

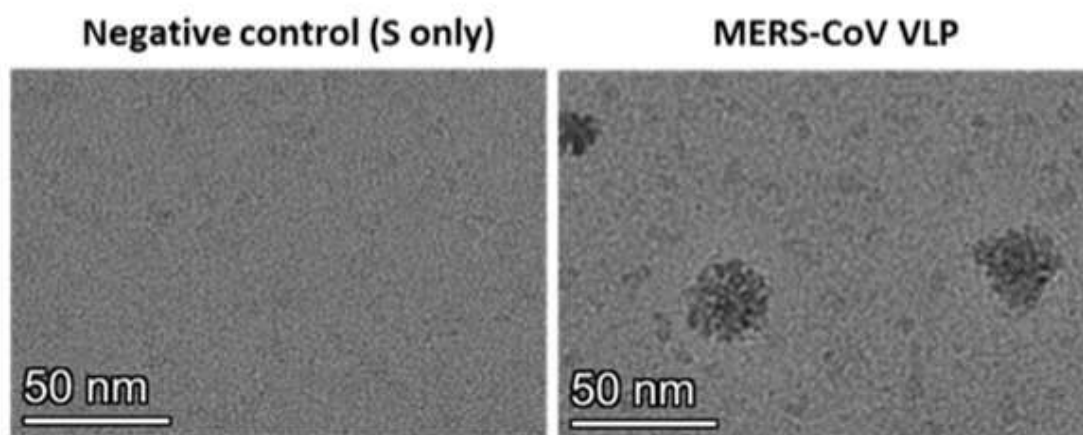
**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2024-0067009
(43) 공개일자 2024년05월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0148442
- (22) 출원일자 2023년10월31일
심사청구일자 2023년10월31일
- (30) 우선권주장
1020220142467 2022년10월31일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
신현진
대전광역시 서구 계룡로264번길 4, 105동 610호(월평동, 월평타운)
- 박정은
세종특별자치시 달빛로 80, 1203동 402호(중촌동, 가재마을 12단지)
- (74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **바이러스 유사입자를 이용한 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 백신****(57) 요약**

본 발명은 바이러스 유사입자를 이용한 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)에 대한 백신에 관한 것으로, 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 및 뉴클레오키프 단백질을 포함하는, 바이러스 유사입자(virus-like particle; VLP) 및 상기 바이러스 유사입자를 포함하는 중동 호흡기 증후군 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

대표도 - 도3

(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 2039/5258 (2013.01)

C12N 2770/20023 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중동 호흡기 증후군 바이러스(MERS-CoV)의 스파이크(spike), 멤브레인(membrane), 엔벨로프(envelope) 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질을 포함하는, 바이러스 유사입자(virus-like particle; VLP).

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크 단백질은 서열번호 1의 야생형 아미노산 서열과 비교하여 L731P, G732D, 및 Q733H를 포함하는 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 엔벨로프 단백질은 서열번호 5의 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I13Q, 및 C40A를 포함하는 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 멤브레인 단백질은 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질은 서열번호 10의 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I18M, G222N, 및 P223S를 포함하는 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 바이러스 유사 입자는 숙주 세포에서 자가 조립 (self-assembly)되어 형성되는 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 바이러스 유사입자를 유효성분으로 포함하는 중동 호흡기 증후군 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스 유사입자를 이용한 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)에 대한 백신에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중동 호흡기 증후군 코로나 바이러스(MERS-CoV)는 2012년 사우디아라비아 반도에서 처음으로 발견된 뒤 중동 지역에서 집중적으로 발생한 바이러스로, 코로나바이러스(Coroviridae)군에 속하며, 사스 코로나바이러스(SARS-CoV, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스)와 유사한 바이러스로 알려져 있다.

[0003] 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스는 잠복기가 1주일가량이며, 사스 코로나바이러스와 마찬가지로 고열을 동반한 기침, 호흡곤란, 숨 가쁨, 가래 등 호흡기 증상을 주로 보이며 그 이외에도 두통, 오한, 콧물 및 근육통뿐만 아니라 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 복통 및 설사 등 소화기 증상도 나타날 수 있다. 다만, 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스는 사스 코로나바이러스와는 달리 급성 신부전증을 동반하며 치사율이 사스보다 6배 가량 높아 매우 치명적인 양상을 보이고 있다. 그러나 현재까지 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 치료를 위한 항바이러스제는 아직 개발되지 않았고 그에 따라 바이러스 감염 증상에 대한 치료에 치중하게 되었다.

[0004] 현재, 사스 코로나바이러스의 연구를 기반으로, 영장류 모델에서 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 백신을 개발을 위한 연구가 활발하며, 개발 중인 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 백신은 재조합된 수용체 결합 도메인(RBD)을 기반으로 한 백신으로, 접종을 통해 체액성 및 세포성 면역반응을 증가시키는 것으로 나타났다. 그 외에도 다양한 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 백신이 개발 중에 있다.

[0005] 현재 연구가 진행된 백신은 대부분 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스의 감염을 매개하는 표면단백질인 스파이크(spike) 단백질을 타겟으로 하여 일부 또는 전체를 발현한 재조합백신의 형태를 가지고 있다. 이러한 재조합 단백질은 주로 모노머 또는 다이머의 형태를 띠고 있으며 엔벨로프(envelope)가 결합되어 있어 구조적 및 기능적으로 실제 바이러스를 완벽히 재현할 수 없는 한계가 있다.

[0006] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 중동 호흡기 증후군 바이러스의 구조를 모사한 바이러스 유사 입자는 live virus와 달리 감염을 일으키는 유전물질을 포함하고 있지 않으므로 우수한 안전성을 나타냄과 동시에, 유의적인 면역 유도 반응을 나타낼 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 중동 호흡기 증후군 바이러스(MERS-CoV)의 스파이크(spike), 멤브레인(membrane), 엔벨로프(envelope) 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질을 포함하는, 바이러스 유사입자(virus-like particle; VLP)를 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 상기 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 유효성분으로 포함하는 중동 호흡기 증후군 바이러스 예방용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의

하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

- [0014] 일 양상은 중동 호흡기 증후군 바이러스(MERS-CoV)의 스파이크(spike), 멤브레인(membrane), 엔벨로프(envelope) 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질을 포함하는, 바이러스 유사입자(virus-like particle; VLP)를 제공한다.
- [0015] 상기 용어 “바이러스 유사 입자 (Virus-Like Particle: VLP)” 는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스와 유사한 형태를 띠고 있는 제조된 단백질을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스의 구조 단백질들간 결합을 통하여 실제 바이러스와 유사한 형태로 자가 조립(self-assembly)이 되지만, 조립 과정에서 바이러스의 유전자는 바이러스 유사 입자 내부로 포함되지 않는 것일 수 있다. 상기의 특성을 갖는 바이러스 유사 입자는 실제 바이러스와 매우 유사한 형태를 띠고 있어 체내 주입 시 높은 면역원성을 나타낼 수 있고, 바이러스의 유전자를 포함하고 있지 않으므로 체내에서 증식이 불가능한 안전한 항원으로 작용할 수 있다. 구체적으로, 중동 호흡기 증후군 바이러스(MERS-CoV)의 유사입자를 말한다.
- [0016] 상기 용어 “중동 호흡기 증후군 바이러스(MERS-CoV)”는 코로나바이러스 중에서 베타코로나바이러스의 일종으로, 11개의 ORF (open reading frame)를 가진다. MERS-CoV의 구조 단백질로 스파이크(spike), 멤브레인(membrane), 엔벨로프(envelope) 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질이 존재하며 각각 S, M, E 및 N으로 표시할 수 있다.
- [0017] 상기 바이러스 유사 입자는 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크 단백질, 엔벨로프 단백질, 멤브레인 단백질, 및 뉴클레오캡시드 단백질을 포함할 수 있다. 상기 스파이크 단백질은 바이러스 표면에 존재하며, 곤봉 모양의 돌기 형태로 이루어진 구조 단백질이다. 상기 단백질은 숙주세포의 당 단백질 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 세포막과 바이러스의 외막의 융합, 그리고, 중화 항체의 생성을 야기할 수 있다. MERS-CoV의 스파이크 단백질은 receptor binding 부분인 S1과 membrane fusion 부분인 S2로 구성되어 있으며, MERS-CoV의 S1 sub-domain에 있는 receptor binding domain (RBD)는 CD-26 이라고 알려진 디펩티딜 펩티다제 4(dipeptidyl peptidase-4) (DPP4) receptor를 인지하고 binding을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 상기 뉴클레오캡시드 단백질은 외피의 내부에 존재하며, 세포성 면역 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0018] 실제 MERS-CoV 및 본 발명에 따른 유사입자의 구조 비교는 도 1에 나타내었다. 외부에서 제공되는 항원(exogenous antigen)으로서 VLP는 전문적인 항원 제시 세포(Antigen presenting cell)들, 특히 수지상세포(dendritic cell, DC) 등에 의해 효율적으로 세포 내로 들어가게 되고 항원 처리 과정을 거쳐 MHC II형 분자에 의해 제시되고, 공동-자극 분자와 사이토카인 생산의 증가에 의해 DC 활성화, 성숙화, CD4+ 도움 T 세포의 자극에 의해 강력한 체액성과 세포성 면역을 유도하게 된다. 나아가 자연상태의 바이러스와 유사하게, 바이러스 유사 입자는 DC의 세포질 내에서 처리되고, MHC I형 분자에 의해 세포표면에 제시된다. 그리고 교차-제시 메커니즘(cross-presentation mechanism)에 의해 세포살해성 CD8+ T 세포에 제시되어 강력한 세포살해성 면역반응을 유도하게 된다. 본 명세서 상에서 상기 용어는 VLP로 약기할 수 있다. 또한, 슈도-타입 바이러스(pseudotyped virus) 또는 위형 바이러스와 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 슈도-타입 바이러스는 외래의 바이러스 막 단백질(Viral envelope protein)과 바이러스 또는 바이러스 벡터를 조합하여 생산된 바이러스 또는 바이러스 입자를 의미하는 것이다. 상기 외래의 바이러스 막 단백질은 숙주 굴성을 변화시키거나, 바이러스 입자의 안정성을 증가 또는 감소시키는데 이용된다.
- [0019] 상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 엔벨로프, 멤브레인, 및 뉴클레오캡시드 단백질의 야생형 아미노산 서열은 각각 서열번호 1, 서열번호 5, 서열번호 9, 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0020] 상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 엔벨로프, 또는 뉴클레오캡시드 단백질의 아미노산 서열에 돌연변이가 발생하는 경우, 상기 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자의 중동 호흡기 증후군 바이러스 감염증 예방 또는 치료 효과가 증진될 수 있으며, 구체적으로 면역원성이 강화, 또는 방어력이 증가될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0021] 일 구체예에서, 상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크 단백질은 서열번호 1의 야생형 아미노산 서열과 비교하여 L731P G732D, 및 Q733H를 포함할 수 있고, 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0022] 일 구체예에서, 상기 중동 호흡기 증후군 바이러스의 엔벨로프 단백질은 서열번호 5의 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I13Q, 및 C40A를 포함할 수 있고, 구체적으로 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

- [0023] 일 구체예에서, 상기 중등 호흡기 증후군 바이러스의 뉴클레오키프 단백질은 서열번호 10의 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I18M, G222N, 및 P223S를 포함할 수 있고, 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0024] 일 구체예에서, 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 스파이크 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, 중등 호흡기 증후군 바이러스의 엔벨로프 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것이며, 중등 호흡기 증후군 바이러스의 멤브레인 단백질은 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, 중등 호흡기 증후군 바이러스의 뉴클레오키프 단백질은 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0025] 상기 서열번호로 구성된 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 상기 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함한다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0026] 본 발명의 바이러스 유사입자는 천연에서 추출하여 수득하거나 유전자 재조합 기술을 이용하여 수득할 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 다음과 같은 방법에 의해 수득할 수 있다. 중등 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오키프 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환 하여 상기 형질전환체를 배양한 뒤, 형질전환체로부터 바이러스 유사 입자를 획득하는 과정으로 이루어진다.
- [0027] 상기 용어 “벡터”란, 적당한 숙주 세포에 도입되어 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 상기 용어 “작동가능하게 연결된 (operably linked)”이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다.
- [0028] 상기 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 번역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임 (in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있고, 원핵 세포의 경우에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터, 진핵세포의 경우에는 원숭이 바이러스 40 (SV40), 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스 (HIV), 예를 들어 HIV의 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, 모로니 바이러스, 시토크롬알로바이러스 (CMV), 엡스타인 바 바이러스 (EBV), 로우스 사코마 바이러스 (RSV) 프로모터뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터 등이 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 또한, 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 트랜스펙션된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제 (selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 트랜스펙션된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터가 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점 (replication origin)을 포함할 수 있다.
- [0030] 외래 유전자를 삽입하기 위한 재조합 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 제한되지 않지만, 구체적으로 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 이용될 수 있다.
- [0031] 상기 용어 “형질전환”은 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것으로, 즉 생물의 어떤 계통의 세포에서 추출된 핵산의 일종인 DNA를 다른 계통의 살아있는 세포의 주었을 때 DNA가 그 세포에 들어가서 유전형질이 변화하는 현상으로 형질변환, 형전환 또는 형변환 등이라고도 지칭한다.
- [0032] 상기 용어 “형질전환체”는 형질전환으로 인해 생성된 형질전환식물 또는 형질전환동물을 의미하며,

유전자 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자의 변형 또는 변이가 유발되어 생성된 유전자재조합체를 포함한다. 상기 형질전환체는 예를 들어, 재조합 발현 벡터가 도입된 세포일 수 있으며, 상기 세포, 예를 들어, 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 원생동물(protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는, 배양된 세포(인 비트로), 이식된 세포(graft cell) 및 일차 세포 배양(인 비트로 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보(in vivo) 세포, 및 또한 인간을 포함하는 포유동물의 세포(mammalian cell)일 수 있다. 또한, 상기 유기체는 효모, 곰팡이, 원생동물, 식물, 고등 식물 및 곤충, 양서류, 또는 포유 동물일 수 있다. 또한, 상기 세포는 동물 세포 또는 식물세포일 수 있다. 상기 형질전환체는 상기 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 엔벨로프 단백질, 및 뉴클레오텐시드 단백질이 모두 발현되는 세포로서, 상기 세포 내에서 자가 조립되어 중동 호흡기 증후군 바이러스의 구조를 모사한 바이러스 유사 입자를 형성하는 것일 수 있다.

[0033] 일 구체예에서, 상기 재조합 발현 벡터는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 스파이크 단백질, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 엔벨로프 단백질, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 멤브레인 단백질, 및 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 뉴클레오텐시드 단백질을 발현시키기 위한 것일 수 있다. 또한, 상기 형질전환체는 상기 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 및 뉴클레오텐시드 단백질이 모두 발현되는 세포로서, 상기 세포 내에서 자가 조립되어 중동 호흡기 증후군 바이러스의 구조를 모사한 바이러스 유사 입자를 형성하는 것일 수 있다.

[0034] 일 실시예에 따르면, 상기 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프 및 뉴클레오텐시드 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 각각의 벡터를 사용하여, 이들을 숙주 세포에 형질감염시킨 경우, 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오텐시드 단백질을 모두 발현하였으며 구조 단백질을 모두 포함한 바이러스 유사입자를 확인하여 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오텐시드 단백질은 감염세포 내에서 자가 조립되어 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 생성한다는 것을 확인하였다. 또한, 일 실시예에 따르면 바이러스 유사입자를 쥐에 접종 후 높은 수준의 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 면역원성 및 방어력이 관찰됨에 따라 높은 수준의 중동 호흡기 증후군 바이러스 감염증 예방 또는 치료 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다.

[0035] 다른 양상은 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 유효성분으로 포함하는 중동 호흡기 증후군 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0036] 상기 중동 호흡기 증후군 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.

[0037] 상기 용어 “백신”은 동물에서 면역학적 반응을 유도하는 적어도 하나의 면역학적으로 활성인 성분을 함유하는 약학적 조성물을 의미한다. 백신의 면역학적으로 활성인 성분은 살아있는 바이러스 또는 죽은 바이러스의 적절한 요소를 함유할 수 있고(서브유닛 백신), 이에 의해 이들 요소는 전체 바이러스 또는 이의 성장 배양물을 파괴하고, 이어서 원하는 구조물(들)을 수득하는 정제 단계에 의해, 또는 제한되는 것은 아니지만 박테리아, 곤충, 포유동물 또는 다른 종과 같은 적절한 시스템의 적절한 조작에 의해 유도된 합성과정 및 이어서 단리 및 정제과정에 의해, 또는 적절한 약학적 조성물을 사용하여 유전자 물질의 직접적인 혼입에 의한 백신을 필요로 하는 동물에서 상기 합성 과정의 유도에 의해 (폴리뉴클레오타이드 백신화)제조된다. 백신은 상기 기술된 요소의 하나 또는 동시에 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0038] 상기 용어 “예방”은 중동 호흡기 증후군 백신 조성물의 투여로 인해 중동 호흡기 증후군 바이러스의 감염에 의한 질환 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0039] 상기 용어 “치료”는 중동 호흡기 증후군 백신 조성물의 투여로 인해 중동 호흡기 바이러스의 감염에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0040] 상기 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자는 백신으로 투여되어 중동 호흡기 증후군 바이러스의 감염에 의한 질환에 대한 면역성을 유도할 수 있는데, 상기 바이러스 유사입자는 약학적으로 허용되는 담체, 보조제(adjuvant), 면역 자극제(immune stimulator) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0041] 이에 적합한 담체는 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 설탕 등을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올

리에이트를 들 수 있다. 수용액 담체는 식염수 및 완충배지를 포함하는, 물, 알코올/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 예컨대 링거 텍스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제 예컨대 예를 들면 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것이 추가로 존재할 수 있다. 바람직한 방부제는 포르말린, 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함한다.

[0042] 또한, 상기 백신 조성물은 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용 가능한 보조제는 프로인트 완전아주번트, 프로인트 불완전아주번트, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레스틴, 플루론 폴리올, 다가음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키텔렛 해모시아닌, 디니트로페놀, 등을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 백신 조성물은 상기 바이러스 유사입자를 약 0.000001 내지 100000, 0.00001 내지 10000, 0.0001 내지 1000, 0.001 내지 100, 또는 0.01 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 백신 조성물에 포함된 상기 바이러스 유사입자의 함량이 상기 범위를 벗어나는 경우, 상기 백신 조성물의 MERS-CoV에 대한 백신 효과가 감소되거나 충분히 발휘되지 않을 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 용어, "유효성분으로 포함"은 상기 단백질 구조체의 MERS-CoV에 대한 백신 효과가 나타날 수 있는 정도의 유효량으로 상기 바이러스 유사입자가 포함되는 것을 의미하고, 약물전달 및 안정화 등을 위하여 다양한 성분을 부성분으로 첨가하여 다양한 형태로 제형화 (formulation)될 수 있음을 포함하는 의미이다.

[0045] 상기 백신 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태의 주사제의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다. 상기 백신 조성물을 제제화할 경우, 일반적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 추가하여 조제될 수 있다.

[0046] 상기 백신 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 들 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화될 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화될 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 기제로는 위텟솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌 글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등이 사용될 수 있다.

[0047] 상기 백신 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 조성물은 근육, 피하, 복강, 정맥, 경구, 진피, 안구 및 뇌 내로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 투여경로를 통해 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 또 다른 양상은, (a) 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 스파이크 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 엔벨로프 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 맴브레인 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터 및 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 뉴클레오캡시드 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터를 제작하는 단계;

[0049] (b) 상기 (a)단계의 각각의 재조합 벡터를 숙주세포에 형질감염시키는 단계;

[0050] (c) 상기 감염된 숙주세포를 배양하고, 그 배양물을 수득하는 단계; 및

[0051] (d) 상기 배양물로부터 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 수득하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자 제조방법을 제공한다.

[0052] 상기 바이러스 유사 입자 제조방법에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은

상술한 바와 같다.

- [0053] 상기 용어 “형질감염”은 벡터를 숙주 세포 내로 혼입시킬 수 있는 모든 기전을 지칭한다. 성공적인 형질감염으로 인해, 숙주 세포가 해당 벡터에 의해 수반된 모든 작동성 유전자를 발현시킬 수 있는 능력이 생긴다. 형질감염은 안정적이거나 일시적일 수 있다. 일시적 형질감염의 한 가지 예는 벡터가 숙주 세포 계층 내에 통합되지 않는, 특정 세포 내에서의 벡터 발현을 포함한다. 또 다른 한편, 안정적 형질감염은 벡터가 숙주 세포 계층 내에 통합되는, 특정 세포 내에서의 벡터 발현을 포함한다.
- [0054] 일 구체예에서, 상기 단계 (a)에서, 상기 단백질을 코딩하는 염기서열을 pcDNA3.1 벡터에 삽입하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0055] 일 구체예에서, 상기 단계 (b)에서, 중동 호흡기 증후군 바이러스의 구조 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현벡터(pcDNA3.1-S, pcDNA3.1-M, pcDNA3.1-E, pcDNA3.1-N) 클론을 숙주 세포에 형질감염시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0056] 일 구체예에서, 상기 단계 (b)에서, 재조합 발현벡터 pcDNA3.1-S 클론, pcDNA3.1-M 클론, pcDNA3.1-E 클론, 및 pcDNA3.1-N 클론의 중량비는 1 : 1 내지 5 : 1 내지 5 : 1, 예를 들어 1 : 1 내지 3 : 1 내지 3 : 1, 1 : 3 : 3 : 1, 또는 1:1:1:1 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 일 구체예에서, 상기 단계 (b)의 형질감염된 숙주 세포를 48 내지 120 시간, 예를 들어, 상기 형질감염된 숙주 세포를 48 내지 96 시간, 48 내지 72 시간, 72 내지 120 시간, 또는 72 내지 96 시간동안 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 일 구체예에서, 상기 단계 (c)의 바이러스 유사 입자를 수득하는 단계는 상기 배양물의 원심분리하여 수득된 상층액으로부터 바이러스 유사 입자를 분리하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 단계는 500 내지 1,500 xg 조건에서 5 내지 15분 동안 1차 원심분리를 수행하는 단계; 및 10,000 내지 150,000 xg 조건에서 30분 내지 20시간 동안 수크로오스 쿠션을 사용하여 2차 원심분리를 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 온도 조건은 2 내지 15 °C일 수 있으며, 이는 필요에 따라 적의 변경될 수 있다.
- [0059] 본 출원에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 출원의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 통합된다.

발명의 효과

- [0061] 일 양상에 따른 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자는 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스에 대해 면역원성 및 방어력이 현저히 우수하다. 따라서 일 양상에 따른 바이러스 유사입자를 이용하여 백신을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1은 실제 중동 호흡기 증후군 바이러스와 그의 유사입자(MERS VLP)를 비교한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 중동 호흡기 증후군 바이러스(MERS-CoV)의 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오캡시드 단백질 발현 유전자를 삽입한 발현 벡터를 나타낸 도이다.
- 도 3은 일 실시예에 따라 제조된 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자(VLP)의 형성을 전자현미경으로 확인한 결과이다.
- 도 4는 일 실시예에 따라 제조된 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자(VLP) 및 구조 단백질 생성을 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인한 결과이다.
- 도 5는 일 실시예에 따른 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 접종에 의한 실험동물의 항체가 수준을 확인한 결과이다. 도 5의 a는 IgG, 도 5의 b는 IgG1 및 IgG2a의 항체가 수준을 확인한 결과이다.
- 도 6은 일 실시예에 따른 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자의 접종에 의한 실험동물의 중화능을 확인한

결과이다.

도 7은 일 실시예에 따른 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 접종한 실험동물의 바이러스 감염 후의 생존력을 확인한 결과이다.

도 8은 일 실시예에 따른 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 접종한 실험동물의 바이러스 감염 후의 체중변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 일 실시예에 따른 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 접종한 실험동물의 폐세포를 조직병리학적으로 분석한 결과이다.

도 10은 일 실시예에 따른 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 접종한 실험동물의 폐세포의 염증 지표를 비교 평가한 결과이다.

도 11은 일 실시예에 따른 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 실험동물의 폐세포에 접종 후, 바이러스 감염시 나타낸 폐조직 내 잔여 바이러스량을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 실시예 1. 중등 호흡기 증후군 바이러스의 구조 단백질 유전자가 삽입된 재조합 발현벡터 제작 및 확인

[0067] 실시예 1.1 중등 호흡기 증후군 바이러스의 구조 단백질 유전자의 제작

[0068] 본 실시예에서는 중등 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 제작을 위해 구조 단백질 유전자가 삽입된 재조합 발현벡터를 제작하였다.

[0069] 구체적으로, 중등 호흡기 증후군 바이러스의 구조단백질인 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오캡시드 단백질 유전자를 GenScript에서 합성하였다. 합성에 사용한 유전정보는 MERS-CoV EMC/2012 (GenBank: JX869059)를 기본 바탕으로 아미노산의 변경을 피하였다.

[0070] MERS 단백질의 가장 중요한 면역 항원 단백질인 스파이크 단백질의 다양한 스파이크 단백질의 mutant들을 제작하여 발현해 본 결과, 야생형 아미노산 서열과 비교하여 L731P G732D, 및 Q733H의 세 부위의 연속 mutation을 실시하면 스파이크 단백질의 발현양이 매우 높아짐을 알게되었다. 스파이크 단백질의 야생형 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재하였으며, 야생형 아미노산 서열과 비교하여 L731P G732D, 및 Q733H의 변이체를 포함하는 아미노산 서열은 서열번호 2로 기재하였다. 또한 다른 구조 단백질 중 하나인 엔벨로프 단백질도 코로나바이러스의 증식에 매우 중요한 역할을 한다는 결과를 얻게 되었으며, 본 발명자들의 연구 결과 아미노산 변이를 유발하였을 때, 이 단백질의 발현양이 매우 높아진다는 결과를 알게되었고, 엔벨로프 단백질의 발현양이 많아질수록 코로나바이러스의 증폭 또한 매우 높아짐을 알게되었다. 이러한 결과를 바탕으로 엔벨로프 단백질의 특정 부위 mutation이 코로나바이러스의 생산력을 증가시킴을 알게되었다. 이에, 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I13Q, 및 C40A의 변이체를 포함하도록 제작하였다. 엔벨로프 단백질의 야생형 아미노산 서열은 서열번호 5로 기재하였으며, 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I13Q, 및 C40A의 변이체를 포함하는 아미노산 서열은 서열번호 6으로 기재하였다.

[0071] 뿐만 아니라, 본 발명자들은 뉴클레오캡시드 단백질도 아미노산의 변형을 일으켰다. 구체적으로, 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I18M, G222N, 및 P223S의 변이체를 포함하도록 제작하였다. 변경된 단백질을 접종한 결과 해당 단백질의 발현양이 높아짐을 알게되었다. 뉴클레오캡시드 단백질의 야생형 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재하였으며, 야생형 아미노산 서열과 비교하여 I18M, G222N, 및 P223S의 변이체를 포함하는 아미노산 서열은 서열번호 11로 기재하였다. 엔벨로프 단백질의 야생형 아미노산 서열은 서열번호 9로 기재하였다.

[0072] 이를 기초로 다른 아미노산도 변경하여 추가 돌연변이 형태도 수득하였다. 추가 돌연변이 형태는 스파이크 아미노산의 경우 서열번호 3 및 서열번호 4, 엔벨로프 아미노산의 경우 서열번호 7 및 서열번호 8, 뉴클레오캡시드 아미노산의 경우 서열번호 12 및 서열번호 13으로 기재하였다.

[0073] 또한, 진핵세포 내에서의 발현율을 높이기 위해 Kozak sequence를 추가하고 codon-optimization을 수행하였다. 예컨대, 서열번호 2 아미노산, 서열번호 6 아미노산 및 서열번호 10 아미노산을 코딩하는 DNA 서열을 각각 서열

번호 14 내지 16으로 기재하였다. 자세한 서열의 정보는 표 1에 기재하였다.

[표 1]

명명	서열 정보	서열 번호
MERS-CoV Spike	MIHSVFLMFLLTPTESYVDVGPDVSKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPI DWSKADGI IYPOGRITY SMITITYQGLFPYQGIHGMIVVYSA GHATGTTPOKLFVANYSDVQKQFANGFVVRIGAAANSTG TVIISFSTSATIRKIYPAFMLGSSVGNFSDGMRGRFFNHTLVLLPDGCGTL LRAFYCI LEPRSG NHCPAGNSYTSFATYHTPATDCSDGMYNRMASLNS FKEYFNLRNCTFMYTYMI TEDEI LEWFGI TQTAQGVHLFSSRYVDLYGGMFQFATLPVYDITIKYYSIIHHSIRSIQSDRKAAAFYVYKLQP LTLFLDFSVDGYIRRAIDOGFNILS QLHCYESFUVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECD FSPLLSGTTPQWYNFKRLVFTNOMYNLTKL LSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILIDYFSY PLSMKEDLSVSSAGPISQFNKQSFNPTCLILATVHMLTTITKPLKYSYINRCSRLSDORT EVPQLVNAVQNSPCVSI VPSYVWEDGDYRKQLSPLEGGWLVASGSTVAMTEQLOMGFGITVQ YGTDTNSVC PKLEFANDTKIASQLGNCVEYSLYGVSGRGVQNCCTAVGVROQRFVYDAYQNLVG YYSDDGNYVCLACVSVPSVIVDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSTQYSRSTBSMLKRRDSTY GPLQTPYGVCLGVNSSLFVEDCKLPLGGLCALPDTPSTLTSPRSVSVPGEMRLASIAFNHPI QWDQNGSSYFKLSIPTNFSFGVTQEIYQTTIQKVTVDCKQVVCNGFQKCEQLLREYGOFCSKI N QALHGANLRQDDSVRLFASVKSQSSPIIPGFGGDFNLT LLEPVYSISTGSBSARSAIEDLLFD KVTIADPGYMGQYDDCQGPASARLICAGVAGYXVLPPLMIDVMEAAYS SLLGS IAGVGV TAGLSSFAAIPFAGSIFYRLNGVGI TQGLSENQKLIANKFNQALGAMQGTFTTNEAFQKVQD AVNNNAQALSKASELSNTPGASISAGDI IORLDVLEQDAQIDRLINGRLTTINAFVAAQLVR SESAAISAQ LAKDKVNECVKAQSKRSGFGQGTTHI VSFVYNAPNGLYFMHVGYPSNHI EVVSA YGLCDAAANPTNCIAPVNGYFIKTNNTRI VDEWSYTGSSFYAPEPI TSLMTKYVAPQVTYQNI ST NLPPPLLGNSTGIDFQDELDEFKRVSTSI PNFGLTQINTTLDLITYEMLSLQGVVKALNESY IDLKELGNYTYNKPWYIWLGFIA GLVALALCVFPILOCTGCGTNMGKLCNRCDDRYEYD LEPHKVVHH	1
Spike 1	MIHSVFLMFLLTPTESYVDVGPDVSKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPI DWSKADGI IYPOGRITY SMITITYQGLFPYQGIHGMIVVYSA GHATGTTPOKLFVANYSDVQKQFANGFVVRIGAAANSTG TVIISFSTSATIRKIYPAFMLGSSVGNFSDGMRGRFFNHTLVLLPDGCGTL LRAFYCI LEPRSG NHCPAGNSYTSFATYHTPATDCSDGMYNRMASLNS FKEYFNLRNCTFMYTYMI TEDEI LEWFGI TQTAQGVHLFSSRYVDLYGGMFQFATLPVYDITIKYYSIIHHSIRSIQSDRKAAAFYVYKLQP LTLFLDFSVDGYIRRAIDOGFNILS QLHCYESFUVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECD FSPLLSGTTPQWYNFKRLVFTNOMYNLTKL LSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILIDYFSY PLSMKEDLSVSSAGPISQFNKQSFNPTCLILATVHMLTTITKPLKYSYINRCSRLSDORT EVPQLVNAVQNSPCVSI VPSYVWEDGDYRKQLSPLEGGWLVASGSTVAMTEQLOMGFGITVQ YGTDTNSVC PKLEFANDTKIASQLGNCVEYSLYGVSGRGVQNCCTAVGVROQRFVYDAYQNLVG	2

	YYSDDQNYCYCLRACYSVPSVVIYDKETKTHATLPGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRRDSTY GPLQTPVQVYGLVNSSLFVEDCKLPPHSLCALPDTPTSTLTPRSVSVPGEMRLASIAFNHP QWDQINSYFKLSIPTNPSFGVTQGEYIGTTIQKVTVDCKQYVCNGFGKCEQLLREYGGPCS KINQALHGANLRQDDSVRMLFASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARS AIEDLLFDKVTIADPGYMOGYDDCMQGPASARDLICAGVAGYKVLPLMDVNMEEAAYTS SLLGS IAGVGVW TAGLSSFAAI PFAQSIFYRLNGVGI TQOVLSENOKLIANKFNQALGAMGTGFTT TNEAFQKVQD AVNNQAQALS KLASLSNTFGAISASIGDI IORLDVLEQDAQI DRLIN GRLLTTINAFVACQLVR SESAAASAQAKDKVNECVKAQSKRSGFCGGGTHI VSFV VNAPNGLYFMHVGYPSNHI EVVSA YGLCDAANPTNCIAPWNGYFIKTNMTRI VDEWSYTGSSFYAPEPITSLNTKYVAPQVTYQNI STNLPPLLQNSTGIDFQDE LDEFKVNSTSI PNFGSLTQINTTLLILTYBMLSLQGVKALNESYIDLKELGNTY TYNKWPYIWLGFIALGLVALALCVFFILCCTGCGTNMGELKCNBCCDRYEYD LEHKKVHVH	
Splice 2	MIHSVFLMFLTLPTESYVVGPSVKSACIEVDIQOTFFDKTWPRPI DWSKADGI IYPOGRTY SNITITYQGLFPYQGHGHVYVYSA GHATGTTPOKLFVANYSDWKQFANG FVVRI GAAANSTGTVIISPTSATIRKIYPAPMLGSSVGNFSDGMRGRFNRHTLVLL PDGCGTLRLAPYCI LEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATIDCSGNNVNRASLMS FKEYFMLANCTRMITYNITEDEILEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGMFQFATL PYYDTIKYYSIIHHSIRSIQSDRKAWAAPPVYKLOPLTFLDPSVDGYIRRAIDG FNDLSQLHCSYESFDVESGYVSYSFPAKPSGSVVEQAAGVECDPSPLSGTTPQ VYMFKRLVFTNQMMLTKLLSLFSVMDFTCSQISPAAIASNCYSSLI LDYFSY PLSMKSDLSVSSAGPISQFNKQGSFNPTCLILATVHMLTTITKPLKYSYINRCS RLSSDRT EVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWEDGNYRKQLSPLEGGWLVASGSTV AMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQLGMCVEYSLYGVSGRGV PQNCTAVGVROQRFVYDAYQNLVGYYSDDQNYCYCLRACYSVPSVVIYDKETKTHATL PGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRRDSTY GPLQTPVQVYGLVNSSLFVEDCKL PPHSLCALPDTPTSTLTPRSVSVPGEMRLASIAFNHP IQWDQINSYFKLSIPTNPS FGVTOGEYIGTTIQKVTVDCKQYVCNGFGYSDQLLREYGGPCS KINQALHGANLR QDDSVRMLFASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARS AIEDLLFDK VTIADPGYMOGYDDCMQGPASARDLICAGVAGYKVLPLMDVNMEEAAYTS SLLGS IAGVGVW TAGLSSFAAI PFAQSIFYRLNGVGI TQOVLSENOKLIANKFNQALGAMGTGFTT TNEAFQKVQD AVNNQAQALS KLASLSNTFGAISASIGDI IORLDVLEQDAQI DRLIN GRLLTTINAFVACQLVR SESAAASAQAKDKVNECVKAQSKRSGFCGGGTHI VSFV VNAPNGLYFMHVGYPSNHI EVVSA YGLCDAANPTNCIAPWNGYFIKTNMTRI VDEWSYTGSSFYAPEPITSLNTKYVAPQVTYQNI STNLPPLLQNSTGIDFQDE LDEFKVNSTSI PNFGSLTQINTTLLILTYBMLSLQGVKALNESYIDLKELGNTY TYNKWPYIWLGFIALGLVALALCVFFILCCTGCGTNMGELKCNBCCDRYEYD LEHKKVHVH	3

[0076]

Spike 3	MIHSVFLIMFLLTPTESVVDWGPDSVESACIEVDIQQTFDRTWPRPIVSKADGIYYPQGRITY SNITITYQGLFPYGGIHGDMYVYSAGHATGTTPOKLPVANYSQDNKQFANGFVVRIGAAANSTG TVIPTCSTSATIRKIYPAPMLGSSVGNFSDGEMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLEAFYCILEPRSG NHCPAGNSYTSFATYHTPATICSDBGVNNENASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNI TEDEILEWFGI TQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFOFATLPVYDTIKYYSII PHSIRSIGSDRKAWAAFYVYKLOP LTFLLDPSVDGYIRRAIDCGFNILSOLHCSYESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEWVED PSPLLSGTTPPGVYMFKRLVFTNCVNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAALASNCYSSLILIVFSY PLSMKSDLSVSSAGPISQPNYKQSFNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYINICSRLSDDRT EVPOLVNANQYSPCVSIVPSVWEDGNYRKQLSPBGGGWLVASGSTVAMTEQLQMGFGITVQ YGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQLGNCVEYSLYGVSGRGVFNCTAVGVROGRFVYDAYQNLVG YYSDGNVYCLAACVSVPSVVIYDKETKTHATLPGSVACEHISSTMSOYSRSTRMLKRRDSTY GPLEQTFVGCYLGVLNSSLFVEDCKLPPHSLCALPTPSTLTTPSRVSVPGEMRLASIAFNHP QVDOLNSSYFKLSIPTNPSFGVTQEIQTITQKVTDCQOYVCMGFQYSQDLLREYQPCSKIN QALHGANLRQDSDVRMLFASVKSSQSSPIIPGFQGDHNLTLLEPVSISTGSRASAI EDLLFD KYTIADPGYMGYDDCMQGPASARDLICAGVAGYKVLPLMDNMMEAAYSLLGS IAGVGW TAGLSSFAAIPRAGSIFRYLNGVGI TQVLSVQKLIANKFMOALGAMGTGPTTINEAFQKVQD AVNNNAQALS KLASLSMTFGAISAIGDI IQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTTINAFAQQLVR SESAAALSAQLAKDKVNECVKAQSKRSGFCGQTHIVSFVVMAPNGLYFMHVGYPSNHI EVVSA YGLCDAAPTNCIAPVNGYFIKTNNTRI VDEWSYTGSSFYAPEPITSLNTKYVAPQVTYQMIST NLPPLLGNSGTIDFQDELDEFKRVSTSI PNFGLTQINTLLDLTYEMLSLQGVKALNESY IDLKELGMYTYYNKWPWYIWLGFIALGLVALALCVFFILOCTGCGTNOMGKLCNRCDDRYEYD LEPHKVVH	4
MERS-CoV Envelope	MLPFVQERIGLFIVNFFIFTVVCAITLLVCMAPLTATRLCVCMTGFNTLLVQPALYLYNTGRS VYVKFQDSKPPLPPDEWV	5
Envelope 1	MLPFVQERIGLFQNFFIFTVVCAITLLVCMAPLTATRLAVOCMTGFNTLLVQPALYLYNTGRS VYVKFQDSKPPLPPDEWV	6
Envelope 2	MLPFVQERIGLFQNFFIFTVVCAITLMVCMAPLTATRLAVOCMTGFNTLLVQPALYLYNTGRS VYVKFQDSKPPLPPDEWV	7
Envelope 3	MLPFVQERIGLFQNFFIFTVVCAITLMVCMAPLTATRLAVOCMTGFNTLLVQPLYLYNTGRS VYVKFQDSKPPLPPDEWV	8
MERS-CoV Membrane	MSNMTQLTEAQIIAIIKDNFAWSLIFLLITIVLQYGYPSRSMTVYVFIMFVLWLLWPSSMAL IFSAYVPIDLASQIISGIVAASAMMWISYFVQSI RLFMRGTGSWWSPNPETNCLLNVPFGGTTV VRPLVEDSTSVTAVVINGHLMAGMHFGACINDRLPNEVTVAKPNVLI ALKMWKQSYGINSGV AIYHRYKAGNYRSPPI TADI ELALLRA	9

[0077]

MERS-CoV Nucleocapsid	MASPAAPRAVSFAIDNNNDITNTNLSRGRGNPKPRAAPNNTVSWYTGLTGHGKVPLTFPPGQGVPLNANSTPAQAGYWRRODRKINTNGIKQLAPRWYFYYTGTGPEAALPFRAVKDGI VVHEDGATDAPSTPGTRNPNMDSAIVTQFAPGTLKPKNFHIEGTGQNSQSSRASLSHNSRSSSQGSRSQNSTRGTSPPSSGIGAVGGDLLYDLLNRLQALSGKVKQSOPKVITKKDAAAARNKMRHKRTSTKSPNMVQAFGLRGPGLQGNFGDLQLNKLGTEDPRWPOIAELAPTASAFMGMSQFKLTHQNNDIHGNPVYFLRYS GAI KLDPKNPNYNKWLLELBQNI DAYKT FPKKEKKOKAPKEESTDOMSEPPKBQHVQGSITQRT RTRPSVQPGPMIDVNTD	10
Nucleocapsid 1	MASPAAPRAVSFAIDNNNDITNTNLSRGRGNPKPRAAPNNTVSWYTGLTGHGKVPLTFPPGQGVPLNANSTPAQAGYWRRODRKINTNGIKQLAPRWYFYYTGTGPEAALPFRAVKDGI VVHEDGATDAPSTPGTRNPNMDSAIVTQFAPGTLKPKNFHIEGTGQNSQSSRASLSHNSRSSSQGSRSQNSTRGTSPPSSGIGAVGGDLLYDLLNRLQALSGKVKQSOPKVITKKDAAAARNKMRHKRTSTKSPNMVQAFGLRGPGLQGNFGDLQLNKLGTEDPRWPOIAELAPTASAFMGMSQFKLTHQNNDIHGNPVYFLRYS GAI KLDPKNPNYNKWLLELBQNI DAYKT FPKKEKKOKAPKEESTDOMSEPPKBQHVQGSITQRT RTRPSVQPGPMIDVNTD	11
Nucleocapsid 2	MASPAAPRAVSFAIDNNNDITNTNLSRGRGNPKPRAAPNNTVSWYTGLTGHGKVPLTFPPGQGVPLNANSTPAQAGYWRRODRKINTNGIKQLAPRWYFYYTGTGPEAALPFRAVKDGI VVHEDGATDAPSTPGTRNPNMDSAIVTQFAPGTLKPKNFHIEGTGQNSQSSRASLSHNSRSSSQGSRSQNSTRGTSPPSSGIGAVGGDLLYDLLNRLQALSGKVKQSOPKVITKKDAAAARNKMRHKRTSTKSPNMVQAFGLRGPGLQGNFGDLQLNKLGTEDPRWPOIAELAPTASAFMGMSQFKLTHQNNDIHGNPVYFLRYS GAI KLDPKNPNYNKWLLELBQNI DAYKT FPKKEKKOKAPKEESTDOMSEPPKBQHVQGSITQRT RTRPSVQPGPMIDVNTD	12
Nucleocapsid 3	MASPAAPRAVSFAIDNNNDITNTNLSRGRGNPKPRAAPNNTVSWYTGLTGHGKVPLTFPPGQGVPLNANSTPAQAGYWRRODRKINTNGIKQLAPRWYFYYTGTGPEAALPFRAVKDGI VVHEDGATDAPSTPGTRNPNMDSAIVTQFAPGTLKPKNFHIEGTGQNSQSSRASLSHNSRSSSQGSRSQNSTRGTSPPSSGIGAVGGDLLYDLLNRLQALSGKVKQSOPKVITKKDAAAARNKMRHKRTSTKSPNMVQAFGLRGPGLQGNFGDLQLNKLGTEDPRWPOIAELAPTASAFMGMSQFKLTHQNNDIHGNPVYFLRYS GAI KLDPKNPNYNKWLLELBQNI DAYKT FPKKEKKOKAPKEESTDOMSEPPKBQHVQGSITQRT RTRPSVQPGPMIDVNTD	13
Spike 1 의 DNA	ATGATACACTCA GTGTTTCTACTGATGTTCTTGTTAACACCTACAGAAAGTTAOGTTGATGTAGGGCCAGATTCTGTTAAGTCTGCTTGATTGAGGTTGATATACAACA GACTTCTTTGATAAAAC TTGGCTAGGCCAATTGATGTTTCTAAGGCTGACGGTATTATATACCTCAAGGCTGACATAT TCTAACATAACTATCACTTATCAAGGCTCTTTTCCCTATCAGGAGACCATGGTGATATGTATG TTTACTCTGCAGGACATGCTACAGGCACAACTCCA AAAAGTTGTTGTAGCTAACTATTCTCA GGACGTCAACAAGTTGCTAATGGGTTTGCTGCTGATAGGAGCA GCTGCCAATTCCACTGGC	14

[0078]

ACTGTTATTATTAGCCATCTACGAGGCTACTATAGAAAAATTTACCTGCTTTTATGCTGG GTCTTTCAGTTGGTAATTTCCTCAGATGGTAAAAATGGGCGCTTCTTCAATCATCTCTAGTTCT TTGGCCGATGGATGTGGCACTTTACTTAGAGCTTTTATGTATTCTAGAGCTGCTGCTGGA AATCAATTGTCTGCTGGCAATTCTATACCTTCTTTTGCACCTTATCACACTCTGCAACAGATT GTCTGATGGCAATTACAATCGTAATGCCAGTCTGAACCTTTTAAAGAGTATTTTAATTTACG TAACTGCACCTTTATGTACACTTATAACATTACCGAAGATGAGATTTTAGAGTGTTTGGCATT ACACAAACTGCTCAAGGTGTTCACTCTTCTCATCTCGTATGTTGATTTGTACGCGGCAATA TGTTCGAATTGGCACTTGGCTGTTATGATACTATTAAATATTATTCTATCAATCTCAAG TATTCTTCTATCCAAAATGATAGAAAACTTGGGCTGCTTCTACGTATATAAACTTCAACCG TTAACCTTCTGTTGATTTTCTGTTGATGTTATATACGCAAGCTATAAGCTGTGTTTA ATGATTTGCACAACTCCAGTCTCATATGAATCTTCGATGTGAATCTGAGATTATTCAGT TTCTGCTTTCGAAGCAAACTCTCTGCTCAGTTGTGGAAAGGCTGAAGTGTGAATGTGAT TTTTCACCTCTTCTGCTGGCAACCTCTCTCAGTTTATAAATTCAAGCGTTTGTTTTATCCA ATTGCAATTATAATCTTACCAAAATGCTTTCACTTTTCTGTTGAATGATTTACTGTAGTCA AAATCTCTCCAGCAAAATGTCTAGCAACTGTTATTCTTCAGTATTTGATTAATTTCTATC CCAGTTAGTATGAAATCCGATCTCAAGTTAGTTCTGCTGGTCCAAATCCCAAGTTAATTATA AACAGTCTTTCTAATCCACATGTTTGAATTTAGGACTGTCTCATAACCTTACTACTAT TACTAAGCTCTTAAAGTACAGCTATATTAAAGTCTCTCTCTTCTTCTGATGATGCTACT GAAGTACCTCAGTTAGTGAAGCTAATCAATCACTCACTCTGTTATCCATTGTCCATCCACTG TGTGGGAAGAGCGTGAATTATTATAGGAAACAACTATCTCCACTGAAGGTGGTGGCTGGCTGT TGCTAGTGGCTCAACTGTTGCCATGACTGAGCAATTACAGATGGCTTTGGTATTACAGTTCAA TATGGTACAGACACCAATAGTGTGTTGCCCAAGCTGAATTTGCTAATGACACAAAAATGGCT CTCAATTAGGCAATTGGGTGAATAATCCCTCTATGTTGTTTCCGGCGGTGGTGTTCAGAA TTGCACAGCTGTAGGTGTTCCAGCAGAGCGCTTTGTTTATGATGGTAACAGAAATTAAGTTGGC TATTATTCTGATGATGGCACTACTACTGTTGGGTGCTTGTGTTAGTGTCTGTTTCTGTTCA TCTATGATAAAGAACTAAAAACCAAGCTACTCTATTTGGTAGTGTGCATGTGAACACATTTCT TTCTACCATGTTCTCAATCTCCCGTTCTACGGATCAATGCTTAAAGGGGAGATTCTACATAT GGCCCGCTTCAGACACCTGTGGTTGTGTCCTAGGACTGTAAATCTCTTTGTTCTGAGAGG ACTGCAAGTTGCTCTCTGCTCTCTCTGTCTCTCTGACACACCTAGTACTCTCACACC TCGCAGTGTGGCTCTGTTCCAGGTGAAATGGCTTGGCATCCATTGCTTTAATCATCTATT CAGGTTGATCAACTTAATAGTAGTTATTTAAATTAAGTATACCACTAATTTTCTTTGGTG TGACTCAGAGTACATTGAGACAACCATTCAGAAAGTTACTGTGAATGTAAACAGTAAGTTTG CAATGTTTCCAGAAAGTGTGAGCAATTACTGGCGAGTATGGCCAGTTTGTTCAAAATAAAC CAGGCTCTCATGTTGCCAATTACGCCAGGATGATTCGTACGTAATTTGTTTGGAGGCTGA	
--	--

[0079]

	AAAGCTCTCAATCATCTCTATCATACCAGGTTTTGAGGTGACTTTAATTTGACACTTCTAGA ACCTGTTTCTATATCTACTGGCAGTGTAGTGCAGTAGTGTCTATTGAGGATTTGCTATTTGAC AAAGTCACTATAGCTGATCTGGTTATATGCAAGTTAOGATGATTGCATGCAACAAGTCCAG CATCAGCTGTGTATCTTATTGTGCTCAATATGTGGCTGTTACAAAGTATTACCTCTCTAT GGATGTTAATATGGAAGGCGGTATCTTCATCTTTGCTTGGCAGCATAGCAGGTGTTGGCTGG ACTGCTGGCTTATCTCTCTTGTCTGCTATTCCATTTGCACAGGATCTTTTATAGGTTAAACG GTGTGGCATTACTCAACAGGTCTTTTCAGAGAACCAAAAGCTTATTGCAATAGTTTAACTCA GGCTCTGGGAGCTATGCAAAACAGCTTCACTACAACTAATGAACTTTTCAAGAGTTCAAGAT GCTGTGAACAACAATGCACAGCTCTATCCAAATTAGCTAGGAGCTATCTAATCTTTTGGTG CTATTTCCGCTCTATTGGAAGCATCATACAACGTCTTGATGTTCTGAAACAGGACGCCAAAT AGACAGACTTATTAAATGCGGTTTGACAACACTAAATGCTTTTGTGCACAGCTTGTCTGT TCCGAATCAGCTGCTCTTTCCGCTCAATGCTAAAGATAAAGTCAATGAGTGTGTCAAGGCAC AATCCAGCGGTTCTGAGTTTGGGTCAAGGCAACATATAGTGTCTTTGTTTAAATGCCGC TAATGCCCTTTACTTCAATGCTGTTGGTTATTAACCTAGCAACACATTTGAGGTTGTTCTGCT TATGGTCTTTTGGATGCAGCTAACCTACTAATTTGTATAGCCCTGTTAATGGCTACTTTATTA AACTAATAACACTAGGATTGTGTAGTGGTGTCTATAGTGGCTGCTCTCTATGCACCTGA GCCATTACCTCTCTTAATACTAAGTATGTGACACAGGTGACATACCAAAACATTTCTACT AACTCTCTCTCTCTCTCTCTGCAATTCCACGGGATTTGACTTCCAAAGATGATGTTGGATGAGT TTTTCAAAAATGTTAGAACAGTATACCTAATTTTGGTTCCTAACACAGTTAATACATCAT ACTCGATCTTACCTAGAGATGTTGCTCTTCAACAAGTTGTTAAAGCCCTTAATGAGTCTTAC ATAGACCTTAAAGAGCTTGGCAATTATCTTATTACAAACAATGGCGTGTGATCATTTGCTTG GTTTCATGCTGGGCTTTGTTGCCCTTAGCTCTATGCTCTTTCTCATCTGTGCTGCACTGTTG TGGCACAACCTGTATGGGAAAACCTTAAGTGTAATCGTTGTGTGATAGATAGGGAATACGAC CTGAGCGGCATAAGGTTCATGTTCACTAATCTAG	
Envelope 1 의 DNA	ATGCTGCGTTCGTGCAAGAACGAAATAGGACTGTTCCAAAGTGAACCTTTTATTTCACGGTGG TTTGTGCGATTACGCTCTGGTCTGCATGGGTTTTCTGACCGCCACGAGCTCGCCGTCCAATG TATGADGGGTTCAACACACTTCTGGTGCACACAGCTTTGTATCTGTATAACACTGGTGTCTCC GTGTADGTTAAATTCAGGACTCCAGGCACTACTCCACCTGATGAGTGGGTGTAATCTAG	15
MERS-CoV Nucleocapsid 의 DNA	ATGGCTCTCTGCAAGCTCTAGGCTGTATCTTTGCGGACAATAATGACATAACAAACACAA ACCTGTCCGAGGACGGGGAGAAAACCCAGCGCGGGCTGCTCCGAATAACAGCTCAGCTG GTACACCGGTCTGACCCAGCATGAAAAAGTCCACTCACTTTCTCTCTGACAGGGGTGCC CTTAATGCAATAGCACACCGCTCAGAAATGCCGCTATTGGAAGAGACAGGATAGGAATAA ACACAGGAAACGGAATAAAGCACTGGCTCCAGATGTGTAATCTCTATACCGGCACGGGCC AGAGGCAGCCCTGCCGTTCAGGGCTGTAAAAGATGGAAATGCTCTGGGTCCATGAAGACGGTCT	16

[0080]

	ACCGAGGCCCATCTACGTTGGAACAAAGAAATCCAAACAAATGATAGTCTATAGTCAACCAAT TCGCACAGGTACAAAACCTTCCAAAAATTTCCACATTGAGGGGACCGGGGAAACTCCCAATC TTCCAGTGGGATCATCATTTGTCGCAACAGTTCTGCTCTCTTCACAAGGTTCCAGAAAT GGAACTCAACGCGGGGACGTCACCTGTTCCAGTGGCATGGGGCGTAAAGGCGGATCTCT TGTAATCTGATTTGCTGAATGACTCCAGGCTTGGAAAGTGAAAAATTAAGCAATCACAACT TAAGGTGATTACTAAAGAAAGAGGCGGCTGCTAAAAATAGATGAGACACAGAGAACTAGT ACTAAAACTTTAACATGTTGCAAGCTTTGGTCTTAGGGGTCCGGGATCTTCAAGGAACT TTGGGACCTTCAAGTGAATAAAGTGGGAACTGAAAGTCCAGGTGGCCCAATAAGTGAATT GGCACTCACTGCTTCCGCTTTATGGAAATGTCCTAATTCAGCTTACTCACTAAAAATTAATGAC GACACAGGCAATCTGTATATTTCTGCGCTACTCAGGTGGATAAAGTTGGATCCAAAAATC CCAACTATAACAAAGTGGTTGGAATCTTGAAACAAATATTGACGCTATATAAACTTTCTTAA GAAAGAGAAAAAGCAAGAGCTCCGAAAGAGAAATCCACGACAGATGAGTGAACCTCCAAAA GACACAGGAGTCCAGGATCAATAACAGAGAACACAGCAACCGGCTCCGCTCCAGCTGGGC CCATGATGACGTTAATACCGATTAGTCTAG	
--	--	--

[0081]

[0082]

[0083]

실시예 1.2 중등 호흡기 증후군 바이러스의 구조 단백질 유전자가 삽입된 재조합 발현벡터 확인

본 발명자들은 상기 실시예 1.1에서 합성된 서열번호 2, 서열번호 6, 서열번호 9 또는 서열번호 11을 코딩하는 유전자를 도 2에 나타난 바와 같이, pcDNA3.1 vector(Invitrogen™)에 EcoRI (GAATTC)와 XbaI (TCTAGA)를 이용하여 각각 클로닝하고 클로닝 유무를 sanger sequencing으로 확인하였다. 상기 방법으로 중등 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크 유전자가 삽입된 pcDNA3.1-S 벡터, MERS CoV의 멤브레인 유전자가 삽입된 pcDNA3.1-M 벡터, MERS CoV의 엔벨로프 유전자가 삽입된 pcDNA3.1-E 벡터, MERS CoV의 뉴클레오캡시드 유전자가 삽입된

pcDNA3.1-N 벡터를 수득하였다.

[0085] 실시예 2. 중동 호흡기 증후군 바이러스의 구조 단백질 유전자를 발현하는 바이러스 유사입자 제작

[0086] 본 실시예에서는 상기 실시예 1.2에서 클로닝이 확인된 클론을 이용하여 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자 합성을 수행하였다.

[0087] 구체적으로, HEK293(5X10E6)세포(ATCC)에 pcDNA3.1-S, pcDNA3.1-M, pcDNA3.1-E, pcDNA3.1-N 클론을 1:3:3:1 (total 10 ug)의 비율로 폴리에틸렌이민(PEI)을 사용하여 DNA:PEI = 1:3의 비율로 transfection하였다. 24시간 후 세포의 배지를 갈아주고 72시간동안 세포를 배양하였다. 72시간 후, 세포로부터 유사 입자를 release하기 위해 세포를 freeze-thawing한 후 상층액을 채취하였다.

[0088] 이후, 세포 및 세포찌꺼기를 제거하기 위해 1000 xg, 4℃, 10 min로 원심분리한 뒤 상층액을 분리해내고, 상층액을 다시 10,000xg, 4℃, 18h 조건으로 원심 분리하여 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자만을 순수 분리하였다. 중동 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 자가조립을 확인하기 위해 전자 현미경 관찰을 수행하였다.

[0089] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 자가조립한 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 존재를 확인하였다.

[0091] 실시예 3. 중동 호흡기 증후군 바이러스의 구조 단백질 유전자 발현의 확인

[0092] 본 실시예에서는 상기 실시예 1.2에서 제작한 재조합 발현벡터가 중동 호흡기 증후군 바이러스의 구조 단백질 유전자를 발현하는지 확인하고자 하였다.

[0093] 구체적으로, 웨스턴 블랏을 수행하기 위해 상기 실시예 2에서 형질전환된 세포를 Triton X-100 용해 완충액(1% Triton X-100, 50mM Tris-Cl [pH 8.0], 150mM NaCl, 1mM EDTA)에서 용해시키고 1,000 xg, 4° C, 10 min 조건으로 원심분리하여 구조 단백질을 수득하였다. 세포의 상층액은 100,000xg, 4℃, 2h 조건으로 원심 분리하여 농축시켜 구조 단백질을 수득하였다. 그 다음, 세포 용해물 또는 농축된 세포 상층액을 SDS 가용화제와 혼합후 95℃에서 10분간 가열한 후 분리하고 웨스턴 블랏을 수행하였다. 상기 웨스턴 블랏은 당업계에서 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0094] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 세포 용해물(왼쪽) 및 농축된 세포 상층액(오른쪽) 모두에서 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오캡시드 유전자의 밴드를 확인하여, 바이러스의 구조 단백질 유전자가 모두 발현됨을 확인하였다. 또한, 뉴클레오캡시드 유전자가 발현되면 엔벨로프 단백질 및 스파이크 단백질의 발현양 또한 증가됨을 확인하였다. 또한, MERS 뉴클레오캡시드의 유전자 대신 MHV(murine hepatitis virus; GenBank: AY700211.1)의 뉴클레오캡시드의 유전자를 사용하는 경우 MERS의 뉴클레오캡시드의 유전자보다 유전자 발현양이 증가하여 바이러스 유사입자의 형성이 더 우수함을 예측할 수 있었으며 바이러스 유사입자 형성시 뉴클레오캡시드의 유전자가 중요함을 알 수 있었다.

[0095] 상기 결과로부터 본 발명자들은 중동 호흡기 증후군 바이러스의 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오캡시드 단백질은 감염세포 내에서 자가 조립되어 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자를 생성한다는 것을 알 수 있었다.

[0097] 실시예 4. 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자의 면역원성 평가

[0098] 본 실시예에서는 실시예 2에서 제작된 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자의 면역원성을 평가하였다.

[0099] 4-1. 동물 모델 확립

[0100] 구체적으로, C57BL/6 마우스(Samtako, 한국)에 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자를 2주 간격으로 2회 근육접종 하였으며 대조군으로 PBS를 동일한 방식으로 접종하였다 (투여용량: 10ug per mice). 2차 접종 2주 후, 혈청을 채취하여 중동 호흡기 증후군 바이러스 pseudovirus를 이용한 ELISA와 중화능시험을 수행하여 혈중 항체가 및 항체의 중화능을 검사하였다.

[0101] 4-2. 항체가 테스트

- [0102] ELISA를 수행하기 위해, 플레이트를 4° C에서 HIV1uc-MERS 슈도바이러스(pseudovirus)로 사전 코팅하고 코팅한 플레이트를 PBS-T(0.1% Tween 20 포함)로 3회 세척한 후 blocking buffer로 25° C에서 2시간 동안 blocking 하였다. 그 후, 마우스 혈청과 함께 25° C에서 2시간 동안 배양하고 1:100에서 시작하여 2배로 희석하였다. 그 다음, PBS-T로 4회 세척하고, HRP 결합 항-마우스 IgG(1:1000), IgG1(1:1000) 또는 IgG2a(1:1000)와 함께 25° C에서 1시간 동안 배양하였다. 4회의 세척 후, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 용액에서 25° C에서 15분 동안 배양하고 ELISA 플레이트 리더(Bio-Rad)를 사용하여 파장 450 nm에서의 광학 밀도(OD)를 측정하였다. Endpoint titer는 광학 밀도가 음성 대조군(2차 항체만)의 평균 이상을 보여주는 마지막 혈청의 희석을 의미한다. 상기 ELISA는 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0103] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자는 대조군(PBS)과 비교하여 높은 항체가를 보여준다. 특히, IgG2a 보다 IgG1의 항체 역가가 더 높은 것으로 확인하였고, 이는 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 면역 원성은 Th2 면역 반응을 일으키는 것을 알 수 있었다.
- [0104] **4-3. 중화 테스트**
- [0105] 중화 테스트를 수행하기 위하여, HIV1uc-MERS 슈도바이러스를 사용하였으며, 슈도바이러스에 대한 중화 항체의 수준을 결정하기 위해 표준 미세중화 분석을 사용하였다.
- [0106] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여 높은 NT₅₀ (440 ± 240)값을 확인하여 높은 중화능을 가짐을 알 수 있었다.
- [0108] 상기 결과로부터 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자의 높은 항체가와 중화능이 관찰된 바 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자가 중동 호흡기 증후군 바이러스의 백신의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.
- [0110] **실시예 5. 마우스에서 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자의 방어력 평가**
- [0111] 본 실시예에서는 실시예 2에서 제작된 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사입자의 방어력을 평가하였다.
- [0112] **5-1. 동물 모델 확립**
- [0113] 구체적으로, hDPP4 knock-in 마우스에 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자를 2주 간격으로 2회 근육접종하고 대조군으로 PBS를 동일한 방식으로 접종하였다. 28일째에는, 마우스를 중동 호흡기 증후군 바이러스(10^4 pfu in 50ul of DMEM)로 감염시켰다. 3일 째에는 마우스의 폐세포의 병변을 비교하고, 잔여 바이러스량을 비교하였다.
- [0114] **5-2. 생존력 평가**
- [0115] 생존력을 평가하기 위해 바이러스 유사 입자 접종 후 생존력 및 체중을 측정하였다.
- [0116] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 대조군 마우스는 바이러스 감염 후 모두 사망하였으나, 유사입자를 접종한 마우스는 최대 12일까지 생존하였다. 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군 마우스는 체중 감소를 나타내었으나, 유사입자를 접종한 마우스는 체중 감소를 나타내지 않았다.
- [0117] **5-3. 면역조직학적 평가**
- [0118] 면역조직학적 평가를 하기 위해 폐 조직을 10% 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하고 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 폐의 부종(edema), 유리막(hyaline membrane) 형성, 세포 잔해(호중구) 및 출혈에 대해 점수를 매겼으며 점수는 0, 1, 2, 3, 4로 각각 0%, 5% 미만, 6%-33%, 33%-66%, 66% 이상의 검출을 나타낸다.
- [0119] 도 9 및 10에 나타난 바와 같이, 유사입자를 접종한 마우스의 폐세포에서 증상 완화가 확인되었으며, 출혈 및 호중구 침윤이 상당히 감소하였다.
- [0120] **5-4. 잔여 바이러스량 평가**
- [0121] 바이러스 분리를 위해 폐 조직을 조직 균질화기를 이용하여 균질화하고 plaque assay를 통해 잔여 바이러스량을 평가하였다. Vero 세포는 37° C에서 1시간 동안 10배 연속 희석된 폐 균질액으로 감염시켰으며, 상기 평가방법

은 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.

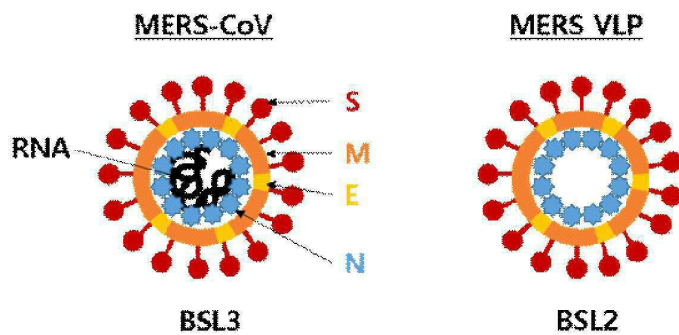
[0122] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 중동 호흡기 증후군 바이러스 감염 후 폐조직 내 잔여 바이러스량 확인시, 대조군은 5×10^5 pfu/g의 바이러스가 확인되었으나 바이러스 유사입자를 접종한 마우스에서는 바이러스가 거의 검출되지 않았다.

[0123] 상기 결과로부터 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자의 유의미한 방어력을 관찰한 바 중동 호흡기 증후군 바이러스 유사 입자가 중동 호흡기 증후군 바이러스의 백신으로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

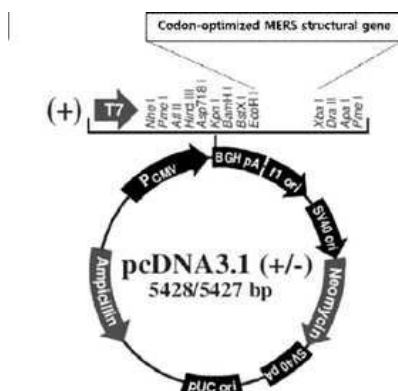
[0125] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

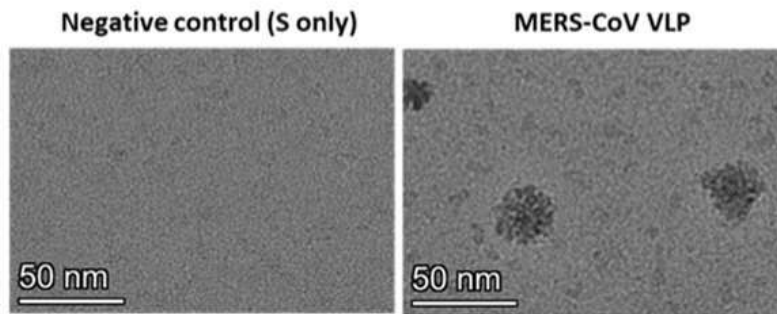
도면1



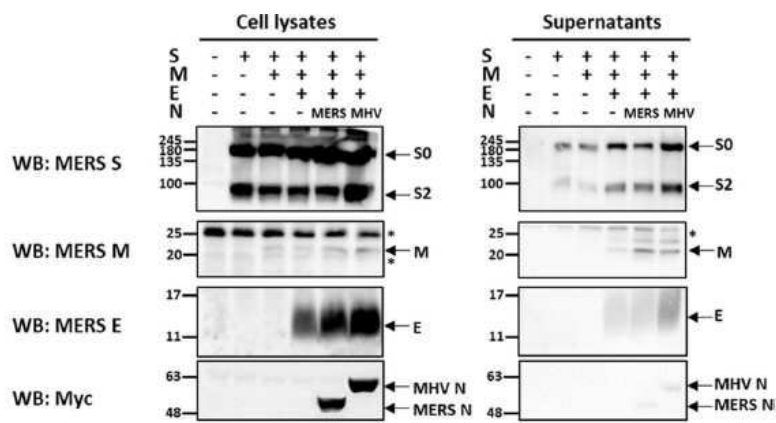
도면2



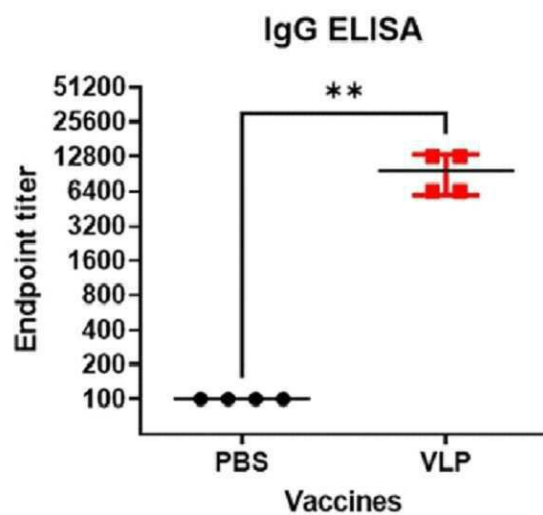
도면3



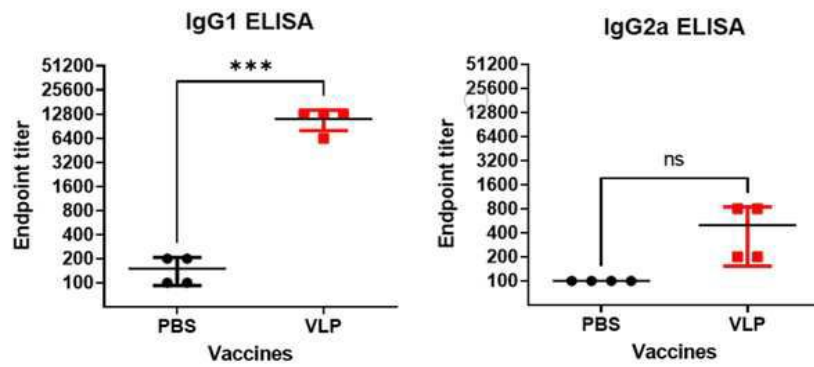
도면4



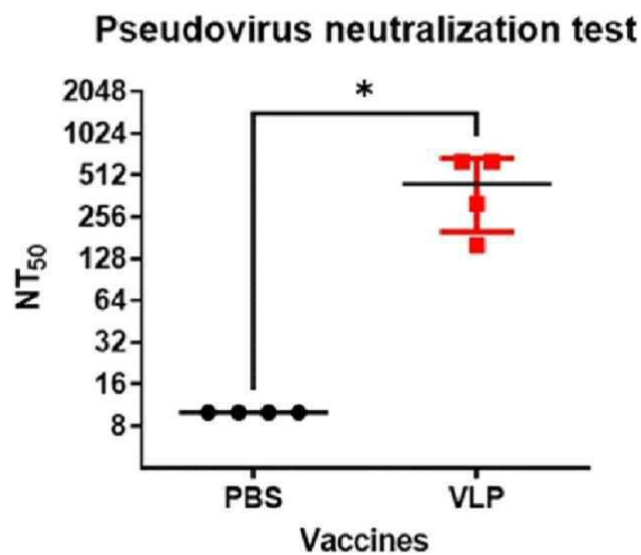
도면5a



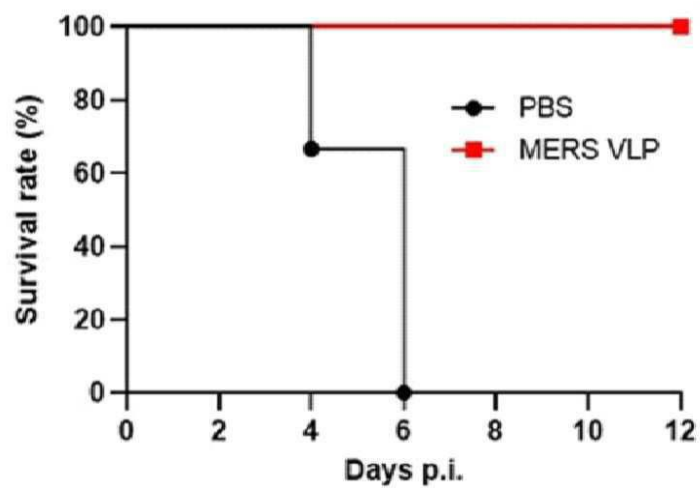
도면5b



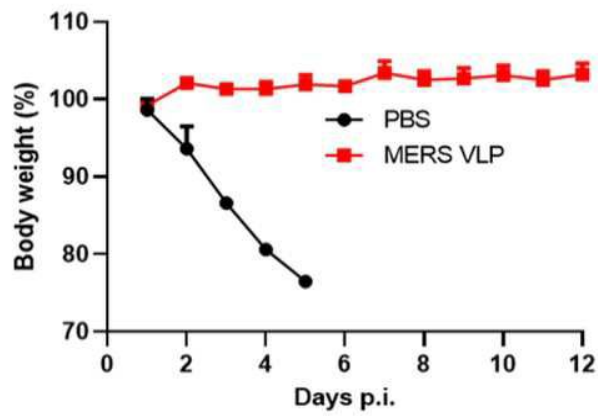
도면6



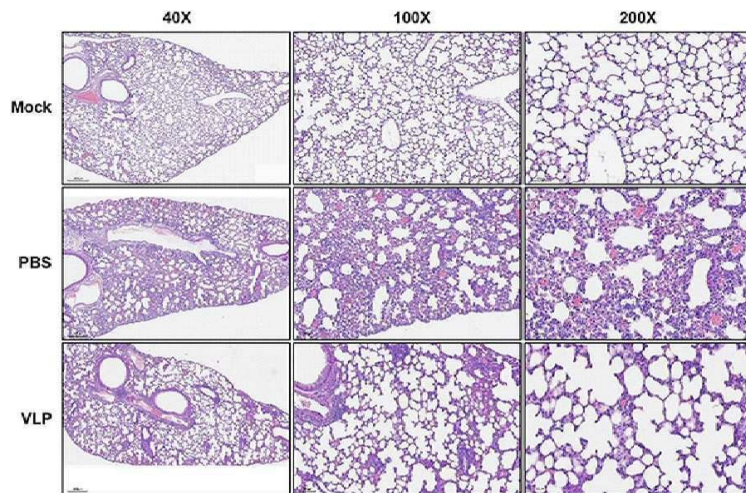
도면7



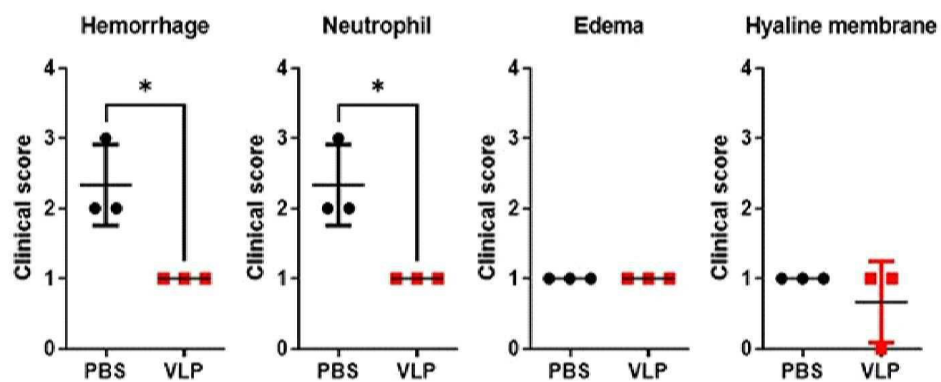
도면8



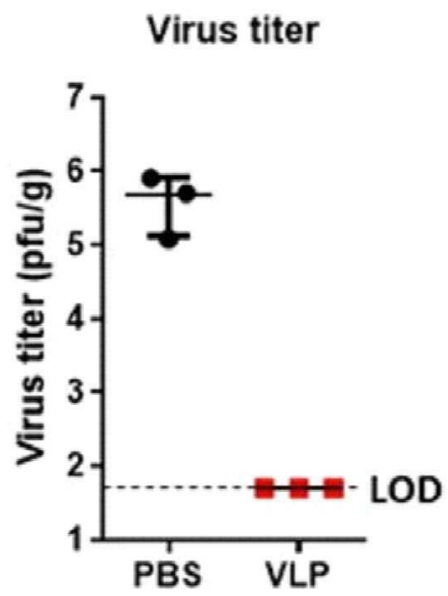
도면9



도면10



도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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