

## An Universal Approach to Getting Ahead for Influenza B Vaccines

Jin Il Kim<sup>1,2</sup> and Man-Seong Park<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, <sup>2</sup>Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do, Korea

Cross-reactive neutralizing antibodies against influenza A viruses have received attention for their potentials for prophylactic and therapeutic. These antibodies usually bind to relatively conserved stem domains of influenza hemagglutinin, one of surface glycoproteins responsible for viral binding to sialic acid-tagged cellular receptors and for membrane fusion to initiate a release process of viral genomes inside cells. Recently, a similar approach extended to influenza B viruses, which causing annual epidemics only in the human population, and some of human monoclonal antibodies exhibited promising efficacies against two antigenically diverged lineages of influenza B viruses. Moreover, one of these broadly neutralizing antibodies protected mice against both of influenza A and B challenges. Appropriate immunization may selectively enhance the efficacy of these antibodies, and this strategy may lead individuals to be prepared with broad immune responses against various influenza viruses.

**Key Words:** Hemagglutinin, Influenza B virus, Monoclonal antibody, Universal vaccine

### 서 론

A형 인플루엔자바이러스(influenza A virus, IAV)에 속하는 H1N1, H3N2 아형 바이러스와 함께, 계절성 인플루엔자바이러스 감염의 또 다른 원인은 B형 인플루엔자바이러스(influenza B virus, IBV)이다. IBV는 사람이 유일한 숙주인 것으로 알려져 있고, 약 2~4년을 주기로 IAV보다 크게 유행하여 인플루엔자로 인한 치료부담을 가중시켜 왔다 (1). 1980년대 들어 서로 다른 두 개의 항원계통(two antigenically distinct lineages)으로 진화하고 있는 IBV는 B/Victoria/2/1987 바이러스로 대표되는 Victoria 계통과 B/Yamagata/16/1988 바이러스의 Yamagata 계통으로 나눌 수 있다(Fig. 1) (2). 그 동안 접종되었던 인플루엔자 삼가백신(inactivated trivalent influenza vaccine, TIV)에는 한 가

지 계통의 IBV 항원만이 포함되었기 때문에, 두 계통의 IBV 감염에 모두 높은 효용성(efficacy)을 나타내긴 어렵다. 그리고 최근 우리나라를 포함한 아시아 지역은 두 계통의 IBV가 동시에 유행하고 있어, 두 계통의 IBV 항원을 모두 포함하는 사가백신(quadrivalent influenza vaccine, QIV) 개발의 필요성이 대두되고 있다 (3).

인플루엔자바이러스의 표면당단백질인 hemagglutinin (HA)은 바이러스 감염 개시를 이끌고, 숙주세포 내에서 면역반응을 유도하는 주요 항원으로 작용한다. HA 단백질을 구성하는 여러 domain 중에서, 세포수용체인 시알산(sialic acid, SA)과 결합하는 globular head domain은 다양한 항원소변이(antigenic drift)를 일으켜 해마다 TIV 항원 바이러스를 새로이 선정해야 하는 원인을 제공하고 있다. 이에 반해, 세포막융합(membrane fusion)에 관여하는 fusion domain은 상대적으로 변이가 낮아 IAV 및

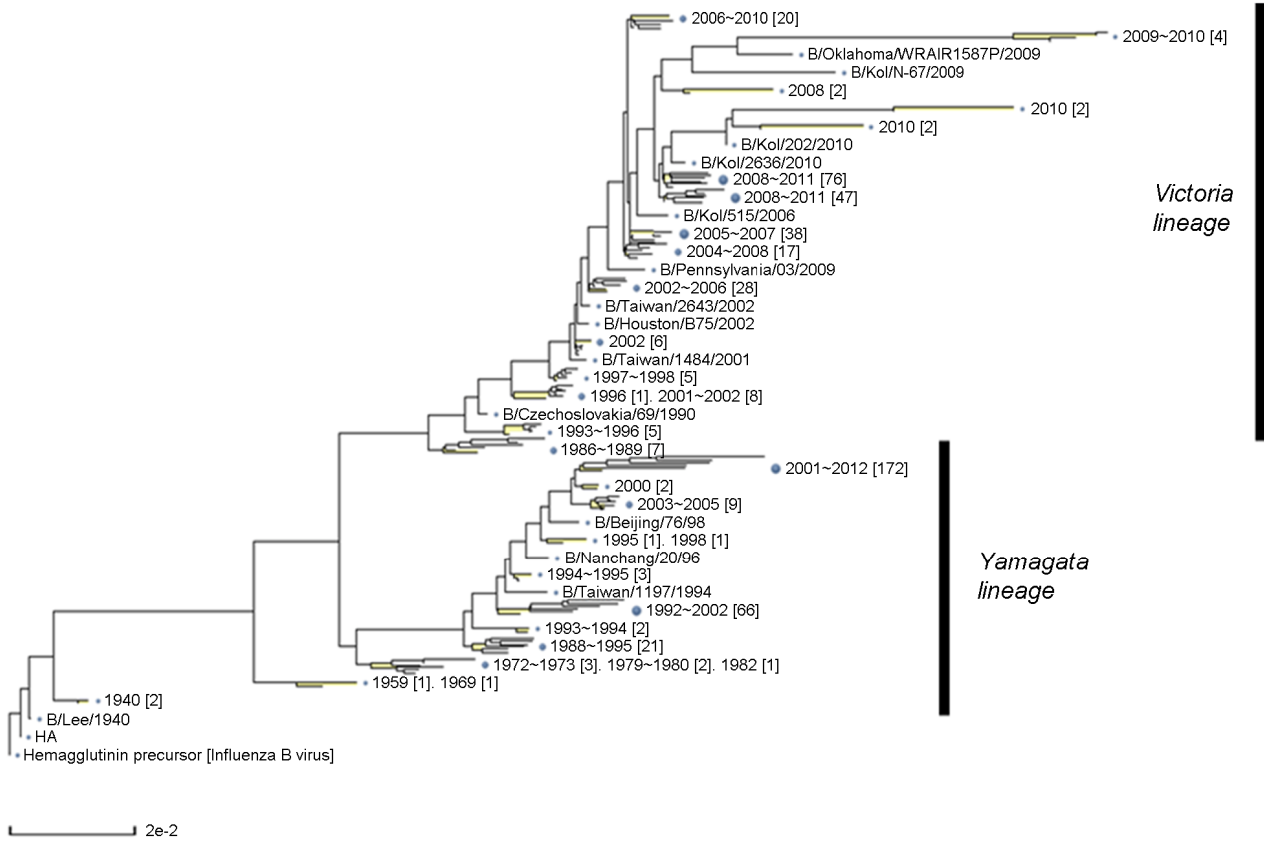
Received: November 15, 2012/ Revised: November 17, 2012/ Accepted: November 20, 2012

\*Corresponding author: Man-Seong Park, Ph.D. Department of Microbiology, Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do, 200-702, Korea.

Phone: +82-33-248-2632, Fax: +82-33-252-2843, e-mail: manseong.park@gmail.com

\*\*This study was supported by grants from the Korea healthcare technology R&D project of the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Grants No. A103001).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).



**Figure 1. Phylogenetic analysis of influenza B HAs.** 571 submitted HA sequences (collapsed from total 1,142 sequences available from National Center for Biotechnology Information) of influenza B viruses since 1940 were analyzed for their genetic distances. To compare phylogenetic lines between sequences, the neighbor-joining method was applied for a clustering algorithm. F84 distance was adopted for nucleotide distances for each coding sequence. The number in the parentheses represents the number of isolates.

IBV에 속하는 다양한 바이러스에 대한 슈퍼독감백신 (universal vaccine) 개발의 표적이 되고 있다(Fig. 2) (4). 이에 최근 HA fusion domain에 대한 단클론항체(monoclonal antibody, mAb)를 이용하여 광범위하게 인플루엔자 감염을 예방하고 치료하고자 하는 시도들이 이루어지고 있다. 이에 따라, 저자들은 다양한 IBV의 HA epitope에 결합하는 mAb의 효용성을 보고한 논문(Dreyfus *et al.*) (5)을 참조하여 인플루엔자 universal vaccine 개발에 대해 기술하고자 한다.

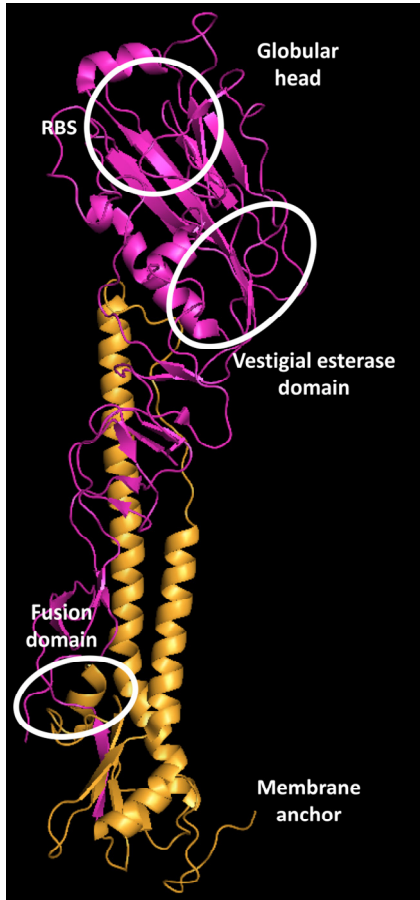
## 본 문

### 1. 백신으로서의 단클론항체

인플루엔자바이러스 감염을 예방할 수 있는 가장 효과적인 수단은 백신이다. 사람에서 유행하는 H1N1, H3N2

바이러스와 IBV 균주를 포함하는 TIV는 해마다 WHO에서 발표하는 백신 바이러스를 모균주(seed virus)로 하여 닭의 유정란에서 배양되어왔다. 백신균주와 유행균주 사이의 항원성이 일치할 경우, TIV 접종은 인플루엔자 유행률을 효과적으로 제어할 수 있지만, 항원성의 불일치 (antigenic mismatch)는 백신 접종 인구에서조차 높은 수준의 유행률을 초래한다. 또한, 1980년대 이후의 IBV에서 확인되고 있는 Victoria, Yamagata 계통으로의 분화는 TIV의 효용성에 점점 더 많은 문제점을 초래할 뿐만 아니라, 포괄적인 효용성을 갖춘 universal vaccine 개발의 필요성을 대두시켰다. 2009년 보고된 IAV의 HA 단백질 fusion domain (Fig. 2)을 표적으로 하는 mAb CR6261의 도출은 범효용성(broad-spectrum efficacy)이 있는 백신개발을 위한 새로운 paradigm을 제시하였다 (6).

HA 단백질의 membrane-proximal stem region에 결합하



**Figure 2. Crystal structure of HA monomer and domains.** 3D-crystalized structure of influenza B HA monomer was represented by PyMol software using B/Brisbane/60/2008 HA crystal structure 4FQM (PDB ID). RBS, receptor binding site; Magenta, HA1; Orange, HA2.

는 mAb CR6261은 인플루엔자바이러스의 감염에 필수적인 membrane fusion을 위한 HA 단백질의 conformational rearrangement를 막는 것으로 알려졌다 (6). 이후, 지속된 항체기반 치료제(antibody-based therapy) 개발 관련 연구를 통해 group 2 (H3, H4, H7, H10, H14, H15) IAV의 HA 단백질을 광범위하게 중화(neutralization)할 수 있는 mAb CR8020의 보고가 이어졌다 (7). Dreyfus *et al.*은 2009년 CR6261 보고 이후, 지속적으로 인플루엔자 감염 억제에 효과적인 mAb에 대한 연구 결과를 발표하였고, 결국 IBV 감염 억제에 효과적인 mAb CR8033, CR8071, 그리고 CR9114의 발견을 이끌어, 인플루엔자 universal vaccine 개발에 새로운 지평을 열었다.

2. mAb CR8033, CR8071, CR9114의 작용 기전

IBV HA에 범효용성을 갖는 mAb를 찾기 위하여 Dreyfus *et al.*은 먼저 TIV 접종자로부터 분리한 B 림프구의 combinatory display library를 구축하였다. 이는 B 림프구와 다양한 종류의 재조합 HA 단백질과의 binding affinity를 확인하는 과정으로 이어졌고, 그 결과 세 개의 mAb인 CR8033, CR8071, CR9114가 Victoria 및 Yamagata 두 계통의 IBV HA에 모두 결합하는 것을 발견하였다. 이 중, CR8033과 CR8071은 IBV 감염을 막는 중화항체로서 작용할 수 있었고, CR8033의 경우는 Yamagata 계통의 B/Harbin/7/1994, B/Florida/4/2006 바이러스에 대하여 응집억제능(hemagglutination inhibition, HI) 효과를 보였다. 즉, CR8033은 HI activity를 통하여 Yamagata 계통의 IBV 감염을 억제하였고, 3D로 구축된 HA와 CR8033의 결합을 보여주는 구조를 근거로 억제 기전을 분석할 수 있었다. 이 구조를 살펴보면 CR8033 Fab는 HA globular head domain의 receptor binding site (RBS)에 결합되는 것으로 확인되었고, 전자현미경을 이용한 모델에서도 CR8033의 Fab region이 heavy-chain complementarity-determining region (HCDRs) loop와 framework site에서 HA와 결합하는 것을 확인할 수 있었다. Dreyfus *et al.*은 CR8033의 HA binding 모델을 근거로 Yamagata와 Victoria 계통 바이러스 HA 단백질 내 RBS 주변의 아미노산 차이로 인한 항원성의 차이가 CR8033의 HI 수치를 결정짓는 중요한 요소임을 확인하였다.

두 번째 mAb인 CR8071은 Victoria 및 Yamagata 두 계통의 IBV 모두에 대해 HI 효과를 보이지 않았다. 또한, CR8033이나 CR9114와 HA binding에서 competition을 보이지 않았다. 이러한 실험 결과를 토대로 HA와 CR8071 사이의 binding interaction을 3D 구조로 확인한 결과, CR8071의 Fab region이 HA의 vestigial esterase domain에 결합하는 것을 알게 되었다. IBV HA에서 나타나는 이 부위의 아미노산 보존율이 약 98% 이상(이 부위의 epitope을 구성하는 19개의 아미노산 중에서 17개가 IBV HA 사이에 보존되어 있음)임을 볼 때, vestigial esterase domain을 표적으로 하는 항체 또한 다양한 IBV에 범효용성을 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

하지만, CR8033이나 CR8071은 IBV의 감염 자체를 막는 것은 아니다. 그렇다면 이들 mAb들의 중화 기전은 무엇일까? Dreyfus *et al.*은 이를 위해 Madin-Darby canine

kidney (MDCK) 세포에 바이러스를 감염시킨 후, CR8033, CR8071 각각을 세포배양액에 첨가하여 이들 mAb들이 과연 바이러스 증식을 억제할 수 있는지 확인하였다. 실험 결과, CR8033과 CR8071은 세포에서 HA 복제를 막진 못하였다. 하지만, 세포에서 생산되어 세포배양액으로 방출되는 바이러스 입자(virion)의 HA 단백질은 억제하는 것으로 밝혀졌다. 더 나아가, Dreyfus *et al.*은 CR8033과 CR8071이 neuraminidase inhibitor (NI)와 같이 감염된 세포에서 새로이 생성된 자손바이러스 입자(progeny virion)의 방출을 막는 것을 전자현미경으로 관찰, 확인하였다 (8). 추후 HA의 RBS와 vestigial esterase domain에 각각 결합하는 이들 mAb들이 어떠한 기전으로 NI와 같은 유사 효과를 나타내는지, 그리고 NI에 의해 발생하는 내성바이러스에서 HA의 역할은 무엇인지 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

세 번째 mAb인 CR9114는 CR8033이나 CR8071과는 다른 중화 효과를 보여주었다. B 림프구를 이용한 초기 combinatorial display library screening에서 IBV의 HA에 binding affinity를 보여주었던 CR9114는 *in vitro* micro-neutralization test에서 IBV HA에 대한 중화 효과를 전혀 나타내지 않았다. 오히려, IAV인 H1N1 (A/New Caledonia/20/1999)과 H3N2 (A/Wisconsin/67/2005) 바이러스에 대한 중화 효과를 보여주었다. 또한, 다양한 IAV HA (H3, H5, H7)와의 3D 결합 구조에서, CR9114의 Fab region이 HCDR loop를 이용하는 또 다른 VH1-69 항체인 CR6261과 같이 HA의 stem region에 결합하는 것으로 확인되었다 (6, 9). 그리고 CR9114를 투여 받은 마우스에 IAV 또는 IBV를 치사량 이상으로 접종(lethal challenge)하여도 마우스가 생존하였다. CR9114가 결합하는 HA stem region은 globular head region에 비해 유전자 변이가 적어 IAV와 IBV에 속하는 대부분의 바이러스에서 유사한 아미노산 서열을 갖는 것으로 알려져 있다. 결국, IAV 및 IBV를 아우르는 CR9114의 중화효과는 이 mAb의 universal vaccine 후보물질로의 가능성을 제시하였다. 이를 위해, Dreyfus *et al.*은 세 가지 선결 요건을 설명하였다. 첫 번째로, IAV의 group 1과 group 2 HA2의 49번째 아미노산 잔기에서 나타나는 Thr/Asn의 차이로 인해 CR9114의 binding affinity가 달라질 수 있음을 지적하였다. 두 번째로, IAV와 IBV HA2의 119번째 아미노산 잔기에서 확인된 His/ Thr/Ala/Glu의 다형대성(polymorphism)이 21번째 Trp의 conformational change에 영향을 주는 점을 지

적하였다. 이는 CR9114의 HCDR2 54번째 아미노산 잔기인 Phe과 작용하여 CR9114의 binding affinity에 영향을 끼칠 수 있다고 언급되었다. 마지막으로, group 2 HA1의 38번째 아미노산 잔기에 위치하는 Asn과 IBV HA1의 332번째 Asn 잔기에서 일어나는 N-linked glycosylation (NLG)을 지적하고 있다. 이들 NLG의 존재는 HA 단백질이 긴 가지의 oligosaccharide side chain을 갖게끔 하고, 이로 인한 CR9114의 binding affinity의 저하를 초래할 수 있다. 이러한 문제점들의 극복 및 개선은 mAb인 CR9114의 universal vaccine으로의 적용 가능성을 한 층 높여줄 수 있을 것으로 판단된다.

### 3. mAb CR8033, CR8071, CR9114의 *in vivo* 효과

6~8주령의 암컷 BALB/c 마우스를 이용한 mAb의 백신 효능평가 실험에서, CR8033과 CR8071은 0.2~0.6 mg/kg의 소량 접종만으로도 Victoria 및 Yamagata 계통 각각의 IBV challenge에 대하여 75% 이상의 마우스가 생존하였다. 이들 mAb의 백신 접종량을 1.7 mg/kg 이상으로 늘릴 경우, CR8033과 CR8071의 예방적 효용성(protective efficacy)은 더욱 증가하여 IBV lethal challenge에 대하여 모든 마우스가 생존하였다.

더욱 놀라운 점은 CR9114가 IBV challenge에 대한 예방 효과를 보였다는 것이다. *In vitro* 실험에서, CR9114는 IBV 감염에 대한 중화 및 HI 효과가 없는 것으로 확인되었다. 하지만, 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서 CR9114는 IBV lethal challenge에 대한 범효용성을 보여주었고, 1.7 mg/kg 이상의 CR9114를 백신으로 접종했을 때 약 75% 이상의 마우스가 생존하였다. 또한, IBV 뿐 아니라 H1N1 및 H3N2 바이러스의 IAV lethal challenge에 대해서도 IBV와 비슷한 생존율을 보여주었다. 그러므로 향후, CR9114의 HA 결합 지역을 표적으로 하는 항체의 개발 및 epitope 적용은 CR9114를 이용한 universal vaccine 개발의 기회를 앞당기고, 이를 위한 다양한 immunotherapy 분야의 발전을 가져올 것으로 사료된다.

## 결론

항원적으로 서로 다른 두 계통으로 변화하고 있는 IBV는 공중보건학적 측면에서 인류에게 지속적인 위협을 초래할 수 있다. 이들 IBV에 대한 광범위한 효과를 보인 mAb CR8033과 CR8071에 대한 백신 효능평가 관

런 연구는 이러한 문제점을 줄일 수 있는 좋은 기회가 될 수 있다. 또한, IBV 뿐만 아니라 IAV에도 예방적 효용성을 보인 CR9114의 발견은 수 많은 TIV 접종 인구의 immune repertoire 내에 CR9114과 유사한 mAb의 존재 가능성을 시사하고 있다. 그러므로 이러한 mAb를 선별적으로 boosting하여 면역원성을 높일 수 있는 적절한 전략 및 immunomodulatory technique 개발, 범효용성 epitope의 발견, 그리고 이를 기반으로 개발된 mAb의 효능평가 관련 연구는 끊임없이 변화하는 인플루엔자바이러스에 효과적으로 대항할 수 있는 universal vaccine의 개발로 귀결될 수 있을 것으로 판단된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, *et al.* Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA: the journal of the American Medical Association.*
- 2) Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* 1990;175:59-68.
- 3) Ambrose CS, Levin MJ. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2012;8:81-8.
- 4) Ekiert DC, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Curr Opin Virol* 2012;2:134-41.
- 5) Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, Zuijdgeest D, Khayat R, Ekiert DC, *et al.* Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 2012;337:1343-8.
- 6) Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, *et al.* Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 2009;324:246-51.
- 7) Ekiert DC, Friesen RH, Bhabha G, Kwaks T, Jongeneelen M, Yu W, *et al.* A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 2011;333:843-50.
- 8) Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000;355:827-35.
- 9) Lingwood D, McTamney PM, Yassine HM, Whittle JR, Guo X, Boyington JC, *et al.* Structural and genetic basis for development of broadly neutralizing influenza antibodies. *Nature* 2012;489:566-70.