



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0075073
(43) 공개일자 2015년07월02일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>A61K 39/145</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/85</i> (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/63</i> (2013.01)
 <i>A61K 39/145</i> (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0084090(분할)
 (22) 출원일자 2015년06월15일
 심사청구일자 2015년06월15일
 (62) 원출원 특허 10-2013-0026767
 원출원일자 2013년03월13일
 심사청구일자 2013년03월13일</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
 (72) 발명자
 박세호
 서울특별시 강북구 도봉로65길 17 (미아동)
 이은비
 경기도 수원시 권선구 금곡로 15, 301호 (금곡동, 금곡아트빌)
 (74) 대리인
 이처영, 장제환</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 12 항

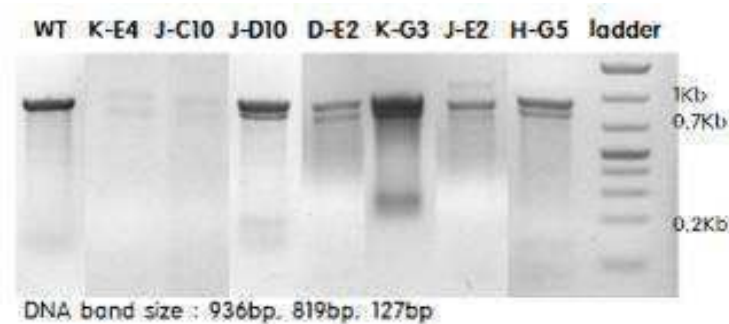
(54) 발명의 명칭 **바이러스 생산능이 증가된 세포주 및 그 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 바이러스 생산능이 증가된 세포주 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 바이러스 방출을 억제하는 *Bst2*(테드린, Tetherin)을 제거 시키거나, 그 기능을 상실시켜 바이러스가 숙주의 방해를 받지 않고 세포외 방출될 수 있도록 하여 바이러스 생산능이 증가된 세포주 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, *Bst2*가 제거되거나, 그 기능이 상실된 세포주는 야생형 세포주에 비해 바이러스 생산능이 우수하므로, 이를 바이러스 생산 세포주로 이용하는 경우, 바이러스 생산 수율을 증가시킬 수 있고 이렇게 생산된 바이러스는 해당 바이러스성 질병의 예방 및 치료를 목적으로 하는 백신의 제조 및 연구에 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 7/00 (2013.01)

C12N 2760/16111 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A10300110111170100

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 신종인플루엔자범부처사업

연구과제명 인플루엔자 바이러스 방출 억제에 미치는 테더린(BST-2)의 기능과 이의 조절

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2011.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

바이러스 생산능이 있는 세포주에서, *Bst2* 유전자 exon1 부위에 특정 염기서열을 삽입시키거나 또는 *Bst2* 유전자 exon1 부위의 특정 염기서열을 결실시켜, *Bst2* 유전자의 기능을 상실시킨 것을 특징으로 하는 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 또는 2로 표시되는 *Bst2* 유전자 exon1 부위에 1~15개의 염기가 삽입되거나 또는 상기 exon1 부위에서 1~15개의 염기가 결실된 것을 특징으로 하는 돌연변이 세포주.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 1의 45번 내지 50번의 염기가 1개 내지 4개 결실되거나, 서열번호 1의 45번 내지 50번 부위에 염기가 1개 내지 3개 삽입된 것을 특징으로 하는 서열번호 3 내지 8로 표시되고, 그 기능이 상실된 *Bst2* 유전자를 포함하는 돌연변이 세포주.

청구항 4

제2항에 있어서, 서열번호 2의 116번 내지 130번 염기가 1개 내지 12개 결실된 것을 특징으로 하는 서열번호 9 및 10으로 표시되고, 그 기능이 상실된 *Bst2* 유전자를 포함하는 돌연변이 세포주.

청구항 5

제1항에 있어서, 바이러스 생산능이 있는 세포주는 동물세포주인 것을 특징으로 하는 돌연변이 세포주.

청구항 6

제5항에 있어서, MDCK 또는 vero 세포주인 것을 특징으로 하는 돌연변이 세포주.

청구항 7

제1항에 있어서, 바이러스는 인플루엔자인 것을 특징으로 하는 돌연변이 세포주.

청구항 8

제7항에 있어서, 인플루엔자 바이러스는 Pandemic/H1N1, A/H1N1 및 A/H3N2로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 돌연변이 세포주.

청구항 9

바이러스 생산능이 있는 세포주에서, *Bst2* 유전자 exon1 부위에 특정 염기서열을 삽입시키거나 또는 *Bst2* 유전

자 exon1 부위의 특정 염기서열을 결실시켜, *Bst2* 유전자의 기능을 상실시키는 것을 특징으로 하는 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주의 제조방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 목적 바이러스의 제조방법:

- (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 돌연변이 세포주에 목적 바이러스를 감염시키는 단계: 및
- (b) 목적 바이러스가 감염된 세포주를 배양한 후, 상등액을 수득하고 원심분리하여 목적 바이러스를 수득하는 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 (a) 단계는 목적 바이러스를 0.005~0.05 MOI로 감염시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이러스성 질병에 대한 백신의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 바이러스 생산능이 증가된 세포주 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 바이러스 방출을 억제하는 *Bst2*(테드린, Tetherin)유전자의 기능을 상실시켜 바이러스가 숙주의 방해를 받지 않고 세포의 방출될 수 있도록 하여 바이러스 생산능이 증가된 세포주 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

지금까지 백신 제조를 위한 바이러스를 생산하기 위해서는 인플루엔자 바이러스의 경우 유정란에 바이러스 종균을 접종하여 증식시키는 방법(KR 2012-0103737 A)을 사용하였으나 이는 계란 알레르기가 있는 사람에게 사용이 힘들거나 바이러스 증식용 유정란의 공급 안정성 등에서 매우 효율이 떨어지는 단점이 있어, 최근들어서는 배양 세포주에서 바이러스를 생산하여 백신을 제조하는 방법(KR 2012-0033334 A)이 사용되고 있다.

[0004]

바이러스가 체내에 감염되면 감염세포에서 바이러스의 증식이 일어나고 증식된 바이러스 입자들은 다시 세포막을 통해 방출(budding out) 되어 주변의 다른 세포들을 재감염시킨다. 바이러스의 감염에 대응하는 세포의 생체 방어 메커니즘의 일환으로 세포막에 *Bst2* 유전자가 발현되고 있다. *Bst2*는 N말단과 C말단 양쪽에 세포막과 결합하는 부위를 가지고 있어서 마치 세포막에 다리처럼 가운데가 들려진 형태로 발현되는데, C말단은 세포막 중 lipid raft 부위에 위치하고 N말단은 비lipid raft 부위에 존재한다. 바이러스가 세포 내부로부터 세포외부로 출아하기 위해 lipid raft 부위에서 빠져나갈 때 *Bst2*는 비lipid raft 부위에 고정된 부위를 통해 바이러스 입자가 세포막을 뚫고 나가는 것을 억제한다. 포유동물 세포의 이러한 방어 기작에 대해 일부의 바이러스들은 이를 회피하기 위한 기작으로 *Bst2* 유전자의 분해를 촉진하는 단백질을 생산하여 숙주세포의 억제 기능을 우회하기도 한다. 이런 점은 역설적으로 *Bst2* 유전자의 기능이 바이러스의 생산 억제에 강력하게 기여함을 보여주고 있다. 그러나 모든 바이러스들이 이러한 기능을 획득한 것은 아니어서 일부의 바이러스 종류, 대표적인 HIV 바이러스의 경우 Vpu 유전자를 통해 *Bst2* 유전자의 분해를 촉진하는 기능을 가지고 있을뿐 그 외 대부분의 바이러스들은 아직 *Bst2* 유전자를 표적화하는 회피기작을 가지고 있지 않다.

[0005]

따라서 바이러스를 효율적으로 대량 생산하여, 백신 제조 등에의 응용을 위해서는 *Bst2* 유전자의 분해를 촉진하지 않는 바이러스의 경우, 바이러스를 배양하는 동물 세포 등에서 *Bst2* 유전자의 기능을 상실 또는 억제할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 야생형 세포주에 비해 바이러스 생산능이 증가된 세포주 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이러스 생산능이 증가된 변이 세포주를 이용한 바이러스의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이러스 생산능이 증가된 변이 세포주를 이용한 백신의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바이러스 생산능이 있는 세포주의 *Bst2* 유전자 기능을 상실시킨 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 바이러스 생산능이 있는 세포주의 *Bst2* 유전자의 기능을 상실시킨 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, (a) 상기 돌연변이 세포주에 목적 바이러스를 감염시키는 단계; 및 (b) 목적 바이러스가 감염된 세포주를 배양한 후, 상등액을 수득하고 원심분리하여 목적 바이러스를 수득하는 단계를 포함하는 목적 바이러스의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이러스성 질병에 대한 백신의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따르면, *Bst2* 유전자의 기능이 상실된 세포주는 야생형 세포주에 비해 바이러스 생산능이 우수하므로, 이를 바이러스 생산 세포주로 이용하는 경우, 바이러스 생산 수율을 증가시킬 수 있고 이렇게 생산된 바이러스는 해당 바이러스성 질병의 예방 및 치료를 목적으로 하는 백신의 제조 및 연구에 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 중합효소 연쇄 반응시킨 *Bst2* 유전자를 돌연변이 시킨 MDCK 세포주의 반응물을 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 중합효소 연쇄 반응시킨 *Bst2* 유전자를 돌연변이 시킨 vero 세포주의 반응물을 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 야생형 MDCK 세포와 *BST2* 유전자를 돌연변이 시킨 MDCK 세포주에 바이러스를 감염시킨 후 수득된 상층액을 이용하여 plaque assay를 통해 역가를 측정하는 것이다.
- 도 4는 야생형 vero 세포와 *BST2* 유전자를 돌연변이 시킨 vero 세포주에 바이러스를 감염시킨 후 수득된 상층액을 이용하여 plaque assay를 통해 역가를 측정하는 것이다.
- 도 5는 야생형 MDCK 세포와 *BST2* 유전자를 돌연변이 시킨 MDCK 세포주를 희석하여 바이러스를 감염시킨 후 배양한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 야생형 vero세포와 *BST2* 유전자를 돌연변이 시킨 vero 세포주를 희석하여 바이러스를 감염시킨 후 배양한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명에서는 *Bst2* 유전자의 기능을 상실시켜 바이러스가 숙주의 방해를 받지 않고 세포의 방출될 수 있도록 하여 바이러스 생산능이 증가된 세포주를 제조할 수 있다는 것을 확인하고자 하였다.
- [0020] 본 발명에서 “생산능”이란, 세포내에 있는 바이러스가 배양액으로 방출되어 배양액의 바이러스 역가가 증가한

것을 의미한다.

- [0021] 본 발명에서 “기능 상실”이란, Bst2 유전자의 염기 일부를 돌연변이시켜 세포내 바이러스를 배양액으로 방출시키는 것을 의미하며 바람직하게는 exon1 부위의 염기를 결실, 삽입, knock-out 및 gene silencing하는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 “바이러스”란, 사람이나 동물에 질병을 유발할 수 있는 바이러스를 의미하며 바람직하게는 인플루엔자 바이러스를 의미하며 더욱 바람직하게는 P/H1N1, A/H1N1 및 A/H3N2로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 일 관점에서, 바이러스 생산능이 있는 세포주의 Bst2 유전자 기능을 상실시킨 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주에 관한 것이다.
- [0024] 상기 바이러스 생산능이 있는 세포주는 인플루엔자 백신 개발에 사용되는 세포주를 종류에 상관없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 동물유래 세포주를 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 MDCK 세포주 또는 vero 세포주를 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 사용된 MDCK(Madin-Darby, canine kidney) 세포주는 개의 신장에서 수립한 상피유사세포이며, vero 세포주는 원숭이 신장 내막에서 수립한 세포이다. 이 둘은 간염바이러스, 백시니아바이러스 및 독감바이러스 등에 감수성을 나타내므로 바이러스연구에 가장 흔하게 사용되는 세포주이다.
- [0026] 본 발명에서는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 Bst2 유전자의 exon1 부위의 염기를 1개 내지 15개 삽입 또는 결실시켜 돌연변이 세포주를 제조하고자 하였다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 1로 표시되는 MDCK 세포주의 Bst2 유전자의 exon1 염기를 결실 또는 삽입시켜 돌연변이된 대립유전자를 포함하는 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주 7개를 제조하였다.
- [0028] 서열번호 1:
- [0029] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCATAACTGACGAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCCTCCTGGAGCGCCAACTAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACTGCAACAAGACTGTG
- [0030] 본 발명에서는 상기 서열번호 1의 45번 내지 50번의 염기가 1개 내지 4개 결실시키거나, 1개 내지 3개 삽입시켜 Bst2 유전자의 기능이 상실된 돌연변이 세포주를 제조하고자 하였으며 하기 서열번호 3 내지 8의 염기서열을 갖는 세포주를 포함할 수 있고, 바람직하게는 K-E4, J-C10, J-D10, D-E2, K-G3, J-E2 및 H-G5일 수 있다.
- [0031] 서열번호 3: ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCATAACTGA--AGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCCTCCTGGAGCGCCAACTAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACTGCAACAAGACTGTG
- [0032] 서열번호 4: ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCATAAC--ACGAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCCTCCTGGAGCGCCAACTAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACTGCAACAAGACTGTG
- [0033] 서열번호 5: ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCATAACT----AGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCCTCCTGGAGCGCCAACTAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACTGCAACAAGACTGTG
- [0034] 서열번호 6: ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCATAACT---GAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCCTCCTGGAGCGCCAACTAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACTGCAACAAGACTGTG
- [0035] 서열번호 7: ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCATAAC----GAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATC

TTTGTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCAACAGCCTCCTGGAGCGCCAACCTAACCCAAACC
CGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAGACTGTG

[0036] 서열번호 8:

[0037] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCATAACTGACGACGAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTG
GGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAG
CAGGAGTGTACAATGTCAACAGCCTCCTGGAGCGCCAACCTAACCCAAACCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAGACT
GTG

[0038] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 서열번호 2로 표시되는 vero 세포주의 Bst2 유전자의 exon1 염기를 결실시
켜 돌연변이된 대립유전자를 포함하는 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주 2개를 제조하였다.

[0039] 서열번호 2:

[0040] ATGGCACCTATTTGTATGACTATTGCAAAATGCCCATGGATGACATTTGCAAGGAAGACAGGGACAAGTGCTGTAACTGGCCGTAGGAATTCTGGGGCTC
CTGGTCATAGTGCTTCTGGGGTGCCCTGATTTTCTTCATCATCAAGGCCAACAGCGAGGCTGCCAGGATGGCCTCCGGGCAGTGATGGAGTGTACAAT
GTCACCTATCTCCTGCAACAAGAGCTGGCCGAGGCCAGCGGGCTTTCGGGACGCAGAGGCCAGGCTGTACCTGCAACCAGACTGTG

[0041] 본 발명에서는 상기 서열번호 2의 116번 내지 130번의 염기가 1개 내지 12개 결실시켜 Bst2 유전자의 기능이 상
실된 돌연변이 세포주를 제조하고자 하였으며 하기 서열번호 9 및 10의 염기서열을 갖는 세포주를 포함할 수 있
고, 바람직하게는 D-D8 및 G-D5일 수 있다.

[0042] 서열번호 9:

[0043] ATGGCACCTATTTGTATGACTATTGCAAAATGCCCATGGATGACATTTGCAAGGAAGACAGGGACAAGTGCTGTAACTGGCCGTAGGAATTCTGGGGCTC
CTGGTCATAGTGC-----
CCCTGATTTTCTTCATCATCAAGGCCAACAGCGAGGCTGCCAGGATGGCCTCCGGGCAGTGATGGAGTGTACAATGTACCTATCTCCTGCAACAAGAGC
TGGCCGAGGCCAGCGGGCTTTCGGGACGCAGAGGCCAGGCTGTACCTGCAACCAGACTGTG

[0044] 서열번호 10:
ATGGCACCTATTTGTATGACTATTGCAAAATGCCCATGGATGACATTTGCAAGGAAGACAGGGACAAGTGCTGTAACTGGCCGTAGGAATTCTGGGGCTC
CTGGTCATAGTGC-----
TGATTTTCTTCATCATCAAGGCCAACAGCGAGGCTGCCAGGATGGCCTCCGGGCAGTGATGGAGTGTACAATGTACCTATCTCCTGCAACAAGAGCTGG
CCGAGGCCAGCGGGCTTTCGGGACGCAGAGGCCAGGCTGTACCTGCAACCAGACTGTG

[0045] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 바이러스 생산능이 있는 세포주의 Bst2 유전자가 발현되지 않도록 돌연변이
시킨 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주의 제조방법에 관한 것이다.

[0046] 본 발명에서는 제조된 돌연변이 세포주의 염기서열을 분석한 결과, MDCK 세포의 K-E4, J-C10 및 J-D10 세포에서
대립유전자 모두에 해독틀 이동 돌연변이가 발생된 것을 확인할 수 있었다.

[0047] 본 발명에서 “해독틀 이동 돌연변이”란, 유전 암호는 유전자의 염기 3개를 하나의 틀로서 읽을 수 있는데, 염
기가 1개, 2개 또는 3의 배수가 아닌 수로 결실 또는 삽입되어 유전암호를 읽을 수 있는 해독틀이 달라지는 돌
연변이를 의미한다.

[0048] 상기 돌연변이 세포주 J-D10은 기탁번호 KCLRF-BP-00285로 기탁되었다.

[0049] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 돌연변이 세포주에 목적 바이러스를 감염시키는 단계: 및 (b) 목적 바이
러스가 감염된 세포주를 배양한 후, 상등액을 수득하고 원심분리하여 목적 바이러스를 수득하는 단계를 포함하
는 목적 바이러스의 제조방법에 관한 것이다.

[0050] 본 발명에서 상기 인플루엔자 바이러스는 P/H1N1, A/H1N1 및 A/H3N2로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 사용할
수 있으며, 바이러스는 0.005~0.05 MOI로 감염시키는 것이 바람직하다.

[0051] 본 발명에서는 상기 해독틀 이동 돌연변이가 일어난 세포를 6-well plate에 깔고 24시간 내지 48시간동안 배양
후, 인플루엔자 바이러스가 들어있는 배양액에 접종하였다.

[0052] 세포의 수는 1×10^4 내지 1×10^7 일 수 있으며, 바람직하게는 5×10^4 내지 5×10^6 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 1×10^5
내지 1×10^6 일 수 있다.

- [0053] 상기 배양액에 접종된 바이러스는 30분 내지 2시간동안 37℃ 5% CO₂ 인큐베이터에서 감염시키는 것이 바람직하다.
- [0054] 감염시킨 바이러스는 새로운 배양액을 넣어 50~70시간동안 배양한 후, 배양액을 걷어 적절한 조건으로 원심분리하여 상층액을 수득할 수 있고, 바람직하게는 4℃ 내지 15℃에서 1500rpm 내지 5000rpm으로 5분 내지 15분간 원심분리하여 상층액을 수득할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서는 *Bst2* 유전자가 발현되지 않는 돌연변이 세포주에 바이러스를 감염시 형성되는 플라그를 확인하고자 하였다.
- [0056] 상기 세포주를 배양액에 희석하고 바이러스를 감염시켜 배양한 결과 돌연변이 세포주의 바이러스 생산능이 증가함을 알 수 있었다.
- [0057] 상기 바이러스 생산능이 증가된 바이러스는 인플루엔자 바이러스 유발 질병을 예방 혹은 치료하기 위한 백신의 제조에 사용할 수 있다.
- [0058] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 바이러스 생산능이 증가된 돌연변이 세포주를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이러스성 질병에 대한 백신의 제조방법에 관한 것이다.
- [0059] 상기 백신 조성물에는 약학적으로 허용가능한 면역보조제(adjuvant) 또는 부형제가 추가적으로 포함될 수 있다. 면역보조제로는 체내에 주입시 항체 형성을 증진시키는 역할을 하여 본 발명에서의 목적 달성이 가능한 것이라면 어떤 것이라도 사용가능하며, 특히 알루미늄염(Al(OH)₃, AlPO₄), 스쿠알렌(squalene), 소르비탄(sorbitane), 폴리소르베이트 80(polysorbate 80), CpG, 리포솜, 콜레스테롤, MPL(monophosphoryl lipid A) 및 GLA(glucopyranosyl lipid A)에서 선택된 하나 이상이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] **[실시예]**
- [0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0064] **실시예 1: *Bst2*가 돌연변이된 MDCK 세포주의 제조 및 돌연변이 확인**
- [0065] 100Φ 배양접시에 고려대 송문정교수님 실험실에서 분양받은 5X10⁵ 개의 야생형 MDCK 세포주를 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 5 μM β-mercaptoethanol, 10 μg/ml gentamicine, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin가 첨가된 DMEM complete (GIBCO) 배지에서 24시간 배양후, 서열번호 1로 표시되는 *Bst2* 유전자의 exon 1 부위와 결합 가능한 TALEN 벡터(ToolGen)1쌍, 리포터 벡터(ToolGen)1개 및 Turbofect reagent(Thermo)를 섞은 총 15μg을 배양중인 세포에 넣고 48시간 동안 37℃ 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.
- [0066] 상기 배양된 반응물을 FACS Aria(BD Bioscience)를 이용하여 GFP와 RFP에 모두 양성인 세포를 선택적으로 고른 500개의 세포를 96-well에 분주하여 단일 클론 세포를 수득하였다.
- [0067] 상기 수득된 단일 클론 세포의 돌연변이 여부를 확인하기 위하여, 단일 클론 세포에 lysis 버퍼(50mM Tris-Cl, pH8.0, 50mM EDTA, 1% SDS, 10mM NaCl, 100μg/ml proteinase K)(300μl)를 추가하여 54℃에서 16시간 반응시켰다. 그리고 반응물에 페놀과 클로로폼이 1:1로 섞인 용액 300μl을 추가하여 섞은후 1700 xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 (300μl)을 새 튜브에 옮겨 닦고 100% 에탄올(600μl)와 3M 아세트산나트륨 90μl을 첨가한후 1700xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 제거하고 70% 에탄올 1ml을 넣어 1700xg에서 2분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 바닥에 남아있는 genomic DNA를 3분간 말린 후 DW 50μl에 다시 녹였다. 상기 추출한 Genomic DNA에 서열번호 11로 표시되는 dBst2-F primer 및 서열번호 12로 표시되는 dBst2-R primer를 이용하여 95℃ 5분, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분, 72℃ 10분의 조건으로 25사이클을 반복하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.
- [0068] 상기 반응물을 10⁻³으로 희석하여 서열번호 13으로 표시되는 NdBst2-F primer 및 서열번호 14로 표시되는 NdBst2-R primer를 이용하여 95℃ 5분, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분, 72℃ 10분의 조건으로 25사이클을 반복하여 다시 한번 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.
- [0069] 서열번호 11: 5 ‘-GGTCAGGATGGCTCCTATGC-3’

- [0070] 서열번호 12: 5 ‘-AACCTGACAGGGTCACCTGG-3’
- [0071] 서열번호 13: 5 ‘-GTAGCCCCAGCCAAAGGTTTC-3’
- [0072] 서열번호 14: 5 ‘-AGGCCTCCCCATGCCCAAAC-3’
- [0073] 상기 반응물의 표적부위에 돌연변이를 확인하기 위하여 반응물을 95℃ 5분, 95℃에서 85℃까지 1초에 2℃씩 온도를 떨어뜨린 후 85℃에서 25℃까지 1초에 0.3℃씩 떨어뜨린 후 16℃에서 정지하는 조건으로 PCR을 이용하여 melting/annealing 반응을 시켰다. 그리고 수득된 반응물에 T7E1 효소(ToolGen)를 처리하여 37℃에서 15분간 반응 시킨 후 전기영동하여 반응물의 사이즈를 확인한 결과, 서열번호 2로 표시되는 exon 1부위에 돌연변이가 일어났을 것으로 추정되는 세포주들은 정상적인 PCR 반응물 사이즈와 핵산내가수분해효소(endonuclease)에 의해 내부가 절단된 2개의 밴드가 추가로 생겨 돌연변이가 일어났음을 확인하였다(도 1).
- [0074] 상기 돌연변이가 확인된 세포주들의 염기서열을 분석하기 위해, 상기 T7E1 효소를 처리하여 반응시킨 반응물을 Bgl II-Xba I 을 이용하여 자르고, pUC18 벡터와 결찰(ligation)한 후, ampicillin과 X-gal-IPTG가 들어있는 배지에 배양하여 흰색 콜로니를 수득하였다. 수득된 흰색 콜로니를 각 클론별로 6개씩 선택하여 염기서열 분석하였다.
- [0075] 그 결과, *Bst2*의 exon 1 부위의 염기가 결실 또는 삽입된 돌연변이 세포주 7개(K-E4, J-C10, J-D10, D-E2, K-G3, J-E2 및 H-G5)중 3개(K-E4, J-C10, J-D10)는 한 쌍의 대립유전자 모두에서 해독틀 이동 돌연변이가 발생된 것을 확인하였다.
- [0077] **실시예 2: *Bst2*가 돌연변이된 vero 세포주의 제조 및 돌연변이 확인**
- [0078] 100Φ 배양접시에 University of Southern California, Chengyu Liang실험실에서 분양받은 5×10^5 개의 야생형 vero 세포주를 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 5 μM β-mercaptoethanol, 10 μg/ml gentamicine, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin 가 첨가된 DMEM complete (GIBCO) 배지에서 24시간 배양후, 서열번호 2로 표시되는 *Bst2* 유전자의 exon 1 부위와 결합 가능한 L1-DAW 및 R1-RR로 구성된 TALEN 벡터(ToolGen)1쌍, 리포터 벡터(ToolGen)1개 및 Turbofect reagent(Thermo)를 섞은 총 12μg을 배양중인 세포에 넣고 48시간 동안 37℃ 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.
- [0079] 상기 배양된 반응물을 FACS Aria(BD Bioscience)를 이용하여 GFP와 RFP에 모두 양성인 세포를 선택적으로 고른 500개의 세포를 96-well에 분주하여 단일 클론 세포를 수득하였다.
- [0080] 상기 수득된 단일 클론 세포의 돌연변이 여부를 확인하기 위하여, 단일 클론 세포에 lysis 버퍼(50mM Tris-Cl, pH8.0, 50mM EDTA, 1% SDS, 10mM NaCl, 100μg/ml proteinase K)(300μl)를 추가하여 54℃에서 16시간 반응시켰다. 그리고 반응물에 페놀과 클로로폼이 1:1로 섞인 용액 300μl을 추가하여 섞은후 1700 xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 (300μl)을 새 튜브에 옮겨 닦고 100% 에탄올(600μl)와 3M 아세트산나트륨 90μl을 첨가한후 1700xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 제거하고 70% 에탄올 1ml을 넣어 1700xg에서 2분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 바닥에 남아있는 genomic DNA를 3분간 말린 후 DW 50μl에 다시 녹였다. 상기 추출한 Genomic DNA에 서열번호 11로 표시되는 dBst2-F primer 및 서열번호 16으로 표시되는 AGM-R primer를 이용하여 95℃ 5분, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분, 72℃ 10분의 조건으로 25사이클을 반복하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.
- [0081] 상기 반응물을 10^{-3} 으로 희석하여 서열번호 15로 표시되는 AGM-F primer 및 서열번호 16으로 표시되는 AGM-R primer를 이용하여 95℃ 5분, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분, 72℃ 10분의 조건으로 25사이클을 반복하여 다시 한번 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.
- [0082] 서열번호 15: 5 ‘-GAGGGGAGATCTGGATGG-3’
- [0083] 서열번호 16: 5 ‘-CTTCTCTGCATCCAGGAAG-3’
- [0084] 상기 반응물의 표적부위에 돌연변이를 확인하기 위하여 반응물을 95℃ 3분, 85℃에서 25℃까지 1초에 2℃씩 온도를 떨어뜨린 후 16℃에서 정지하는 조건으로 PCR을 이용하여 melting/annealing 반응을 시켰다. 그리고 수득된 반응물에 T7E1 효소(ToolGen)를 처리하여 37℃에서 15분간 반응 시킨 후 전기영동하여 반응물의 사이즈를 확인한 결과, 서열번호 2의 exon 1부위에 돌연변이가 일어났을 것으로 추정되는 세포주2개는 정상적인 PCR 반응물 사이즈와 핵산내가수분해효소(endonuclease)에 의해 내부가 절단된 2개의 밴드가 추가로 생겨 돌연변이가 일어났

음을 확인하였다(도1b). 이 후 BST-2 돌연변이가 확인된 단일세포의 이름을 D-D8 및 G-D5라고 명명하였다.

실시예 3: Bst2가 돌연변이된 MDCK 세포주의 바이러스 생산능

Bst2 유전자가 발현되지 않는 돌연변이 세포주의 바이러스 생산능을 확인하기 위해, 야생형 MDCK 세포주와 실시예 1에서 수득된 Bst2 유전자 exon1 부위에 해독틀 이동 돌연변이가 일어난 세포주 K-E4, J-C10, J-D10의 바이러스 생산능을 비교하였다.

6-well에 MDCK 야생형 세포주 및 실시예 1에 의해 제조된 돌연변이 세포주를 5×10^4 cells/well로 seeding하고 48시간 후 P/H1N1을 0.01 MOI로 감염시켰다. 그리고 72시간 후 상층액을 걷어 상층액의 역가를 측정하였다.

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 K-E4의 바이러스 생산량은 야생형 MDCK의 바이러스 생산량 1.8×10^4 pfu/ml에 비해 5×10^4 pfu/ml로 3배 증가하였고, J-C10의 바이러스 생산량은 MDCK의 바이러스 생산량 1.8×10^4 pfu/ml에 비해 2.2×10^4 pfu/ml로 1.2배 증가하였으며, J-D10의 바이러스 생산량은 MDCK의 바이러스 생산량 1.8×10^4 pfu/ml에 비해 2.5×10^4 pfu/ml로 14배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

또한, J-C10, J-D10의 세포주를 10^{-3} , 10^{-4} 및 10^{-5} 로 희석하여 P/H1N1 바이러스를 감염시킨 후 48시간동안 배양하여 바이러스가 형성하는 플라그를 확인한 것을 도3a에 나타내었다.

따라서, Bst2 유전자가 발현되지 않도록 해독틀 이동 돌연변이가 일어난 세포주는 야생형 세포주에 비해 바이러스 생산능이 증가됨을 확인할 수 있었다.

실시예 4: Bst2가 돌연변이된 vero 세포주의 바이러스 생산능

Bst2 유전자가 발현되지 않는 돌연변이 세포주의 바이러스 생산능을 확인하기 위해, 야생형 vero 세포주와 실시예 2에서 수득된 Bst2 유전자 exon1 부위에 돌연변이가 일어난 세포주 D-D8 및 G-D5의 바이러스 생산능을 비교하였다.

6-well에 vero 야생형 세포주 및 실시예 2에 의해 제조된 돌연변이 세포주를 1×10^4 cells/well로 seeding하고 60시간 후 H3N2를 0.01 MOI로 감염시켰다. 그리고 72시간 후 상층액을 걷어 상층액의 역가를 측정하였다.

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 D-D8의 바이러스 생산량은 야생형 vero의 바이러스 생산량 2.5×10^5 pfu/ml에서 6.5×10^5 pfu/ml로 약 3배 증가하였고, G-D5의 바이러스 생산량은 vero의 바이러스 생산량 2.5×10^5 pfu/ml에서 1.9×10^6 pfu/ml로 약 8배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

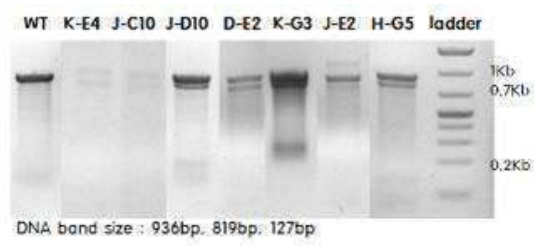
또한, D-D8 및 G-D5의 세포주를 10^{-2} , 10^{-3} 및 10^{-4} 로 희석하여 H3N2 바이러스를 감염시킨 후 60시간동안 배양하여 바이러스가 형성하는 플라그를 확인한 것을 도3b에 나타내었다.

따라서, Bst2 유전자가 발현되지 않도록 돌연변이가 일어난 세포주는 야생형 세포주에 비해 바이러스 생산능이 증가됨을 확인할 수 있었다.

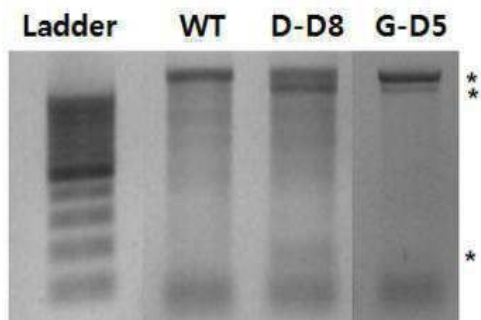
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부한 청구항들과 그 것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

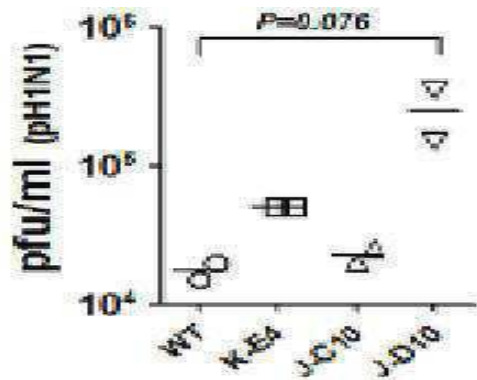
도면1



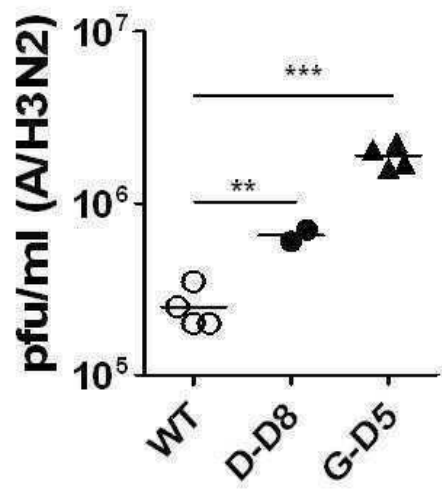
도면2



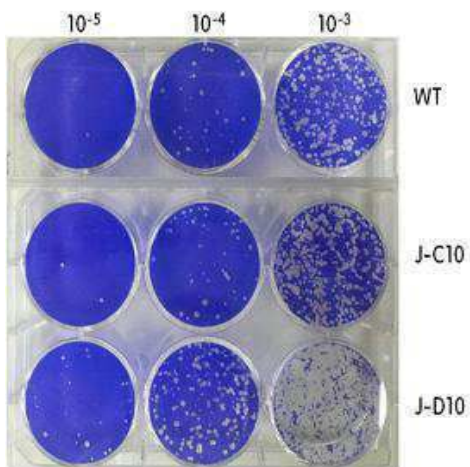
도면3



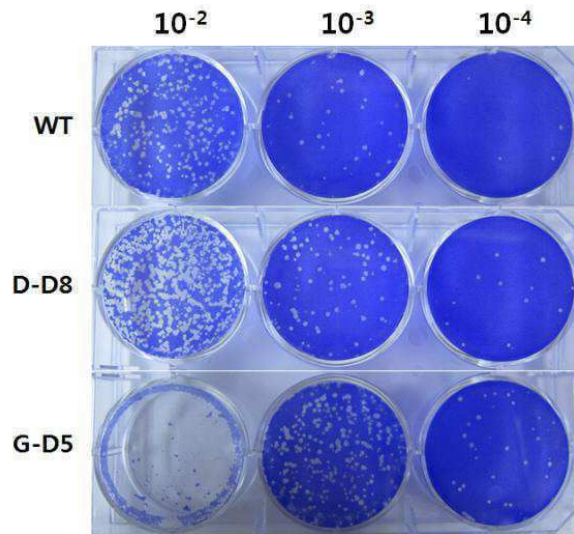
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Cell Lines Having Enhanced Virus Producing Ability and Method for
Preparing the Same

<130> P15-B178

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 306

<212> DNA

<213> dog

<400> 1

atggcaccta cgtttacca ctactactgg cctgtgccca taactgacga gtcagagtca 60

atgtcatcaa gtcagaagct gagctggctg gagtggctgg gcatcttggg gatcccagtg 120

gtgatgggtc tgtctgtggc tctgatcatc ttgtttgtca agaccaacag caaagcctgc 180

ggggatggcc tcctagtaga gcaggagtgt cacaatgtca ccagcctcct ggagcgccaa 240

ctaaccctaaa cccggcaagc gttacagggg accatggacc aggctaccac ctgcaacaag 300

actgtg 306

<210> 2

<211> 294

<212> DNA

<213> monkey

<400> 2

atggcaccta ttttgtatga ctattgcaaa atgcccattg atgacatttg caaggaagac 60
agggacaagt gctgtaaact ggccgtagga attctggggc tcctgggtcat agtgcttctg 120
ggggtgcccc tgattttctt catcatcaag gccaacagcg aggcctgcca ggatggcctc 180

cgggcagtga tggagtgtca caatgtcacc tatctcctgc aacaagagct ggccgaggcc 240
cagcggggct ttcgggacgc agaggcccag gctgtcacct gcaaccagac tgtg 294

<210> 3

<211> 304

<212> DNA

<213> dog

<400> 3

atggcaccta cgctttacca ctactactgg cctgtgcca taactgaagt cagagtcaat 60
gtcatcaagt cagaagctga gctggctgga gtggctgggc atcttgggga tcccagtgg 120
gatgggtctg tctgtggctc tgatcatctt tgttgcaag accaacagca aagcctgcgg 180
ggatggcctc ctagtagagc aggagtgtca caatgtcacc agcctcctgg agcgccaact 240

aacccaaacc cggcaagcgt tacaggggac catggaccag gctaccacct gcaacaagac 300
tgtg 304

<210> 4

<211> 304

<212> DNA

<213> dog

<400> 4

atggcaccta cgctttacca ctactactgg cctgtgcca taacacgagt cagagtcaat 60
gtcatcaagt cagaagctga gctggctgga gtggctgggc atcttgggga tcccagtgg 120
gatgggtctg tctgtggctc tgatcatctt tgttgcaag accaacagca aagcctgcgg 180
ggatggcctc ctagtagagc aggagtgtca caatgtcacc agcctcctgg agcgccaact 240

aacccaaacc cggcaagcgt tacaggggac catggaccag gctaccacct gcaacaagac 300
tgtg 304

<210> 5

<211> 302

<212> DNA

<213> dog

<400> 5

atggcaccta cgctttacca ctactactgg cctgtgcccc taactagtca gagtcaatgt 60
catcaagtca gaagctgagc tggctggagt ggctgggcat cttggggatc ccagtgggtga 120
tgggtctgtc tgtggctctg atcatctttg ttgtcaagac caacagcaaa gcctgcgggg 180
atggcctcct agtagagcag gagtgtcaca atgtcaccag cctcctggag cgccaactaa 240

cccaaaccg gcaagcgta caggggacca tggaccaggc taccacctgc aacaagactg 300
tg 302

<210> 6

<211> 303

<212> DNA

<213> dog

<400> 6

atggcaccta cgctttacca ctactactgg cctgtgcccc taactgagtc agagtcaatg 60
tcatcaagtc agaagctgag ctggctggag tggctgggca tcttggggat ccagtgggtg 120
atgggtctgt ctgtggctct gatcatcttt gttgtcaaga ccaacagcaa agcctgcggg 180
gatggcctcc tagtagagca ggagtgtcac aatgtcacca gcctcctgga gcgccaacta 240

acccaaacc ggcaagcgtt acaggggacc atggaccagg ctaccacctg caacaagact 300
gtg 303

<210> 7

<211> 302

<212> DNA

<213> dog

<400> 7

atggcaccta cgctttacca ctactactgg cctgtgcccc taacgagtca gagtcaatgt 60
catcaagtca gaagctgagc tggctggagt ggctgggcat cttggggatc ccagtgggtga 120
tgggtctgtc tgtggctctg atcatctttg ttgtcaagac caacagcaaa gcctgcgggg 180
atggcctcct agtagagcag gagtgtcaca atgtcaccag cctcctggag cgccaactaa 240

cccaaaccg gcaagcgta caggggacca tggaccaggc taccacctgc aacaagactg 300
tg 302

<210> 8

<211> 309

<212> DNA

<213> dog

<400> 8

atggcaccta cgctttacca ctactactgg cctgtgcccc taactgacga cgagtcagag	60
tcaatgtcat caagtcagaa gctgagctgg ctggagtggc tgggcatctt ggggatccca	120
gtggtgatgg gtctgtctgt ggctctgata atctttgttg tcaagacaa cagcaaagcc	180
tgcggggatg gcctcctagt agagcaggag tgtcacaatg tcaccagcct cctggagcgc	240

caactaaccc aaacccggca agcgttacag gggacatgg accaggctac cacctgcaac	300
aagactgtg	309

<210> 9

<211> 282

<212> DNA

<213> monkey

<400> 9

atggcaccta ttttgtatga ctattgcaaa atgcccattg atgacatttg caaggaagac	60
agggacaagt gctgtaaact ggccgtagga attctggggc tcctgggtcat agtgcccttg	120
attttcttca tcatcaaggc caacagcgag gcctgccagg atggcctccg ggcagtgatg	180
gagtgtcaca atgtcaccta tctcctgcaa caagagctgg ccgaggccca gcggggcttt	240

cgggacgcag agggccaggc tgtcacctgc aaccagactg tg	282
--	-----

<210> 10

<211> 293

<212> DNA

<213> monkey

<400> 10

atggcaccta ttttgtatga ctattgcaaa atgcccattg atgacatttg caaggaagac	60
agggacaagt gctgtaaact ggccgtagga attctggggc tcctgggtcat agtgcttctg	120
ggggtgcctt gattttcttc atcatcaagg ccaacagcga ggctgccag gatggcctcc	180
gggcagtgat ggagtgtcac aatgtcacct atctcctgca acaagagctg gccgaggccc	240
agcggggctt tcgggacgca gaggcccagg ctgtcacctg caaccagact gtg	293

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> dog

<400>	11	
ggtcaggatg gctcctatgc		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	dog	
<400>	12	
aacctgacag ggtcacctgg		20
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	dog	
<400>	13	
gtagccccag ccaaagttt c		21
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	dog	
<400>		
>	14	
aggcctcccc atgccccaaac		20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	monkey	
<400>	15	
gagggggaga tctggatgg		19
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	monkey	
<400>	16	
cttctctgca tccagggaag		20