



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0035666
(43) 공개일자 2016년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0126841

(22) 출원일자 2014년09월23일

심사청구일자 2014년09월23일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

장준

서울 서대문구 연희로 38-20, 103동 1203호 (연희동, 대우아파트)

심상희

부산 해운대구 세실로 126, 105동 501호 (좌동, 건영2차아파트)

(74) 대리인

손민

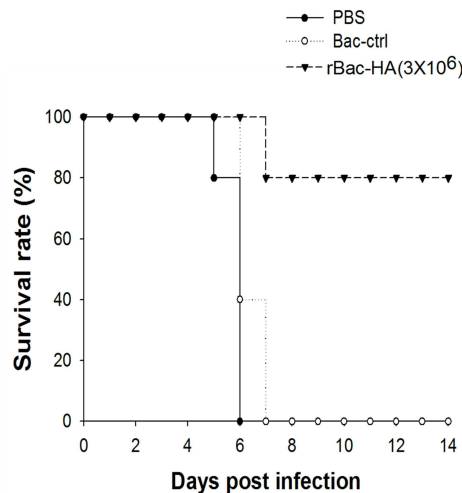
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **헤마글루티닌을 표면에 발현하는 배콜로바이러스 기반의 인플루엔자 바이러스 백신 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 헤마글루티닌 단백질이 배콜로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현된 재조합 배콜로바이러스 또는 그의 바이러스 입자를 유효성분으로 포함하는, 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 상기 백신 조성물의 제조방법에 관한 것으로서, 상기 백신 조성물은 체액성 면역반응 및 스톱 특이적 항체를 유도하여 동형 및 아형의 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 보호 효과를 가지므로 범용 백신으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도5b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A103001

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 신종인플루엔자 범부처사업단

연구과제명 재조합아데노바이러스 기반 차세대인플루엔자 백신 개발

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0826

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 감염병위기대응기술개발

연구과제명 면역백신기반기술개발센터

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2013.06.01 ~ 2015.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

헤마글루티닌 단백질이 배큘로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현된 재조합 배큘로바이러스 또는 그의 바이러스 입자를 유효성분으로 포함하는, 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 헤마글루티닌 단백질은 H1N1 바이러스 유래인 것인, 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 헤마글루티닌 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 정의되는 것인, 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 백신 조성물은 헤마글루티닌 단백질의 스탁(stalk) 도메인에 대한 항체를 유도하는 것인, 백신 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스는 H1N1 바이러스 또는 H5N1 바이러스인 것인, 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 백신 조성물은 설하 투여, 비강 투여 또는 근육 내 투여에 적합한 제형인 것인, 백신 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 백신 조성물은 1종 이상의 면역증강제를 추가로 포함하는 것인, 백신 조성물.

청구항 8

(a) 헤마글루티닌 단백질이 배큘로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현된 재조합 배큘로바이러스가 형질감염된 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 (a)단계의 배양물로부터 재조합 배콜로바이러스를 수득하는 단계를 포함하는, 제1항의 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 백신 조성물은 헤마글루티닌 단백질의 스톱(stalk) 도메인에 대한 항체를 유도하는 것인, 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스는 H1N1 바이러스 또는 H5N1 바이러스인 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 헤마글루티닌 단백질이 배콜로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현된 재조합 배콜로바이러스 또는 그의 바이러스 입자를 유효성분으로 포함하는, 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 상기 백신 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

2009년 4월에 북아메리카에서 발생한 21세기의 첫 번째 유행병인 돼지 근원 신종 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 (pH1N1)가 빠르게 확산되어 대중의 건강을 위협하였다. 세계 보건 기구(WHO)에 따르면, 상기 바이러스는 214개 이상의 국가에서 보고되었으며, 2010년 8월 1일까지 18449명 이상의 사망자를 발생하였다고 보고되었다. 인플루엔자 바이러스는 매년 발생하고, 유행병을 야기하는 주요 호흡기 병원균이다. 인플루엔자 바이러스는 오르토믹소바이러스(Orthomyxoviridae) 과에 속해 있고, 단일 가닥의 분절형 RNA 게놈을 가지고 있다. 인플루엔자 바이러스는 코어 단백질의 시퀀스에 기초하여 타입 A, B 및 C로 분류되고, 타입 B 및 C 바이러스는 주로 사람에게 감염되는 반면, 타입 A 바이러스는 다양한 포유류 동물 및 새에 감염된다. 오직 타입 A 및 B만이 사람의 질병을 야기한다. 인플루엔자 A 바이러스는 그의 헤마글루티닌(HA) 및 뉴라미니다아제(NA) 분자의 항원성에 기초하여 분류되는데, 18개의 다른 HA 서브타입과 11개의 다른 NA 서브타입으로 분류된다(WHO, 2013; CDC, 2014).

[0003]

인플루엔자 바이러스에 대한 백신 접종은 병원균의 확산을 막는 효과적인 방법이다. 그러나, 최근 허가받은 대부분의 인플루엔자 백신들은 부화 계란을 기반으로 제조되었다. 인플루엔자 백신의 생산에 계란을 사용하는 것은 잠재적인 문제, 예를 들어 대량의 수정된 계란의 필요성 및 계란 관련 알러지 반응의 위험성 등이 야기될 수 있다(McPherson, C. E., 2008). 또한, 부화 계란을 기반으로 한 백신을 생산하는데 보통 6 내지 8 개월이 소요된다는 문제도 있다.

[0004]

인플루엔자 바이러스의 확산이 가속화되는 것을 막기 위해, 계란을 기반으로한 인플루엔자 백신의 문제를 극복하는 새로운 전략이 제시되고 있다. 예를 들어, 세포 배양액에 기반한 인플루엔자 백신의 생산을 들 수 있다(Drugs, 2008, 68, 1483-1491). 또한, HA, NA, 핵단백질(NP) 및 막단백질(M)과 같은 주요한 바이러스 구조 단백질과 다양한 벡터 시스템을 이용한 재조합 백신 기술을 들 수 있다(PloS one, 2013, 8, e75460; Microbes and infection/Institut Pasteur, 2010, 12, 280-28; Vaccine, 2010, 28, 4771-4776).

[0005]

최근 배콜로바이러스 발현 시스템은 백신 전달의 플랫폼으로서 주목을 받았다. 배콜로바이러스 오토그라파 칼리포니아 핵다면체 바이러스(*Autographa California nucleopolyhedrosis virus*, AcNPV)는 이중 가닥의 DNA 바이

러스이고, 재조합 단백질의 대량 생산을 위해 매우 잘 연구된 배컬로바이러스이다. 백신 전달 툴로서 배컬로바이러스는 다음과 같은 장점을 가진다: (i) 포유류 세포에서 배컬로바이러스와 이의 복제본은 모두 세포 독성을 유도하지 않으므로, 부작용을 최소화한다; (ii) 크고 유연한 바이러스 게놈 때문에 다른 커다란 유전자의 삽입이 가능하다; (iii) 배컬로바이러스 발현 시스템은 원핵세포 시스템보다 포유류 세포에서 일어나는 번역 후 단백질 변형과정인 폴딩, 인산화, 글리코실화 및 단백질분해성 절단(proteolytic cleavage)을 가능하게 한다; (iv) 인간에서 기존 백신에 대해 존재하던 항체가 없다. 이와 같은 장점으로 인해, 배컬로바이러스는 유망한 백신 전달 도구로써 널리 사용되고 있다.

[0006]

항원으로서 기능하는 바이러스 외피의 당단백질인 인플루엔자 헤마글루티닌(HA)은 호스트 세포 수용체에 결합하여 바이러스 감염을 시작하게 한다. 그러므로 HA는 항체 중화를 유도하는 주요한 타겟이 되고, 현재 인플루엔자 백신의 가장 중요한 구성 요소 중 하나로 여겨지고 있다. HA는 동형 삼량체 분자이고, 각 단량체는 두 개의 이황화물 연결을 가진 서브유닛 HA1 및 HA2로 구성되어 있으며, 상기 서브유닛은 호스트 세린 프로테아제를 사용하여 단백질분해성 절단에 의해 생성된다. 구형의 헤드 도메인인 HA1은 호스트 세포 수용체에서 시알산 잔기의 말단에 결합하여 바이러스 도입의 시작에 중요한 역할을 한다. 바이러스가 세포 내로 들어간 후, 바이러스와 세포 멤브레인의 융합을 가능하게 하는 스톡(stalk) 도메인인 HA2의 입체 형태 변화를 엔도솜의 산성 환경이 촉진한다. HA1 및 HA2의 기능으로 인해 바이러스가 호스트 세포에 들어가서 바이러스 게놈을 세포질 내로 방출하도록 하여 감염의 진행을 야기한다.

[0007]

HA의 구형의 헤드 도메인에 위치한 특이적 항원 사이트에 대한 중화 항체가 대량 생성된다는 것이 잘 알려져 있다. 또한 최근 많은 연구를 통해 스톡 특이적 항체가 효과적으로 다양한 인플루엔자 바이러스의 서브타입을 중화시킬 수 있다는 것이 알려졌는데, 이는 스톡 도메인이 다양한 인플루엔자 바이러스에서 보존되어 있기 때문이다. 특히 HA 스톡 도메인은 그룹 1 사이, 그룹 2 사이 및 인플루엔자 B 바이러스 사이에 잘 보존되어 있다. 따라서, 스톡 특이적 항체는 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 유망한 치료제이지만, 스톡 부분은 막으로 가려져 있기 때문에 항체가 스톡 부분을 인지하도록 유도하는 것이 어렵다는 문제가 있다.

[0008]

또한, 선택적으로 스톡 특이적 항체 생산을 높이기 위해 많은 시도들이 있었고, 그 중 HA의 구형의 헤드와 다른 서브타입의 스톡 부분을 발현하는 키메라 HA를 이용하여 스톡 특이적 항체를 유도하려는 시도가 있었다(Journal of virology, 2013 87, 6542-6550). 그러나 상기 키메라 HA를 이용하여 스톡 특이적 항체를 유도하기 위해서는 세 종류의 키메라 HA를 만들어야 하며, 상기 키메라 HA를 세 번 접종해야 한다는 문제가 있다.

[0009]

이러한 배경하에, 본 발명자는 헤마글루티닌 전장(full-length) 단백질을 배컬로바이러스의 외피에 발현하는(displayed) 재조합 배컬로바이러스(rBac-HA) 백신을 개발하였고, 상기 백신이 체액성 면역반응 및 스톡 특이적 항체를 유도하고, 스톡 특이적 항체의 유도를 통하여 동형 및 아형의 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 우수한 보호 효과를 가져 범용 인플루엔자 바이러스 백신으로 사용될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명의 목적은 헤마글루티닌 단백질이 배컬로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현된 재조합 배컬로바이러스 또는 그의 바이러스 입자를 유효성분으로 포함하는, 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0011]

본 발명의 다른 목적은 (a) 헤마글루티닌 단백질이 배컬로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현된 재조합 배컬로바이러스가 형질감염된 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 배양물로부터 재조합 배컬로바이러스를 수득하는 단계를 포함하는, 상기 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 헤마글루티닌 단백질이 배컬로바이러스의 외피에 포함

된 형태로 발현되도록 형질전환된 재조합 배콜로바이러스 또는 그의 바이러스 입자를 유효성분으로 포함하는, 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 용어 "헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)"은 적혈구의 응집을 불러 일으키는 물질을 의미하며, 본 발명의 목적상 상기 헤마글루티닌은 배콜로바이러스에서 발현되어 인플루엔자 바이러스에 대한 면역력을 생성 또는 증강시키는 항원으로서 사용될 수 있다. 상기 헤마글루티닌은 구체적으로 H1N1 바이러스의 헤마글루티닌 전장 단백질, 이의 단편, 이의 아미노산 서열변이체 또는 이들이 다수 연결된 다량체 형태가 될 수 있지만, 구체적으로는 전장 단백질일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0014] 또한 상기 헤마글루티닌은 서열번호 2로 기재한 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 유사성을 갖는 서열로서 실질적으로 상기 헤마글루티닌과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0015] 본 발명의 용어 "아미노산 서열 변이체"란, 단백질의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 아미노산 서열 변이체는 헤마글루티닌 단백질의 아미노산 서열 변이체를 의미하며, 이러한 변이체는 상기 헤마글루티닌 단백질의 글리코실화된 형태, 리피드화된 형태, 항원 제시(presentation)를 증진시키고 항원의 항원 제시 세포에의 표적을 향상시키는 분자를 포함하도록 유도체화된 형태 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0016] 본 발명의 용어 "배콜로바이러스"란, 막대 모양의 뉴클레오캡시드 내에 130-200 kbp의 환형 이중나선 게놈 DNA를 포함하고, 주로 곤충 세포에 감염하여 치명적인 질병을 일으키는 바이러스를 의미하는데, 유전자 재조합 방법에 의하여 진핵세포 유래의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 진핵세포(예를 들어, 곤충세포)에 도입하여 상기 숙주세포에서 상기 단백질을 발현시키기 위한 일련의 실험을 수행하기 위한 유전자 벡터로서 사용되고 있다.

[0017] 본 발명에서 상기 재조합 배콜로바이러스는 배콜로바이러스의 게놈 DNA에 상기 헤마글루티닌 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하도록 삽입된 배콜로바이러스를 말한다. 상기 재조합 배콜로바이러스는 헤마글루티닌 단백질이 배콜로바이러스의 외피에 발현되는 것을 특징으로 한다. 통상적으로, 배콜로바이러스는 유전자 재조합 방법에 의하여 진핵세포 유래의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 진핵세포(예를 들어, 곤충세포)에 도입하여 상기 숙주세포에서 상기 단백질을 발현시키기 위한 일련의 실험을 수행하기 위한 유전자 벡터로서 사용되고 있으나, 본 발명에서는 그의 외피에 헤마글루티닌 단백질을 발현하여 백신 조성물의 유효성분으로 이용한다. 상기 본 발명의 재조합 배콜로바이러스는 그 자체 또는 그의 바이러스 입자를 인플루엔자 바이러스의 감염 예방 또는 치료용 백신의 유효성분으로서 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 "범용성 인플루엔자 바이러스 백신"이란, 재조합 배콜로바이러스 외피에 발현된 헤마글루티닌 단백질과 동일한 유래를 가지는 인플루엔자 바이러스뿐만 아니라 다른 종류의 인플루엔자 바이러스에 대해서도 면역 효과를 가지는 백신을 의미한다. 이는 기존의 헤마글루티닌을 이용한 백신의 경우 헤마글루티닌의 헤드 부분에 특이적인 항체가 유도되어 동형의 바이러스에 대한 면역 효과만을 가진 것에 반해, 본 발명에서 상기 헤마글루티닌은 배콜로바이러스의 외피에 발현되는 형태로 존재하여 다양한 인플루엔자에서 보존된 것으로 알려진, 헤마글루티닌의 스톱 부분에 특이적인 항체가 유도될 수 있기 때문이다. 따라서 본 발명의 백신 조성물은 다양한 인플루엔자 바이러스 서브타입에 대한 면역 효과를 보일 수 있는 스톱 특이적 항체를 유도하기 때문에 범용성 백신으로 사용될 수 있다는 장점이 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 헤마글루티닌 단백질이 H1N1 바이러스 유래인 경우 상기 백신 조성물은 H1N1 바이러스 또는 H5N1 바이러스에 대한 면역 효과를 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 재조합 배콜로바이러스 또는 그의 바이러스 입자는 백신으로 투여되어 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 질환에 대한 면역성을 유도할 수 있는데, 상기 재조합 배콜로바이러스 또는 그의 바이러스 입자는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 적절하게 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주

사제의 경우에는 주사제는 생리식염액 및 링겔액 등의 수성용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에틸 등) 및 알코올류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 분사제의 경우에는 적합한 분사제, 예컨대, 압축공기, 질소, 이산화탄소, 또는 탄화수소 기반 낮은 끓는점 용매 등을 사용하여 가압팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 제시체의 형태로 편리하게 전달될 수 있다.

[0020] 본 발명의 백신 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0021] 상기 백신 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 인체 또는 수의용으로 제형화되어 다양한 경로로 투여된다. 본 발명의 상기 백신 조성물은 비경구 경로, 예컨대 혈관 내, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내 또는 피하 등의 경로로 투여될 수 있고, 경구, 비강, 직장, 경피 또는 에어로졸을 통한 흡입 경로로 투여될 수도 있으며, 볼루스로 투여하거나 또는 서서히 주입할 수도 있으나, 구체적으로는 설하, 근육 내 또는 비강 경로로 투여될 수 있으며, 보다 구체적으로는 비강 경로이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란, 백신 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 치료될 장애, 장애의 중증도, 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 재조합 배클로바이러스 또는 그의 바이러스 입자의 제거 속도, 치료 지속 기간, 재조합 배클로바이러스 또는 그의 바이러스 입자와 조합되거나 또는 동시에 사용되는 약물, 대상체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태, 및 의학 업제 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다. "치료상 유효량" 결정시 고려되는 다양한 일반적인 사항들은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Gilman et al., eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990] 및 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990]에 기재되어 있다. 본 발명의 백신 조성물을 투여하는 경우, 1회 투여시 투여되는 수는 통상적으로 약 1×10^7 내지 1×10^{11} 개, 보다 구체적으로는 1×10^8 내지 5×10^{10} 개, 더욱 구체적으로는 5×10^8 내지 2×10^{10} 개의 범위이다.

[0024] 본 발명의 백신조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에서는, 웨스턴 블랏 분석을 통해 재조합 배클로바이러스(rBac-HA)의 외피에 HA 단백질 발현을 측정한 결과, rBac-HA로 형질전환된 Sf9-II 세포는 야생형 배클로바이러스(Bac-ctrl)로 형질전환된 세포 또는 형질전환되지 않은 세포에 비하여 형광강도가 증가하였다(도 1c). 이를 통해 rBac-HA가 발현되었고, rBac-HA의 표면에 HA가 발현되었음을 알 수 있었다.

[0026] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 재조합 배클로바이러스(rBac-HA)의 면역화 분석을 위해, 암컷 BALB/c 생쥐(5주)에 rBac-HA 및 대조군인 야생형 배클로바이러스(Bac-ctrl) 또는 PBS를 비강 내로 접종하였다. 그 후 면역화를 촉진하기 위해, 첫 번째 면역화 2주 후 같은 양의 배클로바이러스를 접종하였다(실시예 4-1). 그 결과, 2 번째 백신 접종(면역화 촉진) 후, HA 특이적 IgG 항체의 평균 역가는 rBac-HA로 면역시킨 그룹에서만 현저하게 증가하여, 본 발명의 rBac-HA 백신은 HA 특이적 IgG 항체를 유도할 수 있음을 알 수 있었고, 상기 백신을 2차례 접종하는 것이 1차례 접종하는 것보다 더 강한 항체를 생산할 수 있으며, 1×10^6 PFU 백신을 접종하면 3×10^6 PFU 백신 접종과 유사한 농도의 항체가 생산됨을 알 수 있었다(실시예 5-1).

[0027] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, rBac-HA가 스톱 특이적 항체를 유도할 수 있는지 확인하기 위해, 백신을 접종한 생쥐로부터 수득한 혈청과 정제한 HA 스톱 단백질(A/Korea/1/09 (H1N1)) 및 재조합 키메라 H9/1 단백질의 반응성을 ELISA를 통해 측정하였다(도 2c 및 2d). 그 결과 rBac-HA로 면역시킨 생쥐 그룹에서 2 번째 접종(면역

화 촉진) 후 스톱 특이적 항체 반응이 강하게 일어남을 확인하였다. 또한, 강한 HA 스톱 항체 반응을 가진, HA를 표면에 발현하는 아데노바이러스 기반 백신을 접종한 생쥐의 혈청을 양성 대조군으로 사용한 결과(도 2d), HA 스톱 도메인에 대한 IgG 역가를 확인할 수 없었다. 이를 통해 HA 스톱 도메인에 대한 항체 유도에 아데노바이러스 기반 백신보다 본 발명의 배큘로바이러스 기반 rBac-HA 백신이 현저한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0028] 결론적으로, 본 발명의 rBac-HA 백신을 접종하면 HA 스톱 도메인에 대한 항체가 생산되며, 상기 항체는 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 교차 방어능을 가지므로, 본 발명의 rBac-HA 백신은 범용성 백신으로 사용될 수 있음을 알 수 있었고, 또한 아데노바이러스 기반 백신보다 HA 스톱 도메인에 대한 항체 유도에 현저한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0029] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 점막의 면역반응에서 중요한 역할을 하는 IgA의 유도와 관련하여 rBac-HA의 효능을 측정하기 위해, 바이러스 감염 5일째에 기관지폐포세척(BAL) 액체를 모았고 ELISA를 수행하였다. 그 결과, 생쥐의 rBac-HA 면역 그룹은 점막의 HA 특이적 IgA 반응이 유도된 반면, Bac-ctrl 및 PBS 그룹은 IgA가 측정되지 않았다(도 2e). 이를 통해 HA 특이적 체액성 면역반응이 rBac-HA의 비강 내 투여를 통해 효과적으로 유도됨을 알 수 있었다.

[0030] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 적혈구응집반응을 억제하는(hemagglutination-inhibiting, HAI) 항체의 역가가 높으면 인플루엔자 바이러스 감염을 억제할 수 있으므로, 상기 HAI 항체를 측정된 결과, 2번째 접종 2주 후, rBac-HA를 접종한 생쥐 혈청은 각각 평균 $1:640(3 \times 10^6 \text{ PFU})$ 및 $1:160(1 \times 10^6 \text{ PFU})$ 의 HAI 항체 역가를 보였고, Bac-ctrl 및 PBS 그룹의 HAI 항체 역가는 측정되지 않았다(도 3). 이를 통해 본 발명의 rBac-HA 백신은 2차 접종 후 생산된 HAI 항체로 인해, 동형 바이러스 감염에 대한 높은 방어능을 가짐을 알 수 있었다.

[0031] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, rBac-HA 접종에 의해 인플루엔자 바이러스 감염으로부터 생쥐를 보호할 수 있는지 확인하기 위해, 마지막 접종 3주 후 A/California/04/09 바이러스 10 LD50로 백신을 접종한 생쥐 및 대조군 생쥐를 감염시켰다. 5일 후 생쥐의 폐에서 바이러스 역가를 측정하였고, 감염된 생쥐의 생존율을 측정하였다. 그 결과, rBac-HA를 접종한 생쥐는 폐에서 바이러스가 측정되지 않았다($<10 \text{ PFU/ml}$). 반면, Bac-ctrl 또는 PBS를 접종한 생쥐는 폐에서 바이러스 역가가 높게 측정되었다($\sim 1 \times 10^6 \text{ PFU/ml}$)(도 4a). 또한, Bac-ctrl 또는 PBS를 접종한 생쥐는 각각 0% 및 20%의 생존율을 보였지만, rBac-HA를 접종한 생쥐들은 체중 감소없이 모두 생존하였다(도 4b 및 4c). 이를 통해, 비강 내 접종된 rBac-HA 백신은 치명적인 동형 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 완벽한 보호 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0032] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, rBac-HA 접종에 의해, 그룹 1 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 교차 방어 가능성이 확인하기 위해, 면역화된 생쥐를 H5N1(A/Vietnam/1203/04) 인플루엔자 바이러스의 5 LD50으로 감염시켰다. 그 결과, rBac-HA를 접종한 생쥐는 상기 바이러스 감염 후 6일까지 15% 이하의 체중 감소를 보였지만, 체중 감소는 빠르게 회복되어 결국 감염 전 수준으로 회복되었다. 또한 rBac-HA를 접종한 생쥐는 80%의 생존율을 보였다. 그러나 Bac-ctrl 또는 PBS를 처리한 대조군 생쥐는 심각한 체중 감소를 보였고, 바이러스 감염 후 한 마리도 살아남지 못했다(도 5a 및 5b). 이를 통해, 비강 내 접종된 rBac-HA 백신은 동형 바이러스 감염뿐만 아니라 아형 인플루엔자 바이러스 감염에 대해서도 보호 효과를 가지며, 상기 백신에 의해 유도된 HA 스톱 특이적 항체는 교차 방어능을 가짐을 알 수 있었다.

[0033] 본 발명의 다른 하나의 양태는 (a) 헤마글루티닌 단백질이 배큘로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현된 재조합 배큘로바이러스가 형질감염된 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 배양물로부터 재조합 배큘로바이러스를 수득하는 단계를 포함하는, 상기 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0034] 상기 "헤마글루티닌", "배큘로바이러스", "재조합 배큘로바이러스" 및 "범용성 인플루엔자 바이러스 백신"은 전술한 바와 같다.

[0035] 본 발명에서 용어, "형질감염"은 유전자를 숙주로 도입하여 유전자가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 유전자를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다. 본 발명의 형질감염 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 재조합 배큘로바이러스를 공지의 방법으로 Sf9 세포에 형질감염시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는, HA를 표면에 발현하는 재조합 배큘로바이러스(rBac-HA)를 제조하기 위해, 국제백신

연구소에서 제조된 A/California/04/09(pH1N1)의 헤마글루티닌(HA) 전체 유전자를 PCR을 통해 증폭하여 T easy 벡터에 삽입한 후, 단백질의 강한 발현을 가져오는 오토그라파 칼리포니아 뉴클레오폴리헤드로시스 바이러스 (Autographa California nucleopolyhedrosis virus, AcNPV) 폴리헤드린 프로모터(pPH)에 HA를 코딩하는 염기서열을 연결되도록 pFast Bac 듀얼 벡터의 Sal I 및 Not I 사이트에 도입하였다(도 1a). Bac-to-Bac system(Invitrogen)의 프로토콜을 따라 특이적인 전위 사이트(transposition sites)를 통해 DH10Bac™ (Invitrogen, USA)의 배칼로바이러스 게놈에 상기 발현 카세트를 삽입하였다. 재조합 bacmid를 Sf9 세포에 형질감염하였다.

[0037] 본 발명의 용어 "배양물"은 상기 형질감염 세포를 공지된 미생물 배양방법에 따라 배양한 다음 수득한 산물을 의미한다. 상기 배양물은 배양상등액 또는 세포 파쇄액을 모두 포함하며 세포가 포함 또는 불포함될 수 있다.

[0038] 본 발명의 용어 "수득하는 단계"는 상기 배양물로부터 재조합 배칼로바이러스를 분리하는 단계를 의미하는 것으로, 당업계에 공지된 방법으로 상기 배양물에서 재조합 배칼로바이러스를 분리할 수 있다. 구체적으로 상기 배양물로부터 당 농도 구배를 이용한 원심분리를 통해 재조합 배칼로바이러스를 분리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는, 재조합 배칼로바이러스가 형질전환된 Sf9 세포를 28 °C에서 약 96시간 동안 배양하였고, 70-80% 이상의 생존능을 보일 때 수확하였다. 마지막 상청액을 모으고 수크로오스 쿠션 원심분리를 통해 (5mM NaCl 내 25% w/w 수크로오스, PBS 내 10mM EDTA) 초원심분리기를 이용하여(4°C에서 75분 동안 24000rpm) 농축하였다. 농축 후, 바이러스를 세척하기 위해 인산완충용액(PBS, pH6.2)에 재부유시킨 후 다시 원심분리하였다(4°C에서 150분 동안 27000rpm). 그 뒤에 펠릿을 0.25M 수크로오스에 재부유하고 바이러스 스타크를 LN₂ 탱크에 저장하였다. 정제된 재조합 배칼로바이러스를 Sf9 세포로 플라크법을 통해 프로토콜에 따라서 적정하였다 (Invitrogen, No.10359).

[0040] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 인플루엔자 바이러스의 감염이 예상되거나 또는 인플루엔자 바이러스의 감염으로 인한 질환이 발병된 개체에게 상기 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 감염으로 인한 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0041] 본 발명의 용어 "개체"란, 인플루엔자 바이러스가 감염될 수 있고, 감염된 인플루엔자 바이러스로 인하여 호흡기 질환이 발병할 수 있는 살아있는 유기체를 의미하는데, 구체적으로는 호흡기 질환이 발병할 수 있다는 특성상 호흡기관을 포함하는 고등 척추동물이 될 수 있고, 더욱 구체적으로는 포유동물이 될 수 있으며, 더욱더 구체적으로는 영장류가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0042] 본 발명의 용어 "인플루엔자 바이러스의 감염에 의해 발병되는 질환"이란, 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 유발되는 호흡기성 질환을 의미하는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 기침, 재채기, 고열, 천명, 기관지염, 세기관지염, 폐렴, 천식, 크룹 및 호흡기 부전 등이 될 수 있다.

[0043] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명의 백신 조성물의 투여로 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 질환 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 백신 조성물의 투여로 인해 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 헤마글루티닌 단백질이 배칼로바이러스의 외피에 포함된 형태로 발현되도록 형질전환된 재조합 배칼로바이러스 또는 그의 바이러스 입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물은 체액성 면역반응 및 스톱 특이적 항체를 유도하여 동형 및 아형의 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 보호 효과를 가지므로 범용 백신으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046]

도 1a 내지 1c는 재조합 배큘로바이러스(rBac-HA)의 구조 및 특성을 나타낸 도이다.

도 1a는 폴리헤드린(PH) 프로모터의 조절 하에 A/California/04/09 유래 pH1N1 HA 유전자를 암호화하도록 설계된 pFastBac 듀얼 벡터를 나타낸 도이다.

도 1b는 정제된 바이러스 입자의 재조합 HA 단백질의 존재를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다. 3×10^6 PFU의 바이러스 입자를 각 레인에 로딩하였다.

도 1c는 배큘로바이러스 표면에 발현된 HA 단백질의 발현 수준을 유세포 분석을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다. Sf9 세포를 10 MOI의 rBac-HA 또는 Bac-ctrl로 형질전환시켰다. 형질전환 48시간 후, 표면에서의 HA 발현을 측정하기 위해 세포를 HA 특이적 pAb로 분석하였다. 형질전환되지 않은 세포를 음성 대조군으로 사용하였다(과선: 형질전환되지 않은 세포, 점선: Bac-ctrl, 실선: rBac-HA).

도 2a 내지 2e는 비강 내 접종된 rBac-HA에 의해 유도된 체액성 면역반응을 나타낸 도이다. 3×10^6 PFU 또는 1×10^6 PFU의 재조합 배큘로바이러스(rBac-HA)를 Balb/c 생쥐($n=4$ /그룹) 비강 내 접종하여, 0일 및 16일에 생쥐를 두 번 면역시켰다. 두 번째 백신 접종 3주 후 모든 생쥐로부터 혈청을 수득하였다. 대조군 생쥐에는 비강 내로 3×10^6 PFU의 야생형 배큘로바이러스(Bac-ctrl, bacimid)를 접종하였고, PBS를 접종한 그룹의 생쥐를 음성 대조군으로 사용하였다.

도 2a는 백신 접종 및 바이러스 감염 기간을 나타낸 도이다.

도 2b는 첫 번째 백신 접종 및 두 번째 백신 접종(면역 촉진)한 생쥐의 혈청에서 ELISA를 통해 측정된 HA 특이적 IgG 항체 역가를 나타낸 도이다.

도 2c는 A/Korea/1/09(H1N1) 스톡 단백질을 사용하여 ELISA를 통해 측정된 두 번째 백신 접종(면역 촉진)한 생쥐 혈청의 HA 특이적 IgG 항체 역가를 나타낸 도이다.

도 2d는 재조합 키메라 H9/1 단백질을 사용하여 ELISA를 통해 측정된 두 번째 백신 접종(면역 촉진)한 생쥐 혈청의 HA 특이적 IgG 항체 역가를 나타낸 도이다. HA를 표면에 발현하는 아데노바이러스 기반 백신을 접종한 생쥐의 혈청을 양성 대조군으로 사용하였다.

도 2e는 인플루엔자 A/California/04/09 감염 5일 후 BAL 액체에서 ELISA를 통해 측정된 점막에 존재하는 HA 특이적 IgA를 나타낸 도이다. 결과를 $\log_2$ (마지막 지점 값)으로 나타내었다.

도 3은 rBac-HA에 의해 유도된 적혈구응집반응을 억제하는(hemagglutination-inhibiting, HAI) 항체의 동형 A/California/04/09 바이러스에 대한 역가를 나타낸 도이다(음성 대조군: Bac-ctrl(3×10^6 PFU) 또는 인산완충용액(PBS)을 접종한 생쥐). 38일째에 2차 접종한 생쥐 혈청에서 측정된 단일 값을 그래프에 나타내었다.

도 4a 내지 4c는 rBac-HA의 비강 내 백신 접종을 통한 동형 A/California/04/09 바이러스 감염에 대한 보호를 나타낸 도이다. Balb/c 생쥐($n=4$ /그룹)에게 0일 및 16일째에 비강을 통해 rBac-HA를 접종하였다. 대조군 생쥐는 Bac-대조군으로 면역시켰다. 각 그룹의 생쥐를 비강을 통해 10 LD50의 A/California/04/09 바이러스로 감염시켰다.

도 4a는 감염 5일째에 생쥐의 폐에서 MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포로 표준 플라크법(standard plaque assay)을 통해 측정된 바이러스 역가를 나타낸 도이다. $\log_{10}$ (그룹 당 4마리 생쥐) 값으로 그래프를 나타내었다.

도 4b는 14일 동안 감염된 생쥐의 체중 감소를 측정한 결과를 나타낸 도이다. 실험 시작시 체중을 기준으로 퍼센트 값으로 나타내었다.

도 4c는 생쥐의 생존을 14일 동안 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 5a 내지 5b는 rBac-HA에 비강 내 백신 접종을 통한 야형 H5N1(A/Vietnam/1203/04) 바이러스 감염에 대한 보호 효과를 나타낸 도이다. 생쥐($n=5$ /그룹)에게 0일 및 16일에 비강을 통해 두 번 백신을 접종한 후, 각 그룹의 생쥐를 비강을 통해 5 LD50의 H5N1(A/Vietnam/1203/04)바이러스로 감염시켰다.

도 5a는 14일 동안 감염된 생쥐의 체중 감소를 측정한 결과를 나타낸 도이다. 실험 시작시 체중을 기준으로 퍼센트 값으로 나타내었다.

도 5b는 생쥐의 생존을 14일 동안 측정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 실시예 1. 재료

[0049] 실시예 1-1. 세포 및 바이러스

[0050] 스포도프테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*, Sf9) 세포를 SF-900II 무혈청 배지(Gibco)에서 28 °C로 배양하였고, 인간 배아 신장 293 세포(HEK 293)를 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)(Life Technologies, Gaithersburg, MD)에서 10% 소태아혈청을 첨가하여 배양하였다. 또한 Madin-Darby 개 신장 세포(MDCK)를 minimal essential medium(MEM)에서 10% 소태아혈청을 첨가하여 배양하였다.

[0051] 인플루엔자 A/California/04/09 바이러스(pH1N1; mouse adapted) 및 A/Vietnam/1203/04-PR8/CDC-RG의 약화된 바이러스(H5N1; mouse adapted)는 국제 백신 연구소(서울, 한국)로부터 얻었다. A/Vietnam/1203/04-PR8/CDC-RG의 약화된 바이러스는 고도 성장이 가능한 균주인 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)의 유전 정보를 이용하여 HA 유전자를 가지고 있는 A/Vietnam/1203/04(H5N1) 유래의 유일한 재조합 바이러스이다.

[0052] 실시예 1-2. 생쥐

[0053] 5주된 암컷 BALB/c 생쥐를 Charles River Laboratories Inc.(Yokohama, Japan)에서 구매하여, 이화여자대학교 실험 설비의 무병 조건에서 키웠다. 모든 생쥐 실험은 IACUC(Approval No. 2010-9-4)에서 승인받은 가이드라인을 따라 수행하였다.

[0054] 실시예 2. 재조합 배큘로바이러스(rBac-HA) 제조

[0055] 실시예 2-1. 재조합 배큘로바이러스(rBac-HA)의 설계 및 생산

[0056] 재조합 배큘로바이러스를 사용한 면역화의 효능을 측정하기 위해, 단백질의 강한 발현을 가져오는 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터의 조절 하에, A/California/04/09의 전장 헤마글루티닌(HA) 단백질(서열번호 2)를 코딩하는 재조합 배큘로바이러스(rBac-HA)를 제작하였다.

[0057] 먼저, A/California/04/09(pH1N1)의 헤마글루티닌(HA) 전체 유전자(서열번호 1)는 pUC57 벡터를 사용하여 국제 백신연구소에서 제조되었고, HA 유전자를 하기의 프라이머 세트로 PCR을 통해 증폭시켰다(밑줄은 제한효소 절단 부위이다).

[0058] HA 포워드 Sal I: 5' GGG TCG ACG CCA CCA TGA AGG CAA TAC TA 3'(서열번호 3)

[0059] HA 리버스 NotI: 5' GGG CGG CCG CTT AAA TAC ATA TTC TA 3'(서열번호 4)

[0060] 증폭된 HA 유전자를 T easy 벡터에 삽입한 후, HA를 코딩하는 염기서열을 단백질의 강한 발현을 가져오는 오토그라파 칼리포니아 뉴클레오폴리헤드로시스 바이러스(Autographa California nucleopolyhedrosis virus, AcNPV) 폴리헤드린 프로모터(pPH)에 연결되도록 pFast Bac 듀얼 벡터의 Sal I 및 Not I 사이트에 도입하였다(도

1a). Bac-to-Bac system(Invitrogen)의 프로토콜을 따라 특이적인 전위 사이트(transposition sites)를 통해 DH10BacTM(Invitrogen, USA)의 배컬로바이러스 게놈에 상기 발현 카세트를 삽입하였다.

[0061]

제조합 bacmid를 Sf9 세포에 형질감염하였고, 형질감염 후 96시간 경과 뒤 상청액에 포함된, HA를 표면에 발현하는 제조합 배컬로바이러스(rBac-HA)를 수확하였다. 제조합 바이러스를 플라크 분리(plaque isolation)를 통해 선별하였고, 일반적인 프로토콜에 따라 증폭하였다.

[0062]

실시예 2-2. 제조합 배컬로바이러스(rBac-HA)의 정제

[0063]

제조합 배컬로바이러스를 Sf9 세포에 0.1 MOI로 형질감염하여 생산하였다. 형질감염된 세포를 28 °C에서 약 96시간 동안 배양하였고, 70-80% 이상의 생존율을 보일 때 수확하였다. 마지막 상청액을 모으고 수크로오스 쿠션 원심분리를 통해 (5mM NaCl 내 25% w/w 수크로오스, PBS 내 10mM EDTA) 초원심분리기를 이용하여(4°C에서 75분 동안 24000rpm) 농축하였다. 농축 후, 바이러스를 세척하기 위해 인산완충용액(PBS, pH6.2)에 재부유시킨 후 다시 원심분리하였다(4°C에서 150분 동안 27000rpm). 그 뒤에 펠릿을 0.25M 수크로오스에 재부유하고 바이러스 스타크를 LN₂ 탱크에 저장하였다. 정제된 제조합 배컬로바이러스를 Sf9 세포로 플라크법을 통해 프로토콜에 따라서 적정하였다(Invitrogen, No.10359).

[0064]

실시예 3. 제조합 배컬로바이러스(rBac-HA)의 외피에 HA 단백질 발현 확인

[0065]

실시예 3-1. 웨스턴 블롯

[0066]

HA를 표면에 발현하는 제조합 배컬로바이러스의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 로딩 버퍼(50mM Tris-HCl, pH6.8), 100mM 디티오트레이톨, 2% 도데실황산나트륨, 0.1% 브로모페놀블루, 10% 글리세롤)에 담긴 정제된 바이러스를 100°C에서 5분 동안 끓이고, 10% 도데실황산나트륨-폴리아크릴아미드 겔로 분리하였다. 상기 겔을 트랜스퍼 버퍼(25mM Tris, 192mM 글라이신, 20% 메탄올)에서 1시간 30분 동안 300mA로 PVDF 멤브레인(Pall, Ann Arbor, MI, USA)에 이동시켰다. 멤브레인을 5% 탈지 우유를 포함한 TBST 버퍼로 37°C에서 1시간 동안 블록킹하고 1:1000으로 희석시킨 항-HA 마우스 혈청에 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 세척 후, 멤브레인을 1:1000으로 희석시킨 HRP-결합 고트 항-마우스(HRP-conjugated goat anti-mouse) IgG에 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막 세척 후, 단백질을 FUJIFILM 발광성 이미지 분석기 LAS-3000으로 검출하였다.

[0067]

실시예 3-2. 유세포 분석

[0068]

HA 단백질의 발현을 분석하기 위해, 6웰 플레이트에서 rBac-HA 또는 Bac-ctrl의 10 MOI로 Sf9 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후 세포를 회수하였고, FACS 버퍼(0.5% FBS 및 0.09% NaN₃를 포함한 PBS)로 두 번 세척하였으며, 상온에서 5분 동안 Fc-block으로 블로킹하였다. 이후 세포를 HA 단백질(1:100 희석)에 대한 다중클론 항체와 함께 4°C에서 40분 동안 인큐베이션한 후, FACS 버퍼로 세척하였다. 세포를 FITC 결합 항-마우스 IgG(1:100 희석) (eBioscience, San Diego, CA)로 염색하였다. 염색 후, 세포를 FACS 버퍼로 세척하였다. 마지막으로 FACS Calibur 유세포분석기(BD Biosciences, San Diego, CA) 및 Flowjo 소프트웨어(TreeStar Inc., Ashland, OR, USA)를 이용하여 형광 신호를 검출하여 유세포 분석을 수행하였다.

[0069]

실시예 3-3. 제조합 배컬로바이러스(rBac-HA)의 외피에 HA 단백질 발현 확인

[0070]

수크로오스 구배를 이용하여 정제한 바이러스 입자를 사용한 웨스턴 블랏 분석을 통해 HA 단백질 발현을 측정하

었다. HA 단백질에 대한 다중클론 항체를 이용하여, 정제한 rBac-HA 입자에서 분자량이 약 70kDa인 HA0 특이적 밴드를 찾아내었다. 곤충 세포에는 푸린이 없기 때문에, HA0는 HA1 및 HA2 서브유닛으로 절단되지 않았다(Yang, D. G. et al., 2007). 양성 대조군으로 인플루엔자 바이러스 (A/California/04/09)를 사용하여 분자량이 70kDa임을 알아내었다. 야생형 배큘로바이러스(Bac-ctrl, bacimid)를 로딩한 대조군 웰에서는 특이적인 밴드를 찾을 수 없었다(도 1b). 배큘로바이러스 표면에서 HA 단백질의 발현 수준을 항 HA 항체로 염색하여 유세포분석기를 통해 측정하였다. 감염 48시간 후, rBac-HA로 형질감염된 Sf9-II 세포는 야생형 배큘로바이러스(Bac-ctrl)로 형질감염된 세포 또는 형질감염되지 않은 세포에 비하여 형광강도가 증가하였다(도 1c). 이를 통해 rBac-HA가 발현되었고, rBac-HA의 표면에 HA가 발현되었음을 알 수 있었다.

실시예 4. 재조합 배큘로바이러스(rBac-HA)의 면역화 분석

실시예 4-1. 면역화 및 바이러스 감염

암컷 BALB/c 생쥐(5주)를 Charles River Laboratories(Yokohama, Japan)에서 구입하였다. 면역화를 위해, 생쥐를 아이소플루레인(Ifran; Hana Pharm, 경기도, 한국)을 흡입시켜 마취하였고, 3×10^6 플라크 형성 단위(PFU)의 rBac-HA 및 대조군인 야생형 배큘로바이러스(Bac-ctrl) 또는 PBS를 비강 내로 접종하였다. 그 후 면역화를 촉진하기 위해, 첫 번째 면역화 2주 후 같은 양의 배큘로바이러스를 접종하였다. 바이러스 감염 실험을 위해, 상기 면역 촉진 3주 후, 인플루엔자 바이러스 A/California/04/09(pH1N1)의 10 LD50 또는 A/Vietnam/1203/04(H5N1)의 5 LD50를 생쥐의 비강 내 접종하였다. 모든 동물 실험은 이화여자대학교 동물실험 관련 위원회의 가이드라인을 따라서 수행하였다.

실시예 4-2. 기관지 폐포세척술(BAL)

감염 5일 후 생쥐를 희생시켰고, PBS 1ml로 폐 기도(lung airway)를 플러싱(flushing)하여 BAL을 수득하였다. BAL 액체를 원심분리하여 수득한 상청액으로 분비형 IgA 레벨을 측정하였다.

실시예 4-3. ELISA

모든 그룹의 생쥐는 안와정맥총(retro-orbital plexus)에서 헤파린을 처리한 모세혈관 튜브를 이용하여 마취하고 피를 뽑았다. 면역화된 생쥐의 HA-특이적 항체의 역가를 직접적인 효소 결합 면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 통해 측정하였다. PBS에 희석시킨 정제한 재조합 HA 단백질(50ng/웰) (A/California/07/09(H1N1), Immune Technology, USA); 정제한 HA 스톱 단백질(500ng/웰) (A/Korea/1/09(H1N1), 성백린 교수, 연세대학교); 또는 재조합 키메라 H9/1(H1(PR8) 스톱의 윗부분에 H9 HA 헤드 부분이 연결됨) 단백질(200ng/웰) (Dr. Huan H. Nguyen, International Vaccine Institute)로 ELISA 플레이트(F96 Polysorp NUNC immunoplate)를 코팅하였다. 그 다음 96-웰 플레이트를 1% 탈지 우유를 포함한 PBS로 2시간 동안 상온에서 블로킹하고, 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS(PBST)로 4번 세척하였다. 세척 후 희석시킨 혈청 또는 BAL 샘플을 96-웰 플레이트에 넣고 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 플레이트를 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS(PBST)로 4번 세척하였다. 다음으로, HRP-결합 래빗 항-마우스(HRP-conjugated rabbit anti-mouse) IgG(Abcam, Cambridge, UK)(1:2000 희석); 또는 HRP-결합 고트 항 마우스 IgA(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)(1:3000 희석)를 2차 항체로 첨가하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막 세척 후 ELISA 플레이트를 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 퍼록시다제(KPL, Gaithersburg, MD)를 처리하여 발색시킨 다음, 1M H₃PO₄로 발색반응을 멈추었다. Thermo ELISA plate reader를 통해 450nm에서 색깔을 분석하였다.

[0078] 실시예 4-4. 적혈구응집반응 억제 분석(Hemagglutination inhibition assay)

[0079] 비특이적 억제제를 불활성화시키기 위해, 혈청 샘플에 수용체 파괴 효소(RDE, Denka-Seiken, Tokyo, Japan)를 1:4로 희석하여 37℃에서 18-20시간 동안 처리하였다. RDE-처리 혈청을 RDE를 불활성화시키기 위해 56℃에서 1시간 동안 배양하였고, 6배의 PBS를 첨가하였다. 96웰 V-bottom 플레이트에서 혈청을 1:10부터 2배까지 희석하였고, 각 웰에 같은 부피의 인플루엔자 바이러스(8 HA 단위)를 첨가하였다. 마이크로플레이트를 1시간 동안 상온에서 배양하였고, 0.5% 닭 적혈구 세포를 포함한 Alsever's solution(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)을 첨가하였다. 플레이트를 부드럽게 혼합하였고, 40분 동안 상온에 배양하였다. HI 역가를 비-응집 반응을 포함하는 마지막 희석 지점의 역수를 통해 측정하였다. 1:40 이상에서의 혈청 HAI 항체 역가는 최소 50%의 감염에 대한 보호 효과를 보이는 것과 관련이 있다(Human vaccines & immunotherapeutics, 2013, 9(2), 405-408).

[0080] 실시예 4-5. 폐의 바이러스 역가

[0081] 인플루엔자 A 바이러스 감염 5일 후, 각 그룹의 생쥐를 희생시켜 폐 조직을 회수하였다. 단일 세포를 분리하기 위하여, 조직을 3ml 무혈청 MEM에서 70 μ m 셀 스트레이너(BD Labware, Franklin Lakes, NJ)를 통해 균질화하였다. 원심분리 후에, 상청액을 모으고 Madin-Darby 개 신장(MDCK) 세포에서 플라크법을 통해 바이러스 역가를 측정하였다. 데이터는 폐 조직의 그래프 당 PFU로 나타내었다.

[0082] 실시예 4-6. 통계 분석법

[0083] 짝이 없는(unpaired) two-tailed Student t-검정을 이용하여 편차 비교를 수행하였다. P 값 ≤ 0.05 일 때, 편차가 통계적으로 유의하다.

[0084] 실시예 5. rBac-HA 접종에 의해 유도된 항체 분석

[0085] 실시예 5-1. rBac-HA에 의해 유도된 HA 특이적 IgG 항체

[0086] rBac-HA의 면역원성을 측정하기 위해, 생쥐의 그룹에 비강투여를 통해 rBac-HA, 야생형 배콜로바이러스(Bac-ctrl, bacmid) 또는 PBS를 접종하였다. 첫 번째 접종 2주 후 같은 농도로 면역화 반응을 촉진하였고, 2주 및 5주째에 혈청을 수득하였다.

[0087] 그 결과, 도 2b에서 알 수 있듯이, 첫 번째 접종 14일 후 rBac-HA로 면역시킨 그룹에서만 낮은 레벨의 HA 특이적 IgG 항체를 확인하였다. 또한 2 번째 백신 접종(면역화 촉진) 후, HA 특이적 IgG 항체의 평균 역가는 rBac-HA로 면역시킨 그룹에서만 현저하게 증가하였다.

[0088] 그러나, rBac-HA(3×10^6) 및 rBac-HA(1×10^6)로 면역시킨 생쥐들 사이에는 HA 특이적 IgG 항체 역가의 차이를 발견할 수 없었으며, PBS 또는 Bac-ctrl를 접종한 생쥐에서는 HA 특이적 IgG 항체 역가를 확인할 수 없었다.

[0089] 이를 통해, 본 발명의 rBac-HA 백신은 HA 특이적 IgG 항체를 유도할 수 있음을 알 수 있었고, 상기 백신을 2차례 접종하는 것이 1차례 접종하는 것보다 더 강한 항체를 생산할 수 있으며, 1×10^6 PFU 백신을 접종하면 3×10^6 PFU 백신 접종과 유사한 농도의 항체가 생산됨을 알 수 있었다.

[0090] 실시예 5-2. rBac-HA에 의해 유도된 스톡 특이적 항체

[0091] rBac-HA가 스톡 특이적 항체를 유도할 수 있는지 확인하기 위해, 백신을 접종한 생쥐로부터 수득한 혈청과 정제된 HA 스톡 단백질(A/Korea/1/09 (H1N1)) 및 재조합 키메라 H9/1 단백질의 반응성을 ELISA를 통해 측정하였다(도 2c 및 2d).

[0092] 그 결과 rBac-HA로 면역시킨 생쥐 그룹에서 2 번째 접종(면역화 촉진) 후 스톡 특이적 항체 반응이 강하게 일어남을 확인하였다. 그러나 rBac-HA를 처음으로 접종한 생쥐의 혈청에서는 HA 스톡 도메인에 대한 IgG 역가를 확인할 수 없었다. 또한, PBS 또는 Bac-ctrl로 면역시킨 그룹의 혈청에서도 HA 스톡 도메인에 대한 IgG 역가를 확인할 수 없었다.

[0093] 또한, 강한 HA 스톡 항체 반응을 가진, HA를 표면에 발현하는 아데노바이러스 기반 백신을 접종한 생쥐의 혈청을 양성 대조군으로 사용한 결과(도 2d), HA 스톡 도메인에 대한 IgG 역가를 확인할 수 없었다. 이를 통해 HA 스톡 도메인에 대한 항체 유도에 아데노바이러스 기반 백신보다 본 발명의 배클로바이러스 기반 rBac-HA 백신이 현저한 면역 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0094] 결론적으로, 본 발명의 rBac-HA 백신을 접종하면, 다양한 인플루엔자 바이러스에서 보존되어 있는 HA의 스톡 도메인에 대한 항체가 생산되므로, 상기 항체는 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 교차 방어능을 가져 본 발명의 rBac-HA 백신은 범용성 인플루엔자 바이러스 백신으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 본 발명의 rBac-HA 백신은 아데노바이러스 기반 백신보다 HA 스톡 도메인에 대한 항체 유도에 현저한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0095] 실시예 5-3. rBac-HA에 의해 유도된 HA 특이적 IgA 항체

[0096] 점막의 면역반응에서 중요한 역할을 하는 IgA의 유도와 관련하여 rBac-HA의 효능을 측정하기 위해, 바이러스 감염 5일째에 기관지폐포세척(BAL) 액체를 모았고 ELISA를 수행하였다.

[0097] 그 결과, 생쥐의 rBac-HA 면역 그룹은 점막의 HA 특이적 IgA 반응이 유도된 반면, Bac-ctrl 및 PBS 그룹은 IgA가 측정되지 않았다(도 2e). 이를 통해 HA 특이적 체액성 면역반응이 rBac-HA의 비강 내 투여를 통해 효과적으로 유도됨을 알 수 있었다.

[0098] 실시예 5-4. rBac-HA에 의해 유도된 적혈구응집반응을 억제하는(hemagglutination-inhibiting, HAI) 항체

[0099] 적혈구응집반응을 억제하는(hemagglutination-inhibiting, HAI) 항체의 역가가 높으면 인플루엔자 바이러스 감염을 억제할 수 있으므로, 상기 HAI 항체를 측정하기 위해, 3×10^6 PFU 또는 1×10^6 PFU rBac-HA; 및 음성 대조군인 Bac-ctrl(3×10^6 PFU) 또는 PBS를 비강 내 접종하였다.

[0100] 그 결과, 첫 번째 접종 2주 후, 수득된 혈청에서 동형 A/California/04/09 바이러스에 대한 HAI 항체의 역가는 측정되지 않거나 낮았다(<1:20). 그러나 2번째 접종 2주 후, rBac-HA를 접종한 생쥐 혈청은 각각 평균 1:640(3×10^6 PFU) 및 1:160(1×10^6 PFU)의 HAI 항체 역가를 보였고, Bac-ctrl 및 PBS 그룹의 HAI 항체 역가는 측정되지 않았다(도 3). 또한, HAI 항체 역가가 1:40 이상이면 일반적으로 감염에 대해 최소 50%의 보호를 보인다고 알려져 있다(Cox, R. J. et al., 2013).

[0101] 이를 통해 본 발명의 rBac-HA 백신은 2차 접종 후 생산된 HAI 항체로 인해, 동형 바이러스 감염에 대한 높은 방어능을 가짐을 알 수 있었다.

[0102] 실시예 6. rBac-HA 접종에 의한 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 보호 효과

[0103] 실시예 6-1. rBac-HA 접종에 의한 동형 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 보호 효과

[0104] rBac-HA 접종에 의해 인플루엔자 바이러스 감염으로부터 생쥐를 보호할 수 있는지 확인하기 위해, 마지막 접종 3주 후 A/California/04/09 바이러스 10 LD50로 백신을 접종한 생쥐 및 대조군 생쥐를 감염시켰다. 5일 후 생쥐의 폐에서 바이러스 역가를 측정하였고, 감염된 생쥐의 생존률을 측정하였다.

[0105] 그 결과, rBac-HA를 접종한 생쥐는 폐에서 바이러스가 측정되지 않았다(<10PFU/ml). 반면, Bac-ctrl 또는 PBS를 접종한 생쥐는 폐에서 바이러스 역가가 높게 측정되었다($\sim 1 \times 10^6$ PFU/ml)(도 4a).

[0106] 또한, Bac-ctrl 또는 PBS를 접종한 생쥐는 각각 0% 및 20%의 생존율을 보였지만, rBac-HA를 접종한 생쥐들은 체중 감소없이 모두 생존하였다(도 4b 및 4c).

[0107] 이를 통해, 비강 내 접종된 rBac-HA 백신은 치명적인 동형 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 완벽한 보호 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0108] 실시예 6-2. rBac-HA 접종에 의한 아형 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 보호 효과

[0109] rBac-HA 접종에 의해, 그룹 1 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 교차 방어가 가능한지 확인하기 위해, 면역화된 생쥐를 H5N1(A/Vietnam/1203/04) 인플루엔자 바이러스의 5 LD50으로 감염시켰다.

[0110] 그 결과, rBac-HA를 접종한 생쥐는 상기 바이러스 감염 후 6일까지 15% 이하의 체중 감소를 보였지만, 체중 감소는 빠르게 회복되어 결국 감염 전 수준으로 회복되었다. 또한 rBac-HA를 접종한 생쥐는 80%의 생존율을 보였다. 그러나 Bac-ctrl 또는 PBS를 처리한 대조군 생쥐는 심각한 체중 감소를 보였고, 바이러스 감염 후 한 마리도 살아남지 못했다(도 5a 및 5b).

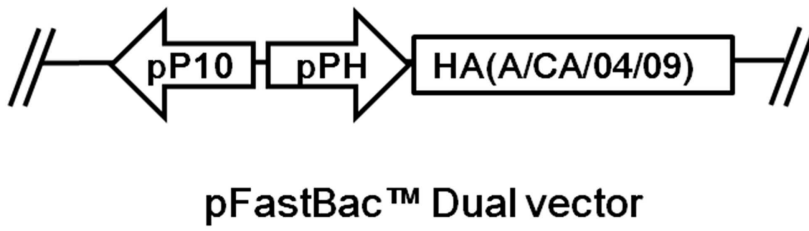
[0111] 이를 통해, 비강 내 접종된 rBac-HA 백신은 동형 바이러스 감염뿐만 아니라 아형 인플루엔자 바이러스 감염에 대해서도 보호 효과를 가지며, 상기 백신에 의해 유도된 HA 스톱 특이적 항체는 교차 방어능을 가짐을 알 수 있었다.

[0112] 결론적으로, 본 발명의 rBac-HA 백신을 접종하면 HA 스톱 도메인에 대한 항체가 생산되며, 상기 항체는 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 교차 방어능을 가지므로, 본 발명의 rBac-HA 백신은 범용성 백신으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

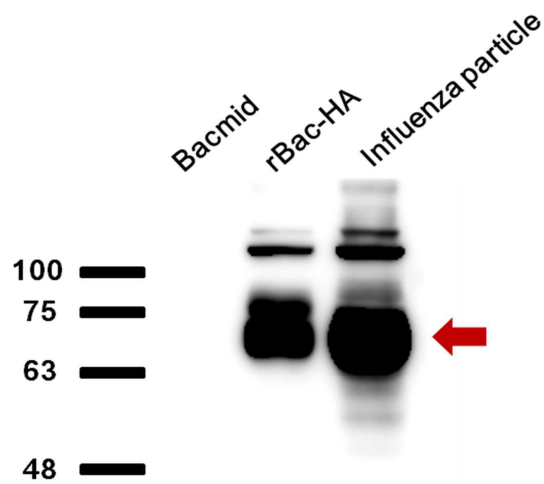
[0113] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

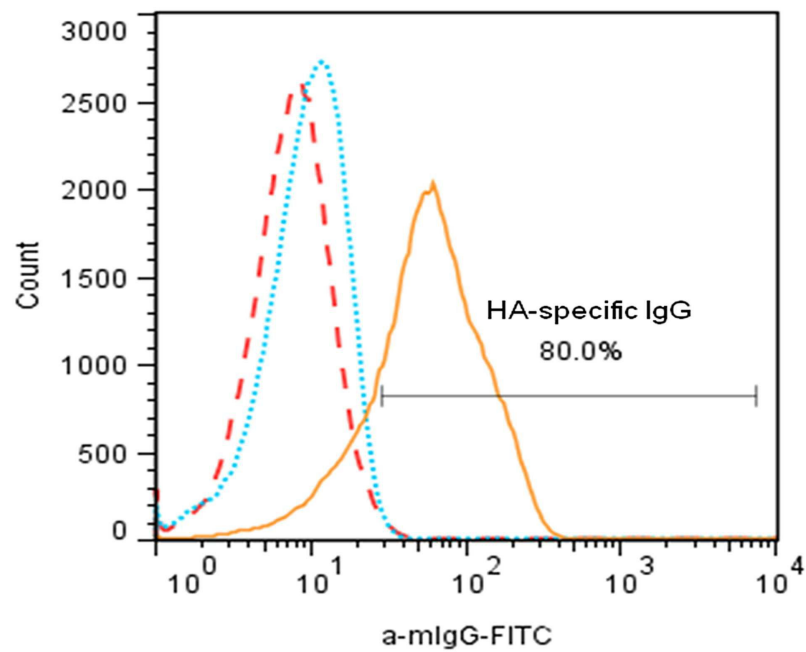
도면1a



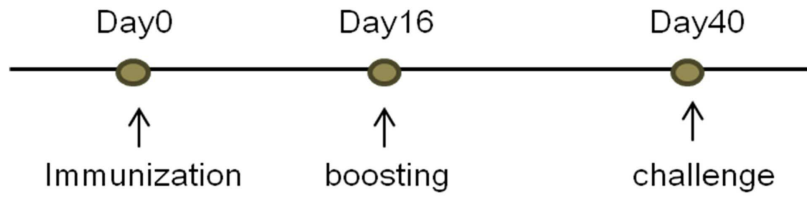
도면1b



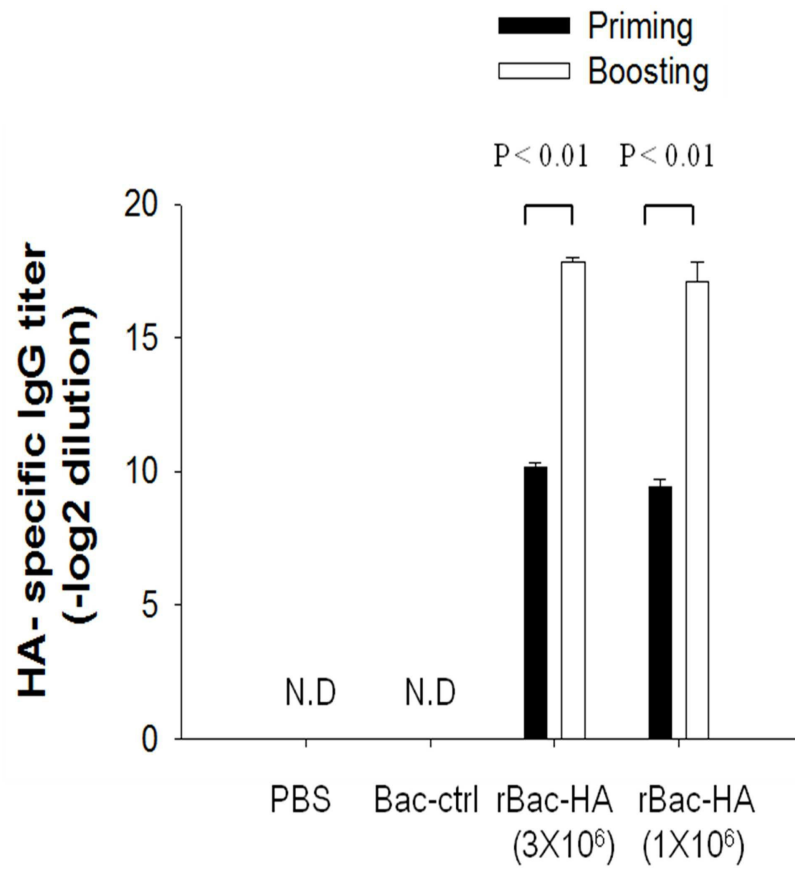
도면1c



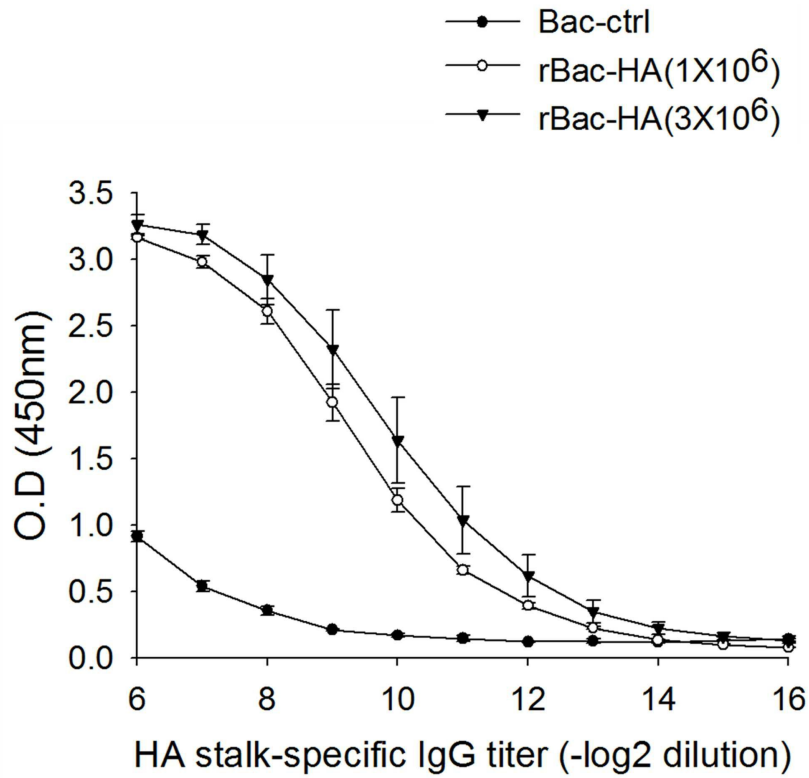
도면2a



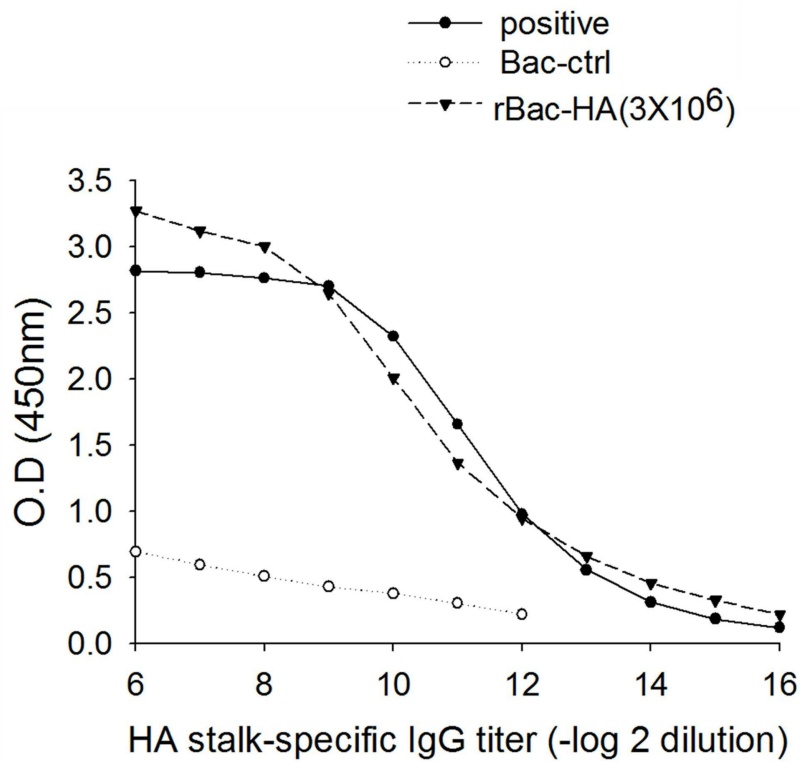
도면2b



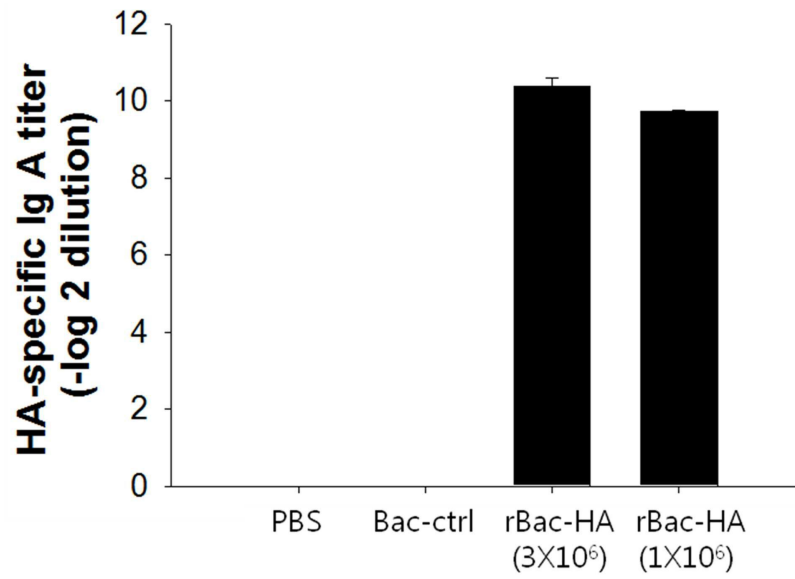
도면2c



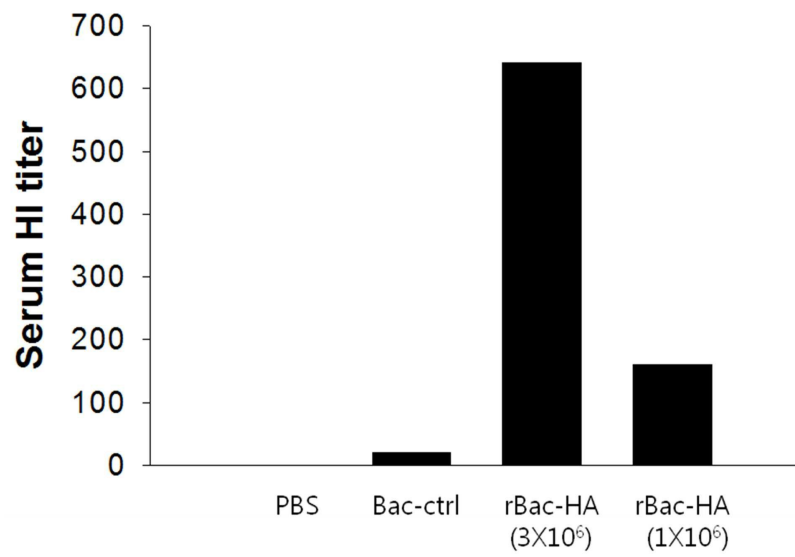
도면2d



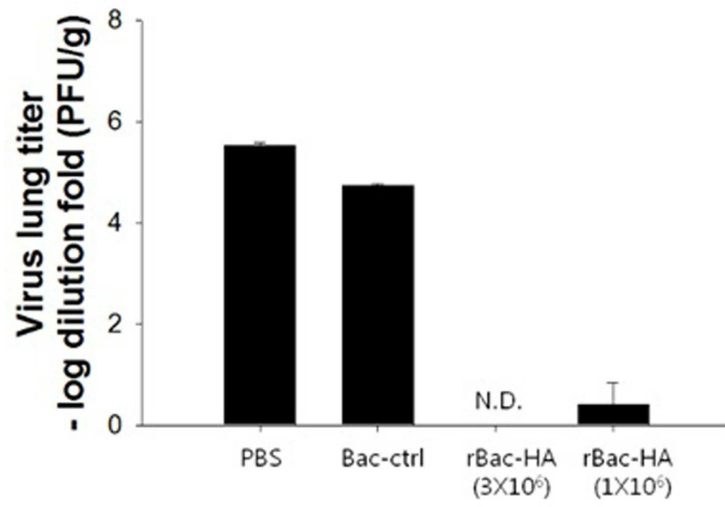
도면2e



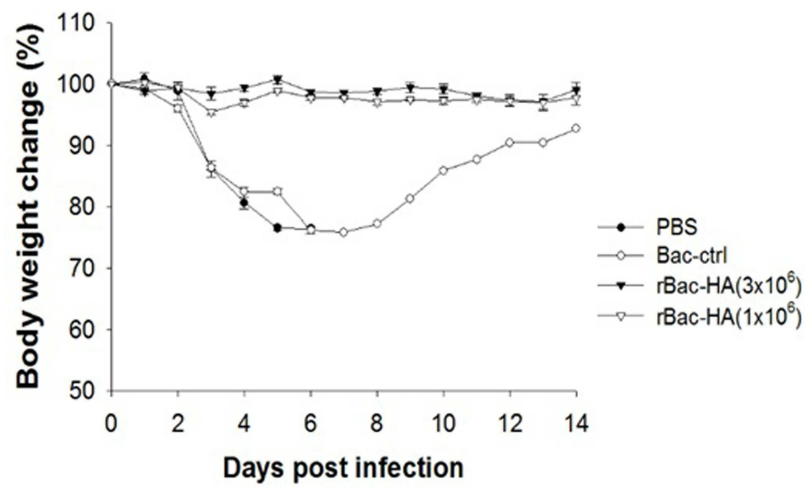
도면3



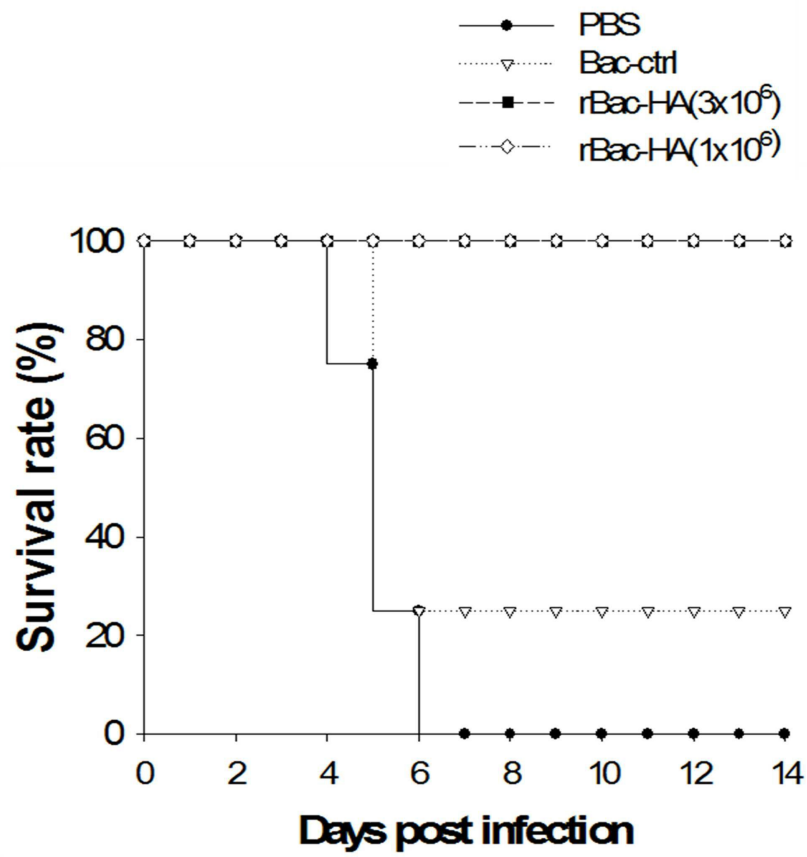
도면4a



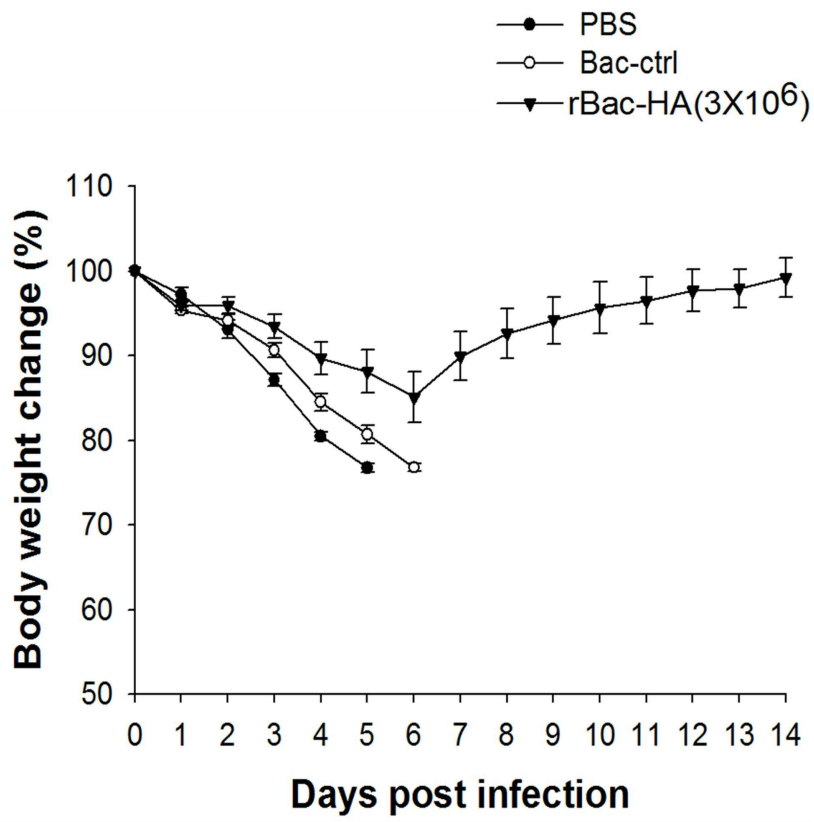
도면4b



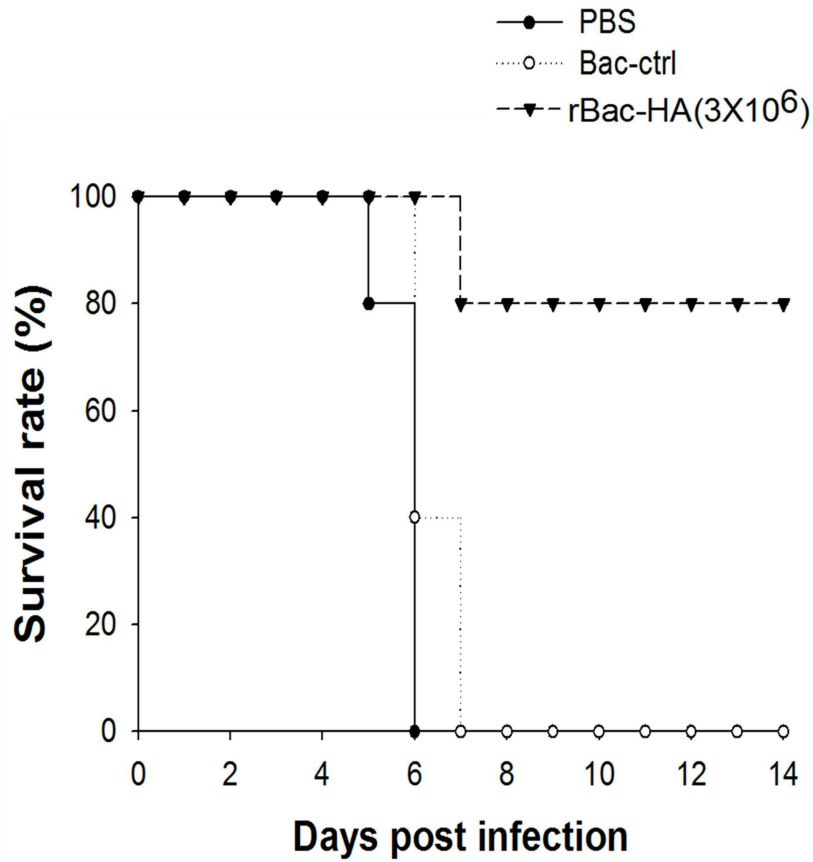
도면4c



도면5a



도면5b



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Vaccine against influenza virus based on hemagglutinin
displayed-baculovirus and method for producing the same
- <130> KPA140781-KR
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1701
- <212> DNA
- <213> A/California/04/09 virus
- <400> 1

atgaaggcaa tactagtagt tctgctatat acatttgcaa ccgcaaatgc agacacatta 60
tgtatagggtt atcatgcgaa caattcaaca gacactgttag acacagtact agaaaagaat 120

gtaacagtaa cacactctgt taaccttcta gaagacaagc ataacgggaa actatgcaaa 180

ctaagagggg tagccccatt gcatttgggt aatgtaaca ttgctggctg gatcctggga 240

aatccagagt gtgaatcact ctccacagca agctcatggt cctacattgt ggaaacacct 300

agttcagaca atggaacgtg ttaccagga gatttcacg attatgagga gctaagagag 360

caattgagct cagtgtcatc atttgaaagg ttgagatat tcccaagac aagttcatgg 420

cccaatcatg actcgaacaa aggtgtaacg gcagcatgtc ctcatgctgg agcaaaaagc 480

ttctacaaaa atttaatatg gctagttaaa aaaggaaatt catacccaaa gctcagcaaa 540

tcctacatta atgataaagg gaaagaagtc ctctgtctat ggggcattca ccatccatct 600

actagtctg accaacaag tctctatcag aatgcagata catatgtttt tgtgggtca 660

tcaagataca gcaagaagtt caagccggaa atagcaataa gacccaaagt gagggatcaa 720

gaaggagaa tgaactatta ctggacacta gtagagccgg gagacaaat aacattcgaa 780

gcaactggaa atctagtgtt accgagatat gcattcgcaa tggaaagaaa tgctggatct 840

ggtattatca ttccagatac accagtccac gattgcaata caacttgtca aacaccaag 900

ggtgctataa acaccagcct cccatttcag aatatacatc cgatcacaat tggaaaatgt 960

ccaaaatatg taaaaagcac aaaattgaga ctggccacag gattgaggaa tatccgtct 1020

attcaatcta gaggcctatt tggggccatt gccggtttca ttgaaggggg gtggacaggg 1080

atggtagatg gatgtacgg ttatcaccat caaatgagc aggggtcagg atatgcagcc 1140

gacctgaaga gcacacagaa tgccattgac gagattacta acaaagtaaa ttctgttatt 1200

gaaaagatga atacacagtt cacagcagta ggtaaagagt tcaaccacct ggaaaaaaga 1260

atagagaatt taaataaaaa agttgatgat ggtttcctgg acatttggac ttacaatgcc 1320

gaactgttgg ttctattgga aaatgaaaga actttggact accacgattc aaatgtgaag 1380

aacttatatg aaaaggtgaag aagccagcta aaaacaatg ccaaggaaat tggaaacggc 1440

tgctttgaat ttaccacaa atgcgataac acgtgcatgg aaagtgtcaa aaatgggact 1500

tatgactacc caaaatactc agaggaagca aaattaaaca gagaagaaat agatggggtgta 1560

aagctggaat caacaaggat ttaccagatt ttggcgatct attcaactgt cgccagtcca 1620

ttggtactgg tagtctccct gggggcaatc agtttctgga tgtgctctaa tgggtctcta 1680

cagtgtagaa tatgtattta a 1701

<210> 2

<211> 566

<212> PRT

<213> A/California/04/09 virus

<400> 2

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn

12 16 21 26
Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
31 36 41
Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
46 51 56
Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
61 66 71
Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
76 81 86 91

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
96 101 106
Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
111 116 121
Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
126 131 136
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
141 146 151
Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser

156 161 166 171
Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
176 181 186
Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
191 196 201
Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
206 211 216
Tyr Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
221 226 231

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
236 241 246 251

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
 256 261 266
 Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
 271 276 281
 Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
 286 291 296
 Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn

 301 306 311
 Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
 316 321 326 331
 Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 336 341 346
 Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 351 356 361
 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 366 371 376

 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 381 386 391
 Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 396 401 406 411
 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 416 421 426
 Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 431 436 441
 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn

 446 451 456
 Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 461 466 471
 Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 476 481 486 491
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 496 501 506

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 511 516 521

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
 526 531 536

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
 541 546 551

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 556 561 566 571

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 576

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA forward primer

<400> 3
 gggtcgacgc caccatgaag gcaatacta 29

<210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA reverse primer

<400> 4
 gggcggccgc ttaaatacat attcta 26