



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0092588
(43) 공개일자 2018년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) C12N 11/08 (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0018469
(22) 출원일자 2017년02월10일
심사청구일자 2017년02월10일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
정현도
부산광역시 해운대구 세실로 19 112동 1701 (좌동,
해운대대우1차아파트)
권우주
부산광역시 해운대구 신반송로 102 (반송동, 삼한
그린타운2차) 202동 1711호
김영철
부산광역시 사하구 낙동대로343번길 14 (당리동,
마마아파트) 601호
(74) 대리인
위병갑

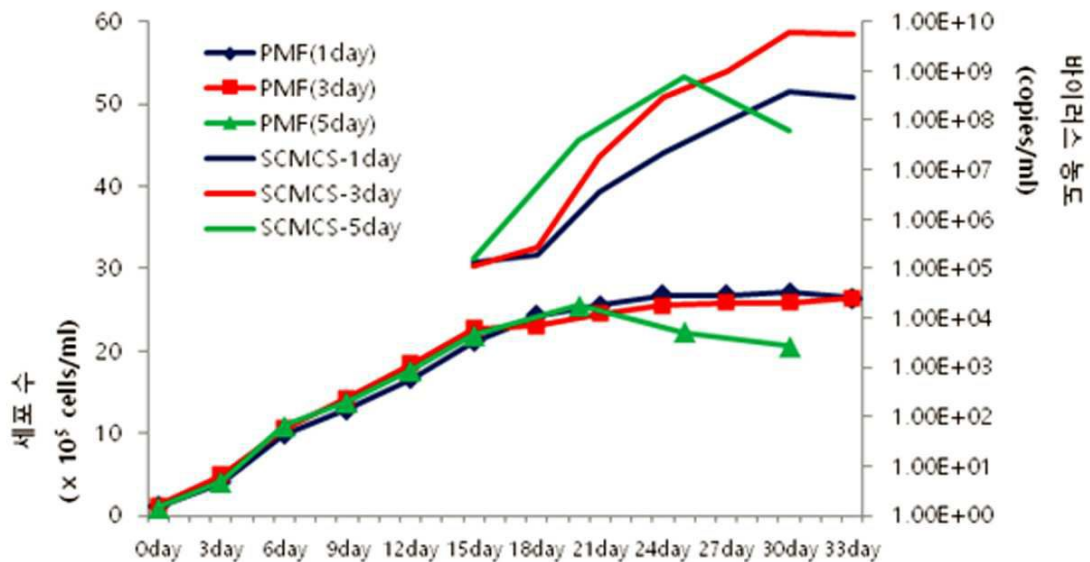
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 마이크로캐리어 비드에 부착된 세포주를 이용한 어류 바이러스 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 어류 바이러스를 마이크로캐리어에 부착된 세포주를 이용하여 고농도로 대량 생산하는 방법에 관한 것으로, 부착 배양 특성을 가진 어류 세포주들을 이용한 어류 바이러스의 고농도 생산이 어려운 점을 극복하기 위하여, 마이크로캐리어 비드에 어류 세포주들을 부착 및 scale-up하고 최적 배양 조건을 도출하여 대량 배양을 가능하게 하였으므로, 본 발명의 방법을 이용하면 협소한 공간에서도 대량의 어류 주화 세포주를 배양할 수 있고, 이를 이용해 어병 유발 바이러스를 고농도로 대량 생산할 수 있으므로, 효율적이고 안정적인 바이러스의 생산 및 백신 제조가 가능하다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

C12N 11/08 (2013.01)

C12N 11/10 (2013.01)

C12N 2500/80 (2013.01)

C12N 2710/00034 (2013.01)

C12N 2710/00051 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20130291

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 수산백신연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 제주대학교 산학협력단

연구기간 2016.09.24 ~ 2017.08.23

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 어류 주화 세포주와 마이크로캐리어 비드를 혼합하여 세포주를 마이크로캐리어 비드에 부착하는 단계;
- 2) 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화 세포주를 배양하는 단계;
- 3) 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화세포에 바이러스를 감염시키는 단계;
- 4) 상기 단계 3)의 바이러스에 감염된 어류 주화세포를 배양하는 단계; 및
- 5) 배양 상등액을 수득하고 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 어류 주화 세포주는 PMF(Pargus major fin), GF-1(Grouper fin cell), BF-2(Blue gill fry), EPC(Epithelioma papulosum cyprinid) 및 E-11(a clone of the cell line SSN-1) 세포주로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 30 내지 60rpm으로 교반하고 정지하는 과정을 1 내지 3시간 동안 반복하여 세포주를 마이크로캐리어 비드에 부착하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 어류 혈청, 어류 근육 추출물 또는 어류 난황 추출물을 배양 배지에 추가로 첨가하여 세포주를 배양하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화 세포주는 1 내지 3일 마다 배지를 교환하여 배양하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화 세포주는 30 내지 80rpm으로 교반하여 배양하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화세포에 새 마이크로캐리어 비드를 1:1 내지 1:4의 부피비로 추가하여 서브컬처(subculture)하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화세포를 작은 용량의 플라스크에서 배양한 뒤 더 큰 용량의 플라스크로 옮기면서 새 마이크로캐리어 비드를 추가하여 scale-up 서브 컬처하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 바이러스는 메갈로사이티바이러스(Iridoviridae Megalocytivirus, IMV), 바이러스성 신경성 괴사 바이러스(Viral nervous necrosis virus, VNNV) 및 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia, VHSV)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스

스 생산 방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 바이러스에 감염된 어류 주화세포를 배양하고 배양 상등액을 수득한 뒤 새로운 배지를 첨가하는 배지 교환 과정을 반복적으로 실시하는 반연속 배양(semi-continuous cell culture)인, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법.

청구항 11

제 1항의 방법으로 제조한 바이러스를 불활화한 바이러스 및 부형제를 포함하는 백신 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 부형제는 베타-글루칸(Beta-glucan), 스쿠알렌 및 수산화알루미늄, 이미퀴모드(Imiquimod), 및 베지터블 오일(vegetable oil) W/O로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인, 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 어류 바이러스를 마이크로캐리어에 부착된 세포주를 이용하여 고농도로 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세계의 Bio 산업계에서는 바이러스의 대량 생산을 위해 발효기(fermentor) 또는 생물반응기(Bioreactor)를 이용하는 것이 일반적이다. 바이러스의 대량 생산을 위해 필수적인 숙주 세포의 대량 배양을 위해서는 수십 내지 수백 리터 용량으로 scale-up할 수 있는 F-SC(Free-cell Suspension cultures) 방법이 이용되고 있다. 어류 세포주는 100여 종에 가깝게 개발되어 있으나 부착의존성을 나타내는 세포주들밖에 없으므로, 포유류의 경우와 같이 F-SC 방법으로 대량 배양을 실시하기 어려워 어류 바이러스의 대량 생산이 어려운 실정이다. 최근에 어류 바이러스의 대량 생산을 위하여 roller bottles를 이용한 방법이 활용되고 있으나 이러한 방법은 매우 많은 노동력을 요구하며 동시에 매우 비경제적인 방법인 한계가 있어왔다.

[0003] 최근 양식 산업의 발달과 함께 어류의 질병 문제는 점점 그 중요성이 커지고 있으며 질병의 관리문제의 정립 또한 그 중요성이 함께 증가하고 있다. 이러한 이유로 어류 질병에서 가장 많은 부분을 차지하는 바이러스성 질병에 대한 관리방법에 대한 수요 및 필요성이 증가하고 있다. 이러한 어류 바이러스 질병의 관리 방법 중에서 가장 중요한 것은 백신의 개발이다. 이에, 바이러스 백신의 개발을 위해서는 새로운 세포주의 대량 배양방법이 먼저 이루어져야 하며 이를 바탕으로 대량의 바이러스 생산이 경제적이고 효율적으로 이루어져야 한다.

[0004] IMV(Iridoviridae Megalocytivirus)는 참돔 이리도바이러스 질병(Red Sea Bream Iridovirus Disease, RSIVD)의 원인체이다. 그러나 양식 현장에서 약 10% 내외의 누적 폐사율을 보이는 참돔보다는 돌돔이 훨씬 높은 감수성을 나타내어 고수온기에 감염이 발생하면 90-100%의 대량 폐사가 나타난다. 이러한 메갈로사이티바이러스의 감염을 예방하기 위한 백신 개발을 위해서는 바이러스의 대량 배양이 필수적이지만, 메갈로사이티바이러스는 제한적인 어류 세포주에서만 증식하고, 계대배양에서 배양 횟수 (virus passage)가 증가함에 따라 감염력이 급격히 감소되며 (Chou et al., 1998; Imajoh et al., 2007; Nakajima and Sorimachi, 1994), 바이러스 생산이 감소하여 배양액에서의 바이러스 농도가 감소하는 현상 등이 나타나는 매우 특이적인 감염을 나타내기 때문에, 바이러스의 산업적인 생산에 많은 어려움이 있었다. 현재 Iridoviridae Megalocytivirus(IMV) 의한 질병의 치료제는 알려진 바 없으며 예방할 수 있는 유일한 방법은 백신 개발이라 할 수 있다. 특히 메갈로사이티바이러스에 가장 감수성이 높으며, 발병이 되면 매우 큰 피해를 입는 돌돔에서는 백신 개발이 어려운 실정이다.

[0005] 현재 상업화된 모든 어류 주화세포에서는 고농도 바이러스의 지속적인 배양에 어려움이 있으며, 생산된 바이러스의 농도가 낮기 때문에 (바이러스의 산업적 농축과정은 고가의 비용이 요구되므로 경제적으로 의미가 없음) 고농도 백신으로서의 개발을 할 수 없는 실정이다 (Imajoh et al., 2007; Dong et al., 2013). 그러므로 현재 메갈로사이티바이러스의 산업적인 백신 개발을 위하여서는 이러한 문제점들을 해결하는 보다 효율적이고 연속적인 고농도 바이러스의 생산법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명에서는 부착 배양 특성을 가진 어류 세포주들을 이용한 어류 바이러스의 고농도 생산이 어려운 점을 극복하기 위하여, 마이크로캐리어 비드에 어류 세포주들을 부착 및 scale-up하고 최적 연속배양 조건을 도출하여 대량 배양을 가능하게 함으로써 이들을 이용한 어병 유발 바이러스의 대량 생산을 용이하게 하고, 이를 이용하여 고농도의 백신을 제조하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 어류 주화 세포주와 마이크로캐리어 비드를 혼합하여 세포주를 마이크로캐리어 비드에 부착하는 단계; 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화 세포주를 배양하는 단계; 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화세포에 바이러스를 감염시키는 단계; 상기 바이러스에 감염된 어류 주화세포를 배양하는 단계; 및 배양 상등액을 수득하고 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법을 제공한다.
- [0008] 아울러, 본 발명은 본 발명의 방법으로 생산한 바이러스 및 부형제를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명에 따른 마이크로캐리어를 이용한 세포 배양은 부착의존적 어류 세포주를 부유 배양 가능하게 함으로써, 협소한 공간에서도 대량의 세포를 생산할 수 있으며, 세포주 및 바이러스에 따른 최적 부착 및 배양 조건을 도출함으로써 세포주 및 바이러스를 고농도로 대량 생산할 수 있으므로, 노동력과 오염 위험성이 감소하여, 효율적이고 안정적인 바이러스의 생산 및 백신 제조가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 다양한 MCB에 부착된 PMF 세포 및 부착 12일 후의 현미경 사진이다:
- A: Cytodex 1에 PMF 부착 직후;
- B: Cytodex 1에 PMF 부착 후 배양 12일 뒤;
- C: Cytodex 3에 PMF 부착 직후; 및
- D: Cytodex 3에 PMF 부착 후 배양 12일 뒤.
- 도 2는 다양한 MCB에 부착된 PMF 세포 및 부착 12일 후의 현미경 사진이다:
- A: Cultispher에 PMF 부착 직후;
- B: Cultispher에 PMF 부착 후 배양 12일 뒤;
- C: Rapidcell에 PMF 부착 직후; 및
- D: Rapidcell에 PMF 부착 후 배양 12일 뒤.
- 도 3은 MCB에 PMF 세포주를 부착하여 배양시 MCB 종류 (cytodex 1, cytodex 3, cultispher 및 Rapidcell)에 따른 생산 세포수를 배양액 양 (ml)을 기준으로 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 MCB에 PMF 세포주를 부착하여 배양시 MCB 종류 (cytodex 1, cytodex 3 및 cultispher)에 따른 생산 세포수(비드의 표면적(mm^2))을 기준으로 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 Cytodex 1에 어류 세포주 PMF, GF-1, EPC 또는 E-11을 부착한 뒤 12일 동안 배양한 후의 모습을 현미경으로 관찰한 도이다:
- A: PMF;
- B: GF-1;
- C: EPC; 및

D: E-11.

도 6은 Cytodex 1에 어류 주화세포인 PMF, GF-1, BF-2, E-11 또는 EPC 세포주를 부착 및 배양하여 나타낸 세포 수 성장 그래프이다.

도 7은 Cytodex 1에 PMF, GF-1, EPC 또는 E-11 세포 주를 부착 및 배양 15일 후에 각각의 감수성을 보이는 IMV, VNNV 및 VHS 바이러스를 접종한 뒤의 세포 수와 바이러스 농도를 나타낸다.

도 8은 Cytodex 1에 PMF, GF-1, EPC 또는 E-11 세포 주를 부착 및 배양 15일 후에 각각의 감수성을 보이는 IMV, VNNV 및 VHS 바이러스를 접종한 뒤 세포변성효과(CPE)를 관찰한 사진이다:

A: Cytodex 1에 PMF 부착 배양 15일 후;

B: Cytodex 1에 부착된 PMF에 IMV를 접종하고 12일 이후

C: Cytodex 1에 GF-1 부착 배양 15일 후;

D: Cytodex 1에 부착된 GF-1에 IMV를 접종하고 12일 이후

E: Cytodex 1에 E-11 부착 배양 15일 후;

F: Cytodex 1에 부착된 E-11에 VNNV를 접종하고 6일 이후;

G: Cytodex 1에 EPC 부착 배양 15일 후; 및

H: Cytodex 1에 부착된 EPC에 VHSV를 접종하고 6일 이후.

도 9는 MCB에 부착된 어류 세포주를 5배 용량 및 10배 용량의 배양 용기로 옮기면서 증가한 세포수를 확인한 도이다.

도 10은 Cytodex 1에 부착된 PMF 세포주에 IMV를 접종하고 반연속 배양하면서 배지 교환 주기 (1일, 3일 또는 5일)에 따른 생산 세포수 및 바이러스 농도를 확인한 그래프이다.

도 11은 Cytodex 1에 부착된 PMF 세포주를 반연속 배양하여 IMV 생산함에 있어서, 접종한 IMV의 서브그룹 (subgroup II, III 및 IV)에 따른 생산 세포수 및 바이러스 농도를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 이하, 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0013] 일 측면에서, 본 발명은 어류 주화 세포주와 마이크로캐리어 비드를 혼합하여 세포주를 마이크로캐리어 비드에 부착하는 단계; 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화 세포주를 배양하는 단계; 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화세포에 바이러스를 감염시키는 단계; 상기 바이러스에 감염된 어류 주화세포를 배양하는 단계; 및 배양 상등액을 수득하고 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는, 마이크로캐리어 비드를 이용한 바이러스 생산 방법에 관한 것이다.
- [0014] 일 구현예에서, 본 발명의 어류 주화 세포주는 PMF(Pargus major fin), GF-1(Grouper fin cell), BF-2(Blue gill fry), EPC(Epithelioma papulosum cyprinid) 및 E-11(a clone of the cell line SSN-1) 세포주로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0015] 일 구현예에서, 마이크로캐리어 비드는 텍스트란, 젤라틴 또는 폴리스티렌으로 이루어질 수 있으며, 비드의 직경은 100 내지 300 μ m일 수 있고, 밀도는 1.02 내지 1.04일 수 있으며, 표면적은 2000 내지 8000cm²/g일 수 있다. 비드의 밀도가 물보다 크기 때문에 교반 환경이 유지되지 않는 상태에서는 가라앉게 되어 배양된 세포와 상등액을 보다 쉽게 구분할 수 있다.
- [0016] 일 구현예에서, 마이크로캐리어 비드는 상용되는 Cytodex1, Cytodex3, Cultispher 또는 Rapidcell일 수 있고, Cytodex1인 것이 더욱 바람직하다.
- [0017] 일 구현예에서, 세포주를 마이크로캐리어 비드에 부착하는 단계는 30 내지 60rpm으로 교반하고 정지하는 과정을

1 내지 3시간 동안 반복하여 수행할 수 있다.

- [0018] 일 구현예에서, 마이크로캐리어 비드에 세포주를 부착하는 단계, 이를 배양하는 단계 및 상기 세포주에 바이러스를 접종하고 바이러스를 생산하는 단계 전반에 걸쳐, 세포주의 배양시 어류 혈청, 어류 근육 추출물 또는 어류 난황 추출물을 배양 배지에 추가로 첨가하여 세포주를 배양할 수 있으며, 각각 0.5%, 1.0% 및 0.1%의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0019] 일 구현예에서, 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화 세포주는 1 내지 3일 마다 배지를 전체 배지 용량의 70%를 교환하는 방식으로 배양될 수 있으며, 30 내지 80rpm의 교반 속도로 배양될 수 있다.
- [0020] 일 구현예에서, 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화세포에 새 마이크로캐리어 비드를 1:1 내지 1:4의 부피 비로 추가하여 서브컬처(subculture)할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 마이크로캐리어 비드 부착된 어류 주화세포를 반으로 나눠 동일 용량의 플라스크에 분주하면서 새 마이크로캐리어 비드를 기존 MCB-부착 세포주의 부피에 대해 1:1 또는 1:4로 첨가하여 서브컬처하였다.
- [0021] 일 구현예에서, 마이크로캐리어 비드에 부착된 어류 주화세포를 작은 용량의 플라스크에서 배양한 뒤 더 큰 용량의 플라스크로 옮기면서 새 마이크로캐리어 비드를 추가하는 scale-up 서브 컬처 방식으로 배양될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 플라스크의 용량을 5배 및 10배로 증가시켜 scale-up 서브 컬처 하였다.
- [0022] 일 구현예에서, 바이러스는 메갈로사이티바이러스(Iridoviridae Megalocytivirus, IMV), 바이러스성 신경성 괴사 바이러스(Viral nervous necrosis virus, VNNV) 및 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia, VHSV)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 감염 대상인 어류 주화세포의 감수성에 따라 선택될 수 있다. 일 실시예에서, PMF 세포주 및 GF-1 세포주는 IMV로, E-11 세포주는 VNNV로, 및 EPC 세포주는 VHSV로 감염되었다.
- [0023] 일 구현예에서, 본 발명에서 생산되는 바이러스는 메갈로사이티바이러스 서브그룹(subgroup) II, 서브그룹 III 및 서브그룹 IV로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [0024] 일 구현예에서, 바이러스에 감염된 어류 주화세포를 배양하고 배양 상등액을 수득하는 과정을, 배양 상등액을 수득한 뒤 수득한 양만큼 새로운 배지를 첨가하는 배지 교환 과정을 세포의 계대배양 또는 분주 과정 없이 반복적으로 실시하는 반연속 배양(semi-continuous cell culture) 방법으로 수행할 수 있다.
- [0025] 일 구현예에서, 감염된 세포를 반연속 배양할 때의 배지 교환 주기는 3일이고, 새로운 배지로 대체하는 배지 교환 비율은 70% (v/v)일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 반연속 배양은 생산된 바이러스가 포함된 배양액을 수득하고, 마이크로캐리어 비드에 부착된 세포들은 그대로 둔 상태로 새 배양액을 넣어 배양하는 조작을 반연속적으로 하는 것을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 3일마다 세포 배양 상등액 (세포 배양 배지)를 70% 수득하고 새 배지를 다시 채워넣는 바이러스 생산 최적 조건을 수립하였으며, Cytodex1 비드에 부착된 PMF 세포주에 IMV를 감염시켜 반연속 배양하는 경우에 가장 바이러스 생산성이 현저함을 확인하였다.
- [0027] 본 발명의 용어 "주화세포"는 어류 조직에서 세포를 분리하여 연속적인 계대 배양을 통하여 세포주화한 세포를 의미하며, "세포주"와 "세포"는 혼용하여 사용한다.
- [0028] 본 발명의 용어 "계대(passage)"는 희석하거나 하지 않고, 또는 희석함 없이, 하나의 배양 용기로부터 다른 용기로 세포를 전달하는 것을 의미한다. 세포가 한 용기에서 다른 용기로 이송될 때마다, 세포의 특정 부분이 걸 손될 수 있으므로, 의도 되었건 또는 의도되지 않았건 간에 세포의 희석이 일어날 수 있다. 이 용어는 용어 "2차 배양(subculture)"과 같은 의미이다. 계대 배양의 수는 세포가 배양되는 횟수로서, 새로운 용기 내로 2차 배양되거나 이송되어 현탁액 또는 부착 상태로 성장한다. 이 용어는 개체군 배가 또는 세포 개체군이 복제하는데 필요한 시간, 즉 세포 집락 중 개개의 세포가 복제하는데 대체로 걸리는 시간과 동의어가 아니다.
- [0029] 일 측면에서, 본 발명은 본원발명의 방법으로 제조한 바이러스를 불활화한 바이러스 및 부형제를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 일 구현예에서, 부형제는 베타-글루칸(Beta-glucan), 스쿠알렌 및 수산화알루미늄, 이미퀴모드(Imiquimod), 및 Montanide ISA 780 VG로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 베타-글루칸이 가장 바람직하다.
- [0031] 일 구현예에서, 상기 백신 조성물은 어류 메갈로사이티바이러스(Iridoviridae Megalocytivirus, IMV), 바이러스성 신경성 괴사 바이러스(Viral nervous necrosis virus, VNNV) 또는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스

(Viral Hemorrhagic Septicemia, VHSV)의 감염증 예방 또는 치료용 백신으로 이용될 수 있다.

- [0032] 일 구현예에서, 상기 어류는 돌돔, 참돔, 강돔, 점농어, 넙치, 감성돔, 강도다리, 조피볼락, 능성어 및 쏘가리로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 돌돔 또는 참돔인 것이 더욱 바람직하다.
- [0033] 일 구현예에서, 상기 백신 조성물은 불활화된 메갈로사이티바이러스(IMV), 바이러스성 신경성 괴사 바이러스(VNNV) 또는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV)를 함유할 수 있다. 상기 메갈로사이티바이러스는 서브그룹(subgroup) II, 서브그룹 III 또는 서브그룹 IV 분리주일 수 있다. 따라서, 본 발명에서 이러한 치료에 관련된 바이러스는 특이적 면역반응에 영향을 주기 위해, 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위해 생물의 면역계에 제공됨으로써 그 생물을 상기 바이러스에 의한 감염으로부터 보호하기 위해 백신 접종된다.
- [0034] 본 발명의 예방용 조성물 (즉, 백신)의 제조를 위해, 본 발명에 따라 포르말린으로 불활화된 어류 바이러스는 그대로 백신으로 이용되거나, 생리학적으로 허용가능한 형태로 변환된다. 이는 두창에 대한 백신접종에 사용된 수두 바이러스 백신의 제조에 있어서 경험을 토대로 하여 실시될 수 있다 (Stickl, H. 등에 의해 개시됨. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392). 백신 주사의 제조를 위해 예를 들면, 바이러스 입자는 애플 내, 바람직하게는 유리 애플에서 동결건조된다. 다르게는, 백신 주사는 제제에서 바이러스의 순차적 동결-건조에 의해 생성될 수 있다. 이 제제는 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 추가 첨가제 또는 산화 방지제 또는 비활성 가스, 안정화제 또는 생체내 투여에 적합한 제조합 단백질과 같은 다른 보조제를 함유할 수 있다. 이어 유리 애플을 밀봉하고 4℃ 및 실온 사이에서 몇 개월동안 저장할 수 있다. 그러나, 다른 요구사항이 없는 한, 상기 애플은 바람직하게는 -20℃ 미만에서 저장될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 치료용 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 개체의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 어류에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 유효량을 결정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 치료용 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0039] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는, 어류의 메갈로사이티바이러스(Iridoviridae Megalocytivirus, IMV), 바이러스성 신경성 괴사 바이러스(Viral nervous necrosis virus, VNNV) 또는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia, VHSV) 감염을 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0040] 예방접종 또는 치료를 위해, 동결건조물은 0.01 내지 0.5ml의 수용액, 바람직하게는 생리 식염수 또는 트리스

완충액에 용해되며 전신적으로 또는 국소적으로, 즉 복강, 비경구, 피하, 근육내 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 투여경로에 의해 투여될 수 있다. 투여 형태, 복용량 및 투여횟수는 공지된 방식으로 당업자에 의해 최적화될 수 있다.

[0042] 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.

[0044] 실시예 1. 어류 바이러스 준비

[0045] 메갈로사이티바이러스(Iridoviridae Megalocytivirus, IMV), 바이러스성 신경성 괴사 바이러스(Viral nervous necrosis virus, VNNV) 및 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia, VHSV)는 각각 현장에서 감염된 어류로부터 분리하였다. 구체적으로, IMV는 2013년 경상남도 통영의 한 양식장에서 감염증상을 보이는 돌돔(185.4 g)으로부터, VNNV는 2014년 부산광역시 기장에서 감염증상을 보이는 넙치(231.2 g)로부터, VHSV는 2013년 경상북도 포항에서 감염증상을 보이는 넙치(183.3 g)로부터 얻어졌다. 각 감염어에서 조직 내 IMV와 VHSV가 가장 높은 것으로 알려진 비장조직과 VNNV가 가장 높은 것으로 알려진 뇌 조직을 적출하여 10% w/v 농도로 PBS에서 마쇄한 뒤, 4℃ 10,000g로 5분간 원심분리하고, 0.2μm syringe filter를 통과시킨 이후 10 μl를 취하여 T-25 플라스크에서 각 세포를 1×10^5 cells/ml 농도를 주입하여 5일간 배양한 어류 주화세포주 PMF, E-11 및 EPC에 각각 IMV, VNNV, VHSV를 접종하였고, 7일간 바이러스를 증식시킨 후 상등액을 사용 전까지 70℃에 보관하였다.

[0047] 실시예 2. 어류 주화 세포의 MCB 부착

[0048] 어류 주화 세포주인 PMF(Pargus major fin), GF-1(Grouper fin cell), BF-2(Blue gill fry), EPC(Epithelioma papulosum cyprinid) 및 E-11(a clone of the cell line SSN-1) 세포주를 항생제 (penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 μg/ml) 및 10% FBS (Gibco)가 첨가된 L-15 배지 (Sigma Aldrich)에서 25℃ 조건으로 T-75 플라스크(flask)에서 배양하였다.

[0049] MCB(micro carrier bead)는 Cytodex 1, Cytodex 3, Cultispher 또는 Rapidcell를 제조사의 추천방법에 따라 준비하여 사용하였다. 각 마이크로캐리어의 농도는 5mg/ml의 농도로 사용하였고, Cultispher 1은 1mg/ml 농도로 사용하였다. 분말 상태의 마이크로캐리어는 spinner 플라스크 용량에 맞춰 적정량을 정량하고, PBS를 이용하여 상온에서 3시간 이상 수화시켰으며, 이 과정 중에 MCB를 침전시켜 PBS를 제거하고 새로운 PBS로 채우는 과정을 2~3회 반복하였다. 이후 멸균기로 멸균하고 사용하기 전에 PBS를 제거하고 세포 배양용 배지 (L15)로 2~3회 세척 후 사용하였다.

[0050] 상기에서 플라스크에 배양된 어류 세포주의 배양액을 모두 제거하고 각 플라스크에 트립신 0.25%(v/v) 500μl를 주입하여 25℃에서 5분간 반응시킨 이후 세포를 모두 떼어내었다. 이후 트립신을 제거하기 위하여 10ml의 배양 배지를 이용하여 희석하고 50ml의 튜브에서 혼합하였다. 세포를 모으기 위해 원심분리기 (Hanil, Combi-514R)를 이용하여 500g에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 모두 제거하고 펠렛을 PBS 20ml로 희석하여 hemocytometer (Superior, Hausser ultra plane)로 세포를 계수하고 spinner 플라스크 내에 1×10^5 cells/ml의 농도로 주입하였다. 이와 동시에 상기에서 배양 배지로 세척한 비드를 배양 배지와 함께 전량 주입하고, 우태아 혈청을 최종농도 10% (v/v)가 되도록 첨가하였다. 이후 Spinner 플라스크의 용량에 맞춰 적정 용량의 배양 배지를 첨가해 주고 제조사에서 추천한 방법인 저속 교반기 (Misung, MSD24) 60rpm 으로 25℃ 인큐베이터 내에서 배양하였다.

[0052] 실시예 3. MCB에 부착된 어류 주화세포 배양조건의 최적화

[0053] 상기 실시예 2에서 MCB에 부착한 각각의 어류 주화세포들을 제조사에서 추천하는 조건인 1×10^5 cells/ml의 농도로 100ml Spinner flask에서 60RPM의 교반 속도에서 배양하였다. 그러나, 상기 조건으로 세포 배양을 한 경우, 배지의 영양성분의 저하 및 pH 변화 등으로 인하여 지속적인 세포의 성장이 나타나지 못했고, 주기적인 배지의

교환이 필요하였다. 이에, Cytodex 1 (MCB)에 부착한 PMF 세포주를 이용하여 배양 조건을 하기와 같이 최적화하였으며, 최적화된 조건에서 다른 어류 세포주(GF-1, BF-2, E-11 및 EPC)의 배양 가능 여부를 확인하였다.

[0055] 3-1. 배지 교환 주기

[0056] 상기 실시예 2에서 MCB에 부착한 각각의 어류 주화세포들을 배양함에 있어서, 배지를 매회 70%(v/v)씩 새 배지로 교환하면서, 배지 교환 주기를 1일, 3일 및 5일로 구분하여 세포 성장성을 MTT 분석 방법을 이용한 세포수 측정을 통해 확인하였다. 구체적으로, Cytodex 1에 부착한 PMF 세포를 96 웰 플레이트에 1×10^6 cells/ml 농도에서부터 1/2배로 단계 희석하여 주입하였고, 24시간 배양 이후 헤모사이토미터를 이용하여 세포수를 계측하였다. 이와 동시에 MTT assay 방법으로 CCK-8을 이용하여 450nm에서의 흡광도를 측정하여 각 흡광도에 따른 세포수의 표준 곡선을 제작하였다. 이후 비드 내 세포는 플라스크 내의 일부 비드를 샘플링하여 CCK-8을 이용하여 흡광도 측정하였고, 위의 표준곡선에 따라 세포를 계수하여 플라스크 내의 전체 세포수를 측정하였다.

[0057] 그 결과, 1일 및 3일 주기로 배지 교환하는 경우 1.11×10^6 cells/ml 및 1.06×10^6 cells/ml로 비슷한 세포성장을 보였고, 5일 주기로 배지를 교환하는 경우에는 세포 배양이 다소 낮은 농도로 나타났다 (표 1). 이는 다른 세포주들에서도 유사하게 나타났다.

[0059] 3-2. 교반 속도

[0060] 상기 실시예 2에서 MCB에 부착한 각각의 어류 주화세포들을 배양하면서, 교반 속도에 따른 세포수를 상기 실시예 3-1의 방법으로 확인하였다. 교반 속도는 30, 60, 90 또는 120 RPM 으로 구분하였다.

[0061] 그 결과, MCB에 부착한 각각의 어류 주화세포들은 30, 60, 90 및 120 RPM 에서 모두 1×10^6 cells/ml 전후의 세포수를 나타내 배양이 잘 이루어지고 있음을 알 수 있었고, 특히, 60 RPM에서 12일 이후 세포수 1.06×10^6 cells/ml로 나타나 가장 높은 세포 생산성을 보였다 (표 1).

[0063] 3-3. Spinner flask 용량

[0064] 상기 실시예 2에서 MCB에 부착한 각각의 어류 주화세포들을 100ml, 250ml 및 500ml의 Spinner 플라스크에서 배양하면서 세포수를 확인하였다.

[0065] 그 결과, MCB에 부착된 세포주는 다양한 규격의 Spinner flask에서 모두 잘 성장하는 것을 알 수 있었다 (표 1).

[0067] 3-4. 혈청의 종류 및 농도

[0068] 상기 실시예 2에서 MCB에 부착한 각각의 어류 주화세포들을 배양하는 배지에 첨가되는 혈청의 종류 및 농도별 세포 성장 정도를 확인하였다. 구체적으로, FBS(Fetal bovine serum)를 0%, 1%, 5% 및 10%, 또는 NCS(New born carp serum)를 5% 및 10% 첨가하여 배양한 뒤, 상기 실시예 3-1에서와 같이 세포 생산성을 확인하였다.

[0069] 그 결과, FBS(Fetal bovine serum)를 첨가하는 것이 NCS (New born carp serum)를 첨가하는 것보다 높은 세포 생산성을 보였으며, FBS는 10% 및 5% 농도에서 잘 성장하였다 (표 1).

[0071] 3-5. 세포 농도

[0072] MCB에 세포 부착시 초기 접종하는 세포 농도에 따른 세포배양 효과는, 최대 세포수에 도달하는 시간은 세포 농도에 따라 다소 차이가 있었으나, 모두 최대 세포수로 도달하였다 (표 1).

[0074] 3-6. 배양 온도

[0075] MCB에 부착된 PMF 세포주의 세포 배양 온도에 따른 세포 배양 효과를 확인한 결과, 배양 온도 22℃, 25℃ 및 28℃에서 모두 배양 가능하였고, 25℃에서 가장 좋은 세포 배양 효율을 보였다 (표 1).

표 1

[0076]

배지 교환주기	12일 배양 이후 세포수($\times 10^6$ cells/ml)
1일	1.11
3일	1.06
5일	0.89
교반속도 (RPM)	
30	0.84
60	1.06
90	0.97
120	0.67
Spinner flask 용량	
100ml	0.87
250ml	1.06
500ml	1.17
혈청 종류 및 농도	
FBS 10%	1.12
FBS 5%	1.06
FBS 1%	0.54
FBS 0%	0.22
NCS 10%	0.72
NCS 5%	0.43
초기 세포 농도 (Cells/ml)	
1×10^6	1.73
5×10^5	1.44
1×10^5	1.06
5×10^4	0.62
배양온도 (℃)	
22	0.77
25	1.06
28	0.65

[0077] 상기 실시예 3-1 내지 3-6을 통해, MCB에 부착된 어류 세포주의 최적 배양 조건을 배지 교환 주기 3일, 교반 속도 60RPM, 250ml Spinner flask, FBS 5% 혈청이 포함된 L15 배지, 초기세포 농도 1×10^5 cells/ml, 세포배양 온도 25℃로 수립하였다. 이 최적화된 조건은 PMF 세포주 뿐만아니라 본 발명에서 사용한 모든 어류세포주 (GF-1, BF-2, E-11 및 EPC)에서 모두 1×10^6 cells/ml 이상의 현저한 세포 배양 효율을 보였다.

[0079] 실시예 4. MCB에 부착된 어류세포의 부착 및 성장 향상 조건 수립

[0080] 4-1. 초기 교반 속도에 따른 세포 부착 및 증식 확인

[0081] 초기 배양에서 고속의 교반은 세포의 부착, 증식 및 성장에 좋지 않은 영향을 미치기 때문에, MCB에 부착된 세포주들의 부착력 및 성장능을 향상시키기 위한 조건으로 초기 교반 속도를 일정시간 동안 교반을 하고 멈추는 조건들로 반복하여 세포의 부착 및 증식을 확인하였다. 대조군 배양은 실시예 3에서 최적화된 교반 속도인 60 RPM으로 실시하였고, 실험군 1은 60RPM 교반 및 정지 (1분/ 4분)를 2시간 동안 반복하였으며, 실험군 2는 30RPM 교반 및 정지 (1분/ 4분)을 2시간 동안 반복하였다.

[0082] 그 결과, 세 가지 세포주 모두 1일차에 실험군 1 및 실험군 2의 세포주의 MVB로의 부착률이 대조군에 비해 30% 이상 증가하였으며, 세포가 MCB에 매우 고르게 부착되었다 (표 2). 또한, 이러한 세포 부착률의 증가는 세포의

증식에 영향을 미쳐 시험군 1과 대조군과 비교해 볼 때, 배양 7일 후 세포수는 PMF 세포주에서 최대 1.46배, GF-1 세포주에서는 최대 1.38배 및 EPC 세포주에서는 최대 1.25배 증가하는 효과를 나타냈다 (표 2).

표 2

세포주	종류	1일째 부착률 (%)	3일째 부착률 (%)	6일째 부착률 (%)	배양 12일 후 세포수 (x 10 ⁵ cells/ml)
PMF	대조군	60	80	90	9.7
	실험군1	90	96	98	14.2
	실험군2	90	94	94	13.6
GF-1	대조군	58	76	82	11.2
	실험군1	90	94	96	15.4
	실험군2	86	96	98	13.8
EPC	대조군	68	82	88	12.4
	실험군1	94	96	98	15.5
	실험군2	90	98	98	14.4

4-2. 어류 유래 추출물 첨가로 인한 세포 성장 및 바이러스 생산성 확인

4-2-1. 세포 성장 확인

보다 더 향상된 세포배양을 위하여 기존의 5% FBS와 함께 어류 (돌돔, 참돔 또는 넙치) 유래의 혈청(serum), 근육 추출물 및 난황추출물 (돌돔 또는 참돔 유래)을 각각 농도별로 첨가하여 세포의 MCB로의 부착 및 성장 향상 효과를 확인하고자 하였다. 구체적으로, 각 첨가물의 제조 방법은 다음과 같다. 어류 유래 혈청을 얻기 위해 각 10마리의 돌돔(210.4 ± 56.2g), 참돔 (354.1 ± 83.3g), 넙치(282 ± 78g)를 준비하였고, 10ml 주사기를 이용하여 미부정맥 채혈법으로 채혈한 혈액을 10,000 RPM에서 원심분리 (Gyrogen, Gyro 1524M) 이후 혈청을 분리하였다. 또한 근육추출물을 제작하기 위하여 비늘과 외피를 제거한 근육부를 homogenizer (PolytronPT 1200E)로 10%(w/v) 농도가 되도록 TBS(Tris-buffered saline, 50mM Tris, 0.9% NaCl, pH 7.6)를 첨가한 이후 3분간 마쇄하였다. 이후 50ml 튜브로 옮겨 3500rpm으로 10분간 원심 분리하였고, 상등액만 모아 다시 10,000 RPM으로 원심 분리하여 상등액만 추출하였다. 혈청과 근육추출물 모두 0.45μm 시린지 필터를 이용하여 통과시킨 것을 사용전까지 -20℃에 보관하였다. 아울러, 난황추출물은 돌돔과 참돔 친어로부터 부화된 부화자어를 사용하여, PBS로 충분히 세척한 이후 PBS와 1:1(w/v)로 혼합하여 homogenizer로 마쇄하고 3,500rpm에서 상등액만 추출한 이후 10,000rpm에서 한 번 더 상등액을 모아 0.45μm 필터를 통과시킨 것을 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

상기와 같이 제조한 어류 유래 추출물이 유효한 농도구간 확인을 위하여 선행실험을 통해 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% 및 1%의 처리농도 구간을 설정하였다. PMF 및 EPC 세포주를 MCB와 혼합하여 마이크로캐리어 비드와 각각의 세포주를 부착한 뒤 실시예 3 및 4-1에서 최적화한 배양 방법으로 각각의 농도별 첨가물을 포함한 세포 배양 배지를 이용하여 세포배양을 7일간 실시하였고, 배지 교환을 3일 마다 할 때에도 같은 조건의 첨가물이 포함된 배지를 사용하였다.

그 결과, 0.5 및 1.0 % 농도의 어류 유래 혈청 실험군은 7일간 세포배양 결과 9.19x10⁵ cell/ml 및 12.97x10⁵ cell/ml로 나타나, 같은 기간 동안의 대조군에 비하여 최대 2배 이상의 세포 성장을 보였다 (표 3). 또한, 근육추출물을 1.0 및 1.5%(v/v)로 처리한 실험군은 7일간 세포 배양한 결과 세포수가 8.07x10⁵ cell/ml 및 9.15x10⁵ cell/ml로 나타나 최대 1.5배 가량 증가하는 효과를 나타냈다. 아울러, 0.5 및 1.0 % 농도의 난황 추출물 첨가한 실험군은 7일간 배양한 세포 농도가 10.37x10⁵ cells/ml 및 10.80x10⁵ cells/ml로 나타나, 대조군에 비해 최대 1.8 배 정도의 세포 성장 향상 효과를 나타냈다 (표 3). 같은 방법으로 실험한 EPC 세포주에서도 FBS를 첨가한 대조군에 비하여 최대 1.8배 및 1.3배의 세포 성장 촉진 효과를 나타냈다.

4-2-2. 바이러스 생산성 확인

[0092]

상기 실시예 4-2-1을 통해, 0.5% 농도의 어류 혈청, 1.0% 농도의 어류 근육추출물 및 0.1% 농도의 난황추출물을 첨가하여 배양한 경우 향상된 세포 배양 현상을 나타내, 첨가물의 농도를 각각 0.5%, 1.0% 및 0.1%(v/v)로 결정하였다. 또한, 이와 같은 첨가물로 인해 MCB-부착 세포주에서의 바이러스 생산능의 변화를 확인하기 위하여, MCB에 각각 부착된 PMF 및 EPC 세포주에 각각 감수성을 나타내는 IMV(Iridoviridae Megalocytivirus) 및 VHSV(Viral Hemorrhagic Septicemia)를 각각 접종한 뒤, 7일 후에 바이러스 농도를 확인하였다. 바이러스의 농도는 qPCR(quantitative PCR) 방법으로 확인하였다. 구체적으로, 바이러스의 DNA를 GeneA11[®] ExgeneTM Tissue SB mini kit (GeneA11)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였고, 최종 부피가 100 μ l가 되도록 용리(elution)한 뒤 20℃에서 보관하였다. 또한, 바이러스의 RNA는 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 분리한 뒤, 최종 50 μ l의 Rnase free water를 사용하여 현탁하였다. 분리한 RNA는 cDNA 합성을 위하여 M-MLV reverse transcriptase 0.5 μ l (Promega) 5xbuffer 2 μ l, dNTP 0.5 μ l, specific primer 1 μ l 및 추출된 RNA 3 μ l를 넣고 총 부피가 10 μ l가 되도록 Nuclease-free water를 첨가한 후, 45℃에서 60분, 99℃에서 10분간 반응시켰다. 제작된 cDNA는 이후 qPCR 주형으로 사용하였고, 사용 전까지 -80도에 보관하였다. Viral DNA 또는 RNA의 absolute qPCR을 위해 2×PreMix (SYBR Green with low ROX, Enzynomics) 10 μ l, 0.5pM의 각각의 바이러스 특이적 프라이머 1 μ l 및 1 μ l의 주형을 사용하였고, 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. qPCR의 조건은 95℃에서 10분간 반응한 후, 95℃ 10초, 60℃ 15초 및 72℃ 20초의 반응을 1 사이클로 하여 40 사이클을 반응시켰으며, 마지막 사이클 후에는 모든 반응물에 대하여 72℃부터 95℃까지의 영역에서 melting curve를 분석하였다.

[0093]

그 결과, 어류 유래 첨가물의 처리에 의해, IMV를 접종한 MCB에 부착된 PMF 세포주는 대조군에 비하여 4.8 내 7.2배 이상 높은 바이러스 생산성을(표 3), VHSV를 접종한 MCB에 부착된 EPC 세포주는 대조군에 비하여 3.2 내지 4.2배 높은 바이러스 생산성을 나타냈다(표 4).

표 3

[0094]

세포주-바이러스	종류	유래 어종	농도(%)	배양 7일 후 세포수	바이러스 감염 7일후 농도
				(1x10 ⁵ cells/ml)	(1x10 ⁷ copies/ml)
PMF-Megalocytiviruses	FBS		0.05	5.91	
			0.1	5.85	1.58
			0.5	6.07	1.28
			1.0	6.10	1.87
			1.5	6.11	
	혈청	돌돔	0.1	8.68	
			0.5	12.71	9.21
			1.0	10.03	
		참돔	0.1	6.52	
			0.5	9.19	9.67
			1.0	10.38	
		넙치	0.1	7.27	
			0.5	11.57	6.55
			1.0	12.97	
	근육추출물	돌돔	0.5	7.12	
			1.0	9.10	3.21
			1.5	9.12	
		참돔	0.5	6.58	
			1.0	9.15	4.51
			1.5	9.10	
		넙치	0.5	6.19	
			1.0	8.14	3.10
			1.5	8.07	
	난황추출물	돌돔	0.05	7.81	
			0.1	10.37	6.14
			0.2	10.44	
		참돔	0.05	6.66	
			0.1	10.48	7.51
			0.2	10.80	.

표 4

세포주-바이러스	종류	유래 어종	농도(%)	배양 7일 후 세포수	바이러스 감염 7일후 농도
				($\times 10^5$ cells/ml)	($\times 10^7$ copies/ml)
EPC-VHS	FBS		0.05	7.42	
			0.1	7.31	1.66
			0.5	7.66	1.38
			1.0	7.99	1.49
			1.5	8.15	
	혈청	돌돔	0.1	8.03	
			0.5	10.76	5.82
			1.0	9.53	
		참돔	0.1	7.65	
			0.5	11.66	5.56
			1.0	12.42	
		넙치	0.1	7.20	
			0.5	12.24	4.85
			1.0	9.10	
	근육추출물	돌돔	0.5	7.51	
			1.0	9.21	2.24
			1.5	9.51	
		참돔	0.5	7.29	
			1.0	10.40	3.49
			1.5	9.18	
		넙치	0.5	7.94	
			1.0	9.87	2.98
			1.5	9.19	
	난황추출물	돌돔	0.05	7.85	
			0.1	9.17	4.46
			0.2	8.06	
		참돔	0.05	7.24	
			0.1	8.08	3.22
			0.2	9.25	

이에, 이 후의 실험에서는 실시예 3에서 최적화된 배양 조건과 함께 실험구 1의 초기 교반속도와 참돔 혈청 0.5%를 첨가한 배지를 기본 배양 조건으로 하였다.

실시예 5. 비드 종류별 어류 세포주의 부착능 확인

상기 실시예들에서 수립한 최적 조건으로 다양한 종류의 MCB들에서 PMF 세포주를 배양하고 부착능을 부착 세포수로 확인하였다. 구체적으로, MCB는 Cytodex1, Cytodex3, Cultispher 및 Rapidcell (표 5)이다. 예비 실험에서 비드의 농도 증가가 배양세포의 수를 증가시킬 수 있으나 비드의 농도 증가에 의해 교반시 비드들끼리 충돌하여 오히려 효율이 떨어지는 것을 확인하였으며, 이를 통해 각각의 MCB에서의 적정 농도를 구한 결과, Cytodex 1, Cytodex 3 및 Rapidcell은 5 mg/ml로, Cultispher는 1 mg/ml로 확인되었다. 상기 적정 농도의 비드에 PMF 세포주를 부착하여 배양하면서 3일 간격으로 세포수를 확인하였으며, 세포 부착 후 배양 12일 후의 세포 부착 비드를 현미경으로 확인하였다 (도 1 및 2).

표 5

[0101]

종류	제조사	크기 (μm)		물질	비드 밀도 (g/cm^3)	비드 표면적 (cm^2/g)	비드수 (bead/g)
		최소-최대	평균				
Cytodex 1	GE Healthcare	131-220	190 ± 58	Dextran	1.03	4400	$4.30\text{E}+06$
Cytodex 3	GE Healthcare	133-215	175 ± 36	Collagen coated,	1.04	2700	$3.00\text{E}+06$
Cultispher	PerCell Biolytica	130-380	225 ± 125	Cross linked gelatin, Macroporous	1.02-1.04	7500	$1.00\text{E}+06$
Rapidcell	ICN Pharmaceuticals	150-210		Polystyrene	1.02	-	-

[0102]

세포수를 확인한 결과, Cytodex 1, Cytodex 3, Cultispher 및 Rapidcell에서 생산된 세포를 배양액 (ml) 기준으로 나타낸 배양 12일 이후 세포수는 각각 27.1×10^6 cells/ml, 21.4×10^6 cells/ml, 17.37×10^6 cells/ml 및 10.96×10^6 cells/ml로 나타나 Cytodex 1 비드의 세포 부착 및 증식능이 가장 우수한 것으로 나타났다 (도 3). 또한, 생산된 세포를 비드의 표면적(mm^2) 기준으로 나타낸 결과에서는 Cultispher가 가장 우수하였다 (도 4). 아울러, 각 비드 종류별 표면적(mm^2)에 따른 세포수, 비드 하나에 부착되는 평균 세포수 및 비드 무게(mg) 당 세포수를 계산한 결과를 표 6에 나타냈다.

표 6

[0103]

	실험군	배양 12일 후 세포수 (10^6 cells/ml)	플라스크 내 전체 세포수 (cells/flask)	비드당 세포수 (cells/bead)	비드 표면적당 세포수 (cells/ mm^2)	비드 mg 당 세포수 (cells/mg)
Cytodex 1	실험 1	2.71	$6.78\text{E}+08$	126.14	$1.23\text{E}+05$	$5.42\text{E}+05$
	실험 2	2.59	$6.48\text{E}+08$	120.56	$1.18\text{E}+05$	$5.18\text{E}+05$
	실험 3	2.48	$6.20\text{E}+08$	115.35	$1.13\text{E}+05$	$4.96\text{E}+05$
	평균	2.59	$6.48\text{E}+08$	120.56	$1.18\text{E}+05$	$5.18\text{E}+05$
Cytodex 3	실험 1	2.15	$5.38\text{E}+08$	143.47	$1.59\text{E}+05$	$4.30\text{E}+05$
	실험 2	2.24	$5.60\text{E}+08$	149.33	$1.66\text{E}+05$	$4.48\text{E}+05$
	실험 3	1.97	$4.93\text{E}+08$	131.47	$1.46\text{E}+05$	$3.94\text{E}+05$
	평균	2.12	$5.30\text{E}+08$	141.33	$1.57\text{E}+05$	$4.24\text{E}+05$
Cultispher	실험 1	1.73	$4.34\text{E}+08$	1736.00	$2.31\text{E}+05$	$1.74\text{E}+06$
	실험 2	1.54	$3.86\text{E}+08$	1544.00	$2.06\text{E}+05$	$1.54\text{E}+06$
	실험 3	1.88	$4.72\text{E}+08$	1888.00	$2.52\text{E}+05$	$1.89\text{E}+06$
	평균	1.72	$4.31\text{E}+08$	1724.00	$2.30\text{E}+05$	$1.72\text{E}+06$
Rapidcell	실험 1	1.09	$2.74\text{E}+08$	-	-	$2.19\text{E}+05$
	실험 2	0.85	$2.14\text{E}+08$	-	-	$1.71\text{E}+05$
	실험 3	1.24	$3.10\text{E}+08$	-	-	$2.48\text{E}+05$
	평균	1.06	$2.66\text{E}+08$	-	-	$2.13\text{E}+05$

[0105]

실시예 6. MCB에 부착된 어류 세포주별 세포 성장 정도 확인

[0106]

상기 실시예 5에서 세포 부착 및 증식능이 가장 우수한 것으로 나타난 Cytodex 1 (5mg/ml)를 이용하여 PMF, GF-1, BF-2, E-11 및 EPC 세포주를 각각 부착 및 배양하였다. 각각의 세포는 1×10^5 cells/ml가 되도록 배양하였으며, 상기 실시예들에서 수립한 최적 조건으로 배양을 실시하였다. 또한, 어류 세포주를 부착하고 12일 동안 배양한 후 각각의 세포주의 모습을 현미경으로 확인하였다 (도 5).

[0107]

그 결과, 각각의 세포 주는 도 6에서와 같은 세포성장을 보여 약 12일 이후부터 최고 농도를 나타냄을 확인할

수 있었다.

[0109] 실시예 7. MCB를 이용하여 배양된 어류 주화세포에서의 어류 바이러스 생산

[0110] Cytodex 1에 PMF, GF-1, EPC 및 E-11 세포 1×10^5 cells/ml를 각각 부착한 뒤 250ml Spinner 플라스크에서 배양하였다. 세포 배양 15일 이후 각 세포 주에 감수성을 보이는 바이러스를 접종하였다. 구체적으로, PMF 및 GF-1 세포주는 IMV를, EPC 및 E-11 세포는 각각 VNNV 및 VHSV를 1×10^5 copies/ml 농도가 되도록 접종하였다. 바이러스 접종 후 배지 교환 없이 15일간 배양하였고, 이를 현미경으로 관찰하여 세포 변성을 확인하였다. 또한, 배양 중에 3일 내지 4일 간격으로 세포수를 측정하고, 배양 상등액을 샘플링하여 바이러스 농도를 측정하였다. VHSV는 배양 최적 조건이 20℃ 이므로, EPC 세포주는 바이러스 접종 이후 20℃에서 배양하였다.

[0111] 그 결과, 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, VNNV 및 VHSV를 접종한 E-11 및 EPC의 경우 감염 7일 이후 세포의 탈락과 용해가 나타나 세포의 수가 빠르게 감소되었고, 이 시기에 바이러스 농도는 크게 증가하였다. 또한, IMV를 접종한 PMF와 GF-1의 경우 세포 변성효과는 보였지만 세포의 탈락은 나타나지 않았고, 많은 세포가 MCB에 부착되어 있었고 바이러스 농도는 점차 증가하였다. 특히, MCB-부착 PMF가 세포수도 감소하지 않으면서 높은 농도의 바이러스 생산을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0113] 실시예 8. MCB 부착 어류 세포주의 subculture 및 scale-up

[0114] MCB 부착 어류 세포주의 세포수 증가를 위하여 MCB에 배양된 세포를 나누는 방법으로 subculture와 scale-up 방법의 두 가지 방식이 존재하며, 본 발명에서는 같은 용량의 플라스크로 기존의 MCB에 부착된 세포를 나누는 과정을 subculture라 하고 세포가 부착된 MCB 전체를 낮은 용량의 플라스크에서 높은 용량의 플라스크로 옮겨 가는 과정을 scale-up 이라고 정의하였다.

[0115] subculture의 경우 250ml의 플라스크에 상기의 실시예들에서 최적화된 방법으로 MCB에 부착된 PMF 세포주를 배양하고, 배양 15일 이후 기존에 배양된 세포 부착된 MCB 5mg/ml이 포함된 배지 125ml과 새로운 MCB 5mg/ml이 포함된 배지 125ml을 혼합하는 1:1(v/v) subculture 과정과 기존에 배양된 세포 부착된 MCB 5mg/ml이 포함된 50ml과 새로운 MCB 5mg/ml이 포함된 배지 200ml을 혼합하는 1:4(v/v) subculture 과정을 각각 실시하였다. 새로운 비드의 첨가 이후 동일한 세포 배양 방법으로 60rpm 교반 1분 후 4분 정지하는 과정을 2시간 동안 반복하였고, 이후 MCB에 세포가 부착된 비율을 3일 간격으로 측정하여 표 7에 나타내었다.

[0116] Scale-up의 경우 MCB-부착 세포주를 작은 용량의 플라스크에서 큰 용량의 플라스크로 옮기면서 (10ml → 50ml → 500ml) 배양을 실시하였다. 구체적으로, 상기의 실시예들에서 최적화된 방법으로 MCB에 부착된 PMF 세포주를 10ml 배양하고, 배양 15일 이후 50ml (5배 scale-up)하였다. 5배 scale-up 후 21일 이후 10배 scale-up (500ml)을 실시하였다. 이후 세포수의 증가를 플라스크 내의 전체 세포수로 나타내었다 (도 9).

[0117] 아울러, subculture와 scale-up에서 최종 생산된 세포를 대상으로 PMF에 감수성을 보이는 바이러스인 IMV를 플라스크 내에 1×10^5 copies/ml 농도가 되도록 접종하였고, 15일 이후 바이러스 농도를 측정하였다.

표 7

[0118]

	마이크로캐리어에서 subculture 이후 세포 부착률 (%)												
	Pre culture 배양 기간						Subculture 이후 배양 기간						
	0	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	18	21
Pre culture	0	88.0	92.0	95.5	98.5	98.5							
1:1 subculture						41.0	65.7	85.7	97.9	95.9	97.7	99.0	99.2
1:4 subculture						18.5	37.5	64.7	86.4	92.7	95.1	97.8	99.2

[0119] 그 결과, subculture 이후 새 MCB로 세포가 90% 이상 부착되는 비율은, MCB-부착 세포주 및 추가하는 새 비드의 비율 1:1 및 1:4에서 9일 및 15일로 확인되었고 (표 7), 최종 세포 수는 두 그룹에서 15일 후, 21일 후에 모두 2×10^6 cells/ml 이상 도달하였다. scale-up의 경우 scale-up 이후 세포 부착률 및 세포 농도가 계속해서 증가하였고, 10배의 scale-up의 이후에 최종 1×10^9 cells/flask 이상의 세포가 생산되었다 (도 9). 또한, subculture

또는 scale-up으로 생산된 MCB-PMF에 바이러스를 각각 접종하고 12일 이후 확인한 결과, 모두 5×10^9 copies/ml 이상의 바이러스가 생산되었다. 특히 scale-up 방법을 통해서 매 3일 마다 350ml의 바이러스가 생산 가능하였다.

[0120] 따라서, 이와 같은 scale-up 방법을 이용한 마이크로캐리어 비드 부착된 세포의 배양은 세포 및 바이러스의 대량 생산에 적합하고 이렇게 생산된 바이러스로 제작된 백신은 양식현장에 직접 사용될 만큼의 많은 양인 것을 알 수 있다.

[0122] 실시예 9. MCB에 부착된 PMF 세포주에서의 IMV 반연속배양

[0123] 9-1. 배지 교환 주기에 따른 반연속 배양

[0124] 상기 실시예 8의 MCB에 부착된 PMF 세포주의 경우 바이러스 농도 또한 계속해서 증가하는 전형적인 연속 감염의 특성을 보였으며, 바이러스 감염 이후에도 일정기간 이상 세포가 변성 없이 유지되는 특성을 나타냈다. 이에, 바이러스 감염 이후에도 장기간 동안 세포의 성장과 바이러스의 생산이 연속적으로 이루어지게 하는 적정화 실험을 수행하였다. 구체적으로, 250ml Spinner 플라스크에서 cytodex 1 (5mg/ml)에 PMF 세포를 부착하고 15일 동안 배양하였다. 그 후, 1×10^5 copies/ml의 IMV로 감염시켜 IMV에 감염된 MCB-PMF 세포주를 얻었다. 이 후, 본 원발명의 최적 세포 배양 조건으로 배양하면서 세포배양액 (바이러스)을 수득하고 새 배지를 첨가하는 배지 교환을 실시하는 반연속적 배양 방식(Semi-continuous Microcarrier culturing system, SCMCS)을 적용하여 연속 감염된 세포주로부터 바이러스의 지속적인 생산이 이루어지게 하였다. 이를 위해, 바이러스 감염 이후 배지 교환 주기를 1일, 3일 및 5일 (SCMCS-1day, SCMCS-3day 및 SCMCS-5day)로 조절하여 세포수의 변화와 생산 바이러스 농도의 변화를 확인하였다.

[0125] 그 결과, 배지 교환과 바이러스 수득을 1일 주기로 실시할 경우 숙주세포는 지속적으로 유지되나 바이러스의 농도가 일정 수준 이상 증가하지 못하였다. 3일 주기로 배지 교환을 실시하는 경우에는 세포 배양이 지속적으로 가능하였으며, 세포의 증식에 어떤 뚜렷한 영향을 미치지 않았고, 배지 내 생산된 바이러스의 농도는 일정기간 동안 증가하여, $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ copies/ml의 고농도로 유지되었다. 이러한 바이러스의 생산은 30회 이상 실시된 반연속적 배양에서도 지속적으로 나타났으며, 장기간 실시 이후에는 약간의 세포변성과 일부세포의 탈락이 관찰되기도 했으나, 비드 내에서 새로운 세포의 성장에 의한 지속적 보상이 이루어지면서 숙주세포와 바이러스 생산은 계속해서 유지되었다. 5일 주기로 배지 교환을 실시한 경우 초기 바이러스 증가량은 높았으나, 배양 10일 이후부터 숙주세포의 수가 계속 감소하여 지속적인 배양이 어려웠고, 생산된 바이러스 농도 또한 감소하였다 (도 10).

[0127] 9-2. MCB 종류에 따른 반연속 배양

[0128] 상기 실시예 9-1의 MCB-부착 PMF 세포주의 연속 배양이 다른 종류의 MCB (Cytodex1, Cytodex3, Cultispher 및 Rapidcell)에 부착되어서도 가능한지 확인하였으며, GF-1 세포주와도 세포수 및 생산 바이러스 농도를 비교하였다. 세포수는 12일 이후 측정하여 나타내었고, 세포 배양 15일 이후 바이러스를 접종하여 12일 이후의 바이러스 농도를 나타내었다 (표 8).

표 8

		12일 이후 세포수	감염 12일 이후 바이러스 농도
		($\times 10^5$ cells/ml)	($\times 10^8$ copies/ml)
Cytodex 1	PMF	21.90	9.47
	GF-1	24.50	0.25
Cytodex 3	PMF	18.00	6.08
Cultispher	PMF	15.60	8.90
	GF-1	17.5	0.16
Rapidcell	PMF	8.54	5.39

[0130] 그 결과, 다양한 MCB (Cytodex1, Cytodex3, Cultispher 및 Rapidcell)에 부착된 PMF 세포의 IMV 연속감염에도

뚜렷한 세포변성효과 없이 세포가 유지되는 것을 확인하였고, Cytodex1 및 3의 경우 오히려 세포수가 일부 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 모든 종류의 MCB 부착 세포주에서 반연속 배양 방법으로 생성되는 IMV의 농도는 모두 최대 2×10^9 copies/ml 이상으로 나타났으며, 특히, MCB-부착 PMF 세포주를 반연속 배양하는 경우, 다른 어류 주화세포인 GF-1보다 바이러스 생산량이 현저히 높은 것을 알 수 있었다 (표 8).

[0132] 9-3. 바이러스 서브그룹에 따른 반연속 배양

[0133] 상기 실시예 9-1의 MCB-부착 PMF 세포주의 반연속 배양이 IMV의 subgroup II, III 및 IV 바이러스에서도 적용 가능한지 확인하였다.

[0134] 그 결과, subgroup II, III 및 IV 바이러스에 각각 감염된 MCB-부착 PMF 세포주들 모두에서 1×10^9 copies/ml 이상의 바이러스를 얻을 수 있었고, 세 서브그룹의 IMV로 감염된 PMF 세포주들은 탈락 없이 세포수가 유지되면서 바이러스를 계속해서 생산할 수 있었다 (도 11). 이에, MCB-부착 PMF 세포주가 모든 IMV subgroup에 대해 반연속 배양으로 세포 성장 유지 및 지속적 바이러스 생산이 가능함을 알 수 있었다.

[0136] 실시예 10: MCB를 이용하여 대량 제작된 백신 및 부형제에 따른 효과 증진 확인

[0137] 본 발명의 상기 실시예들에서는 MCB를 이용하여 어류 주화세포의 대량배양이 가능함을 확인하였으며, 상기 주화세포에서의 어류 바이러스의 대량 생산이 가능함을 확인하였다. 특히 PMF 세포는 반연속 배양시 IMV (subgroup II, III 및 IV)를 연속 생산이 가능하였다. 이에, IMV 바이러스들 중 특히 국내 돌돔 양식에 큰 피해를 주고 있는 subgroup II를 MCB-부착 PMF에 접종하여 반연속 배양 방법으로 생산한 뒤, 이를 포르말린(0.1%)으로 불활화한 백신 SCMCs-IMV-sII (이하 SCMCs-IMV로 표기)과 부형제로 Beta-glucan (Sigma, baker's yeast (*S. cerevisiae*)), squalene + aluminum hydroxide. Imiquimod (Enzo, U.S.A) 및 Montanide ISA 780 VG (Seppic, 36064A)를 각각 혼합하여 백신을 제조한 뒤, 각각의 효과를 확인하였다. 구체적으로, Beta-glucan을 부형제로 사용하는 백신은 한 어체에 glucan 0.15mg이 들어갈 수 있도록 불활화된 SCMCs-IMV-sII에 1.5mg/ml의 농도로 첨가한 뒤 PolytronPT 1200E homogenizer (Kinematica, Switzerland)를 이용하여 균질화하였다. squalene+aluminum hydroxide을 부형제로 사용하는 백신은 PBS에 squalene (Sigma, 2.5%, v/v), glycerol (Amresco, 10%, v/v), Tween 80 (Sigma aldrich, 0.5%, v/v) 및 aluminum hydroxide(Sigma aldrich 1% w/v)로 섞어 15분간 ice에서 반응시키고 PolytronPT 1200E homogenizer로 균질화하였다. 이렇게 제작된 squalene 부형제와 불활화된 SCMCs-IMV를 1:1 (v/v)로 혼합하여 PolytronPT 1200E homogenizer로 균질화하였다. Imiquimod를 부형제로 사용하는 백신은 98% 이상 정제된 Imiquimod를 증류수를 이용해 1 mg/ml 농도로 녹여준 후 이를 100배 희석하여 포르말린으로 불활화된 SCMCs-IMV와 1:20 (v/v)으로 혼합하여 제조하였다. 베지터블 오일을 기반으로 하는 Montanide ISA 780 VG를 부형제로 사용하는 백신은 Montanide ISA 780 VG와 포르말린으로 불활화된 SCMCs-IMV를 1:1 (v/v)로 혼합한 후 PolytronPT 1200E homogenizer로 균질화하여 제조하였다. 각각의 부형제를 혼합한 백신은 각 그룹당 20마리의 돌돔 개체로 실험을 실시하였으며, 대조군으로 PBS를 사용하였다. 각각의 백신 또는 PBS를 접종한 돌돔은 접종 4주 후, SCMCs-IMV를 희석하여 (1×10^5 copies/fish) 공격 실험을 수행하였다. 수온은 25℃로 유지하였고, 환수는 매일 100% 환수하였다. 각 그룹별로 30 일간 누적 폐사율을 확인하면서, 폐사어와 빈사(moribund) 상태의 실험어의 경우 즉시 수조에서 꺼내 비장을 적출한 뒤 viral DNA를 분리하여 감염 여부를 M1F/R primer set를 이용한 PCR로 확인하였다.

[0138] 또한, 백신의 효과를 확인하기 위하여 백신 개체에 대한 중화항체가를 측정하였다. 구체적으로, 백신 접종 4주 이후의 각 백신 접종 그룹의 돌돔 어체 3마리를 미부정맥 채혈법으로 채혈하여 10,000rpm으로 원심분리하고, 상등의 혈청을 분리하여 사용 전까지 -80℃에 보관하였다. 이후 중화항체 실험을 위해 상온에서 녹인 혈청은 L-15 배지로 10배 희석하고, 보체 불활화를 위해 55℃에서 30분간 처리하였다. 이후 2 배의 단계희석을 통해 최대농도 1/10 부터 1/640까지 희석 구간을 설정하였고, 바이러스 상등액 2×10^4 copies/ml 과 1:1로 혼합하여 25℃에서 2시간 동안 중화시켰다. 따라서 항체가 측정을 위한 최종 농도는 1/20부터 1/1280까지 설정하여 중화항체가를 측정하였다. 각 농도별로 중화반응시킨 바이러스는 24 웰 플레이트에서 1×10^5 cells/ml 의 농도 식균한 PMF 세포를 5일간 배양하여 감염시켰고, 감염 7일 이후에 CPE를 관찰하여 중화항체가를 결정하였다.

표 9

부형제 종류		생존율 (%)	평균 생존율 (%)	중화항체 가	중화항체 가 평균
non-adjuvant		65	68.33 ± 5.77	160	213.33
		75		320	
		65		160	
Adjuvant	Beta-glucan	80	83.33 ± 2.89	320	266.67
		85		160	
		85		320	
	Squalene+alum	80	80.00 ± 5.00	160	213.33
		70		160	
		85		320	
	Imiquimod	60	63.33 ± 2.89	160	213.33
		65		160	
		65		320	
	Montanide ISA 780 VG	85	81.67 ± 5.77	320	266.67
		70		160	
		85		320	
Control		0	0.00 ± 0.00	0	0
		0		0	
		0		0	

[0139]

[0140]

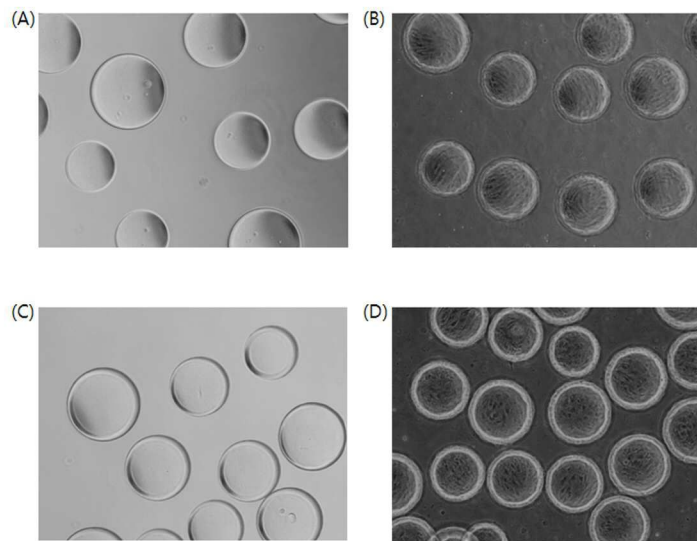
그 결과, 부형제를 첨가하지 않은 SCMCS-IMV-sII 백신은 평균 58.33%의 생존율을 나타냈고, 부형제인 Beta-glucan, Squalene + Aluminum 및 Montanide ISA 780 VG를 각각 투여한 그룹들에서는 10% 이상 높은 생존율을 나타냈다 (표 9). 특히, Beta-glucan을 부형제로 사용한 경우 83.33%의 생존율로 가장 높게 나타났다.

[0141]

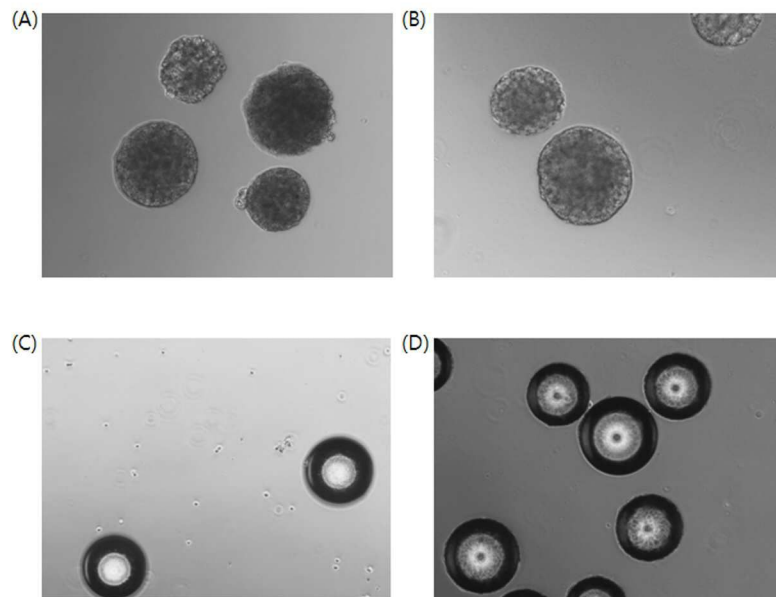
또한, 중화항체가 시험(Neutralization test) 결과 Beta-glucan 또는 Montanide ISA 780 VG를 부형제로 이용한 백신 그룹들에서 266.67로 가장 높았고, 다른 모든 백신 그룹들 모두에서 200 이상의 중화항체가를 나타냈다 (표 9). 이를 통해, 백신접종으로 인한 면역화로 이후 항원의 침입에 대하여 충분한 항체를 생산함으로써 높은 평균 생존율을 보인 것으로 유추된다.

도면

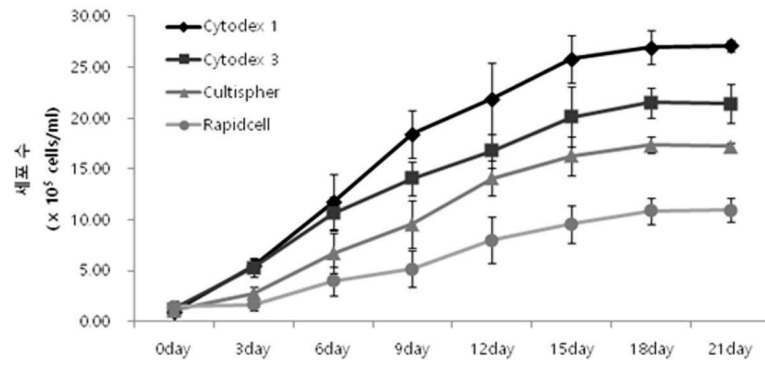
도면1



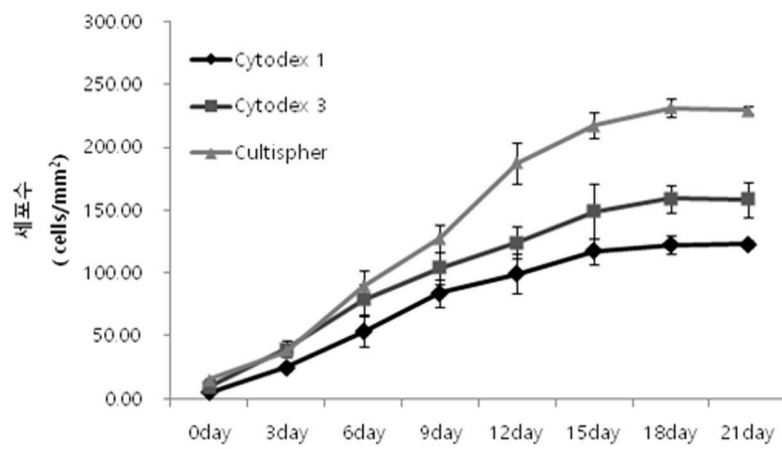
도면2



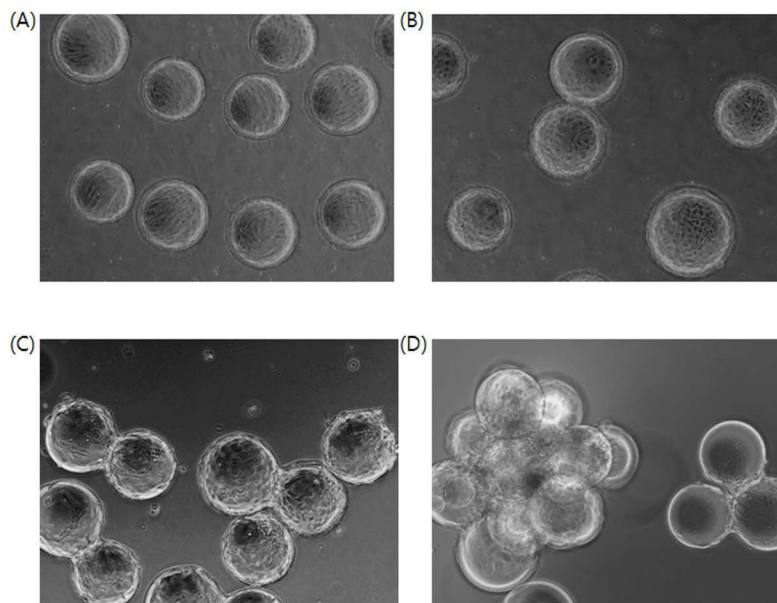
도면3



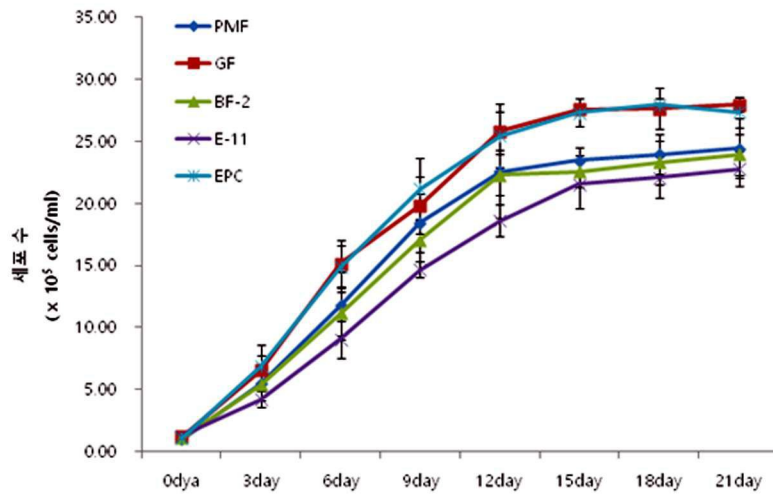
도면4



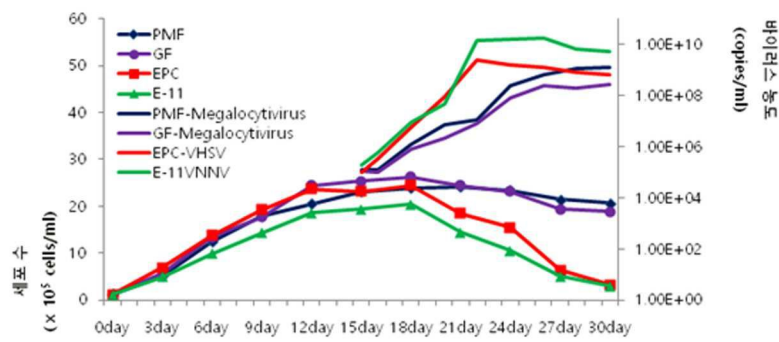
도면5



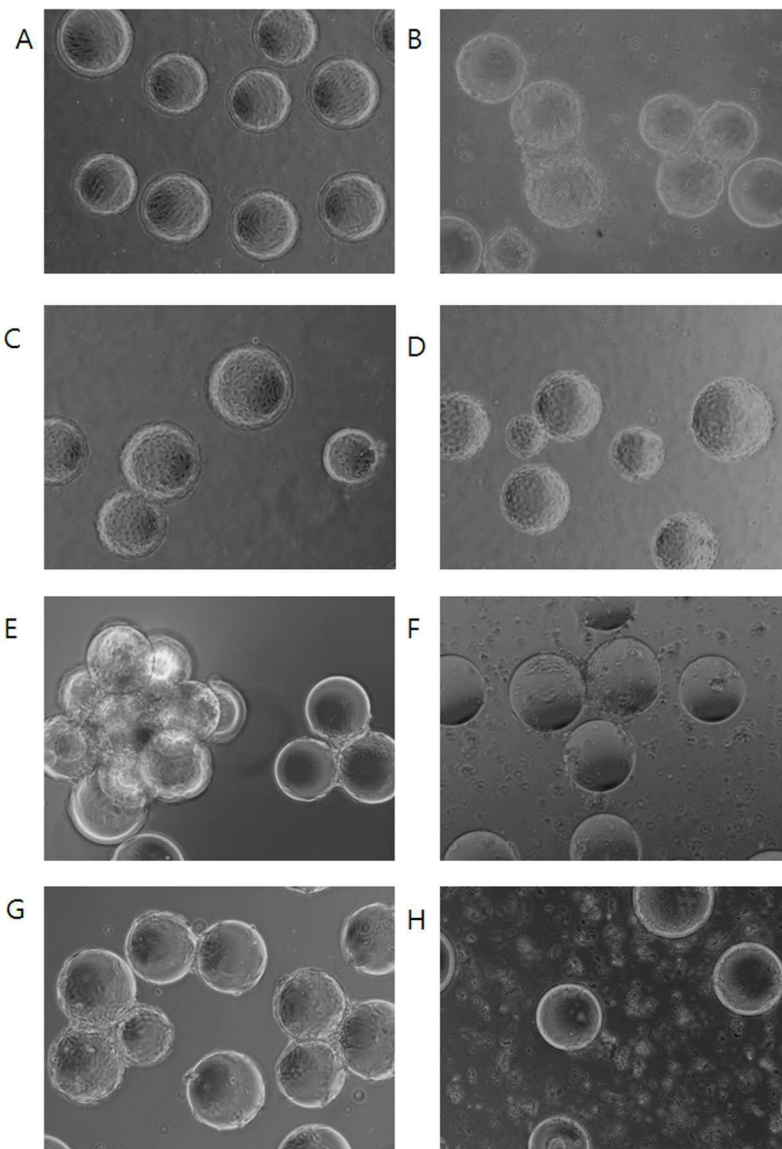
도면6



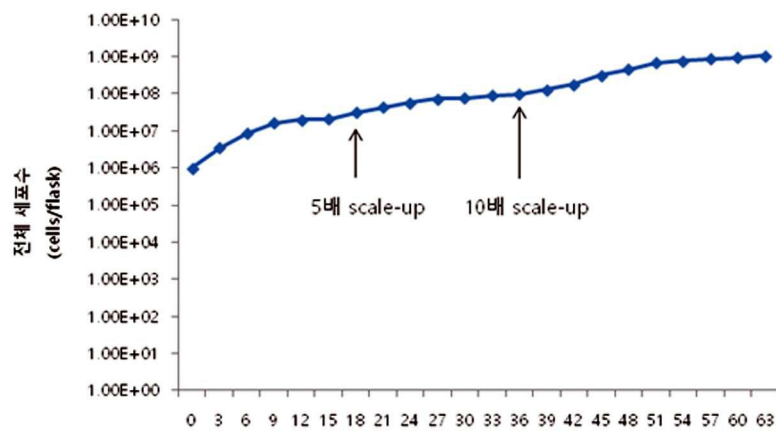
도면7



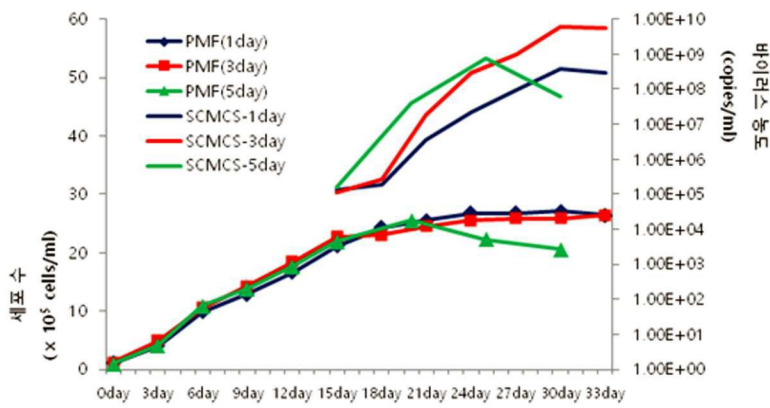
도면8



도면9



도면10



도면11

