(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년05월20일
(11) 등록번호 10-1262300
(24) 등록일자 2013년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/33* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) *A61K 39/145* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0096488
(22) 출원일자 2010년10월04일
심사청구일자 2010년10월04일
(65) 공개번호 10-2011-0037880
(43) 공개일자 2011년04월13일
(30) 우선권주장
1020090094627 2009년10월06일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090005928 A
KR100769584 B1
Vaccine, vol.27, pp.3467-3470, 2009
전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
헬릭스 주식회사
충북 증평군 도안면 노암리 231-1
(72) 발명자
황인환
경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 9동 1702호 (지곡동, 교수아파트)
성영철
서울특별시 용산구 서빙고로 69, 104동 2703호 (용산동5가, 파크타워아파트)
(74) 대리인
황주명, 특허법인 충정

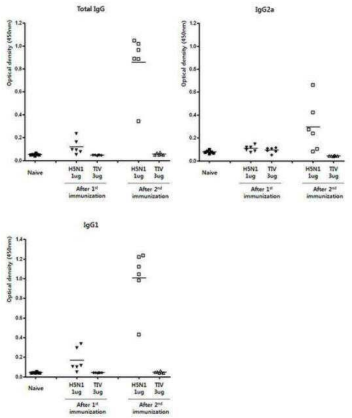
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **형질전환 식물 유래의 고병원성 조류독감 바이러스 단백질 백신 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 고병원성 조류독감 바이러스인 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 고효율로 발현시키고 항원작용에 필수적인 당화를 위해 식물체에서 발현된 단백질을 소포체로 이동 및 체류시킬 수 있는 식물형질전환용 재조합 벡터를 사용하여 H5N1의 헤마글루티닌을 고효율로 생산할 수 있는 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 형질전환 식물체로부터 항원성 H5N1의 헤마글루티닌을 대량 생산하는 방법 및 상기 형질전환 식물체 또는 상기 식물체로부터 생산된 헤마글루티닌을 포함하는 조류독감 바이러스의 백신조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 형질전환 식물체를 이용한 H5N1의 헤마글루티닌 생산방법은 저렴한 비용으로 대량 생산이 가능한 효과가 있고, 본 발명에서 사용한 식물형질전환용 재조합 벡터에는 셀룰로오스-결합 도메인이 삽입되어 있어 식물체에서 발현된 단백질을 신속하고 용이하게 분리할 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따른 형질전환 식물체는 사료 첨가제 등의 형태로 섭취 가능하기 때문에 식용 백신으로 사용할 수 있는 효과가 있으며, 나아가 본 발명에서 생산된 항원성 헤마글루티닌은 동물모델에 투여시 면역 반응을 유도함에 따라 H5N1 조류독감 바이러스에 대한 단백질 백신으로 사용할 수 있는 효과가 있을 뿐만 아니라 조류독감 바이러스의 감염 진단용 시약으로도 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 609004-05-2-CG200
부처명 농림수산식품부
연구사업명 농림기술개발사업
연구과제명 식물세포에서 단백질 고축적 기술 개발
주관기관 포항공과대학교 산학협력단
연구기간 2009.04.10 ~ 2014.04.09
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 CG1123-1
부처명 교육과학기술부
연구사업명 작물유전체기능연구사업
연구과제명 식물 신호전달 연구와 translational enhancer의 개발과 이의 활용
주관기관 포항공과대학교 산학협력단
연구기간 2007.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 서열번호 14의 유전자 서열에 의해 코딩되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 및 (ii) 서열번호 15의 유전자 서열에 의해 코딩되는 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)이 융합된 형태를 갖는, H5N1 바이러스 백신용 재조합 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 재조합 단백질은 서열번호 13의 유전자 서열에 의해 코딩되는 BiP(chaperone binding protein), HDEL(His-Asp-Glu-Leu) 시그널 펩타이드 또는 이 둘 모두가 추가로 결합된 형태인 것을 특징으로 하는, H5N1 바이러스 백신용 재조합 단백질.

청구항 3

(i) 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자 서열 및 (ii) 서열번호 15로 표시되는 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)을 코딩하는 유전자 서열을 포함하는, 제 1 항의 재조합 단백질을 코딩하는 재조합 유전자.

청구항 4

제 3 항의 재조합 유전자를 포함하면서 식물체 내에 도입(transfection)되어 대상 식물체를 형질전환시킬 수 있는 식물형질전환용 벡터.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 식물형질전환용 벡터는

(i) 서열번호 1 내지 12로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 유전자 서열; (ii) 서열번호 13으로 표시되는 BiP(chaperone binding protein) 유전자 서열; (iii) 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자 서열; (iv) 서열번호 15로 표시되는 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)을 코딩하는 유전자 서열 및 (v) HDEL(His-Asp-Glu-Leu) 펩타이드를 코딩하는 유전자 서열을 포함하면서, 이러한 유전자들이 프로모터와 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 식물형질전환용 벡터.

청구항 6

제 4 항의 식물형질전환용 벡터를 식물체에 도입하여 제작된 형질전환된 식물체.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 식물체는 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 샐러리로 이루어진 군 중에서 선택되는 쌍자엽 식물; 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군 중에서 선택되는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환된 식물체.

청구항 8

제 6 항의 형질전환된 식물체를 배양하여 생성된 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 제 1 항의 H5N1 바이러스 백신용 재조합 단백질의 제조 방법.

청구항 9

제 1 항의 H5N1 바이러스 백신용 재조합 단백질을 포함하는 H5N1 바이러스 백신용 조성물.

청구항 10

(a) 검체로부터 혈액을 채취하는 단계;

(b) 상기 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하는 단계; 및

(c) 상기 분리된 혈청에 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 검체에서 생성된 항체가 H5N1 바이러스의 감염에 의해 형성된 것인지 또는 백신투여에 의해 형성된 것인지를 진단하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 (c) 단계의 반응에서 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체가 함께 검출될 경우에는 상기 검체에서 형성된 항체는 제 9 항의 백신용 조성물의 투여에 의해 생성된 것으로 판단하고, 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체만이 검출될 경우에는 H5N1 바이러스의 감염에 의해 생성된 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 검체에서 생성된 항체가 H5N1 바이러스의 감염에 의해 형성된 것인지 또는 백신투여에 의해 형성된 것인지를 진단하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조류독감 바이러스의 표면 단백질인 헤마글루티닌을 고효율로 생산할 수 있는 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 형질전환 식물체로부터 조류독감 바이러스에 대한 면역효과를 유발할 수 있는 항원성 조류독감 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 생산하는 방법 및 상기 방법으로 생산된 헤마글루티닌 단백질을 포함하는 조류독감 바이러스 백신조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 조류 인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus:AIV)는 오르소믹소 바이러스(orthomyxovirus)에 속하는 RNA 바이러스로서, 전파가 매우 빠르고 임상증상이 전혀 나타나지 않는 경우에서부터 감염되면 거의 100% 폐사가 일어나는 경우까지 그 병원성이 매우 다양한 것으로 알려져 있다. 또한, 조류 인플루엔자 바이러스는 모두 A형에 속하는 바이러스로서 바이러스의 외막에 있는 헤마글루틴(hemagglutin:HA)과 뉴라미니다아제(neuraminidase:NA) 유전자에 따라 HA는 16종류, NA는 9종류로 나누어지는 등 그 혈청형이 다양하며, HA와 NA가 서로 조합시에는 144 종류의 A형 인플루엔자 바이러스가 존재할 수 있다.

[0003] 또한, 이러한 다양한 종류의 A형 인플루엔자 바이러스 중에서 조류에 대해 병원성을 나타내는 것은 H5 및 H7이며, 인간에게 인플루엔자를 일으키는 것은 H1, H2 및 H3으로 알려져 있다. 일반적으로 조류 인플루엔자 바이러스는 조류와 돼지 이외의 동물에서는 감염이 안 된다고 알려져 있으나 1997년 홍콩에서 조류 독감에 감염된 환자들이 발생했고 이를 유발한 것이 H5N1이라고 알려짐에 따라 조류 인플르엔자의 인체 감염 가능성이 사실로 확인되었다. 이러한 인체 감염의 이유로는 조류 인플루엔자 바이러스와 인체 인플루엔자가 인체에서 동시에 감염되면 이들이 유전자 변이를 일으켜 고병원성의 바이러스가 된 것으로 설명되고 있다. 또한, 우리나라에서도 2003년 12월에서 2004년 3월 21일까지 총 19건의 H5N1형의 고병원성 조류 독감이 발생하여 국내 양계산업 뿐만 아니라, 인체감염을 우려한 소비 위축으로 인한 관련 2차 산업에 이르기까지 영향을 미쳤으며, 고병원성 조류 독감 근절을 위한 정부의 방역경비는 직접경비만 약 1,500 억원이 소요되는 등 실로 막대한 피해를 입히고 종식되었다. 또한, 최근에는 태국과 베트남에서 H5N1형에 의해 인체감염 사례도 지속적으로 나타나고 있어 세계적인 우려를 자아내고 있다.

[0004] 그러나 조류 독감의 경우, 혈청형이 너무 다양하고 각각의 혈청형끼리는 교차면역이 약하거나 또는 교차면역이 되지 않아 다른 혈청형의 바이러스의 감염을 막기가 어려우며 변이가 잘 발생하여 확실한 예방 백신은 존재하지 않는다. 단지 현재 사용되고 있는 가장 효율적인 예방 방법으로는 소독제를 사용하여 세척하는 방법, 비경구적 사독백신 또는 재조합형 계두 바이러스 백신을 사용하고 있지만 이 또한 조류 독감 발병 후 바이러스의 아형이 밝혀진 후에나 사용되고 있어 조류 독감의 확산을 줄이거나 예방하는 데는 한계가 있다.

[0005] 또한, 조류 독감에 대하여 세계적으로 많은 연구비를 투자하여 다양한 치료제 및 백신 개발에 박차를 가하고 있지만 H5N1 바이러스에 대해 효과적으로 대처할 만한 백신 생산량을 갖추지 못하고 있는 실정이다. 2008년 6월 기준으로 3 종류의 H5N1 백신이 개발되어 있으나 아직 시험단계에 있으며 그 생산량 또한 매우 소량에 불과하여 펜데믹과 같은 급격한 수요가 필요할 경우 충분한 양으로 공급할 가능성이 매우 희박하다.

[0006] 특히, H5N1에 대한 백신 생산은 여러 가지 이유들로 인해 생산이 어렵고 상용화되는데도 시간이 많이 걸리는 문제점이 있다. H5N1에 대한 백신의 경우, 대부분이 바이러스 백신으로서 보통 달걀에 바이러스를 접종하여 바이러스를 증폭시켜 분리하는 방법이 대표적인데 그 생산량이 낮고, 따라서 펜데믹과 같은 급격한 수요에 대처할 능력이 떨어질 뿐만 아니라 생산 설비에 많은 돈과 시간이 든다는 문제점이 있어 현실적으로 달걀을 이용하여 고병원성 H5N1 백신 생산은 불가능하다고 할 수 있다. 따라서 바이러스가 아닌 단백질 항원을 이용한 백신을 사용한다면 조류농가들의 경제적 손실을 막고 치명적인 바이러스로부터 조류 및 사육 농가인을 효과적으로 보호할 수 있을 것으로 예상됨에 따라 단백질 항원을 이용한 백신의 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 한편, 최근에는 식물체를 이용하여 식물체로부터 유용 생리활성 물질을 생산하려는 기술들이 개발되고 있는데, 이는 식물로부터 유용 생리활성 물질을 생산할 경우, 생산 단가를 파격적으로 줄일 수 있는 장점이 있고, 동물세포나 미생물에서 합성된 단백질을 분리 정제하는 과정에서 생길 수 있는 바이러스나 암 유전자 장독소 등의 오염원을 원천 배제할 수 있는 장점이 있으며, 상품화 되었을 경우 종자로 장기간 보관이 가능할 뿐만 아니라 쉽게 재배할 수 있는 식물일 경우에는 종자 형태로 전세계로 보급이 가능하여 냉동 및 냉장 유통에 의지해야하는 단백질 보다 유리한 점이 많기 때문이다. 또한, 생리활성 물질에 대한 수요가 급증할 경우 대량생산에 필요한 설비에 드는 기술이나 비용이 동물세포 시스템에 비해 절대적으로 적기 때문에 최단 기간에 많은 수요에 따른 공급이 가능하기 때문이다.

[0008] 또한, 식물체는 포유동물에서 필수적인 해독 후 수식 과정이 일어나는 진핵생물 단백질의 합성 경로를 가지고 있기 때문에 포유동물의 발현 단백질과 거의 유사한 단백질을 생산할 수 있는 장점을 가지고 있어 이러한 식물체를 형질전환 시킨 후 이로부터 유용 생리활성 물질을 생산하는 방법이 주목이 받고 있다.

[0009] 그러나 지금까지 유용한 생리활성 물질, 예컨대, 의학적으로 유용한 단백질, 백신 및 산업적으로 가치가 있는 효소들을 식물체로부터 효과적으로 합성 및 생산할 수 있는 기술이 그리 많은 성공을 거두지 못하고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 식물의 특성을 이용하여 조류 독감, 특히 고병원성 바이러스인 H5N1에 대한 단백질 백신을 개발하기 위해 연구하던 중, H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자를 포함하는 재조합 식물형질전환용 벡터를 사용하여 식물체를 형질전환 시키고, 형질전환된 식물체로부터 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 대량 생산할 수 있음을 확인함으로써 종래에 비해 경제적이고 안전하며 투여가 용이한 식용 백신으로 사용 가능한 식물체 유래 조류독감 백신을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환된 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 형질전환된 식물체로부터 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법으로 생산된 H5N1 바이러스에 대한 백신 단백질을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질, 또는 상기 형질전환 식물체의 단백질 추출물을 포함하는 H5N1 바이러스 백신용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은, (a) 검체로부터 혈액을 채취하는 단계; (b) 상기 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하는 단계; 및 (c) 상기 분리된 혈청에 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding

domain:CBD)에 대한 항체를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 검체에서 생성된 항체가 H5N1 바이러스의 감염에 의해 형성된 것인지 또는 백신투여에 의해 형성된 것인지를 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 (i) 서열번호 1 내지 12로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 DNA 서열; (ii) 서열번호 13으로 표시되는 BiP(chaperone binding protein) 유전자 서열; (iii) 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자 서열; (iv) 서열번호 15로 표시되는 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)을 코딩하는 유전자 서열 및 (v) HDEL(His-Asp-Glu-Leu) 펩타이드를 코딩하는 염기서열이 프로모터와 작동가능하게 연결된 식물형질전환용 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환된 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물형질전환용 벡터를 식물체로 도입하는 방법은 아그로박테리움(Agrobacterium sp.)-매개에 의한 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커법(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리법(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG 침전법(Polyethylen glycol)으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물은 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 샐러리로 이루어진 군 중에서 선택되는 쌍자엽 식물; 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군 중에서 선택되는 단자엽 식물일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 제조된 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 형질전환된 식물체를 배양하여 상기 식물체에 도입된 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자로부터 발현된 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 형질전환된 식물체로부터 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형질전환된 식물체로부터 분리 및 정제된 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)은 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)과 융합된 형태일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 생산된 H5N1 바이러스에 대한 백신 단백질을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질은 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)과 융합된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질, 또는 상기 형질전환 식물체의 단백질 추출물을 포함하는 H5N1 바이러스 백신용 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은,

[0026] (a) 검체로부터 혈액을 채취하는 단계;

[0027] (b) 상기 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하는 단계; 및

[0028] (c) 상기 분리된 혈청에 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 검체에서 생성된 항체가 H5N1 바이러스의 감염에 의해 형성된 것인지 또는 백신투여에 의해 형성된 것인지를 진단하는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (c) 단계의 반응에서 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체가 함께 검출될 경우에는 상기 검체에서 형성된 항체는 제9항에 따른 백신조성물의 투여에 의해 생성된 것으로 판단하고, 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체만이 검출될 경우에는 H5N1 바이러스의 감염에 의해 생성된 것으로 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따른 H5N1 조류독감 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 고효율로 발현시키고 항원작용에 필수적인 당

화를 위해 식물체 내에서 발현된 단백질을 소포체로 이동 및 체류시킬 수 있는 식물형질전환용 재조합 벡터를 사용하여 형질전환된 식물체로부터 항원성 H5N1 조류독감 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 생산하는 방법은 저렴한 비용으로 항원성 단백질을 대량 생산할 수 있는 효과가 있고, 또한 본 발명에 사용한 상기 재조합 벡터는 셀룰로오스-결합 도메인을 포함하고 있어 식물체에서 발현된 단백질을 신속하고 용이하게 분리할 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따른 형질전환 식물체는 사료 첨가제 등의 형태로 섭취 가능하기 때문에 식용 백신으로도 사용할 수 있는 효과가 있으며, 나아가 본 발명에서 생산된 항원성 헤마글루티닌은 동물모델에 투여시 면역 반응을 유도함에 따라 H5N1 조류독감 바이러스에 대한 단백질 백신으로 사용할 수 있는 효과가 있을 뿐만 아니라 조류독감 바이러스의 감염 진단용 시약으로도 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1a는 본 발명에서 제작한 식물의 형질전환용 벡터에서 35Sp-UTR35:Bip:H5N1(HA):CBD:HDEL:NOS 부분의 연결 형태를 나타낸 모식도이고, 도 1b는 본 발명의 일실시예에서 제작한 식물형질전환용 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 식물체 형질전환용 벡터를 사용하여 제작한 형질전환된 식물체의 각 개체에 대하여 상기 식물체로부터 추출한 단백질을 SDS-PAGE 전기영동 시킨 후 CBD 항체를 이용한 웨스턴 블럿을 통해 형질전환된 식물체로부터 H5N1의 HA 발현 정도를 확인한 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 식물체 형질전환용 벡터를 사용하여 제작한 H5N1의 HA 단백질을 생산할 수 있는 애기장대를 나타낸 사진이다.

도 4는 본 발명에 따라 형질전환된 애기장대에서 발현된 H5N1의 HA 항원 단백질의 세포내 위치를 세포면역 염색법을 이용하여 관찰한 사진이다.

도 5는 본 발명에 따라 형질전환된 애기장대로부터 단백질을 추출한 뒤 H5N1의 HA 항원 단백질이 당화되었는지의 여부를 확인하기 위해 단백질 추출물에 대하여 당잔기 분해효소인 엔도글리코시다아제 H를 처리한 군 및 처리하지 않은 대조군을 대상으로 웨스턴 블럿을 수행한 것이다.

도 6a는 본 발명에 따라 형질전환된 애기장대로부터 셀룰로오즈를 이용하여 H5N1의 HA 항원 단백질을 분리 및 정제한 뒤, SDS-PAGE 전기영동한 다음 coomassie 염색법을 사용하여 분리 및 정제된 단백질을 확인한 것을 나타낸 것이다.

도 6b는 본 발명에 따라 형질전환된 애기장대를 대상으로 상기 애기장대로부터 추출한 총 수용성 단백질 중에서 발현된 H5N1의 HA 항원 단백질의 양을 CBD 항체를 이용하여 웨스턴 블럿을 수행하고 multigauge 프로그램을 이용하여 시그널의 강도를 측정한 것을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따라 형질전환된 애기장대로부터 분리한 H5N1의 HA 항원 단백질을 마우스에 주사하고 각각의 혈청을 이용하여 조류 독감 항원에 대한 특이적 항체, 즉, IgG, IgG2a 및 IgG1의 항체의 형성 정도를 ELISA 방법으로 조사한 것이며, 이때 대조군으로는 H5N1의 HA 항원 단백질 대신 TIV 백신을 주사한 마우스의 혈청을 사용하였다.

도 8은 본 발명에 따라 생산된 H5N1의 HA 항원 단백질 및 대조군으로 TIV 백신을 마우스에 주사한 다음 H5N2 바이러스로 감염을 유도한 후 각 마우스들의 몸무게 변화를 측정한 그래프이다.

도 9는 본 발명에 따라 생산된 H5N1의 HA 항원 단백질 및 대조군으로 TIV 백신을 마우스에 주사한 다음 H5N2 바이러스로 감염을 유도한 후 각 마우스들의 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명에 따라 생산된 H5N1의 HA 항원 단백질로 마우스를 면역화 시킨 뒤 상기 마우스의 혈청을 이용하여 H5N1의 HA에 대한 항체 뿐만 아니라 CBD에 대한 항체 형성 웨스턴 블럿을 통해 확인한 것을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따라 형질전환된 애기장대로부터 분리한 H5N1의 HA 항원 단백질을 닭에 주사하고 혈청을 분리한 후, 조류 독감 항원에 대한 특이적 항체인 anti-total IgG(chicken) 항체의 형성을 ELISA 방법으로 조사한 것이며, 이때 대조군으로는 H5N1의 HA 항원 단백질 대신 PBS 버퍼를 주사한 닭의 혈청을 사용하여 항원 항체 반응을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 고병원성 조류독감인 H5N1 바이러스의 예방을 위한 백신 개발에 관한 것으로서, H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환된 식물체를 제조함에 그 특징이 있다. 보다 구체적으로, 본 발명은 (i) 서열번호 1 내지 12로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 DNA 서열; (ii) 서열번호 13으로 표시되는 BiP(chaperone binding protein) 유전자 서열; (iii) 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자 서열; (iv) 서열번호 15로 표시되는 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)을 코딩하는 유전자 서열 및 (v) HDEL(His-Asp-Glu-Leu) 펩타이드를 코딩하는 염기서열이 프로모터와 작동가능하게 연결된 식물형질전환용 재조합 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환된 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0033] 본 발명자들은 식물체에서 유용한 단백질, 즉, 백신으로 사용가능한 단백질인 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질의 생산을 극대화하기 위한 방법으로 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 식물체 내에 도입한 후 발현시킬 수 있는 식물형질전환용 재조합 벡터를 제조하였다. 이때, 상기 재조합 벡터는 단백질의 발현 조절을 번역(translation) 단계에서 조절할 수 있는 5'비번역 부위(5'UTR:5'untranslated region)의 염기서열을 포함하고 있으며, 일반적으로 mRNA의 5'비번역 부위(5' untranslated region, UTR)은 유전자 발현의 전사 후 조절, 핵 밖으로의 mRNA 수송의 조절, 단백질 번역의 효율 및 mRNA 의 안정성 조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 바 있다.

[0034] 본 발명에서 상기 5'비번역 부위(5'UTR:5'untranslated region)는 애기장대로부터 분리된 단백질의 번역 증진 효율을 가지는 DNA 단편일 수 있으며, 바람직하게는 하기 표에 기재된 서열번호 1 내지 12로 이루어진 염기서열 중 선택된 어느 하나의 염기서열 일 수 있다.

5 ' UTR 서열

[0035]

5' UTR 번호	염기서열	서열번호
UTR 1	AGAGAAGACGAAACACAAAAG	1
UTR 2	GAGAGAAGAAAGAAGAAGACG	2
UTR 6	AAAACTTTGGATCAATCAACA	3
UTR 7	CTCTAATCACCAGGAGTAAAA	4
UTR 24	AGAAAAGCTTTGAGCAGAAAC	5
UTR 35	AACACTAAAAGTAGAAGAAAA	6
U1 AAA	AGAGAAGACGAAACACAAAAA	7
U1 CCC	AGAGAAGACGAAACACAACCC	8
U1 GGG	AGAGAAGACGAAACACAAGGG	9
U1(-4,5G)	AGAGAAGACGAAACACGGAAG	10
U1(-4,5C)	AGAGAAGACGAAACACCCAAG	11
U AAG	AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG	12

[0036] 또한, 본 발명에 따른 상기 식물형질전환용 재조합 벡터는 식물체로부터 항원성 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 대량생산하기 위해 상기 헤마글루티닌 단백질을 소포체로 이동시킬 수 있도록 타겟팅 유전자를 포함할 수 있다.

[0037] 일반적으로 형질전환 식물체 또는 세포내에서 목적 단백질을 과발현시키는 경우, 단백질이 분해(proteolytic degradation)되는 현상들이 종종 발생한다. 그러나 다양한 세포내 소기관으로 외래 단백질을 타겟팅 시킬 경우에는 이들 단백질을 보다 안정적으로 저장할 수 있으며, 특히, 목적 단백질을 소포체로 타겟팅 할 경우, 세포질에 존재하는 것 보다 단백질의 분해를 최소화 할 수 있는 특징이 있다.

[0038] 또한, 대부분의 경우 바이러스의 표면 단백질은 당화된 형태로 존재하고 있는데 이러한 당화 여부는 바이러스 단백질의 안정된 구조형성, 항체 반응유도 및 면역반응 유도 등에 있어 매우 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있으며(Goffard, A., et al., J. Virol. 79, 8400-8409, 2005; Hebert, D. N., et al., J. Cell Biol. 139, 613-623, 1997), 당화 단백질과 비당화 단백질을 비교하여 보았을 때 바이러스 단백질의 당화가 항체 형성에 도움을 준다는 사실도 보고된 바 있다(Ewasyshyn, M., et al., J. Gen. Virol. 74, 2781-2785, 1993). 따라서 소포체에서는 만노즈(mannose)를 다량 함유하고 있어 당화가 활발하게 일어나고 있으므로 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 소포체로 이동시킬 경우 단백질의 안정성을 유지함과 동시에 당화된 형태의 HA 단백질

을 대량으로 얻을 수 있는 장점이 있다.

[0039] 본 발명에서는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질이 식물체 내에서 소포체로 이동할 수 있도록 Bip(chaperone binding protein) 단백질을 코딩하는 염기서열을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 Bip의 cDNA 대신 인트론을 포함하는 Bip의 게놈 DNA인 서열번호 13으로 표시되는 염기서열을 사용할 수 있다.

[0040] 상기 BiP는 루미날 결합 단백질(luminal binding protein)로서, 면역글로불린 중사슬 결합 단백질(immunoglobulin heavy chain binding protein)과 글루코스 조절 단백질(glucose regulated protein)로 동정되었으며, 소포체에 위치해 있는 HSP70 샤페론 패밀리의 한 종류이며 소포체에서 새로이 합성된 단백질에 일시적으로 결합한다. 또한, BiP 단백질의 N-말단에는 소포체로의 타겟팅을 결정하는 신호 서열을 함유하고 있어 목적 단백질들을 소포체로 타겟팅 시키는 역할을 한다.

[0041] 또한, 상기 식물형질전환용 재조합 벡터는 HDEL과 같은 소포체 저장 신호 펩타이드(ER retention signal peptide)를 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있으며, 이는 HDEL 신호 펩타이드의 경우 목적 단백질을 소포체내에 머물도록 함으로써 분자 샤페론에 의한 폴딩(folding)과 조합(assembly)이 증가되어 결과적으로 단백질의 분해를 더욱 최소화하기 위함이다(Nuttall, J. etal.,2002). 이러한 예로서, 목적 단백질을 분비 경로로 보냈을 때보다 소포체에 유지(retention) 시킨 경우, 목적 단백질의 수율이 10~100배 정도 증가된다고 알려진 바 있다(Hellwig, S. etal.,2004).

[0042] 또한, 본 발명에 따른 상기 식물형질전환용 재조합 벡터는 H5N1 바이러스의 표면에 존재하는 헤마글루티닌(HA)을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 일반적으로 인플루엔자 바이러스는 그 표면에 헤마글루티닌(HA:hemagglutinin)과 뉴라미니다아제(NA:neuraminidase) 항원을 가지고 있다. 이러한 HA 및 NA는 크기가 비교적 큰 당단백질로서 HA는 바이러스가 침입하고자 하는 세포를 인식하여 침투하는데 기능을 하는 단백질이고, NA는 바이러스가 숙주세포에서 증식한 후에 바이러스가 숙주 세포를 빠져나오는데 작용하는 단백질이며 이들은 숙주에서 면역 반응을 일으키는 원인 단백질로 밝혀진 바 있다. 특히, HA 단백질은 조류의 적혈구를 응집시키는 능력이 있고 체내에서 유발되는 항체 반응의 대부분의 원인이 되는 항원으로 알려져 있다.

[0043] 따라서 본 발명에서는 H5N1 바이러스에 대한 백신을 식물체로부터 제조하기 위해 식물형질전환용 재조합 벡터에 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 코딩하는 염기서열, 바람직하게는 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 유전자 서열을 포함할 수 있다. 상기 서열번호 14로 표시되는 유전자 서열은 H5N1 타입/Hong Kong/213/03 바이러스의 헤마글루티닌 단백질의 아미노산 23개의 아미노산을 제외한 부분을 포함하는 아미노산을 코딩하는 유전자이다.

[0044] 나아가 상기 식물형질전환용 재조합 벡터는 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 재조합 벡터에 포함되는 CBD 염기서열은 일반적으로 단백질의 정제과정을 위해 당업계에서 사용되고 있는 것이라면 모두 사용가능하며, 바람직하게는 서열번호 15로 표시되는 염기서열을 사용할 수 있다.

[0045] 따라서 본 발명에 따른 상기 식물형질전환용 재조합 벡터는 단백질의 번역 효율을 증진시킬 수 있는 DNA 서열, Bip 유전자 서열, H5N1의 HA 유전자 서열, CBD을 코딩하는 염기서열 및 HDEL 펩타이드를 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현 벡터로서, 상기 서열들은 프로모터와 순차적으로 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 "발현 벡터"라는 용어는 본 발명에 따른 상기 DNA 서열, 유전자 서열 또는 염기서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 상기 DNA 서열, 유전자 서열 또는 염기서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0047] 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터; 피크워트 모자이크 비루스(FMV)에서 유래한 전장 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다. 또한 식물 세포 내로 본

발명에 따른 상기 DNA 서열, 유전자 서열 또는 염기서열을 도입시키기 위한 적합한 벡터로는 Ti 플라스미드 및 식물 바이러스 벡터 등이 있다. 상기 적합한 벡터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 본 발명에 따른 상기 서열들을 식물 세포내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명자들에 의해 개발된 바 있는 목적 유전자를 식물체 내의 소포체로 이동시켜 발현 및 유지시킬 수 있는 벡터, 즉, 대한민국특허출원 제2009-0081403호에 개시된 벡터를 기본 벡터로 하여, 상기 벡터의 목적 유전자 부분에 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 유전자 서열을 도입시킨 다음, 35S 프로모터와 NOS 종결자 부분을 포함하는 영역을 절단한 후, PstI과 EcoRI 제한효소를 이용하여 식물형질전환용 벡터인 pBI121 벡터에 연결함으로써 재조합 H5N1 바이러스의 항원성 헤마글루티닌 발현용 벡터를 제작하였으며, 본 발명에 따라 제조된 상기 벡터 내에서 프로모터, UTR 서열, Bip 서열, H5N1 HA 서열, CBD 서열 및 HDEL 서열의 순차적인 연결부분은 도 1에 나타내었다. 또한, 본 명세서는 대한민국특허출원 제2009-0081403호의 전문을 참고문헌으로 인용하였다. 그러므로 본 발명은 앞서 기술한 식물형질전환용 재조합 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0049] 상기 본 발명의 재조합 벡터를 식물체에 도입하는 방법은 이에 제한되지는 않으나, 아그로박테리움(Agrobacterium sp.)-매개에 의한 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커법(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리법(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylenglycol)에 의한 침전법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 아그로박테리움(Agrobacterium sp.)-매개에 의한 방법을 사용하여 본 발명의 재조합 벡터로 애기장대를 형질전환 하였으며, 상기 방법으로 형질전환된 애기장대의 사진을 도 3에 나타내었다.

[0050] 따라서 본 발명은 상기 본 발명에 따른 방법으로 제조된 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0051] 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 식물, 즉, 식물체 내에서 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)이 고효율로 번역되고 소포체내에서 축적되어 있어서 H5N1의 헤마글루티닌을 고효율로 생산할 수 있는 식물은 당업계의 통상적인 방법인 유성번식 방법 또는 무성번식 방법을 통해 수득할 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명의 식물은 꽃의 수분과정을 통하여 종자를 생산하고 상기 종자로부터 번식하는 과정인 유성번식을 통해 수득할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물체를 형질전환 한 다음 통상적인 방법에 따라 캘러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정인 무성번식 방법을 통해 수득할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 식물의 절편체를 당업계에 공지된 적합한 배지에 치상한 다음 적정 조건으로 배양하여 캘러스의 형성을 유도하고, 신초가 형성되면 호르몬 무첨가 배지로 옮겨 배양한다. 약 2주 후 상기 신초를 발근용 배지에 옮겨서 뿌리를 유도한다. 뿌리가 유도된 다음 이를 토양에 이식하여 순화시킴으로써 본 발명에 따른 식물을 수득할 수 있다. 본 발명에서 형질전환된 식물은 전체 식물체뿐만 아니라 그로부터 수득될 수 있는 조직, 세포 또는 종자를 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 식물은 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 상기 쌍자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추,감자, 터마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 샐러리일 수 있고, 상기 단자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파일 수 있다.

[0053] 한편, 본 발명자들은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체에서 H5N1 의 헤마글루티닌 단백질이 세포내의 소포체에 위치되어 있는지를 확인하기 위해 본 발명의 일실시예에서 세포면역 염색법을 사용하여 조사한 결과, H5N1의 헤마글루티닌 단백질이 식물체 내의 소포체에 존재하는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[0054] 또한, 본 발명의 일실시예에 따르면, 형질전환된 식물체에서 발현된 H5N1의 헤마글루티닌 단백질이 당화된 형태로 존재하는지를 확인하기 위해 식물체로부터 단백질을 추출한 후, 상기 추출물에 당잔기 분해효소인 엔도글리코시다아제(endoglycosidase) H를 처리한 결과, 발현된 H5N1 의 헤마글루티닌 단백질은 식물체 내에서 해독후 수식 과정을 통해 당화되어 있는 것임을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

[0055] 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 식물체로부터 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 방법을 제공할 수 있으며, 상기 방법은 형질전환된 식물체를 배양하여 상기 식물체에 도입된 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA) 유전자로부터 발현된

단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 보다 구체적으로, 상기 형질전환된 식물체로부터 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)을 생산하는 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터를 식물체에 도입하거나 또는 상기 재조합 발현 벡터로 세포를 형질전환시킨 다음, 상기 헤마글루티닌(HA)이 발현되도록 적당한 시간동안 배양한 후, 형질전환된 식물 또는 세포로부터 수득할 수 있다. 이때 상기 단백질을 발현시키는 방법은 당업계에 공지된 방법이라면 모두 사용가능하다. 또한 형질전환된 식물 또는 세포에서 고발현된 단백질의 회수는 당업계에 공지된 다양한 분리 및 정제 방법을 통해 수행할 수 있으며, 통상적으로 세포 조각(cell debris) 등을 제거하기 위하여 상기 세포 용해물을 원심분리한 후, 침전, 예를 들어, 염석(황산암모늄 침전 및 인산나트륨 침전), 용매 침전(아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전)등을 수행할 수 있고, 투석, 전기영동 및 각종 컬럼 크로마토그래피 등을 수행할 수 있다. 상기 크로마토그래피로는 이온교환 크로마토그래피, 겔-침투 크로마토그래피, HPLC, 역상-HPLC, 친화성 컬럼 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 본 발명의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 정제할 수 있다(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)).

[0057] 또한, 본 발명에서는 상기 형질전환된 식물체로부터 헤마글루티닌(HA) 단백질을 보다 간편하고 빠르게 분리 및 정제하기 위해 앞서 기술한 본 발명의 재조합 벡터에 셀룰라제의 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)을 코딩하는 염기서열, 바람직하게는 서열번호 15로 표시되는 염기서열을 추가적으로 작동 가능하게 연결함에 따라 상기 식물체에서 발현된 H5N1 바이러스의 항원성 단백질인 헤마글루티닌(HA)은 셀룰로오스 결합 도메인과 융합된 형태일 수 있으며, 따라서 셀룰로오스 담체를 컬럼으로 이용하는 크로마토그래피를 통하여 용이하게 분리 및 정제할 수 있다.

[0058] 따라서 본 발명은 상기 방법으로 생산된 항원성을 갖는 재조합 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 제공할 수 있으며, 상기 방법으로 생산된 단백질은 H5N1 바이러스에 대한 백신 단백질일 수 있고, 상기 단백질은 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌과 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)이 융합된 형태의 융합단백질일 수 있다.

[0059] 나아가 본 발명자들은 앞서 기술한 바와 같이 본 발명의 방법에 의해 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 융합단백질이 실제로 항원으로 작용하여 H5N1 바이러스 백신으로 사용 가능한지를 조사하였다.

[0060] 즉, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 기술한 본 발명의 방법으로 분리 및 정제한 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 항원 단백질을 마우스 모델을 이용하여 상기 마우스에 근육주사한 뒤, 혈액을 채취하고 혈청을 분리한 다음, ELISA 방법을 사용하여 항원 특이적인 항체 반응을 조사하였으며, 이때 대조군으로는 헤마글루티닌 항원 단백질 대신 TIV(trivalent influenza vaccine; H1N1 + H3N2 + B타입 HA 단백질) 백신을 사용하였다. 그 결과, 대조군으로 사용한 TIV 백신은 H5N1 특이적인 항체 반응을 유도하지 못했으나, 본 발명에 생산한 H5N1의 헤마글루티닌 항원 단백질을 투여한 마우스 군의 경우 면역원성을 보유하여 항원 특이적인 항체 반응을 유도함을 확인할 수 있었다(도 8 참조).

[0061] 또한, 본 발명자들은 상기 결과를 통해 식물로부터 생산한 본 발명의 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질이 생체 내에서 항체를 유도할 수 있다는 사실을 확인함으로써 실제로 조류 독감 바이러스에 대해 방어 효과가 있는지를 조사하였는데, 본 발명의 일실시예에 따르면 식물체로부터 생사된 본 발명의 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질과 TIV 백신(대조군으로 사용)을 접종시킨 마우스에 대하여 H5N1에 배해 상대적으로 위험성이 낮은 것으로 알려진 H5N2 바이러스를 감염시킨 후, 마우스의 몸무게 변화 및 생존율을 조사한 결과, H5N1 헤마글루티닌 단백질을 투여한 군의 경우 마우스의 몸무게의 감소가 나타났으나 시간이 경과하여 15일 후에는 처음 몸무게의 90% 이상을 회복하는 것으로 나타난 반면, TIV 백신 투여군의 경우 지속적으로 마우스의 몸무게가 감소되는 것으로 나타났고(도 8 참조), 생존율 측정 결과, TIV 백신 투여군의 경우 6일에서 8일 사이에 모두 죽는 것으로 나타난 반면, H5N1 헤마글루티닌 단백질을 투여한 군의 경우에는 7일 및 8일째에 각각 한마리의 마우스가 죽었을 뿐 대조군에 비해 67%의 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 9 참조).

[0062] 따라서 본 발명에 따른 형질전환 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질은 H5N1 바이러스에 대한 항체 형성을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 조류 독감 바이러스에 대해 방어 효능도 가지고 있음을 알 수 있었다.

[0063] 이와 같이 본 발명자들은 앞서 기술한 바와 같이 본 발명의 방법에 의해 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질이 마우스를 대상으로 하는 실험을 통해 면역원성을 보유하여 항원 특이적인 항체 반응을 유도할 수 있다는 사실을 확인하였고 따라서 이러한 결과를 토대로 본 발명에서 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 마우스 및 인간을 포함하는 포유류에 적용할 수 있는 백신으로 사용할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0064] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 방법에 의해 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 포유류 뿐만 아니라 조류 및 가금류에 적용가능한 백신으로 사용할 수 있는지를 조사하기 위해 본 발명의 일실시예에서는 닭을 대상으로 상기 닭에게 본 발명의 방법에 의해 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 투여한 후, 닭으로부터 혈청을 분리한 다음, ELISA 방법을 사용하여 항원 특이적인 항체 반응을 조사하였는데, 이때 대조군으로는 헤마글루티닌 항원 단백질 대신 PBS 버퍼를 투여하여 사용하였다. 그 결과, PBS 버퍼를 투여한 닭은 H5N1 특이적인 항체 반응을 유도하지 못했으나, 본 발명에서 생산한 H5N1의 헤마글루티닌 항원 단백질을 투여한 닭의 경우에는 암수 상관없이 면역원성을 보유하여 항원 특이적인 항체 반응을 유도하는 것으로 나타났다(도 11 참조).

[0065] 따라서 본 발명에 따른 형질전환 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질은 포유류 뿐만 아니라 닭을 포함하는 조류 및 가금류에 적용 가능한 백신의 제조에 사용할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0066] 그러므로 본 발명은 상기 기술된 본 발명의 방법에 따른 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질 또는 상기 형질전환 식물체의 단백질 추출물을 포함하는 H5N1 바이러스 백신용 조성물을 제공할 수 있다.

[0067] 본 발명에 따른 상기 백신용 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 대하여 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 상기 조성물의 투여량은 투여 경로, 개체의 체중 및 나이 등의 여러 인자에 따라 적절히 조절할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 조성물은 H5N1 바이러스의 감염을 예방 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있고, 약리학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 본 발명의 백신용 조성물은 유효성분으로 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 100 내지 1,000 ㎎/l로 포함할 수 있으며, 투여량으로 50 내지 500 ㎎을 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 상기 백신용 조성물에 추가로 포함될 수 있는 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명의 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다. 제형은 이에 제한되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명의 백신용 조성물을 투여할 수 있는 상기 개체로는 인간을 포함하는 포유동물, 조류, 가축 및 가금류 등 H5N1 바이러스의 감염 대상이 될 수 있는 모든 개체를 포함할 수 있다.

[0071] 나아가 본 발명의 형질전환된 식물체는 그 자체로 또는 상기 식물체를 분쇄하여 동물의 사료나 식수에 첨가하여 투여할 수 있으므로 경구투여용 백신으로도 사용할 수 있다.

[0072] 따라서 본 발명은 본 발명에 따른 상기 형질전환된 식물체, 상기 형질전환된 식물체로부터 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질, 또는 상기 형질전환된 식물체의 단백질 추출물을 포함하는 H5N1 바이러스에 대한 경구투여용 백신조성물을 제공할 수 있으며, 형질전환된 식물체를 경구투여용 백신조성물로 사용할 경우에는 동물성 바이러스에 대한 오염 가능성이 낮고, 생산되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질이 식물에 함유되어 있으므로 장기간 보관 및 이동이 가능할 뿐만 아니라 주사접종으로 인한 비용소모를 대폭 절감시킬 수 있는 잇점이 있다.

[0073] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 형질전환된 식물체로부터 고병원성 조류독감인 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 항원 단백질을 분리 및 정제할 수 있으므로 H5N1 바이러스의 감염 진단용 시약을 제공할 수 있으며,

나아가 상기 분리 및 정제된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 항원 단백질을 조류 또는 포유동물의 혈청 등과 반응시킴으로써 H5N1 바이러스에 의한 감염 여부를 진단할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.

[0074] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 형질전환된 식물체로부터 분리 및 정제된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 항원 단백질은 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)과 융합된 형태의 융합단백질이라는 특징이 있다.

[0075] 이에 본 발명자들은 본 발명에 의해 생산된 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 항원 단백질을 마우스에 투여하였을 경우, 상기 헤마글루티닌 단백질과 융합된 CBD 단백질에 대한 항체가 생성되는지를 조사한 결과, HA 항원 단백질 투여시 융합된 CBD 단백질에 대한 항체도 생성되는 것을 확인할 수 있었다(도 10 참조).

[0076] 따라서 이러한 결과를 토대로 본 발명은 개체로부터 수득한 혈청을 대상으로 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 CBD 단백질에 대한 항체를 검출하는 과정을 통해 상기 개체에서 형성된 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체가 H5N1 바이러스의 감염에 의해 생성된 것인지 또는 본 발명에 따른 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA)을 포함하는 백신에 의해 생성된 것인지를 진단할 수 있다.

[0077] 그러므로 본 발명은,

[0078] (a) 검체로부터 혈액을 채취하는 단계;

[0079] (b) 상기 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하는 단계; 및

[0080] (c) 상기 분리된 혈청에 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 검체에서 생성된 항체가 H5N1 바이러스의 감염에 의해 형성된 것인지 또는 백신투여에 의해 형성된 것인지를 진단하는 방법을 제공할 수 있다.

[0081] 보다 구체적으로, 상기 진단 방법은 검체, 바람직하게는 조류 독감 바이러스에 의해 감염이 될 가능성이 있는 개체로서, 예컨대 조류 또는 인간을 제외한 모든 동물로부터 혈액을 채취한 다음, 당업계에 통상적으로 사용되고 있는 혈액으로부터 혈청을 분리하는 방법을 사용하여 혈청을 분리한 다음, 상기 혈청에 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체를 첨가하여 면역반응 시킴으로써 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체 검출을 통해 상기 검체에서 형성된 헤마글루티닌(HA) 항체가 H5N1 바이러스의 감염에 의해 생성된 것인지 또는 본 발명에 따른 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA)을 포함하는 백신에 의해 생성된 것인지를 진단할 수 있다.

[0082] 상기 면역반응에 따른 진단은 상기 검체로부터 수득한 혈청에서 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체 및 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)에 대한 항체가 함께 검출될 경우에는 H5N1 바이러스의 HA 항체는 본 발명에 따른 백신 투여에 의해 생성된 것으로 판단할 수 있고, 헤마글루티닌(HA)에 대한 항체만이 검출될 경우에는 H5N1 바이러스의 감염에 의해 생성된 것으로 판단할 수 있다.

[0083] 따라서 본 발명에 따른 상기 진단 방법은 본 발명의 백신 또는 백신조성물을 개체에 투여한 후, 상기 백신에 의해 H5N1 바이러스에 대한 항체가 효과적으로 생성되었는지를 확인할 수 있는 효과가 있으며, 조류독감에 대한 백신을 예방 접종할 경우, 상기 진단 방법에 의해 H5N1 바이러스의 감염으로 진단될 경우에는 신속하게 방역 또는 치료가 수행될 수 있도록 함으로써 불필요한 가금류의 살처분을 방지하여 경제적인 손실을 줄일 수 있는 효과가 있으며, 인체 감염을 예방 또는 치료할 수 있는 효과가 있다. 그러므로 본 발명에서 생산된 CBD와 융합된 형태의 항원성 H5N1 헤마글루티닌 단백질은 마커백신으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

[0084] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실 시 예 1

[0085] **H5N1 바이러스의 항원성 유전자를 포함하는 식물 형질전환용 벡터 제조**

[0086] 본 발명자들은 HPAI(H5N1) 바이러스의 표면에 있는 항원성으로 작용하는 헤마글루티닌(HA) 유전자를 포함하는 식물체 형질전환용 벡터를 제조하기 위해 본 발명자들이 개발한 특허출원 제2009-0081403호에 기재된 목적 단백질의 번역 효율을 증진시키는 번역 효율 증진용 DNA 단편을 포함하는 재조합 벡터를 사용하였다. 즉, 발명에서

사용한 식물 형질전환용 재조합 벡터는 칼라플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 단백질의 번역(translation) 효율을 증진시키는 DNA 단편, 즉, 5'UTR(5' untranslated region) 서열로서, 하기 표 1에 나타낸 서열번호 1 내지 12의 염기서열 중 서열번호 6으로 이루어진 염기서열, 식물 세포에서 소포체(ER)로 목적 단백질을 타겟팅 할 수 있는 서열번호 13으로 표시된 BiP(chaperone binding protein) 서열, 서열번호 14로 표시되는 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌 유전자 서열(HPAI(H5N1)형 A/Hong Kong/213/03 바이러스의 헤마글루티닌 단백질의 마지막 23개의 아미노산을 제외한 서열), 서열번호 15로 표시되는 셀룰로오스-결합 도메인(cellulose-binding domain:CBD)을 코딩하는 염기서열, 목적 단백질을 소포체에 유지시키는 신호서열인 HDEL(His-Asp-Glu-Leu) 서열 및 35S 터미너이터(NOS)를 포함하는 종결 코돈을 포함하는 서열의 영역을 Pst I 및 EcoRI 제한효소를 이용하여 통상적으로 사용하는 벡터인 pBI121 벡터에 연결하여 식물의 형질전환용 벡터인 pBI121-35Sp-UTR35:Bip:H5N1(HA):CBD:HDEL:NOS를 제작하였으며, 도 1a에는 본 발명에 따라 제작한 식물의 형질전환용 벡터에서 35Sp-UTR35:Bip:H5N1(HA):CBD:HDEL:NOS의 순차적인 연결을 나타내었고, 상기 제작한 벡터의 개열지도는 도 1b에 나타내었다.

표 1

5 ' UTR 서열

5' UTR 번호	염기서열	서열번호
UTR 1	AGAGAAGACGAAACACAAAAG	1
UTR 2	GAGAGAAGAAAGAAGAAGACG	2
UTR 6	AAAACTTTGGATCAATCAACA	3
UTR 7	CTCTAATCACCAGGAGTAAAA	4
UTR 24	AGAAAAGCTTTGAGCAGAAAC	5
UTR 35	AACACTAAAAGTAGAAGAAAA	6
U1 AAA	AGAGAAGACGAAACACAAAAA	7
U1 CCC	AGAGAAGACGAAACACAACCC	8
U1 GGG	AGAGAAGACGAAACACAAGGG	9
U1(-4,5G)	AGAGAAGACGAAACACGGAAG	10
U1(-4,5C)	AGAGAAGACGAAACACCCAAG	11
U AAG	AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG	12

[0087]

실 시 예 2

[0088] **H5N1 바이러스의 HA를 발현하는 형질전환 식물체의 제조**

[0089] 상기 실시예 1에서 제조한 식물 형질 전환용 재조합 벡터를 당업계에 공지된 아그로 박테리움-매게 형질 전환 방법을 이용하여 H5N1 바이러스의 HA를 발현하는 애기장대를 제조하였다. 이때, 형질 전환된 애기장대의 선별은 상기 실시예 1에서 제조된 식물 형질 전환용 재조합 벡터는 기본 벡터로서 pBI121을 사용하였는데, 이 벡터는 식물에서 카나마이신에 대한 선택 마커를 가지고 있으므로 카나마이신 내성검사를 이용하여 본 발명의 방법으로 제조된 상기 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 식물체를 선별하였다. 또한, 상기 카나마이신 내성검사로 선별된 애기 장대 식물체는 웨스턴 블럿을 통해 HA 단백질이 잘 발현되는 라인을 찾아 형질전환 1세대를 확보하였고, 이후 형질전환 2세대에서는 선택 마커를 이용하여 죽는 개체 : 살아남은 개체가 1:3의 비율로 깨끗하게 나오는 라인을 1카피로 선정하였으며 이들 라인은 이후 형질전환 3세대로 정한 뒤, 형질전환 3세대에서는 모두 살아남는 개체에 대해 단백질이 모두 발현되는 라인을 웨스턴 블럿으로 확인함으로써 이를 호모(homo)로 선정하여 라인을 유지함으로써 형질전환된 애기장대 식물체 라인을 확보하였다. 이때, HA 단백질의 발현확인을 위한 상기 웨스턴 블럿은 CBD 항체를 이용하여 통상의 웨스턴 블럿 수행 방법으로 실시하였으며, 도 2에 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 항원 단백질을 발현한 결과를 나타내었으며, 도 3에 본 발명에 따란 형질전환된 애기장대를 나타내었다.

실 시 예 3

[0090] **형질전환된 식물체의 소포체 내에서 H5N1의 헤마글루티닌(HA) 항원 단백질 의 위치 확인**

[0091] 앞서 기술한 바와 같이, 본 발명자들은 HPAI(H5N1)형 A/Hong Kong/213/03의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 소포체(ER)로 운반하는 시그널 시컨스(signal sequence)인 BiP를 이용하였다. 따라서 상기 실시예 2에서 제조한 형질전환 식물체에서 발현된 HA 단백질이 소포체(ER)에 위치하는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 면역염색(Immunostaining) 방법을 수행하였다. 즉, pBI121-35Sp-UTR35:BiP:H5N1(HA):CBD:HDEL:NOS로 형질전환된 애기장대의 잎에서 원형질체를 분리한 뒤, W6 버퍼(154mM NaCl, 125mM CaCl2, 2.5mM Maltose, 5mM KCl, 10mM HEPES, pH7.2)에 용해시킨 후, 폴리-L-라이신(lysine)이 코팅된 슬라이드(slide)에 상기 W6 버퍼에 용해된 형질전환 된 원형질체를 300㎕ 올려 놓고 3% 파라포름알데히드로 1시간 정도 처리하고 형질전환 된 원형질체를 고정시킨 뒤, TWS 버퍼(10mM Tris-HCl pH7.4, 0.9% NaCl, 0.25% gelatin, 0.02% SDS,0.1%TritonX-100)로 씻어낸 뒤, 1차 항체(primary antibody)로서 폴리 클론성 Anti-CBD(Rabbit)항체를 반응시킨 다음, TSW 버퍼(10mM Tris-HCl pH7.4, 0.9% NaCl, 0.25% gelatin, 0.02% SDS,0.1% TritonX-100)로 다시 씻어낸 뒤, 2차 항체(Secondary antibody)로 토끼-FITC(녹색형광)를 반응시킨 다음 형광 현미경을 통해 관찰하였다.

[0092] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 녹색형광 패턴이 소포체의 전형적인 그물망 구조(network structure)로 확인됨으로서 본 발명에 따라 제조된 형질전환 식물체에서 발현된 HA 단백질이 소포체(ER)로 정확하게 이동함을 확인할 수 있었다.

실 시 예 4

[0093] **형질전환된 식물체에서 발현된 H5N1 헤마글루티닌 단백질의 당화 확인**

[0094] 일반적으로 바이러스의 표면 단백질은 당화가 되어 있고 이러한 당화 여부는 항체 반응을 유도하는 특징이 있어 항체 형성에 도움을 준다. 본 발명자들은 앞서 설명한 바와 같이 H5N1의 항원성 단백질인 헤마글루티닌의 더 많은 당화 효과를 유도하기 위해 당화가 활발하게 일어나는 소포체로 타겟 단백질을 이동시킬 수 있고 또한 소포체에서 발현된 단백질이 더 오래 유지할 수 있는 재조합 벡터로 형질전환된 벡터를 사용하여 애기장대를 형질전환시켰다. 이에 본 발명의 방법으로 형질전환된 애기장대에서 발현된 H5N1의 헤마글루티닌이 당화되었는지의 여부를 확인하기 위해 엔도글리코시다아제 H(endoglycosidase H) 효소법을 이용하였는데, 상기 엔도글리코시다아제 H 효소는 단백질에서 아사파라진에 연결된 당잔기를 선택적으로 절단하는 효소로서 단백질의 당화여부를 확인하는 방법으로 당업계에서 사용되고 있다. 보다 구체적으로 상기 효소를 이용한 단백질의 당화여부 확인은, 상기 본 발명에 따른 형질전환된 애기장대의 잎부분을 샘플링 하여 1X 균질화 버퍼(25mM Hepes pH7.5, 1mM DTT, 1mM MgCl2, 250mM Sucrose) 100㎕와 단백질 분해효소 억제제를 첨가하여 애기장대로부터 단백질을 추출한 다음, 4X 변성 버퍼(2% SDS4%b-MeOH) 100㎕ 첨가하고 100℃에서 15분 동안 끓인 뒤, 12,000rpm 5분 동안 원심 분리한 다음, 상층액 200㎕을 수득하였다. 이후 2X G5 반응 버퍼(100mM sodium citrate pH5.5) 200㎕ 첨가한 뒤 효소처리 전 샘플 200㎕ 취하고 남은 200㎕에 엔도글리코시다아제(Endoglycosidase) H 1㎕를 넣은 뒤 37℃에서 1시간 동안 처리하였다. 그런 뒤, 상기 샘플을 가지고 SDS-PAGE 전기영동 후 폴리클론성 Anti-CBD(Rabbit)항체를 이용하여 통상의 웨스턴 블럿을 수행하여 H5N1 헤마글루티닌의 당화 여부를 확인하였다.

[0095] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 엔도글리코시다아제 H 효소를 처리하지 않은 샘플에 비해서 처리한 샘플은 엔도글리코시다아제 H 효소가 당잔기(oligosaccharides)를 절단함에 따라 단백질 크기가 더 줄어든 것을 확인할 수 있다. 따라서 상기 결과를 통해 본 발명의 방법으로 형질전환 된 식물체에서 발현된 HPAI(H5N1)형 A/Hong Kong/213/03 HA 단백질은 식물체 내에서 정상적으로 당화(glycosylation)되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 단백질의 항체반응을 유도하기에 적합하다는 것을 알 수 있었다.

실 시 예 5

[0096] **형질전환된 식물체로부터 H5N1 헤마글루티닌 단백질의 분리 및 정제**

[0097] 상기 실시예 2에서 제조한 본 발명에 따른 형질전환된 식물체로부터 조류독감을 유발하는 H5N1 바이러스의 항원인 HPAI(H5N1)형 A/Hong Kong/213/03 HA 단백질을 다음과 같은 방법으로 상기 식물체로부터 분리 및 정제하였다. 즉, 형질전환 된 애기장대를 150mm MAXi 플레이트에 70-80립 정도 심은 뒤, 23℃의 온도에서 16시

간/8시간(빛/어둠)의 환경조건이 구비된 배양실에서 3주 정도 배양하였다. 이때 상기 플레이트에는 2% 수크로즈, B5 혼합물, 0.5% MES pH5.75 및 8% 아가를 함유한 배지가 포함되도록 하였다. 이후 상기 배양한 애기장대는 액화질소에 넣고 아주 곱게 갈은 뒤, 추출 버퍼(10mM Hepes, 10mM NaCl, 3mM MgCl2, 5mM EGTA, 5mM EDTA, 5mM DTT, 0.2% triton X-100)를 첨가하여 10000rpm 10분 동안 원심분리하여 상층액만을 취한 뒤, 셀룰로즈(Sigma type20)을 가지고 제작한 3cm 정도되는 컬럼에 상기 상층액을 로딩(loading)하였다. 이후 상기 로딩한 용액이 컬럼을 다 내려오면 세척 버퍼 1(10mM Hepes, 10mM NaCl, 3mM MgCl2, 5mM EGTA, 5mM EDTA, 5mM DTT, 0.2% triton X-100)을 이용하여 컬럼을 세척하고, 다시 세척 버퍼 2(10mM Hepes, 10mM NaCl, 3mM MgCl2, 5mM EGTA, 5mM EDTA, 5mM DTT)을 이용하여 다시 컬럼을 세척하였다. 이후 용출 버퍼(1% cellobiose, 10mM Hepes, 10mM NaCl, 3mM MgCl2, 5mM EGTA, 5mM EDTA)를 이용하여 셀룰로즈와 결합되어 있는 BiP:H5N1(HA):CBD:HDEL 융합단백질을 정제하였으며, 정제된 상기 융합단백질은 다시 SDS-PAGE로 전기영동후 coomassie로 염색하여 정제된 단백질의 양을 확인하였다.

[0098] 또한, 본 발명의 방법으로 형질전환된 애기장대에서 H5N1 바이러스의 HA 단백질이 얼마나 생산되는지 확인하기 위해 상기 방법으로 분리 및 정제된 H5N1 바이러스의 HA 단백질 100ng을 형질전환된 애기장대에서 추출한 총 수용성 단백질 50㎍과 함께 SDS-PAGE 전기영동 한 후, CBD 항체를 이용하여 웨스턴 블럿을 수행한 다음, 멀티게이지(multigauge) 프로그램을 이용하여 시그널의 강도를 비교하여 정량분석 하였다.

[0099] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 형질전환된 애기장대로부터 BiP:H5N1(HA):CBD:HDEL의 융합단백질이 매우 높은 순도로 정제 및 분리됨을 확인할 수 있었으며, 단백질의 정량 분석 결과, 애기장대를 배양한 하나의 150mm MAXi 플레이트(plate)당 약 1mg정도의 단백질을 얻을 수 있음을 알 수 있었고, 도 6b에 나타낸 바와 같이, 형질전환 애기장대에서 발현된 H5N1 바이러스의 HA 단백질은 애기장대에서 추출한 총 수용성 단백질의 약 5%에 해당하는 것으로 나타났으며, 이러한 수치는 종래 형질전환된 식물체로부터 유용 단백질의 생산효과에 비해 매우 우수한 것이다.

[0100] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 식물형질전환용 벡터로 형질전환된 식물체는 H5N1 바이러스의 HA 단백질을 매우 높은 효율로 발현 및 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

실 시 예 6

[0101] **본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 항원의 항체 형성 반응 분석**

[0102] HPAI(H5N1) type A/Hong Kong/213/03의 바이러스의 표면에 있는 헤마글루티닌(HA) 단백질이 면역 항원으로 작용하기 위해서는 적절한 당화가 중요하다. 그러나 당화과정의 구체적인 메카니즘은 식물과 동물에서 미세한 차이를 보이고 있어 식물에서 생산되고 당화된 헤마글루티닌이 동물세포에서 만들어진 당화 단백질과 마찬가지로 면역원성을 가지는지를 확인하기 위해 마우스 모델을 이용하여 항체 형성 반응을 조사하였다. 먼저, 상기 마우스로는 인플루엔자 바이러스 시험에 많이 이용되고 있는 Balb/c 마우스를 사용하였으며, 항체 형성을 위한 백신으로는 본 발명의 방법으로 형질전환된 식물로부터 얻은 헤마글루티닌 단백질을 사용하였고, 대조군으로 조류독감과 관계없는 백신인 TIV(trivalent influenza vaccine, H1N1 + H3N2 + B type HA 단백질)를 PBS 완충액에 각각 10㎍/ml(H5N1 HA), 30㎍/ml(TIV HA) 농도가 되도록 희석한 후, 마우스의 양쪽 다리에 각 50㎕씩, 총 100㎕ 단백질을 0주와 3주에 걸쳐 총 2회 근육주사 하였다. 이때 상기 TIV 백신은 세 종류의 헤마글루티닌 단백질이 섞여 있으므로, H5N1 헤마글루티닌 단백질에 비하여 3배 양을 투여하였다. 백신 투여 후의 항체 형성 분석은 마지막 투여 후 2주 뒤에 헤파린 처리된 관을 이용하여 안하정맥으로부터 혈액을 채취하고, 13,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층에 위치한 혈청을 분석함으로써 수행하였는데, 즉, 분리한 혈청을 이용하여 ELISA 시험법으로 항원 특이적인 항체 반응을 조사하였다. ELISA 시험법 표적항원으로는 본 발명의 방법으로 생산한 헤마글루티닌 단백질을 사용하였으며, 1.5 ㎍/ml의 농도로 PBS 완충액에 희석한 뒤, 96-웰 흡수 플레이트에 한 웰 당 50㎕씩 분주한 뒤, 4℃에서 밤새 정치 시켰다. 이후, PBST 용액(0.05% Tween-20가 포함된 PBS 완충용액) 200㎕로 2회 세척 후, 결합 버퍼(5% skim milk를 포함하는 PBST 용액) 200㎕를 각 웰에 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking) 시켰다. 이후 다시 PBST 용액 200㎕로 2회 세척 후, 결합 버퍼에 1:50으로 희석한 상기 혈청을 50㎕씩 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 그런 다음 PBST 용액 200 ㎕로 5회 세척 후, HRP(horseperoxidase)가 연결된 anti-total IgG, IgG1, IgG2a 항체를 결합 버퍼에 1:3000으로 희석 후, 각 시료에 50㎕씩 넣어주고, 상온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 반응 후, PBST 용액 200㎕로 7회 세척 후, TMB 기질을 각 웰에 50㎕씩 넣어주어 발색을 유도한 후, 적절하게 발색되었다고 판단되면 2N H2SO4 용액을 각 웰에 50㎕씩 첨가하여 반응을 정지시키고, ELISA 판독 기기를 이용하여 450nm에서 광학 밀도 (optical density)를 측정함

으로써 항체 반응을 측정하였다.

[0103] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 대조군으로 사용한 TIV 백신은 H5N1 특이적인 항체 반응을 유도하지 못했지만, H5N1은 Balb/c 마우스에서 면역원성을 보유하여 항원 특이적인 항체 반응을 유도함을 알 수 있었다. 또한 이러한 항원 특이적 항체 반응은 부스트(boost) 면역화를 통하여 매우 증가함을 알 수 있었다.

[0104] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명의 방법으로 수득한 H5N1의 헤마글루티닌 단백질은 동물세포에서 얻은 헤마글루티닌 단백질과 다른 형태의 당화를 가지고 있으나, 마우스 모델을 통해 동물세포에서 얻은 헤마글루티닌과 같이 면역원성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

실 시 예 7

[0105] **본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 항원의 조류 독감 바이러스의 방어 효과 측정**

[0106] 상기 실시예 6을 통해 본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 단백질이 생체 내에서 항체를 유도할 수 있다는 것을 확인함에 따라 H5N1 조류 독감 바이러스에 대해 방어 효과가 있음을 알 수 있었다. 나아가 본 발명자들은 H5N1 헤마글루티닌 단백질이 실제로 다른 종류의 조류 독감 바이러스에 대해서도 방어 효과를 보이는지 조사하기 위해 H5N2 조류 독감 바이러스를 이용하여 방어 효능을 측정하였다. 즉, 본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 단백질과 TIV 백신을 접종시킨 마우스에 대하여 비면역화 마우스의 경우 100% 치사율을 유도하기에 충분한 5LD50(LD50:감염 시에 50%의 치사율을 유도하는 농도) 농도의 H5N2 바이러스를 감염시키고 감염 후 마우스의 체중의 변화 및 생존율을 측정하였다.

[0107] 그 결과, 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 대조군으로 사용한 TIV 백신 투여군의 경우, H5N2 바이러스의 감염 이후에 전형적인 증상인 몸무게의 감소가 나타났으며, 감염 후 6일에서 8일 사이에 대부분의 마우스들이 죽는 것으로 나타났다. 반면, 본 발명에 따라 생산된 식물 유래의 H5N1 헤마글루티닌 단백질을 투여한 군의 경우, TIV 백신 투여군과 마찬가지로 H5N2 바이러스 감염 이후에 모든 마우스에서 몸무게의 감소가 나타났으나, 대부분의 마우스들이 10일 경부터 점차 몸무게가 증가되어 15일 경에는 처음 몸무게의 90% 이상을 회복함을 알 수 있었다.

[0108] 또한, 마우스 생존율의 경우, 15일까지 TIV 백신 투여군은 0% (0/6), 즉 모든 마우스들이 죽는 것으로 나타났지만, 식물 유래의 H5N1 헤마글루티닌 투여군은 67%(4/6)의 생존율을 보임을 알 수 있었다.

[0109] 따라서 상기 결과를 통해 인플루엔자의 경우, 심지어 같은 아형(subtype)이더라도 바이러스의 균주가 다를 경우 방어 면역이 힘들 수 있다는 점을 고려할 때, 본 발명에 따른 H5N1 헤마글루티닌 투여 이후에 서로 다른 아형 바이러스인 H5N2 조류독감 바이러스에 대해서도 효과적으로 방어 면역을 유도한다는 사실을 통해 본 발명에 따른 H5N1 헤마글루티닌은 H5N1 뿐만 아니라 H5N2에 대해서도 우수한 방어 효능을 가지고 있음을 알 수 있었고, 나아가 H5N1 및 H5N2에 대해 사용되는 기존의 백신을 대체할만한 충분한 새로운 백신의 개발이 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명자들은 상기 결과를 통해 H5N1 바이러스에 대한 신규 단백질 백신을 발굴함에 따라, 상기 단백질 백신을 H5N1 바이러스에 감염된 동물뿐만 아니라 최근에는 인간에게도 H5N1 바이러스가 감염되고 있다는 보고에 비추어 조류 및 인간을 포함하는 모든 동물에게 H5N1 바이러스에 대한 백신으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

실 시 예 8

[0110] **CBD 항체검사를 통한 본 발명에 따른 H5N1 헤마글루티닌의 마커 백신으로서의 확인 측정**

[0111] 나아가 본 발명자들은 본 발명에서 사용한 식물 형질전환용 벡터의 경우 상기 벡터에는 H5N1 헤마글루티닌 유전자 이외에도 식물체로부터 단백질을 효과적으로 분리 및 정제를 목적으로 CBD 유전자를 사용하였다는 점을 착안하여 본 발명에 따른 방법으로 발현된 H5N1의 헤마글루티닌 단백질이 CBD 단백질과 융합되어 있음에 따라 상기 CBD 단백질에 대한 항체도 형성되었는지를 조사하였다. 즉, 본 발명에 따라 형질전환된 애기장대로부터 생산된 H5N1의 헤마글루티닌 단백질, 즉, H5N1의 헤마글루티닌 단백질과 CBD가 융합된 형태의 단백질을 항원으로 하여 마우스에 주사한 후, 상기 마우스로부터 얻은 혈청을 이용하여 웨스턴 블럿을 수행하였는데, 이는 본 발명의 백신으로 면역된 마우스 혈청에 CBD 단백질을 인식할 수 있는 항체를 포함하는지를 조사하는 것이다. 이때 상기 웨스턴 블럿은 통상의 웨스턴 블럿과동일한 방법으로 수행하였으며 웨스턴 블럿 과정에서 사용한 비교 항체로는

CBD 단백질만으로 면역된 토끼로부터 얻은 혈청을 이용하였다.

[0112] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 백신, 즉 H5N1의 헤마글루티닌 단백질과 CBD가 융합된 형태의 단백질로 면역이 된 쥐의 혈청은 면역에 사용한 백신 단백질(H5N1(HA):CBD)뿐만 아니라 불특정 CBD(GFP:CBD, TPA:CBD)를 생산하는 형질 전환 식물체에서 CBD 밴드를 인식함으로써 헤마글루티닌에 연결된 CBD 역시 마우스에서 항체 반응을 유도함을 알 수 있었다. 또한, 동일한 샘플에서 CBD 항체를 사용하는 실험을 실시하였을 경우, 면역이 된 쥐의 혈청에서 CBD 항체와 동일한 밴드가 검출되는 것을 확인함으로써 본 발명에서 사용한 백신은 바이러스로부터 마우스들을 보호하기에 충분한 항체를 생산함과 동시에 CBD에 대한 항체도 함께 생산함을 알 수 있었다.

[0113] 따라서 본 발명자들은 상기와 같은 CBD 항체 검사 결과를 통해, 조류 독감을 진단하는 혈청검사에 있어서 헤마글루티닌에 대한 항체와 CBD에 대한 항체가 함께 검출될 경우 이는 백신 접종 효과에 의한 항체임을 알 수 있고, CBD 항체 검출 없이 헤마글루티닌에 대한 항체만 검출될 경우 이는 바이러스 감염에 의한 항체임을 예측할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0114] 그러므로 상기와 같은 본 발명에 따른 CBD 항체를 이용한 검출방법은 검체에서 검출되는 항체의 분석을 통해 상기 항체가 감염에 의한 항체인지 또는 백신 접종에 의해 생성된 항체인지를 구별할 수 있음에 따라 본 발명에서 제공하는 형질전환된 식물체로부터 생산된 항원성 단백질, 즉, H5N1의 헤마글루티닌 단백질과 CBD가 융합된 형태의 단백질을 마커 백신으로 사용할 수 있음을 알 수 있었고, 이로써 불필요한 가금류의 살처분을 방지하여 경제적인 손실을 막고, 사람들의 조기 감염에 대한 신속한 치료를 가능하게 할 수 있을 것으로 예상할 수 있었다.

실 시 예 9

[0115] **조류모델에서 본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 항원의 항체 형성 반응 분석**

[0116] 본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 단백질이 상기 실시예의 실험, 즉 마우스 실험을 통해 항체반응을 유도할 수 있다는 사실을 통해 본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 단백질은 인간을 포함하는 포유류를 대상으로 하는 백신 개발에 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었다. 나아가 본 발명자들은 본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 단백질을 가금류를 대상으로 하는 백신 개발에도 사용될 수 있는지를 확인하기 위해 닭에서도 H5N1 헤마글루티닌 단백질이 항체 반응을 유도하는지를 다음과 같은 실험을 통해 조사하였다. 즉, 가금류로는 닭을 사용하였는데, 닭의 품종은 암수 구분 없이 White leghorn 품종을 사용하였다. 부화된 지 2주 후에 닭으로부터 pre-serum을 채취한 다음, 본 발명에 따른 방법으로 식물에서 수득한 헤마글루티닌 단백질을 각각 5㎍, 25㎍ 및 50㎍씩 총 6주간, 2주 간격으로 3회 각각 투여하였다. 이때 대조군으로는 헤마글루티닌 단백질 대신 PBS 버퍼를 2주 간격으로 3회 투여한 것을 사용하였다. 또한, 마지막 투여 후 2주 뒤에는 헤파린이 처리된 관을 이용하여 혈액을 채취한 다음, 13,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액인 혈청을 분리하였다. 분리해낸 혈청을 이용하여 당업계에서 널리 사용되고 있는 ELISA 시험법으로 항원-항체 반응을 수행하였다. 이 때, ELISA 시험법 표적항원으로는 본 발명의 방법으로 생산한 헤마글루티닌 단백질을 사용하였으며, 1.5 ㎍/ml의 농도로 PBS 완충액에 희석한 뒤, 96-웰 흡수 플레이트에 한 웰 당 50㎕씩 분주한 다음, 4℃에서 밤새 정치시켰다. 이튿날 PBST 용액(0.05% Tween-20가 포함된 PBS 완충용액) 200㎕로 2회 세척 후, 결합 버퍼(5% skim milk를 포함하는 PBST 용액) 200㎕를 각 웰에 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking) 시켰다. 이후 다시 PBST 용액 200㎕로 2회 세척 후, 결합 버퍼에 1:50으로 희석한 상기 혈청을 50㎕씩 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 그런 다음 PBST 용액 200 ㎕로 5회 세척 후, HRP(horse peroxidase)가 연결된 anti-total IgG (chicken) 항체를 결합 버퍼에 1:3000으로 희석 후, 각 시료에 50㎕씩 넣어주고, 상온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 반응 후, PBST 용액 200㎕로 13회 세척 후, TMB 기질을 각 웰에 50㎕씩 넣어주어 발색을 유도한 후, 2N H2SO4 용액을 각 웰에 50㎕씩 첨가하여 반응을 정지시키고, ELISA 판독기기를 이용하여 450nm에서 광학 밀도 (optical density)를 측정함으로써 항체 반응을 측정하였다.

[0117] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 대조군으로 사용한 PBS 버퍼를 투여한 닭은 H5N1 특이적인 항체 반응을 유도하지 못한 것으로 나타난 반면, 본 발명에 따라 생산된 H5N1 헤마글루티닌 단백질을 투여한 White leghorn 닭에서는 암수 구분 없이 면역원성을 보유하여 항원 특이적인 항체 반응을 유도하는 것으로 나타났다. 또한 이러한 항원 특이적 항체 반응은 부스트(boost) 면역화를 통하여 매우 증가하는 것으로 나타났다.

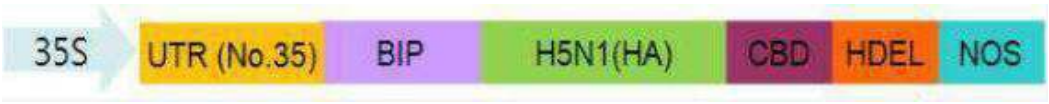
[0118] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 방법으로 수득한 H5N1의 헤마글루티닌 단백질의 경우, 식물로부터 수득한 단백질로서 동물세포에서 얻은 헤마글루티닌 단백질과는 다른 형태의 당화를 가지고 있으나, 상기 닭 모

델을 이용한 실험결과를 통해 식물로부터 수득한 본 발명의 H5N1의 헤마글루티닌 단백질은 동물세포에서 얻은 헤마글루티닌과 같이 동일한 면역원성을 가지고 있음을 확인할 수 있었고, 나아가 본 발명의 H5N1의 헤마글루티닌 단백질은 인간을 포함하는 포유류 뿐만 아니라 닭을 포함하는 가금류에 대한 백신 제조에 사용할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

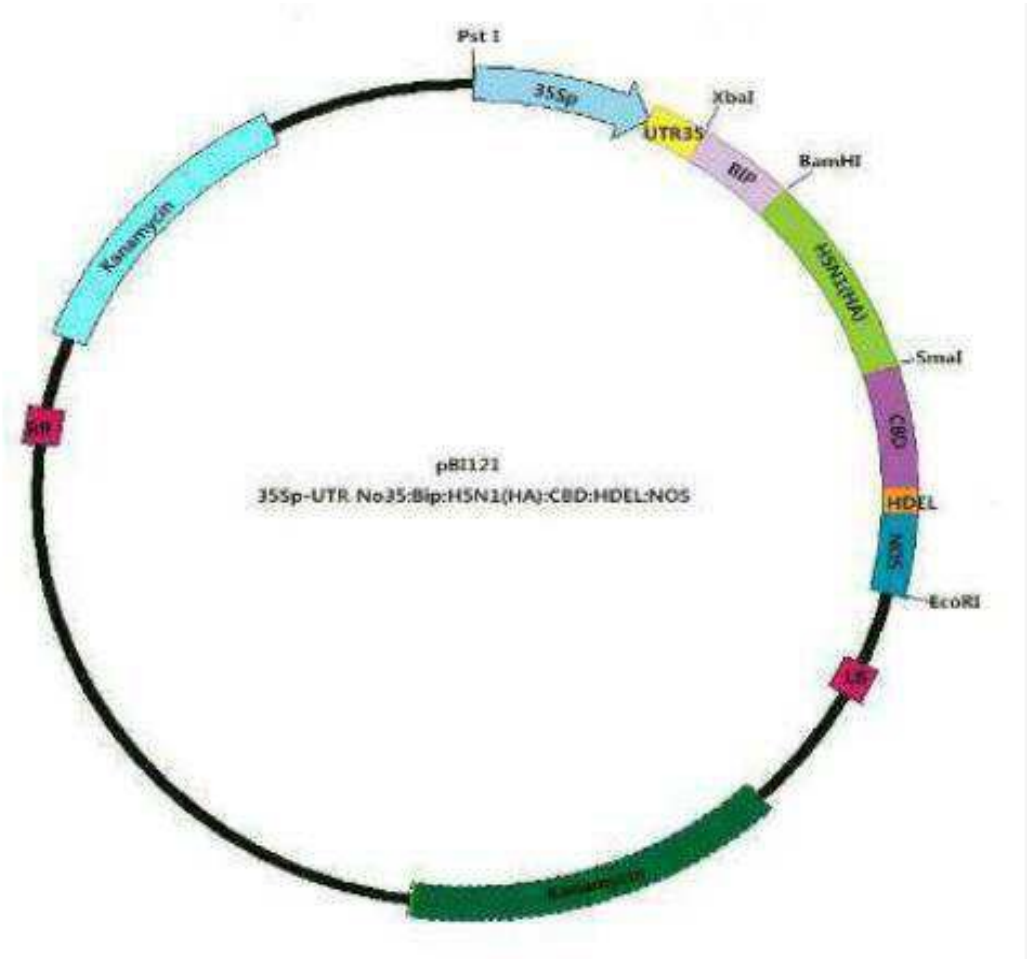
[0119] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

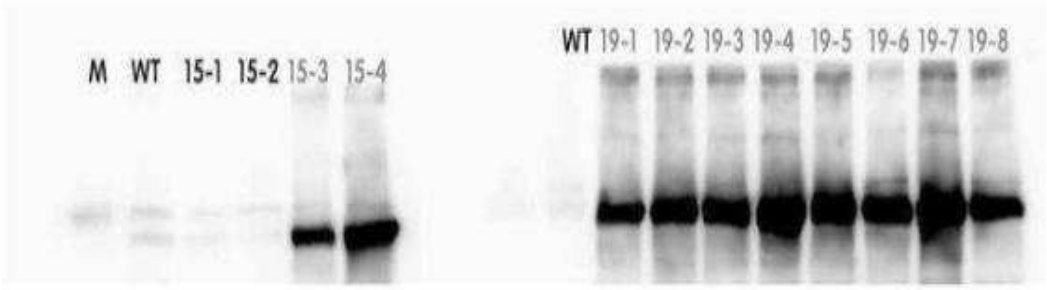
도면1a



도면1b



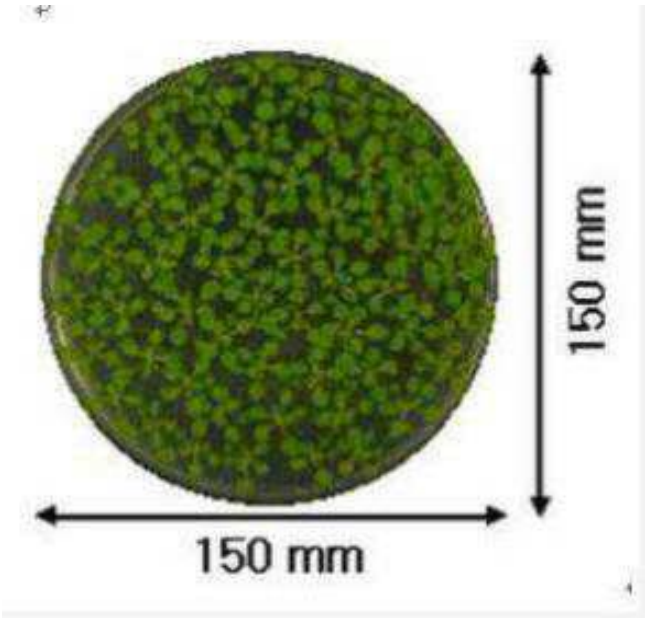
도면2



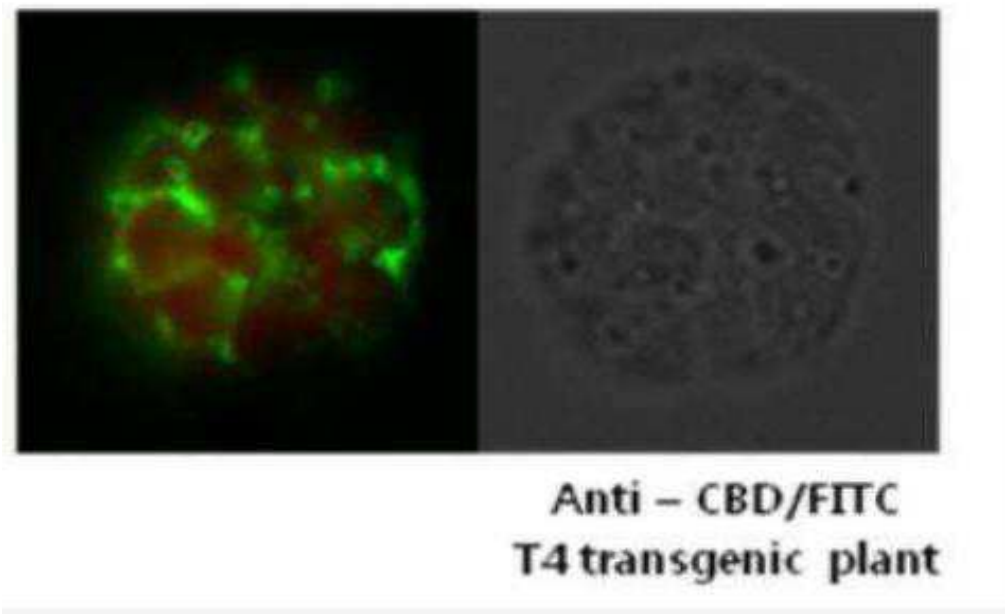
M: 단백질 사이즈 마커

WT: 야생형 식물(wild type)

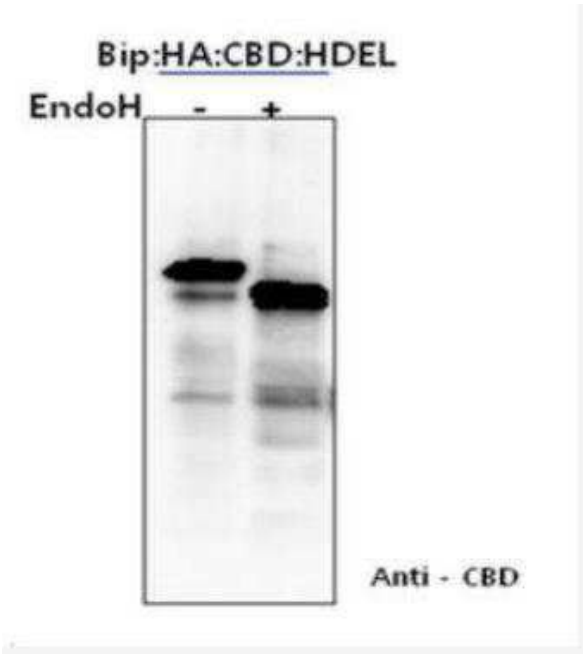
도면3



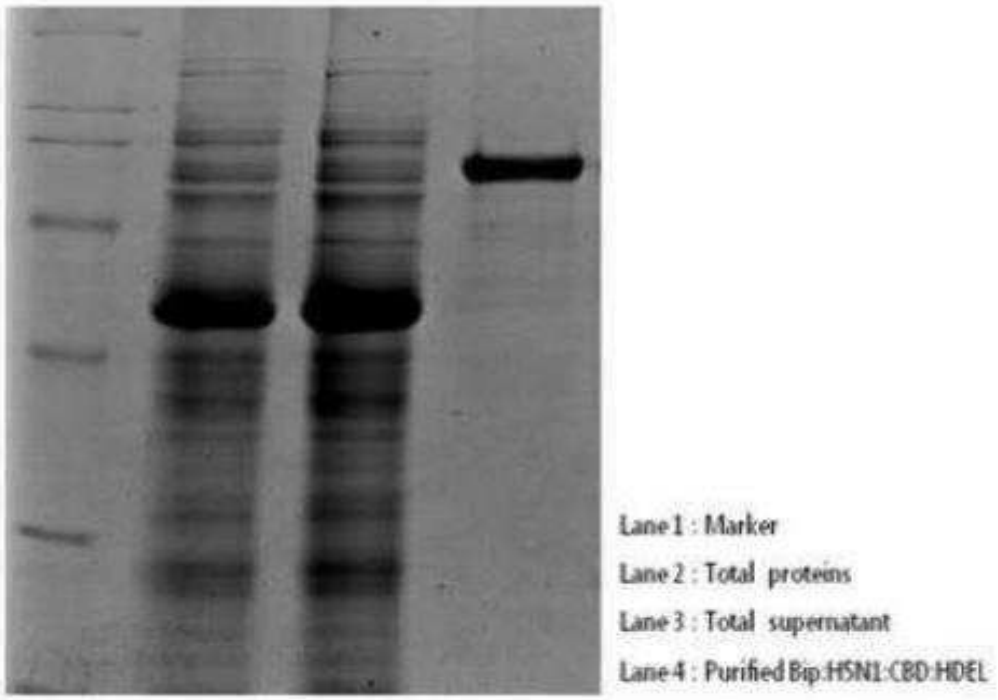
도면4


Anti – CBD/FITC
T4 transgenic plant

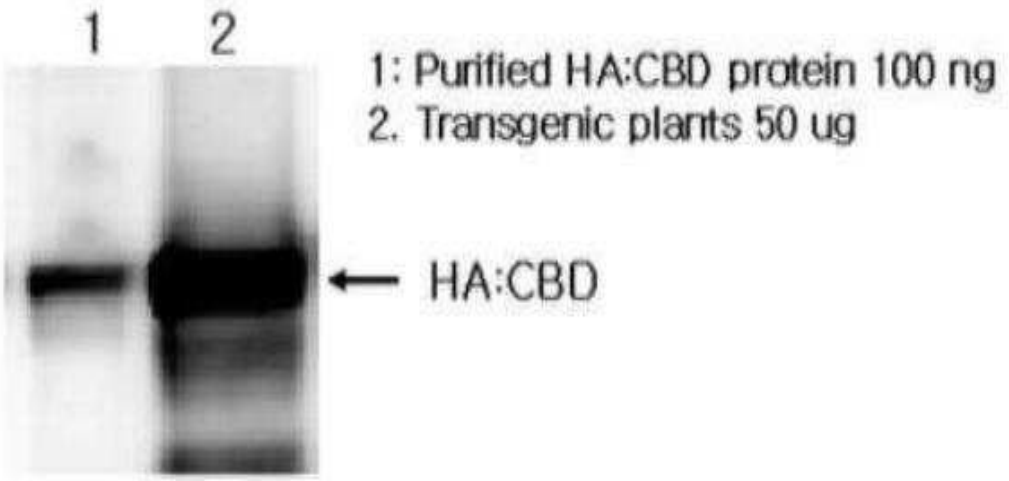
도면5


Bip:HA:CBD:HDEL
EndoH - +
Anti - CBD

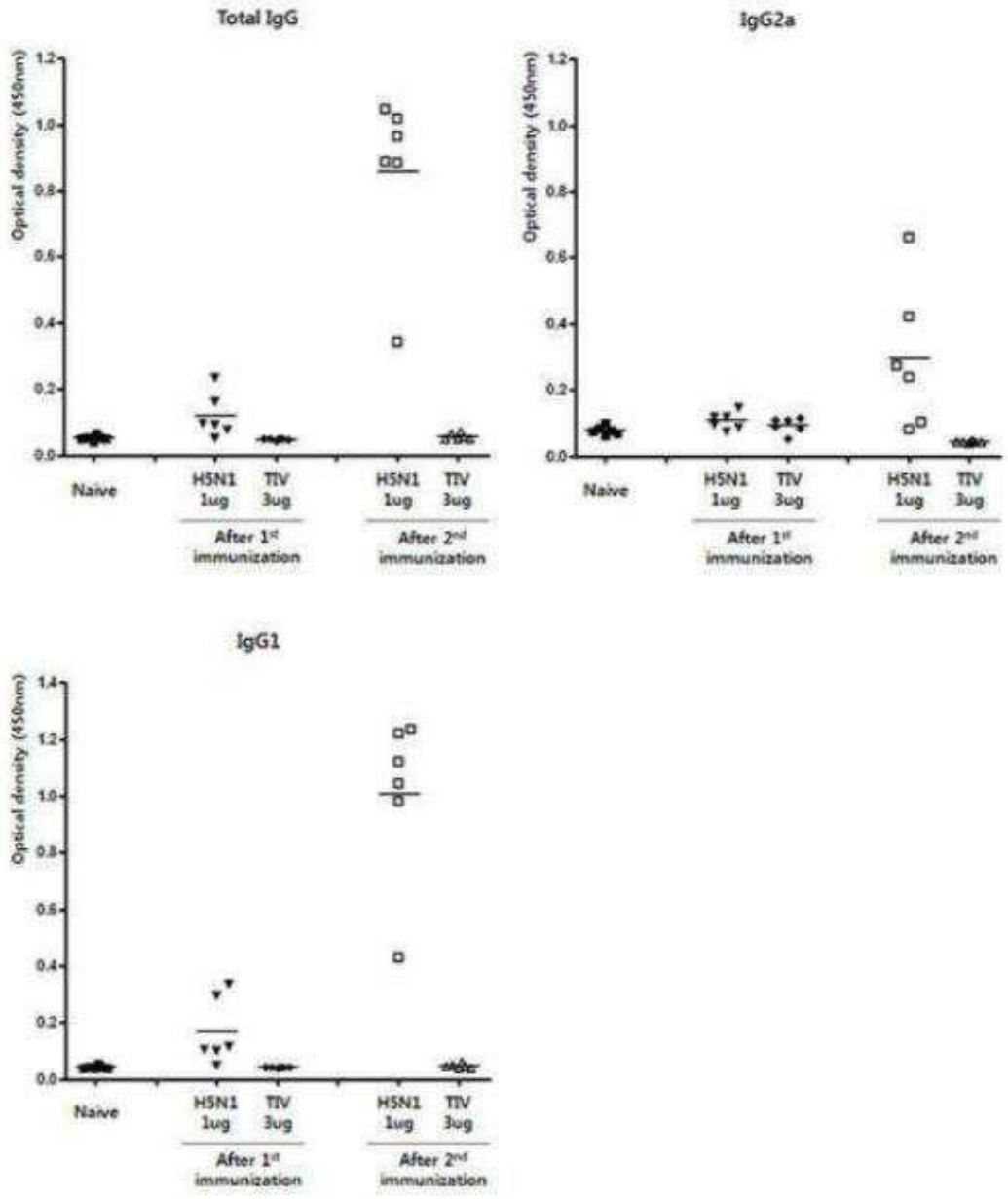
도면6a


Lane 1 : Marker
Lane 2 : Total proteins
Lane 3 : Total supernatant
Lane 4 : Purified Bip:H5N1:CBD:HDEL

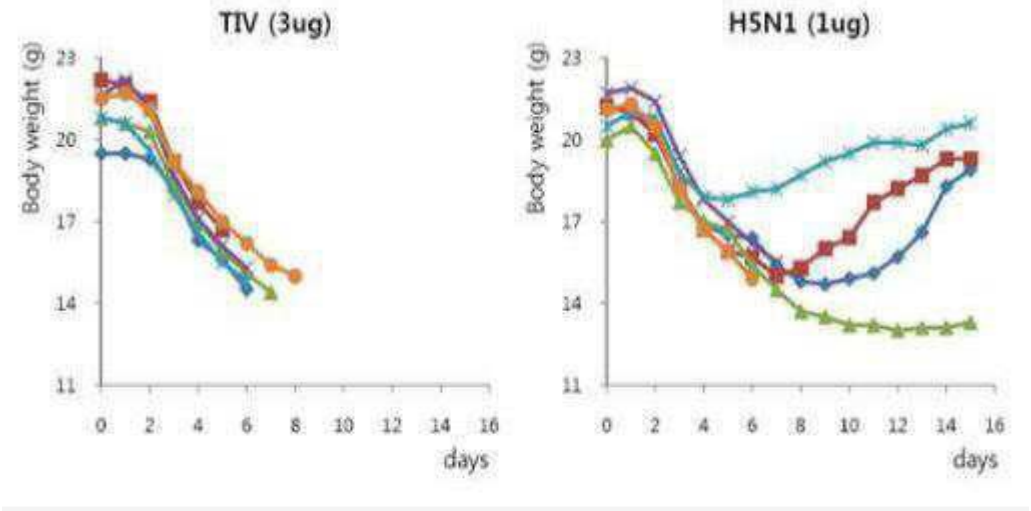
도면6b


1
2
1: Purified HA:CBD protein 100 ng
2. Transgenic plants 50 ug
HA:CBD

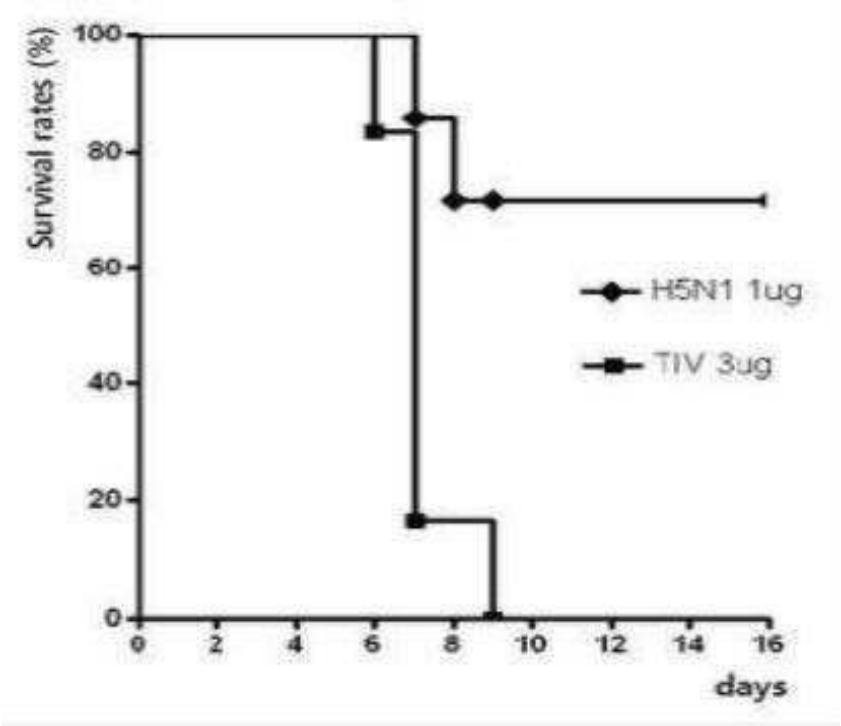
도면7


Total IgG
IgG2a
IgG1
Optical density (450nm)
Naive
H5N1 1ug
TIV 3ug
After 1st immunization
After 2nd immunization

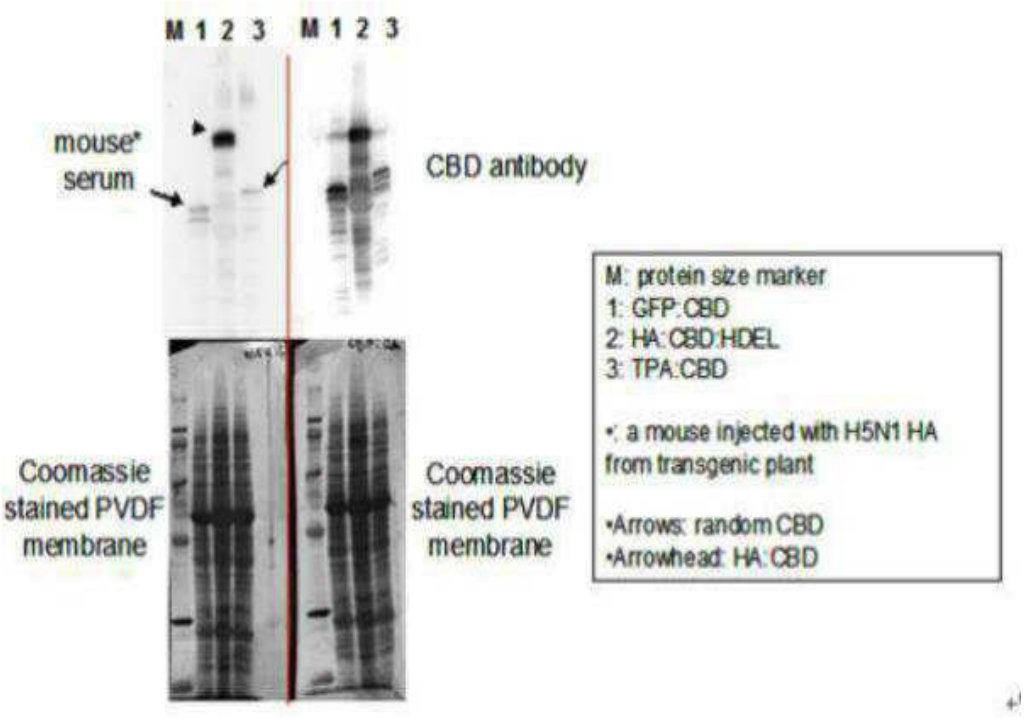
도면8


TIV (3ug)
H5N1 (1ug)
Body weight (g)
23
20
17
14
11
0
2
4
6
8
10
12
14
16
days

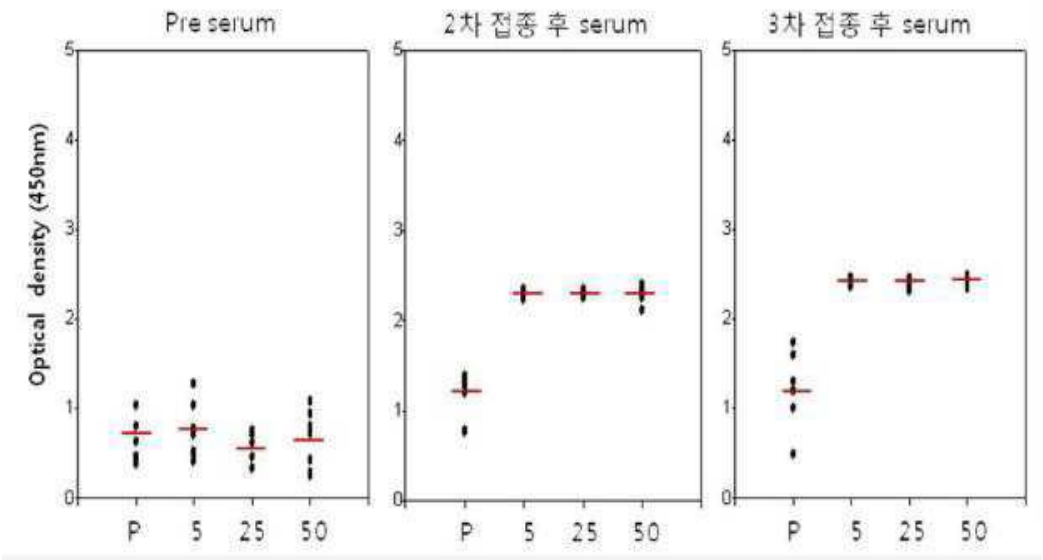
도면9


Survival rates (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
days
H5N1 1ug
TIV 3ug

도면10



도면11



서 열 목 록

<110> Helix.co.ltd.

<120> Protein vaccine of high pathogenic avian influenza virus derived form transgenic plant and method for preparation thereof

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> utr 1

<400> 1

agagaagacg aaacacaaaa g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> utr 2

<400> 2

gagagaagaa agaagaagac g 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> utr 6

<400> 3

aaaactttgg atcaatcaac a 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> utr 7

<400> 4

ctctaatcac caggagtaaa a 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> utr 24

<400> 5

agaaaagctt tgagcagaaa c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> utr 35

<400> 6

aacactaaaa gtagaagaaa a 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> U1 AAA

<400> 7

agagaagacg aaacacaaaa a 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> U1 CCC

<400> 8

agagaagacg aaacacaacc c 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> U1 GGG

<400> 9

agagaagacg aaacacaagg g 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> U1 (-4,5G)

<400> 10

agagaagacg aaacacggaa g 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> U1 (-4,5C)

<400> 11

agagaagacg aaacacccaa g 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UAAG

<400> 12

aagaagaaga agaagaagaa g 21

<210> 13

<211> 272

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BIP seq

<400> 13

atggctcgct cgtttggagc taacagtacc gttgtgttgg cgatcatctt cttcggtgag 60

tgattttccg atcttcttct ccgatttaga tctcctctac attgttgctt aatctcagaa 120

ccttttttcg ttgttcctgg atctgaatgt gtttgtttgc aatttcacga tcttaaaagg 180

ttagatctcg attggtattg acgattggaa tctttacgat ttcaggatgt ttatttgcgt 240

tgtcctctgc aatagaagag gctacgaagt ta 272

<210> 14

<211> 1524

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H5N1 HA gene

<400> 14

cacgccaaca actggaccga gcaggtggac accatcatgg agaagaacgt gaccgtgacc 60

cacgcccagg acatcctgga gaagacccac aacggcaagc tgtgcgacct ggacggcgtg 120

aagcccctga tcctgcgcga ctgcagcgtg gccggctggc tgctgggcaa ccccatgtgc 180

gacgagttca tcaacgtgcc cgagtggagc tacatcgtgg agaaggccaa ccccgccaac 240

gacctgtgct accccggcga cttcaacgac tacgaggagc tgaagcacct gctgagccgc 300

atcaaccact tcgagaagat ccagatcatc cccaagaaca gctggagcag ccacgaggcc 360

agcctgggcg tgagcagcgc ctgcccctac cagggcaaga gcagcttctt ccgcaacgtg 420

gtgtggctga tcaagaagaa caacgcctac cccaccatca agcgcagcta caacaacacc 480

aaccaggagg acctgctggt gctgtggggc atccaccacc ccaacgacgc cgccgagcag 540

acccgcctgt accagaaccc caccacctac atcagcgtgg gcaccagcac cctgaaccag 600

cgcctggtgc ccaagatcgc cacccgcagc aaggtgaacg gccagaacgg ccgcatggag 660

ttcttctgga ccatcctgaa gcccaacgac gccatcaact tcgagagcaa cggcaacttc 720

atcgcccccg agtacgccta caagatcgtg aagaagggcg acagcgccat catgaagagc 780

gagctggagt acggcaactg caacaccaag tgccagaccc ccatgggcgc catcaacagc 840

agcatgccct tccacaacat ccacccccctg accatcggcg agtgccccaa gtacgtgaag 900

agcaaccgcc tggtgctggc caccggcctg cgcaacagcc cccagcgcga gcgccgccgc 960

aagaagcgcg gcctgttcgg cgccatcgcc ggcttcatcg agggcggctg gcagggcatg 1020

gtggacggct ggtacggcta ccaccacagc aacgagcagg gcagcggcta cgccgccgac 1080

aaggagagca cccagaaggc catcgacggc gtgaccaaca aggtgaacag catcatcgac 1140

aagatgaaca cccagttcga ggccgtgggc cgcgagttca acaacctgga gcgccgcatc 1200

gagaacctga acaagaagat ggaggacggc ttcctggacg tgtggaccta caacgccgag 1260

ctgctggtgc tgatggagaa cgagcgcacc ctggacttcc acgacagcaa cgtgaagaac 1320

ctgtacgaca aggtgcgcct gcagctgcgc gacaacgcca aggagctggg caacggctgc 1380

ttcgagttct accacaagtg cgacaacgag tgcatggaga gcgtgcgcaa cggcacctac 1440

gactaccccc agtacagcga ggaggcccgc ctgaagcgcg aggagatcag cggcgtgaag 1500

ctggagagca tcggcaccta ccag 1524

<210> 15

<211> 502

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CBD DNA seq

<400> 15

ttacacatgg catggatgaa ctatacaaat taggaggtgg aggtggaccc cgggcacacc 60

accaccacca ccactttcga agttcaccag tgcctgcacc tggtgataac acaagagacg 120

catattctat cattcaggcc gaggattatg acagcagtta tggtcccaac cttcaaatct 180

ttagcttacc aggtggtggc agcgccattg gctatattga aaatggttat tccactacct 240

ataaaaatat tgattttggt gacggcgcaa cgtccgtaac agcaagagta gctacccaga 300

atgctactac cattcaggta agattgggaa gtccatcggg tacattactt ggaacaattt 360

acgtggggtc cacaggaagc tttgatactt atagggatgt atccgctacc attagtaata 420

ctgcgggtgt aaaagatatt gttcttgtat tctcaggtcc tgttaatgtt gactggtttg 480

tattctcaaa tcaagaactt ag 502