(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0092626
(43) 공개일자 2018년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 39/12* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0018580
(22) 출원일자 2017년02월10일
심사청구일자 2017년02월10일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
정현도
부산광역시 해운대구 세실로 19 (좌동, 해운대대우1차아파트) 112동 1701호
권우주
부산광역시 해운대구 신반송로 102 (반송동, 삼한그린타운2차) 202동 1711호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

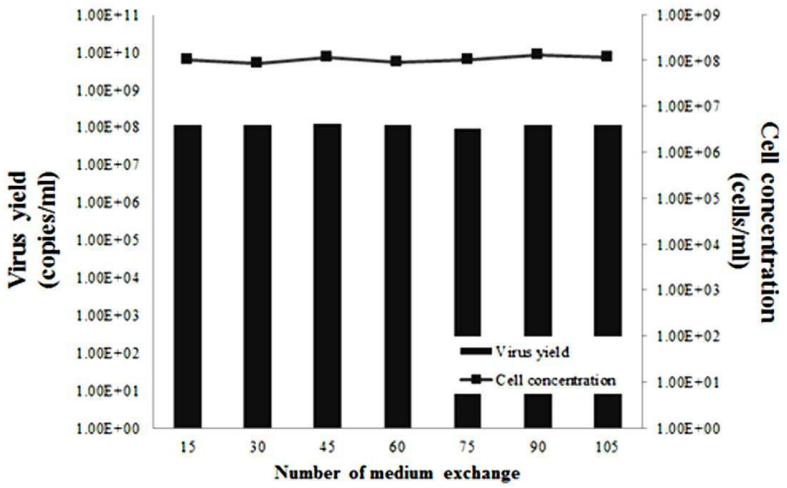
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **반연속 배양 방법을 이용한 바이러스의 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 반연속 배양 방법으로 바이러스를 제조하는 방법 및 이를 이용하여 제조된 바이러스를 이용한 백신에 관한 것으로, 구체적으로는 종래의 연속 감염 세포주를 활용한 바이러스 제조 방법 (Batch culturing system, BCS)에서 매번 새로운 세포주를 계대배양하고 바이러스 접종배양해야 하는 복잡성과 비효율성을 극복하면서 고농도로 바이러스를 연속 생산하기 위하여, 메갈로사이티바이러스에 연속 감염된 어류 세포주를 이용한 반연속 배양 방법 (SCCCS 법)을 이용함으로써, 장기간 반연속 배양에도 숙주 세포주의 수적 감소 또는 사멸 없이 고농도의 바이러스 생산이 가능하므로, 손쉽게 연속적으로 높은 농도의 메갈로사이티바이러스를 생산할 수 있어, 이를 이용한 백신 조제 및 산업화에 용이하다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 5/0602 (2013.01)
C12N 2523/00 (2013.01)
C12N 2710/00034 (2013.01)
C12N 2710/00051 (2013.01)
(72) 발명자
윤민지
부산광역시 서구 대티로115번길 14-9 (서대신동2가)

김영철
부산광역시 사하구 낙동대로343번길 14 (당리동, 마마아파트) 601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20130291
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 수산실용화기술개발사업
연구과제명 수산백신연구센터
기 여 율 1/1
주관기관 제주대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.24 ~ 2017.08.23

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 어류 주화세포에 바이러스를 감염시키는 단계;

2) 감염된 세포를 배양하는 단계;

3) 배양 상등액을 수득하고 새로운 배지로 대체하는 반연속 배양(semi-continuous cell culture) 단계; 및

4) 수득한 배양 상등액에서 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는, 바이러스의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 어류 주화세포는 참돔지느러미(pagrus major fin, PMF) 세포주, 그루퍼지느러미(Grouper fin, GF-1) 세포주 및 블루길자어(bluegill fry, BF-2) 세포주로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인, 바이러스의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 바이러스는 이리도비리데 과 (Iridoviridae family) 바이러스인, 바이러스의 제조방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 이리도비리데 과 바이러스는 메갈로사이티바이러스인, 바이러스의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 메갈로사이티바이러스는 서브그룹(subgroup) Ⅱ, 서브그룹 Ⅲ 및 서브그룹 IV로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인, 바이러스의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 감염은 바이러스를 접종하고 3일 마다 배지 교환을 20회 이상 하는 연속 감염인, 바이러스의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 배양 조건은 우태아혈청(FBS) 5%가 포함된 배지에서 25℃로 배양하는 것인, 바이러스의 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 반연속 배양 단계의 배지 교환 주기는 3일이고, 새로운 배지로 대체하는 배지 교환 비율은 70% (v/v)인, 바이러스의 제조방법.

청구항 9

제 1항의 방법으로 제조한 바이러스를 불활화한 바이러스와 약제학적으로 수용가능한 담체 (carrier) 또는 부형제를 포함하는 백신 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 반연속 배양 방법으로 바이러스를 제조하는 방법 및 이를 이용하여 제조된 바이러스를 이용한 백신에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종래에 바이러스를 세포주에 감염시킨 뒤 바이러스를 생산하기 위해서는 바이러스 감염 상등액을 수득 후 감염 세포주는 배양 용기와 함께 폐기하는 BCS(Batch Culture system)이 이용되어 왔다. 그러므로 추가적인 양의 바이러스 액을 얻기 위해서는 새롭게 연속 감염된 세포주를 배양용기에 분주하여 배양하고 (Subculturing, 계대배양), 연속 감염 세포주가 아니라면 다시 세포주에 바이러스를 접종과정까지 실시해야 하는 번거로움과 함께 수득 바이러스의 농도가 높지 않다는 어려움이 있다. 더구나 이러한 방법은 closed system인 BCS법의 특성 때문에 숙주세포에 대한 배양이 5-7일 동안만 이루어지고 숙주 내 감염 바이러스(intracellular accumulated virus)에 의한 재식균이 이루어지지 않아 계속적인 고농도의 바이러스 생산이 이루어지지 않는다는 문제점이 있어왔다.

[0003] IMV(Iridoviridae Megalocytivirus)는 참돔 이리도바이러스 질병(Red Sea Bream Iridovirus Disease, RSIVD)의 원인체이다. 그러나 양식 현장에서 약 10% 내외의 누적 폐사율을 보이는 참돔보다는 돌돔이 훨씬 높은 감수성을 나타내어 고수온기에 감염이 발생하면 90-100%의 대량 폐사가 나타난다. 이러한 메갈로사이티바이러스의 감염을 예방하기 위한 백신 개발을 위해서는 바이러스의 대량 배양이 필수적이지만, 메갈로사이티바이러스는 제한적인 어류 세포주에서만 증식하고, 계대배양에서 배양 횟수 (virus passage)가 증가함에 따라 감염력이 급격히 감소되며 (Chou eta., 1998; Imajoh et al., 2007; Nakajima and Sorimachi, 1994), 바이러스 생산이 감소하여 배양액에서의 바이러스 농도가 감소하는 현상 등이 나타나는 매우 특이적인 감염을 나타내기 때문에, 바이러스의 산업적인 생산에 많은 어려움이 있었다.

[0004] 해양양식 어류에 큰 피해를 입히는 MVC의 현재 알려진 유일한 대책은 백신 개발이다. 특히 돌돔에서 매년 높은 발병률과 많은 폐사를 유발하는데 현재까지 개발중인 백신으로는 큰 효과를 보지 못한 실정이며 그러한 이유에는 사용할 수 있는 배양 바이러스의 농도가 낮아서 고농도 백신의 제조가 어렵기 때문일 수 있다.

[0005] 상업적으로 구입 가능한 세포주들 중에서 메갈로사이티바이러스의 감수성을 보인다고 알려진 것은 RTG-2(rainbow trout gonad), CHSE-214(chinook salmon embryo), FHM(fathead minnow), BF-2(blue gill fry), KRE-3(belp and re spotted grouper embryo) 등이 있으며, 이들은 세포변성 효과(cytophatic effects, CPE)가 발생하면서 증식된다고 알려져 있다 (Nakajima and Sorimachi, 1994a; Chou et al., 1998). 그러나 이들 모든 주화 세포는 메갈로사이티바이러스의 계대를 거치면 바이러스 역가(viral titer)가 점점 감소한다고 알려져 있어, 백신 제조에 필요한 고농도의 메갈로사이티바이러스를 경제적으로 대량 공급하는데 어려움이 있어 왔다.

[0006] 현재 상업화된 모든 어류 주화세포에서는 이러한 고농도 바이러스의 지속적인 배양에 어려움이 있으며, 생산된 바이러스의 농도가 낮기 때문에 (바이러스의 산업적 농축과정은 고가의 비용이 요구되므로 경제적으로 의미가 없음) 고농도 백신으로서의 개발을 할 수 없는 실정이다 (Imajoh et a., 2007; Dong et al., 2013). 그러므로 현재 메갈로사이티바이러스의 산업적인 백신 개발을 위하여서는 이러한 문제점들을 해결하는 보다 효율적이고 연속적인 고농도 바이러스의 생산법이 필요하고, 이에, 본 발명에서는 다양한 주화세포를 이용해 다양한 유전형의 메갈로사이티바이러스 배양과 계대 배양 횟수에 따른 감염력의 저감화 현상을 해소 하는 동시에 바이러스 생산력을 증대하는 방법을 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 종래의 연속 감염 세포주를 활용한 바이러스 제조 방법 (Batch culturing system, BCS)에서 매번 새로운 세포주를 계대배양하고 바이러스 접종배양해야 하는 복잡성과 비효율성을 극복하면서 고농도로 바이러스를 연속 생산하기 위하여, 메갈로사이티바이러스에 연속 감염된 어류 세포주를 이용한 반연속 배양 방법 (SCCCS법)을 이용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 어류 주화세포에 바이러스를 감염시키는 단계; 감염된 세포를 배양하는 단계; 배양 상등액을 수득하고 새로운 배지로 대체하는 반연속 배양(semi-continuous cell culture) 단계; 및 수득한 배양 상등액에서 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는, 바이러스의 제조방법을 제공한다.

[0009] 아울러, 본 발명은 본 발명의 바이러스 제조방법으로 제조한 바이러스를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 반연속 배양 방법 (SCCCS)은 새로운 세포주의 계대 배양과 새로운 감염과정의 실시 없이 감염 세포주의 배양 상등액을 취한 후 다시 새로운 배지를 첨가하는 방식이고, 특히, 본 발명의 세포주와 배양 조건을 통해 100회 이상의 장기간 반연속 배양에도 숙주 세포주의 수적 감소 또는 사멸 없이 고농도의 바이러스 생산이 가능하므로, 손쉽게 연속적으로 높은 농도의 메갈로사이티바이러스를 생산할 수 있으며, 매우 고농도의 바이러스를 짧은 주기로 수득할 수 있어 대량 생산이 가능하고, 외부로부터 발생할 수 있는 오염 가능성이 낮아, 이를 이용한 백신 조제 및 산업화에 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 PMF, GF-1 및 BF-2 세포주에 IMV 감염 후 매일 수득한 상등액에서 바이러스 농도를 확인한 도이다.

도 2는 연속배양 10회 후의 세포 변성을 현미경으로 확인한 도이다:

A: IMV 감염된 PMF 세포주 (0회 배양);

B: IMV 감염된 GF-1 세포주 (0회 배양);

C: IMV 감염된 BF-2 세포주 (0회 배양);

D: SCCCS 배양 방식으로 10회 배양 (상등액 수득 후 배지 첨가 10회)한 IMV 감염된 PMF 세포주;

E: SCCCS 배양 방식으로 10회 배양 (상등액 수득 후 배지 첨가 10회)한 IMV 감염된 GF-1 세포주; 및

F: SCCCS 배양 방식으로 10회 배양 (상등액 수득 후 배지 첨가 10회)한 IMV 감염된 BF-2 세포주.

도 3은 PMF 세포주에서 IMV를 SCCCS 배양 방법으로 생산함에 있어서, 배지 교환주기 (1일, 3일 및 5일)에 따른 바이러스의 생산성을 확인한 도이다.

도 4는 PMF 세포주에서 IMV를 SCCCS 배양 방법으로 생산함에 있어서, 3일마다 배지를 교환할 때, 새 배지로 교환하는 배지의 비율 (30%, 70% 및 100%)에 따른 바이러스의 생산성을 확인한 도이다.

도 5는 PMF 세포주에서 IMV를 SCCCS 배양 방법으로 생산함에 있어서, 배양 배지 (L-15, MEM 및 RPMI1640)에 따른 바이러스 생산성을 확인한 도이다.

도 6은 PMF 세포주에서 IMV를 SCCCS 배양 방법으로 생산함에 있어서, 배양 배지 내의 FBS 농도 (1%, 5% 및 10%)에 따른 바이러스 생산성을 확인한 도이다.

도 7은 PMF 세포주에서 IMV를 SCCCS 배양 방법으로 생산함에 있어서, 배양 온도 (20℃, 23℃, 25℃, 28℃ 및 30℃)에 따른 바이러스 생산성을 확인한 도이다.

도 8은 최적화된 SCCCS 방법을 이용하여 PMF 세포주에서 IMV를 생산할 때의 세포수 및 바이러스 생산성을 배지 교환 횟수에 따라 확인한 도이다.

도 9는 최적화된 SCCCS 방법을 이용하여 IMV가 연속 감염된 PMF 세포주에서 세포의 형태와 세포변성을 확인한 도이다:

A: 바이러스 배양 전 IMV 감염 PMF 세포주;

B: 배지 교환 20회 후의 IMV 감염 PMF 세포주;

C: 배지 교환 50회 후의 IMV 감염 PMF 세포주; 및

D: 배지 교환 100회 후의 IMV 감염 PMF 세포주.

도 10은 IMV 분리주 subgroup Ⅱ, Ⅲ 또는 Ⅳ로 감염된 PMF를 최적화된 SCCCS 방법으로 20회 배지 교환한 이후의 세포변화를 확인한 도이다:

A: 바이러스 감염 전 PMF;

B: subgroup Ⅱ 분리주에 감염된 PMF;

C: subgroup Ⅲ 분리주에 감염된 PMF; 및

D: subgroup Ⅳ 분리주에 감염된 PMF.

도 11은 최적화된 SCCCS 방법을 이용한 PMF 세포주에서의 IMV 분리주 subgroup Ⅱ, Ⅲ 또는 Ⅳ에 따른 바이러스의 연속 생산성을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0014] 일 측면에서, 본 발명은 어류 주화세포에 바이러스를 감염시키는 단계; 감염된 세포를 배양하는 단계; 배양 상등액을 수득하고 새로운 배지로 대체하는 반연속 배양(semi-continuous cell culture) 단계; 및 수득한 배양 상등액에서 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는, 바이러스의 제조방법에 관한 것이다.

[0015] 일 구현예에서, 본 발명의 바이러스는 이리도비리데 과 (Iridoviridae family) 바이러스일 수 있으며, 어류에서 질병을 일으키는 원인 바이러스인 메갈로사이티바이러스가 바람직하다.

[0016] 일 구현예에서, 본 발명에서 제조하는 바이러스는 메갈로사이티바이러스 서브그룹(subgroup) Ⅱ, 서브그룹 Ⅲ 및 서브그룹 Ⅳ로 구성된 군에서 선택되는 메갈로사이티바이러스일 수 있다.

[0017] 일 구현예에서, 어류 주화세포에 바이러스를 접종하고 3일 마다 배지 교환을 20회 이상 하여 세포를 바이러스로 연속 감염시킬 수 있다.

[0018] 일 구현예에서, 감염된 세포는 우태아혈청(FBS) 5%가 포함된 배지에서 25℃로 배양될 수 있다.

[0019] 일 구현예에서, 감염된 세포를 반연속 배양할 때의 배지 교환 주기는 3일이고, 새로운 배지로 대체하는 배지 교환 비율은 70% (v/v)일 수 있다.

[0020] 본 발명의 반연속 배양은 바이러스에 감염된 세포들로부터 생산된 바이러스가 포함된 배양액을 수득하고, 세포들은 그대로 둔 상태로 새 배양액을 넣어 배양하는 조작을 반연속적으로 하는 것을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 3일마다 세포 배양 상등액 (세포 배양 배지)를 70% 수득하고 새 배지를 다시 채워넣는 바이러스 생산 최적 조건을 수립하였다.

[0021] 일 구현예에서, 상기 어류 유래 주화세포는 해당 바이러스에 감염되는 (감수성이 있는) 어류의 주화세포를 사용할 수 있으며, 일 예로 돌돔, 참돔, 강담돔, 점농어, 넙치, 감성돔, 강도다리, 조피볼락, 능성어, 쏘가리 유래의 주화세포를 사용할 수 있고, 참돔지느러미(pagrus major fin, PMF) 세포주, 그루퍼지느러미(Grouper fin, GF-1) 세포주 및 블루길자어(bluegill fry, BF-2) 세포주로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하며, 본 발명의 반연속 배양 방법에 가장 최적화되어 있는 PMF 세포주 (기탁번호 KCLRF-BP-00324, 한국세포주은행)가 가장 바람직하다.

[0022] 본 발명의 용어 "주화세포"는 어류 조직에서 세포를 분리하여 연속적인 계대 배양을 통하여 세포주화한 세포를 의미하며, "세포주"와 "세포"는 혼용하여 사용한다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에서 PMF 세포주는 본 발명의 반연속 배양 방법으로 배양시 GF-1 및 BF-2보다 100배 이상 더 높은 농도의 바이러스를 생산하였으며, 배지 교환 105회 이후에도 세포의 감소나 탈락 없이 유지하면서 고농도로 바이러스를 생산하였으므로, 본 발명의 반연속 배양 방법에 최적화된 세포주임을 확인하였다. 일반적으로 바이러스로 감염시킨 세포주들을 반연속 또는 연속 배양할 경우, 세포에 변성이 오거나 사멸하기 때문에 바이러스 생산이 불가능하여 계대배양할 수 밖에 없었다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서 반연속 배양 방법과 종래의 *in vitro* 계대배양 방법으로 메갈로사이티바이러스의 생산량을 비교한 결과, 본 발명의 반연속 배양 방법을 이용한 경우 종래의 계대배양에 비해 주어진 기간에서의 총 바이러스 생산량 및 하루 동안 생산되는 평균 바이러스 양 모두 최대 10배 이상 고농도의 바이러스를 수득할 수 있음을 확인하였다.

[0025] 본 발명의 용어 "계대(passage)"는 희석하거나 하지 않고, 또는 희석함 없이, 하나의 배양 용기로부터 다른 용기로 세포를 전달하는 것을 의미한다. 세포가 한 용기에서 다른 용기로 이송될 때마다, 세포의 특정 부분이 결손될 수 있으므로, 의도 되었건 또는 의도되지 않았건 간에 세포의 희석이 일어날 수 있다. 이 용어는 용어 "2차 배양(subclture)"과 같은 의미이다. 계대 배양의 수는 세포가 배양되는 횟수로서, 새로운 용기 내로 2차 배

양되거나 이송되어 현탁액 또는 부착 상태로 성장한다. 이 용어는 개체군 배가 또는 세포 개체군이 복제하는데 필요한 시간, 즉 세포 집락 중 개개의 세포가 복제하는데 대체로 걸리는 시간과 동의어가 아니다.

[0026] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 바이러스 제조방법으로 제조된 바이러스를 불활화한 바이러스와 약제학적으로 수용가능한 담체 (carrier) 또는 부형제를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0027] 일 구현예에서, 상기 백신 조성물은 어류 메갈로사이티바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신으로 이용될 수 있다.

[0028] 일 구현예에서, 상기 어류는 돌돔, 참돔, 강담돔, 점농어, 넙치, 감성돔, 강도다리, 조피볼락, 능성어 및 쏘가리로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 돌돔 또는 참돔인 것이 더욱 바람직하다.

[0029] 일 구현예에서, 상기 백신 조성물은 불활화된 메갈로사이티바이러스를 함유할 수 있다, 상기 메갈로사이티바이러스는 서브그룹(subgroup) Ⅱ, 서브그룹 Ⅲ 또는 서브그룹 IV 분리주일 수 있다. 따라서, 본 발명에서 이러한 치료에 관련된 바이러스는 특이적 면역반응에 영향을 주기 위해, 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위해 생물의 면역계에 제공됨으로써 그 생물을 상기 바이러스에 의한 감염으로부터 보호하기 위해 백신 접종된다.

[0030] 본 발명의 예방용 조성물 (즉, 백신)의 제조를 위해, 본 발명에 따라 포르말린으로 불활화된 메갈로사이티바이러스는 그대로 백신으로 이용되거나, 생리학적으로 허용가능한 형태로 변환된다. 이는 두창에 대한 백신접종에 사용된 수두 바이러스 백신의 제조에 있어서 경험을 토대로 하여 실시될 수 있다 (Stickl, H. 등에 의해 개시됨. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392). 백신 주사의 제조를 위해 예를 들면, 바이러스 입자는 앰플 내, 바람직하게는 유리 앰플에서 동결건조된다. 다르게는, 백신 주사는 제제에서 바이러스의 순차적 동결-건조에 의해 생성될 수 있다. 이 제제는 만니톨, 덱스트란, 당, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 추가 첨가제 또는 산화 방지제 또는 비활성 가스, 안정화제 또는 생체내 투여에 적합한 재조합 단백질과 같은 다른 보조제를 함유할 수 있다. 이어 유리 앰플을 밀봉하고 4℃ 및 실온 사이에서 몇 개월 동안 저장할 수 있다. 그러나, 다른 요구사항이 없는 한, 상기 앰플은 바람직하게는 -20℃ 미만에서 저장될 수 있다.

[0031] 본 발명의 치료용 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 개체의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 어류에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 유효량을 결정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 치료용 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0035] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는, 어류의 메갈로사이티바이러스

감염을 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0036] 예방접종 또는 치료를 위해, 동결건조물은 0.01 내지 0.5ml의 수용액, 바람직하게는 생리 식염수 또는 트리스 완충액에 용해되며 전신적으로 또는 국소적으로, 즉 복강, 비경구, 피하, 근육내 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 투여경로에 의해 투여될 수 있다. 투여 형태, 복용량 및 투여횟수는 공지된 방식으로 당업자에 의해 최적화될 수 있다.

[0038] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실시예 1: 이리도비브리대 메갈로사이티바이러스 분리**

[0041] 1-1. IMV subgroup Ⅱ, subgroup Ⅲ 및 subgroup Ⅳ 분리

[0042] 어류 주화 세포에 감염시키기 위한 IMV(Iridoviridae Megalocytivirus) subgroup Ⅱ, subgroup Ⅲ 및 subgroup Ⅳ를 2013년 경상남도 통영의 한 양식장에서 IMV의 감염증상을 보이는 빈사상태의 돌돔(185.4g), 2009년 싱가포르에서 수입된 퍌구라미(3.2g) 및 2011년 경상남도 거제의 한 양식장에서 감염증상을 보이는 넙치(323.4g)로부터 분리하였다. 바이러스는 각 감염어의 비장조직을 적출하여 10배 부피의 PBS에서 마쇄한 뒤, 4℃ 10,000g에서 5분간 원심분리하고, 0.2㎛ 시린지 필터(syringe filter)를 통과시켜 여과하였다. 각 바이러스는 MCP(Major capsid protein) 유전자를 이용한 PCR을 통해 확인하였고, 염기서열 분석을 통해 확정 진단하였다. 바이러스 증폭을 위하여 T-25 플라스크에서 3일 동안 배양한 GF-1 주화세포주에 상기에서 여과한 바이러스 시료 10㎕를 접종하여 7일간 배양한 뒤 상등액을 취해 사용 전까지 70℃에 보관하였다.

[0044] 1-2. 분리한 바이러스의 정량 분석

[0045] 분리한 바이러스의 정량 분석을 위해 qPCR(quantitative PCR) 분석을 수행하였다. 구체적으로, viral DNA의 분리는 GeneAll® ExgeneTM Tissue SB mini kit (GeneAll)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였고, 용리(elution) 단계에서 최종 부피가 100㎕가 되도록 분리하여 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다. Viral DNA의 absolute qPCR을 위해 2×PreMix (SYBR Green with low ROX, Enzynomics) 10㎕, 0.5pM의 프라이머 및 1㎕의 주형 DNA를 사용하였고, 최종 부피 20㎕가 되도록 하였다. qPCR의 조건은 95℃에서 10분간 반응한 후, 95℃ 10초, 60℃ 15초, 72℃ 20초의 반응을 1 사이클로 하여 40 사이클 반응시켰으며, 마지막 사이클 후에는 모든 반응물에 대하여 72℃부터 95℃까지의 영역에서 용융 곡선(melting curve) 분석을 수행하였다. 아울러, qPCR의 표준 곡선을 작성하기 위해 메갈로사이티바이러스 viral DNA를 주형으로 MCP 유전자의 염기배열을 타겟으로 제작한 qM1F (5'-GGC GAC TAC CTC ATT AAT GT-3') 및 qM1R (5'-CCA CCA GGT CGT TAA ATG A-3')을 프라이머로 이용하여 얻은 141bp의 산물을 TOPO-TA 벡터 (Invitirogen, USA)에 삽입하여 *Escherichia coli* DH5α에 형질전환시켜 대량 배양한 후, 재조합된 플라스미드를 분리하여 10배 단계 희석 ($1x10^8$ 내지 $1x10^1$copies/㎕)하여 표준곡선(standard curve)을 작성하는데 사용하였다.

[0047] **실시예 2. 반연속 배양법(SCCCS)을 이용한 주화세포에서의 IMV 생산**

[0048] 주화세포로는 IMV에 감수성을 보이는 참돔지느러미(pagrus major fin, PMF) 세포주 (한국세포주은행 기탁번호 KCLRF-BP-00324), 그루퍼지느러미(Grouper fin, GF-1) 세포주 (ECACC, Australia) 및 블루길자어(bluegill fry, BF-2) 세포주 (ATCC, USA)를 각각 $1x10^5$cells/ml가 되도록 T-25 플라스크에 식균한 뒤, 세포가 플라스크 바닥의 80% 이상을 차지하는 식균 5일 이후에 상기 실시예 1-1의 IMV subgroup II 바이러스 상등액 $5x10^5$ copies/ml 농도 1ml을 주입하여 2시간 동안 배양기 내에서 Twister (Vision Scientific co., LTD, VS-96 TW)를 사용하여 충분히 흡착 시켰고, 이후 4ml을 첨가하여 25℃에서 배양하였다. IMV 접종 이후 매일 플라스크 내의 상등액을 취하고 100% 새로운 배지로 교환하는 방식으로 세포주를 연속 배양 (SCCCS, semi-continuous cell culture system)하면서, 취한 상등액의 바이러스 농도를 매일 측정하였다. 또한, 10회 연속 배양 후에, 세포 변성을 현미경 (Nikon, Eclipse TS100)으로 확인하였다.

[0049] 그 결과, PMF 세포주에서 가장 높은 농도의 IMV가 생산되었고, 평균 바이러스 농도는 BF-2, GF-1 및 PMF에서 각각 $1.46x10^5$, $4.14x10^5$ 및 $9.49x10^6$ copies/ml로 나타났다 (도 1). 특히, PMF는 GF-1 및 BF-2보다 100배 이상 더 높은 농도까지 IMV를 생산하였으며, SCCCS 배양 15일에 최대 $7x10^7$ copies/ml로 나타났다. 또한, 현미경으로 세포주의 변성을 확인한 결과, 연속배양 10회 후의 세포 변성이 PMF 세포주에서 가장 많이 나타났으며, 이러한 IMV 감염에 의한 PMF 변성에 의해 지속적인 배지 교환에도 세포가 유지되면서 탈착없이 고농도로 바이러스를 생산할 수 있다 (도 2). 이에, 이 후의 SCCCS 배양 방법을 통한 IMV 생산 최적화 실험은 PMF 세포주를 대표 주화 세포주로 사용하여 실시하였다.

[0051] **실시예 3. 반연속 배양(SCCCS)에서의 배지 교환 최적화**

[0052] 3-1. 배지 교환 주기

[0053] PMF 세포주에서 IMV를 SCCCS 배양 방법으로 생산함에 있어서, 배지 교환주기에 따른 바이러스의 생산성을 확인하기 위해, 1일, 3일 및 5일을 주기로 100% 배지 교환 (전체 상등액 수득 후 새 배지 추가)을 실시하였고, 수득한 바이러스는 상기 실시예 1-2의 q-PCR 방법으로 정량분석하였다.

표 1

[0054]

배지 교환 주기 (일)	배지 교환 횟수 (회)	생산된 총 바이러스 양 (viral copies)
1	30	4.87E+09
3	10	6.04E+10
5	6	4.80E+09

[0055] 그 결과, 1일, 3일 또는 5일 주기로 배지 교환한 경우 모두 정상적인 세포배양이 가능하였고 바이러스도 생산되었지만, 3일을 주기로 배지를 교환한 경우 다른 주기에 비하여 10배 이상 더 높은 바이러스 생산성을 보였다 (표 1). 생산된 총 바이러스는 양은 바이러스 감염 직후부터 30일 동안 수득한 모든 바이러스 상등액 내의 바이러스 양을 나타냈으며, 이 때 생산된 바이러스의 상등액의 양은 1일, 3일, 5일 주기에서 각각 150ml, 50ml 및 30ml였다. 또한, 5일 주기의 배지 교환은 초기에 다소 높은 농도를 보였지만 이후는 세포의 탈락으로 바이러스 생산이 점차 감소하였다 (도 3). 즉, 3일의 배지 교환 주기로 배양할 때의 바이러스 생산성이 가장 높은 것으로 나타나, 이 후 SCCCS 배양 방법에서 배지 교환 주기는 3일로 하였다.

[0057] 3-2. 배지 교환 비율

[0058] SCCCS 배양 방법 중 배지 교환 비율에 따른 IMV의 생산성을 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 3-1에서 조건 수립한 배지 교환 주기 (3일)로 배지를 교환할 때, 새 배지로 교환하는 배지의 비율을 30%, 70% 또는 100%로 구분하여 배지를 교환한 뒤, 수득한 바이러스의 양을 상기 실시예 1-2의 q-PCR 방법으로 정량분석하였다.

[0059] 그 결과, 모든 비율에서 세포가 유지되고 바이러스의 농도 증가가 관찰되었으나, 배지 교환 비율 30%에서 초반에는 바이러스 농도는 빠르게 올라갔지만 15일 이후에는 점차 세포가 탈락하여 바이러스 농도가 계속해서 감소하였다. 또한, 배지 교환 비율 100%에서는 계속해서 바이러스 농도가 증가하였지만 70% 교환에 비하여 낮은 속도로 증가하여 바이러스 농도 최고치에 도달하는데 70% 및 30% 교환 비율에 비하여 오랜 기간이 소요되었다. 배지 교환 비율 70%에서는 바이러스의 농도가 15일 동안 계속해서 증가하였고 이 후에도 세포의 탈락 없이 바이러스 농도가 유지되었다 (도 4). 이에, 이 후의 실험 중에 SCCCS 배양시 배지 교환 비율은 70%로 최적화하여 이용하였다.

[0061] **실시예 4. 반연속 배양(SCCCS)에서의 배양 조건 최적화**

[0062] 4-1. 배양 배지 종류

[0063] 상기 실시예 2 및 3에서 확립된 3일 주기로 배지를 70% 교환하는 SCCCS 배양 방법을 이용한 IMV 생산에 있어서, 배지의 종류, FBS 농도 및 배양 온도의 차이에 따른 바이러스 생산성을 비교하여 배양 조건을 최적화하였다. 그

중 배지의 종류는 L-15, MEM 및 RPMI1640를 비교하였다, 우선 PMF 세포에 각각의 배지로 적응을 시키기 위하여 각 배지로 교환한 이후 열 번 이상 계대배양한 뒤 실험을 진행하였다. 새로운 배지에서 적응된 각각의 PMF 세포는 마지막 계대배양 후 $1x10^5$cells/ml로 T-25 플라스크에 주입하여 배양하였고, 세포가 플라스크 바닥의 80% 이상을 차지하게 될 때에 상기 실시예 1-1의 바이러스 상등액을 이용하여 $1x10^5$ copies/ml이 되도록 접종하였다. 접종 3일 후, 생산된 바이러스 상등액 70%를 수득하고 수득한 양의 새로운 배지를 분주하여 배양하는 방식 (3일 주기로 배지를 70% 교환)으로 배양하였다. 이와 같은 방식으로 매일 수득한 바이러스의 양을 상기 실시예 1-2의 q-PCR 방법으로 정량분석하였다.

[0064] 그 결과, 세 종류의 배지 모두에서 유사한 수준의 바이러스 생산성을 보였다 (도 5).

[0066] 4-2. 우태아 혈청 농도

[0067] 상기 실시예 2 및 3에서 확립된 3일 주기로 배지를 70% 교환하는 SCCCS 배양 방법을 이용한 IMV 생산에 있어서, 배지의 종류, FBS 농도 및 배양 온도의 차이에 따른 바이러스 생산성을 비교하여 배양 조건을 최적화하였다. 그 중, SCCCS에서 배양 배지의 첨가물로 사용되는 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)의 적정 농도를 설정하기 위하여 상기 실시예 4-1에서와 동일한 방법으로 세포배양하여 바이러스를 접종하고 3일 주기로 배지를 70% 교환하였다. 이 때, 배지에 FBS를 1%, 5% 및 10%로 첨가하였으며, 생산된 바이러스 상등액의 농도는 q-PCR를 통해 분석하였다.

[0068] 그 결과, 1%의 FBS를 사용한 군에서는 낮은 농도의 바이러스가 생산되었으며, 배양 15일 이후 세포의 confluency가 50% 이하로 저하되었다. 또한, FBS 농도 5% 및 10%의 그룹에서는 모두 정상적인 세포 배양 상태를 보였고, 유사한 농도의 바이러스가 생산됨을 확인할 수 있었다 (도 6). 따라서 본 발명에서는 경제적인 측면을 고려하려 5%의 FBS을 이용하는 것을 최적화된 배양 조건으로 선택하였다.

[0070] 4-3. 배양 온도

[0071] 상기 실시예 2 및 3에서 확립된 3일 주기로 배지를 70% 교환하는 SCCCS 배양 방법을 이용한 IMV 생산에 있어서, 배지의 종류, FBS 농도 및 배양 온도의 차이에 따른 바이러스 생산성을 비교하여 배양 조건을 최적화하였다. 그 중, 최적 세포 배양 온도를 확인하기 위하여, 상기 실시예 4-1에서와 동일한 방법으로 세포배양하여 바이러스를 접종하고 3일 주기로 배지를 70% 교환하면서, 배양 온도를 20, 23, 25, 28 및 30℃로 하여 바이러스의 생산성을 각각 확인하였다. 다른 세포배양 조건은 상기 실시예 4-2에서 최적화된 조건으로 배양하였다.

[0072] 그 결과, 모든 온도 조건에서 IMV에 감염된 PMF 세포의 SCCCS 배양이 가능함을 확인하였고, 20℃의 조건에서는 바이러스 수율이 현저히 낮게 나타났으며, 30℃에서 배양할 경우 배양 15일 이후에 세포의 탈착이 나타나 바이러스의 농도가 감소되는 결과를 나타냈고, 25℃와 28℃에서 가장 높은 바이러스 생산성을 보였다 (도 7). 이에, 이후의 세포 배양은 25℃에서 실시하였다.

[0074] **실시예 5. 반연속 배양(SCCCS)을 통한 바이러스의 장기 생산성 확인**

[0075] PMF 세포주에서 SCCCS(Semi-batch cell culture system) 배양 방법을 이용한 IMV의 생산에 있어서, 상기 실시예들에서 확립한 최적 조건들 (배양 배지: L-15, 우태아혈청(FBS): 5%, 배양 온도: 25℃, 배지 교환 주기: 3일 및 배지 교환율: 70%)로 IMV를 생산성을 확인하였다. 구체적으로, T-flask에 PMF 세포 $1x10^5$cells/ml 농도를 식균하고, 세포가 플라스크 바닥의 80% 이상을 차지하는 식균 5일 이후에 상기 실시예 1-1의 IMV subgroup Ⅱ 바이러스 상등액 1ml을 $5x10^5$ copies/ml 농도로 주입하여 2시간 동안 배양기 내에서 Twister (Vision Scientific co., LTD, VS-96 TW)를 이용하여 충분히 흡착시켰으며, 이후 4ml을 더 첨가하여 25℃에서 배양하였다. 주기적인 세포수 측정을 위해 동일한 방법으로 동일한 양의 세포에 바이러스를 접종한 10개의 T-flask에서 매회 하나의 플라스크의 세포를 제거하여 측정하였다. 세포수는 배지 교환 15회를 주기로, 0.25% 트립신을 이용하여 플라스크 내의 세포를 모두 탈착한 뒤, 헤모사이토미터로 $0.1mm^3$ 내의 세포수가 80-200 세포가 되도록 희석하고 계수하여 1ml내의 세포수를 측정하였다. 바이러스 농도 또한 같은 주기로 상등액을 샘플링하여 DNA 분리한 뒤 q-PCR 분석 방법으로 정량하였다.

[0076] 그 결과, SCCCS로 배양된 PMF에서 IMV는 최소 $4.99x10^{9}$ copies/ml 및 최대 $8.47x10^{9}$ copies/ml의 농도를 보였고, 하루 생산할 수 있는 평균 바이러스 양은 $1.09x10^{10}$ copies/day로 나타났다 (도 8). 이 때, 세포의 농도는 평균 $3.86x10^{6}$ cells/ml였고 (도 8), 배지 교환 20회, 50회 및 100회에도 세포의 감소나 탈락 없이 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (도 9). 이 후, 계속되는 배양에서도 세포의 탈락 없이 바이러스를 생산하였다.

[0078] **실시예 6. IMV 서브그룹별 반연속 배양 생산성 확인**

[0079] IMV의 각 서브그룹의 바이러스의 SCCCS에 따른 생산성을 확인하기 위하여 실시예 1에서 확보한 subgroup Ⅱ, Ⅲ 및 Ⅳ의 분리주를 각각 PMF 세포주에 접종한 뒤 실시예 3 및 4에서 최적화한 방법으로 배양한 뒤 바이러스 생산성을 확인하였다. 또한, 각각의 바이러스 서브 그룹을 접종한 세포의 변성을 현미경으로 확인하였다.

[0080] 그 결과, 각각 서브그룹의 바이러스 모두 동일한 정도의 세포변성을 나타냈다 (도 10). 또한, 모든 그룹에서 세포가 탈락 없이 유지되었고, IMV subgroup에 상관없이 바이러스의 연속 생산성에서 Subgroup Ⅱ에 대비하여 뚜렷한 차이를 발견 할 수 없었다 (도 11). 이를 통해, 본 발명은 모든 IMV subgroup의 고효율적 생산에 적용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0082] **실시예 7. 용기에 따른 반연속 배양**

[0083] PMF 세포주에서 SCCCS(Semi-batch cell culture system) 배양 방법을 이용한 IMV의 생산에 있어서, 세포 배양 용기에 따른 바이러스 생산성을 확인하였다. 배양 용기는 T-25 플라스크, T-75 플라스크, 55mm 디쉬, Roller Bottles (corning, $850cm^{2}$)을 사용하였다. 또한, 배지를 T-75 플라스크에는 15ml, 55mm 디쉬에는 5ml, Roller bottles에는 200ml 첨가하여 상기 실시예들에서 수립한 최적 조건으로 세포 배양을 실시하였다. Roller bottles은 Low Profile Roller Mixer (2.3 inches in Height)를 사용하여 2RPM의 회전속도로 배양하였다. T-25 플라스크와 55m 디쉬에 배양하는 세포에는 바이러스 상등액 1ml을 첨가하여 2시간 동안 흡착이후 배지 4ml을 첨가하였고, T-75 플라스크에 배양하는 세포에는 3ml을 첨가하여 2시간 동안 흡착한 후 배지 12ml을 첨가하였다. 흡착은 Twister (Vision Scientific co., LTD, VS-96 TW)를 사용하였다. Roller bottles에 배양하는 세포에는 100ml의 바이러스 상등액을 첨가한 이후 2시간 동안 2RPM 속도로 흡착시킨 뒤 100ml을 첨가하였다. 모든 용기 내 바이러스 상등액은 3일에 한 번씩 70%의 배지를 교환하여 바이러스를 수득하였고, 각각의 용기에서 30일간 배양기간 동안의 평균 바이러스 농도를 측정하였다.

표 2

[0084]

	배지 용량(ml)	평균 바이러스 생산농도 ($x10^{9}$copoies/ml)
T-25 Flask	5	6.52
T-75 Flask	15	7.01
55mm Dishes	5	0.95
$850cm^{2}$ Roller Bottles	200	6.81

[0085] 그 결과, 모든 용기에서 세포의 정상적인 유지를 확인할 수 있었으나 55mm 디쉬의 경우에는 바이러스 접종 이후 초기 단계에서부터 계속 하여 낮은 CPE를 나타냈다. 또한, $850cm^{2}$ Roller bottles을 사용할 경우에도 최대 바이러스농도와 평균바이러스 생산량이 모두 유사하게 나타나 숙주 세포 부착공간의 넓이와 무관하게 본 방법이 활용되는 것을 확인하였다 (표 2).

[0087] **실시예 8. 계대배양(BCS) 및 반연속 배양(SCCCS)의 바이러스 생산성 비교**

[0088] 종래의 세포주 단순 계대 배양을 통한 바이러스 생산 방법 (Batch culturing system, BCS)을 통한 IMV의 생산성과 본 발명의 반연속 배양(SCCCS) 방법을 이용한 IMV의 생산성을 비교하였다. 구체적으로, 플라스크 내의 PMF 세포주에 10^{5} copies/ml이 되도록 IMV를 접종하고 3일 마다 배지교환을 실시하여 그 횟수가 20회(P20) 이상 되

도록 하여 충분한 연속 감염이 유도되도록 하였다. 그 후, 정확한 비교를 위하여 충분하게 연속감염된 것으로 판단되는 세포를 사용하였으며, 구체적으로 BCS 방법을 이용한 실험군으로는 IMV가 감염된 PMF를 대표하는 30회 또는 60회 계대배양한 세포주 (BCS-P30 또는 P60)를 사용하여 7일에 1회씩 계대배양하였고, SCCCS 실험군으로는 상기 실시예들에서 수립한 최적 조건으로 배지 교환을 50회 또는 100회 실시한 세포주 (SCCCS-W50 또는 W100)를 3일에 1회 배지 교환하는 반연속배양 방법으로 각각 21일 동안 배양한 뒤 바이러스의 생산성을 확인하였다.

표 3

[0089]

바이러스 생산방법	구분	21일간 바이러스의 생산량(ml)	바이러스의 평균농도 (copies/ml)
BCS	BCS-P30	15.0	6.17E+08
	BCS-P60	15.0	5.93E+08
SCCCS	SCCCS-W50	24.5	5.55E+09
	SCCCS-W100	24.5	6.97E+09

[0090] 그 결과, BCS에 의하여 21일간 생성된 바이러스 상등액의 양은 15ml 이었고, SCCCS에 의해 생성된 양은 24.5ml로 1.6배 많은 양의 생산량을 보였으며, 또한 SCCCS 방법이 BCS에 비하여 주어진 기간에서의 생성되는 바이러스 농도 또한 10배 이상 높아 총 생성되는 바이러스의 절대량은 15배 이상 높은 것으로 유추된다 (표 3). 이를 통해, SCCCS 방법을 이용한 바이러스의 생산이 효율적으로 고농도 (high dose)의 메갈로사이티바이러스를 생산할 수 있음을 알 수 있다.

[0092] **실시예 9. 반연속 배양 방법으로 생산된 바이러스를 이용한 불활화 백신 제조 및 효과 확인**

[0093] 상기 실시예 1에서 감염된 돌돔으로부터 분리한 IMV(Iridoviridae Megalocytivirus) subgroup Ⅱ을 이용하여 고농도 불활화 백신 (High Dose Iridovirus Inactivated Vaccine, HDIV)을 제작하였다. 구체적으로, 상기 실시예들에서 확립한 최적 조건으로 IMV subgroup Ⅱ를 생산하고, 이를 희석하여 $2x10^9$copies/ml로 조절하였다 (SCCCS-IMV-SⅡ). 대조군으로서 동일 배지 및 조건에서 계대배양 방법으로 생산한 바이러스 상등액은 $5x10^8$copies/ml 농도의 원액을 사용하였다 (BCS-IMV-SⅡ). 각각의 방법으로 조제 및 생산된 바이러스를 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 4℃에서 2주간 포르말린 0.1% (v/v)로 불활화시켜 백신을 제조하였다 (BCS-IMV-SⅡ 및 HDIV인 SCCCS-IMV-SⅡ). 불활화된 백신 0.1ml를 건강한 돌돔 (어체중 6.98 ± 1.54 g) 20마리에 복강주사 하여 4주간 관찰한 결과 두 가지 백신 접종 그룹 모두 폐사한 개체가 없어, 두 백신 모두 안정성이 있는 것으로 확인되었다.

[0094] 제작된 백신의 효과를 비교 및 확인하기 위하여, HDIV (SCCCS-IMV-SⅡ 백신) ($2x10^9$ copies/ml), BCS-IMV-SⅡ 백신 ($5x10^8$copies/ml) 및 PBS (pH 7.2)를 건강한 돌돔 (7.94 ± 1.37 g) 및 참돔 (9.28 ± 2.21 g) 20 마리에 각각 0.1ml 용량으로 복강주사하여 접종하였다. 백신 접종 2주 후에 SCCCS-IMV-SⅡ 바이러스 ($1x10^4$ copies/fish)를 복강 주사하여 백신 효과를 확인하였으며, 위 과정을 3번 반복 실시한 뒤 평균 생존율을 확인하였다.

[0095] 그 결과, 반연속 배양 방법 (SCCCS)으로 생산한 바이러스 백신 (HDIV)의 IMV 감염 예방 효과가 BCS-IMV-SⅡ로 제작된 백신에 비하여 돌돔 및 참돔에서 25% 및 15% 더 큰 것으로 나타났다 (표 4). 또한 1/10로 희석된 HDIV (SCCCS-IMV-SⅡ 백신)에서는 원액을 사용한 BCS-IMV-SⅡ 백신과 유사한 생존률을 나타내, 종래의 계대배양 방식으로 생산된 바이러스에 비해 백신으로 이용하기에 현저하게 유용함을 알 수 있었다.

표 4

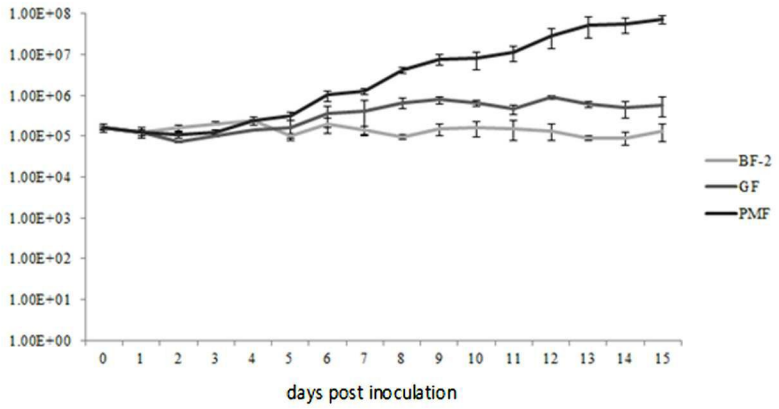
[0096]

어종	백신종류	생존율(%)	평균 생존율 (%)

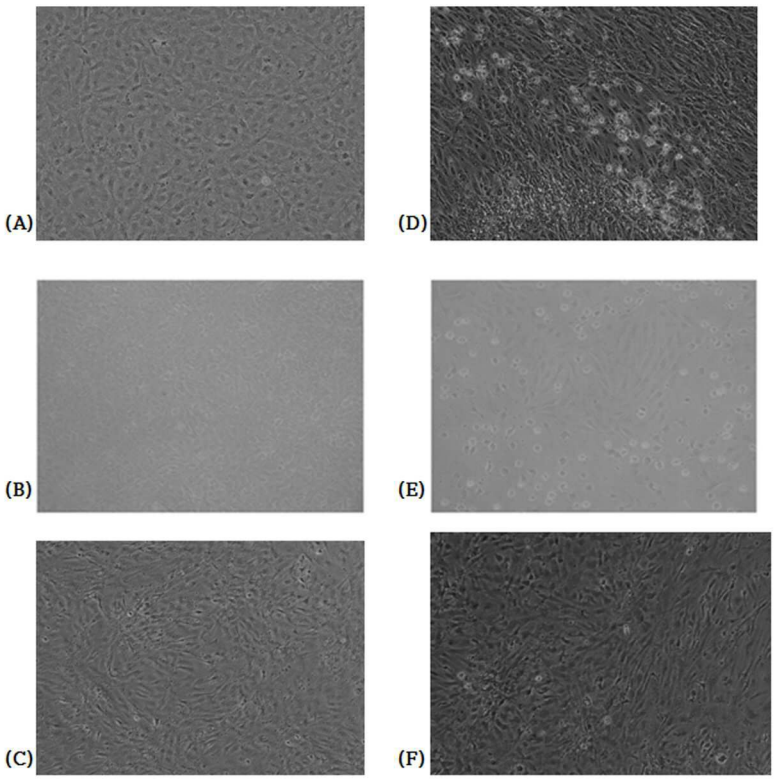
돌돔	SCCCS-HDIV	60	68.33 ± 7.64
		75	
		70	
	1/10희석된 SCCCS-HDIV	40	46.67 ± 7.64
		55	
		45	
	BCS-IMV	50	43.33 ± 16.07
		55	
		25	
	1/10 희석된 BCS-IMV	30	23.33 ± 5.77
		20	
		20	
	Control	0	0.00 ± 0.00
		0	
		0	
참돔	SCCCS-HDIV	90	93.33 ± 2.89
		95	
		95	
	1/10희석된 SCCCS-HDIV	75	81.67 ± 5.77
		85	
		85	
	BCS-IMV	70	78.33 ± 7.64
		85	
		80	
	1/10 희석된 BCS-IMV	60	68.33 ± 7.64
		70	
		75	
	Control	25	48.33 ± 2.89
		30	
		30	

도면

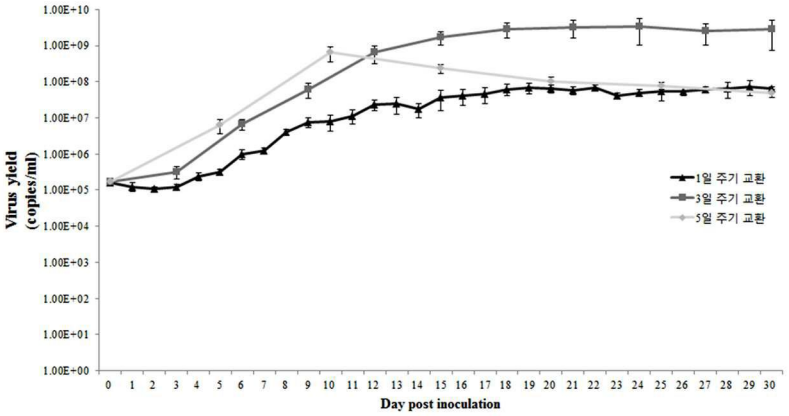
도면1



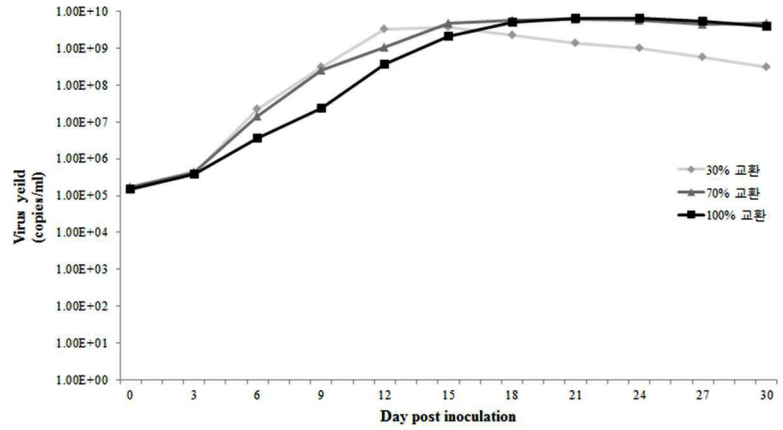
도면2


(A)
(D)
(B)
(E)
(C)
(F)

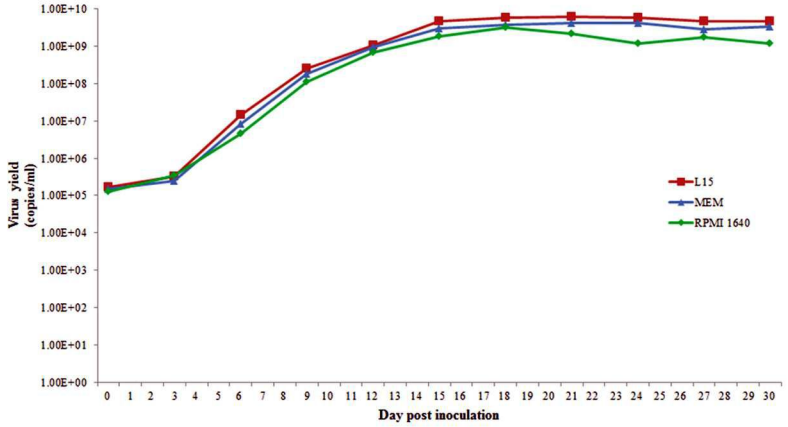
도면3


Virus yield (copies/ml)
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Day post inoculation
1일 주기 교환
3일 주기 교환
5일 주기 교환

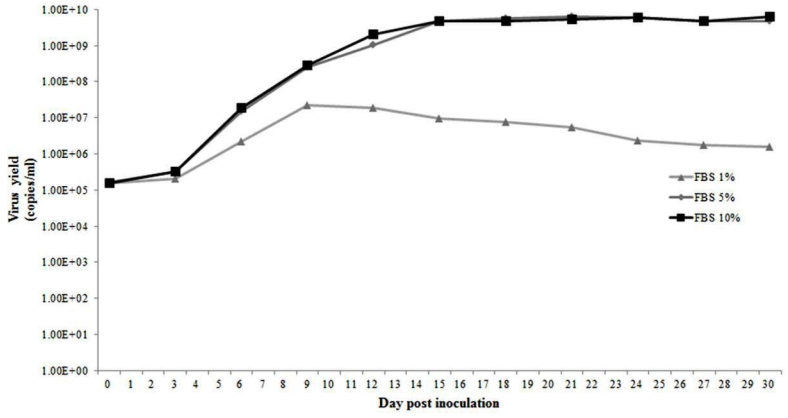
도면4


Virus yeild (copies/ml)
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
Day post inoculation
30% 교환
70% 교환
100% 교환

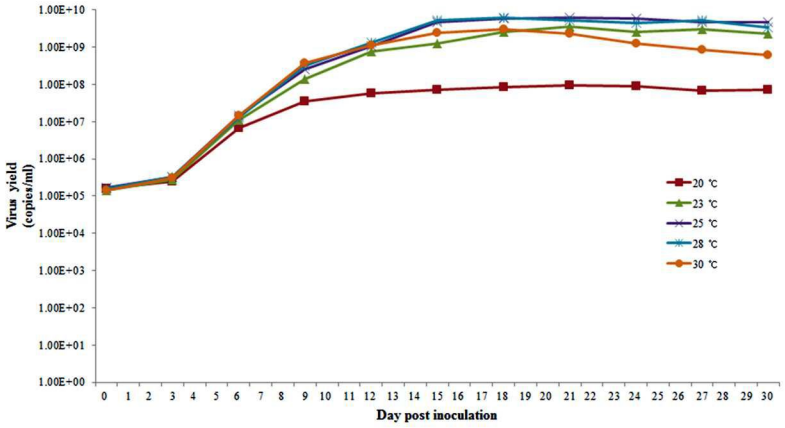
도면5


Virus yield (copies/ml)
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Day post inoculation
L15
MEM
RPMI 1640

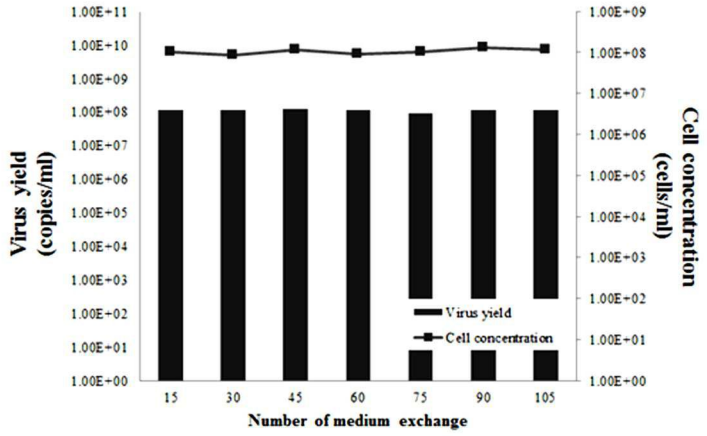
도면6


Virus yield (copies/ml)
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Day post inoculation
FBS 1%
FBS 5%
FBS 10%

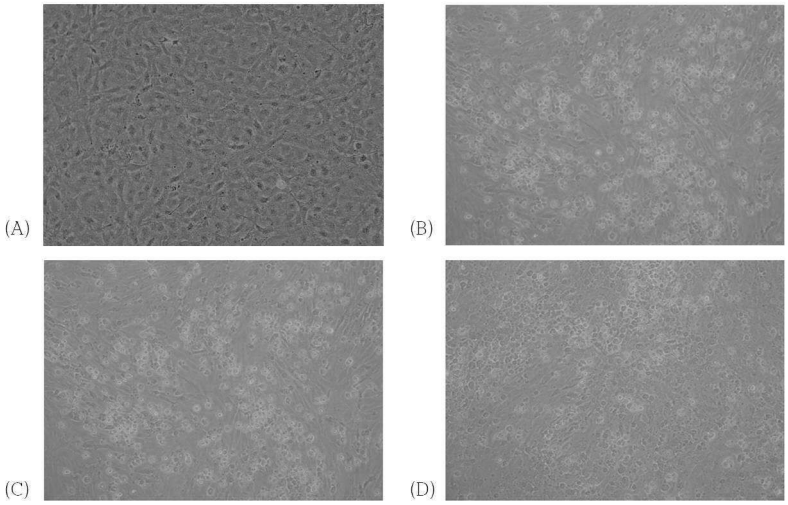
도면7


Virus yield (copies/ml)
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Day post inoculation
20 ℃
23 ℃
25 ℃
28 ℃
30 ℃

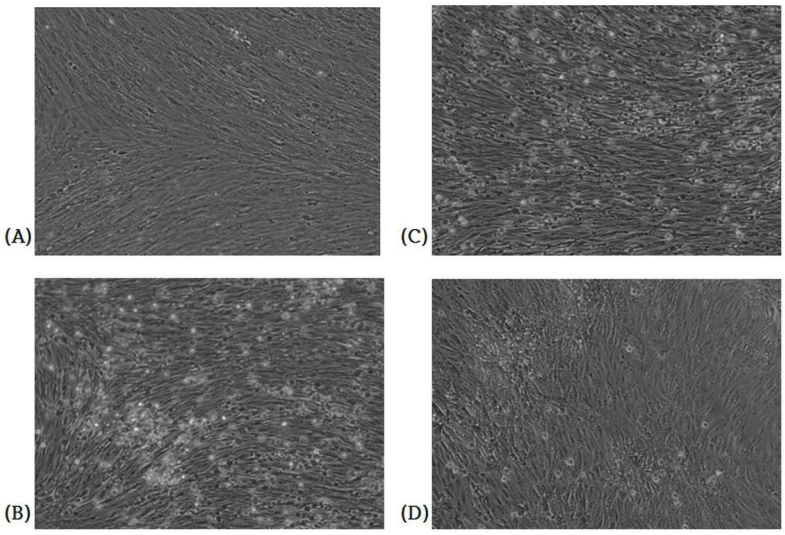
도면8


Virus yield (copies/ml)
1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
Cell concentration (cells/ml)
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
15 30 45 60 75 90 105
Number of medium exchange
Virus yield
Cell concentration

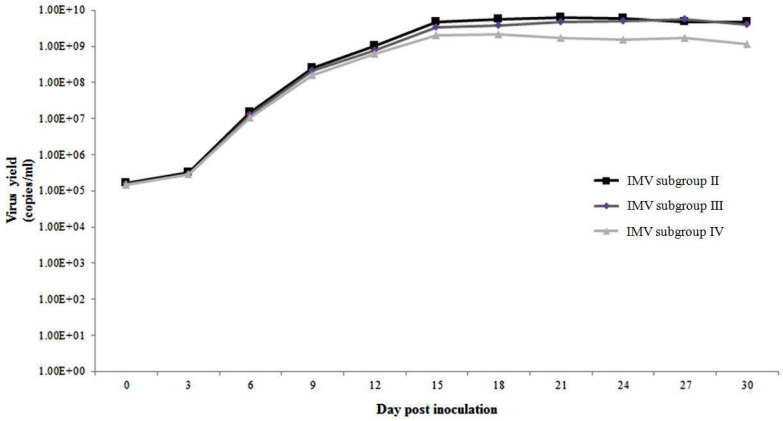
도면9


(A)
(B)
(C)
(D)

도면10


(A)
(C)
(B)
(D)

도면11


1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
Virus yield (copies/ml)
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
Day post inoculation
IMV subgroup II
IMV subgroup III
IMV subgroup IV