

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0027606

(43) 공개일자 2021년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/62 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/385 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01) C07K 14/25 (2006.01)

C07K 14/28 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/62 (2013.01)

A61K 39/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0106390

(22) 출원일자 2019년08월29일

심사청구일자 2019년08월29일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

성백린

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대 제2공학관 522호(신촌동)

성제민

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대 제2공학관 522호(신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이름리온

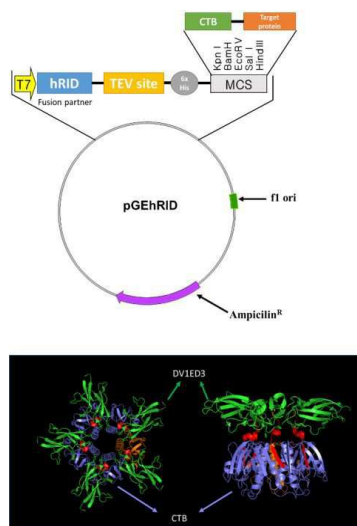
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 오량체 기반 재조합 단백질 백신 플랫폼 및 이를 발현하는 시스템

(57) 요약

본 발명은 오량체 기반 재조합 단백질 백신을 생산하기 위한 재조합 발현 벡터, 상기 발현 벡터가 도입된 숙주세포 및 상기 벡터 및 숙주세포를 이용하여 오량체 기반 재조합 단백질 백신을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 원핵세포에서 재조합 단백질의 발현양 및 수용성을 크게 향상시킴으로써 높은 수율로 항원 단백질을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 구조적으로도 정교한 오량체 형태의 항원 단백질을 생산할 수 있으며, 본 발명의 오량체 형태의 융합 단백질을 포함하는 바이러스 백신은 면역원성이 크게 향상될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 39/385 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 14/245 (2013.01)
C07K 14/25 (2013.01)
C07K 14/28 (2013.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
G01N 33/68 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

유지은

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대 제2공학관
 522호(신촌동)

정유철

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대 제2공학관
 522호(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI15C2934
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병위기대응기술개발사업
연구과제명	녹차 카테킨기반 개량형 불활화바이러스백신 개발(3/3)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.12.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID);

오랑체형 독소 단백질; 및

목적 단백질;을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 융합단백질 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 오랑체형 독소 단백질은 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit, CTB) 단백질, 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit, LTB) 단백질 및 시가 독소 B 서브유닛(Shiga-toxin B subunit) 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 목적 단백질은 면역반응을 유도하는 항원 단백질로서 자가조립(self-assembly) 과정에서 소단위체로 오랑체(pentamer)를 형성하는 정이십면체형 바이러스의 캡시드 단백질인, 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 목적 단백질은 자가조립(self-assembly) 과정에서 소단위체로 오랑체(pentamer)를 형성하는 정이십면체형 바이러스의 캡시드 단백질인, 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 정이십면체형 바이러스는 외피형 바이러스 또는 비외피형 바이러스인 것인, 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 RID는 서열번호 11의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 벡터.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 CTB 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 것이고,
상기 LTB 단백질은 서열번호 9의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 벡터.

청구항 8

제1항에 따른 발현벡터로 형질 전환된 숙주세포.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 숙주세포는 에스케리키아(*Escherichia*)속 세균, 바실러스 바실러스 (*Bacillus*)속 세균, 슈도모나스 (*Pseudomonas*)속 세균, 유산균, 효모, 동물세포, 및 곤충 세포로 이루어진 군에서 선택되는 것인 형질 전환된 숙주세포.

청구항 10

(a) 라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID); 오랑체형 독소 단백질; 및 목적 단백질;을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

(b) 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 형질전환체를 배양하여 RID-CTB-목적단백질 융합단백질 발현을 유도하는 단계; 를 포함하는 재조합 융합단백질의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 오랑체형 독소 단백질은 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit, CTB) 단백질, 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit, LTB) 단백질 및 시가 독소 B 서브유닛(Shiga-toxin B subunit) 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 생산방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 숙주세포는 에스케리키아(*Escherichia*)속 세균; 바실러스 바실러스 (*Bacillus*)속 세균; 슈도모나스 (*Pseudomonas*)속 세균; 유산균; 효모; 동물세포; 및 곤충 세포로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 생산방법.

청구항 13

라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID); 콜레라 독소 B 서브유닛 (cholera toxin B subunit; CTB) 단백질; 및 목적단백질;을 포함하는 재조합 융합단백질.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 재조합 융합단백질은 오량체(pentamer) 형태인 것을 특징으로 하는 재조합 융합단백질.

청구항 15

제1항에 기재된 발현 벡터 또는 제13항에 기재된 재조합 융합단백질을 포함하는 바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 16

제1항에 기재된 발현 벡터 또는 제13항에 기재된 재조합 융합단백질을 포함하는 면역 증강용 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 높은 수용성과 면역원성을 가지는 오량체(pentamer) 자가조립 기반 유전자 재조합 단백질 발현 벡터 시스템 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 백신 개발 방법 중 바이러스 유래 항원단백질을 생산하여 백신으로 사용하는 방법은 유전자 재조합을 통하여 포유류세포, 식물세포, 곤충세포, 효모 등의 진핵세포와 및 대장균(*E. coli*) 등과 같은 원핵세포 시스템을 이용한다. 다양한 생산 시스템마다 고유의 장단점이 존재한다. 특히 포유류 세포 또는 식물세포 등의 고등세포를 사용하는 경우에는 정교한 항원단백질의 수용성 발현이 가능하지만 많은 비용과 시간이 필요한 단점이 있다. 반면 대장균 시스템의 경우에는 매우 많은 양의 단백질을 빠르고 저렴하게 생산할 수 있지만, 대부분의 단백질이 수용성을 잃어버리고 불용성 침전으로 생성되는 커다란 문제점을 안고 있다. 특히, 진핵세포 유래 단백질 또는 이에 감염을 일으키는 바이러스 단백질들은 비교적 단순한 구조의 원핵세포 시스템에서 단백질의 접힘(folding) 구조 및 자가조립(assembly)을 유도함에 한계가 있다.

[0004] 이열성 독소(heat-labile enterotoxin, LT) 패밀리에 속하는 독소 단백질은 일반적으로 AB5형 구조체로 구성되어 있고, 여기서 A는 실제 동물에 독성을 나타내는 독소이고 B5는 A독소를 인체로 운반하는 운반체 B의 오량체 구조를 의미한다(Faruque SM: Nair GB, eds.(2008) *Vibrio cholera: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press). 이열성 독소(heat-labile enterotoxin, LT) 패밀리에 속하는 대표적인 예로는 콜레라 독소를 들 수 있는데 이는 독성인자인 A 서브유닛(cholera toxin A subunit; CTA) 1개와 비독성인자 B 서브유닛(cholera toxin B subunit; CTB) 5개로 구성된 복합체이다. 이 중 CTB는 분자량이 12 kDa인 단량체(monomer)가 5개가 모여 5원 환을 형성한다. AB5독소에는 대장균에서 유래되는 heat-labile enterotoxin (ELT)도 포함되며 유사하게 독소인자 A 서브유닛 (LTA) 및 B 서브유닛 (LTB) 오량체로 구성된다 (Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol.* 230: 890-918). 마찬가지로 이질의 원인균 시겔라균(*Shigella*)의 경우도 A 서브유닛과 B 서브유닛 오량체로 이루어져 있다(Silva, C. J., et al. (2017). *Shiga Toxins: A Review of Structure, Mechanism, and Detection*. Springer.). 이와 같이, 이열성 독소(heat-labile enterotoxin, LT) 패밀리에 속하는 다양한 병원균 유래임에도 불구하고 기본 구조가 동일하고, 이로 인해 독소의 발현 및 오량체로의 자가조립은 상호 유사한 기전을 통해 이루어진다.

[0005] 이열성 독소(heat-labile enterotoxin, LT) 패밀리에 속하는 독소 단백질의 대표적인 예에 속하는 CTB는 장점막 표면에서 GM1 ganglioside-인독소이드 수용체에 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있다(Cervin, J., et al. (2018). GM1 ganglioside-independent intoxication by Cholera toxin. *PLoS pathogens*, 14(2), e1006862.). 따라서 CTB는 화학적으로 또는 유전적으로 결합된 외래 항원의 점막을 통한 흡수를 촉진시키는 운반체(carrier) 기능으로 유용하게 사용되고 있다. 이러한 운반체 기능 외에도 CTB는 다양한 면역조절 기능을 지닌 것으로 알려져 있다(Royal, J., & Matoba, N. (2017). Therapeutic potential of cholera toxin B subunit for the treatment of inflammatory diseases of the mucosa. *Toxins*, 9(12), 379.). 이러한 운반체 및 면역기능을 활용하여 다양한

유용단백질의 활용이 연구되어 왔으며 이를 위해 CTB와 목적단백질간의 상호 결합된 융합단백질의 생산이 보고되고 있다. 예를 들어 인슐린, 인슐린/GAD 및 전장 레트로 바이러스 NSP4가 있는 CTB 융합 단백질이 형질전환 감자 식물에서 발현되었고, 인간 인슐린의 B 사슬은 형질 전환 담배 식물에서 발현된 바 있다(Arakawa, T., et al. (2001). Synthesis of a cholera toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein in potato. *Plant cell reports*, 20(4), 343-348.). 최근에는, 아스카리스 수웜 (*Ascaris suum*) As14를 형질전환 벼 종자에서 성공적으로 발현되는 것으로 확인되었다(Nozoye, T., et al. (2009). Production of *Ascaris suum* As14 protein and its fusion protein with cholera toxin B subunit in rice seeds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7), 995-1000.).

[0006] 그러나, CTB 기반 융합단백질들은 상기 고등세포에서 활성형으로 생산됨에도 불구하고, 대장균 등 원핵세포 시스템에서는 단백질 폴딩의 문제로 인해 활용상 원천적 제약이 있었다. 예를 들어 일본뇌염 바이러스백신항원에 적용 시 융합단백질이 불용성 침전으로 제조되고 이를 화학적 수용화 과정인 재접힘 공정(refolding process)을 거침에도 불구하고 완전한 오량체로 제조하지 못하고 부분적 오량체(융합단백질: CTB단백질 = 1:4의 조성)로만 만들어지는 등 백신에 적용 시 한계점이 있었다(Harakuni, T., et al. (2005). Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. *Infection and immunity*, 73(9), 5654-5665.). 이는 상기한 바와 같이 유전적으로 단순한 대장균 등의 원핵세포에서는 본질적으로 단백질 폴딩 기능에 한계성이 존재하기 때문이다. 따라서 동물감염 바이러스 유래 단백질 및 이의 유전적 변형 융합단백질의 폴딩 구조 및 이의 자가조립을 유도함에 기능적 한계가 있다. 이를 극복하는 방법으로서 화학적 단백질 재접힘 공정이 사용될 수 있다 (Tamaki, Y., et al. (2016). Cholera toxin B subunit pentamer reassembled from *Escherichia coli* inclusion bodies for use in vaccination. *Vaccine*, 34(10), 1268-1274.). 그러나 이에겐 엄청난 자본경비(capital cost)가 요구될 뿐 아니라 최종 생산된 항원의 품질과 오량체로의 생산효율을 담보하기 매우 어려운 문제가 있다.

[0007] 오량체 등으로의 항원 자가조립은 백신효능 증대와 지대한 관계가 있다. 일반적으로 단량체 형태의 항원은 수용성임에도 불구하고 면역원성(immunogenicity)이 매우 낮기 때문에 백신으로서 효용성을 증대하기 위해서는 다량체와 같은 다중구조체로의 형성이 필요하다. 면역원성은 백신의 가장 중요한 기능으로서 이러한 면역원성을 증가하기 위해서는 목표항원이 antigen presenting cell(APC)와 같은 전문적 면역세포로 효율적인 uptake가 이루어져야 한다. 단량체 수용성항원은 APC에의 uptake가 거의 이루어지지 않는데 비해 이러한 단량체를 자가조립을 통해 구조적으로 정형화된 복합체로 만들 경우 APC로의 uptake가 크게 증가하여 백신효능이 증가하기로 알려져 있다 (Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological chemistry*, 389(5), 521-536.; Zabel, F., et al. (2013). Virus-induced humoral immunity: on how B cell responses are initiated. *Current opinion in virology*, 3(3), 357-362.). 따라서 목표 항원을 정형화된 나노입자(nanoparticle)로의 자가조립을 유도함은 백신디자인의 주요 플랫폼을 제공할 수 있다. 그러나 이러한 나노입자로의 자가조립은 자연적 조건에서는 완전 구형에 가까운 형태로까지 진행된다. 예를 들어 여 성자궁경부암 백신으로 사용하는 human papilloma virus(HPV)의 외피항원인 L1 단백질의 경우 360개의 단량체가 모여 바이러스 유사입자(virus-like particle, VLP) 크기로 조립된다(Wang, J. W., & Roden, R. B. (2013). Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert review of vaccines*, 12(2), 129-141.). 아울러 식중독장염백신으로 사용되는 norovirus 외피단백질의 경우 180개의 단량체로 이루어진 VLP로 조립된다. 이러한 VLP로의 자가조립은 이보다 크기가 작은 소단위체(예를 들어 삼량체(trimer) 또는 오량체 등)를 경유하여 조립된다. 그러나 예를 들어 특수목적의 백신 또는 치료제도의 사용을 위해 이러한 자가조립을 특정단계(오량체 단계 등)에서 중지시키는 기술은 없다. 이를 구현하기 위한 방법으로는 목적단백질을 별도의 오량체형 구조체(scaffold)에 융합하여 목적단백질을 오량체로 생산할 수 있다. 그러나 이와 같이 두 개의 상이한 단백질을 상호 융합할 시 단백질 폴딩 측면에서 구조적 문제가 발생하기 때문에 융합단백질을 수용성 오량체로 생산하는 것은 기술적으로 매우 어렵다(Harakuni, T., et al. (2005). Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. *Infection and immunity*, 73(9), 5654-5665.).

[0008] 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명에서는 상기 이열성 독소 패밀리에 속하는 AB5형 독소구조체 중 B5를 오량체형 구조체로 사용하였으며, 오량체 구조로의 형성이 중요한 백신항원을 효율적으로 생산하기 위해 오량체형 구조체인 독소단백질과 목표항원 단백질을 융합하고 이를 구현하였다. 또한, 이를 원핵세포에서 성공적으로 구현하기 위하여 원핵세포에서의 단백질 폴딩과 자가조립을 촉진하는 RNA 매개형 폴딩기능을 추가적으로 조합하

였다(Choi, S. I., et al. (2008). Protein solubility and folding enhancement by interaction with RNA. PLoS One, 3(7), e2677.). 즉 단백질발현 module을 라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; 이하 RID), 독소유래 오량체형 구조체 단백질, 목적단백질의 3중 융합(triple fusion)을 통해 제작하였으며, 제작한 재조합 단백질이 원핵세포에서 높은 수준으로 수용성 발현하고, 오량체로의 구조체가 잘 형성되며, 중화 항체 형성능력이 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 원핵세포에서 수용성 발현이 어려운 목적 단백질을 수용성으로 생산할 뿐 아니라 면역원성을 높일 수 있는 형태로 발현할 수 있는 재조합 발현벡터; 상기 발현벡터로 형질전환된 숙주세포; 및 상기 숙주세포에서 발현된 오량체 형태의 재조합 융합단백질을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현 벡터 및 숙주세포를 이용하여 오량체 형태의 재조합 융합단백질을 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 융합단백질을 포함하는 바이러스 진단용 조성물 또는 백신 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 i) RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain, RID), ii) 오량체형 독소 단백질, 및 iii) 목적 단백질의 상호 융합을 특징으로 하며, 이를 통해 원핵세포에서 정형화된 수용성 오량체를 생산할 수 있을 뿐 아니라 정제된 오량체 단백질이 목적 바이러스에 대해 뛰어난 중화능(neutralization)을 나타내는 것을 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0015] 이에 본 발명은 라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID); 오량체형 독소 단백질; 및 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 융합단백질 발현 벡터를 제공한다.
- [0017] 본 명세서에서 "목적단백질(target protein)"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현벡터에 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 숙주세포에서 발현이 가능한 단백질을 의미하며, 본 발명에서는 면역반응을 유도하는 바이러스 항원단백질이 이에 해당한다.
- [0018] 본 발명에서 상기 바이러스는 구형의 정이십면체(icosahedral) 캡시드 구조를 가지는 바이러스로서 상기 정이십면체는 소단위체인 정삼각형 20개가 모여서 만들어지는 구조이고 12개의 꼭지점은 크게 2배축(two-fold axis), 3배축(three-fold axis), 5배축(five-fold axis)이 존재하고, 축에 따라 소단위체가 오각형 또는 육각형의 조합으로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0019] 이에, 본 발명의 상기 목적 단백질은 자가조립 과정에서 소단위체로 오량체 또는 육량체를 형성하는 바이러스 항원단백질 일 수 있다. 이에는 일반적으로 정이십면체를 구성하는 모든 외피형 또는 비외피형 바이러스의 오량체 구성항원에 적용될 수 있다.
- [0020] 지질막을 가지는 외피형 바이러스(enveloped virus)의 예로는 DNA 유전자형을 가지는 헤르페스바이러스속(Herpesviridae), 헤파드나바이러스속(Hepadnaviridae) 바이러스가 포함될 수 있고, RNA 유전자형을 가지는 플라비바이러스속(Flaviviridae)바이러스가 포함될 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 플라비바이러스속에 속하는 뎡기바이러스(Dengue virus; 이하 DV) 및 일본뇌염바이러스(Japanese Encephalitis virus; 이하 JEV)를 이용하여 재조합 벡터 및 재조합 단백질을 제조하고 원핵세포에서의 수용성 발현, 오량체 구조 형성 및 중화항체의 면역능력을 확인하였다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 뎡기바이러스의 ED3 (E protein domain 3)는 오량체로 조립되어 숙주

세포의 수용체(receptor)와 직접적으로 결합하며 바이러스 융합(viral fusion) 및 숙주세포로의 바이러스 유전자 전달을 통한 세포 내 감염에 매우 중요한 역할을 한다(Zhang, X., et al. (2017). Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses*, 9(11), 338.). 본 발명의 ED3는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 서열번호 1을 코딩하는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 및 그 상동체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 서열번호 2의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0023] [서열번호 1]

[0024] 탕기바이러스 ED3 아미노산 서열

[0025] KGVSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONRLITANPIVTDKEKPVNIEAEPPFGESYLVVGAGEKALKLSWFKKG

[0027] [서열번호 2]

[0028] 탕기바이러스 ED3를 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0029] aaaggcgtctcctacgtaatgtgtaccggcagcttcaagttagaaaaagaggttgccgagacccagcatgggaccgtacttgtccaggtgaagtagagggcactgatgcaccctgtaaaatcccttctccagtcagagcagagaaggggtgacacaaaatggctgctgatcacagcgaacccatcgtagcggaataaggaaagcccgttaacatcgaagcgggaacctccgtttggcgaaagctatttagtagtagggcgggggagaaagctctgaagttatcgtaggttcaagaaaggc

[0031] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 일본뇌염바이러스의 JEV는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 서열번호 3을 코딩하는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 및 그 상동체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 서열번호 4의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0033] [서열번호 3]

[0034] 일본뇌염바이러스의 JEV 아미노산 서열

[0035] kgttygmctekfsfaknpadtghgtvvielsysgsdgpckipivsvaslnmdtpvgrlvtvnpfvatssanskvlvemeppfgdsyivvgrgdkqinhwhkag

[0037] [서열번호 4]

[0038] 일본뇌염바이러스의 JEV 뉴클레오티드 서열

[0039] aaaggcacaacctatggcatgtgcagaaaaattctcgttcgcgaaaaatccggcggacactgggtcacggaacagttgtcattgaactttcctactctgggagtgatggcccttgcaaaattccgattgtctccgttgcgagcctcaatgacatgacccccgtcggcggtggtgacagtgaaaccttctgcgcgacttccagcgccaactcaaaggtgctagtcgagatggaacccccctcggagactcctacatcgtagttggaaggggagacaagcagattaccaccattggcacaaggtgga

[0041] 본 발명에서, 지질막이 없이 바이러스 외피 단백질로 구성된 비외피형 바이러스(non-enveloped 또는 naked virus)로는, DNA 유전자형을 가지는 아데노바이러스속 (Adenoviridae), 파보바이러스속(Pavoviridae) 바이러스가 포함될 수 있고, RNA 유전자형을 가지는 레오바이러스속(Reoviridae), 피코르나바이러스속(Picornaviridae), 칼리시바이러스속(Caliciviridae) 바이러스가 포함될 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 피코르나바이러스속(Picornaviridae)에 속하는 구제역바이러스(Foot-and-mouth disease virus; 이하 FMDV)의 캡시드 단백질을 이용하여 재조합 벡터 및 재조합 단백질을 제조한 후 원핵세포에서의 수용성 발현, 오량체 구조 형성 및 중화항체의 면역능력을 확인하였다. 구제역바이러스의 외피단백질은 VP1, VP0 및 VP3단백질 각각 60개가 모여서

총 180개의 단백질로 구성되어 하나의 정이십면체를 이룬다. 3종의 상이한 구성 항원(VP1, VP0, VP3) 중 오랑체의 조립에는 VP1단백질로 구성되어 있다.

[0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 구제역바이러스의 VP1은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 서열번호 5를 코딩하는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 및 그 상동체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 서열번호 6의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0044] [서열번호 5]

[0045] 구제역바이러스 VP1 아미노산 서열

[0046] ttttgesadpvttttvenygetqtarrlhtdvafvldr fvkltqpkstqtldmqipshtlvgalrrsatyyfsdlevahvhtgpvtwvpngapktalnnht
nptayqkqpitrlalpytaphrvlstvyngktttygeessrrgdlaalarrvnnrlptsfnygavkadt itellirmkraetycprllaldttqdrkqkii
apekqmi

[0048] [서열번호 6]

[0049] 구제역바이러스 VP1 뉴클레오티드 서열

[0050] accactaccaccggtgaaagcgcagaccggt aactactaccgttgaaaactacggggcgaaacccaaacggcgcgctcgtctgcatactgacgtagcgttc
gtgctggaccgcttcgttaaactgacccaaccgaaatcaactcagacacttgattaatgcagatcccttcccacaccctgggtgggtgctctattgcgatct
gccacctactacttcagcgatctggaagtggcctggataccgggcccgttacctgggttccgaacggcgctccgaaaaccgcactcaacaaccacacc
aatccaacagcatatcagaacagccgatcacccgtctggcgctgccttatactgccccgcactcgtgtctgagcagcggtgtacaacggtaaaacgacctat
ggcgaagaatcgtctcgtcgtggtagctggcgcgcttggcacgtcgcgtaaataacgcctgccgacctcttcaactacgggtgcggtaaaagccgatacc
atcaccgaactgctgatccgtatgaaacgtgcggaaacctactgcccgcgcccgttgctggcactggataccacgcaggatcgccgtaaacaaaaaatcatc
gcaccggaaaaacagatgatc

[0052] 본 명세서에서 "오랑체형 독소 단백질"은 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit, CTB) 단백질, 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit, LTB) 및 시가 독소 B 서브유닛(Shiga-toxin B subunit) 단백질 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 오랑체 구조를 유도하는 활성이 유지되는 한 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 CTB는 구조나 독성기작으로 대장균(*E.coli*)나 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에서 분비되는 LTB와 매우 유사하다(Sixma, T. K., et al. (1993). Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *Journal of molecular biology*, 230(3), 890-918.). 아울러 이질 원인균인 시겔라 유래 시가 독소 B 서브유닛과도 구조적으로 매우 유사하다(*Silva, C. J., et al. (2017). Shiga Toxins: A Review of Structure, Mechanism, and Detection. Springer.*). 따라서 본 발명에서의 오랑체 형성 항원융합에 CTB, LTB, 시가 독소 B 서브 유닛 및 기타 유사독소의 경우에도 용이하게 적용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 CTB 및 LTB와 융합된 항원 단백질이 오랑체 구조를 형성하는 것을 확인하였다. 본 발명에서 상기 CTB 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기가 일부 추가, 삭제 또는 치환되어 형성된 단백질 또는 단편일 수 있다. 본 발명에서 상기 LTB 단백질은 서열번호 9의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기가 일부 추가, 삭제 또는 치환되어 형성된 단백질 또는 단편일 수 있다.

[0055] [서열번호 7]

[0056] CTB 아미노산 서열

[0057] TPQNITDLCAEYHNTQIH TLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPQSQHIDSQKKAIERMKDTRLIAYL TEAKVEKLCVWNNKTPHATAAISM
A

- [0059] [서열번호 8]
- [0060] CTB 뉴클레오티드 서열
- [0061] actccgcagaacattacggacctgtgtgcggagtatcataatcgcagattcacactttgaatgacaagatttttcatatacggagtcattagctggtaaacgtgaaatggcaattatcacttttaaaaatgggtgcgacgttccaggtggaagttccgggcagtcagcatattgatagtcagaaaaagccatcgaacgtatgaaggataccttgcgatttgcgtacttaaccgaggctaaagtcagaaaattatgtgtctggaataataagaccccatgccattgctgcgatttcgatggccaat
- [0063] [서열번호 9]
- [0064] LTB 아미노산 서열
- [0065] Apqtitelcseyrntqiytindkilsytesmagkremviiitfksgetfqvevpqshidsqkkaiermktlrlityltetkidklcvwnnktpnsliaaismkn
- [0067] [서열번호 10]
- [0068] LTB 뉴클레오티드 서열
- [0069] gctccccagactattacagaactatgttcggaatatcgcaacacacaaatatatcgataaatgacaagatactatcatatacggaatcgatggcaggcaaaagagaaatgggtatcattacatttaagagcggcgaacatttcaggtcgaagtcgggcagtcacatatagactccagaaaaagccattgaaaggatgaaggacacattaagaatcacatatctgaccgagacaaaattgataaattatgtgtatggaataataaaaccccaattcaattgcggcaatcagtatgaaaac
- [0071] 본 명세서에서 "RNA 결합 도메인(RNA interacting domain, RID)" 또는 "라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID)" 또는 "LysRS RNA 결합 도메인"은 LysRS의 RNA와 기타 단백질간의 상호작용에 관여하는 고유한 N-말단(N-terminal) 연장부위를 의미한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 RID는 서열번호 11의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기가 일부 추가, 삭제 또는 치환되어 형성된 단백질 또는 단편일 수 있다. 본 발명에서 상기 RID는 RNA와 상호결합 능력이 있으면서 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시킬 수 있는 활성이 유지되는 한 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0073] [서열번호 11]
- [0074] hRID 아미노산 서열
- [0075] MSEQHAQAAVQAAEVKVDGSEPKLSKNELKRRLKAEKKVAEKEAKQKELSEKQLSQATAAATNHTDNGVGPEEESV
- [0077] [서열번호 12]
- [0078] hRID 뉴클레오티드 서열
- [0079] atgtctgaacaacacgcacagcgccgtgcaggcgccgaggtgaaagtgatggcagcgagccgaaactgagcaagaatgagctgaagagacgcctgaaagctgagaagaagtagcagagaaggaggccaaacagaaaagagctcagtgagaacagctaagccaagccactgctgctgccaccaaccacaccactgataatgggtgtgggtcctgaggaagagagcgtg
- [0081] 본 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동 가능하게 연결된 목적단백질을 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가 단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택 마커 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0082] 본 명세서에서 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된"은 프로모터에서 전사가 개시하고 암호화 서열을 통해 종료

암호로 진행하는데 작용하도록 단편이 배열되는 것을 나타낸다.

- [0083] 본 발명의 재조합 융합단백질 생산용 벡터는 상기 목적 단백질의 수용성 발현 및 발현효율을 증진시키기 위한 서열번호 11의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서 상기 서열번호 11의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 12로 표시되는 서열일 수 있다.
- [0085] 본 발명의 재조합 융합단백질 발현 벡터는 상기 목적 단백질의 오량체 형태로의 발현을 증진시키기 위한 서열번호 13의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0086] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서 상기 서열번호 13의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 14로 표시되는 서열일 수 있다.
- [0087] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서 상기 재조합 융합단백질 발현 벡터는 1~6개의 히스티딘을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드; 및 단백질 절단효소 인식 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드;를 추가로 포함할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 재조합 융합단백질 발현 벡터에 있어서, 상기 단백질 절단효소는 TEV일 수 있다.
- [0089] 본 발명에 따른 발현벡터에 있어서, 상기 발현벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터, 파지 입자 또는 게놈 삽입물일 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주세포의 게놈과 무관하게 복제되거나 숙주세포의 게놈 내로 통합될 수 있다.
- [0091] 본 발명은 또한, 라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID); 오량체형 독소 단백질; 및 목적 단백질;을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 융합 단백질 발현 벡터가 형질전환 된 숙주세포를 제공한다.
- [0092] 본 명세서에서 사용된 용어 "형질전환" 또는 "도입"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 발현벡터를 형질전환시키는 방법은 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4)법, 염화칼슘(CaCl_2)법, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법 또는 초산 리튬-DMSO법을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0093] 본 발명에 따른 숙주세포에 있어서, 상기 숙주세포는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주세포가 바람직하며, 원핵 및 진핵을 포함한 모든 미생물이 사용될 수 있다. 일반적으로 단백질의 폴딩이나 단량체의 자가조립은 진핵세포에 비해 비교적 단순한 원핵세포의 경우 훨씬 어렵다. 특히 백신의 목표대상이 되는 인체, 동물 등을 감염하는 바이러스 유래 항원의 경우 인체, 동물유래 고등세포나 효모와 같은 진핵세포에서 훨씬 폴딩이나 자가조립이 용이하게 이루어진다. 이에 비해 상기한 바와 같이 대장균의 경우 항원의 폴딩/자가조립이 기술적으로 매우 어렵고 따라서 폴딩이 안된 (misfolding) 무정형의 inclusion body의 refolding이 필요한 공정상의 한계점이 존재한다. 따라서 본 발명에서 사용한 원핵세포의 대표적인 예인 대장균에서 기존 기술의 한계를 극복하여 구현된 오량체로의 폴딩, 자가조립은 매우 용이하게 인체, 동물, 곤충세포 및 효모등의 진핵세포에서 구현될 수 있음이 자명하다. 따라서 본 발명에서 사용하는 숙주세포는 세균 {에스케리키아(*Escherichia*)속 세균; 바실러스(*Bacillus*)속 세균; 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 세균; 유산균 등 포함}뿐 아니라 효모(*Sacharomyces cerevisiae* 등의 bakers yeast, *S. pombe*; *Pichia pastoris*와 같은 메탄올 자화기능 methylotrophic yeast 등); 동물세포; 곤충 세포; 식물세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 바람직하기는, 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)일 수 있다.
- [0095] 본 발명은 또한 수용성 발현 효율이 증진된 재조합 융합단백질의 제조방법을 제공한다. 상기 재조합 융합단백질의 생산방법은
- [0096] (a) 라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID); 오량체형 독소 단백질; 및 목적 단백질;을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;
- [0097] (b) 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

- [0098] (c) 상기 형질전환체를 배양하여 RID-CTB-목적단백질 융합단백질 발현을 유도하는 단계; 를 포함할 수 있다.
- [0099] 본 발명에 따른 재조합 융합단백질 생산방법에 있어서, 상기 숙주세포는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주세포가 바람직하며, 원핵 및 진핵을 포함한 모든 미생물이 사용될 수 있다. 상기 숙주세포는 에스케리키아(*Escherichia*)속 세균; 바실러스 바실러스 (*Bacillus*)속 세균; 슈도모나스 (*Pseudomonas*)속 세균; 유산균; 효모; 동물세포; 및 곤충 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 바람직하게는, 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)일 수 있다.
- [0101] 본 발명은 또한, 라이실 tRNA 합성효소로부터 분리한 N-말단 RNA 결합 도메인(LysRS N-terminal appended RNA interacting domain; RID); 콜레라 독소 B 서브유닛 (cholera toxin B subunit; CTB) 단백질; 및 목적단백질을 포함하는 재조합 융합단백질을 제공한다.
- [0102] 본 명세서에서 사용된 용어 "융합 단백질(fusion protein)" 또는 "재조합 단백질(recombinant protein)"은 원래의 목적 단백질 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다.
- [0103] 본 명세서에서 사용된 용어 "단백질"은 "펩타이드(peptide)" 또는 "폴리펩타이드(polypeptide)"와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.
- [0104] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 융합단백질은 RID-CTB-목적단백질 융합단백질을 의미하며, 상기 재조합 융합단백질은 오량체 형태로 발현될 수 있다.
- [0105] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 재조합 융합단백질은 서열번호 9의 아미노산 서열로 표시될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0107] 본 발명은 또한, 상기 발현 벡터 또는 재조합 융합단백질을 포함하는 바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0108] 본 발명에서 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 바이러스의 발병 여부 또는 발병 가능성 여부를 확인하는 것이다.
- [0109] 상기 바이러스 감염 진단용 조성물은 바이러스 항원 단백질을 포함하는 상기 재조합 융합단백질뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 시약 등이 추가로 포함될 수 있다. 이러한 시약으로는 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.
- [0111] 본 발명은 또한, 상기 발현 벡터 또는 상기 재조합 융합단백질을 포함하는 면역 증강용 백신 조성물을 제공한다.
- [0112] 본 발명에 따른 백신 조성물은 상기 발현 벡터 또는 재조합 융합단백질을 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.
- [0113] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

- [0114] 본 발명의 백신 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.
- [0115] 본 발명의 백신 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.
- [0116] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다.
- [0117] 나아가, 본 발명의 백신 조성물은 항응집제, 유헬제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, [0206] 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있다.
- [0118] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 001 μ g 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0120] 본 발명에서는 단량체간 정형화된 상호작용을 유도할 수 있는 오량체 구조체(scaffold)로서 CTB를 사용하였고 3개의 이종 단백질 융합을 통해 이러한 문제를 모두 해결하였다. 이러한 도메인 조합에 따라 놀랍게도 대장균과 같은 균체내에서도 외래 단백질의 폴딩과 다중구조복합체(multimer)를 유도하여 수용성과 오량체의 생성효율이 크게 향상되었다. 이를 통해 실제로 대장균 시스템에서 발현하였음에도 불구하고 고등세포인 식물세포를 통한 기존 기술 대비 오량체 형성 효율이 200~300% 이상 향상되었다(Kim, T. G., et al. (2010). Cholera toxin B subunit-domain III of dengue virus envelope glycoprotein E fusion protein production in transgenic plants. Protein expression and purification, 74(2), 236-241.). 이뿐 아니라 발현된 단백질을 실험용 쥐에 접종하여 중화항체역가를 분석한 결과 콜레라 독소 B를 융합하지 않은 재조합 단백질 백신에 비하여 200~300% 이상 방어효능이 향상됨을 입증하였다.

발명의 효과

- [0122] 본 발명의 재조합 발현 벡터 및 이를 이용한 재조합 융합 단백질 생산 방법에 의하면 세포에서 재조합 단백질의 발현양 및 수용성을 크게 향상시킴으로써 높은 수율로 항원 단백질을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 구조적으로도 정교한 오량체 형태의 항원 단백질을 생산할 수 있다.
- [0123] 또한, 본 발명의 오량체 형태의 융합 단백질을 포함하는 바이러스 백신은 정교한 오량체 형성으로 인해 면역원성이 크게 향상될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0125]

도 1은 구형 20면체 껍질구조 바이러스의 모식도(A)와 UCSF chimera를 통해 모델링한 구조(B)를 통해 20면체 형성 시 생기는 2배축(twofold axis), 3배축(threefold axis), 5배축(fivefold axis)의 형성과 그 소단위체를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 재조합 단백질의 발현을 위한 pGE-hRID(human 유래 RID) 벡터 구성 및 오량체가 형성된 CTB-DV1ED3의 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 발현된 재조합 ED3 단백질의 발현양 및 수용성 여부를 SDS-PAGE로 확인한 결과이다. M은 marker, T는 total cell lysate solution, S는 soluble fraction after centrifugation, P는 pellet fraction after centrifugation을 의미하고, 각각의 경우 왼쪽 패널은 hRID가 재조합 되어 있지 않는 CTB-DV1ED3의 발현 결과, 오른쪽 패널은 hRID가 재조합 되어 있는 hRID-CTB-DV1ED3 발현 결과이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 발현된 재조합 단백질을 니켈-친화성 크로마토그래피를 통해 정제한 후 분획을 SDS-PAGE로 확인한 결과이다. (A)는 각 분획(fraction) 별로 SDS-PAGE를 걸어 단백질의 정제여부 및 정제된 단백질이 존재하는 분획을 확인한 결과이고, 도면 위의 숫자는 정제 시 나눠진 분획 번호를 의미한다. (B)는 정제 후 BSA(1mg/ml)과 밴드 밀도를 비교하여 얻어진 재조합 단백질의 총량을 계산한 결과이다. 본 재조합 단백질의 농도가 매우 높은 것을 고려하여 먼저 1/4 희석하여 로딩하였다. 밴드 밀도로부터 계산된 평균 농도는 4.803 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이며 총 부피가 약 4ml이므로 총 19.212mg의 재조합 단백질이 500ml culture를 통해 얻어졌다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 발현 및 정제된 재조합 단백질의 오량체 형성 여부를 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다. 샘플을 끓이지 않고 DTT를 넣지 않은 채 로딩하여 재조합 단백질의 변성(denaturation)을 최소화하여 확인한 것이다. hRID는 융합 단백질의 사이즈를 크게 보여지게 하는 성질이 있기 때문에 이를 배제하기 위하여 TEV protease를 이용하여 절단한 샘플도 함께 확인하였다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 발현 및 정제된 재조합 단백질의 오량체 형성 여부를 크기-배제 크로마토그래피(SEC)를 통해 정확한 크기를 계산하여 확인한 결과이다. (A)는 hRID-CTB-DV1ED3의 SEC 결과이며, (B)는 TEV 단백질 절단효소를 이용해 hRID를 절단한 CTB-DV1ED3의 SEC 결과이다. SEC를 통해 얻어진 피크를 수치화하여 계산한 결과로, calibration sample을 통해 추세를 그려 본 재조합 단백질에서 나타나는 피크의 사이즈를 계산하였다(K_{av} = partition coefficient, V_o = column void volume(8.67), V_e = elution volume, and V_c = geometric column volume(25)).

도 7은 본 발명의 일실시예에 따라 발현 및 정제된 재조합 단백질을 마우스에 접종할 때 구성한 실험군 및 진행된 일정을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따라 그룹1(hRID-DV1ED3)과 그룹2(hRID-CTB-DV1ED3)에서 얻어진 혈청으로 야생형 땡기바이러스와의 반응을 확인한 ELISA 결과이다. 각 혈청은 초기 1/200 희석하여 사용하였으며, 바이러스는 웰 마다 10^4 PFU를 코팅하였다.

도 9는 마우스 실험을 통해 얻어진 혈청으로 야생형 땡기바이러스 1에 대해 NT 어세이를 진행한 결과이다. NT titer는 대조군과 비교하여 플라크 수가 50% 감소한 지점을 전후로 이전희석배수, 이후희석배수라 지정하고, $[\text{NT titer} = \text{이전희석배수} + (\text{대조군 플라크수} \times 50\% - \text{이전희석배수의 플라크수}) \times (\text{이후희석배수} - \text{이전희석배수}) / (\text{이후희석배수의 플라크수} - \text{이전희석배수의 플라크수})]$ 로 계산하였다. 검출한계(detection limit)는 20이다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 일본뇌염바이러스(JEV) 재조합 항원 단백질의 발현을 위한 벡터 구성(A) 및 발현된 재조합 단백질의 발현양 및 수용성 여부를 SDS-PAGE로 확인한 결과이다(B). M은 marker, T는 total cell lysate solution, S는 soluble fraction after centrifugation, P는 pellet fraction after centrifugation을 의미하고, 왼쪽 도면은 GP가 재조합 되어 있지 않는 hRID-CTB-JEVEDIII의 발현 결과, 오른쪽 도면은 GP가 재조합 되어 있는 hRID-CTB-GP-GP-JEVEDIII 발현 결과이다.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따라 발현된 일본뇌염바이러스 재조합 단백질을 니켈-친화성 크로마토그래피를 통해 정제한 후 분획을 SDS-PAGE로 확인한 결과이다. 도면 위의 숫자는 정제 시 나눠진 분획 번호를 의미하고, 왼쪽 도면은 GP가 재조합 되어 있지 않는 hRID-CTB-JEVEDIII의 결과, 오른쪽 도면은 GP가 재조합 되어 있는 hRID-CTB-GP-GP-JEVEDIII 결과이다.

도 12는 본 발명의 일실시예에 따라 발현 및 정제된 일본뇌염바이러스 재조합 단백질의 오량체 형성 여부를

SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다. 샘플을 끓이지 않고 DTT를 넣지 않은 채 로딩하여 재조합 단백질의 변성(denaturation)을 최소화하여 오량체 형성 여부를 확인한 것이다.

도 13은 본 발명의 일실시예에 따른 구제역바이러스(FMDV) 재조합 항원 단백질의 발현을 위한 벡터 구성(A) 및 발현된 재조합 단백질의 발현양 및 수용성 여부를 SDS-PAGE로 확인한 결과이다(B). M은 marker, T는 total cell lysate solution, S는 soluble fraction after centrifugation, P는 pellet fraction after centrifugation을 의미하고, S'은 S fraction을 DTT를 처리하지 않고, 끓이지 않은 상태로 로딩한 것을 의미한다. 왼쪽 도면은 hRID가 재조합 되어 있지 않는 CTB-VP1의 발현 결과, 가운데 도면은 hRID가 재조합 되어 있고, GPGP는 재조합 되어 있지 않는 hRID-CTB-VP1의 발현 결과, 오른쪽 도면은 hRID 및 GPGP가 모두 재조합 되어 있는 hRID-CTB-GPGP-VP1 발현 결과이다.

도 14는 본 발명의 일실시예에 따라 발현된 구제역바이러스 재조합 단백질을 니켈-친화성 크로마토그래피를 통해 정제한 후 분획을 SDS-PAGE로 확인한 결과이다. 도면 위의 숫자는 정제 시 나눠진 분획 번호를 의미하고, 왼쪽 도면은 GPGP가 재조합 되어 있지 않는 hRID-CTB-VP1의 결과, 오른쪽 도면은 GPGP가 재조합 되어 있는 hRID-CTB-GPGP-VP1의 결과이다.

도 15는 본 발명의 일실시예에 따라 발현 및 정제된 구제역바이러스 재조합 단백질의 오량체 형성 여부를 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다. 샘플을 끓이지 않고 DTT를 넣지 않은 채 로딩하여 재조합 단백질의 변성을 최소화하여 오량체 형성 여부를 확인한 것이다.

도 16은 본 발명의 일실시예에 따른 LTB 융합단백질의 오량체 형성여부를 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다. 샘플을 끓이지 않고 DTT를 넣지 않은 채 로딩하여 재조합 단백질의 변성을 최소화하여 오량체 형성 여부를 확인한 것이다. (A)는 hRID-LTB 및 hRID-LTB-FMDV VP1의 결과, (B)는 hRID-LTB-JEVEDIII의 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0126] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1]

[0129] 재조합 발현 벡터의 제작

[0130] 단백질 발현 벡터로 pGE-hRID 발현 벡터를 사용하였다(YANG, Seung Won, et al. Harnessing an RNA-mediated chaperone for the assembly of influenza hemagglutinin in an immunologically relevant conformation. The FASEB Journal, 2018, fj. 201700747RR.). pGE-hRID는 T7 promoter에 의해 발현이 조절되고, 필요에 의해 융합 단백질(hRID)을 절단하기 위해 TEV(tobacco etch virus) protease site(ENLYFQ)를 삽입하였다. 또한, 니켈-친화성 크로마토그래피를 수행하기 위해 6X His tag를 삽입하였으며, Kpn1-BamH1-EcoRV-Sal1-Hind3으로 구성된 MCS(Multiple Cloning Site)를 Kpn1 및 Hind3으로 절단하여 CTB와 융합한 목적단백질의 서열을 삽입하였다(도 2A). hRID의 유무에 따라 대장균 내 목적단백질의 수용성 발현의 정도를 비교하기 위하여 hRID를 삽입한 벡터(1), 및 hRID를 제거한 벡터(2)를 사용하였다(도 2B).

[0131] 구체적으로, pGE-hRID 플라스미드에 Kpn1과 Hind3 제한효소를 사용하여 CTB를 코딩하는 유전자 서열(서열번호 8)와 Dengue virus serotype 1(DV1) ED3를 코딩하는 유전자 서열(서열번호 2)을 삽입하여 hRID-CTB-DV1ED3 형태의 재조합 벡터를 제작하였으며, 대조군 벡터로는 hRID 서열(서열번호 12)를 제거한 CTB-DV1ED3 형태의 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 벡터는 IPTG에 의해서 프로모터 활성화가 조절된다.

[실시예 2]

[0134] 본 발명의 재조합 단백질의 수용성 발현 확인

[0135] 실시예 1에서 제조된 단백질 발현 벡터를 SHuffle® T7 competent cell(New England Biolabs #C3026)에 형질전환 시켜 배양하였다. 형질전환된 대장균은 50 µg/ml의 암피실린(Ampicillin)이 포함된 LB 배지에서 배양하였다. 배양 온도는 37°C의 조건에서 배양하였으며, 대장균의 OD₆₀₀ 값이 0.5 이상이 되면 T7 promoter를

활성화 시키기 위해서 IPTG를 1 mM 수준으로 넣어주고, 단백질이 충분히 생산될 수 있도록, IPTG를 넣어준 이후부터 20℃에서 5시간 정도를 배양하였다. 충분히 배양된 대장균은 원심분리하여 상등액을 제거한 후에 보관하였다. 그 다음, 대장균 수확물에 A buffer[50mM Tris-Cl(pH7.5), 300mM NaCl, 10% glycerol, 5mM imidazole] 10ml을 넣은 뒤 초음파 분쇄를 하여, 용해물(lysate)을 만들었다. 그 후, 상기 용해물을 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0136] 그 결과, hRID를 융합한 본 발명의 재조합 단백질은 전체 단백질 발현량의 절반 가량이 수용성으로 발현되었다. 반면 hRID를 융합하지 않은 대조군(CTB-DV1ED3-direct)은 대부분의 단백질이 불용성 형태로 발현되었다(도 3).

[0137] 이를 통해, CTB와 융합시킨 재조합 단백질의 경우에도 hRID 융합을 통해 재조합 단백질의 수용성 발현 효율을 크게 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0139] [실시예 3]

[0140] 본 발명의 재조합 단백질의 정제 및 발현 수율 확인

[0141] 실시예 2에서 발현이 확인된 재조합 단백질은 500ml로 스케일 업 배양하여 생산하였다. 상기 재조합 단백질에는 6x His tag이 존재하기 때문에 Ni-column을 통해 효과적으로 분리할 수 있다. 따라서 초음파 분쇄 및 원심분리를 거친 수용성 분획(soluble fraction)을 Ni column에 로딩하였으며, 단백질은 이미다졸 농도 10mM부터 300mM의 선형구배(linear gradient)에 따라 용리(elution)되었다. 정제 시 사용된 버퍼의 조성은 다음과 같다. A buffer[50mM Tris-Cl(pH7.5), 300mM NaCl, 10% glycerol, 5mM imidazole], B buffer[50mM Tris-Cl(pH7.5), 300mM NaCl, 10% glycerol, 300mM imidazole].

[0142] 다음으로, 니켈-친화성 크로마토그래피를 통해 얻어진 모든 분획(fraction)을 SDS-PAGE로 분석하였으며, 이 가운데 상기 재조합 단백질을 포함하는 분획, 즉 [도 4A]에서 16번 분획 내지 24번 분획만을 섞어 모은 뒤, 원심분리 필터(centrifugal filter, Centriprep; EMD Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용해 농축하였고 C buffer[50mM Tris-Cl(pH 7.5), 300mM NaCl, 0.1mM EDTA]로 투석(dialysis)하여 보관하였다. 정제가 완료된 순수한 hRID-CTB-DV1ED3 단백질의 농도는 SDS-PAGE를 통해 이미 농도를 알고 있는 BSA와 밴드 밀도(band density)를 비교하여 측정하였다.

[0143] 그 결과 [도 4B]에 나타난 바와 같이 대장균 500ml을 통해 발현 및 정제된 재조합 단백질의 양은 총 19.212mg으로 계산되었다.

[0145] [실시예 4]

[0146] SDS-PAGE를 통한 본 발명의 재조합 단백질의 오량체 구조 확인

[0147] 실시예 3의 정제를 통하여 얻어진 재조합 단백질이 오량체 구조를 이루는지 확인하기 위해 먼저 SDS-PAGE를 수행하였다. 이전 SDS-PAGE와는 다르게 단백질의 구조를 비변성 상태(undenaturation)로 유지해야 하기 때문에 DTT를 넣지 않은 로딩버퍼를 사용하였으며, 끓이는 과정을 생략하고 진행하였다.

[0148] 그 결과, 밴드 밀도를 비교하여 측정한 결과 SDS가 포함되어있음에도 불구하고 대부분의 단백질이 오량체로 형성됨을 알 수 있으며(도 5), 이는 실제로는 더 많은 비율의 단백질이 오량체를 형성한다고 추측할 수 있다. 또한 대부분 단백질의 경우 SDS와 상호 결합하여 물리적 성질이 변화됨을 상기할 때 이 결과는 형성된 오량체가 구조적으로 매우 안정화된 정형화 구조(ordered structure)로 자가조립 되어있음을 시사하고 있다.

[0150] [실시예 5]

[0151] 크기 배제 크로마토그래피를 통한 본 발명의 재조합 단백질의 오량체 구조 검증

[0152] 실시예 4에서 확인된 재조합 단백질의 오량체 구조 형성을 확실하게 검증하기 위해서 Superdex-200 Increase column(GE Healthcare)를 이용한 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography; SEC)를 진행하였으며, 크기를 알고 있는 4가지 마커 단백질로 calibration을 하였다. 이 때 사용된 버퍼의 조성은 [50mM Tris-Cl(pH 7.5), 300mM NaCl]이며, Superdex-200 analytical gel-filtration column(GE Healthcare)를 통해 분리

하였다. 모든 분획은 SDS-PAGE로 분석하여 오랑체 크기에 해당하는 단백질을 포함하는 분획만을 모아 사용하였다.

[0153] 그 결과, calibration으로 사용한 페리틴 피크(440kDa) 근처에 재조합 단백질의 주요 피크가 나타났다. 이를 elution volume과 partition coefficient(K_{av})를 통해 계산한 결과 약 476kDa의 사이즈로 나타났으며, 이는 hRID의 size shift 성질 때문이다(도 6A). 실제로 hRID를 절단한 CTB-DV1ED3의 SEC 결과에서는 약 128kDa에서 피크가 나타났으며, 이는 CTB-DV1ED3 단량체(monomer)의 사이즈가 약 25kDa인 것을 미루어보아 정확하게 오랑체 구조가 형성되었음을 확인할 수 있다(도 6B).

[실시예 6]

[0156] 항체 획득 및 ELISA를 통한 중화항체 역가 측정

[0157] <6-1> 본 발명의 재조합 단백질에 대한 혈청을 얻기 위한 동물실험

[0158] 상기 발현, 정제 및 검증이 완료된 재조합 단백질을 마우스에 접종하였을 때의 면역원성 및 그에 대한 항체가 중화능력을 가지는지 확인하기 위해 먼저 항체 획득을 위한 동물실험을 진행하였다. 동물실험은 [도 7]과 같은 일정으로 진행하였으며, 2주 간격으로 접종 후 안와채혈을 통해 혈액샘플을 얻었다. 구체적으로, 실험에 사용된 쥐는 모두 6주령의 암컷 BALB/c 종(Orient Bio, South Korea)이며, 피하주사(subcutaneous injection, SQ)를 통해 20 μ g의 항원단백질을 2주 간격으로 3회 접종시켰다. 항원보조제(adjuvant)로는 알럼(Imject Alum adjuvant; Thermo Fisher Scientific)을 최종 항원단백질과의 부피비가 1:3(항원단백질:알럼)이 되도록 섞어 사용하였다. 각 접종 후 2주가 지난 뒤 안와채혈을 통해 혈액샘플을 얻었으며, 얻어진 혈액샘플은 원심분리를 통해 혈청만을 분리한 뒤 분액(aliquot)하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 상기 모든 동물실험은 연세대학교 동물실험윤리위원회의 심의를 거쳐 진행되었다(IACUC-A-201701-108-03, IACUC-A-201709-352-02).

[0160] <6-2> 혈청의 항체 역가 측정

[0161] 동물실험을 통해 얻어진 혈청의 항체 역가를 측정하기 위해 효소결합 면역흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)을 수행하였다. 96-well Nunc plate (Thermo Fisher Scientific)에 뎅기바이러스(NCCP41507, National Culture Collection for Pathogen, South Korea)를 10^4 PFU/well의 농도로 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 반응시켜 코팅했다. 그 후, TBST로 워싱하고 블로킹을 위해 TBST에 1% BSA를 섞어 한 시간 동안 실온에서 반응시켰다. 다시 워싱 후 초기 1/200 희석한 후 2배 단계 희석(2-fold serial dilution)한 100 μ l의 혈청샘플들을 각 웰마다 넣어준 후 실온에서 두 시간 반응시켰다. 마찬가지로 워싱 후에, 1:10,000으로 희석한 HRP conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma Aldrich)를 100 μ l씩 넣어 실온에서 한 시간 반응시켰다. 마지막으로 워싱 단계를 거친 후에 3,3',5,5'-tetramethybenzidine(TMB) solution(BD bio sciences)을 각 웰마다 100 μ l씩 넣고 실온에서 30분 반응시켰고, 그 후 2N H₂SO₄ 50 μ l를 웰마다 넣어 반응을 멈추게 한 후 microplate reader(FLUOstar Optima; BMG Labtech)를 통해 OD₄₅₀ 값을 측정하였다.

[0163] <6-3> 항체의 중화능력 검증

[0164] 혈액샘플로부터 얻어진 혈청 속 항체의 뎅기바이러스에 대한 중화능력을 검증하기 위해 PRNT assay를 진행하였다. 초기 1/20 희석을 거친 혈청은 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 열불활성화(heat inactivation) 과정을 거친 후 2배 단계 희석을 진행하여 최종 부피가 110 μ l가 되도록 하였다. 뎅기바이러스는 각 웰당 100 μ l를 접종하였을 때 50-60개의 플라크가 형성될 수 있게 희석하여 최종 부피가 110 μ l가 되도록 한 후, 상기 혈청과 섞은 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응시켰다. Vero cell이 배양되어있는 12well plate에 상기 혼합물을 웰당 200 μ l씩 접종한 다음 실온에서 한 시간 동안 배양한 후, 아가로즈-오버레이를 부어 굳힌 후 5% CO₂ 인큐베이터에서 37 $^{\circ}$ C로 4일간 배양하였다. NT titer는 항체를 섞지 않은 대조군과 비교하여 플라크의 개수가 50% 줄어드는 시점을 기준으로 계산하였다.

- [0166] <6-4> 결과 확인
- [0167] 실시예 <6-2>의 항체 역가를 측정한 결과, 생성된 항체의 양 및 반응성, 즉 항체역가는 CTB를 융합하지 않은 'hRID-DV1ED3'와 CTB를 융합한 'hRID-CTB-DV1ED3'간에 큰 차이는 나타나지 않았다(도 8).
- [0168] 그러나, 실시예 <6-3>에서 PRNT를 통해 야생형 뎅기바이러스에 대한 중화능력을 확인한 결과, CTB 융합여부에 따라 중화항체 역가에서는 큰 차이를 나타내는 것을 확인하였다(도 9). 구체적으로, 도 9는 뎅기바이러스 혈청형 1에 대한 중화능력을 확인한 결과로서, neutralizing titer는 혈청을 섞지 않고 바이러스만 배양시켰을 때에 비해 그 플락의 수가 50% 미만인 되는 시점을 기준으로 측정하였다. 이로부터 hRID-CTB-DV1ED3를 접종하였을 경우 CTB가 융합되지 않은 hRID-DV1ED3만 접종한 경우에 비해 중화능력이 200-300%로 증가되어 있음을 확인할 수 있었다.
- [0169] 특이한 점은 ELISA를 통해 측정한 항체 역가는 거의 비슷함에도 불구하고 중화항체 역가에서는 큰 차이를 보인다는 것이다. 이는 실제로 CTB 융합을 통한 오량체 형성이 바이러스의 중화능에 직접 관여하는 항체 형성에 매우 효과적이라는 것을 의미한다.
- [0171] [실시예 7]
- [0172] 정이십면체형 껍질 구조를 가지는 다양한 바이러스 항원단백질의 수용성 발현 및 오량체 구조 형성 확인- 일본 뇌염바이러스에의 적용
- [0173] <7-1> 재조합 벡터의 구축 및 재조합 단백질의 수용성 발현 확인
- [0174] 본 발명의 기술이 뎅기바이러스 외 다른 플라비바이러스에도 적용된다는 것을 검증하기 위하여, 동일한 벡터 시스템을 이용하여 일본뇌염바이러스의 ED3를 동일한 조건에서 발현하였다.
- [0175] 구체적으로, 실시예 1과 동일하게 pGE-hRID 플라스미드에 Kpn1과 Hind3 제한효소를 사용하여 CTB를 코딩하는 유전자 서열(서열번호 8)와 JEV ED3을 코딩하는 유전자 서열(서열번호 4)을 삽입하여 hRID-CTB-JEVED3의 형태의 재조합 벡터를 제작하였으며, CTB와 JEVED3사이 유연한 구조를 만들기 위해 Gly-Pro-Gly-Pro(GPGP)를 링커로 삽입한 형태로도 벡터를 추가 제작하였다(도 10A). 두 개의 재조합 벡터를 각각 SHuffle T7 cell에 형질전환 시켜 단백질의 발현을 확인하였다. 이후 진행된 모든 실험에서 GPGP 링커의 여부는 큰 차이점을 나타내지는 않았다.
- [0176] 그 결과, [도 10B]에 hRID-CTB-JEVED3의 수용성 발현 효율을 확인할 수 있으며, PBS 조건에서 cell lysis를 진행하여 얻은 결과이고, 실제 정제시 사용되는 A buffer 조건하에서는 수용성 효율이 더욱 증가하는 것을 도 11 라인 S 에서 확인할 수 있다.
- [0178] <7-2> 재조합 단백질의 정제 및 발현 수율 확인
- [0179] 상기 수용성 발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 실시예 2와 동일한 니켈-친화성 크로마토그래피를 이용하였다. 재조합 단백질은 이미다졸 농도 10mM부터 300mM의 선형구배(linear gradient)에 따라 용리(elution)되었다. 용리된 단백질은 분획 별로 SDS-PAGE를 진행하였으며, 도 11에서 재조합 단백질이 확인되는 분획(hRID-CTB-JEVED3에서는 18번 분획부터 24번 분획까지, hRID-CTB-GPGP-JEVED3에서는 19번 분획부터 23번 분획까지)을 섞어 모은 뒤 농축 및 투석하여 보관하였다.
- [0181] <7-3> 재조합 단백질의 오량체 구조 형성 확인
- [0182] 상기 정제를 통하여 얻어진 일본뇌염바이러스 재조합 단백질이 오량체 구조를 이루는지 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. 상기 실시예 3과 동일하게 단백질의 구조를 비변성상태(undenaturation)로 유지하기 위해 DTT를 넣지 않은 로딩버퍼를 사용하였으며, 끓이는 과정을 생략하고 진행하였다.
- [0183] 밴드 밀도를 비교하여 측정한 결과 SDS가 포함되어있음에도 불구하고 대부분의 재조합 단백질이 오량체로 형성되어있음을 알 수 있다(도 12). 상기 실시예 3에서 기술하였듯이 대부분 단백질의 경우 SDS와 상호 결합하여 물리적 성질이 변화됨을 상기할 때 이 결과는 형성된 오량체가 구조적으로 매우 안정화된 정형화 구조임을 시사하

며, 이는 본 발명의 기술이 플라비바이러스의 항원단백질을 매우 안정된 오량체 형태로 발현할 수 있음을 나타낸다.

[실시예 8]

정이십면체형 껍질 구조를 가지는 다양한 바이러스 항원단백질의 수용성 발현 및 오량체 구조 형성 확인-구제역 바이러스에의 적용

<8-1> 재조합 벡터의 구축 및 재조합 단백질의 수용성 발현 확인

아울러 본 발명의 기술이 비외피형 바이러스에도 적용이 되는 것을 확인하기 위하여, 상기 외피형 바이러스의 재조합 단백질을 발현했던 벡터를 이용하여 비외피형 바이러스 인 구제역바이러스(FMDV)의 VP1을 동일한 조건에서 발현하였다. 실시예 1과 동일하게 pGE-hRID 플라스미드에서 Kpn1과 Hind3 제한효소를 사용하여 CTB와 FMDV VP1을 코딩하는 유전자 서열을 삽입하여hRID-CTB-VP1의 형태로 벡터를 제작하였으며, CTB와 VP1사이 유연한 구조를 만들기 위해 Gly-Pro-Gly-Pro(GPGP)를 링커로 삽입한 형태로도 제작하였다. 대조군은 hRID 서열을 제거한 CTB-VP1의 형태로제작하였다(도 13A).

도 13B에서 SDS-PAGE를 통한 재조합 단백질의 발현양을 확인할 수 있으며, hRID를 융합하지 않은 대조군(CTB-VP1)은 수용성 단백질의 발현을 확인할 수 없었으나, hRID를 융합한 융합단백질(hRID-CTB-VP1, hRID-CTB-GPGP-VP1)은 30~40%의 단백질이 수용성으로 발현되며 이는 대조군에서는 수용성 단백질의 발현이 거의 일어나지 않는 것을 고려할 때 매우 향상된 결과임을 알 수 있다.

<8-2> 재조합 단백질의 정제 및 발현 수율 확인

상기 수용성 발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 실시예 2와 동일한 니켈-친화성 크로마토그래피를 이용하였다. 재조합 단백질은 이미다졸 농도 10mM부터 300mM의 선형구배(linear gradient)에 따라 용리(elution)되었다. 용리된 단백질은 분획 별로 SDS-PAGE를 진행하였으며, 도 14에서 재조합 단백질이 확인되는 21번 분획부터 25번 분획까지를 섞어 모은 뒤 농축 및 투석하여 보관하였다.

<8-3> 재조합 단백질의 오량체 구조 형성 확인

상기 정제를 통하여 얻어진 비외피형 바이러스 재조합 단백질이 오량체 구조를 이루는지 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. 상기 실시예 3과 동일하게 단백질의 구조를 비변성상태(undenaturation)로 유지하기위해 DTT를 넣지 않은 로딩버퍼를 사용하였으며, 끓이는 과정을 생략하고 진행하였다. 밴드 밀도를 비교하여 측정한 결과 SDS가 포함되어있음에도 불구하고 대부분의 재조합 단백질이 오량체로 형성되어있음을 알 수 있다(도 15). 상기 실시예 3에서 기술하였듯이 대부분 단백질의 경우 SDS와 상호 결합하여 물리적 성질이 변화됨을 상기할 때 이 결과는 형성된 오량체가 구조적으로 매우 안정화된 정형화 구조임을 시사하며, 최종적으로 이는 본 발명의 기술이 외피형 바이러스와 비외피형 바이러스 모두의 항원단백질을 매우 안정된 오량체 형태로 발현할 수 있음을 나타내는 바이다.

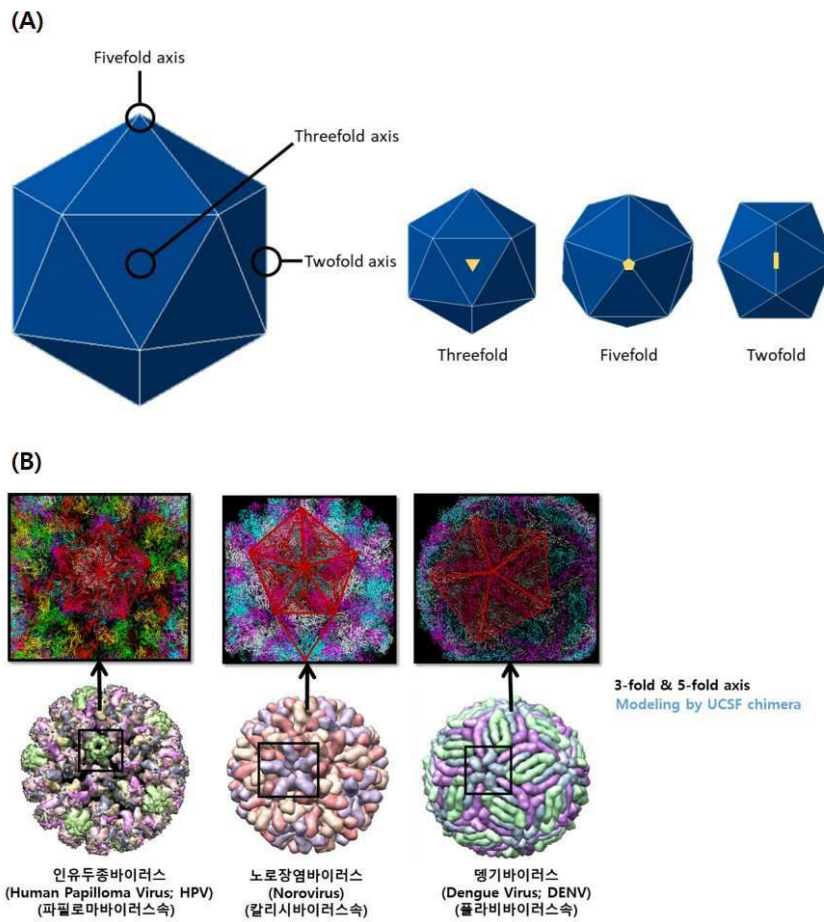
[실시예 9]

대장균 이열성 장독소 B 서브유닛을 이용한 오량체 형성 확인

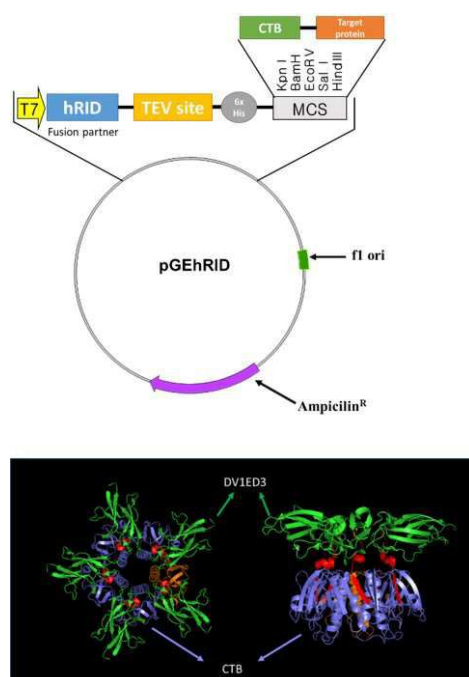
상기 실험들에서는 CTB를 이용한 융합단백질의 오량체 형성을 확인하였으며, 본 실시예에서는 이를 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(LTB)으로 치환하여 진행하였다. 일련의 실험은 이전의 실험들과 동일하게 진행되었으며, [실시예 4]와 동일한 방법으로 LTB 융합단백질의 오량체 형성을 확인하였다(도 16). 이 결과는 본 발명의 오량체형 독소 단백질은 CTB에 한정되지 않으며, 동일한 패밀리에 속하는 LTB 또는 Shiga toxin 등에도 유연히 적용가능함을 시사한다.

도면

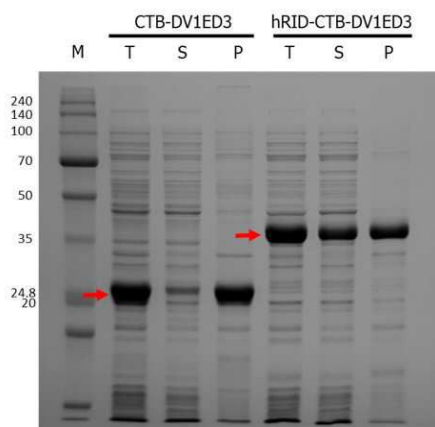
도면1



도면2

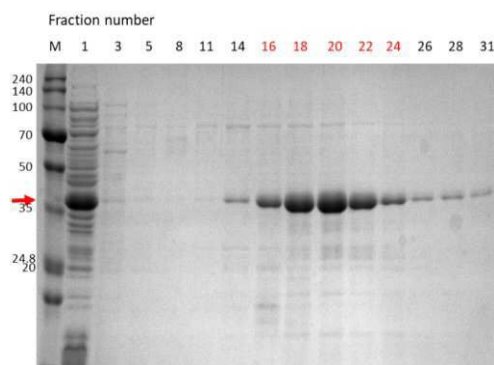


도면3

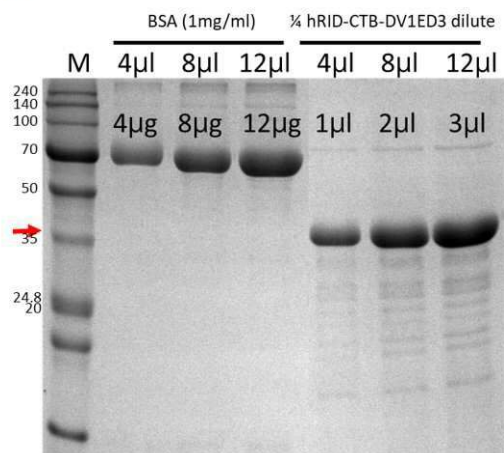


도면4

(A)



(B)

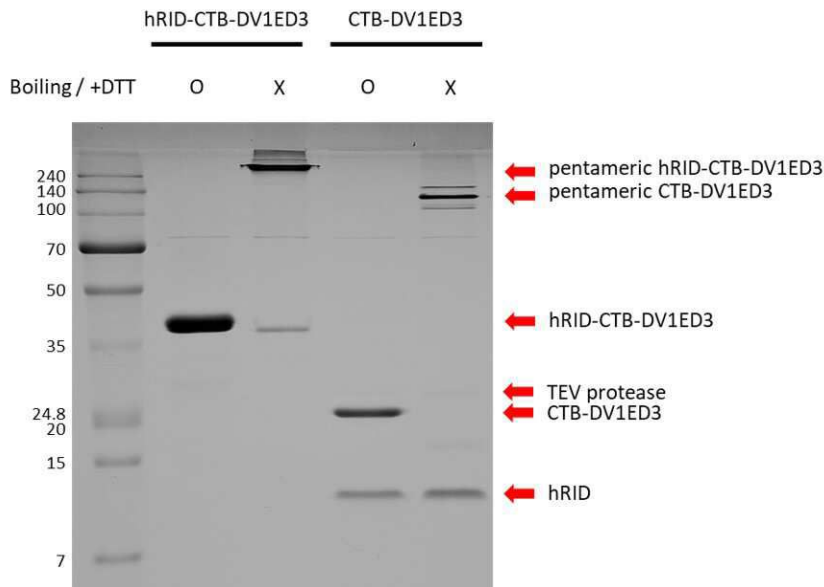


	BSA 4μg	BSA 8μg	BSA 12μg	hRID-CTB-DV1ED3 1μl	hRID-CTB-DV1ED3 2μl	hRID-CTB-DV1ED3 3μl
μg	5.362	8.000	10.943	5.815	9.185	12.004

정제 후 총 단백질 양

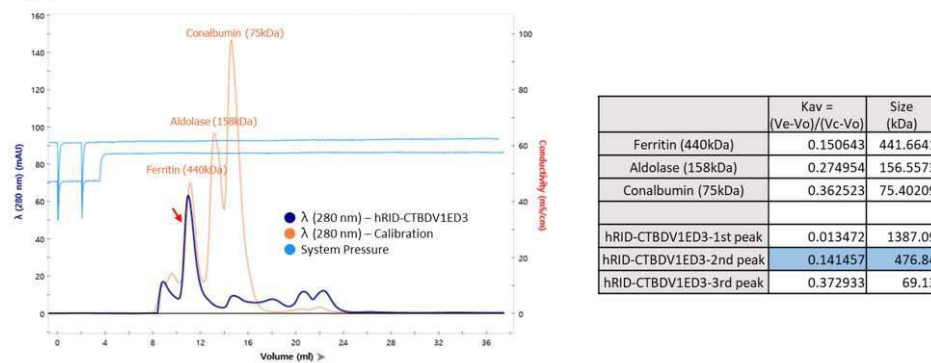
$4.803 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 4\text{ml} = 19.212 \text{ mg}$

도면5

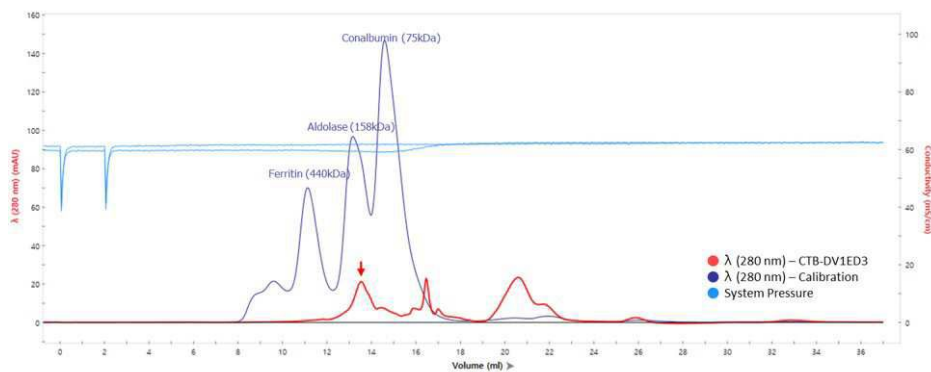


도면6

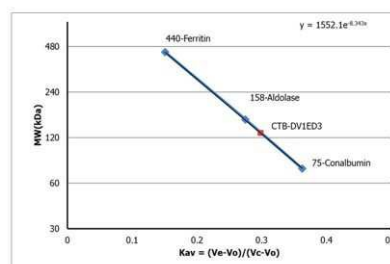
(A) hRID-CTB-DV1ED3 SEC



(B) CTB-DV1ED3 SEC

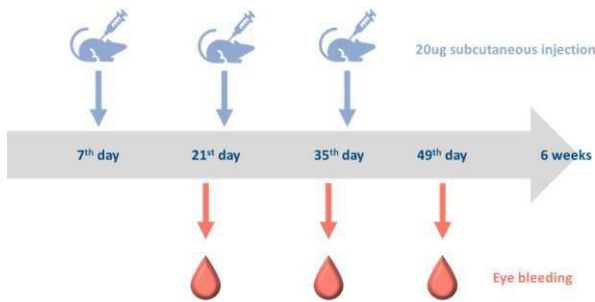


	Ve	Kav = (Ve-Vo)/(Vc-Vo)	Size (kDa)	
Void V(Vo)	8.67			
Ferritin(440)	11.13	0.150642988	441.6641	
Aldolase(158)	13.16	0.274954072	156.5573	
Conalbumin(75)	14.59	0.362522964	75.40209	
CTB-DV1ED3 1st peak	13.54	0.298224127	128.9314	→ Pentamer
CTB-DV1ED3 2nd peak	14.42	0.352112676	82.24381	
CTB-DV1ED3 3rd peak	15.88	0.441518677	39.00828	
CTB-DV1ED3 4th peak	16.47	0.4776485	28.85671	→ Monomer
CTB-DV1ED3 5th peak	16.99	0.509491733	22.12426	

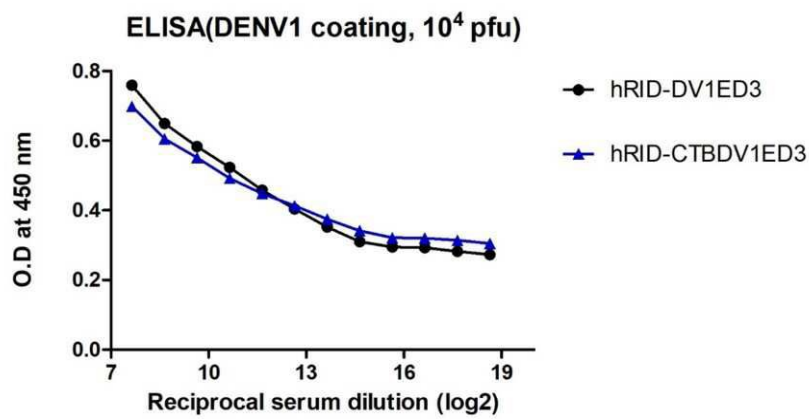


도면7

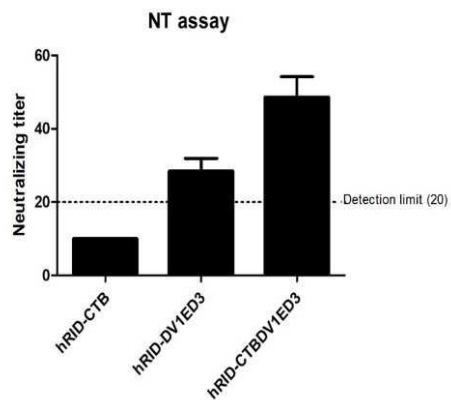
	Group	시험물질	용량 (ug/100ul*mouse)	동물수	투여기간	투여경로
Balb/c	(-)Ctrl_1	PBS	20	5	6 weeks	SC
	(-)Ctrl_2	CTB + Alum	20	5	6 weeks	SC
	1	hRID-DV1EDIII + Alum	20	5	6 weeks	SC
	2	hRID-CTB-DV1EDIII + Alum	20	5	6 weeks	SC



도면8

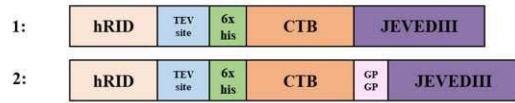


도면9

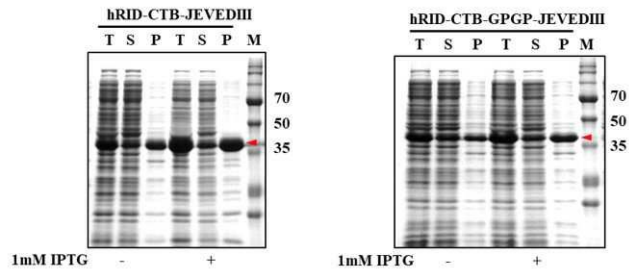


도면10

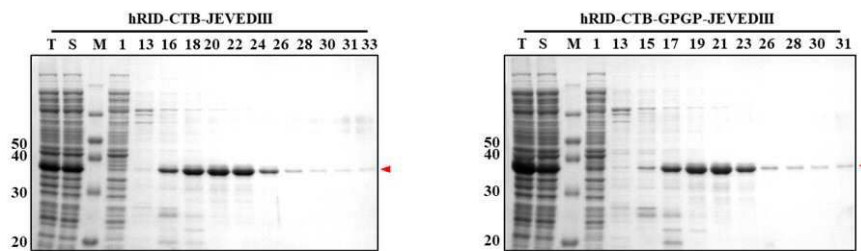
(A)



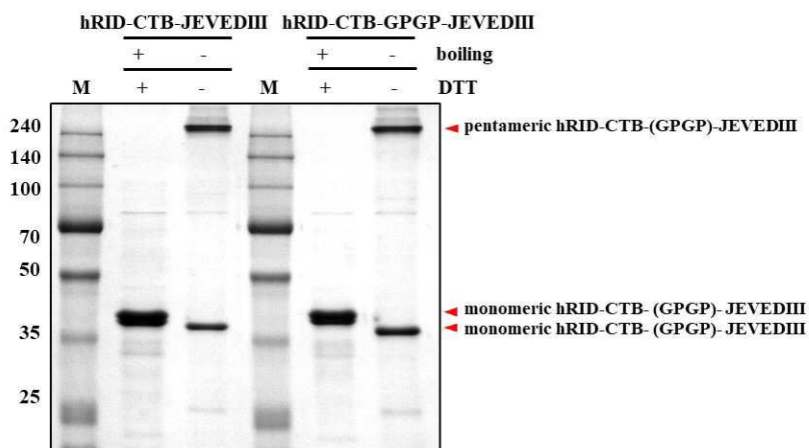
(B)



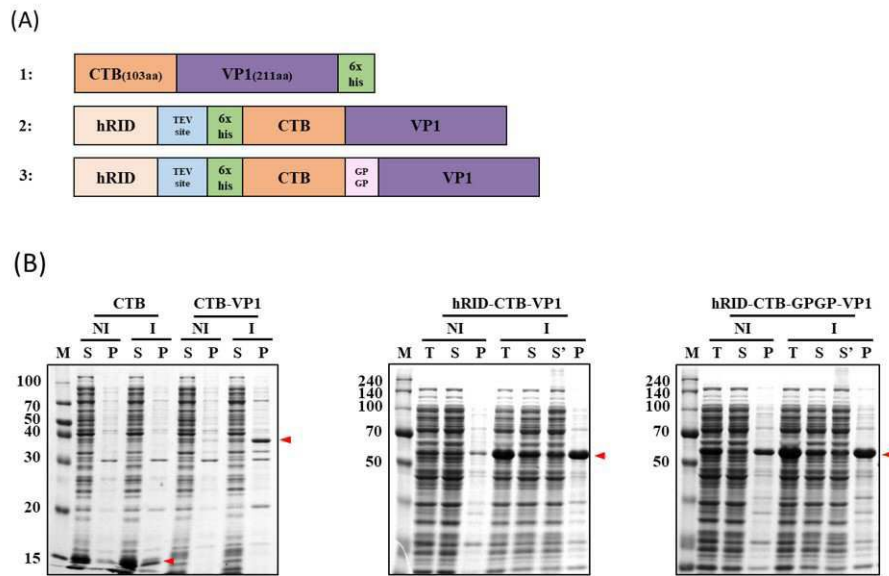
도면11



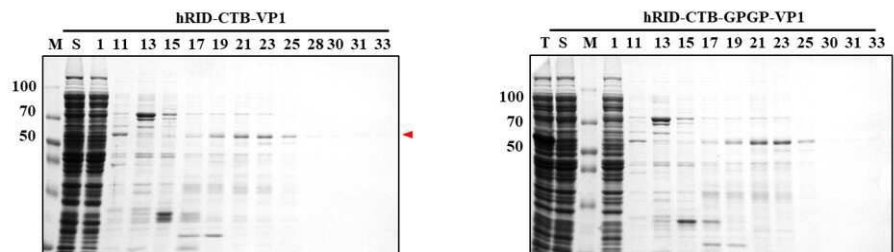
도면12



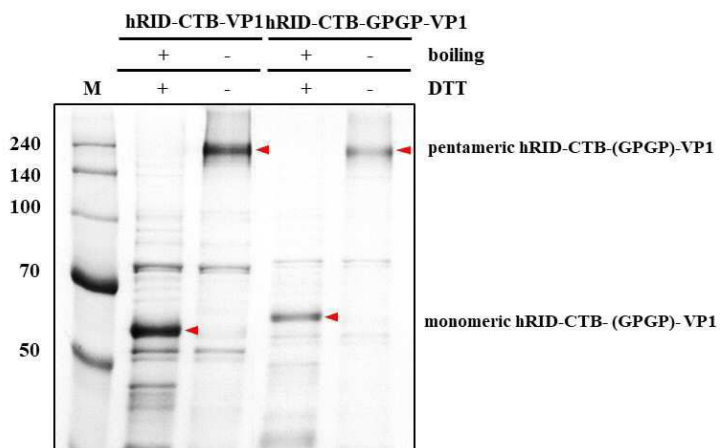
도면13



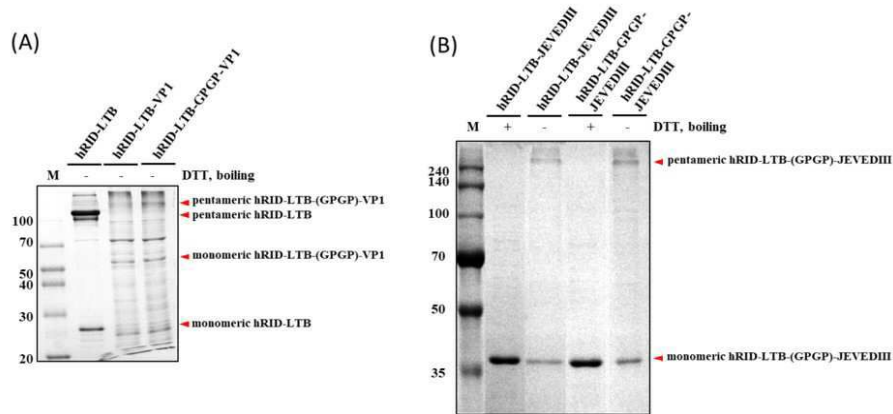
도면14



도면15



도면16



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Pentamer-based recombinant protein vaccine platform and
expressing system there of
- <130> 1064586
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 101
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Dengue virus ED3
- <400> 1

Lys Gly Val Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys

1 5 10 15

Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr

20 25 30

Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Ser Gln Asp Glu

35 40 45

Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val

50 55 60

Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly

65 70 75 80

Glu Ser Tyr Leu Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser

85

90

95

Trp Phe Lys Lys Gly

100

<210> 2

<211> 303

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dengue virus ED3

<400> 2

aaaggcgtct cctacgtaat gtgtaccggc agcttcaagt tagaaaaaga ggttgccgag 60

accacgatg ggaccgtact tgtccagtg aagtacgagg gcactgatgc accctgtaaa 120

atcccccttct ccagtcaaga cgagaagggg gtgacacaaa atggtcgtct gatcacagcg 180

aaccctatcg tgacggataa ggaaaagccc gttaacatcg aagcggaacc tccgtttggc 240

gaaagctatt tagtagtagg ggcggggggag aaagctctga agttatcgtg gttcaagaaa 300

ggc 303

<210> 3

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Japanese Encephalitis virus JEV

<400> 3

Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys

1 5 10 15

Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr

20 25 30

Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Val Ser Val Ala Ser

35 40 45

Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe

50 55 60

Val Ala Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro

65 70 75 80

Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile

85 90 95

Asn His His Trp His Lys Ala Gly

100

<210> 4

<211

> 312

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Japanese Encephalitis virus JEV

<400> 4

aaaggcacia ccatggcat gtgcacagaa aaattctcgt tcgcgaaaaa tccggcggac 60

actggtcacg gaacagttgt cattgaactt tcctactctg ggagtgatgg cccttgcaaa 120

attccgattg tctccgttgc gagcctcaat gacatgaccc ccgtcgggcg gctggtgaca 180

gtgaaccctt tcgtcgcgac ttccagcgcc aactcaaagg tgctagtcga gatggaaccc 240

cccttcggag actcctacat cgtagttgga aggggagaca agcagattaa ccaccattgg 300

cacaaggctg ga 312

<210> 5

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foot-and-mouth disease virus VP1

<400> 5

Thr Thr Thr Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu

1 5 10 15

Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr Asp Val

20 25 30

Ala Phe Val Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr Gln Pro Lys Ser Thr

35 40 45

Gln Thr Leu Asp Leu Met Gln Ile Pro Ser His Thr Leu Val Gly Ala

50 55 60

Leu Leu Arg Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Val Ala Leu

65 70 75 80

Val His Thr Gly Pro Val Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Lys Thr

85 90 95
Ala Leu Asn Asn His Thr Asn Pro Thr Ala Tyr Gln Lys Gln Pro Ile
100 105 110

Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ser Thr
115 120 125
Val Tyr Asn Gly Lys Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Ser Ser Arg Arg Gly
130 135 140
Asp Leu Ala Ala Leu Ala Arg Arg Val Asn Asn Arg Leu Pro Thr Ser
145 150 155 160
Phe Asn Tyr Gly Ala Val Lys Ala Asp Thr Ile Thr Glu Leu Leu Ile
165 170 175
Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Leu

180 185 190
Asp Thr Thr Gln Asp Arg Arg Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Glu Lys
195 200 205
Gln Met Ile
210

<210> 6

<211> 633

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foot-and-mouth disease virus VP1

<400> 6

accactacca ccggtgaaag cgcagaccgc gtaactacta ccgttgaaaa ctacgggggc 60

gaaacccaaa cggcgcgtcg tctgcatact gacgtacgt tctgtctgga ccgcttcgtt 120

aaactgaccc aaccgaaatc aactcagaca ctgatttaa tgcagatccc ttccacacc 180

ctgggtgggtg ctctattgcg atctgccacc tactacttca gcgatctgga agttgccctg 240

gtgcataccg ggccggttac ctgggttccg aacggcgctc cgaaaaccgc actcaacaac 300

caccaatc caacagcata tcagaaacag ccgatcacc gtctggcgct gccttatact 360

gccccgcatc gtgttctgag caggtgttac aacggtaaaa cgacctatgg cgaagaatcg 420

tctcgtcgtg gtgacctggc ggcgttggca cgtcgcgtga ataaccgcct gccgacctct 480

ttcaactacg gtgcggtaaa agccgatacc atcacgaac tgctgatccg tatgaaacgt 540

gcggaaacct actgcccgcg cccgttgctg gcactggata ccacgcagga tcgccgtaaa 600

caaaaaatca tcgcaccgga aaaacagatg atc 633

<210> 7

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cholera toxin B subunit (CTB)

<400> 7

Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn Thr Gln

1 5 10 15

Ile His Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala

20 25 30

Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile Thr Phe Lys Asn Gly Ala Thr Phe

35 40 45

Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala

50 55 60

Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Leu Thr Glu Ala

65 70 75 80

Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro His Ala Ile

85 90 95

Ala Ala Ile Ser Met Ala Asn

100

<210> 8

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cholera toxin B subunit (CTB)

<400> 8

actccgcaga acattacgga cctgtgtgcg gtagtcata atacgcagat tcacactttg 60

aatgacaaga ttttttcata tacggagtca ttagctggta aacgtgaaat ggcaattatc 120

acttttaaaa atggtgacgac gttccagggtg gaagttccgg gcagtcagca tattgatagt 180

cagaaaaaag ccatcgaacg tatgaaggat accttgcgta ttgcgtactt aaccgaggct 240

aaagtcgaga aattatgtgt ctggaataat aagacccac atgccattgc tgcgatttcg 300
atggccaat 309

<210> 9
<211> 103
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heat-labile enterotoxin B subunit (LTB)
<400> 9
Ala Pro Gln Thr Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln
1 5 10 15
Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala
20 25 30
Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Glu Thr Phe
35 40 45

Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala
50 55 60
Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr
65 70 75 80
Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile
85 90 95
Ala Ala Ile Ser Met Lys Asn
100

<210> 10
<211> 309
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
><223> heat-labile enterotoxin B subunit (LTB)
<400> 10
gtcctccaga ctattacaga actatgttcg gaatatcgca acacacaaat atatacgata 60
aatgacaaga tactatcata tacggaatcg atggcaggca aaagagaaat gggttatcatt 120
acatttaaga gcggcgaaac atttcaggtc gaagtcccg gcagtcaaca tatagactcc 180
cagaaaaaag ccattgaaag gatgaaggac acattaagaa tcacatatct gaccgagacc 240

aaaattgata aattatgtgt atggaataat aaaaccccca attcaattgc ggcaatcagt 300
atgaaaaac 309

<210> 11

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human RNA interacting domain (hRID)

<400> 11

Met Ser Glu Gln His Ala Gln Ala Ala Val Gln Ala Ala Glu Val Lys

1 5 10 15

Val Asp Gly Ser Glu Pro Lys Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg

20 25 30

Leu Lys Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu

35 40 45

Leu Ser Glu Lys Gln Leu Ser Gln Ala Thr Ala Ala Ala Thr Asn His

50 55 60

Thr Thr Asp Asn Gly Val Gly Pro Glu Glu Glu Ser Val

65 70 75

<210> 12

<211> 231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human RNA interacting domain (hRID)

<400> 12

atgtctgaac aacacgcaca ggcgccgtg caggcgccg aggtgaaagt ggatggcagc 60

gagccgaaac tgagcaagaa tgagctgaag agacgcctga aagctgagaa gaaagtagca 120

gagaaggagg ccaaacagaa agagctcagt gagaaacagc taagccaagc cactgctgct 180

gccaccaacc acaccactga taatggtgtg ggtcctgagg aagagagcgt g 231