(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0119456
(43) 공개일자 2017년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/0003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0047486
(22) 출원일자 2016년04월19일
심사청구일자 2016년04월19일

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

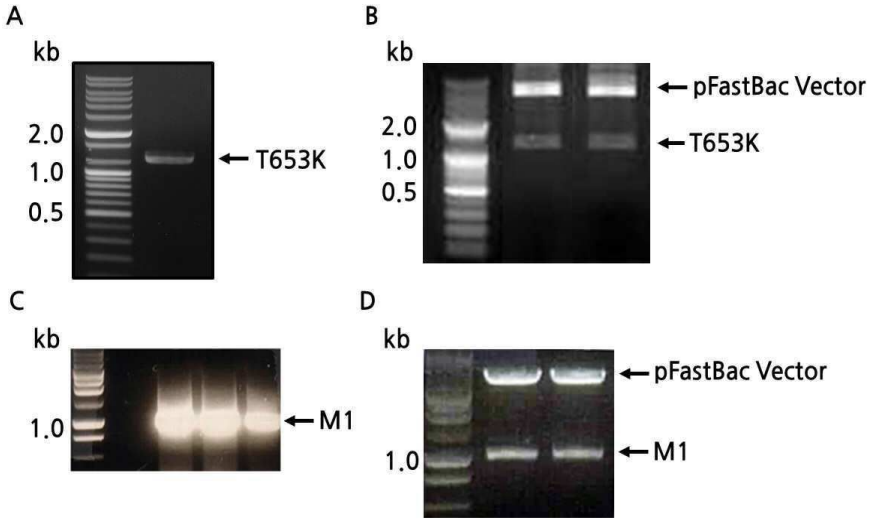
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **선모충 바이러스-유사입자, 이를 제조하기 위한 벡터, 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 본 발명은 선모충 바이러스-유사입자에 관한 것으로, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 선모충 유래의 항원 결정 부위를 포함하는 선모충 바이러스-유사입자를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/145 (2013.01)
C07K 14/4354 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2760/16023 (2013.01)
C12N 2760/16051 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

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

선모충 유래의 항원 결정 부위를 포함하는 선모충(*Trichinella spiralis*) 바이러스-유사입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 53KDa 배설-분비 단백질(excretory secretory protein; T653K)을 포함하는 선모충 바이러스-유사입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 선모충 바이러스-유사입자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화된 선모충 바이러스-유사입자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 6

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)을 암호화하는 핵산 서열 및

선모충 유래의 항원 결정 부위를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 선모충 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 53KDa 배설-분비 단백질을 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 발현 벡터.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 10

제9항에 있어서,

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

청구항 11

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및

상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 선모충 바이러스-유사입자의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)을 구조 단백질로 포함하는 선모충 바이러스-유사입자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 선모충(*Trichinella spiralis*)은 사람, 돼지, 쥐 등 포유동물의 근육에 기생하며 구토, 하리, 열을 동반하고 감염된 근육의 강직 및 동통, 호흡곤란, 안면부종과 결막염을 일으키는 인수 공통 기생충이다.

[0003] 선모충은 동물의 소장 점막 내 암수의 성충이 기생하며, 자충은 장벽의 혈관과 임파선을 통해 전신의 횡문근에 분포하는 근섬유에서 기생한다.

[0004] 선모충에 감염된 고기를 섭취하면 근육 내 피낭 자충(제1기자충)이 소화과정에 의해 위에서 낭으로 유리되며, 숙주의 소장 안에서 탈피를 거쳐 소장하부 대장상부의 점막에서 5 내지 7일만에 성충으로 성장한다.

[0005] 수컷은 교접한 후 죽게 되고, 암컷은 감염 5일 경과 후 전자충을 낳는다. 전자충은 횡문근 섬유로 유입되어 근육 섬유로 이루어진 피막이 형성되고, 낭 속에 있는 자충은 더 이상 발육할 수 없으므로, 다른 숙주의 섭취에 의해 증식할 수 있다.

[0006] 한편, 선모충을 치료하기 위한 약제는 메벤다졸(mebendazole) 또는 알벤다졸(albendazole)이 주로 사용되나, 선모충이 장내에 있을 때만 치료 효과가 나타나고 선모충이 근육에서 포낭 속 유충 단계에 이르면 작용하지 않는다.

[0007] 선모충의 감염에 의한 증상은 심각한 경우 감염 개체의 사망을 야기하기도 하나, 현재 사용되는 치료제는 제한적으로 사용될 수 있으며 치료 효과도 내성에 의해 점차 감소하고 있다. 또한, 선모충에 대한 특이적 항체를 생성시켜 면역력을 부여할 수 있는 백신도 개발되어 있지 않은 실정이다.

[0008] 한편, 실제 바이러스 구조와 형태학적으로 유사한 바이러스-유사입자(이하, 'VLP'라 함)는 여러 바이러스에 대한 백신 항원으로 제안되어 왔다(Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM: Expert review of vaccines 2010, 9:1149-1176;Kang SM, Kim MC, Compans RW: Expert review of vaccines 2012, 11:995-1007;Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V: Vaccine 2012, 31:58-83).

[0009] 바이러스-유사입자는 면역원 조성물에 사용하기 위한 항원으로서 최근 많은 주목을 받고 있다. 바이러스-유사입자는 야생형 바이러스와 유사한 형태로서, 하나 이상의 표면 단백질을 함유하여 체내 면역 반응을 유도할 수 있다. 바이러스-유사입자는 야생형 바이러스와 달리 유전물질이 결여되어 있으므로 면역 체계를 활성화시킬 수 있음에도 불구하고 비감염성이므로 매우 안전하다.

[0010] 본 발명자들은 선모충에 직접적으로 작용하는 종래의 치료제와는 달리 체내 면역 반응을 유도하여 안전하고 내성의 문제가 없으며 선모충증에 대한 예방 및 치료 효과가 우수한 신규한 형태의 바이러스-유사입자를 개발하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 선모충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 신규한 형태의 바이러스-유사입자를 제공하는 것을 목적

으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 측면에 따르면, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 선모충 유래의 항원 결정 부위를 포함하는 선모충(*Trichinella spiralis*) 바이러스-유사입자가 제공된다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 53KDa 배설-분비 단백질(excretory secretory protein; T653K)을 포함할 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물이 제공된다.

[0017] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)을 암호화하는 핵산 서열 및 선모충 유래의 항원 결정 부위를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 선모충 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터가 제공된다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 53KDa 배설-분비 단백질을 포함할 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 선모충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포가 제공된다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 선모충 바이러스-유사입자의 제조 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따르면, 상기 선모충 바이러스-유사입자는 전통적인 백신과 달리 원인 감염체 없이 개발할 수 있으며, 비선택적인 항체 생성을 유도하지 않는다.

[0024] 또한, 상기 선모충 바이러스-유사입자는 체내 면역 체계를 활성화시켜 선모충에 대한 예방 및 치료 효과를 제공할 수 있으므로, 내성을 유발하지 않고 안전하며 부작용이 최소화될 수 있다.

[0025] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스 유사입자의 T653K 및 M1 유전자를 PCR 동정한 것이다. (A) 및 (B)는 PCR을 통해 선모충의 T653K 를 증폭하고 pFastBac 벡터에 내부로 도입한 것이다. (C) 및 (D)는 인플루엔자 M1 유전자를 증폭하고 pFastBac 벡터에 내부로 도입한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자를 묘사한 것이다. (A)는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자를 전자현미경으로 관찰하고 사이즈를 측정한 것이다. (B)는 웨스턴 블랏 분석결과를 나타낸 것이다. SDS-PAGE를 위해 20㎍, 10㎍, 5㎍의 바이러스-유사입자를 각각 로딩하였으며, 프로브(probe)로서 항-선모충 다클론 마우스 항체 및 항-M1 단일클론 항체를 사용하였다.

도 3은 면역 반응 유도에 따른 선모충-특이적 IgG 반응을 확인한 것이다. (A)는 실험 일정을 도식화한 것이다. (B)는 ELISA 분석을 통해 혈청 내의 IgG 항체 반응을 측정한 것이다(after prime 및 after boost).

도 4는 면역 반응 유도에 따른 선모충-특이적 IgG1 및 IgG2a 반응을 확인한 것이다. (A)는 실험 일정을 도식화한 것이다. (A)는 혈청 내의 IgG1 항체 반응을 측정한 것이다. (B)는 혈청 내의 IgG2a 항체 반응을 측정한 것이

다.

도 5는 감염(challenge infection)에 따른 선모충 특이적 항체 반응을 확인한 것이다. (A), (B), (C)는 본 발명의 일 실시예에 따른 선모충 바이러스-유사입자에 의해 면역력이 형성된 마우스를 선모충으로 감염시키고, 1주, 4주, 6주 경과 후 혈청의 선모충-특이적 IgG, IgG1, 및 IgG2a 항체 반응을 확인한 것이다(*P < 0.05, **P < 0.01). (D)는 IgG1 및 IgG2a의 비율을 측정한 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자 접종에 따른 보호 효과를 확인한 것이다. 바이러스-유사입자에 의해 면역력이 형성된 마우스 및 대조군 간의 기생충 감소 정도를 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0028] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0029] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.

[0030] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

[0031] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 씌여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카르복실 방향으로 씌여진다.

[0033] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0035] 본 발명의 일 측면은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 선모충 유래의 항원 결정 부위를 포함하는 선모충(*Trichinella spiralis*) 바이러스-유사입자를 제공한다.

[0036] 상기 “바이러스-유사입자(Virus-Like Particle, VLP)”는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미한다. 예컨대, 상기 바이러스 유사 입자는 DNA 또는 RNA 게놈이 완전히 결여되어 있거나, 바이러스성 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자는 자발적 자가 어셈블리를 진행할 수도 있다.

[0037] 특히, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자는 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으며, 구조 단백질(core protein)로서 인플루엔자 바이러스 유래의 매트릭스 단백질 1(M1)을 포함할 수 있다. 상기 바이러스-유사입자는 별도의 원인 감염체, 즉 선모충 없이도 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으므로 높은 생산성 및 경제성이 구현될 수 있다.

[0038] 상기 “인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1”은 인플루엔자 바이러스의 구조 단백질로서, 인플루엔자 바이러스의 외피(envelop)인 지방층 안쪽에 코트(coat)를 형성하는 기질단백질(matrix protein)을 의미한다. 인플루엔자 바이러스는 A, B 및 C로 명명된 서브타입으로 구성된다. 상기 인플루엔자 바이러스는 코어와 바이러스 외피 간의 연결체로 작용하는 매트릭스 단백질 1(M1)의 층으로 둘러 쌓여 외형을 이루며, 상기 매트릭스 단백질 1은 인플루엔자 바이러스-유사입자의 개발에 있어서 구조 단백질로서 널리 사용된다.

[0039] 상기 바이러스-유사입자는 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 구조 단백질로서 포함할 수 있으며, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 표면에는 선모충에서 유래한 하나 이상의 항원 결정 부위를 포함할 수

있다.

[0040] 상기 바이러스-유사입자는 표면에 선모충에서 유래한 항원 결정 부위를 포함하고 있으므로 특정 개체에 유입되었을 때 선모충에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다. 따라서, 상기 바이러스-유사입자는 상기 개체에게 선모충에 대한 면역력을 부여할 수 있다.

[0041] 상기 바이러스 바이러스-유사입자는 당해 기술 분야에 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 상기 바이러스 유사 입자는 상기 구조 단백질 및 항원 인식 부위를 암호화하는 재조합 DNA 분자를 이용하여 소정의 숙주 세포를 형질 전환시킨 후 배양하여 제조될 수 있으며, 세포 안에서 발현된 단백질이 세포 표면에서 조립된 후 배양 상층액으로 배출될 수 있다. 이 때, 상기 바이러스-유사입자에 포함된 표면단백질은 고정화 과정을 거치지 않고 자연 그대로의 형태를 유지하고 있으므로 개체 내에서 특정 바이러스에 대한 목적하는 면역반응을 유도할 수 있다.

[0042] 상기 바이러스-유사입자는 개체 내에서 항원으로 작용하며 수상돌기세포(dendritic cells)와 같은 항원 표지 세포와의 반응을 통해 T 또는 B 면역 세포에 항원을 표지할 수 있다. 상기 바이러스-유사입자는 선모충에서 유래한 항원 결정 부위를 포함하고 있으나 그 외에 유전 물질은 포함하지 않으므로 증식이 불가능하고 독성이 없어 안전하므로 선모충에 대한 백신으로 사용될 수 있다. 상기 바이러스-유사입자의 표면에 도입된 항원 결정 부위는 순수하게 분리된 재조합 단백질에 비해 높은 항원성을 가지며 효과적인 중화항체를 형성할 수 있다.

[0043] 상기 “항원 결정 부위(epitope)”는 각각의 항체 또는 T 세포 수용체에 의한 인식의 기본 요소 또는 최소 단위이며, 상기 항체 또는 T 세포 수용체가 결합하는 특정 도메인, 영역 또는 분자 구조를 의미한다. 상기 항원 결정 부위는 선모충에서 유래할 수 있으며, 상기 선모충에 대한 면역 활성을 유도할 수 있으면 특별히 제한되지 않는다.

[0044] 일 실시예에 있어서, 상기 항원 결정 부위는 선모충에서 유래한 배설-분비 단백질(excretory secretory protein), TspSP-1, Ts23-2, 세린단백질가수분해효소(serine protease), 에놀라아제(enolase), 5'-뉴클레오티다아제(5'-nucleotidase), 추정 트립신(putative trypsin), 열 충격 단백질 70(heat shock protein 70; Hsp 70), 파라미오신(paramyosin), 및 NBL(glutamic acid-rich protein)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 53KDa 배설-분비 단백질(excretory secretory protein; T653K)을 포함할 수 있다.

[0045] 상기 “배설-분비 단백질(excretory secretory protein)”은 기생충의 면역 조절 작용에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 선모충의 면역 진단 항원의 후보군으로 연구된 바 있다. 특히, 상기 53KDa 배설-분비 단백질은 E-S 산물 중에 다량 포함되어 있으며 *Trichinella* 속 다른 종의 E-S 산물에도 53KDa 배설-분비 단백질의 상동 단백질이 존재하고 있으므로, 항-선모충 항체 검출을 위한 항원으로 사용될 수 있다.

[0046] 특히, 본 발명자들은 상기 53KDa 배설-분비 단백질이 구조적 특성에 의해 항-선모충 항체의 생성을 효과적으로 유도하므로, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1과 융합된 형태로서 개체 내에 유입될 때 선모충에 대한 높은 수준의 면역성을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[0047] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 선모충 유래의 53KDa 배설-분비 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 선모충 유래의 53KDa 배설-분비 단백질은 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다.

[0048] 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 상기 선모충 유래의 53KDa 배설-분비 단백질은 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 구성된 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.

[0049] 상기 “기능적 동등물"은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 가지는 단백질을 의미한다.

[0050] 상기 "실질적으로 동질의 생리활성"은 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 선모충 유래의 53KDa 배설-분비 단백질과의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 선모충에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자로서의 활성을 의미한다.

[0051] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물이 제공된다.

[0052] 상기 백신 조성물은 상기 바이러스-유사입자 또는 이의 농축액을 포함하는 형태이거나, 형질전환 숙주 세포 자체 또는 형질전환 세포의 건조 분말 형태로 사용할 수 있다. 또한, 상기 백신 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0053] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 바이러스 일부(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N-디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 제2 보조제를 더 포함할 수도 있다.

[0054] 또한, 상기 백신 조성물은 의학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 “의학적으로 허용 가능한 담체”는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원 보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착 지연제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 상기 백신 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제는 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 또한, 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.

[0057] 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.

[0058] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0059] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 사용될 수 있다. 비수용성제제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0061] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)을 암호화하는 핵산 서열 및 선모충 유래의 53KDa 배설-분비 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 선모충 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터가 제공된다.

[0062] 상기 벡터는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는 데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주 세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

[0063] 상기 발현 벡터는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터를 의미한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 플라스미드 및 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.

[0064] 예컨대, 상기 발현 벡터는 pET-3a-d, pET-9a-d, pET-11a-d, pET-12a-c, pET-14b, pET-15b, pET-16b, pET-17b, pET-17xb, pET-19b, pET-20b(+), pET-21a-d(+), pET-22b(+), pET-23a-d(+), pET-24a-d(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28a-c(+), pET-29a-c(+), pET-30a-c(+), pET-30 Ek/LIC, pET-30 Xa/LIC, pET-31b(+), pET-32a-c(+), pET-32 Ek/LIC, pET-32 Xa/LIC, pET-33b(+), pET-34b(+), pET-35b(+), pET-36b(+), pET-37b(+), pET-38b(+), pET-39b(+), pET-40b(+), pET-41a-c(+), pET-41 Ek/LIC, pET-42a-c(+), pET-43.1a-

c(+), pET-43.1 Ek/LIC, pET-44a-c(+), pRSETA, pRSETB, pRSETC, pESC-HIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAPα A, pGAPα B, pGAPα C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6α A, pPIC6α B, pPIC6α C, pPIC9K, pYC2/CT, pYD1 Yeast Display Vector, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPink™, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 또는 pYJ406일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 한편, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 선모충 바이러스-유사입자를 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.

[0066] 상기 프로모터는 SBE4, 3TP, PAI-1, p15, p21, CAGA12, hINS, A3, NFAT, NFKB, AP1, IFNG, IL4, IL17A, IL10, GPD, TEF, ADH, CYC, INU1, PGK1, PHO5, TRP1, GAL1, GAL10, GUT2, tac, T7, T5, nmt, fbp1, AOX1, AOX2, MOX1 및 FMD1 프로모터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 숙주 세포 또는 발현 조건 등 다양한 변수를 고려하여 달리할 수 있다.

[0067] 상기 선모충 바이러스-유사입자를 암호화하는 핵산 서열은 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결될(operably linked) 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, 상기 선모충 바이러스-유사입자를 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.

[0068] 한편, 상기 발현 벡터는 추가적인 조절 서열을 더 포함할 수 있다. 상기 조절 서열은 파지 MS-2의 레플리카아제 유전자의 샤인-달가노 서열 및 박테리오파지 람다의 cⅡ의 샤인-달가노 서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 또한, 상기 발현 벡터는 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자 또는 형광 단백질 유전자일 수 있으며, 상기 항생제 저항성 유전자는 히그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 형광 단백질 유전자는 효모-강화 녹색 형광 단백질(yeast-enhanced green fluorescent protein; yEGFP) 유전자, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP) 유전자, 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein; BFP) 유전자, 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP) 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포가 제공된다. 상기 숙주 세포(host cell)는 바이러스에 의해 감염될 수 있고 바이러스 유사 입자에 의해 면역될 수 있는 모든 유기체를 의미한다. 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 대사 조작될 수 있다.

[0072] 일 실시예에 있어서, 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포일 수 있다. 상기 적합한 숙주 세포는 자연적으로 발생하거나 또는 야생형 숙주 세포일 수 있고, 또는 변화된 숙주 세포일 수 있다. 상기 야생형 숙주 세포(wide-type host cell)는 재조합 방법에 의해 유전적으로 변화되지 않은 숙주 세포일 수 있다.

[0073] 상기 숙주 세포는 공학적 방법에 의해 형질 전환되어 특정의 유전자를 효율적으로 발현할 수 있으면 그 종류는 특별히 제한되지 않으며 바람직하게는 곤충 세포일 수 있다. 상기 곤충 세포는 유전자 발현을 위한 숙주 시스템으로서 개발되거나 시판되는 모든 세포가 사용될 수 있으며, 예컨대 스포도프테라 프루지페르다 곤충세포(*Spodoptera frugiperda*) SF21, SF9, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*), 안티카르사 겜미탈리스(*Anticarsa gemmitalis*), 봄빅스 모리(*Bombyx mori*), 에스티그멘 아크레아(*Estigmene acrea*), 헬리오티스 비레쎈스(*Heliothis virescens*), 류카니아 세파라타(*Leucania separata*), 리만트리아 디스파(*Lymantria dispar*), 말라카소마 디스스트리아(*Malacasoma disstria*), 맘메스트라 브라씨카에(*Mammestra brassicae*), 만두카 섹스타(*Manduca sexta*), 플루텔라 질로스텔라(*Plutella zylostella*), 스토도프테라 엑시구아(*Spodoptera exigua*) 및 스포도프테라 리톨리스(*Spodoptera littorlis*)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되

는 것은 아니다.

[0074] 상기 “대사 조작된(metabolically engineered)" 또는 "대사 조작(metabolic engineering)"은 미생물에서 알코올 또는 단백질과 같은 원하는 대사산물의 생산을 위하여, 생합성 유전자, 오페론과 연관된 유전자, 그리고 이들 핵산 서열의 제어 요소(control elements)의 합리적 경로 디자인과 어셈블리를 수반할 수 있다.

[0075] 상기 "대사 조작된"은 유전자 조작과 적절한 배양 조건을 이용한 전사(transcription), 번역(translation), 단백질 안정성(protein stability)과 단백질 기능성(protein functionality)의 조절과 최적화에 의한 대사 흐름(metabolic flux)의 최적화를 더욱 포함할 수 있다. 생합성 유전자는 숙주에 외래성이거나, 돌연변이유발(mutagenesis), 재조합(recombination) 또는 내인성 숙주 세포에서 이종 발현 제어 서열과의 연관에 의해 변형됨으로써, 숙주(예컨대, 미생물)에 이종성일 수 있다. 적절한 배양 조건은 배양 배지 pH, 이온 강도, 영양 함량 등의 조건, 온도, 산소, 이산화탄소, 질소 함량, 습도, 및 상기 미생물의 물질대사 작용에 의한 화합물의 생산을 가능하게 하는 기타 배양 조건을 포함할 수 있다. 숙주 세포로서 기능할 수 있는 미생물에 적합한 배양 조건은 당해 기술 분야에 널리 알려져 있다.

[0076] 따라서, 상기 "대사 조작된(engineered)" 또는 "변형된(modified)" 숙주 세포는 유전 물질을 선택된 숙주 또는 부모 미생물 내로 도입하여 세포 생리와 생화학을 변형하거나 변경함으로써 생산될 수 있다. 유전 물질의 도입을 통하여, 부모 미생물은 새로운 성질, 예를 들면, 새로운 세포 내 대사산물 또는 더욱 많은 양의 세포 내 대사산물을 생산하는 능력을 획득할 수 있다.

[0077] 예컨대, 유전 물질의 부모 미생물 내로의 도입은 화학 물질을 생산하는 새롭거나 변형된 능력을 초래할 수 있다. 부모 미생물에 도입된 유전 물질은 화학 물질 생산을 위한 생합성 경로에 관여하는 하나 이상의 효소를 코딩하는 유전자 또는 유전자의 일부를 포함하고, 이들 유전자의 발현 또는 발현 조절을 위한 추가 구성요소, 예를 들면, 프로모터 서열을 포함할 수도 있다.

[0078] 상기 "변화된 숙주 세포(altered host cell)"는 유전적으로 설계된 숙주 세포를 의미하며, 여기서 목적 단백질은 발현의 수준으로 생성되거나 발현의 수준보다 더 큰 수준으로 생성되거나 본질적으로 동일한 성장 조건 하에서 성장하는 미변화된 또는 야생형 숙주 세포 내에서의 목적 단백질의 발현의 수준보다 큰 발현의 수준으로 발현될 수 있다. 상기 "변형 숙주 세포(modified host cell)"은 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 과발현하도록 유전적으로 설계되는 야생형 또는 변화된 숙주 세포를 의미한다. 상기 변형 숙주 세포는 야생형 또는 변화된 모 숙주 세포보다 더 높은 수준으로 목적 단백질을 발현할 수 있다.

[0079] 한편, 상기 “형질 전환”은 상기 벡터를 미생물 또는 특정 세포 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 전환 하고자 하는 세포가 원핵세포인 경우에는, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. 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 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.

[0080] 형질 전환 하고자 하는 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell. Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990))등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0081] 효모와 같은 진균의 형질 전환의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트(Lithium acetate, R.D. Gietz, Yeast 11, 355360(1995)) 및 열 충격(Keisuke Matsuura, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100, 5;538-544(2005))을 이용한 형질 전환법과 전기천공법(Nina SkoluckaAsian, Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 94-98(2011))에 의해 실시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0083] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 선모충 바이러스-유사입자의 제조 방법이 제공된다.

[0084] 상기 형질 전환된 숙주 세포는 배치, 공급-배치 또는 연속 발효 조건 하에서 배양될 수 있으며, 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 상기 선모충 바이러스-유사입자를 발현할 수 있으므로 상기 배양된 숙주 세포로부터 상기 바이러스-유사입자 단백질을 수득할 수 있다.

[0085] 이 때, 고전적인 배치 발효 방법은 폐쇄적인 시스템을 사용할 수 있고, 상기 배양 매질은 발효가 실행되기 전에 제조되며, 상기 매질에 유기체를 접종하고, 상기 매질에 어떠한 성분의 첨가도 없이 발효가 일어날 수 있다. 특정한 경우에서, 성장 매질의 상기 탄소원 내용물이 아닌, 상기 pH 및 산소 함량은 배치 방법 동안 변화될 수 있다. 배치 시스템의 상기 대사물 및 세포 바이오매스는 끊임없이 발효가 정지될 때까지 변화할 수 있다. 배치 시스템에서, 세포는 정지된 지체 상에서 고도성장 로그 상에 걸쳐 진척하고, 성장율이 감소되거나 멈춘 최종적으로 정지 상에 이를 수 있다. 일반적인 기간에서, 로그 상의 상기 세포는 대부분의 단백질을 만들 수 있다.

[0086] 표준 배치 시스템의 변형은 "공급-배치 발효" 시스템이다. 상기 시스템에서, 영양(예를 들면, 탄소원, 질소원, O_2, 및 통상적으로, 다른 영양)은 이들의 배양물의 농도가 한계치 미만으로 떨어질 때 첨가될 수 있다. 공급-배치 시스템은 이화 생성물 억제가 세포의 대사를 억제하고, 매질이 매질 내에서 영양소를 제한된 양으로 갖는 것이 바람직할 때 유용할 수 있다, 공급-배치 시스템에서의 실제 영양 농도의 측정은 pH, 용존 산소 및 CO_2와 같은 폐기가스의 부분압과 같은 측정 가능한 인자의 변화에 기초하여 예측될 수 있다. 배치 및 공급-배치 발효는 일반적인 시스템으로서 당업계에 널리 알려져 있다.

[0087] 계속적 발효는 정의된 배양 매질이 계속해서 생반응기(bioreactor)에 첨가되고, 조건화된 매질의 동일한 양이 과정 동안 동시에 제거되는 개방 시스템이다. 계속적 발효는 일반적으로 세포가 처음에는 로그 상 성장에 있는 일정한 고 밀도의 배양물을 유지할 수 있다. 계속적 발효는 세포 성장 또는 마지막 생성물 농도에 영향을 미치는 하나의 인자 또는 임의의 수의 인자의 조작이 가능할 수 있다.

[0088] 예를 들어, 탄소원 또는 질소원과 같은 제한 영양소는 고정된 속도로, 모든 다른 파라미터는 적당하게 유지될 수 있다. 다른 시스템에서, 많은 성장에 영향을 주는 인자는 배지 탁도에 의해 측정되는 세포 농도가 일정하게 유지되는 동안, 계속해서 변화할 수 있다. 계속적 시스템은 일정한 상태의 성장 조건을 유지하려고 한다. 따라서, 매질이 빠져나가는 것에 의한 세포 손실은 발효에서의 세포 성장 속도에 대항하여 균형이 맞을 수 있다. 생성물 형성의 속도를 최대화하는 기술뿐만 아니라, 계속적 발효 과정 동안 영양소 및 성장인자를 유지하는 방법은 당업계에 알려져 있다.

[0089] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 본 발명의 기재내용에 기초하여 각 구성의 종류, 도입 비율 등을 변화시켜 적용할 수 있을 것이며, 상기 변형에도 불구하고 동등한 기술적 효과가 구현되는 경우라면, 본 발명의 기술적 사상에 포괄된다고 할 것이다.

[0090] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0092] 제조예 1 : 선모충 바이러스-유사입자의 제조

[0093] 선모충 53KDa 배설-분비 단백질(T653K) 유전자는 정방향 프라이머(5'- AAAGAATTCACCATGTTCAGCATCACATTAAA-3') 및 역방향 프라이머(5'- TTACTCGAGTTAGAACAACAACTGTAGT-3')를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 상기 프라이머는 밑줄로 표시된 제한 효소 부위(EcoR I 및 Xho I)가 각각 도입되었다(도 1A, 1B). cDNA를 주형으로 증폭된 T653K을 암호화하는 서열은 pFastBac 벡터(Invitrogen)에 도입되었다.

[0094] 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 정방향 프라이머(5'- TCCCCCGGGCCACCATGAGCCTTCTGACCGAGGTC-3') 및 역방향 프라이머(5'- TTACTTCTAGATTACTTGAACCGTTGCATCTG-3')를 이용하여 RT-PCR을 통해 증폭하였다. 상기 프라이머는 밑줄로 표시된 제한 효소 부위(SmaI 및 XbaI)가 각각 도입되었다(도 1C, 1D). A/PR/8/34 바이러스가 MDCK 세포에 접종되었고, RNeasy Mini kit를 통해 바이러스성 RNA를 추출하였다.

[0095] 증폭된 인플루엔자 M1 단백질은 상기 pFastBac 벡터에 도입되었다. 재조합 플라스미드는 *E.coli* DH5-alpha, 및 DH10-Bac에 도입되었다.

[0096] 상기 pFastBac 벡터에 도입된 M1(accession number: EF467824, 1027bp) 및 T653K(accession number: DQ399914.1) 유전자는 DNA 염기서열결정 결정법에 의해 확인되었다.

[0097] T653K 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(rBVs)를 제조하기 위하여, cellfectin Ⅱ(Invitrogen) 및 SF9 세포를 이용하여 DNA 형질 감염을 수행하였다. T653K 및 M1을 포함하는 pFastBac 벡터를 이용한 형질 전환은 white/blue 스크리닝에 의해 수행되었다. 바큘로바이러스는 Bac-to-Bac 발현 시스템(Invitrogen)를 통해 제조사의 매뉴얼에 따라 제조되었다.

[0099] 제조예 2 : 선모충 바이러스-유사입자의 제조

[0100] 선모충 바이러스-유사입자는 T653K 및 M1을 발현하는 재조합 rBVs에 의해 공동-감염된 SF9 곤충 세포에서 생산되었다.

[0101] 감염 3일차에 세포 배양 상청액을 분리하였으며, 30분간 원심분리(6000rpm, 4℃)하여 세포를 제거하였다. 상청액 내의 바이러스-유사입자는 고속원심분리(30분, 45,000xg)에 의해 펠렛화 되었다.

[0102] 펠렛화된 침전물은 4℃에서 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 동안 재현탁 되었고, 불연속 수크로오스 구배(20-30-60%)를 통해 4℃, 45,000xg 에서 1시간 동안 수확되고 정제되었다. 단백질 농도는 QuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich)에 의해 결정되었다.

[0103] 바이러스-유사입자는 웨스턴 블랏 및 전자현미경법에 의해 확인되었다. 웨스턴 블랏 분석에서, 마우스 혈청을 이용하여 T653K 단백질을 탐침하였다. 혈청은 4주 후 선모충 ME49 균주에 의해 감염된 BALB/c 마우스에서 수집되었다. M1 단백질의 함량은 항-M1 단일클론 항체에 의해 결정되었다. 전자현미경법 및 사이즈 측정을 위해 바이러스-유사입자를 매질 염색하였으며, 투과전자현미경(TEM)에 의해 관찰되었다(KAIST, Tecnai G2 spirit, USA).

[0104] 바이러스-유사입자는 전자현미경에 의해 표면에 스파이크가 형성된 구 형태로 관찰되었다. 바이러스-유사입자의 크기는 약 40 내지 120nm로 확인되었다(도 2A).

[0105] T653K 및 M1의 바이러스-유사입자로 도입되었는지 확인하기 위하여, 항-선모충 다클론 항체 및 항-M1 단일클론 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다(도 2B).

[0106] 즉, T653K 및 M1을 발현하는 rBVs 에 의해 감염된 SF9 세포는 비리온과 형태 및 크기가 유사한 입자를 생성하였다.

[0108] 실험예 1 : 동물 모델의 체액성 면역 유도 반응 시험

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

[0110] 암컷 BALB/c 마우스(6 내지 8주령) 40마리를 4개의 군(naive 대조군, *T. spiralis* 에 감염된 TS 대조군, T653k VLP 군, T653k VLP/CT 군)으로 분류하였다.

[0111] 마우스는 상기 T653k 바이러스-유사입자를 단독으로 또는 콜레라독소(cholera toxin; CT)와 함께(25 μg VLPs/mouse, 2 μg CT/mouse) 근육 내 주사하여 면역력을 형성하였다.

[0112] 모든 실험군은 2회(0주차 및 4주차) 접종되었으며, 마지막 접종 4주 경과 후 선모충(*T. spiralis*) 유충을 경구로 투여하여 감염시켰다.

[0113] 제조예 2의 바이러스-유사입자 백신 접종(Intranasal route) 후 마우스로부터 시기를 달리하여 혈청을 수집하였으며, ELISA법을 통해 혈청의 선모충 특이적 IgG, IgG1, IgG2a 수준을 측정하였다(도 3A).

[0114] 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 마우스의 IgG, IgG1, IgG2a 수준은 naive 대조군과 비교하여 현저하게 높았으며(0주, 1주, 5주, 및 8주), 콜레라독소를 함께 투여했을 때 면역 반응은 더욱 증가하였다(도 3B).

[0115] 이 때, IgG2a의 수준은 IgG1 수준보다 높게 나타났으며, 상기 결과는 IgG2a 반응이 상대적으로 우세함을 시사한다. 또한, IgG2a의 수준은 IgG1 수준보다 상대적으로 우세하였으나 IgG1 항체 반응도 함께 확인되었으며, 상기 결과는 상기 바이러스-유사입자에 의해 Th1/Th2 혼합 면역 반응이 유도될 수 있음을 시사한다.

[0116] 즉, 제조예 2의 바이러스-유사입자는 선모충에 대한 높은 면역성을 제공하고, 선모충의 감염에 반응하여 항체 반응을 효과적으로 유도할 수 있다.

[0118] 실험예 2 : 선모충 특이적 항체 반응 시험

[0119] 제조예 2의 바이러스-유사입자 접종에 의해 유도되는 선모충 특이적 항체 반응을 시험하였다.

[0120] 마우스의 감염(challenge infection)에 따른 항체 반응 프로파일을 확인하고자 바이러스-유사입자 접종 4주 경과 후(after boost) 선모충 유충을 경구를 통해 감염시켰다.

[0121] 상기 바이러스-유사입자 백신에 의해 유도된 선모충-특이적 항체의 수준을 정량하고자 선모충 감염 후 1주, 4주, 6주에 혈청 내 IgG, IgG1, IgG2a 수준을 측정하였다(도 5A, 5B, 5C).

[0122] 바이러스-유사입자의 감염에 의해 면역력이 형성된 마우스는 음성 대조군(TS 대조군)과 비교하여 현저하게 높은 수준의 선모충-특이적 IgG, IgG1, IgG2a를 생성하였으며(*P < 0.05, **P < 0.01), 콜레라독소를 함께 투여한 마우스의 항체 반응은 더욱 증대되었다.

[0123] 즉, 상기 바이러스-유사입자에 의해 선모충-특이적 면역 반응이 유도되므로, IgG, IgG1, IgG2a 항체의 혈청 내 수준은 선모충 감염에 의해 현저히 증대될 수 있다.

[0124] 또한, 바이러스-유사입자 및 콜레라독소가 함께 투여된 마우스에서 면역 반응이 더욱 증대되었으며, IgG2a 반응이 상대적으로 우세하였다(도 5D).

[0125] 상기 결과는 상기 바이러스-유사입자에 의해 Th1/Th2 혼합 면역 반응이 효과적으로 유도될 수 있음을 시사한다. 즉, 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 마우스는 선모충의 감염에 대한 매우 높은 수준의 면역성을 획득할 수 있다.

[0127] 실험예 3 : 방어적 면역 효과 시험

[0128] 제조예 2의 바이러스-유사입자를 마우스에 접종 후 유도되는 방어적 면역 효과를 확인하였다.

[0129] 제조예 2의 바이러스-유사입자 백신 접종 후 선모충을 감염시킨 마우스를 6주 후 희생시켰으며, 선모충 유충은 횡경막에서 분리하였다.

[0130] 콜레라 독소 및 바이러스-유사입자에 의해 면역력이 형성된 마우스는 기생충이 53.2% 감소하였으며, 바이러스-유사입자를 단독으로 접종한 마우스는 기생충이 34% 감소하였다(도 6, *P < 0.05, **P < 0.01).

[0131] 상기 결과는 상기 바이러스-유사입자가 선모충 감염에 대한 방어적 면역 효과를 유도할 수 있으며, 콜레라독소가 보조제로서 상기 방어적 면역 효과를 증대시킬 수 있음을 시사한다.

[0133] 실험예 4 : 항원 결정 부위 치환에 따른 면역 유도 효과 시험

[0134] 제조예 1 및 2에서 사용된 T653K 단백질을 TspSP-1, Ts23-2, 세린단백질가수분해효소(serine protease), 에놀라아제(enolase), 5'-뉴클레오티다아제(5'-nucleotidase), 추정 트립신(putative trypsin), 및 열 충격 단백질 70(Hsp 70)로 각각 치환하고 실험예 1 내지 3을 반복하였다.

[0135] 실험 결과, 상기 바이러스-유사입자는 항원 결정 부위를 달리했을 때 유도되는 면역 반응 효과는 일부 차이가 있었으나, 동물 모델에서 면역 반응 및 항체-분비 세포 반응을 유도하였다.

[0136] 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 마우스의 IgG, IgG1, IgG2a 수준은 naive 대조군과 비교하여 현저히 증대되었으므로, Th1/Th2 혼합 면역 반응이 유도될 수 있음이 확인되었다.

[0137] 특히, 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 유도된 마우스는 선모충 감염에 의해 선모충-특이적 IgG, IgG1, IgG2a를 효과적으로 생산하였으며, 상기 면역 반응은 콜레라독소를 상기 바이러스-유사입자와 함께 투여했을 때 더욱 증대되었다.

[0138] 즉, 상기 바이러스-유사입자는 인플루엔자 바이러스 유래의 매트릭스 단백질 1(M1)을 구조 단백질로서 포함하고, 표면에 선모충에서 유래한 항원 결정 부위를 포함하고 있으므로 특정 개체에 유입되었을 때 선모충에 특이적인 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있다.

[0139] 또한, 상기 바이러스-유사입자는 항원 결정 부위를 달리하더라도 면역 반응을 효과적으로 유도하였으므로, 상기 인플루엔자 바이러스 유래의 매트릭스 단백질 1 및 선모충 유래의 항원 단백질을 융합하여 항-선모충 항체를 생성하는 백신으로 사용할 수 있다.

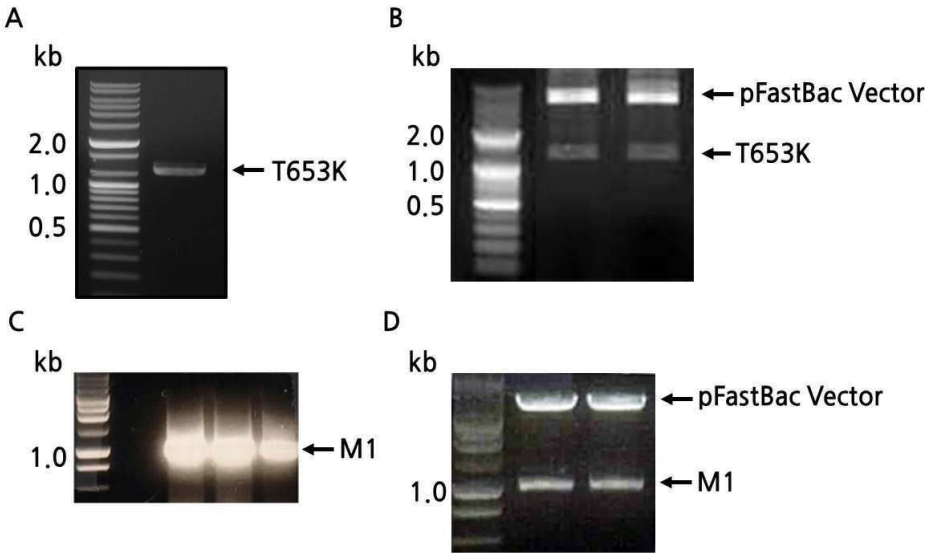
[0140] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명

의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

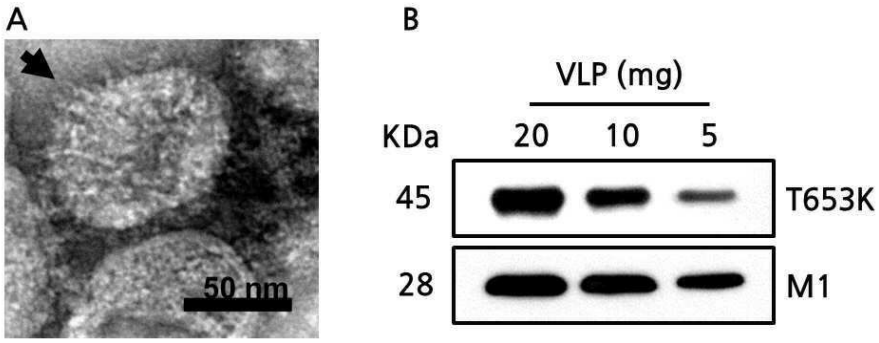
[0141] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

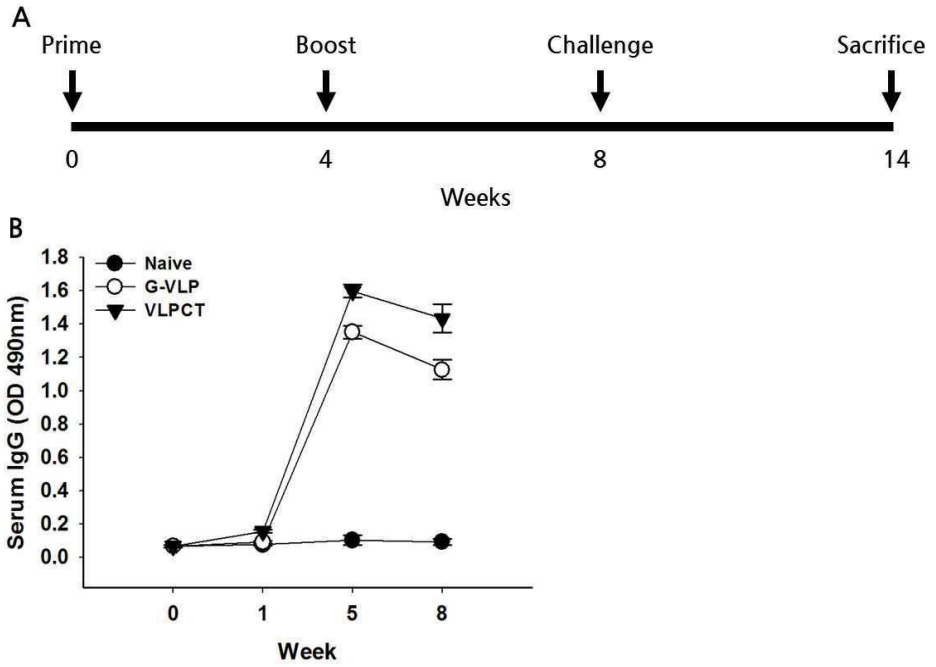
도면1



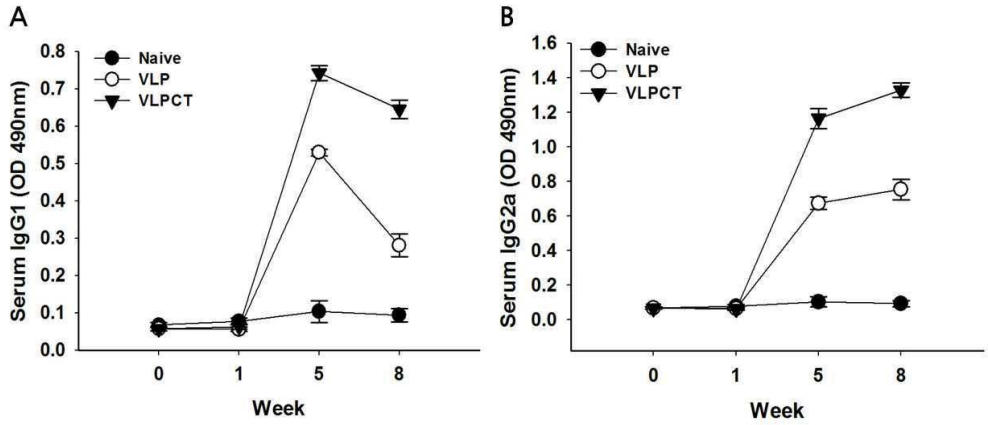
도면2



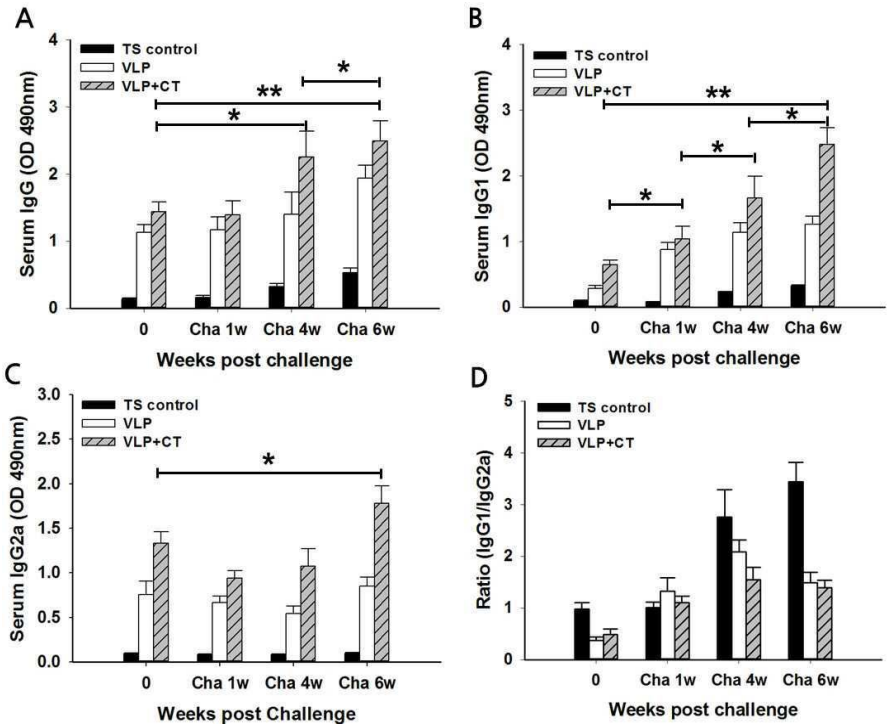
도면3


A
Prime
Boost
Challenge
Sacrifice
0
4
8
14
Weeks
B
Naive
G-VLP
VLPCT
Serum IgG (OD 490nm)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
5
8
Week

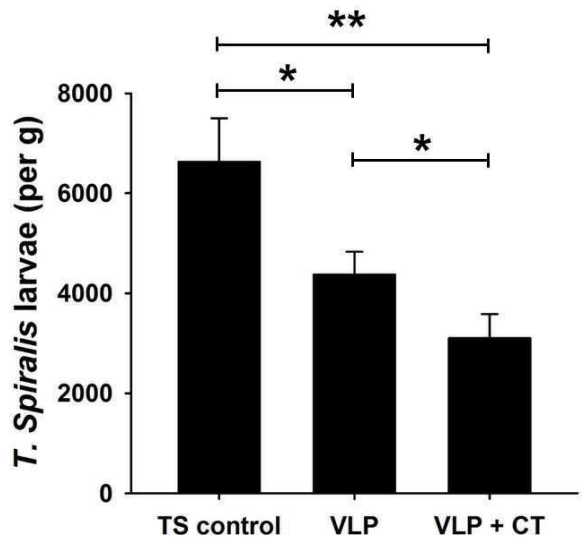
도면4


A
Naive
VLP
VLPCT
Serum IgG1 (OD 490nm)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
1
5
8
Week
B
Naive
VLP
VLPCT
Serum IgG2a (OD 490nm)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
5
8
Week

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> kyung hee university

<120> TRICHINELLA SPIRALIS VIRUS-LIKE PARTICLE, EXPRESSION VECTOR AND METHOD FOR PREPARING THE SAME

<130> 16PP10334

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 252

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 1

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala
85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala

100 105 110

Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met

180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln
195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys

245 250

<210> 2
<211> 412
<212> PRT
<213> Trichinella spiralis
<400> 2
Met Phe Ser Ile Thr Leu Asn Leu Phe Ile Ile Ala Phe Val Asn Phe
1 5 10 15
Gln Leu Cys Thr Cys Ser Thr Asp Asn Glu Asn Val Ala Ile Lys Glu
20 25 30
Met Thr Phe Ser Leu Pro Ile Ser Val Leu Gln Asp Glu Arg Gln Phe
35 40 45
Asp Gly Lys Lys Leu Lys Lys Leu Leu Lys Pro Leu Gly Lys Leu Tyr

50 55 60
Asn Thr Ser Ser Asp Glu Gly Ile Pro Ile Asn Thr Asn Glu Ala Thr
65 70 75 80
Leu Ser Val Glu Lys Met Met Val Glu Leu Asn Arg Leu Ile Gln Lys
85 90 95
Glu Tyr Ser Phe Leu Tyr Lys Gln Tyr Gln Lys Leu Lys Thr Val Leu
100 105 110
Gln Ala Glu Lys Cys Asp Ser Thr Thr Asn Val Tyr Thr Val Thr Leu
115 120 125

Gln Asn Thr Asp Cys Glu Ser Lys Ser Ile Ile Glu Gly Ser Pro Ala
130 135 140
Thr Asn Cys Ser Asp Val Glu His His His Pro Leu Ser Cys Ser Ile
145 150 155 160
Leu Ser Lys Val Ala Ser Ala Asp Glu Lys Ile Ile Gly Ala Tyr Cys
165 170 175
Ser Val Gly Leu Glu Glu Ser Phe Pro Lys Lys Lys Ser Ile Cys Lys

180 185 190

Leu Ser Arg Tyr Pro Gly Glu Glu Lys Phe Lys Thr Phe Val Pro Glu

195 200 205

Glu Val Ser Ser Trp Phe His Asp Ala Ile Val Tyr Val Pro Thr Gly

210 215 220

Asn Arg Pro Leu Ser Asn Ser Met His Ser Asn Asn Tyr Arg Gly Arg

225 230 235 240

Gln Gly Ile Val Gly Leu Gly Met Leu Pro His Leu Gly Ala Val Gln

245 250 255

Met Asn Val Val Thr Ile Phe Arg Lys Asn Gly Lys Thr Thr Glu Val

260 265 270

Leu Ser Leu Ile Asn Ala Asn Gly Ser Ile Glu Ile Pro Lys Val Phe

275 280 285

Val Thr Asn Pro Ile Gln Lys Pro Phe Gly Asp Glu Ile Asp His Ile

290 295 300

Leu Arg Glu Ala Phe Gly Thr Met Lys Leu Ser Ser Ser Asp Ile Glu

305 310 315 320

Asp Lys Leu Gln Lys Leu Tyr Asn Ala Thr Ile Ser Thr Lys Val Lys

325 330 335

His Arg Ala Thr Pro Tyr Asp Thr Asp Asp Ala Tyr Val Ile Thr Glu

340 345 350

Val Ala Gly Val Ile Asp Glu Ser Lys Glu His Ile Gly Ser Ile Asn

355 360 365

Thr Phe Pro Ser Tyr Gly Lys Phe Gln Ile Gly Trp Lys Glu Ala Asp

370 375 380

Lys Ser Ala Leu Arg Leu Lys Arg Phe Ala Lys Pro Pro Lys Gly Val

385 390 395 400

Phe Gln Asp Ile Phe Ser Glu Leu Gln Leu Leu Phe

405 410

<210> 3

<211> 1027

<212> DNA

<213> Influenza virus

<400> 3

agcgaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact 60

ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt 120

tgcagggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct 180

gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg 240

aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa 300

catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc 360

caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata 420

caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga 480

acagattgct gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact 540

aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat 600

ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagtcagg ctagacaaat 660

ggtgcaagcg atgagaacca ttggaactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga 720

tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa 780

gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc 840

ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc 900

cttctacgga aggagtgcca aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg 960

ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt 1020

ttctact 1027

<210> 4

<211> 1239

<212> DNA

<213> Trichinella spiralis

<400> 4

atgttcagca tcacattaaa cttattcatt attgcttttg taaattttca attgtgcaca 60

tgttctacag acaatgagaa tgttgcaata aaggaaatga cattttcact tcctatttcc 120

gtgctacaag atgagcgtca attcgatgga aaaaaactga aaaaattatt gaagcccctt 180

ggaaaattat acaatacatc aagtgatgaa ggtataccga taaatacaaa tgaagctact 240

ctgtcggttg agaaaatgat ggttgaattg aatcgcttaa tacaaaaaga atacagtttt 300

ctttacaagc agtatcagaa attaaagacc gtcctacaag cagaaaaatg tgacagcaca 360

acaaacgtgt acaccgtaac actgcaaaat acagactgtg aatccaaatc gattatcgaa 420

ggaagccctg ctacgaattg cagtgatgtc gaacatcacc atcctctaag ctgcagcatt 480

ttaagtaaag tcgcttctgc agacgaaaaa attattggag catactgtag cgttggtttg 540

gaggaatcat ttccaaagaa aaaatctata tgcaaactgt ccagatatcc aggagaagag 600

aaatttaaaa cattcgttcc tgaagaagtt tcatcttggt ttcatgatgc aattgtatac 660

gtaccaactg gaaatcgtcc gctgtcgaac tcaatgcata gtaacaatta ccgtgggcga 720

caaggtattg ttggtcttgg aatgctacct catttgggcg cagttcaaat gaatgttgta 780

actattttca ggaaaaatgg taaaactact gaagttctat cacttataaa tgcaaatggt 840

tcaatagaaa tcccgaaggt ttttgttaca aatccaattc agaagccatt tggtgatgaa 900

atagatcata ttttaagaga agcttttggt accatgaaat taagcagttc tgacatagaa 960

gataaacttc aaaagttgta caatgcaaca attagcacta aggttaaaca cagggcaaca 1020

ccgtacgata cggacgatgc ttacgtaata actgaagtag ccggagtgat agatgaaagc 1080

aaagaacaca ttggcagcat taatacattt cccagttatg gaaaatttca gattggttgg 1140

aaagaggctg ataaatcggc actacgttta aagcgctttg caaagccccc aaaaggggtt 1200

ttccaagata ttttttcaga actacagttg ttgttctaa 1239