



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0106433
(43) 공개일자 2008년12월05일

(51) Int. Cl.

C07K 14/11 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7022551

(22) 출원일자 2008년09월16일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년09월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/003969

국제출원일자 2007년02월13일

(87) 국제공개번호 WO 2007/095318

국제공개일자 2007년08월23일

(30) 우선권주장

60/773,378 2006년02월13일 미국(US)

60/813,955 2006년06월15일 미국(US)

(71) 출원인

프라운호퍼 유에스에이, 인코포레이티드

미국 미시간주 48170 플리마우스 포트 스트리트 46025

(72) 발명자

유시보브, 비다디

미국, 펜실베이니아 19083, 하베르타운, 마노르 로드 1808

메트, 바딤

미국, 델라웨어 19711, 네워크, 웬지우드 로드 115

무시처크, 콘스탄틴

미국, 펜실베이니아 19801, 스와스모어, 아파트. 2 에이, 에스. 프린세톤 애버뉴 101

(74) 대리인

강명구

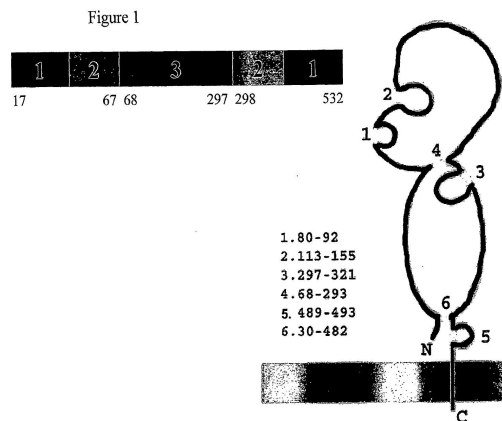
전체 청구항 수 : 총 94 항

(54) 인플루엔자 항원, 백신 조성물 및 관련 방법

(57) 요약

본 발명은 면역학, 단백질 조작, 특히 인플루엔자 바이러스에 의한 감염 예방에 유용한 항원 및 백신에 관계한다. 제조할 단백질 항원 및 이와 같은 항원 및 백신 조성물의 생산 및 이용 방법에 관계한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

열안정성 단백질에 융합된 인플루엔자 A 일체(integral)형 막 단백질의 성분을 포함하는 분리된 항원에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA), 뉴라미니다제(NA) 및 M2 도메인에서 선택된 최소 한가지 도메인으로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 헤마토글루티닌(HA) 도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20 및 SEQ ID No.: 24에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 뉴라미니다제(NA)도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.: 16 및 SEQ ID No.: 18에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 1 또는 SEQ ID No.:3에서 선택된 전장(full length) 헤마토글루티닌(HA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 2 또는 SEQ ID No.:4에서 선택된 전장(full length) 뉴라미니다제(NA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리체나제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 리체나제 코딩 서열은 식물에서 단백질 발현을 위해 최적화된 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 리체나제 단백질 서열은 리체나제 Lic B의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 리체나제에 융합된 일체형 막 단백질 성분은 N0말단 융합체, C-말단 융합체 또는 표면 루프 삽입 융합 단백질중 임의의 하나 인 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20, SEQ ID No.: 24, SEQ ID No.:2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.:16 및 SEQ ID No.:18에서 선택되는 최소 두 개 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 12

열안정성 단백질에 융합된 인플루엔자 A 일체(integral)형 막 단백질의 성분으로 구성된 분리된 항원과 약학적으로 수용가능한 캐리어로 구성된 백신 조성물에 있어서,

일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA), 뉴라미니다제(NA) 및 M2 도메인에서 선택된 최소 한가지 도메인을 포함하고; 그리고

조성물은 개체에 주사하였을 때 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 헤마토글루티닌(HA) 도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20 및 SEQ ID No.: 24에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 뉴라미니다제(NA)도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.: 16 및 SEQ ID No.: 18에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 15

제 12 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 1 또는 SEQ ID No.:3에서 선택된 전장(full length) 헤마토글루티닌(HA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 16

제 12 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 2 또는 SEQ ID No.:4에서 선택된 전장(full length) 뉴라미니다제(NA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 17

제 12 항에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리체나제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 18

제 12 항에 있어서, 열안정성 단백질은 클로스트리듐 터모셀룸(*Clostridium thermocellum*)의 변형된 리체나제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 19

제 17 항에 있어서, 리체나제 코딩 서열은 식물에서 단백질 발현을 위해 최적화된 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 20

제 17 항에 있어서, 리체나제 단백질 서열은 리체나제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 리체나제에 융합된 일체형 막 단백질 성분은 N0말단 융합체, C-말단 융합체 또는 표면 루프 삽입 융합 단백질중 임의의 하나 인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 22

제 12 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20, SEQ ID No.: 24, SEQ ID No.:2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.:16 및 SEQ ID No.:18에서 선택된 최소 두가지 도메인을 포함하고, 이때 조성물은 개체에 주사하였을 때 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 24

제 22 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 전장(full length)의 헤마토글루티닌(HA) 및 전장(full length)의 뉴라미니다제(NA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 25

제 12 항에 있어서, 조성물에는 제 2 항원이 추가로 포함되며, 조성물은 개체에 주사하였을 때 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 제 2 항원은 열안정성 단백질에 융합된 인플루엔자 A 일체형 막 단백질 성분과 약학적으로 수용가능한 캐리어로 구성되고;

이때, 제1항원의 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인, 뉴라미니다제(NA)의 도메인, M2의 도메인에서 선택된 최소 한가지 도메인을 포함하고, 제2항원의 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인, 뉴라미니다제(NA)의 도메인, M2의 도메인에서 선택된 제1 항원과 별개의 최소 한가지 도메인을 포함하고, 그리고

조성물은 개체에 투여되었을 때 면역반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 제 1 항원의 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA) 도메인을 포함하고, 제2 항원의 일체형 막 단백질 성분은 뉴라미니다제(NA)의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 28

제 12 항에 있어서, 항원은 유전자 전이된 식물 및 항원을 일과성으로 발현시키는 식물에서 선택된 식물로부터 생산되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 29

제 12 항에 있어서, 조성물은 식물 세포, 식물, 씨, 과일 또는 이들의 추출물로부터 정제된, 부분적으로 정제된 또는 정제되지 않은 항원으로 구성된 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 30

제 12 항에 있어서, 최소 한 가지 백신 어쥬번트를 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 어쥬번트는 알루미늄(alum), MF59, 사포닌, MAPL2로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 32

최소 두가지 항원과 약학적으로 수용가능한 캐리어를 포함하는 백신 조성물에 있어서, 항원 각각은 인플루엔자 A 일체형 막 단백질 성분을 포함하고; 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인, 뉴라미니다제(NA)의 도메인, M2의 도메인에서 선택된 최소 한가지 도메인을 포함하고, 최소 한가지 항원은 열안정성 단백질

에 융합되며, 그리고 조성물은 개체에 투여되었을 때 면역반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 최소 한가지 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 헤마토글루티닌(HA) 도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20 및 SEQ ID No.: 24에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 34

제 32 항에 있어서, 최소 한가지 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 뉴라미니다제(NA)도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.: 16 및 SEQ ID No.: 18에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 35

제 32 항에 있어서, 최소 한가지 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 1 또는 SEQ ID No.:3에서 선택된 전장(full length) 헤마토글루티닌(HA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 36

제 32 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 2 또는 SEQ ID No.:4에서 선택된 전장(full length) 뉴라미니다제(NA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 37

제 32 항에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리체나제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 38

제 32 항에 있어서, 열안정성 단백질은 클로스트리듐 터모셀룸(*Clostridium thermocellum*)의 변형된 리체나제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 39

제 37 항에 있어서, 리체나제 코딩 서열은 식물에서 단백질 발현을 위해 최적화된 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 40

제 37 항에 있어서, 리체나제 단백질 서열은 리체나제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 41

제 40 항에 있어서, 리체나제에 융합된 일체형 막 단백질 성분은 NO말단 융합체, C-말단 융합체 또는 표면 루프 삽입 융합 단백질중 임의의 하나 인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 42

제 32 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20, SEQ ID No.: 24, SEQ ID No.:2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.:16 및 SEQ ID No.:18에서 선택되는 최소 두 개 도메인을 포함하고, 조성물을 개체에 투여하면 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 43

제 42 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 44

제 42 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 전장(full length)의 헤마토글루티닌(HA) 및 전장(full length)의 뉴라미니다제(NA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 45

제 32 항에 있어서, 조성물에는 제 3 항원이 추가로 포함되며, 조성물은 동물에 주사하였을 때 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 46

제 45 항에 있어서, 제 3 항원은 열안정성 단백질에 융합된 인플루엔자 A 일체형 막 단백질 성분과 약학적으로 수용가능한 캐리어로 구성되고;

이때, 제1항원의 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인, 뉴라미니다제(NA)의 도메인, M2의 도메인에서 선택된 최소 한가지 도메인을 포함하고, 제2항원의 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인, 뉴라미니다제(NA)의 도메인, M2의 도메인에서 선택된 제1 항원과 별개의 최소 한가지 도메인을 포함하고, 그리고

조성물은 개체에 투여되었을 때 면역반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 47

제 32 항에 있어서, 항원은 유전자 전이된 식물 및 항원을 일과성으로 발현시키는 식물에서 선택된 식물로부터 생산되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 48

제 32 항에 있어서, 조성물은 식물 세포, 식물, 씨, 과일 또는 이들의 추출물로부터 정제된, 부분적으로 정제된 또는 정제되지 않은 항원으로 구성된 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 49

제 32 항에 있어서, 최소 한 가지 백신 어쥬번트를 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 어쥬번트는 알룸(alum), MF59, 사포닌, MAPL2로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 51

개체에서 인플루엔자 A 감염에 대한 보호성 면역 반응을 유도하는 방법에 있어서,

항-인플루엔자 A 백신 조성물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하며, 투여로 개체에 의해 세포 면역 반응을 자극하거나 항원 특이적 항체 생산을 자극할 수 있어 보호성 면역 반응을 유도하며;

이때 백신 조성물은 열안정성 단백질에 융합된 인플루엔자 A 일체형 막 단백질의 성분을 포함하며;

일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인, 뉴라미니다제(NA)의 도메인 및 M2의 도메인으로 구성된 집단에서 선택된 최소 한가지 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제 51 항에 있어서 조성물은 경구, 비강, 복막, 정맥, 피하, 또는 근육을 통하여 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제 52 항에 있어서, 조성물은 개체에 식용 식물 세포를 통하여 경구 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제 51 항에 있어서 개체는 사람인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 51 항에 있어서, 개체는 새, 돼지 및 말에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

열안정성에 융합된 인플루엔자 A 일체형 막 단백질을 포함하는 항원 단백질을 생산하는 방법에 있어서,

- 열안정성 단백질에 융합된 인플루엔자 A 일체형 막 단백질의 성분으로 구성된 항원을 인코딩하는 핵산 구조체를 준비하고
- 세포내로 핵산을 도입시키고
- 항원 단백질의 발현에 적절한 조건하에 세포를 배양하여 항원 단백질을 생산하는 단계로 구성되고,

이때 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인에서 선택된 최소 한 가지 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제 56 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 헤마토글루티닌(HA) 도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20 및 SEQ ID No.: 24에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제 56 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 뉴라미니다제(NA)도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.: 16 및 SEQ ID No.: 18에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제 56 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 1 또는 SEQ ID No.:3에서 선택된 전장(full length) 헤마토글루티닌(HA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

제 56 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 SEQ ID No.: 2 또는 SEQ ID No.:4에서 선택된 전장(full length) 뉴라미니다제(NA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

제 56 항에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리체나제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제 62 항에 있어서, 리체나제 코딩 서열은 식물에서 단백질 발현을 위해 최적화된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

제 61 항에 있어서, 리체나제 단백질 서열은 리체나제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64

제 61 항에 있어서, 리체나제에 융합된 일체형 막 단백질 성분은 NO말단 융합체, C-말단 융합체 또는 표면 루프

삽입 융합 단백질중 임의의 하나 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

제 56 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인으로 구성된 군에서 선택된 최소 두 개 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66

제 56 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

제 56 항에 있어서, 항원 단백질 발현은 바이러스 프로모터의 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68

제 56 항에 있어서, 핵산 구조체는 벡터 핵산 서열을 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69

제 68 항에 있어서, 벡터는 바이너리(binary) 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70

제 56 항에 있어서, 핵산 구조체는 바이러스 단백질을 인코딩하는 서열을 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71

제 56 항에 있어서, 세포는 식물 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72

제 71 항에 있어서, 식물 세포는 알파파, 무, 머스타드, 녹두, 브로콜리, 물냉이, 소이빈, 밀, 해바라기, 양배추, 클로버, 페튜니아, 감자, 토마토, 담배, 시금치, 렌즈콩 세포로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

제 56 항에 있어서, 항원 단백질은 클론 뿌리 세포에서 만들어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

제 56 항에 있어서, 항원 단백질은 발아된 묘목(sprouted seedlings)에서 만들어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

제 56 항에 있어서, 만들어진 부분적으로 정제된 또는 정제된 항원 단백질을 회수하는 단계가 추가 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

열안정성 단백질에 융합된 인플루엔자 A 일체형 막 단백질의 성분을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 구조체에 있어서, 이때 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인으로 구성된 군에서 선택된 최소 한가지 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 77

제 76 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 헤마토글루티닌(HA) 도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.: 3, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 11, SEQ ID

No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 20 및 SEQ ID No.: 24에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 78

제 76 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 최소 한가지 뉴라미니다제(NA)도메인을 포함하는데, 이때 도메인은 SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.:4, SEQ ID No.: 16 및 SEQ ID No.: 18에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 79

제 76 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 헤마토글루티닌의 최소 한가지 도메인을 포함하는데, 이때 일체형 막 단백질은 SEQ ID No.: 1 또는 SEQ ID No.:3에서 선택된 전장(full length) 헤마토글루티닌(HA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 80

제 76 항에 있어서, 일체형 막 단백질 성분은 뉴라미니다제의 최소 한가지 도메인을 포함하는데, 이때 SEQ ID No.: 2 또는 SEQ ID No.:4에서 선택된 전장(full length) 뉴라미니다제(NA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 81

제 76 항에 있어서, 일체형 막 성분은 헤마토글루티닌의 최소 한가지 도메인을 포함하고, 열안정성 단백질은 변형된 리체나제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 82

제 76 항에 있어서, 일체형 막 성분은 헤마토글루티닌의 최소 한가지 도메인을 포함하고, 리체나제 코딩 서열은 식물에서 단백질 발현을 위해 최적화된 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 83

제 76 항에 있어서, 일체형 막 성분은 헤마토글루티닌의 최소 한가지 도메인을 포함하고, 리체나제 단백질 서열은 리체나제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 84

제 76 항에 있어서, 일체형 막 성분은 헤마토글루티닌의 최소 한가지 도메인을 포함하고, 이때 리체나제에 융합된 일체형 막 단백질은 리체나제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 표면 루프 삽입 융합 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 85

제 76 항에 있어서, 일체형 막 성분은 헤마토글루티닌의 최소 한가지 도메인을 포함하고, 이때 일체형 막 단백질은 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 뉴라미니다제(NA)의 도메인에서 선택된 최소 두 가지 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 86

제 85 항에 있어서, 일체형 막 단백질은 최소 한가지 헤마토글루티닌(HA)의 도메인 및 최소 한가지 뉴라미니다제(NA)의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 87

제 76 항에 있어서, 벡터 핵산 서열을 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 88

제 85 항에 있어서, 바이러스 프로모터 핵산 서열을 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 89

제 87 항에 있어서, 벡터는 바이너리 벡터인 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 90

제 76 항에 있어서, 바이러스 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 구조체.

청구항 91

제 76 항의 핵산 구조체를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 92

제 91 항에 있어서, 식물 세포인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 93

제 91 항에 있어서, 식물 세포는 알파파, 무, 머스타드, 녹두, 브로콜리, 물냉이, 소이빈, 밀, 해바라기, 양배추, 클로버, 페튜니아, 감자, 토마토, 담배, 시금치, 렌즈콩 세포로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 식물.

청구항 94

제 91 항에 있어서, 식물은 브라시카 속(*Brassica genus*), 니코타나 속(*Nicotana genus*) 및 페튜니아 속(*Petunia genus*)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 식물.

명세서

기술분야

<1> 본 출원은 USC 119(e) 35조하에 미국 출원 U.S.S.N. 60/773,378, (February 13, 2006 출원됨)(이하 '378 출원이라 칭함), 미국 출원 U.S.S.N. 60/813,955, June 15, 2006 출원됨)(이하 '955 출원이라 칭함)에 관계하며 이를 우선권으로 주장하고; '139 출원 및 '955 출원의 전문을 참고문헌으로 제출한다.

배경기술

<2> 인플루엔자는 전세계적으로 유행처럼 번지며, 재발되며 급증하는 등의 특징을 가진 오랜 유래를 가진다. 인플루엔자 개발국가 및 선진국 모두에 동등하게 충격적일 수 있는 심각한 접촉성 질환이다. 인플루엔자 바이러스는 인간들에 위협을 주는 주요 요인중에 하나를 제공한다. 매년 백신 접종의 노력에도 불구하고, 인플루엔자 감염으로 인하여 실질적으로 질병 및 사망에 이르게 된다. 인플루엔자 전염은 거의 매년 발생되지만, 다행스러운 것은 광역적인 전염은 그렇게 흔히 일어나지는 않는다. 그러나, 최근에는 인플루엔자의 전염 가능성에 다시 직면하게 되는 인플루엔자 균주들이 출현하였다. 아시아 및 동유럽 일부 지역의 가금류에서 전염되는 H5N₁ 타입의 조류 인플루엔자 바이러스는 전세계적으로 지속적으로 전파되고 있다. 빠른 감염 및 조류에서 인간 개체로의 종을 교차한 감염은 인간군에서 발병 가능성 및 전염 위험을 증가시킨다. 바이러스는 매우 병원성이 크기 때문에 조류 및 일부 인간에서 확인된 경우 15%이상의 치사률을 가진다. 바이러스가 인간에서 인간으로 전염되는 경우에 신속하게, 광범위하게 질병이 전염되고 사망하게 될 가능성이 있다.

<3> 인플루엔자에 대한 주요 방어 기작은 백신접종이다. 인플루엔자 바이러스들은 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae)에 속하는 분절된 네가티브-가닥 RNA 바이러스이다. 바이러스성 항원은 매우 효과적인 이뮤노젠으로써 전신 및 점막 항체 반응을 유도시킬 수 있다. 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 당단백질 (HA)은 일반적으로 항체 중화 자극 및 백신 작제에 있어서 가장 중요한 바이러스성 항원이다. 바이러스성 뉴라미니다제(NA)의 존재가 바이러스에 대항하여 멀티-암(multi-arm) 보호성 면역 반응을 생성시키는데 중요한 것으로 확인되었다. 뉴라미니다제 활성을 저해시키는 항-바이러스가 개발되어 감염시에 추가적인 항-바이러스 치료가 될 수 있다. 인플루엔자 항바이러스 및 백신 개발에 유용한 것으로 간주되는 세 번째 성분은 이온 채널 단백질 M2 이다.

<4> 인플루엔자 바이러스의 서브타입은 항원 쉬프트(shift)로 인한 상이한 HA 및 NA에 의해 지정된다. 또한 동일한 서브타입의 새로운 균주는 항원 드리프트(drift)로 인한 것이거나 또는 신규하고 상이한 에피토프를 생성시키는 HA 또는 NA 분자에 돌연변이로 인한 것이다. HA의 15가지 항원 서브타입이 설명되기는 하지만 이들 서브타입들 중 세 가지 H1, H2, H3만이 인간에서 광범위하게 순환된다. 선진국 및 개발도상국가에서 개선된 삶의 질을 추구함에 있어서 백신 접종이 최선의 방법이 되었다. 현재까지 이용가능한 백신의 주요성질은 관련 감염에 대해 보호할 수 있는 면역 반응을 유도하기 위해 감염 특징을 모방하는 기본 원리를 따르는 것이다. 그러나, 다양한 서브타입 및 복합물의 감소된 바이러스 생성은 시간이 많이 소요되고 비용도 상당히 든다. 신기술 개발 및 병원성의 분자 생물학의 심도있는 이해, 병원성 및 개인 면역계와 이들의 상호작용에 대한 이해로 백신 개발 및 운반에 새로운 접근 방법이 개발되었다. 따라서, 기술 발전으로 개선된 인플루엔자 항원 백신 조성물을 생산하는 능력이 개선되었으나, 최근의 새로운 서브타입 및 균주들을 해결하기 위한 백신 생산에 신규한 항원 및 백신의 추가 소스를 제공할 필요성은 여전히 존재한다. 비싸지 않은 그리고 접근성이 좋은 치료 조성물을 제공하기 위해 인플루엔자 바이러스 서브타입에 대한 개선된 백신 고안 및 개발 및 이와 같은 조성물을 이용하고 만드는 방법이 필요하다.

<5> **발명의 요약**

<6> 본 발명은 식물에서 생산되는 인플루엔자 항원 및 백신 성분들을 제공하는 것이다. 본 발명은 열안정성(열안정성) 단백질과 융합된 형태로 생산되는 하나 또는 그 이상의 인플루엔자 항원을 제공한다. 또한 본 발명은 인플루엔자 항원을 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 적어도 2가지 상이한 인플루엔자 항원을 포함하는 인플루엔자 백신을 제공한다. 일부 구체예에서 발명의 조성물에는 하나 또는 그이상의 식물 성분들이 포함된다. 또한, 본 발명의 항원 및 백신 조성물의 생산 및 이용하는 방법도 제시한다.

발명의 상세한 설명

<7> 본 발명은 인플루엔자 감염에 대한 백신 조제에 유용한 인플루엔자 항원, 열안정성 단백질에 작용가능하도록 연결된 이와 같은 인플루엔자 항원을 포함하는 융합 단백질에 관계한다. 본 발명은 식물계에서 제공된 항원의 생산을 포함하나 이에 국한시키지 않은 생산 방법에 관계한다. 또한, 본 발명은 벡터, 융합 단백질, 식물 세포 및 본 발명의 항원 및 융합 단백질을 포함하는 백신 조성물에 관계한다. 또한, 본 발명의 백신 조성물을 개체로 투여하는 것으로 구성된 개체에서 인플루엔자 감염에 대항하는 면역 반응을 유도하는 방법에 관계한다.

<8> **인플루엔자 항원**

<9> 본 발명의 인플루엔자 항원 단백질에는 인플루엔자 바이러스에 대항하는 면역 반응을 유도시킬 수 있는 임의 면역원성 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 일반적으로, 관심이 가는 면역원성 단백질에는 인플루엔자 항원(가령, 인플루엔자 단백질, 융합 단백질, 등), 이의 면역원 부분 또는 이의 면역원 변이체 및 이들의 일부 복합이 포함된다.

<10> 본 발명에 따라 이용할 수 있는 인플루엔자 항원에는 전장 인플루엔자 단백질 또는 인플루엔자 단백질의 단편들, 또는 전장 인플루엔자 단백질 또는 인플루엔자 단백질의 일부분을 포함하는 융합 단백질이 포함된다. 인플루엔자 단백질의 단편들을 이용하는 경우에, 단독 또는 융합 단백질로 이용하던 간에 이와 같은 단편들은 면역학적 활성(가령, 항-인플루엔자 항체들과 교차 반응성이 있는)을 보유한다. 바이러스 감염에 대항한 면역 보호 반응을 유도하는 이들의 능력에 근거하여, 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제는 백신을 생성시키는데 있어서 바람직한 1차 항원이다. 추가 항원 예를 들면 막 이온 채널 M2도 면역 보호 효과를 개선시키기 위한 백신 생산(가령, 복합 백신)에 유용할 수 있다.

<11> 따라서, 본 발명은 식물 세포 및 이형성 단백질 인플루엔자 항원(가령, 인플루엔자 단백질 또는 이의 단편, 인플루엔자 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합 단백질)을 발현시키는 식물을 제공한다. 본 발명의 이형성 단백질은 소수의 임의 인플루엔자 항원으로 구성되는데, 여기에는 헤마글루티닌 (HA), 뉴라미니다제 (NA), 막 이온 채널 M2 (M2), 헤마글루티닌 (HA)의 일부분, 뉴라미니다제 (NA)의 일부분 및 막 이온 채널(M2)의 일부분 또는 융합 단백질, 단편 또는 헤마글루티닌 (HA) 복합물, 뉴라미니다제 (NA), 막 이온 채널 M2 (M2), 헤마글루티닌 (HA)의 일부분, 뉴라미니다제 (NA)의 일부분 또는 막 이온 채널 M2의 일부분을 포함하나 이에 국한되지는 않는다.

<12> 상이한 인플루엔자 HA, NA, M2 단백질(가령, 상이한 서브타입 또는 상이한 균주 또는 상이한 분리체)의 다양한 아미노산 서열이 당분야에 공지되어 있고, GenBank와 같은 데이터베이스에서 이용할 수 있다. 현재 특히 관심

을 받은 두 가지 인플루엔자 서브타입의 HA 및 NA의 전장 단백질 서열 및 M2의 서열을 하기에 제공한다:

- <13> V: Vietnam H5N1
- <14> HA (HAV) SEQ ID NO.: 1
- <15> AKAGVQSVKMEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTH
- <16> NGKLCDLGDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDFND
- <17> YEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFFRNVVWLIIKKNSTYPTIK
- <18> RSYNNNTNQEDLLVLWGIIHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNGQ
- <19> SGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCTPMGA
- <20> INSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVATGLRNSPQRERRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQG
- <21> MVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLER
- <22> RIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELG
- <23> NGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSL
- <24> ALALMVAGLSL WMCNGLSLQCRICI
- <25> NA (NAV) SEQ ID NO.: 2:
- <26> *MNPNQJGITIGSICMVTGIVSLMLQIGNMISJWYSUSIHTGNQHQSEPISENTNLLTEKAVASVKL*
- <27> AGNSSLCPINGWA VYSKDNSIRIGSKGDVFIREFPISCSHLECRFTFLTQGALLNDKHSNGT
- <28> VKDRSPHRTLMSCPVGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGTSLWTIGISGPDNGA VAVLKYN
- <29> GIITDTIKS WRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPNSNGQASHKIFKMEKGKVVKSVELDA
- <30> PNYHYEECSYCPDAGEITCVCRDNWHGNSRPVWFSFNQLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDGT
- <31> GSCGPVSSNGAGGVKGFSGFYKNGVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNGWETETDSSFSVKQDI
- <32> VAITDWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKESTIWTSGSSISFCGVNSDVTGWS
- <33> WPDGAELPFTIDK
- <34> W: Wyoming H3N2
- <35> HA (HAW) SEQ ID NO.: 3:
- <36> MKTIIALS YILCL VFSQKLPGNDSTATLCLGHHA VPNGTIVKTIITNDQIEVTNATEL VQSSST
- <37> GG1CDSPHQ1LDGENCTLID ALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKA YSNCYPYDVPDYASLRS
- <38> LVASSGTLEFNNEFSNWAGVTQNGTSSACKRRSmSFFSRLNWLTHLKYKYPALNVTMPN
- <39> NEKFDKLYIWGVHHPVTDSDQISLYAQSGRITVSTKRSQQTVPNIGYRPRVRDISSRISIW
- <40> TIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRI
- <41> TYGACPRRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEGT
- <42> GQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSY
- <43> NAELL VALENQHTIDLTDSEMNKLFERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNG
- <44> TYDHD VYRDEALNNRFQTKGVELKSGYKDWIL WISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIR
- <45> CNICI
- <46> NA (NAW) SEQ ID NO. : 4:
- <47> MNPNQKIITIGSVSLTISTICFFMQIAILITTVTLHFKQYEFNSPPNNQVMLCEPTIERNITEIVY

- <48> LTNTTIEKEICPKL AE YRNWSKPQCNIITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPDKCY
- <49> QFALGQGTTLNN VHSNDTVHRTPYRTLLMNELGVPFHLGTKQVCIAWSSSSCHDGKA WL
- <50> HVCVTGDDENATASF IYNGRLVDSIVSWSKKILRTQESECVCINGTCTVVMTDGSASGKAD
- <51> TKILFIEEGKIVHTSTLSGSAQHVEECSCYPYPGVRCVCRDNWKGSNRP IVDINIKDYSIVSS
- <52> YVCSGLVGDTPRKNDSSSSSHCLDPNNEEGGHGVKGWAFDDGND VWMGRTISEKLRSgye
- <53> TFKVIEGWSNPNSKLQINRQVIIVDRGNRSGYSGIFSVEGKSCINRCFYVELIRGRKQETEVW
- <54> TSNSIVVFCGTSgyTGTGSPDGADINLMP I
- <55> 인플루엔자 Hong Kong M2 단백질 SEQ ID NO.: 5 :
- <56> LTEVETPIRNEWGCRCNDSSDP
- <57> 인플루엔자 단백질
- <58> 헤마글루티닌
- <59> 특정 구체예에서, 전장 헤마글루티닌 (HA)을 본 발명의 백신 조성물에 이용한다. 일부 구체예에서, 하나 또는 그이상의 HA 도메인을 이용한다. 특정 구체예에서, 두 개 또는 그이상의 도메인을 이용하는데, 그 이유는 하나 또는 그이상의 융합 폴리펩티드에서 하나 또는 그 이상의 별개 폴리펩티드 또는 서로 연결되어 있기 때문이다. 특정 예시적인 구체예에서는 전장의 인플루엔자 항원, HA의 도메인 1-2 및 도메인 2-1 (HA1_2라고 칭함), 또는 HA의 도메인 3으로 구성된 인플루엔자 항원을 제공한다.
- <60> HA Vietnam. [H5N 1]: [0035] H5N 1 HA 시그널 펩티드 SEQ ID NO.: 6:
- <61> AKAGVQSVKMEKIVLLFAIVSLVKS
- <62> H5N1 HA 도메인 1 -2 SEQ ID NO.: 7:
- <63> DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTQAHDILEKTHNGKL '
- <64> H5N1 HA 도메인 3 SEQ ID NO.: 33:
- <65> CDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELK
- <66> HLLSRINHFEKI IIPKSSWSSEASLGVSACPYQGKSSFFRNVVWL IKNSTYPTIKRSYNN
- <67> TNQEDLLVL WGIHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNGQSGRME
- <68> FFWTILKPNDAINFESNGNFI APEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNC
- <69> H5N1 HA 도메인 2-1 SEQ ID NO.: 8:
- <70> NTKCQTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQRERRRKKRGLFGAI
- <71> AGFIE GGWQGMVDG WYGYHShJEQGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSI IDKMNTQFEA
- <72> VGREFNLERRJENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRL
- <73> QLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYD YPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQI
- <74> H5N1 HA 막통과 도메인 SEQ ID NO.: 9:
- <75> LSIYSTVASSLALALMVAGLSLWMCNGLQCRICI
- <76> HA A/Wyoming (H3N2)
- <77> H3N2 HA 시그널 펩티드 SEQ ID NO.: 10: MKTIIALSYILCLVFS
- <78> H3N2 HA 도메인 1-2 SEQ ID NO.: 11 :
- <79> QKLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGGI
- <80> H3N2 HA 도메인 3 SEQ ID NO.: 12:

- <81> CDSPHQILDGENCTLID ALLGDPQCDGFQNKK WDLFVERSKAYSNC *YPYDVDPY*ASLRSLVA
- <82> SSGTLEFNNESFNWAGVTQNGTSSACKRRSNKSFFSRLNWLTHLKYKYPALNVTMPNNEK
- <83> FDKL YIWGVHHP VTDSQISLY AQASGRITVSTKRSQQTVPNIGYRPRVRDISSRISYWTIV
- <84> KPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKC
- <85> H3N2 HA 도메인 2-1 SEQ ID NO.: 13:
- <86> NSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGAC*PRYVKQNTLKLAT*GMRNVPEKQTRGIFGA1AGFIEN
- <87> GWEGMVDGWYGRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSE
- <88> VEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYN AELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFERTKKQLRENAEDM
- <89> GNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHD VYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WIL
- <90> H3N2 HA 막통과 도메인 SEQ ID NO.: 14:
- <91> WISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI
- <92> 특정 구체예에서, 전장(full length) 뉴라미니다제 (NA) 항원을 본 발명의 백신 항원으로 이용하였다. 일부 구체예에서 NA의 도메인을 이용한다. 특정 구체예에서 두 개 또는 드 이상의 도메인을 본 발명의 항원에 제공한다. 특정 예시적인 구체예에서는 앵커(anchor) 펩티드 서열이 결합된 전장 NA로 구성된 인플루엔자 항원을 제공한다.
- <93> 뉴라미니다제
- <94> NA Vietnam
- <95> H5N 1 NA 앵커 펩티드 SEQ ID NO.: 15:
- <96> MNPNQKIITIGSIC MVTGIVS
- <97> H5N1 NA SEQ ID NO.: 16:
- <98> LMLQIGNMISIWVSHIHTGNQHQSEPISENTNLLTEKAVASVKLAGNSSLCPINGWAVYSKD
- <99> NSIRIGSGKGDVFIREFPISCSHLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSPHRTLMSCPVGEA
- <100> PSPYNSRFESVAWSASACHDGTSWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQES
- <101> ECACWGSCFTVMTDGPNSGQASHKJFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSYCPDAGEIT
- <102> CVCRDNWHSNRPWVSFNQLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDGTGSCGPVSSNGAGGVKGF
- <103> SFKYGNVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNGTETDSSFSVKQDIVAITDWSGYSGSFVQHP
- <104> ELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKESTIWTSGSSISFCGVNSDTVGSWPDGAELPFTIDK
- <105> H3N2 NA 앵커 펩티드 SEQ ID NO.: 17 :
- <106> MNPNQKIITIGSVSLTISTICFFMQIAILITVTLHF
- <107> H3N2 NA SEQ ED NO.: 18:
- <108> KQYEFNSPPNQVMLCEPTIERNITEIVYLTNTTIEKEICPKLAEYRNWSKPQCNIITGFAPFS
- <109> KDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPKCYQFALGQGTTLNNVHSNDTVHDRTPYRTLMMNELG
- <110> VPFHLGTKQVCIAWSSSSCHDGKAWLHVCVTGDDENATASFYNGRLVDSIVSWSKKI
- <111> LRTQESECVCINGTCTVMTDGSASGKADTKILFIEEGKIVHTSTLSGSAQHVEECSCYPRYP
- <112> GVRVCVRDNWKGSNRPIVDINIKDYSIVSSYVCSGLVGDTPRKNDSSSSSHCLDPNNEEGGH
- <113> GVGWAFDDGNDVWMGRTISEKLRSGETFKVIEGWSNPNSKLQINRQVIIVDRGNRSGYS

<114> GIFSVGKSCINRCFYVELIRGRKQETEVLTWSNSIVVFCGTSGTYGTGSGWPDGADINLMPI

<115> 예시적인 인플루엔자 항원의 서열을 여기에서 제공하고, HA, NA, M2에 대한 각 도메인도 예시적인 균주들로 제공하나, HA, NA 또는 M2 도메인의 면역원성 특징을 보유하는 임의 서열을 대안으로 이용할 수도 있다. 당업자는 제공된 항원에 최소 75%, 80%, 85%, 또는 90% 또는 그이상의 상동성을 가지는 서열을 생성할 수 있을 것이다. 특정 구체예에서, 인플루엔자 항원은 HA, NA 또는 M2 도메인 또는 이들 도메인의 일부에 최소 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 그 이상 상동성을 가지는 것을 포함하는 단백질로 구성되며, 이때 항원 단백질은 면역원성 활성을 보유한다. 예를 들면, 면역원성 특징으로 보유하는 인플루엔자 항원에 충분한 상동성을 가지는 서열은 여기에서 제공되는 도메인 (항원(들))과 반응하는 항체에 결합할 수 있다. 면역원성 특징에는 종종 관련 아미노산 또는 측쇄의 3차원 모양이 포함된다. 당업자는 서열에서 약간의 차이(가령, 경계에 차이 또는 일부 서열의 대체-그림에도 불구하고 면역원성을 보존함)를 가지는 서열을 바로 확인할 수 있을 것이다. 예를 들면, 지정된 아미노산 서열의 어느쪽이건 단부에 있는 도메인 경계에 있는 서열들(가령, 약 15개 아미노산, 약 14개 아미노산, 약 13개 아미노산, 약 12개 아미노산, 약 11개 아미노산, 약 10개 아미노산, 약 9개 아미노산, 약 8개 아미노산, 약 7개 아미노산, 약 6개 아미노산, 약 5개 아미노산, 약 4개 아미노산, 약 3개 아미노산, 약 2개 아미노산, 또는 약 1개 아미노산내에)에 있는 것은 본 발명에 따른 관련 도메인으로 구성되는 것으로 간주한다. 따라서, 본 발명은 도메인 지정에 근접한 잔기들로 구성되는 인플루엔자 항원 서열을 이용하는 것도 고려한다. 예를 들면, HA의 도메인(들)을 작제하여 본 발명의 항원으로써 인-프레임(in-frame) 융합 단백질로 발현시킨다(실시예 참고). 또한, 여기에서 제공하는 구조체 및 방법이 이용하여 면역원성인 인플루엔자 항원(가령 HA, NA, M2)의 아미노산 서열의 부분 도메인 또는 일부분을 만들 수 있다는 것도 인지할 것이다. 또한, 인플루엔자 항원을 생산하기 위해 도메인 또는 서브도메인을 별도로 또는 구성적으로 복합시킬 수도 있다.

<116> 예시적인 항원으로써, 여기에서 설명하는 것과 같이 헤마글루티닌, 뉴라미니다제의 서열 또는 특정 서브타입의 M2를 이용한다. 인플루엔자 바이러스의 다양한 서브타입이 존재하고, 새로운 서브타입 출현에 대해 지속적으로 확인하고 있다. 당업자는 여기에서 제공하는 방법 및 조성물을 적절히 이용하여 추가 서브타입의 서열을 이용할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 이와 같은 변이도 여기에서 제공하는 방법 및 조성물내에 속한다.

<117> 열안정성 단백질과 인플루엔자 폴리펩티드 융합체

<118> 본 발명의 특정 측면에서, 열안정한 단백질에 작용가능하도록 연결된 인플루엔자 단백질(또는 이의 단편 또는 이의 변이체)을 포함하는 융합 폴리펩티드로 구성된 인플루엔자 항원을 제공한다. 발명의 융합 폴리펩티드들은 당분야에 공지된 임의 이용 가능한 발현 시스템에서 생산될 수 있다. 특정 구체예에서, 발명의 융합 단백질들은 식물 또는 이의 일부분 (가령, 식물, 식물 세포, 뿌리, 싹 등)에서 생산된다.

<119> 사람 또는 동물 세포에서 자연적으로는 발견되지 않는 효소 또는 다른 단백질이 본 발명의 융합 폴리펩티드에 이용에 있어서 특별히 적합하다. 융합되었을 때 융합 산물에 열안정성을 부여하는 열안정성 단백질이 유용하다. 열안정성은 생성된 단백질이 실온에서 모양을 유지하고 생성된 단백질을 유지할 수 있도록 한다. 이와 같은 특징은 융합 폴리펩티드의 용이하고, 효과적이고 비용에서 적절한 회수를 할 수 있도록 한다. 본 발명에서 이용할 수 있는 유용한 열안정성 효소로는 글루카노하이드롤라제(glucanohydrolase) 패밀리이다. 이들 효소들은 특히 혼합 연결된 폴리사카라이드에 1,3-β 연결에 인접한 1,4-β 글루코시드 결합만을 특이적으로 절단시킨다. (Hahn et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:10417). 이와 같은 효소들은 귀리 및 보리와 같은 곡물에서 발견되며 *C. thermocellum*와 같은 다수의 곰팡이 및 세균 중에서도 발견된다. (Goldenkova et al., 2002, Mol. Biol. 36:698). 따라서, 본 발명의 융합 폴리펩티드에 이용할 수 있는 바람직한 열안정성 단백질에는 글리코시다제 효소가 포함된다. 예시적인 열안정성 글리코시다제 단백질에는 표 1에서 제시하는 것들에서 선택된 GenBank 수탁 번호로 알수 있는 것들이 포함되며, 이들 각각의 내용은 각 번호에 GenBank accession 정보를 결합시켜 여기에 첨부한다. 본 발명의 융합 단백질에 이용할 수 있는 예시적인 열안정성 효소에는 클로스트리디움 테르모셀룸(*Clostridium thermocellum*) P29716, 브레비바실러스 브레비스(*Brevibacillus brevis*) P37073, 및 로드테르무스 마리누스(*Rhodthermus marinus*) P45798가 포함되며 이들 각각에는 GenBank 수탁 번호가 포함된다. 실시예에서 설명하는 대표적인 융합 단백질들을 클로스트리디움 테르모셀룸에서 분리된 변형된 열안정성 효소로 이용하나, 임의 열안정성 단백질을 본 발명에 따라 유사하게 이용할 수도 있다.

표 A

열안정성 글리코시다제 단백질

P29716	(Beta-glucanase <i>Clostridium thermocellum</i>)
P37073	(Beta-glucanase <i>Brevibacillus brevis</i>)
1MVE A	(Beta-glucanase <i>Fibrobacter succinogenes</i>)
P07883	(Extracellular agarase <i>Streptomyces coelicolor</i>)
P23903	(Glucan endo-1,3-beta-glucosidase A1 <i>Bacillus circulans</i>)
P27051	(Beta-glucanase <i>Bacillus licheniformis</i>)
P45797	(Beta-glucanase <i>Paenibacillus polymyxa</i> (<i>Bacillus polymyxa</i>))
P37073	(Beta-glucanase <i>Brevibacillus brevis</i>)
P45798	(Beta-glucanase <i>Rhodothermus marinus</i>)
P38645	(Beta-glucosidase <i>Thermobispora bispora</i>)
P40942	(Celloxylanase <i>Clostridium stercorarium</i>)
P14002	(Beta-glucosidase <i>Clostridium thermocellum</i>)
O33830	(Alpha-glucosidase <i>Thermotoga maritima</i>)
O43097	(Xylanase <i>Thermomyces lanuginosus</i>)

P54583	(Endo-glucanase E1 <i>Acidothermus cellulolyticus</i>)
P14288	(Beta-galactosidase <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)
O52629	(Beta-galactosidase <i>Pyrococcus woesei</i>)
P29094	(Oligo-16-glucosidase <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>)
P49067	(Alpha-amylase <i>Pyrococcus furiosus</i>)
JC7532	(Cellulase <i>Bacillus</i> species)
Q60037	(Xylanase A <i>Thermotoga maritima</i>)
P33558	(Xylanase A <i>Clostridium stercorarium</i>)
P05117	(Polygalacturonase-2 precursor <i>Solanum lycopersicum</i>)
P04954	(Cellulase D <i>Clostridium thermocellum</i>)
Q4J929	(N-glycosylase <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)
O33833	(Beta-fructosidase <i>Thermotoga maritima</i>)
P49425	(Endo-1,4-beta-mannosidase <i>Rhodothermus marinus</i>)
P06279	(Alpha-amylase <i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
P45702 P45703 P40943	(Xylanase <i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
P09961	(Alpha-amylase 1 <i>Dictyoglomus thermophilum</i>)
Q60042	(Xylanase A <i>Thermotoga neapolitana</i>)
AAN05438 AAN05439	(Beta-glycosidase <i>Thermus thermophilus</i>)
AAN05437	(Sugar permease <i>Thermus thermophilus</i>)
AAN05440	(Beta-glycosidase <i>Thermus filiformis</i>)
AAD43138	(Beta-glycosidase <i>Thermosphaera aggregans</i>)

본 발명에 따라 융합 단백질 및 폴리펩티드를 디자인할 때, 물론 항원의 면역원성을 보존시키는 것이 바람직하다. 또한, 융합 단백질의 열안정성을 제공하는 구조체를 만드는 것이 바람직하다. 이와 같은 특징은 표적 항원의 용이하고, 신속한 그리고 비용 효과적인 회수를 가능하게 한다. 특정 측면에서, 면역원성의 강화, 멀티플 백신 결정체에 결합 가능성이 있으나 백신 접종 개체에 면역원 노출전에는 부족한 것들을 포함하는 추가적인 장점을 제공하는 항원 융합 파트너를 선별할 수 있을 것이다. 소요의 융합 펩티드의 추가적인 요건에는 하나 또는 그이상의 항원의 결합을 용이하게 조절할 수 있으며 백신 조제를 위한 생산, 정제 및 조제에 용이성을 부여하는 단백질을 제공하는 것들이 포함된다. 당업자는 3차원 프리젠테이션이 이들 유익한 특징 각각에 영향을 줄 것이라는 것을 인지할 것이다. 따라서 면역원성의 보존 또는 선호적인 성질의 보존이 융합 위치 선택(가령, N-말단, C-말단, 내부, 이들의 복합) 및 융합 파트너의 선택에 영향을 줄 것이다. 대안으로 또는 추가적으로 선호도가 융합을 위해 선택되는 단편의 길이, 항원의 길이 또는 선택된 융합 파트너의 길이에도 영향을 줄 것이다.

본 발명은 열 안정성 단백질과 다양한 항원의 성공적인 융합을 설명한다. 예를 들면, 우리는 리체나제로 언급한 열안정한 캐리어 분자 LicB를 융합 단백질 생산에 이용한다. LicB는 클로스트리디움 터모셀룸(*Clostridium thermocellum*)에서 얻은 1,3-1,4-β 글루카나제(LicB)이다(GenBank accession: X63355 [gi:40697]). LicB는 구형(globular) 단백질 패밀리에 속한다. LicB의 3차원 구조에 근거하여, 이의 N- 및 C-말단이 활성 도메인에 근접한 표면상에서 서로 인접하게 위치하고 있다. LicB는 또한 활성 도메인으로부터 떨어져 있는 표면상에 노출된 루프 구조를 가진다. 단백질의 N- 및 C- 말단과 루프 구조가 인플루엔자 항원 폴리펩티드의 삽입 부위로 이용될 수 있도록 만들었다. 인플루엔자 항원 폴리펩티드는 N- 또는 C- 말단 융합으로 발현되거나 표면 루프로 삽입될 수도 있다. 중요한 것은 LicB는 낮은 pH 및 고온(최고 75℃)에서 효소 활성을 유지한다. 따라서, 캐리

어 분자로써 LicB를 이용하는 것은 표적 특이적 면역원성의 강화, 다중 백신 결정부위에 결합될 가능성, 비강, 경구 또는 장관외로 운반될 수 있는 백신의 직접적인 조제 등을 포함하는 장점을 제공하는데 기여한다. 또한, 식물에서 LicB 융합물의 생산으로 동물 또는 사람의 병원균 오염 위험을 감소시켜야 한다. 실시예를 제공한다.

<124> 인플루엔자 항원으로 구성된 융합 단백질은 *in vitro* 및 *in vivo*를 포함하는 다양한 발현계를 이용하여 생산할 수 있다. 당업자는 특정 발현계를 위한 핵산 서열의 최적화가 바람직하다는 것을 인지할 것이다. 예를 들면, 여기에서 제공하는 예시에서, 인플루엔자 항원-LicB 융합체의 발현을 위한 최적화된 서열을 제공한다. 실시예 1 참고. 따라서, 본 발명에 따른 인플루엔자 항원(s) 융합 단백질(s)을 인코딩하는 임의의 관련 핵산 및 이의 단편들은 본 발명의 핵산 구조체에 포함된다.

<125> 식물계에서 생산하기 위해, 인플루엔자 항원(s) (가령, 인플루엔자 단백질(s) 또는 이의 단편 또는 이들의 융합체)를 발현시키는 유전자전이 식물을 이용할 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 유전자전이 식물은 안정한 생산 작물을 만드는 분야에 공지된 방법을 이용하여 생산할 수 있을 것이다. 추가적으로, 일과성 발현계를 이용하는 식물을 이용하여 인플루엔자 항원(s)을 생산할 수 있다. 식물에서 유전자전이 또는 일과성 발현에 상관없이 식물 발현계를 이용하는 경우에, 원하는 항원에 대해 발현계의 이용성에 따라 핵 발현, 클로로플라스트 발현, 미토콘드리아 발현 또는 바이러스 발현을 이용하여 잇점을 얻을 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항원 및 융합 단백질 생산에 추가 발현 시스템을 이용할 수도 있다.

<126> 예를 들면, 포유류 발현 (가령, 포유류 세포주 (가령, CHO5 등)), 세균 발현 시스템s (가령, *E. coli*), 곤충 발현 시스템s (가령, 벡로바바이러스), 이스트 발현 시스템, *in vitro* 발현 시스템 (가령, 레티클레이트 라이세이트(reticulate lysates)) 등을 본 발명의 항원 및 융합 단백질 발현이 이용할 수도 있다.

<127> 인플루엔자 항원의 생산

<128> 본 발명에 따르면, 인플루엔자 항원(인플루엔자 단백질(s), 이의 단편, 변이체 및/또는 융합체)을 임의의 바람직한 시스템에서 생산할 수도 있다; 생산은 식물 시스템에 한정시키지 않는다. 벡터 구조체와 발현 시스템들은 당 분야에 잘 공지되어 있으며, 적절히 이용하면 여기에서 제공하는 인플루엔자 항원의 이용에 결합시킬 수 있을 것이다. 예를 들면, 인플루엔자 항원 (이의 단편들, 변이체 및/또는 융합체)들은 공지의 발현 시스템을 통하여 생산할 수 있는데, 포유류 세포 시스템, 유전자 전이 동물, 미생물 발현 시스템, 곤충 세포 시스템, 유전자 전이 및 일과성 식물 시스템 포함 식물 시스템을 통하여 생산할 수 있다. 인플루엔자 항원이 융합 단백질로 생산되는 경우에, 비-식물 시스템에서 이와 같은 융합 단백질을 생산하는 것이 바람직할 수도 있다.

<129> 본 발명의 일부 구체예에서, 인플루엔자 항원이 식물 시스템에서 생산된다. 식물은 유전적인 조작이 상대적으로 용이하고, 사람 유체, 동물 세포주, 재조합 미생물 및 유전자전이 동물과 같은 다른 대체 재료에 비해 몇가지 장점들이 있다. 식물은 동물의 것과 유사한 단백질에 대해 전사후 수정 기전이 매우 정교하다(식물과 포유류 사이에 글리코실화 반응 패턴에 일부 차이가 있다는 것은 알아야 한다). 이것이 식물 조직에서 생활성 물질을 생산하게끔 한다. 또한, 식물들은 정교한 설비없이도 매우 많은 양의 바이오매스를 경제적으로 생산할 수 있다. 또한, 식물은 동물 병원균으로 오염될 대상이 아니다. 리포좀 및 마이크로캡슐과 같이, 식물 세포는 위장관으로 항원이 통과하는 것에 대해 보호해줄 수 있는 것으로 기대된다.

<130> 식물을 이용하여 다양한 생산 시스템을 통하여 이형성(heterologous) 단백질을 생산할 수 있다. 이와 같은 시스템중 하나는 유전자전이/유전적으로 변형된 식물을 이용하는 것인데, 표적 산물을 인코딩하는 유전자를 식물의 게놈으로 영구히 결합시킨 것이다. 유전자전이 시스템은 식물 생산 시스템을 생성시킬 수도 있다. 포유류 기원 및 많은 백신 후보물질 항원을 포함하는 다양한 외부 단백질이 유전자전이 식물에서 발현되었고, 기능적으로 활성을 가진다는 것을 보여주었다.(Tacket et al., 2000, J. Infect. Dis., 182:302; and Thanavala et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 102:3378). 추가적으로 간염 B 주요 표면 항원을 발현시키는 프로세스화된 유전자전이 식물을 면역 주사를 받지 않은 사람 지원자에 투여하면 면역 반응이 생성된다(Kapusta et al., 1999, FASEB J., 13:1796).

<131> 식물에서 폴리펩티드를 발현시키는 또 다른 시스템은 외부 서열(가령, 일과성 발현)을 발현하도록 조작된 식물 바이러스 벡터를 이용하는 것이다. 이와 같은 방법으로 신속한 생산 시스템으로 건강한 비-유전자 전이 식물을 이용하게 한다. 따라서, 유전적으로 조작된 식물 및 재조합 식물 바이러스에 감염된 식물들을 원하는 특정 단백질을 신속하게 발생시키고 생산시키는 "그린 팩토리"로써 사용할 수 있을 것이다. 식물 바이러스들은 외부 단백질 생산을 위한 발현 벡터로써 매력을 가질 만한 특정 장점들이 있다. 식물 RNA 바이러스의 몇 가지 멤버들은 잘 특징화되어 있고, 감염성 cDNA를 유전자 조작을 위해 이용할 수 있다. 일단 감염성 바이러스 유전자 물질이

민감성 숙주 세포에 유입되면, 상당 수준으로 복제되어 전체 식물을 통하여 급속히 확산된다. 식물성 바이러스 발현 벡터를 이용한 표적 폴리펩티드를 생산하는 몇 가지 접근법이 있는데 표적 폴리펩티드를 바이러스 계놈에 결합시키는 방법이 포함된다. 한 가지 방법은 항원 펩티드에 대해 캐리어 분자로 기능을 하는 세균, 동물 또는 식물에 감염되는 바이러스의 피복 단백질을 조작하는 것이다. 이와 같은 캐리어 단백질은 이들 표면상에 원하는 항원 에피토프를 도식하는 재조합 바이러스 유사 입자를 어셈블리하고 형성시키는 능력을 가진다. 이와 같은 방법으로 백신 후보물질의 시간대비 효과적인 생산이 가능한데, 그 이유는 백신 후보물질의 특정 성질이 식물 조직으로부터 용이하고 비용 측면에서 효과적인 회수가 가능하기 때문이다. 추가 장점으로는 표적-특이적 면역원성의 강화, 다중 백신 결합부위에 결합 가능성 및 구강, 비강 또는 장관외로 운반되는 백신으로의 조제 용이성 등이 포함된다. 예를 들면, 피복 단백질에 융합되는 바이러스의 에피토프를 운반하는 재조합 식물 바이러스 입자를 포함하는 시금치 잎은 투여시에 면역 반응을 일으킨다. (Modelska et al, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:2481 ; and Yusibov et al, 2002, 백신, 19/20:3155).

<132> 식물 발현 시스템

<133> 본 발명에 따라 이형성 핵산에 결합 및 유지에 민감한 그리고 이형성 단백질을 생산할 수 있는 임의 식물을 이용할 수 있다. 일반적으로, 비닐하우스 및 수경 시스템과 같은 특정 조건하에 생장을 잘 하는 식물을 이용하는 것이 종종 바람직할 수도 있다. 인류 또는 가축이 일반적으로 소비하지 않은 식물을 선택하거나 인간의 먹이 사슬에 전형적인 일부가 되지 않은 식물을 선택하여 발현된 폴리뉴클레오티드가 원치 않게 섭취되더라도 큰 걱정을 유발하지 않는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구체예에서, 그러나, 식용 식물을 이용하는 것이 바람직하다고 하기도 한다. 특정 구체예에서, 식물의 식용 부분에 발현된 폴리펩티드를 축적시키는 식물을 이용하는 것이 바람직할 것이라는 것이다.

<134> 흔히, 특정 바람직한 식물 특징은 발현되는 폴리뉴클레오티드에 의해 결정될 것이다. 몇 가지 실시예를 제공하기 위해 다량으로 생산될 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(항원 단백질이 발현되는 경우와 같이), 상대적으로 높은 바이오매스를 가지는 식물(가령, 담배, 바이러스 감염에 상당히 민감하여 추가 장점을 가지는 담배는 생장 기간이 짧고, 사람의 먹이쇄에 포함되지 않은)이 바람직할 수 있다. 온전한 활성을 가지는 항원 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 특정 전사후 변형을 요구하는 경우에, 관련 변형(예를 들면 특정 글리코실화 반응)을 이루지기 위해 특정 식물 종의 능력(또는 무능력)이 선별 기준이 될 수도 있다. 예를 들면, 식물이 특정 전사후 변형(가령, 글리코실화반응)을 수행할 수 있는 능력이 있을 때 식물은 포유류 전사후 변형에서 볼 수 있는 시알화 패턴(sialation patterns)을 생성시키지 않을 것이다. 따라서, 항원의 식물 생산은 대안 시스템에서 생산되는 동일한 단백질 서열과는 다른 존재(entity)의 생산으로 이어질 수 있다.

<135> 본 발명의 특정 구체예에서, 농작물 식물 또는 농작물 관련 식물을 이용한다. 특정 구체예에서 식용 식물을 이용한다.

<136> 본 발명에 따라 이용할 수 있는 식물에는 피자식물(Angiosperms), 선태류식물(Bryophytes (가령, 설앵초[Hepaticae], Musci, 등), 양치류[Pteridophytes] (가령, ferns, horsetails, 석송속[lycopods]), 겉씨식물[Gymnosperms] (가령, 침엽수[conifers], cycase, 은행[Ginko], Gnetales), 녹조 (가령, Chlorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, Xanthophyceae, Euglenophyceae)등이 포함된다. 예시적인 식물은 Leguminosae(콩과[Fabaceae]; 가령, 완두, 알파파, 소이빈); 벼과[Gramineae] (Poaceae; 가령, 옥수수, 밀, 쌀); 가지과[Solanaceae], 특히, *Lycopersicon* 종(가령, 토마토), *Solarium* (가령, 감자, 가지), *Capsium* (가령, 고추), 또는 *Nicotiana* (가령, 담배); 미나리과[Umbelliferae] 특히, *Daucus* 종 (가령, 당근), 솔잎미나리속[*Apium*](가령, 셀러리), 또는 운향과[Rutaceae](가령, 오렌지); 국화과[Compositae], 특히 *Lactuca* 종 (가령, 양상추); 십자화과[Brassicaceae] (Cruciferae), 특히, *Brassica* 또는 *Sinapis* 종을 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명의 식물들은 *Brassica* 또는 *Arab idopsis* 종의 식물이 된다. 일부 예시적인 *Brassicaceae* 과에는 *Brassica campestris*, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. oleraceae*, *B. tournifortii*, *Sinapis alba*, *Raphanus sativus*를 포함한다. 변형이 용이하고, 발아 묘목으로써 식용으로 적절한 식물에는 알파파, 녹구, 무, 밀, 머스타드, 시금치, 당근, 비트, 양파, 마늘, 셀러리, 대황, 양배추 또는 양상추, 물냉이 또는 냉이와 같은 초목(잎이 무성한), 파아슬리, 민트와 같은 허브, 클로버, 콜리플라워, 브로콜리, 소이빈, 렌즈콩, 및 해바라기와 같은 식용 꽃을 포함한다.

<137> 식물내로 벡터의 도입

<138> 일반적으로 공지의 기술을 이용하여 벡터를 식물내로 도입시킬 수 있다. 예를 들면, 벡터 자체를 바로 식물에 도입시킬 수 있다(가령, 연마성 접종[abrasive inoculations], 기계적 분무 접종[mechanized spray

inoculations], 진공 침윤[vacuum infiltration], 입자 투하[particle bombardment], 또는 전기천공[electroporation]). 대안으로 또는 추가적으로, 비리온을 준비할 수 있고(예를 들면 이미 감염된 식물로부터), 그리고 공지의 기술을 이용하여 다른 식물에 응용할 수도 있다.

<139> 다양한 식물종에 감염되는 것으로 알려진 다양한 종류의 식물들이 있으며, 본 발명에 따라 폴리뉴클레오티드 발현이 이용할 수 있다.(see, for example, in The Classification and Nomenclature of viruses, "Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses" (Ed. Murphy et al), Springer Verlag: New York, 1995, the entire contents of which are incorporated herein by reference; Grierson et al., plant Molecular Biology, Blackie, London, pp. 126-146, 1984; Gluzman et al., Communications in Molecular Biology: viral vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 172-189, 1988; and Mathew, plant viruses Online (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/>)). 식물 세포로 단일 바이러스 벡터를 운반하는 것보다는 본 발명의 특정 구체예에서 다중 상이한 벡터들을 바이러스 벡터의 복제를 위해 함께 운반될 수 있도록 한다(그리고 추가적으로 세포에서 세포로 또는 장거리 이동을 위해). 일부 또는 모든 단백질이 유전자 전이 식물의 게놈에 인코딩될 수 있다. 특정 측면에서, 하기에서 더욱 상세하게 설명하겠지만, 이들 시스템에는 하나 또는 그 이상의 바이러스 벡터 성분들이 포함된다.

<140> 광범위한 식물에 바로 감염시키고, 감염 전염의 위험이 거의 또는 전혀 없는 시스템을 얻기 위해 두 가지 이형성 식물 바이러스 성분들을 포함하는 벡터 시스템을 이용한다. 예시적인 시스템은 이미 설명된 바 있다(가령, PCT Publication WO 00/25574 및 U.S. Patent Publication 2005/0026291, 여기에서 언급한 바와 같이, 본 발명의 특정 측면에서, 바이러스성 벡터를 주입, 기계적인 접촉, 분무 등을 통하여 식물에 응용한다(가령, 식물, 식물의 일부, 싹 등). 감염이 바이러스 게놈을 식물에 바로 제공하여 얻어지는 경우에 임의 기술을 이용하여 게놈을 준비할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따라 유용하게 이용할 수 있는 많은 바이러스는 ssRNA 게놈을 가진다. ssRNA는 in vivo 또는 in vitro에서 게놈의 DNA 카피의 전사를 통하여 만들거나 RNA 카피를 복제하여 만들 수 있다. 용이하게 이용할 수 있는 in vitro 전사 시스템이 제공된다면 (가령, SP6, T7, 레티쿨로사이트 라이세이트, 등.), 그리고 RNA 벡터의 DNA 카피를 용이하게 유지한다면 발명의 ssRNA 벡터는 in vitro 전사 특히 T7 또는 SP6 폴리메라제를 통하여 만들 수 있다.

<141> 단일 바이러스 벡터 타입을 식물로 도입시키는 것보다는 본 발명의 특정 구체예에서, 다중 상이한 바이러스 벡터를 도입시킨다. 이와 같은 벡터들은 복제, 세포간 이동 또는 장거리 이동과 같은 기능에 대해 교차-보완적이다(trans-complement). 벡터들에는 본원 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나 또는 그이상의 인플루엔자 항원들을 인코딩하는 다중 폴리펩티드를 발현시키는 식물 또는 식물의 일부를 선별하는 것은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드에 대해 실행한 것과 동일한 방식으로 실행할 수 있다.

<142> 식물 조직 발현 시스템

<143> 상기에서 논의한 바와 같이, 본 발명에 따라 인플루엔자 항원을 임의 원하는 시스템에서 만들 수 있다. 벡터 구조 및 발현 시스템들은 당분야에 잘 공지되어 있고, 이를 채용하여 여기에서 제공하는 인플루엔자 항원의 이용에 결합시킨다. 예를 들면, 유전자 전이 식물 생산은 공지된 것이고, 구조체 생성 및 식물 생산을 당분야에 공지된 기술을 이용하여 조작할 수 있다. 일부 구체예에서, 식물에서 일과성 발현 시스템이 바람직할 수 있다. 이들 시스템들중 두 가지에는 클론성 뿌리 및 클론성 식물 시스템 및 이의 유도체 뿐만 아니라 받아낸 묘목 시스템의 생산이 포함된다.

<144> 클론성 식물

<145> 클론 뿌리는 RNA 바이러스성 발현 벡터들을 유지시키고 상당 시간동안 그리고 다중 서브컬처 동안에 전체 뿌리에서 균질하고 안정적으로 표적 단백질을 생산한다. 세포간 또는 장거리 이동시에 재조합에 의해 표적 유전자가 제거된 식물과는 대조적으로, 뿌리 배양물에서는 바이러스 벡터의 일체성이 유지되며, 시간에 걸쳐 생산되는 표적 단백질의 수준이 초기 스크리닝 동안 관찰된 것과 유사하다. 클론 뿌리는 항원 및 백신 조성물의 경구 조성물용 이형성 단백질 물질의 생산을 용이하게 한다. 항원 생산에 유용한 식물에서 유도된 다양한 클론 대상을 생성하는 방법 및 시약은 이미 설명된 바 있으며 당분야에 공지되어 있다(예를 들면, PCT Publication WO 05/81905, 참고문헌으로 첨부됨). 클론 대상에는 항원(본 발명의 항원 단백질을 생산할 수 있는 클론 뿌리 라인, 클론 식물 라인 및 클론 식물이 포함된다. 본 발명에서는 다양한 식물 조직(가령, 뿌리, 잎) 및 단일 세포(클론 식물)에서 유도된 온전한 식물에서 유도된 클론 세포 라인에서 항원 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 생성물의 발현을 위한 시약 및 방법을 제공한다. 이와 같은 방법은 일반적으로 다양한 타입의 식물 바이러스 벡터

사용을 근거한다.

- <146> 예를 들면, 한 측면에서 본 발명은 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 뿌리 라인을 수득하는 방법을 제공하는데, 그 방법은 (i) 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 바이러스 벡터를 식물 또는 식물이 일부에 도입시키고; (ii) 식물로부터 하나 또는 그 이상의 클론 뿌리를 생성하는 단계로 구성된다. 예를 들면, 클론 뿌리 라인은 우둘투둘한 뿌리가 형성되는 원인이 되는 아그로박테리움(가령, *A. rhizogenes*)으로 식물 또는 식물의 일부분(가령, 수확된 잎 조각)에 감염시켜 만들 수 있다. 바이러스를 유지시키는 라인, 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 높은 수준으로 발현시키는 라인 등을 동정하기 위해 다양한 방법으로 클론 뿌리 라인을 스크린할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생산된 클론 뿌리 라인을 제공하고, 또한 이와 같은 클론 뿌리 라인을 이용하여 폴리뉴클레오티드를 발현시키고, 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리펩티드를 생산하는 방법도 포함한다.
- <147> 본 발명은 본 발명에 따른 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 뿌리 세포주를 생성시키는 방법을 제공하는데; 그 방법은
- <148> (i) 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 계놈을 가지고, 바이러스 벡터를 포함하는 클론 뿌리 세포주를 만들고;
- <149> (ii) 클론 뿌리 세포주로부터 개별 세포를 방출시키고;
- <150> (iii) 뿌리 세포 증식에 적절한 조건하에 세포를 유지시키는 단계로 구성된다. 본 발명은 클론 뿌리 세포주 및 클론 뿌리 세포주를 이용하여 폴리뉴클레오티드를 발현시키고, 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공한다.
- <151> 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 식물 세포주를 생성하는 방법을 제공하는데; 그 방법은
- <152> (i) 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 계놈을 가지고, 바이러스 벡터를 포함하는 클론 뿌리 세포주를 만들고;
- <153> (ii) 클론 뿌리 세포주로부터 개별 세포를 방출시키고;
- <154> (iii) 뿌리 세포 증식에 적절한 조건하에 세포를 유지시키는 단계로 구성된다. 본 발명은 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 식물 세포주를 생성하는 방법을 제공하는데; 그 방법은
- <155> (i) 배양물에서 유지된 식물 세포주의 세포내로 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 바이러스 벡터를 도입시키고;
- <156> (ii) 바이러스 벡터를 함유하는 세포를 인리치(enrich)시키는 단계로 구성된다. 인리치(enrichment)는 i)배양물로부터 세포의 일부를 제거하고; ii) 세포 농도를 감소시키기 위해 제거된 세포를 희석시키고 (iii) 희석된 세포가 증식되도록 하고; iv) 바이러스 벡터를 포함하는 세포를 스크리닝하는 것으로 실행된다. 클론 식물 세포주를 본 발명에 따른 인플루엔자 항원 생산에 이용할 수 있다.
- <157> 본 발명에는 클론 식물을 생성시키는 방법이 포함되는데, 이 식물의 세포에는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 바이러스 벡터를 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 방법에는 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 식물을 생성시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은
- <158> (i) 클론 뿌리 라인을 만들고, 이 뿌리 라인의 세포에는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 계놈이 포함되며;
- <159> (ii) 클론 뿌리 라인으로부터 개별 세포를 방출시키고; 그리고
- <160> (iii) 식물 형성에 최적의 조건하에 방출된 세포를 유지시키는 단계로 구성된다. 본 발명은 또한 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 식물을 생성시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은
- <161> (i) 클론 식물 세포주를 생성시키고, 이 식물의 세포에는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 계놈을 가지는 바이러스 벡터를 포함하며; 그리고
- <162> (ii) 식물이 형성되는데 최적의 조건하에 세포를 유지하는 단계로 구성된다. 일반적으로 본 발명의 클론 식물은 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 임의 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있다. 이와 같은 클론 식물을

항원성 폴리펩티드 생산에 이용할 수 있다.

<163> 상기에서 설명한 것과 같이, 본 발명은 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인(가령, 잎, 줄기 등으로부터 유도된 세포 라인), 클론 식물에서 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 시스템을 제공한다. 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작용가능하도록 연결된 바이러스 벡터를 이용하여 조상전래(ancestral)의 식물 세포로 도입되는데, 이때 벡터의 계놈에는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된다. 클론 뿌리 라인 또는 클론 식물 세포 라인은 하기에서 논의하는 몇 가지 기술 중 하나에 따라 바이러스를 포함하는 세포에서 확립한다. 식물 바이러스 벡터 또는 이의 일부분을 감염, 바이러스 전사체의 접종 또는 감염성 cDNA 클론에 의한 감염, 전기 천공 또는 T-DNA 매개 유전자 전달에 의한 감염으로 식물 세포로 도입시킬 수 있다.

<164> 다음에서는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인, 클론 식물을 생성시키는 방법을 설명한다. "뿌리 라인("root line")은 뿌리 세포 라인("root cell line")과 구별되어야 하는데, 뿌리 라인은 실질적인 뿌리형태의 구조 또는 뿌리를 생산하지만, 뿌리 세포 라인은 뿌리형 구조를 형성하지 않은 뿌리 세포로 구성된다. 라인("line")은 세포주(또는 세포 라인)이 증식하고 유전자 정보를 후손 세포에 전달하는 것을 말하는 의도로 이용된다. 세포주의 세포는 일반적으로 고유(intact) 식물에서 볼 수 있는 것과 같은 조직화된 구조의 일부가 없는 배양물에서 증식한다. 뿌리 라인("root line")은 완전한 식물의 일부분 없이 뿌리 구조에 세포가 증식할 수 있다는 것을 말한다. "식물 세포"에는 뿌리 세포가 포함된다는 것을 알아야 한다. 그러나, 비-뿌리 조직으로부터 직접적으로 식물 세포 라인을 생성하기 위해 이용된 것으로부터 뿌리 라인 및 뿌리 세포 라인을 생성시키기 위한 발명의 방법을 구별하기 위해(클론 뿌리 라인 또는 클론 뿌리 라인에서 유도된 클론 식물로부터 클론 식물 세포 라인을 생성하는 것에 반대되는 것으로), 여기에서 사용된 "식물 세포" 및 "식물 세포 라인"은 일반적으로 비-뿌리 식물 조직으로 구성된 세포 및 세포 라인을 말하는 것이다. 예를 들면, 식물 세포는 잎, 줄기, 묘조(shoot), 꽃 부분이 될 수 있다. 여기에서 유도된 것과 같이 생성된 클론 식물로부터 씨를 유도할 수도 있다. 이와 같은 씨에는 바이러스 벡터 및 이들 씨들에서 수득한 식물을 포함할 수 있다. 씨 스톡(stocks)을 수득하는 방법은 공지되어 있다(예를 들면, U.S Patent Publication 2004/093643).

<165> 클론 뿌리 라인

<166> 본 발명은 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 직접 발현에 이용되는 식물 바이러스 벡터가 있는 클론 뿌리 라인을 생성하는 시스템을 제공한다. 프로모터에 작용가능하도록 연결된 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 또는 그이상의 바이러스 발현 벡터를 다양한 공지된 방법 중 하나에 따라 식물 또는 식물의 일부로 도입한다. 예를 들면, 식물 잎에 바이러스 전사체를 접종시킬 수 있다. 벡터 자체를 식물에 직접 제공할 수도 있다(가령, 마찰성 접종, 기계적 분무 접종, 진공 침윤, 입자 투하 또는 전기 천공을 통하여). 대안으로 또는 추가로, 비리온(가령, 이미 감염된 식물로부터)을 만들거나 공지 기술에 따라 다른 식물에 사용할 수 있다.

<167> 바이러스 계놈을 식물에 직접 사용하여 감염을 시킬 수 있는데, 임의 이용가능한 기술을 이용하여 바이러스 계놈을 준비한다. 예를 들면, 본 발명에 따라 유용하게 이용되는 많은 바이러스들은 ssRNA 계놈을 가진다. ssRNA는 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 계놈의 DNA 복사체의 전사, RNA 복사체의 복제에 의해 만들 수 있다. 바로 이용할 수 있는 경우에 사용이 용이한 *in vitro* 전사 시스템(가령, SP6, T7, 레티쿨로사이트 라이세이트, 등) 및 RNA 벡터의 DNA 복사체 유지의 편의성이 있다면, 본 발명의 ssRNA 벡터들은 *in vitro* 전사, 특히 T7 또는 SP6 폴리메라제를 이용한 전사에 의해 만들 수 있다. 감염성 cDNA 클론을 이용할 수도 있다. 아그로박테리아 중개된 유전자 전이를 이용하여 바이러스 벡터와 같은 바이러스 핵산을 당분야에 공지된 방법에 따라 진공침윤(agroinfiltration)을 이용하여 식물 세포로 전달시킨다.

<168> 그 다음 식물 또는 식물 일부를 바이러스 전사체의 복제에 최적의 조건하에 유지시킨다(배양 또는 생장). 본 발명의 특정 구체예에서, 바이러스는 세포간에 국소적으로 또는 처음 접종된 잎에서 추가 잎으로의 시스템적으로 초기 접종된 세포를 벗어나 전파된다. 그러나, 본 발명의 일부 구체예에서 바이러스는 전파되지 않는다. 따라서, 바이러스 벡터에는 기능을 하는 MP 및/또는 CP를 인코딩하는 유전자를 포함하거나 또는 이들 유전자 중 하나 또는 둘다 부족한 것도 있다. 일반적으로, 바이러스 벡터를 식물 또는 식물의 일부분에 있는 (곤충) 다중 세포로 도입한다.

<169> 식물로 바이러스 벡터를 도입시킨 후에, 잎을 수확한다. 일반적으로 잎은 바이러스 벡터를 도입시킨 후 임의 시간에 수확할 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터를 식물로 도입시킨 후 일정 시간 동안 식물을 유지시키는 것이 바

람직한데, 예를 들면 바이러스 복제를 할 충분한 시간 동안 그리고 선택적으로 바이러스가 초기 접종된 세포로부터 전파될 수 있는 시간 동안 유지시키는 것이 바람직하다. 하기에서 설명하는 공지의 방법을 이용하여 클론 뿌리 배양물(또는 다중 배양물)을 준비한다.

<170> 일반적으로, 임의 이용가능한 방법을 이용하여 바이러스 벡터가 도입된 식물 또는 식물 조직으로부터 클론 뿌리 배양물을 준비할 수 있다. 이와 같은 방법중에 하나는 특정 세균 플라스미드에 존재하는 유전자를 이용하는 것이다. 이들 플라스미드들은 DNA를 감염시키고 다양한 많은 유기체로 전달시키는 다양한 종류의 아그로박테리움에서 발견된다. 속(genus)으로써, 아그로박테리움은 쌍떡잎 식물 및 외떡잎 식물, 피자 식물 및 속씨 식물종을 포함하는 크고 다양한 식물 타입으로 DNA를 전달 할 수 있다(예를 들면, Gelvin, 2003, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67:16, 참고문헌으로 첨부함). 식물 세포의 유전적 변경의 분자 근간은 다양한 아그로박테리아(Agrobacterium) 종에 내재하는 거대 종양 유도성(Ti) 또는 뿌리를 내는(rhizogenic)(Ri) 플라스미드의 식물 핵 계놈으로 세균의 전달 및 융합이다. 이 부분은 플라스미드에 존재하는 경우에 T-부분이라고 하고, 플라스미드로부터 잘라낸 경우에 T-DNA라고 한다. 일반적으로 단일 가닥 T-DNA 분자를 자연 발생적 아그로박테리아(Agrobacterium) 감염으로 식물 세포로 전달되며 최종적으로 계놈으로 융합(이중 가닥 형으로)된다. Ti 플라스미드에 기초한 시스템은 식물로 외부 유전자 물질을 도입시키고 유전자 전이 식물을 생산하는데 널리 이용된다.

<171> 다양한 아그로박테리아(Agrobacterium) 종으로 식물을 감염시키고 T-DNA 전달하는 것은 많은 효과를 가진다. 예를 들면, *A. tumefaciens*는 근두암증(crown gall disease)의 원인이 되며, *A. rhizogenes*는 감염 부위에 모근병(hairy root disease)으로 알려진 가는 뿌리가 자라도록 하는 원인이 된다. 각 뿌리는 하나의 유전학적으로 변형된 세포에서 생성된다. 따라서 뿌리에 있는 뿌리 세포는 클론이며, 각 뿌리는 세포의 클론 집단이 된다. *A. rhizogenes* 감염에 의해 생성된 뿌리는 높은 성장률과 유전적 안정성을 특징으로 한다(Giri et al, 2000, Biotech. Adv., 18:1, 참고문헌을 첨부한다). 또한, 이와 같은 뿌리는 유전적으로 안정한 식물을 재생할 수 있다. (Giri 2000, supra).

<172> 일반적으로, 본 발명은 아그로박테리아(Agrobacteria)의 임의 균주 특히 식물 세포로부터 뿌리 형성을 유도할 수 있는 *A. rhizogenes* 균주를 이용하는 것이 포함된다. 상기에서 언급한 것과 같이, Ri 플라스미드 (Ri T-DNA)의 일부는 모근병을 유발하는데 책임이 있다. Ri 플라스미드의 일부를 식물 세포로 전달하는 것은 Ri 플라스미드를 가지는 아그로박테리움으로 감염시켜 편리하게 실시할 수 있는데, 발명에는 식물 세포로 관련 부분을 도입시키는 대안 방법을 이용하는 것도 포함된다. 이와 같은 방법에는 식물 세포로 유전자 물질을 도입시키는 임의 방법이 포함되는데, 유전자총(biostistics), 전기천공(electroporation), PEG-매개된 DNA 취입, Ti-계 벡터등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. Ri T-DNA의 관련 부분을 바이러스 벡터를 이용하여 식물 세포로 도입시킬 수 있다. 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 동일한 벡터에 Ri 유전자가 포함되거나 상이한 바이러스 벡터에 포함될 수 있는데, 이때 이 벡터는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터와 동일한 또는 상이한 타입이 될 수 있다. 모근을 만드는데 전체 Ri T-DNA가 필요하지 않을 수 있으며, Ri-T-DNA의 일부에 당분야에 공지된 것과 같이 뿌리 형성을 유도하는 충분한 유전 물질이 포함되는 경우에 본 발명은 Ri-T-DNA의 이용을 포함한다. 추가 유전 물질, 가령, Ri 플라스미드내에 있으나, T-DNA에는 존재하지 않는 유전자가 본 발명에 따른 식물 세포로 전달될 수 있으며, 특히 유전자의 발현 산물로 T-DNA가 식물 세포 DNA로 통합되도록 한다.

<173> 본 발명의 특정 구체예에 따라 클론 뿌리 라인을 준비하기 위해, 수확한 잎 부분을 감염 및 형질변환에 적절한 조건하에 *A. rhizogenes*와 접촉시킨다. 잎 부분은 배양물에 유지시켜 모근 발생을 유도한다. 각 뿌리는 클론, 가령 뿌리에 있는 세포는 Ri T-DNA가 전달된 단일 조상 세포에서 유도된 것이다. 본 발명에 따르면, 이와 같은 조상 세포의 일부에는 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 따라서, 이와 같은 조상 세포로부터 유도된 뿌리에 세포에는 복제하여 세포 분할 동안에 전이되기 때문에 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 따라서, 세포의 높은 비율(가령 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%)의 세포 또는 모든 세포(100%), 또는 실질적으로 모든(최소 98%) 세포에는 바이러스 벡터가 포함될 것이다. 바이러스성 벡터는 클론 뿌리내에 자녀 세포에 의해 유전되어, 뿌리내 바이러스 벡터의 이동이 뿌리를 통하여 바이러스 벡터를 유지시키는데 필수적인 것은 아니다. 개별 클론 모근을 잎 부분으로부터 떼어내어 추가 배양할 수 있다. 이와 같은 뿌리를 뿌리 라인이라고 한다. 분리된 클론 뿌리는 분리 후에 성장을 계속한다.

<174> 다양한 상이한 클론 뿌리 라인을 본 발명의 방법을 이용하여 만들었다. 이들 뿌리 라인은 본 발명의 인플루엔자 항원(가령, 인플루엔자 폴리펩티드 또는 이의 단편 또는 이의 융합 단백질을 인코딩하는)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 이용하여 만들었다. 뿌리 라인을 웨스턴 블랏으로 테스트하였다. 뿌리

라인은 다양한 폴리펩티드의 상이한 발현 수준을 나타낸다. 높은 발현을 보여주는 뿌리 라인을 선택하여 추가 배양한다. 이들 뿌리 라인을 다시 연속 테스트하여, 상당 시간동안 높은 발현 수준을 유지한다는 것을 보여주었다. 발현 수준은 클론 뿌리 라인을 만드는데 이용된 동일한 바이러스 벡터로 감염된 고유 식물에서의 발현과 필적하거나 그 이상이었다. 또한, 뿌리 라인의 발현 안정성은 동일한 바이러스 벡터로 감염된 식물에서 수득한 것 이상이었다. 이와 같은 바이러스 감염된 식물의 최고 80%는 2-3 계대후에 야생형으로 복귀된다. (이와 같은 계대는 전사체를 식물에 접종하여, 감염(국소 또는 전신)이 일어나게 하고, 잎 샘플을 취하고, 발현에 대해 연속적으로 테스트하기 위해 새로운 식물에 접종하는 것과 연관된다).

<175> 하기에서 설명하는 것과 같이 본 발명의 펩티드의 항원을 생산하기 위해 대규모로 뿌리 라인을 배양할 수 있다. 클론 뿌리 라인(및 클론 뿌리 라인에서 유도된 세포 라인)은 뿌리 및 식물 세포의 배양에 일반적으로 이용되는 다양한 화합물, 가령 옥신, 사이토키닌과 같은 식물 성장 호르몬을 포함하지 않은 배지에 유지시킨다. 이와 같은 특징은 조직 배양과 연관된 비용을 상당히 줄여주고, 발명자는 이것이 식물을 이용하는 단백질 생산의 경제적 실익에 상당히 기여할 것으로 기대한다.

<176> 다양한 임의 방법을 이용하여 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 뿌리를 선별할 수 있을 것이다. 웨스턴 블랏, ELISA 검사 등을 이용하여 인코딩된 폴리펩티드를 감지할 수 있다.

<177> GFP와 같은 감지가능한 마커의 경우에, 비주얼 스크리닝과 같은 대안법을 실시할 수 있을 것이다. 선택가능한 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 이용한다면, 적절한 선택을 부여해야한다(가령, 잎 물질 또는 이로부터 유도된 뿌리를 적절한 항생제 또는 영양 조건하에서 배양하여 생존하는 뿌리를 확인하고 분리하는). 특정 바이러스 벡터에는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 두 개 또는 그이상의 폴리뉴클레오티드, 가령 상이한 폴리펩티드를 인코딩하는 두 개 또는 그이상의 폴리뉴클레오티드, 포함한다. 이들중 하나가 선택성 또는 감지가능한 마커인 경우에, 마커의 발현을 선택 또는 감지에 의해 선택된 또는 감지된 클론 뿌리는 제2 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 가능성이 높다. 특정 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뿌리 라인의 스크리닝도 PCR 및 다른 핵산 감지 방법을 이용하여 실행할 수 있을 것이다.

<178> 대안으로 또는 추가적으로, 클론 뿌리 라인은 바이러스 감염 결과로 국소 병소를 형성하게 되는 숙주 식물(가령, 과민성 숙주 식물)의 접종에 의해 바이러스 존재에 대해 스크리닝할 수 있을 것이다. 예를 들면, 뿌리 조직 5mg을 50 μ l 인산염 완충액에서 균질화시키고, 이를 이용하여 담배 식물의 단일 잎에 접종한다. 바이러스가 뿌리 배양물에 존재하는 경우에, 2 내지 3일 이내에 특징적인 병소가 감염된 잎에 나타날 것이다. 이는 뿌리 라인에 본 발명의 인플루엔자 항원(표적 유전자)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 운반하는 재조합 바이러스를 포함한다는 것을 의미한다. 국소 병소들이 형성되지 않으면, 바이러스는 없는 것이고, 뿌리 라인은 네가티브로 거절된다. 이 방법은 시간 및 비용 측면에서 효과적이다. 바이러스 존재에 대해 초기 스크리닝 후에, 바이러스를 포함하는 뿌리는 2차 스크리닝 가령, 웨스턴 블랏 또는 ELISA를 받게되어 높은 발현체를 선별한다. 추가 스크리닝, 예를 들면 신속한 생장, 특정 매체에서 생장 또는 특정 환경 조건하에서의 생장에 대한 스크리닝을 할 수 있을 것이다. 이와 같은 스크리닝 방법은 일반적으로 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인 및/또는 클론 식물 임의 발생에 이용할 수 있을 것이다.

<179> 당업자에게 명백한 것과 같이, 바이러스 벡터를 포함하는 클론 뿌리 라인을 만드는 발명의 설명에 다양한 변형이 가능할 수 있다. 이와 같은 변형도 본 발명의 범주내에 있다. 예를 들면, Ri T-DNA 유전자의 도입전에 고유 식물 또는 이의 일부분으로 바이러스 벡터를 도입시키는 것이 일반적으로 바람직할 수 있으나, 일부 특정 구체예에서, Ri-DNA를 바이러스 벡터 도입전에 도입시킨다. 또한, 잎 부분을 수확하여 세균에 노출시키기 전에 고유 식물을 *A. rhizogenes*에 접촉시키는 것도 가능하다.

<180> 바이러스 벡터를 보유하는 식물 또는 식물의 일부분의 단일 세포로부터 클론 뿌리 라인을 만드는 다른 방법을 이용할 수 있다(가령, Ri 플라스미드로부터 유전 물질 또는 *A. rhizogenes*을 이용하지 않는 방법). 예를 들면, 식물 호르몬 또는 특정 식물 호르몬 복합물로 처리하여 식물 조직으로부터 뿌리를 생성시키는 것은 공지된 것이다.

<181> 클론 뿌리 라인으로부터 유도된 클론 세포 라인

<182> 상기에서 논의된 바와 같이, 본 발명은 클론 뿌리 라인을 생성하는 방법을 제공하는데, 이때 뿌리 라인의 세포에는 바이러스 벡터가 포함되어 있다. 당분야에 공지된 바와 같이, 다양한 상이한 세포가 뿌리로부터 생성된다. 예를 들면, 뿌리 세포 라인은 다양한 공지의 방법을 이용하여 뿌리로부터 수득된 개별 뿌리 세포로부터 생성된다. 이와 같은 뿌리 세포 라인은 뿌리내에 다양한 상이한 뿌리 세포 타입으로부터 수득될 수도 있다. 일반적인

로 뿌리 물질을 수확하여 분해시켜(예를 들면, 물리적으로 또는 효소적으로 분해), 개별 뿌리 세포를 방출시키고 추가 배양한다. 완전한 프로토플라스트(protoplast)을 형성할 필요는 없다. 원하는 경우, 단일 뿌리 세포로부터 뿌리 세포 라인을 얻기 위해, 뿌리 세포를 매우 희석된 세포 농도에서 플레이트할 수 있다. 이와 같은 방식으로 유도된 뿌리 세포 라인은 바이러스 벡터를 포함하는 클론 뿌리 세포 라인이다. 이와 같은 뿌리 세포 라인은 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 나타낸다. 적절한 식물 호르몬 존재 하에 분해된 뿌리 세포를 배양함으로써 클론 뿌리로부터 유사한 방식으로 클론 식물 세포 라인을 수득할 수 있다. 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 높은 수준으로 발현시키는 세포 라인을 확인하기 위해 인리치의 스크리닝 및 연속적인 라운드(successive rounds)를 이용할 수 있다. 그러나, 세포 라인이 유도된 클론 뿌리 라인이 높은 수준으로 발현시키면 추가 스크리닝은 불필요하다.

<183> 클론 뿌리 라인의 경우에서와 같이 클론 뿌리 세포 라인의 세포는 바이러스 벡터를 포함하는 단일 조상 세포로부터 유도되고, 따라서 바이러스 벡터를 포함하는데, 이는 복제되어 세포 분할 동안에 전이된다. 따라서, 높은 비율(가령, 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%), 세포의 전부(100%), 또는 실질적으로 전체(최소 98%) 세포에는 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 바이러스 벡터는 클론 뿌리 세포 라인내에 자녀 세포에 의해 유전되기 때문에, 세포중에서 바이러스 벡터의 이동이 바이러스 벡터를 유지하는데 필수사항이 아니라는 것이다. 하기에서 설명하는 것과 같이 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 생산하는데 클론 뿌리 세포 라인을 이용할 수 있다.

<184> 클론 식물 세포 라인

<185> 본 발명은 클론 식물 세포 라인을 생성하는 방법을 제공하는데, 이때 식물 바이러스 벡터를 이용하여 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 직접 발현시킨다. 본 발명의 방법에 따르면 프로모터에 작용 가능하도록 연결된 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 또는 그이상의 바이러스 발현 벡터를 세포 배양물내에 유지된 식물 세포 라인의 세포내로 도입한다. 다양한 타입의 식물로부터 다수의 식물 세포 라인이 공지되어 있는데, 이들중 임의의 것을 이용할 수 있을 것이다. 새로이 유도된 세포 라인은 본 발명을 실행하는데 이용되는 공지 방법에 따라 만들 수 있을 것이다. 다수의 방법중 임의 방법에 따라 식물 세포 라인의 세포내로 바이러스 벡터를 도입시킨다. 예를 들면, 프로토플라스트를 준비하고 바이러스 전사체를 세포내로 전기천공시킨다. 식물 세포 라인의 세포로 식물 바이러스 벡터를 도입시키는 다른 방법들도 이용할 수 있다.

<186> 본 발명에 따른 클론 식물 세포 라인을 생성시키는 방법 및 식물 세포(가령 프로토플라스트)내로 도입에 적절한 바이러스 벡터를 생성시키는 방법은 다음과 같이 이용할 수 있다: 바이러스 벡터를 도입시킨 후에, 식물 세포 라인을 조직 배양물에 유지시킨다. 이 기간 동안 바이러스 벡터가 복제되고, 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 발현될 것이다. 클론 식물 세포 라인은 연속 인리치먼트 과정에 의해 배양물로부터 유도된다. 예를 들면 샘플을 배양물에서 빼내고 선택적으로 세포의 농도를 낮추기 위해 희석할 수 있으며, 개별 드롭(drop)으로 배양접시상에 도말한다. 드롭을 유지시켜 세포 분할을 허용한다.

<187> 드롭에는 배양물의 초기 밀도, 희석 양에 따라 다양한 세포 수를 포함할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 1회의 인리치먼트후에 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 클론 세포 라인을 수득하고자 한다면, 세포를 희석하여 대부분의 드롭에 0 또는 1 세포가 포함될 수 있도록 한다. 그러나, 멀티 세포가 각 드롭에 존재하도록 농도를 선별하고, 발현 세포를 포함하는 지를 확인하기 위해 드롭을 스크리닝하는 것이 좀더 효과적일 것이다. 일반적으로, 임의 적절한 스크리닝 과정을 이용할 수도 있을 것이다. 예를 들면, GFP와 같은 감지가능한 마커를 이용할 수 있을 것이다. 웨스턴 블랏 또는 ELISA 검사를 이용할 수도 있다. 각 드롭(100 μ l)에는 이들 검사를 실행하는데 충분한 양이상의 세포를 포함한다. 다수의 인리치먼트 라운드를 실행하여 연속적으로 더 높은 발현 세포 주를 분리한다. 단일 클론 식물 세포 라인(예를 들면, 단일 조상 세포로부터 유도된 집단)은 단일 세포 클로닝을 위한 표준 방법을 이용하여 추가 희석을 제한시켜 생성시킬 수 있다. 그러나, 개별 클론 라인을 반드시 분리시킬 필요는 없다. 다중 클론 세포 라인을 포함하는 집단을 이용하여 본 발명의 하나 또는 그이상의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있다.

<188> 일반적으로, 클론 뿌리 라인을 생성시키기 위해 상기에서 설명한 특정 방식을 클론 식물 세포 라인 생성에 응용한다. 예를 들면, 다중 상이한 벡터 조합을 이용할 수 있는 것과 같이 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 하나 또는 그이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터의 다양성을 이용할 수 있다. 유사한 스크리닝 방법을 이용할 수도 있다. 클론 뿌리 라인 및 클론 뿌리 세포 라인의 경우와 같이, 클론 식물 세포 라인의 세포들은 바이러스 벡터를 포함하는 단일 조상 세포로부터 유도되어, 따라서 이들이 복제될 것이고, 세포 분할 동안

전달되기 때문에 바이러스 벡터를 포함하게 될 것이다. 따라서, 세포의 많은 부분(가령 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%), 모든 세포(100%), 또는 실질적으로 모든 세포(최소 98%)에 바이러스 벡터가 포함될 것이다. 클론 식물 세포 라인내에 자녀 세포에 의해 바이러스 벡터가 유전될 것이므로, 세포간에 바이러스 벡터의 이동이 바이러스 벡터를 유지시키는데 반드시 필요한 것은 아니다. 하기에서 설명하는 것과 같이 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 폴리펩티드를 생산하는데 클론 식물 세포 라인을 이용할 수도 있다.

<189> 클론 식물

<190> 클론 식물은 상기에서 설명하는 다양한 방법에 따라 만들어진 클론 뿌리, 클론 뿌리 세포 라인 및/또는 클론 식물 세포 라인으로부터 생성될 수 있다. 여기에서 설명하는 것과 같이, 뿌리, 뿌리 세포 라인, 클론 뿌리 라인과 같은 식물 세포 라인 및 클론 뿌리 세포 라인 및 클론 식물 세포 라인으로부터 식물을 생성시키는 방법은 당분야에 공지되어 있다(가령, Peres et al, 2001, Plant Cell, Tissue, Organ Culture, 65:37; and standard reference works on Plant molecular biology and biotechnology cited elsewhere herein). 따라서, 본 발명은 다음의 단계로 구성된 클론 식물을 생성시키는 방법을 제공한다; (i) 상기에서 설명하는 방법중 임의 방법에 따라 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인 또는 클론 식물 세포를 생성시키고; 그리고 (ii) 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인 또는 클론 식물로부터 온전한 식물을 생성한다. 클론 식물이 증식되고, 표준 방법에 따라 성장한다.

<191> 클론 뿌리 라인의 경우에서와 같이, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인, 클론 식물의 세포들은 바이러스 벡터를 포함하는 단일 조상 세포로부터 유도되어, 이것들이 복제하고 분할 동안에 전이되기 때문에 바이러스 벡터를 포함하게 될 것이다. 따라서, 세포의 많은 부분(가령 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%), 모든 세포(100%), 또는 실질적으로 모든 세포(최소 98%)에 바이러스 벡터가 포함될 것이다. 클론 식물내에 자녀 세포에 의해 바이러스 벡터가 유전될 것이므로, 세포간에 바이러스 벡터의 이동이 바이러스 벡터를 유지시키는데 반드시 필요한 것은 아니다.

<192> 발아(Sprouts) 및 출아묘(Sprouted Seedling) 식물 발현 시스템

<193> 본 발명에 따른 인플루엔자 항원을 생산하는데 유용한 다양한 발아 및 출아묘를 생성하기 위한 시스템 및 시약들은 이미 설명된 바 있으며 당분야에 공지되어 있다(예를 들면, PCT Publication WO 04/43886, 참고문헌으로 첨부한다). 본 발명은 또한 출아묘를 제공하는데, 이는 인플루엔자 항원을 포함하는 바이오매스로 식용가능하다. 특정 측면에서, 바이오매스는 조성물을 포함하는 항원 소비를 위해 직접적으로 제공된다. 일부 측면에서 바이오매스를 소비전에 프로세싱 예를 들면 균질화(homogenizing), 크러싱(crushing), 건조 또는 추출할 수 있다. 특정 측면에서 바이오매스로부터 인플루엔자 항원을 정제하여, 약학 조성물로 조제할 수 있다. 생(live)으로 소비되거나 수확될 수 있는 출아묘(가령, Brassica 속의 발아, 출아묘) 내에서 인플루엔자 항원을 생산하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 측면에서, 본 발명은 일정한 내부 조절가능한 환경(방, 용기 등)에서 씨앗을 식용 출아묘로 성장시키는 것과 관련된다. 씨앗은 발현이 외인성 유도가능한 프로모터에 의해 구동될 수 있고, 인플루엔자 항원을 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 유전공학적으로 조작된 씨앗이 될 수 있다. 빛, 열, 식물성 호르몬에 의해 유도될 수 있는 다양한 외인성 유도성 프로모터를 이용할 수 있을 것이다.

<194> 관련 구체예에서, 본 발명은 아그로박테리움 형질전환 시스템을 이용하여 인플루엔자 항원을 인코딩하는 박현 카세트로 식물을 형질변환시켜 출아묘용 씨앗 스톡을 우선 만들어 출아묘에서 인플루엔자 항원을 생산하는 방법을 제공하는데, 이때 인플루엔자 항원의 발현은 유도성 프로모터에 의해 구동된다. 유전자 전이 씨앗은 한정된, 조절가능한 환경에서 성장된 형질변환된 식물에서 수득하여 인플루엔자 항원을 발현하도록 유도할 수 있다.

<195> 일부 구체예에서, 인플루엔자 항원을 인코딩하는 바이러스 발현 카세트로 발아묘를 감염시키는 방법을 제공하는데 이때 발현은 바이러스 프로모터 또는 유도성 프로모터중 임의의 것에 의해 구동된다. 출아묘는 한정된, 조절가능한 환경에서 2 내지 14일간 성장시키거나 또는 소비 또는 수확을 위해 충분한 양의 인플루엔자 항원이 수득될 때까지 성장시킨다.

<196> 본 발명은 출아묘에서 인플루엔자 항원을 생산하기 위한 시스템을 추가로 제공하는데, 시스템에는 온도 조절이 가능한 하우스 유닛과 하나 또는 그이상의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 출아묘가 포함되는데, 이때 발현은 구성 또는 유도성 프로모터에 의해 구동된다. 시스템은 조절이 불가능한 외부 환경에 대해 또는 온실에 대해 독특한 장점을 제공한다. 따라서, 본 발명은 재배업자가 인플루엔자 항원의 발현을 유도하기 위해 정확하게 시간을 조절할 수 있게 한다. 이는 인플루엔자 항원을 생산하기 위한 시간 및 비용을 상당히 감소시켜 줄 수 있다.

- <197> 특정 측면에서, 일과성 형질감염된 발아에는 본 발명의 인플루엔자 항원을 인코딩하는 바이러스 벡터를 포함한다. 묘목은 일정시간 성장되어 발아에서 바이러스 핵산을 생산할 수 있도록 하고, 성장 후에 다중 복사체 바이러스가 생산되어 인플루엔자 항원이 생산된다.
- <198> 특정 측면에서, 인플루엔자 항원을 인코딩하는 핵산을 포함하는 유전공학적으로 조작된 씨앗 또는 배를 한정된, 제어가능한 환경에서 출아묘로 성장하게 한다. 한정된 제어가능한 환경은 씨앗이 실내에서 성장할 수 있도록 하우징 유닛 또는 룸이 될 수 있다. 한정된, 조절가능한 환경의 모든 환경 요인은 조절가능하다. 작은 성장을 위해 빛을 요구하지 않기 때문에, 조명은 고가이며, 유전공학적으로 조작된 씨앗 또는 배아를 빛이 없는 실내에서 출아묘 단계로 성장시킬 수 있을 것이다.
- <199> 본 발명의 한정된 조절가능한 환경에서 조절될 수 있는 다른 외부 환경 요인에는 온도, 습도, 수분, 영양소, 가스(가령, O_2 또는 CO_2 함량 또는 대기 순환), 화학물질(당 및 당 유도체와 같은 소분자 또는 식물성 호르몬 지베렐린산 또는 아브시스산과 같은 호르몬) 및 이와 유사한 것들이 포함된다.
- <200> 본 발명의 특정 방법에 따르면, 인플루엔자 항원을 인코딩하는 핵산의 발현은 외인성 유도성 프로모터에 의해 조절될 수 있다. 외인성 유도성 프로모터는 내부 자극보다는 외부 자극에 반응하여 핵산의 발현을 증가 또는 감소시키게 된다. 다수의 환경 인자들이 유전공학적으로 조작된 씨의 발현 카세트에 의해 운반되는 핵산의 발현 유도물질로 기능할 수 있다. 프로모터는 열-쇼크 프로모터와 같은 역-유도성 프로모터가 될 수 있다. 예를 들면, 열-쇼크 프로모터를 이용하여 한정된 공간의 환경의 온도를 핵산 발현을 유도하기 위해 상승시킬 수도 있다. 다른 프로모터에는 빛 유도성 프로모터가 포함된다. 한정된 조절가능한 환경에 항상 빛이 제공되는 경우에, 빛 유도성 프로모터들은 구성 프로모터로 유지시킬 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로 빛을 단순히 밝혀서 발생 동안 특정 시기에 핵산 발현을 개시시킬 수도 있다. 프로모터는 핵산 발현을 유도할 때 사용되는 화학물질에 의한 유도성 프로모터가 될 수도 있다. 이와 같은 구체예에 따르면 화학물질을 씨, 배아 또는 출아묘에 단순히 안개처럼 뿌리거나 분무하여 핵산 발현을 유도할 수 있다. 살포나 분무를 정확하게 조절가능하며, 표적 씨, 배아 또는 묘목에 의도하는 바에 따라 직접 가할 수 있다. 한정된 환경은 바람 또는 기류가 없기 때문에 원하는 표적으로부터 화학물질을 소산시킬 수 있어 원하는 바에 따라 표적에 화학물질을 유지시킬 수 있다.
- <201> 본 발명에 따르면, 수확시기에 출아묘에 인플루엔자 항원의 발현을 최대화시키기 위해 발현 유도 시간을 선택할 수 있다. 특정 생장 단계에서 배아에서 발현 유도 예를 들면, 발아(germination) 후 특정 일정에 배아에서 발현 유도로 인하여 수확시기에 인플루엔자 항원의 최대 합성을 이끈다. 예를 들면 발아후 4일째에 프로모터로부터 발현을 유도하여 3일 또는 5일째에 프로모터 발현을 유도한 것보다 더 많은 단백질을 합성하게 된다. 당업자는 일상적인 실험을 통하여 최대 발현을 얻을 수 있을 것이다. 특정 방법에서 출아묘는 발아후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일 또는 12일에 수확할 수 있다.
- <202> 발현 벡터가 유도성 프로모터 대신에 구성(constitutive) 프로모터를 보유하는 경우, 출아묘는 출아묘의 형질변환 후에 특정 시간에 수확할 수 있을 것이다. 예를 들면, 출아묘는 발생 초기 단계에서 바이러스에 의해 형질변환되면 출아묘는 발현이 형질변환후 최대시점에 되는 시기에 수확할 수 있다. 예를 들면 형질변환후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일 또는 14일이 될 수 있다. 씨앗의 발아에 따라 작은 형질변환후 1개월, 2개월, 3개월 또는 더 긴 시간에 발생될 수 있을 것이다.
- <203> 일반적으로 인플루엔자 항원의 발현이 시작되면, 씨, 배아 또는 출아묘는 인플루엔자 항원 수준이 충분히 발현될 때까지 성장하도록 한다. 특정 측면에서, 충분한 수준은 수확된 바이오매스를 날 것으로 복용했을 때 환자에 치료요법적으로 잇점을 제공할 수 있는 수준이 된다. 대안으로 또는 추가로, 충분한 수준은 인플루엔자 항원이 바이로매스로부터 농축되거나 정제되어 투여시 환자에 치료요법적으로 유익한 점을 제공하는 약학 조성물로 조제될 수 있는 수준이 된다. 일반적으로, 인플루엔자 항원은 자연상태에서 출아묘에 발현되는 단백질이 아니다. 어쨌든, 인플루엔자 항원은 자연상태에서 출아묘에 존재하는 농도이상의 농도에서 발현된다.
- <204> 인플루엔자 항원의 발현이 일단 유도되면, 출아묘를 수확하게 되는 출아묘 단계까지 성장을 계속하도록 한다. 출아묘는 생으로 수확할 수 있다. 생 출아묘 수확은 최소한의 노력과 파손 등을 포함하는 몇 가지 장점을 가진다. 본 발명의 출아묘는 수경재배에 의해 성장되어, 수확은 수경재배 액으로부터 출아묘를 단순히 집어 올리는 것이 된다. 본 발명의 출아묘 생장에 토양이 필요하지 않지만 당업자에 의해 필요하다고 생각되거나 바람직하다고 생각되는 경우에 제공될 수 있다. 씨이 토양없이 성장할 수 있기 때문에 수확 시기에 출아묘 물질을 세척할 필요는 없다. 세척없이 또는 문지름없이(수확된 물질의 파손을 최소화시키게 되는) 수경재배 환경으로부터 출아묘를 직접적으로 수확하게 된다. 식물의 파손 또는 시듦은 아포프토티스를 유도한다. 아포프토티스 동안에 특정

단백질 분해성 효소가 활성화되어 출아묘에서 발현된 약학 단백질을 분해시키고, 이는 단백질의 치료 활성이 감소 결과를 초래한다. 아포프토티스 유도성 단백질 분해는 성숙한 식물로부터 단백질의 수득물을 상당히 감소시킬 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하여 식물로부터 단백질을 추출하는 순간까지 수확이 일어나지 않아 아포프토티스를 피할 수 있을 것이다.

<205> 예를 들면, 살아있는 싹을 연마, 분쇄 또는 혼합하여 프로테아제 저해물질을 포함하는 완충액에 출아묘 바이오매스 슬러리를 만든다. 완충액은 약 4℃로 유지한다. 일부 측면에서, 출아묘 바이오매스는 대기 건조, 분무 건조, 냉동 또는 동결 건조된다. 성숙한 식물에서 이들 방법 중 일부 예를 들면 대기-건조에 의해 약학 단백질의 활성이 상실될 수 있다. 그러나, 출아묘는 매우 작고, 용적 비율에 대해 큰 표면적을 가지기 때문이 이와 같은 것은 발생하지 않을 수도 있다. 당업자는 발현된 단백질의 단백질 분해를 최소화시키는 바이오매스 수확 기술이 상당히 많으며, 본 발명에 이용할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

<206> 일부 구체예에서, 출아묘는 식용이 가능하다. 특정 구체예에서, 수확시(가령, 수확 직후, 수확후 최소한의 시간 내에)에 인플루엔자 항원을 충분한 수준으로 발현시키는 출아묘를 소비한다. 이와 같은 방식으로, 치료를 요하는 환자에 인플루엔자 항원을 투여하기 전에 인플루엔자 항원의 수확에 의해 유도되는 단백질 분해에 의한 분해를 최소화시킨다. 예를 들면, 바로 소비할 수 있는 출아묘를 환자에 직접 제공할 수 있을 것이다. 대안으로 또는 추가로 유전공학적으로 조작된 씨 또는 배아를 치료를 요하는 환자에 제공하고, 환자가 출아묘 키울 수 있다. 한 측면에서, 유전공학적으로 조작된 출아묘를 환자에 공급하거나 또는 환자를 치료하는 의사에 공급하여 특정 바람직한 인플루엔자 항원을 발현시키는 출아묘 스톡을 배양할 수도 있다. 이는 고가의 약품을 구입할 여력이 안되거나 운반할 여력이 안되는 개발도상국가에서 특히 가치가 있다. 본 발명의 출아묘는 이와 같은 개발도상국 집단에 특히 바람직한 출아묘를 만드는데 용이하다.

<207> 한정된 환경에서의 조절가능한 성질은 외부 환경에서 자라는 식물에 비교하여 본 발명에 잇점을 부여한다. 일반적으로, 식물에서 약학 단백질을 발현시키는 유전공학적으로 조작된 출아묘를 생장시키면, 유전공학적으로 조작된 식물을 생장시키는 것보다 더 신속하게(식물을 더 어릴 때 수확하기 때문에) 그리고 힘을 덜 들이고, 위험이 감소된 약학 산물을 제공한다. 본 발명에 이용되는 한정된 조절가능한 환경은 자연계에서 식물의 교차 오염을 감소 또는 제거시킨다.

<208> 예를 들면, 열 유도성 프로모터는 외부 온도를 조절할 수 없기 때문에 실외에서는 이용되지 않을 것이다. 프로모터는 특정 수준이상으로 실외 온도가 상승되면 언제든지 개시될 수 있다. 유사하게, 프로모터는 실외 온도가 떨어질 때마다 작동을 멈추게 될 것이다. 이와 같은 온도 변이는 하루에, 예를 들면 낮에는 개시되고 밤에는 중단될 수 있다.

<209> 여기에서 설명하는 것과 같이 열 유도성 프로모터는 실외와 같이 거의 동일한 정도로 기온 변화에 민감한 온실에 실질적으로 이용할 수 없을 것이다. 온실에서 유전공학적으로 조작된 식물의 생장은 상당히 비용이 든다. 대조적으로, 본 시스템에서, 모든 변수를 조절하여 매년 수확시마다 최대의 발현을 얻을 수 있도록 한다.

<210> 특정 구체예에서, 본 발명의 출아묘를 트레이에 생장시켜, 출아묘 발생동안에 물을 주고, 분무하거나 연무시킬 수 있다. 예를 들면, 트레이에 하나 또는 그 이상의 수분 제공, 분무, 연무 및 배수 장비를 고정시켜 물, 영양소 및 화학물질 등을 출아묘 발생 동안에 특정 시기에 정확한 양으로 공급 및 배수를 시킬 수 있다. 예를 들면, 씨는 축축하게 젖도록 충분한 양의 수분을 요한다. 트레이에 있는 구멍을 통하여 과량의 수분은 바닥으로 배수된다. 일반적으로 배수된 물은 환경으로 방출하기 전에 유해한 화학물질을 제거하기 위해 적절히 조치한다.

<211> 트레이의 또 다른 장점은 매우 작은 공간내에 유지될 수 있다는 것이다. 출아묘의 생장을 위해 빛이 필요하지 않기 때문에 씨, 배아를 함유하는 트레이 또는 출아묘는 하우스 설비의 단위 바닥 공간당 많은 양의 바이오매스를 제공하기 위해 이와 같은 목적으로 제작된 설비에서 상단에 단단하게 수직으로 적재할 수 있다. 또한, 트레이 적재는 하우스 단위내에 수평으로 열을 맞추어 배열할 수도 있다. 싹이 생장하여 수확할 수 있는 시기가 되면(약 2일 내지 14일), 개별 묘목 트레이를 프로세싱 설비로 수작업으로 또는 콘베이어 벨트와 같은 자동화 장비를 이용하여 이동시킬 수 있다.

<212> 본 발명의 시스템은 인플루엔자 항원의 재료가 되는 출아묘 바이오매스를 제공하는 독특한 성질이 있다. 직접적으로 소비되던 또는 약학 조성물 형태로 처리되던, 출아묘는 한정된 조절가능한 환경에서 생장하기 때문에 출아묘 바이오매스 및/또는 이로부터 유도된 약학 조성물을 소비자에게 저렴한 가격으로 제공될 수 있다. 또한, 출아묘의 생장 조건을 조절할 수 있다는 사실은 생성물의 품질 및 순도를 일정하게 유지시킬 수 있다. 본 발명

의 한정된 조절가능한 환경은 과학자들에 의해 실외에서 유전공학적으로 조작된 농산물의 재배를 금지하는 EPA의 많은 안전 규제를 피할 수 있다.

<213> **형질변환된 씨**

<214> 다양한 방법을 이용하여 식물을 형질변환시키고, 유전공학적으로 조작된 출아묘를 만든다. 유전자 전이 식물 세포 라인을 in vitro에서 생성시키고, 세포 라인이 온전한 식물로 재생되는데 요구되는 식물의 형질변환에 이용 가능한 두 가지 방법에는 아그로박테리움 튜머페션스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이와 마이크로프로젝타일 투하(microprojectile bombardment) 또는 전기천공이 포함된다. 바이러스 형질변환이 원하는 산물을 수득하기 전에 실험적인 또는 제너레이션 래그(generational lag) 없이 수확될 수 있는 배아와 출아묘를 좀더 신속하게 그리고 비용을 적게 들이는 방법이다. 임의 기술의 경우에, 당업자는 식물, 씨앗, 배아 또는 출아묘에 통상적으로 이용될 수 있는 형질변환 프로토콜을 어떻게 조절하여 최적화시킬 수 있는지를 인지할 수 있을 것이다.

<215> **아그로박테리움 형질변환 발현 카세트**

<216> 아그로박테리움은 그람 음성 족 리조비아세(Rhizobiaceae)의 대표속이다. 이 종은 크라운 골(crown gall) 및 모근병과 같은 식물 종양의 원인이 된다. 종양의 특징인, (dedifferentiated) 식물 조직에서 오파인(opines)으로 알려진 아미노산 유도체가 아그로박테리움에 의해 생산되고, 식물에 의해 동화(catabolize)된다. 오파인 발현을 맡고 있는 세균 유전자는 키메라 발현 카세트의 조절 요소의 통상의 자원이 된다. 본 발명에 따르면, 아그로박테리움 형질변환 시스템을 이용하여 식용 출아묘를 생성시키고, 이는 성숙한 식물보다 다소 조기에 수확된다. 아그로박테리움 형질변환 방법을 인플루엔자 항원을 발현시키는 출아묘를 생성시키는데 응용할 수 있다.

<217> 일반적으로, 식물의 형질변환은 식물/세균 벡터를 운반하는 아그로박테리움 튜머페션스와 공동 배양하여 조직 배양물에서 성장한 식물의 형질변환시키는 것에 관계한다. 벡터에는 인플루엔자 항원을 인코딩하는 유전자를 포함한다. 아그로박테리움은 식물 숙주 세포로 벡터를 전달하고, 항생제 처리에 의해 아그로박테리움은 제거된다. 인플루엔자 항원을 발현시키는 형질변환된 식물 세포들을 선별하고, 분화시켜 최종적으로 온전한 식물로 재생시킨다(Hellens et al, 2000, 식물 MoI. Biol, 42:819; Pilon-Smits et al., 1999, Plant Physiology., 119:123; Barfield et al, 199], Plant Cell Reports, 10:308; and Riva et al, 1998, J. Biotech, 1(3); 각 참고문헌으로 첨부한다).

<218> 본 발명에서 이용할 수 있는 발현 벡터에는 식물에서 작용하도록 고안된 인플루엔자 항원과 발현 카세트의 하류 및 상류 컴패니언 서열(companion sequences)을 가진 유전자(또는 발현 카세트)가 포함된다. 컴패니언 서열은 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 오리진이며, 세균으로부터 원하는 식물 숙주로 DNA를 전달하기 위해 벡터에 존재하는 필수 특징들을 제공한다.

<219> 기본적인 세균/식물 벡터 구조체는 바람직하게는 광역의 숙주 범주의 원핵 복제 오리진, 원핵세포 선택성 표식을 제공할 수 있다. 적절한 원핵세포 선택성 표식에는 암피실린 또는 테트라사이클린과 같은 항생제에 대한 저항성이 포함된다. 당분야에 공지된 추가 기능을 인코딩하는 다른 DNA서열이 벡터에 존재할 수도 있다.

<220> 아그로박테리움 T-DNA 서열은 식물 염색체로 DNA의 아그로박테리움 매개된 전달에 필요하다. T-DNA의 종양-유도성 유전자를 일반적으로 제거하고 인플루엔자 항원을 인코딩하는 서열로 대체한다. T-DNA 보더(border) 서열은 식물 게놈으로 T-DNA 부분으로 통합개시하기 때문에 보유된다. 인플루엔자 항원의 발현이 바로 감지되지 않는 경우에, 세균/식물 벡터 구조체에 식물 세포의 형질변환이 있는지를 결정하는데 적절한 선택성 표식 유전자, 예를 들면, nptII 카나마이신 저항성 유전자가 포함될 수 있다. 동일한 또는 상이한 세균/식물 벡터 (Ti 플라스미드)가 Ti 서열이다. Ti 서열에는 비루런스(virulence) 유전자, 이 유전자는 T-DNA의 절단, 식물 게놈으로 전달 및 통합을 인코딩한다(Schell, 1987, Science, 237:1176). 식물 게놈으로 이형성 서열의 통합을 허용하는데 적절한 다른 서열들에는 트랜스포존(transposon) 서열 및 상동성 재조합을 위한 유사한 것들이 포함된다.

<221> 특정 구조체에는 항원 단백질을 인코딩하는 발현 카세트를 포함한다. 주어진 형질변환에 하나, 두 개 또는 그 이상의 발현 카세트가 이용될 수도 있다. 재조합 발현 카세트에는 인플루엔자 항원 인코딩 서열에 추가하여 다음의 요소들이 포함될 수 있다: 프로모터 부분, 식물 5' 비해독(untranslated) 서열, 개시 코돈 (발현된 유전자가 이를 보유하느냐에 따라), 전사 및 해독 종료 서열. 추가적으로, 전사 및 해독 종료물질이 본 발명의 발현 카세트 또는 키메라 유전자에 포함될 수 있다. 단백질이 적절하게 프로세싱되고 전좌(translocation)를 허용하는 시그널 방출 서열이 발현 카세트에 포함될 수 있다. 다양한 프로모터, 시그널 서열 및 전사 및 해독 종료물

질에 대해서는 예를 들면 Lawton et al. (1987, Plant Mol. Biol., 9:315) 및 U.S. Patent 5,888,789 (이들 다 참고문헌으로 첨부한다)에서 설명하고 있다. 또한, 항생제 저항성에 대한 구조적 유전자를 선택성 인자로 통상적으로 이용한다 (Fraley et al. 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80:4803, 참고문헌으로 첨부한다). 카세트의 5'와 3'에 유일한 제한 효소 부위가 기존의 벡터로 용이하게 삽입되도록 한다. 적어도 한 가지 T-DNA 보다 서열을 운반하며, 아그로박테리움 매개된 형질변환(binary) 벡터 시스템에 대해 설명되어 있다 (PCT/EP99/07414, 참고문헌으로 첨부됨).

<222> 재생

<223> 형질변환된 식물의 씨앗을 수확하고, 건조하고, 세척하여 원하는 유전자 산물의 생존, 존재 및 발현을 테스트할 수 있다. 이것이 일단 결정되면 씨앗 스탁은 필요할 경우 사용하기에 적절한 일반적으로 온도, 습도, 위생 및 안전성에 적절한 조건하에 보관한다. 그 다음, 배양된 프로토플라스트로부터 전체 식물을 재생할 수 있는데 이는 Evans et al. (Handbook of Plant Cell Cultures, Vol. 1, MacMillan Publishing Co., New York, NY, 1983, incorporated herein by reference); 및 Vasil (ed., Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Acad. Press, Orlando, FL, Vol. I, 1984, and Vol. III, 1986, incorporated herein by reference)에서 설명하고 있다. 특정 측면에서, 출아묘 단계에서만 식물들이 재생된다. 일부 측면에서는 전체 식물들을 재생하여 씨앗 산물 스탁을 만들고, 출아묘는 씨앗 스탁의 씨로부터 생성된다.

<224> 프로토플라스트를 분리하고, 온전한 재생된 식물을 제공하는 모든 식물은 본 발명에 의해 형질변환되어, 전이된 유전자를 포함하는 전체 식물을 회수한다. 실제 모든 식물은 배양된 세포 또는 조직으로부터 재생되는데, 식용 짝을 생산하는 모든 주요 종의 식물을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다. 일부 적절한 식물에는 알파파, 녹두, 무, 밀, 머스타드, 시금치, 당근, 비트, 양파, 마늘, 셀러리, 대황, 양배추 또는 양상추와 같은 잎 식물, 물냉이 또는 큰 바닥 냉이, 파슬리, 민트 또는 클로버와 같은 허브, 콜리플라워, 브로콜리, 소이빈, 렌즈콩, 해바라기와 같은 식용 꽃이 포함된다.

<225> 재생 수단은 식물의 한 종으로부터 다른 종으로 다양하다. 그러나, 당업자는 이형 유전자 복사체를 포함하는 형질변환된 프로토플라스트 현탁액을 먼저 제공해야 한다는 것을 인지할 것이다. 유합(Callus) 조직이 형성되고, 유합조직으로부터 어린가지(shoot)가 유도되고 연속하여 뿌리를 내린다. 대안으로 또는 추가적으로 배아 형성은 프로토플라스트 현탁액으로부터 유도될 수 있다. 이들 배아가 자연 배아로 발아하여 식물을 형성한다. 씨를 물에 담구거나 또는 씨앗에 물을 분무하여 씨의 수분 함량을 35-45%로 증가시켜 발아가 시작된다. 발아의 진행을 위해, 일반적으로 씨앗은 조절된 온도 및 대기 조건하에 물로 포화된 대기에서 유지한다. 배양 배지에는 일반적으로 옥신 및 사이토키닌과 같은 다양한 아미노산 및 호르몬을 포함한다. 알파파와 같은 종에는 배지에는 글루타민산 및 프롤린을 첨가하는 것이 유리하다. 어린 가지와 뿌리는 일반적으로 동시에 발생한다. 효과적인 재생은 배지, 유전자 타입, 배양물의 역학에 따라 달라진다. 이들 세가지 변수가 조절된다면 재생은 반복적으로 재생할 수 있다.

<226> 형질변환된 식물 세포에서 생장된 성숙한 식물은 같은 종류이며, 비-분리형동종접합체 유전자 전이 식물이 확인된다. 동종의 식물은 항원-인코드 서열을 포함하는 씨앗을 만든다. 이와 같은 씨앗이 발아되어 출아묘 단계로 생장하고 본 발명의 인플루엔자 항원을 만든다.

<227> 관련 구체예에서, 본 발명의 씨앗이 씨앗 산물로 형성되어 어떻게 묘목을 약학 조성물로 투여 또는 수확하기 위한 출아묘 단계로 생장시키는지에 대한 지시사항과 함께 판매된다. 관련 구체예에서, 원하는 형질을 포함하는 하이브리드 또는 변이체를 본 발명의 동종 변식 식물로부터 발생시킬 수도 있다.

<228> 직접적인 통합

<229> 본 발명에서 미세입자투사(microprojectile bombardment) 또는 전기천공에 의해 식물 세포의 게놈으로 DNA 단편의 직접 통합을 이용할 수도 있다(가령, Kikkert, et al, 1999, Plant: J. Tiss. Cult. Assoc, 35:43; Bates, 1994, Mol. Biotech., 2:135). 좀더 구체적으로, 본 발명의 인플루엔자 항원을 발현시키는 벡터를 다양한 기술을 이용하여 식물 세포에 도입시킬 수 있다. 상기에서 설명한 것과 같이, 벡터에는 식물 세포에서 이용할 수 있는 선택성 마커를 포함할 수도 있다. 벡터에는 제2 숙주에서 선별 및 증식을 허용하는 서열 예를 들면, 복제기원 및 선택성 마커를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 제2숙주에는 세균 및 이스트를 포함한다. 한 구체예에서, 제2 숙주는 세균(가령, 대장균, 복제 원점은 복제의 colE1-타입 오리진이다)이 되며, 선택성 마커는 암피실린 저항성을 인코드하는 유전자가 된다. 이와 같은 서열은 당분야에 공지되어 있고 상업적으로 이용할 수 있다(가령, Clontech, Palo Alto, CA 또는 Stratagene, La Jolla, CA).

- <230> 본 발명의 벡터를 변형하여, 아그로박테리움 튜머페션스 벡터, 아그로박테리움 튜머페션스의 T-DNA 보다 부분, 핵산 또는 발현 카세트를 인코딩하는 항원에 상동성 부분을 포함하는 식물 형질변환 플라스미드를 조절할 수 있다. 추가로, 벡터에는 아그로박테리움 튜머페션스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 플라스미드를 유도하는 무해한 식물 종양을 포함할 수도 있다.
- <231> 이와 같은 구체예에 따르면, 벡터 발명의 직접적인 형질변환은 기계적인 재조합 DNA 전달에 마이크로피펫을 이용하여 식물 세포에 직접적으로 벡터를 미세주입하는 것과 관련있을 수 있다(가령, Crossway, 1985, Mol. Gen. Genet., 202-119, 참고문헌을 첨부한다). 유전 물질을 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 식물 세포로 전달할 수도 있다(가령, Krens et al., 1982, Nature 296:72). 식물로 핵산을 도입시키는 또 다른 방법은 작은 비드 또는 압자의 매트릭스내에 또는 표면에 핵산의 소립자에 의해 고속 탄도 침투시키는 것이다(가령, Klein et al., 1987, Nature 321:10; Knudsen et al., Planta, 185:330). 또 다른 도입 방법은 미니셀, 세포, 라이소좀 또는 다른 융합성 지질 표면의 바디와 같은 다른 대상과 프로토플라스트를 융합시키는 것이다(가령, Fraley et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79:1859). 본 발명의 벡터를 전기천공에 의해 식물로 도입시킬 수 있다(가령, Fromm et al. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:5824). 이와 같은 기술에 따라 식물 프로토플라스트는 유전자 구조체를 포함하는 플라스미드 존재하에 전기천공된다. 고장력(high field strength)의 전기 펄스는 가역적으로 바이오파크를 침투하게 하여 플라스미드의 도입이 허용된다. 전기천공된 식물 프로토플라스트는 세포벽 분해를 재형성하고, 식물 융합조직을 형성하고, 이는 재생되어 본 발명의 출아묘를 형성한다. 당업자는 식용 출아묘를 만들기 위해, 어떻게 이와 같은 식물 세포의 형질변환 방법을 이용하는지를 인지할 것이다.
- <232> 바이러스 형질변환
- <233> 통상의 발현 시스템과 유사하게, 식물 바이러스 벡터를 이용하여 전장의 항원을 포함하는 전장 단백질을 만들 수 있다. 본 발명에 따라, 식물 바이러스 벡터를 이용하여 씨, 배아, 출아묘에서 항원을 감염 생산할 수 있다. 바이러스성 시스템을 이용하여 짧은 펩티드로부터 큰 복합 단백질을 발현시킨다. 특히, 토마토 바이러스 벡터를 이용하는 방법이 McCormick et al(1999, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96:703; Kumagai et al. 2000, Gene, 245:169; and Verch et al, 1998, J. Immunol. Methods, 220:69; 참고문헌으로 첨부한다). 따라서, 식물 바이러스성 벡터는 짧은 펩티드 뿐만 아니라 큰 복합 단백질을 모두 발현시키는 능력을 가진다.
- <234> 특정 구체예에서, 인플루엔자 항원을 발현하는 유전자 전이 짝은 숙주/바이러스 시스템을 이용하여 만들어진다. 바이러스 감염에 의해 생성된 유전자 전이 짝은 안전한 것으로 이미 설명된 유전자 전이 단백질의 재료를 제공한다. 예를 들면, 짝은 동물 병원균의 오염이 없다. 있음직 하지는 않지만, 예를 들면 담배의 식용 짝에서 단백질은 이론상으로는 정제없이 경구 투여할 수 있어 상당한 비용을 줄일 수 있다. 또한, 바이러스/발아 시스템은 스케일-업 및 제조에 훨씬 간단한 비용 절감적인 경로를 제공하는데, 그 이유는 트랜스젠(transgenes)이 바이러스내로 도입되어 수일내에 상업규모로 성장할 수 있기 때문이다. 대조적으로, 대규모 시도 또는 상업화에는 충분한 양의 씨 또는 식물 재료가 이용되기 때문에 유전자 전이 식물은 5-7년을 필요로 할 수 있다.
- <235> 본 발명에 따르면, 식물 RNA 바이러스는 특정 장점을 가지는데, 이는 외부 단백질 발현을 위한 벡터로서의 매력을 가지도록 한다. 다수의 식물 RNA 바이러스의 분자생물학 및 병리학이 파악되어 있고, 바이러스 생물학, 유전학 및 조절 서열에 대해서도 상당히 공지되어 있다. 대부분 식물 RNA 바이러스는 작은 게놈을 가지며 감염성 cDNA 클론을 이용하여 유전자 조작을 실행할 수 있다. 감염성 바이러스 물질이 일단 민감성 숙주 세포로 유입되면 높은 수준으로 복제하여 전체적인 출아묘를 통하여 신속하게 퍼진다(접종후 1일 내지 10일 후). 바이러스 입자들은 감염된 출아묘 조직으로부터 용이하고 경제적으로 회수된다. 바이러스는 광역의 숙주 범위를 가지고 있어 몇 가지 민감 종의 감염에 단일 구조체를 이용할 수게 된다. 이와 같은 특징들은 짝으로 바로 전달될 수 있다.
- <236> 외부 서열은 식물 RNA 바이러스로부터 발현되는데, 이는 일반적으로, 원하는 서열로 바이러스 유전자들중 하나를 대체하고, 적절한 위치의 바이러스 게놈으로 외부 서열을 삽입하거나 또는 바이러스의 구조 단백질에 외부 펩티드를 융합시켜 실행될 수 있다. 또한 이들 방법중 임의 방법을 복합하여 바이러스의 치명적 기능을 교차 실행(trans-complementation)하여 외부 서열을 발현시킬 수 있다. 담배 모자이크 바이러스(TMV), 알파파 모자이크 바이러스(AIMV), 이의 키메라를 이용하여 바이러스-감염된 식물에서 외부 서열을 발현시키는 도구로 사용할 수 있는 다양한 전략들이 존재한다.
- <237> AIMV 게놈은 브로모비리데(Bromoviridae)속 바이러스의 대표이며, 세가지 게놈 RNAs (RNAs1-3)와 서브게놈 RNA (RNA4)로 구성된다. 게놈 RNAs1 및 2는 바이러스 복제효소(replicase) 단백질 P1 및 2를 각각 인코딩한다. 게놈 RNA3는 세포간 이동 단백질 P3 및 껍질 단백질(CP)을 인코딩한다. CP는 서브게놈 RNA4로부터 해독되는데, 게

놈 RNA3으로부터 합성되고, 감염 시작에 요구된다. 연구에 따르면, 게놈 활성화, 복제, RNA 안정성, 증후 형성 및 RNA 캡슐화를 포함하는 다중 기능에 CP가 관련된다는 것이다(가령, BoI et al, 1971, Virology, 46:73; Van Der Vossen et al, 1994, Virology 202:891; Yusibov et al, Virology, 208:405; Yusibov et al, 1998, Virology, 242:1 ; BoI et al, (Review, 100 refs.), 1999, J. Gen. Virol., 80:1089; De Graaff, 1995, Virology, 208:583; Jaspars et al, 1974, Adv. 바이러스 Res., 19:37; Loesch-Fries, 1985, Virology, 146:177; Neeleman et al, 1991, Virology, 181 :687; Neeleman et al, 1993, Virology, 196: 883; Van Der Kuyl et al., 1991, Virology, 183:731; and Van Der Kuyl et al, 1991, Virology, 185:496).

<238> 바이러스 입자들의 결합포개기(Encapsidation)는 씨, 배아 또는 출아묘의 접종된 부분으로부터 접종안된 부분으로 바이러스의 장거리 이동 및 시스템적 감염에 일반적으로 요구된다. 본 발명에 따르면, 접종은 식물 발생의 임의 단계에서 일어날 수 있다. 배아 및 싹에서 접종된 바이러스 전파는 매우 신속하다. AIMV 비리온은 독특한 CP (24kD)에 의해 결합포개기되어 한 가지 이상의 입자 타입을 형성한다. 입자들의 크기(30- 내지 60-nm의 길이, 18nm 직경) 및 모양(구형, 타원형 또는 간상[bacilliform])은 결합포개기된 RNA의 크기에 따라 달라진다. 어셈블리시에, AIMV CP의 N-말단은 바이러스 입자의 표면에 위치하고 바이러스 어셈블리를 간섭하지 않은 것으로 보인다 (BoI et al., 1971, Virology, 6:73). 또한, 38개 아미노산 펩티드와 AIMV CP는 N-말단에서 in vitro상에서 입자들을 형성하고 생물학적 활성은 유지한다 (Yusibov et al, 1995, J. Gen. Virol., 77:567).

<239> AIMV는 식물 씨앗, 배아 및 싹을 포함하는 다수의 농업적으로 가치가 있는 곡물 식물을 포함하는 광범위한 숙주 범위를 가진다. 이와 함께, 이들 특징으로 AIMV CP를 캐리어 분자로써 우수한 후보물질을 만들고, AIMV는 발생의 발아 단계에 있는 식물에 외부 서열의 발현을 위한 매력적인 후보 벡터가 된다. 또한, TMV와 같은 이형성 벡터로부터 발현시에 바이러스 활성화의 간섭없이 TMV 게놈을 결합포개기시킨다(Yusibov et al, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94:5784, incorporated herein by reference). 이로써 외부 서열에 융합된 AIMV CP용 캐리어 바이러스로 TMV를 이용하게 된다.

<240> 토마모바이러스(tobamviruses)의 프로토타입인 TMV는 17.0kD CP로 결합포개기된 단일 펄스-센스 RNA로 구성된 게놈을 보유하는데, 이는 막대형 입자로 된다(300nm 길이). CP는 TMV의 유일한 구조 단백질이며, 결합포개기에 요구되며, 감염된 숙주에서 바이러스의 장거리 이동에도 필요하다(Saito et al, 1990, Virology 176:329). 게놈 RNA로부터 183 및 126 kD 단백질이 해독되고, 이들은 바이러스 복제에 요구된다 (Ishikawa et al, 1986, Nucleic Acids Res., 14:8291). 30 kD 단백질은 바이러스의 세포간 이동 단백질이다(Meshi et al, 1987, EMBO J., 6:2557). 이동 및 피복 단백질은 서브게놈 mRNA로부터 해독된다(Hunter et al., 1976, Nature, 260:759; Bruening et al., 1976, Virology, 71:498; and Beachy et al, 1976, Virology, 73:498, 각각은 참고문헌으로 첨부된다).

<241> 식물 조직을 형질변환시키는 다른 방법에는 식물의 꽃을 형질변환시키는 것이 포함된다. 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)의 형질변환은 식물의 꽃을 아그로박테리움 튜메페션스(*Agrobacterium tumefaciens*) 용액에 담구어 실행한다(Curtis et al, 2001, 유전자 전이 Res., 10:363; and Qing et al, 2000, Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement 1 :67). "담구진(dipped)" 식물에 의해 생성된 씨앗집단에서 형질변환된 식물은 형성된다. 꽃 발생 동안 특정 시기에 알에는 아그로박테리움 튜메페션스(*Agrobacterium tumefaciens*)가 알의 내부에 근접하는 알의 벽에 구멍이 있다. 알의 내부에 들어가면 아그로박테리움 튜메페션스(*Agrobacterium tumefaciens*)는 개별 난세포(ovules)를 침투하여 형질변환시킨다(Desfeux et al, 2000, Plant Physiology, 123:895). 형질변환된 난세포는 난내에 씨앗 형성의 전형적인 과정을 따른다.

<242> 향원의 생산 및 분리

<243> 일반적으로 당분야에 공지된 표준 방법을 이용하여 향원 생산을 위한 본 발명의 식물, 식물 세포 및/또는 식물 조직(예를 들면, 클론 식물, 클론 식물 세포, 클론 뿌리, 클론 뿌리 라인, 싹, 출아묘, 식물 등)을 배양하고 성장시킨다. 광범위하게 다양한 배양 배지 및 바이오리액터를 이용하여 모근 세포, 뿌리 세포 라인 및 식물 세포를 배양한다(Giri et al, 2000, Biotechnol Adv., 18:1 ; Rao et al, 2002, Biotechnol. Adv., 20:101 ;참고 문헌으로 첨부한다). 클론 식물은 임의 적절한 방법으로 성장시킬 수 있다.

<244> 특정 구체예에서, 본 발명의 인플루엔자 향원은 임의 공지의 방법에 의해 생산할 수 있다. 일부 구체예에서, 식물 또는 식물의 일부에서 인플루엔자 향원이 발현된다. 당분야에 공지된 통상의 조건 및 기술에 따라 단백질을 분리하고 정제한다. 여기에는 추출, 침전, 크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 전기영동 및 이와 유사한 방법이 포함된다. 본 발명은 당분야에 공지된 임의 다양한 식물 발현 시스템 및 여기에서 제공하는 바이러스 발현 시스템을 이용하여 인플루엔자 향원 생산의 적절한 스케일 업 및 정제와 관계한다.

- <245> 본 발명의 많은 구체예에서, 백신 산물을 위한 인플루엔자 항원을 분리하는 것이 바람직할 것이다. 본 발명의 단백질은 이를 발현시키는 식물 조직 또는 이의 일부, 예를 들면, 뿌리, 뿌리 세포, 식물, 식물 세포로부터 생산되고, 식물 재료의 부분적 또는 온전한 분리를 위해 여기에서 설명하는 방법 또는 당분야에 공지된 이용가능한 방법을 이용한다. 식물 세포 또는 조직의 일부 또는 전부로부터 발현 산물을 분리하는 것이 바람직한 경우에 임의의 이용가능한 기술을 이용할 수도 있다. 당업자는 광범위한 분별 및 분리 과정에 대해 잘 숙지하고 있을 것이다(예를 들면, Scopes et al, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Janson et al, 1993; Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, Wiley-VCH, 1998; Springer-Verlag, NY, 1993; and Rot, protein Purification Techniques, Oxford University Press, 2001; 각각을 참고문헌으로 첨부한다). 흔히, 산물은 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 순도를 가지는 것이 바람직하다. 식물 조직 또는 유체로부터 물질을 정제하는데 유용한 방법에 대해서는 U.S. Pat. Nos. 6,740,740 ; 6,841,659을 참고한다.
- <246> 당업자는 원하는 인플루엔자 항원 산물을 수득하는 방법이 추출에 의한 것이라는 것을 인지할 것이다. 식물 재료(가령, 뿌리, 잎 등)를 추출하여 잔류 바이오매스로부터 원하는 산물을 제거하여 산물의 농도 및 순도를 증가시킨다. 식물을 완충액에서 추출한다. 예를 들면, 식물 재료는 완충액 예를 들면 인산염 완충액과 1대1 중량비의 물로 이동한다. 필요한 경우에 단백질을 분해 효소 저해 물질을 첨가할 수도 있다. 식물 재료는 활발한 블렌딩 또는 그라인딩을 이용하여 파쇄시키고, 여과 또는 원심분리에 의해 제거된 바이오매스는 완충액에 현탁되고 추출된다. 용액에 포함된 산물을 추가 단계를 이용하여 추가 정제하거나 동결 건조 또는 침전을 통하여 건조 분말로 전환시킬 수 있다. 프레스링으로 추출을 할 수도 있다. 식물 또는 뿌리는 프레스에서 가압하거나 또는 서로 접해 있는 롤러를 통과시켜 뭉개어 추출할 수 있다. 으깨진 식물 또는 뿌리로부터 나타나는 유체를 수거하고, 당분야에 공지된 방법에 따라 처리한다. 프레스를 통한 추출은 좀더 농축된 형태의 산물 방출을 가능하게 한다. 그러나, 산물의 전반적인 수율은 산물이 용액에서 추출되는 경우에 낮아질 수도 있다.
- <247> 백신
- <248> 본 발명은 인플루엔자 감염의 치료 및 예방을 위한 백신으로 활성이 있는 인플루엔자 항원(가령 인플루엔자 단백질 또는 이의 면역원 부분 또는 인플루엔자 단백질 또는 이의 면역원 부분을 포함하는 융합 단백질과 같이 치료요법적 용도의 약리학적 항원 단백질을 제공한다. 또한, 본 발명은 수의학 분야에 활성이 있는 인플루엔자 항원으로 수의학 분야에 용도를 제공한다. 특정 구체예에서, 인플루엔자 항원은 식물 또는 이의 일부분(가령, 뿌리, 세포, 싹, 세포 라인, 식물 등)으로부터 만들 수 있다. 특정 구체예에서, 제공된 인플루엔자 항원이 식물, 식물 세포 또는 식물 조직(가령, 싹, 출아묘, 뿌리, 뿌리 배양물, 클론 세포, 클론 세포 라인, 클론 식물 등)에서 발현된다면 식물을 직접 사용하거나 또는 부분적으로 정제된 또는 정제된 형태의 개체에 약리학적 투여를 위해 조제물로 이용할 수 있다.
- <249> 본 발명은 투여가 필요한 개체에 투여하였을 때 약리학적 활성을 유지하는 인플루엔자 항원을 발현시키는 식물, 식물 세포, 식물 조직을 제공한다. 예시적인 개체에는 척추동물(사람과 같은 포유류)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 개체에는 소, 양, 개, 고양이 등과 같은 수의학적 개체가 포함된다. 특정 구체예에서 식용 식물 또는 이의 일부분(가령, 싹, 뿌리)를 치료요법적 효과량으로 개체의 구강으로 투여한다. 일부 측면에서, 하나 또는 그 이상의 인플루엔자 항원은 여기에서 설명하는 약리학적 조제물로 제공된다. 본 발명의 백신 조성물에는 하나 또는 그 이상의 인플루엔자 항원을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 최소 두 가지 인플루엔자 항원이 투여되는 백신 조성물에 포함될 수 있다.
- <250> 본 발명에 따르면, 인플루엔자 항원 백신으로 개체를 치료하면 생리학적 효과를 유도할 수 있다. 백신 단백질은 질환 또는 질병에 대해 치료 또는 경감 성질을 가질 수 있어, 이를 투여하여 질환 또는 질병의 증상 또는 심각성을 완화, 경감 또는 개시의 지연 또는 역전시킬 수 있다. 인플루엔자 항원을 포함하는 백신은 예방학적 성질을 가질 수 있기 때문에 이를 이용하여 이와 같은 질병 또는 질환 또는 발병할 것 같은 병리학적 상태에서 심각성을 감소시키거나 질병의 개시를 방지 또는 지연시킬 수 있다. 본 발명에 따른 항원으로 개체를 치료하여 유도할 수 있는 생리학적 효과에는 유기체에 의한 감염을 방해하기 위해 효과적인 면역 반응을 유도하는 것이 포함된다.
- <251> 일부 구체예에서, 발명의 백신은 경구 또는 점막 경로를 통하여 운반될 수 있다. 경구 및/또는 점막 운반은 많은 병원균의 주요 감염 경로가 되는 점막 조직 감염을 예방할 가능성이 있다. 경구 및/또는 점막 운반은 전신 면역 반응을 준비시킬 수 있다. 점막 면역 시스템을 자극하고 전신 면역원성을 준비시킬 수 있는 항원의 경구 투여용 이형 발현 시스템 개발에 상당한 진전이 있어왔다. 그러나, 경구 백신의 운반에 기존 효과는 효과를 달성하기

위해 상당량의 항원이 요구된다는 것을 설명한다. 따라서, 표적 항원의 다량을 경제적으로 생산하는 것이 효과적인 경구 백신을 만드는 선행 조건이다. 열안정성 항원을 포함한 항원을 발현시키는 식물 개발이 이와 같은 난제를 해결하는 좀 더 실질적인 방법이 된다.

<252> 본 발명의 약학 조성물은 개체에 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있는데 예를 들면, 경구, 비강, 장관(enterally), 장관외(parenterally), 근육 또는 정맥, 직장, 질, 국소, 안구, 폐를 통하여 또는 접촉에 의해 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, 식물 또는 이의 일부에서 발현되는 인플루엔자 항원은 식물을 개체로 직접 경구로 직접 투여할 수 있다. 일부 측면에서 식물 또는 식물의 일부에서 발현되는 백신 단백질을 추출하고 정제하여 약학 조성물 조제에 이용할 수 있다. 이들의 사용처에 따라 분리된 산물을 적절히 조제하는 것이 바람직하다(약리학적 물질, 백신 조성물 등). 일부 구체예에서, 이를 발현시키는 일부 또는 전부의 식물 조직과 함께 산물을 조제하는 것이 바람직할 것이다.

<253> 식물 재료와 함께 산물을 조제하는 것이 바람직할 경우에, 관련 수용체(예를 들면, 사람 또는 다른 동물)에 독성이 없는 식물을 이용하는 것이 바람직할 것이다. 관련 식물 조직(가령, 세포, 뿌리, 잎)을 단순하게 수확하여 공지의 기술을 이용하여 처리할 수 있는데 발현된 산물의 활성을 유지하는 것이 고려되어야 한다. 특정 구체예에서, 식용 식물(및 식물의 식용 부분)에 발현된 인플루엔자 항원을 보유하여 물질을 바로 섭취하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 경구 투여(적절히 조제된)후에 백신 항원이 활성화되면 식용 식물 부분에서 항원 단백질을 생산하여 단백질이 발현된 식물의 일부 또는 전부와 함께 경구 투여용으로 발현된 인플루엔자 항원을 조제하는 것이 바람직할 것이다.

<254> 제공되는 백신 항원(가령, 본 발명의 인플루엔자 항원)은 공지 기술에 따라 조제될 수 있다. 예를 들면, 백신 산물의 효과량을 하나 또는 그이상의 유기 또는 무기, 액상 또는 고체의 약리학적으로 적절한 캐리어 물질과 함께 조제할 수 있을 것이다. 본 발명에 따라 생산된 백신 항원은 정제, 캡슐, 트로치, 분산액, 현탁액, 용액, 젤캡, 알약, 캐플릿, 크림, 연고, 에어로졸, 분말 패킷형태가 되며, 약형에서 단백질의 활성을 파괴하지 않는한 액체, 용매, 희석액, 표면활성물질, 등장액, 농후제, 또는 에멀전화제, 보존제 및 고체 결합제등이 포함될 수 있다.

<255> 일반적으로, 조성물은 상이한 약리학적 수용가능한 캐리어, 어쥬번트, 비이클 또는 이들중 하나 또는 그 이상의 복합체를 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 바와 같이 "약리학적으로 수용가능한 캐리어, 어쥬번트 또는 비이클"에는 투여에 사용할 수 있는 용매, 분산 매체, 코팅, 향균 및 향균광안제, 등장액, 흡수 지연 물질이 포함된다. 약리학적으로 수용가능한 캐리어로 사용될 수 있는 물질에는 락토즈, 글루코즈, 슈크로즈와 같은 당; 옥수수 전분, 감자 전분과 같은 전분; 셀룰로오스 및 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트와 같은 유도물질; 분말형 트라가탄; 맥아; 젤라틴; 활석; 코코아 버터 및 좌약 왁스와 같은 부형제; 땅콩 오일, 목화씨 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일, 소이빈 오일과 같은 오일; 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; 에틸 올레이트, 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; 한천; 수산화 마그네슘, 수산화 알루미늄과 같은 완충액; 알긴산; 발열물질없는 물; 등장 염; 링거액; 에틸 알코올 및 인산염 완충 용액 및 라우릴 설페이트 나트륨 및 스테아레이트 마그네슘과 같은 비-독성 윤활제, 발색제, 방출제, 피복제, 감미제, 향료, 방향, 보존제, 항산화제 등이 제조업자의 판단에 따라 조성물에 포함될 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, Fifteenth Edition, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1975). 예를 들면, 백신 항원 산물은 통상의 당의정을 만드는 혼합 과립화, 용해, 동결건조 또는 유사한 과정을 통하여 약학 조성물로 제공될 수 있다.

<256> 추가 백신 성분

<257> 발명의 백신에는 개체에 투여하였을 때 백신의 면역원성을 강화시키기 위해 임의 적절한 어쥬번트를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 이와 같은 어쥬번트에는 Quillaja saponaria (QS) 추출물, 식품 등급의 QS, 예를 들면, Quil A 및 QS-21의 정제된 서브분류물, 명반, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, MF59, Malp2, 인컴플리트 Freund's 어쥬번트; 컴플리트 freund's 어쥬번트; 3 De-0-아실화된 모노포스포릴 리피드 A (3D-MPL)등이 포함되나 이에 국한되지는 않는다. 추가 어쥬번트에는 면역 조절 올리고뉴클레오타이드 예를 들면, WO 96/02555에서 설명하는 메틸화안된 CpG 서열을 포함한다. 여기에서 언급한 것과 같이, TH1 세포 반응의 신호 자극물질인 어쥬번트를 제공하는 경우에 상이한 어쥬번트의 복합도 고려할 수 있다. 예를 들면, QS21는 3D-MPL와 함께 조제할 수 있다. QS21:3D-MPL 비율은 일반적으로 1: 10 내지 10:1; 1:5 내지 5:1이 되며; 실질적으로는 1:1이다. 적절한 시너지 효과를 내는 범위는 3D-MPL:QS21이 2.5:1 내지 1:1이 된다. 사람 백신 조제물에 이용하기에 적절한 정제된 QS 추출물의 양은 체중 kg당 0.01 mg 내지 10 mg이다.

- <258> 특정 열안정성 단백질(가령, 리체나제)은 자체적으로 면역 반응 강화 활성을 설명하는데, 이와 같은 단백질은 인플루엔자 항원과 융합되거나 별도로 사용되건 간에 어췌버트 이용으로 간주한다. 따라서, 발명의 백신 조성물에는 하나 또는 그이상의 어췌버트를 포함한다. 특정 백신 조성물에는 두 개 또는 그이상의 어췌버트를 포함한다. 또한, 조성물 및 투여 경로에 따라, 특정 어췌버트가 특정 조성물 또는 복합물에 바람직하다.
- <259> 특정 상황에서, 피하로 또는 근육으로 투여되는 백신 산물(가령, 단백질)의 하나 또는 그 이상의 성분의 흡수를 느리게 함으로써 발명의 백신 효과를 연장시키는 것도 바람직할 수도 있다. 이는 물에 용해도가 나쁜 결정 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 이용하면 된다. 산물의 흡수 속도는 분해율에 따라 달라지고, 분해율은 크기 및 형태에 따라 달라진다. 대안으로 또는 추가로, 장관외로 투여된 산물의 흡수 지연은 오일 비이클에 산물을 용해 또는 현탁시켜 얻을 수 있다. 주사용 데포는 단백질의 마이크로 캡슐 매트릭스를 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해가능한 폴리머에 형성시켜 만들 수 있다. 산물과 폴리머의 비율 및 이용되는 특정 폴리머의 성질에 따라 방출 속도를 조절할 수 있다. 생분해가능한 폴리머에는 포틸(오르소에스테르) 및 폴리(안하이드리드)등이 포함된다. 주사용 데포 조성물은 신체 조직에 적응할 수 있는 리포솜 또는 마이크로에멀전에 산물을 포집시켜 만들 수 있다. 대안적인 폴리머 운반 비이클을 경구 조제물에 이용할 수 있다. 예를 들면, 생분해가능한, 인체에 사용가능한 폴리머 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드리드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르 및 폴리락트산 등이 이용될 수 있다. 항원 또는 이의 면역원성 부분을 미소 입자 가령 폴리머 운반 비이클과 복합시켜 미소입자로 조제할 수도 있다.
- <260> 백신 항원의 장관 투여용 조제물을 고체, 반고체, 현탁액 또는 에멀전 형태로 조입시킬 수 있고 물, 현탁액, 에멀전 물질과 같은 임의 약리학적으로 수용가능한 캐리어와 함께 합성될 수 있다. 항원은 특히 예방 수잔으로 투여되는 경우에 펌프 또는 지연 방출형으로 투여될 수 있다. 보조 활성 화합물 예를 들면, 치료될 질병 또는 임상 상태에 대해 독립적으로 활성을 가지는 화합물 또는 본 발명 화합물의 활성을 강화시키는 화합물을 조성물에 또는 조성물과 함께 투여할 수 있다. 향료 및 발색제를 이용할 수도 있다.
- <261> 본 발명의 백신 산물, 선택적으로 식물 조직과 함께 백신 산물은 약학 조성물로 경구 투여하는데 특히 적합하다. 경구 액체 조성물을 이용하고, 소아 집단에 특히 용도가 있을 것이다. 수확된 식물 재료는 원하는 치료요법적 산물, 원하는 형태에 따라 다양한 방법(가령, 대기 건조, 동결 건조, 추출 등)에 의해 프로세스된다. 상기에서 설명하는 이와 같은 조성물은 경구로만 복용하거나 음식 또는 사료 또는 음료와 함께 복용할 수 있다. 경구 투여용 조성물에는 식물, 식물의 추출물, 감염된 식물에서 정제된 단백질이 건조 분말, 음식, 수용성 또는 비-수용성 용매, 현탁액 또는 에멀전 형으로 제공된다. 비-수용성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 생선 오일, 주사용 유기 에스테르가 된다. 수용성 캐리어에는 물, 물-알코올 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함하는데, 염화나트륨 염, 링거 텍스트로즈 용액, 텍스트로즈+염화나트륨 용액, 락토즈 또는 고정 오일을 포함하는 링거액을 포함한 염 및 완충 의료용 비경구 비이클이 포함된다. 건조 분말에는 동결 건조, 대기 건조 또는 분무 건조된 임의 식물 바이오매스를 포함한다. 예를 들면, 식물은 이들을 시판되는 대기 건조기에 약 120°F에서 바이오매스내 수분 함량이 중량대비 5% 미만이 될 때까지 대기 건조시킬 수도 있다. 건조된 식물은 벌크 고체로 프로세싱하기 위해 보관하거나 그라인딩하여 원하는 메쉬 크기의 분말로 만들기 위해 프로세스한다. 대안으로 또는 추가로, 동결-건조는 대기 건조에 민감한 산물에 이용할 수 있다. 산물은 바이오매스내 수분 함량이 중량대비 5% 미만이 될 때까지 진공 건조기에서 동결 건조시킬 수도 있다. 건조된 물질은 여기에서 설명하는 것과 같이 추가 처리할 수 있다.
- <262> 식물에서 유도된 물질을 하나 또는 그이상의 허브 조제물과 함께 또는 이와 같은 형태로 투여할 수도 있다. 유용한 허브 조제물에는 액체 및 고체 허브 조제물이 포함된다. 허브 조제물의 일부 실시예에는 탱크제, 추출물(예를 들면, 수용성 추출물, 알코올 추출물), 달임(decoctions), 건조 조제물(예를 들면 대기-건조, 분무 건조, 냉동 또는 냉동-건조), 분말(동결건조된 분말) 및 액체가 포함된다. 허브 조제물은 임의 표준 운반 비이클 예를 들면, 캡슐, 정제, 좌약, 액상 약형 등의 형태로 제공될 수 있다. 당업자는 본 발명에 이용할 수 있는 허브 조제물의 운반 양식 및 다양한 조제물의 형태를 인지할 수 있을 것이다.
- <263> 발명의 뿌리 라인, 세포 라인, 식물, 추출물, 분말, 건조된 조제물, 정제된 단백질 또는 핵산 산물 등은 상기에서 설명하는 하나 또는 그이상의 부형제 유무하게 포집된 형(encapsulated form)가 될 수 있을 것이다. 고형 약형은 정제, 당의, 캡슐, 알약, 과립 등과 같은 형태는 피복이나 장용피, 방출 제어 피복 및 당분야에 공지된 다른 코팅으로 준비될 수도 있다. 고형 약형에서 활성 물질은 슈크로즈, 락토즈 또는 전분과 같은 하나이상의 비활성 희석제와 혼합될 수 있다. 이와 같은 약형은 정상적인 경우에, 비활성 희석제 이외에 비활성 윤활제 및 스테아레이트 마그네슘 및 미소결정 셀룰로오스와 같은 다른 태블릿 보조제를 추가 포함할 수 있다. 캡슐, 정제 및 알약의 경우에, 약형에는 완충물질이 포함될 수 있다. 이들은 선택적으로 불투명제를 포함하거나 활성 성분

만을 방출하거나 또는 지연된 방식으로 장관의 특정 부분에 선택적으로 방출하는 조성물이 될 수 있다. 이용되는 삽입조성물에는 폴리머 물질 및 왁스를 포함할 수 있다.

<264> 일부 방법에서 본 발명에 따른 인플루엔자 항원 또는 이의 바이오매스를 발현시키는 식물 또는 이의 일부를 의료용 식품으로 경구 투여할 수 있다. 이와 같은 식용 조성물은 일반적으로 고형일 경우에는 날로 먹고, 액상형일 경우에는 마신다. 식물 재료를 사전 프로세싱 단계없이 또는 최소한의 조리후에 바로 섭취할 수 있다. 예를 들면, 직접적으로 먹을 수 있는 썩에 백신 단백질이 발현될 수 있다. 예를 들면, 알파파 썩, 녹두 썩 또는 시금치 또는 양상추 잎에 백신 항원이 발현된다. 한 구체예에서, 식물 바이오매스를 프로세스하여 프로세싱 단계후에 회수된 물질을 섭취한다.

<265> 본 발명에 따른 유용한 프로세싱 방법은 식품 또는 사료 산업에 흔히 이용되는 방법이다. 이와 같은 방법에 의한 최종 산물에는 일반적으로 발현된 항원의 실질적인 양이 포함되고, 먹거나 또는 마시기에 편리하다. 최종 산물은 다른 음식 또는 사료형 예를 들면, 염, 캐리어, 향 보강제, 향생제 등과 함께 혼합될 수 있으며, 고형, 반-고형, 현탁액, 에멀전 또는 액상형으로 소비될 수 있다. 이와 같은 방법에는 보존 단계 예를 들면, 파스퇴르화 반응, 조리 또는 보전 및 방부 물질 첨가등이 포함된다. 임의 식물을 이용할 수 있고, 본 발명에 따라 프로세싱되어 식용 또는 마실 수 있는 식물성 물질을 만든다. 식물에서 유도된 조제물에 있는 인플루엔자 항원의 양은 당분야에 표준 방법에 의해 테스트될 수 있는데, 예를 들면, 겔 전기영동, 산물에 특이적인 프로브 또는 항체를 이용하는 ELISA 또는 웨스턴 블랏 분석이 있다. 이와 같은 측정 방법을 이용하여 소비되는 백신 항원 단백질 양을 표준화시킨다. 예를 들면 백신 항원의 양을 측정 및 조절하여, 산물의 상이한 수준을 가지는 산물 배치(batches)를 혼합하여 단일 약량으로 소비되는 또는 마시게 되는 물질의 양을 표준화시킬 수 있다. 본 발명의 한정된 조절가능한 환경은 이와 같은 표준화 과정을 실행할 필요를 최소화시킬 수 있다.

<266> 개체가 복용하는 식물 세포 또는 조직에서 생산된 백신 단백질은 소화계에 적절하게 흡수될 수 있다. 최소화로 프로세스된 식물 조직을 섭취할 경우 한 가지 장점은 식물의 세포에 단백질을 포집 또는 격리(sequestration)시킬 수 있다는 것이다. 따라서, 산물은 장에 도달하기 전에 상부 소화기관으로부터 어느 정도 보호를 받게되며, 활성 산물의 더 많은 비율이 흡수되는데 이용될 수 있을 것이다.

<267> 본 발명의 약학 조성물은 치료목적으로 또는 예방목적으로 투여될 수 있다. 조성물을 질병의 치료 또는 예방에 이용될 수 있을 것이다. 예를 들면, 질병의 발생 위험이 있는 또는 질병으로 고통을 받고 있는 임의 개체를 치료할 수 있을 것이다. 개인은 질병의 임의 증상을 가진다고 진단을 받지 않고도 질병의 발생 위험이 있다고 판단될 수도 있을 것이다. 예를 들면 개인이 인플루엔자 감염에 대해 상대적으로 높은 위험 환경에 있거나 있었던 것으로 보이면 개인은 질병 발생 위험이 높은 것으로 간주한다. 유사하게, 개인의 가족 또는 친구 구성원이 인플루엔자 감염으로 진단을 받은 경우에 개인은 질병 발생 위험이 높은 것으로 간주한다.

<268> 액상 약형은 경구 투여형을 형성하는데, 예를 들면, 약학적으로 수용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘렉시르등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 활성 성분에 추가하여, 액체 약형에는 당분야에 통상으로 이용되는 비활성 희석제를 포함할 수 있는데, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 용해물질, 유화제 예를 들면, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(특히, 목화시, 땅콩, 옥수수, 배, 올리브, 캐스터, 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로프루피톨 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄 지방산 에스테르 및 이의 혼합물이 된다. 비활성 희석제 이외에도, 경구 조성물에는 습윤제, 유화제, 현탁제, 감미제, 방향제 및 풍미제와 같은 어쥬번트가 포함될 수 있다.

<269> 직장 또는 질 투여용 조성물에는 좌약 또는 체류 관장제가 될 수 있는데, 이는 적절한 비-자극 부형제 또는 캐리어 예를 들면, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 또는 실온에서는 고체이나 체온에서는 액체가 되어 직장 또는 질에서 용해되어 활성 단백질을 방출하는 좌약 왁스 등의 부형제 또는 캐리어를 본 발명의 조성물과 혼합하여 만들 수 있다.

<270> 본 발명의 백신 조성물의 국소, 점막 또는 경피 투여용 약형에는 연고, 고약, 크림, 로션, 겔, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치 등이 포함된다. 활성 물질 또는 이의 조제물을 멸균 조건하에서 약학적으로 수용가능한 캐리어와 혼합하고, 임의 필요한 보존제 또는 완충액도 필요에 따라 혼합할 수 있다. 점막 또는 경피 투여의 경우에 장벽을 침투하기에 적절한 침투제를 조성물에 이용한다. 이와 같은 침투제는

<271> 당분야에 공지되어 있고, 경점막 투여의 경우에, 계면활성제, 담즙염, 푸시딘산 유도체 등이 포함된다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌약을 이용하여 실시할 수 있다. 경피 투여의 경우에, 항원 또는 이의 면역원 부분

을 연고, 살브스(salves), 겔 또는 크림이 된다. 안구 조성물, 귀점안제 및 안약등으로 조제하는 것도 본 발명의 범주에 속한다. 추라고 본 발명은 경피 패취를 이용하는 것도 고려하는데, 이는 신체로 백신 단백질의 조절된 운반을 제공하는데 추가적인 장점을 가진다. 이와 같은 약형은 적절한 매체에 백신 산물을 현탁 또는 분산시켜 만들 수 있다. 흡수 강화물질을 이용하여 피부를 통과하는 백신 단백질의 흐름을 증가시킬 수 있다. 속도 조절 막을 제공하거나 폴리머 매트릭스 또는 겔에 백신 단백질을 분산시켜 속도를 조절할 수 있다.

<272> 본 발명의 조성물은 원하는 결과를 얻는데 필수적인 양 및 시간으로 투여할 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 약학 조성물의 "치료요법적 효과량"은 개체에서 질병을 치료, 경감 또는 예방하는데 효과적인 양을 말한다. 따라서, 여기에서 언급하는 "질병의 치료, 경감 또는 예방에 효과적인 양"은 임의 개체에서 질병을 치료, 경감 또는 예방하기 위해 약학 조성물의 독성을 일으키지 않는 범위의 충분한 양이 된다. 예를 들면, "치료요법적 효과량"은 감염 치료(예를 들면 바이러스 감염, 인플루엔자 감염) 등의 치료, 경감 또는 예방을 하기 위한 양이 된다.

<273> 요구되는 정확한 양은 개체의 종, 나이, 일반적인 상태, 질병의 단계, 특정 약학 혼합물, 투여 방식 등에 따라 개체마다 다양하다. 항원을 발현시키는 식물 및 이의 준비물을 포함하는 본 발명의 인플루엔자 항원은 투여의 용이성 및 약형의 단일성을 위해 단위 투약형으로 조제될 수 있다. 여기에서 언급하는 발현 "투약 단위형"은 치료될 환자에 적절한 백신 조성물 단위를 말한다. 그러나, 본 발명의 조성물의 전체 매일 용도는 일반적으로 의학적 판단 범위내에서 의사가 결정한다. 임의 특정 환자 또는 유기체에 특별히 치료요법적으로 효과적인 약량 수준은 감염의 심각성 또는 위험도; 이용되는 특정 화합물의 활성; 환자의 나이, 체중, 전반적인 건강, 성별, 환자의 식이요법, 약리역학적 상태, 투여 시간, 투여 경로 및 이용되는 특정 항원 방출 속도; 치료 기간; 이용되는 백신 조성물에 복합되는 또는 동시 투여되는 약물 및 의학 분야에 공지된 요인을 포함하는 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.

<274> 본 발명의 백신 조성물은 복합 요법에 이용될 수 있는데(예를 들면 복합 백신 요법), 즉 약학 조성물을 하나 또는 그이상의 다른 원하는 약학 및 백신 과정과 동시에, 이전에, 또는 연차적으로 이용할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 복합 섭생에 이용되는 특정 복합 치료(가령, 인플루엔자 감염의 백신 치료법)는 일반적으로 얻고자 하는 치료효과 및 원하는 치료요법 또는 과정의 공존성을 고려한다. 이용되는 치료법 및/또는 백신은 동일한 질환에 대해 원하는 효과를 얻거나(예를 들면 항원을 다른 인플루엔자 백신과 동시에 투여할 수 있고) 이들은 상이한 효과를 가질 수 있다는 것을 인지할 것이다.

<275> 특정 구체예에서, 백신 조성물은 최소 두 가지 인플루엔자 항원을 포함한다. 예를 들면, 특정 백신 조성물은 본 발명의 최소 두 가지 인플루엔자 항원으로 구성된다(본 발명의 항원을 포함하는 HA 도메인 및 NA 도메인). 일부 측면에서, 이와 같은 복합 백신에는 인플루엔자 항원을 포함하는 한 가지 열안정성 융합 단백질을 포함할 수 있고, 일부 다른 측면에서 인플루엔자 항원을 포함하는 두 가지 또는 그이상의 열안정성 융합 단백질이 제공될 수 있다.

<276> 복합 백신을 이용하는 경우에, 인플루엔자 항원의 임의 복합을 이용할 수 있다. 조성물에는 여기에서 제공되는 다중 항원을 포함하는 다중 인플루엔자 항원을 포함할 수도 있다. 또한 조성물에는 여기에서 제공하는 한가지 또는 그이상의 항원과 한가지 또는 그 이상의 추가 항원을 포함할 수도 있다. 인플루엔자 항원 복합물에는 한가지 이상의 감염 타입에 대항하여 면역 반응을 부여하기 위해 한가지 또는 그이상의 다양한 서브 타입 또는 균주에서 유도된 인플루엔자 항원을 포함한다. 인플루엔자 항원 복합물에는 상이한 서브타입 또는 균주에서 유도된 최소 한 개, 최소 두 개, 최소 세 개, 최소 네 개 또는 그이상의 항원을 포함할 수 있다. 일부 복합의 경우에, 상이한 서브타입으로부터 최소 두 개 또는 최소 세 개 항원이 하나의 백신 조성물에 복합된다. 또한, 복합 백신은 인플루엔자 항원 및 하나 또는 그이상의 독특한 감염성 물질을 이용할 수 있다.

<277> 키트

<278> 한 측면에서 본 발명은 본 발명에 따른 인플루엔자 항원을 포함하는 약학 팩 또는 키트를 제공한다. 특정 구체예에서, 약학 팩 또는 키트에는 본 발명에 따른 인플루엔자 항원을 생산하는 생 출아요, 클론 물질 또는 조제물, 추출물 또는 본 발명의 약학 조성물의 하나 또는 그 이상의 추가 성분들을 선택적으로 포함하는 하나 또는 그 이상의 용기에 백신을 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 약학 팩 또는 키트에는 약학 조성물의 하나 또는 그 이상의 추가 성분들을 선택적으로 포함하는 하나 또는 그 이상의 용기에 본 발명에 따른 정제된 인플루엔자 항원을 포함한다. 특정 구체예에서, 약학 팩 또는 키트에는 복합 요법으로 사용하기 위한 추가의 승인된 치료제(가령, 인플루엔자 항원, 인플루엔자 백신)을 포함한다.

- <279> 이와 같은 용기에는 약학 산물의 조제, 이용 또는 판매에 관한 정부 기관의 주의 경고형태의 안내문이 부착될 수 있으며, 이는 인체 투여를 위한 조제, 이용 및 시판을 기관이 승인한다는 의미도 반영된다.
- <280> 키트에는 치료시약을 포함한다. 비-제한적인 예로, 인플루엔자 백신은 경구 투여형으로 치료를 위해 제공될 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로 인플루엔자 백신은 투여용 주사용 조제물로 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, 인플루엔자 백신은 투여용 흡입가능한 조제물로 제공될 수 있다. 따라서 약학적인 투여량 또는 지시는 인플루엔자 감염으로 고통을 받는 또는 감염 위험에 처한 개체에 투여하기 위해 키트에 제공될 수 있다.
- <281> 다음의 대표적인 실시예는 본 발명을 설명하기 위함이며, 본 발명의 범주를 이에 국한시키고자 함은 아니다. 또한, 본 발명의 다양한 변형 및 여기에 제공된 것에 추가하여 다양한 실시예들은 내용으로부터 발생될 수 있다는 것을 당업자가 충분히 인지할 수 있을 것이다. 다음의 실시예는 다양한 구체예 및 이의 등가의 형태로 본 발명을 실행할 수 있도록 정보, 예시, 가이드 등이 포함된다.

실시예

<302> 실시예 1. 백신 후보물질 구조체 생성

<303> 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌으로부터 항원 서열 생성

<304> 인플루엔자 바이러스 타입 Vietnam H5N1 및 Wyoming H3N2의 HA 스템(stem) 도메인 (SD) 1-2 및 HA 구형(globular) 도메인 (GD)3을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 합성하고, 이것이 정확하다는 것을 확인하였다. 생산된 핵산을 도메인을 인코딩하는 서열의 양단부상에 조작하기 위한 부위인 제한효소 BglIII/HindIII로 절단한다.

<305> 생성된 DNA 단편은 조작된 열안정성 캐리어 분자를 인코딩하는 서열에 in frame으로 융합시킨다.

<306> HA Vietnam TH5N 11

<307> (SD 도메인 1-2): HA1_2V: (SEQ ID NO.: 19):

<308> AGATCTGATCAAATCTGCATTGGATACCACGCTAACAACCTCTACTGAGCAAGTGGATAC

<309> AATTATGGAGAAGAACGTGACTGTTACTCACGCTCAGGATATTCTTGAAAAGACTCACA

<310> ACGGAAAGTTGGGAGGAGGAAACACTAAGTGCCAGACTCCAATGGGAGCTATTAACCTC

<311> TTCTATGCCATTCCACAACATTCACCCACTTACTATTGGAGAGTGCCCAAAGTACGTGA

<312> AGTCTAACAGGCTTGTGCTTGCTACTGGACTTAGGAATCTCCACAAAGAGAGAGGAGA

<313> AGGAAGAAGAGGGGACTTTTCGGAGCTATTGCTGGATTCATTGAGGGAGGATGGCAAG

<314> GAATGGTTGATGGATGGTACGGATACCATCTCTAATGAGCAGGGATCTGGATATGCT

<315> GCTGATAAGGAGTCTACTCAGAAGGCTATTGATGGAGTGACTAACAAGGTGAACCTCTAT

<316> TATTGATAAGATGAACACTCAGTTCGAAGCTGTTGGAAGGGAGTTCAACAATCTTGAGA

<317> GGAGGATTGAGAACCTTAACAAGAAAATGGAGGATGGATTCTTGATGTGTGGACTTA

<318> CAACGCTGAGCTTCTTGCTTATGGAGAACGAGAGGACTCTTGATTTCACGATTCTA

<319> ACGTGAAGAACCTTTACGACAAAGTGAGGCTTCAGCTTAGGGATAACGCTAAGGAGCT

<320> TGGAAACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCATAATGAGTGCATGGAGTCTGTTA

<321> GGAACGGAACCTTACGATTACCCACAGTACTCTGAGGAAGCTAGACTTAAGAGGGAGGA

<322> GATTTCTGGAGTGAAGTTGGAGTCTATTGGTATCTACCAGATTAAGCTT

<323> (SD 도메인 1-2): HA1_2V: (SEQ ID NO.: 20):

<324> DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTQAQDILEKTHNGKLNKQTPMGAINSSMPFHN IH

<325> PLTIGCEPKYVKSINRLVLATGLRNSPQRERRRKKJLGLFGA IAGF IEGGWQGMVDGWYGYH

<326> HSNEQSGSYAADKESTQKA1DGVNTKNVNSI IDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMED
 <327> GFLDVWITYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCD
 <328> NECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQI
 <329> (GD 도메인 3): HA3V: (SEQ ID NO.: 21):
 <330> AGATCTTGCATCTTGATGGAGTGAAGCCACTTATTCTTAGGGATTGCTCTGTGCTGGA
 <331> TGGCTTCTTGAAACCAATGTGCGATGAGTTCATTAACGTGCCAGAGTGGTCTTATATT
 <332> GTGGAGAAGGCTAACCCAGTGAACGATCTTTGTTACCCAGGAGATTTCAACGATTACGA
 <333> GGAGCTTAAGCACCTTCTTTCTAGGATTAACCACTTCGAGAAGATTAGATTATTCCAA
 <334> AGTCATCTTGGTCATCTCACGAGGCTTCTCTGGAGTTTCTTCTGCTTGCCCATACCAGG
 <335> GAAAGTCATCTTTCTTCAGGAACGTTGTGTGGCTTATTAAGAAGAACTCTACTTACCCA
 <336> ACTATTAAGAGGTCTTACAACAACACTAACCAGGAGGATCTTCTGTGCTTTGGGGAAT
 <337> TCACCATCCAAATGATGCTGCTGAGCAGACTAAGTTGTACCAGAACCAACTACTTACA
 <338> TTTCTGTGGAACTTCTACTCTTAACCAGAGGCTTGTGCCAAGAATTGCTACTAGGTCTA
 <339> AGGTGAACGGACAATCTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACTATTCTTAAGCCAAACGAT
 <340> GCTATTAACCTCGAGTCTAACGGAACTTCATTGCTCCAGAGTACGCTTACAAGATTGT
 <341> GAAGAAGGGAGATTCTACTATTATGAAGTCTGAGCTTGAGTACGGAACTGCAAGCTT
 <342> (GD 도메인 3): HA V3: (SEQ ID NO.: 8):
 <343> CDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCEDEFINVPESYIIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELK
 <344> HLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSEASLGVSACPYQGKSSFFRNVVWLIIKKNSTYPTIKRSYNN
 <345> TNQEDLLVLWGIIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNGQSGRME
 <346> FFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNC
 <347> (전장): HASJV: (SEQ BD NO.: 22):
 <348> GGATCCATTAATTAATAATGGGATTTCGTGCTTTTCTCTCAGCTTCCTTCTTCTTCTTG
 <349> TCTACTCTTCTTCTTTTCTTGTGATTCTCACTCTTGCCGTGCTGATCAAATCTGCATTG
 <350> GATACCACGCTAACAACTCTACTGAGCAAGTGGATACAATTATGGAGAAGACGTGAC
 <351> TGTTACTCACGCTCAGGATATTCTTGAAAAGACTCACACGGAAAGTTGTGCGATCTTG
 <352> ATGGAGTGAAGCCACTTATTCTTAGGGATTGCTCTGTTGCTGGATGGCTTCTTGGAAC
 <353> CAATGTGCGATGAGTTCATTAACGTGCCAGAGTGGTCTTATATTGTGGAGAAGGCTAAC
 <354> CCAGTTAATGATCTTTGTACCCAGGAGATTCAACGATTACGAGGAGCTTAAGCACCT
 <355> TCTTTCTAGGATTAACCACTTCGAGAAGATTAGATTATTCCAAAGTCATCTTGGTCATC
 <356> TCACGAGGCTTCTCTGGAGTTTCTTCTGCTTGCCCATACCAGGAAAGTCATCTTCTT
 <357> CAGGAACGTTGTGTGGCTTATTAAGAAGAACTCTACTTACCCAACTATTAAGAGGTCTT
 <358> ACAACAACACTAACCAGGAGGATCTTCTGTGCTTTGGGGAATTCACCATCCAAATGAT
 <359> GCTGCTGAGCAGACTAAGTTGTACCAGAACCAACTACTTACATTTCTGTGGAACTTC
 <360> TACTCTTAACCAGAGGCTTGTGCCAAGAATTGCTACTAGGTCTAAGGTGAACGGACAAT
 <361> CTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACTATTCTTAAGCCAAACGATGCTATTAACCTTCGAG

<362> TCTAACGGAACTTCATTGCTCCAGAGTACGCTTACAAGATTGTGAAGAAGGGAGATTC
 <363> TACTATTATGAAGTCTGAGCTTGAGTACGGAACTGCAACACTAAGTGCCAACTCCAA
 <364> TGGGAGCTATTAACCTCTTCTATGCCATTCCACAACATTCACCCACTTACTATTGGAGAGT
 <365> GCCCAAAGTACGTGAAGTCTAACAGGCTTGTGCTTGCTACTGGACTTAGGAATTCTCCA
 <366> CAAAGAGAGAGGAGAAGGAAGAAGAGGGGACTTTTCGGAGCTATTGCTGGATTCATTG
 <367> AGGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGATGGTACGGATACCATCACTCTAATGAGCA
 <368> GGGATCTGGATATGCTGCTGATAAGGAGTCTACTCAGAAGGCTATTGATGGAGTGA
 <369> ACAAGGTGAACCTCTATTATTGATAAGATGAACACTCAGTTCGAAGCTGTTGGAAGGGAG
 <370> TTCAACAATCTTGAGAGGAGGATTGAGAACCTTAACAAGAAAATGGAGGATGGATTCC
 <371> TTGATGTGTGGACTTACAACGCTGAGCTTCTTGTGTTGATGGAGAACGAGAGGACTCTT
 <372> GATTTCCACGATTCTAACGTGAAGAACCTTTACGACAAAGTGAGGCTTCAGCTTAGGGA
 <373> TAACGCTAAGGAGCTTGGAACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCATAATGAGT
 <374> GCATGGAGTCTGTTAGGAACGGAACCTACGATTACCCACAGTACTCTGAGGAAGCTAGA
 <375> CTTAAGAGGGAGGAGATTCTGAGTGAAGTTGGAGTCTATTGGTATCTACCAGATTCA
 <376> CCATCACCATCACCACAAGGATGAGCTTTGATGACTCGAGCTC
 <377> HA A/Wvoming (H3N2)
 <378> (SD 도메인 1-2): HA1_2W: (SEQ ID NO.: 23):
 <379> AGATCTCAAAAGTTGCCAGGAAACGATAACTCTACTGCTACTCTTGCCTTGGACATCA
 <380> CGCTGTTCCAAACGGAACCTATTGTGAAAACCTATTACTAACGATCAGATTGAGGTGACAA
 <381> ACGCTACTGAGCTTGTTCACTCATCTTCTACTGGAGGAATTGGAGGAGGAACTCTGAG
 <382> TGCATTACACCTAATGGATCTATTCCAAACGATAAGCCATTCCAGAACGTGAACAGGAT
 <383> TACTTATGGAGCTTGCCCAAGATACGTGAAGCAGAACACTCTTAAGTTGGCTACTGGAA
 <384> TGAGGAATGTGCCAGAGAAGCAGACTAGGGGAATTTTCGGAGCTATTGCTGGATTCA
 <385> GAGAATGGATGGGAGGGAATGGTTGATGGATGGTACGGATTCAGGCATCAGAATTCTG
 <386> AGGGAACCTGGACAAGCTGCTGATCTTAAGTCTACTCAGGCTGCTATTAACCAGATTAAC
 <387> GGAAAGTTGAACAGGCTTATTGGAAAGACTAACGAGAAGTTCCACCAGATTGAGAAGG
 <388> AGTTCTCTGAGGTTGAGGGAAGGATTGAGGATCTTGAGAAGTACGTGGAGGATACAAA
 <389> GATTGATCTTTGGTCTTACAACGCTGAGCTTCTTGTGCTCTTGAGAACCAGCAGACTAT
 <390> TGATCTTACTGATTCTGAGATGAACAAGTTGTTTCGAGAGGACTAAGAAGCAGCTTAGGG
 <391> AGAACGCTGAGGATATGGGAAATGGATGCTTCAAAATCTACCACAAGTGCATAACGC
 <392> TTGCATTGAGTCTATTAGGAACGGAACCTACGATCACGATGTGTACCGTGATGAGGCTC
 <393> TTAACAACAGGTTCCAGATTAAGGGAGTGGAGCTTAAGTCTGGATACAAGGATTGGATT
 <394> CTTAAGCTT
 <395> (SD 도메인 1-2): HA1_2: (SEQ ID NO.: 24):
 <396> QKLPNDNSTATLCLGHA VPNGTIVKTIITNDQIEVTNATELVQSSSTGGINSECITPNGSIPN
 <397> DKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWY

<398> GFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYV

<399> EDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFERTKKQLRENAEDMGNGCFKIVHKC

<400> DNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIL

<401> (GD 도메인 3): HA3W: (SEQ ID NO.: 25):

<402> AGATCTTGCATTCTCCACACCAGATTCTTGATGGAGAGAACTGCACTCTTATTGATGCT

<403> CTTCTTGAGATCCACAGTGCATGGATTCCAGAACAGAAGTGGGATCTTTTCGTGGA

<404> AAGGTCTAAGGCTTACTCTAACTGCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTCTCTTAG

<405> GAGTCTTGTTGGCTTCTTCTGAACTCTTGAGTTCAACAACGAGTCTTCAACTGGGCTGG

<406> AGTTACTCAGAACGGAATTCTTCTGCTTGTAAAGAGGAGGTCTAACAAGTCTTCTTCTC

<407> TAGGCTTAAGTGGCTTACTCACCTTAAGTACAAGTACCCAGCTCTTAACGTGACTATGCC

<408> AAACAACGAGAAGTTCGATAAGTTGTACATTGGGGAGTTCACCACCCAGTTACTGATT

<409> CTGATCAGATTTCTCTTTACGCTCAGGCTTCTGGAAGGATTACTGTGTCTACTAAGAGGT

<410> CTCAGCAGACTGTGATTCCAAACATTGGATACCGTCCAAGAGTGAGGGATATTTCTTCT

<411> AGGATTTCTATCTACTGGACTATTGTGAAGCCAGGAGATATTCTTCTTATTAACCTACT

<412> GGAAACCTTATTGCTCCAAGGGGATACTTCAAGATTAGGAGTGGAAGTCATCTATTAT

<413> GAGGAGTGATGCTCCAATTGGAAGTGCAAGCTT

<414> (GD도메인 3): HA3W: (SEQ ID NO.: 12):

<415> CDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNC *IPYDVDPY*ASLRSLVA

<416> SSGTLEFNNESEFNWAGVTQNGTSSACKRRSNKSFFSRLNWLTHLKYKYPALNVTMPNNEK

<417> FDKLYIWGVHHPVTDSDQISLYAQASGRITVSTKRSQQTIVIPNIGYRPRVRDISSRISIIYWTIV

<418> KPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKC

<419> (전장): HASW: (SEQ ID NO.: 26):

<420> GGATCCATTAATTAATAATGGGATTTCGTGCTTTTCTCTCAGCTTCCTTCTTCTCTTGTG

<421> TCTACTCTTCTTCTTTTCTTGTGATTCTCACTCTTGCCGTGCTCAAAGTTGCCAGGAA

<422> ACGATAACTCTACTGCTACTCTTTGCCTTGACATCACGCTGTTCCAAACGGAATATTG

<423> TGAAACTATTACTAACGATCAGATTGAGGTGACAAACGCTACTGAGCTTGTTCACTCA

<424> TCTTCTACTGGAGGAATTGCGATTCTCCACACCAGATTCTTGATGGAGAGAACTGCAC

<425> TCTTATTGATGCTCTTCTTGAGATCCACAGTGCATGGATTCCAGAACAGAAGTGGG

<426> ATCTTTTCGTGGAAGGTCTAAGGCTTACTCTAACTGCTACCCATACGATGTTCCAGATT

<427> ACGCTTCTCTTAGGAGTCTTGTGGCTTCTTCTGAACTCTTGAGTTCAACAACGAGTCTT

<428> TCAACTGGGCTGGAGTTACTCAGAACGGAATTCTTCTGCTTGTAAAGAGGAGGTCTAAC

<429> AAGTCTTTCTTCTTAGGCTTAAGTGGCTTACTCACCTTAAGTACAAGTACCCAGCTCTT

<430> AACGTGACTATGCCAAACAACGAGAAGTTCGATAAGTTGTACATTTGGGGAGTTCACCA

<431> CCCAGTTACTGATTCTGATCAGATTTCTCTTTACGCTCAGGCTTCTGGAAGGATTACTGT

<432> GTCTACTAAGAGGTCTCAGCAGACTGTGATTCCAAACATTGGATACCGTCCAAGAGTGA

<433> GGGATATTTCTTCTAGGATTTCTATCTACTGGACTATTGTGAAGCCAGGAGATATTCTTC

<434> TTATTAACCTCTACTGGAAACCTTATTGCTCCAAGGGGATACTTCAAGATTAGGAGTGGA

<435> AAGTCATCTATTATGAGGAGTGATGCTCCAATTGGAAAGTGCAACTCTGAGTGCATTAC

<436> TCCAAACGGATCTATTCCAAACGATAAGCCATTCCAGAACGTGAACAGGATTACTTATG

<437> GAGCTTGCCCAAGATACGTGAAGCAGAACACTCTTAAGTTGGCTACTGGAATGAGGAA

<438> TGTGCCAGAGAAGCAGACTAGGGGAATTTTCGGAGCTATTGCTGGATTCATTGAGAATG

<439> GATGGGAGGGAATGGTTGATGGATGGTACGGATTACGGCACCAGAATTCAGAGGGAAC

<440> TGGACAAGCTGTGATCTTAAGTCTACTCAGGCTGCTATTAACCAGATTAACGGAAGT

<441> TGAACAGGCTTATTGGAAAGACTAACGAGAAGTTCACCAGATTGAGAAGGAGTTCTCT

<442> GAGGTTGAGGGAAGGATTACGATCTTGAGAAGTACGTGGAGGATACAAAGATTGATC

<443> TTTGGTCTTACAACGCTGAGCTTCTTGTGCTCTTGAGAACCAGCACACTATTGATTGGA

<444> CTGATTCTGAGATGAACAAGTTGTTTCGAGAGGACTAAGAAGCAGCTTAGGGAGAACGC

<445> TGAGGATATGGGAAATGGATGCTTCAAAATCTACCACAAGTGGGATAACGCTTGCATTG

<446> AGTCTATTAGGAACGGAACCTACGATCACGATGTGTACCGTGATGAGGCTCTTAACAAC

<447> AGGTTCCAGATTAAGGGAGTGGAGCTTAAGTCTGGATACAAGATTGGATTCTTCATCA

<448> TCACCACCACCACAAGGATGAGCTTTGATGACTCGAGCTC

<449> 인플루엔자 바이러스 뉴라미니다제로부터 항원 서열의 생성

<450> 인플루엔자 바이러스 type Vietnam H5N1 (NAV) 및 Wyoming H3N2(NAW)의 각 인플루엔자 바이러스 타입의 뉴라미니다제를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 합성하고 이것들이 정확하다는 것을 확인하였다. 생산된 핵산은 도메인을 인코딩하는 서열의 양단 상에 조직된 부위가 되는 제한효소 *SalI*으로 절단하였다. 생성된 DNA 단편들은 조작된 열안정성 캐리어 분자를 인코딩하는 서열에 C 말단에 in frame 융합되었다.

<451> NAV(N1): (SEQ ID NO.: 27):

<452> GGATCCTTAATTAATAATGGGATTCGTGCTTTTCTCTCAGCTTCCTTCTTTCCTTCTGTGT

<453> CTACTCTTCTTCTTTTCCTTGTGATTCTCACTCTTGCCGTGCTCAAAATGTCGACCTTAT

<454> GCTTCAGATTGGAACATGATTTCTATTGGGTGTCACACTCTATTCACACTGGAACCA

<455> GCATCAGTCTGAGCCAATTTCTAACACTAACCTTTTGAAGTGAAGGCTGTGGCTTCTGT

<456> TAAGTTGGCTGGAACCTCTTCTTTTGCCTATTAAACGGATGGGCTGTGTACTCTAAGGA

<457> TAACTCTATTAGGATTGGATCTAAGGGAGATGTGTTTCGTGATTAGGGAGCCATTCAATT

<458> CTTGCTCTCACCTTGAGTGCCGTACTTTCTTCTTACTCAGGGTGTCTTCTTAACGATAA

<459> GCACTCTAACGGAAGTGTGAAGGATAGGTCTCCACACAGGACTCTTATGTCTTGTCCAG

<460> TTGGAGAAGCTCCATCTCCATACAACCTAGATTCGAGTCTGTTGCTTGGAGTGCTTCTG

<461> CTTGCCATGATGGAACCTTATGGCTTACTATTGGAATTTCTGGACCAGATAACGGAGCT

<462> GTTGCTGTGCTTAAGTACAACGGAATTATTACTGATACCATCAAGTCTTGGAGGAACAA

<463> CATTCTTAGGACTCAGGAGTCTGAGTGTGCTTGCGTTAACGGATCTTGCTTCACTGTGAT

<464> GACTGATGGACCATCTAATGGACAGGCTTCTCACAAGATTTTCAAGATGGAGAAGGGA

<465> AAGGTTGTGAAGTCTGTGGAACCTTGATGCTCCAACTACCATTACGAGGAGTGTCTTG

<466> CTATCCAGATGCTGGAGAGATTACTTGTGTGTGCCGTGATAATTGGCATGGATCTAACA

<467> GGCCATGGGTGTCATTCAATCAGAACCTTGAGTACCAGATTGGTTACATTTGCTCTGGA
 <468> GTGTTGCGAGATAATCCAAGGCCAAACGATGGAACCTGGATCTTGTGGACCAGTGTATC
 <469> TAATGGAGCTGGAGGAGTGAAGGGATTCTCTTTCAAGTACGGAACGGAGTTTGGATTG
 <470> GAAGGACTAAGTCTACTAACTCTAGGAGTGGATTTCGAGATGATTGGGACCCAAACGG
 <471> ATGGACTGAGACTGATTCTTCTTCTCTGTGAAGCAGGATATTGTGGCTATTACTGATTG
 <472> GAGTGGATACTCTGGATCTTTTCGTTCAGCACCCAGAGCTTACTGGACTTGATTGCATTAG
 <473> GCCATGCTTCTGGGTTGAACTTATTAGGGGAAGGCCAAAGGAGTCTACTATTTGGACTT
 <474> CTGGATCTTCTATTTCTTCTGCGGAGTGAATTCTGATACTGTGGGATGGTCTTGGCCAG
 <475> ATGGAGCTGAGCTTCCATTCACTATTGATAAGGTGACCATCATCATCACCACAAG
 <476> GATGAGCTTTGACTCGAG
 <477> NAV: (SEQ ID NO.: 16):
 <478> LMLQIGNMISIWVSHSIHTGNHQSEPI SNTNLLTEKAVASVKLAGNSSLCPINGWAVYSKD
 <479> NSIRIGSKGDVFIREFPISCSHLECRFTFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSPHRTLMSCPVGEA
 <480> PSPYNSRFESVAWSASACHDGTSWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQES
 <481> ECACVNGSCFTVMTDGPNSNGQASHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSYPDAGEIT
 <482> CVCRDNWHGSNRPWVSFNQLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDGTGSCGPVSSNGAGGVKGF
 <483> SFKYGNVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNGWTTETDSSFVKQDIVAITDWSGYSGSFVQHP
 <484> ELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKESTIWTSGSSI SFCGVNSDTVGSWPDGAELPFTIDK
 <485> NAW(N2): (SEQ ID NO.: 28):
 <486> GGATCCTTAATTAATAATGGGATTCGTGCTTTTCTCTCAGCTTCCTTCTTCTTCTGTGT
 <487> CTACTCTTCTTCTTTTCTTGTGATTCTCACTCTTGCCGTGCTCAAAATGTCGACAAGCA
 <488> GTACGAGTTCAACTCTCCACCAACAACAGGTTATGCTTTGCGAGCCAACATTATTG
 <489> AGAGGAACATTACTGAGATTGTGTACCTTAACACTACTATTGAGAAGGAGATTGTC
 <490> CCAAAGTTGGCTGAGTACCGTAATTGGTCTAAGCCACAGTGCAACATTACTGGATTCGC
 <491> TCCATTCTCTAAGGATAACTCAATTAGGCTTTCTGTCTGGAGGAGATATTGGGTTACAA
 <492> GGGAGCCATACGTTTCTTGCATCCAGATAAGTGCTACCAGTTCGCTCTTGGACAAGGA
 <493> ACTACTCTTAACAACGTGCACTCTAACGATACTGTGCACGATAGGACTCCATACCGTAC
 <494> TCTTTTGATGAACGAGCTTGAGTTCCATTCCACCTTGGAACAAAGCAAGTGTGCATTGC
 <495> TTGGTCATCTTCATCTTGCCACGATGGAAAGGCTTGGCTTCATGTTTGCCTGACTGGAGA
 <496> TGATGAGAACGCTACTGCTTCTTTCATCTACAACGGAAGGCTTGTGGATTCTATTGTTTC
 <497> TTGGTCTAAGAAGATTCTTAGGACTCAGGAGTCTGAGTGTGTGTCATTAACGGAACCT
 <498> GCACTGTGGTTATGACTGATGGATCTGCTTCTGGAAAGGCTGATACAAAGATTCTTTTC
 <499> ATTGAGGAGGGAAAGATTGTGCACACTCTACTCTTCTGGATCTGCTCAGCATGTTGA
 <500> GGAGTGTCTTGCTACCCAAGGTATCCAGGAGTTAGATGTGTGTGCCGTGATAACTGGA
 <501> AGGGATCTAACAGGCCAATTGTGGATATTAACATTAAGGATTACTCTATTGTGTCATCTT
 <502> ATGTGTGCTCTGGACTTGTGGAGATACTCCAAGGAAGAAGATTCTTCTTCATCTTCAC

<503> ACTGCCTTGATCCAAATAACGAGGAGGGAGGACATGGAGTTAAGGGATGGGCTTTCGA

<504> TGATGGAACGATGTTTGGATGGGAAGGACTATTTCTGAGAAGTTGAGGAGCGGATAC

<505> GAGACTTTCAAAGTGATTGAGGGATGGTCTAACCCAAATTCTAAGCTGCAGATTAACAG

<506> GCAAGTGATTGTGGATAGGGGAAACAGGAGTGGATACTCTGGAATTTTCTCTGTGGAGG

<507> GAAAGTCTTGCATTAACAGATGCTTCTACGTGGAGCTTATTAGGGGAAGGAAGCAGGA

<508> GACTGAGGTTTTGTGGACTTCTAACTCTATTGTGGTGTCTGCGGAACCTTCTGGAACCTTA

<509> CGGAACTGGATCTTGGCCAGATGGAGCTGATATTAACCTTATGCCAATTGTGCGACCATC

<510> ATCACCATCACCACAAGGATGAGCTTTGACTCGAG

<511> NAW: (SEQ ID NO.: 18):

<512> KQYEFNSPPNNQVMLCEPTIIERNITEIVYLTNTTIEKEICPKLAEYRNWSKPQCNI TGFAPFS

<513> KDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPDKCYQFALGQGTTLNNVHSNDTVHDRTPYRTLMLN

<514> ELGVPPFHLGTKQVCIAWSSSSCHDGKAWLHVCVTGDDENATASF IYNGRLVDSIVSWSKKI

<515> LRTQESECVCTINGTCTWMTDGSASGKADTKILFIEEGKIVHTSTLSGSAQHVEECSCYPRYP

<516> GVRCVCRDNWKGSNRP IVDINIKDYSIVSSYVCSGLVGDTPRKNDSSSSSHCLDPNNEEGGH

<517> GVKGWFDDGNDVWMGRTISEKLRSYETFKVIEGWSNPNSKLQINRQVI VDRGNRSGYS

<518> GIFSVEGKSCINRCFYVELIRGRKQETEVLTWSNSIVVFCGTSGTYGTGSGWPDGADINLMP1

<519> 열안정성 캐리어 구조체 생성

<520> 전장의 고유 *C. thermocellum* 리체나제, LicB는 리더 펩티드 펩티드 (Lp)5 N-말단 부분(A), 표면 루프(1), C-말단 부분(C), Pro-Thr 박스 및 셀룰로솜-결합 도메인 (C-BD)으로 구성된다. 우리는 LicB 인코딩 유전자로부터 Lp, Pro-Thr 박스 및 C-BD를 제거하고 분자를 고리모양으로 순서를 교환하여, N- 과 C- 말단을 바꾸고 (Musiychuk et al, 2007, influenza and Other Respiratory viruses, 1 :1), N- 및 C-말단에 뿐만 아니라 표면 루프(1)내에 표적 서열을 클로닝하기 위한 독특한 제한효소 부위를 삽입하였다. 생성된 조작된 캐리어 분자 서열을 확인하고, 이를 LicKM으로 명명하였다.

<521> SEQ ID NO.: 29:

<522> **GGATCCTTAATTAATAATGGGAGGTTCTTATCCATATAAGTCTGGTGAGTATAGAACTA**

<523> AGTCTTTCTTTGGATATGGTTATTATGAAGTTAGGATGAAGGCTGCAAAGAACGTTGGA

<524> ATTGTTTCTTCTTTCTTTACTTATACTGGACCATCTGATAACAACCCATGGGATGAGATT

<525> GATATTGAGTTTCTTGAAAAGGATACTACTAAGGTTCAATTCAACTGGTATAAGAATGG

<526> TGTGGTGGAACGAGTATCTTCATAACCTTGATTGTGATGCTTCTCAAGATTTTCATAC

<527> TTATGGTTTTGAGTGGAGACCAGATTATATTGATTTTTATGTTGATGGAAGAAGGTTTA

<528> TAGAGGTACTAGAAACATTCCAGTTACTCCTGGAAGATTATGATGAATCTTTGGCCAG

<529> GAATTGGTGTGATGAATGGCTTGGTAGATATGATGGAAGAACTCCACTTCAAGCTGAG

<530> TATGAGTATGTTAAGTATTATCCAAACGGT**AGATCTGAATTCAGCTT**GTTGTTAATAC

<531> TCCATTTGTGTGTTTTCTCTAACTTTGATTCTTCTCAATGGGAAAAGGCTGATTGGGC

<532> TAACGGTTCTGTTTTTAAGTGTGTTTGAAGCCATCTCAAGTTACTTTTTCTAACGGAAA

<533> GATGATTCTTACTTTGGATAGAGAGTATGTCGACCATCATCATCATCATCAT **TGACTCGA**

<534> **GCTC**

- <535> SEQ ID NO.: 30:
- <536> MGGSYPYKSGEYRTKSFFGYGYEVRMKAANKVGVSSFFTYTGPSDNNPWDEIDIEFLGK
- <537> DTTKVQFNWYKNGVGGNEYLHNLGFDASQDFHTYGFWRPDYIDFYVDGKKVYRGTRNI
- <538> PVTPGKIMMNLWPGIGVDEWLGRYDGRTPQLAEYEVVKYYPNGRSEFKLVVNTPFVAVFS
- <539> NFDSSQWEKADWANGSVFNCVWKPSQVTFSSNGKMILTLTREYVDHHHHHH
- <540> 특정 구조체의 경우, LicKM의 N- 및 C- 말단에 PR1a 시그널 펩티드 및 KDEL 서열을 만들었다. 이들 구조체의 핵산 및 아미노산 서열은 SEQ ID NO.: 31 및 SEQ ID NO.: 32에 나타내었다.
- <541> SEQ ID NO.: 31 :
- <542> GGATCCTTAATTAATAATGGGATTGTCTCTTTTACAATTGCCTTCATTTCTTCTGTCT
- <543> CTACACTTCTCTTATTCCTAGTAATATCCCACTCTTGCCGTGCCCAAAATGGAGGTTCTT
- <544> ATCCATATAAGTCTGGTGAGTATAGAACTAAGTCTTTCTTTGGATATGGTTATTATGAAG
- <545> TTAGGATGAAGGCTGCAAGAAGCTTGAATGTTCTTTCTTTTACTTATACTGGAC
- <546> CATCTGATAACAACCCATGGGATGAGATTGATATTGAGTTTCTTGAAAGGATACTACT
- <547> AAGGTCAATTCACTGGTATAAGAATGGTGTGGTGAAACGAGTATCTTCATAACCT
- <548> TGGATTTGATGCTTCTCAAGATTTTCATACTTATGGTTTGTAGTGAGACCAGATTATAT
- <549> TGATTTTATGTTGATGGAAGAAGGTTTATAGAGGTACTAGAAACATTCCAGTTACTC
- <550> CTGGAAGATTATGATGAATCTTTGGCCAGGAATTGGTGTGATGAATGGCTTGGTAGA
- <551> TATGATGGAAGAAGTCCACTTCAAGCTGAGTATGAGTATGTTAAGTATTATCCAAACGG
- <552> TAGATCTGAATTCAGCTTGTGTTAATACTCCATTGTTGCTGTTTTCTCTAACTTTGAT
- <553> TCTTCTCAATGGGAAAAGGCTGATTGGGCTAACGGTTCTGTTTTTAAGTGTGTTTGAAG
- <554> CCATCTCAAGTTACTTTTTCTAACGGAAGATGATTCTTACTTTGGATAGAGAGTATGTC
- <555> GACCATCATCATCATCATCATAAGGATGAACCTTGGACTCGAGCTC
- <556> SEQ ID NO.: 32:
- <557> MGFVLFSQLPSFLVSTLLFLVISHSCRAQNGGSYPYKSGEYRTKSFFGYGYEVRMKA
- <558> KNVGVSSFFTYTGPSDNNPWDEIDIEFLGKDTTKVQFNWYKNGVGGNEYLHNLGFDASQD
- <559> FHTYGFWRPDYIDFYVDGKKVYRGTRNIPVTPGKIMMNLWPGIGVDEWLGRYDGRTPQL
- <560> AEYEVVKYYPNGRSEFKLVVNTPFVAVFSNFDSSQWEKADWANGSVFNCVWKPSQVTFSS
- <561> NDKMILTLTREYVDHHHHHHKDEL
- <562> 제조합 항원 구조체의 생성
- <563> pBR322 플라스미드로부터 유도된 pET 발현 벡터를 이용하는데 이는 높은 수준의 전사 및 해독을 촉진시키는 T7 박테리오파아지 유전자 10의 특징을 가지도록 조작한 것이다. RNA 폴리메라제를 인코딩하는 박테리오파아지는 T7 프로모터 서열에 매우 특이성을 가지며 이는 T7 파아지 게놈이외의 게놈에서는 거의 볼 수 없다(도 2). pET-32를 이용하여 이 벡터에 클론된 변형된 리체나제 서열의 루프 부분으로 HA 및 NA 구조체를 융합시킨다. 리체나제 유전자의 촉매 도메인, 상류 서열 PR-1A ("병원균-관련 단백질 1 A"), 엔도플라스믹 레티큘럼(KDEL) 또는 액포 보유 서열(vacuolar retaining sequence)(VAC), 하류 His₆ 태그를 변형된 pET-32 벡터의 PacI 및 XhoI 부위(T7 프로모터 및 T7 종료물질이 잘려나간 위치)로 클론하였다. 이와 같은 방식으로, pET-PR-LicKM-KDEL 및 pET-PR-LicKM-VAC을 수득하였다(도 3).
- <564> HA 도메인 또는 NA의 DNA 단편을 LicKM의 루프(1) 부분에 서브클론시켜 해독을 위한 정확한 리딩 프레임내에 용

합한다. LicKM-NA 융합체가 작제된다. NAW 또는 NAV의 DNA 단편은 해독을 위한 정확한 frame에 융합체를 제공하기 위해 *SaI*I 부위를 이용하여 LicKM의 C-말단으로 서브클론시킨다.

<565> 실시예 2. 백신 후보물질 항원 백터의 생성

<566> 표적 항원 구조체 LicKM-HA(SD), LicKM-HA(GD), 또는 LicKM-NA는 개별적으로 선택된 바이러스성 백터 (pBI-D4)에 서브클론시켰다. pBI-D4는 *pBI121*-유도된 이중(binary) 백터인데 이 백터는 대장균(*Escherichia coli*) β -D-글루쿠로니다제(GUS)를 코딩하는 리포터 유전자가 폴리링커("polylinker")로 대체되었는데, 여기에 *Xba*I과 *Sac*I 부위사이에 TMV-유도된 백터가 클론되었다(도 4). pBI-D4는 TMV -기초한 구조체로, 발현되는 외부 유전자(가령, LicKM-HA(SD), LicKM-HA(GD), LicKM-NA와 같은 표적 항원)를 TMV의 껍질 단백질 (CP) 유전자로 대체한다. 바이러스는 TMV 126/183kDa 유전자, 이동 단백질 (MP) 유전자, CP 오픈 리딩 프레임(ORF)로 뻗어있는 CP 서브게놈 mRNA 프로모터(sgp)를 보유한다. CP의 개시 코돈을 변형했다. 바이러스는 CP가 결핍되어 체관부(phloem)를 통하여 숙주 식물로 이동할 수 없다. 그러나, 바이러스 감염의 세포가 이동은 기능을 유지하며, 바이러스는 이와 같은 방법으로 상층 잎으로 서서히 이동할 수 있다. 다중 클로닝 부위(PacI-PmeI-AgeI-XhoI)를 외부 유전자 발현을 위해 sgp의 말단에 만들고, 그 다음에 이어서 TMV 3' 비-해독 부위(NTR)가 이어진다. 35S 프로모터를 바이러스 서열의 5'말단에서 융합한다. 백터 서열은 pBI121의 *Bam*HI과 *Sac*I 부위에 위치한다. 바이러스 서열의 3'에는 망치머리 리보자임이 위치한다(Chen et al, 2003, Mol. Breed., 11 :287). 이와 같은 구조체에는 LicKM-HA-SD, LicKM-HA(GD), 또는 NA를 인코딩하는 서열과 시그널 펩티드 from 담배 PR-1a 단백질, a 6x His tag, ER-체류 고정 서열 KDEL의 시그널 펩티드를 인코딩하는 서열 또는 공포(vacuolar) 서열 융합된 서열을 포함한다(도 5). PR-LicKM-HA(SD)-KDEL, PR-LicKM-HA(GD)-KDEL, PR-LicKM-NA-KDEL를 인코딩하는 구조체를 위해, 코딩 DNA를 *Pac*I-*Xho*I 단편으로 pBI-D4안으로 도입시킨다. 또한, HAW (HA Wyoming), HAV (HA Vietnam), NAW (NA Wyoming), NAV (NA Vietnam)를 *Pac*I-*Xho*I 단편으로써 pBI-D4안으로 도입시킨다. 뉴클레오타이드 서열이 최종 발현 구조체의 서브클로닝 정션으로 연결되어 있다는 것을 확인하였다(도 6).

<567> 실시예 3: 식물 생성 및 항원 생산

<568> 식물에 아그로박테리움의 침투

<569> 아그로박테리움 침투에 의해 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개된 일과성 발현 시스템을 얻었다(Turpen et al., 1993, J. Virol. Methods, 42:227). *N. benthamiana*의 건강한 잎에 LicKM-HA 또는 LicKM-NA를 발현시키도록 조작된 바이러스 백터를 포함하는 *A. rhizogenes* 또는 *A. tumefaciens*(GV3101)를 침투시켰다.

<570> *A. rhizogenes* 균주 A4 (ATCC 43057)를 구조체 pBI-D4- PR-LicKM-HA(SD)-KDEL, PR-LicKM-HA(GD)-KDEL, pBI-D4-PR-LicKM-NA-KDEL를 이용하여 형질변환시켰다. 아그로박테리움 배양물을 Kapila et al.(1997, Plant Sci., 122:101)에서 설명하는 것에 따라 성장시키고 유도시켰다. 2ml 스타터-배양물(새로운 콜로니로부터 취함)을 YEB (5g/l 소고기 추출물, 1g/l 이스트 추출물, 5g/l 펩톤, 5g/l 슈크로스, 2mM MgSO₄, 25μg/ml 카나마이신)에서 280℃ 하룻밤동안 성장시켰다. 스타터 배양물은 1:500으로 500ml YEB+ 25μg/ml 카나마이신, 10mM 2-4(-몰포리노)에탄설폰산(MES) pH 5.6, 2mM 추가 MgSO₄, 20μM 아세토시리곤에 희석하여 넣는다. 희석된 배양물을 280℃에서 O.D.₆₀₀ 값이 ~1.7이 되도록 하룻밤동안 성장시켰다. 세포는 15분간 3,000 x g에서 원심분리시키고, (MS염, 10 mM MES pH 5.6, 20 g/l 슈크로스, 200μM 아세토시리곤)에 재현탁시켜, O.D.₆₀₀ 값이 ~2.4가 되도록 한 후에 실온에서 1-3시간 동안 유지시키고, 이를 아그로박테리움 침투에 이용하였다. *N. benthamiana* 잎들에 바늘 없는 일회용 주사기를 이용하여 아그로박테리움 현탁액을 주사하였다. 침투된 잎들은 침투후 4-7일(예를 들면 6일)에 수확한다.

<571> 식물은 리체나제 활성 검사 및 면역블랏 분석 평가를 통하여 표적 항원 발현이 되었는지를 스크리닝하였다(도 7, 8, 9, 10). 효소도(Zymogram) 분석에서 테스트된 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 침투 잎에 HA 및 NA 키메라 단백질이 모두 발현된 것으로 나타났다. 발현은 리체나제 활성과 연관된다(도 7 및 9). 융합 단백질과 연관된 활성 밴드에서 리체나제 대조군보다 조금 더 무거운 밴드와 아그로박테리움 감염 후에 식물에서 발현되는 산물과 동일한 무게를 가지는 밴드가 나타났는데, 이는 전체 융합 산물의 존재를 확인시켜주는 것이다.

<572> 클론 뿌리 및 클론 뿌리 라인 생성

<573> 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 외식편 1cmX1cm를 0.1% NH₄Cl에 살균 및 dH₂O에 6회 세척후에 얻었다. 외식편에 abacsial 측면에 나이프를 이용하여 약간의 상처를 낸 후, 아그로박테리움 리조겐

(*Agrobacterium rhizogenes*), 균주 A4, -pBID4-Lic-HA-KDEL 또는 pBID4-Lic-NA-KDEL을 포함하고 있음-와 공동 배양시켰다. 외식편을 2' 동안 아그로박테리움 하룻밤 배양물(O.D._{600nm}?? 0.8-1)으로 배양하고, 3000 rpm, 4℃에서 원심분리시키고, MMA 배지로 재현탁시켜, 20mM 아세트시리곤 존재하에 최종 O.D._{600nm}이 ~0.5가 되도록 한다. 배양 종료시에, 외식편은 멸균 종이 상에서 건조시키고, 1% 글루코즈 및 20mM 아세트시리곤 존재하에 0.8% 한천 MS 플레이트로 이동시켰다. 플레이트를 파라필름으로 마감하고, 실온에서 2일간 유지시켰다. 외식편을 500mg/ℓ 세포탁심(Cif), 100mg/ℓ 티멘틴(Timentin)(Tim), 25mg/ℓ 카나마이신 존재하에 MS 플레이트로 옮겼다. 약 5주 후에, 유전자 전이 뿌리가 pBID4-Lic-HA-KDEL 및 pBID4-Lic-NA-KDEL 구조체를 포함하는 아그로박테리움 리조젠(*Agrobacterium rhizogenes*)으로 형질변환된 니코디아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 잎 외식편으로부터 생성된다.

<574> 형질변환후에, 모근을 잘라내고, 고품의 호르몬없는 K3 배지에 일렬로 둔다. 4 내지 6일 후에, 가장 활발하게 성장된 뿌리를 분리해내고, 액상 K3 배지로 옮긴다. 선택된 뿌리는 24℃ 암상태에서 회전 셰이크 상에서 배양시키고, 클론 라인은 분리하여 주단위로 서브배양시킨다. 뿌리 및/클론 라인을 리체나제 활성 검사 및 면역 블랏 분석을 통하여 표적 항원 발현이 있었는지에 대해 스크리닝할 수 있다.

<575> 실시예 4: 백신 후보물질의 생산

<576> 100mg 니코디아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 침투된 잎 샘플을 감염후 4, 5, 6, 7일에 회수하였다. 단백질을 발현에 대해 수확 후 바로 새로운 조직을 분석하였고, 연속하여 정제되지 않은 식물 추출물 준비 또는 융합 단백질 정제를 위해 -80℃에서 수집하였다.

<577> 새로운 샘플을 냉각 PBS 1x + 프로테아제 저해물질(Roche) 1/3 w/v 용적비(1ml/ 0.3 g 조직)에 재현탁시키고, 페스텔(pestel)로 뺀다. 균질물은 SDS 겔 로딩 완충액으로 5분간 가열하고, 12,000rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하여 맑게 한다. 상청액을 새로운 튜브에 옮기고, 20μℓ, 1μℓ 또는 이들의 희석액을 12% SDS-PAGE상에서 분리하고, 항-His₆-HA 생쥐 또는 토끼 항-리체나제 다클론 항체를 이용하여 웨스턴 분석을 통하여 분석하거나 또는 효소도 분석에 의해 기능을 가진 리체나제 활성을 나타내는 효소 활성을 평가한다. 효소도는 효소 활성을 측정하여 전기영동(electrophoretic) 방법이다. 이 방법은 배양 기간 동안에 용해된 효소에 의해 분해되는 기질로 충전된 도데실 설페이트 나트륨 겔에 기초한다. 겔의 착색으로 어두운 적색 배경에 효소 활성은 흰색 밴드로 나타난다. 특정 범위 내에, 밴드 강도는 적화된 효소 양과 1차원적인 관계에 있을 것이다.

<578> 플라스미드 pBID4-LicKM-HA(SD)-KDEL 또는 pBID4-LicKM-HA(GD)-KDELHA를 포함하는 아그로박테리움 튜머페션스(*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 리조젠(*rhizogenes*)으로 침투된 니코디아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물에서 발현은 융합 단백질에서 HA 단백질의 전기영동성 이동이 이론상 MW에 상응하는 경우에 키메라 단백질 LicKM-HA(SD)-KDEL 또는 LicKM-HA(GD)-KDEL의 분자량에 특정 결합이 상응하게 된다. (리체나제 효소 MW는 약 28kD이다).

<579> 정제안된 추출물에서 발현되는 키메라 단백질 Lic-HA-KDEL 및 Lic-NA-KDEL의 정량화는 수작업으로 침투된 조직 및 진공-침투된 조직상에 면역 블랏팅으로 할 수 있다.

<580> 항원의 정제

<581> pBID4-LicKM-HA(SD)-KDEL, pBID4-LicKM-HA(GD)-KDEL, pBID4-full-length-NA-KDEL 구조체를 포함하는 재조합 아그로박테리움 튜머페션스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 침투된 식물의 잎은 균질화과정을 통하여 뺀다. "EDTA-없는" 프로테아제 저해물질(Roche)을 포함하는 추출 완충액과 X-100 1%를 3용적비 w/v로 이용하여 30분간 4℃에서 혼돈다. 추출물은 10분간 4℃에서 9000 x g에서 원심분리시켰다. 상청액을 연속하여 miracloth로 여과시키고, 20,000 x g에서 30분간 원심분리시키고, 0.45-μm 필터를 통하여 여과시킨 후에 크로마토그래피를 이용하여 정제시킨다.

<582> 생성된 추출물은 암모늄 설페이트 침전을 이용하여 절단한다. 간단하게 설명하면, (NH₄)₂SO₄를 추출물에 첨가하여 20% 포화되도록 하고, 얼음위에서 1시간 동안 두고, 15분간 18,000 x g에서 회전시킨다. 펠렛은 버리고, (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 60% 포화되도록 하고, 얼음위에서 1시간 동안 두고, 15분간 18,000 x g에서 회전시킨다. 상청액을 버리고, 생성된 펠렛은 완충액에 재현탁시키고, 얼음위에서 20분간 유지시키고, 30분간 18,000 x g에서 원심분리시키고, 상청액은 10000 용적의 세척 완충액에 대해 하룻밤동안 투석시켰다:

<583> 중력하에 실온에서 IMAC ("Immobilized Metal Affinity Chromatography," GE Healthcare)를 이용하여, His-

tagged LicKM-HA(SD)-KDEL, LicKM-HA(GD)-KDEL, 전장-NA-KDEL 키메라 단백질을 정제하였다. 정제는 변성 조건 하에서 실시하였다. 단백질을 0.5ml 분획물로 회수하고, 단일화시키고, PBS 1X에 대해 하룻밤동안 4℃에서 투석된 20mM EDTA5를 첨가하고, SDS-PAGE로 분석하였다.

<584> 대안으로, 분획물을 첨가된 20mM EDTA와 함께 수거하고, 하룻밤동안 4℃에서 NaH_2PO_4 10 mM에 대해 투석시키고, 음이온 교환 크로마토그래피를 통하여 정제시킨다. LicKM-HA(SD)-KDEL, LicKM-HA(GD)-KDEL, 전장-NA-KDEL 정제의 경우, 음이온 교환 컬럼 Q Sepharose Fast Flow(Amersham Pharmacia Biosciences)를 이용한다. LicKM-HA(SD)-KDEL, LicKM-HA(GD)-KDEL, 전장-NA-KDEL 친화력 또는 이온-교환 정제된 키메라 단백질은 12% 폴리아크릴아미드 겔상에서 분리하고, 코마시 블루 착색시켰다. 분리된 단백질은 다클론 항-리체나제 항체와 연속하여 항-토끼 IgG 양고추냉이 과산화효소-컨쥬게이트된 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 위해, PDVF 막으로 전기영동에 의해 이동시킨다.

<585> 투석후에 수집된 분획물은 pAb α -리체나제 및 pAb α -His₆.을 이용한 이뮤노블랏을 이용하여 분석하였다. His-tag는 발현된 키메라 단백질에 의해 유지되었고, 정제된 단백질의 최종 농도는 소프트웨어를 이용하여 평가하였다.

<586> 헤마토글루티닌화 반응 검사

<587> 두 가지 상이한 원료로부터 적혈구세포(RBC)의 세종을 이용하여 식물에서 만들어진 인플루엔자 백신에 헤마토글루티닌 활성을 설명한다. 검사된 백신 재료를 인플루엔자 A/Wyoming/03/03 (H3N2 바이러스) 또는 인플루엔자 A/Vietnam/ 1194/2004(H5N1 바이러스)의 "도메인 3" (구형 도메인)으로 명명한다.

<588> 닭, 칠면조 및 말에서 얻은 RBC는 개별적으로 인산염 완충염(PBS)로 3회 세척하고, PBS로 0.5% v/v로 조정한다. 밀둥근 96 웰 미량적정 플레이트에 Falcon 플레이트가 포지티브와 네가티브 결과사이에 분명한 설명을 제공한다는 것을 보장하는 품질 보증용으로 PBS만으로 테스트하였다. 백신 재료는 중복으로 0.5mg/ml로 시작하여, 재료 25 μ l를 25 μ l PBS에 단계적으로 피펫팅하여 플레이트를 최고 2배까지 희석하였다. RBC/플레이트 한 종의 0.5% 현탁액 25 μ l를 플레이트의 모든 웰에 분배하였다. 플레이트를 흔들어서 RBC를 분포시키고 4℃에서 4시간 동안 배양한 후 네가티브 결과로부터 포지티브를 결정한다.

<589> 인플루엔자 A/Vietnam/I 194/2004 (H5N 1 바이러스)의 도메인 3은 일관되고 반복적으로 조류 RBC에는 포지티브한 결과를 제공하지만 말 RBC에서는 아니다. 희석종말점(endpoint dilution)은 중복재료(replicates)에서 모두 8로 일치하며, 반복 실험으로 H5 도메인 3은 62.5 μ g 농도에서 조류 RBCs를 헤마토글루티네이트 시킬 수 있다(도 11).

<590> 실시예 5: 면역원성 연구

<591> 초기 면역원성 연구

<592> 초기 면역원 연구를 실시하여 식물에서 생산된 LicKM-항원 융합체가 복막을 통하여 면역주사를 맞은 생쥐에서 특정 혈청 IgG를 유도할 수 있는지, 그리고 유도된 항체가 in vitro에서 인플루엔자 바이러스를 중화시킬 수 있는지를 확언한다. 이 연구는 LicKM, LicKM-HA(SD), LicKM-HA(GD)를 이용하고 아그로박테리움으로부터 인리치한 재조합 NA를 상기에서 설명하는 것과 같이 75% 순도로 니코디아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*)의 잎에 침투시켰다.

<593> 8주령의 암컷 BALB/c 생쥐를 재조합 LicKM-HA(SD), LicKMHA(GD) 100 μ g/투여량 및 재조합 NA 50 μ g/투여량으로 면역주사하였다. 이뮤노겐의 면역주사는 1일에 복막으로 주사후, 제1 부스터는 14일 후에, 제2 부스터는 10일 후에 실시한다. 첫 투여량에는 1:1 용적 비율의 컴플리트 Freund's 어쥬번트가 포함되고, 제2투여량에는 임의 어쥬번트가 포함되지 않는다. 네가티브 대조군은 재조합 LicKM 투여량 250 μ g를 제공받는다. 각 군에는 세 마리 생쥐가 있다. 제1 투여전 1일에 프레-이뮤 혈청을 수집하고, 혈청은 제2부스터 후 28일에 연속하여 수거한다. 인플루엔자 특이적 IgG 항체 역가는 ELISA 검사를 이용하여 결정한다(도 12).

<594> 인플루엔자 백신에 대해 발생된 면역 혈청에 의한 바이러스의 헤마토글루티닌 활성 저해.

<595> 상기에서 설명한 것과 같이 생쥐로부터 프레이뮤(Preimmune) 혈청 및 제2부스트 후 혈청을 비활성화된 인플루엔자 바이러스의 헤마토글루티닌 활성 저해에 대한 항체 역가 능력을 평가하였다. 비활성화된 인플루엔자 A/Vietnam/I 194/2004 바이러스(H5N1 바이러스)의 4 HA 단위를 프레이뮤 혈청과 백신의 제2부스터후에 수득한 혈청 25 μ l 희석액과 복합하였다. 실시예 4에서 설명하는 것과 같이 조류 RBC에서 헤마토글루티닌 활성 저해를

평가하였다. 생성된 항체 역가는 바이러스의 헤마토글루티닌 저해에 효과가 있었다. 예시적인 결과는 도 13에 나타내었고 표 1에 정리하였는데, 생성된 항체는 바이러스의 헤마토글루티닌 활성에 대해 보호할 수 있다는 것을 설명한다.

표 1

<596> 실험적인 인플루엔자 백신에 대해 생성된 면역 혈청에 의한 헤마토글루티닌 저해

백신화 그룹	헤마토글루티닌 저해 역가(혈청 희석 -1)
PBS 대조군	<10
프레이문 혈청	160
백신 w/o 어쥬번트	2560
백신+어쥬번트	2560

<597> 실시예 6: 인플루엔자 백신화반응의 모델 시스템

A. 근육내 백신주사

<599> 인플루엔자 감염 연구를 위해 확립된 동물 모델인 흰 족제비를 이용하여 인플루엔자 백신의 효과를 측정하였다 (가령 Boyd et al, 1975; Chen et al., 1995; Scheiblaue et al., 1995; Sweet et al, 1980, Microbiol. Rev., 44:303; Maassab et al, 1982, J. Infect. Dis., 146:780; Toms et al, 1977; Webster et al, 1994; Fenton et.al, 1981 ; and Webster et al, 1994). 흰족제비 동물 모델을 이용한 유전(Transmission) 연구에서 인플루엔자 바이러스의 수용체 전파 뿐만 아니라 바이러스의 비루린스에 돌연변이의 효과를 설명한다(Herlocher et al., 2001 ; and Herlocher et al., 2002). 여기에서 설명하는 연구에 사용된 이형성 프라임-백신-도전으로 비활성화된 어쥬번트연결된 인플루엔자 백신으로 성공적으로 테스트하였다.

테스트 물질 생산

<601> 우리는 흰족제비에서 식물에서 생산된 항원의 면역원성 및 보호 효과를 평가하였다. 테스트 물질은 식물에서 생산된 정제된 표적 항원으로 구성된다. 인플루엔자 type A (A/Wyoming/3/03 [H3N2])의 균주의 HA 도메인은 열안정성 캐리어 분자와 융합되도록 만들어 상기에서 설명하는 식물계 발현 시스템에서 만들어진다. 동일한 균주에서 구한 NA는 상기에서 설명하는 식물계 발현 시스템에서 만들어진다. 테스트 물질에는 임의 핵산, 독성 물질 또는 감염성 물질을 포함하지 않는다.

<602> 특히, HA의 아미노산 17 내지 67 + 아미노산 294 내지 532(스텝 도메인을 함께 구성)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열(Wilson et al, 1981, Nature 289:366)을 LicKM (GenBank accession number DQ776900)에 삽입하여 LicKM-HA(SD)을 얻는다. HA의 아미노산 68 내지 293(구형 도메인을 구성)을 인코딩하는 뉴클레오타이드도 유사하여 삽입하여 LicKM-HA(GD)을 얻는다. 니코티나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*) 병인성 관련 단백질 PR1a의 시그널 펩티드를 인코딩하는 서열(Pfitzner et al., 1987, Nucleic Acids Res. , 15 :4449)을 융합체가 N-말단에 포함되어 있다. 폴리-히스티딘 친화력 정제 tag(6XHis) 및 엔도플라스믹 레티큘럼 유지 시그널(KDEL)을 인코딩하는 서열은 C-말단에 포함된다. LicKM 융합체를 하이브리드 벡터 pBID4 (Wilson et al, supra)에 도입시켜, 바이러스 게놈이 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터로부터 전사되고, 바이러스 복제 및 담배 모자이크 바이러스 (TMV) 피복 단백질 서브 게놈 mRNA로부터 표적 서열이 발현되도록 하는데(Shivprasad et al, 1999, Virology, 255:312), 이 하이브리드 벡터는 앞에서 표적의 일과성 발현을 위해 아그로박테리움 바이너리 플라스미드 pBI121(Chen et al, 2003, MoI, Breed., 11 :287)로부터 유도된다. 또한, 동일한 인플루엔자 균주의 NA의 아미노산 38 내지 469를 인코딩하는 서열을 LicKM에 사전 융합없이 pBID4로 도입시킨다. 상기에서와 같이, PR1a의 시그널 펩티드는 N-말단에 포함되며, 6xHis + KDEL은 C-말단에 포함된다.

<603> 인플루엔자 항원을 포함하는 조작된 벡터는 전기천공에 의해 아그로박테리움 튜머페션스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 GV3101로 도입된다. 재조합 아그로박테리움 튜머페션스(*Agrobacterium tumefaciens*) 현탁액을 씨를 뿌린 후 약 6주되는 잎에 접종하여 니코티아나 벤탄미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물에 도입시켜 표적 서열을 잎 조직으로 도입시킨다. 식물은 약 21℃에서 12시간 낮밤 주기 조건하에 화분에서 성장시켰다. 잎들을 발현 구조체에 따라 접종후 4일 내지 7일에 수확한다. 단백질 추출물은 완충액(50mM 인산나트륨염, pH 7.0; 100mM 염화나트륨; 10mM 디에틸디티오카르바메이트; 10mM β-메캅토에탄올)에서 잎을 빻아서 준비한다 재조합 항원은 황화암모늄 침전 및 고정된 금속 친화력 크로마토그래피(6xHis tag이용) 및 음이온 교환 크로마토그래

피, 각 단계후에는 투석하여 최소 순도를 80%로 하는 과정에 의해 준비한다.

<604> 기준 항혈청으로 식물에서 생산된 항원의 반응을 ELISA 분석으로 평가하고(도 16A), 면역 블랏팅에 의해 변성 조건하에서 평가하였다(도 16B). ELISA의 경우에, 96 웰 플레이트를 LicKM-HA(SD), LicKM-HA(GD), 또는 식물에서 정제된 NA로 또는 비활성화된 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스로 피복한다. 피복된 플레이트를 정제된 A/Wyoming/3/03 바이러스에 대해 생성된 양 항혈청, NEBRG-18 (H7N2) 재조합된 바이러스에 대해 생성된 양 항혈청 또는 NIBRG-17 (H7N1) 재조합된 바이러스에 대해 생성된 양 항혈청과 배양시켰다. 면역블랏 분석을 위해, 100ng LicKM-HA(SD), 100ng LicKM-HA(GD), 100ng HA에 상응하는 양의 비활성화된 인플루엔자 A/Wyoming/3/03를 SDS-PAGE를 이용하여 분리하고, 폴리비닐리덴 플로라이드 막으로 옮기고, LicKM 또는 A/Wyoming/3/03 바이러스의 정제된 HA에 대해 생성된 양 항혈청으로 배양시켰다. NA 활성은 표준 WHO 프로토콜 WHO/CDS/CSR/NCS 2002.5.Rev.1에 따라 검사하였다. NA 활성 저해는 뉴라미니다제 검사 실행전에 상동성 (NIBRG-18 [H7N2J] 또는 이형성(NIBRG-17 [H7N1]) 재조합 바이러스에 대해 생성된 양 항혈청과 식물에서 생산된 NA를 사전-배양하여 평가하였다.

<605> ELISA 및 면역블랏 검사에서, LicKM에 대해 생성된 다클론 토끼 혈청이 비슷하게 각 융합체를 인지하기는 하지만, LicKM-HA(SD)는 LicKM-HA(GD) 보다 기준 혈청에 의해 더 강하게 인지되었다(도 16B). 또한, 식물에서 생산된 NA는 재조합 H7N2 바이러스에 대해 생성된 다클론 양 혈청에 의해 인지되었고(도 16C), 이는 균주 특이적인 방법으로 기준 혈청에 의해 저해되는 효소 활성을 보여준다. (도 16C).

<606> 백신 접종

<607> 흰족제비 연구는 UK동물법, 1986에서 요구되는 UK Home Office 라이선스하에 실행되었다(Scientific Procedures). 고밀도 흰족제비 LabDiet 5L1 5 (IPS Product Supplies, London, UK)에서 유지된 수컷 긴털족제비 또는 알비노 흰족제비(High gate Farm, Highgate, England), 4.5월령, 441 내지 629 g의 체중(연구개시일 당시)를 표 2에서 나타낸 것과 같이 처리군으로 나누었다.

표 2

<608> 처리군

처리군	투여 경로	각군에 동물수	투여량	용적	처리
1	SC	8	-	300 μ l	네가티브 기준, 테스트 물질 1
2	SC	8	100 μ g	300 μ l	VC1 + 어쥬번트, 테스트 물질 2
3	SC	8	100 μ g	300 μ l	VC2, 어쥬번트없음, 테스트 물질3
4	SC	8	100 μ g	300 μ l	VC2+어쥬번트
5	SC	8	TCID ₅₀ 기록	300 μ l	포지티브 기준

<609> * TCID₅₀ ("조직 배양 감염 약량") = 실험 웰의 절단에 활성, 성장하는 바이러스를 포함하는 바이러스 회석 수준

<610> 8마리 흰족제비 세그룹에 후보 백신 조제물(식물에서 생산되는 인플루엔자 항원 복합물을 포함; VC1+어쥬번트, VC2, VC2+어쥬번트)로 프라이밍 및 부스트 2회(0, 14, 28일)에 피하 면역주사하였다(표 1). VC1 동물은 100 μ g LicKM-HA(SD) 및 100 μ g LicKM-GD + 1.3mg alum을 투여받았다. VC2 동물은 100 μ g LicKM-(SD), 100 μ g LicKM-(GD), 50 μ g NA, 1.3mg alum ("어쥬번트") 또는 alum 없음 ("어쥬번트 없음")을 투여받았다. 100 μ g LicKM-(SD) 및 100 μ g LicKM-(GD)은 HA 100 μ g에 상응하도록 함께 제공된다. 네가티브 대조군 동물은 alum 어쥬번트 만을 제공받고, 포지티브 대조군 동물은 단일 비강 투여량의 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스 (0일에 ml당 10^{5.5} TCID₅₀ 농도에서 0.5ml)를 제공받았다. 면역주사후에, 병소, 자극, 운동성, 흥반, 일반적 활성에 대해 동물을 매일 주시한다.

<611> 동물의 비강으로 바이러스 도전을 받게 되는데, 최종 투여후 10일 ml당 10^{5.5} TCID₅₀ 농도에서 마취하에 0.5ml 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스로 도전을 받게된다. 혈액 샘플은 백신주사일, 도전(challenge)일, 도전후 4일째에 수거하였고, 비강 세척액은 도전후 4일째 수거하였다. 혈청 HI 역가를 상동성 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스 및 이형성 인플루엔자 A/Sydney/5/97 (H3N2), A/California/7/04 (H3N2), A/New

Caledonia/20/99 (H1N1) 바이러스에 대해 결정하였다.

<612> 표 3에 나타난 과정에 따라 인플루엔자 백신접종, 과정, 바이러스 도전을 실행하였다. 식물에서 만들어진 백신 후보물질을 제공받은 동물에서 부작용이 나타나지는 않았다. 동물에 개별 확인 및 체온 감시를 위해 트랜스폰더를 삽입하였다. 투약은 연구 과정에 나타난 시간대에 세 번의 별도 과정으로 실시하였다(표 3). 미리 준비된 테스트 물질을 각 투약에 분배하였다. 테스트 물질은 투여직전에 어쥬번트와 혼합하였다.

표 3

<613> 연구 과정

연구일	-38	-24	-10	0	1	2	3	4
트랜스폰더 삽입	X							
백신 주사	X	X	X					
도전				X				
마취	X	X	X	X	X	X	X	X
체중	X	X	X	X	X	X	X	X
매일 체온	X	X	X	X	X	X	X	X
건강 수치	X	X	X	X	X	X	X	X
비강 세척액					X	X	X	X
항체 혈청	X	X	X	X				X
죽임								X

<614> 분석

<615> 임상적 징후(건강 수치), 체중 및 체온 변화를 기록하였다. 매일, 감염후에 각 동물에서 병소, 자극, 운동성, 흥반 및 일반적인 활동에 대해 검사를 하고, 건강 지수를 결정하기 위해 기록하였다. 각 동물은 다음과 같이 기록한다: 재채기 또는 코가 꾸룩거름(1점); 외부 콧구멍으로부터 화농 방출(1점); 자발적인 활동 또는 움직임 감소(1점); 자발적인 활동 없음 또는 민첩함 감소(2점). "자발적 활동 또는 움직임 감소" 및 "자발적 활동 없음 또는 민첩함 감소"는 상호 배타적인 수치이다. 감염후 체중의 최대 감소를 각 동물마다 기록한다. 감염후 최대 체온 증가도 각 동물마다 기록한다. 임의 날에 각 동물에서 최대 건강 수치, 체중 감소 및 체온 변화의 평균 및 표준 편차를 처리군으로 계산하고, ANOVA로 비교한다. 각 동물에서 매일 종합 건강, 체중 감소, 체온 변화로 구성된 AUC-유사 측정을 계산한다: 처리군 평균, 중간 및 표준 편차를 계산하고, ANOVA 또는 Kruskal-Wallis 테스트와 비교한다. 살아있는 바이러스로 도전후, 각 처리군은 임상 징후, 체온 및 체중 변화로 나타나는 도전으로부터 회복을 설명한다. 테스트 백신을 제공받은 동물 집단은 보호되며, 상동성 인플루엔자 바이러스로 도전을 받은 후에 질병의 징후는 없거나 거의 없는 것으로 나타났다. 테스트 백신 후보물질 모두 동물에 완전한 보호를 제공한다(도 14).

<616> 바이러스 도전후에 비강 세척액을 수거하였다. 각 비강 세척액 용적으로 측정하고, 비강 세척액 중량을 모니터 하였다. 도전후 비강 세척액에서 트립판 블루(총 세포 카운트를 결정하는데 이용됨)를 이용하여 백혈구 세포를 카운트하여 염증 세포 반응을 측정하였다. 비강 세척액에 감염후 세포 카운터를 각 샘플링 날에 log 변환된 데이터의 평균, 중간 및 표준 편차를 통하여 종합한다; 처리군은 ANOVA 또는 Kruskal-Wallis 테스트로 비교하였다. 상기에서 설명된 임상 징후에 유사하게, 테스트 처리 백신을 제공받은 처리 군에서 비강 세척액의 모니터링으로 감염에 대해 포지티브 대조군에 동등한 또는 그 이상의 보호를 받는다는 것을 설명한다(도 14).

<617> 비강 세척 샘플상에 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 세포 적정을 이용하여 바이러스 발산(shedding)을 결정 하였다. MDCK 세포 적정 검사의 종결점은 칠면조 적혈구세포를 이용한 헤마토글루티닌 검사로 결정한다. Karber 계산을 이용하여 각 샘플에서 log₁₀ TCID₅₀/mL을 결정하였다. 비강 세척 샘플에서의 바이러스 발산은 감염후 비강 세척 샘플 상에서 결정하였다. 각 동물에서 발산되는 최대 역가는 로그 변환되었다; 처리군, 평균, 표준 편차를 계산하고, Kruskal-Wallis 테스트로 비교하였다. 임의 시간에서 임의의 바이러스 발산을 가는 처리군에 동물 비율을 표로 만들고, 각 군은 독립적으로 χ^2 테스트를 이용하여 대조하였다. 바이러스 발산으로부터 결과를 도 15에 나타내었다. 네가티브 대조군 처리 군만 유의성있는 바이러스 발산이 있었다(도 15).

<618> 헤마글루티닌 저해 검사(HAI)는 상동성 바이러스(인플루엔자 A/Wyoming/3/2003 (H3N2) 바이러스)에 대해 백신주 사전 및 주사후 혈청 샘플을 이용하여 실시예 5에서 설명하는 것과 같이 실행하여, 기저수준에서 혈청-네가티브

와 면역주사 및 감염후에 동물의 혈청 변환이 있는지에 대해 확인하였다. HAI 역가를 표로 만들고, 기준일(0일째)와 종료일에 4배이상 상승된 동물들을 확인하였다.

<619> 면역주사를 맞은 동물의 혈청의 헤마토글루티닌-저해(HI) 활성은 보호와 관련있는 것으로 간주된다(Brown et al. , 2004, Dev. Biol. (Basel), 115:1; and Hobson et al. , 1972, J. Hyg., 70:767). 각 실험 결과를 표 4에 나타내었다. H3N2 또는 포지티브 대조군에 대해 테스트 백신으로 면역주사를 받은 군의 모든 동물은 고혈청 헤마토글루티닌 저해 활성을 가지는 강력한 표적-특이적인 면역 반응을 가졌다. 백신의 제1투여후에, VC2+어쥬번트는 높은 HAI 역가를 생성하였다. 어쥬번트 없이 VC2는 보호 반응을 생성하였으나 제1투여후에 어쥬번트를 포함하는 것만큼 역가가 높지는 않았다. 그러나 제2투여후에, 역가는 어쥬번트를 가지는 CMB1 수준과 유사한 수준에 도달하였다. VC1 +어쥬번트는 항체의 보호 수준을 생성하였는데, 이는 백신의 제2투여후에 상당히 더 높았다(표 4).

표 4

<620> 흰족제비 HAI 데이터 종합

백신주사군	헤마토글루티닌 저해역가(혈청 희석 -1)		
	프레이뮌	Dose 1	Dose 2
N/대조군	5	5	5
VC2+A	5	1280	1280
VC1+A	5	50	1826
VC2, no A	5	322	1440
P/대조군	5	3000	1367

<621> 도 17에서는 제2 HA 검사 실험 결과를 나타내었다. 임의 동물의 프레-이뮌 혈청에서 또는 NC 동물의 혈청에서 HI 활성이 관찰되지 않았다(도 17). 그러나, VC2+어쥬번트로 백신주사를 맞은 모든 흰족제비의 혈청은 1:320 내지 1:2560(평균 역가 1273)의 높은 HI 역가를 나타내었다. VC1+어쥬번트를 제공받은 동물 가운데 제1투여후에 HI 역가가 낮거나 반응이 없는 것(Fewer responders)들이 관찰되었고(도 17), 이는 NA가 면역 반응을 조절할 것이라는 것을 말한다. VC2를 제공받은 8마리 동물중 다섯 마리는 1:160 내지 1:1280 범위의 HI 역가를 가지며, 어쥬번트 없이 상업적인 비활성화된 인플루엔자 백신은 일반적으로 HI 역가가 매우 낮았다(Potter et al, 1972, Br. J. Exp. Pathol., 53: 168; Potter et al, 1973, J. Hyg. (Lond.), 71 :97; and Potter et al, 1973, Arch. Gesamte virusforsch., 42:285). FVC1+어쥬번트, VC2 또는 VC2+어쥬번트의 제2투여후에, 모든 흰족제비의 혈청은 1:640 내지 1:2560 범위의 HI 역가를 가지고, 이들은 제3투여후에도 유사한 높은 역가를 유지한다(도 17). 이들 동물 모두의 혈청에는 1:40의 과량의 역가를 가지는데, 이는 최저 HI 역가가 사람에서 보호와 일치하는 것으로 간주된다(Brown et al, 2004, Dev. Biol. (Basel), 115:1; and Hobson et al, 1972, J. Hyg., 70:767).

<622> 식물에서 생산된 백신 후보물질의 2 내지 3회 투여후 흰족제비의 혈청에 HI 역가는 비강으로 감염된 포지티브 대조군 동물에서의 것과 상응하거나 이보다 컸고(도 17), 다른 흰족제비 연구에서 관찰된 것보다는 초과되었다. 예를 들면, 시판되는 비활성화된 H3N2 인플루엔자 백신을 근육으로 면역주사를 맞은 흰족제비는 2회 투여후에 1:20의 HI 역가가 발생되는 것으로 보고되었다(Lambkin et al, 2004, 백신, 22:4390). VC1+어쥬번트, VC2 또는 VC2+어쥬번트로 면역주사를 맞은 흰족제비의 혈청에는 A/Wyoming/3/03에 대항하는 것보다 이형성 H3N2 바이러스 균주A/Sydney/5/97 및 A/California/7/04 Sera에 대해 약 4 내지 12배 더 낮은 역가를 가졌으나, 이들 역가는 보호에 상응하는 1 :40 분계점을 모두 초과하여, 이는 이들 백신 후보물질이 이형성 H3N2 균주에 대한 보호 능력이 있다는 것을 설명한다. HI titers below 1 :10 were observed against 인플루엔자 A/New Caledonia/20/99 (H1N1)에 대해 1:10이하의 HI 역가가 관찰되었는데 이는 HI 항체 반응의 H3 서브타입 특이성을 나타내는 것이다.

<623> 면역원성 및 보호 효과 연구가 실행되어 살아있는 난에서 생장된 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스로 비강 도전을 받은 흰족제비의 식물에서 생산되는 HA 및 NA 항원으로 면역주사 후 보호 효과를 평가하였다.

<624> 도전후에 바이러스 감염은 도전후 4일에 비강 세척물에서 바이러스 발산을 모니터링하여 각 동물에서 결정한다. 세 가지 후보물질 백신 조성물중 임의의 것을 제공받은 한 마리 동물에서만 감지가능한 정도의 바이러스 발산이 나타났고, 이는 10^2 TCID₅₀보다 적었으며, NC 군의 동물에서는 10^6 TCID₅₀ 내지 10^7 TCID₅₀ 범위의 발산을 보여주

었다(도 18A). PC 군에서 바이러스 발산 수준은 10^2 TCID₅₀ 내지 10^3 TCID₅₀ 범위에 있고 이는 후보 백신군에 임의 동물에서보다 높았다(도 18A).

<625> 후보 백신 조제물을 제공받은 동물에서 보호 증가가 관찰되었다. 감염후 체중 감소는 NC 군에 있는 것들과 비교하였을 때 VC1+어쥬번트, VC2+어쥬번트 또는 상동성 바이러스를 제공받은 흰족제비에서 상당히 감소되었다.(도 18B). VC2를 제공받은 동물에서 체중 감소가 줄어든 것은 그다지 놀라운 것은 아니다(도 18B). 또한, 임의 백신 후보 물질 조성물로 면역주사를 맞은 흰족제비에서 체온 상승은 NC 또는 PC 군의 동물과 비교하였을 때 감소되었다(도 18C). 또한, 증후 수치 평균 피크, 도전후에 몇 가지 인플루엔자 관련된 증후 빈도는 NC군의 동물과 비교하였을 때 후보 백신 조제물을 제공받은 동물에서 감소되었다(도 18D). 유사하게, 상부 호흡기관 감염의 지시 물질로써 취한 흰족제비의 비강 세척액에 백혈구세포 카운터는 NC 군에 있는 동물과 비교하였을 때 후보물질 백신 수용체에서 감소되었다(도 18E).

<626> 도전 연구에서 식물에서 생산된 HA 및 NA 항원은 흰족제비에서 고도의 높은 보호 면역성을 부여하고, 이는 백신 개발에 전망을 보여주는 것이다. 앞으로 연구에서 LicKM-SD 및 LicKM-GD를 개별적으로 투여하였을 때 보호 역할 및 면역 반응을 실험함에 있어서 NA의 역할을 밝혀야 할 것이다.

<627> B. 비강 백신 주사

<628> Balb/c 생쥐 또는 흰족제비 동물 모델에서 비강 면역주사후에 후보 백신의 면역원성을 평가하였다. 연구안은 상기 실시예에서 논의된 근육내 면역주사의 경우와 유사하다. 간략하게 설명하면 어쥬번트(가령, 수산화알루미늄, MALP-2, 등) 존재 하에 또는 부재 하에 0, 14, 28일에 표적 항원 세 가지 약량($100\mu\text{g}$ /투여)으로 생쥐 또는 흰족제비 집단(집단에 약 8-10마리)의 비강으로 면역주사한다. 혈청 샘플과 비강 세척액을 항원 투여전 각 백신 투여일 및 제3투여후 10일에 수거하였다. 면역주사를 맞은 동물에 최종 투여일후에, 동물을 감염시키고, 열을 수반하는 호흡기 감염 증후를 만들기 위해 비강 경로를 통하여 공지된 인플루엔자 바이러스 상동성 균주로 도전시켰다. 면역 반응의 성질은 바이러스 도전후에 바이러스 발산, 감염후 체중 감소, 체온 상승, 증후 수치의 평균 피크, 비강 세척액에 백혈구세포 카운트 수준을 결정하여 검사한다. NA 및/또는 HA에 대한 항체 존재 및 HI 및 바이러스 중화 활성도 검사하였다.

<629> C. 투여량 상승 연구

<630> 항원 및 어쥬번트의 최적 조성 및 투여량, 투여경로 및 면역주사 섭생은 약량 상응 연구(dose escalation studies)를 통하여 추가 평가할 수 있다. 이 연구는 근육 경로(표 3) 및 비강 경로를 모두 이용하여 실시한다. 실시예에서 논의된 근육 및 비강 면역주사와 유사하게, 동물군(집단에 약 8-10마리)을 다양한 약량의 테스트 백신(어쥬번트 유무하에-가령, 수산화알루미늄, MALP-2, 등) 비강으로 면역주사한다. 예시적인 약량은 하기 표 5에 나타내었다.

<631> 다른 연구에서, 혈청 샘플 및 비강 세척액은 항원 투여전 각 백신주사일 및 제3 투여후 10일에 계산하였다. 면역주사를 맞은 동물은 동물을 감염시키고, 열을 수반하는 호흡기 감염 증후를 만드는 것으로 공지된 인플루엔자 바이러스의 상동성 균주로 비강 경로를 통하여 최종 투여후에 도전을 받게 한다. 면역 반응의 성질은 바이러스 도전후에 바이러스 발산, 감염후 체중 감소, 체온 상승, 증후 수치의 평균 피크, 비강 세척액에 백혈구세포 카운트; NA, HA 및/또는 M2에 대한 항체 존재; 헤마토글루틴인 저해 및 바이러스 중화 활성도 검사하여 결정하였다.

표 5

<632> 동물에서 약량 증가 연구에 대한 실험안

집단	백신 후보물질 조성물#	백신 주사 경로	동물의 수	투여 빈도	투여당 VC μg
1	표준	i.m.*	8		
2	1	i.m.	8	3	10
3	1	i.m.	8	2	50
4	1	i.m.	8	1	100
5	LicKM	i.m.	8	2	100

6	2	i.m.	8	3	10
7	2	i.m.	8	2	50
8	2	i.m.	8	1	100
9	3	i.m.	8	3	10
10	3	i.m.	8	2	50
11	3	i.m.	8	1	100

<633> *i.m.은 근육투여를 말한다.

도면의 간단한 설명

- <282> 도 1 헤마글루티닌 (HA) 단백질 및 단백질 도메인의 도식도. 상부 좌측에 있는 I₅2 및 3은 여기에서 설명하는 도메인 1, 2, 3에 상응한다. 도메인 1, 2, 및 2, 1은 함께 폴딩되어 스템 도메인(SD)을 만든다. 도메인 3은 구체(globular) 도메인(GD)이다. 아이템 1-6에 제시된 범위는 HA의 아미노산 위치에 상응한다.
- <283> 도 2. pET32 플라스미드의 지도. 상부 좌측은 표적 항원을 클로닝하는데 이용되는 변형 플라스미드에 부족한 T7 프로모터 및 T7 터미네이트 사이의 부분을 나타낸다.
- <284> 도 3. 변형된 pET32a 벡터내로 삽입된 pET-PR-LicKM-KDEL 및 pET-PR-LicKM-VAC 구조체의 도식.
- <285> 도 4. pBI121 벡터 조직의 도식.
- <286> 도 5. GUS 유전자 절단 및 TMV-유도된 플라스미드 추가후에 pBI 벡터로부터 pBID4 플라스미드 유도를 위한 도식.
- <287> 도 6. 벡터내로 삽입된 표적 서열 유무하에 리체나제(richenase) 서열에서 HA, HA의 도메인 및 NA의 융합 도식.
- <288> 도 7A, B. LicKM 및 융합 단백질을 발현시키는 식물 추출물의 리체나제 검사.
- <289> (7A)는 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*)에서 리체나제의 일과성 발현.
- <290> (7B)는 식물에서 리체나제 HA 융합 단백질의 자이모그램(Zymogram)(화살표).
- <291> 도 8. 항-HA 및 항-LiB 항체를 이용하여 Lic-HA 융합 단백질을 발현시키는 식물 추출물의 웨스턴 분석.
- <292> 도 9. Lic-NA 융합 단백질을 발현시키는 식물 추출물의 리체나제 검사.
- <293> 도 10. Lic-HA 융합 단백질을 발현시키는 식물 추출물의 웨스턴 분석.
- <294> 도 11. HA 리체나제 융합 단백질을 발현시킨 식물에서 적혈구 세포 헤마토글루티닌 검사.
- <295> 도 12. 어쥬번트 유무하에 테스트용 H5N1 인플루엔자 백신으로 면역화시킨 생쥐에서 항체 반응.
- <296> 도 13. 어쥬번트 유무하에 테스트용 H5N1 인플루엔자 백신으로 면역화시킨 생쥐로부터 수득한 혈청 희석물에 의한 헤마토글루티닌 활성 저해.
- <297> 도 14A-D. H3N2 인플루엔자 테스트 백신 및 대조군 처리 집단에서 H3N2 바이러스 도전에 대한 증후. (14A)는 임상적인 증후 전반에 대한 평균 최대 결과. (14B) 바이러스 도전후에 비강 세척물에서 세포 카운트의 평균 최대 결과. (14C) 동물에서 체중 감소의 평균 최대 결과. (14D) 동물의 체온 변화의 평균 최대 결과.
- <298> 도 15. H3N2 인플루엔자 테스트 백신 및 대조군 처리군에서 H3N2 바이러스 도전후에 바이러스 쉼딩(shedding); Group 1은 네가티브 대조군의 결과를 나타낸다; Group 2는 테스트 물질 1 (CMB F1)으로 처리된 동물에서의 결과를 나타낸다; Group 3은 테스트 물질 2 (CMB F2)로 처리된 동물에서의 결과를 나타낸다; Group 4는 테스트 물질 3 (CMB F3)로 처리된 동물에서의 결과를 나타낸다; 그리고 Group D는 포지티브 대조군 처리된 동물에서의 결과를 나타낸다. N은 각 Group에서의 평가된 동물의 수를 말한다(그룹당 8마리).
- <299> 도 16. 식물에서 생산된 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스 항원의 특징. (16A) 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스의 정제된 HA에 대해 생성된 양 혈청을 이용한 LicKM-(SD) 및 LicKM-(GD)의 ELISA 분석. 상동성 바이러

스 (AJ W/3/03) 및 식물에서 생산된 NA를 각각 포지티브 및 네가티브 대조군으로 이용한다. (16B) LicKM (anti-LicKM)에 대해 생성된 토끼 혈청 및 인플루엔자 A/Wyoming/3/03 바이러스 (anti-HA)의 정제된 HA에 대해 생성된 양 혈청을 이용하여 LicKM-HA(SD)의 이뮤노블랏 분석(lane 4) 및 LicKM-HA(GD)의 이뮤노블랏 분석 (lane 3). LicKM (lane 2) 및 상동성 바이러스 (lane 1)를 대조군으로 이용한다. (16C) NIBRG-18 재조합 바이러스에 대해 생성된 양 혈청(anti-H7N2) 및 NIBRG-17 재조합 바이러스에 대해 생성된 양 혈청 (anti-H7N1)을 이용한 NA의 ELISA 분석. NIBRG-18 (anti-H7N2)에 대한 양 혈청을 이용하여 평가된 상동성 바이러스 (A/W/3/03)를 포지티브 대조군으로 이용한다. (16D) NIBRG-18 (anti-H7N2) 또는 NIBRG-17 (anti-H7N1)에 대하여 생성된 양 혈청으로 선 배양후에 뉴라미니다제 활성의 균주 특이적인 저해. 세가지 반복체로부터 평균 효소 활성을 표준 편차로 나타내었다.

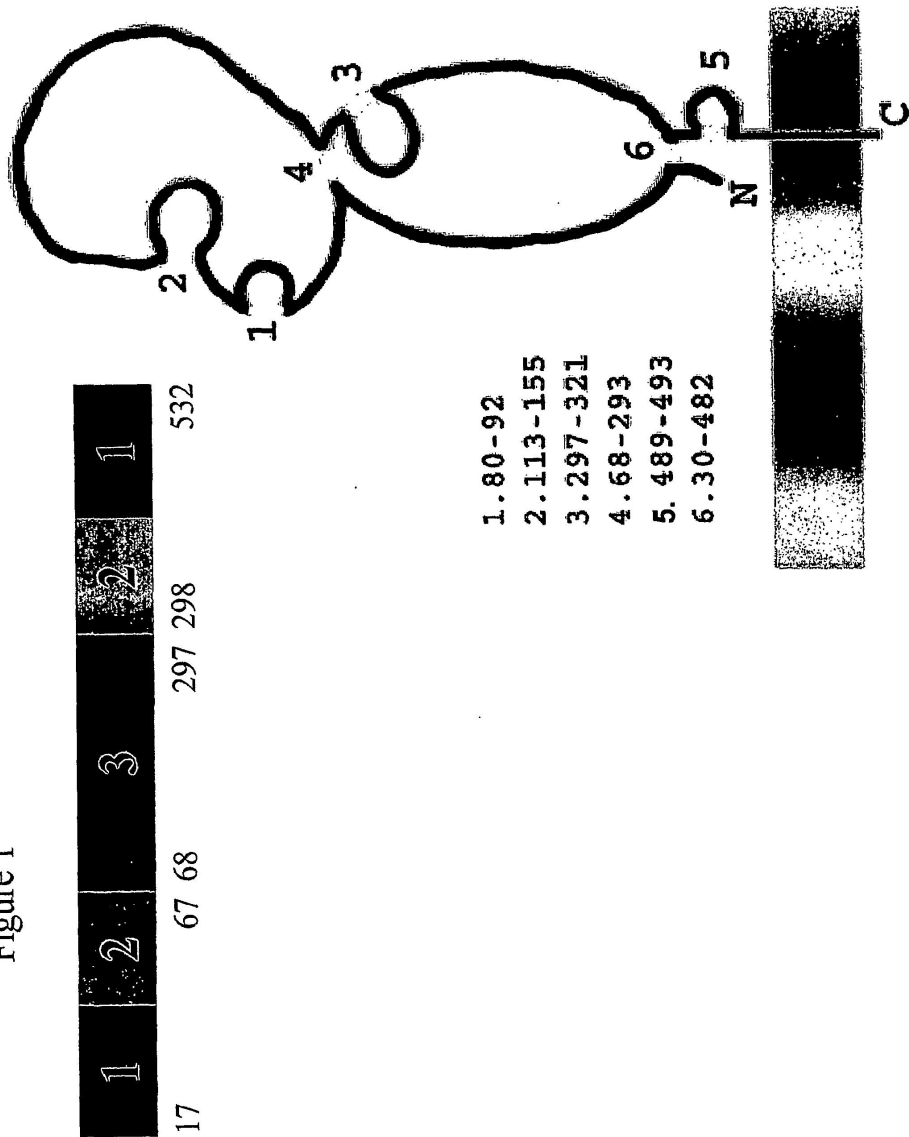
<300> 도 17. VC1+ 어쥬번트, VC2 (어쥬번트 없이) 또는 VC2 + 어쥬번트로 면역화시킨 흰 족제비로부터 헤마토글루틴인 저해 역가. 혈청 샘플은 제1투여전에(Pre-imm), 제1투여후 14일에(D1), 제2투여후 14일에(D2), 제3투여후 10일에(D3), 그리고 도전후 4일(Post-Ch)에 수득하였다. 표준 편차와 기하학적 평균 역가를 나타내었다.

<301> 도 18. VC1+ 어쥬번트, VC2 (어쥬번트 없이) 또는 VC2 + 어쥬번트로 면역화시킨 흰 족제비의 도전후 모니터링이다. 표준 편차와 평균치를 나타내었고, 멀티플 테스트용으로 Bonferroni 보정한 ANOVA를 이용하여 데이터의 통계학적 분석을 실시하였다. 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 으로 정의함. (18A) 감염후 바이러스 발산(shed) 피크. (18B) 감염후 체중 최대 체중 감소. (18C) 감염후 체온 상승 피크. (18D) 감염후 증후 수치 피크 (18E) 감염후 비강 세척 샘플의 ml당 전체 백혈구세포 카운트 피크.

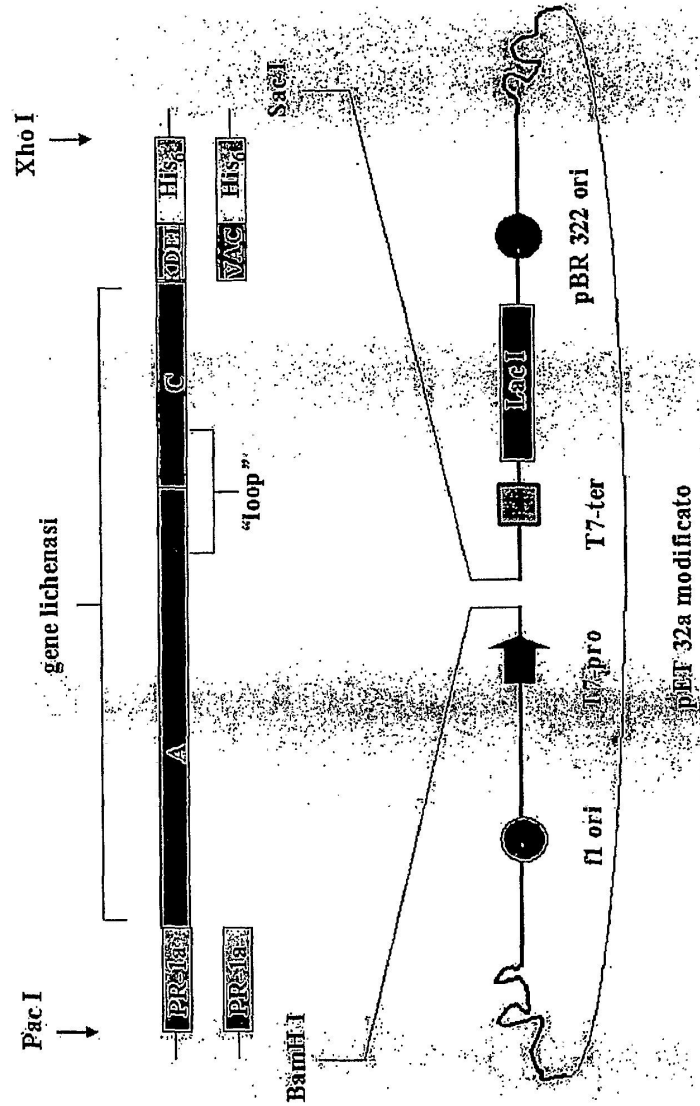
도면

도면1

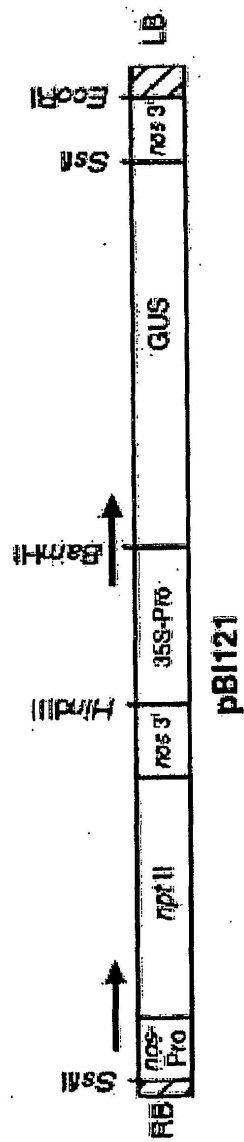
Figure 1



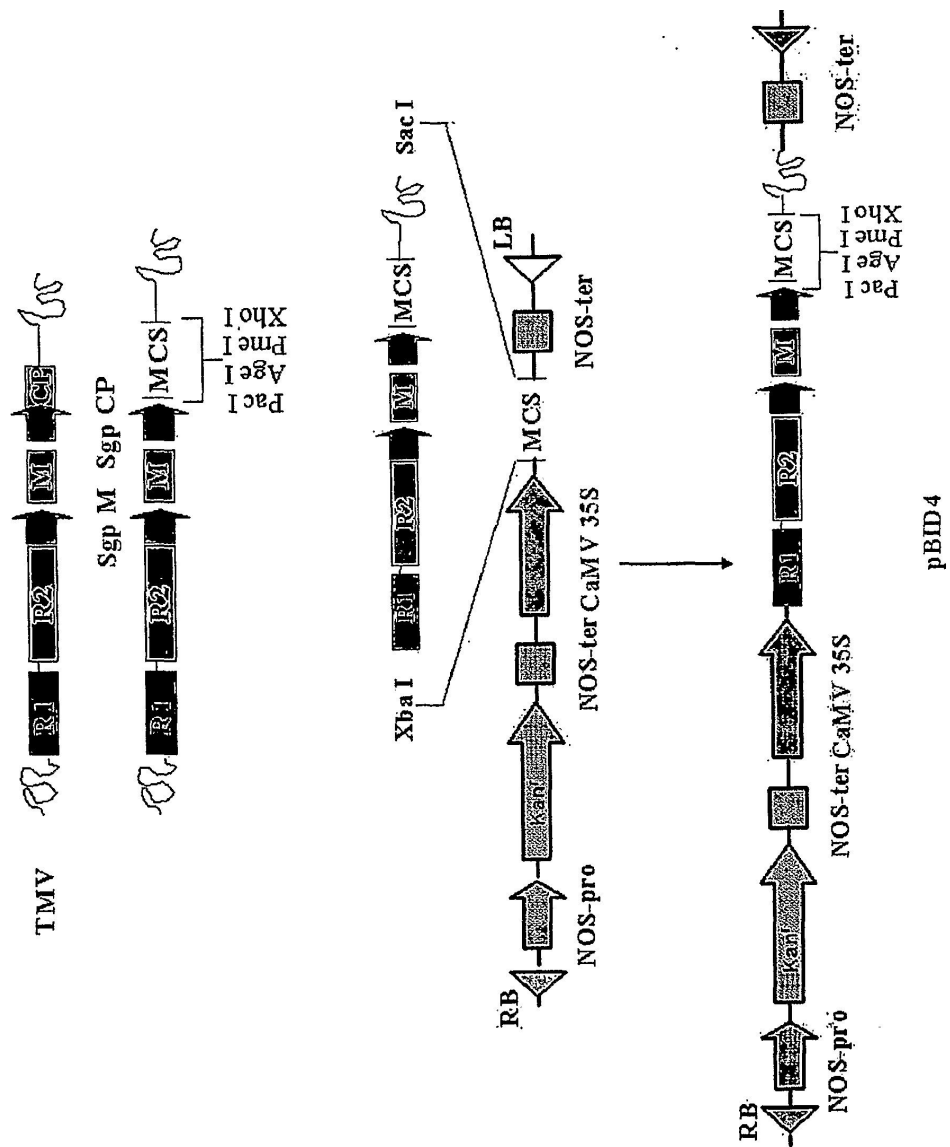
도면3



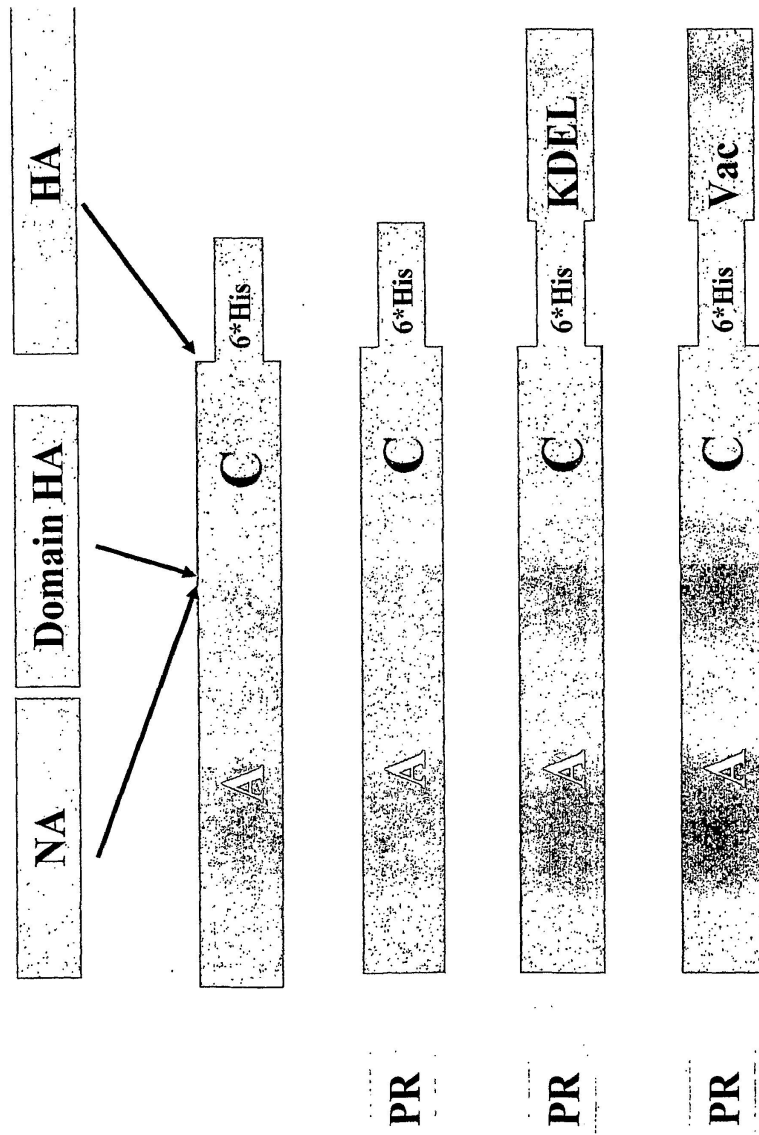
도면4



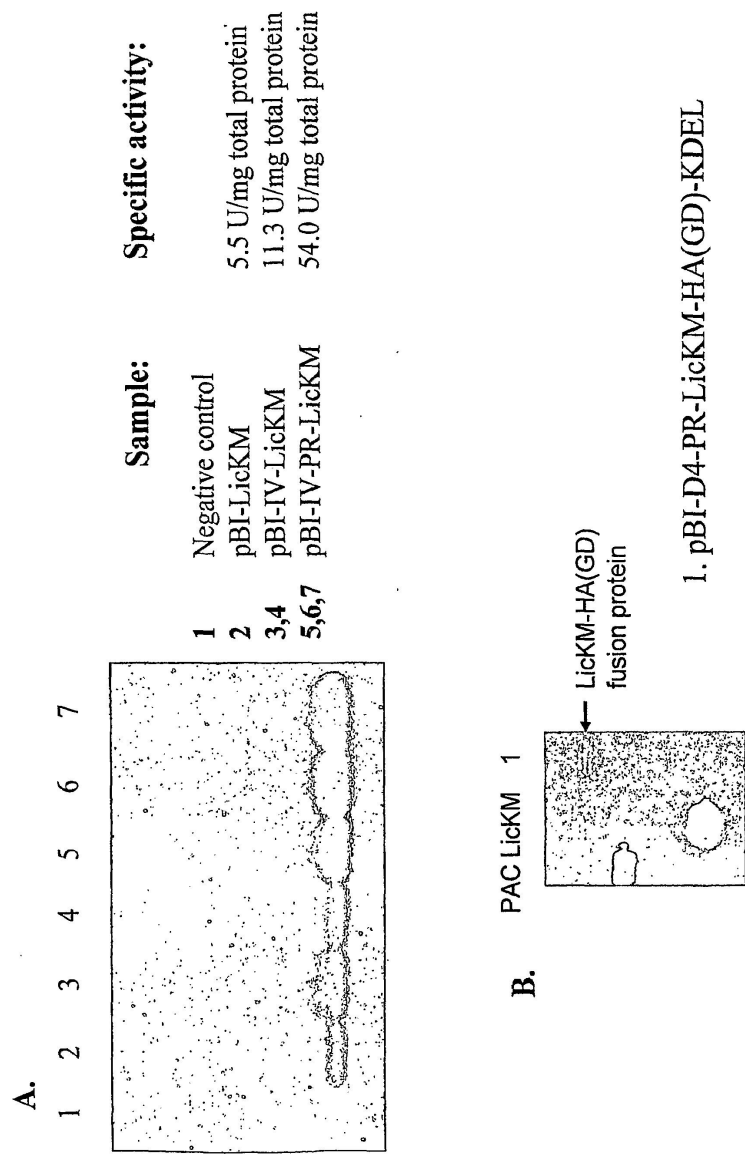
도면5



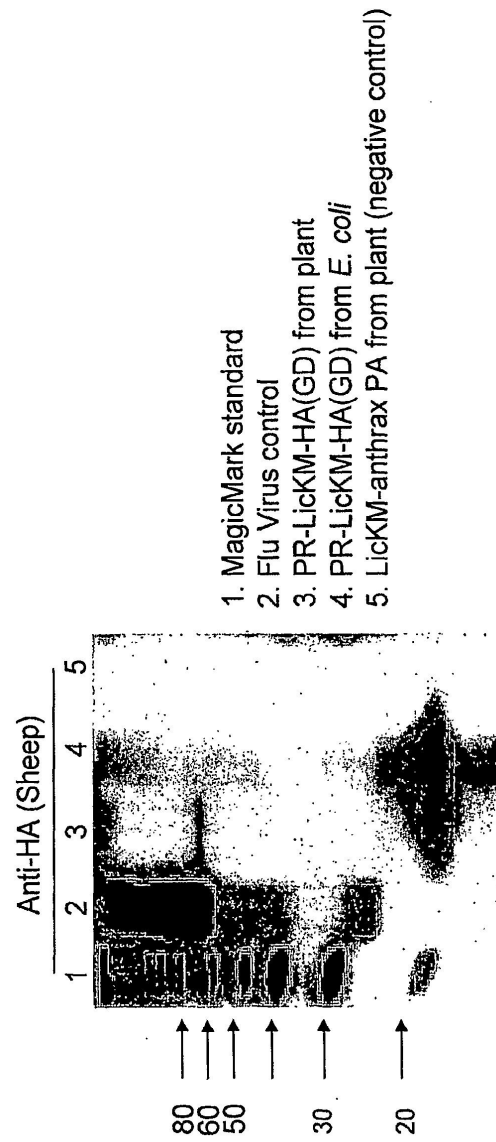
도면6



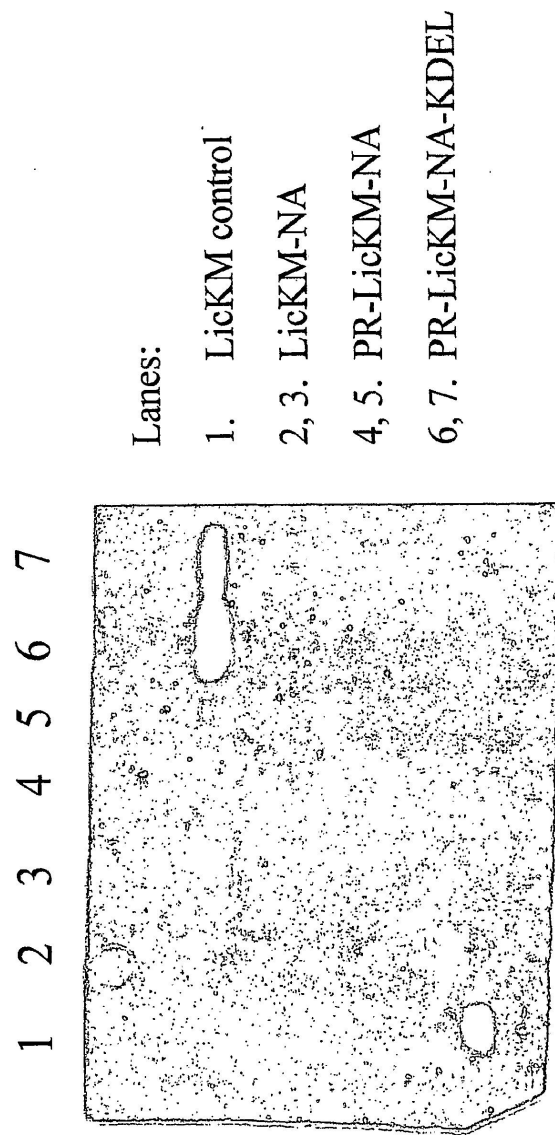
도면7



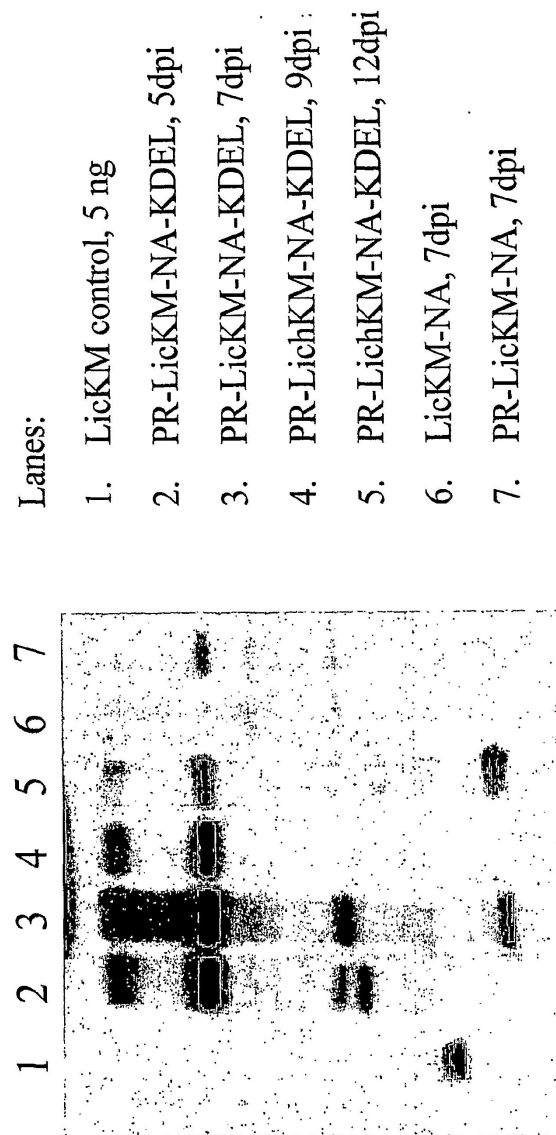
도면8



도면9



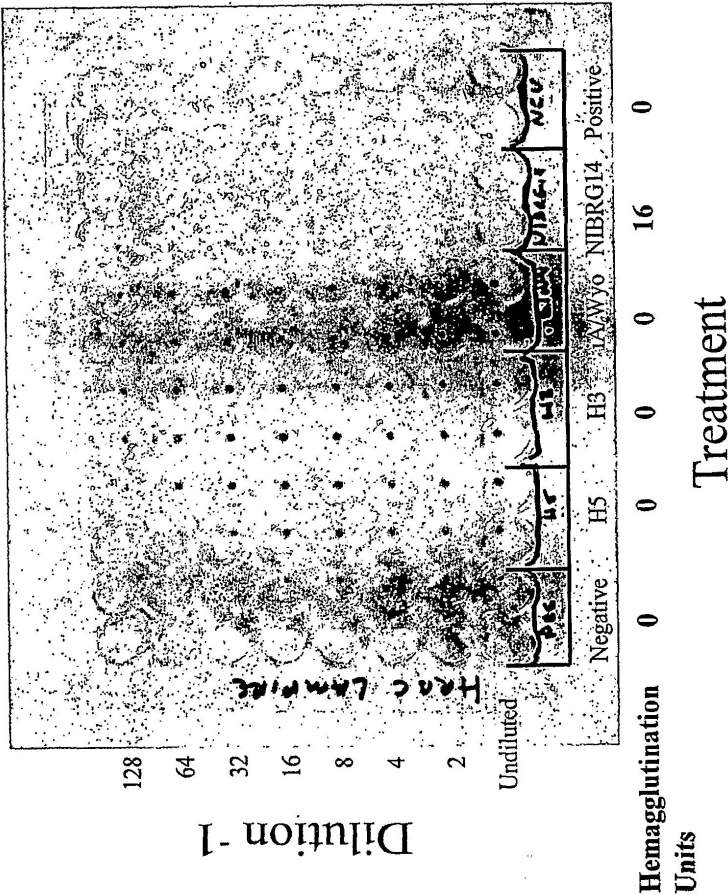
도면10



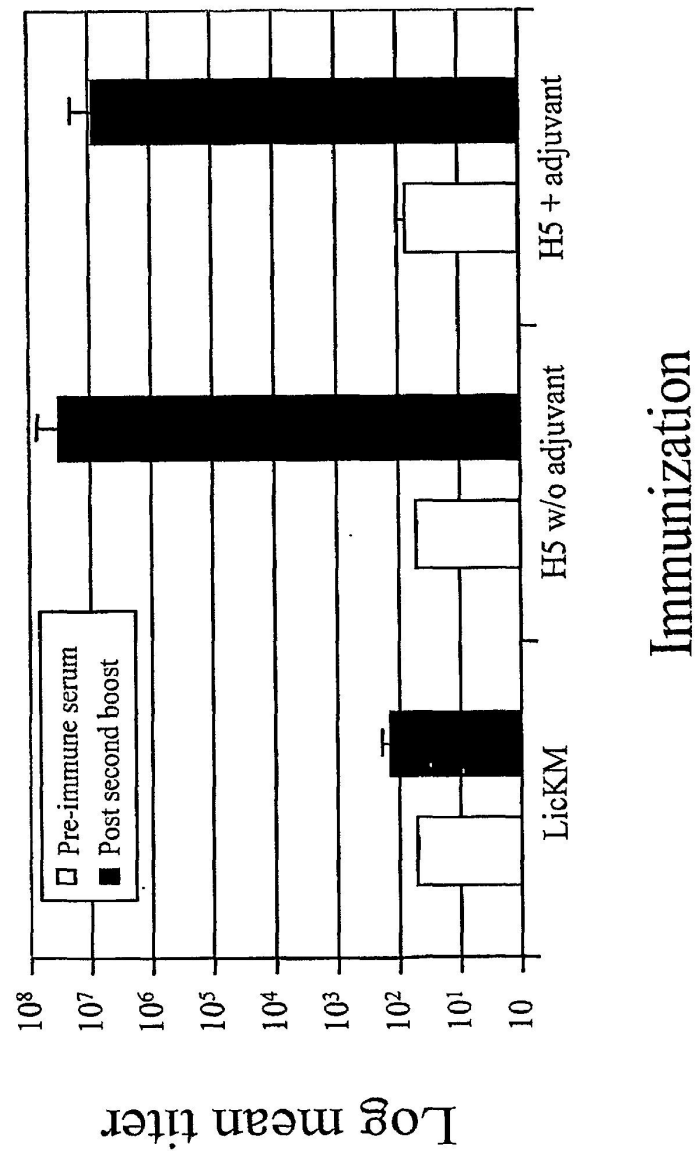
도면11

Negative – PBS
H5 – Vietnamese Domain 3/Lichenase construct
H3 – A/Wyoming Domain 3/ Lichenase construct
iA/Wyo – inactivated A/Wyoming/ H3N2 virus
NIBRG-14 – inactivated A/Vietnam/ H5N1 virus
Positive – Newcastle Virus

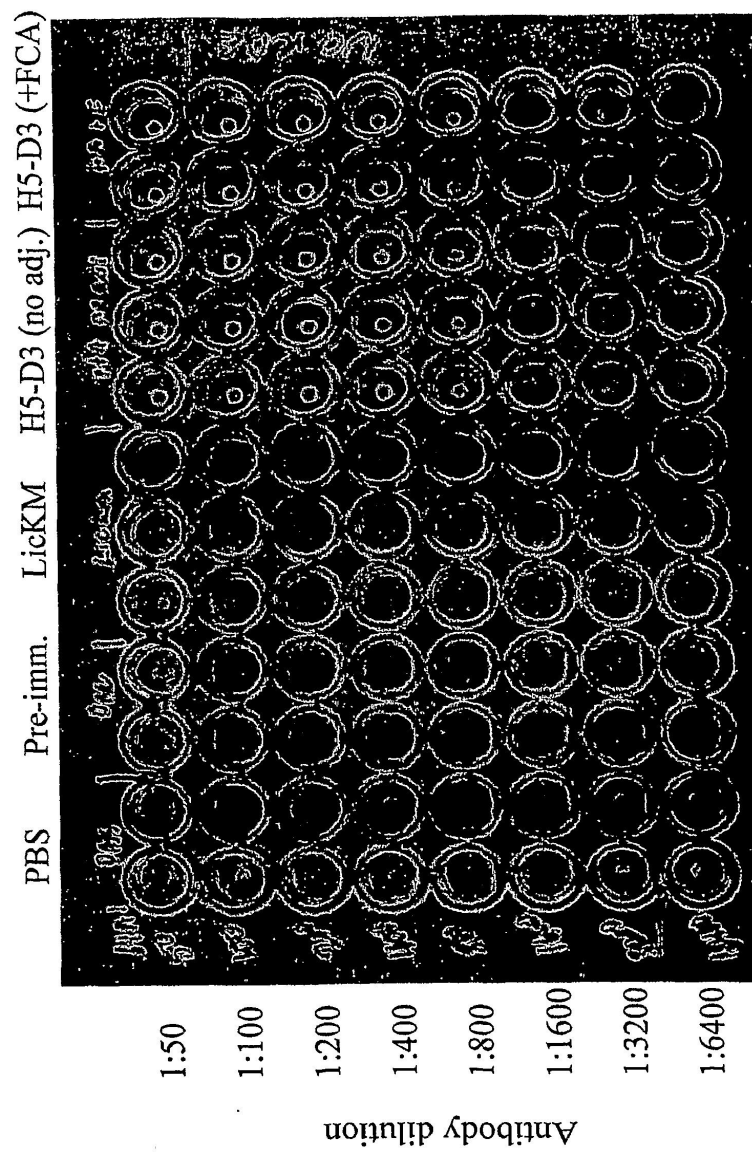
Figure 11



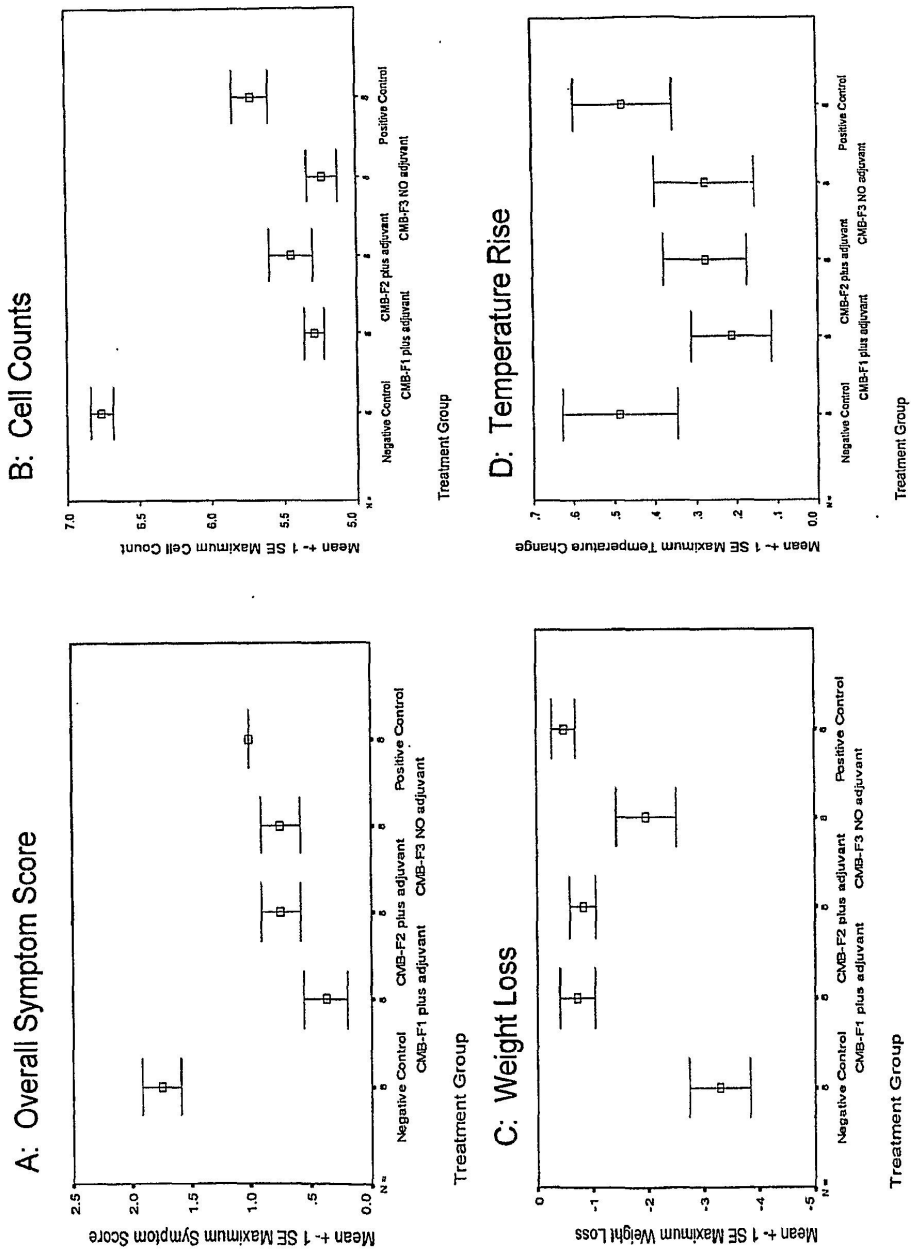
도면12



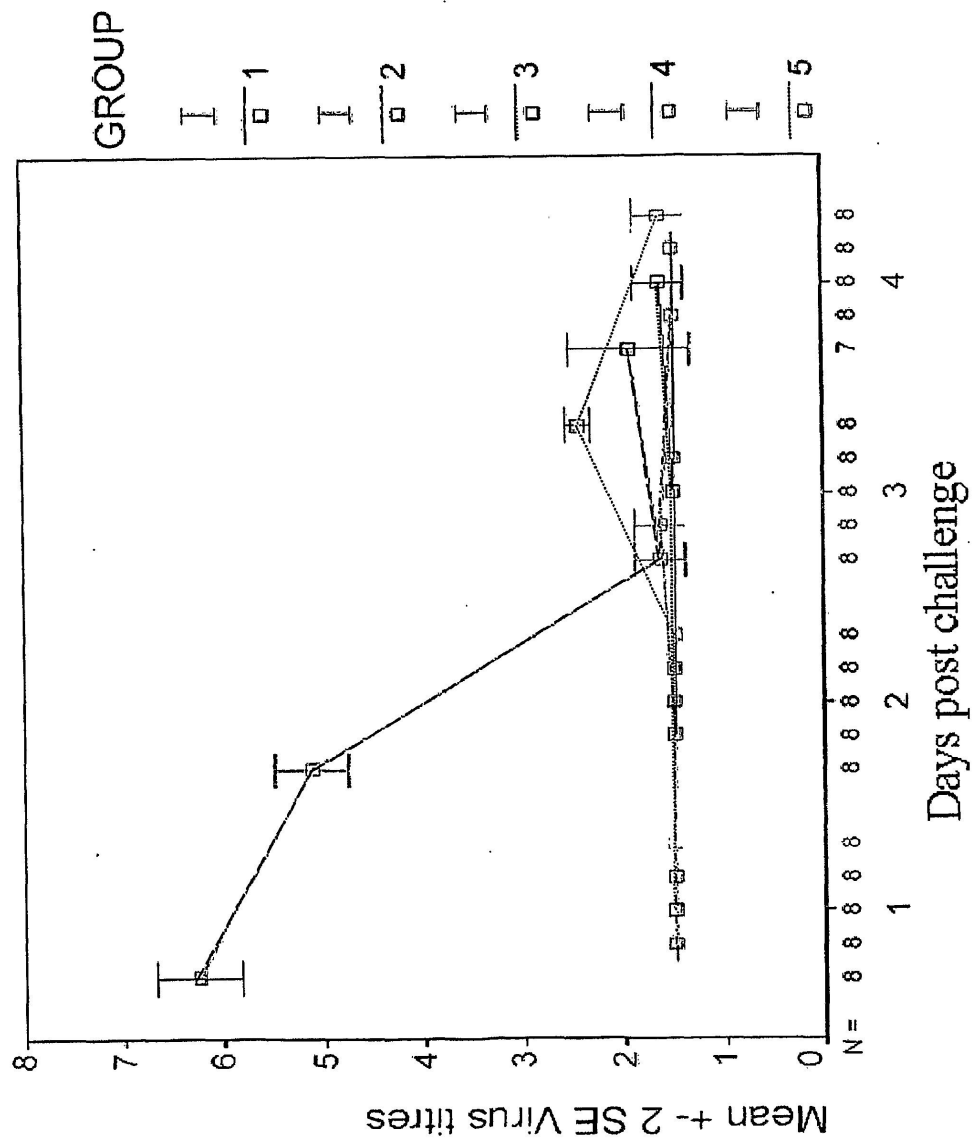
도면13



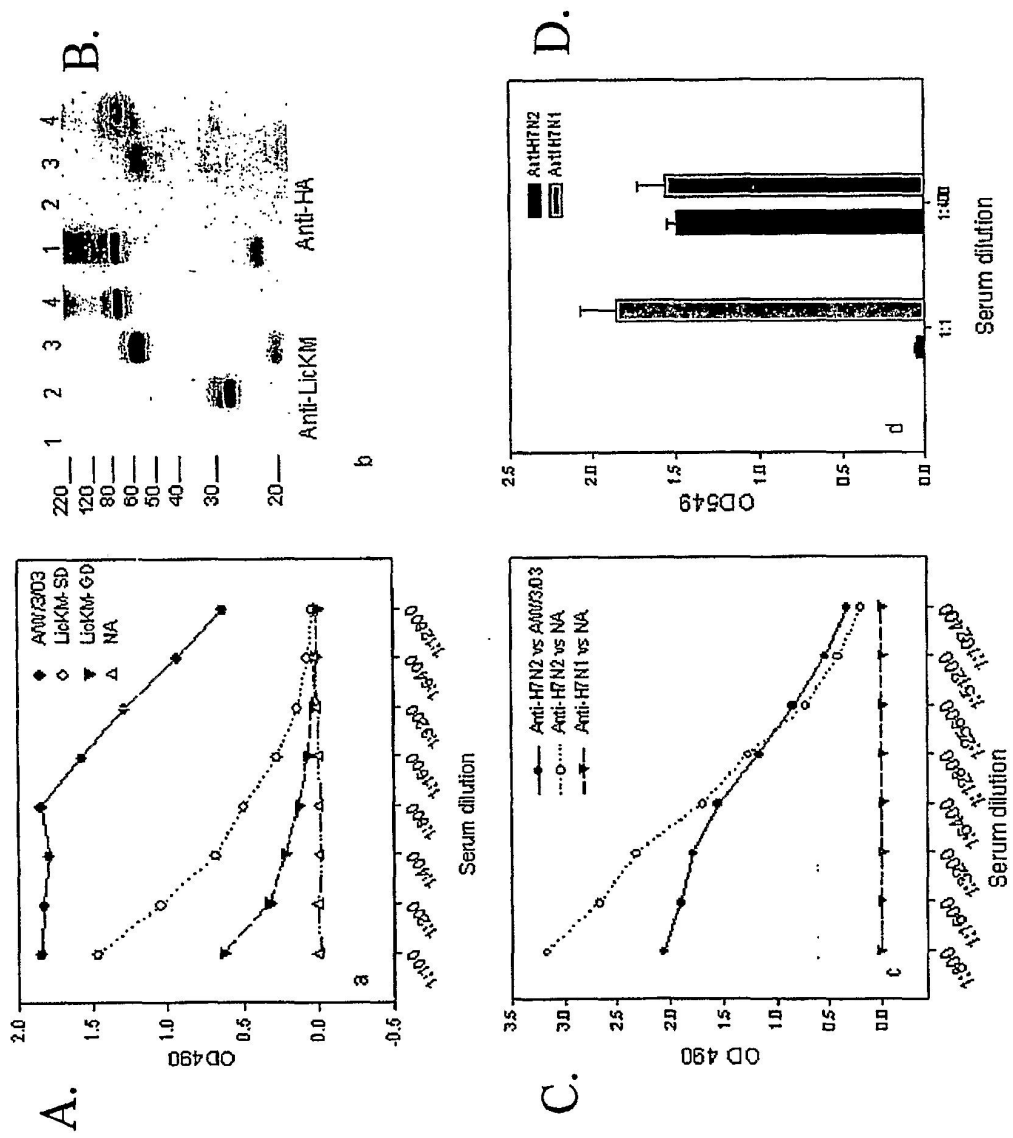
도면14



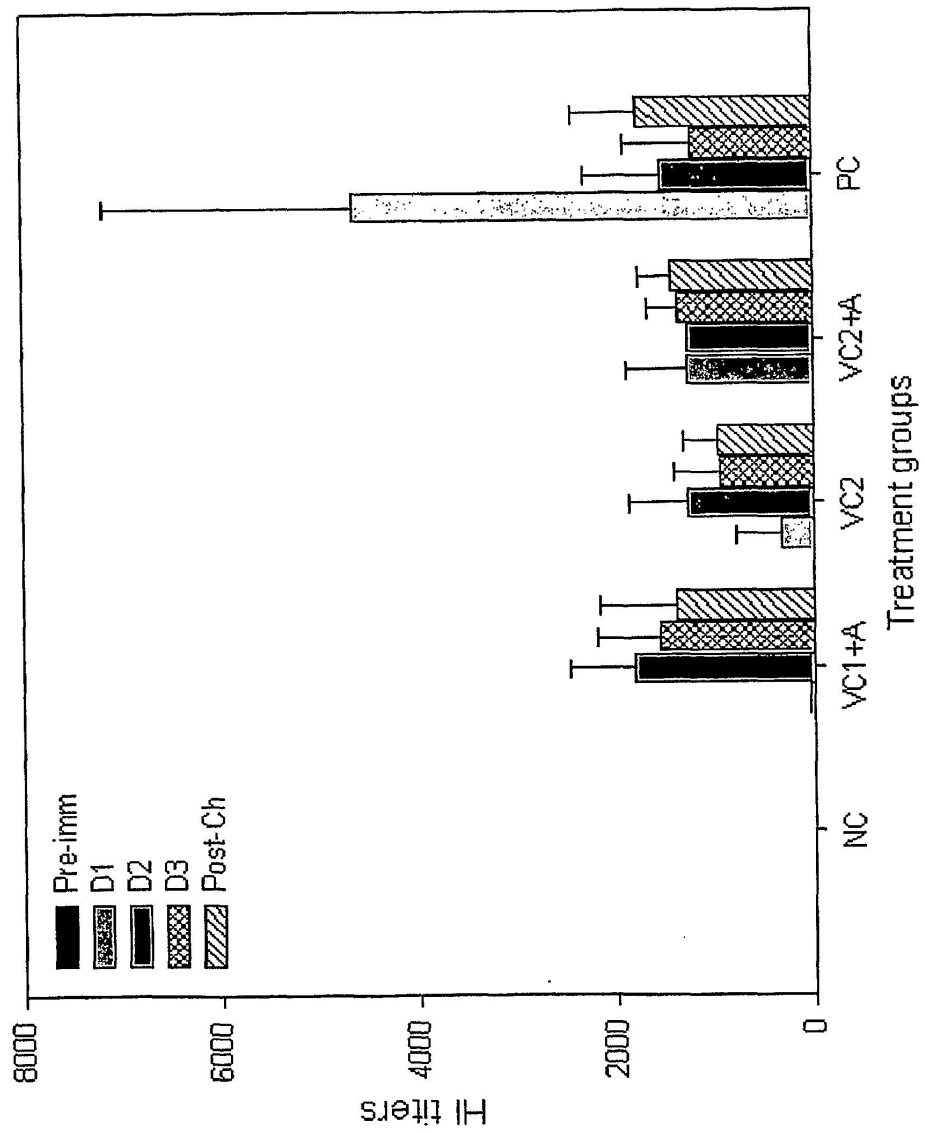
도면15



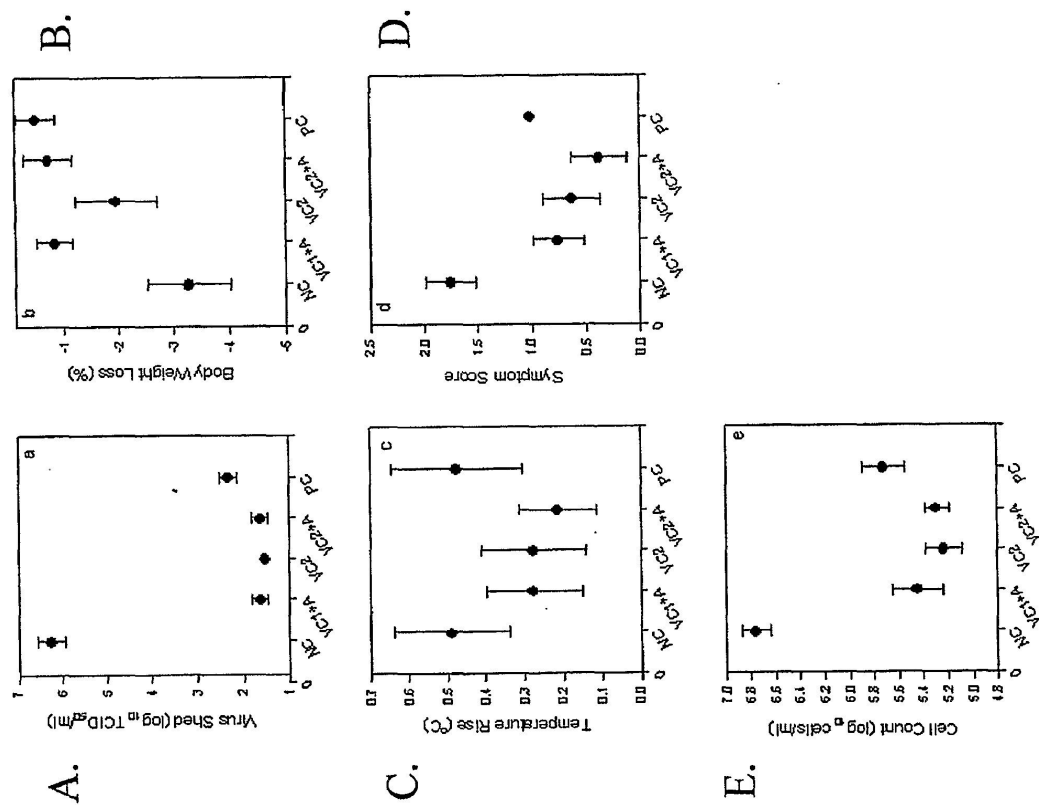
도면16



도면17



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Yusibov, et al.
- <120> Influenza Antigens, Vaccine Compositions, and Related Methods
- <130> 2002645-0113
- <140> 11/706573
- <141> 2007-02-13
- <160> 35
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 577
- <212> PRT
- <213> HA (HAV) Protein

<400> 1

Ala Lys Ala Gly Val Gln Ser Val Lys Met Glu Lys Ile Val Leu Leu
1 5 10 15

Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr
20 25 30

His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn
35 40 45

Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly
50 55 60

Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys
65 70 75 80

Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile
85 90 95

Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn
100 105 110

Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His
115 120 125

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys
130 135 140

Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys
145 150 155 160

Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile
165 170 175

Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr

180	185	190
Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp		
195	200	205
Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser		
210	215	220
Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr		
225	230	235
Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr		
245	250	255
Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe		
260	265	270
Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr		
275	280	285
Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln		
290	295	300
Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His		
305	310	315
Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu		
325	330	335
Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg		
340	345	350
Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly		
355	360	365
Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu		

370

375

380

Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile
385 390 395 400

Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr
405 410 415

Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile
420 425 430

Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr
435 440 445

Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp
450 455 460

Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln
465 470 475 480

Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr
485 490 495

His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr
500 505 510

Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile
515 520 525

Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile
530 535 540

Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Leu Met Val Ala Gly
545 550 555 560

Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys
565 570 575

Ile

<210> 2
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> NA (NAV) Protein

<400> 2

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
 1 5 10 15

Thr Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile
 20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile His Thr Gly Asn Gln His Gln Ser Glu Pro
 35 40 45

Ile Ser Asn Thr Asn Leu Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser Val Lys
 50 55 60

Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Asn Gly Trp Ala Val Tyr
 65 70 75 80

Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe Val
 85 90 95

Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr Phe
 100 105 110

Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr
 115 120 125

Val Lys Asp Arg Ser Pro His Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val Gly

130

135

140

Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser
145 150 155 160

Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile Ser
165 170 175

Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly Ile Ile
180 185 190

Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu
195 200 205

Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met Thr Asp
210 215 220

Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser His Lys Ile Phe Lys Met Glu Lys
225 230 235 240

Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr His Tyr
245 250 255

Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys Val Cys
260 265 270

Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe Asn Gln
275 280 285

Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe Gly Asp
290 295 300

Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Val Ser Ser
305 310 315 320

Asn Gly Ala Gly Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly Asn Gly
325 330 335

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
340 345 350

Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp Ser Ser Phe Ser
355 360 365

Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly
370 375 380

Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile Arg Pro
385 390 395 400

Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Ser Thr Ile
405 410 415

Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser Asp Thr
420 425 430

Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr Ile Asp
435 440 445

Lys

<210> 3
<211> 566
<212> PRT
<213> HA (HAW) Protein

<400> 3

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Gly Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Ala
130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Lys Arg Arg Ser Asn
145 150 155 160

Lys Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Lys Tyr Lys
165 170 175

Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys
180 185 190

Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Val Thr Asp Ser Asp Gln Ile
195 200 205

Ser Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg

210

215

220

Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Tyr Arg Pro Arg Val Arg
225 230 235 240

Asp Ile Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
245 250 255

Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
260 265 270

Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala
275 280 285

Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile
290 295 300

Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala
305 310 315 320

Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
325 330 335

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
355 360 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
370 375 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu
385 390 395 400

Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
405 410 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
435 440 445

Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
450 455 460

Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 4
<211> 469
<212> PRT
<213> NA (NAW) Protein

<400> 4

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr
1 5 10 15

Ile Ser Thr Ile Cys Phe Phe Met Gln Ile Ala Ile Leu Ile Thr Thr
20 25 30

Val Thr Leu His Phe Lys Gln Tyr Glu Phe Asn Ser Pro Pro Asn Asn
35 40 45

Gln Val Met Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu
50 55 60

Ile Val Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys
65 70 75 80

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

Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly
100 105 110

Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys
115 120 125

Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Val His
130 135 140

Ser Asn Asp Thr Val His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met
145 150 155 160

Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile
165 170 175

Ala Trp Ser Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val
180 185 190

Cys Val Thr Gly Asp Asp Glu Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn
195 200 205

Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Val Ser Trp Ser Lys Lys Ile Leu Arg
210 215 220

Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val
225 230 235 240

Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe
245 250 255

Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Thr Ser Thr Leu Ser Gly Ser Ala
260 265 270

Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg
275 280 285

Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp
290 295 300

Ile Asn Ile Lys Asp Tyr Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly
305 310 315 320

Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asn Asp Ser Ser Ser Ser His
325 330 335

Cys Leu Asp Pro Asn Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp
340 345 350

Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu
355 360 365

Lys Leu Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser
370 375 380

Asn Pro Asn Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Arg
385 390 395 400

Gly Asn Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser
405 410 415

Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Gln
420 425 430

Glu Thr Glu Val Leu Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly
435 440 445

Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile
450 455 460

Asn Leu Met Pro Ile
465

<210> 5
<211> 22
<212> PRT
<213> Influenza Hong Kong M2 Protein

<400> 5

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys
1 5 10 15

Asn Asp Ser Ser Asp Pro
20

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> H5N1 HA Signal Peptide

<400> 6

Ala Lys Ala Gly Val Gln Ser Val Lys Met Glu Lys Ile Val Leu Leu
1 5 10 15

Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
20 25

<210> 7

<211> 41

<212> PRT

<213> H5N1 HA domain 1-2

<400> 7

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu
35 40

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> H5N1 HA domain 2-1

<400> 8

Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro
1 5 10 15

Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val
20 25 30

Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln

35

40

45

Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
50 55 60

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
65 70 75 80

His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser
85 90 95

Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile
100 105 110

Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn
115 120 125

Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe
130 135 140

Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn
145 150 155 160

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp
165 170 175

Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly
180 185 190

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
195 200 205

Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu
210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Ile

<210> 9
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> H5N1 HA transmembrane domain

<400> 9

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Leu Met
 1 5 10 15

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
 20 25 30

Arg Ile Cys Ile
 35

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> H3N2 HA Signal Peptide

<400> 10

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ser
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> H3N2 HA domain 1-2

<400> 11

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
20 25 30

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
35 40 45

Gly Gly Ile
50

<210> 12
<211> 226
<212> PRT
<213> H3N2 HA domain 3

<400> 12

Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys Thr Leu Ile
1 5 10 15

Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln Asn Lys Lys
20 25 30

Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro
35 40 45

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser
50 55 60

Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Ala Gly Val Thr
65 70 75 80

Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Lys Arg Arg Ser Asn Lys Ser Phe
85 90 95

Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Lys Tyr Lys Tyr Pro Ala

100 105 110
 Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile
 115 120 125
 Trp Gly Val His His Pro Val Thr Asp Ser Asp Gln Ile Ser Leu Tyr
 130 135 140
 Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln
 145 150 155 160
 Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Tyr Arg Pro Arg Val Arg Asp Ile Ser
 165 170 175
 Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu
 180 185 190
 Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys
 195 200 205
 Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly
 210 215 220
 Lys Cys
 225

<210> 13
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> H3N2 HA domain 2-1

<400> 13

Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro
 1 5 10 15

Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val

20 25 30

Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu
35 40 45

Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn
50 55 60

Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn
65 70 75 80

Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala
85 90 95

Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Gly Lys Thr Asn
100 105 110

Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg
115 120 125

Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp
130 135 140

Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile
145 150 155 160

Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Arg Thr Lys Lys
165 170 175

Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile
180 185 190

Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr
195 200 205

Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln

210 215 220

Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu
225 230 235

<210> 14
<211> 34
<212> PRT
<213> H3N2 HA transmembrane domain

<400> 14

Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys Val Ala Leu Leu
1 5 10 15

Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile
20 25 30

Cys Ile

<210> 15
<211> 21
<212> PRT
<213> H5N1 NA anchor peptide

<400> 15

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
1 5 10 15

Thr Gly Ile Val Ser
20

<210> 16
<211> 428
<212> PRT
<213> H5N1 NA

<400> 16

Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile Trp Val Ser His Ser
1 5 10 15

Ile His Thr Gly Asn Gln His Gln Ser Glu Pro Ile Ser Asn Thr Asn
20 25 30

Leu Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser Val Lys Leu Ala Gly Asn Ser
35 40 45

Ser Leu Cys Pro Ile Asn Gly Trp Ala Val Tyr Ser Lys Asp Asn Ser
50 55 60

Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe
65 70 75 80

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

Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser
100 105 110

Pro His Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro
115 120 125

Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His
130 135 140

Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly
145 150 155 160

Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys
165 170 175

Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys

180	185	190
Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr	Val Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly	
195	200	205
Gln Ala Ser His Lys Ile Phe Lys Met Glu Lys Gly Lys Val Val Lys		
210	215	220
Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys		
225	230	235 240
Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His		
245	250	255
Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln		
260	265	270
Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn		
275	280	285
Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Val Ser Ser Asn Gly Ala Gly Gly		
290	295	300
Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg		
305	310	315 320
Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro		
325	330	335
Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp Ser Ser Phe Ser Val Lys Gln Asp Ile		
340	345	350
Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His		
355	360	365
Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu		

370

375

380

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

Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp
405 410 415

Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr Ile Asp Lys
420 425

<210> 17

<211> 37

<212> PRT

<213> H3N2 NA anchor peptide

<400> 17

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr
1 5 10 15

Ile Ser Thr Ile Cys Phe Phe Met Gln Ile Ala Ile Leu Ile Thr Thr
20 25 30

Val Thr Leu His Phe
35

<210> 18

<211> 432

<212> PRT

<213> H3N2 NA

<400> 18

Lys Gln Tyr Glu Phe Asn Ser Pro Pro Asn Asn Gln Val Met Leu Cys
1 5 10 15

Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu Ile Val Tyr Leu Thr

20 25 30

Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys Leu Ala Glu Tyr Arg
35 40 45

Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Asn Ile Thr Gly Phe Ala Pro Phe Ser
50 55 60

Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly Asp Ile Trp Val Thr
65 70 75 80

Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys Cys Tyr Gln Phe Ala
85 90 95

Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Val His Ser Asn Asp Thr Val
100 105 110

His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met Asn Glu Leu Gly Val
115 120 125

Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile Ala Trp Ser Ser Ser
130 135 140

Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val Cys Val Thr Gly Asp
145 150 155 160

Asp Glu Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn Gly Arg Leu Val Asp
165 170 175

Ser Ile Val Ser Trp Ser Lys Lys Ile Leu Arg Thr Gln Glu Ser Glu
180 185 190

Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val Met Thr Asp Gly Ser
195 200 205

Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe Ile Glu Glu Gly Lys

210

215

220

Ile Val His Thr Ser Thr Leu Ser Gly Ser Ala Gln His Val Glu Glu
225 230 235 240

Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg Cys Val Cys Arg Asp
245 250 255

Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp Ile Asn Ile Lys Asp
260 265 270

Tyr Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly Leu Val Gly Asp Thr
275 280 285

Pro Arg Lys Asn Asp Ser Ser Ser Ser His Cys Leu Asp Pro Asn
290 295 300

Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp Ala Phe Asp Asp Gly
305 310 315 320

Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu Lys Leu Arg Ser Gly
325 330 335

Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser Asn Pro Asn Ser Lys
340 345 350

Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Arg Gly Asn Arg Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser Cys Ile Asn Arg Cys
370 375 380

Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Gln Glu Thr Glu Val Leu
385 390 395 400

Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly Thr Ser Gly Thr Tyr
405 410 415

Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile Asn Leu Met Pro Ile
 420 425 430

<210> 19
 <211> 870
 <212> DNA
 <213> (SD domain 1-2) HA1-2V

<400> 19
 agatctgac aaatctgcat tggataccac gctaacaact ctactgagca agtggataca 60
 attatggaga agaactgtac tgttactcac gctcaggata ttcttgaaaa gactcacaac 120
 ggaaagtgg gaggaggaaa cactaagtgc cagactccaa tgggagctat taactcttct 180
 atgccattcc acaacattca cccacttact attggagagt gcccaaagta cgtgaagtct 240
 aacaggcttg tgcttgctac tggacttagg aattctccac aaagagagag gagaaggaag 300
 aagaggggac ttttcggagc tattgctgga ttcattgagg gaggatggca aggaatggtt 360
 gatggatggt acggatacca tcactctaata ggcagggat ctggatatgc tgctgataag 420
 gagtctactc agaaggctat tgatggagtg actaacaagg tgaactctat tattgataag 480
 atgaacactc agttcgaagc tgttggaagg gaggttcaaca atcttgagag gaggattgag 540
 aaccttaaca agaaaatgga ggatggattc ctgatgtgt ggacttaca cgtgagctt 600
 cttgtgctta tggagaacga gaggactctt gatttccacg attctaact gaagaacctt 660
 tacgacaaag tgaggcttca gcttagggat aacgctaagg agcttggaac cggttgcttc 720
 gaggttctacc acaagtgcga taatgagtgc atggagtctg ttaggaacgg aacttacgat 780
 taccacagt actctgagga agctagactt aagaggagg agatttctgg agtgaagttg 840

gagtctattg gtatctacca gattaagctt

870

<210> 20

<211> 283

<212> PRT

<213> (SD domain 1-2) HA1-2V

<400> 20

Asp	Gln	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Glu	Gln	Val
1			5						10					15	

Asp	Thr	Ile	Met	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ala	Gln	Asp	Ile
			20					25					30		

Leu	Glu	Lys	Thr	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
		35					40					45			

Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser	Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu
	50					55					60				

Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu
65					70					75				80	

Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser	Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys
				85					90					95	

Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln
		100						105					110		

Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly
		115					120					125			

Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly
	130					135					140				

Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

145	150	155	160
Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn			
	165	170	175
Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn			
	180	185	190
Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His			
	195	200	205
Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg			
	210	215	220
Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys			
	225	230	235
Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr			
	245	250	255
Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly			
	260	265	270
Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile			
	275	280	
<210> 21			
<211> 711			
<212> DNA			
<213> (GD domain 3) HA3V			
<400> 21			
agatcttgcg atcttgatgg agtgaagcca cttattctta gggattgctc tgttgctgga	60		
tggtctcttg gaaaccaat gtgcgatgag ttcattaacg tgccagagtg gtcttatatt	120		
gtggagaagg ctaaccagat gaacgatctt tgttaccag gagatttcaa cgattacgag	180		

gagcttaagc accttctttc taggattaac cacttcgaga agattcagat tattccaaag 240

tcactcttggc catctcacga ggcttctctt ggagtttctt ctgcttgccc ataccaggga 300

aagtcatctt tcttcaggaa cgttgtgtgg cttattaaga agaactctac ttaccaact 360

attaagaggt ctiacaacaa cactaaccag gaggatcttc ttgtgctttg gggaattcac 420

catccaaatg atgctgctga gcagactaag ttgtaccaga acccaactac ttacatttct 480

gtgggaactt ctactcttaa ccagaggctt gtccaagaa ttgctactag gtctaagggtg 540

aacggacaat ctggaaggat ggagttcttc tggactattc ttaagccaaa cgatgctatt 600

aacttcgagt ctaacggaaa cttcattgct ccagagtacg cttacaagat tgtgaagaag 660

ggagattcta ctattatgaa gtctgagctt gagtacggaa actgcaagct t 711

<210> 22

<211> 1699

<212> DNA

<213> (full-length) HAS-V

<400> 22

ggatccatta attaaaatgg gattcgtgct tttctctcag cttccttctt tccttcttgt 60

gtctactctt cttcttttcc ttgtgatttc tcactcttgc cgtgctgac aaatctgcat 120

tggataccac gctaacaact ctactgagca agtggataca attatggaga agaactgac 180

tggtactcac gctcaggata ttcttgaaaa gactcacaac ggaaagtgtg gcgacttga 240

tggagtgaag ccacttattc ttagggattg ctctgttgcg ggatggcttc ttggaaaccc 300

aatgtcgcat gatttcatta acgtgccaga gtggtcttat attgtggaga aggctaaccc 360

agttaatgat ctttctacc caggagattt caacgattac gaggagctta agcaccttct 420

ttctaggatt aaccacttcg agaagattca gattattcca aagtcattct ggtcatctca 480

cgagccttct cttggagttt cttctgcttg cccataccag ggaaagtcac ctttcttcag	540
gaacgttgtg tggcttatta agaagaactc tacttaccca actattaaga ggtcttacia	600
caacactaac caggaggatc ttcttgtgct ttggggaatt caccatccaa atgatgctgc	660
tgagcagact aagttgtacc agaaccaac tacttacatt tctgtgggaa cttctactct	720
taaccagagg cttgtgcca gaattgctac taggtctaag gtgaacggac aatctggaag	780
gatggagttc ttctggacta ttcttaagcc aaacgatgct attaacctcg agtctaacgg	840
aaacttcatt gctccagagt acgcttacia gattgtgaag aaggagatt ctactattat	900
gaagtctgag cttgagtacg gaaactgcaa cactaagtgc caaactccaa tgggagctat	960
taactcttct atgccattcc acaacattca cccacttact attggagagt gcccaaagta	1020
cgtgaagtct aacaggtctg tgcttgctac tggacttagg aattctccac aaagagagag	1080
gagaaggaag aagaggggac ttttcggagc tattgctgga ttcatgagg gaggatggca	1140
aggaatggtt gatggatggt acggatacca tcactctaata gagcagggat ctggatatgc	1200
tgctgataag gactctactc agaaggctat tgatggagtg actaacaagg tgaactctat	1260
tattgataag atgaacactc agttcgaagc tgttggaagg gattcaaca atcttgagag	1320
gaggattgag aaccttaaca agaaaatgga ggatggattc cttgatgtgt ggacttacia	1380
cgtgagctt cttgtgttga tggagaacga gaggactctt gatttccacg attctaactg	1440
gaagaacctt tacgacaaag tgaggcttca gcttagggat aacgctaagg agcttggaag	1500
cggttgcttc gatttctacc acaagtgcga taatgagtgc atggagtctg ttaggaacgg	1560
aacttacgat taccacagt actctgagga agctagactt aagagggagg agatttctgg	1620

agtgaagttg gagtctattg gtatctacca gattcaccat caccatcacc acaaggatga	1680
gctttgatga ctcgagctc	1699
<210> 23	
<211> 891	
<212> DNA	
<213> (SD domain 1-2) HA1-2W	
<400> 23	
agatctcaaa agttgccagg aaacgataac tctactgcta ctctttgcct tggacatcac	60
gctgttccaa acggaactat tgtgaaaact attactaacg atcagattga ggtgacaaac	120
gctactgagc ttgttcagtc atcttctact ggaggaattg gaggaggaaa ctctgagtgc	180
attacaccta atggatctat tccaaacgat aagccattcc agaacgtgaa caggattact	240
tatggagctt gcccaagata cgtgaagcag aacactctta agttggctac tggaatgagg	300
aatgtgccag agaagcagac taggggaatt ttcggagcta ttgctggatt cattgagaat	360
ggatgggagg gaatggttga tggatggtac ggattcaggc atcagaattc tgagggaact	420
ggacaagctg ctgatcttaa gtctactcag gctgctatta accagattaa cggaaagttg	480
aacaggctta ttggaagac taacgagaag ttccaccaga ttgagaagga gttctctgag	540
gttgagggaa ggattcagga tcttgagaag tacgtggagg atacaaagat tgatctttgg	600
tcttacaacg ctgagcttct tgttgctctt gagaaccagc acactattga tcttactgat	660
tctgagatga acaagttgtt cgagaggact aagaagcagc ttagggagaa cgctgaggat	720
atgggaaatg gatgcttcaa aatctaccac aagtgcgata acgcttgcat tgagtctatt	780
aggaacggaa cttacgatca cgatgtgtac cgtgatgagg ctcttaacaa caggttcag	840
attaaggag tggagcttaa gtctggatac aaggattgga ttcttaagct t	891

<210> 24
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> (SD domain 1-2) HA1-2

<400> 24

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
 20 25 30

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn
 50 55 60

Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro
 65 70 75 80

Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn
 85 90 95

Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 100 105 110

Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg
 115 120 125

His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr
 130 135 140

Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Gly

145 150 155 160

Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val
165 170 175

Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile
180 185 190

Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln
195 200 205

His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Arg
210 215 220

Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys
225 230 235 240

Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile Arg
245 250 255

Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn
260 265 270

Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp
275 280 285

Ile Leu
290

<210>	25
<211>	690
<212>	DNA
<213>	(GD domain 3) HA3W

<400> 25
agatcttgcg attctccaca ccagattctt gatggagaga actgcactct tattgatgct 60

cttcttggag atccacagtg cgatggattc cagaacaaga agtgggatct tttcgtggaa 120

aggtctaagg cttactctaa ctgctacceca tacgatgttc cagattacgc ttctcttagg 180

agtcttgtgg ctctctctgg aactcttgag ttcaacaacg agtctttcaa ctgggctgga 240

gttactcaga acggaacttc ttctgcttgt aagaggaggt ctaacaagtc ttctctctct 300

aggcttaact ggcttactca ccttaagtac aagtaccag ctcttaacgt gactatgcca 360

aacaacgaga agttcgataa gttgtacatt tggggagtgc accaccaggt tactgattct 420

gatcagattt ctctttacgc tcaggcttct ggaaggatta ctgtgtctac taagaggtct 480

cagcagactg tgattccaaa cattggatac cgtccaagag tgagggatat ttcttctagg 540

atttctatct actggactat tgtgaagcca ggagatattc ttcttattaa ctctactgga 600

aacctattg ctccaagggg atacttcaag attaggagtg gaaagtcac tattatgagg 660

agtgatgctc caattggaaa gtgcaagctt 690

<210> 26
 <211> 1699
 <212> DNA
 <213> (full length) HASW

<400> 26
 ggatccatta attaaaatgg gattcgtgct ttctctcag cttcttctt tccttctgt 60

gtctactctt ctcttttcc ttgtgatttc tctctctgc cgtgctcaa agttgccagg 120

aaacgataac tctactgcta ctctttgcct tggacatcac gctgttcaa acggaactat 180

tgtgaaaact attactaacg atcagattga ggtgacaaac gctactgagc ttgttcagtc 240

atcttctact ggaggaattt gcgattctcc acaccagatt cttgatggag agaactgcac 300

tcttattgat gctcttcttg gagatccaca gtgcgatgga ttccagaaca agaagtggga 360

tcttttcgtg gaaaggtcta aggcttactc taactgctac ccatacgaag ttccagatta	420
cgcttctctt aggagtcttg tggcttcttc tggaactctt gagttcaaca acgagtcctt	480
caactgggct ggagttactc agaacggaac tttctctgct tgtaagagga ggtctaacaa	540
gtctttcttc tctaggctta actggcttac tcaccttaag tacaagtacc cagctcttaa	600
cgtgactatg ccaacaacg agaagttcga taagtgtac atttggggag ttcaccaccc	660
agttactgat tctgatcaga tttctcttta cgctcaggct tctggaagga ttactgtgc	720
tactaagagg tctcagcaga ctgtgattcc aaacattgga taccgtcaa gagtgagga	780
tatttcttct aggatttcta tctactggac tattgtgaag ccaggagata tttctcttat	840
taactctact ggaaacctta ttgtccaag gggatacttc aagattagga gtggaaagtc	900
atctattatg aggagtgatg ctccaattgg aaagtgaac tctgagtga ttactccaaa	960
cggatctatt ccaaacgata agccattcca gaacgtgaac aggattactt atggagcttg	1020
ccaagatac gtgaagcaga acactcttaa gttggctact ggaatgagga atgtgccaga	1080
gaagcagact aggggaattt tccgagctat tgctggattc attgagaatg gatgggaggg	1140
aatggtgat ggatggtaac gattcaggca ccagaattca gagggaactg gacaagctgc	1200
tgatcttaag tctactcagg ctgctattaa ccagattaac ggaaagtga acaggcttat	1260
tggaaagact aacgagaagt tccaccagat tgagaaggag ttctctgagg ttgaggaag	1320
gattcaggat cttgagaagt acgtggagga tacaagatt gatctttgtt cttacaacgc	1380
tgagcttctt gttgctcttg agaaccagca cactattgat ttgactgatt ctgagatgaa	1440
caagtgttc gagaggacta agaagcagct tagggagaac gctgaggata tgggaaatgg	1500
atgcttcaaa atctaccaca agtgcgataa cgttgcatt gactctatta ggaacggaac	1560

ttacgatcac gatgtgtacc gtgatgaggc tcttaacaac aggttccaga ttaaggaggt	1620
ggagcttaag tctggatata aggattggat tcttcatcat caccaccacc acaaggatga	1680
gctttgatga ctcgagctc	1699
<210> 27	
<211> 1446	
<212> DNA	
<213> NAV (N1)	
<400> 27	
ggatccttaa ttaaaatggg attcgtgctt tctctcagc ttccttcttt ccttcttgtg	60
tctactcttc tcttttctt tgtgatttct cactcttgcc gtgctcaaaa tgtcgacctt	120
atgcttcaga ttggaaacat gatttctatt tgggtgtcac actctattca cactggaaac	180
cagcatcagt ctgagccaat ttctaacct aaccttttga ctgagaaggc tgttgcttct	240
gttaagttag ctggaaactc tctcttttgc cctattaacg gatgggctgt gtactctaag	300
gataactcta ttaggattgg atctaaggga gatgtgttcg tgattagga gccattcatt	360
tcttgctctc accttgagtg ccgtactttc ttccttactc aggttgctct tcttaacgat	420
aagcactcta acggaactgt gaaggatagg tctccacaca ggactcttat gtcttgtcca	480
gttgagaag ctccatctcc atacaactct agattcgagt ctgttgcttg gactgcttct	540
gcttgccatg atggaacttc atggcttact attggaattt ctggaccaga taacggagct	600
gttgctgtgc ttaagtacaa cggaattatt actgatacca tcaagtcttg gaggaacaac	660
attcttagga ctcaggagtc tgagtgtgct tgcgttaacg gatcttgctt cactgtgatg	720
actgatggac catctaattg acaggcttct cacaagattt tcaagatgga gaagggaag	780

gttgtgaagt ctgtggaact tgatgctcca aactaccatt acgaggagtg ttccttctat	840
ccagatgctg gagagattac ttgtgtgtgc cgtgataatt ggcatggatc taacaggcca	900
tgggtgtcat tcaatcagaa ccttgagtac cagattgggt acatttgctc tggagtgttc	960
ggagataatc caaggccaaa cgatggaact ggatcttggt gaccagtgtc atctaattga	1020
gctggaggag tgaagggtatt ctctttcaag tacggaaacg gagtttggat tggaggact	1080
aagtctacta actctaggag tggattcgag atgatttggg acccaaacgg atggactgag	1140
actgattctt ctttctctgt gaagcaggat attgtggcta ttactgattg gagtggatac	1200
tctggatctt tcgttcagca cccagagctt actggacttg attgcattag gccatgcttc	1260
tgggttgaac ttattagggg aaggccaaag gagtctacta tttggacttc tggatcttct	1320
atttctttct gcggagtga tttctgatact gtgggatggg cttggccaga tggagctgag	1380
cttcattca ctattgataa ggtcgacat catcatcatc accacaagga tgagctttga	1440
ctcgag	1446

<210> 28
 <211> 1458
 <212> DNA
 <213> NAW (N2)

<400> 28	
ggatccttaa ttaaaatggg attcgtgctt ttctctcagc ttcttcttt cttcttgtg	60
tctactcttc ttcttttct tgtgatttct cactcttgcc gtgctcaaaa tgtcgacaag	120
cagtacgagt tcaactctcc accaaacaac caggttatgc tttgcgagcc aactattatt	180
gagaggaaca ttactgagat tgtgtacctt actaacacta ctattgagaa ggagatttgc	240
ccaaagttag ctgagtaccg taattggtct aagccacagt gcaacattac tggattcgct	300

ccattctcta aggataactc aattaggctt tctgctggag gagatatttg ggttacaagg	360
gagccatacg ttctttgcga tccagataag tgcctaccagt tcgctcttgg acaaggaact	420
actcttaaca acgtgcactc taacgatact gtgcacgata ggactccata cgtactctt	480
ttgatgaacg agcttggagt tccattccac ctggaacta agcaagtgtg cattgcttgg	540
tcatcttcat ctggccacga tggaaaggct tggcttcatg tttgcgtgac tggagatgat	600
gagaacgcta ctgcttcttt catctacaac ggaaggcttg tggattctat tgtttcttgg	660
tctaagaaga ttcttaggac tcaggagtct gagtgtgtgt gcattaacgg aacttgact	720
gtggttatga ctgatggatc tgcctctgga aaggctgata caaagattct ttctattgag	780
gagggaaaga ttgtgcacac ttctactctt tctggatctg ctacagcatgt tgaggagtgt	840
tcttgcctacc caaggtatcc aggagttaga tgtgtgtgcc gtgataactg gaagggatct	900
aacaggccaa ttgtggatat taacattaag gattactcta ttgtgtcatc ttatgtgtgc	960
tctggacttg ttggagatac tccaaggaag aacgattctt cttcatcttc acactgcctt	1020
gatccaaata acgaggaggg aggacatgga gttaagggat gggctttcga tgatggaaac	1080
gatgtttgga tgggaaggac tatttctgag aagttgagga gcggatacga gactttcaaa	1140
gtgattgagg gatggtctaa cccaaattct aagctgcaga ttaacaggca agtgattgtg	1200
gataggggaa acaggagtgg atactctgga attttctctg tggagggaaa gtcttgcatt	1260
aacagatgct tctactgga gcttattagg ggaaggaagc aggagactga ggttttgttg	1320
acttctaact ctatttgtgt gtctctgcga acttctggaa cttacggaac tggatcttgg	1380
ccagatggag ctgatattaa ccttatgcca attgtcgacc atcatcacca tcaccacaag	1440

gatgagcttt gactcgag 1458

<210> 29
<211> 717
<212> DNA
<213> LicKM

<400> 29
ggatccttaa ttaaaatggg aggttcttat ccatataagt ctggtgagta tagaactaag 60

tctttctttg gatatggtta ttatgaagt aggatgaagg ctgcaaagaa cgttggaatt 120

gtttcttctt tctttactta tactggacca tctgataaca acctatggga tgagattgat 180

attgagtttc ttggaaagga tactactaag gttcaattca actggtataa gaatggtgtt 240

ggtggaaacg agtatcttca taaccttgga tttgatgctt ctcaagattt tcatacttat 300

ggttttgagt ggagaccaga ttatatgat ttttatgttg atggaaagaa ggtttataga 360

ggtactagaa acattccagt tactcctgga aagattatga tgaatctttg gccaggaatt 420

ggtgttgatg aatggcttgg tagatatgat ggaagaactc cacttcaagc tgagtatgag 480

tatgttaagt attatccaaa cggtagatct gaattcaagc ttgttggtta tactccattt 540

gttgctgttt tctctaactt tgattcttct caatgggaaa aggctgattg ggctaacggt 600

tctgttttta actgtgtttg gaagccatct caagttactt tttctaacgg aaagatgatt 660

cttacttttg atagagagta tgtcgacat catcatcatc atcattgact cgagctc 717

<210> 30
<211> 230
<212> PRT
<213> LicKM

<400> 30

Met Gly Gly Ser Tyr Pro Tyr Lys Ser Gly Glu Tyr Arg Thr Lys Ser

1					5					10					15				
Phe	Phe	Gly	Tyr	20	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Val	Arg	Met	Lys	Ala	Ala	Lys	Asn			
Val	Gly	Ile	Val	35	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Tyr	Thr	Gly	Pro	Ser	Asp	Asn			
Asn	Pro	Trp	Asp	50	Glu	Ile	Asp	Ile	Glu	Phe	Leu	Gly	Lys	Asp	Thr	Thr			
Lys	Val	Gln	Phe	65	Asn	Trp	Tyr	Lys	Asn	Gly	Val	Gly	Gly	Asn	Glu	Tyr			
Leu	His	Asn	Leu	85	Gly	Phe	Asp	Ala	Ser	Gln	Asp	Phe	His	Thr	Tyr	Gly			
Phe	Glu	Trp	Arg	100	Pro	Asp	Tyr	Ile	Asp	Phe	Tyr	Val	Asp	Gly	Lys	Lys			
Val	Tyr	Arg	Gly	115	Thr	Arg	Asn	Ile	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Lys	Ile	Met			
Met	Asn	Leu	Trp	130	Pro	Gly	Ile	Gly	Val	Asp	Glu	Trp	Leu	Gly	Arg	Tyr			
Asp	Gly	Arg	Thr	145	Pro	Leu	Gln	Ala	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Val	Lys	Tyr	Tyr			
Pro	Asn	Gly	Arg	165	Ser	Glu	Phe	Lys	Leu	Val	Val	Asn	Thr	Pro	Phe	Val			
Ala	Val	Phe	Ser	180	Asn	Phe	Asp	Ser	Ser	Gln	Trp	Glu	Lys	Ala	Asp	Trp			
Ala	Asn	Gly	Ser		Val	Phe	Asn	Cys	Val	Trp	Lys	Pro	Ser	Gln	Val	Thr			

195	200	205
Phe Ser Asn Gly Lys Met Ile Leu Thr Leu Asp Arg Glu Tyr Val Asp 210	215	220
His His His His His His 225	230	
<210> 31		
<211> 822		
<212> DNA		
<213> Engineered LickM		
<400> 31		
ggatccttaa ttaaaatggg atttgttctc ttttcacaat tgccttcatt tcttcttgc	60	
tctacacttc tcttattcct agtaatatcc cactcttgcc gtgccccaaa tggaggttct	120	
tatccatata agtctgggtga gtatagaact aagtctttct ttggatatgg ttattatgaa	180	
gttaggatga aggctgcaaa gaacgttgga attgtttctt ctttctttac ttatactgga	240	
ccatctgata acaacccatg ggatgagatt gatattgagt ttcttggaat ggataactact	300	
aaggttcaat tcaactggta taagaatggt gttggtggaa acgagtatct tcataacctt	360	
ggatttgatg ctctcaaga ttttcatact tatggttttg agtggagacc agattatatt	420	
gatttttatg ttgatggaaa gaaggtttat agaggtacta gaaacattcc agttactcct	480	
ggaaagatta tgatgaatct ttggccagga attggtgttg atgaatggct tggtagatat	540	
gatggaagaa ctccacttca agctgagtat gattatgtta agtattatcc aaacggtaga	600	
tctgaattca agcttgttgt taatactcca tttgttctg ttttctctaa ctttgattct	660	
tctcaatggg aaaaggtgga ttgggctaac ggttctgttt ttaactgtgt ttggaagcca	720	
tctcaagtta ctttttctaa cggaagatg attcttactt tggatagaga gtatgtcgac	780	

catcatcacc atcatcataa ggatgaactt tgactcgagc tc

822

<210> 32
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Engineered LickM

<400> 32

Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu Leu Val Ser
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg Ala Gln Asn
 20 25 30

Gly Gly Ser Tyr Pro Tyr Lys Ser Gly Glu Tyr Arg Thr Lys Ser Phe
 35 40 45

Phe Gly Tyr Gly Tyr Tyr Glu Val Arg Met Lys Ala Ala Lys Asn Val
 50 55 60

Gly Ile Val Ser Ser Phe Phe Thr Tyr Thr Gly Pro Ser Asp Asn Asn
 65 70 75 80

Pro Trp Asp Glu Ile Asp Ile Glu Phe Leu Gly Lys Asp Thr Thr Lys
 85 90 95

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Lys Asn Gly Val Gly Gly Asn Glu Tyr Leu
 100 105 110

His Asn Leu Gly Phe Asp Ala Ser Gln Asp Phe His Thr Tyr Gly Phe
 115 120 125

Glu Trp Arg Pro Asp Tyr Ile Asp Phe Tyr Val Asp Gly Lys Lys Val
 130 135 140

Tyr Arg Gly Thr Arg Asn Ile Pro Val Thr Pro Gly Lys Ile Met Met
145 150 155 160

Asn Leu Trp Pro Gly Ile Gly Val Asp Glu Trp Leu Gly Arg Tyr Asp
165 170 175

Gly Arg Thr Pro Leu Gln Ala Glu Tyr Glu Tyr Val Lys Tyr Tyr Pro
180 185 190

Asn Gly Arg Ser Glu Phe Lys Leu Val Val Asn Thr Pro Phe Val Ala
195 200 205

Val Phe Ser Asn Phe Asp Ser Ser Gln Trp Glu Lys Ala Asp Trp Ala
210 215 220

Asn Gly Ser Val Phe Asn Cys Val Trp Lys Pro Ser Gln Val Thr Phe
225 230 235 240

Ser Asn Gly Lys Met Ile Leu Thr Leu Asp Arg Glu Tyr Val Asp His
245 250 255

His His His His His Lys Asp Glu Leu
260 265

<210> 33
<211> 233
<212> PRT
<213> H5N1 HA domain 3

<400> 33

Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val
1 5 10 15

Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val
20 25 30

Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu

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

225

230

<210> 34
<211> 428
<212> PRT
<213> NAV

<400> 34

Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile Trp Val Ser His Ser
1 5 10 15

Ile His Thr Gly Asn Gln His Gln Ser Glu Pro Ile Ser Asn Thr Asn
20 25 30

Leu Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser Val Lys Leu Ala Gly Asn Ser
35 40 45

Ser Leu Cys Pro Ile Asn Gly Trp Ala Val Tyr Ser Lys Asp Asn Ser
50 55 60

Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe
65 70 75 80

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

Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser
100 105 110

Pro His Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro
115 120 125

Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His
130 135 140

Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly

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

Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His
355 360 365

Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu
370 375 380

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

Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp
405 410 415

Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr Ile Asp Lys
420 425

<210> 35
<211> 432
<212> PRT
<213> NAW

<400> 35

Lys Gln Tyr Glu Phe Asn Ser Pro Pro Asn Asn Gln Val Met Leu Cys
1 5 10 15

Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu Ile Val Tyr Leu Thr
20 25 30

Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys Leu Ala Glu Tyr Arg
35 40 45

Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Asn Ile Thr Gly Phe Ala Pro Phe Ser
50 55 60

Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly Asp Ile Trp Val Thr
65 70 75 80

Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys Cys Tyr Gln Phe Ala
85 90 95

Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Val His Ser Asn Asp Thr Val
100 105 110

His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met Asn Glu Leu Gly Val
115 120 125

Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile Ala Trp Ser Ser Ser
130 135 140

Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val Cys Val Thr Gly Asp
145 150 155 160

Asp Glu Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn Gly Arg Leu Val Asp
165 170 175

Ser Ile Val Ser Trp Ser Lys Lys Ile Leu Arg Thr Gln Glu Ser Glu
180 185 190

Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val Met Thr Asp Gly Ser
195 200 205

Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe Ile Glu Glu Gly Lys
210 215 220

Ile Val His Thr Ser Thr Leu Ser Gly Ser Ala Gln His Val Glu Glu
225 230 235 240

Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg Cys Val Cys Arg Asp
245 250 255

Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp Ile Asn Ile Lys Asp
260 265 270

Tyr Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly Leu Val Gly Asp Thr
275 280 285

Pro Arg Lys Asn Asp Ser Ser Ser Ser Ser His Cys Leu Asp Pro Asn
290 295 300

Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp Ala Phe Asp Asp Gly
305 310 315 320

Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu Lys Leu Arg Ser Gly
325 330 335

Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser Asn Pro Asn Ser Lys
340 345 350

Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Arg Gly Asn Arg Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser Cys Ile Asn Arg Cys
370 375 380

Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Gln Glu Thr Glu Val Leu
385 390 395 400

Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly Thr Ser Gly Thr Tyr
405 410 415

Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile Asn Leu Met Pro Ile
420 425 430