

(72) 발명자

오진석

경기 수원시 영통구 영통동 988-2 살구골 동아아파트717동 1303호

강동석

경기 수원시 영통구 매탄3동 436-39번지 202호

송대섭

경기 수원시 장안구 천천동 비단마을 신명아파트 751동202호

강보규

경기 수원시 영통구 영통동 신나무실 5단지 신안아파트531동 401호

이철승

서울 강남구 압구정동 현대아파트 79동 604호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 10의 아미노산 서열 또는 그와 98% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되며 동등한 면역원성을 가지는 헤마글루티닌(HA)을 포함하는 H3N2 혈청형의 인플루엔자 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 98% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열은 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열 중 97, 127, 142, 176, 188, 209, 212 및 252의 위치의 아미노산 잔기 중 하나 이상이 서열번호 10의 해당 아미노산 잔기와 동일한 것인 H3N2 혈청형의 인플루엔자 바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 그와 98 % 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되며 동등한 면역원성을 가지는 뉴라미다아제(NA)을 포함하는 H3N2 혈청형의 인플루엔자 바이러스.

청구항 4

제 3항에 있어서, 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 비구조성 단백질(NS), 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 매트릭스 단백질(M), 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 핵단백질(NP), 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 중합효소 단백질(PA), 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 중합효소 단백질 2(PB2) 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 중합효소 단백질 1(PB1) 을 추가로 포함하는 인플루엔자 바이러스.

청구항 5

제 1항에 있어서, 수탁번호 KCTC 11205BP 의 인플루엔자 바이러스.

청구항 6

제 1항에 있어서, 수탁번호 KCTC 11206BP 의 인플루엔자 바이러스.

청구항 7

제 1항에 있어서, 수탁번호 KCTC 11207BP 의 인플루엔자 바이러스.

청구항 8

제1항에 있어서, 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열 또는 그와 98% 이상 상동성을 가지는 뉴클레오타이드 서열로 표시되며 동등한 면역원성을 가지는 헤마글루티닌(HA)을 포함하는 H3N2 혈청형의 인플루엔자 바이러스.

청구항 9

서열번호 9의 염기서열을 가지는 뉴클레오타이드.

청구항 10

제3항에 있어서, 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열 또는 그와 98% 이상 상동성을 가지는 뉴클레오타이드 서열로 표시되며 동등한 면역원성을 가지는 뉴라미다아제(NA)를 포함하는 H3N2 혈청형의 인플루엔자 바이러스.

청구항 11

서열번호 11의 염기서열을 가지는 뉴클레오타이드.

청구항 12

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 바이러스 또는 이의 항원을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 백신은 개에 적용되는 것인 백신 조성물.

청구항 14

제 12항에 있어서, 면역증강제(adjuvant)로서 알루미늄 하이드록사이드 겔 또는 오일을 추가적으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 백신은 개 파라인플루엔자 바이러스(canine parainfluenza virus), 개 디스탬퍼 바이러스(canine distemper virus), 개 아데노바이러스(canine adenovirus) 또는 개 보테텔라 브론키셉티카 균(Bordetella bronchiseptica)와 혼합 또는 복합된 백신인 백신 조성물.

청구항 16

제 12항에 있어서, 상기 백신은 바이러스를 약독화시켜 만드는 생독 백신인 조성물.

청구항 17

제 12항에 있어서, 상기 백신은 인플루엔자 바이러스를 2^5 HAU 함유한 백신 조성물.

청구항 18

제12항에 있어서, 상기 항원은 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 그와 98% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되며 동등한 면역원성을 가지는 헤마글루티닌(HA) 또는 면역활성을 갖는 이의 단편이며, 이러한 항원이 90% 이상 함유된 백신 조성물.

청구항 19

제12항에 있어서, 상기 항원은 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 그와 98 % 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되며 동등한 면역원성을 가지는 뉴라미다아제(NA) 또는 면역활성을 갖는 이의 단편이며, 이러한 항원이 90% 이상 함유된 백신 조성물.

청구항 20

제12항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 바이러스 또는 이의 항원을 포함하는 H3N2 혈청형 인플루엔자 바이러스의 진단 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 신규한 인플루엔자 바이러스 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 및 A/Canine/Korea/03/07 (H3N2), 이들 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물, 상기 조성물을 개체에 투여하여 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법, 및 검정 키트에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 인플루엔자는(Influenza)는 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae)의 인플루엔자 바이러스 타입 A(Influenza virus type A)에 의해 유발되는 질병으로서, 사람, 돼지, 말, 조류 등에서 경제적으로 중요한 질병이다. A형 인플루엔자의 혈청형은 두 가지 단백질 즉, 혈구응집(Hemagglutinin) 및 뉴라미다아제

(Neuraminidase)의 종류에 따라 구분되며 H 혈청형과 N 혈청형이 있다. 인플루엔자 바이러스의 혈청형은 각각의 H 혈청형과 N 혈청형으로 표시(예: H9N2) 하며, 조류 인플루엔자 바이러스는 H혈 청형이 16가지, N 혈청형이 9가지 종류가 있으며 산술적으로 존재 가능한 인플루엔자 바이러스의 혈청형은 144가지이다.

<3> 인플루엔자는 인수 공통 전염병으로서, 인플루엔자 바이러스는 변이성이 크며 한 종에서 다른 종으로 바로 전파될 수 있는 가능성을 가지고 있어, 고병원성 인플루엔자의 세계적인 전파를 해결하는 일이 큰 과제로 떠오르고 있다. 하지만 인플루엔자 바이러스가 관계가 없는 전혀 새로운 종에 전파되는 것은 몇몇의 보고 사례가 있었지만 흔한 일은 아니었다.

<4>

<5> 한편, 개 인플루엔자 바이러스는 신종 바이러스로서 개에서 현재 백신이나 자연 면역이 되어 있지 않은 상태이므로, 모든 종과 연령에서 감수성이 있는 바이러스이다. 급성 호흡기 질환을 야기하는 개 인플루엔자 바이러스는 심한 기침, 열, 비강의 분비물등의 임상증상을 가진다.

<6> 개 인플루엔자는 처음 2004년 미국 플로리다 주의 그레이 하운드견 경주장에서 발생되었다고 보고되었다. 그 이후 미국의 텍사스, 알라바마, 알칸소 주 등에서 개 인플루엔자가 발생되면서 개의 신종 전염병으로 인식되기 시작했다. 미국에서 발생한 개 인플루엔자의 역학적 조사에 따르면, 말 인플루엔자 H3N8과 거의 동일하게 밝혀져, 말에서 개에게로 인플루엔자가 옮겨가 새로운 개 인플루엔자 바이러스가 생성되었을 것이라 추측하고 있다. 이처럼 말 인플루엔자 H3N8 에 의해 경주견에 발병된 출혈성 폐렴이나, 개에게서 분리된 사람 인플루엔자 H3N2에 대한 보고가 있지만, 개에게서 발병된 인플루엔자에 대한 혈청학적이고 바이러스학적인 증거는 충분히 제시하지 못하고 있다.

<7> 또한, 조류 인플루엔자가 개에게 전파된 예도 보고되고 있는데, 조류 인플루엔자가 개에게 전파되는 메카니즘은 역학적으로 두가지로 추측될 수 있다. 하나는 개 농장에서 조리되지 않은 오리와 닭의 부산물을 개의 먹이로 함으로써 바이러스의 전파가 일어날 수 있는 가능성과, 또 하나는 정상 개와 조류 인플루엔자에 감염된 개의 직접적 접촉 또는 호흡기 전파에 의하여 일어날 수 있는 가능성이다. 이렇게 감염된 개가 다른 환경에 노출되고, 다른 개들과 접촉하게 됨으로써, 개 인플루엔자의 확립에 도움을 주었을 것이라 추측하고 있다.

<8> 이러한 개 인플루엔자 바이러스는 2차 감염의 가능성과 치사율이 다양하기 때문에 백신으로 예방하는 것이 중요하다. 하지만 현재 전 세계적으로 시판되는 개 인플루엔자 바이러스 백신은 없는 상태이다.

<9> 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 최근 한국에서 인플루엔자에 감염된 개로부터 신규한 인플루엔자 바이러스 A/Korea/Canine/01/07, A/Korea/Canine/02/07 및 A/Korea/Canine/03/07를 분리하였고, 이들 바이러스의 바이러스학적, 혈청학적, 병원소적 및 계통 발생학적 분석을 통하여 조류 인플루엔자 타입 A의 전체 유전자가 조류와 개라는 종을 뛰어넘어 전파되었음을 확인하였고, 나아가 이들 바이러스에 대하여 안정성 높은 백신을 개발하는데 성공함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<10> 본 발명의 하나의 목적은, 신규한 H3N2형의 개 인플루엔자 바이러스를 제공하는 것이다.

<11> 본 발명의 다른 목적은, 상기 인플루엔자 바이러스를 코딩하는 뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 또다른 목적은, 상기 바이러스에 대해 면역을 형성시킬 수 있는 인플루엔자 백신 조성물을 제공하는 것이다.

<13> 본 발명의 또다른 목적은, 상기 바이러스 또는 이의 항원을 포함하는 H3N2 혈청형 인플루엔자 바이러스의 검정 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<14> 하나의 양태로서, 본 발명은 신규한 H3N2 형의 개 인플루엔자 바이러스에 관한 것이다.

<15> 본 발명은 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 그와 95 % 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되는 헤마글루티닌(HA)을 포함하는 H3N2 혈청형의 인플루엔자 바이러스에 관한 것이다.

<16> 또한, 본 발명의 개 인플루엔자 바이러스의 전체 뉴라미다아제(NA) 아미노산 서열(도 1) 및 전체 헤마글루티닌

(HA) 아미노산 서열(도 2)을 분석한 결과, 본원 발명에서 분리한 개 인플루엔자 바이러스는 기존에 알려진 말 인플루엔자 바이러스 H3N8과 비교했을 때, 매우 특징적으로 아미노산 서열이 변화되어 있음을 확인할 수 있었다. 특히, A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 및 A/Canine/Korea/03/07 (H3N2)의 HA 아미노산 서열 분석에서 아미노산 서열 번호 97, 127, 142, 176, 188, 209, 212 및 252의 위치에서 각각 N (Asparagine), I (Isoleucine), T (Threonine), T (Threonine), N (Asparagine), S (Serine), I (Isoleucine) 및 I (Isoleucine)의 8개 아미노산이 특징적으로 변화되어 있었음을 확인할 수 있었다(도 3). 따라서, 본 발명에서 상기 95 % 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열은 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열 중 97, 127, 142, 176, 188, 209, 212 및 252의 위치의 아미노산 잔기 중 하나 이상이 서열번호 10의 해당 아미노산 잔기와 동일한 것인 H3N2 혈청형의 인플루엔자 바이러스를 포함할 수 있다.

<17> 또한, 본 발명의 인플루엔자 바이러스는 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 그와 95 % 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되는 뉴라미다아제(NA)을 포함할 수 있다.

<18> 또한, 본 발명의 인플루엔자 바이러스는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 비구조성 단백질(NS), 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 매트릭스 단백질(M), 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 핵단백질(NP), 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 중합효소 단백질(PA), 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 중합효소 단백질 2(PB2) 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 중합효소 단백질 1(PB1) 을 추가로 포함할 수 있다.

<19> 본 발명에서 헤마글루티닌 또는 뉴라미다아제 단백질에 대해 사용된 용어 “상동성”이란 야생형(wild type) 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 단백질의 경우 본 발명의 헤마글루티닌 또는 뉴라미다아제 단백질의 아미노산 서열과 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상 동일할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 일반적으로, 단백질 상동물은 목적 단백질과 동일한 활성 부위를 포함할 것이다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

<20> 구체적으로, 본 발명의 개 인플루엔자 바이러스는 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 및 A/Canine/Korea/03/07 (H3N2)를 포함한다.

<21> 상기 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스는 조류 인플루엔자 바이러스와 95.5 내지 98.9%의 상동성을 가진다. 특히 HA(Hemagglutinin) 및 NA(Neuraminidase) 유전자는 한국에서 분리된 비둘기 인플루엔자 바이러스인 A/Dove/Korea/S11/03 (H3N2)과 가장 높은 상동성을 보였고, NS(nonstructural) 유전자는 중국에서 분리된 닭 인플루엔자 바이러스인 A/Chicken/Nanchang/7-010/2000 (H3N6)과 가장 높은 상동성을 보였다. PB1(Polymerase basic protein 1), PB2, PA(Polymerase), NP(nucleoprotein) 및 M(matrix) 유전자는 홍콩, 일본 및 중국에서 분리된 조류 인플루엔자 바이러스와 높은 상동성을 보였다. A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스는 2007년 9월 19일자로 대한민국 대전시 유성구 어은동에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 KCTC 11205BP 로 기탁되었다.

<22> A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자는 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하며, 뉴라미다아제(NA) 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함한다. 서열번호 9는 HA 유전자 및 아미노산의 전체 서열을 나타내고, 서열번호 11은 NA 유전자 및 아미노산의 전체 서열을 나타낸다. 또한, 비구조성 단백질(NS) 유전자는 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하며, 매트릭스 단백질(M) 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하며, 핵단백질(NP) 유전자는 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하며, 중합효소 단백질(PA) 유전자는 서열번호 6에 기재된 염기서열을 포함하며, 중합효소 단백질 2(PB2) 유전자는 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하며, 중합효소 단백질 1(PB1) 유전자는 서열번호 8에 기재된 염기서열을 포함한다.

<23> 상기 A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자는 서열번호 13에 기재된 염기서열을 포함하며, NA 유전자는 서열번호 14에 기재된 염기서열을 포함한다. 이들 HA 및 NA의 유전자 및 아미노산은 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 HA 및 NA의 유전자 및 아미노산과 각각 98%의 상동성을 가짐으로써 동일한 바이러스로 확인되었다. A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스는 2007년 9월 19일자로 대한민국 대전시 유성구 어은동에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 KCTC 11206BP 로 기탁되었다.

<24> 상기 A/Canine/Korea/03/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자는 서열번호 15에 기재된 염기서열

을 포함하며, NA 유전자는 서열번호 16에 기재된 염기서열을 포함한다. 이들 HA 및 NA의 유전자 및 아미노산은 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 HA 및 NA의 유전자 및 아미노산과 각각 99%의 상동성을 보였고, A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 HA 및 NA의 유전자 및 아미노산과는 98%의 상동성을 가짐으로써 동일한 바이러스로 확인되었다. A/Canine/Korea/03/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스는 2007년 9월 19일자로 대한민국 대전시 유성구 어은동에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 KCTC 11207BP로 기탁되었다.

<25> 본 발명에 따른 개 인플루엔자 바이러스는 한국 개의 비강에서 직접 분리한 것으로, 이들의 바이러스들은 도 4 및 도 5로 도시한 계통도와 같은 계통발생학적 연관성을 갖는다. 대표적으로, 도 4는 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 계통발생학적 관련성을 HA를 이용하여 분석한 것이고, 도 5는 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 계통발생학적 관련성을 NA를 이용하여 분석한 것이다. 도 4 및 도 5에서 swine은 돼지를 의미하고, chicken는 닭을 의미하고, duck는 오리를 의미하고, dove는 비둘기를 의미하고, equine은 말을 의미하고, green-winged teal은 상오리를 의미하고, mallard는 청둥오리를 의미한다. 또한, 도 4 및 도 5의 계통도에 따르면 본 발명의 인플루엔자 바이러스는 조류 인플루엔자 바이러스와 군락(cluster)을 이루며, HA 및 NA 유전자는 말과 개에서 분리된 H3N8 바이러스와는 다른 군락에 속하는 것으로 확인되었다.

<26> 본 발명에 따른 개 인플루엔자 바이러스는 개에게 공격적접종하였을 때 체온상승 및 폐 염증을 일으키는 병원성이 있음을 확인하였고, 국내 개에서 유행하는 바이러스 종임을 알 수 있었다. 이에, 본 발명의 개 인플루엔자 바이러스에 대한 백신을 제조하여 투여한 결과, 대부분의 개에서 인플루엔자 바이러스에 대한 면역을 형성하거나 또는 개를 통한 바이러스 전파 및 신종의 인플루엔자 바이러스의 생성을 억제시킬 수 있었다.

<27> 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 그와 95% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되는 헤마글루티닌(HA)을 코딩하는 뉴클레오타이드에 관한 것으로서, 바람직하게는 서열번호 9의 염기서열을 가지는 뉴클레오타이드이다.

<28> 또한, 본 발명은 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 그와 95% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되는 뉴라미다아제(NA)를 코딩하는 뉴클레오타이드에 관한 것으로서, 바람직하게는 서열번호 11의 염기서열을 가지는 뉴클레오타이드이다.

<29> 또 하나의 양태로서, 본 발명은 개 인플루엔자 바이러스에 대해 면역을 형성할 수 있는 인플루엔자 백신 조성물에 관한 것이다.

<30> 바람직하게, 본 발명의 백신 조성물은 개 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원을 유효성분으로 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 개 인플루엔자 바이러스는 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 및 A/Canine/Korea/03/07 (H3N2)으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택될 수 있다.

<31> 또한, 상기 항원은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분을 말하며, 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 그와 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되는 헤마글루티닌(HA) 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 또한, 상기 95% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열은 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열 중 97, 127, 142, 176, 188, 209, 212 및 252의 위치의 아미노산 잔기 중 하나 이상이 서열번호 10의 해당 아미노산 잔기와 동일한 헤마글루티닌(HA) 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.

<32> 또한, 상기 항원은 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 그와 95% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열로 표시되는 뉴라미다아제(NA) 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.

<33> 상기 백신은 약독화된 생독 백신 또는 사독 백신, 서브유닛 백신(subunit vaccine), 합성 백신(Synthetic vaccine) 또는 유전공학 백신(Genetic engineering vaccine)일 수 있으나, 효과적인 면역 반응을 유도하는 생독 백신이 바람직하다.

<34> 용어, "생독 백신"은 살아있는 바이러스 활성 성분을 포함하는 백신을 의미한다. 용어, "약독화(attenuation)"란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고 면역 체계만을 자극해서 면역성을 유도하는 것을 의미한다. 바이러스의 약독화는 자외선(UV) 조사, 약품처리 또는 시험관 내 고차 연속 계대배양에 의해 달성될 수 있다. 약독화는 또한 명확한 유전 변화를 만듦으로써, 예를 들어 독성을 제공하는 것으로 알려진 바이러스 서열의 특

정 결실 또는 바이러스 게놈 내로의 서열의 삽입에 의해 달성될 수 있다.

- <35> 용어, "사독 백신"은 불활화 백신 또는 사균 백신이라고도 하며, 죽은 바이러스를 포함한 백신이다. 이의 예로는 전 바이러스 백신(whole-virus vaccine)과 분할 백신(split vaccine)이 있으며, 이들은 공지된 방법으로 용이하게 제조가능하다. 예컨대 전 바이러스 백신은 바이러스 전체에 포르말린을 처리하여 제조할 수 있으며, 분할 백신은 바이러스에 에테르를 처리하여 외피만을 분쇄, 수득하여 제조할 수 있다.
- <36> 용어, "서브유닛 백신"은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 바이러스 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다. 예컨대 개 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 추출하여 사용할 수 있다.
- <37> 용어, "합성 백신"은 바이러스의 항원 또는 항원결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산한 펩타이드를 포함한 백신으로, 예컨대 개 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 합성하여 사용할 수 있다.
- <38> 유전공학 백신은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.
- <39> 또한, 본 발명의 인플루엔자 백신은 개에게 발생하는 인플루엔자 이외의 질병을 예방하기 위하여 사용되는 다른 백신의 제조에 사용되는 불활화된 균체들 또는 항원들과 혼합하여 인플루엔자를 포함한 다른 질병들을 함께 예방할 수 있는 혼합 또는 복합 백신으로 사용되는 것이 바람직하다. 용어, "혼합 백신"이란 서로다른 바이러스 백신을 함께 사용한 백신을 말하며, 용어, "복합 백신"이란 바이러스 백신과 세균 백신을 함께 사용한 백신을 말한다. 본 발명의 구체적인 실시예로서, 예를 들어, 개 파라인플루엔자 바이러스(canine parainfluenza virus), 개 디스토펙 바이러스(canine distemper virus), 개 아데노바이러스(canine adenovirus), 개 보테텔라 브론키셉티카 균(Bordetella bronchiseptica)과 혼합 또는 복합되어 백신으로 이용될 수 있다.
- <40> 본 발명의 개 인플루엔자 바이러스 백신은, 일례로 (a) 개 인플루엔자 바이러스를 부화란에 주입하여 증식시키는 단계; (b) 상기 부화란으로부터 장요막강액을 수득하여 여기에 포르말린, BPL(betapropiolactone) 또는 BEI(binaryethylimine)를 처리하는 단계; 및 (c) 상기 포르말린이 처리된 장요막강액으로부터 불활화된 바이러스를 수득하고 이를 개 바이러스 백신으로 제조하는 단계를 통하여 제조될 수 있다. 각 단계의 상세방법은 하기와 같다.
- <41> 상기 (a) 단계는, 개 인플루엔자 바이러스를 9 내지 11일령의 부화란에 주입하고, 부화란은 30 내지 40℃에서 24 내지 72시간 두어 바이러스의 증식을 유도한다. 상기 (b) 단계에서는 통상의 방법으로 장요막강액을 수득하여 여기에 최종농도 0.005 내지 0.2 (v/w)%로 포르말린, BEI 또는 BPL을 가하고 저온에 방치하여 바이러스를 불활화시킨다. 상기 (c) 단계에서는 포르말린, BEI 또는 BPL이 처리된 장요막강액을 원심분리 또는 여과를 통하여 불활화된 바이러스를 수득한다. 수득된 바이러스는 수산화알루미늄 겔에 흡착시킨다. 상기한, 백신 제조 방법은, 공지의 방법을 채택하거나 또는 일부 수정을 가하여 용이하게 실시가능하다.
- <42> 또한 본 발명의 백신 조성물은 추가적으로 용매, 면역증강제(adjuvant) 및 부형제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 더욱 포함할 수 있다. 상기 용매로는 생리식염수 또는 증류수가 있으며, 면역증강제로는 프레운즈(Freund's) 불완전체 또는 완전체 어쥬번트, 알루미늄 하이드록사이드 겔 및 식물성 및 광물성 오일 등이 있으며, 부형제로는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포타슘 설페이트(alum)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 기술자에게 잘 알려진 백신 제조에 사용되는 공지의 물질을 더 모두 포함할 수 있다.
- <43> 본 발명의 백신 조성물은 개 인플루엔자 바이러스를 2^5 HAU(hemagglutination unit, 혈구응집 단위)로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다만, 백신의 혈구응집 단위가 2^5 HAU 미만인 경우, 개에 효과적으로 항체형성을 유도하지 못할 수 있으며, 2^5 HAU를 초과하는 경우, 효율대비 비경제적일 수 있다.
- <44> 본 발명의 백신 조성물은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액제로 제조하며, 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 비강 또는 경막외(eidural) 경로로 투여할 수 있다.
- <45> 본 발명의 백신 조성물은, A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Canine/Korea/02/07 (H3N2) 또는 A/Canine/Korea/03/07 (H3N2)에 감염될 수 있으며 상기 인플루엔자 바이러스를 다른 개체에 전파시킬 수 있는 모든 종류의 가금 및 조류, 예를 들어, 개, 돼지, 닭, 오리, 칠면조 등과 사람에도 사용가능하다.

<46>

<47>

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 인플루엔자 바이러스의 감염이 의심되는 개체에 투여하여 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

<48>

본 발명에서 용어, "인플루엔자 바이러스 감염 질환"이란 인플루엔자 바이러스의 감염으로 유발되는 질환으로서, 부비강염, 발작적 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴, 설사 등을 예시할 수 있으나 (Pitkaranta 와 Hayden, 1998. Ann. Med.), 본 발명은 이들에 제한되지 않는다.

<49>

본 발명에서 용어, "개체"란 인플루엔자 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물을 개체에 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 인플루엔자 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자 바이러스로 감염된 닭 또는 돼지를 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물을 기존의 인플루엔자 바이러스 감염 질환 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.

<50>

본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

<51>

본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적으로 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

<52>

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기한 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원을 포함하는 H3N2 혈청형 인플루엔자 바이러스의 검정 키트에 관한 것이다.

<53>

본 발명의 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원은 항원-항체 복합체 반응을 통해 감염될 또는 감염된 세포층의 인플루엔자 바이러스를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.

<54>

이러한 검정 키트에는 본 발명의 인플루엔자 바이러스뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에 서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함된다. 이러한 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함하나 이로 제한되지 않는다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

<55>

항원-항체 복합체 형성은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법 (ELISA), 웨스턴 블롯(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip)등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

<56>

항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β -글루루코시다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 피옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이

트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

효 과

<57> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 신규의 개 인플루엔자 바이러스를 제공하고 그에 대한 백신을 제조함으로써, 개 인플루엔자 바이러스에 대한 면역을 효과적으로 형성시킬 수 있으며, 따라서 개 또는 그로부터 2차 감염되는 개체의 인플루엔자 바이러스에 의한 질환 발병을 현저히 감소시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<58> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제공한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

<59> 실시예 1. 검체의 확보 및 바이러스 분리

<60> 우리나라 경기도 지방에 위치한 지역 동물병원에서 검체(비강 분비물)를 제공받았다. 임상증상으로서 첫 번째 경우였던 5살된 미니어처 슈나우저는 3일동안 콧물이 보였고, 2일동안 재채기를 한 뒤 회복되었다. 두 번째 경우였던 3살된 코카 스파니엘은 열, 기침, 콧물과 식욕부진을 보이면서 결국은 죽었다. 세 번째 경우였던 요크셔테리어 한 마리와 진돗개 두 마리는 심한 기침, 열과 콧물을 동반하며, 동물병원을 방문한 2일 후에 죽었다.

<61> 이 동물들은 모두 (주) 에니젠의 인플루엔자 A 타입 신속진단키트와 RT-PCR을 이용한 실험을 통하여 모두 인플루엔자 A 타입 양성임이 증명되었고, 다른 병원소와 감별 진단 결과 일치하지 않았다.

<62> 이 개들로부터 채취된 검체(비강 분비물)를 이용하여 11일령 발육계란에 접종한 결과, 채취한 요막강액은 닭 적혈구 세포를 응집시켰다. 그리고, 분리된 바이러스를 혈청학적으로 동정한 결과 H3N2바이러스임이 밝혀졌다. 이 분리된 바이러스를 A/Canine/Korea/01/07, (H3N2), A/Canine/Korea/02/07, (H3N2) 및 A/Canine/Korea/03/07, (H3N2) 이라고 명명하고, 2007년 9월 19일자로 대한민국 대전시 유성구 어은동에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 각각 기탁번호 KCTC 11205BP, KCTC 11206BP 및 KCTC 11207BP로 기탁하였다.

<63> 실시예 2. 분리된 바이러스의 유전적 특성

<64> 실시예 1에서 분리된 바이러스의 유전적 특성을 규명하기 위하여 바이러스에 대하여 각 유전자를 분석하였다. 트리플 LS 를 이용하여 요막강액으로부터 추출한 인플루엔자 바이러스 RNA는 랜덤한 헥사머 프라이머(hexamer primer)로 RT-PCR을 실행한 뒤, 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. H3, N2, PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS 유전자를 검출하기 위한 프라이머 서열은 변형된 Primer 3 프로그램(Whitehead Institute/MT Center for Genome Research) 을 이용하였다.

<65> PCR 반응은 cDNA($2\mu l$)를 반응혼합물{ $2.5\mu l$, 10X Taq DNA 중합효소 완충액, $MgCl_2$ 1.5mM, dNTPs($2.5mM/\mu l$) $2.0\mu l$, 각 특정 프라이머(각 10pmol) $1\mu l$, Taq DNA 중합효소(Promega, USA) $1\mu l$ }과 섞고 증류수를 첨가하여 전체 부피 $25\mu l$ 로 만들었다. PCR은 $94^\circ C$ 에서 10분, $94^\circ C$ 에서 30초간 32 사이클, $55^\circ C$ 에서 30초, $72^\circ C$ 에서 30초, $72^\circ C$ 에서 10분동안 실행했으며 반응은 $4^\circ C$ 에서 멈추었다. PCR산물은 에티디움 브로마이드를 함유한 1.5% 아가로스 겔을 전기영동함으로써 분석하였다. 분리된 바이러스 서열은 바이오에디트 소프트웨어(bioedit software)를 이용하여 분석하고 편집하였다.

<66> 표 1. PCR에 사용한 프라이머 서열

타겟 유전자	프라이머 서열(5'→3')	예상되는 산물
H3	CARATTGARGTGACHAATGC(서열번호 15)	720bp
	GGTGCATCTGAYCTCATTA(서열번호 16)	

N2	TGTTCCGTTTCATTTGGGAA(서열번호 17)	477bp
	CCAACAAGCCCTGAACACAC(서열번호 18)	
PB1	AAAGTGCCAGCACAAAATGC(서열번호 19)	764bp
	TTCTCACAGATGCTCCTCGC(서열번호 20)	
PB2	TCATGGAGGTCGTTTTTCCA(서열번호 21)	661bp
	TGAATCAGCCTTCTGGTTGC(서열번호 22)	
PA	GAAGTGAGCGCCAAAATTGA(서열번호 23)	477bp
	CTCTGGCTCATCGCTGTCAT(서열번호 24)	
NP	ACGGTCTGCACTCATCCTGA(서열번호 25)	602bp
	GCCCCTGGAAAGACACATCT(서열번호 26)	
M	AACATTCCATGGGGCTAAGG(서열번호 27)	456bp
	CGGCAATAACGAGAGGATCA(서열번호 28)	
NS	GACTGGTTTCATGCTATGCC(서열번호 29)	844bp
	GAGAGAGTGAAGGTCCCCCA(서열번호 30)	

<68> 분리된 개 인플루엔자 바이러스 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 의 8개 유전자 조각(segment)을 시퀀싱하였고, 그 서열의 상동성(homology)을 GeneBank에 있는 서열과 비교하였다(서열번호 1 내지 서열번호 12). 그 결과, 분리된 바이러스는 조류인플루엔자 바이러스와 95.5 내지 98.9%의 상동성을 보였다(표 2). 특히 HA와 NA 유전자는 한국에서 분리된 S11과 가장 높은 상동성을 보였고, NS 유전자는 닭에서 분리된 중국 분리주와 가장 높은 상동성을 보였다. PB1, PB2, PA, NP 및 M 유전자는 홍콩, 일본, 중국에서 분리된 조류 인플루엔자와 높은 상동성을 보였다. 또한, 분리된 A/Canine/Korea/01/07, A/Canine/Korea/02/07 및 A/Canine/Korea/03/07 간의 HA 및 NA 유전자의 상동성 98% 내지 99% 로서 동일한 바이러스로 확인되었다.

<69> 표 2. 분리된 개 인플루엔자 바이러스의 유전자 상동성 비교

바이러스	유전자	높은 상동성을 가지는 바이러스	RNA 단편의 인플루엔자 바이러스 계열	상동성 (%)	등록 번호
A/Canine/Korea/01/07	HA	A/Chicken/Korea/S6/03 (H3N2)	Avian	96.6	AY862607
	NA	A/Dove/Korea/S11/03 (H3N2)	Avian	97.4	AY862644
	PB1	A/Duck/Yangzhou/02/2005 (H8N4)	Avian	98.9	EF061124
	PB2	A/Duck/Zhejiang/11/2000 (H5N1)	Avian	97.6	AY585523
	PA	A/Duck/Hokkaido/120/2001 (H6N2)	Avian	95.9	AB286878
	NP	A/Duck/Hong Kong/Y439/97 (H9N2)	Avian	95.5	AF156406
	M	A/Duck/Jiang Xi/1850/2005 (H5N2)	Avian	97.5	EF597295
	NS	A/Chicken/Nanchang/7-010/2000 (H3N6)	Avian	97.5	AY180648

<71> 실시예 3. 분리된 바이러스의 계통학적 분류

<72> A/Canine/Korea/01/07의 계통학적 분류는 클러스탈 정렬 알고리즘(Clustal alignment algorithm)과 MEGALIGN 프로그램(DNASTAR, Madison, WI) 을 이용하여 확인하였다. 그 결과, HA 및 NA 유전자는 말과 개에서 분리된 H3N8 바이러스와는 다른 군락에 속하는 것으로 확인되었고, 한국에서 분리된 H3N2 와는 매우 밀접한 근연관계를 보였다(도 4 및 도 5).

<73> 실시예 4. 분리된 바이러스의 병원성 시험

- <74> 분리한 개 인플루엔자 바이러스 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2)의 병원성 유무를 확인하기 위하여, 개에 대한 공격접종 실험을 실시하였다.
- <75> 10주령 비글견을 접종군 7마리, 대조군 3마리로 나누고, 접종군 7마리에는 $1:64$ HA 역가($10^{6.9}$ EID₅₀/0.1ml)를 가진 분리된 바이러스 (2ml)를 비강과 구강으로 투여하였다. 대조군 3마리는 무균의 PBS (phosphate buffer saline, 2ml)를 비강과 구강으로 투여하였다. 투여 후 임상증상을 7일 동안 관찰하였으며, 바이러스 배출은 접종 후 10일 동안 분변과 비강 분비물을 통하여 RT-PCR을 실행하여 확인하였다. 각 그룹의 혈청학적 변화는 제조업 NP(Nucleoprotein)를 항원으로 하는 경쟁적 원리를 가진 ELISA (Animal Genetics Inc. Korea) 및 HI 실험을 이용하여 확인하였다. HI 실험은 OIE 추천 실험 방법에 따라 실행하였다. 또한 사후 부검을 위하여 접종후 3일, 6일 및 9일에 접종 그룹에서 2마리씩, 대조군에서 1마리씩 자일라진(xylazine) 1 ml로 안락사시켜 병변을 확인하였다.
- <76> 그 결과, 접종군에서 재채기와 콧물을 동반하는 임상증상이 접종 후 2일부터 7일까지 관찰되었다. 직장 온도는 대조군에서 실험을 하는 동안 39 °C로 변함이 없었고, 접종군에서는 접종 24시간 후에 평균 40.14 °C로 발열이 있었다(도 6).
- <77> 또한 혈청학적 검사를 수행한 결과, 접종 전에 모든 실험견의 혈청학적 실험은 음성이었으며, 대조군 실험견의 혈청은 실험을 하는 동안 음성으로 남아 있었다. 접종군에서는 접종후 6일후 ELISA실험 결과 퍼센트 저해율 (Percent Inhibition) 값은 다른 대조군 실험견 보다 훨씬 높아 항체가 높이 상승했음을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 접종군의 접종 후 8일 후 HI 역가가 1:80을 보였다.
- <78> 그리고, 분변과 비강 분비물에서의 바이러스 배출을 조사한 결과, 바이러스의 배출은 접종군에서 접종 후 6일동안 비강 분비물을 통해 지속되었으나, 대조군으로 인플루엔자 바이러스는 분변에서는 검출되지 않았다. 개 인플루엔자 바이러스에 감염된 동물은 일반적으로 감염 후 1일부터 바이러스 배출을 시작하며, 가장 많이 배출되는 시기는 $10^{6.0}$ EID₅₀/0.1ml로서 감염 4일 후이다.
- <79> 한편, 조직병리학적 병변은 기관과 폐에 국한되어 있었다. 조직학적으로 상부호흡기(기관, bronchi)와 하부호흡기(bronchiole과 alveoli)에 심한 괴사병변이 있었다. 비록 공격접종한 개들 모두 약간의 병변정도에 차이는 있었지만 조직학적으로 세기관지염 및 기관지염을 보이는 비슷한 모습을 보였다(도 7).
- <80> 결론적으로, 분리된 바이러스는 개에서 체온상승과, 폐 염증을 일으키는 병원성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 6일 동안 바이러스가 배출됨을 확인할 수 있었다.
- <81> **실시예 5. 백신 제조**
- <82> 분리한 개 인플루엔자 바이러스 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2)를 종(seed) 바이러스로 하여 백신을 제조하였다. 10일령 부화란의 장요막강에 종(seed) 바이러스를 접종하고 3일 후 장요막강액을 채취하여 바이러스 벌크로 하였다. 이 바이러스 벌크에 0.2% 포르말린을 첨가하여 실온에서 24시간 불활화하였다. 불활화 여부는 불활화된 벌크를 부화란에 재접종하여 바이러스가 생존하지 않았을 때 불활화된 것으로 확인하였다. 불활화가 완료된 바이러스 벌크는 2^5 HAU 이상이 되게 하였다. 이 벌크 70%와 알루미늄 하이드록사이드 겔 30%를 10,000rpm으로 10분간 혼합한 후 무균검사를 실시하고, 이상이 없음을 확인한 후 백신으로 이용하였다.
- <83> **실시예 6. 백신접종후 공격시험**
- <84> 제조된 백신을 0.5ml씩 10주령 비글견 10마리에 피하로 접종하고, 3주 후 동일한 방법으로 추가 접종하였다. 추가 접종 2주 후 $1:64$ HA 역가($10^{6.9}$ EID₅₀/0.1ml)를 가진 분리된 바이러스 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2)를 2 ml씩 구강과 비강으로 공격접종하였다. 대조군은 3마리를 공시하였으며 PBS를 접종하였다. 시험기간 동안 체온과 바이러스 배출 유무, 임상증상 및 항체가 상승 여부를 확인하였다.
- <85> 그 결과, 접종군의 경우 체온변화가 공격접종 후까지 정상적인 체온이 일정하게 유지되었으며, 바이러스 배출도 없었고 임상증상도 확인되지 않았다. 그러나, 대조군의 경우 공격접종 후 1주 동안 체온상승을 확인할 수 있었고(표 3) 바이러스 배출이 3마리 모두에서 PCR로 확인되다가 6일 후에는 배출이 없었다(표 4). 그리고 대조군은 공격접종 후 콧물을 흘리며 건성기침 또는 습성기침을 하는 등의 임상증상을 확인할 수 있었다. 항체는 접종군의 경우 뉴클레오프로테인에 대한 ELISA 항체 및 헤마글루티닌에 대한 HI 항체는 7일 후부터 상승하기 시작하였으며 시험기간동안 지속되었다(표 5). 그러나 대조군은 공격접종 7일 후부터 뉴클레오프로테인

및 헤마글루티닌에 대한 항체가 상승되기 시작하였다.

<86> 따라서, 백신 접종군은 공격접종에 대하여 방어를 할 수 있음을 확인할 수 있어 백신으로서의 효과가 있음을 증명할 수 있었다.

<87> 표 3. 백신접종 및 공격접종 후의 평균 체온(℃)변화(21일째 추가접종, 35일째 공격접종)

	0일	7일	14일	21일	28일	35일	36일	37일
접종군	37.8±0.1	37.6±0.2	38.4±0.1	38.2±0.1	38.1±0.2	38.3±0.2	40.2±0.3	40.6±0.1
대조군	38.2±0.2	37.8±0.1	38.0±0.2	37.6±0.1	38.3±0.1	37.6±0.1	38.3±0.2	38.0±0.3

	38일	39일	40일	41일	42일	49일
접종군	39.84±0.2	39.3±0.1	38.9±0.2	38.7±0.1	38.6±0.1	38.0±0.1
대조군	38.0±0.2	37.6±0.1	38.3±0.1	37.6±0.1	38.0±0.1	38.0±0.1

<90> 표 4. 백신접종 및 공격접종 후의 바이러스 배출 (21일째 추가접종, 35일째 공격접종)

	0일	7일	14일	21일	28일	35일	36일	37일
접종군	0/10*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
대조군	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3

	38일	39일	40일	41일	42일	49일
접종군	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
대조군	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3

<93> * PCR 양성 검체 마리수 / PCR 검사 마리수

<94> 표 5. 백신접종 및 공격접종 후의 항체가 변화(21일째 추가접종, 35일째 공격접종)

		0일	7일	14일	21일	28일	35일	42일	49일
접종군	ELISA*	14	89	87	96	89	94	92	98
	HI	<10	10	40	40	80	80	80	160
대조군	ELISA	12	20	14	19	26	18	97	92
	HI	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160

<96> * ELISA 값은 PI value로서 50 이상이면 양성, 50 미만이면 음성임

도면의 간단한 설명

<97> 도 1은 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Dove/Korea/S11/03 (H3N2), A/Duck/Korea/S7/03 (H3N2) 및 A/Chicken/Korea/S6/03 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 NA 유전자에 대한 전체 아미노산 서열을 비교한 것이다.

<98> 도 2는 A/Equine/Jilin/1/1989 (H3N8), A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Dove/Korea/S11/03 (H3N2), A/Duck/Korea/S7/03 (H3N2) 및 A/Chicken/Korea/S6/03 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자에 대한 전체 아미노산 서열을 비교한 것이다.

<99> 도 3은 A/Equine/Jilin/1/1989 (H3N8), A/Canine/Korea/01/07 (H3N2), A/Canine/Korea/02/07 (H3N2), A/Canine/Korea/03/07 (H3N2), A/Dove/Korea/S11/03 (H3N2), A/Duck/Korea/S7/03 (H3N2) 및 A/Chicken/Korea/S6/03 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자에 대한 부분적인 아미노산 서열을 비교한 것이다.

<100> 도 4는 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 계통발생학적 관련성을 HA 유전자 염기서열로 분석한 것이다.

<101> 도 5는 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스의 계통발생학적 관련성을 NA 유전자 염기서열로 분석

한 것이다.

<102>

도 6은 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스를 접종한 접종군과 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스를 접종하지 않은 대조군의 체온 변화, 항체가 변화, 및 바이러스 배출을 일주일 동안 측정한 결과를 나타낸 것이다.

<103>

도 7은 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스를 접종한 접종군과 A/Canine/Korea/01/07 (H3N2) 인플루엔자 바이러스를 접종하지 않은 대조군의 기관과 폐에서의 조직병리학적 병변을 나타낸 것이다. (A,C:대조군, B,D,F : 접종군. (A) 접종 9일후의 대조군 개로서, 정상적인 기관의 위중층원상피과피아닝(pseudostratified columnar epithelium lining, 400배); (B) 접종 9일 후의 접종군 개로서, 괴사된 기관(n), 편평상피화생(squamous metaplasia, s), 상피세포의 과형성 및 결합조직에서의 만성 염증(C) (400배); (c) 접종 3일 후의 대조군의 정상 폐포 (200배); (D) 접종 3일 후 접종군의 심각한 괴사성 기관지염(severe diffuse necrotizing bronchitis) 과 기관지강에서의 화농성 염증을 동반한 세기관지염(100배) (E) 접종 6일 후 접종군의 심각한 괴사성 세기관지염(탈락된 괴사성 세포 및 호중구가 가득 차있으며 약한 또는 보통의 만성적 세기관지 주변의 염증이 보임(200배) (F) 접종 9일 후 접종군의 심각한 괴사성 폐포염 (폐포강(ad)과 폐포(a)에서의 괴사 세포 침윤 (200배). H&E 염색)

도면

도면1

		10	20	30	40	50
1.	A/Canine/Korea/01/07 (H3N2)	MNP	NQKII	AGSV	SLTI	ATV
2.	A/Dove/Korea/S11/03 (H3N2)			M		
3.	A/Duck/Korea/S7/03 (H3N2)			M		
4.	A/Chicken/Korea/S6/03 (H3N2)			M		
		50	60	70	80	90
1.		VVPCKPI	IIERN	ITEV	VLNNT	TIEKE
2.		E.T.		V	PGMP	
3.		E.T.		V	PGMP	
4.		E.T.		V	PGMP	
		130	140	150	160	170
1.		YQFAL	GQGT	LLNNK	HSNGT	IHDR
2.			D		P	
3.			D		P	
4.			D		P	
		210	220	230	240	250
1.		MLVDS	IGSWS	RNRL	TQES	ECVCI
2.			Q			
3.			Q			
4.			Q			
		290	300	310	320	330
1.		VCRDN	WKGS	NRFP	IDIN	MADYS
2.						
3.						
4.						
		370	380	390	400	410
1.		LRSGY	ETFK	VIGGW	TTANS	KLQVN
2.		S		S		
3.		S		S		
4.		S		S		
		420	430	440	450	460
1.	A/Canine/Korea/01/07 (H3N2)	SCVNR	CFY	VELIR	GGPQ	ETRV
2.	A/Dove/Korea/S11/03 (H3N2)		R		A	
3.	A/Duck/Korea/S7/03 (H3N2)		R		A	
4.	A/Chicken/Korea/S6/03 (H3N2)		R		A	

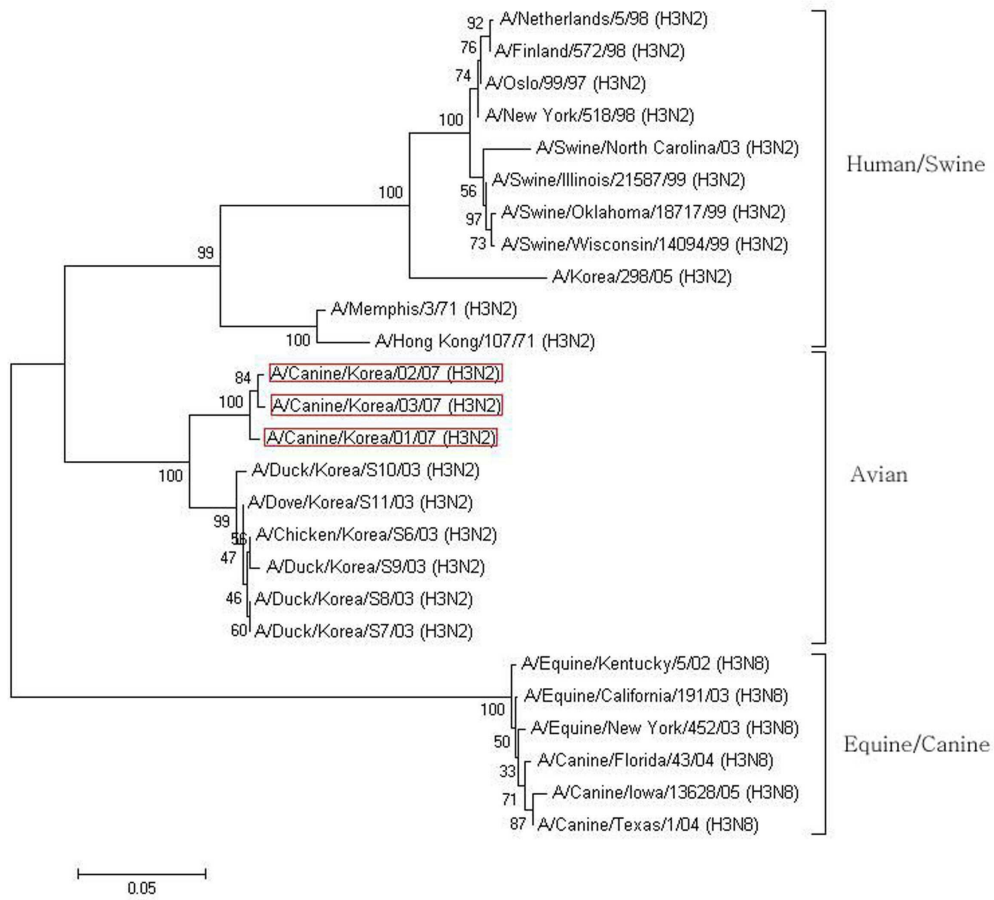
도면2

		10	20	30	40	50			
1. A/Equine/Jilin/1/89(H3N8)	MRTVIALSYIFCLAFGQGLFWNDNNTATLCLGHAVPNGTIVKTITDDQIEVTNAI								
2. A/Canine/Korea/01/07(H3N2)	.K.....N..G.E..A.....								
3. A/Dove/Korea/S11/03(H3N2)	.K.....N..G.E.....								
4. A/Duck/Korea/S7/03(H3N2)	.K.....N..G.E.....								
5. A/Chicken/Korea/S6/03(H3N2)	.K.....N..G.E.....								
	50	60	70	80	90	100	110	120	130
1. IEVTNATELVQSSSTGKICNNPHRILDGGNCTLIDALLGDPHCNVFQYETWDLFVERTNAFSNCYPYDVDPYASLRISIVASSI									
2.N.....K.....RD.....D..N.....S.....									
3.N.....K.....RD.....D..D.....S.....L.....									
4.N.....KV.....RD.....D..D.....S.....L.....									
5.N.....KV.....RD.....D..D.....S.....L.....									
	130	140	150	160	170	180	190	200	210
1. SSGTLEFFAESFTWTGVTQNGGSSACKRGTSASSFFSRLNWLTKSGNAYPLLNVTMPNDNFDKLYIWGVHHPSTNQEQTELYV									
2.IT.G.....G.....P..NG.....T..V.....N.....S.....									
3.IT.G.N.A.....G.....P..NG.....V.....T.....									
4.IT.G.N.A.....G.....P..NG.....V.....T.....									
5.IT.G.N.A.....G.....P..NG.....V.....T.....									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290
1. LYVQASGRVTVSTRKSQQTVIPNIGSRFWVRGQSGRVSIYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKVRTGKSSIMRSDAPID'									
2.I.....R.....I.....L.....I..V.....M..I.....									
3.I.....R.....I.....L.....I..V.....M..I.....									
4.I.....R.....I.....L.....I..V.....M..I.....									
5.I.....R.....I.....L.....I..V.....M..I.....									
	290	300	310	320	330	340	350	360	370
1. IDTCISECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQIRGIFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRRH									
2.E.....R.....T..L.....V.....									
3.E.....R.....T..L.....V.....									
4.E.....R.....T..L.....V.....									
5.E.....R.....T..L.....V.....									
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
1. RHQNSEGTGQAADLKSTQAALDQINGKLNRVIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQH'									
2.I.....R.....V.....K.....									
3.I.....R.....V.....V.....									
4.I.....R.....V.....V.....									
5.I.....R.....V.....V.....									
	450	460	470	480	490	500	510	520	530
1. QHTIDLTDSEMKNLFKETRRLRENAEDMGNGCFKIYHNCDNACIESIRNGTYDHNIRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI'									
2. .K.....K.....V.....									
3.K.....D.....V.....									
4.K.....D.....V.....									
5.K.....D.....V.....									
	520	530	540	550	560				
1. A/Equine/Jilin/1/89(H3N8)	KGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICF'								
2. A/Canine/Korea/01/07(H3N2)	R.....I.....								
3. A/Dove/Korea/S11/03(H3N2)	R.....I.....								
4. A/Duck/Korea/S7/03(H3N2)	R.....I.....								
5. A/Chicken/Korea/S6/03(H3N2)	R.....I.....								

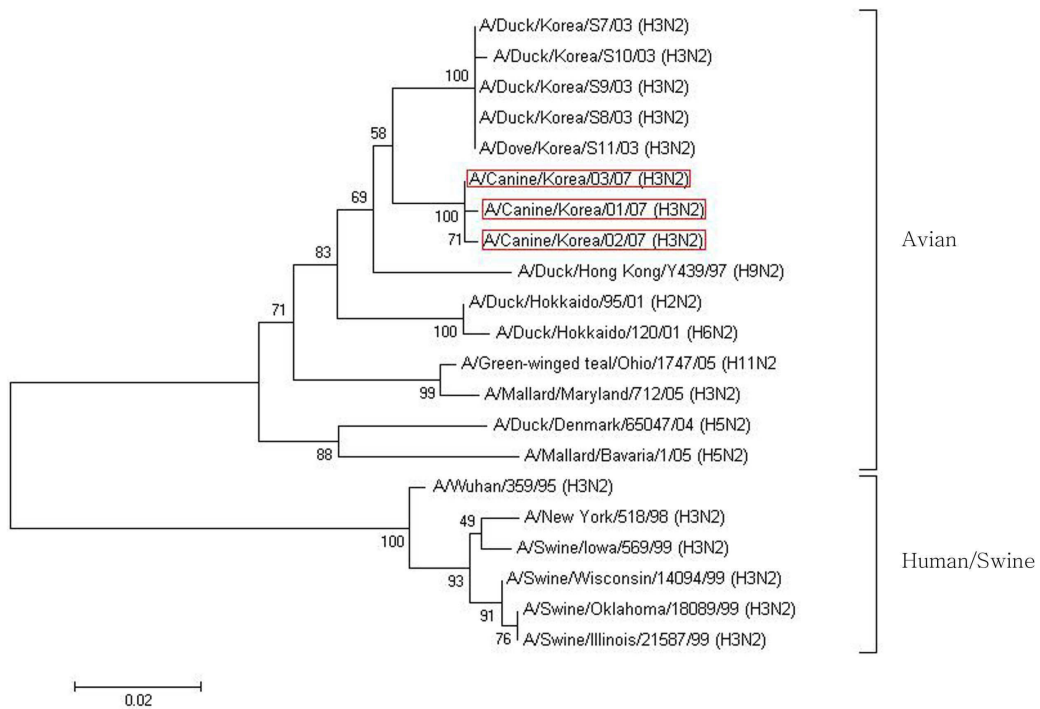
도면3

		50	60	70	80	90	100
1. A/Equine/Jilin/1/1989(H3N8)		QIEVTNATELVQSSSTGKICNNPHRILDGGNCTLIDALLGDPHCNVFQYETWD					
2. A/Canine/Korea/01/07(H3N2)		N.....K.....RD.....D.....N.....					
3. A/Canine/Korea/02/07(H3N2)		N.....K.....RD.....D.....N.....					
4. A/Canine/Korea/03/07(H3N2)		N.....K.....RD.....D.....N.....					
5. A/Dove/Korea/S11/03(H3N2)		N.....K.....RD.....D.....D.....					
6. A/Duck/Korea/S7/03(H3N2)		N.....KV.....RD.....D.....D.....					
7. A/Chicken/Korea/S6/03(H3N2)		N.....KV.....RD.....D.....D.....					
		120	130	140	150	160	170
1. A/Equine/Jilin/1/1989(H3N8)		DYASLRISIVASSGTLEFFAESEFTWTGVTQNGGSSACKRGRTASSFFSRLNWLTKS					
2. A/Canine/Korea/01/07(H3N2)		IT.G.....G.....P.NG.....					
3. A/Canine/Korea/02/07(H3N2)		IT.G.....A.....G.....P.NG.....					
4. A/Canine/Korea/03/07(H3N2)		I.G.....A.....G.....P.NG.....					
5. A/Dove/Korea/S11/03(H3N2)		L.....IT.G.N.A.....G.....P.NG.....					
6. A/Duck/Korea/S7/03(H3N2)		L.....IT.G.N.A.....G.....P.NG.....					
7. A/Chicken/Korea/S6/03(H3N2)		L.....IT.G.N.A.....G.....P.NG.....					
		170	180	190	200	210	220
1. A/Equine/Jilin/1/1989(H3N8)		LTKSGNAYPLLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTNQEQTELYVQASGRVTVST					
2. A/Canine/Korea/01/07(H3N2)		T.V.....N.....S.....I.....					
3. A/Canine/Korea/02/07(H3N2)		T.V.....N.....Y.....S.....I.....					
4. A/Canine/Korea/03/07(H3N2)		T.V.....N.....S.....I.....					
5. A/Dove/Korea/S11/03(H3N2)		V.....N.....T.....I.....					
6. A/Duck/Korea/S7/03(H3N2)		V.....N.....T.....I.....					
7. A/Chicken/Korea/S6/03(H3N2)		V.....N.....T.....I.....					
		230	240	250	260	270	
1. A/Equine/Jilin/1/1989(H3N8)		QQTVIPNIGSRPFVVRGQSGRVSIYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKVRT					
2. A/Canine/Korea/01/07(H3N2)		I.....L.....I.V.....M.I.....					
3. A/Canine/Korea/02/07(H3N2)		I.....L.....I.V.....R.....M.I.....					
4. A/Canine/Korea/03/07(H3N2)		I.....L.....I.V.....M.I.....					
5. A/Dove/Korea/S11/03(H3N2)		I.....L.....I.V.....V.....M.I.....					
6. A/Duck/Korea/S7/03(H3N2)		I.....L.....I.V.....V.....M.I.....					
7. A/Chicken/Korea/S6/03(H3N2)		I.....L.....I.V.....V.....M.I.....					

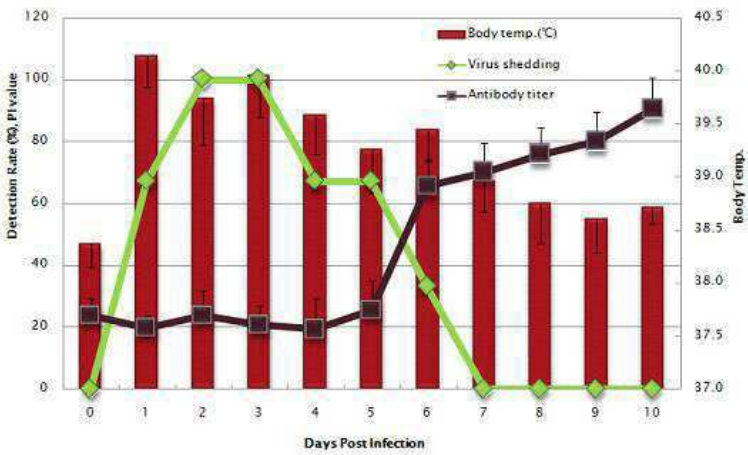
도면4



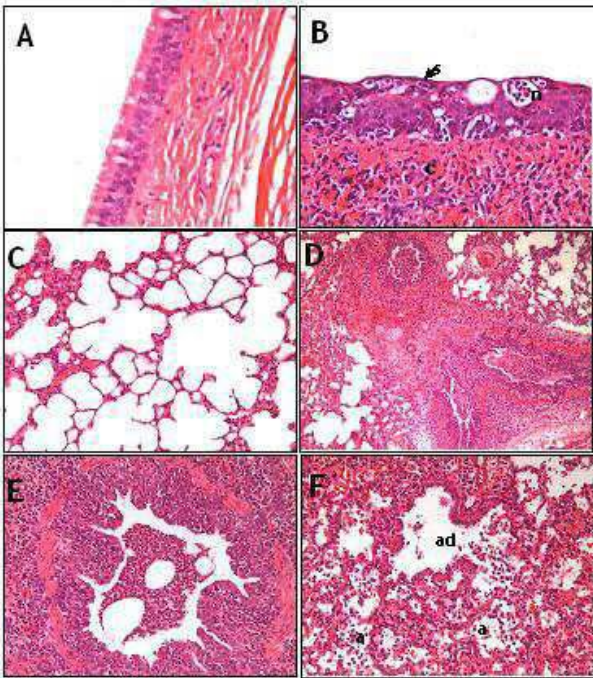
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

[서열목록 전자파일 첨부](#)