
- [184] Mann *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
- [185] Halperin *et al.* (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
- [186] Herbert *et al.* (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
- [187] Chen *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
- [188] WO2008/115785.
- [189] *Towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses.* WHO/OIE/FAO H5N1 evolution working group.
- [190] Haaheim (2003) *Dev Biol* 115: 49-53.
- [191] Stephenson *et al.* (2008) *N Engl J Med* 359:1631-33.
- [192] Hoelscher *et al.* (2008) *J Infect Dis* 197 :1185-8.
- [193] Rao *et al.* (2008) *PLoS ONE* 3(6):e2432.

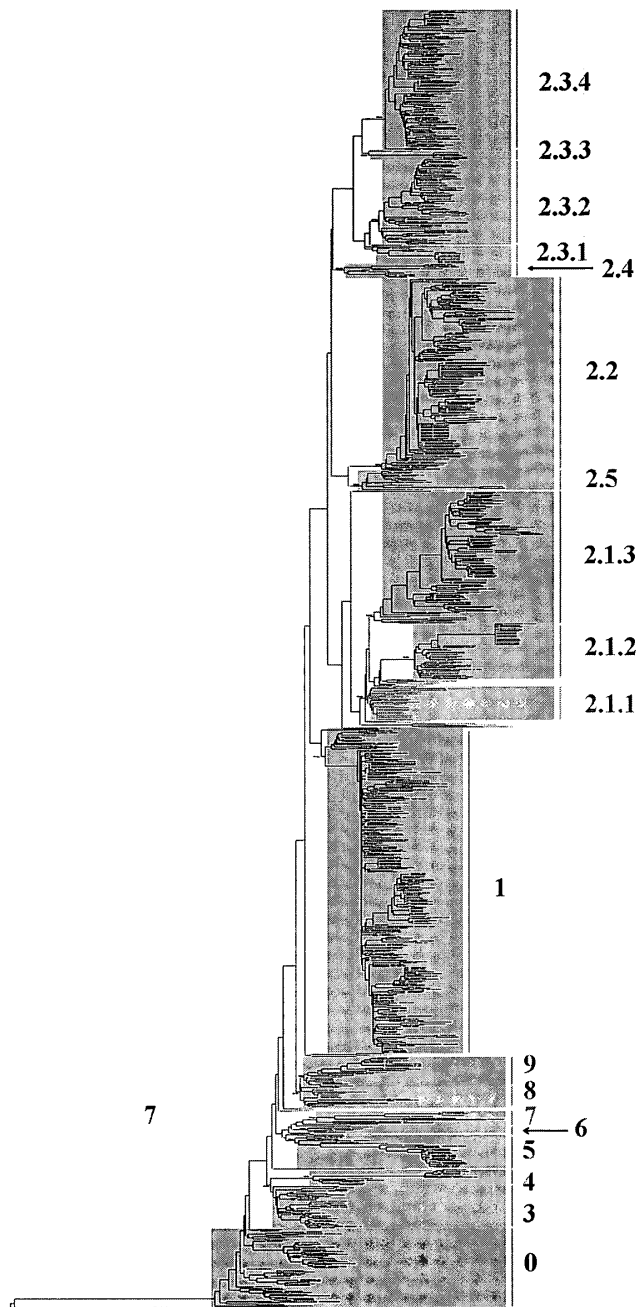
[0302]

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

<120> VACCINATION WITH MULTIPLE CLADES OF H5 INFLUENZA A VIRUS

<130> P049768W0

<140> PCT/IB2008/_____

<141> 2008-11-25

<150> US 61/004334

<151> 2007-11-26

<150> GB 0810305.3

<151> 2008-06-05

<160> 16

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 1707

<212> DNA

<213> Influenza A virus (A/Hong Kong/213/03)

<400> 1

```

atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt 120

actgttacac atgcccaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctcta tttgagagat ttagtgtag ctggatggct cctcggaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat 300
ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaacgact atgaagaatt gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc caaaaattc ttgtccagt 420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc aaggaaagtc ctctttttc 480
aggaatgtgg tatggcttat caaaaagaac aatgcatacc caacaataaa gaggagctac 540

aataatacca accaagaaga tcttttggtt ttgtggggga ttcacatcc taatgatgcg 600
gcagagcaga ctaggtctta tcaaaacceca accacctaca tttcgttgg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaatgga 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagcaat 780
ggaaatttca ttgtccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctgagcaatt 840
atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960

tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggtca gaaatagccc tcaaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg attatttga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttagaa 1260

```

aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380

gtcaagaacc tttagacaaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
aacggttgtt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac 1500
ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaaagaga ggaaataagt 1560
ggagtaaaat tggagtcaat aggaacttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatggg 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 2
<211> 1707
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/Indonesia/5/05)

<400> 2

atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacia ttcaacagag cagggttgaca caatcatgga aaagaacgtt 120
actgttacac atgcccaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctaatt ttaagagat ttagttagtag ctggatggct cctcgggaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat 300
ccaaccaatg acctctgtta cccagggagt ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt caaatcatcc caaaagtgc ttggtccgat 420

catgaagcct catcaggagt gagctcagca tgtccatacc tgggaagtcc ctctttttt 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaaaagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggaa ttaccatcc taatgatgcg 600
gcagagcaga caaggctata tcaaaacca accacctata ttccattgg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gattgggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaaa cctaattgat caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctgagcaatt 840

atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtctttgca acagggtca gaaatagccc tcaaagagag 1020
agcagaagaa aaaagagagg actatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080

cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactca 1200
 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttagaa 1260

aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt ttctagatgt ctggacttat 1320
 aatgccgaac ttctggttct catggaataat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
 gttaagaacc tctacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
 aacggttggt tcgagtctca tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tataagaaac 1500
 ggaacgtaca actatccgca gtattcagaa gaagcaagat taaaaagaga ggaaataagt 1560
 ggggtaaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caatttattc aacagtggcg 1620
 agttccctag cactggcaat catgatggct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680

tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 3
 <211> 1654
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/Chicken/Hong Kong/SF219/01)
 <400> 3

agtcttgta aaagtgatc gatttgcatt ggttaccatg caaacaactc gacagagcag 60
 gttgacacaa taatggaaaa gaacgttact gttacacatg cccaagacat attggaaaag 120
 acacacaatg ggaagctctg cgatctagat ggagtgaagc ctctaatttt gagagattgt 180
 agtgtagctg gatggctcct cggaaaccca atgtgtgacg aattcatcaa tgtgccggaa 240
 tggctttaca tagtggagaa ggccagtcca gccaatgacc tctgttacc aggggatttc 300

aacgactatg aagaactgaa acacctattg agcagaataa accattttga gaaaattcag 360
 atcatcccca aaagtctctg gtccaatcat gaagcctcat caggggtgag ctgagcatgt 420
 ccataccttg ggaagtcctc ctttttcaga aatgtggtat ggcttatcaa aaagaacagt 480
 acatacccaa caataaagag gagctataat aataccaacc aagaagatct tttggtactg 540
 tgggggattc accatcctaa tgatgcggca gagcagacaa agctctatca aaaccaacc 600
 acctatattt ccgttggaa atcaacacta aaccagagat tggtaacaaa aatagctact 660
 agatccaaag taaacgggca aagtgaaga atggagtctt tctggacaat tttaaagccg 720

aatgatgcta tcaatttcga gagtaatgga aatttcattg ctccagaata tgcatacaaa 780
 attgtcaaga aaggggactc atcaattatg aaaagtgaat tggaatatgg taactgcaac 840
 accaagtggc aaactccaat gggggcgata aactctagta tgccattcca caacatacac 900

cctctcacca tcggggaatg ccccaaatat gtgaaatcaa acagattagt ccttgcgact 960
ggactcagaa ataccctca aagagagaga agaagaaaa agagaggact atttgagct 1020
atagcaggtt ttatagagg aggatggcag ggaatgtag atggttgta tgggtaccac 1080
catagcaatg agcaggggag tggatcgct gcagacaaag aatccactca aaaggcaata 1140

gatggagtta ccaataaggt caactcgatc attgacaaaa tgaacactca gtttgaggcc 1200
gttgaaggg aatttaataa cttagaaagg agaatagaaa atttaacaa gaagatggaa 1260
gacggattcc tagatgtctg gacttataat gctgaacttc tggttctcat ggaaaatgag 1320
agaactctag actttcacga ctcaaatgtc aagaaccttt acgacaaggt ccgactacag 1380
cttagggata atgcaaagga gctgggtaac ggctgtttcg agttctatca caaatgtgat 1440
aatgaatgta tggaaagtg aaaaaacgga acgtatgact acccgagta ttcagaagaa 1500
gcaagactaa acagagagga aataagtga gtaaaattgg aatcaatggg aacttacaa 1560

atactgtcaa tttattcaac agtggcgagt tccctagcac tggcaatcat ggtagctggt 1620
ctatctttat ggatgtgctc caatggatcg ttac 1654

<210> 4
<211> 1668
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/chicken/Guiyang/441/2006)
<400> 4

atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata atcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacia ctgcacagtg caggttgaca cgataatgga aaagaatgtt 120
actgtaacac atgcccaga catactggaa aagacacaca atgggaagct ctgcagtcta 180
gatggagtga agcctctaatt ttttaagagat ttagttagtag ctggatggct cctcggaac 240

ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgcc gaatggtctt acatagtga gaaggccagt 300
ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaacgact acgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc caaaagtgc ttggcccaat 420
catgaagcct cactaggggt gagctcagca tgcataacc tgggggagtc ctccttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agttcatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttagta ttgtggggga tccatcacc taatgatgcg 600
gcagagcaga taaagcttta tcaaaacca aacacctata tttccgttgg aacatcaaca 660

ctaaaccaga ggttggtacc aacaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtga 720
aggatggagt tcttctggac aattttaag ccgaatgata ctatcaattt cgagagtaat 780

ggaaatttca ttgtccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctgagcaatt 840
 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg 900
 ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca actggactca gaaataccct tcaaagagag 1020
 agaaggagaa aaaagagagg actatttgga gccatagcag gttttattga gggaggatgg 1080

 cagggaatgg tagacggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtggatac 1140
 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggaa tcaccaataa ggtcaactcg 1200
 atcattaaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggac gggaatttag taacttagaa 1260
 aggagaatag aaaatttaaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gaaagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
 gtcaagaacc tttagcaca agtccgacta cagcttaggg ataatgcaa agagctgggt 1440
 aacggttggt tcgagttcta tcacaaatgt gatgatgaat gtatggaaag tgtaaaaaac 1500

 ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagctagac taaacagaga ggagataaat 1560
 ggagtaaat tggaatcaat gggaacctac caaatactgt caatttactc aacagtggcg 1620
 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatg 1668

 <210> 5
 <211> 1698
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/duck/Guangxi/1681/2004)
 <400> 5

 atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
 attggttacc atgcaaaca ctcgacagag caggttgata caataatgga aaagaatgtt 120
 actgttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaaact ctgcgatcta 180

 gatggagtga agcctctaatt tttgagagat ttagtggttg cgggatggct cctcggaac 240
 ccaatgtgtg atgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccagt 300
 ccagccaatg acctctgta cccaggagat ttcaacgact atgaagaact aaaacaccta 360
 ttgagcagaa taaatcattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagtgc ttggtccaat 420
 catgaagcct catcaggggt gagtcagca tgcataacc aggggaggcc ctcctttttc 480
 aggaatgttg tatggcttat caaaaagaac agtgcatacc ctacaataaa gaggagctac 540
 aataatacca gtcaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcacatcc taatgatgag 600

 gcagagcaga caaagctcta tcaaaacca actacctata tttccgttgg aacatcaaca 660

ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaaccg gcagagtga 720
 agaatggagt tcttctggac aattttaag ccgaatgatg ctatcaactt cgagagtaat 780
 ggaaatttca ttgctccaga atatgcctac aaaattgtca agaaaggga ctcagcaatt 840
 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaaat gtcaaactcc aatgggggcg 900
 ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccag 960
 tatgtgaaat caagcagatt agtccttgcg acagggtca ggaatagccc tcaaagagag 1020

 ataagaagaa aaaagagagg actatttga gctatagcag gctttataga gggaggatgg 1080
 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca acgagcaggg gagtggatac 1140
 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa agtcaattcg 1200
 atcattgaca aaatgaacac tcaatttgag gccgttggaa gggaatttaa taatttagaa 1260
 aggagaatag agaattttaa caaaaagatg gaggacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
 gtcaagaacc ttacgacag ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggg 1440

 aacggttgtt tcgatttcta tcacaagtgt gacaatgaat gcatggaaag tgtaagaaac 1500
 ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaagagaga ggaaataagt 1560
 ggagtaaaat tggaatcgat aggaacttac caaatattgt caatttatc aacagtggcg 1620
 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
 tcgttacaat gcagaatt 1698

 <210> 6
 <211> 1707
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/tree sparrow/Henan/4/2004)
 <400> 6

 atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60

 attggttacc atgcaaaca ctcgacagag cagggtgaca caataatgca aaagaacgtt 120
 actgttacac atgccaaga cactactgga aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
 gatggagtga aacctcta ttttaagagat ttagttag ctggatggct cctcggaac 240
 ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccagt 300
 ccagccaatg acctctgta cccaggggat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagtgc ttggtccgat 420
 catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgcataacc aggggagtc ctcctttttc 480

agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtgcatacc caacaataaa gaggagctac 540
 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggga ttcacatcc taatgatgcg 600
 gcagagcaga caaagctcta tcaaaacca accacctata tttccgttgg aacatcaaca 660
 ctaaaccaga gatttggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaagg gcaaagtga 720
 agaatggagt tcttctggac aattttaag ccgaatgacg ctatcaactt cgagagtaat 780
 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaaggga ctcagcaatt 840
 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg 900

 ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg acagggtca gaaatagccc tcaaagagag 1020
 agaagaaga aaaagagagg actatttga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
 cagggaatgg tagatggtt gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtggatac 1140
 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttagaa 1260
 aggagaatag aaaattttaa caagaagatg gaggacggat tcctagatgt ctggacttat 1320

 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
 gtcaagaacc ttacgaaaa ggtccgacta caacttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
 aacggttgtt tcgatttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaaaaaac 1500
 ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaacagaga ggaaataagt 1560
 ggagtaaaat tggaatcaat aggaacttac caatactgt caatttatc aacagtgggtg 1620
 agttccctag cactggcaat catggttagt ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
 tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 7

<211> 1707

<212> DNA

<213> Influenza A virus (A/chicken/Shanxi/2/2006)

<400> 7

atggagaaaa tagtcttct tcttgaata atcggctctt ttaaaagtga tcagatttgc 60
 gtgtgttacc atgcaaaca ctcaacagag caggttgaca caataatga aaagaacgtt 120
 actgttacac atgctcaaga catactggag aagacacaca acgggaagct ctgcgaccta 180
 gatggagtga agcctctcat ttgaaagat ttagttag ctggatggct cctcggaac 240
 cctatgtgtg acgaatttat caatgtgtcg gaatggtctt acatagtga gaaggccagt 300

ccagccaatg gcctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaact gaaacaccta 360

ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt aagatcatcc ccaaagtgc ttgtccaat 420

catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgttctatc tggggaagcc ctctttttc 480

agaaatgttg tatggcttat caaaaagaat aatacatacc caccaataaa ggtgaactac 540

accaatacca accaagaaga tcttttggtta ctgtggggga ttcacatcc caacgatgag 600

acagagcaga taaagatcta tcaaaacceca accacctata tttcgttgg aacatcaaca 660

ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actaaatccc aagtgaacgg gcaaagtga 720

agaatggagt tcttctggac aattttaag ccgaatgatg ctatcaattt cgatagtaat 780

ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctgagcgatt 840

atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg 900

ataaattcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960

tatgtgaaat caacagatt agtcctcgcg actggactca gaaatgcccc tcaaagagag 1020

ggaagaagaa aaaagagagg actatttga gccatagcag ggtttataga gggaggatgg 1080

cagggaatgg tagatggtg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtggatac 1140

tctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200

atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag ggcgttggtta gggaaattaa taacttagaa 1260

aggagaatag agaattttaa caaaaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320

aacgctgaac tcttggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380

gtcaagaacc tttagacaa ggtccgactg cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440

aacggttggt tcgaattcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaaaaaac 1500

ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaacagaga ggaataagt 1560

ggagtaaaat tggaatcaat ggtaacttac caaatactgt caatttattc aacagtggcg 1620

agttccctag cattggcaat catggtggct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680

tcgttacaat gcagaatttg catttga 1707

<210> 8

<211> 1707

<212> DNA

<213> Influenza A virus (A/Chicken/Henan/12/2004)

<400> 8

atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60

attggttacc atgcaaaca ctcgacagag caggttgaca caataatga aaagaacgtt 120

actgttacac atgcccaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctaata tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcggaac 240

ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggcttt acatagtga gaaggccagt 300
ccagccaatg gcctctgtta cccaggggat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccaat 420
catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgccataacc agggaaagtc ctcctttttc 480
agaaatgttg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggtta ctgtggggga ttcacatcc taatgatgcg 600
gcagagcaga caaggctcta tcaaaaccca accacctata tttcgttgg aacatcaaca 660

ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtga 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcagcaatt 840
atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aatgggggca 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg actatttga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080

cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtggatac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttagaa 1260
aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgtcgaac tttctgttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
aacggttggt tcgagtctta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac 1500

ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaagaga ggaataagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caattttatc aacagtggcg 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 9
<211> 1695
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/duck/Guangxi/2775/2005)

<400> 9

atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc	60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt	120
actgttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca atgggaagct ctgcgaccta	180
gatgggtga agcctctaata tttagagat ttagttag ctggatggct cctcggaac	240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggtctt acatagtga gaaggccagt	300
ccagccaatg acctctgtta ccaggtgat ttcaacgatt atgaagaact gaaacaccta	360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc caaaagtgc ttggcccaac	420
catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgcataacc tgggaaagcc ctctttttc	480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtgcatacc caacaataaa gaggagctac	540
aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggga ttcacatcc taatgatgag	600
acagagcaga caaagctcta tcaaaacca accacttata tttcgttgg aacatcaaca	660
ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct accagatcca aagtaaacgg gcaaagtga	720
aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat	780
ggaaatttca ttgtccaga atatgcctac aaaattgtca agaaaggga ctgagcaatt	840
atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaaata gtcaactcc aatgggggcg	900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgcccacaa	960
tatgtgaaat caaacagatt agtcttgcg actgggtca gaaatagccc tcaaaggag	1020
agaagaagaa aaaagagagg actatttga gctatagcag gttttataga gggaggatgg	1080
cagggaatgg tagatggtg gtacggatac caccatagca atgagcaggg gattggatac	1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg	1200
atcattgaca aatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttagaa	1260
aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat	1320
aatgtgaac ttctggttct catggaaaat gagcgaactc tagactttca tgactcaaat	1380
gtcaagaacc ttiacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa agagctgggt	1440
aacggttgtt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gcatggaaag tgtaagaaac	1500
ggaacgtatg actaccgca ttattcagaa gaagcaaggc taaaaagaga ggaaataagt	1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caattttatc aacagtggca	1620
agttccctag cgctggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatggt	1680
tcgttacaat gcaga	1695

<210> 10

<211> 1707

<212> DNA

<213> Influenza A virus (A/Hong Kong/156/97)

<400> 10

atggaaagaa cagtgtctct tcttgcaaca gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
atgggttacc atgcaaacaa ctgcacagag cagggtgaca caataatgga aaagaatgtt 120
actgttacac atgccaaga catactggaa aggacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
aatggagtga agcctctcat tttgagggat ttagttagtag ctggatggct cctcggaac 240
cctatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggcttt acatagtgga gaaggccagt 300
ccagccaatg acctctgtta tccagggaat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccaat 420

catgatgcct catcaggggt gagctcagca tgtccatacc ttgggaggtc ctctttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtgcatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggggg ttaccatcc taatgatgcg 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaatcca accacctaca tttccgttgg aacatcaaca 660
ctgaaccaga gattggttcc agaaatagct actagacca aagtaaacgg gcaaagtgga 720
agaatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgatg ccatcaattt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840

atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata cacccttca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtcttgcg actggactca gaaatacccc tcaaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg actatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagttgctac 1140
tctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattaaca aatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttgga 1260

aggaggatag agaattttaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttac 1320
aatgtcgaac tcttggttct catggaaaat gagagaactc tcgactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc ttiacgaca ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
aatggttggt tcgaattcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaaaaaac 1500
ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaacagaga ggaaataagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat gggaacttac caatactgt caatttatc aacagtggcg 1620

agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680

tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 11

<211> 1704

<212> DNA

<213> Influenza A virus (A/Anhui/1/2005)

<400> 11

atggagaaaa tagtgcctct tcttgcaata gtcagccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60

attggttacc atgcaaaca ctcgacagag cagggtgaca caataatgga aaagaacgtt 120

actgttacac atgccaaga cactactgga aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180

gatggagtga agcctctgat tttaagagat ttagttagtag ctggatggct cctcggaac 240

ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctt acatagtgga gaaggccaac 300

ccagccaatg acctctgtta cccaggggaat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360

ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccgat 420

catgaagcct catcaggggt gagctcagca gtccatacc aggggaacgcc ctctttttc 480

agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac aatacatacc caacaataaa gagaagctac 540

aataatacca accaggaaga tcttttgata ctgtggggga ttcatcattc taatgatgcg 600

gcagagcaga caaagctcta tcaaaacca accacctata tttccgttgg gacatcaaca 660

ctaaaccaga gattgttacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga 720

aggatggatt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780

ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcagcaatt 840

gttaaaagtg aagtggaata tggtaactgc aacacaaagt gtcaaaactcc aatagggcg 900

ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960

tatgtgaaat caaacaatt agtccttgcg actgggtca gaaatagtcc tctaagagaa 1020

agaagaagaa aaagaggact atttggagct atagcagggt ttatagaggg aggatggcag 1080

ggaatggtag atggttggtg tgggtaccac catagcaatg agcaggggag tgggtacgct 1140

gcagacaaag aatccactca aaaggcaata gatggagtca ccaataaggt caactcgatc 1200

attgacaaaa tgaacactca gtttgaggcc gttggaaggg aatttaataa cttagaaagg 1260

agaatagaga atttaacaa gaaaatggaa gacggattcc tagatgtctg gacttataat 1320

gctgaacttc tggttctcat ggaaaatgag agaactctag acttccatga ttcaaatgtc 1380

aagaaccttt acgacaaggt ccgactacag cttagggata atgcaaagga gctgggtaac 1440

gggtgttttcg agttctatca caaatgtgat aatgaatgta tggaaagtgt aagaaacgga 1500
 acgtatgact acccgagta ttcagaagaa gcaagattaa aaagagagga aataagtga 1560

 gtaaaattgg aatcaatagg aacttaccaa atactgtcaa tttattcaac agttgcgagt 1620
 tctctagcac tggcaatcat ggtggctggt ctatctttgt ggatgtgctc caatgggtcg 1680
 ttacaatgca gaatttgcac ttaa 1704

 <210> 12
 <211> 1707
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/turkey/Turkey/1/05)
 <400> 12

 atggagaaaa tagtgcttct tcttgaata gtcagccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
 attggttacc atgcaaaca ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtc 120
 actgttacac acgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaaact ctgcgatcta 180

 gatggagtga agcctctaata ttttaagagat ttagttag ctggatggct cctcggaac 240
 ccaatgtgtg acgaattcct caatgtgccg gaatggctt acatagtga gaagatcaat 300
 ccagccaatg acctctgtta cccaggaat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtcagat 420
 catgaagcct cagcaggggt gagctcagca tgtccatacc aggaaggtc ctctttttt 480
 agaaatgtgg tatggcttat caaaaaggac aatgcatacc caacaataaa gagaagttac 540
 aataatacca accaagaaga tcttttggta ttgtggggga ttcacatcc aaatgatgcg 600

 gcagagcaga caaggctcta tcaaaacca actacctata tttcgttg gacatcaaca 660
 ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagcc actagatcta aggtaaacgg gcaaagtga 720
 aggatggagt tcttttgac aattttaaaa ccgaatgatg caataaactt tgagagtaat 780
 ggaaatttca ttgctcaga aaatgcatac aaaattgtca agaaaggga ctcaacaatt 840
 atgaaaagtg agttggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaactcc aatagggcg 900
 ataaactcta gtatgccatt ccacaacatc caccctctca ccatcggga atgccccaaa 960
 tatgtgaaat caagcagatt agtccttgct actgggtca gaaatagccc tcaaggagag 1020

 agaagaagaa aaaagagagg actatttga gctatagcag gtttataga gggaggatgg 1080
 cagggaatgg tagatggtg gtatgggtac caccatagca acgagcagg gagtgggtac 1140
 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
 atcattgaca aaatgaacac tcagttag gctgttgga gggaatttaa taacttagaa 1260

aggagaatag aaaatttaaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc tttagacaaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagcttgg 1440

aacggttggt tcgagtctta tcacagatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac 1500
ggaacgtatg actaccgcga gtattcagaa gaagcaagat taaaagaga ggaaataagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaacttac caatactgt caatttattc aacagtggcg 1620
agctccctag cactggcaat catggtggct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 13

Arg Glu Gly Arg Arg Arg Lys Arg

1 5

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adjuvant oligonucleotide

<220><221> N

<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25

<223> N is inosine

<400> 14

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnn 26

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adjuvant polycationic peptide

<400> 15

Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys

1 5 10

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 16

Gly Glu Arg Arg Arg Arg Lys Arg

1 5