(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0143866
(43) 공개일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) *A61P 31/16* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0034503
(22) 출원일자 2024년03월12일
심사청구일자 2024년03월12일
(30) 우선권주장
1020230036250 2023년03월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 영동대로 22, 812동 802호 (일원동, 디에이치 자이 개포)
김기순
서울특별시 양천구 목동중앙북로 38, 105동 302호 (목동, 롯데캐슬위너아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

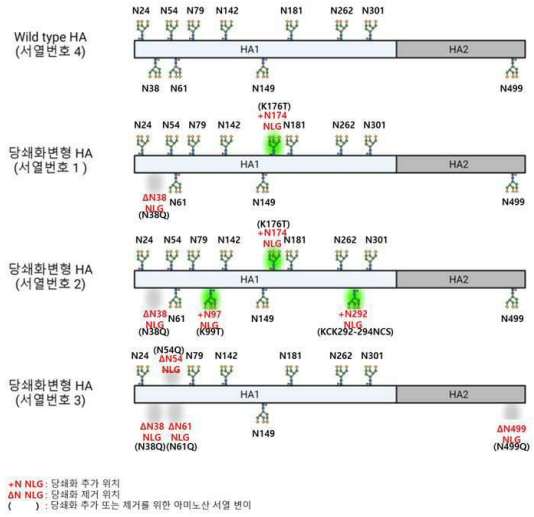
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **교차 면역원성을 갖는 H3 아형 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신**

(57) 요 약

본 발명은 교차 면역원성을 갖는 H3 아형 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신에 관한 것으로서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 H3 아형에서 유래된 헤마글루티닌(HA)의 특정 아미노산 잔기를 당쇄화하여, 다양한 H3 아형 인플루엔자 바이러스(H3N1, H3N2, H3N3, H3N4, H3N5, H3N6, H3N7, H3N8 및 H3N9 등)에 교차 면역원성을 가지는 백신의 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 31/16 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 2039/5254 (2013.01)
C12N 2760/16021 (2013.01)
C12N 2760/16022 (2013.01)
C12N 2760/16034 (2013.01)

(72) 발명자
김진일
서울특별시 양천구 목동동로 130, 1402동 406호 (신정동, 목동신시가지아파트14단지)

석종현
서울특별시 성북구 보문로30나길 8-12, 201호 (동선동2가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465035708
과제번호	HV20C0091010022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병 예방, 치료 기술개발(사업단)
연구과제명	범용인플루엔자 백신후보주 유효성 평가
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345358444
과제번호	2021R1A6C101C570
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초과학연구역량강화사업
연구과제명	핵심연구지원센터 조성 지원 과제
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 당쇄화 변이 헤마글루티닌(hemagglutinin; HA) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 176번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 트레오닌(Threonine)으로 치환된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열은, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 99번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 트레오닌(Threonine)으로 치환되며, 176번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 트레오닌(Threonine)으로 치환되고, 292번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 아스파라긴(Asparagine)으로 치환되며, 294번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 세린(Serine)으로 치환된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열은, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 54번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되며, 61번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 499번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환으로 치환된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 H3 아형 인플루엔자 바이러스는 A/Kansas/07/2017인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 뉴라미니다아제 단백질(neuraminidase; NA), 중합효소 염기성 단백질 2(Polymerase basic protein 2; PB2), 중합효소 염기성 단백질 1(Polymerase basic protein 1; PB1), 중합효소 산성 단백질(Polymerase acidic protein; PA), 뉴클레오캡시드 단백질(Nucleocapsid protein; NP), 매트릭스 단백질(Matrix protein; M) 및 비구조성 단백질 (Nonstructural protein; NS)을 코딩하는 유전자를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 NA를 코딩하는 유전자는 서열번호 5로 표시되고, 상기 PB2를 코딩하는 유전자는 서열번호 6으로 표시되며, 상기 PB1을 코딩하는 유전자는 서열번호 7로 표시되고, 상기 PA를 코딩하는 유전자는 서열번호 8로 표시되며, 상기 NP를 코딩하는 유전자는 서열번호 9로 표시되고, 상기 M을 코딩하는 유전자는 서열번호 10으로 표시되며, 상기 NS를 코딩하는 유전자는 서열번호 11로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로부터 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 9

제8항의 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 백신은 약독화된 생독 백신 또는 사독 백신인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 백신.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 백신은 H3 아형 인플루엔자 바이러스에 교차 면역원성을 갖는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 백신.

청구항 12

제8항의 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제9항의 인플루엔자 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 교차 면역원성을 갖는 H3 아형 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오르소믹소바이러스과(Family Orthomyxoviridae)에 속하는 A형 및 B형 인플루엔자 바이러스 감염 질환(독감)은 인수공통 전염병으로 인간뿐만 아니라 돼지, 말, 조류 등에서 발병하며, 공중보건학적·경제적으로 중요하게 인식되는 호흡기 질환이다.

[0003] 인플루엔자 바이러스는 변이성이 높으며 이종 간 전파 가능성이 있어 신종인플루엔자 바이러스나 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus, AIV)의 대유행에 대비하는 일이 큰 이슈로 떠오르고 있다.

[0004] A형 인플루엔자의 아형(subtype)은 표면 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 및 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA)의 항원성 차이에 따라 구분되며, 이들은 각각 H 아형과 N 아형으로 표시된다. A형 인플루엔자 바이러스의 HA 아형은 H1부터 H16까지 16가지, NA 아형은 N1부터 N9까지 9가지 종류가 발견되어, 산술적으로 존재 가능한 인플루엔자 바이러스의 아형은 144가지이다. 이와 더불어 최근 박쥐에서 분리된 인플루엔자-유사 바이러스(influenza-like virus)인 H17N10과 H18N11의 존재가 새로이 규명된 바 있다.

[0005] 인플루엔자 바이러스 유전자는 8개의 음성(negative-polarity) 단일가닥 RNA 절편(PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS)으로 구성되고, 이들 8개의 RNA 절편으로부터 중합효소복합체의 구성체인 PB2, PB1 및 PA 단백질(polymerase subunit B2, B1, A; 각각 PB1, PB2, PA)과 헤마글루티닌 단백질(hemagglutinin; HA), 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein; NP), 뉴라미니다아제 단백질(neuraminidase, NA), 매트릭스 단백질 1 및 2(matrix protein 1, 2; 각각 M1, M2), 및 비구조성 단백질 1 및 2(nonstructural protein 1, 2; 각각 NS1, NS2)가 생성된다.

[0006] 인플루엔자 백신은 역유전학 기술(reverse genetics system)을 사용하여 제조할 수 있으며, 한 방향으로는 바이러스 유전자의 mRNA가 생성되고, 다른 방향에서는 viral RNA가 생성되는 8개의 플라스미드를 세포에 도입(transfection)하여 재조합 바이러스를 제조(rescue)할 수 있다.

[0007] 통상적으로 HA와 NA 유전자는 최근 유행하는 바이러스로부터 PCR로 증폭하여 벡터에 클로닝하고, 나머지 유전자 6개는 유정란에서 효율적으로 증식하는 PR8 바이러스 유래의 것을 사용하여 세포에 도입하면 백신주 바이러스를 제조(rescue)할 수 있다. 그리고 이러한 바이러스를 불활성화 하거나 약독화하여 사독백신 또는 약독화된 생독 백신으로 제조할 수 있다.

[0008] 이와 같이 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 대유행에 대비하기 위한 백신주의 개발이 요구되며, 특히 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 유전적 다양성에 따른 항원성 차이를 극복할 수 있도록 교차 면역원성을 갖는 백신주의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2098585호(2020.04.02 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 당쇄화 변이 헤마글루티닌(hemagglutinin; HA) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로부터 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 또는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 인플루엔자 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 당쇄화 변이 헤마글루티닌(hemagglutinin; HA) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로부터 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스재조합 벡터로부터 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 인플루엔자 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 교차 면역원성을 갖는 H3 아형 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신에 관한 것으로서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 H3 아형에서 유래된 헤마글루티닌(HA)의 특정 아미노산 잔기를 당쇄화하여, 다양한 H3 아형 인플루엔자 바이러스(H3N1, H3N2, H3N3, H3N4, H3N5, H3N6, H3N7, H3N8 및 H3N9 등)에 교차 면역원성을 가지는 백신의 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 1~4 HA의 당쇄화 위치를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 wild type 및 당쇄화 변형 서열을 포함하는 유전자를 증폭한 PCR 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 H3N2 아형 WT 및 NLG 변이 백신후보주의 바이러스 플라크 형태(viral plaque morphology) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 H3N2 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 boost 면역화 한 후 이종 H3N2 바이러스(mouse adapted-A/Philippines/02/1982)에 감염시킨 경우의 폐 조직 내 바이러스의 역가를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 H3N2 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 boost접종한 후 이종 H3N2 바이러스(mouse adapted-A/Philippines/02/1982)에 감염시킨 경우의 체중변화를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 H2N3 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 boost접종한 후 이종 H3N2 바이러스(mouse adapted-A/Philippines/02/1982)에 감염시킨 경우의 생존율을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 H2N3 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 boost 면역화 한 후 혈청을 2022-2023 시즌 백신주인 A/Darwin/9/2021 H3N2 바이러스에 대한 중화항체가를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 H2N3 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 boost 면역화 한 후 혈청에서 HA stem 부분을 표적으로하는 항체의 생성량을 측정한 ELISA 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 당쇄화 변이 헤마글루티닌(hemagglutinin; HA) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0021] 바람직하게는, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 176번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 트레오닌(Threonine)으로 치환된 것일 수 있다.

[0022] 바람직하게는, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열은, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 99번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 트레오닌(Threonine)으로 치환되며, 176번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 트레오닌(Threonine)으로 치환되고, 292번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 아스파라긴(Asparagine)으로 치환되며, 294번째 아미노산인 라이신(Lysine)이 세린(Serine)으로 치환된 것일 수 있다.

[0023] 바람직하게는, 상기 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열은, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 54번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되며, 61번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환되고, 499번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)이 글루타민(Glutamine)으로 치환으로 치환된 것일 수 있다.

[0024] 한편, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 당쇄화 변이 HA 유전자는 서열번호 12의 염기서열로 표시하였고, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 당쇄화 변이 HA 유전자는 서열번호 13의 염기서열로 표시하였으며, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 H3 아형 인플루엔자 바이러스의 당쇄화 변이 HA 유전자는 서열번호 14의 염기서열로 표시하였다.

[0025] 바람직하게는, 상기 H3 아형 인플루엔자 바이러스는 H3N2 아형 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 보다 바람직하게는 A/Kansas/07/2017일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 바람직하게는, 상기 재조합 벡터는 뉴라미니다아제 단백질(neuraminidase; NA), 중합효소 염기성 단백질 2(Polymerase basic protein 2; PB2), 중합효소 염기성 단백질 1(Polymerase basic protein 1; PB1), 중합효소 산성 단백질(Polymerase acidic protein; PA), 뉴클레오캡시드 단백질(Nucleocapsid protein; NP), 매트릭스 단백질(Matrix protein; M) 및 비구조성 단백질 (Nonstructural protein; NS)을 코딩하는 유전자를 추가적으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 상기 NA는 H3N2 아형 인플루엔자 바이러스 유래일 수 있고, 구체적으로 상기 H3N2 아형 인플루엔자 바이러스는 A/Kansas/07/2017일 수 있다. 구체적으로, 상기 매트릭스 단백질(M) 암호화 유전자는 M1 및 M2 단백질을 발현하고, 상기 비구조성 단백질(NS) 암호화 유전자는 NS1 및 NS2 단백질을 발현할 수 있다.

[0028] 상기 PB2, PB1, PA, NP, M 및 NS을 각각 코딩하는 유전자는 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)으로부터 유래된 6개의 내부 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 보다 바람직하게는, 상기 NA를 코딩하는 유전자는 서열번호 5로 표시되고, 상기 PB2를 코딩하는 유전자는 서열번호 6으로 표시되며, 상기 PB1을 코딩하는 유전자는 서열번호 7로 표시되고, 상기 PA를 코딩하는 유전자는 서열번호 8로 표시되며, 상기 NP를 코딩하는 유전자는 서열번호 9로 표시되고, 상기 M을 코딩하는 유전자는 서열번호 10으로 표시되며, 상기 NS를 코딩하는 유전자는 서열번호 11로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 "헤마글루티닌(Hemagglutinin; HA)"은 인플루엔자 바이러스의 표면 당단백질 중 하나로서 바이러스의 숙주 세포막 부착과 바이러스의 세포 침투 동안 바이러스-세포막의 융합을 매개하며, 인플루엔자 아형의 항원 특이성을 결정하는 인플루엔자 바이러스의 표면 항원단백질이다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "당쇄화(Glycosylation)"는 당분자에서 헤미아세탈 수산기가 제거된 글리코실기를 단백질에 전위하는 반응을 의미한다. 상기 당쇄화는 각 반응에 특이적인 글리코실전달효소가 촉매로 관여하며, 당뉴클레오티드를 공급체 기질로 하는 경우가 주를 이룬다. 수용체로는 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 히드록실리신 등의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 이러한 잔기에 전이된 올리고당에 점차로 단당을 전이하는 연속반응에 의해 복합당질을 합성할 수 있다. 상기 복합당질은 생체조직의 구성물질, 특히 세포외 기질의 주성분이 될 수 있고, 그 외 세포 표면에서 세포 인식에도 중요한 역할을 담당한다.

[0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "N-결합 당쇄화(N-Linked Glycosylation; NLG)"는 번역(translation) 후의 단백질 변형 중 하나로, 다당류와 부착할 수 있는 단백질 내 3개의 연속된 아미노산 서열인 시퀀(sequon)이 "N-X-S/T(X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산)"으로 이루어진 경우, 아스파라긴(Asn, N) 잔기 상에 글리칸(glycan)이 접합되는 것을 의미한다. 이하, "NLG 첨가"는 비-당쇄화 아미노산의 당쇄화를 의미하고, "NLG 제거"는 당쇄화 아미노산의 비-당쇄화를 의미한다.

[0033] 인플루엔자 바이러스의 HA 구형 헤드 영역 주변의 NLG 상태 변화는 시알산(SA, Sialic Acid) 수용체에 대한 바이러스의 결합성에 영향을 미칠 수 있어, 결과적으로 바이러스의 감염성이나 교차 면역원성 등의 특성을 변화시킬 수 있다. 또한, NLG 변화는 종종 특정 항원 부위(antigenic site)의 차폐(masking) 및 숙주 면역기구의 인식으로부터 바이러스 자신을 숨기는 면역 회피를 야기할 수 있다. 종래 1918년과 2009년에 유행한 H1N1 바이러스의 HA 헤드 영역 주변의 NLG 상태 변화, 구체적으로 NLG 첨가는 상기 H1N1 바이러스에 대한 교차 면역 반응을 제공한다는 연구결과가 보고된 바 있다.

[0034] 또한, 이와 유사한 방법으로, 2009년에 유행한 H1N1 바이러스 HA 헤드 영역에 NLG를 첨가하였을 때 서로 다른 아미노산 변이를 갖는 다양한 NLG 돌연변이에 대해 광범위한 HI 및 PRNT 반응을 보인다는 연구결과가 보고되었다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 용어 “벡터”는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주 세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 고리형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로부터 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스를 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신을 제공한다.

[0038] 구체적으로, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 및 백신 제조를 위해, 본 발명자들은 A/Puerto Rico/8/34의 6개의 내부 유전자를 백본(backbone)으로, NLG 제거 또는 첨가된 HA(N38Q/K176T, 서열번호 1) 및 A/Kansas/07/2017 바이러스의 NA 유전자를 이용하여 H3N2 백신을 제조하였다.

[0039] 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 및 백신 제조를 위해, 본 발명자들은 A/Puerto Rico/8/34의 6개의 내부 유전자를 백본(backbone)으로, NLG 제거 또는 첨가된 HA(N38Q/K176T/K97T/KCK292-294NCS, 서열번호 2) 및 A/Kansas/07/2017바이러스의 NA 유전자를 이용하여 H3N2 백신을 제조하였다.

[0040] 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 및 백신 제조를 위해, 본 발명자들은 A/Puerto Rico/8/34의 6개의 내부 유전자를 백본(backbone)으로, NLG 제거 또는 첨가된 HA(N38Q/N54Q/N61Q/N499Q, 서열번호 3) 및 A/Kansas/07/2017 바이러스의 NA 유전자를 이용하여 H3N2 백신을 제조하였다.

[0041] 바람직하게는, 본 발명의 백신은 약독화된 생독 백신, 사독 백신, 서브유닛(subunit) 백신, 합성 백신 또는 유

전공학 백신일수 있다.

[0042] 본 명세서에서 사용된 용어 "생독 백신"이란 살아있는 바이러스 활성성분을 포함하는 백신을 의미한다. 또한 용어 "약독화된(attenuation)"이란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고 면역 체계만을 자극해서 면역성을 유도하는 것을 의미한다. 바이러스의 약독화는 자외선(UV) 조사, 약품처리 또는 시험관 내 고차 연속 계대배양에 의해 달성될 수 있다. 약독화는 또한 명확한 유전 변화를 만듦으로써, 예를 들어 독성을 제공하는 것으로 알려진 바이러스서열의 특정 결실 또는 바이러스 게놈 내로의 서열의 삽입에 의해 달성될 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 용어 "사독 백신"은 불활성화 백신 또는 사균 백신이라고도 하며, 죽은 바이러스를 포함한 백신이다. 이의 예로는 전 바이러스 백신(whole-virus vaccine)과 분할 백신(split vaccine)이 있으며, 이 등록특허 10-2098585들은 공지된 방법으로 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 전 바이러스 백신은 바이러스 전체에 포르말린을 처리하여 제조할 수 있으며, 분할 백신은 바이러스에 에테르를 처리하여 외피만을 분쇄, 수득함으로써 제조할 수있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어 "서브유닛 백신"은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 바이러스 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다. 예를 들면, 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 추출하여 사용할 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 용어 "합성 백신"은 바이러스의 항원 또는 항원결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산한 펩타이드를 포함한 백신으로, 예를 들면, 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및 또는 NA 단백질을 합성하여 사용할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 용어 "유전공학 백신"은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.

[0047] 바람직하게는, 본 발명의 백신은 H3 아형 인플루엔자 바이러스에 교차 면역원성을 갖을 수 있으며, 구체적으로 H3N1, H3N2, H3N3, H3N4, H3N5, H3N6, H3N7, H3N8 및 H3N9 아형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 H3 아형 인플루엔자 바이러스에 교차 면역원성을 갖을 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명의 백신은 면역원성을 강화시키기 위해 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다. 면역증강제로는 완전 프로인트 면역증강제(CFA, Complete Freund's Adjuvant), 불완전 프로인트 면역증강제(IFA, Incomplete Freund's Adjuvant), 스쿠알렌(Squalene), 스쿠알란(Squalane), 수산화알루미늄(Aluminium hydroxide), 인산알루미늄(Aluminium phosphate) 및 사포닌(Saponin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있고, 바람직하게는 수산화알루미늄과 인산알루미늄이 겔 상으로 혼합된 것(Alum)을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 나아가, 본 발명의 백신은 상기 면역증강제 뿐만 아니라, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0050] 상기 담체는 본 발명의 백신을 제형화하기 위해 사용하는 것으로 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 방부제 등을 포함할 수 있다.

[0051] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 한편, 본 발명의 백신 이에 포함된 재조합 인플루엔자 바이러스 외 이종 인플루엔자 바이러스에 교차 면역반응을 형성할 수

있다. 예를 들어, 본 발명의 백신이 A/Kansas/07/201(H3N2) 바이러스 기반의 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하면, 본 발명의 백신의 접종은 다른 H3 아형의 인플루엔자 바이러스에 대한 항체를 형성할 수 있다.

[0055] 또한, 상기 백신은 불활성화된 균체들 또는 항원들과 혼합하여 조류 인플루엔자를 포함한 다른 질병들을 함께 예방할 수 있는 혼합 또는 복합 백신으로 사용될 수 있다. 상기 혼합 백신은 서로 다른 바이러스 백신을 함께 사용한 백신을 의미하며, 복합 백신은 바이러스 백신과 세균 백신을 함께 사용한 백신을 의미한다.

[0056] 상기 백신은 경구, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비강내, 흡입, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0057] 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 상기 백신의 비경구 투여는 바람직한 순도 하에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 즉 사용되는 농도와 투여량에서 수용체에 비독성이고 다른 제제 성분과 혼화될 수 있는 것을 혼합하여 단위 투여량의 제형으로 조제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0058] 상기 백신의 제형은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 제조한 제형은 경구용, 주사용, 도포용으로 사용할 수 있다. 상기 백신의 제형은 정제, 캅셀제, 연질캅셀제, 수액제, 과립제, 환제 또는 주사용 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 또한, 본 발명은 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0060] 상기 인플루엔자 감염 질환은 인플루엔자 감염에 의해 유발되는 질환으로 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유종, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0062] 상기 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0063] 상기 약학 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차로 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명은 상기 인플루엔자 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0065] 본 발명의 인플루엔자 바이러스 백신이 면역 반응을 일으킬 수 있는 숙주 동물은 인간, 개, 고양이, 돼지, 말, 닭, 오리, 칠면조, 페럿 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 인간이다.

[0066] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0067] **<실시예 1> H3 아형 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스의 제조**

[0068] **1. H3 아형 헤마글루티닌 유전자 역유전학법용 플라스미드 제조**

[0069] A/Kansas/07/(H3N2) 바이러스의 HA, NA 유전자를 역유전학법용 플라스미드인 pDZ 벡터에 삽입하고, 이를 주형으로 하는 PCR 반응을 통해 H3N2 아형 HA 유전자(서열번호 4), H3N2 아형 NA 유전자(서열번호 5)를 확보하였다. 확보된 HA, NA 유전자는 pDZ 벡터로 클로닝 한 뒤, M13 primer를 이용하여 삽입 여부를 확인하였다.

[0070] 2. H3 아형 HA 유전자의 당쇄화 변이 도입

[0071] 상기에 기술된 방법으로 제작된 HA 플라스미드를 주형으로 하여, site-directed mutagenesis 방법을 통해 당쇄화 변이를 도입하였다. PCR은 당쇄화 변이를 도입할 아미노산 자리를 중심으로 프라이머로 수행하였으며, 당쇄화 변이가 도입된 H3N2 아형 HA 유전자(서열번호 1~3) 및 H3N2 아형 HA 유전자(서열번호 4)을 확보하였다. H3N2 아형 HA 유전자를 pDZ 벡터에 클로닝 한 뒤 HA primer를 이용하여 PCR하여 HA DNA band를 확인하고, 이를 도 2에 나타내었다.

[0072] 3. H3 아형 백신주의 제작

[0073] 상기에서 확보된 H3N2 아형 HA 유전자(서열번호 4) 및 당쇄화 변이(NLG) H3N2 아형 HA 유전자(서열번호 1~3) 및 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스로부터 확보한 6개의 내부 유전자인 PB2(서열번호 6), PB1(서열번호 7), PA(서열번호 8), NP(서열번호 9), M(서열번호 10) 및 NS(서열번호 11)를 삽입하여 4개의 H3 아형 재조합 백신주 바이러스를 제작하기 위한 wild type(wt) H3N2 1개 및 당쇄화 변이(NLG) H3N2 3개 아형 플라스미드 세트(HA, NA 유전자 조합 및 6개의 내부 유전자 플라스미드)를 준비하였다. 상기 플라스미드 세트를 293T-MDCK 혼합세포에 도입(transfection)하고 TPCK-처리된 트립신 1ug/ml를 보충하였다. 48 내지 72시간 후, 세포 상층액을 회수하고 재조합 바이러스를 증식시키기 위하여 MDCK cell에 감염시켰다. 감염 48시간 후, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스를 분리하였다.

[0074] <실시예 2> 백신후보주의 viral plaque morphology 분석

[0075] 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스의 *in vitro* 특성을 분석하기 위해, 상기에서 제조된 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스를 MDCK 세포에 감염시킨 후, semi-solid agarose가 첨가된 세포배양액으로 세포를 덮어주었다. 감염 48-72시간 후, 크리스탈 바이올렛 시약으로 살아있는 세포를 염색하여 관찰하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0076] 도 3를 참고하면, WT 백신후보주와 당쇄화변이 백신후보주 모두 plaque를 형성하는 것으로 확인할 수 있다.

[0077] <실시예 3> 백신접종 후 이종 H3N2 바이러스 감염에 따른 마우스의 체중변화, 생존률 및 바이러스 역가 평가

[0078] 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스 백신의 범 인플루엔자 중화 능력을 검증하기 위해, 상기에서 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 다음 mouse adapted-A/Philippines/02/1982 H3N2 바이러스를 각각의 실험군에 감염시킨 뒤 3일 및 6일 차 폐조직 내 바이러스 역가를 측정하여, 도 4에 나타내었으며, 14일 동안의 마우스 체중변화 및 생존율을 도 5 및 도 6에 각각 나타냈다.

[0079] 1. H3N2 백신

[0080] 체중변화의 경우, 도 5에 나타낸 바와 같이, 대조군 (PBS 접종) 그룹은 바이러스 감염 후 지속적으로 체중이 감소한 반면, wild type 및 H3N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군들은 체중이 감소한 후 회복하는 양상을 보였다. 그리고 wild type 백신을 접종한 그룹보다 H3N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군들은 몸무게가 덜 감소하였으며, 서열번호 3번의 H3N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군은 몸무게가 거의 감소하지 않았다.

[0081] 또한, 생존률의 경우, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 백신을 접종하지 않은 실험군(Control)의 마우스는 바이러스 감염 후 9일째에 모두 사망하였으나, wild type 및 H3N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군들은 100%의 생존율을 보였다. 따라서 H3N2 NLG 변이 백신이 기존의 H3N2 백신과 동등하거나 더 높은 인플루엔자 바이러스 중화 효능을 갖는 것으로 판단된다.

[0082] 도 4를 참고하면, 폐에 존재하는 바이러스 역가를 분석한 결과에서도, H3N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군의 역가가 백신을 접종 받지 않은 실험군(Control) 보다 낮은 것으로 분석되었다. 특히, H3N2 wild type 백신을 접종 한 실험군과 비교해 보았을 때, H3N2 NLG 변이 백신이 유의차 없이 폐조직 내 바이러스역가를 감소시켜 동등한 방어능을 획득한 것으로 판단된다.

[0083] 도 7을 참고하면 최근 2022-2023 시즌 백신주인 A/Darwin/9/2021 바이러스에 대한 교차 면역반응을 확인하기위해 중화항체역가를 측정하였을 때, H3N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군의 역가가 백신을 접종 받지 않은 실험군(Control) 보다 높은 것으로 분석되었다. 특히, H3N2 wild type 백신을 접종 한 실험군과 교차면역 중화항체 역가를 비교해 보았을 때, 서열번호 1번 H3N2 NLG 변이 백신 접종그룹이 약 3배 증가하였으며, 서열번호 2번 H3N2 NLG 변이 백신 접종그룹이 약 6배 증가한 역가를 획득하였다.

[0084] 도 8을 참고하면 stem target IgG 역가를 확인하기위한 ELISA를 수행하였을 때, H3N2 wild type 및 NLG 변이

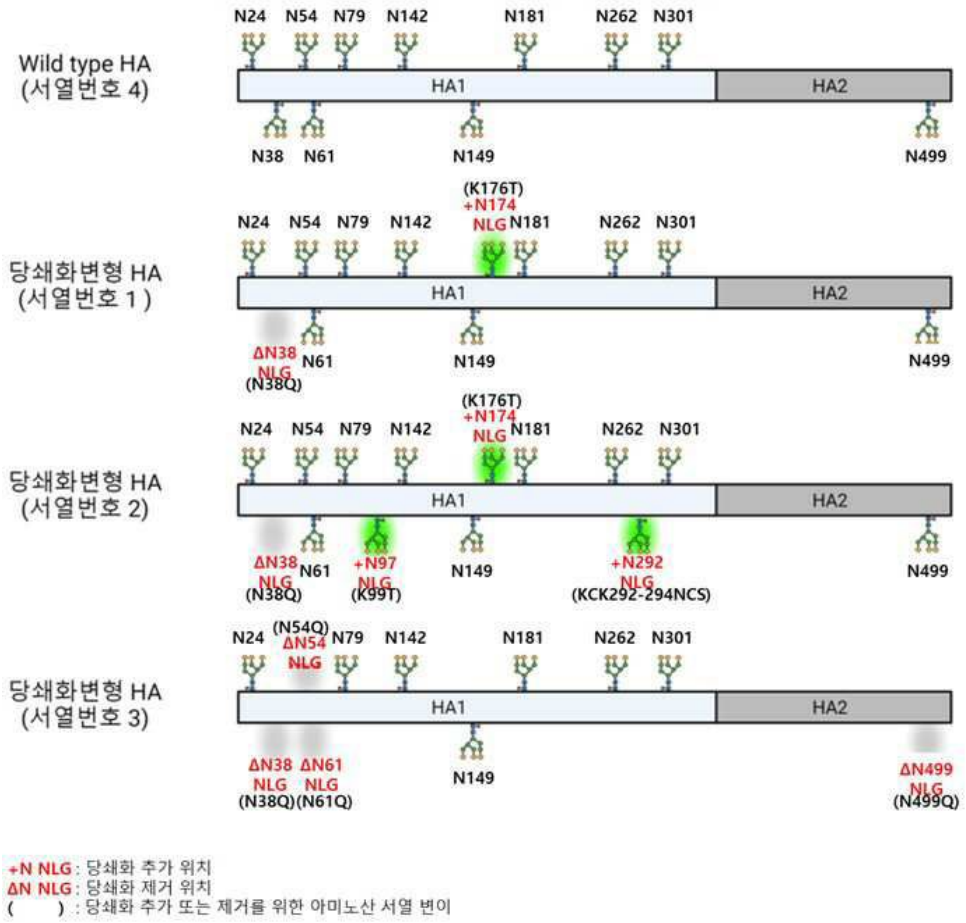
백신을 접종 한 실험군의 역가가 백신을 접종 받지 않은 실험군(Control) 보다 높은 것으로 분석되었다. 특히, H3N2 wild type 백신을 접종 한 실험군과 비교해 보았을 때, stem target 항체양이 H3N2 NLG 변이 백신 접종그룹에서 유사하거나 높은 것을 확인하였다.

[0085] 그러므로 결과를 종합하여 볼 때, 본 발명의 H3N2 NLG 변이 백신은 기존의 백신보다 보존된 stem을 target으로 하는 항체생성을 유도하여 동등하거나 더 우수한 교차면역원성을 유도하여 효과적으로 이후 발생한 이종 아형의 H3N2 인플루엔자 바이러스의 감염을 중화하는 효력을 갖는 것으로 판단된다.

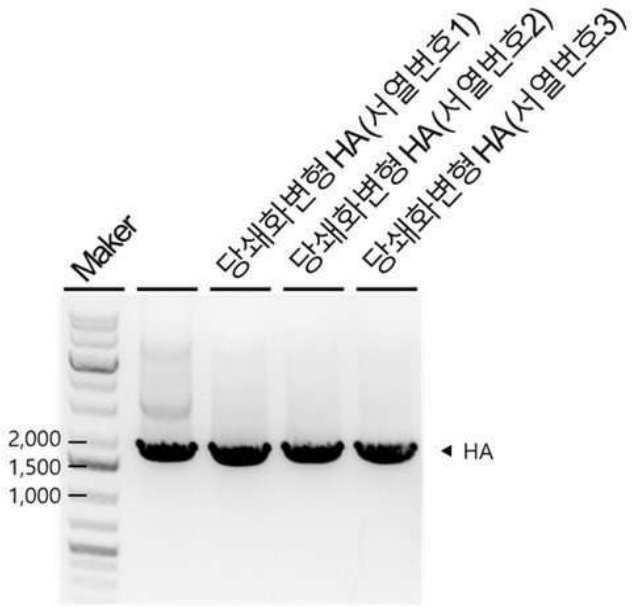
[0086] 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다. 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

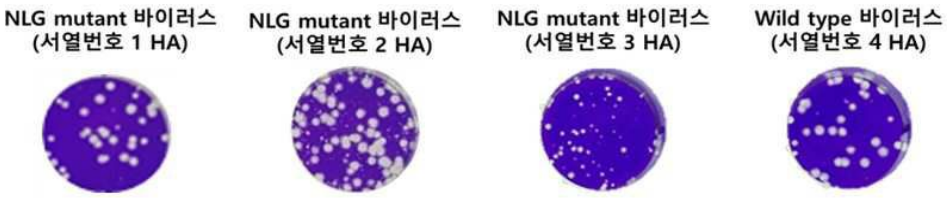
도면1



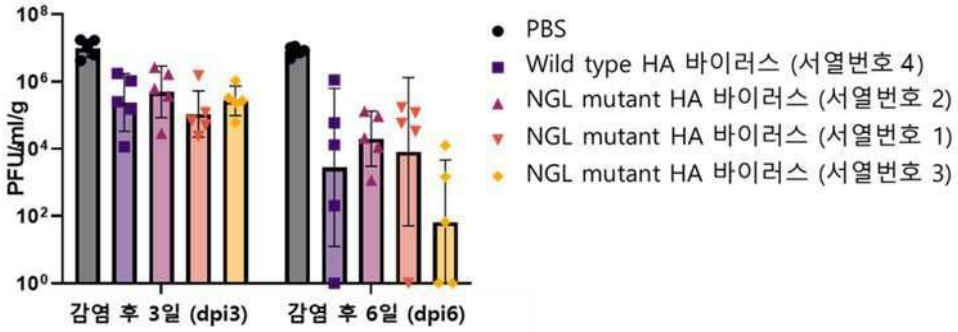
도면2


Maker
당쇄화변형 HA(서열번호1)
당쇄화변형 HA(서열번호2)
당쇄화변형 HA(서열번호3)
2,000
1,500
1,000
HA

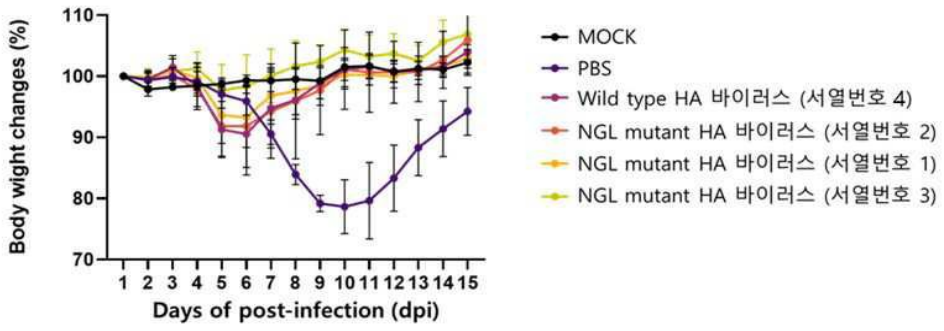
도면3


NLG mutant 바이러스 (서열번호 1 HA)
NLG mutant 바이러스 (서열번호 2 HA)
NLG mutant 바이러스 (서열번호 3 HA)
Wild type 바이러스 (서열번호 4 HA)

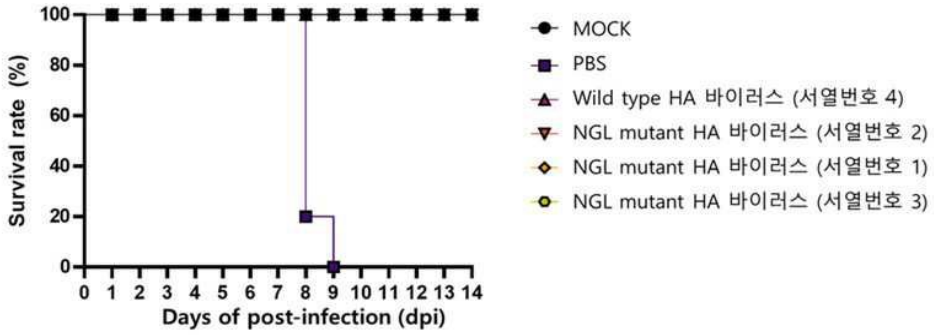
도면4


PFU/ml/g
감염 후 3일 (dpi3)
감염 후 6일 (dpi6)
PBS
Wild type HA 바이러스 (서열번호 4)
NGL mutant HA 바이러스 (서열번호 2)
NGL mutant HA 바이러스 (서열번호 1)
NGL mutant HA 바이러스 (서열번호 3)

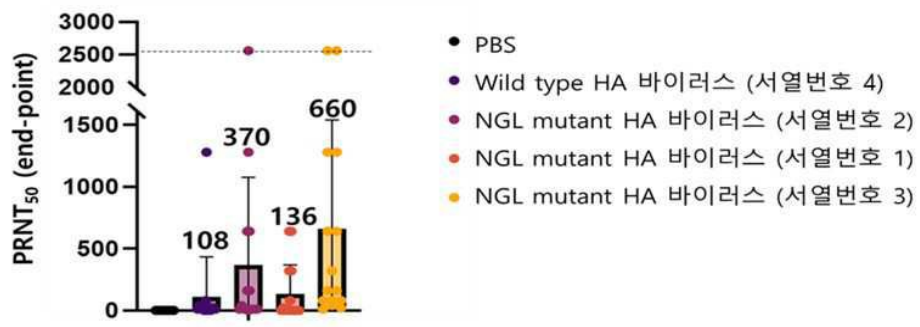
도면5



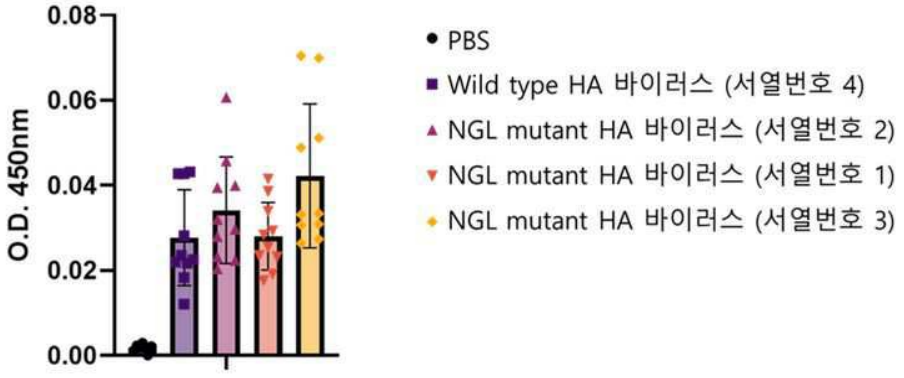
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.