

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0105751 (43) 공개일자 2012년09월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/44 (2006.01) C07K 14/11 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0023380 (22) 출원일자 2011년03월16일 심사청구일자 없음		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 정인식 서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 삼성래미안 102동 1102호 (도곡동) 김원용 서울특별시 용산구 이촌로71길 10, 213동 503호 (이촌동, 한가람아파트) (뒷면에 계속)

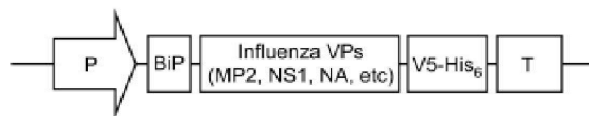
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 곤충세포 (드로소필라 멜라노게스터 에스2 세포) 발현시스템을 이용한 재조합 인플루엔자 바이러스 백신소재 단백질 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 형질전환된 곤충세포, 드로소필라 멜라노게스터 (*Drosophila melanogaster*) S2 세포를 이용하여 효율적으로 재조합 인플루엔자 바이러스 백신소재 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포를 인플루엔자 바이러스 구성단백질 유전자가 삽입되어 있는 재조합 플라스미드로 안정하게 형질전환시킴으로써 기존의 다른 발현시스템에 비해서 높은 수율로 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 효율적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박중화

서울특별시 송파구 성내천로6길 9-12, 302호 (오
금동)

김경일

부산광역시 서구 충무동2가 충무아파트 B동 405호

유기현

인천광역시 부평구 부개1동 251-2 동원아파트 90
5동 403호

특허청구의 범위

청구항 1

드로소필라 멜라노게스터 (*Drosophila melanogaster*) S2 세포를 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 플라스미드 pKHU101로 형질전환시키고, 배양함을 특징으로 하여 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 플라스미드 pKHU101이 플라스미드 pMT/BiP/V5-His 및 인플루엔자 바이러스 유전자에서 제조하는 방법.

청구항 3

인플루엔자 바이러스 구성단백질 cDNA를 함유하는 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 재조합 플라스미드 pKHU101.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 드로소필라 멜라노게스터 S2 (*Drosophila melanogaster* Schneider 2) 세포를 이용하여 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 효율적으로 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포를 인플루엔자 바이러스 구성단백질 유전자가 삽입되어 있는 재조합 플라스미드로 안정하게 형질전환시킴으로써 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 효과적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

인플루엔자 예방을 위한 백신은 현재 계란을 이용한 방법을 주로 이용하고 있다. 계란을 이용한 인플루엔자 백신 제조 방식은 비교적 긴 시간이 소요되고 (6개월) 그 생산과정이 복잡하여 대유행 인플루엔자의 확산에 신속하게 대응하기 위한 백신 제조 방법으로는 적절치 않으며 보다 빠르고 유연성 있는 백신 생산 제조 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0003]

불활성화백신 및 약독화백신의 단점을 극복하기 위해 개발된 바이러스 유사입자 (VLP, virus-like particle)는 바이러스를 구성하는 구조단백질로 형성된 원래의 바이러스와 유사한 구조를 지니는 바이러스 입자를 의미하며 바이러스의 감염 없이 항바이러스 면역반응을 유도하여 기존의 불활성화, 약독화 백신을 대용할 수 있는 새로운 개념의 백신이다. 바이러스 유사입자는 바이러스의 감염 없이 원래 바이러스에 대한 항체 생산을 유발하여 안전성이 높고 백신으로서의 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있으며 여러 가지 서로 다른 아형 바이러스의 구조 단백질을 이용한 경우 보다 넓은 범위의 예방능력을 지닌다. 하지만 인플루엔자 바이러스에 대한 바이러스 유사입자 백신은 아직 개발된 바 없다. 인플루엔자 바이러스 유사입자를 생산하기 위해서는 인플루엔자 바이러스를 구성하는 구성 단백질을 효율적인 생산할 수 있는 재조합 인플루엔자 구성단백질 생산 방법의 개발이 필수적이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004]

본 발명자는 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있는 여러 가지 세포 주들을 이용하여 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질의 발현을 연구하였으며, 그 결과 특정한 드로소필라 멜라노

개스터 (*Drosophila melanogaster*) 세포주가 이러한 목적을 효과적으로 달성할 수 있음을 확인하였다. 즉, 본 발명자는 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포를 인플루엔자 구성단백질의 cDNA가 삽입된 발현플라스미드로 형질 전환시키고 배양함으로써 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 효율적으로 생성시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

- [0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포를 이용하여 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 효율적으로 제조하는 방법을 제공한다.
- [0006] 본 발명은 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포를 인플루엔자 바이러스 유전자가 삽입되어 있는 재조합 플라스미드로 안정하게 형질전환시킴으로써 재조합 인플레인자 바이러스 구성단백질을 효과적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다.
- [0007] 본 발명은 재조합 인플레인자 바이러스 구성단백질을 발현시키기 위해 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포를 형질전환시키는데 사용되는 것으로 인플레인자 바이러스 구성단백질을 코드화한 이중유전자가 삽입되어 있는 신규 재조합 플라스미드를 제공한다.

발명의 효과

- [0008] 본 발명은 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포를 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현플라스미드인 pKHU101을 사용하여 형질전환시켜 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 효율적으로 발현, 생산할 수 있는 방법에 관한 것이다. 지금까지 형질전환된 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포에서 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 발현시킨 예는 보고된 바 없으며, 본 발명은 곤충세포 발현시스템을 이용하여 발현된 인플레인자 바이러스 구성 단백질을 이용해 인플루엔자 바이러스 유사입자 생산의 잠재적 가능성이 입증한다.

도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 드로소필라 멜라노개스터 (*Drosophila melanogaster*) S2 세포가 재조합 인플레인자 바이러스 단백질을 발현할 수 있도록 형질전환시키는데 사용되는 발현 플라스미드 pKHU101의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환되지 않은 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포 및 형질전환된 드로소필라 멜라노개스터 S2세포에서 재조합 인플레인자 바이러스 단백질 NS1 (non-structural protein 1), MP2 (Matrix protein 1)의 발현을 웨스턴 블롯 분석을 통해 조사한 결과를 나타낸 것이다. [M은 분자량 마커, 레인 (N)은 형질전환되지 않은 세포의 배지부분, 레인 (1)은 인플루엔자 바이러스 NS1 유전자 발현 플라스미드가 형질전환된 S2 세포의 배지부분, 레인 (2)는 인플루엔자 바이러스 MP2 유전자 발현 플라스미드가 형질전환된 S2 세포의 배지부분, 화살표는 재조합 인플루엔자 바이러스 NP1, MP2 단백질을 지시함.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환되지 않은 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포 및 형질전환된 드로소필라 멜라노개스터 S2세포에서 재조합 인플루엔자 바이러스 단백질 NA (neuraminidase)의 발현을 웨스턴 블롯 분석을 통해 조사한 결과를 나타낸 것이다. [레인 (N)은 형질전환되지 않은 세포의 배지부분, 레인 (1)은 인플루엔자 바이러스 NA 유전자 발현 플라스미드가 형질전환된 S2 세포의 배지부분, 화살표는 재조합 인플루엔자 바이러스 NA 단백질을 지시함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 발명에서 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 발현시키기 위해 사용되는 숙주세포인 드로소필라 멜라노개스터 S2 (*Drosophila melanogaster* Schneider 2) 세포는 유전공학 분야에서 광범하게 이용되고 있는 초파리속 (*Drosophila*)에 속하는 세포주의 하나로서 공지되어 있는 세포주이다. 그러나, 지금까지 인플루엔자 바이러스 구성단백질의 발현을 위해 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포주를 사용한 예는 없었다. 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포 주는 이미 문헌에 공지되어 있으며 (참조: “*Drosophila Cells in Culture*”, Guy Echallier, 1997, Academic Press, U.S.A.) 인비트로젠사 (Invitrogen Corp. CA, U.S.A.)로부터 용이하게 입수할 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 드로소필라 멜라노개스터 S2 세포에서 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 발현시키기 위하여 사용되는 재조합 플라스미드는 플라스미드 pKHU101이다. 이 플라스미드는 지금까지 알려지지 않

있던 신규 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 재조합 플라스미드이며, 그의 구조는 도 1에 나타내었다. 이 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 재조합 플라스미드인 pKHU101은 공지의 플라스미드인 pMT/BiP/V5-His 및 인플루엔자 바이러스 유전자로부터 유전공학 분야에서 통상적인 방법에 따라 용이하게 제작할 수 있다. 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 재조합 플라스미드 pKHU101의 제조에 관하여는 이하의 실시 예에서 더욱 상세히 설명된다.

[0012]

본 발명에 따르면 또한, 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포를 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 재조합 플라스미드 pKHU101로 형질전환시키고, 이렇게 하여 수득된 형질전환된 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포를 배양하는 방법이 제공된다. 이러한 형질전환 및 배양에는 목적하는 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 고수율로 효과적으로 발현시킬 수 있지만 하면 유전공학 분야에서 통상적인 어떠한 방법이라도 사용될 수 있다. 특히 바람직하게는 형질전환된 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포는 넉크(Nunc) T-플라스크를 이용하여 배양한다.

부호의 설명

[0013]

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

인플루엔자 바이러스 구성단백질을 발현시키기 위해 사용되는 숙주세포인 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포는 인비트로젠사 (Invitrogen Corp. CA, U.S.A.)에서 구입한 10% IMS (insect medium supplement, Sigma)를 함유하는 M3 배지 (Shields and Sang M3 insect medium, Sigma)로 넉크 (Nunc) (T-75, Denmark) 플라스크를 이용하여 27℃에서 배양하였다. 인플루엔자 바이러스 구성단백질의 발현을 위해 숙주세포인 S2 세포에 도입되는 재조합 플라스미드 pKHU101의 제조를 위해 사용되는 플라스미드 pMT/BiP/V5-His (3.6kb)는 인비트로젠사로부터 용이하게 입수할 수 있으며, 메탈로티오네인 (methallothionein) 프로모터, BiP 시그널 서열, V5 에피토프 표지 (tag) 및 폴리히스티딘 부위를 함유하고 있다. 또한, 형질전환을 수행하기 위하여 구조적 드로소필라 코피아 (Drosophila Copia) 5' LTR 프로모터의 조절 하에 박테리아 하이그로마이신 B 포스포트랜스페라제 유전자를 함유하는 선별플라스미드 pCoHygro (Invitrogen 사)를 사용하였다.

인플루엔자 바이러스 구성단백질을 코딩하는 유전자는 인플루엔자 바이러스에서 추출한 RNA genome을 이용한 RT-PCR 방법으로 확보하였고, 확보된 PCR 산물은 PCR 산물 결합 플라스미드인 pGEM-T (Promega, U.S.A.)에 결합시키고 대장균 DH5 α에 형질전환시켰다. 대장균 DH5 α 세포는 37℃에서 교반하면서 ml 당 50 μg의 앰피실린을 함유하는 LB 배지 (1% 트립톤, 0.5% 효모추출물 및 0.5% NaCl, pH 7.3)에서 통상적인 방법으로 배양하고 유지시켰다. pGEM-T 플라스미드에 결합된 인플루엔자 바이러스 구성단백질 코딩 유전자는 제한효소 SmaI, XhoI (Takara, Japan)으로 절단된 후 SmaI, XhoI으로 절단된 pMT/BiP/V5-His 플라스미드에 결합시켜 pKHU101 플라스미드를 확보하고 대장균 DH5 α에 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균 DH5 α 세포에서 pKHU101의 존재를 확인하고 드로소필라 멜라노게스터 S2 (Drosophila melanogaster Schneider 2) 세포에 형질전환시킬 플라스미드로 이용하였다. 존재하는 이하의 실시 예에서 제한효소들은 각각 이들의 제조자인 프로메가사 (Promega) 또는 타카라사 (Takara)에 의해 제시된 사용지침에 따라 이용하였다.

이하의 실시예에서 웨스턴 블롯(Western blot) 분석은 래블리 방법 (Laemmli, UK, Nature 227: 680-685, 1970)에 따라 SDS-PAGE를 사용하여 단백질 표본에 대하여 수행하였다. 즉, 겔상에서 전기영동한 단백질들을 니트로셀룰로즈상에 전이시키고, 마우스 안티-V5 (Invitrogen사) 다세포균항체와 반응시킨 후에, 토끼 안티-마우스 IgG 알칼리성 포스파타제 결합체(1:1000, v/v)로 표지하였다. TBS buffer를 이용한 세척 과정을 거친 후에 BM 자색 (purple) AP 기질용액 (Boehringer Mannheim)을 첨가하였고 증류수 또는 TBS buffer로 반응을 정지시켰다.

실시예 1: 발현 플라스미드의 제조

올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 RT-PCR에 의해 확보한 인플루엔자 바이러스 구성단백질 유전자를 Easytrap Kit (Takara, Japan)로 분리하고 pGEM-T 플라스미드 (Promega)내에 T4 DNA ligase로 4℃에서 12시간 동안 ligation시켜 삽입한 후 pGEM-T-Influenza VPs를 수득하고, DNA 서열화로 인플루엔자 바이러스 구성단백질의 cDNA 서열이 정확하게 삽입되어 있는지를 확인하였다. 플라스미드 pMT/BiP/V5-His(Invitrogen사)를 37℃, 2시간동안 제한효소 SmaI 및 XhoI로 분해시켰다. 또한, 상기에서 수득한 pGEM-T-Influenza VPs를 역시

37°C, 2시간동안 제한효소 SmaI 및 XhoI로 분해시켜 인플루엔자 바이러스 구성단백질의 cDNA를 함유하는 SmaI-XhoI 단편을 얻었다. 이렇게 하여 수득한 pGEM-T-Influenza VPs의 SmaI-XhoI 단편을 상기의 플라스미드 pMT/BiP/V5-His의 SmaI 및 XhoI 절단부위 사이에 4°C, 12시간 T4 DNA ligase로 ligation시켜 삽입하여 목적하는 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 플라스미드 pKHU101을 수득하였다. 플라스미드 pKHU101의 구조는 도 1에 나타내었다. 재조합 발현플라스미드 pKHU101에서 유전자 삽입이 적합한 방향으로 되었는지와 판독프레임은 제한효소 지도작성과 DNA 서열결정에 의해 확인하였다.

실시예 2: 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포의 형질전환

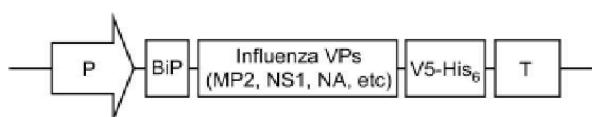
리포펙틴을 이용하여 상기에서 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질 발현용 플라스미드 pKHU101 및 pCoHygro (19:1의 비율)로 이하에 기술하는 바와 같은 방식에 따라 성장하는 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포를 이용하여 형질전환시켰다. 우선, 형질전환 배지를 만들기 위해서 플라스미드 DNA와 리포펙틴 시약 (Gibco BRL사, U.S.A.)을 각각 IMS가 없는 M3 배지로 DNA 3 µg, lipofectin 15 µg이 되도록 희석시킨 후, 1:5 (v/v)의 비로 혼합시켰다. 형질전환 배지를 상온에서 15분 동안 반응시키고, 2시간 전에 6-웰 플레이트에 미리 분주해 놓은 IMS가 없는 M3 배지내의 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포 (3×10^6 세포/웰)에 DNA, lipofectin, medium mixture 1.5 ml을 웰에 가하였다. 플레이트를 24시간 동안 27°C 배양기에서 배양한 후에, 리포펙틴을 제거하기 위해 웰내의 배지를 10% IMS가 함유되었으나 항생제는 존재하지 않는 M3 배지로 교환하고, 이 배지 내에서 27°C 배양기에서 5일 동안 더 세포를 배양하였다. 그 후, 세포들을 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여, 형질전환된 숙주세포를 분리하였다. 이어서 분리된 숙주세포를 10% IMS와 ml당 300 µg의 하이그로마이신 B가 함유되어 있는 선별 M3 배지 1.5 ml에 다시 부유시켰다. 선별배지를 5일 간격으로 교체해 주면서 하이그로마이신 B를 이용하여 4주의 선별기간을 거친 후에 형질전환된 폴리클로날 세포군집을 선별하였다. 하이그로마이신 B는 선별기간 후에도 일상적으로 내내 배지에 유지시켰다.

이렇게 형질전환된 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포가 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질을 안정적으로 발현하는지 여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석법에 의해 조사하였다. 1 mM의 CuSO₄를 이용하여 형질전환된 S2 세포의 배양을 유도한 후에 24시간 동안의 유전자 발현을 분석하여, 그 결과를 도 2와 3에 나타내었다. SDS-PAGE는 pKHU101을 포함하는 형질전환된 S2 세포가 형질전환되지 않은 세포의 배양에 의해서는 관찰되지 않는 23, 40 kDa의 분자량을 갖는 인플루엔자 바이러스 구성단백질 MP2, NS1이 발현됨을 보여주었다 (도 2). 또한 SDS-PAGE는 pKHU101를 포함하는 형질전환된 S2 세포가 형질전환되지 않은 세포의 배양에 의해서는 관찰되지 않는 65 kDa의 분자량을 갖는 인플루엔자 바이러스 구성단백질 NA가 발현됨을 보여주었다 (도 3). 이상과 같이, 마우스 안티-V5 다세포균향체 (Invitrogen사)를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의해서는 이와 같이 축적된 단백질이 새롭게 발현된 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질 MP2, NS1, NA임을 확인하였고 (도 2, 3), 그의 분자크기는 V5와 His의 C-말단 표지를 함유하는 융화된 재조합 인플루엔자 구성단백질들의 예견된 분자량과 비슷한 것으로 판단되었다. 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질은 형질전환된 드로소필라 멜라노게스터 S2 세포의 배지에 존재하는 것으로 확인되었다. 즉, 형질전환된 S2 세포는 발현된 재조합 인플루엔자 구성단백질을 효과적으로 세포 밖으로 분비하는 것이다. 형질전환되지 않은 S2 세포 내에서는 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질 검출되지 않았다. 이 결과는 형질전환된 S2 세포에서의 재조합 인플루엔자 바이러스 구성단백질의 발현이 이 세포내에 이입된 재조합 인플루엔자 구성단백질의 cDNA를 함유하는 플라스미드 pKHU101에 의한 것임을 시사하는 것이다.

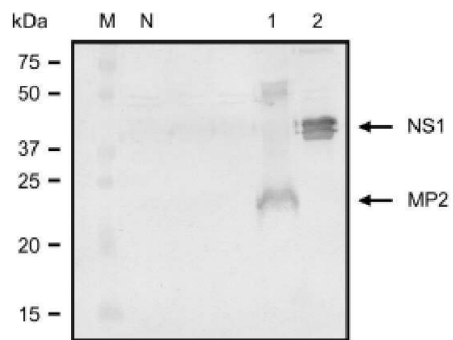
이상으로 본 발명 내용의 특정된 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

