



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0038374
(43) 공개일자 2015년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7004966
(22) 출원일자(국제) 2013년07월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/065920
(87) 국제공개번호 WO 2014/019990
국제공개일자 2014년02월06일
(30) 우선권주장
12305968.5 2012년08월03일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
사노피 파스티르
프랑스 리용 아브뉴 폰 파스티르 2 (우편번호:69007)
(72) 발명자
르가스텔루아, 이자벨
프랑스 에프-69700 생 안테올 르 샤토 뒤 데 라 조안나 392
메디나, 줄리
프랑스 에프-69210 렌틸리 뒤 두 줄리 39씨
모스테, 캐서린
프랑스 에프-69260 샤토보니에르 레 방 아브뉴 루이 모메 7
(74) 대리인
양영준, 심미성

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **감염성 인플루엔자 바이러스의 생산**

(57) 요약

본 발명은 세포를 적절한 발현 벡터의 세트와 형질감염시켜 생성된 감염성 인플루엔자 바이러스의 시드로 CHO 세포를 감염시키는, 인플루엔자 감염성 바이러스의 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 감염성 바이러스의 생산 방법, 특히 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있는, 재조합 카세트 및 상기 재조합 카세트를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 2760/00051 (2013.01)

C12N 2760/00052 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 세포를 발현 벡터의 세트에 형질감염시켜 감염성 인플루엔자 바이러스의 시드를 생성하고,
b) CHO 세포를 상기 감염성 인플루엔자 바이러스의 시드로 감염시키는 것
으로 이루어진 단계를 포함하는, 감염성 인플루엔자 바이러스의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 a)에서의 세포가 영장류 기원의 세포, 영장류 기원의 세포와 CHO 세포의 혼합물이거나 또는 CHO 세포로 이루어지는 것인 방법.

청구항 3

제3항에 있어서, 영장류 기원의 세포가 베로(Vero) 세포인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CHO 세포가 CHO-K1 세포인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 벡터의 세트가

- 적어도 인플루엔자 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질을 코딩하는 mRNA의 발현을 허용하는 발현 벡터, 및
- 적어도 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 발현 벡터

를 포함하고, 상기 발현 벡터의 세트의 발현이 (i) 인플루엔자 vRNA(들)을 함유하는 리보핵단백질 복합체 (RNP)의 형성 및 (ii) 상기 형질감염된 세포에서 감염성 인플루엔자 바이러스의 생성을 허용하는 것으로 이해되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

(i) 인플루엔자 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질을 코딩하는 mRNA의 발현을 허용하는 상기 발현 벡터가 4개의 상이한 단방향성 플라스미드를 포함하고, 각각의 플라스미드는 RNA 폴리머라제 II에 결합하는 프로모터의 제어 하에 PB1, PB2, PA 및 NP 인플루엔자 단백질로부터 선택된 4개의 별개의 단백질을 코딩하는 mRNA에 상보적인 cDNA를 함유하고,

(ii) 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 상기 발현 벡터가 8개의 상이한 단방향성 플라스미드를 포함하고, 각각의 플라스미드는 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 상기 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA 인플루엔자 vRNA로부터 선택된 8개의 별개의 vRNA 중 하나 또는 상응하는 cRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 상기 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 중 하나 또는 상응하는 cRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 상기 각각의 플라스미드가, 상기 cDNA 서열을 5' → 3' 센스 방향으로

- a) RNA 폴리머라제 I 또는 T7 RNA 폴리머라제에 결합하는 프로모터;
- b) 5' → 3' 센스 방향으로

- 인식 서열 외부에 절단 부위를 갖고 점착성 말단을 생성하는 제1 제한 효소에 대한 역전된 상보적 인식 서열;

- 인식 서열 내부에 절단 부위를 갖는 제2 제한 효소에 대한 제한 부위;

- 인식 서열 내부에 절단 부위를 갖는 제3 제한 효소에 대한 제한 부위; 및

- 인식 서열 외부에 절단 부위를 갖고 점착성 말단을 생성하는 상기 제1 제한 효소에 대한 인식 서열을 포함하며, 여기서 상기 제2 및 제3 제한 효소는 상이한 것인 재조합 카세트; 및

c) 종결인자 서열

을 포함하는 벡터 내에 클로닝함으로써 얻어진 것이고;

- 프로모터가 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 경우, 상기 종결인자 서열이 간염 델타 리보자임 서열이고;

- 프로모터가 T7 RNA 폴리머라제에 결합하는 경우, 상기 종결인자 서열이 T7 폴리머라제 종결인자 서열인 것으로 이해되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 벡터가 서열 1의 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 벡터의 세트가 8개의 상이한 양방향성 플라스미드를 포함하고, 각각의 플라스미드는 2개의 프로모터의 제어 하에 상기 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA 인플루엔자 vRNA로부터 선택된 8개의 별개의 vRNA 중 하나에 상보적인 cDNA를 함유하며, 여기서 상기 제1 프로모터는 폴리머라제 I에 결합하고, 상기 제2 프로모터는 폴리머라제 II에 결합하고,

상기 발현 벡터의 세트의 발현이 (i) 인플루엔자 vRNA(들)을 함유하는 리보핵단백질 복합체 (RNP)의 형성 및 (ii) 상기 형질감염된 세포에서 감염성 인플루엔자 바이러스의 생성을 허용하는 것으로 이해되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스가 A형 또는 B형 인플루엔자 바이러스인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스가 적어도 2개의 공여자 바이러스의 유전 물질의 조합에 의해 생성된 유전 물질을 함유하는 재편성 감염성 인플루엔자 바이러스인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 공여자 바이러스 중 하나가 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (A/PR/8/34), B/Lee/40 또는 B/Panama/45/90인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스가 키메라 바이러스인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 키메라 바이러스가 키메라 인플루엔자 HA 및/또는 NA vRNA를 함유하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 키메라 인플루엔자 HA vRNA 및/또는 NA vRNA가 계절성 또는 대유행 바이러스로부터의 HA vRNA의 하나 이상의 도메인 또는 NA vRNA의 하나 이상의 도메인 및 또 다른 공여자 바이러스로부터의 HA vRNA의 하나 이상의 도메인 또는 NA vRNA의 하나 이상의 도메인을 포함하며, 여기서 상기 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터의 HA vRNA의 적어도 하나의 도메인은 상기 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터의

HA, 예컨대 HA1 및/또는 HA2의 항원성 엑토도메인을 코딩하는 mRNA의 영역에 상보적이고, 상기 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터의 NA vRNA의 적어도 하나의 도메인은 상기 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터의 NA의 항원성 엑토도메인을 코딩하는 mRNA의 영역에 상보적인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 전적으로 혈청-무함유 배지 내에서 또는 동물 성분-무함유 조건에서 수행하는 방법.

청구항 17

- a) 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 인플루엔자 바이러스를 생산하고;
- b) CHO 세포에서의 증식 후에 감염성 인플루엔자 바이러스를 수거하고,
- c) 수거된 감염성 인플루엔자 바이러스를 정제하고,
- d) 임의로, 정제된 바이러스를 불활성화하고,
- e) 정제된 바이러스를 제약상 허용되는 담체와 혼합하는 것을 포함하는, 인플루엔자 백신 조성물의 제조 방법.

청구항 18

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 발현 벡터의 세트를 포함하는 CHO 세포.

청구항 19

제18항에 있어서, CHO-K1 세포인 CHO 세포.

청구항 20

5' → 3' 센스 방향으로

- RNA 폴리머라제 I 또는 T7 RNA 폴리머라제에 결합하는 프로모터;
 - 5' → 3' 센스 방향으로
 - 인식 서열 외부에 절단 부위를 갖고 점착성 말단을 생성하는 제1 제한 효소에 대한 역전된 상보적 인식 서열;
 - 인식 서열 내부에 절단 부위를 갖는 제2 제한 효소에 대한 제한 부위;
 - 인식 서열 내부에 절단 부위를 갖는 제3 제한 효소에 대한 제한 부위; 및
 - 인식 서열 외부에 절단 부위를 갖고 점착성 말단을 생성하는 상기 제1 제한 효소에 대한 인식 서열
- 을 포함하며, 여기서 상기 제2 및 제3 제한 효소는 상이한 것인 재조합 카세트; 및
- 종결인자 서열
- 을 포함하고,
- 프로모터가 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 경우, 상기 종결인자 서열이 간염 델타 리보자임 서열이고;
 - 프로모터가 T7 RNA 폴리머라제에 결합하는 경우, 상기 종결인자 서열이 T7 폴리머라제 종결인자 서열인 것으로 이해되는 것인 벡터.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 프로모터가 설치류 RNA 폴리머라제 I 또는 인간 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 것인 벡터.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 재조합 카세트의 상기 제1 제한 효소가 BbsI 또는 SapI이고, 재조합 카세트의 상기 제2 및 제3 제한 효소가 NotI 및 SbfI로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 벡터.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 카세트가 서열 2의 서열로 이루어지는 것인 벡터.

청구항 24

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터가 서열 1의 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 25

역 유전학에 의한 재편성 RNA 바이러스의 생산 방법에 사용하기 위한, 제20항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 세포를 적절한 발현 벡터의 세트와 형질감염시켜 생성된 감염성 인플루엔자 바이러스의 시드로 CHO 세포를 감염시키는, 인플루엔자 감염성 바이러스의 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 감염성 바이러스의 생산 방법, 특히 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있는, 재조합 카세트 및 상기 재조합 카세트를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인플루엔자 바이러스는 공중 보건 및 경제적 문제를 야기하는, 동물 및 인간에서 발생하는 통상 "독감 (flu)"으로 불리는 고 전염성 호흡기 질환의 원인 물질이다. 인플루엔자 바이러스는 단일 가닥 음성 RNA 절편으로 이루어진 절편화된 계층을 갖는 외피가 있는 RNA 바이러스이다. 인플루엔자 바이러스는 다음과 같은 세가지 유형을 포함한다: 인플루엔자 A, 인플루엔자 B 및 인플루엔자 C 바이러스. 인플루엔자 A 및 B 바이러스는 1년에 5만 명의 사람을 죽게 만드는 인간 인플루엔자 유행병의 원인이다 (Rossman et al., 2011, Virology, 411 (2):229-236). 인플루엔자 A 바이러스는 인간 및 매우 다양한 동물 (새, 돼지, 말, 개, 고양이 등)을 감염시키지만 (가장 큰 천연 보유 숙주는 야생 수생 조류임), 인플루엔자 B 바이러스는 주로 인간으로 제한되며, 이것은 다른 종의 선천 면역 반응을 상쇄하는 B/NS1 단백질의 무능력에 의해 부분적으로 야기되고 (Sridharan et al., 2010, J Biol Chem, 285(11):7852-7856), 인플루엔자 C 바이러스는 인간 및 돼지로부터 단리된다.

[0003]

A형 바이러스는 구 또는 사상 형태이고, 크기는 약 80 내지 150 nm이다. 지질 이중층으로 이루어진 바이러스 외피는 숙주 세포의 원형질막으로부터 유래된다. 숙주 항체의 주 표적인 표면 당단백질 HA (헤마글루티닌) 및 NA (뉴라미니다제)로 형성된 침상체는 상기 외피 내로 삽입된다. 상기 막에 또한 끼워지는 M2 단백질은 주로 바이러스의 캡시드 제거 동안 기능하는 이온 채널이다. 매트릭스 단백질 M1은 지질 이중층 및 리보핵단백질 (RNP)과 결합하는 바이러스의 내부 주변부 상에 위치한다. 이것은 RNP의 핵-세포질 외수송에서 근본적인 역할을 갖는다. 캡시드에서, vRNA 절편은 바이러스 계층의 전사, 복제 및 캡시드화를 위해 필요한 신호를 함유하는 비코딩 5' 및 3' 말단을 갖는다. PA (폴리머라제 산성), PB1 (폴리머라제 염기성 단백질 1), PB2 (폴리머라제 염기성 단백질 2), NP (핵단백질), HA, NA, M 및 NS (비-구조 단백질)로 불리는 인플루엔자 A 바이러스의 8개의 vRNA는 선택적 스플라이싱에 의해 하나 이상의 단백질을 코딩한다. PA 절편은 PA 단백질을 코딩하고; PB1 절편은 PB1, PB1-F2 및 PB1-N40 단백질을 코딩하고; NP 절편은 NP 단백질을 코딩하고; HA 절편은 HA 단백질을 코딩하고; NA 절편은 NA 단백질을 코딩하고; M 절편은 M1 및 M2 단백질을 코딩하고; NS 절편은 비구조 단백질 NS1 및 NS2 또는 NEP (vRNP의 핵 외수송)을 코딩한다. vRNA는 단량체당 24개의 뉴클레오타이드에 결합하는 NP 상에서 나선형으로 감기고, 폴리머라제 복합체는 RNA 분자의 두 말단에 결합하고, 헤어핀 구조를 형성한다. 상기 복합체는 PB1, PB2 및 PA로 이루어진다. RNA, NP 및 폴리머라제 조립물은 리보핵단백질 (RNP) 복합체를 형성한다.

[0004]

B형 바이러스는 단백질 M2처럼 타입 III 구조를 갖는 NB로 불리는, NA 외에 추가의 당단백질을 갖는다.

[0005]

C형 바이러스는 단지 하나의 다기능성 표면 당단백질, 즉 "헤마글루티닌-에스테라제-융합 단백질" (HEF)만을 갖

는다.

[0006] 따라서, A형 및 B형 바이러스의 계놈은 8개의 바이러스 RNA (vRNA)를 포함하지만, C형 인플루엔자 바이러스는 7개만을 포함한다.

[0007] 인플루엔자 A 바이러스는 또한 표면 바이러스 당단백질, 즉 현재의 헤마글루티닌 (HA) (H1 내지 H17) 및 뉴라미니다제 (NA) (N1 내지 N9)의 특성에 따라 별개의 하위유형으로 분류된다.

[0008] 1936년에, 인플루엔자 바이러스가 유정란에서 성장할 수 있다는 버넷 (Burnet)의 발견을 통해 그의 특성에 대한 연구가 가능해졌고, 불활성화된 백신의 개발이 가능해졌다 (De Ona et al., 1995, J Clin Microbiol, 33(7):1948-1949). 세계 보건 기구 (WHO)에서 설명한 것처럼, 백신접종은 감염을 방지하기 위한 가장 효과적인 방법이다. 다행스럽게도, 안전하고 효과적인 백신이 70년을 초과하는 기간 동안 이용가능하였다. 계절성 독감 백신은 항원 변형 때문에 1년에 2회 (북반구에서 1회 및 남반구에서 1회) 업데이트되는 상이한 인플루엔자 유형 및 하위유형 (A/H1N1, A/H3N2 및 B)을 포함한다. 이 때문에, WHO는 인플루엔자 바이러스의 역학을 모니터링하기 위해 전세계 인플루엔자 감시 체제 (Global Influenza Surveillance Network (GISN))를 조직화하였다. 다음 계절성 백신에 포함될 바이러스가 결정되면, 후보 고성장 시드 바이러스 균주는 미국 뉴욕 의과대학 (NYMC), 영국 국립 생물 표준 통제 연구소 (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)), CSL 그룹 (호주) 및 일본 국립 감염성 질환 연구소 (National Institute for Infectious Diseases (NMD))와 같은 WHO 협력 센터에서 제조되어야 한다 (Gerdil et al., 2003, Vaccine, 21 (16):1776-1779). 백신 균주는 이어서 제조자에 의해 난, MDCK 또는 베로 (Vero) 세포주에서 증폭된다 (Koudstaal et al., 2009, Vaccine, 27(19):2588-2593). 현재, MDCK (Tree et al., 2001, Vaccine, 19(25-26):3444-3450), 베로 (Kistner et al., 1998, Vaccine, 16(9-10):960-968) 및 PER.C6® (Pau et al., 2001, Vaccine, 19(17-19):2716-2721)는 규제 요건을 충족할 수 있는 3개의 세포주이고, 인플루엔자 A 및 B 바이러스의 복제를 성공적으로 보장하는 것으로 밝혀졌다. 3개의 모든 세포주는 혈청-무함유 배지에서 성장하도록 적응되었다 (Coussens et al., 2011, Vaccine, 29(47):8661-8668).

[0009] 세포 내로의 인플루엔자 바이러스의 도입 (감염의 제1 단계)은 인플루엔자 헤마글루티닌 (HA) 표면 단백질과 특이적 세포 표면 수용체 사이의 특이적 상호작용을 통해 발생한다. 인플루엔자 바이러스에 특이적인 숙주 세포막 수용체는 시알릴 락토사민 쇠 (시알산 [Sia] 알파2-3/6 갈락토스 [Gal] 베타1-4/3 N-아세틸글루코사민)의 탄수화물 구조로 제조된다 (Suzuki et al., 2011, Adv Exp Med Biol, 705:443-452). 인간 인플루엔자 바이러스는 Sia2-6Gal 연결을 함유하는 세포 수용체에 우선적으로 결합하는 반면, 조류 바이러스는 Sia2-3Gal 수용체에 우선적으로 결합한다 (Coussens et al., 2011, Vaccine, 29(47):8661-8668). 두가지 바이러스가 동일한 세포를 감염시킬 때, 재편성 (reassortant)으로 불리는 계놈 vRNA의 상이한 조합이 발생할 수 있다. 상기 특성은 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (H1N1)로 불리는, 난-적응된 바이러스의 유리한 성장 특성 (내부 유전자)을 갖는 표적 순환 바이러스의 HA 및 뉴라미니다제 (NA) 단백질의 항원 특성을 조합한 인플루엔자 A 백신의 생산을 위해 사용되었다. 불운하게도, 요구되는 고수율 바이러스의 유도 성공은 예측이 불가능하다. 또한, 몇몇의 균주는 비-인증된 세포주에서 단리될 경우 전구체 백신 균주로서 규제 당국에 의해 승인될 수 없기 때문에 사용될 수 없다 (Nicolson et al., 2005, Vaccine, 23(22):2943-2952). 인플루엔자 B형 바이러스의 경우, 아주 최근까지 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 성장 특징을 갖는 어떠한 B형 바이러스도 확인되지 않았다. 따라서, 유행성 순환 (또는 계절성) B 바이러스가 유정란 감염을 위해 직접 사용되었고, 몇회의 계대배양이 B형 백신 균주의 수율을 개선하기 위해 필요하였다 (Iwatsuki-Horimoto et al., 2008, Virus Res, 135(1):161-165).

[0010] 1999 이후에, 전적으로 클로닝된 바이러스 cDNA로부터 감염성 인플루엔자 바이러스의 생성을 허용하는 플라스미드-기반 역 유전학 (reverse genetics) 기술에 의해 속도 및 안전성 측면에서 유의한 개선이 달성되었다 (Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682). 8개의 vRNA 및 적어도 전사를 위해 필요한 폴리머라제 단백질 복합체 및 핵단백질 (NP)의 발현을 유도할 수 있는 플라스미드 세트를 기초로 하여 상이한 시스템이 개발되었다. 폴리머라제 단백질 복합체 및 NP는 또한 4개의 추가의 플라스미드의 형질감염에 의해 또는 각각 RNA 폴리머라제 I (POL 1) 및 RNA 폴리머라제 II (POL 2)를 통해 vRNA 및 mRNA 합성 둘 모두를 허용하는 양방향성 프로모터를 갖는 플라스미드의 사용에 의해 발현될 수 있다 (Jackson et al., 2011, J Gen Virol, 92(Pt1):1-17). 형질감염되는 플라스미드의 총수는 전략이 단방향성 또는 양방향성인지에 따라 16 (Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350), 또는 12로부터 (Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682) 8까지 (Hoffmann et al., 2002, Vaccine, 20(25-26):3165-3170), 및 플라스미드(들)이 몇 개의 vRNA를 코딩할 경우 3으로부터 (Neumann et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829) 1까지 (Zhang et al.,

2009, J Virol, 83(18):9296-9303) 상이할 수 있다.

[0011] 현재의 역 유전학 시스템은 PER.C6® (Koudstaal et al., 2009, Vaccine, 27(19):2588-2593), CEP (닭 배아 1차) 세포 또는 닭 배아 섬유모세포 (CEF) (Zhang et al., 2009, J Virol, 83(18):9296-9303), 293T 세포 (Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350)를 단독으로 또는 MDCK ([Hoffmann et al., 2002, Vaccine, 20(25-26):3165-3170]; [Schickli et al., 2001, Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 356(1416):1965-1973]), 베토 세포 단독 ([Nicolson et al., 2005, Vaccine, 23(22):2943-2952]; [Neumann et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829])에 대한 추가의 증폭과 함께 또는 매딘-다비 (Madin-Darby) 소 신장 (MDBK) (Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682), CEP 세포 또는 CEF ([Legastelois et al., 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(3):95-104]; [Whiteley et al., 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(4):157-166])에 대한 추가의 증폭과 함께 사용하는 것을 기초로 한다.

[0012] 세포주의 혼합물이 역 유전학 방법에 의해 바이러스를 생산하기 위해 사용될 때, 가장 효율적으로 형질감염될 수 있는 세포주는 감염성 인플루엔자 바이러스의 생성을 책임지는 것으로 간주되고, 다른 세포주는 감염성 바이러스의 증식에 기여한다. 인간 RNA POL I 프로모터는 일반적으로 인플루엔자 vRNA의 생산을 허용하는 플라스미드에서 사용되기 때문에, 인간 및 원숭이 세포는 역 유전학 시스템에서 형질감염되는 세포주로서 사용되기에 가장 적절한 세포주이다. 그러나, 개 또는 닭 기원의 POL I 프로모터는 또한 각각 개 또는 조류 세포에서 사용될 수 있다 ([Massin et al., 2005, J Virol, 79(21):13811-13816]; [Murakami et al., 2008, 82(3):1605-1609]). 다른 한편으로, 바이러스 단백질을 코딩하는 mRNA의 생산을 허용하는 플라스미드는 대체로 임의의 진핵 세포에서 기능할 수 있는 시토메갈로바이러스 (CMV) 또는 베타 액틴 POLII 프로모터를 함유한다 ([Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350]; [Schickli et al., 2001, Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 356(1416):1965-1973]).

[0013] 상기 설명한 역 유전학 시스템의 대부분의 시간에, 세포는 대체로 형질감염 직전에 상이한 세포 유형의 활발한 성장을 보장하기 위해 혈청-함유 배지에서 배양된다. 또한, 돼지 기원의 트립신이 감염 후에 바이러스 증식을 유지하기 위해 감염 배지에 사용된다. 충분한 바이러스를 얻기 위해, 난 또는 세포에서 몇회의 증폭이 또한 제 1 형질감염 단계 후에 필요할 수 있다.

[0014] 대유행 A/H1N1 (2009) 바이러스는 인플루엔자 A 바이러스가 집단 내에서 전파될 수 있는 속도를 입증하였고, 역 유전학을 통한 재편성 생산을 촉진할 필요성을 제시하였다. 따라서, 주요 문제는 백신의 다량의 용량이 전세계에 걸쳐 배포하기 위한 최소 시간 내에, 이상적으로는 바이러스가 전파되는 것보다 더 빠르게 생산됨을 보장하는 것이다.

[0015] 클로닝을 위해 사용되는 통상적인 방식은 제한 효소를 필요로 한다. 그러나 제한 부위는 종종 vRNA에 상보적인 상이한 인플루엔자 cDNA에 존재하고, 이것은 벡터 변형 또는 바이러스 게놈 돌연변이유발의 실시를 필요로 한다. 단순화된 재조합 방법이 역 유전학 목적으로 vRNA에 상보적인 인플루엔자 cDNA를 클로닝하기 위해 이전에 개발되었다 ([Stech et al., 2008, Nucleic Acid Res, 36(21):e139]; [Wang et al., 2008, J Virol Methods, 151 (1)74-78]). 상동성 재조합은 유전 물질의 새로운 조합을 생성하기 위해 2개의 DNA 분자 사이의 동일한 DNA 서열의 영역 내의 파괴 및 재결합 과정을 수반한다 (Watt et al., 1985, Proc Natl Acad Sci, 82:4768-4772). 이전에 설명된 상기 재조합 클로닝 시스템은 인간 POL I 프로모터와 종결인자 (terminator) 사이에 인플루엔자 A 절편의 컨센서스 5' (Uni13) 및 3' (Uni12) 보존된 비코딩 말단을 포함하는 25 뉴클레오티드 재조합 카세트를 기초로 한다. 이들은 임의의 인플루엔자 A 게놈의 신속하고 직접적인 클로닝을 허용한다. 그러나, 인플루엔자 B 게놈의 vRNA 5' 및 3' 비코딩 말단의 뉴클레오티드 서열은 인플루엔자 A 바이러스와 상이하기 때문에, 인플루엔자 B 게놈은 상기 재조합 카세트를 기초로 하여 클로닝될 수 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 따라서, RNA 바이러스 게놈, 및 특히 인플루엔자 A, B 및 C 게놈을 가능한 한 신속하고 효율적으로 클로닝하기 위한 보편적인 방법을 개발할 필요성이 또한 존재한다.

[0017] 특히 새로운 순환 인플루엔자 바이러스가 확인되고 유행성 또는 대유행 독감의 원인이 될 때 최적화된 안전한 조건에서 인플루엔자 백신의 생산을 용이하게 하고/하거나 촉진하는 유용한 도구 및 방법을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 이런 취지에서, 본 발명의 주제는 특히 역 유전학에 의해 생성된 바이러스인 재편성 또는 키메라 (chimeric) 바이러스를 포함하는 감염성 A형 및 B형 바이러스의 큰 집단을 생성하기 위한 새로운 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 보다 안전한 조건에서 인플루엔자 바이러스의 제조를 보다 용이하게 만든다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 역 유전학 방법을 수행하기 위한 유용한 도구로 판명된, A형 또는 B형 바이러스로부터의 임의의 유형의 인플루엔자 RNA 단편의 클로닝을 허용하는 보편적 재조합 벡터를 제공한다.
- [0019] **정의**
- [0020] "프로모터" 또는 "프로모터 서열"은 세포에 존재하는 RNA 폴리머라제에 결합하고 하류 (3' 방향) 코딩 서열의 전사를 개시시킬 수 있는 DNA 조절 영역이다. 본 발명을 정의하기 위해, 프로모터 서열은 그의 3' 말단에서 전사 개시 부위가 결합되고, 전사를 배경 조과의 검출가능한 수준으로 개시시키기 위해 필요한 최소 수의 염기 또는 요소를 포함하도록 상류 (5' 방향)로 연장된다. 프로모터 서열 내에서 전사 개시 부위 (예를 들어 뉴클레아제 S1을 사용한 맵핑 (mapping)에 의해 편리하게 정의됨), 및 RNA 폴리머라제에 대한 결합을 책임지는 단백질 결합 도메인 (컨센서스 서열)이 발견된다. 프로모터는 인핸서 및 리프레서 (repressor) 서열을 포함하는 다른 발현 제어 서열과 작동가능하게 결합될 수 있다. 예를 들어, 인간 RNA 폴리머라제 I 프로모터 (인간 RNA POLI 프로모터)는 인간 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터이고; 조류 RNA 폴리머라제 I 프로모터는 조류 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터이거나 또는 T7 폴리머라제 프로모터는 박테리오파지 T7의 RNA 폴리머라제에 결합하는 프로모터이다.
- [0021] 용어 "벡터", "클로닝 벡터" 및 "발현 벡터"는 숙주를 형질전환시켜 도입 서열의 발현 (예를 들어 전사 및 번역)을 촉진하기 위해 DNA (예를 들어 외래 유전자)를 숙주 세포 내로 도입시킬 수 있는 비히클을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스, 파지미드, 트랜스포존, 및 인공 염색체 등을 포함하고; 아래에서 보다 상세하게 논의된다.
- [0022] 벡터는 일반적으로 외래 DNA가 삽입되는 미생물의 DNA를 포함한다. DNA의 한 절편을 DNA의 또 다른 절편 내로 삽입하기 위한 통상적인 방법은 DNA를 제한 부위로 불리는 특이적인 부위 (뉴클레오타이드의 특이적인 군)에서 절단하는 제한 효소로 불리는 효소의 사용을 수반한다. 일반적으로, 외래 DNA는 벡터 DNA의 하나 이상의 제한 부위에서 삽입된 후, 벡터에 의해 전달가능한 벡터 DNA와 함께 숙주 세포 내로 전달된다. 삽입되거나 추가되는 DNA를 갖는 DNA의 절편 또는 서열, 예컨대 발현 벡터는 또한 "DNA 구축물"로 언급될 수 있다. 통상적인 유형의 벡터는 "플라스미드"이고, 이것은 일반적으로 추가의 (외래) DNA를 쉽게 수용할 수 있으며 적합한 숙주 세포 내로 쉽게 도입될 수 있는, 대체로 박테리아 기원의 이중 가닥 DNA의 자족 (self-contained) 분자이다. 플라스미드 벡터는 종종 코딩 DNA 및 프로모터 DNA를 함유하고, 외래 DNA 및 대체로 종결 서열을 삽입하기 적합한 하나 이상의 제한 부위를 갖는다. 코딩 DNA는 특정 단백질 또는 효소의 특정 아미노산 서열 또는 바이러스의 vRNA 절편을 코딩하는 DNA 서열이다. 프로모터 DNA는 코딩 DNA의 발현을 개시시키거나, 조절하거나, 다르게는 매개하거나 제어하는 DNA 서열이다. 프로모터 DNA 및 코딩 DNA는 동일한 유전자 또는 상이한 유전자로부터 유래될 수 있고, 동일한 또는 상이한 유기체로부터 유래될 수 있다. 플라스미드 및 진균 벡터를 포함하는 매우 많은 벡터가 다양한 진핵 및 원핵 숙주에서 복제 및/또는 발현에 대해 설명되어 있다. 비제한적인 예는 pKK 플라스미드 (클론테크 (Clontech)), pUC 플라스미드, pET 플라스미드 (노바젠, 인크. (Novagen, Inc.)), 미국 위스콘신주 매디슨), pRSET 또는 pREP 플라스미드 (인비트로젠 (Invitrogen), 미국 캘리포니아주 샌 디에고), 또는 pMAL 플라스미드 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs), 미국 매사추세츠주 비벌리), pVAX1 플라스미드 (라이프 테크놀로지 (Life technology), 프랑스 세르지 폰투아즈) 및 본원에 개시 또는 언급되거나 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려진 방법을 사용하는 많은 적절한 숙주 세포를 포함한다. 재조합 클로닝 벡터는 종종 하나 이상의 복제 시스템, 숙주에서의 선택을 위한 하나 이상의 마커, 예를 들어 항생제 내성, 및 하나 이상의 발현 카세트를 포함한다. 재조합 클로닝 벡터는 또한 항생제-무함유 선택 시스템, 예컨대 문헌 [Peubez et al., 2010, Microbial Cell Factories, 9:65]에 기재된 시스템을 포함한다.
- [0023] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "프라이머"는 올리고뉴클레오타이드의 기능을 나타낸다. 프라이머는 일반적으로 표적 서열에 대한 혼성화 후에 올리고뉴클레오타이드의 연장에 의해 표적 서열을 증폭하기 위해 사용되는 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0024] "RNA 폴리머라제 II"는 진핵세포에서 DNA의 mRNA 또는 mRNA의 전구체로의 전사를 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0025] "RNA 폴리머라제 I"은 진핵세포에서 DNA의 리보솜 RNA (rRNA) 또는 rRNA의 전구체로의 전사를 촉매하는 효소를

의미한다.

- [0026] 용어 "단방향성 플라스미드"는 전사 카세트가 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 폴리머라제 프로모터를 함유할 경우 DNA의 rRNA로의 전사를 허용하거나 또는 전사 카세트가 RNA 폴리머라제 II에 결합하는 폴리머라제 프로모터를 함유할 경우 DNA의 mRNA로의 전사를 허용하는 단지 하나의 전사 카세트를 함유하는 DNA 플라스미드를 의미한다. 예를 들어, 상기 플라스미드는 문헌 [Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350], 및 US 2009/0246830 또는 US 2011/0143424에 기재된 것을 포함한다.
- [0027] 용어 "양방향성 플라스미드"는 제1 전사 카세트가 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 폴리머라제 프로모터를 함유하고 제2 전사 카세트가 RNA 폴리머라제 II에 결합하는 폴리머라제 프로모터를 함유하기 때문에 DNA의 rRNA 및 mRNA로의 전사를 허용하는 2개의 전사 카세트를 함유하는 DNA 플라스미드를 의미한다. 예를 들어, 상기 플라스미드는 문헌 [Hoffman et al., 2000, PNAS, 97(11):6108-6113] 및 WO 01/83794에 기재된 것을 포함한다.
- [0028] 용어 "인플루엔자 바이러스"는 오르토믹소바이러스과 (*Orthomyxoviridae*)의 표준 종 (type species)을 나타낸다. 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스는 상기 설명된 바와 같다.
- [0029] 바람직하게는, 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A 또는 B 바이러스이다. 인플루엔자 A 또는 B 바이러스는 임의의 균주의 바이러스일 수 있다. 특히, 인플루엔자 A 바이러스는 H1N1, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H7N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 및 H10N7 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0030] "계절성 또는 대유행 바이러스"는 감염된 숙주, 예컨대 인간으로부터 단리된 인플루엔자 바이러스의 임상 단리물을 의미한다.
- [0031] "감염성 인플루엔자 바이러스"는 허용 (permissive) 세포로 복제될 수 있는 인플루엔자 바이러스를 의미한다. 바이러스가 감염성인지 결정하는 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 바이러스가 감염성인지 결정하는 것은 TCID₅₀ 검정을 사용하여 수행할 수 있다. TCID₅₀은 허용 세포 (예컨대 MDCK 세포) 상에 샘플의 순차적 희석액을 도입하고 스피어만-카버 (Spearman-Kärber) 통계학 방법을 사용하여 허용 세포의 50%의 감염을 유도하는 종점 희석액을 결정함으로써 샘플 내의 감염성 바이러스 (예를 들어 감염된 세포 배양 상청액, 또는 감염된 요막 유체)의 양을 평가하는 방법이다.
- [0032] 몇몇 실시양태에서, 상기 감염성 인플루엔자 바이러스는 재편성 인플루엔자 바이러스, 키메라 인플루엔자 바이러스, 또는 약독화 인플루엔자 바이러스일 수 있다. 바람직하게는, 상기 감염성 인플루엔자 바이러스는 재편성 인플루엔자 바이러스이다. 보다 바람직하게는, 상기 감염성 인플루엔자 바이러스는 재편성 키메라 인플루엔자 바이러스이다.
- [0033] "허용 세포"는 인플루엔자 바이러스가 세포 내로 침투하여 새로운 감염성 바이러스의 생산시까지 그의 전체 복제 사이클을 달성하도록 허용하는 세포를 의미한다. 고 허용 세포는 인플루엔자 바이러스가 활발히 복제되고 다량의 감염성 바이러스를 생산하는 세포이다.
- [0034] 용어 "재편성 바이러스"는 적어도 2개의 공여자 바이러스의 유전 물질의 조합에 의해 생성되는 유전 물질을 함유하는 바이러스를 나타낸다. 재편성 바이러스가 독감 백신 제조에 사용될 때, 그의 유전 물질은 대체로 계절성 또는 대유행 바이러스로부터의 적어도 HA 및 NA 유전자를 함유하는 반면, 다른 유전자 (골격 유전자)는 독감 백신 제조를 위해 사용된 생산 물질 (예컨대, 유정란의 요막 공간 또는 허용 세포주) 상에서 쉽게 성장하고/거나 인간에 대해 병원성이 낮거나 없는 그의 능력에 대해 선택된 하나 또는 몇몇의 다른 공여자 바이러스로부터 유래된다. 골격 유전자의 "공급자"로서 기여하는 공여자 바이러스의 예는 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (A/PR/8/34), B/Lee/40 및/또는 B/Panama/45/90 바이러스를 포함한다.
- [0035] 용어 "키메라 바이러스"는 키메라 단백질을 코딩하는 키메라 유전자를 함유하는 바이러스를 나타낸다. "키메라 유전자 및/또는 단백질"은 상기 유전자 또는 단백질이 적어도 2개의 상이한 공여자 바이러스로부터 유래된 적절 한 유전자의 적어도 2개의 부분 또는 단백질의 2개의 부분의 조합에 의해 얻어짐을 의미한다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스 A형 또는 B형의 경우에, 상기 키메라 유전자 및/또는 단백질은 키메라 HA 및/또는 키메라 NA vRNA 또는 단백질일 수 있다.
- [0036] 용어 "약독화 바이러스"는 허용 세포에서 복제되지만 동물 또는 인간에서 복제되는 능력은 부분적으로 또는 심지어 완전히 상실한 바이러스를 나타낸다. 따라서, 약독화 바이러스의 병독성은 인간 및 동물에서 크게 감소하거나 심지어 완전히 존재하지 않는다. 약독화 바이러스에 의한 감염과 연관된 임상 증상은 동물 또는 인간에서 감소하거나 또는 심지어 완전히 존재하지 않는다. 약독화 바이러스의 예는 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다.

약독화 바이러스는 연속 계대배양 (예를 들어 상이한 배양 기재 상에서, 또는 그의 최적 복제 온도보다 낮은 온도에서), 재조합 DNA 기술, 부위-지정 돌연변이유발, 유전자 조작에 의해 야생형 바이러스로부터 제조될 수 있다. 본 발명에 유용한 약독화 바이러스는 대상체에서 보호 면역 반응을 유도하는 그의 능력을 보유하면서 대부분의 백신접종된 개체에서 부작용을 전혀 또는 낮은 정도로 생성할 수 있다.

[0037] 용어 "불활성화된 바이러스"는 임의의 유의한 정도로 허용 세포로 복제될 수 없는 바이러스를 나타낸다. 바이러스는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 많은 수단에 의해 불활성화될 수 있다. 바이러스를 불활성화하기 위한 방법의 예는 유전자 조작, 화학적 또는 물리적 처리, 또는 방사선 처리 (포름알데히드, 베타프로피오락톤, 세제, 열 또는 일반적으로 X-선 또는 자외선 형태의 전자기 방사선 포함)를 포함한다. 본 발명의 체제에서, 유용한 불활성화된 인플루엔자 바이러스는 대상체에서 보호 면역 반응을 유도하는 능력을 보유하는 것이다.

[0038] 용어 "역 유전학"은 상보적 DNA (cDNA)로부터 감염성, 재편성 바이러스, 또는 약독화 바이러스를 생산하기 위한 분자 방법을 나타낸다. 상기 방법은 상이한 인플루엔자 바이러스 사이의 vRNA의 재편성에 의해 재편성 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위해 매우 유용하다. 역 유전학 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 역 유전학 방법은 상기 설명된 것, 예를 들어 문헌 [Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350]; [Neumann et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829]; [Zhang et al., 2009, J Virol, 83(18):9296-9303]; [Massin et al., 2005, J Virol, 79(21):13811-13816]; [Murakami et al., 2008, 82(3):1605-1609]에 기재된 플라스미드; 및/또는 문헌 [Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350]; [Neumann et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46): 16825-16829]; [Zhang et al., 2009, J Virol, 83(18):9296-9303]; [Massin et al., 2005, J Virol, 79(21):13811-13816]; [Murakami et al., 2008, 82(3):1605-1609]; [Koudstaal et al., 2009, Vaccine, 27(19):2588-2593]; [Schickli et al., 2001, Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 356(1416):1965-1973]; [Nicolson et al., 2005, Vaccine, 23(22):2943-2952]; [Legastelois et al., 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(3):95-104]; [Whiteley et al., 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(4):157-166]에 기재된 세포를 사용하는 방법일 수 있다.

[0039] 바람직하게는, 상기 방법은 다음 방법일 수 있다:

[0040] (i) 16 플라스미드 방법, 예컨대 문헌 [Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350], 및 US 2009/0246830 또는 US 2011/0143424에 기재된 방법, 여기서 인플루엔자 바이러스는 세포를 폴리마인 유도체 (트랜스 IT-LT1)를 사용하여, 각각 RNA 폴리머라제 I 프로모터 및 RNA 폴리머라제 I 종결인자의 제어 하에 1개의 인플루엔자 vRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 8개의 플라스미드, 및 각각 RNA 폴리머라제 II 프로모터의 제어 하에 PA, PB1, PB2, NP, HA, NA, M 및 NS mRNA 중 하나에 상보적인 cDNA를 함유하는 8개의 플라스미드로 형질감염시켜 생산된다. 특히, 세포는 인간 신장 배아 부착성 세포 (293T 세포주)이다.

[0041] (ii) 12 플라스미드 방법, 예컨대 문헌 [Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682], 및 US 2004/0142003, US 2012/0058538에 기재된 방법, 여기서 인플루엔자 바이러스는 제1 세포 유형을 각각 RNA 폴리머라제 I 프로모터 및 RNA 폴리머라제 I 종결인자 (간염 델타 리보자임)의 제어 하에 1개의 인플루엔자 vRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 8개의 플라스미드, 및 각각 RNA 폴리머라제 II 프로모터의 제어 하에 NP, PA, PB1 및 PB2 mRNA 중 하나에 상보적인 cDNA를 함유하는 4개의 플라스미드로 형질감염시키고, 바이러스를 제2 세포 유형에서 추가로 증폭함으로써 생산된다. 특히, 상기 제1 세포 유형은 베토 세포이고, 상기 제2 세포 유형은 MDBK 이다.

[0042] (iii) 13 플라스미드 방법, 예컨대 문헌 [De Wit et al., 2007, Journal of General Virology, 88:1281-1287]에 기재된 방법, 여기서 인플루엔자 바이러스는 세포를 각각 T7 RNA 폴리머라제 프로모터 및 T7 RNA 폴리머라제 종결인자의 제어 하에 1개의 인플루엔자 vRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 8개의 플라스미드, 각각 RNA 폴리머라제 II의 제어 하에 NP, PA, PB1 및 PB2 mRNA 중 하나에 상보적인 cDNA를 함유하는 4개의 플라스미드, RNA 폴리머라제 II의 제어 하에 T7 RNA 폴리머라제 및 핵 국재화 (nuclear localization) 신호를 코딩하는 mRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 1개의 플라스미드로 형질감염시켜 생산된다. 특히, 형질감염된 세포는 베토, 293T, 또는 QT6 (메추라기 (Japanese quail)의 섬유육종 세포주) 세포이다.

[0043] (iv) 8 플라스미드 방법, 예컨대 문헌 [Hoffmann et al., 2000, PNAS, 97(11):6108-6113] 및 WO 01/83794에 기재된 방법, 여기서 각각의 플라스미드는 mRNA 및 vRNA(들) 둘 모두를 발현할 수 있다. 따라서 각각의 플라스미드는 1개의 인플루엔자 vRNA에 상보적인 cDNA 및 바로 앞의 경우에서처럼 하나 대신에 2개의 전사 카세트를 함

유한다. 각각의 8개의 인플루엔자 바이러스 vRNA에 상보적인 cDNA는 폴리머라제 I 종결인자와 폴리머라제 I 프로모터 사이에 삽입된다. 상기 폴리머라제 I 전사 단위에는 폴리머라제 II 프로모터 및 폴리아데닐화 신호가 측면에 위치한다. 제1 전사 카세트는 vRNA의 형태로 cDNA의 전사를 허용한다. 제2 전사 카세트는 mRNA의 형태로 cDNA의 전사를 허용한 후, 세포 기구를 사용하여 바이러스 단백질(들)로 번역된다. Pol I-Pol II 시스템으로도 불리는, 전사를 위한 상기 이중 카세트 시스템을 이용하여, 동일한 플라스미드의 cDNA는 vRNA의 형태 및 mRNA의 형태 둘 모두로 전사된다. 이것은 vRNA 및 하나 이상의 바이러스 단백질의 발현에 의해 형질감염된 세포의 수준에서 실제로 나타난다. 특히, 부착성 MDCK 세포 및 293T 세포의 동시-배양, 및 형질감염제로서 폴리아민 유도체 (트랜스 IT-LT1)가 사용된다.

[0044] (v) 3 플라스미드 방법, 예컨대 문헌 [Neumann et al., 2005, PNAS, 102(46): 16825-16829]에 기재된 방법, 여기서 인플루엔자 바이러스는 세포를 각각 RNA 폴리머라제 I 프로모터 및 폴리머라제 I 종결인자의 제어 하에 PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M 및 NS vRNA에 상보적인 8개의 cDNA를 함유하는 1개의 플라스미드, 및 2개의 플라스미드, 즉 RNA 폴리머라제 II 프로모터의 제어 하에 PB2, PB1 및 PA mRNA 중 하나에 상보적인 3개의 cDNA를 함유하는 제1 플라스미드 및 NP mRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 제2 플라스미드로 형질감염시킴으로써 생산된다. 특히, 형질감염된 세포는 293T 또는 배로이다.

[0045] (vi) 1 플라스미드 방법, 예컨대 문헌 [Zhang et al., J.Virol., 83(18): 9296-9303]에 기재된 방법, 여기서 인플루엔자 바이러스는 세포를 PB2, PB1, PA 및 NP cDNA 사이의 폴리머라제 II 프로모터 및 폴리아데닐화 신호와 함께 뮤린 (murine) 폴리머라제 I 종결인자 및 닭 RNA 폴리머라제 I 프로모터의 제어 하에 PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M 및 NS vRNA에 상보적인 8개의 cDNA를 함유하는 하나의 플라스미드로 형질감염시킴으로써 생산된다. 특히, 형질감염된 세포는 CEF 세포이다.

[0046] (vii) 2개의 상이한 세포 시스템을 사용하는 WO 2005/062820에 기재된 방법: 제1 단계에서, 세포는 PolI-PolII 시스템 (PolI/PolII)을 갖는 8개의 양방향성 플라스미드로 형질감염되고, 이어서 제2 단계에서 형질감염된 세포는 인플루엔자 바이러스의 생산을 증폭하기 위해서 인플루엔자 바이러스에 대해 매우 허용성인 또 다른 세포주로부터의 세포와 함께 배양된다. 특히, 제1 단계에서 상기 형질감염된 세포는 배로 세포이고, 제2 단계에서 상기 다른 세포주는 닭 배아 세포로부터 유래된 세포주인 CEK 또는 CEF 세포주이다.

[0047] "인플루엔자 바이러스 단백질"은 A형 인플루엔자의 경우 PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 및 NS2/NEP 단백질, B형 인플루엔자의 경우 PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, NB, M1, BM2, NS1 및 NS2/NEP 단백질, 또는 C형 인플루엔자의 경우 PB1, PB2, PA, HEF, NP, M1, M1', CM2, NS1 및 NS2/NEP를 나타낸다.

[0048] "리보핵단백질 복합체 형성에 필요한 인플루엔자 바이러스 단백질"은 A, B 또는 C형 인플루엔자 바이러스에 대한 단백질 PA, PB1, PB2 및 NP를 의미한다.

[0049] "vRNA"는 리보핵단백질 복합체 내로 캡슐화되는 인플루엔자 바이러스의 음성-센스 (negative-sense) 바이러스 RNA를 의미한다. 인플루엔자 바이러스가 A형 또는 B형일 때, 상기 vRNA는 PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M 및 NS vRNA이다. 인플루엔자 바이러스가 C형일 때, 상기 vRNA는 PB1, PB2, PA, HEF, NP, M 및 NS vRNA이다.

[0050] "cRNA"는 vRNA에 상보적인 양성-센스 (positive-sense) RNA 중간체를 의미한다. 핵 내에서, 도입되는 음성-센스 바이러스 RNA (vRNA)는 프라이머-의존성 메카니즘에 의해 메신저 RNA (mRNA)로 전사된다. 상기 mRNA 생성물은 vRNA 주형의 불완전한 카피이고, vRNA와 달리 캡핑되고 (capped), 폴리아데닐화된다. 복제는 2 단계 과정을 통해 발생한다. 상보적 RNA (cRNA)로 언급되는 vRNA의 전장 양성-센스 카피가 먼저 제조되고, 이는 다시 보다 많은 vRNA를 생산하기 위한 주형으로 사용된다.

[0051] **제조합 카세트, 벡터 및 그들의 용도**

[0052] 본 발명의 목적은 음성 단일 가닥 RNA 바이러스의 vRNA에 상보적인 cDNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해 사용될 수 있는 신규한 제조합 카세트를 제공하는 것이다. 상기 제조합 카세트는 따라서 A형 및 B형 인플루엔자 바이러스의 vRNA에 상보적인 cDNA를 클로닝하기 위해 특히 유용하다.

[0053] 본 발명은 따라서 5' → 3' 센스 방향으로 다음을 포함하거나 다음으로 이루어지는 제조합 카세트에 관한 것이다:

[0054] - 인식 서열 외부에 절단 부위를 갖고 점착성 (sticky) 말단을 생성하는 제1 제한 효소에 대한 역전된 (inverted) 상보적 인식 서열;

- [0055] - 인식 서열 내부에 절단 부위를 갖는 제2 제한 효소에 대한 제한 부위;
- [0056] - 인식 서열 내부에 절단 부위를 갖는 제3 제한 효소에 대한 제한 부위; 및
- [0057] - 인식 서열 외부에 절단 부위를 갖고 점착성 말단을 생성하는 상기 제1 제한 효소에 대한 인식 서열
- [0058] (여기서, 상기 제2 및 제3 제한 효소는 상이함).
- [0059] "제한 효소"는 인식 부위에 결합한 후, 그의 인식 서열에 대해 고정된 위치에서 DNA 가닥을 절단하는 엔도뉴클레아제 (타입 II 제한 효소)이다. "인식 서열"은 DNA 백본을 절단하기 전에 제한 효소가 결합하는 특이적 뉴클레오티드 서열이다. 인식 서열은 일반적으로 4 내지 8개 염기쌍 길이이고, 종종 회문성 (palindromic)이고 (즉, 이들은 5' → 3' 방향으로 읽을 때 뒤로 및 앞으로 동일하게 읽혀짐), 인식 서열은 종종 DNA의 두 가닥 상에서 동일하다. "절단 부위"는 제한 효소가 절단하는 특이적 뉴클레오티드 서열이다. 몇몇 경우에, 절단 지점은 정확히 회문성 제한 부위의 대칭 축에서 발생하고, 평활 말단인 생성물을 제공한다. 몇몇의 제한 뉴클레아제는 "응집성 말단" 또는 "점착성 말단"으로 알려진, 각각의 단편의 두 말단에 짧은 단일 가닥을 남기는 스테거드 (staggered) 절단을 생성한다.
- [0060] 인식 서열에 대한 절단 위치는 효소에 따라 결정된다. 예를 들어, SapI 또는 BbsI 효소 (타입 IIS 제한 효소)의 경우, 절단 부위는 인식 서열의 외부에 위치한다:
- SapI 인식 서열: GCTCTTC.
- ↓

| | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|------------------|----|
| 5' | G | C | T | C | T | T | C | (N) ₂ | 3' |
| 3' | C | G | A | G | A | A | G | (N) ₄ | 5' |

↑
- BbsI 인식 서열: GAAGAC
- ↓

| | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|------------------|----|
| 5' | G | A | A | G | A | C | (N) ₂ | 3' |
| 3' | C | T | T | C | T | G | (N) ₆ | 5' |

↑
- ↓, ↑: 절단 부위
- [0061]
- [0062] 본원에서 사용되는 바와 같이, "제한 부위"는 바람직하게는 제한 효소에 대한 인식 서열로 이루어지고 상기 효소의 절단 부위를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- [0063] 몇몇 실시양태에서, 인식 서열 외부에 절단 부위를 갖는 상기 제1 제한 효소는 BbsI, SapI, AceIII, BsaI 또는 BsmBI일 수 있다.
- [0064] 바람직하게는, 상기 제1 제한 효소는 BbsI 또는 SapI이다. 따라서, 제1 제한 효소가 BbsI일 때, 상기 역전된 상보적 인식 서열은 서열 5'-GTCTTC-3'으로 이루어지고, 상기 BbsI 인식 서열은 서열 5'-GAAGAC-3'으로 이루어진다. 제1 제한 효소가 SapI일 때, 상기 역전된 상보적 인식 서열은 서열 5'-GAAGAC-3'으로 이루어지고, 상기 SapI 인식 서열은 서열 5'-GCTCTTC-3'으로 이루어진다.
- [0065] 바이러스 게놈에 존재하는 제2 및 제3 제한 부위를 갖는 위험을 최소화하기 위해, 상기 제한 부위는 바람직하게는 긴 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 상기 제2 및 제3 제한 효소의 제한 부위는 적어도 또는 정확하게 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 뉴클레오티드 길이이다. 바람직하게는, 상기 제2 및 제3 제한 효소의 제한 부위는 적어도 또는 정확하게 7 또는 8개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0066] 몇몇 실시양태에서, 상기 제2 및 제3 제한 효소는 NotI 및 SbfI로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 상기 제2 제한 효소는 NotI이고, 상기 제3 제한 효소는 SbfI이다.
- [0067] 따라서, 제2 또는 제3 제한 효소의 제한 부위는 서열 5'-GCGGCCGC-3' 또는 서열 5'-CCTGCAGG-3'으로 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 제2 제한 효소의 제한 부위는 서열 5'-GCGGCCGC-3'으로 이루어지고, 제3 제한 효소의 제한 부위는 서열 5'-CCTGCAGG-3'으로 이루어진다.
- [0068] 재조합 카세트는 제1 제한 효소에 대한 상기 역전된 및 상보적 인식 서열과 제2 제한 효소에 대한 상기 제한 부

위 사이에; 및/또는 제2 제한 효소에 대한 상기 제한 부위와 제3 제한 효소에 대한 상기 제한 부위 사이에 추가의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 추가의 뉴클레오티드는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30개 뉴클레오티드의 스트레치로 이루어질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 추가의 뉴클레오티드는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30개 뉴클레오티드의 스트레치로 이루어진다.

[0069] 따라서, 상기 재조합 카세트는 적어도 또는 정확하게 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120개 뉴클레오티드 길이이다. 바람직하게는, 상기 재조합 카세트는 적어도 또는 정확하게 28 또는 30개 뉴클레오티드 길이이다.

[0070] 바람직하게는, 상기 재조합 카세트는 서열 5'-GTCTTCGCGGCCCTGCAGGAAGAC-3' (서열 2)로 이루어진다.

[0071] 상기 재조합 카세트가 이중 가닥 핵산이고, 상기 설명한 서열이 핵산의 코딩 가닥에 상응함이 이해되어야 한다.

[0072] 본 발명은 또한 5' → 3' 센스 방향으로 다음을 포함하는 벡터에 관한 것이다:

[0073] - RNA 폴리머라제 I 또는 T7 RNA 폴리머라제에 결합하는 프로모터,

[0074] - 본 발명에 따른 재조합 카세트,

[0075] - 종결인자 서열.

[0076] 여기서, 다음이 이해된다:

[0077] - 프로모터가 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 경우, 상기 종결인자 서열은 간염 델타 리보자임 서열이고,

[0078] - 프로모터가 T7 RNA 폴리머라제에 결합하는 경우, 상기 종결인자 서열은 T7 폴리머라제 종결인자 서열이다.

[0079] "종결인자 서열"은 전사를 위한 DNA 상의 유전자 또는 오페론의 종료를 나타내는 서열을 의미한다. 상기 간염 델타 리보자임 서열은 서열 3의 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 상기 T7 폴리머라제 종결인자 서열은 서열 4의 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0080] 몇몇 실시양태에서, 상기 프로모터는 설치류 RNA 폴리머라제 I 또는 인간 RNA 폴리머라제 I에 결합한다. 바람직하게는, 상기 프로모터는 마우스 또는 햄스터 RNA 폴리머라제 I에 결합한다.

[0081] 몇몇 실시양태에서, 설치류 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 상기 프로모터는 서열 5, 서열 6 또는 서열 7의 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0082] 몇몇 실시양태에서, 인간 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 상기 프로모터는 서열 8의 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0083] 바람직하게는, 상기 벡터는 5' → 3' 센스 방향으로 다음을 포함한다:

[0084] - 인간 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터,

[0085] - 서열 2의 서열의 재조합 카세트,

[0086] - 서열 3의 서열의 간염 델타 리보자임 서열.

[0087] 보다 바람직하게는, 상기 벡터는 서열 1의 서열을 포함한다.

[0088] 보다 바람직하게는, 상기 벡터는 5' → 3' 센스 방향으로 다음을 포함한다:

[0089] - 설치류 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터,

[0090] - 서열 2의 서열의 재조합 카세트,

[0091] - 서열 3의 서열의 간염 델타 리보자임 서열.

[0092] 보다 바람직하게는, 상기 벡터는 5' → 3' 센스 방향으로 다음을 포함한다:

[0093] - 서열 9의 서열의 T7 폴리머라제에 결합하는 프로모터,

[0094] - 서열 2의 서열의 재조합 카세트,

- [0095] - 서열 4의 서열의 T7 폴리머라제 종결인자.
- [0096] 본 발명에 따른 벡터 내에서, 상기 재조합 카세트 앞에 RNA 폴리머라제 I 또는 T7 RNA 폴리머라제에 결합하는 프로모터가 존재하고, 카세트 바로 다음에 종결인자 서열이 존재한다.
- [0097] 몇몇 실시양태에서, 상기 벡터는 또한 항생제 내성 유전자, 예컨대 카나마이신 내성 유전자를 포함할 수 있다. 따라서, 상기 벡터는 서열 10의 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 즉 상기 벡터는 소위 보편적 pSP-flu 플라스미드이다.
- [0098] 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 벡터는 임의의 항생제 내성 유전자를 포함하지 않지만, 항생제-무함유 선택 시스템, 예컨대 문헌 [Peubez et al., 2010, Microbial Cell Factories, 9:65]에 기재된 시스템을 포함한다.
- [0099] 본 발명에 따른 벡터는 역 유전학에 의한 음성 단일 가닥 RNA 바이러스, 특히 감염성 음성 단일 가닥 RNA 바이러스의 생산 방법에서 사용될 수 있다. 특히, 상기 벡터는 vRNA에 상보적인 cDNA에 대해 사용될 수 있다.
- [0100] 예를 들어, 상기 음성 단일 가닥 RNA 바이러스는 아레나바이러스과(*Arenaviridae*), 예컨대 림프구성 맥락수막염 바이러스; 오르토믹소바이러스과, 예컨대 인플루엔자 바이러스, 이사바이러스(*Isavirus*) 및 토고토바이러스(*Thogotovirus*); 파라믹소바이러스과(*Paramyxoviridae*), 예컨대 홍역 바이러스, 메프스 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스, 우역(Rinderpest) 바이러스 및 개 디스토펙퍼(distemper) 바이러스; 분야바이러스과(*Bunyaviridae*), 예컨대 캘리포니아 뇌염 바이러스 및 한타바이러스(*Hantavirus*); 람도바이러스과(*Rhabdoviridae*), 예컨대 광견병 바이러스; 필로바이러스과(*Filoviridae*), 예컨대 에볼라 바이러스 및 마르부르크(Marburg) 바이러스; 보르나바이러스과(*Bornaviridae*), 예컨대 보르나병 (Borna disease) 바이러스의 바이러스일 수 있다.
- [0101] 바람직하게는, 상기 음성 단일 가닥 RNA 바이러스는 재편성 바이러스 및/또는 키메라 바이러스일 수 있다. 이들 바이러스는 약독화 바이러스 또는 불활성화된 바이러스일 수 있다.
- [0102] 특정 바람직한 실시양태에서, 상기 음성 단일 가닥 RNA 바이러스는 인플루엔자 바이러스이다.
- [0103] 역 유전학에 의한 음성 단일 가닥 RNA 바이러스의 생산 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 잘 알려져 있다. 예를 들어, 상기 방법은 문헌 [Pattnaik et al., 1992, Cell, 69(6):1011-1020]에 기재된 바와 같은 VSV 바이러스; 문헌 [Schnell et al., 1994, EMBO J, 13(18):4195-4203]에 기재된 바와 같은 광견병 바이러스; 문헌 [Radecke et al., 1995, EMBO J, 14(23):5773-5784]에 기재된 바와 같은 홍역 바이러스; 문헌 [Garcin et al., 1995, EMBO J, 14(24):6087-6094]에 기재된 바와 같은 센다이(Sendai) 바이러스; 문헌 [Hoffman and Banerjee, 1997, J Virol, 71(6):4272-4277] 및 [Durbin et al., 1997, Virology, 235(2):323-332]에 기재된 바와 같은 파라인플루엔자(Parainfluenza) 타입 3 바이러스; 문헌 [He et al., 1997, Virology, 237(2):249-260]에 기재된 바와 같은 SV5 바이러스; 문헌 [Baron and Barrett, 1997, J Virol, 71(2):1265-1271]에 기재된 바와 같은 우역 바이러스; 문헌 [Jin et al., 1998, Virology, 251(1):206-014]에 기재된 바와 같은 RSV 바이러스; 문헌 [Peeters et al., 1999, J Virol, 73(6):5001-5009]에 기재된 바와 같은 뉴캐슬(Newcastle) 바이러스; 문헌 [Neumann et al., 2002, J Virol, 76(1):406-410]에 기재된 바와 같은 에볼라 바이러스; 문헌 [Kawano et al., 2001, Virology, 284(1):99-112]에 기재된 바와 같은 파라인플루엔자 타입 2 바이러스; 문헌 [Herfst et al., 2004, J Virol, 78(15):8264-8270]에 기재된 바와 같은 메타뉴모바이러스(Metapneumovirus); 문헌 [Bridgen and Elliott, 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93(26):15400-15404]에 기재된 바와 같은 부니아 웨라(Bunyamvera)의 생산 방법이다.
- [0104] 바람직하게는, 상기 역 유전학에 의한 음성 단일 가닥 RNA 바이러스의 생산 방법은 상기 설명한 바와 같은 인플루엔자 바이러스의 생산 방법이다. 보다 바람직하게는, 상기 인플루엔자 바이러스의 생산 방법은 문헌 [Neuman et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350], US 2009/0246830, US 2011/0143424, [Hoffmann et al., 2002, Vaccine, 20(25-26):3165-3170], WO 01/83794, [Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682], US 2004/0142003, US 2012/0058538, [De Wit et al., 2007, Journal of General Virology, 88:1281-1287], WO 2005/062820에 기재된 방법, 또는 본 발명에 따른 방법일 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 벡터는 본 발명에 따른 방법에서 사용된다.
- [0105] 본 발명에 따른 벡터는 vRNA 바이러스에 상보적인 cDNA가 하나 이상의 상기 벡터(들) 내로 클로닝된 후에 상기 방법에서 사용될 수 있다.
- [0106] **클로닝 전략**

- [0107] 본 발명의 문맥에서, 클로닝 전략은 본 발명에 따른 벡터 및 클로닝할 cDNA 서열 사이의 상동성 재조합을 포함한다.
- [0108] 따라서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, RNA 바이러스의 vRNA에 상보적인 cDNA를 클로닝하는 방법을 추가로 제공한다:
- [0109] (i) 본 발명에 따른 벡터의 프로모터 서열로부터의 뉴클레오티드를 함유하는 정방향 프라이머, 및 본 발명에 따른 벡터의 종결인자로부터의 뉴클레오티드를 함유하는 역방향 프라이머를 사용하여, 바이러스의 바이러스 RNA의 RT-PCR (역전사-폴리머라제 연쇄 반응)에 의해 RNA 바이러스의 vRNA에 상보적인 cDNA를 생산하고;
- [0110] (ii) 재조합 카세트의 제1 제한 효소를 사용하여 본 발명에 따른 벡터를 선형화하고;
- [0111] (iii) 단계 (i)에서 얻어진 cDNA를 단계 (ii)에서 얻어진 선형화된 벡터와, 상기 cDNA와 상기 벡터 사이에 상동성 재조합을 허용하는 조건 하에 접촉시킨다.
- [0112] 단계 (i)에서, 역전사는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다. 바람직하게는, 역전사는 실시예의 단락 1.8에 설명되는 바와 같이 수행한다.
- [0113] 몇몇 실시양태에서, 상기 역방향 프라이머는 그의 5' 측면 상에, 본 발명에 따른 벡터의 종결인자 서열로부터의 적어도 17개의 뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 역방향 프라이머는 그의 5' 측면 상에, 간염 델타 리보자임 서열로부터의 적어도 17개의 뉴클레오티드를 포함한다. 보다 바람직하게는, 역방향 프라이머는 그의 5' 측면 상에 서열 5'-CTGGGACCATGCCGGCC-3' (서열 11)을 포함한다. 상기 역방향 프라이머는 종결인자 서열로부터의 뉴클레오티드의 3'에, 역전사시킴 vRNA에 상보적인 뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0114] 몇몇 실시양태에서, 상기 정방향 프라이머는 그의 5' 측면 상에, 본 발명에 따른 벡터의 프로모터 서열로부터의 적어도 17개의 뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 정방향 프라이머는 그의 5' 측면 상에, 인간 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터로부터의 적어도 17개의 뉴클레오티드를 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 정방향 프라이머는 그의 5' 측면 상에, 서열 5'-TGGGCCGCCGGGTATT-3' (서열 12)를 포함한다. 상기 정방향 프라이머는 프로모터 서열로부터 뉴클레오티드의 3'에, 역전사시킴 vRNA에 상보적인 뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0115] 단계 (ii)는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다. 바람직하게는, 단계 (ii)는 실시예의 단락 1.8에 설명되는 바와 같이 수행한다.
- [0116] 단계 (iii)은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다. 바람직하게는, 단계 (iii)은 실시예의 단락 1.8에 설명되는 바와 같이 수행한다.
- [0117] 단계 (ii)에서 상기 정방향 및 역방향 프라이머의 사용 때문에, 얻어진 cDNA는 5' → 3' 센스 방향으로, 인간 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터로부터의 뉴클레오티드 서열, 바이러스의 vRNA를 코딩하는 cDNA, 및 간염 델타 리보자임 서열로부터의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 따라서, 단계 (iii)에서, 단계 (i)에서 얻어진 cDNA는 본 발명에 따른 벡터 내로 안티센스로 클로닝된다.
- [0118] 몇몇 실시양태에서, 상기 클로닝 전략은 단계 (i)에서 얻어진 cDNA를 함유하지 않는 벡터를 제거하는 단계 (iv)를 추가로 포함한다. 재조합 카세트가 NotI 및 SbfI 제한 부위를 포함하는 경우에, 단계 (iv)는 단계 (iii)에서 얻어진 cDNA와 접촉된 벡터를 적절한 조건에서 단락 "재조합 카세트, 벡터 및 용도"에 기재된 제2 및 제3 제한 효소를 사용하여, 예를 들어 NotI 및 SbfI 효소를 사용하여 소화시킴으로써 수행할 수 있다. 상기 적절한 조건은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지되어 있다.
- [0119] 본 발명에 따른 벡터의 특징 덕분에, 상기 클로닝 전략은 A형 및 B형 인플루엔자 바이러스로부터의 vRNA에 상보적인 cDNA를 삽입하기 위해 수행할 수 있다. 본 발명에 따른 벡터는 A형 및 B형 인플루엔자 바이러스 모두로부터의 vRNA에 상보적인 cDNA의 클로닝을 허용하므로 선행 기술에 비해 개선된 도구를 제공한다.
- [0120] **감염성 인플루엔자 바이러스의 생산 방법**
- [0121] 고수율 인플루엔자 생산을 지지하기 위해, 세포는 그들의 표면 상에 Sia2-6Gal 또는 Sia2-3Gal 수용체를 발현해야 한다. CHO-K1 세포는 Sia2-6Gal 수용체를 발현하지 않고, 단지 Sia2-3Gal 수용체를 불량하게 발현하지만 (30%의 세포에서 발현됨), 놀랍게도 CHO 세포주의 하위클론인 CHO-K1 세포주가 분자 생물학에 의해, 특히 적절한 발현 벡터의 세트에 의한 역 유전학 방법에 의해 생성된 인플루엔자 바이러스의 생산을 위한 매우 효율적인

포와 CHO 세포의 혼합물)이다.

- [0135] 마지막으로, vRNA 생산을 위한 플라스미드가 설치류 RNA 폴리머라제 I, 예컨대 햄스터 또는 마우스 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터를 함유할 때, 형질감염 단계는 CHO 세포만을 사용하여 수행할 수 있다. 이 경우에, CHO 세포는 형질감염 및 감염 단계 둘 모두를 위해 사용되는 세포의 유일한 유형이다. 따라서, 적절한 발현 벡터의 세트로부터 감염성 인플루엔자 바이러스의 생산은 단지 CHO 세포의 사용만을 수반할 수 있고, 이것은 인플루엔자 바이러스 생산 공정을 단순화한다. 단지 하나의 세포주만이 배양되어야 한다.
- [0136] 별법으로, 적절한 발현 벡터의 세트가 문헌 [De Wit et al., 2007, J. Gen. Virol., 88 (Pt4):1284-1287]에 기재된 바와 같이 T7 폴리머라제 프로모터의 제어 하의 vRNA 생산을 위한 플라스미드 및 T7 폴리머라제를 코딩하는 추가의 단백질 발현 플라스미드를 포함할 때, CHO 세포는 또한 형질감염 및 감염 단계 둘 모두를 위해 사용되기 위한 및 감염성 인플루엔자 바이러스의 생산을 보장하기 위한 유일한 유형의 세포일 수 있다.
- [0137] 몇몇 실시양태에서, 형질감염을 위해 사용되는 세포 (예를 들어 CHO 세포 또는 배로 세포와 CHO 세포의 혼합물)는 인플루엔자 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질을 안정적으로 발현하는 재조합 세포일 수 있고, 재조합 세포에 도입되는 벡터의 세트는 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA를 발현할 수 있는 발현 벡터의 세트이다.
- [0138] 따라서, 몇몇 실시양태에서, 단계 a)에서 상기 세포는 배로 세포 또는 배로 세포와 CHO 세포의 혼합물을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0139] 또한, 몇몇 실시양태에서, 단계 a)에서 상기 세포는 CHO 세포를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0140] 본 발명에 따라 사용하기 위한 세포주는 CHO 세포주이다. CHO 세포주는 산업적 단백질 생산을 위해 통상적으로 사용되고, 많은 CHO 세포주가 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 예를 들어, 상기 CHO 세포주는 예를 들어 ATCC 카탈로그에서 번호 CCL-61 또는 CCL-9618로 이용가능한 CHO-K1 세포주, CHO DP-12 세포주 (ATCC 번호: CRL-12444 및 12445) 및 CHO 1-15 세포주 (ATCC 번호 CRL-9606)를 포함한다. 한 실시양태에 따르면, 본 발명의 목적을 위해 사용되는 세포주는 그의 표면 상에 Sia2-6Gal 수용체를 발현하지 않지만, 50% 미만의 세포 집단이 디코시게닌-표지된 마악키아 아무렌시스(*Maackia amurensis*) 아글루티닌의 존재 하에 형광성이 되도록 Sia 2-3Gal 수용체를 약하게 발현하는 CHO 세포주이다. 바람직하게는, 본 발명의 목적을 위해 사용되는 세포주는 CHO-K1 세포주, 특히 ATCC에서 번호 CCL-61로 언급되는 세포주이다. 보다 바람직하게는, CHO-K1 세포주, 예를 들어 ATCC에서 CCL-61로 언급되는 CHO-K1 세포주는 세포의 현탁액의 형태이다. 예를 들어, 상기 세포의 현탁액은 세포주를 혈청-무함유 배지에서 배양함으로써 얻을 수 있다.
- [0141] 영장류 세포주가 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위해 CHO 세포주와 조합하여 사용될 때, ATCC 카탈로그에서 번호 CCL-81, CRL-1586, CRL-1587 또는 CCL-81.5로 이용가능한 배로 세포주가 바람직하는데, 그 이유는 이들이 규제 당국에 의해 오래 전에 승인되었기 때문이다. 바람직한 293-T 세포주는 ATCC 카탈로그에서 번호 CRL-11268로 이용가능한 세포주를 포함한다.
- [0142] CHO 및 형질감염된 세포, 특히 배로 세포는 바람직하게는 GLP (우수 실험실 관리 기준)/GMP (우수 제조 관리 기준) 규정 또는 국가 통제 당국의 요건에 따라 배양된다. 예를 들어, 상기 세포는 이력, 즉 세포 기원에 대한 정보, 그의 개발 방법, 생산을 위한 시험관내 배양 연령 제한에 의해 확인될 수 있다. 상기 세포에는 또한 배양가능한 박테리아, 미코플라스마, 진균, 내인성 바이러스가 존재하지 않을 수 있다. 세포 배양 및 백신 생산을 위한 세포 배양을 지지하기 위해 사용되는 물질에 대한 지침은 생물학적 표준화에 대한 WHO 전문 위원회, 47차 보고서, 생물학 제제의 생산을 위한 시험관내 기질로서 동물 세포의 사용을 위한 요건 (WHO technical report series, 1998, 878:19-52)에서, 감염성 질환 적응증에 대한 바이러스 백신의 생산에 사용되는 세포 기질 및 다른 생물학적 물질의 특성화 및 필요조건 (US department of health and human services food and drug administration center for biologics evaluation and research [February 2010])에서, 유럽 약전 (European pharmacopoeia, 5th edition)의 단락 5.2.3에서, 또는 유럽 의약청 (European Medicines Agency)에서 출간된 문헌 [guidance on quality of biotechnological products: derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products (cpmp/ich/294/95)]의 주해에서 볼 수 있다.
- [0143] CHO 및 형질감염된 세포, 특히 배로 세포는 바람직하게는 혈청-무함유 배지 및/또는 동물 성분-무함유 조건에서 배양을 위해 적응된다.
- [0144] 혈청-무함유 배지에서 배양에 대한 세포 적응은 세포가 혈청-무함유 배지 내에서 성공적으로 생존하고 증식할 수 있을 때까지 혈청의 양이 감소하는 배지에서 세포를 점진적으로 계대배양함으로써 관련 기술 분야의 통상의

기술자에 의해 쉽게 달성될 수 있다.

- [0145] 베로 세포 또는 베로 세포와 CHO 세포의 혼합물이 형질감염을 위해 사용될 때, 부작성인 베로 세포는 바람직하게는 형질감염 효능을 개선하기 위해 형질감염 전에, 예를 들어 트립신 처리에 의해 지지체로부터 떨어진다. 따라서, 형질감염은 바람직하게는 세포의 현탁액에 대해 수행된다. 그러나, 세포는 방법 진행 과정에서 부작성이 될 수 있다. 별법으로, US 2009/0203112 (그 주제가 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 현탁액에서 성장하도록 적응된 베로 세포주를 사용할 수도 있다.
- [0146] 본 발명에 따른 방법의 체제에서, 형질감염은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 형질감염은 막 전기천공, 핵 전기천공에 의해 수행할 수 있다. 바람직하게는, 형질감염 (단계 a))은 핵 전기천공에 의해 수행한다. 표현 "핵 전기천공"은 그의 강도가 핵 세공의 수 및/또는 그의 투과성을 증가시키기에 충분한 하나 이상의 전기 충격에 의한 핵산의 형질감염 방법을 의미하는 것으로 이해된다. 일반적으로, 전기 충격(들)의 총 강도는 적어도 2 kV/cm이고, 충격(들)의 총 지속시간은 적어도 10 μ s이다. 현탁액 내의 세포의 핵 전기천공은 그의 총 강도가 적어도 2 kV/cm이고 충격(들)의 총 지속시간이 적어도 10 μ s인 하나 이상의 전기 충격에 의해 수행된다. 바람직하게는, 충격(들)의 총 강도는 2 내지 10 kV/cm이고, 충격(들)의 총 지속시간은 10 내지 1000 μ s이다. 보다 더 바람직하게는, 충격(들)의 강도는 2 내지 6 kV/cm이고, 충격(들)의 총 지속시간은 100 내지 600 μ s이다. 바람직하게는, 하나 이상의 휴지기가 중간에 존재하는 몇몇의 전기 충격이 세포에 전달된다. US 2007/0059834 (그 주제가 본원에 참조로 포함됨)에는 전기 충격을 세포에 인가한 후 휴지기가 이어지는 실제 인가 방식이 설명되어 있다. 전기 충격(들) 후에, 강도가 2.5 A를 초과하지 않는 전류를 또한 1 내지 50 ms의 시간 동안 세포에 인가할 수 있다. 일반적으로, 형질감염 단계는 실시예의 단락 1.9에 상세히 설명된 바와 같이 수행하고, 즉 형질감염은 U-023 프로그램을 사용하여 뉴클레오펙터 (nucleofector), 예컨대 론자 (Lonza)에서 시판되는 뉴클레오펙터를 사용하여 수행한다.
- [0147] 형질감염 용액은 세포를 전기 충격(들)로부터 보호하도록 및 핵을 향한 발현 벡터의 확산을 방지하도록 선택된다. US 2005/0064596 (그 주제가 본원에 참조로 포함됨)에는 최적화된 형질감염 용액이 기재되어 있다. 용액은 그의 완충제 용량이 적어도 20 mM pH^{-1} 이고 25°C의 온도 및 7 내지 8의 pH에 적용될 때 적어도 200 mM의 이온 강도를 갖는 체제이다. 바람직하게는, 상기 체제 내의 Na^+ 및 K^+ 의 몰 농도는 각각 100 내지 150 mM 및 2 내지 6 mM이다. 이들은 또한 일반적으로 Mg^{++} 이온을 함유한다. 본 발명의 측면에서 사용될 수 있는 형질감염 매질의 예가 제시된다:
- [0148] - 형질감염 용액 번호 1: 4-6 mM KCl, 10-20 mM MgCl_2 , 120-160 mM 및 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2);
- [0149] - 형질감염 용액 번호 2: 4-6 mM KCl, 10-20 mM MgCl_2 , 5-25 mM HEPES, 120-160 mM 및 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2);
- [0150] - 형질감염 용액 번호 3: 4-6 mM KCl, 10-20 mM MgCl_2 , 50-160 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2) 및 5-100 mM의 나트륨 락토비오네이트 또는 5-100 mM 만니톨 또는 5-100 mM 숙신산나트륨 또는 5-100 mM의 염화나트륨;
- [0151] - 형질감염 용액 번호 4: 4-6 mM KCl, 10-20 mM MgCl_2 , 5-25 mM HEPES, 50-160 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2) 및 5-100 mM의 나트륨 락토비오네이트 또는 5-100 mM 만니톨 또는 5-100 mM 숙신산나트륨 또는 5-100 mM의 염화나트륨;
- [0152] - 형질감염 용액 번호 5: 4-6 mM KCl, 10-20 mM MgCl_2 , 80-100 mM NaCl, 8-12 mM 글루코스, 0.3-0.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 20-25 mM HEPES 및 50-100 mM 트리스/HCl 또는 30-50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2);
- [0153] - 형질감염 용액 번호 6: 0.1-3.0 mM MgCl_2 , 50-200 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.5) 및/또는 1-50 mM 만니톨 및/또는 1-50 mM의 숙신산나트륨; 및
- [0154] - 형질감염 용액 번호 7: 0.42 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 5.36 mM KCl; 0.41 mM MgSO_4 ; 103 mM NaCl; 23.8 mM NaHCO_3 ; 5.64 mM Na_2HPO_4 ; 11.1 mM d(+)- 글루코스; 3.25 μ M 글루타티온; 20 mM HEPES; pH 7.3;
- [0155] - 인산염 완충 염수 (PBS).
- [0156] 보다 바람직하게는, 전기천공 용액은 아막사(Amaxa)TM 세포주 뉴클레오펙터 키트 V-VCA-1003으로 언급되는 키트

내의 문자에 의해 제공되는 용액 V이다.

- [0157] 형질감염 단계에 이어서, 배양 배지를 1 부피의 형질감염 용액에 대해 적어도 5 부피, 바람직하게는 10 부피, 보다 바람직하게는 15 부피의 배양 배지의 비로 형질감염된 세포에 첨가한다. 바람직하게는, 배양 배지는 CHO 세포의 배양을 위해 적합한 배지이다. CHO 세포 및 베토프 세포 둘 모두에 적합한 배지 또는 CHO 세포에 적합한 배지와 베토프 세포에 적합한 배지의 혼합물이 또한 베토프 세포가 형질감염 단계 동안 사용될 때 사용될 수 있다.
- [0158] 특히, 형질감염은 실시예의 단락 1.9에 설명된 바와 같이 수행한다.
- [0159] 감염 단계 동안 사용된 배지 (감염 배지)는 CHO 세포의 배양을 위한 적합한 임의의 배지일 수 있다. 몇몇 감염성 인플루엔자 바이러스가 트립신에 없는 감염성 배지 내의 CHO 세포에서 어느 정도 증식할 수 있기는 하지만, 매우 바람직하게는 배지는 바이러스가 세포 내로 복제되도록 허용하고 다른 CHO 세포를 통한 인플루엔자 바이러스의 증식을 보장하기 위해 트립신 또는 세린 프로테아제 활성을 갖는 효소를 포함하거나 이들이 첨가되었다. 실제로, 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌은 바이러스가 세포 내로 복제될 수 있도록 세린 프로테아제에 의해 절단되어야 한다. 바람직하게는, 트립신은 합성 기원의 것이거나 또는 동물 기원의 임의의 생성물이 존재하지 않는다. 트립신 또는 보다 일반적으로 세린 프로테아제 활성을 갖는 임의의 효소, 예컨대 프로나제, 썬틸리신, 플라스민 또는 테르몰리신은 유전자 재조합에 의해 생산될 수 있다. 트립신은 특히 트랜스제닉 (transgenic) 식물 (WO 00/05384), 효모 또는 박테리아 (WO 01/55429)에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 상표명 TrypLE 셀렉트 (Select) 하에 킵코 (Gibco)에 의해 또는 상표명 TrypLE 익스프레스 (Express) 하에 인비트로젠에 의해 제공되는 재조합 트립신이 본 발명의 목적을 위해 적합하다.
- [0160] 바람직하게는, 배양 배지 및 감염 배지를 포함하여 본 발명의 맥락에서 사용된 배지에는 동물 기원의 혈청이 존재하지 않고, 바람직하게는 동물 기원의 임의의 단백질이 존재하지 않고, 보다 더 바람직하게는 동물 기원의 임의의 성분이 존재하지 않는다. 본 발명의 주제에 적합할 수 있는, 동물 기원의 혈청이 없고/없거나 동물 기원의 원료가 없는 배지의 예는 상품명 VP SFM (인비트로젠), 에피세르프 (Episerf) (인비트로젠), LC17 (캄브렉스 (Cambrex)), Pro CHO 5-CDM (캄브렉스), HyQ SFM4CHO (하이클론 (Hyclone)), HyQ SFM4CHO-유틸리티 (Utility) (하이클론), HyQ PF 베토프 (하이클론), 엑스 셀 (Ex cell) 325 PF CHO 단백질-무함유 배지 (JRH 바이오사이언시스 (JRH Biosciences)), 엑스 셀 302 혈청-무함유 배지 (JRH 바이오사이언시스), 엑스 셀 525, 엑스 셀™ CD CHO 퓨전 (Fusion) (SAFC 바이오사이언시스 (SAFC Biosciences)) 하에 시판된다. 따라서, 동물-무함유 배지 (예를 들어, 임의의 오염물 또는 동물 기원의 성분이 존재하지 않음)를 사용하여 본 발명에 따른 방법을 수행하는 것이 가능하다. 특히, 본 발명의 주제에 적합한 배지는 L-글루타민으로 보충된, SAFC 바이오사이언시스에 의해 제조된 엑스 셀™ CD CHO 퓨전 배지이다. CHO 세포 감염에 의해 감염성 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위해, 바람직하게는 동물 기원의 임의의 성분이 존재하지 않는 트립신 또는 트립신 유도체가 상기 배지에 첨가한다.
- [0161] 몇몇 실시양태에서, 형질감염에 적용되는 세포의 총량은 예를 들어 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 6개 또는 심지어 천만 개의 세포 또는 그 초과이다.
- [0162] 추가의 실시양태에서, 형질감염에 적용되는 세포가 베토프 세포와 CHO 세포의 혼합물일 때, 베토프 및 CHO 세포는 0.5:1 내지 2:1, 예를 들어 1:1, 1.5:1, 1:0.5, 또는 1:1.5의 베토프:CHO 비로 존재할 수 있다. 일반적으로, 상기 베토프:CHO 세포 비는 1:1이다. 예를 들어, 상기 베토프:CHO 세포 비가 1:1일 때, 각각의 유형의 세포의 양은 예를 들어 적어도 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3백만 개의 세포를 나타낸다.
- [0163] 몇몇 실시양태에서, 감염 단계를 수행하기 위해 형질감염 단계 후에 첨가되는 CHO 세포의 양은 예를 들어 적어도 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3백만 개의 세포이다.
- [0164] 본 발명의 방법의 몇몇 실시양태에서, 발현 벡터는 하나 이상의 인플루엔자 단백질 및 하나 이상의 인플루엔자 vRNA 둘 모두의 발현을 허용하는 발현 벡터를 포함하고, 상기 발현 벡터의 세트의 발현은 (i) 상기 바이러스의 vRNA를 함유하는 리보핵단백질 복합체 (RNP)의 형성 및 (ii) 상기 형질감염된 세포에서 상기 바이러스 입자의 조립을 허용하는 것으로 이해된다. 임의로, 헬퍼 바이러스가 상기 발현 벡터의 세트에 추가될 수 있다.
- [0165] 상기 벡터는 예를 들어 mRNA 및 vRNA 둘 모두의 발현을 촉진하는 양방향성 플라스미드이고, 각각의 플라스미드는
- [0166] - 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 중에서 선택되는 8개의 vRNA 중 하나 이상 또는 상응하는 cRNA(들)에 상보적인 하나 이상의 cDNA를 함유하며, 여기서 각각의 cDNA는

- [0167] - RNA 폴리머라제 II에 결합하여, 상응하는 인플루엔자 단백질의 발현을 허용하는 프로모터 (POL II 프로모터), 및
- [0168] - RNA 폴리머라제 I에 결합하여, 상응하는 vRNA 또는 상기 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 프로모터 (POL I 프로모터)
- [0169] 의 제어 하에 존재한다.
- [0170] 몇몇 실시양태에서, RNA 폴리머라제 II에 결합하는 프로모터는 인간 RNA 폴리머라제 II에 결합하는 프로모터이고/이거나, RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터는 인간 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터이다.
- [0171] 바람직하게는, 발현 벡터의 세트가 CHO 세포 내로 형질감염되면, RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터는 설치류 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터이다. 설치류 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터는 바람직하게는 햄스터 또는 마우스 RNA 폴리머라제 I에 결합한다.
- [0172] 몇몇 실시양태에서, mRNA 및 vRNA 둘 모두 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 발현 벡터의 세트는 상기 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개의 양방향성 플라스미드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 8개의 양방향성 플라스미드로 이루어지고, 각각의 플라스미드는 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 중에서 선택되는 8개의 vRNA 중 하나 또는 상응하는 cRNA(들)에 상보적인 cDNA를 함유한다. 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 문헌 [Ozawa et al., 2007, J Virol, 81 (17):9556-9559]에 기재된 8개의 플라스미드로 이루어진다.
- [0173] 발현 벡터의 세트는 또한
- [0174] - 단지 하나 이상의 인플루엔자 단백질을 코딩하는 하나 이상의 mRNA의 발현을 허용하는 발현 벡터, 및
- [0175] - 단지 인플루엔자 바이러스의 하나 이상의 인플루엔자 vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 발현 벡터
- [0176] 를 포함하고, 상기 발현 벡터의 세트의 발현은 (i) 상기 바이러스의 vRNA를 함유하는 리보핵단백질 복합체 (RNP)의 형성 및 (ii) 상기 형질감염된 세포에서 상기 바이러스 입자의 조립을 허용하는 것으로 이해된다.
- [0177] 단지 인플루엔자 단백질의 발현을 유도하는 벡터는 적어도 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질의 발현을 유도할 것이지만, 또한 다른 인플루엔자 단백질 (M, NS, HA 및 NA 단백질)의 발현을 유도할 수 있다. 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 단방향성 플라스미드이고, 각각의 플라스미드는 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질의 군 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 단백질의 발현을 유도하는 하나 이상의 cDNA를 함유하며, 여기서 각각의 cDNA는 RNA 폴리머라제 II에 결합하는 프로모터의 제어 하에 있다. 따라서, 상기 발현 벡터는 각각 문헌 [Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682]에 기재된 플라스미드, 또는 실시예의 단락 1.8에서 설명되는 바와 같이 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질 중 하나에 상응하는 cDNA로 클로닝된 pVAX1 플라스미드를 포함할 수 있다. 별법으로, 발현 벡터의 세트는 8개의 별개의 플라스미드를 포함하고, 각각의 플라스미드는 RNA 폴리머라제 II에 결합하는 프로모터의 제어 하에 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA 단백질 중 하나의 별개의 바이러스 단백질을 코딩하는 mRNA에 상보적인 1개의 cDNA를 함유한다. 따라서, 상기 발현 벡터는 문헌 [Neumann et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350]에 기재된 8개의 플라스미드를 포함할 수 있다.
- [0178] 하나 이상의 인플루엔자 vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 벡터는 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 유도할 것이다. 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 단방향성 플라스미드이고, 각각의 플라스미드는 상기 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 중 하나 이상 또는 상응하는 cRNA에 상보적인 하나 이상의 cDNA를 함유하며, 각각의 cDNA는 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 존재한다. 상기 발현 벡터는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 플라스미드를 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는, 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 상기 발현 벡터는 8개의 상이한 플라스미드를 포함하고, 각각의 플라스미드는 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 8개의 vRNA PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA 중 하나에 상보적인 1개의 cDNA를 함유한다. 따라서, 상기 발현 벡터의 세트는 문헌 [Neumann et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350] 또는 [Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682]에 기재된 8개의 플라스미드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 발현 벡터의 세트는 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA에 상보적인 8개의 cDNA를 함유하는 하나의 플라스미드로 제시되고, 이들 cDNA는 각각 문헌 [Neumann et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829]에 기재된 바와 같이 RNA 폴리머라제 I 프로모터 및 폴리머라제 종결인자의 제어 하에 존

재한다. 또 다른 실시양태에서, 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 또는 상응하는 cRNA의 발현을 허용하는 발현 벡터의 세트는, 예를 들어 2개의 상이한 플라스미드, 즉 6개의 cDNA를 함유하는 하나의 플라스미드 (각각의 상기 cDNA는 RNA 폴리머라제 I 프로모터의 제어 하에 각각의 PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS vRNA에 상보적임) 및 2개의 cDNA를 함유하는 하나의 플라스미드 (각각의 상기 cDNA는 각각의 HA 및 NA vRNA에 상보적이고, 각각의 cDNA는 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 존재함)를 포함한다. RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 8개의 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 중 하나 또는 상응하는 cRNA에 상보적인 1개의 cDNA를 함유하는 플라스미드는 바람직하게는 상기 cDNA를 서열 2의 서열을 포함하는 벡터 내로 클로닝함으로써 얻는다. 보다 바람직하게는, 상기 각각의 플라스미드는 상기 cDNA를 서열 10의 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 벡터, 즉 보편적 pSP-flu 플라스미드 내로 클로닝함으로써 얻는다.

[0179] 바람직한 특정 실시양태에서, 발현 벡터의 세트는 다음을 포함한다:

[0180] - RNA 폴리머라제 II에 결합하는 프로모터의 제어 하에 4개의 바이러스 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질 중 하나를 코딩하는 mRNA에 상보적인 1개의 cDNA를 각각 함유하는 4개의 상이한 플라스미드, 예컨대 문헌 [Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682]에 기재된 플라스미드, 또는 실시예의 단락 1.8에서 설명되는 바와 같이 PB2, PB1, PA 및 NP를 코딩하는 cDNA로 클로닝된 pVAX1 플라스미드, 및

[0181] - RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 8개의 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 중 하나 또는 상응하는 cRNA에 상보적인 1개의 cDNA를 각각 함유하는 8개의 상이한 플라스미드 (상기 각각의 플라스미드는 상기 cDNA를 본 발명에 따른 벡터, 예컨대 보편적 pSP-flu 플라스미드 내로 클로닝함으로써 얻는다).

[0182] 바람직하게는 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA를 발현할 수 있는 벡터는 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA cDNA가 각각 클로닝된 본 발명에 따른 벡터이다.

[0183] 인플루엔자 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질을 발현할 수 있는 벡터는 이어서 예를 들어 pVAX1 플라스미드 (라이프 테크놀로지, 프랑스 세르지 폰투아즈)일 수 있다.

[0184] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스는 야생형 인플루엔자 바이러스, 예컨대 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스, 재편성 인플루엔자 바이러스, 키메라 인플루엔자 바이러스, 또는 심지어 약독화 인플루엔자 바이러스일 수 있다.

[0185] 바람직하게는, 본 발명의 방법에 따라 생산된 상기 감염성 인플루엔자 바이러스는 재편성 인플루엔자 바이러스이다.

[0186] 보다 바람직하게는, 상기 감염성 인플루엔자 바이러스는 재편성 키메라 인플루엔자 바이러스이다.

[0187] 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스는 A 군주, B 군주 또는 C 군주의 임의의 하위유형일 수 있다. 이것은 인간을 감염시키는 바이러스 군주, 예컨대 A/H1N1, A/H3N2, A/H5N1, A/H7N1 또는 B 군주일 수 있다. 이것은 새를 감염시키는 바이러스 군주, 예컨대 A/H5N1, A/H5N2, A/H5N8, A/H5N9, A/H7N1, A/H7N3, A/H7N7 군주일 수 있다. 또한, 이것은 말을 감염시키는 바이러스 군주 (A/H3N8 군주), 돼지를 감염시키는 바이러스 군주 (A/H1N1; A/H3N2 또는 A/H1N2 군주) 동일 수 있다.

[0188] 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스는 인간 계절성 인플루엔자의 원인일 수 있다. 특히, 상기 생산된 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스는 A/H1N1, A/H3N2 군주 또는 B 군주일 수 있다. 이것은 또한 조류 독감의 원인 바이러스일 수 있다.

[0189] 본 발명에 따라 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스는 또한 대유행 인플루엔자의 원인일 수 있다. 특히, 상기 생산된 인플루엔자 바이러스는, 예를 들어 A/H1N1, A/H5N1 또는 A/H7N1 군주일 수 있다.

[0190] 바람직하게는, 감염성 인플루엔자 바이러스는 재편성 감염성 인플루엔자 바이러스이고, 즉 이들은 적어도 2개의 공여자 바이러스로부터 유래된 유전 물질을 함유한다.

[0191] A형 인플루엔자 백신의 제조에 유용한 A형 재편성 바이러스의 예는 타입 6:2 또는 5:3의 것이고, 여기서 각각의 6 또는 5 vRNA는 A/PR/8/34 (H1N1)처럼 생산 기재에서 양호한 성장 능력을 갖는 공여자 바이러스로부터 유래되는 반면, 상실 vRNA(들)은 계절성 또는 대유행 바이러스로부터의 HA, NA 절편 및 가능하게는 PB1이다. 재편성 바이러스가 타입 6:2의 H1N1 바이러스일 때, 이것은 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터의 6 vRNA (PB1, PB2, PA, NP, M, NS) 및 계절성 또는 대유행 바이러스로부터의 HA 및 NA vRNA를 포함할 수 있다.

[0192] 특히, 타입 6:2의 A형 재편성 바이러스의 경우에, 6 vRNA 절편은 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터 유래될 수

있고, 서열 13의 서열의 PA vRNA, 서열 14의 서열의 PB1 vRNA, 서열 15의 서열의 PB2 vRNA, 서열 16의 서열의 NP vRNA, 서열 17의 서열의 M vRNA, 서열 18의 서열의 NS vRNA를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0193] B형 인플루엔자 백신의 제조에 유용한 B형 재편성 바이러스는 예를 들어 타입 2:2:4의 것 (뉴욕 의과대학 (New York Medical College)에서 제공받음)이고, 여기서 PB2 및 NP vRNA는 B/Lee/40 바이러스로부터 유래되고, PA 및 NS vRNA는 B/Panama/45/90 바이러스로부터 유래되고, HA, NA, PB1 및 M vRNA는 B/Hubei-Wujiagang/158/209로 불리는 계절성 B 바이러스로부터 유래된다.

[0194] 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스는 또한 키메라 인플루엔자 바이러스, 특히 키메라 재편성 인플루엔자 바이러스이고, 보다 특히 상기 키메라 인플루엔자 바이러스는 키메라 인플루엔자 HA 및/또는 NA vRNA를 함유한다.

[0195] 몇몇 실시양태에서, 상기 HA 또는 NA vRNA는 키메라이다.

[0196] 바람직하게는, 상기 키메라 인플루엔자 HA 또는 NA vRNA는 키메라 HA 또는 NA 단백질을 코딩한다. 이것은 공여자 바이러스 (예컨대 A/PR8/34 (H1N1) 또는 B/Lee/40)로부터의 HA vRNA 또는 NA vRNA 단편의 하나 이상의 도메인 및 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터의 HA 또는 NA vRNA의 하나 이상의 도메인을 포함한다. 특히, 계절성 또는 대유행 바이러스의 HA vRNA의 상기 도메인은 HA, 예컨대 HA1 및/또는 HA2의 항원성 엑토도메인을 코딩하는 mRNA에 상보적이거나 또는 계절성 또는 대유행 바이러스의 NA vRNA의 상기 도메인은 상기 계절성 또는 대유행 바이러스의 NA의 항원성 엑토도메인을 코딩하는 mRNA에 상보적이다.

[0197] 예를 들어, 상기 키메라 HA vRNA는 공여자 바이러스로부터 유래된 2개의 NCR (비코딩 영역) 도메인, SP (신호 펩티드) 도메인, HA2 도메인, TM (막 횡단) 도메인 및 Cyto (세포질) 도메인을 함유하는 반면, HA1 도메인은 계절성 인플루엔자 바이러스 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터 유래된다.

[0198] 바람직하게는, A형 인플루엔자 바이러스의 경우에, 키메라 HA vRNA는 공여자 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터의 2개의 NCR, SP, HA2, TM 및 Cyto 도메인, 및 계절성 또는 대유행 인플루엔자 A형 바이러스로부터의 HA1 도메인을 포함한다.

[0199] 보다 바람직하게는, A형 인플루엔자 바이러스의 경우에, 키메라 HA vRNA는 A/PR/8/34 (H1N1) 공여자 바이러스로부터의 각각 서열 19, 20, 21, 22, 23 및 24의 서열을 갖는 2개의 NCR, SP, HA2, TM 및 Cyto 도메인, 및 계절성 또는 대유행 인플루엔자 A형 바이러스로부터의 HA1 도메인을 함유한다.

[0200] 바람직하게는, B형 인플루엔자 바이러스의 경우에, 키메라 HA vRNA는 공여자 바이러스, 예컨대 A/PR/8/34 (H1N1) 또는 B/Lee/40으로부터의 도메인 NCR, SP, HA2, TM, Cyto, 및 계절성 B형 바이러스로부터의 HA1 도메인을 함유한다.

[0201] 키메라 NA vRNA의 경우에, 이것은 공여자 바이러스로부터의 NCR, TM, Cyto 및 줄기 (Stalk) 도메인을 함유하는 반면, 엑토도메인으로 불리는 도메인은 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터 유래된다. 바람직하게는, A형 인플루엔자 바이러스의 경우에, 키메라 NA vRNA는 A/PR/8/34 (H1N1) 공여자 바이러스로부터의 NCR, TM, Cyto 및 줄기 도메인, 및 계절성 또는 대유행 인플루엔자 바이러스로부터의 엑토도메인을 함유한다. 보다 바람직하게는, A형 인플루엔자 바이러스의 경우에, 키메라 NA vRNA는 A/PR/8/34 (H1N1) 공여자 바이러스로부터의 각각 서열 25, 26, 27, 28 및 29의 서열을 갖는 NCR, TM, 줄기 및 Cyto 도메인, 및 계절성 또는 대유행 바이러스로부터의 엑토도메인을 함유한다. 바람직하게는, B형 인플루엔자 바이러스의 경우에, 키메라 NA vRNA는 공여자 바이러스, 예컨대 A/PR/8/34 (H1N1) 또는 B/Lee/40으로부터의 NCR, TM, 줄기 및 Cyto 도메인, 및 계절성 B형 바이러스로부터의 엑토도메인을 함유한다.

[0202] 숙주 세포

[0203] 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 발현 벡터의 세트를 포함하는 CHO 세포에 관한 것이다.

[0204] 상기 CHO 세포 및 감염성 인플루엔자 바이러스는 상기 설명된 바와 같다.

[0205] 따라서, 특히 상기 CHO 세포는 상기 설명된 바와 같은 CHO-K1 세포이다.

[0206] 특정 실시양태에서, 상기 발현 벡터의 세트는 다음을 포함한다:

[0207] (i) 인플루엔자 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질을 발현할 수 있고 4개의 상이한 플라스미드를 포함하는 발현 벡터 (여기서 각각의 플라스미드는 RNA 폴리머라제 II에 결합하는 프로모터의 제어 하에 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질을 발현하는 바이러신 단백질 중 하나를 코딩하는 mRNA에 상보적인 1개의 cDNA를 함유함), 및

- [0208] (ii) 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 또는 상응하는 cRNA를 발현할 수 있고 8개의 상이한 플라스미드를 포함하는 발현 벡터 (여기서 각각의 플라스미드는 설치류 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터의 제어 하에 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 및 NA vRNA 중에서 선택된 8개의 vRNA 중 하나 또는 상응하는 cRNA에 상보적인 1개의 cDNA를 함유하고, 상기 cDNA 서열을 본 발명에 따른 벡터 내에 클로닝함으로써 얻어지며, 상기 벡터는 설치류 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터를 포함한다고 이해됨).
- [0209] 인플루엔자 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질을 발현할 수 있는 상기 발현 벡터는 문헌 [Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682]에 기재된 플라스미드, 또는 각각 실시예의 단락 1.8에 설명된 바와 같이 PB2, PB1, PA 및 NP 중에서 선택된 바이러스 단백질 중 하나를 코딩하는 mRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 pVAX1 플라스미드를 포함할 수 있다.
- [0210] 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 벡터는 햄스터 RNA 폴리머라제 I에 결합하는 프로모터를 포함한다. 별법으로, vRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 8개의 플라스미드의 프로모터는 T7 폴리머라제 프로모터이다. 이 경우에, 발현 벡터의 세트는 문헌 [De Wit et al., 2007, J. Gen. Virol, 88 (Pt4): 1284-1287]에 기재된 T7 폴리머라제를 코딩하는 mRNA에 상보적인 cDNA를 함유하는 추가의 플라스미드 (총수는 13입)를 함유한다.
- [0211] 본 발명은 또한 인플루엔자 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질을 안정적으로 발현하는 재조합 CHO 세포에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 상기 재조합 CHO 세포는 또한 인플루엔자 PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS vRNA를 발현할 수 있는 발현 벡터의 세트를 포함한다.
- [0212] 바람직하게는, 상기 재조합 CHO 세포는 재조합 CHO-K1 세포이다.
- [0213] 안정한 세포를 확립하는 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 상기 방법은 문헌 [Wang et al., 2012, Genet Mol Res, 11(2):1442-1448] 또는 [Liu et al., 2011, Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 27(5)747-754]에 기재되어 있다.
- [0214] **제약 조성물의 제조 방법**
- [0215] 본 발명은 또한 인플루엔자 백신 조성물의 제조 방법에 관한 것이고, 이 방법은
- [0216] a) 상기 설명한 본 발명의 임의의 실시양태에 따른 방법에 의해 인플루엔자 바이러스를 생산하고;
- [0217] b) CHO 세포, 바람직하게는 CHO-K1 세포에서의 증식 후에 감염성 인플루엔자 바이러스를 수거하고,
- [0218] c) 수거된 감염성 인플루엔자 바이러스를 정제하고,
- [0219] d) 임의로, 정제된 바이러스를 불활성화하고,
- [0220] e) 정제된 바이러스를 제약상 허용되는 담체와 혼합하는 것
- [0221] 을 포함한다.
- [0222] 정제는 간단할 수 있고, 일반적으로 수거된 감염성 바이러스를 맑게 한 후, 원심분리에 의해 바이러스를 농축하는 단계로 제한될 수 있다. 정제는 예를 들어 수크로스 밀도 구배에 의해 수행되는 원심분리 단계 (EP 0 7760362)로 보충될 수 있다. 크로마토그래피 방법이 또한 바이러스를 정제하기 위해 수행할 수 있다. 따라서, 정제된 전체 바이러스의 현탁액을 얻고, 이것은 최종 백신 조성물을 얻기 위해 추가로 처리될 수 있다. 정제된 바이러스 현탁액은 또한 후속 처리를 거칠 수 있다. 이와 같이, 독감 바이러스-유래 생성물이 얻어진다. 바이러스 현탁액은, 예를 들어 단편화된 또는 분할된 바이러스, 독감 바이러스 헤마글루티닌을 함유하는 비로솜 또는 하위단위 백신을 기초로 한 백신을 제조하기 위해, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법에 따라 세제 또는 지질 용매를 사용하여 단편화될 수 있다. 정제된 바이러스로부터 얻어진 단편화된 또는 분할된 바이러스, 독감 바이러스 헤마글루티닌을 함유하는 비로솜 및 독감 바이러스 헤마글루티닌을 함유하는 하위단위 백신은 독감 바이러스-유래 생성물로 고려된다.
- [0223] 최종 백신 조성물은 전체 불활성화된 독감 바이러스 또는 약독화 독감 바이러스로 제조될 수 있다.
- [0224] 바이러스 현탁액의 불활성화는 β -프로피오락톤 ([E. Budowsky et al. 1991, Vaccine, 9: 319-325]; [1991, Vaccine, 9: 398-402]; [1993, Vaccine, 11: 343-348]), 에틸렌이민 또는 유도체 (D. King 1991, Avian Dis. 35: 505-514) 또는 포르몰 (EP 0 776 0362)를 사용하여 통상의 수단에 의해 수행한다. 바이러스의 불활성화는 정제 단계 전 또는 후에 수행할 수 있다.

- [0225] 최종 백신 조성물은 일반적으로 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된다.
- [0226] "제약상 허용되는 담체"는 인간에서 임의의 2차 반응, 예를 들어 알레르기 반응을 생성하지 않는, 활성제의 안정성, 멸균성 및 전달성을 향상시키기 위해 제약물질 및 백신의 제제화시에 통상 사용되는 임의의 용매, 분산 매질, 충전제 등을 의미한다. 부형제는 선택된 제약 형태, 투여 방법 및 경로를 기초로 하여 선택된다. 적절한 부형제, 및 제약 제제에 관한 요건은 관련 기술 분야의 참고서인 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" (19th Edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995))]에 기재되어 있다. 제약상 허용되는 부형제의 예는 물, 인산염-완충 염수 용액, 0.3% 글리신 용액이다.
- [0227] 불활성화된 전체 바이러스를 기초로 한 백신 조성물은 또한 하나 이상의 아주반트 (adjuvant)를 포함할 수 있다. 상기 백신은 알루미늄 염, 예컨대 수산화알루미늄 겔, 인산알루미늄 또는 명반과 함께, 또는 유중수 또는 수중유 에멀전에서 제제화될 수 있다. 독감에 대한 체액성 및/또는 세포성 반응을 증가시킬 수 있는 임의의 아주반트가 사용될 수 있다. 아주반트 제제의 비제한적인 예로서, MF59[®] 에멀전, 리포솜-기반 제제, 및 MPL, 코리네박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*), 사포닌, 리소레시틴, 플루로닉 (pluronic) 유도체, 또는 이들의 조합을 기초로 한 제제를 언급할 수 있다. TLR 효능제도 사용될 수 있다.
- [0228] 본 발명에 따른 방법에 의해 얻어진 백신은 독감에 대해 인간 및 동물을 보호할 때 사용하기 위한 것이다.
- [0229] 수의학 분야에서, 백신은 조류 독감 예방 분야에서 주로 사용되지만, 말과의 구성원, 특히 말, 개과의 구성원, 특히 개, 고양이과의 구성원, 특히 고양이, 돼지과의 구성원, 특히 돼지, 족제비, 특히 밍크 및 흰담비, 및 조류 중, 특히 닭, 오리, 칠면조, 메추라기, 꿩, 거위 및 타조에서 독감 증상 및/또는 바이러스 분비의 예방 또는 감소를 위해 사용될 수도 있다.
- [0230] 인간에서, 백신은 유행성 독감 및 대유행 독감 예방 분야에서 사용된다. 유행성 독감이, 접촉에 의해 (감염에 의해) 또는 전염병의 원인인 바이러스로부터의 HA와 항원성 관계가 존재하고 특정 면역이 존재하는 인플루엔자 바이러스의 하나의 (또는 그 초과)의 균주(들)을 사용한 면역접종에 의해 이미 감작화된 인간 집단을 침범하지만, 단지 부분적으로 효과적인 경우에도, 새로운 바이러스의 HA는 이전의 순환 바이러스와 항원성 관계를 전혀 또는 거의 갖지 않기 때문에 대유행 독감은 바이러스의 상기 새로운 바이러스에 감작화되지 않은 인간 집단을 침범한다.
- [0231] 유행성 독감 백신은 이미 순환된 이전의 바이러스와 항원성 관계를 갖는 순환하는 계절성 인플루엔자 바이러스에 의해 발생하는 계절성 독감 형태에 대해 인간 집단을 보호하고자 의도된다. 현재, 유행성 독감의 원인이 되는 인플루엔자 바이러스는 A형이고, H1N1 또는 H3N2 하위유형에 속하거나 또는 B형이다.
- [0232] 대유행 독감 백신은 이전의 순환 바이러스와 HA의 측면에서 항원성 관계를 갖지 않는 새로운 인플루엔자 바이러스인 대유행 인플루엔자 바이러스에 의한 감염에 대해 인간 집단을 보호하고자 의도된다. 현재, 대유행 독감의 원인이 되는 인플루엔자 바이러스는 A/H1N1 바이러스이다.
- [0233] 유행성 또는 대유행 독감 백신은 생 약독화 백신 또는 불활성화된 백신의 형태일 수 있지만, 불활성화된 백신이 대유행 독감의 예방을 위해 바람직하다. 백신은 1가 백신 (단일 독감 바이러스 균주로부터 제조된 백신) 또는 다가 백신 (몇몇의 독감 바이러스 균주로부터 제조된 백신)의 형태일 수 있다. 유행성 독감 백신의 조성물은 현재 H3N2 및 H1N1 바이러스로부터 및 B형 바이러스로부터 제조된 3가 백신의 형태이다. 불활성화된 백신은 일반적으로 전체 바이러스, 단편화된 바이러스 (분할된 바이러스) 또는 비로솜 형태, 또는 HA를 함유하는 하위단위 형태로 존재하고, 임의로 하나 이상의 아주반트, 예컨대 상기 언급된 것을 함유한다. 생 약독화 백신은 일반적으로 점막 면역의 발생을 촉진하기 위해 경구로 또는 비내로 투여되지만, 불활성화된 백신은 비경구로 (근내 또는 피하), 피내 또는 심지어 점막에 (비내), 또는 심지어 WO 01/22992에 기재된 바와 같이 2개의 상이한 투여 경로의 조합에 의해 투여될 수 있다. 면역접종 방식은 일반적으로 주사 또는 주사에 이은 부스터 (booster)를 제공한다. 투여되는 백신 용량은 개체의 연령 및 아주반트의 존재 또는 부재에 따라 결정된다. 통상적으로, 백신 용량은 백신에 포함된 각각의 백신 균주의 15 μ g의 HA의 동등물을 함유한다. 상기 용량은 백신에 아주반트가 존재할 때 대략 1 내지 2 μ g의 HA로 감소될 수 있거나, 또는 노인 또는 면역 결핍으로 고통 받는 개체에서 30 μ g의 HA 또는 심지어 이를 초과하는 양으로 증가될 수 있다.
- [0234] 조성물은 통상적인 피하 주사기 또는 안전성 주사기, 예컨대 벡톤 디킨슨 코퍼레이션 (Becton Dickinson Corporation, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)로부터 상업적으로 이용가능한 것 또는 분사식 주입기 (jet injector)를 사용하여 투여될 수 있다. 피내 투여를 위해, 통상적인 피하 주사기는 망투 (Mantoux) 기술을 이용하여 사용될 수 있거나 또는 특수 피내 전달 장치, 예컨대 BD 솔루비아 (Soluvia)(TM) 미세주사 시스템 (벡톤

디킨슨 코퍼레이션, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)도 사용될 수 있다.

[0235] 투여된 조성물의 부피는 투여 방법에 따라 결정될 것이다. 피하 주사의 경우에, 부피는 일반적으로 0.1 내지 1.0 ml, 바람직하게는 대략 0.5 ml이다.

[0236] 본원 전체에서, 다양한 참조문헌을 인용한다. 상기 참조문헌의 개시내용은 본 개시내용에 참조로 포함된다.

[0237] 본 발명은 다음 도면 및 실시예에 의해 추가로 예시될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0238] 도 1: 백신 재편성으로서 사용될 수 있는 제조할 인플루엔자 바이러스의 신속한 생성을 위한 간소화된 도면의 예시이다. pSP-flu는 서열 10의 서열로 이루어진 보편적 벡터에 상응한다.

도 2: 보편적 pSP-flu 플라스미드를 사용한 클로닝 전략. 카나마이신 내성 유전자의 위치를 공란에 도시하고, POL 1 프로모터 및 리보자임을 어둡게 도시한다. 플라스미드를 BbsI로 선형화하고, 적격 이. 콜라이(*E. Coli*)의 형질전환 전에 말단에서 리보자임 및 프로모터로부터의 17개의 뉴클레오타이드를 함유하는 바이러스 cDNA과 혼합하였다. cDNA는 POL I 프로모터 및 리보자임 사이에 바이러스 게놈 절편을 도입하기 위해 말단 상보성의 영역 내에서 원형 플라스미드 내로 재조합되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0239] **실시예**

[0240] 1. 물질 및 방법

[0241] 1.1. 세포

[0242] CHOK1 세포 (ATCC 번호: CCL-61)의 현탁액을 교반하면서 4 mM L-글루타민 (김코®)을 보충한 엑스-셀 CD CHO 융합 배지 (시그마-알드리치 (SIGMA-ALDRICH, 프랑스 상 캉팅 팔라비에)) 내에서 125 mL 진탕기 플라스크 (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific)) 내에서 배양하였다. 부착성 MDCK 세포 (CCL-34) 및 배로 세포 (ATCC 번호: CCL-81)를 각각 10% FBS (써모 사이언티픽)를 보충한 DMEM (김코®) 내에서 또는 0.1% 포비돈 K30 (사노피 파스퇴르 (Sanofi Pasteur))을 보충한 VP-SFM (김코®) 내에서 조직 배양 플라스크 (백톤 디킨슨) 내에서 배양하였다. CEP 세포를 10일령의 특이적 병원체-무함유 (SPF) 닭 배아 (발로 비오메디아 (Valo Biomedica, 독일 오스테르홀츠 샤름베트))로부터 수집하고, 5% FBS (써모 사이언티픽)를 보충한 DMEMF12+글루타맥스(Glutamax) I (HAM) (김코®) 내에서 조직 배양 플라스크 (백톤 디킨슨) 내에서 배양하였다. 모든 세포 배양액을 37°C에서 95% 공기 및 5% CO₂의 분위기에서 유지하였다.

[0243] 1.2. 수용체 분석

[0244] 상이한 세포 유형의 표면 상에서 Sia2-3Gal 및 Sia2-6Gal 잔기 발현의 분석을 디곡시게닌 글리칸 분화 키트 (로슈 (Roche, 독일 만하임))를 사용하여 수행하였다. 2백만 개의 세포를 PBS 1x (유로비오 (Eurobio, 프랑스 코르타퇴)) 내에서 2회, 및 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂ 및 1 mM CaCl₂ (pH 7.5)를 함유하는 완충제 내에서 1회 세척하였다. 세포를 Sia2-6Gal 잔기에 특이적인 디곡시게닌-표지된 렉틴 삼부쿠스 니그라 (*Sambucus nigra*) 아글루티닌 (SNA) (1/1000), 또는 Sia2-3Gal에 특이적인 마악키아 아무렌시스 아글루티닌 (MAA) (1/300)과 함께 실온에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. 대조군 세포를 렉틴 없이 인큐베이션하였다. 세포를 TBS (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5) 내에서 2회 세척하고, 실온에서 (암소에서) 1 h 동안 1/40 항-디곡시게닌-플루오레세인 Fab 단편 (로슈)로 처리하였다. PBS 1x (유로비오) 내에 2주 후에, 세포를 구아바 (Guava) 모세관 세포측정기 상에서 초록 형광 강도에 대해 분석하였다.

[0245] 1.3. 바이러스

[0246] 인플루엔자 B/Brisbane/60/08 바이러스 및 재편성 백신 바이러스 A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116, A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14 및 A/California/07/09 (H1N1) X179A를 NIBSC (영국 허트포드셔)로부터 입수하였다. 바이러스를 유정란 (발로 비오메디아) 내에서 번식시키고, 감염된 요막 유체로부터 수거하였다.

[0247] 1.4. 바이러스 감염

[0248] 세포를 감염 4 h 전에 1 ml의 최종 부피로 각각의 세포 유형에 적절한 혈청-무함유 배양 배지 내에 6-웰 플레이

트 (코닝 (Corning, 미국 뉴욕)) 내에서 1.6×10^5 개 세포/cm²의 밀도로 접종하였다. 감염은 35℃에서 1 h 동안 다양한 감염 다중도 (MOI)에서 수행하였다. 돼지 트립신 (시그마-알드리치)을 함유하고 혈청이 없는, 각각의 세포 유형에 적절한 혈청-무함유 배양 배지 (2 ml)를 첨가하고, 세포를 4일 동안 35℃에서 8% CO₂에서 인큐베이션하였다.

[0249] 1.5. 적혈구응집 검정

[0250] HA 검정은 V자-바닥 플레이트 (코닝) 내에서 50 μ l의 배양 상청액을 PBS 1 x (김코®)로 2배 연속 희석함으로써 수행하였다. 이어서, 50 μ l의 0.5% 닭 적혈구 (사노피 파스퇴르, 프랑스 알바 라 로렌)를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4℃에서 1 h 동안 인큐베이션하고, 적혈구응집 또는 적혈구응집의 부재를 각각의 웰에 대해 시각적으로 결정하였다.

[0251] 1.6. TCID₅₀ 검정

[0252] MDCK 세포를 1 μ g/ml 돼지 트립신 (시그마-알드리치)을 보충한 DMEM (김코®) 내에서 96 웰 플레이트 (코닝) 내에서 2.7×10^6 개 세포/cm²의 밀도로 접종하였다. 세포를 50 μ l의 1:10 연속 바이러스 희석액으로 감염시키고, 35℃에서 4일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 이들 배양으로부터 상청액을 적혈구응집 검정으로 시험하였다. TCID₅₀ 역가는 스피어만-카버의 통계학 방법 (David John Finney, 1952, Statistical method in biological assay, Hafner editor)에 따라 계산하였다.

[0253] 1.7. 형질감염 효율

[0254] 2백만 개의 세포를 10 min 동안 200 x g에서 원심분리하고, 실온에서 100 μ l의 cGMP (현재 우수 제조 실무) 용액 V (론자, 스위스 바젤) 내에 재현탁하고, 10 μ g의 pGFP (사노피 파스퇴르) 플라스미드를 첨가하였다. 상이한 프로그램을 이용하여 뉴클레오펙터 (론자)를 사용하여 핵전공을 수행하였다. 세포를 37℃, 5% CO₂에서 24 h 동안 각각의 세포 유형에 최적인 배지 내에서 6 웰 플레이트 (코닝) 내에서 인큐베이션하였다. 세포를 구아바 모세관 세포추정기 (밀리포어 (Millipore), 미국 매사추세츠주 벨레리카) 상에서 초록 형광 강도에 대해 분석하였다.

[0255] 1.8. 플라스미드 DNA

[0256] 감염성 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 구조 (rescue)를 위한 12개의 플라스미드는 문헌 [Fodor et al., 1999, J Virol, 73(11):9679-9682]에서 이전에 설명되었다. 동일한 방법을 아래에 언급한 몇몇 변형과 함께 적용하였다.

[0257] A/WSN/33 (H1N1) (WSN) 바이러스의 PB2, PB1, PA 및 NP 단백질의 코딩 영역을 CMV 프로모터 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 (BGH-polyA) 부위 사이에 pVAX1 플라스미드 (라이프 테크놀로지, 프랑스 세르지 퐁투아즈) 내로 클로닝하였다. pVAX1 플라스미드 (라이프 테크놀로지)는 바이러스 RNA 발현을 위해 변형되었다. 간단히 설명하면, 선형화를 위한 BbsI 부위를 함유하는 링커 (linker)에 의해 분리된 인간 POL 1 프로모터 및 간염 델타 리보자임 서열에 상응하는 DNA 단편 (NotI 및 SbfI 부위)을 pVAX1 플라스미드 내로 클로닝하고, CMV 프로모터 및 BGH-polyA 부위를 제거하였다. 생성되는 플라스미드를 "보편적 pSP-flu"로 명명하였다.

[0258] 바이러스 RNA를 QIAamp 바이러스 RNA 미니 키트 (퀴아젠, 프랑스 코르타비)를 사용하여 감염된 요막 유체로부터 추출하고, vRNA에 상보적인 게놈 cDNA를 각각 간염 델타 리보자임으로부터의 17개의 뉴클레오티드 (5'-ctgggaccatgccggcc) (서열 11) 및 POL 1 프로모터로부터의 17개의 뉴클레오티드 (5'-tgggccgccgggttatt) (서열 12)를 함유하는 1쌍의 프라이머를 사용하여 슈퍼스크립트(Superscript) III 1-단계 RT-PCR 시스템 (라이프 테크놀로지)으로 얻었다.

[0259] 온도 사이클 파라미터는 47℃에서 60 min, 94℃에서 2 min, 및 이어서 40 사이클 (94℃에서 15 sec, 60℃에서 30 sec, 및 72℃에서 2 min), 및 72℃에서 5 min이었다. 이어서, 각각의 단편을 젤일루트 (GenElute) 겔 추출 키트 (시그마-알드리치)를 사용하여 정제하고, 인 퓨전 (In Fusion) HD PCR 클로닝 키트 (클론테크, 타카라 바이오 (Takara Bio), 프랑스 생 제르맹 앙 레)를 사용하는 상동성 재조합에 의해, 앞서 BbsI (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 임스위치)에 의해 선형화한 보편적 pSP-flu 플라스미드 내로 클로닝하였다. 내독소-무함유 플라스미드 DNA 제제는 뉴클레오본드 맥시 (Nucleobond Maxi) EF 키트 (마세리 나겔 (Macherey Nagel), 독일 뒤렌)를 사용하여 생성하였다.

1.9. 역 유전학

백만 개의 베로 및 백만 개의 CHOK1 세포를 혼합하고, 10 min 동안 200 x g에서 원심분리하고, 실온에서 100 μ l의 용액 V (론자) 내에 재현탁하였다. 1 μ g의 각각의 8 vRNA 발현 플라스미드 및 0.5 μ g의 각각의 4 단백질 발현 플라스미드의 혼합물을 세포에 첨가하고, U-023 프로그램을 이용하여 뉴클레오펙터 (론자)를 사용하여 핵감염을 수행하였다. 세포를 4 mM L-글루타민 (김코®)을 보충한 엑스-셀™ CD CHO 융합 배지 (시그마-알드리치) 내로 6웰 플레이트 내에서 인큐베이션하였다. 37°C, 5% CO₂에서 2 h 인큐베이션한 후, 2백만 개의 CHOK1 세포를 재조합 트립신 (TryLE 셀렉트) (김코®)을 보충한 동일한 배지 내에 첨가하고, 회전 플랫폼 상에서 35°C, 8% CO₂에서 인큐베이션하였다.

1.10. 억제 적혈구응집 검정 (IHA)

영국 국립 생물 표준 통제 연구소 (NIBSC)로부터 구입한 A/California/07/09 (H1N1) 바이러스의 HA에 특이적인 혈청을 비브리오 콜레라 (*Vibrio Cholera*)로부터 수용체 파괴 효소 (RDE, 시그마 (Sigma), 10 mU/mL)로 37°C에서 18 h 동안 처리하였다. 56°C에서 1 h 동안 RDE를 불활성화시켰다. 이어서, RDE-처리 혈청을 5% 칠면조 적혈구 (RBC)와 함께 4°C에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 2000 rpm에서 10 min 동안 원심분리하였다. 이어서, 처리된 혈청의 연속 희석액을 4HAU의 처리할 바이러스와 함께 실온에서 1 h 동안 인큐베이션한 후, 0.25% 닭 RBC와 함께 4°C에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. IHA 역가는 바이러스에 의해 매개된 RBC의 적혈구응집을 억제하는 혈청의 최고 희석율에 의해 결정한다.

2. 결과

2.1. 세포 성장

MDCK, CHO-K1, 베로 및 CEP 세포를 먼저 CHO-K1에 대해 현탁액으로 또는 다른 세포 유형에 대해 부착성으로서 각각의 세포 유형에 대해 가장 적절한 배지 내에서의 성장을 지지하는 그들의 능력에 대해 평가하였다. 집단 배가 수준 (pd1)은 한 세대에 필요한 기간을 추정함으로써 각각의 세포 유형에 대해 결정하였다. 표 1에 제시된 바와 같이, MDCK 및 CHO-K1은 베로 (38 h) 및 CEP 세포 (48 h)에 비해 더 짧은 pd1 (각각 23 및 18 h)을 나타냈다. CHO-K1 및 베로 세포주를 혈청 없이 배양하였음을 주목하는 것은 중요하다.

표 1

MDCK, CHO-K1, 베로 및 CEP 세포의 집단 배가 수준 (pd1).

| 세포 유형 | 집단 배가 (시간) | S.D. |
|--------|------------|------|
| MDCK | 23.03 | 3.5 |
| CHO-K1 | 18.0 | 2.6 |
| 베로 | 38.4 | 5.1 |
| CEP | 47.66 | 0.5 |

성장 연구를 6일에 걸쳐 37°C에서 수행하였고, 집단 배가 수준 (pd1)은 한 세대에 필요한 기간을 추정함으로써 계산하였다. 이것은 비 T/N으로부터 계산하였고, 여기서 T는 세포 배양 기간이고, N은 다음 식으로부터 계산된 세포 세대의 수이다: $Cf = Ci \times 2^N$ (여기서, Ci 및 Cf는 각각 초기 및 최종 세포 농도임). 값은 3개의 독립적 실험의 평균 및 표준 편차 (S.D.)를 나타낸다.

2.2. 인플루엔자 수용체

감염 동안, 조류 바이러스 및 난-적응된 인간 바이러스 변이체는 Sia2-3Gal 연결에 주로 결합하는 반면, 인간으로부터 직접 단리된 임상 단리물은 Sia2-6Gal 연결에 우선적으로 결합한다 (Suzuki et al., 2011, Adv Exp Med Biol, 705:443-452).

상이한 세포 유형의 표면 상에서 2개의 유형의 인플루엔자 바이러스 수용체를 검출하기 위해, MAA 렉틴 (Sia2-3Gal 연결에 대해 특이적) 및 SNA 렉틴 (Sia2-6Gal 연결에 대해 특이적)을 사용하였다. 세포를 디코시게닌-표지된 렉틴 삼부쿠스 니그라 아글루티닌 (SNA) (Sia2-6Gal에 대해 특이적) 또는 마약키아 아무렌시스 아글루티닌

(MAA) (Sia2-3Gal에 대해 특이적)과 함께 실온에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 항-디곡시게닌-플루오레세인 Fab 단편과 함께 인큐베이션하고, 구아바 모세관 세포측정 시스템을 이용하여 형광 강도에 대해 분석하였다. 표 2에 제시된 값은 3개의 독립적 실험의 평균 및 표준 편차 (S.D.)를 나타낸다.

MAA 및 SNA는 배로 및 MDCK 세포의 표면에 강하게 결합하였고 (80% 초과)의 세포), 이것은 2개의 수용체 (Sia2-3Gal 및 Sia2-6Gal)가 MDCK 및 배로 세포 상에 발현되었음을 의미한다 (표 2). 또한, MAA는 73%의 CEP 세포에 결합한 반면, SNA는 단지 23%의 CEP 세포에 결합하였고, 이것은 많은 수의 CEP 세포가 Sia2-3Gal 수용체를 발현하지만 적은 수가 Sia2-6Gal을 발현하였음을 나타낸다. 조류 기원의 CEP 세포는 인간 수용체보다 훨씬 더 많은 조류 수용체를 발현한 이유를 설명할 수 있다. CHO-K1 세포는 Sia2-6Gal 수용체를 발현하지 않고, Sia2-3Gal 수용체를 단지 약하게 발현한다.

표 2

MDCK, CHO-K1, 배로 및 CEP 세포 상의 인플루엔자 바이러스 수용체를
디곡시게닌 클리칸 분화 키트를 사용하여 분석하였다.

| 세포 유형 | 렉틴 유형 | 렉틴에 의해 결합된 살아있는 세포의 백분율 (%) | S.D. |
|--------|-------|-----------------------------|------|
| MDCK | MAA | 93.3 | 3.0 |
| | SNA | 96.4 | 3.8 |
| CHO-K1 | MAA | 31.4 | 3.0 |
| | SNA | 0.0 | 0.0 |
| 배로 | MAA | 87.2 | 20.2 |
| | SNA | 83.3 | 11.1 |
| CEP | MAA | 63.3 | 7.4 |
| | SNA | 22.8 | 12.4 |

2.3. 바이러스 생산

인플루엔자 바이러스의 요막액을 사전 적응화를 실시하지 않은 상태로 시험할 세포주와 직접 접촉시켰다. 2개의 인플루엔자 재편성 바이러스 (A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116, 및 A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14) 및 1개의 인플루엔자 B 바이러스 (B/Brisbane/60/08 계통 B/Victoria/2/87)을 시험하였다. 다양한 MOI (10^{-1} , 10^{-2} 및 10^{-3}) 및 돼지 트립신 농도 (0, 1, 2, 5 및 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하였다. A형 인플루엔자 바이러스 감염 3일 후 및 B형 인플루엔자 바이러스 감염 4일 후에 10^{-1} 의 MOI 및 가장 적절한 트립신 농도를 사용하여 얻어진 결과를 각각의 세포 유형에 대해 제시한다 (표 3 및 4 참조).

표 3

인플루엔자 A 바이러스에 의한 MDCK, CHO-K1, 배로 및 CEP 세포의 감염.

| 세포 유형 | 트립신 농도 | A/New Caledonia/20/99 (H1N1) | A/Vietnam/1194/04 (H5N1) |
|--------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|
| MDCK | 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 6.4* | 3 |
| CHO-K1 | 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 7.4 | 3.1 |
| 배로 | 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 6.7 | 2.9 |
| CEP | 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 4.4 | 3.1 |

*: \log_{10} TCID₅₀/ml 로 표현

표 4

인플루엔자 B 바이러스에 의한 MDCK, CHO-K1 및 배로 세포의 감염.

| 세포 유형 | 바이러스 역가 (\log_{10} TCID ₅₀ /ml) |
|--------|---|
| | B/Brisbane/60/08 |
| MDCK | 5 |
| CHO-K1 | 4.3 |
| 배로 | 4.9 |

[0277]

[0278]

A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116 및 A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14 재편성 바이러스를 사전 적응화 필요 없이 시험된 4개의 세포 유형에서 성장시켰다. 또한, A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116 재편성 바이러스의 최상의 생산은 최고 바이러스 역가 ($>10^7$ TCID₅₀)를 생성한 CHO-K1 세포 상에서 관찰되었다.

A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14 재편성 바이러스의 생산은 모든 세포 유형에서 동일하였다 (대략 10^3 TCID₅₀/mL).

[0279]

감염성 B형 바이러스의 생산에 관하여, 표 4에 제시된 바와 같이, B/Brisbane/60/08 바이러스는 사전 적응화 필요 없이 3개의 세포주에서 잘 복제되었다.

[0280]

2.4. 역 유전학 방법에 의한 감염성 인플루엔자 바이러스의 구조를 통한 바이러스 생산

[0281]

2.4.1. 형질감염되는 세포주의 능력

[0282]

감염성 인플루엔자 바이러스를 생성할 수 있는 발현 벡터의 세트에 의한 형질감염 후에 바이러스를 생산하는 상이한 세포 유형의 능력을 시험하는 것이 또한 중요하다. 제1 단계에서, 형질감염되는, 특히 동물 기원의 원료의 사용을 수반하지 않는 물질을 사용하여 형질감염되는 상이한 세포 유형의 능력을 시험하는 것이 중요하다. 핵을 표적으로 하는 아막사 (아막사, 분자 테크놀로지)에 의해 제공되는 핵전공 기술을 세포의 형질감염을 위해 사용하였다. 초록 형광 단백질 (GFP) 발현 플라스미드를 형질감염되는 상이한 세포주의 능력을 평가하기 위해 사용하였다. 세포를 V 용액 내에 재현탁하고, pGFP 플라스미드와 함께 인큐베이션하고, 뉴클레오펙터를 사용하여 핵전공하였다. 상이한 프로그램 (U-023, A-024, V-001, T-030, L-005)을 시험하였다. 이어서, 세포를 1일 동안 37°C에서 인큐베이션하고, 초록 형광 세포의 비율을 구아바 세포측정기에 의해 분석하였다. GFP 발현 세포의 비율 및 표준 편차를 3으로부터 계산하였다. 최적 형질감염 프로그램을 사용한 독립적 실험을 표 5에 제시한다.

표 5

핵전공에 대한 MDCK, CHO-K1, 배로 및 CEP 세포 감수성.

| 세포 유형 | 핵전공 프로그램 | GFP를 발현하는 살아있는 세포의 % | S.D. |
|--------|----------|----------------------|------|
| MDCK | A-024 | 71.2 | 26.9 |
| CHO-K1 | U-023 | 74.4 | 15.1 |
| 배로 | V-001 | 70.9 | 3.4 |
| CEP | V-001 | 96.4 | 2.3 |

[0283]

[0284]

70% 초과인 세포가 GFP를 발현하였고, 이것은 시험된 모든 세포주가 핵전공에 의해 형질감염가능함을 의미한다.

[0285]

2.4.2. 인플루엔자 cDNA 클로닝 단계의 최적화

[0286]

효율적이기 위해서, 대체로 2개의 A형 바이러스 및 1개의 B형 바이러스로부터 유래된 항원성 물질을 함유하는 독감 백신은, 출현하여 계절성 독감 또는 대유행 독감의 원인이 되는 새로운 순환 바이러스에 따라 매년 업데이트되어야 한다. 중요하게는, HA 및 NA 항원성 물질은 새로운 순환 바이러스에 상응하도록 업데이트되어야 한다. 역 유전학을 수행하기 위해, HA 및 NA 코딩 유전자는 매년 또는 새로운 순환 바이러스가 특성화되었을 때 POL I 프로모터의 제어 하에 vRNA 발현 플라스미드 내에 클로닝되어야 한다. 내부 A/PR/8/34 vRNA를 코딩하는 다른 vRNA 플라스미드 및 단백질 발현 플라스미드는 대체로 1회만 구축된다. vRNA 발현 플라스미드 내의 클

로닝 단계는 역 유전학이 미지의 HA 및 NA 유전자에 대해 수행될 때 매우 복잡할 수 있기 때문에, A형 및 B형 바이러스로부터의 임의의 인플루엔자 절편의 재조합에 의한 클로닝을 위해 사용될 수 있는 보편적인 역 유전학 플라스미드가 개발되었다. 그러나, vRNA 전사체의 정밀한 개시 및 종결에 대한 엄격한 요건은 재조합 영역의 선택을 크게 제한한다. 따라서, POL 1 프로모터의 마지막 17개 뉴클레오타이드 및 간염 델타 리보자임의 처음 17개 뉴클레오타이드를 포함하는, 인플루엔자 게놈에 특이적이지 않은 새로운 재조합 카세트를 사용하였다. 또한, 원형 플라스미드를 선형화하기 위한 BbsI, 빈 플라스미드를 배제하기 위한 NotI 및 SbfI 부위를 포함하는 28개 뉴클레오타이드를 POL 1 프로모터와 간염 델타 리보자임 사이에 도입하였다. "보편적 pSP-flu"로 명명한 생성된 플라스미드는 비교적 작고 (2202pb), 카나마이신 내성 유전자를 함유하였다 (도 2). 클로닝을 위한 인플루엔자 cDNA를 제조하기 위해, vRNA를 재조합 말단을 함유하는 cDNA로 역전사시키고, POL 1 프로모터와 리보자임 사이에 클로닝하였다. 상기 개선된 RNA 생산 플라스미드를 사용하여, 인플루엔자 A 및 B 바이러스로부터의 몇몇 유전자를 상동성 재조합에 의해 클로닝하였다. 양성 클론의 비율은 "용이한" 클로닝에 대해 90% 초과이고 "힘든" 클로닝에 대해 30%이었고, 클로닝 실험당 평균 150개 클론을 사용하였다.

[0287] 이와 같이 개발된 보편적 pSP-flu 플라스미드는 용이하고 신속한 인플루엔자 게놈 클로닝을 위한 몇몇의 개선을 제시한다. 재조합 카세트는 A형 및 B형 바이러스로부터 모든 인플루엔자 RNA 단편을 클로닝하기 위해 사용될 수 있다. 두 번째로, 선형화된 벡터에 배정 콜로니를 생성하는 빈 플라스미드가 존재하지 않음을 보장하는 것이 어렵기 때문에, 보편적 pSP-flu 플라스미드는 클로닝 단계 후에 임의의 잔류하는 빈 플라스미드를 제거하기 위해 사용될 수 있는 3개의 효소 부위 (BbsI, SbfI 및 NotI)를 함유한다. 인식 부위 외부에 절단점을 함유하는 BbsI 효소를 사용한 선형화는 응집성 말단을 생성하고, 플라스미드의 재원형화를 가능하게 하였다.

[0288] 2.4.3. 인플루엔자 바이러스의 구조

[0289] 양호한 성장 특성을 기초로 한 CHO-K1 및 배로 세포주를 역 유전학에 의해 감염성 인플루엔자 바이러스를 구조하는 그의 능력에 대해 시험하였다.

[0290] 일반적으로 역 유전학에 의해 인플루엔자 바이러스를 구조하기 위해 사용되는 돼지 트립신을 집코의 고도로 정제된 동물 기원-무함유 효소 (TrypLETM 셀렉트)에 의해 교체하였다. 제1 실험에서, A/WSN/33 (H1N1) 바이러스로부터의 HA 및 NA vRNA 및 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터의 6개의 나머지 바이러스 유전자 (PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS)를 함유하는 재편성 바이러스의 구조는 배로 및/또는 CHO-K1 내로 12개의 플라스미드 (인간 POL II 프로모터의 제어 하에 PB1, PB2, NA 및 NP mRNA의 발현을 허용하는 4개의 플라스미드, 및 인간 POL I 프로모터의 제어 하에 8개의 vRNA의 발현을 허용하는 8개의 플라스미드)의 핵천공에 의해 수행하였다. 배로 또는 CHO-K1 세포 단독의 형질감염 후에는 바이러스 입자가 얻어지지 않았지만, 배로 세포를 CHO-K1 세포와 혼합할 때, 바이러스는 형질감염 2일 후에 즉시 세포 혼합물의 상청액에서 적혈구응집 검정에 의해 검출되었다.

[0291] 또한, 핵천공된 배로/CHO-K1의 혼합물에서 감염 징후를 가시화하는 것은 용이하였다. 실제로, 4일의 배양 후에, 플라스미드 없이 형질감염된 세포는 분명히 개별화된 반면, 12개의 플라스미드로 형질감염되고 상청액 내에 바이러스 입자를 흘리는 세포는 응집되었다. 상기 기술을 사용하여 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 내부 골격 (PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS)을 함유하고 상이한 인플루엔자 바이러스, 예컨대 A/WSN/33 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1), A/NC/20/99 (H1N1) IVR116, A/Solomon Island/03/06 (H1N1) IVR145, A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14, A/Brisbane/10/07 IVR-147 (H3N2), A/Uruguay/716/07 (H3N2) X175C 및 A/Wisconsin/67/05 (H3N2) X161b로부터의 HA 및 NA 단백질을 발현하는 다양한 인플루엔자 바이러스 재편성 바이러스가 매우 빠르게 구조되었다.

[0292] 얻어진 결과는 실험시마다 고도로 재현가능하였고, 대부분의 최적 역가는 형질감염 5일 후에 얻어졌다. 예를 들어, A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14로부터의 HA 및 NA를 함유하는 재편성 바이러스는 3개의 상이한 핵천공 프로그램 (U-023, U-027, F-014)을 사용한 배로/CHOK1의 혼합물의 형질감염 후에 128 HAU/50 μ l만큼 높은 역가로 세포 배양 상청액에서 생산되었다. 상기 언급된 A/H1N1 또는 A/H3N2 바이러스로부터의 HA 및 NA를 함유하는 다른 재편성 바이러스는 형질감염 5일 후에 유사한 역가 (256-512 HAU/50 μ l까지)에 도달하였다. 상응하는 TCID₅₀ 역가는 4 내지 7 log₁₀ TCID₅₀/ml로 상이하였다.

[0293] 인간 백신 생산을 위해 사용되기 적합한 2개의 세포주, 즉 배로 및 CHO-K1을 사용하는 개선된 역 유전학 시스템을 본 연구에서 설명한다. 바이러스 감염 연구에서 밝혀진 바와 같이, 몇몇의 A/H1N1 및 A/H5N1 바이러스 또는 재편성 바이러스는 배로/CHO-K1 세포의 혼합물을 사용하여 쉽게 회수되었다. 동일한 방식으로, A/H3N2 바이러스도 구조되었고, 이것은 상기 시스템이 임의의 대유행 및 계절성 바이러스의 재편성 바이러스의 생산을 위해 사용될 수 있음을 입증한다. 바이러스는 형질감염 2일 후에 바로 배로/CHO-K1 상청액으로부터 직접 회수하고 HAU 검정에 의해 적정할 수 있다. 바이러스가, 예를 들어 인간 또는 수의학용 백신 생산 체제에서 산업 규모에

서 생산될 때, 상청액은 CHO-K1 세포의 원액을 추가로 감염시키기 위한 시드로서 사용될 수 있다.

[0294] 또한, 실시예에서 제시되는 바와 같이, 베토와 CHO-K1의 혼합물을 사용한 역 유전학에 의한 감염성 인플루엔자 바이러스의 생성, 또는 감염성 바이러스 시드를 사용한 CHO-K1 세포의 직접 감염에 의한 바이러스의 생산은, 혈청 및/또는 동물 기원의 생물학적 물질의 사용을 필요로 하지 않는다. 따라서, 상기 생산된 감염성 인플루엔자 바이러스는 바이러스, 미코플라스마 및 프리온과 같은 우발적 물질에 의한 가능한 오염이 더이상 존재하지 않기 때문에 보다 안전하다. 또한, 형질감염 및/또는 감염 단계 동안 사용되는 배지 내의 혈청의 결여는 정제 공정을 용이하게 하고, 독감 백신 제조를 보다 쉽게 만든다. 본 발명자들의 지식에 따르면, 역 유전학에 의해 인플루엔자 바이러스를 구조하기 위한 완전한 동물-무함유 방법은 본원에서 처음으로 설명되는 것이다.

[0295] 3. 역 유전학에 의한 키메라 인플루엔자 바이러스의 생산

[0296] 3.1. HA 및 NA 키메라 유전자의 구축

[0297] 키메라 구축물을 먼저 소프트웨어 벡터 엔티아이 (Vector NTI)를 이용하여 인 실리코 (in silico)로 조립하였다. HA 키메라 유전자 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1)는 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터의 비코딩 영역 (NCR), 신호 펩티드 (SP), HA2 도메인, 막횡단 (TM) 도메인 및 Cyto 도메인 및 A/California/07/09 (H1N1) 바이러스로부터의 HA1 도메인을 함유한다.

[0298] NA 키메라 유전자 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1)는 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 비코딩 영역 (NCR), 막횡단 (TM) 도메인, Cyto 도메인 및 줄기 도메인, 및 A/California/07/09 (H1N1) 바이러스로부터의 엑토도메인을 함유한다.

[0299] 일단 상기 서열이 결정되면, 상응하는 HA 및 NA 키메라 유전자를 합성하고, 보편적 pSP-flu 플라스미드 내에 클로닝하였다.

[0300] 3.2. 역 유전학에 의한 키메라 인플루엔자 바이러스의 생산

[0301] 역 유전학에 의한 키메라 인플루엔자 바이러스의 생산은 상기 설명된 바와 같이, 즉 상기 언급된 바와 같이 핵 천공에 의해 CHO-K1/베토 세포의 혼합물 내로 도입된 바이러스 단백질 PB1, PB2, PA 및 NA의 발현을 위한 4개의 플라스미드, 및 vRNA PB1, PB2, PA, NP, NS, M, 키메라 HA 및 키메라 NA의 발현을 위한 8개의 플라스미드를 사용함으로써 수행하였다. 생산된 바이러스는 2개의 키메라 유전자를 함유하기 때문에 "2-키메라"이다. 이들은 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터의 PB2, PA, NP, NS 및 M 유전자, A/California/07/09 (H1N1) 바이러스로부터의 PB1 유전자, HA 키메라 유전자 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1) 및 NA 키메라 유전자 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1)를 함유한다. A/NC/20/99 (H1N1) 바이러스를 각각의 역 유전학 실험을 위한 양성 대조군으로서 사용하였다.

[0302] 제1 실험에서, 사용되는 트립신 농도를 결정하였다. 시험된 트립신 농도 (1 내지 6 USP/ml) 중에서, 3 및 4 USP/ml의 트립신 농도만이 키메라 인플루엔자 바이러스의 생산을 허용한다 (표 6). 후속 실험에서, 4 USP/ml의 농도는 헤마글루티닌 역가가 약간 더 높기 때문에 (32 HAU/50 μ l에 비해 64 HAU/50 μ l) 3 USP/ml보다 약간 더 양호한 것으로 밝혀졌다.

표 6

역 유전학에 의해 키메라 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1) 인플루엔자 바이러스를 얻기 위해 필요한 트립신 농도의 결정

| 역 유전학 실험 | | | HAU/50 μ l | | |
|----------|---|--------------|----------------|-----|-----|
| N° | 잠재적으로 생산된 바이러스 | 트립신 (USP/ml) | 핵천공 후 일수 | | |
| | | | D+5 | D+6 | D+7 |
| 1 | A/NC/20/99 (H1N1) 재편성 | 2 | 128 | 128 | 64 |
| 2 | 키메라 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1) | 1 | <1 | <1 | <1 |
| 3 | | 2 | <1 | <1 | <1 |
| 4 | | 3 | 2 | 16 | 32 |
| 5 | | 4 | 4 | 32 | 64 |
| 6 | | 5 | <1 | <1 | <1 |
| 7 | | 6 | <1 | <1 | <1 |

[0303]

[0304] 키메라 재편성 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1)의 생산은 재현가능하였다. 키메라 바이러스는 핵천공 후 제5일로부터 세포 배양 상정액에서 검출가능하였고, 핵천공 후 제8일 또는 제9일에 최적으로 생산되었다.

[0305] 키메라 HA 유전자 또는 키메라 NA 유전자를 함유하는 "1-키메라" 바이러스가 또한 키메라 HA A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1) 유전자 및 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터의 NA 유전자 또는 키메라 NA A/캘리포니아 07/09-A/PR/8/34 (H1N1) 유전자 및 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스로부터의 HA 유전자를 사용하여 역 유전학에 의해 성공적으로 생산되었다.

[0306] 3.3. 키메라 바이러스에 의해 생산된 HA 단백질 항원성의 평가

[0307] HA 키메라 유전자의 사용이 키메라 바이러스에 의해 발현된 HA 단백질의 항원성을 변경하지 않음을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 시험 바이러스로서 재편성 A/California/07/09 (H1N1) 바이러스 또는 3.2에서 얻은 "2-키메라" 바이러스를 사용하여 1.10에서 설명된 억제 적혈구응집 검정에서 얻은 역가를 비교하였다. 억제 적혈구응집 검정에서 역가가 높을수록, 항체에 의한 HA 항원의 인식이 더 강하였다. 시험된 2개의 바이러스를 사용하여 얻은 IHA 역가는 10240보다 더 높았고, 이것은 2-키메라 바이러스에 의해 발현된 HA 단백질의 항원성이 잘 보존되고, A/California/07/09 (H1N1) 재편성 바이러스의 것과 매우 유사함 또는 동일함을 의미한다.

[0308] 4. 세포의 2개의 혼합물, 즉 베로/CEF 및 베로/CHO-K1 세포에서 재편성 인플루엔자 바이러스의 생산의 비교

[0309] 1백만 개의 베로 세포를 실온에서 용액 V (론자) 내에 재현탁하였다. A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS의 vRNA를 발현하는 1 μ g의 각각의 6개의 vRNA 발현 플라스미드, A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 바이러스의 NA 및 HA의 vRNA를 발현하는 1 μ g의 각각의 2개의 vRNA 발현 플라스미드, 및 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 PB1, PB2, PA, NP의 mRNA를 발현하는 0.5 μ g의 각각의 4개의 단백질 발현 플라스미드의 혼합물을 세포에 첨가하고, V-001 프로그램을 이용하여 뉴클레오펙터 (론자)를 사용하여 핵감염을 수행하였다. 세포를 1.5 ml의 DMEM-F12[®] 배지 (김코[®])에서 6웰 플레이트 내에서 인큐베이션하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 2 h 인큐베이션한 후, 1백만 개의 CEF (닭 배아 섬유모세포) 세포를 돼지 트립신 (시그마)을 보충한 동일한 배지 내에 첨가하고, 회전 플랫폼 상에서 35 $^{\circ}$ C, 8% CO₂에서 인큐베이션하였다. 규칙적인 간격으로, 적혈구응집 검정으로 바이러스 역가를 평가하기 위해 100 μ l의 배양 상정액을 수집하였다. 적혈구응집 검정의 결과를 아래 표 7에 제시한다.

[0310] 5십만 개의 베로 및 5십만 개의 CHO-K1 세포를 혼합하고, 실온에서 용액 V (론자) 내에 재현탁하였다. A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS의 vRNA를 발현하는 1 μ g의 각각의 6개의 vRNA 발현 플라스미드, A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 바이러스의 NA 및 HA의 vRNA를 발현하는 1 μ g의 각각의 2개의 vRNA 발현 플라스미드, 및 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 PB1, PB2, PA, NP의 mRNA를 발현하는 0.5 μ g의 각각의 4개의 단백질 발현 플라스미드의 혼합물을 세포에 첨가하고, U-023 프로그램을 이용하여 뉴클레오펙터 (론자)를 사용하여 핵감염을 수행하였다. 세포를 4 mM L-글루타민 (김코[®])으로 보충한 엑스-셀[™] CD CHO 융합 배지 (시그마-알드리치) 내에서 6웰 플레이트 내에서 인큐베이션하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 3 h 인큐베이션한 후, 1백만 개의 CHOK1 세포를 돼지 트립신 (시그마)을 보충한 동일한 배지 내에 첨가하고, 회전 플랫폼 상에서 35 $^{\circ}$ C, 8% CO₂에서 인큐베이션하였다 (이때 트립신의 최종 농도는 2 μ g/ml임). 규칙적인 간격으로, 적혈구응집 검정으로 바이러스 역가를 평가하기 위해 100 μ l의 배양 상정액을 수집하였다. 적혈구응집 검정의 결과를 아래 표 7에 제시한다.

표 7

배양 상정액의 바이러스 역가 (UHA/50 μ l).

| | D4 | D5 | D6 | D7 | D12 |
|--------|----|-----|----|----|-----|
| 베로/CEF | <1 | <1 | 4 | 32 | 128 |
| 베로/CHO | 32 | 512 | 64 | NT | NT |

[0311] D: 형질감염 후 일수. NT: 시험되지 않음.

[0312] 결과는 베로/CHO-K1 세포 시스템이 단지 형질감염 4일 후에 재편성 인플루엔자 바이러스의 생산을 허용하는 반면, 베로/CEF 시스템을 이용하여 동일한 양의 재편성 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위해 적어도 7일이 필요함을 보여준다. 베로/CHO-K1 세포 시스템은 또한 다량의 재편성 바이러스 (512 UHA/50 μ l)의 생산을 허용한다.

따라서, 결과는 베로/CHO-K1 세포 시스템이 재편성 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위해 베로/CEF 세포 시스템보다 더 효율적임을 입증한다.

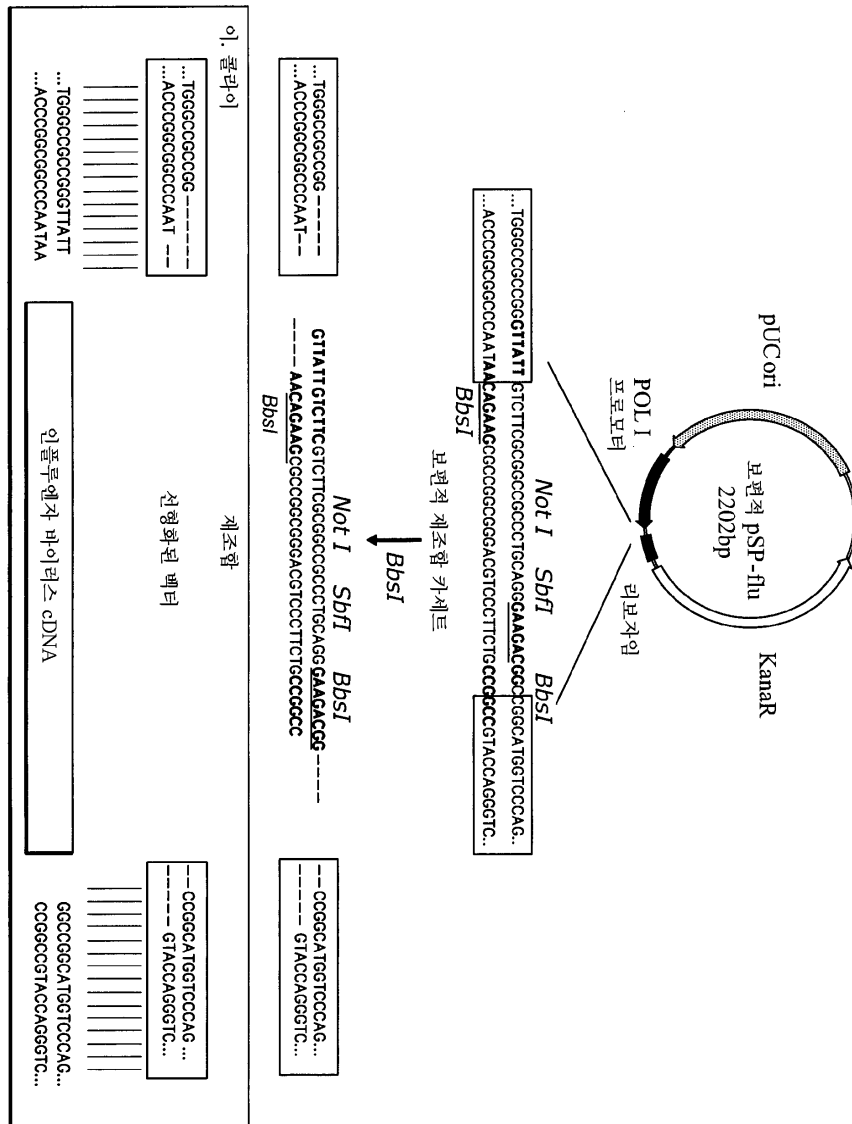
도면

도면1

일

| | | |
|---|---------------------------------|-------------------|
| 1 | RNA 추출 및 RT-PCR | pSP-flu 내에 클로닝 |
| 2 | 콜로니의 배양 | |
| 3 | 콜로니의 스크리닝 | 플라스미드 서열분석 |
| 4 | 서열 분석 | 플라스미드 정제 |
| 5 | CHOK1 또는 베로/CHOK1을 사용한 역 유전자 | |
| 7 | 바이러스 회수 | |

도면2



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> SANOFI PASTEUR
- <120> Production of infectious influenza viruses
- <130> BET 13P2019
- <150> EP12305968.5
- <151> 2012-08-03
- <160> 29
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vector

<400> 1

| | |
|--|-----|
| cgggccggcc cctgcgtgtg gcacgggcgg ccgggagggc gtccccggcc cggcgtgct | 60 |
| cccgcgtgtg tcctgggggtt gaccagaggg ccccgggcgc tccgtgtgtg gctgcgatgg | 120 |
| tggcggtttt ggggacaggt gtccgtgtcg cgcgtgcct gggccggcgg cgtggtcggt | 180 |
| | |
| gacgcgacct cccggccccg ggggaggtat atctttcgt ccgagtcggc attttgggcc | 240 |
| gccgggttat tgtcttcgcg gccgccctgc agggaagacg gccggcatgg tcccagcctc | 300 |
| ctcgttgcg cggcgtgggc aacattccga ggggaccgtc ccctcggtaa tggcgaatgg | 360 |
| gac | 363 |

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombination cassette

<400> 2

| | |
|--------------------------------|----|
| gtcttcgcgg ccgccctgca gggaagac | 28 |
|--------------------------------|----|

<210> 3

<211>

> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hepatitis delta ribozyme terminator sequence

<400> 3

| | |
|--|----|
| ggccggcatg gtcccagcct cctcgtggc gccggctggg caacattccg aggggaccgt | 60 |
| cccctcggtat atggcgaatg ggac | 84 |

<210> 4

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7 polymerase terminator sequence

<400> 4

ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttt 47

<210> 5

<211> 223

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Rodent RNA poll promoter

<400> 5

ctcttgggtcc tatcacggtt atgaggctga ccagttgttg ctttgatgtt cggttctctc 60

gttgattggg acaatatttg gggcacttcg ccggtcccgga cttccagaat ttccgtgtgg 120

tctgtgaatt tatcacgct acactgtcat cataatccag ttttgcaatc tgctctcttt 180

gtacctgcag ataggctactg acacgcttgt cttgtgagtg ggt 223

<210> 6

<211> 770

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rodent RNA poll promoter

<400> 6

gtcgaccaga agccttttaa aagtccttca cgtcccgtaa ctgtaactaa ccctcggtcc 60

ccggcgggtgg tctcggcgac ccgaggccga gaggaagcgc tgttcccggga ttcactagcg 120

ggccggggacc cgggattctc tgggtgcctc ggaacatttt atcttgtgtg cgtgcggtag 180

ccaccctcgg tcgatccccg gcggtgggtc cggcgaccg aggccgagag gaagcgctgt 240

tcccggattc actagcgggc cggggcccgg gattctctgg gtgcctcgga acttttcctt 300

ctgcggaagc cctcggtccc cagcggctgt ctcggcgtct cgaagccgag aggaggcgct 360

gtttccggcc tactgcctg ctagttcccg gttccttgta gggtcagact tttgttttc 420

ttcgacgtgt cctcccatcc cgggctctg cctccgggtc cttgcccgag aggatgccgg 480

tgtgtgccga tcttttctgc atgtctacct cgctcttggc cctatcacgg ttatgaggtc 540

gaccagtgtg tgctttgatg ttccggtctc tcgttgattg ggacaatatt tggggcactt 600

cgccgggtccc gacttcaga atttccgtgt ggtctgtgaa tttatcacg ctacactgtc 660

atcatattcc agttttgcaa tctgctctct ttgtacctgc agataggtac tgacacgctt 720

gtcttgtgag tgggtgacat tagtaaagga ctgctctcgg gctttttctg 770

<210> 7

<211> 268

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rodent RNA pol1 promoter
 <400> 7
 gtcgaccagt tgttcctttg aggtccggtt cttttcgta tggggtcatt tttgggccac 60

 ctccccaggt atgacttcca ggtattctct gtggcctgtc actttcctcc ctgtctcttt 120
 tatgcttggtg atcttttcta tctgttccta ttggacctgg agataggtac tgacacgtg 180
 tcctttccct attaacacta aaggacacta taaagagacc ctttcgattt aaggctgttt 240
 tgcttggtcca gcctattctt tttactgg 268
 <210> 8
 <211> 251
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human RNA pol1 promoter
 <400> 8
 cgggccggcc cctgcgtgtg gcacgggcgg ccgggagggc gtccccggcc cggcgctgct 60
 cccgcgtgtg tcctgggggtt gaccagaggg ccccgggcgc tccgtgtgtg gctgcgatgg 120

 tggcgttttt ggggacaggt gtccgtgtcg cgcgtgcct gggccggcgg cgtggtcggt 180
 gacgcgacct cccggccccg ggggaggtat atctttcgt ccgagtcggc attttgggcc 240
 gccgggttat t 251
 <210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7 RNA polymerase promoter
 <400> 9
 tattgtaata cgactcacta taggtctt 29
 <210> 10
 <211> 2202
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Universal pSP-flu plasmid

<400> 10

| | |
|---|------|
| gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgtcgggcc ggcccctgcg tgtggcacgg | 60 |
| gcggccggga gggcgcccc ggcccggcgc tgctcccgcg tgtgtcctgg ggttgaccag | 120 |
| agggccccgg gcgtccgtg tgtggctgcg atggaggcgt ttttggggac aggtgtccgt | 180 |
| gtcgcgcgtc gcctgggccc gcggcgtggt cggtgacgcg acctccggc cccgggggag | 240 |
| gtatatcttt cgctccgagt cggcattttg ggccggcggg ttattgtctt cgcggccgcc | 300 |
| ctgcagggaa gacggccggc atgggtccag cctcctcgt ggccggcgt gggcaacatt | 360 |
| ccgaggggac cgtcccctcg gtaatggcga atgggactga tcaagagaca ggatgaggat | 420 |
| | |
| cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga | 480 |
| ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc | 540 |
| ggctgtcagc gcaggggcgc cgggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga | 600 |
| atgaactgca agacaggca gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg | 660 |
| cagctgtgct cgactgttc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc | 720 |
| cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg | 780 |
| atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggtacctg cccattcgac caccaagcga | 840 |
| | |
| aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc | 900 |
| tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca | 960 |
| tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg | 1020 |
| tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct | 1080 |
| atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg | 1140 |
| accgttctct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc | 1200 |
| gccttcttga cgagtcttc tgaattatta acgcttaca tttcctgatg cggatatttc | 1260 |
| | |
| tccttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcatacaggt ggcacttttc ggggaaatgt | 1320 |
| gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag | 1380 |
| acaataaccc tgataaatgc ttcaataata gcacgtgcta aaacttcatt tttaatftaa | 1440 |
| aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt | 1500 |
| ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt | 1560 |
| ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag cggtggtttg | 1620 |
| tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca | 1680 |
| | |
| gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc caccatttca agaactctgt | 1740 |
| agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggtgctg ccagtggcga | 1800 |

| | |
|--|------|
| taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccgataagg cgcagcggtc | 1860 |
| gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact | 1920 |
| gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga | 1980 |
| caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg | 2040 |
| aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt | 2100 |
| | |
| tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt | 2160 |
| acggttcctg ggcttttctg ggccttttgc tcacatgttc tt | 2202 |
| <210> 11 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Reverse primer | |
| <400> 11 | |
| ctgggaccat gccggcc | 17 |
| <210> 12 | |
| <211> 17 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Forward primer | |
| <400> 12 | |
| tgggccgccc gggtatt | 17 |
| | |
| <210> 13 | |
| <211> 2233 | |
| <212> DNA | |
| <213> Influenza A virus | |
| <400> 13 | |
| agtagaaaca aggtactttt ttggacagta tggatagcaa atagtagcac tgccacaact | 60 |
| aactcaatgc atgtgtaagg aaggagtga accaagaagc attaagcaa acccagggat | 120 |
| cattaatcag gcactcctca attgcttcat atagcccccc aagatcaaag gtcccagggt | 180 |
| ctaggttgtc cctaagagcc tgaacgataa gaagcagttt tcttgattca gctgaaaatc | 240 |
| cttctagtgt tggagatgca tacaagctgt tgaataccga ctttgctaat aaagtctctgc | 300 |
| agaccttccc aatggaactt tctcctaact ctttggggga ctctccaatg ggccatgttt | 360 |

| | |
|--|------|
| ctgatttgtt ctcaaagaac tctttgttca tgtctttctc tttgacagag gactcagctt | 420 |
| caatcatact ctcaatttgt tgaagtgact ggaggaggca acgcctcatc tccattcccc | 480 |
| atttcatttt aatttttgag gttccatttg ttctcacata caagaacatg ggctttgaaa | 540 |
| cctggcctat ggcacttctt ataagcatat ctctatctc aagaacacag tacttctccc | 600 |
| atttatgtgg ttcaagtctt gggtcagtga gagaaaactc catgctcaca aagtttacca | 660 |
| cgtcggtgtc attccttaag tgggatcttc cttttatgat gaaaccatac aagttggtct | 720 |
| ttcgcttcc ctcttagtt ctacacttgc ttatcattgg aattaattgg aaatcatcca | 780 |
| ttgtgcaca agatgcatta agcaaggcag tattgatgta cacccttctc attatgtatt | 840 |
| ctgtggctct gcagttagac acctctgatg tgaaataatt ctttctcatg cttgcaatgt | 900 |
| gttcaattgg agccacatct tctccaatct catcgagctc tatccagctt gaatctgtca | 960 |
| gttcgcatgc cttgttaaac tcattctgaa tccaacttgc aagcgacctc aattctggtt | 1020 |
| catcactatc atattgcttc aaatcaccta catctttaca gtcgtcaaag tctacctttt | 1080 |
| ctggtgccat gttctcacca agtgcccact ttagctgact tgttttcttc atatttttag | 1140 |
| tctttggaat ttctctca ttctcaatgt cctgcagttc tgccagtact tgcttccatg | 1200 |
| acagaagata atttggattt attccctttt cgtgtggttt aacaacattg ggttccttcc | 1260 |
| atccaaagaa tgttctcatg catttgattg catcatatag cggatttccc tctccttcat | 1320 |
| gacttgggtc ctcaatgctt aattttaagg catccatcag caggaatttg gaccgctgag | 1380 |
| aacagggagg cccttcgga agtctaagt gtcgtggtgt tgttttcaa aaaggttcaa | 1440 |
| ttctagcatt tacttctttg gacatttgag acagcttgcc ctcaatgtag ccgttcggtt | 1500 |
| cgaatccatc cacataggct ctaaaatttt caaggctgga gaagtccggc gggagacttt | 1560 |
| ggtcggcaag cttgcgcatt gttcctgtga ttcaaacct ttcttcaatt gtctcttctc | 1620 |
| ctctctcgga ctgacgaaag gaatcccaga ggctctgct ggccatttct tgtcttatgg | 1680 |
| tgaatagtct ggttttgatc ctagccctgc tttcttcac gagagtgtag tctgccttg | 1740 |
| tggccatttc ttccccagt aacgagaaaa tgtggatgtg tgttttctca gatttaattt | 1800 |
| tattggcctt ttccagatag tataatgtgaa ctctctctct tgttactcca atttcgatga | 1860 |
| atctattctc cttgtaatca tacaatctg gtagaaactt tggtttctca gcccctgtag | 1920 |
| tgttgcaaat actgtttact actgtccagg ccattgtgcg atctcttccc tcgattattt | 1980 |
| caaatctgtg cttcaaaagt gcatttggat caccaagttc tacgattatt gactcgctt | 2040 |
| gctcattgat gaagtgaata tctgaatata tgaagcatat ttccaagtga gtgcatattg | 2100 |
| ctgcaattt gttgttttcg attttcaggt cctccccata ctctttcatt gttttttccg | 2160 |
| caagctcgac aatcatcgga ttgaagcatt gtcgcacaaa atcttccatt ttggatcagt | 2220 |

| | |
|--|------|
| acctgctttc gct | 2233 |
| <210> 14 | |
| <211> 2341 | |
| <212> DNA | |
| <213> Influenza A virus | |
| <400> 14 | |
| agtagaaaca aggcattttt tcatgaagga caagctaaat tcaactatttt tgccgtctga | 60 |
| gctcttcaat ggtggaacag atcttcatga tctcagtga ctcttctttc tttatccttc | 120 |
| cagattcgaa atcaatccgt gcatcaattc gggtcttga aaccatagcc tccaccatac | 180 |
| tggatatccc gactgggtctt ctgtatgaac tgctggggaa gaatttttca aataaattgc | 240 |
| agcacctttg gtacatttgt tcatcctcaa gtactcctct ttgacttgta ttcaagatgg | 300 |
| atcgatttct tttggggatc caggagtgtg ttgttgcaac agcatcatac tccatgtttt | 360 |
| tggtctggacc atgtgctggc atcatcactg cattgttcat tgattcaatt tctttatggc | 420 |
| tgacaaatgg gttcagtggg ttgcataaac gcccttgta atcctcatcc atcaattccc | 480 |
| attttaggca gacttcagga atgtggagat ttctaagtgt gtataaattt gggcctccgt | 540 |
| cggagaccag cagtcagct ttggaacggg tttgtccca cagtttcttt atttcaaagt | 600 |
| atcttcgggt ttgtatttgt gtgtcacctc tatggcatcg gtacgtgtac ctgtaattctt | 660 |
| tgtatgaaca ctgaaggccc atttgagctg ttgctggacc aagatcattg tttatcatat | 720 |
| tgtttttgat gacagtaact ccaatactca tgtccgctga ctctgtgac ccagacaccc | 780 |
| caaaactggg aagctccatg ctgaaattgg caacaaaccc ataacgatag aaaaaacttg | 840 |
| tgaattcaaa tgtacctgtt ctgtttatgt aagacttttt cttgctcata ttgattccaa | 900 |
| gtagcttaca gggtcgataa aacctgtcga ctccggcttg aatcccttca tgattgggtg | 960 |
| cattcacaat cagagcaaaa tcgtcagagg attgaagacc atcccaccag taagtagtct | 1020 |
| tgggttatct cttttgtcca agattcagga tggagacgcc taatacagtg cttacatat | 1080 |
| tgaacatgcc catcatcatt ccagggtcga atgatgcagt cccctctatt aagagcggtc | 1140 |
| ggattttttc aatcttcttt cttgttgaat cattgaaata tttcaaactg atgcttgcta | 1200 |
| gcattttctg aggtatttga gttctaagtt tcatactctt gctctcaaac atataccctt | 1260 |
| ttccagctct cgccattttg ttgagaaca ttattggagc aatacttaga acattttctga | 1320 |
| accattcggg ctgattttctg gtcatatatg tgatcatggc caaaaacatc cgaggattct | 1380 |
| gattttcgtt ccatttgggt ttatctccag tgatgggtgaa agaaagttcg gtgtcctgag | 1440 |
| aattgggtcat catcttctt acaacatttg ccaactttgc tttcttctca ttgcctccaa | 1500 |

| | |
|--|------|
| ctggcaaccc tgattgttca agttttctac atatactcct tgccagtgtc tcaacaaagt | 1560 |
| atacaaaccc ccttatttgc atccctgggg ttgcaattgc tctccgtttt agcttccttc | 1620 |
| tctcagcatc ttgggtcatt gtgttcaggg tcaatgctct aattagataa ctctttttgt | 1680 |
| tcaatctctg cttcttttta cccattgttc tctgtgttat ctttttctta gtcattattgt | 1740 |
| ctctcacccg tctctttctc tgaaaatgag ttgtgatccc catttcttct ttgttcattg | 1800 |
| actccattac atccttaagg aagtctatga gccttcaga ctcatggcc gtgaggccat | 1860 |
| ttgatctgaa cacttctatt gtgttgcca atgctgttgc agcaggttgg tttctattta | 1920 |
| gagtcagtc ataggtctgt cggccttgtg tcagcttgtc tactcgtgtt tgcgaacaa | 1980 |
| cctccatcgt ttcaatacac gagttttcaa aaataccagg atgggattcc tcaaggaaag | 2040 |
| ccatgcctc caatacaca tctgtttggg cataaccact tggttcattg tcttctggca | 2100 |
| gtggcccatc aatcgggttg agttgcgtg ctccagtttc ggtgtttgtt gtccatcttc | 2160 |
| ccttttctga gtactgatgt gtcctgttga cagtatccat ggtgtatcct gttcctgtcc | 2220 |
| catggctgta aggagggtct ccagtataag ggaaagtgt gcttatagca ttttgtctg | 2280 |
| gcacttttaa gaaaagtaag gtcggattga catccattca aatggtttgc ctgctttcgc | 2340 |
| t | 2341 |
| <210> 15 | |
| <211> 2341 | |
| <212> DNA | |
| <213> Influenza A virus | |
| <400> 15 | |
| agtagaaaca aggtcgtttt taaactattc gacactaatt gatggccatc cgaattcttt | 60 |
| tggtcgtctg ctggctgtca gtaagtatgc tagagtcccg tttccgtttc attaccaaca | 120 |
| ccagctctcc ttgcccaatt agcacattag cttctctccc tttcgcaagg ttgctcagtt | 180 |
| cattgatgct tagtgctggc ccatatctct tgtcttcttt gcccagaatg aggaatcccc | 240 |
| tcagaacagc ggactccact ccagctgtgc cttcatctgg gtcttcagtt aaagtgccag | 300 |
| catcctttcc gagaactgtg agtctcttcg tggccttgtt atagttagaat acaggagaat | 360 |
| tgccctttac aagtattctc attcctgac ccctcacatt cacagtaaat gaggagaact | 420 |
| gcattctact ttgcttttgt ggagcggctg cgaagggag aagttttatt atctgtcgg | 480 |
| tatcaaatgt cccaagcaca tccctcattt gttggaacag agttcttaca aaccactgt | 540 |
| attggcctct aatggcctta ggtactaaag actgaaatgg ttcaaattcc atttattgt | 600 |
| atagcattgt agggttctgg gaccactgaa ttttaacagt ttcccagttt ctgatgatcc | 660 |

attgataggt attgaccaac actgattcag gaccattaat ctcccacatc attgacgatg 720
 agtaagttaa tgtcagtttc tctgttccct gtgtttcact gacctcctcg ggagacagta 780
 gtacatttcc tcgttgggtc cggatttcca aaaaacggtc aatgtccacc actaccctct 840
 ccgtgctgga gtactcatct acacccattt tgctgattct cactcctctc attgacatct 900
 cgatgcttgg agtcatgtcg ggcaatatcc caatcattcc catcacattg tcgataggtt 960
 caactcccca attttgaata agcactttcg catccttctg aaaatgtctt aaaagttgat 1020

gcataggatt caatcgtga ttcgccctat tgacgaaatt cagatcacct ctgactgctt 1080
 ttatcataca atcctcttgt gaaaatacca tggccacaat tattgtctcg gcaatcgact 1140
 gttcgtctct cccactcact atcagctgaa tcaatctcct ggttgccttt ctgagtatgg 1200
 ctgttgcctt tctcccaacc attgtgaact cttcataatc ctcatgcact cttatcttca 1260
 atgtttgaag attgcccgtg agcacctctt cctctctctt gactgatgat ccgcttgttc 1320
 tcttaaatgt gaatccacca aaactgaagg atgagctaata tctcagtcct attgcagcct 1380
 tgcataatc cagggttgc tcttctgttg ggttctgcct aaggatgtct accatcctaa 1440

ttccaccaat ctgtgtgtcg tggcacatct ccaataaaga tgctagtga tctgctgata 1500
 ctgcagctct tctcactatg ttcttagcag caataatcaa gctttggta acatcatcat 1560
 tctcacttc cctcctgga gtatacatct gtccagca tgttccttga gtcaaatgca 1620
 acacttcaat gtacacactg cttgttccac cagccactgg gaggaatctc gttttgcgga 1680
 ccagttctct ctccaacatg tatgcaacca tcaaaggaga aattttgcaa tcttgagatt 1740
 cttctttctt ctctttggtt atcgttagt gcgattccga tgttagtata ctggtccca 1800
 cttcgttagg gaaaacaact tccatgatta catcctgtgc ctcttggca ctgagatctg 1860

catgaccagg atttatgtca actctccgac gtattttgac ttggtttcta aaatggacag 1920
 ggccaaagggt tccatgcttt agcctttcga ctctttcaaa ataagttttg tagatttttg 1980
 gataatgaac tgtattttgt attggtccat tcctattcca ccatgtcaca gccagagggtg 2040
 ataccatcac tcggtctgat ccggcatcat tcattttact ccataaagtt tgccttgct 2100
 catttctctc aggaatcatt tccgttatcc tcttgtctgc tgtaattgga tatttcattg 2160
 ccatcatcca ttcatccta agtgcctgggt tcttctctg tcttctgat gtgtactct 2220
 tgattatggc catatgggtc acggtggttt ttgtgagtat ctgcgggtg cgagactgcg 2280

acattagatt tcttagttct tttattcttt ccatattgaa tataattgac ctgctttcgc 2340
 t 2341

<210> 16

<211> 1565

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 16

| | |
|---|------|
| agtagaaaca agggatattt tctttaattg tctactcct ctgcattgtc tccgaagaaa | 60 |
| taagatcctt cattactcat gtcaaaggaa ggacacgatc ggctcgctgc ctttcgtcc | 120 |
| gagagctcga agactccccg cccctggaaa gacacatctt ctggctcttc actttccatc | 180 |
| atccttatga tttcggctct catgtcagat gttctccct ctgtattccc attgaatgct | 240 |
| | |
| gccataatgg ttgttctgtc aaaagggaga tttctctgta ctgagaacgt aggttgtatg | 300 |
| ctgatttggc ccgcagatgc cctctgttga ttggtgttct ctcacttctt ggctcctatg | 360 |
| gcccagtacc tgcttctcag ttcaagtgtt cttgattcca tagtctccat attttcattg | 420 |
| gaagcaattt gaactcctct agtggaaagc ttccctcttg ggagcacctt cgtccctttg | 480 |
| atgaagctta atactcttag atcttcaaat gcggcagaat ggcatgcat ccacaccagt | 540 |
| tgactcttgt gtgtcggatt ctcatcttgt ctgattaggc tgtacacttg gctgttttga | 600 |
| agcagtctga aagggtctat tccgactaga gagtatccct ctctttcaaa gtcgtaccca | 660 |
| | |
| ctggctacgg caggtccata cacacaggca ggacggcagg acttgtgagc aaccgacct | 720 |
| ctcaatatga gtgcagaccg tgctagaaaa gtgagatctt cgaactcagc attccctggg | 780 |
| ttccggctct ctctcacttg atccatcatt gctttttgtg cagcagtttg aaatttcct | 840 |
| ttgagaatgt tgcacattct ttcataagca attcttgtt ttctgtccatt ctacccctc | 900 |
| cagaagtcc gatcattgat cccacgtttg atcatcctga ccaattccat caccattgtt | 960 |
| ccaactcctt tgactgcagc acctgcggct ccagacctcc tagggagagt tgaaccttgc | 1020 |
| atcagagagc acatcctggg atccattccg gtgcgaacaa gagctcttgt cctctgataa | 1080 |
| | |
| gttgcacat tcaaattgga atgccagatc atcatgtgag tcagaccagc cgttgcacg | 1140 |
| tcaccattat tagcttggcg ccagattcgc cttatttctt cttgtcata aaggatgagt | 1200 |
| tctctcatcc actttccgtt tactctctg tatataggc ctccagtttt cttaggatct | 1260 |
| ttccccgcac tgggatgttc ttccaggtat ttatttctcc ttctgtcaaa agcagagagc | 1320 |
| accattctct ctattgttaa gctgttttgg atcaaccgtc cctcataatc actgagtttg | 1380 |
| agtccgttgc acatttggat gtagaatcgt ccaattccac caatcatttt tccgacggat | 1440 |
| gctctgattt cagtggcatt ctggcgttct ccatcagctt ccatctgttc gtaagaccgt | 1500 |
| | |
| ttggtgcctt gggacgcat gattttgatg tcaactcagt agtgattatc taccctgctt | 1560 |
| ttgct | 1565 |

<210> 17

<211> 1027

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 17

| | |
|--|------|
| agtagaaaca aggtagtttt ttactccagc tctatgctgg caaatgacc atcgtcagca | 60 |
| tccacagcac tctgctgttc ctttcgatat tcttcctca tagactttgg cacccttcc | 120 |
| gtagaaggcc ctcctttcag tccgtattta aagcgacggt aaatgcattt gaaaaaaga | 180 |
| cgatcaagaa tccacaatgt caagtgaag atcccaatga tatttgcggc aatagtgaga | 240 |
| ggatcacttg aaccgttgca tctgcacccc cattcgtttc tgataggcct gcaaattttc | 300 |
| aagaagatca tttttcagac cagcactgga gctaggatga gtcccaatgg ttctcatcgc | 360 |
| ttgcaccatt tgtctagcct gactagcaac ctccatggcc tctgctgctt gctcactcga | 420 |
| tccagccatt tgcctcatag ccttagctgt agtgctggct aaaaccattc tgttctcatc | 480 |
| tctgattagt ggattgggtg ttgtcaccat ttgcctatga gaccgatgct gggagtcagc | 540 |
| aatctgttca caggttgcac ataccaggcc aaatgccact tcagtggtea cagcccccat | 600 |
| cctgttgtat atgaggccca tacaactggc aagtgcacca gcagaataac tgagtgagat | 660 |
| ttctttggcc ccatggaatg ttatctccct cttgagcttc ctatacagtt taactgcttt | 720 |
| gtccatgtta tttggatccc cgttccattt aagggcattt tggacaaagc gtctacgctg | 780 |
| cagtcctcgc tcaactggca cggtagcgt gaacacaaat cctaaaatcc ccttagtcag | 840 |
| aggtgacagg attggctctg tctttagcca ttccatgaga acctcaagat cgggtgttctt | 900 |
| ccctgcaaag acatcttcaa gtctctgtgc gatctcggct ttgagggggc ctgacgggat | 960 |
| gatagagagt acgtacgttt cgacctcggc tagaagactc atctttcaat atctacctgc | 1020 |
| tttcgct | 1027 |

<210> 18

<211> 890

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 18

| | |
|---|-----|
| agtagaaaca aggtgttttt ttattactaa ataagctgaa acgagaaagt tcttatctct | 60 |
| tgctccactt caagcaatag atgtaaggct tgcataaatg ttatttgctc aaaactattc | 120 |
| tctgttatct tcagttgtg tctcattct tcaatcaacc atcttatttc ttcaaacttc | 180 |
| tgacctaat gttcccgcca tttctcgttt ctgttttga gtgagtggag gtctccatt | 240 |
| ctcattactg cttctccaag cgaatctctg tagagtttca gagactcgaa ctgtgttata | 300 |

attccattca agtcctccga tgaggactcc aactgcattt ttgacatcct cagcagtatg 360

tcctggaaga gaaggcaatg gtgaaatttc gccacaatt gctccctctt cggtgaaagc 420

ccttagcaat attagagtct ccagccggtc aaaaatcaca ctgaagtctg ctttcagtat 480

gatgttctta tccatgatcg cctgggtccat tctgatacaa agagggcctg ccactttctg 540

cttgggtatg agcatggacc agtccttga catttcctca agagtcatgt cagttaggta 600

acgcgacgca ggtacagagg ccatgggtcat ttttaagtcc tcacggatt cttctttcag 660

aatccgctcc actatctgct ttccagcacg tgtggctgtc tcgatgtcca gaccgagagt 720

gctgccccctt cctcttaggg atttctgac tcggcgaagc cgatcaagga atggggcatc 780

acctagtctt tggctgcaa ctcgtttgcg gacatgcaa agaaagcaat ctacctgaaa 840

gcttgacaca gtgtttggat ccattatgtt tttgtcaccc tgcttttgct 890

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NCR domain of HA

<400> 19

agtagaaaca aggggtgtttt tctcatatc tctgaaattc taatc 45

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NCR domain of HA

<400> 20

tttgggtgtt tttattttcc cctgcttttg ct 32

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SP domain of HA

<400> 21

tgcacttgca gctgcaagtg cacataacag gaccagtagg tttgccttca t 51

<210> 22

<211> 255
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA2 domain of HA
 <400> 22
 ctgatagatc cccattgatt ccaatttcac tccatctacc tttccctgt tcaactttga 60
 ctcttctgaa tatttgggat aatcataagt cccatttctt acactttcca tgcattcatt 120
 gtcacacttg tggtagaact caaaacatcc atttccgatt tctttggcat tattctttaa 180

 ttggcttttt actttctcat acagattctt cacatttgag tcatggaaat ccagagtcct 240
 ttcattttcc agtag 255
 <210> 23
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TM domain of HA
 <400> 23
 catccagaaa ctgattgccc ccaggagagac caaaagcacc agtgaactgg cgacagttga 60
 gtagatcgcc agaat 75
 <210> 24
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cyto domain of HA

 <400> 24
 tcagatgcat attctgcact gcaaagatcc attagaaca 39
 <210> 25
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NCR domain of NA
 <400> 25
 agtagaaaca aggagttttt tgaacaga 28
 <210> 26

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NCR domain of NA
 <400> 26
 tttaaactcc tgctttcgct 20
 <210> 27
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TM domain of NA
 <400> 27
 tgaatggcta atccatatg agattatatt ccctatttgc aatattaggc taattagtc 60
 gactaccaga cagattgac caatggttat tat 93
 <210> 28
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Stalk domain of NA
 <400> 28
 gccggttaat atcactgaag ttgtgtcctt taccagggtg ctatttttat aggtaatgat 60
 gttttggttg catattccag tatggttttg acttcagtt tgaat 105
 <210> 29
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cyto domain of NA
 <400> 29
 tttctgattt ggattcat 18