

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2017년 9월 21일 (21.09.2017)



(10) 국제공개번호  
**WO 2017/160124 A2**

- (51) 국제특허분류:  
C07K 5/10 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)  
C12N 9/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002945
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 17일 (17.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2016-0032451 2016년 3월 18일 (18.03.2016) KR  
10-2017-0033689 2017년 3월 17일 (17.03.2017) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 성백린 (SEONG, Baik Lin); 03722 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동), Seoul (KR). 황범중 (HWANG, Beom Jeung); 03722 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

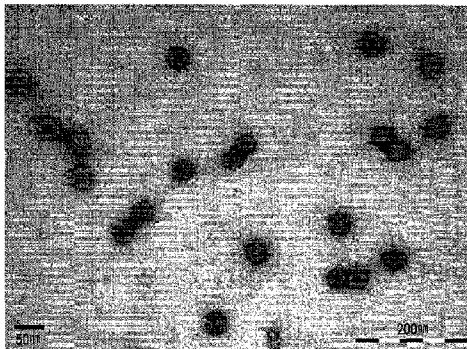
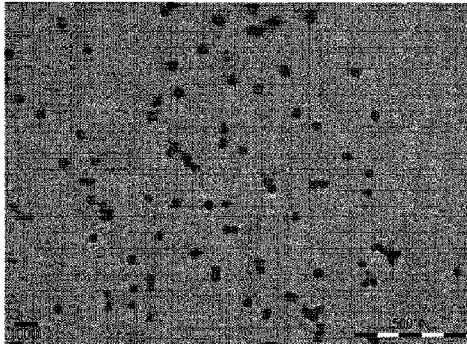
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: RECOMBINANT EXPRESSION VECTOR FOR PRODUCING NOROVIRUS VACCINE

(54) 발명의 명칭: 노로 바이러스 백신을 생산하기 위한 재조합 발현 벡터

[도 7a]



(57) Abstract: The present invention relates to a recombinant expression vector for producing a water-soluble norovirus vaccine, and more particularly, to a recombinant expression vector for producing a water-soluble norovirus vaccine, and a method for using same to produce a water-soluble norovirus vaccine. According to the present invention, a recombinant expression vector and a method for using same to produce a norovirus vaccine can not only efficiently produce a norovirus VLP vaccine from E. coli, but by enabling the production of a VLP that is structurally delicate, allows for the production of an inexpensive and highly efficient norovirus VLP vaccine.

(57) 요약서: 본 발명은 수용성 노로 바이러스 백신을 생산하기 위한 재조합 발현 벡터에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 수용성 노로 바이러스 백신을 생산하기 위한 재조합 발현 벡터 및 이를 이용한 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 발현 벡터 및 이를 이용한 노로 바이러스 백신 생산방법은 대장균에서 효과적으로 노로 바이러스 VLP 백신을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 구조적으로도 정교한 VLP 생산을 가능하게 함으로써, 저비용 고효율의 노로 바이러스 VLP 백신을 생산할 수 있게 되었다.



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 공개:  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**규칙 4.17 에 의한 선언서:**

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의  
예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를  
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 노로 바이러스 백신을 생산하기 위한 재조합 발현 벡터

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 수용성 노로 바이러스 백신을 생산하기 위한 재조합 발현 벡터에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 노로 바이러스 백신항원을 수용성으로 생산하고 이를 효율적으로 바이러스 유사입자로의 자가조립을 유도하는 재조합 발현 벡터 및 이를 이용한 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 노로 바이러스(Norovirus)는 전 세계적으로 위장염을 유발하는 병원체이며, 매년 20만 명의 5세 미만 개발도상국 어린이들이 노로 바이러스로 인해 사망한다. 칼리시바이러스과(Caliciviridae)에 속하는 노로 바이러스는 막이 없는 바이러스이며 직경은 약 30 ~ 40 nm 정도이다. 7.6 kbp 길이의 단일가닥 (+)RNA로 이루어져 있으며 3개의 ORF(open reading frame)를 가지고 있다. 이 중 ORF2에는 노로 바이러스의 형태를 이루는 주요 구조단백질 VP1이 코딩되어 있고, ORF3에는 VP2 단백질이 코딩되어 있으나 구조형성에 직접적으로 관여하지는 않는다. VP1은 전체 59 kDa 크기이며 이합체(dimer)를 이룬다. 이렇게 90개의 이합체가 자가 조립되어(self-assembly) 총 180개의 VP1이 하나의 바이러스 입자(particle)를 형성한다. VP1 단백질은 2개의 도메인(domain)으로 이루어지는데 S 도메인(S domain)이 구조를 이루는데 작용하고 P 도메인(P domain)은 실제적인 면역반응 유발에 관여한다.
- [4] 현재까지 노로 바이러스에 대한 세포 배양 방법은 알려진 바 없으며 적절한 동물모델 또한 개발되지 않은 상황이다. 따라서 효과적인 노로 바이러스 백신을 개발하기 위해서는 세포배양에 제한 받지 않는 VLP(Virus-Like Particles) 형태의 백신개발이 필수적이다. VLP는 바이러스 구조 단백질을 야생형 바이러스와 겉모습이 유사한 구조를 나타내도록 특이적으로 발현시킨 것으로서 매우 복잡하고 정교한 구조물이다. 야생형 바이러스와 그 구조가 유사하기 때문에 체내에서 높은 면역반응을 유도할 수 있으며 T-cell, B-cell 면역경로를 둘 다 자극할 수 있다는 장점이 있다. 또한 형성된 구조물 안에 유전물질이 없으므로 감염능력이 없어 높은 안전성을 가진다는 점과 뛰어난 구조적 안정성을 보인다는 것이 특징이다. 하지만 그 구조가 복잡하여 완전한 VLP를 만드는 것이 매우 어렵다는 단점이 있다.
- [5] 노로 바이러스 VLP는 주로 배칼로 바이러스-곤충세포에서 생산할 수 있으며, 효모에서도 VLP를 생산할 수 있다고 알려져 있다. 곤충을 이용한 VLP 백신 생산 방법은 VLP의 구조가 정교하다는 장점이 있지만 생산비용이 높고, 생산효율이

낮다는 문제점이 있었다. 또한 효모를 이용한 VLP 생산의 경우 역시 대장균 생산 시스템에 비해 고비용 및 저효율 방법이라는 점이 단점으로 지적되고 있다. 하지만 대장균(*E. coli*)에서는 구조 단백질(VP1)을 수용성으로 발현했다는 보고만 있을 뿐, VLP를 형성했다는 사실은 지금까지 알려진 바가 없다. 대장균 발현 시스템의 경우 대장균 자체의 세포분열이 너무 빠르고 전사후 수정(post-translation modification) 과정이 일어나지 않는다는 점 때문에 정교하게 폴딩된 단백질을 생산하기 어렵다고 알려져 있었다. 대장균에서 유래하는 노로 바이러스 VLP가 개발될 수 있다면 다른 발현시스템을 이용한 백신에 비해 저가형 백신의 공급이 가능할 것으로 기대된다.

- [6] 이에 본 발명자들은 대장균에서 생물학적 활성을 띄는 수용성 노로 바이러스 VLP를 다량으로 생산하는 방법을 제공하고자 예의 노력한 결과, 대장균에서 단백질의 수용성 발현을 향상시키는 융합 단백질을 노로 바이러스 VP1 단백질의 N-말단에 결합시킨 재조합 발현 벡터를 완성하고 이를 발현시킴으로써 수용성의 생물학적 활성을 갖는 노로 바이러스 VLP를 생산할 수 있게 되었다.

[7]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자, 1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자, 단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 유전자 및 노로 바이러스 유래 VP1 유전자 서열을 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터를 제공하는 데 있다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자, 1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자, 단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 유전자 및 노로 바이러스 유래 VP1 유전자 서열을 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터를 생산하는 단계, (b) 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 생산하는 단계 및 (c) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 융합 단백질의 발현을 유도하고, 이를 수득하는 단계를 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법을 제공하는 것이다.

[11]

### 과제 해결 수단

- [12] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자, 1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자, 단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 유전자 및 노로 바이러스 유래

- VP1 유전자 서열을 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 제조합 발현 벡터를 제공한다.
- [13] 본 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동 가능하게 연결된 타겟 단백질을 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가 단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택 마커 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [14] 본 명세서에 사용된 용어 "목적 단백질"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 제조합 발현 벡터에 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 숙주세포에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [15] 본 명세서에서 사용된 용어 "목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질"은 융합 단백질을 수용성 형태로 발현시킬 수 있다고 보고된 펩타이드를 말하고 GST(Glutathione S transferase), 말토오스 결합 단백질, 유비퀴틴, 타오레독신 등이 포함되며, 본 발명에서는 이에 한정하지 않고 일반적으로 알려진 수용성 발현 촉진 단백질이면 제한 없이 사용될 수 있다.
- [16] 본 발명에 있어서, 상기 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질은 hRBD, LysRS 또는 hRBD와 LysRS의 융합 단백질 중에서 선택될 수 있다.
- [17] 본 명세서에 사용된 용어 "hRBD(human RNA binding domain)" 또는 인간 아미노아실 tRNA 합성효소 N-말단 도메인"은 인간 유래 아미노아실 tRNA 합성효소 도메인 중 RNA가 결합하는 N-말단 도메인을 의미하는 것으로, 대장균이나 효모의 tRNA 합성효소에는 존재하지 않으며, 사이즈는 작지만 RNA와 상호작용하는 기능을 가지고 있는 서열로서, 특히 본 발명의 hRBD는 인간 유래 LysRS의 N-말단 도메인을 의미한다.
- [18] 본 명세서에 사용된 용어 "LysRS(lysyl tRNA synthetase)" 또는 "라이실 tRNA 합성효소"는 아미노아실 tRNA 합성효소의 일 구성원으로서, 몇몇 포유류에서 아미노아실 tRNA 합성효소를 구성하는 단백질의 다양한 기능을 조절하기 위하여 분자 저장소로서 작용하는 거대 분자 복합체를 형성한다.
- [19] 본 명세서에 사용된 용어 "융합 단백질" 또는 "제조합 단백질"은 원래의 목적 단백질 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다.
- [20] 본 발명의 일실시예에서, 상기 hRBD는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열인 것일 수 있다.
- [21] 본 발명의 또 다른 일실시예에서, 상기 LysRS는 서열번호 3으로 표시되는 LysRS 유래 펩타이드 서열인 것일 수 있다.
- [22] 본 발명의 또 다른 일실시예에서, 상기 hRBD와 LysRS 융합 단백질은 서열번호

5로 표시되는 아미노산 서열인 것일 수 있다.

- [23] 본 발명에 있어서, 상기 1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자는 서열번호 7로 표시되는 것일 수 있다.
- [24] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 절단효소는 TEV일 수 있으며, 구체적으로 상기 TEV 인식 부위를 코딩하는 서열은 서열번호 8로 표시되는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명은 또한 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [26] 본 명세서에서 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 발현 벡터를 형질전환시키는 방법은 전기천공법(electrophoration), 인산칼슘( $\text{CaPO}_4$ )법, 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ )법, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법 또는 초산 리튬-DMSO법을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것을 아니다.
- [27] 본 발명에 따른 숙주세포에 있어서, 상기 숙주세포는 DNA 도입 효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주세포가 바람직하며, 원핵 및 진핵을 포함한 모든 미생물이 사용될 수 있다. 바람직하기는, 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)일 수 있다.
- [28] 본 발명은 또한 (a) 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자, 1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자, 단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 유전자 및 노로 바이러스 유래 VP1 유전자 서열을 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터를 생산하는 단계, (b) 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 생산하는 단계 및 (c) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 융합 단백질의 발현을 유도하고, 이를 수득하는 단계를 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법을 제공한다.
- [29]

### 발명의 효과

- [30] 본 발명의 재조합 발현 벡터 및 이를 이용한 노로 바이러스 백신 생산 방법은 대장균에서 효과적으로 노로 바이러스 VLP 백신을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 구조적으로도 정교한 VLP 생산을 가능하게 함으로써, 저비용 고효율의 노로 바이러스 VLP 백신을 생산할 수 있게 되었다.

[31]

### 도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 수용성 노로 바이러스 생산용 재조합 발현 벡터의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [33] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 발현된 VP1 단백질의 수용성 여부를 SDS-PAGE로 확인한 결과이다. (A)는 과발현 후 37°C에서 3시간 배양한 결과, (B)는 과발현 후 16°C에서 하룻동안 배양한 결과이고, 각각의 경우 왼쪽 패널은

hRBD가 재조합 되어 있는 VP1(69 kDa)의 발현 결과, 오른쪽 패널은 대장균 VP1(59 kDa)의 결과이다.

- [34] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 발현된 VP1 단백질을 니켈 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하고 확인한 크로마토그램 결과이다.
- [35] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 발현된 VP1 단백질을 정제한 후 SDS-PAGE로 확인하였고, 18 ~ 20레인의 분획을 풀링(pooling)한 결과이다.
- [36] 도 5는 TEV 단백질 절단효소를 이용하여 노로 바이러스 VP1을 절단한 후 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다.
- [37] 도 6은 TEV 단백질 절단효소로 절단한 후 형성된 VLP를 정제하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행한 결과를 나타낸 크로마토그램(A) 및 SDS-PAGE(B) 결과이다.
- [38] 도 7은 노로 바이러스 VLP의 형성 여부를 TEM을 통해 확인한 결과이다(A: 대장균 유래 노로 바이러스 VLP, B: 야생형 노로 바이러스, C: hRBD가 융합되어 있는 VP1).
- [39] 도 8은 곤충세포 유래 VLP(A)와 대장균 유래 VLP(B)에 대한 ELISA 실험 결과이다.
- [40] 도 9는 대장균 유래 VLP가 노로 바이러스 백신으로써 실제 효능을 가질 수 있는지 HBGA 결합 분석을 통해 확인한 결과이다.

[41]

### 발명의 실시를 위한 형태

- [42] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[43]

#### [44] 실시예 1. 재조합 발현 벡터 제작 및 VP1 단백질 발현

[45]

- [46] 대장균을 통한 노로 바이러스 VLP 생산에는 Norovirus Hu/GII.4/Hiroshima/55/2005/JPN 유래 VP1 유전자가 이용되었으며, 해당 VP1 유전자는 IVI(International Vaccine Institute)로부터 제공받았다.

- [47] pGE-RBD3 벡터가 발현 벡터로 이용되었으며 위 벡터는 pGE-LysRS3 벡터에서 LysRS 유전자 대신 LysRS의 RNA 결합 도메인 부분만을 지정하는 유전자로 대체 편집하여 제작하였다. 구체적으로, pGE-RBD3 벡터에 XbaI과 KpnI 제한효소를 처리하여 절단하였으며, 잘려진 발현 벡터 내에 hRBD(서열번호 1)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열번호 2), 6개의 히스티딘 태그(Histag)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열번호 7), TEV 인식 서열(ENLYFQ)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열번호 8) 및

VP1(서열번호 9)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열번호 10)이 연속적으로 구성되어 있는 DNA 절편을 삽입하였다(도 1). 이렇게 완성된 재조합 플라스미드를 대장균 숙주 HMS174에 형질전환 하였다. 단백질을 발현하기 위한 최소배양은 50 µg/ml 암피실린이 들어간 3 ml LB 배지에 37°C에서 하룻동안 배양한 후, 같은 농도의 암피실린이 들어간 15 ml의 LB 배지에 전일 배양한 대장균 1 ml를 첨가하여 37°C에서 O.D600nm가 0.5 ~ 0.7에 도달할 때까지 배양하였다. 적정 O.D 값에 도달하였을 때 1 mM IPTG로 과발현을 유도하였으며 IPTG 첨가 후에는 37°C에서 3시간, 16°C에서 하룻동안 배양하여 발현시켰다. hRBD, 6xHis, TEV 서열이 포함되어 있지 않은 대조군 VP1도 동일한 조건에서 발현시켰으며, 발현된 단백질을 채취하여 SDS-PAGE를 통하여 수용성 여부를 확인하였다.

- [48] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 37°C에서는 대조군 VP1 과 재조합 VP1 모두 불수용성으로 발현되었으나(도 2A), 16°C에서 발현하였을 때 대조군 VP1은 약 90%이 불수용성 형태로 발현된 반면, 재조합 VP1은 대조군 VP1에 비해 획기적으로 수용성이 향상되어 발현되었으며 발현량 또한 대조군 VP1 보다 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 2B). 이로부터 hRBD가 대장균에서 VP1 단백질 발현의 수용성을 증진시킬 수 있는 적합한 융합 파트너임을 알 수 있었다.

[49]

[50] 실시예 2. 단백질 정제

[51]

- [52] 수용성이 확인된 단백질들은 니켈(Ni) 친화성 크로마토그래피를 통하여 정제되었다. 위와 동일한 방식의 배양방법을 이용하여 3 ml, 50 ml를 거쳐 최종적으로 500 ml의 대장균을 발현 및 수확한 뒤 정제를 진행하였다. 구체적으로, A 버퍼 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM 염화나트륨, 10% 글리세롤, 2 mM 2-머캅토에탄올, 트리톤X-100 0.05%, 및 10 mM 이미다졸] 로 먼저 이퀄리브리엄 하였고 이퀄리브리엄 한 Ni-NTA 컬럼 레진(GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 샘플 단백질을 정제하였다. A 버퍼 이후 B 버퍼[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM 염화나트륨, 10% 글리세롤, 2 mM 2-머캅토에탄올, 트리톤X-100 0.05% 및 300 mM 이미다졸]를 이용해 10 ~ 300 mM 범위의 직선형 그라디언트 이미다졸로 단백질을 용출시켰다. SDS-PAGE를 통해 타겟 단백질을 포함하는 분획을 확인한 후 해당 분획을 모아 C 버퍼(저장버퍼) [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 및 0.1% Tween 20]를 이용하여 투석하였다. 최종적으로 정제된 단백질의 농도는 BSA(Amresco, Solon, OH, USA)를 이용하여 정량하였으며, 그 결과 5.38 mg/ml 의 VP1 단백질을 얻었다. 정제된 VP1 단백질은 30% 글리세롤(glycerol)을 1:1비율로 섞은 후 -20°C에서 보관하였다.

- [53] 니켈 친화성 크로마토그래피로 정제된 VP1을 확인한 결과를 도 3에

나타내었고, SDS-PAGE를 통해 정제 여부를 확인한 결과를 도 4에 나타내었다.

[54]

[55] 실시예 3. TEV 단백질 절단효소의 세포 내 발현

[56]

[57] 상기에서 발현 및 정제된 단백질이 TEV 단백질 절단효소(AcTEV Protease, Cat. 12575-015, Invitrogen life technology)에 의해 적절하게 절단되는지 확인하였다. 실험은 25°C에서 진행하였으며 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간, 7시간의 간격을 두어 점차적으로 퓨전 파트너 단백질의 절단 여부를 확인하였으며, 그 결과 정제된 VP1 단백질은 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간, 7시간에서 TEV 단백질 절단효소에 의해 순차적으로 절단되는 것을 확인하였다(도 5A).

[58] 다음으로 각 시간 별로 TEV 단백질 절단효소 절단 후 채취한 RBD가 제거된 VP1 단백질 샘플은 원심분리를 통해 수용성 영역과 불수용성 영역을 구분하였고, 이를 통해 효소 절단 후 타겟 단백질의 수용성 여부에 변화가 있는지 확인한 결과, 모두 수용성으로 존재하는 것을 확인하였다(도 5B).

[59] 아울러, VP1 단백질은 일반적으로 이합체(dimer)를 이루는 형태로 존재하고 각각의 이합체가 모여 VLP를 이루는 것으로 알려져 있다. 대장균을 이용해 발현한 VP1 단백질 역시 이합체를 이루는지 확인하기 위해 16°C에서 하룻동안 TEV 단백질 절단효소로 절단시킨 VP1과 절단시키지 않은 VP1(hRBD-VP1)를 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. DTT가 첨가 또는 제거된 SDS 로딩 염료(loading dye)에 VP1을 섞고, 가열(boiling) 여부를 구분하여 샘플을 로딩한 후, SDS-PAGE 겔에 내려 비교하였다. 그 결과, 재조합 VP1 과 TEV 단백질 절단효소에 의해 절단된 VP1 모두 이합체를 형성하는 것을 확인할 수 있었다(도 5C). hRBD가 융합된 VP1에서도 이합체를 형성하는 이유는 이합체를 형성할 때 대칭으로 이루어 지면서 N-말단에 부착된 hRBD가 VP1의 양쪽에 배치되어 구조형성에 큰 영향을 미치지 않기 때문인 것으로 보인다.

[60]

[61] 실시예 4. 크기 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)

[62]

[63] TEV 단백질 절단효소로 절단시킨 VP1 단백질의 이합체가 VLP를 형성하는지 여부를 확인하기 위한 생화학적 분석을 수행하였다. 구체적으로, 4°C에서 Superdex-200 분석 겔-여과 컬럼(analytical gel-filtration column)을 통하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 진행하였다.

[64] 전날 AcTEV 단백질 절단효소를 이용하여 4°C에서 하룻동안 융합 단백질을 절단시켰다. 컬럼에는 버퍼[Ammonium acetate 250 mM (pH 6.0)]로 이퀄리브리엄을 진행하였고, 이퀄리브리엄 종료 후에 융합 파트너 단백질이 절단된 VP1 샘플을 로딩하여 정제하였다. 정제 후 페리틴(440 kDa), 알돌레이즈(158 kDa), 콘알부민(75 kDa), 오발부민(44 kDa), 블루 텍스트란 2000(GE Healthcare)을 이용하여 칼리브레이션을 진행함으로써

크로마토그램(chromatogram) 상에서 피크(peak)로 나타난 단백질의 분자량을 결정하였다.

- [65] 종래 연구 결과에 의하면 노로 바이러스 VLP는 10 MDa 의 분자량을 보이고 우리가 사용한 컬럼의 최대 정제 한계가 800 kDa이므로 VLP를 적절하게 형성하였을 때 Void에서 정제될 것이라고 가정하였다. 크로마토그램을 확인한 결과 Void에서 노로 바이러스 VLP로 보이는 높은 피크를 확인할 수 있었으며(도 6A), 정제하여 수확한 분획들을 SDS-PAGE로 확인해본 결과 크로마토그램의 void에서 나타난 피크가 노로 바이러스 VLP에 해당함을 확인할 수 있었다(도 6B). 또한 TEV 단백질 절단효소에 의해 잘려진 hRBD 또한 크로마토그래피를 통하여 정제되었음을 확인할 수 있었다.

[66]

[67] 실시예 5. 전자 현미경을 통한 VLP 형성 확인

[68]

- [69] Void에서 정제된 VP1 단백질이 VLP를 형성했는지 확인하기 위하여 전자 현미경으로 관찰하였다. 정제된 노로 바이러스 VLP를 먼저 구리 그리드에 1분 간 올린 뒤 2% 아세트산 우라닐(uranyl acetate)을 이용하여 15초 간 염색하였다. 전 처리한 샘플을 30분 간 상온에서 건조시킨 뒤 투과 전자 현미경(TEM, Transmission electron microscopy; JEM-1011, JEOL, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 위 실험은 연세대학교 의과대학 의생명연구원 연구지원부에서 수행하였다.

- [70] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 정제된 VP1 단백질이 VLP를 형성하는 것을 확인할 수 있었다(도 7A). 확인된 VLP의 직경은 34 nm 였으며, 배큘로바이러스-곤충세포 발현시스템을 이용하여 생산한 노로바이러스 VLP와 야생형 노로바이러스(도 7B)의 직경과 비슷하였다. 반면, TEV 단백질 절단효소로 단백질 절단하지 않고 hRBD가 융합되어 있는 VP1은 VLP를 형성하지 못하고 응집되는 것을 확인할 수 있었다(도 7C).

[71]

[72] 실시예 6. 항체 획득 및 ELISA를 통한 혈청 항체 역가 측정

[73]

- [74] 마우스 실험은 6주령 BALB/c(Orient-bio)를 이용하였으며 2회에 걸쳐(1일차, 21일차) 접종하였다. 대장균 유래 VLP와 배큘로바이러스-곤충세포 유래 VLP 에 대하여 각각 그룹(n = 3)을 구분하였으며 각 그룹에는 5 µg의 단백질에 항원보강제(Imject™ Alum adjuvant, Thermo SCIENTIFIC, 40 µg)를 섞어 주어 근육주사를 통하여 접종하였다. PBS와 아세트산 암모늄(ammonium acetate)을 접종한 쥐는 대조군으로 사용하였다. 4회에 걸쳐(0일차, 21일차, 28일차, 42일차) 전신 마취(Alfaxalone (3-α-hydroxy-5-α-pregnane-11,20-dione) 40 µg/mouse, Xylazine 0.4 mg/mouse) 후 눈 출혈을 통하여 혈액을 채취하였으며 채취한 혈액은 4°C에서 하룻동안 혈구를 가라앉힌 뒤 다음날 30분간 원심분리 하여 혈청표본을

채취 후 -80°C에서 보관하였다. 위 실험계획은 연세 실험동물연구센터(YLARC) (Permit number: IACUC-A-201609-388-03)에서 평가 및 승인되었다.

[75] 배칼로바이러스-곤충세포 VLP 및 대장균 VLP와 동물실험을 통해 얻은 대장균 VLP, 배칼로바이러스-곤충세포 VLP에 대한 혈청 사이에 항원-항체 교차반응성이 있는지 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)을 이용하여 확인하였다.

[76] 구체적으로, 96-칸 Nunc 플레이트(Thermo Fisher Scientific)에 2 µg/ml 농도의 곤충세포 유래 VLP 및 대장균 유래 VLP로 100 µl/well씩 코팅하였으며 4°C에서 하룻동안 보관하였다. 플레이트를 PBS에 0.05% Tween 20을 포함시킨 PBS-T를 이용하여 3회 세척한 뒤 1% BSA가 포함되어있는 PBS를 이용하여 상온에서 1시간 블로킹(blocking)함으로써 다른 단백질의 코팅을 차단하였다. 다음으로 PBS-T로 다시 플레이트를 3회 세척하고, 곤충세포 유래 VLP와 대장균 유래 VLP를 각각 마우스에 접종하여 얻은 혈청을 100 µl/well씩 넣은 후 상온에서 1시간 반응시켰다. 첫 번째 웰에 1/100으로 희석된 혈청을 넣고, 두 번째 웰부터는 순차적으로 1/2로 희석한 혈청을 넣어 반응시켰으며, 희석에는 0.05% Tween 20, 0.25% BSA가 포함된 PBS를 이용하였다. 1차 항체 처리 후 PBS-T로 3회 플레이트를 세척한 뒤 HRP가 부착된 2차 항 토끼 IgG 염소항체를 1/10,000로 희석하여 100 µl/well씩 넣은 후 상온에서 1시간 동안 반응시킴으로써 2차 항체 처리를 하였다. PBS-T로 3회 세척한 플레이트에 3,3', 5,5'-테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB) 용액(BD Biosciences) 100 µl를 각각의 웰에 첨가한 뒤 해당 플레이트를 상온에서 30분 동안 현상하였다. 50 µl/well의 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(Blue to yellow)를 통해 비색 반응(colorimetric reaction)을 중단하였고, ELISA 판독기를 통해 450 nm에서의 흡광도(O.D.)를 측정하였다.

[77] 그 결과 곤충세포 유래 VLP를 플레이트에 코팅한 뒤 대장균 VLP를 접종하여 얻은 혈청을 반응시켰을 때에 높은 항원-항체 반응성을 보이는 것을 확인할 수 있었고(도 8A), 반대로 대장균 유래 VLP를 플레이트에 코팅한 뒤 곤충세포 유래 VLP를 접종하여 얻은 혈청을 반응시켰을 때에도 항원-항체 반응성이 있음을 확인할 수 있었다(도 8B).

[78]

[79] 실시예 7. HBGA 결합 및 블로킹 시험

[80]

[81] 대장균에서 생산한 VLP가 충분한 마우스 면역원성을 가지는지 확인한 후 대장균에서 생산한 VLP가 노로 바이러스 백신으로써 실질적으로 효능을 가지는지 HBGA 결합 분석(binding assay)을 통해 간접적으로 확인하였다.

[82] 구체적으로, 96-칸 Nunc 플레이트(Thermo Fisher Scientific)의 첫 번째 칸에 대장균 유래 VLP 5 µg를 코팅한 후 나머지 웰에 1/2로 연속적으로 희석하였으며 상온에서 5시간 동안 코팅하였다. 세척버퍼 [PBS, 0.05% Tween 20(PBS-T)]로 각각의 웰을 세척한 뒤 1% BSA가 포함되어 있는 PBS로 블로킹하였다. 블로킹은

4°C에서 하룻동안 진행되었다. 세척과정을 거친 후 20 µg/ml 농도의 비오틴(biotin)이 부착된 Type 2 HBGA(Glycotech, USA, Cat.01-034)를 각각의 웰에 100 µl씩 넣고 상온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 반응 뒤 각각의 웰을 세척한 뒤 스트라프타비딘(streptavidin)이 부착된 HRP(Horseradish peroxidase; Thermo scientific, Cat. 21124)를 2 mg/ml 농도로 각각의 웰에 100 µl씩 넣어주어 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 그리고 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB) 용액(BD Biosciences) 150 µl를 각각의 웰에 첨가하여 상온에서 20분 동안 현상하였다. 현상 후 50 µl/well의 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(Blue to yellow)를 통해 비색 반응(colorimetric reaction)을 중단하였고 효소결합 면역흡수 분석법(ELISA) 판독기를 통해 450 nm에서의 흡광도(O.D.)를 측정하였다.

- [83] 그 결과, 5 µg 대장균 유래 VLP로 코팅한 웰에서는 흡광도가 1.0로 나타났고, 이로부터 대장균에서 유래한 VLP 또한 HBGA에 결합하는 능력이 있음을 알 수 있었다(도 9).

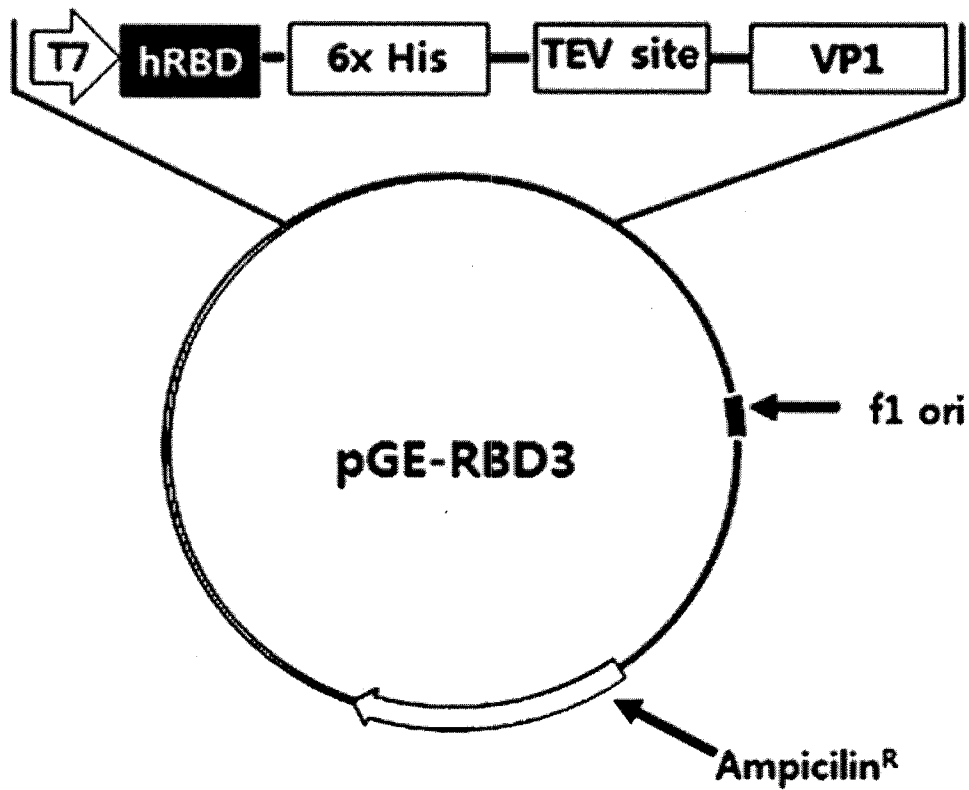
## 청구범위

- [청구항 1] 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자;  
1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자;  
단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 유전자; 및  
노로 바이러스 유래 VP1 유전자 서열  
을 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,  
상기 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질은 hRBD, LysRS 또는  
hRBD와 LysRS의 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 수용성 노로  
바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,  
상기 hRBD는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열인 것을 특징으로  
하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서,  
상기 LysRS는 서열번호 3으로 표시되는 LysRS 유래 펩타이드 서열인  
것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터.
- [청구항 5] 제 2항에 있어서,  
상기 hRBD와 LysRS 융합 단백질은 서열번호 5로 표시되는 아미노산  
서열인 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합  
벡터.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,  
상기 1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자는 서열번호 7로 표시되는  
것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서,  
상기 단백질 절단효소는 TEV인 것을 특징으로 하는 수용성 노로  
바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서,  
상기 단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 유전자는 서열번호 8로  
표시되는 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합  
발현 벡터.
- [청구항 9] 제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 따른 발현벡터로 형질전환된  
숙주세포.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서,  
상기 숙주세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 형질전환 숙주세포.
- [청구항 11] (a) 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자, 1  
내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자, 단백질 절단효소 인식 부위를  
코딩하는 유전자 및 노로 바이러스 유래 VP1 유전자 서열을 포함하는

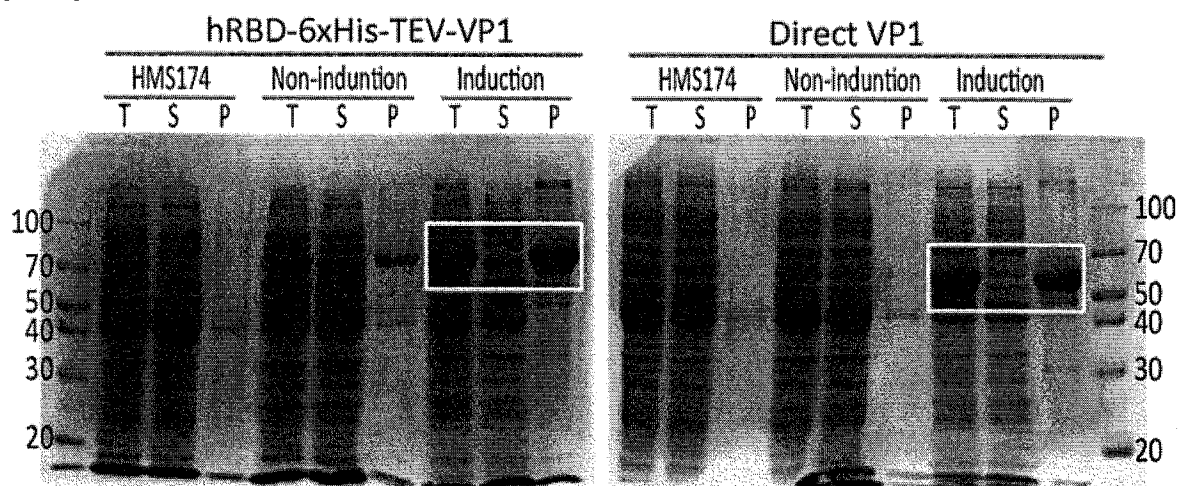
수용성 노로 바이러스 백신 생산용 재조합 발현 벡터를 생산하는 단계;  
 (b) 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 생산하는 단계;  
 및  
 (c) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 융합 단백질의 발현을 유도하고,  
 이를 수득하는 단계를 포함하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.

- [청구항 12] 제 11항에 있어서,  
 상기 목적 단백질의 수용성 발현을 촉진하는 단백질은 hRBD, LysRS 또는 hRBD와 LysRS의 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서,  
 상기 hRBD는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.
- [청구항 14] 제 12항에 있어서,  
 상기 LysRS는 서열번호 3으로 표시되는 LysRS 유래 펩타이드 서열인 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.
- [청구항 15] 제 12항에 있어서,  
 상기 hRBD와 LysRS 융합 단백질은 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.
- [청구항 16] 제 11항에 있어서,  
 상기 1 내지 6개의 히스티딘을 코딩하는 유전자는 서열번호 7로 표시되는 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.
- [청구항 17] 제 11항에 있어서,  
 상기 단백질 절단효소는 TEV인 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.
- [청구항 18] 제 11항에 있어서,  
 상기 단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 유전자는 서열번호 8로 표시되는 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.
- [청구항 19] 제 11항에 있어서,  
 상기 숙주세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 수용성 노로 바이러스 백신 생산방법.

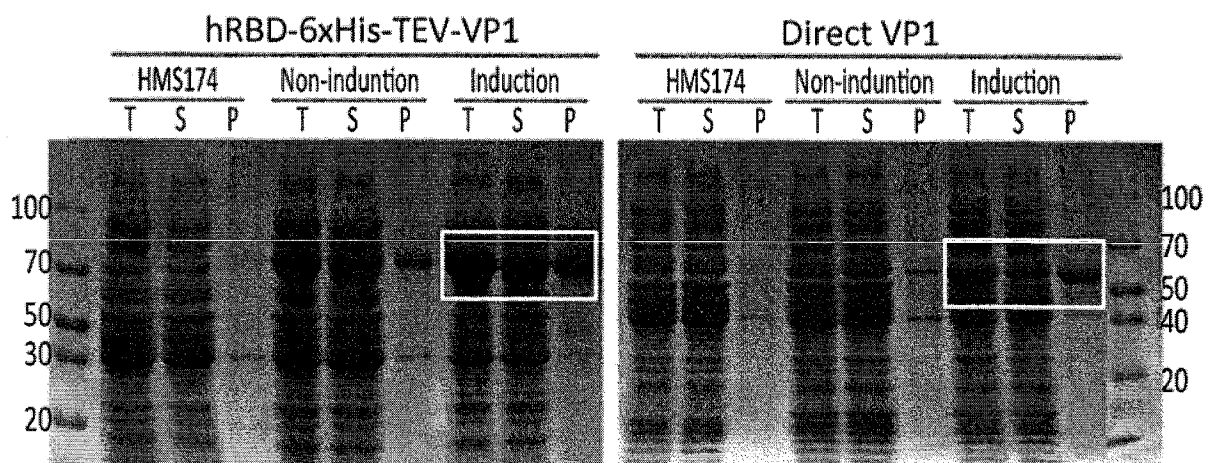
[도 1]



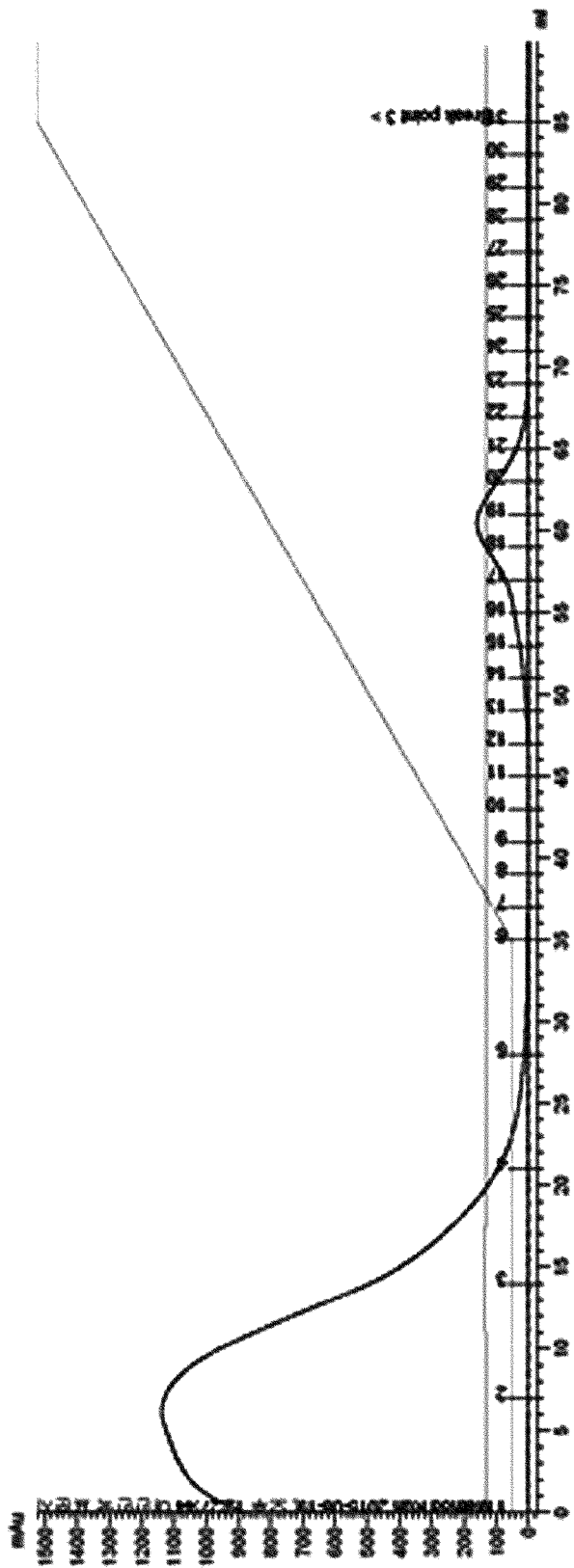
[도 2a]



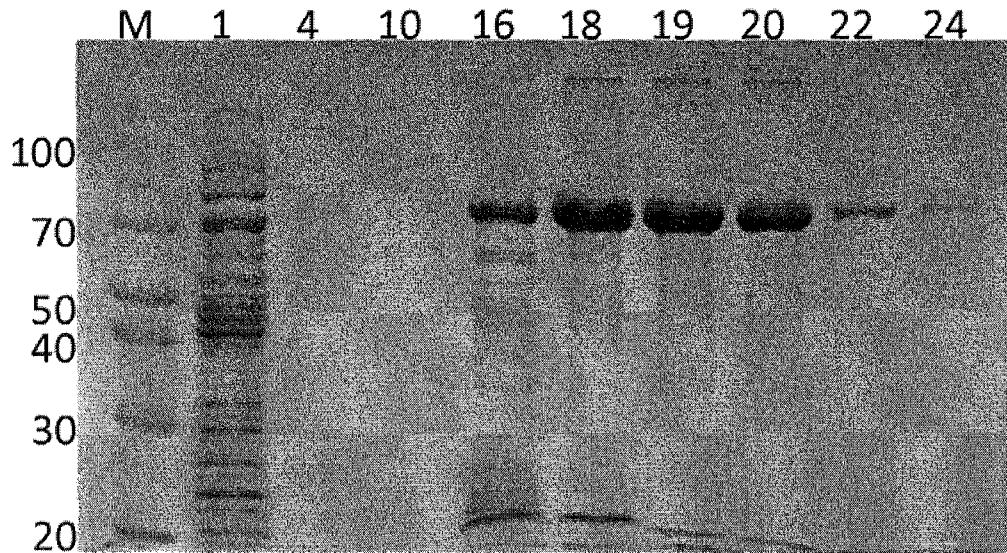
[도 2b]



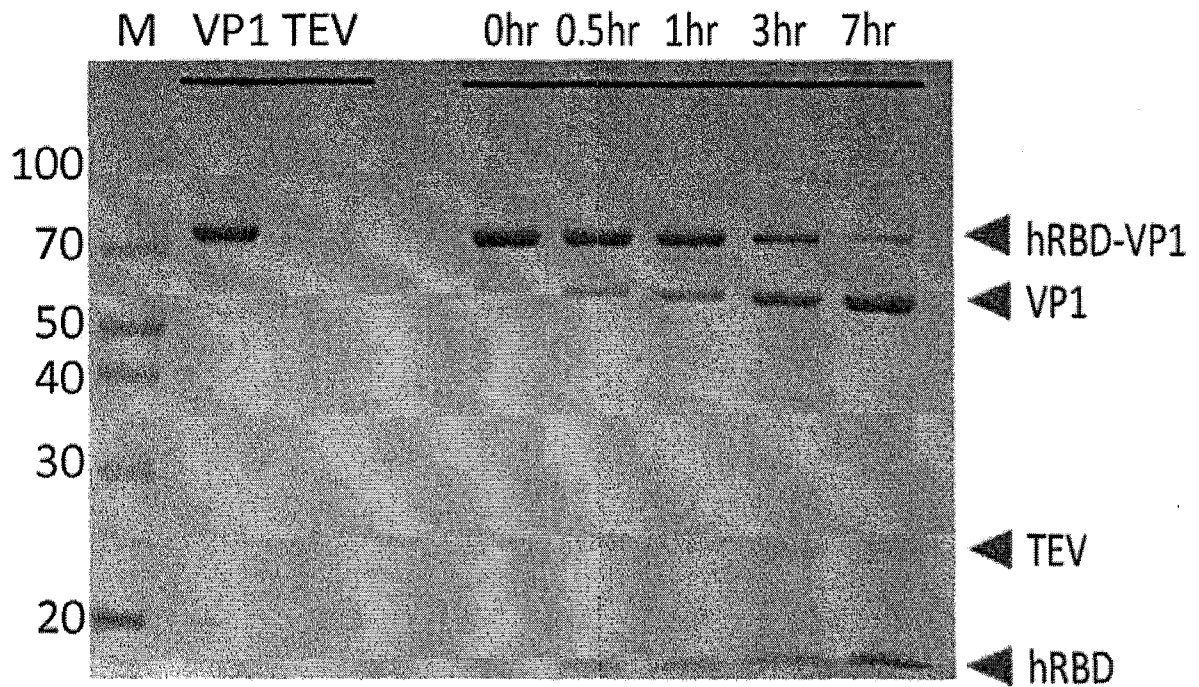
[도3]



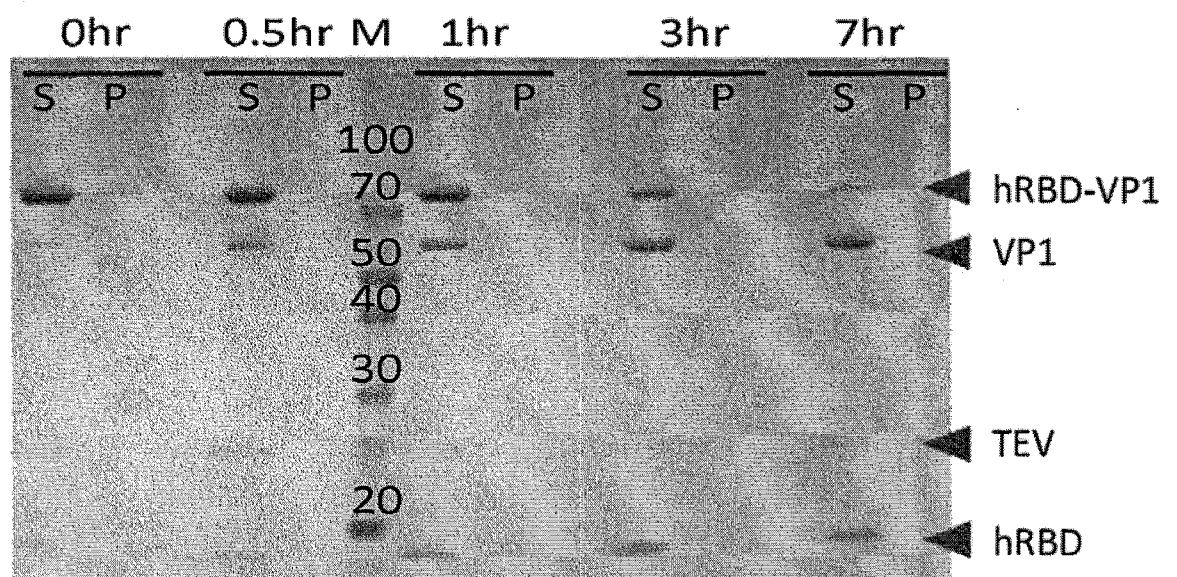
[도4]



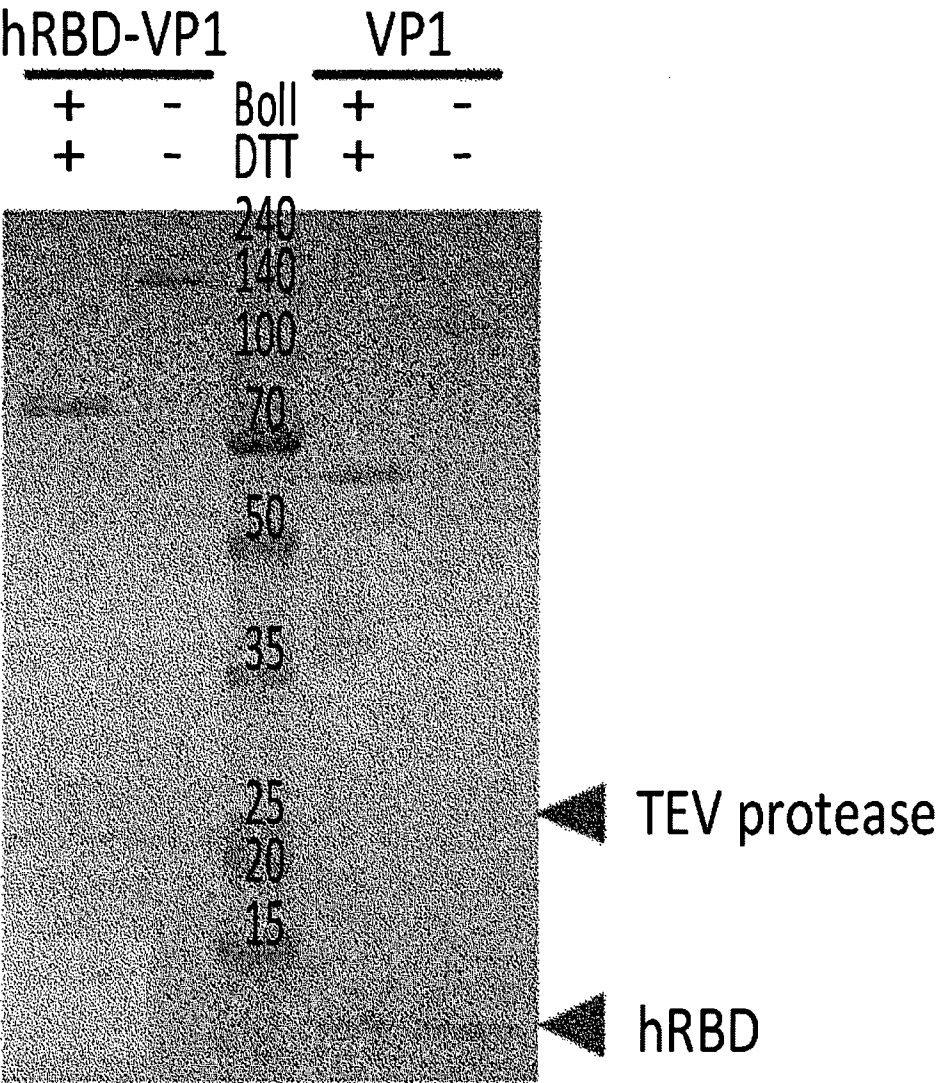
[도5a]



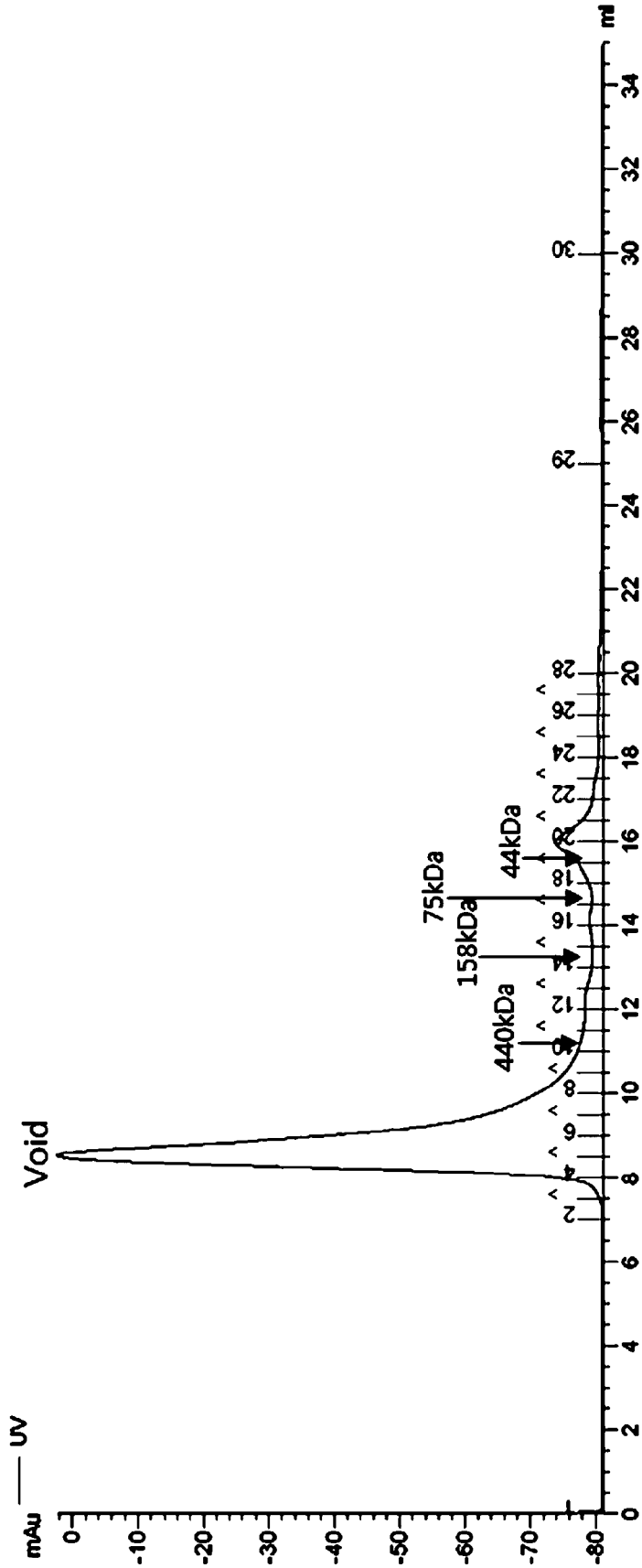
[도5b]



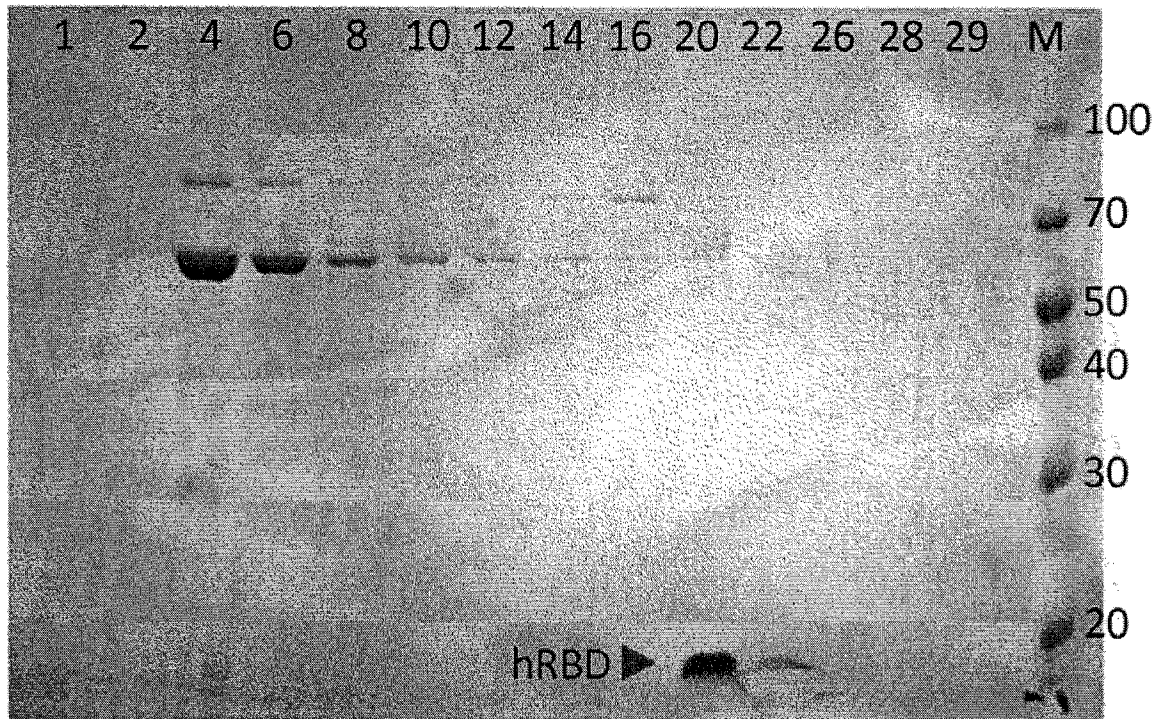
[도5c]



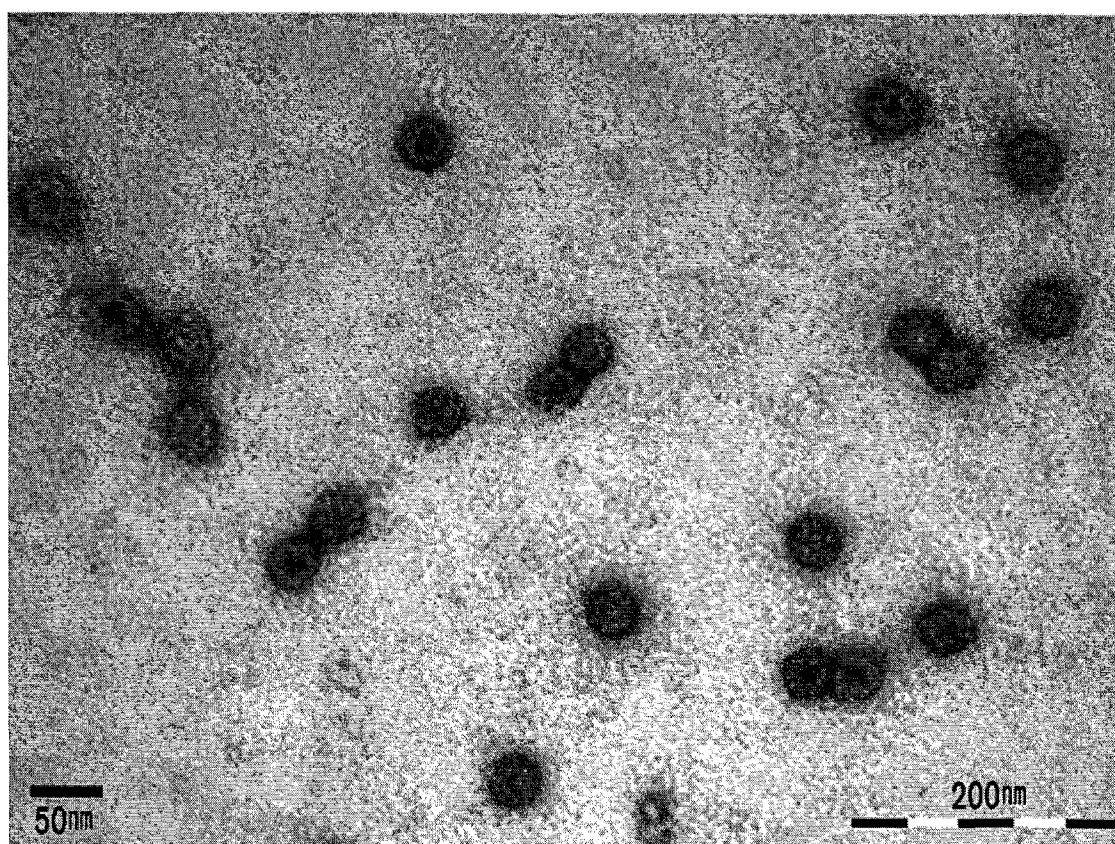
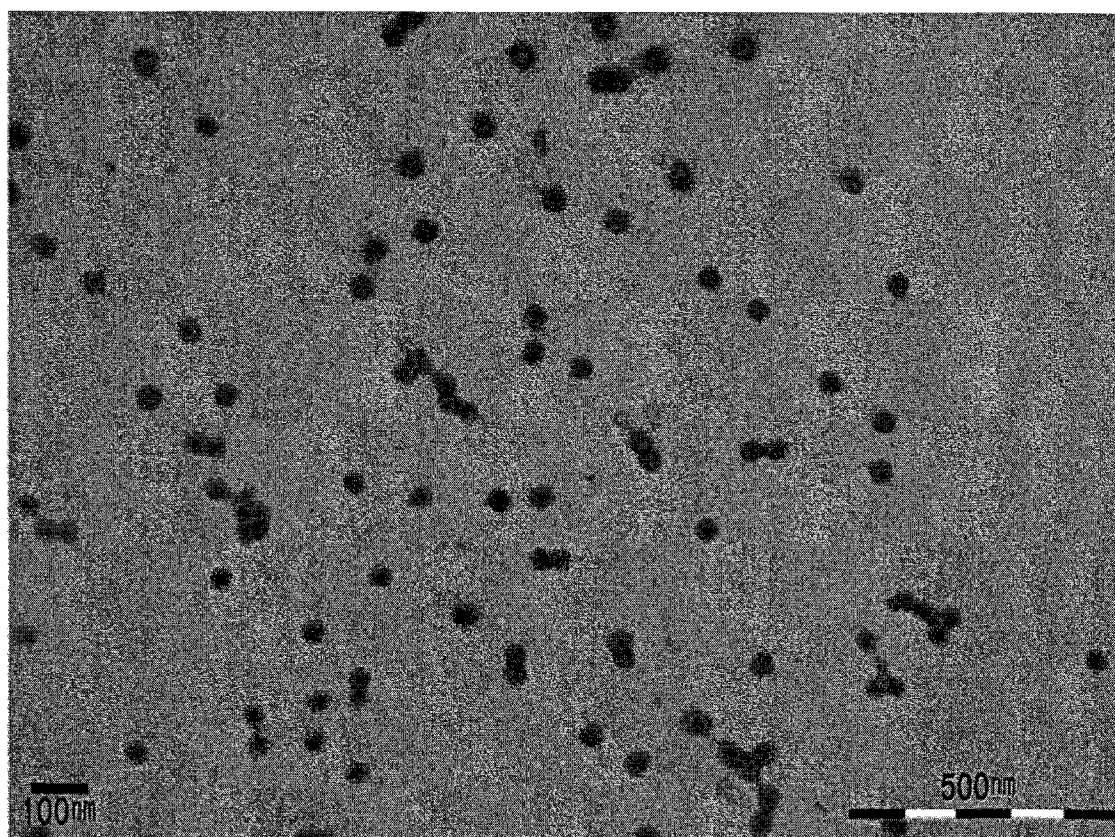
[도6a]



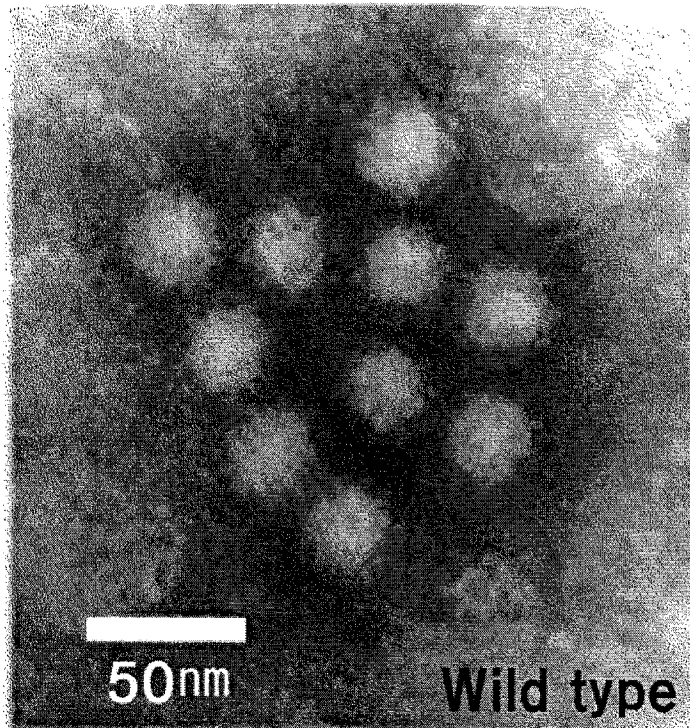
[도6b]



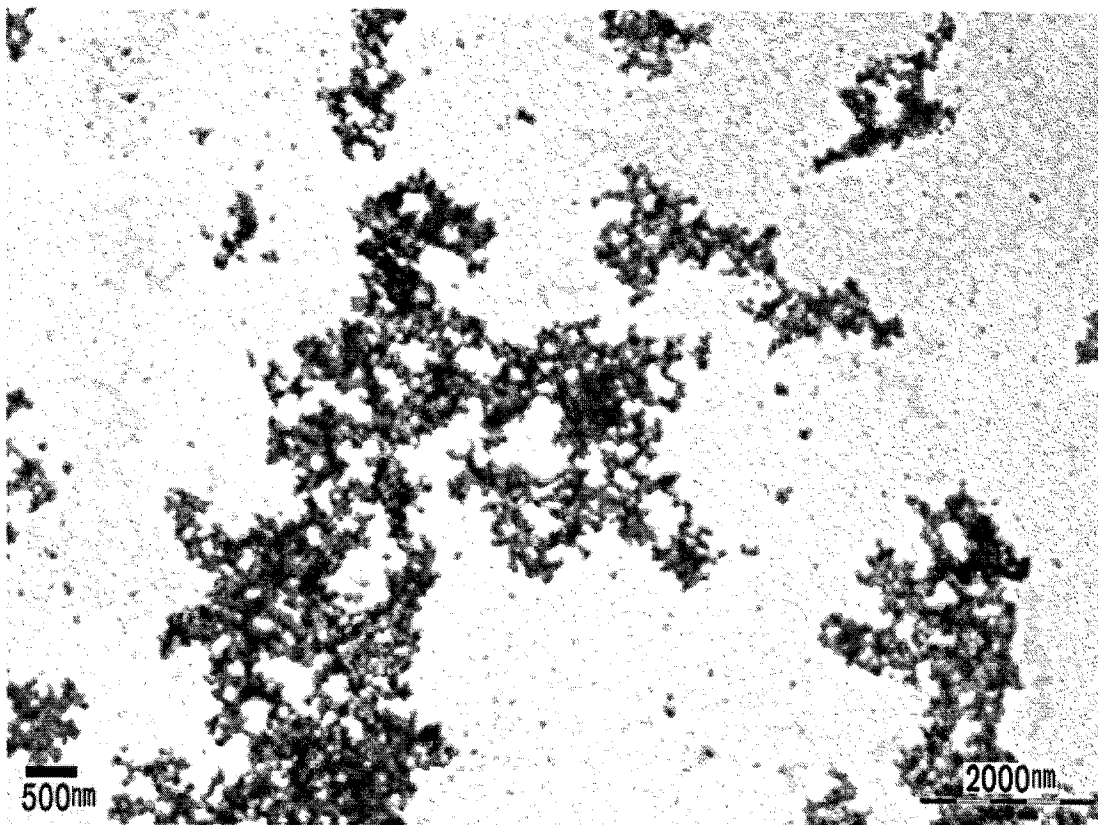
[도7a]



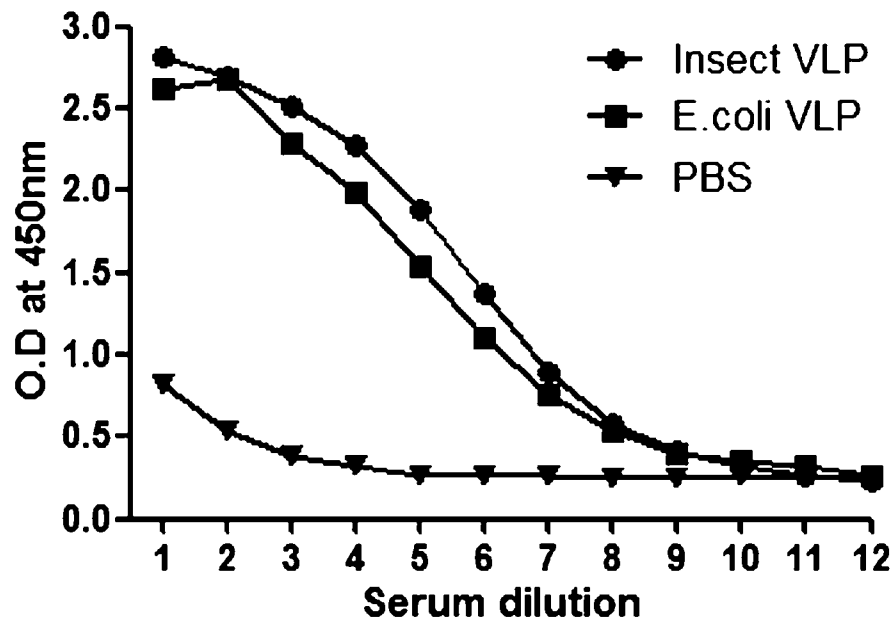
[도7b]



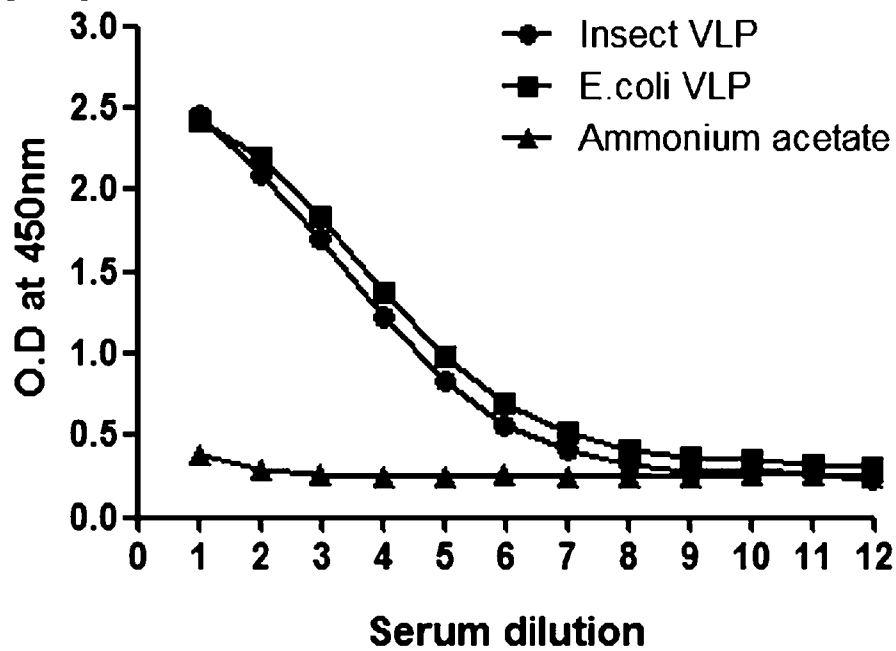
[도7c]



[도8a]



[도8b]



[도9]

**HBGA binding assay**