



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월31일
(11) 등록번호 10-2379951
(24) 등록일자 2022년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/11 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C07K 14/465 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/11 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7029403
(22) 출원일자(국제) 2014년03월18일
심사청구일자 2019년03월11일
(85) 번역문제출일자 2015년10월14일
(65) 공개번호 10-2015-0131292
(43) 공개일자 2015년11월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/055438
(87) 국제공개번호 WO 2014/147087
국제공개일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
13305320.7 2013년03월18일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
WO2007062819 A2*
WO2011045612 A1
Q. Ye 등, Nature, Vol.444, p.1078-1082
(2006)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
오시백스 에스에이에스
프랑스 파리 75008 튀 드 코펜하겐 4
(72) 발명자
델 캄포 아스카라테일, 주디스
프랑스 에프-95150 타베르니 튀 피에르 드 쿠베르
탱 12
힐, 페르갈
프랑스 에프-69003 리옹 쿠르 드 라 리베르테 39
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 **인플루엔자 핵단백질 백신**

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자로부터 온 핵단백질 항원의 세포 면역원성을 증가시키기 위한 인플루엔자 균주 A, B 또는 C로부터 온 핵단백질 항원의 변종 및 C4bp 올리고머화 도메인의 변종을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인플루엔자 질병의 예방 및 치료를 위한 백신 또는 면역요법으로의 사용을 위한 핵산, 벡터, 융합 단백질 및 면역원성 조성물에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/646 (2017.08)

C07K 14/445 (2013.01)

C07K 14/465 (2013.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

핵단백질(NP) 항원의 변종 하나 이상 및 닭 C4bp 올리고머화 도메인의 변종을 포함하고, 상기 핵단백질 항원의 변종 하나 이상은 인플루엔자 균주 A, B 및 C로부터 선택된 인플루엔자 핵단백질의 야생형의 90 % 이상의 동종성을 갖는 서열을 갖되 야생형은 아닌 단백질이며, 닭 C4bp 올리고머화 도메인의 변종은 서열 4 또는 서열 5의 서열을 나타내는, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 하나의 핵단백질 항원의 변종이 단량체성 핵단백질 항원인, 융합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 단량체성 핵단백질 항원이 다음의 두 점 돌연변이: E339A 및 R416A 중 하나 이상을 갖는 인플루엔자 균주 A로부터 온 핵단백질인, 융합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 단량체성 핵단백질 항원이 서열 2의 서열에 의해 인코딩되는, 융합 단백질.

청구항 5

핵단백질(NP) 항원의 변종 하나 이상 및 닭 C4bp 올리고머화 도메인의 변종을 포함하고, 상기 핵단백질 항원의 변종 하나 이상은 인플루엔자 균주 A, B 및 C로부터 선택된 인플루엔자 핵단백질의 야생형의 90 % 이상의 동종성을 갖는 서열을 갖는 단백질이며, 닭 C4bp 올리고머화 도메인의 변종은 서열 4 또는 서열 5의 서열을 나타내고, NP 항원이 신호 펩티드를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 융합 단백질을 인코딩하는 핵산.

청구항 7

제6항에 있어서, 서열 6 또는 서열 7의 서열을 나타내는, 핵산.

청구항 8

제6항에 기재된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 9

- 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 융합 단백질, 및
- 세포내 톨-유사 수용체(TLR)에 대한 핵산 리간드를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 세포내 TLR에 대한 핵산 리간드가 폴리 I:C인, 면역원성 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 백신 보조제를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 인플루엔자 질병의 예방 및 치료를 위한 백신 또는 면역요법으로의 용도를 위한, 면역원성 조성물.

청구항 13

서열 2에 나타낸 서열을 갖는 핵단백질 항원과 서열 4 또는 서열 5에 나타낸 서열을 갖는 운반 단백질의 융합 단백질을 포함하는, 인플루엔자의 핵단백질 항원에 대한 세포 면역 반응을 증가시키기 위한 면역원성 조성물.

청구항 14

- 제6항에 기재된 핵산, 및
- 세포내 TLR에 대한 핵산 리간드를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 15

- 제8항에 기재된 백터, 및
- 세포내 TLR에 대한 핵산 리간드를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 16

제11항에 있어서, 인플루엔자 질병의 예방 및 치료를 위한 백신 또는 면역요법으로의 용도를 위한, 면역원성 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술분야

배경기술

[0001]

배경기술

[0002]

개선된 인플루엔자 백신에 대한 수요가 존재한다. 인플루엔자에 대한 현재의 백신 전략은 적혈구응집소에 대한 활발한 항체(체액성) 반응 생성에 집중한다. 한 해에 걸친 인플루엔자 균주 순환 중의 높은 정도의 항원 변이로 인해, 백신 균주는 특별히 각 인플루엔자 계절에 대해 새로 만들어져야 한다. 매년의(또는 매계절의) 인플루엔자 백신이 상이한 연령 범위에서 다른 정도로 성공적이지만, 특히 어린이 및 노인에게 대해 보다 효과적인 방어가 명확히 요구된다. 또한, "항원 변위"로 알려진 과정에서 매우 다른 HA(적혈구응집소) 유전자를 얻은 재조합 바이러스가 진화할 주된, 영구적인 위험이 존재한다. 현재의 인플루엔자 백신은 HA 항원에 본질적으로 의존하기 때문에 이는 공중 보건 비상 사태를 초래할 수 있다.

[0003]

인플루엔자는 오소믹소바이러스과의 바이러스에 속하는 껍질보유, 단일 가닥, 네거티브-센스 RNA 바이러스로, 3 주요 종류: A, B, 및 C로 나뉜다. 인플루엔자 A 바이러스는, 인간, 새, 돼지, 말, 박쥐 등을 포함한 다양한 동

물을 감염시키지만, 임의의 특정 인플루엔자 바이러스의 친화성은 일반적으로 특정 숙주에 매우 맞춰져 있다. 인플루엔자 B 바이러스는 더 작은 수의 중, 즉 인간 및 물개를 감염시키지만, 그럼에도 불구하고 매년의 인플루엔자 유행병의 실질적인 원인이다. 대부분의 인간 인플루엔자 감염은 인플루엔자 A 또는 B에 의해 발생하고; 인간 및 돼지를 감염시키는 인플루엔자 C 바이러스는, 심각한 인간 감염 또는 유행병의 원인이 거의 되지 않는다(Lamb).

[0004] 현재의 비활성화된 인플루엔자 바이러스 백신은 밀접한 관계가 있는 바이러스 균주를 방어하는 항체를 유도한다. 현재 허가된 백신은 바이러스 표면의 주요 항원 결정기인 적혈구응집소(HA)에 대해 주로 균주-특이적 중화 항체를 유도하는데, 이는 매우 면역원성이고, 일치하는 바이러스 균주 감염에 의해 발생하는 질병을 예방할 수 있다. 그러나, HA는 현저한 항원 변이가 있어 폭넓은 방어를 제공하도록 설계된 백신에서 단독으로 사용이 배제된다. 이러한 이유로, 덜 변동성인 표적을 향한 방어 반응을 발생시키는 대안적인 백신 전략이 큰 관심사이다.

[0005] 인플루엔자 A 바이러스의 자연 감염은 체액 및 세포 면역 둘 다를 유도한다. 오래 지속되는 세포 면역은 대부분 핵단백질(NP)과 같은 보존된, 내부 바이러스 단백질을 향한다. NP 항원은 자연 감염 후 인간에게 면역원성이지만, 유도되는 세포독성 T 림프구는 짧은 수명을 갖는다(McMichael a, McMichael b).

[0006] NP에 대한 세포 면역는 소중한데, 이는 NP 항원결정인자의 상이한 변종을 향하기 때문이며, NP-표적 DNA 백신은 동물에서 교차 방어성 면역을 유도했다(Schotsaert).

[0007] 핵단백질(NP) 항원은 오랫동안 매우 보존된 항원으로 여겨져 왔으며: 가장 분지성인 인플루엔자 A 균주조차 그들이 인코딩하는 NP 단백질에서 90 % 동일성을 공유한다(Gorman, Xu). NP의 항원 변이는 드물고 사소한 정도로만 일어난다(Stanekova).

[0008] **종래 기술**

[0009] **백신에서의 항원으로의 핵단백질의 용도**

[0010] 인플루엔자 핵단백질을 항원으로 사용하는 것은 1980년대에 기술되었다(Wraith). NP에 대한 마우스에서의 세포 면역 반응은 면역을 유도할 수 있고, 주로 분지성 A형 바이러스에 대해 교차 방어를 생성할 수 있다. 치사 이종발현성(H1N1) 검사로부터 H3N2 바이러스로부터 정제된 NP를 사용한 마우스의 면역화가 상당한 방어(75 %)를 제공할 수 있다는 것이 밝혀졌으나, 감염을 예방하지는 않았다.

[0011] NP 유전자를 사용하는 DNA 백신은 20 년 전부터 알려져 있었고: DNA 백신 접종 자체를 위한 첫번째 "개념 입증" 실험에 사용되었다(Ulmer).

[0012] 바이러스 벡터로부터의 NP 발현은 1980년대에 처음으로 입증되었고(Yewdell 1985), 이 벡터를 사용한 면역화는 DNA 백신과 비교하여 다양한 인플루엔자 A 균주에 대한 세포독성 T 림프구의 향상된 생성과 관련되었으나 인플루엔자 B에 대해서는 그렇지 않았다.

[0013] 그 후, PR8 핵단백질을 발현하는 MVA 벡터를 사용한 마우스의 면역화가 이중서브타입 인플루엔자 바이러스에 의한 저용량 감염에 대해 방어하는 것으로 확인되었다(Altstein). 더욱 최근에는, M1 단백질에 융합된 NP 단백질을 인코딩하는 바이러스 벡터가 인간 면역화에 사용되었다(Lillie, Berthoud, Antrobus). 이들 연구는 체액 반응이 면역노화를 통해 감소할 때 특히 NP에 대한 세포 면역 반응이 노인에서 현저히 상승될 수 있다는 것을 밝혔다(Antrobus).

[0014] **핵단백질 분비**

[0015] 일부 연구는 NP 단백질이 주로 핵에 위치하여, 이러한 DNA 백신의 면역원성을 감소시킨다는 것을 시사했다(Stanekova).

[0016] NP에 대한 개선된 세포 면역 반응은 NP 분비를 강제함으로써, 예를 들어 tPA 신호 펩티드를 NP 유전자에 융합함으로써(Luo), DNA 제조에 의해(Greenland, Sullivan) 및 DNA 전달 향상을 위한 전기천공(Laddy) 사용에 의해 얻을 수 있다.

[0017] **단량체성 인플루엔자 핵단백질**

[0018] C4bp 올리고머화 도메인과의 융합에서의 단량체성 항원의 바람직한 사용은 특허 출원 WO 2005/014654에 기술되었다. 그러나 단량체화된 항원을 사용함에 있어서의 위험은 이들의 감소된 면역원성이다. 이는 백신만

(Bachmann) 등에 의해 수포성 구내염 바이러스의 당단백질 G로(Bachmann 1993), 및 피어스(Fiers) 등에 의해 인플루엔자 항원 뉴라민분해효소, 또는 NA에 대해(Fiers 2001) 입증되었다. 인플루엔자 핵단백질로부터 교차 구조를 감소 또는 제거하는 것은 그의 면역원성을 감소시킬 것으로 예상된다.

[0019] 다수의 돌연변이가 자연적으로 올리고머화되는 인플루엔자 핵단백질을 단량체성 형태로 전환하는 것으로 밝혀졌다(Ye 2006). 이 2006년 논문에 기술된 NP의 단량체성 버전은 보다 최근의 논문에서 단량체성인 것으로 확인되었다(Tarus, Ye 2012). 인플루엔자 A 핵단백질을 단량체성으로 만드는 이들 논문에 기술된 두 점 돌연변이는, 인플루엔자 B 및 C 균주의 핵단백질에 보존된다(Nakada의 도 3 참조). 따라서 인플루엔자 B 및 C 균주의 핵단백질에, 이들 다른 인플루엔자 핵단백질을 단량체성으로 만들기 위해, 동일한 점 돌연변이가 도입될 수 있다. 그러나 단량체성 핵단백질의 면역원성의 연구는 수행되지 않았다.

[0020] NP 항원을 사용하여 인플루엔자 백신을 제조하는 데에 있어 주된 기술적 과제는 강력하고 지속적인 세포 면역 반응을 유도하는 것이다. '세포 면역 반응'은 항원에 대한 반응으로 항체를 수반하지 않고 오히려 항원-특이적 T-림프구, 및 특히 세포독성 T 림프구의 활성화 및 다양한 사이토카인 방출을 수반하는 면역 반응이다. CD4 세포 또는 도움 T 세포는 면역 반응을 활성화하는 사이토카인을 분비함으로써 상이한 병원체에 대한 방어를 제공한다. 세포독성 T 세포(CD8)는 사이토카인을 사용하지 않고 병원체의 세포자멸에 의한 사멸을 일으킨다.

[0021] NP에 대한 CD4 또는 CD8 반응 중 어느 것이 방어에 더 중요한지에 대해 논란이 있지만(Epstein), 핵단백질에 대해 체액 보다 세포 반응이 이 항원이 유도할 수 있는 방어에 중요하다는 데 대해서는 의견이 일치한다(Thomas). 강력한 세포독성 T 세포 반응을 이끌어냄으로써 방어를 제공하는 백신은 T 세포 항원결정인자가 잘 보존된 NP 단백질로부터 유도될 때 유용할 수 있다(Epstein; Roy). T 림프구에 의해 중재되는 세포 면역 반응은, 인플루엔자 바이러스-감염된 세포 인지에 의해, 바이러스 복제 억제에 의해 그리고 바이러스 제거 가속화에 의해 주로 기능한다.

[0022] 면역 부여에 수반되는 특이적 T 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다를 포함하고, 종종 각각 분비된 사이토카인 및 세포용해 활성의 작용을 통해 그 기능을 발휘한다. 특히 인플루엔자 NP-특이적 CD8+ CTL이 마우스에서의 치명 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 이형서브타입 방어 면역에서 중요한 역할을 할 수 있고(Gschoesser), 상기도 점막 표면으로부터의 인플루엔자 바이러스 제거를 포함하여(Mbawuike), 감염 후의 생존 및 회복을 촉진한다(Epstein). 최적의 NP-기재 백신은 CD4 및 CD8 세포 반응 둘 다를 향상시킬 것이다.

[0023] 이 특허 출원은 인플루엔자 바이러스 핵단백질에 대한 세포 면역 반응을 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0024] 본 발명은, 인플루엔자 균주 A, B 또는 C로부터 온 NP 항원의 하나 이상의 변종을 운반 단백질로서의 닭 C4bp 올리고머화 도메인의 변종에 융합함으로써, 인플루엔자 바이러스로부터 온 NP 항원의 면역원성, 및 특히 세포 면역원성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0025] 본 발명은 특히, 인플루엔자 균주 A, B 또는 C로부터 온 NP 항원의 하나 이상의 단량체성 변종, 및 특허 출원 WO2007/062819에 기술된 것과 같은 서열 1에 나타난 서열을 갖는 운반 단백질 IMX313을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0026] 본 발명은 특히, 서열 2에 나타난 E339A 및 R416A 점 돌연변이를 나타내는 인플루엔자 균주 A로부터 온 NP 항원의 단량체성 변종, 및 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에 기술한 것과 같은 서열 3에 나타난 서열 ZXBBBBZ(식 중, (i) Z는 아미노산이거나 부재이고, (ii) X는 아미노산이고 (iii) B는 아르기닌(R) 또는 리신(K)이다)을 갖는 하나 이상의 양으로 대전된 펩티드의 C-말단 치환을 갖는 IMX313 운반 단백질의 변종을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. IMX313 운반 단백질의 바람직한 변종은 프로타민과 교차 반응하는 항체를 유도하지 않는다.

[0027] 본 발명은 특히, NP 항원의 단량체성 변종, 및 각각 서열 4 및 서열 5에 나타난 변성된 운반 단백질 IMX313T 또는 IMX313P를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0028] 본 발명은 또한, 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내의 DNA 서열을 포함하고, 서열 6에 나타난 tPA와 같은 신호 펩티드를 추가로 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 인코딩하는 재조합 DNA 서열에 관한 것이다.

[0030] 본 발명은 또한, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 또는 융합 단백질에 의해 인코딩된 DNA 서열을 포함하고,

2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에 기술한 대로 백신 보조제 또는 세포내 TLR에 대한 핵산 리간드를 추가로 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[0031] 본 발명은 또한, 인플루엔자의 치료 또는 예방 방법으로서의 백신 또는 면역요법으로서의 용도를 위한 DNA 플라스미드, 바이러스 벡터, 융합 또는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명을 자세히 기술하기 전에, 본 발명은 상세히 예시된 방법에 제한되지 않고, 물론 변동될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 특히, 본 발명은 인플루엔자로부터 온 하나 이상의 핵단백질 항원을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이며, 특정 인플루엔자 핵단백질에 제한되지 않는다.

[0033] 위에서든 또는 아래에서든 본원에서 인용되는 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 전체로서 참조문헌으로 본원에 포함된다. 그러나, 본원에서 언급되는 간행물은 그 간행물에서 보고되고 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 프로토콜, 시약 및 벡터를 기술하고 개시하는 목적으로 인용된다.

[0034] 또한, 본 발명의 실시는 달리 언급하지 않는 한, 관련 기술 분야 내의 관련 통상적인 단백질 정제 및 분자 생물학적 기술을 사용한다. 이러한 기술은 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 문헌에 상세히 설명되어 있다. 다음에 오는 청구항 및 이어지는 발명의 상세한 설명에서, 언어 또는 필요한 함축을 표현하기 위해 문맥상달리 필요한 경우를 제외하고, 단어 "포함한다(comprise)", "함유한다(contains)", "수반한다(involve)" 또는 "포함한다(include)" 또는 "포함한다(comprises)", "포함하는(comprising)", "함유하는(containing)", "수반된(involved)", "포함한다(includes)", "포함하는(including)"과 같은 변형은 포괄적 의미로, 즉, 언급된 특징의 존재를 명시하지만 본 발명의 다양한 실시태양에서 추가적인 특징의 존재 또는 추가를 배제하지 않도록 사용된다.

[0035] 본 발명의 보다 나은 이해를 위해 다음의 용어를 정의한다:

[0036] 인플루엔자 바이러스는 세 종류, A, B 및 C이다. 이 분류는 처음에 혈청학적이다: 인플루엔자 바이러스 A 핵단백질에 대한 항혈청은 다른 A형 바이러스의 핵단백질과 교차 반응하지만, B형 또는 C형 바이러스의 그것과는 하지 않는다. 인플루엔자 A 바이러스는, 그들의 적혈구응집소(H) 및 뉴라민분해효소(N) 당단백질의 혈청학적 교차 반응에 기초하여 아형으로 추가로 분류된다.

[0037] "인플루엔자 핵단백질"은 모든 세 종류의(A, B 및 C) 인플루엔자 바이러스의 핵단백질을 의미한다.

[0038] "운반 단백질"은 일반적으로 항원이 컨쥬게이션되거나 융합됨으로써 보다 면역원성이 되는 단백질을 의미한다. 여기에서 이 용어는 특히 항원을 운반하는 단백질의 의미로 사용된다. 단백질의 기능은 컨쥬게이션되거나 융합되는 상기 항원의 면역원성을 증가시키는 것이다.

[0039] "NP의 변종"은 인플루엔자 균주 A, B 및 C로부터 온 인플루엔자 핵단백질의 야생형의 90 % 이상의 동종성을 갖는 서열을 갖는 모든 단백질을 의미한다.

[0040] "닭 C4bp 올리고머화 도메인의 변종"은 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 W02007/062819, 및 PCT/EP2013/076289(참조문헌 둘 다 참조문헌으로 본원에 포함된다)에 기술된 서열 1의 C4bp 도메인의 변종, 특히 특허 출원 W02007/062819에 기술된 상기 서열 1의 48 이상의 연속적인 아미노산의 및/또는 70 % 이상 아미노산 서열 동일성을 갖는 단편이다.

[0041] "IMX313 운반 단백질의 변종"은 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에 기술된다.

[0042] 프로타민은 물고기로부터 얻어지는, 4500 돌턴의 평균 분자량을 갖는 일단의 이종성 펩티드로 이루어진다. 프로타민의 아미노산 조성의 약 67 %가 아르기닌이다. 이는 인슐린 제조(중성 프로타민 하계도른에서), 또는 헤파린 중성화에 오랫동안 사용되어왔다.

[0043] 용어 "융합 단백질"은 융합된, 상이한 출처로부터의 두 도메인을 포함하는 자연적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 나타낸다. 보다 정확히, 본 발명에서, 융합 단백질은 닭 C4bp 올리고머화 도메인, 특히 'IMX313T' 또는 'IMX313P'의 운반 도메인 변종에 융합된 인플루엔자 핵단백질 항원을 포함한다. 융합은 균일한 생성물을 생성하는 이점을 갖는다. 보다 형식적으로, "컨쥬게이션"은 유전학적으로 기술될 수 있다: 전-면역원성 운반 단백질을 인코딩하는 DNA가 항원을 인코딩하는 DNA로 스플라이싱된다. 항원은 운반 단백질의 N- 또는 C- 말단에 융합될 수 있다.

- [0044] 본 발명은, 인플루엔자 핵단백질 항원의 하나 이상의 변종 및 C4bp 올리고머화 도메인의 변종을 포함하고, 인플루엔자 핵단백질 항원에 대한 증가된 세포 면역 반응을 발휘하는, 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명에 따르면, 닭 C4bp 올리고머화 도메인, 특히 IMX313T 또는 IMX313P의 운반 단백질 변종에 융합된 핵단백질은, 임의의 종류의(A, B 또는 C) 인플루엔자 바이러스로부터 온 핵단백질일 수 있다.
- [0046] 핵단백질 항원은 운반 단백질, 특히 IMX313T 또는 IMX313P의 N- 또는 C-말단에 융합될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따르면, 하나 이상의 핵단백질이 하나의 운반 단백질, 특히 IMX313T 또는 IMX313P에 융합된다; 그러나, 동일하거나 상이한 둘 이상의 핵단백질이 동일한 운반 단백질에 융합될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 바람직한 측면에 따르면, 닭 C4bp 올리고머화 도메인, 특히 IMX313T 또는 IMX313P의 변종에 융합된 핵단백질 항원은 단량체성 항원이다. 정말로, 단량체화가 면역원성을 감소시키지 않는다면, 특허 출원 WO 2005/014654에 기술된 대로 단량체성 항원을 사용하는 것이 유리하다. 또한, NP는 결정에서 삼량체를(Ye 2006) 형성하고 다른 올리고머를 *체 내*(Arranz, Moeller) 형성한다. 삼량체성 또는 올리고머성 단백질을 IMX313T 또는 IMX313P와 같은 칠량체성 단백질에 융합하면 입체 충돌 발생의 위험이 있다. 반면, 자연적으로 올리고머성 인 단백질의 단량체성 형태는 감소된 면역원성을 갖는다(Fiers).
- [0049] 단량체성 핵단백질 항원을 얻기 위해, 당업자는 단량체화를 유도하기 위해 NP 항원의 단백질 서열에 도입될 수 있는 상이한 점 돌연변이를 알고 있다. 특히, NP 항원은 다음의 두 점 돌연변이: E339A 및 R416A 중 하나 이상을 나타낸다.
- [0050] 본 발명의 한 실시태양에서, NP 항원은 인플루엔자 균주 A로부터 온다.
- [0051] 본 발명의 바람직한 실시태양에서, NP 항원은 점 돌연변이 E339A 및 R416A 둘 다를 포함하고, 따라서 단량체성이다.
- [0052] 본 발명의 다른 실시태양에서, NP 항원은 서열 2에 나타난 폴리펩티드 서열을 나타낸다.
- [0053] DNA 백신으로부터 발현된 항원에 대한 증가된 세포 면역 반응은 종래에 IMX313을 인코딩하는 유전자에 항원의 유전자를 융합함으로써 얻어졌다(Spencer). 유리하게, 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에 기술된 것과 같은, 항원에 융합되면 이 항원에 대해 개선된 면역 반응을 가능하게 하는, 서열 3에 나타난 서열 ZXBBBBZ(식 중, (i) Z는 아미노산이거나 부재이고, (ii) X는 아미노산이고 (iii) B는 아르기닌(R) 또는 리신(K)이다)를 갖는 하나 이상의 양으로 대진된 펩티드의 C-말단 치환을 나타내는 이 도메인의 변종. IMX313 운반 단백질의 바람직한 변종은 프로타민과 교차 반응하는 항체를 유도하지 않는다.
- [0054] IMX313T 및 IMX313P로 불리는 특정 개선된 변종은 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에 최근 기술되었다. 이들의 펩티드 서열은 다음과 같다:
- 서열 4 - KKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVQLQSPRRRRS
- 서열 5 - KKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVGRRRRRS
- [0055]
- [0056] 본 발명의 다른 실시태양에서, 융합 단백질은 신호 펩티드를 포함하는 NP 항원을 포함한다. 여러 연구는 NP 단백질이 주로 핵에 위치하고, 이것이 이러한 DNA 백신 면역원성을 잠재적으로 감소시킬 수 있다는 것을 시사했다. 따라서, 신호 펩티드 첨가에 의해 NP 항원의 분비를 가능하게 하는 것이 바람직하다. 특히, 상기 신호 펩티드는 루오(Luo)에 기술된 tPA(조직 플라스미노겐 활성화자(tissue plasminogen activator)) 분비 신호 펩티드이다.
- [0057] 본 발명의 특정 실시태양에서, NP 항원은 단량체성이고 신호 펩티드를 포함한다.
- [0058] 본 발명의 다른 실시태양에서, NP 항원은 돌연변이 E339A 및 R416A 둘 다, 및 신호 펩티드 tPA를 포함한다. 실시예에 나타난 대로, IMX313T 및 신호 펩티드를 포함하는 단량체성 NP 항원을 포함하는 융합 단백질은 마우스에 DNA 백신으로 주사될 때 Th2 반응보다 강력한 Th1 반응(IgG2a)을 유도한다(도 13). 면역학자들 사이에서는 Th1 반응이 Th2 반응보다 바람직하다는 인식이 있다. 그러나 이 목적을 위해 개발된 보조제 사용 없이 항원에 대해 Th1 반응을 우선적으로 향상시키는 방법은 알려지지 않았다. 아래의 실시예에서, 인플루엔자 핵단백질 항원의 IMX313T 또는 IMX313P의 융합이 Th1 반응을 우선적으로 향상시키는 것으로 나타난다.
- [0059] 본 발명은 또한 코일드-코일 도메인을 포함하는 임의의 운반 단백질, 및 인플루엔자로부터 온 하나 이상의 핵단

백질(NP) 항원을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 특히, 상기 핵단백질 항원은 단량체성이다.

[0060] 본 발명은 또한, 위에서 기술한 것과 같은 융합 단백질을 인코딩하는, 및 특히:

[0061] - NP 항원 및 IMX313T 또는 IMX313P를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는;

[0062] - 단량체성 NP 항원 및 IMX313T 또는 IMX313P를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는;

[0063] - 신호 펩티드를 포함하는 NP 항원 및 IMX313T 또는 IMX313P를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는;

[0064] - 신호 펩티드를 포함하는 단량체성 NP 항원 및 IMX313T 또는 IMX313P를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는, 핵산에 관한 것이다.

[0065] 바람직한 실시태양으로, 상기 핵산은 인플루엔자 A로부터 온 단량체성 NP 항원을 포함하는 융합 단백질을 코딩한다. 바람직한 실시태양으로, 상기 핵산은 프로타민과 항체 교차 반응을 유도하지 않는 융합 단백질을 코딩한다. 특히, 상기 핵산은 서열 6 및 서열 7에 나타낸 서열을 나타낸다.

[0066] 본 발명은 또한 위에서 나타낸 핵산, 및 숙주 세포 내의 DNA 카세트의 발현을 담보하기 위한 프로모터 및 인핸서와 같은 유전학적 요소를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0067] 본 발명은 또한:

[0068] - 위에서 나타낸 융합 단백질 또는 핵산 또는 벡터, 및

[0069] - 세포내 TLR에 대한 핵산 리간드, 및/또는 임의의 다른 백신 보조제를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[0070] **톨-유사 수용체(TLR)**

[0071] 선천성 면역계의 세포는 제한된 집단의 균계 인코딩된 수용체를 통해 병원체를 검출한다. 이들 선천성 면역 수용체는 병원체에 의해 발현된 일련의 보존된 분자 구조, PAMP(병원체 관련 분자 패턴(pathogen associated molecular patterns))를 인식한다.

[0072] 이들 병원체-유래 분자는 일반적으로 한 세트의 병원체에 대해 매우 특이적인 복잡한 분자를 나타낸다. TLR은 병원체에 의한 감염 직후 면역계에 알릴 수 있는 한 세트의 면역 패턴 인식 수용체를 나타낸다. 이들은 선천성 및 적응성 면역 사이에서 중심 성분으로서의 중요한 역할을 하고 바이러스에서 기생충까지 다양한 병원체를 알아낼 수 있다. 첫번째 특성화된 톨이라고 불리는 TLR은, 지금까지 확인된 병원체 인식에 수반된 성체 초파리 및 10 인간 등가물에서 항진균 반응의 원인인 것으로 나타났다. TLR은 그들의 국소화 및 그들이 인식하는 PAMP의 종류에 기초하여 상이한 그룹으로 분류될 수 있다. TLR 1, 2, 4, 5 및 6은 주로 박테리아 생성물을 인식하는 세포 표면에 주로 발현되고, TLR 3, 7, 8 및 9는 세포내 구획에 국소화되고 주로 바이러스 생성물 및 핵산을 인식한다.

[0073] **세포내 톨-유사 수용체**

[0074] 그밖에, 면역화 방법을 개선하기 위해서는, TLR 수용체를 통해 신호전달을 제한하는 것이 또한 매우 중요하다. 톨-유사 수용체(TLR)는 선천성 면역계에서 핵심 역할을 하는 단백질 종류이다. 일단 미생물이 생물의 물리적 장벽을 통과하면, 그들은 TLR에 의해 인식된다. 미생물로부터의 인식된 특징은 바이러스의 이중가닥 RNA, 박테리아 및 바이러스 및 특정 RNA 및 DNA 분자의 비메틸화된 CpG 위치 섬을 포함한다.

[0075] 이러한 핵산은 톨-유사 수용체(이하 TLR) 종류에 대한, 및 특히 TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR13에 대한 리간드이므로 상당한 관심의 대상이다(Blasius 및 그의 참조문헌). 이들은 종종 "세포내 톨-유사 수용체"로 분류되지만, 적어도 TLR3은 일부 세포 표면에 또한 존재한다. TLR3은 기도, 자궁, 각막, 질, 자궁경부, 담관 및 장상피 세포를 포함한 다양한 상피 세포에 발현되고, 이들 세포는 그들의 세포 표면 위에 TLR3을 발현하는 것으로 보인다(Akira).

[0076] 이들 수용체, 및 특히 TLR3 수용체를 통한 신호전달 제한의 중요성은 용량 의존적이다. 따라서 핵산 리간드를 항원에 견고하게 결합시키는 것은, 항원이 없을 때 TLR에 결합하는 것을 방지하게 위해 필수적이다. 견고하게 결합된 세포내 TLR 리간드는 따라서 결합이 덜 견고한 제제에 비해 매우 바람직하다. 따라서, 통상의 기술자는, 다른 곳의 TLR 수용체에의 리간드 결합에 의해 매개되는 잠재적인 부정적인 효과를 감소시키는 목표와 더불어, TLR 리간드에 효율적으로 결합할 수 있어 항원이 면역 반응을 촉발하게 될 세포에 도달하기 전에 항

원에서 분리되지 않는, 항원성 조성물을 찾고 있다.

- [0077] 본원에서, 및 특히 실시예에서, 다음의 세포내 TLR 리간드가 사용되었다:
- [0078] - TLR3에 대해: 이중가닥 RNA의 유사체인, 폴리시티딜산에 혼성된 폴리이노신산의 폴리뉴클레오티드의 듀플렉스인 폴리 I:C. 사슬 길이는 각 가닥에 대해 20 뉴클레오티드였다.
- [0079] - TLR7에 대해: 서열 5' GsCsCsCsGsUsCsUsGsUsUsGsUsGsUsGsAsCsUsC 3'(식 중, "s"는 포스포티오에이트 연결을 나타낸다)(서열 8)을 갖는 ssRNA40으로 불리는 올리고뉴클레오티드;
- [0080] - TLR9에 대해: 서열: 5' tccatgacggttcctgacgtt 3'(서열 9)을 갖는 ODN1826으로 불리는 올리고뉴클레오티드.
- [0081] 본 발명의 특정 측면에서, 면역원성 조성물은 다음을 포함한다:
- [0082] - 위에서 나타난 융합 단백질 또는 핵산 또는 벡터, 및
- [0083] - 폴리 I:C.
- [0084] 본 발명은 또한 인플루엔자 질병의 예방 또는 치료를 위한 백신으로의 용도를 위한, 위에서 기술한 것과 같은 융합 단백질에 관한 것이다. 상기 인플루엔자 백신은 복수의 응용을 위해 사용될 수 있다:
- [0085] - 계절성 인플루엔자의 예방;
- [0086] - 유행병 상황에서의 예방;
- [0087] - '전반적인' 예방, 즉 모든 종류의 인플루엔자 바이러스에 대한 백신 면역화;
- [0088] - 모든 종류의 인플루엔자의 면역요법.
- [0089] 인플루엔자의 예방 또는 치료 방법은, 본 발명에 따른 특정 백신으로, 인체 또는 동물체에서 수행될 수 있다. 당업자는 각 특정 응용 및 특정 환자를 위해 백신 조성물을 조정하는 방법을 안다.
- [0090] 본 발명은 또한 인플루엔자 질병의 예방을 위한 DNA 백신으로의 용도를 위한, 위에서 기술한 것과 같은 핵산에 관한 것이다.
- [0091] 본 발명은 또한 인플루엔자 질병의 예방을 위한 바이러스 백신으로의 용도를 위한, 위에서 기술한 것과 같은 벡터에 관한 것이다.
- [0092] 본 발명은 또한 인플루엔자 질병의 예방을 위한 백신으로의 용도를 위한, 위에서 기술한 것과 같은 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0093] 본 발명은 또한, 항원의 서열 4 및 서열 5에 나타난 서열을 갖는 운반 단백질 IMX313T 또는 IMX313P로의 융합을 포함하는, 인플루엔자의 핵단백질 항원에 대한 세포 면역 반응 증가 방법에 관한 것이다.
- [0094] 본 발명의 다른 실시태양에서, 위에서 기술한 것과 같은 융합 단백질 또는 핵산 또는 벡터 또는 면역원성 조성물은 인플루엔자 질병의 면역요법에 사용된다.
- [0095] 도 1: 부모 플라스미드 pcDNA3 NP의 지도 - 실시예에서 기술한 대로 구축된 이 플라스미드 및 그의 유도체를 DNA 백신 접종을 위해 사용했다.
- [0096] 도 2: NP, 또는 IMX313에 융합된 NP를 인코딩하는 플라스미드를 사용한 면역화에 대한 반응으로 IFN- γ 를 분비하는 총 T 세포의 비교.
- [0097] 도 3: NP를 인코딩하는 플라스미드 또는 IMX313에 융합된 NP를 인코딩하는 플라스미드를 사용한 면역화에 대한 반응으로 IFN- γ 를 분비하는 CD8 및 CD4 T 세포의 비교.
- [0098] 도 4: NP 또는 IMX313에 융합된 NP를 인코딩하는 DNA 플라스미드에 의해 유도되는 재조합 NP에 대한 IgG 항체 반응의 비교.
- [0099] 도 5: NP 또는 IMX313에 융합된 NP를 인코딩하는 DNA 플라스미드에 의해 유도되는 재조합 NP에 대한 IgG 항체 서브클래스 반응의 비교.
- [0100] 도 6: NP, 단량체성 NP(NPm), IMX313에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313) 및 IMX313T에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313T)를 인코딩하는 플라스미드에 대한 총 T 세포 반응의 비교.

- [0101] 도 7: NP, 단량체성 NP(NPm), IMX313에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313) 및 IMX313T에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313T)를 인코딩하는 플라스미드에 대한 CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응의 비교.
- [0102] 도 8: NP, 단량체성 NP(NPm), IMX313에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313) 및 IMX313T에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313T)를 인코딩하는 플라스미드에 대한, 재조합 NP를 사용하여 ELISA에 의해 측정된, IgG 항체 세포 반응의 비교.
- [0103] 도 9: NP, 단량체성 NP(NPm), IMX313에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313) 및 IMX313T에 융합된 단량체성 NP(NPm-IMX313T)를 인코딩하는 플라스미드에 대한, 재조합 NP를 사용하여 측정된, IgG 항체 서브클래스 반응의 비교.
- [0104] 도 10: 다양한 NP 융합 단백질에 대한 tPA 신호 펩티드에 의한 분비의 영향. 총 T 세포를 NP, 분비된 NP(tPA-NP), 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm), IMX313에 융합된 분비된 NP(tPA-NP-IMX313), IMX313에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313), 및 IMX313T에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313T)를 비교하여 IFN γ ELISpot에 의해 측정했다.
- [0105] 도 11: NP, 분비된 NP(tPA-NP), 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm), IMX313에 융합된 분비된 NP(tPA-NP-IMX313), IMX313에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313), 및 IMX313T에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313T)를 비교하는 IFN γ ELISpot에 의해 측정된, 다양한 NP 융합 단백질에 대한 CD8+ 및 CD4+ 반응에 대한 tPA 신호 펩티드에 의한 분비의 영향.
- [0106] 도 12: NP, 분비된 NP(tPA-NP), 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm), IMX313에 융합된 분비된 NP(tPA-NP-IMX313), IMX313에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313), 및 IMX313T에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313T)를 비교하는 ELISA에 의해 측정된, 다양한 NP 융합 단백질에 대한 IgG 반응에 대한 tPA 신호 펩티드에 의한 분비의 영향.
- [0107] 도 13: NP, 분비된 NP(tPA-NP), 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm), IMX313에 융합된 분비된 NP(tPA-NP-IMX313), IMX313에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313), 및 IMX313T에 융합된 분비된 단량체성 NP(tPA-NPm-IMX313T)를 비교하는 ELISA에 의해 측정된, 다양한 NP 융합 단백질에 대한 IgG 서브클래스 반응에 대한 tPA 신호 펩티드에 의한 분비의 영향.
- [0108] 도 14: 핵단백질의 IMX313T에의 융합은 NP의 면역원성을 수증유 보조제 아다백스(AddaVax)(인비보젠(Invivogen)) 내의 NP 제제와 동일한 정도로 증가시키고; 아다백스 및 NPm-IMX313T 융합 단백질의 사용은 시너지 효과를 나타낸다.
- [0109] 도 15: CD4 및 CD8 세포 분리 후 도 14에 나타난 결과의 분석. 아다백스 및 NPm-IMX313T 단백질의 시너지 효과는 CD4 반응 및 CD8 반응 둘 다에서 나타난다.
- [0110] 도 16: 핵단백질에 대한 IgG 반응. 보조제 아다백스가 없을 때, 핵단백질의 IMX313T에의 융합은, NP에 비해 IgG 타이타의 현저한 변화를 보이지 않았다. 그러나 아다백스가 있을 때, 융합 단백질은 핵단백질보다 현저히 더 면역원성이다.
- [0111] 도 17: 아다백스가 있거나 없는 NP 또는 NPm-IMX313T를 사용한 면역화 후, 재조합 NP를 사용하여 측정된, IgG 항체 서브클래스 반응의 비교. 표 4에서 보이는 대로, 아다백스가 있거나 없는 NP는 Th1 반응을 유도했다. 그러나 아다백스가 있거나 없는 융합 단백질 NPm-IMX313T는 Th1에 대한 IgG 반응을 추가로 극대화했다.
- [0112] 도 18: 면역화에 사용된 재조합 단백질의 SDS-PAGE 분석. 레인 1: 분자량 마커(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)); 레인 2: 재조합 NP(임제넥스(Imgenex)); 레인 3: 정제된 NP; 레인 4: 정제된 NPm-IMX313T.
- [0113] 도 19: 재조합 NPm-IMX313P 단백질의 SDS-PAGE 분석. 레인 1: 정제된 NP; 레인 2: 정제된 NPm-IMX313T; 레인 3: 정제된 NPm-IMX313P; 레인 4: 분자량 마커(뉴 잉글랜드 바이오랩스).
- [0114] 도 20: IMX313P 단백질을 사용한 마우스의 면역화 후, 프로타민에 대한 또는 IMX313P에 대한 IgG 반응. 이는, 마우스가 IMX313P에 대해 IgG 항체(및 IMX313과 일부 교차 반응)를 생성하지만, 프로타민과 교차 반응하는 항체는 발견되지 않았다는 것을 나타낸다.
- [0115] **실시예**
- [0116] DNA 백신 접종을 위해, 도 1에 나타난 부모 플라스미드 pcDNA3-NP를 아래의 실시예에서 기술한 대로

변형시켰다. 플라스미드 pIMX494 및 pIMX497은 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에 기술된다.

[0117] **실시예 1 - NP 인코딩 플라스미드로의 IMX313 삽입**

[0118] 올리고뉴클레오티드 프라이머 IMX1289 (5' caatgcagaggagtacgacaatggatccaagaagcaaggtgatgctgatg 3' - 서열 10) 및 IMX1290 (5' GTAGAAACAAGGGTATTTTCTTtattactccttgctcagtccttgc 3' - 서열 11)을 사용하여 플라스미드 pIMX494로부터 IMX313 코딩 서열을 증폭시키고 가이저(Geiser)에 의해 기술된 대로 플라스미드 pcDNA3-NP로 삽입시켰다.

[0119] **실시예 2 - tPA 신호 펩티드 삽입**

[0120] 올리고뉴클레오티드 IMX1305(5' cactgagtgcacataaaatcatgGATGCAATGAAGAGAGGGC 3' - 서열 12) 및 IMX1306(5' cgtaagaccgtttggccttgctagctcttctgaatcgggcatggatttcc 3' - 서열 13)을 사용하여 벡터 pSG2-85A(Spencer)로부터 tPA 신호 펩티드를 증폭시키고 가이저에 의해 기술된 대로 다수의 플라스미드에서 NP 코딩 서열의 N-말단으로 인-프레임 삽입시켰다.

[0121] **실시예 3 - 단량체성으로 만들기 위해 NP의 두 점 돌연변이 생성**

[0122] 올리고뉴클레오티드 프라이머 IMX1287(5' ccattctgccgcatttgCagatctaagag 3' - 서열 14) 및 IMX1288(5' CAAAAGGGAGATTGCGCTGTACTGAGAAC 3' - 서열 15)을 사용하여 NP 유전자의 내부 단편을 증폭시키고, 가이저에 의해 기술된 대로 PCR 생성물을 NP-인코딩 플라스미드로 삽입시켰다. 두 올리고뉴클레오티드 모두 NP 유전자에 불완전하게 매칭되었기 때문에, PCR 생성물의 삽입은 두 점 돌연변이를 생성했다. IMX1287 프라이머는 돌연변이 E339A(GAA에서 GCA)를 생성한 반면, IMX1288 프라이머는 NP 유전자에서 돌연변이 R416A(AGA에서 GCA)를 생성했다.

[0123] **실시예 4 - IMX313T 삽입**

[0124] 올리고뉴클레오티드 프라이머 IMX1289(서열 10) 및 IMX051(5' GTAGAAACAAGGGTATTTTCTTtattaggagcgcagcgcgacgc 3' - 서열 16)을 사용하여 플라스미드 pIMX497로부터 IMX313T 코딩 서열을 증폭시키고, 가이저에 의해 기술된 대로 다양한 pcDNA3-NP-유도 플라스미드로 삽입시켰다.

[0125] **실시예 5 - 본 발명에 따른 핵산을 사용한 DNA 번역화**

[0126] **5.1. 프로토콜**

[0127] 다섯 마리 암컷 BALB/C 마우스 집단을, 다양한 플라스미드 DNA로, 주사당 20 μ g의 각 플라스미드를 사용하여 14 일 간격으로 2 회 근육내로 번역화했다. 번역 반응을 28 일째에 측정하여, 다양한 변형: +/- IMX313 또는 IMX313T; +/- tPA 신호 펩티드; +/- 단량체화 돌연변이의 영향을 판단했다.

[0128] 28 일째에 비장세포를 사용하여 ELISPOT에 의해 항원 특이적 T 세포 반응을 측정했다. 번역화된 마우스로부터 단리한 정제된 비장 CD4+, CD8+ 및 총 T 세포를 유로진텍(Eurogentec)에서 구입한 NP A 인플루엔자 펩티드(아미노산 366-374)와 공배양했다.

[0129] **ELISPOT 분석:** 편평-바닥, 96-웰 니트로셀룰로스 플레이트(밀리타이터; 밀리포어)를 IFN- γ mAb(15 μ g/ml; 맵테크(MABTECH), 스톡홀름)로 코팅하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 인큐베이션했다. PBS로 세척 후, 플레이트를 10 % 소 태아 혈청으로 한 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 차단시켰다. 웰 당 2×10^6 세포를 15 μ g/ml 항-인간 IFN- γ 로 코팅된 IPVH-막 위에서 2 μ g/ml의 최종 농도의 관련 펩티드(NP A 인플루엔자 펩티드)로 자극시키고 20 시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBS로 철저히 세척하여 세포를 제거하고, IFN- γ mAb(1 μ g/ml의 비오틴, 맵테크)를 각 웰에 첨가했다. 2 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고 스트렙타비딘-HRP (1 μ g/ml; 맵테크)로 한 시간 동안 실온에서 전개시켰다. 세척 후, 기질(3-아미노-9-에틸카바졸 (시그마(Sigma)))를 첨가하고 15 분 동안 인큐베이션했다. 추가 세척 후, 붉은 점을 현미경하에서 계수했다.

[0130] 체액 면역 반응을 연구하기 위해, 본 발명자들은 총 IgG에 대해 특이적인 ELISA에 의해, IgG1 및 IgG2a에 대해 별도로 항체 수준을 평가하여, Th1 및 Th2의 상대적인 비율을 평가했다. BALB/c 마우스는 IgG1 항체의 자극과 관련 있는 Th2-형 면역 반응으로 인플루엔자 백신에 통상적으로 반응한다. 그러나, 바이러스 감염으로부터 생존한 마우스의 혈청에 존재하는 주요 항체 동형은 IgG2a이고, 이는 Th1-형 면역 반응 도중 자극된다(Huber). IgG2a 항체의 자극은 인플루엔자 백신 접종의 증가된 효율과 관련되었다.

[0131] ELISA를 위해, 항원을 0.1 M 탄산/중탄산 나트륨(pH 9.6)에 5 mg/ml의 농도로 희석하고 이어서 맥시소르브(MaxiSorb) 플레이트(눈크-이몰론(Nunc-Immulon), 덴마크)의 웰을 코팅하는 데에 사용했다. 시험 혈청의 2배 연속 희석액을 웰에 첨가하고, 세척 후, 결합된 항체를 겨자무 과산화효소에 컨주게이션된 항-마우스 IgG, 또는 항-마우스 IgG1 또는 항-마우스 IgG2a(시그마)로 검출했다. o-페닐렌디아민(시그마) 및 H₂O₂ 첨가 후 490 nm에서 흡광을 측정했고; 반응은 1 M 황산으로 정지시켰다.

[0132] 결과는 도 2 내지 5에 나타낸다.

[0133] 5.2. 예비 실험에서, 본 발명자들은 NP 또는 IMX313에 융합된 NP를 인코딩하는 DNA 백신에 의해 유도된 NP에 대한 총 T 세포 반응을 시험했다. NP-IMX313 면역화된 마우스로부터 단리된 총 T 세포는 NP 면역화된 마우스의 그것에 비해 현저히 높은 IFN γ 반응을 나타내어 IMX313가 T 세포 반응을 증가시키는 능력을 확인했다.

[0134] 도 2는 융합 단백질이 세포질에서 발현될 때, 부모 NP 항원 유전자를 IMX313 유전자에 융합하는 것이 NP에 대한 T 세포 반응을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0135] 5.3. ELISPOT에서 검출된 IFN- γ 가 CD4 또는 CD8 T 세포에 의해 생성되었는지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 면역화된 마우스로부터 비장 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 정제했고, 이들을 인플루엔자 A NP 펩티드와 공배양했다. CD8+ T 세포로부터의 IFN- γ 생성의 현저한 증가가 NP-IMX313으로 면역화된 집단에서 검출되었다. IFN- γ 를 생성하는 항원-특이적 CD8+ 세포의 퍼센티지는 CD4+ T의 상응하는 집단보다 높았다(도 3).

[0136] 도 3은 NP 항원 유전자를 IMX313 유전자에 융합시키는 것이 NP 항원에 대한 CD4+ 및 CD8+ 반응 둘 다를 향상시킴을 나타낸다.

[0137] 5.4. 이어서 본 발명자들은 면역화 후 및 최종 면역화 14 일 후 NP에 대한 항체 반응을 검사했고, NP-특이적 IgG Ab 반응이 혈청에서 측정되었다. NP 대조군 마우스 및 NP-IMX313이 주어진 마우스는 보통의 NP-특이적 IgG Abs를 나타냈고(도 4), 이는 NP-IMX313으로 면역화된 집단에서 더 높았다.

[0138] 도 4는 NP 유전자를 IMX313 유전자에 융합시키는 것이 NP 항원에 대한 IgG 항체 반응을 향상시킴을 나타낸다.

[0139] 5.5. NP-특이적 IgG1 및 IgG2a 항체(각각 Balb/C 마우스에서 Th2 및 Th1 유형 반응을 나타냄)의 존재에 대해 혈청을 또한 검사했다. NP-특이적 IgG1 및 IgG2a 항체 동형이 NP-IMX313 면역화된 마우스의 혈청에서 검출되었지만; NP가 단독으로 주어진 마우스로부터의 혈청 샘플은 단지 낮은 수준의 IgG1 및 IgG2a Ab를 나타냈다(도 5).

[0140] 도 5는 NP 항원에 대해 유도된 항체의 서브클래스 분포를 나타낸다. IMX313 유전자로의 융합은 IgG1 반응보다 IgG2a 반응을 향상시켜, NP에 대한 Th2-편향된 반응을 NP-IMX313에 대한 Th1-편향된 반응으로 전환시켰다.

[0141] 결과를 여기에 표로 나타낸다:

[0142] <표 1>

면역원성 성분	IgG2a 서브클래스	IgG1 서브클래스	IgG2a/IgG1	Th 패턴
NP	0.215	0.265	0.8	Th2
NP-IMX313	0.528	0.35	1.51	Th1

[0143] 도 6은 NP의 단량체화(NP_m)가 그의 면역원성을 약간 향상시킨다는 것(향상이 통계학적으로 의미 있지 않지만; NS); NP_m 면역원성이 IMX313 유전자에의 융합에 의해 추가로 향상된다는 것; 및 마지막으로 단량체성 NP의 IMX313T 유전자로의 융합이 NP 면역원성을 추가로 향상시킨다는 것을 나타낸다. 놀랍게도, NP의 단량체화는 그의 면역원성을 감소시키지 않는다.

[0145] 도 7은, CD4+ 및 CD8+ 반응의 분석 결과, 도 6에서와 동일한 등급 순서가 나타난다는 것을 보여준다: NP의 단량체화는 NP의 면역원성을 약간 향상시키지만 현저히 향상시키지 않는다(NS); NP의 면역원성은 IMX313 유전자로의 융합에 의해 추가로 향상되지만, NP 면역원성의 가장 큰 개선은 단량체성 NP의 IMX313T 유전자로의 융합에 의해 얻어진다.

[0146] 도 8은 도 6 및 7에서 T 세포 반응(CD4+ 및 CD8+ 둘 다)에 대해 본 것과 동일한 등급 순서가 B 세포 반응에 대

해 발견된다는 것을 나타낸다. NP에 대한 총 IgG 반응은 IMX313보다 IMX313T의 경우에 더 높았다.

[0147] 도 9는 단량체성 NP 항원에 의해 유도된 항체의 서브클래스 분포를 나타낸다. NP를 사용한 경우와 같이, IMX313 유전자로의 융합은 IgG1 반응보다 IgG2A 반응을 증강시켜, NP에 대한 Th2-편향된 반응(0.8)을 NP-IMX313에 대한 Th1-편향된 반응(1.51)으로 전환시켰다. Th2에서 Th1 편향으로의 이러한 반전은 IMX313보다는 IMX313T로의 융합에 의해 유지된다(1.5). 인플루엔자 백신에서의 IgG2a 항체 발현은 바이러스 제거 및 치명적인 인플루엔자 감염에 대한 증가된 방어와 상관관계가 있다. ELISA에 의해 측정된 항체 동형 모두의 증가된 유도는 백신 효율에 대해 중화 단독보다 더 나은 상관성이었다(Huber).

[0148] <표 2>

면역원성 성분	IgG2a 서브클래스	IgG1 서브클래스	IgG2a/IgG1	Th 패턴
NP	0.215	0.265	0.8	Th2
NPm	0.4	0.363	1.1	Th1
NPm-IMX313	0.528	0.35	1.51	Th1
NPm-IMX313T	0.95	0.632	1.5	Th1

[0149] 실시예 6 - NP 항원의 분비가 그의 면역원성을 향상시켰다

[0151] 조직 플라즈미노겐 활성자(tPA) 분비 신호 서열을 함유하는 일련의 NP DNA 백신 구축물을 제조했다: tPA-NP, tPA-NPm, tPA-NPm-IMX313, 및 tPA-NPm-IMX313T. tPA의 NP로의 융합이 면역화된 동물로부터의 체액 및 세포 면역 반응에 미치는 영향을 분석했다.

[0152] tPA 함유 구축물로 면역화된 마우스는 NP 면역화된 마우스의 그것에 비해 현저히 높은 IFN γ 반응을 보였고 IMX313T 및 단량체화 돌연변이가 T 세포 반응을 증가시키는 능력을 확인했다.

[0153] 도 10는, 단량체이든 아니든 간에(tPA-NP 대 tPA-NPm), NP 항원 분비를 강제시키는 것이 그의 면역원성을 향상시키는 것을 나타낸다(NP 대 tPA-NP). 그러나, IMX313으로의 융합은 NP의 단량체성 버전의 사용이 변형되지 않은 항원을 사용하는 것보다 면역원성이었다는 것을 나타냈다(tPA-NP-IMX313 대 tPA-NPm-IMX313). 그리고 IMX313T에 의한 IMX313의 치환이 NP의 면역원성을 추가로 향상시켰다(tPA-NPm-IMX313 대 tPA-NPm-IMX313T).

[0154] 도 11은 상이한 분비된 버전의 NP에 대한 CD8+ 및 CD4+ 반응을 나타낸다. 도 10에서와 동일한 등급 순서가 관찰되고, 항원 단량체화의 유용성이 IMX313이 첨가될 때 다시 한 번 확인된다. 앞의 도에서 본 것과 같이, IMX313보다 IMX313T가 사용될 때 가장 큰 면역 반응이 관찰된다.

[0155] 도 12는 항원 NP에 대한 총 IgG 반응을 나타내고 T 세포 반응에 대해 도 11과 동일한 결론을 이끌어낸다: 가장 큰 반응은 IMX313T가 사용될 때 관찰되지만, 분비(NP 대 tPA-NP) 및 단량체화(tPA-NP-IMX313 대 tPA-NPm-IMX313) 또한 중요하게 기여한다.

[0156] NP 단독(NP, tPA-NP 또는 tPA-NPm과 같이)으로 면역화된 마우스는 혈청 내의 항-NP IgG 항체가 없거나 매우 낮은 수준이었다(도 12). 반면 tPA-NP-IMX313, tPA-NPm-IMX313 또는 tPA-NPm-IMX313T로 면역화된 마우스는, 높은 수준의 전신성 NP-특이적 IgG 항체 반응을 나타냈다; 다시 한번, tPA-NPm-IMX313T 면역화된 마우스가 모든 다른 집단 면역화된 마우스에 비해 현저히 높은(p < 0.001) IgG 항체 반응을 보였다. 이는 모든 변형(단량체화 돌연변이, tPA 및 IMX313T)의 조합이 부모 서열 또는 다른 조합에 비해 항원에 대한 현저히 향상된 면역원성을 부여한다는 것을 나타낸다.

[0157] 도 13은 NP에 대한 B 세포 반응의 서브클래스 분석을 나타내고, NP 단독으로의 최초 Th2 편향이 IMX313에 의해 및 IMX313T에 의해 반전된다는 것을 나타낸다. 분비는 그 자체로 효과가 미미하지만(NP 대 tPA-NP), 단량체화(tPA-NP-IMX313 대 tPA-NPm-IMX313) 및 이어서 IMX313T에 의한 IMX313 대체(tPA-NPm-IMX313 대 tPA-NPm-IMX313T) 모두 향상된 Th1(IgG2a) 대 Th2(IgG1) 반응에 기여한다.

[0158] tPA-NPm-IMX313T 자체로 거의 동등하게 Th1 및 Th2 반응을 향상시킨다는 것은 매우 중요하다. NP의 IMX313로의 융합은 Th1 및 Th2 반응이 둘 다 증가되었다는 것을 나타내고, 반응 종류의 뚜렷한 이동은 없다. 그러나 IMX313T 및 단량체화 돌연변이가 조합되면, Th1 반응(IgG2a)이 우세해지기 시작한다. 면역학자들 사이에서 Th1

반응이 Th2 반응보다 바람직하다는 것에 의견이 일치한다(도 13).

[0159] 이들 결과를 여기에 표로 나타낸다:

[0160] <표 3>

면역원성 성분	IgG2a 서브클래스	IgG1 서브클래스	IgG2a/IgG1	Th 패턴
NP	0.215	0.265	0.8	Th2
tPA-NP	0.27	0.31	0.85	Th2
tPA-NPm	0.328	0.363	0.9	Th2
tPA-NPm-IMX313	0.528	0.35	1.51	Th1
tPA-NPm-IMX313T	0.95	0.632	1.5	Th1

[0161]

[0162] **실시예 7 - 재조합 NPm-IMX313T 단백질 제조**

[0163] C-말단 6-His-태그를 가진 균주 A/WSN/33(Tarus 2012b)의 야생형 H1N1 NP 단백질을 발현하는 pET22-유래 플라스미드를 박테리아 균주 C43R에서 발현했다. 이 균주는 C43(DE3)를 플라스미드 pRARE2(노바젠)를 발현하는 흔치 않은 코돈으로 형질변환함으로써 만들어진다. 발현은 TB(테리픽 브로스(terrific broth)) 배지 내에서 IPTG로 유도했다. 과발현된 단백질을 먼저 정화를 위해 예(Ye)에 의해 및 타루스(Tarus)에 의해 기술된 대로 및 이온-교환 단계에서 정제했지만, 마지막 단계에서 융합 단백질은 헤파린 세파로스 위에서 친화도에 의해, 그리고 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에서 기술한 대로 겔 여과(하이 프랩(Hi Prep) 26/60 세파크릴 S-300)에 의해 정제했다.

[0164] NPm-IMX313T 단백질을 발현하기 위해, NP를 발현하는 플라스미드를 두 단계로 변형시켰다. 먼저, 올리고뉴클레오티드 프라이머 IMX1287(5' ccattctgccgcatttgCagatctaagag 3' - 서열 14) 및 IMX1288(5' CAAAAGGGAGATTTCCTGTACTGAGAAC 3' - 서열 15)을 사용하여, 단량체화 돌연변이를 실시예 3에서와 같이 도입했다. 두번째 단계에서, 실시예 4에서와 동일한 올리고뉴클레오티드 프라이머: IMX1289(서열 10) 및 IMX051(5' GTAGAAACAAGGGTATTTTCTTtattaggagcgcagcgcgacgc 3' - 서열 16)를 사용하여, 6-His-태그를 IMX313T 코딩 서열로 교체했다. 이어서 PCR 생성물을 가이저에 의해 기술된 대로 6-His-태그를 대신하여 삽입했다.

[0165] NPm-IMX313T 융합 단백질은 NP 단백질과 동일한 방식 및 균주에서 발현되었고, 동일한 크로마토그래피 단계를 사용하여 정제했다.

[0166] **실시예 8 - 면역화**

[0167] 이어서 아다백스 보조제(인비보젠)가 있는 제제가 있거나 없는 경우의 NPm-IMX313T의 면역원성을 비교하기 위해 마우스의 면역화를 수행했다. 아다백스 보조제가 있는 제제가 있거나 없는 NP 단백질을 대조물로 사용했다.

[0168] 이를 위해, 4 집단의 (다섯 마리) 암컷 BALB/c 마우스를, 주사 당 20 µg의 각 단백질을 사용하여, 14 일 간격으로 피하로 2 회 면역화시켰다. 항원-특이적 T 세포 반응의 유도를 28 일째에 비장세포를 사용하여 ELISPOT에 의해 측정했다. 면역화된 마우스로부터 단리된 정제된 비장 CD4+, CD8+ 및 총 T 세포를 NP 단백질 또는 인플루엔자 A NP (366-374) 펩티드와 함께 공배양했다. 사전-면역 및 28 일째 항체 반응을 NP를 항원으로 하여 ELISA에 의해 측정했다.

[0169] **실시예 9 - IMX313T는 분비 경로를 통한 통과에서 프로테아제에 의해 분해되지 않는다**

[0170] IMX313T를 함유하는 플라스미드를 사용한 DNA 면역화에 의해 얻어진 결과는 분자가 프로테아제가 풍부한 분비 경로를 통과할 때 분자의 꼬리가 프로테아제에 의해 절단되지 않음을 강력하게 시사한다. 이 질문을 보다 직접적으로 확인하기 위해, *체 내* NPm-IMX313T를 발현하기 위해 사용되는 pcDNA3 플라스미드로 CHO K1 세포의 형질감염에 착수했다. 형질감염은 다른 곳에 기술된 대로 수행했다(Krammer).

[0171] 2013년 12월 11일에 출원된 특허 출원 PCT/EP2013/076289에 기술된 대로, 18 내지 24 시간 후, 형질감염된 세포의 상청액을 원심분리에 의해 회수하고, 헤파린-세파로스 칼럼에 로딩하기 전에 여과했다.

- [0172] SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅에서 단백질 Npm-IMX313T를 함유하는 것으로 입증된 소형 "피크 C"가 관찰되었다.
- [0173] **실시예 10 - 재조합 Npm-IMX313P 단백질 제조**
- [0174] Npm-IMX313P 단백질을 발현하기 위해, NPM-IMX313T 단백질을 인코딩하는 플라스미드 내의 상응하는 단편 대신 IMX313P를 인코딩 하는 플라스미드로부터의 제한 단편(Pml I-Hind III)을 교환함에 의해 Npm-IMX313T를 발현하는 플라스미드를 IMX313T 유전자 대신 IMX313P 유전자를 치환함으로써 변형했다. 이어서 실시예 7에서와 같이 융합 단백질을 발현하고 정제했다. 도 19는 정제된 단백질을 나타낸다; 주요 밴드는 단량체성이지만, 주요 밴드 위에(과부하된 겔 위에) 올리고머성 형태 또한 보인다.
- [0175] **실시예 11 - IMX313P에 대한 과다면역 항혈청 제조**
- [0176] 다섯 마리 암컷 BALB/C 마우스 집단을, 주사 당 50 μ g을 사용한 IMX313P 단백질로, 14일 간격으로 6 회 근육내로 면역화했다.
- [0177] 수정된 ELISA 방법을 사용함으로써 IgG 항체에 대해 혈청을 시험했다. 항체를 포획하기 위해 프로타민 황산염 그레이드 X(시그마), IMX313 또는 IMX313P를 사용하여 마이크로플레이트의 웰을 코팅했다. 검출 항체는 염소-항-마우스 IgG-HRP(시그마)였고, 이는 과산화수소와 반응하여 405 nm에서 흡광 측정값을 나타냈다.
- [0178] IMX313P로 면역화된 마우스의 모든 혈청은 IMX313P에 대한 고 타이터의 IgG 항체, 및 IMX313과 교차 반응한 일부 항체를 나타냈지만; 프로타민과 교차 반응한 것은 없었다(도 20).

[0179] 참조문헌 (알파벳 순)

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* **124**:783-801.

Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, Piskareva LM, Zakharova LG, Pashvykina GV, Shmarov MM, Zhirnov OP, Varich NP, Ilyinskii PO, Shneider AM. (2006) **Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses.** *Arch Virol.* **151**:921-931.

Antrobus RD, Lillie PJ, Berthoud TK, Spencer AJ, McLaren JE, Ladell K, Lambe T, Milicic A, Price DA, Hill AV, Gilbert SC. (2012) **A T cell-inducing influenza vaccine for the elderly: safety and immunogenicity of MVA-NP+M1 in adults aged over 50 years.** *PLoS One.* **7**:e48322.

Arranz R, Coloma R, Chichón FJ, Conesa JJ, Carrascosa JL, Valpuesta JM, Ortín J, Martín-Benito J. (2012) **The structure of native influenza virion ribonucleoproteins.** *Science.* **338**:1634-1637.

Bachmann MF, Rohrer UH, Kündig TM, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. (1993) The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* **262**:1448-1451.

Berthoud TK, Hamill M, Lillie PJ, Hwenda L, Collins KA, Ewer KJ, Milicic A, Poyntz HC, Lambe T, Fletcher HA, Hill AV, Gilbert SC. (2011) **Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+M1.** *Clin Infect Dis.* **52**:1-7.

Blasius AL & Beutler B. 2010. **Intracellular Toll-like Receptors.** *Immunity* **32**:305-315.

Couch RB, Atmar RL, Franco LM, Quarles JM, Niño D, Wells JM, Arden N, Cheung S, Belmont JW. (2012) **Prior infections with seasonal influenza A/H1N1 virus reduced the illness severity and epidemic intensity of pandemic H1N1 influenza in healthy adults.** *Clin Infect Dis.* **54**:311-317.

Epstein SL, Stack A, Misplon JA, Lo CY, Mostowski H, Bennink J, Subbarao K. (2000) **Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8(+) cytotoxic T lymphocytes: either CD4(+) or CD8(+) T cells can promote survival and recovery after challenge.** *Int Immunol.* **12**:91-101.

Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, Renshaw M, Sambhara S, Katz JM. (2002). **DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice.** *Emerg Infect Dis.* **8**:796-801.

[0180]

- Fiers W, Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Jou WM. (2001) **Soluble recombinant influenza vaccines.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **356**:1961-1963.
- Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, García-Sastre A. (1999) **Rescue of influenza A virus from recombinant DNA.** *J Virol.* **73**:9679-9682.
- Gammelín M, Altmüller A, Reinhardt U, Mandler J, Harley VR, Hudson PJ, Fitch WM, Scholtissek C. (1990) **Phylogenetic analysis of nucleoproteins suggests that human influenza A viruses emerged from a 19th-century avian ancestor.** *Mol Biol Evol.* **7**:194-200.
- Geiser M, Cèbe R; Drewello D, Schmitz R. 2001. **Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase.** *Biotechniques* **31**:88-92.
- Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG. (1991) **Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses.** *J Virol.* **65**:3704-3714.
- Greenland JR, Letvin NL. (2007) **Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines.** *Vaccine* **25**:3731-3741.
- Gschoesser C, Almanzar G, Hainz U, Ortín J, Schonitzer D, Schild H, Saurwein-Teissl M, Grubeck-Loebenstein B. (2002). **CD4+ and CD8+ mediated cellular immune response to recombinant influenza nucleoprotein.** *Vaccine* **20**:3731-3738.
- Huang B, Wang W, Li R, Wang X, Jiang T, Qi X, Gao Y, Tan W, Ruan L. (2012) **Influenza A virus nucleoprotein derived from Escherichia coli or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice.** *Virol J.* **9**:322.
- Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, Miller L, Keating R, Brown SA, Makarova N, Perez DR, MacDonald GH, McCullers JA. (2006) **Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza.** *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY* **13**: 981-990.
- Krammer F, Pontiller J, Tauer C, Palmberger D, Maccani A, Baumann M, Grabherr R. (2010) **Evaluation of the influenza A replicon for transient expression of recombinant proteins in mammalian cells.** *PLoS One.* **5**:e13265.
- Laddy DJ, Yan J, Kutzler M, Kobasa D, Kobinger GP, Khan AS, Greenhouse J, Sardesai NY, Draghia-Akli R, Weiner DB. (2008) **Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens.** *PLoS One.* **3**:e2517.

Lamb RA, Krug RM. **Orthomyxoviridae: the viruses and their replication**. In: Knipe DM, Howley PM, editors. , eds. *Fields Virology* Vol 1 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:1487-1531.

Lillie PJ, Berthoud TK, Powell TJ, Lambe T, Mullarkey C, Spencer AJ, Hamill M, Peng Y, Blais ME, Duncan CJ, Sheehy SH, Havelock T, Faust SN, Williams RL, Gilbert A, Oxford J, Dong T, Hill AV, Gilbert SC. (2012) **Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans**. *Clin Infect Dis*. **55**:19-25.

Luo M, Tao P, Li J, Zhou S, Guo D, Pan Z. (2008) **Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice**. *J Virol Methods*. **154**:121-127.

Mbawuike I, Zang Y, Couch RB. (2007) **Humoral and cell-mediated immune responses of humans to inactivated influenza vaccine with or without QS21 adjuvant**. *Vaccine* **25**:3263-3269.

McMichael AJ, Gotch FM, Dongworth DW, Clark A, Potter CW. (1983a) **Declining T-cell immunity to influenza, 1977-82**. *Lancet* **2**(8353):762-724.

McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA. (1983b) **Cytotoxic T-cell immunity to influenza**. *N Engl J Med*. **309**:13-17.

McMichael AJ, Michie CA, Gotch FM, Smith GL, Moss B. (1986) **Recognition of influenza A virus nucleoprotein by human cytotoxic T lymphocytes**. *J Gen Virol*. **67**:719-726.

Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA. (2012) **Organization of the influenza virus replication machinery**. *Science* **338**:1631-1634.

Nakada S, Creager RS, Krystal M, Palese P. (1984) **Complete nucleotide sequence of the influenza C/California/78 virus nucleoprotein gene**. *Virus Res*. **1**:433-441.

Ogun SA, Dumon-Seignovert L, Marchand JB, Holder AA, Hill F .(2008). **The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria**. *Infect Immun*. **76**:3817-3823.

Roy S, Kobingerb GP, Lina J, Figueredo J, Calcedoa R, Kobasab D, Wilson JM. (2007) **Partial protection against H5N1 influenza in mice with a single dose of a chimpanzee adenovirus vector expressing nucleoprotein**. *Vaccine* **25**:6845-6851.

Schotsaert M, Ysenbaert T, Neyt K, Ibañez LI, Bogaert P, Schepens B, Lambrecht BN, Fiers W, Saelens X. (2012) **Natural and long-lasting cellular immune responses against influenza in the M2e-immune host**. *Mucosal Immunology* **1**-12.

[0182]

Spencer AJ, Hill F, Honeycutt JD, Cottingham MG, Bregu M, Rollier CS, Furze J, Draper SJ, Sogaard KC, Gilbert SC, Wyllie DH, Hill AV. (2012) **Fusion of the Mycobacterium tuberculosis antigen 85A to an oligomerization domain enhances its immunogenicity in both mice and non-human primates.** *PLoS One.* 7:e33555.

Staneková Z, Varečková E. (2010) **Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development.** *Virology* 7:351

Sullivan SM, Doukas J, Hartikka J, Smith L, Rolland A. (2010) **Vaxfectin: a versatile adjuvant for plasmid DNA- and protein-based vaccines.** *Expert Opin Drug Deliv.* 7:1433-1446.

Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B. (1994) **A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus.** *Vaccine* 12:1032-1040.

Tarus B, Bakowicz O, Chenavas S, Duchemin L, Estrozi LF, Bourdieu C, Lejal N, Bernard J, Moudjou M, Chevalier C, Delmas B, Ruigrok RW, Di Primo C, Slama-Schwok A. (2012a) **Oligomerization paths of the nucleoprotein of influenza A virus.** *Biochimie.* 94:776-785.

Tarus B, Chevalier C, Richard CA, Delmas B, Di Primo C, Slama-Schwok A. (2012b) **Molecular dynamics studies of the nucleoprotein of influenza A virus: role of the protein flexibility in RNA binding.** *PLoS One.* 7:e30038.

Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, and Doherty PC. (2006) **Cell-mediated Protection in Influenza Infection.** *Emerging Infectious Diseases* 12: 48-54.

Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al. (1993) **Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein.** *Science.* 259:1745-1749.

Wraith DC, Vessey AE, Askonas BA. (1987) **Purified influenza virus nucleoprotein protects mice from lethal infection.** *J Gen Virol.* 68:433-440.

Xu J, Christman MC, Donis RO, Lu G. (2011) **Evolutionary dynamics of influenza A nucleoprotein (NP) lineages revealed by large-scale sequence analyses.** *Infect Genet Evol.* 11:2125-2132.

Ye Q, Guu TS, Mata DA, Kuo RL, Smith B, Krug RM, Tao YJ. (2012) **Biochemical and structural evidence in support of a coherent model for the formation of the double-helical influenza A virus ribonucleoprotein.** *MBio.* 4:e00467-12.

[0183]

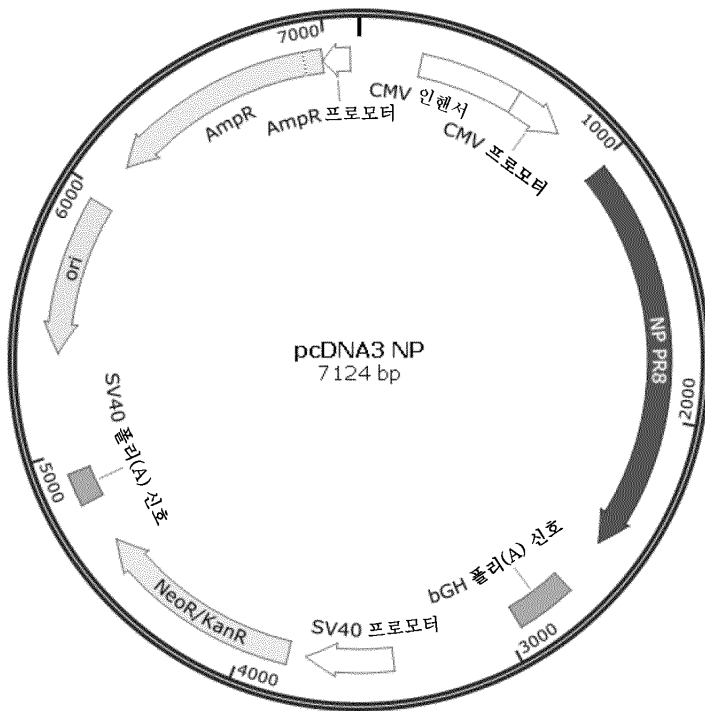
Ye Q, Krug RM, Tao YJ. (2006) **The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA.** *Nature.*444:1078-1082.

Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B. (1985) **Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:1785-1789.

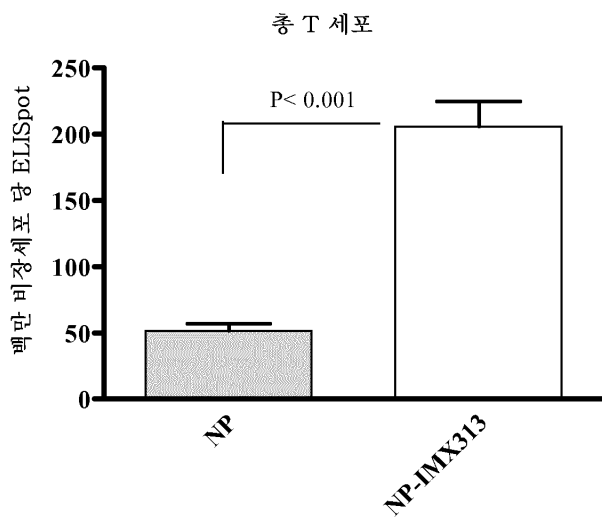
[0184]

도면

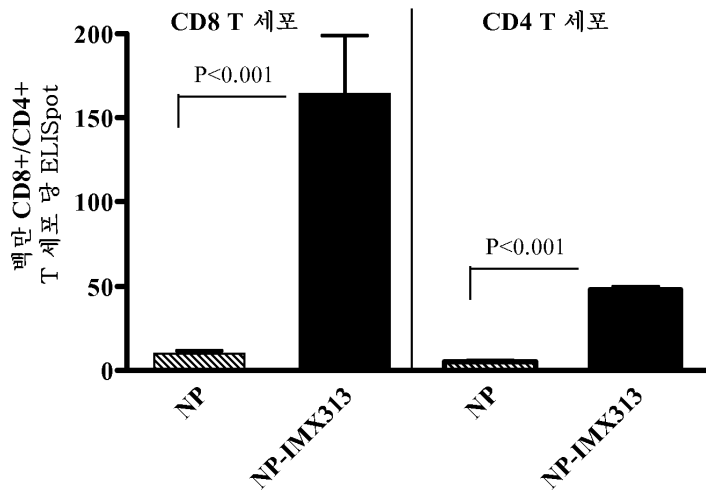
도면1



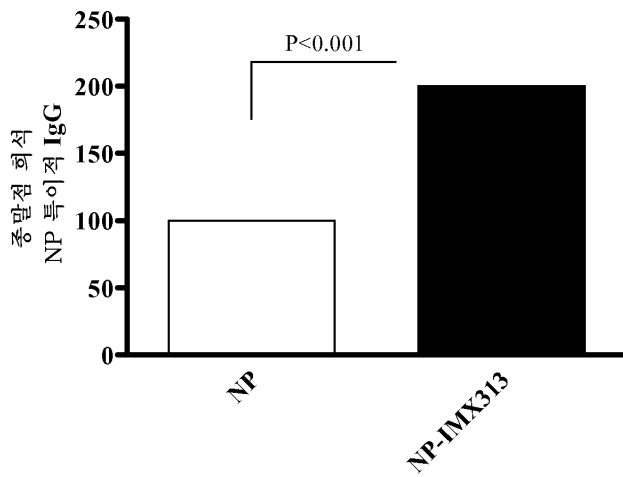
도면2



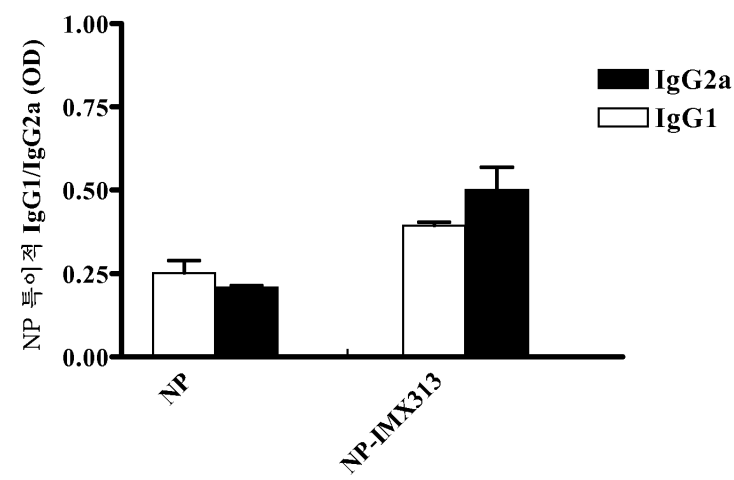
도면3



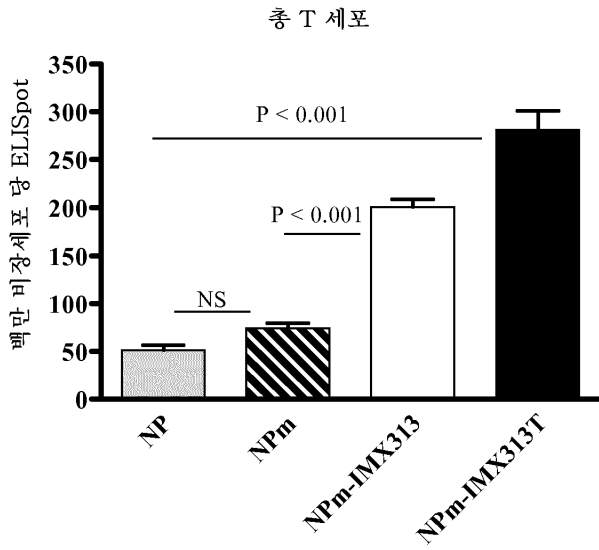
도면4



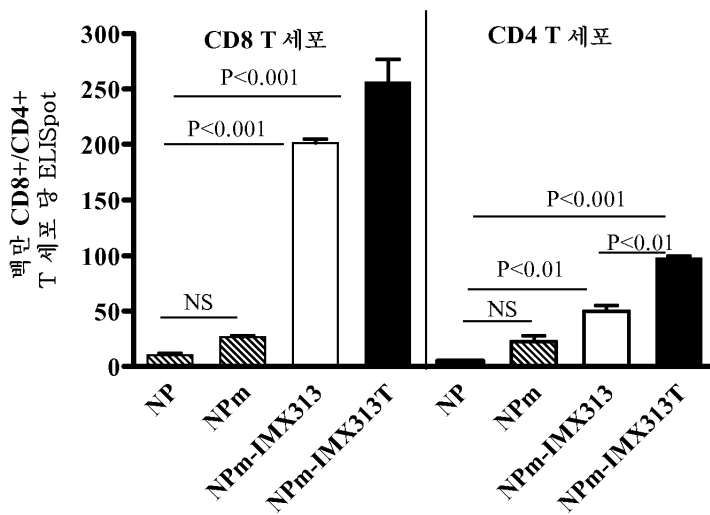
도면5



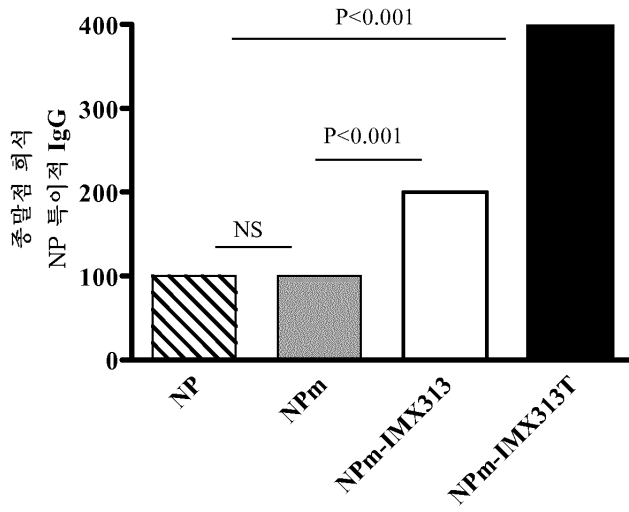
도면6



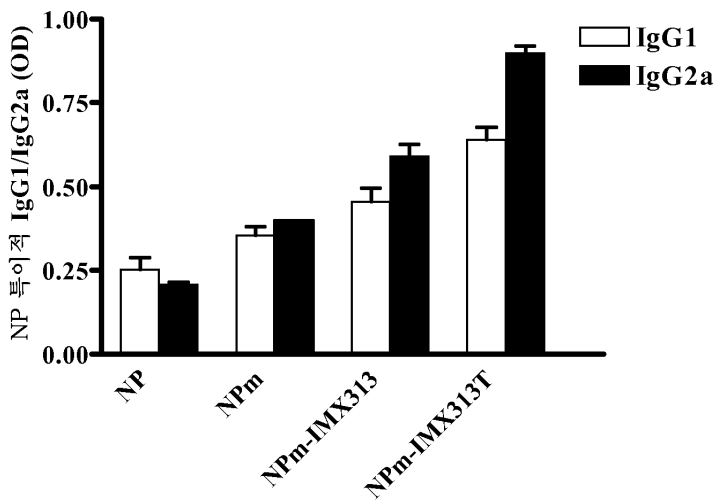
도면7



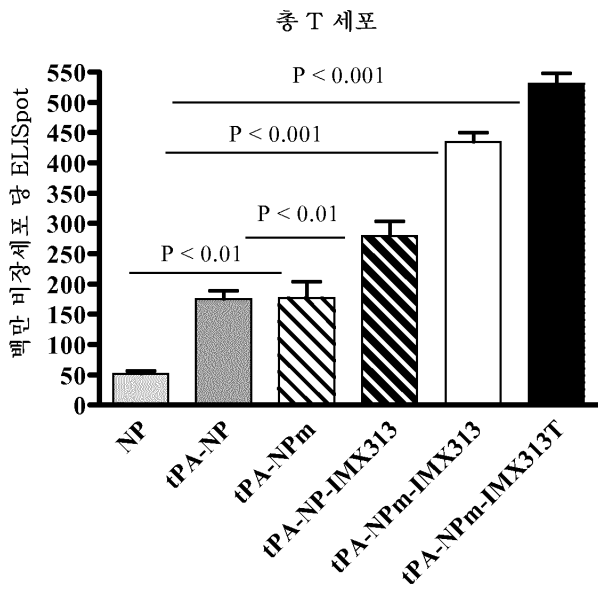
도면8



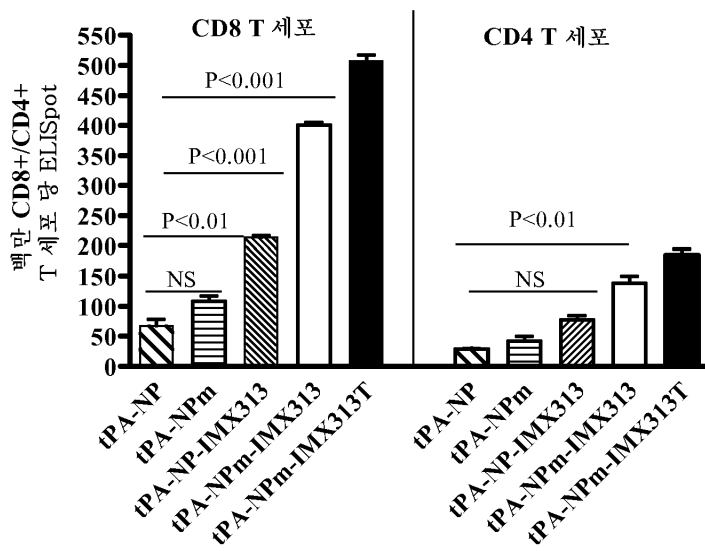
도면9



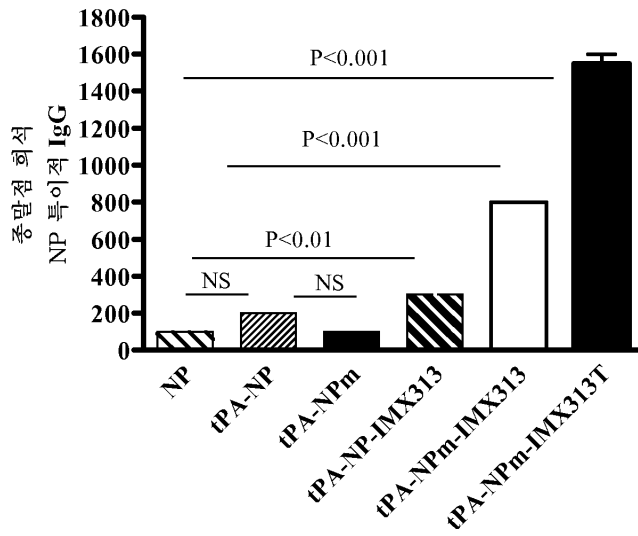
도면10



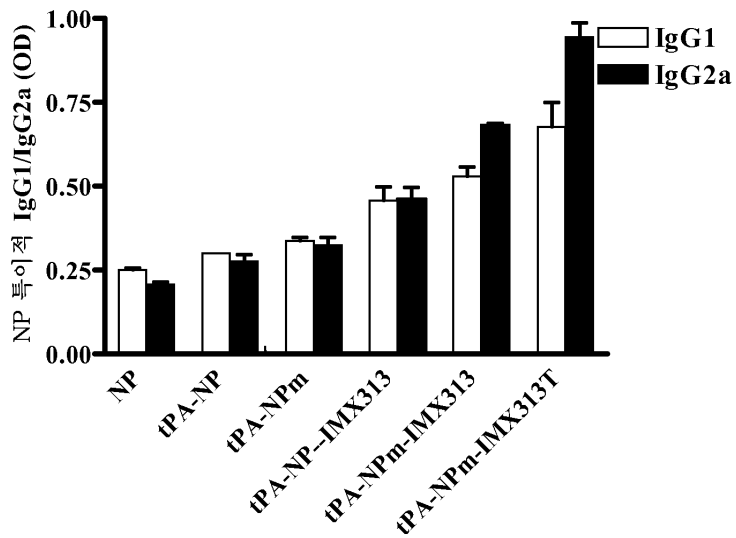
도면11



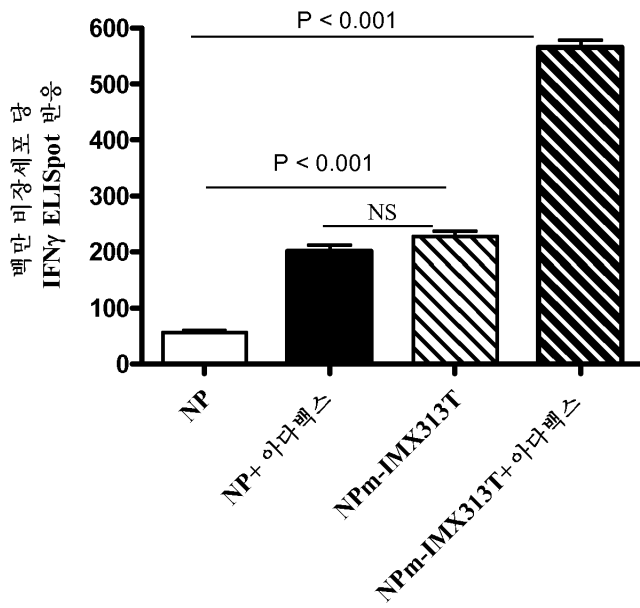
도면12



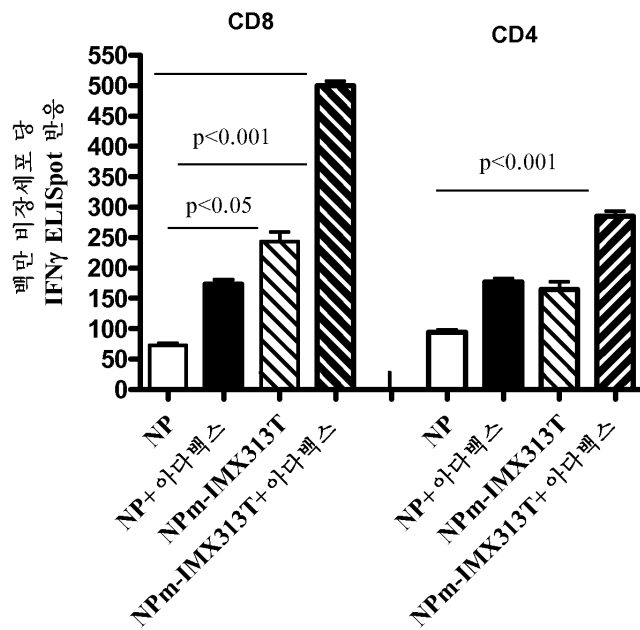
도면13



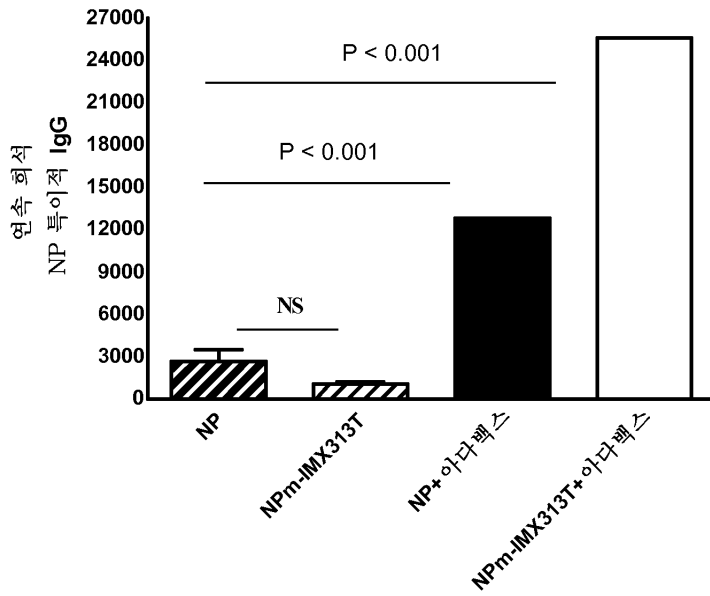
도면14



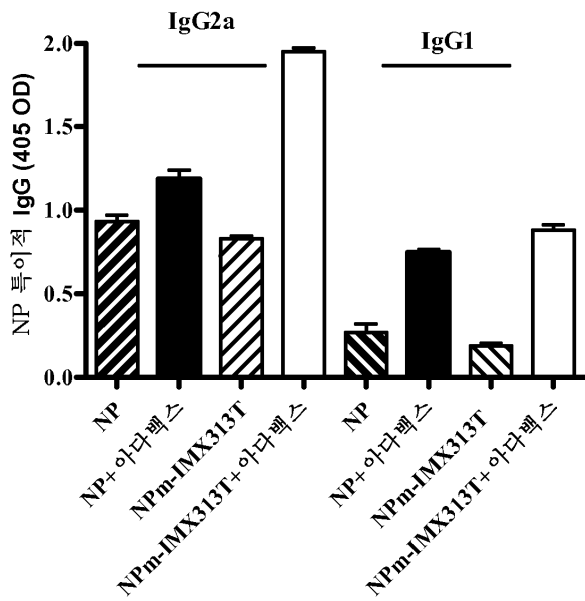
도면15



도면16



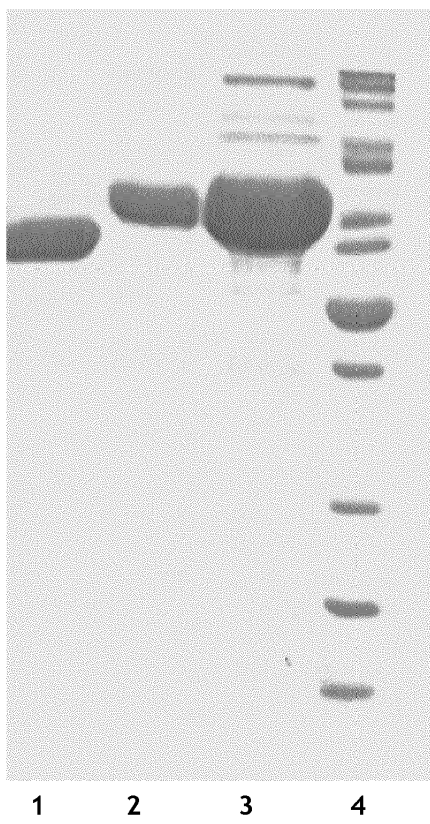
도면17



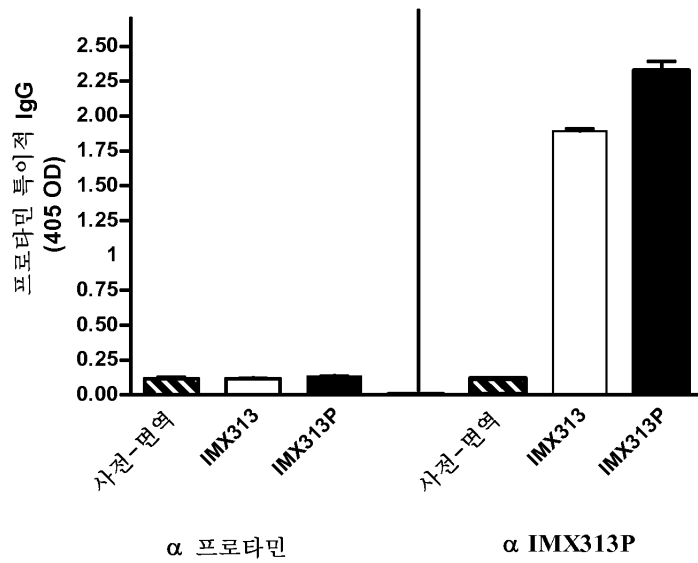
도면18



도면19



도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> IMAXIO

<120> INFLUENZA NUCLEOPROTEIN VACCINES

<130> PC155321

<140> PCT/EP2014/055438

<151> 2014-03-18

<150> EP13305320.7

<151> 2013-03-18

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IMX313

<400> 1

Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln

1 5 10 15

Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu

20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu
 35 40 45

Leu Gln Gly Leu Ser Lys Glu
 50 55

<210> 2

<211> 497

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monomeric NP

<400> 2

Ala Thr Lys Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met Ile

20 25 30
 Asp Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu
 35 40 45

Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu Arg
 50 55 60

Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu Glu
 65 70 75 80

His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr

85 90 95
 Arg Arg Val Asp Gly Lys Trp Arg Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp Lys
 100 105 110

Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Asp Asp Ala
 115 120 125

Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn Asp
 130 135 140

Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp Pro

145 150 155 160
 Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser Gly

Leu Pro Phe Asp Arg Pro Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn Thr
 420 425 430
 Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Leu Met Glu
 435 440 445
 Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu
 450 455 460
 Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp Met
 465 470 475 480
 Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr Asp
 485 490 495
 Asn

<210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> positively-charged peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa is any amino acid or is absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is any amino acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222>
 > (3)..(6)
 <223> Xaa is arginine (R) or lysine (K)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa is any amino acid or is absent
 <400> 3
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 4

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IMX313T

<400> 4

Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln

1 5 10 15

Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu

35 40 45

Leu Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser

50 55

<210> 5

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IMX313P

<400> 5

Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln

1 5 10 15

Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu

35 40 45

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser

50 55

<210> 6

<211> 1767

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gene encoding tPA-NPm-IMX313T

<400> 6

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
 tcgcccagcc aggaaatcca tgcccgattc agaagagcta gccaaggcac caaacggtct 120

 tacgaacaga tggagactga tggagaacgc cagaatgcca ctgaaatcag agcatccgtc 180
 ggaaaaatga ttggtggaat tggacgattc tacatccaaa tgtgcacaga acttaaactc 240
 agtgattatg agggacggtt gatccaaaac agcttaacaa tagagagaat ggtgctctct 300
 gcttttgacg aaaggagaaa taaatacttg gaagaacatc ccagtgcggg gaaagatcct 360
 aagaaaactg gaggacctat atacagaaga gtaaacggaa agtggatgag agaactcatc 420
 ctttatgaca aagaagaaat aaggcgaatc tggcgccaag ctaataatgg tgacgatgca 480
 acggctggtc tgactcacat gatgatctgg cattccaatt tgaatgatgc aacttatcag 540

 aggacaaggg ctcttgttcg caccggaatg gatcccagga tgtgctctct gatgcaaggt 600
 tcaactctcc ctaggaggtc tggagccgca ggtgctgcag tcaaaggagt tggacaatg 660
 gtgatggaat tggtcaggat gatcaaactg gggatcaatg atcggaactt ctggaggggt 720
 gagaatggac gaaaaacaag aattgcttat gaaagaatgt gcaacattct caaagggaaa 780
 tttcaaactg ctgcacaaaa agcaatgatg gatcaagtga gagagagccg gaaccaggg 840
 aatgctgagt tcgaagatct cacttttcta gcacggtctg cactcatatt gagagggtcg 900
 gttgctcaca agtctgctt gctgctgt gtgtatggac ctgccgtagc cagtgggtac 960

 gactttgaaa gagagggata ctctctagtc ggaatagacc ctttcagact gcttcaaac 1020
 agccaagtgt acagcctaat cagaccaaat gagaatccag cacacaagag tcaactggtg 1080
 tggatggcat gccattctgc cgcatcttga gatctaagag tattgagctt catcaaaggg 1140
 acgaaggtgg tccaagagg gaagctttcc actagaggag ttcaaattgc ttccaatgaa 1200
 aatatggaga ctatggaatc aagtacactt gaactgagaa gcaggtactg ggccataagg 1260
 accagaagtg gaggaaacac caatcaacag agggcatctg cgggccaat cagcatacaa 1320
 cctacgttct cagtlacaggc aaatctcct tttgacagaa caaccgttat ggcagcattc 1380

 actgggaata cagaggggag aacatctgac atgaggaccg aatcataag gatgatggaa 1440
 agtgcaagac cagaagatgt gtctttccag gggcggggag tcttcgagct ctcgacgaa 1500
 aaggcagcga gcccgatcgt gccttcttt gacatgagta atgaaggatc ttatttcttc 1560
 ggagacaatg cagaggagta cgacaatgga tccaagaagc aaggtgatgc tgatgtgtgc 1620
 ggagaggttg ctatattca gagcgtctgc tccgattgcc acgtgcctac agcggaaactg 1680
 cgtactctgc tggaatfacg aaaactcttc ctggagattc aaaaactgaa ggtggaactg 1740

cagtctccgc gtcgccgtcg ctccctaa 1767

<210> 7

<211> 1761

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gene encoding tPA-NPm-IMX313P

<400> 7

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgccagcc aggaaatcca tgcccgattc agaagagcta gccaaaggcac caaacggtct 120

tacgaacaga tggagactga tggagaacgc cagaatgcca ctgaaatcag agcatccgtc 180

ggaaaaatga ttggtggaat tggacgattc tacatccaaa tgtgcacaga acttaaactc 240

agtgattatg agggacggtt gatccaaaac agcttaacaa tagagagaat ggtgctctct 300

gcttttgacg aaaggagaaa taaatactg gaagaacatc ccagtgccggg gaaagatcct 360

aagaaaactg gaggacctat atacagaaga gtaaaccgaa agtggatgag agaactcatc 420

ctttatgaca aagaagaaat aaggcgaatc tggcgccaag ctaataatgg tgacgatgca 480

acggctggtc tgactcacat gatgatctgg cattccaatt tgaatgatgc aacttatcag 540

aggacaaggg ctcttgttcg caccggaatg gatcccagga tgtgctctct gatgcaaggt 600

tcaactctcc ctaggaggtc tggagccgca ggtgctgcag tcaaaggagt tggacaatg 660

gtgatggaat tggtcaggat gatcaaacgt gggatcaatg atcggaactt ctggaggggt 720

gagaatggac gaaaaacaag aattgcttat gaaagaatgt gcaacattct caaagggaaa 780

tttcaaactg ctgcacaaaa agcaatgatg gatcaagtga gagagagccg gaaccaggg 840

aatgctgagt tcgaagatct cacttttcta gcacggctcg cactcatatt gagagggtcg 900

gttgctcaca agtcctgcct gcctgcctgt gtgtatggac ctgccgtagc cagtgggtac 960

gactttgaaa gagagggata ctctctagtc ggaatagacc ctttcagact gcttcaaac 1020

agccaagtgt acagcctaata cagaccaaat gagaateccag cacacaagag tcaactgggtg 1080

tggatggcat gccattctgc cgcatttgca gatctaagag tattgagctt catcaaaggg 1140

acgaagtggt tccaagagg gaagctttcc actagaggag ttcaaattgc ttccaatgaa 1200

aatatggaga ctatggaatc aagtacactt gaactgagaa gcaggtactg ggccataagg 1260

accagaagtg gaggaaacac caatcaacag agggcatctg cgggccaat cagcatacaa 1320

cctacgttct cagtacaggc aaatctccct ttgacagaa caaccgttat ggcagcattc 1380

actggaata cagaggggag aacatctgac atgaggaccg aatcataag gatgatggaa 1440

agtgcaagac cagaagatgt gtctttccag gggcggggag tcttcgagct ctcggacgaa 1500
 aaggcagcga gcccgatcgt gccttccttt gacatgagta atgaaggatc ttatttcttc 1560
 ggagacaatg cagaggagta cgacaatgga tccaagaagc aaggtgatgc tgatgtgtgc 1620

 ggagaggttg cttatattca gagcgtcgtc tccgattgcc acgtgcctac agcggaaactg 1680
 cgtactctgc tggaaatagc aaaactcttc ctggagattc aaaaactgaa ggtggaaggt 1740
 cgccgtcgcc gtcgctccta a 1761

 <210> 8
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ssRNA40
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> s is a phosphothiotate linkage
 <400> 8
 gscscscsgs uscsusgsus usgsusgsus gsascscusc 39

 <210> 9
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide ODN1826
 <400> 9
 tccatgacgt tcctgacgtt 20

 <210> 10
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide IMX1289
 <400> 10
 caatgcagag gagtacgaca atggatccaa gaagcaaggt gatgctgatg 50

 <210> 11
 <211> 47
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide IMX1290
 <400> 11
 gtagaacaa gggatatttt ctttattact ccttgctcag tccttgc 47

<210> 12
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide IMX1305
 <400> 12
 cactgagtga catcaaaatc atggatgcaa tgaagagagg gc 42

<210> 13
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide IMX1306
 <400> 13
 cgtaagaccg ttgggtgctt tggctagctc ttctgaatcg ggcatggatt tcc 53

<210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide IMX1287
 <400> 14
 ccattctgcc gcatttcag atctaagag 29

<210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide IMX1288
 <400> 15
 caaaaggag atttcctgt actgagaac 29

<210> 16

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide IMX051

<400> 16

gtagaaacaa ggtatTTTT cttattagg agcgacggcg acgc

44