



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월20일
(11) 등록번호 10-2047072
(24) 등록일자 2019년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0042778

(22) 출원일자 2018년04월12일

심사청구일자 2018년04월12일

(65) 공개번호 10-2019-0119391

(43) 공개일자 2019년10월22일

(56) 선행기술조사문헌
Scientific Reports (2017) 7:44875
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 3 항

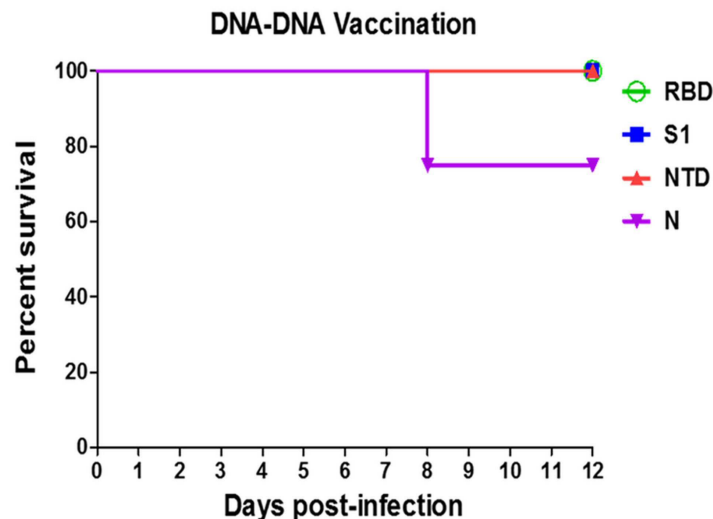
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 메르스 코로나바이러스 핵단백질의 전장 단백질 유전자 및 이를 포함하는 메르스 코로나바이러스 감염 예방용 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV) 핵단백질의 전장 단백질 유전자 및 이를 포함하는 MERS-CoV 감염 예방용 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 MERS-CoV 핵단백질의 전장 단백질 유전자 항원은 대장균에서 대량 생산이 가능하다. 또한, 상기 항원이 공격 접종된 동물모델은 MERS-CoV에 대한 방어능력을 나타내므로, MERS-CoV 예방에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도4d



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 16/10 (2013.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)

(72) 발명자

윤선우

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

김두진

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

김지형

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

박성균

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

송대섭

세종특별자치시 조치원을 세종로 2511(고려대학교
 세종캠퍼스 약학대학)

(56) 선행기술조사문헌

Human Vaccines & Immunotherapeutics (2016)
 12(9):2351-2356
 Viruses (2019) 11:74
 W02016116398 A1*
 International Journal of Virology & Infectious
 Diseases (2017) 2(1):001-007
 W02014045254 A2
 Annals of Translational Medicine (2016)
 4(24):499
 NCBI, GenBank: JX869059.2 (2012.12.04.)
 Journal of Virology (2015) 89(17):9029-9043
 Vaccine (2017) 35(16):2069-2075
 Human Vaccines & Immunotherapeutics
 (2017.11.29.) 14(2):304-313
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465024501
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 감염병위기대응기술개발
 연구과제명 메르스 백신 개발을 위한 면역항원 발굴 연구
 기여율 9/10
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2017.12.01 ~ 2018.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711063652
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국생명공학연구원
 연구사업명 한국생명공학연구원연구운영비지원
 연구과제명 인플루엔자 범용 백신 개발 및 아주버트 연구사업
 기여율 1/10
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메르스 코로나바이러스 핵단백질의 전장 단백질을 코딩하는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 포함하는 메르스 코로나바이러스 감염 예방용 DNA 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메르스 코로나바이러스 핵단백질의 전장 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는, 메르스 코로나바이러스 감염 예방용 DNA 백신 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 서열번호 2 또는 3의 염기 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, 메르스 코로나바이러스 감염 예방용 DNA 백신 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메르스 코로나바이러스 핵단백질의 전장 단백질 유전자 및 이를 포함하는 메르스 코로나바이러스 감염 예방용 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메르스(middle east respiratory syndrome, MERS)는 메르스 코로나바이러스 감염으로 인한 중증 급성 호흡기 질환이다. 메르스 코로나바이러스(MERS coronavirus, MERS-CoV)는 2012년 사우디아라비아에서 새로 발견된 신종 베타코로나 바이러스이다(Azhar EI, et al., 2014). MERS-CoV의 명칭은 2013년 5월 국제바이러스 분류 위원회에 의해 명명되었으며, 이전에는 신종 코로나 바이러스, SARS 유사 바이러스, 중동 사스, 또는 사우디 사스라고 불렸다. 이러한 MERS-CoV의 감염경로는 박쥐로부터 낙타와 사람에게 전염되는 것으로 알려져 있다. 또한, MERS-CoV는 사람 간의 전염이 가능하며 40%의 치사율을 보이고 있다.

[0003] MERS-CoV의 유전체는 비분절 형태이며 크기는 약 30 kb로 11개의 단백질을 암호화하고 있다. 상기 11개의 단백질은 2개의 복제 다단백질, 4개의 구조 단백질, 및 5개의 비구조적(non-structural) 단백질로 구성되어 있다.

[0004] 현재, 사스 코로나바이러스의 연구를 기반으로, 영장류 모델에서 MERS-CoV 백신을 개발하고 있다. 개발중인 메르스 코로나 바이러스 백신은 재조합된 수용체 결합 도메인(RBD)을 기반으로 한 백신으로, 접종을 통해 체액성 및 세포성 면역반응을 증가시키는 것으로 나타났다. 그 외에도 다양한 메르스 바이러스 백신이 개발 중에 있으나, 현재까지 상업화된 백신은 없는 상태이며, 최근 몇몇 제약회사들이 MERS 백신개발을 추진 중인 상태이나, 아직 개발단계로서 전임상, 임상 시험 등을 통한 유효성 검증이 필요한 상황이다.

[0005] 또한, 현재까지 MERS-CoV의 치료를 위한 항바이러스제는 아직까지 개발되지 못하여 임상증상을 완화하는 대증 치료가 이루어지고 있는 실정이다. Chloroquine, chlorpromazine, loperamide, lopinavir 등이 in vitro 상에서 MERS-CoV 증식을 억제한다는 보고는 있으나, 실제 환자에서 효과가 있는지는 밝혀지지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Azhar EI, Hashem AM, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Aburizaiza AS, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Jamjoom GA, Madani TA. 2014. Detection of the middle east respiratory syndrome coronavirus genome in an air sample originating from a camel barn owned by an infected patient. mBio 5(4):e01450-14. doi:10.1128/mBio.01450-14.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 MERS-CoV 감염 예방을 위한 백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MERS-CoV 핵단백질의 전장 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터를 포함하는 MERS-CoV 감염 예방용 백신 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 (a) 상기 발현 벡터를 항원으로 개체 내에 도입하는 단계; 및 (b) 상기 개체로부터 항체를 회수하는 단계를 포함하는 MERS-CoV 항체 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 MERS-CoV 감염에 따른 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다

다.

[0012] 또한, 본 발명은 MERS-CoV 핵단백질의 DNA 유전자 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 MERS-CoV 감염 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 MERS-CoV 핵단백질의 전장 단백질 유전자 항원은 대장균에서 대량 생산이 가능하다. 또한, 상기 항원이 공격 집중된 동물모델은 MERS-CoV에 대한 방어능력을 나타내므로, MERS-CoV 예방에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 MERS-CoV 핵단백질의 DNA 유전자 백신 제작을 위해 사용한 박터의 모식도이다.
 도 2는 MERS-CoV 핵단백질의 DNA 유전자 백신 제작을 위해 사용한 발현 박터의 모식도이다.
 도 3은 hDPP4 유전자 이식마우스에 직접 핵단백질 DNA 유전자 백신을 면역 후, 정제된 단백질 항원을 이용하여 항체 형성 효과를 ELISA 실험을 통해 나타낸 것이다.
 도 4a 및 도 4b는 MERS-CoV 핵단백질의 유전자 백신을 접종 하지 않은 마우스 그룹에 MERS-CoV를 공격 집중하여, 체중 감소율 및 생존율을 hDPP4 유전자 이식여부에 따라 관찰하여 바이러스에 대한 방어능력을 확인한 것이다.
 도 4c 및 도 4d는 MERS-CoV 핵단백질의 유전자 백신을 접종한 hDPP4유전자 이식마우스 그룹에 MERS-CoV를 공격 집중하여, 바이러스에 대한 방어효과를 스파이크 단백질 부위의 DNA 유전자 백신들과 비교 실험한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 일 측면으로, 메르스 코로나바이러스 핵단백질의 전장 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 박터를 제공한다.

[0016] 본 발명에서 사용하는 용어 "메르스 코로나바이러스(이하, MERS-CoV 라고 한다)"란, 아라비아 반도에서 최초로 발견된 중증의 급성 호흡기 질환의 발생 원인으로 확인된 중등 호흡기 증후군-코로나 바이러스(Middle East Respiratory Syndrome-Corona Virus)를 의미한다. 또한, MERS-CoV는 초기에 인간 코로나바이러스-EMC(Erasmus Medical Centre; hCoV-EMC)로 호칭되었다. 상기 MERS-CoV는 베타코로나바이러스 계통(lineage) 2c에 속하고, 중국에서 출현한 중증의 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus(SARS-CoV))와 유사한 중증의 호흡기 질환을 야기한다. MERS-CoV는 4개의 부속단백질(예를 들면, accessory protein 3, 4a, 4b, 5) 2개의 복제단백질(Open reading frame 1a, 및 1b) 및 4개의 구조단백질(Spike; S, Envelope; E, Nucleocapsid; N, 및 Membrane; M)로 구성되어 있으며, 구조 단백질 중 스파이크(S) 단백질을 통해 인간 숙주 세포 수용체 디펩티딜 펩티다제 4(DPP4)에 결합한다.

[0017] 본 발명에서 사용한 용어, “핵단백질”은 바이러스성 유전자를 단백질 막으로 감싼 구조 단백질이다. 이는 중 특이성의 주요 결정 요인 중 하나이다.

[0018] MERS-CoV 핵단백질은 서열번호 1로 표시되는 413개의 아미노산으로 구성되어 있다. 이는 인간 베타코로나바이러스 2c EMC/2012(GenBank: JX869059.2)를 구성하는 염기서열의 28,566번째 내지 29,807번째에 위치해있다. 상기 MERS-CoV 핵단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 핵단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 MERS-CoV 핵단백질의 단편은 MERS-CoV 핵단백질의 N-말단 도메인, C-말단 도메인 및 NC 융합단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0019] 상기 MERS-CoV 핵단백질의 N-말단 도메인은 서열번호 1의 10번 내지 207번 위치의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 구체적으로, 상기 N-말단 도메인은 서열번호 1의 10번 위치의 아미노산부터 207번 위치의 아미노산 서열 중 1개 내지 198개, 10개 내지 180개, 20개 내지 160개, 30개 내지 140개, 50개 내지 120개 또는 70개 내지 100개의 연속된 아미노산 서열일 수 있으며, 구체적으로 50 개 내지 198개의 연속된 아미노산 서열일 수 있다.

- [0020] 더욱 구체적으로, 상기 MERS-CoV 핵단백질의 N-말단 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 일 수 있다. 상기 N-말단 도메인은 서열번호 4와 동일한 폴리펩타이드 뿐만 아니라 이의 아미노산이 보존적 치환에 의하여 치환된 폴리펩타이드, 이와 80 내지 99%, 85 내지 99%, 바람직하게는 90 내지 99%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩타이드를 모두 포함할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명에서 상기 N-말단 도메인 단편은 서열번호 4의 1번 위치의 아미노산부터 134번 위치의 아미노산 서열 중 1개 내지 134개, 10개 내지 130개, 20개 내지 110개, 30개 내지 90개, 40개 내지 70개 또는 50개 내지 60개의 연속된 아미노산 서열일 수 있으며, 구체적으로 50개 내지 134개의 연속된 아미노산 서열일 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 MERS-CoV 핵단백질의 C-말단 도메인은 서열번호 1의 208번 내지 362번 위치의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 구체적으로, 상기 C-말단 도메인은 서열번호 1의 208번 위치의 아미노산부터 362번 위치의 아미노산 서열 중 1개 내지 155개, 10개 내지 140개, 20개 내지 120개, 30개 내지 100개, 40개 내지 80개 또는 50개 내지 60개의 연속된 아미노산 서열일 수 있으며, 구체적으로 50개 내지 155개의 연속된 아미노산 서열일 수 있다.
- [0023] 더욱 구체적으로, 상기 MERS-CoV 핵단백질의 C-말단 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 일 수 있다. 상기 C-말단 도메인은 서열번호 5와 동일한 폴리펩타이드 뿐만 아니라 이의 아미노산이 보존적 치환에 의하여 치환된 폴리펩타이드, 이와 80 내지 99%, 85 내지 99%, 바람직하게는 90 내지 99%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩타이드를 모두 포함할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명에서 상기 C-말단 도메인 단편은 서열번호 5의 1번 위치의 아미노산부터 117번 위치의 아미노산 서열 중 1개 내지 117개, 10개 내지 100개, 20개 내지 80개, 30개 내지 60개 또는 40개 내지 50개의 연속된 아미노산 서열일 수 있으며, 구체적으로 50개 내지 117개의 연속된 아미노산 서열일 수 있다.
- [0025] 상기 MERS-CoV 핵단백질의 NC 융합 단백질은 N-말단 도메인과 C-말단 도메인이 결합된 단백질을 의미하며, N-말단 도메인과 C-말단 도메인은 앞서 기술한 바와 같다. 또한, MERS-CoV 핵단백질의 NC 융합 단백질은 N-말단 도메인 단편 및 C-말단 도메인 단편으로 다양한 조합이 가능하다.
- [0026] 구체적으로, 상기 MERS-CoV 핵단백질의 NC 융합 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 NC 융합 단백질은 서열번호 6과 동일한 폴리펩타이드 뿐만 아니라 이의 아미노산이 보존적 치환에 의하여 치환된 폴리펩타이드, 이와 80 내지 99%, 85 내지 99%, 바람직하게는 90 내지 99%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩타이드를 모두 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용하는 용어 "보존적 치환"이란, 한 부류의 아미노산이 동일한 부류의 다른 아미노산으로 대체되는 것을 의미한다. 보존적 치환은 폴리펩타이드의 구조, 기능 또는 두 가지 모두를 변경시키지 않는다. 보존적 치환의 목적을 위한 아미노산의 부류는 소수성(예를 들어, Met, Ala, Val, Leu), 중성 친수성(예를 들어, Cys, Ser, Thr), 산성(예를 들어, Asp, Glu), 염기성(예를 들어, Asn, Gln, His, Lys, Arg), 입체 형태 파괴물질(disrupter)(예를 들어, Gly, Pro) 및 방향족(예를 들어, Trp, Tyr, Phe)을 포함한다.
- [0028] 본 발명에서 사용한 용어, "폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터"란, 서열번호 1로 표시되는 MERS-CoV 핵단백질의 전장 단백질 또는 이의 단편을 PCR로 증폭한 절편을 제한효소를 이용하여 절단한 벡터에 삽입하여 세포 내에서 유전물질을 발현할 수 있게 제작된 것을 의미한다.
- [0029] 상기 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터일 수 있다. 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 헬퍼-의존형 아데노바이러스 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 비바이러스성 벡터는 플라스미드, 리포솜 등 일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서는, pMT3 벡터를 변형시켜 제작한 pGX-10 벡터를 EcoRI과 XbaI 제한효소를 이용하여 자른 후, 서열번호 1로 표시되는 MERS-CoV 핵단백질을 PCR로 증폭한 절편을 삽입하여 MERS-CoV 핵단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 제작하였다.
- [0031] 본 발명은 다른 측면으로, MERS-CoV 핵단백질의 전장 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 포함하는 MERS-CoV 감염 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 사용한 용어, "백신 조성물"은 동물에서 면역학적 반응을 유도하는 적어도 하나의 면역학적으로 활성인 성분을 함유하는 조성물을 의미한다.
- [0033] 상기 백신 조성물은 당업계에 알려진 임의의 형태, 예를 들면, 액제 및 주사제의 형태 또는 현탁액에 적합한 고

체 형태일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 제제는 또한 리포솜이나 가용 유리 내로 유화 또는 캡슐화되거나 에어로졸이나 스프레이 형태로도 제조될 수 있다. 이들은 경피(transdermal) 패치에 함유시킬 수도 있다. 액체 또는 주사제의 경우, 필요시 프로필렌 글리콜 및 용혈 현상을 방지하는데 충분한 양(예: 약 1%)의 염화나트륨을 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 백신에 적합한 담체는 기술분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 당 등을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일, 및 주사 가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트일 수 있다.

[0035] 수용액 담체는 식염수 및 완충배지를 포함하는, 물, 알콜/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 비경구 담체는 염화 나트륨 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함할 수 있다. 정맥주사용 담체는 예컨대 링거 텍스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양보충제 등을 포함할 수 있다. 방부제 및 기타 첨가제 예컨대 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성가스 등과 같은 것이 추가로 존재할 수 있다. 바람직한 방부제는 포르말린, 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 백신 조성물은 어주번트(adjutant, 면역조성제, 면역증강제)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 어주번트는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함할 수 있다. 허용 가능한 어주번트로는 프로인트 완전 어주번트, 프로인트 불완전 어주번트, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레시틴, 플루론 폴리올, 다중음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키흐림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 백신 조성물은 경구, 경피, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내 또는 비강으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 투여경로를 통해 투여될 수 있으며, 바람직하게는 주사로 투여되는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란, 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양으로, 부작용 또는 심각하거나 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량의 수준은 치료하려는 장애, 장애의 중증도, 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 단백질의 제거 속도, 치료 지속 기간, 단백질과 조합되거나 동시에 사용되는 약물, 개체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는, MERS-CoV 핵단백질 유전자 DNA 백신의 효능 확인 실험에서, MERS-CoV 핵단백질의 DNA 유전자 항원이 백신으로 작용하여 개체 내에서 세포성 면역 반응 및 면역항체를 효과적으로 유도하고, MERS-CoV를 효과적으로 방어함을 확인하였다. 이를 통해, MERS-CoV 핵단백질의 유전자 항원이 MERS-CoV 예방을 위한 백신으로 사용 가능함을 확인하였다.

[0040] 본 발명은 또 다른 측면으로, (a) MERS-CoV 핵단백질의 전장 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 항원으로서 개체 내에 도입하는 단계; 및 (b) 상기 개체로부터 항체를 회수하는 단계를 포함하는 MERS-CoV 핵단백질에 특이적으로 결합하는 항체 제조 방법을 제공한다.

[0041] 상기 용어 "항원"은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 성분으로서 바이러스가 발현하는 단백질이다.

[0042] 또한, 상기 발현 벡터의 도입은 피내, 피하 또는 근육 조직 내로 주사하여 수행될 수 있다.

[0043] 상기 용어 "항체"는 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 성분으로서 특정한 항원과 특이적으로 결합하여 림프와 혈액을 떠돌며 항원-항체반응을 일으키는 단백질이다. 항원-항체 반응은 각 항원에 대하여 높은 특이성을 갖는다. 이는 림프구의 B세포에서 항체가 만들어질 때 특정항원에 의해 생성된 항체는 원칙적으로 다른 항원과 반응하지 않는다. 이러한 높은 특이성은 면역, 알레르기, 각종 병 및 감염의 종류·형의 결정 등의 검사에 사용된다.

[0044] 본 발명에서 사용한 용어, "MERS-CoV 핵단백질에 특이적으로 결합하는 항체"는 MERS-CoV 핵단백질의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, N-말단 도메인과 C-말단 도메인이 결합된 NC 융합 단백질 또는 전장 단백질에 특이적으로

결합하는 항체를 의미한다.

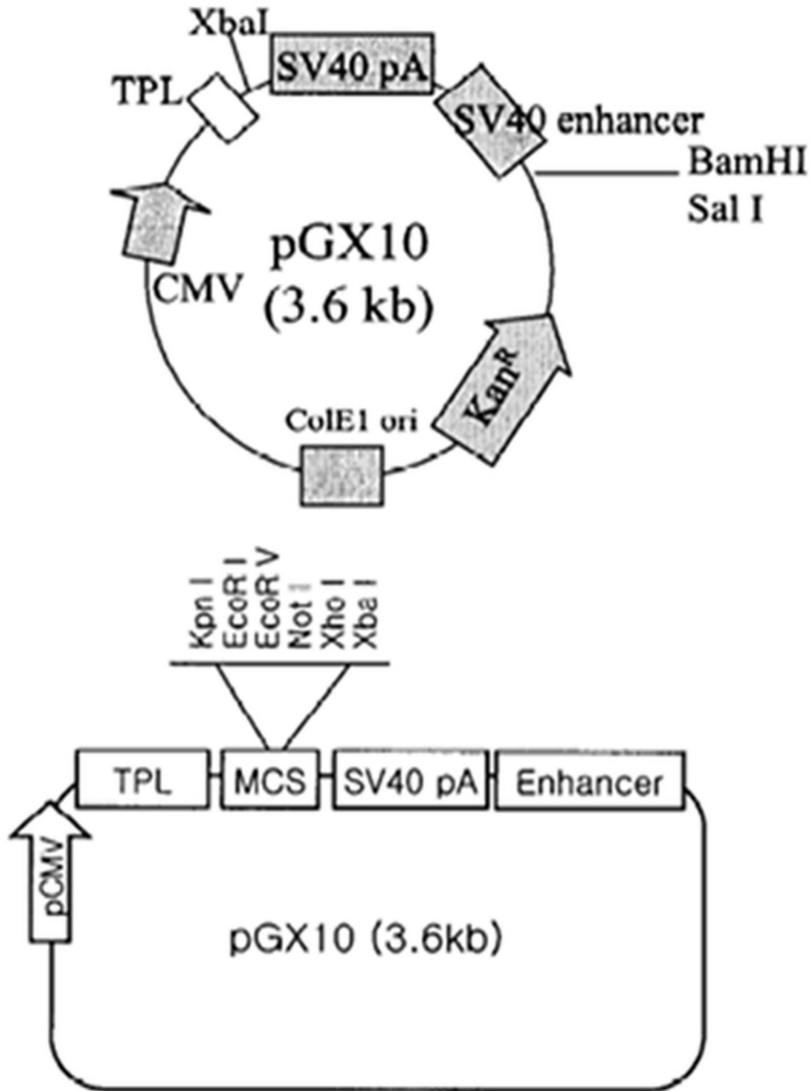
- [0045] 본 발명의 일 실시예에서는, MERS-CoV 핵단백질의 유전자가 개체에 투여되었을 때 면역 항체 형성을 유도하는 항원으로 작용하였다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 MERS-CoV 감염에 따른 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0047] 상기 "MERS-CoV 감염에 따른 질환"은 호흡기 질환일 수 있으며, 바이러스 감염 후 2일 내지 14일의 잠복기를 거친 뒤 38℃ 이상의 고열, 기침 또는 호흡곤란 등의 심한 호흡기 증상이 나타날 수 있다. 설사 또는 변비 등의 소화기 증상을 보이는 경우도 있으며, 만성질환 또는 면역 저하자의 경우 폐렴 또는 급성신부전 등의 합병증이 동반되어 사망에 이를 수도 있다.
- [0048] 본 발명은 MERS-CoV 핵단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 MERS-CoV 감염 진단용 키트를 제공한다.
- [0049] 상기 MERS-CoV 핵단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 앞서 기술한 바와 같으며, 일 구체예로, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 MERS-CoV 핵단백질은 이에 대한 항체와 특이적으로 결합할 수 있어, MERS-CoV 감염 진단 키트에 적용될 수 있다.
- [0050] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **실시예 1. MERS-CoV 핵단백질 유전자 DNA 백신 제조**
- [0052] 하기 실험예에 사용한 MERS-CoV의 핵단백질은 USA NIH NCBI를 통해 MERS-CoV (Human betacoronavirus 2c EMC/2012) 염기서열을 확보하여 (주)바이오니아를 통해 합성하여 제조하였다. 상기 염기서열은 서열번호 1로 나타내었다.
- [0053] 서열번호 1로 표시되는 MERS-CoV 핵단백질은 벡터 pMT3(Sambrook, et al., Molecular cloning 2nd Ed., vol 3: 16.20; Kaufman RJ, et al., Mol. Cell Biol. 9,946-958, (1989))를 변형시켜 제작한 pGX-10 벡터를 EcoRI과 XbaI 제한효소를 이용하여 자른 후(도 1), 핵단백질 전장유전자를 PCR로 증폭한 절편을 삽입하여 제작하였다(도 2).
- [0054] **실험예 1. MERS-CoV 핵단백질 DNA 유전자의 항체 생성 확인**
- [0055] 상기 실시예 1에서 제조된 MERS-CoV 핵단백질의 DNA 유전자 항원이 효과적으로 항체 생성을 유도하는지 여부를 확인하기 위하여, 이의 항체 생성 효과를 확인하였다.
- [0056] 먼저, 정제된 핵단백질의 pGX-MCoV-NC 유전자 항원을 생후 6 내지 8주령 마우스(hDPP4 유전자이식 Mouse C57b1/6N)의 대퇴근육에 마리당 10 ug씩 전기천공법(electroporation)(50V)으로 면역하였다. 일차적 면역화(primary immunize)한지 3주 후, 2차 부스팅(boosting)을 진행하였다. 3주 후, 마우스를 채혈하고 최종 혈청을 분리하여 ELISA 테스트 실험을 수행하였다. 이때, ELISA 테스트에서 핵단백질 항원은 웰(well) 당 100 ng을 사용하였다. 또한, 면역 혈청은 1X PBS로 1:100, 1:500, 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000, 1:50,000, 1:100,000 및 1:500,000 비율로 희석하였고, 2차 확인을 위하여 항-마우스 IgG-HRP(ABC5001)을 1:5,000 비율로 희석하여 사용하였다. 광학 밀도 405 nm에서 발색을 검출하여 우선적으로 면역 항체 생성 여부를 확인하였으며, 이를 도 3에 나타내었다.
- [0057] 도 3에 나타난 바와 같이, 핵단백질의 유전자는 상기 실험에 사용한 마우스에서 모두 면역 항체 형성 효과를 나타내었다. 이는 핵단백질의 유전자 백신이 개체 내에서 항원으로 작용하여 항체를 효과적으로 유도할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0058] **실험예 2. MERS-CoV 핵단백질 유전자 백신의 효능 확인**
- [0059] MERS-CoV 핵단백질의 유전자 항원을 공격 접종한 후의 방어능력 여부를 확인하기 위하여, 바이러스 공격 접종 유효성 평가를 진행하였다. 대조군(control group)으로는 백신을 접종하지 않은 그룹을 사용하였다. 이를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다. 5 LD50의 MERS-CoV 핵단백질의 유전자 항원을 마우스 비강으로 공격 접종한 후, 2주 동안 체중과 생존율을 관찰하였다. 비교를 위해 MERS-CoV 스파이크 단백질의 RBD(receptor binding domain), S1 및 NTD(N-terminal domain) 도메인을 상기 실시예 1의 동일한 벡터를 사용하여 제작한 후, MERS-CoV 핵단백질의 유전자 항원의 방어능력을 확인하였다. 이는 도 4c 및 도 4d에 나타내었다.

[0060]

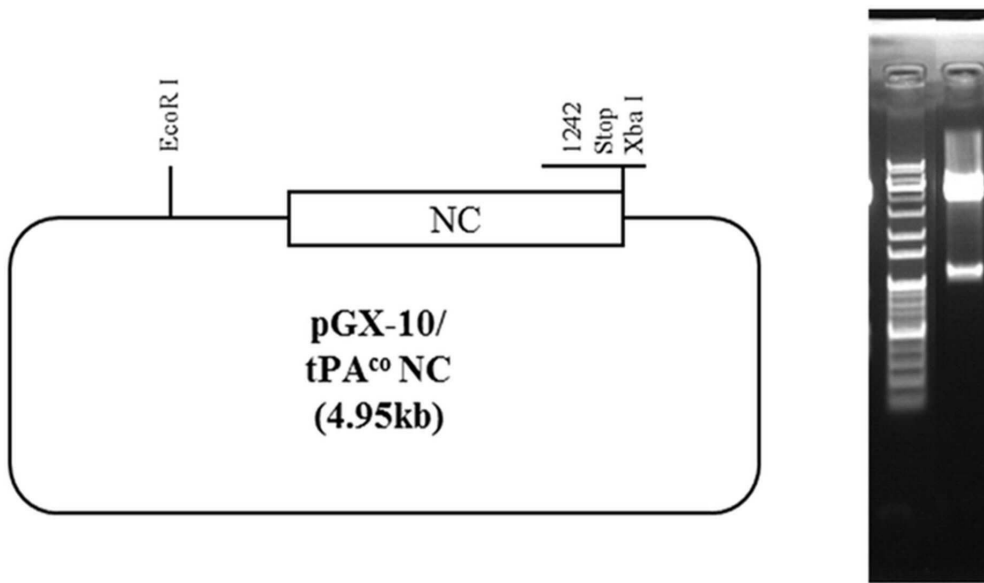
도 4c 및 도 4d에 나타난 바와 같이, MERS-CoV 핵단백질의 DNA 유전자 항원은 백신으로 작용하여 개체 내에서 세포성 면역 반응 및 면역항체를 효과적으로 유도하였고, MERS-CoV를 효과적으로 방어하였다. 이를 통해, MERS-CoV 핵단백질의 유전자 항원이 MERS-CoV 예방을 위한 백신으로 사용 가능성을 확인하였다.

도면

도면1

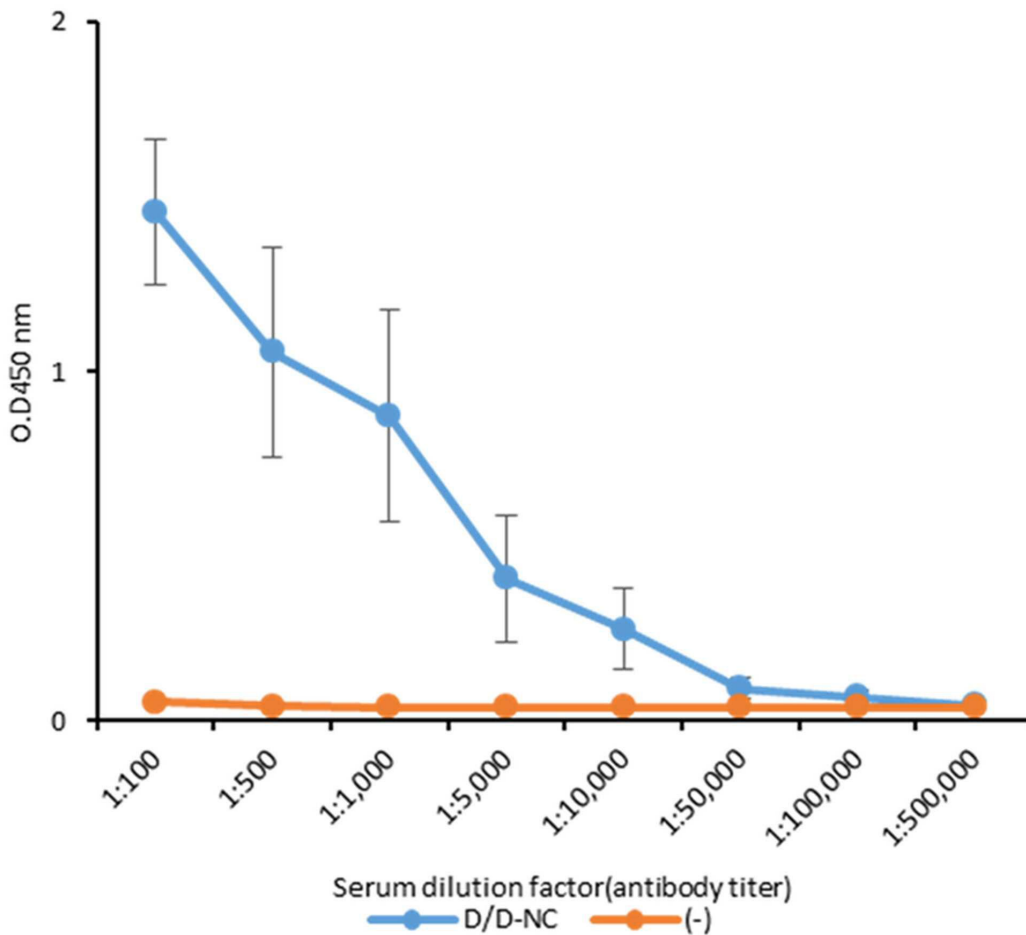


도면2

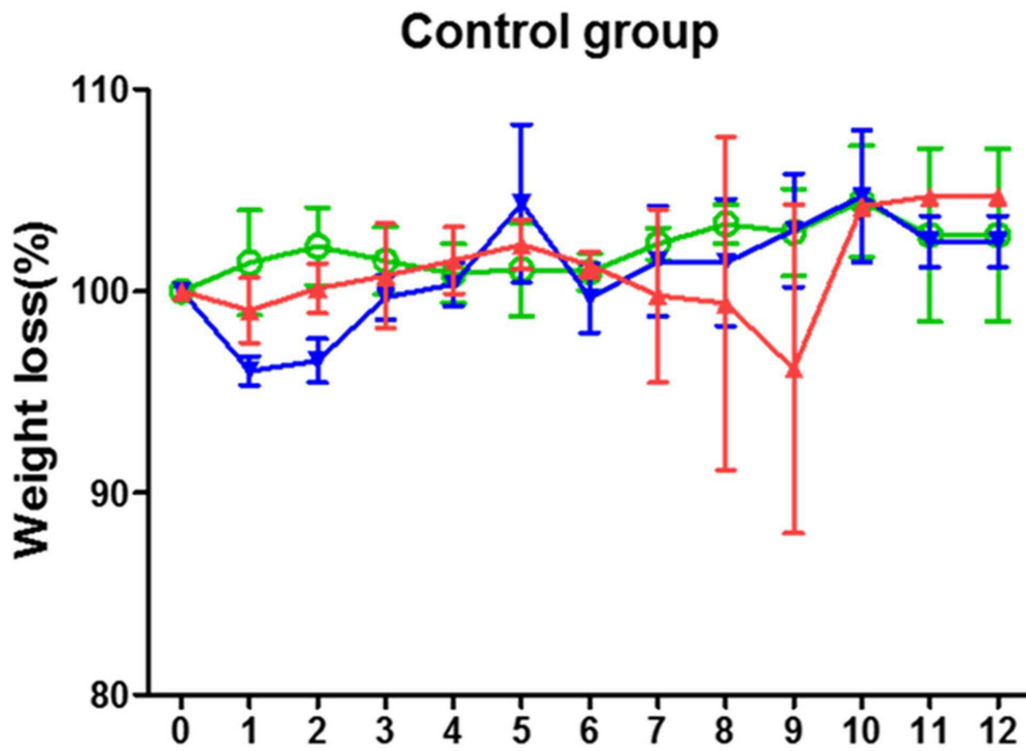


EcoR I / Xba I: ~3.63kb + ~1325bp

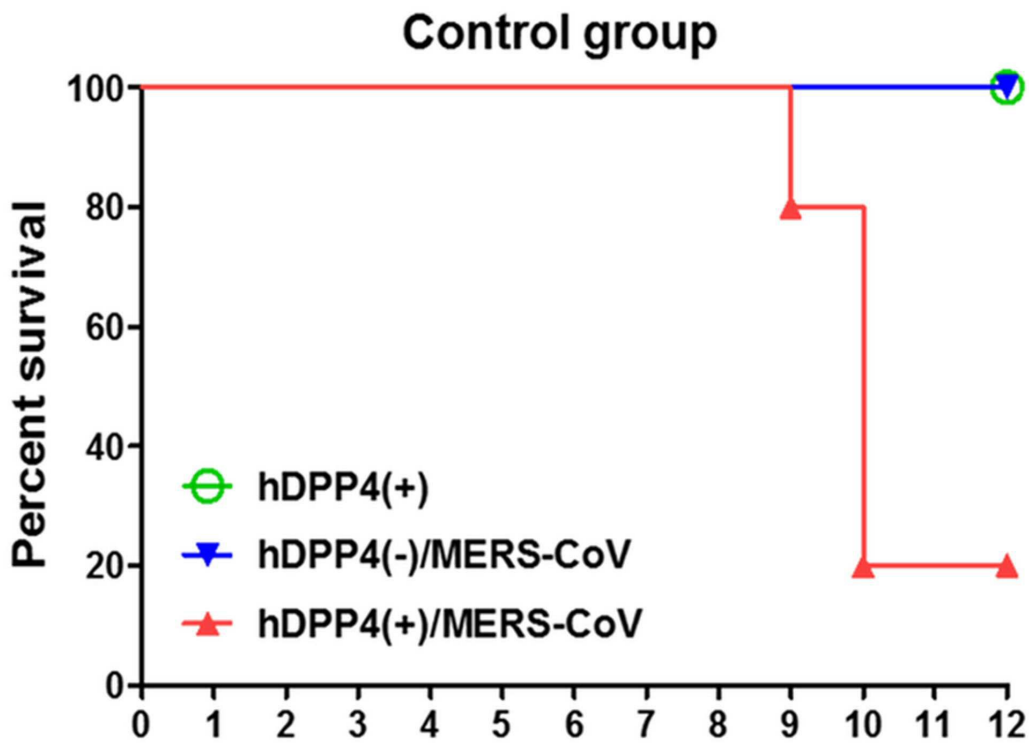
도면3



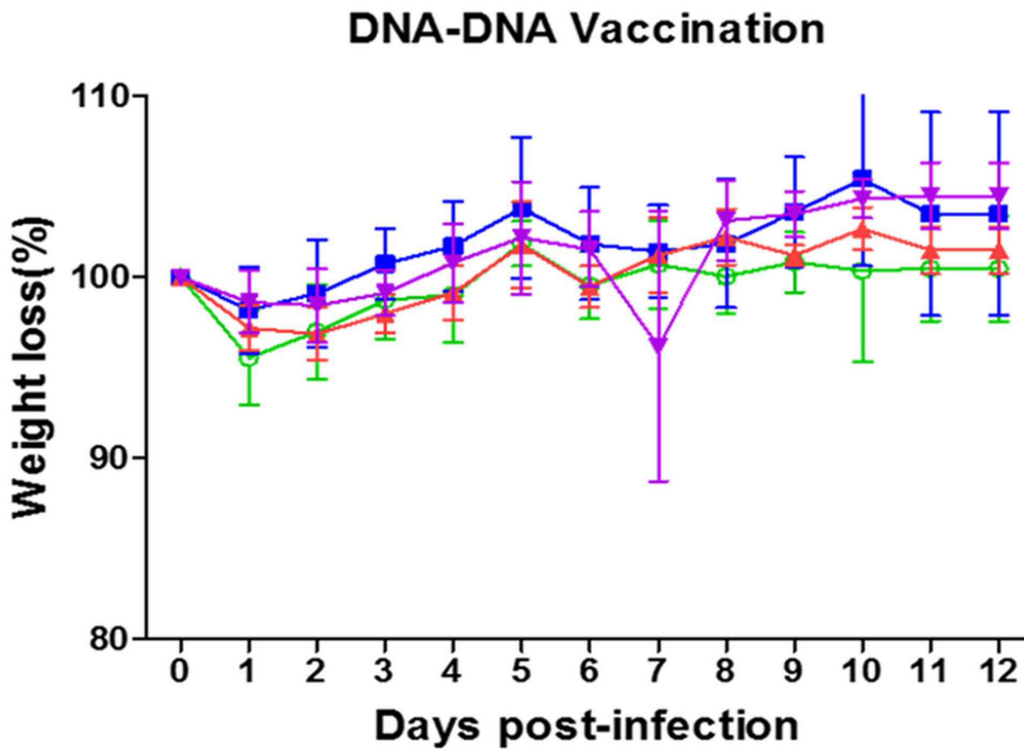
도면4a



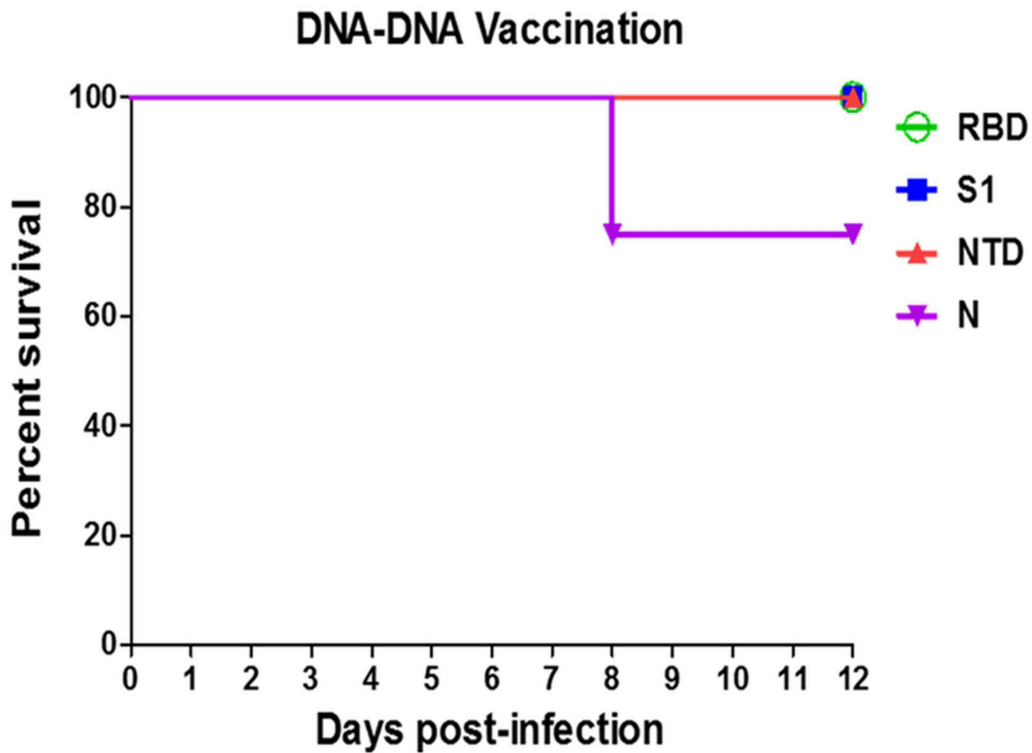
도면4b



도면4c



도면4d



서열 목록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

<120> WHOLE PROTEIN GENE OF MERS-CoV NUCLEOPROTEIN AND VACCINE
 COMPOSITION FOR PREVENTING INFECTION OF MERS-CoV COMPRISING THE
 SAME

<130> FPD/201711-0087

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MERS CoV nucleoprotein

<400> 1

Met Ala Ser Pro Ala Ala Pro Arg Ala Val Ser Phe Ala Asp Asn Asn

1 5 10 15

Asp Ile Thr Asn Thr Asn Leu Ser Arg Gly Arg Gly Arg Asn Pro Lys

20 25 30

Pro Arg Ala Ala Pro Asn Asn Thr Val Ser Trp Tyr Thr Gly Leu Thr

35 40 45

Gln His Gly Lys Val Pro Leu Thr Phe Pro Pro Gly Gln Gly Val Pro

50 55 60

Leu Asn Ala Asn Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ala Gly Tyr Trp Arg Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ala Leu Pro

100 105 110

Phe Arg Ala Val Lys Asp Gly Ile Val Trp Val His Glu Asp Gly Ala

115 120 125

Thr Asp Ala Pro Ser Thr Phe Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asp Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

His Ile Glu Gly Thr Gly Gly Asn Ser Gln Ser Ser Ser Arg Ala Ser
 165 170 175
 Ser Val Ser Arg Asn Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gln Gly Ser Arg Ser
 180 185 190
 Gly Asn Ser Thr Arg Gly Thr Ser Pro Gly Pro Ser Gly Ile Gly Ala
 195 200 205
 Val Gly Gly Asp Leu Leu Tyr Leu Asp Leu Leu Asn Arg Leu Gln Ala
 210 215 220
 Leu Glu Ser Gly Lys Val Lys Gln Ser Gln Pro Lys Val Ile Thr Lys
 225 230 235 240
 Lys Asp Ala Ala Ala Ala Lys Asn Lys Met Arg His Lys Arg Thr Ser
 245 250 255
 Thr Lys Ser Phe Asn Met Val Gln Ala Phe Gly Leu Arg Gly Pro Gly
 260 265 270
 Asp Leu Gln Gly Asn Phe Gly Asp Leu Gln Leu Asn Lys Leu Gly Thr
 275 280 285
 Glu Asp Pro Arg Trp Pro Gln Ile Ala Glu Leu Ala Pro Thr Ala Ser
 290 295 300
 Ala Phe Met Gly Met Ser Gln Phe Lys Leu Thr His Gln Asn Asn Asp
 305 310 315 320
 Asp His Gly Asn Pro Val Tyr Phe Leu Arg Tyr Ser Gly Ala Ile Lys
 325 330 335
 Leu Asp Pro Lys Asn Pro Asn Tyr Asn Lys Trp Leu Glu Leu Leu Glu
 340 345 350
 Gln Asn Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Lys Lys Glu Lys Lys Gln
 355 360 365
 Lys Ala Pro Lys Glu Glu Ser Thr Asp Gln Met Ser Glu Pro Pro Lys
 370 375 380
 Glu Gln Arg Val Gln Gly Ser Ile Thr Gln Arg Thr Arg Thr Arg Pro
 385 390 395 400
 Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Ile Asp Val Asn Thr Asp
 405 410

<210> 2
 <211> 1242
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MERS CoV nucleoprotein
 <400> 2

atggcatccc ctgctgcacc tcgtgctgtt tcctttgccg ataacaatga tataacaaat 60
 acaaacctat ctcgaggtag aggacgtaat ccaaaaccac gagctgcacc aaataacact 120

gtctcttggg aactgggct tacccaacac gggaaagtcc ctcttacctt tccacctggg 180
 cagggtgtac ctcttaatgc caattctacc cctgcgcaaa atgctgggta ttggcggaga 240
 caggacagaa aaattaatac cgggaatgga attaagcaac tggctcccag gtggtacttc 300
 tactacactg gaactggacc cgaagcagca ctcccattcc gggctgttaa ggatggcatc 360
 gtttgggtcc atgaagatgg cgccactgat gtccttcaa cttttgggac gcggaaccct 420
 aacaatgatt cagctattgt tacacaattc gcgcccggta ctaagcttcc taaaaacttc 480
 cacattgagg ggactggagg caatagtcaa tcatcttcaa gagcctctag ctttaagcaga 540

aactcttcca gatctagttc acaagttca agatcaggaa actctaccg cggcacttct 600
 ccagggtccat ctggaatcgg agcagtagga ggtgatctac tttaccttga tcttctgaac 660
 agactacaag cccttgatc tggcaaagta aagcaatcgc agccaaaagt aatcactaag 720
 aaagatgctg ctgctgctaa aaataagatg cgccacaagc gcacttccac caaaagtttc 780
 aacatggtgc aagcttttgg tcttcgcgga ccaggagacc tccagggaaa ctttggatgat 840
 cttcaattga ataaactcg cactgaggac ccacgttggc cccaaattgc tgagcttgct 900
 cctacagcca gtgcttttat gggatgtcg caatttaaac ttacccatca gaacaatgat 960

gatcatggca acctgtgta cttccttcgg tacagtggag ccattaaact tgacccaaag 1020
 aatcccaact acaataagtg gttggagctt cttgagcaaa atattgatgc ctacaaaacc 1080
 ttccctaaga aggaaaagaa acaaaaggca ccaaaagaag aatcaacaga ccaaatgtct 1140
 gaacctcaa aggagcagcg tgtgcaaggt agcatcactc agcgactcg caccctcca 1200
 agtgttcage ctggtccaat gattgatgtt aacactgatt ag 1242

<210> 3
 <211> 1242
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> MERS-CoV DNA vaccine sequence

<400> 3

```

atggctttctc ctgccgtcc tagagccgtg tctttcgccg acaacaacga catcaccaac      60
accaactgt ccagaggcag gggcagaaac cccaagccta gagctgcccc taacaacacc      120
gtgtcctggt acaccggcct gacacagcat ggaaagggtgc ccctgacctt tccacctgga      180
cagggcgttc cactgaacgc caattctacc cctgctcaga acgccggcta ttggcggaga      240
caggaccgga agatcaacac cggcaacggc atcaagcagc tggcccctag atggtacttc      300
tactacaccg gcaccggacc tgaggccgct ctgcctttta gagctgtgaa ggacggcatc      360
gtgtgggtgc acgaagatgg cgctaccgac gctccttcta ccttcggcac ccggaatcct      420

aacaacgact ccgccatcgt gaccagttt gcccttgaa caaagctgcc caagaacttc      480
cacatcgaag gcaccggcgg caactcccag agttcctcta gagcctcttc tetgtcccg      540
aactcctctc ggictagctc ccagggtctt agatccgca acagcaccag aggcacaagc      600
cctggaccat ctggaatcgg agctgtcggc ggcgatctgc tgtatctgga cctgctgaat      660
agactgcagg cctggaatc cggcaaagtg aagcagctcc agcctaaagt gatcaccaag      720
aaggatgccg ccgtgcca gaacaagatg cggcacaagc ggacctccac caagtccttc      780
aatatggtgc agccttcgg cctgagaggc cctggggatc tgcagggcaa tttcggagat      840

ctgcagctga acaagctggg caccgaggat cctagatggc cccagattgc tgagctggct      900
cctaccgct ctgccttcat gggcatgtcc cagttcaagc tgaccacca gaacaacgac      960
gaccacgga acccctgta ctctctgaga tactccggcg ccatcaagct ggacctaa      1020
aacccaact acaacaagtg gctggaactg ctggaacaga acatcgacgc ctacaagaca      1080
ttcccaaga aagagaaga gcagaaggcc ctaaagagg aatccaccga ccagatgtcc      1140
gagcctccta aagaacagag agtgcaggc agcatcaccc agcggacaag aaccagacct      1200
tccgtgcagc ccggacctat gatcgactg aacaccgact ga                          1242
    
```

<210> 4

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal domain of MERS CoV nucleoprotein

<400> 4

Ala Pro Asn Asn Thr Val Ser Trp Tyr Thr Gly Leu Thr Gln His Gly

1 5 10 15

Lys Val Pro Leu Thr Phe Pro Pro Gly Gln Gly Val Pro Leu Asn Ala
 20 25 30
 Asn Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ala Gly Tyr Trp Arg Arg Gln Asp Arg
 35 40 45

 Lys Ile Asn Thr Gly Asn Gly Ile Lys Gln Leu Ala Pro Arg Trp Tyr
 50 55 60
 Phe Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ala Leu Pro Phe Arg Ala
 65 70 75 80
 Val Lys Asp Gly Ile Val Trp Val His Glu Asp Gly Ala Thr Asp Ala
 85 90 95
 Pro Ser Thr Phe Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asp Ser Ala Ile Val
 100 105 110
 Thr Gln Phe Ala Pro Gly Thr Lys Leu Pro Lys Asn Phe His Ile Glu

 115 120 125
 Gly Thr Gly Gly Asn Ser
 130
 <210> 5
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-terminal domain of MERS CoV nucleoprotein
 <400> 5
 Ala Lys Asn Lys Met Arg His Lys Arg Thr Ser Thr Lys Ser Phe Asn
 1 5 10 15
 Met Val Gln Ala Phe Gly Leu Arg Gly Pro Gly Asp Leu Gln Gly Asn
 20 25 30
 Phe Gly Asp Leu Gln Leu Asn Lys Leu Gly Thr Glu Asp Pro Arg Trp

 35 40 45
 Pro Gln Ile Ala Glu Leu Ala Pro Thr Ala Ser Ala Phe Met Gly Met
 50 55 60
 Ser Gln Phe Lys Leu Thr His Gln Asn Asn Asp Asp His Gly Asn Pro
 65 70 75 80

Val Tyr Phe Leu Arg Tyr Ser Gly Ala Ile Lys Leu Asp Pro Lys Asn
 85 90 95

Pro Asn Tyr Asn Lys Trp Leu Glu Leu Leu Glu Gln Asn Ile Asp Ala
 100 105 110

Tyr Lys Thr Phe Pro
 115

<210> 6

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NC fusion protein of MERS CoV nucleoprotein

<400> 6

Ala Pro Asn Asn Thr Val Ser Trp Tyr Thr Gly Leu Thr Gln His Gly
 1 5 10 15

Lys Val Pro Leu Thr Phe Pro Pro Gly Gln Gly Val Pro Leu Asn Ala
 20 25 30

Asn Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ala Gly Tyr Trp Arg Arg Gln Asp Arg
 35 40 45

Lys Ile Asn Thr Gly Asn Gly Ile Lys Gln Leu Ala Pro Arg Trp Tyr
 50 55 60

Phe Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ala Leu Pro Phe Arg Ala
 65 70 75 80

Val Lys Asp Gly Ile Val Trp Val His Glu Asp Gly Ala Thr Asp Ala
 85 90 95

Pro Ser Thr Phe Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asp Ser Ala Ile Val
 100 105 110

Thr Gln Phe Ala Pro Gly Thr Lys Leu Pro Lys Asn Phe His Ile Glu
 115 120 125

Gly Thr Gly Gly Asn Ser Ala Lys Asn Lys Met Arg His Lys Arg Thr
 130 135 140

Ser Thr Lys Ser Phe Asn Met Val Gln Ala Phe Gly Leu Arg Gly Pro
 145 150 155 160

Gly Asp Leu Gln Gly Asn Phe Gly Asp Leu Gln Leu Asn Lys Leu Gly
 165 170 175
 Thr Glu Asp Pro Arg Trp Pro Gln Ile Ala Glu Leu Ala Pro Thr Ala
 180 185 190

 Ser Ala Phe Met Gly Met Ser Gln Phe Lys Leu Thr His Gln Asn Asn
 195 200 205
 Asp Asp His Gly Asn Pro Val Tyr Phe Leu Arg Tyr Ser Gly Ala Ile
 210 215 220
 Lys Leu Asp Pro Lys Asn Pro Asn Tyr Asn Lys Trp Leu Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Glu Gln Asn Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro
 245 250