

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0047940
(43) 공개일자 2010년05월11일

(51) Int. Cl.
C12N 7/01 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0106874
(22) 출원일자 2008년10월30일
심사청구일자 2008년10월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
서상희
대전광역시 서구 삼천동 청솔아파트 4동 502호
김희만
인천광역시 부평구 산곡동 우성아파트 112동 609호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

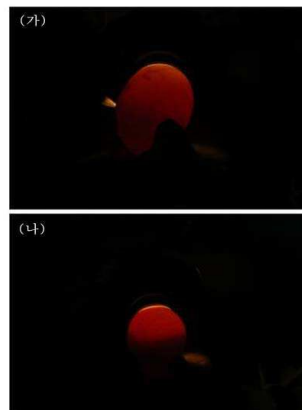
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) H 5 N 1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 감염의 예방용 백신

(57) 요 약

본 발명은 사람 또는 동물에서 H5N1 혈청형 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염의 예방을 하기 위한 백신 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주에서 분리된 고병원성 유발 유전자를 포함하는 H5N1 혈청형 조류 인플루엔자 바이러스주 (KCTC 11405BP)를 이용하여 제조한 백신에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

황선도

대전광역시 유성구 장대동 325-12 동서빌라 103호

김윤희

울산광역시 울주군 범서읍 구영리 구영2차 우미린
아파트 701동 1501호

신진수

대전광역시 서구 괴정동 한신아파트 101동 104호

구근본

울산광역시 중구 우정동 선경2차아파트 212동 501
호

특허청구의 범위

청구항 1

A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)주로부터 고병원성 유발 유전자를 증폭하는 제 1단계; 상기 1단계의 유전자를 재조합하여 형질전환하는 제 2단계; A/PR/8/34 (H1N1)주로부터 고병원성 유발 유전자를 증폭하는 제 3단계; 상기 2단계 및 3단계에서 수득한 플라스미드를 배로 세포에 배양하는 제 4단계; 상기 배양 상층액을 특정병원체부재 (SPF) 부화란에 접종하는 제 5단계를 포함하는 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (KCTC 11405BP)의 제조방법.

청구항 2

제 1항의 제조방법으로 제조된 고병원성 유발 유전자를 포함함을 특징으로 하는 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (KCTC 11405BP).

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 고병원성 유발 유전자는 HA, NA, PB2, PB1, PA, NP, M 및 NS를 포함하는 것을 특징으로 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (KCTC 11405BP).

청구항 4

제 3항의 고병원성 유발 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

청구항 5

H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (KCTC 11405BP)를 특정병원체부재 (SPF) 부화란에 12시간 내지 72시간 배양하여 요수를 수득하는 제 1단계; 상기 1단계의 요수를 1/5 (v/v) 내지 1/15의 비율로 농축한 후 10% 내지 100% (v/v%) 슈크로스로 2차례 정제하는 제 2단계; 상기 2단계의 정제된 바이러스를 0.001 내지 0.1% 포르말린을 첨가한 후, 0 내지 10℃에서 6 내지 24시간 처리하여 불활화시키는 제 3단계; 10% 내지 100% (v/v%) 슈크로스를 이용하여 3차 정제하는 제 4단계를 포함하는 백신의 제조방법.

청구항 6

제 5항의 제조방법으로 제조된 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자의 인체 및 동물 예방용 백신.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 백신은 제 4항의 플라스미드 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 어쥘반트 또는 부형제를 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 동물은 닭, 칠면조, 거위, 오리, 꿩, 메추라기, 비둘기, 타조 등과 같은 야생조류, 가금류, 돼지, 개 및 고양이를 포함함을 특징으로 하는 백신.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 H5N1 혈청형 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염을 예방하기 위하여 고병원성 유발 유전자를 포함하는 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (KCTC 11405BP)를 이용하여 제조한 백신에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] [문헌 1] Selmons et al., *Avian Dis.*, 18(1), pp119-124, 1974
- [0003] [문헌 2] Webster RG et al., *Microbiol Rev.*, 56(1), pp152-179, 1992
- [0004] [문헌 3] Alexander DJ, *Vet. Microbiol.*, 74(1-2), pp3-13, 2000
- [0005] [문헌 4] *Avian Diseases*, 2003. 47 : 1002-1005
- [0006] [문헌 5] Differentiating Infected from Vaccinated Animals; DIVA, *Avian Pathology*, 2003. 32(1) : 47-55
- [0007] [문헌 6] Capua I et al., *Avian Pathol.*, 32, pp47-55, 2003
- [0008] [문헌 7] Capua I and Marangon S, *Avian Pathol.*, 32, pp335-343, 2003
- [0009] [문헌 8] Swayne DE et al., *Avian Pathol.*, 28, pp245-255, 1999

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 인플루엔자 바이러스 (Influenza virus)는 오르소믹소 계통 (Family Orthomyxoviridae)에 속하는 RNA 바이러스로서 혈청형은 A형, B형, C형 등 3가지로 구분된다. 그 중 B형과 C형은 사람에서만 감염이 확인되고 있으며, A형은 사람, 말, 돼지, 기타 포유류 그리고 다양한 종류의 가금과 야생조류에서 감염이 확인되고 있다 (Selmons et al., *Avian Dis.*, 18(1), pp119-124, 1974; Webster RG et al., *Microbiol Rev.*, 56(1), pp152-179, 1992).

[0011] A형 인플루엔자 바이러스의 혈청형은 바이러스 표면의 두 가지 단백질인 헤마글루티닌 (Hemagglutinin: HA), 뉴라미니다제 (Neuraminidase: NA)의 종류에 따라 구분되며, 혈청형에 따라 144종류 (HA 단백질 16종과 NA 단백질 9종)로 분류할 수 있다. HA는 바이러스가 체세포에 부착하는 역할을 하며, NA는 바이러스가 세포 내로 침투할 수 있도록 한다 (Alexander DJ, *Vet. Microbiol.*, 74(1-2), pp3-13, 2000).

[0012] 조류 인플루엔자 바이러스 (AIV)는 모두 A형에 속하는 바이러스로, 바이러스의 외막에 있는 혈구응집소 (Hemagglutinin; HA)와 뉴라미니다제 (Neuraminidase; NA) 유전자에 따라 HA는 15종류, NA는 9종류로 나누어지는 등 그 혈청형이 다양하며, 다른 혈청형 간에 교차방어가 되지 않는 것이 특징이다. AIV의 다양한 혈청형 중 현재까지 발생한 고병원성 조류 인플루엔자(HPAI)는 모두 H5 또는 H7 혈청형에 의한 것으로 나타났다. 과학적으로 확인된 첫 고병원성 조류인플루엔자(Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI)의 발생은 1959년 스코틀랜드에서 발생한 H5N1형의 조류인플루엔자바이러스(AIV)에 의한 것으로, 이후 영국, 캐나다, 호주, 독일, 미국, 아일랜드, 멕시코, 파키스탄, 홍콩, 이탈리아, 칠레, 네덜란드, 벨기에 등 세계 각국에서 AIV 아형(subtype) 중 H5 혈청형 혹은 H7 혈청형에 의해 2003년 말까지 총 21건의 HPAI가 발생하였다.

[0013] 우리나라에서는 2003년 12월에서 2004년 3월 21일까지 총 19건의 H5N1형의 HPAI가 발생하여 국내 양계 산업 뿐만 아니라, 인체감염을 우려한 소비 위축으로 인한 관련 2차 산업에 이르기까지 영향을 미쳤으며, HPAI 근절을 위한 정부의 방역경비는 직접경비만 약 1,500억원이 소요되는 등 실로 막대한 피해를 입히고 종식되었다. 더욱 문제가 되는 것은 2004년부터 현재까지 태국, 베트남, 인도네시아, 말레이시아 등 우리나라와 지리적으로 가까운 동남아시아지역에 H5N1형에 의한 HPAI가 지속적으로 발생하고 있으며, 특히 태국과 베트남에

서는 H5N1형의 HPAI에 의해 인체감염 사례도 지속적으로 나타나고 있어 세계적인 우려를 자아내고 있다. HPAI의 경우 대부분의 나라에서 감염 동물의 살처분(도태)을 통한 근절정책을 원칙으로 하고 있으며, 우리나라 또한 2003년부터 2004년까지 살처분정책을 실시하여 질병을 종식시켰다. 그러나, 현재 조류인플루엔자 백신을 사용하고 있는 멕시코나 이탈리아의 경우처럼 우리나라도 조기에 HPAI를 근절시키지 못하여 나라 전체에 만연이 될 경우에는 막대한 보상금과 환경적인 문제 등으로 인해 과거와 같이 살처분정책 만을 고집할 수 없게 된다. 따라서, HPAI의 재발방지를 위해 노력하는 한편, 만일의 경우에 대비한 H5 혈청형 HPAI에 대하여 방어효과를 나타내는 저병원성 백신 바이러스를 백신주로 개발할 필요성이 제기되고 있다.

[0014] 현재까지 개발된 조류인플루엔자 백신으로는 멕시코에서 사용 중인 H5N2 혈청형에 대한 사독오일백신 (inactivated oil vaccine; Intervet Mexico사, 멕시코)과 계두바이러스를 벡터로 한 H5 혈청형에 대한 유전자 재조합 백신 (H5 recombinant fowl pox-vectored AI vaccine; Merial Select사, 미국)이 있고(Avian Diseases, 2003. 47 : 1002-1005), 이탈리아에서 개발되어 사용 중인 이른바 디바(DIVA) 백신이 있다(Differentiating Infected from Vaccinated Animals; DIVA, Avian Pathology, 2003. 32(1): 47-55). 이탈리아의 디바 백신은 H7N1 혈청형의 HPAI를 방어하기 위하여 저병원성의 H7N3 혈청형의 바이러스를 백신주로 사용하여 개발한 백신으로, N형이 다른 점을 이용하여 감염동물과 백신접종동물을 혈청학적으로도 감별할 수 있는 장점이 있다. 그러나, 조류인플루엔자는 전술한 바와 같이 다양한 혈청형이 존재하며, 혈청형이 다르면 방어도 되지 않기 때문에 2003년말 이후 아시아지역에 유행하고 있는 H5N1 혈청형에 높은 방어능을 보이면서 백신 제조과정 중 안전성이 높은 고병원성 백신주를 이용한 백신 개발이 요구되고 있다.

[0015] 조류 인플루엔자 예방백신 중 생바이러스 백신은 변이가 쉽게 되는 바이러스의 특성상 개발이 거의 불가능한 실정이며, 현재까지 개발된 백신은 크게 사독백신과 유전자재조합 백신으로 구분할 수 있다. 1999년도 이탈리아 그리고 2003년 홍콩에서는 고병원성 조류 인플루엔자 발생이 장기화되고 전국으로 확산되면서 조류 인플루엔자 예방백신을 선택적 살처분 정책과 병행하여 고병원성 조류 인플루엔자 퇴치의 수단으로 이용하였으며, 현재 이탈리아와 홍콩에서는 조류 인플루엔자 예방백신의 사용이 고병원성 조류 인플루엔자를 방제하는데 효과적이었다는 긍정적인 평가를 받고 있다. 이탈리아 (혈청형 A/H7N1)와 홍콩 (혈청형 A/H5N1)에서 긍정적인 평가를 받은 백신은 모두 사독백신으로 HA형은 동일하나 NA형이 다른 이중 혈청형의 바이러스 (혈청형 A/H7N3, 혈청형 A/H5N2)로 사독백신을 제조하여 항체검사 시 야외 감염과의 구별을 시도한 경우이다. 그러나 이 사독백신은 기존 A형 조류 인플루엔자 표준진단법인 한천겔침강법 (AGP, Agar Gel Precipitation) 검사법으로는 백신항체와 야외감염항체의 구분이 불가능하고 NA형을 감별하는 형광항체법은 대규모의 항체 모니터링 검사에 적합하지 않다는 점이 가장 큰 단점으로 지적되고 있다. 또한 현재 개발되어 있는 사독백신은 고병원성 조류 인플루엔자 감염 시 분변으로 배출되는 바이러스의 양을 줄여줄 수는 있지만 완벽하게 질병의 확산을 막지는 못하는 것으로 평가되고 있다 (Capua I et al., *Avian Pathol.*, 32, pp47-55, 2003; Capua I and Marangon S, *Avian Pathol.*, 32, pp335-343, 2003; Swayne DE et al., *Avian Pathol.*, 28, pp245-255, 1999).

[0016] 이에 본 발명자들은 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주에서 분리된 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스를 이용하여 H5N1형에 높은 방어능력을 나타내는 고병원성 유발 유전자를 포함하는 백신주를 선발하여 이를 이용한 백신을 제조함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고병원성 유발 유전자를 포함하는 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (기탁기관: Korean Collection for Type Cultures, 기탁일: 2008년 10월 20일, 기탁번호: KCTC 11405BP)를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (KCTC 11405BP)의 고병원성 유발 유전자를 포함하는 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자의 인체 및 동물 예방용 백신을 제공한다.

[0019] 본원에서 정의되는 고병원성 유발 유전자는 HA, NA, PB2, PB1, PA, NP, M 및 NS를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드를 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은 상기 플라스미드를 이용한 제조된 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자의 인체 및 동물 예방용 백신을 제공한다.

- [0022] 상기 동물은 닭, 칠면조, 거위, 오리, 꿩, 메추라기, 비둘기, 타조 등과 같은 야생조류, 가금류, 돼지, 개 및 고양이를 포함함을 특징으로 하는 백신.
- [0023] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0024] 본 발명에 의한 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주는 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)주로부터 고병원성 유발 유전자, 바람직하게는 HA 및 NA 유전자를 증폭하는 제1단계; 상기 1단계의 유전자를 재조합하여 형질전환하는 제2단계; A/PR/8/34 (H1N1)주로부터 고병원성 유발 유전자, 바람직하게는 PB2, PB1, PA, NP, M 및 NS 유전자를 증폭하는 제3단계; 상기 2단계 및 3단계에서 수득한 플라스미드를 배로 세포에 배양하는 제4단계; 상기 배양 상층액을 특정병원체부재 (SPF) 부화란에 접종하는 제5단계의 제조방법을 통하여 본 발명의 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 KCTC 11405BP (이하 'CNUK-H5N1-08-01'이라 명명함)를 수득할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 의한 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주를 이용한 사독백신의 제조방법은 CNUK-H5N1-08-01주 (KCTC 11405BP)를 특정병원체부재 (SPF) 부화란에 12시간 내지 72시간, 바람직하게는 40시간 내지 50시간, 보다 바람직하게는 48시간 배양하여 요수를 수득하는 제1단계; 상기 1단계의 요수를 1/5 (v/v) 내지 1/15, 바람직하게는 1/10의 비율로 농축한 후 10% 내지 100% (v/v%) 슈크로스, 바람직하게는 20% 내지 80% 슈크로스로 2차례 정제하는 제2단계, 상기 2단계의 정제된 바이러스를 0.001 내지 0.1%, 바람직하게는 0.01% 포르말린을 첨가한 후, 0 내지 10℃, 바람직하게는 4℃에서 6 내지 24시간, 바람직하게는 12시간 처리하여 불활화시키는 제 3단계; 10% 내지 100% (v/v%) 슈크로스, 바람직하게는 20% 내지 80% 슈크로스를 이용하여 3차 정제하는 제 4단계의 제조방법을 통하여 본 발명의 백신을 수득할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 상기의 제조방법으로 제조된 고병원성 유발 유전자를 포함하는 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스주를 제공한다.
- [0027] 또한 본 발명은 상기의 제조방법으로 제조된 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자의 예방 및 치료용 백신을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 백신은 고병원성 유발 유전자 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 어쥘란트 또는 부형제와 함께 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 백신을 위한 담체는 수화된 단백질, 락토오스 등의 하나이상의 안정화제를 포함한 생리학적으로 균형 맞춰진 배양배지를 사용할 수 있으며 0.01 내지 0.1 M의 인산완충액 또는 0.8%의 생리식염수를 사용할 수 있다. 추가적으로 약학적으로 허용가능한 담체는 용액 또는 비용액, 현탁액, 에멀전의 형태를 사용할 수 있다. 배용액 용매의 예로 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일 같은 식물성 오일 및 에틸 올레이트와 같은 주사용 유기 에스테르가 있다. 용액성 담체는 물, 알콜용액, 에멀전 또는 생리식염수 및 완충배양액 같은 현탁액을 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 백신을 위한 어쥘란트로는 완전 프로인트 어쥘란트 (complete Freund's adjuvant), 불완전 프로인트 어쥘란트, 리포펙틴(lipofectin), 피로탁시(lipotaxi), CaPO₄, 25 내지 30% 슈크로스, DEAE 텍스트란, 폴리브렌(polybrene), 사포닌, 알루미늄 히드록시드와 같은 무기질 젤, 리소레스틴, 플루로닉 폴리올스(pluronic polyols), 폴리음이온(polyanions), 펩티드(peptides), 오일 또는 탄화수소 에멀전과 같은 표면활성물질, 디니트로페놀 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0031] 본 발명의 백신을 위한 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.
- [0032] 본 발명의 백신은 경구, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0033] 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 본 발명의 백신의 비경구 투여는 바람직한 순도하에 약제학적으로 허용가능한 담체, 즉 사용되는 농도와 투여량에서 수용체에게 비독성이고 다른 제제 성분과 화합할 수 있는 것을 혼합하여 단위 투여량의 제형으

로 조제하는 것이 바람직하다.

[0034] 또한 본 발명의 백신의 제형은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 제조한 제형은 경구용, 주사용, 도포용으로 사용할 수 있다. 상기 제형은 정제, 캡셀제, 연질캡셀제, 수액제, 과립제, 환제 또는 주사용 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)로 조제할 수 있고, 주사용으로 조제하는 것이 가장 바람직하다.

효 과

[0035] 본 발명은 H5N1 혈청형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 방어효과를 나타내는 H5N1 혈청형의 백신주를 이용한 백신을 제조함으로써, 아시아지역에서 유행하고 있는 H5형의 재유입 또는 재발생에 대비한 안전하고 효과적인 백신으로 질병방제에 크게 기여할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0036] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1. 백신 제조

[0038] 1-1. 고병원성 H5N1주의 HA 유전자 (H5) 제거

[0039] A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) 인체감염증 바이러스 (미국 CDC; 한국질병관리본부 관리번호: 2-008-AIV-MF-016)를 Rneasy kit (Qiagen)를 사용하여 RNA를 추출한 후 cDNA를 만든다. HA 부분의 분절부위의 고병원성 유전자 (RRRKK)를 제거하기 위해 하기 표 1에 나타난 중첩되는 프라이머들(overlapping primers)을 사용하여 2개의 분절을 증폭한 후 이 두개의 분절을 이용하여 PCR을 통해 HA 유전자를 증폭 (PCR 조건: 94℃ 30초, 57℃ 1분, 72℃ 4분/ 35회)하였으며, 하기 실험의 재료로 사용하였다.

표 1

이름	염기서열
HA-1F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG
H5-1089R	CATTCCCTGCCATCCTCCTCTATAAAACCTGCTATAGCTCCAAA
H5-1028F	AGAGGATTATTTGGAGCTAT
NS-890R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT

[0041] 1-2. 고병원성 H5N1주의 유전자 NA (N1) 증폭

[0042] 상기 실시예 1-1와 동일한 방법으로 실험을 수행하여 cDNA를 만든 후, NA (N1)를 하기 표2에 나타난 말단의 프라이머들을 이용하여 PCR을 통해 증폭 (PCR 조건: 94℃ 30초, 57℃ 1분, 72℃ 4분/ 35회)하였으며, 하기 실험의 재료로 사용하였다.

표 2

이름	염기서열
N1-1F	TATGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT
N1-1413R	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTT

[0044] 1-3. 고병원성 H5N1주의 벡터 클로닝

[0045] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 PCR를 이용하여 증폭한 유전자 HA 및 NA를 pGEM-T 이지 벡터 (Promega, 미국)에 클로닝한 후 염기서열을 확인하여, HA 유전자는 Esp3I 엔자임 (Fermentas, 미국)으로 자르고, NA 유전자는 Eco31I 엔자임 (Fermentas, 미국)으로 자른 후, Esp3I 또는 Eco31I으로 자른 pHW2000 vector (SJCRH, p2000, 미국아동질병연구소, 미국)에 T4 DNA ligase (Promega, 미국)로 접합 시킨 후 대장균 (E. coli, JM109 competent cells)를 이용하여 형질전환 시킨 후 LB broth (벡터바이오, 한국)를 이용하여 37℃ 회전배양기 (shaking incubator)에 18시간 배양증폭한 후 Qiagen plasmid Midi kit (Qiagen, 미국)로 정제하여 HA 및 NA 유전자를 얻었다.

[0046] 1-4. A/PR/8/34 (H1N1)주의 벡터 클로닝

[0047] A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스 (ATCC, 미국)에서 상기 실시예 1-1 내지 1-3와 동일한 방법으로 실험을 수행하여 PB2, PB1, PA, NP, M, NS 유전자들을 하기 표 3에 나타난 특정 프라이머들을 이용하여 PCR을 통해 증폭 (PCR 조건: 94℃ 30초, 57℃ 1분, 72℃ 4분/ 35회)한 후, pGEM-T 이지 벡터 (Promega, 미국)에 클로닝한 후 염기서열을 확인 후 PB2는 Esp3I 엔자임 (Fermentas, 미국)으로 자르고, PB1, PA, NP, M 및 NS 유전자는 Eco31I 엔자임 (Fermentas, 미국)으로 자른 후 Esp3I 또는 Eco31I 으로 자른 pHW2000 벡터 (SJCRH, p2000, 미국아동질병연구소, 미국)에 T4 DNA ligase (Promega, 미국)로 접합 시킨 후 대장균 (E. coli, JM109 competent cells)를 이용하여 형질전환한 후 LB broth (벡터바이오, 한국)를 이용하여 37℃ 회전배양기 (shaking incubator)에 18시간 배양증폭한 후 Qiagen plasmid Midi kit (Qiagen, 미국)로 정제하여 PB2, PB1, PA, NP, M 및 NS 유전자를 얻었다.

표 3

[0048]

이름	염기서열
PB2-1	TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTCAAAT
PB2-2341R	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTTTAA
PB1-1	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCAAACC
PB1-2341R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTTTTTC
PA-1	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTACTGAT
PA-2233R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTTTTTT
NP-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTAGATA
NP-1565R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTCTTT
M-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAGATAT
M-1027R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTTACT
NS-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTGACAA
NS-890R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTAT

[0049] 1-5. 약독화된 재조합 H5N1 혈청형 바이러스주 제조

[0050] 상기 실시예 1-3 및 1-4에서 수득한 8개의 플라스미드 (plasmids)를 베로(vero) 세포 (ATCC, CDL-81, 미국)를 37℃, 5% CO₂에 배양 후 각각의 플라스미드 1.5 mg씩 리포펙타민2000 (Lipofectamine2000, Invitrogen, 미국)으로 접종 (transfection) 48시간 후 상층액을 10일령된 특정병원체부재 (SPF, specific pathogen free) 부화란에 접종하여 약독화된 재조합 H5N1 혈청형 바이러스주 (이하 'CNUK-H5N1-08-01' 로 명명함)를 수득하였다 (기탁기관: Korean Collection for Type Cultures, 기탁일: 2008년 10월 20일, 기탁번호: KCTC 11405BP).

[0051]

[0052] 실시예 2. 사독 백신의 제조방법

[0053] 상기 실시예 1에서 수득한 CNUK-H5N1-08-01주 (KCTC 11405BP)를 100개의 10일령의 SPF 부화란에 접종

후 37℃ 배양기에서 48시간 배양한다. 48시간 배양된 부화란을 4℃에서 6시간 냉장 한 후 요수를 수득한다. 수득한 요수를 1/10로 농축한 후 75% 및 25% 슈크로스 (sucrose, 시그마, 미국)를 이용하여 1차 정제한다. 1차 정제한 바이러스를 75% 및 25% 슈크로스를 이용하여 2차 정제한다. 2차 정제된 바이러스를 0.01% 포르말린 (formalin)으로 4℃에서 12시간 불활화 시킨 후로 75% 및 25% 슈크로스를 이용하여 3차 정제한다. 3차 정제한 바이러스의 헤마그루티닌 함량 (HA)을 H5 표준항체 (H5N1 antiserum, 04/214/, NIBSC, 영국)를 사용하여 단위 평판 확산법 (single radial immunodiffusion)으로 측정한다 후 하시 실험에 사용하였다.

실험예 1. CNUK-H5N1-08-01주 (KCTC 11405BP)의 HA 분절부위의 고병원성 유전자 존재 제거 여부 검증.

상기 실시예 1에서 수득한 CNUK-H5N1-08-01주 (KCTC 11405BP)의 HA 유전자 제거 여부를 검증하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

1-1. 유전자 분석에 의한 검증

고병원성 H5N1 조류독감은 HA 단백질 분절부위에 고병원성 유전자 (RRRKK: AGAAGAAGAAAAAG)가 있어 사람에게 감염시 전신 장기에 감염하여 치명적인 질병을 야기하기에 이에 대한 백신을 개발하기 위해서는 HA 단백질 분절부위에 RRRKK가 제거된 약독화된 백신주를 개발하여야 한다.

CNUK-H5N1-08-01 백신주로부터 상기 실시예 1-1의 실험방법에 HA 유전자를 PCR로 증폭하여 pGEM-T 이질 벡터 (Progmega, 미국)에 클로닝한 후 ABI prism™ BigDye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 ((주) 솔젠트, 한국)를 이용한 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer ((주) 솔젠트, 한국)로 염기서열을 얻은 후 Lasergene 프로그램 (DNASTAR, 미국)를 이용하여 고병원성유전자 제거를 확인하였다.

실험결과, 하기 표 4에 나타난 바와 같이, CNUK-H5N1-08-01 백신주의 고병원성 유전자 RRRKK가 제거되었음을 확인할 수 있었다.

표 4

바이러스주	염기서열
A/Vietnam/1203/4 (H5N1)	AGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGA
CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 인체백신주	AGAGAG-----AGAGGA

1-2. 10일령의 부화란에 접종하여 검증

고병원성 유전자 RRRKK를 가지고 있는 고병원성 H5N1 조류독감 바이러스를 10일령의 부화란에 접종하면 태아가 사망함으로써 등불로 검란 시 혈관이 보이지 않는다.

고병원성 H5N1 조류독감 바이러스 및 상기 실시예 1에서 수득한 상기 약독화된 CNUK-H5N1-08-01 백신주를 10일령의 부화란에 접종하여 72시간 후에 등불을 이용하여 태아의 상태를 검란하였다.

실험결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 고병원성 H5N1 조류독감 바이러스를 접종받은 부화란은 등불로 검란하니 혈관이 거의 보이지 않았던 반면에, 약독화된 CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 백신주를 접종한 부화란은 태아가 죽지않아 선명한 혈관을 확인할 수 있었다.

실험예 2. CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 인체백신주의 안전성 및 면역성 검증.

상기 실시예 2에서 수득한 백신의 H5N1 혈청형 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 안전성 및 면역성을 확인하기 위하여 족제비를 사용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

족제비는 사람 유행성독감으로 감염되면 사람과 가장 유사한 독감증상을 나타내기에 고병원성 H5N1 조류독감 인체백신 효능검증에 사용하였다. 10마리의 6주령의 족제비 (Marshall's Farms, 미국)에 오른쪽 뒷다리의 이두근 (biceps muscle)에 15 mg씩 CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 조류독감 인체백신 항원을 접종 2주 후 2차 접종하고, 2차 접종 1주일 후 혈청을 수득하여 항체억가를 혈구응집억제반응 (HI, hemagglutination inhibition)에

의해 검증하였다. 대조군으로 사용한 10마리의 족제비는 생리식염수 (saline)를 접종하여 효능 비교하였다.

실험결과, 하기 표 5에 나타난 바와 같이, 백신을 접종 받은 10마리의 족제비 모두는 혈구응집역가 (HI) 역가가 40 이상을 나타냈으며, 사망, 체중 감소 등의 특별한 임상증상을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

표 5

그룹	혈구응집역가(HI)	폐사
백신접종	1번족제비: 80	0/10
	2번족제비: 40	
	3번족제비: 80	
	4번족제비: 160	
	5번족제비: 80	
	6번족제비: 160	
	7번족제비: 80	
	8번족제비: 160	
	9번족제비: 160	
	10번족제비: 80	
대조군	1번족제비: 0	0/10
	2번족제비: 0	
	3번족제비: 0	
	4번족제비: 0	
	5번족제비: 0	
	6번족제비: 0	
	7번족제비: 0	
	8번족제비: 0	
	9번족제비: 0	
	10번족제비: 0	

실험예 3. CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 인체 조류독감 백신주의 효능 검증.

상기 실시예 2에서 수득한 CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 백신 항원의 효능을 검증하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

3-1. H5N1 공격접종

10마리의 6주령의 족제비 (Marshall's Farms, 미국)에 오른쪽 뒷다리의 이두근 (biceps muscle)에 15 mg씩 CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 백신 항원을 접종 2 주 후, 2차 접종하고, 2차 접종 1 주일 후 백신을 접종하지 않은 10마리 족제비의 대조군과 함께 100 ferret lethal dose 50 (FLD50) 1 ml를 코로 공격접종하여 14일간 생존여부를 판정하였다.

실험결과, 하기 도 2에 나타난 바와 같이, 백신을 접종한 10마리의 족제비들은 특별한 임상증상 없이 100% 생존한데 반하여, 백신을 접종하지 않은 10마리의 족제비들은 공격접종 7일내로 100% 사망하였음을 확인할 수 있었다.

3-2. 조직학적 바이러스 역가 검증

상기 실험예 3-1의 실험방법에 따라 100 ferret lethal dose 50 (FLD50) 1 ml를 코로 공격접종 후 3일 및 5일째에 실험군 및 대조군으로부터 각 3마리의 족제비를 안락사 시킨 후 폐, 심장, 간, 대장 및 뇌의 조직들을 적출하여, 조직의 0.1 g씩 마쇄한 후 바이러스 역가 ($\log_{10}EID_{50}/0.1\text{ g}$)를 측정하였다.

실험결과, 도 3에 나타난 바와 같이, CNUK-H5N1-08-01 (H5N1) 백신 항원을 2 번 접종받은 실험군은 모든 조직에서 공격접종한 고병원성 H5N1 조류독감 바이러스가 검출되지 않았던 반면에, 대조군은 모든 조직에서

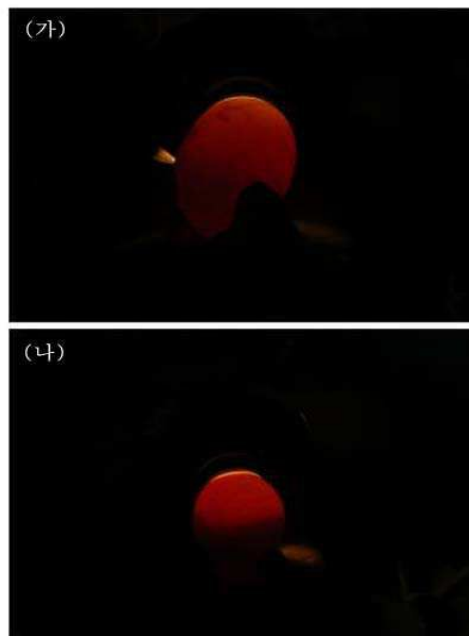
높은 역가의 공격 접종한 바이러스가 검출되었음을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

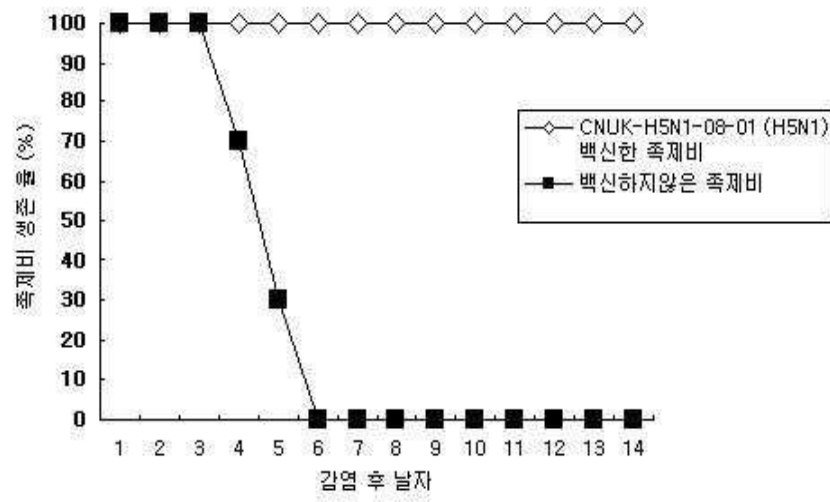
- [0079] 도 1은 약독화된 CNUK-H5N1-08-01(H5N1) 인체백신주(나) 및 고병원성 인체감염증 H5N1주(가)를 접종한 부화란을 등불을 이용하여 검증한 결과를 나타낸 도이며,
- [0080] 도 2는 약독화된 CNUK-H5N1-08-01(H5N1) 인체백신 항원을 죽제비 근육 접종한 후 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 100 FLD 1 ml를 코로 공격접종 한 후 14일 동안 생존율을 나타낸 도이고,
- [0081] 도 3은 약독화된 CNUK-H5N1-08-01(H5N1) 인체백신 항원 접종 받은 죽제비(가) 및 백신을 접종하지 않은 죽제비(나)의 조직에서의 바이러스 역가 ($\log_{10}EID_{50}/0.1g$) 검증한 결과를 나타낸 도이다.

도면

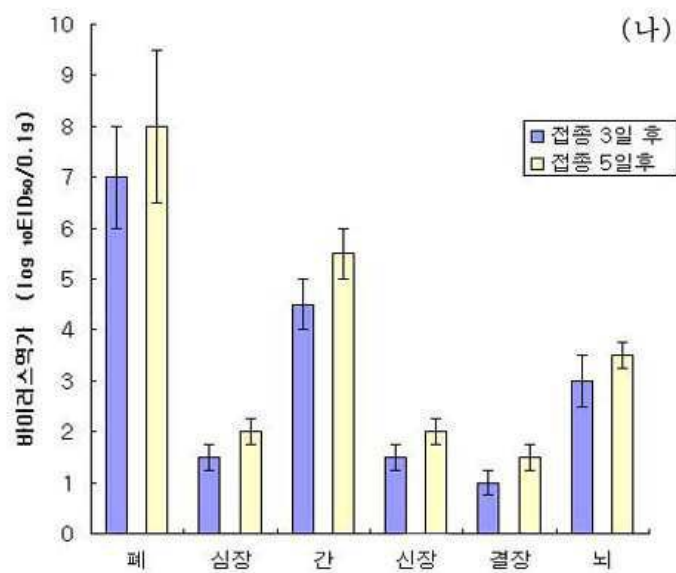
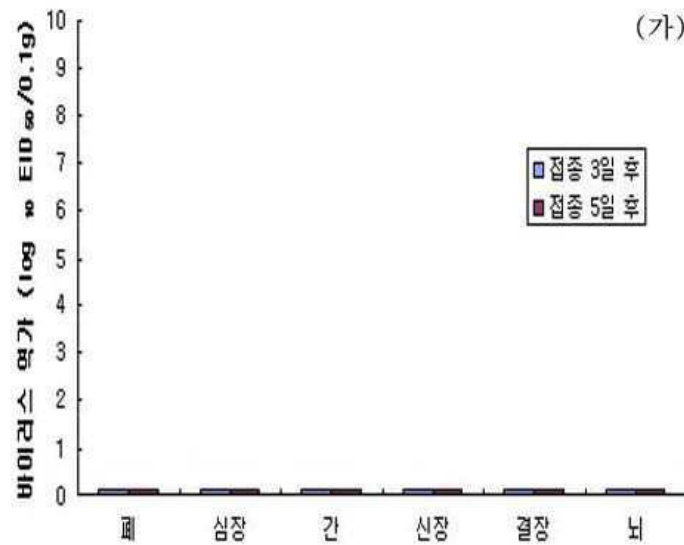
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> University-Industry Collaboration Foundation Chungnam National University
- <120> The vaccine for preventing the infection of H5N1 serotype highly pathogenic avian influenza
- <130> DIF/08-10-05/SJ
- <160> 18
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HA-1F

<400> 1
 tattcgtctc agggagcaaa agcagggg 28

<210> 2
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> H5-1089R

<400> 2
 cattccctgc catcctccct ctataaaacc tgctatagct ccaaa 45

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> H5-1028F

<400> 3
 agaggattat ttggagctat 20

<210> 4
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> NS-890R

<400> 4

atattgtctc gtattagtag aaacaagggt gtttt

35

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N1-1F

<400> 5

tatttgtctc agggagcaaa agcaggagt

29

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N1-1413R

<400> 6

atatgtctc gtattagtag aaacaaggag tttttt

36

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PB2-1

<400> 7

tatttgtctc agggagcgaa agcagggtcaa at

32

<210> 8
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PB2-2341R

<400> 8
 atatggtctc gtattagtag aaacaaggtc gtttttaa

38

<210> 9
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PB1-1

<400> 9
 tattcgtctc agggagcgaa agcaggcaaa cc

32

<210> 10
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PB1-2341R

<400> 10
 atatcgtctc gtattagtag aaacaaggca ttttttc

37

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PA-1

<400> 11
tattcgtctc agggagcgaa agcaggtact gat 33

<210> 12
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PA-2233R

<400> 12
atatcgtctc gtattagtag aaacaaggta ctttttt 37

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NP-1

<400> 13
tattcgtctc agggagcaaa agcagggtag ata 33

<210> 14
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NP-1565R

<400> 14
atatcgtctc gtattagtag aaacaagggt atttttcttt 40

<210> 15

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M-1

<400> 15
 tattcgtctc agggagcaaa agcaggtaga tat 33

<210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M-1027R

<400> 16
 atatcgtctc gtattagtag aaacaaggta gttttttact 40

<210> 17
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NS-1

<400> 17
 tattcgtctc agggagcaaa agcagggtga caa 33

<210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NS-890R

<400> 18
atatcgtctc gtattagtag aaacaagggt gttttttat

39