



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0041134
(43) 공개일자 2014년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/20 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0108142

(22) 출원일자 2012년09월27일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울시 성북구 안암로 145 (안암동)

(72) 발명자

이지원

서울 광진구 아차산로70길 62, 301동 204호 (광장동, 광장현대3단지아파트)

안금영

경기 안산시 상록구 양지편3길 2, 202호 (이동)

송중암

서울 성북구 안암로 145, 제2공학관 251호 (안암동5가, 고려대학교이과대학)

(74) 대리인

특허법인다나

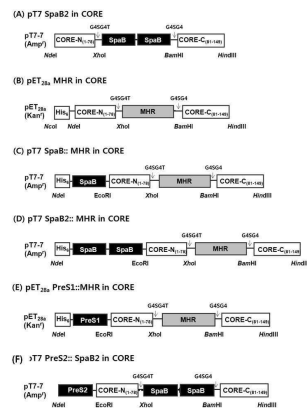
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 단백질 나노입자 기반의 복합백신

(57) 요약

본 발명은 단백질 나노입자 기반의 복합백신에 관한 것으로, 보다 상세하게는, B형 간염 바이러스의 캡시드 단백질의 표면에 면역증강제 또는 항원을 발현하는 단백질 나노입자 소단위체들이 혼합된 키메라 구조를 갖는 단백질 나노입자를 제공한다. 상기 단백질 나노입자는 하나의 단백질 나노입자 표면에 항원과 면역증강제를 동시에 표출 시킴으로써 단백질 나노입자에 의한 면역세포 인식을 향상시키고, 면역증강제로 스타필로코컬 단백질 에이를 사용하여 항원의 면역세포로의 타겟팅 효율을 높임으로써 백신의 면역원성을 향상시키는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012008085
부처명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원_도약연구
연구과제명	의료기능 맞춤형 단백질 나노입자 기반 차세대 나노의료 혁신기술 개발
기 여 율	4/5
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0029409
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터육성(ERC)
연구과제명	실시간 체외검지용 기능성 소재연구
기 여 율	1/5
주관기관	성균관대학교 산학협력단
연구기간	2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체(subunit); 및

스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 1종 이상의 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체를 포함하는 복합 단백질 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 복합 단백질 나노입자는

스파이크 팁 부위에 면역증강제를 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체; 및

스파이크 팁 부위에 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 것인 복합 단백질 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

면역증강제는 스태필로코컬 단백질 에이(Staphylococcal protein A), 열충격단백질(heat shock protein), Flt-3L(fms-like tyrosine kinase 3 ligand), 과립구큰포식 세포집락자극인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2) 및 플라젤린(Flagellin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 복합 단백질 나노입자.

청구항 4

제3항에 있어서,

면역증강제는 스태필로코컬 단백질 에이(Staphylococcal protein A)의 B 도메인인 복합 단백질 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서,

면역증강제를 표출하는 나노입자의 소단위체는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 79-80번째 아미노산 서열 사이, 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 스태필로코컬 단백질 에이(Staphylococcal protein A)의 B 도메인 또는 상기 B 도메인과 PreS1, PreS2 및 MHR(Major hydrophilic region)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항원의 아미노산 서열 부분이 연결된 키메라 단백질로부터 제조되는 것인 복합 단백질 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서,

항원은 B형 간염 표면 항원, A형 간염 표면 항원 및 C형 간염 표면 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 복합 단백질 나노입자.

청구항 7

제6항에 있어서,

B형 간염 표면 항원이 PreS1, PreS2 및 MHR(Major hydrophilic region)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 복합 단백질 나노입자.

청구항 8

제1항에 있어서,

항원을 표출하는 나노입자의 소단위체는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 79-80번째 아미노산 서열 사이, 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 PreS1, PreS2 및 MHR로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항원의 아미노산 서열 부분이 연결된 키메라 단백질로부터 제조되는 것인 복합 단백질 나노입자.

청구항 9

제1항에 있어서,

면역증강제를 표출하는 나노입자의 소단위체 및 항원을 표출하는 나노입자의 소단위체는 1 : 1 내지 4 의 중량 비로 혼합되어 있는 복합 단백질 나노입자.

청구항 10

B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 톱, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터 및 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 톱, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 1종 이상의 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터를 숙주세포에 도입하여 상기 두 개의 벡터를 모두 포함하는 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 제1항의 복합 단백질 나노입자의 제조방법.

청구항 11

제1항의 복합 단백질 나노입자; 및

약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 백신 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

스파이크 톱, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 단백질 나노입자; 및

스파이크 톱, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 부위에 1종 이상의 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 단백질 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함하는 백신 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

백신 조성물은 B형 간염 바이러스에 대한 면역반응을 유도하기 위해 사용되는 것인 백신 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

면역증강제는 스타필로코컬 단백질 에이(Staphylococcal protein A), 열충격단백질(heat shock protein), Flt-3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand), 과립구큰포식 세포집락자극인자 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 인터루킨-2 (interleukin-2, IL-2) 및 플라젤린(Flagellin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 백신 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서,

항원은 B형 간염 표면 항원, A형 간염 항원 및 C형 간염 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 백신 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 B형 간염 바이러스의 캡시드 단백질의 표면에 면역증강제 또는 항원을 표출하는 단백질 나노입자 소단위체들이 혼합된 키메릭 구조를 갖는 단백질 나노입자를 B형 간염 백신에 사용하는 단백질 나노입자 기반의 복합백신에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로 백신은 생백신, 약독화백신, 사백신, 재조합 백신이 있다. 생백신 및 약독화 백신은 바이러스의 제조 시일이 오래 걸리고 생산 단가가 높을 뿐 아니라 안정성 문제를 수반하고 있다. 그러므로 안정성이 뛰어나고 생산 효율이 좋은 재조합 백신의 연구 개발이 활발히 진행되고 있으나 재조합 백신의 경우 기존 바이러스 유래의 백신에 비해 면역원성이 낮은 단점이 있다.

[0003] 이를 극복하기 위하여 면역원성을 향상시킬 수 있는 면역보조제 (면역증강제, Adjuvant)의 개발이 요구되어 왔다. 사용 중인 면역증강제로는 수산화 알루미늄 겔, 동물 또는 식물 유래의 오일, 미네랄 오일 등이 주로 사용되고 있으나 세포성 면역유발 효과가 떨어지는 단점이 있다. 특히 미국 식약청의 허가를 받아 제품화 된 면역증강제로인 산화 알루미늄 겔은 세포성 면역 유발 효과가 낮으며, 면역증강제가 첨가된 백신은 주사 후에 과민반응을 일으킬 수 있음이 알려져 그 사용범위가 넓지는 않다. 또한 알루미늄 겔은 생체에 축적되어 생체 독성을 나타낼 뿐 아니라 알러지 반응 등 유발한다고 알려지면서 생체 안정성 문제가 대두되고 있다(Petrovsky, N. and Aguilar, J.C., *Immunol Cell Biol.* 2004, 82:488-96). 때문에 더 나은 면역증강제의 개발이 요구되는 실정이다.

[0004] 기존 연구에 따르면 대장균 장독소 단백질인 콜레라 독소의 효소 활성 부위인 A 도메인(Cholera Toxin A, 또는 CTA)와 스타필로코커스 유래의 항체 결합 단백질 A의 D 도메인(*Staphylococcus aureus* protein A의 domain D, 또는 DD) 을 결합 시킨 단백질 (CTA1-DD) 가 가용성 단백질 항원에 대한 항체 형성물을 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 콜레라 독신 중 세포 결합 수용체와 결합하는 콜레라 독신 B 도메인(cholera toxin B, 또는 CTB)이 제거되어 콜레라 독신이 세포에 영향을 미치지 못하지만 CTB를 항체 결합 도메인으로 치환함으로써 B세포 표적이 가능하게 했기 때문이다. 즉, 항체 결합 단백질은 B 림프구 및 수지상세포의 표면 수용체와 결합이 가능하므로 독소 효소 활성을 가지는 CTA를 면역세포(B 림프구 또는 수지상세포)에 전달 가능하므로 면역 증강 효과를 나타내는 것이다(Eriksson, A. and Lycke, N., *Vaccine*. 2003,22:185-93; Leonetti, M. *et al.* *J Immunol.* 1998, 160:3820-7).

[0005] 또한 재조합 백신 제작에 있어서 바이러스 유래의 단백질 나노입자는 운반체로 널리 사용되고 있다. 특히 B형

간염 바이러스의 캡시드 단백질(Hepatitis B virus core antigen 또는 HBVcAg 또는 HVcAg)는 대장균에서 수용성으로 발현이 되어 자가조립을 통해 구형의 나노입자를 만들 뿐 아니라 외래 단백질을 융합할 경우 외래 단백질의 고집적 표출이 가능하다. 또한 자가조립을 통해 35 nm 정도의 구형을 이루며 이는 면역 세포에 의해 쉽게 인식되고, 항원단백질의 융합 발현을 통해 항원이 고밀도로 표출된 단백질 나노입자를 제작할 수 있으므로 재조합 항원 개발 시 운반체로 활용하기 위한 연구가 진행되어 왔다(Pumpens, P. and Grens, E. *Intervirolgy*, 2001, 44:98-114; Schodel, F. *et al.*, *J. Biotechnol.*, 1996, 44:91-6).

[0006] 고효율 복합 백신을 생산하기 위해서는 1) 질병 특이적인 항원 단백질과 항원 운반체의 조합 가능성 분석, 2) 복합 백신의 면역원성 증대 3) 면역증강제와의 효율적 조합을 위한 기술 개발이 우선되어야 하며 특히 면역원성이 높은 복합 백신의 생산 시스템의 구축이 우선시 되어야 한다. 즉, 제조 설비 구축 및 장기간의 기술 개발 기간이라는 이유로 신규 업체의 조기 시장 진입이 어려운 백신 산업 시장에 있어서, 빠른 백신 후보 물질의 검증, 재조합 단백질의 생산 공정 단축을 위한 단백질 나노입자 설계 및 재조합 단백질 생산 기술 개발이 요구되는 실정이다.

[0007] 이러한 문제를 근본적으로 해결하기 위해서는 새로운 개념의 고효율 백신 생산 시스템 및 응용 분야의 대변화 등 기존 백신 생산 시스템이 가지고 있는 단점을 혁신적으로 해결 할 수 있는 기술이 확보되어야 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제2011-0090347호
(특허문헌 0002) 2. 대한민국 등록특허 제10-0836745호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 1. The Korean Journal of Hepatology, vol.14, pp.446-464, 2008
(비특허문헌 0002) 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.96, pp.1915-1920, 1999.03.02

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 항원과 면역증강제를 동시에 표출하는 키메라 단백질 나노입자를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질 나노입자를 기반으로 하여 세포성 면역 유도 효과를 높이고 부작용을 줄일 수 있는 효과적인 B형 간염 백신을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체(subunit); 및 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 1종 이상의 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체를 포함하는 복합 단백질 나노입자를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터 및 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상

의 부위에 1종 이상의 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터를 숙주세포에 도입하여 상기 두 개의 벡터를 모두 포함하는 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 본 발명의 복합 단백질 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 상기 복합 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 하나의 단백질 나노입자 표면에 항원과 면역증강제를 동시에 표출시킴으로써 단백질 나노입자에 의한 면역세포 인식을 향상시키고, 면역증강제로 스타필로코컬 단백질 에이를 사용하여 항원의 면역세포로의 타겟팅 효율을 높임으로써 백신의 면역원성을 향상시키는 효과가 있다.

[0016] 또한, 항원 및 면역증강제를 동시에 표출하는 복합 백신 단백질 나노입자를 대장균에서 대량생산함으로써 제조 시간과 비용을 절감할 수 있다.

[0017] 아울러, 유전공학적인 기법을 통해 다양한 항원에 대한 연구가 가능하므로 새로운 백신 개발 및 면역원성 검증에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 발현 벡터 모식도로, (A)는 SpaB 표출 단백질 나노입자, (B)는 MHR 표출 단백질 나노입자, (C)는 MHR 표출 단백질 나노입자의 아미노 말단에 SpaB 가 융합된 단백질 나노입자, (D)는 MHR 표출 단백질 나노입자의 아미노 말단에 SpaB 가 두 번 중복되게 융합된 단백질 나노입자, (E)는 PreS1과 MHR을 표출하는 단백질 나노입자, (F)는 PreS2와 SpaB를 융합한 단백질 나노입자 생산을 위한 발현 벡터이다.

도 2는 본 발명의 발현 벡터를 이용하여 형질전환 된 대장균에서 재조합 단백질의 발현 결과 및 정제 후 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것으로, (A)는 MHR 표출 단백질 나노입자 발현 결과 및 정제 결과, (B)는 도 1(A) 및 도 1(B)에 명시된 두 개의 발현 벡터를 동시에 형질전환 시킨 대장균에서 재조합 단백질 생산 후 정제한 결과이다. (C)는 도 1(E) 및 도 1(F)에 명시된 두 개의 발현 벡터를 동시에 형질전환 시킨 대장균에서 재조합 단백질 생산 후 정제한 결과이다.

도 3는 ELISA 를 이용한 항체가 분석에 사용되는 표준곡선을 나타낸 것이다.

도 4는 SpaB의 면역증강효과 검증을 위한 1차 동물 실험 결과를 나타낸 것으로, (A)는 동물 실험에 적용한 백신 군, (B)는 백신군 투여 후 쥐 혈청 내 B형 간염 바이러스 항체 농도 측정을 통한 항체 양전률 비교 결과 [Seroconverted rate: 각 백신군 별 접종 후 20마리 쥐에서 추출한 혈청 내 B형 간염 바이러스 항체 농도가 4mIU/mL 이상인 쥐 마리수의 백분율 (%), GMT: 항체 농도의 기하평균 (mIU/mL)와 혈청 내 B형 간염 바이러스 항체 중 IgG1 농도/IgG2a 값의 기하평균(IgG/IgG2a), IgG1/IgG2a의 비율이 1이상인 개체수의 백분율 (IgG1/IgG2a>1)]이다.

도 5는 본 발명의 발현 벡터를 이용하여 형질전환 된 대장균에서 재조합 단백질의 발현 결과 및 정제 후 SDS-PAGE 결과로, (A)는 MHR 표출 단백질 나노입자의 아미노 말단에 SpaB 가 융합된 단백질 나노입자 발현 및 정제 결과, (B)는 MHR 표출 단백질 나노입자의 아미노 말단에 SpaB 가 두 번 중복되게 융합된 단백질 나노입자 발현 및 정제 결과이다.

도 6은 SpaB의 융합 위치에 따른 면역원성 비교를 위한 2차 동물 실험 결과로, (A)는 동물 실험에 적용한 백신 군, (B)는 백신군 투여 후 쥐 혈청 내 B형 간염 바이러스 항체 농도 측정을 통한 항체 양전률 비교 결과 [Seroconverted rate: 각 백신 군 별 접종 후 20마리 쥐에서 추출한 혈청 내 B형 간염 바이러스 항체 농도가 4mIU/mL 이상인 쥐 마리 수의 백분율 (%), GMT: 항체 농도의 기하평균 (mIU/mL), (C)는 혈청 내 B형 간염 바이러스 항체 중 IgG1 농도/IgG2a 값의 기하평균(IgG/IgG2a)]이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0020] 본 발명자들은 새로운 개념의 고효율 백신 생산 시스템을 개발하고자 항원과 면역증강제를 동시에 발현하는 백신 시스템을 제작하였다. 면역세포 타겟팅을 통한 면역 증강 효과가 있다고 알려진 스태필로코커스 아우레우스 단백질 에이(Staphylococcus aureus protein A)의 B 도메인(SpA_B)을 HBVcAg의 표면에 표출시키고, 이 단백질 나노입자에 항원 단백질을 동시에 표출시켜 고효율 복합 백신을 개발하고자 하였다. 모델 질환으로는 B형 간염으로 선정하였고, B형 간염 백신용 항원으로 B형 간염 바이러스의 표면 단백질 중 주요 항원 부위라고 알려진 MHR(Major hydrophilic region)을 선정하여 단백질 나노입자와 융합 발현함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 따라서, 본 발명은 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체(subunit); 및 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 1종 이상의 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체를 포함하는 복합 단백질 나노입자를 제공한다.
- [0022] 본 명세서에서, 용어 "재조합 단백질(recombinant protein) 또는 융합 단백질(fusion protein)"은 하나의 단백질의 특정 부위, N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다.
- [0023] 용어, "키메라 단백질" 또는 "키메라 나노입자" 또는 "복합 단백질 나노입자"는 최광의 의미로 사용된 것으로서 유전공학 또는 단백질공학 기술을 바탕으로 단백질 나노입자의 표면에 외래 생체 물질을 결합시킴으로써 다양한 기능이 부여된 단백질 또는 단백질 나노입자를 의미한다. 비록 본 발명에서는 HBV 캡시드가 면역증강제 또는 항원의 표면 표출을 모델 바이러스 스캐폴드(scaffold)로 사용되었지만, 다른 바이러스 또는 바이러스-유사 입자들도 표면 항원 또는 면역증강제를 표출하는 키메라 단백질 또는 키메라 나노입자 또는 복합 단백질 나노입자의 생성에 사용될 수 있다.
- [0024] 용어, "표출" 또는 "발현"은 단백질 나노입자의 표면, 예컨대, 스파이크 팁, N-말단(또는 아미노 말단), 또는 C-말단(또는 카복시 말단) 등에 외래 단백질을 제시할 때 사용하는 의미로, 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁, N-말단, 또는 C-말단 등에 외래 단백질이 삽입되어 캡시드 단백질의 자가 조립 시 캡시드의 3차 구조를 유지하면서 스파이크 팁, N-말단, 또는 C-말단 등에 외래 단백질이 표면 표출 또는 발현할 수 있다.
- [0025] 용어, "단백질 나노입자의 소단위체"란 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질(HBVcAg)이 숙주세포, 예컨대, 대장균에서 발현될 경우 240개의 소단위체가 모여서 하나의 나노입자로 자가 조립될 때, 재조합 단백질 나노입자의 소단위체들이 혼합되어 하나의 단백질 나노입자를 이루는데, 이러한 단백질 나노입자의 240개의 각 단위를 단백질 나노입자의 소단위체로 명명한다. 상기 소단위체들은 종류가 같거나 상이한 재조합 단백질로부터 제조될 수 있다. 종류가 상이한 재조합 단백질로부터 제조되는 소단위체들이 자가 조립되는 경우 단백질 나노입자는 키메라 3차 구조를 나타낸다. 이러한 키메라 3차 구조는 외래 단백질을 다양한 위치에서 표출할 수 있어 당업자의 목적에 따라 조절될 수 있다.
- [0026] 용어, "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0027] 용어 "B형 간염 표면 항원" 또는 "HBsAg"은 임의의 HBsAg 항원 또는 HBV 표면 항원의 항원성을 나타내는 이것의 단편을 포함한다. B형 간염 바이러스 표면 항원은 3개의 교호번역 개시코돈(alternate translational start codon)으로부터 생산되는 3개의 서로 관련된 외피단백질(envelope protein)로 구성된다. B형 간염 바이러스 표면 항원의 주요한 성분인 S 단백질은 226개의 아미노산으로 구성되며, 당쇄화 여부에 따라서 p24와 gp27로 명명된다. 중간크기인 M 단백질은 S 도메인의 N말단 부위에 preS2 도메인인 55개 아미노산이 추가된 형태로 당쇄화 여부에 따라서 gp33과 gp36으로 명명된다. 가장 큰 크기의 단백질인 L 단백질은 S 도메인과 preS2 도메인으로 구성된 M 단백질의 N 말단에 preS1 도메인인 119개의 아미노산이 추가된 형태로 당쇄화 여부에 따라 p39와 gp42로 명명된다. 실제 바이러스 외피에서는 이들 L 단백질, M 단백질 및 S 단백질의 S도메인이 이황화결합(disulfide bonds)으로 연결되어 바이러스 입자를 형성한다. 상기 B형 간염 표면 항원은 둘 이상의 면역원성 도메인 또는 동일한 항원으로부터의 에피토프, 둘 이상의 항원 면역원성 도메인들, 또는 동일한 세포, 조직 또는 유기체로부터의 에피토프, 또는 둘 이상의 다른 항원, 둘 이상의 면역원성 도메인, 또는 세포, 조직 또는 유기

체로부터의 에피토프(epitopes)를 포함할 수 있다.

- [0028] 바람직하게는, 본 발명은 B형 간염 바이러스 중 C형 유전자 아형에 속하는 adr 혈청형이 한국 환자에게서 가장 빈번하게 발견된다고 알려져 있으므로(차충환 외, *Korean J Lab Med*, 2009) adr 혈청형의 HBVsAg 중 주요항원 부위라고 알려진 97 내지 169번째 아미노산 서열인 MHR(Major hydrophilic region)(서열번호 1), PreS1(서열번호 14), PreS2(서열번호 15) 등을 B형 간염 표면 항원으로 사용할 수 있다.
- [0029] 용어, "아주반트"는 면역 반응 형성에서 면역원을 보조할 수 있는 물질로, 항원의 생물학적 또는 면역학적 반감기 증가; 항원 제공 서열로의 항원 전달 개선; 항원 제공 세포에 의한 항원 프로세싱 및 제공의 개선; 및 면역 조절성 사이토카인의 생산 유도를 포함하는 하나 이상의 기작과 같은 여러 기작을 통해 작용할 수 있다.
- [0030] 상기 아주반트로 수산화알루미늄, 인산알루미늄 또는 기타 다른 알루미늄 염, 인산칼슘, DNA CpG 모티프, 모노포스포릴 지질 A, 콜레라 독소, 대장균 열불활화 독소, 백일해 독소, 뮤라밀 디펩타이드, 프로인트 불완전 아주반트, MF59, SAF, 면역자극성 복합체, 리포솜, 생체분해성 미소구, 사포닌, 비이온성 블록 공중합체, 뮤라밀 펩타이드 유사체, 폴리포스파젠, 합성 폴리뉴클레오타이드, IFN- γ , IL-2, IL-12, 또는 ISCOMS 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 스파이크 팁, N-말단 또는 C-말단 등에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체와, 스파이크 팁, N-말단 또는 C-말단 등에 1종 이상의 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체가 혼합되어 있는 키메라 구조를 갖는다.
- [0032] 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 나노입자 상에 항원과 면역증강제를 표면 표출시킴으로써 백신의 면역원성 증대 및 면역 유도 활성화 효과를 가질 수 있다. 즉, 본 발명의 복합 단백질 나노입자 상에 항원과 면역증강제가 동시에 존재할 경우 면역증강제에 의한 항원의 B 세포 타겟팅을 가능하게 함으로써 B 세포가 항원 표출 세포(APC)로 활성화시키고 이는 결과적으로 Th1 세포의 활성을 촉진시켜 면역 유도 향상 효과를 가져올 수 있다. 결과적으로 항원과 면역증강제를 동시에 표출하는 복합 단백질 나노입자는 가장 높은 항체 형성율을 보이며, 특히 체액성 면역 반응뿐 아니라 세포성 면역 반응 또한 촉진시킬 수 있다.
- [0033] 일 구체예에 따르면, 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 스파이크 팁 부위에 면역증강제를 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체; 및 스파이크 팁 부위에 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 것일 수 있다.
- [0034] 다른 구체예에 따르면, 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 N-말단 또는 C-말단 부위에 면역증강제를 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체; 및 스파이크 팁 부위에 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 것일 수 있다.
- [0035] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 스파이크 팁 부위에 면역증강제를, N-말단 또는 C-말단 부위에 항원을 동시에 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체; 및 스파이크 팁과 N-말단 또는 C-말단 부위에 종류가 같거나 상이한 1종 이상의 복합 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 것일 수 있다. 이 경우 면역증강제와 항원을 동시에 표출하는 소단위체와 복합 항원을 표출하는 소단위체에서 각 항원은 종류가 같거나 상이할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 3차 구조로 자가조립하기 때문에 면역증강제와 항원의 표출 부위에 따라 면역 증강 효과가 다를 수 있다.
- [0037] 일 구체예에 따르면, HBcAg의 아미노 말단에 면역증강제인 SpaB가 존재할 경우 단백질 나노입자의 표면에 효과적으로 표출되지 않아 B 세포의 BCR에 결합하는 효율이 저하되며, 상기 SpaB를 중복되게 연장하여 HBcAg의 아미노 말단에 융합한 경우 SpaB의 표면 표출이 증가하고 BCR이 결합 능력이 향상됨에 따라 항체 양전률 및 항체 형성 농도가 증가된다. 결과적으로, 상기 면역증강제가 단백질 나노입자 표면의 가장 바깥 부분인 스파이크 팁에 융합 발현되었을 때 B 세포와의 결합 효율이 증가되고 이로 인해 가장 높은 면역 증강 효과를 나타낼 수 있다.
- [0038] 상기 면역증강제는 스태필로코컬 단백질 에이(Staphylococcal protein A), 열충격단백질(heat shock protein), Flt-3L(fms-like tyrosine kinase 3 ligand), 과립구큰포식 세포집락자극인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2) 또는 플라젤린(Flagellin) 등을 사용할 수 있고, 보다 구체적으로는, 스태필로코컬 단백질 에이(Staphylococcal protein A)의 B 도메인을 사용할 수 있다.
- [0039] B형 간염 바이러스 캡시드 단백질은 구조상 스파이크에 해당하는 79-80번째 아미노산 서열 사이, N-말단 또는

C-말단에 외래 단백질을 융합 발현할 경우, 발현된 외래 단백질이 단백질 나노입자의 바깥 표면에 표출될 수 있다. 다만, 이러한 외래 단백질의 표면 표출은 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 3차 구조를 형성하는데 영향을 줄 수 있으므로 상기 3차 구조를 형성할 수 있는 범위에서 외래 단백질을 채택할 수 있다.

[0040] 따라서, 면역증강제를 표출하는 나노입자의 소단위체는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 79-80번째 아미노산 서열 사이, 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 스태필로코컬 단백질 에이(Staphylococcal protein A)의 B 도메인의 아미노산 서열 부분이 연결된 키메라 단백질로부터 제조될 수 있다. 상기 B 도메인이 스파이크 팁에 표출되는 경우 단백질 나노입자의 3차 구조 형성을 위해 B 도메인은 탠덤 리피트로 키메라 단백질에 연결될 수 있고, 상기 B 도메인이 N-말단 또는 C-말단에 표출되는 경우에는 1개 이상의 도메인이 제한 없이 연결될 수 있다.

[0041] 또한, 면역증강제와 항원을 동시 표출하는 나노입자의 소단위체는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 79-80번째 아미노산 서열 사이에 면역증강제를, 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 항원이 연결된 키메라 단백질로부터 제조될 수 있다. 또는 항원이 스파이크 팁에, 면역증강제가 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 연결된 키메라 단백질로부터 제조될 수 있다.

[0042] 상기 항원은 B형 간염 표면 항원, A형 간염 표면 항원, 또는 C형 간염 표면 항원 등을 사용할 수 있다.

[0043] 보다 구체적으로, 상기 항원은 PreS1, PreS2 또는 MHR(Major hydrophilic region) 등의 B형 간염 표면 항원일 수 있다.

[0044] 상기 항원을 표면에 표출시킬 때, 같거나 다른 종류의 항원을 1종 이상 사용할 수도 있다.

[0045] 상기 항원을 표출하는 나노입자의 소단위체는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 79-80번째 아미노산 서열 사이, 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 PreS1, PreS2 및 MHR로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항원의 아미노산 서열 부분이 연결된 키메라 단백질로부터 제조될 수 있다.

[0046] 상기 면역증강제와 항원을 표출하는 나노입자의 소단위체와 항원만을 표출하는 나노입자의 소단위체에서 각 항원의 종류는 같거나 상이할 수 있다.

[0047] 본 발명의 복합 단백질 나노입자에 있어서, 상기 면역증강제를 표출하는 나노입자의 소단위체 및 항원을 표출하는 나노입자의 소단위체는 1 : 1 내지 4 의 중량비로 혼합될 수 있다. 상기 범위 내일 경우, 우수한 항체 양전율과 GMT를 나타낼 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터 및 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위에 1종 이상의 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터를 숙주세포에 도입하여 상기 두 개의 벡터를 모두 포함하는 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 상기 복합 단백질 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0049] 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 도 1에 도시된 바와 같이, 항원 또는 면역증강제를 단백질 나노입자의 표면에 표출되도록 발현 벡터를 구축하여 제조할 수 있다.

[0050] 상기 면역증강제를 표출하는 단백질 나노입자 발현용 벡터 즉, B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁, N-말단 또는 C-말단 등을 나타내는 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터는 카나마이신 저항성 벡터인 pET28a 벡터를, 1종 이상의 항원 표출 단백질 나노입자 발현용 벡터 즉, B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁, N-말단 또는 C-말단 등을 나타내는 부위에 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터는 암피실린 저항성 벡터인 pT7-7 벡터를 뼈대벡터로 하여 제조할 수 있다. 각기 다른 항생제 마커를 가지고 있으므로 대장균에 형질전환 하였을 때 암피실린과 카나마이신 혼합 배지에 도말함으로써 두 개의 발현 벡터를 동시에 포함하는 형질전환체를 선별할 수 있다.

[0051] 상기 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 단백질 나노입자 발현용 벡터에는 HBVcAg의 79-80번째 아미노산 서열 사이, 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 면역증강제가 삽입되거나, HBVcAg의 79-80번째 아미노산 서열 사이에 면역증강제가, N-말단 또는 C-말단 부위에 항원이 삽입되거나, HBVcAg의 79-80번째 아미노산 서열 사이에 항원이, N-말단 또는 C-말단 부위에 면역증강제가 삽입되는 등 단백질 나노입자의 3차 구조를 형성할 수 있는 범위 내에서 제한 없이 사용될 수 있다. 구체적으로, N-HBVcAg(1-78)-(SpaB)2-HBVcAg(81-149)-

C, N-SpaB-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-C, N-(SpaB)2-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-C 또는 N-(PreS2)-HBVcAg(1-78)-(SpaB)2-HBVcAg(81-149)-C 의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터일 수 있다.

[0052] 상기 항원을 표출하는 단백질 나노입자 발현용 벡터에는 HBVcAg의 79-80번째 아미노산 서열 사이, 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단 부위에 1종 이상의 항원이 삽입되어 있을 수 있다. 바람직하게는, N-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-C, 또는 N-PreS1-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터일 수 있다.

[0053] 상기 발현 벡터에서, 면역증강제 또는 항원은 서열번호 12 또는 13의 링커 서열에 의해 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질 (HBVcAg)에 연결될 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁을 나타내는 부위에 면역증강제가 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터는 N-NdeI-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-XhoI-SpaB-SpaB-BamHI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-HindIII-C를 코딩하는, HBV 캡시드 단백질의 스파이크(78-81 a.a) 사이에 SpaB 유전자가 두 번 중복된 유전자가 삽입된 유전자 클론을 얻고 유전자를 수득하고, 이를 플라스미드 pT7-7에 삽입하여 N-HBVcAg(1-78)-SpaB-SpaB-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현벡터 pT7 SpaB2 in CORE를 구축한다. 상기 주형으로 한 유전자는 크게 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분, 스테필로코컬 단백질 에이의 B 도메인이 연속적으로 2개 포함되어 있는 부분, 그리고 캡시드 단백질의 81-149번째 아미노산 서열부분으로 나눌 수 있다(캡시드 단백질의 1-78번째 서열: NCBI Nucleotide accession number AF286594의 염기서열 1901-2134(서열번호 4), 캡시드 단백질의 81-149번째 염기서열: AF286594의 염기서열 2141-2347(서열번호 5), 그리고 단백질 에이의 B 도메인 서열: NCBI nucleotide accession No. M18264, nucleotide sequence 625-813(서열번호 6)).

[0055] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁을 나타내는 부위에 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터는 프라이머쌍(서열번호7, 8)을 사용하여 N-XhoI-MHR-BamHI-C를 암호화하는 유전자 서열을 수득하고, XhoI, BamHI을 이용하여 제한효소 처리한 후 상기 pT7 SpaB2 in CORE의 SpaB가 삽입되었던 부위에 삽입하여 SpaB 대신 MHR이 삽입되도록 라이게이션을 진행하며, N-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라스미드 pT7 MHR in CORE를 구축한다. N-NdeI-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-XhoI-MHR-BamHI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-HindIII-C 구조로 구성된 플라스미드 pT7 MHR in CORE을 다시 NdeI 과 HindIII 제한효소로 절단하여 이를 pET28a 발현 벡터의 NdeI과 HindIII 위치에 삽입하여 최종적으로 pET28a MHR in CORE 발현 벡터를 구축한다.

[0056] 상기에서 구축된 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁을 나타내는 부위에 면역증강제가 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터 및 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 팁을 나타내는 부위에 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터를 1 : 1 내지 4의 중량비로 숙주세포에 도입하여 형질전환 시킨다.

[0057] 상기 발현 벡터들은 각기 다른 항생제 마커를 가지고 있으므로 형질전환체를 종류가 상이한 항생제, 예컨대, 암피실린과 카나마이신 혼합 배지에서 도말함으로써 두 개의 발현 벡터를 동시에 포함하는 형질전환체를 선별할 수 있다.

[0058] 상기에서 선별된 형질전환체를 통상의 배양방법에 따라 배양하여 정제함으로써 본 발명의 복합 단백질 나노입자를 얻을 수 있다.

[0059] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO₄) 침전, 염화 칼슘(CaCl₂) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0060] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

[0061] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시에

(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.

- [0062] 본 발명은 또한 상기 복합 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명의 복합 단백질 나노입자상에 항원과 면역증강제가 동시에 존재할 경우 면역증강제에 의한 항원의 B 세포 타겟팅을 가능하게 함으로써 B 세포가 항원 표출 세포로 활성화하고 이는 결과적으로 Th1 세포의 활성을 촉진시켜 면역 유도 향상 효과가 있을 수 있다. 따라서, 본 발명의 복합 단백질 나노입자는 백신으로 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, B형 간염 바이러스에 대한 면역반응을 유도하기 위해 사용될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 백신 조성물은 스파이크 톱, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 단백질 나노입자; 또는
- [0065] 스파이크 톱, N-말단 및 C-말단으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 부위에 1종 이상의 항원을 표출하는 B형 간염 바이러스 캡시드 유래의 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 단백질 나노입자를 적어도 하나 더 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 면역증강제 또는 면역증강제와 항원을 표출하는 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 단백질 나노입자 또는 1종 이상의 항원을 표출하는 단백질 나노입자의 소단위체로 이루어진 단백질 나노입자는 상술한 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 톱, N-말단 또는 C-말단을 나타내는 부위에 면역증강제 또는 면역증강제와 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터 또는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 스파이크 톱, N-말단 또는 C-말단을 나타내는 부위에 1종 이상의 항원이 삽입된 키메라 단백질을 발현하는 벡터를 각각 숙주세포에 도입하여 형질전환 시켜 제조할 수 있다.
- [0067] 상기 면역증강제 및 항원의 종류는 상술한 바와 같다.
- [0068] 본 발명의 백신 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0069] 상기 담체는 면역원의 보관 및 환자에 대한 면역원의 투여를 용이하게 한다. 약학적으로 허용되는 담체는 완충액, 주사용 멸균수, 일반 식염수 또는 인산염 완충 식염수, 슈크로스, 히스티딘, 염 및 폴리솔베이트 등과 같은 여러 성분을 함유할 수 있다.
- [0070] 한, 본 발명의 백신 조성물은 주사 형태로 투여할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 상기 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- [0071] 상기 백신 조성물의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 20~52mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.
- [0072] 또한, 본 발명은 백신의 면역 반응 유도 기작의 원인을 규명할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 복합 단백질 나노입자에서, 면역증강제로 SpaB를 사용할 경우, 기존 문헌에 의하면 SpaB는 항체의 Fc γ , V β 3B-type B 세포 수용체(B-cell receptor, 또는 BCR)에 직접적으로 결합할 수 있으므로 B 세포 특이적으로 결합이 가능하다. B 세포는 면역 체계에서 T 세포 활성화시킬 수 있는 항원 표출 세포(professional antigen presenting cell, 또는 APCs) 역할을 한다. 휴지기의 B 세포 표면에 존재하는 BCR에 SpaB가 선택적으로 결합하고 B-세포를 활성화하게 된다. 활성화된 B-세포는 APC이 되어 Native T 세포를 활성화시켜 Native T 세포(CD4+, CD8+)을 메모리 T 세포 또는 작동 T 세포로 분화하도록 돕는다. 특히 작동 T 세포는 CD4+ 헬퍼 T 세포(사이토카인 분비, B 세포 활성화)이나, 세포 사멸 활성(cytotoxic killing activity)을 지닌 CD8+ CTL로 분화된다. 차후 CD4+ 작동 T 세포는 cell mediated function(CTL)을 하는 Th1(IL-2, IFN-r, TNF-beta 분비), 또는 B 세포 활성화를 돕는 Th2(IL-4,5,6,10)로 분화됨. Th1, Th2 cell 모두 항체의 생성을 촉진시키지만 이 중

Th1이 활성화되면 IFN- γ 가 촉진되고 IgG 클래스 중 IgG2a로 클래스 스위칭(class switching) 시켜 항체 내 IgG2a의 비율이 증가하게 된다. 또한 Th1으로부터 분비된 IL-2와 IFN- γ 은 CD8 $^{+}$ 전구체가 세포독성 Tc 세포로 분화하는 것을 돕는다. 반면 Th2로부터 분비된 IL-4,5는 IgE 생산을 유도하고 IgG1 생산으로 클래스 스위칭을 유도한다. 따라서 IgG1/IgG2a의 비율을 조사하면 백신의 면역 반응 유도 기작 원인을 규명할 수 있다(immunology 5th edition, W.H. Freeman and Company).

[0074] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 동물 실험 결과 생성된 항체의 IgG1, IgG2a의 농도를 ELISA로 분석한 결과, 실제 체액성 면역반응을 유도한다고 알려진 Alum 젤을 면역증강제로 사용한 경우 IgG1의 비율이 현저히 높은 반면 SpaB를 면역증강제로 사용한 복합 백신 단백질 나노입자의 경우 IgG2a의 비율이 증가한 것을 확인하였다. 이는 기존에 발표된 연구 결과와 마찬가지로 단백질 나노입자 상에 SpaB와 항원이 동시에 존재할 경우 SpaB 의한 항원의 B 세포 타겟팅을 가능하게 함으로써 B 세포가 APC로 활성화시키고 이는 결과적으로 Th1 세포의 활성을 촉진시켜 면역 유도를 향상 효과를 가져온 것을 알 수 있다. 따라서, SpaB 동시 표출 복합 백신은 가장 높은 항체 형성율을 보였으며, 특히 체액성 면역 반응뿐 아니라 세포성 면역 반응 또한 촉진시킨 것을 알 수 있다.

[0075] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0076] <실시예 1> HBV 캡시드 유래 키메라 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현벡터 제조

[0077] 본 발명은 B 형 간염 예방을 위한 효과적인 재조합 백신을 제조하기 위하여 B형 간염 바이러스의 캡시드 단백질을 운반체로 선정하였으며, 운반체 상에 항원 단백질(MHR)과 면역 증강 단백질(SpaB)를 동시에 표출하는 재조합 복합 백신 생산을 위한 발현 벡터 및 정제 시스템을 확보하였다.

[0078] B형 간염 바이러스 중 C형 유전자아형에 속하는 adr 혈청형 이 한국 환자에게서 가장 빈번하게 발견된다고 알려져 있으므로 (차충환 외, *Korean J Lab Med*, 2009) 본 발명은 adr 혈청형의 HBVsAg 중 주요항원 부위라고 알려진 97-169 번째 아미노산 서열인 MHR을 항원 단백질로 선정하였다 (서열번호 1). 또한 추가적으로 면역원성이 있다고 알려진 PreS1(서열번호 14), PreS2 (서열번호 15)을 항원으로 선정하였다.

[0079] HBVsAg는 구조상 스파이크에 해당하는 79-81번째 아미노산 서열 사이에 외래 단백질을 융합 발현할 경우, 융합 발현된 외래 단백질이 단백질 나노입자의 가장 바깥 표면에 표출이 되는 것으로 알려져 있다 (Park, J.S. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4(4):259-64). 발명자는 B 형 간염 바이러스의 표면 단백질(Hepatitis B virus surface antigen, 또는 HBVsAg) 중 주요 항원 부위라고 알려진 MHR(HBsAg의 100-160 a.a)을 HBVsAg의 스파이크 부위에 융합하여 항원 표출 단백질 나노입자를 제조하였다. 또한 외래 단백질을 융합 발현 시 표면 표출이 가능하다고 알려진 N-말단에 PreS1, PreS2를 각각 융합하였다 (도 1, 도 2).

[0080] 재조합 단백질은 기존 사백신이나 약독화 백신에 비해 면역원성이 낮다고 알려져 있다. 이를 극복하기 위하여 항체 결합능력을 통해 면역 세포인 B 림프구 표적화를 통해 면역 증강 효과가 있다고 알려진 SpaB 단백질을 면역증강제로 선정하여 HBVsAg의 스파이크 부위에 융합 발현하여 면역 증강 효과를 검증하고자 하였다.

[0081] 항원 단백질(MHR)과 면역증강 단백질(SpaB)을 동시에 단백질 나노입자(HBsAg) 표면에 표출되도록 하기 위하여 도 1 과 같이 발현 벡터를 구축하였다. 즉, SpaB 표출 단백질 나노입자 발현용 벡터는 카나마이신 저항성 벡터인 pET28a 벡터 (도 1A), MHR 표출 단백질 나노입자 발현용 벡터는 암피실린 저항성 벡터인 pT7-7 벡터를 뼈대벡터로 하여 제작하였다(도 1B). 또한 세가지 항원 (PreS1, PreS2, MHR)과 면역증강 단백질 (SpaB)를 동시에 표출하는 단백질 나노입자를 제조하기 위하여 도 1과 같이 발현용 벡터를 제작하였다. 즉, PreS1과 MHR을 포함하는 벡터는 카나마이신 저항성 벡터인 pET28a에 (도 1E), PreS2와 SpaB를 포함하는 벡터는 암피실린 저항성 벡터인 pT7-7 벡터를 뼈대벡터로 하여 제작하였다(도 1F).

[0082] 각기 다른 항생제 마커를 가지고 있으므로 대장균에 형질전환 하였을 때 암피실린과 카나마이신 혼합 배지에 도 말함으로써 두 개의 발현 벡터를 동시에 포함하는 형질전환체를 선별할 수 있다.

[0083] (1) HBV 캡시드 유래 스태필로코컬 유래의 항체 결합 단백질(SpaB) 융합 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조

[0084] 본 발명자들이 기존에 제작한(Park *et al.*, 2009) 재조합 유전자를 주형으로 프라이머쌍(서열번호 2, 서열번호

3)을 사용하여 PCR을 진행하여 N-*NdeI*-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-*XhoI*-SpaB-SpaB-*BamHI*-G4SG4-HBVcAg(81-149)-*HindIII*-C를 코딩하는 HBcAg의 스파이크(78-81 a.a) 사이에 SpaB 유전자가 두 번 중복된 유전자가 삽입된 유전자 클론을 얻었고, 유전자를 수득하였다. 주형으로 한 유전자는 상세히 다음과 같은 서열로 이루어져 있다. 크게 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분, SpaB가 연속적으로 2개 포함되어 있는 부분, 그리고 캡시드 단백질의 81-149번째 아미노산 서열부분으로 나눌 수 있다(캡시드 단백질의 1-78번째 서열: NCBI Nucleotide accession number AF286594의 염기서열 1901-2134(서열번호 4), 캡시드 단백질의 81-149번째 염기서열: AF286594의 염기서열 2141-2347(서열번호 5), 그리고 단백질 에이의 서열: NCBI nucleotide accession No. M18264, nucleotide sequence 625-813(서열번호 6))(Park et al.). 이를 제한효소 *NdeI*, *HindIII* 로 처리 후 플라스미드 pT7-7에 삽입하여 N-HBVcAg(1-78)-SpaB-SpaB-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터 pT7 SpaB2 in CORE를 구축하였다 (도 1A).

- [0085] (2) HBV 캡시드 유래 B 형 간염 바이러스 표면 단백질의 주요항원 (Hepatitis B virus surface antigen major hydrophilic resion, 또는 MHR) 융합 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조
- [0086] 프라이머쌍(서열번호 7, 8)를 사용하여 N-*XhoI*-MHR-*BamHI*-C를 암호화하는 유전자 서열을 수득하였다. 이를 *XhoI*, *BamHI*을 이용하여 제한효소 처리한 후에 상기 실시예 1(1)에서 제작한 pT7 SpaB2 in CORE 의 SpaB가 삽입되었던 부위에 삽입하여 SpaB 대신 MHR이 삽입되도록 라이게이션을 진행하였으며 그 결과 N-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-C 의 합성을 코딩하는 플라스미드 pT7 MHR in CORE를 구축하였다.
- [0087] N-*NdeI*-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-*XhoI*-MHR-*BamHI*-G4SG4-HBVcAg(81-149)-*HindIII*-C 구조로 구성된 플라스미드 pT7 MHR in CORE를 다시 *NdeI* 과 *HindIII* 제한효소로 절단하여 이를 pET28a 발현 벡터의 *NdeI*과 *HindIII* 위치에 삽입하여 최종적으로 pET28a MHR in CORE(도 1B) 발현벡터를 구축하였다.
- [0088] 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 젤- 정제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.
- [0089] (3) HBV 캡시드 유래 SpaB 와 MHR 동시 융합 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조
- [0090] HBV 캡시드 단백질의 아미노 말단에는 SpaB가, 스파이크 부위(78-81 a.a)에는 MHR을 융합하여 SpaB와 MHR을 동시에 표출하는 복합 백신 단백질 나노입자를 제조하기 위하여 두 단계로 라이게이션을 진행하였다.
- [0091] 먼저 프라이머쌍(서열번호 9, 10)를 이용하여 N-*NdeI*-His6-SpaB-*EcoRI*-C를 암호화하는 유전자 서열과 N-His6-SpaB-SpaB-*EcoRI*-C 유전자 서열을 수득하였다. 이를 플라스미드 pT7-7 에 각각 라이게이션 하였으며 이를 각각 pT7 SpaB, pT7 SpaB2 라고 명명하였다. 두 번째로 실시예 1(2)의 pT7 MHR in CORE 을 주형으로 프라이머쌍(서열번호 11, 3)를 이용하여 N-*EcoRI*-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-*HindIII*-C의 구조로 된 유전자 서열을 수득하였으며 이를 pT7 SpaB 또는 pT7 SpaB2 의 뒤부분에 라이게이션하여 최종적으로 pT7 SpaB::MHR in CORE 와 pT7 SpaB2::MHR in CORE 발현 벡터를 제조하였다(도 1C 및 1D 참고).
- [0092] (4) HBV 캡시드 유래 SpaB 와 PreS1, PreS2, MHR 동시 융합 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조
- [0093] 상기 실시예 1(1)에서 제조한 pT7 SpaB2 in CORE와 실시예 1 (2)에서 제조한 pT7 MHR in CORE를 각각 주형으로 프라이머쌍(서열번호 11, 3)를 이용하여 *EcoRI*-HBVcAg(1-78)-SpaB-SpaB-HBVcAg(81-149)-*HindIII*-C 와 N-*EcoRI*-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-*HindIII*-C의 구조로 된 유전자 서열을 수득하였다. 서열번호 16 (5' *NdeI* PreS1), 서열번호 17 (3' *EcoRI* PreS1) 프라이머쌍을 이용하여 *NdeI*-PreS1-*EcoRI*, 서열번호 18(5' *NdeI* PreS2), 서열번호 19(3' *EcoRI* PreS2) 프라이머 쌍을 이용하여 *NdeI*-PreS2-*EcoRI* 을 각각 제조하였다. 순차적인 라이게이션을 통해 N-PreS1-*EcoRI*-HBVcAg(1-78)-MHR-HBVcAg(81-149)-*HindIII*-C의 구조를 이루는 pET28a PreS1-MHR in CORE (도 1E) 와 N-PreS2-*EcoRI*-HBVcAg(1-78)-SpaB-SpaB-HBVcAg(81-149)-*HindIII*-C를 이루는 pT7 PreS2-SpaB2 in CORE (도 1F)를 제작하였다.
- [0094] <실시예 2> HBV 캡시드 유래 키메라 단백질 나노입자의 생합성을 위한 형질전환체 제조 및 발현
- [0095] 하나한(Hanahan)이 기술한 방법(Hanahan D, *DNA Cloning* vol.1 109-135, IRS press 1985)에 의해 실시예 1의

백터들(도 1)을 대장균에 형질전환하였다.

- [0096] 구체적으로 CaCl₂로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 실시예 1의 pET MHR in CORE 백터를 열 충격 방법으로 형질전환시킨 후, 카나마이신(Kanamycin)이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현백터가 형질전환되어 카나마이신 저항성을 나타내는 콜로니를 선별하였다. 다음으로 항원부위(MHR)와 면역증강 단백질(SpaB)을 동시에 표출하는 단백질 나노입자를 제조하기 위하여 실시예 1을 통해 제조한 pET MHR in CORE(카나마이신 저항 백터)와 pT7 SpaB2 in CORE(암피실린 저항 백터)를 혼합하여 CaCl₂로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시킨 후 암피실린과 카나마이신이 모두 포함된 배지에서 배양하여 두 개 백터를 모두 포함하는 콜로니를 선별하였다.
- [0097] 다음으로 항원부위 PreS1, PreS2, MHR과 면역증강 단백질(SpaB)을 동시에 표출하는 단백질 나노입자를 제조하기 위하여 실시예 1(4)을 통해 제조한 pET PreS1-MHR in CORE(카나마이신 저항 백터)와 pT7 PreS2-SpaB2 in CORE(암피실린 저항 백터)를 혼합하여 CaCl₂로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시킨 후 암피실린과 카나마이신이 모두 포함된 배지에서 배양하여 두 개 백터를 모두 포함하는 콜로니를 선별하였다.
- [0098] 실시예 1(3)을 통해 제조한 pT7 SpaB:: MHR in CORE, pT7 SpaB2:: MHR in CORE 백터는 각각 형질전환시킨 후 암피실린 배지에 배양하여 형질전환체를 선별하였다. 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 100mg/mL 암피실린(100mg/mL 카나마이신)또는 을 포함하는 LB 배지에 접종한 다음 37℃에서 130 rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀이 0.7~0.8에 이르렀을 때 IPTG를 첨가(0.5mM)하여 20℃로 옮겨 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건으로 16~18시간 더 배양하였다.
- [0099] <실시예 3> HBV 캡시드 유래 복합백신 키메라 단백질 나노입자의 정제
- [0100] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5mL 라이시스 버퍼[pH 8.0, 1mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride: serine proteinase inhibitor), 10% 글리세롤, 0.1% Triton X-100, 2mM MgCl₂, 50mM Tris-Cl, 0.1mg/mL lysozyme] 에 재부유하고 상온에서 15~30 분간 교반 후 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각 재조합 단백질을 Ni²⁺-NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다(세척 버퍼: pH 8.0, 50mM 소듐 포스페이트, 300mM NaCl, 80mM 이미다졸 / 용출 버퍼: pH 8.0, 50mM 소듐 포스페이트, 300mM NaCl, 250mM 이미다졸). 용출 버퍼의 이미다졸을 제거하기 위하여 멤브레인 필터레이터(Amicon, 10K)을 이용하여 PBS로 버퍼를 교체해 주었다.
- [0101] 도 2에 나타난 바와 같이, MHR 이 삽입된 단백질 나노입자 발현 백터로 형질전환된 대장균을 20℃에서 발현한 결과 MHR 이 삽입된 단백질 나노입자가 수용성으로 발현되는 것을 확인하였으며 히스티딘 태그를 매개로 니켈 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.
- [0102] 또한, 백터를 동시에 가지고 있는 형질전환체를 배양한 후 재조합 단백질의 발현을 유도한 결과 MHR 표출 단백질 나노입자와 SpaB 표출 단백질 나노입자가 동시에 발현되는 것을 확인하였다(도 2B). 마찬가지로 PreS1과 MHR 표출 단백질 나노입자와 PreS2, SpaB 표출 단백질 나노입자가 동시에 발현되는 것을 확인하였다(도 2C).
- [0103] 상기 언급한 발현 백터 제조 시 MHR 융합 단백질 나노입자(PreS1과 MHR 융합 단백질 나노입자)의 아미노 말단에만 히스티딘을 융합하였고, SpaB 융합 단백질 나노입자(PreS2와 SpaB 융합 단백질 나노입자)에는 정제 태그(히스티딘 태그)를 융합하지 않았다.
- [0104] 도 2B 및 2C에서 보면 히스티딘을 포함하지 않는 SpaB 융합 단백질 나노입자(PreS2와 SpaB 융합 단백질 나노입자) 또한 니켈 크로마토그래피를 통해 같이 정제되는 것으로 나타나는데 이는 SpaB 융합 단백질 나노입자가 히스티딘 태그를 포함하는 MHR 융합 단백질 나노입자와 자가 조립되어 같이 정제되기 때문이다. 이는 HBVcAg를 대장균에서 발현할 경우 240개의 소단위체가 모여서 하나의 나노입자로 자가 조립될 때, 두 개의 다른 재조합 단백질 나노입자가 혼합되어 하나의 단백질 나노입자를 이루는 것을 뜻한다.
- [0105] <실시예 4> HBV 캡시드 유래 복합백신의 면역원성 검증을 위한 동물 실험
- [0106] (1) 1차 동물실험: SpaB의 면역 증강효과 검증
- [0107] SpaB의 면역 증강 효과를 검증하기 위하여 MFR 표출 단백질 나노입자, MHR 표출 단백질 나노입자를 알루미늄 젤

에 흡착 시킨 제제, MHR 과 SpaB 동시 표출 단백질 나노입자를 준비하여, 각 백신 군을 5주령인 쥐(outbred ICR SPF mouse) 20 수에 접종하였다. 복강내에 아래 표와 같이 각 백신군을 접종 후 28일 후에 심장에서 전채혈을 하였다.

표 1

SpaB의 면역 증강 효과 검증을 위한 동물 실험에 투여한 백신군

HBcAg 나노입자 기반 합성백신	백신접종량 (MHR 단백질기준)	비고
MHR in CORE (대조군)	75 μ g	-
MHR in CORE + Alum 젤	75 μ g	아쥘반트로서 500 μ g Alum/mL
MHR-SpaB2 in CORE (동시발현)	75 μ g	-
PreS1-PreS2-MHR:SpaB2 in CORE (동시발현)	75 μ g	

(2) 2차 동물실험: SpaB의 융합 위치에 따른 면역 효과 검증

표 2

SpaB 융합 위치에 따른 효과를 비교하기 위해 동물 실험에 투여한 백신군

HBcAg 나노입자 기반 합성백신	백신접종량 (MHR 단백질기준)	비고
MHR-SpaB2 in CORE (동시발현)	75 μ g	별도의 보조제 첨가 하지 않음
N-SpaB- MHR in CORE	75 μ g	
N-SpaB2- MHR in CORE	75 μ g	

1차 동물 실험과 마찬가지로 각 백신군을 위의 표와 같이 준비하여 5주령 쥐(outbred ICR SPF mouse) 20 수에 접종하였다. 복강내에 아래 표와 같이 각 백신군을 접종 후 28일 후에 심장에서 전채혈을 하였다.

채혈 후 혈청 분리하여 ELISA kit (Monolisa Anti-HBs PLUS, Bio-Rad)를 이용하여 polyclonal anti-MHR antibody 농도 (항체가, mIU/ml)를 분석하였다. 이를 2회 반복하였고 각각의 혈청에 대한 결과치는 산술평균치로 하였다. ELISA를 이용하여 항체가를 분석할 때 도 3의 표준곡선을 이용하였다.

SpaB 단백질은 기존 연구에 의하면 항원 표출 세포(APC) 중 하나인 B 세포의 표면에 표출된 B 세포 수용체와 결합하여 B 세포가 APC로 분화하도록 촉진한다고 알려져 있으며 이를 통해 수지상세포, Th 세포 등에서 인터루킨-2 생성을 촉진시키므로 세포성 면역 반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. SpaB 단백질의 면역 증강 효과를 검증하기 위하여, MHR 표출 단백질 나노입자, 동시 발현을 통해 제조한 MHR과 SpaB를 동시 표출하는 복합 단백질 나노입자, 그리고 기존에 면역증강제로 사용되고 있는 알루미늄 젤을 흡착시킨 MHR 표출 단백질 나노입자를 준비하였으며, 추가적으로 항원 3가지(PreS1, PreS2, MHR)와 면역증강 단백질(SpaB)을 동시에 표출하는 단백질 나노입자를 준비하였다. 이를 각각 쥐에 주사하여 항체 양전율을 확인하였다(도 4). B형 간염백신의 항체 양전율에 대해서는 기존 항체가가 다양할 수 있지만 본 실시예에서는 보수적으로 4mIU/mL을 기준으로 사용하여 항체가 4mIU/mL 이상 시 항체 양전되었다고 평가하였다.

그 결과 면역증강제로 선정한 SpaB와 면역 주요항원 물질인 MHR을 동시에 표출하는 단백질 나노입자에서 가장 높은 항체 양전율을 나타내는 것을 확인하였다(도 4B). 면역증강제를 포함하지 않는 대조군은 20%, 체액성 면역 증강제 알루미늄 젤을 사용한 경우는 30% 항체 양전율을 보인 반면 SpaB와 동시 발현한 경우 2배 높은 60%의 항체 양전율을 나타냈다. 반면 3가지 항원과 면역증강 단백질을 포함하는 단백질 나노입자의 경우 15%의 항체 양전율을 보이는 것을 확인하였다. 이는 PreS1과 PreS2에 의해 SpaB의 표출이 저해되어 면역 증강 효과가 제대로 발휘되지 못한 것으로 사료된다. 이를 통해 SpaB의 표면 표출 문제가 높은 항체 양전율 이끌어 내는 데 가장 큰

영향을 주는 것으로 판단된다. 기존 문헌에서 spaB가 세포성 면역 반응을 주로 증가시킨다는 점을 고려해 볼 때 SpaB 이용 시 체액성 면역 반응을 유도하는 알루미늄 젤을 사용했을 때보다 체액성 면역 반응을 2배 이상 증진시켜 높은 항체 양전율을 나타낸 것은 굉장히 고무적인 결과이다.

- [0115] 또한 95%의 신뢰구간에서 SpaB를 사용한 경우의 항체가(3.57~6.26mIU/mL)는 alum 젤을 사용한 경우의 항체가(2.62~7.11mIU/mL)와 유사하지만 항체가 산술에 있어 중요한 기하평균 항체가(GMT; geometric mean titration, 백신 접종 후 모든 개체의 평균 항체가 증가 비율)는 알루미늄 젤을 사용 때(3.0mUI/mL) 보다 SpaB 사용 시 4.3mUI/mL로 유의미하게 상승한 것을 확인하였음. 결론적으로 SpaB를 면역증강제로 사용한 경우에 가장 높은 항체 양전율과 GMT를 나타낸 것을 확인하였다(도 4B).
- [0116] SpaB의 면역증강제로서의 효용성을 검증하였으므로 단백질 나노입자 상의 SpaB의 표출 위치 및 항원과의 조합 비율에 따른 영향을 분석하기 위하여(도 1C 및 1D) 와 같은 백신군을 제조하였다.
- [0117] 도 5와 같이 구축한 발현 벡터를 이용하여 면역증강제와 항원 동시 표출 복합 단백질 나노입자를 발현 정제 하였으며 준비된 각 단백질 샘플을 이용하여 동물 실험을 진행하였다. 2차 동물 실험과 마찬가지로 각 시료당 20 수의 마우스에 접종하였으며 접종 시 동일한 양의 MHR이 적용되도록 표 2와 같이 주사하였다.
- [0118] 그 결과 HBcAg의 아미노 말단에 SpaB를 융합 발현한 경우 동시발현을 통해 SpaB를 HBcAg의 스파이크 부위에 표출시켰을 때 보다 SpaB의 비율이 높음에도 불구하고 항체 양전율 및 항체 형성농도가 현저히 낮은 것을 확인하였다(도 6B). 이는 HBcAg의 아미노 말단에 SpaB가 존재할 경우 단백질 나노입자의 표면에 효과적으로 표출되지 않아 B 세포의 BCR에 결합하는 효율이 저하되었기 때문이라고 생각된다.
- [0119] 또한 SpaB를 중복되게 연장하여 HBcAg의 아미노 말단에 융합한 경우 SpaB의 표면 표출이 증가하고 BCR이 결합 능력이 향상됨에 따라 항체 양전율 및 항체 형성 농도가 증가된 것을 확인하였다. 이는 면역증강제가 단백질 나노입자 표면의 가장 바깥 부분인 스파이크 부위에 융합 발현되었을 때 B 세포와의 결합 효율이 증가되고 이로 인해 가장 높은 면역 증강 효과를 나타내는 것으로 보인다.
- [0120] 결과적으로 3차 동물 실험을 통해 단백질 나노입자 기반의 복합백신 개발에 있어서 면역증강제의 단백질 나노입자 상의 표면 표출이 백신의 면역원성 증대 및 면역 유도 활성화에 결정적인 역할을 함을 보여주었다.
- [0121] 또한 1차 동물 실험을 진행 후 각 복합 백신의 면역 반응 유도 기작을 연구하기 위해 IgG1/IgG2a의 비율을 비교했던 것과 마찬가지로 2차 동물 실험을 통해 얻은 마우스 혈청 내 B형 간염에 대한 항체 비율을 조사하였다.
- [0122] 2차 동물 실험에서 보여진 바와 같이 면역증강제 SpaB가 융합 발현된 복합 단백질 나노입자의 경우 IgG2a의 비율이 증가한 것을 알 수 있었다. 즉, 동일한 양의 항원을 주입했을 때 면역증강제가 표면으로 표출이 잘 된 복합 단백질 나노입자 일수록 Th1 세포의 활성화를 촉진하여 높은 면역 유도 효과를 보이는 것을 알 수 있다(도 6B).
- [0123] 결론적으로 본 발명을 통해 항원 단백질과 면역 증강 단백질을 동시 표출 할 수 있는 복합 백신 단백질 나노입자를 설계 제조하였으며, 복합 백신의 면역원성을 검증하였고, 동시에 SpaB 단백질의 면역증강제로서의 효용성 및 면역 유도 기작을 검증하였다.

[0124]

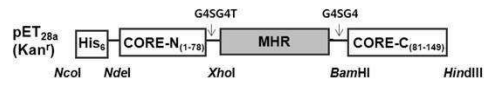
도면

도면1

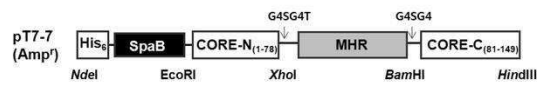
(A) pT7 SpaB2 in CORE



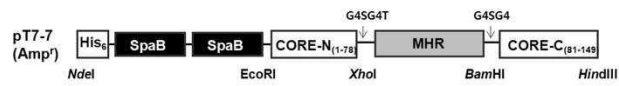
(B) pET_{28a} MHR in CORE



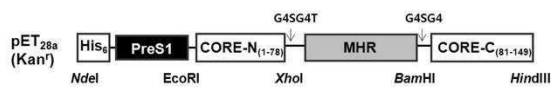
(C) pT7 SpaB:: MHR in CORE



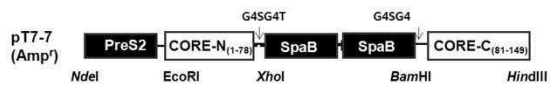
(D) pT7 SpaB2:: MHR in CORE



(E) pET_{28a} PreS1::MHR in CORE

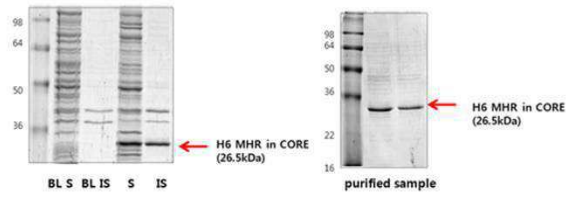


(F) pT7 PreS2:: SpaB2 in CORE

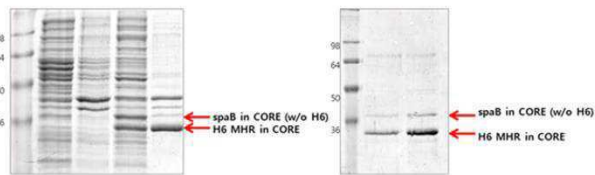


도면2

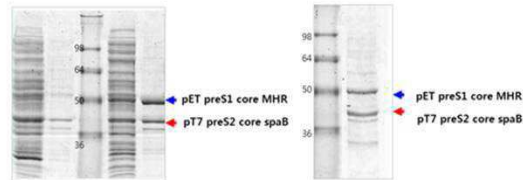
(A) 항원 표출 단백질 나노입자
(pET_{28a} MHR in CORE)



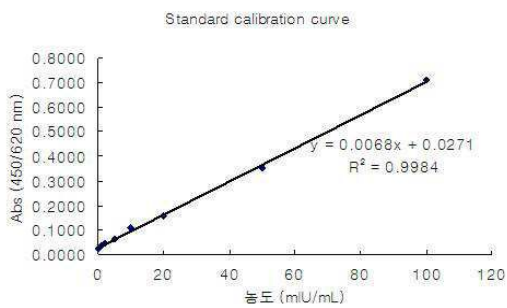
(B) 항원 / 면역 증강단백질 동시 표출 단백질 나노입자 (MHR-SpaB)
(pET_{28a} MHR in CORE + PT7 SpaB2 in CORE 동시 발현)



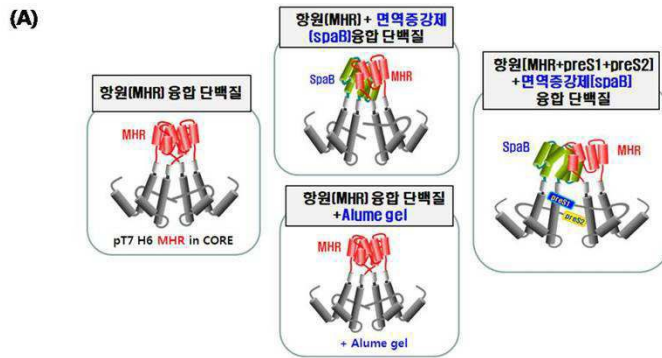
(C) 3 개 항원 / 면역 증강단백질 동시 표출 단백질 나노입자 (PreS1, PreS2, MHR-SpaB)
(pET_{28a} PreS1::MHR in CORE + PT7 PreS2::SpaB2 in CORE 동시 발현)



도면3



도면4

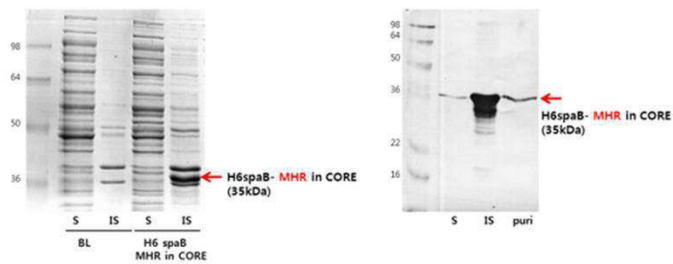


(B)

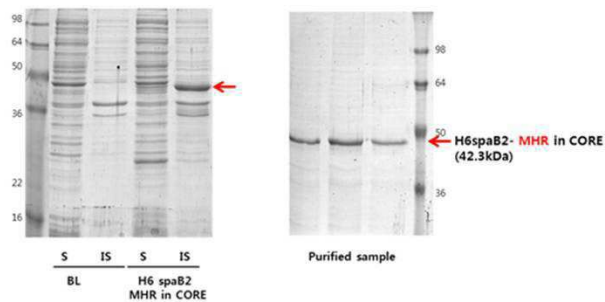
	Mice (n)	GMT ¹ (mIU/ml)	Seroconverted mice (n)	% of Total	95% CI ² (mIU/ml)
MHR(control)	20	2.3	4	20%	0.83~4.85
MHR+ Alum gel	20	3.0	6	30%	2.60~7.11
MHR-SpaB	20	4.3	12	60%	3.57~6.26
PreS1-PreS2-MHR-SpaB	20	2.1	3	15%	1.16~5.45

도면5

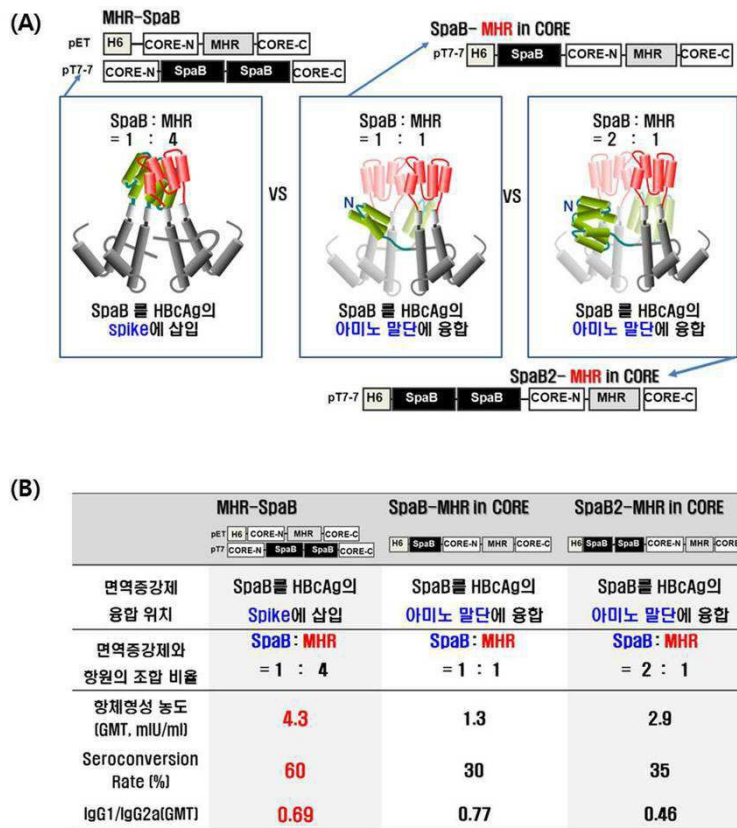
(A) 항원 / 면역 증강단백질 동시 표출 단백질 나노입자 (SpaB- MHR in CORE) (PT7 SpaB:: MHR in CORE)



(B) 항원 / 면역 증강단백질 동시 표출 단백질 나노입자 (SpaB2- MHR in CORE) (PT7 SpaB2:: MHR in CORE)



도면6



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Protein nanoparticle based multivalent vaccines

<130> P120636

<160> 19

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Major hydrophilic region

<400> 1

Leu Asp Tyr Gln Gly Met Phe Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Thr Thr Ser Ala Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly

35 40 45
 Gln Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe
 50 55 60
 Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg
 65 70
 <210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5-NdeI CORE: primer
 <400> 2
 catatggaca ttgaccgta taaaga 26
 <210> 3

 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3- HindIII CORE: primer
 <400> 3
 aagcttttaa acaacagttg ttccc 25
 <210> 4
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1-78 aa of capsid protein from HBV
 <400> 4
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp

 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp

65 70 75

<210> 5

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 81-149 aa of capsid protein from HBV

<400> 5

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys

1 5 10 15

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

20 25 30

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

35 40 45

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

50 55 60

Glu Thr Thr Val Val

65

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B domain of Staphylococcal protein A

<400> 6

Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe

1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly

20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu

35 40 45

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn

50 55 60

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
65 70 75 80
Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
85 90 95
Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
100 105 110
Asn Asp Ala Gln Ala Leu Lys Ala Asp

115 120

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5-XhoI MHR: primer

<400> 7

ctcgagggcg gaggtggcag tctcgactac caagg 35

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3-BamHII MHR: primer

<400> 8

ggatccaccg ccaccacgga ctgaggccca 30

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5- NdeI H6 SpaB: primer

<400> 9

catatgcacc atcaccatca ccatgcaccg aaagctgata ac 42

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3- EcoRI SpaB: primer

<400> 10

gaattcgtca gcttttagtg c

21

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5- EcoRI CORE: primer

<400> 11

gaatccgaca ttgaccgta taaaga

26

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PreS1

<400> 14

Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser

1 5 10 15
Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala
20 25 30
Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys
35 40 45
Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe Gly Pro
50 55 60
Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala
65 70 75 80

Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr
85 90 95
Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg
100 105 110
Asp Ser His Pro Gln Ala

115
<210> 15
<211> 54
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> PreS2
<400> 15

Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val
1 5 10 15

Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn
20 25 30
Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr
35 40 45
Gly Asp Pro Ala Pro Asn
50

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' NdeI PreS1: primer

<400> 16

catatgggag gttggtcttc caaacct

27

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' EcoRI PreS1: primer

<400> 17

gaattcggcc tgaggatgac tgtctc

26

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' NdeI PreS2: primer

<400> 18

catatgcagt ggaactccac cacattc

27

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' EcoRI PreS2: primer

<400>

> 19

gaattcgttc ggtgcagggt ccccag

26