(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0096368
(43) 공개일자 2021년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/015* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) *C07K 14/445* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/015 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0009722
(22) 출원일자 2020년01월28일
심사청구일자 2020년01월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 24, 의과대학(회기동)
이수화
경기도 군포시 곡란로74번길 16-7, 102호(산본동, 거성빌라)
(74) 대리인
특허법인 하나

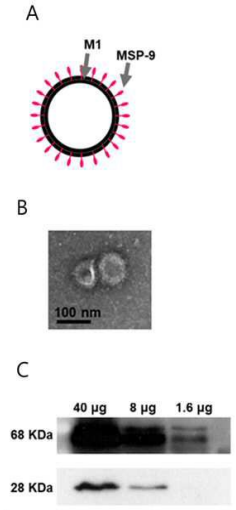
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9을 포함하는 바이러스-유사입자 및 이를 이용한 백신**

(57) 요 약

본 발명은 말라리아의 바이러스-유사입자, 이를 포함하는 백신 조성물, 발현벡터, 숙주세포 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/145 (2013.01)
C07K 14/445 (2013.01)
C12N 2760/16023 (2013.01)
C12N 2760/16034 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018R1A6A1A03025124
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야 기초 연구 사업/ 중점연구소 지원사업
연구과제명 활성산소 조절을 통한 만성 질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율 5/10
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단 (서울)
연구기간 2018.06.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018R1A2B6003535
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야 기초 연구 사업/ 중견연구자 지원사업
연구과제명 말라리아 감염병 대응 바이러스 유사입자 백신 개발 연구
기 여 율 3/10
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단 (서울)
연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01320501
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오 그린 21
연구과제명 바이러스 유사입자 기술기반의 가금류 고병원성 조류인플루엔자 예방백신 개발
기 여 율 2/10
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단 (서울)
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1); 및

말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9(merozoit surface protein-9, MSP-9);을 포함하는, 말라리아 바이러스-유사입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 메로조이트 표면 단백질-9은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 말라리아 바이러스-유사입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열로 이루어지고, 상기 메로조이트 표면 단백질-9은 서열번호 4의 핵산 서열로 이루어진, 말라리아 바이러스-유사입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 말라리아의 바이러스-유사입자를 포함하는, 백신 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 보조제, 면역 자극제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것인, 백신 조성물.

청구항 6

서열번호 3으로 이루어진 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 암호화하는 핵산 서열; 및

서열번호 4로 이루어진 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 말라리아 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 벡터는 바큘로바이러스(Baculovirus) 벡터인, 말라리아 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

청구항 8

제6항 또는 제7항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포인, 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 숙주 세포는 곤충 유래의 SF9세포인, 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 11

(a) 서열번호 3으로 이루어진 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제작하는 단계;

(b) 상기 발현 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조하는 단계;

(c) 상기 형질전환체를 숙주세포에 형질감염(transfection)시키는 단계;

(d) 상기 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 그 배양물을 수득하는 단계; 및

(e) 상기 배양물로부터 바이러스 유사입자를 수득하는 단계

로 이루어진 말라리아 바이러스-유사입자 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 메로조이트 표면 단백질-9을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 5 및 6의 핵산 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭되고, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 7 및 8의 핵산 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 것인, 말라리아 바이러스-유사입자 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 말라리아의 바이러스-유사입자, 이를 포함하는 백신 조성물, 발현벡터, 숙주세포 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 말라리아는 사람 혈액 속에서 기생하여 학질을 일으키며, 세계적으로 단일 질환으로 가장 많은 사망자(연간 240만명)를 발생시키는 질환이다.

[0003] 매년 약 300 내지 500백만명이 비교적 높은 유병율(morbidity) 및 치사율(mortality)로 말라리아에 감염되고 있다. 특히 아동 뿐만 아니라 이전에 말라리아에 노출된 적이 없는 성인의 경우에도 말라리아 감염에 의한 유병율 및 치사율이 심각한 수준이다.

[0004] 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 매년 아프리카에서만 2 내지 3백만 어린이들이 말라리아로 사망하는 것으로 추산한다.

[0005] 또한, 약물 저항성 기생충(*Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax*) 및 살충제-저항성 매개체(Anopheles mosquitoes)에 의해 유발되는 말라리아의 광범위한 발생 및 유병율의 증가로 인해, 많은 국가에서 말라리아의 새로운 통제 방법을 개발해야 할 필요성을 강조하고 있다.

[0006] 국내에서는 휴전선과 인근한 경기 북부 지방 및 강원 북서부를 중심으로 말라리아가 재 출현하였으며, 현재 감염위험 지역이 점차 확대되고 있다. 국내에서 매년 천명 이상의 환자가 발생하고 있으나, 현재 말라리아 치료제인 클로로퀸(chloroquine), 아르테메터(artemether) 등은 내성을 유발하므로 백신 접종법이 말라리아 원충을 예방함에 있어 가장 효과적인 방법으로 평가되고 있다.

[0007] 한편, 바이러스-유사입자는 실제 바이러스 구조와 형태학적으로 유사한 항원의 종류를 의미하며, 여러 바이러스에 대한 백신 항원으로 제안되어 왔다(Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM: Expert review of vaccines 2010, 9:1149-1176;Kang SM, Kim MC, Compans RW: Expert review of vaccines 2012,

11:995-1007;Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V: Vaccine 2012, 31:58-83).

[0008] 바이러스-유사입자는 바이러스 구조 단백질들의 결합을 통하여 실제 바이러스와 유사한 형태로 조립되지만, 조립과정에서 바이러스의 유전자가 포함되지 않아 감염의 위험성이 없어 매우 안전한 것이 특징이다.

[0009] 종래에는 말라리아 백신과 관련하여 재조합 단백질 또는 약독화된 백시니아 바이러스로 제공되는 2개의 항원(Pfs25와 Pvs25)에 중점을 두어 연구하였지만, 그 효과가 크지 않다고 알려짐에 따라, 효과가 향상된 말라리아 백신의 연구개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2019-0009691호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1); 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9(merozoit surface protein-9, MSP-9)을 포함하는 말라리아 바이러스-유사입자를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이러스-유사입자를 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 말라리아 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 말라리아 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1; 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9을 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 측면은, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1); 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9(merozoit surface protein-9, MSP-9);을 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자에 관한 것이다.

[0017] 본 발명에서 “말라리아(malaria)”는 말라리아 원충에 감염되어 발생하는 급성 열성 전염병을 의미하는 것으로서, 원인 병원체의 종류에 따라 증상 및 특징이 다르다. 구체적으로, 본 발명에서 상기 말라리아 원충은 설치류 말라리아 원충(*Plasmodium berghei* ANKA)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에서 “바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs)”는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미한다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 DNA 또는 RNA 게놈이 완전히 결여되어 있거나, 바이러스성 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자의 경우 자발적 자가 어셈블리를 진행할 수도 있다.

[0019] 본 발명에서 “말라리아의 바이러스-유사입자”는 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도하며, 바이러스와 유사한 형태를 가진 단백질 구조체(입자)를 의미한다. 한편, 본 발명에서 상기 “말라리아의 바이러스-유사입자”라는 용어는 말라리아가 바이러스에 의한 질병임을 의미하는 것은 아니나, 그 형태 및 활용에 있어서 바이러스와 유사하다는 의미로 사용된 것으로서, 필요에 따라 적절히 변경하여 적용될 수 있다.

[0020] 상기 말라리아의 바이러스-유사입자는 바이러스에서 유래한 구조 단백질이 조립되어 바이러스와 유사한 형태의 입자를 생성함과 동시에 말라리아 원충으로부터 유래한 항원 결정 부위를 포함함으로써, 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 특정 개체에 접종하였을 때 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적 일 예로서, 상기 단백질 구조체는 바이러스 유래의 구조 단백질 외부에 말라리아 원충 유래의 항원 결정 부위가 결합된 형태(도 1A)를 가질 수 있다.

[0021] 상기 바이러스 유래의 구조 단백질(core protein)은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 "인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)"은 인플루엔자 바이러스의 구조 단백질로서, 인플루엔자 바이러스의 외피(envelop)인 지방층 안쪽에 코트(coat)를 형성하는 기질단백질(matrix protein)을 의미한다. 상기 인플루엔자 바이러스는 8개의 분절된 음성가닥 RNA, 표면 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, H), 뉴라미다제(neuraminidase, N), 뉴클레오프로테인(neucleoprotein, NP) 매트릭스(matrix, M1), 프로톤 이온-채널 단백질(proton ion-channel protein, M2), 중합효소 염기 단백질 1(polymerase acidic protein, PA), 중합효소 염기 단백질 2(PB2, polyMerase basic protein 2), 중합효소 산성 단백질(PA, polymerase acidic protein) 및 비구조 단백질 2(NS2, nonstructural protein 2)와 같은 단백질을 포함하는데, 이때 매트릭스 단백질 1은 외형을 층으로 둘러 쌓고 있음으로써 코어와 외피 간의 연결체로 작용한다. 상기 매트릭스 단백질 1은 바이러스-유사입자 생성에 있어, 바이러스-유사입자를 안정한 형태로 조립하는데 중요한 역할을 한다.

[0023] 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 A/Puerto Rico/8/34, A/Bangkok/163/2000, A/AA/Huston/1945, A/Berlin/6/2006, A/Brandenburg/1/2006, A/Brevig Mission/1/1918, A/Chile/8885/2001, A/DaNang/DN311/2008, A/FLW/1951, A/FW/1/1950, A/Fiji/15899/83, A/Fort Monmouth/1-MA/1947, A/HaNoi/TX233/2008, A/Iowa/CEID23/2005, A/Malaysia/35164/2006, A/Managua/4086.04/2008, A/Texas/VR06-0502/2007, A/WSN/1933, A/Colorado/18/2011, A/Kentucky/04/2010, A/Maryland/28/2009, A/New Mexico/05/2012, A/Philippines/TMC10-135/2010, A/Singapore/GP4307/2010, A/Singapore/GP489/2010, A/Boston/14/2007, A/Brisbane/09/2006, A/Hong Kong/CUH34175/2002, A/Kyrgyzstan/WRAIR1256P/2008, A/Malaysia/12550/1997, A/Nanjing/1663/2010, A/Wyoming/08/2010, A/Berkeley/1/1968, A/Korea/426/1968 등으로부터 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서는 A/Puerto Rico/8/34 유래 M1 단백질을 바이러스-유사입자의 구조 단백질로 활용하였다.

[0024] 상기 말라리아 원충으로부터 유래한 항원 결정 부위는 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9(merozoit surface protein-9, MSP-9)일 수 있다.

[0025] 본 발명에서 용어 "항원 결정 부위(epitope)"는 각각의 항체 또는 T 세포 수용체에 의한 인식의 기본 요소 또는 최소 단위이며, 상기 항체 또는 T 세포 수용체가 결합하는 특정 도메인, 영역 또는 분자 구조를 의미한다. 상기 항원 결정 부위는 말라리아에서 유래할 수 있으며, 상기 말라리아에 대한 면역 활성을 유도할 수 있으면 특별히 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에서 "메로조이트 표면 단백질-9(merozoit surface protein-9, MSP-9)"은 말라리아 원충 표면에 특이적으로 존재하는 표면 단백질이다. 메로조이트 표면 단백질-9은 말라리아 원충에서 가장 높게 발현하는 대표 단백질로서 무성생식 초기단계에서 합성된다. 말라라이 원충은 합성된 메로조이트 표면 단백질-9 복합체를 이용하여 적혈구에 부착한 뒤, 상기 메로조이트 표면 단백질-9 복합체를 적혈구 세포막 내부 표면상의 스펙트린(spectrin) 복합체를 표적화하여 적혈구로 침습한다. 이에 본 발명에서는 메로조이트 표면 단백질-9을 항원 결정 부위의 단백질로 활용하고자 한다.

[0027] 상기 메로조이트 표면 단백질-9은 *Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium malariae* 등으로부터 유래한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서는 *Plasmodium berghei* ANKA 유래 메로조이트 표면 단백질-9를 바이러스-유사입자의 항원 결합 부위로 활용하였다.

[0028] 상기 말라리아의 바이러스-유사입자는 말라리아에서 유래한 항원 결정 부위로서 메로조이트 표면 단백질-9을 포함하고 있으나, 그 외에 유전 물질은 포함하지 않으므로 증식이 불가능하고 독성이 없어 안전하므로 말라리아에 대한 백신으로 사용할 수 있다. 상기 바이러스-유사입자의 표면에 도입된 항원 결정 부위는 순수하게 분리된 재조합 단백질에 비해 높은 항원성을 가지며 효과적인 중화항체를 형성할 수 있다.

[0029] 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 메로조이트 표면 단백질-9은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 메로조이트 표면 단백질-9은 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 기능적 동등물을 포함한 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "기능적 동등물"은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 2의 아

미노산 서열과 적어도 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 가장 구체적으로는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 가지는 단백질을 의미한다.

[0031] 본 발명에서 용어 "실질적으로 동등한 생리활성"은 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 메로조이트 표면단백질-9과의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자로서의 활성을 의미한다.

[0032] 보다 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 메트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열로 이루어지고, 상기 메로조이트 표면 단백질-9은 서열번호 4의 핵산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 예컨대, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 M1은 Genebank Accession No. ABO21712 또는 Genebank Accession No. EF467824 로 표현되는 유전자일 수 있다. 상기 메로조이트 표면 단백질-9은 Genebank Accession No. XP_022714061.1 또는 Genebank Accession No. XM_022858221.1로 표현되는 유전자일 수 있다.

[0033] 상기 바이러스-유사입자는 개체 내에서 항원으로 작용하며 수상돌기세포(dendritic cells)와 같은 항원 표지 세포와의 반응을 통해 T 또는 B 면역 세포에 항원을 표지할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 접종하여 IgG 항체가 형성됨을 확인하였으며(도 3), $CD4^+$, $CD8^+$ T 세포의 수가 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 4 내지 도 6). 특히, 치사량의 말라리아 원충을 감염시킨 마우스에 말라리아 바이러스-유사입자를 처리한 결과, 높은 수준의 기억 B 세포 군집이 형성됨을 확인하였다(도 7).

[0035] 본 발명의 일 실시예에서 상기 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 염증반응 및 기생충 증식 효과를 확인한 결과, 바이러스-유사입자 미접종 대조군에 비해 염증반응 및 기생충 증식이 현저히 감소됨을 확인하였다(도 8).

[0036] 본 발명의 일 실시예에서 상기 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 따라 마우스 생존율을 확인한 결과, 마우스의 체중변화율이 감소하는 반면, 마우스의 생존율은 바이러스-유사입자 미접종 대조군과 비교하여 현저히 증가함을 확인하였다(도 9)

[0037] 상기와 같은 결과는 본 발명의 바이러스-유사입자가 말라리아에 대한 높은 수준의 면역성을 제공할 수 있으며, 말라리아 감염에 대한 백신으로 활용할 수 있음을 시사한다.

[0038] 본 발명의 다른 측면은 상기 바이러스-유사입자를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0039] 상기 '바이러스-유사입자'에 관한 설명은 전술한 바와 동일하다.

[0040] 본 발명에서 “백신 조성물”은 백신 효과를 가지는 단백질 항원을 투여함으로써 이후의 병원균 감염을 예방할 수 있는 조성물을 의미한다. 상기 백신 조성물은 말라리아 원충에 대한 항원성을 나타내는 바이러스-유사입자를 포함하는 조성물일 수 있다.

[0041] 구체적으로, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 보조제, 면역 자극제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지되어있으며, 단백질, 설탕 등을 포함한다. 상기 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트를 포함한다. 수용액 담체는 식용수 및 완충배지를 포함하는 물, 알코올/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로오스, 덱스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 링거 덱스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제로서 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것을 추가로 포함할 수 있다. 방부제로는 포르말린 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 백신 조성물은 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용가능한 보조제는 프로인트 완전보존제, 프로인트 불완전보존제, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레시틴, 플루론 폴리올, 다가음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키홀림펫 헤모시아닌, 디니트로페

놀 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 상기 백신 조성물은 면역 자극제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 면역 자극제는 인공적으로 합성된 레바미솔, 이소프레노신 및 사이토카인을 포함할 수 있다. 사이토카인의 일 예로서 인터페론-α, 인터류킨-2, GM-CSF, G-CSF 등이 있다.

[0045] 상기 백신 조성물은 상기 바이러스-유사입자 또는 이의 농축액을 포함하는 형태이거나, 형질전환 숙주 세포 자체 또는 형질전환 세포의 건조 분말 형태로 사용할 수 있다. 또한, 상기 백신 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0046] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 바이러스 일부(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N-디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 제2보조제를 더 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 설치류 말라리아 원충(*Plasmodium berghei* ANKA strain)에서 유래한 메로조이트 표면 단백질-9 및 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 포함하는 바이러스-유사입자를 이용한 백신 조성물을 제조하여 말라이아 원충에 감염된 마우스에 투여한 결과, 항체 형성, T 세포 증식에 따른 면역성이 증가함을 확인하였으며(도 3 내지 6), 백신 조성물 투여 결과 말라리아 감염에 대한 생존율 또한 증가함을 확인하였다(도 8).

[0048] 상기 결과는 본 발명의 바이러스-유사입자를 포함하는 백신 조성물이 항체 형성 및 T 세포 증식을 통해 면역체계를 강화시킴으로써 말라리아 감염 예방에 활용할 수 있음을 시사한다.

[0049] 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.

[0050] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0051] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.

[0052] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 사용될 수 있다. 비수용성제제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 3으로 이루어진 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 말라리아 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터에 관한 것이다.

[0054] 본 발명에서 용어 “벡터”는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주 세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 고리형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

[0055] 본 발명에서 용어 “발현 벡터”는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터를 의미한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 플라스미드 및 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.

[0056] 상기 발현 벡터는 pET-3a-d, pET-9a-d, pET-11a-d, pET-12a-c, pET-14b, pET-15b, pET-16b, pET-17b, pET-

17xb, pET-19b, pET-20b(+), pET-21a-d(+), pET-22b(+), pET-23a-d(+), pET-24a-d(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28a-c(+), pET-29a-c(+), pET-30a-c(+), pET-30 Ek/LIC, pET-30 Xa/LIC, pET-31b(+), pET-32a-c(+), pET-32 Ek/LIC, pET-32 Xa/LIC, pET-33b(+), pET-34b(+), pET-35b(+), pET-36b(+), pET-37b(+), pET-38b(+), pET-39b(+), pET-40b(+), pET-41a-c(+), pET-41 Ek/LIC, pET-42a-c(+), pET-43.1a-c(+), pET-43.1 Ek/LIC, pET-44a-c(+), pFastBac, pRSETA, pRSETB, pRSETC, pESC-HIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAPα A, pGAPα B, pGAPα C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6α A, pPIC6α B, pPIC6α C, pPIC9K, pYC2/CT, pYD1 Yeast Display Vector, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPink™, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 또는 pYJ406일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 구체적으로, 상기 벡터는 바큘로바이러스(Baculovirus) 벡터일 수 있다. 상기 바큘로바이러스(Baculovirus)는 사람이나 척추동물에는 병원성이 없으며, 곤충에 대해서만 병원성을 가지고 있는 병원성 바이러스를 의미한다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에서는 바큘로바이러스 벡터 중 하나인 pFastBac vector에 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하여 말라리아 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제조하였다(도 2).

[0059] 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.

[0060] 상기 프로모터는 SBE4, 3TP, PAI-1, p15, p21, CAGA12, hINS, A3, NFAT, NFKB, AP1, IFNG, IL4, IL17A, IL10, GPD, TEF, ADH, CYC, INU1, PGK1, PHO5, TRP1, GAL1, GAL10, GUT2, tac, T7, T5, nmt, fbp1, AOX1, AOX2, MOX1 및 FMD1 프로모터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 숙주 세포 또는 발현 조건 등 다양한 변수를 고려하여 달리할 수 있다.

[0061] 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 암호화하는 핵산 서열은 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결될(operably linked) 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.

[0062] 상기 발현 벡터는 추가적인 조절 서열을 더 포함할 수 있다. 상기 조절 서열은 파지 MS-2의 레플리카아제 유전자의 샤인-달가노 서열 및 박테리오파지 람다의 cⅡ의 샤인-달가노 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 또한, 상기 발현 벡터는 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자 또는 형광 단백질 유전자일 수 있으며, 상기 항생제 저항성 유전자는 히그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 형광 단백질 유전자는 효모-강화 녹색 형광 단백질(yeast-enhanced green fluorescent protein, yEGFP) 유전자, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP) 유전자, 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein, BFP) 유전자 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0065] 본 발명에서 용어 “숙주 세포(host cell)”는 바이러스에 의해 감염될 수 있고 바이러스 유사 입자에 의해 면역될 수 있는 모든 유기체를 의미한다. 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 대사 조작될 수 있다.

[0066] 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포일 수 있다. 상기 적합한 숙주 세포는 자연적으로 발생하거나 또는 야생형 숙주 세포일 수 있고, 또는 변화된 숙주 세포일 수 있다. 상기 야생형 숙주 세포(wide-type host cell)는 재조합 방법에 의해 유전적으로 변화되지 않은

숙주 세포일 수 있다.

[0067] 본 발명에서 “형질 전환”은 상기 벡터를 미생물 또는 특정 세포 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 전환 대상 세포가 원핵세포인 경우에는, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법 및 전기 천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 형질 전환 대상 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 효모와 같은 진균의 형질 전환의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트 및 열 충격을 이용한 형질 전환법과 전기천공법에 의해 실시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명에서 용어 “대사 조작된(metabolically engineered)" 또는 "대사 조작(metabolic engineering)"은 미생물에서 단백질 또는 알코올과 같은 원하는 대사산물의 생산을 위하여 생합성 유전자, 오페론과 연관된 유전자, 그리고 이들 핵산 서열의 제어 요소(control elements)를 조작하거나 적절한 배양 조건을 이용함으로써, 전사(transcription), 번역(translation), 단백질 안정성(protein stability)과 단백질 기능성(protein functionality)의 조절과 최적화에 의한 대사 흐름(metabolic flux)의 최적화를 유도하는 것을 의미한다.

[0069] 예컨대, 대사 조작된 숙주세포는 유전적으로 설계된 숙주 세포를 의미하며, 여기서 목적 단백질은 발현의 수준으로 생성되거나 발현의 수준보다 더 큰 수준으로 생성되거나 본질적으로 동일한 성장 조건 하에서 성장하는 야생형 숙주 세포 내에서의 목적 단백질의 발현의 수준보다 큰 발현의 수준으로 발현될 수 있다.

[0070] 상기 숙주세포는 공학적 방법에 의해 형질 전환되어 특정의 유전자를 효율적으로 발현할 수 있으면 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 숙주세포는 곤충 세포일 수 있다.

[0071] 상기 곤충 세포는 유전자 발현을 위한 숙주 시스템으로서 개발되거나 시판되는 모든 세포가 사용될 수 있으며, 예컨대 스포도프테라 프루지페르다 곤충세포(*Spodoptera frugiperda*) SF21, SF9, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*), 안티카르사 겜미탈리스(*Anticarsa gemmitalis*), 봄빅스 모리(*Bombyx mori*), 에스티그멘 아크레아(*Estigmene acrea*), 헬리오티스 비레쎈스(*Heliothis virescens*), 류카니아 세파라타(*Leucania separata*), 리만트리아 디스파(*Lymantria dispar*), 말라카소마 디스스트리아(*Malacasoma disstria*), 맘메스트라 브라씨카에(*Mammestra brassicae*), 만두카 섹스타(*Manduca sexta*), 플루텔라 질로스텔라(*Plutella zylostella*), 스토도프테라 엑시구아(*Spodoptera exigua*) 및 스포도프테라 리톨리스(*Spodoptera littorlis*)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 구체적으로, 상기 곤충세포는 가을 거염벌레(*Spodoptera frugiperda*) 유래의 SF9 세포일 수 있다.

[0073] 본 발명의 일 실시예에서는 말라리아의 바이러스-유사입자 제조용 재조합 바큘로바이러스를 SF9 곤충 세포에 형질전환시켜, 형질전환된 숙주세포를 획득하였다.

[0074] 본 발명의 또 다른 측면은 (a) 서열번호 3으로 이루어진 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열번호 4로 이루어진 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제작하는 단계; (b) 상기 발현 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조하는 단계; (c) 상기 형질전환체를 숙주세포에 형질감염(transfection)시키는 단계; (d) 상기 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 그 배양물을 수득하는 단계; 및 (e) 상기 배양물로부터 바이러스 유사입자를 수득하는 단계로 이루어진 말라리아 바이러스-유사입자 제조방법에 관한 것이다.

[0075] 상기 바이러스-유사입자는 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으며, 별도의 원인 감염체, 즉 본 발명에서는 말라리아 원충 없이도 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으므로 높은 생산성 및 경제성이 구현될 수 있다.

[0076] 상기 바이러스-유사입자는 당해 기술 분야에 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 상기 구조 단백질 및 항원 인식 부위를 암호화하는 재조합 DNA 분자를 이용하여 소정의 숙주 세포를 형질 전환시킨 후 배양하여 제조될 수 있으며, 세포 안에서 발현된 단백질이 세포 표면에서 조립된 후 배양 상층액으로 배출될 수 있다. 이 때, 상기 바이러스-유사입자에 포함된 표면단백질은 고정화 과정을 거치지 않고 자연 그대로의 형태를 유지하고 있으므로 개체 내에서 특정 병원체에 대한 목적하는 면역반응을 유도할 수 있다.

[0077] 구체적으로, 상기 (a) 단계에서 메로조이트 표면 단백질-9을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 5 및 6의 핵산 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭되고, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 암호화하는 핵

산 서열은 서열번호 7 및 8의 핵산 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 것일 수 있다.

[0078] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 물질에 존재하는 핵산과 혼성화 되어 상기 표적 물질의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.

[0079] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 구체적으로는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있고, 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0080] 상기 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.

[0081] 상기 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862) 및 미국 특허 제 4458066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0082] 상기 형질 전환된 숙주 세포는 배치, 공급-배치 또는 연속 발효 조건 하에서 배양될 수 있으며, 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 발현할 수 있으므로 상기 배양된 숙주 세포로부터 상기 바이러스-유사입자 단백질을 수득할 수 있다.

[0083] 이 때, 배치 발효 방법은 폐쇄적인 시스템을 사용할 수 있고, 상기 배양 매질은 발효가 실행되기 전에 제조되며, 상기 매질에 유기체를 접종하고, 상기 매질에 어떠한 성분의 첨가도 없이 발효가 일어날 수 있다. 특정한 경우에서, 성장 매질의 상기 탄소원 내용물이 아닌, 상기 pH 및 산소 함량은 배치 방법 동안 변화될 수 있다. 배치 시스템의 상기 대사물 및 세포 바이오매스는 끊임없이 발효가 정지될 때까지 변화할 수 있다. 배치 시스템에서, 세포는 정지된 지체 상에서 고도성장 로그 상에 걸쳐 진척하고, 성장율이 감소되거나 멈춘 최종적으로 정지 상에 이를 수 있다. 일반적인 기간에서, 로그 상의 상기 세포는 대부분의 단백질을 만들 수 있다.

[0084] 배치 시스템은 "공급-배치 발효" 시스템으로 변형할 수 있다. 상기 시스템에서, 영양(예를 들면, 탄소원, 질소원, O_2 및 통상적으로, 다른 영양)은 이들의 배양물의 농도가 한계치 미만으로 떨어질 때 첨가될 수 있다. 공급-배치 시스템은 이화 생성물 억제가 세포의 대사를 억제하고, 매질이 매질 내에서 영양소를 제한된 양으로 갖는 것이 바람직할 때 유용할 수 있다, 공급-배치 시스템에서의 실제 영양 농도의 측정은 pH, 용존 산소 및 CO_2와 같은 폐기가스의 부분압과 같은 측정 가능한 인자의 변화에 기초하여 예측될 수 있다. 배치 및 공급-배치 발효는 일반적인 시스템으로서 당업계에 널리 알려져 있다.

[0085] 계속적 발효는 정의된 배양 매질이 계속해서 생반응기(bioreactor)에 첨가되고, 조건화된 매질의 동일한 양이 과정 동안 동시에 제거되는 개방 시스템이다. 계속적 발효는 일반적으로 세포가 처음에는 로그 상 성장에 있는 일정한 고 밀도의 배양물을 유지할 수 있다. 계속적 발효는 세포 성장 또는 마지막 생성물 농도에 영향을 미치는 하나의 인자 또는 임의의 수의 인자의 조작이 가능할 수 있다.

[0086] 예를 들어, 탄소원 또는 질소원과 같은 제한 영양소는 고정된 속도로, 모든 다른 파라미터는 적당하게 유지될 수 있다. 다른 시스템에서, 많은 성장에 영향을 주는 인자는 배지 탁도에 의해 측정되는 세포 농도가 일정하게 유지되는 동안, 계속해서 변화할 수 있다. 계속적 시스템은 일정한 상태의 성장 조건을 유지하려고 한다. 따라서, 매질이 빠져나가는 것에 의한 세포 손실은 발효에서의 세포 성장 속도에 대항하여 균형이 맞을 수 있다.

[0087] 본 발명의 일 실시예에서는 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 암호화하는 서열번호 3으로 이루어진 핵산 서열, 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9을 암호화하는 서열번호 4로 이루어진 핵산 서열을 이용하여 발현 벡터를 제조하였으며, 상기 발현 벡터를 SF9 곤충세포에 형질전환시킨 후, 배양하여 배양액으로부터 말라리아의 바이러스-유사입자를 획득하였다.

발명의 효과

[0088] 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자는 전통적인 백신과 달리 원인 감염체 없이 개발할 수 있으며, 비선택적인 항체 생성을 유도하지 않는다.

[0089] 또한, 상기 말라리아의 바이러스-유사입자는 체내 면역 체계를 활성화시켜 말라리아에 대한 면역 및 예방 효과를 제공할 수 있으므로, 내성을 유발하지 않고 안전하며 부작용이 최소화될 수 있다.

[0090] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0091] 도 1은 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자를 나타낸 것이다(A: 본 발명의 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1) 및 메로조이트 표면 단백질-9(merozoit surface protein-9, MSP-9)을 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자의 모형, B: 말라리아의 바이러스-유사입자를 전자현미경으로 관찰한 모습, C: 말라리아의 바이러스 유사입자를 말라리아 원충 감염 혈청 및 인플루엔자 M1 항체와 반응시킨 후의 웨스턴 블랏 결과).

도 2는 말라리아 바이러스 유사입자 백신 제조를 위해 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9을 pFastBac 벡터에 클로닝한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 말라리아 바이러스 유사입자 접종시 말라리아 특이적 항체인 IgG 형성 여부에 관한 ELISA 분석 결과를 나타낸 것이다(A: 1차 접종시 결과, B: 2차 접종시 결과).

도 4는 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 면역 반응 결과를 나타낸 것이다(A: $CD4^+$ T 세포의 수준 비교 B: $CD8^+$ T 세포의 수준 비교).

도 5는 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 기억 면역 T 세포($CD4^+$ T_{EM})의 군집을 유동세포 분석법을 통해 나타낸 것이다.

도 6은 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 기억 면역 T 세포($CD8^+$ T_{EM})의 군집을 유동세포 분석법을 통해 나타낸 것이다.

도 7은 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 기억 B 세포 군집을 유동세포 분석법을 통해 나타낸 것이다.

도 8은 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 염증반응 및 기생충 증식 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: 사이토카인 IFN-gamma 수치, B: 기생충 증식 여부)

도 9는 말리라이 원충 감염후 말라리아의 바이러스-유사입자 처리에 따른 마우스 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: 마우스의 체중 변화, B: 마우스의 생존율 변화)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0092] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0093] **실시예 1. 말라리아의 바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs) 제조용 벡터의 제조**

[0094] 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질-9을 포함하는 바이러스-유사입자를 제조하기 위해, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 설치류 말라리아(*Plasmodium berghei* ANKA)의 메로조이트 표면 단백질-9(merozoit surface protein-9, MSP-9)의 일부를 항원 유전자로 선정하였다.

[0095] 상기 말라리아의 메로조이트 표면 단백질-9(MSP-9) 항원 유전자는 서열번호 5의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머(5'-AAA GAATTC atgaagataa gtatcgtggc a-3') 및 서열번호 6의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머(5'-TTA AAGCTT ttatgcttgg tttggagctg g-3')를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 상기 프라이머는 밑줄로 표시된 부분에 제한 효소 부위(EcoRI 및 HindIII)를 각각 도입하였다.

[0096] 이후 상기 프라이머를 cDNA 주형으로 하여 증폭된, 메로조이트 표면 단백질-9(MSP-9) 항원을 암호화하는 서열은

pFastBac 벡터(Invitrogen)에 도입하였다.

[0097] 한편, 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 인플루엔자 A/PR/8/34 바이러스에서 유래한 것으로서, 서열번호 7의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머(5'-TCCCCCGGGCCACCATGAGCCTTCTGACCGAGGTC-3') 및 서열번호 8의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머(5'-TTACTTCTAGATTACTTGAACCGTTGCATCTG-3')를 이용하여 RT-PCR을 통해 증폭하였다. 상기 프라이머는 밑줄로 표시된 부분에 제한 효소 부위(SmaI 및 XbaI)를 각각 도입하였다. 이후 A/PR/8/34 바이러스를 MDCK 세포에 접종하였고, RNeasy Mini kit를 통해 바이러스성 RNA를 추출하였다.

[0098] 상기 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 한국 공개특허 10-2019-0009691호에 기재된 M1 유전자와 동일한 서열을 사용하였다(GenBank accession number: EF467824, 1027bp).

[0099] 상기 프라이머를 이용하여 증폭시킨 인플루엔자 M1 단백질 유전자를 앞서 메로조이트 표면 단백질-9(MSP-9) 암호화 서열이 도입된 pFastBac 벡터에 도입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다. 이때, 상기 pFastBac 벡터에 도입된 서열번호 3의 M1 및 서열번호 4의 MSP-9 유전자가 제대로 도입되었는지를 DNA 염기서열 결정법에 의해 확인하였다.

[0100] MSP-9 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(recombinant BaculoViruses, rBVs)를 제조하기 위하여, cellfectin Ⅱ(Invitrogen) 및 SF9 세포를 이용하여 DNA 형질 감염을 수행하였다. MSP-9 및 M1을 포함하는 pFastBac 벡터를 이용한 형질 전환은 white/blue 스크리닝에 의해 수행되었다. 재조합 바큘로바이러스는 Bac-to-Bac 발현 시스템(Invitrogen)를 통해 제조사의 매뉴얼에 따라 제조되었다.

[0101] **실시예 2. 말라리아의 바이러스-유사입자의 제조**

[0102] 2-1. 말라리아의 바이러스-유사입자의 제조

[0103] 말라리아의 바이러스-유사입자는 MSP-9 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(rBVs)에 의해 공동-감염된 SF9 곤충 세포에서 생산하였다. 상청액 내의 바이러스-유사입자는 고속원심분리(30분, 45,000 x g)를 사용해 펠렛화하였다.

[0104] 바이러스-유사입자를 4℃에서 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 동안 재현탁하였고, 불연속 수크로오스 구배(20-30-60%)를 통해 4℃, 45,000 x g에서 1 시간 동안 수확하고 정제하였다. 단백질 농도는 QuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich)에 의해 결정하였다.

[0105] 2-2. 말라리아의 바이러스-유사입자 확인

[0106] 상기 2-1에서 제작한 바이러스-유사입자를 전자현미경법 및 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다

[0107] 먼저, 혈청은 말라리아 ANKA 균주에 의해 감염된 4주 후 BALB/c 마우스로부터 수집하였다. 전자현미경법 및 이를 이용한 사이즈 측정을 위해 바이러스-유사입자를 매질 염색하였으며, 투과전자현미경(TEM)을 통해 관찰하였다(CANADA, ALBERTA).

[0108] 또한, 웨스턴 블랏 분석에서, 마우스 혈청을 이용하여 MSP-9 단백질을 탐침하였다. 구체적으로, SDS-PAGE를 위해 40 μg, 8 μg, 1.6 μg의 말라리아의 바이러스-유사입자를 각각 로딩하였으며, 프로브(probe)로서 말라리아 원충 감염 혈청 및 항-M1 단일클론 항체를 사용하였다.

[0109] 그 결과, 전자현미경에 의해 바이러스-유사입자를 생산하는 SF9 세포는 대조군인 정상 세포보다 큰 것으로 확인되었고, 바이러스-유사입자의 형태는 표면에 스파이크가 형성된 비정형의 구 형태로 관찰되었다(도 1B). 또한, 웨스턴 블랏 분석 결과, MSP-9 및 M1의 바이러스-유사입자가 제대로 도입되었음을 확인하였다(도 1C).

[0110] 상기 결과를 통해, MSP-9 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(rBVs)에 의해 감염된 SF9 세포는 비리온과 형태 및 크기가 유사한 입자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0111] **실험예 1. 동물모델에서의 면역 유도 활성 시험**

[0112] 본 발명의 바이러스-유사입자를 마우스에 접종 후 유도되는 면역 반응을 확인하였다.

[0113] 먼저, 7주령의 암컷 BALB/c 마우스를 이용하여 바이러스-유사입자를 근육접종(Intramuscular route) 시킨 후, 마우스로부터 정해진 시기에 혈액을 수집하여 ELISA법을 통해 혈청의 말라리아 특이적 IgG 항체의 형성 정도를 측정하였다.

[0114] 구체적으로, 말라리아 특이적 항체를 측정하기 위해, 96 웰 면역 플레이트(SPL Life Science, Korea)에 불활성

화된 말라리아 원충 *Plasmodium berghei* ANKA의 항원을 웰당 최종 농도 4 μg/mL인 0.05 M, pH 9.6의 카르보네이트 바이카르보네이트 완충제(carbonate bicarbonate buffer)와 함께 4℃에서 밤새 코팅하였다. MSP-9 특이적 IgG 항체 반응은 100 mL의 MSP-9 바이러스-유사입자로 면역화된 마우스의 혈청 샘플(PBST에 1 : 100의 비율로 희석)을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. PBS(100 μL/well)로 희석된 HRP-접합된 염소 항 마우스 IgG 항체를 37℃에서 2차 항체로 추가하였다.

[0115] 그 결과, 상기 바이러스-유사입자의 접종에 의해 면역성이 형성된 마우스의 총 IgG 반응은 1차 접종 후 현저히 상승하였으며, 특히 2차 접종 후에 증가량이 뛰어난 것을 확인하였다(도 3). 이러한 결과로부터 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자를 접종함으로써 말라리아 MSP-9 특이적 항체가 점진적으로 성숙된다는 사실을 확인하였다.

[0116] 상기 실험 결과는 본 발명의 바이러스-유사입자가 말라리아에 대한 높은 면역성을 제공하고, 말라리아의 감염에 반응하여 조직 계통의 항체 반응을 효과적으로 유도할 수 있음을 시사한다.

[0117] **실험예 2. 항체-분비 세포(B 세포) 반응, T 세포 반응 시험**

[0118] 본 발명의 바이러스-유사입자를 마우스에 접종에 따른 항체-분비 세포 반응을 유세포 분석법을 통해 확인하였다.

[0119] 먼저, 면역화를 위하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 이용하여 바이러스-유사입자 백신을 2번 접종시켰다. 2차 면역화(boost immunization)한 지 4주 후에, 말라리아 원충(*Plasmodium berghi* ANKA)을 치사량 감염시켰다. 말라리아 원충을 감염시킨(challenge infection) 마우스를 6일 후 희생시켰다. 말라리아에 의해 감염된 비장세포를 염색 완충액(0.1M PBS 중 2% 소혈청알부민 및 0.1% 소듐아자이드)과 Fc 블록(BD Biosciences, CA, USA)을 4℃에서 15분 동안 함께 배양하였다. 표면 항원 염색을 위해, 세포를 4℃에서 30분 동안 형광단에 콘주게이트된 항체(BD Bioscience)와 함께 배양하였다. 사용된 항체는 다음과 같다: PE-Cy7-conjugated anti-CD3e (145-2C11), PE-conjugated anti-CD4 (RM4-5), FITC or PE-conjugated anti-CD8a (53-6.7), PE-conjugated anti-CD44 (IM7), APC-conjugated anti-CD62L (MEL-14), FITC-conjugated anti-B220 (RA3-6B2), PE-conjugated anti-IgG1 (A85-1), PE-Cy7-conjugated anti-CD27 (LG.3A10). 이후 비장세포를 염색 완충액으로부터 세척하고 BD Accuri C6 유세포 분석기(BD Biosciences)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0120] 그 결과, 바이러스-유사입자의 접종에 의해 면역력이 형성된 마우스의(Imm+Cha)경우, 바이러스-유사입자를 처리하지 않은 마우스(Naïve) 대비 현저히 증가한 $CD4^+$ T세포 수준(도 4A) 및 $CD8^+$ T세포 수준(도 4B)을 보이는 것을 확인하였다.

[0121] 또한 기억 면역 T세포($CD4^+$ T_{EM}, $CD8^+$ T_{EM})의 군집 형성 또한 바이러스-유사입자 접종에 따라 증가함을 확인하였으며(도 5 및 도 6), 기억 B세포 군집 형성 또한 현저히 증가함을 확인하였다(도 7).

[0122] 상기와 같은 결과는 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 마우스는 말라리아의 감염에 대한 매우 높은 수준의 면역성을 획득할 수 있으며, 재감염에 대한 방어 면역 형성능 또한 우수하여, 말라리아 감염에 대한 백신으로 활용할 수 있음을 시사한다.

[0123] **실험예 3. 바이러스-유사입자 접종에 의한 백신 방어효능 확인**

[0124] 면역화를 위하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 이용하여 바이러스-유사입자 백신을 2번 접종시켰다. 2차 접종 4주 후 말라리아 원충(*Plasmodium berghi* ANKA) 치사량을 감염시켰다.

[0125] 먼저, 감염 6일째 마우스로부터 비장을 수집하여 RPMI 1640 배지(10% FBS 포함)에서 비장세포를 분리하였다. PBS 100 μL 내의 항-마우스 감마 인터페론(IFN-γ 포획 항체(BD Bioscience) 400 ng/well 으로 96 웰 플레이트를 4℃에서 하룻밤 동안 코팅하였다. Assay diluent (BD bioscience, CA, USA) 100 μL로 1시간 동안 25℃에서 블록킹한 후 PBS 0.01% Tween 20으로 플레이트를 3회 세척하였다. 이어, 비장세포를 분리한 배지 용액만 웰 당 100 μL (assay diluent에 1:1, 1:4, 1:49 비율로 희석) 첨가한 후 25℃에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. PBS0.01% Tween 20으로 플레이트를 3회 세척한 후, detection antibody와 SAv-HRP conjugated 항체를 웰 당 100 μL 첨가하고 25℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS 0.05% Tween 20로 5회 세척한 후, 플레이트에 TMB 기질 시약(BD Biosciences, CA, USA) 100 μl를 첨가하고 10분 동안 반응시켰다. 플레이트에 50 μL의 2N 황산을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 플레이트는 ELISA 리더에서 490 nm에서 측정하였다. 또한 감염시킨 마우스로부터 혈액을 수집하여 기생충 증식율을 확인하였다. 말라리아 원충(*Plasmodium berghi* ANKA) 감염 6일째, 모

든 마우스로부터 혈액을 수집한 후, 2 μL의 혈액을 PBS 100 μL에 첨가하고 1 μL의 염색시약 (SYBR green, ThermoFisher)을 첨가 후 30분동안 37℃에 배양하였다. 배양 후, 400 μL의 PBS를 첨가한 후 BD Accuri C6 유세포 분석기(BD Biosciences)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 희생하지 않은 나머지 마우스는 생존율을 확인하기 위해 매일 몸무게를 측정하고 관찰하였다.

[0126] 그 결과, 바이러스-유사입자를 처리한 결과 염증성 사이토카인의 일종인 인터페론 감마의 방출량이 바이러스-유사입자 미처리한 대조군에 비해 감소됨을 확인하였으며, 기생충혈증(Parasitemia) 또한 현저히 감소함을 확인하였다(도 8).

[0127] 나아가, 말라리아 원충을 감염시킨 마우스에 바이러스-유사입자를 처리한 경우 면역성이 형성됨으로써 생존율이 바이러스-유사입자를 처리하지 않은 마우스에 비해 생존율이 6일이상 증가함을 확인하였다(도 9).

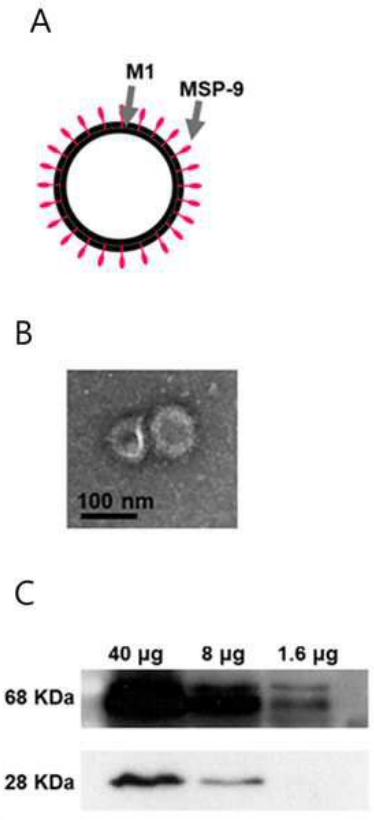
[0128] 상기와 같은 결과는 본 발명의 바이러스-유사입자가 말라리아 감염에 대한 방어적 면역 효과를 유도함으로써, 말라리아 감염 예방 및 치료를 위한 백신에 활용할 수 있음을 시사한다.

[0129] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

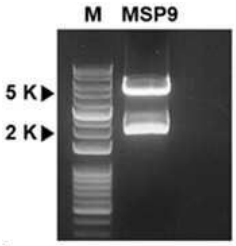
[0130] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

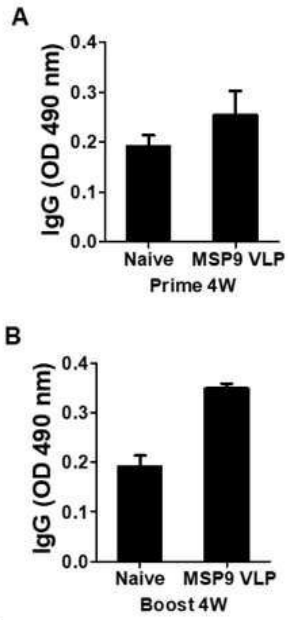
도면1



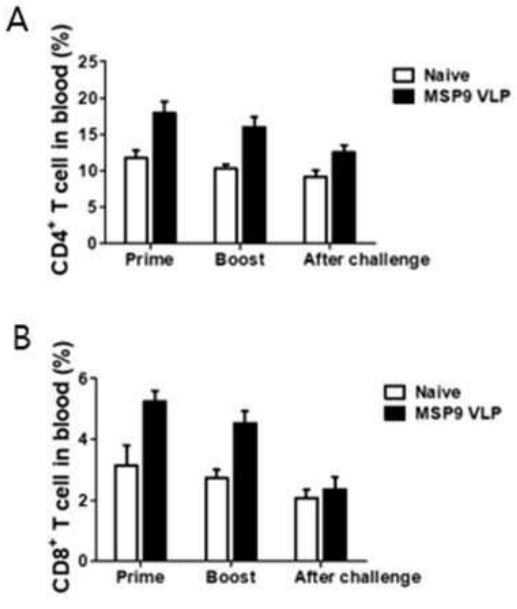
도면2


M
MSP9
5 K
2 K

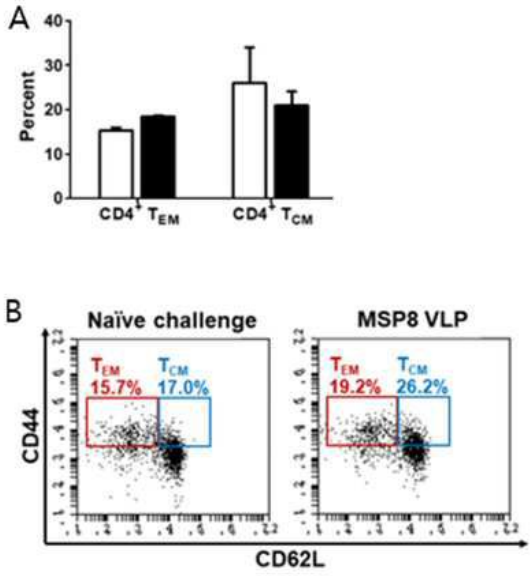
도면3


A
IgG (OD 490 nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Naive
MSP9 VLP
Prime 4W
B
IgG (OD 490 nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Naive
MSP9 VLP
Boost 4W

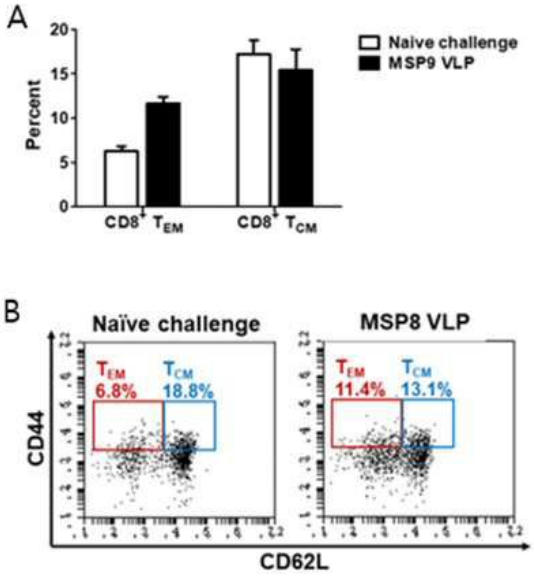
도면4


A
CD4+ T cell in blood (%)
25
20
15
10
5
0
Naive
MSP9 VLP
Prime
Boost
After challenge
B
CD8+ T cell in blood (%)
6
4
2
0
Naive
MSP9 VLP
Prime
Boost
After challenge

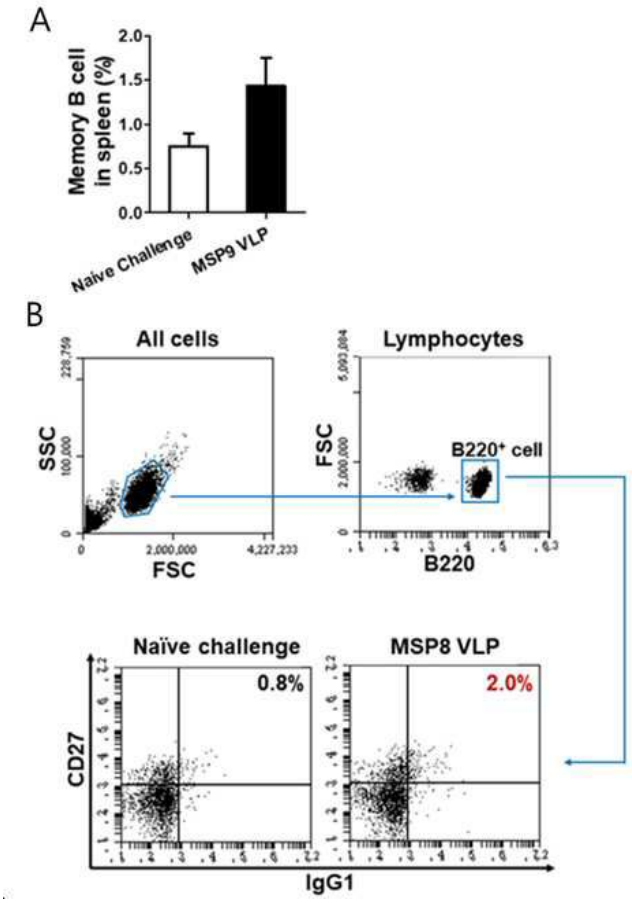
도면5


A
Percent
40
30
20
10
0
CD4+ TEM
CD4+ TCM
B
Naïve challenge
MSP8 VLP
TEM
15.7%
TCM
17.0%
TEM
19.2%
TCM
26.2%
CD44
CD62L

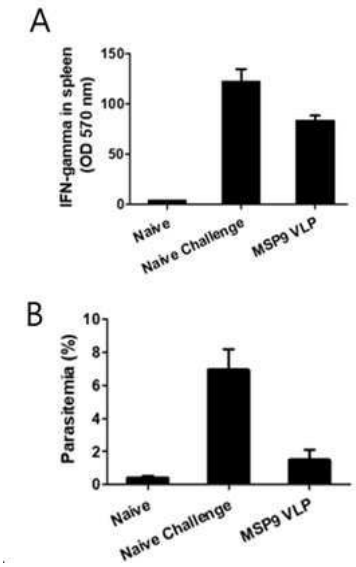
도면6


A
Percent
20
15
10
5
0
Naive challenge
MSP9 VLP
CD8+ TEM
CD8+ TCM
B
Naïve challenge
MSP8 VLP
TEM
6.8%
TCM
18.8%
TEM
11.4%
TCM
13.1%
CD44
CD62L

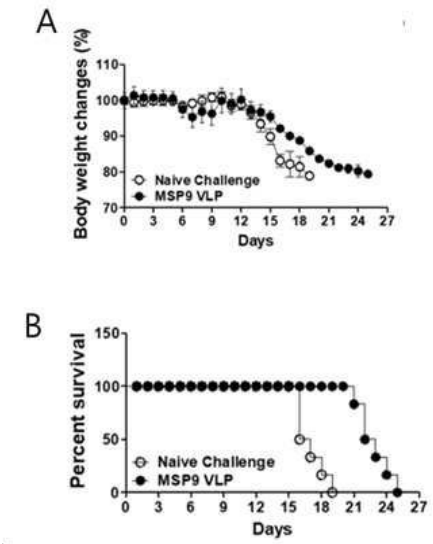
도면7


A
Memory B cell in spleen (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Naive Challenge
MSP9 VLP
B
All cells
SSC
FSC
2,000,000
4,227,233
Lymphocytes
FSC
B220+ cell
B220
Naïve challenge
0.8%
MSP8 VLP
2.0%
CD27
IgG1

도면8


A
IFN-gamma in spleen (OD 570 nm)
150
100
50
0
Naive
Naive Challenge
MSP9 VLP
B
Parasitemia (%)
10
8
6
4
2
0
Naive
Naive Challenge
MSP9 VLP

도면9



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> VIRUS-LIKE PARTICLES COMPRISING THE MEROZOIT SURFACE PROTEIN OF MALARIA PROTOZOA, AND VACCINE COMPOSITIONS USING THE SAME

<130> 19PP31250

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) matrix protein 1

<400> 1

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val

65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala

85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala

100 105 110

Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met

115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe

130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg

145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu

165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met

180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln

195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser

210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr

225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys

245 250

<210> 2

<211> 618

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> merozoite surface protein 9, putative [Plasmodium berghei ANKA]

<400> 2

Met Lys Ile Ser Ile Val Ala Phe Pro Leu Leu Met Ile Ala Leu Arg

1 5 10 15

Ser Lys Ser Thr Asn Ala His Lys Thr Asn Asn Leu Glu Ala Gln Ile

20 25 30

Asn Tyr Gly Ile Ile Asn Asn Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Val Ala Lys

35 40 45

Cys Gln Tyr Cys Leu Thr Thr Thr Asn Pro Val Glu Glu Glu Asn Cys

50 55 60

Asp Glu Ile Met Glu Glu Cys Arg Gly Leu Leu Ser Asn Lys Asp Leu

65 70 75 80

Gly Phe Leu Leu Lys Ala Ile Thr Asp Glu Ser Met His Asn Lys Ser

85 90 95

Gln Tyr Ile His Gly Lys His Ser Asn Thr Leu Arg Arg Ile Ile Lys

100 105 110

Val Leu Glu Ala Gln Lys Lys Asn Ile Glu Ser Val Lys Asn Ile Val

115 120 125

Arg Asp Ile Lys Lys Ser Gly Asn Thr Gln Leu Arg Ser Ser Gly Thr

130 135 140

Ser Ile Ser Asp Leu Asp Lys Leu Asn Thr Ser Ile Lys Asn Ile Lys

145 150 155 160

Lys Gly Phe Gln Phe Leu Asn Asp Asn Tyr Ser Thr Ile Asn Lys His

165 170 175

Ile Asn Ile Pro Ser Gly Asp Met Asn Lys Ile Tyr Lys Arg Ile Val

180 185 190

Asn Thr Asn Asn Phe Asp Gly Leu Ser Lys Ser Gln Glu Lys Ile Cys

195 200 205

Ser Asn Glu Asp Asp Thr Asn Val Gly Ile Asp Asp Ile Ile Lys Ser

210 215 220

Ser Val Gln Asp Ile Phe Asp Glu Gly Glu Asn Ile Met Asn Val Val

225 230 235 240

Lys Thr Val Leu Val Gln Glu Ser Asp Gly Ile Gly Asn Glu Leu Ala

245 250 255

Gly Leu Ile Glu Lys Gly Lys Glu Ile Gly Glu Gln Ile Val Asn Ile

260 265 270

Glu Gly Leu Leu Ser Pro Lys Asn Gly Leu Phe Ser Gly Gly Leu Pro

275 280 285

Ser Leu Asn Lys Leu Tyr Glu Phe Thr Ser Asn Leu Ser Ser Tyr Glu

290 295 300

Tyr Leu Leu Val Lys Leu Lys Asp Ser Ile Ile Ser Lys Leu Lys Asp

305 310 315 320

Ile Leu Leu Arg Leu Leu Tyr Lys Ser Tyr Ile Thr Tyr Arg Lys Asn

325 330 335

Lys Ser Ile Glu Leu Gly Glu Glu Glu Ile Pro Met Val Ser Lys Asp

340 345 350

Glu Tyr Leu Asp Glu Leu Lys Lys Gly Val Ile Gln Leu Ser Met Lys

355 360 365

Leu Leu Tyr Ser Lys Ile Lys Arg Leu Leu Ile Lys Ile Lys Asn Lys

370 375 380

Met Ser Arg Lys Lys Lys Thr Glu Asn Ile Pro Asp Pro Leu Pro Val

385 390 395 400

Glu Ser Ser Ile Tyr Asp Tyr Asp Asp Asp Asp Ala Ile Val Asp Asp

405 410 415

Thr Ala Asp Asp Asp Ala Ala Asp Asp Asp Val Ala Asp Asn Asp Lys

420 425 430

Phe Ile Ser Phe Asn Lys Ser Ser Ser His Met Lys Leu Phe Arg Gly

435 440 445

Ile Leu Pro Gln Lys Lys Ser Ile Val Ser Thr Ile Asp Lys Met Ile

450 455 460

Ser Glu Ile Asp Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Tyr Thr Asp Thr His Ala

465 470 475 480

Asp Tyr Glu Asn Asp Glu Ile Leu Ser Thr Val Glu Gly Met Asp Glu

485 490 495

Thr Glu Ser Asp Glu Ala Glu Leu Ser Asn Glu Cys Val Gln Lys Ile

500 505 510

Ile Asp Glu Asn Ile Ala Val Glu Ala Ile Asn Asn Leu Leu Lys Val

515 520 525

Asp Glu Ser Ala Val Glu Glu Arg Glu Asn Val Asn Asp Ser Glu Asn
530 535 540
Lys Ser Asn Asn Ser Ser Ile Asp Ile Glu Lys Gly Ala Ser Thr Pro
545 550 555 560
Ser Asp Ile Ser Glu Ile Pro Asn Ile Ile Lys Lys Ile Val Ile Tyr
565 570 575
Val Ile Lys Glu Arg Ile Tyr Asp Leu Ala Glu Glu Leu Ser Asp Asn
580 585 590
Lys Leu Glu Asp Glu Ser Lys Thr Ser Thr Pro Ser Asn Asn Ile Ile

595 600 605
Leu Glu Asp Thr Pro Ala Pro Asn Gln Ala
610 615

<210> 3
<211> 1027
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Influenza virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) matrix protein 1
<400> 3

agcgaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact 60
ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt 120
tgcagggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct 180

gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg 240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa 300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc 360
caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata 420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga 480
acagattgct gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact 540
aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat 600

ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagtcagg ctagacaaat 660
ggtgcaagcg atgagaacca ttggaactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga 720

tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa 780

gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc 840

ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc 900

cttctacgga aggagtgcca aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg 960

ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt 1020

ttctact 1027

<210> 4

<211> 1857

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 9, putative

<400> 4

atgaagataa gtatcgtggc attcccttta cttatgattg ctctcagaag caaatctacc 60

aatgctcata aaacaaataa tttggaagcc caaattaatt atggtattat aaataattat 120

aacgaattgt taaaagtagc aaaatgccaa tattgcttaa ctaccaccaa tcctgttgaa 180

gaagaaaatt gtgatgaaat aatggaagaa tgtagaggat tgttaagcaa taaagacctt 240

ggatttttat taaaagccat aacagatgag tctatgcata ataaatctca atatattcat 300

ggaaaacata gtaatacatt aagaagaatt attaaagttt tagaagcaca aaaaaaaaat 360

attgaatcag taaaaaatat tgtacgtgat attaaaaaaa gtggtaatac acagttaaga 420

agtagtggta caagtatttc agatttagat aaattaaaca caagcattaa aaatataaaa 480

aaaggtttcc aatttttaaa tgataattac agcacaatta ataaacacat aaatatacca 540

agtggtgata tgaataaaat ttataaaaga atagtaaaca caaataattt tgatgggtta 600

tcaaaatcac aagaaaaaat ttgttcaaat gaagacgaca ccaatgtagg tattgatgat 660

attataaaat caagtgttca agatattttt gatgagggag aaaatataat gaatgtagtt 720

aaaactgttt tagtacaaga aagtgatgga attggaaatg aattagcagg gttaattgaa 780

aaaggaaaag aaatcggaga acaaattgta aatattgaag gattgttatc tccaaaaaat 840

ggattattta gtggcggttt accatcatta aataagttgt atgaatttac aagtaattta 900

tcatcttatg aatatttgtt agttaagctc aaagattcaa taatatcaaa attaaaagac 960

atattattaa gattgttata taaatcatat ataacttaca gaaaaaataa atcaattgag 1020

ttaggagaag aagaaatacc aatggttagc aaggatgaat atttagatga attaaaaaaa 1080

ggtgtaatac aattaagtat gaaattatta tatagcaaaa tcaaaaggtt attaattaaa 1140

attaaaaaca aaatgtcccg taaaaagaaa acggaaaata ttcctgaccc attaccagtt 1200

gaatcctcaa tttatgatta tgatgatgac gatgcaattg tcgacgatac agctgatgat 1260

gatgcagctg atgatgatgt agctgataat gataaattta tttcatttaa taaatcctcg 1320

tcacatatga aattattcag aggtattttg ccccagaaaa aatctattgt atctaccatc 1380

gataagatga ttagtgaaat cgatttatat gaacaaggat tatatactga tacacatgca 1440

gattatgaaa acgatgaaat cttatctact gtcgaaggta tggatgaaac agaatctgat 1500

gaagctgaat tgtcaaatga gtgtgttcag aaaattatcg atgaaaacat tgccgtagaa 1560

gctatcaaca atttacttaa agtcgatgaa tctgcagtag aggaaaggga aaatgtaaat 1620

gattcagaaa ataaatcaaa taattcatcc attgacattg aaaagggtgc tagtactcct 1680

agtgacattt cagaaattcc taacatcata aaaaaaatcg ttatatatgt tataaaagaa 1740

agaatatatg atttagcaga agaattatca gacaataaac tcgaggatga atctaaaaca 1800

tcaacacctt caaacaatat aatcctagaa gatacaccag ctccaaacca agcataa 1857

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSP-9_forwardprimer

<400> 5

aaagaattca tgaagataag tatcgtggca 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSP-9_reverseprimer

<400> 6

ttaaagcttt atgcttggt ttggagctgg 30

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M1_forwardprimer

<400> 7

tcccccgggc catgagcctt ctgaccgagg tc 32

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M1_reverseprimer

<400> 8

ttatctagat tagtagaaac aaggtagt 28