

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2009년 10월 29일 (29.10.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/131423 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/33 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/002173
- (22) 국제출원일: 2009년 4월 24일 (24.04.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0038483 2008년 4월 25일 (25.04.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교 수원캠퍼스, 446-701 Gyeonggi-do (KR). **메디칸(주) (MEDIKAN INC.)** [KR/KR]; 서울특별시 강남구 신사동 577-7 구정빌딩 3층, 135-891 Seoul (KR). **김종범 (KIM, Jong-Bum)** [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 구운동 삼환아파트 4동 1207호, 441-703 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **정인식 (CHUNG, In Sik)** [KR/KR]; 서울특별시 강남구 도곡동 삼성래미안 아파트 10동 1102호, 135-270 Seoul (KR). **김정일 (KIM, Kyung Il)** [KR/KR]; 부산광역시 서구 충무동 충무아파트 B동 405호, 602-012 Busan (KR). **이종민 (LEE, Jong Min)** [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 곡반정동 533-5번지 303호, 441-400 Gyeonggi-do (KR).

이현호 (LEE, Hyun Ho) [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 세류 2동 456-8번지 공우아파트 가동 501호, 441-869 Gyeonggi-do (KR). **손동화 (SHON, Dong Hwa)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 금곡동 181번지 청솔마을 308동 1402호, 463-725 Gyeonggi-do (KR). **김원용 (KIM, Won Yong)** [KR/KR]; 서울특별시 용산구 이촌 1동 한가람아파트 213동 503호, 140-031 Seoul (KR). **이희영 (LEE, Heeyoung)** [KR/KR]; 전라북도 군산시 문화동 919-9, 573-140 Jeollabuk-do (KR). **정호용 (CHUNG, Ho Yong)** [KR/KR]; 인천광역시 남동구 서창동 현대모닝사이드 아파트 308동 1301호, 405-782 Incheon (KR). **정하영 (CHUNG, Ha Young)** [KR/KR]; 경기도 용인시 포곡면 신원리 617번지, 449-814 Gyeonggi-do (KR). **황보전 (HWANG Bo, Jeon)** [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 곡반정동 533-4번지, 441-400 Gyeonggi-do (KR). **유기현 (YOO, Ki Hyun)** [KR/KR]; 인천광역시 부평구 부개 1동 251-2 동원아파트 905동 403호, 403-810 Incheon (KR).

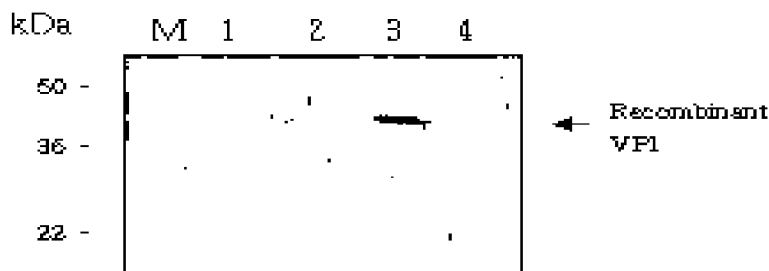
- (74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo young)**; 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL HEPATITIS A VIRUS ANTIGEN GENE AND TRANSFORMED PLANTS WITH THE GENE

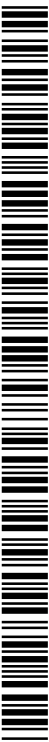
(54) 발명의 명칭: 신규 A형 간염 바이러스의 항원 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물체

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel hepatitis A virus antigen gene and transformed plants with the gene, more particularly to a novel hepatitis A virus antigen gene synthesized by optimization of a genetic code, a recombinant vector containing the gene and plants transformed with the recombinant vector. According to the invention, the use of a synthesized antigen gene of hepatitis A virus makes it possible to prepare recombinant hepatitis A virus vaccine materials at a high efficiency, and transformed plants expressing a hepatitis A virus antigen are useful as functional food materials and orally administrated vaccine materials.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 A형 간염 바이러스의 항원 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 유전자 코돈 최적화에 의해 합성된 신규 A형 간염 바이러스의 항원 유전자, 상기 유전자를 함유하는 제조합벡터 및 상기 제조합벡터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 합성 A형 간염 바이러스의 항원 유전자를 사용하면 높은 효율로 제조합 A형 간염 백신 소재를 제조할 수 있으며, A형 간염 바이러스 항원을 발현하는 형질전환 식물체는 기능성 식품 소재와 구강 복용성 백신 소재로 유용하다.



WO 2009/131423 A2



MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

신규 A형 간염 바이러스의 항원 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물체

기술분야

- [1] 본 발명은 신규 A형 간염 바이러스의 항원 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 유전자 코돈 최적화에 의해 합성된 신규 A형 간염 바이러스의 항원 유전자, 상기 유전자를 함유하는 재조합백터 및 상기 재조합백터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 백신은 특정 병원체가 생체 내에 침입하기 전에 그 특정 병원체를 항원으로 기억하도록 하기 위하여 여러 기작을 통해 면역 시스템을 자극함으로써 한번 기억된 항원과 다시 만나게 될 때 특정 병인을 비활성화시키는 생물학적 소재로서, 현재 사용되는 백신 소재는 약독화 생균 백신 소재와 비활성화 사균 백신 소재로 구분되고 있다.
- [4] 전세계 백신 소재 시장 규모는 2010년에 약 170억 달러에 이를 것으로 예측되며, 연평균 약 13% 정도로 급속하게 성장하고 있다. 이에 따라, 국내도 현재 약 1,500억원의 시장을 형성하고 있다. 연령별 백신 소재 시장은 소아용 백신 부문이 2001년도에 약 25억 달러의 매출을 기록하여 가장 높은 점유율을 나타내었지만, 최근 정부 차원에서 고령층과 여행자들에 대한 백신 접종이 적극 권장되고 있으므로 성인용 백신에 대한 수요도 증가하고 있다.
- [5] 그러나, 지금 시판되고 있는 백신 소재는 효능, 용이성, 제조 및 분배의 측면에서 많은 단점을 지니고 있다. 예를 들어, 사균 백신 소재는 안전하나, 여러 번 접종하여야 하는 단점이 있고, 생균 백신 소재는 면역원성은 뛰어나나, 임신부와 면역기전이 저하된 사람에게는 투여하지 못하고, 생산비가 비싸며 냉장을 필요로 하는 단점이 존재한다. 또한, 이러한 백신 소재들은 전신 면역 반응을 유도하지만, 대부분의 세균과 바이러스의 침투 경로인 점막세포 표면에서의 면역반응을 일으키지 못한다.
- [6] 그러므로, 접종에 사용되는 인력, 비용, 고통 등을 감안할 때 식이성 백신 소재가 가장 바람직한 형태의 백신 소재로 여겨지고 있지만, 현재까지 개발된 식이성 백신 소재는 모두 약독화 생균 백신 소재로 장티푸스와 소아마비에 그치고 있는 실정이다. 따라서, 최근 항원 유전자를 식물체에서 발현시켜 사용하는 의약 기능성 식품 소재는 재조합 백신 소재의 안전성과 식이성 백신 소재의 수월성 및 효용성을 접목시켜 차세대 바이오 건강식품으로 부상하고 있다.
- [7] A형 간염(hepatitis A) 바이러스는 *Picornaviridae*과에 속하는 27nm 크기의 RNA

바이러스로서, 평균 28일의 잠복기 후에 고열, 권태감, 식욕부진, 오심, 복통, 압뇨, 황달 등의 임상 증상을 특징으로 하는 급성 간질환을 일으킨다. A형 간염 바이러스는 로타바이러스와 마찬가지로 피막이 없고, 직경 27nm의 정20면체 형태로 7.5kb의 단일가닥 RNA 게놈을 가지고 있으며, 한 개의 긴 ORF(P1~3)를 가지고 있는 것이 특징이다. A형 간염의 주된 전파 경로는 로타바이러스와 같이 분변-경구 통로이며, 오염된 음식물이나 식수에 의하여 전염되고 있다.

- [8] 최근 A형 간염의 발생이 세계적으로 증가하고 있는 추세이므로, ACIP는 A형 간염 풍토성이 있는 지역을 여행하는 사람, 혈액 응고 질환이 있는 사람, 동성연애자, 만성 간질환을 가지고 있는 사람, A형 간염의 빈도가 높은 지역에 거주하는 소아군에 대해 예방 접종을 권고하고 있고, 특히 인구 10만명당 10명 이상 발생시, 광범위한 백신 접종이 필요하며, 만성 B형 간염 보균자, 노인, 만성신부전으로 혈액투석을 받는 환자 등과 집단 생활을 하는 청소년은 A형 간염 백신 접종이 필수적으로 요구되고 있다.
- [9] 최근 10년간의 조사에 따르면, 미 서부지역, 중동 지역, 일부 아시아 지역에서 A형 간염의 발생이 증가하고 있어 세계적으로 A형 간염의 확산이 우려되고 있는데, 우리나라에서도 최근 면역력이 없는 10, 20대의 젊은층에서 A형 간염이 급속도로 증가하기 시작하고 있다. A형 간염의 호발 연령은 5~14세이며, 주로 환자의 약 30%가 15세 이하이다. 미국에서 1982~1993년에 조사한 결과에 의하면, A형 간염의 발생율은 약 47%로써, B형 간염 발생율 약 37%보다 많으며, 혈청학적 검사 결과 미국 전체 인구의 약 33%가 과거에 A형 간염에 이환되었던 경험이 있음이 규명되었다.
- [10] A형 간염 환자는 약 11~22%가 입원 치료를 받게 되고, 성인이 입원하는 경우 약 27일 동안 절근하게 되며, 병이 발생하였을 때 환자 1명당 평균 11명의 접촉자에 대한 예방 요법이 시행되어야 한다. 미국의 경우, A형 간염 환자 1명당 소요되는 직접 및 간접 비용은 성인의 경우 \$1,817~2,459, 18세 이하에서는 \$433~1,492의 비용이 소요된다고 보고되어 있고, 1989년 A형 간염으로 인해 미국에서 지출하는 의료비는 약 2억불 이상으로, 2000년 화폐가치로 환산하면 약 3억불에 해당된다고 보고되고 있다.
- [11] 1995년 스미스클라인비참에서 개발된 Havrix는 세계 최초의 A형 간염 백신 소재로, HM175 스트레인(strain)을 사람 이배체 세포인 MRC5 세포에서 배양, 정제하여 불활성화하고, 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide)에 흡착시켜 제조한 사균 백신 소재로서, 2~18세의 청소년은 3회, 어른은 2회의 접종이 요구되며, 근육에 접종하기 때문에 바이러스의 침투 경로인 장내 점막 면역을 형성하기에는 완벽하지 못하고, 면역 기간의 지속성도 문제가 있다.
- [12] 기존의 A형 간염 바이러스 항원의 제조는 대장균이나 배큘로바이러스를 통한 발현시스템을 이용하여 시도된 바 있으나, 그 발현량이 미미하여 현재까지 상기 발현시스템에서의 항원 발현량은 정확히 보고되지 않고 있다.
- [13] 이에, 본 발명자들은 보다 안정적이면서도, 경구 투여가 용이한 A형 간염

바이러스 백신을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 유전자 코돈 최적화에 의해 합성된 신규 A형 간염 바이러스 항원 유전자로 형질전환된 식물체를 이용할 경우, 효율적으로 A형 간염 바이러스 항원이 발현된다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[14]

[15] 발명의 요약

[16] 본 발명의 주된 목적은 A형 간염 바이러스 항원을 코딩하는 신규 유전자 및 상기 유전자를 포함하는 재조합백터를 제공하는데 있다.

[17] 본 발명의 다른 목적은 상기 A형 간염 바이러스 항원을 코딩하는 신규 유전자 또는 상기 재조합백터로 형질전환된 식물체를 제공하는데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 A형 간염 바이러스 항원의 제조방법 및 A형 간염 바이러스 항원을 제공하는데 있다.

[19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 A형 간염 바이러스 항원을 코딩하는 유전자 및 상기 유전자를 포함하는 재조합백터를 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 A형 간염 바이러스 항원을 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, 상기 유전자 또는 상기 재조합백터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

[22] 본 발명은 또한, 상기 형질전환된 식물체를 배양하는 단계; 및 A형 간염 바이러스 항원을 회수하는 단계를 포함하는 A형 간염 바이러스 항원의 제조방법을 제공한다

[23] 본 발명의 다른 특징 및 구현에는 다음의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 더욱 명백해 질 것이다.

[24]

도면의 간단한 설명

[25] 도 1은 native A형 간염 바이러스 항원 유전자와 유전자 코돈 최적화에 의해 합성된 A형 간염 바이러스 항원 유전자의 염기서열을 비교한 것이다.

[26] 도 2는 본 발명에 따른 BCTV/CsVMV/합성 VP1의 개략도를 나타낸 것이다.

[27] 도 3은 토마토 세포 시스템에서 발현된 재조합 단백질을 웨스턴 블릿으로 확인한 것이다 (레인 M: 분자량 마커; 레인 1: native VP1 유전자로 형질전환된 식물체의 잎에서 추출한 단백질; 레인 2: 본 발명에 따른 코돈 최적화된 합성 VP1 유전자로 형질전환된 식물의 잎에서 추출한 단백질; 레인 3: native VP1 유전자로 형질전환된 *E. coli*에서 추출한 단백질(positive control); 레인 4: 음성 대조군(형질전환되지 않은 정상 식물체에서 추출한 단백질(negative control)).

[28]

[29] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현에

- [30] 본 발명은 일 관점에서, 식물체에 적합하도록 유전자 코돈 최적화에 의한 합성된 신규 A형 간염 바이러스 항원 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합백터 및 상기 유전자 또는 상기 재조합백터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.
- [31] 본 발명에 있어서, 상기 재조합백터는 T-DNA 보더 사이에 2개의 BCTV 레플리콘을 가지고, 상기 두 레플리콘 사이에 CsVMV 프로모터, 노스(NOS) 및 복제개시단백질(REP)을 포함하는 발현백터에, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 A형 간염 바이러스 항원 유전자가 삽입되어 있고, 도 1의 개열지도를 가지는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 식물은 토마토, 상추, 고추, 콩, 벼 및 옥수수 등으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [32] 본 발명의 일 실시예에서는 유전자 코돈 최적화를 실시하여 A형 간염 바이러스 항원 유전자를 합성하였다. 상기 합성 유전자는 타카라 코리아사에 의뢰하여 GENEART사가 자체 개발한 코돈 최적화 프로그램을 이용하여 합성하였다.
- [33] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 합성된 A형 간염 바이러스 항원 유전자를 포함하는 재조합백터를 제작하고, 상기 재조합백터를 식물체에 도입하였다.
- [34] 본 발명에서는 A형 간염 바이러스 항원 유전자를 포함하는 재조합백터를 제작하기 위하여, 제미니바이러스 레플리콘을 포함하는 식물발현용 백터를 사용하였으며, 바람직하게는, 2개의 T-DNA 보더 사이에 2개의 BCTV(*beet curly top virus*) 레플리콘을 가지고, 상기 두 레플리콘 사이에 프로모터, 노스(NOS) 및 복제 개시 단백질(*replication initiator protein, REP*)을 포함하고, 상기 코돈 최적화에 의해 합성된 A형 간염 바이러스 항원 유전자가 삽입될 수 있는 것을 특징으로 하는 식물 발현용 재조합백터를 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되지는 않는다.
- [35] 상기 프로모터는 CaMV35S 프로모터 또는 CsVMV 프로모터인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 REP 유전자는 BCTV의 REP 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [36] 본 발명에서 사용하는 CsVMV 프로모터 함유 BCTV 백터는 대한민국 등록특허 제10-0625334호에 기재된 방법에 의하여 제작할 수 있다. 즉, 제미니바이러스에 속하는 BCTV의 레플리콘을 클로닝하고, BCTV의 REP 유전자를 *cis*로 넣어 발현시스템의 골격을 재구성하였다. 또한, BCTV의 레플리콘을 *HindIII* 및 *Sall* 제한효소 부위를 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 CaMV 35S 프로모터+GFP+Nos poly-A 앞부분에 클로닝하였고, BCTV의 REP 유전자와 BCTV 레플리콘을 *SacI* 제한효소 부위를 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 클로닝하였다. CsVMV 프로모터를 BCTV 백터에 *Sall*과 *XbaI*의 제한효소를 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 각각 클로닝하여 제조하였다.
- [37] 상기와 같은 방법으로 제조된, T-DNA 보더 사이에 2개의 BCTV 레플리콘을 가지고, 상기 두 레플리콘 사이에 CsVMV 프로모터, 노스(NOS) 및

- 복제개시단백질(REP)을 포함하는 발현벡터에서 제한효소 절단부위 *Sma* I 및 *Spe* I 사이에 상기에서 합성된 A형 간염 바이러스 항원 유전자를 클로닝하였다.
- [38] 상기 합성된 A형 간염 바이러스 항원 유전자를 함유하는 식물세포 형질전환용 발현 플라스미드를 이용하여 아그로박테리움 속 균주에 상기 합성 유전자를 도입하여 A형 간염 바이러스 항원을 생산하는 식물세포 또는 식물체를 제조하였다. 상기 아그로박테리움 속 균주로는 아그로박테리움 투메파시앙스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용할 수 있고, 본 발명에서 사용한 아그로박테리움 투메파시앙스는 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자 pCAMBIA 1300 플라스미드가 들어 있는 *GV3101* 계통을 사용하였다.
- [39] 상기 형질전환은 A형 간염 바이러스 항원을 고수율로 효과적으로 발현시킬 수 있다면, 유전공학 분야에서 어떠한 방법이라도 사용될 수 있다.
- [40] 특히, 본 발명에서는 형질전환 식물로 토마토를 사용하였으나, 상추, 고추, 콩, 벼, 옥수수 등 경제적으로 재조합 단백질을 제조할 수 있는 식물이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 또한, 형질전환에 사용되는 식물은 유성번식 식물이라 할지라도, 조직배양 등에 의해 무성적으로 반복생식시킬 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.
- [41] 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [42] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM101, *E. coli* TOP10, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL1-Blue(Stratagene), *E. coli* B, *E. coli* BL21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움

A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(*bacilli*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르케센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

- [43] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook *et al.*, *supra*의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 또한, 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.
- [44] 본 발명에서 사용되는 유전자는 숙주세포 내에서 플라스미드 내에 독립적으로 또는 숙주의 염색체에 삽입되어 존재할 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [45] 본 발명에 있어서, 외래 단백질이 세포 내에서 발현될 때 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 하나이거나 두 번 이상 반복된 것 또는 두 번 이상 반복된 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 동일한 것이거나, 서로 다른 것 등이 가능하고 상기한 어떠한 조합의 경우도 가능하다.
- [46] 한편, 외래 단백질의 발현 유도는 숙주세포에서 성장 정지기에 발현이 유도될 수 있는 적절한 다른 프로모터에 의해 발현될 수 있음은 당업자에게 자명하다 할 것이다.
- [47] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 형질전환체를 이용하여 재조합 A형 간염 바이러스 항원을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [48] 본 발명에 따르면, 상기 합성된 A형 간염 바이러스 항원 유전자는 A형 간염 바이러스 항원을 구성하는 단백질을 발현시키므로, 상기 형질전환된 식물체는 재분화 과정 중에 A형 간염 바이러스 항원을 발현하고, 이러한 재조합 단백질의 발현 여부를 웨스턴 블롯으로 확인할 수 있었다.
- [49] 따라서, 본 발명에 따른 신규 A형 간염 바이러스 유전자를 이용하면 토마토 식물체에서 A형 간염 바이러스 항원의 유전자의 발현 효율을 크게 증진시키므로, 상기 형질전환체를 간염 예방 또는 치료용 백신으로 유용하게 이용할 수 있다. 특히, 상기 형질전환 식물체를 유효성분으로 함유하는 경구용 간염 예방 백신 조성물을 제공할 수 있다.
- [50] 상기 조성물은 형질전환 식물체를 그대로 사용하거나 건조시킨 후, 분말 형태로 사용할 수 있고, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분으로서 식물체의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있으며, 유효성분인 식물은 통상 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 특정한 최대 허용 범위 없이 사용될 수 있음은 자명하다.
- [51] 본 발명에 있어서, "백신"이란 전염병의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 조성물을 말한다. 백신은 항원을 포함하고 있든지, 또는 항원 발현이 가능하여 항원에 대한 면역응답을 유도할 수 있다. A형 간염 바이러스의 감염, 전파 및 유행의 예방 또는 치료를 위해 본 발명의 재조합백터를 포함하는 백신을 사용할

수 있다.

- [52] "예방접종(vaccination)"이란 백신의 접종에 의해 생물의 체내 또는 배양계에 능동적으로 면역(체액성 면역, 세포성 면역, 또는 양자)을 만들게 하는 것을 의미한다. 이것에 의해 병원체의 감염, 증식, 전하 및/또는 유행 등을 저지할 수 있다.
- [53] "항원"이란, 1개 또는 그 이상의 에피토프를 포함하는 분자로, 숙주의 면역계를 자극하여 항원 특이적인 면역응답을 유도할 수 있는 것을 말한다. 면역응답은 체액성 면역응답 및/또는 세포성 면역응답이어도 좋다. 3개~수개 정도의 아미노산도 1개의 에피토프로 될 수 있지만, 통상 단백질 중 1개의 에피토프는 약 7~15 아미노산, 예를 들면 8, 9, 10, 12 또는 14 아미노산을 포함하고 있다. 항원은 면역원이라고도 한다. 또한, 항원 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 사용하여 항원을 사용하여 항원을 발현시키는 경우, 본 발명에 있어서는 이러한 폴리뉴클레오티드 및 벡터도 항원으로 칭하고 이들은 백신 성분으로서도 사용될 수 있다.
- [54] "유전자"란 유전 물질을 가리키고, RNA 및 DNA 등의 핵산을 포함하는 것으로, 천연 유래 또는 인위적으로 설계된 서열을 가질 수 있다.
- [55]
- [56] 실시예
- [57] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [58]
- [59] 실시예 1: A형 간염 바이러스 항원 유전자의 발현 시스템 구축
- [60]
- [61] 실시예 1-1: A형 간염 바이러스 항원 유전자의 합성
- [62] 타카라 코리아사에 의뢰하여 코돈 최적화를 실시하여 약 903bp의 A형 간염 바이러스 항원 유전자(서열번호 1)를 합성하였다. 상기 합성 유전자는 타카라 코리아사에 의뢰하여 GENEART사가 자체 개발한 코돈 최적화 프로그램을 이용하여 합성하였는바, 코돈을 토마토의 코돈으로 치환하고, very high 또는 very low GC content를 피하는 방법으로 코돈 최적화를 수행하였다 (도 1).
- [63]
- [64] 실시예 1-2: BCTV 레플리콘을 포함하는 BCTV-CsVMV-synthetic VP1 발현벡터 구축
- [65] 대한민국 등록특허 제10-0625334호에 기재된 방법에 의하여 CsVMV 프로모터 함유 BCTV 벡터를 제작하였다.
- [66] 즉, 제미니바이러스에 속하는 BCTV(beet curly to virus, ATCC PVMC-6)의 레플리콘을 클로닝하고, BCTV의 REP(replication initiator protein) 유전자를 cis로

넣어 발현 시스템의 골격을 재구성하였다. 또한, BCTV의 레플리콘을 *HindIII* 및 *SalI* 제한효소 부위를 갖는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 CaMV 35S 프로모터+GFP+Nos poly-A 앞부분에 클로닝하였고, BCTV의 REP 유전자와 BCTV 레플리콘을 *SacI* 제한효소 부위를 갖는 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 클로닝하였다. CsVMV 프로모터를 BCTV 벡터에 *SalI* 및 *XbaI* 제한효소를 갖는 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 각각 클로닝하였다.

[67]

[68] 서열번호 2: 5'-AAGCTTCTGCAGATGCGAATATATTTTTTATTC-3'

[69] 서열번호 3: 5'-GTCGACCTTGCTTAGCAAGTTTCTTGTGGG-3'

[70] 서열번호 4: 5'-GAGCTCATTTTTTATTAATAAAAATATTATTTTTTTTAATAC-3'

[71] 서열번호 5: 5'-GAGCTCCTTGCTTAGCAAGTTTCTTGTGGG-3'

[72] 서열번호 6: 5'-GGATCCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAG-3'

[73] 서열번호 7: 5'-GGTACCCCCGATCTAGTAACATAGATGAC-3'

[74]

[75] 상기에서 합성된 A형 간염 바이러스 VP1 유전자는 PCR 증폭시 클로닝이 용이하도록 *SmaI* 및 *SpeI* 제한효소 부위를 갖도록 하였다. PCR 조건은 전변성 94°C에서 5분, 변성 94°C에서 1분, 어닐링 55°C에서 1분, 신장 72°C에서 1분, 확장 72°C에서 7분간 총 30회 수행하였다.

[76] 상기 PCR 산물을 pGEM-T 벡터(Promega, USA)에 라이게이션한 후, *E. coli* DH5a에 형질전환시킨 다음, 플라스미드를 분리하고 *SalI* 및 *SpeI*로 절단하여 약 2.0kb의 밴드를 확인하여 유전자 삽입 여부를 확인하였다. A형 간염 바이러스 항원 발현 벡터는 BCTV 레플리콘이 삽입된 식물 발현용 binary 벡터인 재조합벡터 BCTV-CsVMV-합성 VP1을 제작하였다 (도 2).

[77] 상기 재조합벡터 BCTV-CsVMV-HAV(합성 VP1)에서 유전자 삽입이 적합한 방향으로 되었는지와 판독 프레임은 제한효소 지도 작성과 DNA 서열 결정에 의하여 확인하였다.

[78]

[79] 실시예 2: 아그로박테리움을 이용한 토마토의 형질전환

[80]

[81] 상기에서 제작된 재조합벡터 BCTV-CsVMV-합성 VP1이 삽입되어 있는 아그로박테리움 투메파시앙스(*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101)를 멸균된 LB 액체 배지에 넣고 항생제(카나마이신 50mg/l)를 첨가하여 36시간 동안 28°C에서 150rpm의 속도로 조절된 진탕배양기에서 배양한 후, 원심분리기에 넣고 2500rpm으로 10분간 원심분리시킨 다음, 원심분리된 균을 액체 MSO 배지로 현탁시켜 토마토(MicroTom) 절편의 접종에 사용하였다.

[82] 상기 전배양된 절편을 아그로박테리움 용액에 15분간 담근 후, 멸균된 여과지에서 절편 위에 묻은 과량의 아그로박테리움을 닦아낸 다음, 항생제가

첨가되지 않은 재분화 배지(MS salt, 0.3% phytigel, 수크로오스 30 g/l)에 3-인돌아세트산(IAA) 0.1mg/l와 6-벤질아미노퓨린(BA) 0.5mg/l가 첨가된 배지에 치상하여 2일 동안 25°C에서 암배양하였다. 2일 후, 항생제(티멘틴 150mg/l, 하이그로마이신 10mg/l)가 첨가된 재분화 배지로 옮겨서 형질전환체를 선별하였다.

- [83] 형질전환체를 선별하면서 짝이 유도되면 뿌리를 유도하기 위하여, MSO(MS salt, 0.3% phytigel, 수크로오스 30 g/l) 호르몬을 제거한 배지에 성장한 줄기를 절단하여 뿌리를 유도하였다. 상기 재분화가 완성된 형질전환 식물체를 화분으로 옮겨 토양 순화를 실시하였다.

[84]

- [85] 실시예 3: 합성 A형 간염 바이러스 항원 발현 확인

[86]

- [87] 합성 A형 간염 바이러스 항원 유전자가 발현되었는지 확인하기 위하여, 래플리 방법(Laemmli UK, *Nature*, 227:680, 1970)에 의해 SDS-PAGE를 사용하여 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다.

- [88] 즉, 상기 형질전환된 토마토로부터 A형 간염 바이러스 항원 단백질의 발현 여부를 확인하기 위하여, 형질전환 잎 절편에서 추출한 단백질 시료에 대해 웨스턴 블롯(western blot)을 수행한 후, 겔상에서 전기영동한 단백질들을 니트로셀룰로오스 막에 전이시키고 토끼 anti-VP1 다세포균 항체와 반응시킨 다음, Goat anti-토끼 IgG 알칼리성 포스파타제 결합체(1:1000, v/v)로 표지하였다. 세척 후, BCIP/NBT 용액(Amersco Co., OH)을 첨가한 다음, 증류수로 반응을 정지시켰다.

- [89] 그 결과, 형질전환된 토마토의 잎 절편에서 합성 VP1 항원이 높은 효율로 발현되었으며, 제조합 단백질은 약 40kDa 정도의 분자량을 나타내었다 (도 3).

- [90] 또한, native VP1 유전자를 포함하는 BCTV/CsVMV/native VP1 제조합벡터로 형질전환된 식물체(도 3의 레인 1, 대한민국 특허출원 제10-2006-0124041호)에서는 A형 간염 바이러스 항원 단백질의 발현 수준이 매우 미미하였으나, 상기 합성 VP1 유전자로 형질전환된 토마토에서는 A형 간염 바이러스 항원 단백질이 10배 이상 높게 발현되었다 (도 3의 레인 2).

[91]

산업상 이용가능성

- [92] 이상 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 식물체에 적합하도록 유전자 코돈 최적화에 의해 제조된 합성 A형 간염 바이러스 항원 유전자를 포함하는 제조합벡터로 형질전환된 식물체를 배양함으로써 제조합 A형 간염 바이러스 항원을 수득할 수 있고, 이를 유효성분으로 하는 백신 소재를 제조할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 형질전환 식물체는 식품으로 섭취하여 간염 백신의 효능을 나타내므로, 기능성 식품 소재와 구강 복용성 백신 소재로 유용하게 사용할 수

있다.

[93]

[94] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[95]

서열목록

[96]

전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 A형 간염 바이러스 항원을 코딩하는 유전자.
- [2] 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 A형 간염 바이러스 항원.
- [3] 제1항의 유전자를 포함하는 재조합백터.
- [4] 제3항에 있어서, 상기 재조합백터는 T-DNA 보더 사이에 2개의 BCTV 레플리콘을 가지고, 상기 두 레플리콘 사이에 CsVMV 프로모터, 노스(NOS) 및 복제개시단백질(REP)을 포함하는 발현백터에, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 A형 간염 바이러스 항원 유전자가 삽입되어 있고, 도 1의 개열지도를 가지는 재조합백터.
- [5] 제1항의 유전자 또는 제3항의 재조합백터로 형질전환된 식물체.
- [6] 제5항에 있어서, 상기 식물은 토마토, 상추, 고추, 콩, 벼 및 옥수수으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 형질전환된 식물체.
- [7] 제5항의 형질전환된 식물체를 배양하는 단계; 및 A형 간염 바이러스 항원을 회수하는 단계를 포함하는 A형 간염 바이러스 항원의 제조방법.

