(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176108
(43) 공개일자 2024년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0076169
(22) 출원일자 2023년06월14일
심사청구일자 2023년06월14일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 의과대학 126호 의동물학교실(회기동, 경희대학교)
윤건웅
경기도 용인시 처인구 금령로106번길 14-8, 1805호 (김량장동)
(74) 대리인
특허법인태백

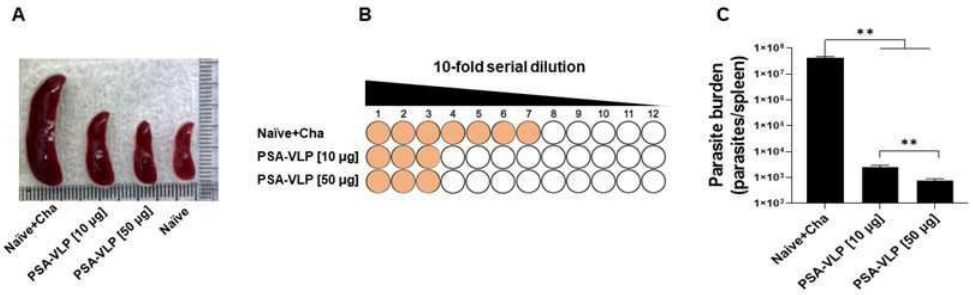
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **내장 리슈만편모충의 PSA 항원을 포함하는 재조합 바이러스 유사입자 백신**

(57) 요 약

본 발명은 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA)을 포함하는 재조합 바이러스 유사입자 백신(Virus-like particles, VLPs)에 관한 것으로서, 구체적으로, 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 PSA 항원 및 인플루엔자 M1의 조합으로 바이러스 유사입자 백신을 제조하였다. 바이러스 유사입자 백신은 구조적 안정성이 높아 지속시간이 길며 선택적인 항체를 생성할 수 있으며, 바이러스 유전자를 포함하지 않는 비병원성으로 질병을 유발하지 않아 안전함이 검증되어 다양한 병원체에 적용 가능하다. 특히, 대량 생산과 생산단가를 크게 낮출 수 있는 장점이 존재한다. PSA는 family gene으로 내장 리슈만편모충 이외에도 다른 피부 리슈만편모충 및 점막 리슈만편모충에도 존재하는 항원 단백질로 교차 면역 반응의 기대효과를 보일 수 있다는 점에서 기술적인 파급 효과를 가지고 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61P 33/02 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 14/44 (2013.01)
C12N 2760/16122 (2013.01)
C12N 2760/16123 (2013.01)
C12N 2760/16141 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345365662
과제번호 2018R1A6A1A03025124
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 활성산소 조절을 통한 만성질환병 예방치료에 관한 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA) 단백질을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 PSA는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 PSA는 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 5

M1을 암호화하는 서열번호 3의 핵산 서열; 및 PSA를 암호화하는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 PSA는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터.

청구항 7

제5항 또는 제6항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 9

제5항 또는 제6항의 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및

상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계를 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모충체(promastigotes) 및 무편모충체(amastigotes)에서 발현하는, 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA)을 포함하는 재조합 바이러스 유사

입자 백신(Virus-like particles, VLPs)에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리슈만편모충증은 모래파리(Sand fly)에 의해 매개되는 열대성 질병이며 인수공통질병으로 증세는 피부 리슈만편모충증, 피부점막 리슈만편모충증, 내장 리슈만편모충증 3가지 특징적 증상을 나타내며, 특히 kala-azar라고 불리는 내장 리슈만편모충증(VL)은 치료하지 않으면 95% 이상 치명적이다. 매년 새로운 50,000-90,000 건의 내장 리슈만편모충증이 발병되며 WHO에 보고되는 것은 25-45%에 불과하다. 현행 치료법은 리포솜 암포테리신 B(LAmB), 밀테포신 등이 있지만, 이러한 화학 요법은 약물 부작용 내성 및 독성으로 인해 사용이 제한적이다. 2022년 WHO에 따르면 동아프리카와 동남아시아에서 리슈만편모충-HIV 동시 감염 환자를 위한 새로운 치료 권장 사항을 발표하였다.

[0003] 이에, 내장 리슈만편모충에 효과적인 예방을 위해 높은 항원성과 안정성에 기반한 재조합 바이러스 유사입자 백신 개발 연구가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 미국공개특허 US 2021-0213114 A1 (2021.07.15 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA) 단백질을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)을 제공하는데 있다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공하는데 있다.

[0007] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 M1을 암호화하는 핵산 서열; 및 PSA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터, 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포 및 상기 숙주 세포를 이용한 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA) 단백질을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 M1을 암호화하는 서열번호 3의 핵산 서열; 및 PSA를 암호화하는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계를 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA)을 포함하는 재조합 바이러스 유사입자 백신(Virus-like particles, VLPs)에 관한 것으로서, 구체적으로, 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 PSA 항원 및 인플루엔자 M1의 조합으로 바이러스 유사입자 백신을 제조하였다. 바이러스 유사입자 백신은 구조적 안정성이 높아 지속시간이 길며 선택적인 항체를 생성할 수 있으며, 바이러스 유전자를 포함하지 않는 비병원성으로 질병을 유발하지 않아 안전함이 검증되어 다양한 병원체에 적용 가능하다. 특히, 대량 생산과 생산단가를 크게 낮출 수 있는 장점이 존재한다. PSA는 family gene으로 내장 리슈만편모충 이외에도 다른 피부 리슈만편모충 및 점막 리슈만편모충에도 존재하는 항원 단백질로 교차 면역 반응의 기대효과를 보일 수 있다는 점에서 기술적인 파급 효과를 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 리슈만편모충(*Leishmania donovani*) PSA 바이러스 유사입자 특성 확인 결과를 나타낸다.

도 2는 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 생존율 및 운동성 확인 결과를 나타낸다.

도 3은 혈청에서의 IgG 리슈만편모충(*Leishmania donovani*) 특이 항체 반응 결과를 나타낸다.

도 4는 리슈만편모충(*Leishmania donovani*) 감염 이후 비장 세포에서 B, 배중심 B, 기억 B 세포 반응 결과를 나타낸다.

도 5는 리슈만편모충(*Leishmania donovani*) 감염 이후 간에서의 염증반응 결과를 나타낸다.

도 6은 리슈만편모충(*Leishmania donovani*) 감염 이후 비장의 크기 및 LDA 측정 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA) 단백질을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 "내장 리슈만편모충증"은 리슈만편모충에 감염되어 발생하는 열대성 질병으로, 인수공통질병이다. 구체적으로, 본 발명에서 상기 리슈만편모충은 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 "바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs)"는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미한다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 DNA 또는 RNA 게놈이 완전히 결여되어 있거나, 바이러스성 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자의 경우 자발적 자가 어셈블리를 진행할 수도 있다.

[0018] 본 발명에서 "내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자"는 내장 리슈만편모충증에 대한 특이적인 면역 반응을 유도하며, 바이러스와 유사한 형태를 가진 단백질 구조체(입자)를 의미한다.

[0019] 상기 바이러스-유사입자는 바이러스에서 유래한 구조 단백질이 조립되어 바이러스와 유사한 형태의 입자를 생성함과 동시에 내장 리슈만편모충으로부터 유래한 항원 결정 부위를 포함함으로써, 상기 바이러스-유사입자를 특정 개체에 접종하였을 때 내장 리슈만편모충에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적 일 예로서, 상기 단백질 구조체는 바이러스 유래의 구조 단백질 외부에 내장 리슈만편모충 유래의 항원 결정 부위가 결합된 형태를 가질 수 있다.

[0020] 상기 바이러스 유래의 구조 단백질(core protein)은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)일 수 있다.

[0021] 본 발명에서 "인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)"은 인플루엔자 바이러스의 구조 단백질로서, 인플루엔자 바이러스의 외피(envelop)인 지방층 안쪽에 코트(coat)를 형성하는 기질단백질(matrix protein)을 의미한다. 상기 인플루엔자 바이러스는 8개의 분절된 음성가닥 RNA, 표면 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, H), 뉴라미다제(neuraminidase, N), 뉴클레오프로테인(neucleoprotein, NP) 매트

릭스(matrix, M1), 프로톤 이온-채널 단백질(proton ion-channel protein, M2), 중합효소 염기 단백질 1(polymerase acidic protein, PA), 중합효소 염기 단백질 2(PB2, polyMerase basic protein 2), 중합효소 산성 단백질(PA, polymerase acidic protein) 및 비구조 단백질 2(NS2, nonstructural protein 2)와 같은 단백질을 포함하는데, 이때 매트릭스 단백질 1은 외형을 층으로 둘러 쌓고 있음으로써 코어와 외피 간의 연결체로 작용한다. 상기 매트릭스 단백질 1은 바이러스-유사입자 생성에 있어, 바이러스-유사입자를 안정한 형태로 조립하는데 중요한 역할을 한다.

[0022] 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 A/Puerto Rico/8/34, A/Bangkok/163/2000, A/AA/Huston/1945, A/Berlin/6/2006, A/Brandenburg/1/2006, A/Brevig Mission/1/1918, A/Chile/8885/2001, A/DaNang/DN311/2008, A/FLW/1951, A/FW/1/1950, A/Fiji/15899/83, A/Fort Monmouth/1-MA/1947, A/HaNoi/TX233/2008, A/Iowa/CEID23/2005, A/Malaysia/35164/2006, A/Managua/4086.04/2008, A/Texas/VR06-0502/2007, A/WSN/1933, A/Colorado/18/2011, A/Kentucky/04/2010, A/Maryland/28/2009, A/New Mexico/05/2012, A/Philippines/TMC10-135/2010, A/Singapore/GP4307/2010, A/Singapore/GP489/2010, A/Boston/14/2007, A/Brisbane/09/2006, A/Hong Kong/CUH34175/2002, A/Kyrgyzstan/WRAIR1256P/2008, A/Malaysia/12550/1997, A/Nanjing/1663/2010, A/Wyoming/08/2010, A/Berkeley/1/1968, A/Korea/426/1968 등으로부터 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서는 A/Puerto Rico/8/34 유래 M1 단백질을 바이러스-유사입자의 구조 단백질로 활용하였다.

[0023] 상기 내장 리슈만편모충으로부터 유래한 항원 결정 부위는 내장 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)의 전편모형 표면 항원(promastigote surface antigen; PSA)일 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어 “항원 결정 부위(epitope)”는 각각의 항체 또는 T 세포 수용체에 의한 인식의 기본 요소 또는 최소 단위이며, 상기 항체 또는 T 세포 수용체가 결합하는 특정 도메인, 영역 또는 분자 구조를 의미한다. 상기 항원 결정 부위는 내장 리슈만편모충에서 유래할 수 있으며, 상기 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 활성을 유도할 수 있으면 특별히 제한되지 않는다.

[0025] 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 PSA는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 PSA는 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 기능적 동등물을 포함한 것일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어 “기능적 동등물"은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 가장 구체적으로는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 가지는 단백질을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 용어 "실질적으로 동등한 생리활성"은 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 PSA와의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 내장 리슈만편모충증에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자로서의 활성을 의미한다.

[0028] 보다 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 메트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 PSA는 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화 될 수 있다. 예컨대, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 M1은 Genebank Accession No. ABO21712 또는 Genebank Accession No. EF467824 로 표현되는 유전자일 수 있다. 상기 PSA는 Genebank Accession No. DQ086111.1로 표현되는 유전자일 수 있다.

[0029] 상기 바이러스-유사입자는 개체 내에서 항원으로 작용하며 수상돌기세포(dendritic cells)와 같은 항원 표지 세포와의 반응을 통해 T 또는 B 면역 세포에 항원을 표지할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 바이러스-유사입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명에서 “백신 조성물”은 백신 효과를 가지는 단백질 항원을 투여함으로써 이후의 병원균 감염을 예방할 수 있는 조성물을 의미한다. 상기 백신 조성물은 내장 리슈만편모충에 대한 항원성을 나타내는 바이러스-유사입자를 포함하는 조성물일 수 있다.

[0032] 구체적으로, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 보조제, 면역 자극제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0033] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지되어있으며, 단백질, 설탕 등을 포함한다. 상기 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유

예컨대 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트를 포함한다. 수용액 담체는 식용수 및 완충배지를 포함하는 물, 알코올/수용액, 에멀젼 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로오스, 덱스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 링거 덱스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제로서 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것을 추가로 포함할 수 있다. 방부제로는 포르말린 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 상기 백신 조성물은 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용가능한 보조제는 프로인트 완전보존제, 프로인트 불완전보존제, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레시틴, 플루론 폴리올, 다가음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀젼, 키홀림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 백신 조성물은 면역 자극제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 면역 자극제는 인공적으로 합성된 레바미솔, 이소프레노신 및 사이토카인을 포함할 수 있다. 사이토카인의 일 예로서 인터페론-α, 인터류킨-2, GM-CSF, GCSF 등이 있다. 상기 백신 조성물은 상기 바이러스-유사입자 또는 이의 농축액을 포함하는 형태이거나, 형질전환 숙주 세포 자체 또는 형질전환 세포의 건조 분말 형태로 사용할 수 있다. 또한, 상기 백신 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0036] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 바이러스 일부(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 하나 이상의 제2보조제를 더 포함할 수 있다.

[0037] 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.

[0038] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0039] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.

[0040] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 사용될 수 있다. 비수용성제제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 M1을 암호화하는 서열번호 3의 핵산 서열; 및 PSA를 암호화하는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자 제조용 발현 벡터를 제공한다.

[0042] 바람직하게는, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 PSA는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에서 용어 “벡터”는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주 세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 고리형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어 “발현 벡터”는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할

수 있는 벡터를 의미한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 플라스미드 및 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.

[0045] 구체적으로, 상기 벡터는 바큘로바이러스(Baculovirus) 벡터일 수 있다. 상기 바큘로바이러스(Baculovirus)는 사람이나 척추동물에는 병원성이 없으며, 곤충에 대해서만 병원성을 가지고 있는 병원성 바이러스를 의미한다.

[0046] 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 바이러스-유사입자를 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.

[0047] 상기 바이러스-유사입자를 암호화하는 핵산 서열은 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결될(operably linked) 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, 상기 바이러스-유사입자를 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.

[0048] 또한, 상기 발현 벡터는 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자 또는 형광 단백질 유전자일 수 있으며, 상기 항생제 저항성 유전자는 히그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 형광 단백질 유전자는 효모-강화 녹색 형광 단백질(yeast-enhanced green fluorescent protein, yEGFP) 유전자, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP) 유전자, 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein, BFP) 유전자 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 또한, 본 발명은 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0050] 본 발명에서 용어 “숙주 세포(host cell)”는 바이러스에 의해 감염될 수 있고 바이러스 유사 입자에 의해 면역될 수 있는 모든 유기체를 의미한다. 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 대사 조작될 수 있다.

[0051] 상기 숙주 세포는 미생물, 동물세포, 식물세포, 동물에서 유래한 배양세포, 또는 식물에서 유래한 배양세포일 수 있다. 상기 적합한 숙주 세포는 자연적으로 발생하거나 또는 야생형 숙주 세포일 수 있고, 또는 변화된 숙주 세포일 수 있다. 상기 야생형 숙주 세포(wide-type host cell)는 재조합 방법에 의해 유전적으로 변화되지 않은 숙주 세포일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 “형질 전환”은 상기 벡터를 미생물 또는 특정 세포 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 전환 대상 세포가 원핵세포인 경우에는, CaCl2 방법, 하나한 방법 및 전기 천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 형질 전환 대상 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 효모와 같은 진균의 형질 전환의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트 및 열 충격을 이용한 형질 전환법과 전기천공법에 의해 실시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스-유사입자를 발현시키는 단계를 포함하는 내장 리슈만편모충증에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자의 제조 방법을 제공한다.

[0054] 상기 바이러스-유사입자는 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으며, 별도의 원인 감염체, 즉 본 발명에서는 내장 리슈만편모충 없이도 유전 공학적인 방법에 의해 제조될 수 있으므로 높은 생산성 및 경제성이 구현될 수 있다.

[0055] 상기 바이러스-유사입자는 당해 기술 분야에 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 상기 구조 단백질 및 항원 인식 부위를 암호화하는 재조합 DNA 분자를 이용하여 소정의 숙주 세포를 형질 전환시킨 후 배양하여 제조될 수 있으며, 세포 안에서 발현된 단백질이 세포 표면에서 조립된 후 배양 상층액으로 배출될 수 있다. 이 때, 상기 바이러스-유사입자에 포함된 표면단백질은 고정화 과정을 거치지 않고 자연 그대로의 형태를 유지하고 있으므로 개체 내에서 특정 병원체에 대한 목적하는 면역반응을 유도할 수 있다.

[0056] 상기 형질 전환된 숙주 세포는 배치, 공급-배치 또는 연속 발효 조건 하에서 배양될 수 있으며, 상기 숙주 세포는 형질 전환에 의해 상기 바이러스-유사입자를 발현할 수 있으므로 상기 배양된 숙주 세포로부터 상기 바이러

스-유사입자 단백질을 수득할 수 있다.

[0057] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0058] **<실시예 1> 리슈만편모충 PSA 항원을 이용하여 PSA 바이러스 유사입자 백신 제조 후 특성 확인**

[0059] 리슈만편모충(*Leishmania donovani*) PSA (유전자 번호: DQ086111.1, 1161bp) 유전자를 pFastBac 벡터(Genscript USA)에 클로닝 하였다. 제한효소 (BamHI, xhoI)가 존재하는 PSA 유전자를 pFastBac에 ligation 하였다. 재조합 플라스미드 PSA-pFastBac를 E. coli DH5-alpha로 형질 전환하였다. PSA 유전자는 제한효소(BamH1, xhoI)을 이용해 전기영동을 진행하였다. 확인된 재조합 플라스미드를 DH10-Bac로 형질전환하고 QIAprep spin Miniprep kit(Qiagen Germany)를 이용하여 추출하였다.

[0060] 재조합 배큘로바이러스는 Bac-to-Bac™ (Thermo Fisher Scientific Waltham MA U.S) 제조업체 지침에 따라 생산되었다. PSA-pFastBac의 형질감염은 제조업체에 따라 cellfectin II(Invitrogen)를 사용하여 Sf-9 세포로 형질감염 되었다. Sf-9 세포를 bacmid DNA로 형질 감염시킨 후 PSA-rBVs를 함유하는 상등액을 조심스럽게 수득하였다. 바이러스 유사입자 백신 (VLP)을 생성하기 위해 Sf-9 세포를 PSA 및 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)을 발현하는 rBV로 공동 감염시켰다. 배양 4일 후 상등액을 수득하고 4℃, 30분 동안 6000 rpm에서 원심 분리하여 상등액 수득하였다. PSA-VLP를 포함하는 상등액은 고속 원심분리(4℃에서 30분 동안 45000xg)를 사용하여 수득하였다. VLP를 추가로 정제하기 위해 0.1M PBS에 재현탁된 PSA-VLP를 15-30-60% 수크로스 구배 위에 조심스럽게 쌓았다. 45000xg, 4℃, 1시간 원심분리 후 VLP 펠렛을 0.1M PBS를 첨가해 4℃에서 16시간 보관하였다. PSA-VLPs 농도는 QuantiProBCA 분석키트 (Sigma-AldrichSt.LouisMissouriUSA)를 사용하여 결정되었다. PSA-VLPs는 웨스턴 블롯에서 리슈만편모충(*Leishmania donovani*)에 감염된 마우스 혈청을 1:1000의 비율로 1’ Ab를 이용했으며 mouse IgG를 1:2000 2 ‘Ab로 이용하였다.

[0061] 그 결과, Transmembrane은 PSA 유전자에서 확인되었다(도 1A). 제한효소 (BamHI, xhoI)를 통해 *L. donovani* PSA 유전자는 pFastBac 벡터에 클로닝된 것을 전기영동을 통해 확인하였다(도 1B). PSA-VLPs의 발현은 웨스턴 블롯으로 확인하였고(도 1C), VLPs의 표현형은 TEM 전자현미경으로 관찰하였다(도 1D).

[0062] 상기 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 한국 공개특허 10-2019-0009691호에 기재된 M1 유전자와 동일한 서열을 사용하였다(GenBank accession number: EF467824, 1027bp).

[0063] **<실시예 2> 기생충의 운동성 및 metacyclic 형태 확인**

[0064] *L. donovani* 균주 Ld1S (MHOM/SD/62/1S-CL2D)는 BALB/c 마우스에서 유지되었으며 promastigotes는 비장에서 분리된 amastigotes를 M199 배지에서 배양하였다. M199 배지는 L-글루타민 및 25mM HEPES, 0.1mM 아데닌, 0.0005% 헤민, 1% 엽산(Sigma), 0.0001% 비오틴, 0.0001% 비오테린 (Sigma), 4.62mM HaHCO 3M, 10% 불활성화 태아 소 혈청 (FBS Gibco) 및 1% 스트렙토마이신/페니실린 (Gibco)를 이용해 제조하였다. 마우스 감염을 위한 기생충은 $1x10^6$ *L. donovani* / T25 플라스크에 배양하여 준비하였다. 기생충은 3일에서 7일까지 증가했으며 9일에는 감소하였다. Hemacytometer에서 SYBR-green / propidium iodide 염색으로 염색한 후 현미경으로 Promastigotes를 계수하였다. Promastigotes는 hemacytometer의 9개의 다른 시야에서 계산하여 평균을 통해 오차범위를 줄였다. 살아있는 promastigotes는 형광 녹색으로 염색되었지만 죽은 정자는 붉은 색으로 형광을 나타냈다.

[0065] 그 결과, 기생충의 최적 정지기를 결정하기 위해 25T 플라스크에서 $1x10^6$ 기생충을 새로운 M199 배지로 배양하였다(도 2A). 7일 차에 운동성 및 metacyclic한 형태가 관찰되었고 운동성은 7-9일인 2일 동안 유지되었으며 9일 차부터 기생충의 수는 감소하였다(도 2B). 기생충 감소율을 측정하기 위해 SYBR-14와 PI로 염색하여 promastigotes 생존율을 측정하였다(도 2C).

[0066] **<실시예 3> 동물모델에서 백신효능 검증**

[0067] 마우스에 4주 간격으로 VLPs 백신을 접종했으며 혈액 샘플은 각 면역화된 마우스에서 3주차와 7주차에 안와 채혈을 통해 수집되었다. 혈청은 원심분리 4℃, 5000rpm, 10분을 통해 혈액으로부터 분리되었다.

[0068] 그 결과, 각 시점에서 수집된 마우스 혈청을 사용하여 *L. donovani* 특이적 IgG 항체 반응 수준을 측정하였다. 비-면역화 대조군과 비교하여 PSA-VLP 접종에 의한 면역화는 항체 반응을 유도하였다(도 3A). 특히, 모든 백신에 대한 면역 횟수 및 농도가 증가할수록 *L. donovani* 특이 항체 반응이 더 높게 유도되었다(도 3B).

[0069] 다음으로, 비장 세포는 0.70 μm strainer로 분리 후 유세포 분석을 위해 준비되었다. 비장 세포 (1×10^6 세포 / 마우스)를 *L. donovani* promastigote 항원 (5μg / mL)으로 37도에서 5% CO2로 2시간 동안 생체 외에서 반응시켰다. 이후 세포를 형광 표면 마커로 염색하였다. Mouse 형광 마커인 CD19(PE-Cy7), IgD(PE), GL7(PE), B220(FITC), B220(PE), CD19(FITC), CD27(PE-Cy7) 및 CD62L(APC) 항체는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) 및 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구매하였다. B 세포를 평가하기 위해 이들 림프기관에 존재하는 배 중심 B (germinal center B) 세포 및 기억 B (memory B) 세포를 염색하였다. Accuri C6 유세포 분석기를 사용하여 염색된 세포를 획득하고 C6 Accuri 소프트웨어(BD biosciences Franklin Lakes NJ USA)로 분석하였다.

[0070] 그 결과, 마우스의 비장에서 B, 배 중심 B 및 기억 B 세포의 증식을 평가하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 면역화 그룹은 비장에서 높은 수준의 B 세포 이벤트를 유지하였다(도 4A). 이는 비-면역화 그룹인 Naive+Cha와 면역화 그룹을 비교하였다. 배 중심 B 세포의 이벤트는 각각 PSA-VLP [10 μg] 및 PSA-VLP [50 μg]에 대해 각각 1.25배 1.32배 향상되었다(도 4B). 특히 Naive+Cha 그룹과 비교할 때 MB 세포의 비율은 PSA-VLPs [10 μg] 및 PSA-VLPs [50 μg] 그룹에서 1.33배 1.5배 증가하였다(도 4C).

[0071] 다음으로, 18주차에 마우스를 희생시키고 간 조직을 1 mL의 차가운 PBS에서 균질화하고 조직 잔해물을 4℃, 10분, 6000 rpm에서 원심분리 하여 제거하였다. 상등액을 수집하고 -80℃에 보관하였다. BD OptEIA ELISA 키트(BD Biosciences Franklin Lakes NJ USA)를 사용하여 상등액의 전염증성 사이토카인 IFN-gamma 및 IL-6 수준을 측정하였다. 실험은 제조업체 지침에 따라 수행되었으며 생성된 표준 곡선을 사용하여 계산되었다.

[0072] 그 결과, 마우스의 간 균질액을 사용하여 전염증성 사이토카인 IFN-gamma 및 IL-6의 생산을 평가하였다. IFN-gamma는 Naive+Cha 그룹에서 더 높은 수준으로 생성되었다. 면역화 그룹은 IFN-gamma 반응에서 PSA-VLP [10 μg] 및 PSA-VLP [50 μg]에 대해 1.49배 1.92배 감소하였다(도 5A). 유사하게 PSA-VLP [10 μg] 및 PSA VLP [50 μg] 면역화는 IL-6 반응에서 대략 1.33배 1.68배 감소를 유도하였다(도 5B).

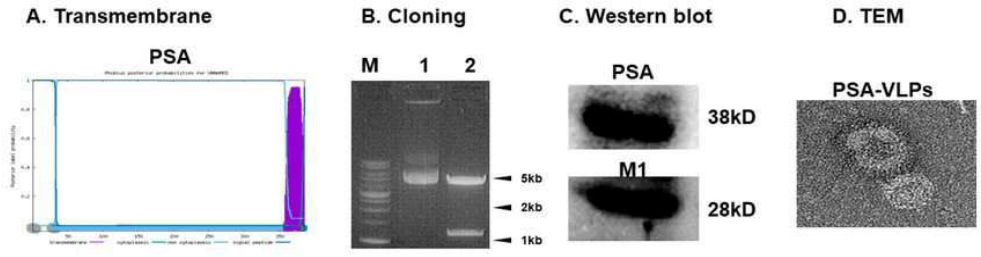
[0073] 다음으로, 마우스를 18주째에 희생시키고 비장을 차가운 PBS에서 균질화한 후 조직을 4℃, 140xg에서 5분 동안 원심 분리하여 잔해물을 제거하였다. 기생충은 10분 동안 2000xg에서 원심분리에 의해 수확되었고 비장 세포는 차가운 PBS에 현탁되었다. 기생충은 PBS로 세척한 후 Percoll 기울기에 의해 분리되었다. 15℃에서 45분 동안 3500x g에서 원심분리한 후 뚜렷한 투명한 밴드를 조심스럽게 수집한 다음 PBS로 3회 세척하였다. Limiting dilution assay (LDA)을 위해 180 μL의 시험관 내 배양 배지를 첨가한 96웰 플레이트(plat bottom)를 준비하였다. 균질액을 추가로 희석(1:1000)하고 현탁액 200 μL를 10배 연속 희석을 위해 96웰 배양 플레이트에 넣고 27℃에서 배양하였다. 마우스 당 기생충의 수를 계산하기 위해 기록되었으며, 각 샘플의 Promastigotes는 현미경(Leica DMi8 Leica Wetzlar Germany)의 다른 시야에서 3번 계산되었다.

[0074] 그 결과, *L. donovani* promastigote 감염에 대한 백신의 보호 효능을 평가하기 위해 비장의 크기 및 amastigotes를 96웰 플레이트에서 LDA 분석을 위해 배양하였다. 백신 접종군의 경우 Naive+Cha군보다 작은 크기의 비장을 확인하였다(도 6A). LDA (limiting dilution assay) 결과에 따르면 PSA-VLPs [10 μg], PSA-VLPs [50 μg]군은 Naive+Cha군과 유의한 차이를 보였다. 두 백신 접종 그룹 모두 NC보다 기생충 부하가 낮게 측정되었다(도 6B). Naive+Cha와 비교하여 promastigotes의 감소는 각각 PSA-VLPs [10 μg] 및 PSA VLPs [50 μg] 면역화에 대해 각각 15000배, 56000배 감소하였다(도 6C).

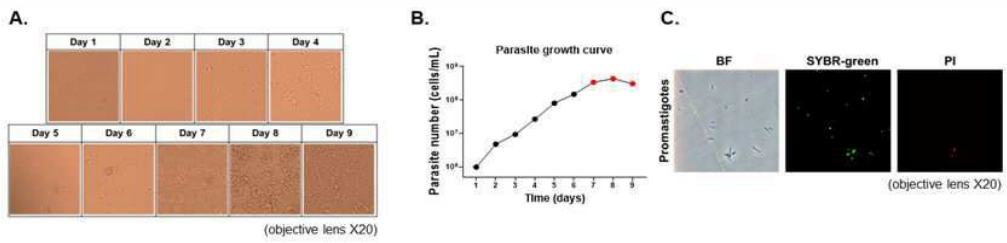
[0075] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

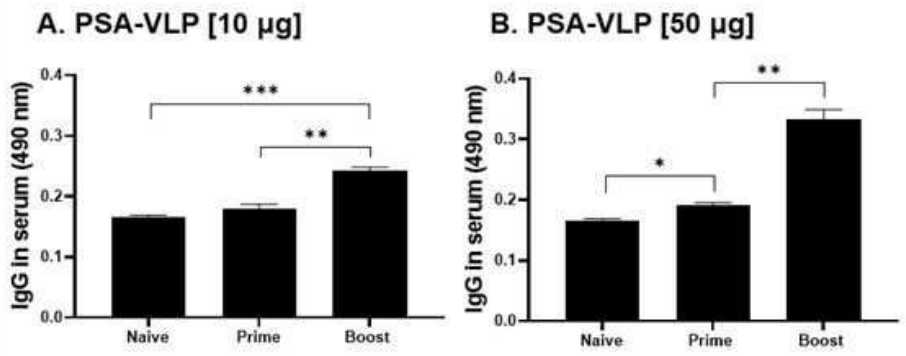
도면1



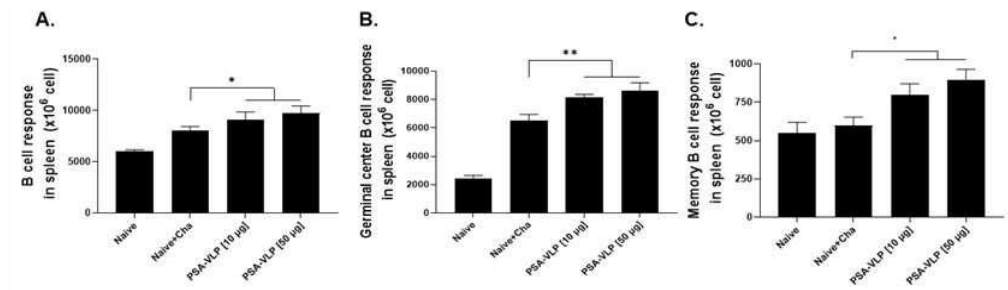
도면2



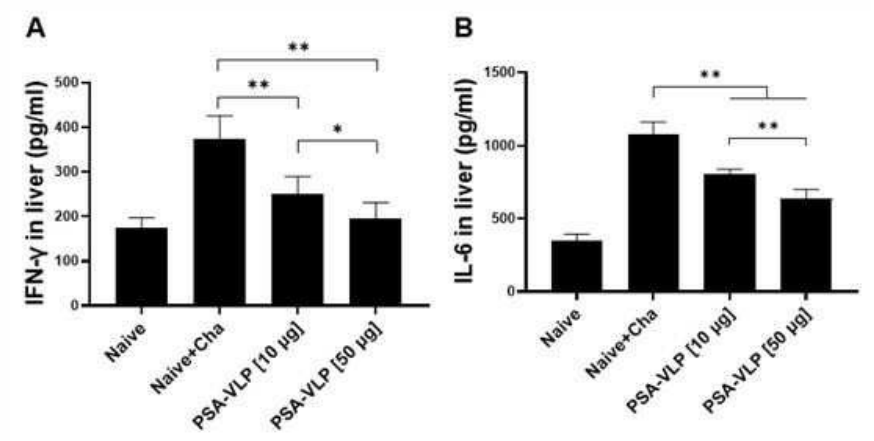
도면3



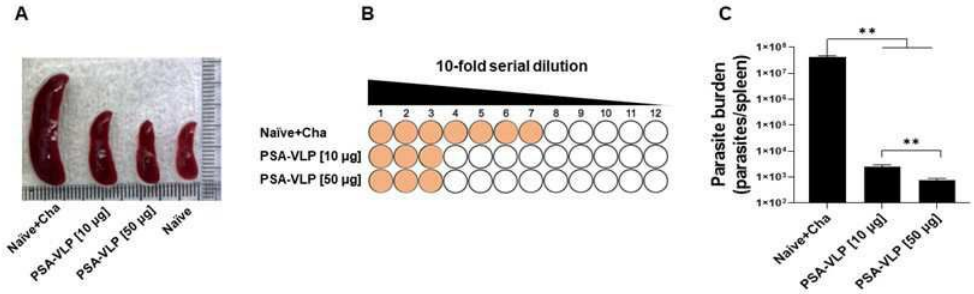
도면4



도면5


A
IFN-γ in liver (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
**
**
*
Naive
Naive+Cha
PSA-VLP [10 μg]
PSA-VLP [50 μg]
B
IL-6 in liver (pg/ml)
1500
1000
500
0
**
**
Naive
Naive+Cha
PSA-VLP [10 μg]
PSA-VLP [50 μg]

도면6


A
Naïve+Cha
PSA-VLP [10 μg]
PSA-VLP [50 μg]
Naïve
B
10-fold serial dilution
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Naïve+Cha
PSA-VLP [10 μg]
PSA-VLP [50 μg]
C
Parasite burden (parasites/spleen)
**
**
Naive+Cha
PSA-VLP [10 μg]
PSA-VLP [50 μg]

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.