



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월08일
 (11) 등록번호 10-1627623
 (24) 등록일자 2016년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/145 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0103343
 (22) 출원일자 2013년08월29일
 심사청구일자 2013년09월03일
 (65) 공개번호 10-2015-0027882
 (43) 공개일자 2015년03월13일
 (56) 선행기술조사문헌
 [논문] JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY*
 BLAST 검색: 서열번호1*
 WO2010092477 A1*
 KR1020110083126 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
송대섭
 대전 유성구 반석동로 33, 502동 501호 (반석동, 반석마을5단지아파트)
나운성
 충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 111, 603동 303호 (오송호반베르디움아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 9 항

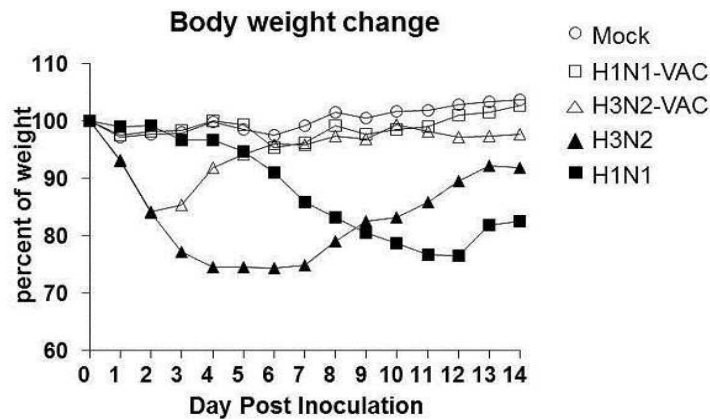
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **이종 인플루엔자 바이러스에 대한 백신 조성물**

(57) 요약

본 발명은 이종 인플루엔자 바이러스에 대하여 효과를 나타내는 백신조성물에 관한 것으로, H3N1 CIV 백신의 경우 이종 인플루엔자 바이러스에 의한 질환의 감염 및 전염을 동시에 예방 또는 치료 할 수 있으므로, 유행성이 강한 인플루엔자 바이러스의 방역에 효과적으로 이용될 수 있고, 이에 따라 보건산업의 발전에 크게 이바지 할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
홍민기
 대전 서구 청사로 282, 12동 603호 (둔산동, 수정
 타운)
염민주
 경기 수원시 권선구 매송고색로691번길 9, 207동
 1204호 (고색동, 태산아파트)

김상현
 충북 청원군 오창읍 오창중앙로 32, 212동 601호
 (중앙하이츠아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 BGM0021213
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 신종인플루엔자 범 부처 사업단
 연구사업명 신종인플루엔자 범 부처사업단 연구개발사업
 연구과제명 반려동물의 인플루엔자 바이러스 감염양상 및 중간감염 기전연구
 기 여 율 1/2
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2012.11.01 ~ 2013.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM3121322
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 기초기술연구회
 연구사업명 주요사업(연구개발과제)
 연구과제명 인플루엔자 팬더믹 대응기반연구
 기 여 율 1/2
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열의 헤마글루티닌 유전자(HA) 및 서열번호 2의 염기서열의 뉴라미다아제 유전자(NA)를 포함하는 H3N1 혈청형의 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는 H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스(H3N2 Canine Influenza Virus) 및 유행성 H1N1 바이러스(pandemic H1N1 Virus)에 의한 인플루엔자 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 H3N1 혈청형의 인플루엔자 바이러스는 수탁번호 KCTC12440BP를 갖는 것인 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

알루미늄 하이드록사이드 겔 또는 오일을 추가적으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 백신은 생독 백신, 사독 백신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 백신 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 백신은 사독 백신인 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 H3N1 혈청형의 인플루엔자 바이러스는 서열번호 1의 염기서열 또는 그와 99% 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는 헤마글루티닌 유전자(HA), H3형을 갖는 HA 유전자가 코딩하는 단백질 또는 이의 단편, H3형을 갖는 HA 유전자의 단편, 서열번호 2의 염기서열 또는 그와 99% 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는 뉴라미다아제 유전자(NA), N1형을 갖는 NA 유전자가 코딩하는 단백질 또는 이의 단편, N1형을 갖는 NA 유전자의 단편 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것인, 백신 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항의 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하여 H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스(H3N2 Canine Influenza Virus) 및 유행성 H1N1 바이러스(pandemic H1N1 Virus)에 의한 인플루엔자 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 9

서열번호 1의 염기서열의 헤마글루티닌 유전자(HA) 및 서열번호 2의 염기서열의 뉴라미다아제 유전자(NA)를 포함하는 H3N1 혈청형의 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스(H3N2 Canine Influenza Virus) 및 유행성 H1N1 바이러스(pandemic H1N1 Virus)에 의한 인플루엔자 감염증 예

방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스(H3N2 Canine Influenza Virus) 및 유행성 H1N1 바이러스(pandemic H1N1 Virus) 에 의한 인플루엔자 바이러스의 감염증은 간헐적 호흡곤란, 점액성의 비강분비물 배출, 부비강염, 발작적 천식, 중이염, 기관지염, 폐렴 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인, H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스(H3N2 Canine Influenza Virus) 및 유행성 H1N1 바이러스(pandemic H1N1 Virus) 에 의한 인플루엔자 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 이종 인플루엔자 바이러스에 대하여 효과를 나타내는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)는 오소믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)에 속하는 단쇄, 나선형 RNA 바이러스로 8개의 유전자 분절을 포함하고, 핵산의 구성에 따라 A, B, C 형으로 구분된다. A 형 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 중 가장 독력이 강하며 표면항원인 헤마글루티닌 유전자(hemagglutinin, HA)와 뉴라미다아제 유전자(neuraminidase, NA)에 의해서 아형(subtype)이 결정되는데, H 혈청형과 N 혈청형이 있다.

[0003] HA 는 15가지 아형(H1 내지 H15)이 있고, NA는 9가지 아형(N1 내지 N9)이 있으며, 이 중 세가지 HA(H1, H2, H3)와 두 가지 NA(N1, N2)가 주로 사람에게 발생한다. 또한 B형 인플루엔자는 A 형보다 경미한 증상을 나타내며, 주로 아이들에게서 발생하고, 오직 사람에게서만 발생한다. C 형 인플루엔자 바이러스는 대부분 증상이 없고, 사람에게 감염된 예가 거의 없으며, 유행과도 관련이 없다. 개 인플루엔자 바이러스의 아형으로 H1N1(Lin et al., 2011), H3N8(Crawford et al., 2005), H3N2(Song et al., 2008), H5N1(Songserm et al., 2006) 그리고 H5N2(Zhan et al., 2011)이 보고되어 있다. 개 인플루엔자 바이러스는 신종 바이러스로서 개에서 현재 백신이나 자연 면역이 되어 있지 않은 상태이므로, 모든 종과 연령에서 감수성이 있는 바이러스로, 급성 호흡기 질환을 야기하는 개 인플루엔자 바이러스는 심한 기침, 열, 비강의 분비물 등의 임상증상을 가진다.

[0004] 인플루엔자는 인수 공통 전염병으로서, 인플루엔자 바이러스는 변이성이 크고 한 종에서 다른 종으로 바로 전파될 수 있는 가능성을 가지고 있어, 고병원성 인플루엔자의 세계적인 전파를 해결하는 일이 큰 과제로 떠오르고 있다. 하지만 인플루엔자 바이러스가 관계없는 전혀 새로운 종에 전파되는 것은 몇몇의 보고 사례가 있지만 흔한 일은 아니다.

[0005] 인플루엔자 바이러스의 종간 전염은 2 가지 기본적인 메커니즘이 가능하다. 한 가지는 근본적으로 변하지 않는 바이러스가 한 종으로부터 다른 종으로 직접 전염되는 것이다. 이러한 메커니즘의 예는 조류 인플루엔자 바이러스의 H5N1 아형에 의한 인간 감염 사례와 스페인 독감으로 알려진 1918년의 세계적인 유행병이 있다. 다른 메커니즘은 인플루엔자의 단편화된 유전자 특성의 결과이다. 다른 종들로부터 온 바이러스들로 숙주를 동시에 감염(coinfection)시키면 단편화된 바이러스 유전자의 재조합 및 다른 종들을 감염시키는 능력을 지닌 재조합체를 발생시킬 가능성이 있다. 예를 들어, 조류 및 인간 인플루엔자 바이러스 들 사이의 유전자 재조합에 의해 발생된 신규 바이러스들은 1957년과 1968년에 전세계적인 인간 인플루엔자 유행병을 일으켰다.

[0006] 이러한 인플루엔자 바이러스는 치사율이 다양하고, 치명적인 특성 때문에 감염의 예방이 중요하고, 특히 다양한 아형의 변종이 발생할 수 있어, 하나의 백신으로도 이종의 바이러스에 대한 감염의 예방 및 치리가 가능한 백신의 개발을 통해 인플루엔자 바이러스의 확산을 신속히 방지할 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 최근 새롭게 분리한 H3N1 바이러스를 유효성분으로 포함하는 백신의 경우 이종 바이러스에 대하여 감염 예방 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 1008505450000

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 이종(heterologous) 인플루엔자 바이러스에 의한 감염 질환을 동시에 예방 또는 치료할 수 있는 백신 조성물, 상기 조성물을 개체에 부여하여 이종(heterologous) 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법 및 검정 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열의 헤마글루티닌 유전자(HA) 및 서열번호 2의 염기서열의 뉴라미다아제 유전자(NA)를 포함하는 H3N1 혈청형의 인플루엔자 바이러스, 상기 바이러스의 항원 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 이종(heterologous) 인플루엔자 바이러스에 대한 백신 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하여 이종(heterologous) 인플루엔자 바이러스의 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0012] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열의 헤마글루티닌 유전자(HA) 및 서열번호 2의 염기서열의 뉴라미다아제 유전자(NA)를 포함하는 H3N1 혈청형의 인플루엔자 바이러스, 상기 바이러스의 항원 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0014] 상기 H3N1 혈청형의 개 인플루엔자 바이러스(Canine Influenza Virus, CIV)는 호흡기 이상, 기침, 열, 비강 분비물의 증상을 나타내는 개의 분비물로부터 분리되었다. 상기 분비물로부터 CIV-특이적 실시간 PCR(Real Time-PCR, RT-PCR)과 헤마글루티닌(HA)과 뉴라미다아제(NA)의 염기서열 분석을 실시하여 H3N1 아형의 개 인플루엔자 바이러스(H3N1 CIV)를 동정하였다.

[0015] H3N1 CIV의 각각의 유전자 단편의 뉴클레오티드 서열을 BioEdit program v.7.0.5.3(ha11, 1999)를 이용하여 분석하고, GenBank에 개시된 인플루엔자 바이러스의 서열과 비교하였다.

[0016] 상기 H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010)의 헤마글루티닌 유전자(HA)는 서열번호 1의 염기서열을 가지고, H3N2 개 인플루엔자 바이러스(A/canine/Korea/GCVP01/2007, EU127500)와 99.6% 상동성을 가지며, 뉴라미다아제 유전자(NA)는 서열번호 2의 염기서열을 가지고, H1N1 유행성(pandemic) 인플루엔자 바이러스(A/Finland/631/2009, HQ247664)와 99.9% 상동성을 가져, H3N1 아형으로 동정되었다.

[0017] 또한, 상기 H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010)의 중합효소 1 단백질 유전자(Polymerase basic protein 1, PB1), 중합효소 2 단백질 유전자(PB 2), 중합효소 단백질 유전자(Polymerase, PA), 핵단백질 유전자(nucleoprotein, NP), 매트릭스 단백질 유전자(matrix, M) 및 비구조성 단백질 유전자(nonstructural, NS)는 러시아, 스페인, 말레이시아, 한국, 캘리포니아 및 중국에서 분리된 유행성 H1N1 바이러스와 99% 이상의 상동성을 가진다.

[0018] H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010)는 2013년 7월 5일 자료 한국생명공학연구원 생물자원센터(KRIBB)에 기탁하여, KCTC 12440BP의 수탁번호를 부여받았다.

[0019] 상기 H3N1 혈청형의 개 인플루엔자 바이러스는 바람직하게는 수탁번호 KCTC12440BP를 갖는 것 일 수 있다.

[0020] 상기 H3N1 CIV를 포함하는 백신 조성물을 개체에 투여하는 경우, 이종의 항원, 특히 H3N2 개 인플루엔자 바이러스와 H1N1 유행성(pandemic) 인플루엔자 바이러스 모두에 대하여 면역성을 형성할 수 있어, 다양한 아형이 발생하는 인플루엔자 바이러스에 의한 질병을 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

- [0021] 상기 이종(heterologous) 인플루엔자 바이러스는 아형이 상이한 인플루엔자 바이러스를 의미하고, 바람직하게는 HA 유전자가 H3형 이거나, NA 유전자가 N1 형을 갖는 아형의 인플루엔자 바이러스를 모두 포함한다. 본 발명의 백신이 가장 최적의 효과를 나타내는 바이러스는 H3N2 혈청형 개(Canine) 인플루엔자(Influenza) 바이러스(A/canine/Korea/CGVP01/2007; 이하 H3N2)와 유행성(pandemic) H1N1 바이러스(A/California/04/2009; 이하 H1N1) 일 수 있다.
- [0022] 상기 항원은 바이러스 구성성분 중 바이러스에 대항하는 면역반응을 일으킬 수 있는 임의의 면역원성 단백질 또는 펩티드를 포함하는 것으로, 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열 또는 그와 99% 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는 헤마글루티닌 유전자(HA), H3형을 갖는 HA 유전자가 코딩하는 단백질 또는 이의 단편, H3형을 갖는 HA 유전자의 단편, 서열번호 2의 염기서열 또는 그와 99% 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는 뉴라미다아제 유전자(NA), N1형을 갖는 NA 유전자가 코딩하는 단백질 또는 이의 단편, N1형을 갖는 NA 유전자의 단편 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.
- [0023] 상기 상동성이란 야생형(wild type) 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 단백질의 경우 본 발명의 헤마글루티닌 또는 뉴라미다아제 단백질의 아미노산 서열과 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상 동일할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 일반적으로, 단백질 상동물은 목적 단백질과 동일한 활성 부위를 포함할 것이다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.
- [0024] 상기 백신 조성물은 추가적으로 용매, 면역증강제(adjuvant), 부형제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 더 포함할 수 있다. 상기 용매로는 생리식염수 또는 증류수가 있고, 면역증강제로는 프로인트항원보강제(freund's adjuvant), 알루미늄 하이드록사이드 겔, 및 식물성 및 광물성 오일 등이 있고, 부형제로는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포타슘 설페이트 등이 있으나 이에 한정되지 않고 본 발명이 속하는 분야에서 통상적으로 백신 제조에 사용하는 물질을 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서 백신 조성물 전체에 대하여 알루미늄 하이드록사이드 겔 10 중량%를 H3N1 CIV와 혼합하여 백신 조성물을 제조하였다.
- [0026] 상기 백신은 약독화된 생독 백신, 사독 백신, 서브유닛 백신(subunit vaccine), 합성 백신(synthetic vaccine), 유전공학 백신(genetic engineering vaccine) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있으나, 효과적으로는 바이러스를 불활성화 시킨 사독백신이 바람직하다.
- [0027] 상기 생독 백신은 살아있는 바이러스 활성 성분을 포함하는 백신을 의미하고, 상기 약독화(attenuation)란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고 면역체계만을 자극해서 면역원성을 유도하는 것을 의미한다. 바이러스의 약독화는 자외선(UV) 조사, 약품처리 또는 시험관 내 고차 연속 계대배양에 의해 달성될 수 있다. 약독화는 또한 명확한 유전 변화를 만듦으로써, 예를 들어 독성을 제공하는 것으로 알려진 바이러스 서열의 특정 결실 또는 바이러스 게놈 내로의 서열의 삽입에 의해 달성될 수 있다.
- [0028] 상기 사독 백신은 불활화 백신 또는 사균 백신이라고도 하며, 죽은 바이러스를 포함하는 백신이다. 이의 예로는 전 바이러스 백신(whole-virus vaccine)과 분할 백신(split vaccine)이 있다.
- [0029] 상기 사독 백신의 제조방법은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 이용되는 바이러스의 불활성화 방법으로 제조할 수 있고, 일 예로 바이러스 전체에 포름알데히드(formaldehyde)를 처리하는 방법으로 바이러스를 불활성화시킬 수 있고, 분할 백신은 바이러스에 에테르를 처리하여 외피만을 분쇄, 수득하여 제조할 수 있다.
- [0030] 상기 서브유닛 백신은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 바이러스 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다. 일 예로, 개 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 추출하여 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 합성 백신은 바이러스의 항원 또는 항원 결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산한 펩타이드를 포함한 백신을, 일 예로 인플루엔자 바이러스의 HA 및/또는 NA 단백질을 합성하여 백신으로 사용할 수 있다.
- [0032] 유전공학 백신은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거하여 제조한 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 백신은 이종(heterologous) 인플루엔자 바이러스에 대하여 면역 및 예방 효과를 가지므로, 본 발명의

백신을 개체에 접종하는 경우 H1N1 혈청형 유행성 인플루엔자 바이러스와 H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스 모두에 대하여 질병의 예방 또는 치료 효과를 동시에 얻을 수 있다. 따라서 다양한 아형이 존재하는 인플루엔자 바이러스에 의한 질병의 감염 및 전염을 빠르게 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

- [0034] 본 발명의 백신 조성물은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있고, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액 제로 제조하며, 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 비강 또는 경막 외(eidural) 경로로 투여할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 백신 조성물은 H1N1 혈청형 유행성 인플루엔자 바이러스와 H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스에 감염될 수 있고, 다른 종의 개체에도 전파시킬 수 있는 모든 종류의 포유류, 특히 가금류 및 사람에게도 이용할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 이중 인플루엔자 바이러스에 대한 백신 조성물은 하기의 단계를 포함하여 제조될 수 있다. 구체적으로, H3N1 CIV를 중바이러스로 하여, 원심분리를 통해 가라앉은 펠릿(pellet)을 재부유시켜 바이러스를 정제하는 단계, 상기 정제된 바이러스 처리하여 불활화하는 단계, 상기 불활화된 바이러스를 수득하는 단계를 통해서 제조될 수 있다.
- [0037] 상기 불활화 단계는 농도 0.005 내지 0.2(v/w)% 포르말데히드, BEI 또는 BPL로 처리하여 바이러스를 불활화시킬 수 있고, 상기 바이러스 수득단계는 원심분리, 여과, 또는 수산화알루미나 겔에 흡착시키는 방법으로 수행될 수 있으나, 상기 백신의 제조 방법은 공지된 방법을 채택하거나, 또는 일부 수정을 가하여 실시할 수 있다.
- [0038]
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하여 이중(heterologous) 인플루엔자 바이러스의 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0040] 상기 인플루엔자 바이러스 감염 질환이란 인플루엔자 바이러스의 감염으로 유발되는 질환으로서 대표적으로 호흡기 질환이 있고, 구체적인 감염으로 유발되는 질환으로 간헐적 호흡곤란, 점액성의 비강분비물 배출, 부비강염, 발작적 천식, 중이염, 기관지염, 폐렴 또는 이들의 조합 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 상기 개체란 인플루엔자 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물을 개체에 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [0042] 예를 들어, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 인플루엔자 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자 바이러스로 감염된 닭 또는 돼지를 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물을 기존의 인플루엔자 바이러스 감염 질환 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.
- [0043] 상기 예방이란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0044] 상기 치료란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0045] 상기 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 결정될 수 있다.
- [0046] 백신이 일, 주, 월 또는 년에 걸쳐서 1 회; 또는 다르게는 2 회 이상으로 개 환자에게 투여될 수 있다. 상기 제 2 투여는 제 1 투여 이후 1 주 내지 8 주 후에 투여 될 수 있다. 상기 제 1 및 후속 투여는 예를 들어, 그 양 및/또는 형태 면에서 달라질 수 있다. 그러나, 때때로 투여는 양과 형태가 동일하다. 단독 투여만이 투여되는 경우에, 그러한 투여량 단독의 백신 투여량은 일반적으로 백신의 치료상 유효량을 포함한다. 그러나, 1 투여량을 초과하여 투여되는 경우에, 그렇게 함께 투여되는 백신의 양들은 치료상 유효량을 구성할 수 있다.

- [0047] 일 예로, 약독화된 생백신의 일반적인 투여량은 개체당 $10^{0.5}$ pfu 이상 일 수 있다. 상기 pfu는 단위체(unit)을 형성하는 플라크(plaque)를 의미한다. 사독 백신의 일반적인 투여량은 40 HA 단위체 이상 일 수 있고, 40 내지 10,000 HA 단위체 일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 마우스 한 마리당 256 HA 단위체 농도 사독 백신을 투여하였다.
- [0048] 또한, 본 발명은 발명은 서열번호 1의 염기서열의 헤마글루티닌 유전자(HA) 및 서열번호 2의 염기서열의 뉴라미다아제 유전자(NA)를 포함하는 H3N1 혈청형의 인플루엔자 바이러스, 상기 바이러스의 항원 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 이중 인플루엔자 바이러스의 검정 키트에 관한 것이다.
- [0049] 상기 항원은 바이러스 구성성분 중 바이러스에 대항하는 면역반응을 일으킬 수 있는 임의의 면역원성 단백질 또는 펩티드를 포함하는 것으로, 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열 또는 그와 99% 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는 헤마글루티닌 유전자(HA), H3형을 갖는 HA 유전자가 코딩하는 단백질 또는 이의 단편, H3형을 갖는 HA 유전자의 단편, 서열번호 2의 염기서열 또는 그와 99% 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는 뉴라미다아제 유전자(NA), N1형을 갖는 NA 유전자가 코딩하는 단백질 또는 이의 단편, N1형을 갖는 NA 유전자의 단편 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.
- [0050] 상기 이중(heterologous) 인플루엔자 바이러스는 아형이 상이한 인플루엔자 바이러스를 의미하고, 바람직하게는 HA 유전자가 H3형 이거나, NA 유전자가 N1형을 갖는 아형의 인플루엔자 바이러스를 모두 검출할 수 있다. 상기 키트는 바람직하게는 H3N2 혈청형 개(Canine) 인플루엔자(Influenza) 바이러스(A/canine/Korea/CGVP01/2007; 이하 H3N2)와 유행성(pandemic) H1N1 바이러스(A/California/04/2009; 이하 H1N1)를 검출할 수 있다.
- [0051] 상기 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원은 항원-항체 복합체 반응을 통해 감염될 또는 감염된 세포 중의 인플루엔자 바이러스를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용할 수 있다.
- [0052] 상기 검정 키트는 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약을 포함할 수 있다. 상기 도구 또는 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 가용성 담체, 불용성 담체 일 수 있다.
- [0053] 상기 항원-항체 복합체 반응은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블랏(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 단백질 칩(protein chip) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.
- [0054] 상기 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명의 H3N1 CIV 백신의 경우 이중 인플루엔자 바이러스에 의한 질환의 감염 및 전염을 예방 또는 치료할 수 있으므로, 유행성이 강하고 다양한 아형이 존재하는 인플루엔자 바이러스의 방역에 효과적으로 이용될 수 있고,

이에 따라 보건산업의 발전에 크게 이바지 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 바이러스 접종 후 마우스의 체중 변화를 나타내는 그래프이다. 그래프의 세로축은 접종 전 마우스 체중에 대한 마우스 체중의 상대값을 나타내고, 그래프의 가로축은 공격접종 후 시간의 경과(Day)를 나타낸다. 그래프에서 Mock-VAC(○)는 H3N1 CIV 백신 투여 후 생리식염수를 투여한 군이고, H1N1-VAC(□)는 H3N1 CIV 백신 투여 후 H1N1 바이러스를 공격접종한 군이며, H3N2-VAC(△)는 H3N1 CIV 백신 투여 후 H3N2 바이러스를 공격접종한 군이며, H3N2(▲)는 백신 투여 없이 H3N2 바이러스만 공격접종한 군이고, H1N1(■)은 백신투여 없이 H1N1 바이러스만 공격접종한 군을 의미한다.
- 도 2는 H3N1 인플루엔자 바이러스에 대한 HI 방어항체 수준의 변화를 나타내는 그래프 이다. 그래프에서 세로축은 H3N1 인플루엔자 바이러스에 대한 HI 방어항체 수준을 나타내고, 가로축은 공격접종 후 시간(Day)의 경과를 나타낸다. 그래프에서 H1N1은 백신 투여 없이 H1N1 바이러스만 공격접종한 군이고, H3N2는 백신 투여 없이 H3N2 바이러스만 공격접종한 군이며, Mock-VAC는 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여 후 생리식염수를 투여한 군이고, H1N1-VAC는 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여 후 H1N1 바이러스를 공격접종한 군이며, H3N2-VAC는 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여 후 H3N2 바이러스를 공격접종한 군이다.
- 도 3은 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여에 의한 H3N2 인플루엔자 바이러스의 감염성의 감소를 확인한 그래프이다. 그래프에서 세로축은 마우스(C57/BL)의 폐에 있어서 바이러스 역가(log₁₀EID₅₀/ml)를 나타내고, 그래프의 가로축은 H3N2 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 시간(Day)의 경과를 나타낸다. H3N1-VAC는 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신을 투여한 군이고, Non-VAC는 백신을 투여하지 않은 군을 나타낸다.
- 도 4는 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여에 의한 H1N1 인플루엔자 바이러스의 감염성의 감소를 확인한 그래프이다. 그래프에서 세로축은 마우스(C57/BL)의 폐에 있어서 바이러스 역가(log₁₀EID₅₀/ml)를 나타내고, 그래프의 가로축은 H3N2 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 시간(Day)의 경과를 나타낸다. H3N1-VAC는 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신을 투여한 군이고, Non-VAC는 백신을 투여하지 않은 군을 나타낸다.
- 도 5는 H3N1(A/canine/Korea/1/2010) 개 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌 유전자(HA)의 염기서열을 나타내는 도이다.
- 도 6은 H3N1(A/canine/Korea/1/2010) 개 인플루엔자 바이러스의 뉴라미다아제 유전자(NA)의 염기서열을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제공한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 동물을 대상으로 하는 모든 실험은 국립농축산검역원 및 한국농축사 위원회의 지시에 따라 수행하였다.
- [0060]
- [0061] **[실시예 1] H3N1 혈청형 개 인플루엔자 바이러스의 동정**
- [0062] 2007년부터 2010년 까지 호흡기 질환의 징후를 보이는 개의 비강 분비물시료를 총 252개 수집하였다. 상기 시료 중 인플루엔자 A형을 분리하기 위하여 CIV-특이적 RT-PCR을 Song et al. 2008에 실린 방법대로 실시하였다. 252개 시료 중 50개 시료에서 인플루엔자 A형이 확인되었고, 상기 50개 시료의 인플루엔자 바이러스에 대하여 RT-PCR과 헤마글루티닌 인코딩 유전자 및 뉴라미다아제 인코딩 유전자의 염기서열 분석을 실시하였다 그 방법은 Hoffman et al(2001)에 기재된 방법을 따랐다. 상기 분석을 실시한 결과 49개의 시료에서 H3N2 혈청형 인플루엔자 바이러스가 동정되었고, 1개의 시료에서 H3N1 혈청형 인플루엔자 바이러스가 동정되었다.
- [0063] 상기 H3N1 혈청형 인플루엔자 바이러스의 전장 염기서열 및 각 유전자 단편의 염기서열을 BioEdit program v7.0.5.3을 이용하여 분석하고, 이를 GeneBank의 공지된 서열과 비교하였다.

- [0064] 상기 H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010)의 헤마글루티닌 유전자(HA)는 서열번호 1의 염기서열을 가지고, H3N2 개 인플루엔자 바이러스(A/canine/Korea/GCVP01/2007, EU127500)와 99.6% 상동성을 가지며, 뉴라미다아제(NA) 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지고, H1N1 유행성(pandemic) 인플루엔자 바이러스(A/Finland/631/2009, HQ247664)와 99.9% 상동성을 가짐을 확인하였고, 상기 H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010)의 중합효소 1 단백질 유전자(Polymerase basic protein 1, PB1), 중합효소 2 단백질 유전자(PB 2), 중합효소 단백질 유전자(Polymerase, PA), 핵단백질 유전자(nucleoprotein, NP), 매트릭스 단백질 유전자(matrix, M) 및 비구조성 단백질 유전자(nonstructural, NS) 유전자는 러시아, 스페인, 말레이시아, 한국, 캘리포니아 및 중국에서 분리된 유행성 H1N1 바이러스와 99% 이상의 상동성을 가짐을 확인하였고, H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010)는 2013년 7월 5일자로 대한민국 대전시 유성구 과학로 125 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터(KRIBB)에 기탁하여, KCTC 12440BP의 수탁번호를 부여 받았다. 또한 VR1300035의 병원체 등록번호(KVCC)를 부여 받았다.
- [0065] 상기 분리된 H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010)를 생후 5개월 된 비글견(두 그룹, 각 그룹 당 세 마리)에 $10^{6.5}$ 50% egg infectious dose(EID₅₀)/ml씩 투여하였다. 분리된 H3N1 CIV에 감염된 개는 열, 기침, 재채기 그리고 기면 상태와 같이 전형적인 질병의 징후를 나타냄을 확인하여, 상기 분리된 H3N1 CIV의 병리학적 특징은 열, 기침, 재채기 및 기면 상태의 유지 등 입을 확인하였다.
- [0066] **[실시예 2] 백신의 제조**
- [0067] 상기에서 분리한 H3N1 CIV(A/canine/Korea/01/2010, 이하 H3N1 CIV)를 종(seed) 바이러스로 하여 $10^{5.5}$ TCID₅₀ 농도의 H3N1 CIV를 50,000g으로 1시간 동안 원심 분리하여 가라앉은 펠릿(pellet)을 인산완충식염수(Phosphate buffered saline)로 재 부유시켜 정제한 후, 0.2% 포르말데하이드(Formaldehyde)를 이용하여 불활화 시켰다. 상기 불활화된 바이러스 90 중량%와 접종을 위한 보조제(adjuvant)로서 알루미늄 하이드록사이드 겔(Aluminum hydroxide gel, Inject® Alum, Thermo scientific) 10 중량%를 혼합한 후, 이상이 없음을 확인하고 백신으로 이용하였다.
- [0068] **[실험예] 이종 바이러스에 대한 백신의 효과 확인**
- [0069] 실시예에서 제조된 백신과 6주령 마우스(C57/BL, female)를 준비하고, 백신에 대한 이종(heterologous)형 인플루엔자 바이러스로는 VR1300034의 병원체 등록번호(KVCC)를 갖는 H3N2 혈청형 개 인플루엔자 바이러스(A/canine/Korea/GCVP01/2007; 이하 H3N2)를 실험실에서 분리하여 사용하였고, 유행성 H1N1 바이러스(A/California/04/2009; 이하 H1N1)는 연세대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양 받아 실험에 사용하였다.
- [0070] 실험군으로 백신 비 투여군으로 (a)백신 투여 없이 H1N1 인플루엔자 바이러스 공격접종 군(H1N1)와 (b) 백신 투여 없이 개 H3N2 인플루엔자 바이러스 공격접종 군(H3N2)을 설정하고, 백신 투여군으로 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여 후 (c) 생리식염수 투여군(Mock), (d) H1N1 인플루엔자 바이러스 공격접종 군(H3N1-VAC) 그리고 (e) H3N2 인플루엔자 바이러스 공격접종 군(H3N2-VAC)을 설정하여 실험을 실시하였다.
- [0071] 상기 백신 투여군에 해당하는 6주령 마우스(C57/BL, female)에 대하여 상기에서 제조한 H3N1 CIV 백신을 각각 100 μ l씩 1차 근육접종(I.M.) 하였다. 2 주 후 상기 H3N1 CIV 백신을 각각 100 μ l씩 재접종 하였다. 재접종한 날로부터 2 주 후에 백신 비투여군과 백신 투여군 모두에 대하여 공격접종을 실시하였다. 공격접종 바이러스의 농도는 25% weight loss LD₅₀으로 하여, H1N1 바이러스($10^{4.25}$ EID₅₀/ml) 30 μ l, H3N2 바이러스($10^{8.75}$ EID₅₀/ml) 30 μ l를 각각의 처리군에 해당하는 마우스의 비강 내(intra-nasal)에 투여 하였다.
- [0072] 상기 공격접종 후(days post challenge, DPC) 14일 동안 체중의 변화를 확인하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0073] 또한, DPC 0, 3, 5 및 7일 경과 시점에 마우스의 혈청을 확보하여 H3N1에 대한 항체유지 정도를 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다

- [0074] 그리고, DPC 3, 5, 7일에 각각 마우스 3마리의 폐(lung)에서 공격접종 바이러스의 감염정도를 확인하여 백신 투여군(H3N1-VAC)과 백신 비투여군(Non-VAC) 간의 감염양성차이를 확인하였다. H3N2 인플루엔자 바이러스에 대한 감염양성차이는 도 3에 나타내었고, H1N1 인플루엔자 바이러스에 대한 감염양성차이는 도 4에 각각 나타내었다.
- [0075] 도 1에 나타낸 바와 같이, H3N1 인플루엔자 바이러스 백신을 투여한 군의 경우 생리식염수만 투여한 군과 동등하게 체중의 감소 현상이 나타나지 않았고, 백신의 투여 없이 공격접종한 군(CA04-H1N1 및 H3N2)에서만 공격접종 후 체중의 감소가 나타나, 백신 처리군의 체중 변화가 백신 비처리군보다 양호한 것을 실험적으로 확인하였다.
- [0076] 도 2에 나타낸 바와 같이, H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여군에서만 H3N1 인플루엔자 바이러스에 대한 HI 방어항체 수준이 유지 및 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 H3N2 CIV를 공격접종한 군에서 HI 방어항체 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였다.
- [0077] 도 3에 나타낸 바와 같이, H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여군(H3N1-VAC)의 경우 H3N2 CIV를 공격접종 시 백신을 비투여군(Non-VAC)과 비교하여 공격접종 대상 바이러스 H3N2의 감염성이 낮아진 것을 확인하였다. 이러한 감염성의 감소는 공격접종 후 시간이 경과될수록 더욱 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 상기 결과를 토대로 H3N1 CIV 백신의 투여에 의하여 마우스는 백신바이러스와 이종인 H3N2 CIV에 대해서 면역성을 갖게 됨을 알 수 있고, 따라서 H3N1 CIV 백신을 이용하여 H3N2 CIV에 의한 질병의 감염 및 전염을 예방 및 치료 할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.
- [0078] 도 4에 나타낸 바와 같이, H3N1 인플루엔자 바이러스 백신 투여군(H3N1-VAC)의 경우 유행성 H1N1 바이러스를 공격접종 시 백신 비 투여군(Non-VAC)과 비교하여 공격접종 대상 바이러스 H1N1의 감염성이 낮아진 것을 확인하였다. 이러한 감염성의 감소는 공격접종 후 시간이 경과 될수록 더욱 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 상기 결과를 토대로 H3N1 CIV 백신의 투여에 의하여 마우스는 백신 바이러스와 이종인 유행성 H1N1 바이러스에 대해서 면역성을 갖게 됨을 알 수 있고, 따라서 H3N1 CIV 백신을 이용하여 유행성 H1N1 바이러스에 의한 질병의 감염 및 전염을 예방 및 치료할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.
- [0079] 종합적으로 H3N1 인플루엔자 바이러스 백신은 접종 개체에 대하여 체중의 감소 등과 같은 부작용을 일으키지 않으면서도, 이종형인 H3N2 CIV 및 유행성 H1N1 바이러스에 대해서도 면역능을 형성할 수 있음을 확인하였다.

수탁번호

[0080]

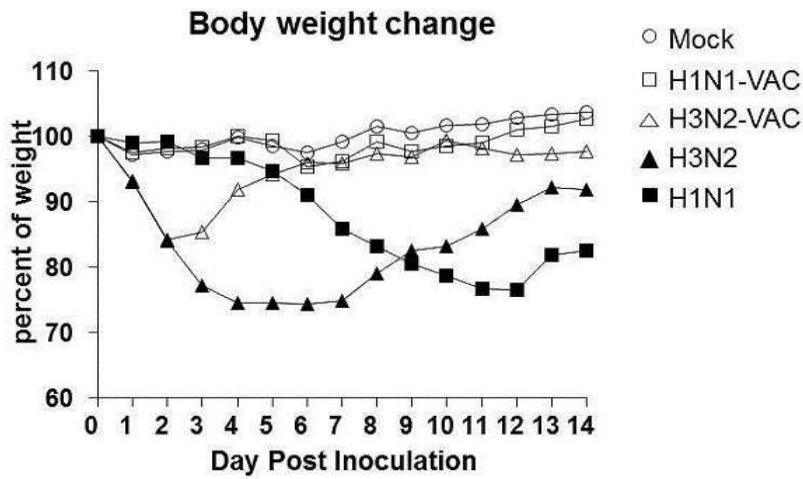
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12440BP

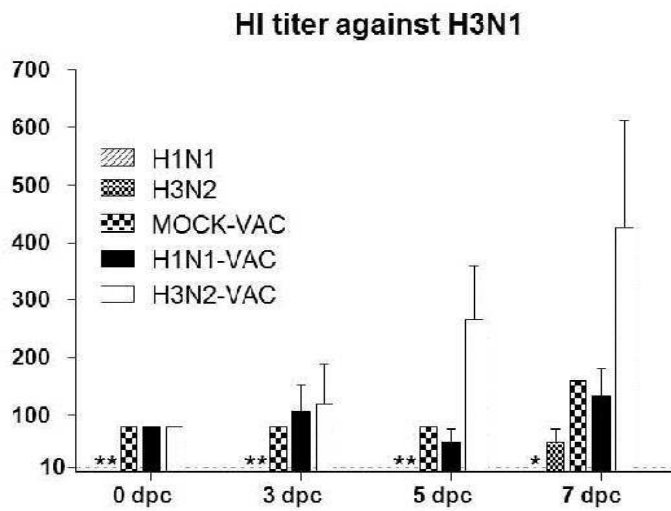
수탁일자 : 20130705

도면

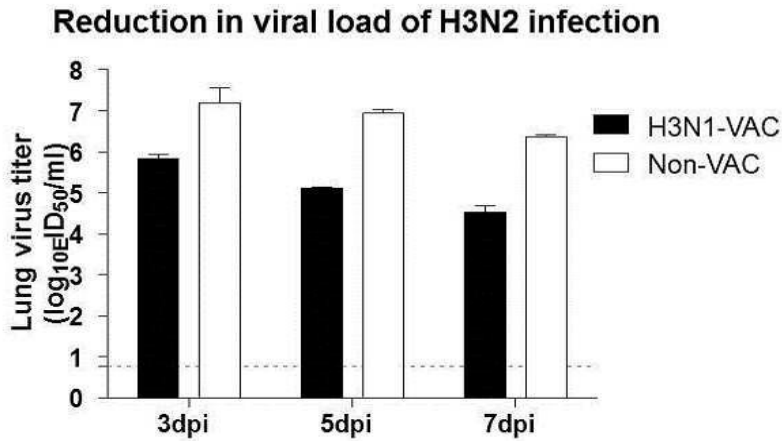
도면1



도면2

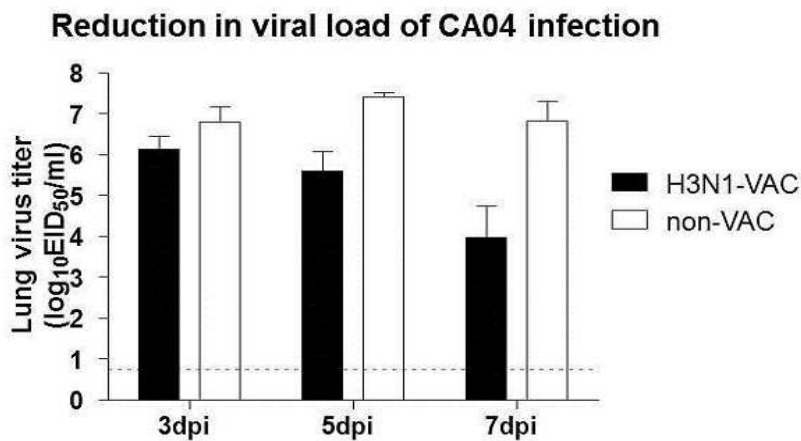


도면3



C57/BL mice were infected with canine H3N2 influenza virus at LD50 ($10^{8.75}$ EID₅₀/mL) per mouse

도면4



C57/BL mice were infected with pH1N1 influenza virus at LD50 ($10^{4.25}$ EID₅₀/mL) per mouse

도면5

atgaaaactgltattgcttfaagctacatlttctgcctggctttggtcagaaatctccaggaaatgaaaataatgctgc
 aacactatgcctgggacalcatgcagtgccgaacgggacaatagtgaaaactatcacagacgatcaaattgaggtgacca
 acgccaccgagctagtccaaaaactcctcaacagggaaaaatgcaacaatccccacaagaltcttgatgggagggactgc
 aactaatagatgccctaactaggggaccgcactgtgatgtctccaaaatgagacatgggaccttttggaacgaag
 caatgcttttagcaaltgtacccttatgatgtaccagactatgcacccctcgatccatagttgcatcatcaggacat
 tggagttcatcactgaaggttccactgggcaggagtaactcaaataaggaggagcggcttgcaaaaggggacctgct
 aatggtttctcagtagattgaattggttaactaagtacaggaaatacatatccagtggtgaatgtgactatgccaacaa
 taacaalttcgacaaatatacaltggggagttcatcacccaagcactaatcaagaacaaccagcctgtatattcagg
 cctcaggaaagagtcacagctttaccaggagaagccaacagaccataatcccaaacattggatctagaccctggtaagg
 ggccaatcggcagaataagcgtatattggacaatagcaaaactggagacgactggtataaacagfaatggaacct
 aatcgtcctcgaggctactcaaatgcccattgggaaaaactcaataatgagacagatgcaacctattgacacctgca
 ttccgaatgtatcactccgaacgggagcatcccaatgaaaagccctccaaatgtaacaagatcacatacggagca
 tgtcccaaatatgttaagcaaacacctgaaactggcaacaggaatgcggaatgcctgagaggcaaacagaggcct
 gttcggcgcaatagcagggttcatagaaaatggatgggaaggatggttagacgggttgatggcttcaggcaccaaaatt
 ccgaaaggtacaggacaagcagcagaccttaaaagcactcaggcagccattgaccagattaatgggaaattgacagagtg
 attgaaaaaacgaatgagaaagtccatcaaatcgaaaaggagtttccgaagtagaagggaggattcaagacctgagag
 atacgttgaagacacaaaaagtagatcttggcttcaaatgccgagcttctgtgctttagaaaaccagaaaaaattg
 atttaactgattcagaaatgaacaaltgftgaaaagactaggaagcaattgaggggaaaatgctgaaacatgggcaat
 ggctgcttcaagatatacccaaggtgacaaatgcttgcatagaatcattagaaaacggaactatgaccataaacatata
 tagagatgaggcagtgacaacatcgggtccagatcaaaagggttgagctaagctctggatacaagaactggtcttgga
 tttccttggccatatactctttgcttggctgtctgctgggttccaltatgtggccctgccagagaggcaaacatt
 aggtgcaacatttgcattga

도면6

atgaatccaaacaaaagataataaccattggtcgtctgtatgacaattggaatggtaacttaataatacaaatgg
 aaacataatctcagtatggattagccactcaattcaactgggaatcaaaatcagattgaaacatgcaatcaaagcgtca
 ttacttatgaaaacaacactgggtaaatacagacatagttaacatcagcaacaccaactttgctgctggacagtcagtg
 gttccgtgaaattagcgggcaattcctctctctgcctgttagtgatgggctatatacagtaaagacaacagtataag
 aatcgggtccaaggggatgtgttgcataagggaaccattcatatcatgctccccctggaatgcagaaccttctct
 tgactcaaggggcctgctaaatgacaacattccaatggaaccattaaagacaggagcccacatgaaacccaatagagc
 tgtcctattggtgaagttccctctccatacaactcaagattgagtcagtcgcttggcagcaagtgcttgcctatgatgg
 catcaattggctaacaattggaattctgcccagacaatggggcagtggtgttaaagtacaacggcataataacag
 acaactatcaagagttggagaacaacatattgagaacacaagagtctgaatgcatgtgtaaatggttcttcttact
 gtaatgaccgatggaccaagtgtatggacaggcctcacaagaatcctcagaatagaaaagggaagatagcaaatcagt
 cgaaatgaatgccctaattatcactatgaggaatgctcctgttatcctgattctagtgaaatcacatgtgtgagggg
 ataactggcatggctgaaatgaccgtgggtgtcttcaaccagaatctggaatcagataggatacatatgcagtggg
 atttcggagacaatccacgcctaataatgataagacaggcagttgtgtccagtatcgtctaattggagcaaatggagtaa
 aggattttcattcaatacggcaatggtgttggatagggagaactaaaagcattagtcaagaaacggtttgatga
 tttgggatccgaacggatggactgggacagacaataacttctcaataaagcaagatacgttaggaataaatgagtggtca
 ggatatacgggagttttgtcagatccagaactaacagggtgattgtataagaccttctctggttgaactaat
 cagagggcgacccaaagagaacacaatctggactagcgggagcagcatatcctttgtggtgtaaacagtgacactgtgg
 gttggtctggccagacggtgctgagttgccattaccattgacaagtaa

서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> VACCINE COMPOSITION FOR HETEROLOGOUS INFLUENZA VIRUS
- <130> KRIBBI-13P
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1701
- <212> DNA
- <213> HA of Influenza A Virus(canine/Korea/1/2010(H3N1))
- <400> 1

atgaaaactg ttattgcttt aagctacatt tctgcctgg cttttggtca gaatcttcca	60
ggaaatgaaa ataatgetgc aacctatgc ctgggacatc atgcagtgcc gaacgggaca	120

atagtgaaaa ctatcacaga cgatcaaatt gaggtgacca acgccaccga gctagtccaa 180

 aactcctcaa cagggaaaat atgcaacaat cccacaaga ttcttgatgg gagggactgc 240
 acactaatag atgccctact aggggacccg cactgtgatg tcttccaaaa tgagacatgg 300
 gacctttttg tggaacgaag caatgctttt agcaattgtt acccttatga tgtaccagac 360
 tatgcatccc ttcgatccat agttgcatca tcaggcacat tggagtccat cactgaaggt 420
 ttcacttggg caggagtaac tcaaaatgga ggaagcgggtg cttgcaaaag gggacctgct 480
 aatggtttct tcagtagatt gaattgggta actaagtcag gaaatacata tccagtgttg 540
 aatgtgacta tgccaaacaa taacaatttc gacaaattat acatttgggg agttcatcac 600

 ccaagcacta atcaagaaca aaccagcctg tatattcagg cctcaggaag agtcacagtc 660
 tttaccagga gaagccaaca gaccataatc ccaaacattg gatctagacc cttggttaagg 720
 ggccaatctg gcagaataag cgtatattgg acaatagtca aacctggaga cgtactggta 780
 ataaacagta atggaaacct aatcgctcct cgaggctact tcaaaatgcg cattgggaaa 840
 agtcaataa tgagatcaga tgcacctatt gacacctgca tttccgaatg tatcactccg 900
 aacgggagca tccccaatga aaagcccttc caaaatgtaa acaagatcac atacggagca 960
 tgtcccaaat atgttaagca aaacaccttg aaactggcaa caggaatgcg gaatgtcctt 1020

 gagaggcaaa ccagaggcct gttcggcgca atagcaggtt tcatagaaaa tggatgggaa 1080
 gggatggtag acggttggtg tggcttcagg caccaaaatt ccgaaggtac aggacaagca 1140
 gcagacctta aaagcactca ggcagccatt gaccagatta atgggaaatt gaacagagtg 1200
 attgaaaaaa cgaatgagaa gttccatcaa atcgaaaagg agttttccga agtagaaggg 1260
 aggattcaag accttgagag atacgttgaa gacacaaaag tagatctttg gtcttacaat 1320
 gccgagcttc ttgttgcttt agaaaaccag aaaacaattg atttaactga ttcagaaatg 1380
 aacaaattgt ttgaaaagac taggaggcaa ttgagggaaa atgctgaaga catgggcaat 1440

 ggctgcttca agatatacca caagtgtgac aatgcttgca tagaatcgat tagaaacgga 1500
 acttatgacc ataacatata tagagatgag gcagtgaaca atcggttcca gatcaaaggt 1560
 gttgagctaa agtctggata caaagactgg atcttgtgga tttcctttgc catatcatgc 1620
 tttttgcttt gtgtgtctt gctgggtttc attatgtggg cctgccagag aggcaacatt 1680
 aggtgcaaca ttgcatctg a 1701

 <210> 2
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> NA of Influenza A Virus(canine/Korea/1/2010(H3N1))

<400> 2

atgaatccaa accaaaagat aataaccatt ggttcggtct gtatgacaat tggaatggct	60
aacttaatat tacaaattgg aaacataatc tcagtatgga ttagccactc aattcaactt	120
gggaatcaaa atcagattga aacatgcaat caaagcgtca ttacttatga aaacaacact	180
tgggtaaatc agacatatgt taacatcagc aacaccaact ttgctgctgg acagtcagt	240
gtttccgtga aattagcggg caattcctct ctctgccctg ttagtggatg ggctatatac	300
agtaaagaca acagtataag aatcggttcc aaggggatg tgtttgtcat aagggaacca	360
ttcatatcat gctccccctt ggaatgcaga accttcttct tgactcaagg ggccttgcta	420
aatgacaaac attccaatgg aaccattaaa gacaggagcc cacatcgaac cctaagagc	480
tgtcctattg gtgaagtcc ctctccatac aactcaagat ttgagtcagt cgcttggca	540
gcaagtgtct gtcatgatgg catcaattgg ctaacaattg gaatttctgg cccagacaat	600
ggggcagtgg ctgtgttaaa gtacaacggc ataataacag acaactatcaa gagttggaga	660
aacaacatat tgagaacaca agagctgaa tgtgcatgtg taaatggttc ttgctttact	720
gtaatgaccg atggaccaag tgatggacag gcctcataca agatcttcag aatagaaaag	780
ggaaagatag tcaaatcagt cgaaatgaat gccctaatt atcactatga ggaatgctcc	840
tgttatcctg attctagtg aatcacatgt gtgtgcaggg ataactggca tggctcgaat	900
cgaccgtggg tgcctttcaa ccagaatctg gaatatcaga taggatacat atgcagtggg	960
attttcggag acaatccacg ccctaagat aagacaggca gttgtggtcc agtatcgtct	1020
aatggagcaa atggagttaa aggatittca ttcaaatacg gcaatggtgt ttggataggg	1080
agaactaaaa gcattagttc aagaaacggt tttgagatga tttgggatcc gaacggatgg	1140
actgggacag acaataactt ctcaataaag caagatatcg taggaataaa tgagtgtca	1200
ggatatagcg ggagttttgt tcagcateca gaactaacag ggctggattg tataagacct	1260
tgcttctggg ttgaactaat cagagggcga ccaaagaga acacaatctg gactagcggg	1320
agcagcatat ccttttggg tgtaaacagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt	1380
gctgagttgc catttaccat tgacaagtaa	1410