



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월08일
 (11) 등록번호 10-1637955
 (24) 등록일자 2016년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 14/11 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 C07K 14/11 (2013.01)
 A61K 39/145 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0069106
 (22) 출원일자 2015년05월18일
 심사청구일자 2015년05월18일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020100032920 A
 KR1020100137804 A
 KR1020140010583 A

(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
 정대균
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 송대섭
 세종특별자치시 조치원을 세종로 2511, 고려대학교 세종캠퍼스 약학대학
 김정기
 세종특별자치시 조치원을 세종로 2511, 고려대학교 세종캠퍼스 약학대학
 (74) 대리인
 김순용

전체 청구항 수 : 총 13 항

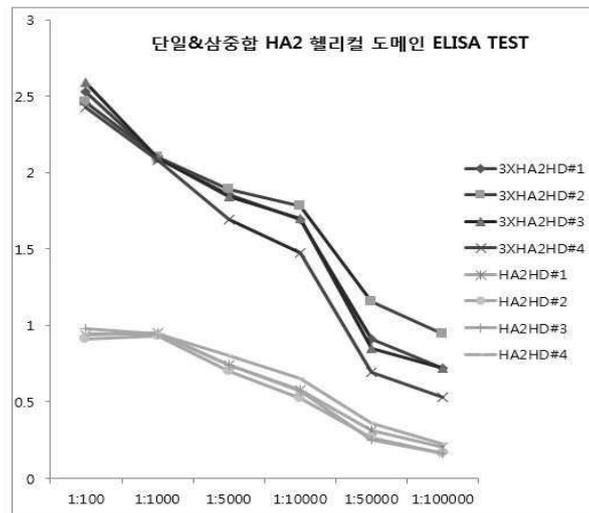
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물**

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 표면 단백질인 헤마글루티닌 단백질의 HA2 헬리컬 도메인을 이용한 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 서열 번호 3으로 표시되는 폴리펩티드 및 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드는 대장균에서 대량 생산이 가능하고 다양한 인플루엔자 아형에 대하여 중화항체를 효과적으로 생산할 수 있으므로, 인플루엔자 아형 및 신종 변이 인플루엔자에 대한 범용성 백신으로 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C07K 16/1018 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H-GUARD 2013M3A6B2078954

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국생명공학연구원

연구사업명 글로벌프런티어사업

연구과제명 Bioinformatics 기반 바이러스 변종 예측 및 검증기술 개발

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드.

청구항 2

서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드에 대한 단클론 항체.

청구항 3

서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 헤마글루티닌의 단일 HA2 헬리컬 도메인인, 백신 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 헤마글루티닌의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인인, 백신 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 서열번호 1의 379-480 서열로 표시되는 절편 1, 서열번호 1의 373-480 서열로 표시되는 절편 2, 서열번호 1의 373-480 서열로 표시되는 절편 3으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 바이러스는 H1, H3, H5, H7 및 H9으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 인플루엔자 바이러스 아형인, 백신 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 백신은 범용성 백신인, 백신 조성물.

청구항 10

제3항에 있어서, 상기 백신은 아단위(sub unit) 백신, 합성 백신 및 유전공학 백신으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.

청구항 11

서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 인플루엔자 감염 질환은 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 인간의 제외된 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 인플루엔자 면역 유도 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 표면 단백질인 헤마글루티닌 단백질의 HA2 헬릭스 도메인을 이용한 범용성 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자는 인플루엔자 바이러스 호흡기 감염으로 발생하는 급성 발열성 질환이다. 인플루엔자 바이러스는 표면 구조단백질의 차이에 따라 A, B, C형으로 분류되며, 각각에 따라 숙주 및 역학과 임상양상에 다소 차이가 있다. 인플루엔자 바이러스는 직경 80~120nm 크기의 구형바이러스로 표면에 노출된 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)와 뉴라미니데이즈(neuraminidase, NA) 당단백질의 종류에 따라 아형(subtype)이 결정된다. 아형은 주로 A형 인플루엔자를 중심으로 구분하는데 현재 H1~H16까지 16가지의 HA와 N1~N9의 9가지 NA가 발견되어 단순히 계산해도 총 144종 (예컨대 H1N1, H1N2)의 아형이 A형 인플루엔자 내에 분포하게 된다. 인플루엔자는 항원변이를 통하여 매년 크고 작은 새로운 유행을 일으킨다. 항원변이는 새로운 HA 또는 NA로 교체되어 아형이 바뀌게 되는 항원대변이(antigenic shift; 예) H3N2 →H2N2)와 기존의 HA, NA 유전자의 점상돌연 변이(point mutation)로 근소한 항원변이가 발생하는 항원 소변이(antigenic drift)가 있다. 항원소변이는 A, B형 인플루엔자를 중심으로 거의 매년 일어나기 때문에 계절인플루엔자유행(seasonal epidemic)의 원인이 된다.

[0003] HA와 NA 표면항원 중에 특히 HA에 대한 면역이 인플루엔자 예방 및 병의 중증도와 관련된다. 따라서 인플루엔자 백신의 가장 중요한 구성요소는 헤마글루티닌에 대해 체내에서 생산된 중화항체가 인플루엔자 바이러스 감염 예방에 결정적 역할을 하게 된다. 인플루엔자 백신에는 비활성화백신과 생백신이 있으며, 비활성화 백신은 부화란(embryonated egg)에서 배양한 바이러스를 정제하여 포르마린 등으로 비활성화시켜서 만든다. 비활성화시킨 바이러스 전체를 사용하는 전바이러스백신(whole virus vaccine), 에테르 등으로 바이러스 외피(envelope)를 분쇄시킨 분할 백신(split vaccine), 헤마글루티닌과 뉴라미다아제 성분을 정제한 아단위 백신(subunit vaccine)등

이 있고, 생백신은 약독화 생백신(live attenuated influenza vaccine, LAIV)이 개발되어 사용되고 있다. 전바이러스 백신은 소아에서 부작용을 유발하므로 현재 국내를 비롯하여 세계적으로 잘 사용되지 않으며, 일부 국가에서만 이용되는 실정이다. 반면, 분할백신이나 아단위백신과 같은 성분백신은 매우 안전하며 효과가 인정되어 가장 많이 사용되고 있다. 이외에 면역반응을 증강시키기 위하여 MF-59와 같은 면역보강제가 포함된 백신이나 바이러스 유사 형태의 소포를 형성하는 virosome 백신 등이 개발되어 일부 국가에서 사용되고 있다. 자연감염이나 백신을 통하여 얻어진 특정 아형 또는 인플루엔자 바이러스에 대한 항체는 다른 형이나 아형의 인플루엔자 바이러스에 보호항체를 형성하지 못하며, 한 가지 항원내의 새로운 변이(variant)에 대해서도 충분한 면역원성을 나타내지 못하는 문제점들이 있다. 인플루엔자 바이러스는 해마다 크고 작은 변이를 일으키기 때문에 매년 유행주가 변하게 되고, 따라서 전년에 접종한 백신으로 인한 보호 효과를 기대하기 어렵기 때문에 해마다 접종해야 하는 어려움이 있다.

[0004] 세계적으로 인플루엔자 바이러스는 인류건강에 심각하면서 지속적인 위협이 되고 있다. 매해 3-5 백만 명이 감염으로 인한 심각한 증세를 보이고 50 만 명이 사망하며, 계절성 인플루엔자 유행병은 잠재적으로 수백만을 사망시킬 수 있다. 바이러스 표면 당단백질인 뉴라미니데이즈에 대한 길항체는 인플루엔자 감염 치료를 위해 광범위하게 사용되고 있지만, 그 효능은 약물 저항적인 바이러스 변종에 의해 급격히 감소되었다. 백신은 인플루엔자 바이러스 감염을 막는 가장 효과적인 방법이나, 앞서 언급한 바와 같이 소아, 노인과 같이 면역이 약한 환자와 같이 높은 위험성이 있는 그룹에게는 백신의 보호적인 효능이 최적화되어 있지 않다. 또한 백신 후 면역은 전형적으로 새로운 변종에 특정적으로 반응하지만, 인플루엔자 바이러스가 빠르게 변화하기 때문에 백신은 거의 매해 새롭게 생산되어야만 한다. 백신의 항원적 구성에 대한 결정은 새해에 유행하게 될 변종에 대한 예상을 기반으로 한다. 따라서 백신 변종과 유행하는 변종이 다른 경우 백신은 효과가 떨어진다. 결과적으로 인플루엔자 바이러스에 대해 광범위하게 보호할 수 있는 새로운 예방적이고 치료적 효과를 갖은 백신이 절실히 필요한 실정이다.

[0005] 인플루엔자 바이러스에 대한 면역은 주로 헤마글루티닌 (hemagglutinin, HA)을 목표로 하는 중화항체에 의해 거의 매개된다. 헤마글루티닌에서 항원적 위치를 동정하는 것은 인플루엔자 항체들이 시알산 (sialic acid) 수용체에 부착하여 숙주세포 안으로 바이러스가 들어가도록 매개하는 면역적으로 우세한 헤마글루티닌 헤드 도메인 (head domain, HA1)을 찾아낸 것을 의미한다. 항-HA 헤드도메인 단일항체를 이용한 연구는 이러한 항체 종류가 숙주 세포 표면에 있는 시알릭 산에 바이러스가 부착되는 것을 차단하여 바이러스가 세포 안으로 유입되는 것을 막는다는 것을 의미한다. 그러나, 헤마글루티닌 헤드 도메인에서 높은 돌연변이 발생률과 항원적 변화에 대한 관용 때문에 헤마글루티닌 헤드를 목표로 한 항체들은 매우 유사한 변종에만 효과적이다. 그러므로 수용체 부착 위치를 목표로 하는 좀 더 광범위한 항체는 구조적으로 밝혀져 있지 않다. 반대로 세포막에 근접한 헤마글루티닌 스템 도메인(stem domain, HA2)에 부착하는 항체들은 바이러스와 숙주의 엔도조멀 세포막 (endosomal membranes)의 융합에 필수적인 HA의 주요한 구조적 재배열을 차단하여 바이러스가 세포 안으로 유입되는 것을 막는다. HA 스템도메인은 헤드도메인보다 돌연변이가 덜 발생되어 다양한 인플루엔자에서 상대적으로 아미노산 서열이 잘 보존되어 있다. 그러나 헤마글루티닌 헤드 도메인 내에서 발견되는 항원자극성의 다양성으로 인해 이 도메인을 목표로 하는 대부분의 단일 항체들은 특정한 단일 바이러스만을 일반적으로 중화시키는 것으로 알려져 있다.

[0006] 그러나 아직까지 다양한 인플루엔자 바이러스 아형을 한번에 중화시킬 수 있는 범용성의 광범위 중화 단일항체 (broadly neutralizing monoclonal antibodies, bNAbs)에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않아, 다양한 변이형에 대해서 광범위한 범용성 백신으로 활용될 수 있는 새로운 백신에 대한 필요성이 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 다양한 인플루엔자 바이러스 아형에 효과를 나타낼 수 있어, 새로운 변종 인플루엔자 출현에 대비할 수 있는 신규한 인플루엔자 범용 백신을 제공하는 것이다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 인플루엔자 헤마글루티닌의 단일 HA2 헬리컬 도메인 또는 이의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인에 대한 항체, 이를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물 및 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 목적은 인플루엔자 면역 유도 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드에 대한 단클론 항체를 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 인간의 제외한 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 인플루엔자 면역 유도 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드 및 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드는 대장균에서 대량 생산이 가능하고 다양한 인플루엔자 아형에 대하여 중화항체를 효과적으로 생산할 수 있으므로, 인플루엔자 아형 및 신종 변이 인플루엔자에 대한 범용성 백신으로 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 도 1은 ESPript 3.0을 이용하여 헤마글루티닌 HA1 헤드도메인의 아미노산 서열을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 ESPript 3.0을 이용하여 구조기반 헤마글루티닌 HA2 스템도메인 아미노산 서열을 분석한 결과 및 이의 삼중합체 도메인 형태를 나타낸 도이다.

도 3은 대장균 발현 벡터 pET28a-3XHA2HD를 나타낸 도이다.

도 4는 SDS-PAGE 를 이용하여 단일 HA2 헬리컬 도메인(a) 및 이의 삼중합 헬리컬 도메인(b)을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 단일 HA2 헬리컬 도메인(HA2HD) 및 삼중합 HA2 헬리컬 도메인(3XHA2HD)의 면역 항체 형성 효과를 ELISA TEST를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6는 인플루엔자 아형 pH1N1, cH3N2, hH3N2, aH5N1, dH7N9 에 대한 삼중합 HA2 헬리컬 도메인(3XHA2HD) 유도 항체의 결합 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다.

[0019] 본 발명의 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 및 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 바이러스의 H1, H3, H5, H7 및 H9 과 같은 다양한 아형에 대하여 효과적으로 중화항체를 형성할 수 있는 폴리펩티드로, 개체 내에서 항원으로 작용하여 항원-항체 반응을 유도함으로써 인플루엔자에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.

- [0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명의 “서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드” 는 이와 동일한 폴리펩티드 뿐만 아니라 이의 아미노산이 보존적 치환에 의하여 치환된 폴리펩티드, 이와 80 내지 99%의 서열상동성, 바람직하게는 85 내지 99%, 더욱 바람직하게는 90 내지 99%의 상동성을 갖는 폴리펩티드를 모두 포함할 수 있다.
- [0022] 용어 “보존적 치환” 은 한 부류의 아미노산이 동일한 부류의 다른 아미노산으로 대체되는 것을 말한다. 보존적 치환은 폴리펩티드의 구조 또는 기능 또는 둘 모두를 변경시키지 않는다. 보존적 치환의 목적을 위한 아미노산의 부류는 소수성(예를 들어, Met, Ala, Val, Leu), 중성 친수성(예를 들어, Cys, Ser, Thr), 산성 (예를 들어, Asp, Glu), 염기성(예를 들어, Asn, Gln, His, Lys, Arg), 입체형태 파괴물질(disrupter)(예를 들어, Gly, Pro) 및 방향족(예를 들어, Trp, Tyr, Phe)을 포함한다.
- [0023] 용어 “항원” 은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원성분으로, 바람직하게는 바이러스가 발현하는 단백질이다. 특정 구현예에서, 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 인플루엔자 바이러스가 발현하는 헤마글루티닌 스템 도메인으로부터 유래한 것으로 개체에 투여되었을 때 면역 반응을 유도하는 항원으로 작용할 수 있다. 이와 같은 항원들은 서열번호 4 및 서열번호 2의 염기서열로부터 당업계에 널리 알려진 방법을 통해 제조할 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 “백신” 이란 일반적인 인플루엔자 바이러스에 대한 예방 또는 치료를 목적으로 개체에서 항원-항체 반응을 유도하는 것이다.
- [0026] 상기 “서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드” 는 인플루엔자 헤마글루티닌의 전장 서열의 단일 HA2 헬리컬 도메인을 말한다.
- [0027] 또한 상기 “서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드” 는 인플루엔자 헤마글루티닌의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 말한다. 여기에서 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 서열번호 3의 379-480 서열로 표시되는 절편 1, 373-480 서열로 표시되는 절편 2, 373-480서열로 표시되는 절편 3으로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이와 같은 삼중합체의 절편 1 내지 3은 앞서 설명한 잔기와 동일한 또는 이의 보존적 치환 또는 이와 80 내지 99%의 서열상동성, 바람직하게는 85 내지 99%, 더욱 바람직하게는 90 내지 99%의 상동성을 갖는 폴리펩티드를 모두 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [0029] 상기 “인플루엔자 바이러스” 는 A, B 및 C의 인플루엔자 바이러스 타입으로 분류된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "인플루엔자 바이러스 아형(subtype)"은 헤마글루티닌(H) 및 뉴라미다제(N) 바이러스 표면 단백질의 조합을 특징으로 하는 인플루엔자 A 바이러스 변이체를 말한다. 본 발명에 따르면, 인플루엔자 바이러스 아형은 이들의 H 번호에 의해, 예를 들어, "H3 아형의 HA를 포함하는 인플루엔자 바이러스", "H3 아형의 인플루엔자 바이러스" 또는 "H3 인플루엔자"에 의해, 또는 H 번호 및 N 번호의 조합, 예를 들어, "인플루엔자 바이러스 아형 H3N2" 또는 "H3N2"에 의해 지칭될 수 있다. 용어 "아형"은 구체적으로 보통 돌연변이로부터 야기되는 각각의 아형 내의 모든 개별 "균주"를 포함하며, 천연 분리주 및 인공 돌연변이체 또는 재배열 등을 포함하고, 상이한 병리학적 프로파일을 보인다. 이러한 균주는 또한 바이러스 아형의 다양한 "분리주"로 호칭될 수도 있다. 따라서, 용어 "균주" 및 "분리주"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 백신은 다양한 인플루엔자 바이러스 아형에 대하여 효과적으로 중화항체의 형성을 유도할 수 있으며, 바람직하게는 H1, H3, H5, H7 및 H9으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 인플루엔자 바이러스 아형에 대하여 항체의 형성을 유도할 수 있고, 이와 같이 형성된 항체는 모두 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌의 다양한 아형에 결합할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 pH1N1, cH3N2, hH3N2, aH5N1, dH7N9와 같은 아형에 결합할 수 있다.
- [0031] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리

펩티드를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물에 있어서, 상기 바이러스가 H1, H3, H5, H7 및 H9으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 인플루엔자 바이러스 아형인, 백신 조성물을 제공한다.

- [0032] 또한 본 발명은 상기 백신이 범용성 백신인 백신 조성물을 제공한다.
- [0033] 용어 “범용성 백신”은 인플루엔자 바이러스 아형 및 이의 신규한 변이체를 포함하는 다양한 인플루엔자 바이러스를 한번에 중화시킬 수 있는 광범위한 적용 범위를 가진 백신을 말한다.
- [0034] 본 발명의 백신은 아단위(sub unit) 백신, 합성 백신 및 유전공학 백신으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0035] 용어 "아단위 백신"은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 바이러스 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다.
- [0036] 용어 "합성 백신"은 바이러스의 항원 또는 항원결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산한 펩티드를 포함한 백신을 말한다.
- [0037] 용어 "유전공학 백신"은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 백신은 인플루엔자를 예방하기 위해 사용되는 다른 백신의 제조 백신의 제조에 사용되는 불활화된 균체들 또는 항원들과 혼합하여 인플루엔자를 포함한 다른 질병들을 함께 예방할 수 있는 혼합 또는 복합 백신으로 사용될 수 있다. 용어 "혼합 백신"이란 서로다른 바이러스 백신을 함께 사용한 백신을 말하며, 용어 "복합 백신"이란 바이러스 백신과 세균 백신을 함께 사용한 백신을 말한다.
- [0039] 또한, 본 발명의 백신 조성물은 추가적으로 용매, 면역증강제(adjuvant) 및 부형제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 더욱 포함할 수 있다. 상기 용매로는 생리식염수 또는 증류수가 있으며, 면역증강제로는 프루이트(Freund's) 불완전체 또는 완전체 어쥬번트, 알루미늄 하이드록사이드 겔, 및 식물성 및 광물성 오일 등이 있으며, 부형제로는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포타슘 설페이트(alum)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 기술자에게 잘 알려진 백신 제조에 사용되는 공지의 물질을 더 모두 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 백신 조성물은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액제로 제조하며, 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 비강 또는 경막외(eidural) 경로로 투여할 수 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드는 개체에 투여되는 경우 개체 내에서 항체를 형성하여 면역반응을 유도하므로, 인플루엔자 감염 질환을 예방하거나 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0043] 본 명세서에 사용되는 용어 "인플루엔자 바이러스 질병"은 세포 또는 대상에서의 인플루엔자 바이러스, 예를 들어, 인플루엔자 A 또는 B 바이러스의 존재로부터 야기되거나, 또는 인플루엔자 바이러스에 의한 세포 또는 대상의 침입으로부터 야기되는 병태를 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 용어는 인플루엔자 바이러스에 의해 야기되는 호흡기 병을 지칭하며, 바람직하게는 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 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 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0045] 또한 본 발명은 서열번호 1의 379 내지 474 잔기로 표시되는 폴리펩티드 또는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드를 인간의 제외한 개체에 투여하는 단계; 를 포함하는 인플루엔자 면역 유도 방법을 제공한다.

[0046] 상기 개체는 인플루엔자 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형에 감염된 동물을 치료할 수 있다. 보다 구체적으로 개체란 개체에 전파시킬 수 있는 모든 종류의 동물을 말한다.

[0047] 이하, 본 발명을 제조에 및 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 제조에 및 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 제조에 및 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0048] **실시예 1. 인플루엔자 헤마글루티닌 HA2 헬리컬 도메인의 단일 및 삼중합체 제조**

[0049] 범용 항원으로 사용될 수 있는 인플루엔자 헤마글루티닌(이하, HA)의 서열을 동정하기 위하여, 구조를 기반으로 둔 단백질 서열분석 비교 프로그램(Clustal W & ESPript 3.0)을 이용하여 다양한 아형의 헤마글루티닌 단백질의 아미노산 서열 중 6종의 서열을 비교 분석하고, 아형 간의 보존된 서열을 가진 HA2 헬리컬 도메인을 결정하였다. 이와 같은 구조 기반 인플루엔자 헤마글루티닌 HA2 헤드 및 스템 도메인의 서열 분석결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다. 상기와 같은 서열 분석을 통해 헤마글루티닌에 공통적으로 보존된 아미노산 서열을 갖는 HA2 헬리컬 도메인을 확인하였으며, 이를 이하의 항원으로 제조하였다.

[0050] 실험에 사용된 인플루엔자 (Influenza) A 바이러스(A/California/04/2009(H1N1))의 헤마글루티닌 단백질(567개 아미노산)은 (주)바이오니아에서 합성하였으며, 이의 염기서열은 서열번호 4와 같다. 서열번호 1로 표시되는 헤마글루티닌(A/California/04/2009(H1N1), NCBI:FJ966082.1)에 공통으로 보존된 아미노산서열을 가지는 HA2 헬리컬 도메인(잔기 379-474)을 pET21a의 NdeI과 XhoI 부위에 서브클론(subclone)하고 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3) RIL 균주(strain)를 사용하여 이를 과발현시켰다.

[0051] 삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 제조하기 위하여 절편1은 HA2 헬리컬 도메인의 아미노산잔기 379-480, 절편2는 373-480 그리고 절편3은 373-480을 각각 NdeI과 BamHI, BamHI과 HindIII 그리고 HindIII와 XhoI을 사용하여 pET28a에 단백질의 N-, C- 양말단에 6개의 히스티딘이 붙도록 서브클론하고 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3) Star 균주(strain)를 사용하여 과발현시켰다. 각각의 단백질을 대장균에 접종하고 OD 600nm에서 0.6~0.8사이에서 0.2mM IPTG를 넣고 16시간 동안 291K에서 배양하였다. 사용된 대장균 발현 벡터 pET28a-3XHA2HD 를 도 3에 나타내었다.

[0052] His-태그된 단일 HA2 도메인 또는 삼중합 HA2 헬리컬도메인을 니켈-친화성 크로마토그래피로 정제하였고, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 M NaCl, 5 %(v/v) 글리세롤을 포함하는 완충용액에서 투석하여, 정제된 단일 HA2 도메인 및 삼중합 HA2을 얻었다. 결과를 도 4에 나타내었다.

[0053] 도 4에 나타낸 바와 같이, 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 이의 삼중합 헬리컬 도메인이 SDS-PAGE 상에서 확인되었으며, 니켈-친화성 크로마토그래피에 의하여 순도 96%이상으로 정제된 것을 확인하였다. 삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 발현하기 위한 염기서열은 서열번호 2에 표시하였으며, 이에 의해 제조되는 351개의 아미노산 서열을 서열번호 3에 표시하였다. 이하 제조된 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 이의 삼중합 헬리컬 도메인을 항원으로 하여, 이들이 인플루엔자 범용성 백신으로 유용성이 있는지 여부를 확인하였다.

[0054] **실시예 2. 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 삼중합 HA2 헬리컬 도메인의 항체 생성 확인**

[0055] 상기 실시예 1에서 얻은 단일 또는 삼중합 HA2 헬리컬도메인 항원이 효과적으로 항체를 유도하는지 여부를 확인하기 위하여, 이의 항체 생성 효과를 확인하였다.

[0056] 먼저, 이들 각각을 랫트(Rat)에 주사하기 전에 전-면역 혈청(pre-immune serum)을 채취하여 이를 음성대조군으로 사용하였다. 일차적 면역화(Primary immunize)를 위하여 각각 정제된 단일 또는 삼중합 HA2 헬리컬 도메인 항원 200ug을 완전 프로인트 어쥬번트(complete freund's adjuvant)(sigma)와 혼합하여 복강(IP)주사하고, 2주 후 완전 프로인트 어쥬번트 (sigma)와 혼합하여 1차 부스팅(boosting)을 하였다. 1주 후 1차 혈액을 채취하여

ELISA 테스트를 진행하고 1주 간격으로 부스팅과 혈액 채취(bleeding)를 하였으며, 3차 부스팅 1주 후 랫트의 심장으로부터 채혈하였으며, 4주 후 최종 혈청을 분리하여 최종 ELISA 테스트를 수행하였다. ELISA 테스트에서 항원은 웰 당 100ng을 사용하였으며, 면역 혈청은 1XPBS로 1:100 내지 1:100,000 비율로 희석하였고, 2차 확인을 위해서는 항-마우스 IgG-HRP(ABC5001)를 1:10,000 희석하여 사용하였다. 광학 밀도 405nm 에서 발색을 검출하여 최종적으로 면역 항체 생성 여부를 확인하였으며, 이를 도 5에 나타내었다.

[0057] 도 5에 나타난 바와 같이, 단일 HA2 헬리컬 도메인은 4 마리의 랫트 모두에서 면역 항체 형성 효과를 나타내었다. 또한 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 4 마리의 랫트 모두에서 단일 도메인보다 훨씬 높은 면역력을 나타내고 항체가 더 잘 생성되는 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과를 통해 단일 HA2 헬리컬 도메인과 삼중합 HA2 헬리컬 도메인이 모두 개체 내에서 항체를 효과적으로 유도할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0058] 실시예 3. 삼중합 HA2 헬리컬 도메인의 범용성 백신 이용성 확인

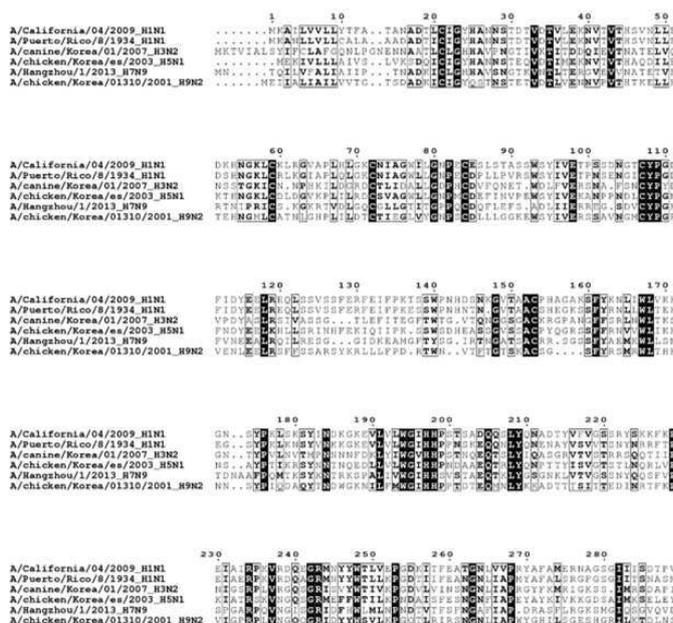
[0059] 제조합 삼중합 HA2 헬리컬 도메인이 우수한 항체 유도 효과를 나타냄을 확인하였으므로, 이를 다양한 인플루엔자 항원의 범용성 백신으로 활용할 수 있는지 여부를 확인하였다. 보다 구체적으로 정제된 삼중합 HA2 헬리컬 도메인 항원을 이용하여 마우스 단일클론 항체를 제조하였으며, 총 2개의 클론에서 얻은 복수(ascites)를 이용하여 곤충에서 발현한 제조합 헤마글루티닌 (pH1N1, cH3N2, hH3N2, aH5N1, dH7N9)을 감지할 수 있는지 여부를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다. 결과를 도 6에 나타내었다.

[0060] 도 6에 나타난 바와 같이, 삼중합 HA2 헬리컬 도메인의 단클론 항체는 헤마글루티닌의 다양한 아형에 모두 결합을 하였으며, 이와 같은 결과를 통해 삼중합 HA2 헬리컬 도메인을 다양한 아형에 대한 범용성 백신으로 이용할 수 있음을 확인하였다.

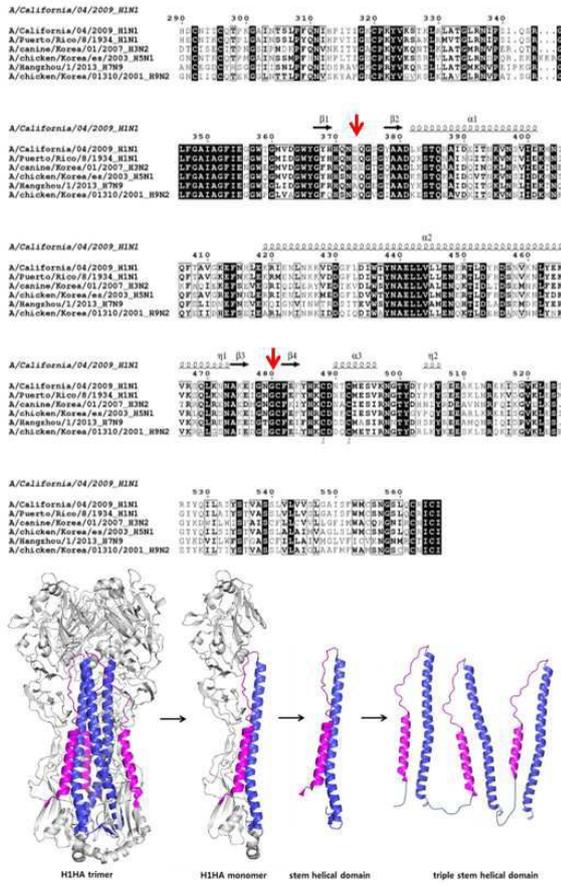
[0061] 따라서 본 발명의 단일 HA2 헬리컬 도메인 및 이의 삼중합 HA2 헬리컬 도메인은 항원으로 작용하여 다양한 아형의 인플루엔자에 대해서 항체를 효과적으로 유도할 수 있으므로 다양한 인플루엔자에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있는 유용성이 있음을 확인하였다.

도면

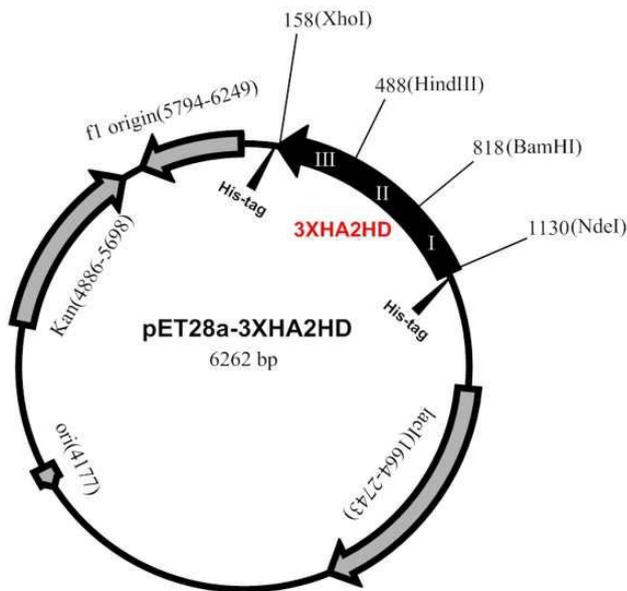
도면1



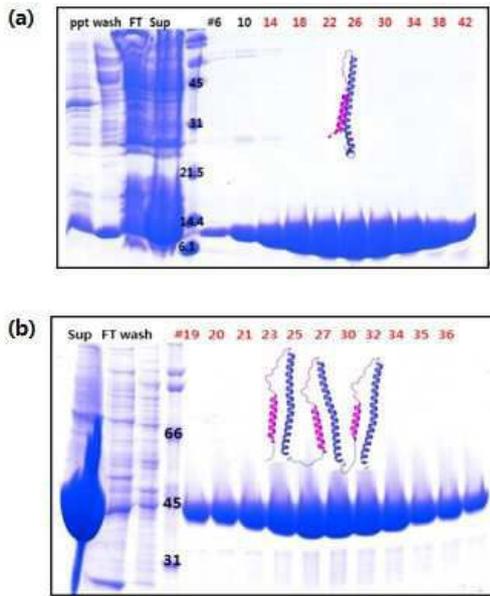
도면2



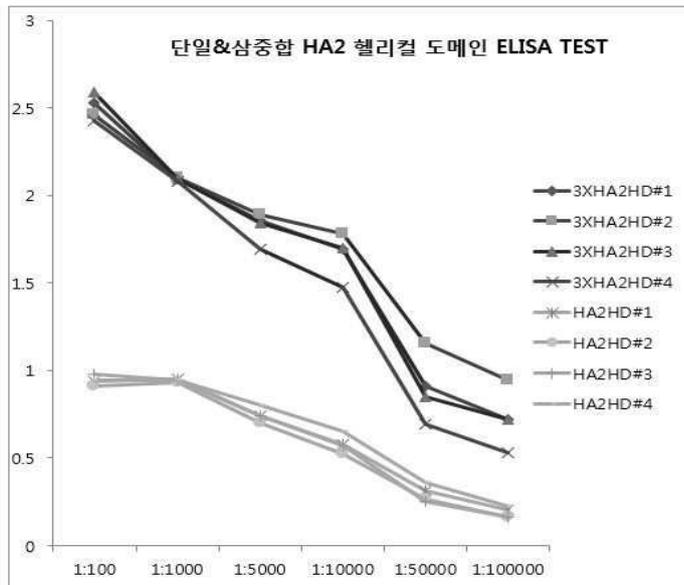
도면3



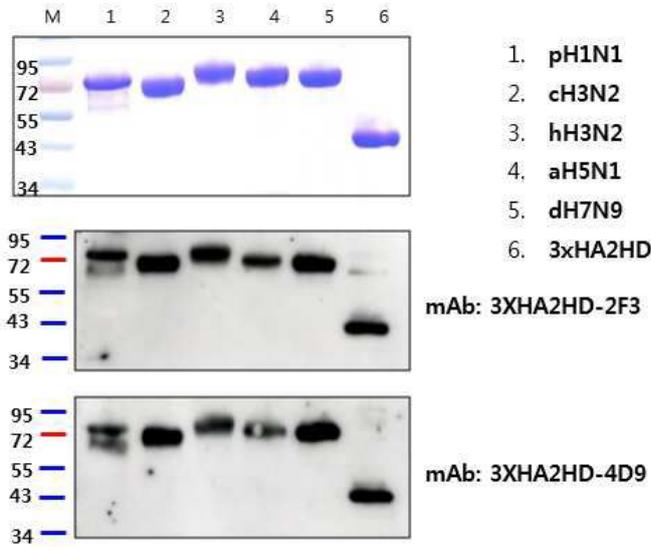
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Universal influenza virus vaccine composition
- <130> 1-20p
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 566
- <212> PRT
- <213> influenza virus
- <400> 1

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

1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr

20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn

35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val

50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly

65 70 75 80

<211> 1056
 <212> DNA
 <213> influenza virus
 <400> 2

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tgggtcccgcg cggcagccat 60
 atggcagccg acctgaagag cacacagaat gccattgacg agattactaa caaagtaaat 120
 tctgttattg aaaagatgaa tacacagttc acagcagtag gtaagagtt caaccacctg 180

gaaaaaagaa tagagaattt aaataaaaaa gttgatgatg gtttctgga catttggact 240
 tacaatgccg aactgttggg tctattggaa aatgaaagaa ctttggacta ccacgattca 300
 aatgtgaaga acttatatga aaagtaaga agccagctaa aaaacaatgc caaggaaatt 360
 ggaaacggcg gatccgagca ggggtcagga tatgcagccg acctgaagag cacacagaat 420
 gccattgacg agattactaa caaagtaaat tctgttattg aaaagatgaa tacacagttc 480
 acagcagtag gtaagagtt caaccacctg gaaaaaagaa tagagaattt aaataaaaaa 540
 gttgatgatg gtttctgga catttggact tacaatgccg aactgttggg tctattggaa 600

aatgaaagaa ctttggacta ccacgattca aatgtgaaga acttatatga aaagtaaga 660
 agccagctaa aaaacaatgc caaggaaatt ggaaacggca agcttgagca ggggtcagga 720
 tatgcagccg acctgaagag cacacagaat gccattgacg agattactaa caaagtaaat 780
 tctgttattg aaaagatgaa tacacagttc acagcagtag gtaagagtt caaccacctg 840
 gaaaaaagaa tagagaattt aaataaaaaa gttgatgatg gtttctgga catttggact 900
 tacaatgccg aactgttggg tctattggaa aatgaaagaa ctttggacta ccacgattca 960
 aatgtgaaga acttatatga aaagtaaga agccagctaa aaaacaatgc caaggaaatt 1020

ggaaacggcg tcgagcacca ccaccaccac cactga 1056

<210> 3
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> influenza virus
 <400> 3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile
 20 25 30
 Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr

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

Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Leu Glu His His His His His His
 340 345 350

- <210> 4
- <211> 1701
- <212> DNA
- <213> influenza virus
- <400> 4

atgaaggcaa tactagtagt tctgctatat acatttgcaa cgcgcaaatgc agacacatta 60
 tgtatagggt atcatgcgaa caattcaaca gacactgtag 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 gatttcatcg attatgagga gctaagagag 360
 caattgagct cagtgtcadc atttgaaagg ttgagatat tccccaaagc aagttcatgg 420
 cccaatcatg actcgaacaa aggtgtaacg gcagcatgtc ctcatgctgg agcaaaaagc 480
 ttctacaaaa atttaatatg gctagttaa aaaggaaatt catacccaa gctcagcaaa 540
 tcctacatta atgataaagg gaaagaagtc ctctgtctat ggggcattca ccatccatct 600
 actagtgtg accaacaag tctctatcag aatgcagata catagtttt tgtgggtca 660

 tcaagataca gcaagaagtt caagccggaa atagcaataa gacccaaagt gagggatcaa 720
 gaagggagaa tgaactatta ctggacacta gtagagccgg gagacaaaat aacattcgaa 780
 gcaactggaa atctagtgtg accgagatat gcattcgcaa tggaaagaaa tgctggatct 840
 ggtattatca ttcagatac accagtccac gattgcaata caacttgtca aacaccaag 900
 ggtgctataa acaccagcct cccatttcag aatatacatc cgatcacaat tggaaaatgt 960
 ccaaatatg taaaagcac aaaattgaga ctggccacag gattgaggaa tatccgtct 1020
 attcaatcta gaggcctatt tggggccatt gccggtttca ttgaaggggg gtggacaggg 1080

atggtagatg gatggtacgg ttatcaccat caaaatgagc aggggtcagg atatgcagcc	1140
gacctgaaga gcacacagaa tgccattgac gagattacta acaaagtaa ttctgttatt	1200
gaaaagatga atacacagtt cacagcagta ggtaaagagt tcaaccacct ggaaaaaaga	1260
atagagaatt taaataaaaa agttgatgat ggtttctctgg acatttgac ttacaatgcc	1320
gaactgttgg ttctattgga aatgaaaga actttggact accacgattc aatgtgaag	1380
aacttatatg aaaaggtaa aagccagcta aaaaacaatg ccaaggaaat tggaaacggc	1440
tgctttgaat ttiaccacaa atgcgataac acgtgcatgg aaagtgtcaa aatgggact	1500
tatgactacc caaataactc agaggaagca aaattaaaca gagaagaaat agatgggta	1560
aagctggaat caacaaggat ttaccagatt ttggcgatct attcaactgt cgccagtca	1620
ttggtactgg tagtctcct gggggcaatc agtttctgga tgtgctctaa tgggtctcta	1680
cagttagaa tatgtattta a	1701