

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0170715
(43) 공개일자 2024년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/00 (2006.01) A61K 35/76 (2015.01)

A61P 31/20 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 7/00 (2013.01)

A61K 35/76 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0068629

(22) 출원일자 2023년05월26일

심사청구일자 2023년05월26일

(71) 출원인

주식회사 중앙백신연구소

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

주식회사 아비넥스트

충청북도 청주시 상당구 남일면 쌍암동길 30-7

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

윤인중

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

이주용

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

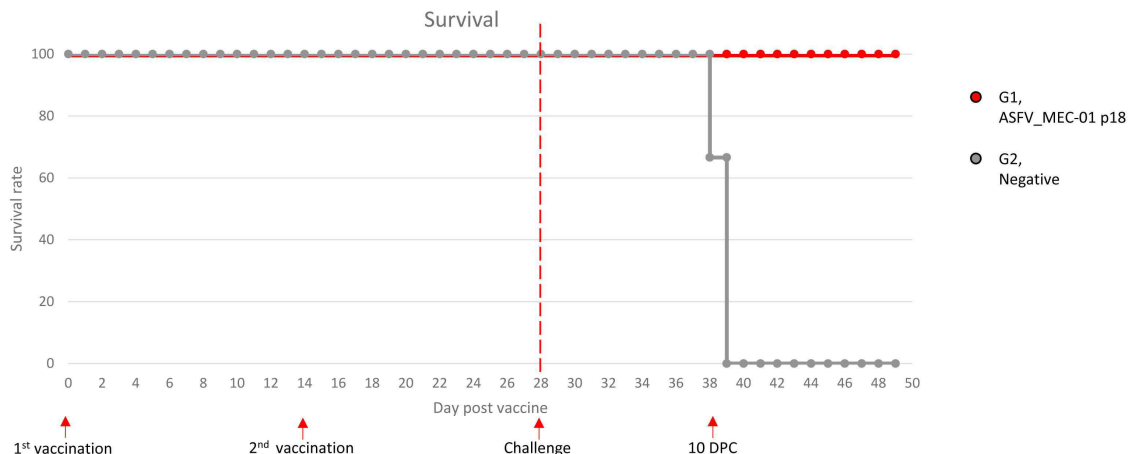
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 세포적응으로 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 아프리카돼지열병(African swine fever) 바이러스를 레수스 원숭이 신장 세포(rhesus monkey kidney cell) 유래의 세포주에 계대배양하여 얻은 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 세포적응으로 자연적으로 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022는 안전성과 효능을 가지고 있으므로, 아프리카돼지열병의 예방을 위한 백신 조성물의 항원으로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도4



	0 DPV	4 DPV	7 DPV	11 DPV	14 DPV	21 DPV	28 DPV	4 DPC	7 DPC	10 DPC	11 DPC	14 DPC	18 DPC
%	01-05	01-09	01-12	01-16	01-19	01-26	02-02	02-06	02-09	02-12	02-13	02-16	02-20
Group 1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Group 2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	66.7	0.0	0.0	0.0

(52) CPC특허분류

A61P 31/20 (2018.01)

G01N 33/56983 (2013.01)

C12N 2710/12021 (2013.01)

C12N 2710/12064 (2013.01)

G01N 2333/01 (2013.01)

(71) 출원인

주식회사 진코어

대전광역시 유성구 과학로 125 ,
바이오벤처센터303호(어은동, 한국생명공학연구원)

대한민국 (환경부 국립야생동물질병관리원장)

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

유성식

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

권혁일

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

이승철

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

김민호

대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

정원화

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

김용관

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

김연지

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

김원준

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

김은솔

인천광역시 서구 환경로 42 (오류동)

이상건

인천광역시 서구 환경로 42 (오류동)

김소정

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

김가람

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

이송이

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

이선미

인천광역시 서구 환경로 42 (오류동)

박재성

광주광역시 광산구 송암길 1 (삼거동)

이종수

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동)

모인필

충청북도 청주시 흥덕구 가경로189번길 52, 106동
901호 (가경동, 벽산아파트)

김용삼

서울특별시 서초구 반포대로 222, A-B1024 (반포동)

김도연

서울특별시 서초구 반포대로 222, A-B1024 (반포동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365507
과제번호	2021R1A6A1A03045495
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	동물의과학연구소
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

아프리카돼지열병(African swine fever) 바이러스를 레수스 원숭이 신장 세포(rhesus monkey kidney cell) 유래의 세포주에 계대배양하여 얻은, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 레수스 원숭이 신장 세포 유래의 세포주는 KCTC14568BP로 기탁된 CA-CAS-01-A 세포주인 것을 특징으로 하는, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스는 *MGF 100-1R*, *ASFV G ACD 00190*, *MGF 110-9L*, *MGF 110-10L*, *MGF 110-14L*, *ASFV G ACD 00240*, *MGF 110-12L*, *MGF 110-13La*, *MGF 110-13Lb*, *ASFV G ACD 00270*, *MGF 360-4L*, *MGF 360-6L*, *MGF 360-8L partial*, *MGF 300-1L*, *MGF 300-2R*, *MGF 300-4L*, *MGF 110-8L partial*, *ASFV G ACD 00210*, *ASFV G ACD 00300*, *ASFV G ACD 00320*, *ASFV G ACD 00330*, *ASFV G ACD 00350*, *ASFV G ACD 00360* 및 *X69R*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 결손된 것을 특징으로 하는, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스는 *MGF 100-1R*, *ASFV G ACD 00190*, *MGF 110-9L*, *MGF 110-10L*, *MGF 110-14L*, *ASFV G ACD 00240*, *MGF 110-12L*, *MGF 110-13La*, *MGF 110-13Lb*, *ASFV G ACD 00270*, *MGF 360-4L*, *MGF 360-6L*, *MGF 360-8L partial*, *MGF 300-1L*, *MGF 300-2R*, *MGF 300-4L*, *MGF 110-8L partial*, *ASFV G ACD 00210*, *ASFV G ACD 00300*, *ASFV G ACD 00320*, *ASFV G ACD 00330*, *ASFV G ACD 00350*, *ASFV G ACD 00360* 및 *X69R* 유전자가 결손된 것을 특징으로 하는, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스는 ASFV Georgia 2007/1 게놈 서열을 기준으로, 2,329번째 염기인 아데닌(adenine, A)이 구아닌(guanine, G)으로, 7,059번째 염기인 시토신(cytosine, C)이 티민(thymine, T)으로; 26,425번째 및 27,200번째 염기인 티민(T)이 시토신(C)으로, 44,576번째 염기인 아데닌(A)이 구아닌(G)으로; 72,295번째, 72,315번째 및 72,316번째 염기인 구아닌(G)이 아데닌(A)으로; 179,097번째, 180,319번째, 180,607번째, 180,619번째, 180,718번째, 181,034번째, 181,322번째, 181,809번째, 181,891번째 및 182,053번째 염기인 시토신(C)이 티민(T)으로; 돌연변이된 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 유효성분으로 포함하는, 아프리카돼지열병의 예방을 위한 백신 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 또는 아주번트(adjuvant)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 8

제6항의 백신 조성물을 돼지과(Suidae) 동물에 투여하여 아프리카돼지열병을 예방하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 유효성분으로 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스의 검출용 키트.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 아프리카돼지열병 의심 개체로부터 분리된 면역혈청과 반응시키는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병 감염 진단방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 백신 생산 세포주에서 계대 배양하는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병에 대한 백신의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포적응으로 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아프리카 돼지 열병(African swine fever; ASF)은 돼지와 멧돼지에만 감염되기 쉬운 바이러스성 질환으로, 초기 감염 후, 증상이 나타나기까지 2 내지 10일이 소요된다. 일반적인 증상에는 식욕 감소, 쇠약, 붉은 피부, 안구 점막에 염증 발생, 구토, 혈성 설사 및 발열이 포함된다. 또한, 피부는 청색으로 변할 수 있고, 피부 부위는 사멸하고(흑색 얼룩), 출혈이 발생할 수 있으며, 임신한 모돈에서 자연 유산을 야기할 수 있다. ASF의 증상은 전형적인 돼지 열병의 증상과 유사하고, 바이러스의 병원성에 따라, 감염된 동물의 30% 내지 100%가 사망한다.

[0003] ASF 바이러스(ASFV)는 아스파르비리다에(Asfarviridae) 과에 속하는 큰 이중 가닥 DNA 바이러스로, DNA 게놈은 단리물에 따라, 160 내지 210 kbp의 길이로 상당한 차이를 보인다. 게놈은 ASFV 입자의 54개의 구조 단백질 및 100개 이상의 감염 단백질을 지정하는 150 내지 167개의 오픈 판독 프레임을 포함하며(Dixon et al., 2013. Virus Res 173:3-14), 현재까지 24가지의 유전형이 발견되었다.

[0004] 아직까지 전 세계적으로 개발된 백신이나 치료제는 없다. ASFV는 현재까지 24종으로 분류되는데 바이러스 종류가 많을수록 백신 개발이 어렵다. 최근 전 세계적으로 아프리카돼지열병이 많아지면서 미국, 중국 등에서 백신 개발을 서두르고 있다고 하지만 상용화까지는 시간이 걸릴 것으로 보인다. 현재까지 유럽 15개국, 아프리카 29개국, 아시아 9개국 등 전 세계 53개국에서 발생 중이며, 우리나라와 가까운 아시아에서는 2018년 8월 중국에서 처음 발생한 이후 몽골, 베트남, 캄보디아, 라오스, 미얀마, 필리핀, 북한에서 발생하였다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2021-0065128호에는 아프리카 돼지 열병 바이러스의 단백질로부터의 T-세포 항원을 포함하는 폴리에피토프를 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 제조합 핵산 분자에 관한 '아프리카 돼지 열병 바이러스 백신'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2021-0127887호에는 아프리카돼지열병에 대한 면역 반응 생성에 관여하는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 이들을 함유하는 '아프리카돼지열병 백신 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '세포적응으로 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 아프리카돼지열병 바이러스 분리주(야외주)의 감수성 세포주를 개발하는 과정에서 레수스 원숭이 신장 세포(rhesus monkey kidney cell) 유래 세포주에 감염시켜 계대배양 중이던 아프리카돼지열병 바이러스가 약독화된 형태로 변한 것을 확인하였고, 상기 자연적으로 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스가 안전성과 백신주로서의 효능이 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 아프리카돼지열병(African swine fever) 바이러스를 레수스 원숭이 신장 세포(rhesus monkey kidney cell) 유래의 세포주에 계대배양하여 얻은, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 유효성분으로 포함하는 아프리카돼지열병의 예방을 위한 백신 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 돼지과(Suidae) 동물에 투여하여 아프리카돼지열병을 예방하는 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 유효성분으로 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스의 검출용 키트를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 아프리카돼지열병 의심 개체로부터 분리된 면역혈청과 반응시키는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병 감염 진단방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022를 백신 생산 세포주에서 계대 배양하는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병에 대한 백신의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 세포적응으로 자연적으로 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022는 안전성과 효능을 가지고 있으므로, 아프리카돼지열병의 예방을 위한 백신 조성물의 항원으로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1A는 국내 멧돼지 ASFV 분리주 1종(ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021)을 CA-CAS-01-A 세포주에 감염시켜 계대 배양하며, 18번의 계대(passage)에 따른 ASFV 분리주의 세포 적응 과정을 ASFV P72 유전자를 이용한 qPCR Ct값 확인 결과이다. 도 1B 및 도 1C는 CA-CAS-01-A 세포주에서 용균반검사(plaque assay)를 통하여 최종 확보한 계대 18번의 단일 백신 후보주(ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022)의 바이러스 역가를 측정된 것으로, B는 CA-CAS-01-A 세포주에서 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose)을 확인한 결과이고, C는 일차 돼지 대식세포(primary Porcine macrophage)에서 HAD₅₀ (median hemadsorption unit)을 확인한 결과이다.
- 도 2는 국내 멧돼지 ASFV 분리주(ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021)로 감염된 CA-CAS-01-A 세포주에서 생산된 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022 (ASFV_MEC-01)의 유전체 결손 부위를 보여주는 모식도이다.
- 도 3은 백신 후보주(ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022)의 안전성 및 효능을 평가하기 위한 동물실험의 모식도이다.
- 도 4는 백신 후보주(ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022)를 2주 간격으로 2회 접종하고 ASFV_화천주(국내 멧돼지 유래)로 공격 접종 후 3주간 실험동물의 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 5는 백신 후보주(ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022) 접종 및 공격 접종 후 실험동물의 체온 변화를 관찰한 결과이다. 38~39.5℃ 구간이 정상 체온이다.
- 도 6은 동물실험에서 ASFV의 p32, p62, p72 단백질에 대한 multi-antigen indirect ELISA 분석을 통한 항체가 측정 결과이다. S/P (sample-to-positive) 값이 30% 이하이면 음성, S/P 값이 30% 초과 40% 미만이면 의심, S/P 값이 40% 이상이면 양성으로 판정한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아프리카돼지열병(African swine fever) 바이러스를 레수스 원숭이 신장 세포(rhesus monkey kidney cell) 유래의 세포주에 계대배양하여 얻은, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022 (이하, ASFV_MEC-01)를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01은 약독화와 관련된 유전자들이 결손된 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 MGF 100-1R, ASFV G ACD 00190, MGF 110-9L, MGF 110-10L, MGF 110-14L, ASFV G ACD 00240, MGF 110-12L, MGF 110-13La, MGF 110-13Lb, ASFV G ACD 00270, MGF 360-4L, MGF 360-6L, MGF 360-8L partial, MGF 300-1L, MGF 300-2R, MGF 300-4L, MGF 110-8L partial, ASFV G ACD 00210, ASFV G ACD

00300, ASFV G ACD 00320, ASFV G ACD 00330, ASFV G ACD 00350, ASFV G ACD 00360 및 X69R로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 결손된 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 MGF 100-1R, ASFV G ACD 00190, MGF 110-9L, MGF 110-10L, MGF 110-14L, ASFV G ACD 00240, MGF 110-12L, MGF 110-13La, MGF 110-13Lb, ASFV G ACD 00270, MGF 360-4L, MGF 360-6L, MGF 360-8L partial, MGF 300-1L, MGF 300-2R, MGF 300-4L, MGF 110-8L partial, ASFV G ACD 00210, ASFV G ACD 00300, ASFV G ACD 00320, ASFV G ACD 00330, ASFV G ACD 00350, ASFV G ACD 00360 및 X69R 유전자가 모두 결손된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 또한, 본 발명의 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01은 ASFV Georgia 2007/1 계놈 서열 (GenBank: FR682468.2)을 기준으로, 2,329번째 염기인 아데닌(adenine, A)이 구아닌(guanine, G)으로, 7,059번째 염기인 시토신(cytosine, C)이 티민(thymine, T)으로; 26,425번째 및 27,200번째 염기인 티민(T)이 시토신(C)으로, 44,576번째 염기인 아데닌(A)이 구아닌(G)으로; 72,295번째, 72,315번째 및 72,316번째 염기인 구아닌(G)이 아데닌(A)으로; 179,097번째, 180,319번째, 180,607번째, 180,619번째, 180,718번째, 181,034번째, 181,322번째, 181,809번째, 181,891번째 및 182,053번째 염기인 시토신(C)이 티민(T)으로; 치환된 것을 추가로 포함할 수 있으며(표 6 참고), 상기 염기 변이는 MGF 360-1La 단백질의 106번째 아미노산 류신(Leu, L)이 프롤린(Pro, P)으로, MGF 110-1L 단백질의 197번째 아미노산 트립토판(Trp, W)이 종결코돈으로, MGF360-10L 단백질의 69번째 및 329번째 아미노산 아스파라긴(Asn, N)이 세린(Ser, S)으로, MGF 505-9R 단백질의 323번째 아미노산 리신(Lys, K)이 글루탐산(Glu, E)로, MGF505-11L 단백질의 14번째 및 422번째 아미노산 메테오닌(Met, M)과 알라닌(Ala, A)이 각각 이소류신(Ile, I)과 트레오닌(Thr, T)으로; MGF 100-1L 단백질의 96번째 및 100번째 아미노산 아스파르트산(Asp, D)과 글루탐산(E)이 각각 아스파라긴(N)과 리신(K)으로, MGF 100-3L 단백질의 86번째 아미노산 알라닌(A)이 트레오닌(T)으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01의 계놈 서열은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01은 primary Porcine macrophages에서 1×10^8 HAD₅₀/ml 이상의 역가를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 레수스 원숭이 신장 세포 유래의 세포주는 기탁번호가 KCTC14568BP인 CA-CAS-01-A 세포주일 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01을 유효성분으로 포함하는 아프리카돼지열병의 예방을 위한 백신 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 백신 조성물에 있어서, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01은 전술한 것과 같으며, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 계놈을 가진다.

[0023] 본 발명에 따른 상기 백신 조성물의 형태는 생독 백신, 사독 백신, 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스의 유전자를 사용하여 생산한 서브유닛 백신, 벡터 백신, 키메라 백신, DNA 및 RNA 백신으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 백신 조성물의 투여에 의해 아프리카돼지열병 감염증의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0025] 또한, 본 발명의 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 아주번트(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 담체 외에 본 발명의 백신 조성물은 부형제 및/또는 희석제를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 생리학적으로 허용되고 포유동물에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 물질을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 또한, 본 명세서에서 사용되는 "아주번트(adjuvant)"는 백신의 면역반응을 향상시킬 목적으로 투여되는 약학적 또는 면역학적 제제를 의미한다. 상기 아주번트로 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄(포타슘 알루미늄 실레이트), MF59, virosome, AS04[알루미늄 하이드록사이드 및 모노포스포릴 리피드 A(MPL)의 혼합

물], AS03(DL- α -tocopherol, squalene 및 유화제인 polysorbate 80의 혼합물), CpG, Flagellin, Poly I:C, AS01, AS02, ISCOMs 또는 ISCOMATRIX가 사용될 수 있다.

- [0028] 본 발명의 백신 조성물은 포유동물에 투여시, 활성 성분의 신속한 방출, 또는 지속 또는 지연된 방출이 가능하도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말 형태를 포함한다.
- [0029] 본 발명에 따른 백신 조성물은 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들면, 경구, 비경구, 예를 들면 좌제, 경피, 정맥, 복강, 근육 내, 병변 내, 비강, 척추관 내 투여로 투여될 수 있으며, 또한 서방형 또는 연속적 또는 반복적 방출을 위한 이식 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 투여 횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수 회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다.
- [0030] 본 발명은 또한, 상기 백신 조성물을 돼지과(Suidae) 동물에 투여하여 아프리카돼지열병을 예방하는 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명에 따른 아프리카돼지열병 예방 방법에 있어서, 상기 돼지과 동물은 바람직하게는 가축화한 종(Sus scrofa)이 속하는 멧돼지속(Sus) 동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명은 또한, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01을 유효성분으로 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스의 검출용 키트를 제공한다.
- [0033] 상기 키트는 본 발명에 따른 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01 및 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01에 특이적으로 결합되는 항체를 검출할 수 있는 시약을 포함할 수 있다. 본 발명의 키트에서 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01은 항원으로 기능하며, 상기 바이러스(항원)-항체 복합체 검출용 시약은 방사상 면역분석, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) 또는 면역형광 분석용 시약을 포함할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명은 또한, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01을 아프리카돼지열병 의심 개체로부터 분리된 면역혈청과 반응시키는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병 감염 진단 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 아프리카돼지열병 감염증이 발병하였거나 발병할 수 있는 포유동물을 의미하는 것으로, 바람직하게는 돼지 또는 멧돼지를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 아프리카돼지열병 감염 진단 방법은, 항원/항체 복합체가 형성될 수 있는 조건하에서 아프리카돼지열병 의심 개체로부터 분리된 시료(면역혈청)를 본 발명의 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01과 반응시킨 후, 항원/항체 복합체 형성을 검출하는 단계로 이루어지는 것일 수 있다. 상기 항원/항체 복합체 형성의 검출 방법은 당업계에 공지된 방법을 통해 수행될 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또한, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01을 백신 생산 세포주에서 계대 배양하는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병에 대한 백신의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 백신 생산 세포주는 바람직하게는 기탁번호 KCTC14568BP로 기탁된 세포주 CA-CAS-01-A일 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01이 감염 및 증식될 수 있는 세포라면, 그 종류에 제한이 없다.
- [0039] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 약독화된 아프리카돼지열병 바이러스 ASFV_MEC-01 또는 이로부터 유래되는 항원은 생리학적으로 허용 가능한 형태로 변환될 수 있다. 이는 인플루엔자에 대한 백신접종에 사용된 백신의 제조 경험을 토대로 하여 실시될 수 있다 (Stickl, H. Dtsch. med. Wschr. 1974, 99:2386-2392). 백신 주사의 제조를 위해 예를 들면, 바이러스 입자는 앰플 내, 바람직하게는 유리 앰플에서 1% 사람 알부민 및 2% 펩톤 존재 하의 100 ml의 인산-완충 식염수(PBS)에서 동결 건조된다. 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 생체 내 투여에 적합한 재조합 단백질(예를 들면, 사람 혈청 알부민)과 같은 다른 보조제를 함유할 수 있다. 이어 유리 앰플을 밀봉하고 4℃ 및 실온 사이에서 몇 개월 동안 저장할 수 있다. 그러나, 다른 요구사항이 없는 한, 상기 앰플은 바람직하게는 -20℃ 미만에서 저장될 수 있다.
- [0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

원숭이 신장 세포 유래 CA-CAS-01-A 세포주(기탁번호 KCTC14568BP)를 5% 우태아혈청(FBS; Invitrogen) 및 항균 및 항진균 용액(100x; Invitrogen)을 함유하는 α -MEM (Invitrogen) 배지, 37℃, 습도 조절된 5% CO₂ 인큐베이터에서 2~3일 간격으로 계대하며 유지하였다. 아프리카돼지열병 바이러스(African Swine Fever Virus, ASFV)는 국립야생동물질병관리원에서 제공한 2022년 강원도 인제 지역에서 발생한 야생 멧돼지 아프리카돼지열병에서 분리한 국내 분리주(ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021)를 사용하였다.

2. 바이러스 연속 계대

ASFV 국내 분리주(ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021)를 CA-CAS-01-A 세포주에 적응시키고, ASFV *P72* 유전자에 특이적인 프라이머 세트(표 1)를 이용하여 qPCR (quantitative PCR)을 수행, Ct 값이 22 이하인 ASFV 배양액(Ct 값: 약 18)을 실험에 사용하였다.

ASFV 감염 배지는 무혈청 배지를 사용하였으며, 감염 후 3~4일째에 감염에 사용되는 바이러스 증식용 배지(무혈청 배지)로 교체하였으며, 증식된 바이러스를 확인하기 위해 기존에 감염된 바이러스를 제거하였다. 감염 후 7일 간격으로 계대배양하였고, 1, 3, 5 및 10 계대(passage) 째의 배양액을 회수하고 상층액과 세포를 -80℃에서 동결한 후 37℃ 항온수조에서 해동 1회 실시한 후 해당 배양액을 이용하여 qPCR을 수행하여 Ct 값을 측정하고, 세포질 내 감염 여부 확인 시험(Alkaline Phosphatase assay_ASFV P30 detection; 1st antisera : Rabbit anti African swine Fever virus phosphoprotein p30 antisera, 2nd antibody : Goat Anti-rabbit IgG H&L, Alkaline phosphate substrate kit : ImmPACT Vector RED)을 진행하였다. ASFV 양성 확인 시, 1차 계대 배양액 2mL (1 x 10⁶ CFU/mL)을 8mL의 무혈청 배지와 함께 다음 계대에 사용하였고, 이를 반복적으로 수행하였다.

표 1

qPCR에 사용된 프라이머 정보

프라이머명	염기서열 (5'→3')	서열번호
P72_Forward	CTG CTC ATG GTA TCA ATC TTA TCG A	1
P72_Reverse	GAT ACC ACA AGA TC(AG) GCC GT	2

3. 바이러스 역가 측정

ASFV 분리주로 감염된 CA-CAS-01-A 세포주에서, 감염 후 70% CPE (cytopathic effect)가 발생한 시점에 배양 상등액을 수거하였다. 성장역학 실험(growth kinetics experiment)을 위해, 상기 상등액을 각 바이러스 균주로 감염시킨 세포로부터 다른 시점에 수거하고, -80℃에서 보관하였다. 바이러스 역가는 상기 표 1의 프라이머 세트를 이용한 정량적 실시간 RT-PCR 방법을 통해 수행하였다. 정량적 실시간 RT-PCR은 RT-PCR은 전 처리 과정 50℃에서 2분 및 95℃에서 10분 1사이클, 본 과정 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분 40 사이클의 조건을 사용하였다.

4. 염기서열분석

세포적응된 ASFV의 전장 염기서열은 (주)셀레믹스에 의뢰하여 분석하였다.

5. 항체가 확인(ELISA)

[0059] ASF 바이러스의 P32, P62, P72를 ELISA로 검출하여 항체가를 측정하였다. 측정은 ID ScreenA[®] African Swine Fever Indirect (ASF Elisa) 키트(IDvet)를 이용하여 수행되었다. 간단하게, 실험동물의 백신 접종군과 음성군 으로부터 채혈한 혈액을 4,500 rpm 및 10분의 조건으로 원심분리하고 상층액(혈청)을 수확하였다. 희석 버퍼 190 μ l을 각각의 well에 첨가하고, 음성 대조군을 well A1과 B1에, 양성 대조군은 well C1과 D1에 각각 10 μ l씩 첨가하고 상기에서 수확한 혈청 시료를 나머지 well에 각각 10 μ l씩 첨가한 후 21 $^{\circ}$ C($\pm$ 5)에서 45분($\pm$ 4분) 동안 반응시켰다. 그 후, 각 well의 반응물을 제거한 후 300 μ l의 세척버퍼로 3회 세척하고, 희석 버퍼를 이용하여 1/10로 희석한 concentrated conjugate 100 μ l를 각 well에 넣고 21 $^{\circ}$ C($\pm$ 5)에서 30분($\pm$ 3분) 동안 반응시켰다. 각 well의 반응물을 제거한 후 300 μ l의 세척버퍼로 3회 세척하고, 각 well에 100 μ l의 기질용액을 첨가하고, 21 $^{\circ}$ C($\pm$ 5)의 어두운 곳에서 15분($\pm$ 2분) 동안 반응시키고 반응 중단 용액 100 μ l을 넣어주고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0060] 반응 결과의 유효성은 다음의 기준으로 판단한다.

[0061] - 양성 대조물질의 OD값 평균이 0.350보다 크다 (ODPC > 0.350)

[0062] - 양성대조물질의 OD 평균값과 음성대조물질의 OD 평균값의 비율이 3보다 크다. (ODPC/ODNC > 3)

[0063] - 각 샘플 시료에 대하여 경쟁 백분율(S/P%)는 다음의 공식으로 계산한다:

[0064]
$$S/P \% = \{(OD_{sample} - ODNC) / (ODPC - ODNC)\} \times 100.$$

[0065] 상기 S/P (sample-to-positive) 값이 30% 이하이면 음성, S/P 값이 30% 초과 40% 미만이면 의심, S/P 값이 40% 이상이면 양성으로 판정한다.

[0067] 6. 돼지 감염 실험

[0068] 본 발명에서 생체 내 돼지 연구는 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 가이드라인에 따라 환경부 야생동물질병관리원 내 생물안전3등급 연구시설에서 수행하였다.

[0069] 본 발명자는 CA-CAS-01-A 세포주로부터 증식 및 약독화된 계대 18번째 ASF 바이러스(ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022; ASFV_MEC-01)에 대한 약독화(안전성) 및 백신으로서의 효능을 확인하기 위하여, 동물실험을 진행하였다. 간단하게, 3~4주령 돼지에 백신 후보주 >10⁵ HAD₅₀/ml을 근육내 주사(intramuscular injection)의 경로로 2주간격으로 총 2회 접종한 후 ASFV_화천주(10² HAD₅₀/ml)로 공격 접종하였다(도 3). 바이러스 검출 정도를 확인하기 위하여 구강 스왑, 직장 스왑, 비강 스왑, 혈청 그리고 전혈 시료를 2~3일 간격으로 채취하였다. 또한 3주간 체온 변화와 임상증상 그리고 생존률을 확인하였다.

[0071] 7. 통계분석

[0072] 스튜던트 t 테스트(Student's t-test)를 모든 통계분석에 이용하였으며, 0.05 미만의 P-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0074] 실시예 1. 세포적응된 ASFV 분리주의 특성 분석

[0075] 국내 멧돼지 ASFV 분리주(ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021)를 CA-CAS-01-A 세포주(기탁번호 KCTC14568BP)에 감염시켜 계대(passage) 배양하며, ASFV 분리주의 세포 적응 과정을 ASFV P72 유전자를 이용한 qPCR로 분석하였다. 그 결과, 도 1A에 개시된 바와 같이 5번째 계대 이후 Ct 값이 20 이하로 나타나기 시작하였으며, 16번째 계대 이후 약 12 이하의 Ct 값이 확인되었다. 또한, CA-CAS-01-A 세포주에서 용균반검사(plaque assay)를 통하여 최종 확보한 계대 18번의 단일 백신 후보주(ASFV_MEC-01)의 바이러스 역가를 측정한 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

백신 후보주(ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022)의 역가 확인 결과

ASFV Virus	Titration (7dpi)		
	CT-value (CA CAS-01 A)	HAD ₅₀ /mL (Primary swine macrophage)	TCID ₅₀ /mL (CA CAS-01 A)
ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022	11.97	1.122 x 10 ⁸	3.981 x 10 ⁵

[0076]

[0077]

또한, 총 18회 계대 배양한 ASFV 분리주(ASFV_MEC-01)를 CA-CAS-01-A 세포주 또는 일차 돼지 대식세포(primary Porcine macrophage)에 감염시키고 일자에 따른 바이러스 증식성을 각각 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) 또는 HAD₅₀ (median hemadsorption unit)으로 확인한 결과, CA-CAS-01 세포주에 적응 계대 후에도 바이러스의 증식성이 모 분리주 대비 감소되지 않고, 일부 오른 것을 확인할 수 있었다(도 1B, 1C).

[0079]

실시예 2. 세포적응된 ASFV 분리주의 유전체 분석

[0080]

최종 확보한 백신 후보주(ASFV_MEC-01)의 특성을 확인하기 위해, 18회 계대 배양한 배양액으로부터 바이러스를 회수하여 이의 유전체 서열을 분석한 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 5' 부위에 큰 유전자 결손이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 상기 결손 부위에 위치하는 유전자를 정리하면 표 3과 같으며, 결손된 유전자 중 약독화(attenuation)와 연관된 유전자는 표 4와 같다. 또한, African swine fever virus isolate ASFV Georgia 2007/1 genome assembly, complete genome: monopartite (GenBank: FR682468.2)의 서열 기준 표 4의 결손 유전자 위치를 정리하면 표 5와 같다.

표 3

ASFV-KOR.INJ.E.MEC-01.2022(ASFV_MEC-01) deletion site 유전자												
MGF		ASFV_MEC-01			G_ACD and Other		ASFV_MEC-01					
Gene info		NGS	PCR status		Gene info		NGS	PCR status				
MGF 100	1L	Gene	Detected		G_ACD	G ACD 00120	Gene	Detected				
	3L	Deletion	Not detected	G ACD 00160		Gene						
	1L	Gene	Detected	G ACD 00190								
	2L	Gene	Detected	G ACD 00210								
	3L	Gene	Detected	G ACD 00240								
MGF 110	4L	Gene	Detected		G ACD 00270		Deletion	Not detected				
	5L-6L	Gene	Detected	G ACD00300								
	7L	Gene	Detected	G ACD00320								
	8L	Deletion (N terminal 80%)	Partial detected	G ACD00330								
	9L	Deletion	Not detected	G ACD00350								
	10L	Deletion	Not detected	G ACD00360								
	12L	Deletion	Not detected	G ACD00520								
	13La	Deletion	Not detected	Other	X69R	Deletion			Not detected			
	13Lb	Deletion	Not detected							285L	Gene	Detected
	1L	Deletion	Not detected							17L	Gene	Detected
MGF 300	2R	Deletion	Not detected		18L	Gene	Detected					
	4L	Deletion	Not detected		19R	Gene	Detected					
	1La	Gene	Detected		110L	Gene	Detected					
	1Lb	Gene	Detected		L11L	Gene	Detected					
	2L	Gene	Detected		A224L	Gene	Detected					
MGF 360	3L	Gene	Detected			EP153R	Gene	Detected				
	4L	Deletion	Not detected			EP402R	Gene	Detected				
	6L	Deletion	Not detected			NP868R	Gene	Detected				
	8L	Deletion (C terminal Frameshift 50%)	Partial detected			P1192R	Gene	Detected				
	9L	Gene	Detected			E119L	Gene	Detected				
	10L	Gene	Detected			EP424R	Gene	Detected				
	11L	Gene	Detected			C962R	Gene	Detected				
	12L	Gene	Detected			NP419L	Gene	Detected				
	13L	Gene	Detected			I267L	Gene	Detected				
	14L	Gene	Detected			I329L	Gene	Detected				
	15R	Gene	Detected			1177L	Gene	Detected				
	16R	Gene	Detected									
	18R	Gene	Detected									
	19Ra	Gene	Detected									
	19Rb	Gene	Detected									
	21R	Gene	Detected									

표 4

약독화 ASFV_MEC-01 바이러스의 유전체 분석 결과

	Gene deleted
Deletion site	<u>MGF 100-1R</u> , <u>ASFV G ACD 00190</u> , <u>MGF 110-9L</u> , <u>MGF 110-10L</u> , <u>MGF 110-14L</u> , <u>ASFV G ACD 00240</u> , <u>MGF 110-12L</u> , <u>MGF 110-13La</u> , <u>MGF 110-13Lb</u> , <u>ASFV G ACD 00270</u> , <u>MGF 360-4L</u> , <u>MGF 360-6L</u> , <u>MGF 360-8L partial</u> , <u>MGF 300-1L</u> , <u>MGF 300-2R</u> , <u>MGF 300-4L</u> , <u>MGF 110-8L partial</u> , <u>ASFV G ACD 00210</u> , <u>ASFV G ACD 00300</u> , <u>ASFV G ACD 00320</u> , <u>ASFV G ACD 00330</u> , <u>ASFV G ACD 00350</u> , <u>ASFV G ACD 00360</u> , <u>X69R</u>
Bold: 약독화에 영향을 주는 유전자	

[0081]

[0082]

표 5

결손 유전자 위치

ASFV_MEC-01				Passage 18
Deletion size				11,527 ~ 24,491
Deletion gene	MGF 100	1R	12056..12430	Del
	MGF 110	8L	11455..>11838	Partial
		9L	12590..13462	Del
		10L – 14L fusion	13753..14571	Del
		12L	14761..15120	Del
		13La	15206..15553	Del
		13Lb	15663..16031	Del
	MGF 300	1L	20704..21510	Del
		2R	22336..22818	Del
		4L	22908..23900	Del
	MGF 360	4L	16212..17375	Del
		6L	18189..19316	Del
		8L	24014..24973	Partial
	G_ACD	G ACD 00190	12456..12581	Del
		G ACD 00210	13461..13652	Del
		G ACD 00240	14570..14680	Del
		G ACD 00270	16056..16169	Del
		G ACD 00300	17929..18045	Del
		G ACD 00320	19544..19669	Del
		G ACD 00330	19857..19970	Del
		G ACD 00350	19967..20098	Del
		G ACD 00360	20169..20285	Del
	Other	X69R	20197..20406	Del

* Reference sequence : ASFV Georgia 2007/1 genome (GenBank : FR682468.2)

[0083]

[0084]

또한, 상기 유전자 결손 외, 백신 후보주 ASFV_MEC-01의 게놈 염기서열에서는 참조서열(ASFV Georgia 2007/1 genome, GenBank: FR682468.2) 및 분리주(ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021)의 게놈 염기서열과 비교하여 특이적인 염기 변이가 다수 확인되었다.

표 6

ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022(ASFV_MEC-01)의 유전체 분석 결과-점 돌연변이

	Gene	MGF360-1La	MGF110-1L	MGF 360-10L	MGF 505-9R	EP424R			MGF505-11L
	Function	Unknown	non-essential	Partial attenuated		mRNA modification			replication in macrophages
	Nucleotide Position	2,329	7,059	26,425	27,200	44,576	72,295	72,315	72,316
	Amino acid change	L106P	W197*	N69S	N329S	K323E	silent mutation		
Virus	Georgia/2007/1	A	C	T	T	A	G	G	G
	ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021	A	C	T	T	A	G	G	G
	ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022	G	T	C	C	G	A	A	A
	Gene	MGF505-11L	MGF100-1L		NCR	MGF100-3L	I7L	hypthetical	
	Function	replication in macrophages	specific CD8+ T-cell epitopes		Unknown	Unknown	Partial virulence	Unknown	
	Nucleotide Position	180,319	180,607	180,619	180,718	181,034	181,322	181,809	181,891
	Amino acid change	A422T	D96N	E100K	silent mutation		A86T	silent mutation	
Virus	Georgia/2007/1	C	C	C	C	C	C	C	C
	ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021	C	C	C	C	C	C	C	C
	ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022	T	T	T	T	T	T	T	T

[0085]

[0086]

본 발명의 백신 후보주 ASFV_MEC-01은 20계대 까지도 유전적 안정성(결손 부위 및 점 돌연변이 위치)을 보여주었다.

[0088]

실시예 3. 백신 후보주의 안전성 및 효능 분석

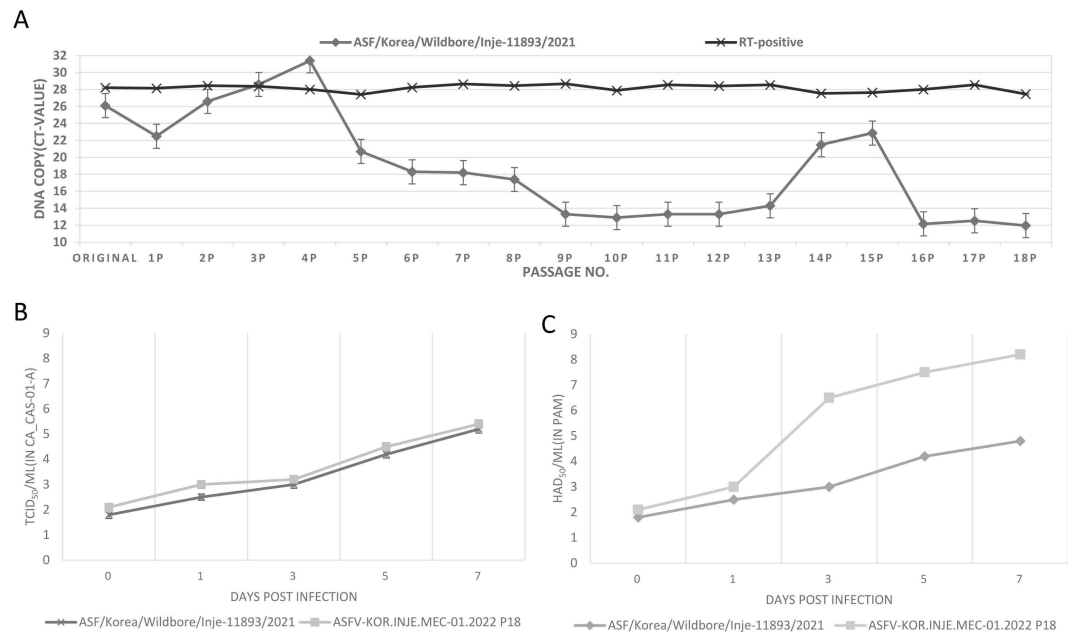
[0089] 최종 확보한 백신 후보주(ASFV_MEC-01)의 안전성(약독화) 및 효능을 평가하기 위해 동물실험을 진행하였다.

[0090] 백신 후보주(ASFV_MEC-01)를 2주 간격으로 2회 접종하고 ASFV_화천주(국내 멧돼지 유래)로 공격 접종 후 3주간 실험동물의 생존율을 확인한 결과, 백신 후보주로 면역화하지 않은 그룹은 공격 접종 후 10일차에 사망 동물이 발생하였고 11일차에 모든 동물이 사망하였으나, 백신 후보주로 면역화한 그룹은 100%의 생존율을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 4). 또한, 백신 후보주로 면역화한 그룹은 백신 접종 기간 및 공격 접종 후에도 발열증상을 보이지 않고 정상체온을 유지하였으나, 백신주 미접종 그룹은 공격 접종 후 4일차부터 발열 증상이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(도 5). 또한, ASFV의 p32, p62, p72 단백질에 대한 multi-antigen indirect ELISA 분석을 통한 항체가 측정 결과, 백신 후보주의 2번째 접종 이후 항체가가 점차 증가되어 백신주 2차 접종 일주일 후부터 항체가가 양성으로 전환되었으며, 공격 접종 후 14일째까지도 높은 항체가가 확인되었다(도 6). 이와 같은 높은 항체가는 ASFV_화천주에 대한 방어에 기여했을 것으로 사료되었다.

[0091] 이상의 결과를 통해 본 발명의 ASF 백신 후보주 ASFV-KOR.INJE.MEC-01.2022 (ASFV_MEC-01)는 자연적인 약독화를 통해 안전성을 가짐과 동시에 백신으로서의 효능을 모두 가지고 있어, ASF 백신 개발을 위한 항원으로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

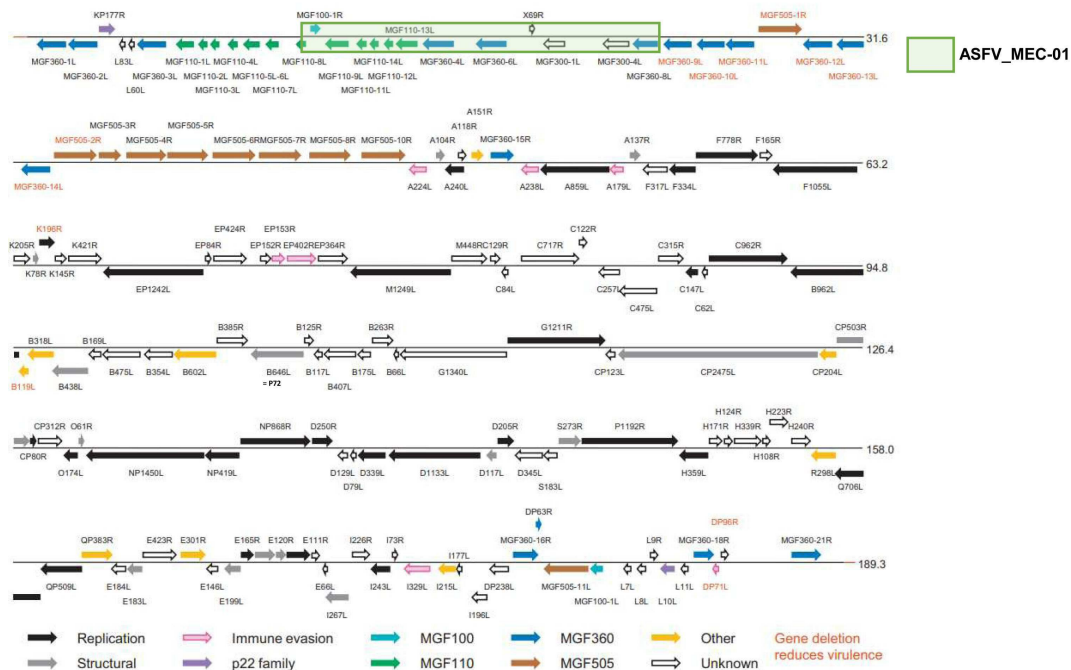
도면

도면1

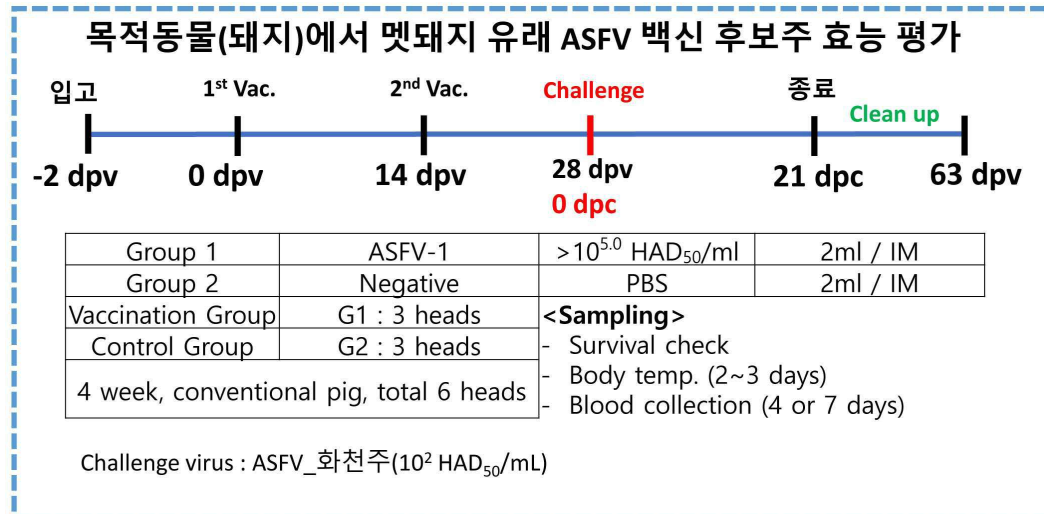


도면2

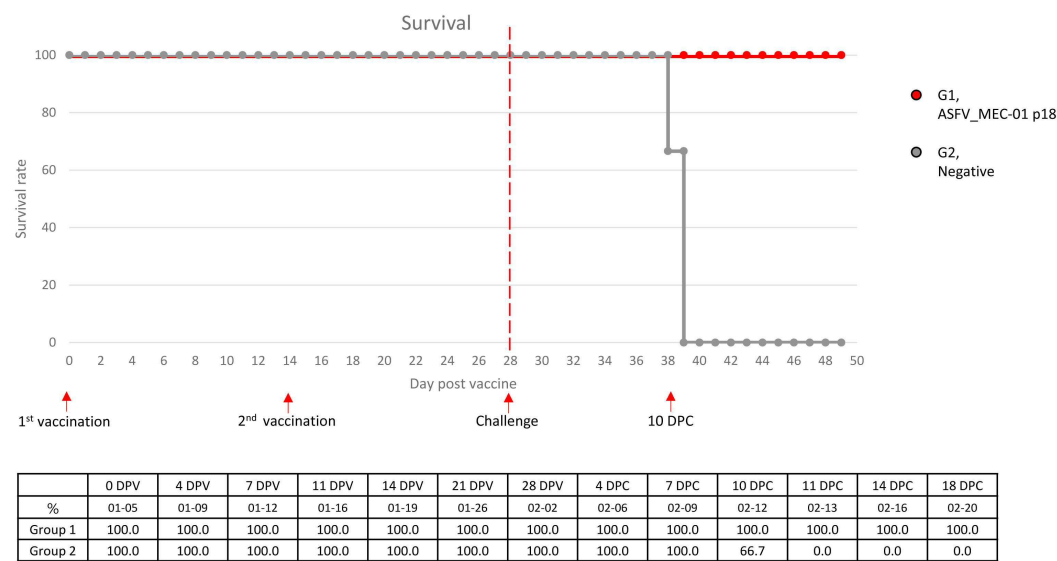
ASFV_MEC-01 Deletion site analysis



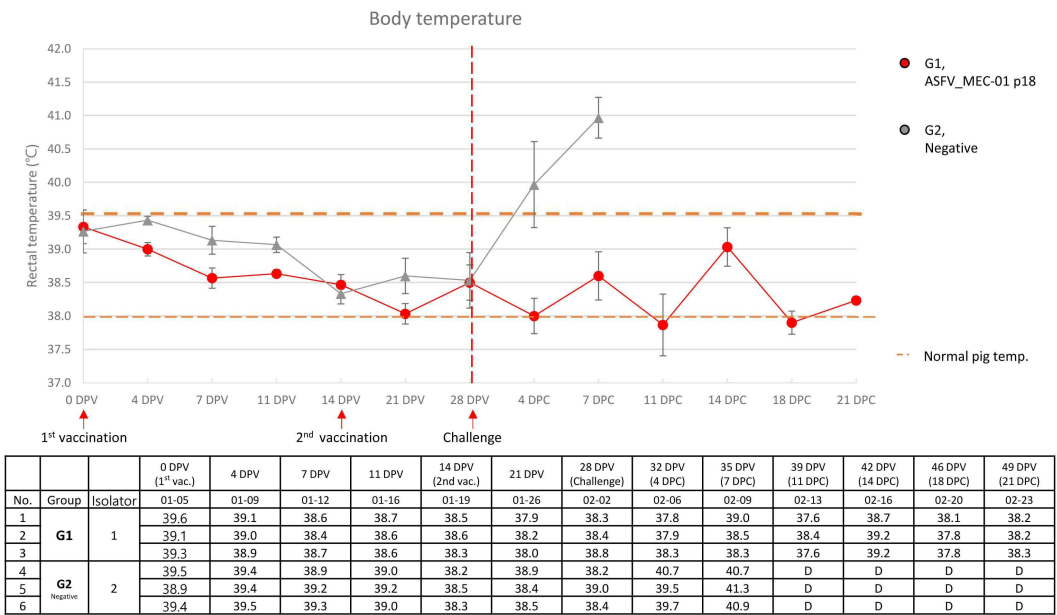
도면3



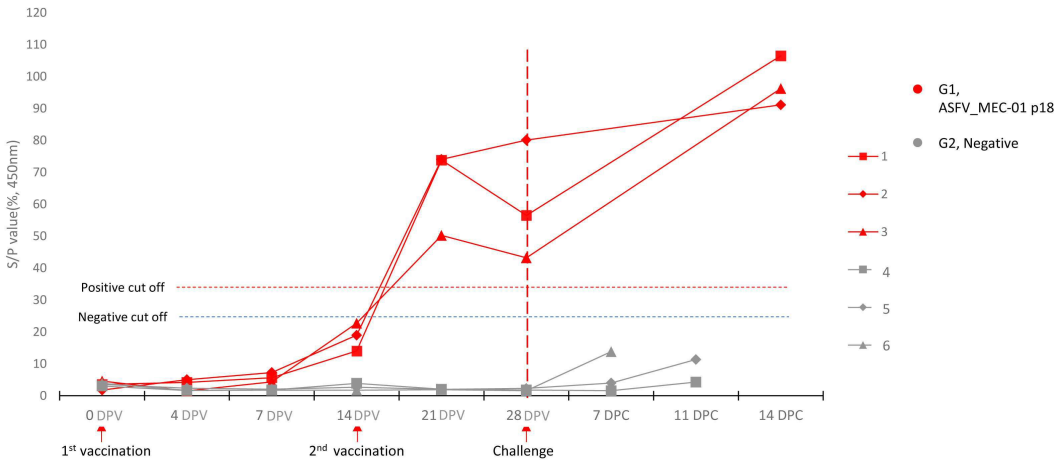
도면4



도면5



도면6



			0 DPV (1st vac.)	4 DPV	7 DPV	14 DPV (2nd vac.)	21 DPV	28 DPV (Challenge)	35 DPV (7 DPC)	39 DPV (11 DPC)	42 DPV (14 DPC)
No.	Group	Isolator	01-05	01-09	01-12	01-19	01-26	02-02	02-09	02-13	02-16
1	G1	1	3.520	4.157	5.639	14.017	73.814	56.477	-	-	106.4639
2			1.751	5.021	7.268	18.956	74.030	80.073	-	-	91.10316
3			4.583	1.489	4.314	22.709	50.200	43.186	-	-	96.21546
4	G2 Negative	2	3.047	1.640	1.781	3.871	2.032	1.779	1.546412	4.257603	-
5			3.538	2.370	2.037	2.650	2.008	2.281	3.979328	11.35758	-
6			3.865	1.693	1.716	1.716	1.903	1.566	13.7905	-	-

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.