



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0138746
(43) 공개일자 2010년12월31일

(51) Int. Cl.

A61K 9/16 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0048650

(22) 출원일자 2010년05월25일

심사청구일자 2010년05월25일

(30) 우선권주장

1020090056027 2009년06월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한밭대학교 산학협력단

대전 유성구 덕명동 산16-1

(72) 발명자

김창섭

대전광역시 유성구 지족동 877 열매마을아파트
504동 504호

김상현

대전광역시 유성구 상대동 444 목련아파트 202동
503호

장용

대전광역시 서구 도마2동 109-20

(74) 대리인

최규환

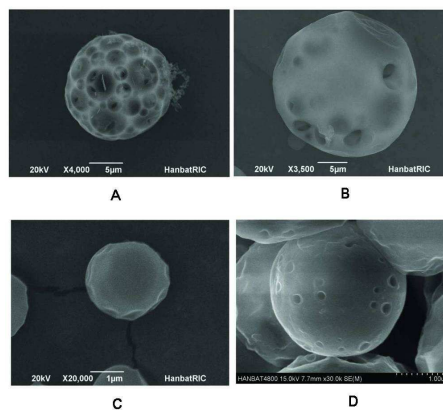
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 안전성이 뛰어난 인플루엔자 바이러스 백신용 재조합 헤마글루티닌 단백질을 함유하는 생분해성 PLGA 미립자의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 바이러스 백신을 개발하고자, 대장균에서 발현시킨 재조합 HA (hemagglutinin) 단백질을 함유하는 PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid)] 미립자를 제조하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자에 관한 것이다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2007-313-D00237

부처명 교육과학기술부 한국연구재단

연구관리전문기관

연구사업명 기초연구과제지원사업

e을 매개체로 하는 안전한 influenza 백신의 개발
연구과제명 감염능력이 결여된 HA2와 야생형 HA1 단백질을 함유하는 생분해성 고분자 microparticl

기여율

주관기관 한밭대학교 산학협력단

연구기간 2007년 12월 1일 ~ 2009년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 HA1 단백질의 1 ~ 16번 아미노산 잔기들이 결실되고, 30번째 아미노산 잔기가 시스테인에서 세린으로 치환되고; 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HA2 단백질의 137번째 아미노산 잔기가 시스테인에서 세린으로 치환되고, 123번째, 124번째 및 127번째 아미노산 잔기에 해당하는 알기닌의 코돈이 AGG에서 CGT으로 각각 치환된 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 백신용 항원성 에피토프 (antigenic epitope)로서의 제조합 HA (hemagglutinin) 단백질을 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화 (microencapsulation)시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자 (microparticle)를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화는

상기 제조합 HA 단백질과 PVA (polyvinylalcohol) 4~5 %(w/v)를 포함하고 있는 수용액상 (aqueous phase)(W₁)을 제조하는 단계;

PLGA를 용매에 용해한 후 (O), W₁ 과 O를 혼합하고 교반기를 이용하여 에멀전시켜 W₁/O를 생성하는 단계;

상기 W₁/O를 PVA 0.5~0.7 %(w/v)를 함유하고 있는 수용액상에 첨가하고 교반을 실시하여 이중 에멀전 (double emulsion)시켜 W₁/O/W₂ 를 생성하는 단계; 및

상기 생성물에 대해 용매 제거 과정 및 경화 (hardening) 과정을 거치는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 용매 제거 과정은 교반 (stirring) 또는 증발 (evaporation)에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 용매 제거 과정 및 경화 과정은 90 ~ 110 rpm의 교반에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 HA2 단백질의 1번째 아미노산 잔기가 글리신에서 글루탐산 또는 발린으로 치환된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 HA2 단백질의 융합 펩티드(fusion peptide)에 해당하는 1 ~ 22번째 아미노산 잔기들이 결실된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 HA2 단백질의 TMD (transmembrane domain)에 해당하는 186 ~ 221번째 아미노산 잔기들이 결실된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 융합 펩티드 및 TMD 부위가 제거되어 막 융합 기능이 상실됨으로써 생체 안전성이 뛰어나면서 수용성이 향상된 HA2 단백질 단편과, intramolecular disulfide bond에 의한 inclusion body 형성을 방지하기 위하여 C30S로 아미노산이 치환되어 있는 wild-type과 유사한 HA1 단백질을 항원성 에피토프로 함께 포함된 PLGA 미립자를 W/O/W 이중 에멀전 방법을 이용하여 제조하는 방법 및 이와 같이 제조된 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인플루엔자 바이러스 (influenza virus)는 Orthomyxoviridae 과에 속하는 바이러스로, single-stranded(-) RNA 가 7 ~ 8개로 segmented되어 있는 게놈을 가진다. 핵단백질과 세포간질 단백질의 항원성 차이에 따라 크게 A, B 그리고 C형으로 나눈다. 인플루엔자 바이러스 A는 바이러스의 envelope에 있는 표면단백질인 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)의 항원성 차이에 따라 각각 15가지 타입 (H1-H15) 그리고 9가지 타입 (N1-N9)으로 나뉜다 (Cross et al. 2001. EMBO J., 20: 4432-4442).

[0003] HA 단백질은 막 당단백질로서 하나의 폴리펩티드 (전구체 HA0)로 발현된 후, proteolytic cleavage에 의해 HA1 과 HA2로 나누어지게 되고 자연 상태에서는 하나의 disulfide bond (HA1의 30번째 아미노산 잔기인 시스테인과 HA2의 137번째 아미노산인 시스테인 간의)로 연결되어 있다 (Swelley et al. 2004. Biochemistry, 43: 5902-5911)(도 1의 (a) 참고).

[0004] 인플루엔자 바이러스가 숙주세포로 침입하기 위해서는 바이러스 envelope 막과 숙주세포 세포막 사이의 막 융합이 일어나야만 한다. 이 과정에는 C-말단에 존재하는 transmembrane domain (TMD)를 가지고 있는 막 단백질 (membrane protein)인 HA2가 관여하는데, HA2의 N-말단에 있는 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 융합 펩티드 (fusion peptide)가 숙주세포 (target cell)의 세포막을 부분적으로 휘저어주는 역할을 함으로써 두 개의 막 계가 융합되는 것으로 알려져 있고, 그래서 HA2 단백질을 막 융합단백질이라고 부르고 있다 (Cross et al. 2001. EMBO J., 20: 4432-4442).

[0005] PLGA[poly(lactic-co-glycolic acid)]는 생체 내에서 젖산과 글리콜산으로 분해되고 최종적으로 이산화탄소와 물로 배출되는 생분해성, 생체 적합성을 갖고 있으며 미국 식품의약품안전청에서 승인된 고분자물질이다 (G Khang et al., 2004, Tissue Eng. Regen. Med., 1, 9).

[0006] 생분해성 고분자 나노-/미립자를 제조하는 기술은 백신 제조뿐만 아니라 전달 시스템으로의 이용, 생체면역 질병치료 등에 관한 연구를 통해 최근 들어 많은 관심을 받고 있다 (Lemoine D, 1998, J Control Release. 54(1):15-27). 바이러스 백신 제조용으로 항원성 단백질을 캡슐화하는 경우는 FDA에서 생체 적합성을 검증받은 생분해성 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)를 이용한 고분자 미립자를 제조하는 방법에 대한 보고에 관심을 가지게 되었다 (Tamber et al., 2005, Adv Drug Deliv Rev. 57(3):357-76).

[0007] DNA 백신 (vaccine)을 제조하는 연구에는 DNA의 특성을 고려한 cationic liposome으로 캡슐화하는 방법이 주로 이용되었으나, 최근에는 PLGA 또는 polycationic polymeric 미립자를 제조하는 시도가 보고되고 있다 (Jilek et al., 2005, Adv Drug Deliv Rev. 57(3):377-90).

[0008] 약물을 전달하기 위한 방법으로서 W/O 단일층 에멀전 (monolayer emulsion method) 미립자 (microparticle)는 높은 초기 방출율을 가지며 일정 양이 방출된 이후에 발생하는 지연시간과 낮은 약물 지속기간을 갖는 단점이 있다 (G Khang et al., 2004, Tissue Eng. Regen. Med., 1, 9).

[0009] 또한 단백질 약물은 대부분 수용성이기 때문에 W/O/W 이중 에멀전 (double emulsion method) 용매 증발법 (solvent evaporation)을 이용하여 주로 미립자를 제조한다 (KJ Cho, 2008, Tissue Eng Regen Med, 5, 172). 본 발명에서도 W/O/W 이중 에멀전 방법을 이용하여 미립자를 제조하였다. 하지만 이 방법은 단일층 에멀전 미립자보다 크기 조절이 어렵고 포접할 수 있는 약물이 제한된다는 단점을 가지고 있다 (JT Ko et al., 2007, Key Eng Mater, 342, 513).

[0010] 인플루엔자 바이러스에 대한 백신 (vaccine)의 제조는 전통적으로 불활성화된 바이러스를 사용하거나 바이러스 입자에서 추출한 HA와 NA 단백질을 사용하고 있으나, 정제 과정에서 완전히 제거되지 못한 viral lipid 등이 함유되어 있어 어린 유아와 노인들에게는 안전성 면에서 아직도 문제가 되고 있다. 또한, 높은 혈청 IgG 반응을 유도하지만 바이러스 침투경로가 되는 코의 분비물에서는 IgA 반응이 유도되지 못하고 있다. 최근에 살아있는

약독화된 (attenuated) 바이러스 (예를 들어, temperature-sensitive)를 백신으로 이용하기 위한 연구가 진행되고 있으나, 활성이 있는 바이러스로 변환될 수 있는 가능성, 낮은 항체 생성 유도도 인하여 높은 dosage로 투여해야 하거나 불활성화된 바이러스를 함께 투여해야 하는 등의 문제점이 있는 것으로 보고되고 있어, 많은 가능성에도 불구하고 아직은 실용화되지 못하고 있는 실정이다.

[0011] HA 단백질을 함유하는 PLGA 고분자 나노-/미립자를 이용한 인플루엔자 바이러스 백신에 관한 2개의 연구 논문이 보고되었으나, egg에서 배양된 인플루엔자 바이러스 입자를 유기용매로 불활성화시킨 후 native 상태의 HA 단백질을 추출 정제하여 사용한 연구로서, 전통적인 불활성화된 바이러스 백신을 제조하는 공정과 유사한 방법을 사용하여 HA 단백질을 추출 정제하여 사용한 것이었다 (Lemoine D, 1998, J Control Release. 54(1):15-27; Hilbert et al., Vaccine. 1999 17(9-10):1065-73). 상기 방법들은 서로 성질이 다른 친수성 HA1과 소수성 HA2를 함께 포함하는 PLGA 고분자 나노-/미립자를 제조할 수 있음을 보여 주었으나, 바이러스 유래의 지질 등의 성분이 완전히 정제되지 못하고 섞여 들어가면서 독성 및 감염의 위험성을 가지고 있다.

[0012] 한국특허등록 제10-0702523호에는 클로닝된 뉴클레오타이드 서열로부터 약독화된 파라인플루엔자 바이러스를 제조하는 방법이 개시되어 있으며, 한국특허공개 제2009-0034297호에는 인플루엔자에 대한 항바이러스제 및 백신이 개시되어 있으나, 본 발명의 생체 안정성이 높은 항원성 에피토프로서의 제조용 HA 단백질을 함유하는 PLGA 미세입자와는 상이하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 N-말단에 존재하는 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 융합 펩티드 (1 ~ 22 아미노산 잔기) 및 C-말단에 존재하는 transmembrane domain (TMD)을 단백질 공학적인 방법으로 제거하여 대장균에서 발현한 변형된 HA2 단백질을, 본 발명에서 인플루엔자 바이러스 백신용 항원성 에피토프로 사용하였다. 이 단백질은 융합 펩티드 자체가 가지는 막 융합 기능이 상실되어 생체 안전성이 뛰어난 새로운 인플루엔자 바이러스 백신용 항원성 에피토프로 작용할 수 있다. 또한, N-말단 신호 서열을 제거하고 (1 ~ 16 아미노산 잔기) intramolecular disulfide bond에 의한 inclusion body 형성을 방지하기 위하여 C30S로 아미노산이 치환된 후 대장균에서 발현된, wild-type과 유사한 HA1 단백질을 항원성 에피토프로 함께 사용하였다.

[0014] 상기와 같이 제조된 변형된 HA1과 HA2 단백질을 함께 포함하는 PLGA 미립자를 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화 방법을 이용하여 제조하였다. 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 융합 펩티드 및 TMD 부위가 제거된 HA2 단백질은 수용성이 증가하여, 친수성 성질의 HA1 단백질과 함께 미세캡슐화가 비교적 용이하게 수행될 수 있는 장점도 있다.

[0015] 고분자 PLGA 미립자를 제조하는 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화 방법의 최적 조건을 유화제 (PVA) 함량, 용매 추출 방법 (stirring 또는 evaporation), 입자 경화시 교반 속도 등을 조절하면서 탐색하였고, SEM (scanning electron microscopy)를 이용하여 제조된 미립자의 크기, 모양 및 표면의 구멍 형성 정도 등을 검증하였다.

[0016] 또한 상기와 같이 제조된 PLGA 미립자는 동결건조한 분말로 보관할 수 있어, 용액 상에서 보다는 단백질의 장기 간 안정성 (long-term stability)이 증가되는 장점을 가지게 된다. 변형된 HA1과 HA2 단백질을 함께 포함하는 PLGA 미립자가 생체 내에서 오랜 기간 항원성 에피토프를 서서히 방출하는 우수한 서방성 (slow release)을 가지는지 *in vitro* 방출 실험을 통하여 검증하였다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 HA1 단백질의 1 ~ 16번 아미노산 잔기들이 결실되고, 30번째 아미노산 잔기가 시스테인에서 세린으로 치환되고; 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HA2 단백질의 137번째 아미노산 잔기가 시스테인에서 세린으로 치환되고, 123번째, 124번째 및 127번째 아미노산 잔기에 해당하는 알기닌의 코돈이 AGG에서 CGT으로 각각 치환된 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 백신용 항원성 에피토프 (antigenic epitope)로서의 제조용 HA (hemagglutinin) 단백질을 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화 (microencapsulation)시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자 (microparticle)를 제조하는 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자를 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따르면, 유아와 노인들에게 요구되는 독성이 없고 향상된 백신 효능을 갖는 인플루엔자 바이러스 백신의 개발이 가능하며, 약물 전달 시스템으로의 활용이 가능하며, 막 융합을 이용한 약물 전달 치료 방법에 활용이 가능하며, 향후 공동 연구를 통한 신규의 생분해성 고분자 물질 및 미립자 제조 공정의 개발이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 HA (hemagglutinin)의 모식도(a)와 본 발명에서 사용한 HA2 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA construct의 종류(b)이다.

도 2는 재조합 HA1과 HA2 단백질 발현을 위한 벡터 construct이다.

도 3은 HPLC를 이용하여 단백질을 정제한 결과이다.

도 4는 미세캡슐화 과정을 나타낸다.

도 5는 HA 단백질을 포함하는 PLGA 캡슐화된 미립자 분말들이다.

도 6는 Indirect ELISA법을 이용한 단백질의 정량곡선이다.

도 7은 혈청에 존재하는 HA(HA1+HA2) 항원 확인 실험 결과이다.

도 8은 anti-HA (anti-HA1 + anti-HA2) 항체 생성 확인 실험 결과이다.

도 9는 항체(anti-HA1) 생성 확인 실험 결과이다.

도 10은 항체(anti-HA2) 생성 확인 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 HA1 단백질의 1 ~ 16번 아미노산 잔기들이 결실되고, 30번째 아미노산 잔기가 시스테인에서 세린으로 치환되고; 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HA2 단백질의 137번째 아미노산 잔기가 시스테인에서 세린으로 치환되고, 123번째, 124번째 및 127번째 아미노산 잔기에 해당하는 알기닌의 코돈이 AGG에서 CGT으로 각각 치환된 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 백신용 항원성 에피토프 (antigenic epitope)로서의 재조합 HA (hemagglutinin) 단백질을 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화 (microencapsulation)시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자 (microparticle)를 제조하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화는

[0023] (a) 상기 재조합 HA 단백질과 PVA (polyvinylalcohol) 4~5 %(w/v)를 포함하고 있는 수용액상 (aqueous phase)(W₁)을 제조하는 단계;

[0024] (b) PLGA를 용매에 용해한 후 (O), W₁ 과 O를 혼합하고 교반기를 이용하여 에멀전시켜 W₁/O를 생성하는 단계;

[0025] (c) 상기 W₁/O를 PVA 0.5 ~ 0.7 %(w/v)를 함유하고 있는 수용액상에 첨가하고 교반을 실시하여 이중 에멀전 (double emulsion)시켜 W₁/O/W₂ 를 생성하는 단계; 및

[0026] (d) 상기 생성물에 대해 용매 제거 과정 (solvent extraction) 및 경화 (hardening) 과정을 거치는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 상기 (a) 및 (c) 단계에 첨가되는 PVA는 바람직하게는 각각 4.2 %(w/v) 및 0.6 %(w/v)이다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 용매 제거 과정은 교반 (stirring) 또는 증발 (evaporation)에 의해 수행될 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 용매 제거 과정 및 경화 과정은 90 ~ 110 rpm, 바람직하게는 100 rpm의 교반에 의해 수행될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법은 상기 (d) 단계 후에 경화 과정을 거친 PLGA 미립자를 액체 질소를 이용하여

급속 냉동을 시킨 후, 동결건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 HA2 단백질의 1번째 아미노산 잔기는 글리신에서 글루탐산 또는 발린으로 치환될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 HA2 단백질의 융합 펩티드 (fusion peptide)에 해당하는 1 ~ 22번째 아미노산 잔기들이 결실될 수 있으며, 동시에 상기 HA2 단백질의 TMD (transmembrane domain)에 해당하는 186 ~ 221번째 아미노산 잔기들이 결실될 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자를 제공한다.
- [0034] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0035] HA2 단백질의 경우 막 융합 기능을 제거하기 위하여 다음과 같이 세 가지 방법을 사용하였다.
- [0036] 첫째, HA2 단백질의 N-말단에 존재하는 융합 펩티드 자체의 막 융합 기능이 저하된 첫 번째 아미노산 잔기가 치환된 G1E HA2와 G1V HA2 mutant 단백질을 제조하여, coiled-coil HA2 trimer는 그대로 유지하면서 막 융합을 막을 수 있도록 하였다. 상기 G1E HA2와 G1V HA2 mutant 단백질은 HA2 단백질의 1번째 아미노산 잔기가 글리신에서 각각 글루탐산 및 발린으로 치환된 것을 의미한다.
- [0037] 둘째, HA2 단백질의 N-말단에 존재하는 22개의 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 융합 펩티드 자체를 제거하여 막 융합 활성을 없애준 HA2(23-185)와 HA2(23-221) 단백질을 단편을 제조하였다. HA2 단백질에 포함된 3개의 rare 알기닌 (arginine) 코돈을 대장균에서 발현에 적합한 코돈으로 치환하였고 (R123, R124, R127), HA1 단백질의 30번째 아미노산 잔기인 시스테인과 intermolecular disulfide bond를 형성할 수 있는 HA2의 137번째 아미노산 잔기인 시스테인을 세린으로 치환하였다 (C137S).
- [0038] HA1 단백질의 경우, N-말단 신호 서열을 제거하고 (HA1(17-344)), intramolecular 또는 intermolecular disulfide bond에 의한 inclusion body 형성을 방지하기 위하여 HA1 단백질의 30번째 아미노산 잔기인 시스테인을 세린으로 치환하였다 (C30S).
- [0039] 재조합 HA1 및 HA2 단백질의 대장균에서의 발현을 위하여, 숙주 세포 균주는 대장균 균주 Rosetta(DE3)pLysS (Novagen)을 사용하였고, O.D.₆₀₀ = 0.8 시점에서 0.5 mM IPTG로 유도 후 18 ~ 20 °C, 110 rpm에서 6 ~ 8시간 발현을 시켰다. 재조합 HA1 및 HA2 단백질의 C-말단에 각각 His7-tag과 His6-tag을 붙여주어 Ni 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제 조건을 확립하였다. 비드에 결합된 단백질을 20 mM과 50 mM 이미다졸이 첨가된 세정 버퍼로 충분히 세척한 후, step-wise 용출을 수행하였다. HA1 단백질의 경우 EDTA와 DTT 및 β-머캅토에탄올을 넣지 않고 세포를 파쇄하였다.
- [0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] **시약 및 기기**
- [0042] 본 발명에서 사용한 HA 유전자는 인플루엔자 바이러스 type A X31 균주 유래이고 플라스미드 pHA에 들어 있다. pET24b(+) 벡터에 삽입하여 대장균의 rare 코돈 문제를 해결한 대장균 균주 Rosetta(DE3)pLysS (Novagen)에서 발현시켰다. Mutant DNA 제조를 위해 사용된 DNA 증폭장치는 Biometra사의 T-GRADIENT 48 모델을 사용하였다.
- [0043] Homogenizer (Ultra-Turrax, IKA)와 scanning electron microscopy (SEM; JEOL JSM-6390, Japan), evaporator (RUCHI, Rotavapor R-210)를 사용하여 실험을 진행하였다. PVA (폴리비닐알콜)와 디클로로메탄은 SIGMA-ALDRICH에서 구입하였으며 PLGA (RESOMER® RG 502H)는 Boehringer Ingelheim에서 구입하였다.
- [0044] 서방성 검증 실험에서 사용한 일차 항체인 마우스 His Tag 항체는 ABGENT에서, 이차 항체인 염소 HRP-conjugated 항-마우스 IgG는 Molecular Probes에서 구입하였다.
- [0045] **실시예 1: Coiled-coil HA2 trimer의 interface에 존재하는 d position mutant의 제조**

- [0046] 본 발명에서 사용한 모든 HA2 construct는 아래와 같은 프라이머를 이용하여 3개 (R123, R124, R127)의 rare 알기닌 코돈 (AGG)을 대장균에서 발현에 적합한 코돈 (CGT)으로 치환하여 사용하였다.
- [0047] HA-3R-F
- [0048] ACAAGCTGTTTGAACAAACACGTCGTCAGTGCAGTGAATGCTGAAGAGAT(서열번호 3)
- [0049] HA-3R-R
- [0050] ATCTCTTCAGCATTTTCACGCAGTTGACGACGTGTTTTTCAACAGCTTGT(서열번호 4)
- [0051] 본 발명에서 수행한 모든 site-directed mutagenesis는 Stratagene (USA)의 QuickChange[®] 방법을 변형하여 PCR (Biometra Tgradient Thermocycler)을 이용하여 수행하였다. 돌연변이를 일으키고자 하는 자리를 가운데에 포함하고 있는 동일한 위치를 포함하는 30 ~ 35 bp 길이의 정방향 및 역방향 mutagenic 프라이머 (Bioneer, Korea)를 사용하였다. 플라스미드 DNA 전체를 복제해야 하기 때문에 fidelity가 우수하면서도 합성속도가 빠른 (1kb/min) *Pfu* Turbo[®] DNA polymerase를 사용하여 일반적으로 다음의 조건으로 PCR 반응을 수행하였다; 25 cycle (95°C 45 sec; 55°C 1 min; 68°C 8 min).
- [0052] PCR 반응이 종결된 후에는 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 linear한 형태의 플라스미드 크기의 DNA 밴드가 증폭되었는지를 확인한 후, *Dpn* I 제한효소를 3시간 정도 처리하여 *E. coli* DH5α에서 추출하여 사용한 parental DNA template를 최대한 제거하였다. *E. coli* DH5α에 형질전환을 시킨 후 2 ~ 3개 정도의 콜로니로부터 플라스미드 DNA miniprep을 하여 DNA sequencing (Solgent, Korea)을 통하여 원하는 위치가 변형된 것을 확인하였다.
- [0053] **실시예 2: N-말단 아미노산 mutant HA2의 제조**
- [0054] 감염능력이 결여되어 생체 안전성이 뛰어날 것으로 판단되는 G1E HA2 mutant와 G1V HA2 mutant를 항원성 에피토프로 사용하기 위하여 site-directed mutagenesis를 통하여 각각 제조하였다. 위의 두 가지 종류의 HA2 mutant는 α-helix propensity가 그대로 유지되어 coiled-coil HA2 trimer를 형성할 수는 있지만 막 융합 활성은 거의 없는 것으로 보고된 바 있다. 이때 주형으로 사용한 플라스미드 DNA construct는 HA2(1-185)였다 (도 1(b)의 B).
- [0055] **실시예 3: 융합 펩티드가 제거된 mutant HA2의 제조**
- [0056] 본 발명에서 사용한 인플루엔자 바이러스 type A X31 균주 유래의 HA2 유전자 (1 ~ 221)는 플라스미드 pH A 상에 HA1 유전자 다음에 위치하고 있다. 자연 상태의 바이러스에서 만들어진 온전한 HA2 단백질의 경우 C-말단 TMD 부위는 바이러스 envelope에 위치하고 N-말단 융합 펩티드 부위는 표적 세포막을 공격하게 된다. 이러한 형태는 분리정제 과정에서 detergent를 사용하여 형성되는 micelle 구조나 artificial membrane (vesicle, liposome) 위에서 두 부위가 하나의 막 상에 동시에 위치하게 되는 구조적인 문제점을 야기할 수가 있다. 같은 이유로 발현된 온전한 HA2 단백질이 발현 숙주세포의 세포막을 불안정하게 만들어 야기되는 세포독성으로 인하여 정상적인 단백질 발현을 유도하기가 어렵다고 판단된다.
- [0057] 따라서, HA2 유전자 (1 ~ 221) 부위 중 N-말단 융합 펩티드 부위 또는 C-말단 TMD 부위를 제거한 HA2(1-185), HA2(23-221) 또는 HA2(23-185) 등 이러한 문제점을 피할 수 있는 변형된 construct를 제조하여, His-tag 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는 발현백터인 pET24b(+) 백터에 삽입하였다.
- [0058] 먼저, HA2의 막 융합 활성부위인 융합 펩티드 (1 ~ 22번째 아미노산까지)가 제거된 HA2(23-221) DNA 단편을 가지는 플라스미드 DNA를 제조하였다 (도 1(b)의 C). 인플루엔자 바이러스 type A X31 균주 유래의 전체 HA 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pH A를 주형으로 이용하여 아래의 2개의 프라이머를 사용하여, *Pfu* Turbo[®] DNA polymerase를 사용하여 다음과 같은 PCR 반응을 통하여, HA2(23-221) 부위만을 증폭하였다; 30 cycle (95°C 45 sec; 53°C 1 min; 68°C 2 min).
- [0059] HA2(-FP)_NdeI_F: CACTTCGTCATATGGGTTTCAGGCATCAAAATTCTG(서열번호 5)
- [0060] HA2_221_SalI_R: CACTTCGTGTCGACAATGCAATGTTGCACCTAATGT(서열번호 6)

- [0061] 위에서 얻어진 HA2(23-221) DNA 단편을 *Nde* I과 *Sal* I으로 각각 double digestion 하고 *Nde* I과 *Sal* I으로 잘라놓은 pET-24b(+) 벡터에 라이게이션하여 DH5 α에 형질전환을 실시하였다. 원하는 형태로 라이게이션이 이루어진 콜로니를 선별하기 위하여 mini-prep을 실시한 후 *Nde* I과 *Sal* I으로 double digestion을 하거나 콜로니 PCR을 실시하였다. 이렇게 선별한 플라스미드 DNA는 다시 DNA sequencing을 통하여 다시 확인하였다 (도 2).
- [0062] 위와 같은 방법으로 얻어진 HA2(23-221) 플라스미드 DNA construct를 재조합 대장균에서 발현할 경우, intramolecular 또는 intermolecular disulfide bond가 형성되어 aggregated form으로 inclusion body의 형태로 침전이 될 가능성이 많다. 그래서 여기에 137번째 시스테인을 세린으로 치환시키기 위한 site-directed mutagenesis를 실시하였다; 25 cycle (95°C 45 sec; 53°C 1 min; 68°C 2 min). 결과적으로 HA2(23-221)/C137S 플라스미드 DNA construct를 최종적으로 확보하였다.
- [0063] 그러나, 위의 HA2(23-221) 플라스미드 DNA construct는 아직도 C-말단에 소수성 성질을 가지는 TMD (transmembrane domain)을 그대로 가지고 있기 때문에, 분리정제 과정에서 Triton X-100과 같은 detergent를 사용하여 micelle 구조가 형성되게 해야만 한다. 그래서 우선은 융합 펩티드 부위와 함께 TMD 부위도 함께 제거된 형태인 HA2(23-185) DNA 단편만을 가지는 플라스미드 DNA construct를 제조하여 사용하기로 결정하였다 (도 1(b)의 D).
- [0064] pET24b(+) 벡터에 들어있는 HA2(1-185)/C137S construct를 주형으로 직접 이용하여, 아래의 2개의 프라이머를 사용하여, HA2(23-221) 플라스미드 DNA construct를 얻을 때와 같은 조건에서 아래의 2개의 프라이머를 사용하여, *Pfu* Turbo[®] DNA polymerase를 사용하여 다음과 같은 PCR 반응을 통하여, HA2(23-185)/C137S 부위만을 증폭하였다; 30 cycle (95°C 45 sec; 53°C 1 min; 68°C 2 min).
- [0065] HA2(-FP)_NdeI_F: CACTTCGTCATATGGGTTTCAGGCATCAAAATTCTG(서열번호 7)
- [0066] HA2_185_SalI_R: CACTTCGTGTCGACCCAGTCTTTGTATCCAGACTTCA(서열번호 8)
- [0067] HA2(23-185)/C137S DNA 단편을 플라스미드 DNA construct를 얻을 때와 같은 방법으로 pET-24b(+) 벡터의 *Nde* I과 *Sal* I 자리에 삽입하여 원하는 형태를 확보하였다.
- [0068] **실시예 4: N-말단 신호 서열이 제거된 재조합 HA1의 제조**
- [0069] 인플루엔자 바이러스 type A X31 균주 유래의 HA 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pHA 상에 HA2 유전자 앞에 위치하고 있는 HA1 유전자 부위 중 N-말단에 존재하는 16개의 아미노산 잔기들로 구성된 신호 서열을 제외한 나머지 부위를 PCR을 이용하여 복제한 후 His-tag 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는 발현벡터인 pET24b(+) 벡터에 삽입하였다.
- [0070] 먼저, 인플루엔자 바이러스 type A X31 균주 유래의 전체 HA 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pHA에서 HA1 유전자 DNA 안에 존재하는 *Nde* I 자리를 먼저 없애주기 위하여 (아미노산의 변형은 없이) 아래의 2개의 프라이머를 사용하여 site-directed mutagenesis를 실시하였다.
- [0071] HA1_NdeIX-F: GTAAACAAGATCACATACGGAGCATGCCCAAG(서열번호 9)
- [0072] HA1_NdeIX-R: CTTGGGGCATGCTCCGTATGTGATCTTGTTTAC(서열번호 10)
- [0073] 이렇게 HA1 유전자 DNA 안에 존재하는 *Nde* I 자리가 제거된 pHA를 주형으로 이용하고 아래의 2개의 프라이머를 사용하여, *Pfu* Turbo[®] DNA polymerase를 사용하여 다음과 같은 PCR 반응을 수행하여, HA1(17-344) 부위만을 증폭하였다; 30 cycle (95°C 45 sec; 53°C 1 min; 68°C 2 min). HA2 DNA construct를 얻을 때와 같은 방법으로 pET-24b(+) 벡터의 *Nde* I과 *Xho* I 자리에 삽입하여 원하는 형태를 확보하였다.
- [0074] HA1_NdeI-F: CGCTACTAGCATATGAAGACCATCATTGCTTTGA(서열번호 11)
- [0075] HA1_XhoI-R: CGCGTGGTCTCGAGAGTTTGTCTCTGGTACATT(서열번호 12)
- [0076] 확보한 HA1(17-344) 플라스미드 DNA construct를 DNA sequencing을 한 후에 문헌에 보고된 인플루엔자 바이러스 type A X31 균주 유래의 HA1 유전자와 비교해 본 결과, 173번째 아미노산 잔기가 세린에서 루신으로 바뀌어져 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 30번째 아미노산 잔기인 시스테인은 native 상태에서 HA2 단백질의 C137과 intermolecular disulfide bond를 형성하게 된다 (도 1의 (a) 참조). 그러나 재조합 HA1 유전자만을 대장균

에서 발현할 경우, 이 C30 자리에 intramolecular 또는 intermolecular disulfide bond가 형성될 수 있어 aggregated form으로 inclusion body의 형태로 침전이 될 가능성이 많다고 판단할 수 있었다. 결국 HA1(17-344) 플라스미드 DNA construct에 C30S와 L173S의 double mutation을 도입하기 위해서 site-directed mutagenesis 과정을 순차적으로 다음과 같은 조건에서 수행하여 최종적으로 HA1(17-344)/C30S 플라스미드 DNA construct를 제조하였다.

[0077] C30S mutation: 30 cycle (95°C 45 sec; 55°C 1 min; 68°C 10 min)/2% DMSO 첨가

[0078] L173S mutation: 25 cycle (95°C 45 sec; 55°C 1 min; 68°C 10 min)

[0079] 실시예 5: 재조합 대장균에서의 발현 및 정제

[0080] 재조합 HA1 및 HA2 단백질의 대장균에서의 발현을 위하여, 숙주 세포 균주는 codon usage 문제를 해결할 수 있는 대장균 균주 Rosetta(DE3)pLysS (Novagen)을 사용하였다.

[0081] 가. HA2 단백질

[0082] HA2(23-185)/C137S 플라스미드 DNA construct (His6-tag)의 단백질 발현을 위한 최적 조건을 다음과 같이 결정하였다. O.D.₆₀₀ 값 0.7에서 0.5 mM IPTG로 유도 후 20 °C, 110 rpm에서 6시간의 발현 조건으로 발현하고 Ni 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제 조건을 확립하였다. 비드에 결합된 단백질을 20 mM 이미다졸이 들어 있는 세정 버퍼로 충분히 세척한 후, step-wise 용출을 수행하였다.

[0083] SDS-PAGE에서 확인한 결과, HA2의 경우는 많은 양이 발현되었고 impurity가 거의 없었다 (데이터 미제시).

[0084] 나. HA1 단백질

[0085] HA1(17-344)/C30S 플라스미드 DNA construct (His6-tag)를 HA2 단백질의 경우와 같은 조건으로 대장균에서 발현 및 정제를 시도하였으나, 발현 양도 적고 정제 후 impurity 밴드가 계속해서 많이 남아 있었다. 이러한 재조합 HA1의 발현과 정제의 문제를 해결하기 위하여, 우선 HA2 단백질의 경우와 같은 조건으로 대장균에서 발현을 시킨 후, EDTA와 DTT 및 β-머캅토에탄올을 넣지 않고 세포를 파쇄하여 HA1 단백질을 정제하였다. 이전의 정제 조건에서 발현과정에서 형성되었을 수 있는 intramolecular 또는 intermolecular disulfide bond를 환원시켜 주기 위해서 1 mM DTT를 넣고 세포를 파쇄하였으나, 오히려 첨가된 DTT가 발현된 HA1(17-344)/C30S(His6) 단백질이 Ni-NTA 아가로스 비드에 결합하는 것을 방해하여, 결과적으로 적은 양의 단백질만을 얻었던 것으로 판단되었다.

[0086] 여기에 purity 개선을 위해 His-tag을 더 붙여 비드와의 결합력을 높이고 세정 작업을 두 배 이상으로 늘려 수행함으로써 불순물을 제거하려는 시도를 하였다. His6이 붙어있는 HA1(17-344)/C30S DNA construct를 가지는 pET-24b(+) 플라스미드 DNA를 주형으로 사용하여 HA1_His8_F와 HA1_His8_R 프라이머를 가지고 49°C, 30 cycle PCR 반응으로 site-directed mutagenesis를 수행한 결과, DMSO를 넣지 않은 샘플에서 복제된 DNA 밴드가 보이는 것을 확인할 수 있었다. 확인된 DNA를 가지고 Dpn I 처리를 거친 뒤 *E. coli* DH5α에 형질전환을 실시하여 얻은 콜로니 중 4개로부터 플라스미드 DNA mini-prep을 하여 DNA sequencing을 한 결과, 우연히도 His7과 His8으로 치환된 construct를 각각 얻게 되었다.

[0087] His7과 His8으로 치환된 HA1 construct를 각각 대장균 균주 Rosetta (DE3)pLysS에서 세포의 배양조건, 유도 시기, 유도 후 발현 시간 등 여러 가지 변수를 변경해 가면서 HA1 단백질 발현을 위한 최적 조건을 다음과 같이 구할 수 있었다. His7 construct를 사용하여, O.D.₆₀₀ 값 0.8에서 0.5 mM IPTG로 유도 후 18 °C, 110 rpm에서 8 시간 동안 배양하였다. 정제 과정에서도 EDTA와 DTT 및 β-머캅토에탄올을 넣지 않고 세포를 파쇄하여, 비드에 결합된 단백질을 20 mM 이미다졸이 들어 있는 세정 버퍼로 비드를 충분히 세척해 준 후, 50 mM 이미다졸이 들어 있는 세정 버퍼로도 두 차례 세정하여 각각 1 mL의 100 mM, 150 mM, 200 mM 이미다졸 버퍼로 순차적으로 용출을 실시한 결과 HA1 단백질의 발현 문제는 크게 개선되었으나, purity를 높이기 위해서는 추가적인 정제 과정이 필요한 것으로 판단된다.

[0088] 발현된 HA1 및 HA2 단백질의 고순도 정제를 위하여 His-tag affinity chromatography를 이용하여 1차로 부분 정제된 단백질을 5RPC 칼럼을 사용한 HPLC를 활용하여 고순도로 정제하였다 (도 3). 샘플 부피는 200μl이고, 버

퍼 A는 증류수 + 0.1% TFA, 버퍼 B는 아세트나이트릴 + 0.1% TFA이며, 아세트나이트릴 구배는 37-47% 및 40-52%이다.

[0089] 실시예 6: 제조합 HA1과 HA2를 함유하는 PLGA 미립자의 제조

[0090] 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 융합 펩티드 및 TMD 부위가 제거되어 막 융합 기능이 상실됨으로써 생체 안전성이 뛰어나면서 수용성이 향상된 HA2 단백질을 단편과, intramolecular disulfide bond에 의한 inclusion body 형성을 방지하기 위하여 C30S로 아미노산이 치환되어 있는 wild-type과 유사한 HA1 단백질을 항원성 에피토프로 함께 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신용 PLGA 미립자를 W/O/W 이중 에멀전 미세캡슐화 방법을 이용하여 제조하였다.

[0091] 정제된 HA1과 HA2 단백질을 이중 에멀전 (double emulsion) ($W_1/O/W_2$) 방법을 이용하여 PLGA로 캡슐화하는 실험을 다음과 같이 수행하였다 (도 4).

[0092] HA1 (His7) 단백질의 분자량은 37347.2 이고 HA2 단백질의 경우는 20173.4 이다. 캡슐화 했을 때의 총 단백질 질량이 400 $\mu\text{g/mL}$ 이므로, HA1 과 HA2 의 몰비를 1 : 1로 하기 위하여 질량비를 1.85 : 1 로 하여 함유시켰다. HA1 과 HA2를 합한 HA 단백질과 PVA (polyvinylalcohol) 2.8 %(w/v)를 포함하고 있는 수용액상 (aqueous phase) 1 mL를 만들었다 (W_1). PLGA를 1.0 % 농도로 디클로로메탄 (methylene chloride) 6 mL에 녹인 후 (O), W_1 과 O를 섞고 homogenizer (Ultra-Turrax, IKA)로 9,500 rpm 30 sec 반응시켜 에멀전 시켰다 (W_1/O). 위 생성물을 다시 PVA 0.4 %(w/v)를 함유하고 있는 수용액상 54 mL 에 넣고 homogenizer를 4,000 rpm에서 30 sec 간 교반을 실시하여 이중 에멀전 시켰다 ($W_1/O/W_2$). 이렇게 얻어진 결과물은 다시 150 rpm 으로 3 시간 동안 용매 제거 (solvent extraction) 과정을 거쳤다. 이때에 오일상에 있던 디클로로메탄이 빠져나오면서 미립자에 작은 pore들이 생기면서 단단해지는 현상이 일어나게 된다. 생성된 미립자는 3차 증류수를 이용하여 세척 작업을 3회 실시하는 경화 (hardening) 과정을 거치면서 캡슐화되지 못한 HA 단백질과 미립자에서 빠져나온 용매를 함께 제거하였다. 이러한 방법으로 얻은 PLGA 미립자를 액체 질소를 이용하여 급속 냉동을 시킨 후, 감압 하에서 동결 건조 (freeze drying)을 수행하여 수분을 증발시키고 PLGA에 캡슐화된 미립자를 얻을 수 있었다.

[0093] 정확한 표면형상을 얻기 위해 SEM 촬영을 실시하였다. 동결건조된 미립자 샘플을 aluminum stub 위에 conductive carbon tape를 이용하여 고정하여, Auto Multi Coater를 이용하여 금 코팅을 진공상태에서 실시한 후, scanning electron microscopy (SEM; JEOL JSM-6390, Japan)를 사용하여 적정한 배율에서 미립자의 표면 모양 사진을 촬영하였다 (도 5의 A). SEM 촬영 결과, 미립자 표면에 많은 수와 큰 크기를 갖는 pore가 발견되었다. 큰 크기를 갖는 pore가 많을 경우 단백질의 캡슐화에 문제가 있을 것으로 보고 이를 개선하기 위한 실험을 실시하였다. 미세캡슐화 방법의 최적 조건을 유화제 (PVA) 함량, 용매 추출 방법 (stirring 또는 evaporation), 입자 경화시 교반 속도 등을 조절하면서 아래와 같이 탐색하였다.

[0094] 두 번째로 실시한 실험은 첫 번째 실험 대비 수용액상 (W_1)과 수용액상 (W_2)에 포함되어 있는 PVA 함량을 1.5배씩 늘려 각각의 함량을 4.2 %(w/v)와 0.6 %(w/v)로 바꾸어 실험을 진행하였다. 이렇게 얻어진 미립자의 표면 영상을 확인하기 위해 SEM 사진을 촬영하였다. SEM 촬영 결과 기존의 미립자에 비해 표면에 존재하는 pore의 개수와 크기가 줄어든 것을 확인할 수 있었으나 여전히 큰 pore가 존재함을 발견할 수 있었다 (도 5의 B).

[0095] 세 번째로 PVA의 함량을 1.5배 증가시킨 조건에서 오일 층의 유기용매인 디클로로메탄이 빠져나오는 시간을 조절하기 위하여 교반기 대신 증발 (evaporation) 방법을 사용하였다. 약간의 감압을 가한 rotary evaporator (BUCHI, rotavaper R-210)를 이용하여 50 rpm으로 3시간 동안 용매제거 및 경화 과정을 동시에 수행하였다. 이외의 실험 방법은 전과 동일하다. 실험에서 얻어진 미립자의 표면 영상을 확인하기 위해 SEM 사진을 촬영하였다. 그 결과 pore가 거의 없는 표면 형태를 나타내는 미립자를 얻어낼 수 있었다 (도 5의 C).

[0096] 하지만 이러한 형태의 미립자는 단백질을 잘 캡슐화할 수 있었지만 생체 내 방출 시 단백질이 잘 빠져나오지 못할 수도 있다는 문제점을 가지고 있어, 적당한 수와 작은 크기의 pore를 가지는 미립자를 만들기 위하여 다음 실험을 진행하였다.

[0097] 상기 실험의 용매 제거 및 경화 과정에서 너무 낮은 rpm으로 인해 유기용매가 제대로 빠져나오지 않았거나 많은 양의 용매가 한꺼번에 빠져나왔을 가능성을 가지고 있어, 다른 조건은 모두 전 실험과 동일하게 고정시키고 회전수만을 조절하여 네 번째 실험을 실시하였다. 약간의 감압을 가한 evaporator를 이용하여 기존 50 rpm에서

100 rpm으로 회전수를 증가하여 실험을 실시하였다. 얻어진 미립자의 표면 영상을 확인하기 위해 SEM 사진을 촬영하였다. 그 결과 기존의 미립자와 유사한 형태의 것들도 존재하고 작은 pore가 존재하는 미립자들이 함께 존재하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0098] 조금 더 나은 표면형태를 얻기 위해 시약의 조성과 방법은 위 실험과 동일한 조건으로 하고 evaporator 대신 감압이 없는 상태의 교반기를 이용하여 첫 실험에서 실시했던 150 rpm 대신 100 rpm으로 회전수를 줄여서 용매를 제거 (solvent extraction)하고 경화 과정을 수행하는 다섯 번째 실험을 수행하였다. SEM 사진을 촬영한 결과 기존 결과물들에 비해 적당한 수와 작은 pore 크기를 갖는 미립자를 얻을 수 있었다 (도 5의 D).

[0099] 실시예 7: *in vitro* 방출 실험을 통한 HA 단백질의 서방성 (slow release) 검증 실험

[0100] 변형된 HA1과 HA2 단백질을 함께 포함하는 PLGA 미립자가 생체 내에서 오랜 기간 동안 항원성 에피토프를 서서히 방출하는 우수한 서방성 (slow release)을 가지는 지를 *in vitro* 방출 실험을 통하여 검증하였다.

[0101] 먼저, HA1 단백질과 HA2 단백질을 몰비 1 : 2로 맞추어, 각각 0.28 nM, 0.56 nM, 0.84 nM, 1.12 nM의 HA1과 HA2 단백질을 합한 몰 농도를 포함하는 1X PBS (pH 7.4) 용액을 사용하여 검증 곡선 (calibration curve)을 작성하였다. HA1의 경우 부분 정제된 단백질을 사용하였기 때문에 impurity를 고려하여 몰농도를 계산하였다. 각각의 용액 50 μ l를 가지고 아래와 같은 indirect ELISA법을 사용하여 흡광도를 측정하여 검증 곡선을 작성하였다 (도 6).

[0102] 1X PBS (pH 7.4) 800 μ l에 다섯 번째 실험에서 얻은 4 mg의 미립자를 분산 시킨 후 37 $^{\circ}$ C 진탕 배양기에서 250 rpm으로 교반하여 HA 단백질이 방출되도록 하였다. 일정시간마다 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 150 μ l 씩 샘플링하였다. 각 샘플은 indirect ELISA법을 이용하여 blank 값을 빼서 아래와 같이 정량하였다.

[0103] 96 웰 플레이트에 샘플 50 μ l를 넣고 RT에서 약간의 shaking을 하면서 인큐베이션하여 코팅하였다. 0.05 %(v/v) Tween-20를 포함하는 1X PBS (pH 7.4)로 3 ~ 5회 washing을 실시한 후 건조시켰다. 1 %(w/v) BSA를 함유한 1X PBS (pH 7.4) 200 μ l를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 인큐베이션을 실시하여 blocking 하였다. 다시 PBST로 3 ~ 5회 washing 한 후 건조시켰다. 1:5000으로 희석한 일차 항체인 His-tag 항체를 50 μ l 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 인큐베이션하였다. PBST로 다시 washing을 3 ~ 5회 실시한 후 건조시켰다. 1:5000으로 희석한 이차 항체 HRP-conjugated 항-마우스 IgG를 50 μ l 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다시 PBST로 3 ~ 5회 washing 하고 건조시켰다. Stop agent로 TMB를 50 μ l 가하고 RT에서 10분간 방치시킨 다음 2 M H₂SO₄ 50 μ l를 가하여 RT에서 20분간 방치시킨 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여, 검증 곡선을 이용하여 입자에서 방출된 단백질의 몰 농도를 정량하였다.

[0104] 60일 동안 실험을 수행한 결과, PLGA 미립자에 들어있는 HA1과 HA2 단백질이 30일 이상 서서히 방출되고 있음을 확인하였다.

[0105] 실시예 8: Mouse를 이용한 *in vivo* 실험

[0106] Mouse를 이용하여 항체 생성 여부를 알아보기 위한 실험을 충북대 실험동물연구지원센터(Laboratory Animal Research Center)에 의뢰하여 실시하였다. 실험에 사용된 모델 동물로서 mouse SPF/BALB/C(ORIENT BIO Inc.)를 이용하여 진행되었다. 10주령 암컷 30마리를 가지고 4개의 group으로 나누었다 (표 1).

표 1

	투여방법	마리 수
Group 1	PLGA encapsulation (15 μ g HA in 200 μ l sol.)	10
Group 2	PLGA encapsulation + Fluid vaccine (7.5 μ g HA + 7.5 μ g Fluid HA in 200 μ l sol.)	10
Group 3	Fluid vaccine (15 μ g Fluid HA in 200 μ l sol.)	5
Group 4	Fluid vaccine (7.5 μ g Fluid HA in 200 μ l sol.) * 2회	5

[0108] 첫 번째 group은 15 μ g PLGA encapsulation HA(HA1+HA2)(in 200 μ l solution)을 접종하고 두 번째 group은 PLGA encapsulation HA(HA1+HA2) 7.5 μ g + Fluid HA 7.5 μ g(in 200 μ l solution)을 접종하였다. 세 번째 group은

Fluid HA 15 μ g (in 200 μ l solution)을 한꺼번에 접종하고 네 번째 group은 Fluid HA 7.5 μ g (in 200 μ l solution)을 접종하고 4주 후 동일량을 추가 접종함으로써 boosting을 실시하였다. 2주 간격으로 12주 동안 혈액 샘플을 채취하여 혈액 샘플에 대해 ELISA를 이용하여 항체 생성 여부 및 항원 존재 여부를 확인하였다.

[0109] 실시예 9: ELISA를 이용한 항원 존재 여부 확인

[0110] 주입한 항원이 mouse의 혈액 내에 존재하는지를 검증하기 위하여 혈액 샘플을 채취하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. 먼저 1:500으로 희석한 혈청을 96 well에 100 μ l씩 넣고 4℃에서 밤새 (또는 room temp에서 2시간) coating을 실시하였다. PBT (PBS + Tween20) pH 7.2 버퍼를 이용하여 3-5회 washing을 실시한 후 BSA를 TB 버퍼에 희석한 block agent를 200 μ l 넣고 block step을 RT에서 1시간 동안 실시하였다. PBT 버퍼를 이용하여 5회 washing을 실시하였다. Secondary antibody로 1:500으로 희석한 His-tag antibody를 이용하여 37℃에서 한 시간 동안 반응시켰다. PBT 버퍼를 이용하여 5회 washing을 실시하였다. Goat anti-mouse IgG HRP를 1:5000으로 희석하여 100 μ l를 넣어준 뒤 37℃ incubator에서 한 시간 동안 반응시키고 반응을 중단시키기 위해 TMB 100 μ l를 넣고 잠시 방치한 후 다시 0.5N의 H₂SO₄ 100 μ l를 첨가한 뒤 잠시 반응하여 ELISA를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (도 7).

[0111] 측정 결과 mouse에 투여한 항원이 혈액 내에 존재하는 것을 확인하였다. 수용성 단백질을 항원으로 사용한 fluid vaccine의 경우는 주입한 항원이 초기에 높은 농도로 검출되나 빠른 시일 내에 소실되는 반면에, PGA 미립자 형태의 항원을 투여한 동물 군의 경우는 항원 존재 시간이 더 길며, 서서히 혈액 내로 방출되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0113] 실시예 10: ELISA를 이용한 항체 생성 여부 확인

[0114] HA 단백질(HA1 + HA2) 200ng/ml의 농도를 갖도록 희석하여 96 well에 100 μ l씩 넣고 4℃에서 밤새 (또는 room temp에서 2시간) coating을 실시하였다. PBT (PBS + Tween20) pH 7.2 버퍼를 이용하여 3-5회 washing을 실시하였다. BSA를 TB 버퍼에 희석한 block agent를 200 μ l 넣고 block step을 RT에서 1시간 동안 실시한 후 PBT 버퍼를 이용하여 5회 washing을 실시하였다. 여기에 mouse에서 채취한 sera를 1:50으로 희석하여 96 well에 넣고 37℃ incubator에서 한 시간 동안 반응시켰다. PBT 버퍼를 이용하여 5회 washing을 실시한 후 Goat anti-mouse IgG HRP를 1:5000으로 희석하여 100 μ l를 넣어준 뒤 37℃ incubator에서 한 시간 동안 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위해 TMB 100 μ l를 넣고 잠시 방치한 후 다시 0.5N의 H₂SO₄ 100 μ l를 첨가한 뒤 잠시 반응하여 ELISA를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 정밀한 데이터 산출을 위해 위와 동일한 방법으로 3회 실시하여 측정값을 구하였다 (도 8).

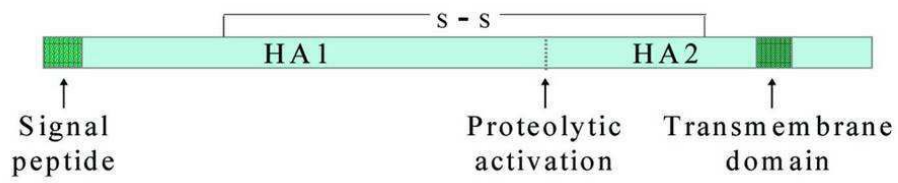
[0115] 측정 결과 HA 항원에 대한 항체 반응을 확인할 수 있었으며 PLGA 미립자를 포함하는 백신의 항체 함유량의 변화가 적은 것으로 관찰되며 이는 항원의 지속적인 방출에 의한 효과로 해석할 수 있다.

[0116] 또한 HA1의 항체와 HA2 항체 생성을 개별적으로 확인하기 위하여 각각의 HA1과 HA2를 항원으로 하여 위와 동일한 방법으로 실험을 3회 반복하여 실시하였다 (도 9 및 도 10). 위 실험에서 각 그룹별 HA1과 HA2의 그래프 모양이 유사한 것을 확인할 수 있다. 이는 항체 내에 HA1에 대한 항체와 HA2에 대한 항체가 모두 생성되어 존재하는 것을 의미한다. 또한 HA1 항체의 양과 HA2 항체의 양을 합하였을 때 HA1과 HA2의 항원을 따로 분리하지 않고 측정한 데이터 값과 유사함을 알 수 있었다.

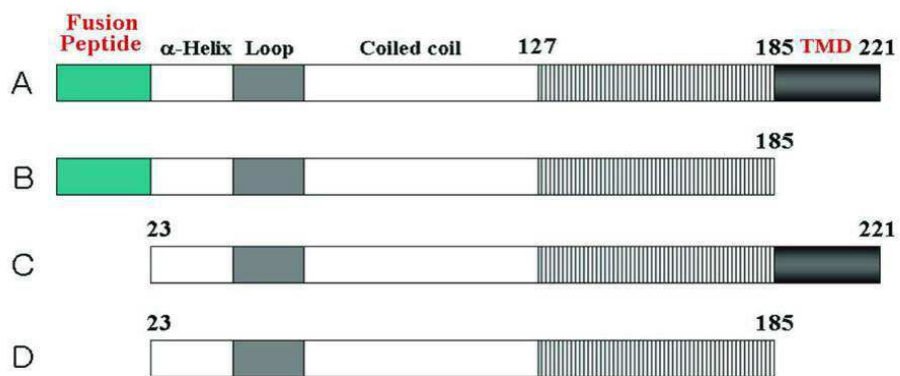
도면

도면1

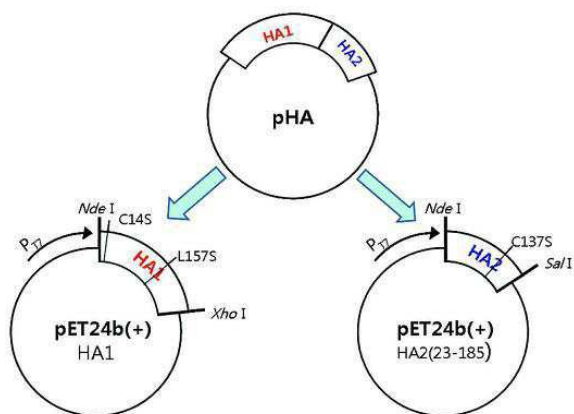
(a)



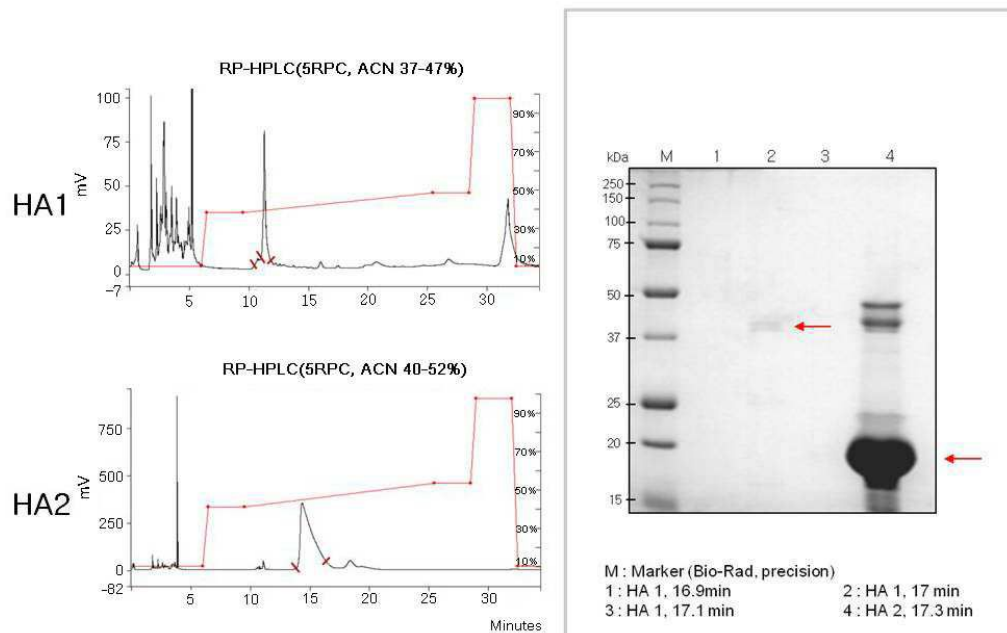
(b)



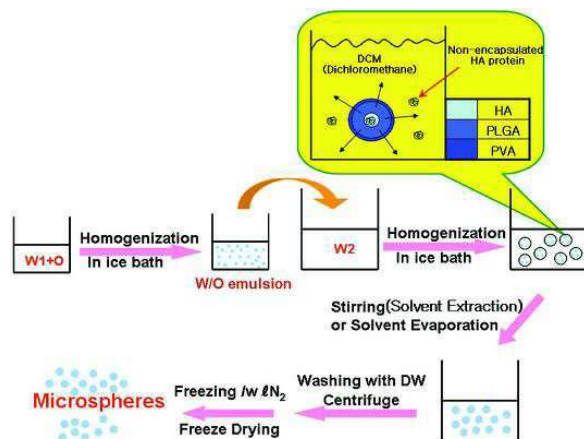
도면2



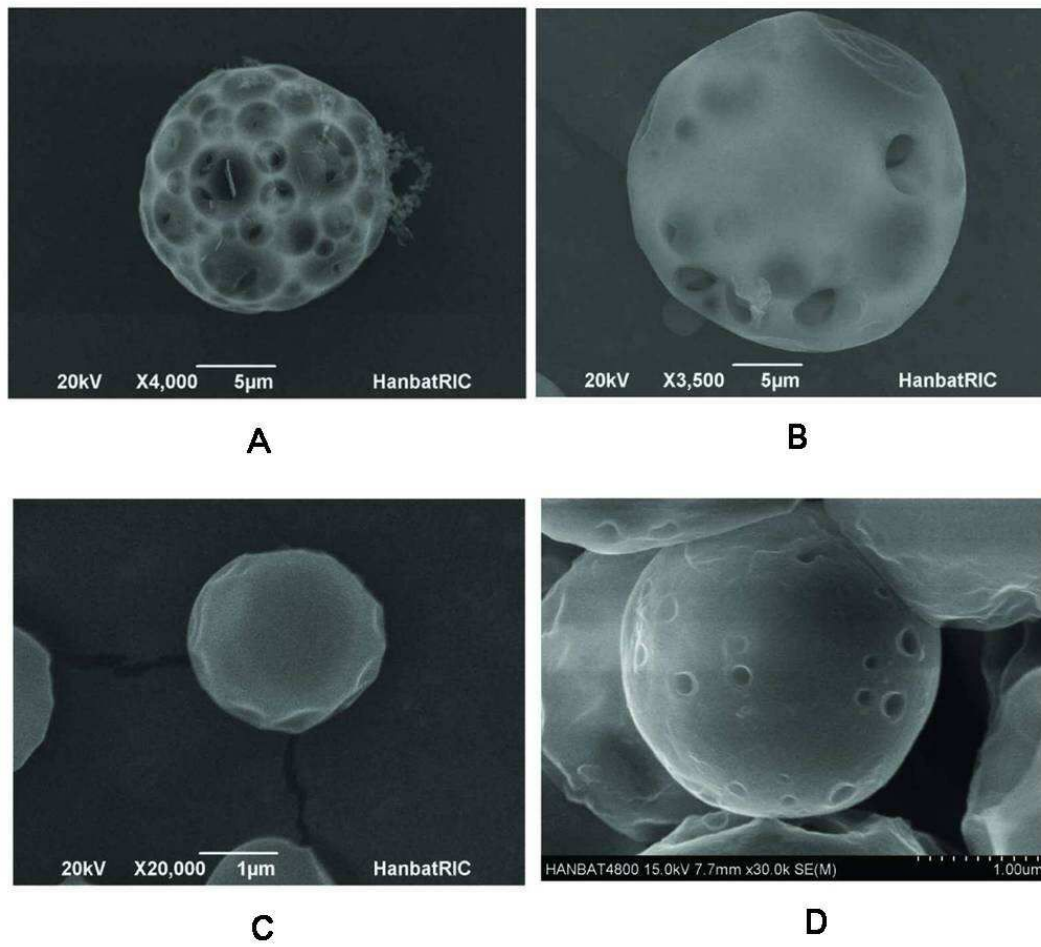
도면3



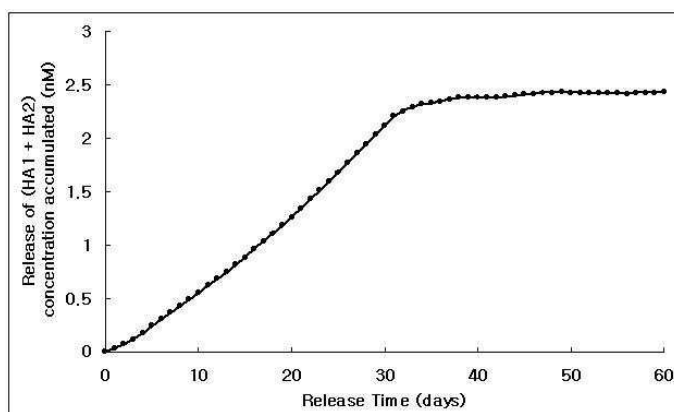
도면4



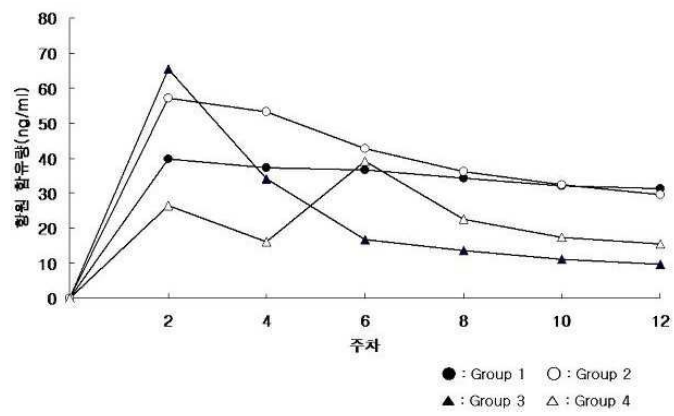
도면5



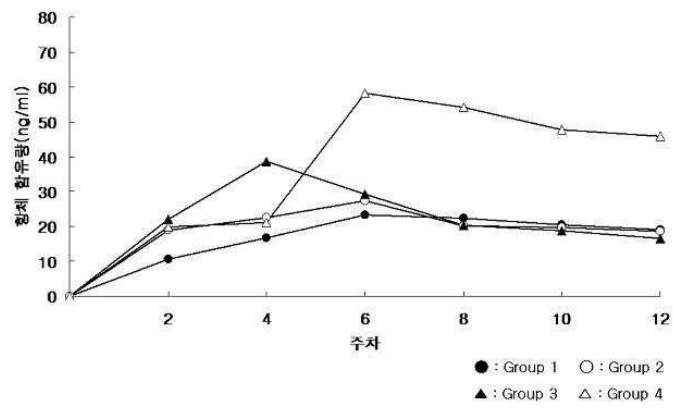
도면6



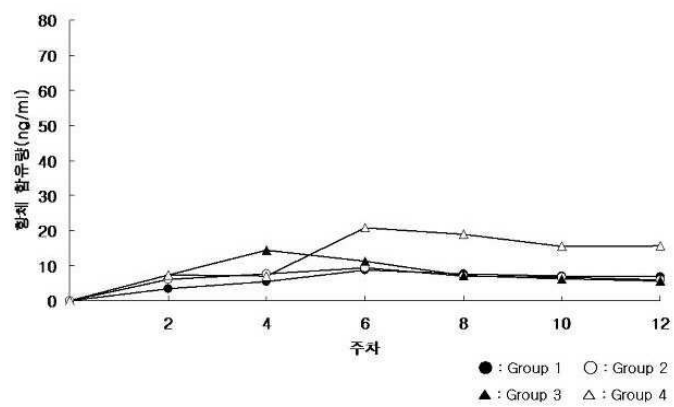
도면7



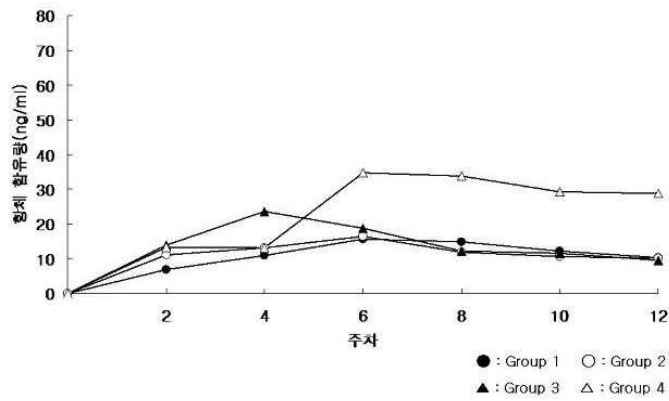
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Hanbat National University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Method for producing biodegradable PLGA microparticles comprising recombinant influenza virus hemagglutinin protein for vaccination with enhanced safety
- <130> PN10111
- <160> 12
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 344
- <212> PRT
- <213> Influenza virus type A X31 strain
- <220><221> PEPTIDE
- <222> (1)..(344)
- <223> HA1
- <400> 1

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Ala Leu Gly

1 5 10 15

Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly

20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp

35 40 45

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

50 55 60

Gly Lys Ile Cys Asn Asn Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Ile Asp Cys

65				70				75				80			
Thr	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	His	Cys	Asp	Val	Phe	Gln
				85				90				95			
Asn	Glu	Thr	Trp	Asp	Leu	Phe	Val	Glu	Arg	Ser	Lys	Ala	Phe	Ser	Asn
100								105				110			
Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	Ser	Leu	Val
115								120				125			
Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ile	Thr	Glu	Gly	Phe	Thr	Trp	Thr
130								135				140			
Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Asn	Ala	Cys	Lys	Arg	Gly	Pro	Gly
145				150				155				160			
Ser	Gly	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Lys	Ser	Gly	Ser	Thr
				165				170				175			
Tyr	Pro	Val	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn	Asp	Asn	Phe	Asp	Lys
180								185				190			
Leu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Gln	Thr
195								200				205			
Ser	Leu	Tyr	Val	Gln	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Arg
210								215				220			
Ser	Gln	Gln	Thr	Ile	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Pro	Trp	Val	Arg
225				230				235				240			
Gly	Leu	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Gly
				245				250				255			
Asp	Val	Leu	Val	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Arg	Gly
260								265				270			
Tyr	Phe	Lys	Met	Arg	Thr	Gly	Lys	Ser	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Asp	Ala
275								280				285			
Pro	Ile	Asp	Thr	Cys	Ile	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile
290				295				300							
Pro	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Ile	Thr	Tyr	Gly	Ala
305				310				315				320			

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met

325 330 335

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr

340

<210> 2

<211> 221

<212> PRT

<213> Influenza virus type A X31 strain

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(221)

<

223> HA2

<400> 2

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr

20 25 30

Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile

35 40 45

Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His

50 55 60

Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu

65 70 75 80

Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala

85 90 95

Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp

100 105 110

Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu

115 120 125

Asn Ala Glu Glu Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys

130 135 140

Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp

145 150 155 160

Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
165 170 175
Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala
180 185 190
Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp
195 200 205

Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
210 215 220

<210> 3
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HA-3R-F primer
<400> 3

acaagctgtt tgaaaaaaca cgctgtcaac tgcgtgaaaa tgctgaagag at 52

<210> 4
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HA-3R-R primer
<400> 4

atctcttcag cattttcacg cagttgacga cgtgtttttt caaacagctt gt 52

<210> 5
<211>
> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HA2(-FP)_NdeI_F primer
<400> 5

cacttcgtca tatgggtttc aggcatcaaa attctg 36

<210> 6
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> HA2_221_SalI_R primer
 <400> 6
 cacttcgtgt cgacaatgca aatgttgac ctaatgt 37
 <210> 7
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA2(-FP)_NdeI_F primer
 <400> 7

 cacttcgtca tatgggttc aggcacaaa attctg 36
 <210> 8
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA2_185_SalI_R primer
 <400> 8
 cacttcgtgt cgaccagtc ttgtatcca gacttca 37
 <210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA1_NdeIX-F primer
 <400> 9
 gtaaacaaga tcacatacgg agcatgccc aag 33
 <210> 10
 <211> 33
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA1_NdeIX-R primer
 <400> 10
 cttggggcat gctccgtatg tgatcttgtt tac 33
 <210> 11
 <211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA1_NdeI-F primer

<400> 11

cgctactagc atatgaagac catcattgct ttga 34

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA1_XhoI-R primer

<400> 12

cgcgtgggtct cgagagtttg tttctctggt acatt 35