



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0033962
(43) 공개일자 2025년03월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0115571
(22) 출원일자 2024년08월28일
심사청구일자 2024년08월28일
- (30) 우선권주장
1020230112949 2023년08월28일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자
이창희
경기도 성남시 수정구 위례광장로 97, 3218동 70
1호(창곡동, 위례자연엔센트럴자이)
- (74) 대리인
특허법인정진

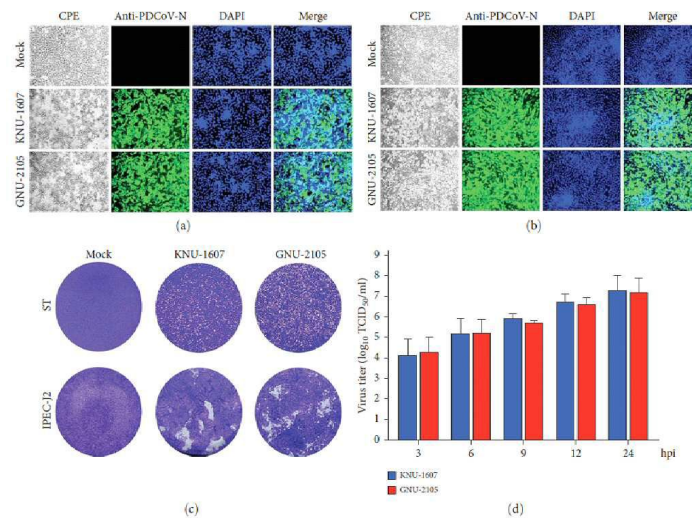
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 신규한 고병원성 돼지 델타코로나바이러스 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 고병원성 돼지 델타코로나바이러스의 신규한 국내 분리주 및 이의 용도에 관한 것으로, 국내에서 순환하고 있는 PDCoV를 분리한 본 발명의 신규한 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5는 고병원성을 가지므로, 백신 개발 또는 테스트를 위한 공격접종용 바이러스주로 유용하게 사용할 수 있어, 우수한 백신의 개발에도 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

G01N 33/56983 (2013.01)

C12N 2770/20021 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

G01N 2333/165 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC19222P로 기탁된, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 스파이크(Spike) 단백질을 포함하는, 고병원성 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 국내 분리주 GNU-2105-P5.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PDCoV 국내 분리주는 GenBank accession number OQ566228의 염기서열로 이루어진 게놈 RNA를 갖는 것을 특징으로 하는,

고병원성 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 고병원성 PDCoV 국내 분리주는 공격접종(challenge) 또는 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 백신을 제조하는 데 사용하는 것을 특징으로 하는,

고병원성 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5.

청구항 4

다음 단계를 포함하는, 기탁번호 KCTC19222P로 기탁된, 고병원성 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 국내 분리주 GNU-2105-P5의 제조 방법:

- (1) GenBank accession number OQ566228의 염기서열로 이루어진 게놈 RNA를 갖는 PDCoV 검출이 확인된 시료로부터 세포 배양을 위한 접종원을 확보하는 단계;
- (2) 상기 PDCoV가 함유된 접종원을 트립신이 첨가된 배양 배지에 현탁하는 단계;
- (3) 상기 현탁액을 ST 세포(Swine Testicle cell)에 접종시키는 단계;
- (4) 상기 ST 세포를 트립신이 함유된 성장 배지에서 5회 계대배양하는 단계; 및
- (5) 상기 ST 세포에서 PDCoV 특이성 세포 변성 효과 (Cytopathic effects; CPE)를 나타내고, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 스파이크(Spike) 단백질을 포함하는 균주를 확인하여 분리하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 (1) 단계의 시료는 소장 조직 시료, 분변 시료 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는,

고병원성 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5의 제조 방법.

청구항 6

다음 단계를 포함하는, 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 백신 또는 백신 후보 물질의 면역원성 검정 방법:

- (a) 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 백신 또는 백신 후보 물질을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;
- (b) 상기 백신 또는 백신 후보 물질이 투여된 인간을 제외한 동물에게 제1항 또는 제2항의 바이러스 또는 이로부터 유래된 항원을 공격접종하는 단계; 및
- (c) 상기 공격접종한 인간을 제외한 동물의 증상을 조사하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 인간을 제외한 동물은 3일령 내지 4개월령의 돼지인 것을 특징으로 하는,

돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 백신 또는 백신 후보 물질의 면역원성 검정 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 바이러스, 상기 바이러스의 배양물 또는 이의 항원을 포함하는 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)의 검정 키트.

청구항 9

제1항 또는 제2항의 바이러스, 상기 바이러스의 배양물 또는 이의 항원을 유효성분으로 포함하는, 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 감염증 예방용 백신 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항의 바이러스, 상기 바이러스의 배양물 또는 이의 항원을 유효성분으로 포함하는 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 감염증 예방용 백신 조성물을, 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 감염증 예방 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고병원성 돼지 델타코로나바이러스의 신규한 국내 분리주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)는 신생 자돈에서 급성 장염과 사망을 유발하는 신종 장병원성 돼지 코로나바이러스(coronavirus, CoV)이다. 신생 자돈에서 PDCoV의 임상 증상으로는 식욕 부진, 구토, 수양성 설사(경증에서 중증), 탈수, 성장 지연 등이 있으며, 다른 전형적인 돼지 장내 CoV인 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 및 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)로 인한 것과 증상이 비슷하고 임상적으로 구별하기 어렵다. 그러나, PDCoV에 감염된 돼지는 PEDV 및 TGEV에 감염된 돼지보다 임상 증상과 질병 중증도가 경미하고 폐사율이 낮다.

[0004] 한편, PDCoV는 니도바이러스(Nidovirales) 과 코로나바이러스(Coronaviridae) 류에 속하는 델타코로나바이러스

(Deltacoronavirus) 속의 볼테코바이러스(Buldecovirus) 아속에 속한다. 이 바이러스는 돼지 코로나바이러스 중 가장 작은 게놈 크기인 약 25.4 kb 길이의 양감각 단일 가닥 RNA 게놈을 가지고 있다. PDCoV 게놈은 여러 개의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다. ORF1a와 ORF1b는 두 개의 다단백질(1a와 1ab)을 코딩하며, 이는 단백질 분해 절단으로 추가 처리되어 15개의 비구조적 단백질(nsp2-16)을 생성한다. 반면, 다운스트림 ORF는 4개의 보존된 구조 단백질인 당화 스파이크(Spike, S), 외피(E), 막(M), 뉴클레오캡시드(N) 단백질과 3개의 보조 단백질인 비구조 유전자 6(NS6), NS7, NS7a를 코딩한다.

[0005] 2012년 포유류와 조류 종을 감염시킬 수 있는 CoV를 수득하는 지역 조사 연구에서 발견되었으며, 2014년 미국에서 돼지 농장에서 처음 나타났다. 이후 한국, 일본, 중국 본토, 태국, 베트남, 라오스 등 여러 아시아 돼지 사육 국가에서 PDCoV가 보고되었다. 이는 돼지고기 생산 국가에 막대한 재정적 피해를 입힌 전 세계적인 분포로 나타났다. 미국에서 출현한 직후인 2014년에 한국에서 처음 발표된 PDCoV는 미국 균주와 유전적으로 매우 유사하였다. 이전 보고서에서 전국적으로 단일 감염으로 PDCoV가 비교적 높은 유병률을 보였고, PDCoV와 PEDV의 동시 감염이 확인되어 국내 돼지 개체군을 파괴할 수 있는 잠재적 능력에 특히 주목하였다. 그러나 2010년 말부터 산발적으로 PDCoV가 발생하여 국내 돼지고기 생산에 눈에 띄지 않는 임상적, 재정적 손실을 초래하고 있다. 또한, 동물 접촉 실험에서 신생 자돈에서 심각한 질병과 폐사를 일으키지 않고 낮은 장내 병원성을 보인 공지된 PDCoV 한국(KOR) 균주 KNU-1607은 이 조류 유래 CoV가 포유류 자연 숙주에 적응했을 수 있음을 시사한다. 최근 대규모 상업용 돼지 농장에서 치명적인 수양성 설사와 신생 자돈 폐사율이 높은 심각한 PDCoV 발생이 보고된 바 있다. 이는, 다른 원인 병원체가 없고 독성이 높다는 점에서 새로운 고독성(고병원성) PDCoV 균주의 출현 가능성을 시사한다.

[0006] 그러나, 국내에서는 외국 분리주-기반의 PDCoV 감염 여부 확인 및 이에 대한 유전자 분석만이 진행되고 있는 실정이고, 유전자 분석을 통해 신종 병원체를 검출할 수 있다 하더라도 코흐의 가설(Koch's Postulates)에 따라 질병의 원인을 명확히 검증할 필요가 있다. 또한, 현재 사용되고 있는 외국 분리주-기반의 PDCoV는 국내에서 순환하고 있는 야외주와 큰 차이를 나타내므로, 효능에 한계를 나타낼 수 있어, 국내에서 유행하는 PDCoV의 개발의 필요성이 대두하고 있다.

[0007] 따라서, 새로운 감염병에 대한 분자생물학적 연구, 항체와 같은 치료제, 백신, 진단제의 개발 및 평가를 위해서는 효율적인 세포 배양을 통한 한국형 PDCoV 분리주를 확보하는 것이 필수적이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. K. Jung, H. Hu, B. Eyerly, Z. Lu, J. Chepngeno, and L. J. Saif, "Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs," Emerging Infectious Diseases, vol. 21, no. 4, pp. 650-654, 2015.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 국내에서 유행하는 고병원성 돼지 델타코로나바이러스에 대응하기 위한 분자생물학적 특성 연구, 진단, 백신 개발 등 다양한 분야에 사용하기에 적합한 신규한 국내 발생된 PDCoV 분리주를 개발하고자 예의연구 노력하였다. 그 결과, 국내에서 급성 설사 및 장염을 유발하는 신종 병원체인 돼지 델타코로나바이러스에 감염된 새끼 돼지로부터 GNU-2105/KOR/2021 (GNU-2105-SI, GenBank 접근번호 OQ566226)를 분리한 후, 5회 계대 배양하여 PDCoV 국내 분리주(GNU-2105-P5, GenBank 접근번호 OQ566228)를 확립하였고, 상기 본 발명의 신규한 국내 분리주의 고병원성을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 일 목적은 신규한 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 국내 분리주 GNU-2105-P5를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5의 제조 방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 PDCoV 백신 또는 백신 후보 물질의 면역원성 검정 방법을 제공하는 데 있다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 PDCoV의 검정 키트를 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 PDCoV 감염증 예방용 백신 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 PDCoV 감염증 예방 방법을 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0020] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0024] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 기탁번호 KCTC19222P로 기탁된, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 스파이크(Spike) 단백질을 포함하는, 고병원성 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 국내 분리주 GNU-2105-P5(GNU-2105)를 제공한다.
- [0025] 상기 기탁번호 KCTC19222P로 기탁된, PDCoV 국내 분리주는 GenBank accession number OQ566228의 염기서열로 이루어진 게놈 RNA를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 균주는 국내 PDCoV 모균주(GenBank accession number OQ566226)로부터 분리 및 5대 계대배양된 신규한 PDCoV 분리주로서 GNU-2105-P5로 명명하여, NCBI GenBank에 기탁하여 GenBank accession number OQ566228을 부여받았고, 동일한 균주를 GNU-2105 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV)로 명명하면서 2024년 08월 23일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 기탁번호 KCTC19222P를 부여받았다.
- [0027] 본 명세서에서, 본 발명의 신규한 균주인 "기탁번호 KCTC19222P로 기탁된, 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 국내 분리주 GNU-2105-P5"는 GNU-2105와 혼용되며, GNU-2105-P5는 국내에서 순환하고 있는 PDCoV에 속한다.
- [0028] 본 발명에서 "돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)"은 PDCoV는 니도바이러스(Nidovirales) 과 코로나바이러스(Coronaviridae) 류에 속하는 델타코로나바이러스(Deltacoronavirus) 속의 불테코바이러스(Buldecovirus) 아속에 속하며, 돼지에 감염되어 식욕 부진, 구토, 수양성 설사(경증에서 중증), 탈수, 성장 지연, 급성 장염 및 사망을 발생시킬 수 있는 바이러스를 의미한다.
- [0029] 또한, 본 발명의 GNU-2105-P5는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 스파이크(Spike) 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 즉, 상기 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5는 대한민국 경북 돼지 농장으로부터 제공받은 PDCoV 감염된 포유자돈 시료에서 바이러스를 분리하여 배양하고 5대 계대 및 증식하여 얻은 바이러스주로, 5대 계대 및 증식을 통해 최초 분리주 및 공시균주(KNU-1607)와 비교하여, 스파이크(Spike) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 이의 아미노산

서열에 변화가 발생하였으며, 이로 인해 병원성이 증가된 고병원성의 균학적 특성을 갖는다.

- [0031] 이에, 본 발명의 PDCoV 국내 분리주는, 바람직하게는 공격접종(challenge) 또는 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 백신을 제조하는 데 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 스파이크(Spike) 단백질은 본 명세서에 기재된 서열번호 1의 서열 뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물들도 포함할 수 있다. 예를 들면, 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항원의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항원의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다.
- [0034] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은, 다음 단계를 포함하는, 기탁번호 KCTC19222P로 기탁된, 고병원성 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 국내 분리주 GNU-2105-P5(GNU-2105)의 제조 방법을 제공한다:
- [0035] (1) GenBank accession number OQ566226의 염기서열로 이루어진 게놈 RNA를 갖는 PDCoV 검출이 확인된 시료로부터 세포 배양을 위한 접종원을 확보하는 단계;
- [0036] (2) 상기 PDCoV가 함유된 접종원을 트립신이 첨가된 배양 배지에 현탁하는 단계;
- [0037] (3) 상기 현탁액을 ST 세포(Swine Testicle cell)에 접종시키는 단계;
- [0038] (4) 상기 ST 세포를 트립신이 함유된 성장 배지에서 5회 계대배양하는 단계; 및
- [0039] (5) 상기 ST 세포에서 PDCoV 특이성 세포 변성 효과 (Cytopathic effects; CPE)를 나타내고, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 스파이크(Spike) 단백질을 포함하는 균주를 확인하여 분리하는 단계.
- [0040] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 (1) 단계의 시료는 소장 조직 시료, 분변 시료 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 방법은 당업계에 공지된 방법 및 실시예를 통해 상술한 본 발명의 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5를 수득하는 방법에 대한 것이므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0043] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 백신 또는 백신 후보 물질의 면역원성 검정 방법을 제공한다:
- [0044] (a) 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 백신 또는 백신 후보 물질을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;
- [0045] (b) 상기 백신 또는 백신 후보 물질이 투여된 인간을 제외한 동물에게 상술한 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5 또는 이로부터 유래된 항원을 공격접종하는 단계; 및
- [0046] (c) 상기 공격접종한 인간을 제외한 동물의 증상을 조사하는 단계.
- [0047] 본 발명의 면역원성 검정 방법에는 3일령 내지 4개월령의 돼지를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0048] 본 발명의 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5는 국내에서 유행하는 일반적인 야외주와 유전적으로 차이가 있어 고병원성을 나타내므로 이를 기존의 백신의 재평가나 백신후보물질의 효능과 면역원성을 평가하는데 효과적으로 이용할 수 있다. 보다 구체적으로 PDCoV 백신 또는 백신후보물질을 돼지에 피하 또는 근육 접종한 다음 GNU-2105-P5를 공격 접종하고 분변 내에 바이러스의 배출을 확인하는 방법으로 효능을 평가할 수 있다. 본 발명에 따르면 GNU-2105-P5가 돼지 자돈에서 병원성을 나타낼 수 있다는 것이 확인되었으므로, 이 범위 내의 돼지 자돈을 대상으로 효능시험을 평가하고, 또한 이 바이러스로 접종한 자돈의 혈액에서 항체가를 측정하여 면역원성을 평가하는 것이 바람직하다.
- [0050] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5, 상기 바이러스의 배양물

또는 이의 항원을 포함하는 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)의 검정 키트를 제공한다.

- [0051] 본 발명의 GNU-2105-P5, 이의 배양물 또는 이의 항원은 항원-항체 복합체 반응을 통해 감염될 또는 감염된 세포 중의 PDCoV를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라, PDCoV를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.
- [0052] 이러한 검정 키트에는 본 발명의 GNU-2105-P5 뿐만 아니라, 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다. 이러한 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함될 수 있으나 이를 제한하는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액(PBS), 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종리, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0053] 항원-항체 복합체 형성은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블롯(Western blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.
- [0054] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5, 상기 바이러스의 배양물 또는 이의 항원을 유효성분으로 포함하는, 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 감염증 예방용 백신 조성물; 및 상기 백신 조성물을, 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 돼지 델타코로나바이러스(Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 감염증 예방 방법을 제공한다.
- [0057] 본 명세서에서, "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, PDCoV 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0058] 또한 본 명세서에서, "백신"은 항원, 즉 병원체를 약하게 만들어 인체 또는 동물에 주입하여 항체를 형성하게 하여 그 질병에 방어, 면역성을 가지게 하는 의약품을 총칭하는 것으로, 백신의 종류는 완전히 병원체를 죽여 만드는 불활화 백신과 병원성을 순화시킨 생백신이 있다.
- [0059] 이 중 불활화 백신은 병원체를 정제한 후 가열하거나, 자외선 조사 또는 포르말린이나, 알킬화 시약 등의 약품을 이용하여 병원성 미생물을 죽여서 만든 백신으로, 불활성화 할 때에 바이러스가 복제될 수 없게 만들지만 생물체 표면에 존재하는 항원의 구조를 그대로 유지시키는 것이 중요하다. 불활성화 백신은 주로 체액성 면역만을 유도하지만 안전성이 높아서 백신 접종의 부작용이 거의 없으며 다가 백신으로서 응용 가능성이 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 불활성화 백신은 애주번트(adjuvant)를 포함할 수 있다.
- [0061] 상기 애주번트는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다.
- [0062] 상기 애주번트는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 허용 가능한 애주번트로는 프로인트 완전 애주번트, 프로인트 불완전 애주번트, 사포닌, 미네랄 겔, 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레스틴, 플루론 폴리올, 다중음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키흐림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 백신 조성물은 특정 유전자 변이에 의해 고병원성 변이체인 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5, 이의 배양물 또는 이로부터 유래된 항원을 유효성분으로 포함하여, 상기 백신 조성물을 동물에 처리하여 PDCoV 감염증을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 용어 "PDCoV 감염증"이란 PDCoV의 감염으로 유발되는 질환으로서, 식욕 부진, 구토, 수양성 설사(경증에서 중증), 탈수, 성장 지연, 급성 장염, 사망 등을 예시할 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다.
- [0065] 또한, 상기 조성물의 투여량은 투여대상의 상태, 투여 경로 및 투여 형태에 따라 조절될 수 있어 한정되지 않음

며 증상에 따라 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 자명하게 다양한 범위 내에서 사용할 수 있다.

- [0066] 본 발명의 백신 조성물은 경구, 근육, 피하, 복강, 정맥, 진피, 안구, 뇌내 등의 투여경로를 통해 투여될 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 바람직하게는 피하 투여경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0067] 상기 백신 조성물은 포유 동물에 접종할 수 있으며, 포유동물은 개, 돼지, 말, 소, 양, 염소, 사슴, 너구리, 인간 등 일 수 있으며, 바람직하게는 돼지에 접종할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 서브바이러스(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N,N-디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제 2 보조제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0069] 또한, 상기 백신 조성물은 수의학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "수의학적으로 허용 가능한 담체"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원 보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착 지연제 등을 포함한다. 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다.
- [0070] 또한, 상기 백신용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 드립(drip) 또는 스프레이 등의 비강용 제형 그리고 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [0071] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리 에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 비강내 투여를 위한 제제에 적합한 침투제는 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 그러한 적합한 제형물은 안정성과 순응도를 위해 바람직하게 무균, 등장 및 완충되도록 제형화된다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명의 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5은 국내에서 순환하고 있는 신규 PDCoV를 분리한 것으로, 고병원성을 가지므로 백신 개발 또는 테스트를 위한 공격접종용 바이러스주로 유용하게 사용할 수 있어, 우수한 백신의 개발에도 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1은 PDCoV 균주 KNU-1607-P5(KNU-1607로 표시) 및 GNU-2105-P5(GNU-2105로 표시)의 세포 병리 및 성장 특성을 보여준다. (a 및 b) KNU-1607 및 GNU-2105의 표현형 특성. ST(a) 또는 IPEC-J2(b) 세포를 모의 감염시키거나 각 바이러스에 0.1의 MOI로 감염시켰다. PDCoV 특이적 CPE를 매일 모니터링하고 세포를 200배율의 역현미경을 사용하여 6 hpi로 촬영하였다(왼쪽 패널). 면역 염색을 위해 감염된 세포를 6 hpi에서 고정하고 PDCoV N 단백질에 대한 MAb로 배양한 다음 Alexa 녹색 접합 염소 항마우스 이차 항체로 배양하였다(두 번째 패널). 그런 다음 세포를 DAPI로 카운터 염색하고(세 번째 패널) 형광 현미경으로 200배 배율로 검사하였다. (c) KNU-1607과 GNU-2105의 플라크 형태 표현형을 보여주는 대표 이미지. ST(위쪽 패널) 또는 IPEC-J2(아래쪽 패널) 세포의 단

층을 각 균주에 감염시켰다. 세포를 한천 오버레이 배지에서 유지한 후 1일 동안 배양하였다. 플라크를 크리스탈 바이올렛으로 염색하고 24시간 후 사진을 촬영하였다. (d) KNU-1607 및 GNU-2105의 성장 동역학. 감염 후 지정된 시점에 배양 상청액을 채취하고 바이러스 역가를 측정하였다. 결과는 중복으로 수행된 세 가지 독립 실험의 평균으로 표시되며 오차 막대는 SDM을 나타낸다.

도 2는 감염을 위한 세포 표면 산에 대한 PDCoV 균주의 의존성을 보여준다. (a) 뉴라미니다아제 처리 감염성 분석. ST 또는 IPEC-J2 세포를 37°C에서 2시간 동안 뉴라미니다아제(NA+) 또는 PBS(NA-)로 전처리한 후 트립신이 있는 상태에서 1시간 동안 MOI 1로 KNU-1607 또는 GNU-2105를 접종했다. 도 1(a)에 설명된 대로 세포를 5% FBS를 함유한 α -MEM 또는 RPMI에서 유지한 후 5 hpi에서 IFA를 처리했다. 시알산 의존성 감염의 형광 병소의 비율은 200배 현미경 필드에서 감염된 세포를 세어 계산했다. 형광 현미경으로 획득한 IFA 이미지가 하단에 표시된다. (b) 형광 강도 측정. 위에서 설명한 바와 같이 웰에서 IFA 염색의 형광 방출을 형광 측정법으로 검출하고 형광 강도의 백분율을 플롯했다. 표시된 값은 세 번의 독립적인 실험의 평균이며, 오차 막대는 SDM을 나타낸다. **P < 0.001.

도 3은 4가지 코로나바이러스(CoV) 속(알파-CoV, 베타-CoV, 감마-CoV, 델타-CoV)의 전체 게놈 서열(a)과 PDCoV 균주의 전체 게놈 서열(b) 및 S 유전자(c)의 뉴클레오타이드 서열을 기반으로 한 계통학적 분석을 보여준다. ClustalX 소프트웨어를 사용하여 다중 서열 정렬을 수행하고, 이웃 결합 방법을 사용하여 정렬된 뉴클레오타이드 서열로부터 계통 발생 트리를 구성했다. 각 분기의 숫자는 1,000개의 복제본을 기준으로 50% 이상의 부트스트랩 값이다. 균주 이름, 분리 날짜(연도)와 함께 국가, GenBank 가입 번호, 이 연구에서 제안된 클레이드가 표시되어 있다. 개별 클레이드는 황록색(UKJ), 주황색(중국), 하늘색(SEA) 등 다양한 색상으로 음영 처리되어 있다. 한국(KOR) PDCoV 균주도 회색 음영으로 표시되어 있다. 파란색 원은 KNU-1607 균주, 빨간색 원은 이 연구에서 확인된 GNU-2105 균주, 녹색 원은 한국 프로토타입 균주인 KNU14-04를 나타낸다. 눈금 막대는 부위별 뉴클레오타이드 치환을 나타낸다.

도 4는 신생아 자돈에서 PDCoV 균주의 독성을 나타낸다. (a) 각 그룹의 임상적 중요도 점수(CSS). 각 그룹의 개별 돼지의 CSS는 설사 중증도에 대한 점수 기준을 사용하여 측정했다: 0, 정상 및 설사 없음(평균 Ct 값 > 35); 1, 경증 및 유동성 분변; 2, 중등도 점액성에서 수양성 설사; 3, 중증 수양성 및 투사성 설사(평균 Ct 값 < 20); 4, 폐사. (b) 생존 곡선. 개별 자돈을 모니터링하고 7 DPI까지 각 그룹의 생존율을 플롯했다. (c) 각 그룹의 분변 PDCoV 배출 프로필. 표시된 샘플링 시점의 직장 스왑에서 PDCoV RNA 역가(로그10 게놈 카피/ml)는 rRT-PCR을 사용하여 측정했다. (d) 장 조직 내 PDCoV 분포. 부검(사망 시 또는 7 DPI에서 안락사 후 수행)에서 수집한 각 장 조직에서 PDCoV RNA 부하(log10 게놈 카피/ml)를 rRT-PCR을 사용하여 측정했다. 각 시점의 각 그룹의 평균값이 표시되어 있으며 오차 막대는 SDM을 나타낸다. P값은 KNU-1607 바이러스 접종 그룹과 GNU-2105 바이러스 접종 그룹 간의 데이터를 비교하여 계산했다. *p = 0.001 - 0.05; **p < 0.001.

도 5는 KNU-1607을 접종한 돼지의 거시적 및 현미경적 장 병변(a) 또는 GNU-2105(b) 및 가짜 대조군 동물(c)의 장 병변을 보여준다. 각 그룹의 새끼 돼지의 소장과 대장에서 총 병변이 있는지 검사했다. 각 패널의 상단에 대표적인 해부 이미지가 표시되어 있다. GNU-2105를 접종한 새끼 돼지는 일반적으로 얇고 투명한 장 벽을 보였다. 각 그룹의 대표 자돈의 헤마톡실린 및 에오신 염색 장 조직 단면이 각 패널의 왼쪽 하단에 표시된다(100배 확대, 눈금 막대 = 100 μ m). GNU-2105를 접종한 자돈의 소장 절편에서 심각한 용모 위축을 관찰할 수 있다. 각 그룹의 대표 자돈의 각 장 조직 색션에서 PDCoV 항원을 보여주는 DIF 분석 결과가 각 패널의 오른쪽 하단에 표시된다(200배 확대, 눈금 막대 = 50 μ m). KNU-1607과 GNU-2105를 접종한 자돈의 장 절편 상피 세포에서 PDCoV N 단백질의 면역 형광 염색이 검출되었다. 모의 접종한 자돈의 장에서는 PDCoV 항원이 확인되지 않았다.

도 6은 KNU-1607 또는 GNU-2105를 접종한 자돈의 VH : CD 비율을 보여준다. 각 소장 절편의 용모와 크립트 10개를 측정했다. 각 그룹의 개별 소장 절편의 평균 VH : CD 비율을 제시하고, 오차 막대는 SDM을 나타낸다. **P < 0.001.

도 7은 S 단백질에서의 PDCoV 공시균주(KNU-1607)와 본 발명의 신규한 PDCoV GNU-2105-P5(GNU-2105) 사이의 유전적 변이(variations)를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0076]

[0078] **실험 방법**

[0079] 세포, 바이러스 및 항체

[0080] 돼지 고환(Swine testicular, ST) 세포는 5% 태아 소 혈청(FBS, Invitrogen)과 페니실린-스트렙토마이신(100 X, Invitrogen)이 보충된 알파 최소 필수 배지(α -MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하였다. 돼지 소장 상피 세포주(IPEC-J2, 한국 단국대학교)를 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신, 10mM HEPES(Invitrogen), 1mM 피루베이트 나트륨(Invitrogen) 및 비필수 아미노산(100배; Invitrogen)이 보충된 RPMI 1640 배지(Invitrogen)에서 배양하였다. 앞서 설명한 대로 FBS 없이 바이러스 성장 배지(페니실린-스트렙토마이신이 보충된 α -MEM 또는 RPMI 1640, 10mM HEPES(Invitrogen), 트립신 5 μ g/ml(USB, 클리블랜드, OH))에서 ST 또는 IPEC-J2 세포에서 PDCoV KOR 균주 KNU-1607을 배양하였다. PDCoV N 단백질을 표적으로 하는 이전에 공지된 단일 클론 항체(MAb)를 이용하였다(Journal of Veterinary Science. (2018) 19, no. 4, 577-581).

[0082] 바이러스 분리

[0083] 2020년 11월부터 2021년 4월까지, 대한민국 경북에 위치한 모든 1,000두 규모의 상업적 분만-비육 농장에서 모돈과 함께 흑색 설사 및 식욕부진을 반복적으로 보이며 포유자돈에서 80% 이상의 폐사를 초래하는 치명적인 수양성 설사를 동반한 PDCoV가 발생하였다. 설사 자돈에서 채취한 소장(SI, n = 4) 및 분변(n = 5) 표본은 진단을 위해 실험실에 제출되었다. 장 균질물과 분변 현탁액은 당업계에 공지된 바와 같이 준비하였고, 바이러스성 장내 병원체에 대한 RT-PCR을 추가로 실시하였다. PDCoV 양성 검체는 0.22 μ m 기공 주사기 필터(밀리포어, 빌레리카, MA)를 통해 여과하고 바이러스 분리 및 뉴클레오티드 시퀀싱이 수행될 때까지 -80°C에서 보관하였다.

[0084] 당업계에 공지된 방법(Journal of Veterinary Science. (2018) 19, no. 4, 577-581)에 따라, 트립신이 있는 상태에서 ST 세포를 사용하여 상기 표본으로부터 PDCoV(GNU-2105/KOR/2021, GNU-2105-SI)를 분리하였다. 그런 다음 세포병증 효과(CPE)를 보이는 감염된 세포에서 채취한 바이러스 상층액을 플라크 정제를 거쳤다. 잘 분리된 단일 플라크를 수집하여 바이러스 성장 배지에 다시 현탁시켜 PDCoV(GNU-2105-P1)으로 명명하였다. 이어서, GNU-2105-P1을 ST 세포에서 4번의 계대배양에 걸쳐 순차적으로 증식시켜 GNU-2105-P5를 수득하였다. 각 바이러스주는 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였고, 이하 본 발명의 실시예에 GNU-2105-P5(이하, GNU-2105과 혼용)를 이용하였다.

[0085] (GNU-2105-SI: 소장 유제액으로 PDCoV를 분리한 원(original) 시료/ GNU-2105-P1: GNU-2105-SI를 접종한 ST 세포에서 분리된 바이러스(계대 1회)/ GNU-2105-P5: GNU-2105-P1를 접종한 ST 세포에서 연속 5회 계대 배양된 바이러스(계대 5회))

[0086] 본 발명의 균주로서 국내 PDCoV 모균주(GenBank accession number OQ566226)로부터 분리 및 5대 계대배양된 신규한 PDCoV 분리주 GNU-2105-P5는, NCBI GenBank에 기탁하여 GenBank accession number OQ566228을 부여받았고, 동일한 균주를 GNU-2105 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV)로 명명하면서 2024년 08월 23일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 기탁번호 KCTC19222P를 부여받았다.

[0088] 면역 형광 분석

[0089] ST 또는 IPEC-J2 세포를 모의 감염시키거나 트립신이 있는 상태에서 1시간 동안 0.1의 MOI(multiplicity of infection)로 KNU-1607(P5) 또는 GNU-2105(P5)에 감염시켰다. 감염 후 6시간(hpi)에 감염된 세포를 앞서 설명한 대로 PDCoV N-특이적 MAb를 사용하여 면역 형광 분석(IFA)을 실시하였다. 염색된 세포는 라이카 DM IL LED 형광 현미경(라이카, Wetzlar, 독일)으로 시각화하였다.

[0091] 플라크 분석

[0092] 6웰 조직 배양 플레이트에서 배양한 ST 또는 IPEC-J2 세포에 트립신을 함유한 각 바이러스 현탁액을 37°C에서 1시간 동안 접종하였다(MOI 0.1). 흡착 후, 감염된 세포에 1.5% Bacto 한천(Difco, Detroit, MI)을 미리 혼합한

바이러스 성장 배지 2ml를 덮고 적절한 크기의 바이러스 플라크가 생성될 때까지 37℃에서 하루 동안 증식시켰다. 24시간 후 한천 배지를 제거한 후, 플라크를 7% 파라포름알데히드로 고정하고 5% 에탄올에 1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.

[0094] 정량적 실시간 RT-PCR

[0095] 감염된 ST 또는 IPEC-J2 세포의 바이러스 상청액에서 i-TGE/PED 검출 키트(iNtRON Biotechnology, 성남, 대한민국)를 사용하여 바이러스 RNA를 추출하였다. PDCoV M 유전자 기반 실시간 RT-PCR(rRT-PCR)은 원스텝 TB 그린 프라이믹스립트 RT-PCR 키트(TaKaRa, 일본 오츠)를 사용하여 수행하였다. 반응 혼합물은 CronoSTAR 96 실시간 시스템(Clontech, 마운틴뷰, 캘리포니아주)을 사용하여 증폭하였고, 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0097] 바이러스 적정

[0098] ST 또는 IPEC-J2 세포에 각 PDCoV 균주(P5)를 접종하였다. 배양 상청액을 3, 6, 9, 12, 24시간에 채취하였다. 바이러스 역가는 중복 세포에서 회석을 제한하여 측정된 다음, 리드-핀치 방법을 사용하여 ml당 50% TCID₅₀(tissue culture infectious dose)을 결정하였다.

[0100] 뉴라미니다아제(NA, Neuraminidase) 처리 감염성 분석

[0101] 96웰 조직 배양 플레이트에서 24시간 동안 배양한 ST 또는 IPEC-J2 세포에, 37℃에서 2시간 동안 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*, 독일 만하임, Roche Diagnostics)의 NA 200mU를 50 µl로 전처리하였다. 그런 다음 세포에 트립신을 함유한 각 바이러스 균주(P5)를 MOI 1로 1시간 동안 접종하고 5% FBS를 보충한 α-MEM 또는 RPMI 1640에서 5시간 동안 추가 배양하였다. PDCoV에 감염된 세포 foci의 수를 IFA로 측정하고, 마이크로플레이트 형광분석기(Fluoroskan FL; Thermo Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 IFA의 형광 강도를 측정하였다.

[0103] 유전자 및 계통 발생 분석

[0104] GNU-2105-SI, -P1, -P5 균주의 전체 길이 게놈 뉴클레오타이드 서열은 Sanger 시퀀싱을 사용하여 결정하였다. 전체 바이러스 게놈을 포괄하는 9개의 cDNA 단편을 증폭하고 시퀀싱하였다. 각 분리주의 게놈의 5' 및 3' 말단은 cDNA 끝의 RACE(rapid amplification of cDNA ends)을 통해 결정되었다. GNU-2105-SI, -P1, -P5 바이러스의 전체 게놈 서열 데이터는 각각 GenBank accession number OQ566226-8로 NCBI GenBank에 기탁되었다. 전 세계 PDCoV 분리주의 총 123개 게놈 서열은 서열 정렬 및 계통 발생 분석에 사용되었다.

[0106] 동물 실험 및 임상 시험

[0107] 동물 실험 프로토콜은 경상대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 승인을 받았으며(IACUC 번호: GNU-221212-P0176), 경상대학교 동물 시설에서 수행되었다. 15마리의 신생 자돈(연구 시작 시 3일령)은 PDCoV 노출 또는 백신 접종 기록이 없는 일반 사육장의 상업적 교배 모돈(그레이트 요크셔 X 더치 란드레이스)에서 얻었다. 모든 동물은, 바이러스 특이적 rRT-PCR을 실시해 알려진 돼지 장내 바이러스에 대해 음성 판정을 받았다. 동물을 체중별로 무작위로 세 실험군(KNU-1607, GNU-2105, 모의 접종)에 배정하고 세 개의 별도 공간에 사육하였다. 새끼 돼지는 시판 우유 대체제를 매일 3~4회 먹었으며 연구 기간 동안 물을 자유롭게 이용할 수 있었다. 2일간의 적응 기간을 거친 후, 5일령의 동물에게 KNU-1607(n = 5) 또는 GNU-2105(n = 6)를 10^{4.0} TCID₅₀/돼지(신생자돈 설사 중앙값 100회에 해당하는 KNU-1607의 용량)로 경구 접종하였다. sham 그룹(n = 4)에는 플라시보로 세포 배양액을 투여하였다. 접종 후 7일인 7 DPI(days postinoculation) 동안 매일 구토, 설사, 사망을 포함한 임상 징후를 기록하였다. 접종 전과 접종 후 매일 직장 면봉 샘플을 채취하여 대변 내 바이러스 배출량을 정량화하기 위해 rRT-PCR을 실시하였다. 분변 샘플의 바이러스 역가(게놈 카피/ml)는 각 그룹의 모든 돼지에 대해 계산하였다. 임상적 유의성 점수(CSS)는 7 DPI에 대한 대변 일관성을 기준으로 결정하였다. 죽은 동물은 사망 시점에 해

부했고, 각 그룹에서 살아남은 돼지는 사후 검사를 위해 7 DPI에 안락사시켰다.

[0109] 조직병리 및 DIF(direct immunofluorescence)

[0110] 각 자돈에서 장 조직(십이지장, 근위 공장, 회장, 맹장, 결장) 샘플(두께 3mm 미만)을 채취하여 RT에서 24시간 동안 10% 포르말린에 고정하고 표준 실험실 프로토콜에 따라 파라핀에 담았다. 탈파라핀화된 장 조직 섹션은 조직 병리학을 위해 헤마톡실린과 에오신(H&E; 시그마-알드리치)으로 염색하거나 바이러스 항원 검출을 위해 직접 면역 형광(DIF)을 실시하였다. 용모 위축의 심각도는 H&E 염색 조직 절편 전체에서 용모 높이와 토굴 깊이(VH : CD) 사이의 비율을 정량화하여 결정했으며, 각 소장 세그먼트에서 VH : CD의 평균 비율을 계산하였다.

[0112] 통계 분석

[0113] 모든 값은 평균 차이(SDM)의 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시된다. 통계 분석은 GraphPad Prism 7 software package (GraphPad Software, San Diego, CA)를 사용하여 수행하였다. P값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의미한 결과로 간주하였다.

[0115] 실시예 1. 본 발명의 PDCoV 분리주 GNU-2105(GNU-2105-P5) 시험관 내 표현형 특성

[0116] 초기 진단 테스트에서 모든 임상 SI 및 분변 샘플은 PDCoV 양성으로 확인되었다. 반면에 PEDV, TGEV, PRV(porcine rotavirus)를 포함한 다른 바이러스성 장내 병원체는 검출되지 않았다. 그런 다음 바이러스 분리를 위해 PDCoV 양성 임상 샘플을 ST 세포에 접종하고 바이러스에 의한 CPE를 매일 관찰하였다. GNU-2105-P5(GNU-2105)로 명명된 PDCoV 균주는 PDCoV에 자연 감염된 자돈으로부터 제조한 SI homogenate (GNU-2105-SI)에서 분리하여 5회 계대배양하여 획득하였다.

[0117] CPE 관찰 결과, 배양 상청은 플라크 정제를 통해 복제되었고, 정제된 바이러스(GNU-2105-P1)는 바이러스 역가를 높이기 위해 최대 4회 계대배양하였다. 제1 계대에서 감염된 ST 세포에서 GNU-2105 바이러스는 둥글게 클러스터로 뭉치고, 세포가 분리되는 등 PDCoV 감염의 전형적인 CPE를 생성하였다. 계대배양할수록 GNU-2105는 6 hpi에서 CPE를 보이기 시작하여 12 hpi까지 뚜렷하게 보였고, 비교 대조군으로써 국내 PDCoV 공시균주인 KNU-1607-P5와 유사하였다. 바이러스 전파는 PDCoV N-특이적 Mab를 사용하여 IFA로 PDCoV 항원을 검출하여 확인하였다. 명백한 염색은 감염된 세포의 세포질에 국한되었다. 대조적으로, 모의 접종한 ST 세포에서는 CPE나 N-특이적 염색이 나타나지 않았다. 두 균주의 이러한 성장 특성은 IPEC-J2 세포에서 재현되었다. 도 1(a)와 1(b)는 KNU-1607-P5 또는 GNU-2105-P5에 감염된 ST 및 IPEC-J2 세포의 CPE 및 결과물의 IFA 이미지이다. 도 1(c)에서 볼 수 있듯이, KNU-1607-P5(KNU-1607)과 GNU-2105-P5(GNU-2105)의 플라크는 두 세포주에서 크기와 형태가 유사하였다.

[0118] 또한, 각 균주에서 바이러스 계능의 양을 평가하고 비교하였다. 평균 Ct 값은 KNU-1607과 GNU-2105가 각각 13.57과 12.65로 유사한 수치를 보였다. ST 세포에서의 바이러스 복제 동역학 연구 결과, 두 바이러스 모두 구별할 수 없는 성장 곡선을 보였으며 12 hpi에서 최대 역가가 10^6 TCID₅₀/ml 이상으로 비슷하게 나타났다(도 1(d)). 또한, 두 균주 모두 IPEC-J2에서 효율적으로 복제되어 ST 세포에서와 유사한 성장 동역학을 보였다.

[0119] 한편, 세포 표면의 시알산(SA)은 PDCoV의 수용체 역할을 하며 감염 효율을 높인다. 따라서, 각 PDCoV 균주에 감염된 세포에서 SA의 역할을 평가하였다. 이를 위해 바이러스 감염 전에 세포 표면에서 SA를 고갈시킬 수 있는 ST 또는 IPEC-J2 세포에 NA 처리를 실시하였다. NA 처리된 세포를 트립신이 포함된 각 PDCoV-P5 스톱에 감염시키고 트립신의 작용(바이러스 전파를 제한할 수 있음)을 방지하기 위해 FBS가 배합된 배지에서 배양한 후 5시간 후 IFA에 노출시켰다. NA 미처리 및 KNU-1607 감염 대조군 세포와 비교했을 때, NA 처리 및 감염된 ST 및 IPEC-J2 세포에서 형광 초점의 양이 각각 62.8% 및 91.7% 감소하였다(도 2(a)). 마찬가지로 NA 전처리는 GNU-2105의 감염성에도 유의미한 영향을 미쳤다. NA로 전처리한 ST 세포와 IPEC-J2 세포는 각각 NA 미처리 및 감염된 대조군 세포에 비해 58.2%와 89.6% 감소하는 것을 관찰하였다. 각 바이러스의 NA 처리 의존적 감염성 수준은 형광분석을 통해서도 확인되었다(도 2(b)). 이러한 데이터는 감염을 위해 세포 표면에 존재하는 SA에 대한 두 가지 PDCoV 균주의 중요성을 보여주었다.

[0121] 실시예 2. 본 발명의 PDCoV 분리주 GNU-2105(GNU-2105-P5)의 유전적 및 계통학적 특성 분석

[0122] 본 발명자들은 GNU-2105-SI 분리주와 GNU-2105-P1 및 -P5 바이러스의 전체 길이 게놈 서열을 결정하고 분석하였다. GNU-2105-SI, -P1, -P5 균주의 전체 게놈은 25,422개의 뉴클레오타이드(3' 폴리(A) 꼬리 제외)로 구성되었으며 이전에 시퀀싱된 모든 PDCoV와 동일한 조직을 보였다. GNU-2105-P1 및 -P5 바이러스의 전체 게놈 서열을 모 균주인 GNU-2105-SI와 비교했으며, 연속 계대배양하는 동안 발생한 GNU-2105의 뉴클레오타이드 및 아미노산 변화는 하기 표 1에 요약되어 있다. GNU-2105-SI와 비교했을 때 GNU-2105-P1과 -P5는 3,444, 9,567, 17,015, 21,115, 21,209, 21,247 위치에서 6개의 동일한 뉴클레오타이드(nt) 차이를 보였다. 이 중 5개는 비침묵성 돌연변이로, ORF1a, ORF1b, S(Spike) 코딩 영역에서 각각 1개, 1개, 3개의 아미노산(aa) 치환을 일으켰다. S 코딩 영역의 598번(Ser에서 Pro로), 629번(Phe에서 Ser로), 642번(Gln에서 Lys로) 위치에 있는 세 개의 aa 돌연변이는 10회 계대배양(GNU-2105-P10)까지도 보존되었다. 세포 배양 적응 돌연변이는 E, M, N 및 보조 유전자를 코딩하는 영역에서 발견되지 않았다.

[0123] 따라서, 본 발명의 신규한 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5는 GenBank 접근번호 OQ566226으로 표시되는 GNU-2105-SI의 S 유전자가 코딩하는 부위(S 단백질)의 598번째 아미노산이 Ser에서 Pro, 629번째 아미노산이 Phe에서 Ser, 642번째 아미노산이 Gln에서 Lys로 치환된 변이체(variant)(spike protein; 서열번호 1)임을 확인하였다.

[0124] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 신규한 PDCoV 국내 분리주 GNU-2105-P5(GenBank 접근번호 OQ566228)는, PDCoV 공시균주인 KNU-1607와 비교했을 때, 마찬가지로 S 단백질에서 아미노산 서열 상 변이(variations)가 있음을 확인하였다.

[0125] 이를 통해, 스파이크 단백질 유전자의 아미노산 변화가 돼지 숙주에서의 병원성과 연관이 있음을 유추할 수 있다.

[0126] [표 1]

Genome region (nucleotide length)	Nucleotides			Amino acids				
	Position	SI	P1	P5	Position	SI	P1	P5
5'-UTR (539)	- ^a	-	-	-	-	-	-	-
ORF1a (10,881)	3,444	C	T	T	969	L	L	L
	9,567	C	G	G	3,010	P	A	A
ORF1ab (18,803)	17,015	G	T	T	5,493	G	C	C
	21,115	T	C	C	598	S	P	P
S (3,483)	21,209	T	C	C	629	F	S	S
	21,247	C	A	A	642	Q	K	K
E (252)	-	-	-	-	-	-	-	-
M (654)	-	-	-	-	-	-	-	-
NS6 (285)	-	-	-	-	-	-	-	-
N (1,029)	-	-	-	-	-	-	-	-
NS7 (603)	-	-	-	-	-	-	-	-
NS7a (303)	-	-	-	-	-	-	-	-
3'-UTR (392)	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. ^aNo nucleotide or amino acid change found.

[0127]

[0129] 전체 게놈 서열 분석 결과 GNU-2105 균주는 5' UTR, 단백질 코딩 ORF, 3' UTR에서 1-nt, 35-aa, 8-nt 변이로 인해 게놈 수준에서 PDCoV KOR 프로토타입 균주(KNU14-04)와 99.4% 상동성이 있는 것으로 나타났다(표 2). 게놈 서열을 정렬한 결과 GNU-2105는 미국, 한국, 일본(UKJ) 분리주와 가장 밀접한 관련이 있으며, 게놈 수준에서 131-248 nt 차이로 99.0%-99.5%의 동일성을 공유하는 것으로 나타났다(표 3). 반면, GNU-2105 균주는 중국 및 베트남, 태국, 라오스 등 동남아시아(SEA) 국가에서 보고된 분리주와 먼 거리에 있는 것으로 나타났다. 또한 GNU-2105는 게놈 수준에서 546~782 nt 변이를 보이며 96.9%-97.9%의 범위로 SEA 균주와의 동일성이 가장 낮았다(표 3). UKJ 균주는 PDCoV 프로토타입 균주 HKU15-155와 비교했을 때 S 유전자에 두 개의 삽입(IN) 시그니처(nt 위치 19,476-19,478 또는 S의 aa 위치 52)와 3' UTR (nt 위치 25,048-25,050)을 가졌다. GNU-2105의 경우, S 유전자의 전자는 IN 서명이 동일하지만 3' UTR의 후자는 "TTA" IN 서명이 TCT로 수정되었다. 또한 GNU-2105 균주는 중국 균주에서 흔히 볼 수 있는 C25086T 및 G25096A를 포함하여 3' UTR에 여러 점 돌연변이를 가지고 있었다.

[0131] [표 2]

Genome region (nucleotide length)	GNU-2105
5'-UTR (593)	99.8 (1)
ORF1ab (18,803)	99.7 (18)
nsp2 (1,779)	99.7 (2)
nsp3 (4,209)	99.5 (7)
nsp4 (1,536)	99.6 (2)
nsp5 (921)	99.7 (1)
nsp6 (831)	99.6 (1)
nsp7 (288)	100 (0)
nsp8 (567)	100 (0)
nsp9 (327)	100 (0)
nsp10 (399)	100 (0)
nsp11 (21)	100 (0)
nsp12 (2,787)	99.9 (1)
nsp13 (1,788)	99.8 (1)
nsp14 (1,551)	99.8 (1)
nsp15 (981)	99.4 (2)
nsp16 (837)	100 (0)
S (3,483)	99.2 (9)
E (252)	100 (0)
M (654)	100 (0)
NS6 (285)	98.9 (1)
N (1,029)	99.7 (1)
NS7 (603)	97.5 (5)
NS7a (303)	97.0 (3)
3'-UTR (392)	98.0 (8)
Total	99.4 (1/35/8) ^a

Note. ^aThe number of individual differences in the 5'-UTR, protein-coding region, and 3'-UTR, respectively.

[0132]

[0134] [표 3]

Strain	Nucleotide/amino acid identity (%) (No. of nucleotide/amino acid differences)										
	GNU-2105	Minnesota 454	Iowa 136	HKD	Peru isolate	HKU15-155	HB	GX 1468B	NT1 1215	VN 0116	BTL 0115
GNU-2105/		99.5	99.3	99.0	99.4	98.9	99.0	97.3	96.9	97.9	97.2
KOR/2021		(131)	(105)	(248)	(153)	(285)	(257)	(688)	(782)	(546)	(705)
Minnesota 454/	99.2		99.8	99.4	99.5	99.2	99.3	97.5	97.1	98.1	97.4
USA/2014	(9)		(49)	(141)	(123)	(202)	(172)	(630)	(724)	(481)	(650)
Iowa 136/	99.1	99.7		99.3	99.4	99.1	99.2	97.4	97.1	98.0	97.4
USA/2015	(11)	(4)		(166)	(148)	(229)	(199)	(655)	(746)	(504)	(670)
HKD/	98.4	98.9	98.9		99.1	98.8	98.9	97.1	96.8	97.7	97.0
Japan/2016	(18)	(13)	(13)		(254)	(312)	(285)	(732)	(822)	(589)	(751)
Peru isolate/	98.8	99.1	98.9	98.1		98.8	99.0	97.3	96.9	97.8	97.2
Peru/2019	(14)	(11)	(13)	(22)		(303)	(264)	(694)	(792)	(522)	(717)
HKU15-155/	98.2	98.8	98.8	98.2	98.2		99.5	97.7	97.3	98.1	97.6
China/2012	(21)	(14)	(14)	(21)	(21)		(124)	(592)	(682)	(494)	(608)
HB/	98.6	99.2	99.3	98.4	98.4	99.2		97.7	97.3	98.1	97.6
China/2015	(16)	(9)	(8)	(18)	(18)	(9)		(574)	(679)	(478)	(603)
GX 1468B/	97.4	98.0	98.0	97.4	97.5	97.6	98.0		98.0	98.6	98.3
China/2018	(30)	(23)	(23)	(30)	(29)	(28)	(23)		(514)	(361)	(431)
NT1 1215/	96.7	97.3	97.3	96.6	96.7	97.2	97.5	97.4		98.1	98.4
Thailand/2015	(38)	(31)	(31)	(40)	(38)	(32)	(29)	(30)		(473)	(164)
VN 0116/	98.7	99.1	99.1	98.4	98.5	98.4	98.7	97.8	97.2		98.4
Vietnam/2015	(15)	(10)	(10)	(19)	(17)	(18)	(15)	(25)	(33)		(395)
BTL 0115/	97.2	97.8	97.8	97.0	97.3	97.5	97.9	97.7	99.1	97.4	
Laos/2016	(33)	(26)	(26)	(35)	(31)	(29)	(24)	(27)	(10)	(30)	

Note. The percent full-length genome identities (nucleotide level) were shown in the upper right, and the percent S gene identities (amino acid level) were presented in the lower left.

[0135]

[0137] 그런 다음 GNU-2105 균주의 전체 게놈과 S 유전자의 nt 염기서열과 GenBank 데이터베이스에서 접근 가능한 염기서열을 다른 속의 대표적인 CoV 염기서열과 함께 사용하여 계통학적 분석을 수행하였다(도 3). 전장 게놈 서열을 기반으로 한 계통 발생은 GNU-2105 균주가 조류 유래 델타코로나바이러스와는 다른 델타코로나바이러스 속의 돼지 유래 계통으로 분류되는 것을 확인하였다(도 3(a)). 전체 게놈 또는 PDCoV의 S 유전자를 기반으로 한 추가 계통수에서는 지리적으로 분리된 세 개의 계통이 나타났다: UKJ, 중국, SEA 계통(도 3(b) 및 3(c)). 이전과 최근의 모든 KOR 균주는 UKJ 계통에 속했지만, 서로 다른 가지에 위치하여 바이러스 진화가 진행 중임을 시사한다. 흥미롭게도 전체 게놈 기반 계통 발생은 GNU-2105 균주가 더 가깝게 배치된 반면(도 3(b)), S 유전자 기반 계통 발생은 중국 계통에서 더 멀리 떨어져 있는 것으로 나타났다(도 3(c)).

[0138] 즉, 계통학적 결과를 종합하면, 2021년에 확인된 균주는 과거 한국에서 발생한 바이러스와 유사하지 않다는 것을 알 수 있다.

[0139] 따라서, 본 발명의 신규한 PDCoV 국내 분리균주인 PDCoV GNU-2105-P5(GNU-2105)는, 앞서 상술한 바와 같이, 최초 분리주 및 공시균주인 2016년도에 분리된 저병원성 분리주 KNU-1607와 비교하였을 때 염기서열 및 아미노산의 상이한 변화가 존재하는 신규 균주이다.

[0140] 특히, 저병원성인 KNU-1607 바이러스와 비교하여 스파이크 단백질의 상이한 아미노산 변화가, 돼지 숙주에서의 병원성에 영향을 미쳐 이에 의해 본 발명의 PDCoV GNU-2105-P5이 고병원성을 갖는 균학적 특징이 발휘된다.

[0142] 실시예 3. 신생 자돈에서 본 발명의 PDCoV 분리주 GNU-2105(GNU-2105-P5)의 고병원성 확인

[0143] 본 발명의 PDCoV 분리주 GNU-2105(GNU-2105-P5)는 심각한 규모의 신생 자돈 폐사를 겪은 기존의 분만~비육돈 무리에서 확인되었기 때문에 자연 숙주에서의 생물학적 특성을 평가하고자, 신생 자돈에 대한 공격접종(challenge) 후 KNU-1607(KNU-1607-P5) 및 GNU-2105(GNU-2105-P5) 분리주의 병원성을 조사하였다. 15마리의 자돈을 세 그룹으로 나누어 첫 번째 그룹(5마리)은 KNU-1607을 접종하고(1그룹), 두 번째 그룹(6마리)은 GNU-2105를 접종하고(2그룹), 마지막 그룹(4마리)은 세포 배양액(sham)을 접종하였다. 매일 세 번씩 임상 증상을 기록하고 전체 실험 기간 동안 접종 전과 접종 후 매일 분변 샘플을 수집하였다. 적응 기간 동안 모든 동물은 활기차고 정상적인 대변의 일관성을 유지하며 임상 증상이 나타나지 않았으며 직장 면봉 검사 결과 PDCoV RNA가 음성으로 나타났다. Sham-접종 그룹에서는 켈런지 실험 내내 어떤 동물도 PDCoV의 임상 증상을 보이지 않았다.

[0144] 그러나 1그룹에 속한 대부분의 KNU-1607에 감염된 새끼 돼지(4/5)는 1 DPI(평균 CSS = 1.0)에서 설사 대변을 보였고 5 DPI(평균 CSS = 0.8-1.2, 도 4(a))까지 경증에서 중등도 설사를 계속하였다. 또한, 1그룹의 거의 모든 동물(4/5마리)은 6 DPI에서 회복되었고 관찰 기간 내내 모두 생존하였다(도 4(b)). 마찬가지로, 2그룹의 돼지 한 마리를 제외한 대부분의 동물(5/6마리)은 GNU-2105를 접종한 후 1 DPI까지 임상 장애(예: 무기력증, 식욕부진, 중등도 설사)가 나타났다(평균 CSS = 1.3). 놀랍게도 2그룹의 모든 자돈은 이후 심각한 수양성 설사(평균 CSS > 3.0; 도 4(a))를 겪었으며, 2그룹의 모든 문제 자돈에서 2, 3, 5 DPI에서 각각 2/6, 3/6, 1/6의 PDCoV 관련 폐사가 5 DPI에 나타났다(도 4(b)).

[0145] 따라서, 상기 결과는 본 발명의 2021(GNU-2105) 분리주에 의한 자돈의 실험적 감염이 PDCoV 감염으로 인해 발생하는 해당 임상 질병 징후를 유도할 수 있음을 나타낼 뿐만 아니라, 자연 숙주로부터 분리된 본 발명의 2021(GNU-2105) 분리주가 저병원성인 KNU-1607에 비해 고병원성을 가짐을 나타낸다.

[0146] 또한, 분변 검체에서 바이러스의 검출을 rRT-PCR로 확인한 결과, 1그룹에서는 KNU-1607을 공격접종한 자돈의 60%(3/5)가 평균 역가 $10^{7.1}$ 게놈 카피/ml로 1 DPI까지 PDCoV 게놈에 양성 반응을 보였다. 1그룹의 모든 돼지는 분변에서 평균 역가 $10^{5.3}$ 게놈 카피/ml로 2 DPI까지 바이러스를 배출하였다. 그 후, 바이러스 배출은 6 DPI까지 $10^{0.8}$ 내지 $10^{4.7}$ 게놈 카피/ml 범위에서 꾸준히 감소하여 7 DPI에서 rRT-PCR로 검출할 수 없는 수준에 도달하였다(도 4(c)). 마찬가지로, 2그룹의 GNU-2105를 공격접종한 세 마리(3/6)의 자돈은 1 DPI까지 평균 $10^{6.0}$ 게놈 카피/ml의 역가로 분변에서 PDCoV를 배출하였다. 그러나 2그룹의 모든 동물은 2 DPI에서 평균 $10^{6.8}$ 게놈 카피/ml의 역가로 대변에 바이러스 부하가 증가했으며, 사망할 때까지 $10^{5.2}$ 내지 $10^{6.0}$ 게놈 카피/ml의 높은 분변 PDCoV RNA 역가를 보였다(도 4(c)). sham 그룹의 동물들은 연구 기간 내내 설사 대변과 검출 가능한 분변 바이러스 배출 없이 건강한 상태를 유지하였다.

[0147] 또한, 해부 시 채취한 장 조직에서도 PDCoV RNA 부하를 확인하였다. 1그룹에서 KNU-1607을 공격접종한 3마리의 돼지는 십이지장을 제외한 대부분의 장 분절에서 PDCoV 양성 반응을 보였고, 나머지 동물(2/5마리)은 모든 장 조직에서 PDCoV 음성으로 확인되었다. 이와 대조적으로, 2그룹의 GNU-2105에 감염된 돼지의 5개의 장 분절 모두에서 PDCoV RNA가 존재하였다. 전반적으로, 2그룹 GNU-2105에 도전한 자돈의 각 장 조직은 1그룹 자돈에 비해 평균 역가가 $10^{4.4}$ 내지 $10^{6.3}$ 게놈 카피/ml로 훨씬 더 높은 PDCoV 역가를 나타냈다(도 4(d)).

[0148] 2-4 DPI에서 사망한 2그룹의 모든 새끼 돼지는 사망 즉시 부검하였다. 반면, 1그룹과 3그룹에서 살아남은 나머지 동물은 사후 평가를 위해 실험 종료 후 안락사시켰다. KNU-1607 공격접종에서 살아남은 1그룹의 동물은 부검 시 거시적으로 경미한 장 병변을 보였다(도 5(a)). 또한, 조직병리학적 및 DIF 검사 결과, KNU-1607에 감염된 자돈의 공장 및 회장 조직에서만 용모 위축과 바이러스 항원이 존재하는 것으로 나타났다.

[0149] 2그룹에서 GNU-2105를 공격접종한 자돈은 폐사 후 부검한 결과 장에 심각한 병적 병변이 나타났다. 용모 위축으로 인해 장이 팽창하여 얇고 투명한 장 벽을 보였다(도 5(b)). 조직병리학적 평가 결과, 1군에 속한 모든 폐사 자돈의 소장은 용모 수축과 공포를 동반한 급성 바이러스성 장염이 특징적으로 나타났다. DIF 검사에서는 GNU-2105를 접종한 그룹의 소장(십이지장~회장)과 대장(맹장 및 결장)의 위축된 용모 상피에서 PDCoV N 단백질이 검출되었다. 반면, sham-접종 음성 대조군에서는 거시적 또는 미세한 장의 변화나 면역 형광 염색 세포가 검출되지 않았다(도 5(c)).

- [0150] 또한, 십이지장, 공장, 회장의 평균($\pm$ SDM) VH : CD 비율은 그룹별로 통계적으로 차이가 있었으며(도 6), GNU-2105 공격접종 그룹이 가장 낮은 VH : CD 비율(1.78 ± 0.34 - 3.44 ± 0.49), KNU-1607 공격접종 그룹이 중간 비율(3.34 ± 0.41 - 4.34 ± 0.69), sham 대조군이 가장 높은 비율(5.90 ± 0.71 - 7.21 ± 0.55)이었다(도 6). 이러한 관찰 결과는 KNU-1607에 비해 GNU-2105의 독성이 증가했음을 입증한다. 종합적으로, 상기 결과들은, 최신 PDCoV 균주 GNU-2105가 신생 자돈에서 장내 병원성이 높다는 것을 보여주었다.
- [0151] 즉, 본 발명의 PDCoV 분리주 GNU-2105-P5는, 고병원성 균주로서 백신의 효능을 확인할 때 공격용 바이러스로 효율적이고 효과적으로 활용이 가능함을 입증한다.
- [0153] 종합적으로, 본 발명의 PDCoV 분리주 GNU-2105-P5는, 국내에서 분리해낸 분리주를 지속적으로 5 계대를 배양함으로써 모균주와 서열 상 차이에 의해 특정 아미노산의 결손이 존재하는 신규한 PDCoV 국내분리주인 것으로 확인되었고, 본 발명의 GNU-2105-P5는 고병원성을 가지고 있어, 백신 개발 또는 효능시험을 위한 공격 접종용 바이러스로 유용하게 사용할 수 있으므로, 본 발명에서 기술하고 있는 PDCoV 분리주를 이용하여 당업계에 공지된 임의의 방법을 통해 용이하게 백신을 제조할 수 있고, 이후 백신의 개발에도 큰 도움이 될 것으로 기대된다.
- [0154] 또한, 국내에서 분리된 PDCoV를 이용하여 상용화된 백신은 아직까지 없다. 국내 분리주를 이용한 예방 백신은 현재 사용 중인 외국용 백신의 수입을 대체할 수 있을 뿐만 아니라, 동남아시아를 비롯하여 다른 나라에 수출이 가능하다.
- [0155] 따라서, 이러한 백신을 접종하면, 돼지에게 심각한 장염, 설사, 구토 및 탈수를 유발하며 양돈 농장에 막대한 손실을 입히고 있는 PDCoV를 예방 및/또는 치료함으로써, 양돈 산업이 더욱 성장하게 되는 선순환의 계기가 될 수 있을 뿐만 아니라, 산업적으로 이용 가능성이 높을 것으로 예상된다
- [0157] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

수탁번호

[0159]

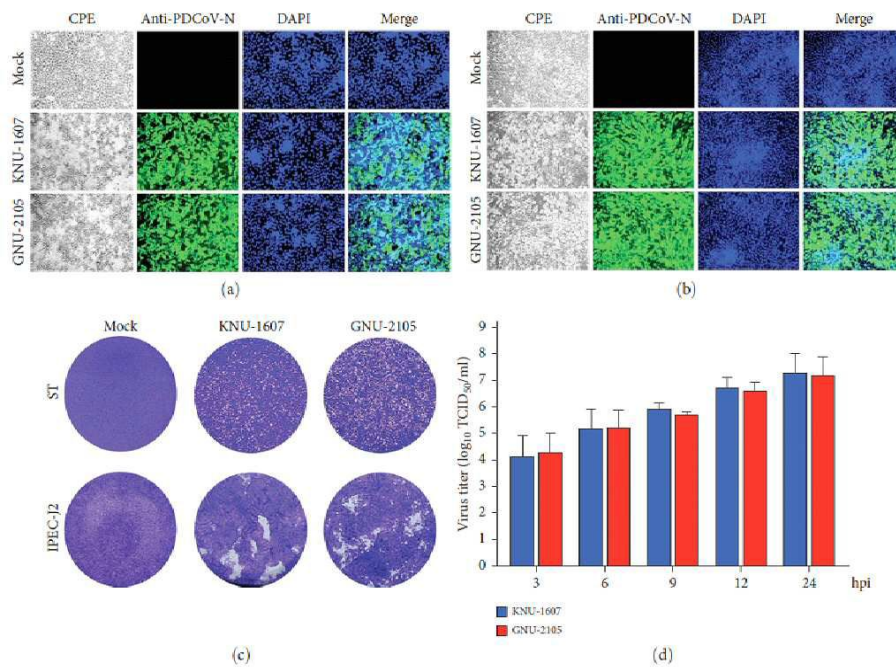
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19222P

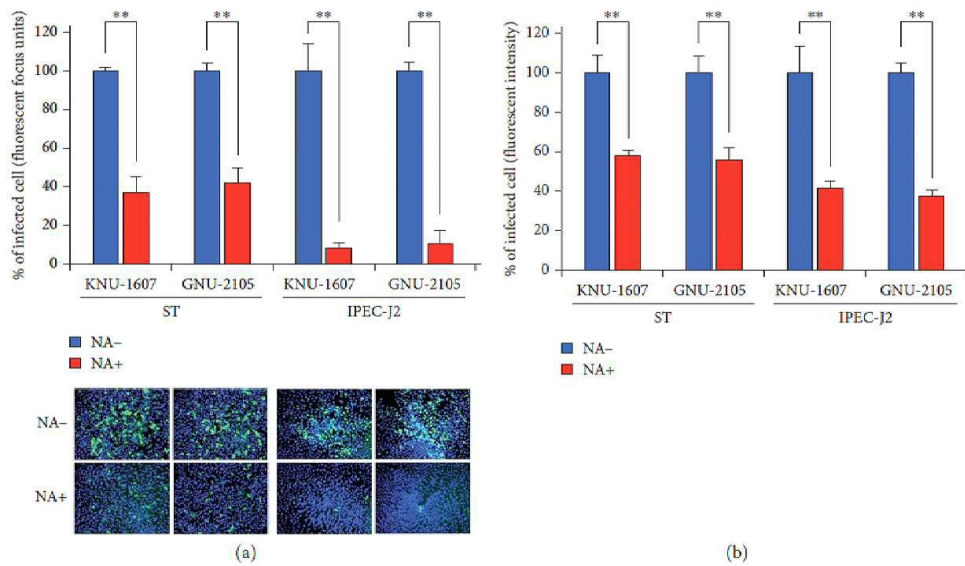
수탁일자 : 20240823

도면

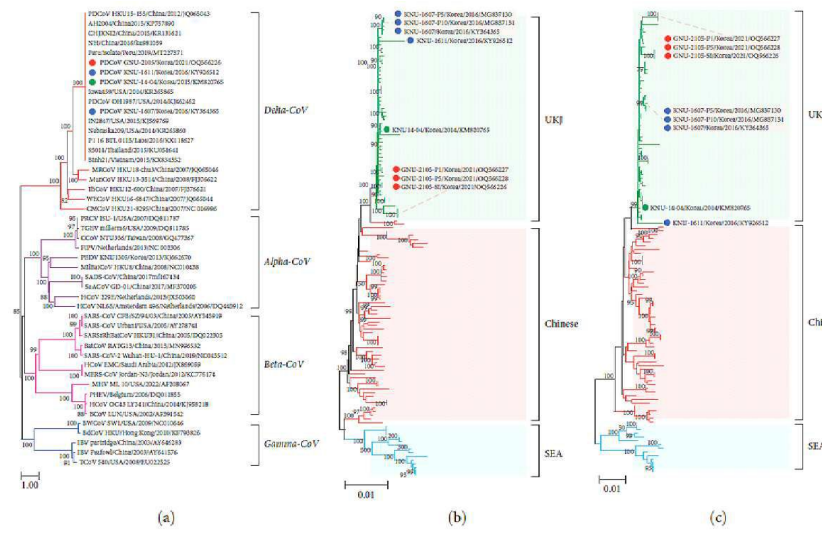
도면1



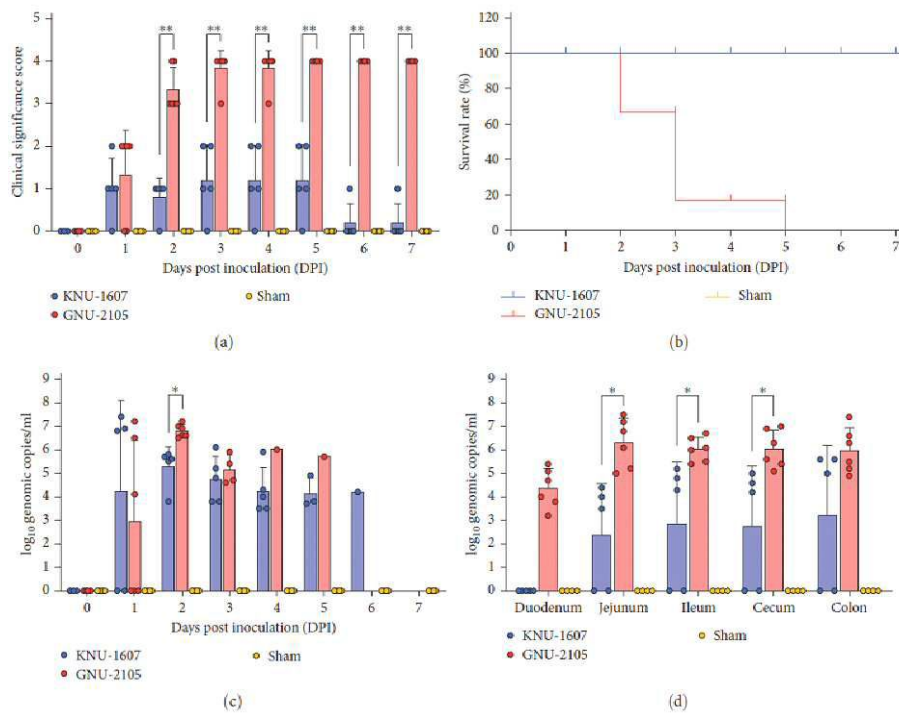
도면2



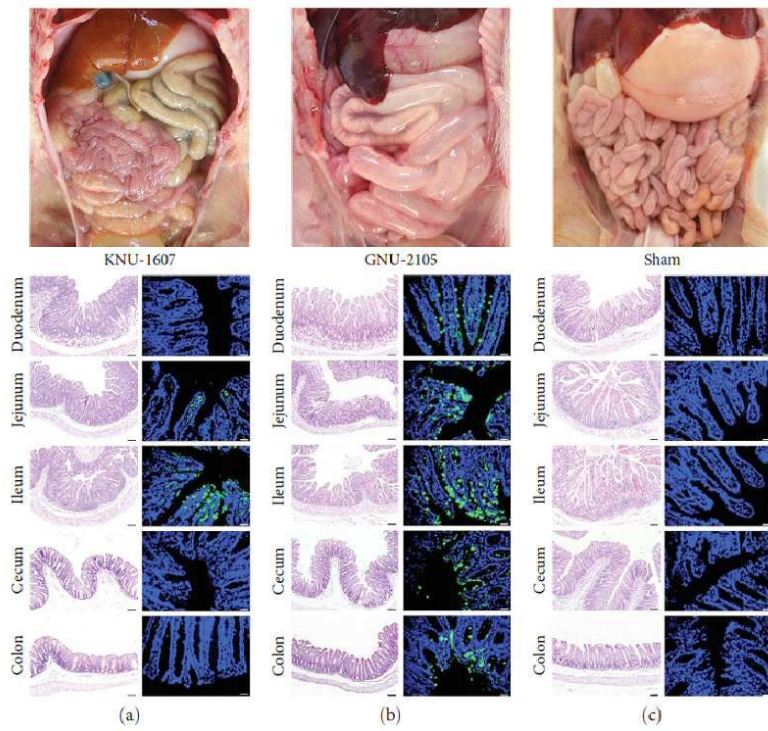
도면3



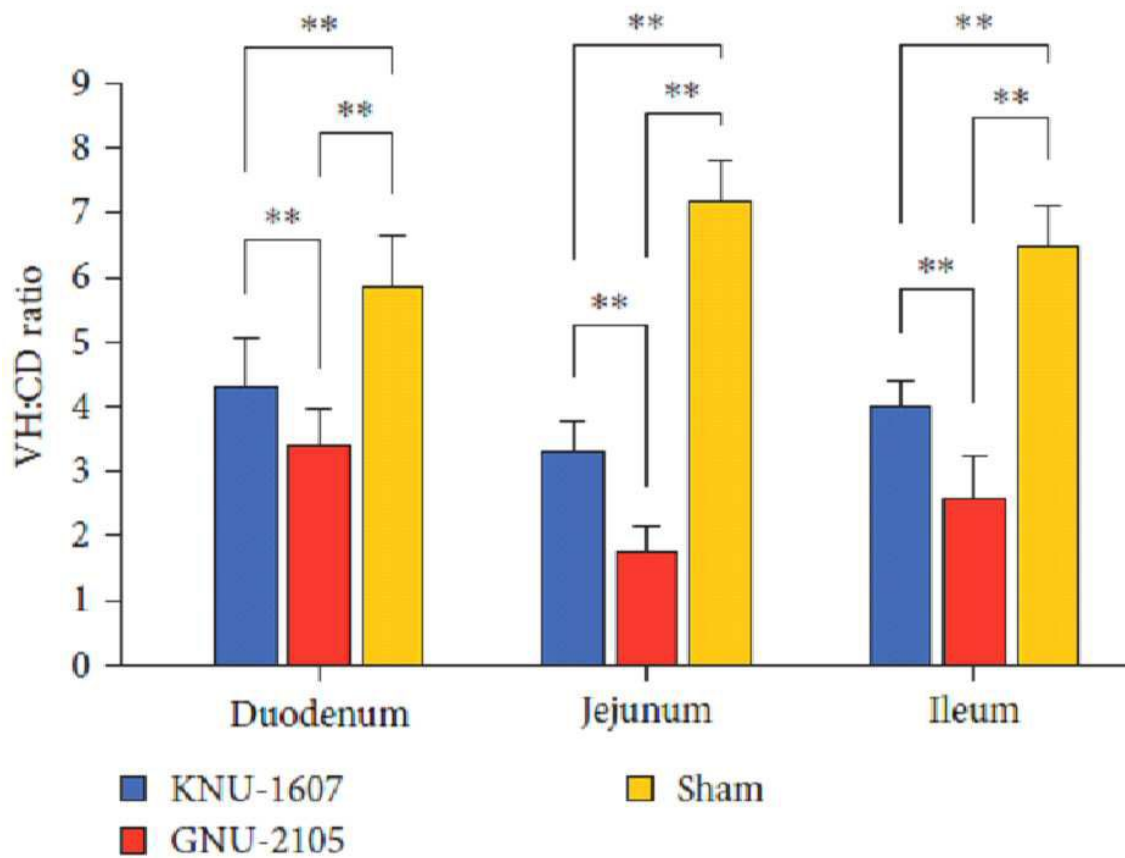
도면4



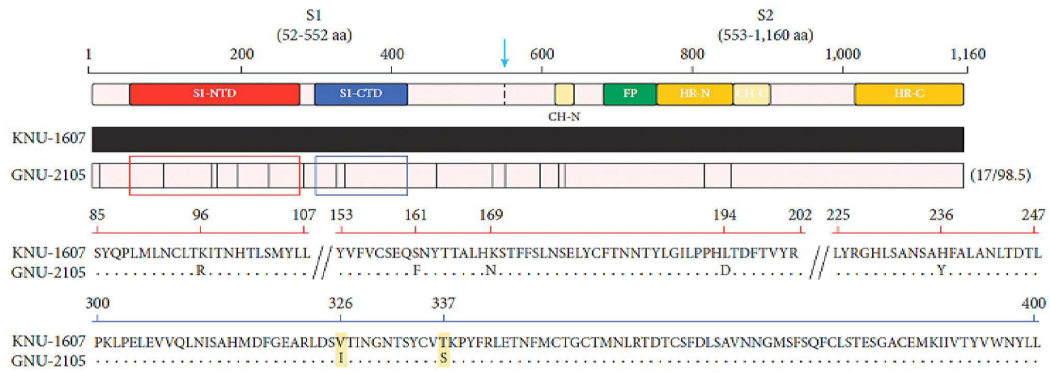
도면5



도면6



도면7



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.