

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12N 7/04

(11) 공개번호 특2001-0015629

(43) 공개일자 2001년02월26일

(21) 출원번호	10-2000-7003251		
(22) 출원일자	2000년03월27일		
번역문제출일자	2000년03월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/20230	(87) 국제공개번호	WO 1999/15631
(86) 국제출원출원일자	1998년09월28일	(87) 국제공개일자	1999년04월01일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키스탄 베트남		
(30) 우선권주장	60/060, 153	1997년09월26일	미국(US)
	60/084, 133	1998년05월04일	미국(US)
	60/089, 207	1998년06월12일	미국(US)
(71) 출원인	아비론, 인크. 미국, 캘리포니아 94043, 마운티 뷰, 노스 베르나르도 애비뉴 297		
(72) 발명자	진홍 미국, 캘리포니아94087, 씨니벌, 콘네마라웨이354 탕로드릭 미국, 캘리포니아94070, 산카를로스, 체스넛스트리트#3, 730 리첸퀴양 미국, 캘리포니아94043, 구페리티노, 세븐스프링파크웨이, 21001 브리안트마티 미국, 캘리포니아94024, 로스알토스, 클레이드라이브1664		
(74) 대리인	강명구		

**심사청구 : 없음**

**(54) 재조합 RSV 바이러스 발현 시스템 및 백신**

**요약**

본 발명은 백신으로 이용할 수 있는 이형 유전자를 포함하는 유전공학적으로 조작된 재조합 RS 비리온 및 바이러스 벡터에 관계한다. 본 발명에 따르면, 재조합 RS 비리온 벡터 및 바이러스는 다른 바이러스, 병원균, 세포 유전자, 종양 항원을 포함하는 이형 유전자를 포함하거나 상이한 RSV 균주의 유전자 복합물질을 인코딩하도록 조작된 것이다.

**대표도**

**도1**

## 명세서

### 기술분야

#### 1. 개요

본 발명은 재조합 네가티브 가닥 바이러스 RNA 주형에 관한 것으로 이를 이용하여, 적절한 숙주 세포 시스템에서 이형성 유전자 생성물을 발현시키고, 이형성 유전자 생성물을 발현, 포장, 제공하는 재조합 바이러스를 작제한다. 발현 구조체 및 키메라 바이러스는 백신 조제물에 유익하게 이용될 수 있다. 특히, 본 발명은 재조합 호흡기 합체 바이러스를 만들고, 발현 벡터 및 백신으로 이와 같은 재조합 바이러스를 이용하는 것에 관계한다. 본 2발명은 재조합 호흡기 합체 바이러스 계통을 이용하여 감염성 바이러스 입자를 만드는 실시예를 통하여 설명한다.

### 배경기술

#### 2. 배경 기술

숙주 세포 시스템에서 이형성 단백질을 발현시키도록 유전공학적으로 다양한 DNA 바이러스가 조작되어왔다(가령, 백시니아 바이러스, 베콜로바이러스등). 최근에는 포지티브-가닥 RNA 바이러스(가령, 폴리오바이러스)를 이용하여 유사한 발견을 하였다. 이와 같은 구조체의 발현 생성물 가령, 이형성 유전자 생성물을 발현시키는 이형성 유전자 생성물 또는 키메라 바이러스는 백신 조제물(소단위 또는 전체 바이러스 백신)에 특히 유용한 것으로 간주되고 있다. 백신에 이용하기 위해 재조합 또는 키메라 바이러스를 작제하는데 있어서 백시니아와 같은 바이러스를 이용하는데 있어서 한 가지 단점은 이들의 주요 에피토프에서 변이가 부족하다는 것이다. 이와 같이 바이러스 균주에서 다양성의 부족은 키메라 백시니아를 반복적으로 이용하는데 엄격한 제한을 두게되고, 다봉 백신화는 균주에 숙주 저항성을 제공하여 접종된 바이러스가 숙주를 감염시키지 못하게 된다. 키메라 백시니아에 대해 저항성을 가진 개체에 접종을 하여도, 면역학적으로 자극이 유도되지 않는다.

대조적으로, 네가티브-가닥 RNA 바이러스 가령, 인플루엔자 바이러스 및 호흡기 합체 바이러스는 이들의 주요 에피토프에 광범위한 다양성을 가지는 것으로 설명되고 있다. 또한, 인플루엔자 바이러스의 변이체는 수천가지로 확인되었고, 각 균주는 항원 변동으로 진화된 것으로 보인다. 네가티브-가닥 바이러스 즉, 인플루엔자 및 호흡기 합체 바이러스는 백신으로 이용하는 키메라 바이러스를 작제하는데 있어서 매력적인 후보물질이 되는데 그 이유는 이와 같은 유전적인 다양성은 다양한 백신 조제물을 작제할 수 있도록 하기 때문에 내성의 발생 위험없이 면역성을 자극할 수 있기 때문이다.

##### 2.1. 호흡기 합체 바이러스

네가티브-센스 계통으로 된 한 가닥 RNA를 싸고 있는 것으로 구성된 바이러스 족은 비-분할 계통을 가지는 집단(Paramyxoviridae, Rhabdoviridae), 또는 분할된 계통을 가지는 집단(Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae)로 분류된다. 파라믹소비리데는 세 가지 종으로 분류되는데, 파라믹소바이러스(센다이 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 타입 1-4, 유행성 이하선염(mumps), 뉴우캐슬병 비), 모르빌리바이러스(홍역 바이러스, 개 디스토포 바이러스, 린더페스트 바이러스); 뉴모바이러스(호흡기 합체 바이러스, 소 호흡기 합체 바이러스).

사람의 호흡기 합체 바이러스(RSV)는 유아 및 어린이에서 하부 호흡기 기관에 심각한 질병을 일으키는 것으로 상당한 치사율 및 발병율을 가진다. 사람에서는 두 가지 항원성으로 다양한 RSV 소단위 A 및 B가 있다. RSV는 면역 절충된 성인 및 노인에서 심각한 질병을 제공하는 물질로 인지되고 있다. 자연적인 감염에 의해 유도되는 RSV 재감염에 대해 저항성이 불완전하기 때문에 RSV는 어린시절 및 인생에 있어서, 다발적으로 감염을 시킨다. RSV 면역예방의 목적은 RSV 감염과 관련될 수 있는 심각한 질병을 예방할 수 있을 정도의 충분한 저항성을 유도하는 것이다. RSV 백신을 개발하는데 있어서 현재 전략은 정제된 바이러스 항원을 투여하거나 또는 비강으로 투여하기 위한 살아있는 감쇠된 RSV를 개발하는 것이다. 그러나, 현재까지 RSV에 대해 승인된 백신 또는 매우 효과가 있는 항-바이러스 치료법은 없다.

RSV에 감염되는 경우에 전혀 감지할 수 없는 감염부터 심각한 폐렴 및 죽음에 이르는 경우까지 다양하다. RSV는 15,221개 뉴클레오티드로 된 한 가닥 비-분할된 네가티브-센스 RSV 계통을 가진다(Collins, 1991, In The paramyxoviruses pp. 103-162, D.W. Kingsbury (ed.) Plenum, New York). RSV 계통은 10개 mRNAs를 인코딩한다(Collins et al., 1984, J. Virol. 49: 572-578). 계통에는 3'말단에 44개 뉴클레오티드 리더 서열과 NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 및 5'말단에 155개 뉴클레오티드 트레일러 서열을 포함한다(Collins, 1991, supra). 각 유전자 전사 단위에서는 짧은 보존된 유전자 시작 서열(GS) 및 유전자 종료 서열(GE)을 가진다.

바이러스 계통 RNA는 네이키드 RNA로는 감염성이 없다. RSV의 RNA는 주요 뉴클레오캡시드(N) 단백질로 단단하게 싸여있고, 인단백질(P) 및 큰 폴리메라제 소단위(L)와 연합되어 있다. 이와 같은 단백질은 뉴클레오단백질 코어를 형성하는데, 이는 감염성의 최소 단위로 간주된다(Brown et al., 1967, J. Virol. 1: 368-373). RSV의 N, P, L 단백질은 바이러스 RNA 의존성 RNA 전사효소를 형성하여 RSV 계통의 전사 및 복제를 담당하게 한다(Yu et al., 1995, J. Virol. 69:2412-2419; Grosfeld et al., 1995, J. Virol. 69:5677-86). 최근에 연구에 따르면, M2 유전자 생성물(M2-1 및 M2-2)가 전사에 관여하고, 이를 요구하는 것으로 나타났다(Collins et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:81-5).

M 단백질은 말초 막 단백질로 발현되나, F 와 G 단백질은 막 내부 결함 단백질로 발현되어 바이러스 부착 및 세포에 바이러스가 들어갈 때 관여하는 것으로 보인다. G 및 F 단백질이 in vivo에서 항체의 중화를 유도하는 주요 항원이다(as reviewed in McIntosh and Chanock, 1990 'Respiratory Syncytial Virus' 2nd ed. Virology (D.M. Knipe et al., Ed.)(Raven Press, Ltd., N.T.)). RSV의 A와 B 소단위 간의 항원성 이형체는 주로 G 단백질과 연계되고, 반면에 F 당단백질은 이들 소단위 집단사이에 좀더 밀접한 관계가

있는 것으로 보인다.

수년간의 연구에도 불구하고, RSV 감염과 관련된 심각한 치사 및 발병율을 예방하기 위한 목적의 안전하고, 효과적인 RSV 백신이 개발되는 못하였다. 포르말린-비활성화시킨 바이러스 백신은 RSV 감염에 대해 보호하지 못하였고, 유아에서 야생형 바이러스에 의한 연속적인 감염동안에 심각한 증후에 대해서도 보호하지 못하였다(Kapikian et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:405-21; Chin et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:449-63). 이후로는 화학물질에 의한 돌연변이 발생 또는 야생형 RSV의 저온 계대를 이용하여 살아있는 감쇠된 온도-감응성이 있는 돌연변이체를 개발하는데 주력하여왔다(Gharpure et al., 1969, J. Virol. 3: 414-21; Crowe et al., 1994, Vaccine 12: 691-9). 그러나, 초반기 시도에서는 이와 같은 살아있는 감쇠된 온도-감응성 돌연변이체에서 바람직하지 못한 결과를 얻었다. 바이러스 후보물질은 과다감쇠되거나, 초과감쇠되었고(Kim et al., 1973, Pediatrics 52:56-63; Wright et al., 1976, J. Pediatrics 88:931-6), 일부 백신 후보물질은 유전학적으로 불안정하여, 감쇠된 표현형을 상실하였다(Hodes et al., 1974, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145:1158-64).

RSV F 또는 G 외피 당단백질을 발현시키는 재조합 백신이나 벡터를 조작하는데 노력을 기울였다. 그러나, 이와 같은 벡터를 동물 연구에서 RSV 감염에 대해 보호하기 위한 백신으로는 이용하기에는 결과가 연속성이 없었다(Olmsted et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7466; Collins et al., 1990, Vaccine 8:164-168).

따라서, 백신을 만들기 위해, 재조합 RSV를 삭제하기로 연구 방향을 전환하였다. 상당시간 동안, 네가티브-센스 RNA 바이러스가 연구에 방해가 되었다. 최근에 겨우 재조합 역 유전학 연구를 이용하여 네가티브 가닥 RNA 바이러스를 회수할 수 있었다(U.S. Patent No. 5,166,057 to Palese et al.). 이와 같은 방법은 원래는 인플루엔자 바이러스 계통에 적용하는 방법이었으나(Luytjes et al. 1989, Cell 59:1107-1113; Enami et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567), 다양한 비-분할된 및 분할된 다양한 네가티브 가닥 RNA 바이러스에 성공적으로 적용시킬 수 있었는데, 이와 같은 RNA 바이러스로는 다음과 같다; 광견병(Schnell et al. 1994, EMBO J. 13: 4195-4203); VSV (Lawson et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-81); 홍역 바이러스(Radecke et al., 1995, EMBO J. 14:5773-84); 린더퍼스트 바이러스(Baron & Barrett, 1977, J. virol. 71: 1265-71); 사람 파라인플루엔자 바이러스(Hoffman & Banerjee, 1997, J. Virol. 71:3272-7; Dubin et al., 1997, Virology 235:323-32); SV5(He et al., 1997, Virology 237:249-60); 호흡기 합체 바이러스(Collins et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9663-9667); 샌다이 바이러스[Sendai virus](Park et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5537-5541; Kato et al. 1996, Genes to Cells 1:569-579). 이와 같은 방식에 성공적으로 RSV를 회수하는데 이용되기는 하였지만, 다수의 집단에서는 RSV는 여전히 주어진 파라믹소바이러스, 루블라바이러스, 모르빌라바이러스 등의 잘 알려진 특징과 다른 RSV의 성질을 연구하는데에는 방해가 된다. 이와 같은 차이에는 RNA의 수가 더 많고, 계통의 3'말단에 비정상적인 유전자 순서, 균주와 균주간에 서열 다양성이 방대하고, 다른 비-분할된 네가티브 가닥 RNA 바이러스에서 발견되지 않는 몇 가지 단백질, 전체 전사를 위해 그리고 전체 길이의 계통을 회수하는데 있어서 M2 단백질(ORF1)의 요구성등이 있다(Collins et al. PCT W097/12032; Collins, P.L. et al. pp 1313-1357 of volume 1, Fields Virology, et al., Eds. (3rd ed., Raven Press, 1996).

### 3. 발명의 요약

본 발명은 백신으로 이용할 수 있는 이형 유전자를 포함하는 유전공학적으로 조작된 RS 바이러스 및 바이러스 벡터에 관계한다. 본 발명에 따르면 재조합 RS 바이러스 벡터 및 바이러스는 다른 바이러스, 병원균, 세포 유전자, 종양 항원등의 유전자를 포함하는 이형 유전자를 포함하거나 상이한 RSV 균주에서 얻은 유전자를 복합하여 인코딩하도록 삭제한다.

재조합 네가티브-가닥 바이러스 RNA 주형은 RNA 의존성 RNA 폴리메라제를 발현시키는 형질변환된 세포에 트랜스펙트되어, 상보성이 되도록 허용하는데 이용된다. 또는, 적절한 프로모터에서 RNA 폴리메라제의 성분을 발현시키는 플라스미드를 이용하여 세포에 트랜스펙트시켜, 네가티브-가닥 바이러스 RNA 주형의 상보성을 허용한다. 상보성은 헬퍼 바이러스 또는 야생형 바이러스를 이용하여 얻을 수 있고, RNA 의존성 RNA 폴리메라제를 제공한다. RNA 주형은 DNA-관련된 RNA-폴리메라제로 적절한 DNA 서열을 전사하여 얻을 수 있다. 생성된 RNA 주형은 네가티브 또는 포지티브-극성이고, 바이러스 RNA-합성 장치가 주형을 인지할 수 있도록 하는 적절한 말단 서열을 포함한다. 이중시스트론성(bicistronic) mRNAs는 바이러스 서열의 내부 해독을 개시할 수 있고, 정규적인 말단 개시 부위의 외부 단백질 코딩 서열의 발현을 허용할 수 있도록 삭제한다.

여기 실시예에서 설명하는 것과 같이 포지티브- 또는 네가티브-센스 방향으로 있는 재조합 RSV 계통은 바이러스성 뉴클레오텍시드(N) 단백질, 연합된 뉴클레오텍시드 인단백질(P), 큰 폴리메라제 소단위 단백질(L)을 인코딩하는 발현벡터에 추가로 RSV의 M2/ORF1을 가지고, 또는 이것 없이 공동-트랜스펙션시켜, 감염성 바이러스 입자를 만든다. RS 바이러스 폴리펩티드를 인코딩하는 플라스미드를 이용하여 합성으로 유도된 RNPs를 복제 및 전사시킬 수 있는 단백질원으로 이용한다. 바이러스 RNP의 특이적인 복제 및 발현에 필요한 RSV 단백질의 최소 단위는 세가지 폴리메라제 복합 단백질(N, P, L)로 밝혀졌다. 이는 전체 M2 유전자 기능이 감염성 RSV의 복제, 발현 및 회수에 절대적으로 필요한 것이 아니라는 것을 제시하는 것이다.

수득된 발현 생성물 또는 키메라 바이러스를 백신 조제물에 유익하게 이용할 수 있다. 특히, 감쇠된 표현형을 설명하기 위해 유전공학적으로 조작된 재조합 RSV를 살아있는 RSV 백신으로 이용한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 재조합 RSV를 유전공학적으로 조작하여, 또 다른 RSV 균주의 항원성 폴리펩티드(가령, RSV G 및 F 단백질) 또는 또 다른 바이러스의 항원성 폴리펩티드(가령, HIV의 gp120에서 얻은 면역원성 펩티드)를 발현시키, 키메라 RSV를 만들어 백신으로 이용하는데, 이와 같은 백신은 척추동물 체액 및 세포-주입된 면역 반응을 유도할 수 있다. 이와 같은 목적을 위한 재조합 인플루엔자 또는 재조합 RSV를 이용하는 것이 특히 유익한데 그 이유는 이와 같은 바이러스들은 다양한 백신 조제물을 만들 수 있는 아주 많은 균주 다양성을 제공할 수 있기 때문이다. 키메라 바이러스를 삭제하기 위해 수천가지 바이러스 변이체를 선택하면 백신이나와 같은 다른 바이러스를 이용할 경우에 처하게 되는 숙주 저항성 문제를 피

할 수 있다.

### 3.1. 정의

여기에서 사용된 것은 다음의 의미를 가진다

cRNA= 안티게놈 RNA

HA= 헤마글루티닌(외피 당단백질)

HIV=사람 면역 결핍 바이러스

L= 큰 폴리메라제 소단위

M= 매트릭스 단백질(외피의 내부에 있는)

MDCK= MAdin Darby 개의 신장 세포

MDBK= MAdin Darby 소의 신장 세포

moi= 감염의 다양성

N= 뉴클레오타이드 단백질

NA= 뉴라미니다제(외피 당단백질)

NP= 핵단백질(RNA와 연합되어 있고, 폴리메라제 활성화에 필요)

NS= 비-구조 단백질(기능은 모름)

nt= 뉴클레오타이드

P= 뉴클레오타이드 인단백질

PA, PB1, PB2= RNA-관련된 RNA 폴리메라제 성분

RNP= 리보뉴클레오타이드단백질(RNA, PB2, PB1, PA, NP)

rRNP= 재조합 RNP

RSV= 호흡기 합체 바이러스

vRNA= 계놈 바이러스 RNA

viral= 폴리메라제 복합체= PA, PB1, PB2, NP

WSN= 인플루엔자 A/WSN/33 바이러스

WSN-HK 바이러스: WSN 바이러스의 7개 유전자와 인플루엔자 A/HK/8/68의 NA 유전자를 포함하는 재조합 바이러스

### 도면의 간단한 설명

도1은 구제 실험에 사용한 RSV/CAT 구성체(pRSVA2CAT)의 개요도다. RSV의 대략 100 nt 길이의 리더 및 200 nt 트레일러 영역은 부분중복 상보성을 보유한 합성 올리고뉴클레오타이드의 조절 어닐링으로 작제한다. 중복 리더 올리고뉴클레오타이드는 구성체에 보이는 1L - 5L로 표시하였다. 중복 트레일러 올리고뉴클레오타이드는 구성체에 보이는 1T - 9T로 표시하였다. 리더 및 트레일러 DNA의 뉴클레오타이드 서열은 각각 XbaI 및 PstI 표시위치상의 정제한 CAT 유전자 DNA와 결합하였다. 전체 구성체는 이후, KpnI/HindIII 압축된 pUC19와 결합하였다. T7 프로모터 서열 및 HgaI를 각각 트레일러 및 리더 서열과 인접연결시켜 정확한 계놈서열 3' 및 5'말단을 가진 RSV/CAT RNA 전사체를 시험관내에서 합성한다.

도2는 도11에 제시한 RNA RSV/CAT로부터 전사한 RNA로 감염 및 트랜스펙션후, 293세포 추출물상에 나타난 CAT활성을 보여주는 박층 크로마토그램(TLC)이다. 6-웰 평판( $10^6$  세포)상의 293 세포의 융합 단일층은 RSV A2 또는 B9320을 이용하여 0.1-1.0 pfu 세포의 m.o.i.로 감염시켰다. 감염 1시간 후, 세포는 Life Technologies의 Transfect-Act™ 프로토콜을 이용하여 5-10  $\mu$ g의 CAT/RSV로 트랜스펙션시켰다. 감염 24시간 후, 감염된/트랜스펙션된 단일층을 수거하고, 계속하여 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Chapter 9.6.2: Gorman, et al., (1982) Mol. Cell. Biol. 2:1044-1051. Lanes 1, 2, 3 CAT 293에 따라 CAT 분석을 위해 가공하였다. 레인 1, 2, 3, 4는 감염되지 않는 293세포(1), CAT/RSV-A2로 트랜스펙션된 세포, 감염된 293세포, 상기 (2)에서 얻은 상청액과 공동-감염시킨 세포상의 CAT활성을 보여준다. 각 레인에서 관찰한 CAT 활성은  $10^6$  세포에서 얻은 전체 세포추출물의 1/5에서 나타났다.

도3은 전체 계놈으로 이루어진 cDNA의 합성에 사용되는 프라이머쌍의 상대적 위치를 보여주는 RSV 계통 A2 계놈의 개요도다. 이들 클론을 함께 접합하기 위해 이용한 엔도뉴클레아제 위치를 표시하였다; 이들 위치는 원 RSV 서열에 존재하는데, cDNA합성에 이용한 프라이머에 포함시켰다. 대략 100 ng의 바이러스 계놈 RNA는 각 일곱 개의 cDNA의 개별합성을 위한 RT/PCR 반응에 사용하였다. 계놈 RNA 주형으로부터 제 1 및 제 2 가닥 cDNA합성을 또한 나타내었다. 각 cDNA의 경우, 제 1가닥 합성을 위한 프라이머는 nos.1'-7'이고, 제 2 가닥 합성을 위한 프라이머는 nos.1'-7'이 된다.

도4는 RSV 소그룹 B 계통 B9320의 개요도다. BamHI 위치를 RT/PCR에 사용한 올리고뉴클레오타이드 프라이머상에 만들어 B3290 계통에서 얻은 G 및 F 유전자를 RSV 소그룹 A2 안티게놈 cDNA(도4A)로 클론시켰다. A2 계통의 4326 뉴클레오타이드 내지 9387 뉴클레오타이드에서 얻은 G 및 F 유전자를 보유한 cDNA 단편은 먼저 pUC19 (pUCRVH)로 계대클론한다. Bgl II 위치를 4630(SH/G 유전자간 접점)위치(도4B) 및 7554 (F/M2

유전자간 접점)위치(도4C)에 만든다. B93260 A-G 및 -F cDNA는 A-G 및 F 유전자가 결손된 pUCR/H로 삽입하였다. 생성된 안티게놈 cDNA 클론은 pRSVB-GF라고 하고, Hep-2 세포를 트랜스팩션시켜 감염성 RSVB-GF를 만드는데 사용하였다.

도5에서, 재조합 RSVB-GF 바이러스는 RSV 소그룹 B 특이적 프라이머를 이용한 RT/PCR로 특징지어진다. G 영역상의 RSV 소그룹 B 특이적 프라이머는 재조합 바이러스 RSV 바이러스 게놈 일부분과 함께 배양하고, PCR처리하였다. PCR 산물은 1% 아마로즈 겔상에서 전기영동하여 분석하고, 에티디움 브로마이드로 염색하여 시각화하였다. 보이는 바와 같이, RSV A2를 주형으로 이용한 RT/PCR 반응에서 어떤 DNA 산물도 만들어지지 않았다. 하지만, 253 염기쌍의 예상 산물은 주형으로 RSVB-GF RNA를 이용한 RT/PCR, 플라스미드 pRSV-GF DNA를 이용한 PCR 컨트롤에서 나타났는데, 이것은 구제된 바이러스가 B9320 바이러스로부터 유도한 G 및 F 유전자를 보유한다는 것을 암시한다.

도6은 RT/PCR에 의한 키메라(rRSVA2(B-G))의 확인 및 RNA 발현의 노란 블랏 분석을 나타낸다. 도6A는 야생형 A2(A2)와 비교하여, 키메라 rRSV A2 (B-G), A2(B-G)의 RT/PCT 분석을 나타낸다. rRSVA2(B-G)(레인 1,2), rRSVA2(레인 3,4)에서 추출한 비리온 RNA는 역전사효소(RT)의 존재(+) 또는 부재(-)하에서, RSV F 유전자상의 (-)센스 vRNA로 서냉복원된 프라이머를 이용하여 역전사되고, 이후 B-G 삽입위치를 공격하는 프라이머쌍으로 PCR처리한다. 역전사효소(RT)가 없는 경우(레인 2,4), RT/PCR (RT)상에서 어떤 DNA도 검출되지 않았다. A2에서 유도한 cDNA보다 대략 1kb 더 큰 cDNA 단편은 rRSVA(B-G)로부터 만들었다. 이 PCR DNA 산물은 삽입된 B-G 유전자(레인 5)에 독특한 Stu I 제한효소로 절단한다. 100 bp DNA 크기 마크는 (M)으로 표시한다. 도6B는 G mRNA 발현의 노란 블랏 분석을 나타낸다. Hep-2 세포는 RSV B9320, rRSV 및 키메라 rRSV A2(B-G)로 감염시켰다. 감염 48시간후, 전체 세포 RNA를 추출하고, 포름알데히드를 함유한 1% 아가로스 겔상에서 전기영동하였다. RNA는 Hybond Nylon 막에 전이시키고, 필터는 A2-G에 특이적인 또는 B9320-G mRNA에 특이적인 <sup>32</sup>P-라벨된 올리고뉴클레오티드 프로브와 혼성화시킨다. A2-G 특이적, B9320-G 특이적 전사체 모두 rRSV A2 (B-G) 감염된 세포에서 검출된다. rRSV A2 (B-G)로부터 얻은 최종 RNA 전사체(G-M2)를 또한 표시하였다.

도7은 rRSV A2(B-G)에 의한 단백질 발현분석을 나타낸 것이다. Hep-2 세포는 모의 감염시키고(레인 1,5), RSV B9320(레인 2,6), rRSV(레인 3,7), rRSV A2(B-G)(레인 4,8)로 감염시켰다. 감염 14-18 시간 후, 감염된 세포는 <sup>35</sup>S-프로믹스(promix)로 라벨하고, 폴리펩티드는 RSV A2 계통(레인 1-5)에 대항하는 염소 다중클론 항혈청 또는 RSV B9320 계통(레인 5-8)에 대항하는 생쥐 다중클론 항혈청으로 면역침강시켰다. 면역침강된 폴리펩티드는 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 분리한다. RSV A2 특이적 G 단백질 및 RSV B9320 특이적 G 단백질은 rRSV A2 (B-G)감염된 세포에서 만든다. G 단백질 이동은 \*로 표시하였다. F1 당단백질의 이동성, 그리고 N, P, M을 표시하였다. 분자 크기는 왼쪽의 킬로달톤 단위로 알 수 있다.

도8은 rRSV, rRSVC3G, rRSV A2(B-G), 야생형 A2 바이러스(wt A2)의 플라크 형태를 나타낸다. Hep-2 세포를 각 바이러스로 감염시키고, 6일 동안 35°C로 배양하였다. 세포단일층을 고착시키고, 면역염색하여 시각화하고, 사진 촬영하였다.

도9는 rRSV, rRSVC4G, 야생형 A2 RSV(wt A2), 키메라 rRSV A2 (B-G)의 생장곡선을 나타낸 것이다. Hep-2 세포는 0.5 moi로 각 바이러스를 이용하여 감염시키고, 배지는 24시간 간격을 두고 수거하였다. 각 바이러스의 적정량은 Hep-2 세포상의 플라크 분석을 두 번 반복하여 결정하고, 면역염색으로 시각화하였다.

도10은 특정부위 돌연변이의 표적이 되는 RSV 단백질 하전된 잔기 무리를 나타낸다. 무리중의 연속적으로 하전된 아미노산 잔기는 QuikChange 특정부위 돌연변이 키트(Stratagene)를 이용한 RSV L 유전자의 특정부위 돌연변이에 의해 알라닌으로 전환하였다.

도11은 특정부위 돌연변이의 표적이 되는 RSV L 단백질 시스테인 잔기 무리를 나타낸다. 시스테인 잔기는 QuikChange 특정부위 돌연변이 키트(Stratagene)를 이용한 RSV L 유전자의 특정부위 돌연변이에 의해 알라닌-잔기로 전환하였다.

도12는 RSV M2-2의 확인과 SH 결손 돌연변이를 나타낸다. M2-2상의 결손은 PET(S/B)의 Hind III로 절단하여 발생시키고, 이후, 남아있는 SacI을 BamHI 단편에 재클론시켜 전장클론을 만들었다. SH상의 결손은 PET(A/S)의 SacI로 절단하여 발생시키고, 이후, 남아있는 AvrII를 SacI 단편에 재클론시켜 전장클론을 만들었다. 수거한 rRSVsSH 및 rRSV M2-2는 각각 SH 유전자 또는 M2-2 유전자에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 RT/PCR로 확인하였다(도12A). 수거한 rRSV SH M2-2 또한, SH 유전자 또는 M2-2 유전자에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 RT/PCR로 검출하였다(도12B). RT/PCR 산물은 에티디움 브로마이드 겔에 걸고, 띠는 자외선(UV)광으로 시각화하였다.

## 발명의 상세한 설명

### 5. 발명의 설명

본 발명은 상이한 RS 바이러스에서 유도된 바이러스 유전자의 복합물 또는 이형성 유전자 또는 돌연변이된 RS 바이러스 유전자를 발현시킬 수 있는 유전공학적으로 조작된 재조합 RS 바이러스 및 바이러스 벡터에 관계한다. 본 발명은 재조합 네가티브 가닥 RS 바이러스 RNA 주형을 작제하고 이를 바이러스성 RNA-관련된 RNA 폴리메라제와 함께 이용하여, 적절한 숙주세포에서 이형성 유전자 생성물을 발현시키고 또는 바이러스 입자에서 이형성 유전자를 회수한다. 본 발명의 RNA 주형은 박테리오파아지 T7, T3, Sp6 폴리메라제와 같은 DNA-관련된 RNA 폴리메라제를 이용하여 적절한 DNA 서열을 전사하여 준비할 수 있다. 이와 같은 RNA 주형을 이용하여 상보성을 허용하는 RNA-관련된 RNA 폴리메라제 단백질을 발현시킬 수 있는 연속성/트랜스팩트된 세포주에 트랜스팩트시키는데 이용한다.

본 발명은 다양한 실시예로 설명하는데, 이때, 감염성 RSV는 RSV 폴리메라제 복합체의 N, P, L 단백질을 발현시키는 세포에 도입되는 게놈 태는 항게놈 센스에 RSV 게놈을 포함하는 cDNA에서 회수한다. 실시예에서는 기존에 설명된 cDNA에서 감염성 RSV를 회수하는데 M2-2가 필수적이라는 것이 틀렸다는 것을 설명한다(Collins et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-7). 또한, M2-ORF2 없는 재조합 RSV

cDNA는 감소된 RSV 입자를 회수한다. M2-결손된-RSV는 M2 db 대신에 이형성 유전자 생성물을 인코딩하는 키메라 RSV 만드는데 우수한 운반체가 되고, 이와 같은 키메라 바이러스 벡터 및 회수된 바이러스 입자는 이형성 유전자 생성물을 발현시키는 발현벡터, RSV 항원성 폴리펩티드 또는 다른 바이러스의 하우언성 폴리펩티드를 발현시키는 살아있는 감소된 RSV 백신으로 이용할 수 있다.

본 발명은 또한 여러 가지 실시예로 설명되는데, 이때 T7 프로모터, 헤파타이티스 델타 바이러스 리보자임, T7 종료물질에 추가하여 RSV의 완전한 게놈을 포함하는 cDNA 클론을 이용하여 RSV의 N, P, L, M2-ORF1 단백질을 인코딩하는 발현벡터와 함께 공동 트랜스팩션시키면, 감염성 바이러스 입자를 만들 수 있다. 또한, 실시예에서는 클론된 DNA의 RNA 전사체에는 코딩 부분이 네가티브 가닥 방향으로 크로람페니콜-아세틸-트랜스퍼라제(CAT) 유전자 또는 그린 형광 단백질(GFP) 유전자가 RSV 게놈의 5'말단 및 3'말단 뉴클레오티드에 인접하여 있다는 것을 설명한다. 실시예에서는 활성이 증가되도록 돌연변이된 RSV 프로모터는 전체 길이 RSV cDNA에서 감염성 RSV 입자를 매우 효과적으로 회수한다는 것을 설명한다. 이와 같은 결과는 RSV를 회수하는데 활성이 증가된 RSV 폴리메라제와 재조합 바이러스 네가티브 가닥 주형을 이용하는 것이 성공적이라는 것을 설명한다. 이와 같은 시스템은 정의된 생물학적 성질을 가지는 RSV 바이러스를 조작하는데 우수한 도구가 되는데, 이때 생물학적 성질이란 RSV에 대해 살아있는 감소된 백신을 말하는 것이고, 이는 또한 이형성 유전자 생성물을 발현시키는 발현벡터로써 재조합 RSV를 이용하는 데 우수한 도구가 된다.

본 발명은 재조합 네가티브 가닥 바이러스 RNA 주형을 작제하고 이용하는 것에 관계하는데, 이와 같은 주형은 바이러스성 RNA-관련된 RNA 폴리메라제와 함께 이용하여, 적절한 숙주 세포에서 이형성 유전자 생성물을 발현시키고, 바이러스 입자에서 이형성 유전자를 회수하고, 돌연변이된 또는 키메라 재조합 네가티브 가닥 바이러스 RNA 주형을 발현시킨다(see U.S. Patent No. 5,166,057 to Palese et al., incorporated herein by reference in its entirety). 본 발명의 특정 구체예에서, 이형성 유전자 생성물은 바이러스의 또 다른 균주 또는 또 다른 바이러스에서 유도한 펩티드 또는 단백질이 된다. RNA 주형은 포지티브 또는 네가티브-센스 방향으로 있으며, 이는 박테리오파아지 T7, T3, Sp6 폴리메라제와 같은 DNA 관련된 RNA 폴리메라제를 이용하여 적절한 DNA 서열의 전사에 의해 준비할 수 있다.

in vitro에서 RNP's를 재구성하는 능력으로 외부 유전자를 발현할 수 있는 새로운 키메라 인플루엔자 및 RSV 바이러스를 고안할 수 있다. 이와 같은 목적으로 이루는 한 가지 방법은 기존의 바이러스 유전자를 변형시키는 것이다. 예를 들면, G 또는 F 유전자를 변형시켜, 외부 서열 가령 외부 도메인에 있는 인플루엔자의 HA 유전자와 같은 외부 서열을 포함하도록 하는 것이다. 이형 서열이 병인균의 에피토프 또는 항원인 경우에, 이와 같은 키메라 바이러스를 이용하여 질병에 대해 보호성 면역 반응을 유도한다. 예를 들면 키메라 RNA를 작제하는데 있어서, 사람의 면역결핍바이러스의 gp120 코딩 부분에서 유도된 코딩 서열을 RSV의 코딩 서열에 삽입시키고, 이와 같은 키메라 RNA 단편의 트랜스팩션에 의해 생성된 키메라 바이러스는 야생형 RSV에 감염된 숙주 세포에 삽입한다.

표면 단백질을 코딩하는 유전자를 변형시키는데 추가하여, 비-표면 단백질을 코딩하는 유전자도 변형시킬 수 있다. 후자 유전자는 RS 바이러스 시스템에서 중요한 세포 면역 반응의 대부분과 연관이 있는 것으로 보인다. 따라서, RSV의 G 또는 F 유전자에 있는 외부 결정부분을 포함한다는 것은 감염 후에, 이와 같은 결정부분에 대한 효과적인 세포 면역 반응을 유도할 수 있다는 것이다. 이와 같은 방법은 특히, 보호성 면역반응이 세포 면역 반응에 상당히 의존하는 상황(가령, 말라리아등)에서 특히 유익하다.

본 발명은 RSV의 게놈에서 특이적인 돌연변이를 도입시켜 만들어지는 감소된 재조합 RSV에 관계하는데, 이와 같은 돌연변이에 의해 폴리메라제 단백질과 같은 RSV 단백질에 아미노산이 변화되어 감소된 표현형이 나타난다.

### 5.1. 재조합 RNA 주형의 작제

당분야에 공지된 기술을 이용하여 바이러스 폴리메라제 결합 부위/프로모터의 상보부분에 인접하는 이형 유전자 코딩 서열 가령, 3'-RSV 말단 또는 3'-및 5'-RSV 말단의 보체를 작제할 수 있다. 당분야에 공지된 기술을 이용하여, 이형 유전자 코딩 서열은 RSV 폴리메라제 결합 부위/프로모터 가령, 리더 및 트레일러 서열의 보체에 인접하게 할 수 있다. 이와 같은 하이브리드 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자는 박테리오파아지 T7, T3, Sp6 폴리메라제와 같은 DNA-관련된 RNA 폴리메라제를 이용하여 클론시키고, 전사시켜, 재조합 RNA 주형을 만들고, 이와 같은 주형에는 바이러스 폴리메라제 인지 및 활성을 허용하는 적절한 바이러스 서열을 가진다.

본 발명의 적절한 구체예에서, 이형성 서열은 RSV의 또 다른 게놈으로부터 유도할 수 있는데, 가령, RSV A 균주의 게놈은 RSV B 균주의 항원성 폴리펩티드 G, F 또는 이의 단편을 코드하는 뉴클레오티드 서열을 포함하도록 작제한다. 본 발명의 이와 같은 구체예에서, RSV의 또 다른 균주에서 이형성 코딩 서열을 이용하여 시작 균주의 항원성 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열로 대체시키거나 또는 모균주의 항원성 폴리펩티드에 추가하여 발현시켜, 재조합 RSV 게놈이 한 개, 두 개 또는 그 이상의 RSV의 항원성 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 작제한다.

본 발명의 또 다른 구체예에서, 이형성 서열은 인플루엔자 바이러스의 임의 균주 게놈으로부터 유도하였다. 본 발명에 따르면, 인플루엔자의 이형 코딩 서열을 RSV 코딩 서열내에 삽입시켜, RSV 바이러스 단백질내에 이형 펩티드 서열을 포함하는 키메라 유전자 생성물이 발현되게 한다. 또 다른 구체예에서, 인플루엔자의 게놈에서 유도한 이형 서열에는 HA, NA, PB1, PB2, PA, NS1, NS2를 포함하나 이에 한정하지는 않는다.

본 발명의 한 특정 구체예에서, 이형 서열은 사람의 면역결핍 바이러스(HIV), 특히 사람 면역결핍 바이러스-1 또는 사람의 면역결핍 바이러스-2의 게놈으로부터 유도하였다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 이형 코딩 서열은 RSV 유전자 코딩 서열내에 삽입시켜, 인플루엔자 바이러스 단백질내에 이형성 펩티드 서열을 포함하는 키메라 유전자 생성물이 발현되도록 한다. 본 발명의 이와 같은 구체예에서, 이형 서열은 사람의 면역결핍 바이러스(HIV), 특히 사람 면역결핍 바이러스-1 또는 사람의 면역결핍 바이러스-2의 게놈으로부터 유도하였다.

이형 서열이 HIV-에서 유도된 것인 경우에는 이와 같은 서열에는 env 유전자(가령, gp160, gp120, gp41의 일부 또는 전부), pol 유전자(가령, 역 전사효소, 엔도뉴클레아제, 프로테아제, 인테그라제의 일부 또는 전부를 인코딩하는 서열), gag 유전자(p7, p6, p55, p17/18, p24/25의 일부 또는 전부를 코딩하는 서열); tat, rev, nef, vif, vpr, vpx등이 포함되나 이에 국한되지는 않는다.

이와 같은 하이브리드 분자를 작제하는 한 가지 방법은 RSV 게놈 RNA의 DNA 보체내에 이형 코딩 서열을 삽입시켜, 이형 서열이 바이러스 폴리메라제 활성에 요구되는 바이러스 서열에 인접하도록 하는데, 가령 예를 들면 폴리메라제 활성에 요구되는 서열은 바이러스 폴리메라제 결합 부위/프로모터가 되고, 이후로는 바이러스 폴리메라제 결합 부위라고 통칭한다. 또 다른 방식으로는 바이러스 폴리메라제 결합 부위를 인코딩하는 올리고뉴클레오티드 가령, 바이러스 게놈 단편의 3'말단 또는 약 말단의 보체를 이형 코딩 서열에 결합시켜, 하이브리드 분자를 작제하는 것이다. 표적이 되는 서열내에 적절한 제한 효소 부위가 있으면, 표적 서열안에 외부 유전자 또는 그 단편을 위치시킬 수 있다. 그러나, 최근 분자생물학의 발전에 의해, 이 문제는 상당히 감소되었다. 부위-적절한 돌연변이 발생등을 통하여 표적 서열내에 어느 위치에서건 제한효소 부위를 만들 수 있다(the techniques described by kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:488). 폴리메라제 사슬 연쇄 반응(PCR) 기술에서 다양성으로 인하여, 특이적인 서열을 삽입하고(가령, 제한효소 부위), 하이브리드 분자를 작제할 수 있다. 또는, PCR 반응을 이용하여 클로닝 없이 재조합 주형을 준비할 수 있다. 예를 들면, PCR 반응을 이용하여 DNA-관련된 RNA 폴리메라제 프로모터(가령, 박테리오파아지 T3, T7, Sp6)를 포함하는 이중 가닥 DNA 분자 및 인플루엔자 바이러스 폴리메라제 결합 부위를 포함하는 하이브리드 서열을 준비할 수 있다. 이와 같은 재조합 DNA로부터 RNA 주형을 바로 전사시킬 수도 있다. 또 다른 구체예에서는 재조합 RNA 주형은 네가티브 극성의 이형 유전자가 되는 RNA와 바이러스 폴리메라제 결합 부위를 RNA 리게이스를 이용하여 결합시켜 준비할 수 있다. 본 발명에 이용할 수 있는 바이러스 폴리메라제 활성 및 구조에 서열 요구성은 하기 단락에서 설명한다.

### 5.1.1 이형 유전자의 삽입

L 단백질을 코딩하는 유전자에는 한 개의 오픈 리딩 프레임이 있다. NS 또는 M2를 코딩하는 유전자에는 각각 NS1, NS2 및 ORF1, 2의 두 개 오픈 리딩 프레임을 포함한다. 별개의 유전자에 의해 코드되는 G 및 F 단백질은 바이러스의 주요 표면 당단백질이다. 결과적으로, 이들 단백질은 감염후에 체액 면역 반응의 주요 표적이 된다. 이와 같은 코딩 부분의 임의의 부분으로 외부 유전자 서열을 삽입은 발현될 외부 유전자를 첨가하거나 또는 바이러스 코딩 부분을 외부 유전자로 대체시키거나 부분적인 대체로 실시할 수 있다. RSV 게놈으로 삽입된 이형 서열은 길이가 최고 5킬로베이스 정도가 된다. PCR-에 의한 돌연변이 발생을 이용하여 안전하게 대체시키는 것이 가장 적절하다.

또는, 비시스트론성 mRNA를 작제하여, 바이러스 서열의 내부 해독 개시를 허용하고, 정규적인 말단 개시 부위에 외부 단백질 코딩 서열의 발현도 허용할 수 있다. 또는, 바이러스 서열은 일상적인 말단 오픈 리딩 프레임에서 해독되도록 하면서, 외부 서열은 내부 부위에서 해독이 개시되도록 하는 방식으로 비시스트론성 mRNA 서열을 작제한다. 특정 내부 리보솜 출입 부위(IRES) 서열을 이용할 수 있다. 이와 같은 IRES 서열은 RS 바이러스 포장을 간섭하지 않을 정도로 짧아야 한다. 따라서, 이와 같은 비시스트론 방식에 선택되는 IRES는 길이가 500개 뉴클레오티드 보다는 짧아야 하고, 적절하게는 250개 정도 미만이 되어야 한다. 또한, 이용되는 IRES는 피코바이러스 성분과 서열 또는 구조적으로 상동성을 공유하지 않아야 한다. 적절한 IRES 요소에는 포유류 BiP IRES 및 간염 C 바이러스 IRES를 포함하나 이에 국한되지는 않는다.

### 5.2. 재조합 RNA 주형을 이용한 이형 유전자 생성물의 발현

상기에서 설명한 것과 같이 준비된 재조합 주형을 다양한 방식으로 이용하여 이형 유전자 생성물을 발현하는 키메라 바이러스를 만들거나 적절한 숙주 세포에서 이형 유전자 생성물을 발현시킨다. 한 구체예에서, 재조합 주형은 나중에 정제시킨 바이러스 폴리메라제 복합체와 복합되어, 감염성이 있는 rRNPs를 만든다. 이를 위해, 재조합 주형은 바이러스 폴리메라제 복합체 존재하에 전사시킨다. 또는 재조합 주형은 재조합 DNA 분자를 이용하여 준비한 바이러스성 폴리메라제 복합체 존재하에서 전사시키거나 혼합시킨다(Kingsbury et al., 1987, Virology 156:396-403). 또 다른 구체예에서, 재조합 주형을 이용하여, 적절한 숙주 세포를 트랜스펙트시켜, 이형 유전자 생성물을 상당 수준으로 발현시킨다. 상당한 발현 수준을 제공하는 숙주 세포 시스템에는 RSV에 감염된 세포주와 같은 바이러스 기능을 제공하는 연속성 세포주, RSV 바이러스 기능을 보충하도록 조작된 세포주등이 포함된다.

### 5.3. 키메라 네가티브 가닥 RNA 바이러스 준비

키메라 바이러스를 준비하기 위해, 변형된 RSV RNA 또는 외부 단백질을 코딩하는 RNA를 포함하는 재구성된 RNP를 이용하여, '모' RSV 바이러스로 또한 감염된 세포에 트랜스펙트시킨다. 또는, 재구성된 RNP 준비물은 야생형 모 바이러스의 RNP와 혼합시키거나 직접 트랜스펙션시킨다. 다시 모은 후에, 신규한 바이러스를 분리하여, 하이브리드 반응 분석을 통하여 이들의 게놈을 확인하였다. 감염성 키메라 바이러스 생산을 위해 여기에서 설명하는 방식에 추가하여, rRNPs는 RSV 또는 인플루엔자 바이러스성 폴리메라제 단백질을 발현시킬 수 있는 숙주 세포 시스템(가령, 바이러스/숙주 세포 발현 시스템; 폴리메라제 단백질을 발현시키도록 조작된 형질변환된 세포주)에서 복제시킬 수 있고, 감염성 키메라 바이러스를 회수하고, 이 경우, 헬퍼 바이러스를 이용할 필요는 없는데, 그 이유는 발현되는 바이러스 폴리메라제 단백질이 이와 같은 기능을 제공하기 때문이다. 특히 바람직한 구체예에서, 모두 8개 인플루엔자 바이러스 단편에 대해 조작된 rRNPs에 감염된 세포는 원하는 유전자형을 포함하는 감염성 키메라 바이러스를 생산하고, 이대 선별 시스템은 필요없게 된다.

이론적으로는, RSV의 유전자중 하나를 또는 일부분을 외부 서열로 대체시킬 수 있다. 그러나, 결손 바이러스를 증식시키기 위해서는 필수적인 부분이 필요한데 그 이유는 정상적인 바이러스 유전자 생성물이 결손되었거나 변형되었기 때문이다. 이와 같은 문제를 해결할 수 있는 여러 가지 가능한 방법이 있다.

재조합 바이러스를 증식시키는 3번째 방법은 야생형 바이러스와 공동 배양하는 것이다. 이는 간단히 재

조합 바이러스를 취하고, 야생형 바이러스(적절하게는 백신 균주)를 세포에 공동에 감염시키는 것과 관계된다. 야생형 바이러스는 결손 바이러스 유전자 생성물에 상보적이고, 야생형 및 재조합 바이러스 모두 다 성장시킬 수 있다. 이는 인플루엔자 바이러스의 결손-방해 입자를 증식시키는 상황과 유사하다(Nayak et al., 1983, In: Genetics of Influenza Viruses, P. Palese and D. W. Kingsbury, eds., Springer-Verlag, Vienna, pp. 255-279). 결손-방해 바이러스의 경우에, 조건은 증식된 바이러스의 대부분이 야생형 바이러스보다는 결손 입자가 되도록 변형시킨다. 따라서, 이와 같은 방법은 고역가의 재조합 바이러스 원액을 만드는데 유용하다. 그러나, 이와 같은 원액에는 필수적으로 일부 야생형 바이러스를 포함한다.

또는, 합성 RNPs는 RS 바이러스 폴리메라제 단백질을 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스에 공동 감염된 세포에서 증식될 수 있다. 사실, 이 방법을 이용하면, 본 발명에 따른 재조합 감염성 바이러스를 회수할 수 있다. 이를 위해서, RSV 바이러스 폴리메라제 단백질은 임의 발현백터/숙주 세포 시스템에서 발현될 수 있는데, 예를 들면, 바이러스 발현 백터(가령, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 벡로바이러스등), 또는 폴리메라제 단백질을 발현시키는 세포주등이 된다(see Krystal et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2709-2713).

#### 5.4. 감쇠된 표현형을 가지는 키메라 바이러스 생성

본 발명의 방법을 이용하여 돌연변이 또는 이형 서열을 도입시켜, 키메라 감쇠된 바이러스를 만들어, RSV를 분자 생물학적으로 분석, 병인성, 성장 및 감염성 성질등의 다양한 용도에 사용한다. 본 발명의 방법에 따르면, 돌연변이 또는 이형 서열은 F 또는 G 단백질 코딩 서열, NS1, NS2, M1ORF1, M2ORF2, N, P, L 코딩 서열로 도입시킬 수 있다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 특정 바이러스 유전자 EH는 이의 발현을 제거하여, 표현형이 감쇠시키는데, 예를 들면 M ORF는 RSV 게놈으로부터 제거하여, 표현형이 감쇠된 재조합 RSV를 만든다. 또 다른 구체예에서, 사람 RSV의 개별적인 내부 유전자는 또 다른 균주에 상응하는 부분으로 대체하거나 소 또는 유린의 상응하는 부분으로 대체할 수 있다. 예를 들면, NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2)의 한가지 이상 일부 또는 전부, L 유전자, G 유전자, F 유전자등이 포함된다. RSV 게놈에는 침투에 필요한 세 가지 막 단백질, G 단백질, 융합 F 단백질; 작은 SH 단백질; 뉴클레오티드 단백질 N, P, L; 두 개의 비-구조 단백질 NS1, NS2를 인코딩하는 10개 mRNA를 포함한다. 단백질중 한 가지가 표적이 되어 감쇠된 표현형을 만들 수 있다. 감쇠된 표현형을 만드는데 이용되는 다른 돌연변이는 리더 및 트레일러 서열에 삽입, 결손, 부위-직접적인 돌연변이가 된다.

본 발명에 따르면, 감쇠된 RSV는 야생형과 비교하였을 때 실제 독성이 낮고, 성장 속도도 낮아, 면역화된 개체에서는 바이러스 감염 중후가 발생되지 않는다.

본 발명에 따르면, 감쇠된 재조합 RSV는 단일 뉴클레오티드 변화, 부위-특이적인 돌연변이, 삽입, 치환, 결손 또는 재배열등을 포함하는 광범위한 돌연변이에 의해 만들어진다. 이와 같은 돌연변이는 RSV 게놈의 작은 부분 가령, 15 내지 30개 뉴클레오티드 또는 RSV의 많은 부분, 50 내지 1000 뉴클레오티드에 영향을 주는데, 이는 돌연변이의 성질에 따라 달라진다. 또 다른 구체예에서, 돌연변이는 기존의 시스-작용 조절 원소의 상류 또는 하류에 도입되어, 이의 활성을 제거하여, 표현형이 감쇠된다.

본 발명에 따르면, 바이러스의 비-코딩 조절 부분을 변형시켜, 임의 바이러스 유전자를 하향 조절시키는데, 가령, 이의 mRNA 전사를 감소시키거나 또는 vRNA (viral RNA)의 복제를 감소시켜, 감쇠된 바이러스가 생성된다.

바이러스 유전자의 복제의 하향 조절 및 바이러스 유전자의 전사 하향 조절을 일으키는 바이러스 게놈의 비-코딩 조절 부분을 변형시키면, 각 복제 과정에서 결손 입자가 생성되는데, 완전하게 감염성을 가지는 병인성 바이러스에 요구되는 바이러스 단편의 완전한 보체보다 적게 포장된 바이러스등의 입자를 말한다. 따라서, 변형된 바이러스는 감쇠된 성질을 가지는데, 이때 바이러스는 각 복제 과정에서 야생형 보다 더 결손된 입자를 가진다. 그러나, 각 과정에서 합성된 단백질의 양이 야생형 및 결손 입자의 것과 유사하기 때문에, 이와 같은 감쇠된 바이러스도 우수한 면역 반응을 유도할 수 있는 능력이 있다.

상기 방법은 분할된 바이러스 및 비-분할 바이러스에 동일하게 적용할 수 있는데, 바이러스 유전자의 전사가 하향 조절되면, 이의 mRNA 및 인코딩된 유전자 생성물의 생산도 감소된다. 바이러스 유전자가 캡시드, 매트릭스, 표면 또는 외피 단백질을 인코딩하는 경우에, 복제 과정에서 만들어지는 입자의 수가 감소되어, 변형된 바이러스는 감쇠된 성질을 가지는 것으로 역가가 임상적 이하 수준의 감염을 이루어진다. 가령, 바이러스 캡시드 발현이 감소되었다는 것은 복제하는 동안에 뉴클레오패시드 포장 수가 감소되었고, 반면에 외피 단백질 발현의 수가 감소되었다는 것은 후손 비리온의 수 또는 감염성이 감소되었다는 것을 말한다. 또는, 복제에 요구되는 바이러스 효소(가령, 폴리메라제, 복제효소, 헬리카제 등) 발현이 감소되었다는 것은 복제하는 동안에 발생하는 후손 게놈의 수가 감소되었다는 것을 말한다. 복제하는 동안에 만들어지는 감염성 입자의 수가 감소되었기 때문에, 변형된 바이러스는 성질이 감쇠되었다는 것을 말한다. 그러나, 생성된 항원성 바이러스 입자의 수는 상당한 면역 반응을 유도하는데에는 충분하다.

감쇠된 바이러스를 조작하는 또 다른 방법은 변형을 도입시키는 것이는데, 이는 바이러스 단백질 한 가지 이상에 한 가지 이상의 아미노산 잔기 또는 에피토프의 삽입, 결손, 치환등이 포함되나 이에 한정시키지는 않는다. 이는 상응하는 바이러스 유전자 서열로 적절히 변형시켜 만들 수 있다. 바이러스 복제를 변형시키거나 감소시켜, 바이러스 단백질의 활성을 변화시키는 임의 변화는 본 발명에 따라 실시할 수 있다.

예를 들면, 숙주 세포 수용체에 바이러스가 부착하는 것을 간섭하나 완전하게 방해하지 않게 하여 감염이 이루어지는 변형은 이 과정에 관련된 바이러스 프로테아제 또는 바이러스 표면 항원에 실시하여, 감쇠된 균주를 만든다. 이와 같은 구체예에 따르면, 바이러스 표면 항원을 변형시켜, 숙주 세포 수용체에 바이러스 항원의 결합 친화력을 감소시키거나 간섭하는 한 가지 이상의 아미노산 또는 에피토프의 삽입, 치환, 결손등의 변형이 있다. 이와 같은 방법은 여러 가지 장점을 제공하는데, 외부 에피토프를 발현시키는 키메라 바이러스는 감쇠된 성질을 가진다. 이와 같은 바이러스는 살아있는 재조합 백신으로 이용할 수 있는 이상적인 물질이 된다. 예를 들면, 본 발명의 키메라 바이러스안에 포함될 이형 유전자 서열에



는 사람 면역결핍 바이러스(HIV) gp120; 간염 B 바이러스 표면 항원(HB sAg); 허피스 바이러스의 당단백질(가령, gD, gE); 폴리오바이러스의 VP1; 박테리아 및 기생충과 같은 비-바이러스성 병인균의 항원성 결정 부위가 되나 이에 국한시키지는 않는다.

이에 대해, RSV는 외부 에피토프를 만들 수 있는 이상적인 시스템인데, 그 이유는 백시니아와 같은 다른 바이러스 벡터를 이용할 때 부딪히는 숙주 저항성 또는 면역 내성등의 문제를 피하면서 키메라 바이러스를 작제할 수 있는 수천가지 바이러스 변이체를 선택할 수 있기 때문이다.

또 다른 구체예에서, 바이러스 단백질을 처리하는 공정에 요구되는 바이러스 프로테아제를 변경시키면, 감쇠를 만들 수 있다. 효소 활성에 영향이 적은 변형 및 효소가 프로세싱에 효과가 적도록 하는 변형은 바이러스 감염성, 포장에 영향을 주고, 감쇠된 바이러스 생산을 위한 방출에도 영향을 준다.

또 다른 구체예에서, 바이러스 복제 및 바이러스 유전자에 전사에 관련된 바이러스 효소 가령, 바이러스 폴리메라제, 복제효소, 헬리카제등을 변형시켜, 효소의 효과를 감소시키거나 활성을 줄일 수 있다. 이와 같은 효소 활성이 감소되면, 후손 계능 및 바이러스 전사체 생산이 적어지고, 복제하는 동안에 감염 입자가 더 적게 만들어진다.

임의 바이러스 효소에 변형되는 방법으로는 분자의 활성 부위의 아미노산 서열에 삽입, 결손, 치환등이 포함되나 이에 국한되지는 않는다. 가령, 효소의 결합 부위를 변형시켜, 기질에 대한 결합 친화력을 감소시켜, 효소의 특이성이 감소되거나 효과를 줄일 수 있다. 가령, 표적 선택은 바이러스 폴리메라제 복합체가 되는데, 모든 폴리메라제 단백질에는 온도 감응성 돌연변이가 있기 때문이다. 따라서, 이와 같은 온도 감응성과 연관된 아미노산 부위에 변화를 도입시키면 바이러스 폴리메라제 유전자에 변화가 생겨, 감소된 균주가 생성된다.

#### 5.4.1. 감쇠용 표적으로 RSV L 유전자

본 발명에 따르면, RSV L 유전자는 감소된 표현형을 가지는 재조합 RSV를 만드는 중요한 표적이 된다. L 유전자는 전체 RSV 게놈의 48%가 된다. 본 발명에는 RSV L 유전자에 한정된 돌연변이 또는 무작위 돌연변이를 가지는 L 유전자 돌연변이를 만드는 것을 포함한다. 당분야에 공지된 임의 기술을 이용하여, RSV L 유전자에 한정된 또는 무작위 돌연변이를 만들 수 있다. 일단 돌연변이가 유도되면, db의 cDNA 돌연변이의 기능을 *in vitro*에서 미니게놈 복제 시스템을 이용하여 스크리닝하고, 회수된 L 유전자 돌연변이체는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 추가로 분석하였다.

다음의 과정은 감쇠된 표현형을 가지는 돌연변이체를 만드는데 이용되는 방법을 예로 든 것이다. 또한, 다음은 L 유전자만 예로 든 것이나, 다른 RSV 유전자에도 적용시킬 수 있다.

감쇠된 표현형을 가지는 돌연변이체를 만드는 한 가지 방법은 스캐닝 돌연변이 생성 방법을 이용하는 것으로 전하를 가진 아미노산 덩어리를 알라닌으로 돌연변이시키는 것이다. 이와 같은 방법은 기능을 하는 도메인을 표적으로 하는 경우에 특히 효과가 있는데, 그 이유는 전하를 띠는 아미노산 덩어리는 단백질 구조내에 묻혀있지 않는 것으로 나타났기 때문이다. 전하를 띤 아미노산을 보존성 치환체, 가령, 중성 아미노산, 가령, 알라닌으로 치환시키면, 단백질의 구조에는 큰 변화가 없으나, 단백질의 기능을 하는 도메인의 활성을 변경시킨다. 따라서, 전하를 띤 덩어리를 파괴시키면, 단백질이 다른 단백질과 상호작용하는 능력이 간섭을 받아서, 돌연변이된 단백질 활성이 열감응성으로 되어, 열감응성 돌연변이체를 만든다.

전하를 띤 아미노산 덩어리는 길이가 5개 아미노산으로 되는데, 이때 적어도 2개 이상의 잔기가 전하를 가진 잔기가 된다. 스캐닝 돌연변이 생성 방식에 따르면, 덩어리에 있는 모든 전하를 띤 잔기를 부위-직접적인 돌연변이를 이용하여 알라닌으로 돌연변이시킨다. RSV L 유전자의 큰 부위 때문에, 전하를 띤 많은 잔기 덩어리가 있다. L 유전자내에, 4개의 연속하는 전하를 띤 잔기가 적어도 두 덩어리, 세 개의 연속하는 전하를 띤 잔기가 적어도 17개 덩어리가 있다. 이들 각 덩어리에 전하를 띤 잔기중 적어도 2 내지 4개는 알라닌과 같은 중성 아미노산으로 치환된다.

감쇠된 표현형을 가지는 돌연변이체를 만드는데 이용되는 또 다른 방식에서, 시스테인을 글리신 또는 알라닌과 같은 아미노산으로 돌연변이시키는 스캐닝 돌연변이 방법을 이용한다. 이와 같은 방법은 잔자내 및 분자간의 결합 형성에서 시스테인의 역할을 이용한 것으로 시스템을 또 다른 잔기 즉, 보존성 치환기 가령, 발린 또는 알라닌으로 치환이나, 급격한 치환, 가령, 아스파르트산으로 치환, 단백질의 안정성 및 기능의 변형등이 있는데, 이는 단백질의 3차 구조를 변형시키는 것이다. RSV L 유전자에는 대략 39개 시스테인 잔기가 있다.

또 다른 방식에서, RSV L 유전자의 무작위 돌연변이 생성은 전하를 띤 잔기 또는 시스테인을 이용한 잔기에 해당안되는 단기를 포함한다. RSV L 유전자는 매우 크기 때문에, 이와 같은 방법은 PCR 돌연변이 생성에 의해 L 유전자의 큰 cDNA 단편을 돌연변이시켜 이루어진다. 이와 같은 돌연변이체의 기능은 미니게놈 복제 시스템에 의해 스크리닝될 수 있고, 회수된 돌연변이체는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 추가 분석하였다.

#### 5.5. 키메라 바이러스를 이용한 백신 제조물

백신으로 이용하기 위해 임의 이형 유전자 서열을 키메라 바이러스안에 작제시킬 수 있다. 적절한 구체예에서, 본 발명은 RSV-A 및 RSV-B에 대해 보호를 할 수 있는 이가 RSV 백신에 관계한다. 이와 같은 백신을 조제하기 위해, RSV-A 및 RSV-B 소단위 항원성 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 키메라 RS 바이러스를 이용한다. 또 다른 적절한 구체예에서, 본 발명은 RSV 및 인플루엔자에 대해 보호할 수 있는 이가 백신에 관계한다. 이와 같은 백신을 만들기 위해, RSV 및 인플루엔자의 항원성 폴리펩티드를 발현시키는 키메라 RS 바이러스를 이용한다.

적절하게는 다양한 병인균에 대해 보호성 면역 반응을 유도할 수 있는 에피토프 또는 중화 항체에 결합할 수 있는 항원을 키메라 바이러스에 의해 또는 이의 일부로 발현시킨다. 예를 들면, 백신으로 이용할 수 있는 본 발명의 키메라 바이러스안으로 작제되는 이형 유전자 서열에는 사람의 면역결핍 바이러스(HIV),

적절하게는 타입 1 또는 2에서 유도된 서열을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다. 적절한 구체예에서, 항원 소스로 이용되는 면역원성 HIV-유도된 펩티드는 키메라 인플루엔자 바이러스내에 작제되어, 척추동물의 면역 반응을 유도하는데 이용할 수 있다.

이와 같은 HIV-유도된 펩티드에는 env 유전자(가령, gp160, gp120, gp41의 전부 또는 일부를 인코딩하는 서열), pol 유전자(가령, 역 전사효소, 엔도뉴클레아제, 프로테아제, 인테그라제의 일부 또는 전부를 인코딩하는 서열), gag 유전자(가령, p7, p6, p55, p17/18, p24/25의 일부 또는 전부를 인코딩하는 서열), tat, rev, nef, vif, vpu, vpr, vpx등이 포함되나 이에 국한되지는 않는다.

다른 이형성 서열은 간염 B 바이러스 표면 항원(HBsAg)에서 유도되거나; 허피스 바이러스(가령, gD, gE)의 당단백질; 폴리오바이러스의 VP1; 박테리아 및 기생충과 같은 비-바이러스성 병원균의 항원성 결정부위에서 유도된다. 또 다른 구체예에서, 이류노글로블린 유전자의 전부 또는 일부가 발현될 수 있다. 예를 들면, 이와 같은 에피토프를 흉내내는 항-이디오타입 이류노글로블린의 다양한 부분이 본 발명의 키메라 바이러스내에 작제될 수 있다.

살아있는 재조합 바이러스 백신 또는 비활성 재조합 바이러스 백신이 조제될 수 있다. 살아있는 백신이 더 바람직한다, 그 이유는 숙주에서 다중복제로 인하여, 천연 감염에서 발생하는 것과 유사한 종류 및 크기의 자극이 장시간 유도되고, 따라서, 실제 오랫동안 면역성을 지속시킬 수 있다. 이와 같은 살아있는 재조합 바이러스 백신 조제물을 생산하는 것은 세포 배양물 또는 병아리 배의 알란토이스(allantois)에서 바이러스의 증식과 관련된 통상의 방법을 이용하고, 정제한다.

이에 대해, 백신을 위해 유전학적으로 조작된 RSV를 이용하면, 이들 균주에 감쇠 특징이 존재해야 한다. 사람에게 이용할 수 있는 현재 살아있는 바이러스 백신 추천물질은 저온-계대, 온도 감응성어어서, 조류 바이러스로부터 몇 가지 유전자(6개)를 유도하는데, 이들은 감쇠된 것이다. 트랜스펙션에 이용되는 주형으로 적절한 돌연변이(결손)를 도입하면, 감쇠된 성질을 가지는 신규한 바이러스를 제공하게 된다. 예를 들면, 온도 감응성 또는 저온 적응과 연관된 특이적인 미스센스 돌연변이는 결손 돌연변이에 만들 수 있다. 이와 같은 돌연변이는 저온 또는 온도-감응성 돌연변이와 연관된 점 돌연변이보다는 좀더 안정적이고, 역전 빈도는 상당히 낮다.

또는, 자살['suicide'] 특징을 가지는 키메라 바이러스를 작제할 수도 있다. 이와 같은 바이러스는 숙주에서 1회 또는 수회 복제를 할 수 있다. 백신으로 이용할 경우에, 재조합 바이러스는 단일 복제 과정을 거치고, 충분한 면역 반응을 유도할 수 있지만, 사람 숙주에서는 질병을 일으키지는 않는다. 필수 RS 바이러스 유전자중 한 가지 이상이 부족한 재조합 바이러스는 성공적으로 복제과정을 할 수 없다. 이와 같은 결손 바이러스는 이와 같은 유전자를 영구적으로 발현시킬 수 있는 세포주로 특정 유전자가 결손된 재구성된 RNPs를 공동 트랜스펙션시켜 만든다. 필수 유전자가 결손된 바이러스는 이와 같은 세포주에서 복제될 수 있지만, 숙주 세포에 투여할 때 완전한 복제를 할 수는 없다. 이와 같은 조제물은 미성숙과정에서 면역 반응을 충분히 유도할 수 있는 충분한 수의 유전자를 전사 및 해독시킨다. 또는, 더 많은 양의 균주를 투여할 수도 있는데, 이와 같은 준비물은 비활성(죽은) 바이러스 백신으로 작용한다. 비활성 백신의 경우에는 이형 유전자 생성물이 바이러스 성분으로 발현되어, 유전자 생성물은 비리온과 연합된다. 이와 같은 조제물의 장점은 고유 단백질을 포함하나, 죽은 바이러스 백신을 제조하는데 이용되는 포르말린 또는 다른 물질로 처리하여 비활성화 과정을 하지 않는다는 것이다.

본 발명의 또 다른 구체예에서, 키메라 바이러스를 죽이는 통상의 기술을 이용하여 비활성화된 백신 조제물을 만든다. 비활성화된 백신은 이들의 감염성이 파괴되었다는 의미에서 '죽음'을 말하는 것이다. 이 상적으로는 바이러스의 감염성은 이들의 면역원성에는 영향을 주지 않고, 파괴되었다. 비활성 백신을 준비하기 위해, 키메라 바이러스를 세포 배양물 또는 병아리 배 알란토이스에 성장시키고, 구역 한외원심분리에 의해 정제하고, 포르말데히드 또는  $\beta$ -프로피오락톤으로 비활성화시키고, 모은다. 생성된 백신을 근육내로 통상 접종하였다.

비활성화된 백신은 면역 반응을 강화시키기 위해 적절한 어쥬번트와 함께 조제한다. 이와 같은 어쥬번트로는 미네랄 겔(수산화 알루미늄); 표면 활성 물질(가령, 리소레시틴, 플로로닉 폴리올, 폴리안이온); 펩티드; 오일 에멀전; BCG 및 코리네박테리움 파르툼과 같은 유용한 사람 어쥬번트 등이 포함되나 이에 한정시키지는 않는다.

상기에서 설명하는 백신 조제물을 도입시키는 방법은 다양한데, 예를 들면, 구강, 피부아래, 근육내, 복막내, 정맥, 피하, 비강 경로등이 있으나, 이에 국한되지는 않는다. 백신의 고안 목적이 되는 병원 감염 천연 경로를 통하여 키메라 바이러스 백신 조제물을 도입시키는 것이 바람직하다. 살아있는 키메라 바이러스 백신 조제물을 이용하는 경우에는 인플루엔자 바이러스의 천연 감염 경로를 통하여 조제물출 도입시키는 것이 적절하다. 강한 분비 및 세포 면역 반응을 유도하는 RSV 및 인플루엔자 바이러스의 능력을 유익하게 이용한다. 예를 들면, 키메라 RSV 또는 인플루엔자 바이러스를 호흡기 감염시키면, 비노-생식기에 강한 분비성 면역 반응을 유도할 수 있고, 동시에 특정 질병을 일으키는 물질에 대해 보호한다.

다음은 실시예로 설명하는 것으로, RSV를 이용하여 네가티브 가닥 RNA 바이러스 계통을 조작하는 것을 설명하는데, 이는 이형 유전자 발현을 위해 키메라 바이러스 생성, 백신화를 위해 감염성 바이러스 입자 및 감쇠된 바이러스 입자를 만드는 본 발명의 방법을 설명한다.

#### 6. 특정 재조합 DNA에서 유도된 RNA를 이용하여 감염성 호흡기 합체 바이러스(RSV)의 구조

이 실시예에서는 상기 단락 5에서 설명한 것과 같은 안전하고 감염성이 있는 RSV로 전체 RSV RNA를 코딩하는 재조합 cDNAs에서 유도된 감염성 호흡기 합체 바이러스(RSV)dm1 구조 과정을 설명한다. 여기에서 설명하는 방법은 오르소믹소바이러스, 파라믹소바이러스(센다이 바이러스), 파라인플루엔자 바이러스 타입 1-4, 뎀프(mumps), 뉴우캐슬병 바이러스와 같은 분할 및 비-분할 RNA 바이러스; 모르빌리바이러스(홍역); 개 디스토퍼 바이러스, 린더페스트 바이러스; 뉴모바이러스(호흡기 합체 바이러스); 라브도바이러스(광견병, 베시쿨로바이러스, 베시쿨라 소차티티스 바이러스)등이 포함되는데 이에 한정되지는 않는다. 이 공정을 이용하여, 외부 유전자를 발현시킬 수 있는 키메라 RSV 바이러스를 생산하는데, 이때 외부 유전자는 RSV에 대해 비-고유 유전자 즉, HIV env 단백질과 같은 다른 바이러스성 단백질이 포함된다. 키

메라 RSV를 생산하기 위한 또 다른 방법은 하기에서 추가로 설명될 기존의 고유 RSV 유전자를 변형시키는 것이다. 따라서, 이 실시예에는 RSV 병인성에 관련된 감쇠에 이과정을 이용하는 것을 설명하여, 사람에게 이용할 수 있는 생물학적 성질을 가지는 백신을 생산할 수 있다.

전체 RSV RNA 게놈에 관련된 구조 과정의 첫 단계는 RSV 균주 A2의 15kb 게놈 전체 길이를 합성하는 것이다. 1kb-3.5kb 길이의 서브-게놈 이중 가닥 cDNA를 접합하여, 완전한 게놈 cDNA를 만들면 된다. 게놈 cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 결정하면, 어셈블리 과정동안에 생기는 오류를 확인할 수 있고, 오류는 부위-직접 돌연변이로 수정하거나 화학적으로 합성된 이중 가닥 DNA의 일부를 오류 부분에 치환시켜 수정한다. 어셈블리 후에, 게놈 DNA는 한 단부에 전사 프로모터(가령, T7 프로모터)에 인접하게 위치시키고, 다른 단부에는 전사 종료를 위한 DNA 서열(가령, 특이적인 엔도뉴클레아제 또는 리보자임)을 두어, *in vitro* 또는 배양된 세포에서 완전한 바이러스 게놈의 (+)(-)센스 RNA 복사체를 합성하도록 한다. 리더 또는 트레일러 서열에는 원하는 바에 따라 추가 서열을 포함할 수 있는데, 가령, 인접 리보자임 및 무작위 T7 전사 종료 물질 등이 된다. 리보자임은 간염 델타 바이러스 리보자임이거나 헴머헤드 리보자임이 되고, 이는 비-바이러스성 뉴클레오타이드의 3' 말단을 만드는 기능을 한다.

본 발명의 특징에 따르면, 고유 RSV 게놈 서열에 돌연변이, 치환 또는 결손을 만들어 RSV 프로모터 활성을 증가시킬 수 있다. 출원인은 RSV 프로모터 활성이 증가하는 경우에도, RSV 구조 효과가 상당히 증가되어, 돌연변이를 가지는 전체 길이의 RSV cDNA에서 감염성 RSV 입자를 구조할 수 있다고 설명한다. 특히, 게놈의 4번 위치 점 돌연변이(C에서 G)로 인하여, 프로모터 활성이 몇 배 증가되었고, 돌연변이를 가지는 전체 길이 RSV cDNA에서 감염성 바이러스 입자 구조도 몇 배 증가되었다.

구조 과정은 전체 길이 RSV 균주 A2 게놈 RNA의 상호작용을 이용하는데, 이는 배양된 세포내부에 있는 헬퍼 RSV 소단위 B 바이러스와 함께 작제된 cDNA에서 전사된 것이다. 여러 가지 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들면, RSV 균주 A2에서 전체 길이의 바이러스 게놈 RNA를 *in vitro*에서 전사하고, RSV 균주 B9320 감염된 세포 가령, 293 세포로 표준 트랜스펙션 과정을 이용하여 트랜스펙션시킨다. 또한, RSV 균주 A2의 *in vitro* 전사된 게놈은 안정적으로 합체된 바이러스 유전자로부터 필수적인 RSV 균주 A2 단백질을 발현시키는 세포주로 트랜스펙션시킨다(헬퍼 바이러스가 없는 경우).

또는, *in vitro* 전사된 바이러스 게놈 RNA(RSV 균주 A2)는 필수 헬퍼 RSV 균주 A2 단백질 특히, N, P, L, M2-ORF1 단백질을 발현시키는 이형 바이러스로 감염된 세포(특히, 백시니아 바이러스)에 트랜스펙션시킨다. 또한, *in vitro* 전사된 게놈 RNA는 T7 폴리메라제를 발현시키는 백시니아 바이러스와 같은 이형 바이러스에 감염된 세포에 트랜스펙션시키는데, 이는 헬퍼 N, P, L, M2/ORF1 유전자를 포함하는 트랜스펙션된 플라스미드 DNA에서 헬퍼 단백질을 발현시킬 수 있다.

*in vitro* 전사된 게놈 RNA의 트랜스펙션에 또 다른 것으로는 전체 RSV cDNA 구조체를 포함하는 플라스미드 DNA를 이형 바이러스에 감염된 세포에 트랜스펙션시키는데, 가령, 이형 바이러스로는 필수적인 헬퍼 RSV 균주 A2 단백질 및 T7 폴리메라제를 발현시키는 백시니아 바이러스가 되어, RSV cDNA 구조체를 포함하는 플라스미드 DNA로부터 전체 RSV 게놈 RNA의 전사를 가능하게 한다. 그러나, 백시니아 바이러스는 헬퍼 단백질 자체 및 T7 폴리메라제의 공급을 필요로 하지 않기 때문에, 헬퍼 단백질은 N, P, L, M2/ORF1 유전자를 포함하는 트랜스펙션된 플라스미드로부터 이들의 고유 T7 프로모터에 인접한 적절한 위치에 발현될 수 있다.

복제 바이러스는 구조 실험동안에 헬퍼 기능을 제공하기 때문에, RSV의 B9320 균주를 이용하여, RSV B9320에 대한 후손 구조를 차등화시킬 수 있다. 구조된 RSV 균주 A2는 구조하기 전에 RSV 게놈의 cDNA 복사체에 삽입된 특이적인 '표식' 서열 존재로 양성적으로 확인될 수 있다.

고유의 야생형 RSV 균주 A2에 대한 구조 시스템의 확립으로 고유 RSV와 어느 정도 유사한 방식으로 이형 서열을 포함하는 키메라 RSV를 작제하기 위해 RSV 게놈의 cDNA 복사체안으로 도입되도록 변형을 허용하여, 생성된 구조 바이러스는 병인성이 감쇠되어, 단란 5.4에서 논의한 바와 같은 안전하고 효과적인 사람 백신을 제공한다. 바이러스 감쇠를 일으키는데 요구되는 유전자 변형이 크거나(가령, 바이러스 게놈안에 전체 유전자 또는 조절 서열의 전치) 또는 작을 수 있다(가령, 바이러스 게놈안에 주요 조절 또는 기능 도메인에 단일 또는 다중 뉴클레오타이드 치환, 추가 결손).

이형 서열을 제공하기 위해 RSV 유전적 물질의 변형에 추가하여(전치로 인한 변형을 포함), 이 공정은 '외부' 유전자(가령, RSV에 고유적인 유전자가 아닌 유전자) 또는 이의 유전자 성분의 삽입을 허용하여, 이와 같은 유전자 성분의 발현으로 인하여 생물학적 기능 또는 항원성을 나타내거나, 이와 같은 방식에서 변형된 키메라 RSV는 리보자임, 항-센스 RNA, 특이적인 올리고리보뉴클레오타이드와 같은 예방 또는 치료 능력을 가지는 다른 이형 단백질 또는 유전자 물질 또는 백신 목적으로 다른 바이러스 단백질의 발현 시스템으로 기능을 할 수 있다.

#### 6.1.1. 헬퍼 바이러스로 RSV 균주 B9320을 이용하여 RSV 균주 A2의 리더 및 트레일러 서열의 구조

이 실시예에서는 RSV 균주 A2 및 RSV 균주 B9320을 이용하였으나 이는 예시적인 것이다. 당업자는 RSV의 소단위 A 및 소단위 B 바이러스를 실시예의 기술에 따라 이용할 수 있을 것이다. 이와 같은 다른 균주를 이용하는 방법도 본 발명에 포함된다.

RSV 균주 A2 및 RSV 균주 B9320은 Hep-2 세포 및 Vero 세포에서 각각 생장시키고, 293 세포는 트랜스펙션 및 구조 실험동안에 숙주로 이용한다. 이들 세 가지 균주는 ATCC(Rockville, Maryland)에서 구하였다.

#### 6.1.2. 리포터 플라스미드의 작제 및 기능 분석

플라스미드 pRSVA2CAT(도 1)은 하기에서 설명하는 것과 같이 작제하였다.

RSV 균주 A2의 44개 뉴클레오타이드 리더 및 155개 뉴클레오타이드 트레일러 성분의 cDNAs, 박테리오파지 T7 폴리메라제의 프로모터 컨센스 서열을 포함하는 트레일러 성분은 부분적인 오버랩 상보성을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 어닐링으로 별도로 어셈블리하였다(see Mink et al., *Virology* 185:615-624 (1991); Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:9663-9667 (1991))(도 1참고). 어닐링에 이용된

올리고뉴클레오티드는 Applied Biosystems DNA 합성기(Foster City, CA)에서 합성하였다. 도 1에는 리더 및 트레일러 서열에 있는 별개 올리고뉴클레오티드 및 이들의 관련 위치를 나타내었다. 리더를 삭제하는데 이용되는 올리고뉴클레오티드는 다음과 같다;

1. 5'CGA CGC ATA TTA CGC GAA AAA ATG CGT ACA ACA  
AAC TTG CAT AAA C
2. 5'CAA AAA AAT GGG GCA AAT AAG AAT TTG ATA AGT  
ACC ACT TAA ATT TAA CT
3. 5'CTA GAG TTA AAT TTA AGT GGT ACT
4. 5'TAT CAA ATT CTT ATT TGC CCC ATT TTT TTG GTT  
TAT GCA AGT TTG TTG TA
5. 5'CGC ATT TTT TCG CGT AAT ATG CGT CGG TAC

트레일러를 삭제하는데 이용되는 올리고뉴클레오티드는 다음과 같다;

1. 5'GTA TTC AAT TAT AGT TAT TAA AAA TTA AAA ATC  
ATA TAA TTT TTT AAA TA
2. 5'ACT TTT AGT GAA CTA ATC CTA AAG TTA TCA TTT  
TAA TCT TGG AGG AAT AA
3. 5'ATT TAA ACC CTA ATC TAA TTG GTT TAT ATG TGT  
ATT AAC TAA ATT ACG AG
4. 5'ATA TTA GTT TTT GAC ACT TTT TTT CTC GTT ATA  
GTG AGT CGT ATT A
5. 5'AGC TTA ATA CGA CTC ACT ATA ACG A
6. 5'GAA AAA AAG TGT CAA AAA CTA ATA TCT CGT AAT  
TTA GTT AAT ACA CAT AT
7. 5'AAA CCA ATT AGA TTA GGG TTT AAA TTT ATT CCT  
CCA AGA TTA AAA TGA TA
8. 5'ACT TTA GGA TTA GTT CAC TAA AAG TTA TTT AAA  
AAA TTA TAT GAT TTT TA
9. 5'ATT TTT AAT AAC TAT AAT TGA ATA CTG CA

그 다음 완전한 리더 및 트레일러 cDNAs를 클로람페니콜-아세틸-트랜스퍼라제(CAT) 리포터 유전자의 XbaI 및 PstI에 각 결합시켜, 선형의 1kb RSV/CAT cDNA 구조체를 만든다. 이와 같은 cDNA 구조체는 pUC19의 KpnI 및 HindII 부위에 결합시킨다. 최종 pRSVA2CAT 구조체의 완전성은 XbaI/PstI 및 KpnI/HindII 절단 생성물의 크기를 겔 분석하여 확인하였다. 완전한 리더 및 트레일러 cDNAs를 적절한 제한효소 부위를 이용하여 그린 형광 단백질(GFP)에 결합시켜, 선형 cDNA 구조체를 만든다. 생성된 RSV-GFP-CAT는 CAT 및 GFP를 발현하는 비시스트론성 리포터 구조체가 된다.

In vitro 박테리오파아지 T7 폴리메라제와 HgaI에 의해 선형화된 pRSVA2CAT의 전사는 T7 공급 업체의 프로토콜에 따라 실행하였다(Promega Corporation, Madison, Wisconsin). 6개 웰 접시에 합류 293 세포(웰 당  $-1 \times 10^6$ )을 세포당 1pfu에서 RSV 균주 B9320에 감염시키고, 1시간 후에, pRSVA2CAT 구조체의 in vitro 전사된 RNA 5-10 $\mu$ g으로 트랜스펙션시킨다. 트랜스펙션 과정은 Collins et al., Virology 195:252-256(1993)에 따르고, 제조업자의 지시에 따라, Transect/ACT™ 및 Opti-MEM 시약을 이용하였다. 감염 후 24시간에 293 세포는 표준 과정(Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Chapter9.6.2; Gorman, et al., 1982) Mol. Cell Biol. 2: 1044-1051)을 이용하여 CAT 활성에 대해 검사하였다(Gibco-BRL, Bethesda, Maryland). CAT 활성이 상당히 높게 감지되면, RSV 균주 A2의 '리더' 및 '트레일러' 부분을 포함하고, CAT 유전자를 포함하는 in vitro에서 전사된 네가티브 센스 RNA가 막에 싸여 있고, RSV 균주 B9320에 의해 공급되는 단백질을 이용하여, 복제되고, 발현되었다는 것을 알 수 있다(도 2 참고). 이 실험에서 관찰된 CAT 수준은 상동성 RSV 균주 A2가 헬퍼 바이러스로 이용된 유사한 구조 실험에서 관찰된 만큼 높다는 것을 알 수 있다. 소집단 A RSV 균주 A2 RNA의 포집, 복제, 전사를 지원하기 위한 항원적으로 별개의 소단위 B RSV 균주 B9320의 능력에 대해서는 아직 정식으로 보고된 바 없다.

## 6.2. RSV의 완전한 계놈을 제시하는 cDNA의 삭제

cDNA 합성을 위한 주형을 얻기 위해, RSV 계놈 RNA(15,222개 뉴클레오티드로 구성)를 Ward et al., J. Gen. Virol. 64:167-1876 (1983)에서 설명하는 방법에 따라 감염된 Hep-2 세포로부터 정제하였다. RSV의

공개된 뉴클레오타이드 서열에 기초하여, 올리고뉴클레오타이드는 Applied Biosystems DNA 합성기를 이용하여 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 합성하여, 게놈 RNA 주형으로부터 제 1 및 제 2 가닥 cDNA를 합성하였다. 도 3에는 뉴클레오타이드 서열, RSV 게놈안에 cDNA 프라이머 및 주요 엔도뉴클레아제 부위의 위치가 표시되어 있다. 바이러스 게놈 RNA로부터 cDNA를 생산하는 것은 Perkin Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut(see also Wang et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9717-9721)의 역 전사.폴리메라제 사슬 연쇄 (RT/PCR) 과정에 따라 실행하였다; 증폭된 cDNAs는 아가로즈 겔의 적절한 DNA 밴드의 전기 용출에 의해 전제하였다. 정제된 DNA는 pCRII 플라스미드 벡터에 직접 결찰시키고(Invitrogen Corp. San Diego), 'One Shot E. coli 세포(Invitrogen) 또는 'SURE' E. coli 세포(Stratagene, San Diego)로 형질 도입시킨다. 표준 기술에 따라 생성된 클론된 바이러스 특이적인 cDNAs를 합체하여(Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, 1989), 전체 RSV 게놈에 이어지는 cDNA를 만든다. 전체 cDNA 게놈을 서열화시키고, 부정확한 서열은 부위-직접적인 돌연변이생성 또는 화학적으로 합성된 DNA에 의해 치환시킨다. 뉴클레오타이드 치환은 'F' 유전자의 염기 7291 및 7294(주;염기 번호는 게놈 RNA의 3' 말단에 시작되는 것을 1로 한다)에 도입시켜, 신규한 StuI 엔도뉴클레아제 부위를 만들고, 7423, 7424, 7425(F 유전자내에)에 도입시켜, 신규한 PmeI 부위를 만든다. 이와 같은 변화는 구조 과정을 위해 확실한 표식으로 이용하기 위함이다. 박테이로파지 T7 폴리메라제 및 HgaI 엔도뉴클레아제 부위는 바이러스 게놈의 반대 단부에 위치하여, in vitro에서 네 가티브 또는 포지티브 센스 바이러스 게놈이 합성되도록 한다. T7 폴리메라제 프로모터 서열 및 HgaI의 인지 서열을 가지는 cDNA를 Applied Biosystems DNA 합성기에서 합성하고, 바이러스 게놈의 cDNA의 말단을 별도로 결찰시키고 또는 이를 게놈 cDNA의 말단 부분 증폭하는 동안에 PCR 프라이머의 합체 부분으로 참가하였다. 후자의 경우는 게놈 cDNA의 말단 부근에 적절한 엔도뉴클레아제 부위가 없을 경우에 이용하여, 화학적으로 합성된 T7 프로모터/HgaI 부위 cDNA가 게놈 cDNA에 직접 결찰되지 않도록 한다. 이와 같은 완전한 구조(게놈 cDNA 및 인접하는 T7 프로모터/HgaI 인지 서열)를 Bluescript II SK 파아지미드(부위-직접적인 돌연변이에 의해 고유의 T7 프로모터는 제거함)(Stratagene, San Diego)의 KpnI/NotI 부위에 클론시킨다. 이와 같은 완전한 게놈으로부터 전사된 RNA는 RSV 소단위 B 혈퍼 바이러스를 이용하여 구조 함으로써, 실시예 6.1에서 설명하는 감염성 RSV를 제공한다. 완전한 고유('야생형 RSV A2 균주) 게놈 RNA의 이와 같은 기본적인 구조 시스템을 이용하여, 게놈의 cDNA 복사체에 다양한 변형을 도입시킬 수 있어, 게놈안으로 이형 서열을 도입시킬 수 있다. 이와 같은 변화는 바이러스 복제를 제한하지 않으면서 바이러스 병인성을 구조가 불가능하거나 바이러스 유전자 발현이 적절한 면역성을 유도하는데 불충분한 수준으로 감소시키도록 고안된 것이다.

다음의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 리보자임/T7 종료물질 서열을 작제하였다.

**5' GGT\*GGCCGGCATGGTCCCAGC**  
**3' CCA CCGGCCGTACCAGGGTGC**

**CTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACA**  
**GAGCGACCGCGGCCGACCCGTGTG**

**TTCCGAGGGGACCGTCCCCTCGGT**  
**AAGGCTCCCCTGGCAGGGGAGCCA**

**AATGGCGAATGGGACGTCGACAGC**  
**TTACCGCTTACCCTGCAGCTGTGC**

**TAACAAAGCCCGAAGGAAGCT**  
**ATTGTTTTGGGCTTCCTTCGA**

**GAGTTGCTGCTGCCACCGTTG**  
**CTCAACGACGACGGAGGCAAC**

**AGCAATAACTAGATAACCTTGGG**  
**TCGTTATTGATCTATTGGAACCC**

**CCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTCT**  
**GGAGATTTGCCAGAACTCCCAGA**

**TTTTGCTGAAAGGAGGAACTA**  
**AAAACGACTTTCCTCCTTGAT**

**TATGCGGCCGCGTCGACGGTA**  
**ATACGCCGGCGEAGCTGCCAT**

**CGGGGCCCGCCTTCGAAG3'**  
**GGCCCCGGGCGGAAGCTTC5'**

RSV의 완전한 게놈, T7 프로모터, 간염 델타 바이러스 리보자임, T7 종료물질을 포함하는 cDNA 클론을 만들었다. 이와 같은 구조를 이용하여 T7 폴리메라제 존재하에서 안티게놈성 RNA 또는 RSV를 in vivo에서 만들었다. 서열 분석에 따르면, 플라스미드에는 RSV 게놈에 있는 돌연변이를 거의 포함하지 않는다는 것을 알 수 있다.

#### 6.2.1. RSV 게놈의 변형

RSV RNA 게놈의 변형은 유전자 섞임과 같이 RSV의 유전자 구조의 방대한 변형으로 구성된다. 예를 들면, RSV N1 유전자는 게놈의 5'말단에 근접하게 위치하도록 정치되어, 바이러스 유전자 발현에 알려진 3'에서

5'방향으로의 장점을 가질 수 있고, 감염된 세포에서 M1 단백질 발현 수준이 감소되고, 바이러스 어셈블리 및 성숙 속도가 감소된다. 사람 또는 동물 기원의 다른 RSV 균주의 경우에 다른 유전자 또는 조절 부분이 적절하게 전치될 수 있다. 예를 들면, 사람의 소단위 B의 F 유전자( 및 'G' 유전자도 가능성이 있음)를 다른 RSV 균주의 A 게놈에 삽입할 수도 있다(RSV 균주 A, F, G 유전자에 대체하거나 이에 추가하여).

또 다른 방법에 있어서, RSV 바이러스 N 단백질의 RNA 서열은 이의 3'말단 부위에서 게놈의 5'말단에 근접한 위치로 옮겨질 수 있어, 이 또한 유전자 전사에서 3'에서 5'로의 방향의 장점을 가질 수 있어, 생산된 N 단백질의 수준을 줄일 수 있다. 생산된 N 단백질의 수준을 줄임으로써, RSV에 대한 숙주 면역원을 자극하는데 관련된 유전자의 전사의 관련 속도를 동시에 증가시키고, 게놈 복제의 관련 속도를 감소시킨다. 따라서, RSV N 단백질을 코딩하는 RSV RNA 서열을 전치시켜, 고유 RSV에 비해 병인성이 감소된 키메라 RS 바이러스가 생성될 수 있다.

감소된 RSV를 생산하는 또 다른 예시적인 전치 변형으로는 RSV의 L 단백질을 코딩하는 RSV RNA 서열을 전치하는 것으로 구성된다. RS 바이러스의 이와 같은 서열은 바이러스 폴리메라제 단백질 생산을 담당하는 것으로 보인다. L 단백질을 코딩하는 RSV 서열을 고유 5' 말단에서 게놈의 3'말단으로 전치시키면, 병인성이 감소된 키메라 RS 바이러스가 만들어질 것이다. 또 다른 예시적인 전치로는 RSV G 및 F 단백질을 인코딩하는 RSV RNA 서열의 위치를 바꿈(가령, 게놈에서 서로의 위치를 바꿈)으로써 생산되는 G 및 F 단백질의 양이 약간 변화되어, 병인성이 감소된 키메라 RSV를 얻을 수 있다. 이와 같은 설명된 유전자 혼란 변형은 고유의 RSV 시작 물질과 비교하였을 때 병인성이 감소된 키메라 변형된 RSV를 만들 수 있다. 전문한 인코딩된 단백질의 뉴클레오티드 서열은 전체 RSV 게놈에 대한 이의 뉴클레오티드 서열로 공지되어 있다(See McIntosh, Respiratory Syncytial Virus in Virology, 4th Ed. edited by B.N. Fields, D.M. Knipe et al., Raven Press, Ltd. New York, 1990 Chapter 38, pp 1045-1073, and references cited therein).

이와 같은 변형은 추가로 또는 선택적으로 RSV 게놈의 유전자 또는 조절 도메인내에 위치한 부위 특이적인 단일 또는 다중 뉴클레오티드 치환, 결손 추가등으로 구성된다. 이와 같은 부위-특이적인, 단일 또는 다중, 치환, 결손 또는 추가는 지나치게 감소시키지 않으면서 바이러스 병인성을 감소시키는데, 가령, F 단백질에 있는 절단 부위에 리신 또는 아르기닌 잔기의 수를 감소시켜 숙주 세포 프로테아제에 의해 이를 절단하는 효과를 감소시키고(이와 같은 절단은 F 단백질의 기능적인 활성화 과정에서 필수적인 단계로 간주됨), 따라서, 독성이 감소될 수 있다. RSV 게놈의 3' 또는 5' 조절 부위에 부위 특이적인 변형을 이용하여 게놈 복제를 희생시켜 전사를 증가시킬 수도 있다. 또한, N 단백질내에 도메인을 국소적으로 조작하면, 전사와 복제간에 전환을 조절하는 것으로 파악되어, 게놈 복제를 감소시킬 수 있고, 전사는 높은 수준으로 유지시킬 수 있다. 또한, G 및 F 당단백질의 세포질 도메인을 변형시켜, 감염된 세포의 망상내피 및 골지체를 통한 이들의 이동 속도를 감소시켜, 바이러스 성숙을 느리게 할 수 있다. 이와 같은 경우에, G 단백질만의 이동을 변형시키는 것으로도 충분하는데, 이는 RSV 감염동안에 항체 생산을 중화시키는 것을 자극하는데 관련된 주요 항원인 'F' 생산의 추가 상향 조절을 허용한다. 이와 같은 RSV 게놈의 유전자 또는 조절 도메인내에 국소화된 치환, 결손, 추가는 고유 RSV 게놈에 비해 병인성이 감소된 키메라 변형 RSV를 만들 수 있게 한다.

### 6.3. RSV의 완전한 게놈을 제공하는 cDNA의 회수

#### 6.3.1. 발현 플라스미드의 구조 및 기능 분석

RSV, N, P, L 유전자는 RSV의 바이러스 폴리메라제를 인코딩한다. RSV M 유전자의 기능은 아직 모른다. 헬퍼 RSV 균주 AZ 단백질 기능을 하는 RSV, N, P, M, L 발현 플라스미드의 능력은 하기에서 설명한다. RSV, N, P, L, M2-1 유전자를 T7 프로모터 조절하에서, 변형된 PCITE 2a(+) 벡터(Novagen Madison, WI)에 클론시키고, 이의 3'말단에는 T7 종료물질이 인접하도록 한다. PCITE-2a(+)는 PCITE-3a(+)의 T7 종료물질 서열을 pCITE-2a(+)의 AlwI 및 BglII 부위에 삽입시켜 변형시킨다. N, P, L 발현벡터의 기능은 이들이 트랜스펙션된 pRSVA2CAT를 복제시키는 능력으로 결정한다. 약 80% 함유되는 수준에서, 6개 웰 플레이트에 있는 Hep-2 세포에 MVA(5 moi)를 감염시킨다. 1시간 뒤에, 감염된 세포는 pRSVA2CAT(0.5mg) 및 N(0.4mg), P(0.4mg), L(0.2mg) 유전자를 인코딩하는 플라스미드를 LipofectACE(Life Technologies, Gaithersburg, M.D.) 이용하여 트랜스펙션시킨다. 트랜스펙션은 5시간 또는 하룻밤동안 계속하고, 트랜스펙션 배지는 2%(태아 소 혈청) FBS를 포함하는 새로운 MEM으로 바꾼다. 감염 2일 후에, 세포를 용해시키고, 용해물질을 CAT 활성에 대해 분석하는데, 이때 Boehringer Mannheim:s CAT ELISA kit를 이용한다. CAT 활성은 N, P, L 플라스미드와 PRSVAZCAT로 트랜스펙션된 세포에서 감지하였다. 또한, RSV-GFP-CAT와 N, P, L 발현 플라스미드의 공동 트랜스펙션에 의해 GFP 및 CAT 단백질이 모두 발현된다. 재조합 백신이나 바이러스의 상이한 발현 플라스미드 비율 및 moi를 리포터 유전자 발현 시스템에서 최적화시킨다.

#### 6.3.2. 완전한 RSV cDNA로부터 감염성 RSV의 회수

Hep-2 세포는 1 moi에서 MVA(T7 폴리메라제를 발현시키는 재조합 백신이나 바이러스)로 감염시킨다. 50분 후에, 트랜스펙션 혼합물을 세포에 첨가한다. 트랜스펙션 혼합물은 2 $\mu$ g N 발현 벡터, 2 $\mu$ g P 발현 벡터, 2 $\mu$ g L 발현 벡터, 1.25 $\mu$ g M2/ORF1 발현 벡터, 2 $\mu$ g RSV 게놈 클론과 강화 프로모터, 50 $\mu$ g LipofectACE(Life Technologies, Gaithersburg, M.D.), 1ml OPTI-MEM로 구성된다. 하루 뒤에, 트랜스펙션된 혼합물은 2% FCS를 포함하는 MEM로 대체시킨다. 세포는 2일간 37°C에서 배양시킨다. 트랜스펙션 상청액을 수득하고, 이를 이용하여 40mg/ml arac(백신이나 바이러스에 저항성이 있는 약물) 존재하에서 새로운 Hep-2 세포를 감염시킨다. 감염된 Hep2 세포는 7일간 배양시킨다. P1 상청액을 수득한 후에, 세포는 RSV A2 균주의 F 단백질에 대한 항체를 이용하는 면역착색에 이용한다. 눈으로 볼 수 있는 세포-세포간 용합을 한 6개의 포지티브 착색된 좌위를 확인하였다. RNA를 P1 상청액으로부터 추출하고, 이를 RT-PCR 분석에 주형으로 이용한다. 두 가지 생성물에는 도입된 표식을 포함한다. 대조적으로 천연 RSV 바이러스에서 유도된 PCR 생성물에는 표식이 결여되어 있다.

점 돌연변이는 RSV 게놈 클론의 리더 서열의 4번 위치에 있고(C 잔기가 G로), 이와 같은 게놈 클론은 pRSVC4GLwt이라한다. 이와 같은 클론은 리포터 유전자에서 야생형에 비교하였을 때 몇 배이상 프로모터

활성이 증가되었다는 것을 볼 수 있다. 이 돌연변이를 전체 길이 게놈에 도입시킨 후에, 감염성 바이러스를 cDNA 클론으로부터 회수하였다. 회수된 재조합 RSV 바이러스는 야생형 RSV 바이러스에 비하여 더 작은 플라크를 형성하였다(도 8).

이와 같은 시스템은 돌연변이된 RSV를 구조할 수 있도록 한다. 따라서, RSV에 대한 살아있는 감쇠된 백신을 만들고, 이형 유전자 발현을 얻기 위해 RSV 벡터 및 바이러스를 이용하게 하는 우수한 도구가 된다. 타입 B RSV의 G 단백질을 타입 A 배경에 발현시킬 수 있게 하고, 백신은 타입 A와 타입 B 감염을 보호할 수 있다. 유전자의 순서를 바꾸거나 또는 L 단백질의 부위-직접적인 돌연변이 생성에 의해 RSV 게놈으로 온도 감응성 돌연변이 및 감쇠를 실시할 수 있다.

6.4. 단클론 항체를 이용하여, 헬퍼 바이러스로부터 구조된 바이러스를 분별할 수 있다.

RSV 균주 B9320 헬퍼 바이러스를 중화시키고, 구조된 A2 균주 RSV를 확인하기 위해, RSV 균주 B9320에 대한 단클론 항체를 다음과 같이 만든다.

6마리 BALB/c 암컷 생쥐에 비강으로  $10^5$  (p.f.u.) RSV B9320을 감염시키고, 5주 뒤에, 복막으로 50% 컴플리트 Freund's adjuvant를 포함하는 혼합물에 포함된  $10^6-10^7$  pfu의 RSV B9320를 접종시킨다. i.p. 접종 후 2주뒤에, 각 생쥐의 혈액을 표준 중화 검사를 이용하여 RSV 특이 항체 존재에 대해 테스트하였다(Beeler and Coelingh, J. virol. 63:2941-2950(1988)). 최고의 중화 항체를 생산하는 생쥐에는  $10^6$  p.f.u RSV 균주 B9320/인산완충염(PBS)으로 추가 부스팅시킨다. 3일 뒤에, 생쥐를 죽이고, B-세포를 생산하는 단클론성 항체 소스로 이 생쥐의 비장을 취한다. 비장세포(B-세포 포함)는 5ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME)에 비장 캡슐에 만들어진 절개를 통하여 생쥐 비장을 데스트한다. 세포 덩어리는 가라앉히고, 남아있는 현탁된 세포는 실온에서 2000xg 5분간 원심분리에 의해 별도로 분리한다. 이와 같은 세포 펠렛은 15ml 0.83(W/V)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 에 재현탁시키고, 5분간 방치하여, 적혈구 세포를 용해시킨다. 비장 세포는 이전에 언급한 바와 같이, 10ml 태아 송아지 혈청 쿠션을 통하여 원심분리에 의해 수득한다. 그 다음 비장세포는 DME로 행구고, 다시 펠렛을 만들고 마지막으로 20ml의 새로운 DME로 재현탁시킨다. 이와 같은 비장세포는 그 다음 Sp2/0 세포(생쥐 골수종 세포 이는 비장세포의 불사화반응에 융합 짝으로 이용)와 혼합하는데, 이때 혼합 비율은 비장세포에 대해 Sp2/0가 10:1이 되도록 한다. Sp2/0 세포는 ATCC로부터 수득하고, 이는 10% 태아 소 혈청이 보충된 DME에 유지시킨다. 세포 혼합물은 그 다음 실온에서 8분간 2000xg 원심분리시킨다. 세포 펠렛은 1ml 5% 폴리에틸렌 글리콜 1000mol. wt.(PEG 1000)에 재현탁시키고, 1분 간격으로 동량의 DME를 첨가하여 최종 용적이 25ml이 되도록 한다. 융합된 세포는 이전과 같이 펠렛화시키고, 성장 배지[SP2/0 세포의 50% 조건화된 배지, 10ml RPMI를 포함하는 50% HA, 25ml F.C.S., 100  $\mu\text{g/ml}$  젠타마이신, 4ml 50X 하이포산틴, 티미딘, 아미노프테린(HAT) 배지(Sigma Che. Co., St. Louis, MO)]에서  $3.5 \times 10^6$  비장세포로 현탁시킨다. 세포 현탁액은 웰 플레이트(200ml well<sup>-1</sup>)에 분포시킨 다음, 37°C, 95 습도, 5%  $\text{CO}_2$ 에 배양시켰다. 하이브리도마 세포(비장세포 및 Sp2/0가 융합된) 콜로니는 그 다음 24웰 플레이트에 계대배양하고, 함유가 될 때까지 성장시킨다; 상청액 성장 배지를 표준 중화 검사를 이용하여 RSV 균주 B9320 중화 단클론 항체의 존재에 대해 검사하였다(Beeler and Coelingh, J. virol.. 63:2941-50(1988)). 중화 활성을 가지는 웰의 하는 것을 하이브리도마 세포는 성장 배지로 재현탁시키고, 100 $\mu\text{l}$ 당 0.5 세포의 밀도가 되도록 희석시키고, 96웰 플레이트에 도말하는데, 웰당 200 $\mu\text{l}$ 가 되도록한다. 이와 같은 과정으로 단클론(단일 세포로부터 유도된 하이브리도마 세포주) 생산을 확인할 수 있는데, 이는 단클론 항체 중화를 할 수 있는지를 다시 검사한다. RSV 균주 B9320는 중화시키고, RSV 균주 A2는 중화시키지 않는 단클론성 항체를 생산하는 이와 같은 하이브리도마 세포를 연속적으로 생쥐에 감염시킨다(i.p. 생쥐당  $10^6$  세포). i.p. 주사후 2주 뒤에, RSV 균주 B9320의 중화 단클론 항체를 포함하는 생쥐의 복수는 19 가우지 바늘로 빼내어, -20°C에 저장하였다.

이와 같은 단클론 항체를 이용하여 단락 9.1에서 설명하는 것과 같이 RSV 균주 A2 구조후에 RSV 균주 B9320 헬퍼 바이러스를 중화시킨다. 1% F.C.S를 포함하는 Eagle's Minimal Essential Medium(EMEM)에 용된 0.4%(w/v) 한천으로 중화 단클론 항체를 희석시키면 된다(이때 희석 비율은 항체 1에 한천 50). 이와 같은 혼합물은 Hep-2 세포 단층에 첨가되고, 세포 단층은 세포당 0.1-0.01 p.f.u.(moi)에서 구조 실험 후순으로 감염시켰다. 한천에 있는 단클론 항체는 RSV 균주 B9320 성장을 저해하나, RSV 균주 A2의 생장은 허용하여 A2 균주에 의한 플라크 형성된다. 마개를 제거한 파스되린 피펫을 이용하여 이와 같은 플라크를 찍어내고, 세포와 한천 플러그는 2ml EMEM, 1% FCS에 재현탁시키고, 방출된 바이러스는 새로운 Hep-2 세포 단층에서 단클론 항체 존재하에 다시 플라크를 만들어 헬퍼 바이러스로부터 추가 정제하였다. 2회 플라크를 이룬 바이러스를 이용하여 24-웰 플레이트에서 Hep-2 세포를 감염시킨 다음 이들 후순을 이용하여 6개 웰 플레이트를 감염시킨다(세포당 0.1p.f.u의 m.o.i). 최종적으로, 6개 웰 플레이트의 한 개 웰로부터 총 감염된 세포 RNA를 RT/PCR 반응에 이용하는데, 이때 상기 6.2에서 설명한 것과 같이(구조 인지 수 단으로 작용하기 위해 RSV 균주 A2 게놈으로 도입되는) '표식 서열'의 어느 한 쪽에 제 1 가닥 및 제 2 가닥 프라이머를 이용한다. RT/PCR 반응에서 생성된 DNA는 StuI 및 PmeI로 연속하여 절단하여, RSV 균주 A2 cDNA로 도입되는 '표식 서열'을 양성적으로 확인할 수 있고, 구조 과정의 유효성을 확립할 수 있다.

## 7. M2 발현없이 감염성 RSV 입자의 구조

다음의 실험을 실행하여, M2/ORF1 유전자 유무하에 RS 비리온의 구조 효과를 비교하였다. M2/ORF1 유전자 기능이 RSV 감염성 입자의 구조에 필요하지 않는 경우에는 M2/ORF1 유전자 기능의 발현없이 RS 비리온을 구조하는 것이 가능하다. 현재 분석에 따르면, RSV 복제에 민감한 Hep-2 세포에 RSV의 바이러스 폴리메라제의 'N', 'P', 'L' 유전자를 인코딩하는 플라스미드와 전체 길이의 RSV 안티게놈에 상응하는 cDNA를 공동-트랜스펙트시키는데, 이때 M2/ORF1 유전자를 인코딩하는 플라스미드 DNA가 존재할 경우와 없을 경우 두 가지로 실시한다. RSV 감염성 단위 수를 측정하여, M2/ORF1 유전자 생성물이 감염성 RSV 입자를 구조하는데 필수적인지를 결정하였다.

하기에서 설명하는 실험에는 다음의 플라스미드를 이용한다; RSV 균주 A2의 전체 길이 안티게놈을 인코딩

하는 cDNA 클론-pRSVC4GLwt라고 함; N, P, L 폴리메라제 단백질을 인코딩하는 플라스미드; M2/ORF1 신장 인자를 인코딩하는 플라스미드; T7 RNA 프로모터의 각 하류-이 인코딩된 바이러스 단백질의 이름으로 지정함.

pRSVC4GLwt는 N, P, L 단백질을 인코딩하는 플라스미드와 함께 Hep-2 세포에 공동 트랜스펙션시키는데, 이때 세포는 이미 T7 RNA 폴리메라제를 발현시키는 재조합 백시니아 바이러스(MVA로 지정)로 미리-감염시킨다. 또 다른 Hep-2 세포에서, pRSVC4GLwt에는 N, P, L 폴리메라제 단백질을 인코딩하는 플라스미드와 M2 기능을 인코딩하는 플라스미드로 공동-트랜스펙션시킨다. 재조합 RSV의 트랜스펙션 및 회수는 다음과 같이 실행하였다; Hep-2 세포는 트랜스펙션 전 5시간 또는 24시간에 6개 웰 접시(웰당 35mm)에 나눈다.

각 웰에는 10% FBS를 포함하는 MEM(최소 필수 배지)에서 성장시킨  $1 \times 10^6$  세포를 포함한다. 70%-80% 함유 시점에서 Hep-2 단층은 5moi에서 MVA로 감염시키고, 60분간 35°C에서 배양시켰다. 그 다음 세포는 OPT1-MEM(Life Technologies)로 1회 세척시키고, 각 접시의 배지는 1ml OPT1-MEM 및 0.2ml 트랜스펙션 혼합물로 치환시킨다. 트랜스펙션 혼합물은 네 개 플라스미드 pRSVC4GLwt, N, P, L 플라스미드를 최종 용적이 0.1ml OPT1-MEM에 되도록 혼합하는데, 그 양은 0.5-0.6µg pRSVC4GLwt, 0.4µg N 플라스미드, 0.4µg P 플라스미드, 0.2µg L 플라스미드가 된다. 제 2 혼합물에는 추가로 M2/ORF1 플라스미드 0.4µg을 포함한다. 0.1ml 플라스미드 혼합물은 10µl lipofectACE(Life Technologies, Gaithersburg, M.D.)을 포함하는 0.1ml OPT1-MEM와 복합시켜, 완전한 트랜스펙션 혼합물을 만든다. 실온에서 15분간 배양한 후에, 트랜스펙션 혼합물을 세포에 첨가하고, 1일 뒤에, 2% FBS를 포함하는 MEM으로 대체시킨다. 배양물은 3일간 35°C에서 배양시키고, 이때 상청액은 수득한다. 세포는 35°C에서 배양시키는데, 그 이유는 MVA 바이러스가 약한 온도 감응성이고, 35°C에서 효과가 더욱 크기 때문이다.

트랜스펙션 후 3일 경에, 트랜스펙트된 세포 상청액은 면역검사에 의해 RSV 감염 단위 존재에 대해 검사하였는데, 이는 RSV 포장된 입자가 있다는 것을 나타내는 것이다(표 1 참고). 이 검사에서, 0.3-0.4ml 배양 상청액은 새로운 감염안된 Hep-2 세포에 계대시키고, 1% 메틸셀룰로오스 및 2% FBS를 포함하는 1 x L15 배지에 둔다. 배양 6일 후에, 상청액은 수득하고, 세포를 고정시키고, 양고추냉이 과산화효소 방법을 이용하여 간접적으로 착색시키는데, 이때 RSV 바이러스 입자를 인지하는 염소 항-RSV(Biogenesis, Sandown, NH)를 이용하고, 그 다음 양고추냉이 과산화효소에 공액된 토끼 항-염소 항체를 이용한다. RSV-감염된 세포에 결합된 항체 복합물은 제조업자의 지시에 따라, AEC-(3-아미노-9-에틸카르바졸) 크로모겐 기질(DAKO)을 첨가하여 감지할 수 있다. RSV 플라크는 플라크에 결합된 RSV-항체 복합체와 크로모겐 기질 사이에 반응으로 인한 흑갈색을 나타낸다. RSV 플라크의 수는 트랜스펙션 상청액 0.5ml당 플라크 형성 단위(p.f.u.) 수로 나타낸다.

M2/ORF1 유무하에 트랜스펙션 접시의 상청액으로부터 회수된 RS 비리온의 양을 비교한 것을 표 1에 나타내었다. 네가지 별개 실험 결과에서 트랜스펙션 검사에서 M2/ORF1가 없어도 관찰된 RSV의 감염 수가 감소되지 않았다는 것을 설명하였다. 따라서, 이와 같은 실험 결과로 RSV는 세 가지 폴리메라제 단백질, N, P, L을 인코딩하는 플라스미드와 전체 길이의 RSV 안티게놈을 인코딩하는 cDNA로만 트랜스펙트된 세포에서 M2/ORF1 없이도 구조될 수 있다는 것을 볼 수 있다. M2/ORF1 없이 RS 비리온의 구조는 최고 6회 계대까지 구조된 재조합 RSV를 계대하는 능력으로 나타낼 수도 있다. 따라서, RSV 비리온의 생산은 M2/ORF1 유전자의 발현에 의존하지 않고, 또한 트랜스펙션 검사에서 M2/ORF1 유전자가 포함되어 있다는 것이 RSV 구조를 증가시킨다는 것은 아니다.

### [표 1]

#### 플라스미드 트랜스펙션을 통한 감염성 RSV 생산은 M2/ORF1 발현과는 무관.

실험	감염성 RSV 생산(0.5ml 상청액의 pfu)	
	+M2 ORF1	-M2 ORF1
1.	6,10(8)	16,9(13)
2.	120,46,428(198)	100,122,105(109)
3.	160,180(170)	150,133(142)
4.	588,253,725(522)	300,1000,110(470)

### 실시에

8. 실시에; RSV A2 균주에 의해 RSV 소단위 B, G, F 단백질의 발현

다음의 실험은 한 가지 균주 이상의 RSV 항원성 폴리펩티드를 발현시키는 키메라 RSV를 만들기 위함이다. 호흡기 합체 바이러스(RSV)의 두가지 주요 항원성 소단위(A와 B)는 사람에게서 질병의 원인이 된다. 당단백질 F와 G는 RSV의 두 가지 주요 항원 결정체이다. 소단위 A와 B 바이러스의 F 당단백질은 50% 관련된 것으로 간주되고, G 당단백질의 관련 정도는 1-5%미만인 것으로 간주된다. RSV 소단위 A의 감염은 소단위 B 균주의 복제에 부분적인 저항성을 유도하거나 전혀 유도하지 못할 수도 있다. 소단위 A와 B RSV 바이러스 백신이 RSV 감염으로부터 보호하는데 필요하다.

여기에서 설명하는 처음 방법은 현재 감염성 RSV A2 cDNA 클론 G 및 F 단백질을 하위 집단 B-G 및 -F 유



전자로 대체하여, 하위 집단 B 항원을 발현하는 감염성 키메라 RSV cDNA를 만드는 것이다. 키메라 RSV는 하위 집단 B 항원 특이적이다. 여기에서 설명하는 제 2 방법은 현재 A2 cDNA 클론에 하위 집단 B-G 유전자를 삽입시켜, 하위 집단 A 및 B 특이적인 항원을 발현시키는 것이다.

### 8.1. B9320 G 및 F 유전자에 의해 A2 G 및 F의 치환

RSV 하위 집단 B 균주 B9320 G 및 F 유전자를 RT/PCR을 이용하여 B9320 vRNA로부터 증폭시키고, 서열 결정을 위해 pCRII 벡터로 클론시켰다. B9320 균주의 G 및 F 유전자를 A2 안티게놈 cDNA로 클론시키기 위해 RT/PCR에 이용되는 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 BamHI 부위를 만들었다(도 4A). A2 균주의 뉴클레오타이드 4326에서 9387 까지 G 및 F 유전자를 포함하는 cDNA 단편을 pUC19(pUCR/H)로 먼저 클론시켰다. Quickchange 부위-직접적인 돌연변이생성 kit(Stratagene, La Jolla, CA)에 의해 4360(SH/G 유전자가 정합) 및 7554(F/M2 유전자간 정합) 위치에서 BglII 부위를 만들었다. B9230 G 및 F cDNA를 pCRII 벡터에 삽입시키고, 이는 BamHI로 절단시키고 그 다음 BglIII으로 절단된 pUCR/H(A2 G 및 F를 제거함)에 클론시킨다. A2 G 및 F 유전자가 B9320 G 및 F로 대체된 cDNA 클론을 이용하여 전체 길이의 A2 안티게놈 cDNA의 XhoI를 MscI 부분을 대체시킨다. 생성된 안티게놈 cDNA 클론을 pRSVB-GF이라고 하고, 이를 이용하여 Hep-2에 트랜스펙션시켜, 감염성 RSVB-GF 바이러스를 만든다.

키메라 RSVB-GF를 만드는 방법은 다음과 같다; pRSVB-GF는 단백질 N, P, L, M2/OPF1를 인코딩하는 플라스미드와 함께 Hep-2 세포에 트랜스펙션시키는데, 이때 세포는 MVA라는 재조합 백시니아 바이러스(T7 RNA 폴리메라제를 발현시킴)에 감염되었다. Hep-2 세포는 6개 웰 접시에 트랜스펙션시키기 전에 나눈다. 60%-70% 합류된 Hep-2 세포 단층에는 MVA로 5moi에서 감염시키고, 이는 60분간 35°C에서 배양시킨다. 그 다음 세포는 OPTI-MEM(Life Technologies, Gaithersburg, MD)으로 1회 세척한다. 각 접시에는 1ml OPTI-MEM을 두고, 0.2ml 트랜스펙션 배지를 첨가한다. 트랜스펙션 배지는 최종 용적이 0.1ml이 되는 OPTI-MEM 배지에 5개 플라스미드를 혼합하여 만드는데, 즉, 0.6µg RSV 안티게놈 pRSVB-GF, 0.4µg N 플라스미드, 0.4µg P 플라스미드, 0.2µg L 플라스미드, 0.4µg M2/OPF1 플라스미드를 혼합하여 만든다. 이는 10µl lipofectACE(Life Technologies, Gaithersburg, MD U.S.A)를 포함하는 0.1ml OPTI-MEM으로 복합한 것이다. 실온에서 15분간 배양한 후에, DNA/lipofectACE를 세포에 첨가시키고, 배지는 2% FBS를 포함하는 MEM으로 하루 뒤에 교체한다. 배양물은 35°C에서 3일간 추가 배양하고, 상청액은 수득한다. 배양물 상청액(P0) 한 방울을 이용하여 새로운 Hep-2 세포를 감염시킨다. 35°C에서 6일간 배양시킨 후에, 상청액은 수득하고, 세포는 고정시키고, 염소 항-RSV 항체(Biogenesis, Sandown, NH)를 이용하고, 이어서 다음 양고추냉이 과산화효소에 연결된 토끼 항-염소 항체를 이용하여 양고추냉이 과산화효소 방법으로 간접적으로 착색시킨다. 바이러스 감염된 세포는 제조업자의 지시에 따라 기질 크로모겐을 첨가하여 감지할 수 있다(DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A.). RSV와 유사한 플라크는 pRSVB-GF로 트랜스펙션된 세포의 상청액으로 감염된 세포에서 감지된다. 바이러스는 추가 플라크를 형성하고, 2회 정제시키고, Hep-2 세포에서 증폭된다.

재조합 RSVB-GF 바이러스는 RSV 하위 집단 B 특이적인 프라이머를 이용하여, RT/PCR에 의해 그 성질을 조사한다. 두 개의 별개 정제된 재조합 RSVB-GF 바이러스 분리체를 RNA 추출 키트(Tel-Test, Friendswood, TX)에서 추출시키고, RNA는 이소프로판올에 의해 침전시킨다. 비리온 RNAs는 슈퍼스크립터 역 전사효소(Life Technologies, Gaithersburg, MD)를 이용하여 표준 RT 조건(반응물은 10µl)에서 1시간 동안 배양된 nt 4468 부터 4492까지의 RSV 부분에 연장되는 프라이머로 어닐링한다. 각 반응물 한 방울씩을 G 부분에 하위 집단 B 특이적인 프라이머(CACCACCTACCTTACTCAAGT 와 TTTGTTTGTGGGTTTGATGGTTGG)를 이용하여, PCR(94°C에서 30초간, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분간 과정을 30회)을 실시한다. PCR 생성물은 1% 아가로스 겔상에서 전기영동으로 분석하였고, 이는 에티디움 브로마이드로 착색시켜 볼 수 있다. 도 5에서 볼 수 있는 것과 같이, 주형으로 RSV A2 균주를 이용하는 경우에 RT/PCR 반응에서 DNA 생성물이 만들어 지지 않는다. 그러나, 254bp로 예상되는 생성물은 RT/PCR 반응에서, RSVB-GF RNA 또는 PCR 기준 플라스미드, pRSVB-GF DNA를 주형으로 이용할 경우에 감지되었는데, 이는 구조된 바이러스에는 B9320 바이러스에서 유도된 G 및 F 단백질이 포함되어 있다는 것을 말하는 것이다.

### 8.2. RSV A2 바이러스에 의한 B9320의 발현

서열 결정을 위해 RT/PCR에 의해 B9320 vRNA로부터 RSV 하위 집단 B 균주 B9320 G 유전자를 증폭시키고, 이를 pCRII 벡터로 클론시켰다. 두 개의 BglIII 부위를 PCR 프라이머에 결합시키는데, 프라이머에는 유전자 시작, 유전자 종료 시그널이 포함되어 있다(GATATCAAGATCTACAATAACATTGGGGCAAATG 및 GCTAAGAGATCTTTTGAATAACTAAGCATG). B9320 cDNA 삽입체를 BglIII로 절단시키고, A2 cDNA 서브클론의 SH/G(4630nt) 또는 F/M2(7552 nt) 유전자간 접합부로 클론시켰다(도 4B, 도 4C). SH/G 또는 F/M2 유전자간 부위에서 B9320 G 삽입체를 포함하는 XhoI 내지 MscI 단편을 이용하여 A2 안티게놈 cDNA의 이에 상응하는 XhoI 내지 MscI 부분을 대체시킨다. 생성된 RSV 안티게놈 cDNA 클론은 pRSVB9320G-SH/G 또는 pRSVB9320G-F/M2이라 한다.

F/M2 유전자간 부분에 삽입된 B9320 G를 가지는 RSV A2 바이러스를 만드는 것도 RSVB-GF 바이러스를 만들 때 설명된 것과 유사하게 실행된다. 간략하게 설명하면, 단백질 N, P, L을 인코딩하는 플라스미드와 함께 pRSVB9320G-F/M2를 Hep2 세포에 트랜스펙션시키는데, Hep-2 세포는 T7 RNA 폴리메라제(Life Technologies, Gaithersburg, M.D.)를 발현시키는 MVA 백시니아 바이러스 재조합체에 이미 감염되었다. 트랜스펙션된 세포 배지는 트랜스펙션 후 1일 뒤에 2% FBS(태아 소 혈청)을 포함하는 MEM으로 교체하고, 35°C에서 3일간 추가 배양시킨다. 배양물 상청액(P0)을 이용하여 새로운 Hep-2 세포를 감염시킨다. 35°C에서 6일간 배양시킨 후에, 상청액은 수득하고, 세포는 고정시켜, 염소 항-RSV 항체(Biogenesis)에 이어서 양고추냉이 과산화효소에 연결된 토끼 항-염소 항체를 이용하여 간접적인 양고추냉이 과산화효소 방법을 이용하여 착색시켰다. 바이러스에 감염된 세포는 기질 크로모겐(Dako)을 첨가하여 감지할 수 있다. RSV와 유사한 플라크는 pRSVB9320G/F/M2로 트랜스펙션된 세포의 상청액에 감염된 세포에서 감지된다.

B9320 특이적인 프라이머를 이용하여, RT/PCR에 의해 pRSVB9320G-F/M2의 특징을 조사하였다. 410bp의 예상되는 PCR 생성물은 pRSVB9320G-F/M2 RNA를 주형으로 이용한 RT/PCR 샘플에서 볼 수 있었고, 이는 구조된 바이러스에는 B9320에서 유도된 G 유전자를 포함하고 있다는 것을 설명하는 것이다(도 6).

삽입된 RSV B9320 G 유전자의 발현은 A2-G 또는 B-G mRNA에 특이적인 <sup>32</sup>p-라벨된 올리고뉴클레오타이드를 이

용한 노던 블랏으로 분석하였다. 총 세포 RNA는 RNA 추출 키트(RNA stat-60, Tel-Test)를 이용하여, 감염 48시간 후에 야생형 RSVB 9320, rRSVA2, rRSVB9320G-F/M2으로 감염된 Hep-2 세포에서 추출하였다. 포름알데히드를 포함하는 1.2% 아가로즈 겔에서 RNA를 전기영동하였고, 이를 나일론 막(Amersham)으로 옮긴다. A2 균주의 G유전자에 특이적인 올리고뉴클레오티드 (5' TCTTGACTGTTGTGGATTGCAGGGTTGACTTGGACTCCGATCGATCC-3') 및 B9320 G 유전자에 특이적인 올리고뉴클레오티드

(5' CTTGTGTTGTTGTTGTATGGTGTGTTTCTGATTTTGTATTGATCGATCC-3')는 당분야에 공지된 카이나제 반응을 이용하여 <sup>32</sup>P-ATP로 라벨시킨다. <sup>32</sup>p-라벨된 G 유전자 특이적인 올리고뉴클레오티드중 하나와 막을 하이브리드 시키는 반응은 65°C에서 실시하고, 표준 과정에 따라 세척한다. A2-G 및 B9320-G 특이적인 RNA는 rRSVB9320G-F1M2 감염된 Hep-2 세포에서 감지된다(도 6B). 이와 같은 결과로 하위타입 특이적인 RNA 발현을 설명한다.

키메라 rRSVA2(B-G)의 단백질 발현을 RSV B9320 및 rRSV와 비교하는데 이때는 <sup>35</sup>S-라벨된 감염된 Hep-2 세포 용해물질을 면역침전시켜 비교하였다. 간략하게 설명하면, 바이러스 감염된 세포에 당업자에 공지된 프로토콜을 이용하여, 감염 후 14 내지 18시간에 <sup>35</sup>S-promix(100 µCi/ml), <sup>35</sup>S-CYS, <sup>35</sup>S-Met(Amersham, Arlington Heights, IL)으로 라벨시킨다. 세포 단층은 RIPA 완충액으로 용해시키고, 폴리펩티드는 계면 활성제로 파괴된 RSV A2 바이러스에 대해 염소에서 생성된 다클론성 항혈청(도 7, 라인 1-4) 또는 파괴안된 B9320 바리온에 대해 생쥐에서 발생시킨 항혈청(도 7, 라인 5-8)을 이용하여 면역침전시킨다. 방사능 라벨된 면역침전된 폴리펩티드는 0.1% SDS를 포함하는 10% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동시키고, 자가방사로 감지한다. 항-RSV A2 혈청은 RSV A2 균주의 주요 폴리펩티드를 면역침전시키는 반면에, 항-B9320 혈청은 주로 RSV B9320 G 단백질 및 A 및 B의 하위 집단의 보존된 F 단백질과 반응한다. 도 7에서 볼 수 있는 것과 같이, A2-G 단백질(라인 3)에 동일한 단백질은 RSV A2에 대한 항혈청을 이용하였을 때 rRSVA2(B-G) 감염된 세포(라인 4)로부터 면역침전되었다. A2-G 단백질보다 작은 단백질 종은 B9320 바리온에 대해 생쥐에서 생성된 항혈청을 이용한 B9320(라인 6) 및 rRSVA2(B-G)(라인 9) 감염된 세포에서 면역 침전된다. 이와 같은 폴리펩티드는 감염안된 그리고 RSV A2 감염된 세포에서는 없었고, 유사하게, RSV B 9320 균주에 특이적인 G 단백질은 제공한다. A2와 B9320 RSV G 단백질의 아미노산 서열을 비교하면, 두 개 추가 N-글리코실화반응 가능성 있는 부위(N-X-S/t)가 RSV A2 G 단백질에 존재한다는 것으로 이는 이용된 조건하에서 A2 G 단백질의 이동을 느리게 하는데 기여한다. RSV B9320의 F 단백질은 RSV A2 F 단백질보다 약간 빠르게 이동한다. P와 M 단백질은 또한 두 개 바이러스 서브타입간에 이동성 차이를 설명한다. FSV B9320 및 rRSVA2(B-G) 감염된 세포에 존재하는 단백질 겔의 상부 부근에 있는 폴리펩티드는 확인되지 않았다. N, P, M 단백질을 거의 인지하지 못하는 RSV B9320 바리온에 대해 생쥐에서 생성된 항혈청과 RSV A2 균주에 대해 생성된 염소 항혈청을 비교하였다. 상기에서 설명하는 데이터에서 분명하게 볼 수 있는 것은 키메라 rRSV A2(B-G)는 RSV A2 및 B9320 특이적인 G 단백질을 모두 발현한다는 것이다.

### 8.2.1. 조직 배양물에서 재조합 RSV의 복제

재조합 RS 바이러스는 플라크로 3회 세척하고 Hep-2 세포에서 증폭시켰다. 플라크 검사를 12-웰 플레이트에서 실행하는데, 이때 1% 메틸셀룰로오스 오버레이 층과 2% 태아 소 혈청(FBS)을 포함하는 1 x L15 배지를 이용하였다. 6일간 35°C에서 배양시킨 후에, 단층은 메탄올로 고정시키고, 플라크는 면역착색으로 확인하였다. rRSV의 플라크 크기와 형태는 야생형 A2 RSV와 매우 유사하다(도 8). 그러나, rRSVC4G에 의해 형성된 플라크는 rRSV 및 야생형 A2 바이러스보다는 작았다. rRSV와 rRSVC4 간의 유전학적 차이는 단지 RSV 리더 부분에 한 개 뉴클레오티드 치환이 있다는 것이다. 따라서, rRSV A2(B-G)의 작은 플라크 크기는 rRSVC4G의 것과는 구별할 수 없다.

rRSV, rRSVC4G, rRSV A2(B-G)의 성장 곡선은 생물학적으로 유도된 야생형 A2 바이러스의 것과 비교하였다. Hep-2 세포는 T25 배양물 플라스크에서 성장시키고, 이를 rRSV, rRSVC4G, rRSVA2(B-G), 야생형 RSV A2 균주에 moi가 0.5가 되도록 감염시켰다. 37°C에서 1시간 흡착 후에, 세포는 2% FBS를 포함하는 MEM으로 3회 세척시키고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양시켰다. 감염후 4시간 간격으로, 250 µl 배양 상층액을 수집하고, 바이러스 역가를 측정할 때까지 -70°C에 저장하였다. 한 방울씩을 취하여 동량의 새로 만든 배지로 교환하였다. 각 바이러스의 역가는 Hep-2 세포에서 플라크 검사로 결정하고, 면역착색으로 볼 수 있다. 도 9에서 볼 수 있는 것과 같이, rRSV의 성장 역학은 야생형 A2 바이러스의 것과 매우 유사하다. 모든 바이러스의 최대 바이러스 역가는 48hr 내지 72hr 사이에서 얻을 수 있었다. rRSVC4G의 바이러스 역가는 rRSV 및 야생형 A2 RSV보다는 2.4배(48hr), 6.6배(72 hr) 낮았다. rRSVC4G의 생장이 나쁜 것은 아마도 리더 부분에 한 개의 뉴클레오티드가 변화되었기 때문으로 보인다. 키메라 rRSV A2(B-G)는 역학도 더 느리고, 피크 역가도 더 낮은 것으로 나타났다(도 9).

### 9. 실시예: RSV L 유전자 돌연변이체의 생성

L 유전자 돌연변이체를 만드는 전략은 RSV L 유전자로 무작위 돌연변이생성 또는 특정 돌연변이생성을 도입시키고자 하는 것이다. L 유전자 cDNA의 기능은 미니게놈 복제 시스템으로 in vitro에서 스크리닝할 수 있다. 회수된 L 유전자 돌연변이체를 in vitro 및 in vivo에서 추가 분석할 수 있다.

#### 9.1.1. 전하를 띤 아미노산을 알라닌으로 변화시키는 돌연변이의 스킴

이와 같은 돌연변이생성 전략은 단백질 표면에 노출된 기능을 가진 도메인을 전체적으로 표적으로 하는 경우에 특히 효과가 있는 것으로 보인다. 그 이론적 근거는 전하를 띤 잔기 덩어리는 일반적으로 단백질 구조안에 ??혀있지 않다는 것이다. 이와 같은 전하를 띤 잔기를 알라닌으로 보존성 치환을 하면 단백질의 구조에는 큰 변화를 주지 않고, 전하를 제거할 수 있게 된다. 전하를 띤 덩어리를 파괴하면, 다른 단백질과 RSV L 단백질의 상호작용을 방해하고, 활성 열감응성으로 만들어, 온도-감응성 돌연변이를 만들 수 있다.

덩어리한 두 개 이상의 잔기가 전하를 띤 잔기인 5개 아미노산 띠를 말하는 것이다. 돌연변이생성을 스

캐닝하기 위해, 덩어리에서 모든 전하를 띤 잔기를 부위-직접적인 돌연변이생성으로 알라닌으로 변화시킬 수 있다. RSV L 유전자의 크기가 크기 때문에, L 단백질에는 전하를 띤 많은 덩어리가 있다. 따라서, 전체 L 유전자에서 3 내지 5개의 아미노산이 연속하여 전하를 띤 잔기만을 표적으로 한다(도 10). RSV L 단백질에는 5개의 연속 전하를 띤 잔기가 2 덩어리, 4개의 연속하여 전하를 띤 잔기가 2개 덩어리, 세 개의 연속하여 전하를 띤 잔기가 17 덩어리가 있다. 각 덩어리에 있는 전하를 띤 잔기 2 내지 4개를 알라닌으로 치환한다.

본 발명의 체 1 단계는 QuikChange 부위-직접적인 돌연변이생성 키트(Stratagene)를 이용하여, 전체 RSV L-유전자를 포함하는 pCITE-L로 변화를 유도하는 것이다.

### 9.1.2. 시스테인 스캐닝 돌연변이생성

시스테인을 돌연변이생성에 좋은 표적이 되는데 그 이유는 이들은 분자내 그리고 분자간에 결합 형성에 관여하기 때문이다. 시스테인을 글리신 또는 알라닌으로 치환하면, 단백질의 안정성 및 기능이 변화되는데, 그 이유는 이들의 3차 구조가 파괴되기 때문이다. RSV L 단백질에는 39개 시스테인 잔기가 있다(도 11). RSV L 단백질과 다른 파라믹소바이러스의 것을 비교하면, 시스테인의 일부가 보존되었다는 것을 볼 수 있다.

5개의 보조노던 시스테인 잔기를 발린(보존성 변화) 또는 아스파르트산(비-보존성 변화)으로 변화시키는데, 이때는 QuikChange 부위-직접적인 돌연변이생성 키트(Stratagene) 축중성 돌연변이성 올리고뉴클레오티드를 이용한다. 당업자는 돌연변이성 올리고뉴클레오티드의 서열은 원하는 단백질 서열에 따라 결정된다는 것을 인지할 것이다. 도입된 돌연변이는 서열 분석으로 확인할 수 있다.

### 9.1.3. 무작위 돌연변이생성

무작위 돌연변이생성은 단순히 전하를 띤 잔기 또는 시스테인뿐만 아니라 임의 잔기를 변화시킬 수 있다는 것이다. RSV L 유전자의 크기 때문에, 몇 가지 L 유전자 cDNA 단편은 PCR 돌연변이생성에 의해 돌연변이 될 수 있다. PCR을 이용하여 Stratagene에서 수득된 exo Pfu 폴리메라제를 이용하여 실시한다. 돌연변이된 PCR 단편은 pCITE-L 벡터에 클론시킨다. 20개 돌연변이생성된 cDNA 단편의 서열 분석에 따르면, 80-90% 돌연변이생성 비율을 얻을 수 있다는 것이다. 이들 돌연변이체의 기능은 미니게놈 복제 시스템으로 스크리닝할 수 있다. 폴리메라제 기능이 변화된 임의 돌연변이체를 전체 길이의 RSV cDNA에 클론시키고, 트랜스펙트된 세포로부터 바이러스를 회수하였다.

### 9.2. 미니게놈 복제 시스템을 이용한 RSV L 단백질 돌연변이체의 기능 분석

L-유전자 돌연변이체의 기능은 안티센스에 CAT 유전자를 포함하고, RSV 리더 및 트레일러 서열을 인접하고 있는 RSV 미니게놈을 복제하는 능력으로 테스트를 받는다. Hep-2 세포에는 T7 RNA 폴리메라제를 발현시키는 MVA 백시니아 재조합체로 감염시킨다. 1시간 뒤에, 돌연변이된 L 단백질과 N 단백질, P 단백질을 발현시키는 플라스미드와 CAT 유전자를 포함하는 pRSV/CAT 플라스미드를 함께 세포로 트랜스펙션시킨다. 트랜스펙트된 세포에서 CAT 유전자 발현은 제조업자의 권유에 따라 CAT ELISA 검사(Boehringer Mannheim)를 이용하여 결정한다. L 유전자 돌연변이체에 의해 생성된 CAT 활성은 야생형 L 단백질의 것과 비교한다.

### 9.3. 돌연변이체 재조합 RSV의 회수

돌연변이체 재조합 RSV를 회수 또는 구조하기 위해, L 유전자 돌연변이는 포지티브 센스(안티게놈)에서 전체 RSV 게놈을 인코딩하는 플라스미드에 만든다. L 유전자에 돌연변이를 포함하는 L 유전자 cDNA 제한 효소 단편(BamHI 및 NotI)은 pCITE 벡터에서 제거하고, 이는 전체 길이의 RSV cDNA 클론으로 클론시킨다. cDNA 클론의 서열을 조사하여, 각각에 도입된 돌연변이체가 포함되었는지를 확인한다.

각 RSV L 유전자 돌연변이 바이러스는 다음의 플라스미드를 6웰 플레이트에서 성장시킨 준합류 Hep-2 세포안으로 공동-트랜스펙션시켜 구조하였다. 트랜스펙션 전에, Hep-2 세포에는 MVA(T7 RNA 폴리메라제를 발현시키는 재조합 백시니아 바이러스)로 트랜스펙션시킨다. 1 시간 뒤에, 세포에 다음의 플라스미드를 트랜스펙션시킨다;

▶pCITE-N: 야생형 RSV N 유전자를 인코딩함, 0.4 $\mu$ l

▶pCITE-P: 야생형 RSV P 유전자를 인코딩함, 0.4 $\mu$ l

▶pCITE-Lmutant: 돌연변이 RSV L 유전자를 인코딩함, 0.2 $\mu$ l

▶pRSV mutant: pCITE-L 돌연변이체와 같은 동일한 L 유전자 돌연변이를 포함하는 포지티브 센스(안티게놈)의 전체 길이 게놈 RSV, 0.6 $\mu$ l

OPTI-MEM에서 IipofecTACE(Life Technologies)에 의해 세포로 DNA를 도입시킨다. 5시간 또는 하룻 밤경과 후, 트랜스펙션 배지를 제거하고, 2% MEM으로 대체시킨다. 3일 간 35°C에서 배양시킨 후에, 트랜스펙션된 세포로부터 배지 상청액을 이용하여 Vero 세포를 트랜스펙션시킨다. 바이러스는 감염된 Vero 세포에서 회수하고, 회수된 재조합 바이러스에 도입된 돌연변이는 바이러스 RNA에서 유도된 RT/PCR DNA의 서열로 확인할 수 있다.

표 2에는 알라닌으로 변화된 돌연변이를 스캐닝하여 수득된 L 유전자 돌연변이의 예를 보여주는 것이다. N, P를 발현시키는 플라스미드와 공동-트랜스펙션시킨 후에 pRSV/CAT 미니게놈으로 CAT 발현을 결정하여 돌연변이를 검사하고, 33°C 또는 39°C에서 배양시킨 후에 트랜스펙션후 40시간 경에 야생형 또는 돌연변이 L 세포를 수득하고, 용해시킨다. CAT 활성은 CAT ELISA assay(Boehringer Mannheim)를 이용하여 모니터링한다. 각 샘플에서 생성된 CAT의 양은 선형 표준 곡선으로 결정하였다.

예비 연구에서 여러 가지 다른 돌연변이가 발견되었다.

#### 9.3.1. 유해한 돌연변이생성

7개 L 단백질 돌연변이체는 야생형 L 단백질의 것과 비교하였을 때, 생성된 CAT의 양이 99%이상 감소되었음을 나타낸다. 이와 같은 돌연변이는 RSV 폴리메라제의 활성을 급격하게 감소시켜, 생존하기 않는 것으로 기대된다.

### 9.3.2. 중간 돌연변이

몇 가지 L 돌연변이체는 야생형 L 단백질의 CAT 생산 수준의 절반 즉, 약 1 내지 50% 정도의 CAT 생산 수준을 나타낸다. 이와 같은 돌연변이를 바이러스에 도입시키고, 살아있다는 것을 발견하였다. 예비 데이터를 보면, 돌연변이 A2는 33°C에서 생장한 것과 비교하였을 때, 40°C에서 생장시켰을 경우에 바이러스 역가가 10 내지 20배 감소되었다는 것을 알 수 있다. 돌연변이체 A25는 33°C 및 39°C에서 생장시켰을 때, 모두 플라크 형성 표현형이 더 작아졌다는 것을 알 수 있다. 이와 같은 돌연변이는 33°C에서 생장시킨 것과 비교하였을 때, 바이러스 역각각 약 10배 감소된 것이다.

### 9.3.3. 야생형 타입 L 단백질의 것과 비슷하거나 높은 L 단백질 기능을 가진 돌연변이체

일부 L 유전자 돌연변이는 *in vitro*에서 야생형 L 단백질의 것과 유사하거나 조금 높은 CAT 유전자 발현 수준을 가지고, 회수된 바이러스 돌연변이체는 조직 배양물에서 야생형 바이러스와 구별하기 힘든 표현형을 가진다.

L에 돌연변이생성은 온도 감응성 및 감쇠를 제공하는 것이 확인되면, 돌연변이는 다중 온도-감응성 표식의 누적 효과를 가지는 것과 복합될 것이다. 한 가지 이상의 온도 감응성 표식을 가지는 L 돌연변이는 온도 허용성이 낮고, 단일 표식 돌연변이체보다 유전적으로 안정하다고 기대된다.

발생된 L 유전자 돌연변이체는 다른 RSV 유전자에 있는 돌연변이와 복합될 수 있고, 또는 비-필수 RSV 유전자 결손 돌연변이(가령, SH 및 M2-2 결손)와 복합될 수 있다. 이는 안전하고, 안정적이고, 효과적인 살아있는 감쇠된 RSV 백신 추천물질로 선택하게 되는 것이다.

10. 바이러스 SH 및 M2/ORF2 유전자를 결손시켜, 사람의 호흡기 합체 바이러스 백신(RSV) 추천물질 생성

#### 10.1 M2-2 결손 돌연변이체

M2-2 유전자를 결손시키기 위해, 두 개의 HindIII 제한효소 부위를 RSV 뉴클레오티드 4478 내지 8505 단편을 포함하는 cDNA 서브클론 pET(S/B)에 있는 RSV 뉴클레오티드 8196 및 8430에 각각 도입시킨다. RSV 제한효소 단편은 Quikchange 부위-직접적인 돌연변이생성(Stratagene, La Jolla, CA)으로 준비하였다. pET(S/B)를 HindIII 제한효소로 절단하여, M2-2 오픈 리딩 프레임의 대부분을 포함하는 234개 뉴클레오티드 서열을 제거한다. M2-2 유전자 생성물의 N말단에서 처음 13개 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오티드는 제거되지 않는데, 그 이유는 이 서열은 M2-1과 겹쳐지기 때문이다. M2-2 결손을 포함하는 cDNA 단편은 SacI 및 BamHI로 절단시키고, 이를 다시 전체 길이 RSV cDNA에 클론시킨다(pRSVΔM2-2라고 칭함).

이와 같은 M2-2 결손을 가지는 감염성 RSV는 pRSVΔM2-2 플라스미드를 MVA-감염된 Hep-2 세포(N, P, L 유전자를 발현시키는)로 트랜스펙션시켜 만든다. 간략하게 설명하면, pRSVΔM2-2는 N, P, L 단백질을 인코딩하는 플라스미드와 함께 Hep2 세포로 트랜스펙션시키는데, 이때 세포는 이미 T7 RNA 폴리메라제를 발현시키는 재조합 백신이나 바이러스(MVA)에 감염되었다. 재조합 RSV의 트랜스펙션 및 회수는 다음과 같이 실시한다; Hep-2 세포는 6개 웰 접시에서 트랜스펙션시키기 전에 5시간 또는 1일경에 나눈다. 70% - 80% 함유된 Hep-2 세포의 단층에는 5moi에서 MVA로 감염시키고, 60분간 35°C에서 배양시켰다. 세포는 그 다음 OPTI-MEM(Life Technologies, Gaithersburg, M.D.)으로 세척한다. 각 접시에 1ml OPTI-MEM으로 대체시키고, 0.2ml 트랜스펙션 배지를 첨가하였다. 트랜스펙션 배지는 0.6μg RSV, 0.4μg N 플라스미드, 0.4μg P 플라스미드, 0.2μg L 플라스미드를 최종 용적이 0.1ml OPTI-MEM 배지에 혼합하여 만든다. 이는 10μl LipofecTACE(Life Technologies)을 포함하는 0.1ml OPTI-MEM과 복합시킨다. 실온에서 15분간 배양한 후에, DNA/LipofecTACE 혼합물을 세포에 첨가하였다. 배지는 하루 뒤에, 2% FBS를 포함하는 MEM을 넣는다. 3일간 35°C에서 배양물을 추가 배양시키고, 상청액을 수득하였다. 트랜스펙션 후 3일 뒤에, 0.3 - 0.4ml 배양물 상청액을 새로운 Hep-2 세포에 계대시키고, MEM(2% FBS 포함)으로 배양시켰다. 6일간 배양시킨 후에, 상청액은 수득하고, 세포를 고정시키고, 염소 항-RSV 항체(Biogenesis)에 이어서 양고추냉이 과산화효소에 연결된 항-염소 항체를 이용하여 간접적인 양고추냉이 과산화효소 방법으로 착색시킨다. 바이러스 감염된 세포는 제조업자의 지시에 따라 기질 크로모겐(DAKO)을 첨가하면 감지할 수 있다. M2-2 유전자 돌연변이를 포함하는 재조합 RSV는 트랜스펙션된 세포로부터 회수할 수 있다. rRSVΔM2-2는 결손된 부분에 인접한 프라이머를 이용하여 RT/PCR에 의해 확인할 수 있다. 도 12A에서 볼 수 있는 것과 같이 야생형 RSV보다는 짧은 234개 뉴클레오티드인 cDNA 단편이 rRSVΔM2-2 감염된 세포에서 감지되었다. RT 반응에서 역 전사효소를 포함하지 않은 RT/PCR 반응에서는 cDNA가 감지되지 않는다. 이는 DNA 생성물이 바이러스 RNA에서 유도되었고, 오염물에서는 유도되지 않았다. M2-2 결손된 RSV의 성질은 현재 측정하고 있다.

#### 10.2 SH 결손 돌연변이체

RSV로부터 SH 유전자를 제거하기 위해, SacI 제한효소 부위를 nt 4220위치에 SH 유전자의 유전자 시작 시그널에 도입시킨다. 유일한 SacI 부위 또한 SH db의 C-말단에 존재한다. 부위-직접적인 돌연변이생성은 서브클론 pET(A/S)에서 실시하는데, 이 서브클론은 AvrII(2129) 및 SacI(4478) 제한효소 단편을 포함한다. pET(A/S) 돌연변이체를 SacI으로 절단시키면, 258개 뉴클레오티드 단편의 SH 유전자를 제거하게 된다. SH 결손을 포함하는 pET(A/S) 서브클론을 AvrII 및 SacI으로 절단시키고, 생성된 제한효소 단편은 전체 길이의 RSV cDNA 클론에 클론시킨다. SH 결손을 포함하는 전체 길이 cDNA는 pRSVΔSH라고 지정하였다.

pRSVΔSH 돌연변이는 상기에서 설명한 것과 같이 만든다(단락 10.1 참고). SH-없는 RSV(rRSVΔSH)는 pRSVΔSH와 N, P, L 발현 플라스미드가 공동-트랜스펙션된 MVA-감염된 세포에서 회수하였다. 회수된 rRSVΔSH는 SH 유전자에 인접한 한 쌍의 프라이머를 이용하여 RT/PCR로 확인하였다. 도 12A에서 볼 수 있는 것과 같이, 야생형보다는 짧은 약 258개 뉴클레오티드를 가지는 cDNA 밴드가 rRSVΔSH 감염된 세포에서 확인되었다. RT 반응에서 역 전사효소를 가지지 않는 RT/PCR 반응에서 DNA는 감지되지 않았다. 이

는 PCR DNA가 바이러스 RNA에서 유도된 것이고, 인정적인 것이 아니면, 수득된 바이러스는 실제 SH없는 RSV라는 것을 말하는 것이다.

### 10.3 SH 및 M2-2 결손 돌연변이체의 생성

SH 및 M2-2 유전자는 cDNA 서브클로닝에 의해 전체 길이의 RSV cDNA로부터 제거하였다. cDNA 서브클론 pET(S/B)ΔM2-2RSV에서 제거된 M2-2 결손을 포함하는 SacI 내지 BamHI 단편을 pRSVΔSH cDNA 클론에 클론시켰다. 이중 유전자 결손 플라스미드 pRSVΔSHΔM2-2는 제한효소 유전자 매핑으로 확인하였다. 도 12B에서 볼 수 있는 것과 같이, SH/M2-2 이중 결손 돌연변이는 야생형 pRSV cDNA보다는 짧았다.

SH 및 M2-2 결손을 모두 포함하는 감염성 RSV의 회수는 초기에 설명한 것과 같이 실시하였다. SH 및 M2-2를 가지는 감염성 바이러스는 트랜스팩션된 Hep-2 세포에서 수득하였다.

[표 2]

돌연변이 RSV L-유전자의 CAT 발현 수준.

돌연변이	의 농도 · CAT (ng/mL)		평어리수	알려진 변화	수득된 바이러스
	33°C	39°C			
A33	0.246	Bkg	5	135E, 136K	무
A73	3.700	0.318	3	146D, 147E, 148 D	유
A171	3.020	Bkg	3	157K, 158D	유
A81	1.000	0.280	3	255H, 256K	유
A185	Bkg	Bkg	3	348E, 349E	무
A91	Bkg	Bkg	3	353R, 355R	무
A101	Bkg	Bkg	3	435D, 436E, 437R	무
A192	1.960	Bkg	3	510E, 511R	유
A11	0.452	Bkg	1	520R	유
A111	2.320	0.267	4	568H, 569E	유
A121	0.772	Bkg	2	587L, 588R	무
A133	Bkg	Bkg	4	620E, 621R	무
A141	2.800	Bkg	3	1025K, 1026D	유
A25	0.169	Bkg	3	1033D, 1034D	유
A45	5.640	0.478	5	1187D, 1188K	유
A153	4.080	0.254	5	1187D, 1188K, 1189R, 1190E	유
A162	10.680	Bkg	3	1208E, 1209R	무
A201	Bkg	Bkg	3	1269E, 1270K	무
A211	2.440	0.047	3	1306D, 1307E	유
A221	0.321	Bkg	3	1378D, 1379E	무
A231	Bkg	Bkg	3	1515E, 1516K	무
A241	1.800	0.308	3	1662H, 1663K	유
A57	5.660	0.706	3	1725D, 1726K	유
A65	3.560	0.168	2	1957R, 1958K	유
A251	0.030	Bkg.	3	2043D, 2044K	유
A261	Bkg	Bkg	3	2102K, 2103H	무
AD11	2.800	0.456	5 and 3	1187D, 1188K, 1725D, 1726K	무
AD21	2.640	0.226	5 and 2	1187D, 1188K, 1957R, 1958K	무
AD31	1.280	0.192	3 and 2	1725D, 1726K, 1957R, 1958K	무
F1	Bkg	Bkg	-	521 F to L	유
F13	0.13	Bkg	-	521 F to L	유
Lwt	3.16	-	-	아미노산 변화 없음.	유

본 발명은 본 발명의 한 가지 특징을 설명하는 의도를 가진 특정 구체예에 한정하지 않고, 본 발명의 범위에는 임의의 구조, 바이러스, 효소에 기능적 등가체가 포함된다. 또한, 여기에서 설명하는 것에 추가하여 다양한 변형이 가능함을 당업자는 인지할 것이다. 이와 같은 변형 또한 본 발명의 범위에 속한다.

여기에서는 다양한 공보를 언급하였고, 전문을 참고로 첨부한다.

### **(57) 청구의 범위**

#### **청구항 1**

M2 유전자에 적어도 한 가지 기능적인 결손을 포함하는 RSV 안티게놈 또는 게놈으로 구성된 것을 특징으로 하는 분리된 감염성 호흡기 합체 바이러스(RSV) 입자.

#### **청구항 2**

RSV-A 및 RSV-B의 항원성 폴리펩티드를 인코딩하는 키메라 RSV 안티게놈 또는 게놈으로 구성된 것을 특징으로 하는 분리된 감염성 RSV 입자.

#### **청구항 3**

L 유전자 돌연변이를 포함하는 RSV 안티게놈 또는 게놈으로 구성된 표현형이 감소된 것을 특징으로 하는 분리된 감염성 RSV 입자.

#### **청구항 4**

제 1, 2, 3항에 있어서, 이형성 서열이 추가로 포함되는 것을 특징으로 하는 분리된 감염성 RSV 입자.

#### **청구항 5**

제 4 항에 있어서, 이형성 서열은 인플루엔자 게놈에서 유도된 것을 특징으로 하는 감염성 RSV 입자.

#### **청구항 6**

재조합 RNA 분자에 있어서, M2-ORF1 또는 M2-ORF2에 결손이 있는 RSV RNA에 연결된 네가티브 가닥 RNA 바이러스의 RSV RNA-직접적인 RNA 폴리메라제에 특이적인 결합부위로 구성되고, 코딩 서열의 역 보체로 구성된 이형성 RNA 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 RNA 분자.

#### **청구항 7**

제 6 항에 있어서, 이형성 서열은 RSV가 아닌 다른 바이러스의 게놈에서 유도된 것을 특징으로 하는 재조합 RNA 분자.

#### **청구항 8**

제 6 항에 있어서, 이형성 서열은 RSV의 또 다른 균주의 게놈에서 유도된 것을 특징으로 하는 재조합 RNA 분자.

#### **청구항 9**

제 8 항에 있어서, 이형성 코딩 서열은 G 또는 F 유전자 생성물을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 재조합 RNA 분자.

#### **청구항 10**

제 6 항에 있어서, L 유전자에 돌연변이가 추가로 포함된 것을 특징으로 하는 재조합 RNA 분자.

#### **청구항 11**

제 6 항에 있어서, SH 유전자에 돌연변이가 추가로 포함된 것을 특징으로 하는 재조합 RNA 분자.

#### **청구항 12**

키메라 RSV 바이러스를 만드는 방법에 있어서, RSV의 N, P, L 유전자 생성물을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 RSV M2-ORF의 발현 없이 RSV 안티게놈 또는 게놈을 포함하는 숙주 세포를 배양시키는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 13**

키메라 RSV를 포함하는 백신에 있어서, RSV의 게놈에는 RSV의 폴리메라제 결합 부위에 연결된 mRNA 코딩 서열의 역 보체가 포함되어 있고, 백신에는 제약학적으로 수용가능한 담체가 포함된 것을 특징으로 하는 백신.

#### **청구항 14**

제 13 항에 있어서, mRNA 코딩 서열은 돌연변이된 SH 유전자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 15**

제 13 항에 있어서, mRNA 코딩 서열은 돌연변이된 L 유전자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 16**

제 13 항에 있어서, mRNA 코딩 서열은 돌연변이된 NS1 유전자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 17**

제 13 항에 있어서, mRNA 코딩 서열은 돌연변이된 M2 유전자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 18**

제 13 항에 있어서, mRNA 코딩 서열은 RSV A 및 B의 G와 F 유전자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 19**

제 13 항에 있어서, 이형 유전자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 20**

제 19 항에 있어서, 이형 유전자는 인플루엔자 계통에서 유도된 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 21**

유전공학적으로 감쇠된 RSV에 있어서, 적어도 한 개의 변형된 바이러스 유전자 서열을 가지고 있어서, 숙주에서 바이러스 복제하는 각 과정동안에 적어도 일부 결손 입자를 생산하는 것을 특징으로 하는 유전공학적으로 감쇠된 RSV.

**청구항 22**

제 21 항에 있어서, 변형된 서열은 비-코딩 부분으로써 바이러스 유전자의 합성이 하향 조절되는 것을 특징으로 하는 유전공학적으로 감쇠된 RSV.

**청구항 23**

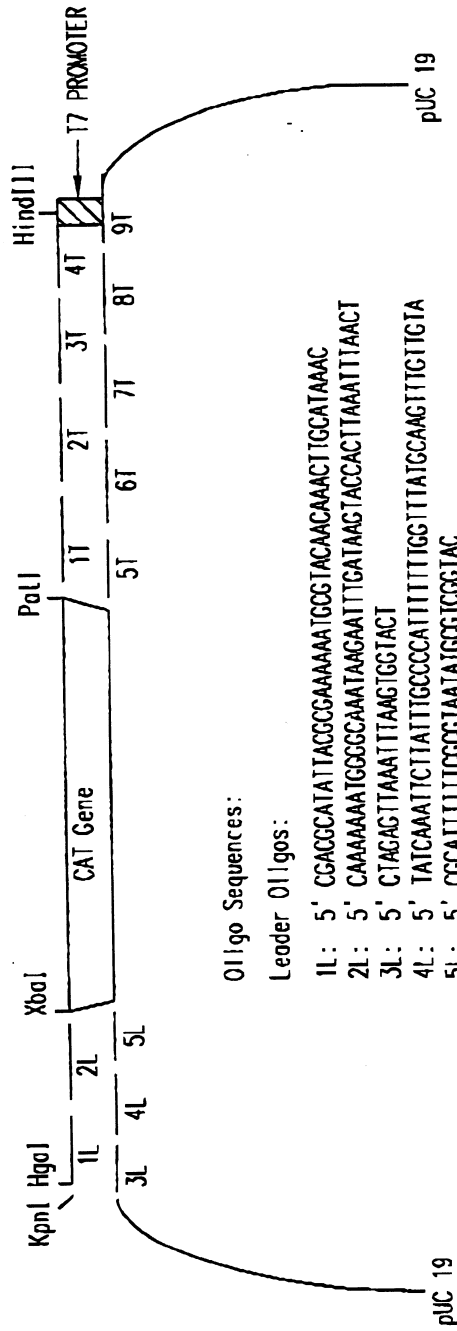
제 21 항에 있어서, 변형된 서열은 아미노산 잔기 또는 에피토프에 삽입, 치환, 결손중 하나를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 유전공학적으로 감쇠된 RSV.

**청구항 24**

제 22 또는 제 23항의 감쇠된 표현형으로 구성된 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

**도면**

도면1



Oligo Sequences:

Leader Oligos:

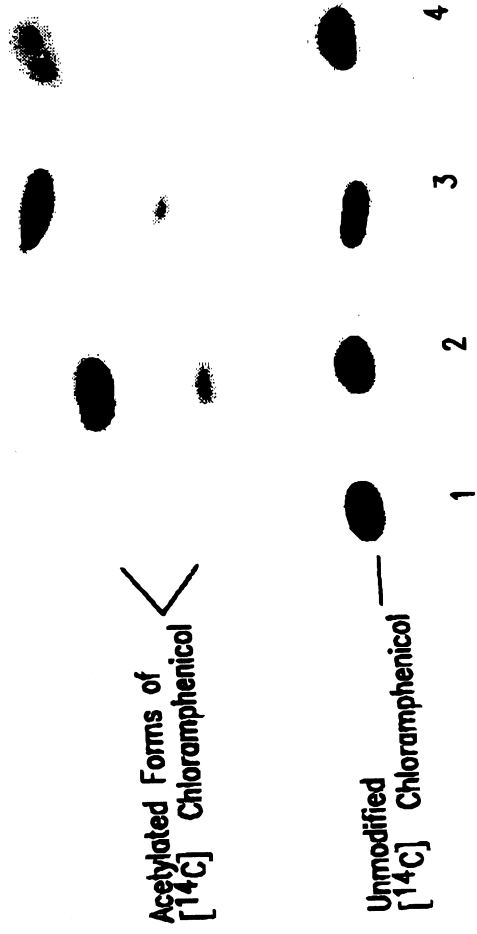
- 1L: 5' CGACGCATATACCGCAAAAAATCGGTACACAAACTTGCATAAAC
- 2L: 5' CAATAAAATGGCGCAAAATAGAAATTTGATAAGTACCACCTTAATTTAACT
- 3L: 5' CTACAGTTAAATTTAAGTGGTACT
- 4L: 5' TATCAAAATCTTATTTGCCCCCATTTTTTGGTTTATCCCAAGTTCTTGTA
- 5L: 5' CGCATTTTTCCCGTAATAIGCGTCGGTAC

Trailer Oligos:

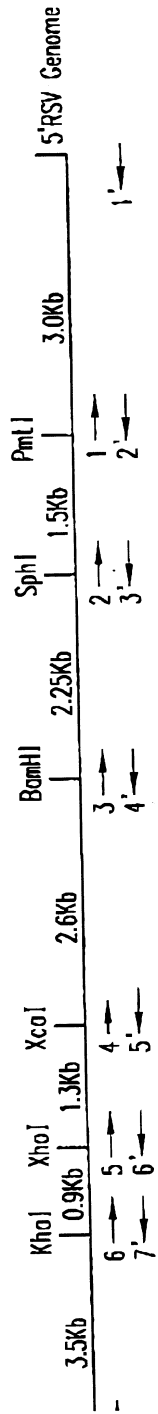
- 1T: 5' GTATTCAAATTAAGTATTAAAAATTAATAATCATATAATTTTTTAAATA
- 2T: 5' ACTTTTACGTAACTAATCTAAGTTATGCAATTTAATCTTGGAGGAATAA
- 3T: 5' ATTTAAACCCTAATCTAATGGTTTATATGCTATTAACCTAAATTAGCAG
- 4T: 5' ATATTAGTTTTGACACTTTTTCTCGTTATAGTGAGTCCGTAATTA
- 5T: 5' AGCTTAATACGACTCACATAACGA
- 6T: 5' CAATAAAGTGTCAAAAACATAATCTCGTAATTTAGTTAATACACATAI
- 7T: 5' AAACCAATTAGATTAGGTTTAAATTTATCTCCCAAGATTAAAAIGATA
- 8T: 5' ACTTTAGGATTAGTTCACATAAAGTTATTTAAAAATTAATGATTTTTTA
- 9T: 5' AATTTAATAACTATAATTGAATACTGCA



도면2



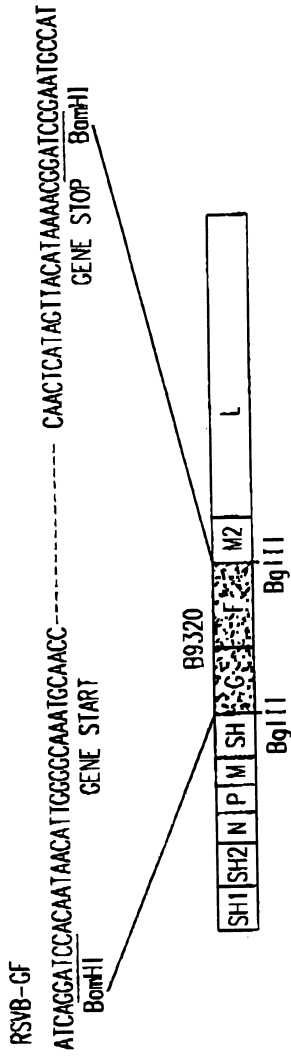
도면3



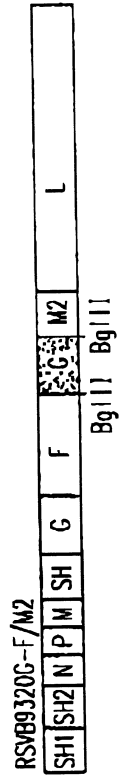
## Primer Sequences:

- 1: 5' GTTAAACACGIGGTGAG
- 2: 5' ACATATAGGCATGCACC
- 3: 5' GACAAATGGATCCCATI
- 4: 5' TGGTTGGTATACCAGTGT
- 5: 5' TACCAAGAGCTCGAGTCA
- 6: 5' TTTACCATAIGCGCTAATGT
- 7: 5' ACGCGAAAAAATGCGTACA
- 1: 5' ACCGAGAAAAAAGTGTCAA
- 2: 5' CTCACCACGGTTAAAC
- 3: 5' GGTGCAIGCCTATAATGT
- 4: 5' AATGGGATCCATTTGTCC
- 5: 5' AACACTGGTATACCAACCA
- 6: 5' TGACTGGCGCTCTGGTA
- 7: 5' ACATTAGCCCATATGGTAAA

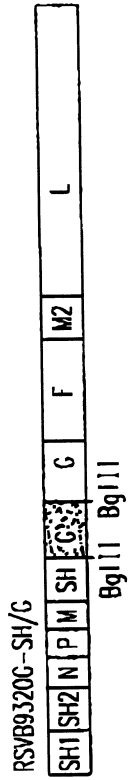
도면4a



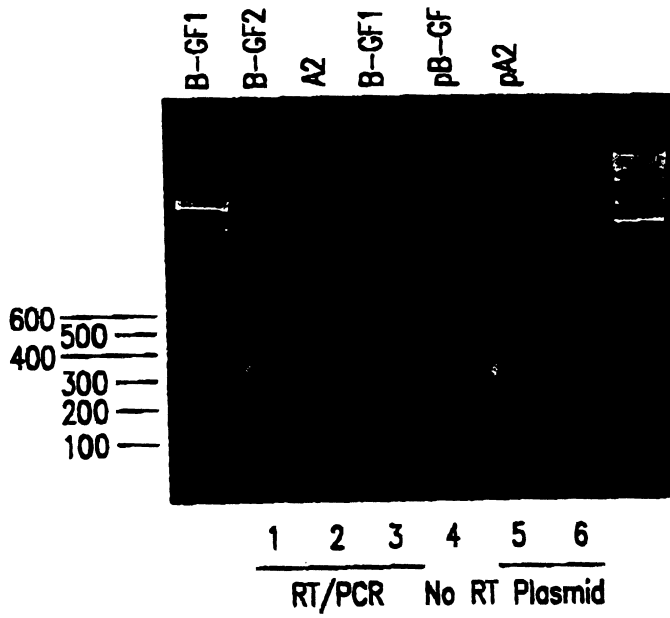
도면4b



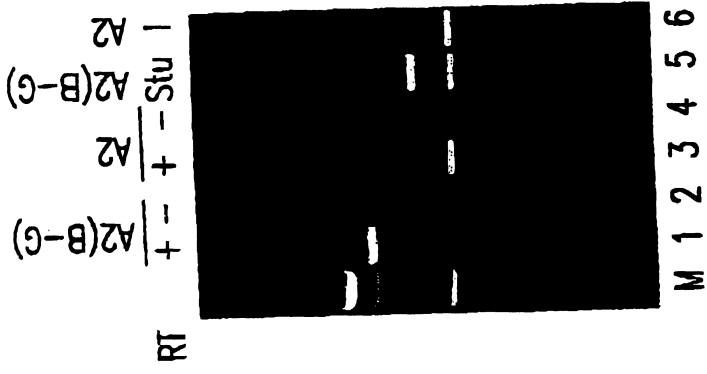
도면4c



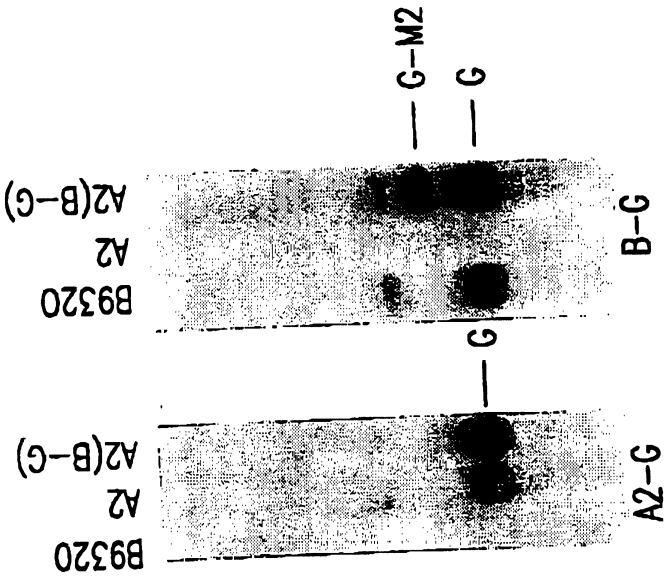
도면5



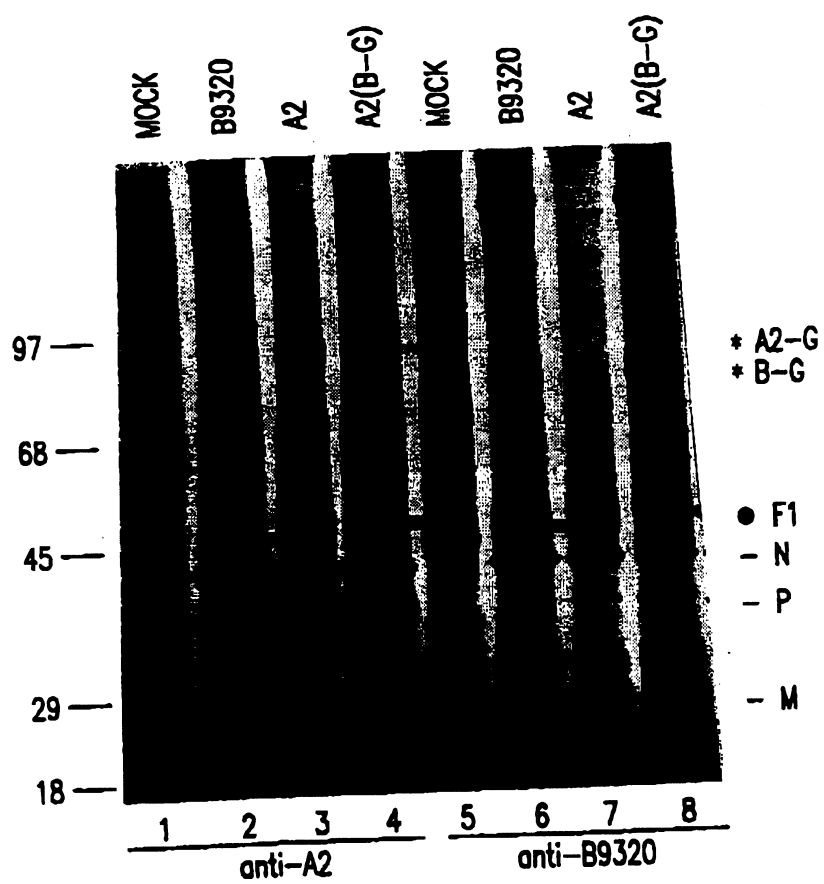
도면 9a



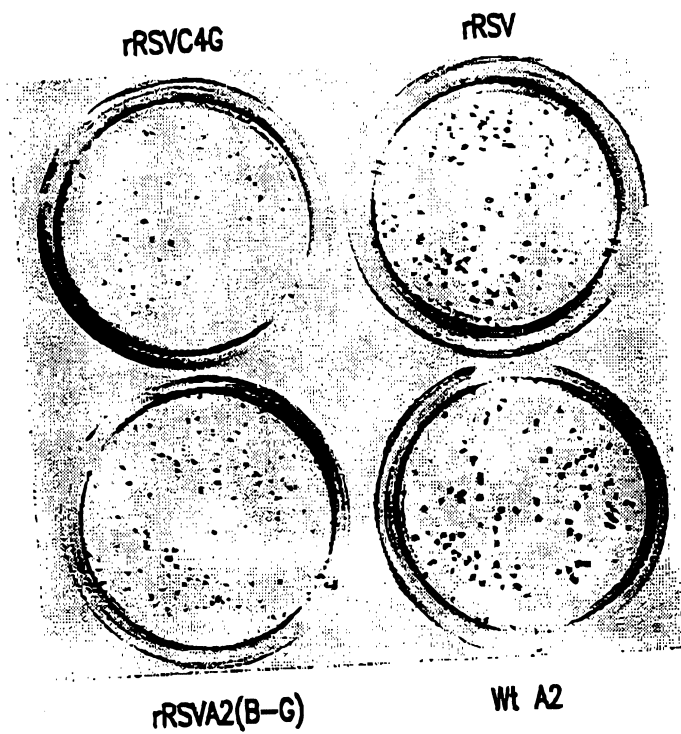
도면 9b



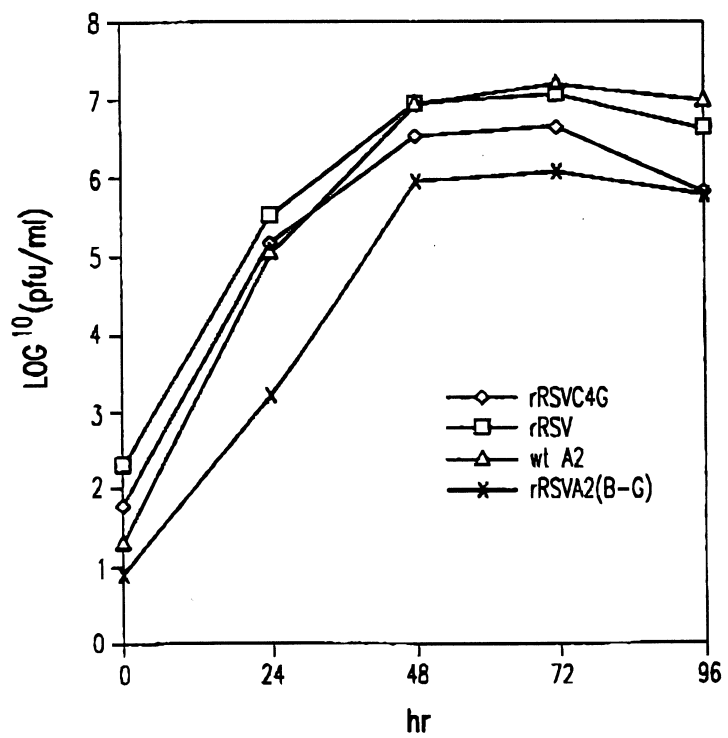
도면7



## 도면8



## 도면9





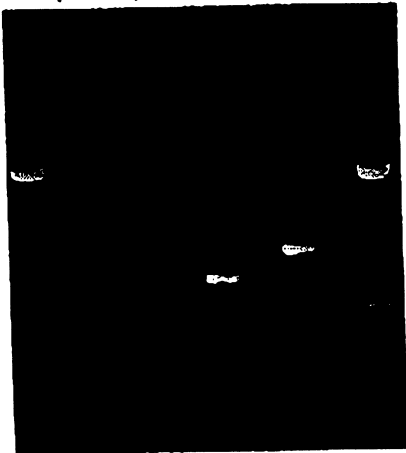
MDPITINGSANVYL DSYLKGVSFSEQNA LGSYIFNGPYLKNDY TNLISRQNPPLIEHM LKKNITQSLISKYH 75  
 KGEIKLEEPTYFQSL LMTYKSMTSSEQIAT TNLKKTIRRAIEIS DVKYVAILNKLGLKE KDKIKSNNGODEDNS 150  
 VJTITIKDDILSAVK DNGSHLKAJKNHSTK QRDITKTLKLLKLMC SMQHPPSWLHMFNL YTKLNNILTOYRSNE 225  
 VKNHGFTLIDNQTLG GDFQILNQYGCIVYH KELKRITVTYVYQFL TWKDISLRLNVCCLI TWISNCLNLTNKSGLG 300  
 LRCGFNNVILTQLFL YGDCILKLFHNEGFI IKEVEGEIMSLLIN ITEEDQFKREYNSM LNNITDAANKAKQNL 375  
 LSRVCHTLLDKTVSD NINGRWIILLKSKFL KLIKLAGDNNLNNLS ELYFLFRIFGHPMVD ERQANDAVKINCNET 450  
 KEYLLSSLMLRGAF IYRIIKGFVNNYNRW PTLRNATVLPRLMT YKKNLNTYPSLLELLE RDLIVLSGLRFYREF 525  
 RLPKVDLEMIINDK AISPKNLWTSFPR NYPMSHIQNYIEHEK LKFESEDKSRRVLEY YLRDNKFNEDCLYNC 600  
 VVNQSYLNNPWHVVS LTGKERELSVGRMFA MQPGMFRQVQILA EK MIAENILOFFPESLT RYGDLELQKLELKA 675  
 GISNKNRYNDNYNN YISKCSITDLSKEN QAFRYETSICSDVL DELHGVQSLFSWLHL TIPHVTIICTYRHAP 750  
 PYIGDHIVDLNNVDE QSGLYRYHMGGIEGH CQKLWTIEATSLLDL ISLKGKESITALING ONQSIDISKPIRLME 825  
 GQTHAQADYLLALNS LKLLYKEYAGTGHKL KGTETYISRDMQFMS KTIQHGYYYPASIK KVLPGPWJNTILD 900  
 FKVSLESIGSLTOEL EYRGESLICSJFRN VMLYNOJALQKMHFA LCNKLYLDILKVLK HLKTFNLDNIDTAL 975  
 TLYMNLMLFGGDP NLLYHSFYRRTPDFL TEATVHSVFIISYVT NHJLKDQLQDLSDDR LNKFLTCJITFDKNP 1050  
 MAEFVTLMRDPOALG SERQAKITSEINRLA VTEVLSTAPNKIFSK SAQHYTTEIDLNDI MQNIETYPHGLRVV 1125  
 YESLPFYKAEKIVNL ISGTKSITWILEKTS AIDLIDDRATEMR KNITLLIRILPDCN RDKREILSMENLSIT 1200  
 ELSKYVREBSWSLSN IVGVTSPSINVTMDI KYTTSTISSGIIIEK YWNVSLIRGERGPTK PWGSSQEKKTMPV 1275  
 YNRQVLTQQRQDID LAKLDNYYASIDNK DEFMEELSITGLT YEKAKKLFPOYLSWN YLHRLTVSSRPEFP 1350  
 ASIPIAYRTTNYHEDT SPINRILTEKYGDED IDIVFQNCISFGLSL MSVVEQFTWVCPNRI ILIPKLINEIHLMKPP 1425  
 IFTGDVDIHLKQVI QKQHMFLPKLSLTQ YVELFSLNKTLSGS HWNSNLTAHKISDY FHNTYILSTNLAGHW 1500  
 ILIILQMKDSKGTFE KDWGEGYITDHMFIN LKVFFFNAVKTLLCF HGGYKAKLECDHNT SDLLCVLELIDSSYW 1575  
 KSMKVFLEQVJKY ILSODASLHRWKGCH SFKLWFLKRLNVAEF TVCPWVWVIDYHPTH MKAILTYIDLVRMGL 1650  
 INIDRTHIKNKHFN DEFYTSNLFYINYNF SDNTHLLTKHIRIAN SELENNYKLYHPTP ETELENLANPKSND 1725  
 KKTLDNYCIGKNVDS IMLPLLSNKKLIKSS AMIRTNYSKODLYNL FPMWVIDRIIDHSGN TAKSNQLYTTISHQI 1800  
 SLVHNSTSLYCHLPW HHINRFNFVFSSTGC KISIEYILKDLKIKD PNCIAFTEGEGAGNLL LRTVVVELHPDIRYIY 1875  
 RSLKDCNDHSLPIEF LRLYNGHINIYDGEN LTIPATDATNNIHWS YLHIKFAEPISLFCV DAELSIVTWNKSI11 1950  
 EMSKHVRKCKYCSSV NKCMLIVKYHAQDDI DFKLDNTTILKTYVC LGSKLGSEVYVLT IGPANIFPVFNWQV 2025  
 AKLILSRITKMFDMPK KADKESIDANIKSLI PFLCYPITKKGINTA LSKLKSUVSGDILSY SIAGRNEVFSNKLIN 2100  
 HKHJMNILKWFNHWLN FRSTELNYMHLWYVE STYPVLSSELLNSLTT NELKLIKITGSLLY NFHNE 2165

도표 11

75 MDP IINGNSANVYLT DSYLKGVISFSECNA LGSYIFNGPYLKNDY TNLISRQWPLJEHNM LKKLNTQSLISKYH  
 150 KGETKLEEPTYFQSL LMTYKSMTSSEQIAT TNLKKIIRRAIEIS DVKVAJLWKLGLKE KDKIKSNWGDQEDMS  
 225 VITTIKDDILSAVK DQOSHLKADKNHSTK QRDITKTLKLLKLMC SMOHPPSWLHMFWL YTKLNNILTOYRSNE  
 300 VKNHGFLLIDNQTLG GFQFILLNQYGCIVYH KELKRITVTTYNGFL TWKDJLSLSRLNVCIL TWISNCLNLTNKSILG  
 375 LRCGFNNWILTQLFL YGDCILKLFHNEGFI IKEVEGFIISLILN ITEEDQFRKREYNM LNNITDAANKAQKNL  
 450 LSRVCHTLIDKTVSD NIINGRWIILLSKFL KLITKLAGDNNLNLN ELYFLFRIFGHPMVD EROAMDVAKINCNET  
 525 KFYLLSSLMLRGAF IYRIIKGFVNNYRW PTLRNAIVLPLRWL TYKLNTPYSLELLE RDILVLSGLRFYREF  
 600 RLPKVDLEMIINDK AISPKNLINTSFR NYMPSHIOQYIEHEK LKFESEDKSRVLEY YLRDNKFNECOLYNC  
 675 VVNOYLNPNHWS LTKERELSVGRMFA MQPGRQVQILA EK MIAENILOFFPESLTYGDELQKLELAK  
 750 GISNKSRYNDNYNN YISKCSITIDLKFN QAFRYETSCISDVL DELHGVSOLFWSHL TIPHVTIICTYRHAP  
 825 PYIGDHIVDLNNVDE QSQLYRYHMGIEGN CQKLWTEAISLIDL ISLKGKESITALING DNOISIDISPIRLME  
 900 GQTHAQADYLLALNS LKILLYKAYAGIGHKL KGTETYISRDIMQFMS KTIQHNQYYPYPAK KVLPGVPWINTILDD  
 975 FKVSLESIGSLTOEL EYRGESLLCSLFRN VWLYNQJALQKNHA LCNNKLYLDILKVLK HLKTFNLDNIDTAL  
 1050 TLYMNLMLFGGUP NLLYRSFYRRTPDFL TEATVHSVFLSYTT NHDLDKDLQDLSDDR LNKFLTCIIFDKNP  
 1125 NAEFVTLMRDPOALG SERQAKITSEINRLA VTEVLSTAPNKIFSK SAQHYTTTEIDLNDI MQNIEPTYPHGLRVV  
 1200 YESLPPFYKAEKIWNL ISGKSTIWNILEKTS AIDLTDIDRATENMR KNITLLIRILPLDCN ROKREILSMENLSIT  
 1275 ELSKYVREKRSWLSN IGVTSPTSIMYTMDI KYTTSITSSGIIIEK YVNSLIRGERGPTK PHWGSSTOEKKTMPV  
 1350 YNRQVLTKKORDQID LLAKLDWVYASIDNK DEFMEELSTIGTLGT YEKAKLFPQYLSVN YLHRLTVSSRPCEFP  
 1425 ASI PAYRITTYNHEDT SPINRILTEKYGDED IDIVFQNCISFGLSL MSVVEQFTNVCNRI ILIPKLEIHLMKPP  
 1500 IFTGDWDIHLKQVI QKQHMFLPDKISLTQ YVELFSLNKTLSKGS HVNSNLIAHKISDY FHNTYILSTNLAGHW  
 1575 ILIIQLMKDSKGIFE KDWEGYITDHF IN LKVFENAYKTYLLCF HKGYGKAKLECOMNT SDLLCVLELIDSSYV  
 1650 KSMKVFLEQVTKY ILSQDASLHRVKGCH SFKLWFLKRLNAEF TVCPMVVNIIDYHPTH MKAILTYIDLVRMGL  
 1725 INIDRIHKNKHFN DEFYTSMLFYINYF SONTLLTKHIRTAN SELENNYKLYHPTP ETELENILAMPKSNL  
 1800 KKTINDYCYGKINWDS IMLPLLNNKLLKJSS AMIRINYSKQDLYNL FPMVVIDRIDHSGN TAKSNQLYTTTSHQI  
 1875 SLVHNSSTLYCMPLPW HHTNRFNFVSSITGC KISIEYTLKDLKIDK PNCJAFIGEGAGNLL LRTWELHPDIRIYI  
 1950 RSLKDCNOHSLPTEF LRLYNHINIIDIYGEN LTIPATDATINIHMS YLHIKFAEPISLFVC DAELSVTVNWSKIII  
 2025 ENSKHVRKCKYCSSV NKCMLIVKYHAQDDI DFKLONITILKTYVC LGSKLKGSSEVYVLT IGPANIFPVFNWQV  
 2100 AKLILSRTKNFDMPK KADKESIDANIKSLI PFLCYPITKKGINTA LSKLKSVMGDIISY STAGRNEVFSNKLIN  
 2165 HKHMWTLKMFNHWLN FRSTELINYHLWYVE STYPYLSSELLNSLTT NELKKLIKITGSLLY NFHNE

도표 12a

RT            -SH    SH    -M2-2    M2-2  
 +   -   +   -   +   -   +   -



도면 12b

