

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0114162
(43) 공개일자 2019년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)*A61K 39/12* (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 7/00 (2013.01)*A61K 39/12* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0036415

(22) 출원일자 2018년03월29일

심사청구일자 2018년03월29일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

노재량

대전광역시 유성구 은구비로 31, 507동 1702호(지족동, 열매마을 아파트 5단지)

장현

경기도 안산시 단원구 광덕서로 19, 107동 502호(고잔동, 호수공원대림아파트)

이진희

대전광역시 동구 광명4길 23(관암동)

(74) 대리인

위병갑

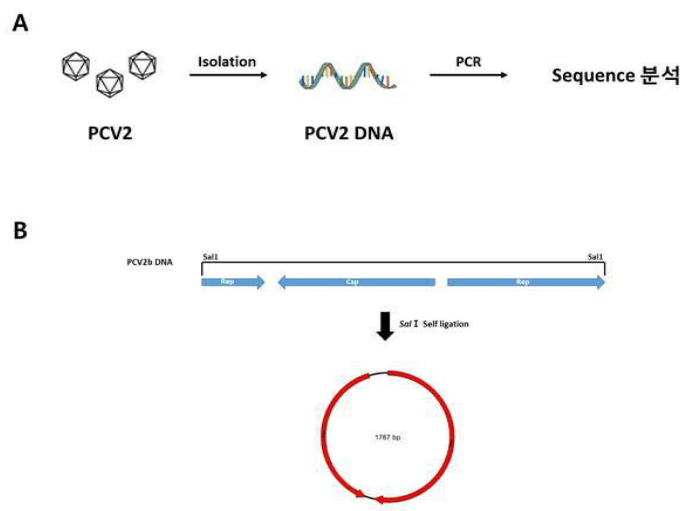
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 돼지 켜코바이러스 및 이를 포함하는 돼지 켜코바이러스 감염 질환의 예방용 백신 조성물**

(57) 요약

본 발명은 재조합 돼지 켜코바이러스 및 이를 포함하는 돼지 켜코바이러스 감염 질환의 예방용 백신 조성물과 이의 다양한 적용에 관한 것이다. 본 발명의 PCV2 재조합 바이러스는 종래 Single-stranded DNA virus인 PCV2가 세포에 극도로 적게 증식되는 단점을 극복한 것으로, double-stranded DNA 형태로 재조합되어 생산의 효율성이 증대된 효과가 있다. 또한, 항체 형성 유도 효과가 우수한 바, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

A61K 2039/552 (2013.01)

C12N 2750/10034 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017-2151-01

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 [LINC+]산학공동기술개발사업

연구과제명 [총괄과제명]고세장비 마이크로 필라 어레이 기판 제조기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 사회맞춤형산학협력선도대학육성사업단

연구기간 2017.08.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2(Porcine circovirus type 2) 재조합 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PCV2는 PCV2a, PCV2b, PCV2c 및 PCV2d로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아형인 것을 특징으로 하는, PCV2 재조합 바이러스.

청구항 3

서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는, PCV2 감염 질환 예방용 백신 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 PCV2 감염 질환은 전신성 소모성 증후군(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), 가성 광견병(pseudorabies), 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS), 글래스병(Glasser's disease), 연쇄구균성 수막염(streptococcal meningitis), 살모넬라증(salmonellosis), 이유 후 대장균증(postweaning colibacillosis), 식이성 간증(dietetic hepatosis) 및 화농성 기관지폐렴(suppurative bronchopneumonia)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 백신 조성물은 용매, 면역증강제(adjuvant) 및 부형제로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 백신 조성물은 생백신, 약독화 백신 및 사독 백신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 백신 조성물은 근육, 피하, 복강, 정맥, 경구, 진피, 안구 및 뇌 내로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 투여 경로를 통해 투여되는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.

청구항 8

서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2 재조합 바이러스를 포함하는, PCV2의 진단 키트.

청구항 9

서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2 재조합 바이러스를 검출하는 단계를 포함하는, PCV2 검출 방법.

청구항 10

제3항의 백신 조성물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, PCV2 감염 질환의 예방을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 돼지 쉼코바이러스 및 이를 포함하는 돼지 쉼코바이러스 감염 질환의 예방용 백신 조성물과 이의 다양한 적용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] PCV는 single-stranded DNA virus이다. PCV는 세포에서 독자적으로 자기복제하는 작은 게놈 크기의 virus이다. 상기 바이러스는 숙주의 polymerase를 이용하여 핵에서 자기복제 한다는 특징을 가지고 있다. PCV의 돼지 혈청 형은 1형(PCV1)과 2형(PCV2)으로 구분되고 있으며, 1형은 비병원성이나, 2형은 돼지의 병원성 바이러스로 알려져 있고 소독제에 상당한 저항성을 나타내는 것이 특징이다. PCV2는 다시 PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d의 아형으로 구분된다.

[0003] 상기 PCV2는 돼지와 관련된 다양한 질환의 원인으로 알려져 있으며, 특히, 전신성 소모성 증후군(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)에 가장 문제가 되는 원인체이다. 상기 전신성 소모성 증후군(PMWS)은 새끼돼지에서 모체이행 항체가 떨어지는 시기인 6주에서 16주령 사이에 발생하는데 특히 8~12주령의 돼지에서 집중적으로 발병하며, 감염 돼지는 만성적으로 위축돈이 되고 피부가 창백하고 림프절이 커지는 것이 특징이다. 일부의 감염 돼지에서는 호흡곤란, 만성폐렴 등의 호흡기 증상과 설사, 위궤양 등의 소화기 증상을 나타내는 경우도 있다. 또 다른 중요한 특징은 질병의 경과가 느리기 때문에 서서히 발병함으로써 다른 질병과 혼동될 수 있다. 이유자돈에서 감염율은 다양하며 폐사율이 높게 (5~50%) 나타나는 경우도 있다.

[0004] 현재 국내의 경우 PCV2a 형에 대한 백신으로 바이러스를 불활화한 백신이 상용화 되어있다. 그러나, 최근 양돈 농가에서 발생하고 있는 PCV2b형에 대해서는 백신의 방어능이 매우 약한 것으로 알려졌으며, 이에 따라 PCV2b형에 대한 신규 백신 개발의 필요성이 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 PCV2(Porcine circovirus type 2) 재조합 바이러스를 제공할 수 있다.

[0006] 또한 본 발명의 목적은 PCV2 감염 질환 예방용 백신 조성물을 제공할 수 있다.

[0007] 또한 본 발명의 목적은 PCV2의 진단 키트를 제공할 수 있다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은 PCV2 검출 방법을 제공할 수 있다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은 PCV2 감염 질환의 예방을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 목적은 PCV2(Porcine circovirus type 2) 재조합 바이러스를 제공할 수 있다.

[0011] 또한 본 발명의 목적은 PCV2 감염 질환 예방용 백신 조성물을 제공할 수 있다.

[0012] 또한 본 발명의 목적은 PCV2의 진단 키트를 제공할 수 있다.

[0013] 또한 본 발명의 목적은 PCV2 검출 방법을 제공할 수 있다.

[0014] 또한 본 발명의 목적은 PCV2 감염 질환의 예방을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 PCV2 재조합 바이러스는 종래 Single-stranded DNA virus인 PCV2가 세포에 극도로 적게 증식되는 단점을 극복한 것으로, double-stranded DNA 형태로 재조합되어 생산의 효율성이 증대된 효과가 있다. 또한, 항체 형성 유도 효과가 우수한 바, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 재조합 PCV2b C5 분리 및 재조합 PCV2b C5 제조를 모식화한 도이다.
- 도 2은 본 발명의 PCV2b C5 계통수를 분석한 도이다.
- 도 3는 재조합 PCV2b C5 바이러스를 처리한 군에서 면역 조직 화학 염색한 결과를 확인한 도이다.
- 도 4는 본 발명이 PCV2b C5의 백신 접종에 대한 생체 내 항체 생성 유도효과를 비교 평가한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2(Porcine circovirus type 2) 재조합 바이러스를 제공한다.
- [0018] 상기 PCV2는 PCV2a, PCV2b, PCV2c 및 PCV2d로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아형이고, 바람직하게는 PCV2b 아형이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에서 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열은 프로모터와 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절 인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0022] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al.(2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0023] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 E. coli(예컨대, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, E. coli 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C.(1984), J. Bacteriol., 158:1018-1024) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(pL λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D.(1980), Ann. Rev. Genet., 14:399-445)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0024] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 유전체로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 사 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0025] 본 발명의 벡터는 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 필요에 따라 다른 서열과 융합될 수도 있으며, 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 발현 벡터는 선택 표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카바니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0026] 또한 본 발명의 P1-2A-3C 재조합 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입된 세포(KCCM11561P)는 다양한 방법으로 도입되며, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al.(1973), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al.(1973), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114; 및 Hanahan, D.(1983), J. Mol. Biol., 166:557-580) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al.(1988), Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145) 등

에 의해 실시될 수 있다.

- [0027] 상기 PCV2 재조합 바이러스는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시될 수 있으며, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 유전자로서 사용될 수 있는 핵산분자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터가 도입된 재조합 세포를 제공한다.
- [0029] 상기 재조합 세포는 필요 시 배양할 수도 있으며, 본 발명에서 용어 "배양"은 미생물/세포를 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명의 재조합 세포는 통상의 배지에서 생육 가능하며, 특정 미생물/세포를 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물/세포가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.
- [0031] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로스의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.
- [0032] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는, PCV2 감염 질환 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0035] 상기 PCV2 감염 질환은 전신성 소모성 증후군(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), 가성 광견병(pseudorabies), 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS), 글래스병(Glasser's disease), 연쇄구균성 수막염(streptococcal meningitis), 살모넬라증(salmonellosis), 이유후 대장균증(postweaning colibacillosis), 식이성 간증(dietetic hepatosis) 및 화농성 기관지폐렴(suppurative bronchopneumonia)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 상기 백신 조성물은 용매, 면역증강제(adjuvant) 및 부형제로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다.

- [0037] 상기 백신 조성물은 생백신, 약독화 백신 및 사독 백신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 용어, "면역증강제(adjuvant)"란 항원성을 높여 백신의 개발에 이용되거나 항원에 대한 비특이적 면역반응을 증강시켜 치료 및 예방 등에 이용될 수 있는 소재이다. 면역보조제는 항원량이 적을 때 항원에 대한 면역반응을 신속하고 강력하게, 그리고 장기간 유지시켜 주는 역할을 하기 때문에 백신을 제조할 때 사용되며, 특별한 면역보조제를 사용하거나 항원의 양을 다르게 하여 면역반응을 조절하거나 항원에 대한 항체의 종류, 아형 등을 조절할 수 있게 한다. 면역보조제의 사용은 백신의 효능을 증대시킬 수 있고, 광범위한 바이러스 감염 병으로부터 보호할 수 있다. 본 발명의 목적 상, PCV2 감염 질환을 일으키는 바이러스이며, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명에서 용어 "백신"은 생체에 면역을 주는 항원성 물질을 함유한 생물학적인 제제로서, 구제역의 예방을 위하여 생물체에 주입 또는 주사하여 생체에 면역이 생기게 하는 면역원을 말한다.
- [0040] 본 발명의 백신은 동물, 바람직하게는 우제류의 동물용일 수 있으며, 보다 바람직하게는 소 또는 돼지일 수 있다. 가장 바람직하게는 돼지용일 수 있다. 그러나 동물의 종류는 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명은 백신 조성물 이외에도 약학 조성물을 포함할 수 있으며, 텍스트란 중합 나노 입자 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 백신 조성물 또는 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0043] 본 발명의 백신 조성물 또는 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0044] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 백신 조성물 또는 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 근육, 피하, 복강, 정맥, 경구, 진피, 안구 및 뇌 내에 의해 투여될 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 백신 조성물 또는 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 백신 조성물 또는 약학 조성물 중 포함되는 텍스트란 중합 나노 입자의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2 재조합 바이러스를 포함하는, PCV2의 진단 키트를 제공한다.

- [0049] 상기 진단 키트는 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0050] 이러한 진단 키트는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열 중 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 PCV2 재조합 바이러스 또는 이의 항원뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함된다. 이러한 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 PCV2 재조합 바이러스를 검출하는 단계를 포함하는, PCV2 검출 방법을 제공한다.
- [0053] 상기 바이러스에 이의 항원을 더 포함할 수 있으며, 항원-항체 반응을 통해 감염될 또는 감염된 세포 내에서 PCV2를 검출할 수 있다. 상기 항원-항체 반응은 조직면역염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴블롯(Western Blotting), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산분석법(Immunodiffusion Assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence-activated cell sorter) 및 단백질칩(protein chip) 분석법으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법을 이용할 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, PCV2 감염 질환의 예방을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0056] 상기 포유류는 돼지, 소, 박쥐, 붉은 여우, 스컹크, 너구리, 오소리, 개, 늑대, 몽구스, 코요테, 흰족제비, 개 및 고양이로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이고, 바람직하게는 돼지이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 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.
- [0060] **<준비예 1> PCV2b C5 바이러스 제작**
- [0061] <1-1> 재조합 PCV2b C5 컨스트럭션(construction)
- [0062] PCV2 C5는 Porcine circovirus(PCV) 2로부터 분리하였다(도 1의A). PCV2의 conserve된 시퀀스를 이용하여 프라이머를 제작하였고, PCR증폭을 진행하였다. T-blunt를 이용하여 클로닝을 진행하였고 염기서열 분석을 통해 전장 유전체를 분석한 후 Clone C5로 명명하였다.
- [0063] 원형(Circular) 형태의 PCV2b C5를 제작하기 위해, Replicase의 염기서열을 일부 변형하여 *Sal*I site를 만들어 준 후 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 T-blunt를 이용하여 클로닝하였다. 그 후, *Sal*I로 잘라 준 후, self ligation을 통해 원형 형태의 재조합 PCV2b C5를 제작하였다(도 1의 B).
- [0065] <1-2> 재조합 PCV2b C5의 형질감염(Transfection)
- [0066] PK-15 세포는 96-well plate에 5×10^4 Cells/ml로 준비하였다. Self-ligation을 통해 제조된 원형 형태의 재조합 PCV2b C5는 PK-15 세포주에 리포펙타민 3000(lipofectamine 3000)을 이용하여 형질감염하였다. 형질감염 6시간 후 새로운 Media로 바꿔주었고 2일 후 재조합 PCV2 C5의 staining을 진행하였다.

[0068] <준비에 2> 재조합 PCV2b C5의 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

[0069] Transfection 2일 후, PK-15는 10% Formalin으로 고정되었다. PBS를 이용하여 10% Formalin을 제거한 후 0.2% TritonX100을 이용하여 permeabilization시켜준다. 다시 PBS로 씻어 준 후, PCV2 항체를 처리한 후 4℃에서 밤새 보관하였다. 다음 날, PBS를 이용하여 PCV2 항체를 제거한 후 Goat anti mouse(2차 항체)를 상온에서 1시간 처리한다. 그리고 DAB 염색을 진행하였다.

[0071] <준비에 3> PCV2b C5 불활화 백신의 효능 평가

[0072] 불활화 백신의 효능을 평가하기 위하여 제조된 PCV2b C5 불활화 백신 (105.5 TCID₅₀/ml) 1 ml을 기니 피그에 피하 접종하였다. 백신의 효능을 비교평가하기 위하여 시판중인 종래 백신과 항체 생성량을 ELISA 방법으로 비교하였다. 항체 생성량은 Sandwich indirect ELISA 방법을 사용하였으며, PCV2 mAb 항체 10μg/ml을 37℃에서 2시간 동안 ELISA plate에 코팅한 후 PBST(Tween20 0.05%) 300μl로 5 번 세척하였다. 비특이적 결합을 최소화 하기 위하여 3% skim milk 200μl를 사용하여 37℃에서 2시간동안 반응시켰다. PBST 300μl를 사용하여 5 회 세척한 후 본 발명의 PCV2b C5 항원을 각각 1/10희석하여 100ul씩 분주하여 코팅하였다 (1/10dose/ml, 37℃, 2시간). 다시 PBST 300μl를 사용하여 5 회 세척한 후, 기니 피그 혈청을 1:50 희석하여 최종 100μl의 혈청을 37℃에서 2시간 반응시켰다. 비특이적 반응은 PBST 300μl를 사용하여 5 회 세척한 후 anti-Guinea pig-IgG HRP를 1:2000로 희석하여, 37℃에서 1시간 반응 시키고, 450nm에서 흡광도 측정하여 항체 생성량을 비교하였다.

표 1

[0073]

순번	그룹	접종량	접종방법
1	Control (PBS)	1ml	SC
2	PCV2b C5	1ml	SC
3	A company	0.5ml	SC
4	B company	0.5ml	SC
5	C company	0.5ml	SC
6	D company	1ml	SC
7	E company	1ml	SC
8	F company	1ml	SC

[0074] <실시에 1> PCV2b C5 클론의 전장 유전체 염기서열 분석

[0075] 야생형 PCV2로부터 분리된 본 발명의 PCV2 C5는 염기서열 분석을 통해 전장 유전체를 확인하였고, 이의 염기서열을 서열번호 1로 나타내었다. Clone C5에 대한 전체 유전체 분석 및 바이러스의 캡시드(Capsid)단백질의 아미노산 서열 분석을 수행하였다. 구체적으로, 아미노산 서열 분석은 Lagergene 프로그램(Dnastar Inc. WI, USA)의 Megalign clustal W 비교법을 이용하여 분석하였다. PCV2 C5의 아형 type을 확인하기위하여, GenBank database에 규명된 PCV2 아형들의 유전체 및 캡시드 서열을 비교군으로 사용하였다. 최종적으로 계통수 분석은 Megalign clustal W에서 나타난 비교 서열을 바탕으로 Megalign 프로그램의 계통수 분석을 이용하여 분석하였다.

[0076] 그 결과, 분리된 PCV2 C5는 전체 유전체 분석 및 캡시드 단백질 아미노산 서열 분석 결과, PCV2b type임을 확인하였다.

[0078] <실시에 2> 재조합 PCV2b C5의 유전체 염기서열 분석

[0079] 재조합 PCV2b C5 클론은 PCV2의 Replicase의 염기서열을 일부 변경하여 제작하였다. PCR을 통해 PCV2의 Replicase에 *Sa*I enzyme site를 삽입하였다. 그 후, *Sa*I으로 잘라 준 후, Self-ligation을 통해 재조합 PCV2b C5를 제작하였고 이의 염기 서열 분석을 수행하였다.

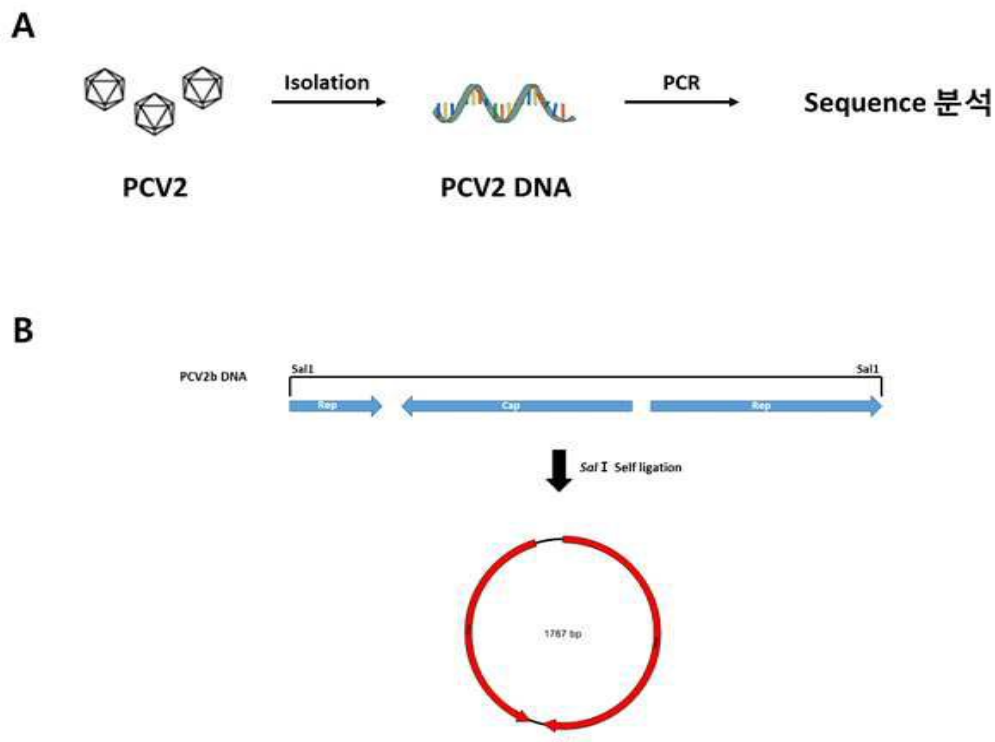
[0080] 그 결과, 본 발명의 재조합 PCV2b C5는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 확인되었다.

[0082] <실시에 3> 본 발명의 PCV2b C5 재조합 바이러스 생성 확인

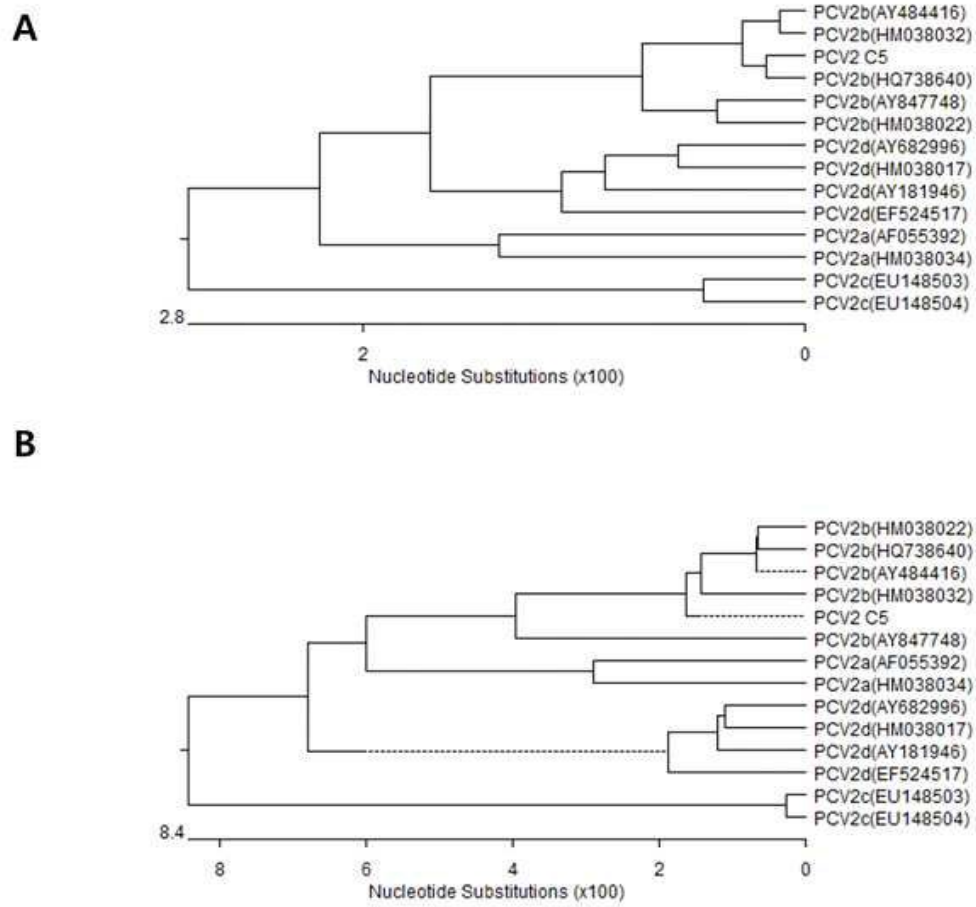
- [0083] 본 발명의 재조합 PCV2b C5 클론을 PK-15 세포에 도입하였고, 재조합 PCV2b C5 클론의 바이러스 생성이 올바르게 되었는지 확인하였다. 구체적으로, 대조군으로서 PK-15 세포 단독군, 야생형 PCV2b 바이러스 감염군, 본 발명의 재조합 PCV2b C5 클론 형질 감염군을 두어, 각 군에 PCV2b 항체를 이용하여 상기 준비예 2와 같은 면역조직화학염색(Immunohistochemistry) 방법으로 염색하였다.
- [0084] 도 3에 나타난 바와 같이, 양성 대조군으로 사용한 야생형 PCV2b C5 바이러스가 감염된 세포와 동일하게, 본 발명의 본 발명의 재조합 PCV2b C5 바이러스가 형질감염 된 PK-15 세포가 갈색으로 염색됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 재조합 PCV2b C5 바이러스가 PK-15 세포 내에서 생성됨을 확인하였다.
- [0085] 따라서, 본 발명의 PCV2b C5 재조합 바이러스는 세포 내에서 고효율로 생성됨을 확인하였다. 따라서, 종래 PCV2 바이러스 유전체가 회전-환 복제 메커니즘(rolling-circle replication mechanism)을 복제되어, 세포 내에서 극도로 적게 증식되어 생산성이 낮은 단점을 극복함을 시사한다.
- [0087] <실시예 4> 본 발명의 PCV2b C5 재조합 바이러스를 이용한 백신 효과
- [0088] 본 발명의 PCV2b C5 재조합 바이러스의 백신효과를 검증하기 위하여, 기니 피그에 PCV2b C5 불활화 백신을 접종하였고, 음성대조군으로 PBS와 비교군으로 6개의 회사에서 생산되는 종래 제품을 그룹별로 나누어 백신 접종을 진행하였다. 백신 접종 3주 후에 채혈하여, sandwich indirect ELISA 법을 이용하여 항체가를 확인하였다.
- [0089] 도 4에 나타난 바와 같이, 생체 내 항체 생성 유도효과 비교 평가한 결과, 종래 생산되는 제품과 비교하여, 본 발명의 PCV2b C5 바이러스에 대한 항체가를 확인한 결과 PCV2b C5가 비교군에 비교하여 상대적으로 높은 항체 생산 효과가 있음을 확인하였다.
- [0090] 따라서, 본 발명의 PCV2b C5 재조합 바이러스는 종래 생산 제품보다 높은 항체 생산 효과가 나타나, PCV2b 에 대한 항체 형성 유도 효과가 우수함을 시사한다.

도면

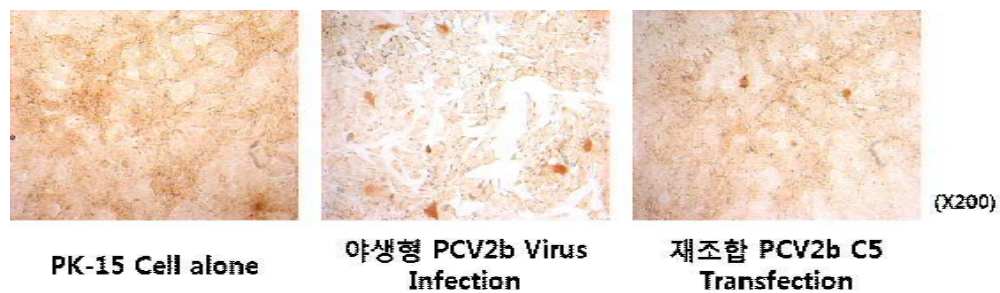
도면1



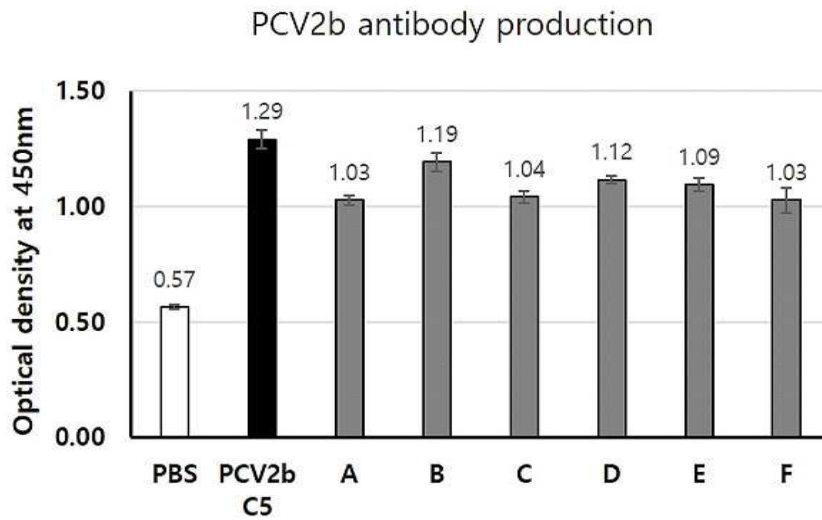
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Recombinant Porcine circovirus and vaccine composition for preventing or treating Porcine circovirus- infected disease comprising the same

<130> PN1803-099

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1767

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone C5

<400> 1

atgcccgca agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaagtg ggtgttcact 60

ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctat 120

gattatttta ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg 180

ttcgctaatt ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggtat 240

tgccacatcg agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa 300

ggcaacttac tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct 360

actgctgtga gtaccttgtt ggagagcggg agtctgtga ccgttgca gacgtaccct 420

gtaacgtttg tcagaaat 480

cagaagcgtg attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa	540
agcaaatggg ctgctaattt tgcagaccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac	600
aagtgggtggg atggttacca tggatgaagaa gtggttgtaa ttgatgactt ttatggctgg	660
ctgccctggg atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa	720
ggtggaactg tacctttttt ggcccgagcgt attttgatta ccagcaatca gacccgttg	780
gaatggtact cctcaactgc tgteccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc	840
ttggtatfff ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gtctgtcacc	900
ctttccccc catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt tttatcact	960
tcgtaatggt tttattatt cattaagggt taagtggggg gtccttaaga ttaaattctc	1020
tgaattgtac atacatggtt acacggatat tgtattcctg gtcgtttata ctgttttcga	1080
acgcagtgcc gaggcctacg tggctctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct	1140
ggtttctttt gtgttttggg tggagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg	1200
taaagtagcg ggagtggtag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagttta	1260
cataggggtc ataggtgagg gctgtggcct ttgttataaa gttatcatct agaataacag	1320
cactggagcc cactccctg tcacctggg tgatcgggga gcagggccag aattcgacct	1380
taacctttct tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg	1440
ggggaagaaa gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttttga	1500
ctgtggttcg ctgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgcat	1560
ttttcttct ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga	1620
tctggccaag atggctgcgg gggcgggtgtc ttcttctccg gtaacgcctc ctgggatacg	1680
tcatactga aaacgaaga agtgcgctgt aagtattacc agcgacttc ggcagcggca	1740
gcacctcggc agcacctcag cagcaac	1767
<210> 2	
<211> 1767	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCV2b C5	
<400> 2	
atgccagca agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaaggtg ggtgttact	60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctattt	120
gattatftta ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg	180

ttcgctaatt ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtattt gggtagccgc	240
tgccacatcg agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa	300
ggcaacttac tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct	360
actgctgtga gtaccttggt ggagagcggg agtctggtga ccgttgacaga gcagtaccct	420
gtaacgtttg tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg	480
cagaagcgtg attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa	540
agcaaatggg ctgctaattt tgcagaccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac	600
aagtgtggg atggttacca tggtaagaa gtggttgta ttgatgactt ttatggctgg	660
ctgccctggg atgatctact gagactgtgt gatcgatgc cattgactgt agagactaaa	720
ggtggaactg tacctttttt ggcccgcagt attttgatta ccagcaatca gaccccgttg	780
gaatgtgact cctcaactgc tgtccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc	840
ttggtatttt ggaagaatgc tacagaacag tcgacggagg aagggggcca gttcgtcacc	900
ctttccccc catgccctga atttcataa gaaataaatt actgagtctt tttatcact	960
tcgtaatggt ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtccttaaga ttaaattctc	1020
tgaattgtac atacatggtt acacggatat tgtattcctg gtcgtttata ctgttttcga	1080
acgcagtgcc gaggcctacg tggctctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct	1140
ggtttctttt gttgtttggt tggaagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg	1200
taaagtagcg ggagtggtag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagttta	1260
cataggggtc ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag	1320
cactggagcc cactccctg tcacctggg tgatcgggga gcagggccag aattcgacct	1380
taacctttct tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg	1440
ggggaagaaa gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgtttga	1500
ctgtggttcg ctgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgcat	1560
ttttccttct ccagcgttaa cggtagcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga	1620
tctggccaag atggctgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg	1680
tcatactga aaacgaaaga agtgcgctgt aagtattacc agcgacttc ggcagcgga	1740
gcacctggc agcacctcag cagcaac	1767