



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0107426
(43) 공개일자 2023년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/215 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/215 (2013.01)
A61K 9/1271 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0002487

(22) 출원일자 2022년01월07일

심사청구일자 2022년12월23일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

신관우

서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 106동 2002호

박현

서울특별시 마포구 백범로 8 우정마샹스 오피스텔 840호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인에스알비, 윤대웅

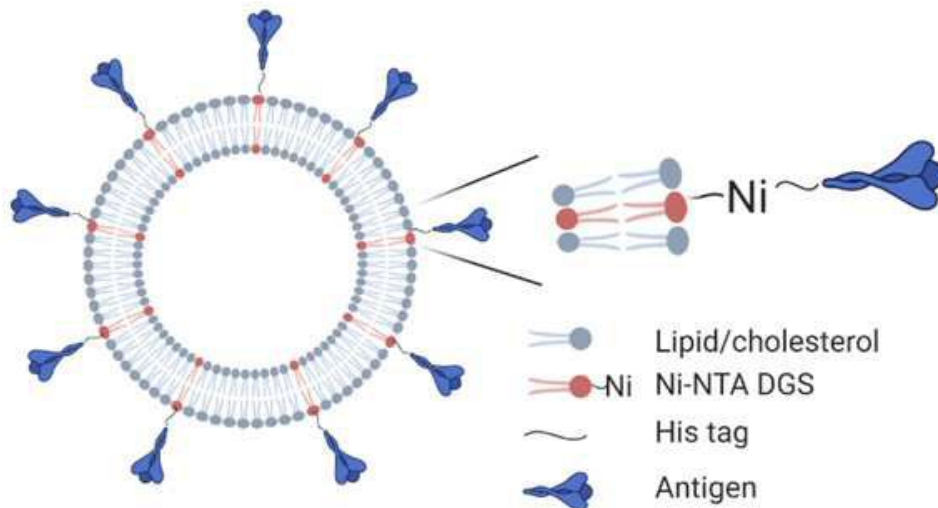
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 스파이크 단백질이 결합된 리포솜 바이러스 유사입자 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 표면에 재조합 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질)이 결합된 리포솜(liposomal) 바이러스 유사입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 상기 바이러스 유사입자는 항원의 특성을 나타내면서도 바이러스 유전 물질은 포함하지 않아 전염성이 없으므로, 이를 효과적으로 항원 운반체 또는 백신 후보물질로 이용 가능하고, 또는 면역 시스템 연구에 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)
A61P 31/14 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 2039/5258 (2013.01)
A61K 2039/60 (2013.01)
C12N 2770/20023 (2013.01)
C12N 2770/20033 (2013.01)

김창호

서울특별시 도봉구 삼양로162가길 42-12, 226동
 401호

(72) 발명자

규엔, 호영 탄

서울특별시 마포구 고산18길 40-10, 1층 1호 (대흥
 동)

편나운

경기도 의정부시 동일로 397, 202-1104

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345331324
과제번호	2018R1A6A1A03024940
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원사업
연구과제명	분자 자가 조립 기반 기능성 인공세포 구현
기 여 율	20/100
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711141374
과제번호	2021K1A4A8A0207922211
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	동북아 R&D 허브 기반구축
연구과제명	서강-하버드-SDU BioHybrid 공동 연구센터
기 여 율	20/100
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2021.07.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2021400000
과제번호	20214000000500
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지인력양성사업(RCMS)
연구과제명	녹색성장을 위한 CCUS 전문인력양성
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415167874
과제번호	20194010201910
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지인력양성(R&D)
연구과제명	Cx가스 전환을 통한 에너지화 및 화학제품 생산 연계 핵심기술 고급트랙
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

항원 전달체; 및 항원 전달체의 표면에 결합된 바이러스 표면 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원 전달체는 리포솜(liposome), 올레오솜(oleosome), 에토솜(ethosome), 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymerosome), 콜로이드솜(colloidosome), 밀리스포어(millisphere), 마이크로스피어(microsphere), 나노스피어(nanosphere), 밀리캡슐(millicapsule), 마이크로캡슐(microcapsule) 및 나노캡슐(nanocapsule)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 바이러스 표면 단백질은 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질), 헤마글루티닌(hemmagglutinin; HA) 및 F 단백질(F protein)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항원 전달체 및 바이러스 표면 단백질은 이작용성(bifunctional) 킬레이팅 작용기에 의해 결합된 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 5

항원 전달체의 표면에 바이러스 표면 단백질을 결합시키는 결합 단계를 포함하는 바이러스 유사입자의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항원 전달체는 리포솜(liposome), 올레오솜(oleosome), 에토솜(ethosome), 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymerosome), 콜로이드솜(colloidosome), 밀리스포어(millisphere), 마이크로스피어(microsphere), 나노스피어(nanosphere), 밀리캡슐(millicapsule), 마이크로캡슐(microcapsule) 및 나노캡슐(nanocapsule)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 바이러스 표면 단백질은 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질), 헤마글루티닌(hemmagglutinin; HA) 및 F 단백질(F protein)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이러스 유사입자.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 결합 단계는 다음 단계로 이루어진 것인, 바이러스 유사입자의 제조 방법:

항원 전달체의 표면에 킬레이팅 작용기를 도입시키는 킬레이팅 단계; 및

킬레이팅 작용기가 도입된 항원 전달체의 표면에 상기 킬레이팅 작용기와 특이적으로 결합하는 작용기를 포함하는 단백질을 부착시키는 단백질 부착 단계.

청구항 9

항원 전달체; 및 항원 전달체의 표면에 결합된 바이러스 표면 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자를 포함하는 백신 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항원 전달체는 리포솜(liposome), 올레오솜(oleosome), 에토솜(ethosome), 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymersome), 콜로이드솜(colloidsome), 밀리스포어(millisphere), 마이크로스피어(microsphere), 나노스피어(nanosphere), 밀리캡슐(millicapsule), 마이크로캡슐(microcapsule) 및 나노캡슐(nanocapsule)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이러스 유사입자를 포함하는 백신 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 바이러스 표면 단백질은 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질), 헤마글루티닌(hemmagglutinin; HA) 및 F 단백질(F protein)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이러스 유사입자를 포함하는 백신 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 항원 전달체 및 바이러스 표면 단백질은 이작용성(bifunctional) 킬레이팅 작용기에 의해 결합된 것인, 바이러스 유사입자를 포함하는 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 스파이크 단백질이 결합된 리포솜 바이러스 유사입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 리포솜의 표면에 Ni 킬레이팅(chelating) 방법을 이용하여 항원으로 사용하고자 하는 바이러스의 재조합 스파이크 단백질을 결합시킨 바이러스 유사입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 리포솜(liposome) 시스템은 가장 잘 알려진 운반체(delivery cargo) 중 하나이다. 기존의 리포솜에는 전달하는 약물이나 소분자가 포함되어 있으나, 리포솜 기술에 대한 연구는 몇 가지 추가적인 기능을 가진 차세대를 향해 나아가고 있다.

[0003] 리포솜 표면의 단백질 어레이는 특정 세포를 표적으로 삼을 수 있으며, 이를 이용하여 리포솜에 다중 기능을 도입함으로써 약물 전달과 결합하면 특정 세포에 대한 약물 전달 효율을 높일 수 있다.

[0004] 또한, 이러한 종류의 리포솜은 바이러스 유사 입자 또는 바이러스 모델이라고 하는 특정 단백질과 조합하여 관련된 질병 모델에 사용할 수 있다.

[0005] 특히 신종 코로나바이러스 감염증(coronavirus disease 2019; COVID-19)의 등장으로 바이러스에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 바이러스 연구에서의 가장 큰 장애요소는 전염성이 높다는 점인데, 항원의 주요 구성 요소를 사용하여 바이러스와 매우 유사함에도 불구하고 바이러스 유전 물질이 포함되어 있지 않은 바이러스 유사 입자를 활용할 경우 전염성을 배제할 수 있다.

[0006] 이와 같이 제조된 바이러스 모델은 항원 운반체로서 일종의 서브 유닛 백신보다 더 우수한 백신 후보가 될 수 있고 면역 분석을 테스트하는 데 사용할 수 있다. 또한, 제어된 항원 배열을 가진 이러한 종류의 바이러스 모델은 면역 시스템 연구에도 기여할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 리포솜의 표면에 Ni 킬레이팅(chelating)을 수행하고 항원으로 재조합 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질)을 결합시킴으로써, 바이러스의 다양한 요소를 포함하고 있지만 전염성이 제거된 바이러스 유사입자를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 항원 전달체; 및 항원 전달체의 표면에 결합된 바이러스 표면 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 항원 전달체의 표면에 바이러스 표면 단백질을 결합시키는 결합 단계를 포함하는 바이러

스 유사입자의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 항원 전달체; 및 항원 전달체의 표면에 결합된 바이러스 표면 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자를 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 표면에 재조합 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질)이 결합된 리포솜(liposomal) 바이러스 유사입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 바이러스 유사입자는 바이러스의 여러 요소를 갖추고 있어 항원으로서의 특징을 가지나 전염성이 제거되었다는 특징을 나타낸다.

[0012] 본 발명자들은 리포솜의 표면에 Ni 킬레이팅(chelating)을 수행하고 항원으로 재조합 스파이크 단백질을 결합시킴으로써 바이러스 유사입자를 제조하였다.

[0013] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0014] 본 발명의 일 양태는 항원 전달체; 및 항원 전달체의 표면에 결합된 바이러스 표면 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자이다.

[0015] 본 발명에 있어서 상기 항원 전달체는 리포솜(liposome), 올레오솜(oleosome), 에토솜(ethosome), 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymersome), 콜로이드솜(colloidsome), 밀리스포어(millisphere), 마이크로스피어(microsphere), 나노스피어(nanosphere), 밀리캡슐(millicapsule), 마이크로캡슐(microcapsule) 및 나노캡슐(nanocapsule)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 리포솜인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명에 있어서 상기 바이러스 표면 단백질은 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질), 헤마글루티닌(hemmaglutinin; HA) 및 F 단백질(F protein)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 스파이크 단백질인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에 있어서 상기 항원 전달체 및 바이러스 표면 단백질은 이작용성(bifunctional) 킬레이팅 작용기에 의해 결합된 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 킬레이팅 작용기는 전이금속 킬레이팅 작용기이며, 상기 전이금속은 2가 이온으로서 Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 상기 킬레이팅 작용기는 Ni 킬레이팅 작용기인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 상기 항원 전달체는 바이러스의 재조합 캡시드 단백질(Nucleocapsid protein; N 단백질) 또는 메신저 리보 핵산 물질(mRNA, S 단백질의 수용체 결합영역(Receptor Binding Domain)을 코딩하는 서열)을 리포솜 내부에 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에서, 바이러스 유사입자는 리포솜의 표면에 Ni 킬레이팅 작용기를 도입시키고, 이에 특이적으로 결합하는 작용기를 포함하는 재조합 S 단백질을 결합시킨 것일 수 있다. 상기 킬레이팅 작용기는 이작용성 킬레이팅 작용기로서, 한 쪽 말단은 리포솜의 표면에 결합하고 다른 한 쪽 말단은 킬레이팅 작용기에 특이적으로 결합하는 작용기와 결합할 수 있다. 상기 Ni 킬레이팅 작용기에 특이적으로 결합하는 작용기는 이미다졸(Imidazole)기인 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 양태는 항원 전달체의 표면에 바이러스 표면 단백질을 결합시키는 결합 단계를 포함하는 바이러스 유사입자의 제조 방법이다.

[0021] 본 발명에 있어서 상기 항원 전달체는 리포솜, 올레오솜, 에토솜, 마이셀, 폴리머솜, 콜로이드솜, 밀리스포어, 마이크로스피어, 나노스피어, 밀리캡슐, 마이크로캡슐 및 나노캡슐로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 리포솜인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에 있어서 상기 바이러스 표면 단백질은 스파이크 단백질, 헤마글루티닌 및 F 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 스파이크 단백질인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에 있어서 상기 결합 단계는 다음 단계로 이루어진 것일 수 있다:

[0024] 항원 전달체의 표면에 킬레이팅 작용기를 도입시키는 킬레이팅 단계; 및

[0025] 킬레이팅 작용기가 도입된 항원 전달체의 표면에 상기 킬레이팅 작용기와 특이적으로 결합하는 작용기를 포함하

는 단백질을 부착시키는 단백질 부착 단계.

- [0026] 바람직하게는 상기 킬레이팅 작용기는 전이금속 킬레이팅 작용기이며, 상기 전이금속은 2가 이온으로서 Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 상기 킬레이팅 작용기는 Ni 킬레이팅 작용기인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 킬레이팅 작용기는 이작용성 킬레이팅 작용기로서, 한 쪽 말단은 리포솜의 표면에 결합하고 다른 한 쪽 말단은 킬레이팅 작용기에 특이적으로 결합하는 작용기와 결합할 수 있다.
- [0028] 상기 단백질 부착 단계는 상기 킬레이팅 작용기와 특이적으로 결합하는 이미다졸기를 포함하는 단백질을 부착시킴으로써 수행되는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태는 항원 전달체; 및 항원 전달체의 표면에 결합된 바이러스 표면 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자를 포함하는 백신 조성물이다.
- [0030] 본 발명에 있어서 상기 항원 전달체는 리포솜, 올레오솜, 에토솜, 마이셀, 폴리머솜, 콜로이드솜, 밀리스포어, 마이크로스피어, 나노스피어, 밀리캡슐, 마이크로캡슐 및 나노캡슐로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 리포솜인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에 있어서 상기 바이러스 표면 단백질은 스파이크 단백질, 헤마글루티닌 및 F 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 스파이크 단백질인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서 상기 항원 전달체 및 바이러스 표면 단백질은 이작용성 킬레이팅 작용기에 의해 결합된 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 킬레이팅 작용기는 전이금속 킬레이팅 작용기이며, 상기 전이금속은 2가 이온으로서 Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 상기 킬레이팅 작용기는 Ni 킬레이팅 작용기인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 항원 전달체는 바이러스의 재조합 캡시드 단백질 또는 메신저 리보 핵산물질을 코딩하는 서열을 리포솜 내부에 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명은 표면에 재조합 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질)이 결합된 리포솜(liposomal) 바이러스 유사입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 상기 바이러스 유사입자는 항원의 특성을 나타내면서도 바이러스 유전 물질은 포함하지 않아 전염성이 없으므로, 이를 효과적으로 항원 운반체 또는 백신 후보물질로 이용 가능하고, 또는 면역 시스템 연구에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 리포솜의 표면에 Ni 킬레이팅(chelating)을 수행한 후 항원을 배열한 바이러스 유사입자를 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이러스 유사입자의 형태를 재조합 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질)의 표면 배열 여부를 구분하여 투과전자현미경(Cryogenic transmission electron microscopy; Cryo-TEM)으로 촬영한 사진이다.
- 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이러스 유사입자의 형광도(fluorescence)를 측정하여 나타낸 형광 광도계(fluorometer) 분석 결과 그래프이다.
- 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이러스 유사입자의 단면부를 공초점 현미경(Confocal observation on GU)으로 촬영한 사진이다.
- 도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이러스 유사입자의 크기를 측정하여 나타낸 DLS(dynamic light scattering) 분석 결과 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이러스 유사입자의 표면 항원의 투입량 대비 바이러스 유사입자의 크기의 관계를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이러스 유사입자의 표면에 결합된 항원의 검출 여부를 확인한 키트 분석 결과 사진이다.

도 6a는 본 발명의 실시예 3에 따라 제조된 A에 대하여 항원 부착여부를 확인한 키트 분석 결과 사진이다.

도 6b는 본 발명의 실시예 3에 따라 제조된 B에 대하여 항원 부착여부를 확인한 키트 분석 결과 사진이다.

도 6c는 본 발명의 실시예 3에 따라 제조된 C에 대하여 항원 부착여부를 확인한 키트 분석 결과 사진이다.

도 6d는 본 발명의 실시예 3에 따라 제조된 D에 대하여 항원 부착여부를 확인한 키트 분석 결과 사진이다.

도 6e는 본 발명의 실시예 3에 따라 제조된 E에 대하여 항원 부착여부를 확인한 키트 분석 결과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0039] 실시예 1: Ni 킬레이팅을 수행한 리포솜 및 이의 분석

[0040] 1-1. 항원 배열법

[0041] 도 1과 같이 직경 100 nm 정도의 리포솜 표면에 Ni 킬레이팅(chelating)을 수행 후 항원을 배열하였다. Ni 킬레이팅에 이용된 Ni NTA-His 태그 상호 작용은 Ni-NTA와 이미다졸기(poly His-tag)의 강한 결합력으로 잘 알려져 있는 강력한 상호 작용이다. Ni 킬레이팅을 수행한 리포솜의 표면에는 Ni 이온이 첨가되어 있어 이미다졸기가 존재하는 단백질을 잡아둘 수 있는 기능을 나타낸다.

[0042] 구체적으로, 최초 리포솜 형성시 특정 인지질인 18:1 DGS-NTA(Ni)(790404C)(Avanti polar lipid)를 투입하여 킬레이팅함으로써 리포솜 표면에 Ni를 배열하였다.

[0043] 항원의 경우 이미다졸기를 포함하는 스파이크 단백질로서 코로나19의 핵심 항원 성분으로 mRNA 백신의 표적 단백질로도 사용되는 스파이크 단백질(Spike protein; S 단백질)(SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike S1+S2 ECD(R683A, R685A, F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P)-His Recombinant Protein(CAT# 40589-V08H4), Sino biological)을 사용하였다.

[0044] 이렇게 Ni가 도입된 리포솜의 외부에 단백질 용액을 후첨가하여 리포솜 표면의 Ni^{2+} 와 이미다졸기(poly His-tag)간의 상호작용을 통하여 항원을 리포솜의 표면에 일정한 방향으로 배열하였다.

[0045] 바이러스 유사입자의 형태를 확인하기 위하여, S 단백질의 표면 배열 여부를 구분하고 리포솜의 형태를 투과전 자현미경(Cryogenic transmission electron microscopy; Cryo-TEM)으로 관찰하여 촬영한 후 도 2와 같이 나타 내었다. (Scale bar: 100 nm)

[0047] 1-2. 항원 배열 여부의 확인

[0048] 상기 1-1과 같이 리포솜 표면에 단백질 배열을 수행하되, 상기 단백질로는 이미다졸기를 포함한 녹색형광단백질 (Green fluorescence protein)을 사용하였다. 이후 필터(Amincon filter)를 이용하여 100 kDa 이하의 단백질을 걸러져 내려오게 함으로써 녹색형광단백질이 부착되지 않은 단백질을 제거하고, 형광 광도계(fluorometer), 공 초점 현미경(Confocal observation on GUV) 및 DLS(Size, ζ potential, aggregation) 분석 방법으로 관찰 및 분석하였다.

[0049] 도 3a 및 3b에서 확인할 수 있듯이, 리포솜(적색)의 표면을 따라 녹색형광단백질(녹색)이 부착되어 리포솜의 표 면에서 노란색이 관찰되었다. 표면에 부착되지 않았을 가능성이 있는 단백질을 제거했음에도 형광이 검출되었으 므로, 형광 단백질이 리포솜의 표면에 부착되었음을 알 수 있다. 이에 따라 Ni 킬레이팅을 통하여 리포솜의 표 면에 이미다졸기를 포함한 단백질을 부착할 수 있음을 확인하였다.

[0050] 도 3c에서 확인할 수 있듯이, 리포솜의 크기가 증가(전: 청색, 후: 적색)하였으므로 리포솜의 표면에 단백질이 부착되었을 것으로 추정할 수 있다.

[0052] 실시예 2: 단백질량 및 리포솜 직경(DLS) 측정

[0053] 리포솜 크기와 회석도와의 관계를 확인하기 위하여, S 단백질을 배양하여 크기 차이를 측정하였다.

[0054] 구체적으로, 형성된 리포솜 용액 50 μ L(5 mg/mL)와 S 단백질을 최종 용액의 부피가 1 mL가 되도록 2시간 동안 약 500 RPM으로 교반하였다. 리포솜과 단백질의 비율은 Ni:단백질 비율로 표시하여 표 1에 나타내었다.

표 1

단백질(μ g)	Ni:단백질 비율	직경(nm)	PDI	직경 증가분(nm)
0	-	141.9	0.038	0.0
5	200:1	146.3	0.041	4.4
10	100:1	149.8	0.060	7.9
20	50:1	160.4	0.044	18.5
50	20:1	168.0	0.022	26.1

[0056] 표 1 및 도 4에서 확인할 수 있듯이, 리포솜은 S 단백질 배양(protein incubation) 후 약 13 nm 정도의 크기 증가를 보였으며, 상기 크기 차이는 분자량(138.5 kDa) 척도에 비례한다. 크기가 증가한 만큼 S 단백질이 Ni 킬레이트 리포솜에 부착된 것으로 판단할 수 있으므로, 단백질의 양을 조절하여 리포솜의 크기를 조절할 수 있을 또한 확인하였다. (Error bar = S.D)

[0057] 한편, S 단백질이 부착된 것 외에도 리포솜들끼리 응집(aggregation)되어 리포솜의 크기가 커졌을 가능성이 있다. 따라서 응집 유무를 판단하기 위하여 PDI 값을 참고하였다. 통상적으로 PDI 값이 0.1보다 작은 경우에는 분침 없이 비교적 균일한 입자 분포를 가진다고 볼 수 있다. 표 1의 PDI 값은 모두 0.1 미만이므로, 리포솜의 크기가 커진 것은 응집으로 인한 것이 아니라 리포솜의 표면에 단백질이 부착된 것 때문임을 알 수 있다.

[0059] 실시예 3: COVID 진단 키트 시험

[0060] 단백질 배양 후 리포솜 표면에 배열된 항원이 항원으로 기능하는지를 확인하였다. 확인을 위해서는 S 단백질을 항원으로 검출하는 키트(코로나19 진단키트, 휴마시스)를 사용하였다. 양성 대조군은 S 단백질이 포함된 Ni 킬레이트 리포솜(Ni chelating liposome + S protein(Positive); A)으로, 음성 대조군은 S 단백질이 없는 Ni 킬레이트 리포솜(Ni chelating liposome (Negative); B)으로 사용하였다.

[0061] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 키트를 사용하여 분석한 결과 양성 대조군인 단백질 배양 샘플은 진단 키트에 양성 을 나타냈다.

[0062] 그러나 리포솜에 결합하지 않은 유리 단백질(free protein)이 항체와 반응할 가능성이 있으므로, 이 단백질을 배제하기 위해 엑소좀 정제에 사용되는 크기 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography; SEC)를 사용 하였다. SEC는 크기가 30 nm 미만인 입자를 필터링한다. 상기 배제율은 97%이므로 단백질의 3%가 여과되지 않고 남아있을 수 있기 때문에 30 nm 미만인 유리 단백질이 남아 있을 가능성이 있다.

[0063] S 단백질의 형태, 리포솜의 존재 여부, SEC 수행 여부, 및 이미다졸(Imidazole)에 의한 용리(elution) 여부를 하기와 같이 달리하여 S 단백질의 검출 여부를 키트를 이용하여 확인하였다.

표 2

	A	B	C	D	E
S 단백질	+	+	+	+	+
리포솜	-	-	+	+	+
SEC 수행	-	+	-	+	+
이미다졸 용리	-	-	-	-	+
검출여부	+	-	+	-	+

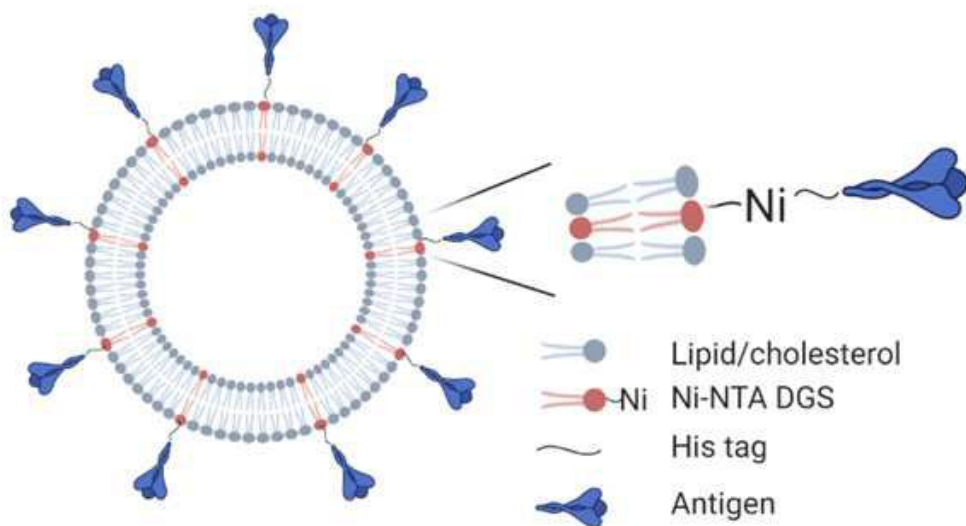
[0065] 표 2 및 도 6a 내지 6e에서 확인할 수 있듯이, A의 경우 S 단백질이 부착된 리포솜이며 B의 경우 단백질이 부착되지 않은 리포솜 이므로 A 샘플은 진단키트 상에서 양성, B 샘플은 진단키트 상에서 음성인 것으로 나타났다. C에서는 리포솜 표면에 배열된 S 단백질이 키트에 의해 검출되었고, D에서는 SEC 수행에 따라 리포솜에 결합되지 않은 S 단백질의 수가 줄어들게 되어 S 단백질이 검출되지 않았으나, E에서는 이미다졸에 의한 용리 과정 결과 리포솜 표면에 배열된 S 단백질이 용리됨으로써 검출되었다.

[0066] 리포솜 표면에 결합되지 않은 유리 단백질 대비 리포솜의 표면에 부착된 단백질의 경우 직경이 큰 구체에 고정되므로 항원 진단키트의 원리 상 색을 띠는 항체들이 단백질과 상호작용을 하는 것에 제한 사항이 발생할 수 있다. 따라서 이러한 경우 실제 용액상에서 존재하는 단백질의 총량에 비해 검출되는 단백질의 양은 적게 나타날 수 있다.

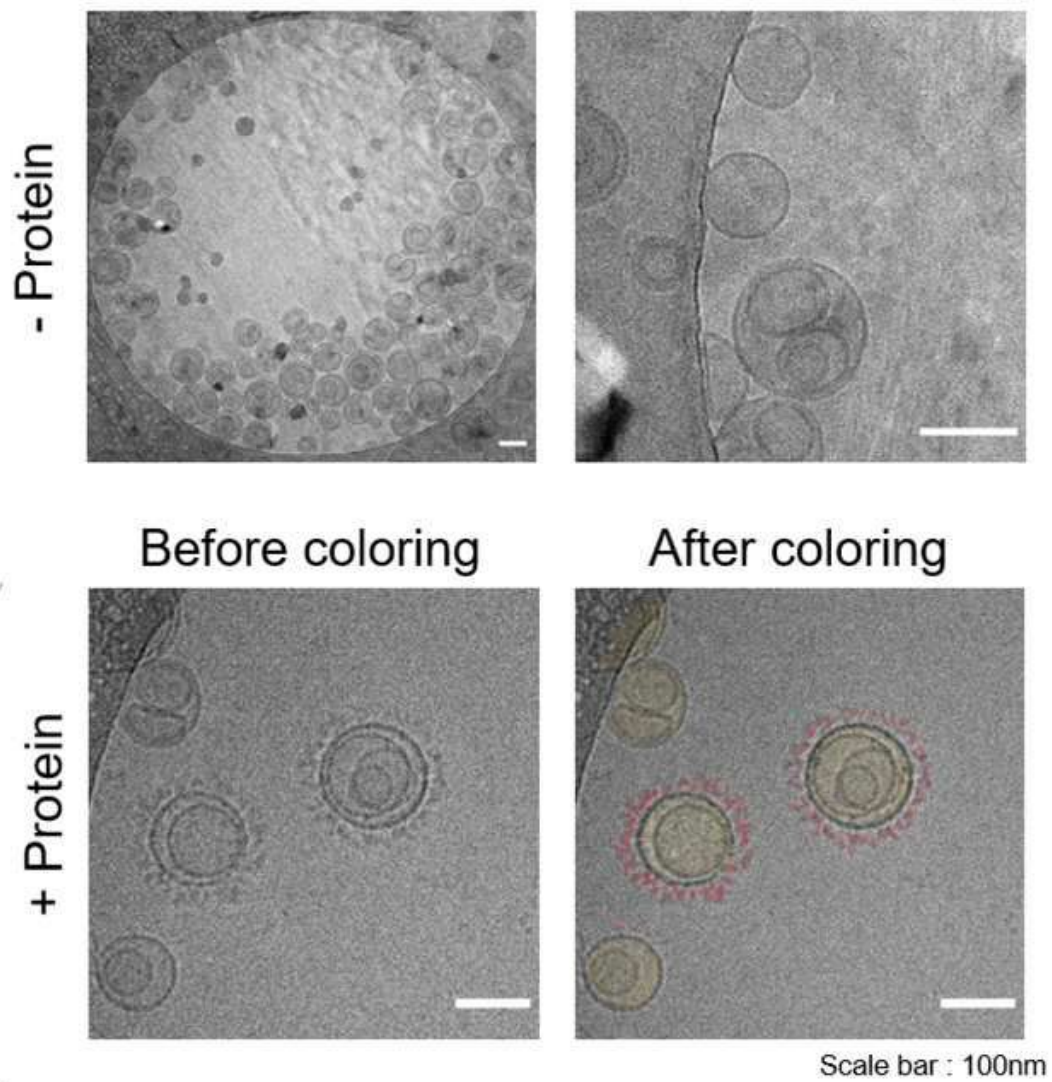
[0067] 결론적으로 리포솜의 표면에 부착된 S 단백질과 함께 유리 단백질이 존재할 때는 일부 유리 단백질이 존재하여 단백질이 쉽게 검출될 수 있지만, 유리 단백질을 제거하여 모든 단백질이 리포솜에 부착되어 있는 상태에서는 상호작용에 제한이 생겨 검출되지 않을 수 있다.

도면

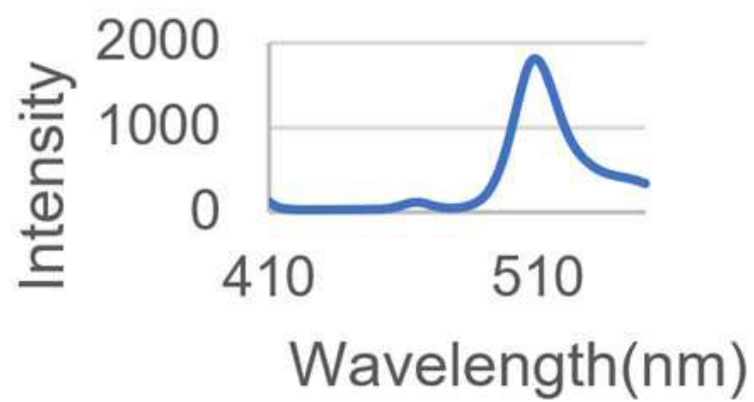
도면1



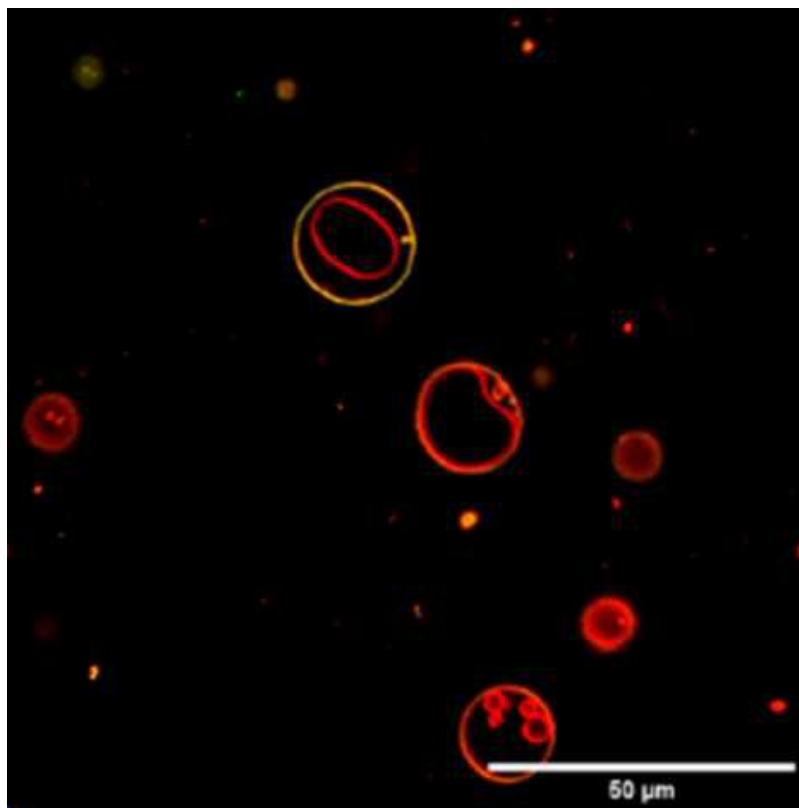
도면2



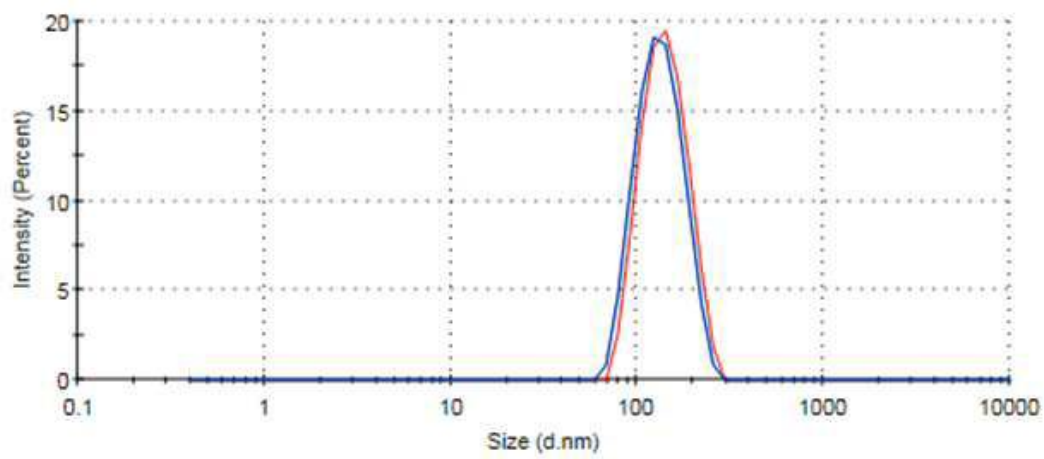
도면3a



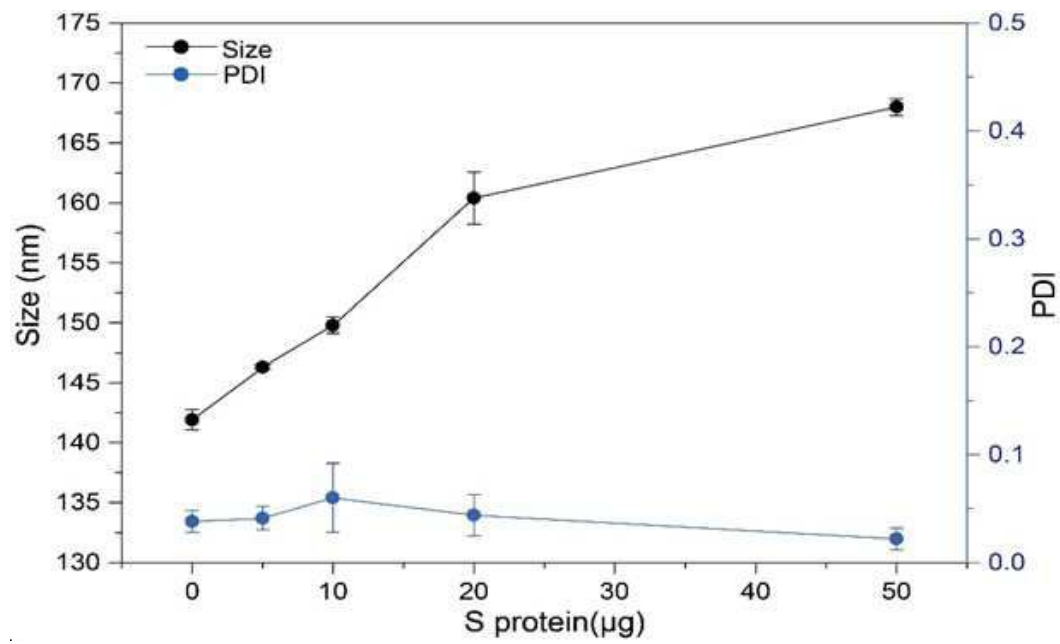
도면3b



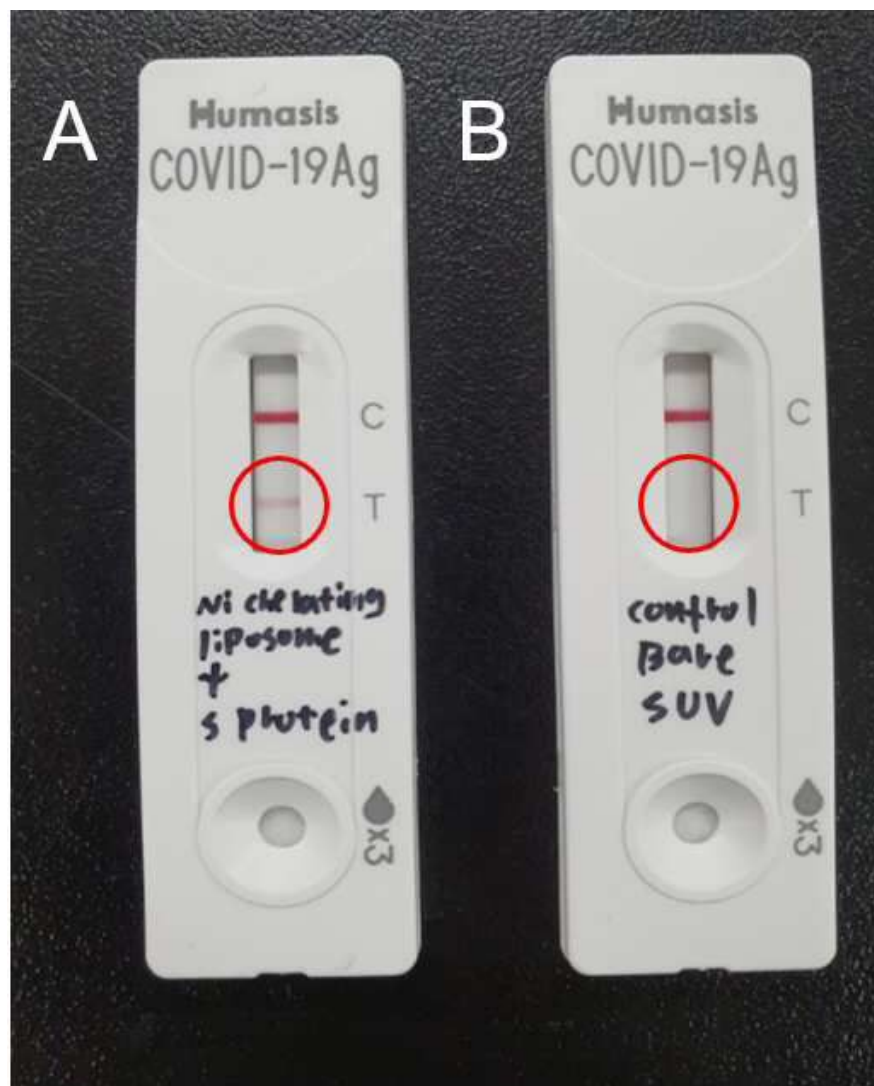
도면3c



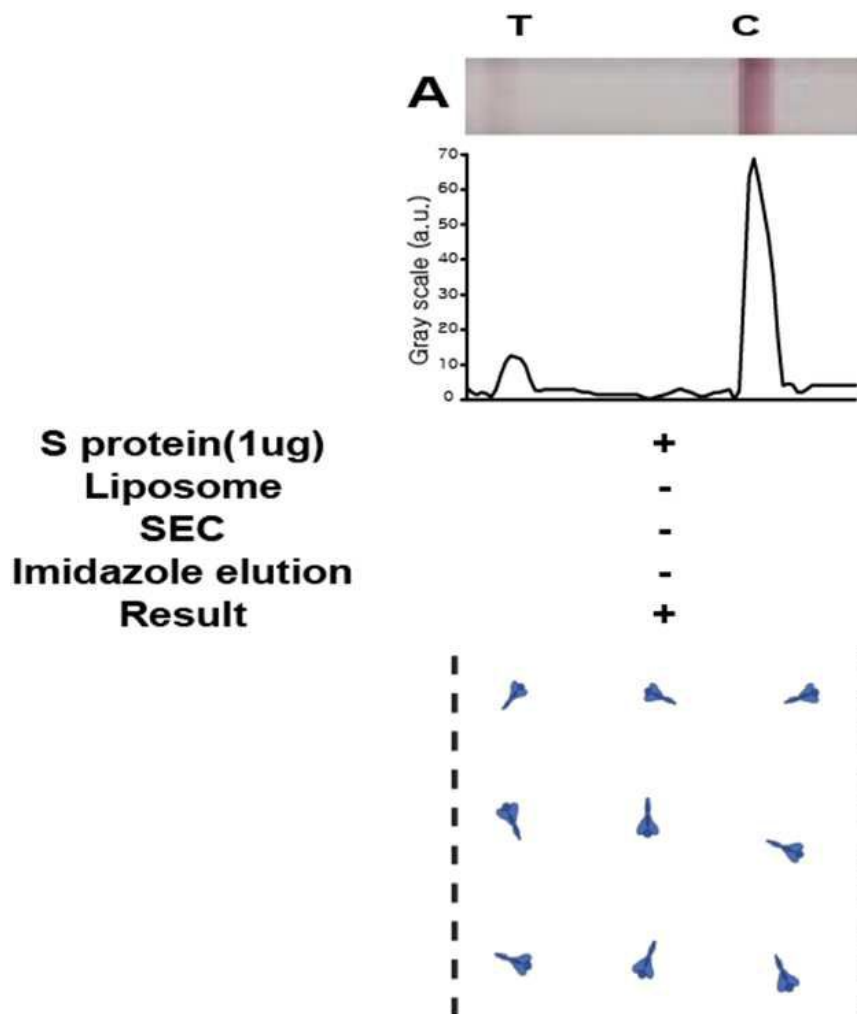
도면4



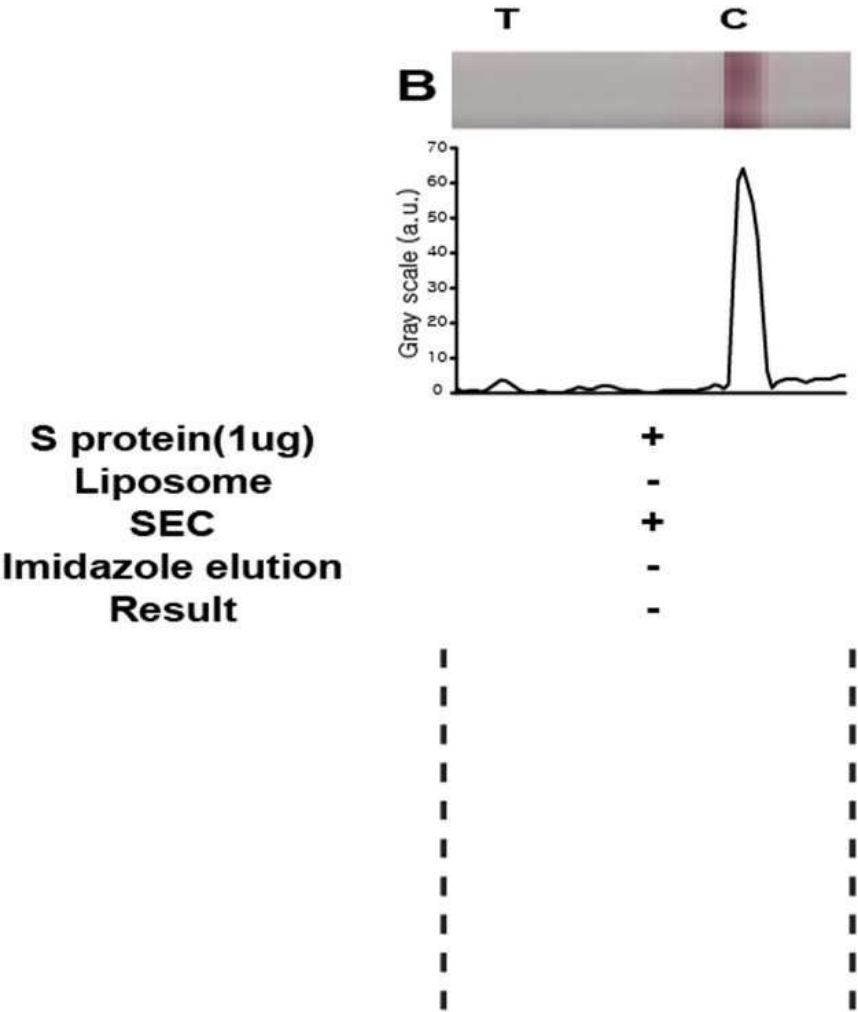
도면5



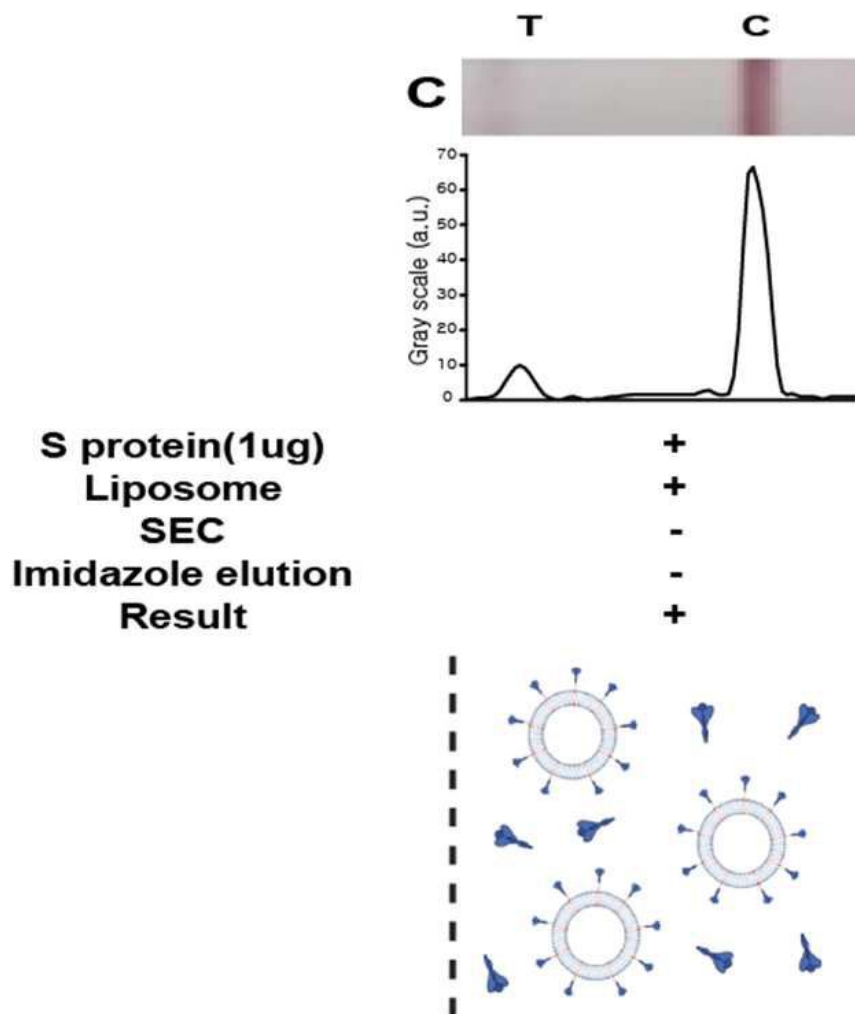
도면6a



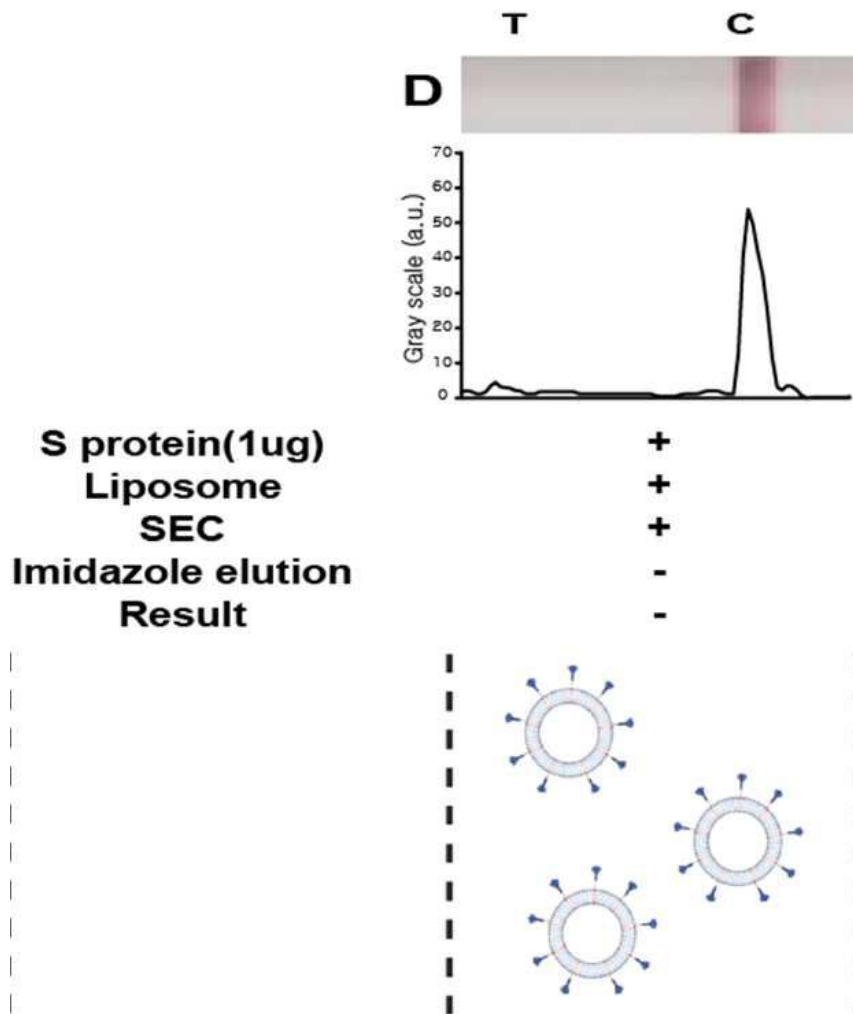
도면6b



도면6c



도면6d



도면6e

