



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일

(11) 등록번호 10-1520307

(24) 등록일자 2015년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/11 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7010893

(22) 출원일자(국제) 2007년10월26일

심사청구일자 2012년10월25일

(85) 번역문제출일자 2009년05월27일

(65) 공개번호 10-2009-0078362

(43) 공개일자 2009년07월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/082699

(87) 국제공개번호 WO 2008/052173

국제공개일자 2008년05월02일

(30) 우선권주장

11/923,326 2007년10월24일 미국(US)

60/863,142 2006년10월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2006113214 A2

WO2005107797 A1

Avian Diseases Vol.40(2):425-437(1996)

Lancet Vol.351(9101):472-477(1998)

(73) 특허권자

베링거 잉겔하임 베트메디카인코퍼레이티드

미국 미주리 64506 세인트조세프 노스 벨트 하이
웨이 2621

(72) 발명자

본 애릭 웹.

미국 아이오와주 50010-8612 에임스 스위트 1000
노쓰 루프 드라이브 2501

콘살레스-에르난데스 파울리노 카를로스

멕시코 쎄.뻬. 45650 할리스코 틀라호물코 데 수
니가 빌라스 데 산타 아나타 222-38번 보울레바르
드 보스케스 데 산타 아나타

웹젠 위르겐

독일 88416 오흐젠하우젠 미텔부히슈트라쎄 1/2

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 신규 H5 단백질, 이를 암호화하는 핵산 분자 및 벡터, 및 이들의 의약 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 헤마글루터닌 H5 단백질, 이를 암호화하는 핵산 및 벡터, 뿐만 아니라 임의의 상기 H5 단백질, 이 H5 단백질을 암호화하는 핵산 또는 벡터를 포함하는 백신에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 사람 및 동물에서의 임의의 이러한 조성물의 의약 용도에 관한 것이다.

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 H5 단백질로서, 서열번호 1의 위치 94에는 아스파라긴이 존재하고, 서열번호 1의 위치 223에 있는 아미노산은 아스파라긴으로 치환되고, 서열번호 1의 위치 120에 있는 아미노산은 아스파라긴으로 치환되고, 서열번호 1의 위치 155에 있는 아미노산은 아스파라긴으로 치환되고, 서열번호 1의 아미노산 위치 328에 제2의 리신이 삽입된, H5 단백질.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 조류 인플루엔자 바이러스로부터 유래된 H5 단백질.

청구항 5

서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는, 인플루엔자 바이러스의 H5 단백질.

청구항 6

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 7

제6항에 따른 핵산 분자를 포함하는 백터.

청구항 8

- a. 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질 및
- b. 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제

를 포함하는 백신.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 부형제가 하나 이상의 애주변트인, 백신.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 애주변트가 에멀시젠(Emulsigen)계 애주변트인, 백신.

청구항 11

제8항에 있어서, 하나 이상의 항원을 포함하는 백신.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 추가의 항원이 가금류 또는 포유동물 병원체의 항원인, 백신.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 추가의 항원이 인플루엔자 바이러스의 H3, H7 또는 H9인, 백신.

청구항 14

- a. 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질을 암호화하는 핵산을 분리하거나 증폭시키는 단계;
- b. 상기 H5 암호화 핵산을 발현 벡터에 클로닝하는 단계; 및
- c. 상기 H5 단백질을 발현시키는 단계

를 포함하는, 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질의 제조 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 발현 벡터가 재조합 배클로바이러스인, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 H5 단백질이 곤충 세포에서 발현되는, 방법.

청구항 17

- a. 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질을 수득하는 단계; 및
- b. 단계 a)의 H5 단백질을 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제와 혼합하는 단계

를 포함하는, 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질을 포함하는 백신의 제조 방법.

청구항 18

- a. 제6항에 따른 H5 핵산 분자를 수득하는 단계; 및
- b. 단계 a)의 H5 핵산 분자를 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제와 혼합하는 단계

를 포함하는, 제6항에 따른 H5 핵산 분자를 포함하는 백신의 제조 방법.

청구항 19

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질을 포함하는, 바이러스 인플루엔자에 의해 유발된 감염을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 20

제6항에 따른 핵산 분자를 포함하는, 바이러스 인플루엔자에 의해 유발된 감염을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 21

제7항에 따른 벡터를 포함하는, 바이러스 인플루엔자에 의해 유발된 감염을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 바이러스 인플루엔자 감염이 조류, 돼지 또는 사람 인플루엔자 바이러스에 의해 유발되거나 또는 이들의 임의의 조합물 또는 하이브리드(hybrid)에 의해 유발되는, 약제학적 조성물.

청구항 23

제8항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 감염의 치료 또는 예방에 사용되는 백신.

청구항 24

- a. 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 H5 단백질; 및
- b. 인플루엔자 바이러스에 의해 유발된 감염의 치료 또는 예방을 위한 상기 a)의 H5 단백질의 사용법을 기재한 설명서

를 포함하는 부품의 키트.

청구항 25

제24항에 있어서, 가금류 또는 포유동물 병원체의 항원을 하나 이상 추가로 포함하는 키트.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 의학 분야, 바람직하게는 감염성 질환 분야에 관한 것이다. 특히 본 발명은 인플루엔자 단백질, 이 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및 벡터, 및 백신에 관한 것이다. 가장 특히, 본 발명은 인플루엔자 감염의 치료 및 예방을 위한, 특히 인플루엔자 바이러스의 종내 및 종간 전파의 예방을 위한 임의의 상기 단백질, 핵산 분자, 벡터 또는 백신의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인플루엔자 감염은 동물과 사람에서 중요한 감염을 유지한다. 인플루엔자는 연속적인 항원성 변화/변형을 겪고 동물 저장소가 있는 바이러스에 의해 유발된다. 따라서, 향후 새로운 유행병과 전염병이 일어날 수 있고, 이 질

환을 근절시키기는 어려울 것이다. 인플루엔자 바이러스는 당업계에 공지되어 있고, 예컨대 문현[P. Palese, *Nature Medicine*, vol.10, no.12, pp. S82-S86, December 2004]과 또 다른 문헌들에 더욱 상세하게 설명되어 있다. 간략히 설명하면, 인플루엔자 A 바이러스의 계놈은 8개의 일본쇄 분절로 이루어져 있고, 바이러스 입자는 표면에 2개의 주요 당단백질인 헤마글루티닌(H) 및 뉴라미니다제(N)를 보유한다. 인플루엔자 바이러스 간에는 적어도 16개의 다른 헤마글루티닌(H1부터 H16까지)과 9개의 다른 뉴라미니다제(N1부터 N9까지)의 아형을 갖는 상당한 항원성 변형이 있다.

[0003] H5N1형의 인플루엔자 바이러스인 가금 역병 바이러스는 가금류, 돼지 및 사람을 감염시키는 것으로 증명된 바 있다. 또한, 이 바이러스는 조류 종으로부터 사람에게 직접 전파될 수도 있다(Claas et al., *Lancet* 1998, 351: 472; Suarez et al., *J.Virol.* 1998, 72: 6678; Subbarao et al., *Science* 1998, 279: 393; Shortridge, *Vaccine* 1999, 17(Suppl. 1): S26-S29). 알려진 사람 임상 증례에서 치사율은 약 50%에 이른다.

[0004] 지난 세기 동안 돼지는 인플루엔자 전염병의 중요한 벡터였다. 돼지, 낙타 및 바다표범, 특히 돼지는 조류 인플루엔자의 '혼합 챔버(mixing chamber)'로서의 역할을 할 수 있고, 인플루엔자 바이러스의 천연 저장소인 가금류로부터 포유동물로 중간 장애를 뛰어넘는 잠재적인 위험 인자를 나타낸다. 이것은 보통 민감성 동물, 예컨대 돼지가 만성 포유동물(돼지)뿐만 아니라 조류 인플루엔자 바이러스에 의해 이중 감염되어 일어난다. 이러한 이중 감염은 사람 또는 돼지 전염병의 원인일 수 있는 새로운 재조합 바이러스를 창출할 수 있다. 하지만, 최근, 포유동물 인플루엔자 바이러스와 현존 조류 H5 주(strain)의 재조합이 고독성 재조합체를 생산하지 않는다는 증거가 제시되었다. 한편, 조류 인플루엔자 바이러스는 돼지를 감염시킬 수 있고 자발적 돌연변이에 의해 돼지에게 적응하게 될 수 있다. 바이러스가 돼지(또는 다른 포유동물) 집단 내에서 수평 감염을 유발할 수 있는 즉시 중대한 장애를 뛰어넘게 될 것이다.

[0005] 그럼에도 불구하고, 동남 아시아 돼지의 대부분은 이웃하는 가금 사육장으로부터 유래하는 조류 (H5) 인플루엔자 바이러스 주에 의해 감염되었다. 이러한 감염은 지금까지 무증상적이어서, 이 감염은 실험실 방법에 의해서만 진단될 수 있고, 이에 따라서 흔히 간과되었다. 무증상적으로 감염된 돼지는 상기 바이러스를 포유동물계로 적응시키고 돼지 집단 내에서 확산되며 사람도 감염시킬 기회로서 작용할 것이기 때문에 매우 위험하다.

[0006] 현준하는 인플루엔자 백신은 서브유닛 백신(Babai et al, *Vaccine* 1999, 17(9-10) 1223-1238, Crawford et al, *Vaccine* 1999, 17(18) 2265-2274; Johansson et al, *Vaccine* 1999, 17(15-16) 2073-2080), 약독화된 백신(Honmoto et al, *Vaccine* 2004, 22(17-18) 2244-2247), DNA 백신(Watabe et al, *Vaccine* 2001, 19(31) 4434-4444) 및 불활성화된 인플루엔자 백신(Cao et al, *Vaccine* 1992, 10(4) 238-242)을 포함하고, 후자가 상업적 규모에서 가장 널리 사용되고 있다(Lipatov et al, *J Virol* 2004 78(17) 8951-8959).

[0007] 서브유닛 백신, 재조합 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제(Babai et al, *Vaccine* 1999, 17(9-10) 1223-1238, Crawford et al, *Vaccine* 1999, 17(18) 2265-2274, Johansson et al, *Vaccine* 1999, 17(15-16) 2073-2080)는 현재 상업적 백신으로서 사용되고 있는 것은 없지만, 불활성화된 백신의 매력적인 대안일 수 있다. 이러한 백신의 제조는 불활성화된 백신의 제조보다 안전하다는 것은 분명하다. 또한, 서브유닛 백신은 내부 인플루엔자 바이러스 단백질에 대한 항체 반응을 생성하지 않기 때문에 백신접종된 동물과 감염된 동물 사이의 구별을 가능하게 한다(Crawford et al, *Vaccine* 1999 17(18) 2265-2274).

[0008] 헤마글루티닌 단백질은 인플루엔자 바이러스의 수용체 결합성 막 융합 당단백질이며, 감염능 중화 항체의 표적이다. H5N1 유래의 전체 헤마글루티닌 단백질(HA)은 568개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 56kDa이다. HA 분자는 HA1 및 HA2 서브유닛으로 구성되며, HA1 서브유닛은 세포막과의 초기 접촉을 매개하고 HA2는 막 융합을 담당한다(Chizmadzhev, *Bioelectrochemistry* 2004 63(1-2) 129-136).

[0009] 배콜로바이러스/곤충 세포계는 조류 인플루엔자 아형으로부터 분리된 헤마글루티닌 유전자를 발현시키는데 사용되었다(Babai et al, *Vaccine* 1999, 17(9-10) 1223-1238. Crawford et al, *Vaccine* 1999, 17(18) 2265-2274, Johansson et al, *Vaccine* 1999, 17(15-16) 2073-2080); Nwe et al, *BMC Mircobiology* 2006, 6(16) doi:10.1186/1471-2180-6-16). 하지만, 이러한 재조합 단백질은 어떤 경우에는 보호적이지 못하거나, 적어도 일부 종에서는 단지 덜 효과적인 것으로 보인다(Treanor et al, *Vaccine* 2001, 19: 1732-1737).

[0010] 따라서, 인플루엔자 감염을 통제하는 더 좋은 접근법을 제공하고 질병 부담에 긍정적인 영향을 미치는 개선된 백신 및 새로운 백신접종 접근법의 유용성을 증가시킬 필요가 있다.

발명의 상세한 설명

[0011]

본 발명의 양태 이전에, 본 명세서 및 후속되는 청구의 범위에 사용된 단수적 표현은 다른 분명한 언급이 없는 한 복수의 언급도 포함한다는 것을 유의해야 한다. 즉, 예컨대, "제조물"에 대한 언급은 이러한 제조물의 다수를 포함하며; "담체"에 대한 언급은 하나 이상의 담체 및 당업자에게 공지된 그 등가물 등을 언급하는 것이다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적, 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 같은 의미를 가진다. 주어진 모든 범위와 같은 다른 표시가 없거나 달리 당업자에게 알려진 것이 없는 한 1 내지 5% 정도의 변동이 있을 수 있고, 이에 따라 "약"이란 용어는 본원에서 삭제했다. 본원에 설명된 것과 유사하거나 동등한 모든 방법과 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 이하 바람직한 방법, 장치 및 재료가 설명된다. 본원에 언급된 모든 문현은 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 문현들에 보고된 바와 같은 물질, 부형제, 담체 및 방법을 설명 및 개시하기 위한 목적으로 참고적으로 인용된 것이다. 본원에서 어떠한 것도 본 발명이 종래 발명에 의해 당해 개시가 선행할 권리가 없다는 것을 인정하는 것으로서 간주되어서는 안된다.

[0012]

상기 기술적 문제에 대한 해결책은 이하 상세한 설명과 청구의 범위에서 특징지어진 양태들에 의해 달성된다.

인플루엔자 단백질 및 이를 암호화하는 핵산 분자

[0014]

본 발명은 아미노산 223N과 변형 328K+를 갖는 인플루엔자 바이러스의 H5 단백질로서, 상기 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하고 상기 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에서 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미하는 H5 단백질에 관한 것이다. 바람직하게는, 이러한 H5 단백질 및 본 발명에 따른 다른 모든 H5 단백질은 분리된 H5 단백질이다. 놀랍게도, 전술한 변형을 보유한 H5 단백질이 위치 223과 328/329에 대응하는 아미노산을 보유하지 않는 H5 단백질에 비해 높은 항원성이 것을 발견했다.

[0015]

본원에 사용된 "헤마글루티닌 5(H5)" 또는 "조류 인플루엔자 바이러스의 H5" 또는 "H5 단백질"이란 용어는 임의의 자연 발생의 H5 단백질 및 H5 단백질의 임의의 변형 형태, 예컨대 H5 단백질의 임의의 결실, 치환 및/또는 삽입 돌연변이체로서, 아미노산 223N과 변형 328K+를 갖는 H5 단백질을 의미하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0016]

본원에 사용된 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미한다. 서열번호 1은 아미노 말단 시그널 펩타이드가 결여된 것을 제외하고는 오리/중국/E319-2/03 주(strain)의 헤마글루티닌의 아미노산 서열을 나타낸다. 다른 말로 하면, 위치 223의 아미노산이라 하면(아미노산 223), 이 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 223에 대응한다는 것을 의미한다. 하지만, 본 발명에 따른 H5 단백질이 서열번호 1과 동일한 아미노산 서열을 갖고 있다는 것을 의미하지는 않는다. 단지 본 발명에 따른 H5 단백질의 대응 아미노산이 분명하게 언급된 아미노산 잔기를 암호화한다는 것을 말한다. 현재의 사례에서, 아미노산 223은 세린(S)일 것이다. "223N" 또는 "155N"이란 용어는 대표적으로 서열번호 1의 아미노산 위치에 따라 번호를 매긴 위치 223과 155의 아미노산이 아미노산 아스파라긴(N)을 암호화할 것이라는 것을 의미한다. 다른 말로 하면, "아미노산 223N을 갖는 H5 단백질"이라 하면, 보통 아미노산 위치 223(서열번호 1의 아미노산 위치에 따라 번호를 매길 때)에서 세린을 암호화하는 H5 아미노산 분자에서 그 아미노산은 아스파라긴(N)으로 치환될 것이다. "328K+" 또는 "변형 328K+"란 용어는 서열번호 1의 아미노산 위치에 따라 번호를 매긴 H5 단백질의 아미노산 위치 328에 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미한다. 본래 위치 328과 329에서 리신-리신을 암호화하는 아미노산 서열인 경우에는 어떠한 추가 리신(K)도 삽입되지 않을 것이다. 하지만, 공지된 H5 서열은 대부분은 아미노산 위치 328과 329에서 리신-아르기닌을 암호화한다. 이러한 모든 경우에, 328K+ 변형이란 용어는 위치 328의 리신과 위치 329의 아르기닌 사이에 제2 리신(K)이 삽입될 수 있음을 의미한다. 이후, 변형된 서열은 리신-리신-아르기닌(KKR)으로 판독될 것이다.

[0017]

따라서, 본 발명은 아미노산 223N과 변형 328K+를 갖는 인플루엔자 바이러스의 H5 단백질로서, 상기 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하고 상기 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에서 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미하는 H5 단백질에 관한 것이다. 본원에 제공된 모든 H5 단백질은 항원성이며, 이는 그 H5 단백질이 인플루엔자 바이러스에 대한 표준 헤마글루티닌 억제 분석에서 항원성을 나타냄을 의미한다는 것은 자명하다.

[0018]

또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 아미노산 223N과 변형 328K+를 보유하고, 표준 헤마글루티닌 억제 분석에서

항원성을 나타내는 임의의 펩타이드 단편을 의미하는 H5 단백질의 임의의 부분에 관한 것으로서, 상기 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하고 상기 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에서 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미한다.

[0019]

H5 단백질은 표준 해마글루티닌 억제 분석, 예컨대 실시예 2에 기술된 분석에서 혈구응집을 억제한다면 항원성을 나타내는 것이다. 보통 H5 단백질의 항원성 부분은 위에서 언급한 변형되거나 미변형된 H5 단백질을 암호화하고 실시예 2에 기술된 바와 같은 표준 해마글루티닌 억제 분석에서 항원성을 나타내는 아미노산 서열의 200, 180, 160, 140, 130, 120, 110 또는 가장 바람직하게는 105개의 연속적 아미노산을 포함한다. 표준 혈구응집 억제 분석은 또한 예컨대 문헌[Stephenson et al., Virus Research vol. 103, pp. 91-95(2005)]에 추가적인 참고 문헌과 함께 설명되어 있다. 하지만, 실시예 2에 기술된 바와 같은 HI 분석은 본원에 기술되는 바와 같이 본 발명의 모든 관점과 관련 있는 적절한 참고 분석인 것으로 이해될 것이다.

[0020]

간략히 설명하면, HI 분석은 HA 특이 항체의 존재를 검출하기 위해 수행했다. 이종성 H5N2 바이러스, A/닭/멕시코/232/94는 HI 분석에서 4 응집 유닛[4 HA 유닛]의 농도로 사용했다. U 바닥형 미세역가 플레이트에서 PBS로 희석한 연속 2배 혈청 희석물을 이어서 4 HA 유닛의 바이러스를 함유하는 동량(25 μ l)과 혼합하고, 실온(약 25°C)에서 30분 동안 항온배양했다. 혈청-바이러스 함유 웰에 PBS 중의 0.5% 농도의 닭 적혈구 세포를 첨가하고 실온에서 40분 동안 항온배양했다. HI 역가는 혈구 응집의 억제가 관찰되는 최고의 혈청 희석률의 역수로 결정했다.

[0021]

특히, 헤스브룩(Haesbrouck)과 펜자어트(Pensaert)(1986)는 "공격용 바이러스에 대한 HI 역가와 공격에 대한 보호 사이에 상관관계가 존재할 수 있다"는 것을 발견했다. 또한, 헤스브룩과 펜자어트(1986)는 HI 역가가 ≥40인 돼지가 "공격시 기도에서 바이러스 복제가 전혀 일어나지 않으며 공격에 대해 완전 저항성"인 것을 측정했다. 즉, 백신접종된 돼지에서 ≥40인 HI 역가의 발생은 보호와 상관관계가 있을 수 있다(F. Haesbrouck and M.B. Pensaert, 1986, Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunized with and inactivated influenza H1N1 vaccine, Veterinary Microbiology, 11(1986) 239-249). 또한, 동등한 또는 적어도 거의 동등한 H5 HI 역가는 결국 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 돼지의 완전한 면역 보호를 제공할 것으로 가정해야 한다. 낮은 역가는 적어도 백신접종된 동물의 혈청전환을 초래하고, 결국 전염병의 위험을 극적으로 감소시킬 수 있는 백신접종된 동물의 부분적 면역 보호를 제공할 것이다.

[0022]

또한, 본 발명에 따른 H5 단백질의 항원성 부분은 다음을 포함하는 H5 단백질의 결실 돌연변이체를 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다:

[0023]

i. 아미노산 223N을 포함하고 이를 둘러싸는 아미노산 서열 중 적어도 35개, 30개, 25개, 20개, 18개, 15개, 13개, 10개, 9개 또는 가장 바람직하게는 8개의 연속적 아미노산;

[0024]

ii. 아미노산 변형 328K+를 포함하고 이를 둘러싸는 아미노산 서열 중 적어도 35개, 30개, 25개, 20개, 18개, 15개, 13개, 10개, 9개 또는 가장 바람직하게는 8개의 연속적 아미노산; 및

[0025]

iii. 실시예 2에 기술된 바와 같은 표준 해마글루티닌 억제 분석에서 혈구응집 억제를 나타내는 H5 단백질의 임의의 항원성 부분.

[0026]

아미노산 223N 및/또는 328K+의 주위 아미노산은 서열번호 1 또는 서열번호 4에 의해 암호화되는 것이 바람직하다.

[0027]

또한, 본 발명에 따른 바람직한 H5 단백질은 다음과 같다:

[0028]

i. 아미노산 223N과 변형 328K+를 갖는 위에서 언급한 임의의 단백질;

[0029]

ii. 아미노산 94N/223N과 변형 328K+를 갖는 위에서 언급한 임의의 단백질;

[0030]

iii. 아미노산 223N과 변형 328K+를 갖는 조류 기원의 임의의 H5 단백질[여기서, 조류 기원이란 조류 인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

[0031]

iv. 아미노산 94N/223N과 변형 328K+를 갖는 조류 기원의 임의의 H5 단백질[여기서, 조류 기원이란 조류 인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

[0032]

v. 아미노산 155N/223N과 변형 328K+를 갖는 조류 기원의 임의의 H5 단백질[여기서, 조류 기원이란 조류 인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

[0033]

vi. 아미노산 120N/155N/223N 및 변형 328K+를 갖는 조류 기원의 임의의 H5 단백질[여기서, 조류 기원이란 조류

인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

- [0034] vii. 변형 94N/223N과 변형 328K+를 갖는 임의의 H5 단백질;
- [0035] viii. 변형 94N/155N/223N과 변형 328K+를 갖는 임의의 H5 단백질;
- [0036] ix. 변형 94N/120N/155N/223N과 변형 328K+를 갖는 임의의 H5 단백질;
- [0037] x. 변형 223N, 변형 328K+ 및 다음과 같은 아미노산 클러스터,
 - [0038] a. aa 93-95: GNF
 - [0039] b. aa 123-125: SDH
 - [0040] c. aa 128-130: SSG
 - [0041] d. aa 138-140: GSS
 - [0042] e. aa 226-228: MDF
 - [0043] f. aa 270-272: EVE
 - [0044] g. aa 309-311: NKL로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 클러스터를 갖는 임의의 H5 단백질;
 - [0045] xi. 아미노산 223N, 변형 328K+ 및 다음과 같은 아미노산 클러스터,
 - [0046] a. aa 93-95: GNF
 - [0047] b. aa 128-130: SSG
 - [0048] c. aa. 138-140: GSS로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 클러스터를 갖는 임의의 H5 단백질; 또는
 - [0049] xii. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 임의의 H5 단백질.
- [0050] 또한, 본원에서 제공되는 바람직한 H5 단백질은 문헌[Hoffmann et al., PNAS, vol. 106, no. 36, pp. 12915-12920, September 6, 2005]에 기술된 바와 같은 H5 단백질을 포함하고, 여기서 H5 단백질은 위에서 기술된 변형 중 하나 이상의 변형, 적어도 아미노산 223N 및 변형 328K+를 포함하고, 여기서 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하며, 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미한다.
- [0051] 또한, 본원에서 제공되는 바람직한 H5 단백질은 아미노산 223N과 변형 328K+를 포함하는 웨타이드[여기서, H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하며, 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미한다], 및
 - [0052] i. 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 서열;
 - [0053] ii. 상기 i)의 폴리웨타이드와 적어도 85% 서열 상동성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90% 서열 상동성, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 95% 서열 상동성, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 97% 서열 상동성, 더 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 98% 서열 상동성, 및 더 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 99% 서열 상동성을 보유하고 전술한 바와 같은 표준 헤마글루티닌 억제에서 헤마글루티닌 억제를 나타내는 임의의 웨타이드;
 - [0054] iii. 상기 i) 또는 ii)의 임의의 웨타이드 중 적어도 35개, 30개, 25개, 20개, 18개, 15개, 13개, 10개, 9개 또는 가장 바람직하게는 8개의 연속적 아미노산을 포함하는 상기 i) 또는 ii)의 폴리웨타이드의 임의의 항원성 부분;
 - [0055] iv. 아미노산 36T, 36K, 83A, 83T, 83D, 86A, 86V, 120N, 120S, 155N, 155S, 156A, 156T, 189R, 189K, 212K, 212R, 212E, 223N, 223N 또는 120N/155N 중 하나를 갖는 상기 i), ii) 또는 iii)의 임의의 웨타이드;
 - [0056] v. 다음과 같은 아미노산 클러스터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 클러스터 중 하나 이상을 갖는 상기 i), ii), iii) 또는 iv)의 임의의 웨타이드;

- [0057] a. aa 93-95: GNF
- [0058] b. aa 123-125: SDH
- [0059] c. aa 128-130: SSG
- [0060] d. aa 138-140: GSS
- [0061] e. aa 226-228: MDF
- [0062] f. aa 270-272: EVE
- [0063] g. aa 309-311: NKL; 또는
- [0064] vi. 다음과 같은 아미노산 클러스터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 클러스터 중 하나 이상을 갖는 상기 i), ii), iii) 또는 iv)의 임의의 웨타이드:
- [0065] a. aa 93-95: GNF
- [0066] b. aa 128-130: SSG
- [0067] c. aa 138-140: GSS
- [0068] 를 포함하는 H5 단백질을 포함한다.
- [0069] 본원에 사용된 "서열 상동성"이란 두 서열의 관련도를 측정하는 방법을 의미한다. 서열 상동성을 측정하기 위해, 2개 이상의 서열은 최적으로 정렬되고, 필요하다면 갭(gap)을 도입한다. 서열 동일성과 달리, 서열 상동성을 측정할 때에는 보존적 아미노산 치환은 정합(match)으로서 계수된다. 다른 말로 하면, 기준 서열과 95% 서열 상동성을 가진 폴리웨타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 수득하기 위해서는 기준 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%가 다른 아미노산 또는 뉴클레오타이드와 정합하거나 보존적 치환을 포함해야 하고, 또는 기준 서열의 총 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드 중 보존적 치환을 포함하지 않는 15% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 더욱 바람직하게는 5% 이하의 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 수가 기준 서열에 삽입될 수 있다. 동족 서열은 바람직하게는 적어도 50개, 더욱 바람직하게는 100개, 더욱 더 바람직하게는 250개, 더욱 더 바람직하게는 500개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 정렬시에, 서열 상동성은 위치별로 확인하며, 예컨대 특정 위치에서 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 동일하다면 서열은 그 특정 위치에서 "동족체"이다. 그 다음, 이러한 위치 동일성의 총 수를 기준 서열의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 총 수로 나누어 서열 상동성을 제공한다. 서열 상동성은 공지의 방법으로 쉽게 계산할 수 있으며, 이러한 방법에는 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993), Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994), Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987), Sequence Analysis Primer, Gubkoff, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York (1991), and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48 1073 (1988), 이 문헌들의 교시는 본원에 참고 인용되었다]에 기술된 방법이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 서열 상동성을 측정하는 바람직한 방법은 시험된 서열 간에 최대의 정합을 제공하도록 설계된다. 서열 상동성을 측정하는 방법은 주어진 서열 간에 서열 동일성을 측정하는 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램으로 체계화되어 있다. 이러한 프로그램의 예에는 GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN 및 FASTA (Altschul, S. F. et al., J Molec Biol, 215 403-410 (1990))가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. BLASTX 프로그램은 NCBI 및 다른 출처(BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215 403-410 (1990), 이 문헌들의 교시는 본원에 참고 인용되었다)로부터 공개적으로 이용가능하다. 이 프로그램들은 제공된 서열과 기준 서열 간에 최고의 서열 상동성 수준을 수득하기 위해 디폴트 갭 가중치(default gap weight)를 이용해서 서열을 최적으로 정렬한다.
- [0070] 또한, 바람직한 H5 단백질은 위에서 언급한 바와 같은 328K+ 변형 및 이하 표 1에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 임의의 면역원성 부분을 포함하는 H5 단백질을 포함한다.

[0071] [표 1] H5 항원

서열 명칭	기본 서열	아미노산 위치 [#]										
		36	83	86	120	155	156	189	212	223	263	
223N/328K+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	
36T/223N/328K+	임의의 HA H5	T	-	-	-	-	-	-	-	N	-	
36K/223N/328k+	임의의 HA H5	K	-	-	-	-	-	-	-	N	-	
83A/223N/328k+	임의의 HA H5	-	A	-	-	-	-	-	-	N	-	
83T/223N/328k+	임의의 HA H5	-	T	-	-	-	-	-	-	N	-	
83D/223N/328k+	임의의 HA H5	-	D	-	-	-	-	-	-	N	-	
86A/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	A	-	-	-	-	-	N	-	
86V/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	V	-	-	-	-	-	N	-	
120N/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	N	-	-	-	-	N	-	
120S/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	S	-	-	-	-	N	-	
155N/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	N	-	-	-	N	-	
155S/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	S	-	-	-	N	-	
156A/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	A	-	-	N	-	
156T/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	T	-	-	N	-	
189R/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	R	-	N	-	
189K/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	K	-	N	-	
212K/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	K	N	-	
212R/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	R	N	-	
212E/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	E	N	-	
223N/263A/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	A	
223N/263T/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	T	
120N/155N/223N/328k+	임의의 HA H5	-	-	-	N	N	-	-	-	N	-	
A/오리/중국/E319-2/03/328k+	AAR99628	T	A	A	S	D	A	R	K	N	A	
A/오리/중국/E319-2/03_223N/328k+	AAR99628	T	A	A	S	D	A	R	K	N	A	
A/오리/중국/E319-2/03_120N/223N/328k+	AAR99628	T	A	A	N	D	A	R	K	N	A	
A/오리/중국/E319-2/03_155N/223N/328k+	AAR99628	T	A	A	S	N	A	R	K	N	A	
A/오리/중국/E319-2/03_120N/155N/223N/328k+	AAR99628	T	A	A	S	N	N	R	K	N	A	
HA/HK/213/03/328k+	AY518362	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A	
HA/베트남/1203/04		K	T	V	S	S	T	K	R	N	T	
HA//베트남/1203/04_223N/328k+		K	T	V	S	S	T	K	R	N	T	
HA//베트남/3046/04_223N/328k+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T	
HA/베트남/3062/04_223N/328k+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T	
HA/닭/베트남/39/04_223N/328k+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T	
HA/매/HK-D0028/04_223N/328k+		T	A	A	S	S	A	K	E	N	A	
HA/오리/싱가폴/3/97_223N/328k+		T	D	V	S	N	A	K	E	N	A	
HA/HK/156/97/328k+		T	A	A	S	S	A	K	E	N	T	

[#] 표 1에 제시된 아미노산 위치는 서열번호 1에 예시적으로 정의된 바와 같은 위치를 의미한다. 즉, 표 1의 아미노산 223은 서열번호 1의 서열의 아미노산 223을 의미한다.

"-"는 이 위치의 아미노산이 기준 서열과 비교했을 때 변동가능하다는 것을 의미한다.

[0072] 또한, 본 발명은 적어도 아미노산 223N과 변형 328K+를 갖는 H5 단백질에 관한 것이며, 여기서 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하고, 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미하고, 다음과 같은 것을 포함한다:

- 전술한 바와 같이 변형된, 즉 야생형 서열의 일부가 아닌 상기 언급한 변형 223N과 328K+를 포함하는, NCBI 등록번호 AAT65209, CAJ32556, ABC47656, CAF21874, CAF21870, AAC58998, AAC58997, AAC58996, AAC58994, AAC58993, AAC58992, AAC58991, AAC58990, AAC58995, AAS45134, AAN17270, AAN17269, AAN17268, AAN17267, AAN17266, AAN17265, AAN17264, AAN17263, AAN17262, AAN17261, AAN17260, AAN17259, AAN17257, AAN17256, AAN17255, AAN17254, AAA43083, AAA43082, AAB19079, BAE48696, BAE48693, BAE48696, BAE48695, BAE48694, BAE48692, BAE48691, BAE48690, BAE48689, BAE48688, BAE48687, BAE48686, BAE48685, BAE48684, BAE48683, AAC58999, ABC72082, AAV91149, AAP71993, AAP71992, AAP71991, AAP71990, AAP71989, AAP72011, AAP72010,

AAP72009, AAP72008, AAP72007, AAP72006, AAP72005, AAP72004, AAP72003, AAP72002, AAP72001, AAP72000, AAP71999, AAP71998, AAP71997, AAP71996, AAP71995, AAP71994, AAF99718, ABF58847, AAG38534, AAC32102, AAC32099, AAL75847, AAC32101, AAC32098, AAC32088, AAC32078, AAR99628, AAC32100, AAM49555, AAL75843, AAL75839, AAD13573, AAD13568, AAF04720, AAF04719, AAC34263, AAR16155, AAD13574, AAD13570, AAD13575, AAD13572, AAD13569, AAD13567, AAD13566, AAK57506, AAG01225, AAG01215, AAG01205, AAG01195 또는 ABD83813의 서열을 갖는 웹타이드;

[0074] ii. 상기 i)의 폴리웹타이드와 적어도 85% 서열 상동성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90% 서열 상동성, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 95% 서열 상동성, 더 더욱 바람직하게는 적어도 약 97% 서열 상동성, 더 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 98% 서열 상동성, 및 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 99% 서열 상동성을 보유하고 전술한 바와 같이 표준 헤마글루티닌 억제에서 헤마글루티닌 억제를 나타내는 임의의 웹타이드;

[0075] iii. 아미노산 36T, 36K, 83A, 83T, 83D, 86A, 86V, 120N, 120S, 155N, 155S, 156A, 156T, 189R, 189K, 212K, 212R, 212E, 263A, 263T 또는 120N/155N을 갖는 상기 i) 또는 ii)의 임의의 웹타이드;

[0076] iv. 다음과 같은 아미노산 클러스터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 클러스터를 갖는 상기 i), ii) 또는 iii)의 임의의 웹타이드:

[0077] a. aa 93-95: GNF

[0078] b. aa 123-125: SDH

[0079] c. aa 128-130: SSG

[0080] d. aa 138-140: GSS

[0081] e. aa 226-228: MDF

[0082] f. aa 270-272: EVE

[0083] g. aa 309-311: NKL; 또는

[0084] v. 다음과 같은 아미노산 클러스터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 클러스터를 갖는 상기 i), ii) 또는 iv)의 임의의 웹타이드:

[0085] a. aa 93-95: GNF

[0086] b. aa 128-130: SSG

[0087] c. aa 138-140: GSS.

[0088] 추가 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 바와 같은 임의의 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 이러한 핵산 분자는 RNA, DNA 또는 카피 (c)DNA 분자인 것이 바람직하다. 즉, 본 발명은 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 바람직하게는 cDNA 분자 또는 H5 단백질의 임의의 결실, 치환 및/또는 삽입 돌연변이체를 포함하는 임의의 H5 단백질의 변형 형태에 관한 것이며, 이때 H5 단백질은 아미노산 223N과 변형 328K⁺를 보유하고, 여기서 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 아미노산 위치를 의미하며, 변형 328K⁺는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에서 제2 리신(K⁺)이 삽입된 것을 의미한다.

[0089] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 바와 같은 표준 헤마글루티닌 억제 분석에서 항원성을 나타내고 적어도 아미노산 223N과 변형 328K⁺를 갖는 H5 단백질의 임의의 부분을 암호화하는 핵산 분자, 바람직하게는 cDNA 분자에 관한 것이며, 여기서 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 아미노산 위치를 의미하며, 변형 328K⁺는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에서 제2 리신(K⁺)이 삽입된 것을 의미한다. 일반적으로, H5 단백질의 항원성 부분을 암호화하는 당해 핵산 분자는 위에서 언급한 바와 같은 변형 또는 미변형된 H5 단백질을 암호화하고 본원에 기술된 표준 헤마글루티닌 억제 분석에서 항원성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열 중 600개, 540개, 480개, 450개, 420개, 390개, 360개, 330개 또는 가장 바람직하게는 315개의 연속적 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0090] H5 단백질의 항원성 부분에 대한 또 다른 양태는 위에서 설명한 바 있다. 전술한 바와 같은 H5 단백질의 항원성 부분을 암호화하는 임의의 당해 핵산 분자, 바람직하게는 cDNA 분자를 차제하는 기술은 당업자에게 통상적인 지식에 속한다. 이 기술은 또한 H5 단백질의 결실 돌연변이체를 비롯하여 위에서 언급한 바와 같은 H5 단백질의

항원성 부분을 암호화하고,

[0091] i. 아미노산 223N을 암호화하는 암호화 서열을 포함하고 이를 둘러싸는 뉴클레오타이드 서열의 적어도 105, 90, 75, 60, 48, 45, 39, 30, 27개 또는 가장 바람직하게는 24개의 연속적 아미노 뉴클레오타이드;

[0092] ii. 변형 328K+를 암호화하는 암호화 서열을 포함하고 이를 둘러싸는 뉴클레오타이드 서열의 적어도 105, 90, 75, 60, 48, 45, 39, 30, 27개 또는 가장 바람직하게는 24개의 연속적 아미노 뉴클레오타이드; 및

[0093] iii. 실시예 2에 기술된 바와 같은 표준 헤마글루티닌 억제 분석에서 헤마글루티닌 억제를 나타내는 H5 단백질의 임의의 항원성 부분을 포함하는, 핵산 분자, 바람직하게는 cDNA 분자의 자체 기술을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0094] 아미노산 223N 및/또는 328K+를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 주위 뉴클레오타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 4를 암호화하는 것이 바람직하다.

[0095] 본 발명에 따른 H5 단백질을 암호화하는 또 다른 바람직한 핵산 분자는 다음과 같다:

[0096] i. 아미노산 223N과 변형 328K+를 암호화하는 전술한 바와 같은 임의의 핵산 분자;

[0097] ii. 아미노산 94N/223N과 변형 328K+를 암호화하는 전술한 바와 같은 임의의 핵산 분자;

[0098] iii. 아미노산 223N 및 변형 328K+를 암호화하는 조류 기원의 임의의 핵산 분자[여기서, 조류 기원이란 조류 인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

[0099] iv. 아미노산 94N/223N과 변형 328K+를 암호화하는 조류 기원의 임의의 핵산 분자[여기서, 조류 기원이란 조류 인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

[0100] v. 아미노산 155N/223N과 변형 328K+를 암호화하는 조류 기원의 임의의 핵산 분자[여기서, 조류 기원이란 조류 인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

[0101] vi. 아미노산 120N/155N/223N 및 변형 328K+를 갖는 조류 기원의 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자[여기서, 조류 기원이란 조류 인플루엔자 바이러스 5형으로 감염된 가금류에서 처음 분리된 바이러스 분리주 유래의 H5 서열을 의미한다];

[0102] vii. 변형 94N/223N과 변형 328K+를 갖는 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자;

[0103] viii. 변형 94N/155N/223N과 변형 328K+를 갖는 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자;

[0104] ix. 변형 94N/120N/155N/223N과 변형 328K+를 갖는 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자;

[0105] x. 다음과 같은 아미노산 클러스터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 클러스터와 변형 223N 및 변형 328K+를 갖는 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자:

[0106] a. aa 93-95: GNF

[0107] b. aa 123-125: SDH

[0108] c. aa 128-130: SSG

[0109] d. aa 138-140: GSS

[0110] e. aa 226-228: MDF

[0111] f. aa 270-272: EVE

[0112] g. aa 309-311: NKL; 또는

[0113] xi. 다음과 같은 아미노산 클러스터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 클러스터, 아미노산 223N 및 변형 328K+를 갖는 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자:

[0114] a. aa 93-95: GNF

[0115] b. aa 128-130: SSG

[0116] c. aa 138-140: GSS; 또는

- [0117] xii. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자.
- [0118] 본원에서 제공되는 더욱 바람직한 H5 단백질은 문헌[Hoffmann et al., PNAS, vol. 106, no. 36, pp. 12915-12920, September 6, 2005]에 기술된 바와 같은 H5 단백질을 포함하고, 여기서 H5 단백질은 위에서 기술된 변형 중 하나 이상의 변형, 적어도 아미노산 223N 및 변형 328K+를 포함하고, 여기서 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하며, 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미한다. 상기 문헌의 개시는 전문이 본원에 참고 인용되는 것이다. 따라서, 추가 양태에 따르면, 본 발명은 문헌[Hoffmann et al., PNAS, vol. 106, no.36, pp. 12915-12920, September 6, 2005]에 기술된 임의의 당해 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자, 바람직하게는 cDNA 분자에 관한 것이며, 상기 H5 단백질은 전술한 바와 같이 하나 이상의 변형, 적어도 아미노산 223N 및 변형 328K+를 포함하고, 여기서 H5 단백질의 아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하며, 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미한다.
- [0119] 인플루엔자 바이러스의 H5 단백질의 암호화 서열을 비롯한 뉴클레오파이드 서열 내에 전술한 임의의 변형을 도입시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전체 인플루엔자 바이러스의 계놈 서열은 본 발명에 따라, 예컨대 US 6,951,754 및 기타 문헌에 기술된 방법에 따라 변형될 수 있다.
- [0120] 또한, 본원에 기술된 항원을 암호화하는 핵산 서열을 변형시키기 위해서는 당업계의 기술 범위에 속하는 통상의 문자생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 이용할 수 있다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예컨대, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor. N.Y., DNA Cloning A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985), Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984), Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds (1985)], Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds (1984)], Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed.(1986)], Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)], B. Perbal A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) F.M. Ausubel et al.(eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc. 1994] 참조.
- [0121] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 임의의 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 환연하면, 본 발명은 상기 임의의 H5 단백질의 암호화 서열 또는 전술한 바와 같은 이의 부분을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 이러한 벡터는 당해 임의의 H5 단백질 또는 전술한 바와 같은 이의 부분을 발현시키는 발현 벡터인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 벡터는 시험관내 또는 생체내에서 세균, 효모 또는 동물 세포의 형질감염 또는 감염에 적합한 것이다.
- [0122] 벡터 및 발현을 위해 벡터(또는 재조합체)를 제조 및/또는 사용하는 방법은 다음과 같은 문헌에 기술된 방법이거나 또는 이와 유사한 방법일 수 있다: 미국 특허 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, PCT 공보 WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018, Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination An update", PNAS USA 93 11349-11353, October 1996, Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93 11341-11348, October 1996, Smith et al., 미국 특허 4,745,051(재조합 배클로바이러스), Richardson, C. D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.), Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, Dec, 1983, Vol. 3, No 12, p. 2156-2165, Pennock et al. "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Insect Cells with a Baculovirus vector," Molecular and Cellular Biology Mar 1984, Vol 4, No 3, p. 399-406, EPAO 370 573, 1986년 10월 16일에 출원된 미국 특허출원번호 920,197, EP 특허 공개번호 265785, 미국 특허번호 4,769,331 (재조합 헤르페스바이러스), Roizman, "The function of herpes simplex virus genes A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93 11307-11312, October 1996, Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93 11313-11318, October 1996, Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93 11334-11340, October 1996, Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors Strategies and applications," PNAS USA 93 11371-11377, October 1996, Kitson et al., J Virol 65, 3068-3075, 1991, 미국 특허 5,591,439, 5,552,143, WO 98/00166, 하여된 미국 특허출원 일련번호 08/675,556 및 08/675,566(둘 모두 1996년 7월 3일에 출원됨)(재조합 아데노바이러스), Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning

vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) p. 237-52, 1993, Ballay et al. EMBO Journal, vol 4, p 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, April, 1990, Prevec et al., J. Gen Virol. 70, 42434, PCT WO 91/11525, Feigner et al.(1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259 1745-49, 1993 and McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93 11414-11420, October 1996, 및 미국 특허 5,591,639, 5,589,466 및 5,580,859, 뿐만 아니라 특히 DNA 밸현 벡터에 관해서는 WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660, Tang et al., Nature and Furth et al Analytical Biochemistry]을 참조한다. 또한, WO 98/33510, Ju et al., Diabetologia, 41 736-739, 1998 (렌티바이러스 밸현 시스템), Sanford et al., 미국 특허 4,945,050, Fischbach et al.(Intrace1), WO 90/01543, Robinson et al., seminars in Immunology vol 9, pp 271-283 (1997)(DNA 벡터 시스템); Szoka et al., 미국 특허 (생세포에 DNA를 삽입하는 방법), McCormick et al., 미국 특허 5,677,178(세포변성 바이러스의 이용) 및 미국 특허 5,928,913(유전자 전달을 위한 벡터), 뿐만 아니라 본원에 인용된 기타 문헌들.

- [0123] 바이러스 벡터, 예컨대 돼지 헤르페스 바이러스, 구체적으로 오제스키병 바이러스, 돼지 아데노바이러스, 폭스 바이러스, 특히 백시니아 바이러스, 아비폭스 바이러스, 카나리폭스 바이러스 및 돈두 바이러스, 뿐만 아니라 DNA 벡터(DNA 플라스미드)는 본 발명의 실시에 유리하게 이용된다.

본 발명에 따라 H5 단백질을 생산하는 방법

다른 관점에 따르면, 본 발명은 다량의 재조합 H5 단백질을 생산 및/또는 회수하는 방법으로서, i) 배양물 중의 민감성 세포를 H5 DNA 암호화 서열을 함유하는 재조합 바이러스 벡터로 감염시켜, 재조합 바이러스 벡터로 H5 단백질을 발현시키는 단계, 및 ii) 그 다음, H5 단백질을 세포 배양물로부터 회수하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 다량의 H5 단백질이란, 세포 배양물 1ml당 약 20 μ g 이상, 바람직하게는 약 25 μ g/ml 이상, 더욱 바람직하게는 약 30 μ g/ml 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 40 μ g/ml 이상, 더 더욱 바람직하게는 약 50 μ g/ml 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 60 μ g/ml 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 80 μ g/ml 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 100 μ g/ml 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 150 μ g/ml 이상, 가장 바람직하게는 약 190 μ g/ml 이상을 의미하며, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0126] 바람직한 양태에 따르면, H5 단백질은 이 H5 단백질을 발현하는 전체(즉, 완전) SF+ 세포를 수거하여 회수한다.

[0127] 바람직한 세포는 H5 DNA를 함유하고 H5 단백질을 발현하는 적당한 재조합 바이러스 벡터로 감염될 수 있는 것이다. 바람직하게는, 세포는 곤충 세포이고, 더욱 바람직하게는 상표명 SF+ 곤충 세포(Protein Sciences Corporation, Meriden, CT)로 판매되는 곤충 세포를 포함한다. 바람직한 세포 배양물은 세포수가 약 0.3 내지 2.0x10⁶ 세포/ml, 더욱 바람직하게는 약 0.35 내지 1.9x10⁶ 세포/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.4 내지 1.8x10⁶ 세포/ml, 더 더욱 바람직하게는 약 0.45 내지 1.7x10⁶ 세포/ml, 가장 바람직하게는 약 0.5 내지 1.5x10⁶ 세포/ml이다.

[0128] 바람직한 바이러스 벡터는 특히 생산 세포가 곤충 세포인 경우, BaculoGold(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)와 같은 배클로바이러스를 포함한다. 배클로바이러스 밸현 시스템이 바람직하지만, 다른 밸현 시스템이 본 발명의 목적을 위해, 즉 세포 배양물의 상청액 내로 H5의 발현을 위해 사용될 수 있다는 것은 당업자라면 잘 알고 있을 것이다. 이러한 다른 밸현 시스템은 배지로 H5의 발현을 유도하기 위해 시그널 서열의 사용을 필요로 할 수 있다.

[0129] 또한, 적당한 증식 배지도 당업자라면 결정할 수 있을 것이며, 바람직한 증식 배지는 Excell 420(JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS)과 같은 무혈청 곤충 세포 배지 등이다.

[0130] H5 DNA 서열을 함유하는 재조합 바이러스 벡터는 민감성 세포의 감염에 사용했을 때, 감염다중도(MOI)가 약 0.03 내지 1.5인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 약 0.05 내지 1.3, 더욱 더 바람직하게는 약 0.09 내지 1.1, 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 1.0이다. 바람직하게는, 위에서 언급한 MOI는 세포 배양액 1ml에 관한 것이다. 바람직하게는, 본원에 기술된 방법은 0.35 내지 1.9x10⁶ 세포/ml, 더욱 바람직하게는 약 0.4 내지 1.8x10⁶ 세포/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.45 내지 1.7x10⁶ 세포/ml, 가장 바람직하게는 약 0.5 내지 1.5x10⁶ 세포/ml를, H5 DNA를 함유하고 H5 단백질을 발현하며 감염다중도(MOI)가 약 0.03 내지 1.5, 더욱 바람

직하게는 약 0.05 내지 1.3, 더욱 더 바람직하게는 약 0.09 내지 1.1, 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 1.0인 재조합 바이러스 벡터로 감염시키는 단계를 포함한다.

[0131] 이 후, 감염된 세포를 최대 10일 동안, 더욱 바람직하게는 약 2일 내지 약 10일 동안, 더욱 더 바람직하게는 약 4일 내지 약 9일 동안, 가장 바람직하게는 약 5일 내지 약 8일 동안 항온배양한다. 바람직한 항온배양 조건은 약 22 내지 32°C, 더욱 바람직하게는 약 24 내지 30°C, 더욱 더 바람직하게는 약 25 내지 29°C, 더욱 더 바람직하게는 약 26 내지 28°C, 가장 바람직하게는 약 27°C의 온도를 포함한다. SF+ 세포는 항온배양 후 특징적인 배클로바이러스 유도성 변화가 관찰되는 것이 바람직하다. 이러한 관찰은 감염후 기간 동안 세포 밀도의 동향과 생존성이 감소를 모니터하는 것을 포함한다. 최고 바이러스 역가는 감염후 3 내지 5일째 관찰되고 세포내 최고 H5 단백질 발현은 5일 내지 8일째 및/또는 세포 생존성이 10% 미만으로 감소할 때 수득되는 것으로 밝혀졌다.

[0132] 즉, 본 발명의 한가지 관점은 재조합 H5 단백질을 바람직하게는 전술한 양으로 생산 및/또는 회수하는 방법으로서, i) 다수의 민감성 세포(상기 참조)의 배양물을 위에서 정의된 바와 같은 MOI를 갖는 재조합 바이러스 벡터로 감염시키는 단계, ii) 재조합 바이러스 벡터로 H5 단백질을 발현시키는 단계 및 iii) 그 다음 감염 후 5 내지 8일째 및/또는 세포 생존성이 10% 미만으로 감소할 때 수득된 세포로부터 H5 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 재조합 바이러스 벡터는 H5 DNA 암호화 서열을 함유하는 재조합 배클로바이러스이고, 세포는 SF+ 세포이다. 또한, 배양물은 감염후 기간 동안 오염의 거시적 및 미시적 증거에 대해 또는 세포 형태의 비전형적 변화에 대해 주기적으로 조사되어야 하는 것이 바람직하다. 임의의 오염을 나타내는 모든 배양물은 폐기해야 한다.

[0133] 백신과 같은 면역원성 또는 면역학적 조성물에 사용될 H5 단백질을 회수하기 위해서는 바이러스 벡터를 불활성화시키기 위한 불활성화 단계를 포함시키는 것이 바람직하다.

[0134] "면역원성 또는 면역학적 조성물"이란 용어는 세포 및/또는 항체 매개된 면역 반응이 있는 숙주에서 당해의 조성물 또는 백신에 대한 면역 반응을 유도하는 적어도 하나의 항원을 포함하는 물질 조성물을 의미한다. 보통, "면역 반응"은 다음과 같은 효과 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다: 당해의 조성물 또는 백신에 포함된 항원 또는 항원들에 대해 특이적인 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 억제 T 세포 및/또는 세포독성 T 세포 및/또는 감마-델타 T 세포의 생산 또는 활성화. 숙주는 세로운 감염에 대한 저항성이 증강되고/되거나 질병의 임상적 중증도가 감소될 정도로 치료학적 또는 보호적 면역 반응을 나타내는 것이 바람직하다. 당해의 보호는 감염된 숙주가 일반적으로 나타내는 증상의 감소 또는 결여, 신속한 회복 시간 및/또는 감염된 숙주에서 저하된 바이러스 역가에 의해 입증될 것이다.

[0135] 따라서, 본 발명은 i) 다수의 민감성 세포(상기 참조)의 배양물을, MOI가 위에서 정의한 바와 같은 재조합 바이러스 벡터로 감염시키는 단계, ii) 재조합 바이러스 벡터로 H5 단백질을 발현시키는 단계, iii) 감염후 5 내지 8일째 및/또는 세포 생존성이 10% 미만으로 감소할 때 수득된 세포에서 발현된 H5를 회수하는 단계, 및 iv) 재조합 바이러스 벡터를 불활성화시키는 단계에 의해 재조합 H5 단백질을 바람직하게는 전술한 양으로 생산 및/또는 회수하는 방법에 관한 것이다.

[0136] 불활성화는 여과 단계 직전 또는 직후에 수행하는 것이 바람직하며, 여과 단계 후가 불활성화에 바람직한 시기이다. 종래의 모든 불활성화 방법이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 즉, 불활성화는 화학적 및/또는 물리적 처리에 의해 수행될 수 있다. 바람직한 형태에서, 수거액의 용적을 결정하고 온도는 약 32 내지 42°C, 더욱 바람직하게는 약 34 내지 40°C, 가장 바람직하게는 약 35 내지 39°C이다. 바람직한 불활성화 방법은 폐환된 이원 에틸렌이민(BEI)을 바람직하게는 약 1 내지 약 20mM, 바람직하게는 약 2 내지 약 10mM, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 8mM, 더욱 더 바람직하게는 약 3 내지 약 7mM, 가장 바람직하게는 약 5mM의 농도로 첨가하는 것을 포함한다. 예를 들어, 불활성화는 0.2M 이원 에틸렌이민(BEI)으로 폐환된 2-브로모에틸렌이민 하이드로브로마이드를 바람직하게는 약 0.4M 농도로 0.3N NaOH에 용해한 용액을 수거액에 BEI의 최종 농도가 약 5mM이 되게 첨가하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 수거액은 그 다음 72 내지 96시간 동안 연속 교반하고, 불활성화된 수거액은 -40°C 또는 그 이하에서 동결 보관하거나 또는 약 1 내지 7°C에서 보관할 수 있다. 불활성화가 완료된 후, 임의의 잔류 BEI를 중화시키기 위해 티오황산나트륨 용액, 바람직하게는 0.1M을 첨가한다. 티오황산나트륨은 불활성화를 위해 사전에 첨가된 BEI와 비교했을 때 등량으로 첨가하는 것이 바람직하다. 예를 들어, BEI가 5mM의 최종 농도로 첨가되는 경우에는 임의의 잔류 BEI를 중화시키기 위해 1.0M 티오황산나트륨 용액을 최종 최소 농도가 5mM가 되도록 첨가한다.

[0137] 즉, 본 발명의 다른 한가지 관점은 i) 다수의 민감성 세포(상기 참조) 배양물을 위에서 정의한 바와 같은 MOI의 재조합 바이러스 벡터로 감염시키는 단계, ii) H5 단백질을 재조합 바이러스 벡터로 발현시키는 단계, iii) 감

염 후 5 내지 8일째 및/또는 세포 생존성이 10% 미만으로 감소할 때 수득된 세포에서 발현된 H5를 회수하는 단계, 및 iv) 재조합 바이러스 벡터를 불활성화시키는 단계에 의해 재조합 H5 단백질을 바람직하게는 전술한 양으로 생산하는 방법에 관한 것이다. 재조합 바이러스 벡터는 H5 DNA 암호화 서열을 함유하는 배클로바이러스이고 세포는 SF+ 세포인 것이 바람직하다. 바람직한 불활성화 단계는 전술한 바와 같다. 불활성화는 약 35 내지 39°C에서, 2 내지 8mM BEI의 존재 하에, 더욱 더 바람직하게는 약 5mM BEI의 존재 하에 수행하는 것이 바람직하다.

[0138] 본 발명의 다른 한가지 관점에 따르면, 전술한 방법은 단계 iv) 이후에 중화 단계를 포함한다. 이러한 단계 v)는 용액 내의 불활성제를 중화시키는 제제를 등량으로 첨가하는 것을 포함한다. 불활성화제가 BEI이면, 티오황산나트륨을 등량으로 첨가하는 것이 바람직하다. 따라서, 추가 관점에 따르면, 단계 v)는 불활성화제가 BEI일 때, 티오황산나트륨 용액을 약 1 내지 약 20mM의 최종 농도, 바람직하게는 약 2 내지 약 10mM, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 8mM, 더욱 더 바람직하게는 약 3 내지 약 7mM, 가장 바람직하게는 약 5mM의 최종 농도로 첨가하는 것을 포함한다.

[0139] 바람직한 형태에서, 특히 백신과 같은 면역원성 조성물에 재조합 H5 단백질을 사용하는 형태에서, 수거된 H5 단백질의 각 분획은 부착 의존적 배클로바이러스 민감성 곤충 세포, 예컨대 Sf9 세포에서 계대배양에 의한 불활성화에 대해 시험한다. 이 시험의 바람직한 형태에 따르면, 150cm²의 적당한 세포 배양 단층에 불활성화된 H5 수거액 1.0ml를 접종하고 적어도 2회 계대가 이루어지는 14일 동안 25 내지 29°C에서 생육시킨다. 생육 기간 마지막에 세포 단층을 H5 배클로바이러스의 전형적인 세포변성 효과(CPE)에 대해 조사한다. 양성 바이러스 대조군도 사용하는 것이 바람직하다. 이 대조군은 불활성화되지 않은 기준 H5 배클로바이러스가 접종된 Sf9 세포의 하나의 배양물 및 무접종 상태인 Sf9 세포의 하나의 플라스크를 포함할 수 있다. 접종 및 계대배양 후, BEI 처리된 바이러스액에 바이러스 감염된 세포가 존재하지 않는 것은 만족스러운 불활성화 시험을 구성해줄 것이다. 기준 바이러스로 접종된 대조군 세포는 H5 배클로바이러스에 전형적인 CPE를 나타내야 하고, 무접종된 플라스크는 H5 배클로바이러스 CPE에 대한 어떠한 증거도 나타내지 않아야 한다. 대안적으로, 생육기간의 마지막에 상청액 시료를 수집해서, Sf9 세포가 로딩되어 있는 Sf9 96웰 플레이트에 접종할 수 있고, 그 다음 25 내지 29°C에서 5 내지 6일 동안 생육시킬 수 있다. 그 다음, 플레이트를 고정시키고, 배클로바이러스 특이적 단백질(즉, gp64)에 대한 임의의 표지된 항체 또는 FITC 접합된 항-H5 항체로 염색한다. BEI 처리된 바이러스액에서 CPE, H5 발현 또는 배클로바이러스 특이적 단백질(즉, gp64) 발현의 부재는 만족스러운 불활성화 시험을 구성한다. 기준 바이러스가 접종된 대조군 세포는 CPE 및 IFA 활성을 나타내야 하고, 무접종 플라스크는 H5 배클로바이러스 CPE의 어떠한 증거도 나타내지 않고 어떠한 IFA 활성도 없어야 한다.

[0140] 즉, 본원에 기술되는 또 다른 관점은 i) 재조합 바이러스 벡터를 함유하는 배양액의 적어도 일부를 불활성화제, 바람직하게는 전술한 바와 같은 불활성화제와 접촉시키는 단계, ii) 불활성화제, 바람직하게는 전술한 바와 같은 불활성화제를 중화시키기 위해 중화제를 첨가하는 단계, 및 iii) 전술한 바와 같은 분석법으로 잔류 감염도를 측정하는 단계를 포함하여, H5 단백질을 발현하는 재조합 바이러스 벡터의 불활성화의 유효성을 측정하는 불활성화 시험에 관한 것이다.

[0141] 불활성화 후, 시료에 존재하는 재조합 H5 단백질의 상대적 양은 다수의 방식으로 측정할 수 있다. 바람직한 정량분석 방법은 SDS-PAGE 농도계측법, ELISA 및 알려진 양의 백신을 임상 결과(혈청학 등)와 상관짓는 동물 백신 접종 연구를 포함한다. SDS-PAGE가 정량 분석에 이용될 때, 미지량의 재조합 H5 단백질을 함유하는 시료를 공지된 여러 양의 재조합 H5 단백질을 함유하는 시료와 함께 겔 상에서 전개시킨다. 공지된 시료를 기반으로 하여 표준 곡선을 작성할 수 있으며, 이 표준 곡선과 비교하여 미지 시료에 존재하는 재조합 H5의 양을 구할 수 있다. ELISA는 일반적으로 항원 정량분석의 산업 표준으로서 인정되고 있기 때문에 정량분석에 바람직하다.

[0142] H5 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 분자 또는 벡터를 함유하는 백신

[0143] 추가 관점에 따라, 본 발명은 일반적으로

[0144] i. 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 H5 단백질;

[0145] ii. 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는, 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 핵산 분자; 및/또는

[0146] iii. 본원에 기술된 바와 같은 임의의 당해 H5 단백질을 암호화하고 임의의 당해 핵산 분자를 포함하는, 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 벡터; 및

[0147] iv. 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는, 백신 또는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

- [0148] 본원에 기술된 "약제학적 조성물", "약제학적/백신 조성물"이란 용어는 감염의 감소 또는 예방을 위한 백신 또는 감염의 치료 또는 경감을 위한 물질의 조성물을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0149] 인플루엔자 헤마글루티닌을 암호화하는 핵산계 백신, 바람직하게는 cDNA 백신의 제조는 예컨대 문헌[Deck et al. Vaccine 1997 15(1) 71-78, Ulmer et al., Science 1993, 259 1745-1749, Ulmer et al., Vaccine 1994, 12(16) 1541-1544]에 기술되어 있다. 이러한 모든 방법은 본원에 기술된 인플루엔자 H5 단백질을 암호화하는 핵산계 백신, 바람직하게는 cDNA 백신의 생산에 사용될 수 있다.
- [0150] 또한, 본원에 기술된 바와 같은 H5 단백질 또는 이의 부분을 포함하는 백신은 통상적인 접근법, 예컨대 재조합 발현 기술 또는 생화학적 정제 및 분리 기술을 통해 생산할 수 있다. 곤충 세포에서의 발현을 비롯한 재조합 발현 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, N. Y., DNA Cloning A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985), Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984), Nucleic Acid Hybridization [B. D. Hames & S. J. Higgins eds (1985)], Transcription And Translation [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R. I. Freshney, ed. (1986)], Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal. A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc 1994]에 기술되어 있다. 충분히 확립된 재조합 발현 시스템의 또 다른 예는 이.콜라이(*E. coli*) 또는 비.서브틸리스(*B. subtilis*)와 같은 세균 발현 시스템, 에스.세레비지에(*S. cerevisiae*) 또는 에스.폼베(*S. pombe*)와 같은 효모계 발현 시스템, 또는 BHK-, CHO- 및/또는 NS0계 발현 시스템과 같은 포유동물 세포 발현 시스템이다. 이러한 발현 시스템은 당업계에 공지되어 있고, 일반적으로 클론테크 레보레이토리즈, 인크.(Clontech Laboratories, Inc.) (미국 캘리포니아 94303-4607 팔로 알토 파비안 웨이 4030 소재) 등에서 입수 가능하다. 또 다른 발현 전략은 예컨대 문헌[Lushow et al., Vaccine no 19 (2001), pp 4249-4259 또는 Veit et al., PNAS vol 103 (2006), pp 8197-8202]에 기술되어 있다. 또한, 재조합 아데노-관련 바이러스 시스템은 충분히 확립되어 있고, 예컨대 추가 참고문헌이 있는 US 5,436,146 또는 WO200203872에 설명되어 있다. 또한, 백시니아(폭스) 바이러스계 발현 시스템은 추가 참고문헌이 있는 US 6,265,183에 기술된 바와 같이, 충분히 확립되어 있고 본 발명에 따라 사용되는 재조합 항원(들), 항원성 조성물(들)을 생산하는데 적합하다. 또 다른 적당한 발현 시스템은 재조합 포포바 바이러스, 예컨대 SV40, 계두 바이러스, 가성광견병 바이러스 및 레트로바이러스를 이용한다.
- [0151] 본원에 기술된 적당한 약제학적/백신 조성물은 또한 본원에 기술된 H5 단백질을 포함하는 불활성화된 바이러스, 본원에 기술된 H5 단백질을 함유하는 생바이러스의 비병원성 형태, 바이러스의 제조물 및/또는 단편을 포함할 수 있으며, 상기 제조물 및/또는 단편은 본원에 기술된 바와 같은 H5 단백질을 포함한다.
- [0152] 당업자는 항원과 함께 상기 조성물/백신에 포함될 수 있는 추가 성분을 알고 있다(예컨대, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed. Mack Publ., Easton). 숙련자는 공지된 주사 가능한 생리학적으로 허용되는 식염수 용액을 이용할 수 있다. 즉석제조용 용액의 제조를 위한 등장성 수용액, 예컨대 식염수 또는 대용하는 혈장 단백질 용액은 쉽게 입수가능하다. 약제학적 조성물/백신은 동결건조물 또는 무수 제조물로서 제공될 수 있고, 이는 예컨대 부품 키트처럼 멸균 조건 하에서 사용하기 직전에 공지된 주사 가능한 용액에 의해 재구성될 수 있다.
- [0153] 또한, 본 발명의 약제학적/백신 조성물은 하나 이상의 수의학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "수의학적으로 허용되는 담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 애주번트, 안정화제, 희석제, 보존제, 항세균제 및 항진균제, 등장화제, 흡수지연제 등을 포함하며, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0154] 희석제는 물, 식염수, 텍스트로스, 에탄올, 글리세롤 등을 포함할 수 있다. 등장화제는 특히 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스를 포함할 수 있다. 안정화제는 특히 알부민 및 에틸린디아민테트라아세트산의 알칼리염을 포함한다.
- [0155] 본원에 사용된 보존제는 젠타마이신, 머티올레이트 등과 같은 항미생물성 활성제를 의미한다. 특히, 보존제의 첨가는 다용량 조성물의 제조에 가장 바람직하다. 이러한 항미생물성 활성제는 당해의 조성물 내에서 임의의 미생물의 성장을 억제하거나 임의의 미생물 오염을 당해의 조성물이 억제하기에 효과적인 농도로 첨가한다.
- [0156] 본원에 사용된 "애주번트"는 수산화알루미늄 및 인산알루미늄, 사포닌, 예컨대 Quil A, QS-21(Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), 유충수 애멀젼,

수중유 에멀젼, 수중유중수 에멀젼을 포함할 수 있다.

[0157] 에멀젼은 특히 경질 액체 파라핀 오일(유럽 약전 타입); 스쿠알란 또는 스쿠알렌과 같은 이소프레노이드 오일; 알켄, 특히 이소부텐 또는 데센의 올리고머화로부터 수득되는 오일; 선형 알킬 그룹을 함유하는 알콜 또는 산의 에스테르, 더욱 구체적으로 식물유, 에틸 올레이트, 프로필렌 글리콜 디-(카프릴레이트/카프레이트), 글리세릴 트리-(카프릴레이트/카프레이트) 또는 프로필렌 글리콜 디올레이트; 분지형 지방산 또는 알콜의 에스테르, 특히 이소스테아르산 에스테르를 주성분으로 할 수 있다. 오일은 에멀젼을 형성하기 위해 유화제와 함께 사용된다. 유화제는 바람직하게는 비이온성 계면활성제, 구체적으로 소르비탄 에스테르, 만나이드 에스테르(예: 안하이드로만니톨 올레이트), 글리콜 에스테르, 폴리글리세롤 에스테르, 프로필렌 글리콜 에스테르 및 올레산, 이소스테아르산, 리신올레산 또는 하이드록시스테아르산의 에스테르이고, 이들은 경우에 따라 에톡실화되며, 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 공중합체 블록, 구체적으로 플루로닉(Pluronic) 제품, 특히 L121이다[Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) 및 Todd et al., Vaccine 15 564-570 (1997) 참조]. 적당한 수중유 에멀젼의 예는 에멀시젠(Emulsigen)계 애주번트, 예컨대 EMULSIGEN[®], EMULSIGEN-D[®], EMULSIGEN-P[®], EMULSIGEN-75[®](MVP Laboratories, Inc Omaha, NE, USA)이다. 놀랍게도, H5 단백질을 함유하는 약제학적/백신 조성물, 바람직하게는 본원에 기술된 재조합 H5 단백질은 수중유 에멀젼에 의해, 바람직하게는 이러한 에멀시젠계 애주번트, 더욱 바람직하게는 EMULSIGEN[®] 및 EMULSIGEN-D[®]에 의해 효과적으로 보강된다는 것을 발견했다.

[0158] 또한, 문헌["Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M.Powell and M.Newmann, Plenum Press, 1995]의 147쪽에 기술된 SPT 에멀젼 및 동일 문헌의 183쪽에 기술된 에멀젼 MF59를 사용하는 것도 가능하다.

[0159] 애주번트의 또 다른 예는 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 및 말레산 무수물 및 알케닐 유도체의 공중합체 중에서 선택되는 화합물이다. 유익한 애주번트 화합물은 특히 당 또는 폴리알콜의 폴리알케닐 에테르와 가교된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체이다. 이러한 화합물은 카르보머(carbomer)란 용어로 알려져 있다(Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). 또한, 당업자는 미국 특히 2,909,462를 참조할 수 있으며, 이 특허는 적어도 3개의 하이드록시의 수소 원자가 적어도 2개의 탄소원자를 갖는 불포화 지방족 라디칼로 치환된, 적어도 3개의 하이드록시 그룹, 바람직하게는 8개 이하를 갖는 폴리하이드록실화된 화합물과 가교된 아크릴계 중합체에 대해 기술하고 있다. 바람직한 라디칼은 탄소원자 2개 내지 4개를 함유하는 것, 예컨대 비닐, 알릴 및 다른 에틸렌계 불포화 그룹이다. 불포화 라디칼은 그 자체가 메틸과 같은 다른 치환체를 함유하기도 한다. 카르보폴(Carbopol)(BF Goodrich, Ohio, USA)이라는 상표로 시판되는 제품이 특히 적당하다. 이 제품은 알릴 슈크로스 또는 알릴 펜타에리트리톨과 가교되어 있다. 이 중에서, 카르보폴 974P, 934P 및 971P를 예로 들 수 있다. 말레산 무수물과 알케닐 유도체의 공중합체 중에서, 공중합체 EMA(Monsanto)는 말레산 무수물과 에틸렌의 공중합체이다. 이러한 중합체를 물에 용해하면 산 용액이 되고, 이 용액은 면역원성, 면역학적 또는 백신 조성물이 첨가될 애주번트 용액이 되도록, 바람직하게는 생리학적 pH로 중화될 것이다.

[0160] 또 다른 적당한 애주번트에는 특히 RIBI 애주번트 시스템(Ribi Inc.), 블록 공중합체(CytRx, Atlanta GA), SAF-M(Chiron, Emeryville, CA), 모노포스포릴 지질 A, 아브리딘 지질-아민 애주번트, 이.콜라이(재조합체 등) 유래의 열불안정성 장독소, 콜레라 독소 또는 뮤라밀 디펩타이드가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0161] 바람직하게는, 애주번트는 용량당 약 100 μ g 내지 약 10mg의 양으로 첨가된다. 애주번트는 용량당 약 100 μ g 내지 약 10mg의 양으로 첨가되는 것이 더욱 더 바람직하다. 애주번트는 용량당 약 500 μ g 내지 약 5mg의 양으로 첨가되는 것이 더욱 더 바람직하다. 애주번트는 용량당 약 750 μ g 내지 약 2.5mg의 양으로 첨가되는 것이 더욱 더 바람직하다. 애주번트는 용량당 약 1mg의 양으로 첨가되는 것이 가장 바람직하다.

[0162] 약제학적/백신 조성물은 추가로 하나 이상의 다른 면역조절제, 예컨대 인터루킨, 인터페론 또는 다른 사이토카인을 포함할 수 있다. 또한, 약제학적/백신 조성물은 젠타마이신 및 머티올레이트를 포함할 수 있다. 본 발명의 상황에서 유용한 애주번트 및 첨가제의 양과 농도는 당업자라면 쉽게 결정할 수 있지만, 본 발명은 백신 조성물 1ml 용량당 애주번트 약 50 μ g 내지 약 2000 μ g, 바라직하게는 약 250 μ g을 포함하는 조성물이 가능할 것으로 생각된다. 다른 바람직한 양태에서, 본 발명은 약 1 μ g/ml 내지 약 60 μ g/ml의 항생제, 더욱 바람직하게는 약 30 μ g/ml 미만의 항생제를 함유하는 백신 조성물이 가능할 것으로 생각된다.

[0163] 따라서, 추가 양태에 따르면, 본 발명은

[0164] 1. 아미노산 223N과 변형 328K+를 갖는 본원에 기술된 인플루엔자 바이러스의 H5 단백질로서, 이 H5 단백질의

아미노산 위치의 번호는 서열번호 1에 예시적으로 제시된 바와 같은 아미노산 위치를 의미하고 상기 변형 328K+는 H5 단백질의 아미노산 위치 328에서 제2 리신(K+)이 삽입된 것을 의미하는 H5 단백질 중 어느 하나의 치료학적 유효량; 및

[0165] ii. 전술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 애주번트를 포함하는 약제학적/백신 조성물에 관한 것이다.

[0166] 바람직하게는, 애주번트는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된다:

[0167] a) EMULSIGEN[®], 수중유 에멀젼(o/w);

[0168] b) EMULSIGEN-D[®], 수중유(o/w) + 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DDA);

[0169] c) Polygen, 공중합체

[0170] d) EMULSIGEN-P[®], 수중유(o/w) + 전매권이 있는 면역자극제

[0171] e) Carbigen, 가교된 중합체

[0172] f) EMULSIGEN-75[®], 가교 중합체와 수중유(o/w) 에멀젼을 포함하는 이중 애주번트;

[0173] g) ISA 70, 유증수(w/o)

애주번트는 EMULSIGEN[®], EMULSIGEN-D[®], EMULSIGEN-P[®], EMULSIGEN-75[®], EMULSIGEN[®] 및 EMULSIGEN-P[®]로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 에멀시전계 애주번트와 같은 수중유 에멀젼인 것이 가장 바람직하다. 본 발명의 제형에는 EMULSIGEN[®] 및 EMULSIGEN-P[®]가 사용되는 것이 가장 바람직하다.

[0175] 추가 관점에 따르면, 본원에서 제공된 약제학적/백신 조성물은 하나 이상의 항원을 포함한다. 이러한 추가 항원은 가금류 또는 포유동물 병원체의 항원인 것이 바람직하다. 추가 양태에 따르면, 추가 항원은 헤마글루티닌 H3, H7, H9 또는 인플루엔자 바이러스의 임의의 다른 헤마글루티닌과 같은 추가 인플루엔자 항원이다. 추가 항원(들)은 정제된 형태, 항원 제조물의 일부, 사멸된 미생물 형태 또는 변형된 생 미생물 형태로 첨가될 수 있다.

[0176] 본원에 사용된 "항원"이란 용어는 이 항원이 투여된 숙주에서 그 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 활성화하거나 또는 자극하기 위해 면역글로불린(항체) 또는 T 세포 항원 수용체와 같은 면역계의 항원 인식 분자와 특이적으로 상호작용할 수 있는 웨타이드, 폴리웨타이드, 글리코웨타이드 또는 폴리사카라이드를 의미하며, 하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, "항원"이란 용어는 핵산 분자, 바람직하게는 DNA 분자 또는 RNA 분자를 의미하기도 하며, 이 각 분자는 이 핵산 분자에 의해 암호화된 항원에 대한 면역반응을 유도, 활성화 또는 자극하기 위해 면역글로불린(항체) 또는 T 세포 항원 수용체와 같은 면역계의 항원 인식 분자와 특이적으로 상호작용할 수 있는 웨타이드, 폴리웨타이드 또는 글리코웨타이드를 암호화하고 발현한다. 본 발명에 따라 사용되는 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 항원은 미생물 또는 이 미생물의 항원성 부분 및/또는 제조물이다. 이와 관련하여, 본원에 사용된 "면역화"란 용어는 면역 반응의 임의의 유발 또는 증강을 의미하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. "면역 반응"이란 용어는 이미 앞에서 설명한 바 있다.

[0177] 인플루엔자 백신의 투여 전략은 당업계에 공지되어 있다. 불활성화 및 약독화된 바이러스 백신의 점막 백신접종 전략이 가능할 것으로 생각된다. 점막은 백신의 국소 전달의 표적이 될 수 있지만, 점막에 면역원성 단백질을 전달하는 데에는 다양한 전략이 이용되었다.

[0178] 구체적 양태에서, 백신은 콜레라 독소 B 또는 콜레라 독소 A/B 키메라와 같은 콜레라 독소와 혼합물로 투여되거나 또는 상기 콜레라 독소와 접합체 또는 키메라 융합 단백질로서 투여될 수 있다(Hajishengallis, J. Immunol., 154 4322-32, 1995, Jobling and Holmes, Infect. Immun., 604915-24, 1992). 콜레라 독소 B 서브 유닛의 사용을 기본으로 한 점막 백신은 설명된 바 있다(Lebens and Holmgren, Dev Biol Stand 82 215-27, 1994). 다른 양태에 따르면, 점막 백신접종을 위해, 열불안정성 장독소(LT)와의 혼합물이 제조될 수도 있다.

[0179] 다른 점막 면역화 전략에는 마이크로캡슐에 바이러스를 캡슐화하는 방법(US 5,075,109, US 5,820,883 및 US 5,853,763) 및 면역강화성 막 담체를 사용하는 방법(WO 98/0558)이 포함된다. 경우 투여된 면역원의 면역원성은 적혈구 세포(rbc) 또는 rbc 고스트(ghost)를 사용하거나(US 5,643,577) 또는 청설병 항원을 사용하여(US 5,690,938) 증강시킬 수 있다.

[0180]

다른 관점에 따르면, 본 발명은 전술한 바와 같은 약제학적/백신 조성물을 제조하는 방법, 바람직하게는 전술한 바와 같은 재조합 배클로바이러스 발현 H5 단백질을 포함하는 백신의 생산 방법에 관한 것이다. 이 방법은 일반적으로 i) 본원에 기술된 바와 같은 재조합 H5 cDNA를 포함하는 작제물로 바이러스를 형질감염시키는 단계, ii) 형질감염된 바이러스로 증식 배지 중의 세포를 감염시키는 단계, iii) 이 바이러스가 본원에 기술된 바와 같은 재조합 H5 단백질을 발현하게 하는 단계, iv) 발현된 H5 단백질을 배양액으로부터 회수하는 단계, 및 v) 발현된 H5 단백질을 적당한 애주번트 및/또는 다른 약제학적으로 허용되는 담체와 배합하여 조성물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0181]

바람직한 애주번트는 전술한 것이다. 즉, 추가 관점에 따르면, 인플루엔자 감염에 대한 면역 반응을 야기시키기 위한 백신과 같은 항원성 조성물을 제조하는 방법은 i) H5 단백질을 제조하여 회수하는 단계, 및 ii) 이를 적당한 애주번트와 혼합하는 단계를 포함한다.

[0182]

또한, 본 발명의 백신 조성물은 추가로 희석제, 등장화제, 안정화제 및/또는 보존제를 포함할 수 있다. 희석제는 물, 식염수, 텍스트로스, 에탄올, 글리세롤 등을 포함할 수 있다. 등장화제는 무기염 또는 유기염, 예컨대 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스, 사카라이드, 트레할로스, 만니톨, 사카로스를 특히 포함할 수 있다. 안정화제는 알부민 및 에틸렌디아민테트라아세트산의 알칼리 염을 특히 포함한다. 적당한 애주번트는 전술한 것이다.

[0183]

당해의 임의의 H5 단백질, 핵산 분자, 벡터 및 백신의 의약 용도

[0184]

본원에 제공된 H5 단백질, 이러한 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 본원에 기술된 이러한 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 이러한 임의의 H5 단백질을 포함하는 임의의 약제학적/백신 조성물은 의약으로서, 바람직하게는 인플루엔자 바이러스에 의해 유발된, 가장 바람직하게는 인플루엔자 A 바이러스에 의해 유발된 감염의 치료 및 예방에 사용될 수 있다. 본원에서 제공된 H5 단백질, 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 본원에 기술된 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 본원에 기술된 임의의 H5 단백질, 핵산 분자 또는 벡터를 함유하는 임의의 약제학적/백신 조성물은 사람의 치료 또는 예방 뿐만 아니라 수의학용 의약에도 사용될 수 있다. 수의학용 의약에 사용될 때, 가금류, 바람직하게는 새, 닭, 오리, 칠면조 등은 물론 포유동물, 바람직하게는 돼지, 소, 말, 바다표범, 낙타, 개, 고양이, 햄스터, 마우스 등의 치료에도 바람직하다.

[0185]

즉, 다른 관점에 따르면, 본 발명은 H5 단백질, 본원에서 제공되는 상기 임의의 H5 단백질을 암호화하는 핵산, 본원에 기술된 바와 같은 상기 임의의 H5 단백질을 암호화하는 상기 임의의 핵산 분자를 함유하는 벡터 및 본원에 기술된 바와 같은 상기 임의의 H5 단백질, 핵산 분자 또는 벡터를 함유하는 임의의 약제학적/백신 조성물은 의약으로서, 바람직하게는 사람용 의약으로서 및/또는 수의학용 의약으로서 사용될 수 있다.

[0186]

또한, 본원에서 제공되는 H5 단백질, 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 본원에 기술된 바와 같은 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 상기 임의의 핵산 분자를 함유하는 벡터는 바이러스 인플루엔자에 의해 유발된 감염을 예방 또는 치료하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물의 제조에 사용될 수 있다. 앞에서 언급한 바와 같이, 상기 약제학적 조성물/백신 조성물은 동물, 예컨대 가금류, 바람직하게는 새, 닭, 오리, 칠면조 등은 물론 포유동물, 바람직하게는 돼지, 소, 말, 바다표범, 낙타, 개, 고양이, 햄스터, 마우스 등의 치료 및/또는 예방은 물론 사람의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다.

[0187]

본원에서 제공되는 H5 단백질, 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 본원에 기술된 바와 같은 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 상기 임의의 핵산 분자를 함유하는 벡터는 본원에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물의 제조에 사용될 수 있고, 바람직하게는 조류, 돼지 또는 사람 인플루엔자 바이러스, 또는 이들의 임의의 조합물 또는 하이브리드(hybrid)에 의해 유발된 바이러스 인플루엔자 감염의 치료 및 예방에 적합하다.

[0188]

추가 양태에 따르면, 본 발명은 또한 본원에 기술된 H5 단백질의 치료학적 유효량을 인플루엔자 바이러스 감염의 치료를 필요로 하는 피검체에게 투여함을 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 임의의 H5 단백질을 암호화하는 본원에 기술된 임의의 H5 핵산 분자 또는 벡터의 치료학적 유효량을 인플루엔자 바이러스 감염의 치료를 필요로 하는 피검체에게 투여함을 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 상기 임의의 H5 단백질, 핵산 분자 또는 벡터를 함유하는 백신의 치료학적 유효량을 인플루엔자 바이러스 감염의 치료를 필요로 하는 피검체에게 투여함을 포함하여, 인플루엔자 바이러스 감염을 치료 또는 예방하

는 방법에 관한 것이다. 치료를 필요로 하는 피검체는 사람뿐만 아니라 동물, 바람직하게는 가금류, 더욱 바람직하게는 새, 닭, 오리, 칠면조 또는 포유동물, 바람직하게는 돼지, 소, 말, 바다표범, 낙타, 개, 고양이, 햄스터, 마우스 등일 수 있다.

[0189] 바람직하게는, 닭이 백신접종될 때, 본원에 기술된 바와 같은 H5 단백질은 1일령 이후, 예컨대 10일령, 또는 1일령 내지 10일령, 또는 10일령째 이후에 백신접종에 사용될 수 있다.

[0190] 바람직하게는, 임의의 H5 단백질, 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 벡터, 또는 본원에 기술된 바와 같은 임의의 약제학적/백신 조성물의 투여에 의해 치료될 수 있는 인플루엔자 감염은 조류, 돼지 또는 사람 인플루엔자 바이러스, 또는 이들의 임의의 조합물 또는 하이브리드에 의해 유발되는 것이 바람직하다.

[0191] 다른 관점에 따르면, 본 발명은 i) 본원에 기술된 바와 같은 임의의 상기 H5 단백질, 이러한 임의의 H5 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 벡터 또는 본원에 기술된 바와 같은 상기 임의의 H5 단백질, 핵산 분자 또는 벡터를 함유하는 임의의 약제학적/백신 조성물, 및 ii) 인플루엔자 바이러스에 의해 유발된 감염의 치료 또는 예방에 사용되는 상기 H5 단백질, 핵산 분자, 벡터 또는 백신의 사용법을 기재한 설명서를 포함하는 부품 키트에 관한 것이다. 닭이 백신접종될 때, 본원에 기술된 H5 단백질은 1일령 이후에 백신접종에 사용될 수 있다.

[0192] 또 다른 양태에 따르면, 부품 키트는 가금류 또는 포유동물 병원체의 적어도 하나의 추가 항원과 이 추가 항원의 의약적, 사람 또는 수의학적 용도를 표시하는 정보를 포함한다.

실시 예

[0193] 이하 실시예는 본 발명에 따른 바람직한 재료와 절차를 예시한다. 하지만, 이 실시예는 단지 예시일 뿐이며, 본 발명의 전체 범위에 대한 제한으로 간주되어서는 안 된다.

실시예 1

HA H5 항원을 암호화하고 발현하는 재조합 배클로바이러스의 작제

[0196] H5 HA 항원을 함유하는 재조합 배클로바이러스는 다음과 같이 수득했다: H5 HA(서열번호 2)의 암호화 서열을 화학적으로 합성하고 전달 벡터 pVL1392(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)에 서브클로닝했다. H5 HA MutK+(서열번호 4)를 올리고뉴클레오파이드 프라이머와 QuikChange®(서열번호 4) 부위-지시된 돌연변이 키트 (Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 수득하고, 전달 벡터 pVL 1392(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)에 서브클로닝했다. 이어서, H5 HA 항원(서열번호 2) 및 H5 HA MutK+(서열번호 4)를 암호화하는 유전자를 함유하는 pVL 1392 플라스미드를 DiamondBac®(Sigma) 배클로바이러스 DNA와 함께 Sf9 곤충 세포(BD Biosciences Pharmingen)에 공동-형질감염시켜 서열번호 2를 암호화하는 유전자 H5 HA와 서열번호 4를 암호화하는 H5 HA mutK+를 함유하는 재조합 배클로바이러스를 수득했다. H5 HA(서열번호 2)와 H5 HA MutK+(서열번호 4)를 암호화하는 유전자를 함유한 재조합 배클로바이러스를 플라크 경제하고, 마스터 씨드 바이러스(MSV; Master Seed Virus)를 SF+ 세포주에 증식시켜 일정량을 취해 -70°C에서 보관했다. MSV 또는 워킹 씨드 바이러스 (Working Seed Virus)를 수득하기 위해 전술한 바와 같이 H5 HA 배클로바이러스로 감염된 곤충 세포는 간접 형광 항체 분석 또는 웨스턴 블로트에서 폴리클로날 혈청 또는 모노클로날 항체로 검출되듯이 H5 HA 항원(서열번호 2)과 H5 HA MutK+(서열번호 4)를 발현한다.

[0197] 적당한 양의 재조합 배클로바이러스(각각 H5 HA 및 H5 HA MutK+)를 접종한 후, SF+ 세포(Protein Sciences, Inc., Meriden, CT)를 함유한 스피너 플라스크를 27±2°C에서 7일 동안 100rpm으로 교반하면서 항온배양했다. 이 플라스크에는 공기를 흐를 수 있게 통풍 캡을 사용했다. 배클로바이러스 감염된 SF+ 세포를 함유하는 미정제 세포 배양물 전체와 각 배양물의 세포 배양 상청액을 수거했다.

실시예 2

HA H5 항원을 포함하는 약제학적 조성물(백신)의 제조

[0200] 배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질 및 H5 HA MutK+ 단백질을 수거했다. 배클로바이러스를 5mM 폐환된 이원 에틸렌이민(BEI)(최종 농도)의 존재 하에 약 32 내지 39°C

에서 72 내지 96시간 동안 불활성화시켰다. 불활성화가 완료된 다음, 0.3M 티오황산나트륨 용액을 임의의 잔류 BEI를 중화시키기 위해 5mM의 최종 농도로 첨가했다. 중화 후, 다양한 애주번트를 첨가했고, 다음과 같은 백신/약제학적 조성물을 수득했다.

백신

[0201]

일반 제품명	501
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen이 보강되었다.

[0203]

일반 제품명	502
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen-D가 보강되었다.

[0204]

일반 제품명	503
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Polygen이 보강되었다.

[0205]

일반 제품명	504
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen-P가 보강되었다.

[0206]

일반 제품명	505
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Carbigen이 보강되었다.

[0207]

일반 제품명	506
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen-75가 보강되었다.

[0208]

일반 제품명	507
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA 단백질

제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 ISA 70이 보강되었다.
----	--

[0209]

일반 제품명	508
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA mutK+ 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen이 보강되었다.

[0210]

일반 제품명	509
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA mutK+ 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen-D가 보강되었다.

[0211]

일반 제품명	510
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA mutK+ 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Polygen이 보강되었다.

[0212]

일반 제품명	511
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA mutK+ 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen-P가 보강되었다.

[0213]

일반 제품명	512
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA mutK+ 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Carbigen이 보강되었다.

[0214]

일반 제품명	513
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA mutK+ 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 Emulsigen-75가 보강되었다.

[0215]

일반 제품명	514
항원	배클로바이러스계 발현 시스템에 의해 곤충 세포에서 발현된 미정제 전체 세포 H5 HA K+ 단백질
제형	재조합 H5 HA를 발현하는 배양된 곤충 세포 및 상청액을 포함하는 실험 백신. 이 백신에는 ISA 70이 보강되었다.

[0216] 실시예 3

[0217] 조류 인플루엔자에 대한 돼지의 백신접종

[0218] 1. 서론

[0219] 본 연구의 목적은 재조합 H5 해마글루티닌(HA) 항원의 미정제 추출물을 함유하는 실험 백신이 돼지에서 해마글루티닌 억제(HI) 역ガ를 유도하는 능력을 측정하기 위한 것이다.

[0220] 본 연구에서 평가된 HA H5 원형(prototype)은 종래의 H5 HA 또는 H5 HA MutK+ 유래의 항원을 함유했다. 종래의 H5 HA는 A/오리/중국/E319-2/03으로부터 유래된 것인 반면, H5 HA MutK+는 종래의 H5 HA에 S120N, D150N, S223N에서 3개의 특정 아미노산 변화와 328mutK+를 함유하도록 유전자 조작한 것이다. 또한, 아미노산 94N도 포함한다. H5 HA Mut K+에서의 특정 아미노산 변화는 A/HK/213/03의 HA와 더욱 밀접하게 유사한 H5 HA를 제공한다. A/HK/213/03의 H5 HA의 아미노산 조성은 H5 HA의 항체 인식에 도움을 준다는 것이 일반적인 생각이다.

[0221] 2. 연구 설계

[0222] [표 1] 연구 개요

그룹	돼지 수	백신 원형	0일	21일	35일
1	5	501			
2	5	502			
3	5	503			
4	5	504			
5	5	505			
6	5	506			
7	5	507			
8	5	508			
9	5	509			
10	5	510			
11	5	511			
12	5	512			
13	5	513			
14	5	514			
15	5	없음	채혈	채혈	

[0224] 연구 초기에 새끼돼지의 연령은 3주령±5일령이었다. 연구 초기, 새끼돼지는 임상적으로 건강했다. 혈액 시료는 연구 0일, 21일 및 35일에 수득했다.

[0225] 모든 연구 동물은 연구 1일부터 35일까지 매일 일반적인 건강 상태에 대해 관찰되었다. 각 백신접종 후 7일 동안에는 매일 주사 부위를 조사하고 가시적인 반응을 기록했다. 연구 35일째인 동물 연구 단계의 마지막에 모든 동물을 인도적으로 안락사시켰다.

[0226] 3. 백신

[0227] 실시예 2에 기술한 바와 같은 백신 501 내지 514를 돼지 백신접종 연구에 사용했다.

[0228] 4. 해마글루티닌 억제 분석

[0229] 돼지는 0일과 21일에 H5 HA 함유 원형으로 백신접종을 받았다. 해마글루티닌 억제(HI) 분석으로 평가하기 위해 0일, 21일, 35일에 돼지 혈청을 수집했다. HI 분석은 HA 특이적 항체의 존재를 검출하기 위해 수행했다. 이종 H5N2 바이러스, A/닭/멕시코/232/94는 HI 분석에서 4 해마글루티닌 단위[4 HA 단위]의 농도로 사용했다. 그 다음, U 바닥형 미세역가 플레이트에서, PBS에 연속 희석한 2배 혈청 희석물을 바이러스 4 HA 단위를 함유하는 동량($25\mu\ell$)과 혼합하고, 실온(약 25°C)에서 30분 동안 항온배양했다. 이 혈청 바이러스 함유 웰에 PBS 중의 0.5% 농도의 닦 적혈구 세포를 첨가하고, 실온에서 40분 동안 항온배양했다. HI 역가는 혈구응집의 억제가 관찰되는

최고 혈청 희석률의 역수로서 측정되었다.

[0230] 5. 결과

[0231] HI 시험은 멕시코 정부 공식 H5N1 항원(A/닭/멕시코/232/94)[4 HA 단위] 백신접종 요법 1 x 1mL를 0일과 21일에 사용했다.

		HI 역가		
		0일	21일	35일
501	H5 - Emulsigen	0	0	4
502	H5 - Emulsigen-D	0	0	4
503	H5 - Polygen	0	0	0
504	H5 - Emulsigen-P	0	0	2
505	H5 - Carbigen	0	0	4
506	H5 - Emulsigen-75	0	0	16
507	H5 ISA 70	0	0	16
508	H5 K+ - Emulsigen	0	0	128
509	H5 K+ - Emulsigen-D	0	0	64
510	H5 K+ - Polygen	0	0	16
511	H5 K+ - Emulsigen-P	0	0	0
512	H5 K+ - Carbigen	0	0	0
513	H5 K+ - Emulsigen-75	0	0	16
514	H5 K+ - ISA 70	0	4	32
대조군	없음	0	0	0
BIV H5 (인플루엔자 A 바이러스(A/오리/중국/E319-2/03(H5N1)로부터 유래됨)				
BIV H5 K+ (S120N, D155N, S223N을 포함하도록 돌연변이되고, 328K+ 부가된 BIV H5)				

[0233] 결과는 백신 조성물의 대부분은 백신접종된 돼지에서 면역 반응을 유도한다는 것을 증명한다. 특히, 대부분의 백신 조성물은 혈청전환을 일으키며, 즉 이것은 백신접종된 돼지 대부분이 HI 분석에 사용된 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 특이적 항체를 발생시켰음을 의미한다. 종합해보면, 결과들은 본 발명의 개념이 매우 우수하게 작용한다는 것을 분명하고도 의심의 여지없이 증명한다. 조류 인플루엔자 바이러스(1차 종의 병원체)에 의한 돼지의 전염성 감염(2차 종의 동물)의 위험은, 조류 인플루엔자 바이러스의 적당한 항원을 돼지에게 백신접종함으로써 급격하게 감소될 수 있다. 이것은 분명하게 입증되었다. 또한, 이러한 백신접종의 개념에 따르면, 사람을 비롯한 포유동물로의 조류 인플루엔자의 전파 및 적응은 급격하게 감소된다. 돼지는 조류 인플루엔자 바이러스를 비롯한 조류 병원체의 가장 중요한 저장소 중의 하나이다. 돼지의 바이러스 복제 및 이에 따른 돼지에 조류 인플루엔자의 적응의 위험이 급감되고 제어된다면, 조류 인플루엔자 바이러스의 사람에 대한 임의의 적응의 위험 역시 급감된다. 항원 투여에 의해 낮은 HI 역가, 즉 30 미만의 역가가 발생하는 경우에는, HI 역가의 추가 향상과 백신접종된 돼지의 면역 보호를 증강시키기 위해 추가 항원 접종이 필요할 것이다. 따라서, 낮은 역가는 어떠한 보호도 달성할 수 없음을 의미하지는 않는다. 백신접종된 돼지에서 면역 반응이 측정될 수 있다는 사실은 본 발명의 기본이 되는 발명의 개념이 매우 우수하게 작동한다는 것을 입증한다. 환연하면, 본원에서 제공된 실험들은 본 발명의 발명적 개념이 작동한다는 증거를 분명하고도 의심의 여지없이 제공한다.

[0234] 실시예 4

[0235] 조류 인플루엔자에 대한 조류의 백신접종

[0236] 1. 서론

[0237] 본 연구의 목적은 재조합 H5mutK+ 헤마글루티닌(H5 HA mutK+) 항원의 미정제 추출물을 함유하는 실험 백신이 닭에서 혈구응집 억제(HI) 역가를 유도하는 능력을 측정하기 위한 것이었다. 또한, 종래의 재조합 H5 항원(H5 HA) 및 불활성화된 백신 Volvac® AI(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Mexico)는 대조군으로서 사용했다. 또한, 다양한 애주번트도 H5 HA 항원과 함께 평가했다.

[0238] 2. 연구 설계

[0239] SPF 조류(15-25)를 1일령 또는 10일령째 목 뒤의 피하 경로로 0.5ml의 여러 실험 백신으로 각각 백신접종하고; 모든 조류를 실험 동안 격리실 내에서 생육시켰다. 사료와 물은 원하는 대로 제공했다. 항원공격(challenge)은 백신접종 후 31일 또는 32일째 H5N2 고병원성 조류 인플루엔자 주(strain)로 수행했다.

[0240] 혈청 시료는 백신접종 후 15일, 30일째 조류의 목정맥에서 채혈하여 수득했다. 수득한 혈청은 실시예 3에 기술된 바와 같이 항체 역가를 수득하기 위해 혈구응집 억제(HI) 시험을 진행할 때까지 4°C에 보관했다.

[0241] 3. 백신 및 항원공격 바이러스:

[0242] 4가지 상이한 제형을 각각 평가했다:

[0243] 1. 통상의 오일 에멀젼 H5 HA Mut k+: H5 HA mutk+ 항원은 베링거 인겔하임 베트메디카(Boehringer Ingelheim Vetmedica) 절차를 기반으로 한 오일 에멀젼(프로인트(Freund) 불완전 애주번트)으로 조제했다.

[0244] 2. Seppic H5 HA Mut k+: 공급업자의 권장사항을 기반으로 한 비통상적 애주번트(ISA 206, W/O/W, Seppic 제품)로 조제된 H5 HA mutk+ 항원

[0245] 3. H5 HA 통상의 오일 에멀젼: H5 HA 항원은 베링거 인겔하임 베트메디카 절차를 기반으로 한 오일 에멀젼(프로인트 불완전 애주번트)으로 조제했다.

[0246] 4. Seppic H5HA: 공급업자의 권장사항을 기반으로 한 비통상의 애주번트(ISA 206, W/O/W, Seppic 제품)로 조제된 H5 HA 항원

[0247] 조류 인플루엔자 베링거 인겔하임 베트메디카 오일 에멀젼 백신은 대조군 Volvac® AI(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Mexico)로서 사용했다.

[0248] 항원공격은 H5N2 항원공격 바이러스를 조류당 $10^{6.7}$ CEID로 함유하는 0.2ml로 비내 경로를 통해 접종하여 백신접종된 닭과 백신접종되지 않은 닭에서 수행했다. 항원공격 후, 징후와 치사율을 기록했다. 접종후 10일째 모든 생존 닭은 동물 실험실 절차에 따라 안락사시켰다.

[0249] 4. 결과:

[0250] 결과는 다음 표에 제시했다.

제형	1일령째 백신접종		10일령째 백신접종	
	백신접종 후 31일째 항원공격		백신접종후 32일째 항원공격	
	사망수#	치사율%	사망수#	치사율%
Seppic H5HA Mut k+	8/25	32%	0/20	0%
통상의 오일 에멀젼 H5HA Mut k+	0/24	0%	0/20	0%
Seppic H5HA	17/25	68%	7/19	36.8%
H5HA 통상의 오일 에멀젼	4/25	16%	2/20	10%
Volvac AI KV			0/14	0%
음성 대조군	10/10	100%	14/14	100%

백신 제형	1일령째 백신접종(0.5ml)		10일령째 백신접종(0.5ml)	
	백신접종 후 30일째 HI 역가 (MG Log2)	항원공격 후 보호율%	백신접종 후 30일째 HI 역가 (MG Log2)	항원공격 후 보호율%
Seppic H5HA Mut k+	0.56	68	2.5	100
통상의 오일 에멀젼 H5HA Mut k+	2.59	100	4.3	100
Seppic H5HA	0.18	32	1.3	63.2
H5HA 통상의 오일 에멀젼	0.7	84	1.6	100
Volvac AI KV	-----	-----	8.8	100

음성 대조군	-----	-----	0	0
--------	-------	-------	---	---

[0253]

OIE 기준에 따라 $\log_2 4$ 는 양성 혈청 역가로 간주한다. 이러한 기준에 근거하여 혈청학적 결과는 음성이었으나, 기준선과 비교했을 때에는 일부 양성 값이 관찰되었다. 최고의 혈청학적 역가는 1일령 또는 10일령째 백신접종된 조류에서 H5HA Mut k+ 항원 및 오일 애주번트로 조제된 백신에 의해 관찰되었다. 최저 혈청학적 역가는 Seppic 및 H5HA 항원으로 조제된 원형에서 관찰되었다. 항원공격 연구에서는 백신 원형, 특히 H5HA Mut k+ 항원으로 조제된 통상의 오일 애멀젼 백신이 보호를 부여하는 것으로 관찰되었다. 항원공격 연구에서 최저 보호는 치사율 68%로 Seppic H5HA에 의해 관찰되었다. 이에 반해, 최고의 혈청학적 역가는 1일령째 백신접종된 조류에 비해 10일령째 백신접종된 조류에서 관찰되었다.

서 열 목록

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

<120> Novel H5 proteins, nucleic acid molecules and vectors
encoding for those, and their medicinal use

<130> Case 1-2150

<150> US 60/863,142

<151> 2006-10-27

<150> US 11/923,326

<151> 2007-10-24

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 551

<212> PRT

<213> avian influenza virus

<400> 1

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

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

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys

35	40	45
Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn		
50	55	60
Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val		
65	70	75
Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn		
85	90	95
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu		
100	105	110
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser		
115	120	125
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe		
130	135	140
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Ile		
145	150	155
160		
Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp		
165	170	175
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln		
180	185	190
Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg		
195	200	205
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly		
210	215	220
Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn		

225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
 340 345 350

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

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

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
 385 390 395 400

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

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

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

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

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
465 470 475 480

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

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
500 505 510

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

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

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
545 550

<210> 2
<211> 567
<212> PRT
<213> duck influenza virus

<400> 2

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

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

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

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

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

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

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

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

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

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

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

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

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg

210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
 355 360 365

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

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

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
 405 410 415

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
515 520 525

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

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

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 3
<211> 568
<212> PRT
<213> duck influenza virus

<400> 3

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

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

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

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

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

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

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

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365

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

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

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415

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

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445

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

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495

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

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525

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

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 4
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> avinan influenza virus

<400> 4

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

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

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

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

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

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

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

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365

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

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

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415

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

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445

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

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495

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

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525

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

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 5
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Avian influenza virus

<400> 5

His Ala Asn Asn Trp Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn
 1 5 10 15

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

Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys
 35 40 45

Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile
 50 55 60

Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn
 65 70 75 80

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

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys
 100 105 110

Asn Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys
 115 120 125

Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile
 130 135 140

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

Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp
 165 170 175

Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser
 180 185 190

Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr
 195 200 205

Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr
 210 215 220

Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe
 225 230 235 240

Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala
 245 250 255

Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu
 260

<210> 6
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> duck influenza virus

<400> 6

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

Leu Val Lys Ser Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser
 20 25 30

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

Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu
 50 55 60

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

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

Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro
 100 105 110

Gly Asn Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile
 115 120 125

Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp
 130 135 140

His Glu Ala Ser Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp Ala
 165 170 175

Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu
 180 185 190

Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr
 195 200 205

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

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

Gly Gln Ser Gly Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn
245 250 255

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

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

Val Glu
290