(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 15/44

(11) 공개번호 특2003-0013463
(43) 공개일자 2003년02월14일

(21) 출원번호 10-2002-7017581
(22) 출원일자 2002년12월23일
번역문 제출일자 2002년12월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/19890
(86) 국제출원출원일자 2001년06월21일
(87) 국제공개번호 WO 2002/00885
(87) 국제공개일자 2002년01월03일

(81) 지정국 국내특허 : 아랍에미리트, 안티구아바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 콜롬비아, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 알제리, 에쿠아도르, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 터어키,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쏘, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 60/213,656 2000년06월23일 미국(US)
60/284,411 2001년04월17일 미국(US)

(71) 출원인 아메리칸사이아나미드컴파니
미합중국 뉴저지 07940 매디슨 파이브 지랄다-팜즈

(72) 발명자 갈라르자호세엠.
미국뉴욕10530하츠데일하모니레인7
레이썸테레사이.
미국뉴욕10543매머로넥어파트먼트1N올드포스트로드1015

(74) 대리인 차윤근

심사청구 : 없음

(54) 야생형 및 키메릭 인플루엔자 바이러스성입자(브이엘피)의 조립

요약

구조 단백질 HA, NA, M1 및 M2를 포함하는 인플루엔자 바이러스성 입자(VLP)가 기재된다. M1 단독을 함유하는 VLP, M1 및 HA, NA와 M2 중 임의 하나 또는 둘을 함유하는 VLP도 생산된다. HA 또는 NA의 일부가 키메릭 VLP를 포함하도록, 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 이종 잔기에 의해 대치되는 VLP처럼, 하나의 인플루엔자 서브타입으로부터의 HA 및 상이한 인플루엔자 서브타입으로부터의 NA를 갖는 VLP도 기재된다.

대표도

도 1

색인어

VLP, 인플루엔자 HA, NA, M1 및 M2

명세서

기술분야

본 발명은 매트릭스 단백질 단독으로 이루어진 인플루엔자 바이러스성 입자에 관한 것이며 추가로 인플루엔자의 구조 단백질을 포함할 수 있다.

배경기술

인플루엔자 바이러스는 A, B 및 C로 명명된 서브타입으로 구성된다. 인플루엔자 바이러스는 바이러스의 생활환에 요구되는 10 폴리펩타이드를 암호화하는 단편화된 단일 네거티브 스트랜드 RNA 게놈을 보유한다. 완전한 게놈의 8개의 RNA 세그먼트 각각은 뉴클레오캡시드 단백질(NP)의 다중 서브유닛으로 캡시드화되어 있고 삼량체 폴리머라제(PB1, PB2 및 PA 서브유닛)과 회합되어 있어서, 리보핵단백질 복합체(RNP)를 형성한다(참조문헌 1). 이들 구조는 코어와 바이러스 엔벨로프 간의 연결체로 작용하는 것으로 보이는 매트릭스 단백질(M1)의 층으로 둘러싸여 있다. 이러한 숙주 세포-유래 엔벨로프에는 항원 결정기인 두 주요 바이러스 암호화 표면 당단백질 헤마글루티닌(HA)과 뉴라미니다제(NA), 및 훨씬 더 소량의 비-글리코실화 소형 단백질 M2가 점재해 있다(1,2). HA 당단백질은 프로테아제에 의해 절단되어 HA1 및 HA2를 형성한다.

인플루엔자 바이러스 감염은 시알산-함유 세포 수용체에 표면 헤마글루티닌의 부착에 의해 개시된다. 이러한 첫 번째 바이러스-세포 상호작용은 수용체-매개 엔도사이토시스에 의한 세포 중으로 바이러스 입자의 흡수를 유도한다. 엔도솜의 낮은 pH 조건하에서, HA는 HA2의 소수성 NH_2 말단 도메인과 엔도솜 막의 상호작용을 촉진하는 형태 변화를 겪게 되어, 막 융합이 일어나고 뒤 이어서 코어 RNP와 매트릭스 단백질(M1)이 세포질 중으로 방출된다. 완전한 게놈의 전사 및 복제가 일어나는 핵으로 RNP가 전좌되기 전에 세포질에서 RNP와 매트릭스 단백질의 해리가 일어난다(3,4).

1차 전사 후, 새로 합성된 단백질은 바이러스 게놈의 복제를 개시하고 이는 다시 전사와 단백질 합성을 증가시킨다. 바이러스 생활환의 이 시점에서, 표면 당단백질 HA 및 NA는 새로 조립된 바이러스가 방출될 원형질막의 불연속 지역에서 축적되기 시작한다. 바이러스 조립은 막에 고정된 단백질과 언더라잉 매트릭스 단백질(M1)의 세포질 및/또는 막횡단 도메인 간의 일종의 상호작용을 통해 개시되는 것으로 추정되며, 이는 다시 RNP와의 클론 회합을 유지시킨다(5,6).

종합적으로 말해서, HA, NA, M1 및 M2는 4종의 바이러스 암호화된 구조 단백질을 구성한다. 매트릭스 단백질 M1과 RNP 복합체간의 접촉, 및 8 RNP의 완전한 세트가 성숙 비리온 입자 중으로 혼입되어 들어가는 메커니즘은 잘 정의되어 있지 않다. 구조 성분 간의 특이적 분자 접촉은 형태발생 과정이 어떻게 개시되어 숙주세포의 표면으로부터 성숙 입자 조립 및 버딩 포인트로 진행하는지를 지시하는 것으로 추정된다.

과정의 복잡성은 다음과 같은 이슈를 불러 일으켰다: 1)어떤 바이러스 단백질이 조립과 버딩에 요구되는지의 확인. 2) 조립과 버딩 과정을 추진하는 표면 및 언더라잉 성분 간의 단백질-단백질 및 지질-단백질 상호작용의 유형. 3)입자 중으로 혼입되어 유사 세그먼트로부터 구분된 조립 부위로 RNP가 인도되는 메커니즘. 4)상호작용의 성질과 화학량론 및 조립과 버딩의 조절. 이러한 사건 전부는 일부 숙주 분자가 조립 및 버딩 과정의 진행을 증진 또는 방해하거나 그러지 않을 수 있는 복잡한 세포 환경에서 일어난다. 이러한 과정은 이어서 세포 단백질이 바이러스 조립에 진실로 수반되는지 여부 및 어떻게 비-바이러스 단백질이 버딩된 입자의 표면으로부터 일반적으로 배제되는지의 이슈를 이끈다.

상이한 훼밀리의 엔벨로핑 RNA 바이러스로 이러한 이슈 일부를 중점적으로 다루기 위해 다수의 연구가 수행되었다; 그러나, 이들 이슈의 대부분은 인플루엔자 바이러스와 관련하여 미해결 상태로 남아있다. 인플루엔자와 다소간 형태적으로 및 진화적으로 관련이 있는 비-단편화 RNA 바이러스 훼밀리(예를 들면, 랩도비리대 및 파라믹소비리대)로 연구한 결과 랩도바이러스 소수포성구내염 바이러스(VSV)의 매트릭스 단백질(M)이 그 자체로 막 입자로서 세포 표면으로부터 핀치 오프(버딩)될 수 있는 것으로 나타났다(7,8). 또한, G 표면 단백질을 암호화하는 유전자의 결실이 있는 광견병 바이러스(또다른 랩도바이러스)의 카피가 감염 세포로부터 여전히 형성되고 방출된다는 사실에서 버딩에서의 M 단백질의 중요성이 또한 반영된다(9). PIV-3(파라믹소바이러스)로 행한 좀더 최근의 작업 또한 매트릭스 단백질과 뉴클레오캡시드 단백질(NP)이 함께 바이러스성 구조로 회합되고 세포 표면으로부터 버딩할 수 있음을 보여주었다(10). 그러나, 인플루엔자 바이러스에 관하여, Semliki Forest 바이러스 레플리콘을 사용하는 이들 두 단백질의 발현은 이들 단백질간의 회합 또는 막 소포의 버딩을 보여주지 않았다(11).

인플루엔자 바이러스의 역 유전학을 수행하는 것은 구조 성분간의 단백질-단백질 상호작용을 조사하기 위한 유용한 방법이었다. 인플루엔자의 조립에서 당단백질의 세포질 도메인의 중요성이 최근에 연구되었으며(12,13,14), HA 테일의 결실이 이의 입자 중으로의 혼입과 버딩 효율을 감소시키지만, 비리온의 형태에는 영향을 주지 않음을 보여주었다. 한편, 결실된 NA 테일이 달린 바이러스는 필라멘트 형태를 보였고 엔벨로프 중으로 NA의 혼입이 손상되었다. 또한, 이중 결실은 버딩 효율 및 감염력을 감소시키는 것으로 보이며 비리온 형태를 변화시켜, 테일 결실이 있는 것들 및 야생형 바이러스와 식별될 수 있다. 비록 이중 테일 결실이 바이러스 입자의 버딩 효율과 형태에 영향을 주는 것으로 보이지만, 이들은 비리온 입자의 조립과 배출을 완전히 폐지시키지는 않았다. 이러한 사실은 M1 단백질이 바이러스 조립과 버딩을 지시할 수 있음을 암시한다(13).

마찬가지로, 매트릭스 단백질과 원형질막 사이에 설정된 상호작용이 바이러스 조립과 방출에 중요한 것으로 보인다. 그러나, 이러한 회합의 물리적 본성, 즉 매트릭스 단백질이 정전기 상호작용에 의해 원형질막 중으로 완전히 매립되는지 아니면 단순히 부착되는지는 미해결 사안이다. 이러한 과제를 중점적으로 다룬 최근의 작업은 매트릭스와 막이 정전기 상호작용을 통해 회합되지만, 일정량의 M1이 막 중으로 매설됨을 배제할 수 없음을 강하게 시사한다(15). 성숙 비리온의 구조에서 M1 및 M2 단백질의 주역할은 아미노산 치환이 이들 분자 중 어느 하나에 존재할 때 입자의 구형 또는 필라멘트 형태에 반영된다(16).

바이러스성 입자(VLP)는 면역원 조성물에의 혼입을 위한 잠재적인 조건으로서 근년에 많은 관심을 끄는 주제이다. 왜

냐하면 VLP가 이들의 네이티브 형태와 충분히 유사한 형태로 보인 하나 이상의 표면 단백질을 함유하며, 이들이 목적하는 면역반응을 도출할 수 있기 때문이다. 이와 동시에, VLP는 숙주에 바이러스 자손을 생산하는 데 요구되는 유전물질의 상보물이 결여되어 있다. 따라서, 야생형 바이러스와는 달리, VLP는 병증이나 병리가 있는 감염을 일으킬 수 없다. 예를 들면, 로타바이러스(이중가닥 RNA 바이러스)의 둘 또는 세 단백질이 면역반응을 도출하는 VLP로 조립되었다(17).

배큘로바이러스 발현 시스템은 20면체 구조로 자기-조립하는 비-엔벨로핑 바이러스의 VLP의 형태발생과 조립의 조사에 광범위하게 사용되어 왔다(18,19,20,21). 마찬가지로, 레트로바이러스 훼밀리의 상이한 멤버의 단백질 gag 및/또는 env의 곤충 세포내 발현도 엔벨로핑 바이러스의 코어 구조의 조립과 버딩 연구에 사용되어 왔다(22,23,23,25).

배큘로바이러스 발현 시스템의 인플루엔자 VLP 생성능을 평가할 필요가 있다. 특히, VLP로 조립될 인플루엔자 바이러스 단백질의 최소수를 확인하고 이들 VLP의 형태와 면역원성을 평가할 필요가 있다.

발명의 요약

따라서, 본 발명의 목적은 VLP로 조립될 인플루엔자바이러스 단백질의 최소수를 확인하는 것이다. 본 발명의 추가 목적은 인플루엔자 바이러스의 하나 이상의 서브타입으로부터의 단백질을 함유하는 VLP를 생산하는 것이다. 본 발명의 추가 목적은 이종, 비-인플루엔자 공급원으로부터의 단백질을 함유하는 키메릭 VLP를 생산하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 하나 이상의 전술한 VLP를 함유하는 면역원 및 약학 조성물을 조제하는 것이다.

후술되는 바와 같이 본 발명의 이러한 목적과 타 목적은 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질을 포함하는 인플루엔자 VLP의 조립에 의해 달성되며, 여기에서 VLP는 항상 M1을 포함한다. 본 발명의 일 양태에서, VLP는 (뉴클레오캡시드 단백질(NP)을 혼입할 수 있는) M1만을 함유한다. 이러한 VLP는 M1을 암호화하는 재조합 DNA 분자를 작제하고, 이러한 재조합 DNA 분자로 적당한 숙주세포를 형질감염, 감염 또는 형질전환시키며, 숙주세포를 M1의 발현을 허용하는 조건하에서 배양하여, VLP가 M1의 발현 후에 세포 안에서 조립되게한 다음, 배양 상층액으로부터 VLP를 정제함으로써 생산된다.

발명의 또다른 양태에서, VLP는 HA, NA 및 M2로 이루어진 그룹 중에서 선택된 인플루엔자 구조 단백질 중 적어도 하나를 추가로 포함한다. 이러한 VLP는 M1+HA, NA 및 M2 중 적어도 하나를 암호화하는 하나 이상의 재조합 DNA 분자를 작제하고, 적당한 숙주세포를 하나 이상의 이러한 재조합 DNA 분자로 형질감염, 감염 또는 형질전환시키며, 숙주세포를 인플루엔자 바이러스 구조 단백질의 발현을 허용하는 조건하에서 배양하여, VLP가 구조 단백질의 발현 후에 세포 안에서 조립되게한 다음, VLP를 배양 상층액으로부터 정제함으로써 생산된다. M1만을 또는 M1+HA, NA 및 M2 중 적어도 하나를 함유하는 VLP를 인플루엔자 바이러스에 의해 유발된 감염에 대한 척추동물 면역용 면역원 조성물로서 희석제 또는 담체로 조제된다.

본 발명의 또다른 양태에서, 인플루엔자 바이러스의 상이한 서브타입으로부터의 표면 당단백질을 함유하는 VLP를 생산하는 것이 바람직할 수 있다. 1 서브타입으로부터의 HA 및 상이한 서브타입으로부터의 NA를 함유하는 이러한 VLP는 인플루엔자 바이러스의 이들 두 서브타입에 의해 유발된 감염에 대한 척추동물 면역용 2가 면역원 조성물로서 희석제 또는 담체로 조제된다.

본 발명의 또다른 양태에서, 키메릭 VLP를 포함하도록 하기 위해, HA 또는 NA의 일부 또는 전부가 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 이종 잔기에 의해 대치되는 VLP를 생산하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 잔기는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함하며 이에 한정되지 않는다. HA 또는 NA의 일부만을 대치하려는 경우, HA 또는 NA를 암호화하는 재조합 DNA 분자내 DNA 서열의 일부는 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 암

호화하는 DNA 서열에 의해 대치된다. 전체 HA 또는 NA를 대치하려는 경우, HA 또는 NA를 암호화하는 재조합 DNA 분자내 전체 DNA 서열은 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 의해 대치된다.

하나의 일면으로서, 이러한 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 병원성 미생물로부터 온다. 이들 키메릭 VLP는 그 병원성 미생물에 의해 유발된 감염에 대한 척추동물 면역용 면역원 조성물로서 희석제 또는 담체로 조제된다.

또다른 일면으로서, 이러한 비-인플루엔자 잔기는 약학적으로 활성인 잔기이다. 이들 키메릭 VLP는 약학 조성물로서 희석제 또는 담체로 조제되고 이러한 비-인플루엔자 잔기로 척추동물 치료에 효과적인 양으로 투여된다.

또다른 일면으로서, VLP는 조립되어 RNP를 패키징하고, 이종 뉴클레오타이드 서열을 추가 혼입하여 이를 발현할 수 있다.

전술한 면역원 및 약학 조성물은 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2) 스트레인의 4 유전자를 운반하는 쿼드러플(quadruple) 배큘로바이러스 전달 벡터(구조적 쿼드 quad)를 도시한다. 인플루엔자 유전자 HA 및 M1의 전사는 폴리헤드린 프로모터(" pH" 로 약칭)에 의해 추진되는 반면에, M2 및 NA는 p10 프로모터에 의해 추진된다. 이 벡터는 쿼드러플 재조합체 (HA/Q)를 생성하기 위해 Sf9 곤충세포 중으로 선형화된 배큘로바이러스 DNA와 함께 형질감염된다.

도 2는 VSV-G/HA 키메라의 구조를 도시한다. 인플루엔자 HA의 막횡단 도메인의 29 아미노산과 세포질 테일의 14 아미노산이 VSV-G 표면 당단백질 (서열번호 1)의 엑토도메인과 프레임에서 융합된다.

도 3은 쿼드러플 배큘로바이러스 재조합체(HA/Q28 또는 VSV-G/Q)에 의해 감염된 Sf9 세포에서 발현된 인플루엔자 및 VSV G 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. 도 3a에서, 안티-HA, 안티-M1 및 M2 모노클로날 항체의 혼합물을 사용하여 인플루엔자 단백질 HA, M1 및 M2를 쿼드러플 재조합체 HA/Q28로 감염된(72시간 후-감염) Sf9 세포의 상층액에서 인플루엔자 HA, M1 및 M2를 검출하고; HA 및 M1 또한 세포 펠릿에서 검출된다(레인 2). 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2)-감염 MDCK 세포를 대조군으로 사용한다(레인 3).

도 3b는 VSV-G/Q (완전 길이 G)로 감염된 Sf9 세포에서, VSV G, 및 인플루엔자 M1과 M2 단백질의 발현을 도시한다. 안티-G, 안티-M1 및 M2 모노클로날 항체의 혼합물로 탐침하였을 때, 발현은 세포 펠릿(레인 2)과 배양 상층액(레인 3)에서 검출되었다. 비감염 Sf9 세포(레인 1), VSV-감염 BHK 세포(레인 4) 및 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2)-감염 MDCK 세포(레인 5)를 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용한다.

도 4는 쿼드러플 배큘로바이러스 재조합체(HA/Q28)로 감염된 Sf9 세포의 면역형광 분석을 도시한다. Sf9 세포의 박스 배양액을 MOI 1에서 HA/Q28로 감염시키고 72시간 배양한다. 이때, 개개의 박스를 메탄올-아세톤으로 고정하고 1차 및 2차 항체와 순차적으로 배양한다. HA(도 4a), M1(도 4b) 또는 HA/M1(도 4c)의 발현을 적당한 필터를 이용하여 검출한다.

도 5는 HA/Q28로 감염된 Sf9 세포의 면역형광 분석을 도시한다. 박스 배양액을 MOI 1에서 HA/Q28로 감염시키고 72시간 동안 배양하였다. 그때, 개개의 박스를 파라포름알데하이드로 고정하고 1차 및 2차 항체와 순차적으로 배양시킨다. HA (도 5a), NA (도 5b) 또는 HA/NA (도 5c)의 발현을 적당한 필터를 이용하여 검출한다.

도 6은 HA/Q28로 감염된 Sf9세포의 면역형광 분석을 도시한다. Sf9 세포의 박스 배양액을 MOI 1에서 HA/Q28로 감염시킨 다음 72시간 동안 배양한다. 그때, 개개의 박스를 파라포름알데하이드로 고정하고 1차 및 2차 항체와 순차적으로 배양한다. M2의 발현을 적당한 필터를 이용하여 검출한다.

도 7은 완전한 길이 VSV-G/Q(완전한 길이 VSV G 유전자에 의해 대치된 HA/Q28내 완전한 길이 인플루엔자 HA 유전자)로 감염된 Sf9 세포의 면역형광 분석을 도시한다. 박스 배양액을 MOI 1에서 VSV-G/Q로 감염시키고 72시간 동안 배양하였다. 그때, 개개의 박스를 메탄올-아세톤으로 고정한 다음 1차 및 2차 항체와 순차적으로 배양한다. VSV G의 발현은 적당한 필터를 사용하여 검출되었다.

도 8은 아이오딕사놀 구배 원심분리에 의한 VLP 형성의 분석을 도시한다. 도 8a는 HA/Q28로부터의 분획이 안티-HA과 M1 모노클로날 항체의 혼합물로 웨스턴 블롯에 의해 탐침되었을 때의 결과를 도시한다. 레인 1-8은 튜브의 상부에서 바닥까지 수집한 분획을 나타내고; 레인 9는 MDCK 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2)-감염 대조군이다. 도 8b는 VSV-G/Q로부터 H 분획이 안티-VSV-G, 안티-M1 및 안티-M2 모노클로날 항체의 혼합물로 웨스턴 블롯에 의해 탐침되었을 때의 결과를 도시한다. 레인 1-8은 튜브의 상부에서 바닥까지 수집된 분획을 나타내고; 레인 9는 대조군으로서 병합된 VSV-감염 BHK과 인플루엔자-감염 MCDK 세포의 혼합물이다.

도 8c는 이중 감염된 (M1 및 NP 단일 재조합체) Sf9 세포의 농축 상층액이 정제되고 안티-MA 항체와 안티-NP 항체의 혼합물로 탐침되었을 때의 결과를 도시한다. 레인 1-8은 튜브의 상부에서 바닥까지 수집한 구배 분획을 나타내고; 레인 9는 대조군으로서 인플루엔자-감염 MDCK 세포이다.

도 9는 MI 단독 또는 HA/Q28+NP 단일 배큘로바이러스 재조합체로 감염된 Sf9 세포의 배양 상층액의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. 도 9a는 안티-M1 항체로 탐침된, 단일 M1 감염의 상층액으로부터 유래한 분획의 분석을 도시한다. 레인 1-8은 튜브의 상부에서 바닥까지 수집한 분획을 나타내고; 레인 9는 대조군으로서 인플루엔자-감염 MDCK 세포이다. 도 9b는 이중-감염 Sf9 세포(HA/Q28+NP 단일 배큘로바이러스 재조합체)의 상층액이 정제되고 안티-HA, 안티-M1 및 안티-NP 항체의 혼합물로 탐침되었을 때의 결과를 도시한다. 레인 1-8은 튜브의 상부에서 바닥까지 수집된 분획을 나타내고; 레인 9는 도 9a에서와 같이 동일한 대조군이다.

도 10은 쿼드러플 재조합체 HA/Q28로 감염된 Sf9 세포의 배양 배지로부터 정제된 네거티브 염색된 인플루엔자 VLP의 전자현미경 사진을 도시한다.

도 11은 임뮤노골드 라벨링된 인플루엔자 VLP의 전자현미경 사진이다. 도 11a에서(3개의 사진), VLP는 안티-HA 모노클로날 항체로 탐침되고 항-마우스 IgG에 커플링된 골드 스피어로 카운터 염색된다. 도 11b에서, VLP는 안티-NA 모노클로날 항체로 탐침되고 도 11a에서와 같이 카운터 염색된다.

도 12는 HA/Q28 VLP로 면역된 마우스로부터의 혈청의 풀로 탐침된 인플루엔자 바이러스-감염 세포의 웨스턴 블롯을 도시한다. 도 12a에서, 결과는 두 마우스의 첫 번째 쌍으로부터 모은 혈청으로부터 기술된다. 도 12b에서, 결과는 두 마우스의 두 번째 쌍으로부터 모은 혈청으로부터 기술된다. 도 12a 및 12b 각각에서, 레인 1: 대조군으로서 비감염 MDCK 세포; 레인 2: 인플루엔자 A 바이러스 감염-MDCK 세포. 비감염 MDCK 세포의 탐침은 인플루엔자-감염 세포에서도 존재한, M1의 것보다 약간 높은 비-특이성 밴드를 보였다.

도 13은 VSV-G/Q 키메릭 VLP로 면역된 마우스로부터의 혈청 풀로 탐침된 VSV-감염 세포의 블롯을 도시한다. 도 13a에서, 결과가 두 마우스의 첫 번째 쌍으로부터 모은 혈청으로부터 기술된다. 도 13b에서, 결과가 두 마우스의 제 2 쌍으로부터 모은 혈청으로부터 기술된다. 도 13a와 13b 각각에서, 레인 1: 대조군으로서 비감염 BHK 세포; 레인 3: 대조군으로서 비감염 MDCK 세포; 레인 4: 인플루엔자-감염 MDCK 세포.

도 14는 폴리머라제 서브유닛과 핵단백질을 암호화하는 세 유전자를 포함하여, 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2) 스트레인의 4 유전자를 운반하는 쿼드러플 배큘로바이러스 전달 벡터를 도시한다. 반대 배향으로 위치되어 있는 인플루엔자 유전자 PB1과 PA의 전사는 폴리헤드린 프로모터(" pH 프로모터" 로 약칭)에 의해 추진되며, 또한 반대 배향으로 있는 PB2 및 NP 유전자의 전사는 p10 프로모터에 의해 추진된다. 4 유전자를 배큘로바이러스 전달 벡터 PAcAB4 중으로 서브클로닝한 다음, 선형화된 배큘로바이러스 DNA로 Sf9 곤충 세포 중으로 동반 형질감염시켜 쿼드러플 재조합체를 생성시킨다.

도 15는 비감염(대조군) 및 VLP-감염 베이비 햄스터 신장 세포(BHK)내 상대적 광 단위(RLU)로 루시퍼라제 활성의 측정을 도시한다.

도 16은 GFP 유전자를 운반하는 VLP로 감염시킨 뒤 BHK 세포에서 녹색 형광 단백질(GFP)의 발현을 도시한다. 화살표는 GFP를 발현하는 BHK 세포를 표시한다.

발명의 상세한 설명

바이러스-감염 세포의 표면으로부터 엔벨로핑 바이러스 입자의 조립과 방출은 복잡하고 단계적인 과정이다. 이 과정은 비리온 입자의 조립을 개시하기 위한 원형질막의 불연속 영역과 바이러스-암호화된 글리코실화 및 비-글리코실화 단백질의 협동 상호작용을 요한다. 이들 성분 외에도, 바이러스의 유전물질을 나타내는 단백질 캡시드화 핵산이 또한 구조 중으로 혼입되어 형태발생 과정을 완료하며, 이 과정은 세포 표면으로부터 성숙 비리온 입자의 핀치 오프 또는 버딩에 의해 종결된다. 완전한 비리온 입자의 조립과 최종 방출에서 상이한 구조 성분의 정확한 분자 상호작용과 기여는 잘 특징규명되어 있지 않다.

본 발명은 인플루엔자 바이러스 구조 단백질을 발현한 재조합 벡터로 감염된 세포의 표면으로부터 인플루엔자 바이러스성 입자(VLP)의 조립과 방출을 기술한다. 각종 발현 시스템이 VLP의 생산에 적당하다. 본 발명은 인플루엔자 바이러스 구조 단백질을 발현한 배큘로바이러스 재조합체로 감염된 곤충 세포로 설명된다.

인플루엔자 바이러스 조립과 버딩에 필요한 분자를 규정하기 위해, 단일 유전자 및 쿼드러플 유전자 배큘로바이러스 재조합체의 시리즈가 작제된다. 재조합체는 스포돕테라 프루기페르다 9(Sf9) 세포에서 4종의 인플루엔자 구조 단백질(HA, NA, M1 및 M2)을 발현하였다. Sf9 세포는 SF21 세포주의 유도체인 곤충 세포 주(ATCC 기탁번호 CRL 1711)이다. 비록 모든 4종의 구조 단백질을 암호화하는 전달 벡터가 기술되지만, 이들 4종의 단백질을 총괄 암호화하는 2 내지 4 전달 벡터의 사용도 본 발명의 범위 안에 속한다.

쿼드러플 재조합체를 수득하기 위해, 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2) 스트레인의 4종의 구조 단백질을 암호화하는 단일 배큘로바이러스 전달 벡터가 작용 플라스미드의 크기를 감소시키고 제한 부위의 수를 증가시킴으로써 클로닝을 촉진한 셔틀 벡터법을 이용하여 작제된다. 최종 전달 벡터에서, 인플루엔자 유전자는 반대 방향으로 유전자의 전사를 추진하도록 위치된, 배큘로바이러스 프로모터 p10(NA 및 M2)및 폴리헤드린(HA 및 M1)으로부터 다운스트림에 위치한다(도 1).

쿼드러플 (HA, NA, M1 및 M2) 배큘로바이러스 재조합체는 Sf9 세포를 선형화된 바이러스 DNA와 전달 벡터 DNA로 동시 형질감염시킴으로써 수득된다. 수개의 재조합 바이러스 플라크를 선택하고 플라크-플라크 분리의 두 부가적인 라운드에 의해 추가 정제한다. 면역블롯에 의해 평가된 단백질 발현의 수준을 토대로, HA/Q28로 명명된 이러한 쿼드러플 재조합 전달 벡터가 후속 실험에의 사용을 위해 선택된다.

이 작제물의 두드러진 특징 하나는 M1 유전자상의 공여체 및 수용체 스플라이싱 부위가 M1 mRNA의 스플라이싱을 방지하도록 돌연변이된다는 점이다. 그렇지 않은 경우, M1 mRNA는 M2 mRNA 중으로 스플라이싱되어, M1 단백질의 발현 수준이 감소된다. M2 DNA를 독립 유전자로서 전달 벡터 중으로 도입시킨다.

이들 4종의 인플루엔자 구조 단백질의 발현이 쿼드러플 배큘로바이러스 재조합체 HA/Q28로 감염된 Sf9 곤충 세포의 표면으로부터 인플루엔자 VLP의 조립과 버딩을 추진하기에 충분한지를 조사하기 위해, 배양 상층액을 웨스턴 블롯으로 분석하여 M1 및 HA 단백질의 존재를 확인한다. 배양 배지를 72시간 감염 후 수거하고, 4000xg로 30분간 청징화한 다음 잔류 현탁 물질을 200000xg로 2시간 동안 원심분리로 농축시킨다.

안티-HA, M1 및 M2 모노클로날 항체의 조합으로 탐침한 감염 세포로부터 농축 상층액의 웨스턴 블롯 분석은 인플루엔자 HA, M1, 및 M2 단백질의 상당한 발현을 입증해주었다(도 3a). HA 단백질은 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2)-감염 Madin-Darby 개 신장 (MDCK) 세포와는 상이한 패턴으로 이동하는 것으로 보이며, 이는 이 단백질의 다양한 글리코실화의 반영일 수 있다. 한편, M1 및 M2 단백질의 이동 패턴은 MDCK 인플루엔자 감염 세포에서 발현된 것들과 유사하다(도 3a, 레인 1-3). NA 단백질의 발현은 또한 HA, M1 및 M2를 인식하는 마우스 폴리클로날 항체로 웨스턴 블롯에 의해 검출된다(데이터는 나타내지 않았음).

하기 논의되는 결과는 4종의 인플루엔자 구조 단백질의 발현이 Sf9 곤충 세포의 표면으로부터 VLP의 조립과 버딩에 충분함을 증명한다. 이들 4종의 단백질 외에, 뉴클레오캡시드 단백질 (NP)의 발현은 NP 단백질을 입자 중으로 혼입한 VLP의 형성을 이끈다.

또한, M1 단백질 단독의 발현은 VLP의 방출을 유도하며, 이는 또한 M1과 동반 발현될 때 뉴클레오캡시드 NP를 혼입할 수 있다. 또한, 소수포성구내염 바이러스의 완전 길이 G-단백질 또는 쿼드러플 재조합체내 하이브리드 HA/G에 의한 HA 유전자의 대치는 키메릭 VLP의 조립과 방출을 유도하였다. 이들 VLP 모두는 VLP의 매질 중으로의 분비 후에 통상의 정제수단에 의해 수득된다.

이종의 비-인플루엔자 당단백질이 인플루엔자 VLP의 표면 중으로 혼입될 수 있는지 여부를 평가하기 위하여, 두 상이한 키메릭 쿼드러플 배큘로바이러스 재조합체를 작제한다. VSV-G/Q로 명명된 첫 번째는 인플루엔자 HA 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 소수포성구내염 바이러스(VSV)의 완전 길이 당단백질 G를 암호화하는 DNA 서열로 대치하였다. VSV-G/HA-Q로 명명된 두 번째는 VSV G 단백질의 엑토도메인 및 인플루엔자 HA 단백질의 막횡단 도메인과 세포질 테일을 암호화하는 하이브리드 DNA 서열을 운반한다(도 2 참조). 두 재조합체는 3 구조 인플루엔자 바이러스 단백질 M1, NA 및 M2에 대한 유전자를 함유한다.

이들 작제물을 야생형 인플루엔자 VLP와 동일한 특징규명 연구에 투입하며 결과는 두 작제물 중 하나로 Sf9 곤충 세포의 감염이 그들 표면상에 VSV G 단백질을 보유하는 인플루엔자성 입자의 조립과 방출을 지시함을 나타낸다. 이들 재조합체 바이러스는 둘 모두 4종의 단백질(M1, M2, NA 및 VSV-G)의 발현을 추진시킬 수 있으며, 이들 단백질 또한 배지 중으로 분비된다.

VSV-G/Q로 감염된 Sf9 세포의 웨스턴 블롯 분석은 VSV G 단백질, 및 인플루엔자 단백질 M1과 M2가 72시간 감염 후에 발현되었음을 보여주었다(도 3b). 더욱이, 감염 세포의 농축 상층액은 VSV G, 및 인플루엔자 M1과 M2에 대한 항체로 탐침하였을 때 양성 웨스턴 블롯을 보여주었다(도 3b, 레인 3).

VSV G 단백질에 대해 방금 기술한 방법은 VLP의 표면 중으로 생물학적 관심 대상의 다른 비-인플루엔자 당단백질의 혼입, 및 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 잔기의 혼입에 용이하게 적용될 수 있다. 이러한 잔기로는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질이 포함되며 이에 한정되지 않는다. 후술되는 바와 같이, 이러한 VLP는 수용체-리간드 상호작용 연구에서 면역원 조성물로서, 및/또는 약학 조성물의 일부로서 비-인플루엔자 잔기의 전달을 위한 시스템으

로서 사용된다.

Sf9 세포내 인플루엔자 단백질의 발현 및 세포 국재를 좀더 자세히 평가하기 위하여, 플라크 정제 배큘로바이러스 재조합체 HA/Q28로 감염된 세포의 면역형광 분석을 수행한다. 이들 실험은 간접 면역형광에 의해 나타내는 바와 같이 4종의 인플루엔자 구조 단백질이 발현되었음을 보여주었다(도 4-6). 안티-HA 및 안티-NA 항체에 의한 이중-염색 실험은 이들 표면 당단백질이 일정 정도의 중첩부를 갖는 감염 세포의 주변에 국재함을 증명하였다(도 5c). 이러한 결과는 이들 주요 당단백질이 감염된 곤충 세포의 표면상 불연속 지역에서 동반 국재함을 암시하며, 이는 포유동물 세포의 자연적인 인플루엔자 감염에서 기대된 것과 공통점이 있다.

마찬가지로, HA 및 M1에 대한 모노클로날 항체의 혼합물로 HA/Q28-감염 Sf9 세포의 이중 면역형광 염색은 표면 단백질 및 매트릭스 M1이 세포막의 독특한 지역에 동반 국재하는 것으로 보임을 나타내었다(도 4c).

한편, M1-배큘로바이러스 재조합체 감염된 Sf9 세포의 면역형광은 M1 단백질이 감염 세포의 핵에 주로 축적되고 미량만이 세포 표면에서 가시화되었음을 보여주었다(데이터 나타내지 않았음). M1이 단일 유전자로서 발현되었든 HA, NA 및 M2와 함께 쿼드러플 재조합체로서 발현되었든간에 감염 세포내 M1 단백질의 분포 패턴은 변화되지 않은 듯하다(도 4). 또한, M1 및 NP 단일 재조합체로 Sf9 세포의 동시 감염은 M1 또는 NP 재조합체로 개별적으로 감염된 Sf9 세포에 비하여 세포내 이들 단백질의 재분포를 보이지 않았다(데이터 나타내지 않았음).

따라서, 감염 세포의 웨스턴 블롯 및 면역형광 분석은 이들 4종의 단백질이 세포와 세포 상층액에 존재할 뿐만 아니라, 원형질막상의 불연속 지역에도 동반 국재함을 보여준다. 이러한 사실은 이들 구조 단백질간의 잠재적인 회합을 시사한다.

VSV-G/Q 재조합체로 감염된 Sf9 세포의 면역형광 연구는 VSV G 단백질이 발현될 뿐만 아니라, 감염 세포의 주변에 축적하는 것으로 보임을 나타내었다.

면역형광 연구에 의해 이들 단백질이 세포 표면에 동반 국재하는 것으로 드러났기 때문에, 이는 이들 4종의 바이러스 단백질이 감염 세포의 표면으로부터 VLP의 형성과 방출을 추진하기에 충분한지 여부의 평가를 이끈다. 구체적으로, 이들 단백질이 세포 손상과 사멸의 결과로서 세포로부터 방출되는지 여부를 조사하기 위하여, 또는 이들이 세포 표면으로부터 버딩된 VLP로서 조립되었기 때문에, HA/Q28-감염된 Sf9 세포로부터의 농축 상층액을 아이오딕사놀 (26) 속도 구배 원심분리시킨다(200000 x g, 3.5시간 동안). 개별적으로 규정된 바와 같이, 당해 단백질을 함유하는 분획을 20-60% 수크로스 구배상에서의 추가 정제에 투입한다.

수집된 분획의 웨스턴 블롯 분석은 HA 및 M1가 구배를 통해 동반 이동하여, 분획 2에서 피크 농도에 이름을 보여주었다(도 8a, 레인 2). 이들 단백질은 또한 인접 분획 3과 4, 및 분획 7과 8에서도 발견되었다(도 8a). 이들 하부 분획(구배의 바닥쪽)에서 HA 및 M1의 검출은 배큘로바이러스와 이들 단백질의 회합에 기인하는 듯하며, 이들 조건하에서 분획 7과 8에 밴드가 나타난다(데이터 나타내지 않았음).

유사 실험이 VSV-G/HA-Q(키메라) 및 VSV-G/Q(완전 길이) 작제물로 수행되었다. HA/Q28로 관찰되는 바와 같이, 아이오딕사놀 구배의 분획 2는 웨스턴 블롯 분석에 의해 나타나는 바와 같이 VSV G 및 인플루엔자 M1과 M2 단백질을 함유한다(도 8b, 레인 2). Sf9 세포를 HA 대신 완전한 길이 VSV-G를 운반하는 쿼드 재조합체로 감염시킬 때, 모든 탐침된 단백질(VSV-G, M1 및 M2)도 농축 상층액 및 아이오딕사놀 구배의 분획 2와 3 모두에 존재하였다(도 3b, 레인 3과 도 8b). 이들 결과는 쿼드 VSV-G/HA-Q(키메라) 또는 VSV-G/Q(완전 길이)로 Sf9 세포의 감염이 이들

의 표면상에 VSV G 단백질을 보유하는 인플루엔자 VLP의 조립과 방출을 지시함을 암시한다.

전자현미경하에서 검사한 HA/Q28 입자의 일부가 검출 가능한 표면 스파이크를 보이지 않았다는 사실의 견지에서(하기 참조), 인플루엔자 매트릭스 단백질 자체가 소포성 입자의 조립과 방출을 추진하기에 충분한지 여부의 의문이 일었다. 이러한 의문을 집중 다루기 위해, Sf9 곤충 세포를 72시간 동안 M1 배큘로바이러스 재조합체로 감염시키고, 농축 배양 상층액을 전술한 바와 동일한 분석에 투입한다. 아이오딕사놀 구배 상층액 분획의 면역블롯 분석은 매트릭스 단백질이 HA/Q28로 감염된 Sf9 세포로부터 방출된 VLP의 이동 패턴과 유사하게, 분획 2와 3에서 농축되었음을 입증하였다(도 9a).

매트릭스 단백질 (M1)이 핵으로부터 바이러스 조립이 일어나는 세포 표면으로의 리보핵단백질 복합체(RNP) 수송에 중요 역할을 한다는 강력한 증거가 존재한다(3). 매트릭스와 RNP간의 회합은 NP, 비리온 RNA 또는 양자 모두와의 접촉을 통해 매개될 수 있다. 따라서, Sf9 세포를 쿼드러플 재조합체 HA/Q28과 NP 단일 배큘로바이러스 재조합체로 동반 감염시켰을 때 뉴클레오캡시드 단백질(NP)이 VLP 중으로 혼입되었는지 여부를 평가하는 것이 관심을 끈다. 구배 분획 2의 웨스턴 블롯 분석은 뉴클레오캡시드 단백질 NP가 사실상 생산된 VLP 중으로 혼입되었음을 입증한다(도 9b). 이러한 결과는 입자 중으로 NP의 혼입을 허용하기 위해 단백질이 NP와의 접촉을 설정하느냐에 관한 의문을 제기하였다.

이러한 의문을 중점적으로 다루기 위하여, M1 및 NP 단일 배큘로바이러스 재조합체를 사용한다. Sf9 세포에서 M1과 NP의 동시 발현은 두 단백질 모두로 이루어진 막 입자를 생산하였다. 이는 정확한 말단을 지닌 규정된 인플루엔자 RNA의 부재하에 이들 두 단백질 간의 잠재적인 상호작용의 평가를 허용한다. M1 및 NP 재조합체로 이중 감염된 Sf9로부터 유래한 구배 정제 입자의 웨스턴 블롯 분석은 M1 및 NP가 동일 분획에 동반 국재되었음을 보여주었다(도 8c). 한편, NP 재조합체만으로의 감염은 입자 방출을 유도하지 않으며 어느 분획에서도 반응성 NP의 존재를 입증하지 않았다(데이터 나타내지 않음). 이러한 결과는 RNA의 부재하에서도 NP를 M1-함유 입자 중으로 도입하기에 충분한 M1과 NP간의 상호작용을 암시한다.

인플루엔자 바이러스내 NP 단백질의 위치선정, 및 단백질 입자 조립의 다른 연구에 기초하여(10), NP 단백질이 매트릭스 단백질 M1과의 접촉을 설정하고, 이러한 상호작용의 결과로서, VLP 중으로 혼입됨을 추정하는 것이 합리적이다. 인플루엔자-감염 세포에서, 핵으로부터 원형질막에서의 바이러스 조립 부위로 RNP의 수송은 잘 특징규명되지 않은 메커니즘에 의해 매트릭스 단백질과의 회합 후에 일어난다.

NP 단백질은 인플루엔자 RNA에 결합할 뿐만 아니라, 비-특이성 RNA에도 낮은 친화력으로 결합할 수 있다. 따라서, 이러한 결과는 RNA가 M1과 NP간의 생산적 상호작용에 요구되는 가능성을 배제하지 않는다.

따라서, 매트릭스 단백질은 입자의 조립과 방출을 이끄는 분자 상호작용을 개시할 뿐만 아니라, 뉴클레오캡시드 NP를 입자에 결합시키고 혼입시킬 수 있는 것으로 결론지워진다. 인플루엔자 감염 세포에서, M1 단백질은 수송 및 바이러스 조립 과정에서 RNP와 회합한다. 단일 M1 재조합체의 경우에, 이들 다른 인플루엔자 구조는 존재하지 않으나, 버딩은 여전히 일어난다. NP는 단량체 또는 올리고머로서, 또는 세포 RNA 결합 후에, M1과 회합할 수 있다. 회합의 종류가 무엇이든, 곤충 세포에서 발현된 M1 및 NP는 세포로부터 배출될 수 있는 소포로 조립될 충분한 친화성으로 결합함이 자명하다.

분획 2와 3 중으로 동반 이동한 인플루엔자 단백질간의 회합의 본성을 좀더 자세히 특징규명하기 위하여, 이들 분획에 존재하는 재료의 전자현미경 평가를 수행한다.

분획 2의 전자현미경 검사는 인플루엔자 바이러스 및 서브바이러스 입자를 매우 닮은 표면 돌기로 점재해 있는 소포성 및 비-소포성 입자 모두의 높은 농도의 존재를 드러내었다(도 10). VLP의 형상과 구조적 특징은 구배내 이들의 위치에 따라 변한다. 일부 소포의 표면으로부터 돌출하는 스파이크는 이들이 인플루엔자 바이러스의 표면으로부터 밀려남에 따라 이들이 입자 표면으로부터 외측으로 밀려난다는 점에서, 인플루엔자 HA 및 NA와 유사하다.

분획 2로부터 일부 VLP에서의 돌기는 인플루엔자 바이러스에 존재하는 HA 스파이크와 현저히 유사하다(도 10). NA의 형태는 이러한 광범위의 스파이크-점재된 실재물을 함유하는 샘플에서 덜 분명하다. 분획 3은 유사 범위의 입자를 고농도로 함유하지만, 분획 2보다 높은 농도의 집합된 막을 함유하는 것으로 보인다(데이터 나타내지 않았음).

전자현미경하에서 최대수의 인플루엔자 VLP를 보인 분획은 웨스턴 블롯 분석에 의해 입증되는 바와 같이 M1 및 HA 단백질의 최대 농도를 함유하였다. 표면 돌기로 덮히고 길이가 약 75 내지 150 nm 범위인 VLP는 크기와 형태에 있어서 인플루엔자 바이러스를 명백히 닮았다.

M1 입자의 구조를 좀더 자세히 특징규명하기 위하여, 구배의 이들 두 분획을 전자현미경으로 검사한다. 네거티브 염색한 전자현미경 검사는 표면상에 스파이크를 보유하지 않은 다수의 가변적인 형상의 소포를 보여주었다(데이터 나타내지 않았음).

배큘로바이러스-감염 세포가 소포를 자발적으로 방출하였는지 여부 또는 세포 표면에서 M1 단백질의 회합이 입자 배출을 추진하기에 충분한지 여부를 측정하기 위하여, 야생형 또는 NP 재조합 배큘로바이러스로 감염된 Sf9 세포의 농축 상층액의 유사 구배 분획을 전자현미경으로 검사한다. 상응하는 단일 재조합체로 감염된 Sf9 세포의 상층액이 분석에 사용될 때, 다른 단백질(NP, HA) 중 어느 것도 이들 분획에서 검출되지 않았다. 이러한 결과는 매트릭스 단백질 자체가 곤충 세포의 표면으로부터 VLP의 조립과 방출을 추진하기에 충분함을 시사한다.

VLP의 표면으로부터 돌출하는 스파이크의 단백질 조성이 HA 및 NA(면역형광 실험에 사용된 것들과 동일)에 대한 특이적 모노클로날 항체로 탐침하였다. 이러한 검사는 골드 비이드의 존재에 의해 표시되는 바와 같이, 주요 인플루엔자 표면 항원 HA가 사실상 VLP의 표면상에 존재함을 보여주었다(도 11a). 이러한 결과는 네거티브 염색과 전자현미경에 의해 가시화된 스파이크의 구조 평가로부터 가정되었던 것을 확인시켜 주었다(도 10). 마찬가지로, 안티-NA 항체로의 임뮤노골드 라벨링 및 전자현미경은 또한 VLP의 표면상에 NA 당단백질의 존재를 드러내었지만, HA보다는 덜 풍부하다(도 11b).

M2 단백질의 아미노-말단의 18 아미노산을 포괄하는 펩타이드에 대해 야기된 토끼 폴리클로날 항체를 사용하는 임뮤노골드 라벨링에 의해 VLP의 표면상 M2 단백질의 존재를 검출하고자 시도되었다. M2 단백질은 입자 표면에서 검출되지 않았지만, 임뮤노골드 라벨링-전자현미경(IEM)에 투입된 구배 분획에는 존재한다. 그러나, IEM이 마이너 단백질을 검출하기 위한 민감한 충분한 시스템이 아니기 때문에 이는 놀랄 일도 아니며, 네이티브 인플루엔자 바이러스로도, 매우 적은 양의 M2가 생산되며 검출하기가 어렵다.

키메릭 인플루엔자-VSV VLP가 정제되고 전자현미경으로 검사될 때, 이들은 인플루엔자 VLP와 유사한 형태를 지닌 것으로 판명되었다. 또한, 임뮤노골드 라벨링 분석은 이들이 안티-G 항체와 반응성인 표면 당단백질을 지님을 보여주었다(데이터 나타내지 않았음).

두 작제물 중 하나로 생산된 입자는 형태에 있어 현저한 차이를 보이는 것 같지는 않다. 두 입자 모두의 표면상 G 단백질의 함량은 분명히 유사하였다. 이러한 사실은 G/HA 키메라의 HA 부분과 막을 언더라잉하는 M1 간의 잠재적으로 호적한 상호작용이 입자 중으로의 G의 혼입 수준을 현저히 증진시키지 않음을 암시한다.

야생형 인플루엔자 VLP와 키메릭 VLP(VSV G 함유)의 면역원성을 평가하기 위하여, Balb/c 마우스의 두 그룹을 HA/Q28 또는 VSV-G/Q로 근육내 경로를 통해 면역시키며, 여기에서 VLP의 각 세트는 알루미늄 포스페이트로 제형된다. 각 그룹에서의 모든 마우스는 2주 간격으로 프라임 및 두 부스터 주사를 맞았다. 최종 면역 2주 후, 혈액 샘플을 수득하고 상응하는 항원에 대한 항체의 존재를 웨스턴 블롯(VLP의 두 유형 모두에 대해), 혈구응집(HA/Q28에 대해) 및 혈청-중화 시험(VSV-G/Q에 대해)에 의해 평가한다.

면역블롯 분석은 인플루엔자 HA/Q 28로 면역된 마우스로부터의 혈청이 시험 면역원(주로 HA 및 M1; 도 12a 및 b, 레인 2)으로 사용된 인플루엔자 바이러스를 인식함을 입증한다. 마찬가지로, 키메릭 VLP VSV-G/Q로 면역된 마우스로부터의 혈청은 VSV의 G 단백질를 인식하였다(도 13a 및 b, 레인 2).

인플루엔자 바이러스 혈구응집 시험(IHA)의 억제 수행은 96 IHAU의 IHA 역가를 가짐을 보여주었고, 이는 대조군 나이브 마우스로부터 수득한 것(32 IHAU)보다 많은 것이다. 이러한 반응은 양성 대조군으로 작용하는 라이브 인플루엔자 A/홍콩(H3N2)(베일러 의과대학 Mbawuike 박사 제공)으로 2번 비내 면역시켜 도출된 128 IHAU의 IHA 역가와 거의 동일하다.

VSV-G/Q로 면역시킨 마우스로부터의 혈청에 의한 VSV의 중화는 1/64 정도로 높은 희석이 VSV의 표준 역가를 완전히 중화시켜, 세포 단일층에 플라크의 형성을 방지한다.

이들 결과는 웨스턴 블롯에서 야생형 인플루엔자 바이러스를 인식할 뿐만 아니라, 인플루엔자 바이러스 혈구응집을 억제하는 항체 반응을 도출하였음을 증명한다. 더욱이, VSV G 단백질을 운반하는 키메릭 VLP로 마우스의 면역은 웨스턴 블롯에서 야생형 바이러스의 VSV G 단백질을 인식하고, 또한 혈청 중화 시험에서 VSV 감염을 방지하는 체액성 항체반응을 유도하였다.

곤충 세포 외에 숙주세포의 다른 유형도 VLP를 생산하기 위해 인플루엔자 바이러스 구조 단백질 (및, 필요하다면, 비-인플루엔자 단백질)을 암호화하는 하나 이상의 재조합 벡터와 사용될 수 있다. VSV의 M 단백질로 수행한 연구는 이러한 특성이 곤충(8) 및 포유동물(7) 세포 유형 모두에서 나타남을 입증하였다. 또한, 포유동물 세포내 파라인플루엔자 바이러스(또다른 비-단편화, 네거티브-스트랜드 RNA 바이러스)의 매트릭스 M 및 NP 단백질의 발현은 바이러스성 입자의 형성과 방출을 이끈다(10).

숙주세포로 사용하기에 적당한 다른 세포 유형으로는 포유동물(예를 들면, 차이니즈 햄스터 난소, 병아리 배아 섬유아세포, BHK 세포, 인간 SW13 세포) 및 효모(예를 들면, 피치아, 사카로마이시즈) 숙주세포가 포함된다. 포유동물 또는 효모 세포의 사용은 곤충 세포로 수득될 수 있는 것보다 야생형 단백질의 것과 더 닮은 글리코실화를 갖는 단백질의 발현을 초래할 수 있다.

배큘로바이러스 외에 유전자의 전달을 위한 적당한 재조합 벡터로는 백시니아 및 다른 폭스바이러스, 신드비스, 아데노바이러스, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스와 같은 바이러스와 기타 알파바이러스, 및 플라스미드 DNA가 포함되며 이에 한정되지 않는다.

재조합 벡터는 상응하는 숙주세포형에서 VLP를 생산하기 위한 인플루엔자 (및 임의 비-인플루엔자) 단백질의 발현을 지시하는 데 효과적인 프로모터 및 기타 조절 요소(예를 들면, 폴리아데닐화 시그널)를 포함하여야 한다. 숙주세포는 당업계에 공지된 통상의 기술에 의해 형질감염, 감염 또는 형질전환된다. 이러한 기술에는 형질도입, 전기천공 및 리포펙션도 포함되며 이에 한정되지 않는다.

본원에서 기술되는 바와 같이, 인플루엔자의 4종의 구조 단백질(HA, NA, M1, M2)의 쿼드러플 배큘로바이러스 재조합체를 통한 발현은 Sf9 곤충 세포의 표면으로부터 VLP의 조립과 방출을 지시하기에 충분하였다. 이러한 점은 4종의

구조 단백질만으로 생산된 인플루엔자 VLP의 형성의 첫 번째 보고이다. 사실상, VLP는 적게는 하나의 구조 단백질 M1을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 M1 단독, M1+HA, NA 및 M2 중 하나 또는 둘, 및 이들 구조 단백질 4종 모두로 이루어진 VLP를 포함한다.

조립된 VLP는 그들의 크기, 입자 형태 및 표면 스파이크의 미세 구조에 있어서 야생형 인플루엔자 바이러스와 밀접하게 닮아있다. 더욱이, 인플루엔자 RNP의 부재하에서 VLP의 형성은 RNP가 입자의 조립과 방출에 필수가 아님을 시사한다.

인플루엔자 VLP를 조립하기 위한 이러한 신규의 방법은 새로운 인플루엔자 변이체에 대한 면역원 조성물의 디자인에 매우 중요하다. 이러한 시스템의 중요한 특징 중 하나는 HA 및/또는 NA의 상이한 서브타입으로 표면 당단백질을 대치하는 능력이며; 이는 이들 단백질의 새로운 항원 변이체로 제제의 업데이트를 허용할 것이다. 이들 당단백질의 항원 변이체가 동정됨에 따라, VLP는 이들 신 변이체를 포함하도록 업데이트시킬 수 있다. 따라서, 세계적인 유행능을 지닌 H1N1(1918 스페인 인플루엔자로부터) 또는 HA, NA 조합과 같은 한층 더 극심하게 위험한 표면 당단백질이 수십년간 인간에서 순환되지 않았던 방출 유전자의 관여에 관한 우려 없이 VLP 중으로 혼입될 수 있다. 이는 VLP가 감염성이 아니고, 복제하지 않으며 질병을 일으킬 수 없기 때문이다.

더욱이, VLP의 표면상으로 이종 당단백질의 혼입 가능성은 이러한 방법을 전달 시스템으로서 매력적이게 할 뿐만 아니라, 이들의 표면상으로 혼입된 표면 당단백질에 기초한 특정 세포형(트로피즘)의 표적화를 허용할 수 있다. 일 양태에서, VLP는 HA의 세포질 테일과 막횡단 도메인 및 비-인플루엔자 당단백질의 외부 도메인을 함유하며, 이는 다가 면역에 유용한 키메릭 입자의 생산을 촉진한다.

요약하면, 매트릭스 단백질 M1이 항상 발현되는 한, 단 하나 내지 4종의 바이러스 구조 단백질의 발현 뒤에 Sf9 세포의 표면으로부터 야생형 및 키메릭 인플루엔자 바이러스성 입자가 조립되고 방출될 수 있음을 보여주었다. 또한, M1과 NP가 함께 존재할 때 M1이 NP를 함유하는 소포성 입자의 방출을 추진할 수 있음도 입증되었다.

본 발명의 추가 양태에서, VLP 중으로 리보핵단백질 복합체(RNP)(3종의 폴리머라제 서브유닛, PA, PB1과 PB2, 및 핵단백질 NP 함유)의 형성과 후속 캡시드화가 달성된다. Sf9 곤충 세포에서 3종의 폴리머라제 서브유닛과 NP를 동시에 발현한 두 번째 쿼드러플 배큘로바이러스 재조합체가 생성되었다(도 14).

RNP 형성과 캡시드화를 평가하기 위하여, 안티-센스 배향으로 루시퍼라제를 암호화하는 시험관내 마이너스 센스 RNA 주형을 합성하며, 이는 인플루엔자 바이러스 NP 말단의 3′ 및 5′ 보존 및 비-암호화 영역에 의해 플랭킹된다. 시험관내 생산된 RNA로 Sf9 곤충 세포의 형질감염 및 Q28과 제 2 쿼드러플 재조합체로의 후속 동반-감염은 리포터 유전자 및 폴리머라제와 NP를 운반하는 VLP의 조립과 방출을 이끌었다. 형질감염/감염된 Sf9 세포의 농축된 상층액을 베이비 햄스터 신장 세포(BHK) 단일층으로 옮기고, 배양한 다음, 세포를 루시퍼라제 분석 용해 완충제로 붕괴시킨다. 감염세포의 용해물은 루시퍼라제 활성이 비감염 대조군 세포의 것의 70 내지 700배인 것으로 기록되었다(도 15).

마찬가지로, RNP 형성과 캡시드화를 평가하기 위하여, 안티-센스 배향으로 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 시험관내 마이너스 센스 RNA 주형이 합성되고, 인플루엔자 바이러스 NP 말단의 3′ 및 5′ 보존 및 비-암호 영역에 의해 플랭킹된다. 시험관내 생산된 RNA로 Sf9 곤충 세포의 형질감염 및 Q28과 제 2 쿼드러플 재조합체로의 후속 동반-감염은 리포터 유전자 및 폴리머라제와 NP를 운반하는 VLP의 조립과 방출을 이끌었다. 형질감염/감염된 Sf9 세포의 농축 상층액을 MDCK 세포 단일층에 옮겼을 때, GFP의 발현이 검출되었다(도 16).

이들 결과는 루시퍼라제와 GFP의 발현에 의해 증명되는 바와 같이, 배큘로바이러스-유래 입자가 1차 전사에서 기능성인 RNP를 캡시드화할 수 있음을 시사한다. 따라서, VLP는 RNP를 조립 및 패키징하고, 아울러 이종 뉴클레오타이드 서열을 혼입 및 발현시킬 수 있다. 이러한 발현된 이종 서열로는 후술되는 바와 같이, 비-인플루엔자 병원성 미생물로부터의 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함하여, 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 이종 잔기를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 이러한 발현된 이종 서열은 면역 반응을 증가 및/또는 쉬프트시키기 위한 면역 조절제를 추가로 포함한다. 이러한 면역조절제로는 IL-12(Genetics Institute, Cambridge, MA) 및 GM-CSF(Immunex Corp., Seattle, WA)이 포함되며 이에 한정되지 않는다. 추가의 발현된 이종 서열에는 표적화 및/또는 처리 잔기로 작용하는 모노클로날 항체가 포함된다.

본 발명의 VLP는 면역원 또는 약학 조성물의 조제에 사용된다. 그렇게 하기 위해서는, VLP를 적정 농도가 되게 조정하고 임의의 적당한 보조제, 희석제 또는 담체로 제형된다. 생리학적으로 허용 가능한 매질이 담체 및/또는 희석제로 사용될 수 있다. 이러한 것들로는 적당한 등장성 매질, 글리세롤, 에탄올 및 기타 통상의 용매, 포스페이트 완충 생리식염수 등이 포함되며 이에 한정되지 않는다. 적당한 보조제로는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드, MPL™ (3-O-탈아실화 모노포스포릴 지질 A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT, 현 Corixa), 529와 같은 합성 지질 A 동족체(Corixa), Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA), CpG 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오타이드와 같은 합성 폴리뉴클레오타이드(U.S. 특허 No. 6,207,646 (28)), 이.콜라이의 열-불안정성 독소, 및 콜레라 독소 (야생형 또는 돌연변이체형에서, 예를 들면, 아미노산 위치 29에서의 글루탐산이 또다른 아미노산, 바람직하게는 히스티딘으로 대치될 경우, 공개된 국제특허출원 No. WO 00/18434 (29))가 포함되며 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 일 양태에서, VLP를 포함하는 제형은 면역원 조성물로서 사용하기 위한 것이다. 바이러스는 단백질(예를 들면, 알부민, 젤라틴), 당(예를 들면, 수크로스, 락토스, 솔비톨), 아미노산(예를 들면, 나트륨 글루타메이트), 생리식염수, 또는 기타 보호제와 같은 저온보호 첨가제 또는 안정제와 혼합시킬 수 있다. 이 혼합물을 액체 상태로 유지시키고, 또는 그런 다음 수송과 보관을 위해 건조 또는 동결건조시키고 투여 직전에 물과 혼합한다.

인플루엔자 바이러스 구조 단백질만을 함유하는 VLP를 포함하는 제형은 인플루엔자 바이러스에 의한 감염에 대해 보호를 유도하기 위하여 인간 또는 다른 척추동물 피검자를 면역시키는 데 유용하다. 따라서, 본 발명은 또한, 전술한 바와 같이 생산된, 인플루엔자 바이러스 구조 단백질만을 함유하는 VLP를 혼입하는 면역원 조성물의 제형의 유효 면역량을 피검자에 투여함으로써 인플루엔자 바이러스에 의한 감염에 대해 보호를 유도하기 위하여 피검자를 면역시키는 방법도 제공한다.

하나의 서브타입으로부터의 HA 및 상이한 서브타입으로부터의 NA와 같은 인플루엔자 바이러스의 상이한 서브타입으로부터의 표면 단백질을 함유하는 VLP를 포함하는 제형은 인플루엔자 바이러스의 그들 두 서브타입에 의해 유발된 감염에 대해 척추동물을 면역시키기 위한 2가 면역원 조성물로서 희석제 또는 담체로 제형된다. 전술한 바와 같이, 항원 변이체가 동정됨에 따라 HA 및 NA 각각이 대치될 수 있다. 따라서, 업데이트된 키메릭 VLP가 본원에서 기술된 방법에 따라 용이하게 작제된다.

이와 달리, 다가 면역원 조성물은 해당하는 각각의 인플루엔자 스트레인으로부터의 VLP의 1 세트를 생산시킨 다음, 생산되는 면역원 조성물을 투여함으로써 제조된다.

본 발명의 제형은 또한 키메릭 VLP를 포함하도록, HA 또는 NA의 일부 또는 전부가 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 이종 잔기에 의해 대치되는 VLP를 포함한다. 이러한 잔기는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함하며 이에 한정되지 않는다. HA 또는 NA의 일부만을 대치시키려는 경우, HA 또는 NA를 암호화하는 재조합 DNA 분자 내 DNA 서열의 일부는 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 의해 대치된다.

전체 HA 또는 NA를 대치시키려는 경우, HA 또는 NA를 암호화하는 재조합 DNA 분자내 전체 DNA 서열이 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 의해 대치된다.

이와 달리, 인플루엔자 바이러스 (또는 NP를 암호화하는 것과 같은 인플루엔자 바이러스 세그먼트)에 의해 생산되지 않는 전술한 바와 같은 이종 잔기가 VLP 내에 혼입된다. 이는 적당한 숙주세포를: (a)각각이 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질을 암호화하는 하나 이상의 재조합 DNA 분자, (여기에서, M1을 암호화하는 재조합 DNA 분자가 항상 작제된다), 및 (b)이종 잔기 (또는 인플루엔자 바이러스 세그먼트)를 암호화하는 재조합 DNA 분자로 동반-감염, 동반-형질감염 또는 동반-형질전환시키고, 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질의 발현을 허용하는 조건하에서 숙주세포를 배양하여, VLP가 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질의 발현 후에 세포 내에서 조립되게한 다음, VLP를 배양 상층액으로부터 정제함으로써 달성된다. 이종 잔기 (또는 인플루엔자 단백질)이 VLP 안에 혼입된다.

이러한 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질이 병원성 미생물로부터 오는 경우에, 생산되는 키메릭 VLP는 그 병원성 미생물 (및 인플루엔자 바이러스)에 의해 야기된 감염에 대해 척추동물 면역을 위한 면역 조성물로서 희석제 또는 담체로 제형된다. 가장 전형적으로는, 키메릭 VLP는 비-인플루엔자 병원성 미생물로부터의 표면 항원을 포함한다.

이러한 비-인플루엔자 병원성 미생물에는 인간과 비-인간 척추동물에 감염하는 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충 미생물로부터의 것들이 포함되며 이에 한정되지 않는다. 다른 유형의 비-인플루엔자 잔기로는 암 세포 또는 종양 세포, 모노클로날 항체(예를 들면, 표적화 및/또는 치료 잔기로 사용된), 앨러지원, 아밀로이드 펩타이드 단백질, 또는 다른 거대분자 성분으로부터의 것들이 포함되며 이에 한정되지 않는다.

이러한 바이러스의 예로는 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 1-3 형, 허피스 심플렉스 바이러스, 인간 사이토메갈로바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 유두종 바이러스, 폴리오바이러스, 로타바이러스, 칼리시바이러스, 홍역 바이러스, 멈프스 바이러스, 루벨라 바이러스, 아데노바이러스, 광견병 바이러스, 개 디스템퍼 바이러스, 린더페스트 바이러스, 코로나바이러스, 파보바이러스, 감염성 비기관염 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 고양이 감염성 복막염 바이러스, 조류 감염성 점액낭병 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 마렉병 바이러스, 돼지 호흡기 및 생식기 증후군 바이러스, 말 관절염 바이러스 및 다양한 뇌염 바이러스가 포함되며 이에 한정되지 않는다.

이러한 박테리아의 예로는 헤모필루스 인플루엔자(유형 분류가 가능한 것과 불가능한 것 모두), 헤모필루스 솜누스, 모락셀라 카타랄리스, 스트렙토코커스 뉴모니애, 스트렙토코커스 피로젠스, 스트렙토코커스 아갈락티애, 스트렙토코커스 페칼리스, 헬리코박터 피롤리, 나이세리아 메닌자이티디스, 나이세리아 고노레아, 클라미디아 트라코마티스, 클라미디아 뉴모니애, 클라미디아 시타시, 보르데텔라 페르투시스, 살모넬라 티파이, 살모넬라 티피무리움, 살모넬라 콜레라수이스, 이.콜라이, 시겔라, 비브리오 콜레라, 코린박테리움 디프테리아, 마이코박테리움 튜버쿨로시스, 마이코박테리움 아비움-마이코박테리움 인트라셀룰라제 컴플렉스, 프로테우스 미라빌리스, 프로테우스 불가리스, 스태필로코커스 아우레우스, 클로스트리디움 테타니, 렙토스피라 인터로간스, 보렐리아 버그도페리, 파스퇴렐라 헤몰리티카, 파스퇴렐라 멀토시다, 액티노바실러스 플루로뉴모니애 및 마이코플라즈마 갈리셉티쿰이 포함되며 이에 한정되지 않는다.

이러한 진균의 예로는 아스퍼질러스, 블라스토마이시즈, 캔디다, 콕시디오드즈, 크립토코커스 및 히스토플라즈마가 포함되며 이에 한정되지 않는다.

이러한 기생충의 예로는 레슈마니아 메이저, 아스카리스, 트리쿠리스, 지아르디아, 시스토조마, 크립토스포리디움, 트리코모나스, 톡스플라즈마 곤디 및 뉴모시스티스 카리니가 포함되며 이에 한정되지 않는다.

이러한 암 세포 또는 종양 세포의 예로는 전립성 특이성 항원, 카시노-엠브리오닉 항원, MUC-1, Her2, CA-125 및 MAGE-3이 포함되며 이에 한정되지 않는다.

이러한 앨러지원의 예로는 본원에서 참조로 인용되는 미국 특허 No. 5,830,877(30) 및 공개된 국제특허출원 No. WO 99/51259(31)에 기재된 것들이 포함되고 이에 한정되지 않으며, 화분, 곤충 독, 동물 비듬, 진균 포자 및 약품(예를 들면, 페니실린)을 포함한다. 이러한 성분은 앨러지 반응의 알려진 원인인 IgE 항체의 생산을 방해한다.

아밀로이드 펩타이드 단백질(APP)은 알츠하이머병, 유전분증, 아밀로이도제닉 질환으로 다양하게 언급되는 질환에 연루되었다. β-아밀로이드 펩타이드(Aβ펩타이드로도 불림)는 β및 γ시크리타제 효소에 의한 APP의 가공에 의해 생성되는 APP의 42 아미노산 단편이며, 다음의 서열을 갖는다:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Try Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (서열번호 2).

일부 환자에서, 아밀로이드 침착은 집합된 Aβ펩타이드의 형태를 취한다. 놀랍게도 현재, 분리된 Aβ펩타이드의 투여가 척추동물 숙주내 아밀로이드 침착의 Aβ펩타이드 성분에 대해 면역반응을 유도함이 판명되었다(32). 이러한 Aβ펩타이드는 또한 비관련 잔기에 결합되어 있다. 따라서, 본 발명의 VLP는 인플루엔자 바이러스의 HA 또는 NA의 일부 또는 전부의 대신에 이러한 Aβ펩타이드의 발현, 및 Aβ펩타이드의 단편과 Aβ펩타이드에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함한다. Aβ펩타이드의 이러한 하나의 단편은 하기 서열을 갖는 28 아미노산 펩타이드이다(33):

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys (서열번호 3).

충분량의 전술한 면역원 조성물이 적정수의 투여용량으로 피검자에 투여되어 면역반응을 도출시킨다. 당업자는 이러한 양과 투여량을 손쉽게 결정할 수 있을 것이다. 투여는 에어로졸 분무에 의해서와 같이, 비내, 경구, 눈, 폐, 질 또는 직장 표면과 같은 점막 표면에 비내, 비경구, 경구, 또는 국소 적용되는 바와 같은 통상의 효과적인 형태에 의할 수 있다. 바람직한 투여 수단은 비내 투여에 의한 것이다.

이러한 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 또한 약학적으로 활성인 잔기일 수 있다. 이러한 잔기로는 치료 단백질, 성장 인자, 면역 조절자, 모노클로날 항체, 및 면역원 조성물과 관련하여 전술한 잔기가 포함되며 이에 한정되지 않는다. 이들 키메릭 VLP는 약학 조성물로서 전술한 희석제 또는 담체로 제형되고 척추동물을 그러한 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질로 치료하기에 효과적인 양으로 투여된다. 유효량은 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

전술한 약학 조성물은 앞서 논의된 바와 같은 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

그러한 비-인플루엔자 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 또한 수용체-리간드 연구에 유용한 수용체 또는 리간드일 수 있다. 예를 들면, 비-인플루엔자 당단백질이 특정 수용체에 표적화되는 VLP에 포함된다.

이들 면역원 또는 약학 조성물 모두에서, VLP는 척추동물 숙주에 투여될 때 면역반응을 유도할 수 있지만, VLP는 유전 물질을 함유하지 않으며 척추동물 피검자에서 복제할 수 없기 때문에 병증을 일으킬 수 없다.

본원에서 인용된 모든 특허와 간행물은 본원에서 참조로 인용된다.

본 발명이 더 잘 이해될 수 있도록, 하기 실시예가 기술된다. 실시예는 단지 설명을 위한 것에 불과하며 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

실시예

실시예 1

배큘로바이러스 전달 벡터 pAcAB4 중으로 인플루엔자 M2 유전자의 클로닝

M1 mRNA의 스플라이싱 산물인 인플루엔자 M2 유전자는 인플루엔자 A/Udorn/72 (H3N2) 스트레인으로 감염시킨 MDCK 세포로부터 추출된 폴리아데닐화 mRNA로부터 RT-PCR에 의해 분리된다. M2 유전자는 pGemT 벡터(Promega) 중으로 DNA 삽입체로서 클로닝되고 염료 종결 서열분석 반응과 자동 ABI 377 DNA 서열분석기(Applied Biosystems)를 사용하여 특이적 프라이머로 서열분석한다.

M2 유전자는 EagI 제한효소로의 분해에 의해 pGemT-M2 플라스미드로부터 방출되고 pAcAB4(PharMingen) 배큘로바이러스 전달 벡터 중으로의 클로닝을 위해 제조된다. M2-DNA 단편을 DNA 폴리머라제(클레나우 단편)으로 충진하고 BglII 링커를 T4 DNA 리가제로 연결에 의해 말단에 혼입시킨다. 모든 효소와 링커는 New England Biolabs (NEB)로부터 입수되었다. 이어서, 전달 벡터 pAcAB4를 BglII로 분해하고 송아지 장 알칼리성 포스파타제(CIP)로 처리한다. 이어서, M2 삽입체를 겔 정제하고(Qiagen) 3:1 비로 전달 벡터 중으로 연결시킨다. 양성 클론을 제한 분석에 의해 선별하고 플라스미드 DNA를 Qiagen 플라스미드 정제 키트를 사용하여 100 ml 이.콜라이 배양액으로부터 제조한다. 이 작제물은 pAcAB4/M2로 명명한다.

실시예 2

중간(" 셔틀") 벡터의 작제

전달 벡터 pAcAB4 중으로 인플루엔자 유전자를 클로닝하기 위한 편리한 제한 부위의 수에 있어 제한이 따르므로, PCR에 의해 첨가되는 새로운 제한 부위에 의해 플랭킹된 3 배큘로바이러스 프로모터(두 폴리헤드린 및 하나의 p10)를 운반하는 셔틀 클로닝 벡터가 생성된다. 이러한 셔틀 벡터는 다음과 같이 작제된다: pAcAB4M2(실시예 1로부터)를 SmaI으로 분해하고 두 샘플로 분할한다. 하나의 pAcAB4/M2-SmaI 샘플을 XbaI으로 분해하며, 이렇게 하여 400 뉴클레오타이드 길이의 DNA 단편이 방출된다. 이 DNA를 겔 정제하고 두 프라이머로 PCR에 의해 증폭시키며, 이중 하나는 최종 산물 PmeI(이탤릭체) 및 NotI(밑줄) 부위의 1 말단에 혼입된다.:

5′ GTTTAAACGCGGCCGCCGTATTTATAGGTTTTTTTATTA 3′ (서열번호 4)

5′ TTTTATTACTAGTCCCGGGGATCTGTGATTGTAAAT 3′ (서열번호 5)

다른 pAcAB4/M2-SmaI 샘플을 BamHI로 분해하고, 방출된 SmaI/BamHI DNA 단편을 겔 정제하며 아울러 두 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시키며, 이중 하나는 최종 PCR 산물 SacI(이탤릭체) 및 NheI(밑줄) 부위 중으로 혼입된다:

5′ AAGAGCTCGCTAGCGTATTTATAGGTTTTTTTATTA 3′ (서열번호 6)

5′ ACAATCACAGATCCCCGGGACTAGTAATAAAACCTAGA 3′ (서열번호 7)

비변형 말단에서 중첩되는 이들 두 PCR 산물은 새로 혼입된 제한효소 부위에 특이적인 두 외부 프라이머와 또다른 PCR 반응에 사용된다:

5′ GTTTAAACGCGGCCGCCG 3′ (서열번호 8)

5′ AAGAGCTCGCTAGCGTA 3′ (서열번호 9)

이어서 이러한 PCR DNA를 SacI/PmeI로 분해시킨다. pNEB193 플라스미드 (Promega)를 또한 SacI/PmeI로 분해하고 T4 리가제를 사용하여 분해된 PCR DNA와 연결시킨다. 최종적으로, 이 생성된 pNEB193 셔틀 벡터는 인플루엔자 유전자 HA, NA, 및 M1의 후속 클로닝에 사용되는 새로운 제한 부위에 의해 플랭킹되는 두 폴리헤드린 프로모터와 하나의 p10 프로모터를 함유하는 DNA 단편을 운반한다.

실시예 3

셔틀 벡터 중으로 인플루엔자 HA, NA 및 M1 유전자의 클로닝

인플루엔자 유전자 HA, NA, 및 매트릭스 (M1)를 인플루엔자 바이러스 A/Udorn/72 (H3N2)의 정제된 게놈 RNA로부터 RT-PCR에 의해 회수된다. 세 유전자 모두를 DNA 삽입체로서 pGemT 또는 pGemTeasy 벡터(Promega) 중으로 클로닝한 다음 염료 종결 서열분석 반응과 자동 ABI 377 DNA 서열분석기를 사용하여 특이적 프라이머로 서열분석한다. M1 유전자의 5′ 말단에서 두 공여자 스플라이스 부위는 Stratagene으로부터의 QuikChange Kit(pGT-M1 스플라이스)를 사용하여 돌연변이시켜 숙주세포내 M1 mRNA의 잠재적 스플라이싱을 방지한다.

이들 세 유전자를 3 단계로 셔틀 벡터에 클로닝시킨다:

1) M1 유전자의 클로닝:

pGemT/M1 (스플라이스) 플라스미드(M1 유전자를 운반하는 pGemT)를 각각 NheI 및 SacI 부위를 증폭된 DNA에 도입한 5′ 및 3′ 프라이머와 PCR 반응에 주형으로 사용된다. 이 PCR DNA를 이어서 NheI/Sac로 분해한 다음 겔 정제한다. 마찬가지로, pNEB193 셔틀 벡터를 NheI/SacI로 분해하고 정제한다. 셔틀 벡터와 삽입체(M1 PCR)를 연결시키고 형질감염에 이어서 이.콜라이에서 증폭시킨다. M1 유전자를 BigDye (Perkin Elmer)를 사용하여 서열분석한다. M1 유전자는 폴리헤드린 프로모터로부터 다운스트림에 위치하였다. 생성되는 플라스미드를 pNEB193M1으로 명명한다.

2) HA 유전자의 클로닝:

pGemT/HA 플라스미드(HA 유전자를 운반하는 pGemT)를 SacII로 분해시키고 충진한다. NotI 링커를 분해된 DNA상에 연결시킨다. 이어서, DNA를 NotI로 분해시켜 HA 삽입체가 방출되고 각각의 말단에 NotI 부위를 갖게 한다. 플라스미드 pNEB193M1을 NotI로 분해하고, 송아지 장 포스파타제(CIP)로 처리한 다음 HA 삽입체를 T4 DNA 리가제(지시적인 것은 아님)로 연결시킨다. PCR을 이용하여 폴리헤드린 프로모터의 전사 조절하에 있는 HA 유전자의 배향을 결정한다. 생성되는 플라스미드를 pNEB193M1/HA로 명명한다.

3) NA 유전자의 클로닝:

플라스미드 pGemT/NA3B (NA 유전자를 운반하는 pGemT)를 먼저 SacII로 분해하고 T4 DNA 폴리머라제로 말단 충진시킨다. 계속해서, SpeI로 분해시켜 NA 유전자를 방출시킨 다음 클레나우로 충진하고, NA 삽입체를 평활말단 연결시킨다. 이어서, pNEB193M1/HA를 SamI으로 분해하고, NA 삽입체를 평활말단 연결시킨다. PCR을 이용하여 정확한 배향으로 NA 유전자를 운반한 클론을 동정하였다. NA 유전자는 p10 프로모터로부터 다운스트림에 위치하였다. 생성되는 플라스미드를 pNEB193M1/HA/NA로 명명하였다.

실시예 4

인플루엔자 유전자 M2, M1, HA 및 NA를 함유하는 전달 벡터의 작제

실시예 3에 기재된 공정의 완료 후에, pNEB193M1/HA/NA 셔틀 벡터는 배큘로바이러스 프로모터의 전사 조절 조절하에 위치한 M1, HA, 및 NA 유전자를 함유한다. 이러한 세 유전자를 DNA의 단일 피스로 방출시키기 위하여, 셔틀 벡터를 PmeI/SacI로 분해시켰다. 이 DNA 단편을 하기와 같이 변형시킨, 실시예 1로부터의 pAcAB4M2(이미 M2 유전자 함유) 중으로 연결시킨다: 새로운 제한 부위를 pAcAB4/M2 중으로 도입시켜 셔틀 벡터로부터의 이들 세 유전자를 함유하는 DNA 단편의 클로닝을 촉진시킨다. 이어서, 이러한 pAcAB4/M2 플라스미드를 XbaI로 정제하고, DNA 폴리머라제(클레나우 단편)로 말단 충진한 다음 PmeI 링커를 T4 DNA 리가제와 첨가한다. 이어서, 이 DNA를 PmeI로 분해하고 재정렬시켜 PmeI 부위를 재생시킨다. 마찬가지로, 재연결된 플라스미드를 BamHI로 분해하고, DNA 폴리머라제(클레나우)로 충진한 다음 SacI 링커를 T4 리가제로 부착시킨다. SacI로의 후속 분해 및 연결은 SacI 부위를 복구시켰다. 생성되는 pAcAB4/M2 벡터는 두 새로운 부위, PmeI 및 SacI를 갖는다. PmeI/SacI으로의 분해 및 겔 정제에 의해 부가적인 인플루엔자 유전자의 삽입을 위한 벡터를 제조한다. 모든 접합점을 서열분석하여 pNEB193 클로닝 동안에 어떠한 돌연변이도 도입되지 않았음을 확인한다. 생성되는 작제물을 HA/Q (도 1 참조)로 명명하고, 이는 네 인플루엔자 유전자를 운반하는 전달 벡터(pAcAB4/M2/M1/HA/NA)이다.

실시예 5

키메릭 전달 벡터의 생성

G 유전자의 3′ 및 5′ 말단에 대한 특이적 프라이머(5′ AACAGAGATCGATCTGT 3′ (서열번호 10) 및 5′ CATAAAAATTAAAAATTAAAATATAATTAAGG 3′ (서열번호 11))로 바이러스 RNA의 RT-PCR에 의해 VSV로부터 VSV G 단백질에 대한 암호화 서열을 회수한 다음 pGemT 플라스미드 (Promega) 중으로 클로닝시킨다. 생성되는 pGemT-VSV 클론을 SacII로 분해하고 T4 DNA 폴리머라제로 평활말단으로 만든다. 이어서, 이를 SpeI로 분해하고 클레나우로 말단 충진한다. NotI 링커를 T4 리가제와 가한 다음 NotI로 재분해시킨다. 계속해서, VSV G 암호화 서열을 HA 유전자 제거를 위해 NotI로 분해시킨 Q28 벡터 중으로 연결시킨다. 유전자의 배향을 PCR과 서열분석에 의해 확인한다. 이 작제물을 전달 벡터 VSV-G로 명명한다.

대안의 양태에서, VSV G 유전자의 일부만을 삽입시킨다. HA의 막횡단(29 아미노산) 및 세포질(14 아미노산) 도메인과 프레임에서 융합된 G 단백질의 엑토도메인을 함유하는 키메릭 유전자(도 2 참조)를 다음과 같이 PCR에 의해 생성시킨다: 인플루엔자 HA 유전자의 막횡단 도메인과 세포질 테일을 PCR에 의해 pGemT-HA 클론으로부터 증폭시키고 겔 정제한다. VSV G 유전자의 엑토도메인도 PCR에 의해 증폭시키고 겔 정제한다. 이들 DNA 단편 둘 모두를 VSV G 유전자의 5′ 말단 및 HA 유전자의 3′ 말단에 상응하는 프라이머를 사용하여 Pfu DNA 폴리머라제(Stratagene, La Jolla, CA)로의 PCR 반응에 주형으로 사용한다. 1620 bp DNA 단편을 겔 정제하고 NotI 링커를 T4 리가제와 가한 다음, NotI로 분해시킨다. 이 삽입체를 HA 유전자를 제거하기 위해 NotI로 분해시킨 HA/Q 벡터 중으로 연결시킨다. 생성되는 작제물은 전달 벡터 VSV-G/HA (키메라)를 생성하였다.

실시예 6

곤충 세포에서 쿼드러플 배큘로바이러스 재조합체의 형질감염

Sf9 세포(ATCC CRL 1711)를 디쉬당 2 x 10 ^{6} 세포의 밀도로 60 mm 디쉬상에 시딩한다. 대략 2 μg의 HA/Q 전달 벡터를 0.5 μg의 선형화된 BaculoGold DNA(PharMingen)와 혼합하고 Sf9 세포를 BaculoGold 형질감염 키트(Pharmingen)를 사용하여 DNA로 형질감염시킨다. 재조합체 배큘로바이러스를 선별하고 3 라운드의 플라크 정제에 의해 정제시킨다. 하나의 이러한 플라크 정제 재조합체를 HA/Q28로 명명하고 추가 연구를 위해 선별한다.

또한, 완전한 길이 VSV-G 또는 VSV-G/HA를 운반하는 쿼드러플 전달 벡터 DNA(키메라)를 전술한 바와 같이 Sf9 세포 중으로 선형화된 BaculoGold DNA로 형질감염시켜 재조합체 VSV-G/Q 및 VSV-G/HA/Q를 생성시킨다. 재조합체 바이러스를 전술한 바와 같이 HA/Q28에 대해 선별한다. 모든 재조합체는 Sf9 세포에서 7 x 10 ^{7} pfu/ml의 역가로 증폭된다.

실시예 7

Sf9 곤충 세포의 생장 및 배큘로바이러스 재조합체로의 감염

모든 Sf9 세포 배양액을 무혈청 배지내 현탁액으로 생장시킨다. 배큘로바이러스 재조합체로의 감염은 5의 감염 중복도(MOI)로 수행된다. 재조합체 바이러스를 세포 단일층에 작은 부피로 접종하고, 실온에서 30분간 흡착시킨 다음, 무혈청 신선 배지 첨가 후에 28℃에서 배양시킨다. 달리 명시하지 않는 한, 세포 및 배양 배지를 72시간 감염 후 수집하고, 단백질 발현 및 VLP 형성의 후속 분석에 사용한다.

실시예 8

전달 벡터 pBlueBac4.5 중으로 단일 인플루엔자 유전자의 클로닝 및 단일 배큘로바이러스 재조합체의 생성

인플루엔자 A/Udorn의 M1 유전자를 pGemt에 사전에 클로닝시킨다(pGT-M1 스플라이스, 상기 실시예 1 참조). M1 유전자를 서브클로닝하기 위해, pGT-M1을 SacII로 분해하고, T4 DNA 폴리머라제로 평활 말단으로 만든 다음, SacI 링커를 T4 리가제와 말단에 가한다. 이어서, 플라스미드를 SacI/Sa1I으로 분해하고 방출된 M1을 겔 정제한다. 삽입체를 SacI/SalI으로 분해시킨 pBlueBac4.5 (Invitrogen) 중으로 연결하고, DH5α 세포를 연결 믹스로 형질전환시킨다.

HA 유전자를 pBlueBac4.5 중으로 서브클로닝하기 위해, pGemT/HA(상기 실시예 3 참조)를 SacII로 분해하고 T4 DNA 폴리머라제로 평활 말단으로 만든다. 이어서, DNA를 SalI로 재분해시켜 삽입체를 제거하고 겔 정제한다. HA 삽입체를 NheI(평활)/SalI-분해 pBlueBac4.5 중으로 연결시키고, STBL2 컴피턴트 이.콜라이 세포를 연결 믹스로 형질전환시킨다.

pGemT-NA(상기 실시예 3 참조)를 SacII로 분해시키고 T4 DNA 폴리머라제로 평활 말단으로 만든다. 이어서, 이 DNA를 SpeI로 분해하고 겔 정제한다. 삽입체를 NheI/SmaI로 분해시킨 pBlueBac4.5 벡터 중으로 연결시키고, STBL2 컴피턴트 이.콜라이 세포를 형질전환시킨다.

전달 벡터 DNA가 서열분석에 의해 정확한 것으로 밝혀졌을 때, Sf9 세포를 5 μg의 각 pBlueBac 클론 및 10 μg의 Bac & Blue DNA(Invitrogen)로 형질감염시킨다. Sf9 세포를 리포솜-매개 형질감염에 의해 이들 DNA로 동반 형질감염시킨다. 세포를 5일간 배양하고 상층액을 플라크 정제한다. 단일 청색 플라크를 생장시키고 Sf9 세포에서 증폭시킨 다음 단백질 발현을 웨스턴 블롯에 의해 평가한다. 이 작업에 사용된 NP 배큘로바이러스 재조합체(인플루엔자 NP 유전자 함유)는 Galarza 등(27)에 의해 기재된 바와 같이 작제한다.

실시예 9

면역블로팅 분석

웨스턴 블롯 분석을 이용하여 감염된 Sf9 세포, 농축 상층액 및 구배 분획에서 단백질을 동정한다. 샘플을 10% SDS-PAGE 겔(달리 명시하지 않는 한)에서 분할 하고 니트로셀룰로스 막에 옮긴다. 블롯을 5% 무지방 분유 및 0.1% Tween-20을 함유하는 TBS(트리스-완충 생리식염수)의 용액에서 블로킹시키고, 계속해서 인플루엔자 HA, M1 (매트릭스) 및 M2 단백질에 대한 모노클로날 항체의 혼합물로 탐침한다. 마우스 모노클로날 안티-HA (클론 12CA5)를 Roche Molecular Biochemicals(Indianapolis, IN)로부터 입수한다. 마우스 모노클로날 안티-M1(클론 GA2B)를 Serotec(Raleigh, NC)로부터 입수한다. 마우스 모노클로날 안티-M2는 Mt. Sinai Hybridoma Center(New York, NY)로부터 입수한다. 항원은 알칼라인 포스파타제-접합된 안티-마우스 IgG 2차 항체(Promega)로 웨스턴 블롯상에서 가시화시킨다. 단일 유전자 배큘로바이러스 재조합체의 단일, 이중 또는 삼중 조합으로 감염된 Sf9 세포에서의 VLP 형성의 분석을 유사한 방식으로 수행한다. VSV G 단백질을 함유하는 샘플의 분석을 인플루엔자 M1 및 M2 단백질에 대한 항체와 병용하여 마우스 모노클로날 안티-G 항체(클론 P5D4; Roche Molecular Biochemicals)로 탐침한다. 결과를 도 3에 나타내었다.

실시예 10

감염된 Sf9 세포의 면역형광

Sf9 세포를 8 스퀘어-챔버에서 생장시키고(박스 배양액) 1의 MOI로 쿼드러플 또는 단일 유전자 배큘로바이러스 재조합체로 감염시킨다. 72시간 후-감염에서, Sf9 세포의 개개 박스를 메탄올/아세톤 (2:1) 또는 3% 파라포름알데하이드에서 고정시킨다. 블로킹 단계로서, 고정 세포를 3% 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 포스페이트-완충 생리식염수(PBS) 중 실온에서 30분간 배양한다. 계속해서, 각각의 슬라이드를 1차 또는 2차 항체의 용액과 순차적으로 배양한다. 래트 안티-HA(Roche Molecular Biochemicals)/마우스 안티-M1 모노클로날(실시예 9 참조) 항체(1차로서, 희석 1:100)의 조합 및 염소 안티-래트 로다민 접합 (Molecular Probes)/양 안티-마우스 FITG 접합(Sigma) 항체(2차로서)의 조합을 이용하여 HA 및 M1의 발현을 검사한다. 래트 모노클로날 안티-HA/토끼 안티-NA 펩타이드(Research Genetics에 의해 주문 생산된)(1차로서, 희석 1:100)의 조합 및 염소 안티-래트 로다민 접합(Molecular Probes)/양 안티-토끼 FITC 접합(Sigma) 항체(2차로서)의 조합을 이용하여 NA 및 HA의 발현을 검사한다. 로다민의 대용으로서, Cy3-접합 염소 안티-래트(Sigma) 항체가 사용될 수 있다. 각각의 항체 반응이 실온에서 30분간 인큐베이트되고, 단계 간에는, 슬라이드를 PBS로 3회 세정한다. 495 nm 및 552 nm의 파장에서 여기되었을 때 FITC 및 로다민 분자가 각각 녹색광과 적색광을 발하였다. 면역형광 분석의 결과를 도 4 내지 7에 나타내었다.

실시예 11

인플루엔자 VLP의 정제

Sf9 세포를 150 cm^3 조직 배양 플라스크당 7.5 x 10^7 세포의 밀도로 시딩하고 실온에서 30분간 침강시킨다. 세포를 배큘로바이러스 재조합체(HA/Q28, VSV-G/Q, VSV-G/HA/Q 키메라 또는 단일 재조합체)로 5의 MOI로 감염시키고 감염을 28℃에서 72시간 동안 진행하도록 허용한다. 완료되었을 때, 배양 배지를 수거하여 저속 원심분리시킨다(4℃ 및 2000 x g에서 30분간). 이어서, 상층액을 90분간 200000 x g에서 스피닝에 의해 펠릿화한다. 초기에 감염된 세포의 수에 따라, 생성되는 펠릿을 50 μℓ 또는 500 μℓ의 1X PBS에 재현탁시키고, 단기의 초음파처리로 균질화한 다음 아이오딕사놀(Optiprep, Nycomed/Sigma) 구배(1.08 g/ml 내지 1.32 g/ml의 밀도)의 상부에 로딩한다. 구배를 200000 x g로 3.5시간 동안 스피닝하고 분획을 U자형 마이크로-모세관을 이용하여 튜브의 바닥으로부터 중력에 의해 수집한다. 이들 분획의 분취량을 SDS-PAGE 후에 웨스턴 블롯에 의해 분석한다. 웨스턴 블롯을 도 8과 9에 나타내었다. 입자를 추가 정제하기 위하여, VLP를 함유하는 분획을 제 2 수크로스 구배 원심분리한다. 수크로스 평형 구배 원심분리를 위해, 사전에 선택된 분획을 PBS로 투석하고 20-60% (wt/wt) 수크로스(NTE 중)상에 층을 형성시킨 다음 4℃ 및 150000 X g에서 22시간 동안 원심분리시킨다. 원심분리 후, 전술한 바와 같이 0.5 ml 분획을 튜브 바닥으로부터 수집하고, SDS-PAGE 후에 웨스턴 블롯에 의해 분석한다.

이어서, VLP를 함유하는 분획을 전자현미경 및 임뮤노골드 라벨링(실시예 12 참조)으로 검사한다.

실시예 12

전자현미경: 네거티브 염색 및 임뮤노골드 라벨링

네거티브 염색 및 임뮤노골드 라벨링을 위해, VLP를 배양 상층액으로부터 농축시키고 두 연속 밀도 구배 원심분리에 의해 정제한다(실시예 11 참조). 샘플의 분취량을 신선한 백열 방출 플라스틱/탄소-코팅 그리드상에 배치하고, 증류수 몇 방울로 부드럽게 세척하며, 2% 나트륨 포스포텅스테이트, pH 6.5로 네거티브 염색한 다음, 전자현미경으로 본다. 네거티브 염색된 인플루엔자 VLP의 전자현미경 사진을 도 10에 나타내었다.

VLP를 장식하는 표면 항원의 임뮤노골드 라벨링용 샘플을 0.5% 글루타르알데하이드에 5분간 미리 고정시키고, 전술한 바와 같이 그리드상에 배치한 다음 증류수 몇 방울로 세척한다. 계속해서, 이들을 하기 용액 100 μℓ 부피의 상부에 순차적으로 훼이스다운 배양한다: PBS-1% BSA에 30분간 희석된 1차 항체; 각각 5분간 PBS-1% BSA로 3회; 30분간 PBS-1% BSA에 희석된(1:10) 마우스 IgG에 대한 항체로 코팅된 골드 스피어의 현탁액; 각각 5분간 PBS-1% BSA로 3회. 최종적으로, 이들을 증류수 몇 방울로 세척하고, 2% 우라닐 아세테이트로 염색하며, 공기 건조시킨 다음 전자현미경에서 검사한다.

안티-HA 또는 안티-NA 모노클로날 항체로 탐침되고 안티-마우스 IgG에 커플링된 골드 스피어로 카운터 염색한 임뮤노골드 라벨링된 인플루엔자 VLP의 전자현미경 사진을 도 11에 나타내었다.

실시예 13

VLP 중으로 인플루엔자 핵단백질(NP)의 혼입

Sf9 세포를 HA/Q28와 NP 또는 NP와 M1 단일 배큘로바이러스 재조합체로 동반 감염시킨다. 동반 감염 세포의 농축 상층액을 실시예 11에 따라 정제한다. 이들 동반 감염 세포에 의해 발현된 바와 같이 HA와 NP 모두를 함유하는 분획의 웨스턴 블롯을 도 9b에 나타내었다. 이들 동반 감염 세포에 의해 발현된 바와 같이 NP와 M1을 함유하는 분획의 웨스턴 블롯을 도 8c에 나타내었다.

실시예 14

마우스에서 VLP의 면역원성

Balb/c 마우스(4-5주령)의 두 그룹을 HA/Q28 VLP(대략 1 μg HA) 또는 VSV-G/Q VLP(대략 1 μg G)로 근육내 경로를 통해 면역시키며, 여기에서 VLP의 각 세트는 알루미늄 포스페이트(200 μg/투여량)로 조제된다. 각 그룹의 모든 마우스는 2주 간격으로 프라이머 및 두 부스터 주사를 맞는다. 최종 면역 2주 후, 혈액 샘플을 수득하고 상응하는 항원에 대한 항체의 존재를 웨스턴 블롯(VLP의 두 유형 모두에 대해), 혈구응집반응 분석의 억제(IHA)(HA/Q28에 대해) 및 혈청 중화 시험(VSV-G/Q에 대해)에 의해 평가한다. 웨스턴 블롯을 도 12(HA/Q28에 대해) 및 도 13(VSV-G/Q에 대해)에 나타내었다. IHA 역가를 IHA 단위(IHAU)로 측정하며 다음과 같다:

나이브 마우스: 32 IHAU*

양성 대조군: 128 IHAU

[인플루엔자 A/홍콩]

HA/Q28 풀링 혈청: 96 IHAU

*나이브 마우스는 비-특이성 아글루티닌에 기인할 수 있는, 억제 역가를 보여주었다. 모든 샘플은 카올린 처리되고 비-특이성 억제자 및/또는 비-특이성 아글루티닌을 불활성화시키기 위한 일환으로 30분간 56℃에서 가열시킨다.

혈청 중화 시험의 경우, 세포 단일층에서 플라크 형성의 방지에 의해 보이는 바와 같이, VSV-G/Q로 면역시킨 마우스 혈청의 증가하는 희석액을 VSV를 함유하는 세포 단일층 위에 배치하고, 배양하여 바이러스 억제능에 대해 분석한다. 혈청의 1/64 정도로 높은 희석액은 VSV의 표준 역가(1×10^{6} PFU/ml)를 완전히 중화시켰다.

실시예 15

인플루엔자 VLP 중으로 리보핵단백질 복합체(RNP)의 패키징 및 리포터 유전자의 발현

폴리머라제 (서브유닛 PB1, PB2 및 PA) 및 NP 배큘로바이러스 작제물 (쿼드러플 전달 벡터 재조합체)

폴리머라제의 서브유닛(PB1, PB2, 및 PA 단백질)을 암호화하는 세 유전자 및 인플루엔자 바이러스 A/Udorn/72 (H3N2) 스트레인의 핵단백질 NP를 단일 배큘로바이러스 전달 벡터 PAcAB4 중으로 서브클로닝시킨다. PB1 및 PA 유전자는 배큘로바이러스 폴리헤드린 프로모터의 전사 조절하에 반대 배향으로 위치되어 있으며, 반면에 PB2 및 NP 유전자 또한 반대 배향으로, 배큘로바이러스 p10 프로모터의 전사 조절하에 있다. 폴리머라제 유전자와 NP, 및 선형화된-게놈 배큘로바이러스 DNA를 운반하는, 정제된 전달 벡터 DNA로 Sf9 곤충 세포의 동반 형질감염은 상동 재조합을 허용한다. 이렇게 하여 배큘로바이러스 DNA 중으로 폴리머라제 및 NP 유전자의 전달이 이루어진다. 이러한 세포내 재조합 사건은 배양 배지 중으로 방출된 쿼드러플-배큘로바이러스 재조합체(도 14)를 생성시켰다. 세 번의 연속적인 플라크 정제/증폭 단계를 수행하여 쿼드러플 배큘로바이러스 전달 벡터 재조합체를 선별한다. 유전자 특이성 프라이머를 사용하는 PCR을 수행하여 정제된 쿼드러플 재조합체내 네 유전자의 존재를 확인한다. 안티-PB1, 안티-PB2, 안티-PA 및 안티-NP 특이성 폴리클로날 항체로의 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 세 폴리머라제 서브유닛 및 NP의 발현을 평가한다(데이터 나타내지 않았음).

리포터 유전자 작제물

인플루엔자 바이러스의 보존된 3′ 및 5′ 말단에 의해 플랭킹된 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자의 루시퍼라제를 함유한 DNA 플라스미드를 생성시켰다. 이들 서열은 야생형 바이러스 감염에서 인플루엔자 게놈의 전사/복제와 패키징에 요구된다. 보존된 서열 외에도, 정확한 3′ 및 5′ 말단이 기능성 게놈에 필수이다. 이들 정확한 말단을 수득하기 위하여, 변성된 T7 프로모터를 인플루엔자 서열의 5′ 말단에 가하고; 이후, R7 RNA 폴리머라제로의 전사는 RNA 전사체내에 정확한 인플루엔자 5′ 말단을 생성하였다. 또한, BsaI 제한 부위를 인플루엔자 서열의 3′ 말단에서 공학처리한다. 이러한 제한 효소로의 플라스미드 분해는 5′ 오버행(overhang)이 있는 DNA 주형을 생성하며, 이는 런-오프(run-off) T7 RNA 폴리머라제 전사 반응에서, 정확한 인플루엔자 3′ 말단이 있는 RNA 분자를 생성한다. 이어서, 이들 모델 인플루엔자 리포터 유전자를 이용하여 폴리머라제 활성, RNA 캡시드화, 및 인플루엔자 바이러스성 입자 중으로 RNA의 패키징을 검토한다.

루시퍼라제 리포터 유전자의 VLP 패키징

Sf9 곤충 세포를 Q28 (HA, NA, M1, M2), 및 쿼드러플 전달 (PB1, PB2, PA, NP) 벡터 배큘로바이러스 재조합체로 동시 감염시킨다(MOI: 5). 감염은 48시간 동안 진행되게 하고 그 시간에서, 인플루엔자 게놈의 3′ 및 5′ 말단 서열에 의해 플랭킹된 역 배향으로 루시퍼라제 유전자를 함유하는 30 μg의 시험관내 합성된 RNA를 LT1 형질감염 시약(Panvera, Madison, WI)을 사용하여 Sf9 세포 중으로 형질감염시킨다. 감염/형질감염된 세포를 추가로 24시간 동안 배양

한다. 이어서, 배양 상등액을 수거하고, 저속 원심분리로 청징화한 다음, VLP를 2시간 동안 2000 x g에서 원심분리로 농축시킨다. VLP를 배양 배지에 재현탁시키고 베이비 햄스터 신장 세포(BHK)의 새로운 단일층에 적용한다. 배양 48시간 후, BHK 세포를 루시퍼라제 분석 용해 완충제로 붕해시키고, 루시퍼라제 활성을 세포 추출물에서 측정한다. 백그라운드 루시퍼라제 활성을 루미노미터를 이용하여 비-감염 BHK 세포(대조군)에서 측정하고 판독치는 50 내지 500 상대 광 단위(RLU) 범위이다. VLP-감염 BHK 세포의 용해물은 36,000 RLU의 루시퍼라제 활성 판독치를 기록하였다(도 15).

녹색 형광 단백질(GFP) 리포터 유전자의 VLP 패키징

VLP 중으로 RNP의 유사한 패키징 실험을 리포터로서 녹색 형광 단백질 유전자(GFP)를 사용하여 수행한다. Sf9 곤충 세포를 전술한 파라미터에 따라 감염/형질감염시킨다. 인플루엔자 바이러스 RNA의 3′ 및 5′ 말단에 의해 플랭킹된 안티-센스 배향으로 GFP에 대한 암호화 서열을 함유한 형질감염된 RNA 분자를 작제한다. BHK 세포 및 MDCK 세포를 VLP로 24시간 동안 감염시키고 이어서 GFP의 발현을 Zeiss 현미경과 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC) 필터를 사용하여 모니터링한다. 소량의 녹색 세포가 존재하며, 이는 VLP가 GFP 유전자를 전달할 수 있고, 이에 따라 녹색 형광 단백질이 발현됨을 암시한다(도 16).

참고문헌

1. Lamb, R.A., pages 1-87 of The Influenza Viruses, R.M. Krug, ed. (Plenum Press, 1989).
2. Lamb, R.A., et al., Cell, 40, 627-633 (1985).
3. Martin, K., and Helenius, A., Cell, 67, 117-130 (1991).
4. Shapiro, G.I., et al., J. Virology, 61, 764-773 (1987).
5. Garoff, H., et al., Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 1171-1190 (1998).
6. Nayak, D.P., ASM News, 62, 411-414 (1996).
7. Justice, P.A., et al., J. Virol., 69, 3156-3160 (1995).
8. Li, Y., et al., J. Virol., 67, 4415-4420 (1993).
9. Mebatsion, T., et al., Cell, 84, 941-951 (1996).
10. Coronel, E.C., et al., J. Virol., 73, 7035-7038 (1999).
11. Zhao, H., et al., J. Gen. Virol., 79, 2435-2446 (1998).
12. Jin, H.,. EMBO J., 13, 5504-5515 (1994).
13. Jin, H., et al.,. EMBO J., 16, 1236-1247 (1997).
14. Zhang, J., et al., J. Virology, 74, 4634-4644 (2000).
15. Ruigrok, R.W.H., et al., Virology, 267, 289-298 (2000).
16. Roberts, P.C., et al., Virology, 240, 127-137 (1998).
17. U.S. Patent Number 5,298,244.

18. Kirnbauer, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 12180-12184 (1992).
19. Loudon, P.T., and Roy, P., Virology, 180, 798-802 (1991).
20. Rose, R.C., et al., J. Virology, 67, 1936-1944 (1993).
21. Zeng, C.Q.-Y., et al., J. Virology, 70, 2736-2742 (1996).
22. Gheysen, D., et al., Cell, 59,103-112 (1989).
23. Nermut, M.V., et al., Virology, 198, 288-296 (1994).
24. Takahashi, H., et al., Virology. 256:371-380 (1999).
25. Yamshchikov, G.V., et al., Virology, 214, 50-58 (1995).
26. Ford, T., et al., Analytical Biochem., 220, 360-366 (1994).
27. Galarza, J.M., et al., Virus Res., 24, 91-106 (1992).
28. U.S. Patent Number 6,207,646.
29. Published International Patent Application Number WO 00/18434.
30. U.S. Patent Number 5,830,877.
31. Published International Patent Application Number WO 99/51259.
32. Published International Patent Application Number WO 99/27944.
33. U.S. Patent Number 4,666,829.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(i) 각각이 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질을 암호화하는 하나 이상의 재조합 DNA 분자를 작제하고 (여기에서, 매트릭스 단백질 (M1)을 암호화하는 재조합 DNA 분자가 항상 작제된다);

(ii) 적당한 숙주세포를 하나 이상의 재조합 DNA 분자로 형질감염, 감염 또는 형질전환시키고, 숙주세포를 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질의 발현을 허용하는 조건하에서 배양하여, VLP가 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질의 발현 후에 세포내에서 조립되게한 다음;

(iii) 배양 상층액으로부터 VLP를 정제하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스성 입자(VLP)의 제조방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, VLP가 M1+ 헤마글루티닌(HA), 뉴라미니다제(NA) 및 M2로 이루어진 그룹 중에서 선택된 인플루엔자 구조 단백질 중 적어도 하나를 포함하는 방법.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, HA 및 NA가 인플루엔자 바이러스의 상이한 서브타입으로부터 오는 방법.

청구항 4.

제 2 항에 있어서, HA 또는 NA를 암호화하는 재조합 DNA 분자내 DNA 서열의 일부 또는 전부가 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 잔기를 암호화하는 DNA 서열에 의해 대치되어, 키메릭 VLP를 생성하는 방법.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, HA를 암호화하는 재조합 DNA 분자내 DNA 서열이 소수포성 구내염 바이러스(VSV)의 G 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 의해 대치되는 방법.

청구항 6.

제 4 항에 있어서, 하나의 재조합 DNA 분자내 DNA 서열이 HA의 막횡단 및 세포질 도메인을 암호화하되, HA의 나머지 암호화 영역이 VSV의 G 단백질의 엑토도메인을 암호화하는 DNA 서열에 의해 대치되는 방법.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 숙주세포를 인플루엔자 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 분자로 동반 형질감염, 동반 감염 또는 동반 형질전환시켜, 인플루엔자 단백질이 VLP내에 혼입되도록 하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 재조합 DNA 분자가 인플루엔자 뉴클레오캡시드 단백질(NP)을 암호화하는 방법.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 숙주세포를 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 잔기를 암호화하는 재조합 DNA 분자로 동반 형질감염, 동반 감염 또는 동반 형질전환시켜, 비-인플루엔자 잔기가 VLP내에 혼입되도록 하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10.

적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 구조 단백질을 포함하고, VLP가 항상 M1을 포함하는 인플루엔자 VLP.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, VLP가 HA, NA 및 M2로 이루어진 그룹 중에서 선택된 인플루엔자 구조 단백질 중 적어도 하나를 추가로 포함하는 인플루엔자 VLP.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, HA 및 NA가 인플루엔자 바이러스의 상이한 서브타입으로부터 오는 인플루엔자 VLP.

청구항 13.

제 10 항에 있어서, HA 또는 NA의 일부 또는 전부가 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 잔기에 의해 대치되어, 키메릭 VLP를 포함하는 인플루엔자 VLP.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, HA 또는 NA의 일부 또는 전부가 병원성 미생물에 의해 생산된 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질에 의해 대치되는 키메릭 VLP.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, HA가 VSV의 G 단백질에 의해 대치되는 키메릭 VLP.

청구항 16.

제 14 항에 있어서, HA의 막횡단 및 세포질 도메인이 존재하고, HA의 나머지 영역이 VSV의 G 단백질의 엑토도메인에 의해 대치되는 키메릭 VLP.

청구항 17.

제 10 항에 있어서, 인플루엔자 단백질이 VLP내에 혼입되는 인플루엔자 VLP.

청구항 18.

제 17 항에 있어서, VLP내에 혼입된 인플루엔자 단백질이 NP인 인플루엔자 단백질.

청구항 19.

제 10 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 잔기가 VLP내에 혼입되는 인플루엔자 VLP.

청구항 20.

희석제 또는 담체와 함께, 제 10 항의 VLP를 포함하는 면역원 조성물.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역원 조성물.

청구항 22.

희석제 또는 담체와 함께, 제 11 항의 VLP를 포함하는 면역원 조성물.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역원 조성물.

청구항 24.

희석제 또는 담체와 함께, 제 13 항의 VLP를 포함하는 약학 조성물.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 26.

희석제 또는 담체와 함께, 제 14 항의 VLP를 포함하는 면역원 조성물.

청구항 27.

제 26 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역원 조성물.

청구항 28.

희석제 또는 담체와 함께, 제 17 항의 VLP를 포함하는 면역원 조성물.

청구항 29.

제 28 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역원 조성물.

청구항 30.

희석제 또는 담체와 함께, 제 19 항의 VLP를 포함하는 면역원 조성물.

청구항 31.

제 30 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역원 조성물.

청구항 32.

희석제 또는 담체와 함께, 제 19 항의 VLP를 포함하는 약학 조성물.

청구항 33.

제 32 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 34.

제 20 항의 면역원 조성물을 척추동물에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 의해 야기된 감염에 대한 면역방법.

청구항 35.

제 22 항의 면역원 조성물을 척추동물에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 의해 야기된 감염에 대한 면역방법.

청구항 36.

제 26 항의 면역원 조성물을 척추동물에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 이외의 병원성 미생물에 의해 야기된 감염에 대한 면역방법.

청구항 37.

제 30 항의 면역원 조성물을 척추동물에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 이외의 병원성 미생물에 의해 야기된 감염에 대한 면역방법.

청구항 38.

유효량의 제 24 항의 약학 조성물을 척추동물에 투여하는 단계를 포함하는 치료방법.

청구항 39.

유효량의 제 32 항의 약학 조성물을 척추동물에 투여하는 단계를 포함하는 치료방법.

청구항 40.

인플루엔자 바이러스 M1, M2, HA 및 NA 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 분자로 형질감염, 감염 또는 형질전환된 숙주세포.

청구항 41.

제 40 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 폴리머라제 서브유닛 PA, PB1과 PB2, 및 인플루엔자 바이러스 핵단백질 NP를 암호화하는 제 2 재조합 DNA 분자로 추가 형질감염, 감염 또는 형질전환된 숙주세포.

청구항 42.

제 41 항에 있어서, 이종 뉴클레오타이드 서열로 추가 형질감염, 감염 또는 형질전환된 숙주세포.

청구항 43.

제 42 항에 있어서, 발현시에 이종 뉴클레오타이드 서열이 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않은 잔기인 숙주세포.

청구항 44.

리보핵단백질 복합체를 조립하고 패키징하는 인플루엔자 VLP.

청구항 45.

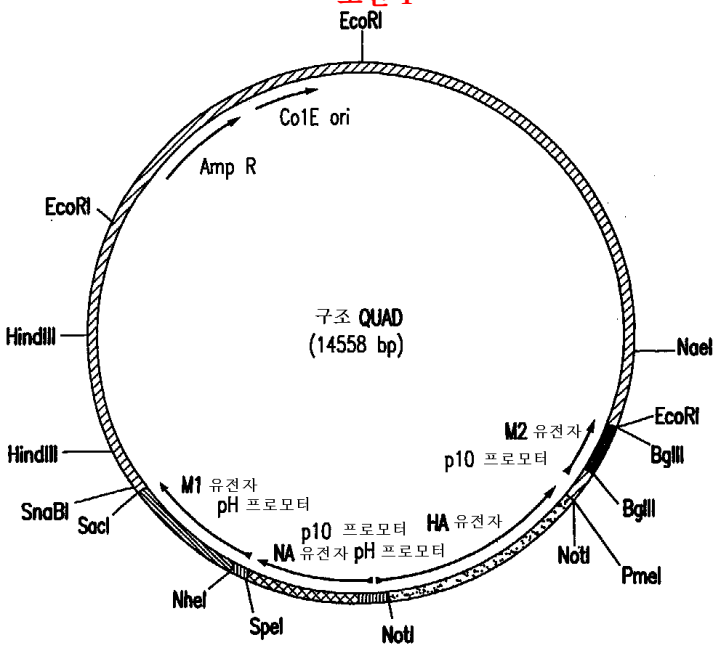
제 44 항에 있어서, 이종 뉴클레오타이드 서열을 추가로 발현하는 인플루엔자 VLP.

청구항 46.

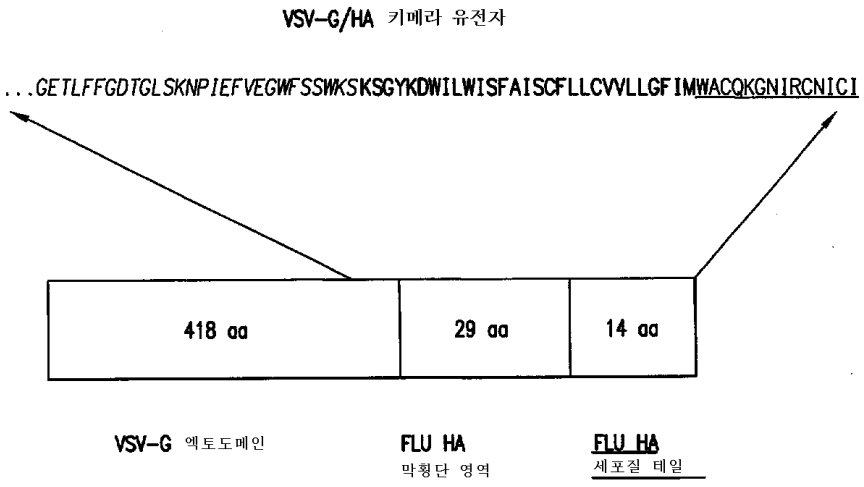
제 45 항에 있어서, 발현시 이종 뉴클레오타이드 서열이 인플루엔자 바이러스에 의해 생산되지 않는 잔기인 인플루엔자 VLP.

도면

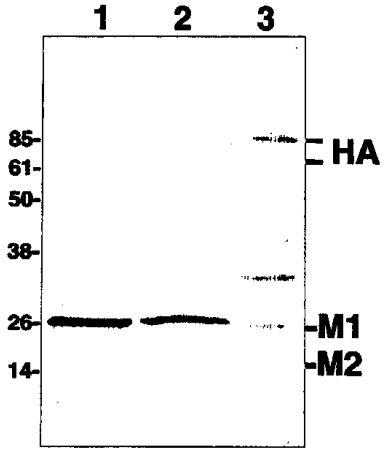
도면 1


EcoRI
Col E ori
Amp R
EcoRI
HindIII
구조 QUAD
(14558 bp)
NaeI
M2 유전자
EcoRI
p10 프로모터
BglII
HindIII
M1 유전자
pH 프로모터
BglII
SnaBI
SacI
p10 프로모터
HA 유전자
NA 유전자 pH 프로모터
NotI
PmeI
NheI
SpeI
NotI

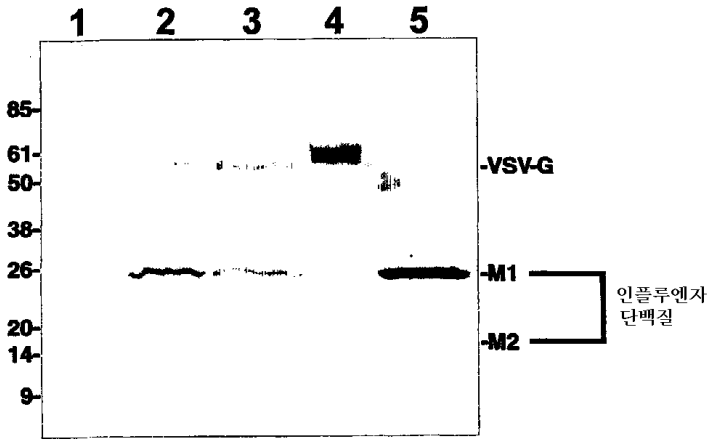
도면 2


VSV-G/HA 키메라 유전자
...GETLFFGDTGLSKNPIEFVEGWFSSWKSKSGYKDWILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQKGNIRCNICI
418 aa
29 aa
14 aa
VSV-G 엑토도메인
FLU HA
막횡단 영역
FLU HA
세포질 테일

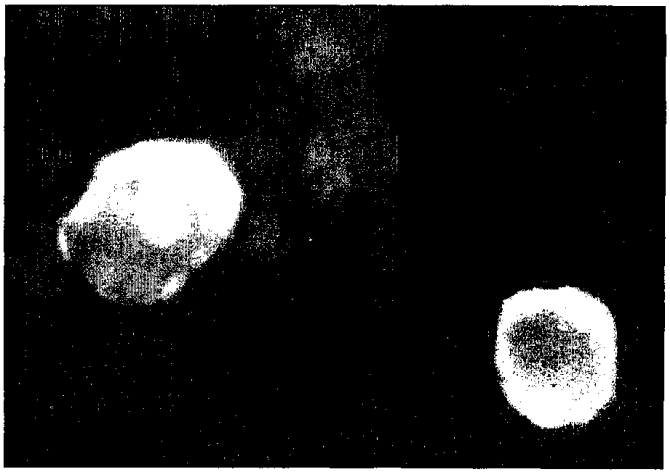
도면 3a


1
2
3
85
61
50
38
26
14
HA
M1
M2

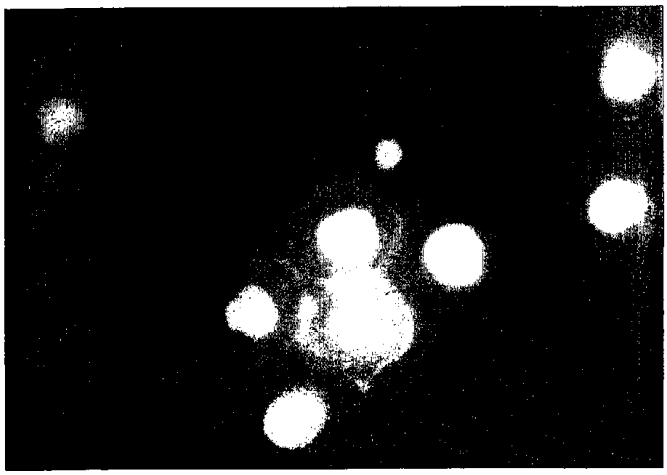
도면 3b


1
2
3
4
5
85
61
50
38
26
20
14
9
VSV-G
M1
M2
인플루엔자
단백질

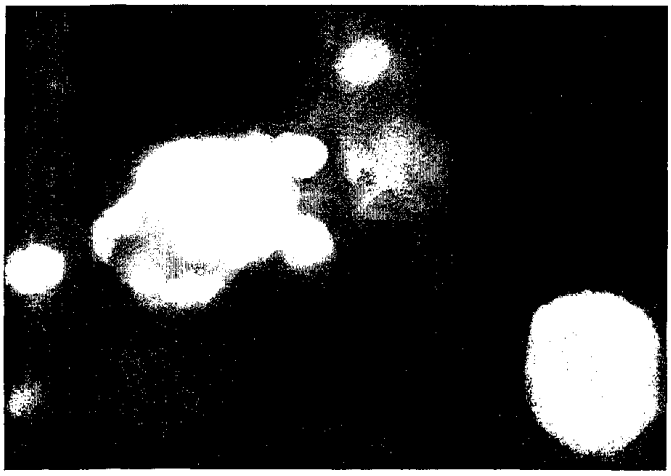
도면 4a



도면 4b

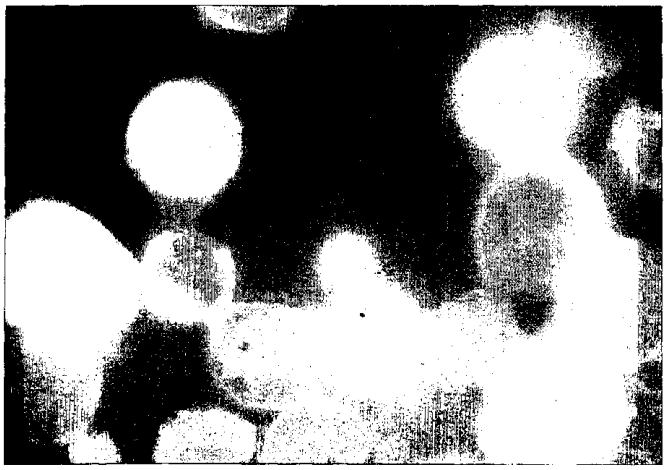


도면 4c

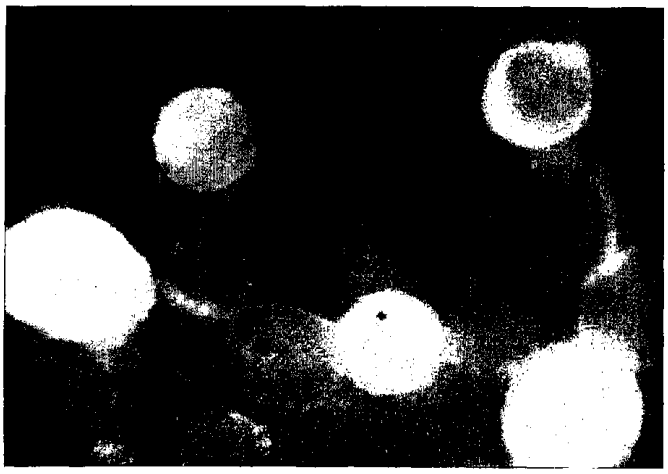


도면 5a

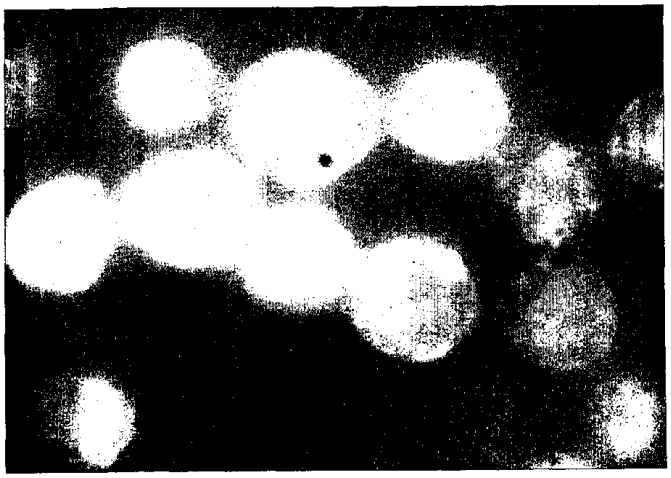
도면 5b



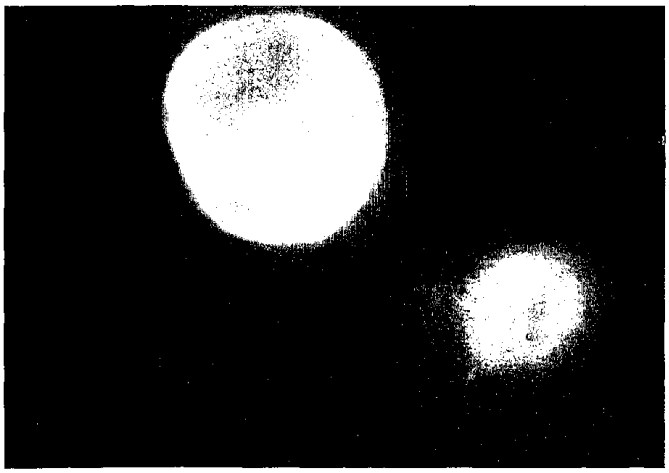
도면 5c



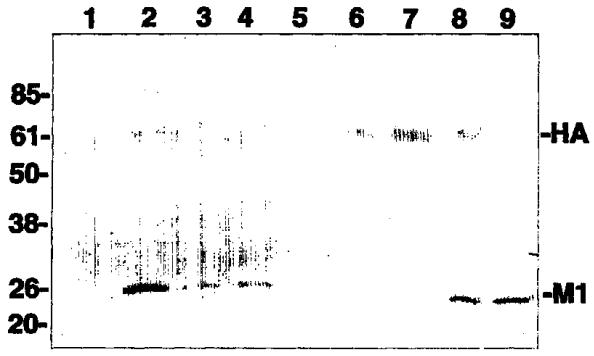
도면 6



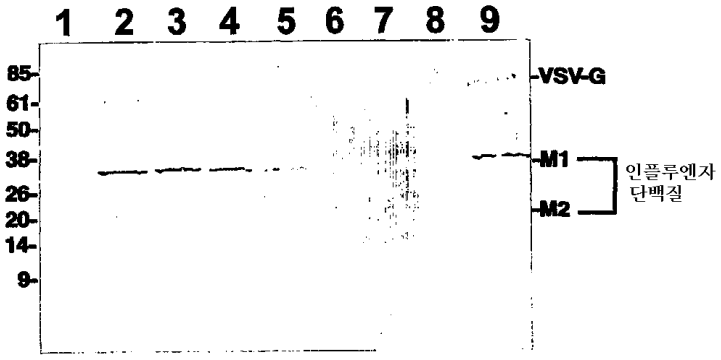
도면 7



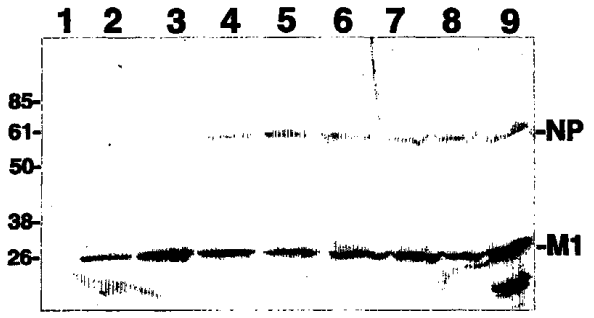
도면 8a



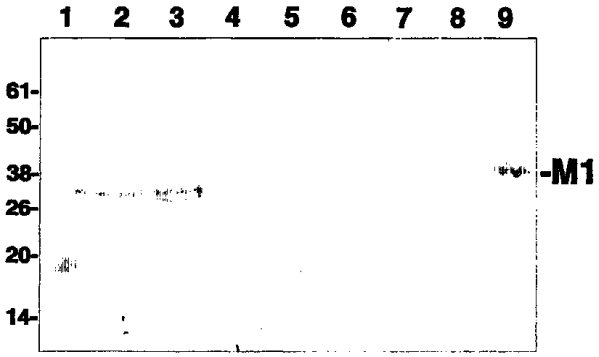
도면 8b



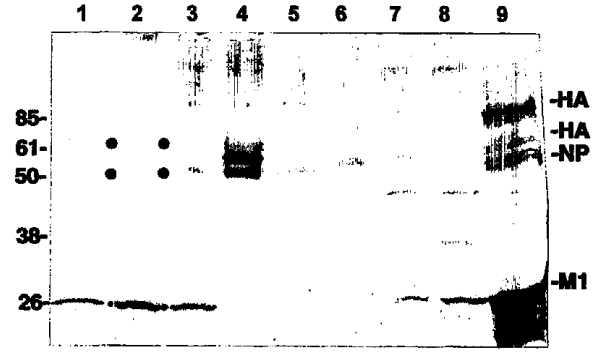
도면 8c



도면 9a

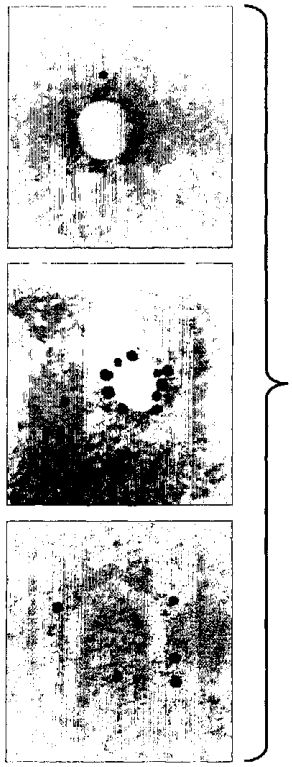

1 2 3 4 5 6 7 8 9
61-
50-
38-
26-
20-
14-
-M1

도면 9b


1 2 3 4 5 6 7 8 9
85-
61-
50-
38-
26-
-HA
-HA
-NP
-M1

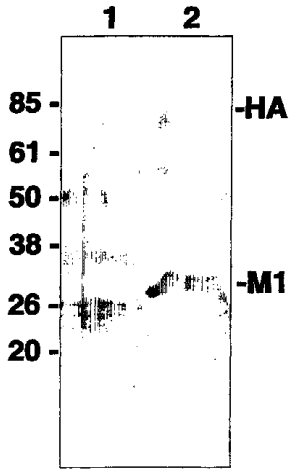
도면 10

도면 11a

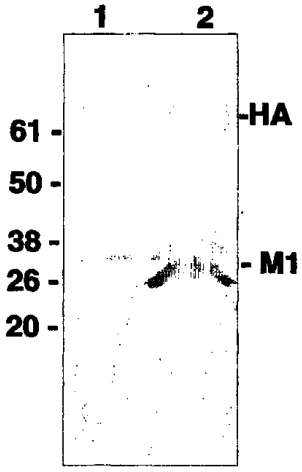


도면 11b

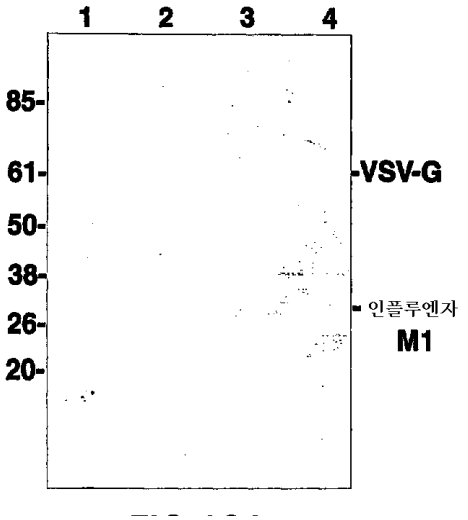
도면 12a



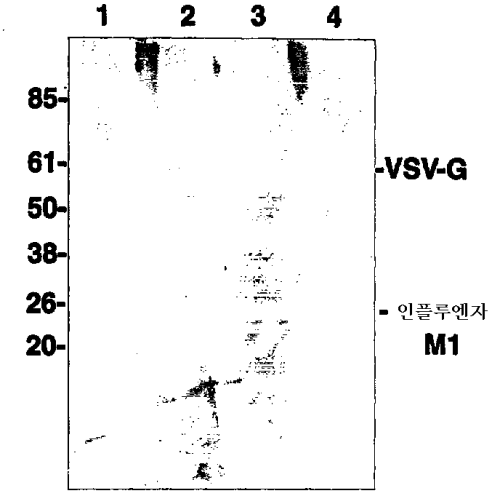
도면 12b



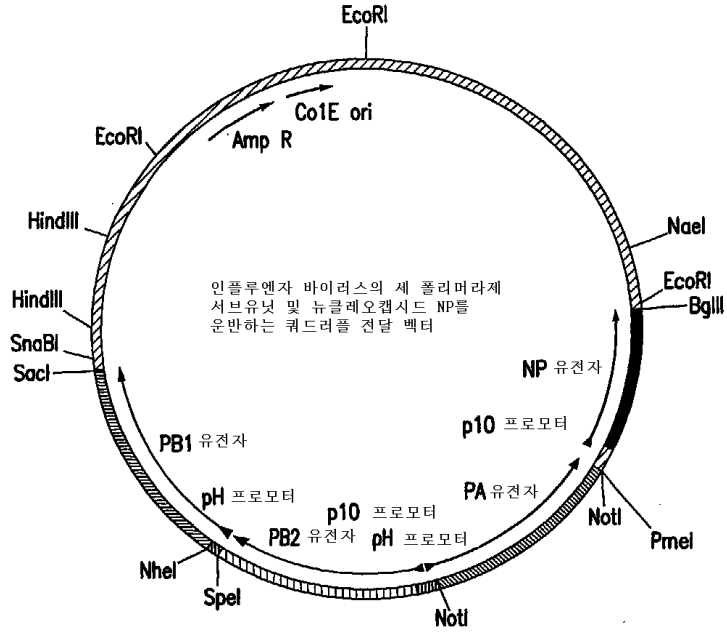
도면 13a


1
2
3
4
85-
61-
50-
38-
26-
20-
-VSV-G
- 인플루엔자
M1

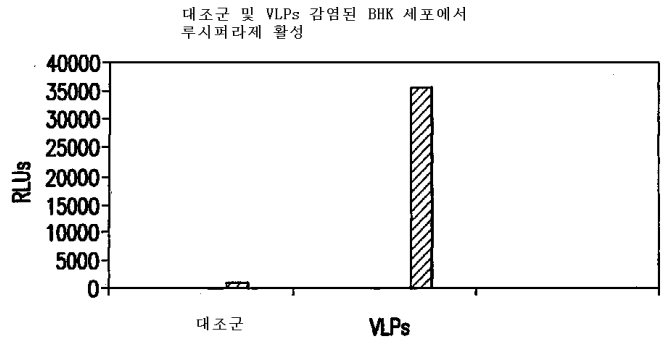
도면 13b


1
2
3
4
85-
61-
50-
38-
26-
20-
-VSV-G
- 인플루엔자
M1

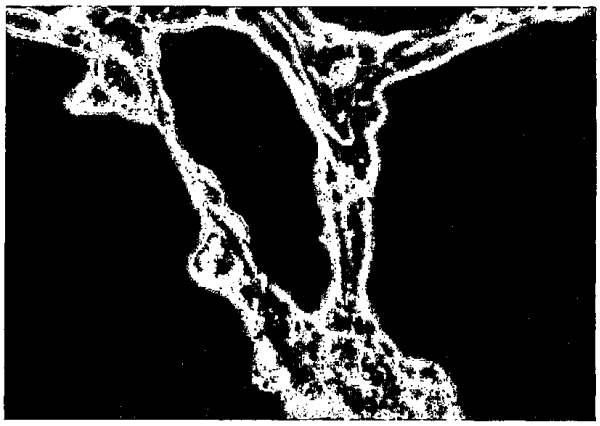
도면 14


EcoRI
Co1E ori
Amp R
EcoRI
HindIII
NaeI
HindIII
EcoRI
BglII
SnaBI
SacI
인플루엔자 바이러스의 세 폴리머라제
서브유닛 및 뉴클레오캡시드 NP를
운반하는 쿼드러플 전달 벡터
NP 유전자
p10 프로모터
PB1 유전자
PA 유전자
pH 프로모터
p10 프로모터
NotI
PmeI
PB2 유전자
pH 프로모터
NheI
SpeI
NotI

도면 15


대조군 및 VLPs 감염된 BHK 세포에서
루시퍼라제 활성
RLUs
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
대조군
VLPs

도면 16



GFP 유전자를 운반하는 VLPs로 감염 후 BHK 세포에서
GFP의 발현(화살표는 발현 세포를 표시함)

<110> American Cyanamid Company
<120> Assembly of Wild-Type and Chimeric Influenza Virus-Like Particles (VLPs)
<130> AM100288PCT
<150> PCT/US01/19890
<151> 2001-06-21
<160> 11
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 71
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Chimera of portions of Vesicular Stomatitis Virus G protein and influenza HA protein
<400> 1

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

<210> 2
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Amino acids 1-42 of human amyloid peptide protein
<400> 2
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40
<210> 3
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Amino acids 1-28 of human amyloid peptide protein
<400> 3
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
20 25
<210> 4
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 4
gtttaaacgc ggccgccgta tttataggtt tttttatta 39
<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 5
ttttattact agtcccgggg atctgtgatt gtaaat 36
<210> 6
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 6
aagagctcgc tagcgtattt ataggttttt ttatta 36
<210> 7
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 7
acaatcacag atccccggga ctagtaataa aacctaga 38
<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 8
gtttaaacgc ggccgccg 18
<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 9
aagagctcgc tagcgta 17
<210> 10
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 10
aacagagatc gatctgt 17
<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 11
cataaaaatt aaaaattaaa atataattaa gg 32