



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0163443
(43) 공개일자 2023년11월30일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 39/00 (2023.05)
A61K 39/12 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7035571</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년03월28일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년10월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/014798</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/210465
국제공개일자 2022년10월06일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2021-056392 2021년03월30일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
고쿠리츠다가쿠호우진 도쿄다가쿠
일본, 도쿄, 분쿄구, 혼고 7-초메 3-1
가부시카이가이사 하나박스
일본 지바켄 지바시 슈오쿠 이노하나 1초메 8방
15고</p> <p>(72) 발명자
기요노 히로시
일본, 도쿄, 분쿄구, 혼고 7-초메 3-1 고쿠리츠다
이가쿠호우진 도쿄다가쿠 나이
유키 요시카즈
일본 지바켄 지바시 슈오쿠 이노하나 1초메 8방
15고 가부시카이가이사 하나박스 나이</p> <p>(74) 대리인
특허법인코리아나</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 7 항

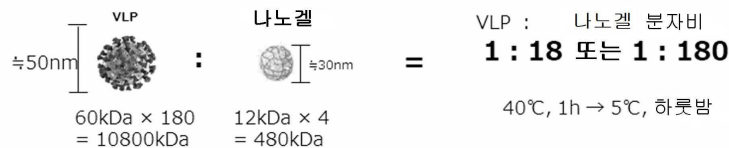
(54) 발명의 명칭 **나노겔 피복형 백신**

(57) 요약

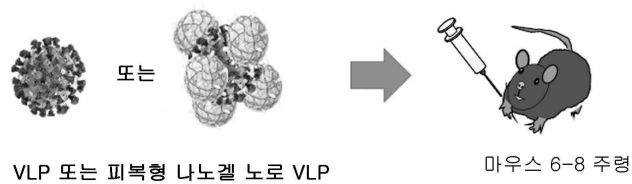
본 발명은, 나노겔에 내포되지 않는 항원과 나노겔의 복합체 및 당해 복합체를 포함하는 백신 제제의 제공을 목적으로 한다. 구체적으로는, 본 발명은, 나노겔 및 백신 항원의 복합체로서, 그 백신 항원이 나노겔로 피복되어 있는, 상기 복합체를 제공한다.

대표도 - 도1

나노겔화 조건



노로 바이러스의 VLP 를 사용한 나노겔 피복 검증 실험



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61P 37/04 (2018.01)

A61K 2039/541 (2013.01)

A61K 2039/55583 (2013.01)

A61K 2039/6087 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

나노겔 및 백신 항원의 복합체로서, 그 백신 항원이 나노겔로 피복되어 있는, 상기 복합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 백신 항원의 입경이, 20 nm 이상인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 백신 항원이, 나노겔보다 큰 물질인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 백신 항원이, VLP (virus like particle), 불활성화 바이러스, 20 nm 이상의 거대 단백질 분자 또는 중합체인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 백신 항원과 나노겔이, 1 : 15 ~ 1 : 200 의 몰비로 복합화되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

애주번트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 복합체를 포함하는 백신 제제.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은, 나노겔을 사용한 백신에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 백신 항원과 나노겔의 복합체로서, 항원이 나노겔에 의해 피복되어 있는 백신에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종래, 백신의 투여는 주사에 의해 실시되는 경우가 대부분이다. 주사에 의한 백신 투여는, 생체 내에 있어서, 항체의 산생을 포함하는 면역 응답을 유도하는 것이 가능하다. 그러나, 주사에 의한 백신 투여에서는, 바이러스의 감염 국소에 방어 면역 반응을 유도하는 것이 어렵고, 그 결과, 병원체의 감염 자체를 저해하는 것이 곤란하였다. 특히, 바이러스 감염증의 경우, 감염 후, 감염에 의한 여러 증상이 발증하기 전에, 타인에게 바이러스가 전파되는 경우가 많기 때문에, 주사형 백신에서는, 감염 직후의 타인으로부터의 감염을 유효하게 저지할 수 없었다. 주사형 백신에 대하여, 경비형 백신 등의, 점막에 투여하는 백신은, 병원체가 감염되는 점막 영역에 있어서, 점막 면역 (점막 IgA) 을 유도하고, 병원체를 중화시킬 수 있으므로, 병원체의 감염, 굳이는 병원체의 타인으로부터의 전파를 억제할 수 있다.

[0003] 지금까지 발명자들은, 점막 면역을 유효하게 유도하기 위해, 경비 점막 백신의 딜리버리 단체로서 콜레스테롤이 부가된 카티온성 풀루란에 의해 구성되는 자기 응집성 나노 사이즈 하이드로겔 (cCHP ; cationic type of cholesteryl group-bearing pullulan (특허문헌 1, 비특허문헌 1)) 을 이용하여, 백신 항원을 나노겔 내에 내포한 형상으로 항원 복합체를 제제화하고, 유효한 점막 면역을 유도할 수 있는 방법을 확립하였다. cCHP 나노겔은, 그 나노 매트릭스 내부에 단백질 항원을 내포하면, 인공적인 샤페론으로서 기능하여, 항원의 응집 및 변성을 방지하고, 항원 방출 후의 리폴딩을 돕는다. 이 나노겔은, 효율적으로 부전하의 점막 표면에 부착되는 성질을 갖고, 지속적으로 항원을 방출하여 항원 제시 세포까지 항원을 송달함으로써 면역 응답을 유도한다 (비특허문헌 2, 비특허문헌 3 및 특허문헌 2). 또, 마우스에 있어서, [¹¹¹In]-표지 BoHc/A (보톨리누스 A형 독소의 중사슬 C 말단 영역 무독 영역) 나 폐렴구균 표면 항원 PspA 를 담지하는 cCHP 나노겔을 경비적으로 투여해도, 후구 (嗅球) 나 뇌 등의 중추 신경계에 축적되지는 않으며 (비특허문헌 2), 그 안전성도 확인되어 있다 (비특허문헌 4).

[0004] 그런데, 지금까지 보고되어 있는 나노겔-항원 복합체는, cCHP 4 분자 정도로 이루어지는 나노겔의 내부에 단백질 항원을 내포함으로써, 항원의 응집 및 변성을 방지하고, 나노겔 내부로부터 방출된 항원의 리폴딩을 촉진시켜, 효율적인 면역 응답을 유도한다 (비특허문헌 5). 그 때문에, 나노겔의 분자량 (약 1,000 kDa) 이상의 분자를 나노겔에 내포시킬 수는 없어, 그러한 거대 분자는, 나노겔과의 복합체를 형성할 수는 없는 것으로 생각되고 있었다 (비특허문헌 5). 즉, 종래의 항원을 나노겔에 내포시키는 제제화법에서는, 나노겔 (직경 약 30 nm) 보다 큰 바이러스 항원, VLP (virus like particle, 바이러스 유사 입자) 및 불활화 바이러스 등의 항원과 나노겔의 복합체를 제조할 수는 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) W000/12564호
(특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 2010-105968호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Ayame 등, Bioconjugate Chem 19 : 882-890 2008
(비특허문헌 0002) Nochi 등, Nat Mater 9 : 572-578 2010
(비특허문헌 0003) Yuki 등, Biotechnol Genet Eng Rev 29 : 61-72 2013
(비특허문헌 0004) Kong 등, Infect Immun 81 : 1625-1634 2013
(비특허문헌 0005) Yuki 등, Mol. Pharmaceutics, 18 : 1582-1592 2021

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기 사정을 감안하여, 본 발명은, 나노겔에 내포되지 않는 항원 (나노겔에 내포 가능한 크기를 초과하는 항원) 과 나노겔의 복합체 및 당해 복합체를 포함하는 백신 제제의 제공을 해결 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은, 나노겔 내에 내포 가능한 크기를 초과하는 항원과 나노겔의 복합체를 형성하는 방법에 대해 예의 연구를 실시하였다.

[0009] 본 발명자들은, 백신 항원을 나노겔 내에 내포하는 것이 아니라, 백신 항원의 표면에 나노겔을 부착시키는, 즉, 백신 항원을 나노겔로 피복한 복합체 (이하 이와 같은 복합체를 「나노겔 피복형」 복합체로도 기재한다) 의 제조를 시도한 결과, 순조롭게 나노겔 피복형의 복합체의 제조에 성공하였다. 본 발명자들은, 나노겔 피복형 항

원이 유효한 점막 면역을 유도하는 것을 확인하였다.

[0010] 구체적으로는, 종래의 항원을 내포하는 나노겔 복합체 (이하 「항원 내포형 복합체」로도 기재한다) 를 조제하기 위한 항원과 나노겔의 최적의 혼합비는, 항원 1 분자에 대하여, 1 ~ 2.5 분자 (CHPNH₂ 환산으로 1 ~ 10), 바람직하게는 1 분자 (CHPNH₂ 환산으로 4) 로 되어 있었던 (특허문헌 2) 바, 본 발명자들은, 1 분자의 노로 바이러스 VLP (항원) 에 대하여 혼합하는 나노겔의 양을 대폭 증가시켜, 나노겔을 18 분자 (CHPNH₂ 환산으로 72) 또는 180 분자 (CHPNH₂ 환산으로 720) 의 나노겔로 처리한 결과, 나노겔로 비교적 균일하게 VLP (항원) 를 피복할 수 있는 것을 처음으로 알아냈다 (도 8 및 도 9 를 참조). 얻어진 나노겔 피복형 VLP 를 마우스에 경비 투여하면, VLP 단독 투여에 비하여 10 배 이상 높은 점막 면역 응답을 유도할 수 있는 것을 확인하였다. 노로 바이러스의 VLP 의 입경은 약 30 ~ 40 nm 로서 나노겔의 입경 (약 30 nm) 을 초과하는 항원이다.

[0011] 즉, 본 발명자들은, VLP 와 같이 나노겔보다 큰 항원이어도, 나노겔로 항원을 피복함 (나노겔에 내포화하는 것이 아니라) 으로서, 나노겔과 항원의 복합체를 형성하는 것이 가능하고, 이 나노겔-항원 복합체는 점막 면역 응답을 효과적으로 유도하는 것을 처음으로 알아내어, 본 발명을 완성시켰다.

[0012] 즉, 본 발명은 이하의 (1) ~ (7) 이다.

[0013] (1) 나노겔 및 백신 항원의 복합체로서, 그 백신 항원이 나노겔로 피복되어 있는, 복합체.

[0014] (2) 상기 백신 항원의 입경이, 20 nm 이상인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 에 기재된 복합체.

[0015] (3) 상기 백신 항원이, 나노겔보다 큰 물질인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 또는 (2) 에 기재된 복합체.

[0016] (4) 상기 백신 항원이, VLP (virus like particle), 불활성화 바이러스, 20 nm 이상의 거대 단백질 분자 또는 중합체인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 복합체.

[0017] (5) 상기 백신 항원과 나노겔이, 1 : 15 ~ 1 : 200 의 물비로 복합화되는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 복합체.

[0018] (6) 에주번트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 기재된 복합체.

[0019] (7) 상기 (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 기재된 복합체를 포함하는 백신 제제.

[0020] 또한, 본 명세서에 있어서 「~」의 부호는, 그 좌우의 값을 포함하는 수치 범위를 나타낸다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 의하면, 큰 항원 분자여도, 나노겔과의 복합체를 형성시키는 것이 가능하기 때문에, 점막에 있어서의 면역 응답을 효과적으로 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1 은, 본 발명의 실시예에 관련된 나노겔 피복형의 나노겔-항원 복합체에 관한 실험 조건의 개요를 나타낸다.

도 2 는, 나노겔 피복형 VLP (GII.4 VLP 또는 GII.17 VLP) 에 의한 경비 면역 응답의 결과를 나타낸다. A 는 나노겔 피복형 GII.17 VLP 또는 GII.17 VLP 단독을 마우스에 경비 투여한 후, 혈청 중의 IgG, 비강 세정액 중의 IgA 및 분변 중의 IgA 의 항체가를 측정된 결과이다. B 는 나노겔 피복형 GII.4 VLP 또는 GII.4 VLP 단독을 마우스에 경비 투여한 후, 혈청 중의 IgG 및 비강 세정액 중의 IgA 를 측정된 결과이다. VLP 와 나노겔 (입자) 의 혼합 비율은, 분자비로, VLP : 나노겔 = 1 : 180 으로 하였다.

도 3 은, 나노겔 피복형 VLP (GII.17 VLP) 에 의한 경비 면역 응답의 결과를 나타낸다. 나노겔 피복형 GII.17 VLP 또는 GII.17 VLP 단독을 마우스에 경비 투여한 후, 혈청 중의 IgG 및 비강 세정액 중의 IgA 를 측정된 결과이다. VLP 와 나노겔 (입자) 의 혼합 비율은, 분자비로, VLP : 나노겔 = 1 : 180 또는 = 1 : 18 로 하였다.

도 4 는, 나노겔 피복형 VLP (GII.4 VLP 또는 GII.17 VLP) 에 의해 유도된 항체의 중화 효과를 검토한 결과를 나타낸다. A 는 나노겔 피복형 GII.17 VLP 에 의해 유도된 혈청 중의 IgG 및 비강 세정액 중의 IgA 에 의한, 노로 바이러스 GII.17 의 증식 억제 효과를 검토한 결과이다. B 는 나노겔 피복형 GII.4 VLP 에 의해

유도된 혈청 중의 IgG 및 비강 세정액 중의 IgA 에 의한, 노로 바이러스 GII.4 의 증식 억제 효과를 검토한 결과이다. Pre 는, 경비 면역 전의 마우스 혈청 또는 비강 세정액으로 노로 바이러스 용액을 처리한 후, 장관 상피 세포에 첨가하고, 배양 상청 중의 바이러스 계승 카피수를 측정된 결과이다. cCHP + VLP 는, 노로 바이러스 용액을, 미리 나노겔 피복형 VLP 에 의해 유도된 혈청 중의 IgG 또는 비강 세정액 중의 IgA 로 처리한 후, 장관 상피 세포에 첨가하고, 배양 상청 중의 바이러스 계승 카피수를 측정된 결과이다.

도 5 는, 나노겔 피복형 VLP (GII.2 VLP) 에 의한 경비 면역 응답의 결과를 나타낸다. 나노겔 피복형 GII.2 VLP 또는 GII.2 VLP 만을 마우스에 경비 투여한 후, 혈청 중의 IgG, 비강 세정액 중의 IgA, 타액 중의 IgA 및 장관 세정액 중의 IgA 의 항체가를 측정된 결과이다. VLP 와 나노겔 (입자) 의 혼합 비율은, 분자비로, VLP : 나노겔 = 1 : 180 으로 하였다.

도 6 은, 나노겔 피복형 VLP (GII.2 VLP) 에 의해 유도된 혈청 중의 IgG 의 중화 효과를 검토한 결과를 나타낸다. 노로 바이러스 용액을, 경비 면역 전의 마우스 혈청으로 처리 (미면역), VLP 만에 의해 유도된 혈청 중의 IgG 로 처리 (VLP 단독) 또는 나노겔로 피복한 VLP 에 의해 유도된 혈청 중의 IgG 로 처리 (나노겔화 VLP) 한 후, 장관 상피 세포에 첨가하고, 배양 상청 중의 바이러스 계승 카피수를 측정된 결과이다.

도 7 은, 나노겔 피복형 VLP (GII.2 VLP) 에 의해 유도된 장관 세정액 중의 IgA 의 중화 효과를 검토한 결과를 나타낸다. 노로 바이러스 용액을, 경비 면역 전의 마우스의 장관 세정액 (미면역), VLP 만에 의해 유도된 장관 세정액 중의 IgA 로 처리 (VLP 단독) 또는 나노겔로 피복한 VLP 에 의해 유도된 장관 세정액 중의 IgA 로 처리 (나노겔화 VLP) 한 후, 장관 상피 세포에 첨가하고, 배양 상청 중의 바이러스 계승 카피수를 측정된 결과이다.

도 8 은, 나노겔 피복형 VLP (GII.17 VLP) 의 전자 현미경에 의한 관찰 화상을 나타낸다. A 는 GII.17 VLP 의 전자 현미경 관찰 화상, B 는 나노겔의 전자 현미경 관찰 화상, C 는 나노겔 피복형 GII.17 VLP 의 전자 현미경 관찰 화상이다. C 에 대해서는, 관찰 화상 중의 사각으로 둘러싼 영역을 각각 확대한 화상을 함께 나타낸다.

도 9 는, 나노겔 피복형 VLP (GII.2 VLP) 의 전자 현미경에 의한 관찰 화상을 나타낸다. A 및 B 는 GII.2 VLP 의 전자 현미경 관찰 화상, C 및 D 는 나노겔 피복형 GII.2 VLP 의 전자 현미경 관찰 화상, E 는 나노겔 (cCHP) 의 전자 현미경 관찰 화상, F 는 PspA 를 내포한 나노겔-PspA 복합체의 전자 현미경 관찰 화상이다.

도 10 은, 인듐 (¹¹¹In) 표지화 나노겔의 경비 투여에 의한 마우스 체내 동태 시험의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 제 1 실시형태는, 나노겔 및 백신 항원의 복합체 (이하 「나노겔-백신 항원 (또는 항원)」으로도 기재한다)로서, 그 백신 항원이 나노겔로 피복되어 있는, 상기 복합체 (이하 「본 실시형태에 관련된 복합체」로도 기재)이다.

[0024] 본 실시형태에 있어서, 나노겔이란, 소수성의 콜레스테롤이 측사슬로서 부가된 친수성의 다당 (예를 들어, 풀루란)으로 이루어지는, 고분자 겔 나노 입자이다. 나노겔은 공지된 방법, 예를 들어, 국제공개 제W000/12564호 공보에 기재된 방법 등에 기초하여 제조할 수 있다.

[0025] 구체적으로는, 먼저, 탄소수 12 ~ 50 의 수산기 함유 탄화수소 또는 스테롤과, OCN-R₁ NCO (식 중, R₁ 은 탄소수 1 ~ 50 의 탄화수소기이다)로 나타내는 디이소시아네이트 화합물을 반응시켜, 탄소수 12 ~ 50 의 수산기 함유 탄화수소 또는 스테롤이 1 분자 반응한 이소시아네이트기 함유 소수성 화합물을 제조한다. 얻어진 이소시아네이트기 함유 소수성 화합물과 다당류를 반응시켜, 탄소수 12 ~ 50 의 탄화수소기 또는 스테릴기를 함유하는 소수성기 함유 다당류를 제조한다. 다음으로, 얻어진 생성물을 케톤계의 용매로 정제함으로써, 순도가 높은 소수성기 함유 다당류를 제조할 수 있다.

[0026] 여기서, 다당류로는, 풀루란, 아밀로펙틴, 아밀로오스, 텍스트란, 하이드록시에틸텍스트란, 만난, 레반, 이눌린, 키틴, 키토산, 자일로글루칸 또는 수용성 셀룰로오스 등이 이용 가능하고, 특히, 풀루란이 바람직하다.

[0027] 본 실시형태에서 사용되는 나노겔로는, 카티온성 콜레스테롤 치환 풀루란 (cationic cholesteryl-group-bearing pullulan : cCHP 라고 칭한다) 및 그 유도체를 들 수 있다. cCHP 는, 분자량 3 만 내지 20 만, 예를 들어 분자량 100,000 의 풀루란에 100 단당당 콜레스테롤이 1 ~ 10 개, 바람직하게는 1 ~ 3 개 치환된 구조를 갖는다. 또한, 본 발명에서 사용되는 cCHP 는, 항원의 사이즈나 소수성의 정도에 따라, 콜레스테롤 치환량을 적

절히 변경해도 된다. 또, CHP 의 소수성의 정도를 변경하기 위해, 알킬기 (탄소수 10 ~ 30, 바람직하게는 탄소수 15 ~ 20 정도) 를 부가시켜도 된다. 본 발명에서 사용되는 나노겔은, 입경 10 ~ 50 nm, 바람직하게는 20 ~ 30 nm 이다. 나노겔은 이미 널리 시판되고 있으며, 이들 시판품을 사용해도 된다.

[0028] 본 실시형태에서 사용되는 나노겔은, 백신이 부 (負) 로 대전되는 비점막 표면에 침입할 수 있도록, 정전하를 갖는 관능기, 예를 들어 아미노기를 도입한 나노겔이다. 아미노기의 나노겔에 대한 도입 방법으로는, 아미노기를 부가한 콜레스테롤플루란 (CHPNH₂) 을 사용하는 방법을 들 수 있다. 구체적으로는, 감압 건조된 CHP 를 디메틸설폭시드 (DMSO) 에 용해시키고, 이것에 1-1' 카르보닐디이미다졸을 질소 기류하에 첨가하고 수 시간, 실온에서 반응시킨다. 그 반응 용액에 에틸렌디아민을 서서히 첨가하고, 수 시간 내지 수십 시간 정도 교반한다. 얻어진 반응 용액을 증류수에 대하여, 수 일간 투석한다. 투석 후의 반응 용액을 동결 건조시켜, 유백색의 고체를 얻는다. 에틸렌디아민의 치환도는 원소 분석이나 H-NMR 등을 사용하여 평가할 수 있다.

[0029] 지금까지 보고되어 있는 나노겔-항원 복합체는, 카티온성 콜레스테롤 치환 플루란 4 분자 정도로 이루어지는 나노 입자 (나노겔) 의 내부에 항원이 내포되는 형태였다 (Yuki 등, Molecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021). 이에 대하여, 본 실시형태에 관련된 복합체는, 항원이 나노겔에 내포될 수 있는 크기를 초과하는 물질이기 때문에, 당해 항원이 나노겔에 내포되지 않고, 항원 표면에 나노겔이 부착된 형태 (이와 같은 형태를 「항원이 나노겔로 피복된 형태」 로도 기재한다) 인 (도 1, 도 8 및 도 9 를 참조) 것을 특징으로 한다. 여기서, 나노겔에 내포되지 않는 항원이란, 나노겔과 동일한 정도의 크기의 항원, 또는 나노겔보다 큰 항원이다. 당해 항원과 나노겔의 크기의 비교는, 예를 들어, 광 산란법 (예를 들어, 동적 광 산란 (dynamic light scattering : DLS) 법) 등에 의해 산출되는 항원의 입경 (항원이 구체인 것으로 가정한 경우의 직경) 을 지표로 하는 방법, 전자 현미경 관찰에 의해 나노겔과 항원을 관찰하여 각 크기를 평가하는 방법 등에 의해, 비교할 수 있지만, 이들 방법에 한정되는 것은 아니며, 당업자라면 다양한 방법을 용이하게 선택할 수 있다. 보다 구체적으로는, 나노겔의 입경이 약 30 nm 정도 (DLS 법) (Yuki 등, Molecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021) 인 점에서, 본 실시형태에 관련된 항원은, 예를 들어, DLS 법으로 결정된 입경이, 나노겔의 입경보다 약간 작은 약 20 nm 이상 (예를 들어, 20 nm 이상 1,000 nm 이하 정도, 혹은 30 nm 이상 600 nm 이하 정도) 인 항원이 바람직하다. 본 실시형태에 관련된 항원으로서, 예를 들어, 불활성화된 바이러스, VLP (virus like particle, 바이러스 유사 입자), 20 nm 이상의 거대 단백질 분자 또는 중합체 (예를 들어, 분자량이 5,000 kDa 이상인 분자) 등이지만, 이것들에 한정되는 것은 아니다. 또, 상기 바이러스로는, 어떠한 바이러스여도 되지만, 굳이 들자면, 노로 바이러스 이외에서는 예를 들어, 사포 바이러스, 로타 바이러스, 계절성 인플루엔자 바이러스 (A 형 및 B 형), 신형 (강독성) 인플루엔자 바이러스 (예 H1N1, H5N1, H7N9 인플루엔자 바이러스), 코로나 바이러스 (예 SARS-CoV, SARS-CoV 2, MERS-CoV 등), RS 바이러스 (A 형, B 형), 라이노 바이러스, 아데노 바이러스, 헤르페스 바이러스, 인유두종 바이러스, 엔테로 바이러스, 사이토메갈로 바이러스, 에볼라 바이러스, 웨스트나일 바이러스, 지카 바이러스, 땡기 바이러스, ATL (인간 성인 T 세포 바이러스), HIV, A 형 간염 바이러스, 치쿤구냐 바이러스 등을 들 수 있다.

[0030] 본 실시형태에 관련된 복합체는, 나노겔 및 백신 항원을 공존시키고, 상호 작용시켜, 나노겔을 항원 표면에 부착시킴으로써 제조할 수 있다. 이 때, 나노겔과 백신 항원의 혼합비는, 특별히 한정되지 않고, 당업자라면 예비적인 실험에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 백신 항원과 나노겔의 바람직한 혼합비는, 백신 항원 : 나노겔이, 몰비 또는 분자비로, 예를 들어, 1 : 10 (CHPNH₂ 환산으로 40) 내지 1 : 400 (CHPNH₂ 환산으로 1,600) 정도, 보다 바람직하게는 1 : 15 (CHPNH₂ 환산으로 60) 내지 1 : 200 (CHPNH₂ 환산으로 800) 정도의 범위 내의 혼합비를 적절히 선택할 수 있다.

[0031] 본 실시형태에 관련된 복합체의 제조는, 나노겔 및 백신 항원을 혼합하고, 4 °C 내지 50 °C (예를 들어, 40 °C) 에서, 30 분 내지 48 시간 (예를 들어, 1 시간 정도) 정치 (靜置) 하여 실시할 수 있다. 나노겔-백신 항원의 복합체 형성에 사용하는 버퍼는, 특별히 한정되지 않고, 굳이 예시하자면, Tris-HCl 완충액 등을 들 수 있다.

[0032] 또, 본 실시형태에 관련된 복합체에는, 나노겔-백신 항원 복합체에 추가하여 애주번트가 포함되어도 된다 (당해 복합체도 「본 실시형태에 관련된 복합체」 에 포함된다).

[0033] 여기서, 애주번트란, 항원성 보강제 또는 면역 부활화제 등으로 칭해지는 것과 동일한 의미이며, 당해 분야에 있어서, 이들 제의 통상적인 사용 목적에 사용되는 것이다. 본 실시형태에서 사용되는 애주번트의 유효 성

본은, 특별히 한정은 하지 않지만, 예를 들어, STING (stimulator of interferon genes) 를 활성화하는 STING 리간드 (예를 들어 cGAMP, cyclic-di AMP, cyclic-di GMP, cyclic-di CMP, cyclic-di UMP 또는 cyclic-di IMP 등의 고리형 디뉴클레오티드나 DMXAA (5,6-dimethylXAA (xanthenone-4-acetic acid), Vadimezan 또는 ASA404) 등의 크산테논 (Xanthenone) 유도체), polyIC 또는 CpG ODN 등을 들 수 있다. 당해 애주번트는, 추가로, 의약상 허용되는 담체나 그 밖의 성분 (예를 들어, 안정화제, pH 조정제, 보존제, 방부제 및 완충제 등) 을 포함하고 있어도 된다. 의약상 허용되는 담체 및 그 밖의 성분은, 백신 투여되는 동물의 건강에 악영향을 미치지 않는 물질인 것이 필요하다.

[0034] 본 실시형태에 관련된 복합체에 애주번트가 포함되는 경우, 당해 애주번트의 함량은, 백신 제제 (제 2 실시형태를 참조) 100 중량% 에 대하여, 0.01 중량% 내지 99.99 중량% 정도 포함되어 있어도 되고, 백신 항원 1 중량% 에 대하여, 예를 들어, 0.01 중량 내지 10 중량 정도여도 된다.

[0035] 본 실시형태의 복합체의 형성은, 나노겔 및 백신 항원, 또는 나노겔, 백신 항원 및 애주번트를 혼합하고, 4 °C 내지 50 °C (예를 들어, 40 °C) 에서, 30 분 내지 48 시간 (예를 들어, 1 시간 정도) 정지하여 실시할 수 있다. 나노겔 및 백신 항원, 또는 나노겔, 백신 항원 및 애주번트의 복합체 형성에 사용하는 버퍼는, 특별히 한정되지 않고, 굳이 예시하자면, Tris-HCl 완충액 등을 들 수 있다.

[0036] 제 2 실시형태는, 제 1 실시형태에 관련된 복합체, 즉, 나노겔 및 백신 항원의 복합체로서, 그 백신 항원이 나노겔로 피복되어 있는 복합체를 포함하는 백신 제제 (이하 「본 실시형태에 관련된 백신 제제」 로도 기재한다) 이다.

[0037] 본 실시형태에 관련된 백신 제제는, 조성물 (본 실시형태에 관련된 백신 조성물) 로서, 약리학상 허용된 첨가제를 포함하고 있어도 된다. 본 실시형태에 관련된 백신 제제는 경비 투여에 적합한 것이며, 제형으로서도, 경비 투여가 가능한 형체가 바람직하고, 액체 제제 (점비제 및 주사제 등) 등을 들 수 있다.

[0038] 본 실시형태에 관련된 백신 제제가 액체 제제인 경우, 유효 성분을 필요에 따라 염산, 수산화나트륨, 젓당, 락트산, 나트륨, 인산일수소나트륨 및 인산이수소나트륨 등의 pH 조정제, 염화나트륨 및 포도당 등의 등장화제와 함께 제제용 증류수에 용해시키고, 무균 여과하여 앰플에 충전하거나, 추가로, 만니톨, 텍스트린, 시클로텍스트린 및 젤라틴 등을 첨가하여 진공 동결 건조시키고, 사용시 용해형의 제제로 해도 된다. 당해 액체 제제에는, 약학적으로 허용할 수 있는 공지된 안정제, 방부제, 산화 방지제 등이 포함되어 있어도 되며, 안정제로는, 예를 들어, 젤라틴, 텍스트란 및 소르비톨 등을, 방부제로는, 예를 들어, 티메로살 및 β 프로피오락톤 등을, 산화 방지제로는, 예를 들어, α 토크페롤 등을 들 수 있다.

[0039] 제 3 실시형태는, 제 2 실시형태에 관련된 백신 제제, 즉, 나노겔 및 백신 항원의 복합체로서, 그 백신 항원이 나노겔로 피복되어 있는 복합체를 포함하는 백신 제제를 환자에게 경비 투여하는 것을 포함하는, 질환의 예방 및/또는 치료 방법이다.

[0040] 제 3 실시형태의 치료 또는 예방의 대상 질환은, 사용하는 백신 항원에 의존하며, 특별히 한정은 되지 않고, 병원체에 의한 감염증 외에, 암 등이어도 된다.

[0041] 본 발명의 백신 제제는, 비점막을 통하여 투여해도 된다. 그 방법으로는, 예를 들어, 비점막에 대한 분무, 도포, 적하 등에 의해 비강 내에 투여하는 방법을 들 수 있다.

[0042] 제 2 실시형태에 관련된 백신 제제의 투여량은, 투여 대상의 연령이나 체중 등에 따라 적절히 결정할 수 있지만, 약학적으로 유효한 양의 백신 항원을 포함한다. 약학적으로 유효한 양이란, 그 백신 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 데에 필요한 항원량을 말한다. 예를 들어, 1 회의 백신 항원 투여량 수 μg 내지 수 10 mg 으로 1 일 1 회 내지 수 회 투여하고, 1 주일 내지 수 주일 간격으로 토탈 수 회, 예를 들어 1 내지 5 회 정도 투여하면 된다.

[0043] 본 명세서에 있어서 인용된 모든 문헌의 개시 내용은, 전체로서 명세서에 참조에 의해 편입된다. 또, 본 명세서 전체에 있어서, 단수형의 「a」, 「an」, 및 「the」 의 단어가 포함되는 경우, 문맥으로부터 분명하게 그렇지 않은 것이 나타나 있지 않는 한, 단수 뿐만 아니라 복수의 것을 포함하는 것으로 한다.

[0044] 이하에 실시예를 나타내어 추가로 본 발명의 설명을 실시하지만, 실시예는, 어디까지나 본 발명의 실시형태의 예시에 불과하며, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0045] 실시예

- [0046] 1. 재료와 방법
- [0047] 1-1. VLP 의 조제
- [0048] 지방 독립 행정 법인 오사카 건강 안전 기반 연구소로부터 분여된 HuNoV (human norovirus) 를 포함하는 분변으로부터 바이러스를 조 (粗) 정제하고, 거기로부터 바이러스 계놈을 조제하였다. 조제한 계놈 상의 GII.4, GII.17 또는 GII.2 의 VP1 ORF 의 외측에 프라이머를 설정하여 각 ORF 영역을 PCR 로 증폭시키고, 그 증폭 산물의 뉴클레오티드 서열을 결정하였다. 각 VP1 의 ORF 는, pFastBac Dual Expression Vector (Invitrogen) 에 클로닝하였다. GII.4 VP1 의 아미노산 서열 및 이것을 코딩하는 핵산 서열을 각각 서열 번호 1 및 서열 번호 2 에, GII.17 VP1 의 아미노산 서열 및 이것을 코딩하는 핵산 서열을 각각 서열 번호 3 및 서열 번호 4 에, GII.2 VP1 의 아미노산 서열 및 이것을 코딩하는 핵산 서열을 각각 서열 번호 5 및 서열 번호 6 에 나타낸다. 각 컨스트럭트는, 그 서열이 올바른 것을 확인한 후, Bac-to-Bac expression system (Invitrogen) 의 재조합 바클로 바이러스의 제조에 사용하였다. High Five 세포 (Invitrogen) 에 대하여 각 재조합 바클로 바이러스를 MOI (multiplicity of infection), 7 pfu (plaque-forming units)/세포로 감염시켰다. 감염으로부터 6 일 후, 배양 상청을 회수하고, 20,000 g 으로 1 시간 원심하였다. 얻어진 상청을 100,000 g 으로 2 시간 초원심하고, 침전된 VLP 를 PBS 에 현탁하였다. 농축된 VLP 는, 10 % ~ 60 % 수크로오스 밀도 구배로 중층 (重層) 하고, 100,000 g 으로 1 시간 초원심을 실시하고, 정제하였다. 수크로오스 밀도 구배를 통한 VLP 를 2 L 의 PBS 에 대하여 3 회 투석하고, 샘플 중의 수크로오스를 제거하였다. VLP 는 AmiconUltra 30-kDa centrifugal filter (Millipore) 로 농축시켰다.
- [0049] 1-2. 노로 바이러스 VLP 의 나노겔에 의한 피복화
- [0050] cCHP 나노겔은, 기보 (Ayame 등, Bioconjugate Chem 19 : 882-890, 2008) 의 방법에 따라서 조제하였다. 조제한 나노겔 (4 분자의 cCHP 가 1 분자의 나노겔을 형성하는 것으로 하여 다양한 산정을 실시하였다 ; Kuroda 등, Langmuir 18, 3780-3786, 2002) 과 정제한 노로 바이러스 VLP (virus like particle) (VP1 (60 kDa) 분자가 180 개로 1 분자의 VLP 를 형성하는 것으로 하여 다양한 산정을 실시하였다 ; Glass 등, N. Engl. J. Med 361, 1776-1785, 2009) 를 분자비 (VLP : 나노겔), 1 : 18 또는 1 : 180 으로 혼합하고, 40 °C 의 히트 블록에서 1 시간 인큐베이트한 후, 4 °C 에서 하룻밤 정치하였다.
- [0051] 1-3. 나노겔 피복 노로 바이러스 VLP 에 의한 마우스 경비 면역
- [0052] 나노겔-VLP 복합체 또는 VLP (복합체를 형성하지 않은 VLP, 이하 동일), Balb/c 마우스의 7 주령 암컷에 경비적으로 투여하였다. 투여 항원량은, 1 마리 1 회당 VLP 단백질로 환산하여 5 µg 을 투여하였다. 경비 면역은 1 주 간격으로 합계 3 회 실시하였다. 최종 면역으로부터 1 주일 후에, 혈청, 비 세정액, 장관 세정액, 분변을 채취하였다. 분변은 100 mg/mL 의 PBS 에 현탁 후, 그 상청을 검체로 하였다.
- [0053] 1-4. 항노로 바이러스 VLP 항체의 항체가의 측정
- [0054] 항원 특이적인 항체 응답에 대해, ELISA 법에 의해 해석을 실시하였다 (Kong 등, Infect Immun 81 : 1625-1634, 2013 을 참조). PBS 중, 1 µg/mL 의 VLP 를 4 °C 에서 하룻밤, 96 웰 플레이트에 코트하였다. 1 % BSA 를 포함하는 PBS-Tween 으로 블로킹을 한 후, 10 배로 연속 희석시킨 샘플을 첨가하고, 실온에서 2 시간 인큐베이트하였다. 세정 후, HRP 결합 염소 항마우스 IgG (Southern Biotech 사) 또는 HRP 결합 염소 항마우스 IgA (Southern Biotech 사) 를 1 : 4,000 으로 희석시켜, 웰에 첨가 후, 실온에서 1 시간 30 분 인큐베이트하였다. 인큐베이트 후, TMB Microwell Peroxidase Substrate System (XPL 사) 으로 발색시켰다. 엔드포인트 타이터는, 네거티브 컨트롤보다 OD450 의 값이 0.1 이상 높은 최종 희석 배율에 대해, 대수 표시한 (reciprocal log10 titer) 로 표시하였다.
- [0055] 1-5. 인간 iPS 세포로부터 유도한 오르가노이드 또는 단층화 세포를 사용한 노로 바이러스의 증식의 중화 활성 측정법
- [0056] 인간 iPS 세포주로부터 유도한 장관 오르가노이드의 Matrigel (Corning) 상에서의 배양, 및 단층화의 방법, 그리고 그것들을 사용한 항 VLP 항체에 의한 노로 바이러스의 증식의 중화 활성 측정은, 기보 (Sato 등, Cell Mol Gastroenterol Hepatol 7 : 686-688, 2019) 에 기재된 방법에 따라서 실시하였다. 노로 바이러스 (GII.4_2012 Sydney, GII.17_2015 Kawasaki 및 GII.2 OSN201926 ; 오사카 건강 안전 기반 연구소로부터 공여) 용액은 기본 배지 (Advanced DMEM/F12 (Gibco) 에 10 mM HEPES (pH 7.3, Gibco), 2 mM Glutamax (Gibco) 및 100 units/mL Penicillin plus 100 µg/mL streptomycin (Gibco) 을 첨가한 것) 로 100 µL 당 2×10^6 계놈

카피가 되도록 희석시켰다. 그 후, 세포에 감염시키기 전에 희석된 바이러스 용액을 적당히 희석된 마우스 항혈청 혹은 비 세정액과 혼합하거나, 또는 마우스 항혈청, 비 세정액과 혼합하지 않고, 37 °C 에서 90 분간 인큐베이트하였다. 얻어진 바이러스 용액을 장관 상피 세포로의 감염에 사용하였다.

[0057] 단층화된 장관 상피 세포에, 희석된 바이러스액을 100 μL 첨가하여, 바이러스를 장관 상피 세포에 감염시킨 후, 37 °C, 5 % CO₂ 조건하에서, 1 시간 또는 3 시간 인큐베이트하였다. 그 후, 바이러스액을 제거하고, 세포를 150 μL 의 기본 배지로 2 회 세정하였다. 세정 후의 웰에 분화 배지 (기본 배지에 1 × B-27 base medium, 1.25 % 송아지 혈청 (Biosera), 50 ng/mL 마우스 EGF, 375 ng/mL 마우스 R-Spondin1 (R & D Systems), 50 ng/mL 마우스 Noggin (Peprotech) 및 500 nM A83-01 을 첨가한 것) 에 담즙을 0.03 % 첨가한 용액을 100 μL 첨가한 후, 바로 상청을 회수하였다. 바이러스 감염 후 1 시간 또는 3 시간의 배양 상청을, 각각 1 hpi (1 hour post infection) 또는 3 hpi 샘플로 하였다.

[0058] 이어서, 상청 회수 후의 웰에 100 μL 의 분화 배지 및 0.03 % 담즙을 첨가하고, 37 °C, 5 % CO₂ 조건하에서, 48 시간 인큐베이트하였다. 이 상청을 48 hpi (48 hour post infection, 감염 후 48 시간) 로서 회수하였다. 바이러스 계놈 카피의 정량은 High Pure Viral RNA Kit (Roche) 를 사용하여, 희석된 바이러스 용액, 감염 후 1 시간 (상기 1 hpi), 3 시간 (상기 3 hpi) 또는 48 시간 (상기 48 hpi) 에 회수한 샘플로부터 RNA 를 조제하였다. RT-qPCR 은, qPCR (GI/GII) Typing Kit (TakaRa) 및 StepOne Plus 리얼타임 PCR 시스템 (Applied Biosystems) 을 사용하여 실시하였다.

[0059] 1-6. 나노겔 피복 노로 바이러스 VLP 의 네거티브 염색에 의한 전자 현미경 관찰

[0060] GII.17 VLP 와 cCHP 를 몰비 1 : 18 의 비율로, 혹은, GII.2 VLP 와 cCHP 를 몰비 1 : 180 의 비율로 나노겔화 하여, 관찰용 샘플로 하였다. 또, 이미 보고가 있는 나노겔 내포형의 나노겔-항원 복합체로서, PspA 와 cCHP 를 몰비 1 : 1 의 비율로 나노겔화하였다. GII.17 VLP 는 PBS (-) 로 0.5 mg/mL 로 희석시키고, GII.2 VLP 는 PBS (-) 로 0.1 mg/mL 로 희석시켰다. cCHP 는, 1 % cCHP 를 원액으로 사용하였다. 카본 증착과 친수화 처리를 실시한 포름바 지지막을 붙인 그리드 (MAXTAFORM 그리드 HF36 Cu 400 메시) 에 샘플을 5 μL 엮고, 1 분간 염색하였다. 샘플액을 제거하고 1 % 아세트산우라늄 용액 (증류수에 용해) 으로 부(負) 염색한 후, 투과형 전자 현미경 (JEM-1400, 니혼 전자 주식회사) 으로 관찰을 실시하였다.

[0061] 2. 결과

[0062] 2-1. 본 실시예의 개략

[0063] 종래 보고되어 있는 방법에 의해, 항원을 나노겔에 내포화하여 경비 면역시킴으로써 효과적인 면역을 유도할 수 있다. 이 경우, 항원과 모노머인 cCHP 의 최적의 혼합 비율은, 분자비 (항원 : cCHP) 로 1 : 2 내지 1 : 8 정도이다. 이것을 항원과 구상의 나노겔 (4 분자의 cCHP 로 1 분자의 나노겔이 형성된다 : Kuroda 등, Langmuir 18 : 3780-3786, 2002) 의 비율로 환산하면, 1 : 0.5 내지 1 : 2 (항원 : 나노겔) 가 된다. 따라서, 1 분자의 나노겔에, 1 분자 내지 2 분자 정도의 단백질 항원이 내포되어 있게 된다 (Yuki 등, Molecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021).

[0064] 이상의 지견을 참고로 하여, 항원이 나노겔보다 큰 경우 (즉, 항원을 나노겔에 내포화할 수 없는 경우), 항원을 나노겔로 피복함 (항원 표면에 나노겔을 부착시킴) 으로써, 나노겔이 갖는 경비 면역에서의 유용성을 발휘시킬 수 있는지 검토하였다. 구체적으로는, 30 내지 40 nm 의 구상 구조의 VLP 를 형성하는 노로 바이러스 VLP (GII.17 및 GII.4) 를 항원으로 하고, VLP 에 대한 나노겔의 분자비 (VLP : 나노겔) 를, 1 : 180 및 1 : 18 정도로 하여, VLP 에 대한 나노겔의 비율을 종래의 방법보다 대폭 높여, 나노겔-VLP 복합체의 조제를 실시하였다 (도 1 참조).

[0065] 2-2. 나노겔 피복형 VLP (GII.17 및 GII.4) 의 마우스 경비 면역 응답

[0066] 항원 분자에 대한 나노겔의 분자수가 대과잉인 상태, 즉, 노로 바이러스 VLP 에 대한 나노겔의 분자비를 1 : 180 으로 하여, 노로 바이러스 VLP (GII.17 및 GII.4) 와 나노겔의 복합체를 형성시켰다. GII.17 VLP 만 또는 나노겔-GII.17 VLP 복합체로, 마우스를 1 주일 간격으로 3 회 경비 면역시켰다. 1 주일 후의 항원 특이적인 혈청 IgG, 비강 세정액 중 IgA 및 분변 중 IgA 의 항체가를 도 2A 에 나타낸다. 나노겔-GII.17 VLP 복합체로 면역시킨 모든 마우스에 있어서 유도된 항체가는, VLP 만으로 면역시킨 경우의 항체가와 비교하여, 약 10 배 이상의 상승이 확인되었다.

[0067] 도 2B 는, 동일한 조건에서의, GII.4 VLP 만 또는 나노겔-GII.4 VLP 복합체로의 경비 면역의 결과를 나타낸다.

나노겔-GII.4 VLP 복합체로 면역시킨 모든 마우스에 있어서 유도된 항체가는, VLP 만으로 면역시킨 경우의 항체가와 비교하여, 약 10 배 이상의 상승이 확인되었다.

[0068] 2-3. 나노겔 피복형 VLP (GII.17) 의 마우스 경비 면역 응답

[0069] 다음으로, VLP 에 대한 나노겔의 혼합 비율을 상기 2-2 의 경우의 혼합 비율의 1/10 로 하여, 즉 항원 (VLP) 에 대한 나노겔의 분자비 (VLP : 나노겔) 를 1 : 18 로 하여 노로 바이러스 VLP (GII.17) 와 나노겔의 복합체를 형성시켰다. GII.17 VLP 만 또는 나노겔-GII.17 VLP 복합체로, 마우스를 1 주일 간격으로 3 회 경비 면역시켰다. 1 주일 후의 항원 특이적인 혈청 IgG 및 비장 세정액 중 IgA 의 항체가를 도 3 에 나타낸다. VLP 에 대한 나노겔의 혼합비를 낮춘 경우에 있어서도, 항원 특이적 혈청 IgG 및 비 세정액 IgA 의 항체가는, VLP 만으로 면역시킨 경우의 항체가에 비해, 약 10 배 이상의 상승이 확인되었다.

[0070] 2-4. 나노겔 피복형 VLP (GII.17 VLP 및 GII.4 VLP) 에 의해 유도된 항체의 중화 활성의 검토

[0071] 다음으로, 나노겔 피복형 VLP (GII.17 VLP 및 GII.4 VLP) 에 의해 유도된 항체가, 중화 활성, 즉, 노로 바이러스의 장관 상피 세포 중에서의 증식을 억제하는 활성을 갖는지의 여부에 대해 검토를 실시하였다. 노로 바이러스의 증식은, 배양 상층 중의 바이러스 계층의 카피수를 지표로 하여 평가하였다. 결과를 도 4 에 나타낸다. 나노겔 피복형 VLP 의 경비 투여에 의해 유도된 혈청 IgG 및 비 세정액 IgA 는, VLP 가 GII.17 VLP (도 4A) 및 GII.4 VLP (도 4B) 의 어느 경우에 있어서도, 각각 노로 바이러스 GII.17 및 노로 바이러스 GII.4 의 장관 상피 세포 내에서의 증식을 억제하는 것이 확인되었다. 즉, 나노겔 피복형 VLP 의 경비 면역에 의해 유도되는 항체는, 현저한 중화 활성을 갖고 있는 것을 알 수 있었다.

[0072] 2-5. 나노겔 피복형 VLP (GII.2 VLP) 의 마우스 경비 면역 응답

[0073] GII.2 VLP 에 대한 나노겔의 분자비를 1 : 180 으로 하여, GII.2 VLP 와 나노겔의 복합체를 형성시켰다. GII.2 VLP 만 또는 나노겔-GII.2 VLP 복합체로, 마우스를 1 주일 간격으로 3 회 경비 면역시켰다. 1 주일 후의 항원 특이적인 혈청 중 IgG, 비장 세정액 중 IgA, 타액 중 IgA 및 장관 세정액 중 IgA 의 항체가를 도 5 에 나타낸다. 나노겔-GII.2 VLP 복합체로 면역시킨 모든 마우스에 있어서 유도된 항체가는, VLP 만으로 면역시킨 경우의 항체가와 비교하여, 약 10 배 ~ 100 배 이상의 상승이 확인되었다. 특히, 장관 세정액 중의 항체가의 상승이 현저하였다.

[0074] 2-6. 나노겔 피복형 VLP (GII.2 VLP) 에 의해 유도된 혈청 중의 IgG 항체의 중화 활성의 검토

[0075] 나노겔 피복형 VLP 의 경비 투여에 의해 유도된 혈청 중 IgG 는, VLP 만을 경비 투여한 경우에 유도되는 혈청 중 IgG 와 비교하여, 노로 바이러스 (HuNoV GII.2) 의 장관 상피 세포 내에서의 증식을 보다 강하게 억제하는 것이 확인되었다 (도 6).

[0076] 2-7. 나노겔 피복형 VLP (GII.2 VLP) 에 의해 유도된 장관 세정액 중의 IgA 항체의 중화 활성의 검토

[0077] 다음으로, 나노겔 피복형 VLP 의 경비 투여에 의해 유도된 혈청 중 IgG 는, VLP 만을 경비 투여한 경우에 유도되는 혈청 중 IgA 와 비교하여, 노로 바이러스 (HuNoV GII.2) 의 장관 상피 세포 내에서의 증식을 보다 강하게 억제하는 것이 확인되었다 (도 7).

[0078] 특별해야 할 것은, 본 실시예에 있어서, 나노겔로 피복한 GII.2 VLP 를 경비 면역시키면, GII.2 VLP 만을 단독으로 경비 면역시킨 경우보다, 장관 세정액 중에, HuNoV GII.2 특이적 IgA 항체가 100 배 이상 많이 유도되어, HuNoV GII.2 의 증식이 매우 효과적으로 억제되는 것을 실증할 수 있었던 점이다. 이 결과에 의해, 노로 바이러스의 경비 백신의 임상 응용에 매우 기대를 가질 수 있다. 즉, 종래, 이와 같은 경비 VLP 백신으로 노로 바이러스의 방어 효과를 얻기 위해서는 애주번트가 필요해지는 것이 보고되어 있었다 (Atma 등, N. Eng. J. Med. 365 : 2187-87, 2011). 그러나, 본 실시예에서 나타난 결과에 입각하면, 제제 첨가물인 나노겔로 항원을 피복함으로써, 애주번트 미첨가의 노로 바이러스 경비 백신의 제조가 충분히 가능한 것으로 생각된다.

[0079] 2-6. 네거티브 염색에 의한 나노겔 피복형 VLP 의 전자 현미경 관찰

[0080] 도 8A 는, GII.17 VLP 단독 샘플의 전자 현미경 관찰 상을 나타낸다. 입경이 약 38 nm 이고 정이십면체의 중공 입자인 VLP 가 관찰되었다. 한편, 1 % cCHP 만의 샘플 중에 있어서의 나노겔의 크기 (입경) 는 약 20 ~ 40 nm 이고, 콘트라스트가 약간 약한 하얗게 발색된 입자상의 연속으로서 관찰되었다 (도 8B). 나노겔 피복형 VLP 의 전자 현미경 관찰 화상에 있어서는, VLP, 나노겔이 보이는 것 외에, 나노겔과 복합체를 형성하고 있는 VLP 가 관찰되었다 (도 5C 의 확대도 중, 화살표로 나타낸다). 나노겔과 복합체를 형성하고 있는 VLP

는, 표면이 cCHP (나노겔) 에 덮여져 있기 때문에 전체적으로 흰 원반상으로 보였다. 또, 진공 상태에서 관찰하고 있기 때문에 VLP 의 중앙이 패인 결과, 속이 들여다보여 약간 어둡게 보이는 구상의 입자로서 관찰되었다.

[0081] 또, 도 9A 및 도 9B 는, GII.2 VLP 단독 샘플의 관찰 상을 나타낸다. 입경이 약 30 ~ 40 nm 이고 정이십면체의 중공 입자인 GII.2 VLP 가 관찰되었다. 실제로, 이 GII.2 VLP 는 분자량 60,000 의 VP1 의 180 개로 형성되어 있고, 분자량 약 1000 만이다. 나노겔화 GII.2 VLP 의 관찰 상 (도 9C 및 도 9D) 에서는, 나노겔화되어 있지 않은 VLP 나 cCHP 가 보임과 함께, 나노겔화되어 있는 것으로 생각된 입자는 표면이 cCHP 에 덮여졌기 때문에 전체적으로 흰 ~ 옅은 그레이의 입체적인 구상으로 관찰되고 (도면 중의 화살표), VLP 보다 약간 큰 사이즈의 것이 피복 상태의 나노겔인 것으로 생각되었다. 이와 같이 관찰되는 것은, 상기 서술한 나노겔 피복형 GII.17 VLP 와 동일하게, 진공 상태에서 중앙이 패였기 때문에 VLP 의 중공이 들여다보여 약간 어둡게 보이는 구상의 입자로서 관찰된 것과 동일하다고 생각된다. 한편, 1 % cCHP 단독 샘플 (도 9E) 의 크기는 약 15 ~ 40 nm 이고 약간 폭이 보이며, 하얗게 발색된 입자상으로서 관찰되었다. PspA 는 투과형 전자 현미경 관찰에 있어서 단독으로의 확인이 곤란하기 때문에 나노겔화된 PspA 를 관찰한 결과, 관찰 상은 cCHP 단독과 비교하여 큰 변화는 거의 보이지 않았다 (약 20 ~ 40 nm).

[0082] 이상의 전자 현미경 관찰의 결과로부터, cCHP (나노겔) 가 VLP 의 주위를 덮도록 하여 부착시켜, 피복화되어 있는 것이 시사되었다.

[0083] 2-7. DLS (dynamic light scattering) 법에 의한 나노겔 피복형 VLP 의 입경의 측정

[0084] 전자 현미경에 의한 관찰에 추가하여, cCHP 나노겔, GII.2 VLP 및 나노겔 피복형 GII.2 VLP 의 입경을 DLS 법으로 측정하고, 각각의 입경을 비교하였다 (표 1).

표 1

표 1. DSL 측정

샘플	D _H (nm)	PDI
cCHP 나노겔	51.8	0.394
GII.2 VLP	69.7	0.345
cCHP나노겔화 VLP (몰비 1 : 180)	109.2	0.308
cCHP나노겔화 PspA (몰비 1:1)	53.8	0.407

[0085]

[0086] 그 결과, cCHP 나노겔은, 입경 (DH) 52 nm, 다분산도 (PDI) 0.394 였다. 또, GII.2 VLP 는 입경 70 nm, PDI : 0.345 로 TEM 관찰 상과 비교하여 커져 있지만, PDI 가 약간 큰 점에서 양자 모두 근소한 응집체 등의 영향에 의해 값이 커져 있는 것으로 생각된다. 나노겔로 피복화한 VLP 는, 입경 109 nm, PDI : 0.308 로 되어 있어, 나노겔의 피복화에 의한 입경 증가가 값으로서 나타나 있는 결과가 되었다. 한편, 나노겔에 내포한 PspA 의 입경 및 PDI 는, 모두 cCHP 나노겔의 입경 및 PDI 와 대략 동일하였다. 이상의 결과로부터, 나노겔에 내포된 PspA 항원 (나노겔 내포 PspA 항원) 에 비해, 나노겔로 피복된 나노겔 피복형 VLP 항원은, 입경이 증가하고 있으며, 상기 전자 현미경 관찰의 결과 (도 8 및 도 9) 가, DSL 측정 결과로부터도 확인할 수 있었다.

[0087] 2-8. 나노겔의 안전성의 검토 (참고)

[0088] 본 실시형태에 관련된 나노겔 피복형 항원 (거대 분자의 항원을 나노겔로 피복한 복합체) 은, 애주번트를 첨가하지 않고, 경비 백신으로서 임상 응용할 수 있다. 이와 같은 결과는, 과거의 인플루엔자 경비 백신과 대장균 이열성 독소 애주번트의 뇌내 이행 관련으로 경비 백신 개발에 실패한 문제 (Mutsch 등, N. Engl. J Med 350 : 896-903, 2004) 와도 관련되어, 매우 중요한 결과라고 할 수 있다. 본 발명자들은, 지금까지, 나노겔 경비 백신에 관하여, 항원 부분의 뇌내 이행을 부정하는 체내 동태 시험의 결과를 보고하고 있다 (Yuki 등, J. Immunol. 185 : 5436-5443 2010 ; Fukuyama 등, Mucosal Immunol. 8 : 1144-1153 2015). 이 결과에 추가하여, 새롭게, 나노겔 자체를 경비 투여하는 것에 의한 체내 동태에 대한 영향에 관하여, 특히 뇌내 이행에 대해, 검토한 데이터를 여기에 나타낸다. 도 10 에 나타내는 결과는, mRNA 백신의 DDS (제제 첨가물) 인 지질계 나노 입자 자체의 근육 내 주사에 의한 안전성에 관한 체내 동태 시험과 동일하게, 나노겔 (제제 첨가물로서

의) 자체의 경비 백신 제제로서의 체내 동태 시험으로 생각할 수 있다.

[0089] 나노겔의 체내 동태를 조사하기 위해, 먼저, 나노겔을 ^{111}In 으로 표지하였다. ^{111}In 표지한 나노겔을 DEAE Sepharose 칼럼을 사용하여, 미반응의 ^{111}In 과 ^{111}In 표지화 나노겔과 분리하고, ^{111}In 표지화 나노겔을 정제하였다. 정제한 ^{111}In 표지화 나노겔 (나노겔로서 0.1 mg) 을, 마우스 (n = 3) 에 경비 투여 후, 0.25 시간, 1 시간, 3 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간 및 72 시간에, 각종 장기에 있어서의 ^{111}In 의 방사 활성을 측정하였다 (도 10). 그 결과, 제제 첨가물인 cCHP 나노겔은, 후구 및 뇌내로는 이행하지 않는 것이 밝혀져, 나노겔 자체의 안전성을 확인할 수 있었다. 또한, ^{111}In 표지는, 기보 (Yuki 등, J. Immunol 185 : 5436-5443, 2010) 에 기초하여 실시하였다.

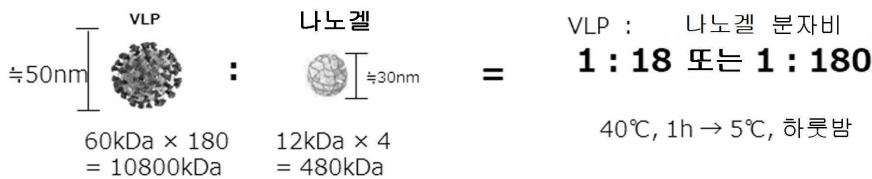
산업상 이용가능성

[0091] 본 발명은, 지금까지 제제화 곤란하였던, 큰 항원 분자를 포함하는 나노겔 백신 제제를 제공하는 것이며, 의학 분야에 있어서의 이용이 기대된다.

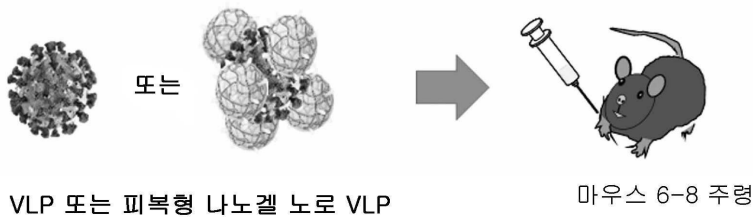
도면

도면1

나노겔화 조건

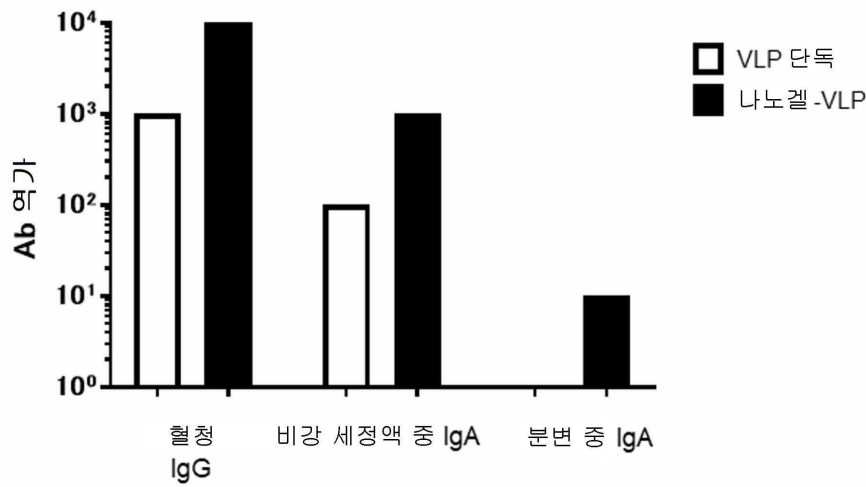


노로 바이러스의 VLP 를 사용한 나노겔 피복 검증 실험

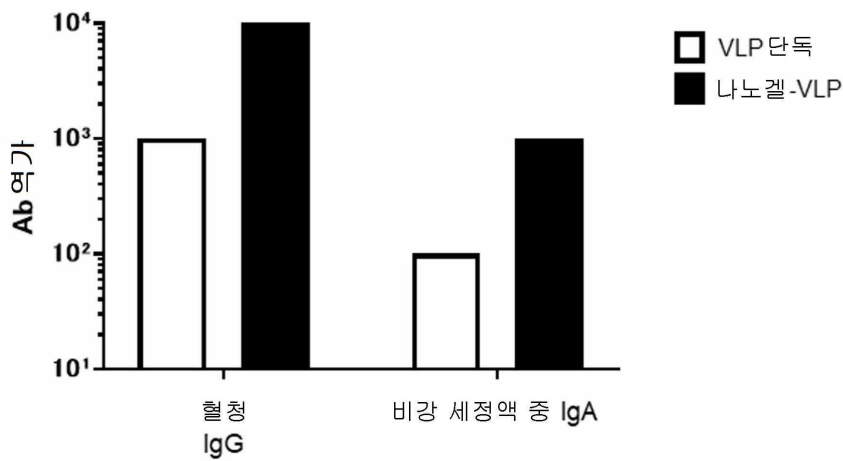


도면2

A 노로 바이러스 GII.17 VLP 에 대한 항체가 (비 1 : 180)

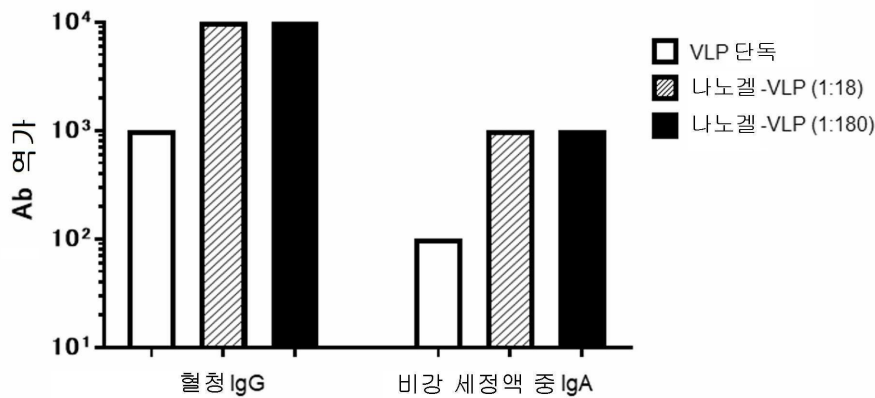


B 노로 바이러스 GII.4 VLP 에 대한 항체가 (비 1 : 180)



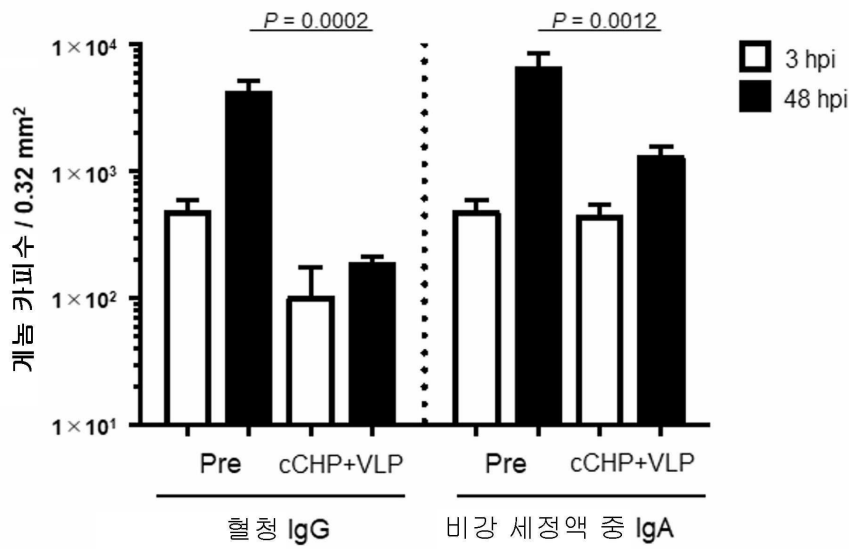
도면3

노로 바이러스 GII.17 VLP 에 대한 항체가 (비 1 : 18)

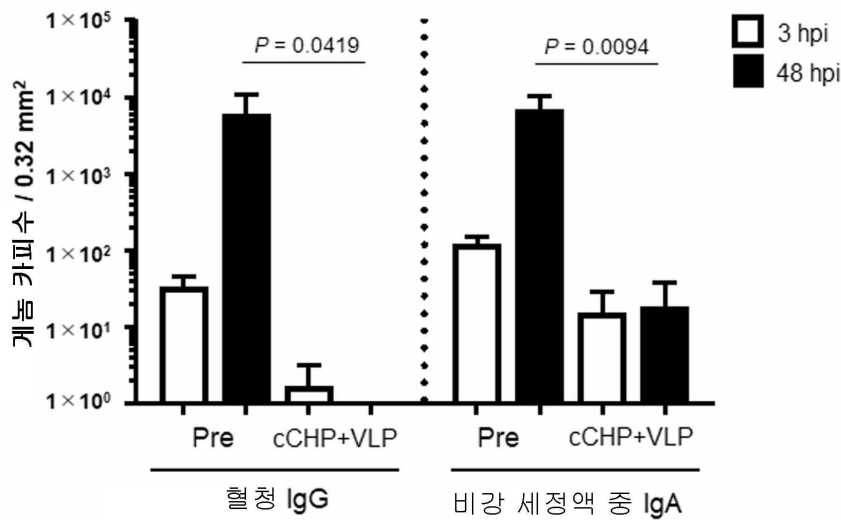


도면4

A 노로 바이러스 GII.17 에 대한 중화 효과 (비 1 : 180)

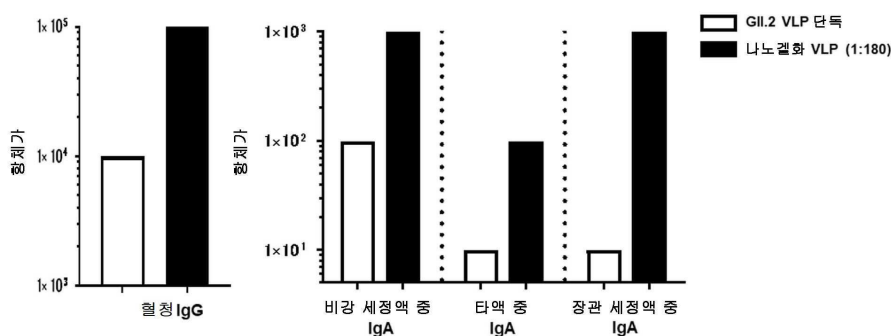


B 노로 바이러스 GII.4 에 대한 중화 효과 (비 1 : 180)



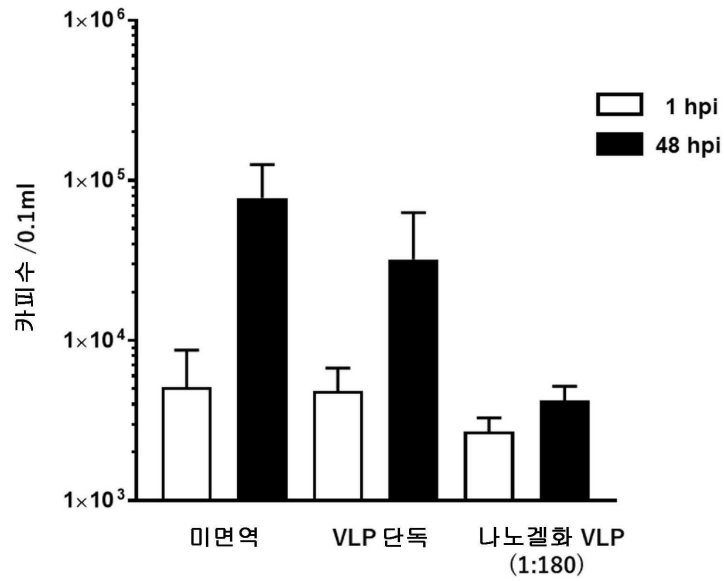
도면5

노로 바이러스 GII.2 VLP 의 경비 면역에서의 마우스 항원 특이적 항체가



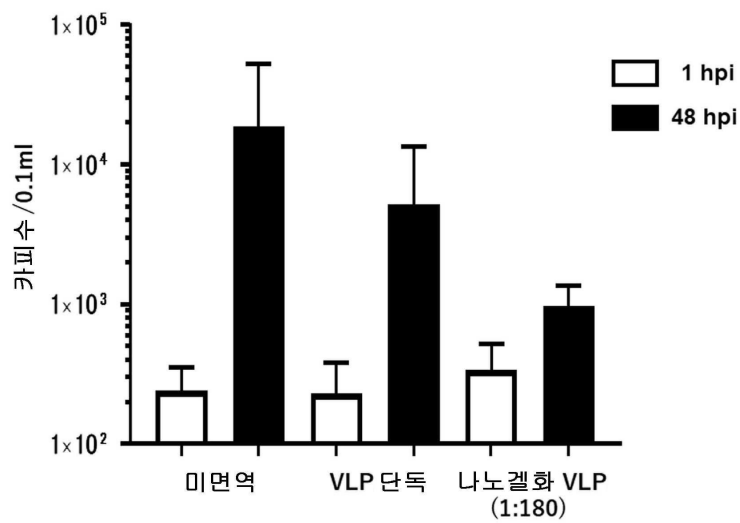
도면6

노로 바이러스 GII.2 에 대한 VLP 경비 면역의 혈청 중 IgG 의 중화 효과

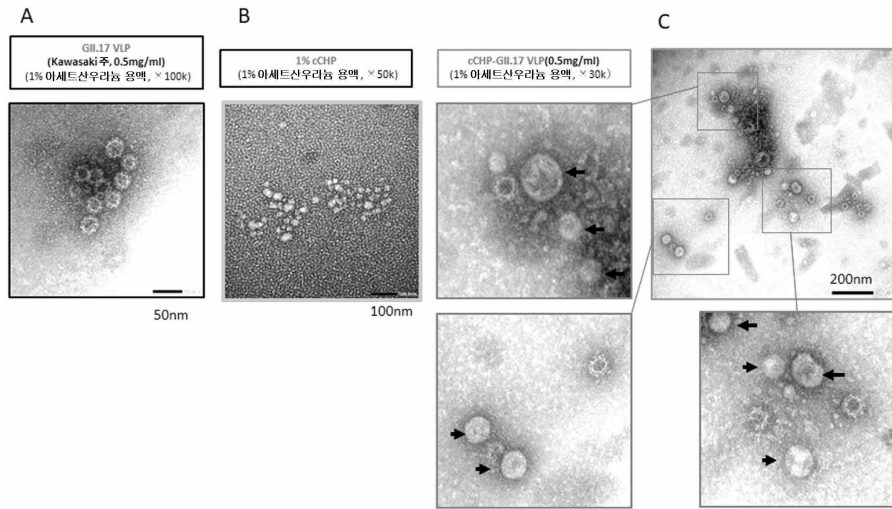


도면7

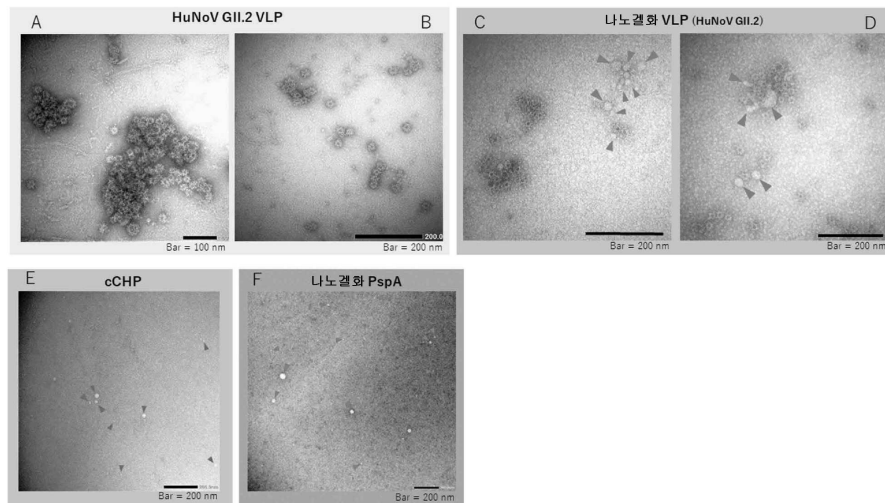
노로 바이러스 GII.2 에 대한 VLP 경비 면역에서의 장관 세정액 중 IgA 의 중화 효과



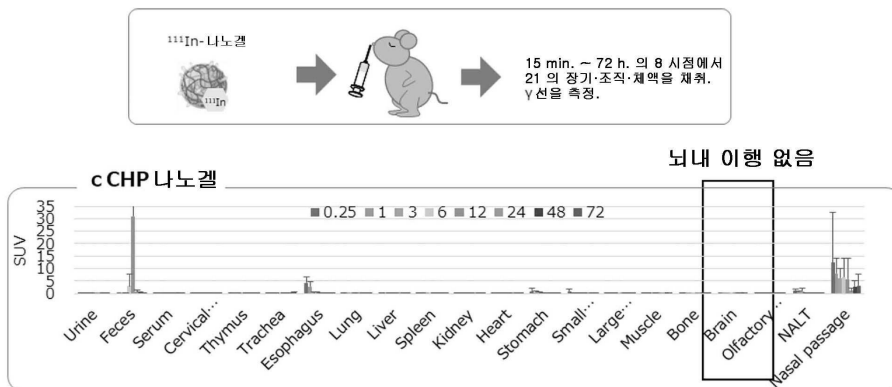
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The University of Tokyo

HanaVax Inc.

<120> Nasal vaccine coated with nanogels

<130> TPC0428UVT

<150> JP2021- 56392

<151> 2021-03-30

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 540

<212> PRT

<213> Human norovirus

<400> 1

Met Lys Met Ala Ser Ser Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Ala Ala

1 5 10 15

Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val

20 25 30

Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile

35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr

85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn

100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Val Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe

115 120 125

Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile

130 135 140

Val Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp

145 150 155 160
 Val Arg Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly
 180 185 190
 Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro
 195 200 205
 Asp Phe Asp Phe Ile Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Arg Thr
 210 215 220

 Lys Pro Phe Ser Val Pro Val Leu Thr Val Asp Glu Met Thr Asn Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Pro Ile Pro Leu Glu Lys Leu Phe Thr Gly Pro Ser Ser Ala
 245 250 255
 Phe Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Thr Thr Asp Gly Val Leu
 260 265 270
 Leu Gly Thr Thr Gln Leu Ser Pro Val Asn Ile Cys Thr Phe Arg Gly
 275 280 285

 Asp Val Thr His Ile Thr Gly Ser His Asn Tyr Thr Met Asn Leu Ala
 290 295 300
 Ser Gln Asn Trp Ser Asn Tyr Asp Pro Thr Glu Glu Ile Pro Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Gly Thr Pro Asp Phe Val Gly Lys Ile Gln Gly Met Leu Thr Gln
 325 330 335
 Thr Thr Arg Thr Asp Gly Ser Thr Arg Gly His Lys Ala Thr Val Tyr
 340 345 350

 Thr Gly Ser Ala Asp Phe Ala Pro Lys Leu Gly Arg Val Gln Phe Glu
 355 360 365
 Thr Asp Thr Asn Asn Asp Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Phe Thr
 370 375 380
 Pro Val Gly Val Ile Gln Asp Gly Gly Thr Thr His Arg Asn Glu Pro
 385 390 395 400

Gln Gln Trp Val Leu Pro Ser Tyr Ser Gly Arg Asn Thr Pro Asn Val
 405 410 415

His Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu
 420 425 430

Phe Phe Arg Ser Thr Met Pro Gly Cys Ser Gly Tyr Pro Asn Met Asp
 435 440 445

Leu Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln Tyr Phe Tyr Gln Glu
 450 455 460

Ala Ala Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro
 465 470 475 480

Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr
 485 490 495

Val Thr Val Ala His Thr Gly Gln His Asp Leu Val Ile Pro Pro Asn
 500 505 510

Gly Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala
 515 520 525

Pro Met Gly Asn Gly Ala Gly Arg Arg Arg Ala Leu
 530 535 540

<210> 2

<211

> 1623

<212> DNA

<213> Human norovirus

<400> 2

atgaagatgg cgtcgagtga cgccaacca tctgatgggt cgcgagccaa cctcgtccca 60
 gaggtcaaca atgaggttat ggctctggag cccgttggtg gtgccgcat tgcggcacct 120
 gtagcgggcc aacaaaatgt aattgacccc tggattagaa acaattttgt acaagcccct 180
 ggtggagagt ttacagtatc cctagaaac gctccaggtg aaatactatg gagcgcgccc 240
 ttgggcctg atctaaatcc ctacttatct cacttggcca gaatgtacaa tggttatgca 300
 ggtggttttg aagtgcaggt aattctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaggtcata 360

 ttgacagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggcttga gccccagcca ggtcactatg 420
 ttccccata tagtagtaga tgtaggcaa ctagaacctg tgttgattcc cttaccgat 480

gttaggaata atttctatca ttacaatcaa tcaaatgacc ccaccattaa gttgatagca 540
 atgttgata caccacttag ggctaataat gctgggatg atgtcttcac agtttcttgc 600
 cgagtctca cgagaccatc ccccgatttt gatctcatat ttctagtgcc acccacagtt 660
 gagtcaagaa ctaaaccatt ctctgtccca gttttaactg ttgatgagat gaccaattca 720
 agattccca ttcctttgga aaagtgttc acgggtccca gcagtgctt tgttgtccaa 780

ccacaaaacg gtaggtgcac gactgatggc gtgctcctag gcaccacca actgtctcct 840
 gtcaacatct gcaccttcag aggagatgtc acccatatca caggtagtca taactacaca 900
 atgaatttg cttctcaaaa ttggagcaat tacgacccaa cagaagaaat cccagccct 960
 ctagggactc cagactttgt ggggaagatt caaggcatgc ttacccaaac cacaaggaca 1020
 gatggttcaa cacgcgcca caaagccaca gtgtactg ggagcgccga ctttgctcca 1080
 aaactggga gagttaatt tgaaactgac acaacaatg atttgaagc taacaaaac 1140
 acaaagtca cccagttgg tgtcatccaa gatggtggca ccaccaccg aatgaacce 1200

caacagtggg tgcctccaag ttactcaggc aggaacactc ctaatgtgca tctggccccc 1260
 gctgtggccc ccacttttc gggtagcaaa ctctcttct tcagatccac catgcccgga 1320
 tgcagcgggt accccaacat ggatttggat tgtctgtcc cccaggaatg ggtgcagtac 1380
 ttctaccaag aggcagcccc agcacaatct gatgtgctc tgctaagatt tgtgaatcca 1440
 gacacaggta gggttttgt tgaatgtaag cttcataaat caggctatgt tacagtggct 1500
 cacactggcc aacatgattt ggttatcccc cccaatggtt attttaggtt tgattcctgg 1560
 gtcaaccagt ttacacgct tgccccatg ggaatggag cggggcgtag acgtgcactg 1620

taa 1623

<210> 3

<211> 540

<212> PRT

<213> Human norovirus

<400> 3

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala

1 5 10 15

Gly Leu Val Pro Glu Gly Asn Asn Glu Thr Leu Pro Leu Glu Pro Val

20 25 30

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

35 40 45

<210> 4

<211> 1623

<212> DNA

<213> Human norovirus

<400> 4

```

atgaagatgg cgtcgaatga cgccgctcca tctaatgatg gtgctgctgg tctcgtacca      60

gagggcaaca acgagaccct tcccctagaa ccagttgcgg gcgcagctat agccgcaccc      120
gtcactggcc aaaataacat aattgacccc tggattagaa caaatTTTgt gcaagcacca      180
aatggagagt tcacagtgtc acccagaaac tctcctggag aaatTTTatt aaatTTtagag      240
ttgggcctg atttgaacct ttattTggct cattTgtcaa ggatgtacaa tgggtatgct      300
ggTggagtgg aagtTcaggt tctcctggca gggaacgcgt tCactgccgg aaagatcctc      360
ttcgccgccc tcccgcaaaa tttccagtg gaattcttaa gcccagcca gatcacaatg      420
ctccacatt taatagtaga tgTtaggact ctTgaaccaa ttatgatccc actccctgat      480

gttaggaata cattcttcca ttatagtaac cagcctaaca gccgcatgag attagtggct      540
atgctctata cccactcag atctaatggc tcaggtgatg atgctTTtac tgtctctTgc      600
agggtcttga ctaggcctac tcttgatTTt gagttcactt atTTtagtgc acTTctgtt      660
gaatctaaaa ctaagcTTt ttcctTacct atTTtaacce tttctgagct cacaaatTeg      720
aggTTtcag tcccacTga ttcgctTTt accgccaga ataatgtgtt gcaggtgcag      780
tgtcaaatg gcaggtgtac actTgatggT gagttacaag gcacaacca gtTgctcca      840
actggcatct gtgcattcag aggacgggtg acagcacaaa ttaaccaacg tgacaggtgg      900

cacatgcaac tgcaaaacct caatgttaca acatatgacc caactgatga tTgTccagcc      960
ccgctgggta cacctgactt caagggcgtc gtgtTTggga tggtaagcca aagaaatgtg      1020
ggtaatgatg cgctTggTc aaccagagcc caacagcgt gggtTTcaac ctatagcccc      1080
caatTTgtcc caaattagg tTctgtcaat ctTtaggatta gtgataatga tgattTcaa      1140
ttccagccga caaattcac accagtggc gtcaatgatg acgatgatgg ccaccgTtC      1200
agacaatggg aactacaaa ctattcaggg gagctTacct tgaatatgaa tctTgcccc      1260
ccagtTgctc caaattTtc tggTgaacaa ttgttattct tcagatcttt cgtgccatgc      1320

tcaggaggTt acaaccaagg tattatagat tTctttattc cccaagaatg gatccaacac      1380
ttctatcagg aatcagcacc ctcccagTca gacgtggccc taatcaggtA tTtcaacccc      1440
gatacgggac gtacactgtt tgaagcaaaa ttgcacagat ctggTtacct cactgtggt      1500
cactctggag actatcctct tgtTgttccg gctaatggac actTTtagatt tgattctTgg      1560

```

gtaaactcagt ttactcact cgccccaatg ggaactggga atgggcgaag gagggctcag 1620

taa 1623

<210> 5

<211> 542

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Thr Asp Gly Ala Ala

1 5 10 15

Gly Leu Val Pro Glu Ser Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val

20 25 30

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

35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Ala Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe

50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Glu

65 70 75 80

Leu Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr

85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Met Glu Val Gln Val Met Leu Ala Gly Asn

100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Leu Val Phe Ala Ala Val Pro Pro His Phe

115 120 125

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

130 135 140

Ile Ile Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Leu Pro Asp

145 150 155 160

Val Arg Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Lys Asp Asp Pro Lys Met

165 170 175

Arg Ile Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly

180 185 190

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

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

 Ala Pro Leu Gly Val Pro Asp Phe Gln Gly Arg Val Phe Gly Ile Ile
 325 330 335
 Ser Gln Arg Asp Lys His Asn Ser Pro Gly His Asn Glu Pro Ala Asn
 340 345 350
 Arg Gly His Asp Ala Val Val Pro Thr Tyr Thr Ala Gln Tyr Thr Pro
 355 360 365
 Lys Leu Gly Gln Ile Gln Ile Gly Thr Trp Gln Thr Asp Asp Leu Thr
 370 375 380

 Val Asn Gln Pro Val Lys Phe Thr Pro Val Gly Leu Asn Asp Thr Glu
 385 390 395 400
 His Phe Asn Gln Trp Val Val Pro Arg Tyr Ala Gly Ala Leu Asn Leu
 405 410 415
 Asn Thr Asn Leu Ala Pro Ser Val Ala Pro Val Phe Pro Gly Glu Arg
 420 425 430
 Leu Leu Phe Phe Arg Ser Tyr Ile Pro Leu Lys Gly Gly Tyr Gly Asn

tgtcaaatg gtaggtgac actggacggg gagctccaag ggacaacaca actccaagtc	840
agtggcattt gtgctttcaa aggtgaagtg accgcccact tacatgacaa tgatcaccta	900
tataatgtca ccatcacaaa cttgaatggg tccccttttg atccctccga ggatatccct	960
gcccctctgg gtgtgcctga cttccaggga agggtttttg gtatcatctc ccaaagagat	1020
aaacacaata gtctgggca taatgaacca gcaaacaggg gacacgacgc tgtggtcctt	1080
acttacacag cacagtacac tccaaaactt ggacaaattc aaattggcac atggcaaact	1140
gacgacctta cagtcaacca accagtcaaa ttcaccccag ttggactcaa tgacactgaa	1200
cattttaacc aatgggtggt ccctaggtat gctggtgccc taaacctcaa tacaaacctt	1260
gccccttctg ttgctccagt atttccggga gagcgctgc tcttcttcag atcatacatt	1320
ccctcaagg gcggttatgg aaaccagcc attgattgcc tactgccaca agagtgggtg	1380
caacacttct atcaggaagc agccccttca atgagtgagg tggccctcgt cagatacatc	1440
aacccggaca ctggtcgggc actgittgag gccaagctcc acagagctgg tttcatgaca	1500
gtctcgagca acaccagtgc cccggtggtt gtgctgcca acgggtactt cagatttgat	1560
tcttgggtga accaatttta ttctctgcc cccatgggaa ctgggaatgg gcgtagaagg	1620
gtccaataa	1629