



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월28일

(11) 등록번호 10-1580660

(24) 등록일자 2015년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/145 (2006.01) **A61P 31/16** (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7003351

(22) 출원일자(국제) 2008년08월03일

심사청구일자 2013년06월13일

(85) 번역문제출일자 2010년02월16일

(65) 공개번호 10-2010-0045473

(43) 공개일자 2010년05월03일

(86) 국제출원번호 PCT/IL2008/001062

(87) 국제공개번호 WO 2009/016639

국제공개일자 2009년02월05일

(30) 우선권주장

60/953,498 2007년08월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Immunobiology. Vol. 207, No. 5, pp. 305-313*

WO2007066334 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

바이오엔드백스 파마슈티칼즈, 리미티드.

이스라엘, 네스-지오나 74140, 피.오. 박스 4143,
아인스타인 스트리트(4층 플로어) 14, 웨이즈만 사
이언스 파크

(72) 발명자

벤-예디디아, 타마르

이스라엘, 마즈케레트 바트야 76804, 하자이트 스트리트 6

싱어, 요셉

이스라엘, 하쉬모나임 73127, 하티로쉬 스트리트 6

(74) 대리인

손민, 이경민

전체 청구항 수 : 총 18 항

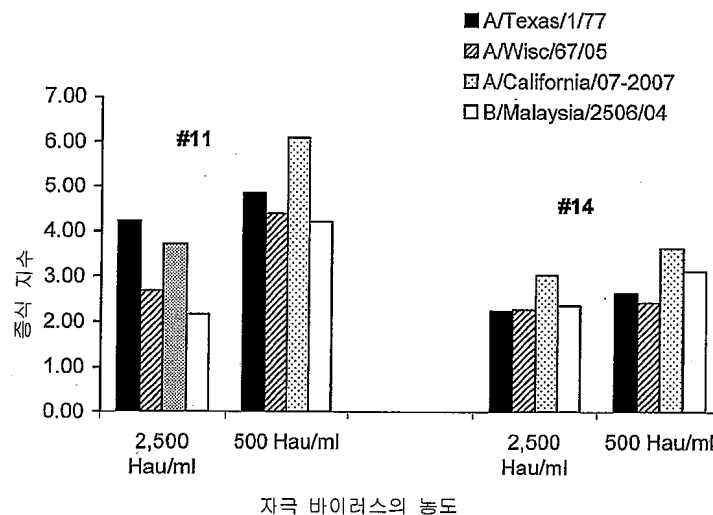
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 다중체 다중-에피토프 인플루엔자 백신

(57) 요약

본 발명은 다중체 다중-에피토프 펩티드-기초된 백신에 관계한다. 특히, 본 발명은 인플루엔자에 대한 보호 면역(protective immunity)을 유도하기 위한 다중체 다중-에피토프 펩티드-기초된 백신의 용도에 관계한다.

대표도 - 도4



명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

교대 순차적 중합체 구조(alternating sequential polymeric structure) $(X_1X_2X_3\cdots X_m)_n$ 또는 블록 공중합체 구조(block copolymer structure) $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 으로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드, 여기서 n 은 각 경우에, 독립적으로 3 내지 5의 정수이고; m 은 9의 정수이고; $X_1, X_2\cdots X_m$ 은 각각, HA 354-372(E1, SEQ ID NO: 82), HA 91-108(E2, SEQ ID NO: 48), M1 2-12(E3, SEQ ID NO: 25), HA 150-159(E4, SEQ ID NO: 52), HA 143-149(E5, SEQ ID NO: 51), NP 206-229(E6, SEQ ID NO: 64), HA 307-319(E7, SEQ ID NO: 59), NP 335-350(E8, SEQ ID NO: 69), 및 NP 380-393(E9, SEQ ID NO: 70)으로 구성된 군에서 선택된 상이한 인플루엔자 펩티드 에피토프인 것에 있어서,

상기 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드는 SEQ ID NO:84에 열거된 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 9

교대 순차적 중합체 구조(alternating sequential polymeric structure) $(X_1X_2X_3\cdots X_m)_n$ 또는 블록 공중합체 구조(block copolymer structure) $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 으로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드, 여기서 n 은 각 경우에, 독립적으로 3 내지 5의 정수이고; m 은 9의 정수이고; $X_1, X_2\cdots X_m$ 은 각각, HA 354-372(E1, SEQ ID NO: 82), HA 91-108(E2, SEQ ID NO: 48), M1 2-12(E3, SEQ ID NO: 25), HA 150-159(E4, SEQ ID NO: 52), HA 143-149(E5, SEQ ID NO: 51), NP 206-229(E6, SEQ ID NO: 64), HA 307-319(E7, SEQ ID NO: 59), NP 335-350(E8, SEQ ID NO: 69), 및 NP 380-393(E9, SEQ ID NO: 70)으로 구성된 군에서 선택된 상이한 인플루엔자 펩티드 에피토프인 것에 있어서,

상기 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드는 SEQ ID NO:86에 열거된 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 10

교대 순차적 중합체 구조(alternating sequential polymeric structure) $(X_1X_2X_3\cdots X_m)_n$ 또는 블록 공중합체 구조(block copolymer structure) $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 으로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드, 여기서 n은 각 경우에, 독립적으로 3 내지 5의 정수이고; m은 9의 정수이고; $X_1, X_2\cdots X_m$ 은 각각, HA 354-372(E1, SEQ ID NO: 82), HA 91-108(E2, SEQ ID NO: 48), M1 2-12(E3, SEQ ID NO: 25), HA 150-159(E4, SEQ ID NO: 52), HA 143-149(E5, SEQ ID NO: 51), NP 206-229(E6, SEQ ID NO: 64), HA 307-319(E7, SEQ ID NO: 59), NP 335-350(E8, SEQ ID NO: 69), 및 NP 380-393(E9, SEQ ID NO: 70)으로 구성된 군에서 선택된 상이한 인플루엔자 펩티드 에피토프인 것에 있어서,

상기 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드는 SEQ ID NO:88에 열거된 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 11

교대 순차적 중합체 구조(alternating sequential polymeric structure) $(X_1X_2X_3\cdots X_m)_n$ 또는 블록 공중합체 구조(block copolymer structure) $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 으로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드, 여기서 n은 각 경우에, 독립적으로 3 내지 5의 정수이고; m은 9의 정수이고; $X_1, X_2\cdots X_m$ 은 각각, HA 354-372(E1, SEQ ID NO: 82), HA 91-108(E2, SEQ ID NO: 48), M1 2-12(E3, SEQ ID NO: 25), HA 150-159(E4, SEQ ID NO: 52), HA 143-149(E5, SEQ ID NO: 51), NP 206-229(E6, SEQ ID NO: 64), HA 307-319(E7, SEQ ID NO: 59), NP 335-350(E8, SEQ ID NO: 69), 및 NP 380-393(E9, SEQ ID NO: 70)으로 구성된 군에서 선택된 상이한 인플루엔자 펩티드 에피토프인 것에 있어서,

상기 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드는 아래의 교대 순차적 중합체 구조 $[E1E2E3E4E5E6E7E8E9]_n$ 로 정렬된 9가지 상이한 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하고, 여기서 n은 3 내지 5인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 12

교대 순차적 중합체 구조(alternating sequential polymeric structure) $(X_1X_2X_3\cdots X_m)_n$ 또는 블록 공중합체 구조(block copolymer structure) $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 으로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드, 여기서 n은 각 경우에, 독립적으로 3 내지 5의 정수이고; m은 9의 정수이고; $X_1, X_2\cdots X_m$ 은 각각, HA 354-372(E1, SEQ ID NO: 82), HA 91-108(E2, SEQ ID NO: 48), M1 2-12(E3, SEQ ID NO: 25), HA 150-159(E4, SEQ ID NO: 52), HA 143-149(E5, SEQ ID NO: 51), NP 206-229(E6, SEQ ID NO: 64), HA 307-319(E7, SEQ ID NO: 59), NP 335-350(E8, SEQ ID NO: 69), 및 NP 380-393(E9, SEQ ID NO: 70)으로 구성된 군에서 선택된 상이한 인플루엔자 펩티드 에피토프인 것에 있어서,

상기 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드는 아래의 블록 공중합체 구조 $[E1E1E1-E2E2E2-E3E3E3-E4E4E4-E5E5E5-E6E6E6-E7E7E7-E8E8E8-E9E9E9]$ 로 정렬된 9가지 상이한 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

청구항 8 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 담체 서열을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 펩티드 에피토프는 담체 폴리펩티드의 서열 내에 삽입되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 19

청구항 8 내지 12 중 어느 한 항에 따른 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 20

청구항 19에 있어서, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, 그리고 SEQ ID NO:88로 구성된 군에서 선택되는 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 21

청구항 19에 있어서, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, 그리고 SEQ ID NO:87로 구성된 군에서 선택되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 22

청구항 8 내지 12 중 어느 한 항에 따른 최소한 하나의 폴리펩티드를 포함하는, 인플루엔자에 대한 개체의 면역화를 위한 백신.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

청구항 22에 있어서, 어쥬번트를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 어쥬번트는 유중수 에멀전(water in oil emulsion), 지질 에멀전(lipid emulsion), 그리고 리포솜(liposome)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 28

청구항 26에 있어서, 어쥬번트는 Montanide[®], 명반(alum), 무라밀 디펩티드(muramyl dipeptide), Gelvac[®], 키

틴 마이크로입자(chitin microparticle), 키토산(chitosan), 콜레라 독소(cholera toxin) 아단위 B, Intralipid®, 그리고 Lipofundin®로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 29

청구항 26에 있어서, 어쥬번트는 Montanide®인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 30

청구항 8 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자에 대한 면역화에 이용되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드.

청구항 31

인플루엔자 감염에 대한 면역화를 위한 제약학적 조성물에 있어서, 청구항 8 내지 12 중 어느 한 항에 따른 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 32

청구항 19에 있어서, 폴리펩티드의 생산에 이용되는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

발명의 설명

기술 분야

본 발명의 기술분야

본 발명은 다중체(multimeric) 다중-에피토프(multi-epitope) 펩티드-기초된 백신에 관계한다. 특히, 본 발명은 인플루엔자에 대한 보호 면역(protective immunity)을 유도하기 위한 다중체 다중-에피토프 펩티드-기초된 백신의 용도에 관계한다.

배경 기술

본 발명의 배경기술

다중-에피토프 백신(multi-epitope vaccine)

B-세포 에피토프, T-보조 세포 에피토프, 그리고 세포독성 T 림프구 에피토프 모두 2가지 면역 반응(immune response)에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 명백하게, 효과적인 예방 접종(vaccination)을 위하여 넓은 스펙트럼(spectrum)과 오래 지속되는 체액(humoral)과 세포 반응이 유도되어야 한다. 높은 돌연변이율(mutation rate)을 갖는 바이러스, 예를 들면, 인플루엔자 바이러스(influenza virus)와 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus)에 대한 넓은 스펙트럼을 갖는 효과적인 백신은 현재 존재하지 않는다.

항원 양(antigen dose)과 특이적 B-세포 반응의 유효성 사이에 밀접한 상관관계가 존재한다. 다양한 양의 에피토프 펩티드에 결합된 동일한 양의 담체 단백질로 구성되는 화학적으로 결합된 담체 단백질과 에피토프 펩티드 시스템을 이용한 연구에서, 에피토프 밀도(epitope density)가 T 보조 세포-의존성 IgG 반응에 극적인 영향을 주는 것으로 밝혀졌다(Jegerlehner et al., Eur J Immunol. 2002, 32:3305-14). Liu et al., Vaccine. 2004 23(3):366-71에서는 인플루엔자 바이러스의 M2 단백질의 M2e 펩티드 에피토프의 다양한 사본수(number of copy)(1개, 2개, 4개, 8개와 16개 사본)를 보유하는 글루타티온(glutathione)-S-전이효소(transferase) 융합 단백질(fusion protein)로 면역화된 생쥐와 토끼의 체액 반응에 대한 에피토프 밀도의 긍정적인 효과를 확인하였다. 동일한 연구에서, 치명적인 공격접종(challenge) 검사에서, 더욱 높은 에피토프 밀도를 갖는 융합 단백질이 더욱 높은 생존율(survival rate)과 더욱 느린 체중 감소(weight loss)를 결과하는 것으로 밝혀졌다.

다중-에피토프 백신, 다시 말하면, 하나 이상의 에피토프를 포함하는 백신이 다양한 적용을 위하여 개발되고 있다. 무제한적 실례에는 예로써, US Pat. No. 6,063,386에 개시된, 연쇄상구균(streptococcal bacteria)에 대한 재조합 다가 백신(recombinant multivalent vaccine); US Pat. No. 6,828,416에 개시된, 기생충 열대열 말라리아(*Plasmodium falciparum*)의 상이한 생명 주기(life cycle) 단계로부터 유래된 펩티드를 포함하는 단일 단백질

을 포함하는 말라리아(malaria) 치료용 백신; US Pat. Application 2007/0056315에 개시된, 전립선 줄기 세포(stem cell) 항원 에피토프를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 항-종양 면역원성 조성물(anti-tumor immunogenic composition); 그리고 HIV(International Publication WO 01/24810), 풍진(rubella) 바이러스(International Publication WO 93/14206)와 C형 간염(Hepatitis C) 바이러스(International Publication WO 01/21189)에 대한 다중-에피토프 항-바이러스 백신이 포함된다.

[0008] International publication WO 2006/069262에서는 개체에서 면역 반응을 촉진하는데 이용되는, 인플루엔자 바이러스 단백질의 병원균 연관된 분자 패턴(Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP)과 에피토프를 포함하는 조성물, 융합 단백질과 폴리펩티드를 제시한다. PAMP는 숙주(host)에서 선천성 면역 반응(innate immune response)을 유발할 수 있는, 다시 말하면, 어쥬번트(adjuvant)로서 기능할 수 있는 미생물에서 관찰되는 분자 모티프(molecular motif)(가령, 단백질, 펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질)이다. 일부 구체예에서, 이들 융합 단백질은 M2e 인플루엔자 에피토프의 복수 사본을 포함한다. International publication WO 2006/078657에서는 플라비바이러스(flaviviral) 단백질의 하나 이상의 PAMP와 다중 에피토프를 포함하는 유사한 융합 단백질과 폴리펩티드를 개시한다.

[0009] 인플루엔자

[0010] 인플루엔자는 항원 결정부위(antigenic determinant)에 따라 분류된 3가지 주요 아형(subtype), 인플루엔자 A, B와 C의 바이러스에 의해 유발되는 질환이다. 인플루엔자 비리온(virion)은 핵단백질(nucleoprotein, NP)과 밀접하게 연관되고, 기질 단백질(matrix protein)(M1)이 정렬하고 2가지 주요 표면 당단백질 항원(surface glycoprotein antigen), 혈구응집소(haemagglutinin, HA)와 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA)를 보유하는 지단백 외피(lipoprotein envelope)에 의해 둘러싸인 단일 가닥 RNA 게놈으로 구성된다. HA와 NA 당단백질은 변화에 가장 민감하다; 가령, HA의 16가지 면역 부류와 9가지 상이한 NA 부류가 H1N1 또는 H3N2와 같은 상이한 인플루엔자 바이러스 아형에 대한 기초를 제공한다. 인플루엔자 A 바이러스는 상이한 HN 아형 사이에 고도로 보존된 추가의 막통과 당단백질, M2를 보유한다. M2 유전자는 비리온 세포 표면 상에서 사합체(tetramer)로서 발현되는 96-97개-아미노산을 보유하는 단백질을 인코딩한다. 이는 대략 24개 세포의 아미노산, 대략 19개 막통과 아미노산, 그리고 대략 54개 세포질 잔기(cytoplasmic residue)로 구성된다(Lamb et al, Cell, 1985; 40:627-633.).

[0011] 인플루엔자 A와 B 바이러스는 인간에서 인플루엔자의 가장 일반적인 원인이다. 인플루엔자는 이완(morbidity)과 심지어 사망(mortality)을 비롯한 치명적인 건강 문제 이외에, 심각한 경제적 함의(economic implication)로 보건에 엄청난 영향을 준다. 감염은 무증상(asymptomatic) 내지 중등도(mild) 상부 호흡기 감염(upper respiratory infection)과 기관기관지염(tracheobronchitis)에서부터 심각한, 때때로 치명적인 바이러스 폐렴(viral pneumonia)까지 경등도(mild), 중등도(moderate) 또는 중증도(severe)일 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 백신 제조에 어려움을 유발하는 2가지 중요한 면역학적 특징을 갖는다. 첫 번째 특징은 "항원 소변이(antigenic drift)"로 지칭되는, 수년 단위로 표면 당단백질에서 발생하는 유전자 변화에 관계한다. 이러한 항원 변화는 기존 백신에 의해 유도된 내성(resistance)을 회피하는 바이러스를 산출한다. 보건 관점에서 극히 우려되는 두 번째 특징은 인플루엔자 바이러스, 특히 인플루엔자 A 바이러스가 유전 물질을 교환하고 합병할 수 있다는 점이다. "항원 대변이(antigenic shift)"로 알려져 있는 이러한 과정은 양쪽 부모 바이러스로부터 상이한 새로운 균주를 발생시키고, 이는 치명적인 전염성 균주일 수 있다.

[0012] 인플루엔자 바이러스 항원과 백신 생산

[0013] 인플루엔자 바이러스에 대한 면역화(immunization)는 상기 바이러스의 항원 변이(antigenic variation)와 호흡기 점막(respiratory mucous membrane)으로 감염의 제한에 의해 한정된다. 현재 가용한 인플루엔자 백신은 완전 비활성(whole inactive) 바이러스, 세균 세포의 표면에 제시된 바이러스 단백질, 또는 플라젤린(flagellin) 보유 바이러스 항원 결정부위에 기초한다. HA는 강한 면역원(immunogen)이고, 상이한 바이러스 균주의 혈청학적 특이성(serological specificity)을 결정하는데 가장 중요한 항원이다.

[0014] HA 분자(75-80 kD)는 복수의 항원 결정부위를 포함하는데, 이들 중에서 일부는 상이한 균주에서 서열 변화를 겪는 영역 내에 존재하고(균주-특이적 결정부위), 다른 일부는 많은 HA 분자에서 보존된 영역 내에 존재한다(공통 결정부위). 이들 변화로 인하여, 독감 백신은 적어도 수년마다 변경되어야 한다.

[0015] 많은 인플루엔자 항원, 그리고 이들로부터 제조된 백신은 당분야에 공지되어 있다. US Patent 4,474,757에서는 적절한 거대분자 담체, 예를 들면, 아미노산 중합체 또는 파상풍 독소이드(tetanus toxoid)에 부착된 HA의 항원 단편(antigenic fragment)에 상응하는 합성 펩티드로 구성되는 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 백신을 개시

한다.

- [0016] PCT International Publication WO 93/20846(본 발명의 발명자중 일부)에서는 플라젤린의 아미노산 서열과 인플루엔자 바이러스 HA 또는 NP의 에피토프의 최소한 하나의 아미노산 서열을 포함하는 최소한 하나의 재조합 단백질, 또는 상기 키메라 단백질의 집합체(aggregate)를 포함하는, 복수의 상이한 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 합성 재조합 백신을 교시한다. 이러한 접근법에 따라서, 3가지 에피토프에 기초한 합성 재조합 항-인플루엔자 백신은 생쥐에서 매우 효과적인 것으로 밝혀졌다. 구현된 백신에는 한쪽이나 양쪽 T-보조 또는 CTL NP 에피토프(각각, NP 55-69와 NP 147-158)와 함께, 모든 H3 균주에서 보존되고 항-인플루엔자 중화 항체(neutralizing antibody)를 유도하는, HA로부터 B-세포 에피토프인 HA 91-108 에피토프를 포함하는 플라젤린 키메라(chimera)가 포함되는데, 이들은 MHC-제한된 면역 반응을 유도한다. 상기 언급된 3가지 키메라의 조합(combination)을 포함하는 백신은 바이러스 감염에 최고 보호를 제공하는 것으로 생각되었다.
- [0017] US Patent No. 6,740,325(본 발명의 발명자중 일부)에서는 인플루엔자 바이러스의 최소한 4개의 에피토프를 포함하는 인간 합성 펩티드-기초된 인플루엔자 백신을 교시하는데, 상기 인플루엔자 바이러스 에피토프는 인간 세포와 반응하고, 상기 에피토프는
- [0018] (i) 하나의 B-세포 혈구응집소(HA) 에피토프; (ii) 많은 HLA 분자에 결합할 수 있는 하나의 T-보조 혈구응집소(HA) 또는 핵단백질(NP) 에피토프; 그리고 (iii) 상이한 인간 집단, 특히 특이적 종족(ethnic) 또는 인종(racial) 군에서 가장 우세한 HLA 분자에 한정된 최소한 2개의 세포독성 림프구(CTL) 핵단백질(NP) 또는 기질단백질(M) 에피토프를 포함한다. 이들 인플루엔자 펩티드 에피토프는 재조합 살모넬라(*Salmonella*) 플라젤린 내에서 발현될 수 있다. 상기 백신은 최소한 4개의 키메라 폴리펩티드의 수고스런 제조(cumbersome preparation)를 필요로 한다.
- [0019] PCT International Publication WO 2007/066334(본 발명의 발명자중 일부)에서는 최소한 2개의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하는 복수의 키메라 단백질을 포함하는, 장기적인 교차-균주 보호(cross-strain protection)를 유도할 수 있는 백신을 개시하는데, 여기서 최소한 하나의 에피토프는 인플루엔자 A 바이러스 기질단백질 M 펩티드 에피토프이고, 두 번째 에피토프는 혈구응집소 HA 펩티드 에피토프이다. 이 경우에도, 인플루엔자 펩티드 에피토프는 재조합 살모넬라(*Salmonella*) 플라젤린 내에서 발현될 수 있다.
- [0020] 포유동물은 종종, 편모 항원(flagellar antigen)에 대한 후천성 면역 반응(acquired immune response)을 나타낸다. 하지만, 임상 데이터에 따르면, 동물에서 재조합 플라젤린 인플루엔자의 효과량(effective dose)은 아마도, 높은 플라젤린/항원 비율로 인하여 고열(high fever)을 비롯한 부작용을 인간 개체에서 유발하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 높은 농도의 플라젤린은 심장에 대한 일시적인 효과를 나타내는 것으로 의심된다.
- [0021] 따라서 넓은 특이성으로 오랜 기간 지속되는 체액과 세포 반응을 유도할 수 있는 인플루엔자 펩티드 에피토프-기초된 백신이 요구된다. 또한, 간편화된 생산과 품질 제어 공정으로 제조되는 백신이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 본 발명의 요약
- [0023] 본 발명에서는 높은 담체 대(對) 항원 비율과 높은 어쥬번트 대(對) 항원 비율의 부작용을 비롯한, 인플루엔자에 대한 공지된 백신의 단점을 극복하는 인플루엔자 백신을 제시한다. 본 발명의 백신은 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하고, 다중 다양성(multi diversity), 높은 밀도 백신을 제공하는 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명에 따라서, 이러한 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드는 재조합 방식으로 단리된 폴리펩티드로서 또는 융합 단백질로서 생산되거나, 복수의 합성 펩티드를 연결함으로써 합성 방식으로 생산되거나, 또는 외부 어쥬번트와 혼합되거나 이러한 어쥬번트로 조제될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다중체 폴리펩티드는 인플루엔자 바이러스 B-세포 에피토프, T-보조 에피토프, 그리고 세포독성 림프구(CTL) 에피토프의 조합을 포함한다. 이들 에피토프는 바람직하게는, 혈구응집소(HA) 펩티드, 기질단백질(M1과 M2) 펩티드, 그리고 핵단백질(NP) 펩티드에서 선택된다. 이들 에피토프는 여러 인간 인플루엔자 아형에 대한 명백한 교차-보호 활성(cross-protection activity)을 나타내고 세포와 체액 면역 반응을 유도하는 향상된 능력에 대하여 선택된다.
- [0025] 놀랍게도, 본 발명에 따른 여러 다중체 폴리펩티드는 담체 단백질(carrier protein)에 결합하지 않으면서, 또는

이의 일부가 되지 않으면서도, 면역 반응을 유도하는데 능동적인 것으로 밝혀졌다. 더 나아가, 이러한 폴리펩티드에 의해 운반되는 면역원성 에피토프의 높은 밀도와 다양성(variety)으로 인하여, 백신은 어췌버트에 대한 요구 없이도 강한 면역 반응을 유도한다. 이에 더하여, 단일 폴리펩티드 내로 다수의 상이한 면역원성 에피토프의 포함(inclusion)은 생산 절차와 품질 제어를 용이하게 한다.

[0026] 첫 번째 측면에서, 본 발명에서는 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하는 합성 또는 재조합 폴리펩티드를 제시하는데, 각 에피토프는 단일 폴리펩티드 내에 최소한 2회 존재한다. 본 발명의 배경에서, "다중체" 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 아미노산 신장(amino acid stretch)의 복수(최소한 2개, 전형적으로 최소한 3개 또는 그 이상)의 반복부위(repeat)(반드시 인접할 필요 없음)를 포함하는 폴리펩티드이다. 이런 이유로, "다중체 다중-에피토프"는 복수의 에피토프의 복수의 반복부위를 포함하는 폴리펩티드에 관계한다.

[0027] 이러한 측면에 따라서, 본 발명에서는 교대 순차적 중합체 구조(alternating sequential polymeric structure) $(X_1X_2X_3\cdots)_n$ 또는 블록 공중합체 구조(block copolymer structure) $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 으로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드를 제시한다.

[0028] 본 발명에 따른 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드는

[0029] i. $B(X_1ZX_2Z\cdots X_m)_nB$; 그리고

[0030] ii. $B(X_1)_nZ(X_2)_nZ\cdots(X_m)_nB$ 로 구성된 군에서 선택되고,

[0031] 여기서 B는 1-4개 아미노산 잔기의 선택적 서열이고; n은 각 경우에, 독립적으로 2-50의 정수이고; m은 3-50의 정수이고; $X_1, X_2\cdots X_m$ 은 각각, 4-24개 아미노산 잔기로 구성되는 인플루엔자 펩티드 에피토프이고; Z는 각 경우에, 단일 결합(bond) 또는 1-4개 아미노산 잔기의 스페이스(spacer)이고; 상기 폴리펩티드 내에서 아미노산 잔기의 최대 숫자는 대략 1000이다.

[0032] 일부 구체예에 따라서, n은 각 경우에, 독립적으로 2-50의 정수이고; m은 3-15의 정수이고; X_1-X_m 은 각각, B-세포 유형 에피토프, T-보조(Th) 유형 에피토프, 그리고 세포독성 림프구(CTL) 유형 에피토프로 구성된 군에서 선택되고 4-24개 아미노산 잔기로 구성되는 인플루엔자 펩티드 에피토프이고; 상기 폴리펩티드 내에서 아미노산 잔기의 최대 숫자는 대략 600이다.

[0033] 다른 구체예에 따라서, 인플루엔자 펩티드 에피토프는 혈구응집소(HA) 펩티드, M1 펩티드, M2 펩티드, 그리고 핵단백질(NP) 펩티드로 구성된 군에서 선택된다.

[0034] 일부 특정한 구체예에 따라서, m은 9이고 n은 3-5의 정수이다.

[0035] 다른 구체예에 따라서, 인플루엔자 펩티드 에피토프는 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:82로 구성된 군에서 선택된다.

[0036] 일부 특정한 구체예에 따라서, 인플루엔자 펩티드 에피토프는 표 1에 따른 에피토프 E1-E9에서 선택된다:

표 1

[0037] 인플루엔자 펩티드 에피토프 E1 내지 E9

에피토프	에피토프 유형	단백질 잔기	아미노산 서열	SEQ ID NO:
E1	B 세포	HA 354-372	PAKLLKERGFFGAIAGFLE	82
E2	B 세포	HA 91-108	SKAYSNCYPYDVPDYASL	48
E3	B 세포 & CTL	M1 2-12	SLLTEVETYVL	25
E4	B 세포	HA 150-159	WLTGKNGLYP	52
E5	B 세포	HA 143-149	WTGVTQN	51
E6	T 보조	NP 206-229	FWRGENGRKTRSAYERMCNILKGG	64
E7	T 보조	HA 307-319	PKYVKQNTLKLAT	59
E8	CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVLSFIRGY	69

E9	CTL	NP 380-393	ELRSRYWAIRTRSG	70
----	-----	------------	----------------	----

- [0038] 더욱 특정한 구체예에 따라서, 인플루엔자 펩티드 에피토프는 HA 354-372(E1, SEQ ID NO: 82), HA 91-108(E2, SEQ ID NO: 48), M1 2-12(E3, SEQ ID NO: 25), HA 150-159(E4, SEQ ID NO: 52), HA 143-149(E5, SEQ ID NO: 51), NP 206-229(E6, SEQ ID NO: 64), HA 307-319(E7, SEQ ID NO: 59), NP 335-350(E8, SEQ ID NO: 69), 그리고 NP 380-393(E9, SEQ ID NO: 70)으로 구성된다.
- [0039] 또 다른 구체예에 따라서, 상기 폴리펩티드 서열은 SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, 그리고 SEQ ID NO:88로 구성된 군에서 선택된다.
- [0040] 일부 구체예에 따라서, 상기 폴리펩티드는 아래의 교대 순차적 중합체 구조 $[E1E2E3E4E5E6E7E8E9]_n$ 로 정렬된 9가지 상이한 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하고, 여기서 n은 3 또는 5이고; E1은 HA 354-372(SEQ ID NO:82)이고, E2는 HA 91-108(SEQ ID NO:48)이고, E3은 M1 2-12(SEQ ID NO:25)이고, E4는 HA 150-159(SEQ ID NO:52)이고, E5는 HA 143-149(SEQ ID NO:51)이고, E6은 NP 206-229(SEQ ID NO:64)이고, E7은 HA 307-319(SEQ ID NO:59)이고, E8은 NP 335-350(SEQ ID NO:69)이고, 그리고 E9는 NP 380-393(SEQ ID NO:70)이다.
- [0041] 다른 구체예에 따라서, 상기 폴리펩티드는 아래의 블록 공중합체 구조 $[E1E1E1-E2E2E2-E3E3E3-E4E4E4-E5E5E5-E6E6E6-E7E7E7-E8E8E8-E9E9E9]$ 로 정렬된 9가지 상이한 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하고, 여기서 E1은 HA 354-372(SEQ ID NO:82)이고, E2는 HA 91-108(SEQ ID NO:48)이고, E3은 M1 2-12(SEQ ID NO:25)이고, E4는 HA 150-159(SEQ ID NO:52)이고, E5는 HA 143-149(SEQ ID NO:51)이고, E6은 NP 206-229(SEQ ID NO:64)이고, E7은 HA 307-319(SEQ ID NO:59)이고, E8은 NP 335-350(SEQ ID NO:69)이고, 그리고 E9는 NP 380-393(SEQ ID NO:70)이다.
- [0042] 또 다른 구체예에 따라서, 상기 폴리펩티드는 아래의 교대 순차적 중합체 구조 $[E1E2E3E4E5]_6$ 로 정렬된 5가지 상이한 B-세포 유형 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 6개 반복부위를 포함하고, 여기서 E1은 HA 354-372(SEQ ID NO:82)이고, E2는 HA 91-108(SEQ ID NO:48)이고, E3은 M1 2-12(SEQ ID NO:25)이고, E4는 HA 150-159(SEQ ID NO:52)이고, 그리고 E5는 HA 143-149(SEQ ID NO:51)이다.
- [0043] 다른 구체예에 따라서, 상기 폴리펩티드는 아래의 교대 순차적 중합체 구조 $[E7E8E9E6]_6$ 로 정렬된 4가지 상이한 T-세포 유형 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 6개 반복부위를 포함하고, 여기서 E6은 NP 206-229(SEQ ID NO:64)이고, E7은 HA 307-319(SEQ ID NO:59)이고, E8은 NP 335-350(SEQ ID NO:69)이고, 그리고 E9는 NP 380-393(SEQ ID NO:70)이다.
- [0044] 또 다른 구체예에 따라서, 상기 폴리펩티드는 아래의 교대 순차적 중합체 구조 $[E7E8E9E6]_n$ 로 정렬된 4가지 상이한 T-세포 유형 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 4개 반복부위를 포함하고, 여기서 n은 6이고, 그리고 E6은 NP 206-229(SEQ ID NO:64)이고, E7은 HA 307-319(SEQ ID NO:59)이고, E8은 NP 335-350(SEQ ID NO:69)이고, 그리고 E9는 NP 380-393(SEQ ID NO:70)이고, 그리고 상기 다중체 폴리펩티드는 담체 단백질에 융합된다.
- [0045] 추가의 구체예에 따라서, 상기 폴리펩티드는 아래의 블록 공중합체 구조 $[E2E2E2E2E2E2-E1E1E1E1E1E1-E3E3E3E3E3E3-E4E4E4E4E4E4-E5E5E5E5E5E5-E6E6E6E6E6E6-E7E7E7E7E7E7-E8E8E8E8E8E8-E9E9E9E9E9E9]$ 로 정렬된 9가지 상이한 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 6개 반복부위를 포함하고, 여기서 E1은 HA 354-372(SEQ ID NO:82)이고, E2는 HA 91-108(SEQ ID NO:48)이고, E3은 M1 2-12(SEQ ID NO:25)이고, E4는 HA 150-159(SEQ ID NO:52)이고, E5는 HA 143-149(SEQ ID NO:51)이고, E6은 NP 206-229(SEQ ID NO:64)이고, E7은 HA 307-319(SEQ ID NO:59)이고, E8은 NP 335-350(SEQ ID NO:69)이고, 그리고 E9는 NP 380-393(SEQ ID NO:70)이다.
- [0046] 다양한 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 각 에피토프의 최소한 2개 반복부위, 전형적으로 각 에피토프의 최소한 3개 반복부위, 대안으로 각 에피토프의 최소한 4개 반복부위, 대안으로 각 에피토프의 최소한 5개 반복부위, 대안으로 각 에피토프의 최소한 6개 반복부위, 각 에피토프의 최대 최소한 50개 반복부위를 포함한다. 면역계(immune system)에 에피토프의 노출을 향상시키기 위하여, 이들 에피토프는 바람직하게는, 스페이스에 의해 분리되는데, 상기 스페이스는 특정 구체예에 따라서, 단일 아미노산으로 구성되고, 그리고 다른 구체예에 따라서, 최소한 하나의 아미노산을 포함하거나, 또는 펩티드이다. 적절하게는, 스페이스는 1-4개 중성 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0047] 특정한 구체예에 따라서, 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드는 교대 순차적 중합체 구조

$(X_1X_2X_3\cdots)_n$ 또는 블록 공중합체 구조 $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본으로 구성된다.

- [0048] 본 발명의 이러한 측면의 일부 구체예에서, 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드는 최소한 2개 인플루엔자 펩티드 에피토프를 포함하고, 여기서 최소한 하나는 B-세포 유형 에피토프, T-보조(Th) 유형 에피토프, 그리고 세포독성 림프구(CTL) 유형 에피토프로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 인플루엔자 펩티드 에피토프는 혈구응집소(HA) 펩티드 에피토프, 기질 단백질(M1 또는 M2) 펩티드 에피토프, 그리고 핵단백질(NP) 펩티드 에피토프로 구성된 군에서 선택된다. 특정의 바람직한 구체예에서, 상기 펩티드 에피토프는 표 1에 따른 에피토프 E1 내지 E9로 구성된 군에서 선택된다.
- [0049] 표 1에서 선택되는 에피토프를 포함하는 다양한 전형적인 구체예가 제시되는데, 여기서 각 에피토프에 대한 반복부위의 숫자는 동일하거나 상이하고, 그리고 폴리펩티드는 교대 순차적 중합체 구조 또는 블록 공중합체 구조로 정렬될 수 있다. "교대 순차적 중합체" 구조는 폴리펩티드에 내포된 모든 에피토프의 단일 사본이 순차적으로 정렬되고, 이러한 정렬(arrangement)이 반복부위의 숫자에 동등한 횟수로 순차적으로 반복된다는 것을 의미한다. 가령, 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드가 교대 순차적 구조에서 3가지 에피토프 X_1 , X_2 와 X_3 의 4개 반복부위를 포함하면, 상기 폴리펩티드는 아래의 중합체 구조를 보유한다: $X_1X_2X_3-X_1X_2X_3-X_1X_2X_3-X_1X_2X_3$ (또는 $[X_1X_2X_3]_4$). "블록 공중합체" 구조는 폴리펩티드에 내포된 단일 에피토프의 모든 사본이 인접하게 정렬된다는 것을 의미한다. 가령, 블록 공중합체 구조에서 3가지 에피토프 X_1 , X_2 와 X_3 의 4개 반복부위를 포함하는 유사한 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드는 아래의 중합체 구조를 보유한다: $X_1X_1X_1X_1-X_2X_2X_2X_2-X_3X_3X_3X_3$ (또는 $[A]_4-[B]_4-[C]_4$).
- [0050] 일부 구체예에 따라서, 스페이서의 최소한 하나의 아미노산은 폴리펩티드의 조각(segment)(가령, 프롤린 잔기)에서 특이적 배열(conformation)을 유도한다.
- [0051] 또 다른 구체예에 따라서, 스페이서는 절단가능 서열을 포함한다. 한 구체예에 따라서, 절단가능 스페이서는 세포내 효소(intracellular enzyme)에 의해 절단된다. 더욱 특정한 구체예에 따라서, 절단가능 스페이서는 프로테아제 특이적 절단가능 서열을 포함한다.
- [0052] 일부 구체예에 따라서, 다중체 폴리펩티드는 가급적, 담체 용합 단백질에 접합되지 않고 담체 용합 단백질이 부재한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 담체 서열을 더욱 포함할 수 있다, 다시 말하면, 펩티드 에피토프가 담체 폴리펩티드의 서열 내로 삽입되거나, 또는 담체 서열에 결합된다. 일부 구체예에 따라서, 다중체 폴리펩티드는 담체 서열을 포함하는 재조합 용합 단백질로서 생산된다.
- [0053] 일부 특정한 구체예에서, 담체 서열은 세균 플라젤린 또는 이의 일부분이다. 특정한 구체예에서, 다중-에피토프 폴리펩티드는 플라젤린의 초가변 영역(hypervariable region) 내에 삽입되고, 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함하는 재조합 플라젤린 용합 단백질을 형성한다. 다른 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 담체 단백질의 아미노 말단(amino terminal) 또는 카르복시 말단(carboxy terminal) 부분에 융합된다.
- [0054] 다른 측면에 따라서, 본 발명에서는 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드를 인코딩(encoding)하는 단리된(isolated) 폴리뉴클레오티드 서열을 제시한다.
- [0055] 일부 구체예에 따라서, 이들 단리된 폴리뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, 그리고 SEQ ID NO:88로 구성된 군에서 선택되는 폴리펩티드 서열을 인코딩한다.
- [0056] 특정한 구체예에 따라서, 이들 단리된 폴리뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, 그리고 SEQ ID NO:87로 구성된 군에서 선택되는 서열을 포함한다.
- [0057] 또 다른 측면에 따라서, 본 발명에서는 인플루엔자에 대한 개체의 면역화를 위한 백신 조성물을 제시하는데, 이들 백신 조성물은 교대 순차적 중합체 구조 $(X_1X_2X_3\cdots)_n$ 또는 블록 공중합체 구조 $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n\cdots(X_m)_n$ 로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 최소한 하나의 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함한다.
- [0058] 일부 구체예에 따라서, 백신 조성물은 최소한 2개의 이와 같은 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에 따라서, 백신은 2개의 폴리펩티드를 포함하는데, 여기서 첫 번째 폴리펩티드는 복수의 B-세포 유형 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하고, 두 번째 폴리펩티드는 복수의 T-세포 유형 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프

를 포함한다. 특정한 구체예에 따라서, 첫 번째 폴리펩티드는 폴리펩티드[E1E2E3E4E5]₆이고, 여기서 E1은 HA 354-372(SEQ ID NO:82)이고, E2는 HA 91-108(SEQ ID NO:48)이고, E3은 M1 2-12(SEQ ID NO:25)이고, E4는 HA 150-159(SEQ ID NO:52)이고, 그리고 E5는 HA 143-149(SEQ ID NO:51)이고; 두 번째 폴리펩티드는 폴리펩티드[E7E8E9E6]₆이고, 여기서 E6은 NP 206-229(SEQ ID NO:64)이고, E7은 HA 307-319(SEQ ID NO:59)이고, E8은 NP 335-350(SEQ ID NO:69)이고, 그리고 E9는 NP 380-393(SEQ ID NO:70)이고, 또는 폴리펩티드 [E7E8E9E6]_n을 포함하는 융합 담체 단백질이고, 여기서 n은 6이고, E6은 NP 206-229(SEQ ID NO:64)이고, E7은 HA 307-319(SEQ ID NO:59)이고, E8은 NP 335-350(SEQ ID NO:69)이고, 그리고 E9는 NP 380-393(SEQ ID NO:70)이다.

[0059] 본 발명의 다른 측면에서는 개체의 면역화를 위한 백신을 제시하는데, 상기백신은 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 백신은 각 에피토프의 최소한 3개 반복부위, 대안으로 각 에피토프의 최소한 4개 반복부위, 대안으로 각 에피토프의 최소한 5개 반복부위, 대안으로 각 에피토프의 최소한 6개 반복부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 이들 에피토프는 스페이서에 의해 분리되고, 상기 스페이서는 단일 아미노산, 또는 최소한 2개 아미노산의 펩티드일 수 있다.

[0060] 일부 구체예에서, 백신은 최소한 2개 인플루엔자 펩티드 에피토프를 포함하는데, 여기서 최소한 하나의 에피토프는 B-세포 유형 에피토프, T-보조(Th) 유형 에피토프, 그리고 CTL 유형 에피토프로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 인플루엔자 펩티드 에피토프는 혈구응집소(HA) 펩티드 에피토프, M1 펩티드 에피토프, M2 펩티드 에피토프, 그리고 NP 펩티드 에피토프로 구성된 군에서 선택된다. 바람직한 구체예에서, 펩티드 에피토프는 상기 표1에서 에피토프 E1 내지 E9로 구성된 군에서 선택된다.

[0061] 한 구체예에서, 백신은 교대 순차적 중합체 구조 [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]₃에 따라 정렬된, 9가지 에피토프 E1-E9의 3개 반복부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 백신은 교대 순차적 중합체 구조 [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]₅에 따라 정렬된, 이들 9가지 에피토프의 5개 반복부위를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 백신은 블록 공중합체 구조 [E1]₃-[E2]₃-[E3]₃-[E4]₃-[E5]₃-[E6]₃-[E7]₃-[E8]₃-[E9]₃에 따라 정렬된, 이들 9가지 에피토프의 3개 반복부위를 포함한다.

[0062] 또 다른 구체예에서, 백신은 블록 공중합체 구조 [E1]₆-[E2]₆-[E3]₆-[E4]₆-[E5]₆-[E6]₆-[E7]₆-[E8]₆-[E9]₆에 따라 정렬된, 이들 9가지 에피토프의 6개 반복부위를 포함한다.

[0063] 본 발명의 다른 측면에서는 인플루엔자에 대한 백신을 제시하는데, 상기 백신은 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드의 혼합물을 포함하고, 여기서 첫 번째 폴리펩티드는 복수의 B-세포 유형 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하고, 두 번째 폴리펩티드는 복수의 T-세포 유형 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함한다. 각각의 다중-에피토프 폴리펩티드는 담체 단백질과의 융합 단백질의 일부일 수 있다.

[0064] 일부 구체예에 따라서, 본 발명에 따른 백신 조성물은 어쥬번트를 포함하지 않는다. 다른 구체예에 따라서, 상기 백신은 어쥬번트를 더욱 포함한다.

[0065] 제약학적으로 허용되는 어쥬번트에는 유중수 에멀전(water in oil emulsion), 지질 에멀전(lipid emulsion), 그리고 리포솜(liposome)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특정한 구체예에 따라서, 어쥬번트는 Montanide[®], 명반(alum), 무라밀 디펩티드(muramyl dipeptide), Gelvac[®], 키틴 마이크로입자(chitin microparticle), 키토산(chitosan), 콜레라 독소(cholera toxin) 아단위 B, Intralipid[®], 그리고 Lipofundin[®]로 구성된 군에서 선택된다. 현재의 바람직한 구체예에 따라서, 어쥬번트는 Montanide[®]이다.

[0066] 일부 구체예에서, 백신은 근육내(intramuscular), 비강내(intranasal), 경구(oral), 복강내(intraperitoneal), 피하(subcutaneous), 국소(topical), 피내(intradermal)와 경피(transdermal) 전달용으로 조제된다. 일부 구체예에서, 백신은 비강내 투여된다. 다른 구체예에서, 백신은 근육내 투여된다. 또 다른 구체예에서, 백신은 피내 투여된다.

[0067] 다른 구체예에 따라서, 본 발명에서는 개체에서 면역 반응을 유도하고 인플루엔자로부터 보호를 제공하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 교대 순차적 중합체 구조 (X₁X₂X₃...) _n 또는 블록 공중합체 구조 (X₁)_n(X₂)_n(X₃)_n... (X_m)_n로 정렬된 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프의 다중 사본을 포함하는 최소한 하나의 합성 또는 재조합 인플루엔자 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함하는 백신 조성물을 상기 개체에 투여하

는 단계를 포함한다.

- [0068] 백신의 투여 경로는 근육내, 비강내, 경구, 복강내, 피하, 국소, 피내, 그리고 경피 전달에서 선택된다. 바람직한 구체예에 따라서, 백신은 비강내, 근육내 또는 피내 투여된다.
- [0069] 인플루엔자에 대한 면역화를 위한 백신 조성물의 제조에서 본 발명에 따른 폴리펩티드의 용도, 그리고 폴리뉴클레오티드의 생산을 위한 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드의 용도 역시 본 발명의 범위에 들어간다.
- [0070] 본 발명에 개시된 모든 다중체 폴리펩티드는 재조합 단백질로서, 융합 단백질로서, 그리고 화학 합성(chemical synthesis)에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 측면에서는 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함하는 재조합 단백질을 제시한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 세균 플라젤린의 추가변 영역 내에 삽입된다.
- [0071] 본 발명의 다른 측면에서는 최소한 하나의 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드와 최소한 하나의 추가적인 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제시한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 세균 플라젤린 또는 이의 일부분에 융합된다. 특정한 구체예에서, 블록 공중합체 구조 $[E1]_6-[E2]_6-[E3]_6-[E4]_6-[E5]_6-[E6]_6-[E7]_6-[E8]_6-[E9]_6$ 에 따라 정렬된, 9가지 에피토프의 6개 반복부위를 포함하는 폴리펩티드가 세균 플라젤린 또는 이의 일부분에 융합된다.
- [0072] 본 발명의 다른 측면에서는 단일 결합, 아미노산, 그리고 최소한 2개 아미노산을 포함하는 펩티드로 구성된 군에서 선택되는 스페이스에 의해 연결된 복수의 합성 펩티드 에피토프를 포함하는 합성 다중체 폴리펩티드를 제시한다.
- [0073] 본 발명에는 인플루엔자에 대한 면역화를 위한 합성 다중체 폴리펩티드 역시 포함된다.
- [0074] 본 발명의 다른 측면에서는 인플루엔자에 대한 개체의 면역화를 위한 제약학적 조성물을 제시하는데, 이러한 제약학적 조성물은 본 발명에 따른 폴리펩티드, 또는 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0075] 본 발명의 다른 구체예와 전체 적용 범위는 하기에 제공된 상세한 설명으로부터 명백할 것이다. 하지만, 이러한 상세한 설명과 특이적 실례는 본 발명의 선호되는 구체예를 지시하긴 하지만, 단지 예시로서 제공되는데, 그 이유는 본 발명의 기술적 사상과 범위 내에서 다양한 개변이 이러한 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이기 때문이다.

과제의 해결 수단

- [0076] **본 발명의 상세한 설명**
- [0077] 본 발명에서는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드, 그리고 복수의 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프를 포함하는, 이들 폴리펩티드에 기초한 백신을 제시한다. 본 발명에 따른 폴리펩티드는 각 에피토프의 최소한 2개 반복부위를 포함한다. 적절하게는, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 각 에피토프의 최소한 3개 반복부위를 포함한다. 본 발명에서는 또한, 이런 폴리펩티드에 기초한 백신과 이들의 이용 방법을 제시한다.
- [0078] 인플루엔자 단백질로부터 유래된 펩티드 에피토프는 인플루엔자에 대한 백신을 제조하는데 유용하다. 하지만, 각 펩티드 단독은 면역계에 거의 무의하고, 급속하게 분해되고, 불충분한 면역 반응을 유발한다. 면역원성 펩티드의 다중 사본이 단일 폴리펩티드로서 면역계에 제공될 때, 에피토프-특이적 면역 반응의 크기가 강화된다. 가령, 한 가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 단일 사본을 포함하는 재조합 플라젤린 융합 단백질에 기초한 백신은 대략 1:28의 에피토프/플라젤린 비율을 제시한다. 각각 여러 사본에서 복수의 에피토프를 포함하는 다중-에피토프 백신을 이용함으로써, 최대 2:1의 에피토프/플라젤린 비율이 달성될 수 있다. 본 발명에서는 공지된 구조체와 형태(configuration)와 비교하여 강화된 면역원성을 갖는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드를 개시한다. 이들 폴리펩티드는 각각, 복수의 에피토프를 포함하는데, 여기서 각 에피토프는 다중 사본에서 반복된다. 각 에피토프의 다중 사본 또는 반복부위는 각 에피토프의 블록으로서 인접할 수 있다. 대안으로, 복수의 에피토프가 미리 결정된 서열에서 나타날 수 있는데, 여기서 상기 서열은 폴리펩티드 내에서 다회 반복된다. 이들 양쪽 유형의 다중 에피토프 형태는 인플루엔자에 대한 면역(immunity)을 개체에 공여함에 있어 예상치 않게 우수한 결과를 제공하는 것으로 밝혀졌다.
- [0079] 정의
- [0080] 편의를 위하여, 상세한 설명, 실시예와 특허청구범위에 이용되는 특정 용어가 여기에 기술된다.

- [0081] "항원 제시"는 동물의 주요 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex) 클래스 I 또는 클래스 II 분자(MHC-I 또는 MHC-II), 또는 인간의 HLA-I 또는 HLA-II와 공동으로, 세포의 표면 상에서 항원의 발현을 의미한다.
- [0082] "면역원성"은 면역 반응을 촉진하거나 유도하는 물질의 능력을 지칭한다. 면역원성은 예로써, 상기 물질에 특이적인 항체의 존재를 결정함으로써 측정된다. 항체의 존재는 예로써, ELISA 검사법을 비롯한 당분야에 공지된 방법에 의해 검출된다.
- [0083] 인플루엔자 에피토프는 유도되는 면역 반응의 유형에 따라서, B-세포 유형, T-세포 유형, 또는 B 세포와 T 세포 이종 유형으로 분류될 수 있다. B 세포 또는 T 세포 펩티드 에피토프의 정의는 명료하지 않다; 가령, 펩티드 에피토프는 항체 생산을 유도할 수 있지만, 이와 동시에 상기 에피토프는 인간 HLA 분자에 결합을 가능하게 하고, CTL에 접근을 가능하게 하며, 따라서 상기 특정 에피토프에 대한 B 세포와 T 세포 이종 분류를 가능하게 하는 서열을 보유할 수 있다. "CTL", "킬러 T 세포" 또는 "세포독성 T 세포"는 바이러스 감염과 암 세포에 대한 방어에서 기능하는 특이적 외래 항원을 보유하는 표적 세포(target cell)를 인식하고 용해시키는 일군의 분화된 T 세포이다. "T 보조 세포" 또는 "Th"는 특이적 항원에 의해 자극될 때, B 세포와 킬러 T 세포의 활성화와 기능을 촉진하는 사이토킨(cytokine)을 방출하는 임의의 T 세포이다.
- [0084] "재조합 플라젤린 융합 단백질"은 자신의 서열 내에 끼여 있는 펩티드 에피토프 또는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함하는 플라젤린 폴리펩티드, 또는 대안으로, N- 또는 C-말단에서 펩티드 에피토프 또는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드에 융합된 플라젤린 폴리펩티드의 일부분을 지칭한다.
- [0085] 본 명세서에서, "아미노산 서열"은 올리고펩티드, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열, 그리고 이의 단편, 그리고 자연 발생 또는 합성 분자를 지칭한다.
- [0086] 상세한 설명과 특허청구범위에서, "스페이스"는 폴리펩티드 서열 내에, 한쪽 말단에, 또는 2가지 에피토프 사이에 존재하는 임의의 화학적 화합물을 의미한다. 적절하게는, 스페이스는 1-4개 아미노산 잔기로 구성된다. 스페이스는 효소 수단에 의해 절단될 수 있거나, 자발적으로 분해하는 서열을 포함할 수 있다. 스페이스는 폴리펩티드에 유익한 배열을 강화 또는 유도할 수 있다. 스페이스는 선택적으로, 프로테아제 특이적 절단가능 서열을 포함할 수 있다.
- [0087] 백신을 제조하는데 유용한 펩티드 에피토프
- [0088] 본 발명의 바람직한 구체예에 따라서, 펩티드 에피토프는 HA, M1, M2, 그리고 NP로 구성된 군에서 선택되는 인플루엔자 단백질로부터 유래된다. 에피토프는 또한, 그들의 유형(B-세포 유형, Th 유형, 그리고 CTL 유형)에 따라서 선택될 수도 있다.
- [0089] 본 발명에 개시된 펩티드 에피토프는 예시의 목적으로만 제공된다. 인플루엔자 바이러스 단백질은 분리체(isolate) 간에 달라지고, 따라서 각 인플루엔자 단백질에 대한 다중 변이 서열(multiple variant sequence)을 제공한다. 따라서 본 발명에는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 보유하는 펩티드 에피토프가 포함된다.
- [0090] 기질 단백질 M1은 인플루엔자 바이러스 입자의 주요 구조 성분(structural component)이고 지질 세포-유래된 외피의 내부층(inner layer)을 형성한다. 비리온 내에서, 그리고 바이러스 복제의 후기 단계(late stage)에서 감염된 세포에서, M1 단백질은 바이러스 RNA 분자, 핵단백질의 다중 사본, 그리고 바이러스 RNA의 단부(end)를 껴안은 바이러스 중합효소(polymerase)의 3개 아단위로 구성되는 바이러스 리보핵단백질(virus ribonucleoprotein, vRNP)과 연합한다. M1의 N-말단 도메인(terminal domain)은 M1 단백질의 아미노산 1 내지 대략 아미노산 20을 지칭한다.
- [0091] 기질 단백질 M2는 공포(vacuole) 내에서 기질과 핵단백질 복합체의 분리를 결과하는 수소 이온 채널(hydrogen ion channel)이다. 이러한 이온 채널은 계능을 방출시켜, 바이러스 RNA가 감염된 세포의 핵으로 들어가 바이러스 복제를 개시하도록 할 수 있다. 인플루엔자에 대한 치료 물질(therapeutic substance), 예를 들면, 아만타딘(amantadine)과 리만타딘(rimantadine)은 M2 활성을 차단함으로써 기능한다. 인플루엔자 B는 NB로 알려져 있는 대응 단백질(counterpart protein)을 보유한다; M2와 NB 사이에 서열 유사성(sequence similarity)이 존재하지 않지만, 이들 둘 모두 막통과 단백질이고 유사한 기능을 공유한다. 인플루엔자 A 바이러스의 막통과 단백질인 M2 단백질의 세포외 도메인은 모든 인플루엔자 A 균주에서 거의 불변이다. M2의 N-말단 도메인은 상기 막통과 도메인의 N-말단에 위치하는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0092] 표 2에서는 본 발명에 따른 다중체 폴리펩티드의 제조에 이용될 수 있는 M1과 M2 펩티드 에피토프의 예시적인 목록을 제시한다.

표 2

[0093] M1과 M2 펩티드 에피토프

에피토프 유형	단백질 잔기	아미노산 서열	SEQ ID NO:
	M2 6-9	EVET	1
Th	M2 1-15	MSLLTEVETHTRNGW	2
	M2 10-18	PIRNEWGCR	3
	M2 8-15	ETPIRNEWGC	4
	M2 10-20	PIRNEWGCRCN	5
CTL	M2 3-11	LLTEVETPI	6
CTL	M2 2-10	SLLTEVETP	7
CTL	M2 2-11	SLLTEVETPI	8
CTL	M2 4-11	LTEVETPLT	9
Th	M2 1-15	MSLLTEVETPIRNEW	10
Th	M2 1-18	MSLLTEVETPIRNEWGCR	11
Th	M2 1-15	MSLLTEVETLTNGW	12
Th	M2 1-15	MSLLTEVETLTRNGW	13
CTL	M2 4-12	LTEVETPIR	14
CTL	M2 4-13	LTEVETPIRN	15
CTL	M2 6-14	EVETPIRNE	16
CTL	M2 6-15	EVETPIRNEW	17
CTL	M2 4-14	LTEVETPIRNE	18
Th	M2 4-18	LTEVETPIRNEWGCR	19
B 세포	M2 6-13	EVETPIRN	20
B 세포	M2 1-18	MSLLTEVETPTRNEWECR	21
B 세포	M2 2-24	SLLTEVETPTRNEWECRSDSSD	22
B 세포	M2 2-24	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	23
B 세포	M2 7-15	VETPIRNEW	24
B 세포	M1 2-12	SLLTEVETYVL	25
CTL	M1 2-12	SLLTEVETYVP	26
CTL	M1 3-11	LLTEVETYV	27
CTL	M1 13-21	SIVPSGPL	28
CTL	M1 17-31	SGPLKAEIAQRLEDV	29
CTL	M1 18-29	GPLKAEIAQRLE	30
CTL	M1 27-35	RLEDVFAGK	31
CTL	M1 41-51	ALMEWLKTRPI	32
CTL	M1 50-59	PILSPLTKGI	33
CTL	M1 51-59	ILSPLTKGI	34
CTL	M1 55-73	LTKGILGFVFTLTVP SERG	35
CTL	M1 56-68	TKGILGFVFTLTV	36
CTL	M1 57-68	KGILGFVFTLTV	37
CTL	M1 58-66	GILGFVFTL	38
CTL	M1 60-68	LGFVFTLTV	39
CTL	M1 59-67	ILGFVFTLT	40
CTL	M1 128-135	ASCMGLIY	41
CTL	M1 134-142	RMGAVTTEV	42
CTL	M1 145-155	GLVCATCEQIA	43
CTL	M1 164-172	QMVATNPL	44
CTL	M1 164-173	QMVATNPLI	45
CTL	M1 178-187	RMVLASTAK	46
CTL	M1 232-240	DLENLQTY	47

[0094] 핵단백질(NP)은 인플루엔자 A, B와 C 바이러스를 구별하는 특이적 항원 그룹중 하나이다. HA와 대조적으로, NP

는 고도로 보존되는데, 모든 인플루엔자 A 바이러스에서 94% 보존된다. 인플루엔자 A 바이러스 NP-특이적 항체는 바이러스 중화 활성(neutralizing activity)을 갖지 않지만, NP는 모든 유형 A 바이러스와 교차-반응하는 세포독성 T 림프구(CTL)에 대한 중요한 표적이다(Townsend, J Exp Med 1984 160(2):552-63). CTL은 인플루엔자 NP 분자의 선형 영역에 상응하는 짧은 합성 펩티드를 인식한다.

[0095] 혈구응집소(HA)는 인플루엔자 외피 내에 끼여 있는 당단백질 삼합체(trimer)이다. 이는 숙주 세포에 바이러스의 부착과 침투를 담당한다. HA에 대한 항체는 바이러스 전염성(infectivity)을 중화시킨다. 상기 분자의 항원 변이는 인플루엔자의 빈번한 발생과 면역화에 의한 감염의 불량한 통제에의 원인이다(Ada and Jones, Curr Top Microbial Immunol 1986;128:1-54).

[0096] 인플루엔자 바이러스 RNA 중합효소는 1:1:1 비율로 존재하는 3가지 중합효소(P) 단백질 PB1, PB2와 PA로 구성된 헤테로복합체(heterocomplex)이다. 인플루엔자 독력(virulence)에서 이들의 역할은 완전하게 밝혀지지 않았다. HA, NP, PB1과 PB2 펩티드 에피토프의 무제한적 실례는 표 3에 제시된다.

표 3

HA, NP와 PB 펩티드 에피토프.

[0097]

에피토프 유형	단백질 잔기	아미노산 서열	SEQ ID NO:
B 세포	HA 91-108	SKAYSNCYPYDVPDYASL	48
B 세포	HA 91-108	SKAFSNCYPYDVPDYASL	49
B 세포	HA 107-124	STAYSNCYPYDVPDYASL	50
B 세포	HA 143-149	WTGVTQN	51
B 세포	HA 150-159	WLTGKNGLYP	52
B 세포	HA 166-175	WLTEKEGSYP	53
Th	HA 306-324	PKYVKQNTLKLATGMRNP	54
CTL	HA 521-531	GVKLESMGIYQ	55
CTL	HA 518-528	EISGVKLESMG	56
CTL	HA 458-467	NVKNLYEKVK	57
Th	HA 128-145	KVKILPKDRWTQHTTTGG	58
Th	HA 307-319	PKYVKQNTLKLAT	59
Th	NP 91-99	KTGGPIYRR	60
CTL	NP 44-52	CTELKLSDY	61
CTL	NP 82-95	HPSAGKDPKKTGGP	62
CTL	NP 82-94	HPSAGKDPKKTGG	63
Th	NP 206-229	FWRGENGRKTRSAYERMCNILKGK	64
CTL	NP 265-273	ILRGSAHK	65
CTL	NP 305-313	KLLQNSQVY	66
CTL	NP 335-349	SAAFEDLRVLSFIRG	67
CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVSSFIRGT	68
CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVLSFIRGY	69
CTL	NP 380-393	ELRSRYWAIRTRSG	70
CTL	NP 380-388	ELRSRYWAI	71
CTL	NP 383-391	SRYWAIRTR	72
CTL	NP 384-394	YWAIRTRSGG	73
CTL	NP 382-390	SRYWAIRTR	74
CTL	NP 418-426	LPFDKPTIM	75
CTL	PB1 591-599	VSDGGPNLY	76
CTL	PB1 571-579	RRSFELKKL	77
CTL	PB2 368-376	RRATAILRK	78
CTL(flu B)	NP 30-38	RPIIRPATL	79
CTL(flu B)	NP 263-271	ADRGLLRDI	80
Th (flu B)	HA 308-320	PYYTGEHAKAIGN	81
B (flu B)	HA 354-372	PAKLLKERGFPGAIAGFLE	82

- [0098] 키메라 또는 재조합 분자
- [0099] "키메라 단백질", "키메라 폴리펩티드" 또는 "재조합 단백질"은 동의어로서 이용되고, 펩티드 에피토프가 유래된 폴리펩티드 이외의 폴리펩티드에 작동가능하게 연결된 인플루엔자 다중체 폴리펩티드를 지칭한다. 본 발명의 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드는 그 자체로 또는 키메라 단백질로서 발현 벡터에서 발현에 의해 제조될 수 있다. 하나 이상의 인플루엔자 펩티드 에피토프를 포함하는 키메라 또는 재조합 단백질을 생산하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 하나 이상의 인플루엔자 펩티드 에피토프를 인코딩하는 핵산 서열은 숙주 세포에서 증식과 발현을 위한 폴리뉴클레오타이드 구조체의 제조를 위하여 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 여러 에피토프의 다중 반복부위를 포함하는 폴리펩티드, 예를 들면, 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 구조체는 그들의 3'와 5' 단부에서 적절한 제한 부위(restriction site)를 보유하는 더욱 작은 폴리뉴클레오타이드 구조체의 결찰(ligation)에 의해 제조될 수 있다.
- [0100] 무제한적 실례에서, 본 발명의 키메라 폴리펩티드에는 아래의 폴리펩티드: 플라젤린, 콜레라 독소(Cholera toxin), 파상풍 독소(Tetanus toxin), 난백 알부민(Ovalbumin), 결핵 열 쇼크 단백질(Tuberculosis heat shock protein), 디프테리아 독소이드(Diphtheria Toxoid), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus)로부터 단백질 G, 뇌수막염(*Neisseria meningitides*)으로부터 외부 막 단백질(Outer Membrane Protein), 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus)의 핵단백질, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus)의 당단백질, 열대열 말라리아(*Plasmodium falciparum*) 항원 글루타민산염-풍부 단백질, 분열소체(Merozoite) 표면 단백질 3 또는 바이러스 외피 단백질 중에서 하나와 인플루엔자 펩티드 에피토프의 키메라가 포함된다.
- [0101] 본 명세서에서, "발현 벡터"와 "재조합 발현 벡터"는 특정 숙주 세포 내에서 발현을 위한 재조합 펩티드 에피토프의 발현에 필요한 적절한 핵산 서열을 포함하는 DNA 분자, 예를 들면, 플라스미드, 플라젤린 또는 바이러스를 지칭한다.
- [0102] 본 명세서에서, "작동가능하게 연결된"은 최소한 2개 서열의 기능적 연쇄(functional linkage)를 지칭한다. "작동가능하게 연결된"에는 프로모터와 두 번째 서열, 예를 들면, 본 발명의 핵산 사이의 연쇄(linkage)가 포함되는데, 여기서 상기 프로모터 서열은 상기 두 번째 서열에 상응하는 DNA 서열의 전사(transcription)를 개시하고 매개한다.
- [0103] 펩티드 에피토프의 전사에 필요한 조절 영역은 발현 벡터에 의해 제공될 수 있다. 유전자 발현에 필요한 조절 영역의 정확한 성격은 벡터와 숙주 세포 간에 달라질 수 있다. 일반적으로, RNA 중합효소에 결합하고 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 전사를 촉진할 수 있는 프로모터가 요구된다. 조절 영역에는 전사와 번역의 개시에 관여하는 5' 비-코딩(non-coding) 서열, 예를 들면, TATA 박스(box), 캡핑(capping) 서열, CAAT 서열 등이 포함된다. 코딩 서열(coding sequence)의 3'에 위치하는 비-코딩 영역은 전사 종결 조절 서열(transcriptional termination regulatory sequence), 예를 들면, 종결인자(terminator)와 폴리아데닐화 부위(polyadenylation site)를 포함한다. 전사 개시 코돈(translation initiation codon, ATG) 역시 제공될 수 있다.
- [0104] 벡터의 클로닝 부위(cloning site) 내로 핵산 서열을 클로닝(cloning)하기 위하여, 핵산의 합성 동안 적절한 제한 부위를 제공하는 링커(linker) 또는 어댑터(adapter)가 추가된다. 가령, 원하는 제한 효소(restriction enzyme) 부위는 원하는 제한 효소 부위를 포함하는 프라이머(primer)로 PCR의 이용에 의한 DNA의 증폭으로 DNA의 단편 내로 도입될 수 있다.
- [0105] 조절 영역에 작동가능하게 연결된 펩티드 에피토프 서열을 포함하는 발현 구조체는 그 자체로 또는 재조합 융합 단백질로서 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드의 발현과 생산을 위하여 적절한 숙주 세포내로 직접적으로 도입될 수 있다. 이용될 수 있는 발현 벡터에는 플라스미드, 코스미드(cosmid), 파지(phage), 파지미드(phagemid), 플라젤린 또는 변형된 바이러스가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 전형적으로, 이런 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내에서 벡터의 증식을 위한 기능성 복제 기점(origin of replication), 원하는 유전자 서열의 삽입을 위한 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제(restriction endonuclease) 부위, 그리고 하나 이상의 선별 마커(selection marker)를 포함한다.
- [0106] 발현 벡터와 다중체 폴리펩티드를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드 구조체는 이후, 세균 숙주 세포 내로 이전되는데, 여기서 상기 구조체는 복제되고 발현될 수 있다. 이는 당분야에 공지된 방법으로 달성될 수 있다. 발현 벡터는 세균, 효모, 곤충, 포유동물과 인간으로부터 유래되는 적합성 원핵(prokaryotic) 또는 진핵(eukaryotic) 숙주 세포와 함께 이용된다.

- [0107] 무제한적 실례에 따라서, 발현 벡터는 예로써, US 6,130,082에 개시된 바와 같은 플라젤린 벡터이다. 다른 특정한 구체예에 따라서, 플라스미드 벡터는 독특한 제한 부위를 보유하는 fliC 플라젤린 유전자를 포함하는데, 여기서 다중체 폴리펩티드는 플라젤린의 초가변 영역 내에 삽입되고, 이러한 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함하는 재조합 플라젤린 융합 단백질은 편모(flagella)-결합성 변이 살모넬라(*Salmonella*) 또는 대장균(*E. coli*)에서 발현된다. 재조합 플라젤린 융합 단백질을 발현하는 숙주 세포는 생존 백신(live vaccine)으로서 조제될 수 있다.
- [0108] 다중체 폴리펩티드의 생산
- [0109] 숙주 세포에 의해 일단 발현된 다중체 폴리펩티드는 다수의 단백질 정제 방법에 의해 원치 않는 성분으로부터 분리될 수 있다. 이와 같은 한 가지 방법은 재조합 단백질을 상에서 폴리히스티딘 태그(폴리히스티딘 tag)를 이용한다. 폴리히스티딘-태그(tag)는 종종, N- 또는 C-말단에서 재조합 단백질에 부가된 최소한 6개 히스티딘(His) 잔기에 존재한다. 폴리히스티딘-태그는 종종, 대장균(*E. coli*) 또는 다른 원핵 발현 시스템에서 발현되는 폴리히스티딘-태그된 재조합 단백질의 친화력 정제(affinity purification)에 이용된다. 세균 세포는 원심분리(centrifugation)에 의해 수확되고, 생성된 세포 펠릿(pellet)은 물리적 수단에 의해, 또는 세제(detergent) 또는 효소, 예를 들면, 라이소자임(lysozyme)으로 용해될 수 있다. 정제되지 않은 용해질(lysate)은 이 단계에서, 세균으로부터 유래된 여러 다른 단백질 중에서 재조합 단백질을 내포하고, 친화력 매체, 예를 들면, NTA-아가로오즈, HisPur 수지 또는 Talon 수지와 함께 항온 처리된다. 이들 친화력 매체는 폴리히스티딘-태그가 마이크로몰(micromolar) 친화력으로 결합하는 결합된 금속 이온(metal ion), 니켈(nickel) 또는 코발트(cobalt)를 내포한다. 상기 수지는 이후, 코발트 또는 니켈 이온과 특이적으로 상호작용하지 않는 단백질을 제거하기 위하여 인산염 완충액(phosphate buffer)으로 세척된다. 세척 효율(washing efficiency)은 20 mM 이미다졸(imidazole)의 첨가에 의해 향상될 수 있고, 단백질은 이후, 통상적으로 150-300 mM 이미다졸로 용리된다. 폴리히스티딘 태그는 제한 효소, 엔도프로테아제 또는 엑소프로테아제를 이용하여 차후에 제거된다. 히스티딘-태그된 단백질의 정제를 위한 키트는 예로써, Qiagen으로부터 구입할 수 있다.
- [0110] 다른 방법은 재조합 폴리펩티드가 원핵생물(prokaryote)에서 발현될 때 형성되는 단백질의 비활성 집합체인 봉입체(inclusion body)의 생산이다. cDNA가 번역가능 mRNA를 적절하게 코딩한다 하더라도, 생성되는 단백질이 정확하게 접힘(folding)되지 않거나, 또는 부가된 펩티드 에피토프의 소수성(hydrophobicity)이 재조합 폴리펩티드를 불용해성으로 변화시킬 수 있다. 봉입체는 당분야에 널리 공지된 방법으로 용이하게 정제된다. 봉입체의 정제를 위한 다양한 절차는 당분야에 공지되어 있다. 일부 구체예에서, 이들 봉입체는 원심분리에 의해 세균 용해질로부터 회수되고, 집합된 재조합 단백질로부터 가능한 많은 세균 단백질을 제거하기 위하여 세제와 킬레이트제(chelating agent)로 세척된다. 가용성 단백질을 획득하기 위하여, 세척된 봉입체는 변성제(denaturing agent)에 용해되고, 방출된 단백질은 이후, 희석(dilution) 또는 투석(dialysis)에 의한 변성 시약의 점진적인 제거에 의해 재접힘(refolding)될 수 있다(예로써, Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Sambrook, J. and Russell, D. W., 2001; CSHL Press 참조).
- [0111] 대안으로, 재조합 플라젤린 융합 단백질은 본래 편모를 형성하는 능력을 유지한다. 본래 편모의 정제를 위한 다양한 절차는 당분야에 공지되어 있다. 한 구체예에서, 세균의 부모, 플라젤린-결합성 운동불능(nonmotile) 균주에 의해 발현된 재조합 플라젤린 분자는 기능성 편모를 생산한다.
- [0112] 백신 제제
- [0113] 본 발명의 백신은 다중-에피토프 폴리펩티드, 또는 다중-에피토프 폴리펩티드를 포함하는 재조합 융합 단백질, 그리고 선택적으로, 어쥬번트를 포함한다. 백신은 많은 상이한 양식 중에서 한 가지 양식으로 투여용으로 조제될 수 있다. 본 발명의 한 구체예에 따라서, 백신은 비강내 투여된다. 백신 제제는 임의의 편의한 방식으로 코의 림프 조직(lymphatic tissue)에 적용될 수 있다. 하지만, 백신 제제는 비관(nasal passage)의 벽에 액상 흐름(liquid stream) 또는 액상 액적(liquid droplet)으로 적용하는 것이 바람직하다. 이러한 비강내 조성물은 예로써, 점비약(nose drop)으로서, 스프레이(spray)로서, 또는 흡입에 적합한 액상 형태로, 분말로서, 크림으로서, 또는 에멀전으로서 조제될 수 있다. 상기 조성물은 다양한 첨가제(additive), 예를 들면, 어쥬번트(adjuvant), 부형제(excipient), 안정화제(stabilizers), 완충제(buffer), 또는 보존제(preservative)를 내포할 수 있다.
- [0114] 간편한 적용을 위하여, 백신 조성물은 가급적, 점비약(nose drop) 또는 에어로졸의 형태로 폴리펩티드 또는 재조합 융합 단백질의 분배에 적합한 용기에 담겨 제공된다. 특정의 바람직한 구체예에서, 백신은 점막 전달, 특히 비강 전달용으로 조제된다(Arnon et al., Biologicals. 2001; 29(3-4):237-42; Ben-Yedidia et al., Int

Immunol. 1999; 11(7):1043-51).

- [0115] 본 발명의 다른 구체예에서, 투여는 경구 투여이고, 백신은 예로써, 정제 형태로 제공되거나, 또는 젤라틴 캡슐(gelatin capsule) 또는 마이크로캡슐(microcapsule)에 넣어진다.
- [0116] 또 다른 구체예에서, 백신은 비경구 투여용으로 조제된다. 일부 구체예에서, 백신은 대량 접종(mass inoculation) 목적으로, 예를 들면, 분사형 주사기(jet-injector) 또는 1회용 카트리지(single use cartridge)와 함께 이용을 위하여 조제된다. 또 다른 구체예에 따라서, 투여는 근육내 투여이다.
- [0117] 또 다른 구체예에 따라서, 투여는 피내 투여이다. 백신을 피내로 집어넣기 위하여 특수하게 설계된 바늘은 예로써, 6,843,781과 7,250,036에서 개시된 바와 같이 당분야에 공지되어 있다. 다른 구체예에 따라서, 투여는 바늘 없는 주사기(needleless injector)로 수행된다.
- [0118] 이들 양식의 제제는 당업자에게 일반적인 지식이다.
- [0119] 리포솜은 항원 전달과 제시를 위한 다른 전달 시스템을 제공한다. 리포솜은 항원 또는 다른 산물이 피포(encapsulation)될 수 있는 전형적으로 수성 중심(aqueous center)을 둘러싸는, 인지질(phospholipid)과 다른 스테롤(sterol)로 구성된 이중층 소포(bilayered vesicle)이다. 이러한 리포솜 구조는 매우 다능하고, 많은 유형이 대략 25 nm에서부터 대략 500 μ m까지 나노미터(nanometer) 내지 마이크로미터(micrometer) 범위의 크기를 갖는다. 리포솜은 치료제를 피부와 점막 표면으로 전달하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 리포솜은 예로써, 특이적 항체를 표면 막 내로 통합함으로써 표적화된 전달을 위하여 더욱 변경되거나, 또는 세균, 바이러스 또는 기생충을 피포하도록 변형될 수 있다. 본래 리포솜 구조의 평균 생존 기간(average survival time) 또는 반감기(half life)는 생체내에서 연장된 방출을 가능하게 하는 일정한 중합체(polymer), 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)의 포함으로 연장될 수 있다. 리포솜은 단일층(unilamellar) 또는 다중층(multilamellar)일 수 있다.
- [0120] 백신 조성물은 항원 또는 항원/어쥘런트 복합체를 리포솜에 피포하여 리포솜-피포된 항원을 형성하고, 이러한 리포솜-피포된 항원을 소수성 물질의 연속상(continuous phase)을 포함하는 담체와 혼합함으로써 조제될 수 있다. 항원/어쥘런트 복합체가 첫 번째 단계에서 이용되지 않으면, 담체가 리포솜-피포된 항원과 혼합되기 이전에 적절한 어쥘런트가 리포솜-피포된 항원, 리포솜-피포된 항원과 담체의 혼합물에, 또는 담체에 첨가될 수도 있다. 이러한 과정의 순서는 이용되는 어쥘런트의 유형에 좌우된다. 전형적으로, 명반과 같은 어쥘런트가 이용될 때, 어쥘런트와 항원은 먼저 혼합되어 항원/어쥘런트 복합체를 형성하고, 그 이후에 상기 항원/어쥘런트 복합체가 리포솜으로 피포된다. 생성된 리포솜-피포된 항원은 이후, 담체와 혼합된다. "리포솜-피포된 항원"은 문맥에 따라서, 항원 단독의 피포 또는 항원/어쥘런트 복합체의 피포를 지칭한다. 이는 어쥘런트와 항원 사이에 친밀한 접촉을 촉진하고, 최소한 부분적으로, 명반이 어쥘런트로서 이용될 때 면역 반응을 설명할 수 있다. 다른 어쥘런트가 이용될 때, 항원은 먼저 리포솜에 피포되고, 생성된 리포솜-피포된 항원은 이후, 소수성 물질에서 어쥘런트에 혼합된다.
- [0121] 실질적으로 물이 없는 백신 조성물을 조제하는 경우에, 항원 또는 항원/어쥘런트 복합체는 리포솜으로 피포되고 소수성 물질과 혼합된다. 소수성 물질에서 물의 에멀전에서 백신을 조제하는 경우에, 항원 또는 항원/어쥘런트 복합체는 수성 매체(aqueous medium)에서 리포솜으로 피포되고, 그 이후에 상기 수성 매체가 소수성 물질과 혼합된다. 에멀전의 사례에서, 소수성 물질을 연속상에 유지시키기 위하여, 리포솜을 내포하는 수성 매체는 혼합과 함께, 분취량(aliquot)으로 소수성 물질에 첨가될 수 있다.
- [0122] 모든 조제 방법에서, 리포솜-피포된 항원은 경우에 따라서, 소수성 물질 또는 수성 매체와 혼합에 앞서, 동결-건조(freeze-drying)될 수 있다. 일부 사례에서, 항원/어쥘런트 복합체는 리포솜에 의해 피포되고, 그 이후에 동결-건조될 수 있다. 다른 사례에서, 항원은 리포솜에 의해 피포되고, 그 이후에 어쥘런트가 첨가되고 동결-건조되어 외부 어쥘런트를 포함하는 동결-건조된 리포솜-피포된 항원을 형성할 수 있다. 또 다른 사례에서, 항원은 리포솜에 의해 피포되고, 그 이후에 어쥘런트의 첨가에 앞서 동결-건조될 수 있다. 동결-건조는 어쥘런트와 항원 사이에 더욱 강한 상호작용을 촉진하여 더욱 효과적인 백신을 결과할 수 있다.
- [0123] 리포솜-피포된 항원의 소수성 물질로의 조제는 또한, 소수성 물질 내에서 리포솜의 더욱 균등한 분포를 촉진하기 위하여 유화제(emulsifier)의 이용을 필요로 한다. 전형적인 유화제는 당분야에 널리 공지되어 있는데, 여기에는 만니드 올레산염(mannide oleate)(ArlacelTM A), 레시틴(lecithin), TweenTM 80, SpansTM 20, 80, 83과 85가 포함된다. 유화제는 리포솜의 균등한 분포를 촉진하는 효과량으로 이용된다. 전형적으로, 소수성 물질

대(對) 유화제의 부피 비율(v/v) 범위는 대략 5:1 내지 대략 15:1이다.

- [0124] 마이크로입자(microparticle)와 나노입자(nanoparticle)는 백신 전달을 위한 저장소(depot)로서 기능하는 작은 생물분해성 구체를 이용한다. 중합체 마이크로구체가 다른 저장소-달성 어쥬번트에 비하여 갖는 주요한 이점은 이들이 극히 안정하고, 봉합선(suture)으로서 인간 의학에서 이용과 생물분해성 약물 전달 시스템으로서 이용 목적으로 미국 식품의약국의 승인을 받았다는 점이다(Langer R. Science. 1990; 249(4976):1527-33). 공중합체 가수분해(hydrolysis) 속도는 충분히 특성화되고, 이는 차례로, 연장된 기간 동안 지속된 항원 방출을 갖는 마이크로입자의 제조를 가능하게 한다(O'Hagen, et al., Vaccine. 1993;11(9):965-9).
- [0125] 마이크로입자의 비경구 투여는 특히, 이들이 연장된 방출 특성을 통합하는 경우에, 장기적인 면역을 유도한다. 방출 속도는 다양한 기간 동안 가수분해하는 중합체의 혼합물과 그들의 상대적인 분자량(relative molecular weight)에 의해 조정될 수 있다. 특정 이론에 한정됨 없이, 상이한 크기(1 μ m 내지 200 μ m)를 갖는 입자의 조제 역시 장기적인 면역 반응에 기여하는데, 그 이유는 대형 입자가 대식세포 흡수(macrophage uptake)에 가용하기 이전에 더욱 작은 입자로 파괴되어야 하기 때문이다. 이러한 방식으로, 다양한 입자 크기를 통합함으로써 항원 체시를 연장하고 목축업자(livestock producer)에게 많은 이익을 주는 단일-주사 백신이 개발될 수 있다.
- [0126] 일부 적용에서, 어쥬번트 또는 부형제가 백신 제제에 포함될 수 있다. 예로써, Montanide™(불완전 Freund 어쥬번트)와 명반이 인간에게 이용하기 적합한 어쥬번트이다. 어쥬번트의 선택은 부분적으로, 백신의 투여 방식에 의해 결정될 것이다. 가령, 비-주사 예방 접종은 더욱 높은 전체 순응도(overall compliance)와 더욱 적은 전체 비용(overall cost)으로 이어질 것이다. 바람직한 투여 방식은 근육내 투여이다. 다른 바람직한 투여 방식은 비강내 투여이다. 비강내 어쥬번트의 무제한적 실례에는 키토산 분말, PLA와 PLG 마이크로구체, QS-21, 인산칼슘(calcium phosphate) 나노입자(CAP)와 mCTA/LTB(열 불안정성 장독소(heat labile enterotoxin)의 펜타머(pentameric) B 아단위를 포함하는 변이 콜레라 독소 E112K)가 포함된다.
- [0127] 또한, 이용되는 어쥬번트는 이론적으로, 펩티드- 또는 단백질-기초된 백신에 대한 공지된 임의의 어쥬번트일 수 있다. 예를 들면, 겔 형태(gel form)의 무기 어쥬번트(수산화알루미늄(aluminium hydroxide)/인산알루미늄(aluminium phosphate), Warren et al., 1986; 인산칼슘(calcium phosphate), Relyvelt, 1986); 세균 어쥬번트, 예를 들면, 모노포스포릴 지질 A(Ribi, 1984; Baker et al., 1988)와 무라밀 펩티드(Ellouz et al., 1974; Allison and Byars, 1991; Waters et al., 1986); 미립자 어쥬번트, 예를 들면, 소위 ISCOMS("면역촉진 복합체(immunostimulatory complex", Mowat and Donachie, 1991; Takahashi et al., 1990; Thapar et al., 1991), 리포솜(Mbawuik et al. 1990; Abraham, 1992; Phillips and Emili, 1992; Gregoriadis, 1990)과 생물분해성 마이크로구체(Marx et al., 1993); 오일 에멀전과 유화제에 기초된 어쥬번트, 예를 들면, IFA("불완전 Freund 어쥬번트" (Stuart-Harris, 1969; Warren et al., 1986), SAF(Allison and Byars, 1991), 사포닌(saponine) (가령, QS-21; Newman et al., 1992), 스쿠알렌(squalene)/스쿠알란(squalane)(Allison and Byars, 1991); 합성 어쥬번트, 예를 들면, 비-이온성 블록 공중합체(Hunter et al., 1991), 무라밀 펩티드 유사체(Azuma, 1992), 합성 지질 A(Warren et al., 1986; Azuma, 1992), 합성 폴리뉴클레오티드(Harrington et al., 1978)와 다가양이온성(polycationic) 어쥬번트(WO 97/30721).
- [0128] 본 발명의 면역원과 함께 이용되는 어쥬번트에는 알루미늄 또는 칼슘 염(가령, 수산화물 또는 인산염)이 포함된다. 본 발명에 이용하기 특히 적합한 어쥬번트는 알루미늄 수산화물 겔, 예를 들면, Alhydrogel™이다. 인산칼슘 나노입자(CAP)는 Biosante, Inc(Lincolnshire, Ill.)에 의해 개발된 어쥬번트이다. 관심 있는 면역원은 입자의 외부에 코팅되거나, 또는 입자 내부에 피포될 수 있다[He et al. (November 2000) Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7(6):899-903].
- [0129] 본 발명의 면역원과 함께 이용되는 다른 어쥬번트는 에멀전이다. 고려되는 에멀전은 수중유(oil-in-water) 에멀전 또는 유중수(water-in-oil) 에멀전일 수 있다. 면역원성 키메라 단백질 입자 이외에, 이런 에멀전은 널리 공지된 스쿠알렌, 스쿠알란, 땅콩기름 등의 오일 상(oil phase), 그리고 분산제(dispersing agent)를 포함한다. 비-이온성 분산제가 선호되는데, 이런 물질에는 소르비탄(sorbitan)과 만니드(mannide)의 모노-와 디-C₁₂-C₂₄-지방산 에스테르(fatty acid ester), 예를 들면, 소르비탄 모노-스테아르산염(sorbitan mono-stearate), 소르비탄 모노-올레산염(sorbitan mono-oleate)과 만니드 모노-올레산염(mannide mono-oleate)이 포함된다.
- [0130] 이런 에멀전은 예로써, 수성 상(aqueous phase)에서 키메라 단백질 입자로 유화된 스쿠알란과 선택적으로 함께, 스쿠알렌, 글리세롤과 계면활성제, 예를 들면, 만니드 모노-올레산염(mannide mono-oleate)(Arlacel™ A)을 포함하는 유중수 에멀전이다. 오일-상의 대안적 성분에는 알파-토코페롤(alpha-tocopherol), 혼성-사슬(mixed-

chain) 디-와 트리-글리세리드, 그리고 소르비탄 에스테르(sorbitan ester)가 포함된다. 이런 에멀전의 널리 공지된 실례에는 MontanideTM ISA-720, 그리고 MontanideTM ISA 703(Seppic, Castres, France)이 포함된다. 다른 수중유 에멀전 어쥬번트에는 WO 95/17210과 EP 0 399 843에 개시된 것들이 포함된다.

[0131] 소형 분자 어쥬번트의 이용 역시 본 발명에서 고려된다. 본 발명에 유용한 소형 분자 어쥬번트의 한 가지 유형은 U.S. Pat. No. 4,539,205, U.S. Pat. No. 4,643,992, U.S. Pat. No. 5,011,828과 U.S. Pat. No. 5,093,318에서 기술된 7-치환된-8-옥소- 또는 8-술포-구아노신 유도체이다. 7-알릴-8-옥소구아노신(록소리빈(loxoribine))은 항원-(면역원-) 특이적 반응을 유도하는데 특히 효과적인 것으로 밝혀졌다.

[0132] 유용한 어쥬번트에는 이전에 Ribi Immunochem, Hamilton, Mont이었던 Corixa Corp.(Seattle)에 의해 제조되는 널리 공지된 어쥬번트인 모노포스포릴 지질 A(MPL®), 3-테아실 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL®) 등이 포함된다. 상기 어쥬번트는 2% 스쿠알렌/TweenTM 80 에멀전에서, 세균으로부터 추출된 3가지 성분: 모노포스포릴 지질(MPL) A, 트레할로스 디미콜레이트(trehalose dimycolate, TDM)와 세포 벽 골격(CWS)(MPL+TDM+CWS)을 내포한다. 이러한 어쥬번트는 GB 2122204B에 교시된 방법으로 제조될 수 있다.

[0133] 다른 화합물은 아미노알킬 글루코사이드 인산염(aminoalkyl glucosamide phosphates, AGP)으로 불리는 MPL® 어쥬번트, 예를 들면, 명칭 RC-529TM 어쥬번트 {2-[(R)-3-테트라-데카노일옥시테트라데카노일아미노]-에틸-2-테옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라-데카노일]-2-[(R)-3-테트라-데카노일옥시테트라데카노일-아미노]-p-D-글루코피라노시드 트리에틸암모늄 염} 하에 Corixa Corp로부터 구입가능한 것들에 구조적으로 관련된다. RC-529 어쥬번트는 Corixa Corp로부터 RC-529SE로서 판매되는 스쿠알렌 에멀전과 RC-529AF로서 판매되는 수성 제제로 구입가능하다(참조: U.S. Pat. No. 6,355,257과 U.S. Pat. No. 6,303,347; U.S. Pat. No. 6,113,918; 그리고 U.S. Publication No. 03-0092643).

[0134] 더욱 고려되는 어쥬번트에는 Coley Pharmaceutical Group으로부터 구입가능한, CpG 뉴클레오티드 모티프(motif)(+ 측면 서열)를 1회 이상 포함하는 합성 올리고뉴클레오티드 어쥬번트가 포함된다. Aquila Biopharmaceuticals, Inc.로부터 구입가능한 명칭 QS21 어쥬번트는 남아메리카(South American)에 자생하는 퀴라자 사포나리아 모리나(Quillaja Saponaria Molina) 나무의 껍질로부터 유래된, 어쥬번트 활성을 갖는 면역학적 활성 사포닌 분획물(가령, QuilTM A)과 이의 생산 방법은 U.S. Pat. No. 5,057,540에서 개시된다. QuilTM A의 유도체, 예를 들면, QS21(QA21로 알려져 있는 QuilTM A의 HPLC 정제된 분획 유도체), 그리고 다른 분획물, 예를 들면, QA17 역시 개시된다.

[0135] 퀴라자 사포나리아 모리나(Quillaja Saponaria Molina) 사포닌의 반-합성과 합성 유도체, 예를 들면, U.S. Pat. No. 5,977,081과 U.S. Pat. No. 6,080,725에서 기술된 것들 역시 유용하다. Chiron Corp.으로부터 구입가능한 명칭 MF59 어쥬번트는 U.S. Pat. No. 5,709,879와 U.S. Pat. No. 6,086,901에서 기술된다.

[0136] 무라밀 디펩티드 어쥬번트 역시 고려되는데, 여기에는 N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thur-MDP), N-아세틸-노르-무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민[CGP 11637, nor-MDP], 그리고 N-아세틸무라밀-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닐-2-(1'-2'-디팔미토일-s-n-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시) 에틸아민[(CGP) 1983A, MTP-PE]가 포함된다. 소위 무라밀 디펩티드 유사체는 U.S. Pat. No. 4,767,842에서 기술된다.

[0137] 다른 어쥬번트 혼합물에는 3D-MPL과 QS21의 조합(EP 0 671 948 B1), 3D-MPL과 QS21을 포함하는 수중유 에멀전(WO 95/17210, PCT/EP98/05714), 다른 담체로 조제된 3D-MPL(EP 0 689 454 B1), 콜레스테롤-포함 리포솜에서 조제된 QS21(WO 96/33739), 또는 면역촉진 올리고뉴클레오티드(WO 96/02555)가 포함된다. 수중유 에멀전에서 QS21과 MPL을 내포하는, SKB(현재, Glaxo-SmithKline)로부터 구입가능한 어쥬번트 SBAS2(현재, ASO2) 역시 유용하다. 대안적 어쥬번트에는 WO 99/52549에서 기술된 것들과 폴리옥시에틸렌 에테르의 비-미립자 현탁액(non-particulate suspension)(UK Patent Application No. 9807805.8)이 포함된다.

[0138] 단독으로, 또는 톨-유사 수용체(toll-like receptor, TLR)-9에 대한 작동물질, 예를 들면, CpG 모티프-포함 비-메틸화된 올리고 데옥시뉴클레오티드와 함께, TLR-4에 대한 하나 이상의 작동물질(agonist)을 내포하는 어쥬번트, 예를 들면, MPL® 어쥬번트 또는 구조적으로 관련된 화합물, 예를 들면, RC-529® 어쥬번트 또는 지질 A 모방체(mimetic)의 이용 역시 선택가능하다.

[0139] 어쥬번트 혼합물의 다른 유형은 예로써, U.S. Pat. No. 6,113,918에서 기술된, 아미노알킬 글루코사민 인산염을 더욱 내포하는 안정적인 유중수 에멀전을 포함한다. 아미노알킬 글루코사민 인산염 중에서, RC-529 {(2-[(R)-3-

테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시-테트라데카노일]-2-[(R)-3--테트라데카노일옥시테트라-데카노일아미노]-p-D-글루코피라노시드 트리에틸암모늄 염))으로 알려져 있는 분자가 가장 선호된다. 선호되는 유증수 에멀전은 WO 9956776에서 기술된다.

- [0140] 어쥬번트는 어쥬번트 양으로 이용되는데, 이는 어쥬번트, 숙주 동물과 면역원에 따라 달라질 수 있다. 전형적인 양은 면역화에 대해 대략 1 .mcg에서부터 대략 1 mg까지 변할 수 있다. 당업자는 적절한 농도 또는 양을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.
- [0141] 수증유 에멀전에 기초된 어쥬번트를 포함하는 백신 조성물 역시 본 발명의 범위 내에 속한다. 유증수 에멀전은 예로써, US 7,323,182에서 기술된 바와 같이, 대사가능 오일과 사포닌을 포함할 수 있다. 이러한 오일과 사포닌은 예로써, 1:1 내지 200:1의 비율로 존재한다.
- [0142] 여러 구체예에 따라서, 본 발명에 따른 백신 조성물은 하나 이상의 어쥬번트를 포함할 수 있고, 실질적으로 무기 염 이온이 존재하지 않는 용액 또는 에멀전으로서 존재하는 것으로 특징되고, 여기서 상기 용액 또는 에멀전은 백신을 등장성(isotonic) 또는 저장성(hypotonic)으로 만들 수 있는 하나 이상의 물 용해성 또는 물-유화가능 물질을 내포한다. 물 용해성 또는 물-유화가능 물질은 예로써, 말토오스(maltose); 프럭토오스(fructose); 갈락토오스(galactose); 사카로오스(saccharose); 당 알코올(sugar alcohol); 지질(lipid); 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [0143] 본 발명의 제제는 선택적으로, 점막 전달-강화제(mucosal delivery-enhancing agent), 예를 들면, US 2004/0077540에서 기술된 바와 같이, 상피 접합 구조(epithelial junctional structure) 및/또는 생리(physiology)를 조정함으로써 점막 상피 세포간 수송(paracellular transport)을 가역적으로 강화시키는 투과성 펩티드(permeabilizing peptide)를 포함할 수 있다.
- [0144] 여러 특정한 구체예에 따라서, 본 발명의 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드는 프로테오솜(proteosome) 어쥬번트를 포함한다. 프로테오솜 어쥬번트는 수막염균(meningococci)의 외부 막 단백질의 정제된 제조물과 다른 세균으로부터 유사한 제조물을 포함한다. 이들 단백질은 고도로 소수성이고, 막통과 단백질과 포린(porin)으로서 그들의 역할을 반영한다. 이들 단백질은 그들의 소수성 단백질-단백질 상호작용으로 인하여, 적절하게 분리될 때 대략 60-100 nm 직경 완전 또는 단편 막 소포로 구성되는 다중-분자(multi-molecular) 구조를 형성한다. 이러한 리포솜-유사 물리적 상태(physical state)는 프로테오솜 어쥬번트가 단백질 담체로서, 그리고 어쥬번트로서 기능할 수 있도록 한다.
- [0145] 프로테오솜 어쥬번트의 용도는 기존 문헌에서 보고되었고 Lowell GH in "New Generation Vaccines", Second Edition, Marcel Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong (1997) pages 193-206에서 재조사된다. 프로테오솜 어쥬번트 소포는 소수성이고 인간에 이용하기 안전한 특정한 바이러스에 크기에서 필적하는 것으로 기술된다. 상기 재조사에서는 용해 세제(solubilizing detergent)가 철저한 투석(exhaustive dialysis) 기술에 의해 선택적으로 제거될 때 형성되는, 다양한 항원과 프로테오솜 어쥬번트 소포 사이에 비-공유(non-covalent) 복합체를 포함하는 조성물의 조제를 기술한다.
- [0146] 본 발명의 폴리펩티드는 선택적으로, 소수성 모이어티(moiety)를 통하여 프로테오솜 항원 소포에 복합된다. 가령, 항원은 지질 모이어티, 예를 들면, 지방 아실 기에 접합된다. 이런 소수성 모이어티는 다중체 폴리펩티드에 직접적으로 연결되거나, 또는 대안으로, 짧은 스페이서, 예를 들면, 1개, 2개, 3개 또는 4개, 최대 6개 또는 10개 아미노산을 이용하여 다중체 폴리펩티드를 지방 기에 연결할 수 있다. 이러한 소수성 앵커(anchor)는 프로테오솜 어쥬번트 소포의 소수성 막과 상호작용하면서, 일반적으로 친수성 항원 펩티드를 제공한다.
- [0147] 특히, 소수성 앵커는 다중체 폴리펩티드의 아미노 말단에 또는 카르복실 말단 인근에 부착된 지방 아실 기를 포함할 수 있다. 한 가지 실례는 12개-탄소 사슬 라우로일(lauroyl)(CH₃(CH)₁₀CO)이지만, 8개-, 10개-, 14개-, 16개-, 18개-, 또는 20개-탄소 사슬 길이(carbon chain length)의 아실 기가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 유사하게 기능하는 지방 아실 기 역시 소수성 앵커로서 기능할 수 있다. 앵커는 면역강화(immunopotentiating) 스페이서를 이용하여 펩티드 항원에 연결될 수 있다. 이런 링커는 1-10개 아미노산으로 구성되는데, 이는 펩티드의 배열 구조(conformational structure)를 유지하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0148] 이들 2가지 성분, 다시 말하면, 다중체 폴리펩티드와 프로테오솜 어쥬번트는 세제의 선택된 용액 내에서 이들 성분을 혼합하고, 이후 정용여과(diafiltration)/한외여과(ultrafiltration) 방법으로 세제를 제거함으로써 조제될 수 있다. 일반적으로, 조성물에 내포된 프로테오솜 어쥬번트 대(對) 다중체 폴리펩티드의 비율은 바람직하게는, 1:1 이상, 예를 들면, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10 또는 1:20(중량으로)이다. 이들 2가지 성분의 세제-기

조된 용액은 동일한 세제 또는 상이한 세제를 내포하고, 하나 이상의 세제가 정용여과/한외여과된 혼합물 내에 존재할 수도 있다. 적절한 세제에는 Triton, Empigen과 Mega-10이 포함된다. 다른 적절한 세제 역시 이용될 수 있다. 이들 세제는 조성물을 제조하는데 이용되는 성분을 용해시키는 역할을 한다.

[0149] 상이한 다중체 폴리펩티드를 포함하는 백신은 다수의 상이한 항원 펩티드를 프로테오솜 어주번트와 혼합함으로써 생산될 수 있다. 대안으로, 2가지 또는 그 이상의 프로테오솜 어주번트/항원 펩티드 조성물이 생산되고 차후에 혼합될 수 있다.

[0150] 난에서 생산된 상업용 인플루엔자 백신이 계란(hen egg)에 민감한 개체에서 알레르기를 유발하는 반면, 다중체 백신은 면역화 전후에 IgE 역가에 의해 증명되는 바와 같이, 이와 같은 반응을 산출하지 않았다.

[0151] 항원 함량(antigen content)은 항원이 발생시키는 생물학적 효과에 의해 최적으로 정의된다. 당연히, 보호 항체의 측정가능한 양의 생산을 산출할 만큼 충분한 항원이 존재해야 한다. 바이러스의 생물학적 활성에 대한 간편한 검사법은 보호 항체의 공지된 양성 항혈청(positive antiserum)을 고갈시키는 검사 중인 항원 물질의 능력에 관련된다. 상기 결과는 평가되는 다양한 희석도의 항원 물질로 사전 처리된 공지된 항혈청으로 사전 처리되는 독력 생물체(virulent organism)로 처리되는 생쥐에 대한 LD₅₀(치사량, 50%)의 음의 대수(negative log)로 보고된다. 이런 이유로, 높은 수치는 공지된 항혈청 내에 항체를 묶음으로써, 소량의 치사량을 만들어내는 독력 생물체에 대한 항혈청의 효과를 감소 또는 소멸시키는 항원 물질의 높은 함량을 반영한다. 적절하게는, 최종 제제 내에 존재하는 항원 물질은 처리되지 않은 항혈청으로 처리된 독력 생물체로부터 결과와 비교하여, LD₅₀의 음의 대수를 최소한 1, 바람직하게는 1.4로 증가시킬 만큼 충분한 수준으로 존재한다. 항혈청 대조와 적절한 백신 물질에서 획득된 절대 수치(absolute value)는 선택된 독력 생물체와 항혈청 표준에 좌우된다.

[0152] 이상적인 백신 제제를 달성하기 위하여 아래의 방법 역시 이용될 수 있다: 원하는 면역 반응을 산출하도록 의도되는 정의된 항원으로부터 출발하여, 첫 번째 단계에서, 전문적인 문헌, 특히 WO 97/30721에서 기술된 바와 같이 항원에 대응된 어주번트가 확인된다. 다음 단계에서, 백신은 등장성 또는 약간 저장성 농도로, 본 발명에 정의된 바와 같은 다양한 등장성화(isotonic-making) 물질, 바람직하게는, 당 및/또는 당 알코올을 항원과 어주번트의 혼합물에 첨가하고, 조성은 다른 모든 점에서 동일하고, 그리고 상기 용액의 생리 pH 범위를 pH 4.0 내지 10.0, 특히 7.4로 조정함으로써 최적화된다. 그 다음, 첫 번째 단계에서, 통상적인 염수-완충된 용액과 비교하여 항원/어주번트 조성물의 용해도(solubility)를 향상시키는 이들 물질 또는 이들의 농도가 결정된다. 후보 물질에 의한 용해도 특성에서 향상은 상기물질이 백신의 면역원성 활성에서 증가를 산출할 수 있다는 첫 번째 표시이다.

[0153] 세포 면역 반응에서 증가를 위한 가능한 필요조건 중의 하나가 APC(항원 제시 세포, antigen presenting cell)에 항원의 증가된 결합이기 때문에, 다음 단계에서 후보 물질이 이런 종류의 증가로 이어지는 지를 확인하는 조사가 실시될 수 있다. 이용되는 절차는 어주번트의 정의에서 기술된 절차와 유사할 수 있다, 가령, APC를 형광-표지된 펩티드 또는 단백질, 어주번트와 등장성화 물질과 함께 항은 처리한다. 후보 물질에 의해 달성된, APC에 펩티드의 증가된 흡수 또는 결합은 통류 세포측정(throughflow cytometry)을 이용한, 단독으로 또는 통상적인 염수 완충액 용액 내에 존재하는 펩티드/어주번트 조성물과 함께, 펩티드와 어주번트와 혼합된 세포와의 비교에 의해 결정될 수 있다.

[0154] 두 번째 단계에서, 후보 물질은 그들의 존재가 APC의 펩티드의 제시를 증가시킬 수 있는지와 어느 정도 증가시킬 수 있는지를 시험관내에서 조사된다; 세포 상에서 MHC 농도는 펩티드를 검사하기 위한 WO 97/30721에서 기술된 방법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0155] 제제의 효능을 검사하는 다른 가능한 방법은 시험관내 모형 시스템(*in vitro* model system)을 이용하는 것이다. 이를 위하여, APC는 어주번트, 펩티드와 후보 물질과 함께 배양되고, 이용된 펩티드를 특이적으로 인식하는 T-세포 클론(clone)의 상대적 활성화(relative activation)가 측정된다(Coligan et al., 1991; Lopez et al., 1993).

[0156] 제제의 효능은 선택적으로, 면역화된 동물에서 "지연형 과민증(delayed-type hypersensitivity, DTH)" 반응을 검출함으로써 세포 면역 반응에 의해 증명될 수도 있다.

[0157] 최종적으로, 상기 제제의 면역조정 활성(immunomodulatory activity)은 동물 검사에서 측정된다.

[0158] 본 발명의 다중체 펩티드와 폴리펩티드는 펩티드, 펩티드 다합체(multimer)와 폴리펩티드의 합성을 위한 당분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 이들 방법은 일반적으로, 펩티드 합성의 공지된 원리에

의존한다; 가장 편의하게는, 이들 절차는 고형 상(solid phase) 펩티드 합성의 공지된 원리에 따라서 수행될 수 있다.

[0159] 본 명세서에서 "펩티드"는 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산의 서열을 지칭한다. 본 발명에 따른 펩티드는 4 개 내지 24개 아미노산 잔기의 서열을 포함한다. 다중체 폴리펩티드는 펩티드 에피토프의 최소 2개 반복부위와 최대 50개 반복부위를 포함한다.

[0160] 펩티드 유사체와 펩티드모방체(peptidomimetic), 그리고 본 발명의 펩티드의 염과 에스테르 역시 본 발명의 범위 내에 속한다. 본 발명에 따른 펩티드 유사체는 선택적으로, C 말단 또는 N 말단에서 최소한 하나의 비-자연 아미노산 및/또는 최소한 하나의 차단기(blocking group)를 포함할 수 있다. 본 발명의 펩티드의 염은 생리학적 으로 허용되는 유기와 무기 염이다. 적절한 "유사체(analog)"의 설계에 컴퓨터가 이용될 수 있다.

[0161] "펩티드모방체"는 본 발명에 따른 펩티드가 최소한 하나의 비-펩티드 결합(non-peptidic bond), 예를 들면, 우레아 결합(urea bond), 카르바메이트 결합(carbamate bond), 술폰아미드 결합(sulfonamide bond), 히드라진 결합(hydrazine bond), 또는 임의의 다른 공유 결합(covalent bond)을 포함하는 방식으로 상기 펩티드가 변경된다는 것을 의미한다. 적절한 "펩티드모방체"의 설계에는 컴퓨터가 이용될 수 있다.

[0162] 본 발명의 펩티드의 염과 에스테르는 본 발명의 범위 내에 속한다. 본 발명의 펩티드의 염은 생리학적으로 허용되는 유기와 무기 염이다. 본 발명의 펩티드의 기능성 유도체는 당분야에 공지된 수단에 의해 잔기, 또는 N- 또는 C-말단 기 상에서 측쇄(side chain)로서 발생하는 기능기(functional group)로부터 제조될 수 있는 유도체를 포괄하고, 이들이 제약학적으로 허용되면, 다시 말하면, 이들이 펩티드의 활성을 파괴하지 않고 이를 포함하는 조성물에 독성 특성을 공여하지 않으면 본 발명에 포함된다. 이들 유도체에는 예로써, 카르복실 기의 지방족 에스테르(aliphatic ester), 암모니아 또는 일차 또는 이차 아민과의 반응에 의해 생산된 카르복실 기의 아미드(amide), 아실 모이어티(가령, 알카노일(alkanoyl) 또는 카르보시클릭 아로일(carbocyclic aroyl) 기)와의 반응에 의해 형성된 아미노산 잔기의 유리 아미노 기의 N-아실 유도체, 또는 아실 모이어티와의 반응에 의해 형성된 유리 히드록실 기(가령, 세릴(seryl) 또는 트레오닐(threonyl) 잔기)의 O-아실 유도체가 포함된다.

[0163] "아미노산"은 가급적, 탄소 골격(carbon backbone) 상에서 1,2- 1,3-, 또는 1,4- 치환 패턴(substitution pattern)으로 아미노 기와 카르복실산 기를 보유하는 화합물을 지칭한다. α -아미노산이 가장 선호되는데, 여기에는 단백질에서 발견되는 20가지 자연 아미노산(이들은 글리신(glycine)을 제외하고 L-아미노산이다), 상응하는 D-아미노산, 상응하는 N-메틸 아미노산, 측쇄 변경된 아미노산, 단백질에서 발견되지 않는 생물합성으로 가용한 아미노산(가령, 4-히드록시-프롤린, 5-히드록시-리신, 시트룰린(citrulline), 오르니틴(ornithine), 카나바닌(canavanine), 드젠콜산(djenkolic acid), β -cyanoalanine(시아노알라닌)), 그리고 합성 유래된 α -아미노산, 예를 들면, 아미노-이소부티르산, 노르류신(norleucine), 노르발린(norvaline), 호모시스테인(homocysteine)과 호모세린(homoserine)이 포함된다. β -알라닌과 γ -아미노 부티르산은 각각, 1,3과 1,4-아미노산의 실례이고, 많은 다른 아미노산이 당분야에 널리 공지되어 있다. 스타틴(statine)-유사 이소스테르(isostere)(CONH 연쇄가 CHOH로 대체된 2개의 아미노산을 포함하는 디펩티드), 히드록시에틸렌 이소스테르(CONH 연쇄가 CHOCH₂로 대체된 2개의 아미노산을 포함하는 디펩티드), 환원된 아미드 이소스테르(CONH 연쇄가 CH₂NH 연쇄로 대체된 2개의 아미노산을 포함하는 디펩티드), 그리고 티오아미드 이소스테르(CONH 연쇄가 CSNH 연쇄로 대체된 2개의 아미노산을 포함하는 디펩티드) 역시 본 발명에 유용한 잔기이다.

[0164] 본 발명에 이용되는 아미노산은 상업적으로 가용하거나, 또는 통상적인 합성 방법에 의해 가용한 것들이다. 일정한 잔기는 펩티드 내로 통합을 위한 특수한 방법을 요구할 수 있는데, 펩티드 서열에 순차적(sequential), 발산적(divergent) 또는 수렴적(convergent) 합성 접근법이 본 발명에 유용하다. 자연 코딩된 아미노산과 이들의 유도체는 IUPAC convention에 따른 3문자 코드(three-letter code)로 표시된다. 달리 표시가 없으면, L 이성체(isomer)가 이용된다.

[0165] 당업자에게 공지된 바와 같은 아미노산의 보존성 치환은 본 발명의 범위 내에 속한다. 보존성 아미노산 치환은 한 아미노산의 동일한 유형의 기능성 기 또는 측쇄를 보유하는 다른 아미노산, 예를 들면, 지방족(aliphatic) 아미노산, 방향족(aromatic) 아미노산, 양으로 하전된(positively charged) 아미노산, 음으로 하전된(negatively charged) 아미노산으로 치환에 관련된다. 이들 치환은 경구 생체이용효율(oral bioavailability), 중추신경계(central nervous system)로 침투, 특정 세포 집단으로의 표적화 등을 강화시킬 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 인코딩된 서열 내에서 단일 아미노산 또는 낮은 비율의 아미노산을 변형, 부가 또는 결실시키는, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 개별 치환, 결실 또는 부가는 변형되면 한 아미노산이 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환되는 "보존성 변경된 변이체(variant)"이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공

하는 보존성 치환 표는 당분야에 널리 공지되어 있다.

[0166] 아래의 6가지 군은 각각, 서로에 대하여 보존성 치환인 아미노산을 내포한다:

[0167] 1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T);

[0168] 2) 아스파르트산(D), 글루타민산(E);

[0169] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0170] 4) 아르기닌(R), 리신(K);

[0171] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 그리고

[0172] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).

[0173] 아래의 실시예는 본 발명의 일부 구체예를 더욱 완전하게 예시하기 위하여 제공된다. 이들은 본 발명의 넓은 범위를 결코 한정하지 않는다. 당업자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명에 개시된 원리의 많은 개변을 용이하게 고안할 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0174]본 발명에 따른 다중체 다중-에피토프 펩티드-기초된 백신은 인플루엔자에 대한 보호 면역(protective immunity)을 유도하는데 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0175]도면의 간단한 설명

도 1A와 1B에서는 교대 순차적 중합체 구조: (HA354-372---HA91-108---M1,2-12---HA150-159---HA143-149---NP206-229---HA307-319---NP335-350---NP380-393)₅로 정렬된 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 5개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드를 도시한다. (A) 다중체 폴리펩티드를 생산하는데 이용된 구조체의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:83); (B) A의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩된 다중체 폴리펩티드의 아미노산 서열(SEQ ID NO:84). 9가지 에피토프의 첫 번째 서열에서 에피토프는 밑줄로 표시된다.

도 2A와 2B에서는 블록 공중합체 구조: (HA354-372)₃---(HA91-108)₃---(M1,2-12)₃---(HA150-159)₃---(HA143-149)₃---(NP206-229)₃---(HA307-319)₃---(NP335-350)₃---(NP380-393)₃로 정렬된 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드를 도시한다. (A) 상기 폴리펩티드를 생산하는데 이용된 구조체의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:85). (B) 상기 다중체 폴리펩티드의 아미노산 서열(SEQ ID NO:86). 첫 번째 에피토프의 3개 반복부위는 밑줄로 표시된다.

도 3A와 3B에서는 교대 순차적 중합체 구조: (HA354-372---HA91-108---M1,2-12---HA150-159---HA143-149---NP206-229---HA307-319---NP335-350---NP380-393)₃로 정렬된 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드를 도시한다. (A) 상기 폴리펩티드를 생산하는데 이용된 구조체의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:87). (B) 상기 다중체 폴리펩티드의 아미노산 서열(SEQ ID NO:88). 9가지 에피토프의 첫 번째 서열에서 에피토프는 밑줄로 표시된다.

도 4에서는 2가지 다중체 백신: #11과 #14로 예방 접종된 생쥐에서, 여러 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 세포 면역 반응을 도시한다. 2가지 상이한 농도의 자극 바이러스에 대한 세포 면역 반응이 측정되고, 자극 바이러스와 함께 배양된 림프구에 대한 증식 지수(proliferation index)로서 표시된다.

도 5에서는 생쥐 적응된 인플루엔자 바이러스 H3N2 균주(A/Texas/1/77)의 치사량(lethal dose)으로부터 다중체 백신 #14의 보호 효과를 도시한다. 이와 같은 백신의 보호 효과는 대조 생쥐(PBS)와 비교하여 예방 접종된 생쥐의 폐에서 바이러스 역가(virus 역가)의 유의한 감소에 의해 증명된다.

도 6A와 6B에서는 바이러스 공격접종으로부터 생쥐를 보호하는 여러 다중체 백신의 효능을 도시한다. 다중체 백신 #11, #12와 #14의 보호 효과는 치사량의 생쥐 적응된 인플루엔자 바이러스 H3N2 균주(A/Texas/1/77)로 감염 후 대조(PBS) 생쥐와 비교하여 예방 접종된 생쥐의 더욱 높은 생존율(survival rate)(도 6A)에 의해, 그리고 대

조(50% Gly/PBS) 생쥐와 비교하여 예방 접종된 생쥐의 폐에서 유의하게 더욱 적은 바이러스 하중(virus load) (도 6B)에 의해 증명된다.

도 7에서는 PBS에 담긴 50% 글리세롤(#11, #12, 그리고 #14)에서 또는 불완전 Freund 어쥘먼트를 포함하는 에멀전(#11-IFA, #12-IFA, 그리고 #14-IFA)에서 다중체 구조체를 포함하는 여러 백신으로 생쥐의 면역화의 효능을 비교한다. 상이한 백신의 보호 효과와 IFA의 효과는 생쥐 적응된 인플루엔자 바이러스 H3N2 균주(A/Texas/1/77)로 공격접종후, 대조 생쥐와 비교하여 예방 접종된 생쥐의 생존율에 의해 측정된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

재료와 방법

다중체 다중-에피토프 폴리펩티드: 표 1에 제시된 인플루엔자 바이러스 펩티드 에피토프 E1 내지 E9의 여러 반복부위를 포함하는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드의 실례가 제공된다. 이들 폴리펩티드는 아미노산과 스페이서로서 짧은 펩티드를 포함한다. 이들 폴리펩티드는 교대 순차적 중합체 구조 또는 블록 공중합체 구조로 정렬된다. 이들 폴리펩티드는 폴리펩티드의 추가적인 조작을 위한 다양한 제한 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 구조체로부터 발현 벡터에서 발현에 의해 제조된다. 상기 폴리뉴클레오티드 구조체는 상업적 공급원으로부터 공급된다.

백신: 실시예 1-3에 제공된 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드로부터 제조된 백신이 다양한 생쥐 균주의 면역화 연구에 이용되었다. 생산되고 조사된 특이적 백신의 실례는 아래와 같다:

다중체 #11은 실시예 1에 제공된 교대 순차적 중합체 구조 [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]₅로 정렬된, 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 5개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드로부터 만들어진다.

다중체 #12는 실시예 3에 제공된 교대 순차적 중합체 구조 [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]₃로 정렬된, 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드로부터 만들어진다.

다중체 #14는 실시예 2에 제공된 블록 공중합체 구조 [E1]₃-[E2]₃-[E3]₃-[E4]₃-[E5]₃-[E6]₃-[E7]₃-[E8]₃-[E9]₃로 정렬된, 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드로부터 만들어진다.

면역화 연구: 3가지 생쥐 균주: 무작위교배(outbred) 종족(ICR), 근친교배(inbred) 종족(BALB/c)과 인간 HLA A*0201 분자에 대한 유전자도입 종족(HLA A*0201)이 면역화 연구에 이용되고, 일부 실험에서 토끼가 이용된다. 이용된 바이러스는 아래와 같다: A/Texas/1/77, A/Wisconsin/67/05(WISC), A/WSN/33(WSN), B/Malaysia/2506/04(MAL), A/California/07-2007, A/New Caledonia20/99(NC) 등. 모든 연구는 양쪽 뒷발(hind limb)에 동등하게 투여된, 100 μ l(microliter)에서 150 mcg 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드의 근육내 투여로 수행된다.

실시예 1: 교대 순차적 구조로 정렬된, 9가지 상이한 에피토프를 포함하는 단위의 5개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드.

본 실시예는 교대 순차적 중합체 구조 [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]₅로 정렬된, 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 5개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드의 실례이다. 예측된 분자량은 80 kD이다.

히스티딘 태그를 비롯한, 상기 다중체 폴리펩티드의 아미노산 서열은 도 1B에 도시된다. 상기 다중체 펩티드를 제조하는데 이용되는 폴리뉴클레오티드 구조체의 DNA 서열은 도 1A에 도시된다.

실시예 2: 블록 공중합체 구조로 정렬된 각각 9가지 상이한 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드.

본 실시예에서, 블록 공중합체 구조 [E1]₃-[E2]₃-[E3]₃-[E4]₃-[E5]₃-[E6]₃-[E7]₃-[E8]₃-[E9]₃으로 정렬된, 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 펩티드를 제조하는데 이용되는 폴리뉴클레오티드 구조체의 DNA 서열은 도 2A에 도시되고, 상응하는 아미노산 서열은 도 2B에 도시된다. 예측된 분자량은 48 kD이다.

실시예 3: 교대 순차적 구조로 정렬된 9가지 에피토프를 포함하는 단위의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리

펩티드.

- [0190] 본 실시예는 교대 순차적 중합체 구조 [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]₃으로 정렬된 9가지 인플루엔자 펩티드 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 폴리펩티드의 실례이다. 예측된 분자량은 48 kD이다.
- [0191] 상기 다중체 폴리펩티드의 아미노산 서열은 도 3B에 도시된다. 상기 다중체 펩티드를 제조하는데 이용되는 폴리뉴클레오티드 구조체의 DNA 서열은 도 3A에 도시된다.
- [0192] 실시예 4: 세포 면역 반응.
- [0193] 군주 A/Texas/1/77, A/WisxWisc/67/05, A/California/07-2007, 그리고 B/Malaysia/2506/04의 자극 인플루엔자 바이러스의 2가지 상이한 농도에 대한 세포 면역 반응을 평가하였다.
- [0194] 유전자도입 생쥐(HLA A*0201에 대한 형질전환(transgenesis))는 IFA (불완전 Freund 어쥬번트) 내에서 유화된 2가지 다중체 백신: #11과 #14로 1회 예방 접종하였다. 면역화후 7-10일 시점에, 이들의 비장(spleen)과 림프절(lymph node)(LN)을 떼어내고, 앞서 언급된 바이러스와 함께 더욱 배양하였다. 증식은 티미딘 흡수(thymidine uptake)로 측정하였는데, 이는 도 4에서, 자극 바이러스와 함께 배양된 림프구에 대한 증식 지수(proliferation index)로서 도시된다. 증식은 300-1300 pg/ml의 범위에서, IFN-감마 분비와 연관하였다. 이러한 반응은 상기 백신에 대한 Th1 세포 매개된 면역 반응을 지시하는데, 이는 공격적접종 바이러스 감염에 더욱 충실한 면역을 공여할 수 있다.
- [0195] 실시예 5: 면역 혈청에 의한 면역화 항원과 바이러스의 인식
- [0196] ICR 생쥐는 교대 순차적 중합체 구조 [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]₅로 정렬된 9가지 에피토프의 5개 반복부위를 포함하는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드(다중체 #11)로, 또는 PBS에 담긴 50% 글리세롤에 현탁되거나, 또는 어쥬번트로서 IFA에 현탁된, 블록 공중합체 구조 [E1]₃-[E2]₃-[E3]₃-[E4]₃-[E5]₃-[E6]₃-[E7]₃-[E8]₃-[E9]₃으로 정렬된 9가지 에피토프의 3개 반복부위를 포함하는 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드(다중체 #14)로, 또는 운반제 대조(vehicle control)로서 PBS에 담긴 50% 글리세롤로 면역화시켰다. 항원 폴리펩티드(각각, #11과 #14)로 면역화된 생쥐의 혈청에 의한, 공지된 보호 인플루엔자 에피토프 HA 91-108과 M2 2-12, 그리고 여러 인플루엔자 바이러스(WISC, WSN, NC, 그리고 MAL)의 인식은 ELISA로 결정하고, 이의 결과는 표 4a와 4b에 요약한다. 유의한 인식(significant recognition)은 면역전(pre-immune) 혈청과 2-3주 간격에서 3회 IM 면역화후 혈청 간에 역가에서 최소한 4배 상승으로 정의된다.

표 4

표 4a: 면역전 혈청과 PBS에 담긴 50% 글리세롤에서 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드로 3회 면역화후 혈청의 다양한 항원에 대한 역가에서 상승 배수						
면역화	PBS에 담긴 50% 글리세롤에서 #11		PBS에 담긴 50% 글리세롤에서 #14			
생쥐	ICR	BALB/c	ICR	BALB/c	C57Bl/6j	토끼
#11에 대한 Ab	16		64			
#14에 대한 Ab	256		1024			
HA91-108에 대한 Ab	1	1	64	200	1600	10
M2 1-18에 대한 Ab	1	2	64	5	3	1.5
WISC에 대한 Ab		2		8	2	2
WSN에 대한 Ab		4		4	2	2
NC에 대한 Ab		ND		8	8	2
MAL에 대한 Ab		2		4	2	2
표 4b: 면역전 혈청과 어쥬번트로서 IFA에서 다중체 다중-에피토프 폴리펩티드로 3회 면역화후 혈청의 다양한 항원에 대한 역가에서 상승 배수						
면역화	어쥬번트에서 #11		어쥬번트에서 #14			
생쥐	BALB/c	BALB/c	C57Bl/6j	토끼		
WISC에 대한 Ab	4	8	4	8		
WSN에 대한 Ab	4	8	2	16		
NC에 대한 Ab	ND	8	2	8		
MAL에 대한 Ab	2	4	2	8		

양쪽 군은 면역화 항원의 높은 인식을 보여주는데, 펩티드 HA91-108과 M2 2-18은 #14로 면역화된 생쥐의 혈청에 의해서만 인식되고 #11로 면역화된 생쥐로부터 혈청에 의해 인식되지 않았다.

삭제

정상적인 인간 혈청은 다중체 백신 후보를 인식할 수 있었는데, 이는 상기 백신으로 인간 개체의 면역화 이후에 유도되는 잠재적 기억 반응(memory response)을 지시한다. #11과 #14에 대한 4가지 인간 혈청의 평균 역가는 각각, 6000과 6400이었다.

실시예 6. H3N2 A/Texas/1/77로 고도 치사성 공격접종으로부터 보호

8마리 유전자도입 생쥐의 군은 3-주 간격에서 3회, 다중체-#14 백신 또는 PBS로 근육내 면역화시켰다. 고도 치사량(300 LD₅₀)의 H3N2 A/Texas/1/77로 공격접종 감염은 최종 추가접종(boost)후 3주 시점에 제공하였다. 생쥐는 감염후 5일 시점에 희생시켰다. 감염에 이용된 대량의 바이러스에도 불구하고, 도 5에 도시된 바와 같이, 생쥐 폐에서 바이러스 역가의 유의한 감소가 관찰되었다.

실시예 7: 생체내 효능 연구

2가지 백신 이형을 생체내에서 평가하였다: PBS에 담긴 50% 글리세롤 또는 불완전 Freund 어쥬번트에 현탁된 다중체 폴리펩티드.

정제된 백신은 반복된 용량 독성평가(dose toxicology)에 앞서, 효능, 작용 기전(mechanism of action)과 예비

독성 데이터(preliminary toxicology data)를 확립하기 위하여 여러 생쥐 모형에서 이용된다. 이들 체액 반응과 약역학(pharmacodynamics) 연구는 여러 생쥐 종족에서 수행된다. 백신의 평가에 이용되는 한 가지 동물 모형은 HLA A*0201에 대한 유전자도입 생쥐이다. 상기 모형은 최적량(optimal dose)의 결정 및 작용 기전을 확인하기 위한 면역 반응의 세포 파라미터(cell parameter)에 이용된다.

[0205] 실시예 8:

[0206] 백신의 효능은 ICR과 유전자도입(HLA A*0201) 생쥐를 이용한 2가지 예비 연구에서 증명되었다. 이들 생쥐는 3주 간격에서 3회, 어쥬번트(IFA)와 함께, 그리고 이러한 어쥬번트 없이 150 mcg/생쥐 용량의 백신 #11, #12와 #14로 근육내 예방 접종하였다. 최종 면역화후 3 내지 4주 시점에, 이들 생쥐는 300 LD50의 생쥐 적응된 인플루엔자 바이러스 H3N2 균주(A/Texas/1/77)로 감염시켰다. 감염후 5일 시점에, 생존율을 모니터링(monitoring)하였다. IFA와 함께, 그리고 IFA 없이 PBS에 담긴 50% 글리세롤로 면역화된 처리된 군과 대조 군을 비교하였다.

[0207] ICR 생쥐에서 300 LD50 감염 이후에 생존율(도 6A)은 100%인 반면, 대조 군(PBS에 담긴 50% 글리세롤)에서 생존율은 20%이었다.

[0208] 폐 내에서 바이러스 하중(virus load)은 도 6B에서 백신 #11과 #14에 대하여 상술된다. 100% 생존이 관찰된 군에서 바이러스 하중은 대조 군에서 바이러스 하중보다 유의하게 낮다($p < 0.05$). 군당 적은 숫자의 생쥐(5마리 생쥐)로 인하여, 통계학적 분석(statistical analysis)은 이측 피서 정확 검증(Two-sided Fisher's Exact Test)을 이용하여 수행하였다. 5% 또는 그 이하의 P 값은 통계학적으로 유의한 것으로 간주된다. 데이터는 SAS® 버전 9.1(SAS Institute, Cary North Carolina)을 이용하여 분석하였다.

[0209] 앞서 언급된 동일한 예방 접종과 감염 절차를 이용하여, PBS/50% 글리세롤에서 백신으로 면역화된 유전자도입 생쥐에서 생존(도 7)의 경우에, 대조 군에서 20%와 비교하여 각각, #11과 #14로 예방 접종에서 생존율이 80%와 60%이었다. 백신 #12와 어쥬번트(IFA) 첨가된 검사 백신은 이러한 생쥐 모형에서 보호 효과가 없었다. 이러한 동물 모형에서 또는 최소한 본 연구에서, 어쥬번트의 첨가는 불필요하고 백신 보호 잠재력을 오히려 감소시키는 것으로 보인다.

[0210] 실시예 9: 반복된 용량 독성평가

[0211] 반복된 용량 독성평가 시험은 예 기초된 프로토콜에 따라서, 백신 #14(PBS에 담긴 50% 글리세롤에 또는 불완전 Freund 어쥬번트에 현탁된 3개의 블록 반복부위에서 다중체 백신)로 수행된다.

[0212] 예비 용량 관련된 독성평가 연구는 ICR 무작위교배 생쥐에서 수행된다. 1회, 2회와 3회 백신의 근육내 투여 이후에 주요 기관의 조직병리(histopathology)를 조사하기 위하여, 각 희생 시점에서 용량당 성별에 따라 3마리 동물이 이용된다.

[0213] 격주 3회 예방 접종을 포함하는 6주 반복부위 투약(dosing)에 이용되는 임상 목적에 의도되는 최대량은 산물 독성을 평가하고 2회 반복을 가능하게 할 만큼 충분할 것으로 생각된다. 이들 연구에는 치료 기간 동안 관찰된 임의의 독성 효과가 반전될 수 있음을 증명하기 위하여 면역화후 2일 시점과 2주 시점에 모든 주요 기관의 검사(necropsy)와 전체 조직병리학적 검사(full histopathological examination)를 비롯한, 생존 단계 모니터링과 그 이후에, 전체 범위의 독성 파라미터(toxicological parameter)가 포함된다.

[0214] 실시예 10: I/IIa 기 임상 시험

[0215] 본 임상 연구의 일차적인 목적은 단일 또는 이중 근육내 투여후 예방 항-인플루엔자 백신의 안정성을 조사하는 것이다. 본 연구는 18세 내지 49세 연령의 건강한 지원자 사이에, 통제된 임상적 설정(controlled clinical setting) 하에 수행된다. 이차적인 목적인 다중체 백신의 투여에 의해 유도된 면역원성을 평가하는 것이다. 본 I/II기 연구에서는 가장 일반적인 급성 부작용을 평가하고, 높은 발생률의 부작용 없이 환자가 안전하게 복용할 수 있는 용량의 크기를 조사한다.

[0216] 실시예 11: 상업적인 인플루엔자 백신으로 면역화되고, 그 이후에 다중체 백신으로 면역화된 생쥐 혈청에서 항-바이러스 반응

[0217] HLA A*0201에 대한 유전자도입 생쥐는 상업적인 비활성화된 인플루엔자 백신 (스플릿 비리온(split virion)) BP Vaxigrip®로 0일, 60일과 81일에 3회 면역화시키거나, 또는 Vaxigrip®로 0일에 1회, 그리고 다중체 백신 #11, #12와 #14로 2회(60일과 81일에) 추가로 면역화시켰다. 혈액 수집은 면역화 이전(면역전)과 최종 면역화 이후

수행하였다. 여러 인플루엔자 균주에 대한 항체는 혼주(pooled) 혈청에서 결정하였다: H3N2: A/Wisconsin/67/05, A/Texas/1/77, A/California/07/2007, A/Fujian/411/2002, A/Moscow/10/99와 A/Panama/2007/99; H1N1: A/New Caledonia/20/99, A/WSN/33, A/PR8/34

B: B/Malaysia/2506/04, B/Lee/40.

인간에서 단일 면역화에 의도되는 Vaxigrip®로 첫 번째 면역화 이후, 모든 바이러스(A/California에 대한 x4배 역가 상승 제외)에 대한 역가에서 유의한 상승은 관찰되지 않았다.

이의 결과는 표 5A와 5B에 도시된다. 다중체 제제의 경우에, Vaxigrip®로 사전 면역화는 유사한 체액 반응이 증명되는 면역화 연구로부터 다른 데이터와 비교하여 바이러스에 대한 반응을 유의하게 상승시키지 못하였다. 면역 전후의 역가에서 최대 8배 상승이 다중체 백신으로 2회 면역화 이후에 관찰되었다. PBS가 투여된 대조 군은 모든 바이러스에 대하여 음성이었다. 상이한 다중체 변이체의 비교에서, #14는 바이러스에 대한 체액 반응의 관점에서 최고 후보이었다.

표 5

표 5a: H3N2												
		WISC		Texas		Califor		Fujian		Moscow		Panama
처리	면역	t	f	t	f	t	f	t	f	t	f	f
1xVaxigrip	0	200		200		800		400		400		400
+ 2x Multi	1	400	2	400	2	800	1	800	2	800	2	800
#11	2+	800	4	400	2	3200	4	800	2	800	2	1600
1xVaxigrip	0	400		200		400		400		800		800
+ 2x Multi	1	800	2	400	2	1600	4	400	1	800	1	800
#12	2+	800	2	400	2	3200	8	1600	4	1600	2	3200
1xVaxigrip	0	200		200		800		400		400		800
+ 2x Multi	1	800	4	400	2	1600	2	800	2	1600	4	3200
#14	2+	1600	8	1600	8	3200	4	1600	4	3200	8	6400
	0											8
PBS	1	200		100		200		200		200		
	2+	200	1	100	1	200	1	200	1	200	1	400
t=역가, f=배수												

표 5B: H1N1과 인플루엔자 B												
		NC		WSN		PR8/34		B/Malaysi		B/Lee		
처리	면역	t	f	t	f	t	f	t	f	t	f	f
1xVaxigrip	0	100		200		400		400		200		
+ 2x Multi	1	400	4	400	2	800	2	1600	4	400		2
#11	2+	400	4	800	4	800	2	1600	4	400		2
1xVaxigrip	0	200		200		200		800		100		
+ 2x Multi	1	400	2	400	2	400	2	800	1	400		4
#12	2+	400	2	800	4	400	2	800	1	400		4
1xVaxigrip	0	100		200		100		200		200		
+ 2x Multi	1	400	4	800	4	400	4	400	2	400		2
#14	2+	400	4	1600	8	400	4	1600	8	400		2
PBS	1	100		100		100		100		100		
	2+	100	1	200	2	200	2	200	2	100		1
t=역가, f=배수												

실시예 12. 펩티드 합성

펩티드와 다중체 펩티드는 아래의 물질로 전형적인 고품 상 펩티드 합성을 이용하여 합성하였다: 보호된 아미노산, 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐-N-히드록시숙시니미드(Fmoc-OSu), 브로모-트리스-피콜리돈-포스포늄 헥사플루오르인산염(PyBrop), 링크 아미드 메틸벤즈히드릴아민(MBHA) 폴리스티렌 수지, 그리고 고품 상 펩티드 합성

(SPPS)을 위한 많은 유기 물질과 지지체(support)는 Nova Biochemicals(Laufelfingen, Switzerland)로부터 구입하였다. 비스(트리클로로메틸)탄산염(BTC)은 Lancaster(Lancashire, England)로부터 구입하고, 트리플루오르 아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)과 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)를 위한 용매는 Bio-Lab(Jerusalem, Israel)으로부터 구입하였다.

[0224]

유기 화학을 위한 용매는 Frutarom(Haifa, Israel)으로부터 구입하였다. 핵 자기 공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 스펙트럼은 Bruker AMX-300 MHz 분광계(spectrometer)에서 기록하였다. 질량 스펙트럼(mass spectrum)은 Finnigan LCQ DUO 이온 트랩 질량 분광계에서 수행하였다. 박막 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)는 Merck F245 60 실리카 겔 플레이트(Darmstadt, Germany)에서 수행하였다. HPLC 분석은 Vydac 분석 RP 칼럼(C18, 4.6X 250 mm, catalog number 201TP54)을 이용하여, Merck-Hitachi L-7100 펌프와 215 nm에서 작동하는 Merck-Hitachi L-7400 가변 파장 검출기(variable wavelength detector)에서 수행하였다. 이동상(mobile phase)은 변화도 시스템(gradient system)으로 구성되는데, 여기서 용매 A는 0.1% TFA를 포함하는 물에 해당하고, 용매 B는 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)에 해당하였다. 상기 이동상은 0분에서 5분까지 95% A로 시작하고, 그 이후 5분에서 55분까지 5% B에서 95% B로 선형 변화도(linear gradient)를 따랐다. 변화도는 추가로 5분 동안 95% B에 유지되고, 이후 60분에서 65분까지 95% A와 5% B로 하락하였다. 변화도는 칼럼 평형(column equilibration)을 달성하기 위하여 추가로 5분 동안 95% A에 유지되었다. 이동상의 유속(flow rate)은 1 ml/min이었다. 펩티드 정제는 Vydac 예비 RP 칼럼(C8, 22 x 250 mm, catalog number 218TP1022)을 이용한 역상 HPLC(RP-HPLC)(L-6200A 펌프, Merck-Hitachi, Japan)로 수행하였다. 모든 예비 HPLC는 변화도 시스템을 이용하여 수행하였는데, 여기서 용매 A는 0.1% TFA를 포함하는 물에 해당하고, 용매 B는 0.1% TFA를 포함하는 ACN에 해당하였다.

[0225]

본 발명이 특정하게 기술되긴 했지만, 당업자는 많은 개변이 이루어질 수 있음을 인지할 것이다. 이런 이유로, 본 발명은 특정하게 기술된 구체예에 한정되지 않고, 본 발명의 개념과 범위는 아래의 특허청구범위를 참고하면 더욱 용이하게 이해될 것이다.

도면

도면1a

ATGCATATGAGATCTCCAGCTAAACTTCTGAAAGAACGTGGATTTTTTCGGTGCAATCGCT
GGTTTTCTGGAGGGGTCGAAAGCCTACAGTAACTGTTACCCCTACGATGTGCCCCGATTAT
GCCAGCCTGGGTAGCCTCCTTACAGAAGTTGAAACTTATGTGCTCGGCTGGCTGACAGGG
AAAAACGGCCTTTATCCTGTGTGGACCGGCGTGACGCAGAACGGATTCTGGCGTGGCGAA
AATGGACGTAAACTCGCAGTGCCTATGAGCGCATGTGTAACATCCTCAAAGGTAAAGGC
CCGAAATATGTGAAACAGAATACATTAAAATTAGCCACCGGCGCGAGCGCTGCCTTTGAA
GACCTCCGTGTGCTCAGTTTTATCCGCGGTTATGGGGAACGTGCGTTCTCGCTATTGGGCG
ATCCGTACCCGGTCAGGGGGTCCACCGGCGAAGCTGCTGAAAGAACGTGGGTTCCTCGGT
GCGATTGCCGTTTCTTGGAAGGATCAAAAGCGTATTCGAACTGCTACCCGTATGATGTG
CCAGATTACGCCAGCCTGGGCTCCCTCTTGACAGAGGTGAAACCTATGTACTGGGTTGG
CTGACCGGTAAGAACGGTCTGTATCCGTTTGGACTGGTGTGACACAAAACGGCTTTTGG
CGGGGGGAAAACGGCCGGAACCCGCGAGCGCTTACGAGCGCATGTGCAACATTCTGAAA
GGCAAAGGCCCGAAATACGTGAAGCAGAATACGCTCAAACTTGCCACGGGCGCAAGCGCA
GCCTTTGAAGACCTGCGGGTCTTGAGCTTTATCCGCGGTTACGGGGAGCTGCGGTGCGGC
TACTGGGCGATTTCGTACGCGTAGTGGTGACCTCCCGCGAAACTTCTGAAAGAGCGGGGC
TTCTTTGGAGCGATTGCGGGCTTCTTGAGGGGAAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCA
TACGATGTGCCTGATTATGCGAGCCTCGGTAGCTTGCTGACAGAAGTGGAACCTACGTT
CTCGGCTGGCTGACGGGCAAAAATGGTCTCTACCCAGTGTGGACCGGAGTTACCCAGAAT
GGGTTCTGGCGCGGTGAGAACGGCCGTAAAACACGTTTACGCGTACGAGCGGATGTGCAAC
ATCTTAAAGGCAAAGGACCGAAATACGTCAAGCAGAATACTCTGAAGTAGCCACTGGG
GCCTCAGCCGCCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGGGGTTATGGGGAACGTG
CGGAGCCGCTACTGGGCTATTCGTACGCGTTCGGGTGGCCCACTCGAGCCGGCCAAATTG
CTCAAAGAACGTGGTTTTCTTCGGAGCGATCGCAGGTTTTCTTGAAGGCTCTAAAGCGTAC
AGCAACTGTTATCCATACGATGTGCCGGATTACGCCAGTCTGGGTTCCTCTGACCGAG
GTGGAAACGTATGTACTAGGATGGCTCACGGGTAAAAATGGTCTCTATCCTGTGTGGACG
GGCGTAACCCAGAACGGCTTTTGGCGGGGCGAAAACGGCCGCAAAACCCGTAGCGCATAC
GAGCGTATGTGTAACATCCTTAAAGGCAAAGGTCCAAAATACGTTAAGCAGAATACCCTG
AAACTGGCTACGGGCGCCAGTGCGGCCCTTCGAAGATTTACGGGTGCTGTCTTTCATCCGC
GGCTATGGTGAACGTGCGCTCTCGTTACTGGGCAATCCGTACCCGCGAGTGGCGGACCTCCG
GCTAAACTGTTGAAAGAACGCGGCTTCTTTGGTGCTATCGCAGGTTTTCTGGAAGGAAGT
AAAGCATATTGCAATTGTTATCCCTACGACGTGCCGGATTATGCGTCGCTCGGTTTCGCTG
CTGACCGAGGTGAAACCTACGTTCTAGGCTGGTTGACAGGTAAGAACGGGCTTTACCCG
GTATGGACCGGCGTTACCCAGAACGGTTTTTGGCGCGGTGAAAATGGCCGTAAAACTCGG
TCAGCATACGAACGGATGTGCAATATCTTGAAAGGTAAAGGACCGAAATACGTTAAACAG
AACACGCTGAAACTGGCAACAGGCGCCAGCGCGGCTTTGAGGATTTACGCGTCCTGTCA
TTTATTTCGGGGCTACGGCGAATTACGTAGTCGTTATTTGGGCGATTTCGTACCCGCGAGCGGA
GGGCTCGAGTAATAAAAGCTTCTAGACATATGATGCAT

도면1b

M H M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S
N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G
K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E
R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E
D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A
K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V
P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V
W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K
G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F
I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L L K E R G
F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G
S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N
G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V
K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L
R S R Y W A I R T R S G G P L E P A K L L K E R G F F G A I
A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E
V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G
E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L
K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W
A I R T R S G G P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S
K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G
W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R
S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S
A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G
G L E

도면2a

ATGCATATGAGATCTCCAGCTAAACTTCTGAAAGAACGTGGATTTTTCGGTGCAATCGCT
GGTTTTCTGGAGCCACCGGCGAAGCTGCTGAAAGAACGTGGGTCTTTCGGTGCGATTGCC
GGTTCTTGGAAACCTCCCGCGAAACTTCTGAAAGAGCGGGGCTTCTTTGGAGCGATTGCG
GGCTTCTTGGAGCCTCGAAAGCCTACAGTAACGTGTACCCCTACGATGTGCCGATTAT
GCCAGCCTGCCTTCAAAAGCGTATTGAACTGCTACCCGTATGATGTGCCAGATTACGCC
AGCCTGCCAAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCATACGATGTGCCTGATTATGCGAGC
CTCCCTAGCCTCCTTACAGAAGTTGAACTTATGTGCTCAGCTTGCTGACAGAAGTGGAA
ACCTACGTTCTCAGCTTGCTGACAGAAGTGGAAACCTACGTTCTCTGGCTGACAGGGAAA
AACGGCCTTTATCCTTGGCTGACCGGTAAGAACGGTCTGTATCCGTGGCTGACGGGCAA
AATGGTCTCTACCCATGGACCGGCGTGACGCAGAACCCTTGGACTGGTGTGACACAAAAC
CCATGGACCGGAGTTACCCAGAATCCTTTCTGGCGTGGCGAAAATGGACGTAAAACCTCGC
AGTGCGTATGAGCGCATGTGTAACATCCTCAAAGGTAAACCCTTTTGGCGGGGGGAAAAC
GGCCGGAAAACCCGACGCGCTTACGAGCGCATGTGCAACATCTGAAAGGCAAACCATTC
TGGCGCGGTGAGAACGGCCGTAACACGTTACGCGTACGAGCGGATGTGCAACATCTTA
AAAGGCAAACCTCCGAAATACGTGAAGCAGAATACGCTCAAACCTTGCCACGCCACCGAAA
TACGTCAAAGCAGAATACTCTGAAGTTAGCCACTCCGCCGAAATACGTCAAGCAGAATACT
CTGAAGTTAGCCACTCCTTCAGCCGCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTATCCGG
GGTTATCCAAGCGCAGCCTTTGAAGACCTGCGGGTCTTGAGCTTTATCCGCGGTTACCCT
TCAGCCGCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGGGGTTATCCAGAACTGCGT
TCTCGCTATTGGGCGATCCGTACCCGGTCAGGGCCGGAGCTGCGGTGCGCTACTGGGCG
ATTCGTACGCGTAGTGGTCCAGAACTGCGGAGCCGCTACTGGGCTATTTCGTACGCGGTCTG
GGTTAATAACTCGAGAGGCTTTCTAGACATATGATGCAT

도면2b

M H M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E P P A K L L
K E R G F F G A I A G F L E P P A K L L K E R G F F G A I A
G F L E P S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L P S K A Y S N
C Y P Y D V P D Y A S L P S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S
L P S L L T E V E T Y V L S L L T E V E T Y V L S L L T E V
E T Y V L W L T G K N G L Y P W L T G K N G L Y P W L T G K
N G L Y P W T G V T Q N P W T G V T Q N P W T G V T Q N P F
W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K P F W R G E N
G R K T R S A Y E R M C N I L K G K P F W R G E N G R K T R
S A Y E R M C N I L K G K P P K Y V K Q N T L K L A T P P K
Y V K Q N T L K L A T P P K Y V K Q N T L K L A T P S A A F
E D L R V L S F I R G Y P S A A F E D L R V L S F I R G Y P
S A A F E D L R V L S F I R G Y P E L R S R Y W A I R T R S
G P E L R S R Y W A I R T R S G P E L R S R Y W A I R T R S
G

도면3a

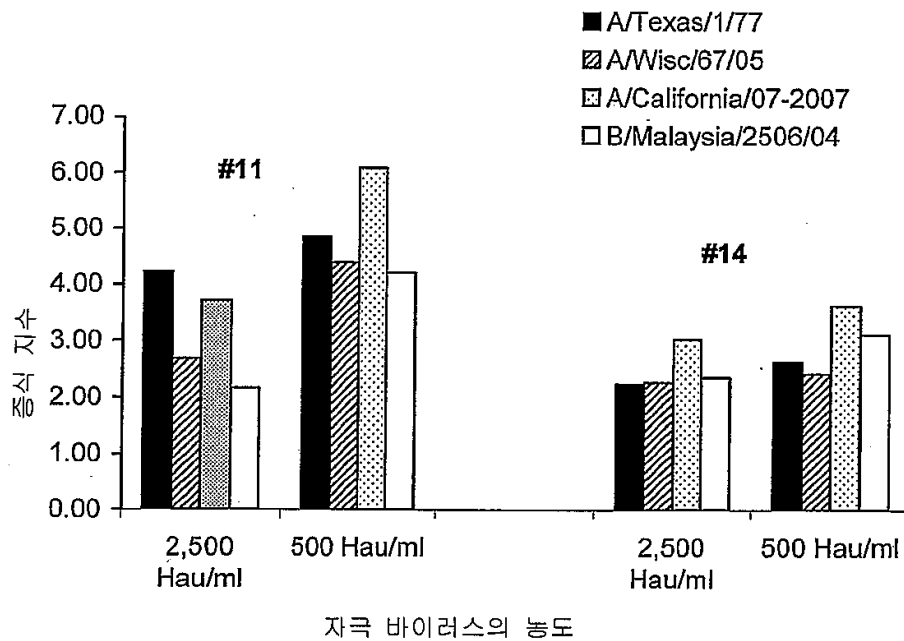
ATGAGATCTCCGGCGAAACTGCTGAAAGAACGTGGCTTTTTTGGCGCGATTGCGGGCTTT
CTGGAAGGCAGCAAAGCGTATAGCAACTGCTATCCGTATGATGTGCCGGATTACGCGAGT
CTGGGCTCTCTGCTGACCGAAGTGGAACCTATGTGCTGGGCTGGCTGACCGGCAAAAAC
GGCCTGTATCCGGTGTGGACCGGCGTGACCCAGAACGGCTTTTGGCGTGGCGAAAACGGC
CGTAAAACCCGTAGCGCGTATGAACGTATGTGCAACATCCTGAAAGGCAAAGGCCGAAA
TATGTGAAACAGAACACCCTGAAACTGGCCACCGGTGCGAGCGCGGCGTTTGAGGACCTG
CGTGTTCTGAGCTTTATTCGTGGCTATGGCGAACTGCGTAGCCGTTATTGGGCGATTCTGT
ACCCGTAGCGGTGGTCCGCCGGCCAAACTGCTGAAAGAACGCGGTTTCTTCGGTGCGATC
GCCGGTTTTCTGGAAGGTAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCGTACGATGTTCCGGAT
TACGCCAGCCTGGGTAGCCTGCTGACCGAAGTTGAAACCTACGTTCTGGGTGGCTGACC
GGTAAAAATGGTCTGTACCCGGTTTGGACCGGTGTTACCCAGAATGGTTTCTGGCGCGGT
GAAAATGGTCGCAAACCCGCGAGCGCTACGAACGCATGTGTAATATTCTGAAAGGTAAA
GGTCCGAAATACGTTAAACAGAATACCCTGAAACTGGCCACCGGCGCCAGCGCCGCTTC
GAGGACCTGCGCGTTCTGAGCTTCATCCGCGGTTACGGTGAACTGCGCAGCCGCTACTGG
GCCATCCGCACCCGCGAGCGGTGGTCCGCCGGCGAAACTGCTGAAAGAACGCGGTTTTTTT
GGTGCCATTGCGGGTTTTCTGGAAGGTAGCAAAGCCTATTCTAACTGCTATCCGTACGAT
GTTCCGGATTATGCGAGCCTGGGTAGCCTGCTGACCGAAGTGGAACCTATGTTCTGGGT
TGGCTGACCGGCAAAAACGGTCTGTATCCGGTTTGGACCGGTGTGACCCAGAACGGTTTT
TGGCGCGGTGAAAACGGCCGTAAAACCCGCGAGCGCCTATGAACGCATGTGCAACATTCTG
AAAGGCAAAGGTCCGAAATACGTGAAACAGAACACCCTGAAACTGGCCACCGGCGCGAGC
GCGGCCTTTGAGGACCTGCGCGTTCTGAGCTTTATTCGCGGCTATGGTGAACTGCGCAGC
CGCTATTGGGCGATTCTGTACCCGCGAGCGCGGCTAATAACTCGAGAAGCTTTCTAGACAT
ATGATGCATGAGCTC

도면3b

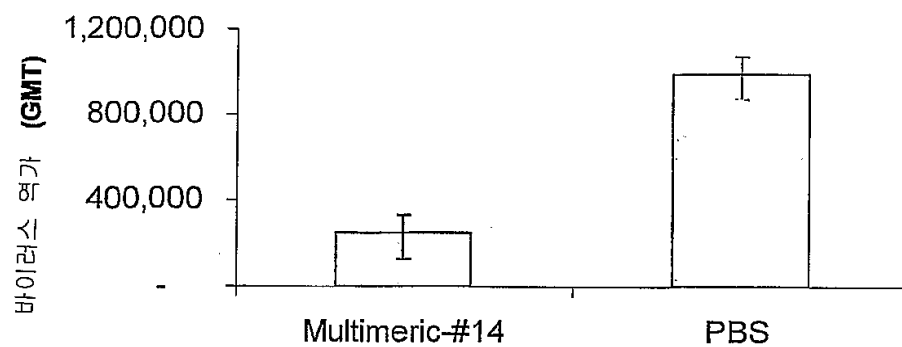
```

M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C
Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N
G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M
C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L
R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L
L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D
Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T
G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K
G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R
G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L L K E R G F F
G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L
L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F
W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q
N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S
R Y W A I R T R S G G
    
```

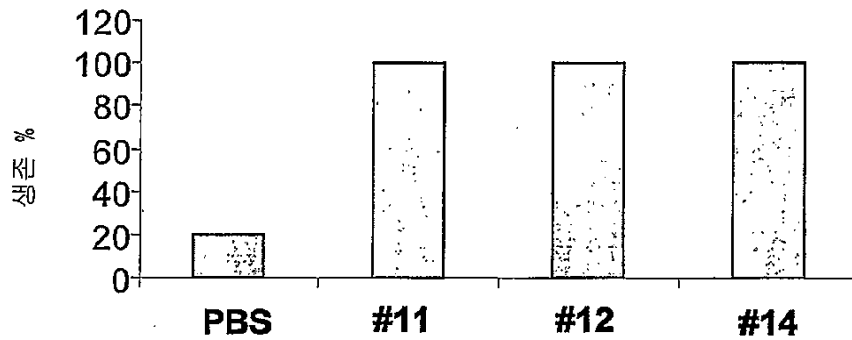
도면4



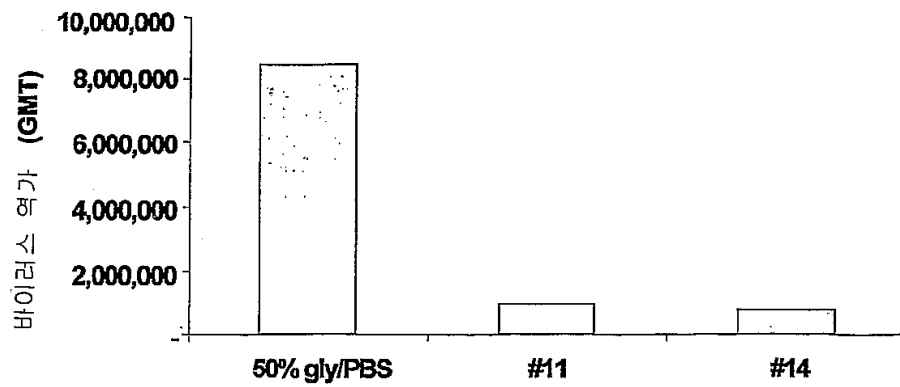
도면5



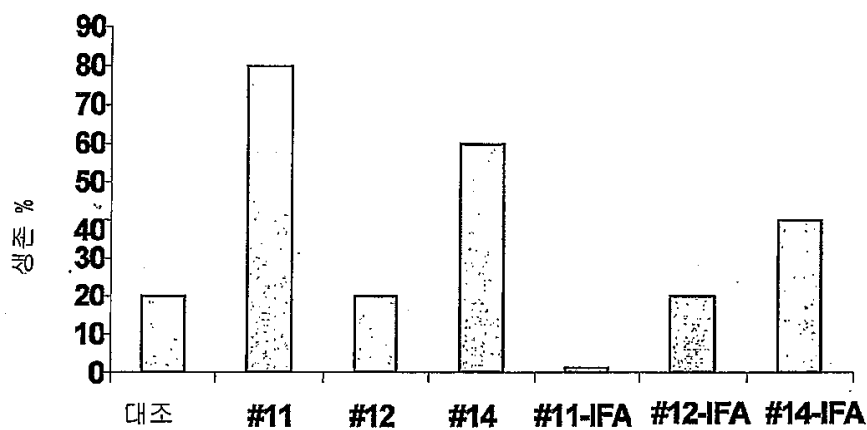
도면6a



도면6b



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BiondVax Pharmaceuticals Ltd.

<120> MULTIMERIC MULTIEPITOPE INFLUENZA VACCINES

<130> BNDVX/005/PCT

<160> 88
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 1
 Glu Val Glu Thr
 1
 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 2
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp
 1 5 10 15

 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 3
 Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg
 1 5
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 4
 Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10
 <210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 5

Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn

1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 6

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 7

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 8

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile

1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 9

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 10

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

1 5 10 15

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 11

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

1 5 10 15

Cys Arg

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 12

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gly Trp

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 14

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 15

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 16

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 17

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 18

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu

1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 19

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg

1 5 10 15

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 20

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn

1 5

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 21

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

1 5 10 15

Cys Arg

<210> 22

<211> 23

<212

> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 22

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu Cys

1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 23

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

1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 24

Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp

1 5

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 25

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 26

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Pro

1 5 10

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 27

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val

1 5

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 28

Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu

1 5

<210> 29
 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 29

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val

1 5 10 15

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 30

Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu

1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 31

Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys

1 5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 32

Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 33

Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 34

Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile

1 5

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 35

Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser

1 5 10 15

Glu Arg Gly

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 36

Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val

1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 37

Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val

1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 38

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 39

Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220

><223> Synthetic peptide

<400> 40

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr

1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 41

Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 42

Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val

1 5

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 43

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala

1 5 10

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 44

Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 45

Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu Ile

1 5 10

<210> 46

<

211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 46

Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys

1 5 10

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 47

Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Thr Tyr

1 5

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 48

Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5 10 15

Ser Leu

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 49

Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5 10 15

Ser Leu

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 50

Ser Thr Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5 10 15

Ser Leu

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 51

Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn

1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 52

Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 53

Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro

1 5 10

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 54

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg

1 5 10 15

Asn Val Pro

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 55

Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln

1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 56

Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 57

Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys

1 5 10

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 58

Lys Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr

1 5 10 15

Gly Gly

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 59

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr

1 5 10

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 60

Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 61

Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr

1 5

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 62

His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 63

His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 64

Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg

1 5 10 15

Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys

20

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 65

Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400>

> 66

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr

1 5

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 67

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly

1 5 10 15

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 68

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr

1 5 10 15

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 69

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr

1 5 10 15

<210> 70

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 70

Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly

1 5 10

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 71

Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 72

Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide
 <400> 73
 Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 74
 Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg
 1 5
 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 75
 Leu Pro Phe Asp Lys Pro Thr Ile Met
 1 5
 <210> 76
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 76
 Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr
 1 5
 <210> 77
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide

<400> 77

Arg Arg Ser Phe Glu Leu Lys Lys Leu

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 78

Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 79

Arg Pro Ile Ile Arg Pro Ala Thr Leu

1 5

<210>

80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 80

Ala Asp Arg Gly Leu Leu Arg Asp Ile

1 5

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 81

Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn

1 5 10

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 82

Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly

1 5 10 15

Phe Leu Glu

<210> 83

<211> 2199

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 83

atgcatatga gatctccagc taaacttctg aaagaacgtg gatttttcgg tgcaatcgct 60

ggttttctgg aggggtcgaa agcctacagt aactgttacc cctacgatgt gcccgattat 120

gccagcctgg gtacccctct tacagaagtt gaaacttatg tgctcggctg gctgacaggg 180

aaaaacggcc tttatcctgt gtggaccggc gtgacgcaga acggattctg gcgtggcgaa 240

aatggacgta aaactcgagc tgcgtatgag cgcatgtgta acatcctcaa aggtaaaggc 300

ccgaaatatg tgaacagaa tacattaaaa ttagccaccg gcgcgagcgc tgcctttgaa 360

gacctcgtg tgctcagttt tatccgcggt tatggggaac tgcgttctcg ctattgggcg 420

atccgtaccc ggtcaggggg tccaccggcg aagctgctga aagaacgtgg gttcttcggt 480

gcgattgccg gtttcttgga aggatcaaaa gcgtattcga actgctaccc gtatgatgtg 540

ccagattacg ccagcctggg ctccctcttg acagaggtcg aaacctatgt actgggttgg 600

ctgaccggta agaacggtct gtatccggtt tggactgggtg tgacacaaaa cggcttttgg 660

cggggggaaa acggccggaa aaccgcgagc gcttacgagc gcatgtgcaa cattctgaaa 720

ggcaaaggcc cgaaatacgt gaagcagaat acgctcaaac ttgccacggg cgcaagcgca 780

gcctttgaag acctgcgggt cttgagcttt atccgcggtt acggggagct gcggtcgcgc 840

tactgggcga ttctgtacgc tagtggtgga cctcccgcga aacttctgaa agagcggggc 900

ttcttttgag cgattgcggg cttcttgag ggaagcaaag cctactctaa ttgttaccca 960
 tacgatgtgc ctgattatgc gagcctcggg agcttgctga cagaagtgga aacctacgtt 1020
 ctccgctggc tgacgggcaa aaatgggtctc tacccagtgt ggaccggagt tacccagaat 1080
 gggttctggc gcggtgagaa cggccgtaaa acacgttcag cgtacgagcg gatgtgcaac 1140

atcttaaaag gcaaaggacc gaaatacgtc aagcagaata ctctgaagt agccactggg 1200
 gcctcagccg cctttgaaga ccttcgcgtc ttgagtttta tccgggggta tggggaactg 1260
 cggagccgct actgggctat tcgtacgagg tcgggtggcc cactcgagcc ggccaaattg 1320
 ctcaaagaac gtggttttct cggagcgatc gcaggttttc ttgaaggctc taaagcgtac 1380
 agcaactgtt atccatacga tgtgccggat tacgccagtc tgggttcctt cctgaccgag 1440
 gtggaaacgt atgtactagg atggctcacg ggtaaaaatg gtctctatcc tgtgtggacg 1500
 ggcgtaaccc agaacggctt ttggcggggc gaaaacggcc gaaaaccg tagcgcatat 1560

gagcgtatgt gtaacatcct taaaggcaaa ggtccaaaat acgttaagca gaataccctg 1620
 aaactggcta cgggcgccag tgcggccttc gaagatttac ggggtgctgc cttcatccgc 1680
 ggctatgttg aactgcgtc tcgttactgg gcaatccgta cccgcagtgg cggacctccg 1740
 gctaaactgt tgaaagaacg cggttctttt ggtgctatcg caggttttct ggaaggaagt 1800
 aaagcatatt cgaattgtta tccctacgac gtgccggatt atgcgtcgtc cggttcgctg 1860
 ctgaccgagg tggaaaccta cgttctaggc tgggtgacag gtaagaacgg gctttaccg 1920
 gtatggaccg gcgttaccca gaacggtttt tggcgcggtg aaaatggcgg taaaactcgg 1980

tcagcatatc aacggatgtg caatatcttg aaaggtaaag gaccgaaata cgttaaacag 2040
 aacacgtga aactggcaac aggcgccagc gcggcgtttg aggttttacg cgtcctgtca 2100
 tttattcggg gctacggcga attacgtagt cgttattggg cgattcgtac ccgcagcgga 2160
 gggtcgtagt aataaaagct ttctagacat atgatgcat 2199

<210> 84

<211> 723

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 84

Met His Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys

20	25	30
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr		
35	40	45
Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu		
50	55	60
Tyr Pro Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu		
65	70	75
80		
Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu		
85	90	95
Lys Gly Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala		
100	105	110
Thr Gly Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile		
115	120	125
Arg Gly Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg		
130	135	140
Ser Gly Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly		
145	150	155
160		
Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr		
165	170	175
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu		
180	185	190
Val Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr		
195	200	205
Pro Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn		
210	215	220
Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys		
225	230	235
240		
Gly Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr		
245	250	255
Gly Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg		
260	265	270

Gly Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser
 275 280 285
 Gly Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala
 290 295 300
 Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro
 305 310 315 320
 Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val
 325 330 335

 Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro
 340 345 350
 Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly
 355 360 365
 Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly
 370 375 380
 Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly
 385 390 395 400

 Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly
 405 410 415
 Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly
 420 425 430
 Gly Pro Leu Glu Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly
 435 440 445
 Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr
 450 455 460

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

515 520 525
 Gly Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 530 535 540
 Gly Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg
 545 550 555 560
 Gly Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser
 565 570 575
 Gly Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala
 580 585 590

 Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro
 595 600 605
 Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val
 610 615 620
 Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro
 625 630 635 640
 Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly
 645 650 655

 Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly
 660 665 670
 Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly
 675 680 685
 Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly
 690 695 700
 Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly
 705 710 715 720

Gly Leu Glu

<210> 85

<211> 1299

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 85

atgcatatga gatctccagc taaacttctg aaagaacgtg gatttttcgg tgcaatcgct 60
ggttttctgg agccaccggc gaagctgctg aaagaacgtg ggttcttcgg tgcgattgcc 120
ggtttcttgg aacctccgcg gaaacttctg aaagagcggg gcttcttgg agcgattgcg 180
ggcttcttgg agccatcgaa agcctacagt aactgttacc cctacgatgt gcccgattat 240
gccagcctgc cttcaaaagc gtattcgaac tgctaccgt atgatgtgcc agattacgcc 300

agcctgcca gcaaagccta ctctaattgt taccatacgt atgtgcctga ttatgcgagc 360
ctccctagcc tccttacaga agttgaaact tatgtgctca gcttgctgac agaagtggaa 420
acctacgttc tcagcttgct gacagaagtg gaaacctacg ttctctggct gacagggaaa 480
aacggccttt atccttggct gaccggtaag aacggtctgt atccgtggct gacgggcaaa 540
aatggctctt acctatggac cggcgtgacg cagaaccctt ggactgggtg gacacaaaac 600
ccatggaccg gagttacca gaatccttc tggcgtggcg aaaatggacg taaaactcgc 660
agtgcgtatg agcgcattgt taacatcctc aaaggtaaac ccttttggcg gggggaaaac 720

ggccggaaaa cccgcagcgc ttacgagcgc atgtgcaaca ttctgaaagg caaaccttc 780
tggcgcggtg agaacggcgc taaaacacgt tcagcgtacg agcggatgtg caacatctta 840
aaaggcaaac ctccgaaata cgtgaagcag aatacgtca aacttgccac gccaccgaaa 900
tacgtcaagc agaatactct gaagttagcc actccgccga aatacgtcaa gcagaatact 960
ctgaagttag ccaactcctc agccgccttt gaagacctc gcgtcttgag ttttatccgg 1020
ggttatccaa gcgcagcctt tgaagacctg cgggtcttga gctttatccg cggttaccct 1080
tcagccgcct ttgaagacct tcgcgtcttg agttttatcc ggggttatcc agaactgcgt 1140

tctcgctatt gggcgatccg taccgggtca gggccggagc tgcggtcgag ctactgggag 1200
attcgtacgc gtagtgggcc agaactgcgg agccgctact gggctattcg tacgcggtcg 1260
ggttaataac tcgagaggct ttctagacat atgatgcat 1299

<210> 86

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 86

Met His Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu

20 25 30
Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Pro Pro Ala Lys
35 40 45
Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu
50 55 60
Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr
65 70 75 80
Ala Ser Leu Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val

85 90 95
Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro
100 105 110
Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val
115 120 125
Glu Thr Tyr Val Leu Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu
130 135 140
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Trp Leu Thr Gly Lys

145 150 155 160
Asn Gly Leu Tyr Pro Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Trp
165 170 175
Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn
180 185 190
Pro Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Pro Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn
195 200 205
Pro Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu

210 215 220
Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Pro Phe Trp Arg Gly Glu Asn
225 230 235 240
Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys
245 250 255
Gly Lys Pro Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala

260 265 270
Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Pro Pro Lys Tyr Val

275 280 285
Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Pro Pro Lys Tyr Val Lys Gln

290 295 300
Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Pro Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr

305 310 315 320
Leu Lys Leu Ala Thr Pro Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu

325 330 335
Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Pro Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val

340 345 350
Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Pro Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg

355 360 365
Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Pro Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp

370 375 380
Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Pro Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala

385 390 395 400
Ile Arg Thr Arg Ser Gly Pro Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile

405 410 415
Arg Thr Arg Ser Gly

420

<210> 87

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 87

atgagatctc cggcgaaact gctgaaagaa cgtggccttt ttggcgcgat tgcgggcttt 60
ctggaaggca gcaaagcgta tagcaactgc tatccgtatg atgtgccgga ttacgcgagt 120
ctgggctctc tgctgaccga agtggaacc tatgtgctgg gctggctgac cggcaaaac 180
ggcctgtatc cgggtgtggac cggcgtgacc cagaacggct tttggcgtgg cgaacacggc 240

cgtaaaaccc gtagcgcgta tgaacgtatg tgcaacatcc tgaaaggcaa aggcccgaaa 300
tatgtgaaac agaacaccct gaaactggcc accggtgcga gcgcggcggtt tgaggacctg 360
cgtgttctga gctttattcg tggctatggc gaactgcgta gccgttattg ggcgattcgt 420
acccgtagcg gtggtccgcc ggccaaactg ctgaaagaac gcggtttctt cggtgcgatc 480
gccggttttc tggaaggtag caaagcctac tctaattgtt acccgtagca tgttccgat 540
tacccagcc tgggtagcct gctgaccgaa gttgaaacct acgttctggg ttggctgacc 600
ggtaaaaatg gtctgtaccc ggtttggacc ggtgttaccc agaatggttt ctggcgcggt 660

gaaaatggtc gcaaaacccg cagcgcctac gaacgcatgt gtaatatctt gaaaggtaaa 720
ggtccgaaat acgttaaaca gaataccctg aaactggcca ccgcgccag cgccgccttc 780
gaggacctgc gcgttctgag cttcatccgc gggtacgggt aactgcgcag ccgctactgg 840
gccatccgca cccgcagcgg tgggtccgccc gcgaaactgc tgaaagaacg cggttttttt 900
ggtgccattg cgggttttct ggaaggtagc aaagcctatt ctaactgcta tccgtacgat 960
gttccggatt atgcgagcct gggtagcctg ctgaccgaag tggaaacctt tgttctgggt 1020
tggctgaccg gcaaaaacgg tctgtatccg gtttggaccg gtgtgaccca gaacggtttt 1080

tggcgcggtg aaaacggcgg taaaaccgc agcgcctatg aacgcatgt caacattctg 1140
aaaggcaaag gtccgaaata cgtgaaacag aacaccctga aactggccac cggcgcgagc 1200
gcggcctttg aggacctgcg cggttctgagc tttattcgcg gctatggtga actgcgcagc 1260
cgctattggg cgattcgtac ccgcagcggc ggctaataac tcgagaagct ttctagacat 1320
atgatgcatg agctc 1335

<210> 88

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 88

Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala

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

50 55 60
 Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly

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

 130 135 140
 Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile
 145 150 155 160
 Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr
 165 170 175
 Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu
 180 185 190
 Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Val

 195 200 205
 Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg
 210 215 220
 Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys
 225 230 235 240
 Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Ala
 245 250 255
 Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr

 260 265 270
 Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly
 275 280 285
 Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala
 290 295 300

Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Tyr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp
305					310					315					320
Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr

[illegible]

385 390 395 400
Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Gly

 405 410 415
Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly

 420 425 430