



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0084420
(43) 공개일자 2023년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/215 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/215 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0166441
(22) 출원일자 2022년12월02일
심사청구일자 2022년12월02일
(30) 우선권주장
1020210172126 2021년12월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
윤원석
서울특별시 성북구 고려대로17가길 64(안암동1가, 래미안 안암)
(74) 대리인
특허법인 무한

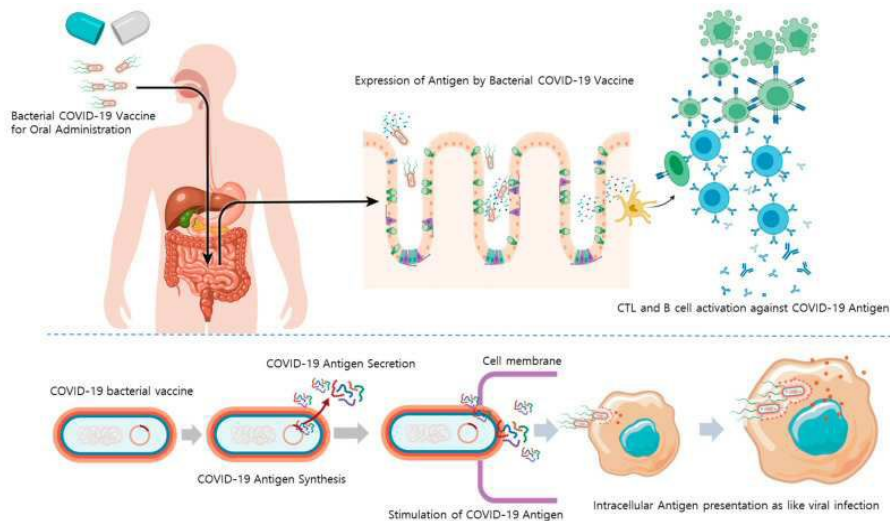
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **약독화 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주를 포함하는 코로나바이러스 감염증용 경구백신조성물**

(57) 요약

본 발명은 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물에 관한 발명으로, 구체적으로는 SipB160서열 및 스파이크 단백질을 포함하는 항원서열이 도입된 플라스미드 벡터로 형질전환된 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주인 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 재조합 균주를 경구투여시 효과적으로 항체를 생성하며 항원특이적 T 세포의 활성화와 CTL 반응을 유도하고 인터페론감마와 같은 항바이러스 면역반응을 유도할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

A61K 2039/522 (2013.01)

A61K 2039/523 (2013.01)

A61K 2039/542 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

C12R 2001/42 (2021.05)

명세서

청구범위

청구항 1

약독화된 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물로서,

상기 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주는 SARS-CoV-2의 외피단백질, 베타코로나바이러스 NS7A단백질 및 스파이크단백질 중 선택되는 어느 하나 이상의 항원을 발현하는 것을 특징으로 하는, 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주는 SARS-CoV-2의 외피단백질, 베타코로나바이러스 NS7A단백질 및 스파이크단백질 중 선택되는 어느 하나 이상을 암호화하는 서열이 도입된 플라스미드 벡터로 형질전환된 것인, 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 플라스미드 벡터는 pET14b 벡터에서 프로모터가 lac 프로모터로 치환되고, sipB160을 암호화하는 서열이 도입된 것을 특징으로 하는, 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 플라스미드 벡터는 스파이크 단백질을 발현하는 pKU-Ag.e.spike 벡터인 것을 특징으로 하는, 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 균주는 살모넬라 티피뮤리움 BRD509인 것을 특징으로 하는, 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 재조합균주 및 이를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방용 백신 조성물로서 경구투여가 가능한 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

코로나바이러스 감염증 2019(COVID-19)는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 의해 유발되는 새로운 호흡기 감염 질환이다. 2019년 12월 중국 우한에서 퍼졌고 현재 범유행(pandemic)을 일으키고 있으며 전 세계적으로 심각한 건강 위기를 초래하고 있다. 2022년 11월을 기준으로 전 세계적으로 6억 4100만 명 이상의 코로나19 확진자와 660만 명 이상의 사망자가 기록되었다.

- [0004] 새로운 SARS-CoV-2는 11개월 동안 216개국에 빠르게 확산되어 4,500만 명 이상의 사람들에게 영향을 미치고 전 세계적으로 1~3%의 사망률을 보여주었다. 현재 COVID-19에 대해 완전히 효과적인 치료법은 존재하지 않고, 따라서 이 질병에 대한 빠른 백신 개발에 관한 수요는 지속적으로 제기되고 있다.
- [0005] 현재까지 COVID-19 백신은 다양한 백신 플랫폼을 사용하여 설계되었지만 단 하나의 mRNA 기반 백신(Pfizer 및 BioNTech)만 미국 식품의약국의 승인을 받았으며 다른 백신 유형은 아직 임상실험 단계에 있다. 후보 백신을 설계하기 위한 플랫폼으로 약독화 생백신, mRNA 백신, DNA, 서브유닛, 및 바이러스 벡터 기반 백신등이 제안되고 있다. 약독화 생백신은 오래 지속되는 중화 항체 생산 및 면역 반응을 보장하는 가장 효과적인 플랫폼이었으나 전달미생물의 독성이 되살아나는 것에 대한 우려가 있으며, DNA, mRNA 및 소단위 백신 플랫폼은 약독화 생백신 보다 상대적으로 안전하지만 면역 반응을 촉진하는 능력이 떨어진다.
- [0006] 현재 백신 플랫폼은 스파이크(S) 단백질을 SARS-CoV-2 중화 항체 생산을 위한 항원으로 사용하고 있다. S 단백질은 체액 및 세포 면역 반응을 유발할 수 있으므로 좋은 항원성을 보여준다. 그러나 COVID-19의 정확한 분자 및 세포 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았으며, 최근 보고서에 따르면 E 단백질 및 ORF7a 부속 단백질과 같은 다른 바이러스 단백질도 중요한 역할을 할 수 있음이 보고되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 다양한 실시예들에 따르면, 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물로서, SARS-CoV-2의 항원을 발현하는 백신 조성물이 제공된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물로서, 상기 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주는 SARS-CoV-2의 외피단백질, 베타코로나바이러스 NS7A단백질 및 스파이크단백질 중 선택되는 어느 하나 이상의 항원을 발현하는 것을 특징으로 하는, 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물이 제공된다.
- [0011] 일 측에 따르면, 상기 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주는 SARS-CoV-2의 외피단백질, 베타코로나바이러스 NS7A 단백질 및 스파이크단백질 중 선택되는 어느 하나 이상을 암호화하는 서열이 도입된 플라스미드 벡터로 형질전환될 수 있다.
- [0012] 일 측에 따르면, 상기 플라스미드 벡터는 pET14b 벡터에서 프로모터가 lac 프로모터로 치환되고, sipB160을 암호화하는 서열이 도입될 수 있다.
- [0013] 일 측에 따르면, 상기 플라스미드 벡터는 스파이크 단백질을 발현하는 pKU-Ag.e.spike 벡터일 수 있다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 균주는 살모넬라 티피뮤리움 BRD509일 수 있다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따른 백신조성물은 약독화된 재조합 살모넬라 티피뮤리움 균주를 사용함으로써, 경구투여시 효과적으로 항체를 생성하며 항원특이적 T 세포의 활성화와 CTL 반응을 유도하고 체내축적을 방지할 수 있으며, 인터페론감마와 같은 항바이러스 면역반응을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 경구투여된 재조합 균주 생백신의 작용방식을 도식화한 것이다.
- 도 2는 스파이크 단백질을 항원으로 발현하는 살모넬라 티피뮤리움 균주의 구성을 나타낸다.

도 3은 재조합 살모넬라 티피뮤리움 균주의 웨스턴블랏 결과를 나타낸다.

도 4는 스파이크단백질 항원을 발현하는 살모넬라 티피뮤리움 균주의 in vitro 및 in vivo 실험결과이다.

도 5는 스파이크단백질 항원을 발현하는 살모넬라 티피뮤리움 균주를 경구투여한 마우스의 체중변화를 나타낸 것이다.

도 6은 스파이크단백질 항원을 발현하는 살모넬라 티피뮤리움 균주를 경구투여한 마우스의 사이토카인 발현을 나타낸 것이다.

도 7은 스파이크단백질 항원을 발현하는 살모넬라 티피뮤리움 균주를 경구투여한 마우스의 항체역가와 CTL 활성을 나타낸 것이다.

도 8은 스파이크단백질 항원을 발현하는 살모넬라 티피뮤리움 균주를 경구투여한 마우스의 항체역가와 T세포 활성화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 다양한 실시 예들에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0020] 명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다. 또한, 명세서에 기재된 "...부", "...모듈" 등의 용어는 적어도 하나의 기능이나 동작을 처리하는 단위를 의미하며, 이는 하드웨어 또는 소프트웨어로 구현되거나 하드웨어와 소프트웨어의 결합으로 구현될 수 있다.
- [0021] 아래에서는 첨부한 도면을 참고하여 본 발명의 실시 예에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시 예에 한정되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 약독화된 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물로서, 상기 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주는 SARS-CoV-2의 외피단백질, 베타코로나바이러스 NS7A단백질 및 스파이크단백질 중 선택되는 어느 하나 이상의 항원을 발현하는 것을 특징으로 하는, 경구투여용 코로나바이러스 감염증 백신 조성물이 제공된다.
- [0024] 살모넬라균주는 Type III 분비 시스템으로 인해 지속적이고 장기적인 항원 단백질 생산을 보장하는 좋은 플랫폼으로 알려져 있다. 살모넬라는 세포내 감염성 세균이며 점막 세포를 감염시켜 세포내 기생 동안 항원을 제시하는 능력을 가진다. 세포면역을 유도하기 위하여 SipB 시그널 펩타이드에 융합될 수 있고, 이는 하기 실시예 1 내지 2에 개시하는 바와 같다. 본 발명에 따른 살모넬라 균주는 세균이지만 바이러스와 유사한 감염 기전을 가지고 있어 점막면역을 유도하고 세포 내에서 항원을 발현시키는 특성을 가진다. 본 발명의 경구 투여 백신은 이 균주를 사용하여 바이러스에 대해 보다 효과적인 세포 및 체액 면역 반응을 유도하는 장점이 있으며 이는 실시예 3 이하에서 개시하는 바와 같다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 살모넬라 티피뮤리움 균주는 장티푸스를 유발하는 그룹 D 살모넬라에 속하는 병원균으로서, 본 발명에서는 상기 살모넬라 균주의 병원성을 없애기 위하여 약독화된(attenuated) 살모넬라 균주를 사용하였다. 여기서, 약독화(attenuation)란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고, 면역 체계만을 자극해서 면역성을 유도하는 것을 의미한다.
- [0026] 상기 약독화된 살모넬라 티피뮤리움은 바람직하게는 살모넬라 티피뮤리움 BRD509일 수 있으며 이는 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 살모넬라 균주(숙주)와 같다(J Infect Dis. 1994 Dec;170(6):1508-17, Medeva사, London). 상기 균주의 약독화 방법은 aro A, aro B의 유전자를 변형시켜서 균주의 대사에 비정상적 일어나게 만들었으며, 이로 인한 약독화 결과를 이용해서 본 발명에서 백신으로 이용하였다.

- [0027] 상기 경구 투여를 위해 약독화 살모넬라 균주가 경구용 백신용 벡터로 탐색되었다. 이 균주는 sipB160 단백질을 사용하여 SARS-CoV-2에 대한 항원을 합성하거나 부분적으로 분비하도록 설계되었다. 이러한 재조합 균주는 장에 상주하는 대식세포의 식균 작용 또는 바이러스 감염에 의해 B 및 T 세포 활성화를 촉진함으로써 백신으로 작용할 수 있으며, 이러한 작용 모식도를 도 1에 나타내었다.
- [0028] 일 측에 따르면, 상기 살모넬라 티피뮤리움 재조합 균주는 SARS-CoV-2의 외피단백질, 베타코로나바이러스 NS7A 단백질 및 스파이크단백질 중 선택되는 어느 하나 이상을 암호화하는 서열이 도입된 플라스미드 벡터로 형질전환될 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 SARS-CoV-2의 외피단백질, 베타코로나바이러스 NS7A단백질 및 스파이크단백질 중 선택되는 어느 하나 이상을 암호화하는 서열은 상용화된 어떤 경로를 통해서든 입수할 수 있으나, 바람직하게는 외피단백질 유전자는 E, protein_id = UFE14292.1의 것을, ORF7a 유전자는 7a, protein_id = UFE14252.1의 것을, 변형된 스파이크 단백질 유전자는 Genbank 수탁번호 OL583529로 개시된 것을 이용할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 항원을 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클 로딩사이트를 가지고 있는 어떤 발현벡터도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 도 2a에 도시된 pKU-Ag.e.spike인 것을 특징으로 한다.
- [0031] 상기 베타코로나바이러스 NS7A단백질은 상술한 ORF7a 유전자가 발현하는 단백질을 의미한다.
- [0032] 일 측에 따르면, 상기 플라스미드 벡터는 pET14b 벡터에서 프로모터가 lac 프로모터로 치환되고, sipB160을 암호화하는 서열이 도입될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 목적은 코로나바이러스의 항원단백질, 바람직하게는 스파이크단백질의 발현벡터를 약독화된 살모넬라에 형질도입함으로써 본 발명의 재조합 살모넬라균주를 제작하고, balb/c 마우스 모델에 상기 형질도입 살모넬라를 투여하여, 그에 의한 면역유도효과를 다른 살모넬라 대조군에 의한 효과와 비교 분석하여 확인함으로써 달성하였다.
- [0034] 본 발명을 위해 사용된 살모넬라 균주는 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) BRD 509 균주로, 병원성이 없는 약독화된 균주이며, 상기 균주내에 형질도입된 스파이크단백질을 포함하는 발현벡터는 pET14b를 골격으로 제작하였다. 본 발명에서 면역반응을 유도하는 스파이크 단백질을 비롯한 항원을 발현하는 살모넬라 균주는 당업계에서 통상 사용되는 형질도입방법에 의해 제조 가능하며, 제조된 살모넬라는 암피실린 내성을 가진 살모넬라 균주로, 체내에 도입될 때 인터페론감마 단백질을 추가로 분비할 수 있다
- [0035] 이하에서는 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 상세히 설명한다.
- [0037] 실시예 1. 실험방법
- [0038] 1.1. 벡터 구성
- [0039] SARS-CoV-2 바이러스 스파이크 유전자 서열은 데이터베이스와 K986 및 V987 잔기의 프롤린 치환을 포함하는 SARS-CoV-2 S-2P를 표적 항원으로 선택하였다. GFP 유전자 서열을 사용하여 리포터 mRNA 모델을 생성하였다. GFP 및 S 단백질의 코딩 영역은 T7 박테리오파지 프로모터의 제어하에 설계 및 합성되었으며 전체 서열은 pUC57 벡터 내에 삽입되었다. 서열 확인 후 플라스미드 수송 및 벡터의 증폭에 유용한 것으로 알려진 *E. coli*의 Stb14 균주로 형질전환 하였다.
- [0040] 1.2. 살모넬라 균주의 구성
- [0041] 먼저 SARS-CoV-2의 Envelope 유전자(E, protein_id = UFE14292.1), ORF7a 유전자(7a, protein_id = UFE14252.1) 및 변형된 Spike 단백질 유전자(Genbank, OL583529)를 NdeI 및 BamHI를 가진 pET14b 벡터에 클로닝 하였다. 각각의 유전자는 유전자 합성을 통해 얻었으며 제작된 벡터는 pET14b-mbe, pET14b-mb7a 및 pET14b-e.spike로 명명하였다. 살모넬라 균주(BRD509)에서 각각의 유전자를 발현시키기 위해 pET14a 벡터의 T7 프로모터 부위를 Gibson assembly cloning(Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A., 3rd, Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods*. 2009;6:343-345.) 방법을 이용하여 하기 표 1의 프라이머를 사용해 pUC19의 Lac 프로모터로 교체하였다.

표 1

서열번호	서열 (5'→3')
1	GCGTAGAGGATCGAGATCTAATACGCAAACCGCCTCT
2	ATGATGGCTGCTGCCCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAAT
3	AGATCTCGATCCTCTACGCCGG
4	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCA

Lac 프로모터 클로닝의 경우 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 사용하였다. E 및 7a 유전자를 포함하는 벡터를 증폭하기 위한 역 PCR 프라이머는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머를 사용하였다. 생성된 플라스미드를 pKU-Ag.e.spike라고 명명하였다. pKU-Ag.e.spike의 증폭을 위해 형질전환된 *S. typhimurium* SF586 균주(SF586)에서 pKU-Ag.e.spike 플라스미드를 추출하였다. 따라서, 상기 pKU-Ag.e.spike 플라스미드를 이용하여 살모넬라 균주 SL1344의 돌연변이 aroA/aroD 변이체인 *S. 티피뮤리움* BRD 509(BRD 509) 세포를 형질전환시켰다.

1.3. 웨스턴 블롯 분석

박테리아 배양의 전체 세포를 SDS-PAGE에서 실행하고 전기영동적으로 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 막을 5% 탈지유를 함유하는 TBS-T 용액으로 밤새 미리 평형화하고 마우스 항-His 항체(Cell Signaling Technology, Catalog #2366)와 함께 2시간 동안 배양하였다. 막을 실온에서 40분 동안 염소 항-마우스 IgG HRP 접합체와 함께 인큐베이션하였다. 면역 반응성 단백질 밴드는 BM 화학발광 블로팅 기질을 사용하여 시각화하였다.

1.4. 침입 분석

뮤린 대식세포 세포주(RAW 264.7 세포)는 항생제(100 units/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 존재하에 10% FBS(fetal bovine serum) 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 배양되었다. RAW 264.7세포를 하룻밤 동안 웰에서 성장시켜 편평한 층을 만들었다. 살모넬라균은 밤새 별도로 성장시켰다. 다음날 RAW 264.7세포에 살모넬라를 MOI 100:1로 접종하고 1시간 동안 함께 배양하였다. 플레이트를 몇 분 동안 원심분리하여 세포와 살모넬라균이 접촉하여 감염이 시작되도록 하였다. 이후 세포를 PBS로 3회 세척한 후 100 µg/mL의 겐타마이신(gentamycin(Invitrogen)) 용액으로 1시간 동안 처리하여 세포 외부에 남아있는 *S. 티피뮤리움*을 사멸시켰다. 그런 다음 플레이트를 잘 세척하여 죽은 박테리아를 제거하였다. 그 후 RAW 264.7세포를 1% Triton X-100을 사용하여 37°C에서 5분 동안 용해시켜 살모넬라를 검출하였다. 10배 연속 희석액을 플레이트팅하여 LB 플레이트에서 배양하였고, 콜로니 형성 단위(CFU)는 그 다음 날에 계산하였다.

1.5. 체외 세포 독성

상기와 같이 유전자 조작된 *S. 티피뮤리움*으로 처리한 후, RAW 264.7 세포의 생존력을 트리판-블루 염료배제분석 및 젖산탈수소효소(LDH) 분석으로 평가하였다. 살아있는 세포에 의한 트리판-블루 염료의 배제는 혈구계산기를 사용하여 광학 현미경으로 평가하였다. 최소 200개의 세포가 계산되었다. LDH 활성은 제조업체의 프로토콜에 따라 CytoTox 96 비방사성 세포독성 분석 키트(Promega)를 사용하여 막 파열 후 세포질에서 배양 배지로 LDH의 방출을 측정하였다. 살모넬라-유도된 LDH 방출은 용해된 세포 + 배양 배지에서의 총 LDH와 비교하여 배양 배지에서의 LDH의 백분율로 계산하였다.

1.6. 사이토카인 분석

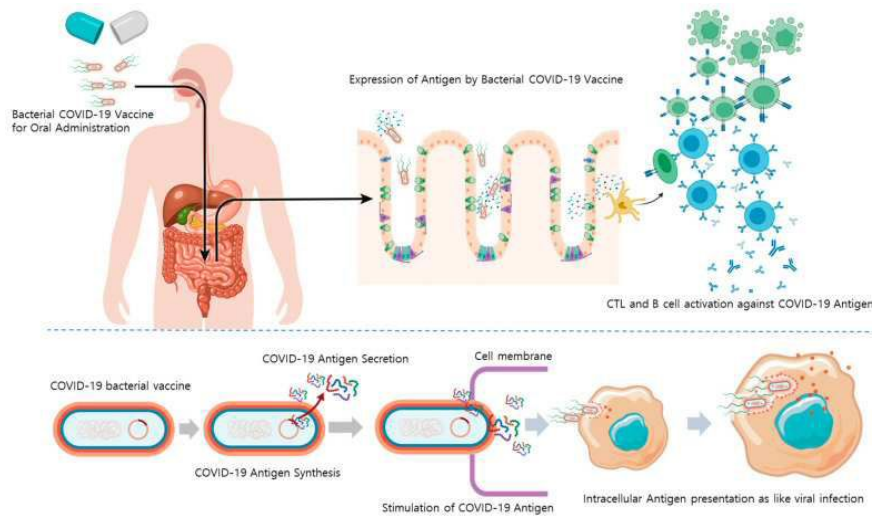
Balb/c 마우스에서 *S. 티피뮤리움* 및 유전자 조작된 *S. 티피뮤리움*을 경구 투여한 후, 혈청을 2000XG, 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 수집하였다. 동일한 그룹의 샘플을 모아 IFN-γ 샌드위치효소결합 면역흡착분석(ELISA) 키트(Bender Medsystems Inc., Burlingame, CA, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 분석하였다.

- [0057] 1.7. 구강 접종 후 정상 마우스 조직의 세균 축적 측정
- [0058] 폐, 비장, 간, 신장 및 혈액과 같은 정상 조직에서 박테리아를 분리하고 적정하였다. 유전자 조작된 살모넬라 (각각 1×10^7 CFU)로 경구감염 ($n = 5$)된 마우스를 인도적으로 안락사시키고, 이들의 조직을 무균적으로 제거한 후 PBS에서 균질화하였다. 연속희석된 균질액을 LB 아가 플레이트에 펴 바르고 37° C에서 24시간 동안 배양하였다. 생존가능한 박테리아 역가는 콜로니(CFU)를 세고 희석계수를 곱하여 도출하였다.
- [0060] 1.8. 동물 연구
- [0061] 특정 병원체가 없는 Balb/c 암컷 마우스는 Shizuoka Laboratory Animal Center(Hamamatsu, Japan)에서 구입하였다. 6 내지 8주령의 동물을 실험 전반에 걸쳐 사용하였다. 마우스는 음식과 물에 제한 없이 접근할 수 있도록 하였다. 3 내지 5마리의 마우스 그룹을 COVID-19 Ag 후보를 발현하는 재조합 살모넬라균으로 면역화하였다. 세균 면역화를 위해 마우스에 마리당 100 μ L의 1×10^7 CFU의 S. 티피뮤리움 현탁액을 경구접종 하고 동일한 제제로 2주 간격으로 2회 부스팅하였다. 대조군 마우스는 PBS만을 경구투여하였다.
- [0063] 1.9. 체액면역 반응의 조사
- [0064] 혈청 샘플은 면역화 전과 각 면역화 후 1주일에 안구 출혈에 의해 마우스로부터 수집하였고, 하위 유형이 있는 스파이크 단백질 특이적 항체의 존재 여부를 분석하였다. 마이크로티터 플레이트를 탄산염-중탄산염 완충액(pH 9.6)에서 스파이크 단백질(2 μ g/mL) 100mL로 코팅하고 37° C에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 3회 세척하고 5% 탈지유의 PBS, 실온에서 1시간 동안 차단되었다. 3회의 세척이 끝난 후, 희석된 혈청 샘플을 37° C에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 HRP-접합 염소 항-마우스 IgG(1:10,000; Jackson Immuno Research Laboratories), 래트 항-마우스 IgG1(1:500; Boehringer Mannheim) 또는 래트 항-마우스 IgG2a(1:500; Boehringer Mannheim)와 함께 배양하였고, 테트라메틸벤지딘을 기질로 하여 특이적 반응을 검출하였다. 정지 용액을 첨가한 후 450 nm에서 OD를 측정하였다. 면역 전 혈청으로 얻은 것보다 더 큰 OD값의 가장 높은 희석도의 역수로서 역가를 결정하였다.
- [0066] 1.10. 세포매개 면역반응의 조사
- [0067] 마지막 면역화 1주 후에 비장세포를 수확하고 이전에 스파이크 단백질(NKMAX, 독일, Catalog# ATGP3962, 2 μ g/mL)의 존재 하에 24-웰 플레이트에서 10^6 세포/mL로 미토마이신 C로 처리한 동일한 수의 나이브 비장세포(naive spleen cells)와 37°C에서 4일 동안 공배양 하였다. 배양 후, 세포를 완전 RPMI-5로 2회 세척한 다음 이펙터 세포로 사용했다. 3일 동안 37° C에서 스파이크 단백질(2 μ g/mL)을 흡착하여 동계 나이브 비장 세포(Syngeneic naive spleen cells)를 준비하고 완전 RPMI-5로 3회 세척하고 5×10^6 세포/mL의 농도로 재현탁하여 표적세포로 사용하였다. 펄스된 표적을 100 mL 부피로 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 1×10^4 세포/웰, 이펙터 세포를 표시된 E:T 비율로 100mL 부피로 3중으로 첨가하였다. 배양 4시간 후 제조사의 매뉴얼에 따라 CytoTox96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega)를 사용하여 항원 특이적 세포용해를 측정하였다. 이 분석으로 세포용해 시 방출되는 젖산 탈수소효소(LDH)를 정량적으로 측정하였다. 특정 용해의 백분율은 ((실험-이펙터 자발적-표적 자발적)/(표적 최대-표적 자발적)) $\times$ 100으로 계산하였다.
- [0069] 1.11. 통계 분석
- [0070] 얻은 모든 정보는 GraphPad Prism 9 소프트웨어를 사용하여 평가되었다. 결과를 통계적으로 분석하기 위해 필요에 따라 t-테스트 및 일원 분산 분석 알고리즘을 사용했습니다. 0.05보다 낮은 p 값은 유의한 차이로 간주하였다.

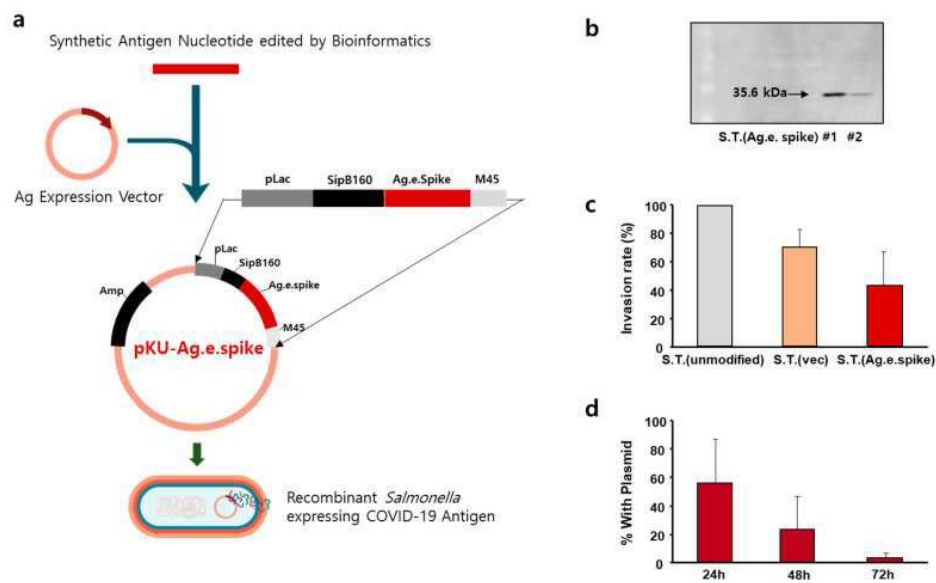
- [0072] 실시예 2. 항원을 발현하는 살모넬라균의 구축
- [0073] 상기 실시예 1.1 내지 1.2에 따라 3종의 항원을 합성했다. 살모넬라에서 항원을 발현할 수 있는 벡터로서 lac 오페론을 이용한 플라스미드를 준비하였다. 살모넬라 모델에 항원분비기작을 부여하기 위해 시그널 펩타이드로 편집되어 항원 서열과 결합된 SipB160을 사용하였다. 설계된 플라스미드를 합성하여 세균에 형질전환시켰다. 이 과정에서 벡터의 클로닝을 대장균에서 확인한 후 생산된 플라스미드를 서틀 살모넬라 균주와 백신으로 사용할 수 있는 살모넬라 균주로 형질전환시켰다(도 2a). 제작된 백신후보균주에서 항원이 잘 발현되는지 확인하기 위해 3종의 코로나바이러스 단백질 항원 후보를 준비하였다. 균주를 배양한 후 조작된 스파이크 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다(도 2b). 웨스턴블롯팅은 상기 실시예 1.3.의 방법에 따랐다. 다양한 크기의 항원 발현도 이 조작된 균주를 사용하여 확인되었다(도 3). 이들 박테리아 균주의 특성은 박테리아가 대식세포를 감염시키는 능력을 측정함으로써 비교되었다(도 2c). 변형되지 않은 균주와 비교하여 단백질 발현 벡터로 형질전환된 균주에서 감염률이 50% 이상 감소하였다. 또한, 계대배양 동안 벡터의 발현을 평가한 결과 박테리아가 72 시간 이내에 모든 단백질 발현 벡터를 상실한 것으로 확인되었다(도 2d).
- [0075] 실시예 3. COVID-19항원을 발현하는 살모넬라 균주 특성확인
- [0076] 재조합 코로나바이러스 항원발현 살모넬라균주의 안전성과 안정성을 측정하기 위해 24시간 노출 후 in vitro 및 in vivo 세포독성을 평가하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 전반적으로, 시험관 내에서 배양된 대식세포 사이에 LDH 세포독성에 관해서는 큰 차이가 없었다(도 4a). 생체 내 실험에서는 1×10^7 의 박테리아를 경구투여한 경우 우 체내에 축적되지 않았고(도 4b) 마우스의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 그럼에도 불구하고 경구로 살아 있는 균주를 과다 복용하면 생존율이나(도 4c) 체중 변화(도 5)에 영향을 줄 수 있다. 중요한 것은 경구투여 시 혈청 사이토카인 수준의 변화가 유도되지 않은 것이며 이는 도 6에 나타내었다. 특히 인터페론- γ 는 박테리아 투여 후 증가했으며, 항원 발현 균주는 이 사이토카인의 수준이 더 높았다(도 4d).
- [0078] 실시예 4. 항원발현 살모넬라 균주의 경구투여 후 항바이러스 면역반응 유도 확인
- [0079] 2주 간격으로 3회에 걸쳐 10^7 박테리아를 경구 투여한 후 balb/c 마우스에서 면역 활성을 평가하였다. 대조군에 비해 혈청 내 항원 특이 항체 생성물이 8000배 이상 크게 증가함을 확인할 수 있었고 이를 도 7a에 나타내었다. 또한 Type 1 면역반응에 의해 생성되는 것으로 알려진 IgG2a 하위 유형 항체의 수준도 증가하였다(도 8a). 세포 면역 활성을 더 알아보기 위해 T세포 활성화를 측정하였다. 면역된 마우스의 T 세포의 항원 특이적 활성을 확인하였으며(도 8b), 항원 특이적 세포독성 T 세포(CTL) 반응에 의해 경구투여 살모넬라 백신균주를 투여한 실험군에서 효과적인 세포면역 반응이 검출됨을 확인하였다(도 7b).
- [0081] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0082] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

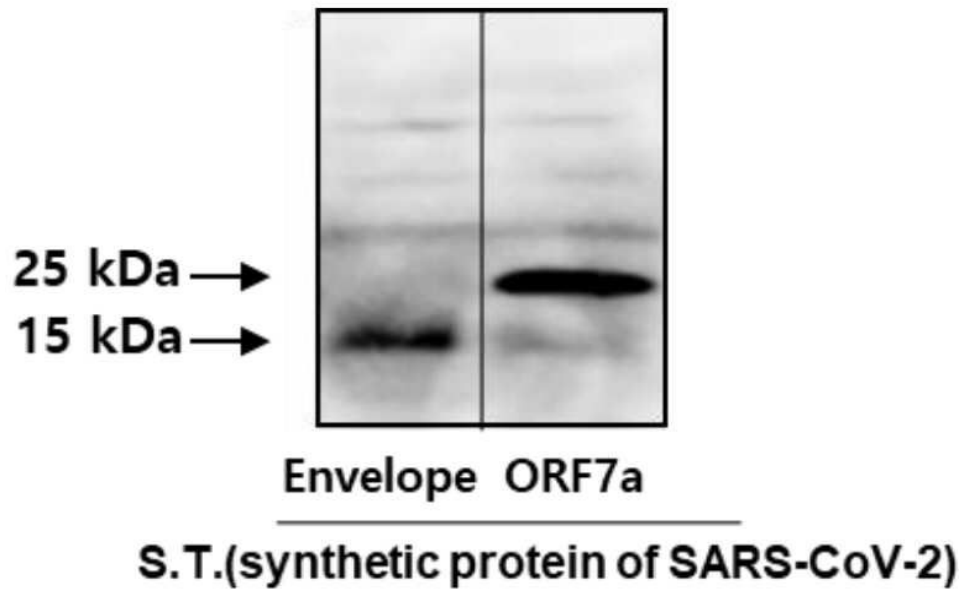
도면1



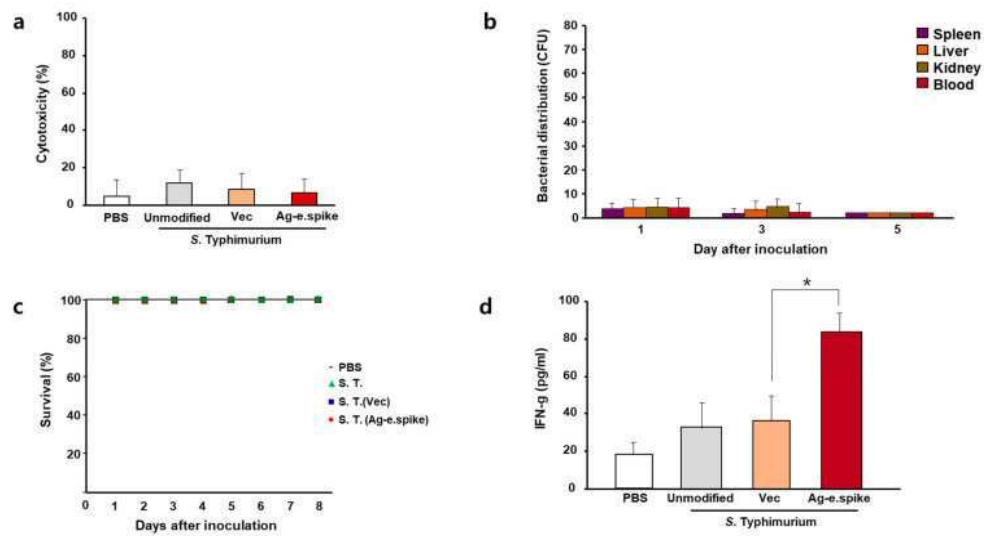
도면2



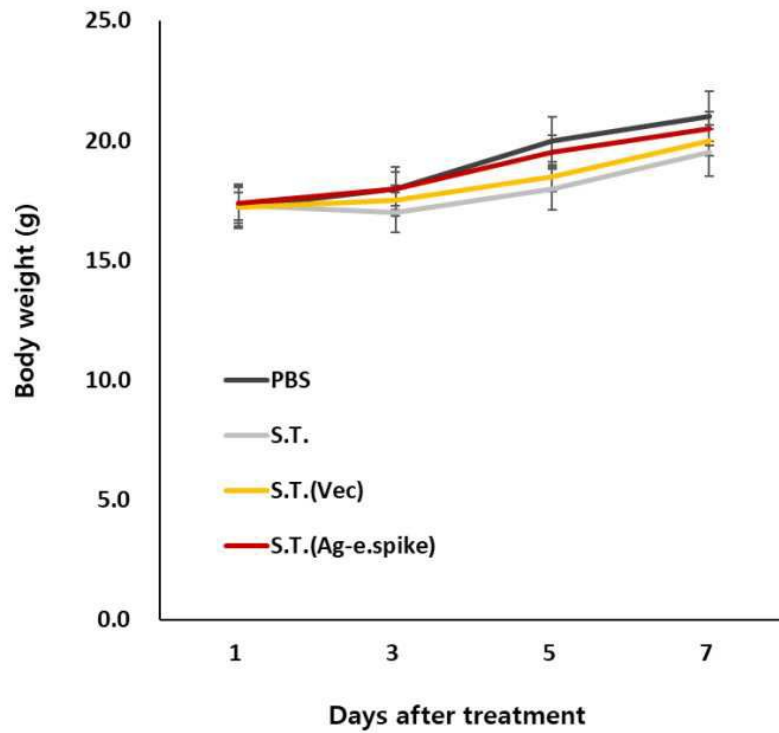
도면3



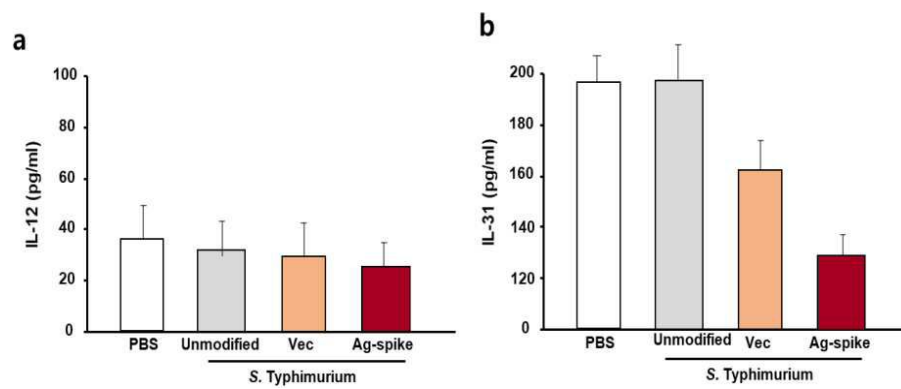
도면4



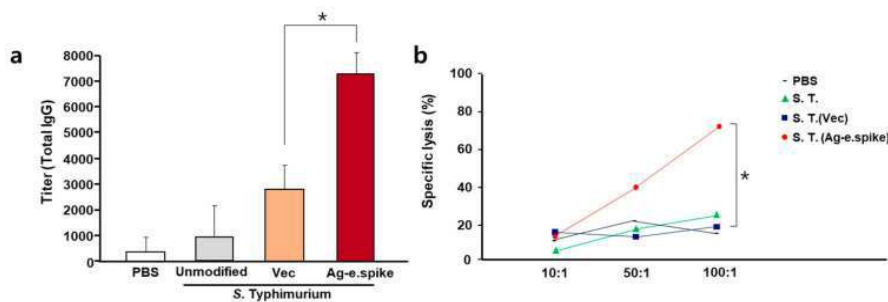
도면5



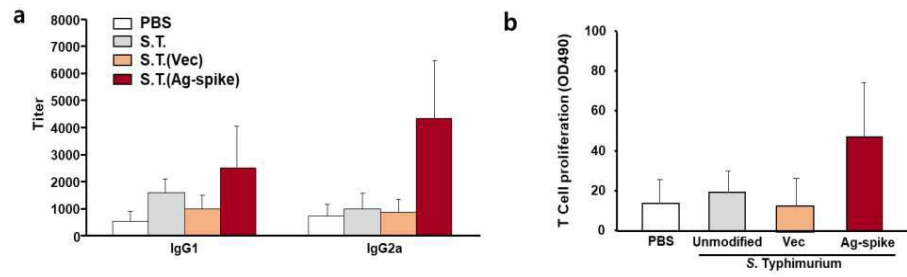
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.