

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0061069
(43) 공개일자 2022년05월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/145 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/145 (2013.01)
A61P 31/16 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0051460(분할)
 (22) 출원일자 2022년04월26일
 심사청구일자 2022년04월26일
- (62) 원출원 특허 10-2020-0025818
 원출원일자 2020년03월02일
 심사청구일자 2020년03월02일

- (71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
 전복실
 서울특별시 동대문구 경희대로 24, 의과대학(회기동)
- 강해지
 강원도 원주시 문막읍 왕건로 20, 104동 1103호(원주문막신원아침도시)
- (74) 대리인
 특허법인 하나

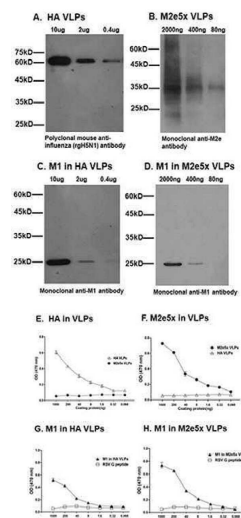
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 강화된 조류 인플루엔자 바이러스-유사입자를 포함하는 백신 조성물 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자; 및 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스-유사입자 백신 조성물, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)

A61K 2039/5258 (2013.01)

C12N 2760/16123 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

C12N 2770/14041 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062730
과제번호	PJ013205012020
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	바이러스 유사입자 기술기반의 가금류 고병원성 조류인플루엔자 예방백신 개발
기 여 율	70/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단 (서울)
연구기간	2018.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345331688
과제번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 기초 연구 사업/ 중점연구소 지원사업
연구과제명	활성산소 조절을 통한 만성 질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율	30/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단 (서울)
연구기간	2018.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2로 이루어진 M2e를 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터; 및

서열번호 6으로 이루어진 헤마글루티닌을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터; 를 포함하는 조류 인플루엔자 백신 제조용 조성물에 있어서,

상기 조류 인플루엔자 백신은 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자와 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 1:1 내지 4:1의 중량비로 포함하는 것인, 조류 인플루엔자 백신 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발현 벡터는 바큇로바이러스(Baculovirus) 벡터인, 조류 인플루엔자 백신 제조용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포인, 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 숙주 세포는 곤충 유래의 SF9세포인, 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 M2e; 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 M1을 포함하는 백신 제조용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자는 H5N1 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌; 및 M1을 포함하는 백신 제조용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 헤마글루티닌; 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 M1을 포함하는 백신 제조용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 M2e를 암호화하는 핵산은 서열번호 7로 이루어진 제1프라이머; 및
서열번호 8로 이루어진 제2프라이머 쌍에 의해 증폭되는 것인 백신 제조용 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 M1을 암호화하는 핵산은 서열번호 9로 이루어진 제3프라이머; 및
서열번호 10으로 이루어진 제4프라이머 쌍에 의해 증폭되는 것인 백신 제조용 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 헤마글루티닌을 암호화하는 핵산은 서열번호 11로 이루어진 제5프라이머; 및
서열번호 12로 이루어진 제6프라이머 쌍에 의해 증폭되는 것인 백신 제조용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자; 및 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스-유사입자 백신 조성물, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 의해 사람 및 동물(조류, 돼지, 개, 말 등)의 호흡기를 통해 전파되는 호흡기성 질병이다. 사람 인플루엔자(Human influenza)의 경우 감염에 의한 매년 전 세계 10 - 20% 인구에서 발생한다. 또한 조류 인플루엔자(Avian influenza)는 닭, 칠면조, 오리 및 야생 조류 등 여러 종류의 조류에 감염되며, 주로 닭과 칠면조의 가금류에 상당히 많은 피해를 주는 급성 바이러스성 전염병이다. 조류 인플루엔자는 전파가 빠르고 병원성이 다양한 질병으로 세계동물보건기구(OIE)에서 병원성에 따라 고병원성과 저병원성 조류 인플루엔자로 분류하고 있다.

[0003] 인플루엔자 A 바이러스는 바이러스 표면에 M2 단백질이 존재하여 바이러스 생장에 필수적인 역할을 한다. 이 M2 단백질의 앞쪽 24개 아미노산은 바이러스 외부로 노출되어 있으며(M2 세포외부 영역, M2e), 이는 인플루엔자 A 바이러스의 공통 항원으로서의 특징을 가지고 있지만, 종 특이성을 나타내고 있다. 즉, 사람, 돼지, 조류 등의 M2e 단백질은 인플루엔자 바이러스 사이에서 그 구조가 유사하지만, 개체에 따라 항원성이 다르게 관찰된다. 기존 연구에서는 사람 인플루엔자 유래 M2 단백질을 이용한 바이러스 유사입자를 백신으로 제작한 후, 이를 비강 접종하여 백신효과를 확인한 바 있지만, M2e에 대한 항체가가 높지 않았으며, 다른 종 유래의 인플루엔자 바이러스이 M2e 단백질에 반응할지도 확신하기 어렵다.

[0004] 백신을 접종한 종의 바이러스 공격에 대한 방어능력을 높이기 위해 면역항상 조절제인 콜레라 독신, 열 민감성 엔도독신 유도체, 사포닌 QS21, 프로인트 항원보강제, 박테리아 단백질 등이 사용되고 있다. 하지만, 이들의 사용은 임상에서 체중감소를 동반한 부작용을 보이고 있는 실정이며, 혈청형이 다른 인플루엔자 바이러스의 공격에 대해서는 심한 체중 감소 및 높은 치사율이 관찰되고 있다. 또한 이러한 면역항상 조절제는 안정성의 문제로 사람에게 사용이 어렵다.

[0005] 따라서, 기존의 백신에 비해 면역력이 높고 또한 예측하지 못한 인플루엔자 바이러스의 발생에 효과적으로 대처할 수 있는 광범위 교차 방어능력을 갖는 백신의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0078523호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 M2e (an amino-terminal extracellular domain; M2e) 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 (VLP); 및 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 2로 이루어진 M2e를 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터; 및 서열번호 6으로 이루어진 헤마글루티닌을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터;를 포함하는 조류 인플루엔자 백신 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자; 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 혼합하는 단계;를 포함하는 조류 인플루엔자 백신 조성물 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 측면은, M2e (an amino-terminal extracellular domain; M2e) 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자(Virus-like particle, VLP); 및 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 백신 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에서 “M2” 단백질은 인플루엔자 바이러스의 입자 표면에 존재하며, 바이러스 성장에 필수적인 역할을 하여 서로 다른 아형의 인플루엔자 바이러스 간에 동일한 항원성을 지니고 있다. 상기 M2 단백질은 바이러스가 세포에 감염되었을 때 바이러스 입자 내부로 수소 이온을 공급하는 통로 역할을 한다. 바이러스가 증식하는 과정 중에 세포 내에서 발현된 M2 단백질은 세포의 표면으로 이동하여 바이러스 조립과정에 참여하게 된다. 이때, M2 단백질에 대한 중화 항체는 세포 표면에 위치한 M2 단백질과 반응하여, 인플루엔자 바이러스에 대한 면역원성을 확보할 수 있다.

[0013] 상기 M2 단백질은 세포 밖 돌출 부위(an amino-terminal extracellular domain: M2e), 막투과 부위(Transmembrane domain: TM) 그리고 세포 안 말단부위(cytoplasmic domain: CT)의 3개의 구조적 도메인으로 구성되며 각각 24, 19, 54개의 아미노산으로 이루어져 있다.

[0014] 본 발명에서는 M2e의 외부 돌출범위를 높이기 위하여 M2e 부분을 중첩시켜 기존 야생형 M2 세포 밖 돌출부위보다 긴 세포 밖 돌출부위를 가진 중첩된 M2e5x(5x는 5개의 M2e 단백질이 중첩됨을 의미함) 단백질을 활용하였다.

[0015] 상기 M2e5x는 각 M2e 도메인 사이에 단백질 3, 4차 구조를 안정화 시키기 위한 7개의 아미노산으로 이루어진 연결부위(L), 세포 표면으로 노출된 다중융합 단백질 (GCN4), 헤마글루티닌 단백질의 막투과 부위(Transmembrane domain: TM) 및 C-말단부위(cytoplasmic tail domain: CT)를 가지고 있다(Kim M, Song J, Eunju O, Kwon Y, Lee Y, Compans RW, et al. Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. Molecular Therapy. 2013; 21: 485-492. 참고).

[0016] 본 발명에서 “헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA)”은 적혈구의 응집을 불러 일으키는 물질을 의미하며, 상기 헤마글루티닌은 베를로바이러스에서 발견되어 인플루엔자 바이러스에 대한 면역력을 생성 또는 증가시키는 항원으로서 사용될 수 있다. 상기 헤마글루티닌 단백질은 구체적으로 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 전장 단백질, 이의 단편, 이의 아미노산 서열변이체 또는 이들의 다수 연결된 다량체 형태가 될 수 있다.

[0017] 본 발명에서 “아미노산 서열 변이체”란, 단백질의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 본 발명에서 상기 아미노산 서열 변이체는 헤마글루티닌 단백질의 아미노산 서열 변이체를 의미하며, 상기 헤마글루티닌 단백질의 글리코실화된 형태, 리피드화된 형태, 항원 제시(presentation)를 증진시키고 항원의 항원 제시 세포에의 표적을 향상시

키는 분자를 포함하도록 유도체화된 형태 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0018] 본 발명에서 “백신 조성물”은 백신 효과를 가지는 단백질 항원을 투여함으로써 이후의 병원균 감염을 예방할 수 있는 조성물을 의미한다. 상기 백신 조성물은 조류 인플루엔자에 대한 항원성을 나타내는 바이러스-유사입자를 포함하는 조성물일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서는, 기존 M2 단백질을 항원으로 할 경우 외부로 돌출되어 있는 단백질 부위가 작아 충분한 면역원성을 확보하기가 어려우며, 헤마글루티닌 항원의 경우 가변성 및 가파른 돌연변이 속도로 인하여, 인간 인플루엔자와 유사한 광범위한 조류 인플루엔자 백신 개발에 있어 제약이 되어온 문제를 해결하고자 하였다. 이에 H5N1 바이러스 유래 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 및 M2e5x 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 혼합할 경우, 종래 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자의 낮은 면역원성, 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자의 높은 돌연변이성으로 인한 백신 효율성을 보완할 수 있음을 규명하였으며, 이에 본 발명에서는 H5N1 인플루엔자 바이러스에 대한 우수한 면역원성을 가지는 백신 조성물을 제공하고자 한다.
- [0020] 본 발명에서 “바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs)”는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미한다. 일반적으로 표면 단백질(envelope protein) 및 매트릭스 단백질(matrix protein)을 포함하며, 바이러스의 유전물질은 포함하지 않는다.
- [0021] 상기 바이러스-유사입자는 체내에서 항원으로 작용하여 수상돌기세포와 같은 항원 표지 세포와의 반응을 통해 T 세포 또는 B 세포에 항원을 표지할 수 있다. 다만, 바이러스의 유전물질은 가지고 있지 않아 증식이 불가능하여 백신 사용에 있어 안정성이 우수하다.
- [0022] 구체적으로, 상기 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자는 M2e 단백질; 및 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(influenza virus matrix protein, M1)을 포함한다.
- [0023] 보다 구체적으로, 상기 M2e를 포함하는 바이러스-유사입자는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 M2e; 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 M1을 포함한다. 보다 더 구체적으로, 상기 M2e는 서열번호 2의 핵산 서열로 암호화되고, 상기 M1은 서열번호 4의 핵산 서열로 암호화될 수 있다.
- [0024] 또한, 구체적으로 상기 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자는 H5N1 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌; 및 M1을 포함할 수 있다.
- [0025] 보다 구체적으로, 상기 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 헤마글루티닌; 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 M1을 포함할 수 있다. 보다 더 구체적으로, 상기 헤마글루티닌 단백질은 서열번호 6의 핵산 서열로 암호화되고, 상기 M1은 서열번호 4의 핵산 서열로 암호화될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 서열번호 1로 이루어진 M2e 단백질; 및 서열번호 3으로 이루어진 M1 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 항-M2e 및 항-M1 단일클론 항체를 이용한 단백질 발현량 측정을 통해 확인하였다(도 1의 B, D, F, H).
- [0027] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 서열번호 5로 이루어진 헤마글루티닌 단백질; 및 서열번호 3으로 이루어진 M1 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 항-H5N1 및 항-M1 항체를 이용한 단백질 발현량 측정을 통해 확인하였다(도 1의 A, C, E, G).
- [0028] 상기 백신 조성물은 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 1 : 1 내지 4 : 1의 비율로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자는 2 : 1의 비율로 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에서 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 2 : 1로 혼합하여 마우스 동물모델을 제작하여 조류 인플루엔자에 대한 면역원성, 백신 방어 효능을 확인하였다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서 백신 조성물 투여한 결과 인플루엔자 바이러스-특이적 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체 반응이 우수하게 나타남을 확인하였다(도 2).
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 백신 조성물의 폐 조직에서의 염증반응 변화를 확인한 결과, INF- γ 및 IL-6의 염증 반응이 낮은 수준으로 나타남을 확인하였다(도 4).

- [0032] 본 발명의 일 실시예에서 상기 백신 조성물 처리에 따른 마우스의 비장세포 및 폐 세포로부터의 T 세포, B 세포 반응을 측정된 결과, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포 및 Germinal center B cell 반응이 모두 높게 나타남을 확인하였다(도 5).
- [0033] 상기 결과들로부터, 본 발명의 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 포함하는 백신 조성물이 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 높은 수준의 면역성을 제공할 수 있으며, 조류 인플루엔자 감염에 대한 백신으로 활용할 수 있음을 시사한다.
- [0034] 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 보조제, 면역 자극제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.
- [0035] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지되어있으며, 단백질, 설탕 등을 포함한다. 상기 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트를 포함한다. 수용액 담체는 식용수 및 완충배지를 포함하는 물, 알코올/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 링거 텍스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제로서 향미생물제제, 향산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것을 추가로 포함할 수 있다. 방부제로는 포르말린 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 백신 조성물은 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용가능한 보조제는 프로인트 완전보존제, 프로인트 불완전보존제, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레스틴, 플투론 폴리올, 다가음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키희림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 백신 조성물은 면역 자극제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 면역 자극제는 인공적으로 합성된 레바미솔, 이소프레노신 및 사이토카인을 포함할 수 있다. 사이토카인의 일 예로서 인터페론- α , 인터류킨-2, GM-CSF, G-CSF 등이 있다.
- [0038] 상기 백신 조성물은 상기 바이러스-유사입자 또는 이의 농축액을 포함하는 형태이거나, 형질전환 숙주 세포 자체 또는 형질전환 세포의 건조 분말 형태로 사용할 수 있다. 또한, 상기 백신 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0039] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 바이러스 일부(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N'-디옥타데실-N', N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 제2보조제를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.
- [0041] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0042] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.
- [0043] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 사용될 수 있다. 비수용성제제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름,

에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

- [0044] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 2로 이루어진 M2e를 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터; 및 서열번호 6으로 이루어진 헤마글루티닌을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터;를 포함하는 조류 인플루엔자 백신 제조용 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명에서 “발현 벡터”는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터를 의미한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 플라스미드 및 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 발현 벡터는 pET-3a-d, pET-9a-d, pET-11a-d, pET-12a-c, pET-14b, pET-15b, pET-16b, pET-17b, pET-17xb, pET-19b, pET-20b(+), pET-21a-d(+), pET-22b(+), pET-23a-d(+), pET-24a-d(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28a-c(+), pET-29a-c(+), pET-30a-c(+), pET-30 Ek/LIC, pET-30 Xa/LIC, pET-31b(+), pET-32a-c(+), pET-32 Ek/LIC, pET-32 Xa/LIC, pET-33b(+), pET-34b(+), pET-35b(+), pET-36b(+), pET-37b(+), pET-38b(+), pET-39b(+), pET-40b(+), pET-41a-c(+), pET-41 Ek/LIC, pET-42a-c(+), pET-43.1a-c(+), pET-43.1 Ek/LIC, pET-44a-c(+), pFastBac, pRSETA, pRSETB, pRSETC, pESC-HIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pA0815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAP α A, pGAP α B, pGAP α C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6 α A, pPIC6 α B, pPIC6 α C, pPIC9K, pYC2/CT, pYD1 Yeast Display Vector, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPink™, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 또는 pYJ406일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 구체적으로, 상기 벡터는 베컬로바이러스(Baculovirus) 벡터일 수 있다. 상기 베컬로바이러스는 사람이나 척추동물에는 병원성이 없으며, 곤충에 대해서만 병원성을 가지고 있는 병원성 바이러스를 의미한다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에서 베컬로바이러스 벡터 중 하나인 pFastBac vector에 M2e5x 단백질 및 M1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하여 조류 인플루엔자 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제조하였다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에서는 pFastBac vector에 헤마글루티닌 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하여 조류 인플루엔자 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제조하였다.
- [0050] 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 바이러스-유사입자를 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 프로모터는 SBE4, 3TP, PAI-1, p15, p21, CAGA12, hINS, A3, NFAT, NFkB, AP1, IFNG, IL4, IL17A, IL10, GPD, TEF, ADH, CYC, INU1, PGK1, PHO5, TRP1, GAL1, GAL10, GUT2, tac, T7, T5, nmt, fbp1, AOX1, AOX2, MOX1 및 FMD1 프로모터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 숙주 세포 또는 발현 조건 등 다양한 변수를 고려하여 달리할 수 있다.
- [0052] 상기 바이러스-유사입자를 암호화하는 핵산 서열은 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결될(operably linked) 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, 상기 바이러스-유사입자를 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.
- [0053] 상기 발현 벡터는 추가적인 조절 서열을 더 포함할 수 있다. 상기 조절 서열은 파지 MS-2의 레플리카아제 유전자의 샤인-달가노 서열 및 박테리오파지 람다의 cII의 샤인-달가노 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또한, 상기 발현 벡터는 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자 또는 형광 단백질 유전자일 수 있으며, 상기 항생제 저항성 유전자는 히그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 형광 단백질 유전자는 효모-강화 녹색 형광 단백질(yeast-enhanced green fluorescent protein, yEGFP) 유전자, 녹색 형광 단백질(green

fluorescent protein, GFP) 유전자, 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein, BFP) 유전자 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0055] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명에서 용어 “숙주 세포(host cell)”는 바이러스에 의해 감염될 수 있고 바이러스 유사 입자에 의해 면역될 수 있는 모든 유기체를 의미한다. 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 대사 조작될 수 있다.
- [0057] 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포일 수 있다. 상기 적합한 숙주 세포는 자연적으로 발생하거나 또는 야생형 숙주 세포일 수 있고, 또는 변화된 숙주 세포일 수 있다. 상기 야생형 숙주 세포(wide-type host cell)는 재조합 방법에 의해 유전적으로 변화되지 않은 숙주 세포일 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 “형질 전환”은 상기 벡터를 미생물 또는 특정 세포 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 전환 대상 세포가 원핵세포인 경우에는, CaCl_2 방법, 하나한 방법 및 전기 천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 형질 전환 대상 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 효모와 같은 진균의 형질 전환의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트 및 열 충격을 이용한 형질 전환법과 전기천공법에 의해 실시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명에서 용어 “대사 조작된(metabolically engineered)” 또는 “대사 조작(metabolic engineering)”은 미생물에서 단백질 또는 알코올과 같은 원하는 대사산물의 생산을 위하여 생합성 유전자, 오페론과 연관된 유전자, 그리고 이들 핵산 서열의 제어 요소(control elements)를 조작하거나 적절한 배양 조건을 이용함으로써, 전사(transcription), 번역(translation), 단백질 안정성(protein stability)과 단백질 기능성(protein functionality)의 조절과 최적화에 의한 대사 흐름(metabolic flux)의 최적화를 유도하는 것을 의미한다.
- [0060] 예컨대, 대사 조작된 숙주세포는 유전적으로 설계된 숙주 세포를 의미하며, 여기서 목적 단백질은 발현의 수준으로 생성되거나 발현의 수준보다 더 큰 수준으로 생성되거나 본질적으로 동일한 성장 조건 하에서 성장하는 야생형 숙주 세포 내에서의 목적 단백질의 발현의 수준보다 큰 발현의 수준으로 발현될 수 있다.
- [0061] 상기 숙주세포는 공학적 방법에 의해 형질 전환되어 특정의 유전자를 효율적으로 발현할 수 있으면 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 숙주세포는 곤충 세포일 수 있다.
- [0062] 상기 곤충 세포는 유전자 발현을 위한 숙주 시스템으로서 개발되거나 시판되는 모든 세포가 사용될 수 있으며, 예컨대 스포도프테라 프루지페르다 곤충세포(*Spodoptera frugiperda*) SF21, SF9, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*), 안티카르사 겐미탈리스(*Anticarsa gemmatilis*), 봄빅스 모리(*Bombyx mori*), 에스티그넨 아크레아(*Estigmene acrea*), 헬리오티스 비레센스(*Heliothis virescens*), 류카니아 세파라타(*Leucania separata*), 리만트리아 디스파(*Lymantria dispar*), 말라카소마 디스트리아(*Malacasoma disstria*), 맘메스트라 브라씨카에(*Mamestra brassicae*), 만두카 섹스타(*Manduca sexta*), 플루텔라 질로스텔라(*Plutella zyllostella*), 스포도프테라 엑시구아(*Spodoptera exigua*) 및 스포도프테라 리틀리스(*Spodoptera littoralis*)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 구체적으로, 상기 곤충세포는 가을 거엄벌레(*Spodoptera frugiperda*) 유래의 SF9 세포일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에서 M2e 단백질 및 M1 단백질을 암호화하는 서열을 포함한 재조합 바큘로바이러스를 SF9 곤충 세포에 형질전환시켜, 형질전환된 숙주세포를 획득하였다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에서는 헤마글루티닌 단백질 및 M1 단백질을 암호화하는 서열을 포함한 재조합 바큘로바이러스를 SF9 곤충 세포에 형질전환시켜, 형질전환된 숙주세포를 획득하였다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 측면은 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자; 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 혼합하는 단계;를 포함하는 조류 인플루엔자 백신 조성물 제조 방법에 관한 것이다.
- [0067] 상기 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자의 제조는 (a) 서열번호 2로 이루어진 M2e를 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제작하는 단계; (b) 상기 발현 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조하는 단계; (c) 상기 형질전환체를 숙주세포에 형질감염(transfection)시키는 단계; (d) 상기 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 그 배양물을 수득하는 단계; 및 (e) 상기 배양물로부터

바이러스 유사입자를 수득하는 단계를 포함한다.

- [0068] 상기 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자의 제조는 (a) 서열번호 6으로 이루어진 헤마글루티닌을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 M1을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제작하는 단계; (b) 상기 발현 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조하는 단계; (c) 상기 형질전환체를 숙주세포에 형질감염(transfection)시키는 단계; (d) 상기 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 그 배양물을 수득하는 단계; 및 (e) 상기 배양물로부터 바이러스 유사입자를 수득하는 단계를 포함한다.
- [0069] 상기 바이러스-유사입자는 당해 기술 분야에 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 상기 구조 단백질 및 항원 인식 부위를 암호화하는 재조합 DNA 분자를 이용하여 소정의 숙주 세포를 형질 전환시킨 후 배양하여 제조될 수 있으며, 세포 안에서 발현된 단백질이 세포 표면에서 조립된 후 배양 상층액으로 배출될 수 있다. 이 때, 상기 바이러스-유사입자에 포함된 표면단백질은 고정화 과정을 거치지 않고 자연 그대로의 형태를 유지하고 있으므로 개체 내에서 특정 병원체에 대한 목적하는 면역반응을 유도할 수 있다.
- [0070] 구체적으로, 상기 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자; 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자를 혼합하는 단계는 1 : 1 내지 4 : 1의 비율로 혼합하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 혼합하는 단계는 2 : 1의 비율로 혼합하는 것일 수 있다.
- [0071] 상기 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 제조에 있어, M2e 단백질을 암호화하는 핵산; 및 M1 단백질을 암호화하는 핵산을 증폭시킬 수 있다.
- [0072] 구체적으로 상기 M2e를 암호화하는 핵산은 서열번호 7로 이루어진 제1프라이머; 및 서열번호 8로 이루어진 제2프라이머 쌍에 의해 증폭될 수 있다.
- [0073] 또한 구체적으로, 상기 M1을 암호화하는 핵산은 서열번호 9로 이루어진 제3프라이머; 및 서열번호 10으로 이루어진 제4프라이머 쌍에 의해 증폭될 수 있다.
- [0074] 상기 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 제조에 있어, 헤마글루티닌 단백질을 암호화하는 핵산; 및 M1 단백질을 암호화하는 핵산을 증폭시킬 수 있다.
- [0075] 구체적으로, 상기 헤마글루티닌을 암호화하는 핵산은 서열번호 11로 이루어진 제5프라이머; 및 서열번호 12로 이루어진 제6프라이머 쌍에 의해 증폭될 수 있다.
- [0076] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 물질에 존재하는 핵산과 혼성화 되어 상기 표적 물질의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.
- [0077] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 구체적으로는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있고, 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0078] 상기 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862) 및 미국 특허 제 4458066호의 고품형 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0079] 상기 형질 전환된 숙주 세포는 배치, 공급-배치 또는 연속 발효 조건 하에서 배양될 수 있으며, 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 발현할 수 있으므로 상기 배양된 숙주 세포로부터 상기 바이러스-유사입자 단백질을 수득할 수 있다.
- [0080] 이 때, 배치 발효 방법은 폐쇄적인 시스템을 사용할 수 있고, 상기 배양 매질은 발효가 실행되기 전에 제조되며, 상기 매질에 유기체를 접종하고, 상기 매질에 어떠한 성분의 첨가도 없이 발효가 일어날 수 있다. 특정한 경우에서, 성장 매질의 상기 탄소원 내용물이 아닌, 상기 pH 및 산소 함량은 배치 방법 동안 변화될 수 있다. 배치 시스템의 상기 대사물 및 세포 바이오매스는 끊임없이 발효가 정지될 때까지 변화할 수 있다. 배치 시스템에서, 세포는 정지된 지체 상에서 고도성장 로그 상에 걸쳐 진척하고, 성장율이 감소되거나 멈춘 최종적으로 정지 상에 이를 수 있다. 일반적인 기간에서, 로그 상의 상기 세포는 대부분의 단백질을 만들 수 있다.

[0081] 배치 시스템은 "공급-배치 발효" 시스템으로 변형할 수 있다. 상기 시스템에서, 영양(예를 들면, 탄소원, 질소원, O_2 및 통상적으로, 다른 영양)은 이들의 배양물의 농도가 한계치 미만으로 떨어질 때 첨가될 수 있다. 공급-배치 시스템은 이화 생성물 억제가 세포의 대사를 억제하고, 매질이 매질 내에서 영양소를 제한된 양으로 갖는 것이 바람직할 때 유용할 수 있다, 공급-배치 시스템에서의 실제 영양 농도의 측정은 pH, 용존 산소 및 CO_2 와 같은 폐기가스의 부분압과 같은 측정 가능한 인자의 변화에 기초하여 예측될 수 있다. 배치 및 공급-배치 발효는 일반적인 시스템으로서 당업계에 널리 알려져 있다.

[0082] 계속적 발효는 정의된 배양 매질이 계속해서 생반응기(bioreactor)에 첨가되고, 조건화된 매질의 동일한 양이 과정 동안 동시에 제거되는 개방 시스템이다. 계속적 발효는 일반적으로 세포가 처음에는 로그 상 성장에 있는 일정한 고 밀도의 배양물을 유지할 수 있다. 계속적 발효는 세포 성장 또는 마지막 생성물 농도에 영향을 미치는 하나의 인자 또는 임의의 수의 인자의 조작이 가능할 수 있다.

[0083] 예를 들어, 탄소원 또는 질소원과 같은 제한 영양소는 고정된 속도로, 모든 다른 파라미터는 적당하게 유지될 수 있다. 다른 시스템에서, 많은 성장에 영향을 주는 인자는 배지 탁도에 의해 측정되는 세포 농도가 일정하게 유지되는 동안, 계속해서 변화할 수 있다. 계속적 시스템은 일정한 상태의 성장 조건을 유지하려고 한다. 따라서, 매질이 빠져나가는 것에 의한 세포 손실은 발효에서의 세포 성장 속도에 대항하여 균형이 맞을 수 있다.

발명의 효과

[0084] 본 발명의 조류 인플루엔자 백신 조성물은 전통적인 백신과 달리 원인 감염체 없이 개발할 수 있으며, 비선택적인 항체 생성을 유도하지 않는다.

[0085] 또한, 상기 백신 조성물은 M2e5x 및 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 항원을 동시에 투여함으로써, 면역 체계를 현저히 향상시켜, 조류 인플루엔자에 대한 면역 및 예방 효과를 제공할 수 있으며, 안전하여 부작용을 최소화할 수 있다.

[0086] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 M2e 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자; 및 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 확인 결과를 나타낸 것이다(A: HA 단백질 웨스턴 블랏 결과, B: M2e5x 단백질 웨스턴 블랏 결과, C: HA 바이러스-유사입자의 M1 단백질 웨스턴 블랏 결과, D: M2e5x 바이러스-유사입자의 M1 단백질 웨스턴 블랏 결과, E: HA 단백질 ELISA 측정 결과, F: M2e5x 단백질 ELISA 측정 결과, G: HA 바이러스-유사입자의 M1 단백질 ELISA 측정 결과, H: M2e 바이러스-유사입자의 M1 단백질 ELISA 측정 결과)

도 2는 마우스에 M2e 및 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 바이러스-유사입자 조합 그룹 접종 후 ELISA 분석을 통해 시간에 따른 H5N1-특이적 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체 반응 및 M2e-특이적 IgG 항체 반응 확인 결과를 나타낸 것이다(A: 접종 후 시간 경과에 따른 IgG의 항체 반응, B: 접종 후 시간 경과에 따른 IgG1의 항체 반응, C: 접종 후 시간 경과에 따른 IgG2a의 항체 반응, D: 접종 후 M2e-특이적 IgG 항체 반응, E: rH5N1 바이러스에 대한 HAI 역가).

도 3은 M2e 바이러스-유사입자 및 헤마글루티닌 바이러스-유사입자 조합 그룹의 폐 바이러스 역가 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 M2e 바이러스-유사입자 및 헤마글루티닌 바이러스-유사입자 접종에 의한 염증성 사이토카인 방출량 측정 결과를 나타낸 것이다(A: IFN- γ 측정 결과 B: IL-6 측정 결과).

도 5는 M2e 바이러스-유사입자 및 헤마글루티닌 바이러스-유사입자 접종에 의한 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, B 세포(germinal center, GC)의 폐 및 비장에서의 면역 반응 결과를 유세포 분석법을 통해 나타낸 것이다(A: 폐에서의 $CD4^+$ T 세포의 수준 비교, B: 폐에서의 $CD8^+$ T 세포의 수준 비교, C: 폐에서의 GC B 세포의 수준 비교, D: 비장에서의 $CD4^+$ T 세포의 수준 비교, E: 비장에서의 $CD8^+$ T 세포의 수준 비교 F: 비장에서의 GC B 세포의 수준 비교).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0088] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0089] **실시예 1. 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs)의 제조**
- [0090] **1-1. 헤마글루티닌 바이러스-유사입자 제조용 벡터의 제조**
- [0091] A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1) 바이러스를 MDCK 세포에 접종한후 Rneasy Mini kit(Qiagen)를 사용하여 총 바이러스 RNA를 추출하였다. 총 RNA는 Prime Script 1ST strand cDNA 합성 키트(Takara, Otsu, Japan)을 사용하여 cDNA로 역전사하였다. A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1) HA 유전자는 서열번호 11의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머(5'-ATAT GGATCC ATGGA GAAAA TAGTG-3') 및 서열번호 12의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머(5'-ATAT AAGCTT TTAAG TGCAA ATTCT-3')를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였으며, 이후 pFastBac 플라스미드 발현벡터(Invitrogen)에 클로닝하였다. 상기 프라이머는 밑줄로 표시된 부분에 제한 효소 부위(BamHI 및 HindIII)를 각각 도입하였다. 상기 헤마글루티닌은 Genebank Accession No. AII30339 또는 Genebank Accession No. KM186135의 서열을 사용하였다.
- [0092] 한편, 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 인플루엔자 A/PR/8/34 바이러스에서 유래한 것으로서, 서열번호 9의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머(5'- AAAGAATTCACCATGAGTCTTCTAACCGAGGT-3') 및 서열번호 10의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머(5'-TTACTCGAGTTACTCTAGCTCTATGTTGAC-3')를 이용하여 RT-PCR을 통해 증폭하였다. 이후 A/PR/8/34 바이러스를 MDCK 세포에 접종하였고, RNeasy Mini kit를 통해 바이러스성 RNA를 추출하였다. 상기 M1을 암호화하는 유전자는 Genebank Accession No. EF467824 또는 Genebank Accession No. AB021712의 서열을 사용하였다.
- [0093] 상기 프라이머를 이용하여 증폭시킨 인플루엔자 M1 단백질을 암호화하는 유전자를 앞서 A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1) HA 유전자 암호화 서열이 도입된 pFastBac 벡터에 도입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다.
- [0094] HA 및 M1을 발현하는 재조합 바큇로바이러스(recombinant BaculoViruses, rBVs)를 제조하기 위하여, cellfectin II(Invitrogen) 및 SF9 세포를 이용하여 DNA 형질 감염을 수행하였다. HA 및 M1을 포함하는 pFastBac 벡터를 이용한 형질 전환은 white/blue 스크리닝에 의해 수행되었다. 재조합 바큇로바이러스는 Bac-to-Bac 발현 시스템(Invitrogen)를 통해 제조사의 매뉴얼에 따라 제조되었다.
- [0095] **1-2. 헤마글루티닌 바이러스-유사입자의 제조**
- [0096] 바이러스-유사입자는 A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1) HA 및 M1을 발현하는 재조합 바큇로바이러스(rBVs)에 의해 공동-감염된 SF9 곤충 세포에서 생산하였다. 상청액 내의 바이러스-유사입자는 고속원심분리(30분, 45,000 x g)를 사용해 펠렛화 하였다.
- [0097] 바이러스-유사입자를 4℃에서 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 동안 재현탁하였고, 불연속 수크로오스 구배(20-30-60%)를 통해 4℃, 45,000 x g에서 1 시간 동안 수확하고 정제하였다. 단백질 농도는 QuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich)에 의해 결정하였다.
- [0098] **1-3. 헤마글루티닌 바이러스-유사입자 확인**
- [0099] 상기 1-2에서 제조한 바이러스-유사입자를 웨스턴 블랏 및 ELISA를 이용하여 확인하였다
- [0100] 먼저, 바이러스-유사입자를 폴리아크릴-아미드 겔상에서 분리하고, PVDF 멤브레인으로 옮긴 다음 5% 탈지유로 블로킹(blocking)하였다. 멤브레인은 A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1), 항-M1 단일클론항체(GA2B)(Abcam, Cambridge, MA) 및 항-M2e 단일클론항체(14C2)로 감염된 BALB/c 마우스로부터 4주 후 수집된 혈청으로 4℃에서 밤새 프로브하였다. HRP- 접합 된 염소 항-마우스 IgG를 이차 항체로 사용하였다.
- [0101] 또한, ELISA를 통해 바이러스-유사입자를 확인하기 위하여, 헤마글루티닌 바이러스-유사입자를 다양한 농도로 코팅하고, 항-HA 다중 클론 항체, 항-M1 단일 클론 항체 및 HRP- 접합 된 염소 항-마우스 IgG를 순차적으로 배양하였다.
- [0102] 그 결과, HA 단백질, M1 단백질 발현량이 웨스턴 블랏 및 ELISA 측정 결과에서 유사하게 확인됨에 따라, 헤마글루티닌 및 M1 단백질을 포함하는 비리온과 형태 및 크기가 유사한 입자를 생성하는 것을 확인하였다(도 1).

[0103] **실시예 2. M2e5x 바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs)의 제조**

[0104] **2-1. M2e5x 바이러스-유사입자 제조용 벡터의 제조**

[0105] 먼저, M2e(M2e5x) 에피토프의 밀도 및 변화를 증가시키기 위해 M2e의 텐덤 반복을 도입하였다. M2e5x는 인간 돼지 및 조류 기원 인플루엔자 A 바이러스로부터 유래된 보존서열을 포함하며, 올리고머 형성을 안정화시키는 것으로 알려진 도메인을 M2e5x의 C-말단 부분에 연결하였다. 골별 단백질 멜라틴의 신호 펩타이드가 곤충 세포 표면에서 효율적으로 발현하기 위하여 M2e5x의 N-말단에 첨가하였다. 또한 막 횡단(transmembrane) 및 세포질 꼬리 도메인(cytoplasmic tail domains)을 A/PR/8/34 바이러스의 HA로부터 유래된 도메인으로 대체하여 바이러스-유사입자로의 통합(incorporation)을 증가시켰다. M2e5x 제조방법은 Kim M, Song J, et al. Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. Molecular Therapy. 2013; 21: 485-492을 참고할 수 있다.

[0106] M2e(M2e5x) 유전자는 서열번호 7의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머(5'- ATAT GGATCC ATGAA ATTCT TAGTC-3) 및 서열번호 8의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머(5'- ATAT AAGCTT TCAGA TGCAT ATTCT-3)를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였으며, 이후 pFastBac 플라스미드 발현벡터(Invitrogen)에 클로닝하였다.

[0107] 상기 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1)은 상기 실시예 1과 동일한 서열의 유전자 및 프라이머를 이용하였다.

[0108] 상기 프라이머를 이용하여 증폭시킨 인플루엔자 M1 단백질 유전자를 앞서 M2e5x 유전자 암호화 서열이 도입된 pFastBac 벡터에 도입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다.

[0109] M2e5x 및 M1을 발현하는 재조합 바큇로바이러스(recombinant BaculoViruses, rBVs)를 제조하기 위하여, cellfectin II(Invitrogen) 및 SF9 세포를 이용하여 DNA 형질 감염을 수행하였다. M2e5x 및 M1을 포함하는 pFastBac 벡터를 이용한 형질 전환은 white/blue 스크리닝에 의해 수행되었다. 재조합 바큇로바이러스는 Bac-to-Bac 발현 시스템(Invitrogen)을 통해 제조사의 매뉴얼에 따라 제조되었다.

[0110] **2-2. M2e5x 바이러스-유사입자의 제조**

[0111] M2e5x 및 M1을 발현하는 재조합 바큇로바이러스(rBVs)에 의해 공동-감염된 SF9 곤충 세포에서 생산하였다. 상청액 내의 바이러스-유사입자는 고속원심분리(30분, 45,000 x g)를 사용해 펠렛화 하였다.

[0112] 바이러스-유사입자를 4℃에서 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 동안 재현탁하였고, 불연속 수크로오스 구배(20-30-60%)를 통해 4℃, 45,000 x g에서 1 시간 동안 수확하고 정제하였다. 단백질 농도는 QuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich)에 의해 결정하였다.

[0113] **2-3. M2e5x 바이러스-유사입자 확인**

[0114] 상기 2-2에서 제작한 바이러스-유사입자를 웨스턴 블랏 및 ELISA를 이용하여 확인하였다.

[0115] 상기 웨스턴 블랏 및 ELISA는 실험예 1-3과 동일하며, 항-HA 단일 클론 항체 대신 항-M2e 단일 클론 항체를 사용하였다.

[0116] 그 결과, M2e 단백질 및 M1 단백질 발현량이 웨스턴 블랏 및 ELISA 측정 결과에서 유사하게 확인됨에 따라, M2e 및 M1 단백질을 포함하는 비리온과 형태 및 크기가 유사한 입자를 생성하는 것을 확인하였다(도 1).

[0117] **실험예 1. 동물모델 면역화 및 감염**

[0118] 본 발명의 바이러스-유사입자의 면역 반응을 확인하기 위하여, 상기 바이러스-유사입자를 접종한 마우스 동물모델을 제작하였다.

[0119] 먼저, 7주령의 암컷 BALB/c 마우스를 이용하였다. 마우스 그룹(n = 8)에 HA VLP (50 µg) 단독, 조합 VLP (M2e5x VLP 10 µg + HA VLP 5 µg) 및 M2e5x VLP (10 µg) 단독을 각각 0주 및 4주째에 100 µL로 근육접종(Intramuscularly, IM)하였다. 나이브(Nive) 마우스에는 PBS만을 제공하였다. 조합 바이러스-유사입자 M2e5x VLP 및 HA VLP의 혼합 비율은 2 : 1로 하였다.

[0120] 2차 면역화(boost immunization)한 지, 4주 후에 조류 인플루엔자 A / VietNam/1203/2004(H5N1)로부터 유래된 HA 및 NA를 함유하는 7.5×10^2 pfu (50 µL PBS)의 reassortant rgH5N1 바이러스를 치사 용량(5xLD₅₀)으로 마우스에 처리하고, 나머지는 A/PR8 H1N1 바이러스의 6개의 내부 유전자를 처리하였다.

[0121] **실험예 2. 인플루엔자 바이러스 특이적 항체 반응**

[0122] 레트로-궤양 신경총 천공법(the retro-orbital plexus puncture method)를 이용하여 2차 면역화한지 1주 및 4주 후에 마우스로부터 혈액 샘플을 수집하였다.

[0123] 96 웰 면역 플레이트에 웰당 0.05M, pH 9.6 카보네이트 바이카보네이트 완충액, 100 μ L의 불활성화된 바이러스 항원조류 인플루엔자 A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1) 4 μ g/mL을 최종 농도로 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 코팅하였다.

[0124] M2e 특이적 IgG 항체반응은 인간 인플루엔자 바이러스 M2e 펩티드 항원을 사용하여 결정하였다. 100 μ L의 혈청 샘플 (PBST 중 1 : 50, 1 : 150, 1 : 450로 희석)을 각 웰에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 배양하였다. PBS (100 μ L/well)로 희석된 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgA, IgG, IgG1 및 IgG2a 항체를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 2차 항체로 추가하였다.

[0125] 그 결과, M2e 및 HA 바이러스-유사입자 조합 그룹을 처리한 경우, M2e 또는 HA 바이러스-유사입자 단독 그룹을 처리한 경우에 비해 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항체반응이 우수함을 확인하였다. 특히, M2e 및 HA 바이러스-유사입자 조합 그룹에서 IgG 및 IgG2a 항체 반응이 현저하게 높게 나타남을 확인하였다(도 2).

[0126] **실험예 3. 바이러스-유사입자의 폐 염증 반응 확인**

[0127] 폐 추출물(lung extracts)에서의 바이러스 역가(viral titers)는 MDCK 세포를 이용하여 측정하였다. 또한, 폐 추출물로부터 사이토카인 인터페론 감마(INF- γ) 및 인터류킨-6(IL-6)의 방출량은 A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1) 바이러스 공격하고 4일 후 수득한 폐 추출물로부터 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[0128] 구체적으로, BD OptEIA Set(BD Biosciences)를 이용하여, 폐 추출물에서 사이토카인 수준을 검출하였다. ASC 분석을 위해, 96 웰 플레이트(SPL Life Sciences, Korea)에 불활성화된 바이러스 항원인 조류 인플루엔자 A/Viet Nam/1203/2004 (rgH5N1)를 4 μ g/mL의 농도로 코팅하였다. 블로킹(blocking) 후 코팅된 플레이트에 비장 및 폐 세포를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO₂와 함께 2시간 동안 배양하였다. 플레이트로부터 세포를 세척하고 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG 항체를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 2차 항체로 추가하여 함께 배양하였다. 비장 및 폐 세포로부터 분리된 항체 수준을 시험관 내 배양 5일 후 측정하였다.

[0129] 그 결과, M2e 바이러스-유사입자 단독 그룹 및 Na⁺ve₊캘린지 그룹에 비해 M2e 및 HA 바이러스-유사입자 조합 그룹을 처리할 때, 현저히 낮은 수준의 폐 바이러스 로드(lung virus loads)가 발견되었다(도 3).

[0130] 또한, M2e 바이러스-유사입자 단독 그룹 및 Na⁺ve₊캘린지 그룹에 비해 M2e 및 HA 바이러스-유사입자 조합 그룹을 처리할 때, 조류 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 폐 조직에서의 염증반응이 낮게 나타났다. 특히 IFN- γ 이 상당히 낮은 수준으로 나타남을 확인하였다(도 4).

[0131] **실험예 4. 항체-분비 세포(B 세포) 반응, T 세포 반응 시험**

[0132] 본 발명의 바이러스-유사입자 처리에 따른, 마우스의 비장 세포 및 폐 세포로부터 T 세포(CD4⁺, CD8⁺) 및 B세포(배아중심)의 비율을 유세포분석법으로 분석하였다.

[0133] 구체적으로, 염색 완충액(0.1 M PBS 중 2% 소혈청알부민 및 0.1% 소듐아자이드)에서 비장 세포 및 폐 세포(1 X 10⁶ cell/mL)를 Fc 블록(BD Biosciences, CA, USA)과 함께 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 배양하였다. 표면 항원 염색을 위해, 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 형광 단-공액항체(CD3e, CD4, CD8, B220, GL7; BD Biosciences)와 함께 배양하였다. 비장세포 및 폐 세포를 염색 완충액으로 세척하고 BD Accuri C6 유세포 분석기(BD Biosciences)를 사용하여 획득하기 전에 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰다. 이후 C6 분석 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0134] 그 결과, 인플루엔자 M2e 및 HA 바이러스-유사입자 조합 그룹을 처리할 때, 각각 단독 바이러스-유사입자 그룹을 처리할 때에 비해 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포 및 B세포(배아중심)반응이 높게 나타남을 확인하였다(도 5).

[0135] 상기와 같은 결과는 본 발명의 바이러스-유사입자가 조류 인플루엔자 감염에 대한 방어적 면역 효과를 유도함으로써, 인플루엔자 감염 예방 및 치료를 위한 백신에 활용할 수 있음을 시사한다.

[0136] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명

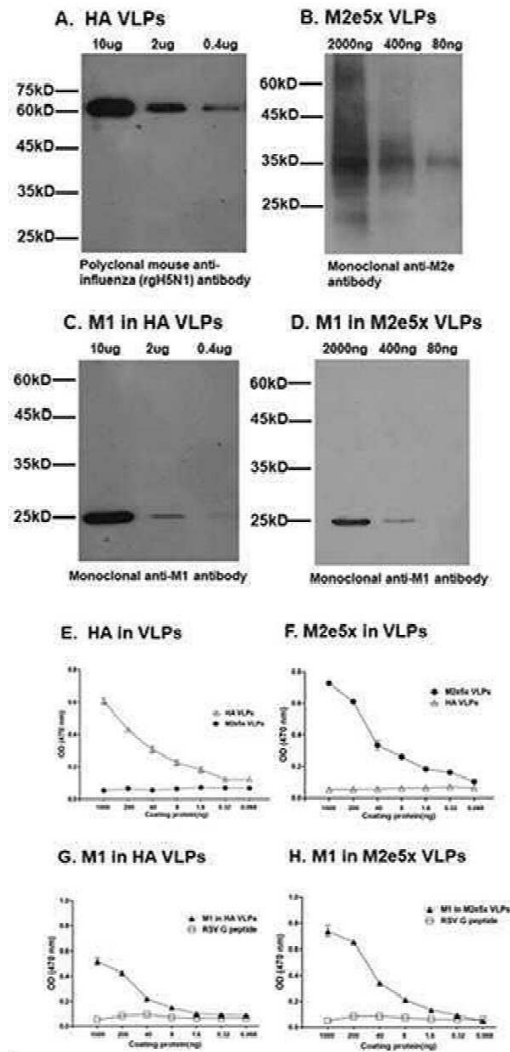
의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0137]

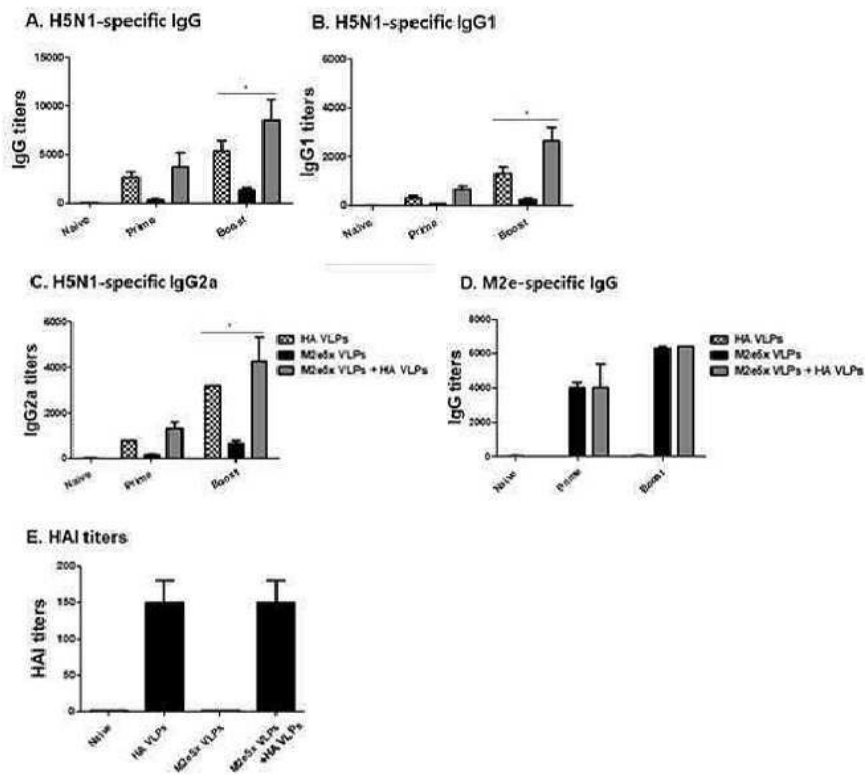
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

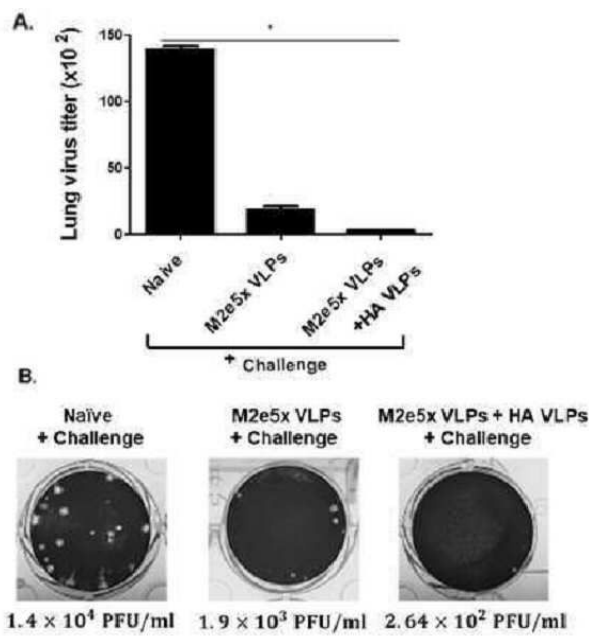
도면1



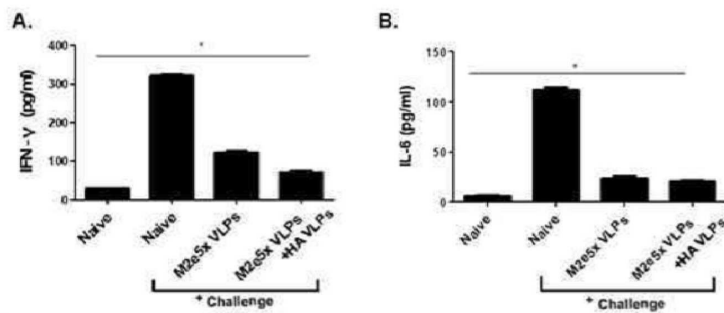
도면2



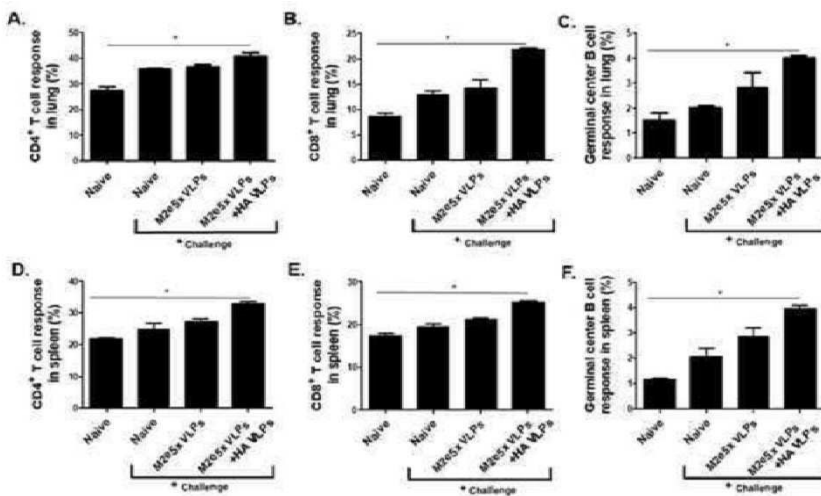
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> VACCINE COMPOSITION COMPRISING ENHANCED AVIAN INFLUENZA VIRUS-LIKE PARTICLES AND METHOD THEREOF
- <130> 22PP30530
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 273
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> M2e5x_amino acids
- <400> 1

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile

1

5

10

15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Asp Pro Ile Asn Met Thr Thr Ser Ile Asn Asn
20 25 30
Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Ala
35 40 45
Ala Ala Pro Gly Ala Ala Val Asp Gly Thr Ser Leu Leu Thr Glu Val
50 55 60
Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser
65 70 75 80
Asp Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr
85 90 95
Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ala
100 105 110
Ala Ala Pro Gly Ala Ala Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr
115 120 125
Arg Ser Glu Trp Glu Ser Arg Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ala Ala Ala
130 135 140
Gly Gly Ala Ala Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
145 150 155 160
Glu Trp Glu Ser Arg Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ala Ala Ala Pro Gly
165 170 175
Ala Ala Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp
180 185 190
Gly Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Gly Gly Leu Lys Gln Ile Glu
195 200 205
Asp Lys Leu Glu Glu Ile Leu Ser Lys Leu Tyr His Ile Glu Asn Glu
210 215 220
Leu Ala Arg Ile Lys Lys Leu Leu Gly Glu Leu Glu Ile Leu Ala Ile
225 230 235 240
Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala
245 250 255
Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys

	260	265	270
Ile			
<210>	2		
<211>	822		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	M2e5x_nucleic acids		
<400>	2		
atgaaattct tagtcaacgt tgcccttggt tttatggctg tgtacatttc ttacatctat			60
gcggacccca tcaacatgac cactagtatc aacaacaacc ttcagcgtgt gcgtgaactg			120
gcggttcagt ctgctaacag cgctgctgca ccaggagcag ctgtcgacgg taccagcctt			180
ctaaccgagg tcgaaacacc tatcagaaac gaatgggggt ccagatcca cgattcaagt			240
gacgtgctg ctggtggagc agctagcctt ctaaccgagg tcgaaacacc tatcagaaac			300
gaatgggggt ccagatcca cgattcaagt gacgtgctg caccaggagc agctagtctt			360
ctaaccgagg tcgaaacgcc taccagaagc gaatgggagt ccagatccag cgattcaagt			420
gatgctgctg ctggtggagc agctagtctt ctaaccgagg tcgaaacgcc taccagaaac			480
gaatgggagt ccagatccag cgattcaagt gatgctgctg caccaggagc agctagtctt			540
ctaaccgagg tcgaaacgct taccagaaac ggatgggggt gcagatgcag cgattcaagt			600
gatggtggac tgaacagat tgaagataaa ttggaagaga ttttgagcaa actctatcat			660
attgaaaacg aactggcgcg tattaataag ctgctgggag aactcgagat tctggcgatc			720
tactcaactg tcgccagttc actggtgctt ttggtctccc tgggggcaat cagtttctgg			780
atgtgttcta atggatcttt gcagtgcaga atatgcatct ga			822
<210>	3		
<211>	252		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	M1_amino acids		
<400>	3		
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro			
1 5 10 15			
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe			

20 25 30
 Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45
 Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50 55 60
 Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val

 65 70 75 80
 Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala
 85 90 95
 Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
 100 105 110
 Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125
 Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
 130 135 140

 Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
 145 150 155 160
 Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
 165 170 175
 Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
 180 185 190
 Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln
 195 200 205
 Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser

 210 215 220
 Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

<210> 4

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M1_nucleic acids

<400> 4

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gtactctcta tcatcccgtc agggcccctc 60

aaagccgaga tcgcacagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120

gttctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta 180

ggattttgtg tcacgtcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240

caaaatgccc ttaatgggaa cggggatcca aataacatgg acaaagcagt taaactgtat 300

aggaagctca agaggagat aacattccat ggggccaaag aaatctcact cagttattct 360

gctgggtcac ttgccagttg tatgggcctc atatacaaca ggatgggggc tgtgaccact 420

gaagtggcat ttggcctggt atgtgcaacc tgtgaacaga ttgctgactc ccagcatcgg 480

tctcataggc aaatggtgac aacaaccaat ccactaatca gacatgagaa cagaatggtt 540

ttagccagca ctacagctaa ggctatggag caaatggctg gatcgagtga gcaagcagca 600

gaggccatgg aggttgctag tcagctaga caaatggtgc aagcgatgag aaccattgga 660

actcacccta gctccagtcg tggctgaaa aatgatcttc ttgaaaattt gcaggcctat 720

cagaaacgaa tgggggtgca gatgcaacgg ttcaagtga 759

<210> 5

<211> 564

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA_amino acids

<400> 5

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 Lys 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 Val 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 Ser 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 Ser Thr 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 Lys 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 Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser 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 Thr 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 Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln

 370 375 380
 Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
 385 390 395 400
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 405 410 415
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 435 440 445

 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 450 455 460
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
 465 470 475 480
 Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
 485 490 495
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
 500 505 510
 Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile

 515 520 525
 Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
 530 535 540
 Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
 545 550 555 560
 Arg Ile Cys Ile

<210> 6

<211> 1695

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA_nucleic acids

<400> 6

atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60

attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt 120

actgttacac atgccccaga catactggaa aagaaacaca acgggaagct ctgcgatcta 180

gatggagtga agcctctaata tttgagagat ttagcgttag ctggatggct cctcggaaac 240

ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctctt acatagtgga gaaggccaat 300

ccagtcaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta 360

ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt 420

catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgcccatacc agggaaagtc ctcttttttc 480

agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac 540

aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggga ttcacatcc taatgatgcg 600

gcagagcaga caaagctcta tcaaaacca accacctata tttccgttgg gacatcaaca 660

ctaaaccaga gattgttacc aagaatagct actagatcca aagtaaaccg gcaaagtgga 720

aggatggagt tcttctggac aattttaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780

ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840

atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggagc 900

ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa 960

tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggetca gaaatagccc tcaacgagag 1020

acgcgaggat tatttggagc tatagcaggt tttatagagg gaggatggca gggaatggta 1080

gatggttggat atgggtacca ccatagcaat gagcagggga gtgggtacgc tgcagacaaa 1140

gaatccactc aaaaggcaat agatggagtc accaataagg tcaactcgat cattgacaaa 1200

atgaacactc agtttgaggc cgttgggaagg gaatttaaca acttagaaag gagaatagag 1260

aattttaaca agaagatgga agacgggttc ctgatgtct ggacttataa tgctgaactt 1320

ctggttctca tggaaaatga gagaactcta gactttcatg actcaaatgt caagaacctt 1380

tacgacaagg tccgactaca gcttagggat aatgcaaagg agctgggtaa cggttgtttc 1440

gagttctatc ataatgtga taatgaatgt atggaaagtg taagaaatgg aacgtatgac 1500

taccgcagat attcagaaga agcgagacta aaaagagagg aaataagtgg agtaaaattg 1560

gaatcaatag gaatttacca aatactgtca atttattcta cagtggcgag ttccttagca 1620
ctggcaatca tggtagctgg tctatcctta tggatgtgct ccaatggatc gttacaatgc 1680
agaatttgca tttaa 1695

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> M2e5x_forwards primer
<400> 7

atatggatcc atgaaattct tagtc 25

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> M2e5x_ reverse primer
<400> 8

atataagctt tcagatgcat attct 25

<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> M1_ forwards primer

<400> 9
aaagaattca ccatgagtct tctaaccgag gt 32

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> M1_ reverse primer

<400> 10
ttactcgagt tactctagct ctatgttgac 30

<210> 11
<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA_forwards primer
 <400> 11
 atatggatcc atggagaaaa tagtg 25
 <210> 12
 <211
 > 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA_ reverse primer
 <400> 12
 atataagctt ttaaatgcaa attct 25