



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0060818  
(43) 공개일자 2023년05월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/015 (2006.01)  
A61K 39/145 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)  
C07K 14/445 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/005 (2013.01)  
A61K 39/015 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0145420  
(22) 출원일자 2021년10월28일  
심사청구일자 2021년10월28일
- (71) 출원인  
경희대학교 산학협력단  
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자  
전복실  
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 의과대학 126호 의동물학교실(회기동, 경희대학교)
- 이수화  
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 의과대학 126호 의동물학교실(회기동, 경희대학교)
- (74) 대리인  
특허법인태백

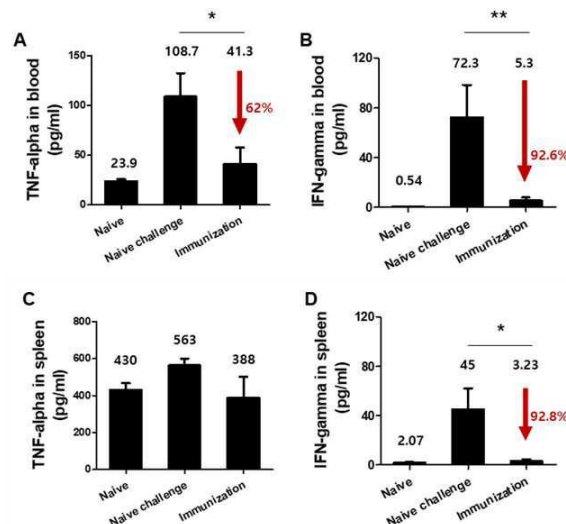
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 말라리아 원충의 MSP-8, MSP-9 및 RAP1을 포함하는 바이러스 유사입자 조합 백신

(57) 요약

본 발명은 말라리아 원충의 MSP-8, MSP-9 및 RAP1을 포함하는 바이러스 유사입자(Virus-like particles, VLPs) 조합 백신에 관한 것으로서, 구체적으로, 인플루엔자 M1을 이용하여 말라리아 질병을 유발하는 기생 원충 (*Plasmodium berghei*, ANKA strain) MSP-8, MSP-9 및 RAP1 항원 유전자 후보의 바이러스 유사입자 백신을 제조하였다. *Plasmodium* 속 MSP-8, MSP-9 및 RAP1 단백질을 발현하는 바이러스 유사입자를 각각 제조하였으며, 이를 1:1:1 비율로 조합하여 동물모델(마우스)에서 효능을 확인하였다. 백신을 마우스에 접종 시 쥐 말라리아 원충 감염에 대한 방어면역을 일으키며 말라리아 원충으로 발생하는 과 염증반응을 완화시킨다는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명에서 개발된 바이러스 유사 입자 백신 기술은 말라리아 원충 외에도 다양한 기생충 및 바이러스 감염 질환에 대응할 수 있는 기술적인 파급 효과를 가지고 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

**A61K 39/145** (2013.01)

**A61P 31/00** (2018.01)

**C07K 14/445** (2013.01)

**C12N 2760/16023** (2013.01)

**C12N 2760/16034** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711114688                     |
| 과제번호        | 2018R1A2B6003535               |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                      |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                         |
| 연구사업명       | 개인기초연구(과기정통부)(R&D)             |
| 연구과제명       | 말라리아 감염병 대응 바이러스 유사입자 백신 개발 연구 |
| 기 여 율       | 25/100                         |
| 과제수행기관명     | 경희대학교                          |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2021.02.28        |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                 |
|-------------|-------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1465034272                                      |
| 과제번호        | HV20C0142010021                                 |
| 부처명         | 보건복지부                                           |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원                                       |
| 연구사업명       | 감염병예방치료기술개발사업(R&D)                              |
| 연구과제명       | 호흡기 세포융합 바이러스의 바이러스 유사입자 백신 플랫폼의 비임상시험 및 유효성 평가 |
| 기 여 율       | 25/100                                          |
| 과제수행기관명     | 경희대학교 산학협력단                                     |
| 연구기간        | 2021.07.01 ~ 2021.12.31                         |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                              |
|-------------|------------------------------|
| 과제고유번호      | 1465033307                   |
| 과제번호        | HV20C0085010021              |
| 부처명         | 보건복지부                        |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원                    |
| 연구사업명       | 감염병예방치료기술개발사업(R&D)           |
| 연구과제명       | 인플루엔자 바이러스 유사입자 범용 백신 플랫폼 개발 |
| 기 여 율       | 25/100                       |
| 과제수행기관명     | 경희대학교 산학협력단                  |
| 연구기간        | 2021.04.01 ~ 2021.12.31      |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| 과제고유번호      | 1345331688                    |
| 과제번호        | 2018R1A6A1A03025124           |
| 부처명         | 교육부                           |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                        |
| 연구사업명       | 이공학학술연구기반구축(R&D)              |
| 연구과제명       | 활성산소 조절을 통한 만성질환병 예방치료에 관한 연구 |
| 기 여 율       | 25/100                        |
| 과제수행기관명     | 경희대학교                         |
| 연구기간        | 2021.03.01 ~ 2022.02.28       |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs).

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 RAP1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 RAP1은 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

#### 청구항 5

M1을 암호화하는 서열번호 3의 핵산 서열; 및 RAP1을 암호화하는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 RAP1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

#### 청구항 7

제5항 또는 제6항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

#### 청구항 9

제5항 또는 제6항의 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및

상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법.

#### 청구항 10

1) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자;

2) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 8(merozoite surface protein 8; MSP-8)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수

있는 바이러스-유사입자; 및

3) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 9(merozoite surface protein 9; MSP-9)를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

## 청구항 11

제5항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 RAP1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 MSP-8은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 MSP-9는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 8(merozoite surface protein 8; MSP-8), 메로조이트 표면 단백질 9(merozoite surface protein 9; MSP-9) 및 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 바이러스 유사입자(Virus-like particles, VLPs) 조합 백신에 대한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 말라리아는 사람 혈액 속에서 기생하여 학질을 일으키며, 세계적으로 단일 질환으로 가장 많은 사망자(연간 240 만명)를 발생시키는 질환이다. 매년 약 300 내지 500백만명이 비교적 높은 유행률(morbidity) 및 치사율(mortality)로 말라리아에 감염되고 있다. 특히 아동 뿐만 아니라 이전에 말라리아에 노출된 적이 없는 성인의 경우에도 말라리아 감염에 의한 유행률 및 치사율이 심각한 수준이다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 매년 아프리카에서만 2 내지 3백만 어린이들이 말라리아로 사망하는 것으로 추산한다. 또한, 약물 저항성 기생충(*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*) 및 살충제-저항성 매개체(*Anopheles mosquitoes*)에 의해 유발되는 말라리아의 광범위한 발생 및 유행률의 증가로 인해, 많은 국가에서 말라리아의 새로운 통제 방법을 개발해야 할 필요성을 강조하고 있다.

[0003] 국내에서는 휴전선과 인근한 경기 북부 지방 및 강원 북서부를 중심으로 말라리아가 재 출현하였으며, 현재 감염위험 지역이 점차 확대되고 있다. 국내에서 매년 천명 이상의 환자가 발생하고 있으나, 현재 말라리아 치료제인 클로로퀸(chloroquine), 아르테메테르(artemether) 등은 내성을 유발하므로 백신 접종법이 말라리아 원충을 예방함에 있어 가장 효과적인 방법으로 평가되고 있다.

[0004] 한편, 바이러스-유사입자는 실제 바이러스 구조와 형태학적으로 유사한 항원의 종류를 의미하며, 여러 바이러스에 대한 백신 항원으로 제안되어 왔다. 바이러스-유사입자는 바이러스 구조 단백질들의 결합을 통하여 실제 바이러스와 유사한 형태로 조립되지만, 조립과정에서 바이러스의 유전자가 포함되지 않아 감염의 위험성이 없어 매우 안전한 것이 특징이다.

[0005] 종래에는 말라리아 백신과 관련하여 재조합 단백질 또는 약독화된 백신이나 바이러스로 제공되는 2개의 항원(Pfs25와 Pvs25)에 중점을 두어 연구하였지만, 그 효과가 크지 않다고 알려짐에 따라, 효과가 향상된 말라리아 백신의 연구개발이 요구되고 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2021-0096368호(2021.08.05 공개)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아

원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)를 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 1) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자; 2) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 8(merozoite surface protein 8; MSP-8)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자; 및 3) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 9(merozoite surface protein 9; MSP-9)를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 M1을 암호화하는 서열번호 3의 핵산 서열; 및 RAP1을 암호화하는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 1) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자; 2) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 8(merozoite surface protein 8; MSP-8)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자; 및 3) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 9(merozoite surface protein 9; MSP-9)를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0016] 본 발명은 말라리아 원충의 MSP-8, MSP-9 및 RAP1을 포함하는 바이러스 유사입자(Virus-like particles, VLPs) 조합 백신에 관한 것으로서, 구체적으로, 인플루엔자 M1을 이용하여 말라리아 질병을 유발하는 기생 원충 (*Plasmodium berghei*, ANKA strain) MSP-8, MSP-9 및 RAP1 항원 유전자 후보의 바이러스 유사입자 백신을 제조하였다. *Plasmodium* 속 MSP-8, MSP-9 및 RAP1 단백질을 발현하는 바이러스 유사입자를 각각 제조하였으며, 이를 1:1:1 비율로 조합하여 동물모델(마우스)에서 효능을 확인하였다. 백신을 마우스에 접종 시 쥐 말라리아 원충 감염에 대한 방어면역을 일으키며 말라리아 원충으로 발생하는 과 염증반응을 완화시킨다는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명에서 개발된 바이러스 유사 입자 백신 기술은 말라리아 원충 외에도 다양한 기생충 및 바이러스 감염 질환에 대응할 수 있는 기술적인 파급 효과를 가지고 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 말라리아 원충 유전자 곤봉체 관련 단백질 1 (rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 이용하여 쥐 말라리아 원충 바이러스 유사입자 (virus-like particles, VLPs)를 제조한 결과를 나타낸다. (A) 인플루엔자 M1을 core protein으로 이용한 *Plasmodium berghei*의 RAP1을 발현하는 VLPs 백신을 전자현미경으로 확인하였다. (B)

*P. berghei* RAP1 VLP 백신을 말라리아 원충 감염 혈청 및 인플루엔자 M1 단일 항체로 반응시킨 웨스턴 블랏 결과이다.

도 2 및 도 3은 말라리아 원충 MSP-8, MSP-9 및 RAP1 조합 바이러스 유사입자 백신을 마우스에 접종시킨 후, 수집한 혈청에서 항체반응 확인 및 백신 접종 후, *Plasmodium berghei* (ANKA strain) 치사량을 마우스에 감염시킨 뒤 비장에서 면역세포 반응을 확인한 결과를 나타낸다.

도 4 내지 도 6은 말라리아 원충 MSP-8, MSP-9 및 RAP1 조합 바이러스 유사입자 백신을 마우스에 접종시키고 *Plasmodium berghei* (ANKA strain) 치사량을 마우스에 감염시킨 후, 비장 내 염증성 사이토카인, 혈중 기생충 증식을 확인한 결과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)를 제공한다.
- [0019] 본 발명에서 “말라리아(malaria)”는 말라리아 원충에 감염되어 발생하는 급성 열성 전염병을 의미하는 것으로서, 원인 병원체의 종류에 따라 증상 및 특징이 다르다. 구체적으로, 본 발명에서 상기 말라리아 원충은 설치류 말라리아 원충(*Plasmodium berghei* ANKA)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서 “바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs)”는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미한다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 DNA 또는 RNA 게놈이 완전히 결여되어 있거나, 바이러스성 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자의 경우 자발적 자가 어셈블리를 진행할 수도 있다.
- [0021] 본 발명에서 “말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자”는 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도하며, 바이러스와 유사한 형태를 가진 단백질 구조체(입자)를 의미한다.
- [0022] 상기 바이러스-유사입자는 바이러스에서 유래한 구조 단백질이 조립되어 바이러스와 유사한 형태의 입자를 생성함과 동시에 말라리아 원충으로부터 유래한 항원 결정 부위를 포함함으로써, 상기 바이러스-유사입자를 특정 개체에 접종하였을 때 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적 일 예로서, 상기 단백질 구조체는 바이러스 유래의 구조 단백질 외부에 말라리아 원충 유래의 항원 결정 부위가 결합된 형태를 가질 수 있다.
- [0023] 상기 바이러스 유래의 구조 단백질(core protein)은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 “인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)”은 인플루엔자 바이러스의 구조 단백질로서, 인플루엔자 바이러스의 외피(envelop)인 지방층 안쪽에 코트(coat)를 형성하는 기질단백질(matrix protein)을 의미한다. 상기 인플루엔자 바이러스는 8개의 분절된 음성가닥 RNA, 표면 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, H), 뉴라미다제(neuraminidase, N), 뉴클레오프로테인(neucleoprotein, NP) 매트릭스(matrix, M1), 프로톤 이온-채널 단백질(proton ion-channel protein, M2), 중합효소 염기 단백질 1(polymerase acidic protein, PA), 중합효소 염기 단백질 2(PB2, polymerase basic protein 2), 중합효소 산성 단백질(PA, polymerase acidic protein) 및 비구조 단백질 2(NS2, nonstructural protein 2)와 같은 단백질을 포함하는데, 이때 매트릭스 단백질 1은 외형을 층으로 둘러 쌓고 있음으로써 코어와 외피 간의 연결체로 작용한다. 상기 매트릭스 단백질 1은 바이러스-유사입자 생성에 있어, 바이러스-유사입자를 안정한 형태로 조립하는데 중요한 역할을 한다.
- [0025] 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 A/Puerto Rico/8/34, A/Bangkok/163/2000, A/AA/Huston/1945, A/Berlin/6/2006, A/Brandenburg/1/2006, A/Brevig Mission/1/1918, A/Chile/8885/2001, A/DaNang/DN311/2008, A/FLW/1951, A/FW/1/1950, A/Fiji/15899/83, A/Fort Monmouth/1-MA/1947, A/HaNoi/TX233/2008, A/Iowa/CEID23/2005, A/Malaysia/35164/2006, A/Managua/4086.04/2008, A/Texas/VR06-0502/2007, A/WSN/1933, A/Colorado/18/2011, A/Kentucky/04/2010, A/Maryland/28/2009, A/New Mexico/05/2012, A/Philippines/TMC10-135/2010, A/Singapore/GP4307/2010, A/Singapore/GP489/2010, A/Boston/14/2007, A/Brisbane/09/2006, A/Hong Kong/CUH34175/2002, A/Kyrgyzstan/WRAIR1256P/2008, A/Malaysia/12550/1997, A/Nanjing/1663/2010, A/Wyoming/08/2010, A/Berkeley/1/1968, A/Korea/426/1968 등

으로부터 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서는 A/Puerto Rico/8/34 유래 M1 단백질을 바이러스-유사입자의 구조 단백질로 활용하였다.

- [0026] 상기 말라리아 원충으로부터 유래한 항원 결정 부위는 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어 “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 말라리아에서 유래할 수 있으며, 상기 말라리아에 대한 면역 활성을 유도할 수 있으면 특별히 제한되지 않는다.
- [0028] 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 곤봉체 관련 단백질 1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 곤봉체 관련 단백질 1은 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 기능적 동등물을 포함한 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 용어 “기능적 동등물”은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 가장 구체적으로는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 가지는 단백질을 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 용어 “실질적으로 동등한 생리활성”은 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 곤봉체 관련 단백질 1과의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 말라리아에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자로서의 활성을 의미한다.
- [0031] 보다 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 곤봉체 관련 단백질 1은 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화 될 수 있다. 예컨대, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 M1은 Genebank Accession No. AB021712 또는 Genebank Accession No. EF467824 로 표현되는 유전자일 수 있다. 상기 곤봉체 관련 단백질 1은 Genebank Accession No. XP034422120.1 또는 Genebank Accession No. XM\_034565422.1로 표현되는 유전자일 수 있다.
- [0032] 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.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 1) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자; 2) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 8(merozoite surface protein 8; MSP-8)을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자; 및 3) 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 9(merozoite surface protein 9; MSP-9)를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0035] 바람직하게는, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 RAP1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 MSP-8은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 MSP-9는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 한편, 상기 MSP-8은 서열번호 7의 핵산 서열로 이루어지고, 상기 MSP-9는 서열번호 8의 핵산서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서 “백신 조성물”은 백신 효과를 가지는 단백질 항원을 투여함으로써 이후의 병원균 감염을 예방할 수 있는 조성물을 의미한다. 상기 백신 조성물은 말라리아 원충에 대한 항원성을 나타내는 바이러스-유사입자를 포함하는 조성물일 수 있다.
- [0038] 구체적으로, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 보조제, 면역 자극제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

- [0039] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지되어있으며, 단백질, 설탕 등을 포함한다. 상기 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 에컨대 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르 에컨대 에틸 올리에이트를 포함한다. 수용액 담체는 식용수 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 링거 텍스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제로서 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것을 추가로 포함할 수 있다. 방부제로는 포르말린 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 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. 허용가능한 보조제는 프로인트 완전보존제, 프로인트 불완전보존제, 사포닌, 미네랄 젤 에컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 에컨대 리소레스틴, 플투론 폴리올, 다가음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키텔렛 헤모시아닌, 디니트로페놀 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 백신 조성물은 면역 자극제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 면역 자극제는 인공적으로 합성된 레바미솔, 이소프레노신 및 사이토카인을 포함할 수 있다. 사이토카인의 일 예로서 인터페론- $\alpha$ , 인터류킨-2, GM-CSF, GCSF 등이 있다. 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.
- [0042] 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 제2보조제를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 백신 조성물은 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 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.
- [0044] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 에컨대, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0045] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 다양한 부형제, 에컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.
- [0046] 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.
- [0047] 또한, 본 발명은 M1을 암호화하는 서열번호 3의 핵산 서열; 및 RAP1을 암호화하는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제공한다.
- [0048] 바람직하게는, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 RAP1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 용어 “벡터”는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는데 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 제한되지 않는다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 고리형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

- [0050] 본 발명에서 용어 “발현 벡터”는 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.
- [0051] 구체적으로, 상기 벡터는 바큘로바이러스(Baculovirus) 벡터일 수 있다. 상기 바큘로바이러스(Baculovirus)는 사람이나 척추동물에는 병원성이 없으며, 곤충에 대해서만 병원성을 가지고 있는 병원성 바이러스를 의미한다.
- [0052] 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 바이러스-유사입자를 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 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 바이러스-유사입자를 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.
- [0054] 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 제한되는 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 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 또한, 본 발명은 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0056] 본 발명에서 용어 “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.
- [0057] 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.
- [0058] 본 발명에서 “형질 전환”은 상기 벡터를 미생물 또는 특정 세포 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 전환 대상 세포가 원핵세포인 경우에는, CaCl<sub>2</sub> 방법, 하나한 방법 및 전기 천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 형질 전환 대상 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 효모와 같은 진균의 형질 전환의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트 및 열 충격을 이용한 형질 전환법과 전기천공법에 의해 실시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계를 포함하는 말라리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법을 제공한다.
- [0060] 상기 바이러스-유사입자는 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으며, 별도의 원인 감염체, 즉 본 발명에서는 말라리아 원충 없이도 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으므로 높은 생산성 및 경제성이 구현될 수 있다.
- [0061] 상기 바이러스-유사입자는 당해 기술 분야에 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 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 병원체에 대한 목적하는 면역반응을 유도할 수 있다.
- [0062] 상기 형질 전환된 숙주 세포는 배치, 공급-배치 또는 연속 발효 조건 하에서 배양될 수 있으며, 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 상기 바이러스-유사입자를 발현할 수 있으므로 상기 배양된 숙주 세포로부터 상기 바이러스

스-유사입자 단백질을 수득할 수 있다.

- [0063] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.
- [0064] <실시예 1> 말라리아 원충 유전자 RAP1을 이용하여 쥐 말라리아 원충 바이러스 유사입자 (virus-like particles, VLPs) 제조
- [0065] 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1) 및 말라리아 원충의 곤봉체 관련 단백질 1(rhoptry-associated protein 1; RAP1)을 포함하는 바이러스-유사입자를 제조하기 위해, 설치류 말라리아(*Plasmodium berghei* ANKA)의 RAP1의 일부를 항원 유전자로 선정하였다. 백신 제조를 위해 *P. berghei*의 최적화된 RAP1이 pFastBac 벡터에 삽입되어 있는 형태로 genscript사에 주문하였다.
- [0066] 상기 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 한국 공개특허 10-2019-0009691호에 기재된 M1 유전자와 동일한 서열을 사용하였다(GenBank accession number: EF467824, 1027bp).
- [0067] 이후, 상기 인플루엔자 M1 단백질 유전자를 RAP1 암호화 서열이 도입된 pFastBac 벡터에 도입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다. 이때, 상기 pFastBac 벡터에 도입된 M1 및 RAP1 유전자가 제대로 도입되었는지를 DNA 염기서열 결정법에 의해 확인하였다.
- [0068] RAP1 및 M1을 발현하는 재조합 바큇로바이러스(recombinant BaculoViruses, rBVs)를 제조하기 위하여, cellfectin II(Invitrogen) 및 SF9 세포를 이용하여 DNA 형질 감염을 수행하였다. RAP1 및 M1을 포함하는 pFastBac 벡터를 이용한 형질 전환은 white/blue 스크리닝에 의해 수행되었다. 재조합 바큇로바이러스는 Bacto-Bac 발현 시스템(Invitrogen)를 통해 제조사의 매뉴얼에 따라 제조되었다.
- [0069] 말라리아의 바이러스-유사입자는 RAP1 및 M1을 발현하는 재조합 바큇로바이러스(rBVs)에 의해 공동-감염된 SF9 곤충 세포에서 생산하였다. 상청액 내의 바이러스-유사입자는 고속원심분리(30분, 45,000×g)를 사용해 펠렛화하였다.
- [0070] 바이러스-유사입자를 4℃에서 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 동안 재현탁하였고, 불연속 수크로오스 구배(15-30-60%)를 통해 4℃, 45,000×g에서 1 시간 동안 수확하고 정제하였다. 단백질 농도는 QuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich)에 의해 결정하였다.
- [0071] 상기에서 제작한 인플루엔자 M1을 core protein으로 이용한 *Plasmodium berghei*의 RAP1을 발현하는 VLPs 백신을 전자현미경법 및 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다(도 1).
- [0072] 바이러스-유사입자를 곤충세포에서 생성한 VLPs 백신의 형태를 확인하기 위해 주사전자현미경(transmission electron microscope)을 통해 촬영하였다. VLPs는 negative stain 후 grid에 올려 주사전자현미경 아래서 관찰하였다(도 1A).
- [0073] RAP1 VLPs 백신의 구성성분을 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 시행하였다. VLPs 샘플을 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)에 전기영동하여 단백질의 크기별로 분리하고 이것을 NC 멤브레인에 옮겼다. 멤브레인은 5% 스킵 밀크(skim milk)로 30분 동안 실온에서 반응시켰다. TBST buffer로 씻어낸 후, 말라리아 원충(*Plasmodium berghei*) 감염 혈청(1:500 으로 희석함, RAP1을 검출하기 위함) 및 인플루엔자 M1 단일클론항체 (1:2000으로 희석함, M1을 검출하기 위함)에 멤브레인을 담귀 약 16시간 (overnight) 4℃ 에서 반응시켰다. TBST buffer로 씻어낸 후, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 1:3000으로 희석하여 1시간 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 ECL 용액을 뿌려 암실에서 필름에 현상하여 밴드(band)를 확인하였다(도 1B).
- [0074] 한편, 본 발명에서 사용된 말라리아 원충 메로조이트 표면 단백질 8(merozoite surface protein 8; MSP-8) 및 메로조이트 표면 단백질 9(merozoite surface protein 9; MSP-9) VLPs는 각각 본 발명자들이 이전에 출원한 한국특허출원 제10-2020-0123118호(출원일: 2020.09.23) 및 한국특허출원 제10-2020-0009722호(출원일: 2020.01.28)에 기재된 대로 제조하였다.
- [0075] <실시예 2> 동물모델에서 백신효능 검증
- [0076] 말라리아 원충 MSP-8, MSP-9 및 RAP1 조합 바이러스 유사입자 백신을 마우스에 접종시킨 후 수집한 혈청에서 항

체반응 확인 및 백신 접종 후, *Plasmodium berghei* (ANKA strain) 치사량을 마우스에 감염시킨 뒤 비장에서 면역세포 반응을 확인하였다.

[0077] 마우스로부터 수집한 혈청에서 항체반응을 확인하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 시행하였다. 말라리아 원충 항원 및 조합 VLPs (MSP8+MSP9+RAP1)를 2 또는 0.5 ug/ml이 되도록 0.05M carbonate buffer에 희석시켜 96 well immunoplate에 well 당 100 ul 씩 분주하여 코팅하였다(overnight at 4°C). Plate는 PBST로 씻어낸 후, 0.2% gelatin in PBST를 well 당 200 ul 씩 분주하여 차단(blocking)하였다(37°C에서 1시간 동안). PBST로 씻어낸 후, 마우스로부터 수집한 혈청을 연속 희석(serial dilution) 하여 well 당 100 ul 씩 분주하여 반응시켰다(37°C에서 2시간 동안). PBST로 씻어낸 후, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 1:3000으로 희석하여 반응시켰다(37°C에서 1시간 동안). PBST로 씻어낸 후, OPD가 첨가된 substrate buffer를 well 당 100 ul 씩 분주하여 반응시켰다. 이후, 발색 정도를 보고 2N 황산을 넣어 반응을 중단시켰다.

[0078] 마우스에 MSP-8, MSP-9, RAP1 조합 VLPs 백신을 4주 간격으로 2번 접종(Intramuscular route) 후, 마우스로부터 정해진 시기에 혈액을 수집하고 혈청에서 말라리아 원충 특이 IgG (도 2A)와 조합 VLPs 특이 IgG (도 2B) 항체를 ELISA 분석법으로 확인하였다. 조합 VLPs 백신 접종 후 말라리아원과 조합 VLPs 백신 특이 IgG 항체가 비면역화 마우스 그룹과 비교하여 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 그중에서도, 2차 접종 후 수집한 혈청에서 아주 높은 IgG 항체반응을 확인하였다.

[0079] 또한, 마우스의 비장을 수집하여 비장을 갈아 세포를 분리하였다. 세포는 다량의 RBC와 섞여있어 RBC lysis buffer를 처리하여 RBC를 제거하였다. 분리한 세포는 10<sup>6</sup>씩 튜브에 나눠 담아 fc block 처리 후, CD3, CD4, CD8, B220, CD27, IgG1등의 형광 항체를 붙여 반응시켰다(얼음에서 30분 동안). 씻어낸 후, 유세포 분석(flow cytometry) 기계에 로딩하여 읽었다.

[0080] 조합 VLPs 백신 접종 후 그리고 치사량의 말라리아 원충을 감염시킨 후, 모든 마우스에서 비장을 수집하여 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T cell과 memory B cell의 군집을 확인하였다(도 3). 기생충 감염 대조군(Naive Challenge)과 비교하였을 때, 조합 VLPs 백신 면역화 그룹에서 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T cell이 유의한 수준으로 증가하였으며(도 3A 및 도 3B), memory B cell 역시 높은 수준으로 검출된 것을 확인하였다(도 3C).

[0081] <실시예 3> 말라리아 원충 바이러스 유사입자 백신 방어효능

[0082] 말라리아 원충 MSP-8, MSP-9 및 RAP1 조합 바이러스 유사입자 백신을 마우스에 접종시키고 *Plasmodium berghei* (ANKA strain) 치사량을 마우스에 감염시킨 후, 비장내 염증성 사이토카인, 혈중 기생충 증식율을 확인하였다.

[0083] 마우스의 혈청과 비장액 (비장세포 분리시 원심분리하여 상층액을 보관하였다가 사용함)에서 염증성 사이토카인을 측정하였다. 실험 방법은 상기 실시예 2에 기재한 ELISA 분석법과 같다. 다른 점은 코팅(coating) 과정에서 항원이 아닌 사이토카인 캡처(cytokine capture) 항체를 사용하였다. 차단(Blocking) 후 마우스의 혈청 및 비장액을 분주하여 반응시켰다(RT에서 2시간 동안). 반응 후 검출 항체(detection antibody)와 반응시켰다. 그 후에 발색시약을 넣어 발색을 확인하였다.

[0084] 비 면역화 마우스와 MSP-8, MSP-9, RAP1 조합 VLPs 백신 면역화 마우스에 치사량의 말라리아 원충을 감염시킨 후 6일째 일부 마우스에서 비장 및 혈액을 수집하여 염증반응을 확인하였다(도 4). 비 면역화 감염 대조군(Naive Challenge)과 비교하였을 때, 조합 VLPs 면역화 그룹(Immunization)은 혈액에서 현저히 낮은 수준의 전염증성 사이토카인 TNF-alpha (도 4A), IFN-gamma (도 4B)가 검출되었다. 뿐만아니라 비장에서의 IFN-gamma 수준 역시 비면역화 감염 대조군(Naive Challenge)에 비해 면역화 그룹(Immunization)에서 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 4D).

[0085] 마우스의 혈액 내, 말라리아 원충을 존재를 확인하기 위해 마우스로부터 피를 회수하였다. 피 2 ul를 PBS 100 ul에 넣고 풀어준 뒤 사이버그린(syber green) 시약(말라리아 원충의 핵에 붙는 형광 항체) 0.5-1 ul 넣고 반응시켰다(37°C에서 30분 동안). 반응 후, 바로 유세포 분석(flow cytometry) 기계에 로딩하여 읽었다.

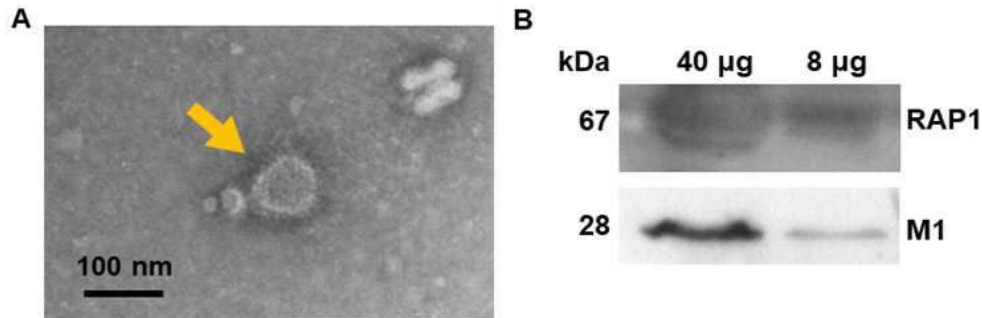
[0086] 비 면역화 마우스와 MSP-8, MSP-9, RAP1 조합 VLPs 백신 면역화 마우스에 치사량의 말라리아 원충을 감염시킨 후 혈액을 수집하여 기생충 증식반응(parasitemia)을 확인하였다(도 5). MSP-8, MSP-9, RAP1 조합 VLPs 백신 접종군(Immunization)은 비 면역화 감염 대조군(Naive Challenge)에 비해 혈중 기생충 증식반응이 장기간 지연되는 것을 확인하였다.

[0087] 조합 VLPs 백신을 접종한 후, 모든 마우스에 치사량의 *P. berghei*를 감염시켜 생존반응을 확인하였다(도 6). 비

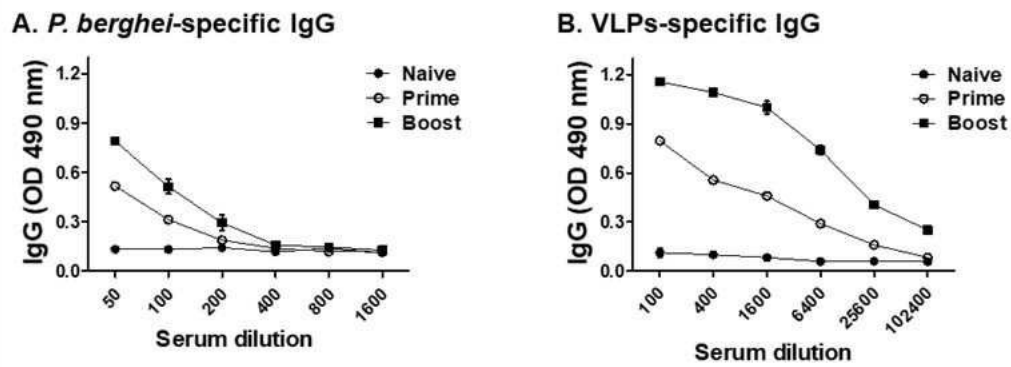
면역화 감염 대조군(Naive Challenge)은 감염 42일 이내 모든 마우스가 사망하였지만, 조합 VLPs 백신 접종군(Immunization)은 비 면역화 감염 대조군(Naive Challenge) 그룹보다 최대 18일 생존기간이 연장된 것을 확인하였다(도 6B).

## 도면

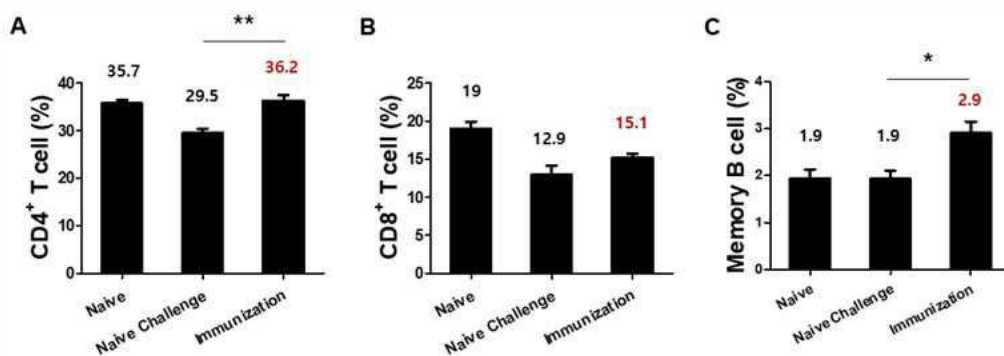
### 도면1



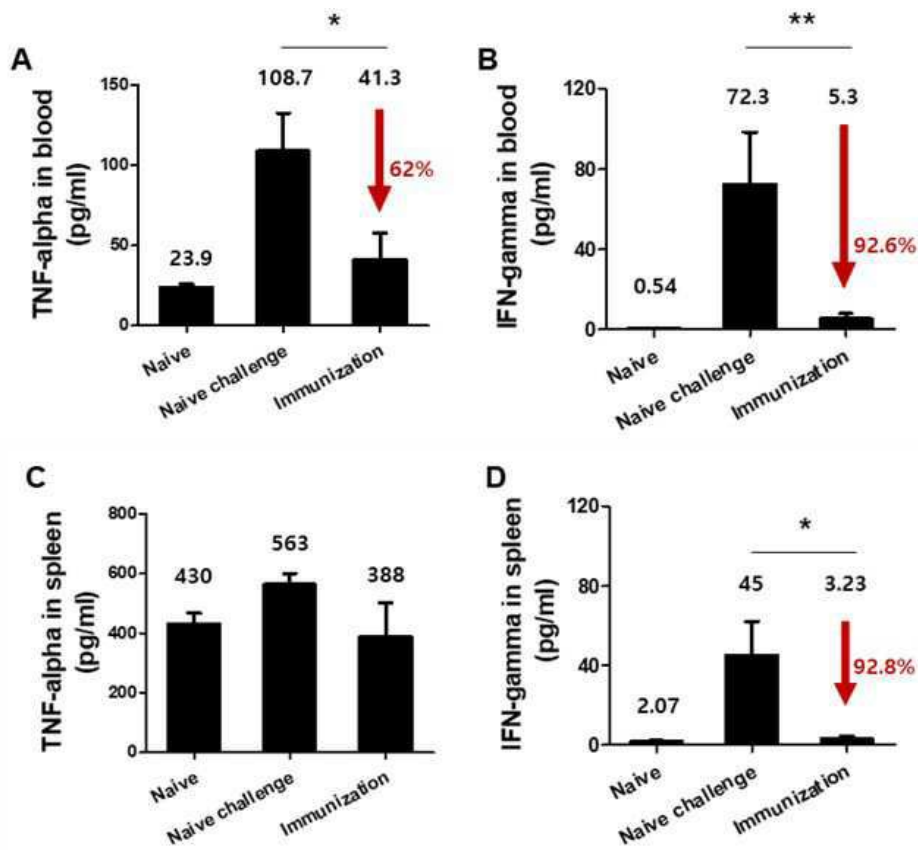
### 도면2



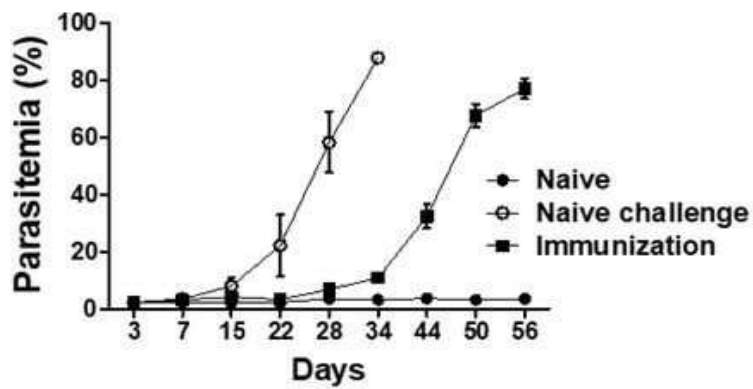
### 도면3



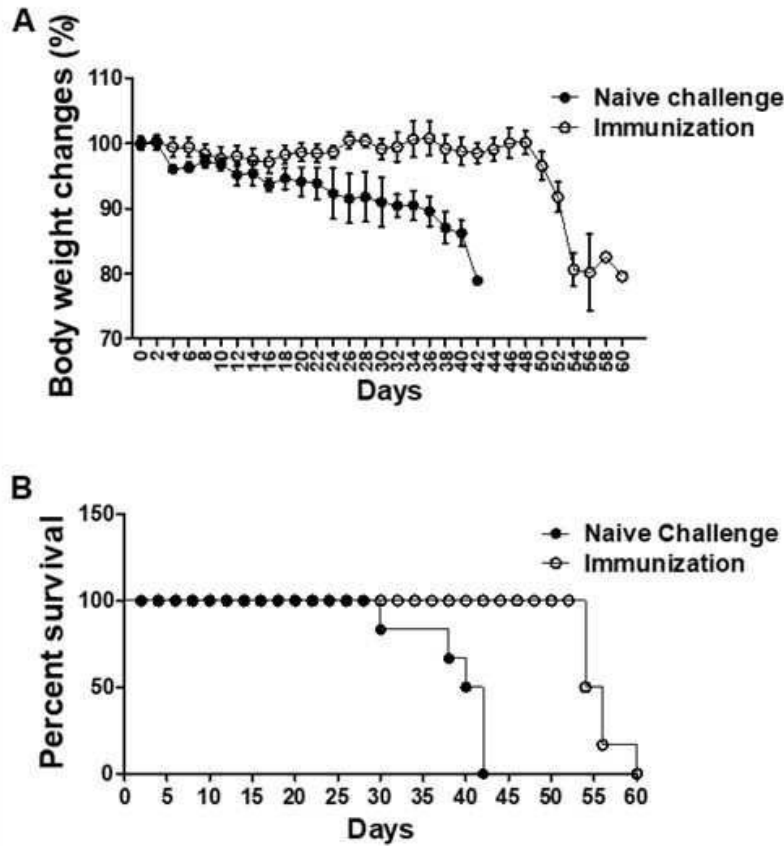
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Virus-like particles combination vaccines comprising MSP-8, MSP-9 and RAP1 of malaria protozoa
- <130> ADP-2021-0480
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> Influenza virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) matrix protein 1
- <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> 604

<212> PRT

<213> Plasmodium berghei ANKA/RAP1

<400> 2

Met Phe Ile Lys Ile Val Ser Leu Phe Ile Leu Ser Arg Leu Val Phe

1 5 10 15

Gln Asp Tyr Ser Val Ala Phe Asn Ile Arg Asp Ser Asn Ile Ile Ser

20 25 30

Asn Tyr Ser His Gly Tyr Asn Ser Pro Gly Ile Asn Asn Asp Lys Leu

35 40 45

Gly Asn Leu Asn Tyr Phe Thr Glu Ile Phe Pro Lys Met Ser Phe Leu

50 55 60

Gln Glu Asp Asp Asp Val Asn Gln Asn Lys Asn Gly Thr Ser Asn Lys

65 70 75 80

Asp Ser Glu Lys Gln Asp Ala Asn Ser Ile Ala Asp Ser Asp Ser Leu

85 90 95

Lys Asp Arg Asp Tyr Ala Leu Phe Asn Gly Asn Leu Ile Ala Asp Leu

100 105 110

Lys Glu Glu Glu Pro Ile Asp Glu Thr Ala Glu Glu Glu Thr Ile Asn

115 120 125

Glu Asn Ile Asp Glu Lys Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Thr Pro Asp

130 135 140

Tyr Thr Pro Arg Leu Lys Lys Ala Met His Thr Leu Gly Tyr Asp Lys

145 150 155 160

Glu Phe Lys Leu Ala Glu Leu Thr Thr Ile Gln Ser Cys Pro Asn Asp

165 170 175

Asn Phe Leu Phe Asp Ile Phe Pro Gln Ala Ile Gln Lys Phe Gln Glu

180 185 190

Asn Asp Met Lys Tyr Ile Gln Thr Gln Gly Asp Gln Tyr Val Glu Cys

195 200 205

Ile Lys Lys His Lys Leu Val Gly Ser Asp Asn Gln Asp Leu Lys Leu

210 215 220

Asn Phe Gly Asn Ser Val Asn Thr Phe Gly Pro Tyr Lys Ile Pro Gln

225 230 235 240

Lys Met Ile Thr Phe Asp Leu Ile Arg Leu Pro Ser Asn Ile Thr Pro

245                                      250                                      255  
 Val Asn Leu Ala Asn Asp Tyr Tyr Leu Ser Glu Ser Glu Phe Pro Asn  
 260                                      265                                      270  
 Leu His Lys Leu Asn Tyr Cys Leu Leu His Pro Ala Lys Leu Glu Lys  
 275                                      280                                      285  
 Leu Leu Lys Arg Lys Asp Ile Lys Ser Tyr Ile Asn Asn Thr Glu Ser  
 290                                      295                                      300  
 Gly Ser Tyr Asp Asn Phe Phe Lys Lys Ala Met Asn Glu Ser Ile Glu  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Cys His Val Glu Asn Thr Leu His Met Ile Leu Ser Lys Leu Thr Leu  
 325                                      330                                      335  
 Phe Met Phe Phe Asn Val Asn Lys Pro Asp Ser Lys Asn Ile Leu Lys  
 340                                      345                                      350  
 Lys Gln Leu Tyr Ile Ile Lys Ser Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Arg Lys  
 355                                      360                                      365  
 Tyr Val Asp Asn Ala Tyr Lys Lys Val Ile Asn Asn Phe Lys Asp Tyr  
 370                                      375                                      380  
 Glu Asn Lys Ile Lys Leu Ile Asp Ser Asn Leu Glu Asn Ile Thr Ser  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Tyr Tyr Ala Ala His Ala Phe Gly Asn Leu Cys Asn Thr Tyr Met Glu  
 405                                      410                                      415  
 Lys Asp Asn Ile Tyr Glu Ala Asn Ala Tyr Leu Tyr Glu His Ile Ala  
 420                                      425                                      430  
 Pro Ser Ile Lys Ile Phe Ser Ser Cys Ile Lys His Leu Thr Ile Tyr  
 435                                      440                                      445  
 Asn Tyr Ile Ile Ser Asn Leu Leu Gly Gln Val Lys His Leu Met Ser  
 450                                      455                                      460  
 Tyr Thr Pro Arg Lys Pro Ile Leu Lys Asp Ile His Phe Lys Ala Leu  
 465                                      470                                      475                                      480  
 Leu Asn Lys Phe Lys Lys Pro Gln Asn Val Asn Glu Leu Pro Tyr Asp  
 485                                      490                                      495

Pro Thr Val Lys Ser Phe Ala Leu Gly Glu Leu Thr Arg Glu Pro Ile  
 500 505 510  
 His Gly Leu Ile His Ser Tyr Phe Glu Tyr Lys Lys Lys Asp Leu Leu  
 515 520 525  
 Asp Ile Met Gln Lys Leu Lys Leu Asp Ile Phe Ser Leu Ala Asn Lys  
 530 535 540

Asp Leu Lys Phe Pro Ser Ala Asp Leu Pro Asp Tyr Lys Leu Phe Lys  
 545 550 555 560  
 Asp Ile Val Asn Lys Tyr Lys Lys Glu Ile Lys Ile Leu Phe Gln Glu  
 565 570 575  
 Met Asn Ser Glu Tyr Val Lys Leu Phe Lys Met Arg Ile Ser Ala Phe  
 580 585 590  
 Tyr Gln Lys Asp Phe Phe Ile Tyr Asp Arg Val Phe  
 595 600

<210> 3

<211> 1027

<212> DNA

<213> Influenza virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) matrix protein 1

<400> 3

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| agcgaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact  | 60  |
| ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt | 120 |
| tgcaggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct  | 180 |
| gtcacctctg actaaggga ttttaggatt tgtgttcacg ctaccgtgc ccagtgagcg   | 240 |
| aggactgcag cgtagacgt ttgtccaaaa tgccttaat gggaacgggg atccaaataa   | 300 |
| catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc | 360 |
| caaagaaatc tactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata  | 420 |
| caacaggatg ggggctgtga ccaactgaag ggcatctggc ctggtatgtg caacctgtga | 480 |
| acagattgct gactcccagc atcggctcga taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact | 540 |
| aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat | 600 |
| ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaaat | 660 |
| ggtgcaagcg atgagaacca ttggaactca tctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga  | 720 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa | 780  |
| gigatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc | 840  |
| ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttta atacggactg aaaggagggc | 900  |
| cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg  | 960  |
| ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt | 1020 |
| ttctact                                                           | 1027 |
| <210> 4                                                           |      |
| <211> 1815                                                        |      |
| <212> DNA                                                         |      |
| <213> Plasmodium berghei ANKA/RAP1                                |      |
| <400> 4                                                           |      |
| atgttcatca agatcgtgtc actgttcatc ctgtccaggc tgggtttcca ggactactca | 60   |
| gtcgttttca acatcagaga ctccaacatc atctccaact acagccacgg ttacaacagc | 120  |
| cccggcatca acaacgacaa gctgggaaac ctgaactact tcaccgagat cttcccaaag | 180  |
| atgtcttttc tgcaggaaga cgacgacgtc aaccagaaca agaacggtac tagcaacaag | 240  |
| gactctgaga agcaggacgc taactccatc gccgactctg actcactgaa ggacagggac | 300  |
| tacgctctgt tcaacggtaa cctgatcgcc gacctgaagg aggaagagcc tatcgacgaa | 360  |
| accgtgaag aggaaactat caacgagaac atcgacgaaa agaacacctc aactatcaag  | 420  |
| tacacccccg actacactcc acgcctgaag aaggtatgc acaccctggg ctacgacaag  | 480  |
| gagttcaagc tggccgaact gaccactatc cagtcctgcc ctaacgacaa cttcctgttc | 540  |
| gacatcttcc cccaggccat ccagaagtgc caggagaacg acatgaagta catccagacc | 600  |
| cagggtgacc agtacgtgga atgcatcaag aagcacaagc tggtcggctc agacaaccag | 660  |
| gacctgaagc tgaacttcgg aaactccgtg aacactttcg gtccttaca gatccccag   | 720  |
| aagatgatca ctttcgacct gatccgctg ccaagcaaca tcactcctgt caacctggct  | 780  |
| aacgactact acctgtccga gagcgagttc ccaaacctgc acaagctgaa ctactgcctg | 840  |
| ctgcaccctg ccaagctgga gaagctgctg aagcgtaagg acatcaagtc ttacatcaac | 900  |
| aacaccgaat ctggatcata cgacaacttc ttcaagaagg ctatgaacga gagcatcgaa | 960  |
| tgccacgtgg agaacacct gcacatgac ctgtctaagc tgactctgtt catgttcttc   | 1020 |
| aacgtcaaca agccagactc caagaacatc ctgaagaagc agctgtacat catcaagtct | 1080 |
| ggcctgtcat accgctcccg taagtacgtg gacaacgcct acaagaaggt catcaacaac | 1140 |
| ttcaaggact acgagaacaa gatcaagctg atcgacagca acctggaaaa catcacctct | 1200 |

tactacgtg cccacgttt cggaacctg tgcaacctt acatggagaa ggacaacatc 1260  
tacgaagcta acgcctacct gtacgagcac atcgcccta gcatcaagat cttctccagc 1320

tgcataagc acctgacat ctacaactac atcatctcaa acctgctggg ccaggtgaag 1380  
cacctgatgt cctacactcc taggaagccc atcctgaagg acatccactt caaggtctg 1440  
ctgaacaagt tcaagaagcc tcagaacgtg aacgagctgc catacgaccc taccgtcaag 1500  
tcattcgccc tggcgagct gactagagaa cccatccacg gactgatcca ctctacttc 1560  
gaatacaaga agaaggacct gctggacatc atgcagaagc tgaagctgga catcttcagc 1620  
ctggctaaca aggacctgaa gtccccctct gccgacctgc cagactacaa gctgttcaag 1680  
gacatcgtga acaagtacaa gaaggagatc aagatcctgt tccaggagat gaacagcgaa 1740

tacgtcaagc tgttcaagat gcgcatctct gctttctacc agaaggactt cttcatctac 1800  
gaccgtgtct tctaa 1815

<210> 5

<211> 409

<212> PRT

<213> Plasmodium berghei ANKA/MSP-8

<400> 5

Met Lys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Ile Phe Leu Leu Leu Ser Leu Val

1 5 10 15

Cys Lys Phe Ser Ile Gly Ile Cys Lys Glu Asn Gly Asn Gly Asn Ile

20 25 30

Asn Lys Ser Asn Asn Asn Arg Val Ile Lys Lys Glu Arg Lys Arg Lys

35 40 45

Ala Lys Ser Asn Ala Asn Lys Asn Glu Pro Glu Asn Lys Glu His Glu

50 55 60

Ile Ile Asn Leu Tyr Asp Asp Val Gln Glu Leu Leu Gly Asn Glu Arg

65 70 75 80

Met Ser Met Leu Asp Lys Tyr Ser Ile Leu Gly Ile Asp Asp Cys Ser

85 90 95

Asn Glu Ser Glu Asn Asn Lys Ile Ile Gly Glu Tyr Asp Leu Lys Ala

100 105 110

Met Lys Ser Val Leu Leu Tyr Lys Asn Arg Ile Ser Lys Val Ser Leu

115                      120                      125  
 Glu Asn Leu Tyr Asp Val Lys Thr Val Phe Lys Arg Cys Phe Asn Lys  
 130                      135                      140  
 Asp Asp Pro Glu Leu Ser Lys Ser Tyr Glu His Leu Gln Asp Gln Ala  
 145                      150                      155                      160  
 Ala Ile Glu Gly Thr Thr Ile Ile Asp Tyr Leu Ser Asn Tyr Ile Leu  
 165                      170                      175  
 Asn Val Tyr Val Lys Met Asn Asp Glu Phe Ile Lys Asn Asp Gly Phe  
  
 180                      185                      190  
 Lys Leu Ser Lys Tyr Ile Pro Glu Leu Glu Ile Ile Asn Tyr Ala Leu  
 195                      200                      205  
 Tyr Asn Gly Pro Lys Glu Leu Glu Asn Arg Ile Lys Ser Gly Leu Asn  
 210                      215                      220  
 Glu Ile Asn Asn Ile Ile Ile Ser Glu Ser Leu Thr Ser Ile Tyr Ser  
 225                      230                      235                      240  
 Ser Val Val Ser Gly Leu Asn Ile Asn Cys Lys Ile Lys Asp Asp Leu  
 245                      250                      255  
  
 Ile Thr Ile Leu Asn Leu Ser Asp Gly Lys Tyr Phe Lys Val Asp Phe  
 260                      265                      270  
 Ser Ser Gln Ala Thr Met Ile Val Pro Gly Gln Tyr Ser His Glu His  
 275                      280                      285  
 Gly Asn Met Lys Lys Ile Ser Glu Tyr Phe Ile Glu Lys Asn Arg Ile  
 290                      295                      300  
 Cys Lys Asn Glu Lys Cys Pro Ile Asn Ser Asn Cys Tyr Val Ile Asp  
 305                      310                      315                      320  
 Asn Val Glu Thr Cys Arg Cys Ile Pro Gly Phe Ser Lys Asn Lys Glu  
  
 325                      330                      335  
 Ser Glu Ser Leu Lys Cys Asp Ile Asp Glu Ser Thr Ser Cys Glu Asn  
 340                      345                      350  
 Asn Asn Gly Gly Cys Asp Val Asn Ala Thr Cys Leu Leu Leu Glu Asp  
 355                      360                      365  
 Lys Ile Met Cys Glu Cys Asn Asn Lys Tyr Asn Gly Asp Gly Ile Tyr

370                      375                      380  
 Cys Ser Asn Ala Ile Tyr Tyr Gly Met Asn Val Phe Val Phe Phe Leu  
 385                      390                      395                      400  
  
 Ile Ser Ile Val Cys Ile Tyr Ile Met  
 405  
 <210>      6  
 <211>      618  
 <212>      PRT  
 <213>      Plasmodium berghei ANKA/MSP-9  
 <400>      6  
 Met Lys Ile Ser Ile Val Ala Phe Pro Leu Leu Met Ile Ala Leu Arg  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Lys Ser Thr Asn Ala His Lys Thr Asn Asn Leu Glu Ala Gln Ile  
 20                      25                      30  
 Asn Tyr Gly Ile Ile Asn Asn Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Val Ala Lys  
 35                      40                      45  
  
 Cys Gln Tyr Cys Leu Thr Thr Thr Asn Pro Val Glu Glu Glu Asn Cys  
 50                      55                      60  
 Asp Glu Ile Met Glu Glu Cys Arg Gly Leu Leu Ser Asn Lys Asp Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Gly Phe Leu Leu Lys Ala Ile Thr Asp Glu Ser Met His Asn Lys Ser  
 85                      90                      95  
 Gln Tyr Ile His Gly Lys His Ser Asn Thr Leu Arg Arg Ile Ile Lys  
 100                      105                      110  
 Val Leu Glu Ala Gln Lys Lys Asn Ile Glu Ser Val Lys Asn Ile Val  
  
 115                      120                      125  
 Arg Asp Ile Lys Lys Ser Gly Asn Thr Gln Leu Arg Ser Ser Gly Thr  
 130                      135                      140  
 Ser Ile Ser Asp Leu Asp Lys Leu Asn Thr Ser Ile Lys Asn Ile Lys  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Gly Phe Gln Phe Leu Asn Asp Asn Tyr Ser Thr Ile Asn Lys His  
 165                      170                      175

Ile Asn Ile Pro Ser Gly Asp Met Asn Lys Ile Tyr Lys Arg Ile Val  
180 185 190

Asn Thr Asn Asn Phe Asp Gly Leu Ser Lys Ser Gln Glu Lys Ile Cys  
195 200 205

Ser Asn Glu Asp Asp Thr Asn Val Gly Ile Asp Asp Ile Ile Lys Ser  
210 215 220

Ser Val Gln Asp Ile Phe Asp Glu Gly Glu Asn Ile Met Asn Val Val  
225 230 235 240

Lys Thr Val Leu Val Gln Glu Ser Asp Gly Ile Gly Asn Glu Leu Ala  
245 250 255

Gly Leu Ile Glu Lys Gly Lys Glu Ile Gly Glu Gln Ile Val Asn Ile  
260 265 270

Glu Gly Leu Leu Ser Pro Lys Asn Gly Leu Phe Ser Gly Gly Leu Pro  
275 280 285

Ser Leu Asn Lys Leu Tyr Glu Phe Thr Ser Asn Leu Ser Ser Tyr Glu  
290 295 300

Tyr Leu Leu Val Lys Leu Lys Asp Ser Ile Ile Ser Lys Leu Lys Asp  
305 310 315 320

Ile Leu Leu Arg Leu Leu Tyr Lys Ser Tyr Ile Thr Tyr Arg Lys Asn  
325 330 335

Lys Ser Ile Glu Leu Gly Glu Glu Glu Ile Pro Met Val Ser Lys Asp  
340 345 350

Glu Tyr Leu Asp Glu Leu Lys Lys Gly Val Ile Gln Leu Ser Met Lys  
355 360 365

Leu Leu Tyr Ser Lys Ile Lys Arg Leu Leu Ile Lys Ile Lys Asn Lys  
370 375 380

Met Ser Arg Lys Lys Lys Thr Glu Asn Ile Pro Asp Pro Leu Pro Val  
385 390 395 400

Glu Ser Ser Ile Tyr Asp Tyr Asp Asp Asp Ala Ile Val Asp Asp  
405 410 415

Thr Ala Asp Asp Asp Ala Ala Asp Asp Val Ala Asp Asn Asp Lys

420 425 430  
Phe Ile Ser Phe Asn Lys Ser Ser Ser His Met Lys Leu Phe Arg Gly  
435 440 445  
Ile Leu Pro Gln Lys Lys Ser Ile Val Ser Thr Ile Asp Lys Met Ile  
450 455 460  
Ser Glu Ile Asp Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Tyr Thr Asp Thr His Ala  
465 470 475 480

Asp Tyr Glu Asn Asp Glu Ile Leu Ser Thr Val Glu Gly Met Asp Glu  
485 490 495  
Thr Glu Ser Asp Glu Ala Glu Leu Ser Asn Glu Cys Val Gln Lys Ile  
500 505 510  
Ile Asp Glu Asn Ile Ala Val Glu Ala Ile Asn Asn Leu Leu Lys Val  
515 520 525  
Asp Glu Ser Ala Val Glu Glu Arg Glu Asn Val Asn Asp Ser Glu Asn  
530 535 540  
Lys Ser Asn Asn Ser Ser Ile Asp Ile Glu Lys Gly Ala Ser Thr Pro

545 550 555 560  
Ser Asp Ile Ser Glu Ile Pro Asn Ile Ile Lys Lys Ile Val Ile Tyr  
565 570 575  
Val Ile Lys Glu Arg Ile Tyr Asp Leu Ala Glu Glu Leu Ser Asp Asn  
580 585 590  
Lys Leu Glu Asp Glu Ser Lys Thr Ser Thr Pro Ser Asn Asn Ile Ile  
595 600 605  
Leu Glu Asp Thr Pro Ala Pro Asn Gln Ala  
610 615

<210> 7

<211> 1230

<212> DNA

<213> Plasmodium berghei ANKA/MSP-8

<400> 7

atgaagaggt ccagccagat catcatcttc ctgctgctgt ctctgggtgtg caagtcttca 60

atcggatatct gcaaggagaa cggaacgggt aacatcaaca agtctaaca caacagagtc 120

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atcaagaagg aacgcaagcg taaggctaag tcaaacgcca acaagaacga gcccgaaaac  | 180  |
| aaggagcacg aaatcatcaa cctgtacgac gacgtgcagg agctgctggg caacgaacgc  | 240  |
| atgtccatgc tggacaagta cagcatcctg ggaatcgacg actgctctaa cgagtcagaa  | 300  |
| aacaacaaga tcatcggcga gtacgacctg aaggctatga agtccgtgct gctgtacaag  | 360  |
| aacaggatct ccaaggtcag cctggaaaac ctgtacgacg tgaagaccgt cttcaagaga  | 420  |
| tgcttcaaca aggacgaccc agagctgtct aagtcatacg aacacctgca ggaccaggct  | 480  |
| gccatcgagg gaaccactat catcgactac ctgtccaact acatcctgaa cgtgtacgtc  | 540  |
| aagatgaacg acgatttcat caagaacgac ggtttcaagc tgagcaagta catccctgag  | 600  |
| ctggaaatca tcaactacgc tctgtacaac ggaccaagg agctggaaaa ccgcatcaag   | 660  |
| tctggcttga acgagatcaa caacatcatc atctccgaaa gcctgacctc tatctactct  | 720  |
| tcagtgggtg ccggtctgaa catcaactgc aagatcaagg acgacctgat caccatcctg  | 780  |
| aacctgtccg acggcaagta cttcaagggt gactttctcca gccaggccac tatgatcgtc | 840  |
| cctggacagt actcccacga gcacggcaac atgaagaaga tcagcgagta cttcatcgaa  | 900  |
| aagaaccgca tctgcaagaa cgagaagtgc ccaatcaact ctaactgcta cgtgatcgac  | 960  |
| aacgtcgaaa ctgtccgttg catccctggc ttctcaaaga acaaggagtc tgaatcactg  | 1020 |
| aagtgcgaca tcgacgagtc caccagctgc gaaaacaaca acggtggctg cgacgtgaac  | 1080 |
| gtactttgcc tgctgttga ggacaagatc atgtgcgaat gcaacaacaa gtacaacggc   | 1140 |
| gacggaatct actgtccaa cgccatctac tacggaatga acgtgttcgt cttcttctg    | 1200 |
| atcagcatcg tctgcatcta catcatgtaa                                   | 1230 |
| <210> 8                                                            |      |
| <211> 1857                                                         |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> Plasmodium berghei ANKA/MSP-9                                |      |
| <400> 8                                                            |      |
| atgaagataa gtatcgtggc attcccttta cttatgattg ctctcagaag caaatctacc  | 60   |
| aatgtcata aaacaaataa tttggaagcc caaattaatt atggtattat aaataattat   | 120  |
| aacgaattgt taaaagtagc aaaatgccaa tattgcttaa ctaccaccaa tcctgttgaa  | 180  |
| gaagaaaatt gtgatgaaat aatggaagaa ttagaggat tgttaagcaa taaagacctt   | 240  |
| ggatttttat taaaagccat aacagatgag tctatgcata ataaatctca atatatcat   | 300  |
| ggaaaacata gtaatacatt aagaagaatt attaaagttt tagaagcaca aaaaaaaaaat | 360  |
| attgaatcag taaaaaatat tgtacgtgat attaaaaaaa gtggttaatac acagttaaga | 420  |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| agtagtggtta caagtatttc agatttagat aaattaaaca caagcattaa aaatataaaa | 480  |
| aaaggtttcc aattttttaa tgataattac agcacaatta ataacacat aaatatacca   | 540  |
| agtggtgata tgaataaaat ttataaaaga atagtaaaca caaataattt tgatgggtta  | 600  |
| tcaaaatcac aagaaaaaat ttgttcaaat gaagacgaca ccaatgtagg tattgatgat  | 660  |
| attataaaat caagtgttca agatattttt gatgaggag aaaatataat gaatgtagtt   | 720  |
| aaaactgttt tagtacaaga aagtgatgga attggaaatg aattagcagg gttaattgaa  | 780  |
| aaaggaaaag aaatcggaga acaaattgta aatattgaag gattgttata tccaaaaat   | 840  |
| ggattattta gtggcggttt accatcatta aataagttgt atgaatttac aagtaattta  | 900  |
| tcatcttatg aatatttgtt agttaagctc aaagattcaa taatatcaaa attaaaagac  | 960  |
| atattattaa gattgttata taaatcata atacttaca gaaaaataa atcaattgag     | 1020 |
| ttaggagaag aagaaatacc aatggttagc aaggatgaat atttagatga attaaaaaa   | 1080 |
| ggtgtaatac aattaagtat gaaattatta tatagcaaaa tcaaaaggtt attaattaaa  | 1140 |
| attaaaaaca aaatgtcccg taaaaagaaa acggaaaata ttcctgaccc attaccagtt  | 1200 |
| gaatcctcaa tttatgatta tgatgatgac gatgcaattg tcgacgatac agctgatgat  | 1260 |
| gatgcagctg atgatgatgt agctgataat gataaattta tttcatttaa taaatcctcg  | 1320 |
| tcacatatga aattattcag aggtattttg ccccgaaaa aatctattgt atctaccatc   | 1380 |
| gataagatga ttagtgaaat cgatttata gaacaaggat tatatactga tacacatgca   | 1440 |
| gattatgaaa acgatgaaat cttatctact gtcgaaggta tggatgaaac agaactgat   | 1500 |
| gaagctgaat tgtcaaatga gtgtgttcag aaaattatcg atgaaaacat tgccgtagaa  | 1560 |
| gctatcaaca atttacttaa agtcgatgaa tctgcagtag aggaaaggga aaatgtaaat  | 1620 |
| gattcagaaa ataatcaaa taattcatcc attgacattg aaaagggtgc tagtactcct   | 1680 |
| agtgacattt cagaaattcc taacatcata aaaaaaatcg ttatatatgt tataaaagaa  | 1740 |
| agaatatatg atttagcaga agaattatca gacaataaac tcgaggatga atctaaaaca  | 1800 |
| tcaacacctt caaacaatat aatcctagaa gatacaccag ctccaaacca agcataa     | 1857 |