



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0045194
(43) 공개일자 2015년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/44 (2006.01) C07K 14/11 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0124580

(22) 출원일자 2013년10월18일

심사청구일자 2013년10월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정인식

서울 강남구 남부순환로 2803, 109동 1102호 (도곡동, 삼성래미안아파트)

박중화

서울 송파구 성내천로6길 9-12, 302호 (오금동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

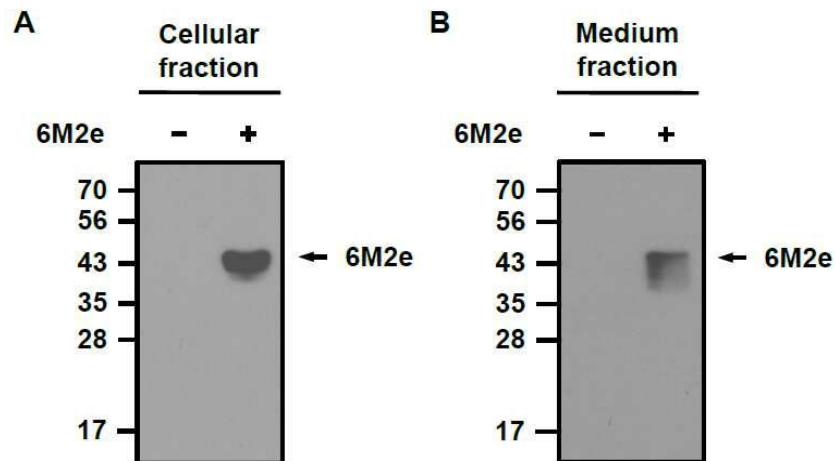
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 곤충세포 발현시스템을 이용한 인플루엔자 백신 소재 M2e 펩타이드 제조방법

(57) 요약

본 발명은 곤충세포 발현시스템에 최적화된 신규한 인플루엔자 M2e 유전자, 2M2e 유전자와, 이를 이용하여 곤충세포에서 M2e 펩타이드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 넓은 범위의 방어능력을 갖는 인플루엔자 백신에 이용될 수 있는 소재인 인플루엔자 바이러스의 M2e 펩타이드를 안정적이고 효율적으로 생산하는 데 이용할 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이현호

경기 수원시 권선구 권선로766번길 7-10, 201호 (권선동)

홍근표

충남 천안시 서북구 공단로 72, (성성동)

김원용

서울 용산구 이촌로71길 10, 213동 503호 (이촌동, 한가람아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009526

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린 21사업

연구과제명 곤충세포 발현시스템을 이용한 차세대 인플루엔자 백신소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 인플루엔자 M2e 유전자.

청구항 2

서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자.

청구항 3

서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열; 및
서열번호 1로 기재되는 인플루엔자 M2e 유전자를 포함하는, 재조합 벡터.

청구항 4

서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열; 및
1 내지 5개의 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함하는, 재조합 벡터.

청구항 5

제3항 또는 제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 곤충세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 곤충세포는 트리코플루시아 니(Trichoplusia ni)의 BT1-Tn-5B1-4 세포, 리만트리아 디스파(Lymantria dispar)의 LD652Y 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf21 세포, 드로소필라(Drosophila)의 Kc1 세포, 드로소필라(Drosophila)의 SL2 세포, 및 모기(mosquito) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 곤충세포.

청구항 7

- (a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 서열번호 1로 기재되는 인플루엔자 M2e 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및
- (b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 펩타이드의 제조방법.

청구항 8

- (a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 1 내지 5개의 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및
- (b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 다량체 펩타이드의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (a) 단계는

- i. 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 합성하는 단계;
- ii. 제한효소 염기 서열을 상기 인플루엔자 2M2e 유전자의 전방 및 후방에 각각 부착한 DNA 서열을 제작하는 단계; 및
- iii. 1 내지 5개의 상기 ii 단계에서 제작된 DNA 서열을 재조합 벡터에 삽입하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 M2e 다량체 펩타이드의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 방법은

(c) 상기 형질전환된 곤충세포의 배양액으로부터 인플루엔자 M2e 다량체 펩타이드를 수득하는 단계를 더 포함하는, 인플루엔자 M2e 다량체 펩타이드의 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 (b) 단계의 곤충세포는 트리코플루시아 니(Trichoplusia ni)의 BT1-Tn-5B1-4 세포, 리만트리아 디스파(Lymantria dispar)의 LD652Y 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf21 세포, 드로소필라(Drosophila)의 Kc1 세포, 드로소필라(Drosophila)의 SL2 세포, 및 모기(mosquito) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 인플루엔자 M2e 펩타이드의 제조방법.

청구항 12

(a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 3개의 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

(b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 욕량체 펩타이드의 제조방법.

청구항 13

(a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 서열번호 7로 기재되는 인플루엔자 6M2e 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

(b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 욕량체 펩타이드의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 곤충세포 발현시스템에 최적화된 신규한 인플루엔자 M2e 유전자 및 2M2e 유전자와, 이를 이용하여 곤충세포에서 M2e 펩타이드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자(influenza, 독감)는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 의해 사람 및 동물(조류, 돼지, 개, 말 등)의 호흡기를 통해 전파되는 호흡기성 질병이다. 사람 인플루엔자(Human influenza)의 경우 매년 전 세계 10-20% 인구에서 발생하며, 전염성이 높아 매년 세계적 규모로 유행하는 경향이 있다. 인플루엔자의 증상은 고열, 두통, 근육통, 인후의 염증, 통증, 기침 등의 호흡기질환을 수반하며 심한 경우 노약자, 만성질환보유자 등의 사망을 유발할 수 있다.

[0003] 사람 인플루엔자 백신의 경우 그 해에 유행할 것으로 예상되는 균주를 미리 예측하고 이를 이용하여 백신을 제작해야 한다. 따라서 유행 균주에 맞춰 백신을 매년 반복적으로 제작해야 할 뿐 아니라 실제 유행하는 균주가 백신 제작 시 사용한 균주와 일치하지 않거나, 변이가 큰 새로운 균주가 유행할 경우 기존의 백신은 효과가 현저히 낮다는 문제점을 갖고 있다. 따라서 이를 극복하기 위해 사람 및 동물에서 넓은 범위의 방어능력을 갖는 항원을 선별하여 인플루엔자 백신으로 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

[0004] 또한 현재 인플루엔자 백신 생산은 유정란을 이용하여 제조되고 있는데, 이러한 백신 제조 방식은 비교적 긴 시간이 소요되고 (6개월 이상) 그 생산 과정이 복잡하여 대유행 인플루엔자의 확산에 신속하게 대응하기 위한 백신 제조 방법으로는 적절하지 않다. 따라서 신속하고 유연성 있는 백신 제조 방법이 개발될 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 곤충세포 발현시스템에 최적화된 신규한 인플루엔자 M2e 유전자, 2M2e 유전자와, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 곤충세포 및 상기 형질전환된 곤충세포를 이용하여 M2e 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 인플루엔자 M2e 유전자를 제공한다.
- [0007] 인플루엔자 A 바이러스는 바이러스 표면에 matrix protein 2 (M2) 단백질이 존재하여 바이러스 생장에 필수적인 역할을 한다. 야생형 M2 단백질은 세포 밖 돌출 부위 (an amino-terminal extracellular domain: M2e), 막투과 부위 (Transmembrane domain: TM) 그리고 세포 안 말단부위 (cytoplasmic domain: CT)의 3개의 구조적 도메인으로 구성되며 각각 24, 19, 54개의 아미노산으로 이루어져 있다. 이 M2 단백질의 앞쪽 24개 아미노산은 바이러스 외부로 노출되어 있고(M2 세포외부 영역, M2e), 이는 인플루엔자 A 바이러스의 공통항원으로서의 특징을 가지고 있으며 중 특이성이 있다.
- [0008] 따라서 상기 M2e 펩타이드는 인플루엔자에 대한 교차 방어 능력이 향상되어 광범위한 보호능력을 갖는 인플루엔자 백신을 제조하기 위한 소재로 사용할 수 있다. 본 발명자들은 인플루엔자 바이러스의 M2 유전자에서 곤충세포 발현에 최적화된 부분을 분석하여 신규한 M2e 유전자를 합성하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 본 발명자들은 인플루엔자 M2e 펩타이드를 다량체로 합성함으로써 epitope의 수가 증가된 펩타이드를 생산하고자 하였다. 이에 상기 서열번호 1의 인플루엔자 M2e 유전자를 기반으로 곤충세포 발현에 최적화된 인플루엔자 M2e 펩타이드 이량체를 코딩하는 신규한 유전자를 합성하였다.
- [0010] 이에 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 제공한다.
- [0011] 상기 유전자에 의해 합성되는 펩타이드는 인플루엔자 M2e 펩타이드가 GGGGS 아미노산 링커에 의해 서로 연결된 구조를 갖고 있다.
- [0012] 본 발명은 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열; 및
- [0013] 서열번호 1로 기재되는 인플루엔자 M2e 유전자를 포함하는, 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열; 및
- [0015] 1 내지 5개의 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함하는, 재조합 벡터를 제공한다. 그러나 재조합 벡터에 포함되는 인플루엔자 2M2e 유전자는 1 내지 5개에 제한되지 않으며, 기반이 되는 재조합 벡터의 크기가 크면 더 많은 수의 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함시키는 것도 가능하다.
- [0016] 본 발명에 이용된 BiP signal sequence는 초파리 BiP 단백질 (immunoglobulin binding chaperone protein)의 secretion signal sequence로서, 단백질의 ER (endoplasmic reticulum) targeting 및 세포 밖으로의 배출 (secretion)을 유도하는 것으로 알려져 있다. BiP signal sequence의 아미노산 서열이 공지되어 있으므로 이를 코딩하는 DNA 서열은 당업자에게 자명하다.
- [0017] 상기 재조합 벡터는 pIZT/V5-His 벡터를 기반으로 한 것일 수 있으나, 사용할 수 있는 벡터는 이에 제한되지 않으며, 곤충세포 발현에 이용할 수 있는 벡터는 모두 이용할 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 곤충세포를 제공한다.
- [0019] 상기 곤충세포는 트리코플루시아 니(Trichoplusia ni)의 세포일 수 있으며, 바람직하게는 BT1-Tn-5B1-4 세포일 수 있다. 그러나 곤충세포의 종류는 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구현예로서, pIZT 벡터를 기반으로 재조합 벡터를 제조하는 경우 Lepidopteran 곤충세포에 해당하는 곤충세포는 모두 이용 가능하며, 바람직하게는 리만트리아 디스파(Lymantria dispar)의 LD652Y 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf21 세포, 드로소필라(Drosophila)의 Kc1 세포, 드로소필라(Drosophila)의 SL2 세포, 및 모기(mosquito) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된 곤충세포를 이용할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 (a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 서열번호 1로 기재되는 인플루엔자 M2e 유전

자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

[0021] (b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은 (a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 1 내지 5개의 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

[0023] (b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 다량체 펩타이드의 제조방법을 제공한다. 그러나 재조합 벡터에 포함되는 인플루엔자 2M2e 유전자는 1 내지 5개에 제한되지 않으며, 기반이 되는 재조합 벡터의 크기가 크면 더 많은 수의 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함시키는 것도 가능하다.

[0024] 본 발명의 제조방법의 일 구현예로서, 상기 (a) 단계는

[0025] i. 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 합성하는 단계;

[0026] ii. 제한효소 염기 서열을 상기 인플루엔자 2M2e 유전자의 전방 및 후방에 각각 부착한 DNA 서열을 제작하는 단계; 및

[0027] iii. 1 내지 5개의 상기 ii 단계에서 제작된 DNA 서열을 재조합 벡터에 삽입하는 단계를 포함할 수 있다. 이와 같이 인플루엔자 M2e 이량체 유전자를 먼저 합성하고 전후에 제한효소 염기 서열을 부착한 후 이를 재조합 벡터에 삽입함으로써 유전자 합성 과정에서 오류가 발생할 가능성을 낮출 수 있다. 제한효소 염기서열의 종류는 2M2e 유전자가 서로 연결될 수 있도록 하는 것이면 충분하고 제한효소의 종류에는 제한이 없다. 상기 방법의 일 구현예로서 재조합 벡터에 삽입되는 유전자는 '(제한효소 염기 서열-서열번호 4)_n-(제한효소 염기서열)'의 구조를 가질 수 있고, 여기서 n은 자연수이고, 바람직하게는 3이며, 보다 바람직하게는 상기 재조합 벡터에 삽입되는 유전자는 서열번호 7의 유전자일 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 (c) 상기 형질전환된 곤충세포의 배양액으로부터 인플루엔자 M2e 다량체 펩타이드를 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0029] 세포 배양액은 일반적으로 세포 배양배지와 세포를 모두 포함하는 것을 의미하며, 세포 배양배지만 일반적으로 세포 배양액으로부터 세포를 제거한 것을 의미한다. 따라서 세포로부터 분리된 펩타이드는 세포 배양배지 내에만 존재하게 된다.

[0030] 본 발명은 (a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 3개의 서열번호 4로 기재되는 인플루엔자 2M2e 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

[0031] (b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 육량체 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0032] 또한 본 발명은 (a) 서열번호 3의 BiP 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열 및 서열번호 7로 기재되는 인플루엔자 6M2e 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

[0033] (b) 곤충세포를 상기 재조합 벡터로 형질전환 시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 M2e 육량체 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 형질전환된 곤충세포를 이용한 인플루엔자 백신소재의 제조방법은 기존의 유정란을 이용한 인플루엔자 백신 제조 방법에 비해 그 생산 과정이 복잡하지 않아 신속하게 대유행 인플루엔자 확산에 대응할 수 있는 인플루엔자 백신을 생산할 수 있다. 안정적으로 형질전환된 곤충세포를 이용하면 동물세포에서 발현된 것과 유사한 번역 후 수식 (당쇄화, 인산화, 지방산의 부가)이 일어난 단백질을 생산할 수 있는 동시에, 단백질의 발현량이 높고 복수의 단백질을 동시에 발현시키거나 세포 밖으로 배출시킬 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명은 넓은 범위의 방어능력을 갖는 인플루엔자 백신 소재로 이용될 수 있는 인플루엔자 바이러스의 M2e 펩타이드를 안정적이고 효율적으로 생산하는 데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 2개의 인플루엔자 M2e 유전자가 GGGGS 링커를 코딩하는 염기서열로 연결된 2M2e DNA 절편을 나타낸 모식

도이다.

도 2는 BiP signal sequence를 코딩하는 DNA 절편 및 제한효소 Spe I, EcoR I 염기서열을 지니는 합성된 BiP-2M2e DNA 절편을 나타낸 모식도이다.

도 3은 6개의 인플루엔자 M2e 유전자가 GGGGS 링커를 코딩하는 염기서열로 연결된 6M2e DNA의 상류에 BiP 신호 서열이 연결된 DNA 절편을 나타낸 모식도이다.

도 4는 재조합 pIZT/BiP-6M2e-V5-His 벡터를 나타낸 모식도이다.

도 5A는 도 4의 pIZT/BiP-6M2e-V5-His 벡터로 형질전환된 트리코플루시아 니의 BT1-Tn-5B1-4 세포의 추출물에서 재조합 6M2e 펩타이드를 Western blot을 이용해 확인한 결과이고, 도 5B는 상기 세포의 배양배지에서 세포 밖으로 분비된 재조합 6M2e 펩타이드를 Western blot을 이용해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0038] <실시예 1> M2e 펩타이드 육량체(6M2e)를 발현하는 재조합 플라스미드 벡터의 제작

[0039] 인플루엔자 H1N1 바이러스 [Influenza A/Korea/01/2009(H1N1)] genome을 주형으로 하여 RT-PCR을 수행하여 M2 유전자의 염기서열을 확보하였다. Sanger's method에 기초하여 염기서열을 분석하여 곤충세포 코돈사용빈도 (codon usage)에 최적화된 M2e 펩타이드를 코딩하는 염기서열을 결정하고(서열번호 1) 2M2e 유전자를 합성하기 위한 염기서열로 이용하였다. 분석은 (주)바이오닉스에 의뢰하여 수행하였다. 이 염기서열로부터 발현되는 M2e 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 2(SLLTEVETPTRSEWECRCSDSDP)와 같다.

[0040] 한번에 6M2e 펩타이드를 코딩하는 DNA 절편을 합성하게 되면 합성시 오류가 발생할 가능성이 높아진다. 따라서 하기와 같이 2M2e 펩타이드를 코딩하는 DNA 절편을 먼저 확보하였고, 이를 이용하여 PCR을 수행하여 6M2e 펩타이드를 코딩하는 DNA 절편이 삽입된 재조합 벡터를 제작하였다.

[0041] 곤충세포 발현에 최적화된, 두 개의 M2e 펩타이드가 GGGGS 아미노산 링커로 연결된 M2e 이량체(2M2e)를 코딩하는 DNA 절편(서열번호 4)이 BiP signal sequence(서열번호 3)를 코딩하는 DNA 절편 및 제한효소 Spe I, EcoR I 염기서열에 연결된 BiP-2M2e DNA 절편을 합성회사인 (주)바이오닉스에 의뢰하여 합성하였다(도 2의 모식도 참조). 상기 BiP signal sequence의 아미노산 서열(서열번호 3)은 MKLCILLAVVAFVGLSLG에 해당한다.

[0042] 상기 2M2e 펩타이드를 코딩하는 DNA 절편을 주형으로 PCR을 수행하여 각각의 M2e 펩타이드가 GGGGS 아미노산 링커로 연결되고 EcoR I/EcoR V 제한효소 염기서열을 지니는 2M2e DNA 1 절편(서열번호 5) 및 각각의 M2e 펩타이드가 GGGGS 아미노산 링커로 연결되고 EcoR V/Xba I 제한효소 염기서열을 지니는 2M2e DNA 2 절편(서열번호 6)을 얻었다. 각각의 2M2e DNA 절편의 증폭에 이용된 PCR 프라이머에 대해서는 하기 표 1에 나타내었다.

[0043] [표 1]

서열번호	Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
6	2M2e DNA 1	Forward	GAA TTC GGC GGC GGC GGC TCG TCT CTC CTC ACT GAG GTC GAA ACA CCT ACA AGA AGC G
7		Reverse	GAT ATC GGG GTC GCT GGA GTC TGA ACA ACG
8	2M2e DNA 2	Forward	GAT ATC GGC GGC GGC GGC TCG TCT CTC CTC ACT GAG GTC GAA ACA CCT ACA AGA AGC G
9		Reverse	TCT AGA GCG GGG TCG CTG GAG TCT GAA CAA CG

[0044]

[0045] 상기 BiP-2M2e DNA 절편, 2M2e DNA 1 절편, 2M2e DNA 2 절편을 pIZT/V5-His 벡터 (Invitrogen, USA)의 Spe I/EcoR I, EcoR I/EcoR V, EcoR V/Xba I 제한효소 절단부위에 각각 클로닝하여 재조합 pIZT/BiP-6M2e-V5-His 벡터를 확보하였다(도 4의 모식도 참조). 재조합 pIZT/BiP-6M2e-V5-His 벡터에 클로닝된 BiP-6M2e DNA 절편의 모식도는 도 3과 같다.

[0046] 각 DNA 서열 또는 아미노산 서열의 번호는 하기 표 2에 정리하였다.

[0047] [표 2]

서열번호	서열
1	인플루엔자 M2e 유전자 DNA 서열
2	인플루엔자 M2e 펩타이드 아미노산 서열
3	BiP signal sequence 아미노산 서열
4	2M2e DNA 서열
5	2M2e DNA 1 서열
6	2M2e DNA 2 서열
7	6M2e DNA 서열

[0048]

[0049]

<실시예 2> 곤충세포의 형질전환

[0050]

실시예 1에서 구축한 재조합 pIZT/BiP-6M2e-V5-His 벡터 (2.2 µg)를 250 µl의 Express Five SFM (Express Five Serum Free Medium, Invitrogen)에 혼합하고, Cellfectin II reagent (Invitrogen) 18 µl가 혼합된 250 µl의 Express Five SFM과 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 웰당 1.8×10^6 개의 트리코플루시아 니 (Trichoplusia ni)의 BT1-Tn-5B1-4 세포(Invitrogen, USA)가 분주된 6 well plate의 well에 상기 pIZT/BiP-6M2e-V5-His 벡터/Cellfectin II reagent 혼합액을 첨가하고 2일간 배양하여 형질전환을 유도하였다.

[0051]

pIZT/V5-His 벡터에 zeocin-GFF 서열이 존재하므로, pIZT/BiP-6M2e-V5-His 벡터로 형질전환된 세포들은 zeocin 항생제에 저항성을 갖는다. 따라서 상기 배양한 곤충세포들을 회수하고 300 µg/ml의 zeocin (Invitrogen) 항생제가 첨가된 Express Five SFM 배지에 첨가하고 배지를 5일 간격으로 교체해 주면서 zeocin 항생제에 저항성을 지니는 곤충세포를 약 5주간의 선별기간을 거쳐 선별하였다.

[0052]

<실시예 3> 곤충세포 추출물에서 6M2e 펩타이드 발현 확인

[0053]

형질전환된 세포 내에서 6M2e 펩타이드가 발현되는지 여부를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0054]

실시예 2에서 수득한 형질전환된 곤충세포를 6 well plate에 well당 1×10^6 개를 첨가하고 27℃ 배양기에서 4일간 배양하였다. 세포 배양액으로부터 세포를 회수하고 펩타이드를 추출하였다.

[0055]

본 발명에 사용된 pIZT/V5-His 벡터에는 V5 epitope를 코딩하는 유전자가 존재한다. 클로닝된 6M2e 유전자는 V5-His 유전자와 융합되므로, 발현된 6M2e 펩타이드의 C-말단에는 V5 epitope 및 His6 tag가 존재하게 된다. 따라서 6M2e 펩타이드의 존재를 anti-V5 항체를 이용하여 확인하였다.

[0056]

단백질 추출물을 anti-V5 항체를 이용한 Western blot으로 분석하여 6M2e 펩타이드가 세포내에서 안정적으로 발현됨을 확인하였다. 발현된 6M2e 펩타이드의 크기는 45 kDa 이었다(도 5A 참조).

[0057]

상기 결과로부터 실시예 1의 재조합 벡터를 사용하여 실시예 2에 기술한 대로 형질전환시킨 트리코플루시아 니 BT1-Tn-5B1-4 세포 내에서 6M2e 펩타이드가 안정적으로 발현됨을 알 수 있다.

[0058]

<실시예 4> 곤충세포 배양배지에서 6M2e 펩타이드 확인

[0059]

형질전환된 세포에서 6M2e 펩타이드는 BiP 신호서열에 의하여 세포 밖으로 분비되어 존재할 수 있다. 따라서 분비된 6M2e 펩타이드를 확인하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0060]

실시예 2에서 수득한 형질전환된 곤충세포를 6 well plate에 well당 1×10^6 개를 첨가하고 27℃ 배양기에서 4일간 배양하였다. 세포 배양액을 원심분리하여 세포 배양배지를 확보하고 anti-V5 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다. 도 5B에 나타난 바와 같이 6M2e 펩타이드가 세포 배양배지에 존재하고, 발현된 6M2e 펩타이드의 크기는 40~45 kDa 이었다.

[0061]

상기 결과로부터 실시예 1의 재조합 벡터를 사용하여 실시예 2에 기술한 대로 형질전환시킨 트리코플루시아 니 BT1-Tn-5B1-4 세포에서 인플루엔자 6M2e 펩타이드가 안정적으로 발현되어 세포 밖으로 분비됨을 알 수 있다.

도면

도면1

2M2e DNA 절편

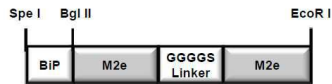


1 TCTCTCCTCACTGAGGTCGAAACACCTACAAGAAGCGAGTGGGAATGTCGCTGCTCTGATTCTCTCAGATCCAGGCGGTGGT 81
S L L T E V E T P T R S E W E C R C S D S S D P G G G

82 GGTTCCTTCACTCCTGACCGAGGTTGAAACCCCAACACGTTCAGAATGGGAGTGTCTGTTTCAGACTCCAGCGACCCC 159
G S S L L T E V E T P T R S E W E C R C S D S S D P

도면2

합성된 BiP-2Me DNA 절편



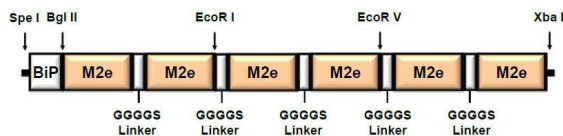
1 ACTAGTATGAAGTTGTGTATCCTGCTGGCCGTCGTTGCCTTTGTCGGACTGAGCCTGGGCAGATCTTCTCTCCTCACTGA 80
(Spe I)M K L C I L L A V V A F V G L S L G R S S L L T E

81 GGTGAAACACCTACAAGAAGCGAGTGGGAATGTCGCTGCTCTGATTCTCTCAGATCCAGGCGGTGGTGGTTCTTCACTCC 160
V E T P T R S E W E C R C S D S S D P G G G G S S L

161 TGACCGAGGTTGAAACCCCAACACGTTCAGAATGGGAGTGTCTGTTTCAGACTCCAGCGACCCCGAATTC 231
L T E V E T P T R S E W E C R C S D S S D P (EcoR I)

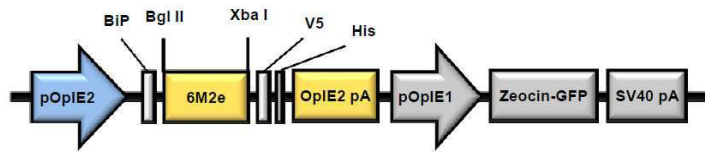
도면3

BiP-6M2e DNA 절편

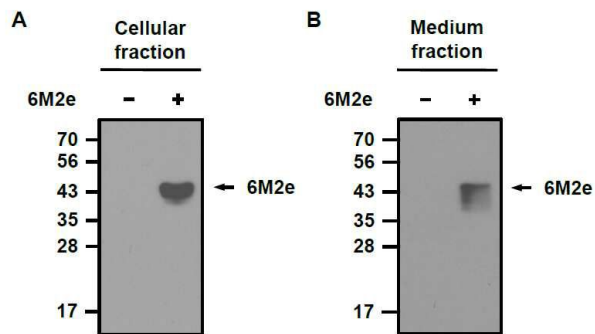


ACTAGTATGGCCAAAGTTGTGTATCCTGCTGGCCGTCGTTGCCTTTGTCGGACTGAGCCTGGGCAGATCTTCTCTCCTCACTGA
GGTCGAAACACCTACAAGAAGCGAGTGGGAATGTCGCTGCTCTGATTCTCTCAGATCCAGGCGGTGGTGGTTCTTCACTCCTGA
CCGAGGTTGAAACCCCAACACGTTTCAAGAATGGGAGTGTCTGTTTCAGACTCCAGCGACCCGAATTCGGCGGGCGGCGGCTCG
TCTCTCCTCACTGAGGTCGAAACACCTACAAGAAGCGAGTGGGAATGTCGCTGCTCTGATTCTCTCAGATCCAGGCGGTGGTGG
TTCTTCACTCCTGACCGAGGTTGAAACCCCAACACGTTTCAAGAATGGGAGTGTCTGTTTCAGACTCCAGCGACCCGATATCG
GCGGCGGGCGGCTCGTCTCTCCTCACTGAGGTCGAAACACCTACAAGAAGCGAGTGGGAATGTCGCTGCTCTGATTCTCTCAGAT
CCAGGCGGTGGTGGTTCTTCACTCCTGACCGAGGTTGAAACCCCAACACGTTTCAAGAATGGGAGTGTCTGTTTCAGACTCCAG
CGACCCCGCTCTAGA

도면4



도면5



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Method for manufacturing influenza vaccine material M2e peptide using insect cell expression system
- <130> P13-087-KHU
- <160> 11
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 72
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Influenza M2e peptide gene
- <400> 1
- tctctctca ctgaggtcga aacacctaca agaagcgagt ggggaatgtcg ctgctctgat 60
- tcctcagatc ca 72

- <210> 2
- <211> 24

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Influenza M2e peptide
 <400> 2
 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys
 1 5 10 15
 Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro
 20

<210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BiP signal sequence
 <400> 3
 Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Gly

<210> 4
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Influenza 2M2e peptide gene
 <400> 4
 tctctctctca ctgaggtcga aacacctaca agaagcgagt gggaatgtcg ctgctctgat 60
 tcttcagatc caggcgggtgg tggttcttca ctctgaccg aggttgaaac cccaacacgt 120
 tcagaatggg agtgtcgttg ttcagactcc agcgacccc 159

<210> 5
 <211> 171
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Influenza 2M2e DNA1
 <400> 5

gaattctctc tcctcactga ggtcgaaaca cctacaagaa gcgagtggga atgtcgctgc 60

tctgattcct cagatccagg cgggtggtgt tcttcactcc tgaccgaggt tgaaacccca 120

acacgttcag aatgggagtg tcgttgttca gactccagcg accccgatat c 171

<210> 6

<211> 171

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza 2M2e DNA2

<400> 6

gatatctctc tcctcactga ggtcgaaaca cctacaagaa gcgagtggga atgtcgctgc 60

tctgattcct cagatccagg cgggtggtgt tcttcactcc tgaccgaggt tgaaacccca 120

acacgttcag aatgggagtg tcgttgttca gactccagcg acccctctag a 171

<210> 7

<211> 501

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza 6M2e peptide gene

<400> 7

agatcttctc tcctcactga ggtcgaaaca cctacaagaa gcgagtggga atgtcgctgc 60

tctgattcct cagatccagg cgggtggtgt tcttcactcc tgaccgaggt tgaaacccca 120

acacgttcag aatgggagtg tcgttgttca gactccagcg accccgaatt ctctctctc 180

actgaggctc aaacacctac aagaagcgag tgggaatgtc gctgctctga ttcctcagat 240

ccaggcgggtg gtgtttcttc actcctgacc gaggttgaaa cccaacacg ttcagaatgg 300

gagtgtcgtt gttcagactc cagcgacccc gatatctctc tcctcactga ggtcgaaaca 360

cctacaagaa gcgagtggga atgtcgctgc tctgattcct cagatccagg cgggtggtgt 420

tcttcactcc tgaccgaggt tgaaacccca acacgttcag aatgggagtg tcgttgttca 480

gactccagcg acccctctag a 501

<210> 8

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza 2M2e DNA1 forward primer

<400>	8	
gaattcggcg gcgcgggctc gtctctctc actgaggtcg aaacacctac aagaagcg		58
<210>	9	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Influenza 2M2e DNA1 reverse primer	
<400>	9	
gatatcgggg tcgctggagt ctgaacaacg		30
<210>	10	
<211>	159	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Influenza 2M2e DNA2 forward primer	
<400>	10	
tctctctca ctgaggtcga aacctaca agaagcgagt gggaatgtcg ctgctctgat		60
tcctcagatc caggcggtgg tggttcttca ctctgaccg aggttgaaac cccaacacgt		120
tcagaatggg agtgcgttg ttcagactcc agcgacccc		159
<210>	11	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Influenza 2M2e DNA2 reverse primer	
<400>	11	
tctagagcgg ggtcgctgga gtctgaacaa cg		32