



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0090468
(43) 공개일자 2025년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/155 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/155 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-0179890

(22) 출원일자 2023년12월12일

심사청구일자 2023년12월12일

(71) 출원인

대한민국(질병관리청 국립보건연구원장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

우인옥

대구광역시 수성구 청호로 426, 103동 302호 (범어동, 대구 범어 삼성체르빌)

임희지

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 87, 501동 1203호 (모아미래도)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리체

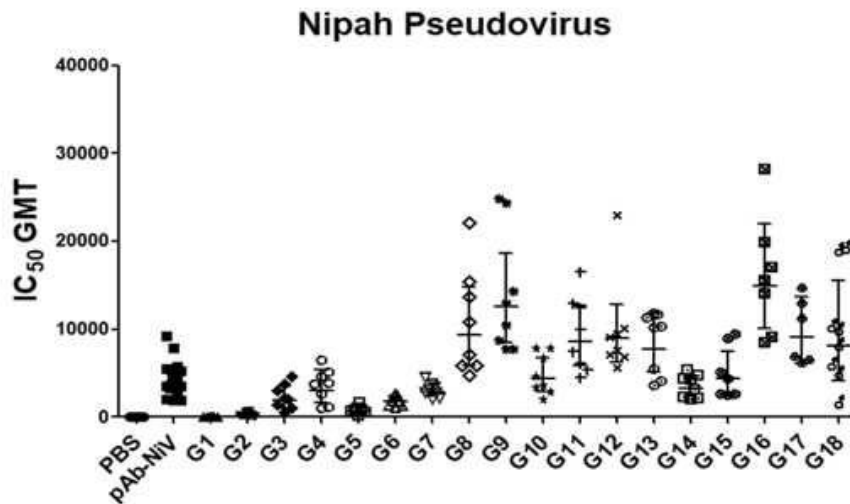
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 니파바이러스 재조합 G 단백질을 포함하는 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래 재조합 단백질을 포함하고, 또는 말레이시아 니파바이러스주의 G 당단백질 유래 재조합 단백질을 더 포함함에 따라 니파바이러스 내 친연형 G 당단백질과 비교하여 니파바이러스 중화효능이 우수할 뿐만 아니라 니파바이러스 감염 혈청 검출이 검출이 우수하여 니파바이러스에 대한 백신 또는 감염 진단용으로 유용하게 활용할 수 있으며, 어쥬번트와 함께 제공될 경우 보다 효과적인 백신 효능을 유도할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

G01N 33/56983 (2013.01)

C12N 2760/18222 (2013.01)

C12N 2760/18234 (2013.01)

G01N 2333/115 (2013.01)

(72) 발명자

이유경

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152,
803동 1801호 (오송힐데스하임아파트)

문서영

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 31,
103동 901호

임민수

충청북도 청주시 청원구 주성로118번길 28, 104동
1105호 (율량동, 삼성아파트)

김승연

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 31,
두산위브센티움 101동 909호

김우현

경상남도 진주시 소호로19번길 11, 107동 602호 (충무공동, 진주혁신도시 중흥에스-클래스 더프라임)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1776000129
과제번호	2022-NI-031-00
부처명	질병관리청
과제관리(전문)기관명	질병관리청
연구사업명	공공백신개발지원사업
연구과제명	니파 바이러스 백신 후보물질 개발 및 면역원성 평가 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립보건연구원
연구기간	2022.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 6으로 표시되는 제1 폴리펩타이드를 포함하는 제1 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 니파바이러스 감염 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제1 재조합 단백질은 사탕채인, 니파바이러스 감염 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 서열번호 5로 표시되는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 제2 재조합 단백질을 유효성분으로 더 포함하는, 니파바이러스 감염 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제2 재조합 단백질은 사탕채인, 니파바이러스 감염 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 감염 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드는 말레이시아 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 감염 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 어쥬번트를 추가로 포함하는, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 8

서열번호 6으로 표시되는 제1 폴리펩타이드를 포함하는 제1 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 니파바이러스 진단용 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 제1 재조합 단백질은 사탕채인, 니파바이러스 진단용 조성물.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 서열번호 5로 표시되는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 제2 재조합 단백질을 유효성분으로 더 포함하는, 니파바이러스 진단용 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 제2 재조합 단백질은 사탕채인, 니파바이러스 진단용 조성물.

청구항 12

청구항 8에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 진단용 조성물.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드는 말레이시아 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 진단용 조성물.

청구항 14

청구항 8 내지 13 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는, 니파바이러스 감염 여부 진단 키트.

청구항 15

청구항 8 내지 13 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는, 니파바이러스에 대한 항체 보유 여부 진단 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 니파바이러스 재조합 G 단백질을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 니파바이러스(Nipah virus, NiV)는 파라믹소바이러스(Paramyxoviridae family)과의 헨니파 (Henipavirus)바이러스속에 속한다. 대표적인 자연숙주로 Pteropodidae 과의 Pteropus 속에 속하는 과일박쥐가 있으며, 감염된 박쥐의 소변이나 타액으로 오염된 대추야자 수액의 섭취 혹은 중간·증폭 숙주인 병든 돼지와와의 접촉 및 섭취로 전염된다. 니파바이러스성 감염증은 급성 호흡기 감염에서부터 치명적인 뇌염에 이르기까지 다양한 임상적 증상을 유발한다.

[0003] 니파바이러스는 헨니파바이러스(Henipavirus)에 속하는 음성 단일가닥 외피 RNA 바이러스로, RNA genome 서열에 주요 6개 유전자의 연속된 배열을 포함한 Lipid bilayer, Viral RNA 등으로 구성된 바이러스이다. 니파 바이러스의 주요 6개 유전자는 Nucleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrix protein (M), Fusion glycoprotein (F), Attachment glycoprotein (G), Large polymerase (L) 등으로 구성되어 있다. 니파바이러스 백신 개발에 필수적인 표면 구조 단백질은 숙주 세포와의 융합에 필수적인 바이러스 막에 고정된 Attachment glycoprotein (G) 및 Fusion glycoprotein (F)으로 알려져 있으나, 아직까지 니파바이러스 감염의 예방과 치료에 효과적인 백신 및 치료제가 없는 현실이다. 니파바이러스는 사람에서 40~70% 사망률을 나타내는 생물안전 4등급(biosafety level 4, BSL4) 병원체이기 때문에 혈청학적 진단법 개발 및 백신 개발이 절실히 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 3, pp. 1628 -1635, January 16, 2009

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래 재조합 단백질을 포함하는 니파바이러스 백신 조성물 또는 니파바이러스 감염 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 또한 본 발명은 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래 재조합 단백질 및 말레이시아 니파바이러스주의 G 당단백질 유래 재조합 단백질을 포함하는 니파바이러스 백신 조성물 또는 니파바이러스 감염 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 1. 서열번호 6으로 표시되는 제1 폴리펩타이드를 포함하는 제1 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [0008] 2. 위 1에 있어서, 상기 제1 재조합 단백질은 사랑채인, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [0009] 3. 위 1에 있어서, 서열번호 5로 표시되는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 제2 재조합 단백질을 유효성분으로 더 포함하는, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [0010] 4. 위 3에 있어서, 상기 제2 재조합 단백질은 사랑채인, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [0011] 5. 위 1에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [0012] 6. 위 3에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드는 말레이시아 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [0013] 7. 위 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 어쥬번트를 추가로 포함하는, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [0014] 8. 서열번호 6으로 표시되는 제1 폴리펩타이드를 포함하는 제1 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 니파바이러스 진단용 조성물.
- [0015] 9. 위 8에 있어서, 상기 제1 재조합 단백질은 사랑채인, 니파바이러스 진단용 조성물.
- [0016] 10. 위 8에 있어서, 서열번호 5로 표시되는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 제2 재조합 단백질을 더 포함하는, 니파바이러스 진단용 조성물.
- [0017] 11. 위 10에 있어서, 상기 제2 재조합 단백질은 사랑채인, 니파바이러스 진단용 조성물.
- [0018] 12. 위 8에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 진단용 조성물.
- [0019] 13. 위 10에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드는 말레이시아 니파바이러스주의 G 당단백질 유래인, 니파바이러스 진단용 조성물.
- [0020] 14. 위 8 내지 13 중 어느 하나의 진단용 조성물을 포함하는, 니파바이러스 감염 여부 진단 키트.
- [0021] 15. 위 8 내지 13 중 어느 하나의 진단용 조성물을 포함하는, 니파바이러스에 대한 항체 보유 여부 진단 키트.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 재조합 G 당단백질은 니파바이러스 내 천연형 G 당단백질과 비교하여 니파바이러스 중화효능이 우수할 뿐만 아니라 니파바이러스 감염 혈청 검출이 우수하여 니파바이러스에 대한 백신 또는 감염 진단용으로 유용하게 활용할 수 있으며, 어쥬번트와 함께 제공될 경우 보다 효과적인 백신 효능을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 단백질 Fm 서열 및 재조합 단백질 Ft 서열을 나타낸 도이다.
- 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 단백질 GMm 서열, 재조합 단백질 GMt 서열, 재조합 단백질 GBm 서열 및 재조합 단백질 GBt 서열을 나타낸 도이다.
- 도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 단백질 cFtGMt 서열 및 재조합 단백질 cFtGBt 서열을 나타낸 도이다.
- 도 2a ~ 도 2d는 본 발명의 일 실시예에 따른 8개 재조합 단백질을 재조합 293F 세포에서 발현한 도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 8개 재조합 단백질의 니파바이러스 특이 항체에 대한 결합력을 확인한 도이다.
- 도 4a~도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 8개 재조합 단백질에 의해 생성된 F 당단백질 항원 코팅 혈정 내 항체가를 나타낸 도이다.
- 도 4c~도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른 8개 재조합 단백질에 의해 생성된 말레이시아 G 당단백질 항원 코팅

혈정 내 항체가를 나타낸 도이다.

도 4e~도 4f는 본 발명의 일 실시예에 따른 8개 재조합 단백질에 의해 생성된 방글라데시 G 당단백질 항원 코팅 혈정 내 항체가를 나타낸 도이다.

도 4g~도 4h는 본 발명의 일 실시예에 따른 8개 재조합 단백질에 의해 생성된 키메릭 단백질 항원 코팅 혈정 내 항체가를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 8개 재조합 단백질을 단독/혼합 투여한 18개 실험군의 니파슈도바이러스에 대한 중화항체 활성을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 단백질 GMt 및 GBt 혼합투여군과 재조합 단백질 Ft, GMt 및 GBt 혼합투여군에 어쥬번트 5종을 각각 추가 투여한 10개 실험군의 니파슈도바이러스에 대한 중화항체 활성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 니파바이러스 감염의 혈청학적 진단, 치료 및 백신 개발을 위한 니파바이러스 특이적 재조합 항원에 관한 것이다.
- [0025] 니파바이러스(Nipah virus, NiV)는 숙주 세포와의 융합에 필수적인 바이러스 막에 고정된G 당단백질(attachment glycoprotein)과 F 당단백질(fusion glycoprotein)을 발현한다. G 당단백질은 적혈구 응집 및 뉴라미니다제(neuraminidase) 활성을 지니지 않고, 부착 당단백질로서 분자의 아미노(N) 말단이 세포질을 향하고 카르복시(C) 말단이 세포 밖을 향하는 2형 막단백질이다. F 당단백질은 두 개의 HR(heptad repeat) 부위 및 하나의 소수성 융합 펩타이드를 갖는 삼량체의 1형 막단백질이다. 니파바이러스는 세포의 수용체에 결합한 후 G 당단백질 및 F 당단백질 일체의 작용을 통해 pH-의존적 막 융합과정을 거쳐 세포를 감염시킨다.
- [0026] 니파바이러스 G 당단백질 또는 F 당단백질을 항원으로 이용한 백신이 연구되고 있으나, 치사율이 높은 니파바이러스에 대해 예방 효율이 높은 백신 개발은 매우 어려운 한계에 놓여 있다.
- [0027] 본 발명자들은 말레이시아와 방글라데시 두 strain으로부터 분류된 니파바이러스 F 당단백질로부터 단량체 또는 삼량체, G 당단백질로부터 단량체 또는 사량체 형태로 제작한 백신후보 서열에 대해 단백질 구조적 측면에 따른 면역원성 및 중화능을 비교하고 니파바이러스 예방 효율이 가장 증대된 구조의 재조합 단백질을 개발하였다.
- [0028] 나아가, 본 발명자들은 말레이시아와 방글라데시 두 strain으로부터 개발한 각 재조합 단백질을 혼합함으로써 각 strain에 대한 예방 효과뿐 아니라 strain에 관계없이 니파바이러스 예방 효율이 탁월하게 우수한 재조합 단백질을 구성하였다.
- [0029] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 일 관점에서 서열번호 6으로 표시되는 제1 폴리펩타이드를 포함하는 제1 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 니파바이러스 감염의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서 제1 폴리펩타이드는 방글라데시 strain 으로부터 분류된 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래일 수 있고, 바람직하게는 방글라데시 서브그룹 및 인도 서브그룹내 conserved 서열을 보존하고 있는 G 당단백질 서열일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이의 기능적 동등물일 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 백신 조성물은 서열번호 5로 표시되는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 제2 재조합 단백질을 유효성분으로 더 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 제2 폴리펩타이드는 말레이시아 strain 으로부터 분류된 말레이시아 니파바이러스주의 G 당단백질 유래일 수 있고, 바람직하게는 conserved 서열을 보존하고 있는 G 당단백질 서열일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열 또는 이의 기능적 동등물일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 ‘폴리펩타이드’ 및 ‘단백질’은 통상의 의미에 따라 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 재조합 단백질은 번역후의 수식, 예를 들면 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등 및 해당 분야에 공지된 다른 수식(자연적으로 발생하는 수식 및 비자연적 발생의 수식)을 포함할 수 있다. 본 발명의 재조합 단백질은 임의의 다양한 공지의 재조합 및/또는 합성의 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

- [0035] 본 발명에서 용어 '기능적 동등물'은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 6으로 표시되는 제1 폴리펩타이드 또는 서열번호 5로 표시되는 제2 폴리펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 의미한다.
- [0036] 이하 '재조합 단백질'은 제1 재조합 단백질 및 제2 재조합 단백질을 모두 포함하는 의미이다.
- [0037] 이하 '폴리펩타이드'는 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 모두 포함하는 의미이다.
- [0038] 다양한 실시예에서, 재조합 단백질은 당분야의 숙련자에게 공지된 임의의 적합한 절차, 즉 유전공학적 방법, 예컨대 재조합 기법에 의해 제조(제작)될 수 있다. 또한 통상적인 방법에 따라 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 동등물에 표적화 서열, 시그널 서열, 태그(tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 추가적인 서열은 필요에 따라 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 동등물의 N 말단, C 말단, 또는 양 말단에 포함될 수 있다.
- [0039] 또한 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 상기 단백질의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 단백질의 개질, 특히 단백질의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 재조합 단백질은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열로 구성될 수 있고, 제2 재조합 단백질은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열로 구성될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 다양한 실시예에서 재조합 단백질은 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포(형질전환체)를 공지된 기술을 이용하여 재조합 단백질의 발현에 적합한 배지에서 배양하는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 재조합 단백질은 사량체일 수 있다. 상기 제1 재조합 단백질 또는 제2 재조합 단백질은 two-heads-up/two-heads-down 구조의 동중사량체 G 당단백질을 발현하기 위한 stalk region을 포함함으로써 사량체 형태로 발현하여 니파바이러스에 대한 면역원성 및 중화능이 극대화되었다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 말레이시아 니파바이러스주와 방글라데시 니파바이러스주 두 strain으로부터 분류된 니파바이러스 G 당단백질로부터 단량체, 삼량체 또는 사량체 형태로 제작한 백신후보 재조합 단백질은 모두 니파바이러스 면역원성을 보였으며 니파슈도바이러스를 이용한 중화능 실험에서 사량체로 존재할 때 가장 높은 중화항체 활성을 보이는 것을 확인하였다.
- [0044] 본 발명에 따른 백신 조성물은 방글라데시 니파바이러스주 유래 사량체 형태의 재조합 단백질을 단독으로 유효성분으로 포함할 수 있고, 말레이시아 니파바이러스주 유래 사량체 형태의 재조합 단백질을 유효성분으로 더 포함할 경우 니파바이러스 백신 효능이 효과적으로 증대될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 말레이시아 니파바이러스주 유래 사량체 형태의 재조합 단백질(GMt)과 방글라데시 니파바이러스주 유래 사량체 형태의 재조합 단백질(GBt)과 혼합 투여한 실험군의 혈청내 중화항체 활성이 현저히 높게 확인되었으며, 방글라데시 니파바이러스주 유래 사량체 형태의 재조합 단백질(GBt) 단독 투여군에서도 높은 중화항체 활성을 나타냈다.
- [0046] 본 발명에 따른 백신 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 어쥬번트를 더 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 담체는 니파바이러스의 치료 또는 예방을 위해, 투여에 적합한 약학적으로 허용되는 다른 치료/예방 약물, 벡터 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0048] 상기 어쥬번트 (adjuvant) 또는 어쥬번트 성분은 예를 들어, 약리학적 또는 면역학적으로 변형될 수 있는 제제 또는 조성물로서 약물이나 백신과 같은 다른 약제의 효능을 향상시키는 물질로서 어쥬번트와 혼입되거나 공동 투여되는 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 물질의 넓은 스펙트럼을 지칭한다. 본 발명에서 어쥬번트는 본 발명에 따른 재조합 단백질이 갖는 니파바이러스 특이적 면역원성 효과를 향상시킬 수 있다. 어쥬번트는 면역 상호작용제의 특정 용량의 유효성 또는 안전성을 증가시키기 위해 더 적은 용량의 면역 상호작용제를 허용할 수 있다. 예를 들어, 어쥬번트는 T 세포 고갈을 방지하여 특정 면역 상호 작용제의 효과 또는 안전성을 증가시킬 수 있다. 어쥬번트는 예를 들어 면역강화제, 항원 전달 시스템 또는 이들의 조합으로 나눌 수 있으며, 미네랄 물질, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 세균 추출물(예를 들어, 세균성 지질당, 프로틴 보조제, 및/또는

MDP), 유성 에멀전, 사포닌, 스쿠알렌, 황산알루미늄칼륨, 수산화칼슘, TLR 작용제 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

- [0049] 본 발명은 다른 관점에서 서열번호 6으로 표시되는 제1 재조합 단백질을 포함하는, 니파바이러스 진단용 조성물을 제공한다.
- [0050] 본 발명에 따른 진단용 조성물은 서열번호 5로 표시되는 제2 재조합 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 제1 또는 제2 재조합 단백질은 전술한 바와 같다.
- [0052] 전술한 재조합 단백질은, 천연형 니파바이러스 단백질과 비교하거나 니파바이러스 단백질 유래 다른 길이/서열 구성의 재조합 단백질과 비교하여도, 특이적으로 니파바이러스 감염 혈청을 검출(진단)하는 효과가 현저하다.
- [0053] 본 발명에서 니파바이러스 감염 혈청을 검출(진단)한다는 것은, 개체의 시료 내에 존재하는 항-니파 바이러스 항체와 본 발명의 재조합 항원(단백질)이 결합하여(항원-항체 복합체 형성) 상기 항체의 존재 유무 또는/및 존재량을 확인하는 것을 포함한다. 개체의 시료 내에 항-니파 바이러스 항체의 존재가 검출 또는/및 확인되는 경우, 해당 개체는 니파바이러스에 감염된 상태인 것으로 판정할 수 있다. 상기 시료는 고형 시료 또는 체액성 시료일 수 있으며, 바람직하게는 혈청, 혈장, 전혈, 림프액 또는 이들의 균질화물(homogenate)일 수 있다.
- [0054] 또한 본 발명의 재조합 단백질은 플레이트의 표면에 코팅된 형태로 제공될 수도 있다. 이 경우에는 상기 플레이트에 시료를 처리하여 적당한 조건에서 반응시킨 후, 플레이트의 표면상에서의 본 발명의 재조합 단백질(항원)과 시료 내 항체의 결합을 관찰하여 니파바이러스 감염 여부 또는 니파바이러스에 대한 항체 보유 여부를 진단할 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 진단용 조성물은 니파바이러스 감염 여부를 진단 또는 니파바이러스에 대한 항체 존재 여부를 진단할 수 있으므로 나아가 상기 진단용 조성물을 포함하는 니파바이러스 감염 진단용 키트 또는 니파바이러스에 대한 항체 보유 여부 진단 키트를 제공할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 진단 키트는 당해 기술분야에서 제공되는 면역분석방법으로 수행될 수 있으며 바람직하게는 ELISA 방법, 더욱 바람직하게는 샌드위치 방식의 ELISA가 사용될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다. 각 방법에 따른 키트 구성품은 당업계에 잘 알려져 있다. 또한 본 발명의 재조합 단백질 이외에 상기 재조합 단백질과 항-니파 바이러스 항체의 결합 반응을 위한 적당한 완충용액 또는 배지 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 재조합 단백질이 직접 표지되지 않은 채로 제공되는 경우에는, 재조합 단백질의 표지를 위한 다른 검출가능한 표지 수단이 추가로 키트에 포함될 수 있다.
- [0057] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 예시적으로 설명한다.

[0059] 실시예 1: 니파바이러스 백신 후보물질 염기서열 디자인

[0060] 니파바이러스 백신의 후보물질을 탐색하기 위해 1998년부터 2021년까지 발생한 니파바이러스에 대해 NCBI 상에 등록된 방글라데시, 인도 및 말레이시아 유래 전체 서열을 확보하고 Fusion glycoprotein 서열 총 78개 및 Glycoprotein 서열 총 71개를 수집하였다. 수집한 서열에서 방글라데시, 인도 및 말레이시아 각 그룹내 서열들 간의 평균 유사도와 최소 유사도가 가장 높은 서열을 대표 서열로 선정하고, 이들을 대상으로 Seaview 프로그램을 사용하여 consensus 서열을 도출하였다. 또한 수집한 서열에서 방글라데시, 인도 및 말레이시아 각 그룹내 전체 서열에 대해 Maximum likelihood tree와 ExtAncSeqMEGA 프로그램을 이용하여 각 유전형의 조상(ancestor sequence)에 해당하는 서열을 디자인하였다. 이후 말레이시아 그룹(MY) 및 방글라데시 그룹(BD)의 F 유전형에 대한 consensus 서열 및 ancestor 서열간 상동성 분석에서 염기서열 상의 유사도는 96.8%이고 아미노산 서열 상의 유사도는 99.6%임을 확인하였다. 또한 G 유전형에 대한 consensus 서열 및 ancestor 서열간 상동성 분석에서 염기서열 상의 유사도는 98.2%이고 아미노산 서열 상의 유사도는 98.3%임을 확인하였다.

[0062] 실시예 2: 니파바이러스 재조합 단백질 발현을 위한 서열 제작

[0063] 2-1: F 당단백질(Fusion glycoprotein)에 대한 서열 제작

[0064] F 당단백질의 경우 말레이시아 strain(말레이시아 니파바이러스주) 및 방글라데시 strain(방글라데시 니파바이러스주)의 높은 상동성으로 말레이시아 니파바이러스주 및 방글라데시 니파바이러스주 전체 ancestor 아미노산

서열(서열번호 9)을 도출하여 사용하였으며, 재조합 단백질의 구조적 측면을 고려하여 단위체(monomer) 또는 삼량체(trimer) 발현이 되는 형태로 제작하였다(도 1a).

[0065] 도 1a에 도시된 바와 같이, conserved 서열을 보존하고 있는 ancestor 서열(서열번호 9)을 이용하여 pre-fusion 형태의 재조합 단백질 발현을 위해 4개의 mutation site(I114C, L104C, L172F, S191P; 굵은 볼드체)를 삽입한 27-488aa 서열 F2-AC(서열번호 1)로부터 재조합 단백질 Fm(서열번호 11)을 제작하였다. 또한 F2-AC 서열을 기초로 삼량체 구조를 위해 C-terminal 영역에 GCNt trimerization motif(보라색 표시)를 삽입한 F2-AC trimer(서열번호 2)을 이용하여 재조합 단백질 Ft(서열번호 12)을 제작하였다.

[0066] 2-2: G 당단백질(glycoprotein)에 대한 서열 제작

[0067] G 당단백질의 경우 말레이시아 및 방글라데시 각각 strain의 상동성이 상대적으로 낮아 말레이시아 니파바이러스주 서열과 방글라데시 니파바이러스주 서열을 따로 선정하였다.

[0068] 구체적으로, 말레이시아 니파바이러스주의 conserver 서열을 최대한 보존하고 있는 서열에 대해 99.7% 상동성을 나타내는 대표서열(MK673562/1999/Malaysia)을 선정하고, 방글라데시 니파바이러스주의 conserver 서열을 최대한 보존하고 있는 서열에 대해 98.1~99.3% 상동성을 나타내는 방글라데시아, 인도 그룹 내(BD1, BD2, India 분리주) consensus 서열(서열번호 10)로 선정하였다.

[0069] 말레이시아 니파바이러스주 대표서열 (MK673562/1999/Malaysia)로부터 172-602aa 서열G_MY monomer(서열번호 3)을 이용하여 단위체 형태의 재조합 단백질 GMm(서열번호 13)을 제작하고, 72-602aa 서열G_MY tetramer(서열번호 5)을 이용하여 사량체 형태의 재조합 단백질 GMt(서열번호 15)을 제작하였다.

[0070] 방글라데시 니파바이러스주 consensus 서열(서열번호 10)로부터 172-602aa 서열 G1-BDC monomer(서열번호 4)을 이용하여 단위체 형태의 재조합 단백질 GBm(서열번호 14)을 제작하고, 72-602aa 서열 G1-BDC tetramer(서열번호 6)을 이용하여 사량체 형태의 재조합 단백질 GBt(서열번호 16)을 제작하였다(도 1b).

[0071] 도 1b에 도시된 바와 같이, G 당단백질은 포함되는 아미노산 서열의 N-terminal 시작부위에 따라 단위체로 발현되는 172-602aa와 사량체로 발현되는 72-602aa로 구분된다. GMt 및 GBt에 포함되는 72-602aa는 two-heads-up/two-heads-down 구조의 동종사량체 G 당단백질을 발현하기 위한 96-147aa의 stalk region(굵은 볼드체)을 포함하고 있다.

[0072] 2-3: 키메릭 단백질 서열 제작

[0073] 추가적으로 F 당단백질과 G 당단백질을 포함하는 키메릭 단백질을 발현하기 위한 재조합 단백질 cFtGMt 및 CFtGBt을 제작하였다(도 1c).

[0074] cFtGMt(서열번호 17)은 F2-AC trimer(서열번호2) 및 G_MY tetramer(서열번호 5) 사이에 GGS linker 서열을 배치한 F2-AC trimer & G_MY tetramer(서열번호 7)을 이용하고, cFtGBt(서열번호 18)은 F2-AC trimer(서열번호2) 및 G1-BDC tetramer(서열번호 6) 사이에 GGS linker 서열을 배치한 F2-AC trimer & G1-BDC tetramer(서열번호 8)을 이용하였다.

[0075] 실시예 2에 따른 8개 재조합단백질을 표 1에 나타냈다. Fm, Ft, GMm, GBm, GBt, GMt, cFtGMt 및 cFtGBt은 각각 N-말단에 동일한 시그널 서열을 결합하고 C-말단에 6개의 히스티딘 잔기로 구성된 폴리히스티딘 태그를 결합하여 제작하였다.

표 1

[0076]

Recombinant protein	Target aa seq.	Structure	Niv-seq.	Mutation	Tag
Fm 서열번호11	F2-AC (27-488) 서열번호1	Monomer	MY와 BD 그룹 전체의 ancestor 서열번호 9	I114C-L104C, S191P, L172F	6x histidine
Ft 서열번호12	F2-AC trimer 서열번호2	Trimer	MY와 BD 그룹 전체의 ancestor 서열번호 9	I114C-L104C, S191P, L172F	6x histidine
GMm 서열번호13	G_MY monomer (172-602) 서열번호3	Monomer	MK673562/1999/Malaysia(QHR78992)	-	6x histidine

GBm 서열번호14	G1-BDC monomer (172-602) 서열번호4	Monomer	G gene의 BD(BD1, BD2, India) consensus 서열번호 10	-	6x histidine
GMt 서열번호15	G_MY tetramer (72-602) 서열번호5	Tetramer	MK673562/1999/Malay sia(QHR78992)	-	6x histidine
GBt 서열번호16	G1-BDC tetramer (72-602) 서열번호6	Tetramer	G gene의 BD(BD1, BD2, India) consensus 서열번호 10	-	6x histidine
cFtGMt 서열번호17	F2-AC trimer & G_MY tetramer 서열번호7	Chimera	MY와 BD 그룹 전체의 ancestor /MK673562/1999/Mala ysia(QHR78992)	-	6x histidine
cFtGBt 서열번호18	F2-AC trimer & G1-BDC tetramer 서열번호8	Chimera	MY와 BD 그룹 전체의 ancestor / G gene의 BD(BD1, BD2, India) consensus	-	6x histidine

[0078] 실시예 3: 재조합 단백질 코돈 최적화(optimization)

[0079] 실시예 2에 따른 재조합 단백질을 발현시키기 위해 미생물 발현 벡터를 구축하고 포유동물세포(293F cell line)를 이용하여 각각의 형질전환된 재조합 293F 세포를 확보하였다. 재조합 293F 세포를 배양하여 단백질 추출물을 수집한 다음 SDS PAGE 및 웨스턴블롯을 통해 8개의 재조합 단백질의 발현을 확인하였다(도 2).

[0080] 도 2a 내지 도 2b를 살펴보면 Fm, Ft, GMm, GBm, GMt, GBt, cFtGMt 및 cFtGBt 단백질은 재조합 293F 세포에서 각각 51.6, 55.6, 49.2, 49.3, 59.9, 60.2, 114.7 및 114.7 kDa의 크기로 발현된 것을 확인할 수 있다.

[0082] 실시예 4: 재조합 단백질에 대한 니파바이러스 항체반응 평가

[0083] 니파바이러스 특이 항체 6종(ab63557, ab154553, DMAB001, DMAB002, MAB12307 및 MAB12304)을 확보하고 실시예 2에 따른 재조합 단백질에 대한 항체 반응성을 분석한 결과, 도 3을 살펴보면 8개의 재조합 단백질은 모두 니파바이러스 특이 항체에 친화도가 높은 것을 확인하였다.

[0085] 실시예 5: 재조합 단백질의 면역원성 평가

[0086] 실시예 2에 따른 재조합 단백질에 대해 니파바이러스 백신 후보물질로서 면역원성을 확인하기 위해 6주령의 수컷 마우스(BALB/cAnNCr10ri, SPF) 144마리를 이용하여 8개 재조합 단백질의 단독/혼합 투여에 따라 표 2와 같이 접종 시험군18군을 구성하였다.

표 2

[0087]

구분	재조합 단백질	투여용량 (μ g/head)	보조제	투여량 (μ L/head)	투여 횟 수	동물수
1	PBS 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
2	Fm 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
3	GMm 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
4	GBm 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
5	Fm + GMm 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
6	Fm + GBm 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
7	Ft 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
8	GMt 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
9	GBt 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
10	Ft + GMt 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8

11	Ft + GBt 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
12	cFtGMt 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
13	cFtGBt 단독 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
14	Gm + GBm 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
15	Fm + Gm + GBm 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
16	Gm + GBt 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
17	Ft + Gm + GBt 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8
18	cFtGMt + cFtGBt 혼합 투여군	20	1:9 ratio	100	2	8

[0088] 8개 제조합 단백질을 각각 보조제(Alhydrogel®adjuvant 2%(InvivoGen) 1:9 ratio)와 함께 2주 간격으로 2회 근육 접종하였다. 접종 용량은 단독 투여시 20 µg/head/time, 혼합 투여시 각 20 µg/head/time로 하였다. 채혈은 1회 접종 2주, 2회 접종 2주, 2회 접종 3주차에 3회 실시하였다.

[0089] 이후 마우스 전혈에서 분리한 혈청에 F 당단백질, 말레이시아 G 당단백질 및 방글라데시 G 당단백질을 항원으로 각 5 µg/mL 코팅한 다음 1:00 희석, 2차 항체 1:10,000 희석하여 실험을 진행하였다. 모든 실험은 duplicate로 수행되었으며 결과는 각 시험군내 모든 개체(n=8)값의 평균 및 표준편차로 나타내고, 코팅에 사용된 각 항원별 및 각 접종시험군별로 그래프로 정리하여 F 당단백질 항원에 대한 항체가는 도 4a~도 4b, 말레이시아 G 당단백질 항원에 대한 항체가는 도 4c~도 4f, 방글라데시 G 당단백질 항원에 대한 항체가는 도 4g~도 4h에 나타냈다.

[0090] 접종후 항체가를 살펴보면, 모든 접종시험군(1~18)의 혈청내 역가는 단량체 또는 다량체에 관계없이 같은 종류의 항원(F or G)이라면 모두 일정 수준 이상의 역가를 보였으며 F 당단백질과 G 당단백질간의 교차 면역원성은 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 또한 키메릭 단백질은 F 당단백질, G 당단백질 모두에 면역원성을 나타내며 단량체와 다량체간의 상호 면역원성도 나타났다. 채혈 일자에 따른 역가는 2차(2차 접종 후 2주)에 비해 3차(2차 접종 후 3주)에서 모두 높은 수준을 나타냈다. 이에 실험에 사용된 8개 제조합 단백질은 니파바이러스 백신 후보 물질로서 면역원성을 보이는 것으로 확인되었다.

[0092] 실시예 6: 제조합 단백질의 니파바이러스 중화능 확인

[0093] 실시예2에 따른8개의 제조합 단백질의 니파바이러스 백신 효능을 확인하기 위해 니파슈도바이러스를 이용한 중화능 실험을 진행하였다.

[0094] 구체적으로 8개 제조합 단백질을 실시예 5와 같이 단독 또는 혼합 투여로 면역시킨 마우스 그룹(G1~G18)의 개별 혈청에 대해, rVSV-NiV-F+G 슈도바이러스를 100TCID50/50ul로 사용하고 마우스 혈청은 1/20으로, 양성 대조군인 NiV-G 단백질 항체(NIV11-S)는 1/300으로 희석한 후 3배씩 연속 희석하여 실험을 진행하였다. 음성 대조군으로는 PBS를 면역한 실험군의 혈청 15 마리 분을 동량 혼합하여 1개의 샘플로 풀링하여 사용하였다.

[0095] 중화항체 역가 실험 결과를 토대로 IC₅₀ titer을 도출하고, IC₅₀ 값은 슈도바이러스 감염성이 50% 억제된 혈청의 희석배수로 결정하였다. G1~G18 실험군마다 각 8개의 혈청에 대한 데이터를 표 3~표 4에 도시하고, 각 혈청의 평균값을 그래프로 정리하여 도 5에 나타냈다.

표 3

No.	후보물질			IC ₅₀	IC ₅₀ (mean)
1	G1	PBS	G1-1	0.00	0
2			G1-2	0.00	
3			G1-3	0.00	
4			G1-4	0.00	
5			G1-5	0.00	
6			G1-6	0.00	
7			G1-7	0.00	
8			G1-8	0.00	

9	G2	Fm	G2-1	29.70	162
10			G2-2	154.18	
11			G2-3	702.27	
12			G2-4	110.30	
13			G2-5	253.15	
14			G2-6	134.53	
15			G2-7	77.10	
16			G2-8	507.91	
17	G3	GMm	G3-1	3691.83	1919
18			G3-2	3028.86	
19			G3-3	4591.19	
20			G3-4	2112.14	
21			G3-5	1064.41	
22			G3-6	1438.08	
23			G3-7	546.47	
24			G3-8	2026.75	
25	G4	GBm	G4-1	5059.78	2978
26			G4-2	4634.52	
27			G4-3	2569.73	
28			G4-4	978.13	
29			G4-5	3822.85	
30			G4-6	3741.18	
31			G4-7	1124.52	
32			G4-8	6531.73	
33	G5	Fm + GMm	G5-1	650.73	699
34			G5-2	1074.65	
35			G5-3	199.58	
36			G5-4	735.67	
37			G5-5	718.06	
38			G5-6	881.49	
39			G5-7	551.74	
40			G5-8	1580.27	
41	G6	Fm + GBm	G6-1	1245.37	1763
42			G6-2	1312.84	
43			G6-3	2511.49	
44			G6-4	1660.45	
45			G6-5	2329.00	
46			G6-6	1038.92	
47			G6-7	2581.59	
48			G6-8	2189.49	
49	G7	Ft	G7-1	3752.09	2934
50			G7-2	2163.77	
51			G7-3	1999.30	
52			G7-4	3339.44	
53			G7-5	2709.78	
54			G7-6	2728.23	
55			G7-7	3080.05	
56			G7-8	4453.65	
57	G8	GMt	G8-1	5831.64	9339
58			G8-2	7119.47	
59			G8-3	4739.85	
60			G8-4	5862.57	
61			G8-5	10763.23	
62			G8-6	22098.11	
63			G8-7	15337.33	
64			G8-8	13725.75	

65	G9	GBt	G9-1	12958.82	12512
66			G9-2	24803.08	
67			G9-3	10469.89	
68			G9-4	24289.57	
69			G9-5	14226.32	
70			G9-6	7670.93	
71			G9-7	8743.37	
72			G9-8	7702.09	

표 4

[0097]

No.	후보물질			IC ₅₀	IC ₅₀ (mean)
73	G10	Ft + GMt	G10-1	7838.83	4359
74			G10-2	1956.64	
75			G10-3	4650.41	
76			G10-4	3653.03	
77			G10-5	6770.05	
78			G10-6	3308.12	
79			G10-7	2837.6	
80			G10-8	7869.02	
81	G11	Ft + GBt	G11-1	9962.2	8560
82			G11-2	5370.17	
83			G11-3	4539.63	
84			G11-4	7404.7	
85			G11-5	12970.2	
86			G11-6	6057.26	
87			G11-7	12394.76	
88			G11-8	16466.03	
89	G12	cFtGMt	G12-1	7601.06	8923
90			G12-2	22904.52	
91			G12-3	5553.83	
92			G12-4	9458.9	
93			G12-5	6892.57	
94			G12-6	10018.68	
95			G12-7	7046.16	
96			G12-8	9030.95	
97	G13	cFtGBt	G13-1	11816.03	7750
98			G13-2	4068.12	
99			G13-3	3569.92	
100			G13-4	10242.76	
101			G13-5	10350.28	
102			G13-6	11273.85	
103			G13-7	5460.2	
104			G13-8	11684.62	
105	G14	GMm + GBm	G14-1	4737.8	3291
106			G14-2	2086.76	
107			G14-3	5301.66	
108			G14-4	3071.16	
109			G14-5	4377.77	
110			G14-6	4221.45	
111			G14-7	2238.51	
112			G14-8	2064.76	

113	G15	Fm + GMm + GBm	G15-1	4338.91	4387
114			G15-2	8900.67	
115			G15-3	-	
116			G15-4	9493.43	
117			G15-5	5079.18	
118			G15-6	2576.49	
119			G15-7	2595.63	
120			G15-8	2512.04	
121	G16	GMt + GBt	G16-1	15576.76	14863
122			G16-2	8466.66	
123			G16-3	51318.13	
124			G16-4	13991.73	
125			G16-5	17066.81	
126			G16-6	19836.89	
127			G16-7	9112.57	
128			G16-8	28150.08	
129	G17	Ft + GMt + GBt	G17-1	12981.15	8024
130			G17-2	14621.18	
131			G17-3	6137.12	
132			G17-4	58976.58	
133			G17-5	6755.85	
134			G17-6	6885.18	
135			G17-7	6413.67	
136			G17-8	11141.22	
137	G18	cFtGMt + cFtGBt	G18-1	19159.93	10032
138			G18-2	6104.59	
139			G18-3	10390.11	
140			G18-4	19323.44	
141			G18-5	8377.25	
142			G18-6	5073.2	
143			G18-7	1700.34	
144			G18-8	10124.23	
	양성대조군	pAB-NiV			3865

[0098] 표 3 ~ 표 4 및 도 5를 살펴보면, PBS를 면역한 마우스 혈청인 음성대조군 그룹(G1)을 제외한 모든 그룹에서 rVSV-NiV-F+G 슈도바이러스에 대한 중화능이 잘 유도된 것으로 보이며, GBt의 단독 투여군인 G9 그룹, GBt 및 GMt와의 혼합 투여군인 G16 그룹, 키메라 단백질의 혼합 투여군인 G18 그룹의 중화항체 활성이 특히 높게 나타났다. 그 중에서도 GMt 및 GBt 혼합 투여군인 G16 그룹의 중화항체 활성이 현저히 우수하여 이러한 조성이 니파바이러스 감염에 진단, 치료 및 백신으로서 활용에 효과적일 더욱 효과적일 것으로 확인하였다.

[0099] 해당 중화능 평가는 하기 기록한 cell only, PV only, pAb-NiV G에 대하여 설정한 acceptance range를 모두 만족하였다.

[0100] cell only : $30.94 \leq \text{Cell only} \leq 72.77$

[0101] PV only : $8494.63 \leq \text{PV only} \leq 194590.30$

[0102] pAb-NiV G : $1335.94 \leq \text{IC}_{50} \text{ of pAb-NiV G} \leq 10350.53$

[0104] 실시예 7: 어쥬번트 조합에 따른 니파바이러스 중화능

[0105] 실시예 6에서 니파바이러스 중화항체 활성이 가장 높게 나타난 G16 그룹에 기본적으로 사용되는 5종의 어쥬번트를 이용하여 니파바이러스 중화능이 가장 좋은 어쥬번트 조합을 확인하였으며 이 때 G16 그룹에 삼량체 형태인 Ft 와 혼합 투여한 G17 그룹에도 동일한 어쥬번트를 적용하여 비교하였다.

[0106] 어쥬번트로 Adju-Phos(이하, phos), Alhydrogel adjuvant 2%(이하, Alum), MPLA-SM VacciGrade(이하, MPLA),

AddaS03(이하, S03) 및 AddaVax(이하, vax)와 조합하여 표 5와 같이 실험군을 구성하였다.

표 5

[0107]

No.	재조합 단백질	Dose	Adjuvant	주사	N수
G1	GMt + GBt	20+20ug/dose (40ug)	phos 50ul	IM(230ul)	6
G2	GMt + GBt	20+20ug/dose (40ug)	Alum 50ul	IM(230ul)	6
G3	GMt + GBt	20+20ug/dose (40ug)	MPLA 50ul	IM(230ul)	6
G4	GMt + GBt	20+20ug/dose (40ug)	So3 50ul	IM(230ul)	6
G5	GMt + GBt	20+20ug/dose (40ug)	vax 50ul	IM(230ul)	6
G6	Ft+GMt+GBt	20+20+20ug/dose (60ug)	phos 50ul	IM(290ul)	6
G7	Ft+GMt+GBt	20+20+20ug/dose (60ug)	Alum 50ul	IM(290ul)	6
G8	Ft+GMt+GBt	20+20+20ug/dose (60ug)	MPLA 50ul	IM(290ul)	6
G9	Ft+GMt+GBt	20+20+20ug/dose (60ug)	So3 50ul	IM(290ul)	6
G10	Ft+GMt+GBt	20+20+20ug/dose (60ug)	vax 50ul	IM(290ul)	6
					총 60

[0108]

G1~G10그룹마다 각 5개의 혈청내 생성된 항체에 대한 IC₅₀ 를 그래프로 정리하여 도 6에 나타내고 정량화값을 표 6 및 표 7에 도시하였다.

표 6

[0109]

No.	후보물질		면역보조제	-	IC ₅₀	IC ₅₀ (mean)
1	Control	PBS		C-1	1.71	3.8
2				C-2	0	
3				C-3	0	
4				C-4	0	
5				C-5	17.31	
6	G1	GMt + GBt	phos	G1-1	6759.23	5706.942
7				G1-2	3798.54	
8				G1-3	10030.35	
9				G1-4	3533.7	
10				G1-5	4412.89	
11	G2	GMt + GBt	Alum	G2-1	6983.78	8641.314
12				G2-2	9510.68	
13				G2-3	2530.75	
14				G2-4	13645.46	
15				G2-5	10535.9	
16	G3	GMt + GBt	MPLA	G3-1	2537.81	3878.01
17				G3-2	4717.93	
18				G3-3	3829.66	
19				G3-4	4744.42	
20				G3-5	3560.23	
21	G4	GMt + GBt	S03	G4-1	39244.56	47147.77
22				G4-2	38483.21	
23				G4-3	36913.19	
24				G4-4	25025.45	
25				G4-5	96072.42	
26	G5	GMt + GBt	vax	G5-1	5511.87	24798.86
27				G5-2	29998.08	
28				G5-3	32372.21	
29				G5-4	20498.32	
30				G5-5	35613.81	

표 7

No.	후보물질		면역보조제	-	IC ₅₀	IC ₅₀ (mean)
31	G6	Ft + GMt + GBt	phos	G6-1	5651.14	8754.14
32				G6-2	4478.31	
33				G6-3	25698.11	
34				G6-4	4621	
35				G6-5	3322.15	
36	G7	Ft + GMt + GBt	Alum	G7-1	15908.72	14572.61
37				G7-2	17436.66	
38				G7-3	6878.91	
39				G7-4	9197.41	
40				G7-5	23441.34	
41	G8	Ft + GMt + GBt	MPLA	G8-1	2567.52	3614.91
42				G8-2	3262.01	
43				G8-3	2371.17	
44				G8-4	4826.57	
45				G8-5	5047.26	
46	G9	Ft + GMt + GBt	S03	G9-1	18814.1	25444.80
47				G9-2	15562.05	
48				G9-3	14884.3	
49				G9-4	13499.26	
50				G9-5	64464.27	
51	G10	Ft + GMt + GBt	vax	G10-1	9828.57	15138.95
52				G10-2	19613.68	
53				G10-3	16082.71	
54				G10-4	17685.75	
55				G10-5	12484.04	
	양성 대조군	pAB-NiV			18300.5	

표 5~표 6 및 도 6을 살펴보면, GMt 및 GBt 혼합 투여군에 S03, vax 어쥬번트를 조합한 경우 니파바이러스 중화 활성이 특히 증가한 것을 확인하였다.

실시에 6 및 실시예 7의 결과에 따르면 방글라데시 니파바이러스주의 G 당단백질 유래 재조합 단백질(GBt)을 단독으로 포함하는 백신 조성물은 니파바이러스에 대해 감염의 진단, 예방 또는 치료에 효능을 나타낼 수 있다. 또한, 말레이시아 니파바이러스주 G 당단백질 유래 재조합 단백질(GMt)을 함께 사용할 경우 니파바이러스에 현저하게 높은 중화효능을 유도함에 따라 상기 항원의 조합으로 니파바이러스에 대한 진단 및 예방 효능을 효과적으로 증가시킬 수 있음을 입증하였다. 나아가 본 발명에 따른 재조합 단백질의 조합은 어쥬번트와 함께 제공될 경우 더욱 효과적으로 니파바이러스에 대한 예방 효능을 유도할 수 있다.

도면

도면1a

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-F2-AC (27-488aa)--6xHis-Stop codon-HindIII

MGWSCILFLVATATGVHSHLHYEKLKIGLVKGITRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNMSOCTGSVMENYKT
RLNGILTPKGALEIYKNNTHDCVGDVRLAGVCMAGVAIGIATAAOITAGVALYEAMKNADNINKLKSSIESNT
EAVVKLOETAETVYVFTALODYINTNLVPTIDKIPCKOTELSLDLALSKYLSDLLFVFGPNLODPVSNMTI
QAISOAFGGNYETLLRLTGYATEDFDDLLSDSITGOIYVDLSGYIIVRVYFPILTEIOQAYIOELLPVSFNND
NSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCLITKRSVICNODYATPMTNNMRECLTGSTTEKCPRELVVSSHVPFALS
NGVLFANCISVTCOCOTTGRAISOSGEOTLLMIDNTTCPTAVLGNVIISLGKYLGSVNYNSEGIAIGPPVFTDK
VDISSQISSMNQSLQSQSKDYKEAQRLLDTVNPSLHHHHHHH*

Pt: F2-AC (27-488) trimer

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-F2-AC (27-488aa)-GCNt Trimerization
motif-linker--6xHis-Stop codon-HindIII

MGWSCILFLVATATGVHSHLHYEKLKIGLVKGITRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNMSOCTGSVMENYKT
RLNGILTPKGALEIYKNNTHDCVGDVRLAGVCMAGVAIGIATAAOITAGVALYEAMKNADNINKLKSSIESNT
EAVVKLOETAETVYVFTALODYINTNLVPTIDKIPCKOTELSLDLALSKYLSDLLFVFGPNLODPVSNMTI
QAISOAFGGNYETLLRLTGYATEDFDDLLSDSITGOIYVDLSGYIIVRVYFPILTEIOQAYIOELLPVSFNND
NSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCLITKRSVICNODYATPMTNNMRECLTGSTTEKCPRELVVSSHVPFALS
NGVLFANCISVTCOCOTTGRAISOSGEOTLLMIDNTTCPTAVLGNVIISLGKYLGSVNYNSEGIAIGPPVFTDK
VDISSQISSMNQSLQSQSKDYKEAQRLLDTVNPSLMKOEDKIEELSKYHIENEIARIKKLIGEGGGSHHHHH
H*

도면1b

GMm: G_MY (172-602) monomer

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-G MY (172-602aa)--6xHis-Stop codon-HindIII

MGWSCILFLVATATGVHSHRPOTEGVSNLVGLPNNICLOKTSNOILKPKLISYTLPVVGOSGTCITDPLLAMDE
GYFAYSHLERIGSCSRGVSQKRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPPNPNTVYHCSAVYNNFEFYVYLCAVS
TVGDPILNSTYWGSGLMMTRLAVKPKSNGGGYNHOHALRSIEKGRYDKVMPYGPBGKOGDTLYPFAVGFL
VRTEFKYNDNSNCPITKCOYSKPENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNLSDEGENPKVVFIEISDORLSIGSPSKIY
DSLGOVPVYQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVVNWRDNTVISRPGOSQCPRFNTCEICWEGVYND AFLIDRI
NWSAGVFLDSNOTAENPVFTVFKDNEILYRAQLASEDTNAQKTITNCFLLNKIWCISLVEIYDTGDNVIRPK
LFAVKIPEQCTHHHHHHH*

GBm: G1-BDC (172-602) monomer

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-G1-BDC (172-602aa)--6xHis-Stop codon-HindIII

MGWSCILFLVATATGVHSHKPOTEGVSNLVGLPNNICLOKTSNOILKPKLISYTLPVVGOSGTCITDPLLAMDE
GYFAYSHLERIGSCSRGVSQKRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPSNPNTVYHCSAVYNNFEFYVYLCAV
SVVGDPIILNSTYWGSGLMMTRLAVKPKNNGESYNHOHALRNIKGRYDKVMPYGPBGKOGDTLYPFAVGFL
FLVRTEFKYNDNSNCPICAOYSKPENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNLSDEENSKIVFIEISDORLSIGSPSKIY
YDSLGOVPVYQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVVNWRDNTVISRPGOSQCPRFNTCEICWEGVYND AFLIDRI
RINWISAGVFLDSNOTAENPVFTVFKDNEVLYRAQLASEDTNAQKTITNCFLLNKIWCISLVEIYDTGDNVIRPK
RKLFAVKIPEQCTHHHHHHH*

GMT: G_MY (72-602) Tetramer

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-G MY (72-602aa)--6xHis-Stop codon-HindIII

MGWSCILFLVATATGVHSHNYTRSTDNOAVIKDALQSIQOQIKGLADKIGTEIGPKVSLIDTSSTITIPANIGLLG
SKISOSTASINENVNEKCKFTLPPLKIHENISCPNLPFFREYRPOTEGVSNLVGLPNNICLOKTSNOILKPKLIS
YTLPVVGOSGTCITDPLLAMDEGYFAYSHLERIGSCSRGVSQKRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPPNP
NTVYHCSAVYNNFEFYVYLCAVSTVGDPILNSTYWGSGLMMTRLAVKPKSNGGGYNHOHALRSIEKGRYD
KVMYPYGPBGKOGDTLYPFAVGFLVRTEFKYNDNSNCPITKCOYSKPENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNLS
DEENSKIVFIEISDORLSIGSPSKIYDSLGOVPVYQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVVNWRDNTVISRPGOSQ
CPRFNTCEICWEGVYND AFLIDRIINWISAGVFLDSNOTAENPVFTVFKDNEVLYRAQLASEDTNAQKTITNC
FLLNKIWCISLVEIYDTGDNVIRPKLFAVKIPEQCTHHHHHHH*

GBT: G1-BDC (72-602) Tetramer

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-G1-BDC (72-602aa)--6xHis-Stop codon-HindIII

MGWSCILFLVATATGVHSHNYTRSTDNOAMIKDALQSIQOQIKGLADKIGTEIGPKVSLIDTSSTITIPANIGLLG
SKISOSTASINENVNEKCKFTLPPLKIHENISCPNLPFFREYRPOTEGVSNLVGLPNNICLOKTSNOILKPKLIS
YTLPVVGOSGTCITDPLLAMDEGYFAYSHLERIGSCSRGVSQKRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPSNP
NTVYHCSAVYNNFEFYVYLCAVSVVGDPIILNSTYWGSGLMMTRLAVKPKNNGESYNHOHALRNIKGRYD
KVMYPYGPBGKOGDTLYPFAVGFLVRTEFKYNDNSNCPICAOYSKPENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNLS
DEENSKIVFIEISDORLSIGSPSKIYDSLGOVPVYQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVVNWRDNTVISRPGOSQ
CPRFNTCEICWEGVYND AFLIDRIINWISAGVFLDSNOTAENPVFTVFKDNEVLYRAQLASEDTNAQKTITNC
FLLNKIWCISLVEIYDTGDNVIRPKLFAVKIPEQCTHHHHHHH*

도면1c

cFtGMt: Chimeric F2-AC (27-488) trimer & G-MY (72-602) Tetramer

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-F2-AC (27-488aa)-GCNt Trimerization motif-linker--
G MY (72-602aa) --6xHis-Stop codon-HindIII

MGWSCILFLVATATGVHSILHYEKLKSKIGLVKGITRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNMSOCTGSVMENYKT
RLNGILTPKGALEIYKNNTHDLVGDVRLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLKSSIESTN
EAVVKLOETAETKVYVLTALODYINTNLVPTIDKISCKOTELSLDLALSKYLSDLLFVFGPNLODPVSNMSMTI
QAISOAFGGNYETLLRTLGYATEDFDDLLLESDSITGOIYVDLSGYIIVRVYFPILTEIOQAYIOELLPVSFNND
NSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCLITKRSVICNODYATPMTNNMRECLTGSTEKCPRELVVSSHVPRFALS
NGVLFANCISVTCOCOTTGRAISQSGETLLMIDNTTCPTAVLGNVITSLGKYLGSVNYNSEGIAIGPPVFTDK
VDISSOISSMNQSLQOSKDYIKEAORLLDTVNPSLMKOIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGGGGSNYTRST
DNOAVIKDALOGIOQOIKGLADKIGTEIGPKVSLIDTSSITIPANIGLLGSKISOSTASINENVNEKCKFTLPPLKI
HECNISCPNLPFREYRPOTEGVSNLVGLPNNICLOKTSNOILKPKLISYTLPPVVGOSGTCITDPLLAMDEGYF
AYSHLERIGSCSRGVSKORIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPPNPNTVYHCSAVYNNEFYVYLCAVSTV
GDPILNSTYWSGSLMMTRLAVKPKSNGGGYNOHOLALRSIEKGRYDKVMPYGPSGIKOGDLYFPVAVGFLVR
TEFKYNDSCNPITKCOYSKPENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNSDGENPKVVFIEISDORLSIGSPSKIYDS
LGOPVFYQASFSDWTMIKFGDVLTVNPLVVNWRNNTVISRPGOSQCPRFNTCPEICWEGVYNDAFLIDRINW
ISAGVFLDSNOTAENPVFTVFKDNEILYRAQLASEDTNAQKTITNCFLLKNKIWCISLVEIYDTGDNVIRPKLF
AVKIQEQCTHHHHHH*

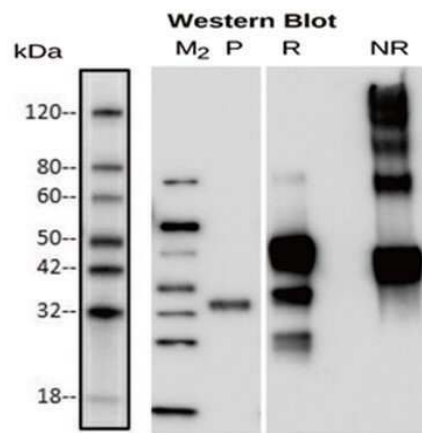
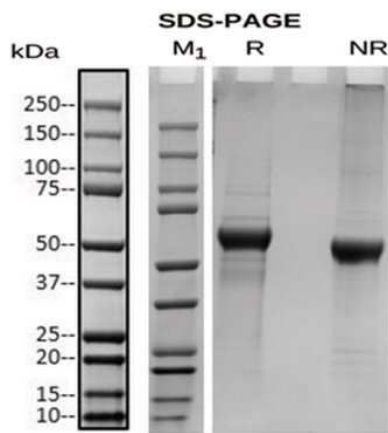
cFtGBT: Chimeric F2-AC (27-488) trimer & G1-BDC (72-602) Tetramer

EcoRI-Kozak sequence-Signal peptide-F2-AC (27-488aa)-GCNt Trimerization motif-linker--
G1-BDC (72-602aa) --6xHis-Stop codon-HindIII

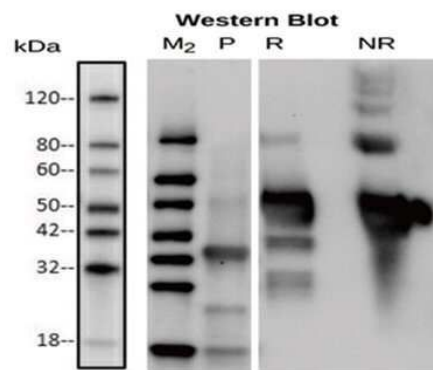
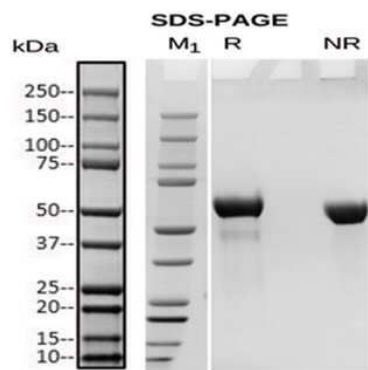
MGWSCILFLVATATGVHSILHYEKLKSKIGLVKGITRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNMSOCTGSVMENYKT
RLNGILTPKGALEIYKNNTHDLVGDVRLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLKSSIESTN
EAVVKLOETAETKVYVLTALODYINTNLVPTIDKISCKOTELSLDLALSKYLSDLLFVFGPNLODPVSNMSMTI
QAISOAFGGNYETLLRTLGYATEDFDDLLLESDSITGOIYVDLSGYIIVRVYFPILTEIOQAYIOELLPVSFNND
NSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCLITKRSVICNODYATPMTNNMRECLTGSTEKCPRELVVSSHVPRFALS
NGVLFANCISVTCOCOTTGRAISQSGETLLMIDNTTCPTAVLGNVITSLGKYLGSVNYNSEGIAIGPPVFTDK
VDISSOISSMNQSLQOSKDYIKEAORLLDTVNPSLMKOIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGGGGSNYTRST
DNOAVIKDALOGIOQOIKGLADKIGTEIGPKVSLIDTSSITIPANIGLLGSKISOSTASINENVNEKCKFTLPPLKI
HECNISCPNLPFREYRPOTEGVSNLVGLPNNICLOKTSNOILKPKLISYTLPPVVGOSGTCITDPLLAMDEGYF
AYSHLERIGSCSRGVSKORIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPPNPNTVYHCSAVYNNEFYVYLCAVSTV
GDPILNSTYWSGSLMMTRLAVKPKSNGGGYNOHOLALRSIEKGRYDKVMPYGPSGIKOGDLYFPVAVGFLVR
TEFKYNDSCNPITKCOYSKPENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNSDGENPKVVFIEISDORLSIGSPSKIYDS
LGOPVFYQASFSDWTMIKFGDVLTVNPLVVNWRNNTVISRPGOSQCPRFNTCPEICWEGVYNDAFLIDRINW
ISAGVFLDSNOTAENPVFTVFKDNEILYRAQLASEDTNAQKTITNCFLLKNKIWCISLVEIYDTGDNVIRPKLF
AVKIQEQCTHHHHHH*

도면2a

Fm: F2-AC (27-488) monomer



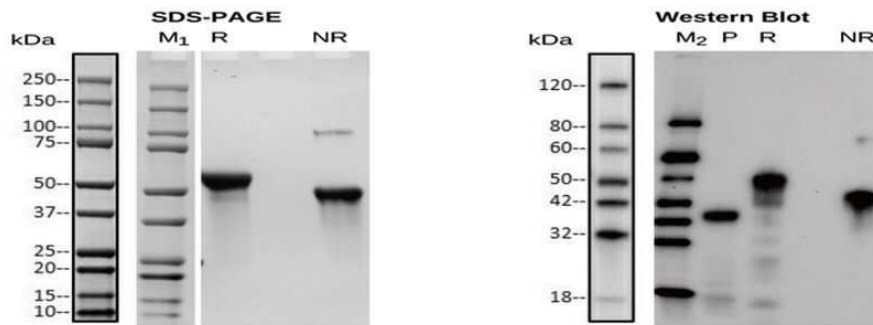
Ft: F2-AC (27-488) trimer



도면2b

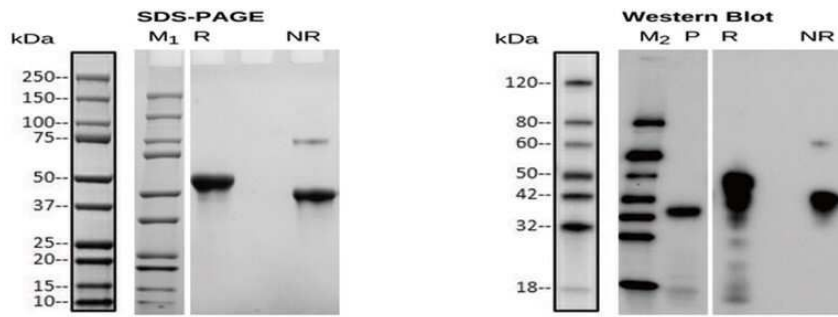
GMm: G_MY (172-602) monomer

SDS-PAGE & Western blot Analysis:



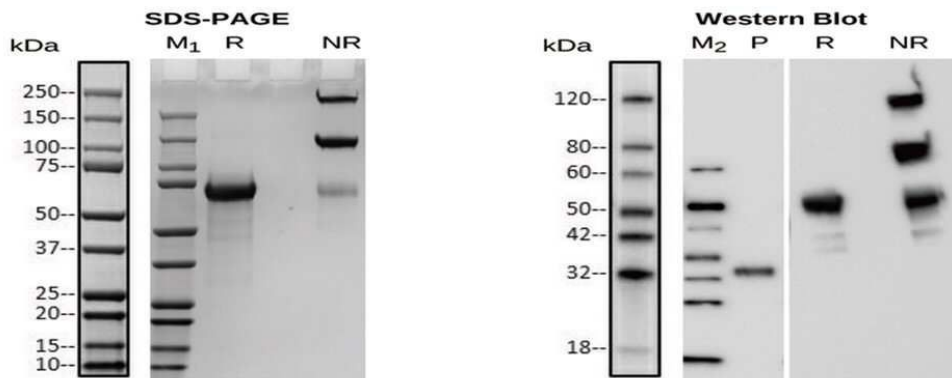
GBm: G1-BDC (172-602) monomer

SDS-PAGE & Western blot Analysis:

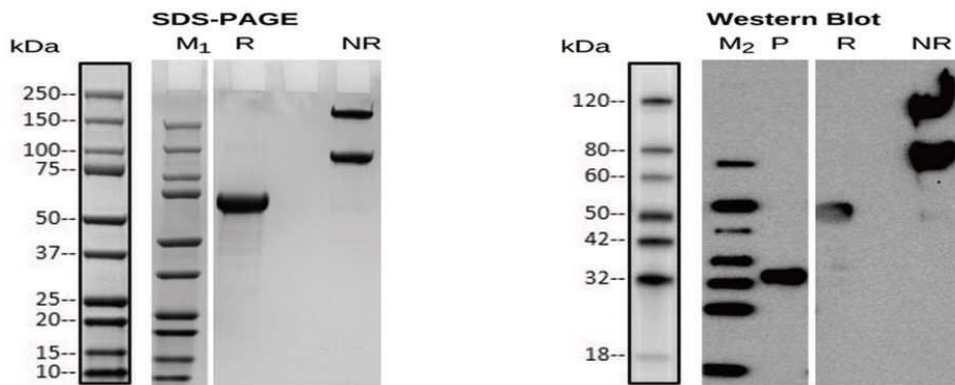


도면2c

GMt: G_MY (72-602) Tetramer

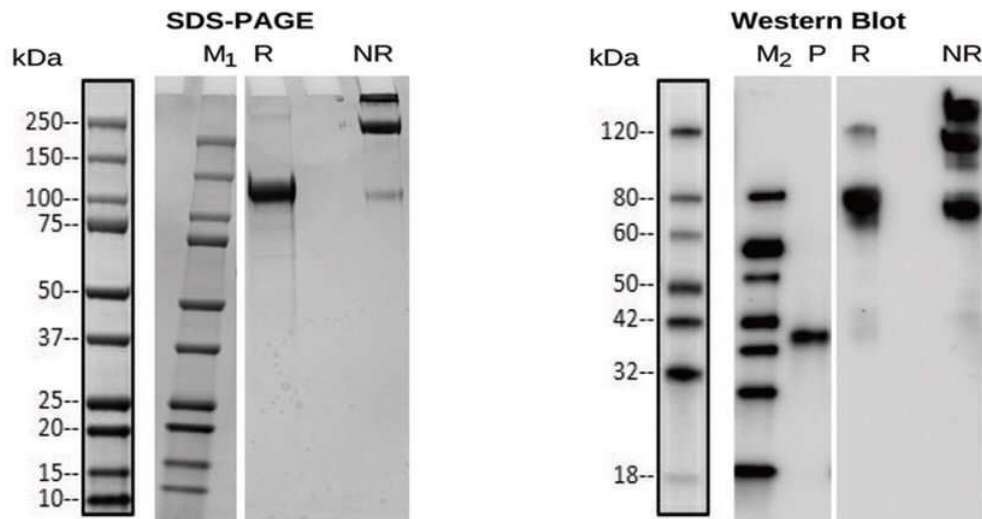


GBt : G1-BDC (72-602) Tetramer

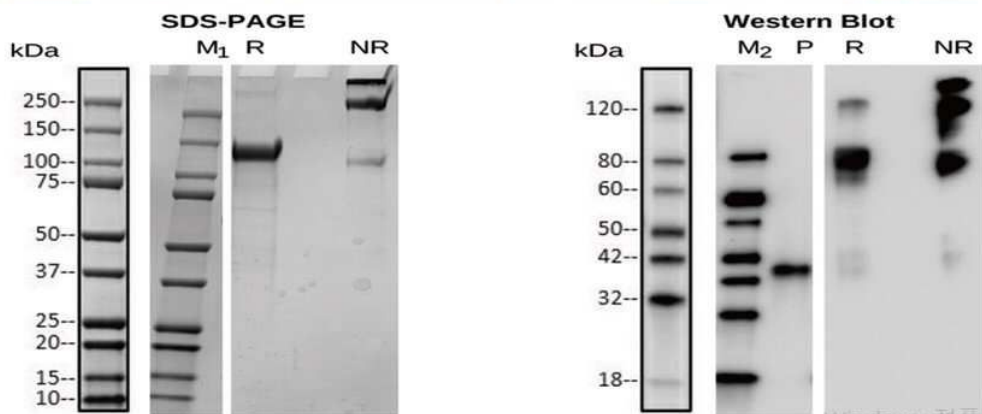


도면2d

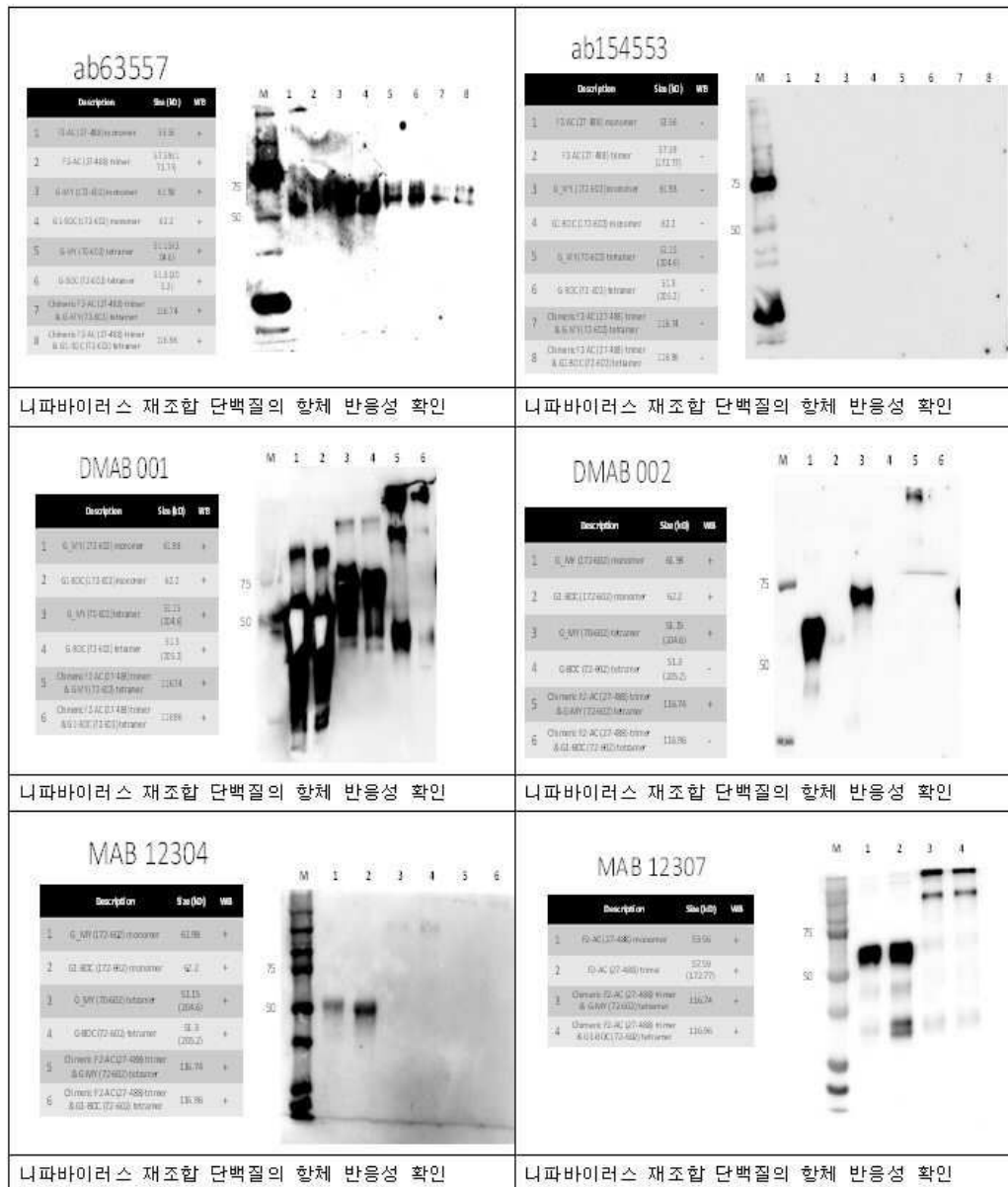
cFtGMt: Chimeric F2-AC (27-488) trimer & G-MY (72-602) Tetramer



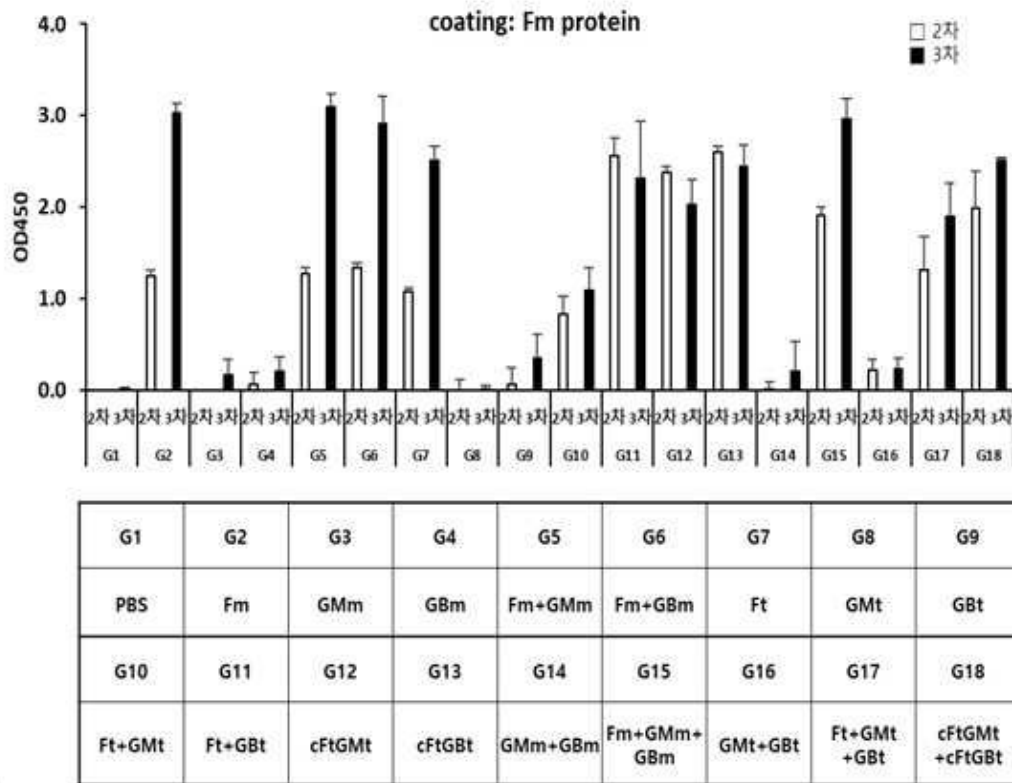
cFtGBt: Chimeric F2-AC (27-488) trimer & G1-BDC (72-602) Tetramer



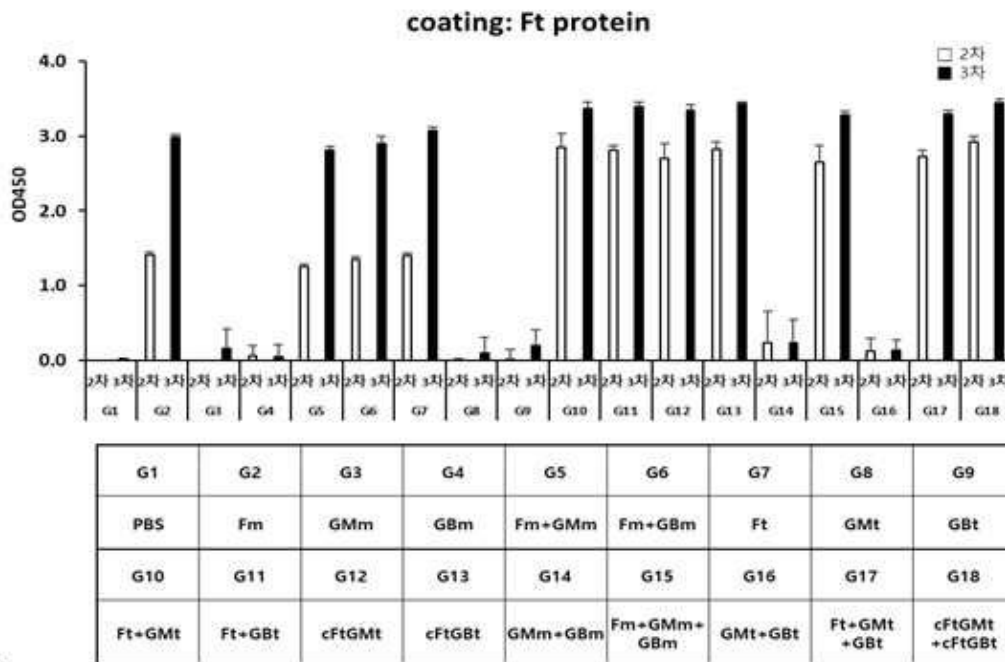
도면3



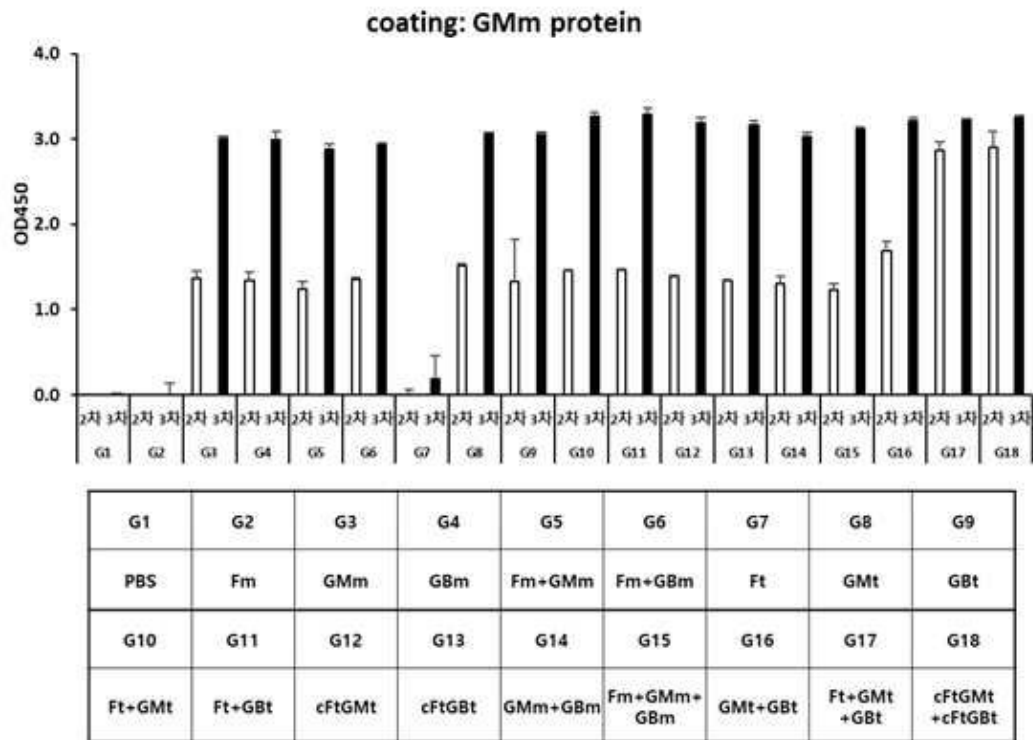
도면4a



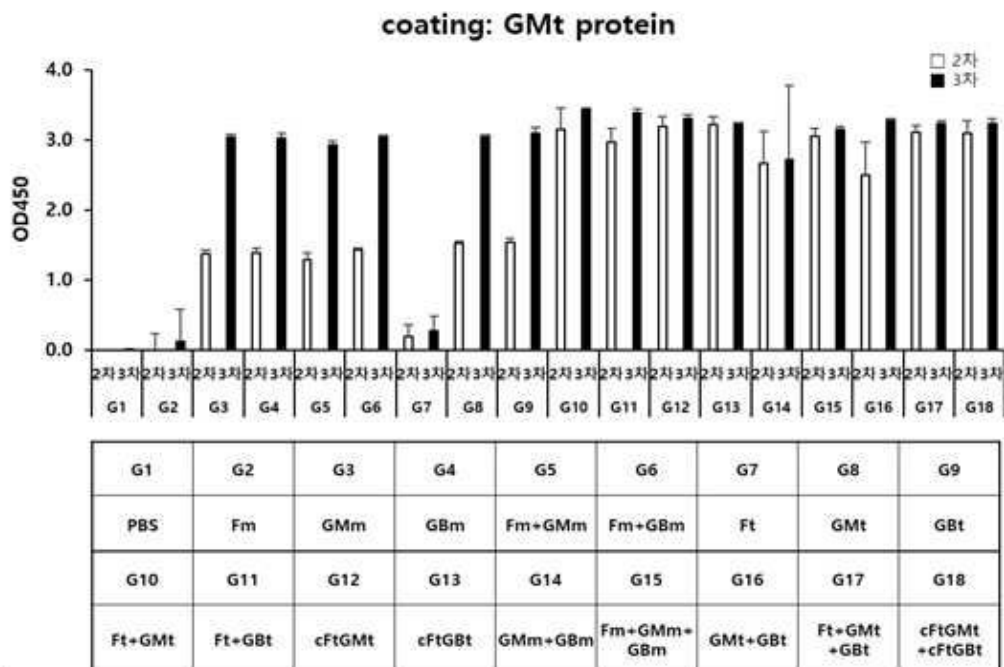
도면4b



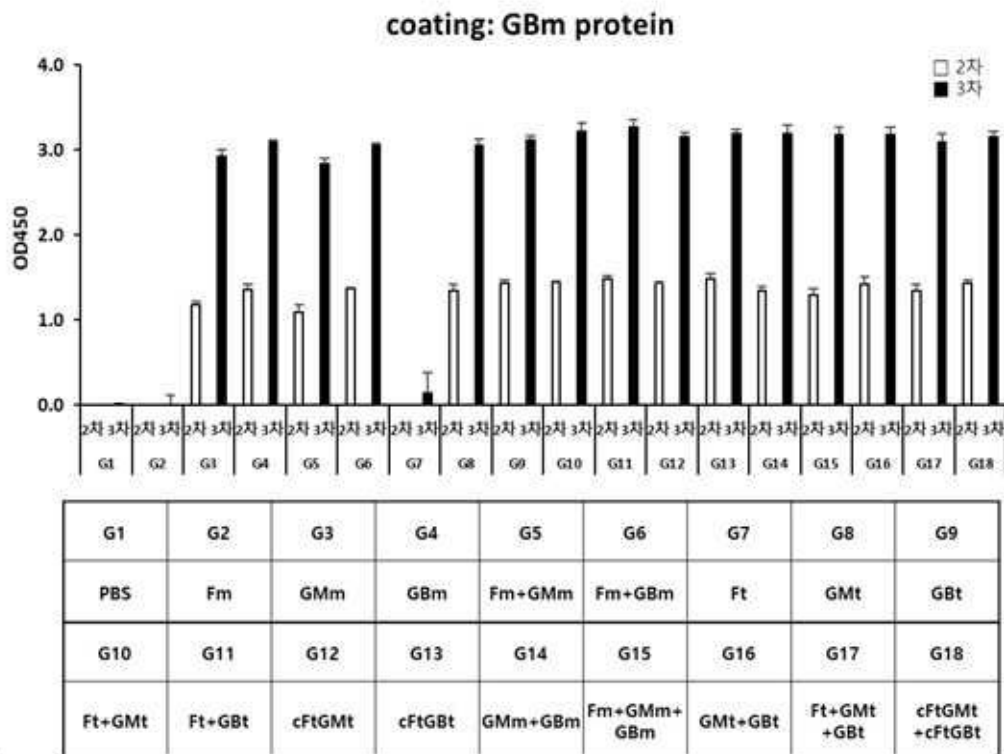
도면4c



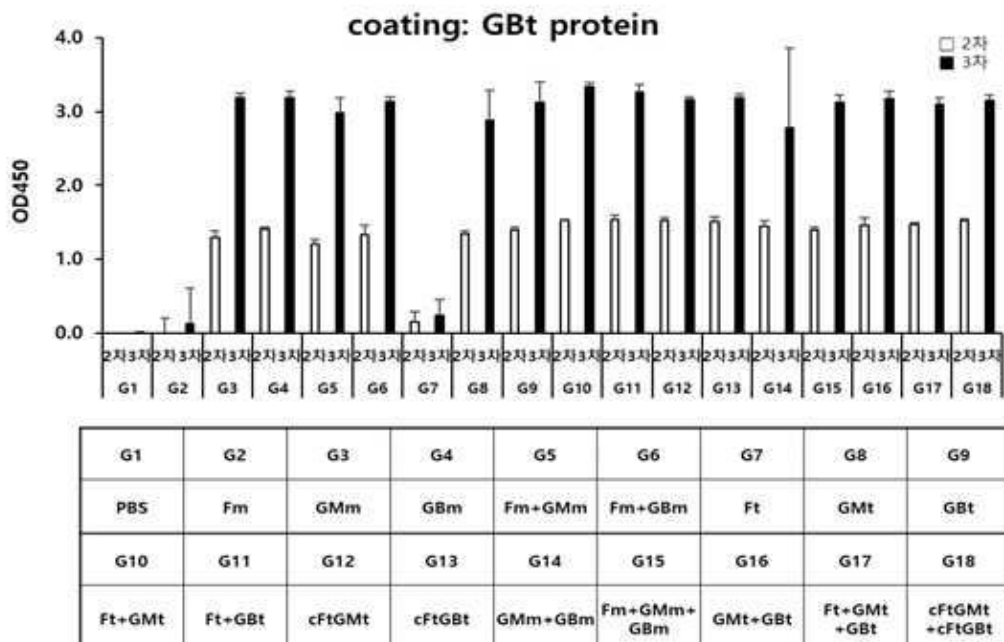
도면4d



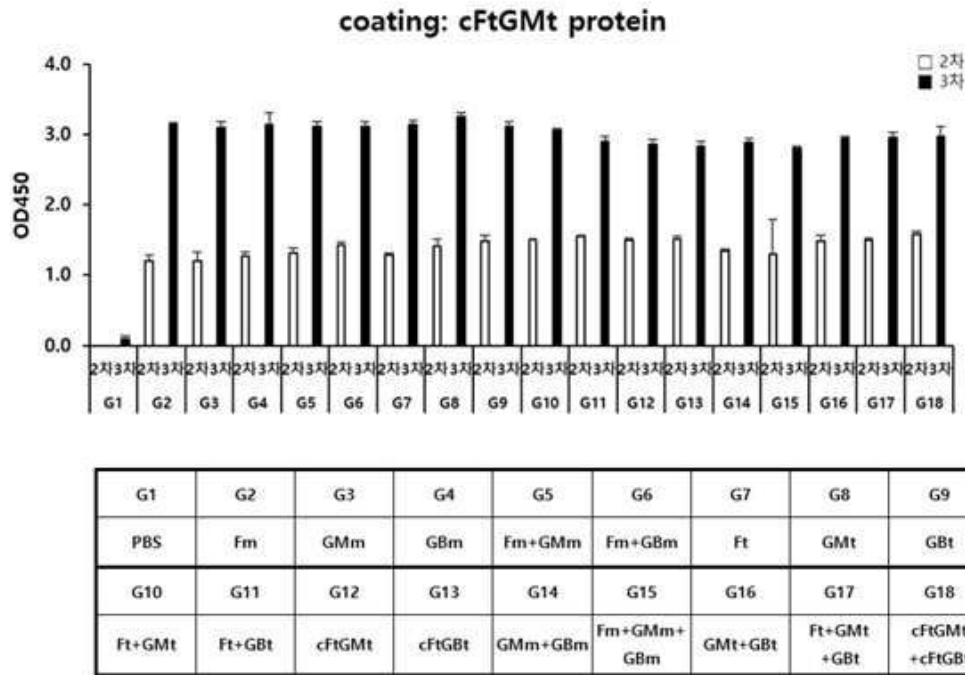
도면4e



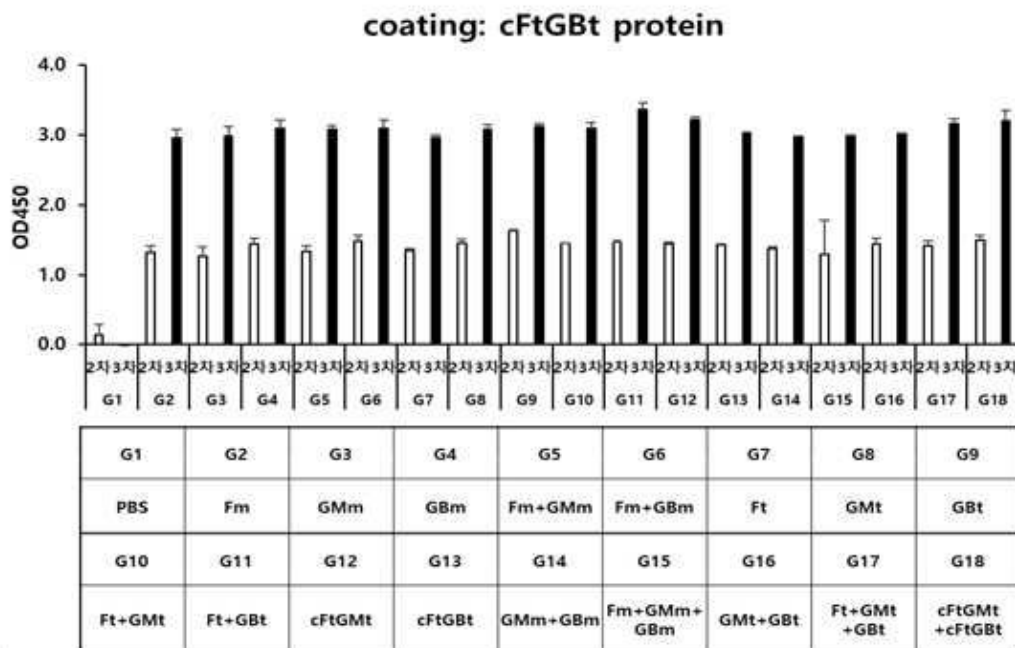
도면4f



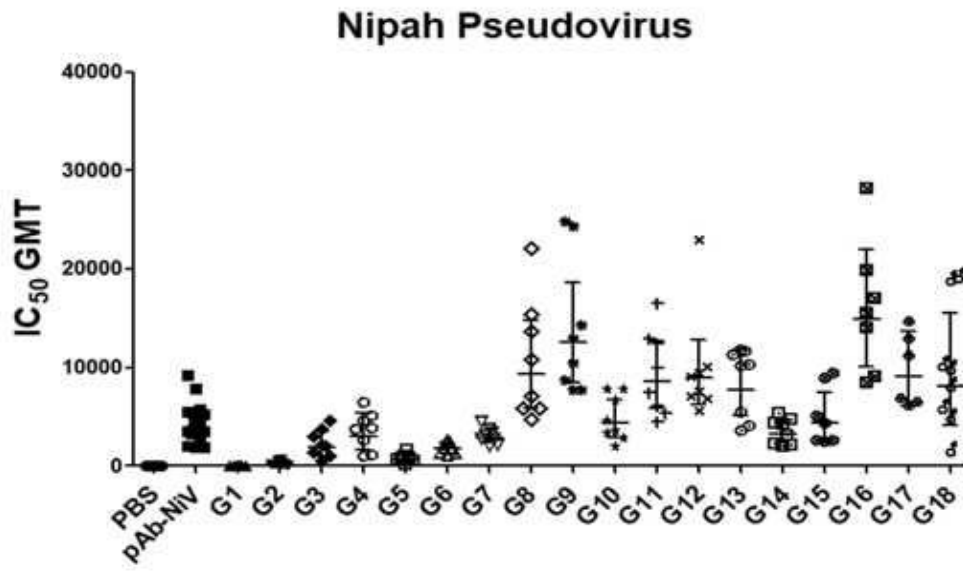
도면4g



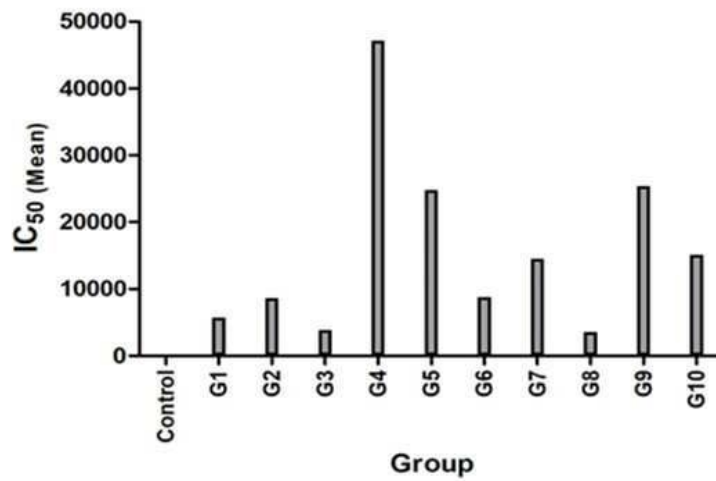
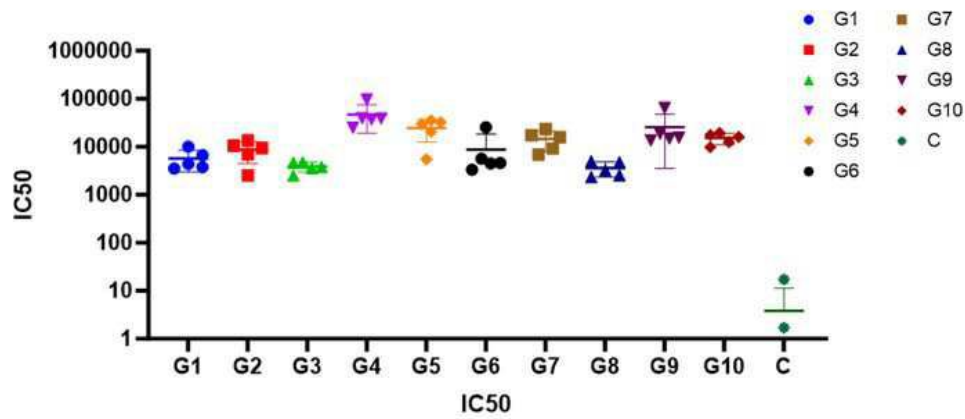
도면4h



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.