(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월21일
(11) 등록번호 10-2168661
(24) 등록일자 2020년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/445 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/015 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0055207
(22) 출원일자 2019년05월10일
심사청구일자 2019년05월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170107327 A
KR1020190009691 A
NCBI Reference Sequence: NP_040978.1, 2018.08.13.
NCBI Reference Sequence: XP_679961.1, 2017.10.24.

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 26-6, 의과대학 의동물학교실 (회기동)
(74) 대리인
특허법인 하나

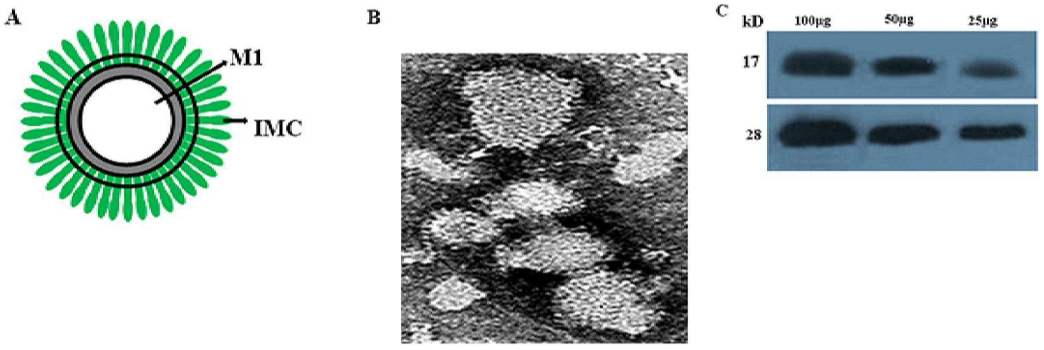
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **말라리아 원충의 내막 복합체를 포함하는 바이러스-유사입자 및 이를 이용한 백신 조성물**

(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
A61P 33/06 (2018.01)
C07K 14/445 (2013.01)
A61K 2039/5258 (2013.01)
C12N 2760/16123 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1A2B6003535
부처명	한국연구재단(통합)
과제관리(전문)기관명	한국연구재단(학술진흥)
연구사업명	이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업
연구과제명	말라리아 감염병 대응 바이러스 유사입자 백신 개발 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	한국연구재단(통합)
과제관리(전문)기관명	한국연구재단(학술진흥)
연구사업명	이공분야기초연구사업/중점연구소지원사업
연구과제명	경희대학교 의과학 연구소 - 활성산소 조절을 통한 만성질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

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

말라리아 원충의 내막 복합체(inner membrane complex, IMC);를 포함하는, 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 말라리아 원충의 내막 복합체 항원-유사 단백질(IMC)은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된, 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)은 서열번호 3 및 4의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 유전자로 암호화되고, 상기 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC)는 서열번호 5 및 6의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 유전자로 암호화된 것인, 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자를 포함하는, 백신 조성물.

청구항 5

서열번호 3 및 4의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1) 암호화 염기서열; 및

서열번호 5 및 6의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC) 암호화 염기서열;을 포함하는, 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC) 항원-유사 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된, 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

청구항 7

제5항 또는 제6항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

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

청구항 9

제7항에 있어서,

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

청구항 10

제5항 또는 제6항의 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및

상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법.

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 내막 복합체(inner membrane complex, IMC);를 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자를 제공하는 것이다.

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

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 제조하기 위한 발현 벡터 및 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 측면은, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1); 및 말라리아 원충의 내막 복합체(inner membrane complex, IMC);를 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자를 제공한다.

[0016] 본 발명에서 용어 "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 입자는 자발적 자가 어셈블리를 진행할 수도 있다.

[0017] 상기 "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, 용어 "말라리아의 바이러스-유사입자"는 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도하며, 바이러스와 유사한 형태를 가진 단백질 구조체(입자)를 의미하는 것이다. 구체적으로, 상기 입자는 바이러스 유래의 구조 단백질 외부에 말라리아 원충 유래의 항원 결정 부위가 결합된 형태(도 1A)를 가질 수 있다. 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.

[0019] 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.

[0020] 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.

[0021] 본 발명에서 상기 바이러스-유사입자는 구조 단백질(core protein)로서 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)을 포함할 수 있다. 상기 "인플루엔자 바이러스(Influenza virus)"는 A, B 및 C로 명명된 서브타입으로 구성될 수 있고, 본 발명에서 "인플루엔자 바이러스 서브타입"은 적혈구응집소(hemagglutinin, H) 및 뉴라미다제(neuraminidase, N) 바이러스 표면 단백질의 조합을 특징으로 하는 인플루엔자 A 바이러스 변이체를 말한다. 구체적으로, 인플루엔자 바이러스 서브타입은 그들의 H 번호에 의해, 예를 들어, "H1 서브타입의 HA를 포함하는 인플루엔자 바이러스", "H1 서브타입의 인플루엔자 바이러스" 또는 "H1 인플루엔자"에 의해, 또는 H 번호 및 N 번호의 조합, 예를 들어, "인플루엔자 바이러스 서브타입 H1N1" 또는 "H1N1"에 의해 지칭될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 용어 "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 형성하

는 기질단백질(matrix protein)을 의미한다.

[0023] 본 발명에서 용어 "서브타입"은 구체적으로 보통 돌연변이로부터 야기되는 각각의 서브타입 내의 모든 개별 "균주"를 포함하며, 천연 분리주 및 인공 돌연변이체 또는 재배열 등을 포함하여, 상이한 병리학적 프로파일을 보일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A 바이러스 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 균주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에서 상기 바이러스-유사입자는 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 구조 단백질로서 포함할 수 있으며, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 표면에는 말라리아에서 유래한 하나 이상의 항원 결정 부위를 포함할 수 있다.

[0025] 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.

[0026] 또한, 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.

[0027] 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자는 말라리아에서 유래한 항원 결정 부위를 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.

[0028] 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.

[0029] 구체적으로, 상기 항원 결정 부위는 말라리아에서 유래한 EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PO32, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs48/45, Pfs230, 또는 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 항원 결정 부위는 기생 원충 마우스 말라리아(*Plasmodium berghei*, ANKA strain)에서 유래한 내막 복합체(inner membrane complex, IMC)를 포함하는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 “내막 복합체 단백질(IMC)”은 원형질막의 기저를 이루는 평탄화 세포를 구성하는 표면막 시스템으로서, 세포골격 네트워크와 연결되어 있다. 상기 내막 복합체 단백질은 기생체 복제, 세포 운동 및 숙주 세포 침투에 있어서 중요한 역할을 수행한다. 상기 내막 복합체 단백질은 말라리아 원충 내에서 신규 세포의 형성에 관여하며, 복제된 염색질 및 세포기관은 세포 분열 과정으로서 골격의 조립과 밀접하게 관련된다.

[0031] 특히, 본 발명자들은 상기 설치류 말라리아 기생 원충(*Plasmodium berghei* ANKA strain)에서 유래한 내막 복합체(IMC)를 포함하는 바이러스-유사입자 백신이 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1과 융합된 형태로서 개체 내에 유입될 때 말라리아에 대한 높은 수준의 면역성을 제공할 수 있음을 확인하였다(도 2 및 도 3).

[0032] 구체적으로, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC)는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0033] 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1) 또는 상기 말라리아 유래의 내막 복합체(IMC) 항원-유사 단백질은 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 구성된 단백질의 기능적 동등물을 포함한 것일 수 있다.

[0034] 본 발명에서 용어 “기능적 동등물"은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 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.

[0035] 본 발명에서 용어 "실질적으로 동등한 생리활성"은 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 말라리아

유래의 내막 복합체(IMC) 항원-유사 단백질과의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자로서의 활성을 의미한다.

[0036] 또한 구체적으로, 상기 말라리아의 바이러스-유사입자는 서열번호 3 및 4의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 유전자로 암호화되는 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1) 및 서열번호 5 및 6의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 유전자로 암호화된 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC)를 포함하는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명에서 "프라이머 쌍"은 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머를 합쳐 동시에 지칭하는 용어로 사용하였다.

[0038] 프라이머 쌍의 설계는 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3 회 이상 반복 금지 등 여러 가지 제약이 따른다. 그 외에 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg2+의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.

[0039] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.

[0040] 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.

[0041] 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.

[0042] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.

[0043] 상기 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다. 상기 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 제어될 수 있다. 일반적으로, 상기 혼성화 온도가 높으면 완전한 매치일 경우 혼성화가 일어날 가능성이 높으며, 혼성화 온도가 낮으면 일부 미스매치가 존재하더라도 혼성화가 일어날 수 있다.

[0044] 상기 프라이머 쌍은 표적 원료에 존재하는 특정 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 원료가 존재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 증폭 되므로 상기 증폭된 산물(amplicon)을 통해 상기 원료의 존부를 판단할 수 있다.

[0045] 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.

[0046] 또한 상기 프라이머 서열은 검출 가능한 신호를 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 32P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.

[0047] 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 포함하

는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 말라리아의 바이러스-유사입자를 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0049] 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.

[0050] 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 제2 보조제를 더 포함할 수 있다.

[0051] 또한, 상기 백신 조성물은 의학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 "의학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원 보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착 지연제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 백신 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제는 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 또한, 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용할 수 있다.

[0054] 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.

[0055] 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.

[0056] 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.

[0057] 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.

[0058] 본 발명의 또 다른 측면은, 서열번호 3 및 4의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1) 암호화 염기서열; 및 서열번호 5 및 6의 염기 서열로 이루어진 프라이머 쌍에 의해 증폭된 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC) 암호화 염기서열을 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0059] 구체적으로, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC) 항원-유사 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0060] 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 한정되지 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.

[0061] 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.

[0062] 구체적으로, 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(+), 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 한정되는 것은 아니다.

[0063] 한편, 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.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 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 한정되는 것은 아니다.

[0067] 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 한정되는 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 한정되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명의 또 다른 측면은, 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0069] 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.

[0070] 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.

[0071] 상기 숙주세포는 공학적 방법에 의해 형질 전환되어 특정의 유전자를 효율적으로 발현할 수 있으면 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 구체적으로는 곤충 세포일 수 있다.

[0072] 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 한정되는 것은 아니다.

[0073] 구체적으로, 상기 곤충세포는 가을 거염벌레(Spodoptera frugiperda) 유래의 SF9 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 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. 이때, 생합성 유전자는 숙주에 외래성이거나, 돌연변이유발(mutagenesis), 재조합(recombination) 또는 내인성 숙주 세포에서 이종 발현 제어 서열과의 연관에 의해 변형됨으로써, 숙주(예컨대, 미생물)에 이종성일 수 있다. 적절한 배양 조건은 배양 배지 pH, 이온 강도, 영양 함량 등의 조건, 온도, 산소, 이산화탄소, 질소 함량, 습도 및 상기 미생물의 물질대사 작용에 의한 화합물의 생산을 가능하게 하는 기타 배양 조건을 포함할 수 있다.

[0075] 따라서, 상기 "대사 조작된(engineered)" 또는 "변형된(modified)" 숙주 세포는 유전 물질을 선택된 숙주 또는 부모 미생물 내로 도입하여 세포 생리와 생화학을 변형하거나 변경함으로써 생산될 수 있다. 유전 물질의 도입을 통하여, 부모 미생물은 새로운 성질, 예를 들면, 새로운 세포 내 대사산물 또는 더욱 많은 양의 세포 내 대사산물을 생산하는 능력을 획득할 수 있다.

[0076] 예컨대, 유전 물질의 부모 미생물 내로의 도입은 화학 물질을 생산하는 새롭거나 변형된 능력을 초래할 수 있다. 부모 미생물에 도입된 유전 물질은 화학 물질 생산을 위한 생합성 경로에 관여하는 하나 이상의 효소를 코딩하는 유전자 또는 유전자의 일부를 포함하고, 이들 유전자의 발현 또는 발현 조절을 위한 추가 구성요소, 예를 들면, 프로모터 서열을 포함할 수도 있다.

[0077] 상기 "변화된 숙주 세포(altered host cell)"는 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.

[0078] 상기 "변형 숙주 세포(modified host cell)"은 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 과발현하도록 유전적으로 설계되는 야생형 또는 변화된 숙주 세포를 의미한다. 상기 변형 숙주 세포는 야생형 또는 변화된 모 숙주 세포보다 더 높은 수준으로 목적 단백질을 발현할 수 있다.

[0079] 본 발명에서 용어 “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.

[0080] 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 한정되는 것은 아니다.

[0081] 효모와 같은 진균의 형질 전환의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트 및 열 충격을 이용한 형질 전환법과 전기천공법에 의해 실시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0082] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자의 제조 방법을 제공한다.

[0083] 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.

[0084] 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.

[0085] 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.

[0086] 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.

[0087] 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.

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 한정되는 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 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC)를 포함하는 말라리아의 바이러스-유사입자의 모형, B: 말라리아의 바이러스-유사입자를 전자현미경으로 관찰한 모습, C: 말라리아의 바이러스-유사입자를 말라리아원충 감염 혈청 및 인플루엔자 M1 항체와 반응시킨 후의 웨스턴 블랏 결과).

도 2는 마우스에 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자의 접종 후 ELISA 분석을 통해 시간에 따른 말라리아 특이적 항체인 IgG, IgG2a, IgG1 및 IgG2b 형성 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: 접종 후 시간 경과에 따른 IgG의 농도, B: 접종 후 시간 경과에 따른 IgG1의 농도, C: 접종 후 시간 경과에 따른 IgG2a의 농도, D: 접종 후 시간 경과에 따른 IgG2b의 농도).

도 3은 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 면역 반응 유도 후 말라리아 원충(*Plasmodium berghei*, ANKA)을 복강 경로로 감염시킨 마우스(Imm+cha)와 접종 없이 감염시킨 마우스(Naive+cha)의 말라리아 특이적 항체인 IgG, IgG2a, IgG1 및 IgG2b의 형성 정도를 비교 측정한 것이다(A: 감염 후 시간 경과에 따른 IgG의 농도, B: 감염후 시간 경과에 따른 IgG1의 농도, C: 감염 후 시간 경과에 따른 IgG2a의 농도, D: 감염 후 시간 경과에 따른 IgG2b의 농도).

도 4는 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 따른 방어면역 효과를 확인하기 위해 비감염군(Naive), 음성대조군(Naive+Cha) 및 실험군(Imm+Cha)을 대상으로 감염률을 비교한 결과를 나타낸 것이다(A: 비감염군의

감염률(M2)은 0%, B: 비 접종 음성대조군(Naive+Cha)의 감염률(M2)은 13.8%, C: 접종 후 감염시킨 실험군(Imm+Cha)은 감염률(M2)은 2.9%, D: 실험군과 대조군의 감염률 비교그래프 (*P<0.05)).

도 5는 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 방어면역 효과를 확인하기 위해 비감염군(Naive), 음성대조군(Naive+Cha) 및 실험군(Imm+Cha)을 대상으로 몸무게 변화를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 T-cell의 면역 반응을 비감염군(Naive), 음성대조군(Naive+Cha) 및 실험군(Imm+Cha)을 대상으로 비교한 결과를 나타낸 것이다(A: 비감염군의 CD3+CD4 면역 반응이 23.2%임, B: 음성대조군의 CD3+CD4 면역 반응이 6.8%임, C: 실험군의 CD3+CD4 면역 반응이 27.7%임, D: A 내지 C의 수치를 도시화 한 막대 그래프, E: 비감염군의 CD3+CD8 면역 반응이 10.1%임, F: 음성대조군의 CD3+CD8 면역 반응이 5.9%임, G: 실험군의 CD3+CD8 면역 반응이 13.2%임, H: E 내지 G의 수치를 도시화 한 막대그래프).

도 7은 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자 접종에 의한 B-cell의 면역 반응을 비감염군(Naive), 음성대조군(Naive+Cha) 및 실험군(Imm+Cha)을 대상으로 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: 비감염군의 B220+CD19 면역 반응이 11.8%임, B: 음성대조군의 B220+CD19 면역 반응이 5.1%임, C: 실험군의 B220+CD19 면역 반응이 13.0%임, D: A 내지 C의 수치를 도시화 한 막대 그래프).

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] <u>제조예 1. 말라리아의 바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs) 제조용 벡터의 제조</u>

[0094] 말라리아 원충의 내막 복합체(inner membrane complex, IMC)를 포함하는 바이러스-유사입자를 제조하기 위해, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 설치류 말라리아(*Plasmodium berghei* ANKA)의 내막 복합체 하위 구획단백질 3(inner membrane complex sub-compartment protein 3)의 일부를 항원 유전자로 선정하였다.

[0095] 상기 말라리아 원충의 내막 복합체(IMC) 항원 유전자는 서열번호 5의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머(5'-aaa<u>GGATCC</u>atgggaaacagcttgtgctgc-3') 및 서열번호 6의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머(5'-tta<u>CTCGAG</u>ttaagcagttaagcaatgctt-3')를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 상기 프라이머는 밑줄로 표시된 부분에 제한 효소 부위(BamH I 및 Xho I)를 각각 도입하였다.

[0096] 이후 상기 프라이머를 cDNA 주형으로 하여 증폭된, 내막 복합체(IMC) 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 3의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머(5'-TCC<u>CCCGGG</u>CCACCATGAGCCTTCTGACCGAGGTC-3') 및 서열번호 4의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머(5'-TTACT<u>TCTAGA</u>TTACTTGAACCGTTGCATCTG-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 내막 복합체(IMC) 암호화 서열이 도입된 pFastBac 벡터에 도입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다. 이때, 상기 pFastBac 벡터에 도입된 M1 및 서열번호 7의 IMC 유전자가 제대로 도입되었는지를 DNA 염기서열결정 결정법에 의해 확인하였다.

[0100] IMC 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(recombinant BaculoViruses, rBVs)를 제조하기 위하여, cellfectin Ⅱ(Invitrogen) 및 SF9 세포를 이용하여 DNA 형질 감염을 수행하였다. IMC 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] <u>제조예 2. 말라리아의 바이러스-유사입자의 제조</u>

[0102] 말라리아의 바이러스-유사입자는 IMC 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 펠렛화

하였다.

[0103] 바이러스-유사입자는 4℃에서 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 동안 재현탁 되었고, 불연속 수크로오스 구배(20-30-60%)를 통해 4℃, 45,000×g에서 1시간 동안 수확하고 정제하였다. 단백질 농도는 QuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich)에 의해 결정하였다.

[0104] 상기 바이러스-유사입자는 웨스턴 블랏 및 전자현미경법을 이용해 확인하였다. 웨스턴 블랏 분석에서, 마우스 혈청을 이용하여 IMC 단백질을 탐침 하였다. 혈청은 말라리아 ANKA 균주에 의해 감염된 4주 후 BALB/c 마우스에서 수집되었다. M1 단백질의 함량은 항-M1 단일클론 항체에 의해 결정되었다. 전자현미경법 및 사이즈 측정을 위해 바이러스-유사입자를 매질 염색하였으며, 투과전자현미경(TEM)을 통해 관찰하였다(CANADA, ALBERTA).

[0105] 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).

[0106] IMC 및 M1의 바이러스-유사입자가 제대로 도입되었는지 확인하기 위하여, 항-말라리아 다클론 항체 및 항-M1 단일클론 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다(도 1C). 구체적으로, SDS-PAGE를 위해 100㎍, 50㎍, 25㎍의 말라리아의 바이러스-유사입자를 각각 로딩하였으며, 프로브(probe)로서 말라리아원충 감염 혈청 및 항-M1 단일클론 항체를 사용하였다.

[0107] 결과적으로 IMC 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(rBVs)에 의해 감염된 SF9 세포는 비리온과 형태 및 크기가 유사한 입자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0108] <u>실험예 1. 동물모델에서의 면역 유도 활성 시험</u>

[0109] 상기 제조예 2의 바이러스-유사입자를 생쥐에 접종 후 유도되는 면역 반응을 확인하였다.

[0110] 제조예 2의 바이러스-유사입자를 근육접종(Intramuscular route) 시킨 후 생쥐로부터 정해진 시기에 혈액을 수집하여 ELISA법을 통해 혈청의 말라리아 특이적 IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b 항체의 형성 정도를 측정하였다(도 2).

[0111] 그 결과, 상기 생쥐의 IgG1, IgG2b의 항체 형성 정도는 아무런 변화가 없는 반면(도 2B 및 2D), 상기 바이러스-유사입자의 접종에 의해 면역성이 형성된 생쥐의 총 IgG, IgG2a 반응은 접종 후 1주 및 4주에 현저하게 증가한 것을 확인하였다 (도 2A, 2C). 이러한 결과로부터 본 발명의 말라리아의 바이러스-유사입자를 접종함으로써 말라리아 IMC-특이적 항체가 점진적으로 성숙된다는 사실을 확인하였다.

[0112] 또한, 감염(challenge infection)에 따른 항체 반응 프로파일을 확인하기 위해 바이러스-유사입자를 접종한 생쥐에 말라리아 원충(*Plasmodium berghei* ANKA)을 복강 경로로 감염시킨 후 말라리아 특이적 IgG, IgG2a, IgG1 및 IgG2b 항체의 형성 정도를 측정하였다(도 3).

[0113] 그 결과, 상기 생쥐의 IgG1, IgG2b의 항체 형성 정도는 여전히 아무런 변화가 없는 반면(도 3B 및 3D), 상기 바이러스-유사입자의 접종에 의해 면역성이 형성된 생쥐(Imm+cha)는 접종 없이 감염시킨 마우스(Naive+cha)보다 말라리아 감염에 의해 혈청에서 현저히 높은 수준의 IgG, IgG2a 항체 반응이 일어나는 것을 확인하였다(도 3A, 3C). 이러한 결과는 상기 바이러스-유사입자 접종에 의해 면역력이 형성된 생쥐가 말라리아 감염에 의해 말라리아 원충 특이적인 IgG, IgG2a의 항체를 매우 신속하게 생성할 수 있음을 의미한다.

[0114] 즉, 상기 실험 결과는 제조예 2의 바이러스-유사입자가 말라리아에 대한 높은 면역성을 제공하고, 말라리아의 감염에 반응하여 조직 계통의 항체 반응을 효과적으로 유도할 수 있음을 시사한다.

[0115] <u>실험예 2. 감염에 따른 방어적 면역 활성 시험(감염률)</u>

[0116] 제조예 2의 바이러스-유사입자를 생쥐에 접종 후 유도되는 방어적 면역 효과를 확인하였다.

[0117] 제조예 2의 바이러스-유사입자 백신 접종 후, 말라리아 원충(*Plasmodium berghi* ANKA)을 감염시킨(challenge infection) 생쥐를 2주 후 희생시키고 말라리아원충 감염률을 유세포 분석기(flow cytometry)로 비교하였다(도 4A 내지 4C).

[0118] 그 결과, 상기 바이러스-유사입자 접종에 의해 면역성이 형성된 생쥐(Imm+Cha)는 음성 대조군(Naive+Cha)과 비교하여 높은 방어 면역(protective immunity)을 나타내는 것을 확인하였다. 특히, 혈액 중에 기생충이 존재하는 기생충혈증(Parasitemia)이 현저히 감소한 것을 확인하였다(도 4D, *P<0.05).

[0119] 또한, 말라리아 감염에 의해 몸무게의 변화를 측정한 결과, 면역성이 형성된 생쥐(Imm+Cha)는 말라리아에 감염

된 마우스(Naive+Cha) 대비 몸무게 감소 정도가 완화되었다(도 5).

[0120] 상기 결과는 본 발명의 바이러스-유사입자가 말라리아 감염에 대한 방어적 면역 효과를 유도할 수 있음을 시사한다.

[0121] <u>실험예 3. 항체-분비 세포(B 세포) 반응, T 세포 반응 시험</u>

[0122] 제조예 2의 바이러스-유사입자를 생쥐에 접종 후 항체-분비 세포 반응을 확인하였다.

[0123] 구체적으로, 상기 생쥐를 감염 후 2주 뒤에 희생시키고, 말라리아에 의해 감염된 비장 세포를 *in vitro* 배양하여 비장에서의 T-cell 및 B-cell의 면역 반응을 유세포분석기로 확인하였다.

[0124] 그 결과, 바이러스-유사입자의 접종에 의해 면역력이 형성된 마우스(Imm+Cha)는 정상 마우스(Naive) 및 감염된 마우스(Naive+Cha) 대비 현저히 증가한 CD4+ T세포 수준(도 6A 내지 6D) 및 CD8+ T세포 수준(도 6E 내지 6H)을 보이는 것을 확인하였다.

[0125] 또한, Total B-cell의 수준에서도 면역력이 형성된 마우스(Imm+Cha)는 정상 마우스(Naive) 및 감염된 마우스(Naive+Cha) 대비 증가한 결과를 나타내는 것을 확인하였다(도 7).

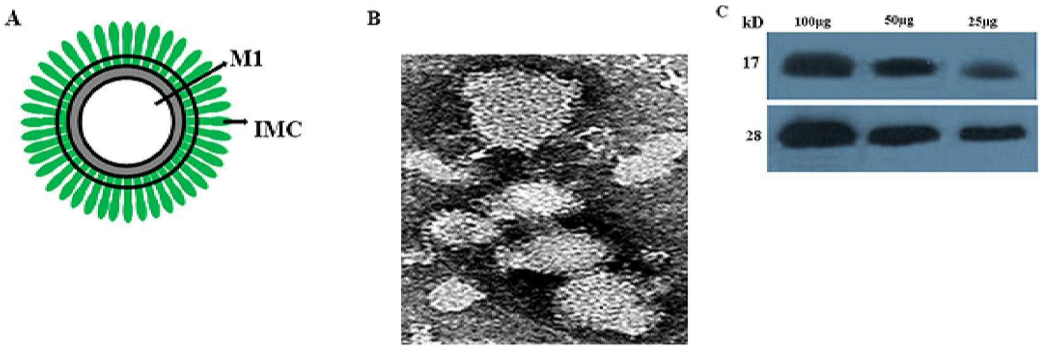
[0126] 즉, 상기한 실험 결과로부터 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 생쥐는 말라리아의 감염에 대한 매우 높은 수준의 면역성을 획득할 수 있음을 확인하였다.

[0127] 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.

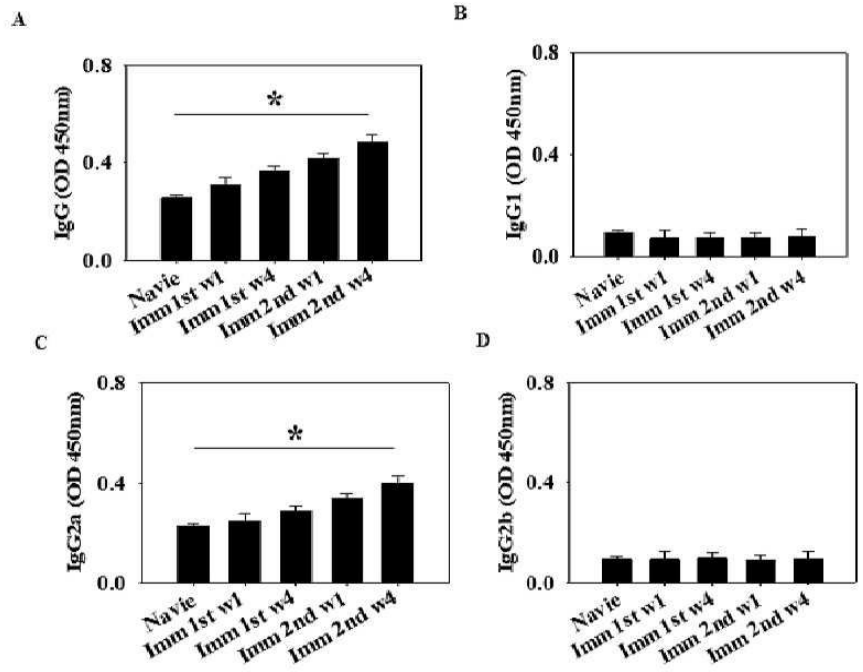
[0128] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

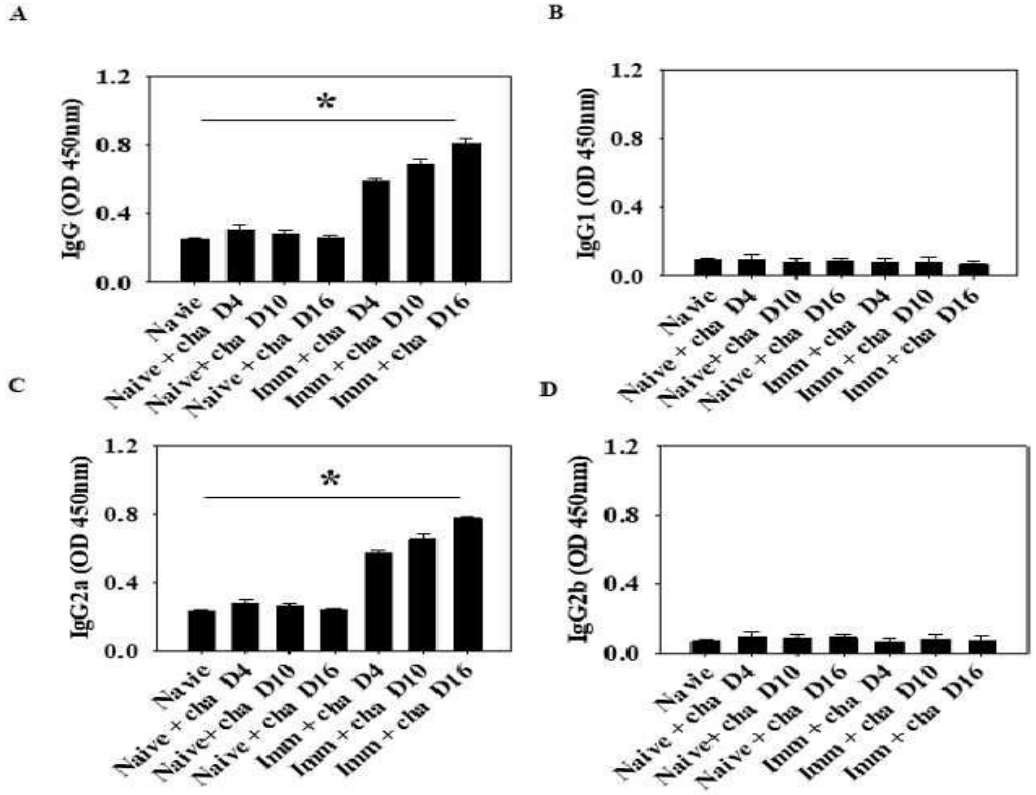
도면1



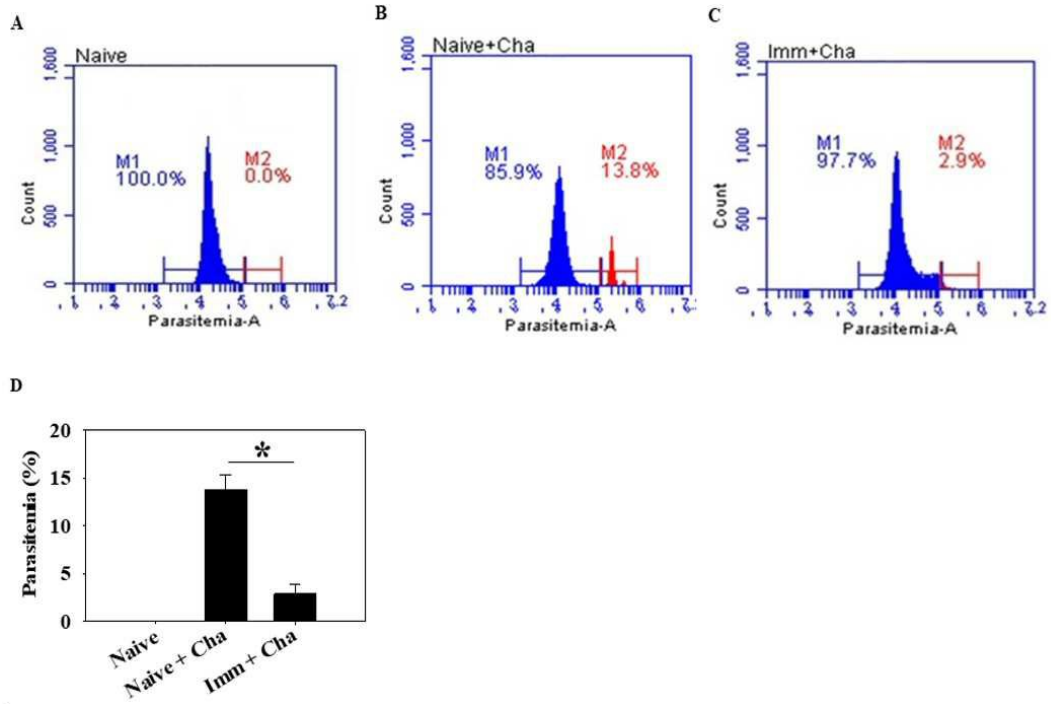
도면2


A
B
C
D
IgG (OD 450nm)
IgG1 (OD 450nm)
IgG2a (OD 450nm)
IgG2b (OD 450nm)
0.0
0.4
0.8
*
Navie
Imm 1st w1
Imm 1st w4
Imm 2nd w1
Imm 2nd w4

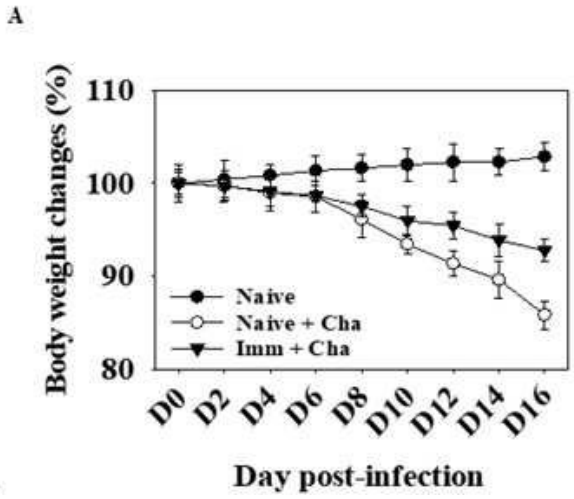
도면3


A
B
C
D
IgG (OD 450nm)
IgG1 (OD 450nm)
IgG2a (OD 450nm)
IgG2b (OD 450nm)
0.0
0.4
0.8
1.2
*
Navie
Naive + cha D4
Naive+ cha D10
Naive + cha D16
Imm + cha D4
Imm + cha D10
Imm + cha D16

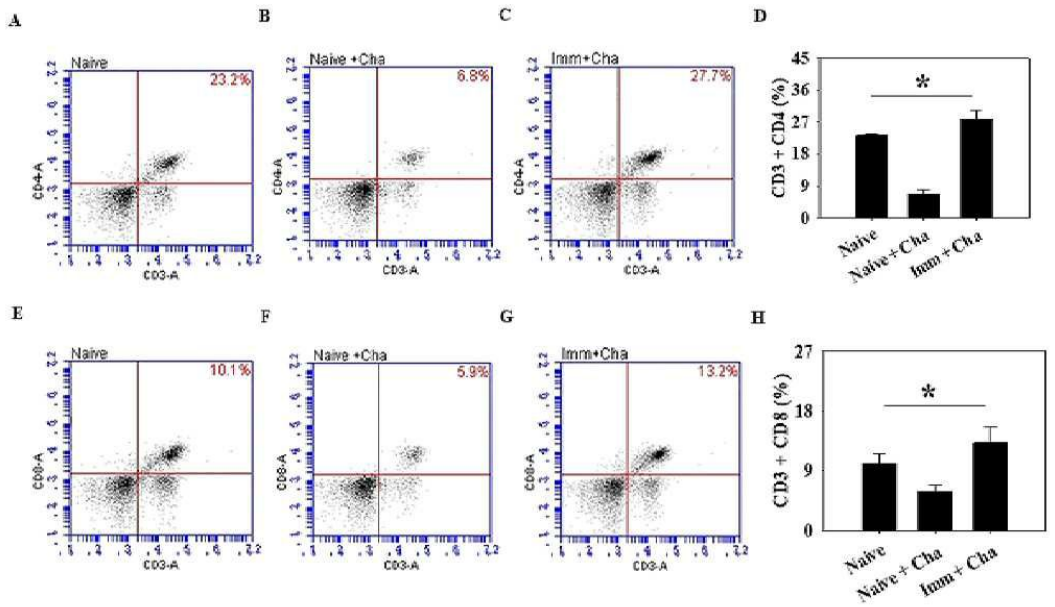
도면4


A
Naive
M1
100.0%
M2
0.0%
Count
Parasitemia-A
B
Naive+Cha
M1
85.9%
M2
13.8%
Count
Parasitemia-A
C
Imm+Cha
M1
97.7%
M2
2.9%
Count
Parasitemia-A
D
Parasitemia (%)
*
Naive
Naive + Cha
Imm + Cha

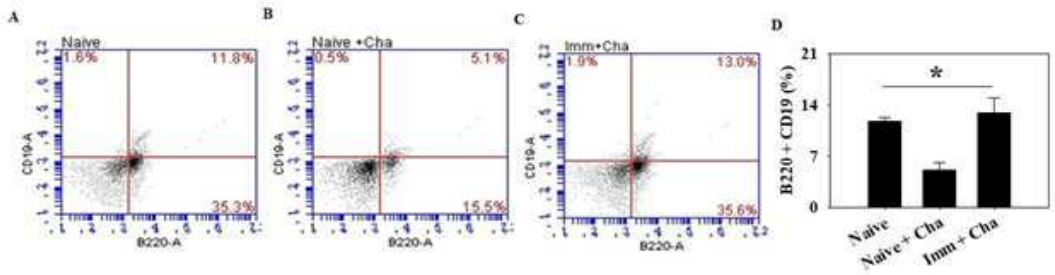
도면5


A
Body weight changes (%)
Naive
Naive + Cha
Imm + Cha
D0
D2
D4
D6
D8
D10
D12
D14
D16
Day post-infection

도면6



도면7



서 열 목 록

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

<120> VIRUS-LIKE PARTICLES COMPRISING THE INNER MEMBRANE COMPLEX OF PLASMODIUM BERGHEI, AND VACCINE COMPOSITIONS USING THEREOF

<130> 19PP30062

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza virus matrix protein, M1

<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> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plasmodium berghei ANKA, inner membrane complex

<400> 2

Met Gly Asn Ser Leu Cys Cys Ile Asn Asp Leu Lys Asn Asn Lys Ser
1 5 10 15

Asn Ile Asp Ile Tyr Ala Tyr Pro Ser Gln Glu Lys Tyr Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Asn Trp Thr Leu Glu Thr Trp Ile Asp Lys Tyr Lys Asn Gly Asn
35 40 45

Thr Ile Arg Val Ala Phe Pro Asp Gly Asn Glu Ile Gln Cys Tyr Phe
50 55 60

Lys Ile Phe Leu Asn Glu Lys Cys Phe Glu Leu Ser Leu Asp Asn Lys
65 70 75 80

Val Arg Ile Ile Lys Phe Asn Asp Ile Lys Cys Val Leu His Arg Asn
85 90 95

Ser Cys Glu Ser Leu Leu Glu Ser Glu Gln Asn Leu Leu Lys Ser Pro

100 105 110

Lys Val Ile Gly Ile Arg Leu Ile Ser Thr Leu Lys Ala Ile Ala Phe
115 120 125

Ala Met Asp Ser Pro Gly Glu Glu Arg Met Phe Tyr Glu Phe Ile Lys
130 135 140

Lys His Cys Leu Thr Ala
145 150

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza M1_primer F

<400> 3

tcccccgggc caccatgagc cttctgaccg aggtc 35

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza M1_primer R

<400> 4

ttacttctag attacttgaa ccgttgcatc tg 32

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IMC_primer F

<400> 5

aaaggatcca tgggaaacag cttgtgctgc 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IMC_primer R

<400> 6

ttactcgagt taagcagtta agcaatgctt 30

<210> 7

<211> 453

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plasmodium berghei ANKA, IMC sub-compartment protein 3

<400> 7

atgggaaaca gcttgtgctg cattaacgac ttaaaaaaca acaaatccaa tatagatata 60

tatgcatatc ctagccaaga aaaatatgat gagtatgata attggacatt agaaacttgg 120

atagataaat ataagaatgg taatacaatt agagtagcat ttcctgatgg aaatgaaatt 180

caatgttatt ttaaaatttt tttaaatgaa aagtgctttg aactatcctt agataataaa 240

gttcgtatta taaaatttaa tgatattaag tgtgtactcc acagaaatag ttgtgaatca 300

ttattagaat cagaacaaaa tttattaaaa tcacctaagg ttataggaat tcgattgatt 360

agtacactta aagctattgc ctttgcaatg gatagtcctg gagaggaaag aatgttttat 420

gaatttataa aaaagcattg cttaactgct taa 453