

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/45

(11) 공개번호 특2000-0067866

(43) 공개일자 2000년11월25일

(21) 출원번호	10-1999-7000236	(87) 국제공개번호	WO 1998/03199
(22) 출원일자	1999년01월14일	(87) 국제공개일자	1998년01월29일
번역문제출일자	1999년01월14일		
(86) 국제출원번호	PCT/FR1997/01316		
(86) 국제출원출원일자	1997년07월15일		
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 케냐 짐바브웨		
	EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄		
	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투 갈 스웨덴 핀란드		
	OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		
	국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 유고슬라비아 오스트레일리 아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케 냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이 베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로 바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이 나 우간다 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 짐바브웨 시에라리온 가나		
(30) 우선권주장	96/09401 1996년07월19일 프랑스(FR)		
(71) 출원인	메리알(쏘시에떼 빠르 악씨옹 생플리취에)	데스폴롱그 티에리	
	프랑스 에프-69002 리옹 뤼 브루젤라 17		
(72) 발명자	오도네장-크리스토프		
	프랑스에프-69006리옹뤼드크레끼119		
	부샤르동안나벨		
	프랑스에프-69007리옹꾸르강베따118		
	리비에르미셸		
	프랑스에프-69130에펠리슈멩뒤샹슬리에11		
(74) 대리인	이윤민, 김윤배		

심사청구 : 없음

(54) 개 질병, 특히 호흡기 및 소화성 질병 치료용 폴리뉴클레오티드

요약

숙주 개 세포 생체내에서 발현될 수 있는 개 병원체 결합가 유전자를 함유하는 플라스미드를 각각 포함하
는 둘 이상의 백신 결합가를 포함하며, 상기 결합가는 개 디스토펜 결합가 및 개 파르보바이러스 결합가
인 개질병 치료용 백신제제. 상기 플라스미드는 결합가당 하나 이상의 유전자를 포함하며, 이 유전자
는 개 디스토펜 바이러스에 대한 HA 및 F 개 파르보바이러스에 대한 유전자 VP2 로 구성된 군에서 선택한
다.

대표도

도1

색인어

백신 제제

명세서

본 발명은 다수의 감염성 병변(pathologies), 특히 호흡기 및 소화성 병변에 대한 개의 예방접종이 가능한 백신제제에 관한 것이다. 또한 본 발명은 대응하는 예방접종방법에 관한 것이다.

감염성 개 병변은 극히 다양하고, 종종 야외에서 조우하게되는 환경에 좌우되어 제어하는 것이 어렵다.

수많은 백신들이 이미 존재하며, 특히 가래병 (CDV 바이러스), 파르보바이러스증 (CPV 바이러스), 코로나 바이러스증 (CCV바이러스), 케넬(kennel) 기침 또는 호흡기 증후군 (PI2 바이러스) 및 광견병 (라브도바이러스) 에 대한 백신이 존재한다. 이러한 백신은, 좀더 일반적으로는, 약독화 균주로 이루어진 생백신이다. 이것은 특히 가래병 백신, 개 아데노바이러스 백신, 파르보바이러스 백신 및 개 코로나바이러스 백신에 대한 경우이다.

몇몇의 경우에서, 또한 불활성화 백신이 광견병 및 코로나바이러스증에 대한 백신으로서 제안되어 있다.

이러한 다양한 백신은 개별적으로, 즉 일가 백신의 형태, 또는 회합된(associated), 즉 다가 백신의 형태로 시판된다.

지금까지 개발된 다가 회합(association) 은 항상 결합가사이의 상용성 및 안정성의 문제점이 있었다. 사용되는 상이한 항원의 관점에서 또는 제제 자체의 관점에서, 특히 불활성화 백신 및 생백신이 결합되는 경우에서든지, 백신의 상이한 결합가사이의 상용성을 동시에 확보하는 것이 사실 필요하다. 이는 또한 이러한 결합된 백신의 보존 및 또한 이들의 안정성 특히 어췌번트 존재하에서의 안정성의 문제점을 노정시킨다. 이러한 백신은 통상적으로 상당히 고가이다.

보호의 정도 및 이러한 보호의 기간은, 더욱이, 상당히 가변적일 수 있으며, 또한 야외 환경에 민감하다. 이것은 특히 강아지의 예방접종에 해당하며, 여기에서 모기원의 항체는 불활성화 백신 및 심지어 생백신에 의한 면역화를 방지한다.

그러므로 개과, 특히 개의 예방접종은 비싸거나 사용이 복잡한 백신의 사용에 대한 경제적 제약을 염두에 두면서 실행하는 것이 바람직할 것이다.

완전한 프로운트(Freund) 어췌번트내 F 용합 항원 및 H 해마글루티닌 동등물의 정제된 제제를 사용한 가래병에 대한 예방접종 시험은, F 항원이 서브유닛 백신을 위한 CDV 바이러스 (E.Norrby et al., J. of Viro. May 1986 : 536-541) 에 대한 보호를 위한 흥미있는 면역원을 구성할 수 있음을 시사하였다.

한편, 다른 문헌 (P. de Vries et al., J. gen. Viro. 1988, 69: 2071-2083) 에는 CDV F 및 HA 단백질은 면역자극성 컴플렉스 (ISCOMS) 의 기술에 따른 예방접종에서 유리할 수 있음이 시사되어 있다.

CDV F 단백질에 대한 유전자를 발현시키는 재조합 백신으로 면역화된 마우스를 이러한 바이러스에 의한 항원투여에 대하여 보호된다.

그러나, 이것은 실험실 결과이며, 이는 특히 야외조건하에서 판단하기는 어렵다.

파르보바이러스증에 있어서는, 바쿠로바이러스에서 유전적 재조합으로 수득한 CPV 바이러스유래의 주 캡시드 단백질 VP2 를 함유하는 서브유닛 백신의 시험은 CPV 바이러스에 의한 항원투여에 대한 면역화된 개의 보호를 보여주는 것을 가능케한다.

개 헤르페스바이러스 CHV 에 있어서는, 서브유닛 백신의 성분으로 당단백질의 사용에 대하여 연구되었다. 이 연구는 FHV 와 같은 기타 헤르페스바이러스와의 교차반응의 유도를 보여주나 보호성 백신의 제조의 가능성에 대해서 어떠한 결론도 이끌어내지 못했다.

라임 질병에 있어서, 회합된 OspA 및 OspB 는 마우스 및 개에서 보호를 유도하고, OspA 만이 마우스, 햄스터 및 개에서 보호를 유도한다.

특허출원 WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 및 WO-A-95 20660 에서는 최근 개발된 폴리뉴클레오티드 백신의 기술을 이용하였다. 이러한 백신에서는 숙주세포에서 플라스미드에 삽입된 항원을 발현시킬 수 있는 플라스미드를 사용함이 공지되어 있다. 모든 투여경로 (복강내, 정맥내, 근육내, 경피, 피내, 점막등) 가 제안되었다. 또한 예방접종의 다양한 수단, 예컨대 DNA 를 금입자의 표면에 부착 투사하여 동물의 피부를 투과시키는 방법 (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992) 및 피부, 근육, 지방조직 및 유방조직을 트랜스펙션시키는 것을 가능케하는 액체제트투사기 (Furth et al., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992) 를 사용할 수 있다.

폴리뉴클레오티드 백신은 예컨대 네이키드(naked) DNA 및 조제된 DNA 양쪽을 리포솜 또는 양이온성 지질 내 사용할 수 있다.

한편 종래의 기술은 상기 질병에 대한 예방접종의 폴리뉴클레오티드 방법에 의한 개에서의 보호를 제공하지 못한다. 아직 개 코로나바이러스 CCV 및 호흡기 증후군의 원인 물질에 대하여 알려진바 없다.

광견병에 있어서, 독성 항원투여에 대한 마우스의 보호가, SV40 바이러스 얼리 프로모터 (Xiang et al., Virology 199, 1994: 132-140) 의 제어하 G 단백질에 대한 유전자를 발현시키는 폴리뉴클레오티드 백신으로 처리후 실증되었고, 유사한 결과가 CMV IE 프로모터의 이용으로 달성된다.

본 발명은 많은 병원성 물질에 대한 개의 예방접종을 보장 가능케하는 다가 백신 제제를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적은 결합가의 안정성 및 상호 상용성의 요구되는 모든 기준을 나타내면서 상이한 결합가를 결합시킨 백신제제를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 사용하기에 용이하고 저렴한 백신 제제를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 백신의 효능을 상당히 증가시키거나 필요한 백신의 양을 실질

적으로 감소시키는 것을 가능케 하는, 양호한 안정성을 갖는 예방접종방법을 제공하는 것이다.

그러므로 본 발명의 주제는 개과 세포에서 생체내 하기 플라스미드를 발현시키기 위하여, 하나의 개 병원체 결합가, 즉 까레병 바이러스 CDV 결합가 및 개 파르보바이러스 CPV 결합가를 갖는 유전자가 통합된 플라스미드를 각각 함유하는 둘이상의 백신 결합가를 갖는 개과 병원체에 대한 백신제제이고, 상기 플라스미드는, 각각의 결합가에 대해, 까레병 바이러스에 대한 HA 및 F 로 구성된 군에서 선택한 유전자 및 개 파르보바이러스에 대한 VP2 유전자중 하나이상을 함유한다.

바람직하게는, 까레병 결합가에 있어서는, 플라스미드(들)은 동일한 플라스미드 또는 상이한 플라스미드에 삽입된 HA 및 F 유전자를 함유한다.

또한 본 발명에 따른 다가 백신은 개 코로나바이러스 CCV 결합가를 함유할 수 있고, S 및 M 유전자의 군으로부터 선택된 하나이상의 유전자 및 바람직하게는 S 유전자 또는 S 및 M 유전자를 함유하는 하나이상의 플라스미드를 함유한다. 여기에서 또한, 유전자는 다른 플라스미드에 삽입되거나 이들의 발현을 허용하는 상황에서 동일한 플라스미드에 함께 통합시킬 수 있다. 전술한 본 발명에 따른 이가 또는 삼가 백신은 또한 호흡기 중후군의 예방에 효과적인 결합가, 즉 HA 및 F 유전자의 적어도 하나를 함유하는 하나이상의 플라스미드를 함유하는 P12 결합가를 함유할 수 있다. 바람직하게는, 두 HA 및 F 유전자의 사용이 구상된다.

그러므로 본 발명의 경우에서의 다른 유리한 결합가는 본 발명에 따른 결합가, 즉 헤르페스바이러스 CHV, 라임병 및 광견병으로 형성된 군에서 선택된 하나이상의 결합가와 회합될 수 있으며, 플라스미드는, 각각의 결합가에 대해, CHV 바이러스에 대한 gB 및 gD 유전자, 비.버그도르페리 (B. burgdorferi) (라임병)에 대한 OspA, OspB 및 p100 유전자 및 광견병에 대한 G 유전자로 구성된 군에서 선택된 선택된 하나이상의 유전자를 함유한다.

바람직하게는, 헤르페스바이러스증에 있어서는, 두개의 gB 및 gD 유전자를 두개의 별개의 플라스미드 또는 단일 플라스미드에서 회합시킨다. 라임병에 있어서는, OspA 유전자가 바람직하다.

바람직하게는, 까레병 및 파르보바이러스증 결합가를 포함하는 본 발명에 따른 백신은, 다른 결합가로서, 코로나바이러스증 결합가, 또는 덜 바람직하게는, 호흡기 중후군 결합가, 또는 이러한 두 결합가를 함유할 것이며, 코로나바이러스증, 호흡기 중후군, 헤르페스바이러스증, 라임병 및 광견병 결합가중 하나, 몇개 또는 전부를 포함한 임의의 조합은 두 까레병 및 파르보바이러스증 결합가와 회합될 수 있음은 물론이다.

본 발명에 있어서의 결합가는 고려되는 병원체의 바이러스로부터 보호를 제공하는 하나이상의 항원을 의미하며, 결합가는, 소결합가(subvalency)로서, 고려되는 병원체의 하나이상의 균주 유래의 하나이상의 변성된 또는 천연 유전자를 함유하는 것이 가능하다.

병원성 물질 유전자는 완전한 유전자 및 다양한 뉴클레오타이드 서열을 의미하며, 이는 보호반응을 유도하는 능력을 보유하는 단편을 포함한다. 유전자의 개념은 실시예에서 상술된 뉴클레오타이드 서열과 동등한 뉴클레오타이드 서열, 즉 상이하나 동일한 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다. 또한 이는 고려되는 병원체의 다른 균주의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 이는 균주 또는 균주군에 특이적인 보호 또는 교차보호를 제공한다. 또한 이는 숙주동물에 의한 생체내 발현을 촉진하기 위하여 변성되나 동일한 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

상이한 결합가가 치료학적으로 유효한 양으로 본 발명에 따른 백신 제제에 함유된다.

바람직하게는, 본 발명에 따른 백신제제는 0.1 내지 5 ml, 바람직하게는 0.5 내지 2 ml 의 최적선량으로 투여용으로 적합한 부형제에 제공되거나, 바람직하게는 근육내 경로에 의해 제공될 수 있다.

투여량은 통상적으로 플라스미드 유형당 10ng 내지 1mg, 바람직하게는 100 ng 내지 500 μ g, 바람직하게는 1 μ g 내지 250 μ g 일 것이다.

통상적으로 생리식염수(0.9% NaCl), 초순수, TE 버퍼등일 예방접종 부형제에 단순히 넣어있는 네이키드 플라스미드를 이용하는 것이 바람직할 것이다.

각각의 플라스미드는 프로모터의 제어하 숙주세포에 삽입된 유전자의 발현을 보장할 수 있는 상기 프로모터를 함유한다. 이것은 통상적으로 강력한 진핵생물 프로모터 및 특히 인간 또는 쥐기원, 또는 임의적으로 래트, 피그 및 기니아 피그와 같은 다른 기원의 사이토메갈로바이러스 얼리 CMV-IE 프로모터일 것이다.

좀더 통상적으로는, 프로모터는 바이러스 기원 또는 세포기원일 수 있다. CMV-IE 이외의 바이러스 프로모터로서, SV 40 바이러스 얼리 또는 레이트(late) 프로모터 또는 로우스 사르코마 (Rous sarcoma) 바이러스 LTR 프로모터를 언급할 수 있다. 또한 이는 유전자가 유래되는 바이러스의 프로모터, 예컨대 유전자 자신의 프로모터일 수 있다.

세포성 프로모터로는, 사이토스켈레톤 유전자의 프로모터, 예컨대 데스민 프로모터 (Bolmont et al., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122; and Zhenlin et al., Gene, 1989, 78, 243-254) 또는 이와는 달리 액틴 프로모터를 언급할 수 있다.

여러 유전자가 동일한 플라스미드에 존재하는 경우, 이것은 동일한 전사유니트 또는 두개의 상이한 유니트에 존재할 수 있다.

본 발명에 따른 상이한 백신 결합가의 조합은 바람직하게는 각각의 결합가의 항원(들)을 발현시키는 폴리뉴클레오타이드 플라스미드를 혼합하여 달성할 수 있으나, 또한 여러 결합가의 항원을 동일한 플라스미드로 발현시키는 것도 구상할 수 있다.

또한 본 발명의 주제는 전술한 바와 같은 백신 제제를 유효량 투여하는 것으로 이루어진 개의 예방접종방법이다. 이러한 예방접종 방법은 백신제제를 하나이상의 투여량으로 투여하는 것으로 이루어지고, 이

러한 투여량은 단기간에 걸쳐 연속하여 그리고/또는 긴 간격을 두고 연속하여 투여하는 것이 가능하다.

본 발명에 따른 백신제제는 이러한 예방접종의 방법의 맥락에서, 폴리뉴클레오티드 예방접종의 경우에는 종래기술에서 제안된 투여의 상이한 경로 및 공지된 투여 기술로 투여할 수 있으나, 바람직한 경로는 근육내경로이다.

면역계에 대한 항원의 제시의 효율은 조직에 따라 변한다. 특히, 호흡기계의 점막은 병원체의 침입에 대한 방벽으로서 작용하고 국부 면역성을 지지하는 림프성 조직과 회합한다. 점막, 특히 구강점막, 인두점막 및 기관지부분의 점막과의 접촉에 의한 백신의 투여는 호흡기 및 소화성 병변에 대한 예방접종에 분명히 중요한 일이다.

따라서, 투여의 점막 경로는 특히 분무 또는 분사 또는 음료수를 이용한 본발명의 투여 양식의 일부를 형성한다. 이러한 취지에서 본 발명에 따른 백신제제 및 예방접종 방법을 적용하는 것이 가능할 것이다.

또한 본 발명의 주제는 상기의 바이러스종의 하나로부터 유래한 하나이상의 유전자를 코딩하는 하나이상의 플라스미드를 함유하는 일가 백신제제이며, 상기 유전자는 전술한 유전자이다. 이들의 일가 특성 외에, 이러한 제제는 유전자의 선택, 이들의 조합, 플라스미드의 조성, 체적선량, 투여량등에 관련하여 전술한 특성을 갖을 수 있다.

일가 백신 제제는 (i) 전술한 바와 같은 다가 백신 제제의 제조를 위해서, (ii) 실제적인 병변에 대한 개별적인 대항, (iii) 또다른 병변에 대한 또다른 유형 (생 또는 불활성 전체, 재조합, 서브유닛)의 백신과 결합 또는 (iv) 후술되는 바와같은 백신에 대한 부스터(booster)로서 사용될 수 있다.

본 발명의 주제는 사실 또한 종래기술의 통상적 1 차 백신 (일가 또는 다가) 유형, 특히 생전 (live whole)백신, 불활성화된 전(inactivated whole)백신, 서브유닛 백신, 재조합 백신으로 구성된 군에서 선택된 백신으로 1차 예방접종된 동물을 예방접종하기 위한 개 백신의 제조를 위한 본 발명에 따른 하나 이상의 플라스미드의 사용이며, 이러한 1 차 백신은(즉 함유하거나 발현시킬 수 있는) 교차 보호를 제공하는 항원(들) 또는 플라스미드(들)에 의해 코딩되는 항원(들)을 갖는다.

현저히, 폴리뉴클레오티드 백신은 면역반응의 증폭 및 장기간 지속되는 면역성의 획득을 가져오는 강력한 부스터 효과를 갖는다.

통상적으로, 1차 예방접종 백신은 다양한 가축 백신 절차로부터 이용할 수 있는 상업적 백신으로부터 선택할 수 있다.

또한 본 발명의 주제는 전술한 바와 같은 1차 예방접종을 하는 예방접종방법 및 본 발명에 따른 백신제제를 갖는 부스터이다.

본 발명에 따른 방법의 바람직한 구현예로는, 첫번째 예로, 통상적인, 특히 불활성화된, 생, 감독된 또는 재조합 유형의 백신 또는 이와는 달리 서브유닛 백신의 유효량을 동물에 투여하여 1차 예방접종을 제공하고, 바람직하게는 2 내지 6 주후 본 발명에 따른 다가 또는 일가 백신을 투여한다.

또한 본 발명의 주제는 전술한 바와 같은 1차 예방접종 백신 및 부스터용의 본 발명에 따른 백신제제가 함께 통합된 예방접종 키트이다. 또한 이는 전술한바와 같은 1차 예방접종을 위한 부스터로서 상기 제제의 사용을 나타내는 리플릿이 수반된 본 발명에 따른 백신 제제에 관한 것이다.

또한 본 발명은 이러한 설명으로부터 명백한 바와 같이, 백신 제제의 제조방법, 즉 결합가 및 이의 혼합물의 제조에 관한 것이다.

본 발명은 첨부된 도면을 참조로 하여 본 발명의 구현예로 좀더 상세히 설명될 것이다.

도면의 목록

도 1 : 플라스미드 pVR1012

도 2 : 플라스미드 pAB044

도 3 : 플라스미드 pAB036

도 4 : 플라스미드 pAB024

도 5 : 플라스미드 pAB021

도 6 : 플라스미드 pAB022

도 7 : 플라스미드 pAB037

도 8 : 플라스미드 pAB038

도 9 : 플라스미드 pAB017

도 10 : 플라스미드 pAB041

서열목록

서열번호 1 : 올리고뉴클레오티드 AB017

서열번호 2 : 올리고뉴클레오티드 AB018

서열번호 3 : 올리고뉴클레오티드 AB085

서열번호 4 : 올리고뉴클레오티드 AB086

서열번호 5 : 올리고뉴클레오타이드 AB053
 서열번호 6 : 올리고뉴클레오타이드 AB054
 서열번호 7 : 올리고뉴클레오타이드 AB045
 서열번호 8 : 올리고뉴클레오타이드 AB048
 서열번호 9 : 올리고뉴클레오타이드 AB049
 서열번호 10 : 올리고뉴클레오타이드 AB050
 서열번호 11 : 올리고뉴클레오타이드 AB087
 서열번호 12 : 올리고뉴클레오타이드 AB088
 서열번호 13 : 올리고뉴클레오타이드 AB089
 서열번호 14 : 올리고뉴클레오타이드 AB090
 서열번호 15 : 올리고뉴클레오타이드 AB038
 서열번호 16 : 올리고뉴클레오타이드 AB039
 서열번호 17 : 올리고뉴클레오타이드 AB011
 서열번호 18 : 올리고뉴클레오타이드 AB012

실시예

실시예 1 : 바이러스의 배양

바이러스를 세포변성 효과가 수득될 때까지 적당한 세포계에서 배양한다. 각각의 바이러스를 위해 사용할 수 있는 세포계는 당업자에게는 잘 알려져 있다. 간략히 말하면, 이글 최소필수배지(MEM 배지) 또는 다른 적당한 배지에서 배양시킨, 사용하는 바이러스에 민감한 세포를 1의 다중 감염(a multiplicity of infection)을 이용하여 연구된 바이러스 균주로 접종시킨다. 이어서 감염된 세포를 완전한 세포 변성이 나타나는데 필요한 기간(평균 36 시간) 동안 37°C 에서 항온처리한다.

실시예 2 : 박테리아의 배양

보르렐리아 버그도르페리(*Borrelia burgdorferi*) 균주를 적당한 배지 및 당업자에게 잘 알려진 조건에 따라 배양한다. 이러한 조건 및 배지는 특히 에이. 바버(J. Biol. Med. 1984, 57, 71-75)에 의해 기술되었다. 박테리아 DNA의 추출은 더블유. 심슨등에 의해 기술된 조건에 따라 실행한다(Infected Immun. 1990, 58, 847-853). 제이.샘브룩등에 의해 기술된 통상의 기술(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)를 또한 사용할 수 있다.

실시예 3: 바이러스 게놈 DNA의 추출

배양후, 상층액 및 용해된 세포는 수집하고 전 바이러스 현탁액은 +4°C 에서 10분간 1000g 로 원심분리하여 세포 부스러기를 제거한다. 이어서 바이러스 입자를 +4°C 에서 1 시간동안 400,000g 로 초원심분리로 수집한다. 펠릿을 최소부피의 버퍼(10mM Tris, 1mM EDTA)에 넣는다. 이 농축된 바이러스 현탁액을 소듐도데실설페이트(SDS)(0.5% 최종)의 존재하 37°C 에서 2 시간동안 프로틴아제 K (100µg/ml 최종)으로 처리한다. 이어서 바이러스 DNA를 페놀/클로로포름 혼합물로 추출한후 2 부피의 무수 에탄올로 침전시킨다. -20°C 에서 밤새워 방치한후, DNA를 +4°C 에서 15 분간 10,000g 으로 원심분리한다. DNA 펠릿을 건조한후 이어서 최소부피의 살균초순수에 넣는다. 이어서 이를 제한효소로 소화시킬 수 있다.

실시예 4 : 바이러스 게놈 RNA의 단리

RNA 바이러스를 당업자에게 공지된 기술에 따라 정제한다. 이어서 각 바이러스의 게놈 바이러스 RNA를 문헌[P. Chomczynski and N. Sacchi (Anal. Biochem., 1987, 162, 156-159)에 기술된 "구아니움 티오시아네이트/페놀-클로로포름" 추출기술을 이용하여 단리시킨다.

실시예 5 : 분자생물학기술

플라스미드의 모든 구조는 문헌[J. Sambrook et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)에 기술된 표준 분자생물학기술을 이용하여 실행한다. 본 발명을 위해 사용하는 모든 제한효소단편은 "Geneclean" 키트를 이용하여 단리시킨다(BIO 101 Inc., LA Jolla, CA).

실시예 6 : RT-PCR 기술

특이적 올리고뉴클레오타이드(증폭된 단편의 클로닝을 촉진하는 5' 말단에서 제한효소부위를 갖는)를 증폭시킬 유전자의 코딩영역을 완전히 커버하도록 합성한다(특별에 참조). 역전사(RT)반응 및 폴리머라아제 사슬 반응(PCR)은 표준기술에 따라 실행한다(Sambrook J. et al., 1989). 각 RT-PCR 반응은 한쌍의 특이적 앰플리머를 이용하여 실행하고, 주형으로서, 추출된 바이러스 게놈 RNA를 취한다. 증폭된 상보 DNA는 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25:24:1)로 제한효소로 소화시키기전에 추출한다.

실시예 7 : 플라스미드 pVR1012

플라스미드 pVR1012(도 1)를 비칼사(Vical Inc., San Diego, CA, USA)로부터 입수한다. 이의 구조는 문헌[J.Hartikka et al. (Human Gene Therapy, 1996, 7, 1205-1217)]에 기술되어 있다.

실시에 8 : 플라스미드 pAB044(CDV HA 유전자)의 구축

실시에 6의 기술에 따른 RT-PCR 반응을 다음의 올리고뉴클레오타이드를 갖고서 실시예 4의 기술에 따라 제조된 가래병 바이러스 (CDV) (온데르스텝퍼트(onderstepoort) 균주) 게놈 RNA (M. Sidhu et al., Virology, 1993, 193, 66-72)로 실행하여 PstI-BamHI 단편의 형태로 CDV HA 당단백질을 코딩하는 유전자를 단리시킨다. 정제후, 1835 bp RT-PCR 산물은 PstI 및 BamHI로 소화시켜 1817 bp PstI-BamHI 단편을 수득한다. 이 단편은 PstI 및 BamHI로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7)와 결합시켜 플라스미드 pAB044 (6676 bp)(도 2)를 수득한다 :

AB017 (35mer)(서열번호 1):

5' AAAACTGCAGAATGCTCCCCTACCAAGACAAGGTG 3'

AB018(37mer) (서열번호 2):

5' CGCGGATCCTTAACGGTTACATGAGAATCTTATACGG 3'

실시에 9 : 플라스미드 pAB036(CDV F 유전자)의 구축

실시에 6의 기술에 따른 RT-PCR 반응을 다음의 올리고뉴클레오타이드를 갖고서 실시예 4의 기술에 따라 제조된 가래병 바이러스 (CDV) (온데르스텝퍼트 균주) 게놈 RNA (R. Driellen, Genbank sequence accession No.=X65509)로 실행하여 NotI-BamHI 단편의 형태로 CDV F 당단백질을 코딩하는 유전자를 단리시킨다. 정제후, 2018 bp RT-PCR 산물은 NotI 및 BamHI로 소화시켜 2000 bp NotI-BamHI를 단리시킨다. 이 단편은 NotI 및 BamHI로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7)와 결합시켜 플라스미드 pAB036 (6893 bp)(도 3)를 수득한다 :

AB085 (40mer)(서열번호 3):

5' ATAAGAAGCGGCCGCACATGCACAAGGGAATCCCCAAAAG 3'

AB086(32mer) (서열번호 4):

5' CGCGGATCCACTTCAGTGTGATCTCACATAGG 3'

실시에 10 : 플라스미드 pAB024(개 파르보바이러스 VP2 유전자)의 구축

PCR 반응을 다음의 올리고뉴클레오타이드를 갖고서 실시예 3의 기술에 따라 제조된 개 파르보바이러스 (CPV) (CPV-b균주) 게놈 DNA (C.Parrish Genbank sequence accession No.=M19296)로 실행하여 SalI-BamHI 단편의 형태로 VP2 캡시드 단백질을 (CPV VP2)을 코딩하는 유전자를 단리시킨다. 정제후, 1773 bp PCR 산물은 SalI 및 BamHI로 소화시켜 1760 bp SalI-BamHI 단편을 단리시킨다. 이 단편은 SalI 및 BamHI로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7)와 결합시켜 플라스미드 pAB024 (6629 bp)(도 4)를 수득한다 :

AB053 (33mer)(서열번호 5):

5' ACGCGTCGACATGAGTGATGGAGCAGTTCAACC 3'

AB054(33mer) (서열번호 6):

5' CGCGGATCCTTAATATAATTTTCTAGGTGCTAG 3'

실시에 11 : 플라스미드 pAB021(CCV S 유전자)의 구축

실시에 6의 기술에 따른 RT-PCR 반응은 다음의 올리고뉴클레오타이드를 갖고서 실시예 4의 기술에 따라 제조된 개 코로나바이러스 (CCV) 게놈 RNA (B.Horsburgh et al., J. Gen. Virol. 1992, 73,2849-2862)로 실행하여 SalI-BamHI 단편의 형태로 CCV S 당단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 4374 bp 단편을 증폭시킨다. 정제후, RT-PCR 산물은 SalI 및 BamHI로 소화시켜 4361 bp SalI-BamHI 단편을 단리시킨다. 이 단편은 SalI 및 BamHI로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7)와 결합시켜 플라스미드 pAB021 (9230 bp)(도 5)를 수득한다 :

AB045 (32mer)(서열번호 7):

5' ACGCGTCGACATGATTGTGCTTACATTGTGCC 3'

AB048(35mer) (서열번호 8):

5' CGCGGATCCTCAGTGAACATGAACTTTTTCAATAG 3'

실시에 12 : 플라스미드 pAB022(CCV M 유전자)의 구축

실시에 6의 기술에 따른 RT-PCR 반응을 다음의 올리고뉴클레오타이드를 갖고서 실시예 4의 기술에 따라 제조된 개 코로나바이러스 (CCV) 게놈 RNA (B.Horsburgh et al., J. Gen. Virol. 1992, 73,2849-2862)로 실행하여 PstI-BamHI 단편의 형태로 M 당단백질(CCV M)을 코딩하는 유전자를 단리시킨다. 정제후, 809 bp RT-PCR 산물은 PstI 및 BamHI로 소화시켜 792 bp PstI-BamHI 단편을 단리시킨다. 이 단편은 PstI 및 BamHI로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7)와 결합시켜 플라스미드 pAB022 (5651 bp)(도 6)를 수득한다 :

AB049 (34mer)(서열번호 9):

5' AAAACTGCAGAAATGAAGAAAATTTTGTTTTAC 3'

AB050(35mer) (서열번호 10):

5' CGCGGATCCTTATACCATATGTAATAATTTTTC 3'

실시에 13 : 플라스미드 pAB037(CHV gB 유전자) 의 구축

PCR 반응은 다음의 올리고뉴클레오티드를 갖고며 실시에 3 의 기술에 따라 제조된 개 헤르페스바이러스 (CHV)(카르미첼 Carmichael 균주) 게놈 DNA (K. Limbach et al., J. Gen. Virol. 1994,75, 2029-2039) 로 실행하여 PstI-XbaI 단편의 형태로 CHV 바이러스 gB 당단백질을 코딩하는 유전자를 단리시킨다. 정제 후, 2667 bp PCR 산물은 PstI 및 XbaI 로 소화시켜 2648 bp PstI-XbaI 단편을 단리시킨다. 이 단편은 PstI-XbaI 로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7) 와 결합시켜 플라스미드 pAB037 (7523 bp)(도 7) 를 수득한다 :

AB087 (34mer)(서열번호 11):

5' AAAACTGCAGAAGTATGTTTTTCATTGTATCTATA 3'

AB088(34mer) (서열번호 12):

5' CTAGTCTAGATTATTAACTTTACTTTTCATTTTC 3'

실시에 14 : 플라스미드 pAB038(CHV gD 유전자) 의 구축

PCR 반응을 다음의 올리고뉴클레오티드를 갖고며 실시에 3 의 기술에 따라 제조된 개 헤르페스바이러스 (CHV)(카르미첼 균주) 게놈 DNA (K. Limbach et al., J. Gen. Virol. 1994,75, 2029-2039) 로 실행하여 PstI-NotI 단편의 형태로 CHV 바이러스 gD 당단백질을 코딩하는 유전자를 단리시킨다. 정제 후, 1072 bp PCR 산물은 PstI 및 NotI 로 소화시켜 1049 PstI-NotI 단편을 단리시킨다. 이 단편은 PstI 및 NotI 로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7) 와 결합시켜 플라스미드 pAB038 (5930 bp)(도 8) 를 수득한다 :

AB089 (34mer)(서열번호 13):

5' AAAACTGCAGAAAATGATTAACTTCTATTTATC 3'

AB090(35mer) (서열번호 14):

5' ATAAGAATGCGGCCGCAAAGGCTAAACATTTGTTG 3'

실시에 15 : 플라스미드 pAB017(보르넬리아 버그도르페리 OspA 균주) 의 구축

PCR 반응을 다음의 올리고뉴클레오티드를 갖고며 실시에 2 의 기술에 따라 제조된 보르넬리아 버그도르페리 (B31 균주) 게놈 DNA (S. Bergstrom et al., Mol. Microbiol. 1989, 3, 479-486) 로 실행하여 SalI-BamHI 단편의 형태로 OspA 막 단백질을 코딩하는 유전자를 단리시킨다. 정제 후, 842 bp PCR 산물은 SalI 및 BamHI 로 소화시켜 829 bp SalI-BamHI 단편을 단리시킨다. 이 단편은 SalI 및 BamHI 로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7) 와 결합시켜 플라스미드 pAB017 (5698 bp)(도 9) 를 수득한다 :

AB038 (37mer)(서열번호 15):

5' ACGCGTCGACTATGAAAAAATATTTATTGGGAATAGG 3'

AB039(34mer) (서열번호 16):

5' CGCGGATCCCTTATTTTAAAGCGTTTTTAATTTC 3'

실시에 16 : 플라스미드 pAB041(광견병 바이러스 G 유전자) 의 구축

실시에 6 의 기술에 따른 RT-PCR 반응은 다음의 올리고뉴클레오티드를 갖고며 실시에 4 의 기술에 따라 제조된 광견병 바이러스 (ERA 균주) 게놈 RNA (A. Anilionis et al., Nature, 1981, 294, 275-278) 로 실행하여 광견병 바이러스 G 당단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 1589 bp 단편을 증폭시킨다. 정제 후, RT-PCR 산물은 PstI 및 BamHI 로 소화시켜 1578 bp SalI-BamHI 단편을 수득한다. 이 단편은 PstI 및 BamHI 로 미리 소화시킨 벡터 pVR1012 (실시에 7) 와 결합시켜 플라스미드 pAB041 (6437 bp)(도 10) 를 수득한다 :

AB011 (33mer)(서열번호 17):

5' AAAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012(34mer) (서열번호 18):

5' CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC 3'

실시에 17 : 플라스미드의 정제 및 제조

동물의 예방접종을 위한 플라스미드의 제조를 위해서는, 우세하게 초나선형태의 정제된 플라스미드의 현

탁액을 수득가능케하는 임의의 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 특히 문헌[J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 기술된 바와 같은 에티동 클로라이드의 존재하 세균 클로라이드 구배상에서 두번의 연속 초원심분리가 뒤이어지는 알칼리 용해 기술을 언급할 수 있다. 또한 산업적 규모로 예방접종을 위해 사용할 수 있는 플라스미드를 제조하는 방법이 기재되어 있는 특허출원 PCT WO 95/21250 및 PCT WO 96/02658을 참조할 수 있다. 백신을 제조하기 위해서는 (실시에 18 참조), 정제된 플라스미드는 저장에 적합한 농도 (> 2 mg/ml)로 용액을 수득하기 위해서 재현탁시킨다. 이를 위해서 플라스미드는 초순수 또는 TE 버퍼(10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0)에 재현탁시킨다.

실시에 18 : 회합된 백신의 제조

회합된 백신의 제조에 필요한 다양한 플라스미드는 이들의 농축된 용액으로 출발하여 혼합한다 (실시에 16). 혼합물은 각 플라스미드의 최종 농도가 각 플라스미드의 유효량에 상응하도록 제조한다. 백신의 최종 농도를 조정하는데 사용할 수 있는 용액은 0.9% NaCl 용액 또는 PBS 버퍼일 수 있다.

특이적 제제, 리포솜 및 양이온성 지질이 또한 백신의 제조에 사용될 수 있다.

실시에 19 : 개의 예방접종

플라스미드당 10 μ g, 50 μ g 또는 250 μ g의 용량으로 개를 예방접종한다.

주사는 근육내 경로를 통해 주사바늘로 실행할 수 있다. 이 경우에서, 백신량은 1 또는 2 ml의 부피로 투여한다. 주사는 피내경로를 통해 주사바늘로 실행할 수 있다. 이 경우, 백신량은 0.1ml로 10개의 지점 또는 0.05ml로 20개의 지점에서 투여하여 총부피 1ml로 투여한다. 피내주사는 피부를 면도한후 (통상적으로 흉부옆구리) 또는 상대적으로 털이없는 해부학적 영역의 면에서, 예컨대 대퇴부의 안쪽면에 실행한다. 또한 액체제주입장치를 피내주사에 사용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

개과 숙주 세포 생체내에서 하기 플라스미드를 발현시키기 위하여, 하나의 개 병원체 결합가, 즉 가래병 바이러스 CDV 결합가 및 개 파르보바이러스 CPV 결합가를 갖는 유전자가 통합된 플라스미드를 함유하는 둘이상의 백신 결합가를 함유하며, 상기 플라스미드는 각각의 결합가에 대해 가래병 바이러스에 대한 HA 및 F로 구성된 군에서 선택된 유전자 및 개 파르보바이러스에 대한 VP2 유전자중 하나 이상을 함유하는 개과 병원체에 대한 백신 제제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 가래병 결합가에 있어서, 플라스미드(들)는 동일한 플라스미드에 삽입된 또는 상이한 플라스미드에 삽입된 HA 및 F 유전자를 함유하는 백신 제제.

청구항 3

제 1항에 있어서, S 및 M 유전자의 군에서 선택한 하나 이상의 유전자를 함유하는 하나 이상의 플라스미드와 함께 개 코로나바이러스 CCV 결합가를 함유하는 백신 제제.

청구항 4

제 3항에 있어서, S 유전자 또는 S 및 M 유전자를 함유하는 백신제제.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항중 어느 한 항에 있어서, 호흡기 증후군의 예방에 효과적인 결합가, 즉 HA 및 F 유전자중 하나 이상을 함유하는 하나 이상의 플라스미드를 함유하는 PI2 결합가를 추가로 함유하는 백신 제제.

청구항 6

제 5항에 있어서, 호흡기 증후군 결합가의 두 HA 및 F 유전자를 함유하는 백신제제.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항중 어느 한 항에 있어서, 헤르페스바이러스증 CHV, 라임병 및 광견병으로 형성된 군에서 선택된 하나 이상의 결합가를 함유하며, 플라스미드는 각각의 결합가에 대하여 CHV 바이러스에 대한 gB 및 gD 유전자, 비.버그도르페리에 대한 OspA, OspB 및 p100 유전자 및 광견병에 대한 G 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자를 함유하는 백신 제제.

청구항 8

제 7항에 있어서, 헤르페스바이러스증에 있어서는, 두개의 gB 및 gD 유전자가 두개의 별개의 플라스미드 또는 단일 플라스미드에서 회합된 백신 제제.

청구항 9

제 8항에 있어서, 라임병에 있어서는 OspA 유전자를 함유하는 백신 제제.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항중 어느 한 항에 있어서, 각 플라스미드의 10ng 내지 1mg, 바람직하게는 100ng 내지 500 μ g, 좀더 바람직하게는 1 μ g 및 250 μ g 를 함유하는 백신제제.

청구항 11

생전(live whole)백신, 불활성화된 전(inactivated whole) 백신, 서브유닛백신, 재조합백신으로 구성된 군에서 선택된 1차 백신을 이용하여 1차 예방접종된 동물을 예방접종하기 위한 개 백신의 제조를 위하여, 상기 1차 백신은 교차보호를 제공하는 항원(들) 또는 플라스미드(들)로 코딩된 항원(들)을 갖는 제 1 항 내지 제 10 항중 어느 한 항에서 기재된 하나이상의 플라스미드의 용도.

청구항 12

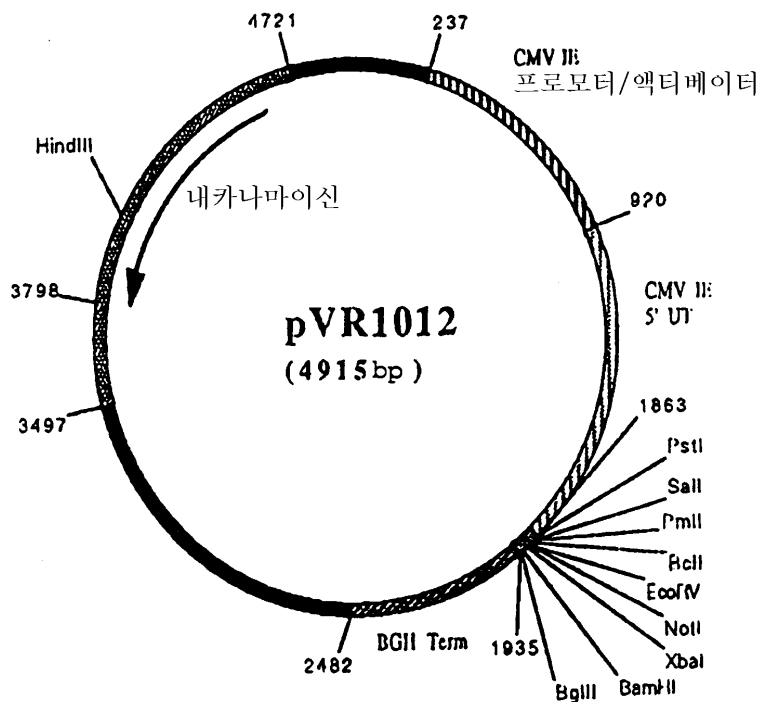
제 1 항 내지 제 10 항중 어느 한 항에 따른 백신 제제 및 생전백신, 불활성화된 전백신, 서브유닛 백신, 재조합 백신으로 구성된 군에서 선택된 개 백신이 함께 통합되고, 상기 1 차 백신은 폴리뉴클레오티드 백신에 의해 코딩된 항원 또는 교차보호를 제공하는 항원을 갖는, 1 차 예방접종에서 개 백신의 투여 및 백신 제제의 부스터(booster) 를 위한 예방접종 키트.

청구항 13

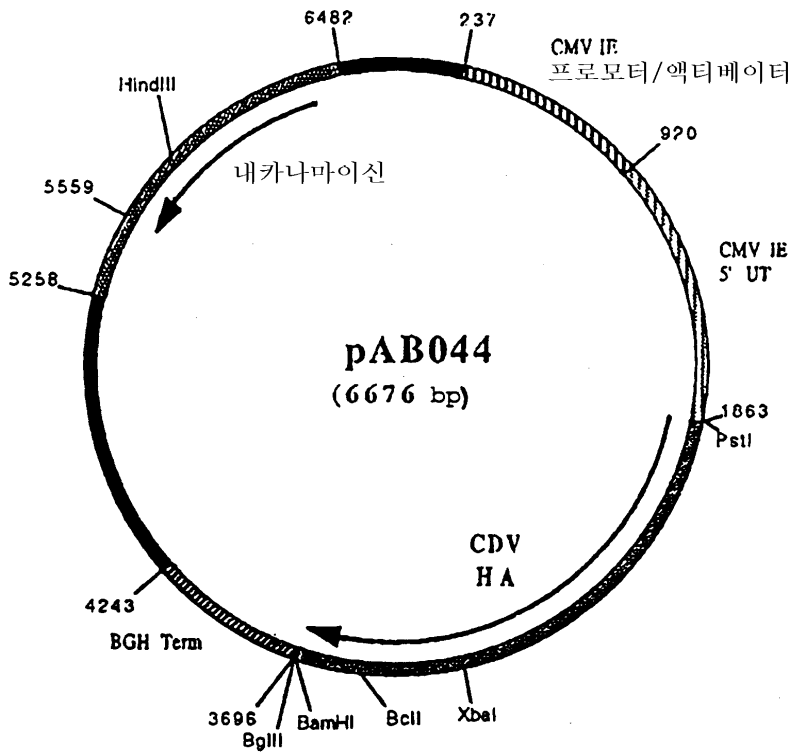
제 1 내지 10 항중 어느 한 항에 있어서, 백신제제가 생전백신, 불활성화된 전 백신, 서브유닛 백신, 재조합 백신으로 구성된 군에서 선택된 1 차 개 백신용 부스터로서 사용될 수 있음을 나타내는 리플릿을 수반하며, 상기 1 차 백신은 폴리뉴클레오티드 백신에 의해 코딩된 항원 또는 교차보호를 제공하는 항원을 갖는 백신 제제.

도면

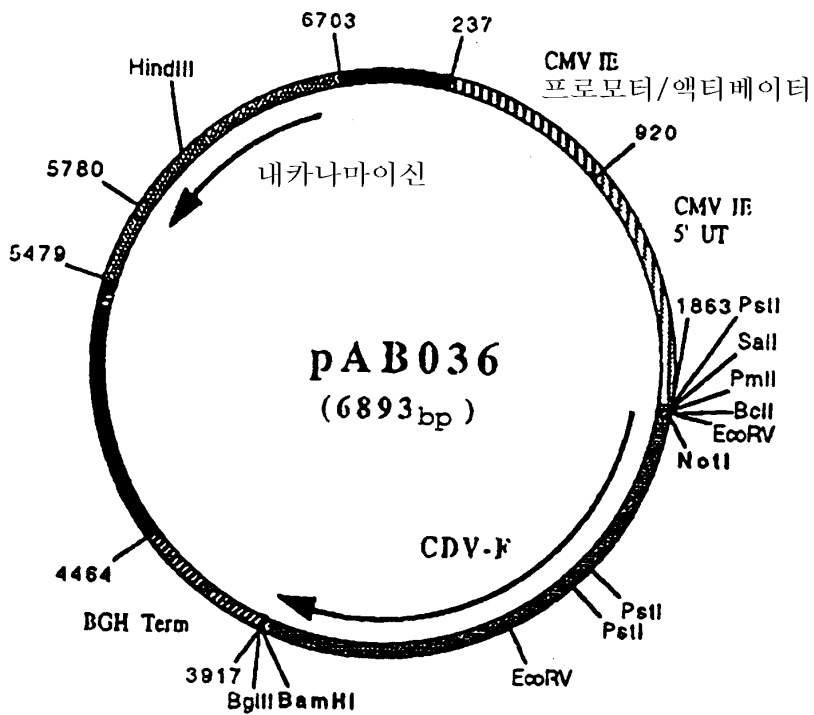
도면1



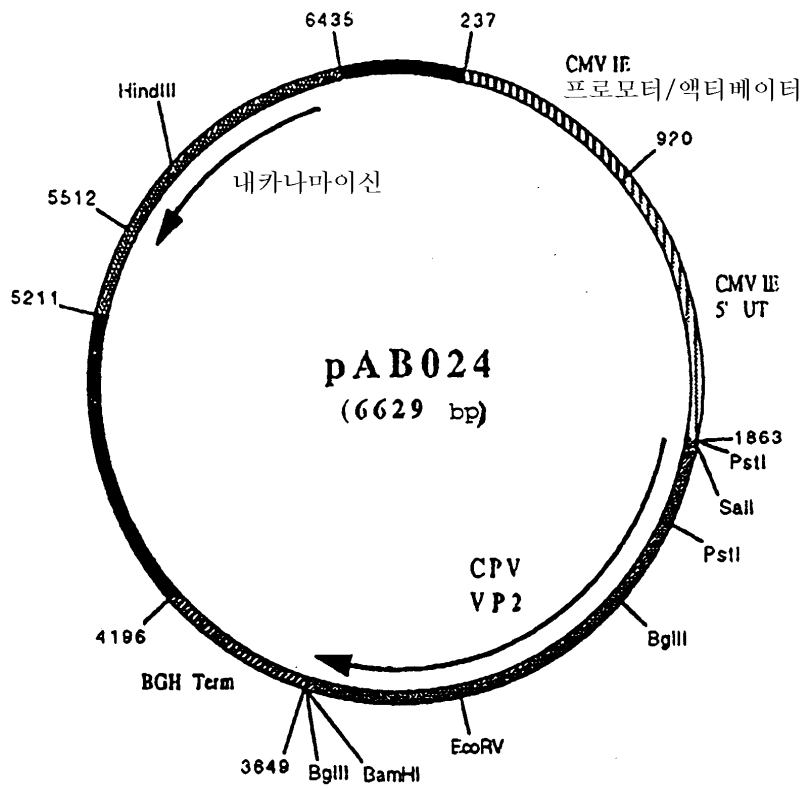
도면2



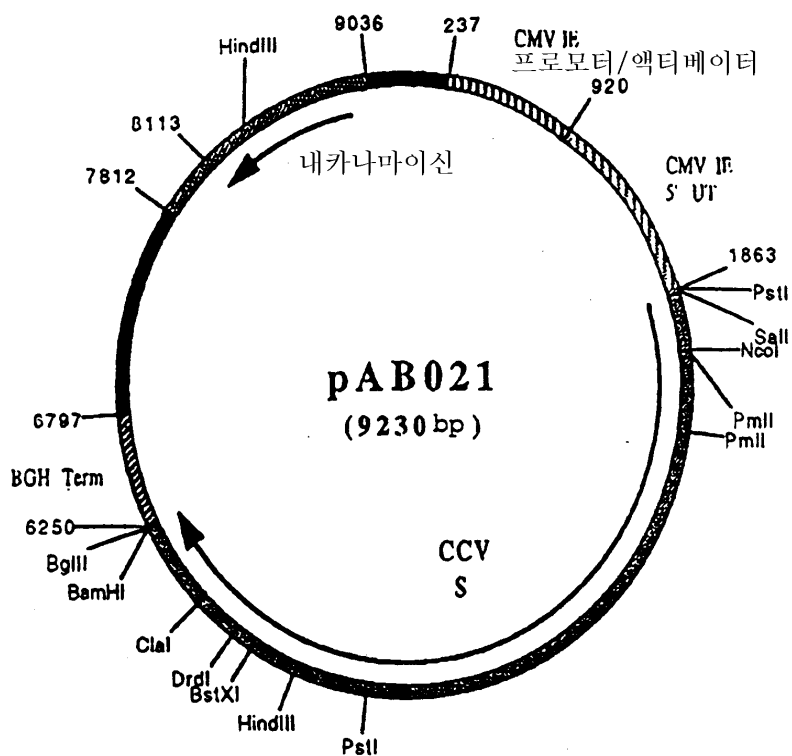
도면3



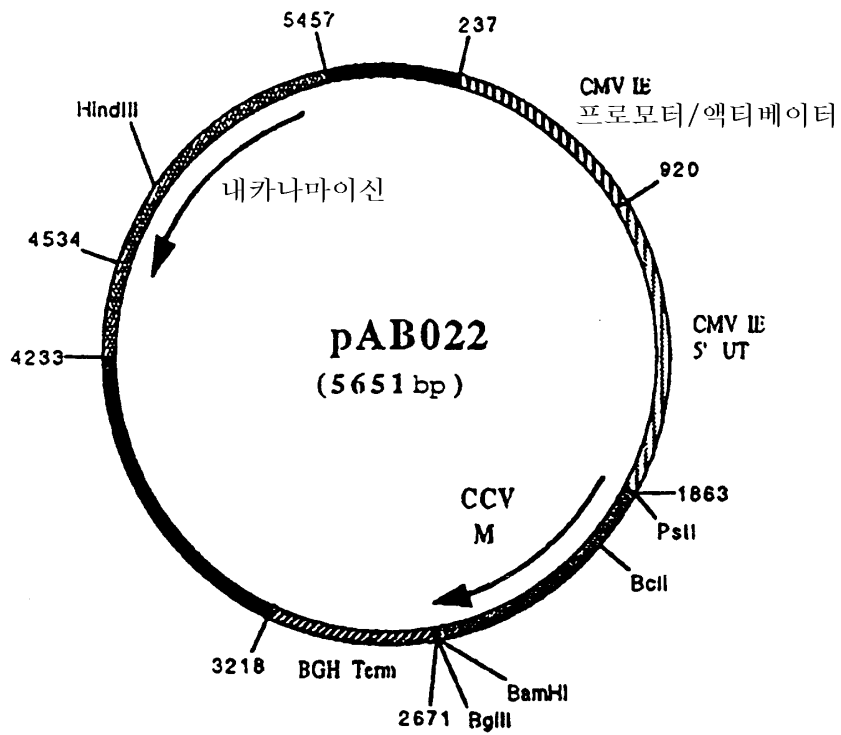
도면4



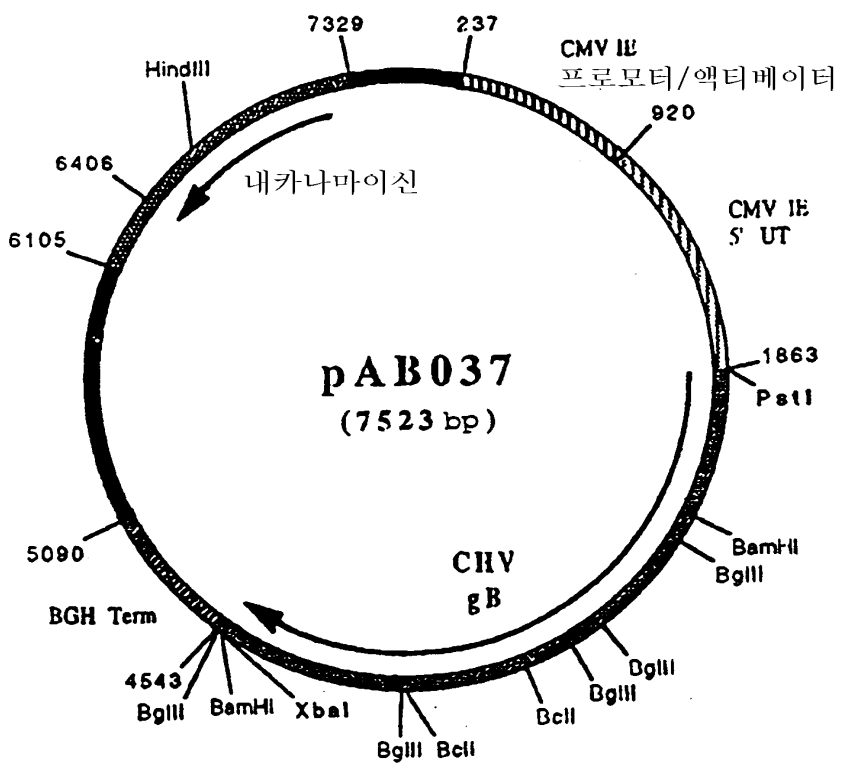
도면5



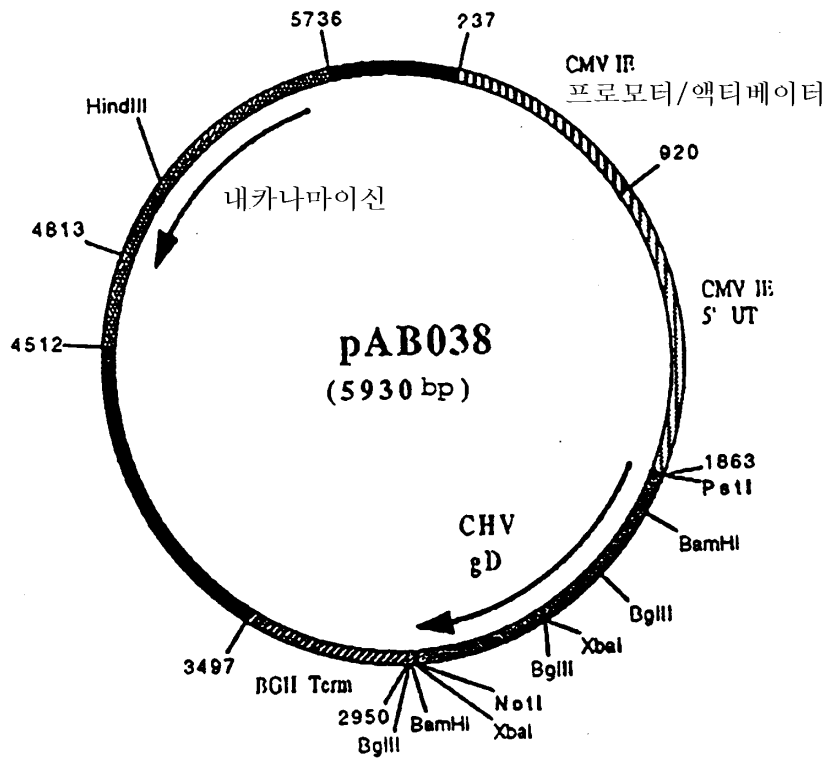
도면6



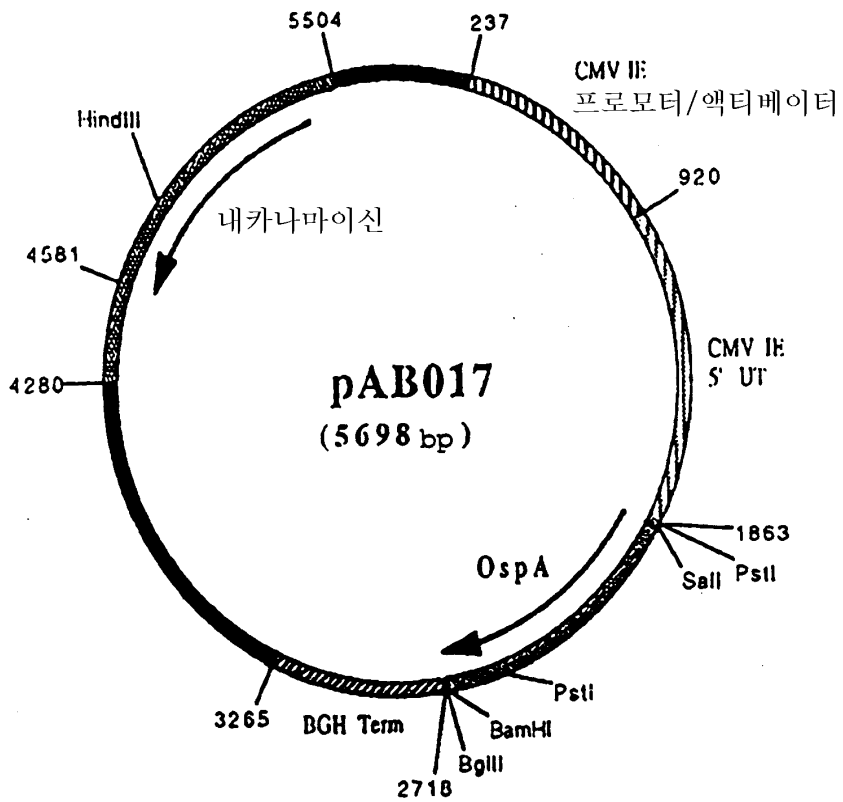
도면7



도면8



도면9



도면 10

