

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0175353
(43) 공개일자 2024년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) *A61K 35/76* (2015.01)*A61P 31/14* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)*A61K 35/76* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0075054

(22) 출원일자 2023년06월12일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

신현진

대전광역시 서구 계룡로264번길 4, 105동 610호(월평동, 월평타운)

박재연

인천광역시 남동구 만수로 14-25, 102동 302호(만수동, 만수주공1단지아파트)

(74) 대리인

리앤목특허법인

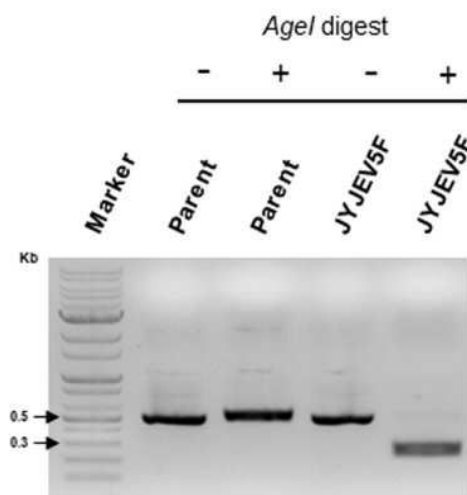
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1에 대한 재조합 바이러스 및 이의 용도

(57) 요약

일본 뇌염 바이러스 5형 국내 분리주 MK541529.1에 대한 재조합 바이러스 및 이의 용도에 관한 것으로서, 재조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물, 재조합 일본 뇌염 바이러스를 제조하는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 재조합 일본 뇌염 바이러스, 및 상기 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 일본 뇌염에 대한 백신 조성물을 제공한다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 2770/24121 (2013.01)

C12N 2770/24134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합으로 이루어지는 cDNA, 또는 상기 cDNA를 포함하는 발현 벡터를 포함하는, 재조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1로부터 유래한 것인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스 cDNA는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1로부터 수득된 cDNA와 비교하여, G1031C 및 T10043A 변이를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합을 포함하는 발현 벡터를 선형화하는 단계; 및 상기 선형화된 발현 벡터를 주형으로 하여 시험관 내 전사 (*in vitro* transcription; IVT)를 수행하는 단계를 포함하는, 재조합 일본 뇌염 바이러스를 제조하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 발현 벡터는 도 2의 개열 지도를 갖는 pACYC177 JYJEV5F인 것인, 재조합 일본 뇌염 바이러스를 제조하는 방법.

청구항 6

서열번호 4의 염기서열로 이루어진 재조합 일본 뇌염 바이러스.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합을 포함하는 발현 벡터를 선형화하는 단계; 및 상기 선형화된 발현 벡터를 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 것인, 재조합 일본 뇌염 바이러스.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스 cDNA는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주

MK541529.1로부터 수득된 로부터 수득된 cDNA와 비교하여, G1031C 및 T10043A 변이를 포함하는 것인 재조합 일본 뇌염 바이러스.

청구항 9

청구항 6의 재조합 일본 뇌염 바이러스를 유효성분으로 포함하는 일본 뇌염에 대한 백신 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 일본 뇌염은 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 감염에 의한 것인, 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 일본 뇌염 바이러스 5형 국내 분리주 MK541529.1에 대한 재조합 바이러스 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일본 뇌염은 모기에 의해서 매개되는 대표적인 감염증으로, 사람에서 고열 및 혼수 등을 동반한 뇌염을 일으켜 결국 사망에 이르게 하는 치명적인 인수공통전염병이다. 한국 및 일본 지역에서 일본 뇌염을 주로 매개하는 모 기종은 작은 빨간 집모기 (*Culex tritaeniorhynchus*)에 의해 전파되는 것으로 알려져 있으나, 중국, 인도를 비 롯한 동남아시아 지역에서는 쿨렉스 비시누이(*Culex vishnui*), 쿨렉스 피피엔스(*Culex Pipiens*), 쿨렉스 애눌리 로스트리스(*Culex annulirostris*) 및 학질 모기(*Anopheles spp.*)도 일본 뇌염 바이러스를 매개하는 것으로 알 려져 있다. 불현성 감염을 나타내는 성인과는 달리 14세 이하의 어린이나 노약자가 일본뇌염에 감염되면 고열, 두통, 지각 이상, 의식 장애, 혼수 및 사망을 일으키며, 회복기에는 언어 장애, 판단 능력 저하 등의 후유증이 나타난다. 돼지, 말, 소, 양 및 염소를 포함한 가축 뿐만 아니라 비둘기 및 왜가리 등과 같은 야생조류, 박쥐, 파충류가 일본 뇌염에 감수성이 있다. 특히, 야생 멧돼지를 포함한 돼지는 일본 뇌염 바이러스의 증폭 숙주로 알려져 있어, 공중 보건학적으로 중요한 면역 대상 동물이다. 모기에 의해 일본 뇌염 바이러스가 성돈과 비육돈 에 감염되면 바이러스 혈증을 일으켜도 불현성 임상증상을 나타내지만, 임신 모돈이 일본뇌염에 감염되면 조산, 미이라 태아 등 유사산 증상과 신경 증상을 동반하는 허약 자돈을 분만하는 번식 장애 질병을 유발한다. 웅돈에 서는 생식기에 침입하여 정자 형성을 저해하며, 정자수의 감소, 기형 정자의 증가로 수태율을 떨어뜨린다.

[0003] 한편, 일본 뇌염의 원인체인 일본 뇌염 바이러스는 플라비바이러스속 (Flavivirus)에 속하는 positive single strand RNA 바이러스이다. RNA genome 은 한 개의 ORF에서 poly protein이 만들어지며 3개의 구조 단백질과 7 개의 비구조 단백질로 이루어진다. [C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5]로 구성되는 poly protein은 NS2B-NS3 영역이 viral protease 에 의해 나뉘어 진다. 계통학적 분류로서 일본 뇌염 바이러스는 5개의 유전형 으로 나뉘며, envelope (E) 유전자의 서열분석을 통해 나뉘게 된다. 국내에서 분리된 일본 뇌염 바이러스 strain은 대부분 유전형 I과 III으로 확인되어 왔다. 그러나, 2010년 경기도 파주 지역 모기에서 유전형 V가 확 인된 이래로 2012년에는 강원도 및 경기 남부 지역에서도 유전형 V가 확인된 바가 있다. 더욱이, 2015년에는 국 내 사람 검체 1건, 2018년에 사람 검체 2건에서도 유전형 V가 검출되었다. 또한, 기존에 사용되던 일본 뇌염 바 이러스 백신은 일본 뇌염 바이러스 유전형 V의 감염에는 백신 효과가 저하됨이 보고된 바 있다. 따라서, 과거 국내에 주를 이루었던 일본 뇌염 바이러스 유전형 I과 III 뿐만 아니라, 일본 뇌염 바이러스 유전형 V의 예방 및 감염에 대한 대비가 필요한 실정이다.

[0004] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 최근 국내에서 유행하고 있는 일본 뇌염 바이러스 5형 국내 분리주 MK541529.1에 대한 재조합 바이러스를 제조하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴 리뉴클레오티드; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합으로 이루어지는 cDNA, 또

는 상기 cDNA를 포함하는 발현 벡터를 포함하는, 재조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 상기 조성물을 이용한 재조합 일본 뇌염 바이러스를 제조하는 방법을 제공한다.

[0007] 또 다른 양상은 상기 방법에 의해 제조된 재조합 일본 뇌염 바이러스를 제공한다.

[0008] 또 다른 양상은 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스를 유효성분으로 포함하는 일본 뇌염 백신 조성물을 제공한다.

[0009] 또 다른 양상은 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스를 유효성분으로 포함하는 일본 뇌염의 진단용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0011] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0012] 일 양상은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합으로 이루어지는 cDNA, 또는 상기 cDNA를 포함하는 발현 벡터를 포함하는, 재조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 명세서에서 용어, "일본 뇌염 바이러스 (Japanese encephalitis virus: JEV)"는 플라비바이러스속 (Flavivirus)에 속하는 positive single strand RNA 바이러스로서, 게놈은 하나의 긴 전사해독틀(ORF)을 가지고 있으며, ORF의 양쪽 끝 부위에 바이러스의 자가복제에 중요한 역할을 하는 시스-작용성(cis-acting) 인자들을 가진 5' 및 3' 비번역부위(nontranslated region: NTR)로 구성되어 있다. 상기 ORF는 하나의 큰 다중단백질로 번역되며, 이것은 번역과 동시 또는 번역 후에 프로세싱되어 세 개의 구조단백질과 일곱 개의 비구조 단백질이 생산된다. 이때, 상기 단백질에 해당하는 유전자들은 JEV RNA 게놈상에서 C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5와 같은 배열을 가진다. 또한, 상기 일본 뇌염 바이러스는 계통학적 분류로서 5개의 유전형으로 나뉘며, 국내에서 분리된 일본 뇌염 바이러스는 대부분 유전형 I과 III이 주를 이루어왔으나, 최근에는 유전형 V가 빈번하게 검출되고 있다. 이러한 기술적 배경 하에서, 일본 뇌염 바이러스 유전형 V, 구체적으로, 유효한 감염능을 갖는 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 V (이하, 일본 뇌염 바이러스 유전형 5로 명명함.)의 개발이 필요하나, cDNA 분자의 유전학적 불안정성에 따라, 유효한 감염성을 보유한 cDNA 클론의 확보에 어려움이 있는 실정이다.

[0014] 본 명세서에서 용어, "재조합 일본 뇌염 바이러스 (Recombinant Japanese encephalitis virus)는 인위적으로 합성되거나 (Artificially synthesized), 또는 비-천연 발생 또는 조작 (Non-naturally occurring or engineered)된 일본 뇌염 바이러스를 지칭하며, 상기 "비-천연 발생 또는 조작"은 자연 상태에서 일어나는 존재 그대로의 상태가 아닌, 인위적인 변형을 가하여 생성된 상태를 의미한다. 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스는 예를 들어, 감염성을 갖는 cDNA 클론의 구축 및 시험관 내 전사 과정을 통해 수득된 것일 수 있으며, 본 발명의 목적상, 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 유전적 특성을 보유하는 것일 수 있다.

[0015] 일 구체예에서, 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1로부터 유래한 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 상기 국내 분리주 MK541529.1로 형질감염된 형질감염 세포로부터 분리한 virus RNA의 유전 정보에 기초하여, 감염성을 보유한 cDNA 클론을 확보하는 과정을 통해 제작되는 것일 수 있다. 여기서, 상기 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1는 질병 관리청, 미국국립보건원의 GenBank 등 공지의 데이터베이스로부터 수득할 수 있다.

[0016] 일 구체예에서, 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스 cDNA는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1로부터 수득된 cDNA와 비교하여, G1031C 및 T10043A 변이를 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 일 구체예에서, 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합으로 이루어지는 cDNA를 포함할 수 있다.

- [0018] 본 명세서에서 용어, "폴리뉴클레오티드 (Polynucleotide)"는 복수의 뉴클레오티드 단위체를 포함하는 고분자 물질로서, 구체적으로, 복수의 뉴클레오티드 단위체가 당/포스페이트 기본 골격의 포스포다이에스테르 결합에 의해 서로 연결되어 있는 폴리머를 지칭하며, 용어, "핵산", "핵산 분자"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 생명체에 필수적인 생체 고분자로서, 고유의 염기 서열을 통해 유전적 정보를 코딩하는 RNA 또는 DNA일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단리되거나 (Isolated), 인위적으로 합성되거나 (Artificially synthesized), 또는 비-천연 발생 또는 조작 (Non-naturally occurring or engineered)된 것일 수 있다. 여기서, 상기 인위적인 변형은 자연적인 RNA, 구체적으로, 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 RNA의 유전적 특성 및 구조를 모방한 것으로, 유효한 감염성을 갖는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 제1 폴리뉴클레오티드 내지 제3 폴리뉴클레오티드는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1의 전장(full-length)을 포함하여 유효한 감염성을 나타냄과 동시에, G1031C 및 T10043A 변이를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드 각각은 동일한 기능성을 발휘한다는 전제 하에서, 서열번호 1, 2, 또는 3의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 염기서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인될 수 있다.
- [0020] 일 구체예에서, 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합으로 이루어지는 cDNA를 포함하는 발현 벡터를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현 또는 형질감염시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항원 결합 단편 또는 제조합 융합 단백질을 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다. 일 실시예에서, 상기 발현 벡터는 5'에 T7 promoter 와 3' end에 HDVr을 포함하고 있는 pACYC177 vector일 수 있다.
- [0022] "작동적으로 연결"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0023] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엠스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다. 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 제조합 융합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타민 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6xHis(hexahistidine; Qiagen, USA) 등이 있다. 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성유전자가 있다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 용어, "형질감염"은, 본래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 외래 유전자가 있는 DNA사슬 조각 또는 플라스미드가 세포들 사이에 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합함으로써 세포의 유전형질을 변화시키는 분자생물학적 기술을 의미한다. 상기 형질전환은 상기 항원 결합 단편 또는 제조합 융합 단백질 유전자를 포함하는 발현 벡터가 숙주 세포로 삽입되는 것을 의미할 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 따르면, 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1로 형질감염된 형질감염 세포로부터 분리한 virus RNA의 유전 정보에 기초하여, 감염성을 보유한 cDNA 클론을 확보한 뒤, 여기에 G1031C 및 T10043A 변이를 포함하는 cDNA 및 이를 포함하는 발현 벡터 pACYC177 JYJEV5F를 제작하였다. 이후, 상기 선형화된 발현 벡터 pACYC177 JYJEV5F를 주형으로 시험관 내 전사를 수행하여 viral RNA를 수득하였으며, 이후, 상기 수득된

viral RNA의 유효한 세포 병변 효과를 확인하였다.

- [0026] 다른 양상은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제1 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제2 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제3 폴리뉴클레오티드의 조합을 포함하는 발현 벡터 또는 플라스미드를 선형화하는 단계; 및 상기 선형화된 발현 벡터를 주형으로 하여 시험관 내 전사 (*in vitro* transcription; IVT)를 수행하는 단계를 포함하는, 제조합 일본 뇌염 바이러스를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0027] 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스를 제조하는 방법에 언급된 용어 또는 요소 중 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 상기한 바와 같다.
- [0028] 본 명세서에서 용어, "플라스미드"는 적합한 숙주 세포 내에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 지칭한다. 일 양상에 따른 플라스미드는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 및/또는 인핸서와 같은 발현 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 플라스미드는 선형화된 플라스미드일 수 있으며, 상기 선형화된 플라스미드는 제한 효소가 인식 부위에서 플라스미드 DNA를 절단하고, 플라스미드 구조를 파괴하는 적합한 조건 하에서, 플라스미드 DNA를 제한 효소와 접촉시킴으로써 수득될 수 있다. 또한, 상기 플라스미드에서 플라스미드의 종류, 제한효소 인식 부위 등의 요소는 당업계의 공지 기술이 비제한적으로 적용될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 플라스미드는 5'에 T7 promoter와 3' end에 HDVr을 포함하고, 전술한 cDNA를 포함하는, 도 2의 개열지도를 갖는 pACYC177 vector(pACYC177 JYJEV5F)일 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서 용어, "시험관내 전사 (*in vitro* transcription; IVT)"는 목적 mRNA 분자가 무세포 시스템(시험관 내)에서 합성되는 과정으로서, 바람직하게, 플라스미드를 구성하는 DNA가 mRNA 전사체 생성을 위한 주형으로 사용될 수 있고, RNA 중합 효소는 시험관 내 전사 과정을 제어하는데 사용될 수 있다. 통상적으로, 시험관내 RNA 전사에서 RNA를 위한 DNA 주형은 시험관내 전사되는 각각의 RNA에 상응하는 특정 cDNA의 클로닝 및 이를 RNA 시험관내 전사를 위한 적합한 벡터, 예를 들어, 플라스미드에 도입함으로써 수득될 수 있다.
- [0030] 또 다른 양상은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 제조합 일본 뇌염 바이러스를 제공하는 것이다.
- [0031] 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스에 언급된 용어 또는 요소 중 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스를 제조하는 방법 및 제조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 상기한 바와 같다.
- [0032] 일 구체예에서, 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스는 전술한 바와 같이 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 유전적 특성 및 구조를 모사한 것일 수 있다. 또하느 상기 제조합 바이러스는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 국내 분리주 MK541529.1로부터 유래한 것으로서, 구체적으로, 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스의 제조를 위한 조성물을 통해 제조된 것일 수 있으며, 서열번호 4이 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스는 동일한 기능성을 발휘한다는 전제 하에서, 서열번호 4의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0033] 다른 양상은 상기 제조합 일본 뇌염 바이러스를 유효성분으로 포함하는 일본 뇌염에 대한 백신 조성물을 제공하는 것이다.
- [0034] 본 명세서에서 용어, "백신"은 생체에 면역력을 주는 항원을 함유한 생물학적인 제제로서, 감염증의 예방을 위하여 사람이나 동물에 주사하거나 경구 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원 또는 항원성 물질을 말한다. 생체 내 면역은 병원균의 감염 후에 생체 내 면역력이 자동적으로 얻어지는 자동면역과 외부에서 주입한 백신에 의하여 얻어지는 수동 면역으로 크게 나누어진다. 자동면역이 면역에 관계하는 항체의 생성 기간이 길고 지속적인 면역력의 특징이 있는 반면, 백신에 의한 수동 면역은 감염증 치료에 즉시 작용하나 지속력이 떨어지는 단점이 있다.
- [0035] 본 명세서에서 용어, "면역원" 또는 "항원성 물질"은 상기 바이러스 유래의 펩티드, 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 발현하는 유산균, 단백질, 상기 단백질을 발현하는 유산균, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 및 제조합 바이러스로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 구체적인 예를 들면, 상기 항원 물질은 불활성화된 전체 또는 부분 바이러스 제제 형태, 약독화 바이러스 제제 또는 통상적인 단백질 정제, 유전 공학 기법 또는 화학 합성에 의해 수득되는 항원 분자 형태일 수 있다.
- [0036] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콕

(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 서브바이탈(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N'-디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제 2 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 상기 백신 조성물은 수의학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "수의학적으로 허용 가능한 담체"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착지연제 등을 포함한다. 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0038] 또한, 상기 백신용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0039] 상기 백신은 다양한 형태로 개체에 주입될 수 있다. "주입"은 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 및 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행될 수 있다.

[0040] 또한, 본 명세서에서 용어, "주사" 또는 "투여"는 투여대상의 나이, 성별, 체중 등에 따라 투여량이 달라질 수 있고, 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서도 백신의 투여량이 본 발명의 백신용 면역증강제는 비경구, 점막(경구 및 비강 등) 및 경피성 경로에 의한 백신 투여시 함께 사용할 수 있다.

[0041] 상기 백신 조성물은 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 하나 이상의 보조제 등을 포함할 수 있다. 적절한 보조제에는 펩티드, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 옥사이드 및 Marcol 52 같은 미네랄 오일 또는 식물성 오일 및 하나 이상의 유화제로 구성된 조성물 또는 리졸레시틴, 다가 양이온, 다가 음이온 같은 표면 활성물질 등이 포함된다.

[0042] 상기 백신 조성물은 1종 이상의 면역증강제를 추가로 포함할 수 있고, 바람직하게는 콜레라 독소(CT: cholera toxin), 알루미늄하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일 또는 생분해성(Biodegradable) 오일을 포함할 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 용어 "면역증강제"란, 일반적으로 항원에 대한 체액 및/또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질을 지칭한다. 전통적인 백신들은 죽은 병원성 미생물의 비가공 제제로 구성되어, 병원성 미생물의 배양액과 관련된 불순물들은 면역 반응을 향상시키기 위한 면역증강제로서 작용할 수 있으나, 정제된 단백질 서브유닛의 균질 제제를 백신접종을 위한 항원으로서 사용하는 경우, 상기과 같은 항원에 의해 발동된 면역성은 불충분하여 면역증강제로서 일부 외래물질의 첨가가 필요해 진다. 면역증강제를 사용함으로써 면역 반응을 자극하는데 보다 적은 용량의 항원이 요구될 수 있으며, 이에 의해 백신 생산 비용이 절감될 수 있다. 이러한 면역증강제는 그 원료(미네랄, 세균, 식물)와 성분(유제현탁액)에 따라 분류된다. 상업적으로 이용되는 면역증강제는 알루미늄하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일(미네랄오일) 또는 생분해성(Biodegradable) 오일 등이 있다.

[0044] 상기 백신은 생백신 또는 사독백신일 수 있다. 상기 생백신은 바이러스의 병원성을 약하게 하여 동물에 투여되었을 때 질병의 임상적 증상이 없거나 감소되었음을 나타내는 바이러스를 의미하는 것으로, 본 발명의 약독화주

는 당업계에서 알려져 있는 방법, 예를 들어, 바이러스의 계대배양을 통해 분리될 수 있다. 사독 백신은 바이러스를 가열(56~60℃, 30~60분) 또는 포르말린이나 페놀 등의 화학약품에 의해서 면역원성을 잃지 않고 병원성을 불활성으로 한 것이며, 상기 바이러스의 불활화는 당업계에서 알려진 방법에 의할 수 있다.

[0045] 또 다른 양상은 상기 재조합 일본 뇌염 바이러스 또는 이의 항원, 또는 이를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 일본 뇌염 바이러스 진단용 조성물을 제공하는 것이다. 상기 일본 뇌염 바이러스 등에 관한 내용은 전술한 바와 같다.

[0046] 본 명세서에서 용어, "진단"은 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로, 일본 뇌염 바이러스에 특이적인 유전자의 발현 유무를 확인하여 일본 뇌염 바이러스에 의해 야기되는 질병의 발병 여부 및 발병 후 항바이러스 약제 치료과정에서의 예후를 확인하는 것을 의미할 수 있다.

[0047] 상기 바이러스, 상기 바이러스의 배양물 또는 이의 항원을 검출할 수 있는 제제는 바람직하게는 상기 바이러스, 상기 바이러스의 배양물 또는 이의 항원에 특이적인 항체일 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 용어, "항체"는 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질로서, 면역글로불린이라고도 하며, 특정한 항원과 특이적으로 결합하여 림프와 혈액을 떠돌며 항원항체반응을 일으킨다. 항체가 특이적 항원에 대한 특이성을 나타내는 반면에, 면역글로불린은 항체, 및 항원 특이성이 결여된 항체 유사 물질모두를 포함한다. 후자의 폴리펩티드는 예컨대 림프계에서는 낮은 수준으로 생산되며 골수종에 의해서 증가된 수준으로 생산된다. 본 발명에서는 상기 PEDV 자체, 스파이크 단백질, 또는 이에 포함된 에피토프일 수 있다. 상기 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체일 수 있다.

발명의 효과

[0049] 일 양상에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5는 본래 일본 뇌염 바이러스의 구조적 또는 유전적 특징을 지니면서, 유효한 세포 감염능을 보유하는 바, 최근 국내에서 유행하는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5를 효과적으로 진단할 수 있는 항원, 또는 이를 효과적으로 예방할 수 있는 백신을 개발하는데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 일본 뇌염 바이러스의 RNA genome 구조를 개략적으로 나타낸 도이다.

도 2는 일 실시예에 따른 제1 내지 제3 폴리뉴클레오타이드 (JEV5 Fragment1 내지 JEV5 Fragment3)를 개략적으로 나타낸 도면으로서, 도 2에서, A는 캡시드 단백질 (C), B는 펩타이드 전구체 (prM), C는 Envelop (E), D는 비구조단백질 1(NS1), E는 비구조단백질2(NS2A), F는 비구조단백질2B(NS2B), G는 비구조단백질3(NS3). H는 비구조단백질4A, 4B, 5(NS4A, NS4B, NS5)를 지칭한다.

도 3은 일 실시예에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 제작을 위한 발현 벡터 pACYC177 JYJEV5F의 개략도이다.

도 4는 일 실시예에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5를 블롯팅을 통해 확인한 결과이다.

도 5는 일 실시예에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 세포 감염 여부를 확인한 결과이다.

도 6은 일 실시예에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 및 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 MK541529.1주를 Vero 세포에 형질감염시킨후, 세포 감염 여부를 확인한 결과이다.

도 7은 일 실시예에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 감염 여부를 정제된 PCR 산물 및 AgeI 제한효소를 이용하여 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 실시예 1: 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 제작

[0053] 본 실시예에서는 일본 뇌염 바이러스 유전형 5에 대한 재조합 바이러스를 제작하고자 하였다.

[0054] 1-1. 발현 벡터의 제작

[0055] 질병 관리청으로부터 분양받은 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 MK541529.1주를 모기 유래 세포인 C6/36 세포에서 감염시킨 후, 바이러스의 역가를 증가시켰다. 이후, 상기 C6/36 세포에서 virus RNA를 추출하고, 역전사 효소를 이용한 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 일본 뇌염 바이러스 유전형 5에 대한 재조합 바이러스의 제작을 위해 Low copy number로 알려진 pACYC177 vector에 일본 뇌염 바이러스 전장 유전자를 삽입하였다. 구체적으로, 5' UTR 및 3' UTR을 포함하는 총 8개 부분으로 나누어 PCR을 수행하였고 infusion cloning kit를 이용하여, 제1 내지 제3 폴리뉴클레오타이드 (JEV5 Fragment1 내지 JEV5 Fragment3)를 사용하여 클로닝을 실시하였다. 한편, 상기 제1 내지 제3 폴리뉴클레오타이드에 대한 정보는 도 2 및 표 1에 나타난 바와 같다.

[0056] [표 1]

Name	Contents	SEQ ID NO.
JEV5 Fragment1	5' UTR, A(C), B(prM), C(Envelop), D(NS1 partial)	1
JEV5 Fragment2	D(NS1 partial) E(NS2A), F(NS2B), G(NS3 partial)	2
JEV5 Fragment3	G(NS3 partial), H(NS4A, NS4B, NS5), 3' UTR	3

[0057]

[0058] 이후, 5' 에 T7 promoter 와 3 ' end 에 HDVr을 포함하고 있는 pACYC177 vector에 infusion cloning하여 최종적으로 도 3에 나타난 바와 같이, pACYC177 JYJEV5F clone을 완성하였다. 또한 parent virus 와 재조합 바이러스를 구분하기 위해, 표 2에 나타난 바와 같이, Envelope 유전자에 속하는 1,031 번 뉴클레오타이드 G를 C로 NS5 유전자에 속하는 10,043 뉴클레오타이드 위치의 T를 A로 silent mutation을 제작하였다.

[0059] [표 2]

Nucleotide position	Parental Strain	cDNA Clone	Amino Acid change	Location
1,031	G	C	Silent (<i>Fm11</i> knockout)	Envelope
10,043	T	A	Silent (<i>Age1</i> Knockout)	NS5
*GACGTG>CACGTG(<i>pm11</i>) *TCCGGT>ACCGGT(<i>Age1</i>)				

[0060]

[0061] 1-2. *in vitro* transcription을 이용한 viral RNA 생산

[0062] 재조합 바이러스 clone에서 viral RNA를 생산하기 위하여, 상기 1-1의 pACYC177 JYJEV5F 발현 벡터에 AvrII 제한 효소를 처리하여 선형화하였다. 이후, 5' 앞쪽에 위치하는 T7 promoter를 이용하여 *in vitro* transcription을 실시하여, 서열번호 4의 염기 서열로 이루어지는 재조합 일본 뇌염 바이러스를 수득하였다.

[0063] 이후, 도 4에 나타난 바와 같이, 블롯팅을 통해, 0.7% agarose gel에서 상기 제작된 viral RNA를 확인하였다.

[0064] 실시예 2: 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 세포 감염능 확인

[0065] 본 실시예에서는 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 RNA의 세포 감염능을 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 상기 제작된 8 µg의 viral RNA를 Lipofectamine 2000과 혼합하고 실온에서 5분간 인큐베이팅한 후, 이를 원숭이 신장세포인 Vero cell에 형질감염시켰다. 이후, Vero 세포에서의 바이러스 감염의 전형적인 세포 병변 효과 (CPE: cytopathic effect)를 현미경을 통해 확인하였다. 한편, 음성 대조군으로는 비감염 군 (Non-transfected)을 사용하였다.

[0066] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 형질감염 4일 및 5일째, Vero 세포에서 세포 병변 효과를 확인하였다. 상기 결과로부터 일 실시예에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스는 유효한 감염능을 보유함을 알 수 있었다.

[0067] 실시예 3: 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 세포 감염능의 재확인

[0068] 본 실시예에서는 실시예 2에서 확인한 세포 감염능이 일 실시예에 따른 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5에 의한 것인지 여부를 재차 검증하고 자하였다. 이를 위하여, 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 MK541529.1주(parent, JEV5)와 재조합 바이러스(JYJEV5F)를 상기 실시예 2와 동일한 방식으로 Vero cell에 형질감염시키고, 세포 병변 효과를 현미경을 통해 확인하였다. 이후, 상기 감염된 Vero 세포의 상등액을 harvest 하여 viral RNA를 추출 하

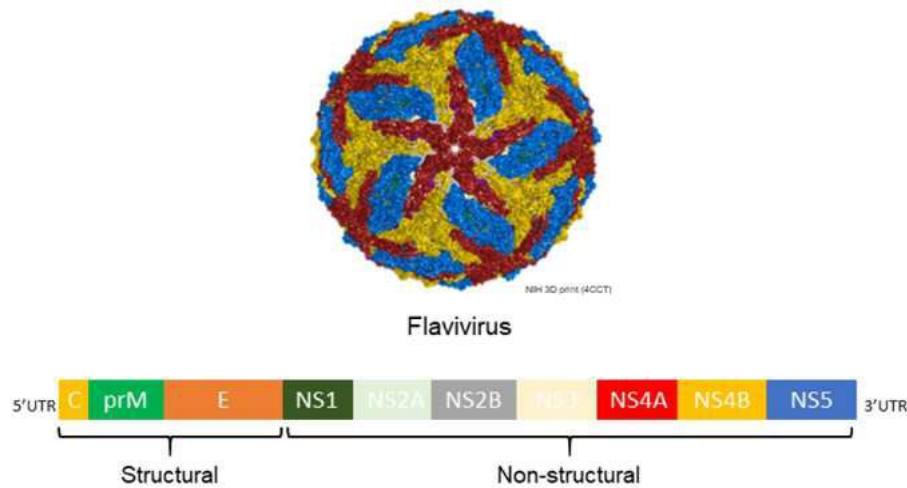
였다. 이후 RT-PCR을 통해 cDNA를 합성하였으며, 앞서 언급한 silent mutation 부위인 NS5 유전자의 일부를 PCR 한 후 PCR 산물을 정제하였다. 상기 정제된 PCR 산물은 AgeI 제한효소로 cutting 하였으며, 이에 따른 산물을 확인하였다.

[0069] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 형질감염 4일째, Vero 세포에서 세포 병변 효과를 확인하였다. 또한, 도 7에 나타난 바와 같이, AgeI 제한효소의 처리에 따른 밴드를 확인하여 본래의 바이러스와 재조합 바이러스를 구분할 수 있으며, 이를 통하여, 재조합 일본 뇌염 바이러스 유전형 5 RNA의 세포 감염을 재차 확인할 수 있었다. 상기 결과는 일 실시예에 따른 재조합 바이러스는 유효한 감염능을 보유하고 있는 바, 일본 뇌염 바이러스 유전형 5의 백신 또는 치료제 개발에 활용될 수 있음을 나타내는 것이다.

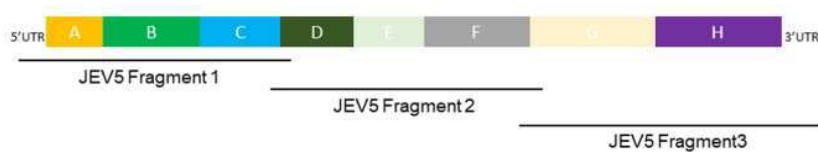
[0070] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

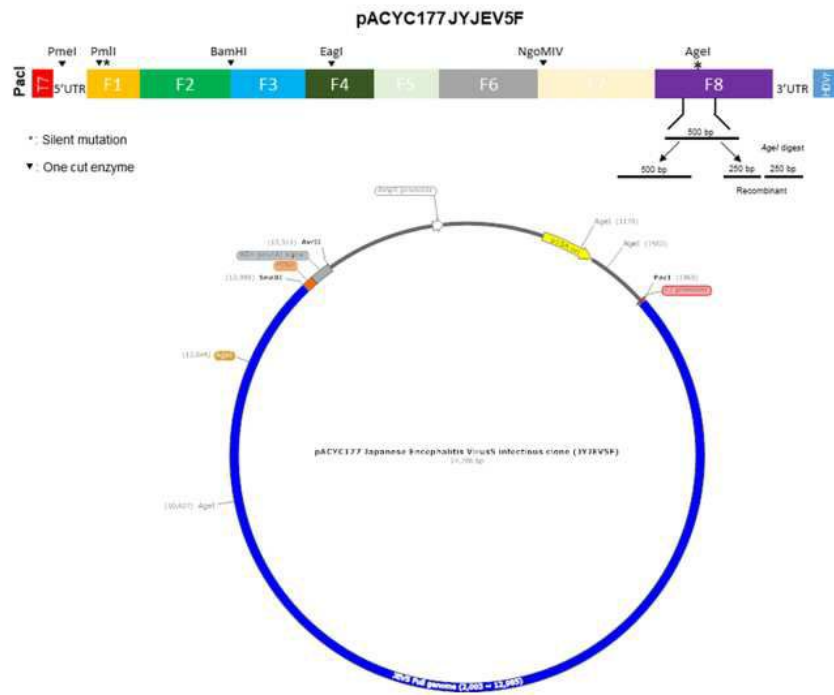
도면1



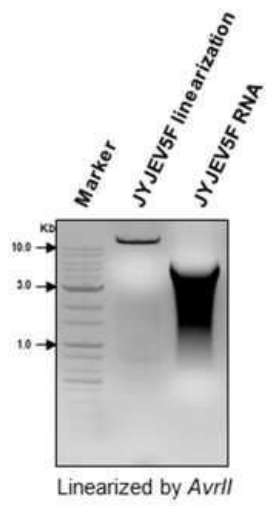
도면2



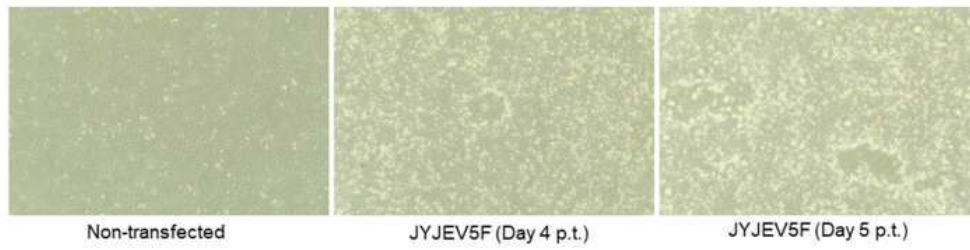
도면3



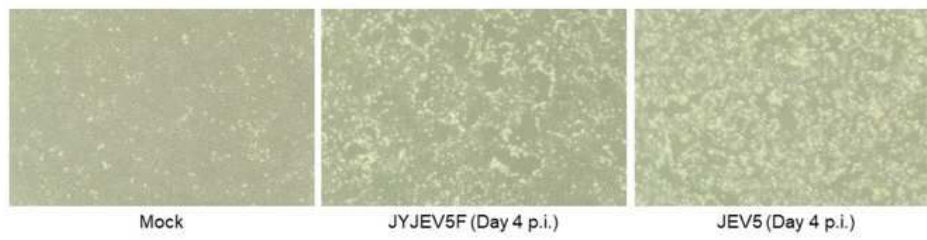
도면4



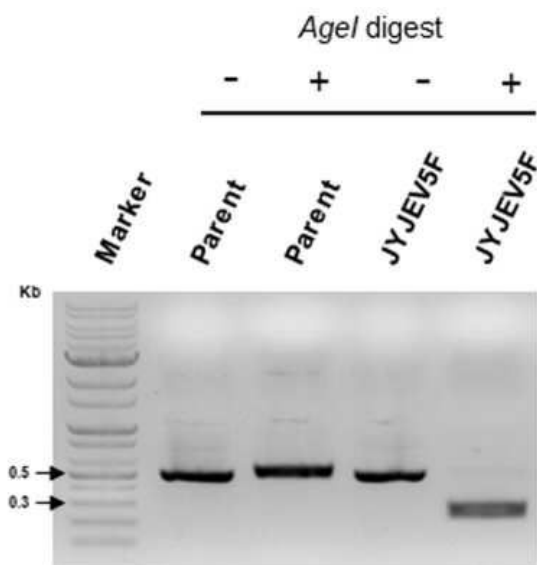
도면5



도면6



도면7



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.