



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0066977
(43) 공개일자 2023년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0152567
(22) 출원일자 2021년11월08일
심사청구일자 2021년11월08일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 의과대학 1층 125호 의동물학교실
강해지
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 의과대학 1층 125호 의동물학교실
(74) 대리인
특허법인 천지

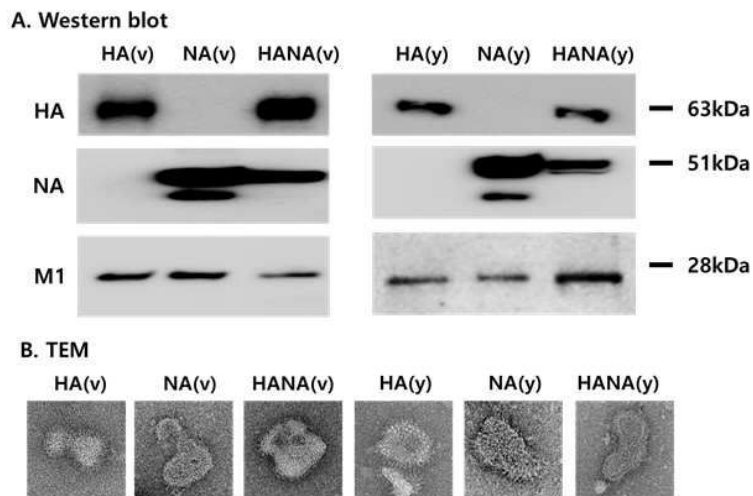
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 인플루엔자 B 바이러스 유사입자 및 이를 이용한 백신

(57) 요약

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질1(M1)으로 이루어진 코어 및 상기 코어의 표면에 디스플레이된 인플루엔자 B 바이러스의 항원을 포함하는 바이러스 유사 입자 및 이를 포함하는 백신이 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/16 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 2710/14043 (2013.01)

C12N 2760/16223 (2013.01)

C12N 2760/16234 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033307
과제번호	HV20C0085
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병예방치료기술개발사업(R&D)
연구과제명	인플루엔자 바이러스 유사입자 범용 백신 플랫폼 개발
기 여 율	7/10
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.10.06 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345331688
과제번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	활성산소 조절을 통한 만성질환병 예방치료에 관한 연구
기 여 율	3/10
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질1(M1)으로 이루어진 코어; 및 항원 단백질을 포함하고,
상기 항원 단백질은, 인플루엔자 B 바이러스의 헤마글루티닌, 뉴라미니다제, 또는 이들의 조합이고,
상기 인플루엔자 B 바이러스는 빅토리아 계통 또는 야마가타 계통인,
인플루엔자 B 바이러스 유사 입자.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 헤마글루티닌은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것이고,
상기 뉴라미니다제는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인,
인플루엔자 B 바이러스 유사 입자.

청구항 3

제1항의 인플루엔자 B 바이러스 유사 입자를 포함하는,
인플루엔자 B 바이러스 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 백신 조성물은 인플루엔자 B 바이러스의 빅토리아 계통 및 야마가타 계통에 대해 교차 면역 반응을 나타내는 것인,
인플루엔자 B 바이러스 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,
상기 조성물은 어쥬번트를 더 포함하는,
인플루엔자 B 바이러스 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 6

i) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질1(M1)을 발현하는 재조합 배컬로바이러스 및 ii) 인플루엔자 B 바이러스의 헤마글루티닌을 발현하는 재조합 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스의 뉴라미니다제를 발현하는 재조합 바이러스, 또는 이들의 조합을 곤충세포에 공동 감염시키는 단계;
공동 감염된 곤충세포를 배양하고 바이러스 유사 입자를 정제하는 단계를 포함하는,
인플루엔자 B 바이러스 유사 입자의 제조 방법.

청구항 7

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질1(M1)을 발현하는 재조합 배컬로바이러스; 및
인플루엔자 B 바이러스의 헤마글루티닌을 발현하는 재조합 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스의 뉴라미니다제를 발현하는 재조합 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함하는,

인플루엔자 B바이러스 유사 입자 제조용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 B 바이러스 유사입자 및 이를 이용한 백신에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자는 급성 호흡기 질환의 일종으로, 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 발병되며 발열, 인후통, 기침 등의 증상이 발생한다.

[0003] 인플루엔자 B 바이러스는 전체 인플루엔자 감염의 23%를 차지하고 있으며, 인플루엔자 관련 소아 사망률의 52%를 차지하고 있다. 인플루엔자 B 바이러스는 크게 Victoria와 Yamagata 계통으로 구별되며, 인플루엔자 A 바이러스보다 상대적으로 낮은 유행성을 나타내므로, 인플루엔자 B 바이러스 감염 예방을 위한 백신 연구는 상대적으로 부족한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Influenza M2 virus-like particle vaccination enhances protection in combination with avian influenza HA VLPs. PLoS ONE 2019, 14, e0216871.

(비특허문헌 0002) Influenza Virus-like Particle (VLP) Vaccines Expressing the SARS-CoV-2 S Glycoprotein, S1, or S2 Domains, Vaccines 2021, 9, 920.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 구체예에 따르면, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질1로 이루어진 코어 및 인플루엔자 B 바이러스의 항원 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자 및 이를 이용한 백신을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 양상은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질1(M1)으로 이루어진 코어; 및 항원 단백질을 포함하고, 상기 항원 단백질은, 인플루엔자 B 바이러스의 헤마글루티닌, 뉴라미니다제, 또는 이들의 조합이고, 상기 인플루엔자 B 바이러스는 빅토리아 계통 또는 야마가타 계통인, 인플루엔자 B 바이러스 유사 입자를 제공한다.

[0007] 상기 바이러스 유사 입자(Virus like particle, VLP)는 바이러스의 단백질을 포함하지만 유전 물질을 포함하지 않기 때문에 감염성이 없는 입자이다. 바이러스 유사 입자는 바이러스 구조 단백질의 개별 발현 및 자가 조립에 의해 합성될 수 있다.

[0008] 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)은 인플루엔자 바이러스의 구조 단백질로서, 인플루엔자 바이러스의 외피(envelop) 안쪽에 코트(coat)를 형성하는 기질단백질(matrix protein)을 의미한다. 일 실시예에 따르면, M1 단백질은 바이러스 유사 입자의 구조 단백질로서 이용될 수 있다. 상기 M1 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0009] 본 발명자는 6가지 종류의 VLP, (1) Hv VLP(Hv+M1), (2) Nv VLP(Nv+M1), (3) HvNv VLP(Hv+Nv+M1), (4) Hy VLP(Hy+M1), (5) Ny VLP(Ny+M1), (6) HyNy VLP(Hy+Ny+M1)를 제작하고, 상기 VLP로 면역화된 마우스에 인플루엔자 B를 감염시킨 결과 면역 효과가 우수함을 확인하였으며, 특히 (4) Hy VLP(Hy+M1), (5) Ny VLP(Ny+M1), (6) HyNy VLP(Hy+Ny+M1)는 교차 면역 반응이 일어남을 확인하였다.

[0010] 일 구체예에 따르면, 상기 헤마글루티닌은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있

고, 상기 뉴라미니다제는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

- [0011] 상기 항원 단백질은 상기 바이러스 유사 입자 또는 코어의 표면에 디스플레이된 것일 수 있다.
- [0012] 상기 바이러스 유사 입자는 당해 기술 분야에서 통상기술자에게 알려진 방법으로 제조될 수 있으며, 예를 들면 배컬로바이러스 발현 시스템으로 제조될 수 있다.
- [0014] 다른 양상은 상기 인플루엔자 B 바이러스 유사 입자를 포함하는 인플루엔자 B 바이러스 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 인플루엔자 B 바이러스 유사 입자는 항원으로 작용할 수 있으며, 유전 물질을 포함하지 않으므로 감염 위험이 없어 안전하므로 인플루엔자 B 바이러스에 대한 백신으로 사용될 수 있다.
- [0016] 일 구체예에 따르면, 상기 백신 조성물은 인플루엔자 B 바이러스의 빅토리아 계통 및 야마가타 계통에 대해 교차 면역 반응을 나타내는 것일 수 있다. 일 실시예에 따르면, 야마가타 계통의 헤마글루티닌, 뉴라미니다제, 또는 이들의 조합을 포함하는 VLP는 빅토리아 계통 바이러스에 대해 교차반응을 나타냈으며, 이에 기초하면 빅토리아 계통의 헤마글루티닌, 뉴라미니다제, 또는 이들의 조합을 포함하는 VLP 또한 야마가타 계통 바이러스에 대해 교차반응을 일으킬 것으로 예상된다.
- [0017] 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 어쥬번트를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 어쥬번트(Adjuvant)는 백신 또는 약학적으로 활성 있는 성분들에 첨가되어 면역반응을 증가시키거나 영향을 주는 물질 또는 조성물을 의미한다. 상기 어쥬번트는 예를 들면 알루미늄 염, 툴 유사 수용체 (TLR) 효현재, 모노포스포릴 지질 A (MLA), 합성 지질 A, 지질 A 모방체 또는 유사체, MLA 유도체, 사이토킨, 사포닌, 무라밀 디펩티드 (MDP) 유도체, CpG 올리고, 그람 음성균의 지질다당류 (LPS), 폴리포스파젠, 에멀션, 비로솜, 카를리 어트, 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLG) 마이크로입자, 폴록사머 입자, 마이크로입자, 리포솜, 완전한 프로인드 어쥬번트 (CFA), 및 불완전 프로인드 어쥬번트 (IFA)로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 알루미늄 염은 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포스페이트가 사용될 수 있으나 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 때는 보통 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘스 테이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제가 포함된다. 비수용성 제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0020] 상기 백신 조성물의 투여 경로는 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들면 경구 또는 비경구 투여될 수 있고, 상세하게는 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여할 수 있다. 비경구 투여는 피하, 피내, 정맥 내, 근육 내, 관절 내, 활액낭내, 흉골 내, 경막 내, 병소 내 및 두개골 내 주사를 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 백신 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택될 수 있다. 별다른 부작용 없이 개체에 면역반응을 유도하기에 필요한 양은 면역원으로써 사용된 VLP 및 다른 성분의 존재에 따라 다양할 수 있으며, 이는 통상기술자에게 알려진 방법으로 결정될 수 있다.
- [0022] 또 다른 양상은, i) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질1(M1)을 발현하는 재조합 배컬로바이러스 및 ii) 인플루엔자 B 바이러스의 헤마글루티닌을 발현하는 재조합 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스의 뉴라미니다제를 발현하는 재조합 바이러스, 또는 이들의 조합을 곤충세포에 공동 감염시키는 단계; 공동 감염된 곤충세포를 배양하고 바이러스 유사 입자를 정제하는 단계를 포함하는 인플루엔자 B 바이러스 유사 입자의 제조 방법을 제공한다.

[0023] 또 다른 양상은, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질(M1)을 발현하는 재조합 배칼로바이러스; 및 인플루엔자 B 바이러스의 헤마글루티닌을 발현하는 재조합 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스의 뉴라미니다제를 발현하는 재조합 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함하는, 인플루엔자 B 바이러스 유사 입자 제조용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 일 구체예에 따른 인플루엔자 B 바이러스 유사입자는 인플루엔자 B 백신으로 사용될 수 있으며, 빅토리아 계통 및 야마가타 계통의 인플루엔자 B 바이러스에 대해 교차 면역 반응을 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 일 실시예에 따라 제조된 VLP 입자의 특성을 웨스턴 블롯 및 TEM 촬영하여 분석한 결과이다.
 도 2는 각각의 VLP로 면역화된 마우스 혈청으로 인플루엔자 B 바이러스 특이 IgG 항체 형성 정도를 확인한 결과이다.
 도 3은 각각의 VLP로 면역화된 마우스 혈청으로 혈구응집억제 반응을 확인한 결과이다.
 도 4는 각각의 VLP로 면역화 후 인플루엔자 B에 감염된 마우스 폐의 염증성 사이토카인 발현량을 확인한 결과이다.
 도 5는 각각의 VLP로 면역화 후 인플루엔자 B에 감염된 마우스 폐의 바이러스 역가를 측정한 결과이다.
 도 6은 각각의 VLP로 면역화 후 인플루엔자 B에 감염된 마우스의 몸무게 변화 및 생존율을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 실험방법

[0029] 1. 마우스, 세포, 및 바이러스 준비

[0030] 7주령 암컷 BALB/c 마우스는 Nara biotech(서울, 대한민국)에서 구입했다. 모든 연구 절차는 경희대학교 동물실험실 운영위원회 지침(승인번호: KHSASP-20-604)에 따라 수행되었다.

[0031] Sf9(*Spodoptera frugiperda* 9) 세포는 재조합 배칼로바이러스(rBV) 및 VLP 제조에 사용되었다. Sf9 세포는 스피너 플라스크(spinner flask) 내 무혈청 SF900II 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 135rpm 및 27° C 조건으로 현탁 배양되었다.

[0032] MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포는 인플루엔자 플라크(plaque) 분석에 사용되었다. MDCK 세포는 10% 소태아혈청(FBS)이 포함된 DMEM에서 배양하였다.

[0033] 인플루엔자 B 바이러스, B/Colorado/06/2017(B/Victoria/2/87 계통)은 0.02의 MOI(multiplicity of infection)로 일련의 바이러스 계대에 걸쳐 현탁 MDCK 세포에 적응되었다. Seed 바이러스는 100 μ l로 분주(aliquot)하여 -80°C에서 저장되었다.

[0034] 2. 재조합 배칼로바이러스 및 바이러스 유사입자 생성

[0035] B/Washington/02/2019 (B/Victoria/2/1987) 또는 B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata/16/1988)의 헤마글루티닌(hemagglutinin, H) 및 뉴라미니다제(Neuraminidase, N)를 생산하기 위해 코돈 최적화 pFast-HA 및 pFast-NA를 포함하는 플라스미드(Genescript사)를 준비했다.

[0036] Hv(Hemagglutinin of B/Victoria/2/1987), Nv(Neuraminidase of B/Victoria/2/1987), Hy(Hemagglutinin of B/Yamagata/16/1988) 또는 Ny(Neuraminidase of B/Yamagata/16/1988)를 함유하는 재조합 플라스미드로 competent 세포(DH10Bac)를 형질전환(transformation)시켰다.

[0037] 플라스미드에 포함된 Hv(Hemagglutinin of B/Victoria/2/1987), Nv(Neuraminidase of B/Victoria/2/1987), Hy(Hemagglutinin of B/Yamagata/16/1988), 및 Ny(Neuraminidase of B/Yamagata/16/1988)의 염기 서열은 서열

번호 6 내지 9에 기재되어 있다.

- [0038] 형질전환된 competent 세포로부터 Hv, Nv, Hy 또는 Ny를 함유하는 재조합 Bacmid 얻고, Bacmid 및 리포펙틴 (Invitrogen)으로 Sf9 세포를 형질감염시켜 Hv, Nv, Hy 또는 Ny를 발현하는 rBV를 생산하였다.
- [0039] 6 종류의 인플루엔자 VLP를 생성하기 위해, Sf9 세포를 M1, Hv, Nv, Hy 또는 Ny를 발현하는 rBV를 조합하여 공동감염(co-infect)시켰다(0.2의 감염 다중도(MOI)). 6가지 공동감염 조합은 (1) Hv VLP(Hv+M1), (2) Nv VLP(Nv+M1), (3) HvNv VLP(Hv+Nv+M1), (4) Hy VLP(Hy+M1), (5) Ny VLP(Ny+M1), (6) HyNy VLP(Hy+Ny+M1)이다. 감염 후 3일째에 Sf9 세포 배양 상청액을 수확하고 6000rpm에서 30분 동안 원심분리하여 세포를 제거하고, 상층액을 4℃에서 20분 동안 30000rpm으로 원심분리하여 VLP를 얻었다. VLP를 15%-30%-60% 수크로스 구배(gradient)를 통해 정제하고 -80℃에서 보관했다.
- [0040] 상기 인플루엔자 M1-발현 rBV 제조 및 공동 형질감염 방법은 Virus-like particle vaccines expressing Toxoplasma gondii rhoptry protein 18 and microneme protein 8 provide enhanced protection. Vaccine 2018, 36, 5692-5700을 참고하여 실시할 수 있다.
- [0042] 3. VLP 특성 분석
- [0043] 3-1. 웨스턴 블롯
- [0044] 인플루엔자 VLP(Hv, Nv, HvNv, Hy, Ny, HyNy) 샘플을 1x running buffer가 있는 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 겔에 로딩했다. 150V에서 1시간 동안 전기영동하고, 트랜스퍼 버퍼를 사용하여 겔을 니트로셀룰로오스(NC) 멤브레인으로 옮겼다. 멤브레인을 5% 탈지유로 27℃에서 30분 동안 blocking 하였다. 멤브레인을 TBST(1x TBS, 0.1% Tween 20)로 세척한 다음 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 1차 항체는 인플루엔자 B(1:500)에 두 번 감염된 마우스 항체, 항-NA 단일클론항체(1:10000) 및 항-M1 단일클론항체(1:3000)를 사용했다.
- [0045] 1차 항체를 처리한 멤브레인을 5% 탈지유로 27℃에서 1시간 인큐베이션하였다. 항-마우스 IgG HRP(1:2000)를 2차 항체로 사용하여 HA 및 M1을 검출하거나, 항-토끼 IgG HRP(1:10000)를 사용하여 NA를 검출했다. 마우스 항-M1 단클론항체(22396)는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하였고 토끼 항-NA 단클론항체(HCA-2)는 강상무 박사로부터 제공받았다.
- [0046] 3-2. 헤마글루티닌 활성
- [0047] HA assay는 96웰 round (U)-bottom 플레이트를 사용했다. column 2 내지 12 웰에는 PBS 50 μ l를 채우고, column 1에는 PBS 100 μ l로 희석된 VLP 샘플 1 μ g을 첨가했다. 피펫을 사용하여 VLP를 column 2 웰부터 12 웰까지 연속 희석하였다. 그 후, 플레이트의 모든 웰에 0.5% 닭 적혈구 현탁액 50 μ l를 첨가했다. 96웰 플레이트를 27℃에서 2시간 동안 인큐베이션하고 HA 역가를 계산하였다.
- [0048] 3-3. 뉴라미니다제 활성
- [0049] VLP의 Neuraminidase 활성은 Amplex Red 뉴라미니다제 분석 키트를 사용하여 제조업체의 지침(Invitrogen)에 따라 측정되었다. 구체적으로, 10 μ g의 각 VLP 샘플을 50 μ l의 Amplex Red 반응 완충액으로 희석한 다음 평평한 96웰 플레이트에 첨가했다. 그 후, Amplex Red working solution을 설명서에 따라 준비하고 working solution 50 μ l를 플레이트에 첨가했다. 플레이트를 37℃에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션하고 VLP에서 NA 활성을 분석하기 위해 570 nm에서 흡광도를 측정했다.
- [0050] 3-4. TEM을 이용한 VLP 형태 관찰
- [0051] TEM(JEOL 2100, JEOL USA, Inc.; Peabody, MA, USA)을 사용하여 인플루엔자 VLP의 형태를 관찰했다. VLP 샘플을 formvar-amorphous carbon-coated copper grid(Ted Pella, Redding, CA)에 놓고 1.5% phosphotungstic acid(pH = 7.0, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)로 염색했다. 염색된 격자를 TEM으로 관찰하고 VLP 형태 이미지를 캡처하였다.
- [0053] 4. VLP 백신 효능 검증

- [0054] 4-1. 면역화 및 바이러스 감염
- [0055] 7주령의 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였다. 마우스(그룹당 n=6)는 4주 간격으로 2회 근육내 주사하여 면역화되었다. 면역화에 사용된 주사제는 PBS 100 μ l에 Hv VLP, Nv VLP, HvNv VLP, Hy VLP, Ny VLP 또는 HyNy VLP 10 μ g을 용해시켜 사용하였다. 프라이밍 및 부스트 면역화 후 각 마우스로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 부스트 면역화 후 4주가 경과한 면역화 마우스에 B/Colorado/06/2017(B/Victoria/2/87 계통)를 치사량(LD)만큼 주입하였다.
- [0056] 4-2. 마우스 혈청에서의 IgG 형성 확인
- [0057] 백신 1차 및 2차 접종 후 수득한 혈청에서의 IgG 형성을 확인하기 위해 96웰 배양 플레이트를 비활성화된 인플루엔자 B 바이러스(B/Colorado/06/2017) 항원 (4 μ g/ml)으로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 수득한 혈청을 1:100으로 희석하여 플레이트에 100 μ l씩 넣어주고 1시간 동안 반응시켰다. 분비된 IgG 및 IgA 항체 수준을 결정하기 위해 2차 항체 IgG를 1:2000으로 희석하여 반응을 시켰다. Substrate buffer를 10 μ l 씩 넣은 후 ELISA reader로 OD값을 확인하였다.
- [0058] 4-3. 헤마글루티닌 억제 분석(hemagglutinin inhibition assay) - 혈구응집억제 분석
- [0059] B/Colorado/06/2017(B/Victoria/2/87 계통)은 이 연구에서 모든 면역화된 마우스 혈청 샘플을 테스트하기 위한 HI(hemagglutinin inhibition) 항원으로 사용되었다. 혈청 샘플은 37°C에서 밤새 표준 수용체 파괴 효소(receptor destroying enzyme, RDE) 처리를 거친 후 56°C에서 30분 동안 비활성화되었다. 96웰 U-bottom 플레이트의 컬럼 2 내지 11에는 PBS 25 μ l/웰을 첨가하고, 컬럼 12에는 PBS 50 μ l를 첨가했다.
- [0060] 초기 1:10 희석된 개별 RDE 처리 혈청 샘플을 각 웰에 50 μ l/웰로 분주하고, 다음 플레이트에 걸쳐 연속적으로(2배) 희석했다. 그 다음 미리 적정된(pre-titrated) 바이러스(8 HA units/50 μ l)를 컬럼에 대해 25 μ l/웰로 각 플레이트에 첨가했다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 인큐베이션하여 항체-바이러스 중화를 유도했다. 인큐베이션 후, 컬럼에 대해 0.5% 닭 RBC를 각 웰에 50 μ l/웰 첨가했다.
- [0061] 4-4. 항체 및 사이토카인 생산을 위한 ELISA 분석
- [0062] 인플루엔자 바이러스 특이적 항체 IgG 및 IgA는 혈청 및 폐 추출물을 ELISA 분석하여 결정되었다. 비활성화된 인플루엔자 바이러스 B/Colorado/06/2017(4 μ g/ml)를 96웰 플레이트에서 4°C에서 밤새 코팅하여 항원으로 사용했다. 폐 추출물의 IFN- γ , IL-6 및 TNF- α 를 포함한 사이토카인의 수준은 ELISA 키트를 사용하여 측정되었다(Kang H, et al (2019) Influenza M2 virus-like particle vaccination enhances protection in combination with avian influenza HA VLPs. PloS One 14(6): e0216871).
- [0063] 4-5. FACS
- [0064] 폐의 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 대식세포, B 세포 및 GC(germinal center) B 세포를 분석하기 위해, 인플루엔자 B 바이러스에 감염 후 4일이 경과한 마우스에서 폐 조직(4 dpi(day post infection))를 수집하였다. 수집된 폐 조직을 주사기로 균질화하고, 폐 세포를 퍼콜 구배(percoll gradients)하고 44% 내지 67% 사이의 층으로부터 수집하였다. 수확된 세포를 37°C에서 2시간 동안 불활성화된 바이러스 항원 H5N1 및 H3N2(0.5 μ g/ml)으로 자극하였다. 그 다음 세포를 항CD3, 항CD4, 항CD8, 항CD45, 항CD11b, 항CD23, 항F480, 항B220, 항GL7, 항CD19 및 항IgD(BD biosciences)로 염색했다. 모든 데이터는 C6 유세포 분석기(BD biosciences) 및 C6 Analysis 소프트웨어(BD biosciences)로 분석되었다.
- [0065] 4-6. 폐 바이러스 역가(lung virus titer)
- [0066] 3 dpi(day post infection)에서 폐 바이러스 역가는 12웰 플레이트에서 MDCK 세포에 형성된 플라크를 계수하여 결정되었다. 폐 추출물을 DMEM에 연속적으로 희석한 후, MDCK 세포를 포함하는 12웰 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 바이러스를 제거하고 overlay 배지(구성: DEAE 텍스트란, 비필수 아미노산, 글루타민 및 트립신)를 첨가하였다. 플레이트를 3일 동안 배양한 다음 세포를 0.25% 글루타르알데히드로 고정하고 1% 크리스탈 바이올렛으로 염색했다.
- [0068] 5. 통계 분석
- [0069] 통계 분석은 GraphPad Prism 8(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)에서 Tukey 다중 비교 테스트를 사용

한 일원 분산 분석(ANOVA)으로 수행되었다. Line은 그룹 간에 직접 비교가 이루어진 위치를 나타낸다. 차이는 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 에서 유의한 것으로 간주되었다.

[0071] 실시예 1: 인플루엔자 VLP 백신의 특성 분석(characterization)

[0072] 인플루엔자 B 바이러스의 HA(v), NA (v), HA(y), NA(y)의 항원을 이용하여 인플루엔자 B 바이러스 유사입자 백신 제조 후 특성을 확인하였다.

[0073] 인플루엔자 B 바이러스의 HA 및 NA 유전자를 pFast vector에 클로닝한 뒤 SF9 cells에 형질전환하여 각각의 재조합 베컬로바이러스(rBV)를 제조하였다. 이후 HA(v), NA (v), HA(y), NA(y), M1 rBV를 다양한 조합으로 SF9 세포에 공동 감염하여 바이러스 유사입자 백신 HA(v) VLPs, NA (v) VLPs, HANA(v) VLPs, HA(y) VLPs, NA(y) VLPs, HANA(y) VLPs를 제조하였다. 제조된 바이러스 유사입자 백신에 단일클론 항체를 이용하여 NA를 확인하고, 다클론 항체를 이용하여 M1 과 HA를 단백질 특성을 확인하였다. 각각의 바이러스 유사입자 백신의 형태는 TEM을 이용하여 확인하였다.

[0074] 도 1의 웨스턴 블롯 및 TEM에 따르면, HA(v) VLPs, NA(v) VLPs, HANA(v) VLPs, HA(y) VLPs, NA(y) VLPs, HANA(y) VLPs가 성공적으로 제작되었다.

[0076] 실시예 2: 동물모델에서 백신효능 검증

[0077] 앞서 제작한 인플루엔자 B 바이러스 유사입자 백신을 마우스에 접종하고 인플루엔자 B 바이러스 B/Colorado/06/2017 (Victoria lineage)를 감염시켜 혈청과 폐에서 특이 면역 반응 확인하였다.

[0078] BALB/c 마우스에 VLPs 10 μ g을 근육 주사로 2번 접종(프라임, 부스트)하고, 1차 접종 4주 후, 그리고 2차 접종 4주 후 마우스의 혈청을 안와채혈(orbital blood collection)로 수득하였다.

[0079] 2-1. 인플루엔자 B 바이러스 특이 IgG 항체 형성 분석

[0080] 1차 접종 4주 후 수득한 혈청 및 2차 접종 4주 후 수득한 혈청으로 인플루엔자 B 바이러스 특이 IgG 항체 형성 정도를 ELISA로 분석하였다. 도 2에 따르면, victoria 계통(lineage)의 HA가 포함된 VLPs 접종 그룹인 HA(v) VLPs 및 HANA(v) VLPs의 항체 반응이 가장 높게 나타났다.

[0081] 2-2. 인플루엔자 B 바이러스에 대한 혈구응집억제 반응 분석

[0082] 2차 접종 4주 후 수득한 혈청을 이용하여 인플루엔자 B 바이러스에 대한 혈구응집억제 반응을 확인하였다. 도 3에 따르면, HA(v) VLPs, HANA(v) VLPs 접종 그룹은 300 HAI 이상의 값을 나타냈다. HA(y) VLPs 및 HANA(y) VLPs의 경우 B/Colorado/06/2017 (Victoria lineage)에 대해 70이 넘는 HAI 값을 나타냈으며, 교차면역이 가능할 것이다.

[0083] 2-3. 면역화 후 감염된 마우스 폐의 사이토카인 발현 분석

[0084] VLPs를 2번 접종한 마우스에 치사량의 인플루엔자 B 바이러스를 비강 경로로 감염시켰다. 감염 4일 후에 마우스에서 폐를 분리하여 바이러스 감염에 의해 유도되는 초기 염증성 사이토카인인 IFN- γ , IL-6, TNF- α 를 ELISA로 측정하였다.

[0085] 도 4에 따르면, HA(v) VLPs, NA(v) VLPs, HANA(v) VLPs 접종군 모두 초기 염증성 사이토카인 발현이 낮았으며, HA(y) VLPs, NA(y) VLPs, HANA(y) VLPs 접종군 또한 염증성 사이토카인 발현이 낮았으므로 교차 면역이 유도된 것으로 확인되었다.

[0086] 2-4. 면역화 후 감염된 마우스 폐의 바이러스 역가 분석

[0087] VLPs를 2번 접종한 마우스에 치사량의 인플루엔자 B 바이러스를 비강 경로로 감염시켰다. 감염 4일 후 마우스의 폐를 분리하여 균질화하고 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 수득한 상층액으로 plaque assay를 실시하여 인플루엔자 B 바이러스 역가를 측정하였다.

[0088] 도 5에 따르면, HA(v) VLPs, NA (v) VLPs, HANA(v) VLPs 접종 마우스의 바이러스 역가가 가장 낮았고, HA(y) VLPs, NA(y) VLPs, HANA(y) VLPs 접종 마우스의 바이러스 역가 또한 Naive+Cha 대조군보다 현저히 낮아 교차 면역을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0089]

2-5. 면역화 후 감염된 마우스의 몸무게 및 생존율 분석

[0090]

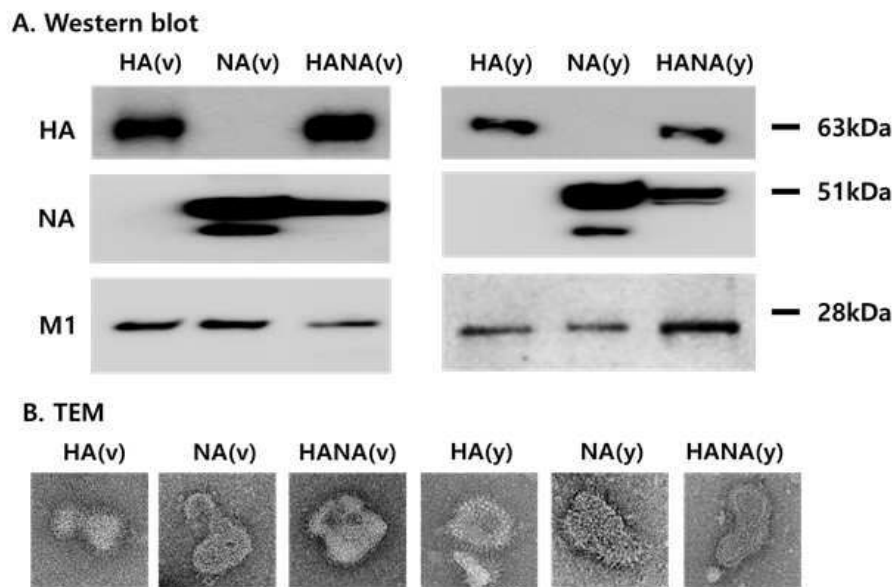
VLPs를 2번 접종한 마우스에 치사량의 인플루엔자 B 바이러스를 감염시켜 14일 동안 몸무게 변화율과 생존율을 기록하였다.

[0091]

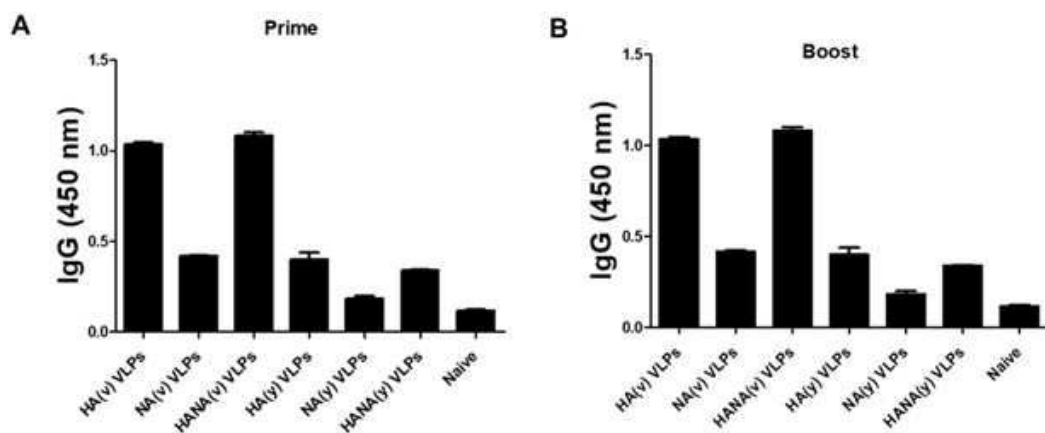
도 6에 따르면, HA(v) VLPs, NA (v) VLPs, HANA(v) VLPs 접종군은 몸무게 변화 없이 모두 100% 생존하였음. HA(y) VLPs, NA(y) VLPs, HANA(y) VLPs 접종군은 5% 정도의 몸무게 감소를 나타냈으나, 이후 모두 회복하여 100% 생존하였으므로 교차 면역 반응을 나타내는 것으로 확인되었다.

도면

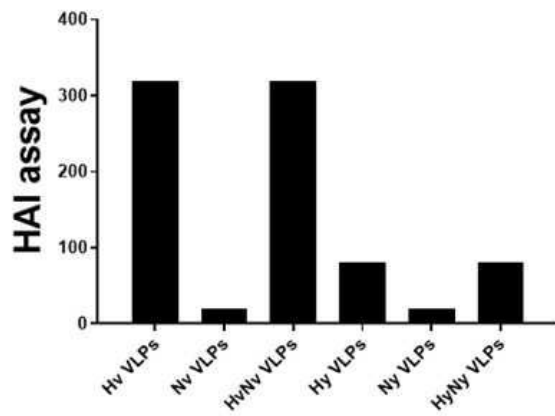
도면1



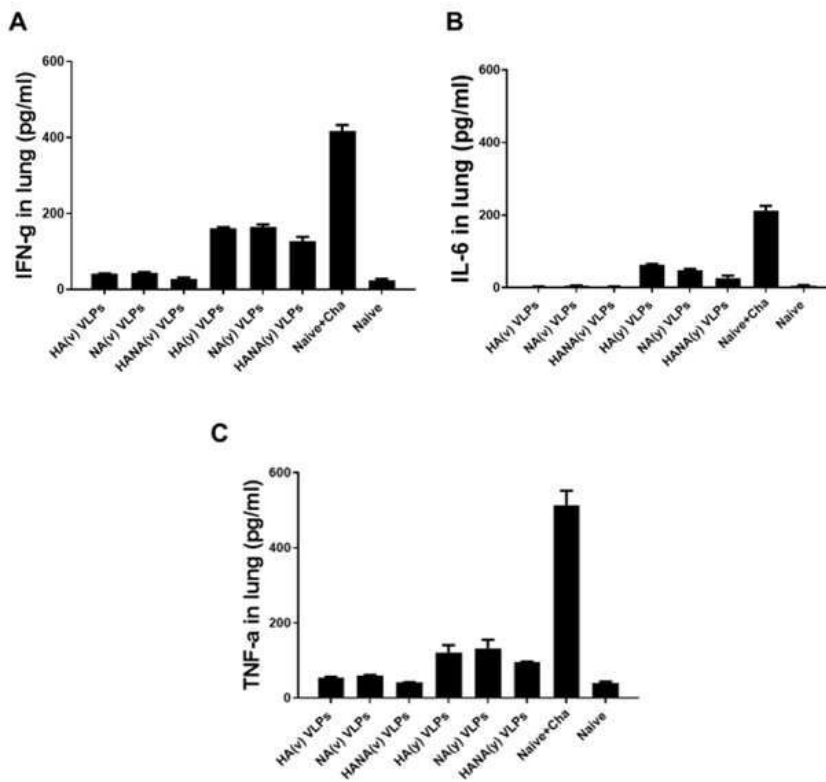
도면2



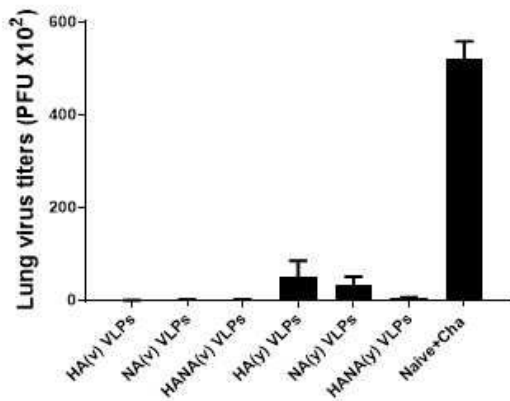
도면3



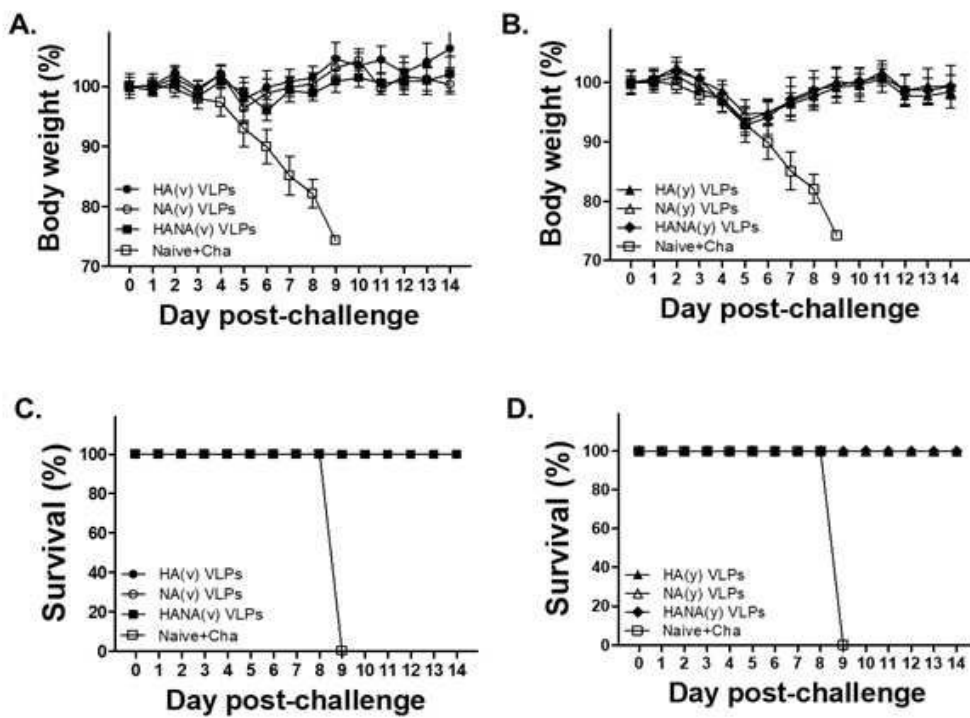
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Influenza B virus-like particles and vaccine using the same
- <130> CDP2021-0762
- <160> 9
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 582
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Hv

<400> 1

Met Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn Ala Asp

1 5 10 15

Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val Lys

20 25 30

Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu Thr

35 40 45

Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Glu Thr

50 55 60

Arg Gly Lys Leu Cys Pro Lys Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp Val

65 70 75 80

Ala Leu Gly Arg Pro Lys Cys Thr Gly Lys Ile Pro Ser Ala Arg Val

85 90 95

Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro Ile

100 105 110

Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg Gly

115 120 125

Tyr Glu His Val Arg Leu Ser Thr His Asn Val Ile Asn Ala Glu Asp

130 135 140

Ala Pro Gly Arg Pro Tyr Glu Ile Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro Asn

145 150 155 160

Ile Thr Asn Gly Asn Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val Pro

165 170 175

Lys Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Ile Glu Val Pro Tyr Ile

180 185 190

Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe His Ser Asp

195 200 205

Asn Glu Thr Gln Met Ala Lys Leu Tyr Gly Asp Ser Lys Pro Gln Lys

210 215 220

Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val Ser Gln Ile

225 230 235 240

Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro Gln Ser Gly

245 250 255

Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Ser Gly Lys Thr Gly Thr

260 265 270

Ile Thr Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu Pro Gln Lys Val Trp Cys Ala

275 280 285

Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu Ile Gly Glu

290 295 300

Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys Ser Lys Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His Gly Tyr Thr

370 375 380

Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr

385 390 395 400

Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser Leu Ser Glu

405 410 415

Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met Asp Glu Leu

420 425 430

His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp Leu Arg Ala

435 440 445

Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu Ser Asn Glu

450 455 460

Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys

465 470 475 480

Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Glu Ile Gly Asn Gly Cys

485 490 495
Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp Arg Ile Ala
500 505 510
Ala Gly Thr Phe Asp Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser
515 520 525
Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu Asp Asn His

530 535 540
Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu Ala Val Thr
545 550 555 560
Leu Met Ile Ala Ile Phe Val Val Tyr Met Val Ser Arg Asp Asn Val
565 570 575
Ser Cys Ser Ile Cys Leu

580

<210> 2

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nv

<400> 2

Met Leu Pro Ser Thr Ile Gln Thr Leu Thr Leu Phe Leu Thr Ser Gly

1 5 10 15
Gly Val Leu Leu Ser Leu Tyr Val Ser Ala Ser Leu Ser Tyr Leu Leu
20 25 30
Tyr Ser Asp Ile Leu Leu Lys Phe Ser Pro Thr Glu Ile Thr Ala Pro
35 40 45
Thr Met Pro Leu Asp Cys Ala Asn Ala Ser Asn Val Gln Ala Val Asn
50 55 60
Arg Ser Ala Thr Lys Gly Val Thr Leu Leu Leu Pro Glu Pro Glu Trp
65 70 75 80

Thr Tyr Pro Arg Leu Ser Cys Pro Gly Ser Thr Phe Gln Lys Ala Leu
85 90 95
Leu Ile Ser Pro His Arg Phe Gly Glu Thr Lys Gly Asn Ser Ala Pro

100	105	110	
Leu Ile Ile Arg Glu Pro Phe Val Ala Cys Gly Pro Asn Glu Cys Lys			
115	120	125	
His Phe Ala Leu Thr His Tyr Ala Ala Gln Pro Gly Gly Tyr Tyr Asn			
130	135	140	
Gly Thr Arg Gly Asp Arg Asn Lys Leu Arg His Leu Ile Ser Val Lys			
145	150	155	160
Leu Gly Lys Ile Pro Thr Val Glu Asn Ser Ile Phe His Met Ala Ala			
165	170	175	
Trp Ser Gly Ser Ala Cys His Asp Gly Lys Glu Trp Thr Tyr Ile Gly			
180	185	190	
Val Asp Gly Pro Asp Asn Asn Ala Leu Leu Lys Val Lys Tyr Gly Glu			
195	200	205	
Ala Tyr Thr Asp Thr Tyr His Ser Tyr Ala Asn Asn Ile Leu Arg Thr			
210	215	220	
Gln Glu Ser Ala Cys Asn Cys Ile Gly Gly Asn Cys Tyr Leu Met Ile			
225	230	235	240
Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Val Ser Glu Cys Arg Phe Leu Lys Ile			
245	250	255	
Arg Glu Gly Arg Ile Ile Lys Glu Ile Phe Pro Thr Gly Arg Val Lys			
260	265	270	
His Thr Glu Glu Cys Thr Cys Gly Phe Ala Ser Asn Lys Thr Ile Glu			
275	280	285	
Cys Ala Cys Arg Asp Asn Arg Tyr Thr Ala Lys Arg Pro Phe Val Lys			
290	295	300	
Leu Asn Val Glu Thr Asp Thr Ala Glu Ile Arg Leu Met Cys Thr Asp			
305	310	315	320
Thr Tyr Leu Asp Thr Pro Arg Pro Asn Asp Gly Ser Ile Thr Gly Pro			
325	330	335	
Cys Glu Ser Asp Gly Asp Lys Gly Ser Gly Gly Ile Lys Gly Gly Phe			
340	345	350	
Val His Gln Arg Met Lys Ser Lys Ile Gly Arg Trp Tyr Ser Arg Thr			

355 Met Ser Lys Thr Glu Arg Met Gly Met Gly Leu Tyr Val Lys Tyr Gly
 370 375 380
 Gly Asp Pro Trp Ala Asp Ser Asp Ala Leu Thr Phe Ser Gly Val Met
 385 390 395 400
 Val Ser Met Lys Glu Pro Gly Trp Tyr Ser Phe Gly Phe Glu Ile Lys
 405 410 415
 Asp Lys Lys Cys Asp Val Pro Cys Ile Gly Ile Glu Met Val His Asp
 420 425 430
 Gly Gly Lys Glu Thr Trp His Ser Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Cys Leu
 435 440 445
 Met Gly Ser Gly Gln Leu Leu Trp Asp Thr Val Thr Gly Val Asp Met
 450 455 460
 Ala Leu
 465
 <210> 3
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hy
 <400> 3
 Met Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn Ala Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val Lys
 20 25 30
 Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu Thr
 35 40 45
 Thr Thr Pro Thr Lys Ser Tyr Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Arg Thr
 50 55 60
 Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asp Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp Val
 65 70 75 80
 Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala Lys Ala

85 90 95
 Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro Ile

 100 105 110
 Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg Gly
 115 120 125
 Tyr Glu Lys Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asp Ala Glu Lys
 130 135 140
 Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro Asn
 145 150 155 160
 Ala Thr Ser Lys Ile Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val Pro
 165 170 175

 Lys Asp Asn Tyr Lys Asn Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val Pro
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe His
 195 200 205
 Ser Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Ser Leu Tyr Gly Asp Ser Asn Pro
 210 215 220
 Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val Ser
 225 230 235 240
 Gln Ile Gly Asp Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro Gln

 245 250 255
 Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Met Gln Lys Pro Gly Lys Thr
 260 265 270
 Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Val Leu Leu Pro Gln Lys Val Trp
 275 280 285
 Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu Ile
 290 295 300
 Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Glu Tyr Gly Gly Leu Asn Lys Ser
 305 310 315 320

 Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Lys His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys Pro
 325 330 335

Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr Arg
340 345 350

Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala
355 360 365

Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His Gly
370 375 380

Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu Lys

385 390 395 400

Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser Leu
405 410 415

Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met Asp
420 425 430

Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp Leu
435 440 445

Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu Ser
450 455 460

Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu Glu
465 470 475 480

Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly Asn
485 490 495

Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp Arg
500 505 510

Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr Phe
515 520 525

Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu Asp

530 535 540

Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu Ala
545 550 555 560

Val Thr Leu Met Leu Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg Asp
565 570 575

Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
580

<210> 4
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ny
 <400> 4

Met Leu Pro Ser Thr Ile Gln Thr Leu Thr Leu Phe Leu Thr Ser Gly

1	5	10	15
Gly Val Leu Leu Ser Leu Tyr Val Ser Ala Ser Leu Ser Tyr Leu Leu			
20	25	30	
Tyr Ser Asp Ile Leu Leu Lys Phe Ser Arg Thr Glu Val Thr Ala Pro			
35	40	45	
Ile Met Pro Leu Asp Cys Ala Asn Ala Ser Asn Val Gln Ala Val Asn			
50	55	60	
Arg Ser Ala Thr Lys Gly Val Thr Pro Leu Leu Pro Glu Pro Glu Trp			
65	70	75	80

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

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

Ala Tyr Thr Asp Thr Tyr His Ser Tyr Ala Lys Asn Ile Leu Arg Thr
210 215 220

Gln Glu Ser Ala Cys Asn Cys Ile Gly Gly Asp Cys Tyr Leu Met Ile
225 230 235 240

Thr Asp Gly Pro Ala Ser Gly Ile Ser Glu Cys Arg Phe Leu Lys Ile
245 250 255

Arg Glu Gly Arg Ile Ile Lys Glu Ile Phe Pro Thr Gly Arg Val Lys
260 265 270

His Thr Glu Glu Cys Thr Cys Gly Phe Ala Ser Asn Lys Thr Ile Glu
275 280 285

Cys Ala Cys Arg Asp Asn Ser Tyr Thr Ala Lys Arg Pro Phe Val Lys
290 295 300

Leu Asn Val Glu Thr Asp Thr Ala Glu Ile Arg Leu Met Cys Thr Lys
305 310 315 320

Thr Tyr Leu Asp Thr Pro Arg Pro Asn Asp Gly Ser Ile Thr Gly Pro
325 330 335

Cys Glu Ser Asp Gly Asp Glu Gly Ser Gly Gly Ile Lys Gly Gly Phe
340 345 350

Val His Gln Arg Met Ala Ser Lys Ile Gly Arg Trp Tyr Ser Arg Thr
355 360 365

Met Ser Lys Thr Lys Arg Met Gly Met Gly Leu Tyr Val Lys Tyr Asp
370 375 380

Gly Asp Pro Trp Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Leu Ser Gly Val Met
385 390 395 400

Val Ser Met Glu Glu Pro Gly Trp Tyr Ser Phe Gly Phe Glu Ile Lys
405 410 415

Asp Lys Lys Cys Asp Val Pro Cys Ile Gly Ile Glu Met Val His Asp
420 425 430

Gly Gly Lys Thr Thr Trp His Ser Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Cys Leu
435 440 445

Met Gly Ser Gly Gln Leu Leu Trp Asp Thr Val Thr Gly Val Asn Met

450 455 460

Thr Leu

465

<210> 5

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M1

<400> 5

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr

35 40 45

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

50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val

65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala

85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala

100 105 110

Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met

115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe

130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg

145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu

165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met

180 185 190
Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln
195 200 205
Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
210 215 220
Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys

245 250
<210> 6
<211> 1749
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Hv
<400> 6

atgaaggcaa taattgtact actcatggta gtaacatcca atgcagatcg aatctgcact 60
gggataacat cgtcaaactc accacatgtc gtcaaaactg ctactcaagg ggaggtaaac 120
gtgaccgggtg taataccact gacaacaaca cccaccaaat ctcatTTTgc aaatctcaaa 180
ggaacagaaa ccagggggaa actatgcca aaatgcctca actgcacaga tctggatgta 240
gccttgggca gacaaaaatg cacagggaaa ataccctctg caagggtttc aatactccat 300

gaagtcagac ctgttacatc tgggtgcttt cctataatgc acgatagaac aaaaattaga 360
cagctgccta accttctccg aggatacgaa catgtcaggt tatcaactca caacgttatc 420
aatgcagaag atgcaccagg aagaccctac gaaattggaa cctcagggtc ttgccctaac 480
attaccaatg gaaacggatt cttcgcaaca atggcttggg ccgTcccaa aaacaaaaca 540
gcaacaaatc cattaacaat agaagtacca tacatttgta cagaaggaga agaccaaatt 600
accgtttggg gggtccactc tgacaacgag acccaaattg caaagctcta tggggactca 660
aagccccaga agttcacctc atctgccaac ggagtgaaca cacattacgt ttcacagatt 720

ggtggcttcc caaatcaaac agaagacgga ggactaccac aaagtggcag aattgttgtt 780
gattacatgg tgcagaaatc tggaaaaaca ggaacaatta cctatcaaag aggtatttta 840
ttgcctcaaa aggtgtggtg cgcaagtggc aggagcaagg taataaaaagg atccttgccc 900
ttaattggag aagcagattg cctccatgaa aaatacgggt gattaaacaa aagcaagcct 960
tactacacag gggaacatgc aaaggccata ggaaattgcc caatatgggt gaaaacaccc 1020

ttgaagctgg ccaatggaac caaatataga cccctgcaa aactattaaa ggaaagaggt	1080
ttcttcggag ccattgctgg tttcttagag ggaggatggg aaggaatgat tgcaggttgg	1140
cacggataca catcccatgg ggcacatgga gtagcggtgg cagctgacct taagagcact	1200
caagaggcca taacaagat aacaaaaaat ctcaactctt tgagttagct ggaagtaaag	1260
aatcttcaaa gactaagcgg tgccatggat gaactccaca acgaaatact agaactagat	1320
gagaaagtgg atgatctcag agctgataca ataagctcac aaatagaact cgcagtcctg	1380
ctttccaatg aaggaataat aaacagtga gatgaacatc tcttggcgct tgaaagaaag	1440
ctgaagaaaa tgctgggccc ctctgctgta gagataggga atggatgctt tgaaacaaaa	1500
cacaagtga accagacctg tctcgacaga atagctgctg gtacctttga tgcaggagaa	1560
ttttctctcc ccacctttga ttactgaat attactgctg catctttaaa tgacgacgga	1620
ttggacaatc atactatact gctttactac tcaactgctg cctccagttt ggctgtaaca	1680
ctgatgatag ctatctttgt tgtttatatg gtctccagag acaatgttcc ttgctccatt	1740
tgtctataa	1749
<210> 7	
<211> 1401	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nv	
<400> 7	
atgtacctt caactatata aacgttaacc ctatttctca catcaggggg agtattatta	60
tcactatatg tgcagcttc attatcatac ttactatatt cggatatatt gctaaaattc	120
tcaccaacag aaataactgc accaacaatg ccattggatt gtgcaaacgc atcaaatgtt	180
caggctgtga accgttctgc aacaaaaggg gtgacacttc ttctcccaga accggagtgg	240
acataccgc gtttatcttg cccgggctca acctttcaga aagcatttct aattagccct	300
catagattcg gagaaaccaa aggaaactca gtcaccttga taataaggga accttttga	360
gcttgtggac caaatgaatg caaacacttt gctttaacct attatgctgc ccaaccaggg	420
ggatactata atggaacaag aggagacaga aacaagctga ggcatctaatt ttcagtcaaa	480
ttgggcaaaa tccaacagt agagaactcc attttccaca tggcagcatg gagcgggtcc	540
gcgtgccatg atggtaagga atggacatat atcggagtgg atggccctga caataatgca	600
ttgctcaaag taaaatatgg agaagcatal actgacacat accattccta tgcaaacaa	660
atcctaagaa cacaagaaag tgcctgcaat tgcacgggg gaaattgtta tctaatgata	720

actgatggct cagcttcagg tgtagtgaa tgcagatttc ttaagattcg agagggccga	780
ataataaaag aaatatttcc aacaggaaga gtaaaacaca ctgaggagtg cacatgcgga	840
tttgccagca ataaaaccat agaatgtgcc tntagagaca acaggtacac agcaaaaaga	900
ccttttgtca aattaaacgt ggagactgat acagcagaaa taaggttgat gtgcacagat	960
acttatttgg acacccccag accaaatgat ggaagcataa caggcccttg tgaatctgat	1020
ggggacaaaag ggagtggagg catcaaggga ggatttgttc atcaaagaat gaaatccaag	1080
attggaaggt ggtactctcg aacgatgtct aaaactgaaa ggatggggat gggactgtat	1140
gtcaagtatg gtggagacc atgggctgac agtgatgccc taacttttag tggagtaatg	1200
gtttcaatga aagaacctgg ttggtattcc ttggcttcg aaataaaaga taagaaatgc	1260
gatgtccctt gtattgggat agagatggta catgatggtg gaaaagagac ttggcactca	1320
gcagcaacag ccatttactg tttaatgggc tcaggacagc tgctgtggga cactgtcaca	1380
ggtgttgaca tggctctgta a	1401
<210> 8	
<211> 1755	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hy	
<400> 8	
atgaaggcaa taattgtact actcatggta gtaacatcca acgcagatcg aatctgcact	60
gggataacat cttaaactc acctcatgtg gtcaaaacag ctactcaagg ggaggtcaat	120
gtgactggcg tgataccact gacaacaaca ccaacaaaat cttattttgc aaatctcaa	180
ggaacaagga ccagaggga actatgcccg gactgtctca actgtacaga tctggatgtg	240
gccttgggca ggccaatgtg tgtggggacc acaccttctg ctaaagcttc aatactccat	300
gaggtcagac ctgttacatc cgggtgcttt cctataatgc acgacagAAC aaaaatcagg	360
caactaccca atcttctcag aggatatgaa aagatcaggt tatcaacca aaacgttatac	420
gatgcagaaa aagcaccagg aggaccctac agacttggaa cctcaggatc ttgccctaac	480
gctaccagta aaatcggatt ttttgaaca atggcttggg ctgtcccaaa ggacaactac	540
aaaaatgcaa cgaaccact aacagtggaa gtaccataca tttgtacaga aggggaagac	600
caaattactg ttggggggtt ccattcggat aacaaaacc aaatgaagag cctctatgga	660
gactcaaata ctcaaaagt cactcatct gctaattggag taaccacgca ttatgtttct	720
cagattggcg acttcccaga tcaaacagaa gacggaggac taccacaaag cggcagaatt	780

gttgttgatt acatgatgca aaaacctggg aaaacaggaa caattgtcta tcaaaggggt 840
gttttgttgc ctcaaaaggt gtggtgctcg agtggcagga gcaaagtaat aaaaggtca 900
ttgcctttaa ttggtgaagc agattgcctt catgaagaat acggtggatt aaacaaaagc 960
aagccttact acacaggaaa acatgcaaaa gccataggaa attgcccaat atgggtaaaa 1020
acacctttga agcttgccaa tggaaccaa tatagacctc ctgcaaaact attgaaggaa 1080
aggggtttct tcggagctat tgctggtttc ctagaaggag gatgggaagg aatgattgca 1140

ggttggcagc gatacacatc tcacggagca catggagtgg cagtggcggc agaccttaag 1200
agtaacaaag aagctataaa taagataaca aaaaatctca attctttgag tgaactagaa 1260
gtaaagaacc ttcaaagact aagtgggtgc atggatgaac tccacaacga aatactcgag 1320
ctggatgaaa aagtggatga tctcagagct gacactataa gctcacaat agaacttgca 1380
gtcttgcttt ccaacgaagg aataataaac agtgaagacg agcatctatt ggcacttgag 1440
agaaaactaa agaaaatgct gggtcctct gctgtagaca taggaaacgg atgcttcgaa 1500
accaaacaca aatgcaacca gacctgctta gacaggatag ctgctggcac ctttaatgca 1560

ggagaatfff ctctcccac ttttgattca ttgaacatta ctgctgcac tttaatgat 1620
gatggattgg ataaccatac tatactgctc tattactcaa ctgctgcttc tagtttggct 1680
gtaacattaa tgctagctat ttttattgtt tatatggtct ccagagacaa cgtttcatgc 1740
tccatctgct tataa 1755

<210> 9

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ny

<400> 9

atgtacatt caactatata aacgttaacc ttatttctca catcaggggg agtgattata 60
tcactatatg tgtcagcttc attgtcatal ttactatatt cggatatatt gctaaaattt 120

tcacgaacag aagtaactgc accaataatg ccattggatt gtgcaaacgc atcaaatgtt 180
caggctgtga accgttctgc aacaaaaggg gtgacacctc ttctcccaga accggagtgg 240
acgtacctc gtttatcttg cccgggctca acctttcaga aagcactcct aattagcccc 300
catagattcg gagaaccaa aggaaactca gctcccttga taataaggga accttttatt 360
gcttgtggac caaaggaatg caaacatttt gctctaacc attatgcagc tcaaccaggg 420
ggatactaca atggaacaag agaagacaga aacaagctga ggcatctaat ttcagtcaaa 480

ttgggcaaaa tccaacagt agaaaactct attttcaca tggcagcttg gagcgggtcc	540
gcatgcatg atggtagaga atggacttac atcggagttg atggcccaga cagtaatgca	600
ttgctcaaaa taaaatatgg agaagcatat actgacacat accattccta tgcaaaaaac	660
atcctaagga cacaagaaag tgcctgcaat tgcatcgggg gagattgta tctgatgata	720
actgatggcc cagcttcagg gattagtga tgcagattcc ttaagattcg agagggccga	780
ataataaaag aaatatttcc aacaggaaga gtaaaacata ctgaggaatg cacatgcgga	840
tttgccagca acaaaacat agaatgtgcc ttagagata acagttacac agcaaaaaga	900
ccctttgtca aattaaatgt ggagactgat acagcggaaa taagattgat gtgcacaaag	960
acttatttgg acacccccag accaaatgat ggaagcataa cagggccttg cgaatctgat	1020
ggggacgaag ggagtggagg catcaaggga ggatttgttc accaaagaat ggcattcaag	1080
attggaaggt ggtactctcg gacgatgtct aaaactaaaa gaatggggat gggactgtat	1140
glaaagtatg atggagaccc atggactgac agtgaagccc ttgctcttag tggagtaatg	1200
gtttcaatgg aagaacctgg ttggtattcc ttggcttcg aaataaaaga taagaaatgt	1260
gatgtccct gtattgggat agaaatggta catgatggtg ggaaaacgac ttggcactca	1320
gcggcaacag ccatttactg tttaatgggc tcaggacaac tgctgtggga cactgtcaca	1380
ggtgttaata tgactctgta a	1401