

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0061288 (43) 공개일자 2012년06월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/62</i> (2006.01) <i>C07K 19/00</i> (2006.01) <i>A01H 5/00</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0122545 (22) 출원일자 2010년12월03일 심사청구일자 2010년12월03일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 이호자 서울특별시 강남구 도곡로27길 46, 현대빌라B동 103호 (역삼동) 이성재 서울특별시 동대문구 이문로1길 21, 신현대아파트 3동 1002호 (회기동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 유수미

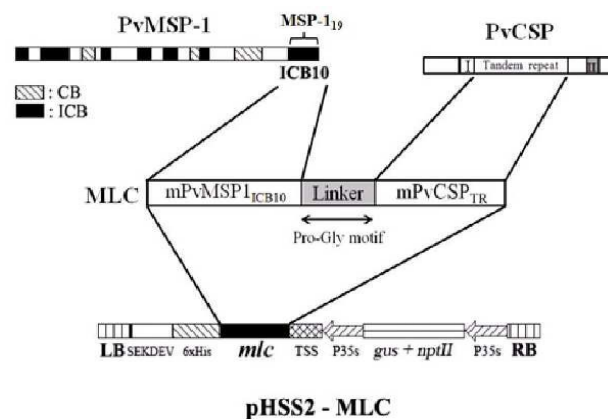
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 (i) 플라스모디움 비박스의 분열소체 표면 단백질-1(merozoite surface protein-1, PvMSP-1)의 중간 보존성 부위(interspecies conserved region, ICB)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, (ii) 링커 모티프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 플라스모디움 비박스의 환상포자소체 단백질(circumsporozoite protein, PvCSP)의 탠덤 반복 부위(tandem repeat region, TR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스모디움 비박스 키메릭 융합 단백질을 암호화하는 유전자 구조체, 및 이를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포 또는 트랜스제닉 식물체, 및 상기 유전자 구조체에 의해 암호화된 플라스모디움 비박스 키메릭 융합 단백질을 제공한다. 상기 융합 단백질은 말라리아 진단용 항원 및 말라리아 백신으로 유용하다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

정남준

대전광역시 유성구 유성대로 1741, 101동 402호
(전민동, 세종아파트)

이충희

경기도 남양주시 미금로42번길 13, 104호 (도농동, 제일아파트101동)

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 플라스모디움 비박스의 분열소체 표면 단백질-1(merozoite surface protein-1, PvMSP-1)의 중간 보존성 부위(interspecies conserved region, ICB)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, (ii) 링커 모티브를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 플라스모디움 비박스의 환상포자소체 단백질(circumsporozoite protein, PvCSP)의 탠덤 반복 부위(tandem repeat region, TR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 플라스모디움 비박스의 키메라 융합 단백질을 암호화하는 유전자 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 MSP-1 및 CSP는 한국인 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*) 분리균주로부터 유래된 서열이며, 링커 모티브는 Gly-Pro 링커인 것을 특징으로 하는 유전자 구조체.

청구항 3

제2항에 있어서, MSP-1 ICB는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가지며, 링커 모티브는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가지며, CSP의 TR은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 유전자 구조체.

청구항 4

제3항에 있어서, MSP-1 ICB를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 2의 서열을 가지며, 링커 모티브를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 8의 서열을 가지며, CSP의 TR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 6의 서열을 갖는 유전자 구조체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 유전자 구조체를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 식물발현용 벡터인 재조합 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, pHSS2-MLC 벡터인 재조합 벡터.

청구항 8

제5항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 세포가 E.coli 또는 아그로박테리움인 형질전환된 세포.

청구항 10

제6항 또는 제7항의 재조합 벡터로 형질전환된 식물 세포.

청구항 11

(a) 제6항 또는 제7항의 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
(b) 상기 식물세포로부터 플라스모디움 비박스의 키메라 융합 단백질을 생산하는 트랜스제닉 식물체를 수득하는 단계를 포함하는 플라스모디움 비박스의 키메라 융합 단백질을 생산하는 트랜스제닉 식물체를 제조하는 방법.

청구항 12

제6항 또는 제7항의 재조합 벡터로 형질전환된 트랜스제닉 식물체.

청구항 13

(a) 분열소체 표면 단백질-1(MSP-1)의 중간 보존성 부위(ICB), (b) 링커 모티브, 및 (c) 환상포자소체 단백질(CSP)의 탠덤 반복 부위(TR)를 포함하는 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, MSP-1 ICB는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가지며, 링커 모티브는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가지며, CSP의 TR은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질.

청구항 15

제13항 또는 제14항의 키메릭 융합 단백질을 포함하는 말라리아 진단 시약.

청구항 16

제15항의 진단 시약을 포함하는 말라리아 진단 키트.

청구항 17

제13항 또는 제14항의 키메릭 융합 단백질을 포함하는 말라리아 백신 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 말라리아 진단용 항원 및 말라리아 백신으로서 유용한 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 말라리아는 많은 열대지방 및 아열대지방 나라에서 주요 공중위생 문제를 보여주는 질병이다. 말라리아는 전 세계적으로 매년 2억 4천 7백만 임상 사례가 보고되고 있으며 2006년에는 연간 거의 백만명에 가까운 사망자가 발생했다[1]. 인간을 감염시키는 플라스모디움(*Plasmodium*) 속 말라리아 원충들 중 하나인 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*)는 전세계적인 말라리아 감염 중에서 매년 1억 3천 2백만에서 1억 9천 1백만의 감염 사례를 나타내는 부-사하라 아프리카 외의 지역에서 말라리아를 유발하는 주요 원인인자이다[2]. 그럼에도 불구하고, 비박스-말라리아 백신의 개발에 대한 노력은 비박스 말라리아에 의한 매우 낮은 사망률 및 *P. 비박스*(*P. vivax*)의 인 비트로 배양의 제한 때문에, *P. 팔시파룸*(*P. falciparum*)에 대한 백신 개발 노력에 비해 상대적으로 낮았다. 하지만, *P. 팔시파룸*에 의해 유발된 말라리아에 비해 비박스 말라리아는 일차 감염이 이미 병의 징후를 유발한 후에 몇 주 내지 몇 달 내에 다시 활성화되는 잠복기간(dormant liver stages)을 야기한다[3, 4]. 따라서, 말라리아와 관련된 질병률(morbidity)을 예방하는 것 뿐 아니라 현재 비-풍토성 지역에서 비박스 말라리아 휴면체(hypnozoites)의 재활성화로 인해 야기되는 잠재적인 확산을 예방하기 위해 비박스 말라리아를 예방하는 백신이 필요하다. 최근에, 비박스 말라리아 백신에 대한 흥미로운 보고들은 이러한 필요사항을 반영한다[5-9].

[0003] 또한, 말라리아로 의심되는 연간 환자 수를 결정하기 위해, 말라리아의 혈청학적 진단에 이용될 수 있는 항원의 개발이 이루어져야만 한다[10, 11]. 백신 및 진단학의 개발에 이용되는 다-단계(multistages) 말라리아를 검출하는 여러 가지 키메릭 재조합 항원들이 연구된 바 있으며[12, 13], 보다 효율적인 말라리아 백신 및 진단용 항원의 개발이 필요하다.

[0004] 한편, Mason 및 공동연구자들에 의해 최초로 트랜스제닉 식물에서 백신 생산이 도입된 이후[28], 트랜스제닉 식물에서 발현된 인간 및 동물 병원체로부터 유래된 여러 항원에 대한 구강 면역원성이 확인되었다. 예를 들어, 헤파티티스 B 표면 항원은 감자에서 발현되었고[29, 30], 바이러스 캡타이드 백신은 아라비도시스에서 발현되었으며[31], *P. 팔시파룸*(*P. falciparum*) 및 *P. 요엘리*(*P. yoelii*)의 MSP 항원은 담배에서 발현되었다[32, 33]. 트랜스제닉 식물에서 생산된 식용 백신에 의한 구강 면역화는 이의 타겟 병원체에 대한 면역 반응

을 자극하여 대규모(large-scale) 및 적은 투여량(low-dose)에 의한 면역화 프로그램의 디자인을 촉진시킬 수 있다[34, 35]. 하지만, 트랜스제닉 식물체에 기반한 상업적으로 유용한 말라리아 백신은 아직까지 생산되지 않았다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 비박스-말라리아에 대한 백신 및 진단 시약으로 사용하기 위한 키메릭 항원의 개발을 위해 연구 노력한 결과, 플라스모디움 비박스 분열소체 표면 단백질-1(*Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1, PvMSP-1), 링커 모티브 및 *P. 비박스* 환상포자소체 단백질(*P. vivax* circumsporozoite protein, PvCSP)의 일부로 구성된 키메릭 융합 단백질(MLC) 및 이를 암호화하는 유전자 구조체를 고안하고, 이를 말라리아 환자의 진단 및 혈청학적 조사, 그리고 트랜스제닉 식물체에서의 말라리아 백신 생산에 효율적으로 이용할 수 있다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 암호화하는 유전자 구조체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상술한 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 암호화하는 유전자 구조체를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포 또는 트랜스제닉 식물체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 생산하는 트랜스제닉 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 키메릭 융합 단백질을 포함하는 말라리아 진단 시약 및 진단 키트, 및 상기 진단 시약을 이용한 말라리아 진단 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 포함하는 말라리아 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 암호화하는 유전자 구조체를 제공한다.

[0014] 본 발명의 유전자 구조체는 (i) 플라스모디움 비박스의 분열소체 표면 단백질-1(merozoite surface protein-1, PvMSP-1)의 중간 보존성 부위(interspecies conserved region, ICB)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, (ii) 링커 모티브를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 플라스모디움 비박스의 환상포자소체 단백질(circumsporozoite protein, PvCSP)의 탠덤 반복 부위(tandem repeat region, TR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0015] MSP-1 단백질은 서로 다른 플라스모디움 종들의 분열소체에 존재하는 주요한 표면 단백질로서, 말라리아의 무성 혈액단계(asexual blood stage)에 대한 백신 후보 물질로 자세히 연구되어 왔다[14-17]. 여러 보고에 따르면, 보존성 서브유닛인 MSP-1, MSP-1₄₂ 및 MSP-1₁₉의 C-말단은 B-세포 에피토프로서 면역 반응을 일으켰다[19, 20]. 특히, MSP-1₁₉의 NMR 구조는 두 개의 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)-유사 도메인을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다[21]. 본 발명에서는, 중간 보존성 블록 10(interspecies conserved block 10, ICB 10) 부위에 상응하는 *P. 비박스* 한국 분리균주의 *msh-1* 유전자를 에피토프를 위해 이용하였다(도 1). 본 발명의 키메릭 융합 단백질을 구성하는 PvMSP-1의 ICB는 바람직하게는 한국인 플라스모디움 비박스 분리균

주로부터 유래된 아미노산 서열을 가지며, 예를 들어, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는다. 따라서, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 암호화할 수 있는 임의의 뉴클레오타이드 서열이 본 발명의 키메릭 융합 단백질을 암호화하는 유전자 구조체의 제조를 위해 사용될 수 있으며, 예를 들어, 서열 번호 2의 뉴클레오타이드 서열이 PvMSP-1의 ICB를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로서 사용될 수 있다.

[0016] CSP 단백질은 포자소체(sporozoite)의 표면 항원으로서 반복전(pre-repeat) 및 반복후(post-repeat) 지역 사이의 18-20개의 반복 서열로 구성된다. 9개의 아미노산 서열의 염기성 탠덤 반복(basic tandem repeat)은 광범위한 분리균주들에서 주로 GDRA(D/A)GQPA 및 GNGA(A/G)GQAA였다[22]. 인간 말라리아 원충 플라스모디움 비박스의 환상포자소체 단백질(PvCSP)은 373개의 아미노산으로 구성되며, 중앙 부위에 DRA(D/A)GQPAG의 노나펩타이드로 구성된 19개의 탠덤 반복 부위(TR)를 포함한다. 본 발명에서는 키메릭 융합 단백질의 제작을 위하여 PvCSP의 TR 부위를 이용하였으며, 바람직하게는 본 발명의 PvCSP의 TR 서열은 9개의 아미노산 서열의 단위가 반복되고, 보다 바람직하게는 한국인 플라스모디움 비박스 말라리아 분리균주들의 CSP-특이 항원의 탠덤 반복 서열로 구성되며, 가장 바람직하게는 두 개의 서열 번호 3(GDGAAGQAA) 및 두 개의 서열 번호 4(GDRAAGQPA) 서열로 구성된 36개의 아미노산 서열로 이루어진다. 두 개의 서열 번호 3(GDGAAGQAA) 및 두 개의 서열 번호 4(GDRAAGQPA) 서열로 구성된 PvCSP의 TR 부위는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 가지며, 예를 들어, 서열 번호 6의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.

[0017] 본 발명의 MSP-1의 ICB와 CSP의 TR은 펩타이드 링커에 의해 연결된다. 펩타이드 링커는 키메릭 단백질의 시너지 효과를 위하여 MSP-1과 CSP의 에피토프가 잘 노출되도록 각 단백질 사이에 충분한 공간이 확보되도록 하는 역할을 하며, 극성-비극성 조합의 임의의 링커 모티브가 본 발명의 키메릭 단백질의 제작에 이용될 수 있다. 바람직하게는 상기 펩타이드 링커는 10개의 아미노산 내부 서열(amino acids internal sequence)의 양쪽에 5-6개의 Gly-Pro 반복 서열을 포함하는 Gly-Pro 링커이며, 보다 바람직하게는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 Gly-Pro 링커일 수 있다. 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 링커는 예를 들어, 서열 번호 8의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화될 수 있다.

[0018] 본 발명의 유전자 구조체에 있어서, 플라스모디움 비박스의 MSP-1의 ICB를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 서열로서, 예를 들어, 서열 번호 2의 뉴클레오타이드 서열일 수 있으나, 코돈의 축퇴성 등으로 인하여 서열 번호 2의 뉴클레오타이드 서열로부터 변이를 가지되 서열 번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 임의의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 링커 모티브를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 플라스모디움 비박스의 CSP의 TR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 역시 마찬가지로 각각 서열 번호 7의 아미노산 서열 및 서열 번호 5의 아미노산 서열을 암호화하는 임의의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

[0019] 이러한 뉴클레오타이드 서열은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 다양한 핵산분자를 포함한다. 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 아미노산 서열은 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 다양한 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 배열하고(align), 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 배열된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 배열 방법은 당업계에 공지되어 있다. 배열을 위한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

- [0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) (i) 플라스모디움 비박스의 분열소체 표면 단백질-1(PvMSP-1)의 중간 보존성 부위(ICB)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, (ii) 링커 모티프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 플라스모디움 비박스의 환상포자소체 단백질(PvCSP)의 탠덤 반복 부위(TR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 구조체를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포 또는 트랜스제닉 식물체를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있으며, 원핵 세포 또는 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 재조합 벡터는 (a) (i) 플라스모디움 비박스의 분열소체 표면 단백질-1(PvMSP-1)의 중간 보존성 부위(ICB)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, (ii) 링커 모티프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 플라스모디움 비박스의 환상포자소체 단백질(PvCSP)의 탠덤 반복 부위(TR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 구조체에 더하여, (b) 상기 구조체에 작동적으로 결합(operatively linked) 되어 있는 프로모터, 및 (c) 세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 “프로모터”는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 벡터에서 발현대상물질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된(operatively linked)”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.
- [0024] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있다.
- [0025] 본 발명의 벡터가 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lac* UV5 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터, T7 프로모터, 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 보다 더 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 숙주세포는 *E. coli* 또는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)이고, 가장 바람직하게는 *E. coli* DH5 α 또는 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)이다. 숙주세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(p_L^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14: 399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵세포인 경우, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기천공법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 재조합 벡터를 이용하여 트랜스제닉 식물체를 제작하는 경우에 이용될 수 있는 프로모터는 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 칼리플라워 모자이크 바이러스 35S(CaMV35S) 프로모터, 노팔린 쥘타아제(nos) 프로모터, 피그위트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러리스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페

이트 카복실라아제 스몰 서브유닛(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 베타 사이토졸 트리오포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비도시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터, 옥토판인 신타아제 프로모터 및 BCB(blue copper binding protein) 프로모터를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 적합한 프로모터는 CaMV35S 프로모터이다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열은 아그로박테리움 튜메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것(NOS 3' end)(Bevan *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜메파시엔스의 옥토판인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 또는 OCS 터미네이터(octopine synthase terminator) 서열을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 암호화하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 또는 제초제(예: 바스타) 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(*hpt*), 등)를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 벡터는 β -글루쿠로니다아제 및 네오마이신을 포함한다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물발현용 재조합벡터는 아그로박테리움 바이너리 벡터이다.

[0031] 본 명세서에서 용어 “바이너리 벡터”는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 유전자 구조체의 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이면 어느 것이라도 좋고, 특히 본 발명에서 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101이 바람직하다.

[0032] 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method), 열충격법(heat shock) 및 냉동-해빙법(freeze-thaw method) 등이 있으며, 가장 바람직하게는 냉동-해빙법(freeze-thaw method)을 이용한다.

[0033] 상기와 같은 본 발명의 재조합 벡터는 형질전환된 식물세포 또는 트랜스제닉 식물체를 제공하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 형질전환 식물세포 및 트랜스제닉 식물체의 제조는 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton *et al.* *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오타이드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz *et al.* *Mol. Genet.* 199:178-182:(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.

[0034] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 아그로박테리움 튜메파시엔스로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.

[0035] 본 명세서에서, 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다. 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물체는 특별하게 제한되지 않으며, 가장 바람직하게는 브라시카 나푸스(*Brassica napus*)를 이용한다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따라, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 생산하는 트랜스제닉 식물체를 제조하는 방법을 제공한다:

[0037] (a) 상술한 본 발명의 식물발현용 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

[0038] (b) 상기 식물세포로부터 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 생산하는 트랜스제닉 식물체를 수득하

는 단계.

- [0039] 식물발현용 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있다. 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (npt II) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호). 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 식물체 브라시카 나푸스의 종자는 2010년 11월 12일에 한국생명공학연구원의 KCTC에 KCTC 11805BP로 기탁되었다.
- [0040] 다른 태양에 따라, 본 발명은 (a) 분열소체 표면 단백질-1(MSP-1)의 중간 보존성 부위(ICB), (b) 링커 모티브, 및 (c) 환상포자소체 단백질(CSP)의 탠덤 반복 부위(TR)를 포함하는 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 키메릭 융합 단백질은 PvMSP-1의 105개 아미노산, 링커 반복 모티브의 31개 아미노산, 및 PvCSP의 탠덤 반복의 36개 아미노산을 포함하며 서열 번호 9의 아미노산 서열을 가지며, 서열 번호 10의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다. 본 발명의 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질은 상술한 본 발명의 유전자 구조체로 형질전환된 세포 또는 트랜스제닉 식물체에서 생산될 수 있으며, 말라리아 진단용 항원 및 말라리아 백신으로 사용될 수 있으며, Th1-관련된 사이토카인(예를 들어, IFN- γ , TNF- α , IL-2 또는 IL-12) 또는 면역글로블린(immunoglobulin, Ig; 예를 들어, IgG1)을 증가시킨다.
- [0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 백신이 효과적인 말라리아 원충은 플라스모디움 비박스(*P. vivax*), 플라스모디움 팔시파룸(*P. falciparum*), 플라스모디움 요엘리(*P. yoelii*), 플라스모디움 말라리아(*P. malariae*) 또는 플라스모디움 오발레(*P. ovale*)를 포함하고, 보다 바람직하게는 플라스모디움 팔시파룸 또는 플라스모디움 비박스를 포함하며, 가장 바람직하게는 플라스모디움 비박스를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 말라리아 백신은 대장균 및 식물체에서 안정적으로 발현되어 생산될 수 있으며(참고: 도 2), 정상인 및 말라리아 환자의 혈청과의 면역원성을 조사한 결과, 대장균 및 식물체에서 안정적으로 발현되어 생산된 본 발명의 백신은 정상인의 혈청과 비교하여 말라리아 환자의 혈청에서 그 반응성이 매우 우수하였다(참고: 도 3 및 도 6). 또한, 브라시카 나푸스에서 발현된 키메릭 융합 단백질의 경구 면역화는 마우스 혈청 내의 Th1-관련된 사이토카인(예를 들어, IFN- γ , TNF- α , IL-2 또는 IL-12) 또는 면역글로블린(예를 들어, IgG1)의 레벨(농도)을 증가시켰다(참고: 도 7 및 도 8). 한편, 본 발명의 백신으로 면역화된 마우스 및 비박스 말라리아 환자로부터 추출한 혈액 시료와 대장균 및 식물체에서 안정적으로 발현되어 생산된 키메릭 융합 단백질과의 웨스턴 블롯팅 실험에서는, 모노머형이 아닌 멀티머형으로 검출되었다(참고: 도 9). 이러한 결과는 식물세포에 존재하는 모노머형 백신을 멀티머형 백신으로 여선허리하는 시스템으로 인한 것이며, 이러한 멀티머형 백신은 모노머형에 비해 보다 더 우수한 면역원성 및 항원성을 촉발할 수 있기 때문에, 더욱 바람직하다. 따라서, 본 발명의 결과들은 키메릭 융합 단백질을 발현하는 트랜스제닉 식물체에서 식용 백신으로의 이용 가능성을 보여준다.
- [0043] 본 발명의 다른 태양에 따라, 본 발명은 (a) 분열소체 표면 단백질-1(MSP-1)의 중간 보존성 부위(ICB), (b) 링커 모티브, 및 (c) 환상포자소체 단백질(CSP)의 탠덤 반복 부위(TR)를 포함하는 키메릭 융합 단백질을 포함하는 말라리아 진단 시약 및 이를 포함하는 진단 키트, 및 상기 진단 시약을 이용한 말라리아 진단 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 키메릭 융합 단백질은 시료가 말라리아 감염 대상으로부터 유래될 경우, 시료와의 접촉시에 시료 속의 항체와 반응하여 말라리아 감염 여부를 판단할 수 있도록 한다. 본 발명의 진단 키트는 본 발명의 키메릭 융합 단백질에 더하여, 진단 시험을 위해 필요한 통상적인 추가 성분을 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 키메릭 융합 단백질을 이용한 진단 방법은 (a) 상술한 본 발명의 키메릭 융합 단백질을 시료와 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 시료에서 면역원성을 분석하는 단계를 포함하며, 상기 시료가 상기 키메릭 융합 단백질에 대해서 면역원성을 나타내면, 상기 시료를 추출한 대상(subject)은 비박스 말라리아(*vivax malaria*)에 감

염된 것으로 판단된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 시료는 혈액, 혈청 또는 혈장이며, 보다 바람직하게는 혈청이다.

발명의 효과

[0046]

본 발명에 따르면, 본 발명의 플라스모디움 비박스의 키메릭 융합 단백질은 정상인의 혈청과 비교하여 말라리아 환자의 혈청에서 그 반응성이 매우 우수하고, 트랜스제닉 식물체에서 생산되었을 경우, 모노머형 보다는 멀티머형으로 생산되어 더욱 우수한 면역원성 및 항원성을 촉발한다.

[0047]

따라서, 본 발명의 키메릭 융합 단백질은 다-단계 말라리아의 진단 및 백신화에 이용될 수 있으며, 본 발명의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물은 매우 강력한 면역원성 및 항원성을 가져 비박스 말라리아(*vivax malaria*)를 효과적으로 예방 또는 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048]

도 1은 트랜스제닉 식물체 제조를 위한 키메릭 재조합 MLC 및 식물 바이너리 벡터 pHSS2-597 MLC의 구조 도식을 나타낸다. MLC는 PvMSP-1의 보존성 부위, Pro-Gly 반복 링커 및 PvCSP의 탠덤 반복으로 구성되어 있다. CB 및 ICB는 PvMSP-1에서 보존성 블록 및 중간 보존성 블록을 각각 지시한다. PvCSP에서, I 및 II는 보존성 부위 I 및 II를 각각 나타낸다. 탠덤 반복은 9개의 아미노산 반복 서열이다. LB 및 RB는 T601 DNA 부위의 왼쪽 및 오른쪽 경계(border)를 각각 의미하며, 이들은 아그로박테리움-매개된 DNA 운반에서 안정적으로 핵 염색체 DNA로 통합되도록 한다. TSS는 번역 개시위치를 나타내며, SEKDEV는 배출 시그널을 코딩하는 올리고 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 또한, 이 시그널은 정확한 올리고머화를 촉진한다. 식물 형질전환을 위한 선택 마커는 *nptII* 유전자로 카나마이신에 대한 저항성을 부여한다. GUS 단백질은 식물 재분화의 선택 단계에서 신속한 스크리닝을 실시할 수 있도록 하는 마커로 이용하였다.

도 2는 대장균 및 브라시카 나푸스에서 키메릭 재조합 MLC의 이중적 유도를 보여주는 결과이다. 쿠마시 블루 염색(A) 및 항-MSP-1에 의한 웨스턴 블롯 분석을 나타내는 결과이다. 유도된 MLC 단백질은 대장균 및 브라시카 나푸스에서 각각 22 kDa 및 20 kDa로 검출되었다.

도 3은 대장균에서 정제된 MLC 단백질을 이용하여 비박스 말라리아 환자(레인 1-9) 및 정상 사람(레인 10-13)의 혈청에서 면역 블롯 분석을 실시한 결과이다(A). 레인 M, 전염색된 단백질 래더 마커. 대장균에서 발현된 MLC 재조합 단백질을 이용하여 실시된 ELISA에 의한 흡광도의 산포도를 보여주는 결과이다(B). 정상 사람 및 말라리아 P. 비박스 환자의 혈청이 이용되었다.

도 4는 야생형과 함께 pHSS2 및 pHSS2-MLC를 각각 포함하는 재분화된 브라시카 나푸스의 외식체들에서 검출된 GUS 활성(A) 및 595 nm에서 광학밀도(B)를 측정된 결과이다.

도 5는 *mhc* 유전자 PCR 산물(A) 및 *nptII* 유전자 PCR 산물(B)의 아가로오스 젤 전기영동 사진이다. 레인 M, 래더 마커; 레인 2, 외식체 2(형질전환되지 않은 야생형 식물체); 레인 1 및 레인 3-6, 외식체 1 및 3-6. 결과는 외식체 1 및 3-6이 pHSS2-MLC를 포함하고 있음을 명확하게 나타낸다.

도 6은 PvMSP 항체 및 PvCSP 항체를 이용한 트랜스제닉 유체 총단백질의 웨스턴 블롯 분석 결과이다(A). 레인 M, 전염색된 단백질 래더 마커; 레인 1 및 4, 야생형 유체; 레인 2 및 5, pHSS2-삽입된 트랜스제닉 유체; 레인 3 및 6, pHSS2-MLC-삽입된 트랜스제닉 유체 후보로, 이들은 *mhc* 프라이머 세트를 이용한 PCR에 의해 확인되었다. 레인 1-3 및 레인 4-6은 각각 PvMSP 및 PvCSP의 단일클론 항체로 테스트되었다. 브라시카 나푸스에서 발현된 키메릭 MLC 단백질을 이용하여 실시된 ELISA에 의해 측정된 흡광도의 산포도 결과이다(B). 정상 사람 및 말라리아 P. 비박스 환자의 혈청이 이용되었다.

도 7은 브라시카 나푸스에서 발현된 키메릭 MLC 단백질의 경구 면역화에 의해 초래된 면역원성 결과이다. 경구적으로 면역화된 마우스의 혈청에서 네 개의 사이토카인(IL-2, IL-12, IFN- γ 및 TNF- α)의 농도를 측정하였다. 야생형은 형질전환되지 않은 식물체(야생형 식물체)로 식이된 마우스의 혈청을 나타낸다. PBS는 경구 면역화에 있어서 PBS 완충액으로 식이된 마우스의 혈청을 나타낸다. pHSS2-MLC 및 pHSS2는 바이너리 벡터를 포함하는 트랜스제닉 식물 외식체로 식이된 마우스의 혈청을 나타낸다. 정제된 MLC는 대장균으로부터 정제된 재조합 MLC로 식이된 마우스의 혈청을 나타낸다.

도 8은 경구 면역화된 마우스의 혈청으로부터 면역글로블린 아형의 분포를 조사한 결과이다. 모든 혈청은 1:25,000(v/v) 비율로 희석하여 측정되었다. MFI는 형광 강도의 평균값을 의미한다.

도 9는 다른 식이 그룹으로부터 추출된 마우스의 혈청에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과이고(A), 트랜스제닉 식물체(*B. napus*)로부터 정제된 키메릭 MLC 단백질을 이용하여 비박스 말라리아 환자 및 정상 사람의 혈청에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다(B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0050] 실시예

[0051] 실시예 1. 키메릭 MLC 단백질 및 이를 암호화하는 유전자 구조체의 구축

[0052] 본 발명자들은 플라스모디움 비박스 말라리아 생활사에서 자유 혈액단계(merozoite)와 초기 간세포 단계(circumsporozoite) 모두를 타겟팅하기 위해, 키메릭 융합 단백질을 이상성 항원(biphasic antigen)으로 디자인하였다. 즉, PvMSP-1의 C-말단 ICB10과 PvCSP의 9개 아미노산 탠덤 반복 부위를 Pro-Gly 반복 모티프를 통해 융합시켰다. MSP 및 CSP 부위의 아미노산 서열은 한국인 비박스 분리균주의 상응하는 유전자 서열에 기반하여, 보존성 PvMSP-1 부위 서열은 매우 보존성이 높은 비박스 분열소체(merozoite) 표면 단백질의 ICB10 부위에 기초하여 선택하였으며, CSP 부위를 위해서는 한국인 비박스 말라리아 분리균주들의 CSP-특이 항원의 탠덤 반복 모티프 서열로부터 두 개의 'GDGAAGQAA' 서열 및 두 개의 'GDRAAGQPA' 서열을 디자인하였다[23]. 링커 모티프는 말라리아 백신의 키메릭 구조화에 일반적으로 이용되는 Pro-Gly 반복 모티프를 Pan 등의 보고(2004)[12]로부터 변형시켜, 5번의 Pro-Gly 반복 모티프가 10개의 아미노산 내부 서열의 양쪽에 위치하도록 하였다. 결과적인 키메릭 MLC 단백질은 PvMSP-1의 105개 아미노산, 링커 반복 모티프의 31개 아미노산, 및 PvCSP의 탠덤 반복의 36개 아미노산을 포함하며(서열 번호 9) 식물 형질전환 벡터 pHSS2의 번역개시 부위 및 C-말단 히스티딘 태그 함께 198개의 아미노산으로 구성되어 이론적으로 20.308 kDa의 분자량을 가졌다.

[0053] 이러한 키메릭 MLC 단백질을 암호화하는 유전자 구조체는, 식물에서 PvMLC의 낮은 발현을 극복하기 위해, MLC 단백질의 아미노산 서열의 변형없이 브라시카 나푸스(*B. napus*)의 코돈 바이어스를 보다 더 반영하도록 구축하였다(서열 번호 10). 그 결과, PvMSP-1의 ICB10의 합성 서열은 야생형 서열과 75.6%의 동일성을 가졌다.

[0054] 실시예 2. 대장균에서 발현된 키메릭 MLC 단백질의 면역원성

[0055] 키메릭 MLC 단백질을 암호화하는 유전자 구조체를 히스티딘-태깅 벡터인 pQE80L(Qiagen, Germany)에서 구축하여 대장균 DH5α에서 이중적으로 발현시켰으며, 1 리터의 LB 배지(USB, 미국) 배양액 당 1 mg의 단백질을 손쉽게(routinely) 정제하였다. 재조합 MLC 단백질은 약 20 kDa의 크기를 가졌다(도 2). 트랜스제닉 식물체에 대해 서열-변형된 재조합 MLC 단백질의 항원성을 조사하기 위해, 웨스턴 블롯 분석 및 ELISA 테스트를 하기와 같이 실시하였다(도 3).

[0056] 대장균에서 이중적으로(heterogeneously) 발현되어 정제된 MLC 단백질을 웰 당 0.5 μg(PBS(Phosphate buffered saline); Sigma(미국), pH 7.4)씩 넣고 4℃에서 하룻밤 동안 코팅한 96-웰 플레이트를 이용하여 비박스 말라리아 한국인 환자로부터 얻은 혈청에서 항원-특이 항체의 존재를 분석하였다. 115명의 *P. 비박스* 환자의 혈청 및 음성 대조군으로서 22명의 감염되지 않은 환자의 혈청을 키메릭 MLC와 반응시켰다. 말라리아 환자 혈청을 차단 완충용액(blocking buffer; 1% 소혈청 알부민(BSA; Sigma(미국))을 포함하는 PBS-0.25% Tween 20(Polysorbate 20, USB(미국)), pH 7.4)으로 1:100(v/v)으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후, 1:1,000(v/v)으로 희석된 퍼옥시다제-컨쥬게이션된 염소 항-인간 IgG 2차 항체(Sigma, USA)와 반응시켰다. 분광광도계(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0057] 본 발명에서는, 결과 값이 음성 대조군의 평균값 + 2배 표준편차(twofold standard deviations)의 범위 안에 있어야만 양성 반응인 것으로 한정하였다. 그 결과, *P. 비박스* 환자의 혈청은 양성반응(94.8%; 115명 중 109명)을 나타냈다(도 3B). 따라서, 키메릭 MLC 단백질은 *P. 비박스* 말라리아에 대해 매우 높은 민감성 항원성을 가지는 것으로 확인되었다.

[0058]

[0059] **실시예 3. 트랜스제닉 식물을 위한 플라스미드의 제작**

[0060]

우선, 식물에 대해 코돈-최적화된 MLC 유전자 구조체를 구축하기 위해 MSP-1, 링커 및 CSP에 대한 올리고뉴클레오타이드의 상보적인 가닥을 다른 제한효소 위치에서 합성하고 60℃에서 30분 동안 상보적인 가닥과 어닐링하여 TA 클로닝 벡터로 클로닝하였다(도 1). 플라스미드를 정제하여 제한효소로 절단하였다. 타겟 DNA 단편을 MSP-1-링커-CSP 순으로 T4 리가제로 연결하여, 재조합 키메라 *mlc* 유전자를 생산하였다. *mlc* DNA 단편을 강력하게 항상 발현되는(strong constitutive) CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터(CaMV35S), 베타-글루쿠로니다제(GUS) 리포터 유전자 및 네오마이신 저항성 유전자를 포함하는 pHSS2 벡터에 삽입하였으며(도 1), 제조된 플라스미드를 pHSS2-MLC로 명명하였다. 아그로박테리움 형질전환 후, Ti 플라스미드의 *vir* 기능이 플랜킹 부위에 의한 플라스미드 벡터의 유전 부위의 절단을 결정하고, 이후 절단 부위가 식물세포로 전달되어 핵 지놈에 통합된다[35]. 진정한 형질전환체를 획득하기 위해, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(*npt II*) 유전자를 카나마이신 저항성을 부여하는 항생제 선택마커로 이용하였다.

[0061] **실시예 4. 식물의 형질전환 및 트랜스제닉 식물체의 선택**

[0062]

상기에서 제조된 pHSS2-MLC 플라스미드를 아그로박테리움-매개된 DNA 운반 시스템에 이용하여 식물을 형질전환시켰으며, 브라시카 나푸스를 Ti 플라스미드에 의한 형질전환용 숙주 식물로 이용하였다. 본 발명자들은 세 그룹의 브라시카 나푸스를 준비하였다: 그룹 1은 비-트랜스제닉 식물체(야생형)이고, 그룹 2는 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101/pHSS2 공벡터 플라스미드(음성 대조군)로 형질전환된 식물체이며, 그룹 3은 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101/pHSS2-MLC 플라스미드(실험군)로 형질전환된 식물체였다.

[0063]

식물 생장(cultivation)은 온실 조건에서 실시하였다. 트랜스제닉 식물은 자엽 아그로박테리움 형질전환 기법을 이용하여 얻었다[37]. 자엽 외식체(explants)를 얻기 위하여, 본 발명자들은 백색 형광등(금호전기, 한국)에 의해 제공되는 빛으로 16시간 빛/8시간 암 조건의 광주기로 조절된 25℃ 생장실에서 씨를 4일 동안 발아시켰다. 발아 배지는 0.2% MSB 솔트(Duchefa, 독일), 1%(w/v) 수크로오스(Duchefa, 독일), 0.05% MES(Sigma, 미국) 및 0.6% 식물 아가(Duchefa, 독일)를 포함하였다. 인 비트로 생장된 묘목(seedlings)으로부터 절단된 자엽 외식체를 0.5-1 cm 조각으로 자른 후 정단 줄기 끝부분(apical shoot tip)을 제거하였다. 두 개의 자엽을 온전히 또는 부분적으로 분리하였지만 이등분된 하이포코틸(bisected hypocotyls)에 여전히 결합되어 있었다. 감염 및 공동-배양을 위해 이용된 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)를 카나마이신-첨가된 YEP 배지(0.5% 효모 추출물(Duchefa, 독일), 0.5% 펩톤(Duchefa, 독일), 0.5% 수크로오스(Duchefa, 독일), pH 7.2)에서 하룻밤 동안 배양하고 통상적으로 600 nm에서 1.0의 광학밀도로 맞추었다. 자엽을 감염 배지(0.4% MSB5 솔트(Duchefa, 독일), 2% 수크로오스(Duchefa, 독일), 1 µg/ml의 2,4-D(Duchefa, 독일), 2 ml의 DMSO(Sigma, 미국) 및 10 ml의 아그로박테리움 배양액의 펠렛으로 구성된 37 ml의 액체 감염 배지)에 담근 후, 20분 동안 반응시켰다[38]. 초과 박테리아 배양액을 여과 종이(Advantec, 일본)로 제거한 후 자엽을 여과 종이(filter paper-covered)의 공동배양 배지[0.05% MES(Duchefa, 독일) 및 0.6% 식물 아가(Duchefa, 독일)]를 포함하는 감염 배지 상에서 2일 동안 공동-배양하였다. 이후, 플레이트를 암 조건으로 옮겨 4℃에서 2일 동안 배양하였다. 자엽을 0.4% MSB5 솔트, 3%(w/v) 수크로오스, 0.05% MES, 2 µg/ml BA(Sigma, 미국), 0.01 µg/ml α-나프탈렌 아세트산(NAA)(Sigma, 미국) 및 0.6% 식물 아가로 구성된 선택 배지로 옮겼으며, 이때 선택을 위해 15 µg/ml의 카나마이신(Duchefa, 독일)을, 아그로박테리움을 제거하기 위해 500 µg/ml의 카르베니실린(Duchefa, 독일)을, 그리고 세포 괴사를 억제하기 위해 2 µg/ml의 AgNO₃(Sigma, 미국)를 보충하였다. 선택 배지에서 캘러스를 25℃로 배양한 후, 2주마다 신선한 배지로 옮겼다. 동일한 선택 배지를 줄기 재분화(shoot regeneration) 배지로 이용하였다. GUS-양성 외식체의 경우, 2-3 cm의 길이로 생장된 재분화 줄기(regenerated shoots)를 뿌리-유도(rooting) 배지로 옮겼다. 약 6주 후, 5-6 cm 길이의 녹색 줄기를 분리하여 줄기 재분화 배지와 동일한 농도의 뿌리-유도 배지, 카르베니실린 및 카나마이신을 포함하는 마젠타 박스(Sigma)에서 배양시켰다. 뿌리 발생의 시작이 2 또는 3주 안에 관찰되었고 한달 안에 성숙한 식물체로 잘 발달되었다.

[0064]

형질전환 식물에서 GUS 발현을 조사하기 위해서는, 재분화된 줄기를 이용하여 조직화학적 분석을 실시하였다. GUS 활성에 대한 조직화학적 분포(localization)를 조직화학적 기질로서 5-브로모-4 클로로-3-인돌릴 β-D-글

루쿠로나이드(XGluc; Duchefa, 독일)를 이용하여 실시하였다. 재분화된 줄기 0.1 g을 각각 X-Gluc 용액(다이메틸포르아마이드(Sigma, 미국)에 녹여진 0.5 mM의 포타슘 페로- 및 페리-시아나이드(Sigma, 미국), 0.3% 트라이톤 X-100(USB, 미국) 및 1.9 mM X-Gluc)에서 37℃로 1시간 동안 반응시켰다. 일반적으로, GUS 양성 반응은 음성 신호인 노란색과는 대조적으로 용액이 녹색-파란색으로 변하여 검출되었다. 따라서, 본 발명자들은 야생형 식물체(음성 대조군)의 광학밀도를 공백터인 pHSS2로 형질전환된 트랜스제닉 식물체(양성 대조군)의 광학밀도 및 타겟 생산물인 pHSS2-MLC로 형질전환된 트랜스제닉 식물체의 광학밀도와 비교함으로써 GUS 활성을 측정하였다.

[0065] 그 결과, 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101/pHSS2 공백터 플라스미드로 형질전환된 브라시카 나푸스는 85개의 캘러스를 유도하였으며, 이들 중 62개의 캘러스가 GUS 검출 완충액에서 파란색 스팟을 나타냈다. 줄기 형성 과정 동안, 50개의 캘러스에서 줄기가 유도되었으며 뿌리 발생을 위해 마젠타 박스로 옮겨졌다. 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101/pHSS2-MLC 벡터 플라스미드로 형질전환된 브라시카 나푸스는 총 35개의 캘러스를 유도하였고, 이들 중 23개의 캘러스가 GUS 검출에서 양성반응을 보였으며(도 4), 총 54개의 줄기가 형성되어 대조군 식물체에서 이용된 뿌리-유도 배지로 옮겨졌다.

[0066] 또한, 트랜스제닉 식물체의 *mlc* 및 *nptII* 유전자의 PCR 분석을 위해 식물 게놈 DNA를 하기와 같이 분리하였다. 200 mg의 잎을 400 μ l의 추출 완충용액[0.2 mM Tris-HCl(pH 7.5)(Sigma, 미국), 250 mM NaCl(Sigma, 미국), 25 mM EDTA(Sigma, 미국) 및 0.5% SDS(Sigma, 미국)]에서 균질화하였다. 혼합물을 1.5 ml 튜브에서 혼합한 후 원심분리하였다. 상층액을 취하여 600 μ l의 클로로포름(Merck, 미국):이소아밀 알코올(Merck, 미국)(24:1, v/v)과 잘 혼합하였다. 원심분리하여 얻어진 상층액을 동일 용량의 이소프로판올로 침전시킨 후, 펠렛을 70% 에탄올로 두 번에 걸쳐서 세척하였다. 세척된 펠렛을 20 μ l의 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹였다. DNA 시료를 1% 아가로오스 겔에서 전기영동하여 확인하였다. 추출된 식물 지놈 DNA를 PCR을 위한 템플레이트로 이용하였다.

[0067] 상기에서 얻어진 식물 지놈 DNA 약 0.5-1 μ g을 포함하는 반응 혼합물에서 PCR 분석을 실시하였다. PCR은 다음과 같은 조건으로 실시하였다: TECHNE PCR 시스템(USA)에서 94℃로 1분 동안 전-변성 단계; 한 사이클이 94℃로 1분, 62℃로 1분, 72℃로 1분으로 구성된 30 사이클의 PCR 단계; 및 72℃로 10분 동안 후-연장 단계. *mlc*(MLC-F, 5'-TTCTAGAGTGCATTGATACCAACGTTCC-3' (서열 번호 11) 및 MLC-R, 5'-TAGGATCCCCAGCTGGTTGACC-3' (서열 번호 12)) 및 *nptII*(NPTII-F, 5'-GAACAAGATGGATTGCACGC-3' (서열 번호 13) 및 NPTII-R, 5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3' (서열 번호 14)) 프라이머 세트를 이용하여 각각 516 bp 및 800 bp의 PCR 생산물을 얻었다. 뉴클레오타이드 서열 분석으로 확인하기 위해, 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101 pHSS2-MLC 플라스미드 DNA 및 트랜스제닉 식물체 지놈 DNA 시료의 PCR 생산물을 Bionics Inc.(Korea)에서 분석하였다. 시퀀싱을 위해, 1 μ g의 플라스미드 DNA 및 200 ng의 PCR 생산물이 요구되었다.

[0068] pHSS2-MLC 프라이머 세트를 이용하여 PCR 분석에 의해 재조합 유전자를 스크리닝하였을 경우, GUS-발현 식물체의 90%가 양성이었다. 증폭된 산물의 아가로오스 겔 전기영동 분석을 통해, 잠재적인 MLC 트랜스제닉 라인 모두에서 약 550 bp의 예상 밴드가 검출되었다. 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101/pHSS2-MLC 벡터 플라스미드로 브라시카 나푸스를 감염시켰음에도 불구하고, 타겟 *mlc* 유전자는 비-형질전환된 라인에서 증폭되지 않았다. 약 800 bp의 산물을 *nptII* 프라이머 세트를 이용한 PCR 분석을 통해 확인하였는데, 이는 *mlc* 유전자의 경우와 동일한 증폭 패턴이었다(도 5). 트랜스제닉 식물체(*B. napus*)의 지놈 DNA로부터 증폭된 PCR 산물은 *mlc* 유전자와 동일한 서열을 포함하는 것으로 추가적인 DNA 시퀀싱 분석을 통해 밝혀졌다.

[0069] 실시예 5. 면역블롯 분석

[0070] ELISA 및 웨스턴 블롯팅 분석을 위한 식물 단백질 추출물을 제조하기 위해, 식물 조직 시료를 액체질소로 동결시켜 분쇄하고 아세톤에 녹여진 10% TCA에 2% β -머캅토에탄올이 첨가된 TCA 추출 완충용액을 포함하는 추출 완충용액에서 균질화시켰다(TCA/아세톤 추출만 수행)[39]. 유채 조직의 1 g 생량(fresh weight) 당 완충용액의 분취액 3 ml를 이용하였다. 추출물을 -20℃에서 30분 동안 놓은 후, 혼합물을 7,000 rpm에서 4℃로 30분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버리고 남은 백색 펠렛을 10 ml의 아세톤으로 두 번에 걸쳐서 세척하였다. 마지막으로, 건조된 펠렛을 1 ml의 SDS-PAGE 겔 로딩 완충액(1x)에 재현탁하였다. 식물 단백질을 추출물을 SDS-PAGE로 분리한 후 반-건조 트랜스퍼(Bio-RAD, USA)를 이용하여 단백질을 PVDF 막(GE, 미국)으로 옮겼다. 웨스턴 블롯 분석을 위해, 막을 MSP 및 CSP 항체(1:1,000 v/v; Abcam, UK)로 프로빙하였다. 야생형 유

채 및 pHSS2 공백터-삽입된 트랜스제닉 식물체를 음성 대조군으로 이용하였다.

[0071] 그 결과, 단일클론 PvMSP 및 PvCSP 항체(Abcam)를 이용한 웨스턴 블롯 분석에서 양성반응이 나타났으며(도 6A), ELISA 테스트에서는 86%(n = 37)의 민감도 및 100%(n = 6)의 특이성이 확인되어(도 6B), 특이 말라리아 항원으로서 재조합 MLC의 면역원성이 확인되었다. 또한, PCR 분석을 통해 서로 독립적인 트랜스제닉 식물체 (*B. napus*) 라인이 형질전환된 식물체라는 것을 확인하였다. 따라서, 트랜스제닉 식물체(*B. napus*)는 PvMSP 및 PvCSP에 대한 단일클론 항체에 의한 검출 결과 및 비박스 말라리아 환자의 혈청에서 검출된 결과와 같이 재조합 MLC 단백질을 실질적으로 발현하였다.

[0072] 실시예 6. 브라시카 나푸스에서 발현된 키메릭 단백질 MLC에 의한 면역원성

[0073] 브라시카 나푸스에서 발현된 키메릭 MLC 단백질의 면역원성을 결정하기 위해, 본 발명자들은 발현된 MLC 단백질을 포함하는 트랜스제닉 식물체의 잎으로 마우스의 경구 면역화를 시도하였다. 6-주령된 20마리의 수컷 BALB/c 마우스(Orient Bio Inc, Korea)를 다섯 마리씩 네 그룹으로 나누었다. 첫 번째 그룹은 300 μ l의 PBS를 섭취하였다. 두 번째 그룹은 대장균(*E. coli*)에서 정제된 200 μ g의 MLC를 포함하는 300 μ l의 PBS를 섭취하였다. 세 번째 그룹은 pHSS2-MLC로 형질전환된 트랜스제닉 식물체에서 유래한 1 g의 잎을 포함하는 1.5 ml의 PBS를 섭취하였다. 마지막 그룹은 공백터 pHSS2로 형질전환된 트랜스제닉 식물체에서 유래한 1 g의 잎을 포함하는 1.5 ml의 PBS를 섭취하였다. 모든 마우스는 비면역화 기간에 실험실의 일반적인 식이(feeding) 스케줄에 따른 사료 및 물을 제공받았으나, 경구 식이를 실시하기 하룻밤 전에 식이를 중단시켰다. 요약하면, 경구 식이(oral feeding)는 4주 간격으로 두 번씩 실시하였으며, 식이가 실시된 주의 경우, 마우스는 두 번에 걸쳐서 식이되었다. 마지막 경구 식이를 실시하고 3주 후에, 비장 및 혈액을 적출(extract)하였다. 혈청을 ELISA에 의해 ELISA 단위로 분석하였고 사이토카인 및 면역글로블린 아형 분석(immunoglobulin subtyping assays)에 의해 분석하였다. 모든 마우스 실험은 경희대학교 동물실험윤리위원회(Kyung Hee University Institutional Animal Care and Use Committee)에서 승인된 프로토콜에 따라 실시하였다.

[0074] 경구 면역화에 의한 비장에서의 면역 시스템의 활성화를 검출하기 위해, 본 발명자들은 Th1-연관된 사이토카인(IFN- γ , TNF- α , IL-2 및 IL-12) 및 면역글로블린(IgG, IgA 및 IgM)의 농도를 분석하였다. 천연 마우스 또는 경구-면역화된 마우스로부터 적출된 비장을 면도칼(도루코, 한국)로 약 1 x 1 mm 크기로 해부하고 프로테아제 억제제 카테일(Roche Diagnostics, Germany) 및 0.1% Igepal CA-630 비-이온성 계면활성제(detergent; Sigma, USA)를 포함하는 냉장 엔도톡신-부재 PBS 1 ml을 첨가하였다[40]. 비장 용해물을 7,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후, 상층액을 수득하여 사이토카인 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 비장 용해물 내의 IL-2, IL-12 (p40), IFN- γ 및 TNF- α 를 제조자의 프로토콜에 따라 Bioplex technology 및 Bio-Plex kits(Bio-Rad)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 Bio-Plex Manager 5.0 소프트웨어(Bio-Rad)로 분석하였다. 각 실험군의 비장에서 400 μ g의 총단백질을 측정하였다. 경구 면역화에 의해 생산된 항체들의 아형(isotype)을 분석하기 위해, 마우스 면역글로블린 아형 키트(Millipore)를 이용하였다. 모든 혈청들은 최종 면역화를 실시하고 3주 후에 수득하였으며 MILLIPLEX MAP 분석 완충액에 1:25,000(v/v)의 비율로 희석하였다. 각 마우스 그룹에 존재하는 항체들(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA 및 IgM)의 양은 Luminex사의 Luminex 100™ IS를 이용하여 측정하였다.

[0075] 사이토카인 IFN- γ 및 TNF- α 은 대장균에서 정제된 MLC 단백질 및 트랜스제닉 식물체에서 발현된 MLC 단백질 모두에 의해 유도되었으며, 사이토카인의 유도 레벨이 야생형 및 PBS-처리된 시료의 레벨보다 2-3배 정도 더 높은 농도를 나타냈다. 하지만, IL-2 및 IL-12는 면역화에 의해 조금 증가하였다(도 7). 흥미롭게도, IL-2 및 IL-12는 대장균에서 이중적으로 발현되어 정제된 MLC 단백질보다 트랜스제닉 식물체-발현된 MLC 단백질에 의해 보다 더 유도되었다. 면역글로블린 G1의 농도는 트랜스제닉 식물체-발현된 MLC 단백질에 의해 2배 증가하였고, IgG3는 대장균 및 트랜스제닉 식물체로부터 발현된 MLC 모두에 의해 조금 증가하였다. 하지만, IgG2a, IgG2b, IgA 및 IgM은 증가하지 않았다(도 8).

[0076] 본 발명자들이 면역화된 마우스 및 비박스 말라리아 환자로부터 추출한 혈액 시료에서 브라시카 나푸스로부터 정제된 키메릭 MLC 단백질에 대한 웨스턴 블롯 분석을 시도하였을 때, 불행하게도 시료 C-1 및 C-3를 제외한 면역화된 마우스의 모든 시료에서 양성반응이 나타나지 않았다. C-1 및 C-3의 마우스 혈청의 반응 시그널은 멀티머형(multimer form)으로 검출되었다(도 9A). 비박스 말라리아 환자의 혈청도 멀티머 위치에서 면역반응을 보였다(도 9B). 따라서, 경구적으로 면역화된 마우스의 혈청에 대한 면역원성 조사는 MLC의 모노머형(monomeric form)을 인식할 수 없었다.

[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명 의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0078] **참고문헌**

- [0079] [1] WHO World Malaria Report 2008.
- [0080] [2] Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(6 suppl):79-87.
- [0081] [3] Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L. *Plasmodium vivax* transmission: Chances for control? *Trends Parasitol* 2004;20(4):192-8.
- [0082] [4] Baird K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* 2007;23(11):533-9.
- [0083] [5] Herrera S, Corradin G, Ar?valo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol* 2007;23(3):122-8.
- [0084] [6] Bell BA, Wood JF, Bansal R, Ragab H, Cargo III J, Washington MA, Wood CL, Ware LA, Ockenhouse CF, Yadava A. Process development for the production of an *E. coli* produced clinical grade recombinant malaria vaccine for *Plasmodium vivax*. *Vaccine* 2009;27(9):1448-53.
- [0085] [7] Bueno LL, Morais CG, Soares IS, Bouillet LEM, Bruna-Romero O, Fontes CJ, Fujiwara RT, Braga EM. *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. *Vaccine* 2009;27(41):5581-8.
- [0086] [8] Mueller I, Moorthy VS, Brown GV, Smith PG, Alonso P, Genton B, WHO MALVAC. Guidance on the evaluation of *Plasmodium vivax* vaccines in populations exposed to natural infection. *Vaccine* 2009; 27(41):5633-43.
- [0087] [9] Brown GV, Moorthy VS, Reed Z, Mendis K, Arevalo-Herrera M, Alonso P. Priorities in research and development of vaccines against *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 2009;27(52):7228-35.
- [0088] [10] Aidoo M, Lalvani A, Gilbert SC, Hu JT, Daubersies P, Hurt N, Whittle HC, Druihle P, Hill AVS. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. *Infect Immun* 2000;68(1):227-32.
- [0089] [11] Bueno LL, Fujiwara RT, Soares IS, Braga EM. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-119 on the innate immune response. *Vaccine* 2008;26(9):1204-13.
- [0090] [12] Pan W, Huang D, Zhang Q, Qu L, Zhang D, Zhang X, Xue X, Qian F. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth *in vitro*. *J Immunol* 2004;172(10):6167-74.
- [0091] [13] Shi Q, Lynch MM, Romero M, Burns JM. Enhanced protection against malaria by a chimeric merozoite surface protein vaccine. *Infect Immun* 2007;75(3):1349-58.
- [0092] [14] Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med* 1990;172(1):379-82.
- [0093] [15] Diggs CL, Ballou WR, Miler LH. The major merozoite surface protein as a malaria vaccine target. *Parasitol Today* 1993;9(8):300-2.
- [0094] [16] Chang SP, Nikaido CM, Hashimoto AC, Hashiro CQ, Yokota BT, Hui GSN. Regulation of antibody specificity to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 by adjuvant and MHC haplotype. *J*

Immunol 1994;152(7):3483-90.

- [0095] [17] Reed ZH, Kieny MP, Engers H, Friede M, Chang S, Longacre S, Malhotra P, Pan W, Long C. Comparison of immunogenicity of five MSP-1 based malaria vaccine candidate antigens in rabbits. Vaccine 2009;27(10):1651-60.
- [0096] [18] del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc Nat Acad Sci USA 1991;88(9):4030-4.
- [0097] [19] Burns JM, Majarian JWR, Young JF, Daly TM, Long CA. A protective monoclonal antibody recognizes an epitope in the carboxy-terminal cysteine-rich domain in the precursor of the major merozoite surface antigen of the rodent malarial parasite, *Plasmodium yoelii*. J Immunol 1989;143(8):2670-6.
- [0098] [20] Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado 492 RLD, Ferreira OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. Malaria J 2003;14(2):39-45.
- [0099] [21] Babon JJ, Morgan WD, Kelly G, Eccleston JF, Feeney J, Holder AA. Structural studies on *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. Mol Biochem Parasitol 2007;153(1):31-40.
- [0100] [22] McCutchan TF, Kissinger JC, Touray MG, Rogers MJ, Li J, Sullivan M, Braga EM, Krettli AU, Miller LH. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(21):11889-94.
- [0101] [23] Lee HW, Lee JS, Lee WJ, Lee HS. DNA sequencing and expression of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* Korean isolate in *Escherichia coli*. J Microbiol 1999;37(4):234-42.
- [0102] [24] Kim T, Kim YJ, Song KJ, Song JW, Cha SH, Kim YK, Shin YK, Suh IB, Lim CS. The molecular characteristics of circumsporozoite protein gene subtypes from *Plasmodium vivax* isolates in Republic of Korea. Parasitol Res 2002;88(12):1051-4.
- [0103] [25] Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP. Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enea V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. Science 1985;230(4727):815-8.
- [0104] [26] Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, Cho YJ, Jeon KW, Ju W, Ki CS, Oh MD, Choe K. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. Clin Diag Lab Immunol 2001;8(1):14-20.
- [0105] [27] Zhang Q, Xue X, Qu L, Pan W. Construction and evaluation of a multistage combination vaccine against malaria. Vaccine 2007;25(11):2112-9.
- [0106] [28] Marson HS, Lam DM, Arntzen CJ. 517 Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89(24):11745-9.
- [0107] [29] Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(20):11539-44.
- [0108] [30] Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, Borisova VN, Melnikov VA, Bykov VA, Buryanov YI. Expression and characterization of hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. Biochem (Mosc) 2004;69(10):1158-64.
- [0109] [31] Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catal? R, Martinez-Torrecuadrada JL, Casal I, Salinas J, Borca MV, Escribano JM. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. FEBS Lett 2001;488(1-2):13-7.
- [0110] [32] Ghosh S, Malhotra P, Lalitha PV, Guha-Mukherjee S, Chauhan VS. Expression of *Plasmodium falciparum* C-terminal region of merozoite surface protein (PfMSP119), a potential malaria vaccine candidate, in tobacco. Plant Sci 2002;162(3):335-43.

- [0111] [33] Wang L, Webster DE, Campbell AE, Dry IB, Wesselingh SL, Coppel RL. Immunogenicity of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 produced in transgenic plants. *Int J Parasitol* 2008;38(1):103-10.
- [0112] [34] Gomez N, Wigdorovitz A, Castan?n S, Gil F, Ord?s R, Borca MV, Escibano JM. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch Virol* 2000;145(8):1725-32.
- [0113] [35] Chowdhury K, Bagasra, O. An edible vaccine for malaria using transgenic tomatoes of varying sizes, shapes and colors to carry different antigens. *Med Hypotheses* 2007;68(1):22-30.
- [0114] [36] Hoekema A, Hooykaas PJ, Schilperoort RA. Transfer of the octopine T-DNA segment to plant cells mediated by different types of *Agrobacterium* tumor- or root-inducing plasmids: Generality of Virulence Systems. *J Bacteriol* 1984;158(1):383-5.
- [0115] [37] Bhalla PL, Singh MB. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica assica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature Protocols* 2008;3(2):181-9.
- [0116] [38] Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Rep* 2004;23(6):386-90.
- [0117] [39] Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catal? C, Saladi? M, Rose JKC. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols* 2006;1(2):769-74.
- [0118] [40] Rosengren S, Firestein GS, Boyle DL. Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diag Lab Immunol* 2003;10(6):1002?0.

수탁번호

[0119]

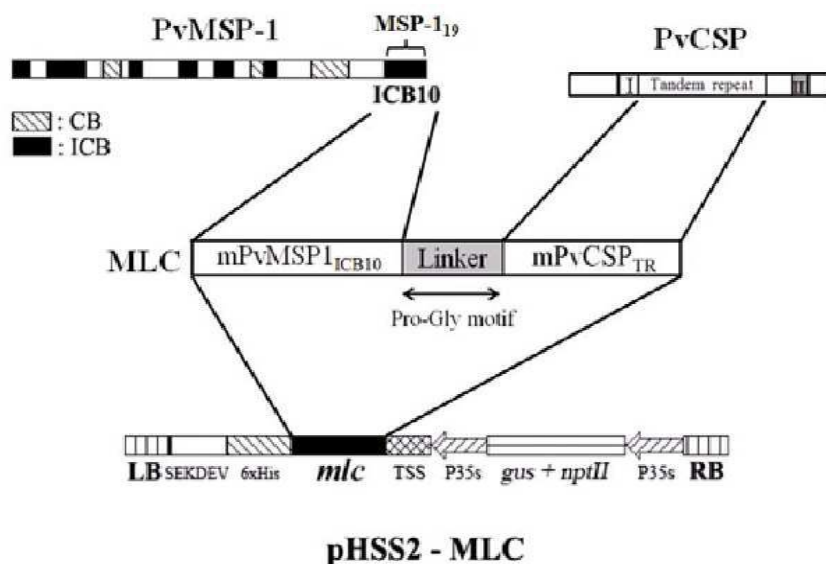
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11805BP

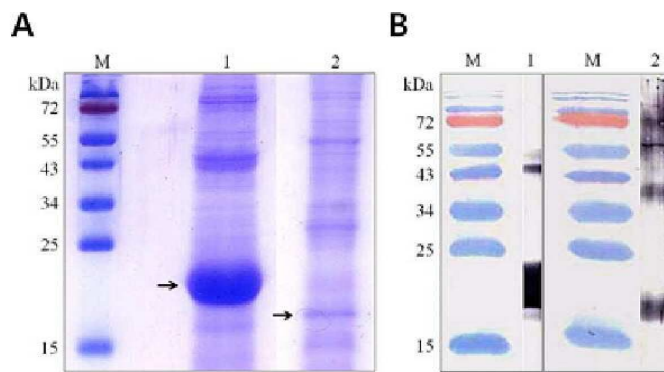
수탁일자 : 20101112

도면

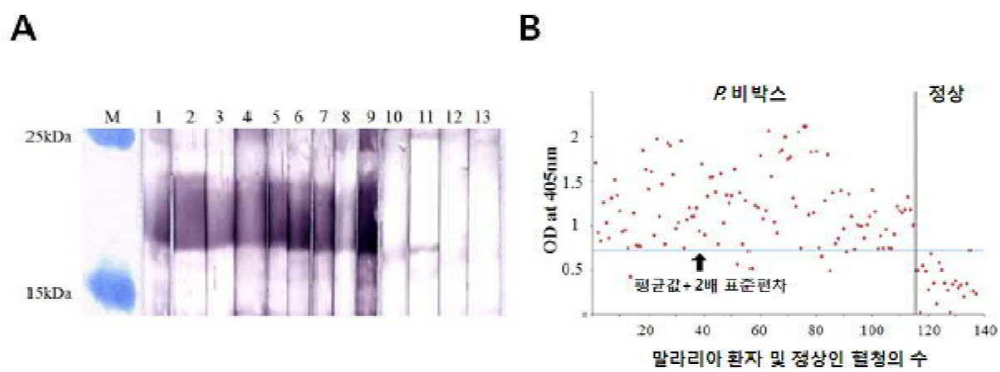
도면1



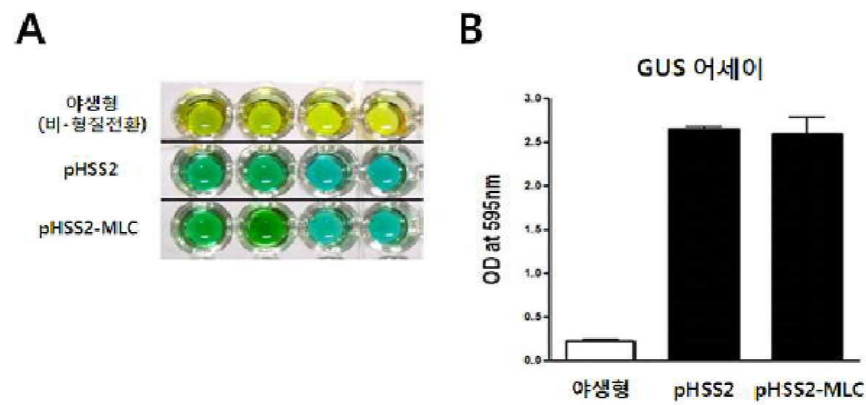
도면2



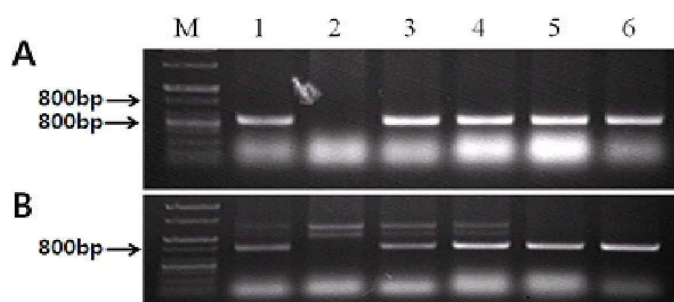
도면3



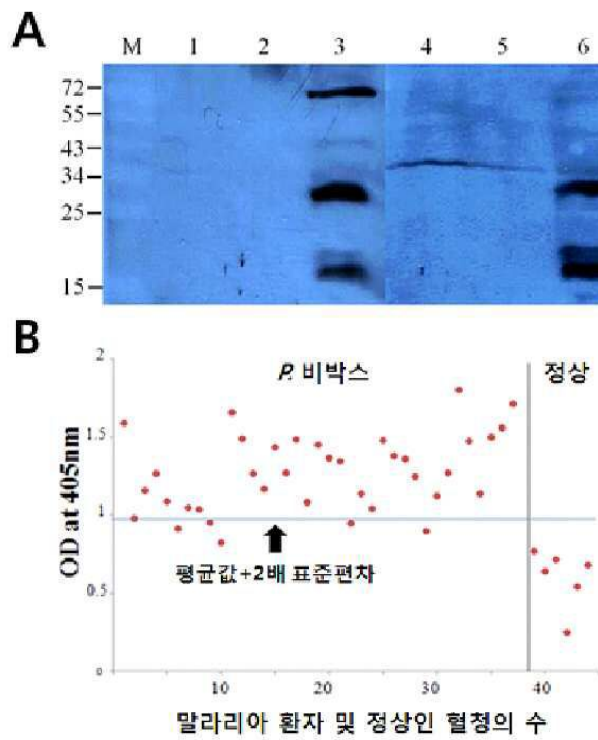
도면4



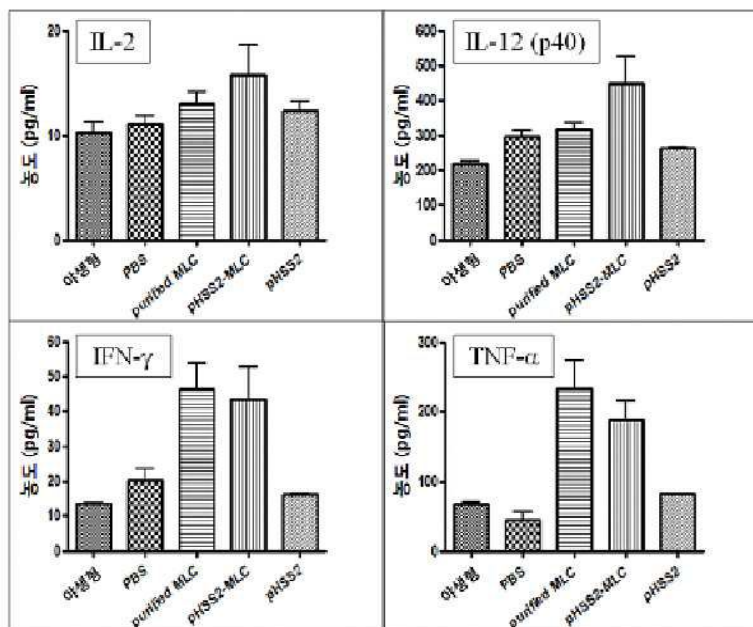
도면5



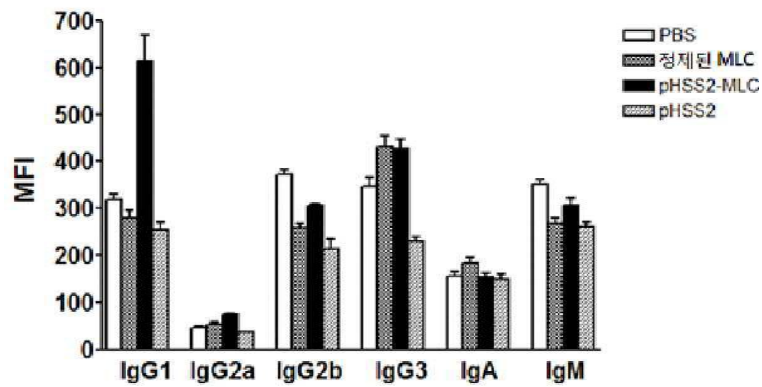
도면6



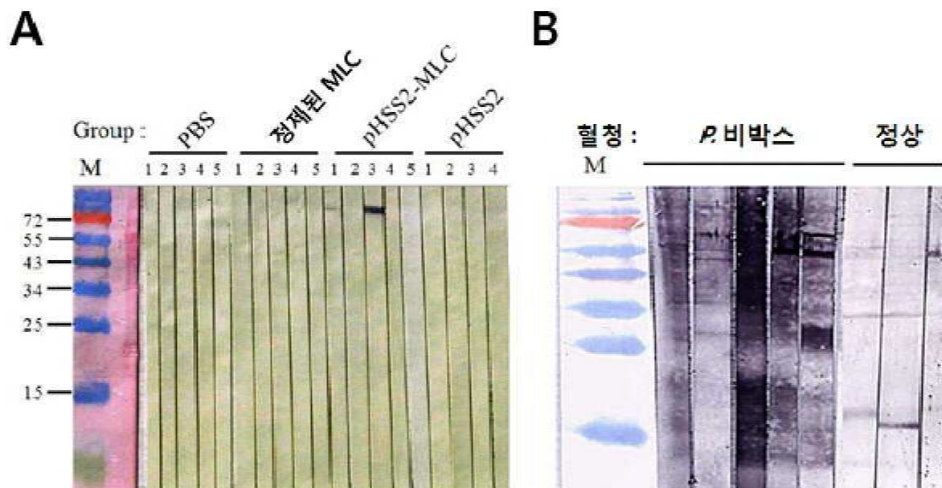
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Chimeric fusion protein of Plasmodium vivax and its use

<160> 14

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 105

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 1

Cys Ile Asp Thr Asn Val Pro Asp Asn Ala Ala Cys Tyr Arg Tyr Leu

1 5 10 15

Asp Gly Thr Glu Glu Trp Arg Cys Leu Leu Thr Phe Lys Glu Glu Gly

20 25 30

Gly Lys Cys Val Pro Ala Ser Asn Val Thr Cys Lys Asp Asn Asn Gly
 35 40 45
 Gly Cys Ala Pro Glu Ala Glu Cys Lys Met Thr Asp Ser Asn Lys Ile
 50 55 60
 Val Cys Lys Cys Thr Lys Glu Gly Ser Glu Pro Leu Phe Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Phe Cys Ser Ser Ser Phe Leu Ser Leu Ser Phe Leu Leu Pro Met
 85 90 95
 Leu Leu Phe Leu Leu Cys Met Glu Leu

100 105

<210> 2
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Plasmodium vivax
 <400> 2
 tgcattgata ccaacgttcc agacaacgcg gctgtctaca ggtatctgga tggtagcgag 60
 gaatggcgct gcttgttgac attcaaggag gaaggcggca agtgcgtgcc tgcattcgaac 120
 gtcacctgta aggacaataa cgggggatgc gctccggagg ctgagtgtaa gatgaccgac 180
 agtaataaga tcgtatgcaa gtgtactaaa gagggctccg agccactctt tgaggggggtc 240
 ttctgctcca gctcttcttt tctctcactt agcttctctg tgcccatgct cctcttctta 300

ttatgtatgg agctc 315

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Plasmodium vivax
 <400> 3

Gly Asp Gly Ala Ala Gly Gln Ala Ala
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Plasmodium vivax
 <400> 4

Gly Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala

1 5
 <210> 5
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Plasmodium vivax
 <400> 5
 Gly Asp Gly Ala Ala Gly Gln Ala Ala Gly Asp Gly Ala Ala Gly Gln

1 5 10 15
 Ala Ala Gly Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala Gly Asp Arg Ala Ala
 20 25 30
 Gly Gln Pro Ala
 35
 <210> 6
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> Plasmodium vivax
 <400> 6
 ggggatggag ctgcaggaca agctgctggt gatggagctg caggtaagc agctggtgat 60
 agagctgcag gacaacctgc aggagataga gctgcaggtc aaccagct 108
 <210> 7
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> linker
 <400> 7
 Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Thr Leu Gln Thr
 1 5 10 15
 Arg Ile Asp Glu Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro
 20 25 30
 <210> 8
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker

<400> 8

cctgggccag gacctgggcc aggacctggt ccaggtaccc tgcagacgcg tatcgatgaa 60
ttcggacctg gtccaggacc tgggtccagga ccc 93

<210> 9

<211> 172

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 9

Cys Ile Asp Thr Asn Val Pro Asp Asn Ala Ala Cys Tyr Arg Tyr Leu

1 5 10 15

Asp Gly Thr Glu Glu Trp Arg Cys Leu Leu Thr Phe Lys Glu Glu Gly

20 25 30

Gly Lys Cys Val Pro Ala Ser Asn Val Thr Cys Lys Asp Asn Asn Gly

35 40 45

Gly Cys Ala Pro Glu Ala Glu Cys Lys Met Thr Asp Ser Asn Lys Ile

50 55 60

Val Cys Lys Cys Thr Lys Glu Gly Ser Glu Pro Leu Phe Glu Gly Val

65 70 75 80

Phe Cys Ser Ser Ser Phe Leu Ser Leu Ser Phe Leu Leu Pro Met

85 90 95

Leu Leu Phe Leu Leu Cys Met Glu Leu Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro

100 105 110

Gly Pro Gly Pro Gly Thr Leu Gln Thr Arg Ile Asp Glu Phe Gly Pro

115 120 125

Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Asp Gly Ala Ala Gly Gln Ala

130 135 140

Ala Gly Asp Gly Ala Ala Gly Gln Ala Ala Gly Asp Arg Ala Ala Gly

145 150 155 160

Gln Pro Ala Gly Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala

165 170

<210> 10

<211> 516

<212> DNA

<213> Plasmodium vivax

<400> 10

tgcattgata ccaacgttcc agacaacgcg gcctgctaca ggtatctgga tggtagcgag 60

gaatggcgct gcttgttgac attcaaggag gaaggcggca agtgcgtgcc tgcacgaac 120

gtcacctgta aggacaataa cgggggatgc gctccggagg ctgagtgtaa gatgaccgac 180

agtaataaga tcgtatgcaa gtgtactaaa gagggctccg agccactctt tgagggggtc 240

ttctgtccca gctcttcttt tctctcactt agcttctctgt tgeccatgct cctcttctta 300

ttatgtatgg agctccctgg tccaggacct ggtccaggac ctggtccagg taccctgcag 360

acgcgtatcg atgaattcgg acctgggtcca ggacctggtc caggacccgg ggatggagct 420

gcaggacaag ctgctgggtga tggagctgca ggtcaagcag ctggtgatag agctgcagga 480

caacctgcag gagatagagc tgcaggtcaa ccagct 516

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ttctagagtg cattgatacc aacgttcc 28

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

taggatcccc agctggttga cc 22

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gaacaagatg gattgcacgc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

gaagaactcg tcaagaaggc

20