



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월22일
(11) 등록번호 10-2446975
(24) 등록일자 2022년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7020817(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년06월21일
심사청구일자 2021년07월28일
(85) 번역문제출일자 2021년07월02일
(65) 공개번호 10-2021-0084710
(43) 공개일자 2021년07월07일
(62) 원출원 특허 10-2020-7004751
원출원일자(국제) 2012년06월21일
심사청구일자 2020년03월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/043606
(87) 국제공개번호 WO 2012/177924
국제공개일자 2012년12월27일
(30) 우선권주장
61/501,034 2011년06월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JOURNAL OF VIROLOGY. 2009, vol. 83, no. 11,
pp. 5947-5950.*
JOURNAL OF VIROLOGY. 2008, vol. 82, no. 5,
pp. 2486-2492.
PNAS. 1999, vol. 96, no. 16, pp. 9345-9350.
Influenza A virus (A/1vPR8/34(H1N1)) segment
7, complete sequence, GenBank: EF190985.1,
2007,04.23.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
플루젠, 인코퍼레이티드
미국 위스콘신 53711 매디슨 사이언스 드라이브
597
(72) 발명자
빌셀 파무크
미국 위스콘신 53717, 매디슨, 부스베이 서클 9
하타 야스코
미국 위스콘신 53719, 매디슨, 라스킨 서클 10
(74) 대리인
황의만

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 인플루엔자 바이러스 돌연변이체들 및 그들의 용도들

(57) 요약

본 명세서에서는 돌연변이 바이러스들, 상세하게는 돌연변이 인플루엔자 바이러스들과 관련된 조성물들 및 방법들이 개시된다. 본 명세서에서 개시된 돌연변이 바이러스들은 돌연변이 M2 서열을 포함하고, 면역원성 조성물들에서, 예로 백신들로서 유용하다. 또한 본 명세서에서는 바이러스 돌연변이체들을 증식하는 방법들, 이를 위한 조성물들 및 세포들, 그리고 백신접종 (vaccination)과 관련된 방법들, 장치들 및 조성물들이 개시된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 2039/5254 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/543 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/552 (2013.01)

A61K 2039/58 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

C12N 2760/16162 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이 M 유전자를 포함하는 재조합 인플루엔자 A 바이러스를 포함하는 숙주 세포에 있어서,
상기 돌연변이 M 유전자는 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 786-791에서 또는 M 유전자 코딩 서열에 대한 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 786-791에 대응하는 위치에서 2개의 종결 코돈들과, 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 792-842의 또는 상기 M 유전자 코딩 서열에 대한 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 792-842에 대응하는 위치에서의 결실(deletion)을 포함하는,
숙주 세포.

청구항 2

돌연변이 M 유전자를 포함하는 재조합 인플루엔자 A 바이러스를 포함하는 숙주 세포에 있어서,
상기 돌연변이 M 유전자는 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 786-791에서 또는 M 유전자 코딩 서열에 대한 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 786-791에 대응하는 위치에서 2개의 종결 코돈들과, 서열번호 28의 뉴클레오타이드 52에서, 또는 상기 M 유전자 코딩 서열에 대한 서열번호 28의 뉴클레오타이드 52에 대응하는 위치에서 G에서 C로의 치환(G to C substitution)을 포함하는,
숙주 세포.

청구항 3

돌연변이 M 유전자를 포함하는 재조합 인플루엔자 A 바이러스를 포함하는 숙주 세포에 있어서,
상기 돌연변이 M 유전자는 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 786-791에서 또는 M 유전자 코딩 서열에 대한 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 786-791에 대응하는 위치에서 2개의 종결 코돈들과, 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 792-842의 또는 서열번호 28의 뉴클레오타이드들 792-842에 대응하는 위치에서의 결실(deletion), 및 서열번호 28의 뉴클레오타이드 52에서, 또는 상기 M 유전자 코딩 서열에 대한 서열번호 28의 뉴클레오타이드 52에 대응하는 위치에서 G에서 C로의 치환을 포함하는,
숙주 세포.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 진핵 세포인,
숙주 세포.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 숙주 세포는 2,6-시알산 수용체를 발현하기 위해 변형되는,
숙주 세포.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
상기 세포는 배로 세포 또는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포인,

숙주 세포.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서에서는 돌연변이 바이러스들, 상세하게는 돌연변이 인플루엔자 바이러스들과 관련된 조성물들 및 방법들이 개시된다. 본 명세서에서 개시된 돌연변이 바이러스들은 돌연변이 M2 서열을 포함하고, 면역원성 조성물들에서, 예로 백신들로서 유용하다. 또한 본 명세서에서는 바이러스 돌연변이체들을 증식하는 방법들, 이를 위한 조성물들 및 세포들, 그리고 백신접종(vaccination)과 관련된 방법들, 장치들 및 조성물들이 개시된다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자는 미국 성인들 중에서 주도적인 사망 원인이다. 매년, 약 36,000명의 사람들이 인플루엔자로 사망하고, 200,000명 이상의 사람들이 병원에 입원한다. 인플루엔자는 기침, 재채기에 의해 또한 바이러스를 보유하는 문고리들 및 전화기들과 같은 물체들과의 직접 신체적 접촉을 통하여 전파되는 매우 높은 전염성을 가진 질환이다. 인플루엔자의 증상들은 열, 극도의 피로감, 두통, 한기 및 몸살을 포함하고; 약 50%의 감염된 사람들은 증상은 전혀 없지만 전염성은 여전히 가진다. 순환하는 바이러스 균주의 항원성들이 백신의 것들과 매칭되는 한에 있어서, 면역화(immunization)는 65세 미만의 건강한 사람들에서 인플루엔자를 예방하는 데 70 내지 90% 효과적이다.

[0003] 백신접종(vaccination)은 인플루엔자를 예방하는 주요한 방법이고, 생 약독화(live attenuated) 및 불활성화(살상된) 바이러스 백신들은 현재 사용가능하다. 전형적으로, 비강내로 투여되는 생바이러스 백신들은 면역계의 모든 단계들을 활성화하고 다수의 바이러스 항원들에 대한 면역 반응을 자극할 수 있다. 따라서, 생바이러스들의 사용은 불활성화 바이러스 백신들의 제조과정 동안 일어날 수 있는 바이러스성 항원들의 파손의 문제점을 해결한다. 또한, 생바이러스 백신들에 의해 생산되는 면역성은 일반적으로 불활성화 백신들에 의해 유도되는 면역성보다 더욱 지속적이고, 더욱 효과적이며, 더 많은 교차-반응성을 가지고, 또한 생바이러스 백신들은 불활성화 바이러스 백신들보다 생산하는 데 비용이 덜 든다. 그러나, 약독화된 바이러스에서 돌연변이들은 종종 잘 정의되어 있지 않고, 역전(reversion)이 문제가 되기도 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 관련 출원들의 교차-참조
- [0005] 본 출원은 2011년 6월 24일자로 제출된 미국 가특허출원 제 61/501,034호의 유익을 주장하고, 그의 내용은 본 명세서에서 전부가 참고문헌으로 통합되어 있다.
- [0006] 한 가지 관점에서, 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0007] 한 가지 관점에서, 본 발명은 서열번호 2를 포함하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0008] 한 가지 관점에서, 본 발명은 서열번호 3을 포함하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0009] 한 가지 관점에서, 본 발명은 (i) 프로모터, 및 (ii) 전사 종결 서열과 작동적으로 연결된 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0010] 한 가지 관점에서, 본 발명은 M 유전자에서 돌연변이를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 제공한다. 일정 구현예들에서, 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 포함한다. 일정 구현예들에서, M 유전자에서 돌연변이는 바이러스가 M2 단백질을 발현하지 못하도록 유도하거나, 바이러스가 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 절단된 M2 단백질을 발현하도록 유도한다. 일정 구현예들에서, M 유전자에서 돌연변이는 시험관내 숙주세포 시스템에서 적어도 10회의 계대들 동안 야생형으로 또는 기능적 M2 단백질을

인코딩하는 비-야생형 서열로 전환되지 않는다. 일정 구현예들에서, 본 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스이다. 일정 구현예들에서, 본 바이러스는 바이러스로 감염된 포유동물에서 비-병원성이다. 일정 구현예들에서, 시험관내 세포 시스템은 중국 햄스터 난소 세포들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 시험관내 세포 시스템은 배로(배로) 세포들을 포함한다.

[0011] 한 가지 관점에서, 본 발명은 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 세포를 제공한다. 일정 구현예들에서, 본 세포는 시험관내이다. 일정 구현예들에서, 본 세포는 생체내이다.

[0012] 한 가지 관점에서, 본 발명은 M 유전자에서 돌연변이를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는, 조성물을 제공한다. 일정 구현예들에서, 본 조성물은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 포함한다. 일정 구현예들에서, M 유전자에서 돌연변이는 바이러스가 M2 단백질을 발현하지 못하도록 유도하거나, 바이러스가 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 절단된 M2 단백질을 발현하도록 유도한다. 일정 구현예들에서, 본 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스이다. 일정 구현예들에서, 본 조성물은 조성물이 투여된 포유동물에게 비-병원성이다. 일정 구현예들에서, 본 조성물은 포유동물에게 조성물의 투여 이후 약 3주 이내에 포유동물에서 검출가능한 면역 반응을 나타낸다.

[0013] 한 가지 관점에서, 본 발명은 M 유전자에서 돌연변이를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는, 백신을 제공한다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 포함한다. 일정 구현예들에서, M 유전자에서 돌연변이는 바이러스가 M2 단백질을 발현하지 못하도록 유도하거나, 바이러스가 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 절단된 M2 단백질을 발현하도록 유도한다. 일정 구현예들에서, 본 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스이다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 백신이 투여된 포유동물에게 비-병원성이다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 포유동물에게 백신의 투여 이후 약 3주 이내에 포유동물에서 검출가능한 면역 반응을 나타낸다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 재조합 바이러스에 추가하여 적어도 둘의 서로 다른 인플루엔자 바이러스 균주들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 적어도 하나의 B형 인플루엔자 바이러스 또는 B형 인플루엔자 바이러스 항원을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 적어도 하나의 C형 인플루엔자 바이러스 또는 C형 인플루엔자 바이러스 항원을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 인간 A형 인플루엔자 및 비-인간 종들로부터 나온 유행성 인플루엔자 바이러스들을 포함하는 하나 이상의 바이러스들 또는 바이러스성 항원들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 백신은 H1N1, H2N2 및 H3N2를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 인간 A형 인플루엔자 바이러스를 포함한다.

[0014] 한 가지 관점에서, 본 발명은 재조합 인플루엔자 바이러스를 증식하는 방법으로서: 숙주세포를 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 재조합 인플루엔자 바이러스와 접촉시키는 단계; 상기 숙주세포를 바이러스 복제에 적합한 조건들 하에서 충분한 시간 동안 배양하는 단계; 및 자손 바이러스 입자들을 분리하는 단계;를 포함하는, 방법을 제공한다.

[0015] 한 가지 관점에서, 본 발명은 백신을 제조하는 방법으로서: 숙주세포를 생물배양기에 배치하는 단계; 상기 숙주세포를 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 재조합 바이러스와 접촉시키는 단계; 상기 숙주세포를 바이러스 증식에 적합한 조건들 하에서 충분한 시간 동안 배양하는 단계; 및 자손 바이러스 입자들을 분리하는 단계; 및 백신으로서 투여를 위해 상기 자손 바이러스 입자들을 제형화하는 단계;를 포함하는, 방법을 제공한다.

[0016] 한 가지 관점에서, 본 발명은 개체를 면역화하는 방법으로서: M 유전자에서 돌연변이를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 M 유전자에서 돌연변이는 바이러스가 M2 단백질을 발현하지 못하도록 유도하거나, 바이러스가 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 절단된 M2 단백질을 발현하도록 유도하는, 방법을 제공한다.

[0017] 한 가지 관점에서, 본 발명은 개체에서 A형 인플루엔자 바이러스에 의한 감염의 가능성 또는 중증도를 감소시키는 방법으로서: M 유전자에서 돌연변이를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 M 유전자에서 돌연변이는 바이러스가 M2 단백질을 발현하지 못하도록 유도하거나, 바이러스가 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 절단된 M2 단백질을 발현하도록 유도하는, 방법을 제공한다. 한 가지 구현예들에서, 본 방법은 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 포함한다. 한 가지 구현예들에서, 본 방법은 본 조성물의 적어도 한 번의 추가 자극 용량을 제공하는 단계로서, 적어도 한 번의 추가 자극 용량은 첫 번째 투여 이후 3주째 제공되는, 단계를 포함한다. 한 가지 구현예들에서, 본 발명은 본 조성물을 비강내로, 근육내로, 또는 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 한 가지 구현예들에서, 본 발명은 투여 단계가 피하로 수행되는 것을 포함한다. 한 가지 구현예들에서, 본 발명은 투여 단계가 미세바

늘 전달 장치 (microneedle delivery device)를 사용하여 수행되는 것을 포함한다.

[0018] 한 가지 관점에서, 본 발명은 면역원성 조성물의 피하 투여 방법으로서: (a) (i) 천자 기작 (puncture mechanism); (ii) 피부를 천공할 수 있는 다수의 미세바늘들을 포함하는 면역원성 조성물 층을 포함하는 미세바늘 전달 장치를 제공하고, 면역원성 조성물이 피하로 투여되도록 허용하는 단계; 및 (b) 천자 기작을 억제하는 단계를 포함하고, 상기 면역원성 조성물은 M 유전자에서 돌연변이를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하고, 상기 M 유전자에서 돌연변이는 바이러스가 M2 단백질을 발현하지 못하도록 유도하거나, 바이러스가 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 절단된 M2 단백질을 발현하도록 유도하는, 방법을 제공한다. 일정 구현예들에서, 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 포함한다. 일정 구현예들에서, 미세바늘 어레이는 처음에 장치 수용기의 내부에 위치되고, 레버의 작동 시 미세바늘들이 장치 바닥을 통하여 확장하고 피부 내로 삽입하도록 허용하며, 이에 의해 피부 내로 백신액의 주입을 허용한다.

[0019] 한 가지 관점에서, 본 발명은 M 유전자에서 돌연변이를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스로서, 상기 바이러스는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 배로 세포, 또는 마딘-다비 (Madin-Darby) 고양이 신장세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 미변형된 숙주세포에서는 복제하지 않는, 재조합 바이러스를 제공한다. 일정 구현예들에서, M 유전자에서 돌연변이는 바이러스가 M2 단백질을 발현하지 못하도록 유도하거나, 바이러스가 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 절단된 M2 단백질을 발현하도록 유도한다.

[0020] 한 가지 관점에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 M2 이온 통로 유전자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 세포로서, 상기 핵산은 세포에서 발현되는, 재조합 세포를 제공한다.

[0021] 한 가지 관점에서, 본 발명은 2,6-시알산 수용체 유전자를 포함하는 재조합 세포를 제공한다.

[0022] 한 가지 관점에서, 본 발명은 (i) 바이러스성 M2 이온 통로 유전자, 및 (ii) 2,6-시알산 수용체 유전자를 발현하는 세포성 계층 또는 발현 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다. 일정 구현예들에서, 본 세포는 진핵세포이다. 일정 구현예들에서, 본 진핵세포는 중국 햄스터 난소 세포 또는 배로 세포이다. 일정 구현예들에서, 본 재조합 세포는 인간 인플루엔자 바이러스로서, 기능적 M2 단백질을 발현하지 않는 바이러스를 더 포함한다.

[0023] 한 가지 관점에서, 본 발명은 재조합 인플루엔자 바이러스 입자들을 생산하는 방법으로서, (A) 상기 세포를 인간 인플루엔자 바이러스로 감염시키는 단계로서, 상기 세포는 (i) 기능적 M2 이온 통로 단백질을 전신적으로 발현하거나, (ii) 바이러스 감염 이후에 기능적 M2 이온 통로 단백질을 발현하도록 유도되고, 상기 바이러스는 상기 세포에 의해 발현되는 기능적 M2 이온 통로 단백질들의 존재 시에만 성공적으로 복제하는, 단계; 및 (B) 자손 바이러스 입자들을 분리하는, 단계를 포함하는, 방법을 제공한다. 일정 구현예들에서, 본 방법은 분리된 바이러스성 입자들을 백신으로 제형화하는 단계를 더 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 바이러스는 인간 인플루엔자 바이러스로서, 기능적 M2 단백질을 발현하지 않는, 바이러스를 포함한다.

과제의 해결 수단

[0024] I. 정의들

[0025] 다음의 용어들이 본 명세서에서 사용되고, 그들의 정의들은 안내를 위해 제공된다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 바, 단수 형태들 "하나 (a)", "하나 (an)", 및 "그의 (the)"는 명백하게 단수만을 지칭하도록 진술되지 않은 경우라면 단수 및 복수 둘 다를 말한다.

[0027] 용어 "약 (about)" 및 범위들의 사용은 일반적으로, 용어 약 (about)에 의해 특정되는지 여부와는 상관없이, 해석된 수가 본 명세서에서 설명된 정확한 수에 제한되지 않고 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 실질적으로 인용된 범위 내의 범위를 가지는 것을 말하도록 의도된다. 본 명세서에서 사용되는 바, "약"은 당업자들에게 의해 이해될 것이고 이것이 사용되는 문맥 상에서 일정 정도로 변화할 것이다. 이것이 사용되는 문맥이 주어지는 기술분야의 당업자들에게 명백하지 않은 용어의 사용들이 존재하는 경우라면, "약"은 특정한 용어의 10% 더하기 또는 빼기까지를 의미할 것이다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 바, "개체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용되고, 동물 예를 들면 임의의 척추동물 종의 구성원을 말한다. 현재 개시된 개체물의 방법들 및 조성물들은 포유동물들 및 새들을 포함하는 항온 척추동물들에게 특히 유용하다. 대표적인 개체들은 인간들과 같은 포유동물들, 뿐만 아니라 멸종 위기로 인한 중요성, 경제적 중요성 (인간들에 의한 소비를 위해 농장들에서 사육된 동물들) 및/또는 인간들에게 사회적 중요성을 가지는 포유동물들 및 새들을 포함할 수 있다. 일정 구현예들에서, 개체는 인간이다. 일정 구현예들에서

서, 개체는 인간이 아니다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "유효량" 또는 "치료적 유효량" 또는 "약제학적 유효량"은 원하는 치료적 및/또는 예방적 효과를 달성하기에 충분한 정량, 예로 질환 병태 및/또는 그의 증상(들)의 예방을 가져오는 양을 말한다. 치료적 또는 예방적 적용들의 맥락에서, 개체에게 투여된 조성물의 양은 질환의 유형 및 중증도에 또한 일반적인 건강, 연령, 성별, 체중 및 조성물 약물들에 대한 내성과 같은 개인의 특징들에 의존할 것이다. 이것은 질환 또는 병태의 정도, 중증도 및 유형에도 역시 의존할 것이다. 당업자라면 이들 및 다른 요인들에 의존하여 적당한 용량들을 결정할 수 있을 것이다. 일정 구현예들에서, 복수의 용량들이 투여된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, 복수의 치료적 조성물들 또는 화합물들 (예로, 백신들과 같은 면역원성 조성물들)이 투여된다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "분리된" 및/또는 "정제된"은 핵산 (예로, 벡터 또는 플라스미드), 폴리펩타이드, 바이러스 또는 세포의 *시험관내* 제조, 분리 및/또는 정제를 말하고, 이는 원치않는 *생체내* 물질들과 연관되지 않거나, 정상적으로 함께 발생하는 원치않는 *생체내* 물질들로부터 실질적으로 정제된다. 예를 들면, 일정 구현예들에서, 분리된 바이러스 제조는 *시험관내* 배양 및 전파에 의해 획득되고, 다른 감염성 체제들이 실질적으로 없다. 본 명세서에서 사용되는 바, "실질적으로 없는 (substantially free)"는 해당 화합물 또는 제제의 표준 검출 방법들을 사용하여 원치않는 핵산들, 단백질들, 세포들, 바이러스들, 감염성 체제들 등과 같은 특정한 화합물을 위한 검출의 수준 미만을 의미한다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "재조합 바이러스"는 바이러스 게놈으로 변화들을 도입하고/하거나 바이러스성 단백질들로 변화들을 도입하도록, 예로 재조합 핵산 기법들을 사용하여 *시험관내* 조작되었던 바이러스를 말한다. 예를 들면, 일정 구현예들에서, 재조합 바이러스들은 야생형 내인성 핵산 서열들 및 돌연변이체 및/또는 외인성 핵산 서열들을 둘 다 포함할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, 재조합 바이러스들은 돌연변이체 또는 변이체 기질, 헤마글루티닌 (hemagglutinin), 뉴라미니다제 (neuraminidase), 핵단백질, 비-구조 (non-structural) 및/또는 중합효소 단백질과 같은 변형된 단백질 성분들을 포함할 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "재조합 세포" 또는 "변형된 세포"는 세포 내로 핵산을 도입하고/하거나 세포성 핵산들을 변형하도록, 예로 재조합 핵산 기법들을 사용하여 *시험관내* 조작되었던 세포를 말한다. 재조합 세포들의 예들로는 외인성 플라스미드들, 발현 벡터들 등을 보유하는 원핵 또는 진핵 세포들, 및/또는 그들의 핵산으로 변형들 (예로, 세포성 게놈 내로 치환들, 돌연변이들, 삽입들, 결실들 등)을 포함하는 세포들을 포함한다. 대표적인 재조합 세포는 바이러스성 M2 단백질과 같은 외인성 단백질을 발현하도록 *시험관내* 조작되었던 것이다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "돌연변이체 (mutant)", "돌연변이 (mutation)", 및 "변이체 (variant)"는 상호교환적으로 사용되고, 야생형 서열들과서 다른 핵산 또는 폴리펩타이드 서열을 말한다. 일정 구현예들에서, 돌연변이체 또는 변이체 서열들은 자연적으로 발생한다. 다른 구현예들에서, 돌연변이체 또는 변이체 서열은 재조합으로 및/또는 화학적으로 도입된다. 일정 구현예들에서, 핵산 돌연변이들은 RNA 및/또는 DNA 서열들로 변형들 (예로, 부가들, 결실들, 치환들)을 포함한다. 일정 구현예들에서, 변형들은 화학적 변형 (예로, 메틸화)를 포함하고, 자연적 및/또는 비-자연적 뉴클레오타이드들의 치환 또는 부가도 역시 포함할 수 있다. 핵산 돌연변이들은 침묵 돌연변이들 (예로, 야생형 서열들과 동일한 아미노산을 코딩하는 하나 이상의 핵산 변화들)일 수 있거나 인코딩된 아미노산에서 변화를 유발하고, 종결 코돈을 유발할 수 있거나, 스프라이싱 결함들 또는 스프라이싱 변경들을 도입할 수 있다. 코딩 서열들로 핵산 돌연변이들은 보존적 또는 비-보존적 아미노산 변화들도 역시 유발할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "vRNA"는 분절된 또는 비-분절된 바이러스성 게놈들, 뿐만 아니라 양성 및 음성 가닥 바이러스성 게놈들을 포함하는, 바이러스성 게놈을 포함하는 RNA를 말한다. vRNA는 전적으로 내인성 및 "야생형"일 수 있고/있거나 재조합 및/또는 돌연변이체 서열들을 포함할 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "숙주세포"는 바이러스와 같은 병원균이 복제할 수 있는 세포를 말한다. 일정 구현예들에서, 숙주 세포들은 *시험관내* 배양된 세포 (예로, CHO 세포들, 배로 세포들, MDCK 세포들 등)이다. 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, 숙주 세포들은 *생체내* (예로, 조류 또는 포유류와 같은 감염된 척추동물의 세포들)이다. 일정 구현예들에서, 숙주 세포들은 예로 수주 세포의 바이러스성 감염을 증진하는 것에 의해 및/또는 바이러스 성장율을 증진하는 것에 의해서와 같이 바이러스 생산을 증진하도록 변형될 수 있다. 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, 대표적인 숙주세포 변형들로는 숙주세포의 세포 표면 위 2,6-연결된 시알산 수용체들의 재조합 발현, 및/또는 병원균 또는 바이러스에서 부재 또는 비효과적으로 되었던 숙주 세포들

에서 단백질의 재조합 발현을 포함한다.

- [0036] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "감염된"은 바이러스와 같은 질환 또는 병원균을 보유하는 것을 말한다. 감염은 바이러스 또는 병원균의 투여에 의한 것(예로, 백신접종에 의해)과 같이 의도적이거나, 하나의 유기체로부터 또 다른 유기체까지, 또는 오염된 표면으로부터 유기체까지 병원균의 자연적 전달에 의해서와 같이 비의도적일 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "약독화 (attenuated)"는 바이러스와 결합하여 사용되는 바, 비-약독화 대상과 비교 시 감소된 발병원성 (virulence) 또는 병원성을 가지지만 여전히 생존가능하거나 살아있는 바이러스를 말한다. 전형적으로, 약독화 (attenuation)는 바이러스와 같은 감염성 체제를 비-약독화 바이러스와 대비하여 감염된 개체에게 덜 해롭거나 덜 발병원성을 가진다. 이것은 살상되거나 완전하게 불활성화된 바이러스와는 대조적이다.
- [0038] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "유형 (type)" 및 "균주 (strain)"는 바이러스와 결합하여 사용되는 바 상호 교환적으로 사용되고, 일반적으로 서로 다른 특징을 가지는 바이러스들을 말하는 데 사용된다. 예를 들면, A형 인플루엔자 바이러스는 B형 인플루엔자 바이러스보다는 다른 유형의 바이러스이다. 마찬가지로, A형 인플루엔자 H1N1은 A형 인플루엔자 H2N1, H2N2 및 H3N2보다는 다른 유형의 바이러스이다. 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, A형 인플루엔자 H2N1, H2N2 및 H3N2와 같은 서로 다른 유형의 바이러스는 "아형들 (subtype)"이라고 명명될 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 바, "M2KO" 또는 "M2KO(Δ TM)"은 이것이 사용되는 문맥에 의존하여 서열번호 1, 서열번호 1을 포함하는 바이러스, 또는 서열번호 1을 포함하는 바이러스를 포함하는 백신을 말한다. 예를 들면, 본 명세서에서 도시된 M2 유전자들을 기술하는 데, "M2KO" 또는 "M2KO(Δ TM)"은 서열번호 1을 말한다. 백신의 바이러스 구성성분을 기술할 때, "M2KO" 또는 "M2KO(Δ TM)"은 PR8의 내부의 6개 유전자들 (핵단백질 (NP), 중합효소 유전자들 (PA, PB1, PB2), 비-구조 (NS), 기질 (M))을 소유하지만, 기능적 M2 단백질을 발현하지는 않는 재조합 인플루엔자 바이러스를 말한다. 백신을 기술할 때, "M2KO" 또는 "M2KO(Δ TM)"은 M2KO(Δ TM) 재조합 바이러스를 포함하는 백신을 말한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 바, "M2KO(Δ TM) 바이러스"는 PR8의 내부의 6개 유전자들 (핵단백질 (NP), 중합효소 유전자들 (PA, PB1, PB2), 비-구조 (NS), 기질 (M))을 소유하지만, 기능적 M2 단백질을 단독으로 또는 다른 바이러스 구성성분들 및/또는 다른 바이러스 구성성분들을 인코딩하는 유전자들과 조합으로 발현하지 않는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포괄한다. 일정 구현예들에서, M2KO(Δ TM) 바이러스는 다른 인플루엔자 바이러스들의 유전자들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 바이러스는 A형 인플루엔자/브리스번/10/2007-유사 A/우루과이/716/2007(H3N2)의 HA 및 NA 유전자들을 포함한다. 일정 구현예들에서, M2KO(Δ TM) 바이러스는 A/베트남/1203/2004 (H5N1) 바이러스의 HA 및 NA 유전자들을 포함한다. 일정 구현예들에서, M2KO(Δ TM) 바이러스는 A/캘리포니아/07/2009 (CA07) (H1N1pdm) 바이러스의 HA 및 NA 유전자들을 포함한다.
- [0041] II. A형 인플루엔자 바이러스
- [0042] A. 일반
- [0043] 인플루엔자는 미국 성인들 중에서 주도적인 사망 원인이다. 인플루엔자의 유발원은 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스 및 C형 인플루엔자 바이러스를 포함하는 오르소믹소비리데 (orthomyxoviridae)과의 바이러스들이고, A형 인플루엔자는 인간들에서 가장 보편적이고 가장 큰 병원성을 가진다.
- [0044] A형 인플루엔자 바이러스는 외투막 (envelope)을 가진 음성-가닥 RNA 바이러스이다. A형 인플루엔자 바이러스의 게놈은 11개의 단백질들 (HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2)을 코딩하는 상보적인 8개의 단일 (쌍-미형성) RNA 가닥들 위에 포함된다. 전체 게놈 크기는 약 14,000개 염기들이다. 게놈의 분절 특성은 세포성 동거 (cohabitation) 동안 서로 다른 바이러스 균주들 간의 전체 유전자들의 교환을 허용한다. 8개의 RNA 분절들은 다음과 같다. 1) HA는 헤마글루티닌을 인코딩하고 (약 500개의 헤마글루티닌의 분자들이 하나의 비리온을 만드는 데 필요하다); 2) NA는 뉴라미니다제를 인코딩하고 (약 100개의 뉴라미니다제의 분자들이 하나의 비리온을 만드는 데 필요하다); 3) NP는 핵단백질을 인코딩하고; 4) M은 동일한 RNA 분절로부터 나온 서로 다른 해독틀들을 사용하여 2개의 단백질들 (M1 및 M2)을 인코딩하고 (약 3,000개의 M1 분자들이 하나의 비리온을 만드는 데 필요하다); 5) NS는 동일한 RNA 분절로부터 나온 서로 다른 해독틀들을 사용하여 2개의 단백질들 (NS1 및 NEP)을 인코딩하고; 6) PA는 RNA 중합효소를 인코딩하고; 7) PB1는 동일한 RNA 분절로부터 나온 서로 다른 해독틀들을 사용하여 RNA 중합효소 및 PB1-F2 단백질 (세포사멸을 유도함)을 인코딩하고; 8) PB2는 RNA

중합효소를 인코딩한다.

- [0045] H 숫자 (헤마글루티닌의 유형의 경우) 및 N 숫자 (뉴라미니다제의 유형의 경우)에 따라 명명된 여러 아형들의 A형 인플루엔자가 존재한다. 현재, 기지의 16개 서로 다른 H 항원들 (H1 내지 H16) 및 기지의 9개 서로 다른 N 항원들 (N1 내지 N9)이 존재한다. 각각의 바이러스 아형들은 병원성 프로파일들을 달리하면서 다양한 균주들로, 일정 병원성은 다른 것을 배제한 하나의 중으로, 일정 병원성은 다수의 중들로 돌연변이 되어 왔다. 인간들에서 입증되어 왔던 대표적인 A형 인플루엔자 바이러스 아형들은 이에 제한되는 것은 아니지만, "스페인 독감" 및 2009년 돼지 독감 발병을 유발하였던 H1N1; 1950년대 후반에 "아시아 독감"을 유발하였던 H2N2; 1960년대 후반에 홍콩 독감을 유발하였던 H3N2; 2000년대 중반에 그의 전파를 통하여 전세계적 인플루엔자 유행의 위협이 고려되었던 H5N1; H7N7; 인간들 및 돼지들에서 현재 유행하는 H1N2; 및 H9N2, H7N2, H7N3, H5N2, H10N7을 포함한다.
- [0046] 일정 A형 인플루엔자 변이체들이 확인되었고 그들이 가장 유사하여 계열을 공유하는 것으로 추정된 기지의 분리물에 따라 (예로, 후지 독감 바이러스-유사); 그들의 전형적인 숙주에 따라 (예를 들면 인간 독감 바이러스); 그들의 아형에 따라 (예를 들면 H3N2); 및 그들의 병원성에 따라 (예를 들면 LP, 저-병원성) 명명된다. 따라서, 분리물 A/후지/411/2002(H3N2)와 유사한 바이러스로부터 나온 독감은 후지 독감, 인간 독감, 및 H3N2 독감이라고 불릴 수 있다.
- [0047] 또한, 인플루엔자 변이체들은 때로 균주가 유행하거나 적응된 종 (숙주)에 따라 명명된다. 이러한 관행을 사용하여 명명된 주요한 변이체들은: 조류 독감, 인간 독감, 돼지 인플루엔자, 말 인플루엔자 및 고양이 인플루엔자. 변이체들은 또한 가금류, 특히 닭들 예로 저-병원성 조류 인플루엔자 (LPAI) 및 고-병원성 조류 인플루엔자 (HPAI)에서 그들의 병원성에 따라 명명되어 왔다.
- [0049] B. 생활환 및 구조
- [0050] 인플루엔자 바이러스들의 생활환은 일반적으로 세포 표면 수용체들과의 부착, 세포 내로 진입 및 바이러스성 핵산들의 탈외피 (uncoating)가 관여하고, 세포 내에서 바이러스성 유전자들의 복제로 이어진다. 바이러스성 단백질들 및 유전자들의 새로운 사본들의 합성 이후에, 이들 구성성분들은 자손 바이러스 입자들 내로 조립되고, 이는 다음으로 세포를 탈출한다. 서로 다른 바이러스성 단백질들은 이들 각각의 단계들에서 역할을 담당한다.
- [0051] A형 인플루엔자 입자는 바이러스 코어를 피막화하는 지질 외투막 (envelop)으로 만들어진다. 외투막의 내부는 기질 단백질 (M1)에 의해 내층이 형성되는 한편, 외부 표면은 2가지 유형들의 당단백질 스파이크들을 특징으로 한다; 헤마글루티닌 (HA) 및 뉴라미니다제 (NA). 막통과 이온 통로 단백질인 M2도 역시 지질 외투막의 일부이다. 예로, 도 1을 참조하라.
- [0052] 삼량체의 제 I형 막 단백질인 HA 단백질은 숙주세포 표면의 당단백질들 또는 당지질들 상의 시아릴올리고사카라이드들 (갈락토스와 연결된 말단 시알산을 포함하는 올리고사카라이드들)와의 결합을 부여한다. 이러한 단백질은 세포내이입 (endocytosis)에 의한 비리온 내입 (internalization)에 이어지는 바이러스 및 숙주세포 막들 간의 융합도 역시 부여한다.
- [0053] 삼량체의 제 II형 막 단백질인 뉴라미니다제 (NA)는 숙주 세포들 및 HA 및 NA의 당결합체들로부터 말단 시알산 잔기들을 절단하는 시알리다제 (sialidase)이고, 따라서 수용체-파괴 효소로서 인식된다. 이러한 시알리다제 활성은 숙주세포 표면으로부터 자손 비리온들의 효율적인 방출, 뿐만 아니라 다른 당단백질들과 바이러스성 HA들의 결합 활성으로 인한 자손 응집의 예방을 위해 필요하다. 따라서, HA의 수용체-결합 활성 및 NA의 수용체-파괴 활성은 상호균형들로서 작용하는 것 같고, 인플루엔자의 효율적인 복제를 허용한다.
- [0054] 게놈 분절들은 바이러스 입자의 코어 내로 포장된다. RNP (핵단백질, NP를 더한 RNA)는 각각의 분절과 연관된 3개의 바이러스성 중합효소 폴리펩타이드들을 가진 나선 형태로 존재한다.
- [0055] 인플루엔자 바이러스의 생활환은 숙주세포의 표면 위에서 시알산-포함 수용체들과 HA의 결합으로 시작하고, 수용체-매개성 세포내이입으로 이어진다. 도 1. 후기 엔도솜들에서 낮은 pH는 HA의 입체형태적 변동 (shift)을 촉발하고, 이에 의해 HA 소단위 (소위 융합 펩타이드)의 N-말단을 노출한다. 융합 펩타이드는 바이러스 및 엔도솜 막의 융합을 개시하고, 기질 단백질 (M1) 및 RNP 복합체들은 세포질 내로 방출된다. RNP들은 핵단백질 (NP)로 구성되고, 이는 vRNA, 또한 PA, PB1, 및 PB2에 의해 형성되는 바이러스성 중합효소 복합체를 캡시드로 둘러싼다. RNP들은 전사 및 복제가 일어나는 핵 내로 운반된다. RNA 중합효소 복합체는 3가지 다른 반응들을 촉매화한다: (1) 5' 캡 및 3' 폴리A 구조를 가진 mRNA, (2) 전장의 상보적 RNA (cRNA), 및 (3) cDNA를 주형으로 사용하는 게놈 vRNA의 합성. 새로이 합성된 vRNAs, NP, 및 중합효소 단백질들은 다음으로 RNP들로 조립되

고, 핵으로부터 방출되며, 세포질 막으로 운반되어 자손 바이러스 입자들의 출아 (budding)가 일어난다. 뉴라미니다제 (NA) 단백질은 시아릴올리고사카라이드들로부터 시알산을 제거하고, 이에 따라 세포 표면으로부터 새로이 조립된 비리온들을 방출하고, 바이러스 입자들의 자가 응집 (self aggregation)을 방지하여 감염의 후기에 역할을 담당한다. 바이러스 조립은 단백질-단백질 및 단백질-vRNA 상호작용들이 관여하더라도, 이들 상호작용들의 특성은 대부분이 미지로 남아있다.

[0056]

[0057]

C. M2 단백질의 역할

[0058]

상기에 기술된 바와 같이, 3가지 단백질들이 바이러스성 막에 흩어져있다: 헤마글루티닌 (HA), 뉴라미니다제 (NA), 및 M2. HA 및 NA의 세포외 도메인들 (엑토도메인들)은 매우 가변적인 한편, M2의 엑토도메인 도메인은 필수적으로 A형 인플루엔자 바이러스들 중에서 비가변적이다. 이론에 의해 얽매이려고 하지 않더라도, A형 인플루엔자 바이러스들에서, 이온 통로 활성을 소유하는 M2 단백질은 바이러스성 RNA의 숙주세포 침투 및 탈외피 사이의 바이러스 생활환의 초기 상태에서 기능하는 것으로 생각된다. 일단 비리온들이 세포내이입을 거쳤던 경우라면, 비리온-연관된 M2 이온 통로, 동중사량체 (homotetramer)의 나선 다발은 양성자들이 엔도솜으로부터 비리온 내부로 유동하여 산-불안정 M1 단백질-리보핵산단백질 복합체 (RNP) 상호작용들을 파괴하고, 이에 의해 세포질로 RNP 방출을 촉진하도록 허용하는 것으로 여겨진다. 또한, HA들이 세포내 절단되는 일정 인플루엔자 균주들 중에서 (예로, A/가금류 전염병들/로스트록 (Rostock)/34), M2 이온 통로는 골지-통과 망의 pH를 올리고, 이러한 구획에서 낮은 pH의 조건들로 인한 HA의 입체형태적 변화들을 방지하는 것으로 생각된다. 또한 M2 막통과 도메인은 스스로 이온 통로로서 기능할 수 있는 점도 관찰되었다. M2 단백질 이온 통로 활성은 M2 이온 통로 활성을 차단하는 아만타딘 염산 (amantadine hydrochloride)이 바이러스성 복제를 저해하는 것으로 확인되어 왔기 때문에, 인플루엔자 바이러스들의 생활환에서 필수적인 것으로 생각된다. 그러나, A형 인플루엔자 바이러스들의 복제에서 이러한 활성을 위한 요구가 직접적으로 설명되지는 않았다. M2 단백질의 구조는 도 2에 나타나 있다. M2 단백질의 핵산 서열은 M1 서열과 함께 도 3에 나타나 있다.

[0059]

B형 및 C형 인플루엔자 바이러스들이 구조적으로 및 기능적으로 A형 인플루엔자 바이러스와 유사하더라도, 일정 차이점들이 존재한다. 예를 들면, B형 인플루엔자 바이러스는 이온 통로 활성을 가진 M2 단백질을 가지지 않는다. 대신에, NA 유전자의 산물인 NB 단백질은 이온 통로 활성을 가지는 것 같고 따라서 A형 인플루엔자 바이러스 M2 단백질과 유사한 기능을 가진다. 유사하게, C형 인플루엔자 바이러스는 이온 통로 활성을 가진 M2 단백질을 가지지 않는다. 그러나, C형 인플루엔자 바이러스의 CM1 단백질은 이러한 활성을 가지는 것 같다.

[0061]

III. M2 바이러스 돌연변이체들

[0062]

한 가지 관점에서, 돌연변이 M2 vRNA 서열을 보유하는 A형 인플루엔자 바이러스들이 개시된다. 전형적으로, 이러한 돌연변이체들은 M2 이온 통로 활성을 가지지 않고 *생체내* 약독화 성장 성질들을 나타내고, 감염성 자손을 생산할 수 없으며 비-병원성이거나 감염된 개체들에서 감소된 발병기전을 보여준다. 돌연변이 바이러스들은 면역 원성을 가지고, 백신으로서 사용될 때 상대방 야생형 및/또는 다른 병원성 바이러스로의 감염에 대한 보호작용을 제공한다. 추가적으로, 본 명세서에서 개시된 M2 돌연변이체들은 안정하고, 사용된 숙주세포와는 상관없이 기능적 M2 폴리펩타이드를 발현하도록 돌연변이되지 않는다. 추가적으로 또는 임의적으로, 일정 구형예들에서, 이들 돌연변이체들의 M1 단백질은 그의 기능의 검출가능한 변경이 없이도 생산된다. 일정 구형예들에서, 돌연변이 M2 핵산 서열들을 보유하는 바이러스들은 해당하는 야생형 바이러스가 증식될 수 없는 숙주세포에서는 복제할 수 없다. 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, 일정 구형예들에서, 야생형 바이러스는 배양하는 MDCK 세포들, CHO 세포들 및/또는 배로 세포들에서 성장되고 증식되고 복제할 수 있는 한편, 돌연변이 M2 서열을 보유하는 해당하는 바이러스는 동일한 유형의 세포들에서 성장하거나, 복제하거나, 증식될 수 없다.

[0063]

상기에서 기술된 바와 같이, 일정 구형예들에서, M2 돌연변이 바이러스는 안정하고, 숙주세포에서 야생형으로 또는 기능적 M2 단백질을 인코딩하는 비-야생형 서열로 돌연변이 또는 역전하지 않는다. 예를 들면, 일정 구형예들에서, M2 돌연변이 바이러스는 2회 계대들, 3회 계대들, 5회 계대들, 10회 계대들, 12회 계대들, 15회 계대들, 20회 계대들, 또는 25회 이상 계대들 동안 숙주세포에서 안정하다. 일정 구형예들에서, 숙주세포는 미변형된 숙주세포이다. 다른 구형예들에서, 숙주세포는 M2 단백질을 발현하는 MDCK 세포와 같은 변형된 숙주세포이다.

[0064]

일정 구형예들에서, M2 돌연변이들은 하나 이상의 핵산 치환들 및/또는 결실들을 포함한다. 일정 구형예들에서, 돌연변이들은 M2 단백질의 세포외 도메인, M2 단백질들의 막통과 도메인 및/또는 M2 단백질의 세

포질 미단의 하나 이상을 코딩하는 핵산들에 위치된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, 하나 이상의 핵산 돌연변이들은 M2 펩타이드의 스프라이싱 변이체, 하나 이상의 종결 코돈들 및/또는 하나 이상의 아미노산 결실들을 유발한다. 일정 구현예들에서, 돌연변이 M2 핵산을 보유하는 바이러스들은 비-기능적 M2 폴리펩타이드를 생산한다. 일정 구현예들에서, 돌연변이 M2 핵산을 보유하는 바이러스들은 M2 폴리펩타이드를 생산하지 않는다. 일정 구현예들에서, 돌연변이 M2 핵산을 보유하는 바이러스들은 절단된 M2 폴리펩타이드를 생산한다. 일정 구현예들에서, 절단된 M2 폴리펩타이드는 아미노산 서열 MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD을 가진다.

[0065] 3가지 대표적인 비제한적 M2 바이러스 돌연변이들 (M2-1, M2-2 및 M2-3)이 하기 표 1 내지 표 3에서 제공된다. 도표들에서, 하부 케이스 문자들은 M2 서열에 해당하고; 상부 케이스 문자들은 M1 서열에 해당하고; 돌연변이 서열 (예로, 종결 코돈들, 스프라이싱 결함)은 굵게 밑줄로 표시된다. M2-2 돌연변이에서 밑줄 친 (하부 상자) 염기들은 M2-1 및 M2-3 돌연변이들에서 결실된 부위를 가리킨다.

표 1

표 1: M2-1 -(서열번호 1) M2 엑토도메인 + 2 개 종결 코돈들 + TM 결실 (PR8 M 분절 + 792 내지 842 번 (TM)이 없는 2 개 종결들 (786 내지 791 번); “M2KOTMdel,” “M2KOΔTM.”로서도 역시 알려짐

3'AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGatgagtcttctaaccgaggtcgaaacGTACGTACTCTCT
ATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCT
TTGCAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACC
AATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCCTGTC
CCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAA
CGGGGATCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAACTGTATAGGAAGCTCAAGAG
GGAGATAACATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCA
CTTGCCAGTTGTATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGGGCTGTGACCACTGAAG
TGGCATTGTCCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCCCAGCATCG
GTCTCATAGGCAAATGGTGACAACAACCAATCCACTAATCAGACATGAGAACAG
AATGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGT
GAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGACAAATGGTGCAA
GCGATGAGAACCATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATC
TTCTTGAAAATTTGCAGGcctatcagaaacgaatgggggtgcagatgcaacgggtcaagtgaTAAATAGgatcgt
cttttttcaaatgcattaccgtcgctttaatacggactgaaaggaggccttctacggaaggagtccaaagtctatgaggaagaat
atcgaaaggacagcagagtgctgtggatgctgacgatggctatttctcagcatagagctggagtaaAAACTACCTTGT
TTCTACT

[0066]

[0067] 이러한 돌연변이로부터 생산된 M2 폴리펩타이드 서열은 다음과 같다:

[0068] MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD. (서열번호 4).

표 2

표 2: M2-2 – 서열번호 2 M2 엑토도메인 + 2 개 종결들 + 스프라이싱 결함 (PR8 M 분절 + 2 개 종결들 (786 내지 791 번) + 스프라이싱 결함 nt 52) (“Splice def M2KO” 또는 “Splice def”로서도 역시 알려짐)

3' AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGatgagcttctaaccgaggtcgaaacCTACGTACTCTCTA
TCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTTG
CAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATC
CTGTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCCAGT
GAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGA
TCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAA
CATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACCTTGCCAGTT
GTATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGGGCTGTGACCACTGAAGTGGCATTGTC
CTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCCCAGCATCGGTCTCATAGGCAA
ATGGTGACAACAACCAATCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTTTTAGCCAG
CACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGG
CCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGACAAATGGTGCAAGCGATGAGAACCATTGGG
ACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTGAAAATTTGCAGgcctat
cagaaacgaatgggggtgcagatgcaacgggtcaagtgatTAATAGatattgccgcaaatatcattgggatcttgacattgt
ggattcttgatgctctttttcaaatgcattaccgtcgctttaataacggactgaaaggaggcgctctacggaaggagtgcgaagtctatga
gggaagaatatcgaaaggacagcagagtgtgtggatgctgacgatggatcatttgcagcatagagctggagtaaAAACTAC
CTTGTTTCTACT

[0069]

[0070]

M2 폴리펩타이드 서열은 이러한 돌연변이로부터 전혀 생산되지 않는다.

표 3

표 3: M2-3 – 서열번호 3 M2 엑토도메인 + 2 개 종결들 + 스프라이싱 결함 + TM 결실 (PR8 M 분절 + 792 내지 842 번 (TM)이 없는 2 개 종결들 (786 내지 791 번) + 스프라이싱 결함 nt 52) (TMdel + Splice def M2KO 로서도 역시 알려짐)

3' AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGatgagcttctaaccgaggtcgaaacCTACGTACTCTCTA
TCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTTG
CAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATC
CTGTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCCAGT
GAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGA
TCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAA
CATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACCTTGCCAGTT
GTATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGGGCTGTGACCACTGAAGTGGCATTGTC
CTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCCCAGCATCGGTCTCATAGGCAA
ATGGTGACAACAACCAATCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTTTTAGCCAG
CACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGG
CCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGACAAATGGTGCAAGCGATGAGAACCATTGGG
ACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTGAAAATTTGCAGgcctat
cagaaacgaatgggggtgcagatgcaacgggtcaagtgatTAATAGatcgctctttttcaaatgcattaccgtcgctttaataacgg
actgaaaggaggcgctctacggaaggagtgcgaagtctatgaggaagaatatcgaaaggacagcagagtgtgtggatgctgacg
atggatcatttgcagcatagagctggagtaaAAACTACCTTGTTTCTACT

[0071]

[0072]

M2 폴리펩타이드 서열은 이러한 돌연변이로부터 전혀 생산되지 않는다.

[0073]

추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, M2 돌연변이들은 세포질 미단 내로 도입된다. 도 2. M2 단 백질 세포질 미단은 감염성 바이러스 생산의 매개인자이다. 일정 구현예들에서, M2 세포질 미단의 절단들은 감

염성 바이러스 역가들의 감소, 포장된 바이러스성 RNA의 감소, 출아 사건들의 감소, 및 출아 효율의 감소를 유발한다. 5' 서열은 게놈 포장을 위해 3' 서열보다 더 중요하고, 더 긴 5' 서열이 게놈 포장을 위해 더 좋은 것으로 확인되어 왔다. 또한, 연구들은 뉴클레오타이드 길이가 중요하고 실제적 서열은 덜 중요한 점을 보여주었다 (무작위 서열들이 바이러스들을 생성하기에 충분하다). 안정한 M2 세포질 미단 돌연변이체들은 개발하는 데 도전적이었으며, 문헌에는 돌연변이 역전 (reversion)의 수많은 예들을 포함한다.

[0074] 예를 들면, Pekosz *et al* JVI, 2005; 79(6): 3595-3605에서는 아미노산 위치 70번에서 2개의 코돈들을 종결 코돈들로 치환하였지만, 바이러스는 바로 역전되었다. 또 다른 대표적인 M2 세포질 미단 돌연변이는 M2del11라고 명명되었다. M2del11 돌연변이에서는, 11개 아미노산 잔기들이 세포질 미단으로부터 결실된다. 이러한 결단은 2개의 종결 코돈들의 도입으로 인하고, 전장의 M2 폴리펩타이드가 만들어지지 않는다. 이러한 돌연변이체는 M2를 발현하는 MDCK 세포들 (M2CK)에서 계대될 때 안정한 한편, 정상 M2CK 세포들에서 계대되는 동안 전장의 M2로 역전된다 (J Virol. 2008 82(5): 2486-92). 이론에 의해 얽매이려고 하지 않더라도, 역전은 MDCK 세포들에서 선택적 압력으로 일어나는 것 같다.

[0075] 또 다른 M2 세포질 미단 돌연변이체인 M2 Stop90 ala78-81는 바이러스 역가를 감소시키지 않았지만, 알라닌 70 내지 77번은 감소시켰다 (JVI 2006; 80 (16) p8178-8189). 알라닌-스캐닝 실험들은 또한 M2 미단의 위치들 74 내지 79번에서 아미노산들이 비리온 형태형성 (morphogenesis)에서 역할을 담당하고 바이러스 감염성에 영향을 주는 것을 가리켰다 (J Virol. 2006 80(11): 5233-40).

[0076] 이에 따라, 상기에 기술된 것들과는 다른 특징들을 가진 새로운 세포질 돌연변이체들이 본 명세서에서 제시된다. 예를 들면, 일정 구현예들에서, 세포질 돌연변이체들은 MDCK 세포들에서 안정하다 (전장의 M2 폴리펩타이드를 발현하도록 역전되지 않는다). 일정 구현예들에서, 세포질 돌연변이체들은 2회 계대들, 3회 계대들, 5회 계대들, 10회 계대들, 15회 계대들, 20회 계대들, 25회 계대들 또는 25회 이상의 계대들 동안 숙주 세포에서 안정하다.

[0077] 야생형 M2 폴리펩타이드는 하기 표 4에 나타나 있다. 각각의 서열들의 경우, 굵은 문자는 막통과 도메인을 가리킨다. 세포외 도메인이 첫 번째 (왼쪽)이고, 막통과 도메인 (중앙) 및 세포질 미단 서열 (오른쪽)이 이어진다.

표 4

표 4: 야생형 M2 폴리펩타이드 및 세포질 미단 돌연변이체들
<p>야생형 M2 폴리펩타이드</p> <p>MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILDRLFFKCIYRRFKYGLKGGPSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE</p>
<p>M2-4: M2del FG#1; M2 의 44 내지 54 번 aa 결실 (뉴클레오타이드들 843 내지 875 번; 11 개 aa 결실)</p> <p>MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILFKYGLKGGPSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE</p>
<p>M2-5: M2del FG#2; M2 의 44 내지 48 번 aa 결실 (뉴클레오타이드들 843 내지 857 번; 5 개 aa 결실)</p> <p>MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILKCIYRRFKYGLKGGPSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE</p>
<p>M2-6: M2del FG#3; M2 의 44 및 45 번 aa 결실 (뉴클레오타이드들 843 내지 848 번; 2 개 aa 결실)</p> <p>MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILLFFKCIYRRFKYGLKGGPSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE</p>

[0078]

[0079]

M2-4 (M2del FG#1)는 정상 MDCK 세포들에서 생성되었지만 계대가능하지 않았고, 그러나 변형된 숙주세포 (예로, 야생형 M2 폴리펩타이드를 발현하는 세포)에서는 계대가능할 수 있다. M2-5 (M2del FG#2) 및 M2-6 (FG#3)은 정상 MDCK 세포들에서 생성되고 계대되었다. 이들 바이러스들의 M 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 MDCK 세포들에서 적어도 10회 계대들에 이르기까지 안정하다. 이들 돌연변이체들은 마찬가지로 다른 세포들에서 증식되고 계대될 수 있다 (예로, 인플루엔자 복제를 지지하는 세포들). 또한 이들 돌연변이체들은 약독화되지 않으며 병원성인 것으로 밝혀졌다.

[0080]

하기 실시예들에서 기술된 바와 같이, 본 명세서에서 기술된 M2 돌연변이 바이러스들은 호흡관에서 복제하지 않거나 담비 모델에서 다른 기관들로 전염되지 않으며 담비 모델에서 전파되지 않는다. M2 돌연변이체를 포함하는 백신들은 포유동물들에서 강한 면역 반응들을 나타내고, 인플루엔자 바이러스 도전에 대해 포유동물들을 보호한다. M2KO 바이러스는 마우스들에서 체액성 및 점막성 면역 반응들 둘 다를 나타내고, 치사성 동종아형 및 이종아형 도전으로부터 마우스들을 보호한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같은 M2 돌연변이 바이러스를 포함하는 백신들은 인플루엔자 도전에 대한 효과적인 보호작용을 제공하고 포유동물 숙주들에서 약독화되는 장점을 가진다. 이들 연구들은 본 명세서에서 기술된 M2 돌연변이 바이러스들이 인플루엔자에 대한 백신들에 유용한 것을 기술한다.

[0082]

IV. 세포-기초 바이러스 생산 시스템

[0083]

A. "첫 번째 세대" 돌연변이 바이러스들을 생산하는 것

[0084]

돌연변이 M2 핵산을 보유하는 것들과 같은 돌연변이 바이러스는 본 명세서에서 그의 전부가 참고문헌으로 통합되어 있는 Neumann *et al.*, *Generation of influenza A viruses entirely from clone cDNAs*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9345-9350 (1999)에 의해 기술된 바와 같이, 플라스미드-기초 역전 유전학 (reverse genetics)에 의해 생성될 수 있다. 간략하게, 진행 숙주 세포들은 8개의 바이러스 RNA들을 인코딩하는 하나 이상의 플라스미드들로 형질전환된다. 각각의 바이러스 RNA 서열은 RNA 중합효소 I 프로모터 및 RNA 중합효소 I 종결인자에 의해 끼여있다. 명확하게는, M2 단백질을 인코딩하는 바이러스 RNA는 돌연변이 M2 핵산 서열을 포

함한다. 숙주세포는 추가적으로 야생형 M2 단백질을 포함하는 바이러스 단백질들 (예로, 중합효소들, 핵단백질들 및 구조 단백질들)을 인코딩하는 하나 이상의 발현 플라스미드로 형질전환된다. 바이러스성 RNA 플라스미드들로 숙주세포의 형질전환은 이 중의 하나는 돌연변이 M2 서열을 보유하는 모두 8개의 인플루엔자 바이러스성 RNA들의 합성을 가져온다. 공동-형질전환된 바이러스 중합효소들 및 핵단백질들은 바이러스성 RNA들을 복제되고 전사되는 기능적 vRNP들로 조립하고, 궁극적으로 돌연변이 M2 핵산 서열을 가지긴 하지만 바이러스 지질 외투막 내로 통합되는 기능적 M2 폴리펩타이드를 가지는 감염성 인플루엔자 바이러스를 형성한다.

[0085] 대안의 "첫 번째 세대" 돌연변이 바이러스를 생산하는 방법들로는 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되는 Enami and Palese, *High-efficiency formation of Influenza virus transfectants*, J. Virol. 65(5): 2711-2713에서 기술된 바와 같은, *시험관내* 생성된 재조합 RNA 분자들로 인플루엔자 바이러스 유전자들의 치환율을 허용하는 리보핵산단백질 (RNP) 형질전환 시스템을 포함한다.

[0086] 바이러스성 RNA는 *시험관내*에서 합성되고, RNA 전사체들은 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되는 Luytjes *et al.*, *Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by Influenza virus*, Cell 59: 1107-1113에 의해 기술된 바와 같이, 형질전환된 세포에서 생물학적으로 활성을 가진 RNP로서 작용하는 바이러스 핵단백질 (NP) 및 중합효소 단백질들로 코팅된다.

[0087] RNP 형질전환 (transfection) 방법은 4가지 단계들로 나눌 수 있다: 1) RNA의 제조: 인플루엔자 바이러스 분절을 코딩하는 플라스미드 DNA는 *시험관내* 전사 반응에서 음성-센스 RNA로 전사된다; 2) RNA의 캡시드 형성: 전사된 RNA는 다음으로 구매 정제된 NP 및 파괴된 인플루엔자 바이러스로부터 분리된 중합효소 단백질들과 혼합되어 생물학적으로 활성을 가진 RNP 복합체를 형성한다; 3) 캡시드 형성된 RNA의 형질전환 및 복구: 인공 리보핵산캡시드는 복구된 유전자와 다른 유전자를 포함하는 헬퍼 인플루엔자 바이러스로 미리 감염된 세포들로 형질전환되고, 헬퍼 바이러스는 형질전환된 RNA를 증폭시킨다; 4) 형질전환된 유전자의 선별: 헬퍼 바이러스 및 복구된 유전자를 포함하는 형질전환체는 둘 다 배양 상청액에 존재하기 때문에, 항체들을 사용하는 적당한 선별 시스템이 형질전환된 유전자를 보유하는 바이러스를 분리하는 데 필요하다.

[0088] 선별 시스템은 특이적 생물학적 및 분자적 특징들로 새로운 형질전환체 인플루엔자 바이러스들의 생성을 허용한다.

[0089] 예를 들면, M2 단백질을 발현하지 않는 M2 유전자를 포함하는 형질전환체 또는 돌연변이 바이러스는 야생형 기능적 M2 단백질을 안정적으로 발현하도록 변형되었던 적합한 포유동물 세포주에서 성장될 수 있다. 야생형 M2 유전자를 발현하는 헬퍼 바이러스의 복제, 따라서 막 표면에서 M2e 단백질을 예방하거나 저해하기 위하여, M2e에 대한 항체들이 사용될 수 있다. 이러한 항체들은 시판되고 있으며, 헬퍼 바이러스의 복제를 저해하고 돌연변이 M2를 포함하는 형질전환체/돌연변이체 바이러스가 성장하고 상청액에서 농축되도록 허용할 것이다. M2e 항체들에 의한 인플루엔자 바이러스 복제의 저해는 이전에 *Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions*, J Virol 62: 2762-2772 (1988) 및 Treanor *et al*, *Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits Influenza A virus replication in mice*, J. Virol. 64: 1375-1377 (1990)에서 기술되어 왔다.

[0090] 추가적으로 또는 대안적으로, 동일한 항체들이 헬퍼 바이러스를 '포획'하는 데 사용되고, 형질전환체의 농축을 허용할 수 있다. 예를 들면, 항체들은 조직 배양 접시의 바닥을 코팅하는 데 사용될 수 있거나 상청액 또는 용출물에서 형질전환체의 농축을 허용하는 컬럼 기질에 사용될 수 있다.

[0091] 형질전환 바이러스는 다중-웰 플레이트들로의 제한 희석에 의해 M2를 발현하는 세포들에서 성장되고, 다음으로 예를 들면 복제본 플레이트들 (replica plate)을 만들어 확인되고 클론될 수 있다. 예를 들면, 성장된 바이러스를 포함하는 다중-웰 플레이트의 주어진 웰의 분량의 절반은 MDCK 세포들을 감염시키는 데, 또한 나머지 절반은 M2 단백질을 발현하는 MDCK 세포들을 감염시키는 데 사용될 수 있다. 형질전환 바이러스 및 헬퍼 바이러스 둘 다는 M2 단백질을 발현하는 MDCK 세포들에서 성장할 것이다. 그러나, 헬퍼 바이러스만이 형질전환체를 포함하는 다중-웰 플레이트에서 웰 확인을 허용하는 표준 MDCK 세포들에서 성장할 것이다. 형질전환 바이러스는 또한 M2 단백질을 발현하는 세포들에서 플라크 정제될 수 있다.

[0093] B. 바이러스 돌연변이체들을 증식하는 것

[0094] 일정 구현예들에서, 본 명세서에서 기술된 바이러스 돌연변이체들은 숙주 세포들에서 유지되고 계대된다. 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, A형 인플루엔자 바이러스 돌연변이체들과 같은 인플루엔자 바이러스 돌연변이체들의 성장에 적당한 대표적인 숙주 세포들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 마딘-다비 (Madin-Darby) 고양이

신장 세포들 (MDCK 세포들), 아프리카 녹색 원숭이 세포들 (예로, 베로 세포들)과 같은 원숭이 세포들, CV-1 세포들 및 레서스 원숭이 신장 세포들 (예로, LLCmk.2 세포들), 소 세포들 (예로, MDBK 세포들), 돼지 세포들, 담비 세포들 (예로, 밍크 폐 세포들), BK-1 세포들, 설치동물 세포들 (예로, 중국 햄스터 난소 세포들), 인간 세포들 예로 인간 배아 망막 세포들 (예로, PER-C6®), 293T 인간 배아 신장 세포들 및 배아 섬유모세포들을 포함하는 조류 세포들을 포함하는, 임의의 많은 진핵 세포들을 포함한다.

[0095] 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, 진핵 숙주세포는 예로 숙주세포의 바이러스성 감염을 증진하는 것에 의해 및/또는 바이러스 성장율을 증진하는 것에 의해 바이러스 생산을 증진하도록 변형된다. 예를 들면, 일정 구현예들에서, 숙주세포는 세포 표면 상에 2,6-연결된 시알산을 발현하거나 이의 증가된 발현을 가지도록 변형되고, 돌연변이 또는 야생형 A형 인플루엔자 바이러스들에 의한 이들 세포들의 더욱 효율적이고 효과적인 감염을 허용한다. 예로, 본 명세서에서 그들의 전부가 참고문헌으로 통합되어 있는 미국 특허 공고 제 2010-0021499호 및 미국 특허 제 7,176,021호를 참조하라. 따라서, 일정 도시적 구현예들에서, 2,6-시아릴전이 효소 유전자 (ST6Gal 1)의 적어도 하나의 사본을 발현하도록 변형된 중국 햄스터 난소 세포들 (CHO 세포들) 및/또는 베로 세포들이 사용된다. 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, 기탁번호 제 BC040009.1호로 표시되는 호모 사피엔스 ST6 베타-갈락토사마이드 알파-2,6-시아릴전이효소 유전자 서열은 CHO 세포들 내로 도입되고 이에 의해 발현될 수 있는 ST6Gal 유전자의 하나의 예이다. 기능적 ST6Gal I 유전자 산물을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상의 사본들이 세포 내로 조작될 수 있다. 즉, ST6Gal I 유전자의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 12개 이상의 사본들을 발현하도록 안정하게 형질전환되었던 세포들이 사용될 수 있다. 단일 발현 카세트는 발현될 ST6Gal I 유전자의 하나 이상의 사본들을 포함할 수 있고, 이는 ST6Gal I 유전자 또는 그의 사본들의 발현을 용이하게 하도록 프로모터들, 인핸서들, 및 종결인자 및 폴리아데닐화 신호 서열들과 같은 조절 요소들과 작동적으로 연결된다. 대안적으로, 단일 발현 카세트는 ST6Gal I 유전자의 하나의 사본을 발현하도록 조작되고, 다수의 발현 카세트들이 숙주세포 게놈 내로 도입될 수 있다. 이에 따라, 일정 구현예들에서, 적어도 하나의 ST6Gal I 유전자가 숙주세포의 게놈 내로 도입되어, 세포는 ST6Gal I 유전자 및 그의 효소적 단백질 산물을 발현한다. 사본수에 의존하여, 단일한 숙주세포는 많은 기능적 ST6Gal I 유전자 단백질을 발현할 수 있다.

[0096] 안정한 변형된 세포주들을 클로닝하고, 형질전환하고, 생산하는 데 적합한 벡터들은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 하나의 비-제한적인 예로는 pcDNA3.1 벡터들 (인비트로젠사 (Invitrogen))을 포함한다.

[0097] 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, 진핵 세포주는 돌연변이 바이러스성 유전자의 야생형 버전을 생산하도록 변형되고, 이에 의해 유전자를 바이러스로 트랜스 작용으로 (*in trans*) 제공한다. 예를 들면, 돌연변이 M2 단백질을 보유하는 바이러스 균주는 야생형 M2 단백질을 생산하는 숙주 세포들에서 계대될 때 증진된 성장율 (예로, 더 큰 바이러스 생산)을 나타낼 수 있다. 일정 구현예들에서, 돌연변이 M2 단백질을 보유하는 바이러스 균주는 야생형 M2 유전자를 발현하지 않는 세포에서 성장하거나 복제할 수 없다. 또한, 이러한 숙주 세포들은 예를 들면 이러한 숙주에서 역전을 위한 선택적 압력이 전혀 존재하지 않기 때문에, 기능적 M2 서열로 바이러스 역전을 지연하거나 예방할 수 있다.

[0098] 발현 벡터들 및 변형된 숙주 세포들 둘 다를 생산하는 방법은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, M2 발현 벡터는 진핵세포 발현 벡터에서 하기 M2 핵산 서열 (M2 ORF 서열; 이것은 "야생형" M2의 개시 코돈 내지 종결 코돈이다 (표 5))을 위치시켜서 만들어질 수 있다.

표 5

표 5: 야생형 M2 핵산 서열
atgagctcttctaaccgaggtcgaacgcctatcagaacgaatgggggtgcagatgcaacgggtcaagtgtcctctcactattgccgcaaa tatcattgggatcttgacattgacattgtggattctgtatcgtcttttttcaaatgcatctaccgtcgtcttaataacggactgaaggaggccttc tacggaaggagtgccaaagtctatgaggaagaatcgaaggaacagcagagtgctgtggatgctgacgatggtcatctttgtcagcata gagctggagtaa

[0099]

[0100] 숙주 세포들 (예로, MDCK 세포들)은 다음으로 당해 기술분야에서 알려진 방법들에 의해, 예로 TransIT® LT1 (마이크로 바이오사 (Mirus Bio), 매디슨, WI)과 같은 시판되는 시약들 및 키트들을 사용하여 형질전환될 수 있

다. 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, 세포들은 검출가능한 또는 선별가능한 마커 (예로, 하이그로마이신-저항성)로의 공동형질전환에 의해 및/또는 예를 들면 M2 항체를 사용하는 간접 면역염색법으로의 검색에 의해 M2 발현에 대해 선별되고 테스트될 수 있다. M2 발현은 간접 면역염색법, 유동 세포측정법 또는 엘라이자 (ELISA)에 의해 결정될 수 있다.

[0101] 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, 293T 인간 배아 신장 세포들 및 마딘-다비 고양이 신장 (MDCK) 세포들은 10% 우태아 혈청이 보충된 돌베코 변형된 이글배지에서 및 5% 우태아 혈청을 포함하는 최소 필수 배지 (MEM)에서 각각 유지되었다. 모든 세포들은 37°C로 5% CO₂에서 유지되었다. A/푸에르토 리코/8/34 (H1N1)로부터 나온 M2 단백질을 발현하는 하이그로마이신-저항성 MDCK 세포들은 1 : 1의 비율로 하이그로마이신 저항성 유전자를 포함하는 플라스미드 pRHyg, 및 전장의 M2 단백질을 발현하는 플라스미드 pCAGGS/M2로의 공동형질전환에 의해 확립되었다. M2를 발현하는 안정한 MDCK 세포 클론 (M2CK)은 항-M2 (14C2) 모노클론 항체를 사용하는 간접 면역염색법으로 검색에 의해 0.15 mg/mL의 하이그로마이신 (로슈사, 독일 만하임)을 포함하는 배지에서 선별되었다 (Iwatsuki *et al.*, JVI, 2006, vol.80, No.1, p.5233-5240). M2CK 세포들은 10% 우태아 혈청 및 0.15 mg/mL의 하이그로마이신이 보충된 MEM에서 배양되었다. M2CK 세포들에서, M2의 발현 수준들 및 정착은 바이러스-감염된 세포들에서 수준들과 유사하였다 (데이타 미도시). M2를 발현하는 배로 세포들은 유사한 방식으로 만들어질 수 있다.

[0102] 일정 구현예들에서, 세포들 및 바이러스 돌연변이체들은 당해 기술분야에서 잘 알려진 방법들에 의해 배양되고 증식된다. 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, 일정 구현예들에서, 숙주 세포들은 10% 우태아 혈청이 보충된 MEM의 존재 시 성장된다. M2를 발현하는 세포들은 PBS로 세척하고 37°C에서 바이러스를 흡착하여 0.001의 MOI로 감염된다. 일정 구현예들에서, 트립신/TPCK를 포함하는 바이러스 성장 배지가 첨가되고, 세포들은 세포변성 효과가 관찰될 때까지 2 내지 3일 동안 배양된다.

[0103] 이들 계열들과 함께, 일회용 생물반응기 시스템들이 바이러스가 있거나 없는 포유동물 세포들을 위해 개발되어 왔고, 이들의 유익들은 더욱 신속한 시설 준비 (setup) 및 교차-오염의 감소된 위험성을 포함한다. 본 명세서에서 기술된 세포들은, 예를 들면 스테딤사 (Stedim)로부터 나온 백들과 같은 일회용 백들, SAFC 바이오사이언스 (SAFC Biosciences)로부터 나온 바이오이즈 (Bioeaze) 백들, 셀렉스 바이오시스템사 (Cellexus Biosystems)로부터 나온 하이브리드백™ (HybridBag™), 하이클론사 (HyClone)로부터 나온 단일 사용 생물반응기들 또는 론자사 (Lonza)로부터 나온 셀테이너 (Celltainer)에서 배양될 수 있다. 생물반응기들은 1 L, 10 L, 50 L, 250 L, 1000 L의 크기 형식들일 수 있다. 일정 구현예들에서, 세포들은 동물 산물들이 없는 최적화된 무혈청 배지에서 현탁액으로 유지된다. 본 시스템은 예를 들면 배양액이 단일 백으로 1 L로부터 10 L에 이르기까지 확장될 수 있는 사료첨가-회분식 시스템 또는 영양분들의 지속적인 공급을 허용하면서 동시에 배양 배지에서 잠재적 독성 부산물들의 축적을 회피하는 관류 시스템일 수 있다.

[0104] 장기간 보관을 위해, 돌연변이 바이러스는 냉동 스톡들로서 보관될 수 있다.

[0106] V. 백신들 및 투여의 방법들

[0107] A. 면역원성 조성물들 / 백신들

[0108] 본 명세서에서 개시된 세포-기초 바이러스 생산 시스템으로부터 제조될 수 있는 서로 다른 유형들의 다양한 백신들이 존재한다. 본 발명은 이에 제한되는 것은 아니지만, 약독화 바이러스 백신들, 불활성화 바이러스 백신들, 전체 바이러스 백신들, 분할 바이러스 백신들, 바이로솜 (viroosomal) 바이러스 백신들, 바이러스 표면 항원 백신들 및 그들의 조합들을 포함한다. 따라서, 다른 인플루엔자 바이러스들에 특이적인 보호적 면역 반응을 생산할 수 있는 수많은 백신들이 존재하고, 임의의 이들 백신 유형들의 적당한 제형물들은 면역 반응, 예로 전신적 면역 반응을 생산할 수 있다. 약독화 생바이러스 백신들은 호흡관에서 국소적 점막성 면역도 역시 촉진할 수 있는 장점을 가진다.

[0109] 일정 구현예들에서, 본 명세서에서 기술된 조성물들에서 사용된 백신 항원들은 "직접적" 항원들이고, 예로 그들은 DNA로서 투여되지 않지만 그들 자체로 항원들이다. 이러한 백신들은, 그들이 단독으로 존재하거나 담체 단백질, 생 약독화 전체 미생물들, 불활성화 미생물들, 재조합 펩타이드들 및 단백질들, 당단백질들, 당지질들, 지질펩타이드들, 합성 펩타이드들, 또는 "분할 (split)" 백신들이라고 명명되는 백신들의 경우에 파열된 미생물들과 같은 담체 요소들과 결합되는 여부와 상관없이, 전체 바이러스 또는, 이에 제한되는 것은 아니지만 바이러스성 탄수화물들과 같은 바이러스의 일부만을 포함할 수 있다.

[0110] 일정 구현예들에서, 완전한 비리온 백신이 제공된다. 완전한 비리온 백신은 초여과법에 의해 농축되고, 다음으

로 구역 (zonal) 원심분리법에 의해 또는 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 전형적으로, 비리온은 예를 들면 포르말린 또는 베타-프로피오락톤을 사용하는 정제 이전 또는 이후에 불활성화된다.

[0111] 일정 구현예들에서, 정제된 당단백질들을 포함하는 소단위 백신이 제공된다. 이러한 백신은 다음과 같이 제조될 수 있다: 계면활성제로의 처리에 의해 단편화된 바이러스 현탁액들을 사용하여, 표면 항원들이 예를 들면 초원심분리법에 의해 정제된다. 소단위 백신들은 따라서 주로 HA 단백질을 또한 NA도 포함한다. 사용된 계면활성제는 예를 들면 헥사데실 트리메틸 암모늄 브로마이드와 같은 양이온성 계면활성제, 암모늄 데옥시콜레이트와 같은 음이온성 계면활성제, 또는 명칭 TRITON X100 하에서 시판되는 것과 같은 비이온성 계면활성제일 수 있다. 헤마글루티닌은 또한 브로멜린 (bromelin)과 같은 프로테아제로 비리온들의 처리 이후에 분리되고, 다음으로 표준 방법들에 의해 정제될 수 있다.

[0112] 일정 구현예들에서, 지질들을 용해하는 제제들로 처리되었던 비리온들을 포함하는 분할 백신이 제공된다. 분할 백신은 다음과 같이 제조될 수 있다: 상기와 같이 불활성화 여부와 상관없이 획득된 정제된 바이러스의 수용성 현탁액은 교반 하에서 계면활성제들과 연관된 에틸 에테르 또는 클로로포름과 같은 지질 용매들에 의해 처리된다. 바이러스 외투막 지질들의 용해는 바이러스 입자들의 단편화를 유발한다. 제거된 그들의 고유한 지질 환경, 및 코아 또는 그의 분해 산물들과 함께 주로 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제로 구성되는 분할 백신을 포함하는 수용성 상이 회수된다. 다음으로 남아있는 감염성 입자들은 이 과정이 이미 시행되지 않았던 경우라도 불활성화된다.

[0113] 일정 구현예들에서, 불활성화 인플루엔자 바이러스 백신들이 제공된다. 일정 구현예들에서, 불활성화 백신은 이에 제한되는 것은 아니지만 포르말린 또는 β -프로피오락톤 처리와 같은 기지의 방법들을 사용하여 바이러스를 불활성화하여 제조된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 불활성화 백신 유형들은 전체-바이러스 (WV) 백신들 또는 소-비리온 (SV) (분할) 백신들을 포함할 수 있다. WV 백신은 고유의 불활성화 바이러스를 포함하는 한편, SV 백신은 지질-포함 바이러스 외투막을 용해하는 계면활성제들로 파쇄되고, 남은 바이러스의 화학적 불활성화가 이어진 정제된 바이러스를 포함한다.

[0114] 추가적으로 또는 대안적으로, 일정 구현예들에서, 생 약독화 인플루엔자 바이러스 백신들이 제공된다. 이러한 백신들은 기지의 방법 단계들에 따라 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하거나 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0115] 일정 구현예들에서, 약독화는 기지의 방법들에 따라 약독화 공여자 바이러스로부터 분리물 또는 재편성된 (reassorted) 바이러스까지 약독화 유전자들의 전달에 의한 단일한 단계로 달성된다 (예로, Murphy, Infect. Dis. Clin. Pract. 2, 174 (1993) 참조). 일정 구현예들에서, 바이러스는 하나 이상의 바이러스 핵산 서열들의 돌연변이에 의해 약독화되고, 돌연변이 바이러스를 유발한다. 예를 들면, 일정 구현예들에서, 돌연변이 바이러스 핵산 서열은 결합성 단백질 산물을 코딩한다. 일정 구현예들에서, 단백질 산물은 감소된 기능을 가지거나 기능을 전혀 가지지 않는다. 다른 구현예들에서, 단백질 산물은 돌연변이 바이러스 핵산으로부터 전혀 생산되지 않는다.

[0116] 따라서 바이러스는 기지의 방법들에 따라, 동물 예로 조류 및/또는 포유류에서 면역 반응을 유도하도록 면역원성 조성물로서 (예로, 백신으로서) 약독화되거나 불활성화되고, 제형화되고, 투여될 수 있다. 이러한 약독화 또는 불활성화 백신들이 이로부터 유래한 임상적 분리물 또는 고성장 균주의 항원성과 유사한 항원성을 유지하는지 여부를 결정하는 방법들은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 이러한 기지의 방법들은 공여자 바이러스의 항원성 결정기들을 발현하는 바이러스들을 제거하기 위한 항혈청들 또는 항체들의 사용을 포함한다; 화학적 선별 (예로, 아만타딘 또는 리만티딘); HA 및 NA 활성 및 저해; 그리고 항원성 결정기들 (예로, HA 또는 NA 유전자들) 또는 다른 돌연변이 서열들 (예로, M2)을 인코딩하는 공여자 유전자들이 약독화 바이러스들에서 존재하지 않는 점을 검증하는 DNA 검색 (탐침 혼성화 또는 PCR과 같음). 예로, Robertson *et al.*, Giornale di Igiene e Medicina Preventiva, 29, 4 (1988); Kilbourne, Bull. M2 World Health Org., 41, 643 (1969); and Robertson *et al.*, Biologicals, 20, 213 (1992) 참조하라.

[0117] 일정 구현예들에서, 백신은 기능적 M2 단백질의 발현이 결여된 약독화 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 일정 구현예들에서, 돌연변이 바이러스는 M2 단백질을 발현하는 세포들에서는 잘 복제하지만, 해당하는 야생형 세포들에서는 감염성 자손 비리온들을 생성하지 않고 바이러스 단백질을 발현한다.

[0118] 피부내 투여, 점종, 또는 비경구 또는 경구적 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물들은 약독화 또는 불활성화 인플루엔자 바이러스들을 포함하고, 선택적으로 무균의 수용성 또는 비-수용성 용액들, 현탁액들, 및 에멀전들을 더 포함할 수 있다. 조성물들은 당해 기술분야에서 알려진 바와 같이, 보조제들 또는 부형제들을 더 포

함할 수 있다. 예로, Berkow *et al.*, The Merck Manual, 제 15판, Merck and Co., Rahway, N.J. (1987); Goodman *et al.*, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 제 8판, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y. (1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 제 3판, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, Md. (1987); 및 Katzung, ed., Basic and Clinical Pharmacology, 제 5판, Appleton and Lange, Norwalk, Conn. (1992)을 참조하라.

[0119] 일정 구현예들에서, 비경구적 투여를 위한 조제물들은 무균의 수용성 또는 비-수용성 용액들, 현탁액들, 및/또는 에멀전들을 포함하고, 이는 당해 기술분야에서 알려진 보조제들 또는 부형제들을 포함할 수 있다. 비-수용성 용매들의 예들로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르들이다. 담체들 또는 밀봉 봉대들이 피부 투과도를 증가시키고 항원 흡수를 증진하는 데 사용될 수 있다. 경구적 투여를 위한 액체 용량 형태들은 일반적으로 액체 용량 형태를 포함하는 리포솜 용액을 포함할 수 있다. 리포솜들을 현탁하는 데 적합한 형태들은 당해 기술분야에서 보편적으로 사용되는 정제된 물과 같은 불활성 희석제들을 포함하는 에멀전들, 현탁액들, 용액들, 시럽들, 및 엘리스르제들을 포함한다. 불활성 희석제들 이외에도, 이러한 조성물들은 아주반트들, 습윤제들, 에멀전화 및 현탁화 제제들, 또는 감미제, 향미제 또는 향수들을 포함할 수 있다.

[0120] 본 발명의 조성물이 개인에게 투여에 사용될 때, 이것은 염들, 완충액들, 아주반트들, 또는 조성물의 효능을 개선하기 위해 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수 있다. 백신들을 위해, 특이적 면역 반응을 증가하는 물질들인 아주반트들이 사용될 수 있다. 정상적으로, 아주반트 및 조성물은 면역계로 제시 이전에 혼합되거나 별도로 제시되지만, 면역화되고 있는 유기체의 동일한 부위 내에 제시된다.

[0121] 일정 구현예들에서, 본 명세서에서 개시된 면역원성 조성물들 (예로, 백신들)은 다수의 서로 다른 형태들의 바이러스 또는 바이러스성 항원들을 포함하고, 이들의 적어도 하나는 돌연변이 M2 유전자 (예로, M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 바이러스), 및/또는 해당 바이러스의 M2 기능적 동등물에서 해당하는 돌연변이 (예로, B형 인플루엔자의 NB 단백질, 또는 C형 인플루엔자의 CM1 단백질)를 포함한다. 다른 구현예들에서, 면역원성 조성물들은 돌연변이 M2 유전자 (예로, M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 바이러스), 및/또는 해당 바이러스의 M2 기능적 동등물에서 해당하는 돌연변이 (예로, B형 인플루엔자의 NB 단백질, 또는 C형 인플루엔자의 CM1 단백질)를 포함하는 단일한 유형의 바이러스 또는 바이러스성 항원을 포함한다. 예를 들면, 일정 구현예들에서, 백신 조성물과 같은 면역원성 조성물들의 주요한 성분은 A형, B형 또는 C형의 인플루엔자 바이러스들의 하나 이상, 또는 그들의 임의의 조합 또는 이들 바이러스들로부터 나온 항원들의 임의의 조합을 포함하고, 적어도 하나의 바이러스는 돌연변이 M2 유전자 (예로, M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 바이러스), 및/또는 해당 바이러스의 M2 기능적 동등물에서 해당하는 돌연변이 (예로, B형 인플루엔자의 NB 단백질, 또는 C형 인플루엔자의 CM1 단백질)를 포함한다. 예를 들면, 일정 구현예들에서, 3가지 유형들의 적어도 둘, 서로 다른 아형들의 적어도 둘, 동일한 유형의 적어도 둘, 동일한 아형의 적어도 둘, 또는 서로 다른 분리물(들) 또는 재편성물(들)이 면역원성 조성물 (예로, 백신)에 제공된다. 그러나 제한으로서 아닌 예로서, 인간 인플루엔자 바이러스 A형은 H1N1, H2N2 및 H3N2 아형들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 면역원성 조성물들 (예로, 백신들)은 돌연변이 M2 유전자 (예로, M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 바이러스), 및/또는 해당 바이러스의 M2 기능적 동등물에서 해당하는 돌연변이 (예로, B형 인플루엔자의 NB 단백질, 또는 C형 인플루엔자의 CM1 단백질) 그리고 상기 조성물 내로 들어간 각각의 균주들로부터 얻은 약 0.1 내지 200 μ g, 예로 10 내지 15 μ g의 헤마글루티닌을 포함한다. 백신의 불균질도는, 2 내지 50개 균주들로부터 또는 이의 임의의 범위 또는 수치와 같은 적어도 둘의 인플루엔자 바이러스 균주들을 위한 복제된 인플루엔자 바이러스들을 혼합하여 제공될 수 있다. 일정 구현예들에서, 현대적 항원성 조성물을 가지는 A형 또는 B형 인플루엔자 바이러스 균주들이 사용된다. 또한, 면역원성 조성물들 (예로, 백신들)은 당해 기술분야에서 알려진 기법들을 사용하여 단일 균주의 인플루엔자 바이러스에서 변화들을 제공할 수 있다.

[0122] 일정 구현예들에서, 백신은 M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 바이러스를 다른 바이러스의 구성성분들 및/또는 다른 바이러스의 구성성분들을 발현하는 유전자들과 함께 포함한다. 일정 구현예들에서, 백신 (예로, M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 바이러스)은 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면 다른 바이러스 균주들로부터 나온 HA 및 NA 유전자들을 포함하는, 다른 바이러스 균주들로부터 나온 유전자들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 백신은 인간 인플루엔자 바이러스 A형 아형들 H5N1, H1N1, H2N2 또는 H3N2로부터 나온 HA 및 NA 유전자들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 백신은 예를 들면, PR8x브리스번/10/2007, A/베트남/1203/2004, 또는 A/캘리포니아/07/2009 (CA07) 바이러스들을 포함한다.

- [0123] 본 발명에 따른 억제학적 조성물은 적어도 하나의 화학요법적 화합물, 예로 유전자 요법을 위한 면역억제제, 항-염증제 또는 면역촉진제, 또는 이에 제한되는 것은 아니지만 감마 글로불린, 아만타딘 (amantadine), 구아니딘, 하이드록시벤즈이미다졸, 인터페론- α , 인터페론- β , 인터페론- γ , 종양괴사인자- α , 티오세미카바존들 (thiosemicarbazone), 메티사존 (methisazone), 리팜핀 (rifampin), 리바비린 (ribavirin), 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 포스카르넷 (foscarnet), 포스포노아세트산, 어사이클로비르 (acyclovir), 디데옥시뉴클레오사이드들, 프로테아제 저해제, 또는 갱사이클로비르 (ganciclovir)를 포함하는 항-바이러스제들을 더 또는 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0124] 본 조성물은 또한, 본 발명의 조성물이 투여되는 유기체들에서 안전한 것으로 밝혀졌고 바람직하지 않은 효과들에 기여하지 않았던, 가변적이지만 적은 정량들의 무-엔도독소 포름알데하이드, 및 보존제들을 포함할 수 있다.
- [0126] B. 투여
- [0127] 본 명세서에서 기술된 바와 같은 면역원성 조성물 (예로, 백신)은 백신들을 위해 통상적으로 사용되거나 추천되는 임의의 경로들: 비경구적 경로, 점막성 경로를 통해 투여될 수 있고, 다양한 형태들: 주사가능하거나 분사가능한 액체, 동결-건조되거나 원자화에 의해 건조되거나 공기-건조되었던 등의 제형물로 존재할 수 있다. 백신들은 주사기에 의해 또는 근육내, 피하 또는 피부내 주사를 위한 무-바늘 주사기에 의해 투여될 수 있다. 백신들은 또한 건조 분말 또는 액체 스프레이를 점액성 막들에 그들이 코, 폐, 질 또는 직장인지 여부와는 상관없이, 전달할 수 있는 분무기에 의해 투여될 수 있다.
- [0128] 본 명세서에서 개시된 바와 같은 백신은 수동적 (passive) 면역화 또는 능동적 (active) 면역화 둘 중 하나에 의해 하나 이상의 인플루엔자 균주들에 대한 저항성을 부여할 수 있다. 능동적 면역화에서, 불활성화 또는 약독화 생백신 조성물은 숙주 (예로, 포유동물)에 예방적으로 투여되고, 투여에 대한 숙주의 면역 반응은 감염 및/또는 질환에 대한 보호작용을 한다. 수동적 면역화를 위해, 발현된 항혈청은 회수되어 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 균주에 의해 유발된 감염을 가지는 것으로 의심된 수여자에게 투여될 수 있다.
- [0129] 따라서 본 발명은 질환 또는 장애, 예로 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 균주에 의한 감염을 예방하거나 약독화하는 방법들을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 백신은 투여가 질환의 증상 또는 병태의 전체적 또는 부분적 약독화 (예로, 억제 (suppression)), 또는 질환에 대한 개인의 전체적 또는 부분적 면역성 둘 중 하나를 가져오는 경우라면 질환을 예방하거나 약독화하는 것이다.
- [0130] 본 발명의 적어도 하나의 불활성화 또는 약독화 인플루엔자 바이러스, 또는 그의 조성물은 이전에 기술된 바와 같은 억제학적 조성물을 사용하여, 의도된 목적들을 달성하는 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 이러한 조성물의 투여는 피하, 정맥내, 피부내, 근육내, 복강내, 비강내와 같은 다양한 비경구적 경로들, 경구적 또는 경피적 경로들에 의할 수 있다. 비경구적 투여는 볼루스 주사에 의해 또는 시간 경과 시 점진적 관류에 의할 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 명세서에서 개시된 바와 같은 면역원성 조성물은 근육내 또는 피하적 적용에 의한다.
- [0131] 일정 구현예들에서, 병리학과 관련된 인플루엔자 바이러스를 예방하거나, 억제하거나, 치료하는 요법은, 1주 및 약 24개월 사이의 범위, 또는 이의 임의 범위 또는 수치까지의 또는 이를 포함하는 기간 경과 시, 단일 치료로서 투여되거나 증진하거나 추가자극하는 용량들로서 반복되는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 백신 조성물의 유효량의 투여를 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 명세서에서 개시된 인플루엔자 백신은 매년 투여된다.
- [0132] 본 발명에 따르면, 백신 조성물의 "유효량"은 원하는 생물학적 효과를 달성하기에 충분한 양이다. 일정 구현예들에서, 유효량은 연령, 성별, 건강, 및 수여자의 체중, 존재하는 경우 동시적 치료의 종류, 치료의 빈도, 및 바람직한 효과의 특성에 의존할 것이라고 이해된다. 하기에 제공된 유효량들의 범위들은 제한하려고 의도되지 않고 대표적인 용량 범위들을 나타낸다. 따라서 일정 구현예들에서, 용량은 당업자에 의해 이해되고 결정가능한 바와 같이 개인적 개체에게 맞추어질 것이다. 포유동물 (예로, 인간) 성체를 위한 약독화 바이러스 백신의 용량은 약 10^3 내지 10^7 플라크 형성 단위 (PFU), 또는 이의 임의 범위 또는 수치로부터 나올 수 있다. 불활성화 백신의 용량은 헤마글루티닌 단백질의 약 0.1 내지 200, 예로 50 μ g의 범위를 가질 수 있다. 그러나, 용량은 기존의 백신들을 시작점으로서 사용하여 통상적인 방법들에 의해 결정된 바와 같이 안전하고 효과적인 양이어야 한다.
- [0133] C. 피하로 전달
- [0134] 생독감 백신들은 통상적으로 자연적 감염의 경로를 모방하고 자연적 바이러스 감염의 반응과 유사한 면역 반응

을 촉진하도록 비강내로 전달된다. 대안으로서, 본 명세서에서는 피부내 전달의 면역학적 유익들을 이용하도록 새로운 미세바늘 장치의 사용이 관여하는 피부내 전달 방법이 개시된다. 일정 구현예들에서, 약독화 바이러스 (예로, M2 바이러스 돌연변이체)는 피부내 투여를 위한 백신 조성물로 사용된다. 일정 구현예들에서, 감염성 자손 바이러스를 생산하지 않는 M2 바이러스 돌연변이체가 백신으로 제공된다. 따라서, 야생형 순환하는 인플루엔자 바이러스들로의 재편성 (reassortment)의 임의의 잠재력이 사실상 배제된다.

[0135] 본 명세서에서 개시된 구현예들에서, 피부내 전달 (피하)은 백신을 피부로 투여한다. 일정 구현예들에서, 피부내 전달은 미세바늘 전달 장치를 사용하여 수행된다. 본 명세서에서 개시된 바와 같이, 피하 전달은 수많은 장점들을 가진다. 예를 들면, 백신의 면역원성은 피부 면역계의 면역학적 잠재력을 촉발하여 증진된다. 백신은 피부의 효능 있는 항원-제시 가지 세포들, 예로 표피 랑게르한스 세포들 및 피부 가지 세포들로의 직접적 접근을 가진다. 피부 세포들은 피부를 통하여 도입되는 항원들에 대한 면역 반응을 증진하는 전-염증성 신호들을 생산한다. 또한, 피부 면역계는 항원-특이적 항체 및 세포성 면역 반응들을 생산한다. 피부내 전달은 백신 용량 보존 (dose sparing)을 허용하고, 예로 피하로 전달될 때 항원의 더 낮은 용량들이 상기 요인들에 비추어 효과적일 수 있다.

[0136] 또한 백신이 장치의 미세바늘 어레이 (microneedle array)를 통하여 전달되기 때문에, 의도되지 않은 바늘-막대들의 위험성이 감소되고, 미세바늘 어레이를 통한 피하 백신 전달은 통상적인 바늘 및 주사기로의 근육내 주사들과 대비하여 상대적으로 통증이 없다.

[0137] 예를 들면 공고된 미국 특허출원들 제 2012/0109066호, 제 2011/0172645호, 제 2011/0172639호, 제 2011/0172638, 2011/0172637호, 및 제 2011/0172609호에서 기술된 것들을 포함하는 미세바늘 장치들이 당해 기술분야에서 알려져 있다. 미세바늘 장치들은 예를 들면 스테인레스 강관들 (트리니티 브랜드사 (rinity Brand Industries), 조지아; SS 304; 50 μm 두께)로부터 습윤 에칭에 의한 제작에 의해 만들어질 수 있다. 일정 구현예들에서, 개별 미세바늘들은 약 500 μm 및 1000 μm 사이의 범위, 예로 750 μm 의 길이, 그리고 약 100 μm 내지 500 사이의 범위, 예로 200 μm 의 너비를 가진다. 다음으로 백신은 미세바늘들에 코팅으로서 적용될 수 있다. 그러나 제한으로서가 아닌 예로서, 코팅 용액은 1% (w/v) 카르복시메틸 셀룰로스 소듐염 (낮은 점도 USP 등급; 카보-머사 (Carbo-Mer), 샌디에고 CA), 0.5% (w/v) 루트콜 F-68 NF (바스프사 (BASF), Mt. 올리브, NJ) 및 항원 (예로, 5 ng/mL로의 용해성 HA 단백질; 본 명세서에서 기술된 M2 돌연변이 바이러스와 같은 약독화 생 바이러스 등)을 포함할 수 있다. 더 높은 백신 농도에 도달하기 위하여, 코팅 용액은 상온 ($\sim 23^{\circ}\text{C}$)에서 5 내지 10분 동안 증발될 수 있다. 코팅은 딥 코팅 (dip coating) 공정에 의해 수행될 수 있다. 미세바늘의 줄마다 백신의 양은 미세바늘들을 200 μL 의 포스페이트-완충된 식염수 (PBS) 내에 5분 동안 잠기게 하고 당해 기술분야에서 알려진 방법들에 의해 항원을 검정하여 결정될 수 있다.

[0138] 일정 구현예들에서, 미세바늘 장치는 단순한 수작업으로 다같이 맞추고 열로 밀봉되는 처음-절단된 스테인레스 강관 조각들로 및 폴리프로필렌으로 주로 만들어진 것이 사용된다. 일정 구현예들에서, 본 장치는 완전한 하나로 제작되고 (self-contained) 백신, 펌프 기작, 활성화 기작, 및 미세바늘 유닛을 포함한다. 이들 구성성분들은 플라스틱 커버 내에 가려진다. 본 장치로, 백신 주입은 작동 버튼을 눌러서 개시된다. 버튼을 누르는 것은 동시에 미세바늘들을 피부 내로 삽입하고 일차적 약물 용기 위에 압력을 가하는 펌프 기작을 개시한다. 스프링 기작이 백신 저장조 위에 충분한 압력을 가할 때, 백신은 미세바늘 어레이를 통하여 피부 내로 유동하기 시작한다. 일정 구현예들에서, 백신 용량의 전달은 장치의 작동 이후 약 2분 이내에 완료된다. 주입이 완료된 이후, 장치는 피부로부터 가만히 분리된다.

[0139] 일정 구현예들에서, 면역원성 조성물 (예로, 백신)의 피하 투여의 방법은 미세바늘 장치를 사용하여 제공된다. 일정 구현예들에서, 미세바늘 장치는 피부를 천공하고 면역원성 조성물이 피하로 투여되도록 허용할 수 있는 다수의 미세바늘들을 포함하는 천자 기작 및 면역원성 조성물 층을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 방법은 천자 기작을 억제하는 단계를 포함한다. 일정 구현예들에서, 면역원성 조성물 (예로, 백신)은 발현되는 돌연변이 M2 단백질 또는 발현되지 않는 돌연변이 M2 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스로서, 상기 발현되는 돌연변이 M2 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되는 바이러스를 포함한다. 일정 구현예들에서, 미세바늘 어레이는 처음에 장치 수용기의 내부에 위치되고, 레버의 작동 시 미세바늘들이 장치 바닥을 통하여 확장하고 피부 내로 삽입하도록 허용하고, 이에 의해 피부 내로 백신액의 주입을 허용한다.

[0140] 본 명세서에서 기술된 전달 장치는 바람직할 수 있는 임의의 물질을 전달하는 데 사용될 수 있다. 한 가지 구현예에서, 전달될 물질은 약물이고, 전달 장치는 약물을 개체에게 전달하도록 제작된 약물 전달 장치이다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "약물"은 치료적, 예방적 또는 의약적 목적을 위해 개체에게 전달되는 임의의 물

질을 포함하도록 의도된다 (예로, 백신들, 약제들, 영양분들, 영양제들 등). 한 가지 이러한 구현예에서, 약물 전달 장치는 백신의 용량을 개체에게 전달하도록 제작된 백신 전달 장치이다. 한 가지 구현예에서, 전달 장치는 독감 백신을 전달하도록 제작된다. 본 명세서에서 논의된 구현예들은 일차적으로 물질을 경피로 전달하도록 제작된 장치에 관한 것이다. 일정 구현예들에서, 본 장치는 물질을 피부가 아닌 기관으로 직접 전달하도록 제작될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0141]

도 1은 (1) 인플루엔자 바이러스가 세포 표면 위에서 시알산 수용체들과 부착하고; (2) 바이러스가 세포 내로 내입되고; (3) M2 이온 통로가 바이러스 표면 위에서 발현되고; (4) M2 이온 통로가 개방되어 양성자 진입을 허용하고, 핵으로 진입하고 복제되고 바이러스성 단백질 합성을 유발하는 바이러스성 DNA의 방출을 유도하고; (5) 바이러스 구성성분들이 비리온들 내로 포장되어 방출되는, 인플루엔자 바이러스 생활환 (life cycle)에서 M2 이온 통로의 역할을 도시하는 도면을 나타낸 것이다.

도 2는 야생형 및 돌연변이 M2 유전자들의 모식도를 나타낸 것이다. A/푸에르토리코/8/1934 (PR8) M 분절의 M2 유전자는 M1 단백질의 개방 해독틀의 하류에서 2개의 종결 코돈들의 삽입에 의해 결실되고 막통과 도메인에서 51개의 뉴클레오타이드들의 결실이 이어져서 전장의 M2 단백질의 발현을 저해한다.

도 3은 미가공된 M1 및 M2의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸 것이다.

도 4는 정상 MDCK 세포들 및 M2 단백질을 안정적으로 발현하는 MDCK 세포들 (M2CK)에서 M2KO(Δ TM) (상부 패널) 및 야생형 PR8 (하부 패널) 바이러스들의 성장 역학들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 세포들은 10^{-5} 의 감염 다중도에서 바이러스들로 감염되었다. 세포 상청액들의 바이러스 역가들이 결정되었다. 야생형 PR8은 둘 다의 세포 유형들에서 높은 역가들로 성장하였던 한편, M2KO(Δ TM)은 M2CK에서만 잘 성장하고 MDCK 세포들에서는 전혀 성장하지 않았다.

도 5는 정상 세포들에서 M2KO(Δ TM) 바이러스는 바이러스 항원들을 생산하지만 M2는 생산하지 않는 점을 보여주는 웨스턴 블롯을 나타낸 것이다. 세포성 용출물들은 PR8-감염된 마우스 혈청들 (패널 A) 또는 항-M2 단일클론 항체 (패널B)로 탐색되었다. 레인 1, 분자량 마커; 레인 2, PR8로 감염된 MDCK 세포들; 레인 3, M2KO(Δ TM)으로 감염된 MDCK 세포들; 레인 4, 미감염된 MDCK 세포들.

도 6은 M2KO 변이체들로의 접종 이후에 마우스 체중에서 변화를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 7A는 M2KO 변이체들로 접종된 마우스에서 항체 반응을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 7B는 감염후 6주째 추가자극된 마우스들의 혈청에서 항-PR8 IgG 항체 역가를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 8은 M2KO 변이체들로의 접종-후, 인플루엔자 도전 이후에 마우스 체중에서 변화를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 9는 M2KO 변이체들로의 접종-후, 인플루엔자 도전 이후에 마우스 생존을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 10은 비강내 (IN), 피부내 (ID) 또는 근육내 (IM)로 PR8로의 접종 이후에 마우스 체중에서 변화를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 11A는 PR8로의 접종-후 2주째 1.8×10^1 pfu (저) 또는 1.8×10^4 pfu (고) 농도의 바이러스를 가진 마우스로부터 수집된 혈청에서 항체 역가를 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 도 11B는 PR8로의 접종-후 7주째 1.8×10^1 pfu (저) 또는 1.8×10^4 pfu (고) 농도의 백신을 가진 마우스로부터 수집된 혈청에서 항체 역가를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 12는 PR8로의 접종-후, 인플루엔자 도전 이후에 마우스 생존을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 13은 PR8로의 접종-후, 인플루엔자 도전 이후에 마우스 체중에서 변화를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 14는 접종-후 7주째 1.8×10^4 pfu PR8로 피부내 접종된 마우스로부터 수집된 혈청에서 항체 역가를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 15는 1.8×10^4 pfu PR8로 피부내 접종된 마우스의 체중에서 변화를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 16은 헤테로아형 바이러스로 감염된 마우스에 대한 도전 후 생존%를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 17은 서로 다른 백신접종 그룹들로부터 나온 마우스들의 엘라이자 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 18은 호모아형 바이러스 감염 이후 마우스의 생존%를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 20은 접종된 담비들의 체중에서 변화들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 담비들은 10^7 TCID₅₀의 M2K0(△TM) 바이러스 (패널 A)로 또는 10^7 TCID₅₀의 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스 (패널 B)로 접종되었다. 체중은 접종 후 3일 동안 감시되었다.

도 21은 접종된 담비들의 체온에서 변화들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 담비들은 10^7 TCID₅₀의 M2K0(△TM) 바이러스 (패널 A)로 또는 10^7 TCID₅₀의 A/브리스번 (Brisbane)/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스 (패널 B)로 접종되었다. 체온은 접종 후 3일 동안 감시되었다.

도 22는 백신접종 이후에 담비들의 체중에서 변화들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 담비들은 10^7 TCID₅₀의 M2K0(△TM) 바이러스 [G1 및 G3]로, 10^7 TCID₅₀의 FM#6 바이러스 [G2 및 G4] 또는 OPTI-MEM™ [G5]로 접종되었다. 체중에서 변화들은 감작 백신접종에 이어서 (패널 A) 및 추가자극 백신을 수여받은 이후에 (패널 B) 14일 동안 감시되었다.

도 23은 도전 이후에 담비들의 체중에서 변화들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 담비들은 10^7 TCID₅₀의 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스로 도전되었다. 체중은 접종 후 14일 동안 감시되었다.

도 24는 백신접종 이후에 담비들의 체온에서 변화들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 담비들은 10^7 TCID₅₀의 M2K0(△TM) 바이러스 [G1 및 G3]로, 10^7 TCID₅₀의 FM#6 바이러스 [G2 및 G4] 또는 OPTI-MEM™ [G5]로 접종되었다. 체온에서 변화들은 감작 백신접종에 이어서 (패널 A) 및 추가자극 백신을 수여받은 이후에 (패널 B) 14일 동안 감시되었다.

도 25는 도전 이후에 담비들의 체온에서 변화들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 담비들은 10^7 TCID₅₀의 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스로 도전되었다. 체온은 접종 후 14일 동안 감시되었다.

도 26은 바이러스 접종 이후에 담비들의 체중에서 변화들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 공여자 담비들은 10^7 TCID₅₀의 M2K0(△TM) 바이러스 (패널 A)로 또는 10^7 TCID₅₀의 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스 (패널 B)로 0일에 접종되었다. 접종 이후 24시간 (1일)째, 공여자들은 에어로졸 접촉 (AC)을 수용하는 사육상자와 인접한 직접적 접촉들 (DC)를 가진 사육상자에 배치되었다. 체중에서 변화들은 공여자 접종에 이어서 14일 동안 감시되었다.

도 28은 M2K0(△TM) 백신이 체액성 및 점막성 반응들을 발현하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 패널 A는 PR8, M2K0(△TM), 활성화된 PR8 (IN, IM), 또는 PBS의 투여에 이어지는 혈청 IgG 및 IgA 역가들을 나타낸다. 패널 B는 PR8, M2K0(△TM), 활성화된 PR8 (IN, IM), 또는 PBS의 투여에 이어지는 폐 세척액 IgG 및 IgA 역가들을 나타낸다.

도 29는 M2K0(△TM) 백신이 치사성 호모아형 및 헤테로아형 바이러스성 도전으로부터 마우스들을 보호하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 패널 A는 동종유래 PR8 (H1N1) 도전에 이어지는 마우스 체중 변화를 나타낸다. 패널 B는 이종유래 아이치 (H3N2) 도전에 이어지는 마우스 생존을 나타낸다.

도 30은 M2K0(△TM) 백신이 호흡관에서 도전 바이러스 복제를 조절하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 패널 A는 PR8 (H1N1) 도전에 이어지는 바이러스 역가들을 나타낸다. 패널 B는 아이치 (H3N2) 도전에 이어지는 바이러스 역가들을 나타낸다.

도 31은 혈청들에서 M2KO(Δ TM) 백신에 대한 항체 반응의 역학들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 32는 혈청들 및 호흡관에서 M2KO(Δ TM) 백신에 대한 점막성 항체 반응을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 33은 M2KO(Δ TM) 백신에 대한 반응에서 항-HA IgG의 역학들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 34는 M2KO(Δ TM)은 FluMist® 및 IVR-147과 유사한 면역 반응을 유도하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 패널 A는 FluMist® H3, M2KO(Δ TM) H3, IVR-147, 및 PBS가 투여된 동물들에서 혈청 바이러스 역가들을 나타낸다. 패널 B는 FluMist® H3, M2KO(Δ TM) H3, IVR-147, 및 PBS가 투여된 동물들에서 폐 세척액 바이러스 역가들을 나타낸다. 패널 C는 FluMist® H3, M2KO(Δ TM) H3, IVR-147, 및 PBS가 투여된 동물들에서 코선반 바이러스 역가들을 나타낸다.

도 35는 M2KO(Δ TM) 백신이 아이치 도전에 대해 보호하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. 패널 A는 FluMist® H3, M2KO(Δ TM) H3, IVR-147, 및 PBS가 투여된 동물들에서 아이치 도전에 이어지는 체중 감소를 나타낸다. 패널 B는 FluMist® H3, M2KO(Δ TM) H3, IVR-147, 및 PBS가 투여된 동물들의 아이치 도전에 이어지는 생존 백분율을 나타낸다.

도 36은 H5N1 M2KO(Δ TM) 백신이 HA에 대한 IgG 항체 역가들을 발현하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 37은 M2KO(Δ TM) CA07, WT CA07, 및 FluMist® CA07 백신들의 투여에 이어지는 체중을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 38은 M2KO(Δ TM) 바이러스가 마우스들의 호흡관에서는 복제하는 않는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 39는 M2KO(Δ TM) 백신이 신속한 항체 역학들을 나타내는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 40은 M2KO(Δ TM) 백신이 H3N2 바이러스, A/아이치/2/1968로의 이중유래 도전에 대해 보호하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 41은 M2KO(Δ TM) 백신이 도전 시 회상되는 세포성 반응을 감작하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 42는 M2KO(Δ TM) 바이러스가 M2에 대한 야생형 바이러스와 유사한 mRNA 수준들을 생성하는 점을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 43은 pCMV-PR8-M2 발현 플라스미드의 제한효소 소화들을 보여주는 아가로스 젤을 나타낸 것이다. 레인 1 및 레인 5; 1 Kb DNA 사다리 (프로메가사, 매디슨, WI, 미국), 레인 2 내지 레인 4; Eco R1 소화된 pCMLV-PR8-M2: 0.375 μ g (레인 2), 0.75 μ g (레인 3), 및 1.5 μ g (레인 4).

도 44는 인플루엔자 M2 유전자의 개방 해독들에 pCMV-PR8-M2의 서열 정렬을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 45는 담비 호흡관에서 M2KO(Δ TM) 및 FluMist® 바이러스 복제를 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 46은 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스로의 비강내 도전 이후에 코 세척액들에서 M2KO(Δ TM) 및 FluMist® 바이러스 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 47은 M2KO(Δ TM) 및 FluMist® 감작 단독 그룹으로의 백신접종에 이어지는 담비들에서 IgG 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 48은 M2KO(Δ TM) 및 FluMist®, 감작-추가자극 그룹들로의 백신접종에 이어지는 담비들에서 IgG 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 49는 M2KO(Δ TM) 또는 FluMist®로의 백신접종으로부터 도전-후에 이르기 까지 담비 혈청들에서 엘라이자 IgG 역가들의 요약을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 50은 전과 연구에서 담비들로부터 얻은 코 세척액들에서 바이러스 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다. M2KO(Δ TM) 바이러스는 전과되지 않았던 (검출된 바이러스 없음) 한편, 대조군 브리스번/10 바이러스는 전과된다.

도 51은 A/캘리포니아, A/퍼스, 및 B/브리스번 바이러스들로 비강내 (IN), 근육내 (IM) 및 피부내 (ID FGN)로 백신접종된 개체들에서 IgG 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 52는 A/퍼스 (H3N2) 백신의 감작 용량 또는 감작 및 추가자극 용량이 근육내 (IM) 또는 피부내 (ID FGN)로 투여된 개체들에서 IgG 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 53은 플루라발 (FluLaval): A/캘리포니아/7/2009 NYMC X-181, A/빅토리아/210/2009 NYMC X-187 (A/퍼스/16/2009-유사 바이러스), 및 B/브리스번/60/2008로 접종-후 0, 30, 및 60일째 비강내 (IN), 근육내 (IM) 및 피부내 (ID FGN) 전달에 의해 접종된 기니아 피그들에서 바이러스 역가들을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 54는 베트남/1203/2004 바이러스로의 면역화-후 5개월째 도전된, H5N1 M2K0(Δ TM) 백신접종된 개체들의 생존 백분율을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

도 55는 베트남/1203/2004 바이러스로의 면역화-후 4주째 도전된, H5N1 M2K0(Δ TM) 백신접종된 개체들의 생존 백분율을 보여주는 도면을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

다음의 실시예들은 A형 인플루엔자로 설명되는 한편, 본 명세서에서 기술된 돌연변이들 및 방법들은 M2, M2-유사 단백질 또는 A형 인플루엔자 M2 단백질과 동일하거나 유사한 기능을 가진 단백질을 발현하는 다른 바이러스들에 동일하게 적용가능한 것으로 이해된다.

실시예 1: M2 바이러스 돌연변이체들의 생성

M2 돌연변이체들은 다음과 같이 파악되었다.

a) M2-1: M2 엑토도메인 + 2개 종결 코돈들 + TM 결실 (PR8 M 분절 + 792번 내지 842번 (TM)이 없는 2개 종결들 (786번 내지 791번))

PR8로부터 얻은 부분적 야생형 M 유전자들은 하기에 나타난 바와 같이 올리고 집합 1 및 올리고 집합 2를 사용한 PCR에 의해 증폭되었다.

표 6

표 6
올리고 집합 1
acacacCGTCTCTAGgatcgtcttttttcaaagcattacc
CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT
올리고 집합 2
acacacCGTCTCateCTATTaatcacttgaaccgttgc
CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGTAG

PCR 산물들은 다음으로 BsmBI로 소화되었다. 발현 벡터 (pHH21)도 역시 BsmBI로 소화되었고, 소화된 PCR 산물들은 T4 DNA 라이게아제를 사용하여 벡터 내로 라이게이션된다. 대장균 (*E. coli*) 세포들은 벡터로 형질전환되었고, 적당한 배양 이후에, 벡터들은 당해 기술분야에서 알려진 방법들에 의해 분리되었고 정제되었다. 본 벡터의 돌연변이체 M2 부분은 핵산 서열결정에 의해 특징 분석되었다.

b) M2-2: M2 엑토도메인 + 2개 종결들 + 스프라이싱 결함 (PR8 M 분절 + 2개 종결들 (786번 내지 791번) + 스프라이싱 결함 nt 51)

PR8로부터 얻은 부분적 야생형 M 유전자들은 하기에 나타난 프라이머 집합을 사용한 PCR에 의해 증폭되었다.

표 7

표 7
PCR 프라이머들
5'acacacCGTCTCcCTACGTACTCTCTATCATCCCG
5'CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT

[0153]

[0154] PCR 산물들은 다음으로 BsmBI로 소화되었다. 발현 벡터 (pHH21)도 역시 BsmBI로 소화되었다. 이중가닥 DNA 단편은 다음으로 하기에 나타낸 2개의 뉴클레오타이드들을 아닐링하여 만들어졌다.

표 8

표 8
뉴클레오타이드들 아닐링
5'GGGAGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGatgagtcttctaaccgaggtcgaaac
5'GTAGgtttcgacctcggttagaagactcatCTTCAATATCTACCTGCTTTTGC

[0155]

[0156] 소화된 벡터, PCR 산물 및 이중가닥 단편은 다음으로 T4 DNA 라이게이즈를 사용하여 라이게이션되었다. 대장균 세포들은 벡터로 형질전환되었고, 적당한 배양 이후에, 벡터들은 당해 기술분야에서 알려진 방법들에 의해 분리되었고 정제되었다. 본 벡터의 돌연변이 M2 부분은 핵산 서열결정에 의해 특징 분석되었다.

[0158] c) M2-3: M2 엑토도메인 + 2개 종결들 + 스프라이싱 결함 + TM 결실 (PR8 M 분절 + 792번 내지 842번 (TM)이 없는 2개 종결들 (786번 내지 791번) + 스프라이싱 결함 nt 51)

[0160] 부분적 M2-1 돌연변이체 (M2 엑토도메인 + 2개 종결들 + 스프라이싱 결함 + TM 결실 (PR8 M 분절 + 792번 내지 842번 (TM)이 없는 2개 종결들 (786번 내지 791번))는 다음의 프라이머들을 사용한 PCR에 의해 PR8로부터 증폭되었다.

표 9

표 9
PCR 프라이머들
5'acacacCGTCTCcCTACGTACTCTCTATCATCCCG
5'CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT

[0161]

[0162] PCR 산물들은 다음으로 BsmBI로 소화되었다. 발현 벡터 (pHH21)도 역시 BsmBI로 소화되었다. 이중가닥 DNA 단편은 다음으로 하기에 나타낸 2개의 뉴클레오타이드들을 아닐링하여 만들어졌다.

표 10

표 10
뉴클레오타이드들 아닐링
5'GGGAGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGatgagtcttctaaccgaggtcgaaac
5'GTAGgtttcgacctcggttagaagactcatCTTTCAATATCTACCTGCTTTTGC

[0163]

[0164]

소화된 벡터, PCR 산물 및 이중가닥 단편은 다음으로 T4 DNA 라이게아제를 사용하여 라이게이션되었다. 대장균 세포들은 벡터로 형질전환되었고, 적당한 배양 이후에, 벡터들은 당해 기술분야에서 알려진 방법들에 의해 분리되었고 정제되었다. 본 벡터의 돌연변이체 M2 부분은 핵산 서열결정에 의해 특징 분석되었다.

[0165]

3가지 M2 돌연변이체 제작물들의 각각의 서열은 표 1 내지 표 3에서 제공된다.

[0167]

실시예 2: M2 돌연변이 바이러스의 생성 및 배양

[0168]

본 실시예는 M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 PR8 바이러스의 배양을 설명한다. 돌연변이 바이러스들은 일정 변형들로 Neumann *et al.*, *Generation of Influenza A Viruses entirely from clone cDNAs*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9345-9350 (1999)에서 보고된 바와 같이 생성되었다. 간략하게, 293T 세포들은 17개의 플라스미드들로 형질전환되었다: 이 중의 하나는 돌연변이 M2 서열을 보유하는 8개 RNA 분절들을 위한 8개의 PoII 제작물들 그리고 다음과 같은 5개 구조 단백질들을 위한 9개 단백질-발현 제작물들: NP (pCAGGS-WSN-NP0/14); M2 (pEP24c); PB1 (pcDNA774); PB2 (pcDNA762); 및 A/푸에르토 리코/8/34 (H1N1) 바이러스의 PA (pcDNA787).

[0169]

플라스미드들은 형질전환 시약 (DNA μ g 당 2 μ L의 Trans IT®LT-1 (마이어스사, 매디슨, Wis.))과 혼합되었고 상온에서 15 내지 30분 동안 배양되었으며, 1×10^6 개의 293T 세포들에 첨가되었다. 48시간 이후에, 생체액에서 바이러스들은 일련으로 회석되었고 M2CK 세포들 내에 접종되었다. 접종 이후 2 내지 4일째, 세포들이 투명한 세포변성 효과 (CPE)를 보이는 최종 회석 웰의 상청액에 있는 바이러스들은 스톡 바이러스의 생산을 위해 M2CK 세포들 내로 접종되었다. 생성된 바이러스들의 M 유전자들은 의도된 돌연변이들의 유전자 및 존재를 검증하고 원치않는 돌연변이들이 전혀 존재하지 않았던 점을 입증하도록 서열결정되었다.

[0170]

돌연변이 M2 바이러스들은 성장되었고 다음과 같이 계대되었다. M2CK 숙주 세포들은 10% 우태아 혈청이 보충된 MEM의 존재 시 성장되었다. 세포들은 PBS로 세척하고 37°C에서 바이러스를 흡착하여 0.001의 MOI로 감염되었다. 트립신/TPCK를 포함하는 바이러스 성장 배지가 첨가되었고, 세포들은 세포변성 효과가 관찰될 때까지 2 내지 3일 동안 배양되었다.

[0172]

실시예 3: M2KO 복제는 정상 세포들에서 제한된다

[0173]

M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 가진 PR8 바이러스 및 야생형 PR8의 성장 역학들이 정상 MDCK 세포들 및 M2 단백질을 안정적으로 발현하는 MDCK 세포들 (M2CK) 둘 다에서 분석되었다. 세포들은 10^{-5} 의 감염 다중도에서 바이러스들로 감염되었다. 세포 상청액에서 바이러스 역가들이 MDCK 또는 M2CK 세포들에서 결정되었다. 야생형 PR8는 둘 다의 세포 유형들에서 높은 역가들로 성장되었던 한편, M2KO는 M2CK 세포들에서만 잘 성장되고 MDCK 세포들에서는 전혀 성장되지 않았다 (도 4).

[0175]

실시예 4: 정상 세포들에서 M2KO 바이러스는 바이러스 항원들을 생산하지만 고 M2는 생산하지 않는다

[0176]

본 실시예는 정상 세포들에서 M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 PR8 바이러스는 바이러스 항원을 생산하지만, M2 단백질을 생산하지 않는 점을 설명한다. 바이러스 단백질 발현은 야생형 MDCK 세포들을 바이러스들이 한 번의 생활환만을 완료하는 점을 입증하도록 트립신이 없는 배지에서 0.5의 감염 다중도 (MOI)에서 야생형 PR8 또는 M2KO로 감염하여 평가되었다. 세포 용출물들에서 바이러스 단백질들은 4 내지 12% SDS-PAGE 젤 상에서 분리되었고, PR8 감염된 마우스 혈청들 (패널 A) 또는 항-M2 단일클론 항체 (14C2, 산타크루즈 바이오 테크놀로지사 (Santa Cruz Biotechnology)) (패널 B)를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 검출되었다. 도 3A는 PR8에

대한 항혈청이 PR8 및 M2KO 둘 다의 경우 단백질 발현의 유사한 수준들을 검출하는 점을 보여준다. 용출물들이 항-M2 단일클론 항체 (패널 B)로 탐색될 때, M2 발현은 PR8 감염된 세포들에서만 검출되었고 M2KO는 아니었다. 이들 결과들은 M2KO 바이러스가 M2 단백질을 제외하고 모든 바이러스 단백질을 PR8 바이러스와 유사한 수준들로 발현하는 점을 가리킨다 (도 5).

[0178] 실시예 5: M2 돌연변이체들은 생체내 약독화된다

[0179] 실험은 M2 돌연변이 바이러스들이 생체내 약독화되는 점을 설명하도록 수행되었다. 6주령의 BALB/c, 암컷 마우스들 (그룹 당 23마리)은 다음의 돌연변이체들의 하나로 비강내 접종되었다: J. Virol (2009) 83: 5947-5950에서 기술된 바와 같은 M2KO(yk); M2-1 (TM del M2KO *aka* M2KO(Δ TM)) 및 M2-2 (Splice def M2KO) (종합적으로 "M2KO 변이체들"이라고 명명됨). 돌연변이체는 마우스 당 1.2×10^4 pfu의 용량으로 투여되었다. 마우스들의 대조군 그룹은 PBS가 주어졌다. 마우스들은 임의의 체중의 변화 및 감염의 증상들에 대해 접종 이후 14일 동안 관찰되었다. 추가적으로, 접종-후 3일 이후에 바이러스 역가들은 각각의 그룹에서 3마리 마우스들로부터 얻은 폐들 및 코선반들 (NT)로부터 가져왔다.

[0180] 도 6에서 나타난 바와 같이, 마우스들은 M2KO 변이체들로 접종되었고 PBS는 감염의 임상적 증상들을 나타내지 않았고 14일 기간 동안 체중도 감소되지 않았다. 그룹들 간의 체중에서 변화들은 14일 기간 동안 비슷하였다. 추가적으로, 바이러스는 폐들 및 NT로부터 수집된 역가들에서 전혀 검출되지 않다. 다같이, 임상적 증상들의 결여, 체중 감소의 결여 및 바이러스의 부재는 M2 돌연변이 바이러스들이 약독화되고 마우스들에서 병원성이 없는 점을 가리킨다.

[0182] 실시예 6: M2 돌연변이체들은 인플루엔자 바이러스에 대한 항체들을 유도하고 치사성 바이러스 도전으로부터 마우스들을 보호한다

[0183] 테스트는 또한 상기 실시예 5에서 기술된 마우스들로부터 나온 항체 역가들 및 치사성 바이러스 용량으로 도전된 이후에 그들의 생존을 결정하도록 수행되었다. 혈청 시료들은 접종 이후 3주째 수집되었고 혈청 시료들로부터 나온 항-바이러스 IgG 항체 역가들은 효소-연결된 면역흡착 검정법 (ELISA)에 의해 결정되었다. 체액성 반응은 도 7에서 나타내고, 이는 모두 3가지 M2 돌연변이체들이 대조군 PBS 그룹보다 높게 항-인플루엔자 바이러스 항체들을 증가시키는 점을 보여준다.

[0184] 또한, 각각의 그룹들 내에서 마우스들의 절반은 동일한 양의 M2 돌연변이 바이러스로 접종 이후 28일째 추가자극되었다. 혈청은 다음으로 첫 번째 접종 이후 6주째 수집되었고, 바이러스에 대한 IgG 역가들이 결정되었다. 도 7B에서 나타난 바와 같이, M2 돌연변이 바이러스들에 의해 추가자극된 마우스들은 추가자극되지 않은 마우스들보다 더 높은 수준의 항-인플루엔자 바이러스 항체들을 가졌다.

[0185] 첫 번째 접종 이후 49일째 (추가자극 이후 3주째), 마우스들은 치사 용량의 PR8 바이러스로 도전되었다 (40의 마우스 50% 치사 용량 (MLD₅₀)). 도 8 및 도 9에서 나타난 바와 같이, M2KO 변이체들로 백신접종된 모든 마우스들은 도전에서 생존하였고 체중을 전혀 손실하지 않았다. 그러나 PBS만 주어진 대조군 마우스들은 체중을 손실하였고 도전일 경과 8일째 생존하지 못하였다. 도전 이후 3일째, 폐들 및 NT가 획득되었고 바이러스 역가들이 MDCK 세포들에서 플라크 검정법에 의해 결정되었다. 표 11에서 도시한 바와 같이, M2KO 변이체들에서 폐 바이러스 역가들은 무-백신 대조군 PBS에서 역가들보다 더 낮은 적어도 1 로그이었다. 또한 바이러스들이 M2KO 변이체들 그룹들의 코선반들에서 거의 검출되지 않았지만 무-백신 대조군 PBS 그룹에서는 100,000 PFU/g 이상으로 검출되었으며, M2 돌연변이체 백신이 보호작용을 부여하고 도전 바이러스의 복제를 제한하는 점을 가리킨다. 표 11은 도전 이후 마우스 조직에서 바이러스 역가 (로그 10 PFU/g)를 나타낸다.

표 11

	폐	코 선반
M2KO (yk)	6.1, 5.9, ND	1.7, ND, ND
M2KO (Δ TM)	5.8 ± 0.25	2.5, ND, ND
M2KO (splice def)	ND, ND, ND	ND, ND, ND
PBS	7.9 ± 0.27	5.3 ± 0.55

[0186]

[0187]

또 다른 실험에서, 면역화 이후 6주째 M2KO(Δ TM) 그룹들은 동종아형 또는 이종아형 인플루엔자 바이러스들로 도전되었다. 마우스들은 아이치 (H3N2) 바이러스로 도전되었고 14일 동안 생존에 대해 점수가 매겨졌다. 이종아형 도전의 결과들은 도 16에 나타나 있다.

[0189]

실시예 7: 피부내 백신 전달

[0190]

실험은 피부내 백신 전달/면역화가 개체를 인플루엔자로부터 보호하는 점을 보여주도록 수행되었다. BALB/c 암컷 6 내지 7주령 마우스들 (그룹 당 5마리) (할랜드 연구소 (Harland Laboratories))이 PR8 바이러스 (3.5×10^7 pfu)로 마우스 당 1.8×10^1 , 1.8×10^2 , 1.8×10^3 또는 1.8×10^4 pfu (50 μ L)의 농도에서 비강내 (IN), 근육내 (IM) 또는 피부내 (ID)로 접종되었다. 대조군 마우스들도 역시 3가지 다른 투여의 경로들로 PBS가 주어졌다. 체중 및 생존은 접종 이후 14일 동안 감시되었다. 마우스 실험들을 위해 피부내 경사 (bevel) 바늘들을 가진 알레르기 주사기들이 사용되었다.

[0191]

대부분의 백신들은 통상적인 바늘들 및 주사기들을 사용하여 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여되었다. 그러나, 최근의 연구들은 피부내 백신 전달이 근육내 또는 피하 투여보다 더 양호한 면역원성을 달성하는 점을 설명한다. 피부내 백신접종은 항원을 직접 강화된 피부 면역계로 전달하고, 광견병, B형 감염 바이러스 및 인플루엔자를 포함하는 다양한 백신들을 위해 효과적인 것으로 관찰되어 왔다. 피부내 전달은 또한 용량 보존을 제공할 수 있고, 근육내 주사로 요구되었던 것보다 더 적은 백신을 사용하여 동일한 면역 반응을 달성한다. (통상적인 바늘들 및 주사기들을 사용하는) 피부내 전달을 위한 최신 기술은, 철저한 훈련을 요구하는 만투스 기법 (Mantoux technique)이고, 수행하는 것이 어렵고 종종 잘못되거나 (피하) 불완전한 투여를 유발한다. 적합한 전달 장치들의 부족은 이러한 투여 경로의 유효한 면역 반응들이 보고되었더라도 피부내 백신접종 연구 및 제품 개발을 어렵게 하여 왔다.

[0192]

표 12에서 나타난 바와 같이, IN-접종된 마우스는 마우스 당 1.8×10^3 및 1.8×10^4 pfu의 더 높은 용량에서 인플루엔자 감염으로 죽었고, 1.8×10^1 pfu의 가장 낮은 용량에서만 완전한 생존이 있었다. 그러나, IM- 및 ID-접종된 마우스들은 모든 용량들에서 생존하였다. 표 13은 IN-접종된 그룹 (MLD₅₀)에서 마우스들의 중앙값 치사 용량을 보여준다. 도 10은 1.8×10^4 pfu의 바이러스로 접종된 IM- 및 ID-접종된 마우스들이 체중에서 변화를 전혀 보이지 않았던 점을 나타내고 1.8×10^4 pfu의 바이러스로 접종된 IN-접종된 마우스들의 생존의 결여를 나타낸다.

표 12

표 12. PR8 접종 이후 마우스 생존			
바이러스 용량 (pfu)	투여의 경로		
	IM	ID	IN
1.8×10^1	5/5	5/5	5/5
1.8×10^2	5/5	5/5	1/5
1.8×10^3	5/5	5/5	0/5
1.8×10^4	5/5	5/5	0/5
PBS	5/5	5/5	5/5

[0193]

표 13

표 13. 마우스들의 평균 치사 용량 (MLD ₅₀).	
경로	MLD ₅₀ (pfu ^a /마우스)
IN	76
IM	$> 1.8 \times 10^4$
ID	$> 1.8 \times 10^4$
^a pfu: 플라크 형성 단위	

[0194]

[0195] 혈청이 접종 이후 2주 (도 11A) 및 7주 (도 11B)에서 수집되었고, 엘라이자에 의해 결정된 바와 같이 항-PR8 IgG 항체에 대해 평가되었다. "고 (Hi)"는 $.8 \times 10^4$ pfu 접종들을 나타내고 "저 (Lo)"는 8×10^1 pfu를 나타낸다. 둘 다의 기간들에서 IN-, IM- 및 ID-접종된 마우스들은 유사하다. 각각의 시간 기간에서, IN-접종된 마우스들은 가장 높은 수의 항체들을 제시하였다. 8×10^1 pfu로 접종된 IN-접종된 마우스들만이 이러한 시간에 의해 더 높은 용량들로 접종된 IN-접종된 마우스들이 버렸기 때문에 확인되었다 (예로, "저"). IM- 및 ID-접종된 마우스들은 PBS만 주어진 대조군 마우스들과 비교 시 더 높은 용량들로 접종된 마우스들이 더 많은 양들의 항체들을 나타내었다더라도, IN-접종된 마우스들보다 더 적은 수준들의 항체들을 제시하였다. 추가적으로, 도 11B에서 보여준 더 높은 역가 수준들에 의해 설명된 바와 같이, 시간 경과 시 피부내 투여 경로는 근육내 경로보다 더 많은 항체들을 생산하였다.

[0196] 또 다른 실험에서, IN-, IM- 및 ID-접종된 마우스들 (8×10^3 개 그룹에서 4마리를 제외하고, 그룹 당 5마리 마

우스들)이 백신접종 이후 8주째 도전되었다. 상세하게는, 8×10^1 개 IN-접종된 마우스들, 8×10^3 개 IM-접종된 마우스들, 8×10^4 개 IM-접종된 마우스들, 8×10^3 개 ID-접종된 마우스들 및 8×10^4 개 ID-접종된 마우스들이 도전되었다. 그들의 체중의 25% 이상이 손실된 마우스들은 안락사되었다.

[0197] 도 12에서 나타난 바와 같이, 8×10^3 개의 용량으로 IM-접종된 마우스들의 100%는 도전 이후 8일째 생존하였다. 모든 ID-접종된 마우스들의 생존율은 40% 및 60% 사이의 범위이었다. 그러나 8×10^4 개로 IM-접종된 마우스들의 생존율은 100%이었다. 도 13은 ID-접종된 및 IM-접종된 (8×10^4 개) 그룹들의 마우스들은 도전일로부터 초기의 평균 체중 손실을 가졌지만, 상대적으로 낮은 체중 손실로 종결되었던 점을 보여준다.

[0198] ID-접종된 마우스들 (8×10^4 개)의 평가는 2마리 마우스들 (도 14 및 도 15에서 1 및 5)이 다른 마우스들보다 더 양호한 면역 반응을 나타내고, 또한 인플루엔자 감염의 증상들을 발생시키지 않았다 (예로, 체중 감소, 거친 털, 우울 등). 그러나, IM-접종된 그룹들 (8×10^4 개)에서 모든 마우스들은 일정 증상들을 보였고 체중의 적어도 10%가 손실되었다.

[0200] 실시예 8: M2KO 변이체들의 안정성

[0201] 야생형 세포들에서 M2KO 변이체들의 M2 유전자의 안정성을 테스트하기 위하여, M2KO 변이체들이 M2 단백질을 발현하는 MDCK 세포들인 M2CK 세포들과 함께, M2 단백질 발현이 결여된 야생형 MDCK 세포들에서 계대되었다. 모든 M2KO 변이체들은 적어도 10회의 계대까지는 임의의 돌연변이들이 없이도 M2CK 세포들에서 계대 가능하였다. 그럼에도, M2-1 (TM del M2KO), M2-2 (Splice def M2KO), 및 M2-3 (TM del + Splice def M2KO)는 야생형 MDCK 세포들에서 계대될 수 없었고 (세포변성 효과 (CPE)는 야생형 MDCK 세포들에서 전혀 관찰되지 않음), M2KO(yk)는 MDCK 세포들에서 심지어 4번째 계대 이후에도 CPE를 보여주었다. M 분절 RNA들이 야생형 MDCK 세포들에서 M2KO(yk) 4회 계대로부터 추출되었고 cDNA가 서열결정되었다. 표 14에서 나타난 바와 같이, M2KO(yk)의 2개 삽입된 종결 코돈들이 편집되었고 야생형 MDCK 세포들에서 M2KO(yk) 4회 계대는 전장의 M2 단백질을 소용하게 하였다.

표 14

표 14 삽입된 2개 종결 코돈들 주위 서열 (M 분절의 nt 700 내지 800 개, nt 786 내지 791 번의 종결 코돈들)	
바이러스	서열
고유 M2KO(yk)	3'CAACGGTTCAAGTGATTAATAAACTATTGCC
M2KO(yk) M2CK에서 2회 계대	3'CAACGGTTCAAGTGATTAATAAACTATTGCC
M2KO(yk) MDCK에서 2회 계대	3'CAACGGTTCAAGTGATTGGTGGACTGTTGCC

[0202]

[0204] 실시예 9: M2KO 백신접종들

[0205] M2KO 백신이 자연적 인플루엔자 감염과 유사한 면역 반응을 자극할 수 있는 점을 설명하기 위하여, 백신 실험이 시행되었다. 자연적 인플루엔자 감염은 PR8 바이러스의 낮은 접종액에 의해 재연되었고 표준 불활성화 독감 백신은 표준 근육내 경로 및 비강내로 전달된 불활성화 PR8 바이러스 (찰스 리버사 (Charles River))에 의해 재연되었다.

[0206] 6 내지 7주령 BALB/c 마우스들은 비강내로 생바이러스 (10 pfu PR8), M2KO(Δ TK)를 포함하는 PR8 바이러스 (10^4 pfu), 또는 비강내 및 근육내 둘 다로 전달된 1 μ g 불활성화 PR8 바이러스로 면역화되었다. M2KO(Δ TK)의 10^4 개 감염성 입자들이 비강내로 주어진 마우스들은 체중이 전혀 손실되지 않았고 감염의 징후들을 전혀 보여주지 않았다. 또한 M2KO(Δ TK)로 처리된 마우스들의 폐들은 접종-후 3일째 검출가능한 감염성 입자들이 전혀 포함되

지 않았다. 혈청들이 21일째 면역화된 마우스들로부터 획득되었고 헤마글루티닌에 대한 항체 역가들은 표준 엘라이자 검정법에 의해 결정되지 않았다. 도 17은 항-HA IgG 역가들이 불활성화 백신 그룹들과 대비하여 생바이러스 및 M2KO(Δ TK) 그룹들에서 가장 높았던 점을 보여준다. 인플루엔자에 대한 점막성 IgA 항체는 단지 생 PR8 또는 M2KO 백신접종된 마우스들의 혈청들에서 검출되었다.

[0207] 면역화 이후 6주째, 모든 그룹들은 동종아형 (PR8, H1N1) 또는 이종아형 (아이치 (Aichi), H3N2) 인플루엔자 바이러스들로 도전되었다. 둘 다의 M2KO 및 불활성화 백신접종들이 동종아형 바이러스 감염으로부터 마우스들을 보호하였다 (도 18). 그러나, M2KO 백신접종된 마우스들만이 이종아형 바이러스 도전들로부터 보호되었다 (도 19). 불활성화 백신으로 면역화된 마우스들은 무-백신 마우스들과 유사한 감염에 희생되었다.

[0209] 실시예 10: M2KO(Δ TK) 바이러스는 호흡관 또는 다른 기관들에서 복제하지 않는다

[0210] 요약 - 본 실시예는 M2KO(Δ TK) 바이러스가 호흡관에서 복제하지 않거나 담비 모델에서 다른 기관들로 전염되지 않는 것을 설명한다. M2KO(Δ TK) 바이러스는 1×10^7 TCID₅₀의 용량 수준에서 3마리 수컷 담비들로 비강내 투여되었다. 대조군으로서, 3마리 수컷 담비들의 두 번째 그룹은 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스가 1×10^7 TCID₅₀의 용량으로 비강내 투여되었다. 바이러스 접종에 이어서, 담비들이 체중들, 체온들 및 매일 측정된 임상적 징후들로 접종 이후 3일까지 사망물에 대해 관찰되었다. 부검은 접종 이후 3일째 모든 동물들에서 수행되었다. 기관들은 조직병리학 및 바이러스 역가들을 위해 수집되었다.

[0211] A/브리스번/10/2007 (H3N2)을 수여받은 대조군 그룹은 접종 이후 2일째 M2KO(Δ TK) 그룹에서는 관찰되지 않았던 체중의 일시적 감소 및 체온의 증가를 나타냈다. 활동 수준도 역시 A/브리스번/10/2007 그룹에서 감염-후 2 내지 3일째 재채기와 함께 감소되었다. 바이러스 노출과 연관된 활동 수준 또는 임상적 징후들에서 변화들은 M2KO(Δ TK) 그룹에서 전혀 관찰되지 않았다. 조직병리학적 분석은 M2KO(Δ TK) 바이러스에 노출된 담비들에서 관찰되지 않았던, A형 인플루엔자/브리스번/10/2007 (H3N2)에 노출된 동물들에서 코선반들의 변화들을 드러냈다. A/브리스번/10/2007에 대한 노출은 호흡기 상피의 위축, 호중성구들의 침윤 및 코선반들에서 부종을 유발하였다. 다른 기관들은 바이러스 접종에 의해 영향받지 않았다. 시험의 조건들 하에서, M2KO(Δ TK) 바이러스는 감염의 임상적 징후들을 유도하지 않았거나 분석된 기관들에서 조직학적 변화들을 유발하지 않았다.

[0213] 재료들 및 방법들

[0214] A. 백신 재료 및 대조군 바이러스: M2KO(Δ TK) 바이러스는 PR8의 내부 6가지 유전자들 (핵단백질 (NP), 중합효소 유전자들 (PA, PB1, PB2), 비-구조 단백질 (NS), 기질 (M))을 소유하지만, 기능적 M2 단백질, 뿐만 아니라 A형 인플루엔자/브리스번/10/2007-유사 A/우루과이/716/2007(H3N2)의 HA 및 NA 유전자들을 발현하지 않는 재조합 바이러스이다. A/브리스번/10/2007 (H3N2) 야생형 바이러스는 대조군 바이러스로서 작용하였고 IITRI에 의해 공급되었다. 바이러스들은 사용될 때까지 -65°C에서 냉동 보관되었다.

[0215] B. 테스트 항목 및 양성 대조군 용량 제형물: 316 μ L 당 1×10^7 TCID₅₀/mL의 M2KO(Δ TK) 바이러스 투여 용액은 8 μ L의 1×10^{10} TCID₅₀/mL을 2.528 mL PBS 내에서 희석하여 제조되었다. 316 μ L 당 1×10^7 TCID₅₀/mL의 역가로 A/브리스번/10/2007 (H3N2)은 미희석되어 사용되었다.

[0216] C. 동물들 및 동물 관리: 8마리 수컷 담비들은 트리플 F 농장들로부터 구입되었고 담비들의 6마리는 연구 상에 배치되었다. 동물들은 연구 개시 시점에 대략 4개월령이었다. 동물들은 공급자에 의해 건강하고 감염성 질환들에 대한 항체들이 없는 것으로 보증되었다. 도착 시 동물들은 종이-내충을 가진 폐기물 팬들이 위에 달린 바닥판을 갖춘 임시 와이어 사육상자들에서 홀로 수용되었다. 동물실 및 사육상자들은 청소되었고 동물 접수 이전에 허용된 동물 관리 관행들 및 적절한 표준 작동 절차들에 따라 위생처리 되었다. 보증된 Teklad 글로벌 담비 다이어트 #2072 (테크라드 다이어트사 (Teklad Diets), 매디슨 WI) 및 시카고시 수돗물이 자유롭게 제공되었고 매일 적어도 한 번 새로이 준비되었다. 동물실들에서 형광등 조명은 12시간 명/암 주기로 유지되었다. 동물실 온도 및 상대 습도는 개별 프로토콜 한계들 이내이었고, 연구과정 동안 각각 22.0 내지 25.0°C 및 33 내지 56%의 범위를 가졌다.

[0217] D. 동물 격리 및 무작위화: 담비들은 무작위화 이전에 5일 동안 격리되어 유지되었고 매일 관찰되었다. 동물들의 일반적인 양호한 건강을 가리키는 매일의 관찰들을 기초로 하여, 담비들은 무작위화 및 테스트를 위해 격리로부터 방출되었다. 격리에 이어서, 담비들은 체중을 재었고 유사한 그룹 평균 수치들을 생산하였던 체중들을

기초로 하는 전산화된 무작위화 절차를 사용하여 [ToxData® 버전 2.1.E.11 (PDS 병리학 데이터 시스템사, 바젤, 스위스)] 처리 그룹들로 할당되었다. 그룹 내에서, 모든 체중들은 그들의 평균의 20% 이내이었다. 연구를 위해 선택된 동물들은 귀 태그 및 자동무선기 (transponder)에 의해 영구적 확인번호를 받았고 개별 사육상자 카드들도 역시 개별적 번호들 및 그들의 그룹에 의해 연구 동물들을 확인하였다. 할당된 확인하는 번호들은 연구 내에서 독특하였다.

[0218] E. 실험적 설계: 모든 동물 절차들은 IIT 연구소에서 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 승인된 프로토콜들에 따라 동물 생체안전성 수준-2 시설에서 수행되었다. 연구 개시의 시점에서 4개월령의 6마리 담비들 (트리플 F 농장들, Sayre PA)이 연구를 위해 사용되었다. 감염 이전에, 담비들은 체중을 측정하고 기저선 체온을 확립하도록 3일 동안 감시되었다. 온도 측정들이 각각의 담비에 피하로 이식된 자동무선기 (바이오메딕 데이터 시스템사, Seaford, DE)를 통해 매일 기록되었다. 혈액은 연구 개시 이전에 목정맥을 통해 채취되었고, 혈청은 인플루엔자 항체들에 대해 테스트되었다. 인플루엔자 항체들이 없는 연구 동물들은 도 15에서 나타난 바와 같이, 무작위화되었고 2개의 그룹들로 (3마리 담비들/그룹) 나뉘었다. 3마리 담비들의 그룹은 마취되었고 M2KO(Δ TK) 바이러스의 1×10^7 TCID₅₀에서 316 μ L의 단일 용량으로 비강내 접종되었다. 대조군 그룹 (3마리 담비들)은 A/브리스번/10/2007 (H3N2)의 1×10^7 TCID₅₀에서 316 μ L으로 접종되었다. 담비들은 매일 체중, 체온 및 임상적 징후들을 감시하도록 관찰되었다. 접종-후 3일째, 담비들 (그룹당 3마리 담비들)은 안락사되었고 부검되었다. 다음의 조직 시료들이 수집되었다: 코선반들, 기관지들, 폐들, 신장들, 췌장들, 후각 망울들, 뇌들, 간들, 비장들, 소장들 및 대장들. 수집된 시료들의 한 부분은 조직학적 평가를 위해 완충된 중성 포르말린으로 고정되었고 시료들의 나머지 부분은 바이러스 역가측정을 위해 -65°C에서 보관되었다. 표 15는 면역화 및 시료 수집 스케줄을 나타낸다.

표 15

그룹	용량	N	기관 수집 (감염 후 일수)
M2KO	1×10^7 TCID ₅₀	3	3
브리스번/10	1×10^7 TCID ₅₀	3	3

[0219]

[0220] F. 바이러스 접종: 담비들은 M2KO(Δ TM) 바이러스 또는 야생형 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스 둘 중 하나로 접종되었다. 냉동 스톱 바이알은 해동되었고 포스페이트 완충된 식염수 용액에서 적당한 농도로 희석되었다. 담비들은 케타민/자일라진으로 마취되었고, 바이러스 용량은 M2KO(Δ TK) 바이러스의 경우 316 μ L 및 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스의 경우 316 μ L의 부피로 비강내로 투여되었다. A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스의 접종 역가를 검증하기 위하여, TCID₅₀ 검정법이 제조된 바이러스 도전 용액의 일정량으로 IIT RI에서 수행되었다. 바이러스 역가 검정법은 일리노이 기술학 연구소 (IITRI)의 표준 작동 절차들에 따라 수행되었다.

[0221] G. 유병율/사망률 관찰들: 도전에 이어서, 모든 동물들은 사망률 또는 유병율의 증거에 대해 매일 두 번 관찰되었다. 동물들은 도전-후 3일 동안 관찰되었다. 동물들은 정맥내로 투여된 소듐 펜토바비탈 150 mg/kg을 과량 투여하여 안락사되었다.

[0222] H. 체중들 및 체중 변화: 동물들의 체중들은 접수 시 (무작위 10% 시료), 무작위화 시 (-3일 내지 0일), 그리고 바이러스 접종 이후 매일 기록되었다.

[0223] I. 임상적 관찰들: 온도에서 변화 (섭씨 온도로)는 각각의 담비를 위해 매일 결정되었다. 식욕부진의 임상적 징후들, 호흡곤란, 재채기, 기침 및 콧물과 같은 호흡기 징후들 및 활동의 수준은 매일 평가되었다. Reuman, et al., "Assessment of signs of Influenza illness in the ferret model", *J. Virol*, Methods 24: 27-34 (1989)에서 기술된 것을 기초로 하는 점수매김 체계는 다음과 같이 활동 수준을 평가하는 데 사용되었다: 0, 각성하고 놀기; 1, 각성하지만 자극될 때만 놀기; 2, 각성하지만 자극될 때도 놀지 않음; 그리고 3, 각성하지 않음.

고 자극될 때도 놀지 않음. 상대적 무활동 지표 (RII)는 연구의 지속기간 동안 관찰 (일) 당 담비들의 그룹 당 평균 점수로서 계산되었다.

- [0224] J. 안락사: 연구 동물들은 소듐 펜토바비탈 150 mg/kg의 정맥내 용량에 의해 안락사되었다. 사망은 관찰가능한 심장박동 및 호흡의 부재에 의해 검증되었다. 부검들은 모든 연구 동물들에서 수행되었다.
- [0225] K. 부검: 코선반들, 기관지들, 폐들, 신장들, 췌장들, 후각 망울들, 뇌, 간, 비장, 소장들 및 대장들이 수확되었다. 수집된 시료들의 한 부분은 중성 포르말린으로 고정되었고 시료들의 나머지 부분은 냉동 및 보관을 위해 IITRI 직원에게 주어졌다. 역가들을 위해 수확된 조직은: 오른쪽 코선반들, 상부 1/3의 기관지들, 오른쪽 뇌측 폐엽, 오른쪽 신장, 췌장들의 오른쪽 팔 (십이지장 근처), 오른쪽 후각 망울, 오른쪽 뇌, 간의 우측엽, 비장의 오른쪽 절반 (복강 개방 시 관찰되는 비장의 말단), 소장 및 대장이다.
- [0226] L. 조직병리학적 분석: 조직들은 파라핀 블록들로 가공되었고, 대략 5-마이크론 두께로 절편화되었으며, 헤마톡실린 및 에오신 (H & E)으로 염색되었다.
- [0227] M. 혈청 수집: 전-백신접종 (-3일) 혈청은 모든 담비들로부터 수집되었다. 담비들은 케타민 (25 mg/kg) 및 자일라진 (2 mg/kg) 혼합물로 마취되었다. 혈액 시료 (대략 0.5 내지 1.0 mL)는 각각의 담비로부터 얻은 대정맥을 통해 채취되었고 혈청으로 가공되었다. 혈액은 혈청 젤 Z/1.1 튜브들 (사스테드사 (Sarstedt Inc.) Newton, NC) 내로 수집되었고 혈청 수집하기 이전에 1시간 정도 동안 실온에서 보관되었다. 혈청 젤 Z/1.1 튜브들은 $10,000 \times g$ 에서 3분 동안 원심분리되었고 혈청이 수집되었다. 개별적 전-접종 혈청 시료들이 수집되었고 각각으로 시료로부터 2개의 분량들이 만들어졌다. 하나의 분량은 담비들이 A형 인플루엔자 바이러스들에 대한 항체들이 없는 점을 검증하도록 연구의 개시 이전에 테스트되었고 혈청의 나머지 분량은 -65°C 에서 보관되었다.
- [0228] N. 혈구응집 억제 (HI) 검정법: 혈청 시료들은 비특이적 혈구응집의 저해제들을 제거하도록 수용체-과과 효소 (RDE) (덴카 세이켄사 (Denka Seiken), 도쿄, 일본)로 처리되었다. RDE는 제조사의 지침들에 따라 재구성되었다. 혈청은 RDE에서 1 : 3으로 희석되었고 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 수조에서 18 내지 20시간 동안 배양되었다. 동일한 부피의 2.5% (v/v) 소듐 시트레이트의 첨가 이후에, 시료들은 $56 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 수조에서 30 \pm 5분 동안 배양되었다. RDE 처리 이후에 0.85% NaCl은 1 : 10의 최종 혈청 희석까지 각각의 시료에 첨가되었다. 희석된 시료들은 다음으로 두 벌씩 4개의 2배 희석들 (1 : 10 내지 1 : 80)로 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)에서 희석되었고 다음으로 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스의 4의 혈구응집 단위들과 배양되었다. 배양 이후, 0.5% 닭 적혈구 세포들이 각각의 시료에 첨가되었고 배양되었다. 혈구응집의 존재 또는 부재가 다음으로 점수 매겨졌다.
- [0229] O. 바이러스 역가들: 도전-전 및 -후 바이러스 접종액 시료들에서 감염성 바이러스의 농도는 마딘-다비 고양이 신장 (MDCK) 세포들의 TCID₅₀에 의해 결정되었다. 간략하게, -65°C 에서 보관된 시료들은 해동되었고 세포성 잔재물을 제거하도록 원심분리되었다. 그 결과로 얻은 상청액은 페니실린/스트렙토마이신, 0.1% 젠타마이신, 3% NaCO₃, 0.3% BSA 분획 V (시그마사, 세인트루이스, MO), 1% MEM 비타민 용액 (시그마사) 및 1% L-글루타민 (메디아테크사 (Mediatech), Manassas, VA, 미국)을 포함하는 둘베코 변형된 이글 배지 (DMEM) (짐코사 (Gibco), 칼스베드, CA, 미국)를 넣은 96-웰 마이크로타이터 플레이트에서 세 벌씩 10배로 희석되었다. 10배 일련의 희석들이 만들어진 이후에, 100 L가 MDCK 세포들의 단일층을 포함하는 96-웰 플레이트의 개별 웰들 내로 전달되었다. 플레이트들은 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 $5 \pm 2\%$ CO₂ 70% 습도로 배양되었다. 48시간 이후에, 웰들은 세포변성 효과 (CPE)에 대해 관찰되었다. 각각의 웰 (50 μL)로부터 얻은 상청액은 96 웰 플레이트로 전달되었고 혈구응집 (HA) 활성이 결정되었고 기록되었다. 상청액의 HA 활성은 0.5% 포장된 칠면조 적혈구 (cRBCs)로의 HA 검정법에 의해 평가되었다. TCID₅₀ 역가들은 Reed LJ and Muench H, "A simple method for estimating 50% endpoints", *Am. J. Hygiene* 27: 493-497 (1938)의 방법을 사용하여 계산되었다.
- [0230] P. 데이터 분석: 체중들 및 체중 증가들 (손실들) 그리고 체온에서 변화들은 각각의 테스트 그룹을 위한 평균 및 평균의 표준 편차들로서 표현된 각각의 개별 동물에 대해 결정되었다.
- [0232] 결과들
- [0233] M2KO(ΔTM) 바이러스 또는 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스 둘 중 하나로의 접종 이후에, 담비들은 생존 및 감염의 임상적 징후들에 대해 감시되었다. 결과들은 표 16A 및 표 16B에 표현되어 있다. 모든 담비들은 M2KO(ΔTM) 및 A/브리스번/10/2007 (H3N2)로의 감염에서 생존하였다. A/브리스번/10/2007가 접종된 담비들은 2일 및 3일째 호흡기 징후들 (재채기)를 나타냈다. A/브리스번/10/2007로 접종된 담비들의 상대적

무활동 지표는 0.67이었던 한편; M2KO(Δ TM)로 접종된 담비들은 상대적 무활동 지표 0.0로 활동 감소 수준을 전혀 보이지 않았다.

[0234] 바이러스 접종 이후에 체중 및 체온에서 변화들은 도 20 및 도 21에 나타나 있다. A/브리스번/10/2007 (H3N2)으로 접종 이후에, 2 내지 3%의 체중 감소가 접종-후 2일째 모든 동물들에서 관찰되었다. 최소 내지 체로 체중 감소가 M2KO(Δ TM) 바이러스로 접종된 담비들에서 관찰되었다. 1마리의 M2KO(Δ TM) 접종된 담비는 접종-후 2일째 1%의 체중 감소를 나타냈다. 40.3 내지 40.7°C의 증가된 체온들은 접종-후 2일째 A/브리스번 10/2007로 접종된 담비들에서 관찰되었다. 체온들은 3일까지 정상 범위로 회복되었다. M2KO(Δ TM) 접종된 담비들의 체온들은 연구의 지속기간 전체를 통하여 정상 범위로 남아있었다. M2KO(Δ TM) 바이러스가 호흡관 또는 다른 기관들에서 복제하고 병리학을 유도하는지 여부를 결정하기 위하여, 담비들의 조직들은 접종-후 3일째 조직학적으로 조사되었고 A/브리스번/10/2007으로 접종된 담비들로부터 얻은 조직들과 비교되었다. A/브리스번/10/2007로 접종된 담비들에서, 병리학은 코선반들에서만 관찰되었다. 호흡기 상피의 위축, 호중성구들의 침윤물들, 및 부종이 코선반들에서 관찰되었다. 바이러스의 감염과 연관된 조직병리학적 변화들은 M2KO(Δ TM) 바이러스로 접종된 담비들에서 전혀 관찰되지 않았다. 도전-전 및 -후 바이러스 용량 용액들의 농도들은 각각 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL 및 $10^{7.75}$ TCID₅₀/mL이었고, 투여 전체를 통하여 도전 물질의 양호한 안정성을 가리킨다. 표 16a는 담비들에서 생존 및 감염의 임상적 징후들 상에 미치는 바이러스 접종의 효과를 나타낸다. a 바이러스 접종 이전에 담비 혈청에서 동종유래 바이러스에 대한 혈구응집 억제 (HI) 항체 역가들. b 임상적 징후들은 바이러스 접종 이후 3일 동안 관찰되었다. 졸음을 제외하고, 임상적 징후들을 위한 연구들은 징후를 가진 담비들의 수/전체 수로서 주어졌다. 호흡기 징후들은 재채기를 포함하였다. c 점수매김 체계를 기초로 하여 관찰 3일 동안 매일 두 번 결정되었고, 3일 기간 경과 시 관찰 (일) 당 담비들의 그룹 당 평균 점수로서 계산되었다. 접종 이전에 상대적 무활동 지표는 0이었다. 표 16b는 M2KO(Δ TM)은 3일째 수확된 담비 호흡 기관들에서 복제하지 않는 점을 나타낸다.

표 16

그룹	N	혈청 HI 역가 ^a	전체 사망 수	임상적 징후 ^b		
				호흡기 징후 (발병일 관찰됨)	식욕부진	졸음 (RII) ^c
M2KO	3	<10	0/3	0/3	0/3	0
브리스번/10	3	<10	0/3	2/3 (2)	0/3	0.67

[0235]

바이러스 역가 (log pfu/g)		
	브리스번/10	M2KO(Δ TM)
코선반	5.43	0
폐	0	0

[0236]

[0238]

결론

[0239]

본 실시예는 접종-후 3일째까지, M2KO(Δ TM) 바이러스는 야생형 바이러스의 감염과 연관된 질환의 임상적 징후

들 또는 조직병리학적 변화들을 유도하지 않는 것을 보여준다. 이것은 본 기술학의 M2KO(Δ TM) 바이러스가 비강내 인플루엔자 백신들을 위해 유용한 점을 보여준다.

[0241] 실시예 11: 다른 백신들과 대비한 M2KO(Δ TM) 바이러스의 면역 반응 및 보호적 효과들

[0242] 요약 - 본 실시예는 담비 모델에서 M2KO(Δ TM)백신에 의해 발현된 면역 반응 및 백신의 보호적 효과들을 설명한다. M2KO(Δ TM) 바이러스는 1×10^7 TCID₅₀의 용량 수준에서 12마리 수컷 담비들에게 비강내로 투여되었다. 대조군으로서, 12마리의 담비들의 두 번째 그룹은 1×10^7 TCID₅₀의 용량으로 FM#6 바이러스가 비강내로 투여되었다. 담비들의 세 번째 그룹은 OPTI-MEMTM이 위약 대조군으로서 투여되었다. 감작 단독 또는 감작-추가자극 백신접종 요법이 각각의 치료 그룹에 사용되었다. 감작-추가자극 백신접종 요법을 수여받은 담비들은 감작 백신 (0일)이 투여되고 28일 이후에 추가자극 백신접종 (28일)이 투여되었다. 감작 백신 단독을 수여받은 담비들은 추가자극 백신이 감작-추가자극 담비들에게 주어진 동일한 날 (28일)에 단일한 백신접종이 투여되었다. 각각의 백신접종에 이어서, 담비들은 접종-후 14일 동안 사망률에 대해 매일 측정된 체중들, 체온들 및 임상적 징후들로 관찰되었다. 코 세척액들이 바이러스성 흐름을 조사하도록 감작-후 백신접종 1, 3, 5, 7 및 9일째 담비들로부터 수집되었다. 코 세척액들 및 혈청은 시간 경과 시 항체 수준들을 평가하도록 백신접종-후 모든 담비들로부터 매주 수집되었다.

[0243] 모든 동물들은 1×10^7 TCID₅₀의 A/브리스번/10/2007 (H3N2)으로 56일째 비강내로 도전되었다. 도전에 이어서, 담비들은 접종 후 14일 동안 사망률에 대해 매일 측정된 체중들, 체온들 및 임상적 징후들로 감시되었다. 코 세척액들이 바이러스 역가들 위한 각각의 그룹에서 감작-후 백신접종 1, 3, 5, 7 및 9일째 담비들로부터 수집되었다. 추가적으로, 혈청이 분석을 위해 생존한 담비들로부터 도전-후 (70일) 수집되었다. 부검은 도전 후 3일째 그룹 당 3마리 담비들에서 수행되었다. 기관들이 조직병리학 및 바이러스 역가들을 위해 수집되었다.

[0244] 백신 관련 부작용들은 5가지 그룹들 중에서 전혀 관찰되지 않았다. 도전 이후, 위약 대조군 그룹은 도전 이후 2일째 체온에서 증가 및 체중에서 감소를 나타냈다. 체중에서 감소는 M2KO(Δ TM) 및 FM#6 백신접종된 그룹들에서도 역시 관찰되었다: 그러나, 감소는 OPTI-MEMTM 그룹에서 관찰된 것 이하까지이었다. 활동 수준들은 임의 그룹들에서 감소되지 않았다: 그러나 재채기는 도전 이후 모든 그룹들에서 관찰되었다. 조직병리학적 분석은 OPTI-MEMTM 대조군 그룹에서 폐 침윤물들과 비교 시 백신접종된 담비들의 폐에서 혼합된 세포 침윤물들의 중증도의 증가를 드러냈다. 코선반들에서, M2KO(Δ TM) 및 FM#6 둘 중 하나의 감작 또는 감작을 더한 추가자극 요법을 수여받은 동물들은 OPTI-MEMTM 대조군 그룹과 비교 시 호흡 상피의 위축의 더 낮은 중증도를 가졌다. M2KO(Δ TM) 바이러스로의 백신접종은 FM#6 바이러스와 유사한 바이러스 도전에 대항한 보호작용을 제공하는 것으로 보였다.

[0246] 재료들 및 방법들

[0247] A. 백신 재료: M2KO(Δ TK) 바이러스는 PR8의 내부 6가지 유전자들 (핵단백질 (NP), 중합효소 유전자들 (PA, PB1, PB2), 비-구조 단백질 (NS), 기질 (M))을 소유하지만, 기능적 M2 단백질, 뿐만 아니라 A형 인플루엔자/브리스번/10/2007-유사 A/우루과이/716/2007(H3N2)의 HA 및 NA 유전자들을 발현하지 않는 재조합 바이러스이다. FM#6 바이러스는 FluMist® (2009 내지 2010년 제형)으로부터 나온 A/우루과이/716/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스의 클론 #6이다. M2KO(Δ TM) 바이러스 및 FM#6 바이러스는 316 μ L 용량의 1×10^7 TCID₅₀ (50% 조직 배양 감염성 용량들)로 동물들에게 비강내로 투여되었다.

[0248] B. 테스트 항목 및 양성 대조군 용량 제형물: 316 μ L 당 1×10^7 TCID₅₀/mL의 M2KO(Δ TK) 바이러스 투여 용액이 120 μ L의 1×10^9 TCID₅₀/mL을 3.680 mL PBS 내에서 희석하여 제조되었다. 316 μ L 당 1×10^7 TCID₅₀/mL의 역가로의 FM#6 바이러스는 120 μ L의 1×10^9 TCID₅₀/mL을 3.680 mL PBS 내에서 희석하여 제조되었다.

[0249] C. 동물들 및 동물 관리: 36마리 수컷 담비들은 트리플 F 농장들로부터 구입되었고 담비들의 30마리는 연구 상에 배치되었다. 동물들은 연구 개시 시점에 대략 4개월령이었다. 동물들은 공급자에 의해 건강하고 감염성 질환들에 대한 항체들이 없는 것으로 보증되었다. 도착 시 동물들은 종이-내층을 가진 폐기물 팬들이 위에 달린 바닥판을 갖춘 임시 와이어 사육상자들에서 홀로 수용되었다. 동물실 및 사육상자들은 청소되었고 동물 접수

이전에 허용된 동물 관리 관행들 및 적절한 표준 작동 절차들에 따라 위생처리 되었다. 보증된 Teklad 글로벌 담비 다이어트 #2072 (테크라드 다이어트사, 매디슨 WI) 및 시카고시 수돗물이 자유롭게 제공되었고 주당 적어도 세 번 새로이 준비되었다. 동물실들에서 형광등 조명은 12시간 명/암 주기로 유지되었다. 동물실 온도 및 상대 습도는 개별 프로토콜 한계들 이내이었고, 연구과정 동안 각각 20.0 내지 25.0℃ 및 30 내지 63%의 범위를 가졌다.

[0250] D. 동물 격리 및 무작위화: 담비들은 무작위화 이전에 7일 동안 격리되어 유지되었고 매일 관찰되었다. 동물들의 일반적인 양호한 건강을 가리키는 매일의 관찰들을 기초로 하여, 담비들은 무작위화 및 테스트를 위해 격리로부터 방출되었다. 격리에 이어서, 담비들은 체중을 재었고 유사한 그룹 평균 수치들을 생산하였던 체중들을 기초로 하는 전산화된 무작위화 절차를 사용하여 [ToxData® 버전 2.1.E.11 (PDS 병리학 데이터 시스템사, 바젤, 스위스)] 처리 그룹들로 할당되었다. 그룹 내에서, 모든 체중들은 그들의 평균의 20% 이내이었다. 연구를 위해 선택된 동물들은 귀 태그 및 자동무선기에 의해 영구적 확인번호를 받았고 개별 사육상자 카드들도 역시 개별적 번호들 및 그룹에 의해 연구 동물들을 확인하였다. 할당된 확인하는 번호들은 연구 내에서 독특하였다.

[0251] E. 실험적 설계: M2K0(ΔTM) 백신 효능을 평가하기 위하여, 담비들은 M2K0(ΔTM) 바이러스, 감기 적응된 약독화 생바이러스 (FM#6) 또는 배지 (OPTI-MEM™) 배지에 의해 면역화된 모의 대조군으로 면역화되었다. 동물들의 체중, 체온 및 임상적 증상들이 감시되었고 면역학적 반응들이 평가되었다. 연구 개시의 시점에서 4개월령의 30 마리 담비들 (트리플 F 농장들, Sayre PA)이 연구를 위해 사용되었다. 모든 동물 절차들은 동물 생체안전성 수준-2 또는 생체안전성 수준-3 시설로 IIT 연구소에서의 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 승인된 프로토콜들에 따라 수행되었다. 접종 이전에, 담비들은 체중을 측정하고 기저선 체온들을 확립하도록 3일 동안 감시되었다. 온도 측정들이 각각의 담비에 피하로 이식된 자동무선기 (바이오메딕 데이터 시스템사, Seaford, DE)를 통해 매일 기록되었다. 혈액은 연구 개시 이전에 채취되었고, 혈청은 인플루엔자 항체들에 대해 테스트되었다. A/브리스번/10/2007 (H3N2)에 대한 HAI (혈구응집 억제) 역가들 40을 가진 담비들만이 혈청음성으로 고려되었고 본 연구에서 사용되었다. 연구 동물들은 도 17에서 나타난 바와 같이, 무작위화되었고, 5가지의 그룹들로 (6마리 담비들/그룹) 나뉘었다. 2가지 그룹들 (1 및 3)은 M2K0(ΔTM) 바이러스를 수여받았고 2가지 그룹들 (2 및 4)는 FM#6 바이러스를 수여받았다. 1가지 그룹 (5)은 OPTI-MEM™으로 모의 면역화되었다. 각각의 백신 그룹 내에서, 담비들은 2가지 백신 요법들로 나뉘었고, 6마리는 감작 백신접종을 수여받았고 (감작 단독) 및 6마리는 감작 백신접종을 수여받고 감작 백신접종 이후 28일째 추가자극 백신이 이어졌다 (감작/추가자극).

[0252] 감작/추가자극 그룹들: 담비들은 M2K0(ΔTK) 바이러스의 1×10^7 TCID₅₀의 316 μL의 단일 용량으로 0일 및 28일째 비강내 접종되었다. 대조군 그룹들은 FM#6의 316 μL의 1×10^7 TCID₅₀ (M2K0(ΔTM)과 동일한 용량) 또는 316 μL의 OPTI-MEM™으로 접종된 모의 대조군으로 0일 및 28일째 비강내 접종되었다. 담비의 체온들, 체중들 및 임상적 징후들이 접종-후 14일 동안 매일 감시되었다. 코 세척액들은 OPTI-MEM™ 대조군 그룹을 포함하는 모든 담비들로부터 세포들에서 바이러스 역가측정을 위해 감작 백신접종-후 1, 3, 5, 7, 9 및 14일째, 그리고 항체 역가측정을 위해 21일 및 49일째 수집되었다. 코 세척 시료들은 -65℃에서 보관되었다. 혈액은 접종 이전에 (-3일 내지 -5일) 그리고 7, 14, 21, 35, 42 및 49일째 수집되었고, 혈청은 엘라이자 및 HI 검정법에 의한 항체 역가의 측정 시까지 -65℃에서 보관되었다.

[0253] 감작 단독 그룹: 담비들은 M2K0(ΔTK) 바이러스의 1×10^7 TCID₅₀의 316 μL의 단일 용량으로 28일째 비강내로 접종되었다. 대조군 그룹들은 FM#6의 316 μL의 1×10^7 TCID₅₀ (M2K0(ΔTM)과 동일한 용량) 또는 316 μL의 OPTI-MEM™으로 접종된 모의 대조군으로 0일 및 28일째 비강내 접종되었다. 담비의 체온들, 체중들 및 임상적 징후들은 접종-후 14일 동안 매일 감시되었다. 코 세척액들은 모든 담비들로부터 세포들에서 바이러스 역가측정을 위해 29, 31, 33, 35, 37 및 42일째, 그리고 항체 역가측정을 위해 49일째 수집되었다. 코 세척 시료들은 -65℃에서 보관되었다. 혈액은 접종 이전에 (23일 내지 25일) 그리고 35, 42 및 49일째 수집되었고, 혈청은 엘라이자 및 HI 검정법에 의한 항체 역가의 측정 시까지 -65℃에서 보관되었다. 모든 담비들은 야생형 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 1×10^7 TCID₅₀의 316 μL의 용량으로 감작/추가자극 백신이 투여된 이후 4주, 56일째 도전되었다. 담비의 체온들, 체중들 및 임상적 징후들은 도전 이후 14일 동안 감시되었고 코

세척액들 및 기관들이 수집되었다. 코 세척액들은 도전된 담비들로부터 도전-후 1, 3, 5, 7, 9 및 14일 (57, 59, 61, 63, 65 및 70일)째 수집되었고 시료들은 세포들에서 바이러스 역가측정을 위해 -65℃에서 보관되었다. 도전-후 3일째 (59일), 동물들 (그룹 당 3마리 동물들, 전체 15마리 동물들)이 안락사되었고 다음의 조직 시료들이 수집되었다: 코선반들, 기관지들 및 폐들. 수집된 시료들의 한 부분은 조직학적 평가를 위해 완충된 중성 포르말린으로 고정되었고 시료들의 나머지 부분은 바이러스 역가측정을 위해 -65℃에서 보관되었다. 혈액은 도전-후 14일째 (70일) 수집되었고 모든 생존하는 동물들은 안락사되었다. 표 17은 백신접종 및 시료 수집 스케줄을 나타낸다. 1. 1×10^7 TCID₅₀의 용량으로 비강내 접종됨. 2. 감작 백신접종 이후에 동물들로부터 수집된 코 세척액들만. 3. 조직학 및 바이러스 역가들을 위해 그룹 당 3마리 담비들로부터 수집된 기관들 (코선반, 기관지 및 폐).

표 17

그룹	백신 바이러스1	N	백신접종 (일)	코 세척액 (일)	도전 (일)	코 세척액 (일)	기관3 (n=3)(일)	혈청 수집
감작 단독								
1	M2KO	6	28	29, 31, 33, 35, 37, 42, 49	56	57, 59, 61, 63, 65, 70	59	35, 42, 49, 70
2	FM#6	6	28	29, 31, 33, 35, 37, 42, 49	56	57, 59, 61, 63, 65, 70	59	35, 42, 49, 70
감작/추가자극								
3	M2KO	6	0, 28	1, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 49	56	57, 59, 61, 63, 65, 70	59	7, 14, 21, 35, 42, 49, 70
4	FM#6	6	0, 28	1, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 49	56	57, 59, 61, 63, 65, 70	59	7, 14, 21, 35, 42, 49, 70
5	운반체 (대조군)	6	0, 28	1, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 49	56	57, 59, 61, 63, 65, 70	59	7, 14, 21, 35, 42, 49, 70

[0254]

[0255]

F. 바이러스 접종: 담비들은 M2KO(Δ TM) 바이러스 또는 FM#6 A형 인플루엔자 바이러스 둘 중 하나로 접종되었다. 냉동 스톱의 바이알은 해동되었고 포스페이트 완충된 식염수 용액에서 적당한 농도로 희석되었다. 담비들은 케타민/자일라진으로 마취되었고, 바이러스 용량은 M2KO(Δ TK) 바이러스의 경우 316 μ L 및 FM#6 바이러스의 경우 316 μ L의 부피로 비강내 투여되었다. M2KO(Δ TM) 또는 FM#6 바이러스들의 접종 역가를 검증하기 위하여, 투여 용액들의 분량들은 투여 이전 (전-용량) 및 투여 이후 (후-용량)이 수집되었다. 분량들은 바이러스 역가측정을 위해 -65℃에서 보관되었다.

[0256]

G. 도전 바이러스: A형 인플루엔자 바이러스, 균주 A/브리스번/10/2007, 혈청형 H3N2가 담비들을 도전하는 데 사용되었다. 바이러스는 사용 전 대략 -65℃에서 보관되었다. 도전 바이러스의 용량 수준은 316 μ L의 부피에서 1×10^7 TCID₅₀로 제조되었다. 정량적 바이러스 감염도 검정법, TCID₅₀ 검정법은 제조된 바이러스 도전 용액의 일정량으로 IITRI에서 수행되었다. 바이러스 역가 검정법은 IITRI 표준 작동 절차들에 따라 수행되었다.

[0257]

H. 유병율/사망률 관찰들: 도전에 이어서, 모든 동물들은 사망률 또는 유병율의 증거에 대해 매일 두 번 관찰되었다. 동물들은 백신 접종 이후 14일 동안 그리고 도전 이후 14일 동안 관찰되었다.

[0258]

I. 체중들 및 체중 변화: 동물들의 체중들은 접수 2일 이내 및 무작위화 시 기록되었다. 모든 연구 동물들은 접종 이전에, 각각의 백신접종에 이어서 14일 동안 매일 무게를 재었고, 도전 후 14일 동안 매일 평가되었다. 접종 이전에, 담비들은 기저선 체온들을 측정하고 확립하도록 3 내지 5일 동안 감시되었다. 온도 측정들은 각각의 담비에 피하로 이식된 자동무선기 (바이오메딕 데이터 시스템사, Seaford, DE)를 통해 각각의 백신접종에 이어서 14일 동안 매일 기록되었고 또한 도전-후 14일 동안 매일 기록되었다. 온도의 변화 (섭씨 온도)가 각각의 동물을 위해 각각의 시간대에서 계산되었다.

- [0259] J. 임상적 관찰들: 온도에서 변화 (섭씨 온도로)는 각각의 담비를 위해 매일 결정되었다. 식욕부진의 임상적 징후들, 호흡곤란, 재채기, 기침 및 콧물과 같은 호흡기 징후들 및 활동의 수준은 매일 평가되었다. Reuman, *et al.*, "Assessment of signs of Influenza illness in the ferret model", *J. Virol. Methods* 24: 27-34 (1989)에서 기술된 것을 기초로 하는 점수매김 체계는 다음과 같이 활동 수준을 평가하는 데 사용되었다: 0, 각성하고 놀기; 1, 각성하지만 자극될 때만 놀기; 2, 각성하지만 자극될 때도 놀지 않음; 그리고 3, 각성하지 않고 자극될 때도 놀지 않음. 상대적 무활동 지표 (RII)는 연구의 지속기간 동안 관찰 (일) 당 담비들의 그룹 당 평균 점수로서 계산되었다.
- [0260] K. 생존 검토들: 두 번의 생존 검토들이 연구 전체를 통하여 모든 연구 동물들에서 매일 수행되었다. 생존 검토들 둘 다는 임상적 관찰들과 동시에 수행되었다. 두 번째 검토는 동일한 날 이내에 이후 수행되었다.
- [0261] L. 코 세척액들: 담비들은 케타민 (25 mg/kg) 및 자일라진 (2 mg/kg) 혼합물로 마취되었고, 페니실린 (100 U/mL), 스트렙토마이신 (100 µg/mL), 및 젠타마이신 (50 µg/mL)을 포함하는 0.5 mL의 무균 PBS가 각각의 콧구멍 내로 주입되었고 담비에 의해 배출될 때 표본 컵에 수집되었다. 코 세척액은 동결건조바이알 내에 수집되었고 회수된 부피가 기록되었다.
- [0262] M. 안락사: 연구 동물들은 소듐 펜토바비탈 150 mg/kg의 정맥내 용량에 의해 안락사되었다. 사망은 관찰가능한 심장박동 및 호흡의 부재에 의해 검증되었다.
- [0263] N. 부검: 부검은 찰스 리버 연구소, 병리학 협회 (PAI)에 의해 수행되었다. PAI팀은 관리자 병리학자 및 2명의 검사자들로 구성되었다. 코선반들, 기관지들 및 폐들이 수확되었다. 각각의 조직의 한 부분은 포르말린으로 고정되었고 나머지 부분은 냉동 및 보관을 위해 IITRI 직원에게 주어졌다. 역가들을 위해 수확된 조직은: 오른쪽 코선반들, 상부 1/3의 기관지들 및 오른쪽 뇌측 폐엽이다.
- [0264] O. 조직병리학적 분석: 각각의 부검에 이어서, 조직들은 PAI 시카고 시설로 전달되었다. 접수 시, 모두 15마리 담비들로부터 얻은 부분적 조직들은 파라핀 블록들로 가공되었고, 대략 5-마이크론 두께로 절편화되었으며, 헤마톡실린 및 에오신 (H & E)으로 염색되었다. 모든 파라핀 H & A 슬라이드들은 현미경으로 평가되었다.
- [0265] M. 혈청 수집: 전-백신접종 혈청 (그룹들 3, 4 및 5의 경우 -3일 그리고 그룹들 1 및 2의 경우 23일 내지 25일)은 담비들로부터 수집되었다. 접종-후, 혈청은 그룹들 3, 4 및 5로부터 7, 14, 21, 35, 42, 49 및 70일째 수집되었다. 혈청은 그룹들 1 및 2로부터 35, 42, 49 및 70일째 수집되었다. 담비들은 케타민 (25 mg/kg) 및 자일라진 (2 mg/kg) 혼합물로 마취되었다. 혈액 시료 (대략 0.5 내지 1.0 mL)는 각각의 담비로부터 얻은 대정맥을 통해 채취되었고 혈청으로 가공되었다. 혈청은 혈청 젤 Z/1.1 튜브들 (사스테드사, Newton, NC) 내로 수집되었고 혈청 수집하기 이전에 1시간 정도 동안 실온에서 보관되었다. 혈청 젤 Z/1.1 튜브들은 10,000 × g에서 3분 동안 원심분리되었고 혈청이 수집되었다.
- [0266] Q. 혈구응집 억제 (HI) 검정법: 혈청 시료들은 비특이적 혈구응집의 저해제들을 제거하도록 수용체-파괴 효소 (RDE) (덴카 세이켄사, 도쿄, 일본)로 처리되었다. RDE는 제조사의 지침들에 따라 재구성되었다. 혈청은 RDE에서 1 : 3으로 희석되었고 37°C ± 2°C 수조에서 18 내지 20시간 동안 배양되었다. 동일한 부피의 2.5% (v/v) 소듐 시트레이트의 첨가 이후에, 시료들은 56 ± 2°C 수조에서 30 ± 5분 동안 배양되었다. RDE 처리 이후에 0.85% NaCl은 1 : 10의 최종 혈청 희석까지 각각의 시료에 첨가되었다. 희석된 시료들은 다음으로 두 벌씩 4개의 2배 희석들 (1 : 10 내지 1 : 80)로 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)에서 희석되었고 다음으로 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스의 4의 혈구응집 단위들과 배양되었다. 배양 이후, 0.5% 조류 적혈구 세포들이 각각의 시료에 첨가되었고 30 ± 5분 동안 배양되었다. 혈구응집의 존재 또는 부재가 다음으로 점수 매겨졌다.
- [0267] R. 바이러스 역가들: 도전-전 및 -후 바이러스 접종액 시료들에서 감염성 바이러스의 농도는 마딘-다비 고양이 신장 (MDCK) 세포들의 TCID₅₀에 의해 결정되었다. 간략하게, -65°C에서 보관된 시료들은 해동되었고 세포성 잔재물을 제거하도록 원심분리되었다. 그 결과로 얻은 상청액은 페니실린/스트렙토마이신, 0.1% 젠타마이신, 3% NaCO₃, 0.3% BSA 분획 V (시그마사, 세인트루이스, MO), 1% MEM 비타민 용액 (시그마사) 및 1% L-글루타민 (메디아테크사, Manassas, VA, 미국)을 포함하는 둘베코 변형된 이글 배지 (DMEM) (집코사, 칼스베드, CA, 미국)를 넣은 96-웰 마이크로타이터 플레이트에서 세 벌씩 10배로 희석되었다. 10배 일련의 희석들이 만들어진 이후에, 100 µL가 MDCK 세포들의 단일층을 포함하는 96-웰 플레이트의 개별 웰들 내로 전달되었다. 플레이트들은 37°C ± 2°C에서 5 ± 2% CO₂ 70% 습도로 배양되었다. 48시간 이후에, 웰들은 세포변성 효과 (CPE)에 대해 관찰되었

다. 각각의 웰 (50 μ L)로부터 얻은 상청액은 96 웰 플레이트로 전달되었고 혈구응집 (HA) 활성이 결정되었고 기록되었다. 상청액의 HA 활성은 0.5% 포장된 칠면조 적혈구 (tRBCs)로의 HA 검정법에 의해 평가되었다. TCID₅₀ 역가들은 Reed LJ and Muench H, "A simple method for estimating 50% endpoints", *Am. J. Hygiene* 27: 493-497 (1938)의 방법을 사용하여 계산되었다.

[0268] S. 데이터 분석: 체중들 및 체중 증가들 (손실들) 그리고 체온의 변화들은 각각의 테스트 그룹을 위한 평균 및 평균의 표준 편차들로서 표현된 각각의 개별 동물에 대해 결정되었다.

[0270] 결과들

[0271] M2KO(Δ TM) 바이러스 또는 FM#6 바이러스 둘 중 하나로 비강내 백신접종 이후에, 담비들은 감염의 임상적 징후들에 대해 매일 감시되었다. 코 세척액들이 바이러스성 흐름을 감시하도록 감작 백신접종 이후에 수집되었고 혈청은 혈청 항체 역가들을 측정하도록 수집되었다. 결과들은 표 18A, 표 18B 및 표 18C에 나타나 있다. 표 18a는 담비들에서 생존 및 감염의 임상적 징후들 상에 미치는 백신접종의 효과를 나타낸다. a 바이러스 접종 이전에 담비 혈청에서 동종유래 바이러스에 대한 혈구응집 억제 (HI) 항체 역가들. b 임상적 징후들은 바이러스 접종 이후 3일 동안 관찰되었다. 졸음을 제외하고, 임상적 징후들을 위한 연구들은 징후를 가진 담비들의 수/전체 수로서 주어졌다. 호흡기 징후들은 재채기를 포함하였다. c 점수매김 체계를 기초로 하여 관찰 3일 동안 매일 두 번 결정되었고, 3일 기간 경과 시 관찰 (일) 당 담비들의 그룹 당 평균 점수로서 계산되었다. 접종 이전에 상대적 무활동 지표는 0이었다. 표 18b는 도전 이후에 담비 호흡 기관들에서 바이러스 역가들을 나타낸다. 표 18c는 담비에서 점막성 IgA 반응들을 나타낸다.

표 18

그룹	처리	N	혈청 HI 역가 a	전체 사망수	임상적 징후 b		
					호흡기 징후 (발병일 관찰됨)	식욕부진	졸음(RII)c
감작							
1	M2KO	6	<10	0/6	2/6 (8)	0/6	0
2	FM#6	6	<10	0/6	0/6	0/6	0
3	M2KO	6	<10	0/6	0/6	0/6	0.07
4	FM#6	6	<10	0/6	0/6	0/6	0.29
5	운반체 (대조군)	6	<10	0/6	0/6	0/6	0
추가자극							
3	M2KO	6	<10	0/6	0/6	0/6	0
4	FM#6	6	<10	0/6	2/6 (7)	0/6	0
5	운반체 (대조군)	6	<10	0/6	2/6 (4)	0/6	0

[0272]

	코션반 (N=3, Log pfu/g)	기관지 (N=3, Log pfu/g)
M2KO(Δ TM) 감작 단독	5.23 \pm 0.24	**
FluMist [®] 감작 단독	5.53 \pm 0.82	2.52 \pm 1.73
M2KO(Δ TM) 감작-추가자극	6.16 \pm 1.17	1.37 \pm 1.06
FluMist [®] 감작-추가자극	6.24 \pm 1.31	3.30 \pm 1.96
**미검출		

[0273]

도전-후 14 일째 α -HA ELISA IgA 역가:		
	코션반	혈청
M2KO(Δ TM) 감작 단독	14	미테스트
FluMist [®] 감작 단독	29	미테스트

[0274]

[0275]

모든 담비들은 M2KO(Δ TM) 바이러스 또는 FM#6 바이러스로의 백신접종에서 생존하였다. 감작 백신접종 이후에 M2KO(Δ TM) 바이러스로 접종된 2마리 담비들은 8일째 호흡기 징후들 (재채기)를 나타냈다. 추가자극 백신접종 이후에, FM#6 바이러스로 접종된 담비들은 백신접종-후 7일째 호흡기 징후들 (재채기)를 나타냈다. 재채기는 OPTI-MEMTM 담비들에서도 역시 추가자극 후 4일째 관찰되었다. 감작 백신접종 이후에, M2KO(Δ TM) 바이러스 또는 FM#6 바이러스로 접종된 담비들의 상대적 무활동 지표는 각각 0.07 및 0.27이었다. 이러한 활동에서 감소는 감작 백신접종 이후 바이러스 당 한 그룹에서 단지 관찰되었다. 추가자극 백신접종 이후 활동 수준에서 감소는 전혀 관찰되지 않았다. 바이러스 접종 이후 체중 및 온도에서 변화들은 도 22 및 도 23에 나타나 있다. 체중 손실은 백신접종 이후 전혀 관찰되지 않았지만; 백신접종은 체중 증가에 미치는 효과를 가지는 것으로 보였다. 백신접종 이후, OPTI-MEMTM 대조군 담비들의 체중들은 14일 관찰 동안 20% 증가하였던 한편 M2KO(Δ TM) 또는 FM#6 백신접종된 담비들의 체중 증가는 감작 이후 6 내지 15% 그리고 추가자극 이후 4 내지 6%의 범위를 가졌다. 도전 이후에 체중 및 체온에서 변화들은 도 24 및 도 25에 나타나 있고, 임상적 징후들은 표 19에 정리된다. 표 19는 담비들에서 생존 및 감염의 임상적 징후들 상에 미치는 바이러스 도전의 효과를 나타낸다.

표 19

그룹	처리	N	전체 사망수	임상적 징후 a		
				호흡기 징후 (발병일 관찰됨)	식욕부진	졸음 (RII) b
1	M2KO	6	0/6	5/6 (2)	0/6	0
2	FM#6	6	0/6	5/6 (1)	0/6	0
3	M2KO	6	0/6	3/6 (2)	0/6	0
4	FM#6	6	0/6	3/6 (2)	0/6	0
5	운반체(대조군)	6	0/6	3/6 (3)	0/6	0

[0276]

[0277]

a 임상적 징후들은 바이러스 접종 이후 3일 동안 관찰되었다. 졸음을 제외하고, 임상적 징후들을 위한 연구들은 징후를 가진 담비들의 수/전체 수로서 주어졌다. 호흡기 징후들은 재채기를 포함하였다. b 점수매김 체계를 기초로 하여 관찰 3일 동안 매일 두 번 결정되었고, 3일 기간 경과 시 관찰 (일) 당 담비들의 그룹 당 평균 점수로서 계산되었다. 접종 이전에 상대적 무활동 지표는 0이었다.

[0279]

A/브리스번/10/2007 (H3N2)으로 도전 이후에, 2 내지 4%의 체중 손실이 모든 동물들에서 도전 후 2일째 관찰되었다. 14일 관찰 기간 전체를 통하여, 동물 체중들은 그들의 초기 체중 미만으로 남아 있었다. OPTI-MEM™ 담비들은 가장 많은 체중이 손실되었다 (8%). 백신접종된 담비들 중에서 체중 손실은 백신 요법에 의존적이었다. M2KO(ΔTM) 또는 FM#6의 감작 단독 요법을 수여받은 담비들은 각각 최대 5% 및 4%가 감소되었다. 추가자극을 수여받은 담비들은 FM#6 그룹의 경우 최대 3% 및 M2KO(ΔTM) 그룹의 경우 2%를 손실하였다. 도전 후 증가된 체온들은 OPTI-MEM™ 담비들에서 2일째 그리고 M2KO(ΔTM) 또는 FM#6의 감작 단독 요법들을 수여받은 담비들은 1일째 관찰되었다 (도 25). 추가자극을 수여받은 담비들의 경우 체온들은 정상 범위 내에 남아 있었다.

[0280]

백신접종이 호흡관에서 도전 바이러스의 복제를 방지하고 기관 병리학을 감시하는지 여부를 결정하기 위하여, 도전된 담비들의 조직들이 접종 후 3일째 조직학적으로 조사되었다. M2KO(ΔTM) 감작 단독 또는 감작/추가자극 요법을 수여받은 동물들의 폐들에서 변화들은 OPTI-MEM™ 그룹과의 비교 시 폐에서 혼합된 세포 침윤물들의 중증도에서 증가와 연관되었다. 폐 침윤물 발병들에서 소수의 차이들이 M2KO(ΔTM) 감작 그룹 및 M2KO(ΔTM) 감작/추가자극 그룹 간에 관찰되었다. 폐에서 혼합된 세포 침윤물들의 중증도에서 증가는 OPTI-MEM™ 그룹과 비교 시 FM#6 감작 그룹 및 FM#6 감작/추가자극 그룹에서도 역시 관찰되었다. 폐 혼합된 세포 침윤물들의 중증도에서 약간의 증가가 FM#6 감작 단독 그룹 대비 FM#6 감작/추가자극 그룹에서 관찰되었다. 코선반들에서, M2KO(ΔTM) 바이러스의 감작 또는 감작/추가자극을 수여받은 동물들은 OPTI-MEM™ 그룹과 비교 시 호흡기 상피 위축의 더 낮은 중증도를 가졌다. 감작 대비 감작/추가자극 M2KO(ΔTM) 그룹들을 비교할 때 코선반들의 위축에서 차이들은 전혀 없었다. FM#6 감작/추가자극 요법을 수여받은 동물들에서 호흡기 상피 위축의 중증도에서 약간의 증가는 FM#6 감작 단독 요법을 받은 동물들 대비 관찰되었다; 모든 FM#6 동물들에서 호흡기 상피 위축의 중증도는 OPTI-MEM™ 그룹에서 관찰된 것보다 더 낮았다. OPTI-MEM™ 그룹과 대비하여 M2KO(ΔTM) 감작 및 감작/추가자극 그룹들에서 비강 (내강) 내로 호중성구 침윤물들의 발병에서 감소가 존재하였다. M2KO(ΔTM) 감작 단독 그룹에서 호중성구 내강 침윤물들은 OPTI-MEM™ 그룹과 서로 다르지 않은 것으로서 해석되었다. OPTI-MEM™ 그룹과 비교 시 FM#6 감작 단독 그룹 및 감작/추가자극 그룹에서 내강의 호중성구 침윤물들의 중증도에서 약간의 증가가 존재하였다. 도전-전 및 -후 바이러스 투여 용액들의 농도들은 각각 $10^{7.83}$ TCID₅₀/mL 및 $10^{7.25}$ TCID₅₀/mL이었고, 투여 전체를 통하여 도전 물질의 양호한 안정성을 가리킨다.

- [0281] 도 45는 담비 호흡관에서 M2K0(Δ TM) 및 FluMist® 바이러스 복제를 나타낸다.
- [0282] 도 46은 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스로의 비강내 도전 이후에 코 세척액들에서 M2K0(Δ TM) 및 FluMist® 바이러스 역가들을 나타낸다.
- [0283] 도 47은 M2K0(Δ TM) 및 FluMist® 감작 단독 그룹으로의 백신접종에 이어지는 담비들에서 IgG 역가들을 나타낸다.
- [0284] 도 48은 M2K0(Δ TM) 및 FluMist®, 감작-추가자극 그룹들로의 백신접종에 이어지는 담비들에서 IgG 역가들을 나타낸다.
- [0285] 도 49는 M2K0(Δ TM) 또는 FluMist®로의 백신접종으로부터 도전-후까지 담비 혈청들에서 엘라이자 IgG 역가들의 요약을 나타낸다.
- [0287] 결론
- [0288] 본 실시예는 M2K0(Δ TM) 바이러스의 비강내 투여가 부작용들 (증가된 체온, 체중 손실 또는 임상적 징후들)과 관련된 임의의 백신과 연관되지 않는 점을 보여준다. 이들 결과들은 본 기술학의 M2K0(Δ TM) 바이러스가 비강내 인플루엔자 백신에서의 사용에 유용한 점을 보여준다.
- [0290] 실시예 12: M2K0(Δ TM) 바이러스는 담비 모델에서 전파되지 않는다
- [0291] 요약 - 본 실시예는 담비 모델에서 M2K0(Δ TM) 바이러스가 전파되지 않는 점을 설명한다. M2K0(Δ TM) 바이러스는 1×10^7 TCID₅₀의 용량 수준으로 3마리 암컷 담비들에게 비강내로 투여되었다. 대조군으로서, 3마리의 담비들의 두 번째 그룹은 1×10^7 TCID₅₀의 용량으로 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스가 비강내로 투여되었다. 접종 이후 24시간째, 각각의 공여자 담비는 2마리의 단순 담비들과 전파 챔버 내로 도입되었다 (직접적 접촉 및 에어로졸 접촉). 접종에 이어서, 담비들은 접종 후 14일 동안 사망률에 대해 매일 측정된 체중들, 체온들 및 임상적 징후들로 관찰되었다. 코 세척액들이 바이러스성 흐름을 조사하도록 모든 접종된 공여자 담비들로부터 1, 3, 5, 7 및 9일째 모든 접촉 (직접 및 에어로졸) 담비들로부터 2, 4, 6, 8, 10일째 수집되었다. 코 세척액들 및 혈청은 항체 수준들을 평가하도록 본 연구의 접종 시 (14일) 모든 담비들로부터 수집되었다. 감염의 임상적 징후들은 M2K0(Δ TM) 그룹에서 전혀 관찰되지 않았지만; A/브리스번/10/2007 (H3N2) 그룹에서 담비들은 체중 손실, 증가된 체온들을 가졌고 재채기를 하였다. 브리스번/10으로 접종 이후, 공여자 담비들은 도전 이후 2일째 체온에서 증가 및 무게에서 감소를 나타냈다. 활동 수준들은 임의의 그룹들에서 감소되지 않았다. 공여자 담비들과 직접적 접촉에 놓인 담비들은 접종 후 4일까지 진행성 무게 증가를 보였다. 유사한 경향성이 접종 후 6일째 시작하여 에어로졸 접촉한 담비들에서 관찰되었다. 접촉한 담비들에서 체중의 손실은 체온의 증가와 상관되었다. M2K0(Δ TM) 바이러스로의 접종은 접종된 동물들에서 감염의 임상적 징후를 나타내지 않았다. 분산된 접촉 담비들은 그렇지 않은 것 같다.
- [0293] 재료들 및 방법들
- [0294] A. 백신 재료: M2K0(Δ TK) 바이러스는 PR8의 내부 6가지 유전자들 (핵단백질 (NP), 중합효소 유전자들 (PA, PB1, PB2), 비-구조 단백질 (NS), 기질 (M))을 소유하지만, 기능적 M2 단백질, 뿐만 아니라 A형 인플루엔자/브리스번/10/2007-유사 A/우루과이/716/2007(H3N2)의 HA 및 NA 유전자들을 발현하지 않는 재조합 바이러스이다. M2K0(Δ TM) 바이러스는 316 μ L 용량의 1×10^7 TCID₅₀ (50% 조직 배양 감염성 용량들)로 동물들에게 비강내로 투여되었다.
- [0295] B. 테스트 항목 용량 제형물: 316 μ L 당 1×10^7 TCID₅₀/mL의 M2K0(Δ TK) 바이러스 투여 용액이 45 μ L의 1×10^9 TCID₅₀/mL을 1.377 mL PBS 내에서 희석하여 제조되었다.
- [0296] C. 동물들 및 동물 관리: 36마리 수컷 담비들은 트리플 F 농장들로부터 구입되었고 담비들의 18마리는 연구 상에 배치되었다. 동물들은 연구 개시의 시점에 대략 4개월령이었다. 동물들은 공급자에 의해 건강하고 감염성 질환들에 대한 항체들이 없는 것으로 보증되었다. 도착 시 동물들은 매달린 종이-내층을 가진 폐기물 팬들이 위에 달린 바닥판을 갖춘 임시적 와이어 사육상자들에서 홀로 수용되었다. 동물실 및 사육상자들은 청소되었고 동물 접수 이전에 허용된 동물 관리 관행들 및 적절한 표준 작동 절차들에 따라 위생처리 되었다. 보증된

Teklad 글로벌 담비 다이어트 #2072 (테크라드 다이어트사, 매디슨 WI) 및 시카고시 수돗물이 자유롭게 제공되었고 매일 적어도 한 번 새로이 준비되었다. 동물실들에서 형광등 조명은 12시간 명/암 주기로 유지되었다. 동물실 온도 및 상대 습도는 개별 프로토콜 한계를 이내이었고, 연구과정 동안 각각 23.0 내지 25.0℃ 및 36 내지 50%의 범위를 가졌다.

[0297] D. 동물 격리 및 무작위화: 담비들은 무작위화 이전에 7일 동안 격리되어 유지되었고 매일 관찰되었다. 동물들의 일반적인 양호한 건강을 가리키는 매일의 관찰들을 기초로 하여, 담비들은 무작위화 및 테스트를 위해 격리로부터 방출되었다. 격리에 이어서, 담비들은 체중을 재었고 유사한 그룹 평균 수치들을 생산하였던 체중들을 기초로 하는 전산화된 무작위화 절차를 사용하여 [ToxData® 버전 2.1.E.11 (PDS 병리학 데이터 시스템사, 바젤, 스위스)] 처리 그룹들로 할당되었다. 그룹 내에서, 모든 체중들은 그들의 평균의 20% 이내이었다. 연구를 위해 선택된 동물들은 귀 태그 및 자동무선기에 의해 영구적 확인번호를 받았고 개별 사육상자 카드들도 역시 개별적 번호들 및 그룹에 의해 연구 동물들을 확인하였다. 할당된 확인하는 번호들은 연구 내에서 독특하였다.

[0298] E. 실험적 설계: M2KO(Δ TM) 바이러스의 전파도 (transmissibility)를 평가하기 위하여, 담비들은 M2KO(Δ TM) 바이러스 또는 A/브리스번/10/2007 (H3N2)로 접종되었다. 동물들의 체중, 체온, 임상적 증상들 및 바이러스성 호흡이 감시되었고 면역학적 반응들이 평가되었다. 연구 개시의 시점에서 4개월령의 18마리 담비들 (트리플 F 농장들, Sayre PA)이 연구를 위해 사용되었다. 모든 동물 절차들은 동물 생체안전성 수준-2 또는 수준-3 시설에서 수행되었다. 접종 이전에, 담비들은 체중을 측정하고 기저선 체온들을 확립하도록 3일 동안 감시되었다. 온도 측정들이 각각의 담비에 피하로 이식된 자동무선기 (바이오메딕 데이터 시스템사, Seaford, DE)를 통해 매일 기록되었다. 혈액은 연구 개시 이전에 채취되었고, 혈청은 인플루엔자 항체들에 대해 테스트되었다. A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스에 대한 HI 역가들 40을 가진 담비들만이 혈청음성으로 고려되었고 본 연구에서 사용되었다. 연구 동물들은 도 20에서 나타낸 바와 같이, 무작위화되었고, 2가지의 그룹들로 (9마리 담비들/그룹, 3마리/전과 체임버) 나뉘었다. 그룹 1 (체임버들 A 내지 C)에서 담비들은 M2KO(Δ TM) 바이러스를 수여받도록 할당되었다. 그룹 2 (체임버들 A 내지 C)에서 담비들은 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스를 수여받도록 할당되었다. 각각의 백신 그룹 내에서, 담비들은 접종된 공여자들 또는 무-백신 접촉들로 나뉘었다. 표 20은 연구 설계를 나타낸다. 1. 각각의 체임버는 3마리의 암컷 담비들로 구성되었다: 1마리 감염된 공여자 담비 및 2마리 무-백신 접촉 담비 (1마리 직접적 접촉 및 1마리 에어로졸 접촉). 2. 1×10^7 TCID₅₀의 M2KO 및 1×10^7 TCID₅₀의 A/브리스번/10/2007 (H3N2) 바이러스의 316 μ L의 단일 용량으로 비강내 접종됨.

표 20

그룹	체임버	바이러스	N ¹	접종 (일) ²	공여자 코 세척액 (일)	접촉 코 세척액 (일)	혈청 수집
1	A	M2KO	3	0	1, 3, 5, 7, 9, 14	2, 4, 6, 8, 10, 14	14
1	B	M2KO	3	0	1, 3, 5, 7, 9, 14	2, 4, 6, 8, 10, 14	14
1	C	M2KO	3	0	1, 3, 5, 7, 9, 14	2, 4, 6, 8, 10, 14	14
2	A	브리스번/ 10	3	0	1, 3, 5, 7, 9, 14	2, 4, 6, 8, 10, 14	14
2	B	브리스번/ 10	3	0	1, 3, 5, 7, 9, 14	2, 4, 6, 8, 10, 14	14
2	C	브리스번/ 10	3	0	1, 3, 5, 7, 9, 14	2, 4, 6, 8, 10, 14	14

[0299]

- [0300] 각각의 그룹은 별도의 방들에 수용되었고, 동물들과 작업하는 개인들은 2가지 그룹들 간의 교차 오염을 방지하도록 엄격한 작업 이동 양식을 따랐다. 각각의 그룹에서, 1마리 공여자 담비는 1×10^7 TCID₅₀의 M2KO(Δ TK) 바이러스 (그룹 1) 또는 1×10^7 TCID₅₀의 A/브리스번/10/2001 (H3N2) 바이러스 (그룹 2)의 316 μ L의 단일 용량으로 비강내 접종되었다. 접종 후 24시간째, 각각의 공여자는 무-백신 담비 (직접적 접촉)와 동일한 사육상자에 배치하여 와이어 사육상자 내에 이중 수용되었다. 추가적인 담비 (에어로졸 접촉)는 공여자의 사육상자로부터 10 내지 12 cm의 거리 떨어진 전과 체임버 내에 별도의 인접한 와이어 사육상자에 (홀로 수용됨) 배치되었다. 담비 체온들, 체중들, 및 임상적 징후들은 접종-후 14일 동안 매일 감시되었다. 코 세척액들은 세포들에서 바이러스 역가측정을 위해 모든 접종된 공여자 담비들로부터 1, 3, 5, 7, 9 및 14일째, 그리고 모든 접촉 (직접 및 에어로졸) 담비들로부터 2, 4, 6, 8, 10일째 수집되었다. 코 세척액들은 항체 역가측정을 위해 모든 담비들로부터 14일째 수집되었다. 코 세척 시료들은 -65°C에서 보관되었다.
- [0301] F. 전과 체임버들: 각각의 전과 체임버는 2 제곱미터이었다. 전산화된 공기 조작 유닛은 HEPA 여과를 위해 또한 전과 체임버들 내의 환경적 조건들을 감시하고 조절하는 데 사용되었다. 방향적 공기유동을 제공하기 위하여, HEPA-여과된 공기는 체임버의 한편의 말단에 위치한 유입 포트를 통하여 공급되었고 체임버의 반대편 말단에서 유출 포트를 통하여 배출되었으며, HEPA 여과되어 방 내로 환기되었다. 공기 교환 속도는 각각의 체임버의 경우 시간 당 20번 완전한 공기 교환들이었고, 공기유동은 < 0.1 m/초로서 유지되었다. 체임버들은 -0.15 인치들의 물의 음성 압력에서 유지되었다. 담비들은 종이-내층 폐기물 팬들이 위에 달린 바닥판을 갖춘 와이어 사육상자들에 수용되었다. 담비들은 각각의 HEPA-여과된 전과 체임버 내에 배치된 32×24×14 크기의 사육상자들에 이중 수용되거나 24×24×14 와이어 사육상자들에 단일 수용되었다.
- [0302] G. 바이러스 접종: 담비들은 M2KO(Δ TM) 바이러스로 접종되었다. 냉동 스톱의 바이알은 해동되었고 포스페이스트 완충된 식염수 용액에서 적당한 농도로 희석되었다. 담비들은 케타민/자일라진으로 마취되었고, 바이러스 용량은 M2KO(Δ TK) 바이러스의 경우 316 μ L의 부피로 비강내 투여되었다. M2KO(Δ TM) 바이러스의 접종 역가를 검증하기 위하여, 투여 용액들의 분량들은 투여 이전 (전-용량) 및 투여 이후 (후-용량)이 수집되었다. 분량들은 바이러스 역가측정을 위해 -65°C에서 보관되었다.
- [0303] H. 도전 바이러스: A형 인플루엔자 바이러스, 균주 A/브리스번/10/2007, 혈청형 H3N2가 대조군 담비들을 접종하는 데 사용되었다. 바이러스는 사용 전 대략 -65°C에서 보관되었다. 도전 바이러스의 용량 수준은 316 μ L의 부피에서 1×10^7 TCID₅₀로 제조되었다. 정량적 바이러스 감염도 검정법, TCID₅₀ 검정법은 제조된 바이러스 도전 용액의 일정량으로 IITRI에서 수행되었다. 바이러스 역가 검정법은 IITRI 표준 작동 절차들에 따라 수행되었다.
- [0304] I. 유병율/사망률 관찰들: 도전에 이어서, 모든 동물들은 사망률 또는 유병율의 증거에 대해 매일 두 번 관찰되었다. 동물들은 백신 접종 이후 14일 동안 그리고 도전 이후 14일 동안 관찰되었다.
- [0305] J. 체중들 및 체중 변화: 동물들의 체중들은 접수 2일 이내 및 무작위화 시 기록되었다. 모든 연구 동물들은 접종 이전에, 각각의 백신접종에 이어서 14일 동안 매일 무게를 재었고 도전 후 14일 동안 매일 평가되었다. 접종 이전에, 담비들은 기저선 체온들을 측정하고 확립되도록 3 내지 5일 동안 감시되었다. 온도 측정들은 각각의 담비에 피하로 이식된 자동무선기 (바이오메딕 데이터 시스템사, Seaford, DE)를 통해 각각의 백신접종에 이어서 14일 동안 매일 기록되었고, 또한 도전 후 14일 동안 매일 기록되었다. 온도의 변화 (섭씨 온도로)가 각각의 동물을 위해 각각의 시간대에서 계산되었다.
- [0306] K. 임상적 관찰들: 온도에서 변화 (섭씨 온도로)는 각각의 담비를 위해 매일 결정되었다. 식욕부진의 임상적 징후들, 호흡곤란, 재채기, 기침 및 콧물과 같은 호흡기 징후들 및 활동의 수준은 매일 평가되었다. Reuman, *et al.*, "Assessment of signs of Influenza illness in the ferret model", *J. Virol*, Methods 24: 27-34 (1989)에서 기술된 것을 기초로 하는 점수매김 체계는 다음과 같이 활동 수준을 평가하는 데 사용되었다: 0, 각성하고 놀기; 1, 각성하지만 자극될 때만 놀기; 2, 각성하지만 자극될 때도 놀지 않음; 그리고 3, 각성하지 않고 자극될 때도 놀지 않음. 상대적 무활동 지표 (RII)는 연구의 지속기간 동안 관찰 (일) 당 담비들의 그룹 당 평균 점수로서 계산되었다.
- [0307] L. 생존 검토들: 두 번의 생존 검토들이 연구 전체를 통하여 모든 연구 동물들에서 매일 수행되었다. 생존 검토들 둘 다는 임상적 관찰들과 동시에 수행되었다. 두 번째 검토는 동일한 날 이내에 이후 수행되었다.

- [0308] M. 코 세척액들: 담비들은 케타민 (25 mg/kg) 및 자일라진 (2 mg/kg) 혼합물로 마취되었고, 페니실린 (100 U/mL), 스트렙토마이신 (100 µg/mL), 및 젠타마이신 (50 µg/mL)을 포함하는 0.5 mL의 무균 PBS가 각각의 콧구멍 내로 주입되었고 담비에 의해 배출될 때 표본 컵에 수집되었다.
- [0309] N. 안락사: 연구 동물들은 소듐 펜토바비탈 150 mg/kg의 정맥내 용량에 의해 안락사되었다. 사망은 관찰가능한 심장박동 및 호흡의 부재에 의해 검증되었다. 부검들은 모든 연구 동물들에서 수행되었다.
- [0310] O. 혈청 수집: 전-백신접종 혈청 (-3일 내지 -5일) 및 접종 후 혈청 (14일)이 모든 담비들로부터 수집되었다. 담비들은 케타민 (25 mg/kg) 및 자일라진 (2 mg/kg) 혼합물로 마취되었다. 혈액 시료 (대략 0.5 내지 1.0 mL)는 각각의 담비로부터 나온 대정맥을 통해 채취되었고 혈청으로 가공되었다. 혈액은 혈청 젤 Z/1.1 튜브들 (사스테드사, Newton, NC) 내로 수집되었고 혈청 수집하기 이전에 1시간 정도 동안 실온에서 보관되었다. 혈청 젤 Z/1.1 튜브들은 10,000 × g에서 3분 동안 원심분리되었고 혈청이 수집되었다. 개별적 전-접종 혈청 시료들이 수집되었고 2개의 분량들이 각각의 시료로부터 만들어졌다. 하나의 분량은 담비들이 A형 인플루엔자 바이러스들에 대한 항체들이 없는 점을 검증하도록 연구의 개시 이전에 테스트되었고 혈청의 나머지 분량은 -65°C에서 보관되었다.
- [0311] P. 혈구응집 억제 (HI) 검정법: 혈청 시료들은 비특이적 혈구응집의 저해제들을 제거하도록 수용체-파괴 효소 (RDE) (덴카 세이켄사, 도쿄, 일본)로 처리되었다. RDE는 제조사의 지침들에 따라 재구성되었다. 혈청은 RDE에서 1 : 3으로 희석되었고 37°C ± 2°C 수조에서 18 내지 20시간 동안 배양되었다. 동일한 부피의 2.5% (v/v) 소듐 시트레이트의 첨가 이후에, 시료들은 56 ± 2°C 수조에서 30 ± 5분 동안 배양되었다. RDE 처리 이후에 0.85% NaCl은 1 : 10의 최종 혈청 희석까지 각각의 시료에 첨가되었다. 희석된 시료들은 다음으로 두 벌씩 4개의 2배 희석들 (1 : 10 내지 1 : 80)로 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)에서 희석되었고 다음으로 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스의 4의 혈구응집 단위들과 배양되었다. 배양 이후, 0.5% 조류 적혈구 세포들이 각각의 시료에 첨가되었고 30 ± 5분 동안 배양되었다. 혈구응집의 존재 또는 부재가 다음으로 점수 매겨졌다.
- [0312] Q. 바이러스 역가들: 도전-전 및 -후 바이러스 접종액 시료들에서 감염성 바이러스의 농도는 마딘-다비 고양이 신장 (MDCK) 세포들의 TCID₅₀에 의해 결정되었다. 간략하게, -65°C에서 보관된 시료들은 해동되었고 세포성 잔재물을 제거하도록 원심분리되었다. 그 결과로 얻은 상청액은 페니실린/스트렙토마이신, 0.1% 젠타마이신, 3% NaCO₃, 0.3% BSA 분획 V (시그마사, 세인트루이스, MO), 1% MEM 비타민 용액 (시그마사) 및 1% L-글루타민 (메디아테크사, Manassas, VA, 미국)을 포함하는 둘베코 변형된 이글 배지 (DMEM) (집코사, 칼스베드, CA, 미국)를 넣은 96-웰 마이크로타이터 플레이트에서 세 벌씩 10배로 희석되었다. 10배 일련의 희석들이 만들어진 이후에, 100 µL가 MDCK 세포들의 단일층을 포함하는 96-웰 플레이트의 개별 웰들 내로 전달되었다. 플레이트들은 37°C ± 2°C에서 5 ± 2% CO₂ 70% 습도로 배양되었다. 48시간 이후에, 웰들은 세포변성 효과 (CPE)에 대해 관찰되었다. 각각의 웰 (50 µL)로부터 얻은 상청액은 96 웰 플레이트로 전달되었고 혈구응집 (HA) 활성이 결정되었고 기록되었다. 상청액의 HA 활성은 0.5% 포장된 칠면조 적혈구 (tRBCs)로의 HA 검정법에 의해 평가되었다. TCID₅₀ 역가들은 Reed LJ and Muench H, "A simple method for estimating 50% endpoints", *Am. J. Hygiene* 27: 493-497 (1938)의 방법을 사용하여 계산되었다.
- [0313] R. 데이터 분석: 체중들 및 체중 증가들 (손실들) 그리고 체온의 변화들은 각각의 테스트 그룹을 위한 평균 및 평균의 표준 편차들로서 표현된 각각의 개별 동물에 대해 결정되었다.
- [0315] 결과들
- [0316] M2KO(ΔTM) 바이러스 또는 A/브리스번/10/2007 (H3N2) A형 인플루엔자 바이러스 둘 중 하나로 공여자 담비들의 접종 이후에, 공여자 담비들은 무-백신 접촉 담비들을 포함하는 전과 체임버들 내로 도입되었다. 담비들은 감염의 임상적 징후들에 대해 매일 감시되었고, 코 세척액들은 바이러스성 흐름을 감시하도록 수집되었으며, 혈청은 혈청 항체 역가들을 측정하도록 수집되었다. 모든 담비들 M2KO(ΔTM) 바이러스 및 A/브리스번/10/2007로의 접종에서 생존하였다 (표 21). 질환의 임상적 징후들은 M2KO(ΔTM) 그룹의 담비들에서 전혀 관찰되지 않았다. A/브리스번/10/2007 바이러스로 접종된 3마리 중 2마리의 공여자 담비들은 6일 및 8일째 호흡기 징후들 (재채기)를 나타냈다. 모든 체임버들에서 직접적 접촉 담비들은 8일째 재채기를 나타냈다. 재채기는 에어로졸 접촉 담비들에서 전혀 관찰되지 않았다. 활동 수준에서 감소는 관찰되지 않았다. 표 20은 접종된 공여자 담비들 및 접촉 담비들에서 임상적 징후들을 나타낸다. a 바이러스 접종 이전에 담비 혈청에서 동종유래 바이러스에 대한 혈구응집 억제 (HI) 항체 역가들. b 임상적 징후들은 바이러스 접종 이후 3일 동안 관찰되었다. 줄음

을 제외하고, 임상적 징후들을 위한 연구들은 징후를 가진 담비들의 수/전체 수로서 주어졌다. 호흡기 징후들은 재채기이었고 각각의 담비의 경우 발병일은 팔호 안에 있다. c 점수매김 체계를 기초로 하여 관찰 14일 동안 매일 두 번 결정되었고, 14일 기간 경과 시 관찰 (일) 당 담비들의 그룹 당 평균 점수로서 계산되었다. 접종 이전에 상대적 무활동 지표는 0이었다.

표 21

그룹	처리	N	혈청 HI 역가 ^a	전체 사망수	임상적 징후 b		
					호흡기 징후 (발병일 관찰됨)	식욕부진	졸음 (RII) c
M2KO							
공여자	M2KO	3	<10	0/3	0/3	0/3	0
직접 접촉	M2KO	3	<10	0/3	0/3	0/3	0
에어로졸 접촉	M2KO	3	<10	0/3	0/3	0/3	0
브리스벤							
공여자	브리스벤/10	3	<10	0/3	2/3 (6,8)	0/3	0
직접 접촉	브리스벤/10	3	<10	0/3	3/3 (8,8,8)	0/3	0
에어로졸 접촉	브리스벤/10	3	<10	0/3	0/3	0/3	0

[0317]

[0318]

바이러스 접종 이후 체중 및 체온에서 변화들은 도 26 및 도 27에 나타나 있다. 유의한 체중 손실은 M2KO(△TM) 바이러스로의 접종 이후에 전혀 관찰되지 않았다. 에어로졸 접촉들은 하루 체중에서 1% 손실을 평균으로 하였지만, 이것이 바이러스에 대한 노출로 인한 것 같지 않다. 14일 관찰 동안 M2KO(△TM) 바이러스에서 담비들의 체중들은 공여자 담비들의 경우 9%, 그리고 접촉 담비들의 경우 10내지 11%이었다 (도 26A). A/브리스벤/10/2007의 체중 증가는 공여자 담비들의 경우 단지 3%, 그리고 바이러스 접촉을 가리키는 접촉 담비들의 경우 6 내지 8%이었다 (도 26B). M2KO(△TM) 그룹에서, 체온들은 감염 후 3일을 제외하고 정상 수준들로 남아있었다 (도 27A). 체온들은 에어로졸 접촉 담비들의 경우 정상보다 낮았다. 이것은 오류 또는 망가진 온도 자동무선기로 인한 것이었고, 온도들은 나머지 연구 전체를 통하여 정상 범위 내에서 기록되었다. 증가된 체온들은 A/브리스벤/10/2007 공여자 담비들에서 2일째 그리고 에어로졸 접촉들의 경우 7일째에 관찰되었다 (도 27B). 도전-전 및 -후 바이러스 용량 용액들의 농도들은 각각 $10^{7.50}$ TCID₅₀/mL 및 $10^{7.25}$ TCID₅₀/mL이었고, 투여 전체를 통하여 도전 물질의 양호한 안정성을 가리킨다.

[0319]

도 50은 전파 연구에서 담비들로부터 얻은 코 세척액들에서 바이러스 역가들을 나타낸다. M2KO(△TM) 바이러스는 전파되지 않았던 (검출된 바이러스 없음) 한편, 대조군 브리스벤/10 바이러스는 전파되는 점을 보여준다.

[0321]

결론

[0322]

본 실시예는 A/브리스벤/10/2007 바이러스로 접종된 담비들은 감염의 임상적 징후들 (재채기, 체중의 손실 및 일시적인 증가된 체온)을 나타내는 한편, M2KO(△TM) 바이러스로 접종된 담비들은 질환의 임상적 징후들을 전혀 나타내지 않았던 점을 보여준다. 따라서, M2KO(△TM)로의 공여자 담비들의 접종은 감염을 유발하거나 접촉을 통해 또는 에어로졸을 통해 바이러스를 전파하는 것으로 보이지 않았다. 이들 연구들은 본 기술학의 M2KO(△TM) 바이러스가 비강내 인플루엔자 백신들을 위해 유용한 점을 보여준다.

[0324]

실시예 13: M2KO(△TM) 바이러스는 마우스들에서 체액성 및 점막성 면역 반응들 둘 다를 발현한다

[0325]

본 실시예는 M2KO(△TM) 바이러스가 마우스들에서 체액성 및 점막성 면역 반응들을 둘 다 발현하는 점을 설명한다. M2KO(△TM)의 면역원성이 마우스들에서 평가되었고 다른 방식들의 백신접종에 의해 생성된 면역 반응들과 비교되었다. 면역원성 연구는 표 22에서 개략된 바와 같은 다음의 그룹들을 포함하여 수행되었다. 1. M2KO(△TM) 바이러스, 2 PR8 바이러스 (10 pfu), 대표적인 생백신, 3. 불활성화 PR8 바이러스 (찰스 리버 연구소,

Wilmington, MA), 1 µg, 비강내 (IN), 4. 불활성화 PR8 바이러스, 1 µg, 근육내 (IM), 또는 PBS만. 표 22는 면역원성 연구에서 백신 그룹들을 나타낸다.

표 22

면역원	전달 경로	용량	비고
M2KO(ΔTM) 바이러스	비강내	1x10 ⁴ pfu	M2KO(ΔTM) (서열번호 1) 돌연변이 포함
PR8 바이러스	비강내	10 pfu	자연 감염 및/또는 생 독감 백신과 관련된 면역 반응들을 나타냄
불활성화 PR8, 전체 바이러스	비강내	1 µg	비강내 전달된 죽은 독감 바이러스에 의해 생성된 기저선 반응을 보여줌
불활성화 PR8, 전체 바이러스	근육내	1 µg	통상적 불활성화 독감 백신을 위한 표준 전달 경로

[0326]

[0327] M2KO(ΔTM) 바이러스의 면역원성을 테스트하기 위하여, 마우스들은 1.2 × 10⁴ pfu의 M2KO(ΔTM), 10 pfu의 야생형 PR8, 1 µg의 불활성화 전체 PR8 (찰스 리버 연구소, Wilmington, MA), 또는 대조군으로서 PBS로 근육내로 투여된 1 µg의 불활성화 전체 PR8과 함께 비강내로 접종되었다. 면역화 이후 3주째, 혈청 및 기관지-폐 세척액들이 마우스들로부터 수집되었고 항-PR8 면역글로불린 G (IgG) 및 IgA 수준들이 효소 연결 면역흡착 검정법 (ELISA)에 의해 측정되었다. 간략하게, 엘라이자 플레이트들은 전체 불활성화 PR8로 코팅되었고 소혈청 알부민 (BSA)에 의해 차단되었으며 시료들이 적용되었다. 마우스 IgG 및 IgA 항체들은 호스레디쉬 퍼옥시다제 표지된 항-마우스 IgG- 및 IgA-염소 항체들 (KPL사, 게티스버그, MD) 및 SureBlue TMB (KPL사) 기질들에 의해 검출되었다.

[0328] 예상된 바와 같이, 면역화 그룹들에서 마우스들은 PBS만의 그룹과 대비하여 혈청 및 기관지-폐 세척액에서 항-PR8 항체들의 유의한 증가를 보여주었다 (도 28). M2KO(ΔTM) 바이러스의 경우 혈청에서 항-PR8 IgG 수준들은 불활성화 PR8 그룹들보다 더 높았고 생 PR8 바이러스와 유사하였다. 더욱 중요하게도, 항-PR8 IgA 항체들은 혈청들 및 기관지-폐 세척액들 둘 다에서 PR8 및 M2KO(ΔTM) 면역화된 마우스들에서만 존재하였다. 이들 데이터는 M2KO(ΔTM) 바이러스가 마우스들에서 유의한 체액성 및 점막성 면역 반응을 발현하는 점을 제시한다.

[0330] 실시예 14: M2KO(ΔTM) 바이러스는 치사성 동종아형 및 이종아형 도전으로부터 마우스들을 보호한다

[0331] 본 실시예는 M2KO(ΔTM) 바이러스가 치사성 동종아형 및 이종아형 도전으로부터 마우스들을 보호하는 점을 설명한다. M2KO(ΔTM) 바이러스의 보호적 효능은 면역화된 마우스들을 면역화-후 6주째 치사 용량들의 야생형 PR8 (H1N1; 동종아형 도전) 또는 마우스-적응된 A형 인플루엔자/아이치/2/68 (아이치; H3N2; 이종아형 도전)으로 도전하여 평가되었다. M2KO(ΔTM) 또는 10 pfu의 PR8 둘 중 하나로 면역화되고 연속하여 야생형 PR8에 의해 도전된 마우스들은 체중 손실을 포함하는 임상적 징후들을 전혀 보이지 않았다 (도 29A). 대조적으로, 단순 PBS 마우스들은 죽었거나 5일까지 20% 이상의 체중 손실로 인해 안락사되었다. 도전된 마우스들의 호흡관들에서 바이러스 복제는 MDCK 세포들에서 TCID₅₀ 검정법에 의해 도전-후 3일째 결정되었다. 도 30A에서 나타난 바와 같이, M2KO(ΔTM) 또는 PR8 면역화된 마우스들의 폐들에서 전혀 검출되지 않았고 (검출 한계 10^{2.75} TCID₅₀/기관) M2KO(ΔTM)가 PR8 감염과 유사한 무균 면역성을 제공하는 점을 가리킨다. 대조적으로, 도전 바이러스이 불활성화

PR8 및 PBS 그룹들로부터 회수되었다.

- [0332] 이종아형 도전을 위해, 마우스들은 아이치 (H3N2)에 의해 도전되었다. M2KO(Δ TM) 및 야생형 PR8 면역화된 마우스들은 도전에서 생존하였던 한편, 불활성화 PR8 또는 PBS를 수여받았던 마우스들은 감염으로 죽었다 (도 29). 도전-후 3일째 마우스 호흡관들에서 바이러스 역가들은 다른 그룹들의 마우스들과 대비하여 M2KO(Δ TM)-백신접종된 마우스들에서 유의한 감소를 보이지 않았다 (도 30). 이들 결과들은 아이치 도전에 대하여 관찰된 교차-보호작용이 부분적으로 M2KO(Δ TM) 백신에 의해 유도된 T-세포 매개된 면역 반응들로 인할 수 있는 점을 제시한다. 아이치에 대한 혈구응집 억제 (HI) 항체들은 도전된 마우스들로부터 얻은 도전-후 혈청들에서 검출가능하지 않았고 (1 : 40 이하), 보호작용이 항체를 중화하여 매개되지 않았던 점을 제시한다.
- [0333] M2KO(Δ TM) 바이러스는 체액성 및 세포성 면역 반응들 둘 다를 자극하고, 표 23에서 요약된 바와 같은 치사성 동종- 및 이종아형 도전에 대하여 동물들에게 보호적 면역성을 부여한다. 표 23은 동종아형 (H1N1) 및 이종아형 (H3N2) 인플루엔자 도전 이후 보호작용을 나타낸다.

표 23

생존 (%)		
백신 그룹	PR8 (H1N1) 도전	아이치 (H3N2) 도전
M2KO(Δ TM)	100%	100%
PR8	100%	100%
불활성화 PR8, IN	100%	0%
불활성화 PR8, IM	100%	20%
PBS	0%	0%

[0334]

실시예 15: Fluzone® 및 FluMist®와 대비한 M2KO(Δ TM) 백신

- [0335] 본 실시예는 약독화 생바이러스 (FluMist®), Fluzone® 불활성화 독감 백신과 대비하여 M2KO(Δ TM) 바이러스의 효능을 설명한다. 마우스들은 M2KO(Δ TM) 바이러스, 감기 적응된 약독화 생바이러스 (FluMist®), Fluzone® 불활성화 독감 백신으로 또는 모의 대조군은 PBS에 의해 면역화되었다. M2KO(Δ TM)-H3 바이러스는 A형 인플루엔자/브리스번/10/2007-유사 A/우루과이/716/2007(H3N2)의 HA 및 NA 코딩 서열들을 M2KO(Δ TM) 골격 (서열번호 1) 내로 삽입하여 제작되었다. A형 인플루엔자/브리스번/10/2007-유사 A/우루과이/716/2007(H3N2)의 HA 및 NA 유전자들을 포함하는 감기-적응된 A/AA/6/60 골격으로부터 나온 내부 유전자들인 FluMist®-H3는 2009/2010 삼가 (trivalent)의 백신 제형물로부터 플라크 정제되었다. Fluzone® 2009/2010 제형물은 삼가 제형물로서 직접 사용되었다.
- [0337] 엘라이자에 의한 항체 반응의 역학들을 비교하도록 면역화-후 4, 14, 21일째 혈청들이 획득되었다 (도 31). 복제 결함 바이러스인 M2KO(Δ TM)-H3 바이러스는 FluMist®-H3, 약독화 방식으로 다중-주기 복제를 거친 생 독감 바이러스 백신보다 일찍 항체들을 발생시켰다. 불활성화 백신 Fluzone®은 혈청들에서 이것이 항원의 농축된 제시인 것과 같이 가장 높은 항체 역가들을 가졌다.
- [0338] 혈청들, 폐 세척액, 및 코신반들에서 항-HA 점막성 항체의 존재는 엘라이자에 의해 평가되었다. 2가지 생 독감 백신들인 M2KO(Δ TM)-H3 바이러스 및 FluMist®은 불활성화 백신 Fluzone®보다 호흡관에서 더 높은 IgA를 가졌다 (도 32).
- [0340] 실시예 16: 생바이러스들에 의해 발현된 보호작용 및 면역원성의 비교
- [0341] 이소플루란에 의해 마취된 6주령 암컷 BALB/c 마우스들이 10^6 TCID₅₀/50 μ L의 M2KO(Δ TM)-H3 (상기 기술됨), FluMist® (2009-2010) (H3N2) IVR-147 (PR8 \times 브리스번/10/2007)으로 0일 및 28일째 비강내로 감염되었다.

IVR-147는 M2KO(Δ TM) 바이러스의 야생형 버전이고, 예로 기능적 M2 단백질을 포함한다. 모의-감염된 대조군 마우스들은 바이러스 대신에 50 μ L PBS를 수여받았다. 혈청은 모든 마우스들로부터 매주 수집되었고 엘라이자에 의해 항-HA 항체들의 존재에 대해 분석되었다. 도 33에서 나타난 바와 같이, M2KO(Δ TM) 바이러스 및 IVR-147은 FluMist®와 대비하여 신속한 역학들로 더 높은 항체 수준들을 생성하였다.

[0342] 동물들의 체중들은 감염 이후 14일 동안 감시되었다. 백신접종된 마우스들은 체중을 전혀 손실하지 않았다. 추가자극-후 21일째, 그룹 당 3마리 마우스들이 안락사되었고 그들의 기관지-폐 세척액들, 코 세척액들, 및 혈청들이 항체 역가 결정들을 위해 수집되었다 (도 34). M2KO(Δ TM)는 혈청들 및 호흡관에서 FluMist® 및 IVR-147와 유사한 수준들로 체액성 및 점막성 항체들 둘 다를 유도하였다.

[0343] 마우스들은 추가자극-후 6주째 40 MLD₅₀의 A/아이치/2/68 바이러스로 비강내 도전되었다. 마우스들은 체중의 손실 및 생존에 대해 14일 동안 관찰되었다 (도 35). M2KO(Δ TM)는 FluMist®와 대비하여 적은 체중 손실 (패널 A) 및 100% 생존(패널 B)에 의해 지시된 바와 같이 치사성 아이치 도전들로부터 마우스들을 보호하였다. 도전-후 3일째, 그룹 당 3마리 마우스들이 안락사되었고 그들의 폐들 및 코선반들이 바이러스 역가 결정들을 위해 수집되었다 (표 24). M2KO(Δ TM)는 표 24에서 나타난 바와 같이 도전 바이러스를 FluMist®보다 더 잘 조절하였다. 표 24는 호흡관에서 도전 바이러스 역가들을 나타낸다.

표 24

	폐 (Log TCID ₅₀ /g)	코선반 (Log TCID ₅₀ /g)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD
M2KO H3	7.05 \pm 0.14	4.37 \pm 1.01
FluMist H3	7.32 \pm 0.38	6.83 \pm 1.50
IVR 147	7.08 \pm 0.14	4.87 \pm 0.14
PBS	7.95 \pm 0.63	6.25 \pm 0.29

[0344]

[0345] 실시예 17: 고-병원성 조류 H5N1 인플루엔자 바이러스에 대한 M2KO(Δ TM) 백신의 생성

[0346] 요약: M2KO(Δ TM)은 기능적 M2 단백질의 발현이 결여된 인플루엔자 바이러스이다. M2 단백질은 인플루엔자 바이러스 감염의 개시를 위해 또한 자손 비리온들 내로 효율적인 바이러스 RNA 도입을 위해 결정적이다. M2KO(Δ TM)는 세포들에 진입하고 바이러스 단백질들을 발현할 수 있지만 M2 유전자의 결실로 인해 감염성 자손 바이러스들을 만들 수는 없다. M2KO(Δ TM)는 허용된 M2 단백질을 발현하는 세포들에서 생산되지만 비-허용성 야생형 세포들에서는 그렇지 못하다. M2KO(Δ TM)는 마우스들에서 점막성 및 체액성 면역 둘 다를 나타내고 동종- 및 이종-아형의 치사성 도전 둘 다로부터 보호한다.

[0347] H5N1 M2KO(Δ TM) 바이러스는 M2KO(Δ TM) 골격 위에 A/베트남/1203/2004의 HA (비병원성) 및 NA 유전자들을 포함한다. "M2KO(Δ TM) 골격"에 의하여 M2KO(Δ TM) (서열번호 1) 돌연변이를 포함하는 PR8의 서열을 의미한다. A/베트남/1203/2004 HA (비병원성) 및 사용된 NA 서열들은 하기에 나타나 있다.

>비병원성 VN1203 HA ORF + PR8 비-코딩

AGCAAAAGCAGGGGAAAAATAAAACAACCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTGAATAGTCAGTCTTGTTAAAGT
GATCAGATTGTCATTGGTTACCATGCAAACTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAGAACGTTACTGTTAC
ACATGCCCAAGACATACTGGAAAAAGAACACACCGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAG
ATTGTAGCGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCAATGTGTGACGAATCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTG
GAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAG
AATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAG
CATGTCCATACCAGGGAAAGTCTCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCAACAATA
AAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCA
GACAAAGCTCTATCAAAACCAACCACTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACAGAGATTGGTACCAAGAATAG
CTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTAAAGCCGAATGATGCAATCAAC
TTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAG
TGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAATCCAAATGGGGGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCACAATA
TACACCTCTCACCATTGGGGAATGCCCAAAATATGTGAATCAAACAGATTAGTCTTGCAGACTGGGCTCAGAAATAGC
CCTCAAAGAGAGACTAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTG
GTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAG
TCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTAGAA
AGGAGAATAGAGAAATTAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCCATAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACCTTCTGTTCT
CATGGAAAATGAGAGAATCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGG
ATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAGTGAAGAAAT
GGAACGTATGACTACCGCAGTATTCAGAAGAAGCGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGAGTAAAATTGGAATCAAT
AGGAATTTACCAAACTGTCAATTTTCTACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCT
TATGGATGTGCTCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGATTAGAATTCAGAGATATGAGGAAAAACACC
CTGTTTCTACT

>VN1203 NA ORF + PR8 비-코딩

AGCAAAAGCAGGGGTTTAAATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAATCTGTATGGTAACTGGAATAGTT
AGCTTAATGTTACAATTTGGGAACATGATCTCAATATGGGTCACTTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGA
ACCAATCAGCAATACTAATTTTCTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAAATAGCGGGCAATTCATCTTTTGCCCCA
TTAACGGATGGGCTGTATACAGTAAGGACAACAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTGTTATAAGAGAGCCG
TTCATCTCATGCTCCCACTTGAATGCAGAACTTTCTTTTACTCAGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGG
GACTGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCCATATAACTCAAGGT
TTGAGTCTGTTGCTTGGTCAAGATGCTTGCCATGATGGCACCAGTTGGTTGACGATTGGAATTTCTGGCCAGACAAT
GGGGCTGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGAATCA
AGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTGACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATCAGATA
AGATCTTCAAATGGAAGGAAAGTGGTTAAATCAGTCGAATGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC
TGTATCCTAATGCCGGAGAAATCACATGTGTGTGCAAGGATAATTTGGCATGGCTCAAATCGGCCATGGGTATCTTTCAA
TCAAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCAGTGGAGTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTA
GTTGTGGTCCGGTGTCTCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTCTTTAAATACGGCAATGGTGTCTGGATCGGG
AGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTGGGATCCAAATGGGTGGACTGAAACGGACAGTAGCTT
TTCAGTGAACAAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAAGATATAGCGGGAGTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAG
GACTAGATTGCATAAGACCTTGTCTGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCAAAGAGAGCAAAATTTGGACTAGTGGG
AGCAGCATATCTTTTGTGGTGTAAATAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGCCAGACGGTGCCGAGTTGCCATTACCATT
TGACAAGTAGTCTGTTCAAAAACCTCTTGTCTACT

H

[0348]

[0349]

5N1 M2K0(ΔTM)의 생성: A/베트남/1203/2004 (H5N1)의 비병원성 HA 및 NA는 각각의 유전자를 위한 CDC 서열들 (CDC ID: 2004706280, 기탁번호들: EF541467 및 EF541403)을 기초로 하여 진아트® (GeneArt®) 유전자 합성에 의해 화학적으로 합성되었다. 제작물들의 서열들은 검증되었고 표준 프로토콜들을 사용하여 종자 바이러스의 생성을 허용하도록 적당한 벡터를 내로 서브-클론되었다.

[0350]

M2K0(ΔTM) VN1203avHA, NA (H5N1 M2K0(ΔTM)) 바이러스는 M2CK 세포들 (M2 단백질을 안정하게 발현하는 MDCK 세포들)에서 증폭되었고, 상청액이 세포 잔체물로부터 분리되었고 센트리콘 플러스-70 (밀리포아사 (Millipore))에 의해 100배 농축되었다. 이러한 바이러스는 마우스 연구에서 면역원으로서 사용되었다.

[0351]

마우스 연구 설계: 마우스들 (7 내지 8주령, 암컷 BALB/c)은 H5N1 M2K0(ΔTM) (10^6 TCID₅₀/마우스), M2K0(ΔTM) CA07HA, NA (10^6 TCID₅₀/마우스)로 비강내 접종되거나 VN1203 단백질 (1.5 μg)이 근육내로 투여되었다. 체중 및 임상적 징후들은 접종-후 14일 동안 관찰되었다. 혈청들은 접종-후 7, 14, 21일째 수집되었다. 마우스들은 28일째 동시에 개시된 새로운 감각 단독 그룹과 함께 28일째 추가자극되었다.

[0352] 추가자극 면역화 및 '감작 단독' 그룹들: 28일째 H5N1 M2KO(Δ TM)로 미리 접종된 마우스들은 10^6 pfu/마우스의 두 번째 면역화로 추가자극되었다. 동시에 '감작 단독' 그룹들에게 그들의 첫 번째 용량이 주어졌다. 체중 손실이 20일째 접종에 이어지는 모든 그룹들의 경우에 이어졌다. M2KO(Δ TM) 백신의 추가자극 용량을 수여받은 마우스들은 그들의 체중의 5% 정도를 손실하였다. '감작 단독' 그룹은 그들의 체중의 10%까지를 손실하였다. 표 25는 마우스 연구에서 백신 그룹들을 나타낸다.

표 25

그룹 ¹	면역원	용량	투여 경로	도전 바이러스
1	H5N1 M2KO(ΔTM)	2	비강내	면역화-후 5 개월째 20 MLD ₅₀ A/VN/1203/2004 로 도전됨
2	H5N1 M2KO(ΔTM)	1	비강내	
3	H1N1pdm M2KO(ΔTM)	2	비강내	
4	H5 HA VN1203 단백질	2	근육내	
5	무-백신 (OPTI- MEM™)	2	비강내	
6	H5N1 M2KO(ΔTM)	1	비강내	면역화-후 4 개월째 20 MLD ₅₀ A/VN/1203/2004 로 도전됨
7	무-백신 (OPTI- MEM™)	1	비강내	
¹ 도전 이후 생존 평가를 위해 5 마리 마우스들/그룹				

[0353]

[0354] H5N1 M2KO(Δ TM)은 HA에 대한 IgG 항체 역가들을 발현한다: 혈청들은 접종-후 7, 14, 21일째 마우스들로부터 획득되었고 헤마글루티닌에 대한 항체들을 위해 엘라이자에 의해 분석되었다. M2KO(Δ TM)는 H5 HA 단백질보다 적어도 100배 더 높은 역가들을 생성하였다 (도 36). 마우스들은 28일째 추가자극되었고 혈청들은 1주 이후에 (35일) 획득되었다. M2KO(Δ TM) 역가들은 130배 추가자극되었던 한편, HA 단백질은 13배만 추가자극되었다. M2KO(Δ TM) 감작 단독 그룹들의 경우 35일째 첫 번째 채혈은 감작-추가자극 그룹들의 첫 번째 주와 같은 높은 IgG 역가들을 보여주었다.

[0355] 마우스들은 베트남/1203/2004 바이러스의 치사 용량 (20 MLD₅₀)으로 도전되었다. 모든 H5N1 M2KO(Δ TM) 백신접종된 (감작 단독 및 감작-추가자극) 마우스들은 생존하였다 (도 54 및 도 55). 면역화-후 5개월째 도전된 마우스들의 높은 생존율은 H5N1 M2KO(Δ TM) 백신이 기억 반응들을 감작시키는 점을 제시한다. 면역화-후 4주째 도전된 마우스들은 백신의 한 번 용량만을 수여받았고, M2KO(Δ TM) 백신이 강한 면역 반응을 자극하는 점을 가리킨다. H1N1pdm M2KO(Δ TM) 면역화된 마우스들도 역시 5개월 이후에 H5N1 도전에서 생존하였고, M2KO(Δ TM)이

이종유래 도전에 대항한 보호작용을 제공하는 교차-반응성 면역 반응들을 감작시키는 점을 제시한다.

[0357] 실시예 18: H1N1pdm: FluMist® CA07 대비 M2KO(Δ TM) CA07

[0358] A/캘리포니아/07/2009 (CA07) (H1N1pdm)의 HA 및 NA cDNA 클론들은 표준 분자생물학 프로토콜들에 의해 생성되었다. 제작물들의 서열들은 검증되었고 표준 프로토콜들을 사용하여 종자 M2KO(Δ TM) 바이러스 및 M2WTCA07/PR8 바이러스의 생성을 허용하도록 적당한 벡터들 내로 서브-클론되었다. FluMist® CA07 (H1N1pdm)는 FluMist® 2011-2012 백신 로트# B11K1802로부터 MDCK 세포들에서 플라크 정제되었다. A/캘리포니아/07/2009 (CA07) HA 및 NA 서열들은 하기에 나타나 있다.

A/California/07/2009 (H1N1) HA in M2KOTMdel

```
AGCAAAAGCAGGGGAAACAAAAGCAACAAAATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTGCAACCGCAAAT
GCAGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAACAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAAACAGT
AACACACTCTGTAAACCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCAATTTGG
GTAAATGTAAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCCTACATT
GTGGAAACACCTAGTTGAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAG
CTCAGTGTCTATCATTGAAAGGTTTGAGATATCCCAAGACAAGTTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAA
CGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCA
AAGCTCAGCAAACTCTACATTAATGATAAAGGAAAGAAAGTCTCTGCTATGGGGCATTCAACATCCATCTACTAGTGC
TGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGGTCATCAAGATACAGCAAGAMGTCAAGCCGG
AAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCRAGAAGGGAGAATGAATTAATGAGCACTAGTAGAGCCGGGAGACAAA
ATAACATTGCAAGCAACTGGAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAGAAATGCTGGATCTGGTATTAT
CATTTGAGATACACCAAGTCCAGATTGCAATACAATGTGCAAAACCCCAAGGGTGTATAAACCAGCCTCCCATTTTC
AGAATATACATCCGATCACAATTGGAATATGTCCAAAATATGTAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGG
AATATCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGA
TGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAATGAGCAGGGGTGAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACAGAAATGCCATTG
ACGAGATTACTAACAAAGTAAATCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTTACAGCAGTAGGTAAAGAGTTCAACCAC
CTGGAAAAAGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCTGGACATTGGAATGCGGAAGTCTGTT
GGTTCTATTGGAAAAATGAAAGAACTTTGGACTACCAAGTTCGCAATGTGAAGAACTTATATGAAAAGGTAAGAAGCCAGC
TAAAAAACATGCCAAAGGAAATTTGGAACGCGCTGCTTTGAATTTTACCACAAATGCGATAACACAGTGCATGGAAAGTGC
AAAAATGGGACTTATGACTACCCAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGA
ATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTTATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAA
TCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTTACAGTGTAGAATATGTATTTAACATTAGGATTTTCAAGCATGAGAAAA
AAACACCTTGTCTTCTACT
```

> A/California/07/2009 (H1N1) NA in M2KOTMdel

```
AGCAAAAGCAGGAGTTTAAATGAATCCAAACCAAAAGATAATAACCATTGGTTCGGTCTGTATGACAATTGGAATGGCT
AATTAATATTACAAATTGGAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATTAACATTGGGAATCAAAATCAGATTGA
AACATGCAATCAAAAGCGTCATTACTTATGAAAAACAACACTTGGGTAATCAGACATATGTTAATCAGCAACACCAACT
TTGCTGCTGGACAGTCAAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGCAATTCCTCTCTCTGCTGTTAGTGGATGGGCTATATAC
AGTAAAGACAAACAGTGAAGAATCGGTTTCCAAGGGGAGTGTGTTTGTATCAAGGGAACCAATTCATATCATGCTCCCCCTT
GGAATGCAGAACCTTCTTCTGACTCAAGGGGCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCAATTAAGACAGGAGCC
CATATCGAACCTAATGAGCTGTCTATTGGTGAAGTTCCTCTCCATACAACCTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCA
GCAAGTCTTGTATGATGGCATCAATGGCTAACAATTTGGAATTTCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAA
GTACAACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTG
TAAATGGTTCTTCTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTAAATGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAAGATAGAAAAG
GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGA
AATCAGATGTGTGTCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGA
TAGGATACATATGCAAGTGGGATTTTTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGAGTGTGGTCCAGTATCGTCT
AATGGAGCAATGGAGTAAAGGGTTTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGTTGGATAGGGAGAACTAAAAGCATTAGTTTC
AAGAAACGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGGACAGACAATAACTTCTCAATAAAGCAAGATATCG
TAGGAATAAATGAGTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTGTTCAGCATCCAGAACTAACAGGGCTGGATTGTATAAGACCT
TGCTTCTGGGTGCAATCAGAGGGGCGACCCAAAGAGAACACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGG
TGTAACAGTGACACTGTGGGTGCTTGGCCAGACGGTGTGAGTTGCCATTACCAATTGACAAGTAATTTGTTCAAA
AAACTCCTTGTCTTCTACT
```

[0359]

[0360] 마우스들 (7 내지 8주령 암컷 BALB/c)은 M2KO(Δ TM) CA07 (10^6 TCID₅₀/마우스), M2WT CA07 (10^6 TCID₅₀/마우스), FluMist® CA07 (10^6 TCID₅₀/마우스) 또는 무-백신 대조군으로서 OPTI-MEM™으로 비강내 접종되었다. 체중 및 임상적 징후들은 접종-후 14일 동안 관찰되었다. 도 37은 M2KO(Δ TM) 및 FluMist® 백신접종된 마우스들이 체중을 손실하지 않았던 한편 WT M2를 포함하는 바이러스는 체중을 손실하고 감염으로 죽는 점을 보여준다. 이들

결과들은 M2 유전자의 결실이 바이러스를 약독화하고 M2KO(Δ TM)가 약독화된 점을 설명한다.

- [0361] 도 38은 M2KO(Δ TM), FluMist®, 및 M2 야생형 바이러스 역가들은 바이러스 페들 및 코션반들에서 결정되었다. 페들 및 코션반들은 백신접종-후 3일째 세포들 상에서 바이러스의 역가측정을 위해 수확되었다. 바이러스는 M2KO(Δ TM) 면역화된 마우스들의 페들 또는 코션반들에서 전혀 검출되지 않았다. 대조적으로, FluMist®는 야생형 바이러스보다 더 낮은 수준들이더라고 페 및 코션반들 둘 다에서 바이러스 복제를 가지지 않았다.
- [0362] 도 39는 접종-후 7, 14, 21일째 수집된 혈청들에서 M2KO(Δ TM) 및 FluMist® 역가들 및 항-HA IgG 역가들은 엘라이자에 의해 결정되었다. M2KO(Δ TM)는 FluMist® 반응들보다 일찍 검출되는 더 높은 반응들을 유도하였다. 20일까지 둘 다의 바이러스들은 피크 항체 수준들에 도달되었다.
- [0363] 도 40은 40 MLD₅₀의 이중유래 바이러스, 마우스-적응된 A형 인플루엔자/아이치/2/1968 (H3N2)로 면역화-후 12주째 도전된 마우스들의 생존 백분율을 나타낸다. 체중 변화 및 임상적 징후들은 도전 이후 14일 동안 관찰되었다. 모든 M2KO(Δ TM) (H1N1pdm HA, NA) 면역화된 마우스들은 아이치 (H3N2) 도전들에 대항하여 보호되었던 한편 단지 80%의 FluMist® (H1N1pdm HA, NA)만이 보호되었다. 생존한 FluMist® 마우스들은 20%에 가까운 그들의 체중을 손실하였던 한편 M2KO(Δ TM) 마우스들은 ~ 10%의 그들의 체중을 손실하였다.
- [0364] 도 26은 도전-후 3일째 수집되었던 페들 및 코션반들에서 바이러스 역가들을 나타낸다. M2KO(Δ TM) 및 FluMist®은 페들 및 코션반들에서 도전 바이러스 복제를 유사한 수준들로 조절하였던 한편, 무-백신 마우스들은 페들 및 코션반들 둘 다에서 로그 더 높은 바이러스 역가들을 나타냈다.
- [0365] 기관지 폐포 세척액 (BAL)에서 세포들의 세포내 염색. BAL은 도전-후 3일째 수집되었고, CD8+CD4+, CD8+CD4-, CD8-CD4+, CD8-CD4- 세포 집단들을 검출하는 유동 세포측정법에 의한 면역염색법을 위한 표면 마커들로 염색되었다. CD4+ 및 CD8+ 세포 집단들은 무-백신 마우스들보다 백신접종된 마우스들에서 더 많았고, M2KO(Δ TM)가 FluMist®와 유사하게 세포성 반응을 감작하였던 점을 가리킨다. M2KO(Δ TM) 백신접종된 마우스들이 FluMist®보다 더 많은 CD8+CD4- 세포 집단을 가졌다 (49% 대비 40%) (도 41). 표 26은 마우스의 호흡관에서 바이러스 역가들을 나타낸다.

표 26

	페 (log pfu/g)	코션반 (log pfu/g)
M2KO CA07	5.95 ± 0.59	5.61 ± 0.47
FluMist CA07	5.94 ± 0.46	3.88 ± 0.64
무-백신	6.86 ± 0.06	6.52 ± 1.05

- [0366]
- [0367] 실시예 19: FluMist® 및 야생형 바이러스 대비한 M2KO(Δ TM) mRNA 발현

- [0368] 일정 구현예들에서, M2KO(Δ TM) 바이러스는 M2 단백질을 트랜스 작용으로 안정하게 제공하는 세포들에서 생산되고, 바이러스 막에서 기능적 M2 단백질을 가지지만 그의 게놈에서 M2를 인코딩하지 않는 바이러스를 가져온다. 따라서, 우리는 M2KO(Δ TM) 바이러스가 정상 세포들에서 초기 감염 및 첫 번째 복제 주기에서는 야생형 바이러스와 유사하게 행동하는 것으로 가정한다. 우리는 바이러스 항원들의 mRNA 수준들이 이른 감염에서는 야생형 수준들과 유사하고 약독화 복제하는 바이러스 백신들보다 더 일찍 강력한 면역 반응을 자극하는 점을 제시한다.
- [0369] 인간 폐 암종 (A549) 세포들은 M2KO(Δ TM), FluMist® 및 야생형 바이러스들로 0.5의 감염 다중도에서 감염되었다. 미흡착된 바이러스는 PBS로 5번 세척하여 제거되었다. 바이러스 성장 배지들의 첨가 이후에, 감염된 세포들은 35°C CO₂ 배양기에 배치되었다. 트립신은 모든 바이러스들의 경우 단일-주기 복제를 입증하도록 성장 배지에 전혀 첨가되지 않았다. 세포 단일층들은 감염 후 4, 9 및 22시간에 수확되었고 RNA가 추출되었다.
- [0370] 대조군 및 감염된 A549 세포들로부터 얻은 전체 RNA (100 ng)는 정량적 RT-PCR 분석을 위해 사용되었다. cDNA는 올리고-dT 프라이머들 및 슈퍼스크립트 II 역전사효소 (인비트로젠사)로 합성되었고, 초기 인플루엔자 유전

자, M1, 및 후기 인플루엔자 유전자, HA 및 사이토카인 IP-10 유전자에 대한 유전자-특이적 프라이머들을 사용한 실시간 정량적 PCR 분석에 의해 정량되었다. 반응들은 제조사의 지침들에 따라 SYBR 그린 시약 (인비트로겐사, 칼스베드)을 사용하여 수행되었다. 반응 효율은 살림 유전자 γ -액틴 및 시료 유전자들의 일련 10배 희석들을 사용하여 계산되었다. 반응들은 ABI 7300 실시간 PCR 시스템 (어플라이드 바이오시스템사 (Applied Biosystems), 포스터시티, CA, 미국)을 사용하여 수행되었고 사용된 열적 프로파일들은 단계 1: 30분 동안 50℃; 단계 2: 15분 동안 95℃; 단계 3: 15초 동안 94℃, 30초 동안 55℃; 및 30초 동안 72℃, 30회 반복되는 것이었다. 모든 정량들 (역치 순환 [CT] 수치들)은 ΔCT 를 생성하도록 살림 유전자의 정량으로 정상화되었고, 시료의 ΔCT 수치 및 참조 (야생형 시료)의 수치 중의 차이는 $-\Delta\Delta CT$ 로서 계산되었다. mRNA 발현의 상대적 수준은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 로서 표현되었다.

[0371]

M2KO(ΔTM) 바이러스 HA mRNA 발현은 감염-후 4시간에서 H3 (표 27), PR8 (표 28) 및 H1N1pdm (표 42)의 경우 야생형 M2 바이러스와 유사하였다. 감기-적응된 FluMist®는 더 늦은 복제 역학들로 인해 초기 시간대들에서 야생형 및 M2KO(ΔTM) 이하이었다. 초기 시간대 유전자 M1 mRNA 발현이 테스트되었을 때, 유사한 결과들이 관찰되었다 (표 27, 도 42). 이들 결과들은 M2KO(ΔTM)가 야생형과 유사한 '위험 신호'를 만들고 강력한 면역 반응을 유도하는 새로운 바이러스성 항원들을 생산하도록 초기 감염 주기에서 유사한 수준들의 mRNA를 생성하는 점을 제시한다. 표 27은 H3 HA 유전자들의 상대적 mRNA 발현을 나타낸다. 표 28은 PR8 HA 및 M1 유전자들의 상대적 mRNA 발현을 나타낸다.

표 27

4hr pi	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (IVR-147과 대비함)		
	미희석	1:10 희석	1:100 희석
IVR-147	1.0	1.0	1.0
M2KO	15.4	16.1	10.8
FluMist	2.3	2.1	1.4
모의대조군	0.0	0.0	N/A

22hr pi	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (IVR-147과 대비함)		
	미희석	1:10 희석	1:100 희석
IVR-147	1.0	1.0	1.0
M2KO	1.0	1.4	1.9
FluMist	1.8	3.1	1.5
모의대조군	0.0	0.0	N/A

[0372]

표 28

		HA		M1	
시료		미희석	1:10	미희석	1:10
4 hr p.i.	PR8 WT	1.00	1.00	1.00	1.00
	PR8 M2KOTMdel	3.07	1.29	3.15	2.64
	모의대조군	0.02	0.30	0.15	0.32
9 hr p.i.	PR8 WT	1.00	1.00	1.00	1.00
	PR8 M2KOTMdel	2.05	3.27	4.04	5.11
	모의대조군	0.00	0.00	0.00	0.00

[0373]

[0374]

실시예 20: M2 배로 생산 세포들의 생성

[0375]

PR8 바이러스의 M2 유전자는 표준 분자적 기법들에 의해 발현 벡터 pCMV-SC (스트라타진사 (Stratagene), La Jolla, CA) 내로 클론되었고 pCMV-PR8-M2를 생성하였다. 플라스미드는 EcoRI로 소화되어 300 bp M2 유전자의 존재가 검증되었고 4.5 Kb 벡터는 도 43에 나타나 있다. M2 유전자 삽입물을 포함하는 플라스미드의 서열은 도 44에 나타난 바와 같이 검증되었다.

[0376]

M2 배로 세포들의 생성: 이전에 기술되고 네오마이신 저항성 유전자를 포함하는 pCMV-PR8-M2 플라스미드는 제조사의 지침들에 따라 트랜스 IT-LT1 형질전환 시약 (마이어스사)을 사용하여 배로 세포들 (ATCC CCL-81) 내로 형질전환되었다. 간략하게, 형질전환 이전 해당일에 배로 세포들은 5×10^5 개 세포들/100-mm 접시로 도말되었다. 1일째, 10 μ g의 플라스미드 DNA는 0.3 mL의 OptiMEM (인비트로젠사)에 넣은 20 μ g의 트랜스 IT-LT1과 혼합되었고 이들 세포들과 5% CO₂에서 37°C로 배양되었다. 2일째, 형질전환 혼합물은 5% 우태아 혈청이 보충된 변형된 이글 배지 (MEM)인 완전한 배지로 대체되었다. 배지는 네오마이신 단백질을 발현하는 포유동물 세포들을 선별하는 데 사용되는 광범위 항생제인 1 mg/mL의 젠타마이신 (인비트로젠사)도 역시 포함하였다. 저항성 세포들 (M2 유전자를 안정하게 발현하는 배로 세포들)은 선별 배지에서 성장하기 시작하고, 배지는 신선한 선별 배지로 대체되었으며, 젠타마이신-저항성 클론들은 TC-96 플레이트들에서 제한된 희석에 의해 분리되었다. M2 단백질의 표면 발현은 M2 특이적 단일클론 항체, 14C2 (산타크루즈 바이오테크놀로지사)를 사용한 면역염색법에 의해 보여진다.

[0377]

M2KO(Δ TM) 바이러스로 부모 및 변형된 M2 배로 세포들의 감염: M2KO(Δ TM) 바이러스를 위한 생산 세포들로서 작용하는 M2 배로 세포들의 능력은 M2KO(Δ TM)-PR8 바이러스로의 감염에 의해 테스트되었다. 간략하게, M2 배로 및 부모 배로 세포들은 표준 인플루엔자 감염 절차들을 사용하여 M2KO(Δ TM)-PR8 바이러스의 10배 일련 희석들 (10^{-1} 내지 10^{-6})로 감염되었다. 감염된 세포들을 35°C에서 배양되었고 세포변성 (CPE)에 대해 매일 관찰되었다. M2 배로 세포들만이 세포 성장을 가리키는 CPE를 나타냈다. 상청액은 10^{-3} 웰로부터 4일째 수확되었고 바이러스 역가는 M2 유전자를 안정적으로 발현하는 MDCK 세포들 (M2CK) 상에서 TCID₅₀에 의해 결정되었다. M2 배로 세포들에서 성장된 M2KO(Δ TM)-PR8 바이러스 역가는 M2 배로 세포들이 M2KO(Δ TM) 백신의 제조를 위한 생산 세포들로서 작용할 수 있는 점을 가리키는 $10^{6.75}$ TCID₅₀/mL이었다.

[0379]

실시예 21: 인플루엔자 백신들의 피부내 전달

[0380]

본 실시예는 근육내 (IM), 피부내 (ID)로 그리고 공고된 미국특허 출원 제 2011/0172609호에서 기술된 장치와 같은 피하 미세바늘 장치를 사용하여 투여될 때 계절성 인플루엔자 백신인 플루라발 (2011-2012년형 제형물)의 면역원성을 설명한다. 털 없는 기니아 피그들이 0일에 접종되었고 선별된 그룹들은 30일째 추가자극되었다. 혈청들은 0, 30 및 60일째 수집되었고 헤마글루티닌-특이적 IgG 반응들을 위해 효소-연결된 면역흡착 검정법

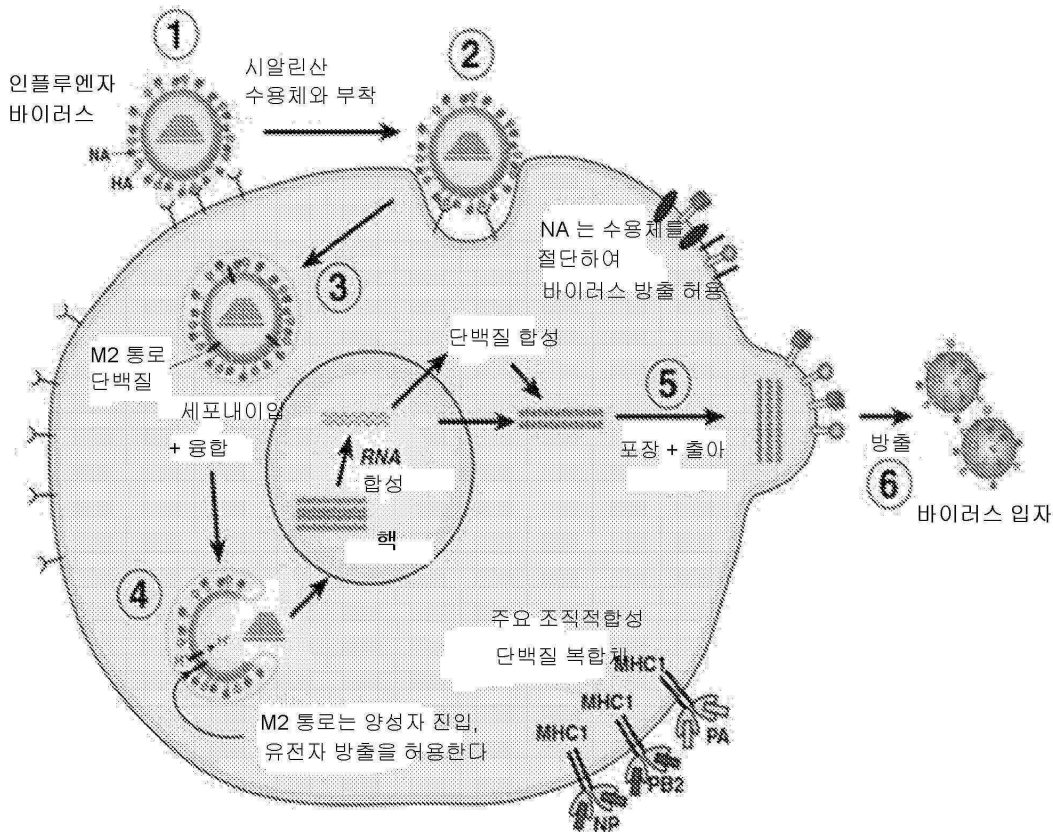
(ELISA)에 의해 분석되었다.

[0381]

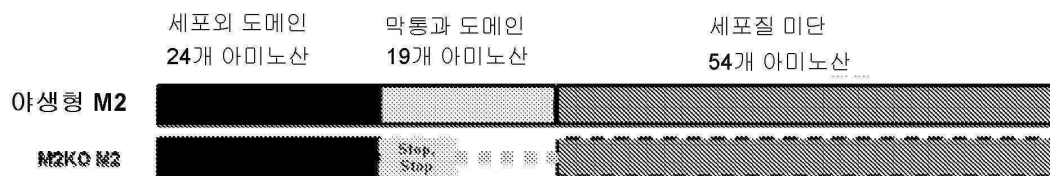
결과들은 도 51 내지 도 53에 나타나 있다. 데이터는 계절성 인플루엔자 백신 플루라발에서 제형화된 3가지 균주들에 대한 항체 수준들의 정성적 흡광도를 보여준다: A/캘리포니아/7/2009 NYMC X-181, A/빅토리아/210/2009 NYMC X-187 (A/퍼스/16/2009-유사 바이러스), 및 B/브리스번/60/2008. 30일째, IM 및 ID 전달은 모든 바이러스 HA와 일치하는 IgG 반응들을 생산하였다. ID 감각 단독 그룹들은 60일째 더 높은 역가들을 나타냈고, ID 전달이 모든 바이러스 HA에 대해 오래 지속되는 면역성을 유도하는 점을 제시한다.

도면

도면1



도면2

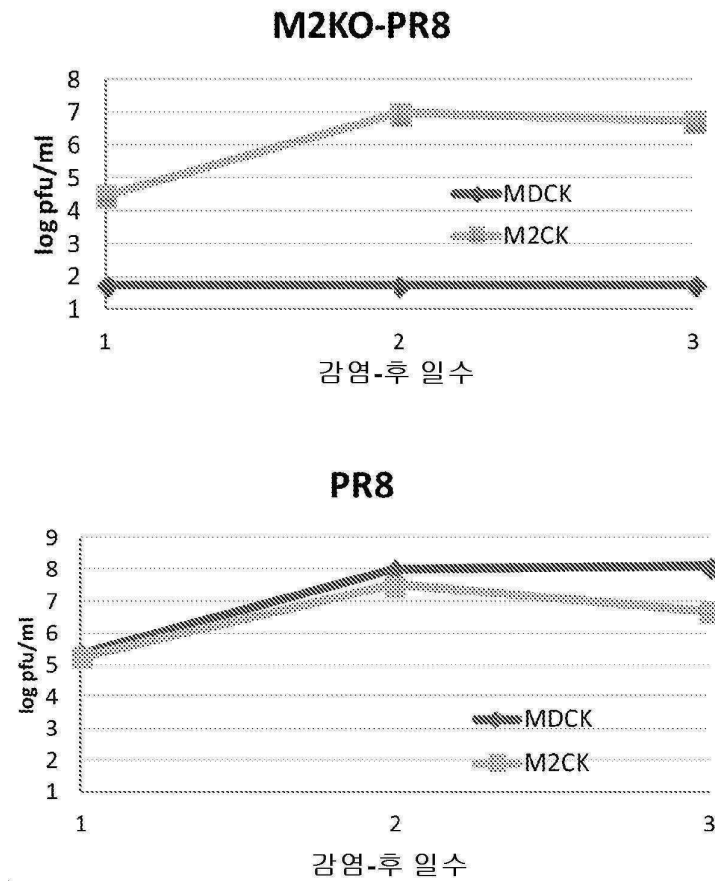


도면3

"야생형" M1/M2 핵산 서열 (3'→ 5')

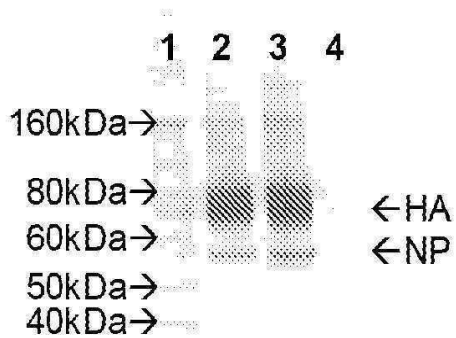
AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGatgagtcttctaaccgaggtcgaaacGTACGTACTCTCTATC
ATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTTGCA
GGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCT
GTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCCAGTGA
GCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGATC
CAAATAACATGGACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAACA
TTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACCTTGCCAGTTGT
ATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGGGCTGTGACCACTGAAGTGGCATTGTCCT
GGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCCCAGCATCGGTCTCATAGGCAAAT
GGTGACAACAACCAATCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCA
CTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGGCC
ATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGACAAATGGTGCAAGCGATGAGAACCATTGGGAC
TCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTGAAAATTTGCAGgcctatcag
aaacgaatgggggtgcagatgcaacgggtcaagtgaatcctctcactatgccgcaaatatcattgggatcttgcaattgacattgtggattcttg
atcgtcttttttcaaatacattaccgtcgcttttaatacggactgaaaggaggccttctacggaaggagtgccaaagtctatgaggaaga
atatcgaaaggaacagcagagtgtgtggatgctgacgatggtcattttgtcagcatagagctggagtaaAAAACCTACCTTGTT
TCTACT

도면4



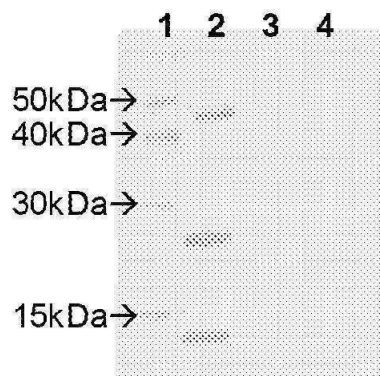
도면5a

항-PR8 다중클론 혈청

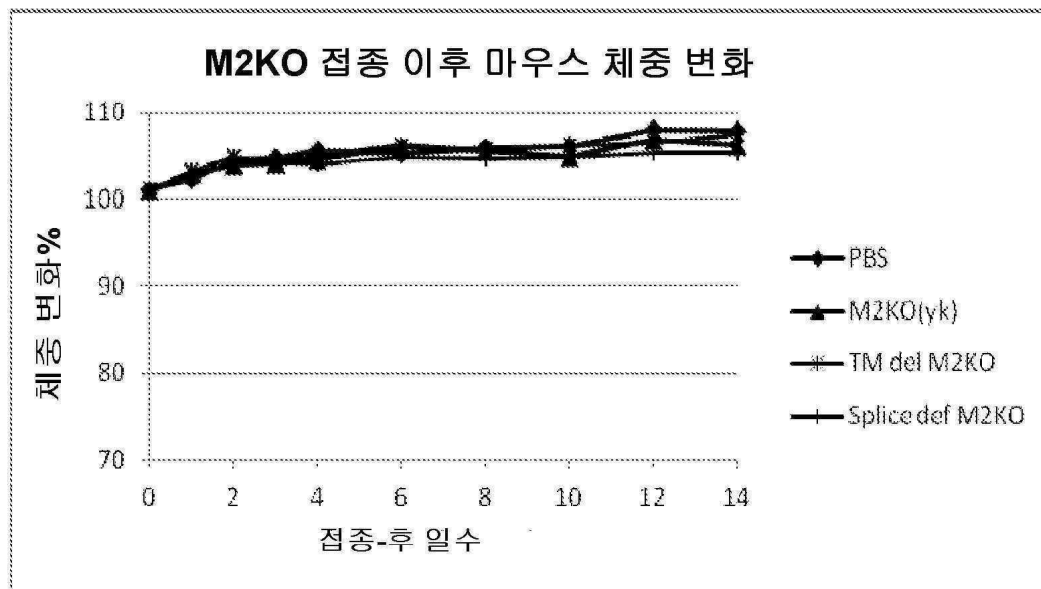


도면5b

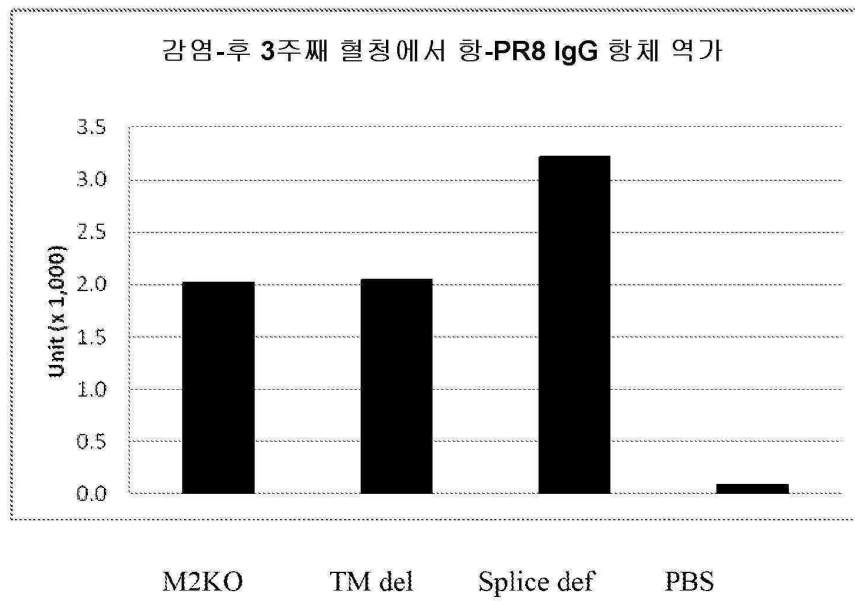
항-M2 단일클론 항체



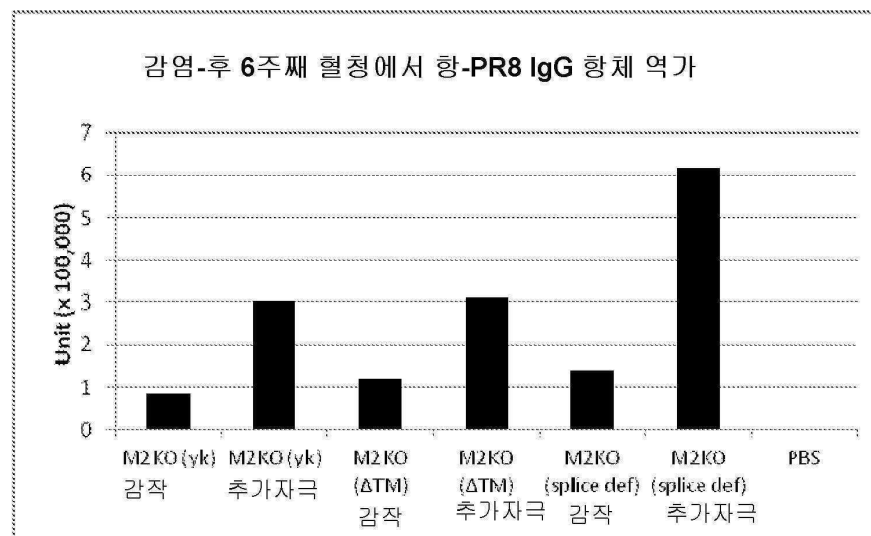
도면6



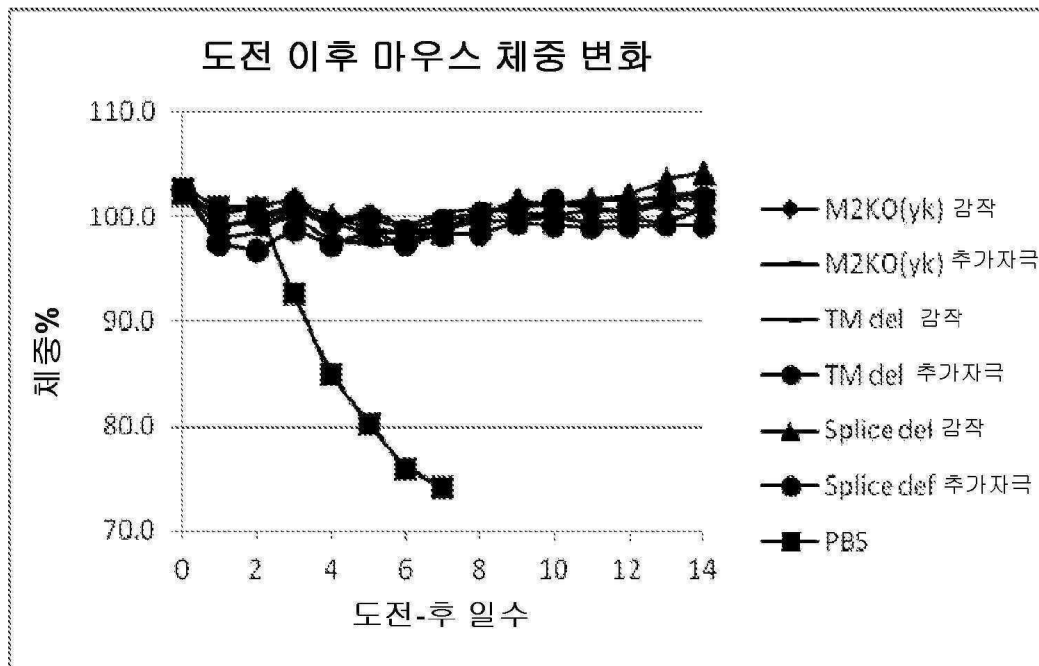
도면7a



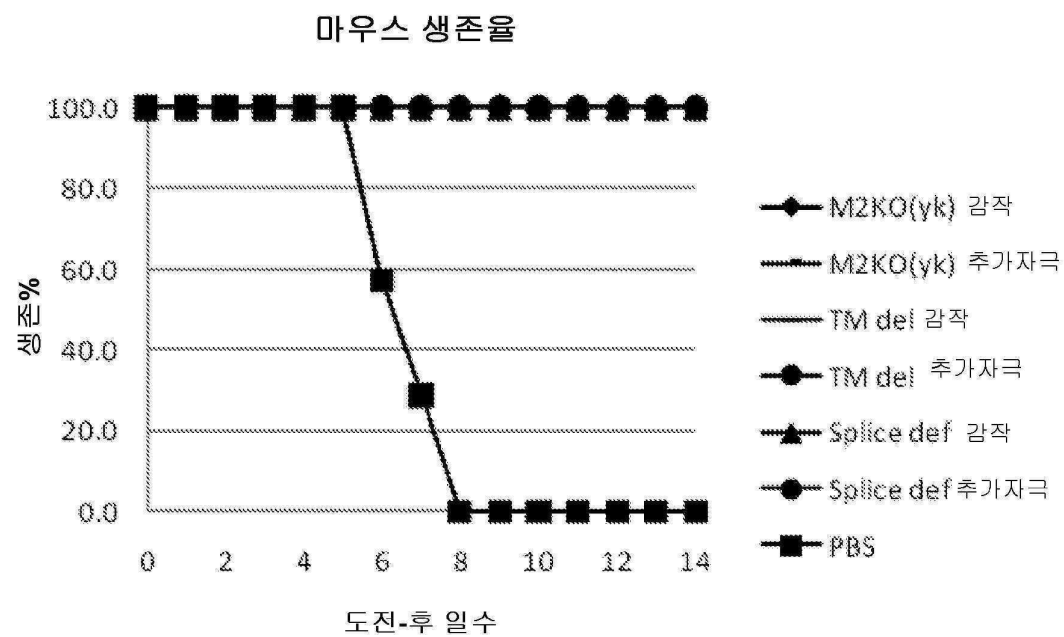
도면7b



도면8

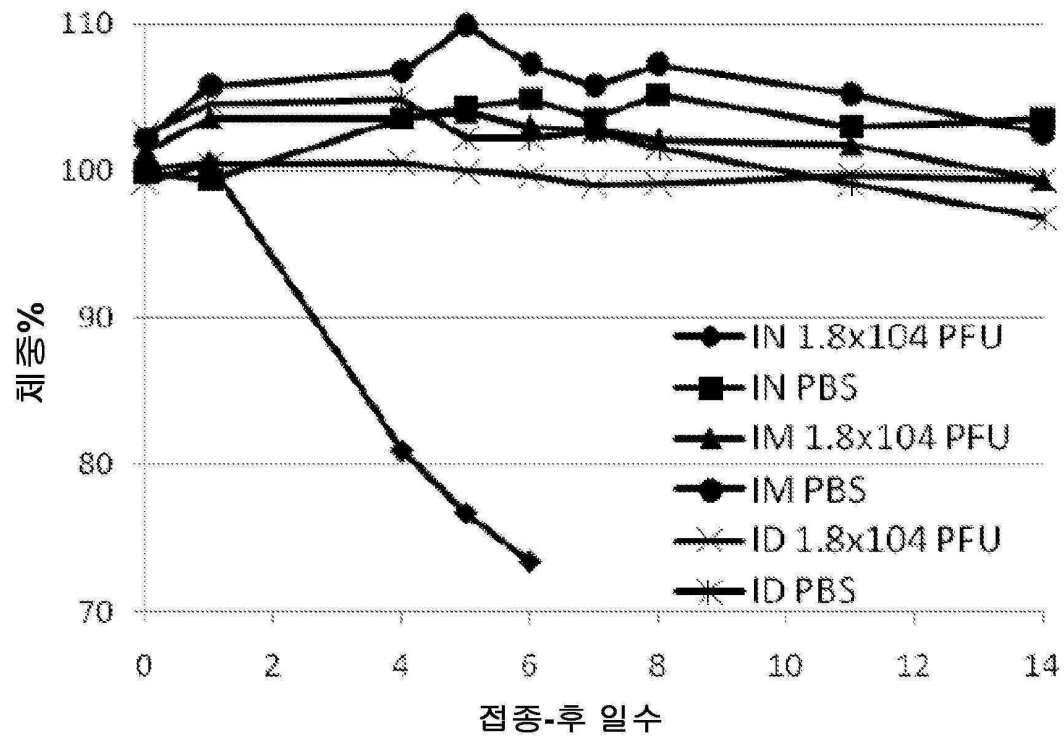


도면9

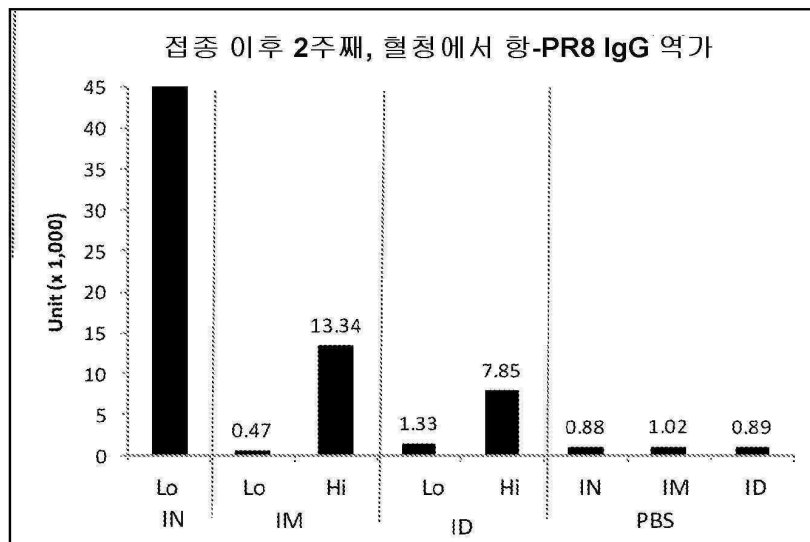


도면10

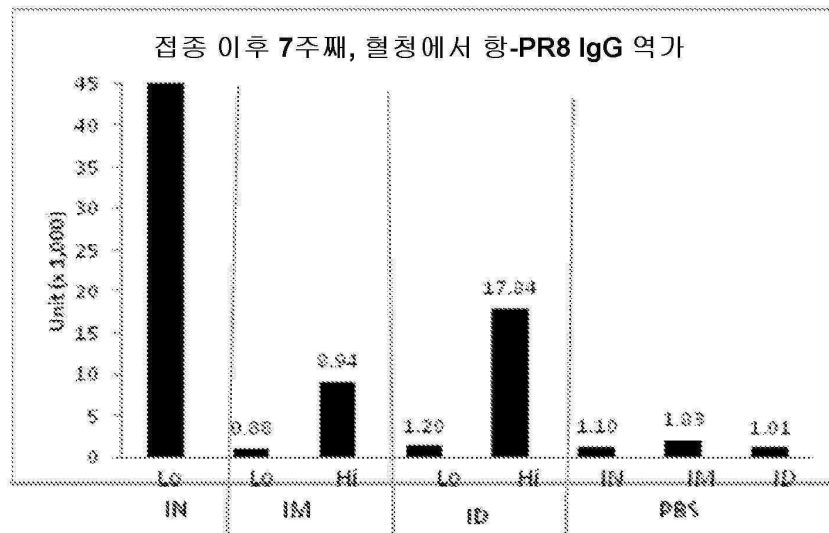
PR8 접종 이후 마우스 체중 변화



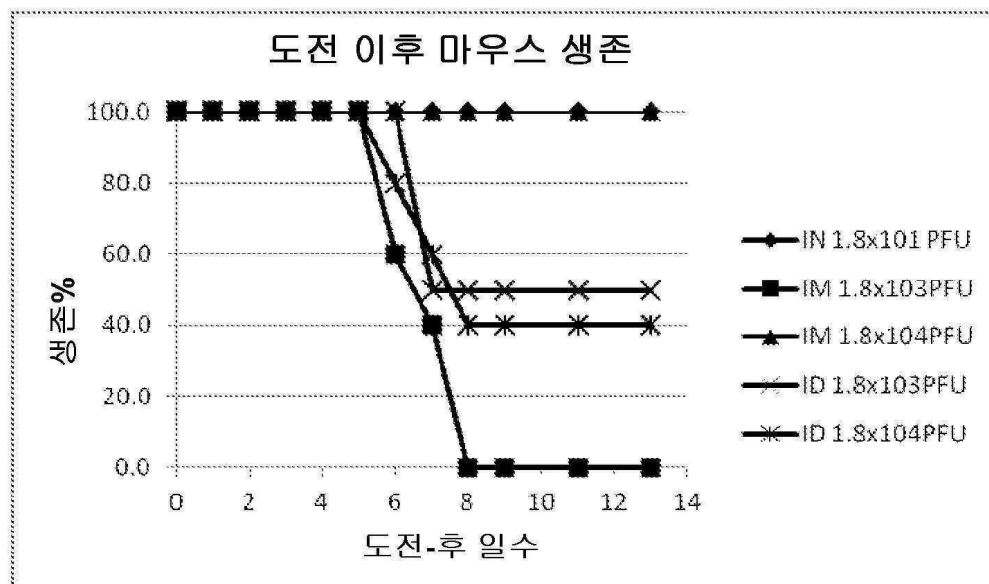
도면11a



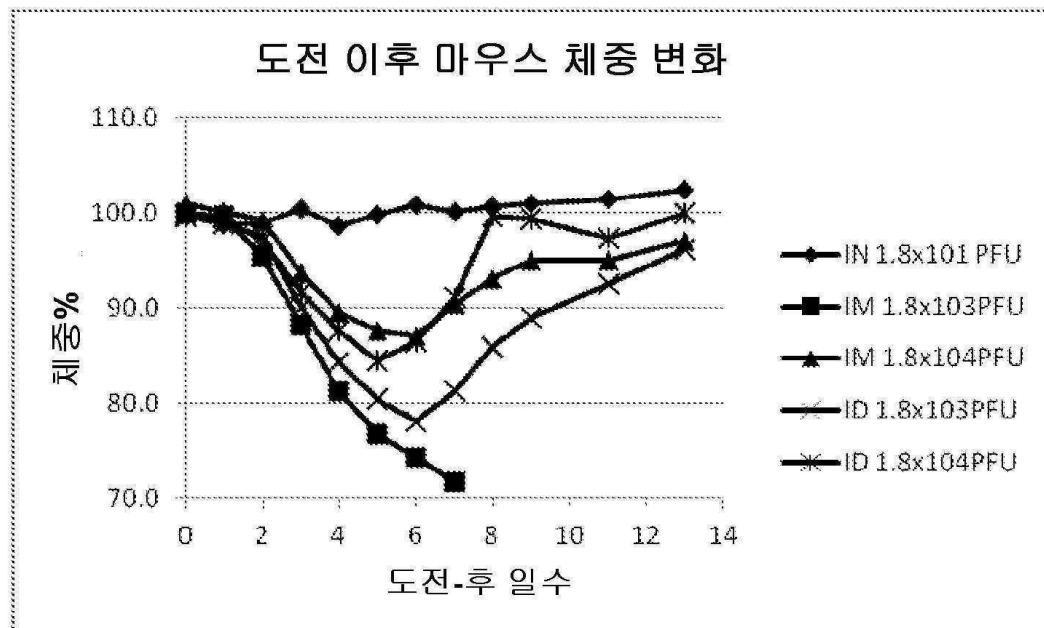
도면11b



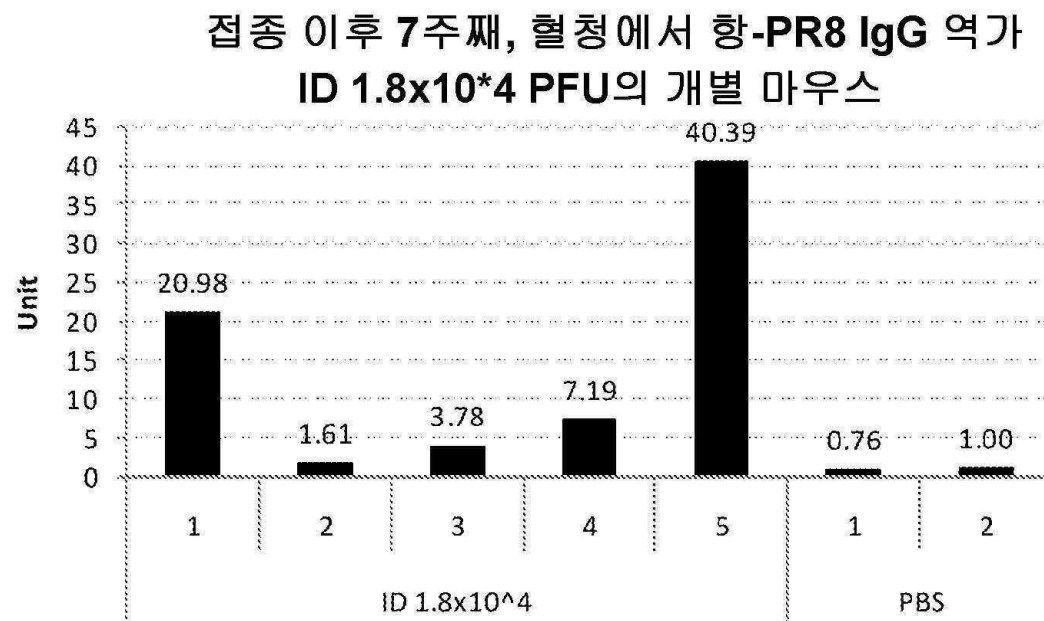
도면12



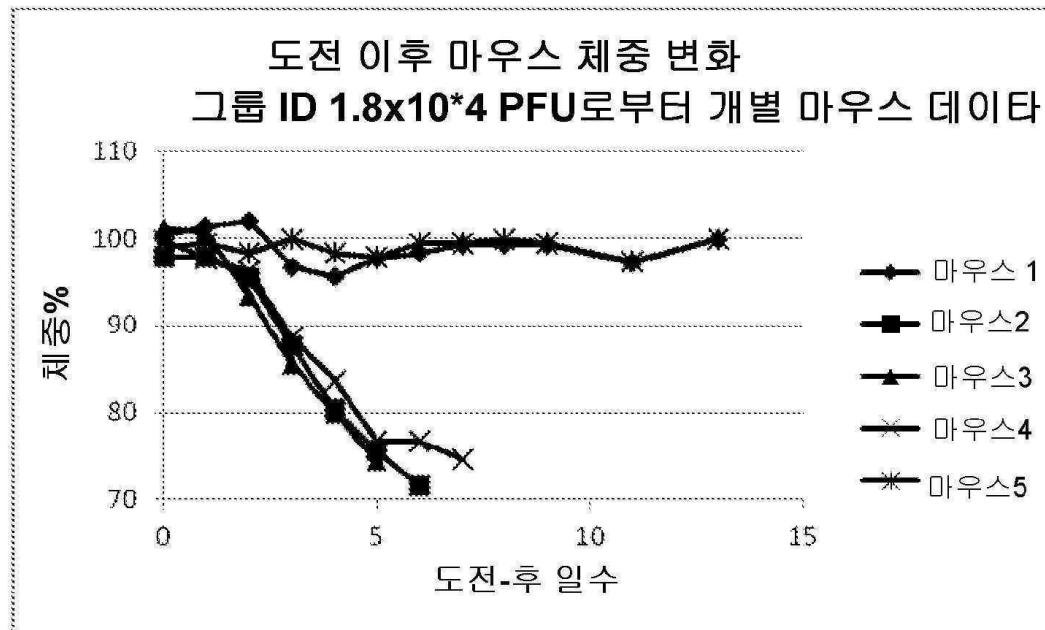
도면13



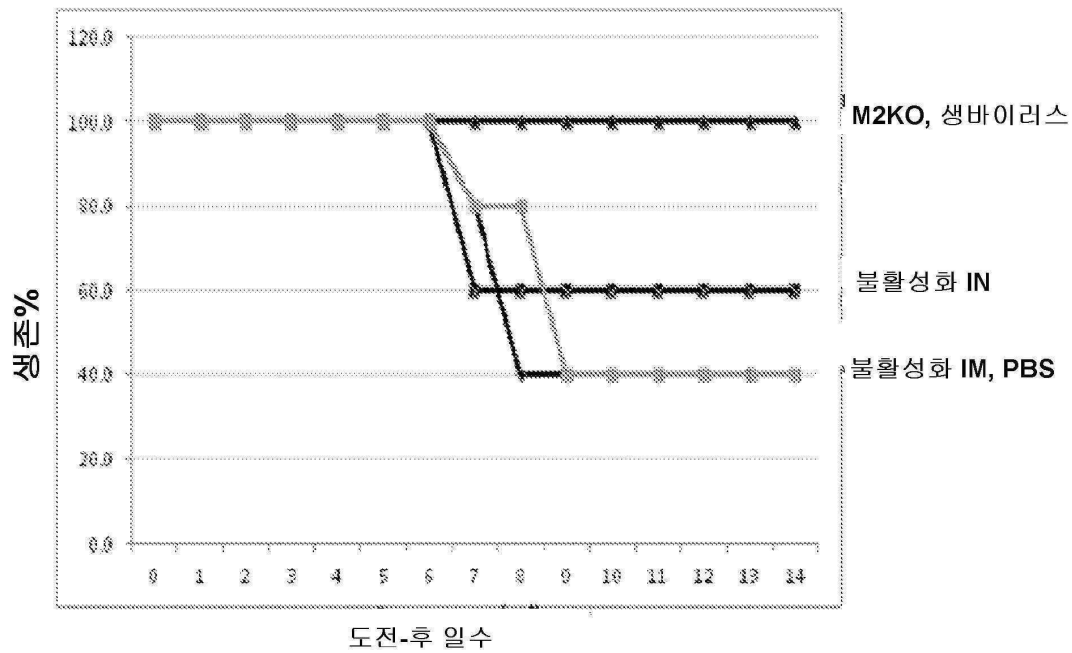
도면14



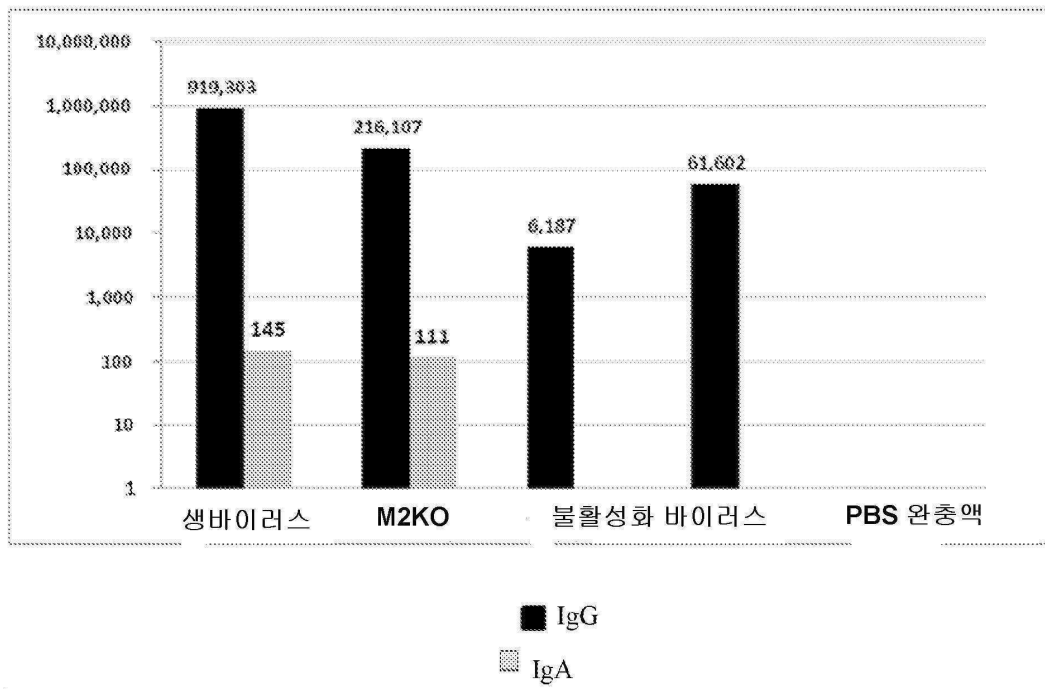
도면15



도면16

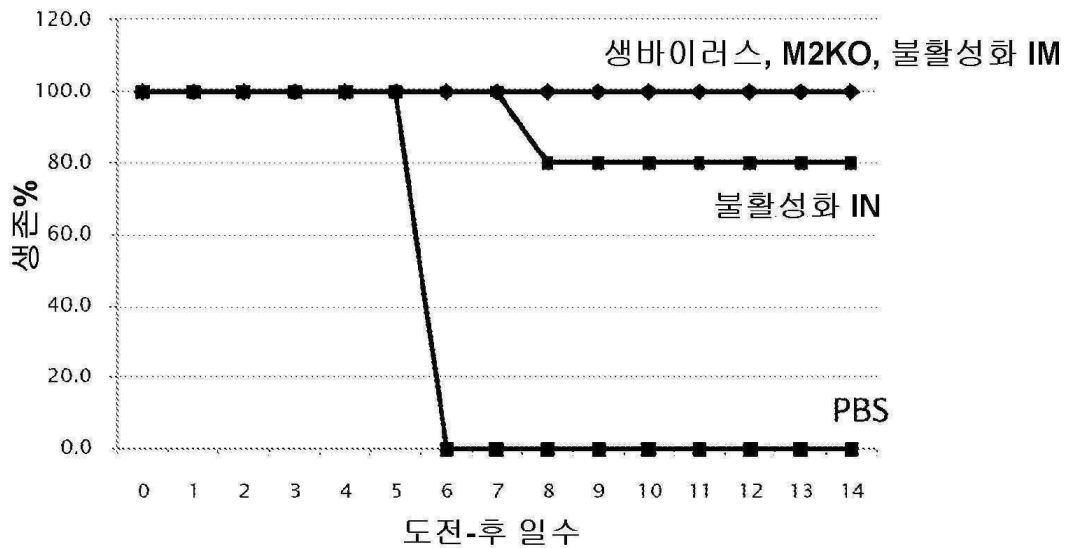


도면17



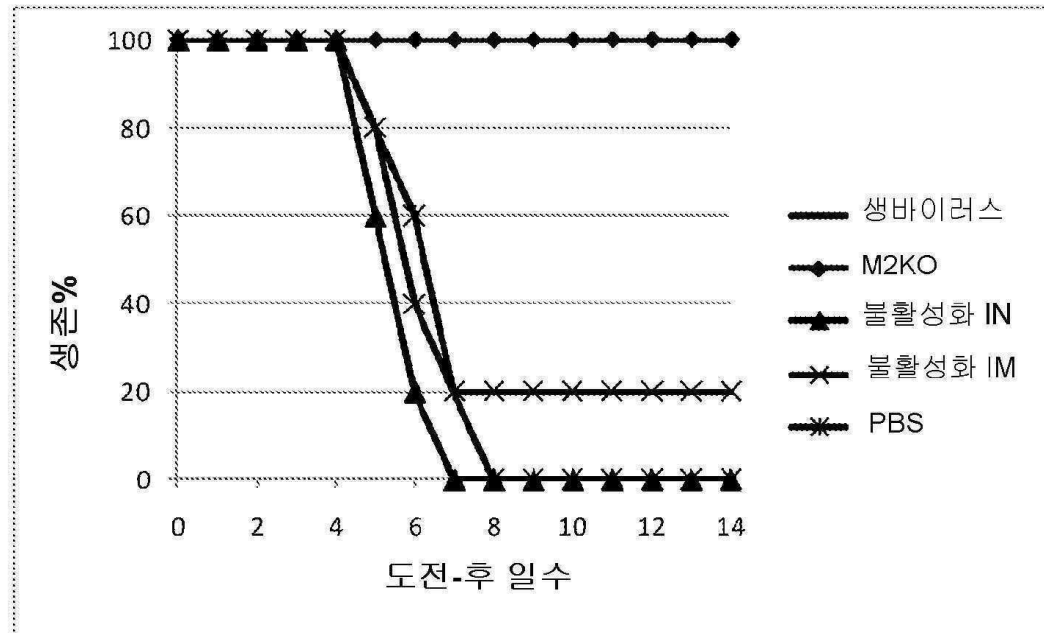
도면18

PR8 H1N1 도전

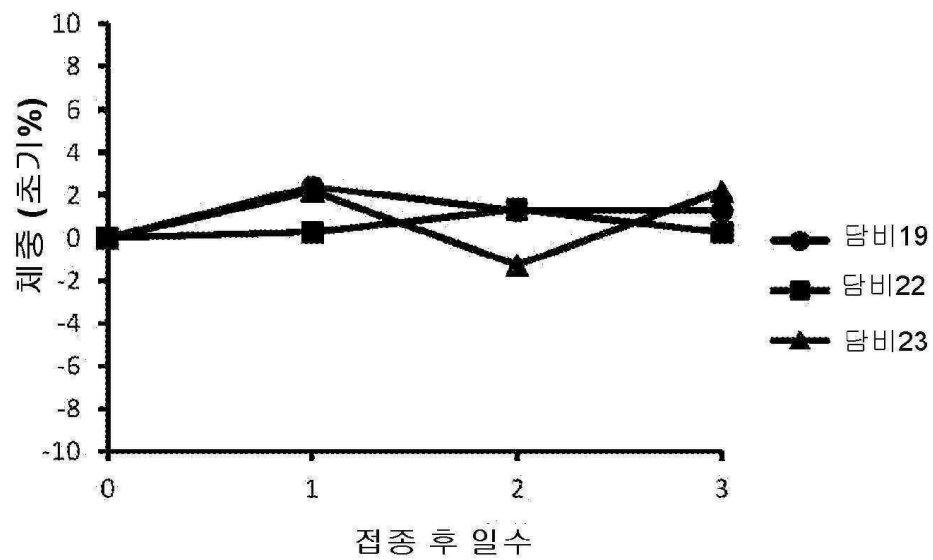


도면19

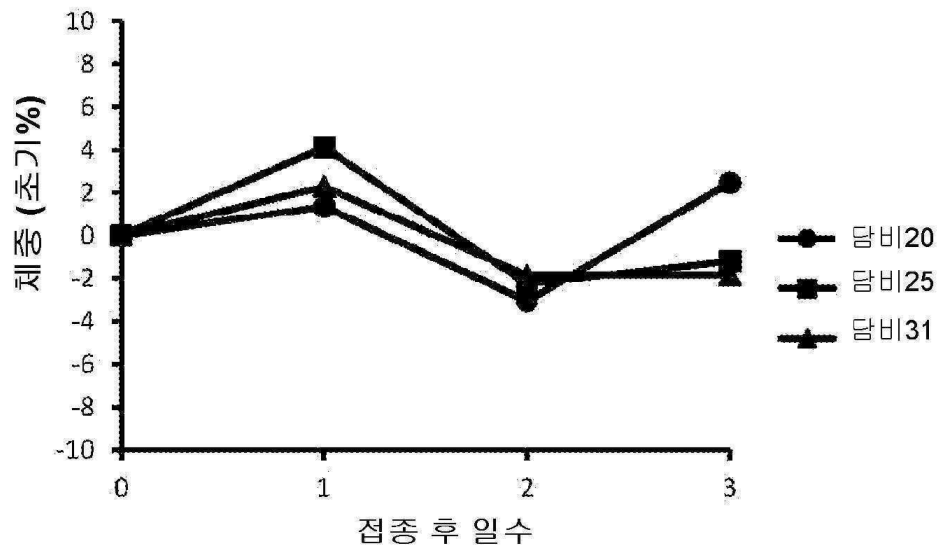
아이치 (H3N2) 도전



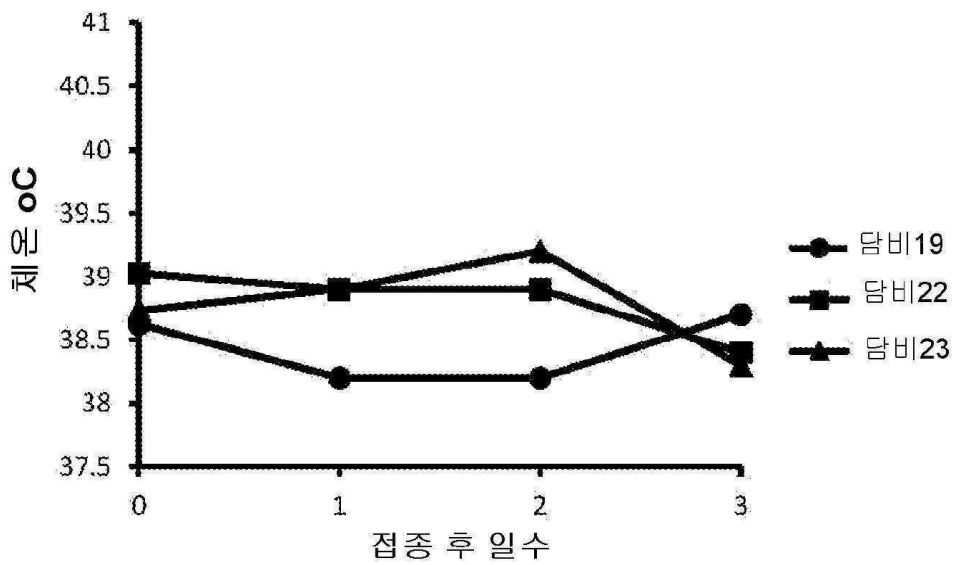
도면20a



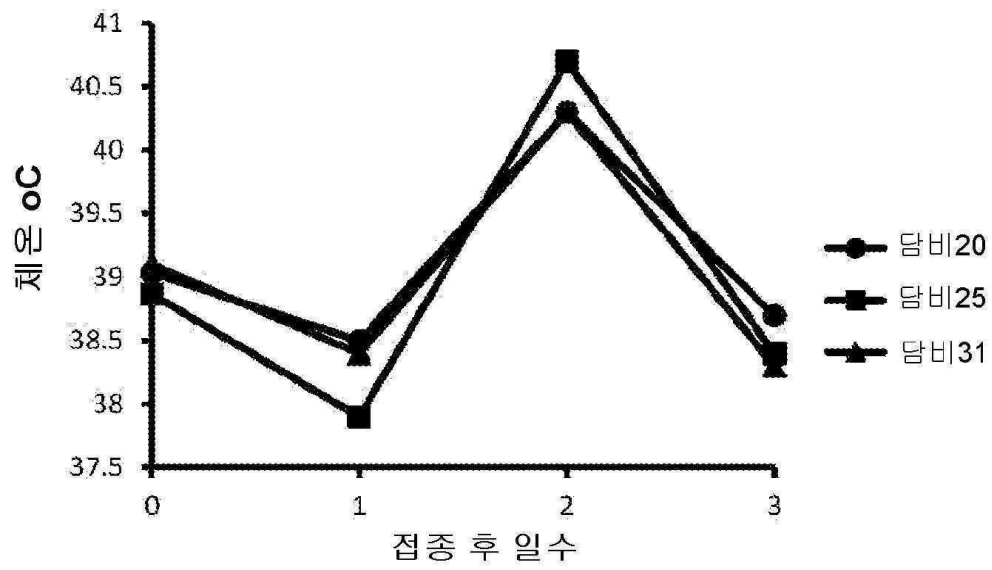
도면20b



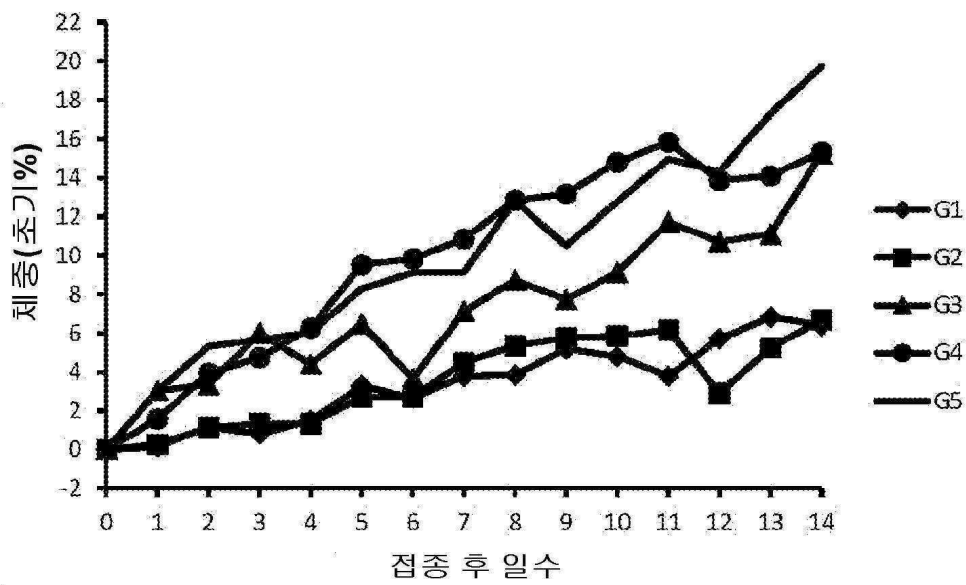
도면21a



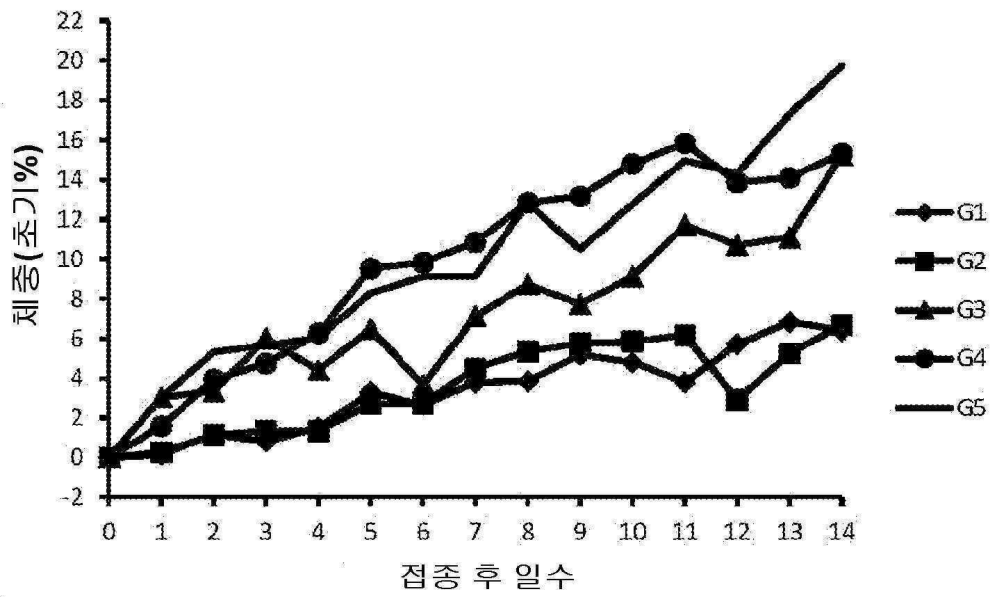
도면21b



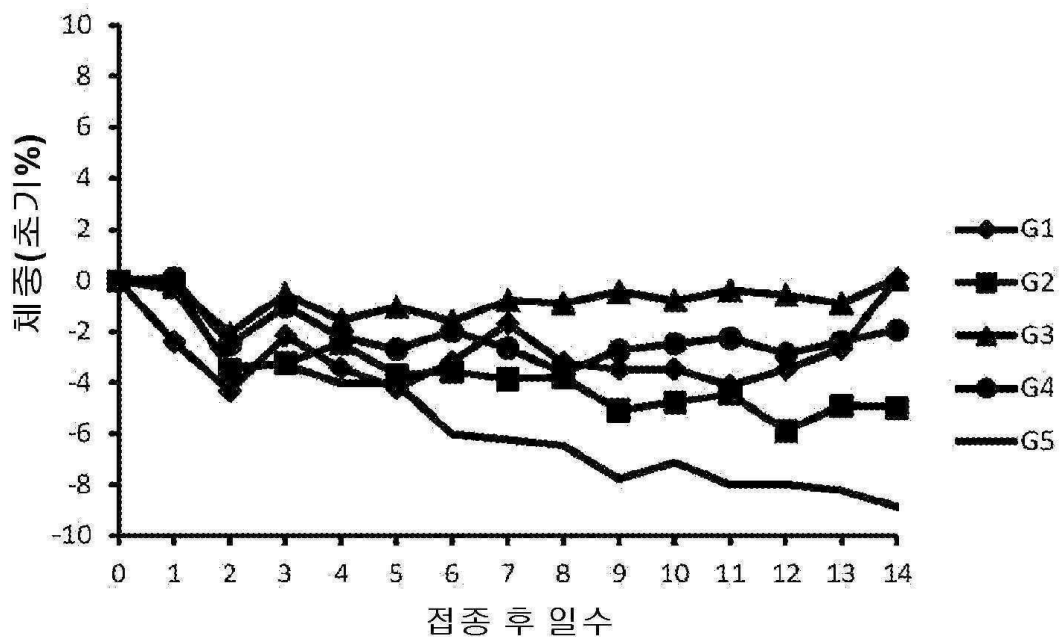
도면22a



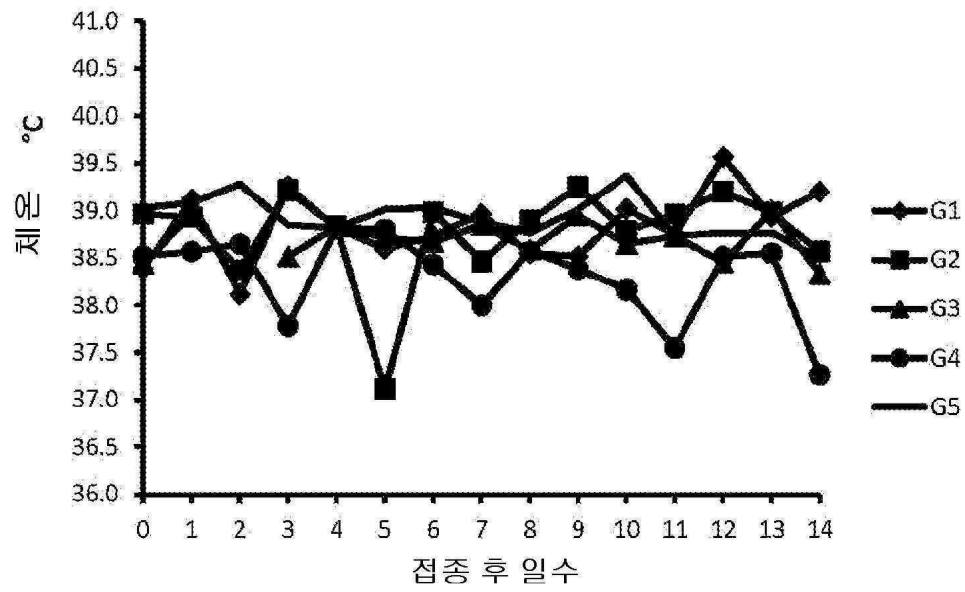
도면22b



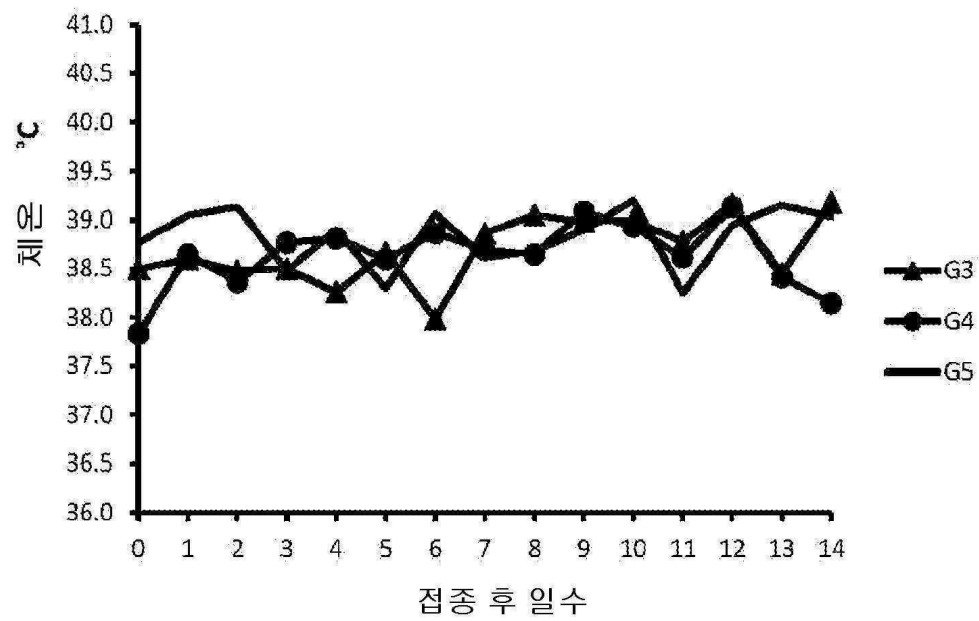
도면23



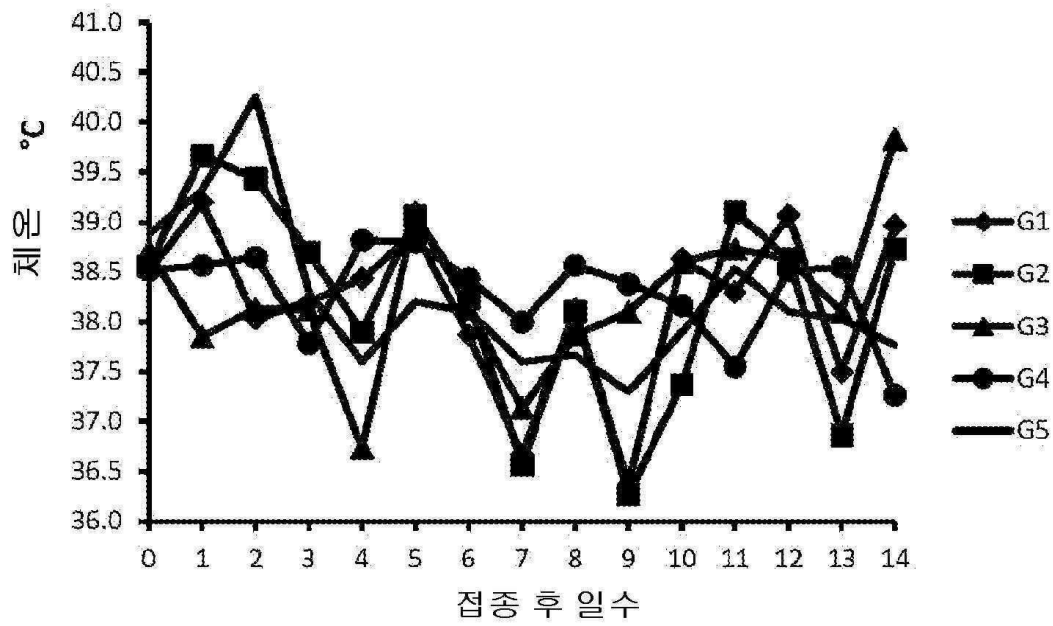
도면24a



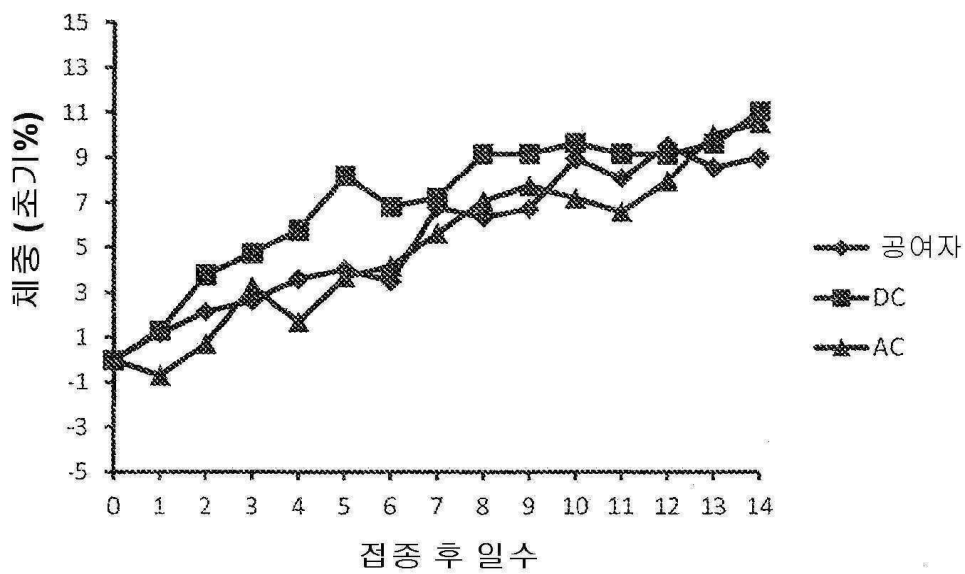
도면24b



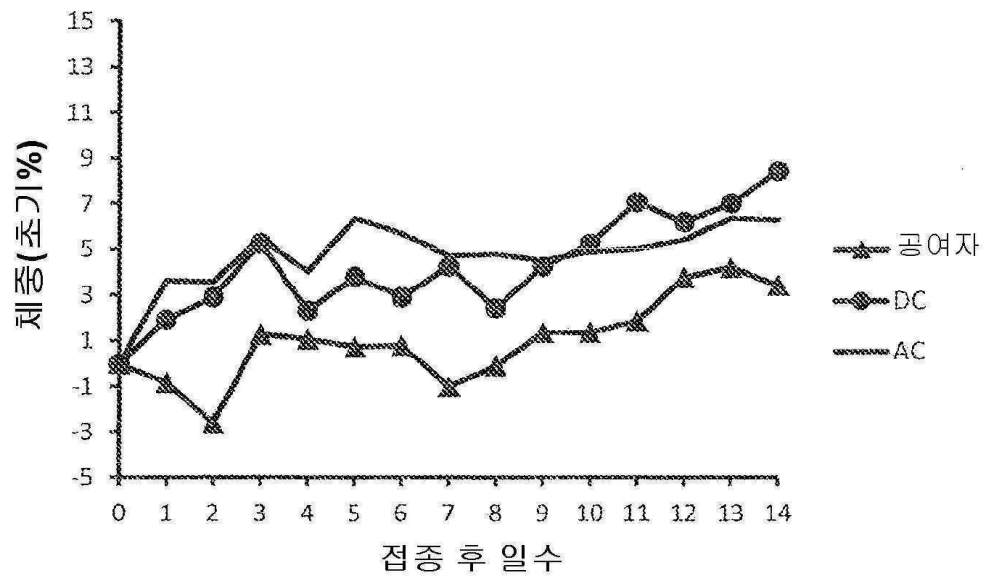
도면25



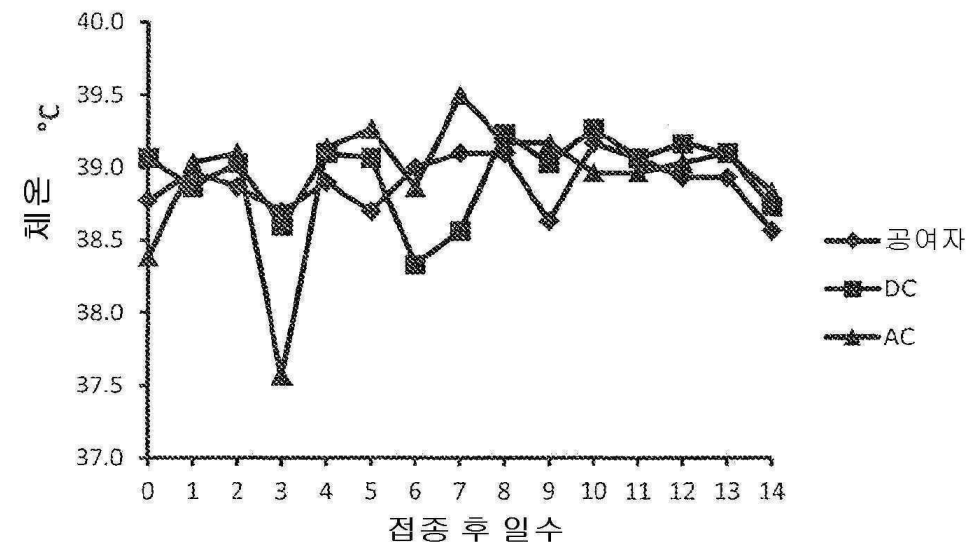
도면26a



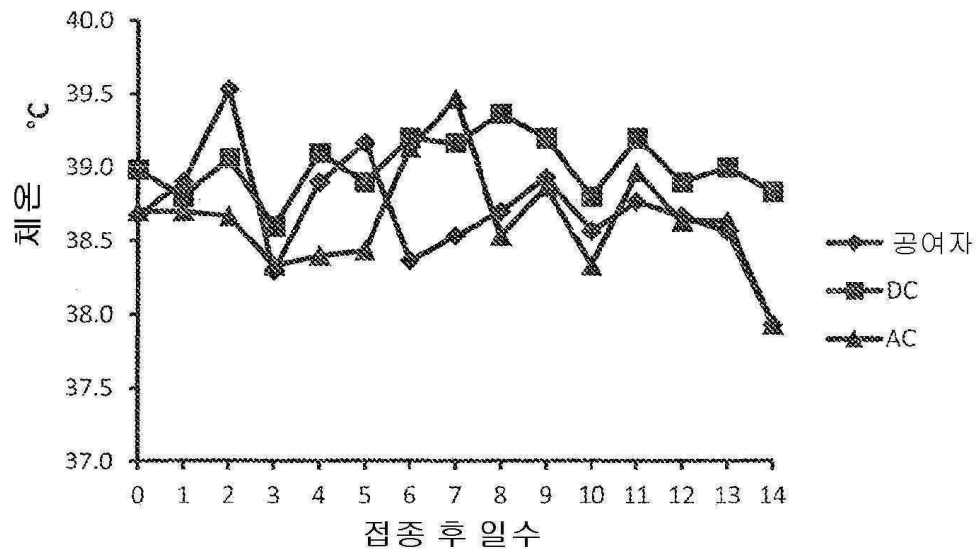
도면26b



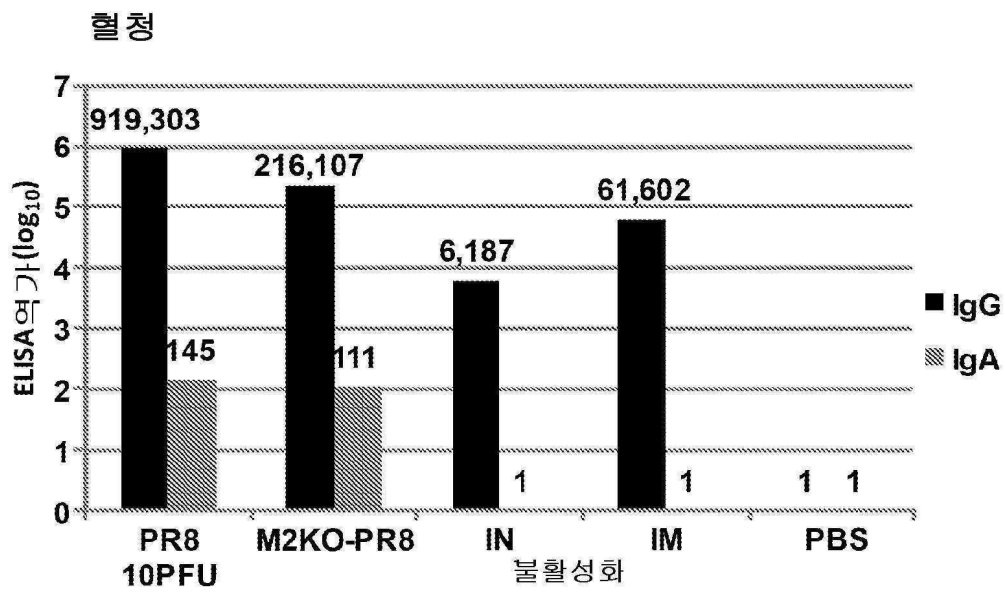
도면27a



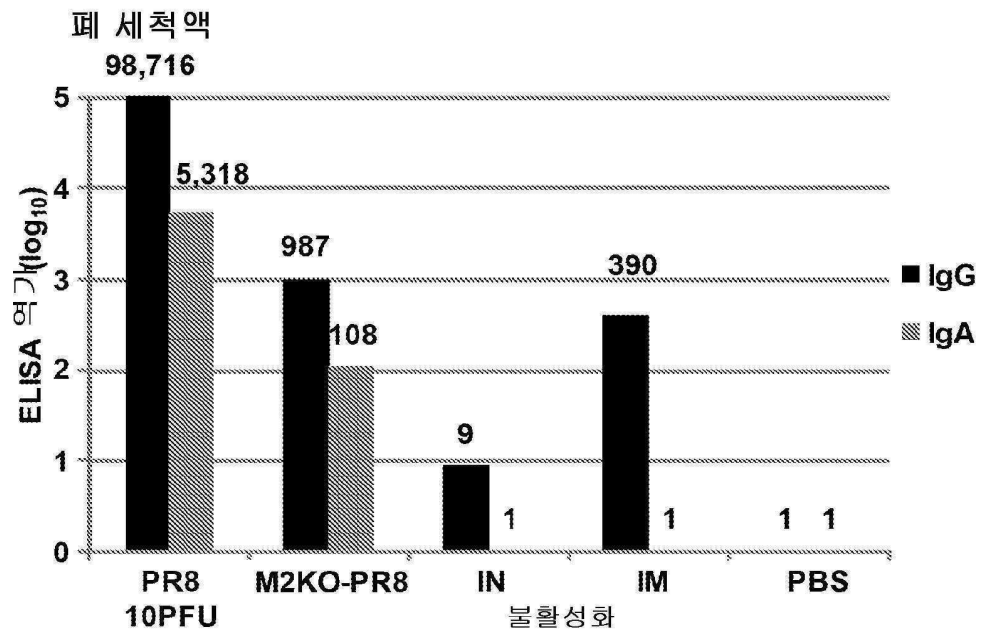
도면27b



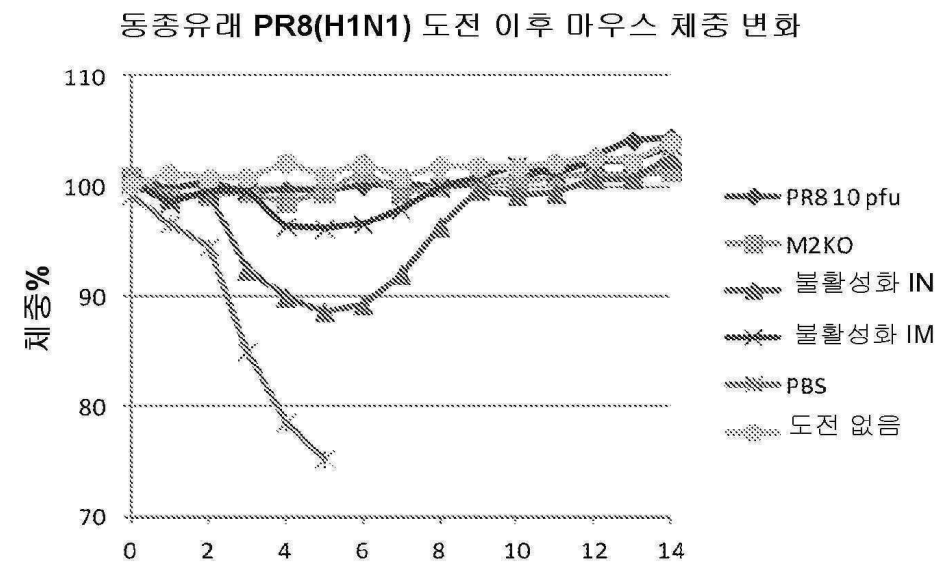
도면28a



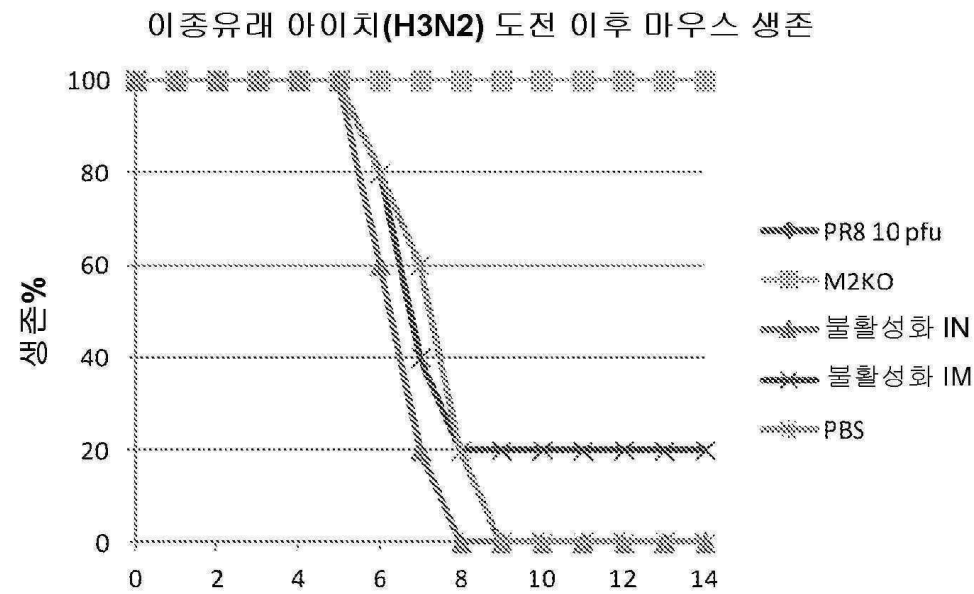
도면28b



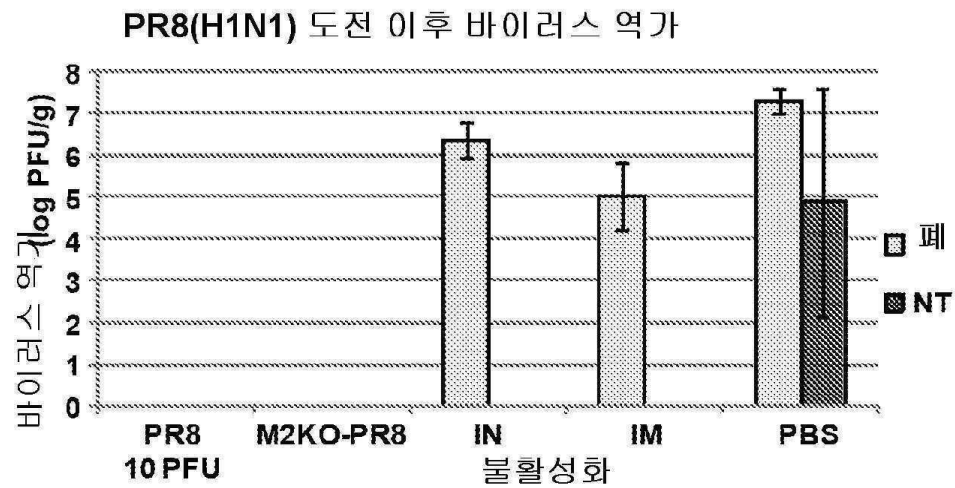
도면29a



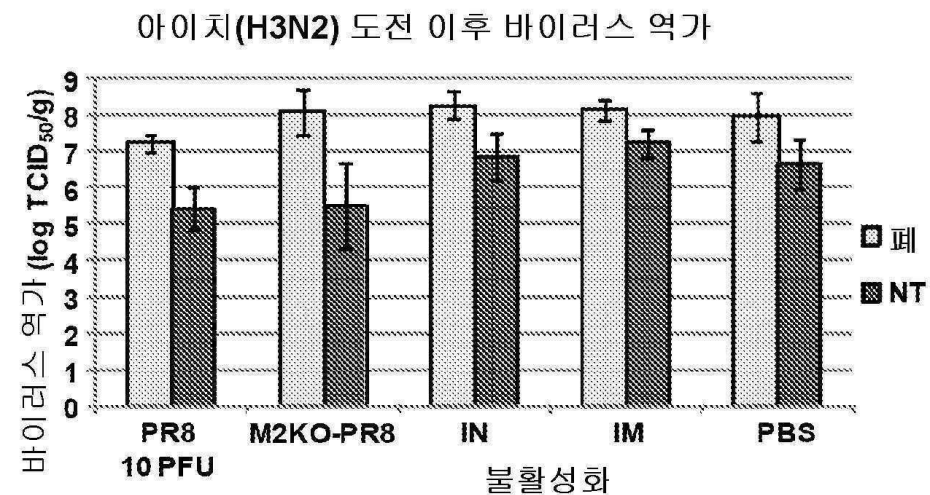
도면29b



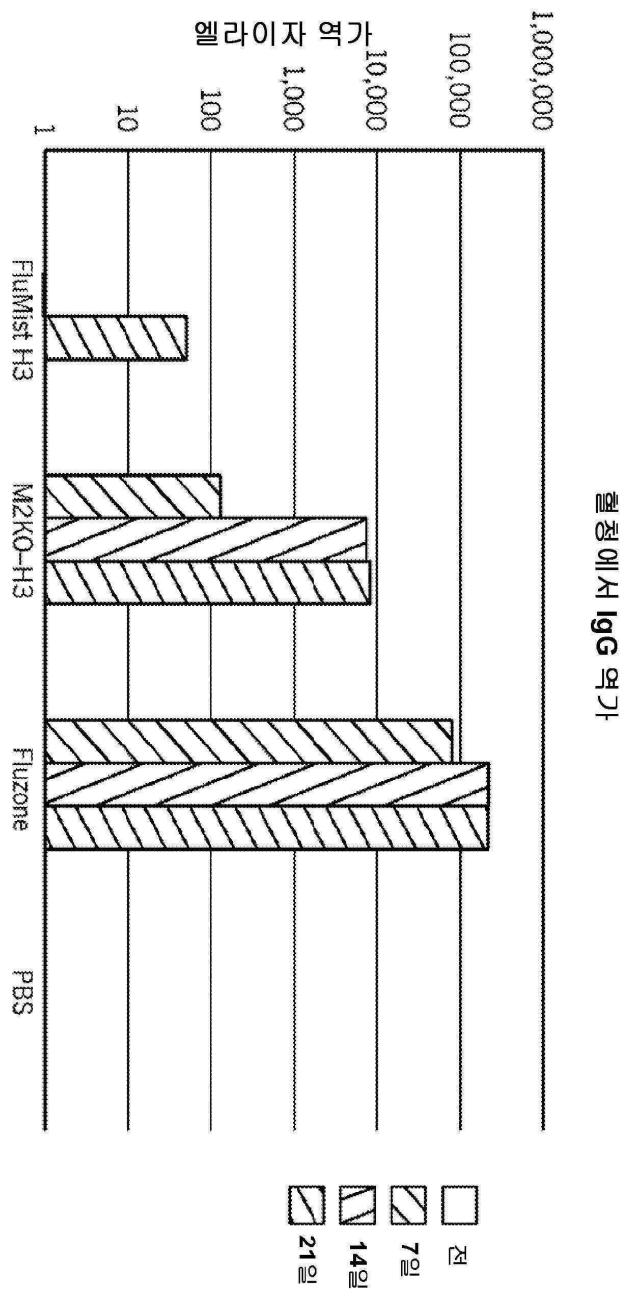
도면30a



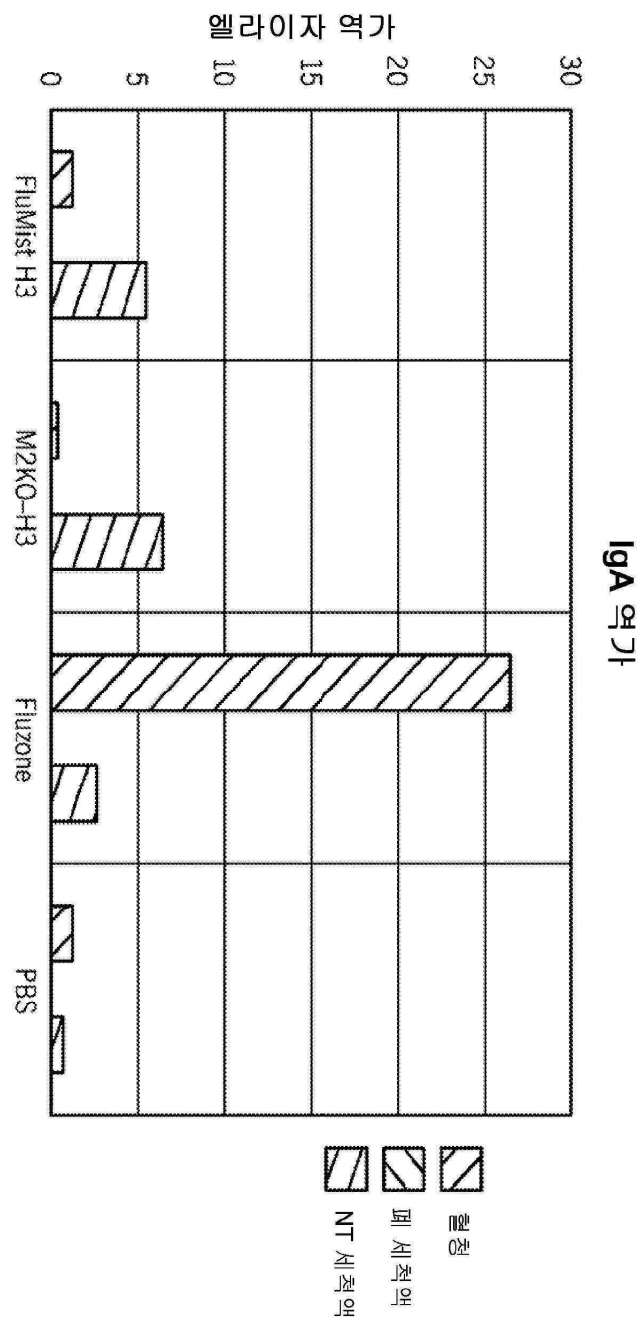
도면30b



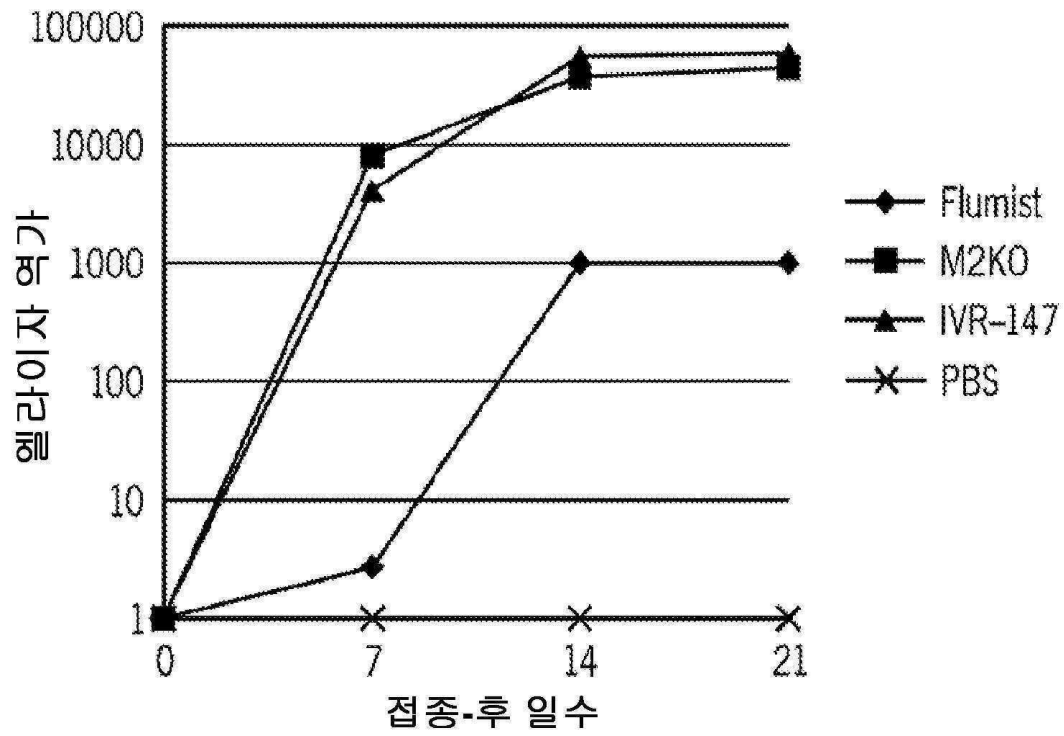
도면31



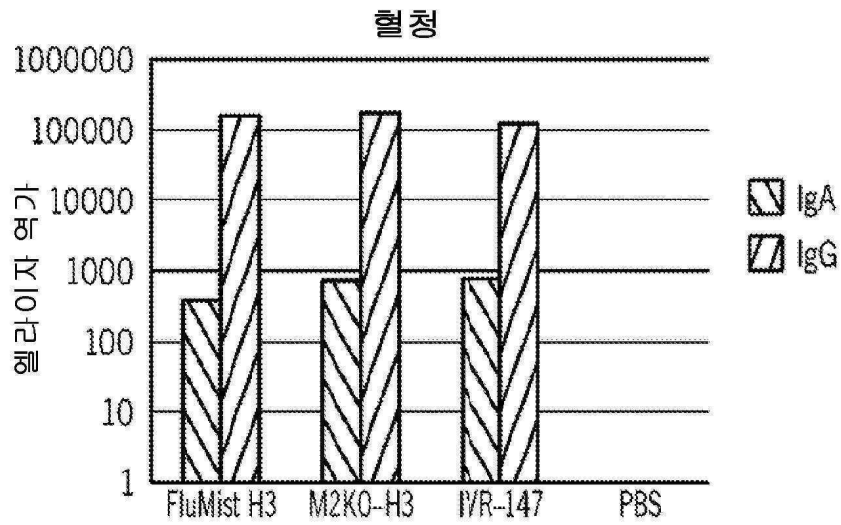
도면32



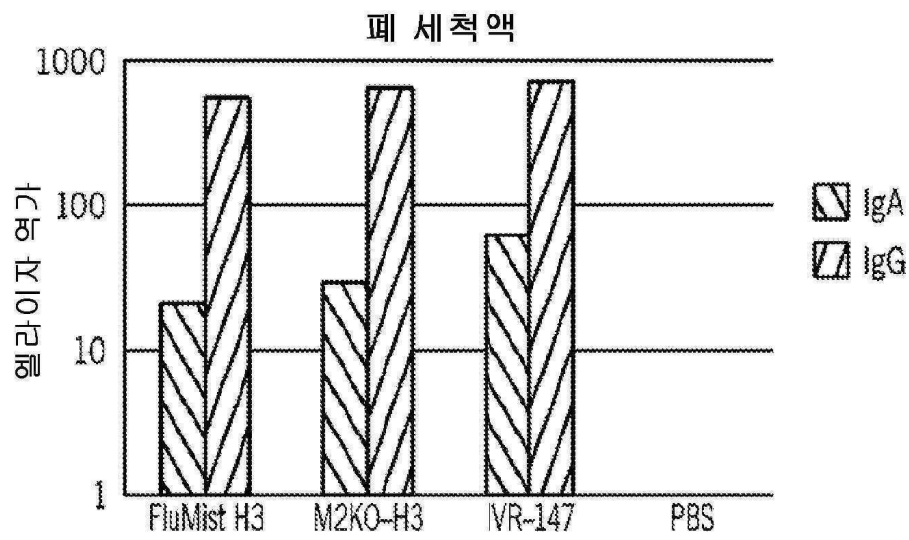
도면33



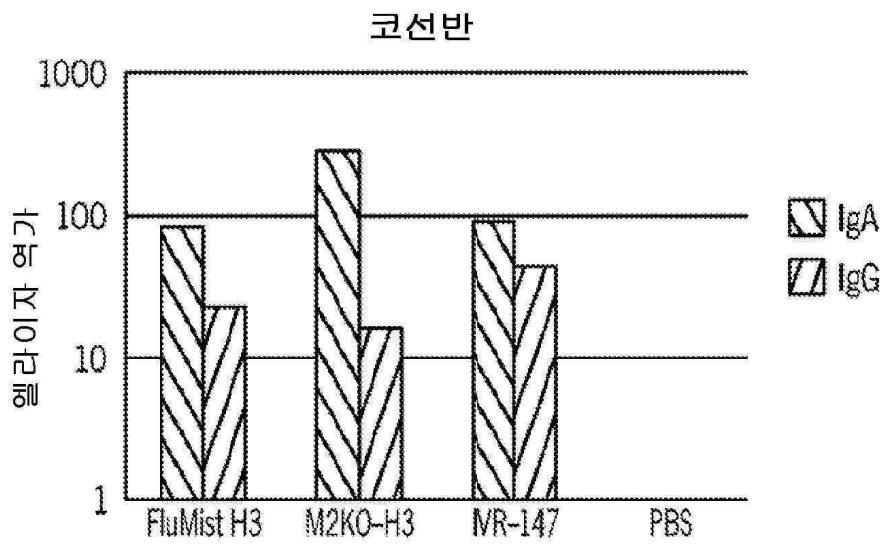
도면34a



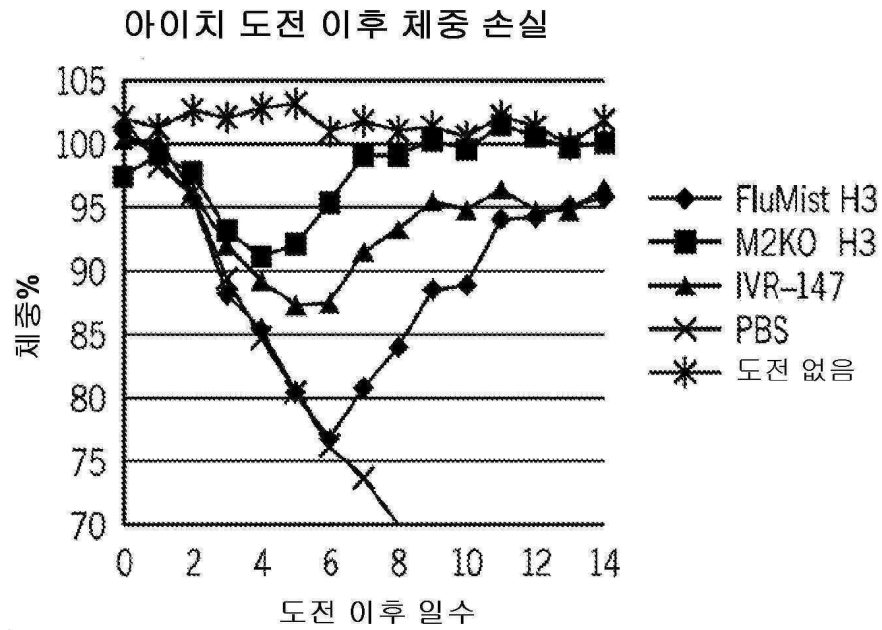
도면34b



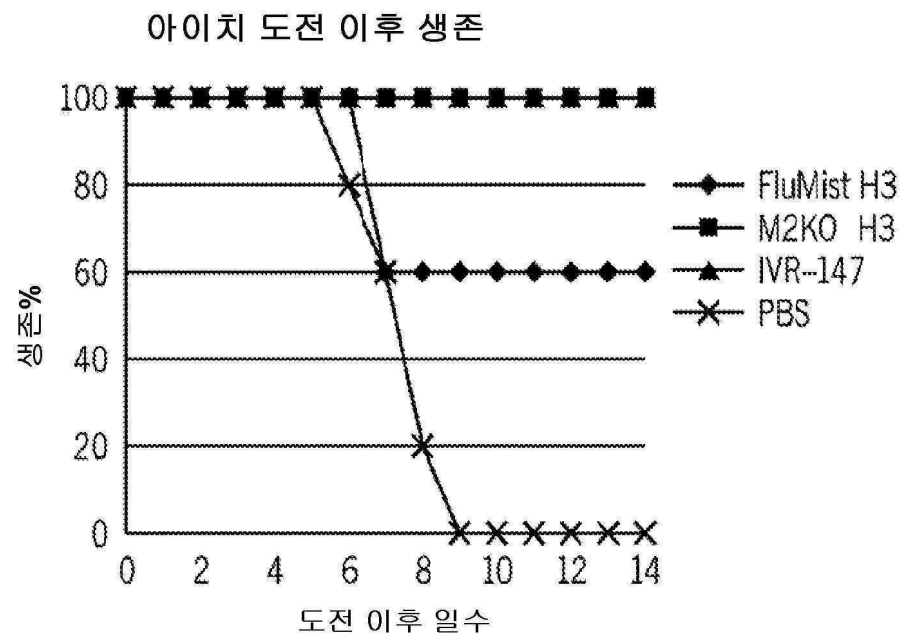
도면34c



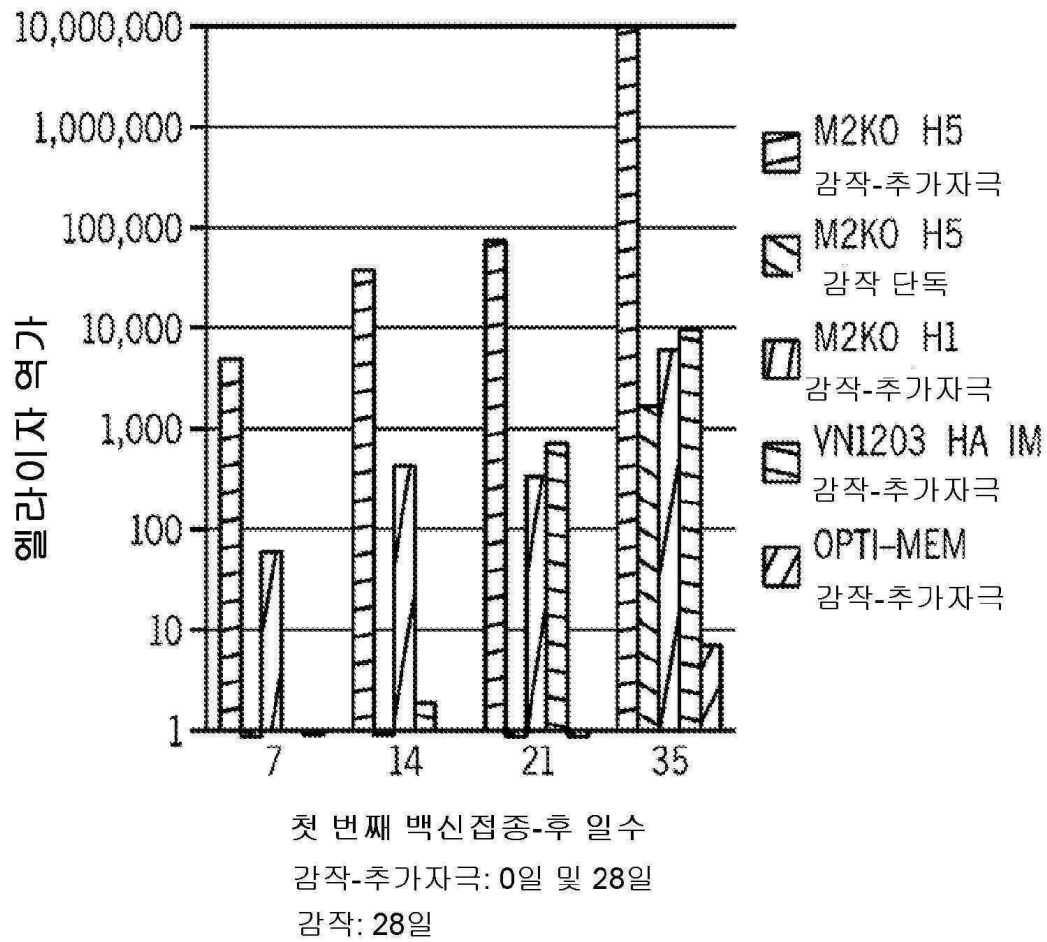
도면35a



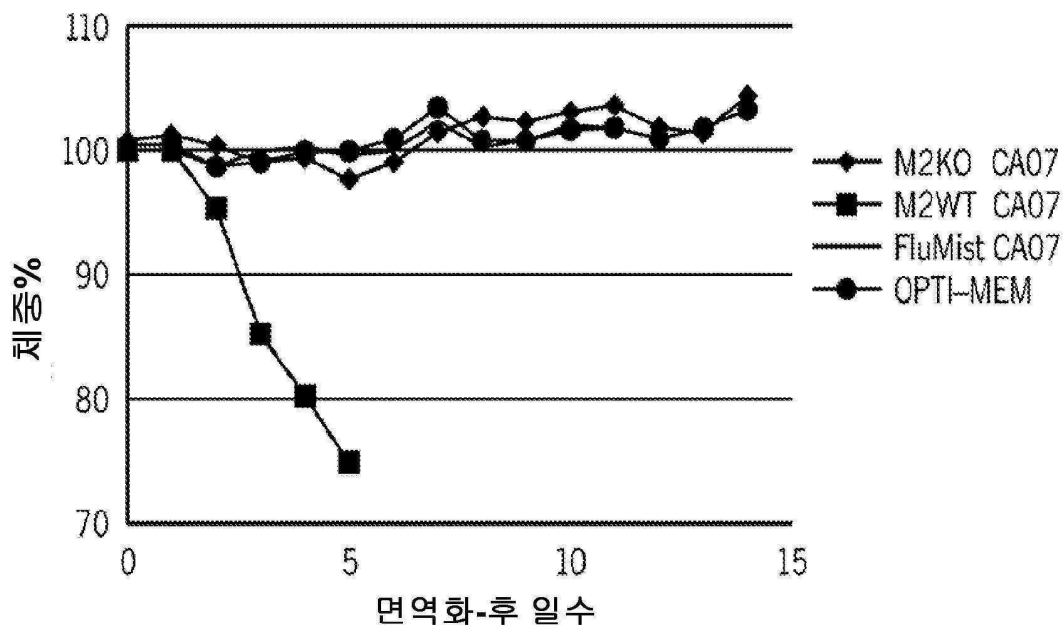
도면35b



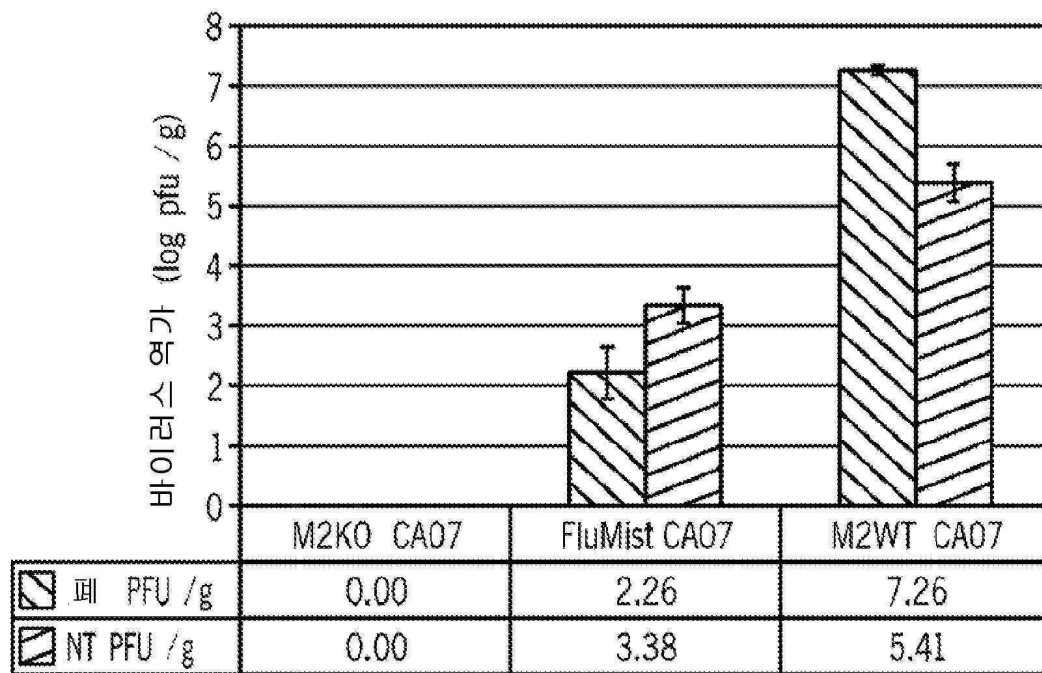
도면36



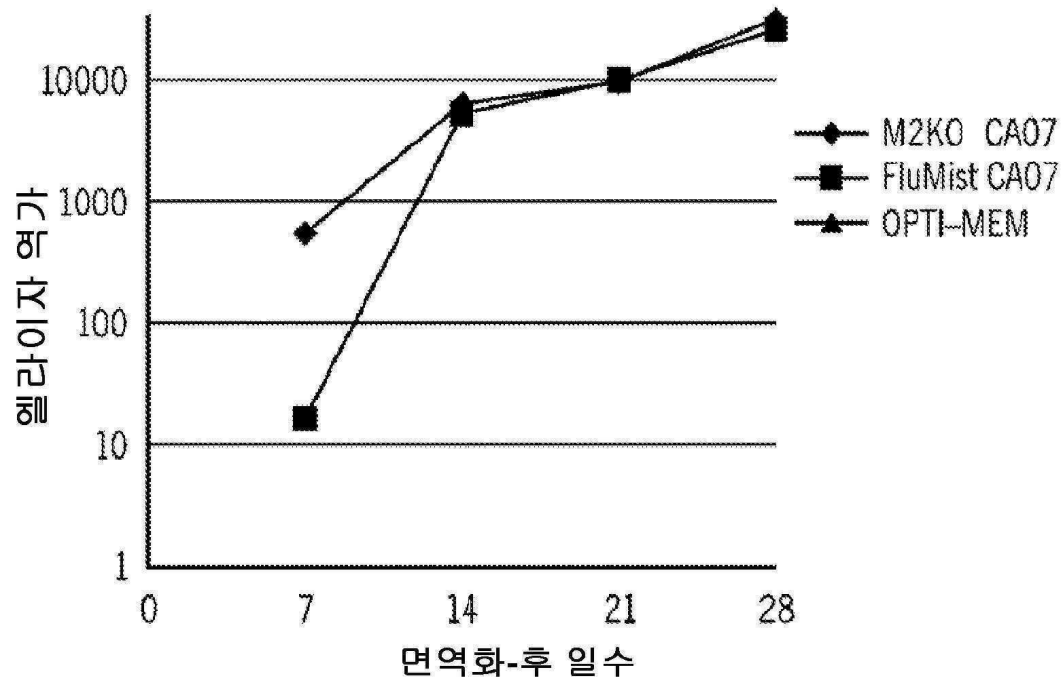
도면37



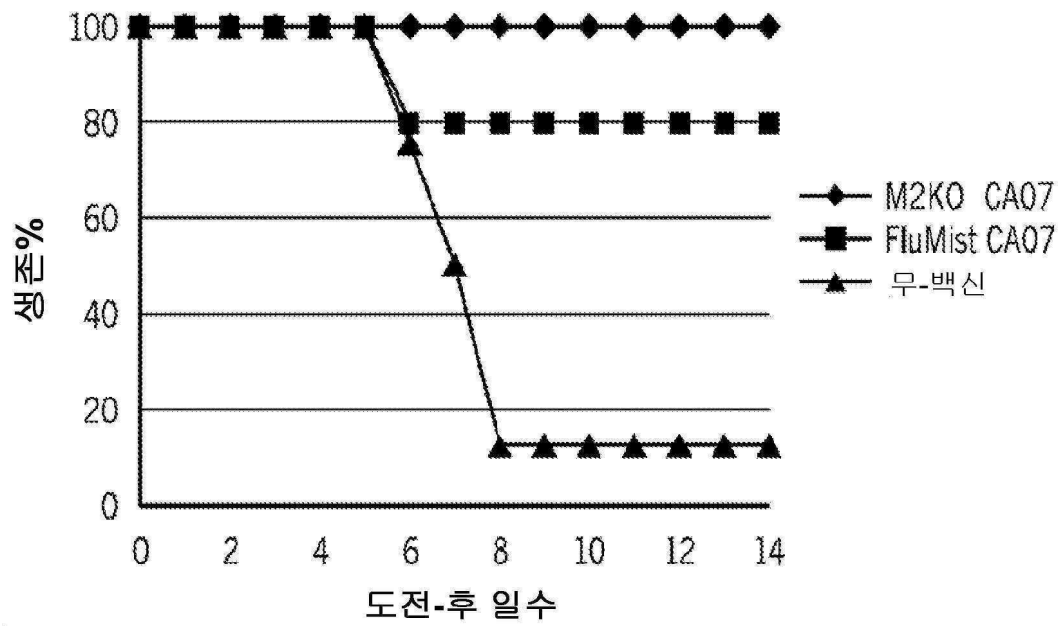
도면38



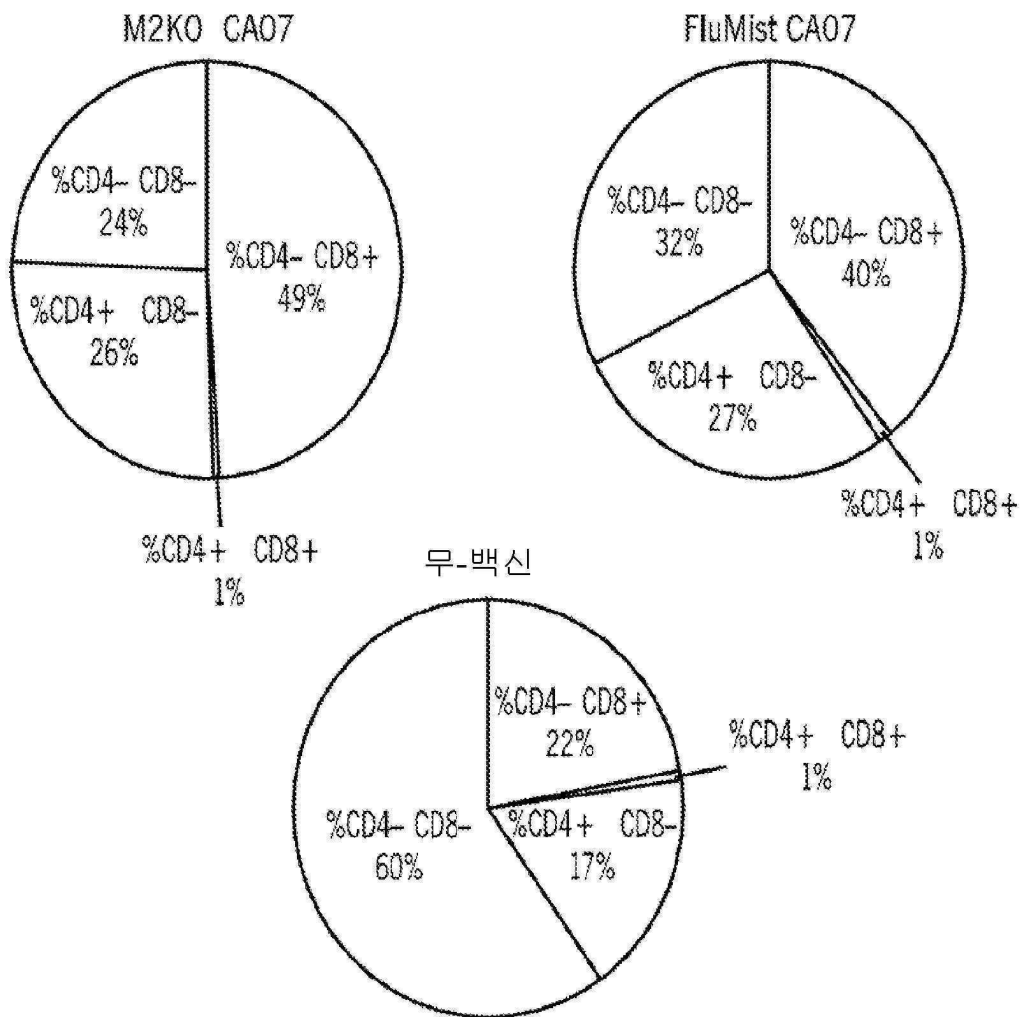
도면39



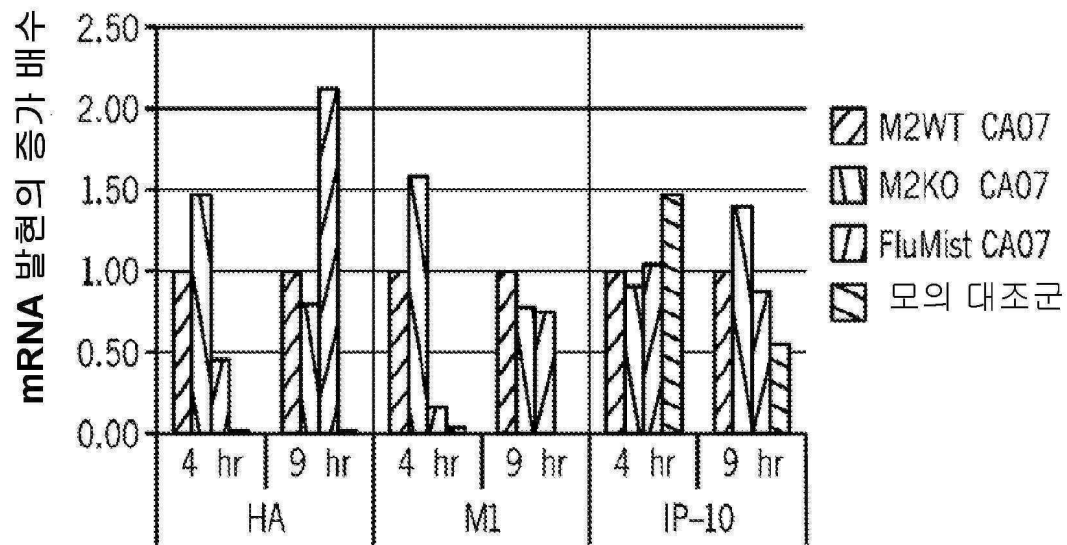
도면40



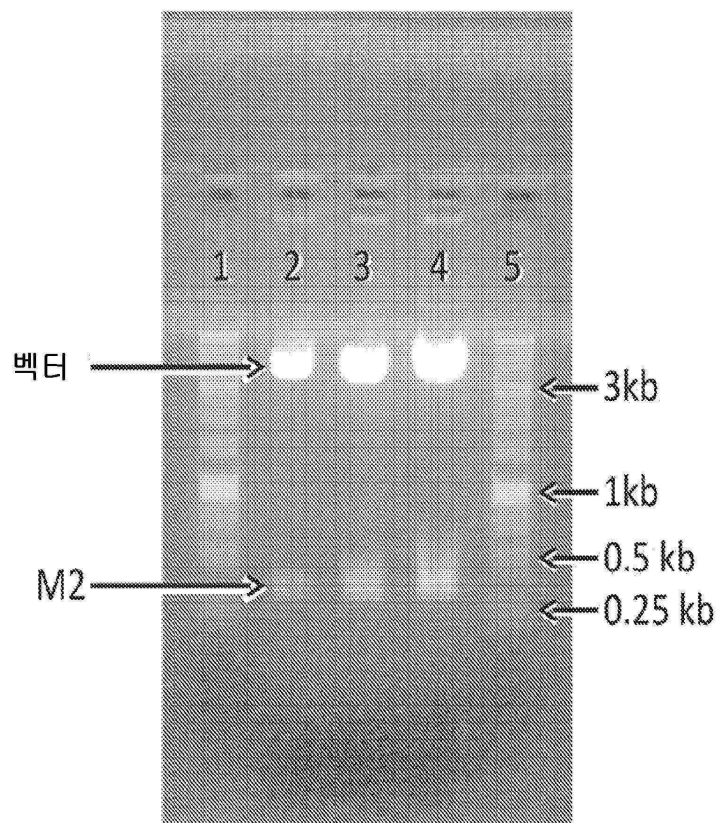
도면41



도면42



도면43



Monday, May 07, 2012 11:15 AM
Project: Untitled.snp Config 1

1쪽

	10	20	30	40	50	60	70	80
	ATGCATTAGTTATTAAATAGTATCAATTACGGGGTCAATAGTTCAATAGCCCATATATGAGTTCCGGTTACATTAAGTTACGGTAA							
CMV pro.seq1 > 594	→	ATGCATTAGTTATTAAATAGTATCAATTACGGGGTCAATAGTTCAATAGCCCATATATGAGTTCCGGTTACATTAAGTTACGGTAA						
	90	100	110	120	130	140	150	160
	170							
	ATGCCCGCGCTGGCTGACCGGCCAACGACCCCGCCCATTTGAGTCAATAATGAGGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGAGCT							
CMV pro.seq1 > 594	→	ATGCCCGCGCTGGCTGACCGGCCAACGACCCCGCCCATTTGAGTCAATAATGAGGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGAGCT						
	180	190	200	210	220	230	240	250
	TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAGCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC							
CMV pro.seq1 > 594	→	TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAGCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC						
	260	270	280	290	300	310	320	330
	340							
	TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCGCTGGCATTTAGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT							
CMV pro.seq1 > 594	→	TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCGCTGGCATTTAGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT						
pCMV-PR8-42MaeI/T/Promoter.ab126 > 756	→	TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCGCTGGCATTTAGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT						
	350	360	370	380	390	400	410	420
	430							
	ACGATATTAGTCATGCGTATTACCAATGGTGAATGGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTACGGGGGATTT							
CMV pro.seq1 > 594	→	ACGATATTAGTCATGCGTATTACCAATGGTGAATGGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTACGGGGGATTT						
pCMV-PR8-42MaeI/T/Promoter.ab126 > 756	→	ACGATATTAGTCATGCGTATTACCAATGGTGAATGGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTACGGGGGATTT						

도 44b로

도면43a

도 44a로부터

	440	450	460	470	480	490	500	510
	CCAGGCTCCACCCGATTGACGTCATGGGAGTTGGTTTGGACCAAAATCAACGGGACTTCCAAATGCTGTACACTCCG							
CMV pre.seq[1>594]	→	CCAGGCTCCACCCGATTGACGTCATGGGAGTTGGTTTGGACCAAAATCAACGGGACTTCCAAATGCTGTACACTCCG						
pcMV-PR8-4/2Maxi T/Promoter.abi[26>756]	→	CCAGGCTCCACCCGATTGACGTCATGGGAGTTGGTTTGGACCAAAATCAACGGGACTTCCAAATGCTGTACACTCCG						
	520	530	540	550	560	570	580	590
	CCGATTGACGCAAAATGGCGGTAAGCGGTGACGGTGGGAGGCTATATAGCAGAGCTGGTTTGGTGAACCGTCAGATCCGCTAGC							
CMV pre.seq[1>594]	→	CCGATTGACGCAAAATGGCGGTAAGCGGTGACGGTGGGAGGCTATATAGCAGAGCTGGTTTGGTGAACCGTCAGATCCGCTAGC						
pcMV-PR8-4/2Maxi T/Promoter.abi[26>756]	→	CCGATTGACGCAAAATGGCGGTAAGCGGTGACGGTGGGAGGCTATATAGCAGAGCTGGTTTGGTGAACCGTCAGATCCGCTAGC						
	600	610	620	630	640	650	660	670
	GATTACGCCAAGCTCGAAATTACCCCTCACTTAAGGGACAAAGCTGGAGCTCCACTGTGGAAATTCGCCCTGGCCGCCATGAGT							
pcMV-PR8-4/2Maxi T/Promoter.abi[26>756]	→	GATTACGCCAAGCTCGAAATTACCCCTCACTTAAGGGACAAAGCTGGAGCTCCACTGTGGAAATTCGCCCTGGCCGCCATGAGT						
pcMV-PR8-4/2Maxi T3Promoter.abi[10>821]	→	GATTACGCCAAGCTCGAAATTACCCCTCACTTAAGGGACAAAGCTGGAGCTCCACTGTGGAAATTCGCCCTGGCCGCCATGAGT						
PR8 M2 ORF seq[1>294]	→	GATTACGCCAAGCTCGAAATTACCCCTCACTTAAGGGACAAAGCTGGAGCTCCACTGTGGAAATTCGCCCTGGCCGCCATGAGT						
	680	690	700	710	720	730	740	750
	CTTCTAACCGAGGTCGAACGGCTATCAGAAACGAAATGGGGGTGCAGATGCACGGTCAAGTGAATCTCTCACTATTGGCGCAA							
pcMV-PR8-4/2Maxi T/Promoter.abi[26>756]	→	CTTCTAACCGAGGTCGAACGGCTATCAGAAACGAAATGGGGGTGCAGATGCACGGTCAAGTGAATCTCTCACTATTGGCGCAA						
pcMV-PR8-4/2Maxi T3Promoter.abi[10>821]	→	CTTCTAACCGAGGTCGAACGGCTATCAGAAACGAAATGGGGGTGCAGATGCACGGTCAAGTGAATCTCTCACTATTGGCGCAA						
PR8 M2 ORF seq[1>294]	→	CTTCTAACCGAGGTCGAACGGCTATCAGAAACGAAATGGGGGTGCAGATGCACGGTCAAGTGAATCTCTCACTATTGGCGCAA						
	760	770	780	790	800	810	820	830
	CTTCTAACCGAGGTCGAACGGCTATCAGAAACGAAATGGGGGTGCAGATGCACGGTCAAGTGAATCTCTCACTATTGGCGCAA							

도 44c로

도면44b

Project: United.sgs Conting 1

227

도 44b로부터

pCMV-P88-M2Max TP promoter: abh126-756g) → TATCATTTGGGATCTTGACACTTGACACTTGGGATCTTGATGCGCTTTTTCGAAATGCATTTACCGTGGCTTAAATACGGACTGA
 pCMV-P88-M2Max TP promoter: abh110>821) → TATCATTTGGGATCTTGACACTTGACACTTGGGATCTTGATGCGCTTTTTCGAAATGCATTTACCGTGGCTTAAATACGGACTGA
 pCMV-P88-M2Max TP promoter: abh110>821) → TATCATTTGGGATCTTGACACTTGACACTTGGGATCTTGATGCGCTTTTTCGAAATGCATTTACCGTGGCTTAAATACGGACTGA
 pCMV-M2-ORF: seq1>294) → TATCATTTGGGATCTTGACACTTGACACTTGGGATCTTGATGCGCTTTTTCGAAATGCATTTACCGTGGCTTAAATACGGACTGA

P8M-PB8-M2Mkai TTPromoter.afk(29>756)	→	AAGGAGGGCCCTTCTACGGAAAGAGGTGCCAAGCTTCACGGGAAGATATCGAAAGGAAACGGCAGAGTGCTGTAATGCTGCAGTT	870	880	890	900	910	920	930	940
PCKH-PB8-M2Mkai TTPromoter.afk(10>821)	→	AAGGAGGGCCCTTCTACGGAAAGAGGTGCCAAGCTTCACGGGAAGATATCGAAAGGAAACGGCAGAGTGCTGTAATGCTGCAGTT								
P8M M2 ORF seq(1>294)	→	aagsggggccccttctacgggaagggtgccaaagcttcacgggaagatatcgaaaaggaaacgcagagtgctgtgatgtgcatacgcatt								

	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030
PCMV-P8-M2Med1TTPromoter.sh125>756)	→	GGTCAATTTTGTACGATAGAGCTGGAGTGATATAGGCCAAGGGCGAATTCACCAATTTGGCTCGAAGGGGGGCCCGGTAACCTTAATTTAA							
PCMV-P8-M2Med1TTPromoter.sh110>821)	→	GGTCAATTTTGTACGATAGAGCTGGAGTGATATAGGCCAAGGGCGAATTCACCAATTTGGCTCGAAGGGGGGCCCGGTAACCTTAATTTAA							
P8-M2 ORF seq(1>294)	→	gggtcaattttgtcagcatatgagctggaggtaa							

GCW-P8-M2Mol T3promoter.aal(0>822) →

1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
TTAAGTACCAAGTAAAGTGTACCAATTGGCCCTATAGAGAGTGGTATTCAATTGCTGGATCGGCTGGATCAAGCTCGACT						
TTAAGTACCAAGTAAAGTGTACCAATTGGCCCTATAGAGAGTGGTATTCAATTGCTGGATCGGCTGGATCAAGCTCGACT						

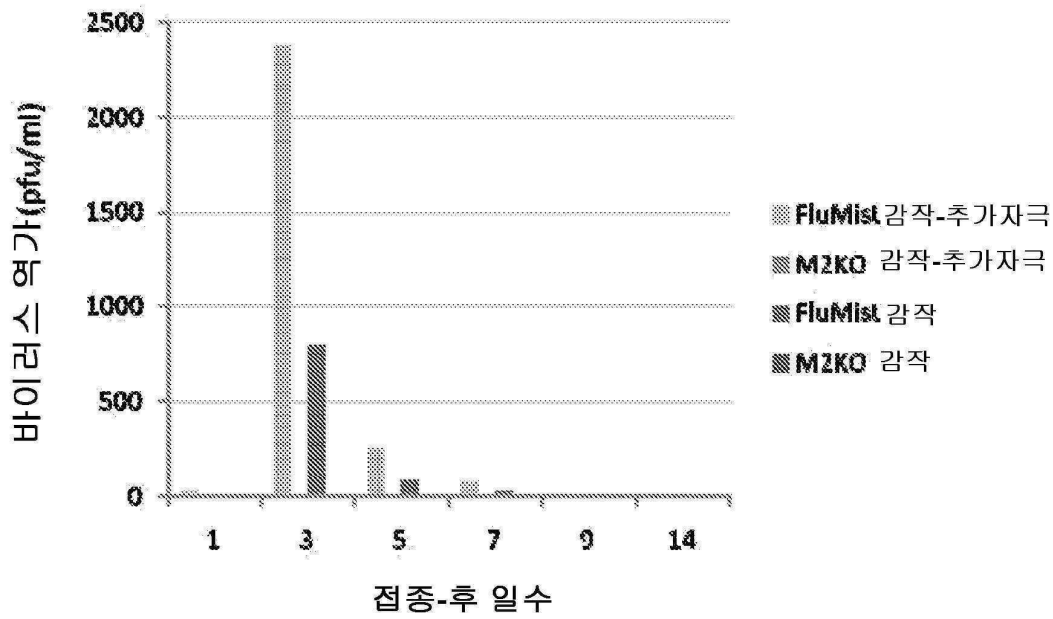
도면44c

5 44D 5

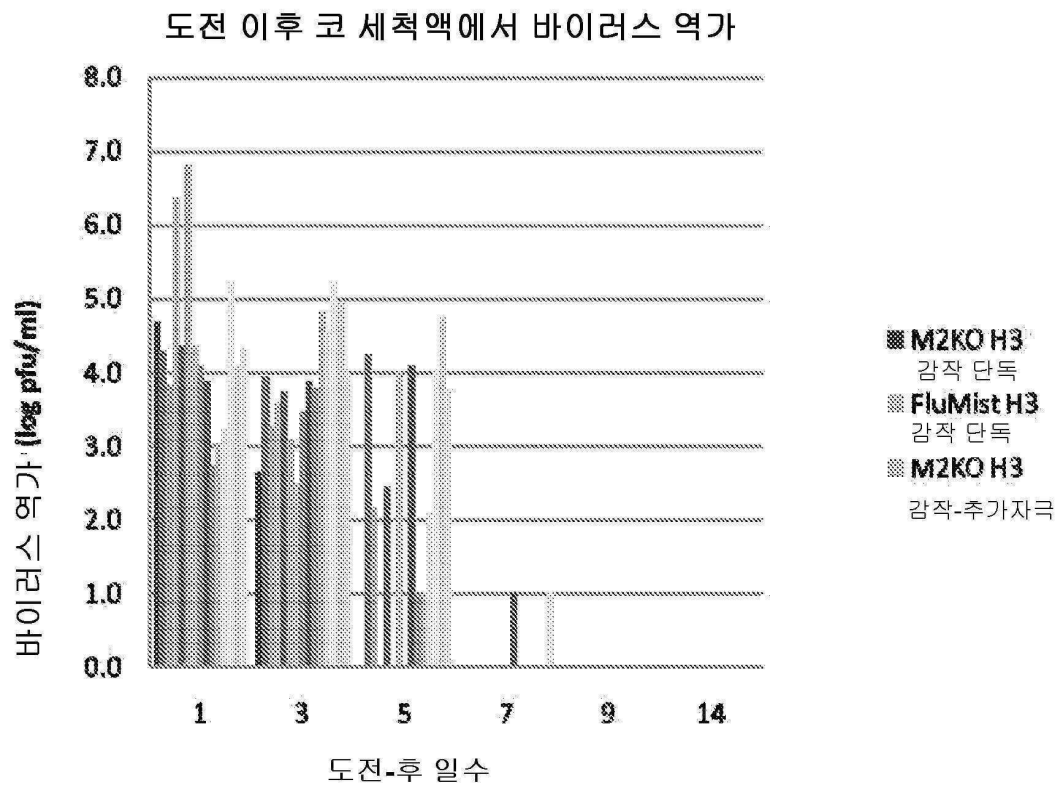
도 44C로부터

	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
PdMv-Pf8_M2Mex1_3Ppromoter.abl(10>821) →	GAGCCTTCTAGTTGCCACCCA	TCTGTTGTTCGCCCTCCCGTGCCCTCTCTGCACCCTGGAAAGTGGCACTCCCACTCCCTTC							
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290
	GAGCCTTCTAGTTGCCACCCA	TCTGTTGTTCGCCCTCCCGTGCCCTCTCTGCACCCTGGAAAGTGGCACTCCCACTCCCTTC							
PdMv-Pf8_M2Mex1_3Ppromoter.abl(10>821) →	CIAATAAAAATGAGAAATTGCATGGCATTCCTGAGTAGGCGCCATTCATCTCGGGGGGTGGGTGGGGCAGGACGAAGAAGGGGG								
	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	
	AGCATTGGGAGACAATAGCAGGCTGCTGGGGAACGGATAATTGTAACGCTTAATATTTTGTAAAATTCCGCTTAATTTTTG								
PdMv-Pf8_M2Mex1_3Ppromoter.abl(10>821) →	AGGATTGGGAGACAATAGCAGGCTGCTGGGGAACGGATAATTGTAACGCTTAATATTTTGTAAAATTCCGCTTAATTTTTG								
	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460
	TTAATCAGCTCATTTTTAACCAAATAGCGGGAATGGCAAAATCCCTATAATCAAAAGAAATGACCGAGATAGGGTTAGAGTG								
PdMv-Pf8_M2Mex1_3Ppromoter.abl(10>821) →	TTAATCAGCTCATTTTTAACCAAATAGCGGGAATGGCAAAATCCCTATAATCAAAAGAAATGACCGAGATAGGGTTAGAGTG								
	1470								
	TTGTTCCA								
	TTGTTCCA								
PdMv-Pf8_M2Mex1_3Ppromoter.abl(10>821) →	TTGTTCCA								

도면45

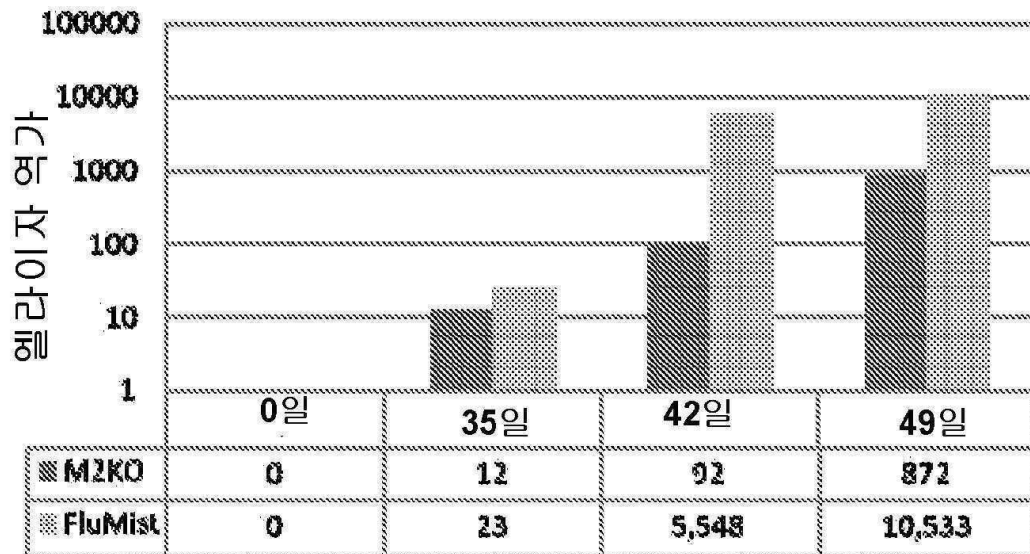


도면46



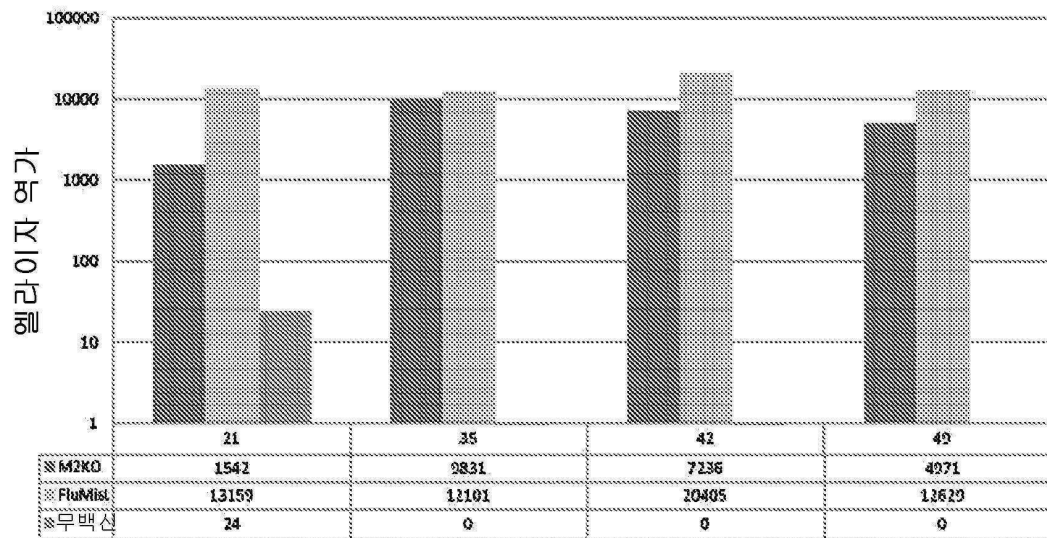
도면47

감작 단독 그룹



도면48

추가자극-전 및 -후 IgG 역가

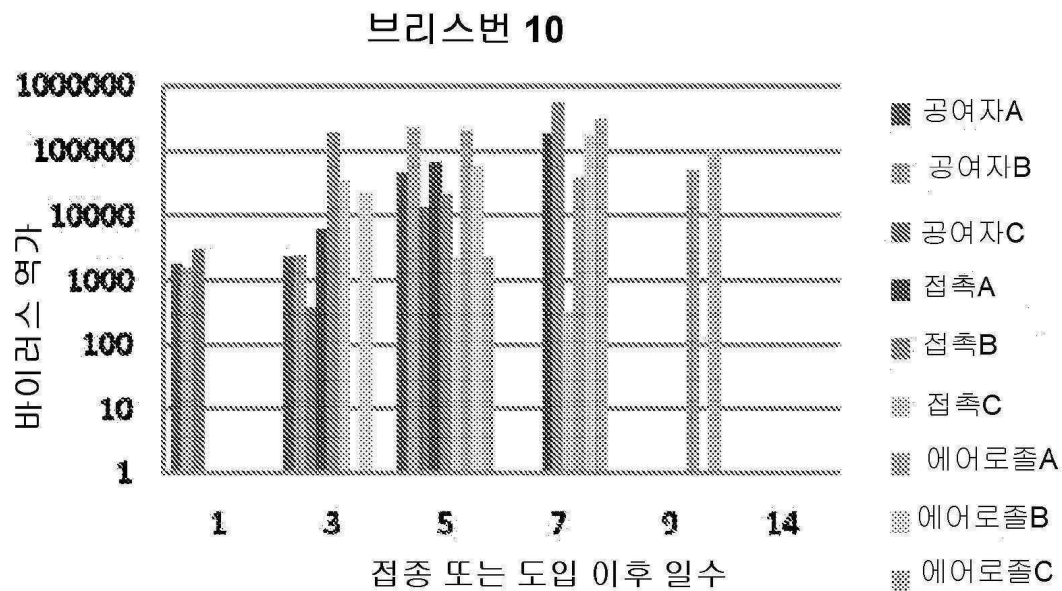


도면49

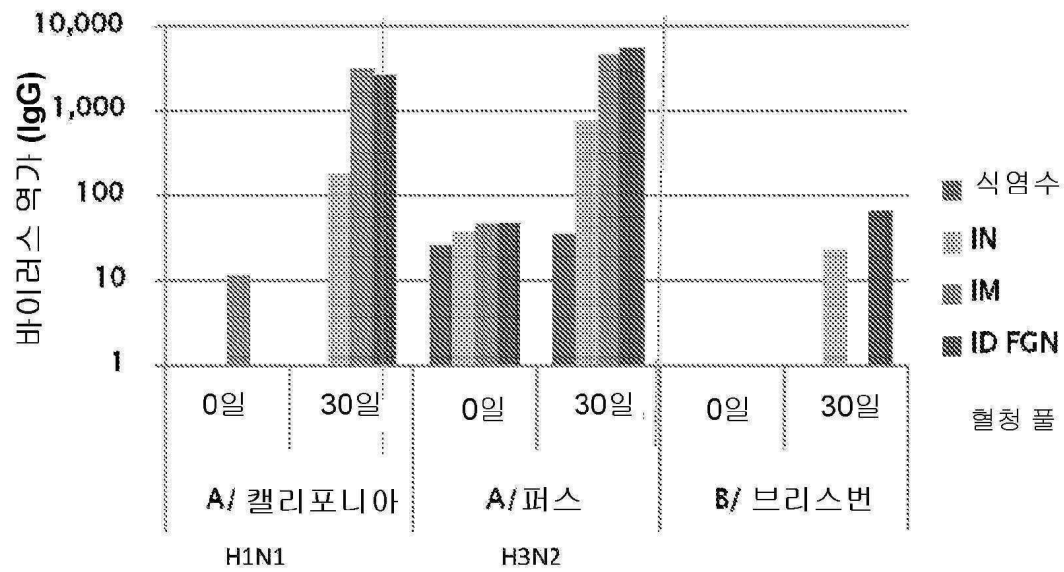
감작-추가자극	추가자극						도전 이후
	7	14	21	35	42	49	
M2KO	34	500	1,542	9,831	7,236	4,971	51,362
FluMist	55	8,989	13,159	12,101	20,405	12,629	64,725
무-백신	13	41	24	0	0	-	-

감작 단독	14				21	
	d.35				d.42 av	
M2KO	12				92	
FluMist	23				5,548	
무-백신					10,533	

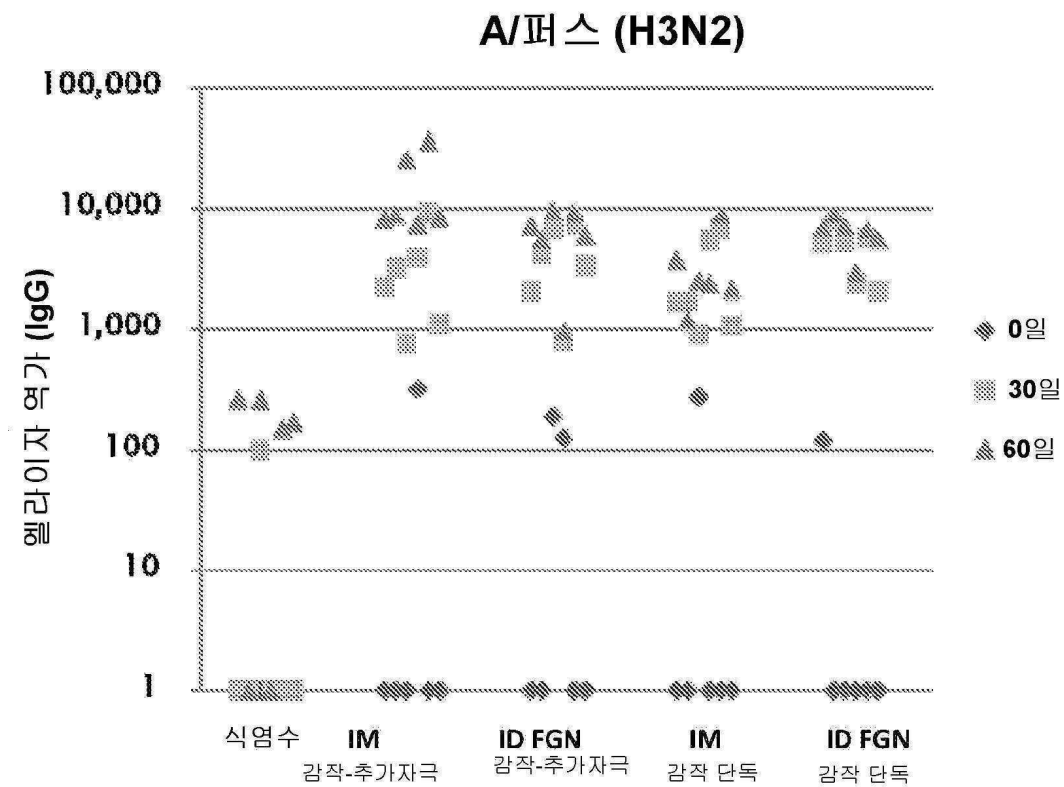
도면50



도면51



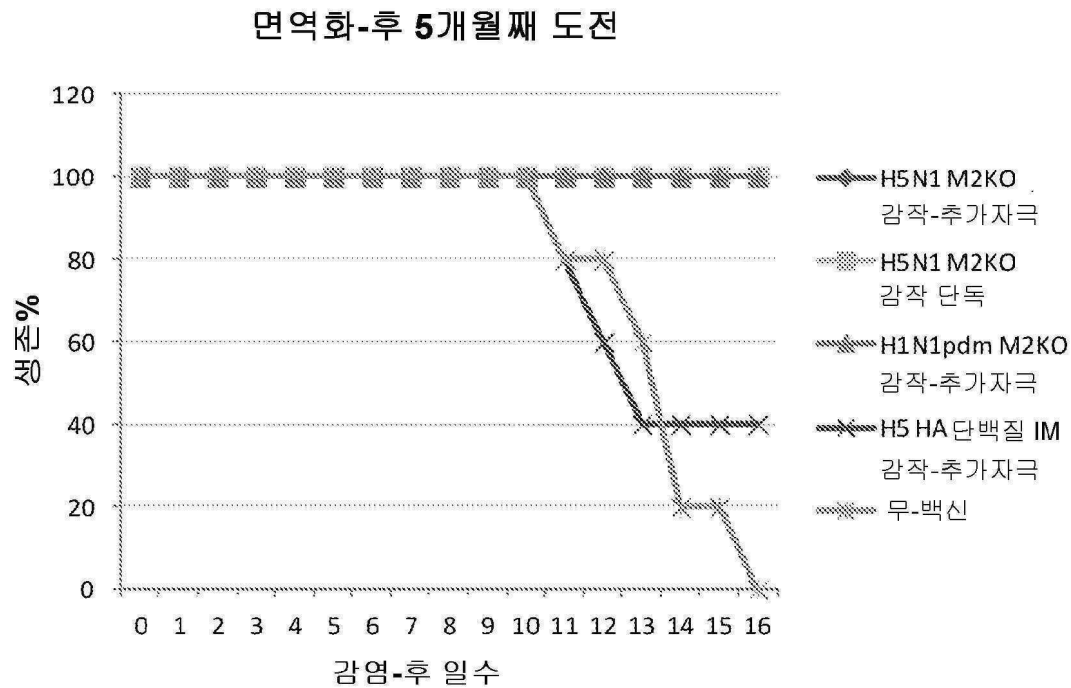
도면52



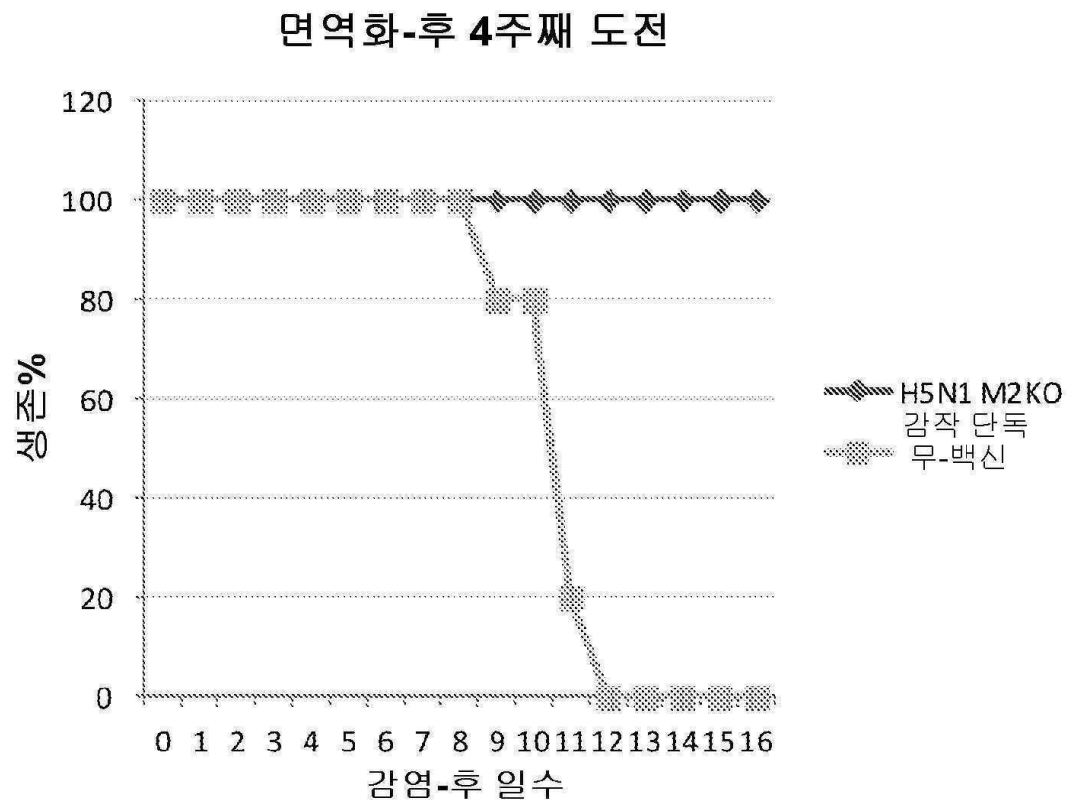
도면53

	기니아 피그	0일	30일	60일	
식염수	1	1	1	263	Av. 211 ± 59
	2	1	1	1	
	3	1	100	259	
	4	1	1	1	
	5	1	1	150	
	6	1	1	170	
IM (감작 추가자극)	13	1	2,238	8,272	Av. 15,877 ± 12,333
	14	1	3,217	8,794	
	15	1	770	25,799	
	16	318	3,952	7,408	
	17	1	9,276	36,543	
	18	1	1,109	8,446	
ID FGN (감작 추가자극)	19	1	2,072	7,220	Av. 6,391 ± 3,109
	20	1	4,254	5,545	
	21	188	6,765	9,589	
	22	124	792	941	
	23	1	7,402	9,015	
	24	1	3,397	6,034	
IM (감작 단독)	31	1	1,696	3,778	Av. 3,463 ± 2,704
	32	1	1,720	1,181	
	33	273	897	2,533	
	34	1	5,530	2,425	
	35	1	6,929	8,714	
	36	1	1,070	2,147	
ID FGN (감작 단독)	37	119	5,217	6,875	Av. 6,312 ± 1,966
	38	1	7,785	8,812	
	39	1	5,404	7,041	
	40	1	2,426	2,894	
	41	1	5,707	6,616	
	42	1	2,063	5,634	

도면54



도면55



서열 목록

<110> FLUGEN, INC.

<120> INFLUENZA VIRUS MUTANTS AND USES THEREFOR

<130> 090248-0125
 <140> PCT/US2012/043606
 <141> 2012-06-21
 <150> 61/501,034
 <151> 2011-06-24
 <160> 33
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 976
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus
 <400> 1

```

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact      60
ctctatcctc ccgtcaggcc ccttcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt      120
tgcagggaag aacaccgata ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct      180

gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgcgagc      240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa      300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc      360
caaagaaatc tactcagtt attctgctgg tgcacttgc agttgtatgg gcctcatata      420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatattggc ctggtatgtg caacctgtga      480
acagattgct gactccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact      540
aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat      600

ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaaat      660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga      720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacgggttcaa      780
gtgattaata ggatcgtctt tttttcaaat gcatttaccg tcgctttaaa tacggactga      840
aaggagggcc ttctacggaa ggagtgccaa agtctatgag ggaagaatat cgaaaggaac      900
agcagagtgc tgtggatgct gacgatggtc attttgcag catagagctg gagtaaaaaa      960
ctaccttggt tctact
    
```

<210> 2
 <211> 1027
 <212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 2

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cctacgtact	60
ctctatcadc ccgtcaggcc cccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt	120
tgcagggaag aacaccgacg ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct	180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg	240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa	300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc	360
caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata	420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatattggc ctggtatgtg caacctgtga	480
acagattgct gactcccagc atcggctctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact	540
aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat	600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagtcagg ctagacaaat	660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgcctggc tgaaaaatga	720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa	780
gtgattaata gactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc	840
ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtgcgtttta atacggactg aaaggagggc	900
cttctacgga aggagtgcga aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg	960
ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt	1020
ttctact	1027

<210> 3

<211> 976

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 3

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cctacgtact	60
ctctatcadc ccgtcaggcc cccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt	120
tgcagggaag aacaccgacg ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct	180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg	240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa	300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc	360
caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata	420

caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatattggc ctggtatgtg caacctgtga 480

acagattgct gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact 540

aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat 600

ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagtcagg ctagacaaat 660

ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga 720

tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa 780

gtgattaata ggatcgtctt ttttcaaat gcatttaccg tcgctttaaa tacggactga 840

aaggagggcc ttctacggaa ggagtgccaa agtctatgag ggaagaatat cgaaagggaac 900

agcagagtgc tgggatgct gacgatggtc attttgcag catagagctg gagtaaaaaa 960

ctaccttggt tctact 976

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 4

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp

20

<210> 5

<211> 97

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400>

> 5

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp Pro Leu Thr Ile Ala Ala Asn Ile

20 25 30

Ile Gly Ile Leu His Leu Thr Leu Trp Ile Leu Asp Arg Leu Phe Phe

35 40 45

Lys Cys Ile Tyr Arg Arg Phe Lys Tyr Gly Leu Lys Gly Gly Pro Ser

50 55 60

Thr Glu Gly Val Pro Lys Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Lys Glu Gln

65 70 75 80
Gln Ser Ala Val Asp Ala Asp Asp Gly His Phe Val Ser Ile Glu Leu
85 90 95
Glu

<210> 6
<211> 86
<212> PRT
<213> Influenza A virus
<400> 6

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15
Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp Pro Leu Thr Ile Ala Ala Asn Ile
20 25 30

Ile Gly Ile Leu His Leu Thr Leu Trp Ile Leu Phe Lys Tyr Gly Leu
35 40 45
Lys Gly Gly Pro Ser Thr Glu Gly Val Pro Lys Ser Met Arg Glu Glu
50 55 60
Tyr Arg Lys Glu Gln Gln Ser Ala Val Asp Ala Asp Asp Gly His Phe
65 70 75 80
Val Ser Ile Glu Leu Glu
85

<210> 7
<211> 92
<212> PRT
<213> Influenza A virus
<400> 7

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15
Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp Pro Leu Thr Ile Ala Ala Asn Ile
20 25 30

Ile Gly Ile Leu His Leu Thr Leu Trp Ile Leu Lys Cys Ile Tyr Arg
 35 40 45
 Arg Phe Lys Tyr Gly Leu Lys Gly Gly Pro Ser Thr Glu Gly Val Pro
 50 55 60
 Lys Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Lys Glu Gln Gln Ser Ala Val Asp
 65 70 75 80

Ala Asp Asp Gly His Phe Val Ser Ile Glu Leu Glu
 85 90

<210> 8
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus
 <400> 8

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
 1 5 10 15
 Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp Pro Leu Thr Ile Ala Ala Asn Ile
 20 25 30
 Ile Gly Ile Leu His Leu Thr Leu Trp Ile Leu Leu Phe Phe Lys Cys
 35 40 45

Ile Tyr Arg Arg Phe Lys Tyr Gly Leu Lys Gly Gly Pro Ser Thr Glu
 50 55 60
 Gly Val Pro Lys Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Lys Glu Gln Gln Ser
 65 70 75 80
 Ala Val Asp Ala Asp Asp Gly His Phe Val Ser Ile Glu Leu Glu
 85 90 95

<210> 9
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus
 <400> 9

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgcct atcagaaacg aatgggggtg cagatgcaac 60

ggttcaagtg atcctctcac tattgccgca aatatcattg ggatcttgca cttgacattg 120

tggattcttg atcgtctttt ttccaatgc atttaccgtc gctttaata cggactgaaa 180
ggagggcctt ctacgaagg agtgccaag tctatgaggg aagaatcgc aaaggaacag 240
cagagtgtg tggaatgctga cgatgggtcat ttgtcagca tagagctgga gtaa 294

<210> 10

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 10

acacaccgtc tctagatcg tcttttttc aaatgcattt acc 43

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 11

cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg tagttttt 38

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 12

acacaccgtc tcacccattt aatcacttga accgttgc 38

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 13

cacacacgtc tccgggagca aaagcaggta g 31

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 14

acacaccgtc tccctacgta ctctctatca tcccg 35

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 15

cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg tagttttt 38

<210> 16

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 16

gggagcaaaa gcaggtagat attgaaagat gagtcttcta accgaggtcg aaac 54

<210> 17

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 17

gtaggtttcg acctcggtta gaagactcat ctttcaatat ctacctgctt ttgc 54

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 18

acacaccgtc tccctacgta ctctctatca tcccg 35

<210> 19
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
 <400> 19
 cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg tagttttt 38

<210> 20
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide
 <400> 20
 gggagcaaaa gcaggtagat attgaaagat gagtcttcta accgaggtcg aaac 54

<210> 21
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide
 <400> 21
 gtaggtttcg acctcggtta gaagactcat cttcaatat ctacctgctt ttgc 54

<210> 22
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus
 <400> 22
 caacggttca agtgattaat aaactattgc c 31

<210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus
 <400> 23
 caacggttca agtgattggt ggactgttgc c 31

<210> 24
 <211> 1772
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus
 <400> 24

agcaaaagca ggggaaaata aaaacaacca aaatggagaa aatagtgtt ctttttgcaa 60
 tagtcagtct tgttaaaagt gatcagattt gcattggtta ccatgcaaac aactcgacag 120

agcaggttga cacaataatg gaaaagaacg ttactgttac acatgcccaa gacatactgg 180
 aaaagaaaca caacgggaag ctctcgatc tagatggagt gaagcctcta attttgagag 240
 attgtagcgt agctggatgg ctctcgaa acccaatgtg tgacgaattc atcaatgtgc 300
 cggaatggtc ttacatagtg gagaaggcca atccagtcga tgacctctgt taccagggg 360
 atttcaatga ctatgaagaa ttgaaacacc tattgagcag aataaacat tttgagaaaa 420
 ttcagatcat ccccaaaagt tcttggcca gtcataagc ctcatagggt gtgagctcag 480
 catgtccata ccagggaag tctctctttt tcagaaatgt ggtatggctt atcaaaaaga 540

acagtacata cccaacaata aagaggagct acaataatac caaccaagaa gatcttttgg 600
 tactgtgggg gattcaccat cctaataatg cggcagagca gacaaagctc tatcaaaacc 660
 caaccaccta tatttcgtt gggacatcaa cactaaacca gagattggta ccaagaatag 720
 ctactagatc caaagtaaac gggcaaagtg gaaggatgga gttcttctgg acaatttta 780
 agccgaatga tgcaatcaac ttcgagagta atggaaattt cattgtcca gaatatgcat 840
 acaaaattgt caagaaagg gactcaacaa ttatgaaaag tgaattggaa tatggtaact 900
 gcaacaccaa gtgtcaact ccaatggggg cgataaactc tagcatgcca ttccacaata 960

tacacctct caccattggg gaatgcccc aatatgtgaa atcaaacaga ttagtccttg 1020
 cgactgggct cagaaatagc cctcaaagag agactagagg attatttga gctatagcag 1080
 gttttataga gggaggatgg cagggaatgg tagatggtt gtatgggtac caccatagca 1140
 atgagcaggg gattgggtac gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag 1200
 tcaccaataa ggtcaactcg atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa 1260
 gggaatttaa caacttagaa aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt 1320
 tcctagatgt ctggacttat aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc 1380

tagactttca tgactcaat gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg 1440
 ataatgcaaa ggagctgggt aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat 1500
 gtagtgaag tgtaagaaat ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcgagac 1560

taaaaagaga ggaaataagt ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt	1620
caattttattc tacagtggcg agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct	1680
tatggatgtg ctccaatggg tcgttacaat gcagaatttg catttaagat tagaatttca	1740
gagatatgag gaaaaacacc cttgtttctia ct	1772

<210> 25

<211> 1398

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 25

agcaaaagca ggggttttaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatc ggatcaatct	60
gtatggtaac tggaatagtt agcttaatgt tacaatttgg gaacatgac tcaatatggg	120
tcagtcattc aattcacaca gggaatcaac accaatctga accaatcagc aatactaatt	180
ttcttactga gaaagctgtg gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca	240
ttaacggatg ggctgtatc agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aagggggatg	300
tgtttgttat aagagagccg ttcatctcat gctccactt ggaatgcaga actttctttt	360

tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc	420
ctcacagaac attaatgagt tgtctgttgg gtgaggtcc ctecccatat aactcaaggt	480
ttgagtctgt tgcttggta gcaagtgtt gccatgatgg caccagttgg ttgacgattg	540
gaatttctgg ccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag	600
acactatcaa gagtggagg aacaacatac tgagaactca agagtcgaa tgtgcatgtg	660
taaattggctc ttgctttact gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata	720
agatcttcaa aatggaaaaa gggaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt	780

atcactatga ggaatgctcc tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg	840
ataattggca tggtcctaat cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa	900
taggatatat atgcagtgga gttttcggag acaatccacg cccaatgat ggaacaggta	960
gttgtgtcc gggtcctct aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg	1020
gcaatggtgt ctggatcggg agaaccaaaa gcactaatc caggagcggc ttgaaatga	1080
tttgggatcc aaatgggtgg actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaac caagatatcg	1140
tagcaataac tgattgttca ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag	1200

gactagattg cataagacct tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga	1260
gcacaatttg gactagtggg agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg	1320

gttggctcttg gccagacggt gccgagttgc cattcaccat tgacaagtag tctgttcaaa 1380
aaactccttg tttctact 1398
<210> 26
<211> 1779
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
<400> 26
agcaaaagca ggggaaaaca aaagcaacaa aaatgaaggc aatactagta gttctgctat 60

atacatttgc aaccgcaaat gcagacacat tatgtatagg ttatcatgcg aacaattcaa 120
cagacactgt agacacagta ctagaaaaga atgtaacagt aacacactct gttaaccttc 180
tagaagacaa gcataacggg aaactatgca aactaagagg ggtagcccca ttgcatttgg 240
glaaatgtaa cattgctggc tggatcctgg gaaatccaga gtgtgaatca ctctccacag 300
caagctcatg gtctacatt gtggaacac ctagtgcaga caatggaacg tgttaccag 360
gagatttcat cgattatgag gagctaacag agcaattgag ctcatgttca tcatttgaaa 420
ggtttgagat attcccaag acaagttcat ggcccaatca tgactcgaac aaaggtgtaa 480

cggcagcatg tctcatgct ggagcaaaaa gcttctacaa aaatttaata tggctagtta 540
aaaaaggaaa ttcataccca aagctcagca aatcctacat taatgataaa gggaaagaag 600
tcctcgtgct atggggcatt caccatccat ctactagtgc tgaccaacaa agtctctatc 660
agaatgcaga tgcataatgtt tttgtggggt catcaagata cagcaagang ttcaagccgg 720
aaatagcaat aagacccaaa gtgagggatc ragaaggag aatgaactat tactggacac 780
tagtagagcc gggagacaaa ataacattcg aagcaactgg aaatctagtg gtaccgagat 840
atgcattcgc aatggaaaga aatgctggat ctggtattat catttcagat acaccagtcc 900

acgattgcaa tacaacttgt caaacacca aggtgtctat aaacaccagc ctccatttc 960
agaatataca tccgatcaca attggaaaat gtccaaaata tgtaaaaagc acaaaattga 1020
gactggccac aggattgagg aatatcccg tcttcaatc tagaggccta tttggggcca 1080
ttgccggttt cattgaaggg ggggtggacag ggatggtaga tggatggtac ggttatcacc 1140
atcaaaatga gcaggggtca ggatatgcag ccgacctgaa gagcacacag aatgccattg 1200
acgagattac taacaaagta aattctgtta ttgaaaagat gaatacacag ttcacagcag 1260
taggtaaaga gttcaaccac ctggaaaaaa gaatagagaa tttaaataaa aaagttgatg 1320

atggtttcct ggacatttgg acttacaatg ccgaactgtt ggttctattg gaaaatgaaa 1380

gaactttgga ctaccacgat tcaaatgtga agaacttata tgaaaaggta agaagccagc	1440
taaaaaacaa tgccaaggaa attggaaacg gctgctttga attttaccac aaatgcgata	1500
acacgtgcat ggaaagtgtc aaaaatggga cttatgacta cccaaaatac tcagaggaag	1560
caaaattaaa cagagaagaa atagatgggg taaagctgga atcaacaagg atttaccaga	1620
ttttggcgat ctattcaact gtcgccagtt catttgtact ggtagtctcc ctgggggcaa	1680
tcagtttctg gatgtgctct aatgggtctc tacagtgtag aatatgtatt taacattagg	1740
atttcagaag catgagaaaa aaacaccctt gtttctact	1779
<210> 27	
<211> 1458	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 27	
agcaaaagca ggagttttaa atgaatccaa accaaaagat aataaccatt ggttcggtct	60
glatgacaat tggaatggct aacttaatat tacaattgg aaacataatc tcaatatgga	120
ttagccactc aattcaactt gggaatcaaa atcagattga aacatgcaat caaagcgta	180
ttacttatga aaacaacact tgggtaaatc agacatatgt taacatcagc aacaccaact	240
ttgctgctgg acagtcagtg gtttccgtga aattagcggg caattcctct ctctgccctg	300
ttagtggtatg ggctatatac agtaaagaca acagtgtgag aatcggttcc aagggggatg	360
tgtttgtcat aagggaacca ttcatatcat gtcctccctt ggaatgcaga accttcttct	420
tgactcaagg ggccttgcta aatgacaaac attccaatgg aaccattaaa gacaggagcc	480
catatcgaac cctaattgagc tgtcctattg gtgaagtcc ctctccatac aactcaagat	540
ttgagtcagt cgcttggta gcaagtgcct gtcatgatgg catcaattgg ctaacaattg	600
gaattttctg cccagacaat ggggcagtgg ctgtgttaaa gtacaacggc ataataacag	660
acactatcaa gagtggaga aacaatatat tgagaacaca agagtctgaa tgtgcatgtg	720
taaatggttc ttgctttact gtaatgaccg atggaccaag taatggacag gcctcataca	780
agatcttcag aatagaaaaa ggaaagatag tcaaatcagt cgaaatgaat gccctaatt	840
atcactatga ggaatgtcc tgttatcctg attctagtga aatcacatgt gtgtgcaggg	900
ataactggca tggctcgaat cgaccgtggg tgtctttcaa ccagaatctg gaatatcaga	960
taggatacat atgcagtggg attttcggag acaatccacg ccctaattgat aagacaggca	1020
gttgtggtcc agtatcgtct aatggagcaa atggagtaaa agggttttca ttcaaatacg	1080

gcaatggtgt ttggataggg agaactaaaa gcattagtgc aagaaacggt ttgagatga 1140
 ttgggatcc gaacggatgg actgggacag acaataactt ctcaataaag caagatatcg 1200
 taggaataaa tgagtggca ggatatagcg ggagttttgt tcagcatcca gaactaacag 1260
 ggctggattg tataagacct tgcttctggg ttgaactaat cagagggcga cccaaagaga 1320
 acacaatctg gactagcggg agcagcatal ccttttggg tgtaaacagt gacactgtgg 1380
 gtgtgtcttg gccagacggt gctgagttgc catctaccat tgacaagtaa ttgtttcaaa 1440
 aaactccttg ttctact 1458

<210> 28

<211> 1027

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 28

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact 60
 ctctatcacc ccgtcagccc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt 120
 tgcaggggaag aacaccgacg ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct 180
 gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgcgcg 240
 aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgccttaaat gggaacgggg atccaaataa 300
 catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaaggagg gagataacat tccatggggc 360

caaagaaatc tcaactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata 420
 caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatattggc ctggtatgtg caacctgtga 480
 acagattgct gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact 540
 aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat 600
 ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaaat 660
 ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcttagctcc agtgctggtc tgaaaaatga 720
 tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa 780

gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc 840
 ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc 900
 ctcttacgga aggagtgcga aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg 960
 ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt 1020
 ttctact 1027

<210> 29

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 29

```
atgcattagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga      60
gttccgcgtt acataactta cggtaaattgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg      120
cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttcattg      180
acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca      240
tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc      300
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc      360
tattaccatg gtgatgcggt ttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc      420
```

```
acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaa      480
tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa tgggcggtag      540
gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctggttta gtgaaccgtc agatccgcta      600
gcgattacgc caagctcgaa attaacctc actaaaggga acaaaagctg gagctccact      660
gtggaattcg ccttggccg ccatgagtct tctaaccgag gtcgaaacgc ctatcagaaa      720
cgaatggggg tgcagatgca acggttcaag tgatcctctc actattgccg caaatatcat      780
tgggatcttg cacttgacat tgtggattct tgatcgtctt ttttcaaat gcatttaccg      840
```

```
tcgctttaa tacggaactga aaggagggcc ttctacggaa ggagtgccaa agtctatcag      900
ggaagaatat cgaaaggac agcagagtgc tgtggatgct gacgatggtc atttgtcag      960
catagagctg gagtaatagg ccaagggcga attccacatt gggctcgagg gggggcccg      1020
taccttaatt aattaaggta ccaggtaat gtaccaatt cgcctatag tgagtcgtat      1080
tacaattcac tcgatcggtc cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat      1140
ctgttgtttg cccctcccc gtgccttctt tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc      1200
tttctaata aatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgccat tctattctgg      1260
```

```
ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg      1320
gggaacgcgt aaattgtaag cgtaaatatt ttgttaaaat tcgctgtaaa tttttgttaa      1380
atcagctcat ttttaacca ataggccgaa atcggcacaa tcccttataa atcaaaagaa      1440
tagaccgaga tagggttgag tggtgttcca      1470
```

<210> 30

<211> 594

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 30

atgcattagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga 60

gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg 120

cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttcattg 180

acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca 240

tatgccaaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcattatgc 300

ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc 360

tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc 420

acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa 480

tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaaa tgggcggtag 540

gcgtgtacgg tgggaggctt atataagcag agctgggtta gtgaaccgtc agat 594

<210> 31

<211> 731

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 31

ttatgccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt 60

catcgtatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt 120

tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca 180

ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg 240

cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat aagcagagct ggtttagtga accgtcagat 300

ccgctagcga ttacgccaag ctcgaaatta accctacta aaggaacaa aagctggagc 360

tccactgtgg aattcgccct tggccgcat gagtcttcta accgaggtcg aaacgcctat 420

cagaaacgaa tgggggtgca gatgcaacgg ttcaagtgat cctctacta ttgccgcaaa 480

tatcattggg atcttgcact tgacatttg gattcttgat cgtctttttt tcaaatgcat 540

ttaccgtcgc tttaaatagc gactgaaagg agggccttct acggaaggag tgccaaagtc 600

tatcagggaa gaatatcgaa aggaacagca gagtgtgtg gatgctgacg atggtcattt 660

tgtcagcata gagctggagt aataggccaa gggcgaattc cacattgggc tcgagggggg	720
gcccgggtacc t	731
<210> 32	
<211> 811	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 32	
tgtggaattc gcccttggcc gccatgagtc ttctaaccga ggtcgaaacg cctatcagaa	60
acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca	120
ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc	180
gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc cttctacgga aggagtgcc aagtctatca	240
gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca	300
gcatagagct ggagtaatg gccaaaggcg aattccacat tgggctcgag ggggggcccc	360
gtaccttaat taattaaggt accaggtaag tgtaccaat tcgccctata gtgagtcgta	420
ttacaattca ctgatcggc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca	480
tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac tcccactgtc	540
ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtagtgcca ttctattctg	600
gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct	660
ggggaacgcg taaattgtaa gcgttaatat ttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta	720
aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggaata atcccttata aatcaaaaga	780
atagaccgag atagggttga gtgttgttcc a	811
<210> 33	
<211> 294	
<212> DNA	
<213> Influenza A virus	
<400> 33	
atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgcct atcagaaacg aatgggggtg cagatgcaac	60
ggttcaagt atcctctcac tattgccga aatatcattg ggatcttgca cttgacattg	120
tggattcttg atcgtctttt ttccaatgc atttaccgtc gctttaaata cggactgaaa	180
ggagggcctt ctacggaagg agtgccaaag tctatcaggg aagaatatcg aaaggaacag	240
cagagtgttg tggatgctga cgatggatcat ttgtcagca tagagctgga gtaa	294