



(51) 국제특허분류:

C07K 14/11 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2015/009618

(22) 국제출원일:

2015년 9월 14일 (14.09.2015)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2015-0069106 2015년 5월 18일 (18.05.2015) KR

(71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 정대균 (JEONG, Dae Gwin); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 송대섭 (SONG, Dae Sub); 30019 세종시 조치원읍 세종로 2511, 고려대학교 세종캠퍼스 약학대학, Sejong (KR). 김정기 (KIM, Jeong Kie); 30019 세종시 조치원읍 세종로 2511, 고려대학교 세종캠퍼스 약학대학, Sejong (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

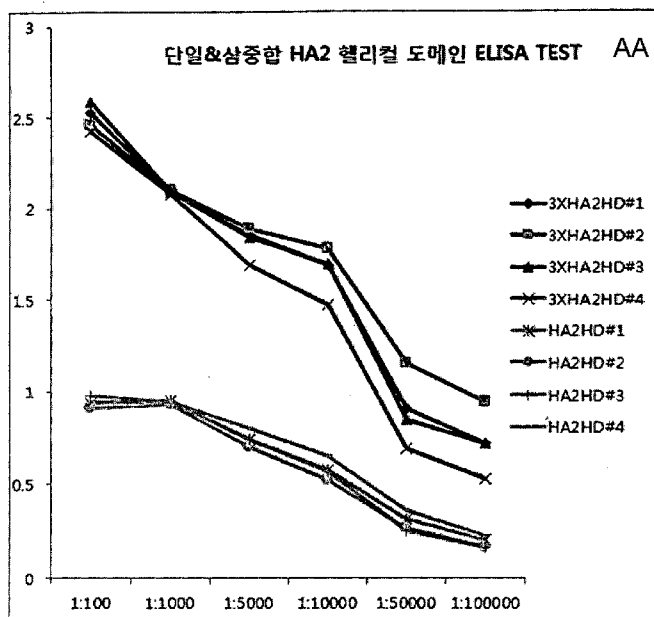
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: VERSATILE INFLUENZA VIRUS VACCINE COMPOSITION

(54) 발명의 명칭 : 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물

[Fig. 5]



AA ... Single & triple HA2 helical domain ELISA TEST

(57) Abstract: The present invention relates to a versatile influenza virus vaccine composition using the HA2 helical domain of a hemagglutinin protein, which is an influenza surface protein, and to a pharmaceutical composition for preventing or treating influenza virus infectious diseases. The polypeptide expressed by SEQ ID NO: 3 and the polypeptide expressed by residues 379 to 474 of SEQ ID NO: 1 of the present invention can be mass-produced in *E. coli*, and effectively produce neutralizing antibodies to various influenza virus subtypes, and thus the polypeptides can be widely utilized as versatile vaccines for influenza virus subtypes and new influenza virus variants.

(57) 요약서: 본 발명은 인플루엔자 표면 단백질인 헤마글루티닌 단백질의 HA2 헬릭컬 도메인을 이용한 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드 및 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드는 대장균에서 대량 생산이 가능하고 다양한 인플루엔자 아형에 대하여 중화항체를 효과적으로 생산할 수 있으므로, 인플루엔자 아형 및 신종 변이 인플루엔자에 대한 범용성 백신으로 널리 활용될 수 있다.



규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 인플루엔자 표면 단백질인 헤마글루티닌 단백질의 HA2 헬리컬 도메인을 이용한 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인플루엔자는 인플루엔자 바이러스 호흡기 감염으로 발생하는 급성 발열성 질환이다. 인플루엔자 바이러스는 표면 구조단백질의 차이에 따라 A, B, C형으로 분류되며, 각각에 따라 숙주 및 역학과 임상양상에 다소 차이가 있다. 인플루엔자 바이러스는 직경 80~120nm 크기의 구형바이러스로 표면에 노출된 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)와 뉴라미니데이즈(neuraminidase, NA) 당단백질의 종류에 따라 아형(subtype)이 결정된다. 아형은 주로 A형 인플루엔자를 중심으로 구분하는데 현재 H1~H16까지 16가지의 HA와 N1~N9의 9가지 NA가 발견되어 단순히 계산해도 총 144종 (예컨대 H1N1, H1N2)의 아형이 A형 인플루엔자 내에 분포하게 된다. 인플루엔자는 항원변이를 통하여 매년 크고 작은 새로운 유행을 일으킨다. 항원변이는 새로운 HA 또는 NA로 교체되어 아형이 바뀌게 되는 항원대변이(antigenic shift; 예) H3N2 → H2N2와 기존의 HA, NA 유전자의 점상돌연변이(point mutation)로 근소한 항원변이가 발생하는 항원소변이(antigenic drift)가 있다. 항원소변이는 A, B형 인플루엔자를 중심으로 거의 매년 일어나기 때문에 계절인플루엔자유행(seasonal epidemic)의 원인이 된다.
- [3] HA와 NA 표면항원 중에 특히 HA에 대한 면역이 인플루엔자 예방 및 병의 중증도와 관련된다. 따라서 인플루엔자 백신의 가장 중요한 구성요소는 헤마글루티닌에 대해 체내에서 생산된 중화항체가 인플루엔자 바이러스 감염 예방에 결정적 역할을 하게 된다. 인플루엔자 백신에는 비활성화백신과 생백신이 있으며, 비활성화 백신은 부화란(embryonated egg)에서 배양한 바이러스를 정제하여 포르마린 등으로 비활성화시켜서 만든다. 비활성화시킨 바이러스 전체를 사용하는 전바이러스백신(whole virus vaccine), 에테르 등으로 바이러스 외피(envelope)를 분쇄시킨 분할 백신(split vaccine), 헤마글루티닌과 뉴라미다아제 성분을 정제한 아단위 백신(subunit vaccine)등이 있고, 생백신은 약독화 생백신(live attenuated influenza vaccine, LAIV)이 개발되어 사용되고 있다. 전바이러스 백신은 소아에서 부작용을 유발하므로 현재 국내를 비롯하여 세계적으로 잘 사용되지 않으며, 일부 국가에서만 이용되는 실정이다. 반면, 분할백신이나 아단위백신과 같은 성분백신은 매우 안전하며 효과가 인정되어 가장 많이 사용되고 있다. 이외에 면역반응을 증강시키기 위하여 MF-59와 같은 면역보강제가 포함된 백신이나 바이러스 유사 형태의 소포를 형성하는 virosome

백신 등이 개발되어 일부 국가에서 사용되고 있다. 자연감염이나 백신을 통하여 얻어진 특정 아형 또는 인플루엔자 바이러스에 대한 항체는 다른 형이나 아형의 인플루엔자 바이러스에 보호항체를 형성하지 못하며, 한 가지 항원내의 새로운 변이(variant)에 대해서도 충분한 면역원성을 나타내지 못하는 문제점들이 있다. 인플루엔자 바이러스는 해마다 크고 작은 변이를 일으키기 때문에 매년 유행주가 변하게 되고, 따라서 전년에 접종한 백신으로 인한 보호 효과를 기대하기 어렵기 때문에 해마다 접종해야 하는 어려움이 있다.

- [4] 세계적으로 인플루엔자 바이러스는 인류건강에 심각하면서 지속적인 위협이 되고 있다. 매해 3~5 백만 명이 감염으로 인한 심각한 증세를 보이고 50 만 명이 사망하며, 계절성 인플루엔자 유행병은 잠재적으로 수백만을 사망시킬 수 있다. 바이러스 표면 당단백질인 뉴라미니데이즈에 대한 길항제는 인플루엔자 감염 치료를 위해 광범위하게 사용되고 있지만, 그 효능은 약물 저항적인 바이러스 변종에 의해 급격히 감소되었다. 백신은 인플루엔자 바이러스 감염을 막는 가장 효과적인 방법이나, 앞서 언급한 바와 같이 소아, 노인과 같이 면역이 약한 환자들과 같이 높은 위험성이 있는 그룹에게는 백신의 보호적인 효능이 최적화되어 있지 않다. 또한 백신 후 면역은 전형적으로 새로운 변종에 특정적으로 반응하지만, 인플루엔자 바이러스가 빠르게 변화하기 때문에 백신은 거의 매해 새롭게 생산되어야만 한다. 백신의 항원적 구성에 대한 결정은 새해에 유행하게 될 변종에 대한 예상을 기반으로 한다. 따라서 백신 변종과 유행하는 변종이 다른 경우 백신은 효과가 떨어진다. 결과적으로 인플루엔자 바이러스에 대해 광범위하게 보호할 수 있는 새로운 예방적이고 치료적 효과를 갖은 백신이 절실히 필요한 실정이다.

- [5] 인플루엔자 바이러스에 대한 면역은 주로 헤마글루티닌 (hemagglutinin, HA)을 목표로 하는 중화항체에 의해 거의 매개된다. 헤마글루티닌에서 항원적 위치를 동정하는 것은 인플루엔자 항체들이 시알산 (sialic acid) 수용체에 부착하여 숙주세포 안으로 바이러스가 들어가도록 매개하는 면역적으로 우세한 헤마글루티닌 헤드 도메인(head domain, HA1)을 찾아낸 것을 의미한다. 항-HA 헤드도메인 단일항체를 이용한 연구는 이러한 항체 종류가 숙주 세포 표면에 있는 시알릭 산에 바이러스가 부착되는 것을 차단하여 바이러스가 세포 안으로 유입되는 것을 막는다는 것을 의미한다. 그러나, 헤마글루티닌 헤드 도메인에서 높은 돌연변이 발생률과 항원적 변화에 대한 관용 때문에 헤마글루티닌 헤드를 목표로 한 항체들은 매우 유사한 변종에만 효과적이다. 그러므로 수용체 부착 위치를 목표로 하는 좀 더 광범위한 항체는 구조적으로 밝혀져 있지 않다. 반대로 세포막에 근접한 헤마글루티닌 스템 도메인(stem domain, HA2)에 부착하는 항체들은 항체들은 바이러스와 숙주의 엔도조멸 세포막 (endosomal membranes)의 융합에 필수적인 HA의 주요한 구조적 재배열을 차단하여 바이러스가 세포 안으로 유입되는 것을 막는다. HA 스템도메인은 헤드도메인보다 돌연변이가 덜 발생되어 다양한 인플루엔자에서 상대적으로

아미노산 서열이 잘 보존되어 있다. 그러나 헤마글루티닌 헤드 도메인 내에서 발견되는 항원자극성의 다양성으로 인해 이 도메인을 목표로 하는 대부분의 단일 항체들은 특정한 단일 바이러스만을 일반적으로 중화시키는 것으로 알려져 있다.

- [6] 그러나 아직까지 다양한 인플루엔자 바이러스 아형을 한번에 중화시킬 수 있는 범용성의 광범위 중화 단일항체(broadly neutralizing monoclonal antibodies, bNAbs)에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않아, 다양한 변이형에 대해서 광범위한 범용성 백신으로 활용될 수 있는 새로운 백신에 대한 필요성이 절실하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 다양한 인플루엔자 바이러스 아형에 효과를 나타낼 수 있어, 새로운 변종 인플루엔자 출현에 대비할 수 있는 신규한 인플루엔자 범용 백신을 제공하는 것이다.
- [8] 따라서 본 발명의 목적은 인플루엔자 헤마글루티닌의 단일 HA2 헬리컬 도메인 또는 이의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인에 대한 항체, 이를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또다른 목적은 인플루엔자 면역 유도 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 제공한다.
- [11] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드에 대한 단클론 항체를 제공한다.
- [12] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [14] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 인플루엔자 면역 유도 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명의 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드 및 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드는 대장균에서 대량 생산이 가능하고 다양한 인플루엔자 아형에 대하여 중화항체를 효과적으로 생산할 수 있으므로, 인플루엔자 아형 및 신종 변이 인플루엔자에 대한 범용성 백신으로 널리 활용될

수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 도 1은 ESPript 3.0을 이용하여 헤마글루티닌 HA1 헤드도메인의 아미노산 서열을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [17] 도 2는 ESPript 3.0을 이용하여 구조기반 헤마글루티닌 HA2 스템도메인 아미노산 서열을 분석한 결과 및 이의 삼중합체 도메인 형태를 나타낸 도이다.
- [18] 도 3은 대장균 발현 벡터 pET28a-3XHA2HD를 나타낸 도이다.
- [19] 도 4는 SDS-PAGE 를 이용하여 단일 HA2 헬리컬 도메인(a) 및 이의 삼중합 헬리컬 도메인(b)을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [20] 도 5는 단일 HA2 헬리컬 도메인(HA2HD) 및 삼중합 HA2 헬리컬 도메인(3XHA2HD)의 면역 항체 형성 효과를 ELISA TEST를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 6는 인플루엔자 아형 pH1N1, cH3N2, hH3N2, aH5N1, dH7N9 에 대한 삼중합 HA2 헬리컬 도메인(3XHA2HD) 유도 항체의 결합 효과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 제공한다.
- [23] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다.
- [24] 본 발명의 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 및 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 바이러스의 H1, H3, H5, H7 및 H9 과 같은 다양한 아형에 대하여 효과적으로 중화항체를 형성할 수 있는 폴리펩티드로, 개체 내에서 항원으로 작용하여 항원-항체 반응을 유도함으로써 인플루엔자에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [25] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [26]
- [27] 본 발명의 “서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드”는 이와 동일한 폴리펩티드 뿐만 아니라 이의 아미노산이 보존적 치환에 의하여 치환된 폴리펩티드, 이와 80 내지 99%의 서열상동성, 바람직하게는 85 내지 99%, 더욱 바람직하게는 90 내지 99%의 상동성을 갖는 폴리펩티드를 모두 포함할 수 있다.
- [28] 용어 “보존적 치환”은 한 부류의 아미노산이 동일한 부류의 다른 아미노산으로 대체되는 것을 말한다. 보존적 치환은 폴리펩티드의 구조 또는 기능 또는 둘 모두를 변경시키지 않는다. 보존적 치환의 목적을 위한 아미노산의 부류는 소수성(예를 들어, Met, Ala, Val, Leu), 중성 친수성(예를 들어, Cys, Ser, Thr), 산성(예를 들어, Asp, Glu), 염기성(예를 들어, Asn, Gln, His, Lys, Arg), 입체형태 파괴물질(disrupter)(예를 들어, Gly, Pro) 및 방향족(예를 들어, Trp, Tyr, Phe)을 포함한다.

- [29] 용어 “항원”은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원성분으로, 바람직하게는 바이러스가 발현하는 단백질이다. 특정 구현예에서, 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 바이러스가 발현하는 헤마글루티닌 스템 도메인으로부터 유래한 것으로 개체에 투여되었을 때 면역 반응을 유도하는 항원으로 작용할 수 있다. 이와 같은 항원들은 서열번호 4 및 서열번호 2의 염기서열로부터 당업계에 널리 알려진 방법을 통해 제조할 수 있다.
- [30]
- [31] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공한다.
- [32] 상기 “백신”이란 일반적인 인플루엔자 바이러스에 대한 예방 또는 치료를 목적으로 개체에서 항원-항체 반응을 유도하는 것이다.
- [33] 상기 “서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드”는 인플루엔자 헤마글루티닌의 전장 서열의 단일 HA2 헬리컬 도메인을 말한다.
- [34] 또한 상기 “서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드”는 인플루엔자 헤마글루티닌의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 말한다. 여기에서 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 서열번호 3의 379-480 서열로 표시되는 절편 1, 373-480 서열로 표시되는 절편 2, 373-480서열로 표시되는 절편 3으로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이와 같은 삼중합체의 절편 1 내지 3은 앞서 설명한 잔기와 동일한 또는 이의 보존적 치환 또는 이와 80 내지 99%의 서열 상동성, 바람직하게는 85 내지 99%, 더욱 바람직하게는 90 내지 99%의 상동성을 갖는 폴리펩티드를 모두 포함할 수 있다.
- [35] 상기 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [36] 상기 “인플루엔자 바이러스”는 A, B 및 C의 인플루엔자 바이러스 타입으로 분류된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 “인플루엔자 바이러스 아형(subtype)”은 헤마글루티닌(H) 및 뉴라미다제(N) 바이러스 표면 단백질의 조합을 특징으로 하는 인플루엔자 A 바이러스 변이체를 말한다. 본 발명에 따르면, 인플루엔자 바이러스 아형은 이들의 H 번호에 의해, 예를 들어, “H3 아형의 HA를 포함하는 인플루엔자 바이러스”, “H3 아형의 인플루엔자 바이러스” 또는 “H3 인플루엔자”에 의해, 또는 H 번호 및 N 번호의 조합, 예를 들어, “인플루엔자 바이러스 아형 H3N2” 또는 “H3N2”에 의해 지칭될 수 있다. 용어 “아형”은 구체적으로 보통 돌연변이로부터 야기되는 각각의 아형 내의 모든 개별 “균주”를 포함하며, 천연 분리주 및 인공 돌연변이체 또는 재배열 등을 포함하고, 상이한 병리학적 프로파일을 보인다. 이러한 균주는 또한 바이러스 아형의 다양한 “분리주”로 호칭될 수도 있다. 따라서, 용어 “균주” 및 “분리주”는

상호교환가능하게 사용될 수 있다.

- [37] 본 발명의 백신은 다양한 인플루엔자 바이러스 아형에 대하여 효과적으로 중화항체의 형성을 유도할 수 있으며, 바람직하게는 H1, H3, H5, H7 및 H9으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 인플루엔자 바이러스 아형에 대하여 항체의 형성을 유도할 수 있고, 이와 같이 형성된 항체는 모두 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌의 다양한 아형에 결합할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 pH1N1, cH3N2, hH3N2, aH5N1, dH7N9와 같은 아형에 결합할 수 있다.
- [38] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물에 있어서, 상기 바이러스가 H1, H3, H5, H7 및 H9으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 인플루엔자 바이러스 아형인, 백신 조성물을 제공한다.
- [39] 또한 본 발명은 상기 백신이 범용성 백신인 백신 조성물을 제공한다.
- [40] 용어 “범용성 백신”은 인플루엔자 바이러스 아형 및 이의 신규한 변이체를 포함하는 다양한 인플루엔자 바이러스를 한번에 중화시킬 수 있는 광범위한 적용 범위를 가진 백신을 말한다.
- [41] 본 발명의 백신은 아단위(sub unit) 백신, 합성 백신 및 유전공학 백신으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있다.
- [42] 용어 "아단위 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.
- [43] 용어 "합성 백신"은 바이러스의 항원 또는 항원결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산한 펩티드를 포함한 백신을 말한다.
- [44] 용어 "유전공학 백신"은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.
- [45] 본 발명의 백신은 인플루엔자를 예방하기 위해 사용되는 다른 백신의 제조 백신의 제조에 사용되는 불활화된 균체들 또는 항원들과 혼합하여 인플루엔자를 포함한 다른 질병들을 함께 예방할 수 있는 혼합 또는 복합 백신으로 사용될 수 있다. 용어 "혼합 백신"이란 서로다른 바이러스 백신을 함께 사용한 백신을 말하며, 용어 "복합 백신"이란 바이러스 백신과 세균 백신을 함께 사용한 백신을 말한다.
- [46] 또한, 본 발명의 백신 조성물은 추가적으로 용매, 면역증강제(adjuvant) 및 부형제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 더욱 포함할 수 있다. 상기 용매로는 생리식염수 또는 증류수가 있으며, 면역증강제로는 프로인트(Freund's) 불완전체 또는 완전체 어쥬번트, 알루미늄 하이드록사이드 겔, 및 식물성 및 광물성 오일 등이 있으며, 부형제로는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포타슘 설페이트(alum)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 기술자에게 잘 알려진 백신 제조에 사용되는 공지의 물질을 더 모두 포함할 수 있다.

- [47] 본 발명의 백신 조성물은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액제로 제조하며, 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 비강 또는 경막외(eidural) 경로로 투여할 수 있다.
- [48]
- [49] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [50] 본 발명의 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 개체에 투여되는 경우 개체 내에서 항체를 형성하여 면역반응을 유도하므로, 인플루엔자 감염 질환을 예방하거나 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [51] 본 명세서에 사용되는 용어 "인플루엔자 바이러스 질병"은 세포 또는 대상에서의 인플루엔자 바이러스, 예를 들어, 인플루엔자 A 또는 B 바이러스의 존재로부터 야기되거나, 또는 인플루엔자 바이러스에 의한 세포 또는 대상의 침습으로부터 야기되는 병태를 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 용어는 인플루엔자 바이러스에 의해 야기되는 호흡기 병을 지칭하며, 바람직하게는 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있다.
- [52] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 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. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [53]
- [54] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 인플루엔자 면역 유도 방법을 제공한다.
- [55] 상기 개체는 인플루엔자 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형에 감염된 동물을 치료할 수 있다. 보다 구체적으로 개체란 개체에 전파시킬 수 있는 모든 종류의 동물을 말한다. 상기 개체는 인간을 제외한 개체일 수 있다.

[56]

[57] 이하, 본 발명을 제조에 및 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 제조에 및 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 제조에 및 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[58]

발명의 실시를 위한 형태

[59]

[60] 실시예 1. 인플루엔자 헤마글루티닌 HA2 헬리컬 도메인의 단일 및 삼중합체 제조

[61] 범용 항원으로 사용될 수 있는 인플루엔자 헤마글루티닌(이하, HA)의 서열을 동정하기 위하여, 구조를 기반에 둔 단백질 서열분석 비교 프로그램(Clustal W & ESPript 3.0)을 이용하여 다양한 아형의 헤마글루티닌 단백질의 아미노산 서열 중 6종의 서열을 비교 분석하고, 아형 간의 보존된 서열을 가진 HA2 헬리컬 도메인을 결정하였다. 이와 같은 구조 기반 인플루엔자 헤마글루티닌 HA2 헤드 및 스템 도메인의 서열 분석결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다. 상기와 같은 서열 분석을 통해 헤마글루티닌에 공통적으로 보존된 아미노산 서열을 갖는 HA2 헬리컬 도메인을 확인하였으며, 이를 이하의 항원으로 제조하였다.

[62]

실험에 사용된 인플루엔자 (Influenza) A 바이러스(A/California/04/2009(H1N1))의 헤마글루티닌 단백질(567개 아미노산)은 (주)바이오니아에서 합성하였으며, 이의 염기서열은 서열번호 4와 같다. 서열번호 1로 표시되는 헤마글루티닌(A/California/04/2009(H1N1), NCBI:FJ966082.1)에 공통으로 보존된 아미노산서열을 가지는 HA2 헬리컬 도메인(잔기 379-474)을 pET21a의 NdeI과 XhoI 부위에 서브클론(subclone)하고 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3) RIL 균주(strain)를 사용하여 이를 과발현시켰다.

[63]

삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 제조하기 위하여 절편1은 HA2 헬리컬 도메인의 아미노산잔기 379-480, 절편2는 373-480 그리고 절편3은 373-480을 각각 NdeI과 BamHI, BamHI과 HindIII 그리고 HindIII와 XhoI을 사용하여 pET28a에 단백질의 N-, C- 양말단에 6개의 히스티딘이 붙도록 서브클론하고 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3) Star 균주(strain)를 사용하여 과발현시켰다. 각각의 단백질을 대장균에 접종하고 OD 600nm에서 0.6~0.8사이에 0.2mM IPTG를 넣고 16시간 동안 291K에서 배양하였다. 사용된 대장균 발현 벡터 pET28a-3XHA2HD를 도 3에 나타내었다.

[64]

His-태그된 단일 HA2 도메인 또는 삼중합 HA2 헬리컬도메인을 니켈-친화성 크로마토그래피로 정제하였고, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 M NaCl, 5 %(v/v) 글리세롤을 포함하는 완충용액에서 투석하여, 정제된 단일 HA2 도메인 및 삼중합 HA2을 얻었다. 결과를 도 4에 나타내었다.

- [65] 도 4에 나타낸 바와 같이, 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 이의 삼중합 헬리컬 도메인이 SDS-PAGE 상에서 확인되었으며, 니켈-친화성 크로마토그래피에 의하여 순도 96%이상으로 정제된 것을 확인하였다. 삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 발현하기 위한 염기서열은 서열번호 2에 표시하였으며, 이에 의해 제조되는 351개의 아미노산 서열을 서열번호 3에 표시하였다. 이하 제조된 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 이의 삼중합 헬리컬 도메인을 항원으로 하여, 이들이 인플루엔자 범용성 백신으로 유용성이 있는지 여부를 확인하였다.
- [66]
- [67] 실시예 2. 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 삼중합 HA2 헬리컬 도메인의 항체 생성 확인
- [68] 상기 실시예 1에서 얻은 단일 또는 삼중합 HA2 헬리컬도메인 항원이 효과적으로 항체를 유도하는지 여부를 확인하기 위하여, 이의 항체 생성 효과를 확인하였다.
- [69] 먼저, 이들 각각을 랫트(Rat)에 주사하기 전에 전-면역 혈청(pre-immune serum)을 채취하여 이를 음성대조군으로 사용하였다. 일차적 면역화(Primary immunize)를 위하여 각각 정제된 단일 또는 삼중합 HA2 헬리컬 도메인 항원 200ug을 완전 프로인트 어쥬번트(complete freund's adjuvant)(sigma)와 혼합하여 복강(IP)주사하고, 2주 후 완전 프로인트 어쥬번트 (sigma)와 혼합하여 1차 부스팅(boosting)을 하였다. 1주 후 1차 혈액을 채취하여 ELISA 테스트를 진행하고 1주 간격으로 부스팅과 혈액 채취(bleeding)를 하였으며, 3차 부스팅 1주 후 랫트의 심장으로부터 채혈하였으며, 4주 후 최종 혈청을 분리하여 최종 ELISA 테스트를 수행하였다. ELISA 테스트에서 항원은 웰 당 100ng을 사용하였으며, 면역 혈청은 1XPBS로 1:100 내지 1:100,000 비율로 희석하였고, 2차 확인을 위해서는 항-마우스 IgG-HRP(ABC5001)를 1:10,000 희석하여 사용하였다. 광학 밀도 405nm 에서 발색을 검출하여 최종적으로 면역 항체 생성 여부를 확인하였으며, 이를 도 5에 나타내었다.
- [70] 도 5에 나타낸 바와 같이, 단일 HA2 헬리컬 도메인은 4 마리의 랫트 모두에서 면역 항체 형성 효과를 나타내었다. 또한 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 4 마리의 랫트 모두에서 단일 도메인보다 훨씬 높은 면역력을 나타내고 항체가 더 잘 생성되는 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과를 통해 단일 HA2 헬리컬 도메인과 삼중합 HA2 헬리컬 도메인이 모두 개체 내에서 항체를 효과적으로 유도할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [71]
- [72] 실시예 3. 삼중합 HA2 헬리컬 도메인의 범용성 백신 이용성 확인
- [73] 제조한 삼중합 HA2 헬리컬 도메인이 우수한 항체 유도 효과를 나타냄을 확인하였으므로, 이를 다양한 인플루엔자 항원의 범용성 백신으로 활용할 수 있는지 여부를 확인하였다. 보다 구체적으로 정제된 삼중합 HA2 헬리컬 도메인 항원을 이용하여 마우스 단일클론 항체를 제조하였으며, 총 2개의 클론에서

얻은 복수(ascites)를 이용하여 곤충에서 발현한 재조합 헤마글루티닌 (pH1N1, cH3N2, hH3N2, aH5N1, dH7N9)을 감지할 수 있는지 여부를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다. 결과를 도 6에 나타내었다.

- [74] 도 6에 나타낸 바와 같이, 삼중합 HA2 헬리컬 도메인의 단클론 항체는 헤마글루티닌의 다양한 아형에 모두 결합을 하였으며, 이와 같은 결과를 통해 삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 다양한 아형에 대한 범용성 백신으로 이용할 수 있음을 확인하였다.

[75]

- [76] 따라서 본 발명의 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 이의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 항원으로 작용하여 다양한 아형의 인플루엔자에 대해서 항체를 효과적으로 유도할 수 있으므로 다양한 인플루엔자에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있는 유용성이 있음을 확인하였다.

산업상 이용가능성

- [77] 본 발명에 따른 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드 및 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드는 대장균에서 대량 생산이 가능하고 다양한 인플루엔자 아형에 대하여 중화항체를 효과적으로 생산할 수 있으므로, 인플루엔자 아형 및 신종 변이 인플루엔자에 대한 범용성 백신으로 널리 활용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드.
- [청구항 2] 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드에 대한 단클론 항체.
- [청구항 3] 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 헤마글루티닌의 단일 HA2 헬리컬 도메인인, 백신 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 헤마글루티닌의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인인, 백신 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 서열번호 3의 379-480 서열로 표시되는 절편 1, 373-480 서열로 표시되는 절편 2, 373-480서열로 표시되는 절편 3으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 바이러스는 H1, H3, H5, H7 및 H9으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 인플루엔자 바이러스 아형인, 백신 조성물.
- [청구항 9] 제3항에 있어서, 상기 백신은 범용성 백신인, 백신 조성물.
- [청구항 10] 제3항에 있어서, 상기 백신은 아단위(sub unit) 백신, 합성 백신 및 유전공학 백신으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.
- [청구항 11] 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 인플루엔자 감염 질환은 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 인플루엔자 면역 유도 방법.

[Fig. 1]

```

      1      10      20      30      40      50
A/California/04/2009_H1N1 .....MKRIILVLLTYFA..TANADTLICGYHANNSTOTVDTVLKNNIVTHSVNLLLE
A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 .....MKANLLVLLCALA..AADADTLICGYHANNSTOTVDTVLKNNIVTHSVNLLLE
A/canine/Korea/01/2007_H3N2 MKTVIALSVIFCLAFGQNLPGNENNAATLCLGHHAVPNGTIWKTITDOQKZVTNATELVQ
A/chicken/Korea/es/2003_H5N1 .....MEKIVLLLAIVS..LVKSDQICIGYHANNSTEOVDITNEKNVIVTHAQDILE
A/Hangzhou/1/2013_H7N9 MN.....TQILVFAIIAIP...INADKKICLGHAAVSNGRKVNLTIRGVEVVNATETVE
A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 .....MEIDALIAILVVTG...TSDADKICIGYOSTNSTETVDTLVENNVIVTHKELLH

      60      70      80      90      100     110
A/California/04/2009_H1N1 DKHNGKLCRLRGVAPLHNGKCNIAAGWLLGNPECCSLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGD
A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 DSHNGKLCRLKGIAPLQNGKCNIAAGWLLGNPECCDPLLPVRSWSYIVETPSSNGICYPGD
A/canine/Korea/01/2007_H3N2 NSSTGKICN.NPHKILDGRDCTLIDALLGDPHCDVFQNET.MDLFVERDNA.FSNCPYD
A/chicken/Korea/es/2003_H5N1 KTHNGKLCDLDGVKPLILRDGSVACWLLGNPMCDDEFINVPESYIVEXANPPNOLCYPGH
A/Hangzhou/1/2013_H7N9 RTNIPRIQS.KGKRTVDLGGQGLGTITGPDQCDQPLEFS.ADLIERREG.SDVCYPGK
A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 TEHNGMLCATNHLGHPILIDTCTIEGLVYGNPSCDLLGGKMSYIVERSAVNGMCPYGR

      120     130     140     150     160     170
A/California/04/2009_H1N1 FIDYDELREQLSSVSSFERFEIFPKTSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSYKNNILWLKK
A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 FIDYDELREQLSSVSSFERFEIFPKSSWPNHNTN.GVTAACSHGKSSSYRNILWLTK
A/canine/Korea/01/2007_H3N2 VPDYASLSRISVASSG...TLEFIIEGFTWIG.VTQNGGSGACKRGPANGSFSRLNWLTKS
A/chicken/Korea/es/2003_H5N1 FNDYDELKHLISRINHFEKIQLIPK.SSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFRNVVWLKK
A/Hangzhou/1/2013_H7N9 FVNEEALRQILRESG...GIDKEAMGFTYSG.IRNGAATSACRR.SGSSSYAEMKLLSN
A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 VENLEELRSFESSARSYKRLLEFPD.RTMN..VTETCTSKACSG...SYRSMAWLTHK

      180     190     200     210     220
A/California/04/2009_H1N1 GN..SYPKLSKSYINDKCKEVLVLCGTHHPPSTASDQOSLYONADITYVFGSSRYSKKFKP
A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 EG..SYPKLKNVYVKKCKEVLVLCGTHHPPSKQONLYONENAYVSVVTSNVMRRFIP
A/canine/Korea/01/2007_H3N2 GN..IYEVLVNVTMPNNNFDKLYINGVHHPPSTNQBOTSLYICASGRVTVSTRRSQOTIIP
A/chicken/Korea/es/2003_H5N1 NS..AYPTIKRSYNNTHQEDLVLCGTHHPPNDANEOTRLYQNPITYISVGTSTLNQRLVP
A/Hangzhou/1/2013_H7N9 TONAAFPDMTKSYKNTRKSPALIVGCIHHSVSTAEQTKLYSGNKLVTVCSSNYQSFVP
A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 NN..SYPIQDAQYVINDGKNILFVLCGTHHPPFDTEQNLNKAADTTTSLTIEDINRTFKE

      230     240     250     260     270     280
A/California/04/2009_H1N1 EIAIRPKVRDQSGRMNYWTLVPGDKITFEATGNLVVRYAFAPERNAGSGTITSDTPV
A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 EIAERPVRDQAGRMNYWTLKPGDTLIFEANGMLIAPMYAFALSRGFGSGITISNASM
A/canine/Korea/01/2007_H3N2 NIGSRPLVRGQSGRISVYWTIVKPGDVLVINSNGMLIAPRGYFKMRIGKSS.IHRSDAPI
A/chicken/Korea/es/2003_H5N1 KIIATRSKLVNGQSGRMETFWTILKPNDAISFESNGNFIAPZYAYKIVKKGDSALNNSELEY
A/Hangzhou/1/2013_H7N9 SPGARPDVNGHISGRIDFWHMLNPNNDIVTFNFNGAFIAP.DRASFLRGKSMGICSGVQVD
A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 VEGPRPLVNGQGRIDYYSVLLKPGDTLIRISNGMLIAPHYGHISGESHGRNLLKIDLNS

```

[Fig. 2]

A/California/04/2009_H1N1

290 300 310 320 330 340
 A/California/04/2009_H1N1 HDNTTICQPPKGAINTSLPONTIHPITIGKCPRYVKSTRRLATGLRNIPSI.QSR...G
 A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 HECHTKCQPLGAINSSLPYONTHPVITIGECPRYVRSANLRNVITGLRNIPSI.QSR...G
 A/canine/Korea/01/2007_H3N2 DTCISECITPPNGSIFNDKRFONVKNITIGACPRYVKQNTLRLATGLMNVPER.QTR...G
 A/chicken/Korea/ea/2003_H5N1 GNCNTKCCPPMGAINSSMPFHNTHPLTIGECPRYVKSSRLVLAIGLNNSPOR.EKKKKRG
 A/Hangzhou/1/2013_H7N9 ANCEGDCYHSGGTIIISNLRFQNTDSRAVGGKCPRYVKQRSLLATGLHKNVPEIPKGR...G
 A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 GNCIIQCQCEKGGILNTLRFQNVSKYAFGNCPRYVGVKSLKLAUGLRLNVBAT.SGR...G

A/California/04/2009_H1N1

350 360 370 380 390 400
 A/California/04/2009_H1N1 LFGAIAGFIEGCGWTQNVDCWYGYRHQNEQGSQVAADLKSTQNAIDITNKVMSVIERMNT
 A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 LFGAIAGFIEGCGWTQNVDCWYGYRHQNEQGSQVAADLKSTQNAIDITNKVMSVIERMNT
 A/canine/Korea/01/2007_H3N2 LFGAIAGFIEGCGWTQNVDCWYGYRHQNEQGSQVAADLKSTQNAIDITNKVMSVIERMNT
 A/chicken/Korea/ea/2003_H5N1 LFGAIAGFIEGCGWTQNVDCWYGYRHQNEQGSQVAADLKSTQNAIDITNKVMSVIERMNT
 A/Hangzhou/1/2013_H7N9 LFGAIAGFIEGCGWTQNVDCWYGYRHQNEQGSQVAADLKSTQNAIDITNKVMSVIERMNT
 A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 LFGAIAGFIEGCGWTQNVDCWYGYRHQNEQGSQVAADLKSTQNAIDITNKVMSVIERMNT

A/California/04/2009_H1N1

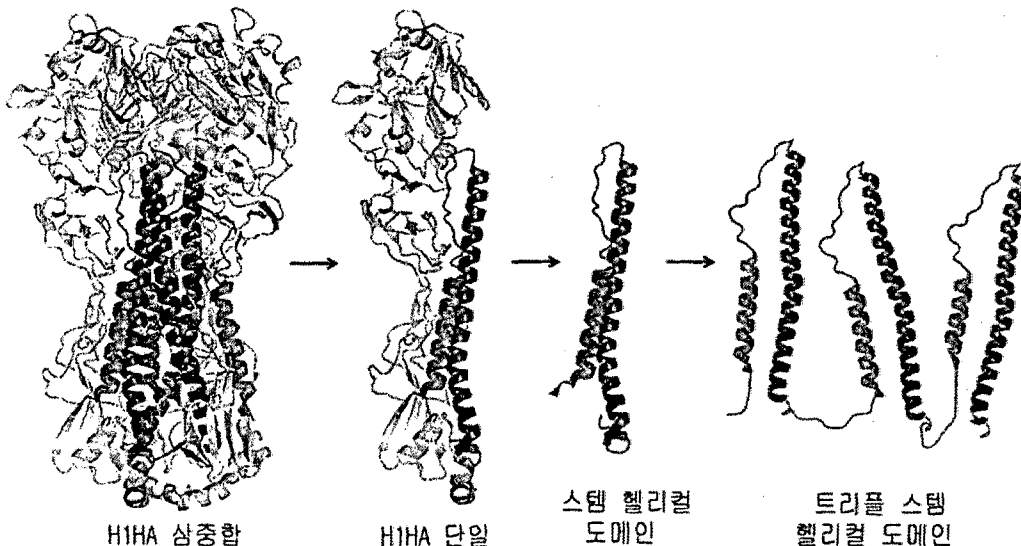
410 420 430 440 450 460
 A/California/04/2009_H1N1 QFTAVCKEENHLEKKTENKVVDDGFLDIATYNAELLVLLTENERLIDYHDSNVKNLYEK
 A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 QFTAVCKEENHLEKKTENKVVDDGFLDIATYNAELLVLLTENERLIDYHDSNVKNLYEK
 A/canine/Korea/01/2007_H3N2 QFTAVCKEENHLEKKTENKVVDDGFLDIATYNAELLVLLTENERLIDYHDSNVKNLYEK
 A/chicken/Korea/ea/2003_H5N1 QFTAVCKEENHLEKKTENKVVDDGFLDIATYNAELLVLLTENERLIDYHDSNVKNLYEK
 A/Hangzhou/1/2013_H7N9 QFTAVCKEENHLEKKTENKVVDDGFLDIATYNAELLVLLTENERLIDYHDSNVKNLYEK
 A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 QFTAVCKEENHLEKKTENKVVDDGFLDIATYNAELLVLLTENERLIDYHDSNVKNLYEK

A/California/04/2009_H1N1

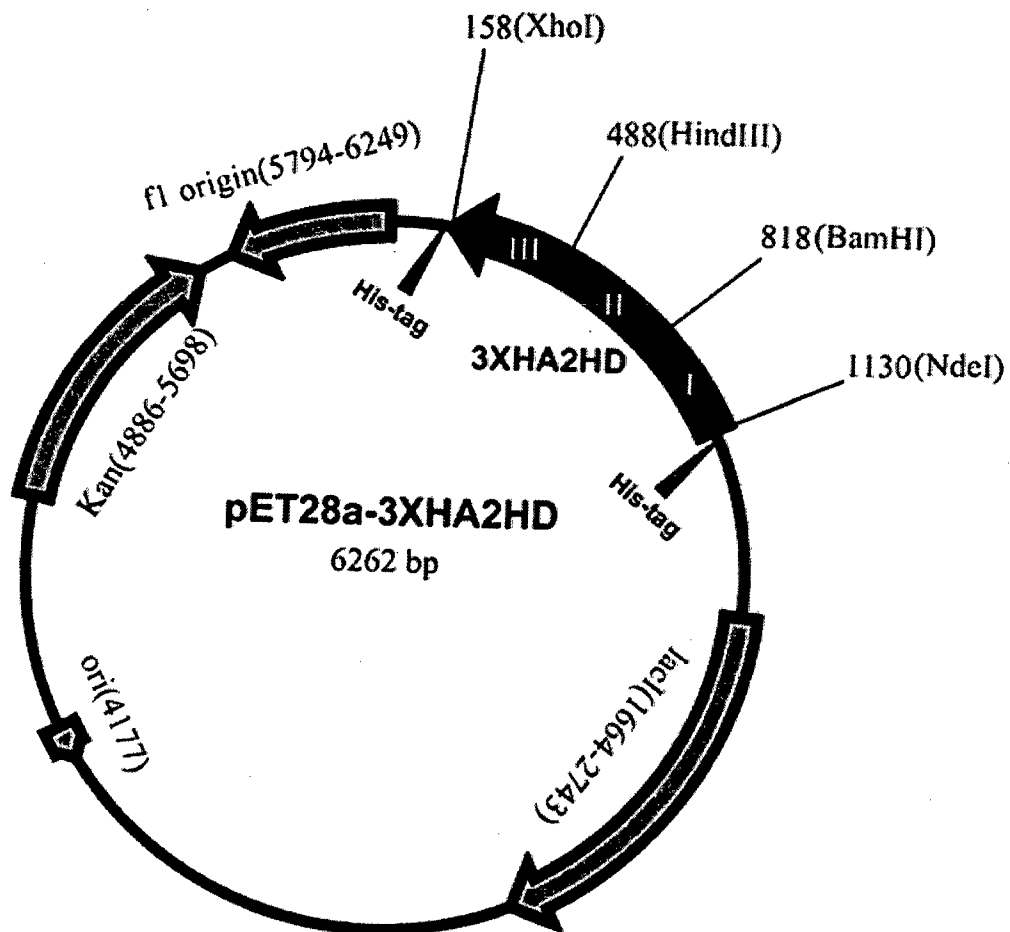
470 480 490 500 510 520
 A/California/04/2009_H1N1 VRSQLENNARZIGNGCFEFYHRCNDTCHESVRNGTYDYPKYSSEAKLNREETDGVRLSEST
 A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 VRSQLENNARZIGNGCFEFYHRCNDTCHESVRNGTYDYPKYSSEAKLNREETDGVRLSEST
 A/canine/Korea/01/2007_H3N2 VRSQLENNARZIGNGCFEFYHRCNDTCHESVRNGTYDYPKYSSEAKLNREETDGVRLSEST
 A/chicken/Korea/ea/2003_H5N1 VRSQLENNARZIGNGCFEFYHRCNDTCHESVRNGTYDYPKYSSEAKLNREETDGVRLSEST
 A/Hangzhou/1/2013_H7N9 VRSQLENNARZIGNGCFEFYHRCNDTCHESVRNGTYDYPKYSSEAKLNREETDGVRLSEST
 A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 VRSQLENNARZIGNGCFEFYHRCNDTCHESVRNGTYDYPKYSSEAKLNREETDGVRLSEST

A/California/04/2009_H1N1

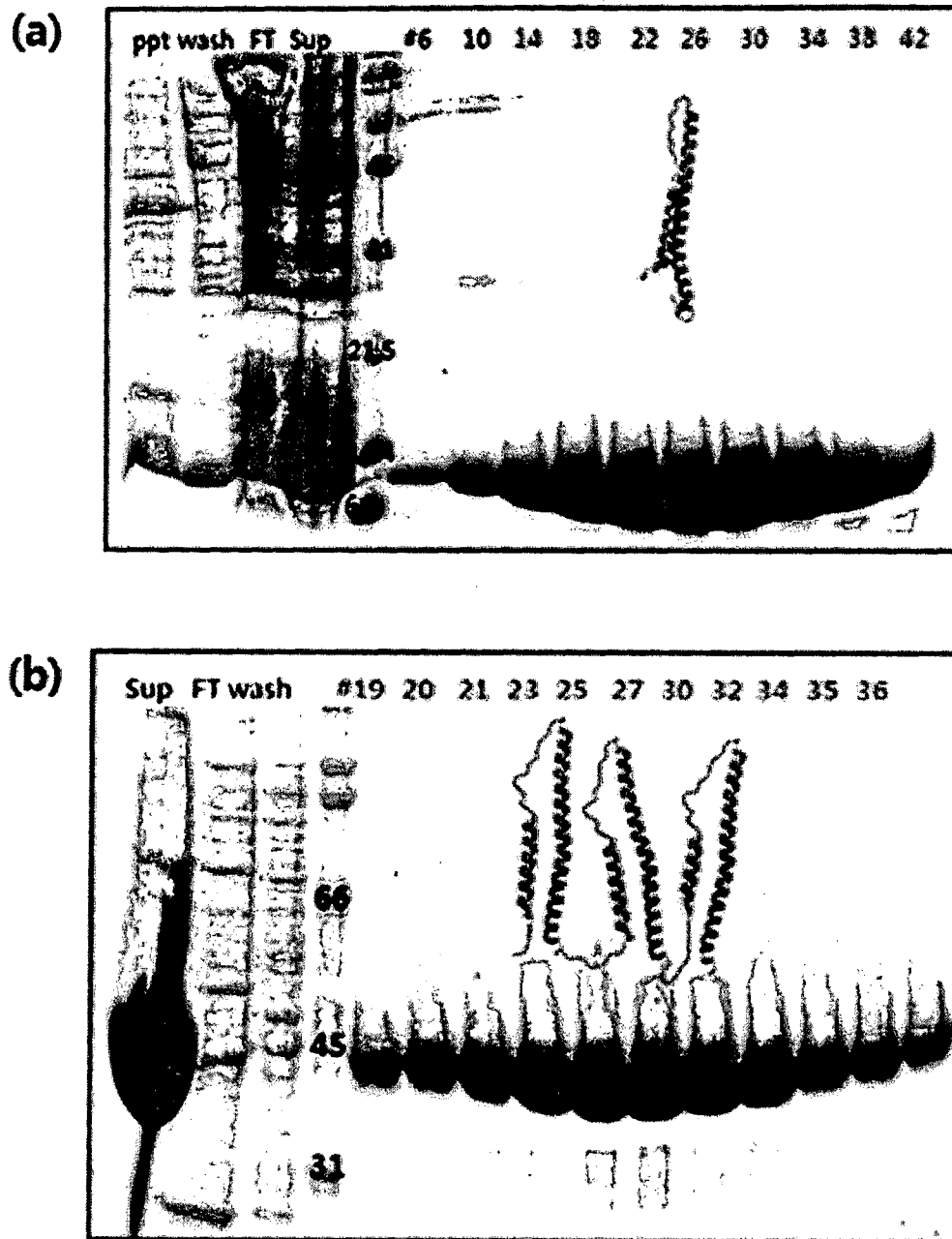
530 540 550 560
 A/California/04/2009_H1N1 RIYOILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI
 A/Puerto/Rico/8/1934_H1N1 RIYOILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI
 A/canine/Korea/01/2007_H3N2 GYKDWILWISFAISCFLLCVVLLGFINWACQGRGNIRCNICI
 A/chicken/Korea/ea/2003_H5N1 GTYOILSIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI
 A/Hangzhou/1/2013_H7N9 GYKDWILWISFAISCFLLVIMGLVFIQVKNNGMRCTICI
 A/chicken/Korea/01310/2001_H9N2 ETYKILTIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI



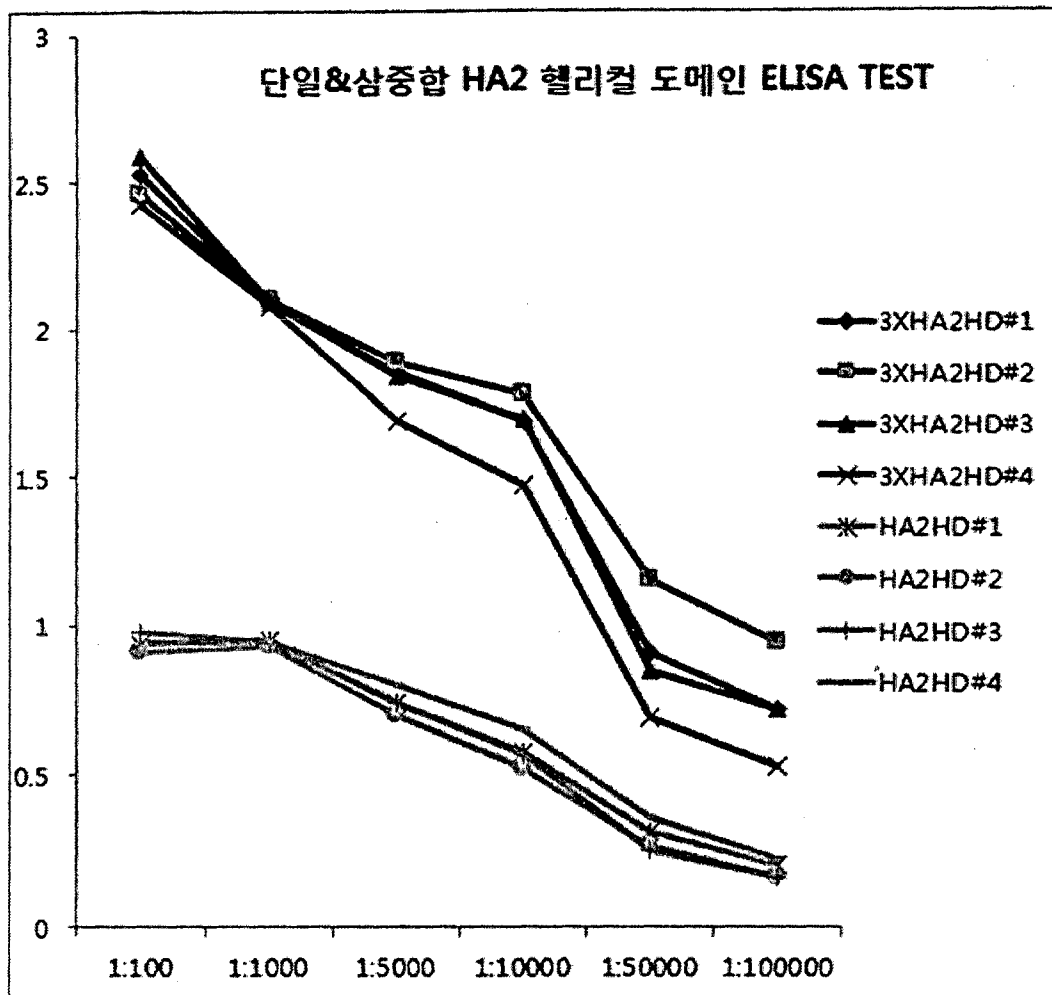
[Fig. 3]



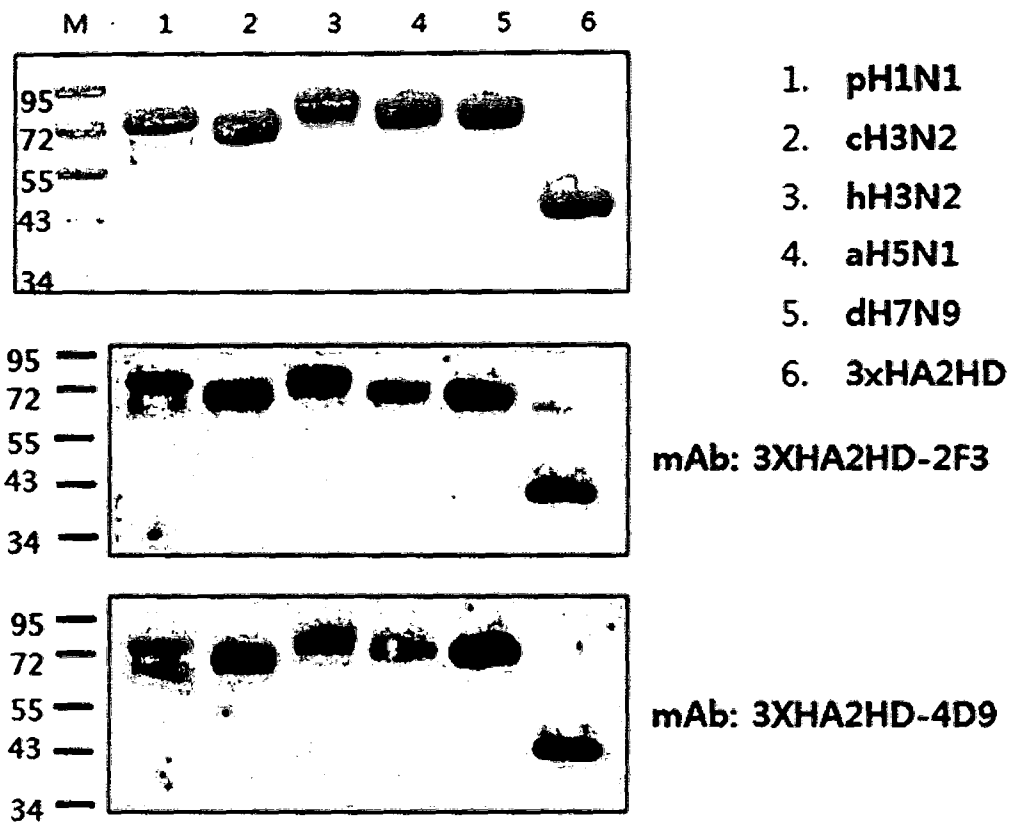
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/009618**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 14/11(2006.01)i, C07K 16/10(2006.01)i, A61K 39/145(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/11; C12N 15/63; C07K 16/10; C12N 7/01; C12N 15/44; A61K 39/145; A61K 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: influenza, hemagglutinin stem domain(HA2), versatile vaccine, HA2 helical domain

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0010583 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 27 January 2014 See abstract; claims 1-21; and paragraphs [0008], [0152]-[0156].	1-13
A	SCHNEEMANN et al., "A Virus-like Particle that Elicits Cross-Reactive Antibodies to the Conserved Stem of Influenza Virus Hemagglutinin", Journal of Virology, Vol. 86, No. 21, pp. 11686-11697 (2012) See pages 11686-11689; and pages 1-2.	1-13
A	KR 10-2010-0137804 A (HANBAT NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 31 December 2010 See the entire document.	1-13
A	FAN et al., "Targeting the HA2 Subunit of Influenza A Virus Hemagglutinin via CD40L provides Universal Protection against Diverse Subtypes", Mucosal Immunology, Vol. 8, No. 1, pp. 211-220 (January 2015) See the entire document.	1-13
A	US 2012-0014972 A1 (HODGES et al.) 19 January 2012 See the entire document.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 DECEMBER 2015 (10.12.2015)

Date of mailing of the international search report

10 DECEMBER 2015 (10.12.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/009618

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0010583 A	27/01/2014	KR 10-1415836 B1	09/07/2014
KR 10-2010-0137804 A	31/12/2010	KR 10-1145720 B1	14/05/2012
		WO 2010-150982 A2	29/12/2010
		WO 2010-150982 A3	30/06/2011
US 2012-0014972 A1	19/01/2012	CA 2825861 A1	04/08/2011
		CA 2825952 A1	04/08/2011
		CN 102939101 A	20/02/2013
		CN 102946901 A	27/02/2013
		EP 2528622 A2	05/12/2012
		EP 2528623 A2	05/12/2012
		US 2012-0009212 A1	12/01/2012
		WO 2011-094357 A2	04/08/2011
		WO 2011-094357 A3	10/11/2011
		WO 2011-094357 A8	19/04/2012
		WO 2011-094363 A2	04/08/2011
		WO 2011-094363 A3	13/10/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/11(2006.01)i, C07K 16/10(2006.01)i, A61K 39/145(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/11; C12N 15/63; C07K 16/10; C12N 7/01; C12N 15/44; A61K 39/145; A61K 39/395

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 인플루엔자, 헤마글루티닌 스템 도메인(HA2), 범용성 백신, HA2 헬리컬 도메인

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2014-0010583 A (서울대학교산학협력단 등) 2014.01.27 요약; 청구항 1-21; 및 문단 [0008], [0152]-[0156] 참조.	1-13
A	SCHNEEMANN 등, 'A virus-like particle that elicits cross-reactive antibodies to the conserved stem of influenza virus hemagglutinin' Journal of Virology, Vol.86, No.21, pp.11686-11697 (2012) 페이지 11686-11689; 및 도면 1-2 참조.	1-13
A	KR 10-2010-0137804 A (한밭대학교 산학협력단) 2010.12.31 전체 문헌 참조.	1-13
A	FAN 등, 'Targeting the HA2 subunit of influenza A virus hemagglutinin via CD40L provides universal protection against diverse subtypes' Mucosal Immunology, Vol.8, No.1, pp.211-220 (2015.01) 전체 문헌 참조.	1-13
A	US 2012-0014972 A1 (HODGES 등) 2012.01.19 전체 문헌 참조.	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 12월 10일 (10.12.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 12월 10일 (10.12.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0010583 A	2014/01/27	KR 10-1415836 B1	2014/07/09
KR 10-2010-0137804 A	2010/12/31	KR 10-1145720 B1	2012/05/14
		WO 2010-150982 A2	2010/12/29
		WO 2010-150982 A3	2011/06/30
US 2012-0014972 A1	2012/01/19	CA 2825861 A1	2011/08/04
		CA 2825952 A1	2011/08/04
		CN 102939101 A	2013/02/20
		CN 102946901 A	2013/02/27
		EP 2528622 A2	2012/12/05
		EP 2528623 A2	2012/12/05
		US 2012-0009212 A1	2012/01/12
		WO 2011-094357 A2	2011/08/04
		WO 2011-094357 A3	2011/11/10
		WO 2011-094357 A8	2012/04/19
		WO 2011-094363 A2	2011/08/04
		WO 2011-094363 A3	2011/10/13