(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0114710
(43) 공개일자 2024년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 39/135* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/135 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0006052
(22) 출원일자 2024년01월15일
심사청구일자 2024년01월15일
(30) 우선권주장
1020230006150 2023년01월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)
경상북도 김천시 혁신8로 177 (율곡동)
(72) 발명자
이종수
대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 수의과대학 수의학과
박종현
경상북도 김천시 혁신4로 46, 105동 2502호(율곡동, 한신더휴 퍼스트리움)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
황이남

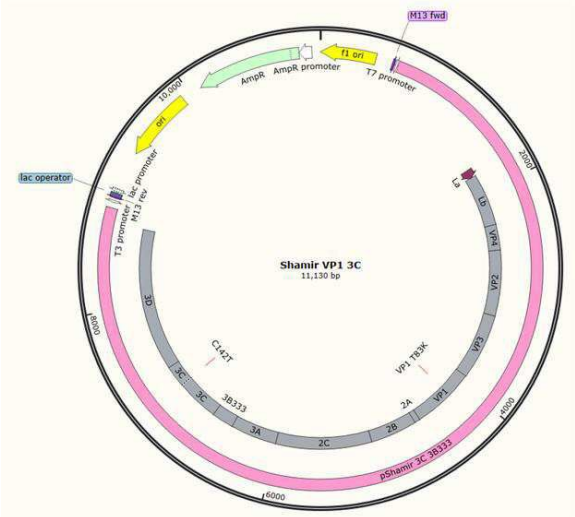
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **약독화된 Asia1 혈청형 구제역 바이러스 및 이를 포함하는 백신 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 구제역 바이러스의 유전자 서열의 일부가 다른 돌연변이를 만들어서 병원성이 없거나 낮아져 약독화된 구제역 키메라 바이러스에 관한 것으로, 본 발명에 따른 약독화된 구제역 바이러스를 이용하게 되면 고도의 차폐 연구실이 아닌 곳에서 사용이 가능하게 되어 구제역 바이러스의 연구 및 백신개발, 방역 기술 등 다양한 분야에서 접근 가능할 것이다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
C12N 2770/32121 (2013.01)
C12N 2770/32134 (2013.01)
C12N 2770/32162 (2013.01)
G01N 2333/09 (2013.01)

(72) 발명자
김수미
대전광역시 중구 계백로1615번길 34, 115동 1903호(유천동, 현대아파트)
이민자
경상남도 양산시 대운5길 7, 106동 406호(명동, 웅상신도시 화성파크드림)
박성한
경상북도 김천시 혁신8로 177 농림축산검역본부
황성윤
경상북도 김천시 해오름1로 17, 405동 102호(율곡동, 경북김천혁신엘에이치천년나무4단지)
신성호
경상북도 김천시 혁신3로 46, 615호(율곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155956
과제번호 2018M3A9H4079660
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 구제역바이러스의 병인기전 연구 및 응용 (숙주 면역반응에 대한 구제역바이러스의 회피기전 연구 및 응용)
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345351952
과제번호 2021R1A6A1A03045495
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소 지원사업
연구과제명 재난형 수의바이러스 기초기전연구 및 예방적 응용연구
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2030.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545028073
과제번호 B-1543386-2022-24-0302
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림축산검역본부
연구사업명 농림축산검역검사기술개발
연구과제명 저병원성 구제역바이러스 제작과 이를 이용한 생물안전 응용기법 연구
과제수행기관명 농림축산검역본부
연구기간 2022.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

구제역 바이러스의 비구조 단백질 3C 서열의 142번째 아미노산인 시스테인 (Cysteine)을 트레오닌으로 변형시킨 아미노산 서열(서열번호 9)을 포함하는 구제역 키메라 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 구제역 키메라 바이러스는 구제역 바이러스의 구조 단백질인 VP1의 83번째 아미노산인 트레오닌(threonine)을 리신(Lysine) 으로 변형시킨 아미노산 서열(서열번호 5)을 추가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 구제역 키메라 바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 구제역 키메라 바이러스는 5' 비번역 영역 또는 3' 비번역 영역 중 어느 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 구제역 키메라 바이러스.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 구제역 키메라 바이러스는 Asia1 혈청형인 것을 특징으로 하는 구제역 키메라 바이러스.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 구제역 키메라 바이러스는 서열번호 16의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 구제역 키메라 바이러스.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 구제역 키메라 바이러스를 제조하는 서열번호 15의 재조합 플라스미드.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 구제역 키메라 바이러스 또는 상기 구제역 키메라 바이러스로부터 분리·정제된 항원을 포함하는 구제역 백신 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 구제역 키메라 바이러스 또는 상기 구제역 키메라 바이러스로부터 분리·정제된 항원을 이용한 구제역 진단 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 구제역 키메라 바이러스 또는 상기 구제역 키메라 바이러스로부터 분리·정제된 항원을 이용하여 사람을 제외한 동물에서의 구제역 예방 또는 치료 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 구제역 키메라 바이러스 또는 상기 구제역 키메라 바이러스로부터 분리·정제된 항원을 포함하는 구제역 진단 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역원성을 유도하고(immunogenic), 살아있으면서(live), 약독화된(attenuated) 구제역 바이러스 백신의 생산을 위해 Asia1 타입 구제역 바이러스(FMDV) 유전자 서열 중 특정 부위를 변형시켜 만들어진 약독화 구

제역 바이러스(Foot-and-mouth disease viruses) 및 구제역 바이러스(또는 FMDV) 키메라(Chimera)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 구제역 바이러스(FMDV)는 피코르나 바이러스과 (Picornaviridae)에 속하며 아프토 바이러스 속(genus Aphthovirus)에 속한다. 구제역 바이러스는 전형적으로 비리온(virion)당 약 30 nm의 직경을 갖는 20면체(icosahedral) 기하학적 구조를 가지는 외피 비보유 (Non-enveloped)바이러스이다.

[0003] 구제역 바이러스 게놈은 길이 약 8-9 킬로베이스이고, 4 개의 주요 바이러스 구조 단백질(P1 region) 및 여러 개의 비구조(P2 region, P3 region) 단백질을 암호화하는 하나의 긴 형태의 선형 단일 양성가닥 RNA 게놈을 포함한다.

[0004] 구조 및 비구조 단백질은 각각의 폴리프로테인으로 번역된다. 폴리프로테인은 세포 및 바이러스 프로테아제에 의해 처리되어 개별 바이러스 폴리펩티드를 형성한다.

[0005] 또한, 구제역 바이러스 게놈은, 바이러스 복제에 일부 관여하는 다양한 보존된 스템(stem) 및 루프 구조를 포함하며 길이가 약 1000 뉴클레오티드(nt)인 보존된 5' 비코딩 영역(NCR 또는 비번역 영역(5'UTR)) 및 길이가 약 100 내지 200 뉴클레오타이드인 3' UTR을 함유한다.

[0006] FMDV는 O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 및 SAT3의 7가지 혈청형이 존재하며, FMDV 감염은 주로 남아메리카, 아프리카 및 아시아의 지역에서 관찰되고 있으며 FMDV에 감염되어 일어나는 전염병인 구제역은 동물의 건강을 위협하고 경제적으로도 생산성의 손실 때문에 발생되는 국가에서 심각한 경제적 손실을 유발할 수 있기 때문에 세계동물보건기구(WOAH)에서 지정한 중요 가축 전염병으로 가축전염병예방법 제1종 가축전염병에 속한다.

[0007] 한편, 구제역은 국내에서도 거의 해마다 발생하고 있으며, 구제역 발생 시 농가의 피해를 최소화하기 위해 다양한 백신들이 개발되고 있지만, 구제역 바이러스를 약독화시키는 기술에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 등록특허공보 제10-1546810호

(특허문헌 0002) 등록특허공보 제10-1535555호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Lee et al., Rapid Engineering of Foot-and-Mouth Disease Vaccine and Challenge Viruses, 2017.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 구제역 백신은 일반적으로 동물세포에서 대량으로 증식시킨 후 이를 화학적으로 불활화하고 정제 및 농축과정을 거쳐 생산된 항원을 이용하여 백신을 생산하고 백신의 안전성 및 방어 효능을 평가하고 있다. 이 때 구제역바이러스 및 백신에 대한 연구를 하기 위해 차폐시설이 필요하게 되므로 높은 비용과 전문적인 인력을 요구하게 된다.

[0011] 따라서 상기와 같은 문제를 해결하기 위해 본 발명은 약독화시킨 구제역 바이러스 및 이를 이용한 백신을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 구제역 바이러스 게놈에서 하나 이상의 염기를 점변이(mutation), 유전자 결손 또는 교체(deletion or replacement) 방법을 통해 병원성이 없거나 낮아진(약독화된) 구제역 바이러스 게놈을 제공한다.

[0013] 상기 약독화된 구제역 바이러스는 키메라 바이러스일 수 있다.

[0015] 본 발명에서의 구제역 키메라 바이러스는 적어도 하나의 비구조적 단백질(nonstructural protein)을 암호화하는 아미노산 서열;

[0016] 및/또는 구제역 바이러스로부터 약독화를 위한 적어도 하나의 구조 단백질(structural protein)을 암호화하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 상기 구조 단백질은 P1을 포함하며, P1은 VP1, VP2, VP3, VP4 중 어느 하나 이상을 포함한다.

[0018] 상기 비구조적 단백질은 P2 및/또는 P3을 포함하며, 상기 P2는 2A, 2B, 2C 중 어느 하나 이상을 포함하며, 상기 P3은 3A, 3B, 3C, 3D 중 어느 하나 이상을 포함한다.

[0019] 또한, 상기 구제역 키메라 바이러스는 5' 비번역 영역(5' untranslated region; UTR) 및/또는 3' 비번역 영역(UTR)의 뉴클레오타이드 서열을 더 포함할 수 있다.

[0020] 상기 구제역 키메라 바이러스는 혈청형 O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 또는 SAT3 중 어느 하나의 혈청형일 수 있으며, 바람직하게는 Asia1 또는 O 혈청형일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명은 구제역 바이러스 게놈에서 하나 이상의 약독화 돌연변이를 도입함으로써, 구제역 바이러스 "백본" 게놈을 변형시켜 FMDV를 키메라 바이러스로 전환함으로써 약독화된 구제역 바이러스에 관한 것이다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에서는 구제역 바이러스 백본으로부터 제조된 키메라 FMDV를 제공하며, 점 돌연변이를 이용하여 구제역 바이러스 유전자 서열을 변화시켜 약독화된 구제역 바이러스 돌연변이 FMDV 게놈을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 구조 단백질 중 하나인 VP1 서열(변형 전 VP1 염기서열: 서열번호 2, 변형 전 VP1 아미노산 서열: 서열번호 4)의 83번째 아미노산 트레오닌(T)을 리신(Lysine) 으로 변형(변형 후 VP1 염기서열: 서열번호 3, 변형 후 VP1 아미노산 서열: 서열번호 5) 및/또는 비구조 단백질 중 하나인 3C(변형 전 3C 염기서열: 서열번호 6, 변형 전 3C 아미노산 서열: 8) 서열의 142번째 아미노산 시스테인(C)을 트레오닌(Threonine)으로 변형(변형 후 3C 염기서열: 서열번호 7, 변형 전 3C 아미노산 서열: 9)시킨 게놈 및 비리온을 제공한다.

[0027] 본 발명에서의 약독화된 구제역 바이러스의 경우, 약독화 돌연변이는 임의의 점 돌연변이 또는 이들의 임의의 조합, 또는 구제역 바이러스의 독성을 감소시키거나 제거하는 그러한 돌연변이를 포함할 수 있지만, 바이러스의 복제 능력을 차단하지 못하며 면역원성 성분을 발현하도록 허용한다. 약독화 돌연변이는 게놈의 어느 곳에나 도입될 수 있으며, 특정부위에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명은 약독화된 구제역 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신을 제공한다. 약독화는 하나 이상의 약독화 돌연변이를 포함하는 구제역 바이러스의 게놈의 결과일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기의 구제역 키메라 바이러스, 상기 구제역 키메라 바이러스에서 분리·정제된 항원을 포함하는 구제역 백신 조성물을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 구제역 키메라 바이러스의 제조방법 및 상기 구제역 키메라 바이러스로부터 항원을 분리·정제하는 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명에 따른 구제역 키메라 바이러스는 구제역 바이러스의 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드를 통해 제조될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 구제역 키메라 바이러스는 서열번호 16의 서열을 갖고, 상기 구제역 키메라 바이러스는 서열번호 14 및/또는 15 의 재조합 플라스미드를 통해 제조될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 구제역 키메라 바이러스 또는 상기 구제역 키메라 바이러스로부터 분리·정제된 항원을 포함하는 구제역 백신 조성물을 이용하여 구제역을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0041] 또한, 상기 구제역 키메라 바이러스 또는 상기 구제역 키메라 바이러스 항원을 포함하는 구제역 진단 키트 또는 구제역 진단 키트 조성물을 제공한다.

[0043] 또한, 상기 구제역 진단 키트 또는 구제역 진단 키트 조성물을 이용한 구제역 진단 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 구제역 키메라 바이러스는 O형 또는 Asia1형을 기초로 한다.

[0046] 상기 O형은 제한되는 것은 아니지만 본 발명의 일 실시예에서 O1-Manisa일 수 있다.

[0047] 상기 Asia1형은 제한되는 것은 아니지만 본 발명의 일 실시예에서 아형인 Asia1 Shamir일 수 있다.

[0049] 상기 백신 조성물은 사람을 제외한 돼지, 양, 염소, 사슴 및 야생 반추류 등의 우제류에 투여될 수 있다.

[0051] 또한, 상기 백신조성물은 당 업계에서 통상적으로 허용 가능한 담체, 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제 등을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0052] 또한, 상기 백신 조성물은 다양한 형태로 개체에 투여(또는 주입)될 수 있다. 투여는 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 또는 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행될 수 있다.

[0054] 본 발명에서 용어 "플라스미드(plasmid)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 플라스미드는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다.

[0056] 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 것이 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포 당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 선별 표지 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker) 등을 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0058] 본 발명의 재조합 벡터 또는 플라스미드, 구제역 키메라 바이러스는 통상의 유전자 조작법, 형질전환법에 의해

제조될 수 있으며, 적은 양으로 형성된 바이러스를 세포배양을 통한 연속 계대로 적절한 양의 바이러스를 수득할 수 있다.

[0059] 상기 세포는 개과 동물, 고양이과 동물, 멧돼지과 동물, 소과 동물, 사슴과 동물, 기린과 동물, 페커리과 동물, 낙타과 동물, 하마과 동물, 말과 동물, 맥과 동물, 코뿔소과 동물, 족제비과, 토끼과, 설치류 및 영장류의 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포에서 유래된 것일 수 있고, 바람직하게는 염소 혀 세포(ZZ-R) 및 햄스터 신장 세포 (BHK-21), 흑염소 신장세포(BGK), 돼지 신장세포 (IBRS-2) 및 소 신장세포 (LFBK)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0060] 본 발명은 구제역 바이러스의 유전자 서열의 일부가 다른 돌연변이를 만들어서 병원성이 없거나 낮아져 약독화된 구제역 바이러스 게놈을 제공한다.

[0061] 또한, 본 발명에 따른 약독화된 구제역 바이러스를 이용하게 되면 고도의 차폐연구실이 아닌 곳에서 사용이 가능하게 되어 구제역 바이러스의 연구 및 백신개발, 방역 기술 등 다양한 분야에서 접근 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1a는 약독화된 바이러스 제작에 사용된 백본 구제역 바이러스의 유전자 모식도를 나타낸 것이며, VP1 83번째 아미노산 서열과 3C 142번째 아미노산 서열의 돌연변이 부위를 나타내고 있다.

도 1b는 약독화된 구제역 바이러스의 발현을 위한 재조합 키메라 플라스미드를 나타낸 것이며, 구제역 바이러스 백본에서 VP1 83번째 아미노산 서열과 3C 142번째 아미노산 서열의 변경됨을 표시하였다.

도 2는 바이러스 성장 곡선 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 면역 사이토카인 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 성체 마우스에서 병원성 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 성체 마우스에서 면역원성 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 포유아(젖먹이) 마우스에서 병원성 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 돼지에서 병원성 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 돼지에서 면역원성 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 돼지 혈청을 이용하여 항체형성율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0064] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0066] <실시예>

[0067] 1. 재조합 플라스미드 준비

[0068] 키메라 바이러스는 이전 연구(Lee et al., Rapid Engineering of Foot-and-Mouth Disease Vaccine and Challenge Viruses, 2017)에 설명된 대로 준비되었고, 구체적인 과정은 다음과 같다.

[0069] 플라스미드(Asia1 Shamir) 백본 서열(서열번호 1과 14)에서 VP1의 83번째 아미노산 트레오닌 (Threonine)을 리신 (Lysine) 로 변형시키고 3C의 142번째 아미노산 시스테인 (Cysteine)을 트레오닌 (Threonine) 으로 변형된 게놈을 만들기 위해 PCR로 증폭 하였으며 올리고뉴클레오티드 프라이머를 다음과 같이 사용하였다.

[0070] *클로닝시 필요한 프라이머 서열(primer)

[0071] Shamir_T83K_F (벡터증폭용 서열정보 1의 4158부터 forward 방향) :

[0072] AGGGCCCGGTCACCTGGGTG(서열번호 10)

[0073] Shamir_T83K_R (벡터증폭용 서열정보 1의 4157부터 reverse 방향) :

[0074] TGTGGACAAGCGCGACCTC(서열번호 11)

[0075] Shamir_C142T_F (벡터증폭용 서열정보 1의 7106부터 forward 방향) :

[0076] TGCATGGATGGAGACACCATGCCG(서열번호 12)

[0077] Shamir_C142T_R (벡터증폭용 서열정보 1의 7105부터 reverse 방향) :

[0078] CACTACAATGTCCTTGTAGGTGAGGGC(서열번호 13)

[0079] Shamir VP1(T83K) 3C(C142T) 재조합 바이러스는 다음과 같이 제조되었다.

[0081] [Shamir VP1(T83K) 3C(C142T) 재조합 바이러스 제조]

[0082] Shamir VP1(T83K) 3C(C142T) 재조합 바이러스를 제조하기 위해 pShamir-3B333 벡터서열(Shamir VP1(T83K) 3C(C142T) 작성을 위한 재조합 플라스미드 벡터 백본 (Asia1 shamir (서열번호 1)의 $3B_1B_2B_3$를 $3B_3B_3B_3$로 교체 조작한 서열)을 pBluescript II 벡터에 삽입하여 재조합 플라스미드(서열번호 14)를 제조하였다. 이후, 4158번째 내지 4159번째 VP1 서열과 7106번째 내지 7107번째에 해당하는 Shamir 3C 서열을 변경(4158번째 내지 4159번째의 서열의 염기 중 CA를 AG로, 7106번째 내지 7107번째의 염기를 TG에서 AC로 변경)하여 재조합 플라스미드(서열번호 15)를 완성하였다.

[0084] 2. 세포 배양 및 바이러스 회수

[0085] ZZ-R 127 세포가 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12로 유지되었으며 BHK는-21 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Corning) 으로 유지했다. 10% 태아 소 혈청 (Paisley, UK), 100U/mL 페니실린 및 100mg/mL 스트렙토마이신이 배양에 첨가되었다. BHK-T7-9 세포는 5% 소 태아 혈청(Gibco BRL, Paisley, UK) 및 10% Tryptose Phosphate Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 넣어 배양하였다. BHK-21 현탁 세포는 5% CO_2 조건에서 CD BHK-21 생산 배지(Gibco BRL, Paisley, UK)에서 유지되었다.

[0086] 회수된 바이러스는 이전 연구(Lee et al., 2017) 와 동일한 절차를 사용하여 획득하였다. 재조합 플라스미드를 제한 효소 SpeI (NEB, Beverly, USA)로 처리하여 선형화하고 BHK-T7-9 세포의 감염성 재조합 바이러스를 Lipofectamine 3000(Invitrogen, Carlsbad, USA)을 사용하여 형질전환시켜 이러한 선형화된 플라스미드가 바이러스가 회복되도록 하여 재조합 키메라 바이러스를 회수하여 수득하였다(서열 16). 이렇게 확보된 재조합 바이러스는 48 내지 72 시간 동안 37℃에서 배양하여 계대하고 바이러스를 3회의 동결-해동 주기로 수확하고 상기의 재조합 키메라 바이러스를 사용하여 신선한 ZZ-R 127 세포에 감염시켰다. FMDV 또는 바이러스 관련 동물에 대한 모든 실험은 생물안전성 수준 3(BSL-3)에서 수행되었다.

[0088] <실험예>

[0089] 1. 바이러스 성장곡선 측정

[0090] ZZ-R 127, LFBKαvβ6, BHK-21 세포에 야생형과 상기 실시예에서 제조된 약독화된 구제역 키메라 바이러스를 각각 접종 1시간 후 배지를 교체하여 준다. 그리고 접종 후 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24시간에 배지 수집을 진행하였다. 세포로부터 나온 증식된 바이러스의 양을 측정하기 위해 제조사의 프로토콜에 따라 QIAcube HT(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 총 세포 RNA를 추출하였다. RT-PCR은 제조사의 지시에 따라 one-step prime-script RT-PCR kit(Bioneer, Republic of Korea)를 사용하여 수행하였다. 바이러스 정량에는 CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 실험결과는 도 2에 나타내었다.

[0091] 실험 결과, ZZ-R 127, LFBKαvβ6, BHK-21 3종류의 세포에 야생형 바이러스를 감염 시켰을 때는 감염 후 8시간이 지났을 때부터 급격하게 세포 내에서 증식이 이루어져 세포 밖으로 방출되는 반면에 약독화된 바이러스 3C, VP1 3C 바이러스의 경우에는 감염 후 24시간이 되어도 야생형 바이러스보다 증식성이 떨어지는 것을 확인할 수

있었다.

[0093] 2. 면역 사이토카인 검출

[0094] 실시간 (RT) PCR은 세포에 바이러스를 감염시킨 후 세포 추출물 채취를 실시하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 QIAcube HT(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 총 세포 RNA를 추출하였다. cDNA 합성은 제조사의 지시에 따라 SuperScript III First-Strand kit (Invitrogen)를 사용하여 수행하였다. RT-PCR은 제조사의 지시에 따라 Bio-Rad iCycler using an iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)를 사용하여 수행하였다. 바이러스 정량에는 CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 실험결과는 도 3에 나타내었다.

[0095] 실험 결과, 야생형 바이러스를 감염시킨 세포보다 약독화 된 바이러스를 감염시킨 세포내에서 항바이러스 효과를 확인할 수 있는 유전자(IFN-α, IFN-β, MX1, OAS)의 발현이 증가함을 통해 세포 내에서 증식성이 억제된 것으로 추정된다.

[0097] 3. 성체 C57BL/6 마우스에서 구제역 바이러스 공격을 통한 병원성 평가

[0098] 도 6은 포유아(젖먹이) 마우스에서 병원성 실험 결과를 나타낸 것이다.

[0099] 표적 동물에 대한 공격시험 전에 병원성의 약독화 예측을 위해 마우스에서 쉽고 빠른 방법을 사용하였다. 7 주령 C57BL/6 암컷 마우스를 이용하였다. 실험그룹 (5 마리 마우스/그룹)이 사용되었다. 제조된 약독화 바이러스 5 x 10^4 $TCID_{50}$/0.1ml를 공격한 후 7일 동안 생존율과 체중(Body weight; BW) 변화를 관찰하였다. 이후 7일째 생존한 개체에 대하여 Shamir 야생형 바이러스를 공격한 후 7일을 추가적으로 관찰하였다. 실험결과는 도 4에 나타내었다.

[0100] 실험 결과, 7 주령 C57BL/6 암컷 마우스에 야생형 바이러스와 약독화된 바이러스를 공격접종하여 생존율과 체중을 측정하였는데, 야생형 바이러스에 감염된 마우스는 2dpc부터 죽기 시작하여 6dpc에 생존율이 0%가 된 반면에 약독화된 바이러스에 감염된 마우스의 경우 7dpc까지 100% 생존률을 확인하였다. 7dpc까지 생존한 모든 마우스에 야생형 바이러스를 공격접종하여 감염 시켰는데 14dpc까지 생존한 것으로 보아 약독화된 바이러스에 의해 자극된 면역반응 덕분에 생존한 것으로 추정된다.

[0101] 체중의 경우 생존율의 경향성과 비슷하여 야생형 바이러스에 감염된 마우스는 체중 감소를 보인 반면에 약독화된 바이러스에 감염된 마우스에서는 체중감소가 확인되지 않았다.

[0103] 4. 마우스 실험용 백신의 면역원성 평가

[0104] 마우스의 혈청은 약독화 공격 접종 후 7일에 수집되었고 추가로 야생형 바이러스 공격 접종 후 7일에 수집되었다. 혈청 내 구제역 바이러스의 구조 단백질에 대한 항체는 PrioCheck FMDV O(Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland)를 사용하여 검출되었다. > 50 % 억제율 (%) 값을 반영 다음과 같이 동물은 면역 반응을 입증한 것으로 간주하였다. 실험결과는 도 5의 왼쪽 그림에 나타내었다.

[0105] 실험 결과, ELISA의 경우 7dpc에서는 약독화 바이러스에 감염되긴 했지만 양·음성의 기준인 50%를 넘지 못하여 음성이지만 항체가 감염시키지 않은 (Negative control) 그룹에 비해 항체가가 증가한 것을 볼 수 있었고 VP1 3C double mutant 바이러스에 감염된 그룹 보다 3C single mutant 바이러스에 감염된 그룹에서 더 높은 항체가를 확인하였다. 14dpc에서는 야생형 바이러스에 감염되어 3C single mutant 바이러스에 감염된 그룹과 VP1 3C double mutant 바이러스에 감염된 그룹 모두 항체가 올라서 양성을 보였다.

[0107] 5. 마우스 혈청에 대한 바이러스 중화시험

[0108] 혈청 샘플을 56℃에서 30분 동안 열처리로 불활성화시켰다. 세포농도를 조정하여 70% 단층을 형성시키고 혈청 샘플의 2배 연속 희석액을 준비했습니다. 희석된 혈청 샘플은 37℃에서 1시간 동안 바이러스의 FMDV 100 $TCID_{50}$의 바이러스 역가로 함께 배양되었다. 1시간 후, LFBK 세포 현탁액을 모든 96웰 플레이트에 첨가하였다. 2-3일 후 항체 역가를 결정하기 위해 세포변성 효과를 확인했으며, 이는 바이러스의 100 $TCID_{50}$을 중화하는 데 필요한

역 항체 희석액의 Log10으로 계산되었다. 실험결과는 도 5의 오른쪽 그림에 나타내었다.

[0109] 실험 결과, VNT 결과의 경우 ELISA 결과와 유사한 경향성을 보였으며 7dpc에서는 3C single mutant 바이러스에 감염된 그룹이 VP1 3C double mutant 바이러스에 감염된 그룹 보다 높은 역가를 보였다. 14dpc에서는 반대로 VP1 3C double mutant 바이러스에 감염된 그룹이 3C single mutant 바이러스에 감염된 그룹보다 약간 더 높은 역가를 보였다.

[0111] 6. 포유아(젖먹이) ICR 마우스에서 백신 접종 및 구제역 바이러스 공격

[0112] 표적 동물에 대한 공격시험 전에 병원성의 약독화 예측을 위해 마우스에서 쉽고 빠른 방법을 사용하였다. 3-7일령 포유아(젖먹이) 마우스를 이용하였다. 실험그룹 (12-13 마리 마우스/그룹)이 사용되었다. 제조된 약독화 바이러스 5 x 10^4 $TCID_{50}$/0.1ml를 공격한 후 7일 동안 관찰하였다. 실험결과는 도 6에 나타내었다.

[0113] 실험 결과, 포유아 마우스에 야생형 바이러스와 약독화 바이러스 2종을 감염 시켰을 때 야생형에 감염된 마우스의 경우 2dpc 생존율 0%를 확인하였고, 3C single mutant 바이러스에 감염된 그룹에서는 13마리 중 한 마리가 3dpc에 죽었으며, VP1 3C double mutant 바이러스에 감염된 그룹의 경우 7dpc까지 100% 생존율을 보이는 것으로 보아 double mutant 바이러스가 더 약독화가 된 것으로 추정된다.

[0115] 7. 6-8주령 돼지에서 구제역 바이러스 공격을 통한 병원성 평가

[0116] 도 7은 표적동물 돼지에서 병원성 실험 결과를 나타낸 것이다.

[0117] 6-8 주령 돼지를 이용하였다. 공격접종군 그룹 (3-4 마리 돼지/그룹)과 접촉감염군 그룹 (2마리 돼지/그룹)이 사용되었다. 제조된 약독화 바이러스 5 x 10^4 $TCID_{50}$/0.1ml를 공격한 후 매일 Oral swab을 진행하였으며 1dpc부터 2일 간격으로 채혈을 하였다. 이후 7일째 병원성이 확인되지 않은 개체에 대하여 Shamir 야생형 바이러스를 공격한 후 7일을 추가적으로 관찰하였다. 실험결과는 도 8에 나타내었다.

[0118] 실험 결과, 6-8 주령 돼지에 야생형 바이러스와 약독화된 바이러스를 공격접종하여 감염증상 관찰과 Oral swab 및 혈청에서 바이러스를 측정하였는데, 야생형 바이러스에 감염된 돼지는 3dpc부터 감염 증상이 확인이 되었고 접촉군에서도 전파가 되어 감염증상이 확인이 된 반면에 약독화된 바이러스에 감염된 돼지의 경우 7dpc까지 감염증상이 확인이 되지 않았으며 접촉군에서도 감염증상이 보이지 않았다. 7dpc까지 병원성이 확인 되지 않은 약독화 바이러스 감염 그룹에 야생형 바이러스를 공격접종하여 감염 시켰는데 14dpc까지 관찰한 결과, 약독화 바이러스 공격접종 그룹에서는 감염증상이 확인 되지 않은 반면에 접촉군에서는 감염증상이 나타난 것으로 보아 공격접종된 그룹은 약독화된 바이러스에 의해 자극된 면역반응 덕분에 감염 증상이 나타나지 않았으며 접촉군에서는 면역반응의 자극이 되지 않았고 야생형바이러스에 감염시 방어가 되지 않았으므로 전파가 일어나지 않은 것으로 추정된다.

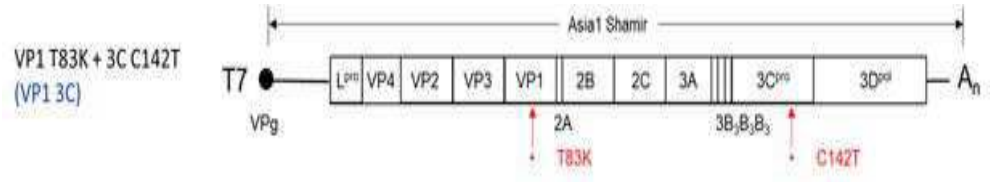
[0120] 8. 돼지 혈청에 대한 바이러스 중화시험

[0121] 혈청 샘플을 56℃에서 30분 동안 열처리로 불활성화시켰다. 세포농도를 조정하여 70% 단층을 형성시키고 혈청 샘플의 2배 연속 희석액을 준비했습니다. 희석된 혈청 샘플은 37℃에서 1시간 동안 바이러스의 FMDV 100 $TCID_{50}$의 바이러스 역가로 함께 배양되었다. 1시간 후, LFBK 세포 현탁액을 모든 96웰 플레이트에 첨가하였다. 2-3일 후 항체 역가를 결정하기 위해 세포변성 효과를 확인했으며, 이는 바이러스의 100 $TCID_{50}$을 중화하는 데 필요한 역 항체 희석액의 Log10으로 계산되었다. 실험결과는 도 9의 오른쪽 그림에 나타내었다.

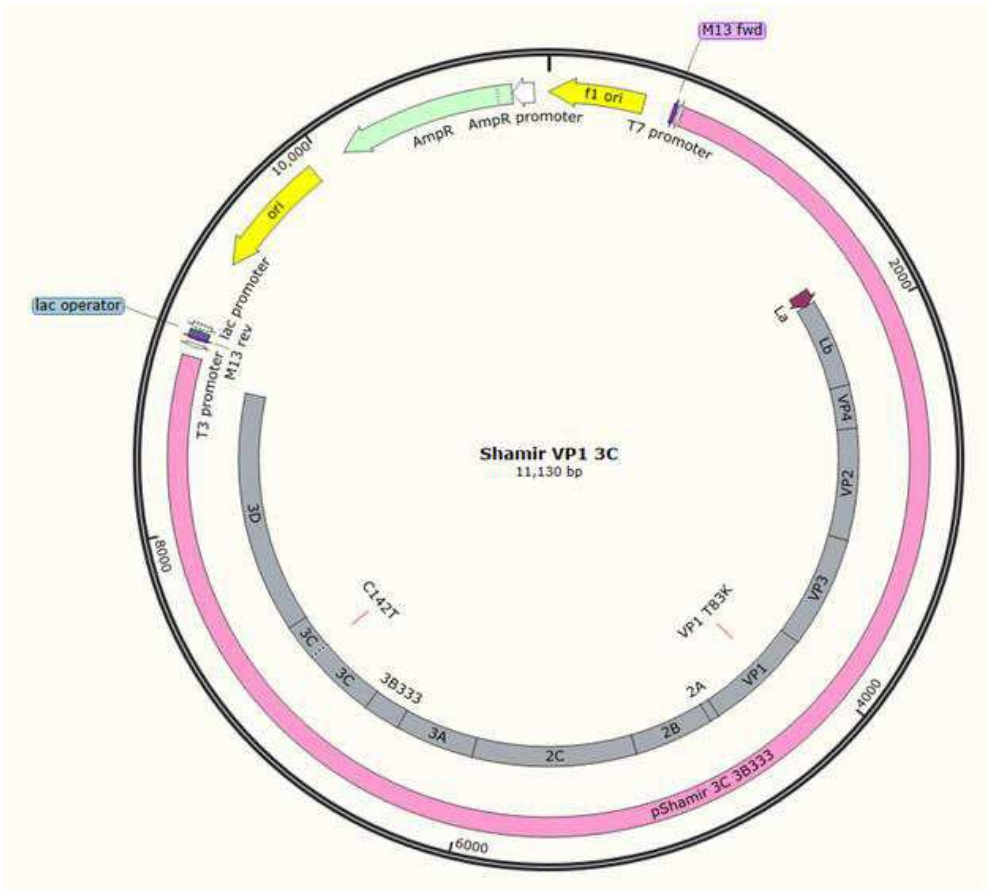
[0122] 실험 결과, VNT 결과의 경우 ELISA 결과와 유사한 경향성을 보였다.

도면

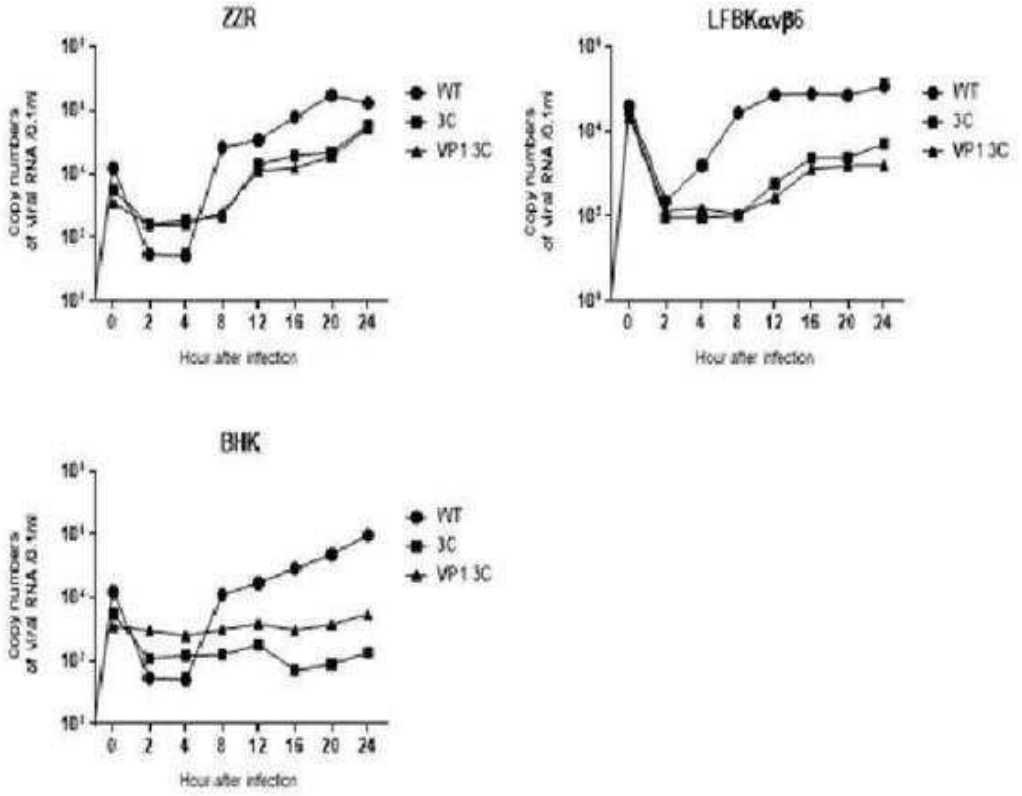
도면1a


VP1 T83K + 3C C142T
(VP1 3C)
Asia1 Shamir
T7
VPg
Lpro
VP4
VP2
VP3
VP1
2B
2C
3A
3Cpro
3Dpol
An
2A
T83K
3B1B2B3
C142T

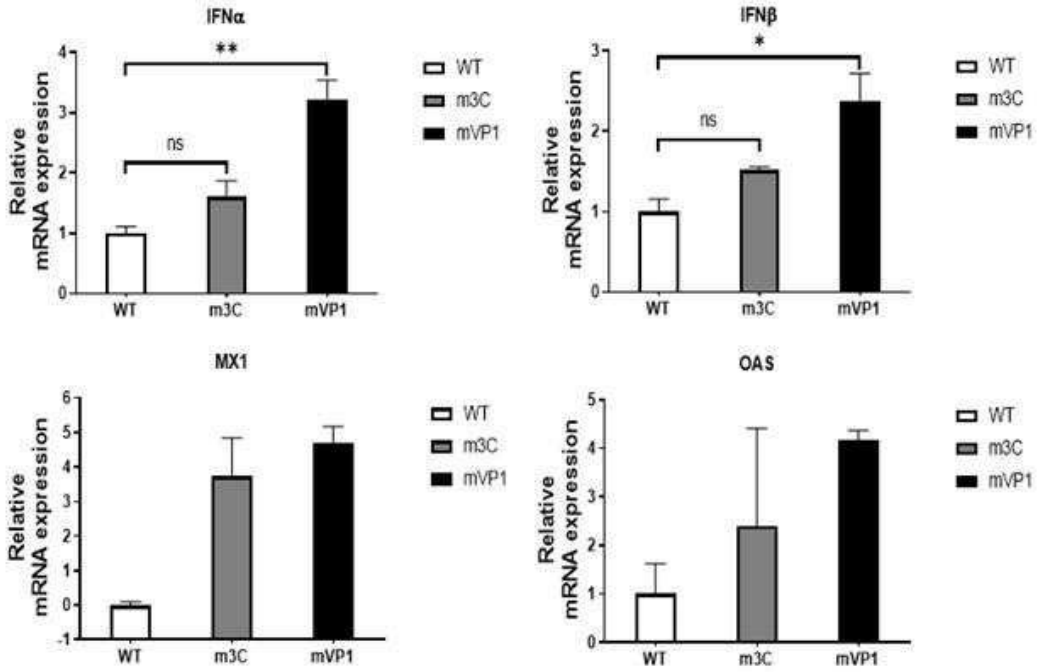
도면1b


M13 fwd
f1 ori
AmpR
AmpR promoter
T7 promoter
10,000
ori
lac operator
lac promoter
M13 rev
T3 promoter
2000
La
Lb
VP4
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3B333
3C
3C
3D
C142T
VP1 T83K
8000
4000
6000
Shamir VP1 3C
11,130 bp
pShamir 3C 3B333

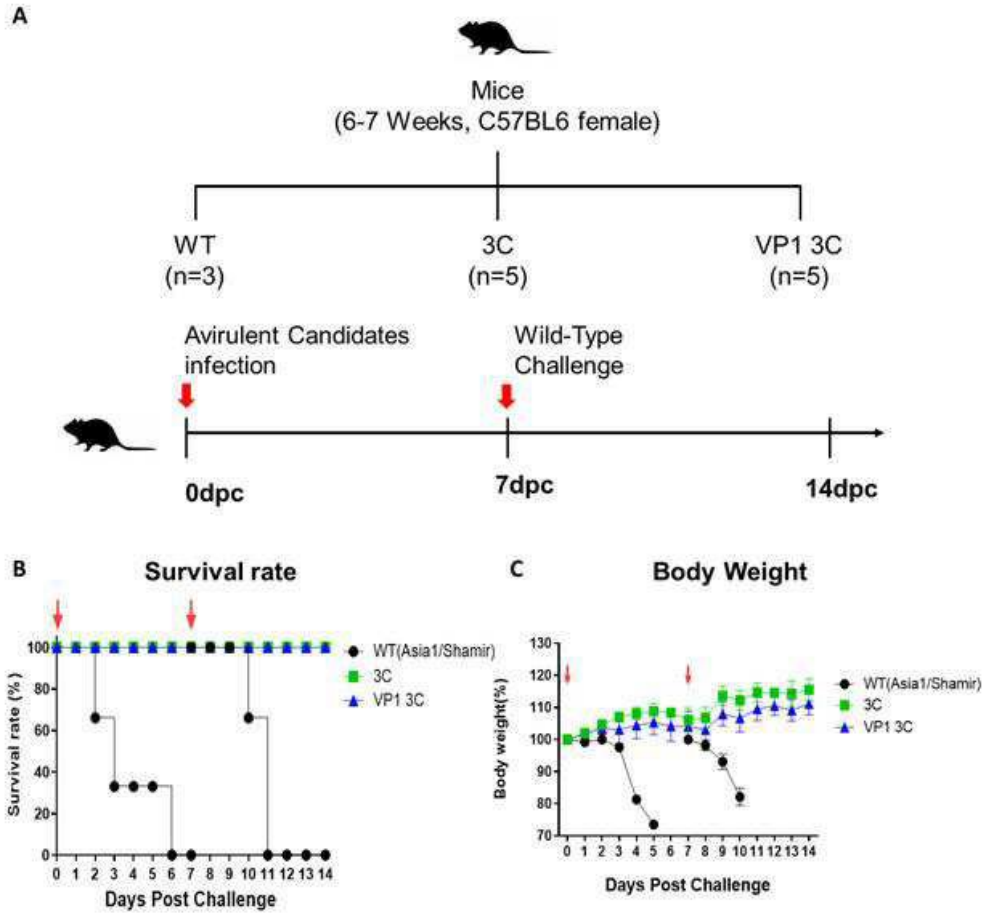
도면2


ZZR
LFBKαvβ6
BHK
Copy numbers of viral RNA /0.1ml
Hour after infection
WT
3C
VP1 3C

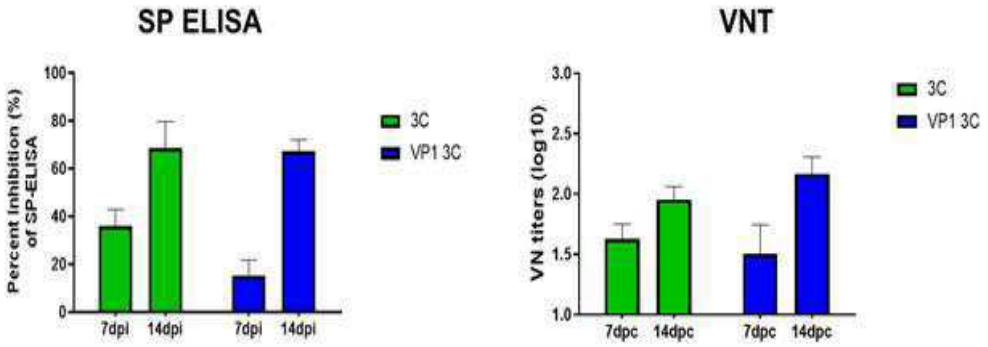
도면3


IFNα
IFNβ
MX1
OAS
Relative mRNA expression
ns
**
*
WT
m3C
mVP1

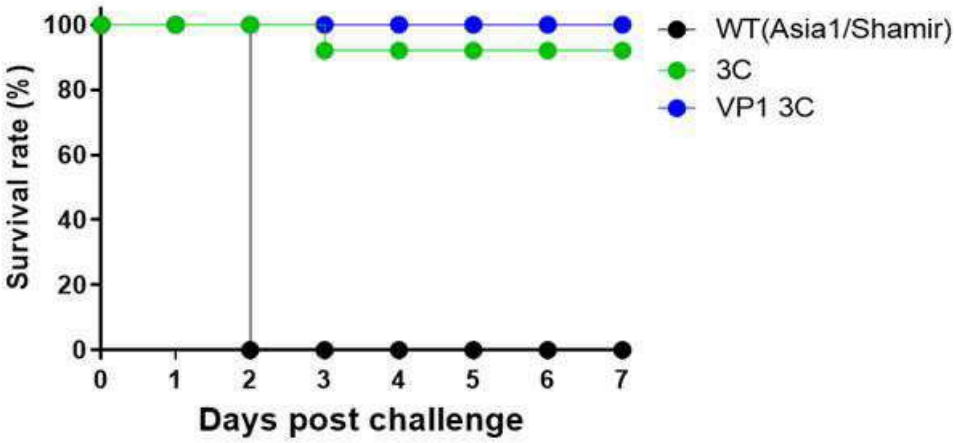
도면4


A
Mice
(6-7 Weeks, C57BL6 female)
WT
(n=3)
3C
(n=5)
VP1 3C
(n=5)
Avirulent Candidates
infection
Wild-Type
Challenge
0dpc
7dpc
14dpc
B
Survival rate
Survival rate (%)
Days Post Challenge
WT(Asia1/Shamir)
3C
VP1 3C
C
Body Weight
Body weight(%)
Days Post Challenge
WT(Asia1/Shamir)
3C
VP1 3C

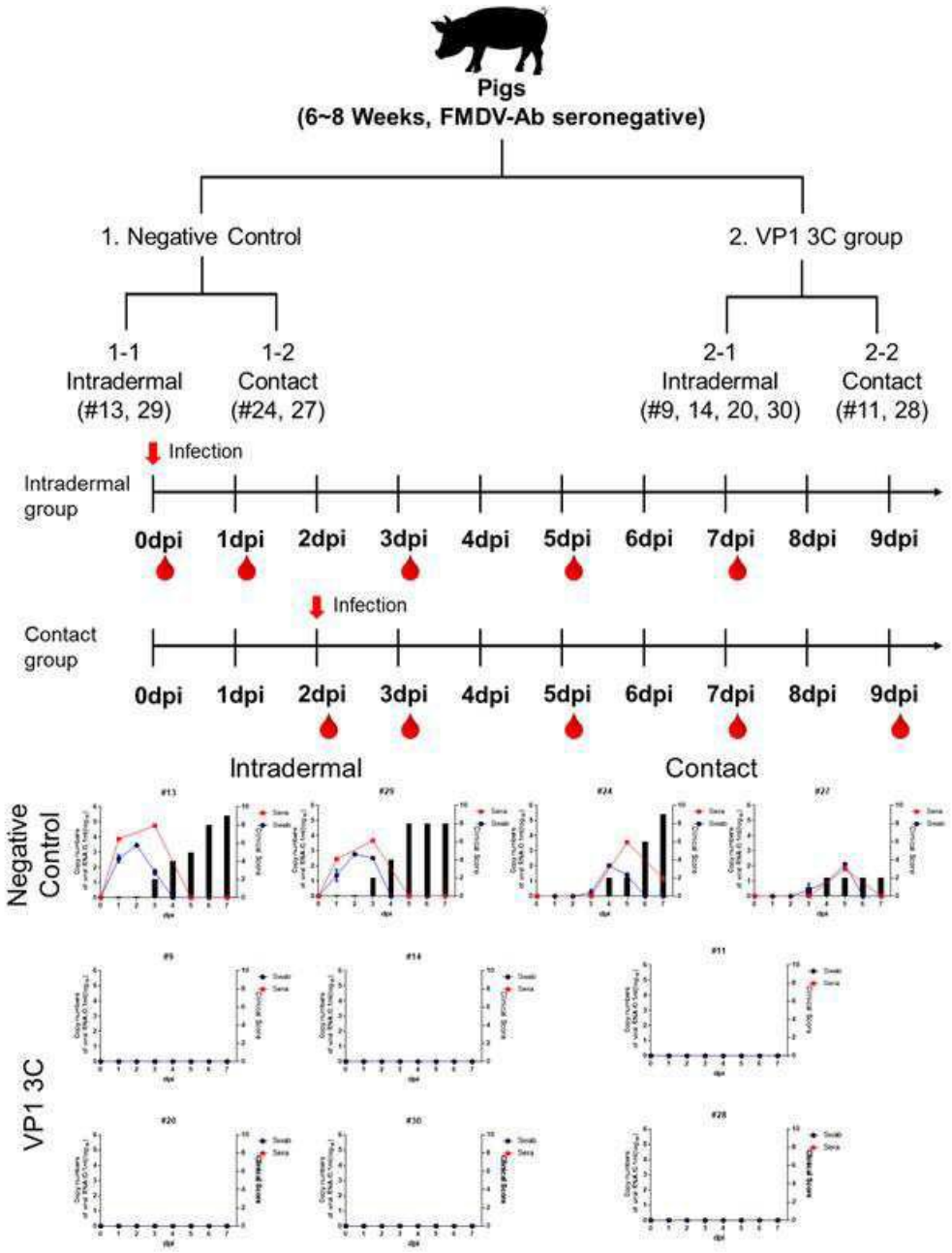
도면5


SP ELISA
Percent Inhibition (%)
of SP-ELISA
7dpi
14dpi
7dpi
14dpi
3C
VP1 3C
VNT
VN titers (log10)
7dpc
14dpc
7dpc
14dpc
3C
VP1 3C

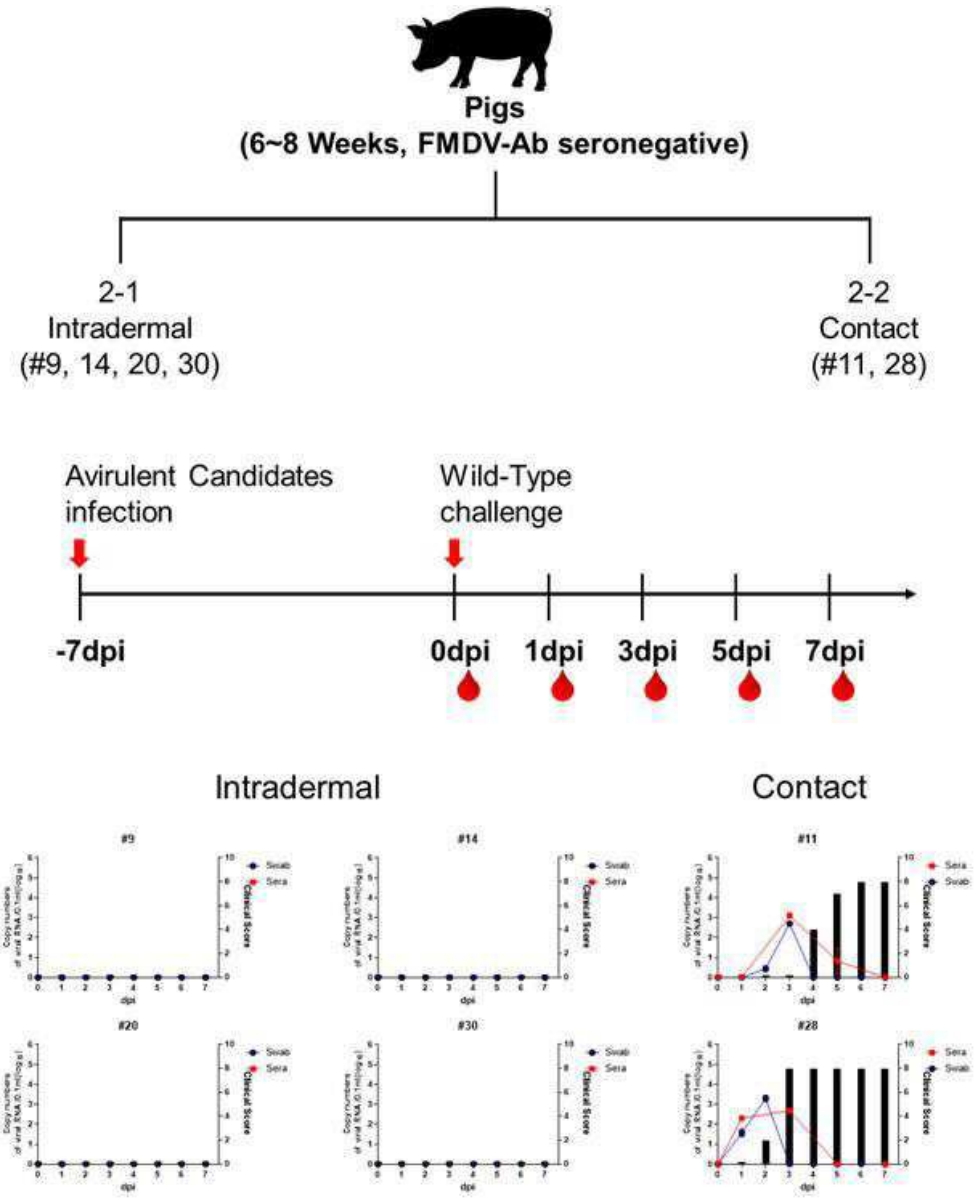
도면6


100
80
60
40
20
0
Survival rate (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
Days post challenge
WT(Asia1/Shamir)
3C
VP1 3C

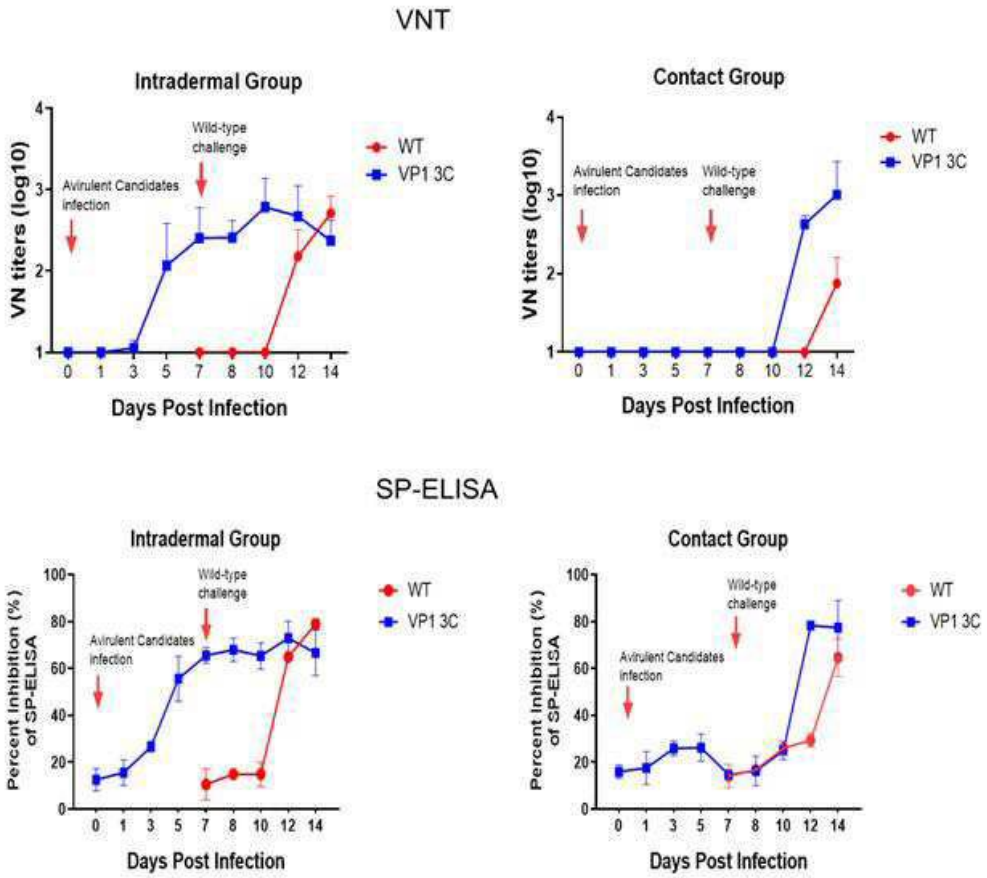
도면7


Pigs
(6~8 Weeks, FMDV-Ab seronegative)
1. Negative Control
2. VP1 3C group
1-1
Intradermal
(#13, 29)
1-2
Contact
(#24, 27)
2-1
Intradermal
(#9, 14, 20, 30)
2-2
Contact
(#11, 28)
Infection
Intradermal group
0dpi 1dpi 2dpi 3dpi 4dpi 5dpi 6dpi 7dpi 8dpi 9dpi
Infection
Contact group
0dpi 1dpi 2dpi 3dpi 4dpi 5dpi 6dpi 7dpi 8dpi 9dpi
Intradermal
Contact
Negative Control
VP1 3C

도면8


Pigs
(6~8 Weeks, FMDV-Ab seronegative)
2-1
Intradermal
(#9, 14, 20, 30)
2-2
Contact
(#11, 28)
Avirulent Candidates infection
Wild-Type challenge
-7dpi
0dpi
1dpi
3dpi
5dpi
7dpi
Intradermal
Contact
#9
#14
#11
#20
#30
#28
Swab
Sera
Clinical Score
dpi

도면9


VNT
Intradermal Group
Contact Group
VN titers (log10)
Avirulent Candidates infection
Wild-type challenge
WT
VP1 3C
Days Post Infection
SP-ELISA
Percent Inhibition (%) of SP-ELISA

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.