

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0048772 (43) 공개일자 2014년04월24일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/85</i> (2006.01) <i>C12N 15/33</i> (2006.01) <i>A61K 35/12</i> (2006.01) <i>A61K 39/12</i> (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(21) 출원번호 10-2012-0115098		(72) 발명자 전태훈 서울 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
(22) 출원일자 2012년10월16일		이석준 인천 계양구 굴현길 39-2, 중앙E클래스 502호 (굴현동)
심사청구일자 2012년10월16일		최창용 서울 성북구 안암로9가길 53-1, 204호 (안암동5가)
		(74) 대리인 김순웅

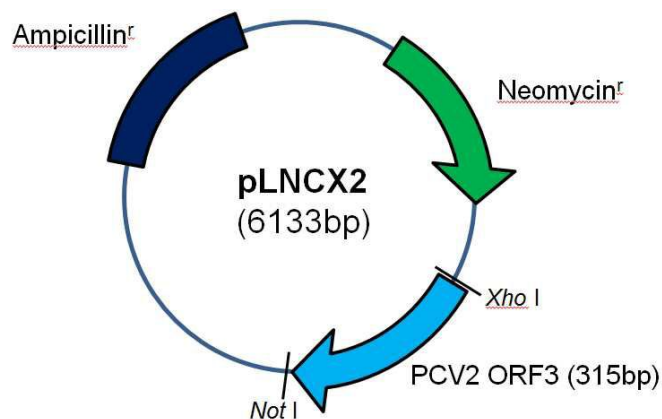
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **돼지 서코바이러스 제2형의 ORF3를 이용하는 면역보강제**

(57) 요약

본 발명은 돼지 서코바이러스2(PCV2) ORF3 유전자가 도입된 도 1의 개열지도를 가지는 재조합 발현벡터 및 이를 포함하는 면역보강제에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, PCV2 ORF3 단백질 과발현은 세포내에서 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-8의 과다 발현을 유발하여 더욱 강한 면역반응을 일으킬 수 있어 PCV2에 의한 PMWS를 포함하는 감염성 질환 또는 암의 치료 또는 예방에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	201204013056530010200
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	[주관] 돼지 이유후전신소모성증후군(PMWS) 발병 방지를 위한 면역 조절 기전 구명 및 이
를 이용한 질병저항성	활용 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 유전자가 도입된 도 1의 개열지도를 가지는 재조합 발현벡터.

청구항 2

제1항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 ORF3 유전자를 과발현하는 세포주.

청구항 3

돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 유전자가 도입된 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포주를 포함하는 백신용 또는 항암치료용 면역보강제.

청구항 4

돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 단백질을 포함하는 백신용 또는 항암치료용 면역보강제.

청구항 5

인간을 제외한 동물에서 제3항 또는 제4항 기재의 면역보강제를 투여하는 단계를 포함하는, 감염성 질환 또는 암의 치료 또는 예방 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 감염성 질환은 PCV2에 의한 감염성 질환인 것을 특징으로 하는 감염성 질환 또는 암의 치료 또는 예방 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 돼지 쉼코바이러스 제2형의 ORF3를 이용하는 면역보강제에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 돼지 쉼코바이러스 제2형(PCV2)의 ORF3(open reading frame 3) 단백질을 과발현하여 유비퀴틴-프로테오솜에 의한 단백질 분해과정을 통해 RGS16 분자의 발현 감소를 매개하며, 이에 따라 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 인터루킨-6(IL-6; interleukin-6)와 인터루킨-8(IL-8; interleukin-8)의 과다 발현을 유도할 수 있는 돼지 쉼코바이러스 제2형의 ORF3를 포함하는 새로운 면역 보강제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 돼지 쉼코바이러스 2형(PCV2)은 단일 가닥의 닫힌 원형의 게놈을 보유하는 작은 비-외피 바이러스이며 1768개의 염기서열을 갖는다(Rose et al., 2012). 돼지 쉼코바이러스는 돼지에게 질병을 일으키지 못하는 제 1형과 이 유후 전신 소모성 증후군(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)의 병인학적 요인이 되는 제 2형으로 나눌 수 있다(Tischer et al., 1995; Allan et al., 1999).

[0003] PMWS는 말초 림프관의 확장, 림프구의 감소, 점진적인 체중감소, 호흡기 장애(respiratory dysfunction), 설사 등의 증상을 가지며 다양한 원인에 의해 발병한다(Allan and Ellis, 2000; Segales et al., 2005).

[0004] PMWS 이외에, PCV2가 연관된 감염 질병으로는 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 가성 광견병(pseudorabies), 글래스씨병(Glasser's disease), 화농성 기관지폐렴(suppurative bronchopneumonia) 등이 있다.

[0005] PCV2 감염으로 인한 피해는 매우 심각하다. PCV2 감염으로 인한 피해로 인해 2010년 정부가 300억 원의 예산을 조성, 농가에 관납백신을 공급할 정도로 PCV2 백신의 중요성은 이미 다 알려진 사실이다. 그러나 PCV2 불활화 백신의 문제점은 아직 백신에 의해 항체 형성이 미약하고 백신접종 이후에도 여전히 돼지의 체내에 바이러스가

감염되어 있는 상태를 유지하여 면역 스트레스나 기타 다른 감염원에 의해 쉽게 증상을 발생시키고 있다는 점이다. 따라서, 양돈 산업계에 미치는 이러한 강력한 영향으로 인해, PCV2에 대한 효과적인 백신 및 백신에 의한 면역반응을 효율적으로 증진시킬 수 있는 면역보강제의 개발이 점차 중요해지고 있다.

- [0006] PCV2는 ORF1 단백질과 ORF2의 주된 두 가지의 단백질로 구성된다. ORF1은 바이러스의 복제를 담당하는 단백질을 암호화하고 ORF2는 약 30kDa의 분자량을 갖는 당단백질로서 바이러스의 유전체 핵산을 둘러싸는 캡시드를 암호화하고 있다(Mankertz et al., 1998; Nawagitgul et al., 2000). 비교적 새로운 단백질인 ORF3 단백질은 PCV2의 복제에는 연관이 없다고 알려져 있으나 생체 내, 외에서 PCV2의 병원성에 관련이 있다고 보고되어 있다(Liu et al., 2005 and 2006). 더욱이, 바이러스가 유도하는 세포자멸사(apoptosis)는 ORF3 단백질과 돼지 p53의 E3 유비퀴틴 연결효소와의 상호작용을 통해서 p53의 단백질 발현을 높임으로써 증개된다고 보고되어 있다(Liu et al., 2007).
- [0007] 박테리아 투 하이브리드 시스템(Bacterial two hybrid system)을 이용하여 찾아낸 ORF3와 상호작용하는 또 다른 단백질로는 G 단백질 신호조절 인자인 RGS16(Regulators of G protein signaling 16)이 있다(Timmusk et al., 2006). RGS 단백질은 large G 단백질의 활성화된 알파 소단위와 결합함으로써, 신호전달의 종결을 가속화하여 신호전달을 억제하는 역할을 한다고 알려져 있고(Willars, 2006), 따라서 RGS 단백질의 조절은 신경전달물질이나 호르몬, 키모카인(chemokine) 등 다양한 자극에 대한 세포의 반응에 영향을 미칠 수 있다(Jean-Baptiste et al., 2006).
- [0008] 한편, 인터루킨-6(IL-6; interleukin-6)는 면역반응에 의해 T 세포, B 세포, 대식세포(macrophage), 상피세포(epithelial cell) 등 다양한 세포로부터 분비되는 사이토카인(cytokine)이다. IL-6는 B 세포의 항체 생산, 림프구(lymphocyte)의 활성화 자극 등의 다양한 작용을 한다(Kishimoto, 1989). 인터루킨-8(interleukin-8)은 대식세포나 상피세포, 내피세포(endothelial cell) 등 다양한 세포에서 생성되는 키모카인(chemokine)이다. IL-8은 호중구(neutrophil)를 포함한 과립구(granulocyte), 대식세포, 비만세포(mast cell) 등의 표적세포들을 감염 장소로 이동시키고 활성화를 자극하는 작용을 한다(Baggiolini and Clark-Lewis, 1992).
- [0009] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 특허공보 10-1030792(201.04.27)에는 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF2 유전자의 표면발현용 벡터 및 이로 형질전환된 살모넬라 백신 균주에 대해 기재되어 있고, 국제공개 W02006/132598 A1(2006.12.14)에는 PCV2의 ORF3 및 이의 apoptosis의 작용을 확인하고, 적어도 부분적으로 비정상 ORF3 발현으로 인하여 약독화된 PVC2 바이러스 백신에 관해 기재되어 있다. 하지만 현재까지 PCV2 ORF3와 RGS16의 상호작용이 어떠한 효과가 있는지 정확히 확인된 사실이 없다.
- [0010] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 10-1030792(201.04.27)
(특허문헌 0002) 국제공개 W02006/132598 A1(2006.12.14)

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. J Comp Pathol. 1999 Jul;121(1):1-11.
- (비특허문헌 0002) Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. J Vet Diagn Invest. 2000 Jan;12(1):3-14.
- (비특허문헌 0003) Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory

cytokine. FEBS Lett. 1992 Jul 27;307(1):97-101.

(비특허문헌 0004) Jean-Baptiste G, Yang Z, Greenwood MT. Regulatory mechanisms involved in modulating RGS function. Cell Mol Life Sci. 2006 Sep;63(17):1969-85.

(비특허문헌 0005) Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood. 1989 Jul;74(1):1-10.

(비특허문헌 0006) Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. J Virol. 2005 Jul;79(13):8262-74.

(비특허문헌 0007) Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. J Virol. 2006 May;80(10):5065-73.

(비특허문헌 0008) Liu J, Zhu Y, Chen I, Lau J, He F, Lau A, Wang Z, Karuppannan AK, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. J Virol. 2007 Sep;81(17):9560-7.

(비특허문헌 0009) Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, Buhk HJ. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. J Gen Virol. 1998 Feb;79 (Pt 2):381-4.

(비특허문헌 0010) Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. J Gen Virol. 2000 Sep;81(Pt 9):2281-7.

(비특허문헌 0011) Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct;93(21):11400-6.

(비특허문헌 0012) Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 2012 Mar;164(1-2):78-89.

(비특허문헌 0013) Segales J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. Anim Health Res Rev. 2005 Dec;6(2):119-42.

(비특허문헌 0014) Timmusk S, Fossum C, Berg M. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. J Gen Virol. 2006 Nov;87(Pt 11):3215-23.

(비특허문헌 0015) Tischer I, Bode L, Peters D, Pociuli S, Germann B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. Arch Virol. 1995;140(4):737-43.

(비특허문헌 0016) Willars GB. Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling. Semin Cell Dev Biol. 2006 Jun;17(3):363-76.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위해, 연구한 결과 PCV2 ORF3의 유전자를 돼지 상피세포에 도입한 결과, PCV2 ORF3가 RGS16 분자의 발현 감소를 유발한다는 것을 밝혀냈다. 이러한 RGS16 분자의 발현 감소는 PCV2 ORF3가 RGS16 분자의 유비퀴틴-프로테오솜에 의한 단백질 분해과정을 촉진함으로써 유발된다. 또한 RGS16 분자의 발현 감소에 의해 상피세포에서 IL-6와 IL-8이 과다 발현하게 됨을 확인하였다. 따라서, PCV2 ORF3 단백질에 의한 돼지 RGS16 분자의 발현 감소 기작을 통한 염증성 사이토카인의 과다 발현을 이용하여 더욱 강한 면역반응을 일으킬 수 있는 새로운 면역 보강제를 제공할 수 있다.

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 돼지 서코바이러스 제2형의 ORF3를 포함하는 재조합 발현벡터 및 이를 포함하는 PCV2 ORF3 단백질에 의한 돼지 RGS16 분자의 발현 감소 기작을 통한 염증성 사이토카인의 과다 발현을 이용하여 더욱 강한 면역반응을 일으킬 수 있는 새로운 면역보강제를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 면역 보강제를 이용한 감염성 질환 및 암의 치료 또는 예방 방법을 제공하는 것이

다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 유전자가 도입된 도 1의 개열지도를 가지는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 ORF3 유전자를 과발현하는 세포주를 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 유전자가 도입된 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포주를 포함하는 백신용 또는 항암치료용 면역보강제를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 단백질을 포함하는 백신용 또는 항암치료용 면역보강제를 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간을 제외한 동물에서 상기 세포주 또는 ORF3 단백질을 포함하는 면역보강제를 투여하는 단계를 포함하는, 감염성 질환 또는 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명에 대해서 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명자들은 PCV2 ORF3 유전자를 세포에 과발현시킨 후, PCV2 ORF3 유전자를 과발현시키지 않은 세포와 비교하여 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-8의 발현을 측정한 결과, PCV2 ORF3 유전자를 세포에 과발현시킨 세포주에서는 IL-6와 IL-8의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 PCV2 ORF3에 의한 IL-6와 IL-8의 과발현은 PCV2 ORF3 단백질이 RGS16 분자의 유비퀴틴-프로테오솜에 의한 단백질 분해과정을 촉진함으로써 RGS16 분자의 발현 감소를 유도하기 때문임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0024] 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 유전자가 도입된 도 1a의 개열지도를 가지는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0025] 본 발명에 있어서, PCV2 ORF3 유전자의 전체 DNA 염기서열은 도 2(서열번호 1)에 나타나 있다. 본 발명에 있어, 상기 PCV2 ORF3 유전자 서열은 일반적으로 공지된 방법을 통해 벡터에 삽입할 수 있다. 통상적으로, 하나 이상의 제한효소로 DNA 서열 및 벡터를 절단하고, 단편들을 함께 결합하여 최종적으로 발현될 DNA 서열을 벡터에 결합시킨다. 본 발명에 있어, PCV2 ORF3 cDNA는 XhoI와 NotI site를 이용하여 PLNCX2 벡터에 삽입되었다(도 1a). 이렇게 제조된 재조합 벡터는 발현 효율을 높일 수 있는 이점이 있다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 ORF3 유전자를 과발현하는 재조합 세포주를 제공한다. 본 발명에 있어 상기 세포주는 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환방법에 의하여 제조 가능하다. 당분야의 기술적 범주에서 통상의 분자 생물학, 미생물학, 면역학 및 재조합 DNA 기술 등을 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 세포주는 본 발명에 의한 ORF3 유전자를 과발현시킬 수 있다면 특별한 제한이 있는 것은 아니나, 본 발명의 일 실시예에는 레트로바이러스로 packaging하는 세포주인 293GPG 세포(Ory et al., 1996)를 이용하였다. 상기 세포주를 이용하면 발현 효율을 높일 수 있는 이점이 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 유전자가 도입된 재조합 발현벡터를 포함하는 세포주 또는 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF3 단백질을 포함하는 백신용 또는 항암치료용 면역보강제를 제공한다.

[0029] 본 발명에 있어, 면역보강제는 백신들 또는 접종물들에 대한 특이적 면역 반응들을 증진시키는 약제이다. 면역보강제는, 백신 또는 접종물 내에 통합된 경우, 일반적으로 또는 특이적으로 그 제조 중의 면역원성 물질들에

대한 특이적 면역반응성을 가속, 연장 또는 그 품질을 증진시키는 작용을 하는, 임의의 물질 또는 제제로서 정의될 수 있다.

- [0030] 바람직한 형태로서, 본 발명의 면역보강제는 당업자에게 공지된 추가 성분을 포함할 수 있고, 하나 이상의 수의 학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. "수의학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 모든 용매, 분산매질, 코팅제, 보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장제, 흡수 지연제 등을 포함한다.
- [0031] 통상 면역보강제는 전형적으로, 약학적으로 허용가능한 희석제 중에 면역보강제-유효량으로 용해 또는 분산된 면역보강제 조성물로서 사용된다. 사용량은, 사용된 T-세포 자극 면역원성 폴리펩티드 부분 및 사용된 구축물에 따라, 상이한 숙주 동물들에서 광범위하게 변경될 수 있다. 전형적인 양은 숙주 체중 kg 당 ORF3 단백질 약 1마이크로그램(μg)($\mu\text{g}/\text{kg}$) 내지 숙주 체중 kg 당 약 1밀리그램(mg)(mg/kg)이다. 보다 일반적인 양은 약 $5\mu\text{g}/\text{숙주 체중 kg}$ 내지 약 $0.5\text{mg}/\text{숙주 체중 kg}$ 이다. 상기 희석제는 전형적으로 수계이며, 하나 이상의 추가의 면역보강제들, 버퍼들, 염들 및 점도 개선제들을 포함할 수 있다. 희석제의 성분들은 백신 또는 접종물에 종종 존재하는 물질들이다.
- [0032] 본 발명의 상기 면역보강제는 경구 혹은 비경구적으로 투여할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 면역보강제의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 대상 동물의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 당업자는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 의한 PCV2 ORF3의 유효량은 PCV2 ORF3가 면역반응을 유도하거나 유도할 수 있는 항원의 양을 의미하지만, 이에 국한되는 것은 아니며, 유효량은 적어도 10주, 바람직하게는 적어도 12주, 더욱 바람직하게는 적어도 20주의 면역 지속시간(DOI)을 부여하는 항원의 양으로 정의되는 것이 바람직하다.
- [0035] 일반적으로, 상기 면역보강제에 포함되는 세포주는 필요에 따라 적절한 농도로 동물에게 접종될 수 있다. 예를 들어, OD 600에서 OD값을 측정한 후 대상 동물에 약 $0.5 \sim 1.5 \times 10^{10}$ CFU/ml의 값으로 접종할 수 있다. 그러나, 투여량은 이에 한정되지 않고, 제형의 종류, 투여 방법, 연령이나 체중, 증상 등을 고려하여 최종적으로 수의사의 판단에 의해 적절히 결정할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 의한 상기 세포주 또는 ORF3 단백질은 RGS16 단백질의 발현을 감소시키고 면역보강제가 투여된 동물의 IL-6 및 IL-8의 발현을 증가시켜 강력한 면역반응을 유도할 수 있는 이점이 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간을 제외한 동물에서 상기 세포주 또는 ORF3 단백질을 포함하는 면역보강제를 투여하는 단계를 포함하는, 감염성 질환 또는 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 동물은 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 돼지, 또는 새끼돼지를 포함한다.
- [0039] 본 발명에 의한 상기 세포주 또는 ORF3 단백질을 동물에 투여하게 되면, RGS16 단백질의 발현을 감소시키고 투여된 동물의 IL-6 및 IL-8의 발현을 증가시켜 강력한 면역반응을 유도할 수 있다. 따라서, PMWS를 일으키는 PCV2 감염에 의한 질환을 포함한 감염성 질환 또는 암을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0040] 감염성 질환의 예방에 있어서 가장 중요한 것은 보다 효율적인 백신의 개발이다. 백신의 경우 새로운 면역 보강제의 개발이 시급한데, 그러한 이유는 동일한 efficacy의 백신이라도 어떤 면역보강제를 사용하는냐에 따라 동일한 항원에 반응하는 면역반응을 보다 효율적으로 증진시킬 수 있기 때문이다. 본 발명은 면역반응의 시작이 되는 주요항원제시세포(antigen presenting cell)인 대식세포나 수지상세포에 PCV2 ORF3 단백질이나 유전자를 도입하여 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 인터루킨-6(IL-6; interleukin-6)와 인터루킨-8(IL-8; interleukin-8)의 발현을 증가시키는 것을 원리로 하기 때문에, 동일한 항원에 반응하는 면역반응을 보다 효율적으로 증진시킬 수 있다.
- [0041] 항암 치료 중에 면역세포의 활성을 증진시켜 항암 치료하는 방법이 있으며, 이 때 면역반응의 시작이 되는 주요항원제시세포(antigen presenting cell)인 대식세포나 수지상세포에 암세포에서 발현하는 항원을 제시해 주어, 이 항원을 발현하는 암세포를 죽이는 방법이 있다. 이 때 대식세포나 수지상세포에 PCV2 ORF3 단백질이나 유전자를 도입하여 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 인터루킨-6(IL-6; interleukin-6)와 인터루킨-8(IL-8; interleukin-8)의 발현을 증가시키는 것을 원리로 하기 때문에, 암에서 발현하는 항원에 반응하는 대식세포나 수지상세포의 활성을 보다 효율적으로 증진시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0042] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 PCV2 ORF3 단백질은 RGS16 분자의 유비퀴틴-프로테오솜에 의한 단백질 분해 과정을 촉진함으로써 RGS16 분자의 발현 감소를 유도하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 상기 PCV2 ORF3 단백질은 세포내에서 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-8의 과다 발현을 유발한다.
- [0043] 따라서, 본 발명에 따른 PCV2 ORF3 단백질은 보다 강한 면역반응을 일으킬 수 있는 새로운 면역 보강제를 제공하여, PCV2에 의한 질환인 PMWS용 백신이나 항암치료 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1a는 본 발명에 의한 ORF3 단백질을 과발현하는 세포 구축을 위한 PCV2 ORF3 / PLNCX2 모식도를 나타낸다.
- 도 1b는 본 발명에 의한 PCV2 ORF3 분자가 도입된 PK15 세포에서 ORF3 유전자의 과발현을 확인한 결과를 나타낸다. NC., 음성대조군(negative control)을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에 의한 PCV2 ORF3 분자의 전체 DNA 서열을 나타낸다.
- 도 3a는 본 발명에 의한 PCV2 ORF3 분자가 도입된 PK15 세포에서 돼지 RGS16 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3b는 본 발명에 의한 PCV2 ORF3 분자가 도입된 PK15 세포에서 단백질 생합성 억제제(CHX, cycloheximide)를 처리하였을 때, 돼지 RGS16 단백질의 양 변화를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3c는 본 발명에 의한 PCV2 ORF3 분자가 도입된 PK15 세포에서 프로테오솜 억제제(MG132)를 처리하였을 때, 돼지 RGS16 단백질의 유비퀴틴화(ubiquitination) 수준의 증가를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명에 의한 돼지 RGS16 단백질의 상위 리간드인 PAF(platelet activating factor)를 처리하였을 때, 염증성 사이토카인인 IL-6, 및 IL-8의 유전자 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046] 실시예 1: PCV2 ORF3 과발현 돼지 신장상피세포 (PK15) 구축

- [0047] PCV2의 ORF3를 클로닝하기 위해, 돼지 비장조직에서 genomic DNA를 추출하고, 연쇄중합반응에 의해 전체 ORF 부위 DNA 서열을 동정하였다. 그 후 전체 ORF 부위 DNA를 제한효소인 XhoI 과 NotI site를 이용하여 T easy vector에 삽입하였다. 그 후 ORF3 부위에 특이적인 프라이머를 사용하여 ORF3의 cDNA를 연쇄중합반응에 의해 클로닝하였고, XhoI과 NotI site를 이용하여, retroviral vector(PLNCX2)에 삽입하였다(도 1a). 이때 사용한 프라이머는 아래와 같다(표 1).

표 1

[표 1] PCV2 ORF3 과발현 vector에 사용되어진 프라이머 세트

Gene name	GenBank Accession No.	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
PCV2 full	EU450591.1	Forward	CCCTCGAGACTCAGTAAT	1788
		Reverse	ATTTCGCGCCGCACTCAGTAA	
PCV2 ORF3	EU450591.1	Forward	CCCTCGAGGACAGCAGTTGAGGAGTACCATTC	335
		Reverse	ATTTCGCGCCGCGGTAATGAGGAAGGACGAACACC	

- [0048]

[0049] 그 후 PCV2 ORF3 cDNA가 삽입된 PLNCX2 벡터를 사용하여 Tetracycline off system의 293GPG 세포를 이용하여 돼지 신장상피세포(PK15)에 PCV2 ORF3 cDNA를 과발현시켰다. 우선 293GPG 세포를 6 well 조직 배양 플레이트에 well 당 5×10^5 세포가 되도록 접종하고 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 24시간 후 well 표면의 70-80% 정도를 덮을 정도로 자라면, 혈청이 없는 DMEM 배지에서 $1 \mu\text{g}$ 의 ORF3 유전자 발현 벡터 DNA를 $6 \mu\text{g}$ 의 Lipofectamine plus (Invitrogen)를 사용하여, 도입된 발현 벡터를 레트로바이러스로 packaging 하는 세포주인 293GPG 세포에 도입시켜 24시간 배양하였다. 293GPG 세포로부터 생성된 ORF3 단백질을 유전자를 함유하는 바이러스가 포함된 배양 상층액을 이용하여 숙주세포를 4-5시간 배양 후 혈청이 10% 함유된 배지로 바뀌어 4시간 배양하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 이 때 사용된 숙주세포는 PK15 세포주이며, ORF3 형질 도입된 세포를 얻기 위해 G418 항생제 1.5 mg/ml 를 처리하여 ORF3 유전자가 발현되는 세포를 얻었다.

[0050] PCV2 ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주는 10% 송아지 혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하고 있는 DMEM 배지에서 세포 배양하였다. 그 후, 이 세포주에서 RT-PCR로 ORF3 cDNA 유전자의 과발현을 확인하였다. 우선 RT-PCR을 수행하기 위해, ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1ml 당 $200 \mu\text{l}$ 의 chloroform (sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이때 추출한 $5 \mu\text{g}$ 의 mRNA를 주형으로 Superscript III (Invitrogen) 역전사 효소를 이용하여 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 합성한 후, ORF3 단백질과 GAPDH 프라이머를 이용하여 연쇄중합반응을 실시하였다. 이때 사용한 중합 효소는 Taq polymerase (Gene craft)이며 사용한 프라이머는 아래와 같다.

표 2

[표 2] PK15 세포주에서 PCV2 ORF3 과발현 확인시 사용되어진 프라이머 세트

Gene name	GenBank Accession No.	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
PCV2 ORF3 RT	EU450591.1	Forward	TCGATCTCAAGGACAACGGAGT	174
		Reverse	TTGGTCTTCCAATCACGCTTCTGC	
GAPDH	NM_001206359.1	Forward	ATGACCACAGTCCATGCCATC	271
		Reverse	CCTGCTTACCACCTTCTTG	

[0051]

[0052] 이때 PCR 조건은 denaturation 95도에서 30초, annealing 60도에서 30초, extension 72도에서 30초의 온도, 시간 조건으로 35 사이클로 진행하였다.

[0053] 또한, 이때 사용된 음성대조군(N.C., negative control)은 ORF3 유전자가 삽입되지 않은 G418 항생제 저항성 유전자를 발현시키는 벡터를 발현시킨 PK15 세포주의 mRNA가 사용되었다. RT-PCR 결과 183 bp의 돼지 서코바바이러스 2형 ORF3 단백질 유전자의 mRNA transcript 산물이 ORF3를 도입한 세포에서만 발견됐다(도 1b 참조). 내적대조군(Internal control)인 GAPDH 산물(271 bp)은 음성대조군(N.C.)과 ORF3를 도입한 세포 모두에서 발견되었다(도 1b 참조).

[0054] 실시예 2: PCV2 ORF3 과발현 돼지 신장상피세포 (PK15)에서 RGS16의 발현 감소 측정 및 기전 분석

[0055] PCV2 ORF3 단백질이 상호작용한다고 알려진 돼지 RGS16의 발현 정도를 측정하기 위하여, 웨스턴블로팅(Western blotting)을 통해 돼지 RGS16의 단백질 양을 측정하였다. 먼저 ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포를 프로테아제 억제제 콕테일(proteinase inhibitor cocktail)이 포함된 RIPA 용해 버퍼 (RIPA lysis buffer, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)로 용해 (lysis) 시킨 후, 12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에 전기 영동시켜 Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에 트랜스퍼(transfer)하였다. 그 후, 돼지 RGS16 분자에 특이적으로 결합하는 항 RGS16 항체(Santacruz)를 멤브레인(membrane)에 처리한 후 ECL system (GE healthcare, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 발색시켜 RGS16 단백질의 발현 정도를 측정하였다.

[0056] 그 결과, RGS16 분자는 LPS (Lipopolysaccharide) 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 Poly I:C (Polyinosinic:polychtidylic acid) 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 같은 면역 자극제(immunostimulant)의 48시간 처리에 관계없이 RGS16의 발현 정도가 ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주에서 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 3a 참조).

[0057] ORF3에 의한 RGS16 분자의 발현 감소가 유비퀴틴화 (Ubiquitination)에 의해 매개되는 프로테아좀 (Proteasome) 단백질 분해 기작에 의한 것인지 알아보기 위해, 먼저 단백질 합성을 억제하는 억제제인 사이클로헥사마이드 (Cycloheximide) 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 시간별로 처리한 후 위와 같은 방법으로 RGS16 분자의 밴드를 관찰하여 안정성을 확인하였고, co-immunoprecipitation을 통해 RGS16의 유비퀴틴화 정도를 측정하였다. ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주의 co-immunoprecipitation 실험을 위해 프로테아좀을 억제할 수 있는 MG132 (10 μM)를 4시간 처리하고 프로테아제 억제제 콕테일(proteinase inhibitor cocktail)이 포함된 NP-40 용해 버퍼 (NP-40 lysis buffer, 50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40)로 용해(lysis) 시킨 후, 항 RGS16 항체를 이용하여 면역 침전시켰다. 위와 같은 방법으로 멤브레인(membrane)에 트랜스퍼(transfer) 시킨 후, 항 유비퀴틴 항체를 이용하여 RGS16 단백질의 유비퀴틴화 정도를 측정하였다.

[0058] 그 결과, ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주에서 RGS16 분자의 발현 정도가 훨씬 빨리 감소함을 확인할 수 있었고(도 3b), ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주에 MG132를 처리하였을 경우 유비퀴틴화 정도가 증가하는 것을 확인하였다 (도 3c 참조). 이때 사용된 멤브레인(membrane)은 항 RGS16 항체를 처리하여 위와 같은 방법으로 RGS16 분자의 밴드를 확인하여 면역침전 반응 여부를 확인하였다. ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주에 MG132 처리하였을 경우, RGS16 분자의 발현이 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 내적 대조군(Internal control)은 항 β -actin 항체에 의한 β -actin의 발현량으로, 항 RGS16 항체를 이용하여 면역침전하기 전의 모든 샘플에서 동일한 β -actin이 검출되어 동일한 양의 단백질을 가지고 면역침전 반응을 수행한 것임을 확인하였다.

[0059] 실시예 3: PCV2 ORF3 과발현 돼지 신장상피세포 (PK15)에서 IL-6와 IL-8의 발현 증가 측정

[0060] 돼지 RGS16 분자의 발현 정도의 감소가 세포의 면역작용에 있어 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 염증반응에 중요한 역할을 하고 있는 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-8의 mRNA 발현 정도를 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time PCR)을 이용하여 알아보았다.

[0061] RGS16 분자가 조절할 수 있는 신호를 전달하여 역할을 더욱 확실하게 드러내기 위해 large G 단백질 수용체인 혈소판활성화인자수용체(Platelet activating factor receptor, PAFR)를 자극할 수 있는 혈소판활성화인자(PAF) 100nM을 ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주에 6시간 처리하였다. 이 후, 상기 실시예 1에 나타난 것과 같이 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml 당 200 μl 의 클로로포름 (sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이때 추출한 1 μg 의 mRNA를 주형으로 Superscript III (Invitrogen) 역전사 효소를 이용하여 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 합성하였다. 이 후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 데이터베이스에서 얻은 염기서열에 따라 프라이머를 제작한 후, 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(Quantitative real-time PCR)을 이용하여 각각의 유전자를 얻었다.

표 3

[표 3] 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time PCR)의 프라이머 세트

Gene name	GenBank Accession No.	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
IL-6	NM_214399.1	Forward	AAGCCACCACCCCTAACC	68
		Reverse	TCCACTCGTTCTGTGACTGC	
IL-8	NM_213867.1	Forward	TTCTTCTTTATCCCCAACTGG	53
		Reverse	CCACATGTCCTCAAGGTAGGA	
GAPDH*	NM_001206359.1	Forward	ACAGACAGCCGTGTGTTC	60
		Reverse	ACCTTCACCATCGTGTCTCA	

[0062]

[0063] *housekeeping gene

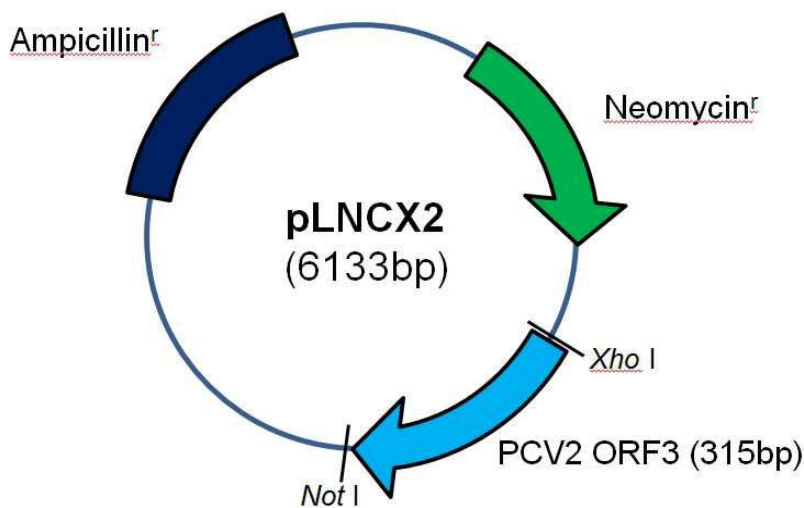
[0064] GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

[0065] 연쇄증합반응에서는 TaqMan probe (Roche)와 LC480 probe master mix (Roche)를 사용하였다. 상기 사이토카인 발현 전사 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 것과 같이, ORF3 단백질이 과발현된 PK15 세포주에서 IL-6 및 IL-8의 전사량이 증가하는 것을 관찰할 수 있으며, PAF를 처리 시에는 차이가 더욱 극명하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 상기 GAPDH는 세포내에서 발현량이 세포의 조건에 따라 잘 변하지 않는 유전자로써, 본 발명의 PK15 세포주의 사이토카인 발현량 조사에서 세포내 기준으로 사용하였다.

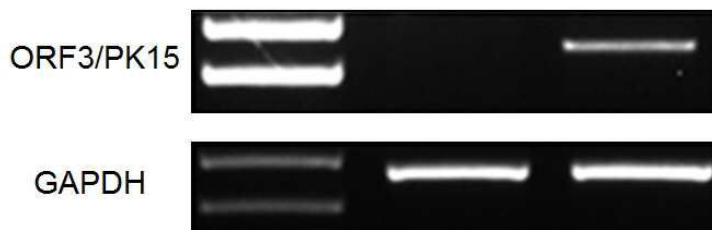
[0066] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1a



도면1b



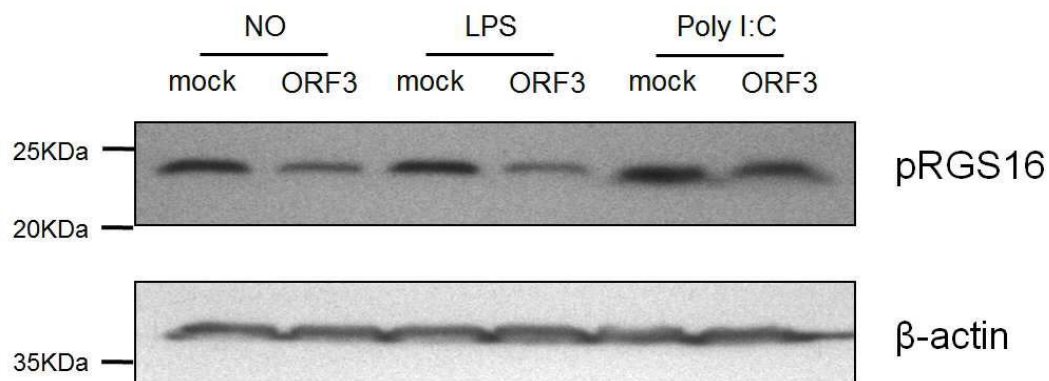
도면2

SEQUENCE

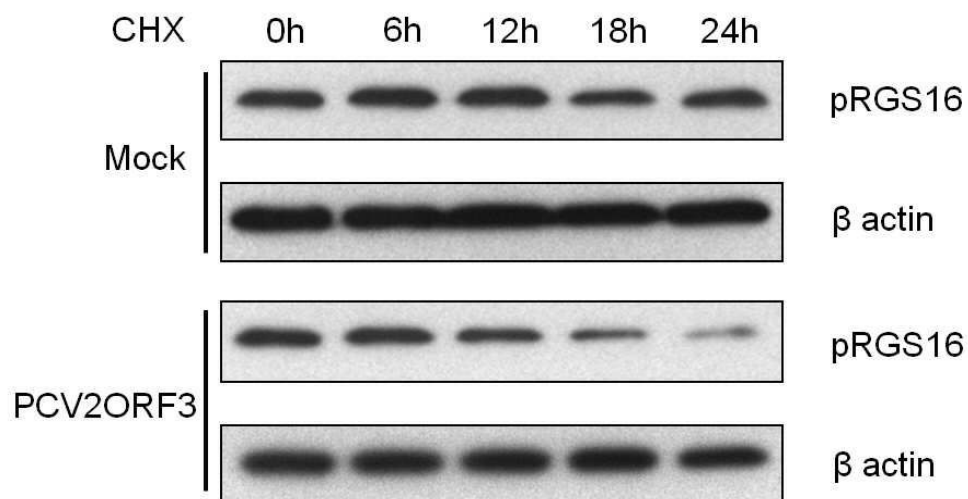
```

1 atggtaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtggttt ccgggtctgc
61 aaaattagca gcccatattgc ttttaccaca cccagggtgc cccacaatga cgtgtacatt
121 ggtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg
181 gaaatttctg acaaacgtta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtcttc
241 caacaaggta ctcacagcag tagacaggtc actccgttgt ccttgagatc gaggagctcc
301 acattcaata agtaa
    
```

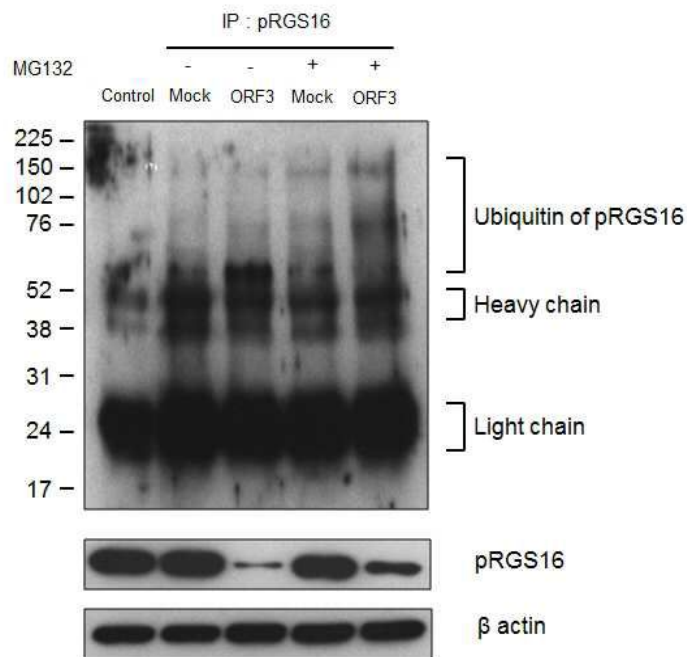
도면3a



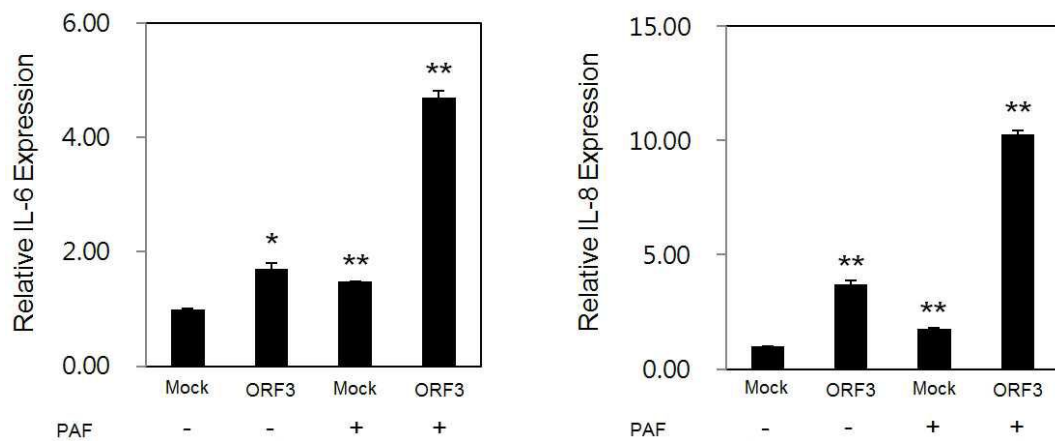
도면3b



도면3c



도면4



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Immunologic adjuvant using ORF3 encoded by PCV2
- <130> P11-121004-01
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 315
- <212> DNA
- <213> PCV2

<400> 1

atggtaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtggttt ccgggtctgc	60
aaaattagca gcccatattgc ttttaccaca ccaggtggc ccacaatga cgtgtacatt	120
ggtcttccaa tcacgtttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg	180
gaaatttctg acaaacgtta caggtgtctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtctc	240
caacaaggta ctcacagcag tagacaggtc actccgttgt ccttgagatc gaggagctcc	300
acattcaata agtaa	315