(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 39/145

(11) 공개번호 특1999-022335
(43) 공개일자 1999년03월25일

(21) 출원번호 특1997-708815
(22) 출원일자 1997년12월04일
번역문제출일자 1997년12월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US 96/08441 (87) 국제공개번호 WO 96/39179
(86) 국제출원출원일자 1996년06월03일 (87) 국제공개일자 1996년12월12일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐

EA EURASIAN특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국

국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체크 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 북한 대한민국

(30) 우선권주장 8/462388 1995년06월05일 미국(US)
(71) 출원인 아비론 브라이언트 마틴 엘

미국 캘리포니아주 94043 마운틴 뷰 노쓰 버나도 애비뉴 297

(72) 발명자 파킨 네일 티

미국 캘리포니아주 94002 벨몬트 펀우드 웨이 1815

코엘링 캐슬린 엘

미국 캘리포니아주 94110 샌프란시스코 돌로레스 스트리트 1507

(74) 대리인 김창세, 장성구

심사청구 : 없음

(54) 인플루엔자의 신규한 재조합 감온성 돌연변이체

요약

본 발명은 재조합 PB2 변종 인플루엔자 바이러스, RNA, cDNA 및 벡터를 제공한다. 또한 본 발명은 변종 바이러스를 함유하는 면역원성 조성물, 이러한 바이러스의 제조 방법, 및 인간의 인플루엔자의 예방적 치료 방법을 제공한다.

명세서

기술분야

본 발명은 인플루엔자 바이러스 면역원성 조성물 및 이러한 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 인플루엔자의 PB2 폴리머라제의 RNA 서열이 조심스럽고 특정하게 조작된 돌연변이를 갖는 인플루엔자 바이러스 면역원성 조성물에 관한 것이다.

배경기술

인플루엔자는 엔벨로프로 싸여진, 단일-스트랜드의 네가티브-센스(negative-sense) RNA 바이러스로서 전 세계에 걸쳐 다수의 호흡기 질환의 원인이 되고 있다. 이들은 단지 오르토믹소바이러스 군의 일종으로 세가지 유형, 즉 A, B 및 C의 하위 그룹으로 나눌 수 있다.

인플루엔자 비리온(virion)은 단일-스트랜드를 갖는 RNA 게놈을 함유하는 내부 리보산단백질 핵 및 매트릭스(본원에서는 M1으로 지칭함) 단백질로 안쪽이 채워진 외부 지단백질 엔벨로프로 구성된다. 인플루엔자 A의 분절된 게놈은 10개의 폴리펩타이드를 코딩하는, 선형의 음극성 단일-스트랜드인 RNA 서열의 8개 분자로 구성된다. 제 1 분절은 2341개의 뉴클레오타이드로 구성되고, RNA-주형 RNA 폴리머라제 착체를 구성하는 3개의 단백질 중 하나인 759개 아미노산의 폴리펩타이드인 PB2를 코딩한다. 나머지 2개의 폴리머라제 단백질, 즉 757개 아미노산의 폴리펩타이드인 PB1 및 757개 아미노산의 폴리펩타이드인 PA는 각각 2341개의 뉴클레오타이드 서열(제 2 분절) 및 2233개의 뉴클레오타이드 서열(제 3 분절)에 의해 코딩된다. 게놈의 제 4 분절은 566개 아미노산의 헤마글루틴(HA) 표면의 당단백질을 코딩하는 1778개의 뉴클레오타이드 서열로 구성되고, 이러한 당단백질은 지단백질 엔벨로프로부터 돌출되어 세포와의 부착 및 세포내로의 진입을 매개한다. 제 5 분절은 498개 아미노산의 핵단백질(NP)(이는 뉴클레오캅시드를 형성함)을 코딩하는 1565개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 제 6 분절은 454개 아미노산의 뉴라미니데이즈(NA) 엔벨로프 당단백질을 코딩하는 1413개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 제 7 분절은 M RNA의

재접합된 변종으로부터 번역된 252개 아미노산의 M1 단백질 및 96개 아미노산의 M2 단백질을 코딩하는 1027개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 제 8 분절은 230개의 아미노산으로 구성된 NS1 및 121개의 아미노산으로 구성된 NS2인 두 비구성 단백질(이들의 기능은 분명하지 않음)를 코딩하는 890개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. NS2는 NS RNA의 재접합된 변종으로부터 번역된다.

인플루엔자 B의 분절된 게놈은 11개의 폴리펩타이드를 코딩하는 선형의, 음극성 단일-스트랜드의 RNA 서열의 8개 분자로 구성된다. 제 2 분절은 2396개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 3개의 RNA-주형 RNA 폴리머라제 단백질중 하나인 770개 아미노산의 폴리펩타이드인 PB2를 코딩한다. 나머지 2개의 인플루엔자 B 폴리머라제 단백질, 즉 752개 아미노산의 폴리펩타이드인 PB1 및 725개 아미노산의 폴리펩타이드인 PA는 각각 2386개의 뉴클레오타이드 서열(제 1 분절) 및 2304개의 뉴클레오타이드 서열(제 3 분절)에 의해 코딩된다. 게놈의 제 4 분절은 584개 아미노산의 HA 표면 당단백질을 코딩하는 1882개의 뉴클레오타이드 서열로 구성되고, 이러한 당단백질은 지단백질 엔벨로프로부터 돌출되어 세포와의 부착 및 막 접합을 매개한다. 제 5 분절은 560개 아미노산의 NP 단백질(이는 뉴클레오캅시드를 형성함)을 코딩하는 1839 내지 1841개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 제 6 분절은 466개 아미노산의 NA 엔벨로프 당단백질 및 비구성 단백질인 100개 아미노산의 NB 단백질(이것의 기능은 공지되지 않음)을 코딩하는 1454개의 뉴클레오타이드의 서열로 구성된다. 제 7 분절은 별개의 리딩 프레임(reading frame)으로부터 번역된 248개 아미노산의 M1 단백질 및 195개 아미노산의 BM2 단백질을 코딩하는 1191개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 제 8 분절은 281개의 아미노산으로 구성된 NS1 및 121개의 아미노산으로 구성된 NS2인 비구성 단백질(이들의 기능은 분명하지 않음)을 코딩하는 1096개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. NS2는 NS RNA의 재접합된 변종으로부터 번역된다.

인플루엔자 C의 분절된 게놈은 8개의 폴리펩타이드를 코딩하는 선형의, 음극성 단일-스트랜드의 RNA 서열의 7개 분자로 구성된다. 제 1 분절은 2356개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 3개의 RNA-주형 RNA 폴리머라제 단백질 중 하나인 774개 아미노산의 폴리펩타이드인 PB2를 코딩한다. 나머지 2개의 폴리머라제 단백질, 즉 754개 아미노산의 폴리펩타이드인 PB1 및 709개 아미노산의 폴리펩타이드인 PA는 각각 2363개의 뉴클레오타이드 서열(제 2 분절) 및 2183개의 뉴클레오타이드 서열(제 3 분절)에 의해 코딩된다. 게놈의 제 4 분절은 655개 아미노산의 헤마글루틴-에스테라제 표면 당단백질을 코딩하는 2074개의 뉴클레오타이드 서열로 구성되고, 이러한 당단백질은 지단백질 엔벨로프로부터 돌출되어 세포와의 부착, 접합을 매개하고 수용체-파괴 활성을 갖는다. 제 5 분절은 565개 아미노산의 NP 단백질(이는 뉴클레오캅시드를 형성함)을 코딩하는 1809개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 제 6 분절은 374개 아미노산의 매트릭스(M) 단백질을 코딩하는 1180개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 제 7 분절은 NS RNA의 재접합된 변종로부터 번역된 286개 아미노산의 NS1 단백질 및 122개 아미노산의 NS2 단백질을 코딩하는 934개의 뉴클레오타이드 서열로 구성된다.

세포를 감염시키기 위해서, 인플루엔자 HA 단백질이 세포 막 당단백질 및 당지질내 시알릴올리고사카라이드 분자에 흡착된다. 비리온의 세포내 이입의 결과로, 세포 엔도솜에서 HA 분자가 형태적으로 변화되어 막의 접합을 용이하게 하고 탈피각을 개시한다. 뉴클레오캅시드는 핵으로 이동하여, 이곳에서 감염의 필수적인 초기 단계로서 바이러스의 mRNA가 전사된다. 인플루엔자 RNA의 전사 및 복제는 감염된 세포의 핵에서 일어나고 비리온으로의 조립은 플라즈마 막을 통해 또는 막으로부터 발아됨으로써 일어난다. 바이러스는 혼합된 감염 과정 동안 유전자를 재배열할 수 있다.

인플루엔자 바이러스 RNA의 복제는 4가지의 바이러스 유전자 생성물, 즉 PB1, PB2, PA 및 NP에 의존한다. 3개의 폴리머라제 단백질, 즉 PB1, PB2 및 PA는 감염된 세포의 핵내에서 3개의 분자로 이루어진 착체를 형성한다. 각각의 단백질은 그 자체의 핵의 위치부여 신호를 갖는다(아키나(Akkina)의 문헌[J. Virol 61:2217-24 (1987)], 무카이가와(Mukaigawa)의 문헌[J. Virol. 65:245-253 (1991) 및 니에토(Nieto)의 문헌[J. Gen. Virol. 75: 29-36(1994)] 참고). 각각의 폴리펩타이드에 있어서 몇가지 특별한 기능들이 기술되었다. PB1은 주로 효소 중합 공정, 즉 연장 단계에 관련되는 것으로 보인다. 이것은 다른 RNA-주형 RNA 폴리머라제 단백질과 아미노산 상동성의 영역을 공유한다. PA의 정확한 기능은 공지되지 않다. PB2 단백질은 숙주 세포 mRNA상에 존재하는 5'-말단 캡(cap) 구조에 결합된다: 그 다음 mRNA는 절단되어 캡화된 9 내지 15 머(mer) 올리고리보뉴클레오타이드(이것은 인플루엔자 mRNA의 전사에 있어서 프라이머(primer)의 역할을 함)를 생성한다. PB2 아미노산 서열은 세포의 캡-결합 단백질, 즉 eIF-4E와 제한된 상동성의 영역을 갖는다(드 라 누나(de la Luna)의 문헌[Virus Res. 13:143-56 (1989)] 참고). PB2가 바이러스 RNA의 복제에 절대적으로 필요한 것은 아니지만, PB1, PA 및 NP만을 발현하는 세포내의 바이러스 주형으로부터 전사된 mRNA는 캡화되어있지 않기 때문에 번역될 수 없다(나카가와(Nakagawa)의 문헌[J. Virol. 69: 728-33(19950] 참고). 전사는 그들의 주형의 말단으로부터 제 15 내지 제 22 염기에서 종결되는 반면, 올리고(U) 서열은 폴리(A) 관(tract)을 주형에 상관없이 부가하기 위한 신호로서 작용한다. 감염의 나중 단계에서, mRNA를 제조하는 대신에 폴리머라제 단백질 PB1, PB2 및 PA를 새로운 바이러스 RNA 게놈을 제조하는데 사용한다. 폴리머라제 착체는 우선 cRNA를 전사하고, 그 다음 이것을 보다 많은 vRNA를 제조하기 위한 주형으로 사용한다. 플러스-스트랜드의 cRNA 복사체는 캡화되고 메틸화된 5'-말단이 결핍되었다는 점에서 플러스-스트랜드의 mRNA 전사물과 구별된다. 또한, 이들은 3' 말단에서 잘려지거나 또는 폴리아데닐화되어 있지않다. 따라서, cRNA는 네가티브 스트랜드 주형과 함께 종결되며, 모든 유전자 정보를 상보적인 형태로 각각의 게놈 분절에 함유한다.

네가티브 스트랜드 게놈(vRNAs) 및 항게놈(cRNAs)은 항상 바이러스 뉴클레오캅시드 단백질에 의해 캅시드화되어 있다: 캅시드화되어 있지 않은 RNA 종만이 바이러스 mRNA이다. 뉴클레오캅시드 조립은 핵내에서 일어나는 것으로 보인다. 발아 엔벨로프의 세포질 측면 또는 내부 표면 상에서 M1 단백질을 혼입하면서 세포의 정점 표면으로부터 발아됨으로써 바이러스가 성숙된다. HA 및 NA 당단백질은 지질 엔벨로프로 혼입된다. 복제를 허용하는 세포내에서, HA는 후-번역되어 절단되지만, 2개의 생성된 쇄는 디설파이드 결합에 의해 연결된 채로 남아있다.

인플루엔자에 대한 면역원성 조성물을 제조하기 위한 노력은 2가지 형태로 진행되고 있다. 숙주내에서 복제를 하지 않는 비활성 백신은 전체 바이러스 또는 바이러스 하위 단위 단백질을 화학적으로 불활성화시킬 수 있다. 불활성 백신 및 하위 단위 바이러스 백신은 둘다 인플루엔자에 유용하다. 이러한 백신은 숙주내로 투여되자마자 면역 반응을 나타내는 항원으로서 HA 및 NA의 표면 단백질을 함유한다. 알 수 없

는 이유로 하위 단위 백신의 인플루엔자 질병에 대한 효율은 단지 60% 내지 80%를 나타내었다. 불활성 전체 바이러스 백신은 근육내 투여되어 주로 전신 면역 반응을 자극하는 반면, 살아있고 감약화된(attenuated) 백신 또한 국부 점막의 면역계를 자극한다. 후자의 면역계 유형은 바이러스가 먼저 마주치는 상부 호흡관에 존재하기 때문에 더 효과적이다. 또한 불활성 백신은 전형적으로 세포독성 T 세포 반응의 유도 능력을 감소시켜, 때때로 지연성 과민 반응의 원인이 된다. 길라인-바레(Guillain-Barre) 증후군은 불활성된 인플루엔자 A 스와인 플루(swine flu) 백신과 관련된다(쉔베르거(Schonberger)의 문헌[Ann. Neurol. 9 (앞과 동일): 31-38(1981)] 참고).

살아있고 감약화된 바이러스는 면역원성 조성물에서 사용할 수 있고, 전형적으로 숙주내에서 요구되는 방어 반응을 유도하는데 성공적이다. 살아있고 감약화된 인플루엔자 바이러스는 숙주내에서 제한적인 복제를 할 수 있어서, 방어 면역 반응을 자극하지만 질병을 유발하지는 않는다. 전에는 이러한 돌연변이체는 발달이 덜 된 란과 같은 비-자연적인 숙주를 통한 다수의 계대배양, 점차로 낮아지는 온도에서의 비-자연적인 숙주를 통한 연속적인 계대배양 또는 화학적인 방법 및 변이 유발 조건의 선택에 의한 무작위 변이 유발에 의해 발생된다. 이러한 방법은 병원성을 손실시키는 반면, 면역원성을 유지시킨다. 그러나 전술한 방법에 의한 유전자 돌연 변이의 특성은 돌연변이체 주 공여체 바이러스가 백신 후보자로서 선택된 경우, 공지되어있지 않다. 이러한 돌연 변이가 하나 또는 두개의 뉴클레오타이드의 변화로 제한된다면, 바이러스 조성물은 궁극적으로는 숙주내에서 돌연변이체를 복구시키거나 또는 되돌려 이의 근원적인 병원성의 표현형을 회복시킨다. 그러나, 이러한 방법중의 하나인, 점차로 감소하는 온도에서의 연속적인 계대배양은 유전학적으로 안정하게 보이는 다발성 돌연 변이를 갖는 바이러스(A/Ann Arbor/6/60으로부터 유도된 저온-적응된 균주)를 발생시킨다(머피(Murphy)의 문헌[Inf. Dis. In Clin. Practice 2: 174-181 (1993] 참고). 이러한 백신 조성물을 제조하는데 있어서, 감약화된 주 공여체 바이러스의 HA 및 NA RNA 서열을 순환하는 인플루엔자 균주로부터의 HA 및 NA RNA 서열로 대체한다. 이러한 바이러스를 재배열 바이러스라고 한다.

화학적인 변이 유발에 의해 발생하거나 또는 자발적인 돌연변이체에 대한 스크리닝으로 동정된 인플루엔자의 감온성(temperature sensitive; ts) 돌연변이체가 기술된바 있다. 이러한 돌연변이체는 감염된 동물의 하부 호흡관에서 복제될 수 없고 야생형 바이러스보다 상부 호흡관에서 보다 적게 복제된다. 이러한 돌연변이체의 하나인 ts1A2는 살아있고 감약화된 인플루엔자 백신의 다수의 바람직한 특성을 갖고 있는 것으로 보였다(머피 및 챈녹(Chanock)의 문헌[Genetic Variation Among Influenza Viruses, 601-613 페이지, Nayak, D. ed, Academic Press. 뉴욕 (1981)] 및 머피의 문헌[Phil. Trans. R. Soc. Lon. B. 288:401-15 (1980)] 참고). ts1A2 균주는 PB1 및 PB2내 감온성 장애를 함유하고 있는 것으로 밝혀졌고 바람직한 정도의 감약화를 나타내지만, 유전학적으로 불안정하여 혈청학적으로 음성인 어린 백신내에서 복제된 후 독성의 상태로 복구된다(머피의 문헌[Ann. NY Acad. Sci. 354:172-82 (1980)] 및 톨핀(Tolpin)의 문헌[Infection and Immunity 36:645-50 (1982)] 참고).

PB2 유전자에 대해 ts 장애가 맵핑(mapping)된 A/Udorn/307/72의 감온성 돌연변이체에 대해 기술된 바 있다. 후속적인 분석을 통해 PB2의 아미노산 위치 65, 100, 112, 171, 298, 310, 386, 391 및 556에서 돌연 변이를 발견하였다. 유사하게, ts1A2 바이러스의 PB2 유전자는 아미노산 위치 658에서 돌연 변이를 발견하였다(로손(Lawson)의 문헌[Virology 91:506-10 (1992)]] 참고). A/AA/6/60의 저온 적응된 균주 또한 감온성이고 후속적인 분석을 통해, ts 표현형에 부분적인 원인을 제공할 수 있는 돌연변이 중의 하나가 PB2의 아미노산 위치 265에서 아스파라긴이 세린으로 교체된 것임을 제안하였다(콕스(Cox)의 문헌[Virology 167:554-67 (1988)], 헐로처(Herlocher)의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 6032-36 (1993)] 및 스나이더(Snyder)의 문헌[J. Virol. 62: 488-95 (1988)] 참고). 또한, A/WSN/33 및 A/FPV/Rostock/34의 PB2 ts 돌연변이체가 공지되어 있다. ts 표현형에 추측컨대 원인이 되는 PB2 유전자 서열의 돌연 변이는 A/WSN/33의 경우 아미노산 417에 있고, A/FPV/Rostock/34의 경우 아미노산 512에 있다(맥컬리(McCauley)의 문헌[Virus Res. 17: 191-98 (1990) 및 야마나카(Yamanaka)의 문헌[Arch. Virol. 114: 65-73 (1990)] 참고). 종합적으로, 이러한 연구는 ts 바이러스를 발생시키기 위해 돌연변이가 도입될 수도 있는, PB2 단백질내의 가능성이 있는 다수의 위치를 제안하고 있다.

살아있고 감약화된 바이러스를 제조하기 위한 또다른 방법은 복귀 유전학 기법을 사용하는 것이다(에나미(Enami)의 문헌[Proc. Nat. Acad. Sci. 87:3802-05 (1990)], 에나미 및 팔레스(Palese)의 문헌[J. Virol. 65:2711-13 (1991)] 및 루이체스(Luytjes)의 문헌[Cell 59:1107-13(1989)] 참고). 이러한 방법에서, 변형된 vRNA와 같은 전사물은 정제된 NP, PB1, PB2 및 PA 단백질의 존재하에서 cDNA 구조물로부터 시험관내에서 전사되었다. 생성된 합성 RNP는 그 다음 사전에 인플루엔자 바이러스, 보통은 헬퍼(helper) 바이러스(이는 숙주 범위 제한 또는 감온성과 같은 조건적인 성장 결함을 가지며, 형질감염 바이러스를 후속적으로 선택하게 함)로 감염된 세포로 형질감염시킨다. 예를 들어, 숙주-범위 헬퍼 바이러스는 합성 NA 및 PB2 유전자를 복귀하는데 성공적으로 사용된다(전술한 에나미의 문헌 및 수바라오(Subbarao)의 문헌[J. Virol. 67:7223-7228(1993)] 참고). HA 및 NA 유전자의 경우 형질감염체를 선택하는데 항체의 선택이 사용될 수 있다. 항체 선택 기법을 사용하여 표면 HA 당단백질 유전자를 형질감염시키고 인플루엔자 A 바이러스로 복귀시킨다(호리모토(Horimoto) 및 가와오카(Kawaoka)의 문헌[J. Virol. 68:3120-3128 (1994)] 및 리(Li)의 문헌[J. Virol. 66:399-404 (1992)] 참고). 또한 HA 유전자를 형질감염시키고 인플루엔자 B 바이러스로 복귀시킨다(바클레이(Barclay) 및 팔레스의 문헌[J. Virol. 69:1275-1279(1995)] 참고). 또한 M 유전자(야스다(Yasuda)의 문헌[J. Virol. 68: 8141-8146(1994)] 참고) 및 NP 유전자(리의 문헌[Virus Res., 발행중] 참고)를 복귀 유전학 기법을 사용하여 복귀시킨다.

복귀 유전학을 사용하여 인플루엔자 게놈에 특이한 돌연변이를 조작할 수 있는 가능성이 제공되면, 쉽게 복구되지 않고 따라서 바람직한 특성인 유전성 안정성을 보여주는 돌연변이를 갖는 ts 균주를 형성하는 것이 가능하다. 이것은 야생형 아미노산을 코딩하기 위해 코돈내에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 돌연변이되는 것을 필요로 하는 새로운 코돈을 도입하거나, 쉽게 유전학외의 방법으로 억압되지 않는 부위를 돌연변이하거나 또는 하나 이상의 유전자에서 다중의 독립적으로 활동하는 돌연변이를 도입함으로써 성취할 수도 있다. 야생형 아미노산을 코딩하는 코돈으로 복귀시키기 위해서 하나 이상의 염기 변화가 필요하도록 전술한 단 4개의 아미노산의 변화를 조작할 수 있기 때문에, ts 돌연변이의 도입을 위한 추가적인 부위를 알아내는 것이 매우 요구된다.

군집화되고 전하를 띠는 아미노산으로부터 알라닌으로의 돌연변이 유발은 전하를 띠는 아미노산을 전하를 띠지 않는 알라닌으로 돌연변이시켜 단백질의 전체적인 구조 또는 안정성을 유지하면서 그의 생물활성을 개질시킨다. 이것은 인간 성정 호르몬 수용체 단백질(바스(Bass)의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 4498-4502 (1991)] 참고), 사카로마이시즈 세레비지에(Saccaromyces cervisiae) 악틴 단백질(워트만(Wertman)의 문헌[Genetics 132:337-50 (1995)] 참고), 폴리오바이러스 3D 폴리머라제 단백질(다이아몬드(Diamond) 및 커케가드(Kirkegaard)의 문헌[J. Virol. 68: 863-76 (1994)] 참고), 종두증 바이러스 G2R 단백질(하셋(Hassett) 및 콘디트(Condit)의 문헌[Pro. Natl. Acad. Sci. 91:4554-4559] 참고), 및 인간 면역결핍 바이러스 유형 1 인테그라제 단백질(비스케르쉔(Wiskerchen)의 문헌[J. Virol. 69: 597-601 (1995)] 참고)의 돌연변이체를 생성하는데 사용된다. 전술한 경우에서 각각 전하를 띤 군집은 5개의 연속된 아미노산(이들 중 2개 이상은 전하를 띰)으로된 서열로 정의된다.

발명의 요약

인플루엔자의 천연 단백질내의 군집화되고 전하를 띠는 아미노산 잔기를 변형하면 결과적으로 인플루엔자 바이러스내에서 감온성이 일관성있고 단정할만하게 나타남을 발견하였다. 인플루엔자 바이러스에 대하여 본원에서 정의한 바와 같이 군집화되고 전하를 띠는 아미노산 잔기란 4개 또는 5개의 양전하 또는 음전하를 갖는 아미노산으로 구성된 인플루엔자 바이러스의 천연 단백질내에 5개 이상의 연속적인 아미노산의 서열을 의미한다. 전하를 띤 아미노산(양전하 또는 음전하를 갖는)은 아르기닌, 리신, 아스파르트산, 글루탐산 및 히스타딘을 들 수 있다. 본 발명은 인플루엔자 PB2 단백질을 사용하여 설명함으로써 예시화된다.

따라서, 한 양태로 본 발명은 신규한 PB2 변종 폴리펩타이드 서열 및 PB2 변종 폴리펩타이드를 코딩하는 RNA 서열을 포함하며, 이들은 인플루엔자 바이러스 주 공여체 바이러스에 도입되는 경우, 이러한 바이러스는 감온성 표현형을 나타내게 된다.

복귀 유전학 기법을 사용하여 PB2 변종 RNA 서열은 인플루엔자 게놈으로 복귀되어 요구되는 특정 감온성 유도 돌연변이를 함유하는 이러한 인플루엔자 주 공여체 바이러스 균주를 생성한다. 따라서, 다른 양상에서 본 발명은 이러한 신규한 PB2 변종 RNA 및 폴리펩타이드 서열을 함유하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 이러한 재조합 인플루엔자 바이러스는 배양된 세포 및/또는 살아있는 숙주내에서 성장이 감약화되고 인플루엔자 감염에 대해 인간을 예방적으로 치료하기 위한 인플루엔자 바이러스 재배열체 및 면역원성 조성물을 제조하는데 있어서 주 공여체 바이러스로서 유용하다. 이러한 재조합 인플루엔자 바이러스를 제조하기 위해서 복제를 허용하는 숙주 세포를 헬퍼 바이러스로 감염시키고 합성 RNP 착체로 형질감염시킨다. 합성 RNP 착체를 돌연변이된 RNA 서열을 코딩하는 DNA로부터 시험관내에서 전사시키고, 형질감염전에 리보핵단백질(RNP)로 포장한다. 형질감염으로 생성된 자손 바이러스는 돌연변이되고 형질감염된 RNA 서열을 바이러스 입자에 도입시킨 바이러스를 포함한다. 돌연변이화되고 형질감염된 서열을 도입시킨 세포로부터 회수되는 형질감염 바이러스는 그 다음 2개의 바이러스간의 표현형의 차이를 이용하여 형질감염체 및 헬퍼 바이러스의 혼합물 중에서 선택한다. 이렇게 선택된 상기 형질감염 바이러스는 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 바람직한 양태에서, 돌연변이된 서열은 인플루엔자 PB2 서열 및/또는 인플루엔자 M 서열 및/또는 인플루엔자 NP 서열이다. 이러한 양태에서, 돌연변이된 PB2 및/또는 M 서열 및/또는 NP 서열은 표현형을 감약화시키는 감온성 돌연변이를 포함할 것이다.

다른 양상에 있어서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 RNA 분절을 생성할 수 있는 헬퍼 바이러스로 감염된 세포에, 전하를 띤 군집 돌연변이를 갖는 PB2 변종 단백질을 코딩하는 재조합 네가티브 스트랜드의 RNA 주형을 도입시킴을 포함하는, 인플루엔자 게놈에서의 변형 제조 방법을 포함한다. 사용할 수 있는 한가지 헬퍼 바이러스는 조류 세포내에서 성장할 수 있으나 포유 동물 세포에서는 성장할 수 없다. 보다 특정하게 예를 들면, 매딘-다비 소의 신장 세포(Madin-Darby bovine kidney; MDBK)는 조류 바이러스의 PB2 유전자를 함유하는 인플루엔자의 숙주-범위 돌연변이체로 감염시킬 수 있다(클레멘츠(Clements)의 문헌[J. Clin. Microbiol. 30:655-662 (1992)] 참고). 그 다음 합성 PB2 RNP를 정제된 RNP 단백질의 존재하에서 돌연변이된 vRNA-센스 PB2 RNA를 코딩하는 cDNA 주형을 전사시킴으로써 시험관내에서 제조한다. cDNA는 헬퍼 바이러스로 복귀되는 경우, 포유 동물 세포내에 플라크를 형성하도록 하는 PB2 단백질을 코딩하여만 한다. 생성된 RNP를 감염된 MDBK 세포에 도입시키고, 세포를 배양시키고, 매질을 수확하여 MDCK 세포를 감염시키는데 사용한다.

또다른 양상으로, 본 발명은 인플루엔자 바이러스의 야생형 유행성 균주로부터 유도된 HA 및 NA 당단백질을 코딩하는 RNA 서열 및 형질감염체 바이러스로부터 유도된 나머지 RNA 서열을 포함한다. 야생형 유행성 바이러스는 면역성이 요구되는 인플루엔자 바이러스의 순환성 균주이다. 형질감염 바이러스는 감약화된 주 공여체, 즉 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스로서, 이것은 내부 단백질을 코딩하는 하나 이상의 RNA 분절내에 감약화된 돌연변이를 함유하거나, 바람직하게는 본원에서 개시하는 바와 같이 본 발명의 PB2 서열내에 전하를 띠는 변형 및/또는 M 서열의 군집 전하를 띤 변형을 함유하며, 이러한 변형은 본원에서 기술한 방법에 제조하며 감약화에 대해 실험할 수 있다. 적절하게 감약화된 백신 바이러스를 발생시킬 수 있는 가장 재현성이 좋은 방법은 주 공여체의 6개의 내부 단백질 RNA 분절(PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS)을 보유시키는 것이지만, 백신 바이러스내에 주 공여체 분절을 거의 포함하지 않지만 적절한 정도의 감약화 및 유전적인 안정성을 유지하는 것도 가능하다.

또다른 양상으로, 본 발명은 면역원성-유도 유효량의 인플루엔자 바이러스 변종을 약학적으로 허용가능한 담체 또는 용액과 함께 함유하는 면역원성 약학 조성물을 포함한다.

또다른 양상에서, 본 발명은 환자에게 면역원성-유도 유효량의 본 발명의 면역원성 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 환자에 대한 예방 치료 방법을 포함한다. 면역원성-유도란 포유 동물내에서 인플루엔자에 대한 방어용 항체의 제조를 자극하기에 충분한 양을 의미한다. 이러한 양은 국부적으로 및/또는 전신적으로 항체 생성을 자극할 수도 있기 때문에, 이러한 감염으로 인한 감염 또는 질병이 예방된다. 환자는 인간 환자인 것이 바람직하다.

발명의 상세한 설명

본 명세서에서는, 일반적인 아미노산을 종래의 1 문자 기호를 사용하여 나타낸다.

인플루엔자내에서 군집화되고 전하를 띤 아미노산 잔기의 변형은 바이러스내에서 일관성있고 예상할 수 있게 감온성을 나타낸다. 전하를 띤 군집 또는 군집화되고 전하를 띠는 아미노산 잔기란 인플루엔자의 천연 단백질에서 4개 또는 5개의 양전하 또는 음전하를 갖는 아미노산으로 구성된 5개 이상의 연속적인 아미노산 서열을 의미한다. 전하를 띤 아미노산은 아르기닌, 리신, 아스파르트산, 글루탐산 및 히스티딘을 포함한다.

아미노산 잔기의 8개의 전하를 띤 군집을 인플루엔자 A 바이러스 A/LA/2/87/PB2 단백질내에서 동정하였다. 이러한 전하를 띤 군집은 N-말단의 MET 잔기를 1로 하여 번호를 매기는 종래의 방법을 사용하여 2 내지 6 (실험 부분에서 ALA1로 지칭), 120 내지 124(실험 부분에서 ALA2로 지칭), 140 내지 144(실험 부분에서 ALA3으로 지칭), 187 내지 192(실험 부분에서 ALA4로 지칭), 339 내지 343(실험 부분에서 ALA5로 지칭), 677 내지 681(실험 부분에서 ALA6으로 지칭), 699 내지 673(실험 부분에서 ALA7로 지칭), 736 내지 710(실험 부분에서 ALA8로 지칭)의 아미노산을 포함한다. 이러한 천연 아미노산의 특성은 하기의 표 2에 제시하였다.

다수의 다른 인플루엔자 A 균주로부터의 PB2 단백질의 아미노산 서열의 분석을 통해 이러한 균주내에서의 이에 상응하는 8개의 전하를 띤 군집을 밝혔다. 이러한 인플루엔자 A 균주는 A/Memphis/8/88, A/Chile/1/83, A/Kiev/59/79, A/Udorn/307/72, A/NT/60/68, A/Korea/426/68, A/Great Lakes/0389/65, A/Ann Arbor/6/60, A/Leningrad/13/57, A/Singapore/1/57, A/PR/8/34 및 A/WSN/33을 들 수 있다. 이들의 서열은 진뱅크(GenBank)로부터 구할 수 있고, 바이러스 스탁은 미국 메릴랜드주 록빌 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 구할 수 있거나 그렇지 않으면 공공연히 구할 수 있다. ALA1, ALA3, ALA4, ALA5 및 ALA6의 전하를 띤 군집을 포함하는 뉴클레오타이드는 각각의 이러한 인플루엔자 균주내에서 완전히 보존된다.

ALA2 전하를 띤 군집에서, 전술한 Chile, NT, Korea, Great Lakes, Ann Arbor, Leningrad, Singapore, PR 및 WSN 균주의 경우, 120 위치의 아미노산 잔기는 D 잔기 또는 다른 전하를 띤 잔기 E이다. ALA7 전하를 띤 군집에서는, 700 위치의 아미노산이 키에브 균주의 경우 G 잔기이고 다른 균주의 경우 E 잔기이다. ALA8 전하를 띤 군집에서, 740 위치의 아미노산 잔기는 Ann Arbor 및 WSN의 균주의 경우는 N인 반면, 다른 균주의 경우는 전하를 띤 군집내의 A/LA/2/87 과 완전히 동일함을 나타낸다. 따라서, 실시예에서는 A/LA/2/87 균주가 사용되었음에도 불구하고 임의의 전술한 균주를 동일하게 사용할 수도 있다. 추가로, 인플루엔자 B 및/또는 인플루엔자 C내에 아미노산의 전하를 띤 군집에 대한 분석은 본 발명의 교시에 따라 쉽게 수행하여 본원에서 인플루엔자 A에 대해 설명했던 것과 유사한 방법으로 PB2 변종 단백질 및 살아있는 재조합 인플루엔자 B와 인플루엔자 C 바이러스를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 A내의 전하를 띤 군집, ALA4 및 ALA8에 상응하는 전하를 띤 군집은 두 인플루엔자 B 균주, 즉 B/AA/1/66 및 B/NY/1/93에서 발견된다. 본원에서 개시된 교시를 사용하여, 당 분야의 숙련자는 인플루엔자의 다른 유형 및 균주에서의 다른 이와 같은 전하를 띤 군집 잔기를 동정할 수 있을 것이다.

추가로, 인플루엔자 바이러스의 다른 단백질내의 전하를 띤 군집을 규명할 수도 있고 이러한 기법을 사용하여 변형할 수도 있다. 특히 인플루엔자 A, B 또는 C의 M1 단백질을 변형하여 면역적으로 중요한 감약화를 유발하는 변종 M1 단백질을 제조하여, 공지된 복귀 유전학 기법을 사용하여 인간에게 예방적으로 투여하기 위한 살아있고 형질감염된 면역원성 조성물을 제조할 수 있다고 기대된다. 다양한 인플루엔자 유형 및 균주로부터의 M 단백질의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 공지되어 있다(베일러(Baylor)의 문헌[Virol. 163:618-21 (1988)], 마르큐신(Markusin)의 문헌[Virus Res. 10: 263 (1988)], 콕스의 문헌[Virology 167: 554-67 (1988)] 및 버클러-화이트(Buckler-White)의 문헌[J. Virol. 57; 670-700 (1986)] 참고). 당 분야의 숙련자라면 인플루엔자 M 단백질내 전하를 띤 군집을 동정하고 변형하기 위해 본원에서 개시한 기법을 사용하고, 이러한 변형된 M 단백질을 함유하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 제조할 수 있다. 인플루엔자 A의 다수의 균주로부터의 NP 단백질의 뉴클레오타이드 및 아미노산의 서열은 공지되어 있다(슈(Shu)의 문헌[J. Virol. 67: 223-29 (1993)] 참고). 당 분야의 숙련자라면 인플루엔자 NP 단백질내 전하를 띤 군집을 동정하고 변형하기 위해 본원에서 개시한 기법을 사용하고, 이러한 변형된 NP 단백질을 함유하는 재조합 인플루엔자 바이러스를 제조할 수 있다.

본원에서 정의하는 바와 같이 전하를 띤 군집은 본원의 교시에 따라 변형하여 감온성 재조합 인플루엔자 바이러스를 제조할 수 있다. 이러한 감온성 재조합 인플루엔자 바이러스는 PB2 변종 아미노산 서열 및 발현되는 감온성의 원인인 코딩된 RNA 서열을 함유하는 것을 포함한다.

따라서, 본 발명은 신규한 RNA 및 이에 상응하는 PB2 변종 단백질을 코딩하는 cDNA 서열을 개시하고 기술한다. 본 발명의 단백질은 변종 또는 변형된 PB2 서열을 포함하고, 이때 1 내지 8개 이하의 야생형 인플루엔자 PB2 서열의 전하를 띤 군집을 중성 아미노산으로 치환시킴으로써 변형한다. 변종, 변형된 또는 돌연변이체 또는 돌연변이된이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 본원에서 중성 아미노산이란 중성 pH에서 전하를 띠지 않고 전체적으로 2차 또는 3차 구조로 분열되지 않음으로 정의된다. 중성 아미노산의 예로는 알라닌, 발린 및 세린을 들 수 있다. 알라닌은 바람직한 중성 아미노산이다.

인플루엔자의 주 공여체 균주를 제조하기 위해 이러한 단백질을 인플루엔자 바이러스에 도입하는 경우, 결과적으로 면역원성 조성물의 제조 및 인플루엔자의 예방적 치료 방법에서 유용한 감온성 돌연변이체가 제조된다.

본 발명의 PB2 변종 단백질, 즉 변형된 PB2 단백질을 공지된 유전자 재배열 또는 복귀 유전학 방법을 사용하여 인플루엔자 바이러스에 도입시킬 수 있다. 복귀 유전학 방법에서, 천연 PB2의 서열은 PB2 단백질내에서 1종 이상의 전하를 띤 군집 변형을 코딩하는 cDNA로부터 시험관에서 합성된 합성 유전자로 대체된다. 헬퍼 바이러스 감염된 세포를 전하를 띠는 군집 변형을 필수적으로 코딩하는 합성 PB2 서열로 형질감염시킨다. 합성 서열을 함유하는 살아있는 바이러스는 주 공여체 바이러스로서 작용하며, 이것이 유행성(즉, 현재 순환하는 유독물질) 인플루엔자 균주의 야생형 HA 및/또는 NA 유전자와 결합되는 경우, 인간에서 인플루엔자를 예방 치료하는데 면역원성 조성물로서 사용할 수 있는 재배열 인플루엔자 바이러스(6:2 재배열)가 제조된다. 유사한 방법으로, 변종 M 서열 및/또는 변종 NP 서열을 인플루엔자 바이러스

에 도입시킬 수 있다. 따라서 6:2 재배열 바이러스는 합성 서열 또는 서열을 함유하는 주 공여체 균주로부터 유도된 6개의 유전자 및 현재 순환하는 인플루엔자의 유독성 균주로부터 유도된 HA 및 NA 유전자로 구성될 수 있다. 6:2 인플루엔자 재배열 바이러스를 제조하는 방법은 세포를 감약화된 주 공여체 균주 및 현재 유행하는 유독성 인플루엔자 A 바이러스로 감염시키고, 자손을 유행성 균주의 HA 또는 NA 유전자 상에서 에피토프-반응성 항체와 접촉시킴으로써 재배열 바이러스를 선택함을 포함한다. 선택적으로, 복귀 유전학 기법은 세포를 유행성 균주의 HA 및 NA 유전자로 형질감염시키는데 사용할 수 있다. 그 다음, 세포를 주 공여체 균주 및 전술한 바와 같이 항체 매개 선택법에 의해 선택된 6:2 재배열체로 감염시킨다.

예를 들어, 제 1 닭 신장(primary chick kidney; PCK) 또는 MDBK 세포 단층을 1시간 동안 1 내지 10의 감염 승수(moi)로 헬퍼 바이러스로 감염시킨다. 루이체스의 전술한 문헌, 에나미 및 팔레스의 전술한 문헌 및 에나미의 전술한 문헌에서 기술한 기법(선택적으로는 하기 실시예 4와 같이 변형시킴)을 사용하여 감염시킨 세포에 본 발명의 하나 이상의 변종 PB2, 또는 M1 또는 NP 단백질을 코딩하는 RNA를 형질감염시켰다. 전사 반응물은 선형화된 플라스미드, 파빈 및 에나미의 전술한 문헌의 방법에 따라 배를 형성한 란의 요막강에서 성장된 바이러스로부터 제조한 디옥시리보뉴클레오타이드, T3 RNA 폴리머라제 및 리보핵단백질을 함유한다. 혼합물을 45분동안 37℃에서 배양시켜, RNA 전사체를 생성하면서 동시에 RNP 착체에 포장시킨다. 그 다음, DNase를 첨가하여 플라스미드를 제거하고 혼합물을 헬퍼 바이러스로 감염시키고 DEAE 덱스트란으로 처리한 PCK 또는 MDBK로 도입시킨다. 선택적으로, 혼합물을 전기천공(electroporation)에 의해 감염된 세포에 도입시킨다. 배양물을 적절한 온도(예: 34℃)에서 유지시키고, 약 16 내지 22 시간 후에 수획하였다. 세포의 파편을 펠렛화하고 바이러스를 함유하는 상청액을 적절한 포유 동물 세포, 예를 들어 MDCK 세포에서 플라크화시킨다. 플라크화된 바이러스의 자손을 후속적인 추가의 플라크 계대배양을 통해 이동시킬 수 있고, 그 다음 배를 형성한 란의 요막강내에서 증폭시킨다.

보다 구체적으로, 인플루엔자 바이러스 A/LA/2/87의 숙주-범위 돌연변이체를 기술한다. 헬퍼 바이러스는 조류 바이러스, A/Mallard/New York/6750/78로부터 유도된 PB2 유전자를 함유하고 PCK 세포와 같은 조류 세포에서 생산적으로 증식할 수 있으나, MDCK와 같은 포유 동물 세포내에서는 플라크를 형성할 수 없다(클레멘트의 문헌[J. Clin. Microbiol. 30:655-62 (1992)] 참고). A/LA/2/87내에 Mallard PB2 유전자를 형질감염된 포유 동물 PB2 서열로 대체시키면 바이러스는 MDCK 세포내에서 플라크화된다(수바라오의 문헌[J. Virol. 67:7223-28 (1993)] 참고). 이러한 방법으로, 포유 동물 PB2 서열의 cDNA로 도입된 부위-지향성 돌연 변이를 지닌 합성 RNA를 형질감염시켜 PB2 유전자 뉴클레오타이드 서열내의 특이한 개조를 도입할 수 있고 시험관내 전사에 사용될 수 있다. 이렇게 제조된 재조합 변종 인플루엔자 바이러스는 감온성을 나타내고, 따라서 인간에게 예방적으로 투여하기 위한, 살아있고 감약화된 면역원성 조성물의 형성에 있어서 주 공여체 균주로 사용될 수 있다.

본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스를 증식시키는데 있어서 표준 방법으로 사용할 수도 있다. 바이러스 스탁은 제 1 또는 결정된 세포 배양, 예를 들어 제 1 소 또는 닭의 신장 세포 또는 MDCK 세포내에서 플라크-정제할 수 있다. 플라크-정제된 바이러스는 추가로 이러한 세포주에서 증식될 수 있다. 세포를 전형적으로 플라스틱 조직 배양 플레이트에서 배양시키고, 바이러스를 전형적으로 0.001 내지 0.1의 moi로 접종시키고 2 내지 3일 동안 배양시킨다. 바이러스 스탁은 또 다르게는 10 내지 12일 배를 형성한 란의 요막강내에 접종시키고, 2 내지 3일동안 33 내지 37℃에서 배양시킬 수 있다.

본 발명의 재조합 인플루엔자의 감약화에 대한 시험은 확립된 시험관내 및 생체내 분석법을 사용하여 수행할 수 있다. 시험관내 분석에서, 하기의 실시예 6에서 기술한 바와 같이 감온성 표현형의 존재에 대해 실험한다. 생체내에서의 재조합 인플루엔자 바이러스의 생체내 반응 유전성은 하기의 실시예 7에서 기술한 바와 같이 결정할 수 있다.

이런 재조합 변형된 변종 인플루엔자 바이러스는 또한 다른 바이러스의 감온성 장애를 맵핑하기위한 유전자 상보 분석, 바이러스 생활 주기에서 PB2의 역할의 기능 분석 및 바이러스 RNA 또는 PB1 또는 PA와 같은 다른 바이러스 단백질과의 상호작용에 관계되는 PB2 단백질의 도메인(domain)을 알아내는데 사용될 수 있다.

본 발명의 변형된 PB2 단백질은 당분야에 공지된 바와 같이 단백질 기능을 시험하기위해 적절한 발현 제어 시스템을 사용하여 상이한 유형의 세포에서 재조합되어 발현될 수 있다. 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 적합한 벡터의 구축은 또한 이런 서열이 사용될 수 있는 하이브리드(hybrid) 형성 분석과 같이 당분야에 공지되어있다. 예를 들면 이타쿠라(Itakura)에게 허여된 미국 특허 제 4,356,270 호, 리그스(Riggs)에게 허여된 특허 제 4,431,739 호 및 루터(Rutter)에게 허여된 제 4,440,859 호를 참고할 수 있다. 다른 숙주 세포, 프로모터, 선택적 마커 및 기술의 예는 마더(Mather)에게 허여된 미국 특허 제 5,122,469 호, 악셀(Axel)에게 허여된 제 4,399,216 호 및 제 4,634,665 호, 레빈슨(Levinson)에게 허여된 제 4,713,339 호, 링골드(Ringold)에게 허여된 제 4,656,134 호, 켈렘스(Kellems)에게 허여된 제 4,822,736 호 및 피어스(Fiers)에게 허여된 제 4,874,702 호에 개시되어있다.

본 발명의 핵산 서열을 포함하는 적합한 벡터의 구축은 당분야에 공지된 종래의 라이게이션(ligation) 및 제한 효소 기법을 이용하여 수행될 수 있다. 부위 특이적 분해는 표준 조건하에서 적합한 제한 효소(들)로 처리하여 수행될 수 있고, 이의 세부사항은 전형적으로 제한 효소 제조자에 의해 명시된다. 표준 기법을 이용하여 분해된 단편을 크기대로 분리하기위해 폴리아크릴아미드 겔 또는 아가로즈 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 합성 올리고뉴클레오타이드는 예를 들면 당분야에 공지된 디에틸포스포아미다이트 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 표준 조건 및 온도하에서 T4 DNA 라이게이즈를 이용하여 라이게이션을 수행하고, 정확한 라이게이션은 라이게이션 혼합물로 이. 콜라이를 형질전환시켜 확인한다. 성공적인 형질전환체는 앰피실린, 테트라사이클린 또는 다른 항생제 저항물질 또는 당분야에 공지된 바와 같은 다른 마커를 이용하여 선택된다.

이런 재조합 기술은 문헌에 완전히 설명되어있다(문헌[삼부룩(Sambrook)의 Molecular cloning: a laboratory manual, 2판,(1989); DNA cloning, Vol. I 및 II, D.N. Glover 편집, 1985; Oligonucleotide synthesis, M.J. Gait 편집, 1984; Nucleic acid hybridization, B.D. Hames 편집, 1984; Transcription and translation, B.D. Hames 편집, 1984; Animal cell culture, R.I. Freshney 편집, 1986; 퍼발(B.

Perbal)의 A practical guide to molecular cloning(1984); Gene transfer vectors for mammalian cells, J. H. Miller 편집, 1987, Cold spring harbor laboratory; 스콥스(Scopes)의 Protein purification: principles and practice, 2판, Springer-Verlag, New York, 1986 및 Handbook of experimental immunology, Vols I-IV, D.M. Weired 편집, 1986] 참고). 본원에서 언급된 이런 모든 문헌은 개시하는 대상에 대한 설명으로 본원에서 인용되어 있다.

본 발명의 살아있는 재조합 인플루엔자 바이러스 변종을 인플루엔자 바이러스에 의한 감염 또는 이런 감염이 일으킨 질병 상태를 예방하기위한 면역원성 조성물에서 사용할 수 있다. 이런 면역원성 조성물을 제조하기위해, 배양된 세포를 살아있는 재조합 인플루엔자 변종(즉, 주 공여체) 및 유행성 야생형 균주로 동시에 감염시킨다. 재배열된 바이러스를 회수하고 감온 유발성 돌연변이의 존재를 시험한다. 야생형 HA 및/또는 NA 단백질을 함유하는 재배열체를 공여체 바이러스의 HA 및/또는 NA 단백질에 의해 코딩되는 표면 에피토프에 대한 항혈청에 노출시켜 선택할 수 있다. 본 발명의 돌연변이된 서열 및 야생형 유행성 인플루엔자 균주의 HA 및/또는 NA 서열을 함유하는, 결과로 생성된 바이러스의 자손들을 면역원성 조성물의 제조에 사용한다. 이런 면역원성 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 용액과 혼합된 면역원성 유도 유효량의 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스 변종을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예는 염수 용액이다. 조성물은 전신 투여, 바람직하게는 허용가능한 피하 또는 근육내 용액의 형태로 피하 또는 근육내 투여될 수 있다. 보다 바람직하게는, 조성물은 점적, 큰 입자 에어로졸(10미크론 이상) 또는 상부 호흡관에의 분무에 의해 비강 투여될 수 있다. 적절한 pH, 등장성, 안정성 등을 갖는 이런 용액의 제조는 당분야에 공지되어있다. 투여 섭생은 예를 들면, 연령, 신체 조건, 체중, 성별, 식사, 투여 시간 및 다른 의학적 인자와 같은 약물의 활성을 변화시키는 것으로 공지된 다양한 인자를 고려하여 참석한 의사에 의해 결정될 것이다. 투여 범의의 예는 약 1 내지 약 1000HID_{50}(인간 감염성 투여량)의 바이러스이다.

본 발명의 예방적 치료 방법을 실시하기 위해서, 면역원성 유도 유효량의 본 발명의 면역원성 조성물을 예방 치료가 필요한 인간 환자에게 투여한다. 본 발명의 면역원성 유도 유효량의 조성물은 투여되는 투여량당 약 1 내지 1000HID_{50}, 즉, 약 10^5 내지 10^8pfu(플라크 형성 단위)의 범위로 예상된다. 투여량의 투여 회수는 상기 언급된 인자에 따라 다양할 수 있다. 이동 경로는 바람직하게는 환자의 상부 호흡관으로의 비강 투여일 것이다.

본 발명은 본 발명의 범위를 한정하지않고 본 발명을 예시하는 하기 실시예에서 더욱 개시될 것이다.

실시예

실시예 1: A/LA/2/87 유전자의 cDNA 클로닝

매딘-다비 개의 신장(MDCK) 및 매딘-다비 소의 신장(MDBK) 세포를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)에서 수득하고 10% 소의 태아 혈청(JRH), 2mM L-글루타민(JRH), 100유니트/㎖ 페니실린 및 0.1㎎/㎖ 스트렙토마이신(시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로 보충된 이글스 개질된 필수 배지(EMEM; JRH 바이오사이언시즈(Biosciences), 미국 켄사스주 레넥사 소재)에서 37℃, 5% CO_2 에서 배양하였다. 인플루엔자 바이러스 A/LA/2/87(H3N2)을 포타쉬(L. Potash) 박사(딘코포레이션(DynCorp)/PRI, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)로부터 수득하고 37℃에서 MDCK 세포에서 한 번 계대배양한 후, 바렛(Barrett)의 문헌[Growth, Purification and Titration of Influenza Viruses, p.119-150, B.W.J. Mahy 편집, IRL Press, Oxford, England(1985)]에 개시된 바와 같이 10 내지 12일된 표준적인 질을 갖는 특정 병원균이 없는(SPF) 배형성된 란(SPAFAS, 미국 코넥티컷주 노르위크 소재)의 요막강에서 증폭시켰다.

A/LA/2/87 바이러스로 감염된 란의 요막액을 수득하여 SW28 로터에서 15,000 rpm으로 90분간 4℃에서 원심분리하여 농축한후, 4℃에서 75분동안 SW28 로터에서 27,000 rpm으로 4회 12% 단계에서 슈크로즈 단계별 농도구배(인산염 완충된 염수중의 12 내지 60% 슈크로즈)로 원심분리하여 정제하였다. 띠를 형성한 비리온을 1% NP-40으로 분쇄하였다. 그 다음, 먼저 1% 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 50mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메틸 하이드로클로라이드(Tris), pH 7.5, 100mM NaCl 및 1mM 에틸렌-디아민-테트라아세테이트(EDTA)의 존재하의 0.5㎎/㎖의 프로테이네이즈 K(PK; 앰레스코(Amresco), 미국 오하이오주 솔론 소재)로 37℃에서 1시간동안 처리한후 동일한 부피의 페놀/클로로포름으로 3회 연속 처리하고 2.5배 부피의 에탄올로 침전시켜 바이러스 RNA(vRNA)를 추출하였다.

-20℃에서 1시간동안 냉각시킨후, RNA를 함유하는 침전물을 14000rpm에서 20분동안 에펜도프(Eppendorf) 원심분리기에서 원심분리하여 펠렛화시키고 80% 에탄올로 세척하고 건조시키고 디에틸 피로카보네이트(DEPC) 처리된 물로 최종 농도 0.5㎎/㎖가 되도록 현탁시켰다. 약 1㎍의 vRNA를 A/Memphis/8/88 PB2 유전자의 서열(고만(Gorman)의 문헌[J. Virol. 64:4893-4902(1990)]을 참고할 수 있다)을 기준으로 PB2 유전자의 3' 말단 뉴클레오타이드 24개에 상보적인 뉴클레오타이드이고, 또한 BamHI 및 BsmI 제한 효소 부위를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 PB 2003으로 하이브리드 형성하였다.

슈퍼스크립트(Superscript) II 역전사효소(깁코(Gibco)/BRL, 미국 메릴랜드주 베세스다 소재)를 이용하여 제작자에 의해 제공된 반응용 완충 용액, 0.5mM의 각각의 데옥시-뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTPs; 프로메가(Promega), 미국 위스콘신주의 매디슨 소재) 및 2 유니트/㎕ RNAsin(프로메가)에서 42℃에서 2시간동안 제 1 스트랜드 cDNA를 합성하였다. cDNA를 페놀/클로로포름 추출을 이용하여 정제하고, S-300 HR 마이크로컬럼(파마시아(Pharmacia), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)에서 크로마토그래피하였다. 그 다음, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 위치 1229에서 독특한 NcoI 부위를 포함하는 두 분절에서 cDNA를 증폭시켰다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PB2003 및 PB2005(vRNA 센스(sense), 위치 1257-1276; PB2005의 서열에 대해서는 표 1을 참고할 수 있다)를 이용하여 C-말단 클론을 제조하였다. 프라이머 PB2002(vRNA 센스, XbaI 제한 효소 부위, T3 프로모터 서열 및 PB2 vRNA의 5' 말단으로부터의 28개 뉴클레오타이드를 포함한다) 및 PB2004(mRNA 센스, 위치 1126-1146)를 이용하여 N-말단 클론을 제조하였다. PB2002 및 PB2005의 서열은 표 1에 도시된다.

퍼킨 엘머(Perkin Elmer)(미국 코넥티컷주 노르위크 소재) 열 순환기를 이용하여 2mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTP, 0.2μM의 각각의 프라이머 및 2.5 유니트의 택(Taq) 폴리머라제를 포함하는 1xPCR 완충용액 II(퍼킨 엘머)에서 94℃에서 1분동안 변성시키고 40℃에서 2분동안 애닐링(annealing)시키고, 72℃에서 3분동안 연장시킨후 72℃에서 30분동안 항온처리시키는 것을 50회 반복하여 PCR을 수행하였다. PCR로 생성된 단편을 페놀/클로로포름 추출하고, 에탄올 침전시키고 1% 저융점 아가로즈 겔(FMC, 미국 메인주 록빌 소재)에서 1xTAE 완충용액(40mM 트리스-아세테이트, 1mM EDTA, pH8.0)에서 100볼트·시간동안 전기영동하였다. 예상되는 크기(N-말단 단편에 대해 1.29kb, 및 C-말단 단편에 대해 1.24kb)를 갖는 DNA 단편을 겔에서 절단하고, 겔 조각을 용융시키고, 개시된 바와 같은 QN^+ 방법(랑그릿지(Langridge)의 문헌[Anal. Biochem. 103:264-71(1980)])을 이용하여 DNA를 추출하였다. 각각의 정제된 DNA의 분취액을 T4 DNA 라이게이즈(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 미국 매사츄세츠주 버버리 소재)를 이용하여 pCRII TA-클로닝 벡터(인비트로겐(InVitrogen), 미국 캘리포니아주 산디에고 소재)에 라이게이션시키는데 이용하였다. 라이게이션 혼합물의 분취액을 컴피턴트(competent) 이. 콜라이 DH5α 세포(깁코/BRL, 미국 메릴랜드주 메세스다 소재)를 형질변환시키는데 이용하였다. 각각의 콜로니를 표준 기법을 이용하여 삽입체의 존재에 대해 스크리닝하였다.

서열이 A/Memphis/8/88 PB2 유전자에 근거하는 프라이머를 이용하여 시퀘네이즈(Sequenase)(USB, 미국 오하이오주 클리블랜드 소재)를 이용한 이중-스트랜드 플라스미드 DNA의 디데옥시 쇄 종결 서열화에 의해 PB2 유전자 삽입물의 서열을 알아냈다. 각각의 단편에 대한 2개의 독립적인 클론의 서열을 확인하고 N-말단 클론중 하나에서 1개의 뉴클레오타이드가 결실된 것을 제외하고는 동일함을 발견하였고, PB2 유전자를 코딩하는 오픈 리딩 프레임에서 프레임쉬프트(frameshift) 돌연변이를 일으킬 것으로 예상되므로, 이 결실이 있는 뉴클레오타이드는 폐기하였다. 예상된 바와 같이 서열은 A/Memphis/8/88 PB2 유전자의 서열과 매우 유사하였고, 단 11개의 뉴클레오타이드 및 3개의 아미노산만이 달랐다. A/Memphis/8/88 PB2 서열은 고만의 문헌[J. Virol. 64: 4893-4902(1990)]에서 개시된다. A/Memphis/8/88(진뱅크에서 보고된 바와 같은)과 A/LA/2/87 PB2 유전자의 서열 차이는 뉴클레오타이드 위치(cRNA(+) 센스 스트랜드의 제 1 뉴클레오타이드부터 계산) 80(Memphis/8/88에서는 G이고 A/LA/2/87에서는 A이다), 81(Memphis/8/88에서는 A이고 A/LA/2/87에서는 G이다), 306(Memphis/8/88에서는 T이고 A/LA/2/87에서는 C이다), 338(Memphis/8/88에서는 A이고 A/LA/2/87에서는 C이다), 504(Memphis/8/88에서는 C이고 A/LA/2/87에서는 A이다), 505(Memphis/8/88에서는 A이고 A/LA/2/87에서는 C이다), 543(Memphis/8/88에서는 T이고 A/LA/2/87에서는 G이다), 886(Memphis/8/88에서는 C이고 A/LA/2/87에서는 A이다), 887(Memphis/8/88에서는 A이고 A/LA/2/87에서는 C이다), 990(Memphis/8/88에서는 G이고 A/LA/2/87에서는 A이다), 1164(Memphis/8/88에서는 A이고 A/LA/2/87에서는 G이다), 1179(Memphis/8/88에서는 T이고 A/LA/2/87에서는 C이다) 및 1929(Memphis/8/88에서는 T이고 A/LA/2/87에서는 C이다)에서 발견되었다. Memphis/8/88 cDNA의 작은 부분을 다시 서열화하여 진뱅크 서열에서의 위치 80과 81에서의 2개의 실수를 발견하였다. 즉, 이 위치에서의 서열은 A/LA/2/87의 서열과 동일하다. 3개의 뉴클레오타이드 차이는 A/LA/2/87에서 아미노산 위치 104, 160 및 287에서 아미노산의 차이를 생성한다.

그 다음, BamHI 및 NcoI으로 C-말단 클론을 분해하고, XbaI 및 NcoI으로 N-말단 클론을 분해시켜 전체 길이의 PB2 cDNA를 재구축하였다. 분해로 유리된 DNA 단편을 QN^+ 방법을 이용하여 겔 정제하고 BamHI/XbaI-분해된 pUC19 표준 클로닝 벡터에 라이게이션시켰다.

[표 1]

실시예 1, 2 및 5에서 사용되는 올리고뉴클레오타이드 서열(서열은 5'에서 3'방향이다)

PB2002	GCGCGCTCTAGAATTAACCCTCACTAAAAGTAGAAACAAGGTCGTT TTTAAACTAT [서열 인식 번호: 1]
PB2003	GCGCGCGGATCCGAATGCGAGCAAAAGCAGGTCAATTA TATTC [서열 인식 번호: 2]
PB2004	GGGAAAAGGGCAACAGCTATA [서열 인식 번호: 3]
PB2005	CACCTCTAACTGCTTTTATC [서열 인식 번호: 4]
PB2006	GAAAAAGCACTTTTGCATC [서열 인식 번호: 5]
n2pb2.4	AAGAGCCACAGTATCAGCAG [서열 인식 번호: 6]
ALA1	GTATCTCGCGAGTGCGAGACTGCGACATCAGGTTCCGTAGTTCAG CTATAGCTTCCATACTG [서열 인식 번호: 7]
ALA2	GGTTCCATGTTTTAAAGCTTCAACAGCGTCAAAATA AGTCTTGTAG [서열 인식 번호: 8]
ALA3	CCAGGGTTTATGTCTACAGCTGCGGCTATTTTG ACTTGATTTC [서열 인식 번호: 9]
ALA4	GCAATCTCGGAGTTCTTCAGCTGCCTCTTTGGTTA TTGTTAATTG [서열 인식 번호: 10]
ALA5	CAAGCGGGTCCTCAATCGCAGCTGAGGAAGAAGT GCTTACAGGC [서열 인식 번호: 11]
ALA6	CCGGATGTGCTTGCAGCTGGGGCTTCAATTAAAGTGCC [서열 인식 번호: 12]
ALA7	GCTTAATGCTGGTCCGTACGCTGCGTCTTCCTTACCTAG [서열 인식 번호: 13]
ALA8	GCTAGAGTCCCGTTTTCTGGCCATTACCAACACCACG [서열 인식 번호: 14]

실시예 2: PB2 cDNA의 돌연변이

본 발명자들은 전하를 띤 군집을 5개의 연속적인 아미노산의 서열중의 4 또는 5개의 양 또는 음전하를 갖는 아미노산으로 정의하였고, 인플루엔자 A/LA/2/87 단백질의 아미노산 서열중에서 8개의 전하를 띤 군집을 확인하였다. 실시예 1에서 클로닝한 cDNA를 이용하여 하기와 같은 특이적, 부위-지향성 변형을 함유한 8개의 PB2 변종 cDNA를 구축하였다.

군집의 위치 및 아미노산 변형 및 실시예 1에서 클로닝된 PB2 cDNA에 도입된 제한 효소 부위를 요약하여 표 2에서 나타낸다. 하나를 제외한 모든 경우에, 군집에서 오직 양전하를 갖는 아미노산(R 또는 K)을 중성 아미노산 잔기, 알라닌을 코딩하는 뉴클레오타이드로 치환하여 변형시켰다. 이는 중성-전하를 갖는 알라닌에 대한 임의의 코돈(GCA, GCC, GCG 또는 GCU)은 단일 뉴클레오타이드 변화에 의해서 음전하를 갖는 아스파테이트(GAC 또는 GAU) 또는 글루타메이트(GAA 또는 GAG)로 다시 돌연변이될 수 있기 때문에 자발적인 복귀 돌연변이의 가능성을 최소화시키기 위해서이다. 군집이 음전하를 갖는 아미노산만으로 구성된 ALA6의 경우, 2개의 D 잔기 및 두번째 E 잔기를 알라닌을 코딩하는 뉴클레오타이드로 치환시켜 변형시켰다. 도입된 ALA8 돌연변이는 제안된 핵 위치부여 신호의 일부와 일치하고, 인플루엔자 A의 A/WSN/33 균주의 PB2 단백질을 동일한 위치에서 글루타민으로 돌연변이시키면 PB2 단백질이 재조합 단백질을 발현하는 BHK 세포의 핵과 세포질에 동일하게 분포하도록 생산되는 것으로 나타났다. 무카이가와(Mukaigawa) 및 나약(Nayak)의 문헌[J. Virol. 65:245-253(1991)]을 참고할 수 있다. 모든 경우에, 다양한 대립인자를 추적하기위한 목적으로 제한 효소(RE) 변화를 도입하기위해 다른 번역 사일런트(silent) 돌연변이를

제조하였다.

PCR에 의해 증폭된 단편을 이용한 카세트(cassette) 돌연변이에 의해 ALA1 및 ALA5 변형을 포함하는 PB2 cDNA를 제조하였다. 근처의 독특한 제한 효소 부위, 및 원하는 치환부의 서열을 포함하는 프라이머(ALA1 또는 ALA5, 이들의 서열은 표 1을 참고할 수 있다)를 다른 독특한 제한 효소 부위와 먼 반대의 센스의 프라이머와 함께 사용하였다. ALA2, ALA3, ALA4, ALA6, ALA7 및 ALA8을 함유하는 PB2 cDNA를 카멜레온 부위 지향성 돌연변이 키트(스트라타진(Stratagene), 미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)를 이용하여 생성시켰다.

[표 2]

돌연변이	야생형 아미노산 서열[1]	돌연변이의 아미노산 서열[2]	도입된 제한효소 부위
ALA1	E_2RIKE	EAIAE	SfcI
ALA2	D_{120}KVER	DAVEA	HindIII
ALA3	K_{140}IRRR	KIAAA	PvuII
ALA4	K_{187}EKKEE	KEAAEE	PvuII
ALA5	K_{339}REEE	AAEEE	PvuII
ALA6	E_{677}DPDE	EAPAA	PvuII
ALA7	K_{699}EDRR	KEDAA	BsiWI
ALA8	K_{736}RKRD	ARKRD	MscI

1 전하를 띤 군집의 위치는 도시된 제 1 아미노산의 숫자에 의해 명시된다(아래첨자)

2 알라닌으로 돌연변이된 아미노산은 진하게 표시된다.

실시예 3: 바이러스 RNP의 제조

바이러스 리보뉴클레오프로테인(RNP)을 약간 변형시킨 파라빈(Paravin)의 문헌[J. Virol. 63:5142-5152(1989)]에 개시된 방법을 이용하여 하기에 개시된 바와 같이 SPF 란에서 성장시킨 A/PR/8/34 바이러스로부터 정제하였다.

600 내지 700개의 SPF 란에 약 10^4 pfu의 인플루엔자 A/PR/8/34 바이러스를 주입하고 35℃에서 이틀동안 배양하였다. 4℃에서 하룻밤 냉각시킨후에, 요막액을 회수하고 아미콘 홀로우 화이버 카트리지(Amicon Hollow Fiber Catridge)(타입 H1P100-20) 및 아미콘 LP-1 펌프를 이용하여 10배 농축하였다. 바이러스를 4℃, SW28 로터에서 25,000rpm으로 90분간 원심분리하여 펠렛을 형성시킨후 100mM NaCl, 10mM 트리스-HCl, pH 7.5, 10mM EDTA(NTE 완충용액)으로 현탁시키고 30% 슈크로즈 쿠션(SW28로터, 25,000rpm에서 2.5시간 후 SW 50.1로터, 36,000rpm에서 90분)을 통해 2회 재펠렛화시켰다.

바이러스 펠렛을 0.1M 트리스, pH 8.1, 0.1M KCl, 5mM $MgCl_2$, 5% 글리세롤, 1.5% 트리톤-N-101, 10㎎/㎖ 리소레시틴(직전에 첨가한다) 및 1.5mM 디티오트레이톨(DTT)에 최종 단백질 농도 3㎎/㎖으로 재현탁시키고, 37℃에서 30분간 항온처리한다. 파괴된 바이러스를 아미콘 센트리프렙(Centriprep)-10 농축기를 이용하여 베크만(Beckman) J-6B 원심분리기로 3000rpm에서 1 내지 3시간동안 농축한다. 바이러스 코어를 SW50.1 로터, 45,000rpm, 4℃에서 4시간동안 3층 글리세롤 단계별 농도구배(33%, 50% 및 70% 글리세롤)로 원심분리하여 정제하였다. 0.3㎖ 분획을 농도구배로부터 회수하고 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)으로 분석하였다.

NP 단백질이 풍부한 분획을 수집하고 4℃, SW50.1 로터, 45,000rpm에서 24시간동안 CsCl/글리세롤 단계별 농도구배(3층: 1.5M CsCl/30% 글리세롤, 2.0M CsCl/35% 글리세롤 및 2.5M CsCl, 40% 글리세롤)로 원심분리하였다. 다시, NP 단백질이 풍부한 분획을 수집하고, 50,000달톤의 분자량 하한을 갖는 투석용 튜브를 이용하여 50% 글리세롤, 50mM 트리스 pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM $MgCl_2$ 및 1mM DTT의 조성을 갖는 최종 완충용액에 투석하였다. 다양한 RNP 제제의 단백질 농도는 1 내지 2㎎/㎖이다. RNP를 -80℃에 저장하였다. 에나미의 방법(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3802-3805(1990)) 및 0.1㎍/㎕ RNP를 이용하고 수득된 바이러스를 트립신 없이 MDBK 세포상에서 플라크로 수집한 점을 제외한 하기 개시된 방법에 따라 WSN-HK 헬퍼 바이러스를 이용한 NA 복귀에 의해 RNP의 활성을 결정하였다. 형질감염 수율은 통상적으로 5 내지 10 × 10^4pfu이었다.

실시예 4: PB2 변종 cDNA의 형질감염 및 재조합 PB2 바이러스의 복귀

야생형 인플루엔자 A/LA PB2 cDNA 및 실시예 2에서 구축된 8개의 인플루엔자 A/LA PB2 cDNA 변종을 팔레스 및 공동 작업자에 의해 원래 개시된 역 유전 방법의 개정판(예를 들면 에나미 및 팔레스의 문헌[J. Virol. 65:2711-13(1991)]을 참고할 수 있다)을 이용하고 머피 및 클레멘츠의 동료의 문헌[J. Clin. Microbiol., 30: 655-662(1992)] 및 수바라오의 문헌[J. Virol. 67:7223-8(1993)]에서 개시된 바와 같은 숙주-범위 돌연변이 PB2 헬퍼 바이러스를 이용하여 인플루엔자 바이러스에 복귀시켰다. PB2 숙주-범위 헬퍼 바이러스는 A/Mallard/NY/6750/78의 PB2 유전자를 포함하는 단일 유전자 재조합 바이러스이고, 나머지 7개는 A/LA/2/87의 유전자를 포함한다. 이를 포타쉬 박사(딘코프레이션/PRI, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)로부터 수득하였고 SPF 란에서 성장시켰다.

이 PB2 헬퍼 바이러스는 이 바이러스가 제 1 닭의 간(PCK) 세포에서는 생산적으로 성장할 수 있지만 포유동물 세포에서는 플라크를 형성하지않는 숙주-범위 돌연변이이기 때문에 PCK 세포의 형질감염에 의한 복

귀에서 이전부터 사용되어왔다(수바라오의 문헌[J. Virol. 67:7223-8(1983)]을 참고할 수 있다). 클레멘츠의 문헌[J. Clin. Microbiol. 30: 655-662(1992)]을 참고할 수 있다.

놀랍게도, 포유동물 세포주, MDBK가 바이러스에 의해 감염될 수 있고 발현하기위해서 인플루엔자 폴리머라제의 성능에 의존하는 감염된 리포터(reporter) 유전자(클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼레이즈, CAT)의 발현을 억제할 수 있음(IVACAT)을 발견하였다. 루이체스의 문헌[Cell 59: 1107-1113(1989)]을 참고할 수 있다. 따라서, PB2 복귀 시험을 위해서 PCK 세포대신에 MDBK 세포를 사용하였다.

또한, MDBK 세포의 전기천공을 이용한 개선된 형질감염 방법을 사용하여 이전에 개시된 DEAE-덱스트란 형질감염 방법(리의 문헌[Virus Res., 출판중 및 1994년 9월 30일자로 출원된 미국 특허원 제 08/316,049호를 참고할 수 있다)과 비교시 헬퍼 바이러스의 복제가 10배 감소된 동일한 수 또는 더 많은 수의 형질감염된 바이러스를 수득하였다. 전기천공 기술은 또한 바탕값의 다른 공급원, 즉 RNP 제조시 소량으로 존재하는 A/PR/8/34의 PB2를 코딩하는 RNA의 복귀를 제거하는 것으로 보인다.

MDBK 세포는 미국 미들랜드주 록빌 소재의 ATCC로부터 수득하였다. MDBK 세포(감염당 1개의 60㎜의 디쉬)의 하부 합류 단층을 인산염 완충된 염수(PBS; JRH 바이오사이언시스(BioSciences), 미국 켄사스주 레넥사 소재)로 희석된 헬퍼 바이러스로 감염시켜 실온에서 1시간동안 5의 moi를 수득하였다. 0.4㎖의 예열(37℃)된 0.5% 트립신(JRH)을 실온에서 2분간 가하여 감염된 세포를 디쉬에서 제거하였다. Mg^{2+} 및 Ca^{2+}(JRH)를 함유한 PBS중의 2㎎ 대두 트립신 억제제(시그마)를 가하여 트립신을 불활성화시켰다. 감염된 세포를 베크만 테이블용 의학용 원심분리기에서 2000rpm으로 5분간 실온에서 원심분리하여 펠렛화시키고, 0.3㎖의 PBS에서 재현탁시켰다. 세포를 전기천공 큐벳(0.4㎝ 간격, 바이오-래드(Bio-Rad), 미국 캘리포니아주 헤르큘레스 소재)으로 옮겼다. 0.5 mM의 각각의 뉴클레오타이드 트리포스페이트(프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨 소재), 1유니트/㎕ RNAsin(프로메가) 및 0.2 내지 0.4㎍/㎕의 정제된 RNP 단백질의 존재하에서 T3 폴리머라제(2유니트/㎕, 스트라타진, 미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)를 이용하여 BsmI-선형화시킨 PB2 cDNA(전사당 2㎍)를 시험관내 전사하여 vRNA-센스 RNP를 준비하였다. 전사물을 37℃에서 45분간 항온처리한후 RQ1 DNase(프로메가)로 37℃에서 5분간 처리하였다. RNP 혼합물을 큐벳내에서 감염된 세포에 첨가하고 곧 바이오-래드(미국 캘리포니아주 헤르큘레스 소재) 진 펄서(Gene Pulser)를 이용하여 250mV, 500㎌에서 1 펄스로 전기천공하였다. 그 다음, 전기천공된 세포를 1% 소의 혈청 알부민(BSA: 깁코/BRL, 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재) 및 1.25㎍/㎖의 L-(토실아미도-2-페닐) 에틸 클로로메틸 케톤(TPCK)-처리된 트립신(워팅톤 바이오케미칼 코포레이션(Worthington Biochemical Corp.), 미국 뉴저지주 프리홀드 소재)을 함유한 2㎖의 MEM(JRH)에 다시 플레이팅하고 34℃에서 하룻밤동안 배양하였다.

상층액을 회수하고 희석시키지않고 10㎝ 디쉬(감염당 2개)의 MDCK 세포의 감염된 합류 단층에 사용하고, 이를 2.5㎍/㎖의 TPCK-트립신을 함유한 L-15 배지(JRH)중의 0.8% 아가로즈에 깔고 34℃에서 사흘동안 배양하였다. 플라크를 0.5㎖의 MEM/1% BSA에 찍고 피펫으로 분산시키고 0.1㎖의 플라크 분산액을 24웰 디쉬중의 MDCK 세포를 감염시키는데 이용하였다. 감염된 MDCK 세포를 34℃에서 2 내지 3일동안 배양하고 하기 실시예 5에 개시된 바와 같이 재조합 바이러스에 대해 스크리닝하였다.

실시예 5: 재조합 바이러스에 대한 RT/PCR 스크리닝

세포변성 효과(CPE)(즉 세포가 길어지고 둥글게된 후, 세포가 탈착되어 죽게된다)를 나타내는 웰의 상층액을 회수하고 RQ1 DNase로 37℃에서 10분간 처리하여 주입된 흔적량의 cDNA가 이월되는 것을 방지하였다. 상기 실시예 1에서 개시된 바와 같이 배지를 PK 처리하고 페놀/클로로포름 추출하고 에탄올 침전시켜 vRNA를 준비하였다. RNA의 1/3을 프라이머 n2pb24 및 PB2006을 이용하는 RT/PCR 스크리닝에 이용하였다(이들 프라이머의 서열은 표 1에 개시되어있다). 이들 프라이머는 이 실험에 이용되는 3가지 균주(A/LA/2/87, A/PR/8/34 또는 A/Mallard/NY/6750/78)의 PB2 유전자의 짧은 영역을 증폭시킬 수 있다. 슈퍼스크립트 II 역전사효소(깁코/BRL, 미국 메릴랜드주 베세스다 소재)를 이용하여 제작자에 의해 제공된 반응용 완충 용액, 0.1mM의 각각의 데옥시-뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTPs; 프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨 소재), 1㎕의 n^{2}pb2.4 프라이머 및 2 유니트/㎖의 RNAsin(프로메가)에서 42℃에서 30분동안 제 1 스트랜드 cDNA를 합성하였다. 1xPCR 완충용액 II(퍼킨 엘머), 2mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTP, 0.2μM의 각각의 프라이머 및 2.5유니트의 택 폴리머라제로 반응 혼합물을 조절하였다. 퍼킨 엘머(미국 코넥티컷주 노르위크 소재) 열 순환기를 이용하여 PCR을 수행하였다. 94℃에서 1분동안 변성시키고 50℃에서 1분동안 애닐링시키고, 72℃에서 2분동안 연장시킨후 72℃에서 30분동안 항온처리시키는 것을 35회 반복하였다.

이들 프라이머를 이용하여 생성된 PCR 단편을 HinfI(뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사츄세츠주 버버리 소재)로 분해하여 특성을 규명하고, 이는 하기 표 3에 도시된 바와 같은 3개의 균주의 PB2 유전자에 대한 진단용인 상이한 크기의 분해 생성물을 생성시킨다.

[표 3]

PB2 RT/PCR HinfI 분해 단편의 크기(bp)

A/LA/2/87	A/PR/8/34	A/Mallard/NY/78
331	176	360
149	163	80
56	129	68
	56	28
	12	

변종 PB2 RNA 서열을 갖는 것으로 검증된 플라크로부터 PB2 변종 바이러스를 MDCK 세포에서 플라크-정제

하고 34℃에서 MDCK 세포에서 1회 계대배양(MEM + 트립신, 2 내지 3일)하고 RT/PCR로 재스크리닝하고 상기 개시된 바와 같이 HinfI 제한 효소 분석한후 SPF 란(SPAFAS)에서 35℃에서 성장시키고, 단 ALA4 돌연변이를 도입한 바이러스는 33℃에서 SPF 란(SPAFAS)에서 성장시킨다. RT/PCR은 8개의 PB2 변종 인플루엔자 바이러스중 6개(ALA1, ALA4, ALA5, ALA6, ALA7 및 ALA8)가 성공적으로 형질감염되고, 전술된 기법을 이용하여 복귀되었음을 나타낸다. ALA2 및 ALA3은 여러 시도후에도 복귀되지않았고, 따라서 MDCK 세포에서 생물학적으로 활성이 없는 PB2 단백질을 코딩하고 있는 것 같다.

실시예 6: 감온성의 결정

상기 실시예 5의 PB2 변종 바이러스의 저장액을 34℃(허용가능한 온도)의 CO_2 인큐베이터에서, 또는 로다(Lauda) 항온 함침 순환계(피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), 미국 캘리포니아주 서니밸 소재)에 의해 밀접하게 온도가 제어되는 수욕에 잠긴 날진(Nalgene) 바이오-컨테이너(날진, 미국 뉴욕주 로체스터 소재)에서 37, 38, 39 또는 40℃의 MDCK 세포에서 플라크 분석하여 적정하였다. 수욕은 0.1℃범위에서 바람직한 온도로 유지되었다. 물로 채워진 용기는 폐쇄되기전에 5% CO_2, 21% O_2, 74% N_2(바이오블렌드(BioBlend), 미국 캘리포니아주 샌 라몬 알테어 소재)로 퍼징되었다. 중단 온도는 플라크 형성 효율(EOP)이 34℃에서 관찰된 것과 비교할 때 100배이상 감소되는 것이 관찰되는 최저 온도로서 정의된다.

플라크 크기가 승온에서 재현성있게 감소되고/되거나 EOP가 39℃에서 10배 이상 감소되는 바이러스가 감온성인 것으로 정의된다. EOP 및 플라크 형태는 37 내지 40℃ 범위의 온도에서 분석되었다. 모 A/LA/2/87 바이러스 또는 야생형 형질감염체(단리된 LA 36-8.1)의 EOP는 이 범위에서 2배 미만으로 변화된다. 결과는 하기 표 4에 도시된다.

[표 4]

MDCK 세포에서 PB2 ALA 돌연변이 바이러스의 표현형

바이러스	계란에서의 적정 (log_{10} pfu/㎖)	34℃에서의 플라크 크기[1]	39.5℃에서의 플라크 크기	중단 온도
A/LA/2/87	8.4	크다	크다	40℃이상
LA 36-8.1	8.4	크다	크다	40℃이상
ALA1	7.0	작다	아주 작다	39℃
ALA4	7.5	작다	-	38℃
ALA5	7.8	크다	크다	40℃이상
ALA6	7.8	작다	아주 작다	40℃
ALA7	7.8	크다	작다	40℃
ALA8	8.0	크다	작다	40℃
1 플라크 직경(3일 배양후): 크다=2 내지 3㎜, 작다 = 1 내지 2㎜, 아주 작다 1㎜미만				

실시예 7: 설치류에서의 PB2 변종 바이러스의 반응원성

설치류가 열, 코막힘, 재채기 및 혼수상태와 같은 인간과 공유하는 인플루엔자 감염의 심각한 증후를 나타내기 때문에, 이들은 인플루엔자 백신 균주 후보자의 반응원성을 시험하기위한 동물 모델이다.

먼저 인플루엔자에 대한 항원여부를 예비 스크리닝하고, 페니실린로 7일간 처리된(매일 30,000 유니트) 10 내지 12주령된 거세된 수컷 설치류를 트리플 에프(Triple F) 농장(미국 펜실베니아주 사이레 소재)에서 수득하였다. 설치류를 디에틸 에테르로 마취시키고 약 1㎖(각각의 콧구멍에 0.5㎖씩)를 접종하여 약 $10^8 EID_{50}$ 바이러스로 비강내 감염시켰다. 감염된 설치류의 체온을 사흘동안 매일 2회씩 직장에서 결정하였다. 감염되지않은 설치류의 통상적인 체온은 39℃(102.2°F)이다. 열은 39.75℃(103.5°F)이상의 온도로 정의된다. 사흘후에 설치류를 나트륨 펜토바비탈(130㎎/설치류)로 심장 천공하여 죽이고 폐 및 비갑개골을 채취하였다. 조직 현탁액(10중량%/부피)를 2x 기초 이글 배지(BME) 아미노산, 2 x BME 비타민, 4㎜ L-글루타민 및 0.05㎎/㎖ 젠타마이신 설페이트(모든 보충물은 깁코/BRL 제품)를 함유한 행크(Hank)의 균형잡힌 염수 용액(HBSS, 깁코/BRL, 미국 메릴랜드주 베세스다 소재)에서 균질화시켜 제조하였다. 바이러스 적정은 EID_{50} 분석법을 이용하여 바레트의 문헌[Growth, Purification and Titration of Influenza Viruses, p. 119-150, B.W.J. Mahy 편집, IRL Press, Oxford, England(1985)]에 개시된 바와 같이 결정하였다.

2개의 가장 감약된 PB2 돌연변이, ALA1(단리물 49-14.1) 및 ALA4(단리물 65-31.1)를 각각 3마리의 설치류의 그룹을 감염시키는데 이용하였다. 대조군으로써 3마리의 설치류를 또한 야생형 LA PB2 유전자(단리물 LA 36-8.1을 ALA1에 대한 대조군으로 사용하였고, LA 36-9.1을 ALA4에 대한 대조군으로 사용하였다)를 포함하는 형질감염 바이러스로 감염시켰다. 결과는 하기 표 5a 및 5b에 도시된다. ALA1은 비갑개골에서 동일한 정도로 복제되었으므로 매우 감약되지는 않았고, 야생형 형질감염체와 같이 감온하여 동일한 상승이 유도되었다. 그러나, ALA4는 감염된 3마리의 설치류 모두에게 열을 유발시키지않았고 비갑개골에서 더 낮은 적정수로 복제되었다. 이들 결과는 PB2 유전자(ALA4)의 전하를 띤 군집을 알라닌으로 돌연변이시켜 생성된 감온성 바이러스가 감약된 특성을 갖는 백신 후보자를 생성시키는데 이용되는 표현형을 가짐을 나타낸다.

[표 5a]

설치류에서 ALA1의 반응원성

바이러스	투여량 ($log_{10}EID_{50}$)	비갑개골 적정±SE (g당 $log_{10}EID_{50}$)	폐 역가 (g당 $log_{10}EID_{50}$)	피크 온도±SE (℃)	열이 지속되는 기간
LA36-8.1	8.5	6.77±0.15	3.0이하	40.85±0.10	48시간
ALA1 49-14.1	8.5	6.23±0.77	3.0이하	40.78±0.17	48시간

[표 5b]

설치류에서 ALA4의 반응원성

바이러스	투여량 ($log_{10}EID_{50}$)	비갑개골 적정±SE (g당 $log_{10}EID_{50}$)	폐 역가 (g당 $log_{10}EID_{50}$)	피크 온도±SE (℃)	열이 지속되는 기간
LA36-9.1	8.0	5.83±0.09	3.0이하	40.41±0.08	48시간
ALA4 65-31.1	7.6	4.16±0.61	3.0이하	39.34±0.34	없음

(57) 청구의 범위

청구항 1

1종 이상의 전하를 띤 아미노산 군집에서 1종 이상의 전하를 띤 아미노산을 코딩하는 뉴클레오타이드를 1종 이상의 중성 아미노산을 코딩하는 뉴클레오타이드로 치환시킴으로써 인플루엔자 바이러스 단백질을 코딩하는 1종 이상의 RNA 서열을 변형시킨 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 서열이 인플루엔자의 PB2 단백질을 코딩하는 바이러스.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 서열이 인플루엔자의 M1 단백질을 코딩하는 바이러스.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 RNA 서열이 인플루엔자의 NP 단백질을 코딩하는 바이러스.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

PB2 단백질을 코딩하는 상기 RNA 서열이 ALA1, ALA2, ALA3, ALA4, ALA5, ALA6, ALA7 및 ALA8로 구성된 그룹중에서 선택된 변형을 갖는 서열을 포함하는 바이러스.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

재배열 바이러스인 바이러스.

청구항 7

ALA1, ALA2, ALA3, ALA4, ALA5, ALA6, ALA7 및 ALA8로 구성된 그룹중에서 선택된 돌연변이를 함유하는 인플루엔자 PB2 단백질을 코딩하는 변형된 RNA 서열.

청구항 8

ALA1, ALA2, ALA3, ALA4, ALA5, ALA6, ALA7 및 ALA8로 구성된 그룹중에서 선택된 돌연변이를 함유하는 인플루엔자 PB2 단백질.

청구항 9

제 7 항의 RNA 서열에 상응하는 cDNA 서열.

청구항 10

면역원성-유도 유효량의, 제 1 항 또는 제 5 항의 바이러스를 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 11

인플루엔자의 치료가 필요한 인간 환자에게 면역원성-유도 유효량의 제 10 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자의 예방적 치료 방법.