

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0123863 (43) 공개일자 2016년10월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/85 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01) (52) CPC특허분류 C12N 15/85 (2013.01) A61K 39/145 (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0054613 (22) 출원일자 2015년04월17일 심사청구일자 2015년04월17일		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내) (72) 발명자 정인식 서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 110동 1002호 (도곡동, 삼성래미안아파트) 박종화 서울특별시 송파구 중대로35길 17, 403호 (오금동, 신도훼미리) 김원용 서울특별시 용산구 이촌로71길 10, 213동 503호 (이촌동, 한가람아파트) (74) 대리인 안소영

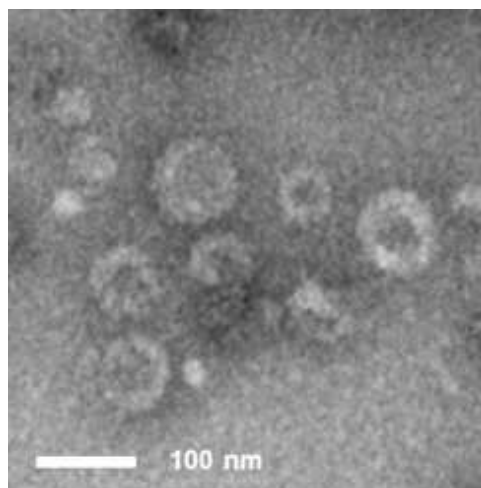
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 곤충세포 발현시스템을 이용한 인플루엔자 백신 소재 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 곤충세포 발현시스템을 이용한 인플루엔자 바이러스 유사 입자 백신 소재 제조방법에 관한 것이다. 본 발명을 이용하면 인플루엔자 백신에 이용될 수 있는 소재인 인플루엔자 바이러스의 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 안정적이고 효율적으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 7/00 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009526

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린 21사업

연구과제명 곤충세포 발현시스템을 이용한 차세대 인플루엔자 백신소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 인플루엔자 M1 유전자 및 서열번호 2의 인플루엔자 M2 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터.

청구항 2

서열번호 3의 인플루엔자 NA 유전자 및 서열번호 4의 인플루엔자 HA 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 재조합 플라스미드 벡터는 서열번호 5로 기재되는 프로모터 유전자 및 서열번호 6으로 기재되는 터미네이터 유전자를 더 포함하는 재조합 플라스미드 벡터.

청구항 4

제1항의 재조합 플라스미드 벡터 및 제2항의 재조합 플라스미드 벡터로 형질전환된 곤충세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 곤충세포는 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)의 BT1-Tn-5B1-4 세포, 리만트리아 디스파(*Lymantria dispar*)의 LD652Y 세포, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)의 Sf21 세포, 드로소필라(*Drosophila*)의 Kc1 세포, 드로소필라(*Drosophila*)의 SL2 세포, 및 모기(*mosquito*) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 곤충세포.

청구항 6

- (a) 서열번호 1의 인플루엔자 M1 유전자 및 서열번호 2의 인플루엔자 M2 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 서열번호 3의 인플루엔자 NA 유전자 및 서열번호 4의 인플루엔자 HA 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터를 제조하는 단계;
- (c) 상기 (a)의 재조합 플라스미드 벡터 및 상기 (b)의 재조합 플라스미드 벡터로 곤충세포를 형질전환 시키는 단계; 및
- (d) 상기 형질전환된 곤충세포를 배양한 배양배지로부터 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자(Virus-like-particle, VLP)를 수득하는 단계를 더 포함하는, 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 (c) 단계의 곤충세포는 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)의 BT1-Tn-5B1-4 세포, 리만트

리아 디스파(Lymantria dispar)의 LD652Y 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf21 세포, 드로소필라(Drosophila)의 Kc1 세포, 드로소필라(Drosophila)의 SL2 세포, 및 모기(mosquito) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 제조방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항의 방법으로 생산된 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 포함하는 인플루엔자 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 곤충세포 발현시스템을 이용하여 인플루엔자 백신 소재인 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자(influenza, 독감)는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 의해 사람 및 동물(조류, 돼지, 개, 말 등)의 호흡기를 통해 전파되는 호흡기성 질병이다. 사람 인플루엔자(Human influenza)의 경우 매년 전 세계 10-20% 인구에서 발생하며, 전염성이 높아 매년 세계적 규모로 유행하는 경향이 있다. 인플루엔자의 증상은 고열, 두통, 근육통, 인후의 염증, 통증, 기침 등의 호흡기질환을 수반하며 심한 경우 노약자, 만성질환보유자 등의 사망을 유발할 수 있다.

[0003] 사람에게 대한 인플루엔자 백신으로는 인플루엔자 바이러스로부터 분리한 HA 단백질을 포함하는 백신이 주로 사용되고 있는데, 항원 1개만을 이용하기 때문에 면역원성이 다소 낮은 단점이 있다. 반면 약독화백신은 면역원성은 높지만 감염 위험이 있어 안전성이 낮다. 따라서 어떻게 면역원성과 안전성을 동시에 높일지가 인플루엔자 백신 생산에 있어서 중요한 과제이다.

[0004] 또한 사람 인플루엔자 백신의 경우 그 해에 유행할 것으로 예상되는 균주를 미리 예측하고 이를 이용하여 백신을 제작해야 한다. 따라서 유행 균주에 맞춰 백신을 매년 반복적으로 제작해야 할 뿐 아니라 실제 유행하는 균주가 백신 제작 시 사용한 균주와 일치하지 않거나, 변이가 큰 새로운 균주가 유행할 경우 기존의 백신은 효과가 현저히 낮다는 문제점을 갖고 있다. 따라서 이를 극복하기 위해 사람 및 동물에서 넓은 범위의 방어능력을 갖는 항원을 선별하여 인플루엔자 백신으로 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

[0005] 현재 인플루엔자 백신 생산은 유정란을 이용하여 제조되고 있는데, 이러한 백신 제조 방식은 비교적 긴 시간이 소요되고(6개월 이상) 그 생산 과정이 복잡하여 대유행 인플루엔자의 확산에 신속하게 대응하기 위한 백신 제조 방법으로는 적절하지 않다. 뿐만 아니라 백신에 계란 단백질이 혼입되어 국소적 또는 전신적 알러지를 유발할 가능성이 있다는 단점이 있다. 따라서 신속하고 유연성 있는 백신 제조 방법이 개발될 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 특허 공개번호 10-2009-0029851호 (발명의 명칭: 인플루엔자 백신)

(특허문헌 0002) 한국 특허번호 10-1316350호 (발명의 명칭: 인플루엔자 백신 조성물의 제조 방법)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 발현할 수 있는 재조합 플라스미드 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 곤충세포, 상기 형질전환된 곤충세포를 이용하여 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법, 및 상기 바이러스 유사 입자를 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 서열번호 1의 인플루엔자 M1 유전자 및 서열번호 2의 인플루엔자 M2 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터를 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 서열번호 3의 인플루엔자 NA 유전자 및 서열번호 4의 인플루엔자 HA 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터를 제공한다.

[0010] 상기 M1, M2, NA, HA 유전자는 인플루엔자 H1N1 바이러스로부터 수득한 것일 수 있고, 예를 들어 인플루엔자 H1N1 바이러스 [Influenza A/Korea/01/2009(H1N1)]로부터 수득한 것일 수 있다. 그러나 M1, M2, NA, HA 유전자는 인플루엔자의 혈청형에 관계없이 존재하는 유전자에 해당하므로, 유전자의 출처는 이에 제한되지 않는다.

[0011] 본 발명의 재조합 벡터는 플라스미드 벡터가 될 수 있다. 그러나 본 발명에 있어 사용될 수 있는 벡터는 이에 한정되지 않으며, 곤충세포에서의 발현에 이용할 수 있는 벡터는 모두 이용할 수 있다.

[0012] 본 발명의 플라스미드 벡터는 서열번호 5의 프로모터 유전자 및 서열번호 6의 터미네이터 유전자를 더 포함할 수 있다. 그러나 본 발명의 재조합 벡터에 사용할 수 있는 프로모터 유전자 및 터미네이터 유전자의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0013] 또한 본 발명은 상기 서열번호 1의 인플루엔자 M1 유전자 및 서열번호 2의 인플루엔자 M2 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터 및 서열번호 3의 인플루엔자 NA 유전자 및 서열번호 4의 인플루엔자 HA 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터로 형질전환된 곤충세포를 제공한다.

[0014] 상기 곤충세포는 트리코플루시아 니(Trichoplusia ni)의 세포일 수 있으며, 바람직하게는 BT1-Tn-5B1-4 세포일 수 있다. 그러나 곤충세포의 종류는 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구현예로서 Lepidopteran 곤충세포에 해당하는 곤충세포는 모두 이용 가능하며, 예를 들어 리만트리아 디스파(Lymantria dispar)의 LD652Y 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 Sf21 세포, 드로소필라(Drosophila)의 Kc1 세포, 드로소필라(Drosophila)의 SL2 세포, 및 모기(mosquito) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된 곤충세포를 이용할 수 있다.

[0015] 본 발명은 (a) 서열번호 1의 인플루엔자 M1 유전자 및 서열번호 2의 인플루엔자 M2 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터를 제조하는 단계;

[0016] (b) 서열번호 3의 인플루엔자 NA 유전자 및 서열번호 4의 인플루엔자 HA 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터를 제조하는 단계;

[0017] (c) 상기 (a)의 재조합 플라스미드 벡터 및 상기 (b)의 재조합 플라스미드 벡터로 곤충세포를 형질전환 시키는 단계; 및

[0018] (d) 상기 형질전환된 곤충세포를 배양한 배양배지로부터 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자(Virus-like-particle, VLP)를 수득하는 단계를 더 포함하는, 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자의 제조방법을 제공한다.

[0019] 본 발명에 있어서 세포 배양배지란 일반적으로 세포를 배양한 배양액으로부터 세포를 제거한 것을 의미한다.

[0020] matrix protein 1(M1), matrix protein 2(M2), neuraminidase(NA), hemagglutinin(HA)는 인플루엔자 아단위백신 개발을 위해 이용될 수 있는 인플루엔자 바이러스의 구조단백질에 해당한다. M1 단백질은 인플루엔자 바이러스의 외피(envelop) 안쪽에 구성의 코트(coat)를 형성하는 기질단백질(matrix protein)이며, M2 단백질은 M1 단백질 코트에 결합하여 이온 채널을 형성하는 기질단백질이다. NA 및 HA는 모두 바이러스 표면에 존재하는 인플루엔자의 대표적인 항원이다. 본 발명의 형질전환된 곤충세포에서는 M1 단백질, M2 단백질, NA 단백질 및 HA 단백질이 발현되어, M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자로서 배양배지로 분비된다. 바이러스 유사 입자는 하나 이상의 바이러스 구조 단백질을 포함하며, 대표적으로 표면 단백질(envelope protein)과 매트릭스 단백질(matrix protein)을 함유하는 반면, 바이러스의 유전물질은 함유하지 않는다. 따라서 감염의 위험이 없으면서 체내에서

바이러스에 대한 목적하는 면역반응을 도출할 수 있다.

[0021] 본 발명은 인플루엔자 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 포함하는 인플루엔자 백신 조성물을 제공한다.

[0022] 바이러스 유사 입자는 체내에서 항원으로 작용하며 수상돌기세포(dendritic cells)와 같은 항원 표지 세포와의 반응을 통해 T 또는 B 면역 세포에 항원을 표지하게 된다. 바이러스 유사 입자는 본래의 바이러스와 유사한 구조를 갖고 있으나 유전물질은 갖고 있지 않아 증식이 불가능하여 백신과 같은 용도로 사용함에 있어 안전성을 기대할 수 있다. 바이러스 유사 입자의 표면에 삽입된 바이러스 표면단백질은 순수하게 분리된 재조합단백질에 비해 높은 항원성을 갖고 있으며 효과적인 중화항체를 형성할 수 있다. 바이러스 유사 입자를 이용한 백신의 대표적인 예로 글락소스미스클라인(GSK)에서 생산하고 있는 human papilloma virus type(HPV-16) L1 백신을 들 수 있다.

[0023] 이러한 바이러스 유사 입자 기반 백신은 살아있는 복제 가능한 바이러스와 같은 면역효능을 지닌 것으로 알려져 있다. 즉, 바이러스 유사 입자는 면역 세포를 효과적으로 활성화시키는 능력을 갖고 있어 높은 항체형성 유도과 효과적인 보호면역을 유도한다(Song JM, et al., Protective immunity against H5N1 influenza virus by a single dose vaccination with virus-like particles. Virology 405: 165-175,(2010); Sailaja G et al., Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. Virology 362: 331-341, (2007)). 즉, 바이러스 단백질의 변이체나 상동성을 갖는 유사 단백질을 기존 유전자에 삽입 및 치환 함으로써 서로 다른 면역원성을 보강할 수 있다. 또한, 인플루엔자에 대한 교차 방어 능력이 향상된 것으로 볼 수 있다. 본 발명의 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자는 4가의 인플루엔자 백신을 제조하기 위한 소재로서 사용 될 수 있다.

[0024] 또한 본 발명의 재조합 플라스미드 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 곤충세포를 이용하면 기존의 유정란, 동물 세포, 배클로바이러스 벡터를 이용한 인플루엔자 백신 제조 방법에 비해 그 생산 과정이 복잡하지 않아 신속하게 대유행 인플루엔자 확산에 대응할 수 있는 인플루엔자 백신을 생산할 수 있다. 안정적으로 형질전환된 곤충 세포를 이용하면 동물세포에서 발현된 것과 유사한 번역 후 수식(당쇄화, 인산화, 지방산의 부가)이 일어난 단백질을 생산할 수 있는 동시에, 단백질의 발현량이 높고 복수의 단백질을 동시에 발현시키나 세포 밖으로 배출시킬 수 있는 장점이 있다.

[0025] 본 발명의 백신 조성물은 매 해 인플루엔자 유행철 이전에 투여될 수 있으며, 0.1 ml 내지 1.0 ml를 피하 또는 근육에 주사함으로써 투여될 수 있다. 그러나 상기 투여빈도, 투여시기, 투여량 및 투여경로는 예시적으로 기재한 것이며, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 인플루엔자 백신에 이용될 수 있는 소재인 인플루엔자 바이러스의 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 안정적이고 효율적으로 생산하는 데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 pIZT/V5-His 벡터에 Orgyia pseudotsugata immediate-early 2 promoter (pOpIE2) 및 Orgyia pseudotsugata immediate-early 2 poly A terminator (OpIE2 pA) DNA 절편을 삽입한 모식도이다.

도 2는 도 1의 재조합 벡터에 인플루엔자 바이러스 M1 및 M2 단백질 유전자를 삽입하여 구축한 pIZT2/M1-M2 벡터의 모식도이다.

도 3은 pCoHygro 벡터에 pOpIE2 및 OpIE2 pA DNA 절편을 삽입한 모식도이다.

도 4는 도 3의 재조합 벡터에 인플루엔자 바이러스 NA 및 HA 단백질 유전자를 삽입하여 구축한 벡터의 모식도이다.

도 5는 BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포의 추출물에서 M1, M2, NA, HA 단백질을 확인한 결과이다.

도 6은 BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포의 배양배지에서 M1, M2, NA, HA 단백질을 확인한 결과이다.

도 7은 BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포의 배양배지에서 웨스턴 블롯으로 4, 5번 분획물에 대부분의 M1, M2,

NA, HA 단백질이 존재함을 확인한 결과이다.

도 8은 상기 4, 5번 분획물의 침전물을 전자현미경으로 관찰하여 바이러스 유사 입자의 존재를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

<실시예 1> M1 및 M2 단백질을 동시에 발현하는 재조합 플라스미드 벡터 제조 및 곤충세포의 형질전환

1-1. M1 및 M2 단백질을 동시에 발현하는 재조합 플라스미드 벡터 제조

M1 및 M2 단백질을 동시에 발현하도록 하기 위해서는 각각의 유전자 발현을 조절하는 프로모터와 터미네이터가 필요하다. pIZT/V5-His(Invitrogen, USA) 벡터에는 재조합 단백질의 발현을 조절할 수 있는 프로모터와 터미네이터가 각각 하나씩만 존재하기 때문에, 하기와 같이 pIZT/V5-His 벡터에 존재하는 프로모터와 터미네이터를 PCR을 사용하여 증폭시킨 후 이를 각각 pIZT/V5-His 벡터에 클로닝하여 추가하였다.

pIZT/V5-His 벡터에 포함된 *Orgyia pseudotsugata* immediate-early 2 promoter (pOpIE2) 및 *Orgyia pseudotsugata* immediate-early 2 poly A terminator (OpIE2 pA)를 주형으로 하고, LA Taq polymerase(Takara, Japan) 및 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여, pOpIE2 DNA 절편 및 OpIE2 pA DNA 절편을 증폭시켰다.

[표 1]

프라이머	서열
pOpIE2 forward primer	5'-GATATCTCATGATGATAAACAATGTATGGTGC-3'
pOpIE2 reverse primer	5'-GCGGCCGCAAGCTTTAAATTCGAACAGATGC-3'
OpIE2 pA forward primer	5'-GAATTCGTTTATCTGACTAAATCTTAGTTTG-3'
OpIE2 pA reverse primer	5'-GATATCGAGCATCGATCCACGCGCTTG-3'

상기 pOpIE2 DNA 절편 및 OpIE2 pA DNA 절편을 곤충세포 발현용 벡터인 pIZT/V5-His 벡터의 EcoR I/EcoR V 및 EcoR V/Not I 제한효소 절단부위에 각각 클로닝하여 재조합 단백질의 발현을 조절하는 두 쌍의 프로모터-터미네이터를 갖춘 재조합 pIZT2 벡터를 구축하였다(도 1의 모식도 참조).

인플루엔자 H1N1 바이러스 [Influenza A/Korea/01/2009(H1N1)] genome을 주형으로 한 RT-PCR을 통해 M1(서열번호 1) 및 M2(서열번호 2) 단백질 DNA 절편을 각각 확보하였다. 이 M1 및 M2 단백질 DNA 절편을 상기에서 구축한 pIZT2 벡터의 Spe I/EcoR I 및 Not I/Xba I 제한효소 절단부위에 각각 클로닝하여 재조합 pIZT2/M1-M2 벡터를 구축하였다(도 2의 모식도 참조).

1-2. 곤충세포의 형질전환

상기 재조합 pIZT2/M1-M2 벡터(2.2 µg)를 250 µl의 Express Five SFM(Express Five Serum Free Medium, Invitrogen)에 혼합하고, Cellfectin II reagent(Invitrogen) 18 µl가 혼합된 250 µl의 Express Five SFM과 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 웰당 1.8×10^6 개의 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)의 BT1-Tn-5B1-4 세포(Invitrogen)가 분주된 6 well plate의 well에 상기 pIZT2/M1-M2 벡터/Cellfectin II reagent 혼합액을 첨가하고 2일간 배양하여 형질전환을 유도하였다.

pIZT/V5-His 벡터에 zeocin-GFF 서열이 존재하므로, pIZT2/M1-M2 벡터로 형질전환된 세포들은 zeocin 항생제에 저항성을 갖는다. 따라서 상기 배양한 곤충세포들을 회수하고 300 µg/ml의 zeocin(Invitrogen) 항생제가 첨가된 Express Five SFM 배지에 첨가하고 배지를 5일 간격으로 교체해 주면서 zeocin 항생제에 저항성을 지니는 곤충세포를 약 5주간의 선별기간을 거쳐 선별하였다.

<실시예 2> NA 및 HA 단백질을 동시에 발현하는 재조합 플라스미드 벡터의 제조 및 형질전환

2-1. NA 및 HA 단백질을 동시에 발현하는 재조합 플라스미드 벡터 제조

pCoHygro 벡터에 포함된 *Orgyia pseudotsugata* immediate-early 2 promoter (pOpIE2) 및 *Orgyia pseudotsugata* immediate-early 2 poly A terminator (OpIE2 pA)를 주형으로 하고, LA Taq polymerase(Takara, Japan) 및 상기 표 1의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여, pOpIE2 DNA 절편 및 OpIE2

pA DNA 절편을 증폭시켰다.

[0043] 상기 pOpIE2 DNA 절편 및 OpIE2 pA DNA 절편을 곤충세포 발현용 벡터인 pCoHygro 벡터의 SphI/EcoRV, EcoRV/SalI 제한효소 절단부위에 각각 클로닝하여 재조합 단백질의 발현을 조절하는 두 쌍의 프로모터-터미네이터를 갖춘 재조합 pICTx2 벡터를 구축하였다(도 3의 모식도 참조).

[0044] 인플루엔자 H1N1 바이러스 [Influenza A/Korea/01/2009(H1N1)] genome을 주형으로 한 RT-PCR을 통해 NA(서열번호 3) 및 HA(서열번호 4)의 DNA 절편을 각각 확보하고 상기에서 준비한 pICTx2 벡터의 SpeI/EcoRI 및 NotI/SacII 제한효소 절단부위에 각각 클로닝하여 재조합 pICTx2/NA-HA 벡터를 구축하였다(도 4의 모식도 참조).

[0045] 2-2. 곤충세포의 형질전환

[0046] 실시예 1에서 준비한 M1, M2 단백질을 동시에 발현하는 BT1-Tn-5B1-4 세포를 6 well plate의 well에 분주하였다. 상기 2-1에서 준비한 재조합 pICTx2/NA-HA 벡터(2.2 μ g)를 250 μ l의 Express Five SFM(Express Five Serum Free Medium, Invitrogen)에 혼합하고, Cellfectin II reagent(Invitrogen) 18 μ l가 혼합된 250 μ l의 Express Five SFM과 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 상기 재조합 pICTx2/NA-HA 벡터 혼합액을 분주된 BT1-Tn-5B1-4 세포에 첨가하고 2일간 배양하여 형질전환을 유도하였다.

[0047] pICTx2/NA-HA 벡터에 하이그로마이신 저항성 선별마커가 존재하므로, 형질전환된 세포들은 하이그로마이신 항생제에 저항성을 갖는다. 따라서 상기 배양한 곤충세포들을 회수하고 300 μ g/ml의 하이그로마이신 B(Invitrogen) 항생제가 첨가된 Express Five SFM 배지에 첨가하고 배지를 5일 간격으로 교체해 주면서 하이그로마이신 B에 저항성을 지니는 곤충세포를 약 5주간의 선별기간을 거쳐 선별하였다. 선별된 재조합 곤충세포를 BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포로 명명하였다.

[0048] <실시예 3> 곤충세포 추출물에서 M1, M2, HA, NA 단백질 발현 확인

[0049] BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포 내에서 재조합 M1, M2, HA, NA 단백질이 발현되는지 여부를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0050] BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포를 6 well plate에 well당 1×10^6 개를 첨가하고 27℃ 배양기에서 4일간 배양하였다. 세포 배양액으로부터 세포를 회수하고 세포로부터 단백질을 추출하였다. 단백질 추출물을 anti-H1N1 M1 항체, anti-H1N1 M2 항체, anti-H1N1 NA 항체, anti-H1N1 HA 항체를 이용한 Western blot으로 분석하여 재조합 HA, NA, M1, M2 단백질이 세포내에서 각각 안정적으로 발현됨을 확인하였다(도 5 참조). 발현된 M1, M2, HA, NA 단백질의 크기는 각각 28, 17, 60, 70 kDa 이었다.

[0051] 상기 결과로부터 BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포 내에서 H1N1 바이러스의 재조합 M1, M2, HA, NA 단백질이 안정적으로 발현됨을 알 수 있다.

[0052] <실시예 4> 곤충세포 배양배지에서 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자 생산 확인

[0053] 4-1. 웨스턴 블롯

[0054] BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포 5×10^6 개를 T-25 culture flask(SPL, Korea)에 첨가하고 27℃ 배양기에서 4일간 배양하였다. 세포배양액을 원심분리하여 세포가 제거된 세포배양 배지를 확보하고, 확보한 세포배양 배지를 30%(w/w) sucrose cushion을 지니는 원심분리 용기에 첨가한 후 32,000 rpm에서 2시간 동안 원심분리하였다. 원심분리에서 얻은 침전물로 anti-H1N1 M1, anti-H1N1 M2, anti-H1N1 NA, anti-H1N1 HA 항체를 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다. 도 6에 나타난 바와 같이 M1, M2, NA, HA 단백질이 30% sucrose cushion 침전물에 존재함을 알 수 있었다. M1, M2, NA, HA 단백질이 바이러스 유사 입자를 구성하지 못하는 경우 세포 밖으로 분비되어 세포배양 배지 내에 존재할 수 없으므로, 상기 결과로부터 상기 단백질들이 형질전환된 곤충세포에서 생산되어 바이러스 유사 입자를 구성했음을 알 수 있었다.

[0055] 또한 상기 30% sucrose cushion 침전물을 30~60% sucrose density gradient를 지니는 원심분리 용기에 첨가하고 32,000 rpm으로 3시간 동안 초원심분리하여 분획한 후 웨스턴 블롯으로 재조합 M1, M2, NA, HA 단백질의 존재를 분석하였다(도 7). 그 결과 M1, M2, NA, HA 단백질이 대부분 함께 존재하는 것을 알 수 있었다(4, 5번 분획). 상기 결과로부터 상기 단백질들이 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자를 구성했음을 알 수 있었다.

[0056] 4-2. TEM 관찰

[0057] 4-1에서 확보한 4, 5번 분획물을 nickel grid에 1분간 부착시키고 2% uranyl acetate로 1분간 염색한 후 에너지과투과 전자현미경 (EF-TEM)으로 관찰하여, 약 80-100 nm의 크기를 지니는 구형의 입자를 확인하였다(도 8).

[0058] 상기 결과로부터 형질전환된 곤충세포에서 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자가 생산되어 배양배지로 분비됨을 알 수 있었다.

[0059] <실시예 5> M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자 생산량

[0060] BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA 세포를 배양한 배양배지 100 ml를 30% (w/v) sucrose cushion을 지나는 원심분리 용기에 첨가한 후 32,000 rpm에서 2시간 동안 원심분리하였다.

[0061] 침전물에 존재하는 단백질의 함량을 확인하였다. 또한 상기 실시예 3에서 M1-M2-NA-HA가 바이러스 유사 입자로 존재함을 확인하였으므로, 침전물에 존재하는 HA 활성을 확인함으로써 간접적으로 M1-M2-NA-HA 바이러스 유사 입자의 활성을 확인하였다.

[0062] 결과는 하기 표 2과 같이 나타났다.

[0063] [표 2]

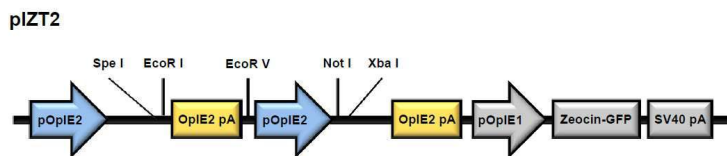
	Culture volume (mL)	Precipitation on 30% sucrose cushion	
		Protein content (mg)	Hemagglutination activity (HAU/mg)
BT1-Tn-5B1-4/M1-M2-NA-HA	100	0.07	100

[0064]

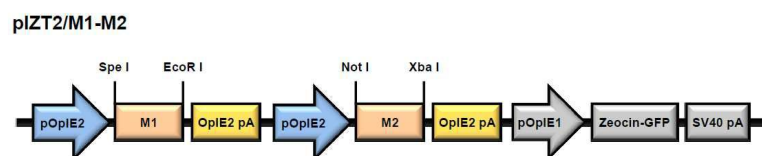
[0065] 표 2에서와 같이, 100 ml의 배양배지 당 총 0.07 mg의 단백질이 존재하였으며, HA 활성은 100 HAU/mg으로 매우 높게 측정되었다.

도면

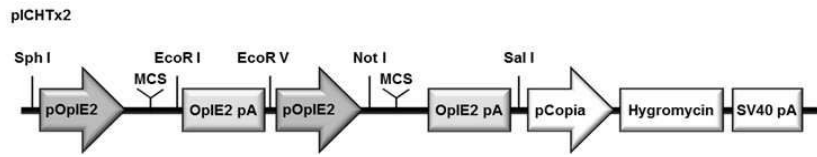
도면1



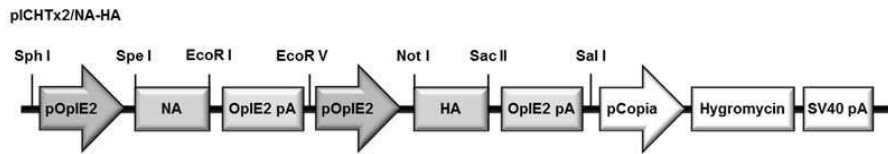
도면2



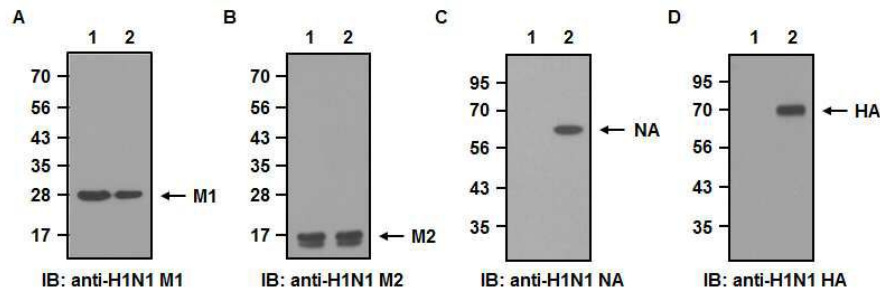
도면3



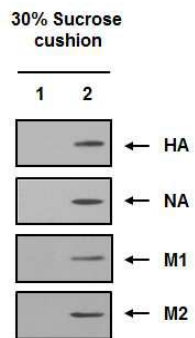
도면4



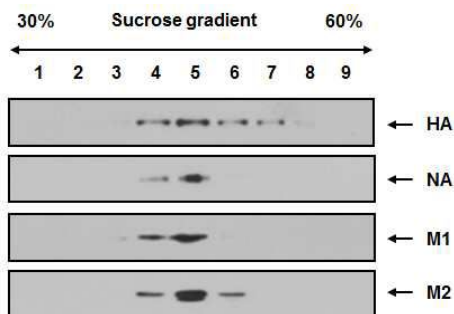
도면5



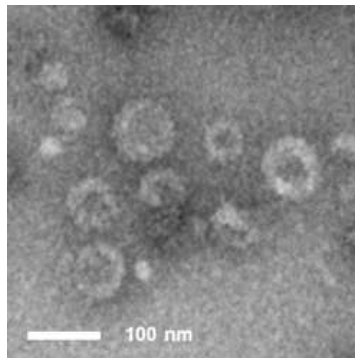
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Method for manufacturing influenza vaccine material M1-M2-NA-HA virus-like-particle using insect cell expression system
 <130> P15-057-KHU
 <160> 6
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Influenza M1 gene
 <400> 1

```

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttcttttcta tcatcccgtc aggccccctc      60
aaagccgaga tcgcgcagag actggaaaagt gtctttgcag gaaagaacac agatcttgag      120

gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcttgtcac ctctgactaa gggaatttta      180
ggatttgtgt tcacgtcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc      240
caaaatgccc taaatgggaa tggggacccg aacaacatgg atagagcagt taaactatac      300
aagaagctca aaagagaaat aacgttccat ggggccaagg aggtgtcact aagctattca      360
actggtgcac ttgccagtgt catgggcctc atatacaaca ggatgggaac agtgaccaca      420
gaagctgctt ttggtctagt gtgtgccact tgtgaacaga ttgctgattc acagcatcgg      480
tctcacagac agatggctac taccaccaat ccactaatca ggcatgaaaa cagaatggtg      540

ctggctagca ctacggcaaa ggctatggaa cagatggctg gatcgagtga acaggcagcg      600
    
```

gaggccatgg aggttgctaa tcagactagg cagatggtag atgcaatgag aactattggg	660
actcacccta gctccagtgc tggctgaaa gatgaccttc ttgaaaattt gcaggcctac	720
cagaagcgaa tgggagtga gatgcagcga ttcaagtga	759
<210> 2	
<211> 294	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Influenza M2 gene	
<400> 2	
atgagcttcc taaccgaggt cgaaacgcct accagaagcg aatgggagtg cagatgcagc	60
gattcaagtg atcctctcgt cattgcagca aatatcattg ggatcttgca cctgatattg	120
tggattactg atcgctcttt tttcaaatgt atttatcgtc gctttaaata cggtttgaaa	180
agagggcctt ctacggaagg agtgcctgag tccatgaggg aagaatatca acaggaacag	240
cagagtgcctg tggatgttga cgatgggtcat ttgtcaaca tagagctaga gtaa	294
<210> 3	
<211> 1410	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Influenza NA gene	
<400> 3	
atgaatccaa accaaaagat aataaccatt gggtcggctc gtatgacaat tggaatggct	60
aacttaatat tacaaattgg aaacataatc tcaatatgga ttagccactc aattcaactt	120
gggaatcaaa atcagattga aacatgcaat caaagcgtca ttacttatga aaacaacact	180
tgggtaaatc agacatatgt taacatcagc aacaccaact ttgctgctgg acagtcagtg	240
gtttccgtga aattagcggg caattcctct ctctgccctg ttagtggatg ggctatatac	300
agtaaagaca acagtataag aatcgggttc aagggggatg tgtttgtcat aagggaacca	360
ttcatatcat gctccccctt ggaatgcaga accttcttct tgactcaagg ggccttgcta	420
aatgacaaac attccaatgg aaccattaaa gacaggagcc catatcgaa cctaattgagc	480
gttcctattg gtgaagttcc ctctccatac aactcaagat ttgagtcagt cgcttgggtca	540
gcaagtgcct gtcatgatgg catcaattgg ctaacaattg gaatttctgg cccagacaat	600
ggggcagttg ctgtgttaaa gtacaacgga ataataacag acactatcaa gagttggaga	660
aacaatatat tgagaacaca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggttc ttgctttact	720

gtaatgaccg atggaccaag taatggacag gcctcataca agatcttcag aatagaaaag	780
ggaaagatag tcaaatcagt cgaaatgaat gcccctaatt atcactatga ggaatgctcc	840
tgttatcctg attctagtga aatcacatgt gtgtgcaggg ataactggca tggctcgaat	900
cgaccgtggg tgcctttcaa ccagaatctg gaatatcaga taggatacat atgccgtggg	960
attttcggag acaatccacg ccctaataat aagacaggca gttgtggtcc agtatcgtct	1020
aatggagcaa atggagtaaa aggattttca ttcaaatacg gcaatggtgt ttggataggg	1080
agaactaaaa gcattagtgc aagaacggg tttgagatga tttgggatcc gaacggatgg	1140
actgggacag acaataactt ctcaataaag caagatatcg taggaataaa tgagtggcca	1200
ggatatagcg ggagttttgt tcagcatcca gaactaacag ggctggattg tataagacct	1260
tgcttctggg ttgaactaat cagagggcga cccaaagaga acacaatctg gactagcggg	1320
agcagcatat ccttttctgg tgtaaacagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt	1380
gctgagttgc catttaccat tgacaagtaa	1410
<210> 4	
<211> 1701	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Influenza HA gene	
<400> 4	
atgaaggcaa tactagtagt tctgtatat acatttgcaa ccgcaaatgc agacacatta	60
tgtataggtt atcatgcgaa caattcaaca gacactgtag acacagtact agaaaagaat	120
gtaacagtaa cacactctgt taaccttcta gaagacaagc ataacgggaa actatgcaaa	180
ctaagagggg tagccccatt gcatttgggt aaatgtaaca ttgctggctg gatcctggga	240
aatccagagt gtgaatcact ctccacagca agctcatggt cctacattgt ggaaacatct	300
agttcagaca atggaacgtg ttaccagga gatttcacg attatgagga gctaagagag	360
caattgagct cagtgtcatc atttgaaagg tttgagatat tcccgaagac aagttcatgg	420
cccaatcatg actcgaacaa aggtgtaacg gcagcatgtc ctcatgctgg agcaaaaagc	480
ttctacaaaa atttaatat gctagttaaa aaaggaaatt cataccaaa gtcagcaaaa	540
tcctacatta atgataaagg gaaagaagtc ctctgtctat ggggcattca ccatccatct	600
actagtgtg accaacaag tctctatcag aatgcagatg catagtttt tgtgggtca	660
tcaagataca gcaagaagtt caagccggaa atagcaataa gacccaaagt gagggatcaa	720
gaaggagaaa tgaactatta ctggacacta gttagagccg gagacaaaat aacattcgaa	780

gcaactggaa atctagtgg accgagatat gcattcgcaa tggaaagaaa tgctggatct 840
 ggtattatca tttcagatac accagtccac gattgcaata caacttgtca gacaccaag 900
 ggtgctataa acaccagcct cccatttcag aatatacatc cgatcacaat tggaaaatgt 960
 ccaaaatatg taaaaagcac aaaattgaga ctggccacag gattgaggaa tgtcccgtct 1020

attcaatcta gaggcctatt tggggccatt gccggtttca ttgaaggggg gtggacaggg 1080
 atggtagatg gatggtacgg ttatcaccat caaatgagc aggggtcagg atatgcagcc 1140
 gacctgaaga gcacacagaa tgccattgac gagattacta acaaagtaaa ttctgttatt 1200
 gaaaagatga atacacagtt cacagcagta ggtaaagagt tcaaccacct ggaaaaaaga 1260
 atagagaatt taaataaaaa agttgatgat ggtttcttgg acatttggac ttacaatgcc 1320
 gaactgttgg ttctattgga aaatgaaaga actttggact accacgattc aaatgtgaag 1380
 aacttatatg aaaaggttaag aagccagcta aaaaacaatg ccaaggaaat tggaaacggc 1440

tgctttgaat tttaccacaa atgcgataac acgtgcatgg aaagtgtcaa aaatgggact 1500
 tatgactacc caaaatactc agaggaagca aaattaacaa gagaagaaat agatggggta 1560
 aagctggaat caacaaggat ttaccagatt ttggcgatct attcaactgt cgccagtcca 1620
 ttggtactgg tagtctccct gggggcaatc agtttcttga tgtgctctaa tgggtctcta 1680
 cagtgttaga tatgtattta a 1701

<210> 5

<211> 563

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Orgyia pseudotsugata immediate-early 2 promoter

<400> 5

tcatgatgat aaacaatgta tgggtctaata gttgcttcaa caacaattct gttgaactgt 60
 gttttcatgt ttccaacaa gcacctttat actcgggtggc ctccccacca ccaacttttt 120
 tgcaactgcaa aaaaacacgc ttttgacgc gggcccatat atagtacaaa ctctacgttt 180
 cgtagactat ttacataaa tagtctacac cgttgtatag gtcctaaata cactaccaca 240
 cattgaacct ttttgacgtg caaaaaagta cgtgtcggca gtcacgtagg cggccttat 300
 cgggtcgcgt ccgtgcagt acgaatcaca ttatcggacc ggacgagtgt tgtcttatcg 360
 tgacaggacg ccagcttcct gtgttgctaa ccgcagccgg acgcaactcc ttatcggaac 420

aggacgcgcc tccatatcag ccgcgcgtta tctcatgcgc gtgaccggac acgagcgccc 480
 cgtcccgttt atcgcgccta taaatcacgc ccgcaacgat ctggtaaaca cagttgaaca 540

gcattctgttc gaatttaaag ctt 563

<210> 6

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Orgyia pseudotsugata immediate-early 2 poly A terminator

<400> 6

gtttatctga ctaaacttta gtttgattg tcatgtttta atacaatatg ttatgtttaa 60

atatgttttt aataaatttt ataaaataat ttcaactttt attgtaacaa cattgtccat 120

ttacacactc ctttcaagcg cgtgggatcg atgctc 156