



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0136764

(43) 공개일자 2015년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/10 (2006.01) A61K 39/29 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/576 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0064166

(22) 출원일자 2014년05월28일

심사청구일자 2014년05월28일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박중화

서울특별시 송파구 성내천로6길 9-12, 302호 (오금동)

정인식

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

김원용

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

(74) 대리인

안소영

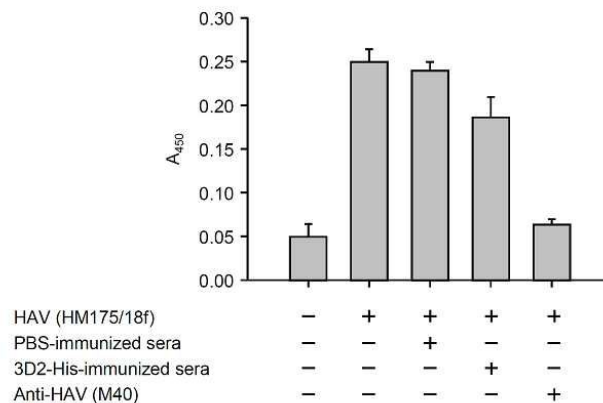
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 A형 간염 바이러스 백신 소재 단백질 3D2 및 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 A형 간염 바이러스 항원 단백질 및 이를 포함하는 A형 간염 바이러스 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 A형 간염 바이러스 항원 단백질 및 백신 조성물은, A형 간염 바이러스에 대한 우수한 항체 유도반응을 나타내며, A형 간염 바이러스를 중화하는 효과가 있으므로, 기존 사균 백신의 안정성 및 생산성을 개선한 새로운 형태의 A형 간염 바이러스 예방, 치료 및 진단용으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009526

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농생명바이오식의약소재개발사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 곤충세포 발현시스템을 이용한 차세대 인플루엔자 백신소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열을 포함하는, A형 간염 바이러스 항원 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 3회 내지 9회 반복된, A형 간염 바이러스 항원 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서 상기 3회 반복된 폴리펩티드는 서열번호 2로 표시된 폴리펩티드인, A형 간염 바이러스 항원 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 반복서열은 링커서열(linker sequence)로 연결되어 있는 것인, A형 간염 바이러스 항원 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 링커서열은 GGGGS 서열인, A형 간염 바이러스 항원 단백질.

청구항 6

서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열로 구성된 A형 간염 바이러스 항원 단백질을 포함하는, A형 간염 바이러스 백신 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 3회 내지 9회 반복된, A형 간염 바이러스 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서 상기 3회 반복된 폴리펩티드는 서열번호 2로 표시되는 것인, A형 간염 바이러스 백신 조성물.

청구항 9

서열번호 2로 표시되는 A형 간염 바이러스 항원 단백질의 발현을 위한 벡터.

청구항 10

제1항의 A형 간염 바이러스 항원 단백질을 포함하는, A형 간염 바이러스 감염 진단 키트.

청구항 11

서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 획득하는 단계;

수득한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 구축하는 단계;

상기 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하는 단계;

숙주세포를 배양하여 발현된 단백질을 회수 및 정제하는 단계;를 포함하는 제조함 A형 간염 바이러스 항원 단백질의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 A형 간염 바이러스 항원 단백질 및 이를 포함하는 A형 간염 바이러스 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] A형 간염은 우리나라 성인 급성 바이러스 간염의 70% 이상을 차지하는 가장 중요한 원인이다. A형 간염 (hepatitis A) 바이러스는 Picornaviridae과에 속하는 27 nm 크기의 RNA 바이러스로서, 평균 28일의 잠복기 후 고열, 권태감, 식욕부진, 오심, 복통, 암노, 황달 등의 임상증상 특징으로 하는 급성 간질환을 유발한다 (Totsuka and Moritsugu, 1999). 최근 10년간의 조사에 따르면 미 서부지역, 중동 지역, 일부 아시아 지역에서 A형 간염이 늘고 있어 세계적인 A형 간염의 확산이 우려되고 있다. 우리나라에서도 최근 면역력이 없는 10, 20 대의 젊은 층에서 A형 간염이 급속히 늘기 시작하고 있으며 (Nwachuku and Gerba, 2006) 특히 학습기 청소년이나 수험생의 경우 A형 간염 바이러스 감염 시 입원과 치료로 인한 개인적, 경제적 피해가 유발된다. 미국의 경우 A형 간염 환자 1명당 소요되는 직·간접비용은 성인에서는 \$2,500, 18세 이하에서는 \$1,500 정도의 비용이 소요되고 A형 간염으로 인한 의료비는 연간 약 3억불 이상인 것으로 알려져 있다 (WHO, 1999). A형 간염의 주된 전파경로는 분변-경구 통로이며, 오염된 음식물이나 식수에 의하여 전염된다. 최근에 A형 간염의 발생이 세계적으로 증가하고 있는 추세이므로 ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices)는 A형 간염 풍토성이 있는 지역에 여행하는 사람, 혈액 응고 질환이 있는 사람, 동성연애자, 만성 간 질환을 갖고 있는 사람, A형 간염의 빈도가 높은 지역에 거주하는 소아 군에서 예방 접종을 권고하고 있다 (Gust, 1992). 특히 인구 10만 명당 10명 이상 발생 시 광범위 백신 접종이 필요하며 특히 만성 B형 간염 보균자, 노인, 만성신부전으로 혈액 투석을 받는 환자 등과 집단생활을 하는 청소년에서는 A형 간염 백신 접종이 필수적으로 요구된다 (Schlindwein et al., 2010).

[0003] 1992년에 스미스클라인비첨에서 개발된 Havrix®는 세계 최초의 A형 간염 백신소재로 HM-175 주를 사람 이배체 세포인 MRC5 세포에서 배양·정제하여 불활화하고, 수산화알루미늄에 흡착시켜 제조한 불활화 백신 소재이다. 그러나 불활화 백신 소재의 특성상 제조에 많은 단가가 요구되어 선진국의 여러 생명공학회사는 A형 간염 바이러스 감염에 대한 새로운 형태의 백신 소재 개발에 대한 연구에 많은 관심을 표방하고 있다. 최근 항원 유전자를 사용하는 재조합 백신 소재는 사균백신 소재보다 안전성과 생산 단가의 이점이 있어 차세대 백신 소재로서 자리 잡고 있다 (Melnick, 1989).

[0004] A형 간염 바이러스의 캡시드 단백질인 VP1 단백질은 A형 간염 바이러스의 증식을 억제하는 항체의 생성을 유도하는 면역우세성 에피토프 (immunodominant epitope)를 지니는 외피단백질로 A형 간염 백신 소재로 사용될 수 있다는 연구가 보고된 바 있다. 하지만 VP1 단백질에 존재하는 모든 에피토프가 A형 간염바이러스의 증식을 억제하는 항체를 생성하는 것은 아니며 A형 간염 바이러스의 증식을 억제하는 항체의 생성을 유도하는 제한된 수의 면역우세성 에피토프를 가지는 재조합 단백질은 재조합 단위 백신 소재 개발을 위한 더욱 유용한 백신 소재로 여겨지지만 아직까지 면역우세성 에피토프만을 이용한 백신 소재 개발에 대한 연구는 많이 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1012830호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 새로운 A형 간염 바이러스 백신 소재를 개발하기 위하여 연구하던 중, A형 간염 바이러스 VP1 외피단백질의 C-말단 부위 및 2A 단백질의 N-말단 부위로 구성된 D2 단백질을 3회 이상 반복시켜 미생물 발현 시스템을 통해 생산된 재조합 단백질이, A형 간염 바이러스에 대한 우수한 중화능력을 갖는 것을 확인하고 새로운 백신 소재로 사용될 수 있는 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은, 새로운 A형 간염 바이러스 백신 소재로 사용될 수 있는 A형 간염 바이러스 항원 단백질 및 이를 포함하는 백신 조성물, A형 간염 바이러스 항원 단백질의 발현을 위한 벡터, A형 간염 바이러스 감

염 진단 키트, A형 간염 바이러스 항원 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열을 포함하는, A형 간염 바이러스 항원 단백질을 제공한다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기 폴리펩티드가 3회 내지 9회 반복된, A형 간염 바이러스 항원 단백질을 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은 상기 3회 반복된 폴리펩티드가 서열번호 2로 표시된 폴리펩티드인, A형 간염 바이러스 항원 단백질을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 반복서열이 링커서열 (linker sequence)로 연결되어 있는 것인, A형 간염 바이러스 항원 단백질을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 링커서열이 GGGGS 서열인, A형 간염 바이러스 항원 단백질을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열로 구성된 A형 간염 바이러스 항원 단백질을 포함하는, A형 간염 바이러스 백신 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 폴리펩티드가 3회 내지 9회 반복된, A형 간염 바이러스 백신 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 상기 폴리펩티드가 서열번호 2로 표시되는 것인, A형 간염 바이러스 백신 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 A형 간염 바이러스 항원 단백질의 발현을 위한 벡터를 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 A형 간염 바이러스 항원 단백질을 포함하는, A형 간염 바이러스 감염 진단 키트를 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 수득하는 단계; 수득한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 구축하는 단계; 상기 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하는 단계; 숙주 세포를 배양하여 발현된 단백질을 회수 및 정제하는 단계;를 포함하는 제조합 A형 간염 바이러스 항원 단백질의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 A형 간염 바이러스 항원 단백질 및 백신 조성물은, A형 간염 바이러스에 대한 우수한 항체 유도 반응을 나타내며, A형 간염 바이러스를 중화하는 효과가 있으므로, 기존 사균 백신의 안정성 및 생산성을 개선한 새로운 형태의 A형 간염 바이러스 예방, 치료 및 진단 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 제조합 3D2-His 단백질 생산용 미생물 발현벡터 pET-21a/3D2-His의 모식도이다.
- 도 2는 제조합 미생물 세포에서 3D2-His 단백질의 발현을 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색법 (A) 및 anti-His 항체를 이용한 웨스턴블랏 분석 (B)으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 제조합 3D2-His 단백질 서열을 나타낸 도이다
- 도 4는 복강 주사된 쥐의 혈청에서 3D2-His 단백질에 대한 항체가 생산되었음을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 3D2-His 단백질이 복강 주사된 실험동물 쥐의 혈청에 의한, A형 간염 바이러스 증식 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열을 포함하는, A형 간염 바이러스 항원 단백질을 제공한다.
- [0022] 본 발명에 따른 A형 간염 바이러스 항원 단백질은, A형 간염 바이러스에 대한 우수한 항체 유도반응을 나타낸다.
- [0023] 상기 "A형 간염 바이러스"는 A형 간염을 일으키는 단일가닥 RNA 바이러스로, 피코르나비리데 (Picornaviridae) 과에 속하는 바이러스이다. 약 7.5 kbp 크기의 단일가닥 RNA를 가지고 있으며, 이의 전체 유전자 서열은 NCBI

GenBank: M14707.1 에 밝혀져 있다. 상기 A형 간염 바이러스는 I 내지 VII, 총 7가지 유전자형을 가진 바이러스를 모두 제한 없이 포함할 수 있으며, IA와 같은 상기 유전자형의 아형 역시 제한 없이 포함할 수 있다.

[0024] 상기 "항원 단백질"은 유전자 및 DNA 서열 분석 등에 근거하여 질병 방어에 관여하는 항원을 동정하고 병원체로부터 직접 정제되어 얻어지는 단백질과 항원 유전자를 발현시켜 생산한 재조합 단백질을 모두 포함하며, 항원으로 작용하여 적절한 특이적 항체 반응을 유도할 수 있는 단백질을 말한다.

[0025] 상기 "서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드"는 A형 간염 바이러스의 공지된 서열 중 캡시드 단백질 VP1의 C-말단의 25개 아미노산 및 2A 단백질의 N-말단 51개 아미노산에 상응하는 서열이며, 이에 대하여 적어도 80% 이상, 바람직하게는 90%이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 가지면서 항원성이나 면역원성과 같은 생물학적 특성이 실질적으로 동일한 폴리펩티드 역시 본 발명의 폴리펩티드에 포함될 수 있다.

[0026] 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 3회 내지 그 이상의 반복되어 반복서열 형태로 존재할 수 있으며, 이들은 서로에게 직접 연결되거나, 링커서열 (linker sequence)에 의하여 연결되어 반복적인 반복서열을 이룰 수 있다. 이와 같은 반복서열 내 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 바람직하게는 3회 이상 반복될 수 있으며, 더 바람직하게는 3회 내지 9회, 더욱 바람직하게는 3회, 6회 또는 9회 반복될 수 있다. 즉, 항체 반응을 유도할 수 있는 항원 단백질 부위인 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 최소 3회 이상 항원 단백질 내에 반복하여 존재할 수 있다. 상기 반복 횟수가 증가할수록 항체 유도능은 증가될 수 있으나, 폴리펩티드 크기가 과도하게 증가할 경우 본 발명이 목적하는 A형 간염 바이러스 백신 소재 단백질의 생산이 어려울 수 있다.

[0027] 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 3회 반복될 수 있으며, 이의 서열은 서열번호 2로 표시된 서열, 또는 이에 대하여 적어도 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 가지면서 항원성이나 면역원성과 같은 생물학적 특성이 실질적으로 동일한 폴리펩티드 서열일 수 있다.

[0028] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복되는 경우 A형 간염 바이러스의 전장 VP1과 유사한 크기의 항원 단백질을 제공할 수 있으며, 더욱 우수한 항체 유도 및 중화반응 효과를 나타낼 수 있다.

[0029] 본 발명의 반복서열은 "링커서열"에 의하여 연결될 수 있으며, 링커서열은 재조합 항원 단백질을 생산하기 위하여 항원 단백질 발현을 위한 유전자를 상호 연결해주는 역할을 할 수 있는 아미노산 서열을 의미한다. 링커서열은 목표하는 재조합 항원 단백질을 생산할 수 있도록 하는 아미노산 서열을 제한 없이 사용할 수 있고, 바람직하게는 GGGGS 로 이루어진 링커서열을 사용할 수 있다. 상기 GGGGS 링커서열은 반복되는 서열을 가진 재조합 단백질에서 이의 선형 구조에 영향을 미치지 않으므로 목표하는 재조합 항원 단백질이 생산될 수 있도록 할 수 있다.

[0030] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열로 구성된 A형 간염 바이러스 항원 단백질을 포함하는, A형 간염 바이러스 백신 조성물에 관한 것이다.

[0031] 상기 반복서열은 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상으로 반복되는 서열 형태일 수 있으며, 이들은 서로에게 직접 연결되거나, 링커서열 (linker sequence)에 의하여 연결되어 반복적인 반복서열을 이룰 수 있다. 이와 같은 반복서열은 바람직하게는 3회 내지 그 이상으로 반복될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 3회 내지 9회, 더더욱 바람직하게는 3회, 6회 또는 9회 반복될 수 있다. 즉, 항체 반응을 유도할 수 있는 항원 단백질 부위인 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 최소 3회 이상 항원 단백질 내에 반복하여 존재할 수 있다.

[0032] 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드는 예컨대 3회 반복되어 존재할 수 있으며, 이의 서열은 서열번호 2로 표시된 서열, 또는 이에 대하여 적어도 80% 이상, 바람직하게는 90%이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 가지면서 항원성이나 면역원성과 같은 생물학적 특성이 실질적으로 동일한 폴리펩티드 서열일 수 있다.

[0033] 상기 "백신 조성물"은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열에 적어도 한 가지 이상의 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 어쥘번트를 함유하여 이루어지는, 포유류에서 A형 간염 바이러스 감염을 예방 또는 치료하기 위한 백신 조성물이다.

[0034] 본 발명의 백신 조성물은 단독으로 또는 임의로 약학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대 방출속도 조절제를 함유하는 치료나 예방을 위한 다른 조성물의 일부로서 사용될 수 있다. 상기 담체는 A형 간염 바이러스의 치료 및/또는 예방을 위한 투여에 적합한 약학적으로 허용되는 벡터 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 적절한 약학적으로 허용 가능한 벡터라 함은 생물학적으로 불활성이고/또는 무독성인 것을 의미한다. 기술분야에 알려진 다양한 벡터를 이러한 목적에 따라 선택할 수 있다.

[0035] 또한, 필요하다면, 본 발명의 백신조성물은 A형 간염 바이러스를 예방 또는 치료하기 위한 다른 치료약물/예방

약물을 추가로 함유할 수도 있다. 예컨대, 상기 조성물은 A형 간염 바이러스 감염의 치료 또는 예방에 유용한 여러가지 약제의 "각테일 혼합물"을 포함할 수 있다. 이러한 각테일 혼합물은 인터페론, 뉴클레오타이드 동족체 및/또는 N-아세틸-시스테인과 같은 다른 약제도 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 A형 간염 바이러스 항원 단백질을 발현하기 위한 벡터에 관한 것이다.

[0037] 상기 "벡터"는 목적하는 서열 또는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 조립체를 포함하고 있으며, 이의 전사를 유도하기 위해 작동적으로 연결되는 프로모터 등의 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0038] 상기 "벡터"는 핵산 서열을 표적 세포에 전달할 수 있다. 전형적으로, "벡터 작제물", "발현 벡터" 및 "유전자 전달 벡터"는 목적하는 핵산의 발현을 유도할 수 있고 핵산 서열을 표적 세포에 전달할 수 있는 임의의 핵산 작제물을 의미하며, 원핵 발현 벡터 또는 진핵 발현 벡터일 수 있다.

[0039] 본 발명의 벡터는 재조합 미생물 세포에서 목적하는 항원 단백질을 발현하도록 이를 암호화하는 유전자를 전달할 수 있는 것을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 pET-21a 벡터를 사용할 수 있다.

[0040] 또한 본 발명은 A형 간염 바이러스 항원 단백질을 포함하는, A형 간염 바이러스 감염 진단 키트에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열을 포함하는 항원 단백질은 피검체의 생물학적 샘플 내에서 A형 간염 바이러스에 대한 IgG와 같은 항체의 존재 여부를 검출할 수 있으며, 이를 신속하게 행할 수 있는 진단 키트 형태로 제공될 수 있다. 상기 진단은 피검체의 생물학적 샘플과 본 발명의 항원 단백질의 유효량을 항원/항체 반응에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 것으로 이루어진다.

[0042] 따라서 상기 A형 간염 바이러스 감염 진단 키트는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3 회 이상 반복된 반복서열을 포함하는 항원 단백질을 적어도 하나 포함하고, 상업적으로 이용가능하거나 통상적으로 제조할 수 있는 검색 가능한 표지된 항체 항-IgG, 및 검색가능한 표지에 대응하는 검색체를 추가로 함유할 수 있다.

[0043] 상기 키트는 임의로 본 발명의 폴리펩티드로 예비-코팅된 마이크로타이터 플레이트, 여러가지 적당하게 조성된 희석제 및/또는 완충액, 표지된 물질 또는 효소 기질, 코-팩터 및 크로모포어와 같이 특이적으로 결합된 항원/항체 복합체의 검색을 위한 다른 시그날-생성제, 기타 시그날-생성제를 포함할 수 있다. 이들 중의 다른 성분들은 당업자라면 쉽게 선택할 수 있다.

[0044] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드가 3회 이상 반복된 반복서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 수득하는 단계; 수득한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 구축하는 단계; 상기 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하는 단계; 숙주 세포를 배양하여 발현된 단백질을 회수 및 정제하는 단계;를 포함하는 재조합 A형 간염 바이러스 항원 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

[0045] 상기 발현벡터는 당 분야에 공지된 것을 제한 없이 사용할 수 있으며, 재조합 단백질을 발현하는 데 사용할 수 있는 숙주세포는 예를 들면 E. coli 또는 효모 세포일 수 있고, 바람직하게는 E. coli를 사용할 수 있다.

[0046] 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.

[0047] 실험예 1. pET-21a/3D2-His 발현 벡터의 구축

[0048] A형 간염 바이러스 (이하, HAV)의 전체 서열 및 VP1, 2A 에 대한 서열정보는 공지되어 있다. 따라서 공지된 서열 중 VP1 의 C-말단의 25개 아미노산 및 2A 단백질의 N-말단 51개 아미노산에 상응하는 서열 (이하, D2 서열)을 증폭시키기 위하여 당업계에 공지된 방법을 이용하여 PCR을 수행하였으며, 각 D2 서열에 서로 다른 제한효소 부위를 포함하도록 하였다. 사용된 A형 간염 바이러스의 D2 서열(76 아미노산)은 서열번호 1에 나타내었다. D2 서열이 3회 반복된 서열을 제조하기 위하여 각 D2를 증폭시켰으며, 이를 위하여 사용된 정방향 및 역방향 프라이머의 서열은 다음과 같다.

[0049] [표 1]

PCR 산물		서열 (5' → 3')
D2-1	정방향	GGATCCATGAGCAGAATTGCAGCTG
	역방향	GTCGACTGAGCCTCCGCTCCAAAAAGAGAAATATTGGCTTGTG
D2-2	정방향	GTCGACATGAGCAGAATTGCAGCTG
	역방향	AAGCTTTGAGCCTCCGCTCCAAAAAGAGAAATATTGGCTTGTG
D2-3	정방향	AAGCTTATGAGCAGAATTGCAGCTG
	역방향	CTCGAGTGAGCCTCCGCTCCAAAAAGAGAAATATTGGCTTGTG

[0050]

[0051] 증폭된 DNA 산물은 미생물 발현벡터인 pET-21a (EMD Chemicals, USA)에 클로닝하여 D2-1, D2-2, D2-3 유전자가 GGGGS 링커로 연결되고 His₆ 에피토프를 지니는 3D2-His 유전자가 클로닝된 pET-21a/3D2-His 발현벡터를 구축하였다. 보다 구체적으로, pGEM-T/D2-3 *Bam*HI -*Sal*I 절편 (D2-1)은 pET-21a의 *Bam*HI 및 *Sal*I 부위로 삽입되었으며, pGEM-T/D2-2의 *Sal*I -*Hind*III 절편 (D2-2) 및 pGEM-T/D2-3의 *Hind* III -*Xho*I 절편 (D2-3)은 pET-21a/D2-1의 *Sal*I 및 *Xho*I 사이에 삽입되어 3D2 발현 플라스미드가 생산되도록 하였다. D2의 3회 반복 서열을 포함하는 pET-21a/3D2-His는 GGGGS 링커와 His₆tag로 연결되도록 하였다.

[0052]

구축된 벡터 개열지도를 도 1에 나타내었다.

[0053]

도 1에 나타난 바와 같이, pET-21a/3D2-His 발현벡터에는 *Bam*HI, *Sal*I, *Hind*III, *Xho*I의 제한효소 부위를 갖는 3개의 D2 유전자 서열이 포함되어 있으며, 이는 GGGGS 링커를 통해 연결되어 있다. 이 후, pET-21a/3D2-His 발현벡터에 의해서 생산되는 총 3개의 D2 서열을 가진 단백질을 재조합 3D2 단백질로 정의하였다.

[0054]

실험예 2. pET-21a/3D2-His 발현 벡터를 이용한 재조합 3D2-His 단백질의 제조

[0055]

상기 실험예 1에서 제조된 pET-21a/3D2-His 발현벡터를 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 세포에 형질전환시켜 재조합 *E. coli* BL21 (DE3) 세포를 확보하였다. 이 후 50 µg/mL 암피실린을 함유한 LB 배지에서 *E. coli* BL21 (DE3) 세포를 배양하였으며, 배양된 재조합 *E. coli* BL21 (DE3) 세포의 A₆₀₀가 0.6일 때 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyruvate (IPTG)를 첨가하여 재조합 3D2에 히스티딘 서열이 결합된 3D2-His 단백질의 발현을 유도하였다. 37°C 배양기에서 3시간 동안 배양한 후 생산된 단백질을 추출물을 회수하였으며, 이를 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 이 후 쿠마시 블루 (Coomassie blue) 염색법 및 항-His 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 수행하여, 재조합 3D2-His 단백질이 정상적으로 발현되는 것을 확인하였다.

[0056]

결과를 도 2에 나타내었으며, 이를 통해 제조된 재조합 3D2-His 단백질의 서열 (서열번호 2)을 도 3에 나타내었다.

[0057]

도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 제조된 재조합 3D2-His 단백질의 크기는 재조합 미생물 세포에서 약 30 kDa의 단일 단백질로 발현되었으며, 총 257개의 아미노산으로 구성되어 있다.

[0058]

실험예 3. 재조합 3D2-His 단백질의 분리 및 정제

[0059]

재조합 3D2-His 단백질을 분리, 정제하기 위해 재조합 *E. coli* BL21 (DE3) 세포의 A₆₀₀가 0.6일 때 0.1 mM IPTG를 첨가하여 재조합 3D2-His 단백질의 발현을 유도하였고 20°C 배양기에서 18시간 동안 배양한 후 수용성 단백질을 추출물을 얻었다. 얻어진 단백질을 추출물을 이용하여 DEAE-세파로오즈 레진(GE Healthcare Life Sciences, USA)을 이용한 이온 교환 크로마토그래피 및 Ni-NTA 레진 (Qiagen, USA)을 이용한 친화성 크로마토그래피를 수행하였고, 이를 통해 최종적으로 생산된 재조합 3D2-His 단백질을 분리, 정제하였다. 이 후, A형 간염 바이러스에 대한 항체 유도반응을 확인하기 위하여 정제된 재조합 3D2-His 단백질을 사용하였다.

[0060]

실시예 1. 재조합 3D2-His 단백질의 항체 유도 반응 확인

[0061]

실험예 1 내지 3을 통해 제조된 재조합 3D2-His 단백질이 A형 간염 바이러스에 대하여 항원성을 나타내어 항체를 효과적으로 유도할 수 있는지 확인하기 위하여, 암컷 Balb/c 마우스 (오리엔트 바이오, 한국)에서 면역화 반응을 확인하였다. 마우스는 자유롭게 식이하도록 하였으며, 무균 및 12시간 단위의 명암 주기 환경에서 사육하였다. 5주령의 암컷 Balb/c 마우스를 8마리씩 총 4개의 그룹으로 분류하였으며, 면역화 반응 유도를 위하여 제조된 재조합 3D2-His 단백질 (50 µg)을 프로인트 보조제(Freund's adjuvant)와 1:1로 혼합한 후 복강에 2주

간격으로 3회 주사하였다. 프로인트 완전 보조제(FCA)를 1차 면역화에 사용하였으며, 프로인트 불완전 보조제(FIA)를 연속적인 부스터 주입에 사용하였다. 마지막 3차 면역화로부터 1주일 이후, 마우스의 혈청을 회수하였다. 혈청 내에 존재하는 재조합 3D2-His 특이적 IgG 항체를 검출하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 96웰 ELISA 플레이트는 코팅완충액 (0.05M 중탄산염-탄산염 완충액, pH 9.6)에서 정제된 재조합 3D2-His (0.2 µg/웰)로 하룻밤 동안 4°C에서 코팅하였다. 플레이트를 200 µl의 PBS-T 로 3회 세척하였고, 재조합 3D2-His 면역화된 마우스의 혈청은 희석시킨 후 (1:100-1:1,000,000 희석) 각 웰에 첨가하였다. 이 후 실온에서 1시간 동안 배양을 수행하였다. PBS-T로 세척한 후, 플레이트는 100 µl의 HRP-접합 양 항-마우스 IgG (PBS-T에서 1:30,000로 희석)와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 그 후 플레이트를 세척하고 30분 동안 100 µl의 TMB One Component HRP Microwell Substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, SurModics, Edan Prairie, MN, USA)와 함께 0.002% (v/v) 과산화수소를 함유하는 인산염-시트레이트 완충액, pH 5.0)과 함께 배양하였다. 반응은 50 µl 2 M H₂SO₄를 각 웰에 첨가함으로써 종료되었다. 흡광도는 ELISA 리더기로 450 nm에서 판단하였다.

[0062] 결과를 도 4에 나타내었다.

[0063] 도 4에 나타난 바와 같이, 마우스에서 얻어진 혈청을 3D2-His 코팅된 ELISA 플레이트에 적용한 결과, 흡광도가 3D2-His 면역화된 ELISA 플레이트에서 대조군과 비교하여 뚜렷하게 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 재조합 3D2-His 의 복강 주사가 마우스에서 3D2-His 단백질을 인지하는 IgG 항체의 생산을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인하였다. 즉, 이와 같은 결과에 의하여 재조합 미생물 세포에서 분리, 정제된 3D2-His 단백질이 IgG 항체의 생성을 유도할 수 있는 항원성을 지닌 물질이라는 것을 확인하였다.

[0064] **실시에 2. 재조합 3D2-His 단백질의 A형 간염 바이러스 중화능력**

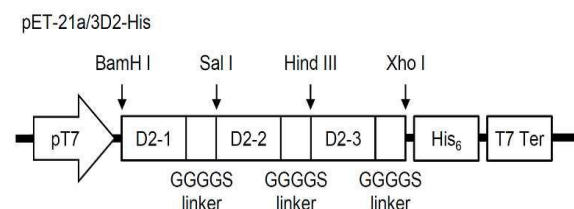
[0065] 복강 주사된 재조합 3D2-His 단백질에 의해 생성된 항체의 A형 간염 바이러스 중화능력을 확인하기 위하여 1 µg 항-HAV 항체 (양성 대조군, M40; Mediagnost, Germany), 대조군 PBS 및 재조합 3D2-His 단백질이 복강 주사된 쥐의 혈청 (5 µl)을 A형 간염 바이러스 (HM175/18f strain; ATCC, USA)와 혼합한 후 실온에서 1시간 반응시켰으며, 이후 BS-C-1 (Korean Cell Line Bank, Korea) 동물세포에 감염시켰다. 감염 1시간 후 A형 간염 바이러스가 감염된 BS-C-1 세포에서 배지를 제거하였으며, 2% FBS를 포함하는 배지를 첨가한 후 5일 동안 배양하였다. 항-HAV 항체 및 horse radish peroxidase (HRP)가 접합된 항-HAV-HRP (Mediagnost) 항체를 이용한 ELISA 방법으로 HM175/18f A형 간염 바이러스의 증식을 비교하였다.

[0066] 결과를 도 5에 나타내었다.

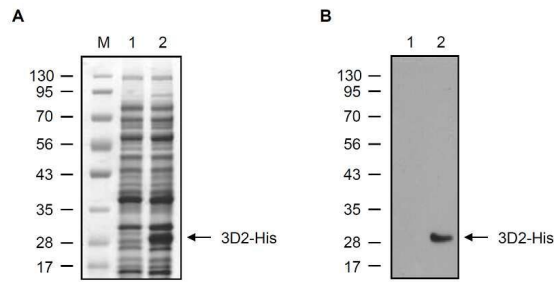
[0067] 도 5에 나타난 바와 같이, 재조합 3D2-His 단백질이 복강 주사된 쥐의 혈청과 반응시킨 실험군에서는 HM175/18f A형 간염 바이러스의 증식이 대조군 PBS와 비교하여 22.5% 감소하였다. 이러한 결과를 통해 재조합 미생물 세포에서 분리, 정제된 3D2-His 단백질에 의해 생성된 항체가 A형 간염 바이러스의 증식을 억제하는 중화능력을 갖는다는 것을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

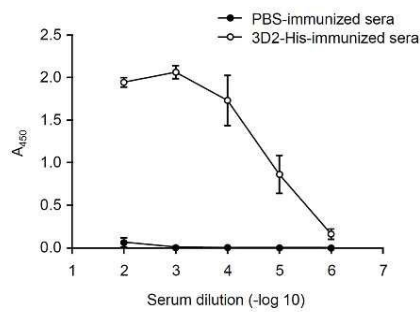


도면3

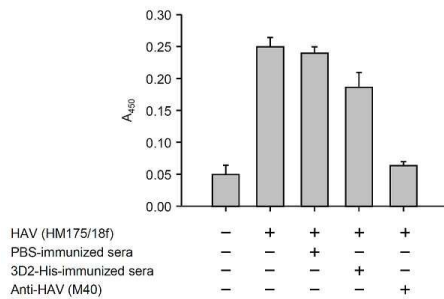
```

G S M S R I A A G D L E S S V D D P R S E E D K R
GGATCCTATGACGCAATTTCAGCTGGAGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGGAGAGATAAGA
F E S H I E C R K P Y K E L R L E V G K Q R L K Y
TTTGAGATCATATAGAAATPCAGGAGCCATATAAAGAACTGAGATTAGAGTTGGGAACAAGACTCAAGTAT
A Q E E L S S E V L P P P R K M K G L F S Q A K I
GCTCAGGAGAAATTGTCAGTGAAGTACTTCCACCCCTAGGAAAATGAAGGACTGTTTTCACAGCCAAAATT
S L F G G G G S V D M S R I A A G D L E S S V D D
TCTCTTTTGGGGTGGTGGTCTCTGACATGAGCAGAAATGACCTGGAGACTTGGATCATCAGTGGATGAT
P R S E E D K R F E S H I E C R K P Y K E L R L E
CCTAGATCAGGAGAGATAAAGATTTCAGAGTCATATAGAAATGACGAGAACATATAAAGACTGAGATTAGAA
V G K Q R L K Y A Q E E L S S E V L P P P R K M K
GTTGGGAACAAGACTCAAGTATGCTCAGGAGAAATTCAGTGAAGTACTTCCACCCCTAGGAAAATGAG
G L F S Q A K I S L F G G G S K L M S R I A A G
GGACTGTTTTCAGAGCCAAAATTCTCTTTTGGGGTGGTGGTCTAAGCTATGAGCAGAAATGACCTGGA
D L E S S V D D P R S E E D K R F E S H I E C R K
GACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGGAGAGATAAAGATTTCAGAGTCATATAGAAATGACGAG
P Y K E L R L E V G K Q R L K Y A Q E E L S S E V
CCATATAAAGACTGAGATTAGAAATGGGAACAAGACTCAAGTATGCTCAGGAGAAATTCAGTGAAGTA
L P P P R K M K G L F S Q A K I S L F G G G G S L
CTTCCACCCCTAGGAAAATGAAGGACTGTTTTCAGAGCCAAAATTCTCTTTTGGGGTGGTGGTCTCTCTC
E H H H H H H
GAGCAGCACACACACACACAC
    
```

도면4



도면5



서열목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> A vaccine material 3D2 protein of hepatitis A virus and vaccine composition
 <130> P14-036-KHU
 <160> 2
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> hepatitis A virus
 <400> 1

Met Ser Arg Ile Ala Ala Gly Asp Leu Glu Ser Ser Val Asp Asp Pro
 1 5 10 15
 Arg Ser Glu Glu Asp Lys Arg Phe Glu Ser His Ile Glu Cys Arg Lys
 20 25 30

Pro Tyr Lys Glu Leu Arg Leu Glu Val Gly Lys Gln Arg Leu Lys Tyr
 35 40 45

Ala Gln Glu Glu Leu Ser Ser Glu Val Leu Pro Pro Pro Arg Lys Met
 50 55 60

Lys Gly Leu Phe Ser Gln Ala Lys Ile Ser Leu Phe
 65 70 75

<210> 2
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinat 3D2-His
 <400> 2

Gly Ser Met Ser Arg Ile Ala Ala Gly Asp Leu Glu Ser Ser Val Asp
 1 5 10 15
 Asp Pro Arg Ser Glu Glu Asp Lys Arg Phe Glu Ser His Ile Glu Cys
 20 25 30
 Arg Lys Pro Tyr Lys Glu Leu Arg Leu Glu Val Gly Lys Gln Arg Leu

35 40 45
 Lys Tyr Ala Gln Glu Glu Leu Ser Ser Glu Val Leu Pro Pro Pro Arg
 50 55 60
 Lys Met Lys Gly Leu Phe Ser Gln Ala Lys Ile Ser Leu Phe Gly Gly
 65 70 75 80

 Gly Gly Ser Val Asp Met Ser Arg Ile Ala Ala Gly Asp Leu Glu Ser
 85 90 95
 Ser Val Asp Asp Pro Arg Ser Glu Glu Asp Lys Arg Phe Glu Ser His
 100 105 110
 Ile Glu Cys Arg Lys Pro Tyr Lys Glu Leu Arg Leu Glu Val Gly Lys
 115 120 125
 Gln Arg Leu Lys Tyr Ala Gln Glu Glu Leu Ser Ser Glu Val Leu Pro
 130 135 140
 Pro Pro Arg Lys Met Lys Gly Leu Phe Ser Gln Ala Lys Ile Ser Leu

 145 150 155 160
 Phe Gly Gly Gly Gly Ser Lys Leu Met Ser Arg Ile Ala Ala Gly Asp
 165 170 175
 Leu Glu Ser Ser Val Asp Asp Pro Arg Ser Glu Glu Asp Lys Arg Phe
 180 185 190
 Glu Ser His Ile Glu Cys Arg Lys Pro Tyr Lys Glu Leu Arg Leu Glu
 195 200 205
 Val Gly Lys Gln Arg Leu Lys Tyr Ala Gln Glu Glu Leu Ser Ser Glu
 210 215 220

 Val Leu Pro Pro Pro Arg Lys Met Lys Gly Leu Phe Ser Gln Ala Lys
 225 230 235 240
 Ile Ser Leu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu His His His His His
 245 250 255
 His