



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0107327
(43) 공개일자 2017년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/002* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) *C07K 14/45* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/002 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0031171

(22) 출원일자 2016년03월15일

심사청구일자 2016년03월15일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

전복실

서울특별시 동대문구 경희대로 26-6 경희대학교 의과대학 의동물학

이동훈

서울특별시 동대문구 경희대로 26-6 경희대학교 의과대학 의동물학

이수화

서울특별시 동대문구 경희대로 26-6 경희대학교 의과대학 의동물학

(74) 대리인

특허법인 하나

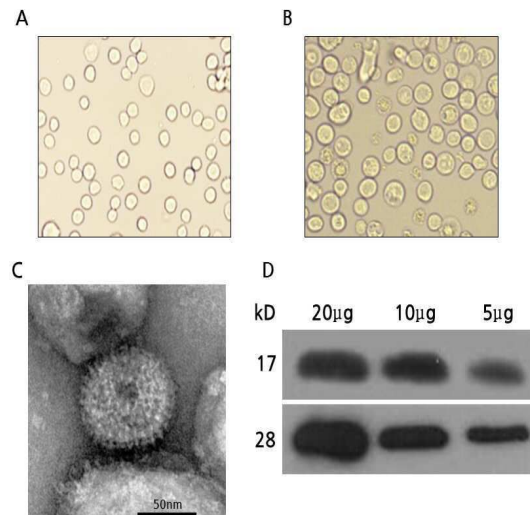
전체 청구항 수 : 총 11 항

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

(57) 요약

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

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)
C07K 14/45 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2760/16023 (2013.01)
C12N 2760/16034 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI15C2928
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병 위기대응기술개발
연구과제명	톡소포자충 대응 바이러스 유사입자 백신 개발연구
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교산학협력단
연구기간	2015.12.07 ~ 2016.12.14

명세서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및
톡소포자충 유래의 항원 결정 부위를 포함하는 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*) 바이러스-유사입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위는 내막 복합체 단백질(inner membrane complex; IMC)을 포함하는 톡소포자충 바이러스-유사입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

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

청구항 4

제1항에 있어서,

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

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

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위는 내막 복합체 단백질(inner membrane complex; IMC)을 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 톡소포자충 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 독소포자충 바이러스-유사입자의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 독소포자충 바이러스-유사입자에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 구조 단백질로서 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)을 포함하는 독소포자충 바이러스-유사입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 독소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 콕시디아아강(subclass of coccidia)에 속하는 침복포자충이다. 독소포자충은 세포 내 기생충(obligate intracellular parasite)으로서 전 세계적으로 분포하는 인간 및 동물에 대한 독소플라즈마증(Toxoplasmosis)을 야기하는 원인 원충이다.

[0003] 독소포자충은 크게 난포낭(oocyst, 오시스트), 영양형(tachyzoite, 타키조이트), 감염형(bradyzoite, 브래디조이트), 분열체(schizont, 시존트) 및 생식모체(gametocyte, 거미토사이트) 단계의 5가지 발육 단계를 거친다. 독소포자충은 종숙주인 고양이 분변의 난포낭(oocyst)에 의해 오염된 물 또는 야채를 섭취함으로써 감염되거나, 중간숙주인 돼지, 양, 소 등의 육류에 씨스트(cyst)로 존재하는 독소포자충을 섭취할 때 감염될 수 있다.

[0004] 전 세계 인구의 약 3분의 1 이상이 독소포자충에 감염된 것으로 추정되며, 국내에서도 그룹에 따라 2 내지 25%의 감염율을 나타내는 것으로 보고된다.

[0005] 독소포자충은 산모를 감염시켰을 때 독소포자충의 영양형(trophozoite)은 태반을 거쳐 태아를 감염시킬 수 있다. 독소포자충의 감염에 의해 초기의 태아는 유산 또는 사산에 이를 수 있으며, 중후기의 태아는 정상적 분만에도 불구하고 시력손상, 수두증, 정신박약 등의 선천적 기형이 야기될 수 있다.

[0006] 또한, 건강한 개체를 감염시킨 독소포자충은 면역계 세포, 망상내피계 세포 등을 파괴시켜 림프선염, 망막맥락막염, 뇌척수염 등의 질병을 유발할 수 있으며, 숙주의 면역부전시 뇌에서 증식된 씨스트가 활성화 되어 뇌수막염 또는 망막맥락막염을 일으킬 수 있다.

[0007] 한편, 말라리아 치료제로도 사용되는 피리메타민(pyrimethamine)이 독소플라즈마증의 치료제로서 가장 널리 사용되고 있으나, 임신 중에는 치료 효과가 잘 나타나지 않으며, 그 외에 스피라마이신(spiramycin)은 약효가 크지 않아 예방용으로 쓰이고 있다.

[0008] 또한, 피리메타민과 병용되는 설파제(sulfa drug)인 설파메톡사졸(sulfamethoxazole)은 골수억제를 일으켜 혈소판 수를 감소시킬 수 있으며, 엽산의 병용 투약에 의해 알리지반응, 신장장애, 혈액장애, 오심(惡心), 구토 등의 부작용을 유발할 수 있다.

[0009] 그러나, 현재 가장 널리 사용되는 항독소포자충제인 설파제나 피리메타민은 내성의 증가로 인하여 치료 효과가 점차 감소하고 있으며, 인체에 대한 항체를 생성시켜 독소포자충에 대한 면역력을 부여할 수 있는 백신의 개발도 개발되어 있지 않은 실정이다.

[0010] 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).

[0011] 바이러스-유사입자는 면역원 조성물에 사용하기 위한 항원으로서 최근 많은 주목을 받고 있다. 바이러스-유사입

자는 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.

- [0012] 본 발명자들은 톡소포자충에 직접적으로 작용하는 종래의 치료제와는 달리 체내 면역 반응을 유도하여 안전하고 내성의 문제가 없으며 톡소플라즈마증에 대한 예방 및 치료 효과가 우수한 신규한 형태의 바이러스-유사입자를 개발하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 신규한 형태의 바이러스-유사입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 측면에 따르면, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위를 포함하는 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*) 바이러스-유사입자가 제공된다.
- [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위는 내막 복합체 단백질(Inner membrane complex; IMC)을 포함할 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물이 제공된다.
- [0019] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)을 암호화하는 핵산 서열 및 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 톡소포자충 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터가 제공된다.
- [0020] 일 실시예에 있어서, 상기 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위는 내막 복합체 단백질(Inner membrane complex; IMC)을 포함할 수 있다.
- [0021] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포가 제공된다.
- [0023] 일 실시예에 있어서, 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 톡소포자충 바이러스-유사입자의 제조 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따르면, 상기 톡소포자충 바이러스-유사입자는 전통적인 백신과 달리 원인 감염체 없이 개발할 수 있으며, 비선택적인 항체 생성을 유도하지 않는다.
- [0026] 또한, 상기 톡소포자충 바이러스-유사입자는 체내 면역 체계를 활성화시켜 톡소포자충에 대한 예방 및 치료 효과를 제공할 수 있으므로, 내성을 유발하지 않고 안전하며 부작용이 최소화될 수 있다.
- [0027] 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

- [0028] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 pFastBac 벡터를 구성한 것이다. (A)는 PCR을 통해 독소포자충 내막 복합체 단백질(IMC)의 유전자를 증폭한 것이다. (B)는 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1)의 유전자를 증폭한 것이다. (C) 및 (D)는 상기 증폭된 각 유전자를 제한 효소를 이용하여 플라스미드 내부로 도입한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자를 묘사한 것이다. (A)는 정상적인 SF9 세포를 나타낸 것이다. (B)는 바이러스-유사입자를 생산하는 세포를 나타낸 것이다. (C)는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스 유사입자를 전자현미경으로 관찰하고 사이즈를 측정한 것이다. (D)는 웨스턴 블랏 분석결과를 나타낸 것이다. SDS-PAGE를 위해 20 μ g, 10 μ g, 5 μ g의 바이러스 유사입자를 각각 로딩하였으며, 프로브(probe)로서 항-독소포자충 다클론 항체 및 항-M1 단일클론 항체를 사용하였다.
- 도 3은 면역 반응 유도에 따른 독소포자충-특이적 항체의 생성 정도를 확인한 것이다. (A), (B), (C)는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자를 이용하여 면역 반응을 유도하고 4주 간격으로 혈청의 독소포자충 특이적 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체 반응을 측정한 것이다. (D) 및 (E)는 분변의 IgA 및 IgG 항체 반응을 측정한 것이다.
- 도 4는 감염(challenge infection)에 따른 독소포자충 특이적 항체 반응을 확인한 것이다. (A), (B), (C)는 본 발명의 일 실시예에 따른 독소포자충 바이러스-유사입자로 생쥐를 감염시키고, 4주 경과 후 혈청의 독소포자충-특이적 IgG, IgG1, 및 IgG2a 항체 반응을 확인한 것이다(*P < 0.05). (D), (E), (F), (G)는 분변, 장(intestine)의 독소포자충-특이적 IgA 및 IgG 항체 반응을 확인한 것이다(*P < 0.05).
- 도 5는 독소포자충 감염에 따른 뇌의 씨스트 및 몸무게의 변화를 측정한 것이다. (A) 및 (B)는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 생쥐를 독소포자충으로 감염시키고, 4주 경과 후 뇌 씨스트의 숫자 및 크기를 측정한 것이다. (C)는 감염에 따른 몸무게의 변화 및 생존율을 측정한 것이다.
- 도 6은 항체를 분비하는 비장 세포의 반응을 확인한 것이다. (A), (B), (C), (D)는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 생쥐를 독소포자충으로 감염시키고, 4주 경과 후 IgG, IgG1, IgG2a를 분비하는 세포의 반응을 확인한 것이다(*P < 0.05).
- 도 7은 T 세포 반응을 확인한 것이다. (A), (B), (C)는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 생쥐를 독소포자충으로 감염시키고 4주 경과 후 사이토카인을 분비하는 세포에서 IFN- γ , IL-6, IL-10의 수준을 측정한 것이다. (D), (E)는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 수준을 측정한 것이다(*P<0.05).
- 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0029] 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.
- [0030] 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.
- [0031] 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.
- [0032] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0033] 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 실험 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.
- [0034] 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 짝여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카복실 방향으로 짝여진다.

- [0035] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0037] 본 발명의 일 측면은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 톡소포자충 유래의 항원 결정 부위를 포함하는 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*) 바이러스-유사입자를 제공한다.
- [0038] 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.
- [0039] 특히, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이러스 유사입자는 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으며, 인플루엔자 바이러스 유래의 매트릭스 단백질 1(M1)을 구조 단백질로서 포함할 수 있다. 상기 바이러스 유사입자는 별도의 원인 감염체, 즉 톡소포자충 없이도 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으므로 높은 생산성 및 경제성이 구현될 수 있다.
- [0040] 상기 “인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1”은 인플루엔자 바이러스의 구조단백질로서, 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 구조단백질로서 널리 사용된다.
- [0041] 상기 바이러스-유사입자는 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1을 구조단백질로서 포함할 수 있으며, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 표면에는 톡소포자충에서 유래한 하나 이상의 항원 결정 부위를 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 바이러스-유사입자는 표면에 톡소포자충에서 유래한 항원 결정 부위를 포함하고 있으므로 특정 개체에 유입되었을 때 톡소포자충에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다. 따라서, 상기 바이러스-유사입자는 상기 개체에게 톡소포자충에 대한 면역력을 부여할 수 있다.
- [0043] 상기 바이러스 유사입자는 당해 기술 분야에 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 상기 바이러스 유사 입자는 상기 구조단백질 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.
- [0044] 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 톡소포자충에서 유래한 항원 결정 부위를 포함하고 있으나 그 외에 유전 물질은 포함하지 않으므로 증식이 불가능하고 독성이 없어 안전하므로 톡소포자충에 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.
- [0045] 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 톡소포자충에서 유래할 수 있으며, 상기 톡소포자충에 대한 면역 활성을 유도할 수 있으면 특별히 제한되지 않는다.
- [0046] 일 실시예에 있어서, 상기 항원 결정 부위는 톡소포자충에서 유래한 SAG1(Membrane-associated surface antigen), SAG2, GRA1(secreted dense-granule protein), GRA2, GRA4, GRA7, ROP1(rhoptry protein), ROP2, MIC1(Micronemal protein), MIC2, MIC4, MIC6, MIC7, MIC8, MIC9, MIC10, MIC11, M2AP(MIC2 associated protein), AMA1(Plasmodium apical membrane antigen 1), 및 BAG1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 내막 복합체 단백질(inner membrane complex; IMC)을 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 “내막 복합체 단백질(IMC)”은 원형질막의 기저를 이루는 평탄화 폐포를 구성하는 표면막 시스템으로서, 세포골격 네트워크와 연결되어 있다. 상기 내막 복합체 단백질은 기생체 복제, 세포 운동, 및 숙주 세포 침투에

있어서 중요한 역할을 수행한다. 상기 내막 복합체 단백질은 독소포자충 내에서 신규 세포의 형성에 관여하며, 복제된 염색질 및 세포기관은 세포 분열 과정으로서 골격의 조립과 밀접하게 관련된다(Sheffield and Melton, 1968).

- [0048] 특히, 본 발명자들은 상기 내막 복합체 단백질은 구조적 특성에 의해 항-독소포자충 항체의 생성을 효과적으로 유도하므로, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1과 융합된 형태로서 개체 내에 유입될 때 독소포자충에 대한 높은 수준의 면역성을 제공할 수 있음을 확인하였다.
- [0049] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되고, 상기 독소포자충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 독소포자충 유래의 항원 결정 부위는 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [0050] 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 상기 독소포자충 유래의 항원 결정 부위는 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 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. 상기 “실질적으로 동질의 생리활성”은 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 및 독소포자충 유래의 항원 결정 부위의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 독소포자충에 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, 텍스트로스, 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 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.
- [0057] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다. 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.

- [0059] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(M1)을 암호화하는 핵산 서열 및 독소포자충 유래의 항원 결정 부위를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 독소포자충 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터가 제공된다.
- [0060] 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.
- [0061] 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.
- [0062] 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, pGAP a A, pGAP a B, pGAP a C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6 a A, pPIC6 a B, pPIC6 a 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, PichiaPinkTM, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 또는 pYJ406일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 한편, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 독소포자충 바이러스-유사입자를 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 프로모터는 SBE4, 3TP, PAI-1, p15, p21, CAGA12, hINS, A3, NFAT, NFkB, AP1, IFNG, IL4, IL17A, IL10, GPD, TEF, ADH, CYC, INU1, PGK1, PHO5, TRP1, GAL1, GAL10, GUT2, tac, T7, T5, nmt, fbp1, AOX1, AOX2, MOX1 및 FMD1 프로모터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 숙주 세포 또는 발현 조건 등 다양한 변수를 고려하여 달리할 수 있다.
- [0065] 상기 독소포자충 바이러스-유사입자를 암호화하는 핵산 서열은 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결될 (operably linked) 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결될(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, 상기 독소포자충 바이러스-유사입자를 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.
- [0066] 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.
- [0067] 또한, 상기 발현 벡터는 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자 또는 형광 단백질 유전자일 수 있으며, 상기 항생제 저항성 유전자는 히그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 형광 단백질 유전자는 효모-강화 녹색 형광 단백질(yeast-enhanced green fluorescent protein; yEGFP) 유전자, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP) 유전자, 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein; BFP) 유전자, 및 적색 형광

단백질(red fluorescent protein; RFP) 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0069] 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.
- [0070] 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(wild-type host cell)는 재조합 방법에 의해 유전적으로 변화되지 않은 숙주 세포일 수 있다.
- [0071] 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 겐미탈리스(Anticarsa gemmatilis), 봄빅스 모리(Bombyx mori), 에스티그멘 아크레아(Estigmene acrea), 헬리오티스 비레센스(Heliothis virescens), 류카니아 세파라타(Leucania separata), 리만트리아 디스파(Lymantria dispar), 말라카소마 디스트리아(Malacasoma disstria), 맘메스트라 브라씨카에(Mamestra brassicae), 만두카 섹스타(Manduca sexta), 플루텔라 질로스텔라(Plutella zyllostella), 스토도프테라 엑시구아(Spodoptera exigua) 및 스포도프테라 리톨리스(Spodoptera littoralis)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0072] 상기 “대사 조작된(metabolically engineered)” 또는 “대사 조작(metabolic engineering)”은 미생물에서 알코올 또는 단백질과 같은 원하는 대사산물의 생산을 위하여, 생합성 유전자, 오피론과 연관된 유전자, 그리고 이들 핵산 서열의 제어 요소(control elements)의 합리적 경로 디자인과 어셈블리를 수반할 수 있다.
- [0073] 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 이중 발현 제어 서열과의 연관에 의해 변형됨으로써, 숙주(예컨대, 미생물)에 이중성일 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.
- [0074] 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.
- [0075] 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.
- [0076] 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.
- [0077] 한편, 상기 “형질 전환”은 상기 벡터를 미생물 또는 특정 세포 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 전환하고자 하는 세포가 원핵세포인 경우에는, CaCl₂ 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 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.

[0078] 형질 전환 하고자 하는 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecci, 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)), 리포솜-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.

[0079] 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.

[0081] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양 하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계;를 포함하는 독소포자충 바이러스-유사입자의 제조 방법이 제공된다.

[0082] 상기 형질 전환된 숙주 세포는 배치, 공급-배치 또는 연속 발효 조건 하에서 배양될 수 있으며, 상기 숙주 세포 는 형질 전환에 의해 상기 독소포자충 바이러스-유사입자를 발현할 수 있으므로 상기 배양된 숙주 세포로부터 상기 바이러스-유사입자 단백질을 수득할 수 있다.

[0083] 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. 특 정한 경우에서, 성장 매질의 상기 탄소원 내용물이 아닌, 상기 pH 및 산소 함량은 배치 방법 동안 변화될 수 있 다. 배치 시스템의 상기 대사물 및 세포 바이오매스는 끊임없이 발효가 정지될 때까지 변화할 수 있다. 배치 시 스템에서, 세포는 정지된 지체 상에서 고도성장 로그 상에 걸쳐 진척하고, 성장율이 감소되거나 멈춘 최종적으 로 정지 상에 이를 수 있다. 일반적인 기간에서, 로그 상의 상기 세포는 대부분의 단백질을 만들 수 있다.

[0084] 표준 배치 시스템의 변형은 "공급-배치 발효" 시스템이다. 상기 시스템에서, 영양(예를 들면, 탄소원, 질소원, O₂, 및 통상적으로, 다른 영양)은 이들의 배양물의 농도가 한계치 미만으로 떨어질 때 첨가될 수 있다. 공급-배 치 시스템은 이화 생성물 억제가 세포의 대사를 억제하고, 매질이 매질 내에서 영양소를 제한된 양으로 갖는 것 이 바람직할 때 유용할 수 있다, 공급-배치 시스템에서의 실제 영양 농도의 측정은 pH, 용존 산소 및 CO₂와 같 은 폐기가스의 부분압과 같은 측정 가능한 인자의 변화에 기초하여 예측될 수 있다. 배치 및 공급-배치 발효는 일반적인 시스템으로서 당업계에서 널리 알려져 있다.

[0085] 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.

[0086] 예를 들어, 탄소원 또는 질소원과 같은 제한 영양소는 고정된 속도로, 모든 다른 파라미터는 적당하게 유지될 수 있다. 다른 시스템에서, 많은 성장에 영향을 주는 인자는 배치 탁도에 의해 측정되는 세포 농도가 일정하게 유지되는 동안, 계속해서 변화할 수 있다. 계속적 시스템은 일정한 상태의 성장 조건을 유지하려고 한다. 따라 서, 매질이 빠져나가는 것에 의한 세포 손실은 발효에서의 세포 성장 속도에 대항하여 균형이 맞을 수 있다. 생 성물 형성의 속도를 최대화하는 기술뿐만 아니라, 계속적 발효 과정 동안 영양소 및 성장인자를 유지하는 방법 은 당업계에 알려져 있다.

[0087] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 본 발명의 기재내용에 기초하여 각 구성의 종류, 도입 비율 등을 변화 시켜 적용할 수 있을 것이며, 상기 변형에도 불구하고 동등한 기술적 효과가 구현되는 경우라면, 본 발명의 기 술적 사상에 포괄된다고 할 것이다.

- [0088] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0090] 제조예 1 : 독소포자충 바이러스-유사입자의 제조
- [0091] 독소포자충 내막 복합체 단백질(IMC)의 유전자는 정방향 프라이머(5'-AAAGAATTCACCATGGGGAACACGGCGTGCTG-3') 및 역방향 프라이머(5'-TTACTCGAGTTAGTTTCTGCTTGCTTGC-3')를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다.
- [0092] 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 정방향 프라이머(5'- AAAGAATTCACCATGAGTCTTCTAACCGAGGT-3') 및 역방향 프라이머(5'- TTACTCGAGTTACTCTAGCTCTATGTTGAC-3')를 이용하여 RT-PCR을 통해 증폭하였다. 상기 프라이머는 제한 효소 부위(EcoR I 및 Xho I)가 각각 도입되었다(도 1A, 1C).
- [0093] 상기 각 유전자는 pFastBac 벡터에 도입되었으며, EcoR I 및 Xho I 제한 효소로 커팅하여 IMC 및 M1 유전자의 도입 여부를 확인하였다(도 1B, 1D). 도입된 유전자의 핵산 서열은 DNA sequencing(Eurofins MWG Operon)에 의해 이전에 공개된 서열(IMC: HQ012579, M1: EF467824) 과 동일한 것으로 확인되었다.
- [0094] IMC 및 M1을 발현하는 재조합 바칼로바이러스(rBV)를 제조하기 위하여, DNA 형질 감염은 cellfectin II (Invitrogen) 및 SF9 세포에 의해 이루어졌으며, IMC 및 M1을 포함하는 pFastBac 벡터를 이용한 형질 전환은 white/blue 스크리닝에 의해 수행되었다. 바칼로바이러스는 Bac-to-Bac 발현 시스템(Invitrogen)를 통해 제조사의 매뉴얼에 따라 제조되었다.
- [0096] 제조예 2 : 독소포자충 바이러스-유사입자의 제조
- [0097] 독소포자충 바이러스-유사입자는 IMC 및 M1을 발현하는 재조합 rBV에 의해 공동-감염된 SF9 곤충 세포에서 생산되었다. 세포 배양액 상청액에 방출된 바이러스-유사입자는 불연속 수크로오스 구배(15%-30%-60%)를 통해 4℃, 28000 rpm에서 1시간 동안 수확되고 정제되었다.
- [0098] 30% 및 60% 사이의 바이러스-유사입자 밴드가 수집되고, 인산완충식염수(PBS)에 의해 희석되었으며, 4℃, 28000 rpm에서 1시간 동안 원심 분리되었다. 바이러스 유사입자는 4℃에서 PBS에 하룻밤 동안 재현탁 되었다.
- [0099] 바이러스 유사입자는 웨스턴 블랏 및 전자현미경법에 의해 확인되었다. 웨스턴 블랏 분석에서, 항체는 독소포자충 ME49 균주에 의해 감염된 마우스에서 수집되었다. M1 단백질의 함량은 항-M1 항체에 의해 결정되었다. 전자현미경법 및 사이즈 측정을 위해, 바이러스-유사입자는 매질 염색되었으며, 투과전자현미경(TEM)에 의해 관찰되었다.
- [0100] 바이러스-유사입자를 생산하는 SF9 세포는 대조군인 정상 세포보다 큰 것으로 확인되었다(도 2A, 2B). 전자현미경에 의해 바이러스-유사입자의 크기 및 형태는 표면에 스파이크가 형성된 구 형태로 관찰되었다(도 2C). IMC 및 M1의 바이러스 유사입자로 도입되었는지 확인하기 위하여, 항-독소포자충 다클론 항체 및 항-M1 단일클론 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다(도 2D).
- [0101] 결과적으로 IMC 및 M1을 발현하는 rBV에 의해 감염된 SF9 세포는 비리온과 형태 및 크기가 유사한 입자를 생성하는 것으로 확인되었다.
- [0103] 실험예 1 : 동물모델에서의 면역 유도 반응 시험
- [0104] 제조예 2의 바이러스-유사입자를 생쥐에 접종 후 유도되는 면역 반응을 확인하였다.
- [0105] 제조예 2의 바이러스-유사입자 백신 접종(Intranasal route) 후 생쥐로부터 정해진 시기에 혈액을 수집하였다. 독소포자충(*Toxoplasma gondii*, ME49) challenge infection(Oral, Intraperitoneal route) 시킨 후 ELISA법을 통해 혈청의 독소포자충 특이적 IgG, IgG1, IgG2a, 및 분변의 IgA 및 IgG 항체 형성 정도를 측정하였다(도 3).
- [0106] 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 생쥐의 총 IgG, IgG1, IgG2a 반응은 접종 후 1주 및 4주에 현저하게 증가하였으며, 이는 독소포자충 IMC-특이적 항체가 점진적으로 성숙되고 있음을 시사한다(도 3B, 3C, 3D). 또한, 분변에서 IgA 및 IgG 항체 반응이 음성 대조군과 비교하여 현저하게 증가하였으며, 이는 점막 면역이 유도되었음을 의미한다(도 3E, 3F).
- [0107] 감염(challenge infection)에 따른 혈청, 분변, 장(intestine)의 항체 반응 프로파일을 확인하기 위해, 상기

바이러스-유사입자 접종 4주 경과 후 톡소포자충 씨스트(ME49)를 경구를 통해 감염시켰다. 톡소포자충 감염에 의해 혈청에서 매우 높은 수준의 IgG, IgG1, IgG2a 항체 반응이 관찰되었다($P < 0.05$, 도 4A, 4B, 4C).

[0108] 또한, 비강 내 면역은 점막 경로(mucosal route)에 의해 유도되는 것으로 예측되었으므로, 분변 및 장의 점막에서 톡소포자충-특이적 IgA 및 IgG 항체 반응을 측정하였다. 측정 결과, 매우 높은 수준의 톡소포자충-특이적 IgA 및 IgG 항체가 분변(도 4D, 4E, $*P < 0.05$) 및 장(도 4F, 4G, $*P < 0.05$)에서 각각 확인되었다. 상기 결과는 IgA 및 IgG 항체가 톡소포자충의 감염에 의해 매우 빠르게 형성되었음을 의미한다.

[0109] 상기 결과는 제조예 2의 바이러스-유사입자는 톡소포자충에 대한 높은 면역성을 제공하고, 톡소포자충의 감염에 반응하여 조직 계통 및 점막의 항체 반응을 효과적으로 유도할 수 있음을 시사한다.

[0111] 실험예 2 : 방어적 면역 효과 시험

[0112] 제조예 2의 바이러스-유사입자를 생쥐에 접종 후 유도되는 방어적 면역 효과를 확인하였다.

[0113] 제조예 2의 바이러스-유사입자 백신 접종 후 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*, ME49)을 감염시킨(challenge infection) 생쥐를 4주 후 희생시키고 뇌의 씨스트(cyst)의 양과 크기를 분석하였다.

[0114] 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 생쥐는 경구(oral) 혹은 복강경로(IP) 감염 후 음성 대조군과 비교하여 높은 방어 면역(protective immunity)을 나타내었다. 특히, 뇌 씨스트 수가 현저히 감소하였으며(도 4A, $*P < 0.05$), 씨스트 크기도 현저하게 감소하였다(도 5A, 5B, 감소율: 60%, $*P < 0.05$).

[0115] 또한, 톡소포자충 감염에 의해 몸무게의 변화를 측정한 결과, 면역성이 형성된 생쥐는 감염에도 불구하고 몸무게가 증가하였으나 음성 대조군은 몸무게가 감소하거나 사망하였다(도 5C). 음성 대조군, 즉 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성되지 않은 생쥐의 생존율은 60%에 불과하였다(도 5D).

[0116] 상기 결과는 바이러스-유사입자가 톡소포자충 감염에 대한 방어적 면역 효과를 유도할 수 있음을 시사한다.

[0118] 실험예 3 : 항체-분비 세포 반응, 사이토카인 생산 및 T 세포 반응 시험

[0119] 제조예 2의 바이러스-유사입자를 생쥐에 접종 후 항체-분비 세포 반응을 확인하였다.

[0120] 톡소포자충에 의해 감염된 비장 세포를 수집한 후 *in vitro* 배양하였다. 톡소포자충의 감염에 의해 면역성이 형성된 생쥐의 비장 세포는 음성 대조군과 비교하여 현저하게 높은 수준의 톡소포자충-특이적 IgG, IgG1, IgG2a를 배양액(supernatant)에 분비하였다(도 6A, 6B, 6C, $*P < 0.05$). 또한, 동일한 배양액의 상청액에 함유된 IgA 항체를 분석한 결과, 4일 경과 후 톡소포자충-특이적 IgA 항체 수준이 매우 높게 나타났다.

[0121] 또한, 상기 바이러스-유사입자를 생쥐에 접종 후 톡소포자충 감염에 따른 사이토카인 생성 및 T 세포 반응을 확인하였다.

[0122] 사이토카인 생산 정도를 측정하기 위해, 감염 후 1개월 뒤 지라세포(splenocytes)를 수득하였다. 사이토카인을 분비하는 세포에서 IFN- γ , IL-6, IL-10의 수준을 측정하였다. 톡소포자충-항원 자극에 의해 면역성이 형성된 생쥐의 지라세포는 음성 대조군과 비교하여 현저하게 높은 수준의 IFN- γ , IL-6, IL-10을 생산하였다(도 7A, 7B, 7C, $*P < 0.05$).

[0123] 면역성이 형성된 생쥐는 감염에 의해 더 높은 수준의 Th1/Th2 사이토카인 반응을 유도하였으며, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 수준이 현저하게 증가되었다(도 7D, 7E, $*P < 0.05$).

[0124] 즉, 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 형성된 생쥐는 톡소포자충의 감염에 대한 매우 높은 수준의 면역성을 획득할 수 있다.

[0126] 실험예 4 : 항원 결정 부위 치환에 따른 면역 유도 효과 시험

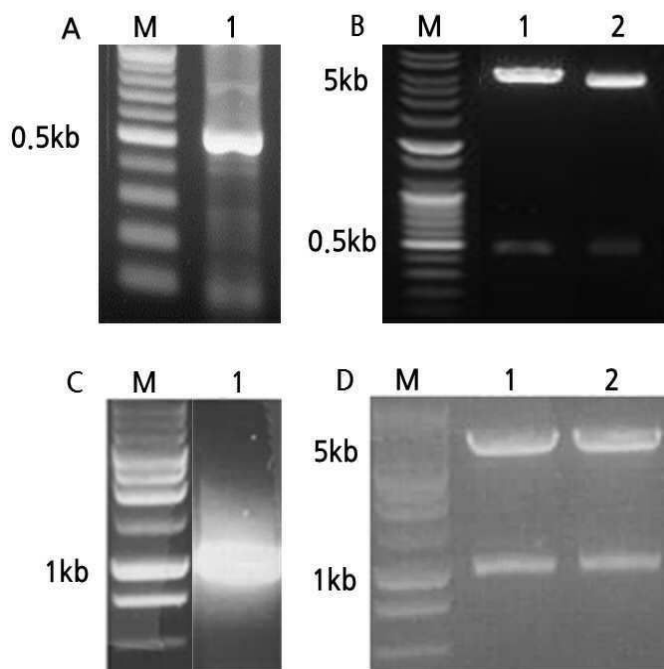
[0127] 제조예 1 및 2에서 사용된 IMC 단백질을 SAG1(Membrane-associated surface antigen 1), GRA1(Secreted dense-granule protein 1), GRA4(Secreted dense-granule protein 4), ROP1(Rhoptry protein 1), ROP2(Rhoptry protein 2), MIC1(Micronemal protein 1), 및 MIC8(Micronemal protein 8)로 각각 치환하고 실험예 1 내지 3을

반복하였다.

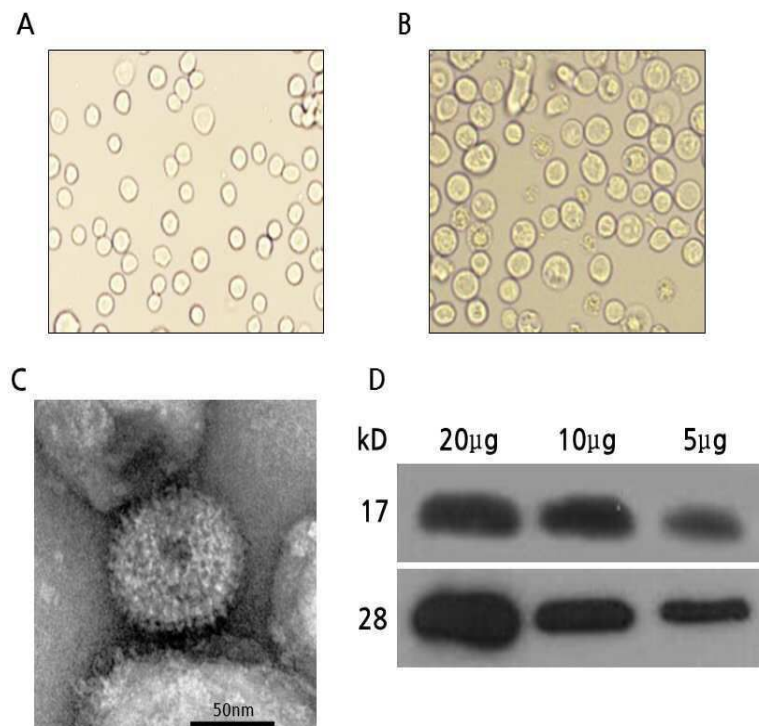
- [0128] 실험 결과, 상기 바이러스-유사입자는 항원 결정 부위를 달리했을 때 유도되는 면역 반응 효과는 일부 차이가 있었으나, 동물모델에서 면역 반응 및 항체-분비 세포 반응을 효과적으로 유도하였으며, 독소포자충 감염에 따른 사이토카인 생성 및 T 세포 반응이 확인되었다.
- [0129] 특히, 상기 바이러스-유사입자에 의해 면역성이 유도된 생쥐는 높은 수준의 IFN- γ , IL-6, IL-10을 생산하였으며, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 수준이 현저하게 증대되었다.
- [0130] 즉, 상기 바이러스-유사입자는 인플루엔자 바이러스 유래의 매트릭스 단백질 1(M1)을 구조 단백질로서 포함하고, 표면에 독소포자충에서 유래한 항원 결정 부위를 포함하고 있으므로 특정 개체에 유입되었을 때 독소포자충에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0131] 또한, 상기 바이러스-유사입자는 항원 결정 부위를 달리하더라도, 면역 반응을 효과적으로 유도하였으므로 독소포자충에 대한 백신으로 사용될 수 있다.
- [0132] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0133] 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

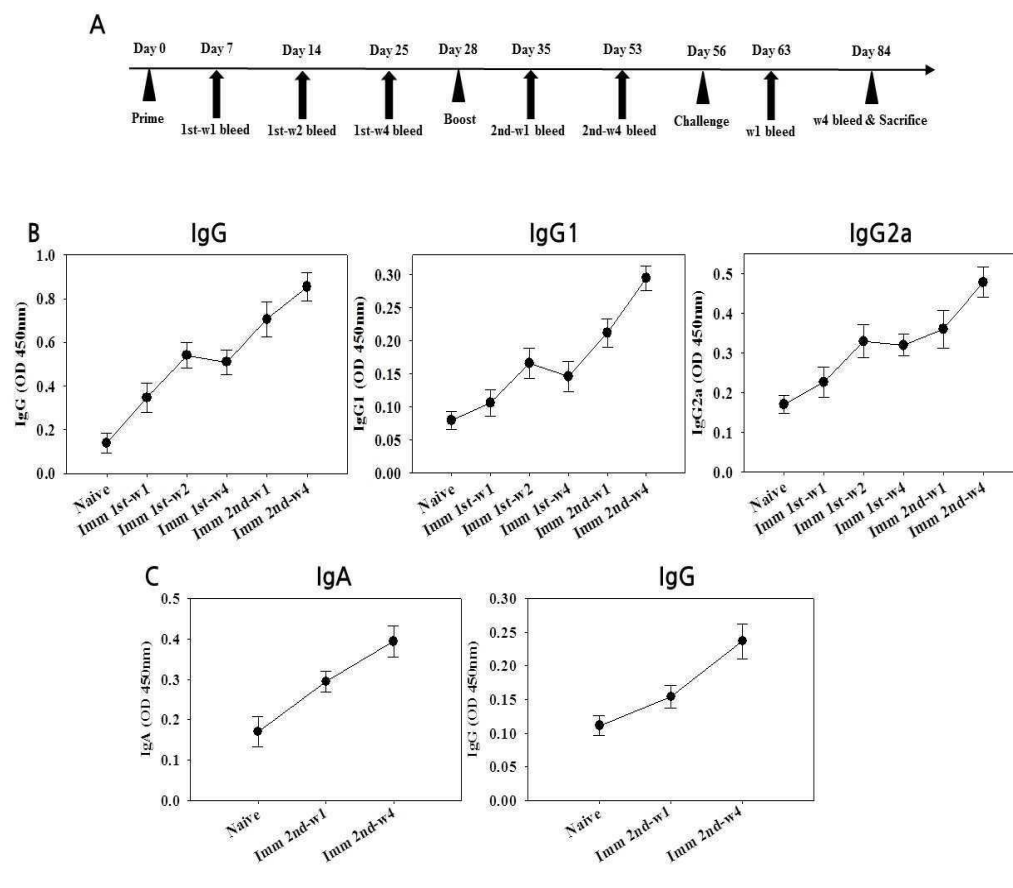
도면1



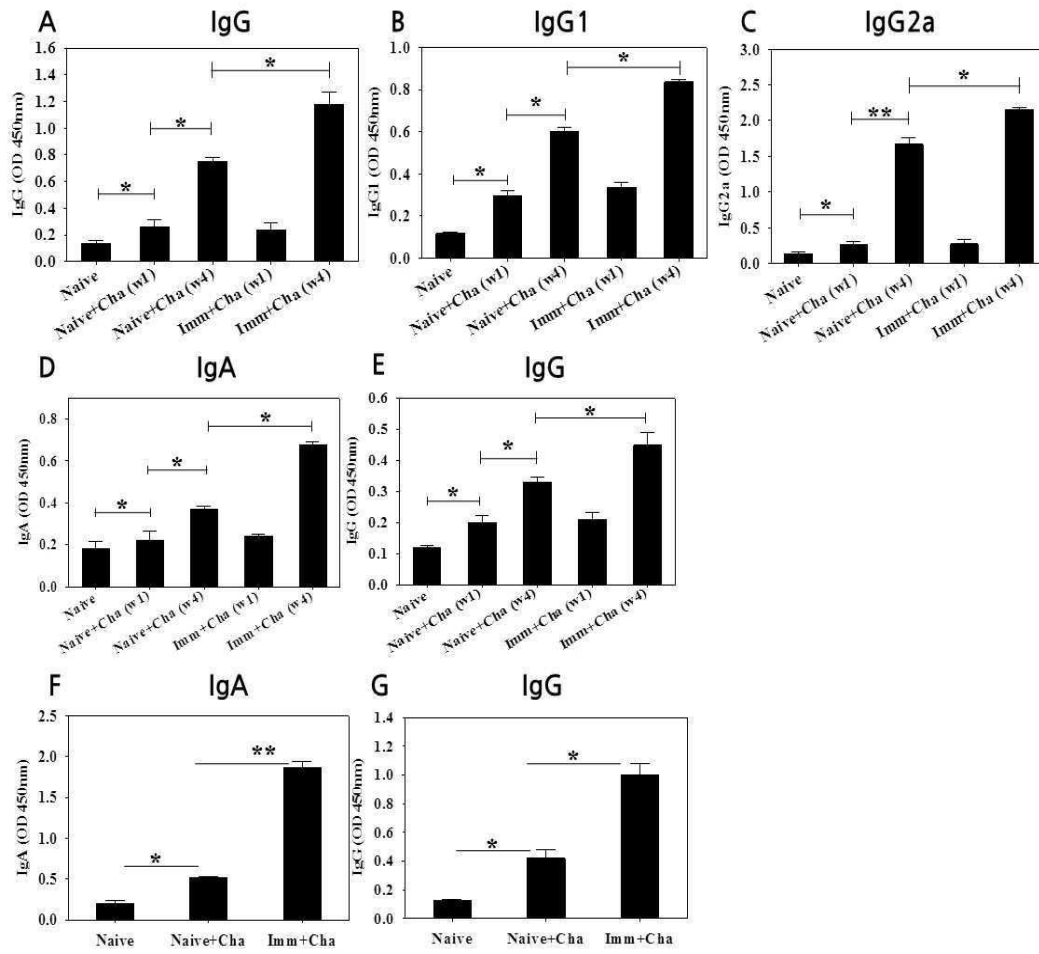
도면2



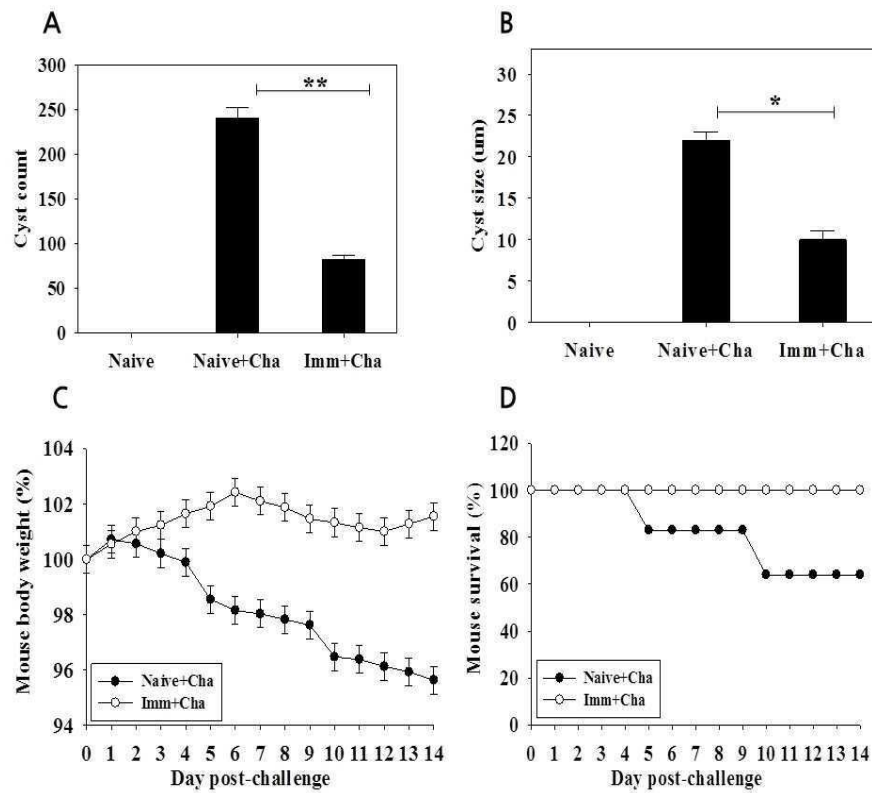
도면3



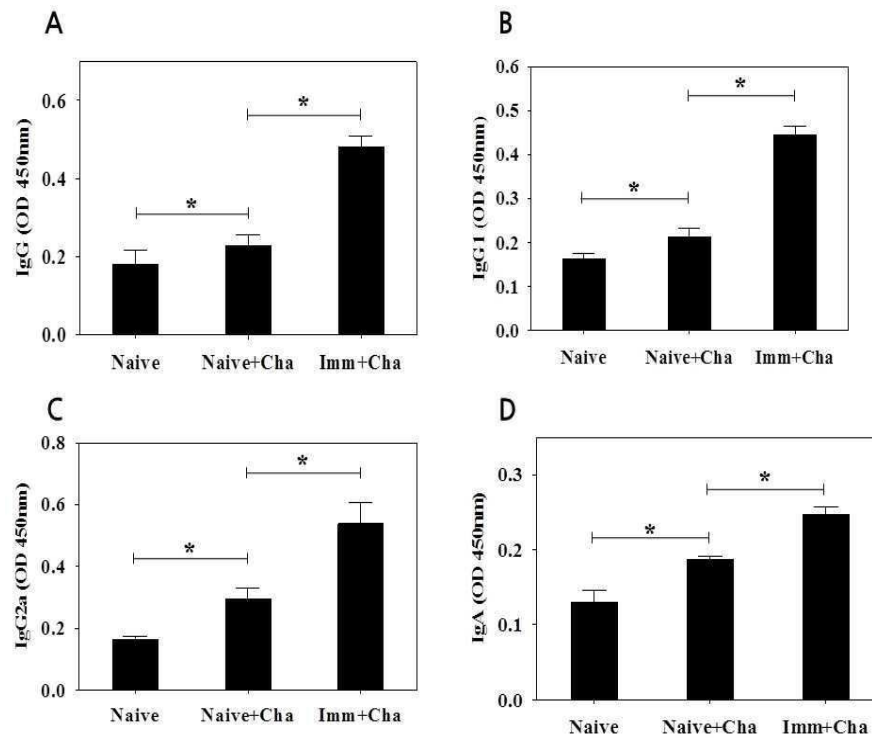
도면4



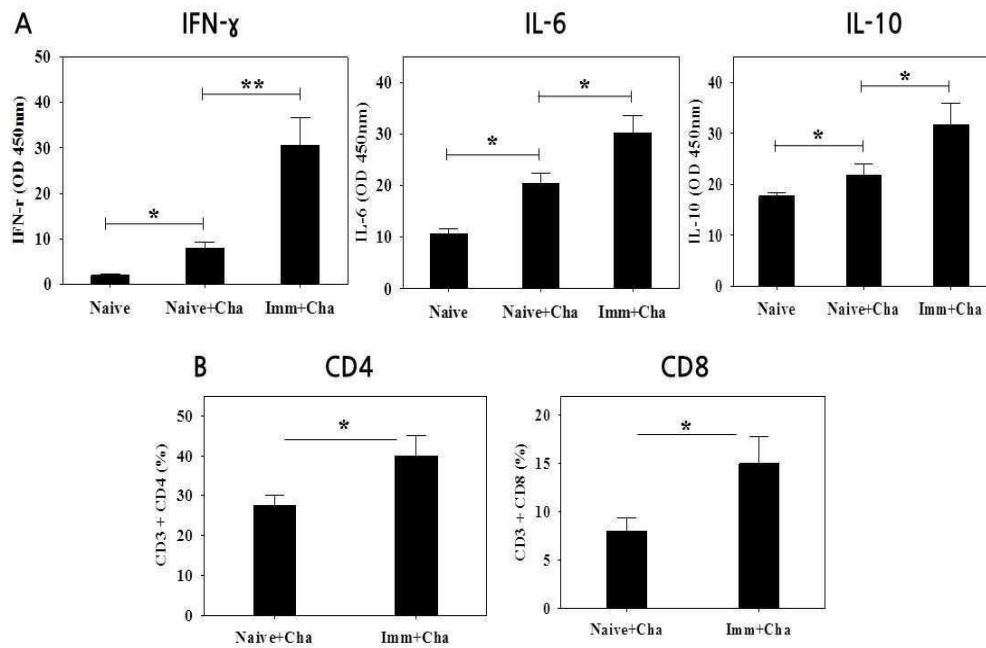
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> Kyung-Hee University
- <120> TOXOPLASMA GONDII VIRUS-LIKE PARTICLE, EXPRESSION VECTOR AND METHOD FOR PREPARING THE SAME
- <130> 2016-PP-10047
- <160> 4
- <170> KoPatent In 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> 164

<212> PRT

<213> Toxoplasma gondii

<400> 2

Met Gly Asn Thr Ala Cys Cys Gly Phe Asp Ser Asp Ser Thr Ala Asp
1 5 10 15
Leu Glu Ile Gly Arg Glu Gly Glu Val Arg Ser Arg Lys Pro Ile Gln

20 25 30
Val Ser Lys Glu Ala Phe Asp Asn Trp Met Asn Arg Tyr Glu Ala Gly
35 40 45
Asp Thr Met Glu Val Leu Phe Pro Asp Gly His Arg Ile Glu Cys Asn

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

Phe Ser Phe Lys Asp Ile Thr Asp Ala Gln Cys Phe Val Ser Phe Leu
130 135 140
Asp Asp Glu Ile Lys Lys Asn Gln Glu Ser Asn Lys Ser Ser Ala Ser
145 150 155 160
Asn Asp Arg Asn

<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

tgcaggaag aacaccgac ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct 180

gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgcgcg 240

aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgccttaat gggaacgggg atccaaataa 300

catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc 360

caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata 420

caacaggatg ggggctgtga cactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga 480

acagattgct gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact	540
aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaa	600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaa	660
ggtgcaagcg atgagaacca ttggaactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga	720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa	780
gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc	840
ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatctacc gtgcctttta atacggactg aaaggagggc	900
cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagt	960
ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actacctgt	1020
ttctact	1027
<210> 4	
<211> 495	
<212> DNA	
<213> Toxoplasma gondii	
<400> 4	
atggggaaca cggcgtgctg cggtttcgac agtgactcta ctgctgacct cgagatcgg	60
cgagaggggg aagtgcggag tcgcaaacca attcaggtat ccaaagaggc gtttgaca	120
tggatgaatc gttatgagcg cggagacacg atggaagtgc ttttctga tggtcaccga	180
attgagtgtg acttgaaaat cgaccgaccg aaaaacttca tgaatctcac cttcaatcag	240
aaagtaagac ccatccagct ggatgacatt gcagctgtcc tatatggctc ggatcctcgc	300
agttccgaat gcgcagatag caaaatgctg cgaaaccctt gtgtcgtggg cttccgcctc	360
gcgagctctg gacgagccat cgcgttttct tttaaagaca tcacggacgc gcagtgtttt	420
gtgtctttcc tggacgacga aatcaagaag aatcaggagt caaacaagtc ttcagcaagc	480
aacgacagaa actaa	495