

122009-
2

식물기반
ASF
재조합
단백질
백신
전임상
및
임상시험

최
종
보
고
서

2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004646-01

식물기반 ASF 재조합 단백질백신 전임상 및 임상시험

2024.06.18

주관연구기관 / (주)바이오엠플

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식물기반 ASF 재조합 단백질백신 전임상 및 임상시험”(개발기간 : 2022. 04. 01. ~ 2023. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.18.

주관연구기관명 : (주)바이오엠플

대표이사 손은주 (인)



주관연구책임자 : 강향주 이사

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서						보안등급	
						일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]	
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명		가축질병대응기술고도화지원사업	
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)		개발성과 현장보급기술	
공고번호		제 농축 2022-17호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
				연구개발과제번호		122009-2	
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	70%	LA9999	20%	LB9999	10%
	농림식품과학기술분류	RB0201	70%	AA0399	20%	CA0106	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문					
		영문					
연구개발과제명		국문		식물기반 ASF 재조합 단백질백신 전임상 및 임상시험			
		영문		Preclinical and clinical trials for plant based ASF recombinant protein vaccine			
주관연구개발기관		기관명		(주)바이오엠플		사업자등록번호	
		주소		(우)37668 경북 포항시 남구 지곡로 394 포항테크노파크 내 바이오엠플		법인등록번호	
		성명		강항주		직위	
		연락처		직장전화		휴대전화	
				전자우편		국가연구자번호	
연구개발기간		전체		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(1년 9개월)			
		단계 (해당 시 작성)		1단계		단계없음	
				n단계		단계없음	
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()	
		현금		현금 현물		현금 현물	
총계		700,000		17,500 157,500		717,500 157,500 875,000	
1단계		300,000		7,500 67,500		307,500 67,500 375,000	
2단계		400,000		10,000 90,000		410,000 90,000 500,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위	
		휴대전화		전자우편		비고	
		위탁연구개발기관		전북대학교 산학협력단		탁동섭	
				교수		위탁 대학	
연구개발담당자 실무담당자		성명		박민희		직위	
		연락처		직장전화		휴대전화	
				전자우편		국가연구자번호	

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 5 월 22 일

연구책임자: 강 항 주

주관연구개발기관의 장: 손 은 주



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술고도화지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		개발성과 현장보급기술			연구개발과제번호		122009-2
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	70 %	LA9999	20 %	LB9999	10%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	70 %	AA0399	20 %	CA0106	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		식물기반 ASF 재조합 단백질백신 전임상 및 임상시험					
전체 연구개발기간		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.					
총 연구개발비		총 875,000천원 (정부지원연구개발비: 700,000천원, 기관부담연구개발비 : 175,000천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3) 종료시점 목표(6)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	안전하고 효과적인 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신 개발					
	전체 내용	(1차년도) - 공격접종실험을 통한 방어능 확인(미국 KSU, 2회) - 공격접종 실험에서 확보한 샘플을 이용하여 항원 신속진단키트의 성능 검사 - 항원 대량생산 공정개발 - ASF 혈청학적 분석기법 비교 평가 - 실험동물 및 돼지에서의 혈청학적 검사법 비교 평가 (2차년도) - 주요 ASF 백신용 항원 동결건조 제형 개발 - 신규 ASF 재조합 시험백신의 면역원성 평가 - 국내분리주인 파주주를 이용한 백신 방어능 평가					
연구개발성과	○ 정량적 성과 특허 출원 6, 기술실시 1, 고용창출 5, 학술 발표 1 ○ 정성적 성과 - 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신 공격접종 실험 수행 - 14종의 ASF 재조합 단백질 항원의 식물기반 대량 생산 공정 개발 - 자체 개발한 p30, p72에 대한 항원 신속진단 키트의 평가 - 항원에 대한 단기 안정성 시험 및 동결건조 제형 개발 - 항원량 및 면역증강제 조합에 따른 시험백신 체액성, 세포성 면역원성 평가 - ASF백신의 혈청학적 검사법 비교 및 평가 기법 개발 - 국내분리 ASFV 분리주인 파주주19 감염에 대한 백신 방어능 평가 진행						

<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>연구개발성과의 활용방안</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구과제에서 개발된 항원 대량생산 기술은 다른 백신에 있어서 항원 대량생산 기술에 적용가능함. - 항원 단백질의 동결건조 기술은 향후 항원안정성을 보충할 수 없는 면역증강제를 사용해야 할때 적용할 수 있으며, 백신의 이동, 보관등에 있어 강점이 있음. - 식물 바이러스 VLP 기반의 면역증강제 기술을 ASF뿐만아니라 PRRS, LSD 등, 특히 host의 면역시스템을 교란 할 수 있는 병원체에 대한 백신 개발에 적극 활용가능함. <p>연구개발성과의 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 현재 사용중인 ASF백신이 약독화 생 백신뿐이기 때문에 미발생국에서는 사실상 활용이 불가능하다는 점을 고려하면, 안전성이 담보된 subunit 백신의 개발이 반드시 필요한 상황이나 아직까지 subunit 백신으로서의 성공사례는 Pirbright의 virus-vectored 백신뿐이고 이마저도 후속 연구가 진행되지 못하여 문제가 있을 것으로 추정되는 상황임. 이러한 상황에서 생산이 용이하고 저렴한 식물기반 재조합 단백질 백신으로서 향후 추가 개발 가능성을 보여준 연구 결과라고 생각됨. 												
<p>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</p>													
<p>연구개발성과의 등록·기탁 건수</p>	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
		2	1					생명 정보	생물 자원		정보	실물	
<p>연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</p>	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	아프리카 돼지열병		재조합 단백질	백신		전임상시험		임상시험					
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	African swine fever (ASF)		recombinant protein	vaccine		preclinical study		clinical trial					

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

※ 각 항목에서 요구하는 정보를 포함하여 연구개발과제의 특성에 따라 항목을 추가하거나 항목의 순서와 구성을 변경하는 등 서식을 수정하여 사용하거나 별도의 첨부자료 활용이 가능합니다.

1. 연구개발과제의 개요

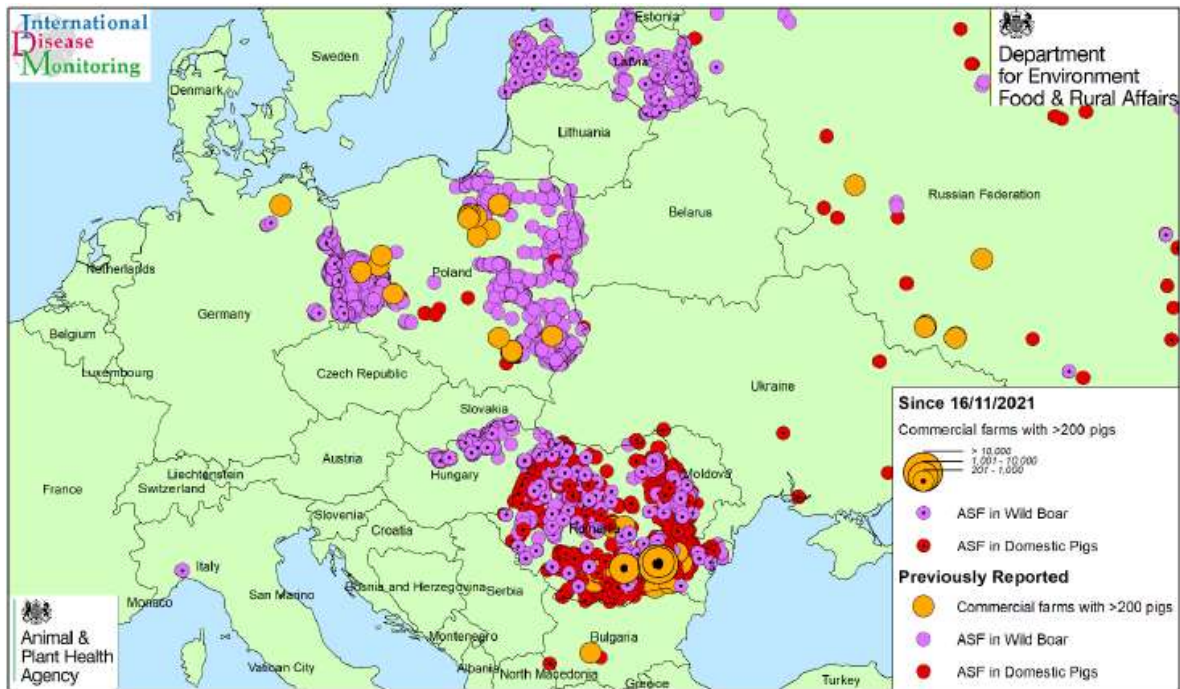
1) 연구개발과제의 배경

(1) 아프리카 돼지열병 바이러스(African swine fever virus)

- *Asfarviridae* 과에 속하는 DNA 바이러스로 주로 마크로파지 세포질에서 복제함.
- 150-167개 유전자를 가지며 약 23종의 유전형으로 구분됨.
- 치사율이 100% 임.
- 바이러스 복제가 매우 신속하게 일어나고 복제된 바이러스는 감염된 돼지의 분변, 소변, 비즙 등으로 전파되고 혈액에 많은 바이러스들이 존재하는데 진드기나 모기 등에 의한 전파도 보고됨.

(2) 아프리카 돼지열병 발생

- 1920년대부터 아프리카 풍토병으로 존재했고, 1960년대 스페인/포르투갈에서 발생하여 근절에 30년 이상이 소요됨.
- 2007년 조지아에서 발생한 이후 러시아, 동유럽에서 지속적으로 발생하였고, 2022년까지도 사육돼지(루마니아, 폴란드, 러시아 등) 및 멧돼지(루마니아, 폴란드, 헝가리, 라트비아, 독일 등)에서 발병이 보고됨



Map prepared by IDM

Date: 11/01/2022

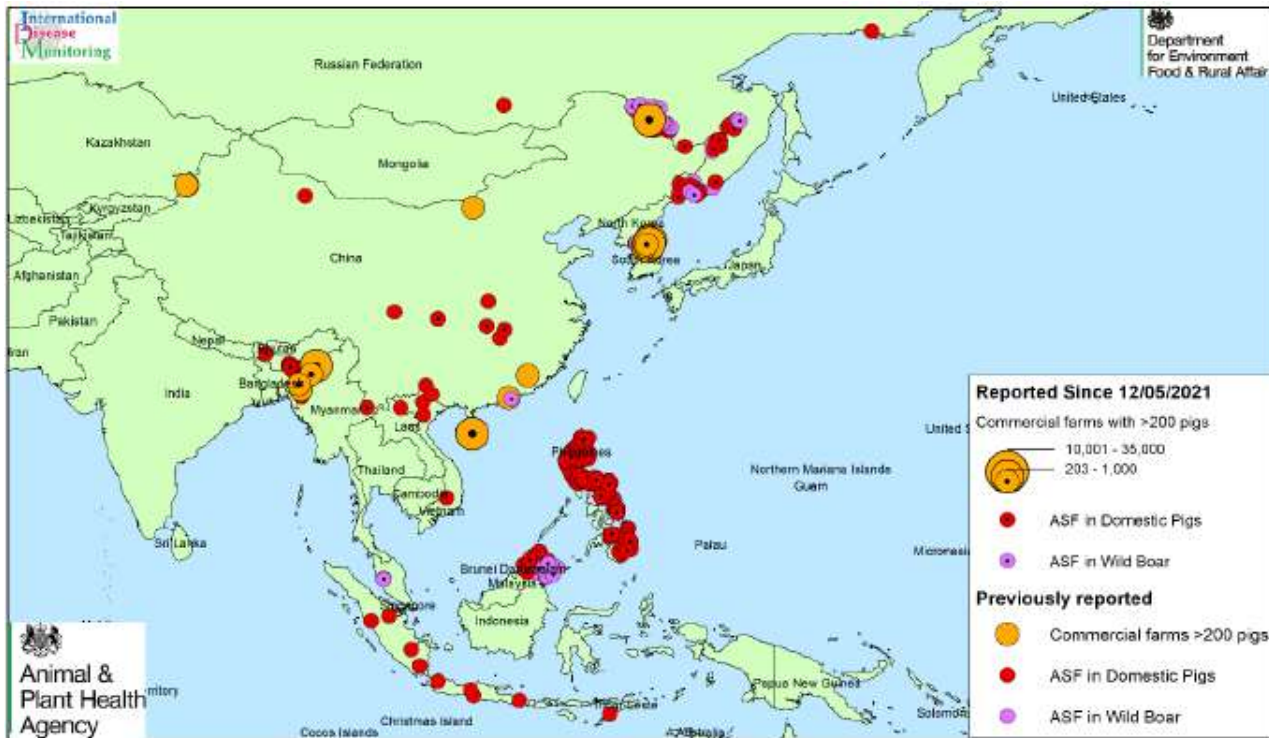
Absolute scale: 1:17,402,799

African Swine Fever in Europe August 2021 - January 2022 (OIE Data Only)

0 120 240 480 720 960 Km

그림 1. 동유럽 ASF 발병 상황(21년8월~22년1월, UK Department for environment, food & rural affairs)

- 중국의 경우 2018년 8월 중국 랴오닝 성에서 처음 발생한 이후 그해만 7억 마리 돼지를 살처분 하였다는 보도가 나온적이 있을만큼 그 피해규모는 천문학적일 것으로 예상된다. 중국에 이어 베트남, 태국, 라오스 등지에서도 2022년까지도 지속적으로 발병이 이어지고 있음.
- 2021년 카리브해의 도미니카 공화국과 아이티에서도 수건의 ASF 발병이 보고되어 미국으로의 전파가 우려되는 상황임



Map prepared by IDM
 Date: 14/12/2021
 Absolute scale: 1:50,000,000

African Swine Fever
 January - December 2021
 (OIE Data Only)

0 345 690 1,380 2,070 2,760

그림 2. 동아시아 ASF 발생현황(2021년, UK Department for environment, food & rural affairs)

(3) 국내 아프리카 돼지열병 발생

- 2019년 5월 북한 자강도에서 첫 발생이 확인된 후 2019년 9월 경기도 파주를 시작으로 경기 북부, 인천 강화지역을 중심으로 발생됨. 1년 후인 2020년 10월 강원도 화천의 양돈농장에서 예찰을 통해 2건의 발병이 확인됨. 그리고 2021년 5월부터 10월까지 5건의 발병이 확인되어 총 36,993마리의 돼지가 살처분됨.

표 1. 국내 ASF 농장 발병 현황 (농림축산식품부 정보공개)

농장 소재지	발생일	가축의 종류	사육두수 (실제 살처분기준)
1	경기 파주시 연다산동	돼지	2,369
2	경기 연천군 백학면 전동리	"	4,638
3	경기 김포시 통진읍 가현리	"	2,119
4	경기 파주시 적성면 자장리	"	2,273
5	인천 강화군 송해면 신당리	"	388
6	인천 강화군 불은면 고능리	"	869
7	인천 강화군 삼산면 석포리	"	2
8	인천 강화군 강화읍 월곶리	"	1,014
9	인천 강화군 하점면 신삼리	"	2,123
10	경기 파주시 파평면 마산리	"	2,661
11	경기 파주시 적성면 주월리	"	19
12	경기 파주시 문산읍 마정리	"	2,226
13	경기 김포시 통진읍 고정리	"	2,916
14	경기 연천군 신서면 답곡리	"	4,245
15	강원 화천군 상서면 다목2길	"	721
16	강원 화천군 상서면 봉오리	"	1,020
17	강원 영월군 주천면 용석리	"	388
18	강원 고성군 간성읍 해상리	"	2,387

19	강원 인제군 인제읍 가리산리	'21.8.15	"	1,736
20	강원 홍천군 내촌면 물걸리	'21.8.25	"	2,300
21	강원 인제군 남면 어른리	'21.10.5	"	579
합계				36,993

- 가장 중요한 ASFV 전파경로로 여겨지는 야생 멧돼지의 경우 2019년 10월부터 2022년 2월 현재까지 꾸준히 감염이 확인되고 있음. 특히 초기에는 경기 및 강원 북부에서 집중적으로 발생해 왔으나 2020년 8월 춘천, 2020년 12월 영월, 2021년 2월 강릉, 2021년 11월 제천, 단양에서 멧돼지 폐사체가 발견되어 양돈농가가 많은 충청 및 경상도에 감염우려가 점점 높아지고 있음. 2022년 2월 6일 기준 총 2055건의 멧돼지 감염발생 건수가 보고됨.

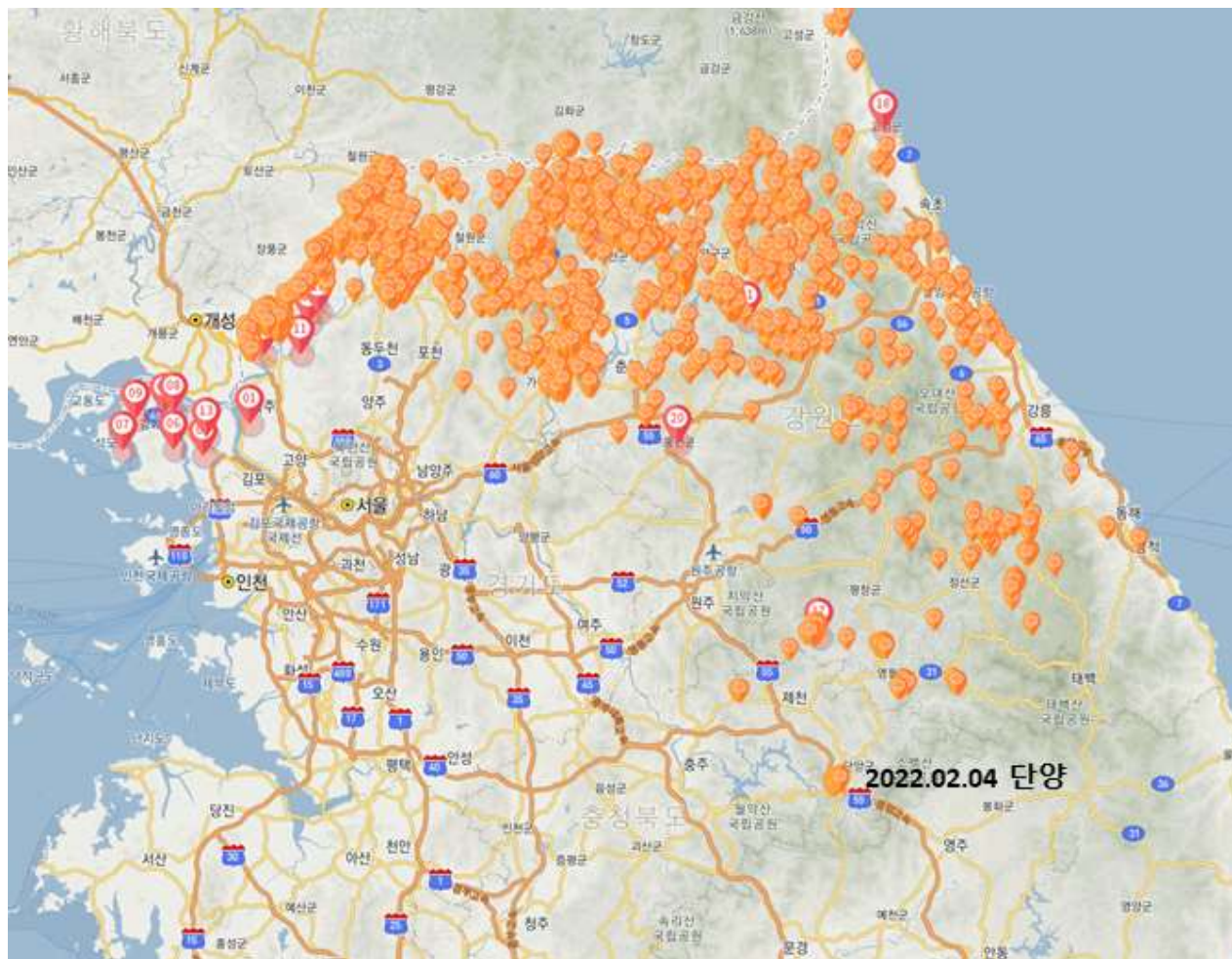


그림 3. 국내 ASF 발생현황(농장 및 멧돼지) 지도(농식품부 가축질병 발생현황 누리집)

(4) 아프리카 돼지열병 백신 개발 진행 현황

- 다양한 연구그룹에서 백신 개발이 진행되고 있지만 현재까지 개발에 성공한 백신 제품은 없음.
- ASFV는 면역반응이 복잡할 뿐 아니라 백신의 방어력과 면역반응간의 상관관계가 명확하지 않음.
- 방어에 효과적인 면역반응은 항체반응과 NK(natural killer) cell과 더불어 CD8+ T 세포성 면역반응 또한 매우 중요한 것으로 알려져 있음.
- 하지만 현재까지 명확한 T cell 혹은 B cell 면역에 필요한 epitope 들이 완벽하게 알려지지 않은 상황임.
- 불활화백신은 방어 효과가 없음.
- 유전자 편집 기술을 활용한 live attenuated virus 백신이 미국과 스페인, 중국에서 개발 중임. 특히 미국 USDA-ARS에서 개발한 ASFV-G-delta I177L/LVR을 베트남의 Navetco

와 Dabaco사에서 기술이전 받아 2021년 하반기부터 베트남에서 효능평가가 진행중이며 2022년 상반기에 출시한다는 보도가 있음. 미국은 현재 미 발생국으로 USDA-ARS 에서 개발한 유전자재조합 생백신을 사용할 계획은 없는 것으로 알려짐.

- 영국 Pirbright 연구소에서 2020년에 아데노바이러스와 MVA에 항원 유전자를 탑재한 virus-vectored 백신 후보물질(8종류의 항원 각테일)이 100% 방어력을 보인다고 보고한 바 있으나 아직 후속연구는 진행되지 않은 것으로 보임.

표 2. 2022년 2월 기준 개발중인 ASF 백신

기관 (국가)	백신타입	특징	개발단계
농무부 , ARS,PIADC (미국)	Modified live virus (MLV) vaccine	ASFV-G-ΔI177L	임상진행 (21 년 상반기 , Navetco)
		ASFV-G-ΔI177L/ΔLVR (PIPEC)	효능 확인 (Dabaco , 22년 2 분기 출시 예정)
농업과학원 하얼빈 수의과학연구소 (중국)	MLV vaccine	7 gene deleted (MGF505-1R, MGF360-12L, MGF360-13L, MGF360-14L, MGF505-2R, MGF505-3R, EP402R)	임상진행 (20 년 6 월)
Pirbright 연구소 (영국)	virus-vectored (rAd-prime/MVA-boost) vaccine	recombinant Adenovirus and Modified Vaccinia Ankara (B602L, B646L, CP204L, E183L, E199L, EP153R, F317L, MGF505-5R)	-

2) 연구개발과제의 필요성

(1) 아프리카 돼지열병 백신 개발 고려사항

○ (유전자 편집) 생백신 안전성:

- 생백신 접종으로 인한 부작용(독성 및 전파)이 없어야 함. 생백신의 경우, 돌연변이나 유전자 재조합 그리고 독력 회복(reversion to virulence)의 가능성을 면밀히 조사해야 함.
- 유전자 편집 생백신의 야외 환경 방출은 야외 환경에서 다양한 병원성 바이러스와의 유전자 재조합의 우려가 있어 신중할 필요가 있음.

○ (유전자 편집) 생백신의 경제성:

- 아프리카 돼지열병 바이러스를 대량배양할 수 있는 Biosafety level을 갖춘 시설이 필요하고 또 대량배양을 위한 세포주 개발 및 세포배양 비용이 높을 것으로 추정함.

(2) 본 연구과제 수행 필요성

- 아프리카 돼지열병 백신 개발을 위해서 면역원성 분석 및 중화항체가 분석이 가능하지만 현재까지 백신의 효능(방어력)과 면역원성 및 중화항체가 분석과의 직접적인 상관관계가 명확하지 않아서 백신 개발에 있어 바이러스 공격접종 실험을 통한 방어효과 분석이 필수적으로 필요함.
- 식물 기반 재조합 서브유닛 백신의 경우, 생백신과는 달리 바이러스 배출이나 돌연변이 출현에 대한 우려가 근원적으로 없고, 또한 식물 발현으로 경제적으로 생산이 가능할 것으로 예상함.
- 현재 국내에서 아프리카 돼지열병 바이러스 공격접종시험은 검역본부 내 구제역백신연구센터와 전북대학교 인수공통감염병 연구소에서만 가능함. 게다가 구제역백신연구센터는 원래 구제역백신 개발을 위한 시설로 ASF 백신개발연구에 할애할 여력이 거의 없음. 현재 ASF 연구를 위한 전용 시설을 준비하고 있는 상황으로 시설 완공 전까지는 해외에서 공격접종 시험을 수행하여 백신 효능을 검증하여야 함.
- 본 연구팀은 러시아 연방바이러스미생물연구소와 미국 캔자스 주립대와 함께 공격접종 실험을 위한 네트워크를 구축하였고, 캔자스 주립대에서의 공격접종 실험을 통해 개발 중인 시험백신의 효능을 일차적으로 확인한 바 있음. 또한 본 연구과제의 주관연구기

관은 가축질병대응기술개발사업을 통해 ASF 그린백신개발을 위한 항원뱅크 구축을 주제로 과제를 수행중임. 해당 과제를 통해 구축된 항원뱅크에서 발굴된 항원을 이용하여 유효성있는 백신을 개발하여 빠르게 인허가 과정에 진입하기 위해 본 사업의 지원이 절실하게 필요한 상황임.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구개발과제의 최종목표

○ 최종 목표: 안전하고 효과적인 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신 개발

(1차년도)

- 공격접종실험을 통한 시험백신 조성 결정
- 항원 대량생산 공정 개발
- 효능 및 경제성 확보를 위한 시험백신 최적화 (항원 신속진단 키트 개발로 대체)
- 백신 평가기법 개발

(2차년도)

- 시험백신 안정성 시험 (항원 동결건조 제형 개발로 대체)
- 야외임상시험 수행 (신규 ASF 재조합 시험백신 면역원성 평가로 대체)
- 국내분리 ASFV감염에 대한 방어능 확인

2) 연구개발과제의 수행 내용

(1) 연구내용(1차년도)

최종목표	목표	주요 연구개발 내용
안전하고 효과적인 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신 개발	공격접종실험을 통한 시험백신 조성 결정 항원 신속진단 키트 개발 항원 대량생산 공정개발 백신 평가기법 개발	공격접종실험을 통한 방어능 확인(미국 KSU, 2회) 공격접종 실험에서 확보한 샘플을 이용하여 항원 신속진단키트의 성능 검사 항원 생산공정 최적화 ASF 혈청학적 분석기법 비교 평가 실험동물 및 돼지에서의 혈청학적 검사법 비교 평가

○ 주관연구기관

가. 공격접종실험을 통한 방어능 확인(미국 KSU, 2회)

① 1차 공격접종 실험

a) 배경

- ASF는 현재까지 면역력과 방어능의 상관관계가 불분명하여 백신의 효능을 확인하기 위해서는 공격접종을 통한 방어능시험이 필수적임. ASFV는 BSL-3에 해당하는 병원균으로 공격접종실험을 위해서는 ABL-3 시설이 필요하나 국내에는 활용가능한 시설이 매우 적어 일찍이 러시아 연방 미생물 바이러스 연구소에서 두 차례 실험하였고 2020년 이후에는 미국 캔자스 주립대의 Jishu 교수 연구진에 공격접종실험역을 진행하고 있음.
- 선행연구를 통해 바이오오프의 5개 항원 단백질로 구성된 재조합 단백질 각테일 백신이 접촉감염에 대한 방어능이 확인된 바 있음. 본 과제의 1차 공격접종 실험의 목적은 사전연구를 재확인하고 동시에 5개의 항원 단백질중 필수적으로 생각되는 항원을 선별하는 것임.

b) 실험방법

- 시험군은 아래 표와 같이 구성함

표 3. 1차 공격접종실험 시험백신 항원 조성

	Lectin	CD2v	p72	p30	p54
G1	+	+	+	+	+
G2	+	+	+	-	-
G3	+	+	-	-	-
G4	+	+	+	-	-
G5	-	-	-	-	-

*G4는 기본 어쥬번트에 single-stranded RNA를 추가

- 4주령 female 돼지 30마리를 6마리씩 5그룹으로 나누고 3주간격 2회 백신 접종(근육)
- 백신은 위의 표의 항원 각 100ug을 w/o/w 어쥬번트로 emulsion 제조. G4의 경우 세포성 면역반응 향상을 위해 single-stranded RNA를 추가함
- 2차 백신접종 2주 후 시험 돼지를 ABL-3시설로 이동시킨 후 그룹당 2마리에 베트남 분리 ASFV 10 HAD50을 근육주사함. 각 그룹당 ASF 근육접종 돼지 1마리와 비 공격접종돼지 2마리씩 모아 각 15마리씩 별도의 공간에서 같이 사육하며 ASFV를 공격접종받지 않은 10마리씩에 접촉을 통한 감염이 되도록 유도. 총 3주간 관찰하며 체온을 측정(microchip을 이용한 RFID방식)하고 매주 채혈하여 RT-PCR을 통한 viremia를 측정.

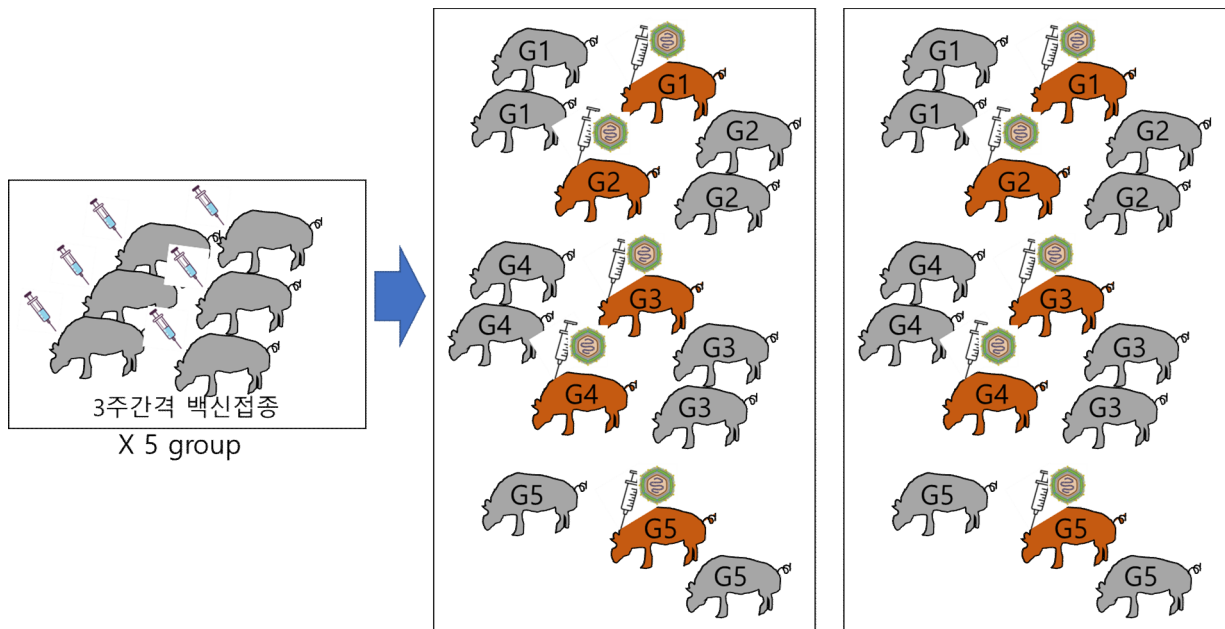


그림 4. 1차 방어능실험 모식도

c) 결과 - 생존률 및 체온

- 공격접종 받은 10마리는 모두 11 DPC(day post challenge, 공격접종 후 11일)이전에 폐사함. 그 외의 돼지들도 계획되어있던 21일이 아닌 16일째에 안락사됨
- 일부 돼지의 경우 고열없이 폐사한 개체들이 발견되나 대부분은 40.5도가 넘는 고열 후 폐사됨

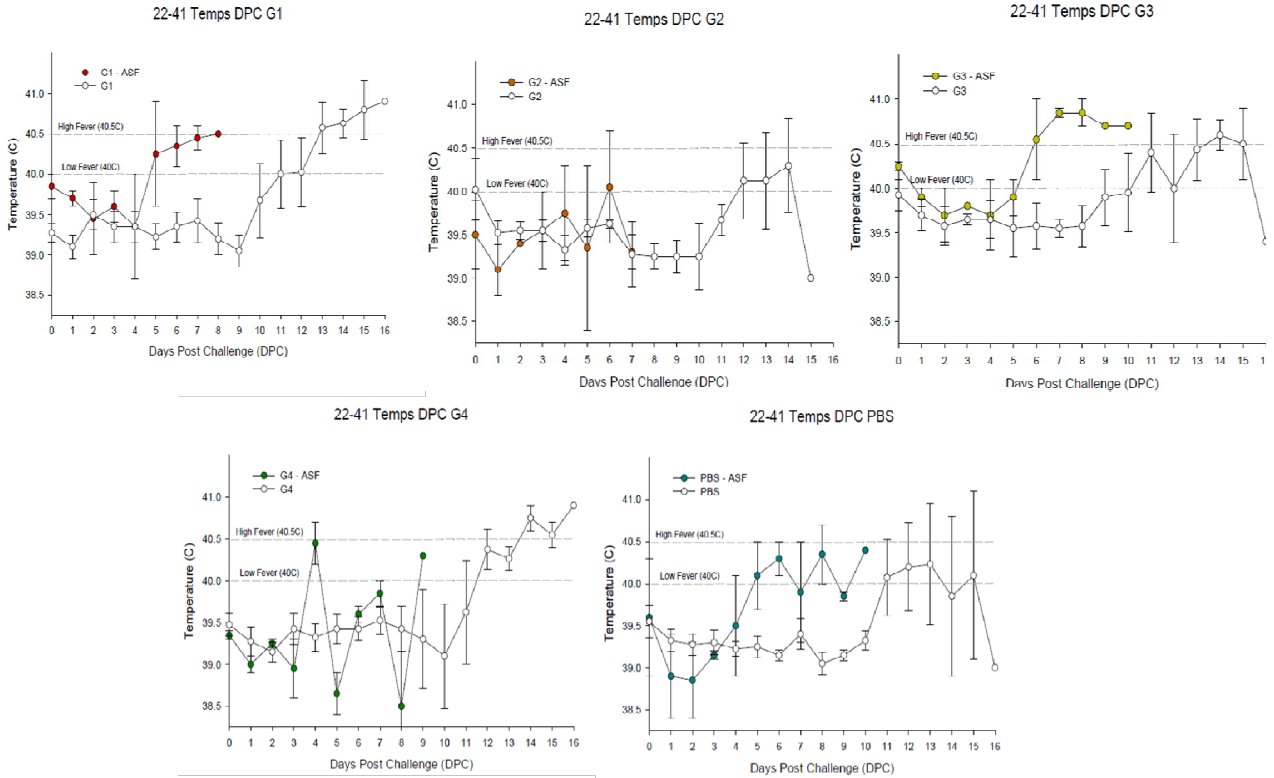


그림 5. 1차 방어능시험 그룹별 평균 체온

Tag#	Sex	Group	Time																				Marker			
			h-11 PM	h-10 PM	7:30 PM	7:45 PM	8:00 PM	2:15 AM	2:30 AM	h-4:00 PM	2:15 AM	h-1:00 PM	h-12:00 PM	h-11:00 PM	h-10:00 PM	h-9:00 PM	h-8:00 PM	h-7:00 PM	h-6:00 PM	h-5:00 PM	h-4:00 PM	h-3:00 PM				
26	♂	OEF G1	39.2°C	39.1°C	39.9°C	39.3°C	39.3°C	39.1°C	39.2°C	39.8°C	39.0°C	---	39.1°C	39.2°C	38.7°C	38.9°C	39.0°C	39.5°C	39.2°C	40.4°C	40.7°C	40.3°C	40.6°C	41.0°C	40.9°C	Euth DPC16
27	♂	KEB G1	39.6°C	39.5°C	39.6°C	39.9°C	39.9°C	39.7°C	39.9°C	40.1°C	39.7°C	---	39.4°C	39.8°C	40.4°C	40.3°C	40.3°C	40.9°C	41.3°C	41.9°C	41.9°C	40.6°C	40.7°C	---	---	Euth DPC15
28	♂	AAA G1	39.7°C	39.6°C	39.0°C	39.4°C	39.4°C	39.7°C	39.6°C	40.1°C	40.4°C	40.5°C	41.3°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Found de-odDPC9
29	♂	FFB G2	39.3°C	39.4°C	39.3°C	39.7°C	39.3°C	39.6°C	39.7°C	39.3°C	39.2°C	---	39.4°C	39.5°C	39.2°C	39.5°C	39.6°C	39.7°C	40.3°C	40.3°C	41.0°C	41.1°C	---	---	Found de-odDPC15	
30	♂	954 G2	39.1°C	38.8°C	39.4°C	40.0°C	39.2°C	38.4°C	39.4°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Found de-odDPC7	
31	♂	A03 G2	39.6°C	39.2°C	39.5°C	39.3°C	39.2°C	39.6°C	39.5°C	39.2°C	38.9°C	---	38.8°C	39.4°C	38.2°C	38.7°C	39.5°C	39.1°C	39.4°C	38.5°C	38.7°C	38.7°C	39.0°C	---	Euth DPC15	
32	♂	E45 G3	40.3°C	40.0°C	39.4°C	39.8°C	40.1°C	40.1°C	41.0°C	40.9°C	41.0°C	40.8°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Found de-odDPC9	
33	♂	484 G3	40.3°C	40.1°C	40.2°C	39.9°C	40.0°C	40.0°C	40.3°C	39.4°C	40.2°C	---	40.1°C	40.6°C	40.0°C	40.1°C	40.3°C	40.3°C	40.3°C	40.4°C	---	---	---	---	Found de-odDPC12	
34	♂	3F0 G3	40.1°C	39.4°C	39.0°C	39.2°C	39.7°C	39.2°C	39.4°C	39.1°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC16	
35	♂	865 G4	39.6°C	39.1°C	39.0°C	39.5°C	39.1°C	39.5°C	39.5°C	39.5°C	38.9°C	---	38.4°C	39.5°C	38.8°C	39.4°C	39.0°C	39.4°C	39.9°C	40.3°C	40.0°C	40.6°C	40.4°C	---	Euth DPC15	
36	♂	0D3 G4	39.3°C	39.9°C	39.2°C	39.6°C	40.1°C	38.4°C	39.5°C	39.7°C	39.7°C	---	40.3°C	39.6°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC9	
37	♂	4FC G4	39.3°C	39.4°C	39.3°C	39.8°C	39.5°C	39.6°C	39.6°C	39.9°C	40.1°C	---	40.9°C	40.9°C	40.6°C	40.9°C	40.9°C	41.0°C	40.7°C	40.3°C	---	---	---	---	Euth DPC12	
38	♂	13D PBS	39.3°C	39.2°C	39.3°C	39.6°C	39.3°C	39.3°C	39.0°C	39.4°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Found de-odDPC14	
39	♂	50F PBS	38.9°C	39.4°C	38.4°C	39.1°C	39.9°C	39.7°C	40.1°C	39.3°C	40.0°C	39.5°C	---	39.1°C	40.2°C	40.4°C	40.1°C	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC10	
40	♂	560 PBS	39.0°C	39.0°C	39.0°C	39.1°C	39.2°C	38.9°C	39.0°C	39.2°C	38.8°C	---	39.1°C	38.9°C	39.1°C	38.9°C	38.8°C	39.0°C	38.8°C	39.1°C	38.8°C	38.9°C	39.1°C	39.0°C	Euth DPC16	
126	♂	A15 G1	39.1°C	29.0°C	39.5°C	39.2°C	39.1°C	39.1°C	39.1°C	29.5°C	39.3°C	---	29.2°C	39.2°C	39.1°C	39.4°C	40.1°C	40.5°C	39.5°C	40.4°C	40.3°C	40.9°C	40.3°C	---	Euth DPC15	
127	♂	28F G1	39.2°C	38.8°C	39.0°C	39.0°C	39.1°C	39.0°C	39.2°C	39.3°C	38.8°C	---	38.5°C	39.3°C	40.3°C	39.6°C	39.6°C	40.1°C	40.3°C	40.3°C	39.9°C	---	---	---	Euth DPC12	
128	♂	0T5 G1	40.0°C	39.8°C	39.9°C	39.8°C	40.0°C	40.9°C	40.6°C	40.2°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Found de-odDPC7	
129	♂	3DF G2	40.2°C	39.7°C	39.8°C	39.4°C	39.4°C	39.3°C	39.7°C	39.4°C	39.3°C	---	39.1°C	39.3°C	39.8°C	40.1°C	39.9°C	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC14	
130	♂	E2A G2	39.9°C	39.4°C	39.4°C	39.4°C	40.3°C	40.3°C	40.7°C	39.5°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC7	
131	♂	361 G2	40.9°C	39.8°C	39.6°C	39.8°C	39.9°C	39.8°C	39.6°C	39.0°C	39.6°C	---	39.7°C	39.3°C	39.8°C	39.7°C	39.4°C	39.9°C	39.9°C	39.5°C	41.0°C	40.6°C	---	---	Euth DPC14	
132	♂	B7F G3	40.2°C	39.8°C	40.0°C	39.8°C	39.3°C	39.7°C	40.1°C	40.9°C	40.7°C	40.9°C	40.7°C	40.9°C	40.7°C	40.9°C	---	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC10	
133	♂	0FB G3	39.8°C	39.9°C	39.5°C	39.5°C	40.0°C	40.1°C	39.2°C	39.5°C	39.6°C	---	39.5°C	39.6°C	40.3°C	41.0°C	40.3°C	41.0°C	40.6°C	40.4°C	41.0°C	40.6°C	---	---	Euth DPC14	
134	♂	F5A G3	39.5°C	39.4°C	39.2°C	39.7°C	39.4°C	39.4°C	39.6°C	39.3°C	39.4°C	---	39.9°C	39.3°C	39.5°C	39.3°C	39.2°C	40.3°C	39.8°C	39.7°C	40.5°C	40.9°C	40.9°C	40.5°C	Euth DPC15	
135	♂	DA2 G4	29.4°C	29.1°C	29.3°C	29.3°C	40.2°C	38.9°C	39.7°C	40.0°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC1	
136	♂	A79 G4	39.2°C	39.9°C	38.9°C	39.9°C	39.9°C	38.9°C	39.0°C	39.0°C	39.1°C	---	38.4°C	39.1°C	39.5°C	39.4°C	39.2°C	39.6°C	40.1°C	39.1°C	---	---	---	---	Found de-odDPC12	
137	♂	026 G4	39.8°C	29.7°C	39.4°C	39.5°C	29.7°C	39.7°C	39.6°C	29.4°C	39.6°C	---	29.5°C	39.5°C	39.4°C	39.4°C	40.4°C	40.7°C	40.5°C	29.9°C	40.5°C	40.9°C	40.7°C	40.9°C	Euth DPC16	
138	♂	B44 PBS	40.1°C	39.7°C	39.5°C	39.5°C	39.4°C	39.5°C	39.1°C	39.8°C	38.9°C	---	39.3°C	39.6°C	39.4°C	40.6°C	40.1°C	39.2°C	40.9°C	---	---	---	---	---	Euth DPC12	
139	♂	00D PBS	40.3°C	39.4°C	39.3°C	39.2°C	40.1°C	40.5°C	40.5°C	40.5°C	40.7°C	41.0°C	39.8°C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Euth DPC9	
140	♂	39A PBS	39.3°C	39.3°C	39.4°C	39.0°C	39.4°C	39.3°C	39.2°C	39.4°C	39.1°C	---	39.2°C	40.5°C	39.6°C	39.7°C	40.7°C	40.5°C	41.1°C	40.6°C	41.1°C	---	---	---	Euth DPC12	

그림 6. 1차 방어능시험 개체별 체온(빨간 box는 근육공격접종 개체를 의미함)

c) 결과 - viremia

- 근육공격접종받은 모든 개체는 7DPC에 20 내외의 매우 낮은 Ct value가 나타남
- 접촉감염 개체들도 모두 시험 종료일(12~16DPC)에 25.31에서 18.52사이의 매우 낮은 Ct value가 나타나 모든 개체가 ASFV에 감염되어 체내에서 바이러스 복제가 일어난 것이 확인됨

2022-07-11 Shi 22-41 BioApp#3 ASF RT-PCR													
Tag#	Group	DPC0		DPC7		DPC14		Early Euthanasia	Pig	Group	Ct	Quantity	
		Ct	Quantity	Ct	Quantity	Ct	Quantity						
26	G1	Undetermined		Undetermined		24.13	203,495.19	DPC16	26.00	G1	19.00	7,759,019.50	Euthanized DPC16
27	G1	Undetermined		Undetermined		22.44	626,871.75	DPC15	27.00	G1	20.89	2,138,830.25	Euthanized DPC15
28	G1	Undetermined		17.96	12,564,508.00			DPC8	28.00	G1	23.66	277,376.44	Found Dead DPC9
126	G1	Undetermined		Undetermined		20.23	3,354,727.50	DPC15	126.00	G1	21.13	1,816,113.63	Euthanized DPC15
127	G1	Undetermined		Undetermined				DPC13	127.00	G1	20.91	1,753,525.63	Euthanized DPC13
128	G1	Undetermined		17.00	23,900,278.00								Found Dead DPC7
29	G2	Undetermined		Undetermined		19.86	3,529,496.25	DPC15	29.00	G2	23.16	454,756.16	Euthanized DPC15
30	G2	Undetermined		21.99	849,347.00								Found Dead DPC7
31	G2	Undetermined		Undetermined		21.82	952,824.44	DPC15	31.00	G2	19.68	4,866,800.50	Euthanized DPC15
129	G2	Undetermined		Undetermined		19.54	5,351,880.00						Euthanized DPC14AM
130	G2	Undetermined		19.76	3,786,696.25								Euthanized DPC7
131	G2	Undetermined		Undetermined		18.66	9,774,952.00						Euthanized DPC14
32	G3	Undetermined		18.73	7,514,674.50			DPC8	32.00	G3	23.77	258,928.80	Found Dead DPC9
33	G3	Undetermined		Undetermined				DPC13	33.00	G3	19.70	3,927,355.75	Found Dead DPC13
34	G3	Undetermined		Undetermined		20.07	3,077,488.50	DPC16	34.00	G3	23.19	444,203.59	Euthanized DPC16
132	G3	Undetermined		20.97	1,678,621.63			DPC10	132.00	G3	23.22	374,031.31	Euthanized DPC10
133	G3	Undetermined		35.66	90.51	19.07	7,380,298.50						Euthanized DPC14AM
134	G3	Undetermined		Undetermined		20.33	3,127,921.25	DPC15	134.00	G3	22.37	776,643.94	Euthanized DPC15
35	G4	Undetermined		Undetermined		19.99	3,247,817.75	DPC15	35.00	G4	19.56	5,286,356.50	Euthanized DPC15
36	G4	Undetermined		19.90	3,434,348.75			DPC8	36.00	G4	23.68	274,740.34	Euthanized DPC9
37	G4	Undetermined		Undetermined				DPC13	37.00	G4	20.14	2,923,164.25	Euthanized DPC13
135	G4	Undetermined		20.17	2,863,952.50			DPC8	135.00	G4	22.85	476,358.38	Euthanized DPC8
136	G4	Undetermined		Undetermined				DPC13	136.00	G4	24.60	147,827.11	Found Dead DPC13
137	G4	Undetermined		Undetermined		19.38	5,987,333.00	DPC16	137.00	G4	18.52	10,775,031.00	Euthanized DPC16
38	PBS	Undetermined		Undetermined		22.15	764,142.44	DPC16	38.00	PBS	25.31	104,889.98	Euthanized DPC16
39	PBS	Undetermined		19.77	3,760,126.75			DPC10	39.00	PBS	24.28	183,686.97	Euthanized DPC10
40	PBS	Undetermined		Undetermined		30.23	3,659.74	DPC16	40.00	PBS	22.46	734,232.44	Euthanized DPC16
138	PBS	Undetermined		Undetermined				DPC12	138.00	PBS	19.97	3,270,997.00	Euthanized DPC12
139	PBS	Undetermined		21.00	1,647,815.13			DPC8	139.00	PBS	21.37	1,282,443.13	Euthanized DPC9
140	PBS	Undetermined		Undetermined				DPC13	140.00	PBS	18.79	7,204,012.00	Euthanized DPC13

* pigs challenged with 10HAD₅₀

그림 7. 1차 방어능시험 개체별 viremia(0, 7, 14, 21 DPC)

d) 결과 - 면역반응

- 곤충세포에서 발현시킨 P30 재조합 단백질을 이용해서 0 DPC 혈청 내 p30 항체를 ELISA를 통해 확인한 결과 p30 항원이 포함된 G1의 모든 개체에서 p30항원에 대한 항체가 확인됨

Group	Pig#	p30-Shi		Results
		Test 1 (OD value)	Test 2 (OD value)	
G1	26	2.87	2.81	+
	27	2.38	2.34	+
	28	1.98	2.08	+
	126	1.89	1.81	+
	127	2.32	2.28	+
	128	2.41	2.26	+
G2	29	0.41	0.40	-
	30	0.50	0.54	-
	31	0.26	0.26	-
	129	0.46	0.44	-
	130	0.42	0.44	-
	131	0.33	0.33	-
Negative Control		0.29	0.29	

그림 8. 1차 방어능시험 0 DPC 혈청의 p30 항체 ELISA

- 세포성 면역반응을 확인하기 위해 0, 14 DPC 혈액에서 PBMC를 분리하여 ASFV로 18시간 재자극한 후 IFN-gamma ELISpot assay를 수행한 결과 각 0, 14 DPC에 IFN-gamma를 분비하는 세포가 있는 개체들이 확인되긴 하지만 세포의 수가 많지도 않고 증상, 체온 생존기간등의 방어와 연관관계가 관찰되지 않음.



그림 9. 1차 방어능시험 0DPC(35DPV) PBMC를 이용한 ELISpot



그림 10. 1차 방어능시험 14DPC(49DPV) PBMC를 이용한 ELISPOT

② 2차 공격접종 실험

a) 실험방법

- 시험군은 아래 표와 같이 구성함

표 4. 2차 공격접종실험 시험백신 항원 조성

G1	pB602L	pF317L
G2	Lectin	CD2v
G3	p72	p54
G4	pI177L	pMGF505-5R
G5	p17	p22
PBS	-	-

- 백신은 위의 표대로 항원 각 50ug, 2개 항원을 w/o/w 어쥬번트로 emulsion 제조
- 4주령 female 돼지 30마리 중 5그룹은 4마리씩, PBS 투여그룹은 10마리로 구성, 3주간격 2회 백신 접종(근육)
- 2차 백신접종 2주 후 시험 돼지를 ABL-3시설로 이동시킨 후 백신투여군 5개군은 각 2마리, PBS투여군은 5마리 총 15마리씩 두 개 방으로 나눠서 사육함. 각 방별 PBS돼지 중3마리씩에 베트남 분리 ASFV 10 HAD50을 근육주사하고 ASFV를 공격접종받지 않은 12마리씩에 접촉을 통한 감염이 되도록 유도. 총 3주간 관찰하며 체온을 측정(microchip을 이용한 RFID방식)하고 매주 채혈하여 RT-PCR을 통한 viremia를 측정.

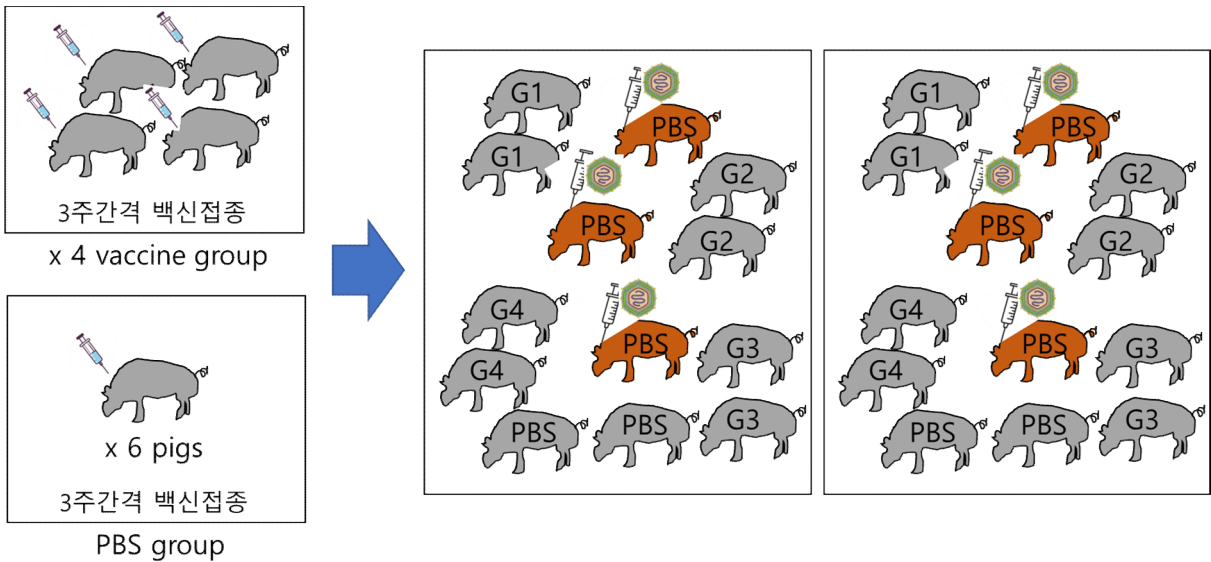


그림 11. 2차 방어능실험 모식도

b) 결과 - 생존률 및 체온

- 공격접종 받은 6마리는 9 DPC에 2마리 폐사를 시작으로 10, 12(2마리), 16 DPC에 폐사함. 접촉감염 돼지들은 다양한 시간에 폐사하거나 일부 시험종료까지 생존한 개체들이 있음. 구체적으로 G1에서 2마리, G2 1마리, PBS그룹 2마리임.

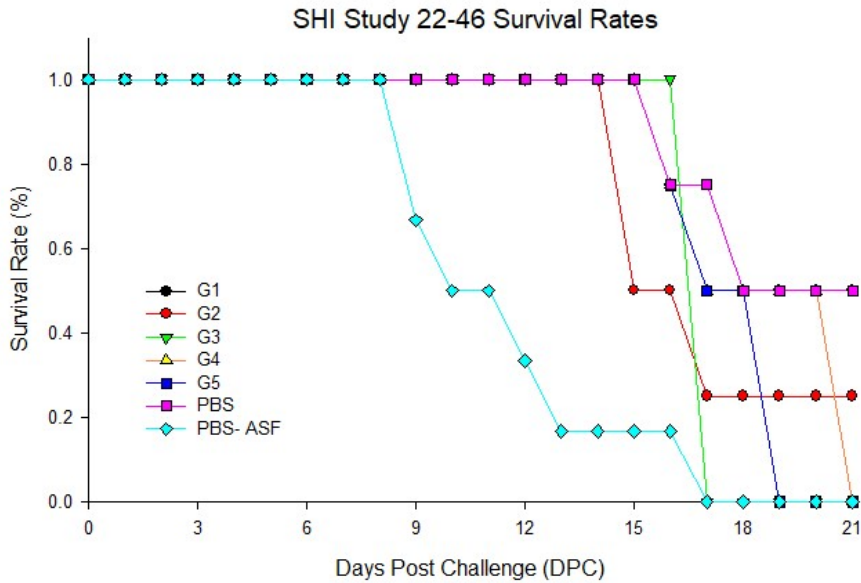


그림 12. 2차 방어능시험 그룹별 생존율

- 접촉감염 유도한 전 개체에서 고열이 관찰됨. 종료시까지 생존한 개체들 중 G1 2개체는 40.5도 이하로 측정되었으나 viremia결과와 종합적인 판단이 필요함

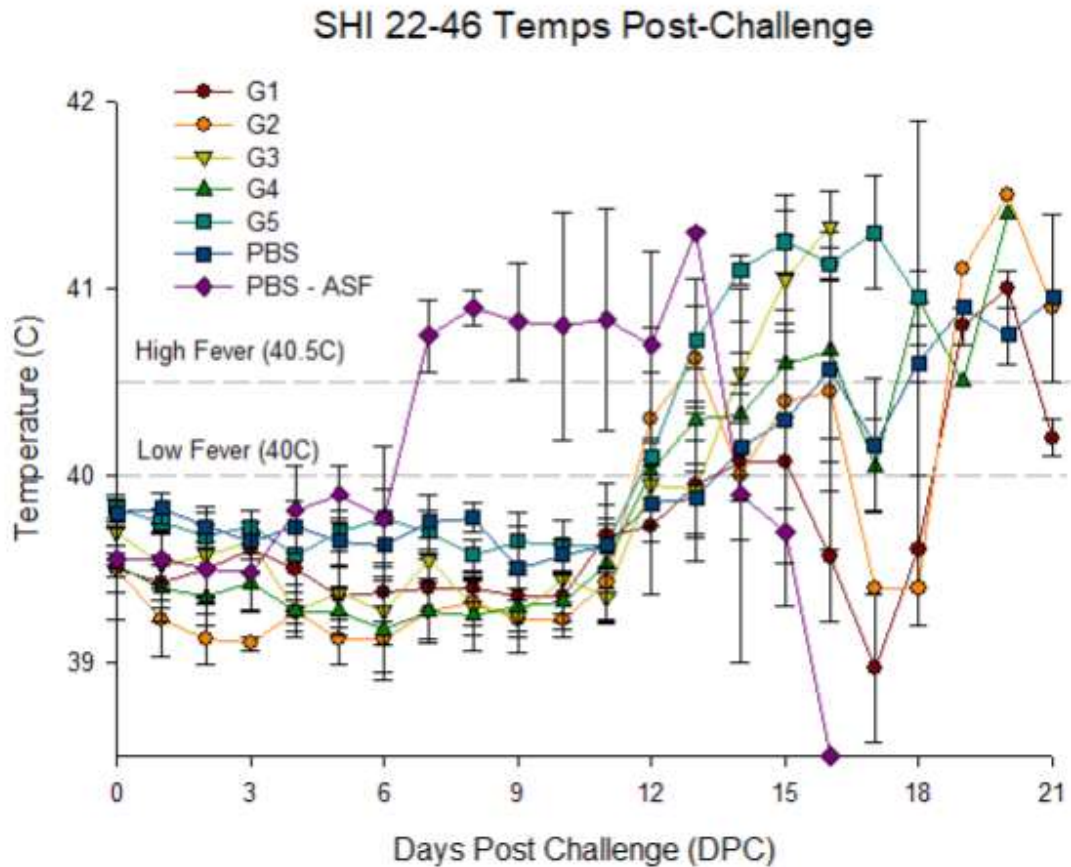


그림 13. 2차 방어능시험 그룹별 평균 체온

c) 결과 - viremia

- 근육공격접종받은 개체는 한 마리를 제외하면 모두 7 DPC에서부터 viremia가 관찰되고 폐사까지 높은 viremia가 유지됨. 한 마리(156)는 7 DPC 전후에 고열이 관찰되었으나 폐사하지 않고 16 DPC까지 생존하였고 Ct value도 35이상으로 높은 것으로 확인됨. 추후 원인파악이 필요함
- 접촉감염시킨 개체 중 최종 생존한 개체 중 G1은 두 마리 모두 높은 viremia가 확인됨. 또한 PBS 1개체(181)를 제외하면 모두 낮은 Ct value로 확인되어 2차 방어능 시험의 시험 백신의 효능은 확인하기 어려움
- 면역반응 여부는 현재 시험중임

Tag#	Group	DPC0		DPC7		DPC14		DPC21		Early Euthanasia	Pig	Group	Cr	Quantity	Note
		Cr	Quantity	Cr	Quantity	Cr	Quantity	Cr	Quantity						
151	G1	Undetermined		Undetermined		Undetermined		23.99	198,298.61						
152	G2	Undetermined		Undetermined		24.68	159,245.75			DPC16	152	G2	25.00	95,855.38	
153	G3	Undetermined		Undetermined		25.89	67,045.82			DPC15	153	G3	24.26	163,218.42	
154	G4	Undetermined		Undetermined		39.77	2.56			DPC20	154	G4	32.40	490.88	FD
155	G5	Undetermined		Undetermined		33.59	209.50			DPC18	155	G5	24.54	133,156.53	
156	PBS	Undetermined		40.67	1.69	37.18	16.16			DPC16	156	PBS	35.78	44.03	
157	PBS	Undetermined		20.04	4,395,958.00					DPC8	157	PBS	23.70	321,268.97	
158	PBS	Undetermined		23.99	259,958.23					DPC9	158	PBS	25.89	66,709.15	
160	G1	Undetermined		Undetermined		Undetermined		22.26	677,649.38						
161	G2	Undetermined		Undetermined		26.01	46,812.03			Found Dead DPC15, no sample					
162	G3	Undetermined		Undetermined		35.52	52.81			DPC16	162	G3	30.98	1,350.43	
163	G4	Undetermined		Undetermined		24.45	142,193.66			DPC16	163	G4	24.51	135,979.52	
164	G5	Undetermined		Undetermined		27.28	18,910.86			DPC18	164	G5	26.87	25,354.73	
165	PBS	Undetermined		Undetermined		29.98	2,751.40			DPC16	165	PBS	19.86	3,763,837.75	
166	PBS	Undetermined		Undetermined		Undetermined		25.72	57,586.10						
167	G1	Undetermined		Undetermined		34.69	95.47			DPC16	167	G1	24.54	133,429.11	
168	G2	Undetermined		Undetermined		35.54	52.35	32.67	403.91						
169	G3	Undetermined		Undetermined		35.94	39.15			DPC16	169	G3	22.95	414,122.06	
170	G4	Undetermined		Undetermined		Undetermined				DPC20	170	G4	27.91	12,096.66	
171	G5	Undetermined		Undetermined		29.47	3,978.55			DPC16	171	G5	21.25	1,395,486.88	
172	PBS	Undetermined		20.81	2,549,015.75					DPC8	172	PBS	23.76	306,788.97	
173	PBS	Undetermined		32.83	465.43					DPC12	173	PBS	26.56	41,353.17	
174	PBS	Undetermined		22.25	906,527.06					DPC11	174	PBS	26.98	30,539.10	
175	G1	Undetermined		Undetermined		25.56	64,650.96			DPC15	175	G1	26.26	39,245.93	
176	G2	Undetermined		Undetermined		24.12	180,786.02			Euthanized DPC14					
177	G3	Undetermined		Undetermined		27.33	18,287.31			DPC16	177	G3	25.41	72,023.02	
178	G4	Undetermined		Undetermined		24.62	126,018.98			DPC15	178	G4	25.65	60,526.99	
179	G5	Undetermined		Undetermined		23.62	257,116.72			DPC15	179	G5	23.98	198,555.63	
180	PBS	Undetermined		Undetermined		24.83	108,879.20			DPC15	180	PBS	21.68	1,027,067.44	
181	PBS	Undetermined		Undetermined		36.15	33.86	40.88	1.16						

그림 14. 2차 방어능시험 개체별 viremia(0, 7, 14, 21 DPC)

d) 결과 - 면역반응

- 세포성 면역반응을 확인하기 위해 0 DPC 혈액에서 PBMC를 분리하여 ASFV로 18 시간 재자극한 후 IFN-gamma ELISpot assay를 수행한 결과 IFN-gamma를 분비하는 세포가 있는 개체들이 확인되긴 하지만 세포의 수가 많지도 않고 증상, 체온 생존기간등의 방어와 연관관계가 관찰되지 않음.

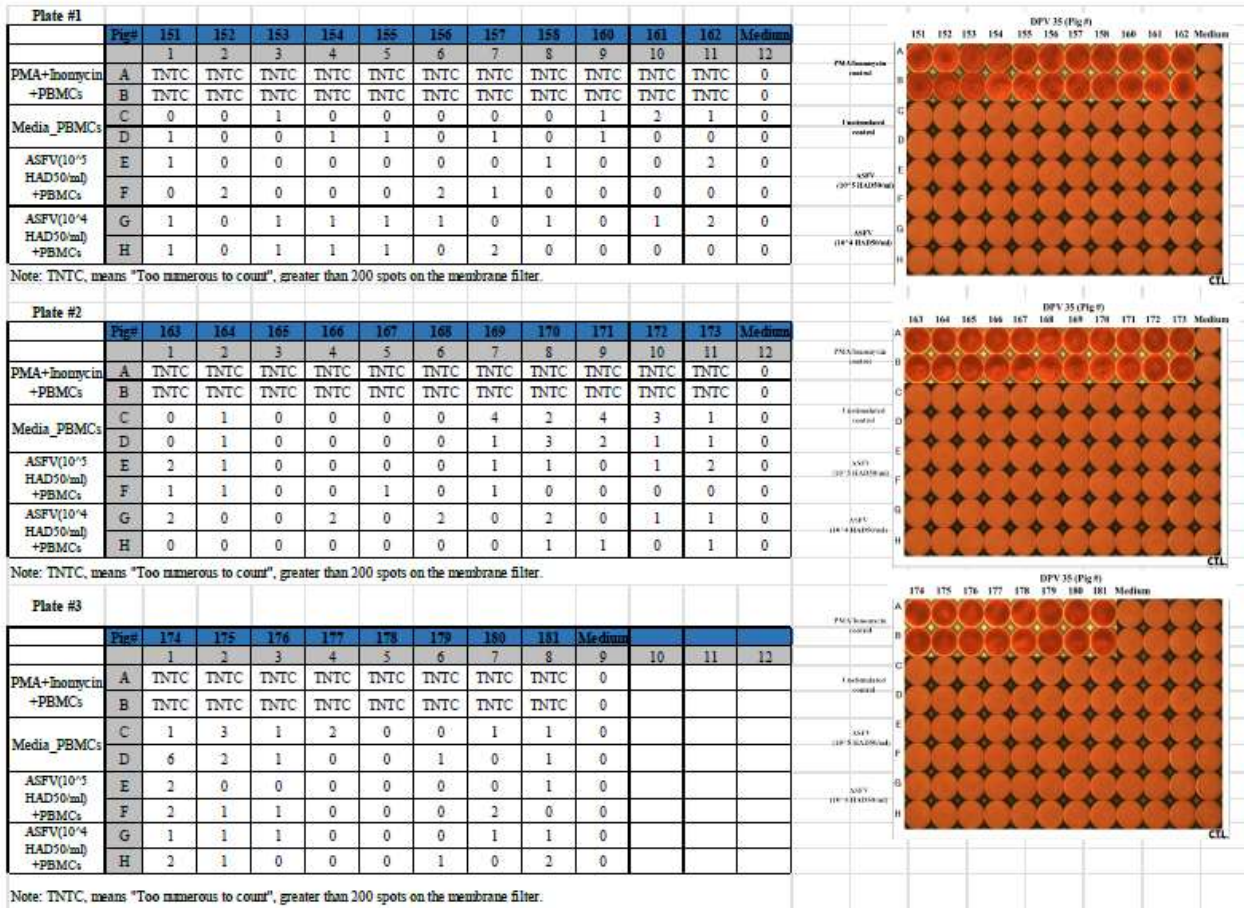


그림 15. 2차 방어능시험 0DPC(35DPV) PBMC를 이용한 ELISpot

나. 항원 신속진단 키트 개발(성능 검사)

a) 배경

- ASF는 질병의 급속한 확산을 막기 위해 빠른 진단이 필요함. 현재 표준 검사법은 RT-PCR을 통한 ASF 바이러스의 유전자를 검출하는 방법이지만, 샘플을 분석기관으로 이동시키고 분석하는데 하루 가까운 시간이 소요됨. 이를 해결하기 위해 주관기관인 바이오앱은 15분만에 결과를 얻을 수 있는 신속진단 키트를 개발을 진행한 바 있음.

b) 실험방법

- 2차 방어능시험의 공격접종 이후 날짜별, 시험돈별 혈청 샘플을 신속진단키트 시제품으로 평가. 시판되는 신속키트와 동일하게 2줄이면 양성, 1줄이면 음성으로 판단.

c) 결과

- 양성을 양성으로 판단하는 민감도, 음성을 음성으로 판단하는 특이도, 종합한 정확도를 아래 표 5에 나타냄.

표 5. ASFV 항원 신속진단키트 성능 검사 결과

	민감도	특이도	정확도
p30	24/46	36/37	60/83
p72	40/46	16/37	56/83

(혈청별 양/음성 기준은 Ct-value 35)

다. 항원 생산공정 최적화

① Lectin

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.2, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 100 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1.5 M Tris-Cl pH 8.8

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 항원 생산 최적화 조건 확립

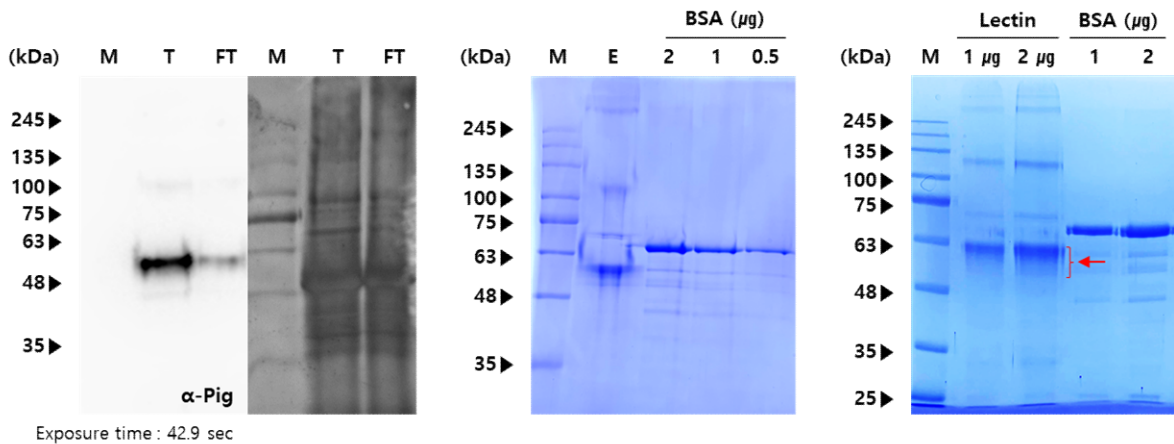


그림 16. Lectin 분리정제 결과

② CD2vN

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 300 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1 M Tris

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 항원 생산 최적화 조건 확립

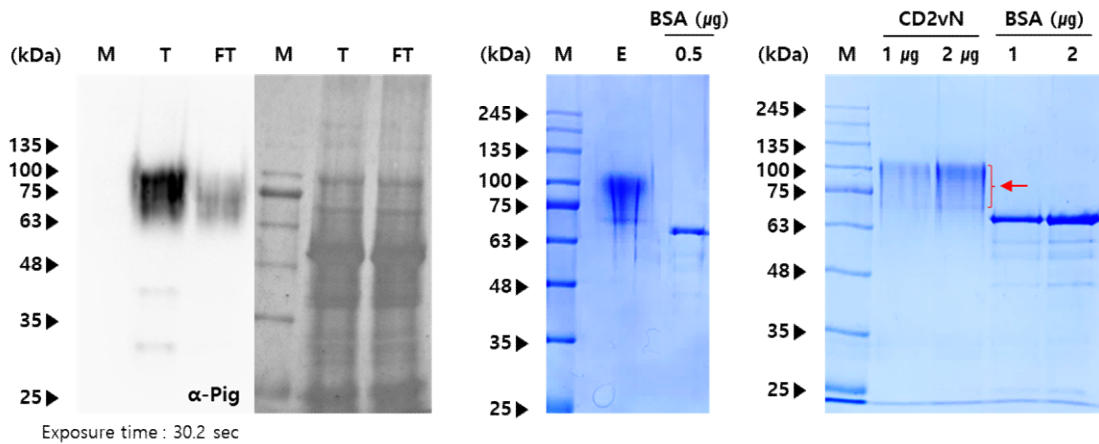


그림 17. CD2vN 분리정제 결과

③ p72

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 154 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1.5 M Tris-Cl pH 8.8

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 항원 생산 최적화 조건 확립

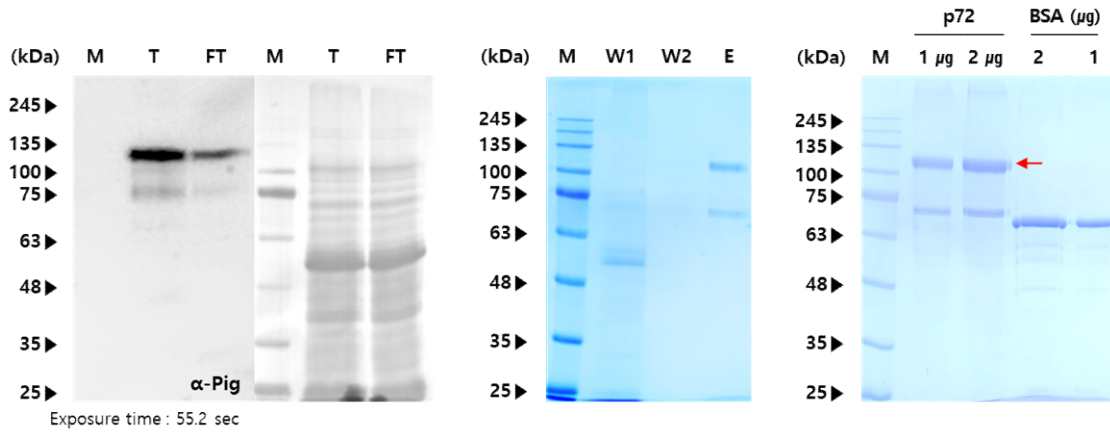


그림 18. p72 분리정제 결과

④ p54

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 154 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1 M Tris

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

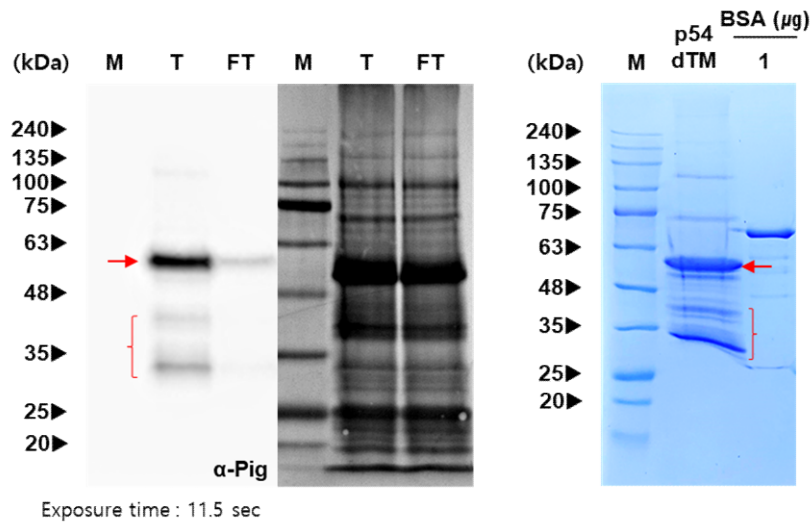


그림 19. p54 분리정제 결과

⑤ p54

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Ni-IDA
- 추출버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 10 mM Ascorbic acid, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 300 mM NaCl, 10~100 mM Imidazole, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole
- 최종버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 300 mM NaCl, 50 mM KCl

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착돼 있는 목적 항원 해리
- TFF사용하여 최종버퍼로 버퍼교환 진행
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

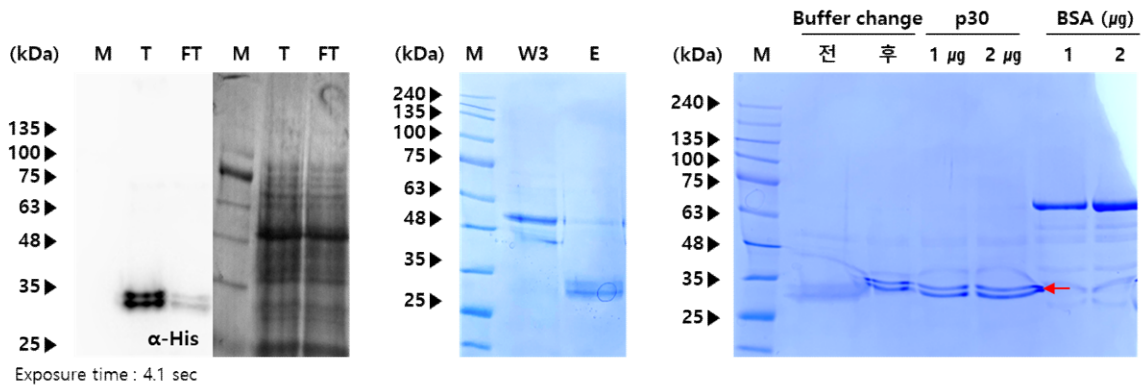


그림 20. p30 분리정제 결과

⑥ p15

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.2, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.2, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 100 mM NaCl
- 중화버퍼 : 0.5 M NaOH

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

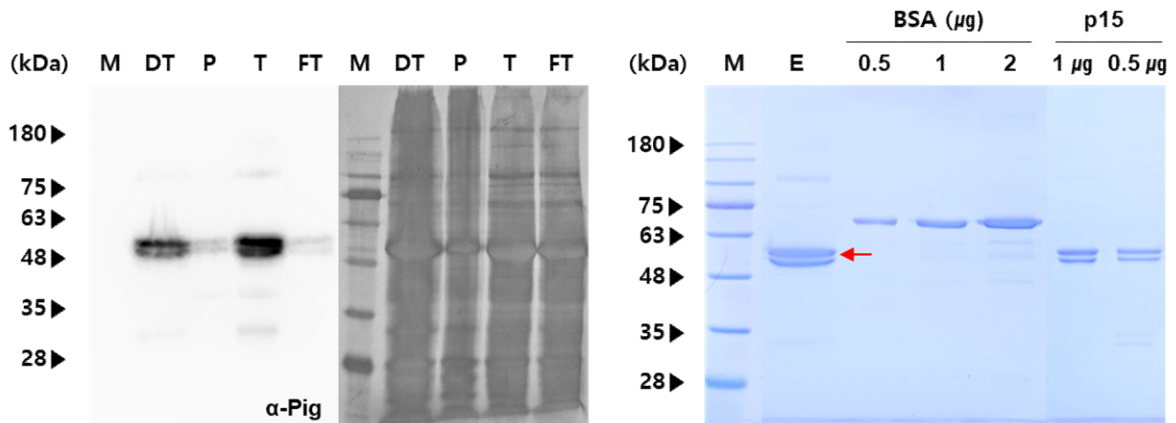


그림 21. p15 분리정제 결과

⑦ p35

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.2, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.2, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 100 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1 M Tris

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

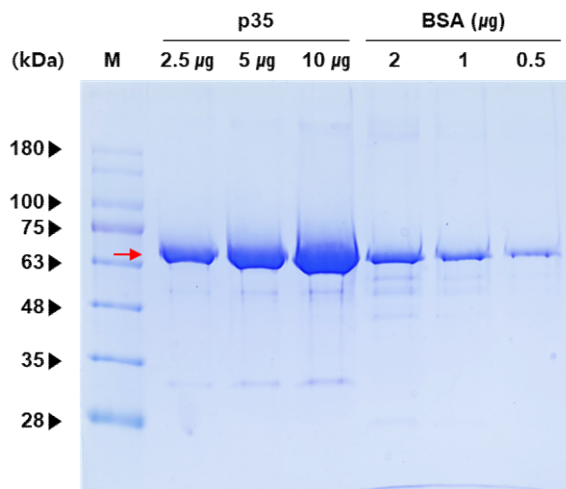


그림 22. p35 분리정제 결과

⑧ pB602L

a) 재료 및 버퍼 조성

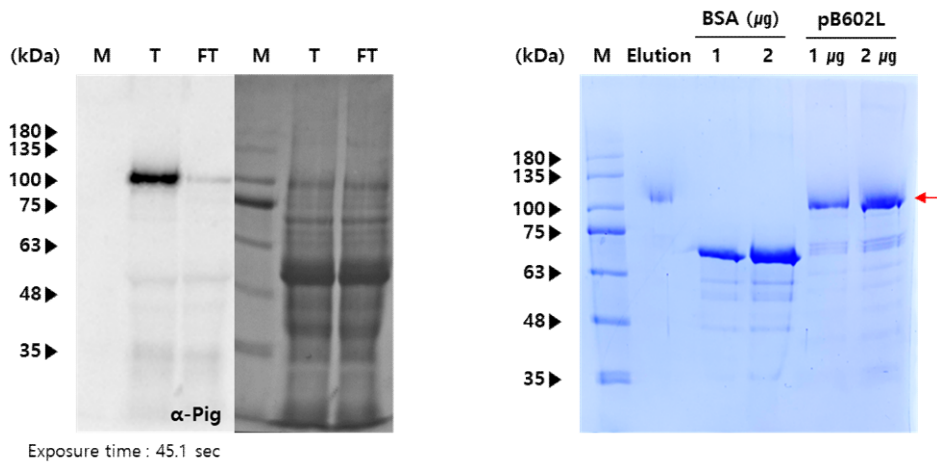
- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 154 mM NaCl
- 중화버퍼 : 5 M NaOH

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능



Exposure time : 45.1 sec

그림 23. pB602L 분리정제 결과

⑨ p17

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 300 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1.5 M Tris-Cl pH 8.8

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Centricon 사용하여 농축 (NaCl 농도 및 Tween 20 첨가)
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

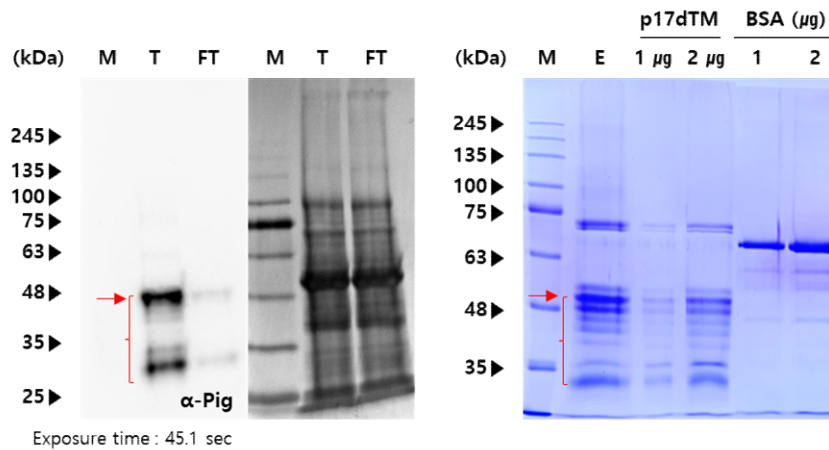


그림 24. p17 분리정제 결과

⑩ p22

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 300 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1.5 M Tris-Cl pH 8.8

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Centricon 사용하여 농축 (NaCl 농도 및 Tween 20 첨가)
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

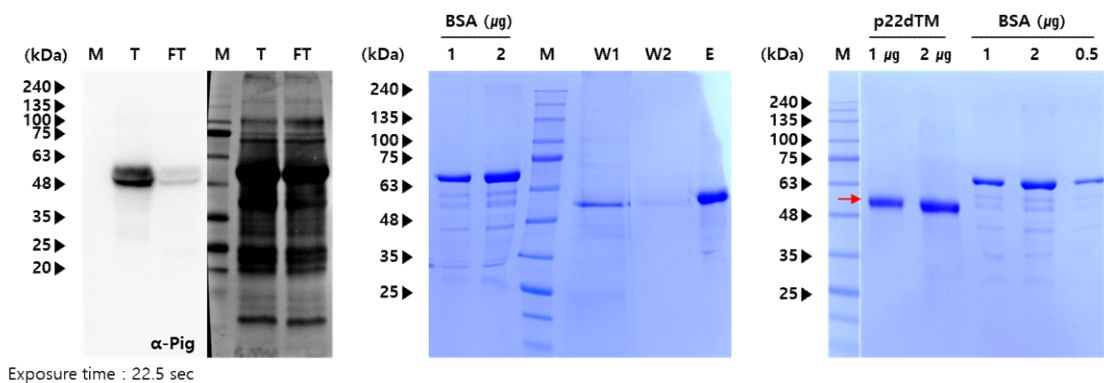


그림 25. p22 분리정제 결과

⑪ pE199L

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.2, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.2, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 154 mM NaCl
- 중화버퍼 : 0.2 M NaOH

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Centricon 사용하여 농축 (NaCl 농도 및 Tween 20 첨가)
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

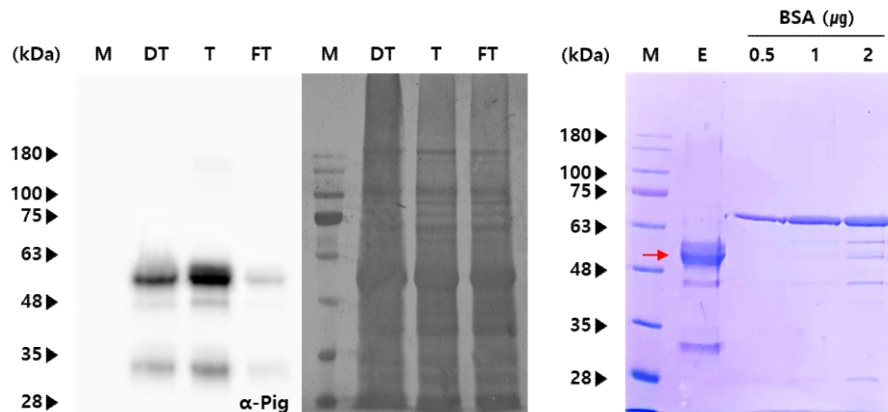


그림 26. pE199L 분리정제 결과

⑫ pF317L

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 100 mM Tris-Cl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 154 mM NaCl

- 중화버퍼 : 0.5 M NaOH
- 최종버퍼 : 1x PBS

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- TFF 사용하여 버퍼 교환 및 농축 (Tween 20 첨가)
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- TFF 공정에서 약간의 loss 및 aggregation이 발생하여 Tween 20 첨가 테스트 진행 했으나 큰 차이 없으므로 Tween 20 미첨가 조건으로 결정
- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

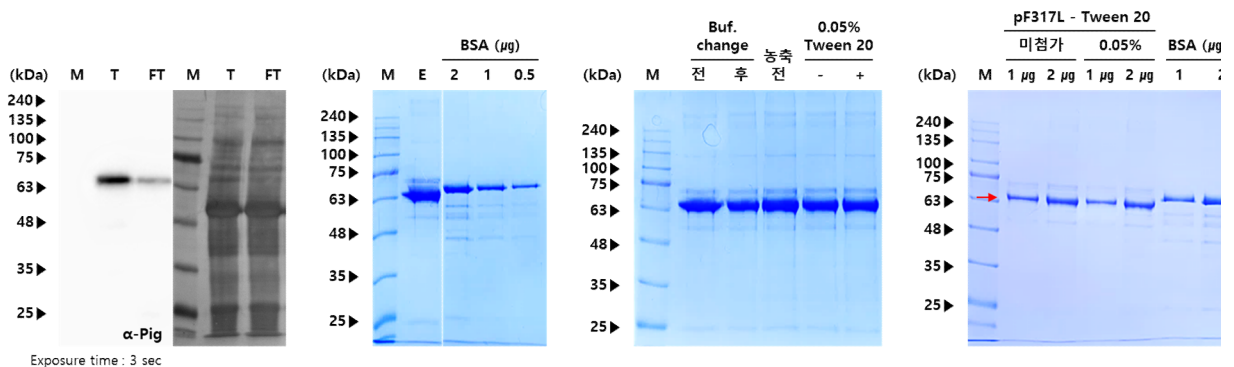


그림 27. pF317L 분리정제 결과

⑬ pMGF505-5R

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 300 mM NaCl
- 중화버퍼 : 1.5 M Tris-Cl pH 8.8

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화

- Centricon 사용하여 농축 (NaCl 농도 및 Tween 20 첨가)
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 농축 조건 test를 통해 0.05% Tween 20을 첨가하면 loss율이 감소 되는 것을 확인
- 농축 공정 loss율 개선 : 약 85% → 약 31.9%
- 농축 공정 적용하여, 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

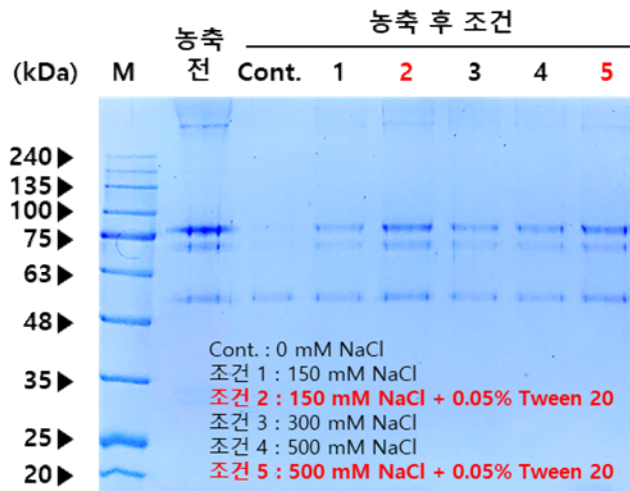


그림 28. pMGF505-5R 농축 조건 test

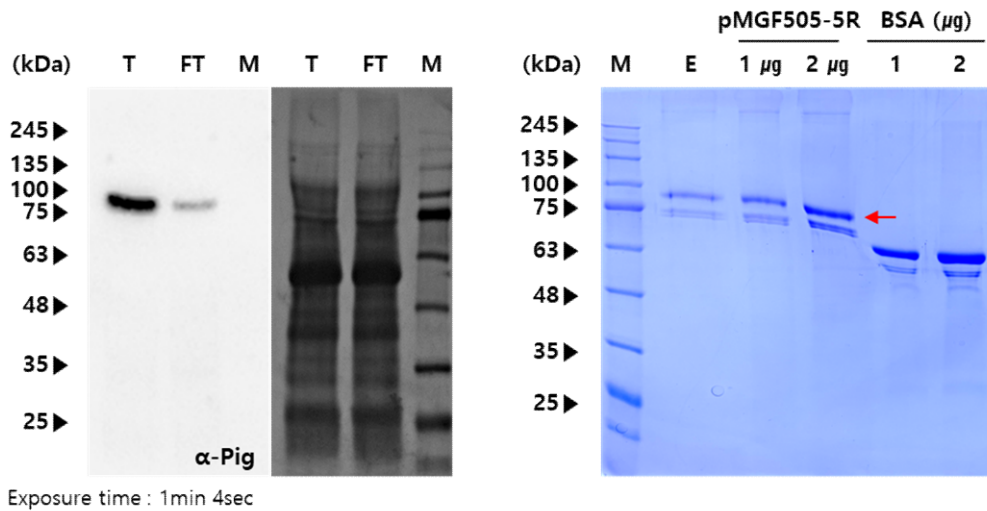


그림 29. pMGF505-5R 분리정제 결과

⑭ p1177L

a) 재료 및 버퍼 조성

- 식물 : *N.benthamiana* TE
- 레진 : Protein A
- 추출버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.2, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Sodiumsulfite, 1.5% PVPP
- 세척버퍼 : 50 mM Tris-Cl pH 7.2, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
- 해리버퍼 : 50 mM Sodium citrate pH 3.0, 300 mM NaCl

- 중화버퍼 : 5 M NaOH

b) 실험방법

- 식물과 추출버퍼를 일정 비율로 섞어 준 다음 파쇄
- 식물 불순물 제거 후 레진에 흡착
- 레진을 세척버퍼로 세척
- 해리버퍼로 레진에 흡착 돼 있는 목적 항원 해리
- 중화 버퍼로 중화
- Western blot 및 SDS-PAGE를 통해 결과 확인

c) 결과

- 해당 조건에서 목적 항원 생산 가능

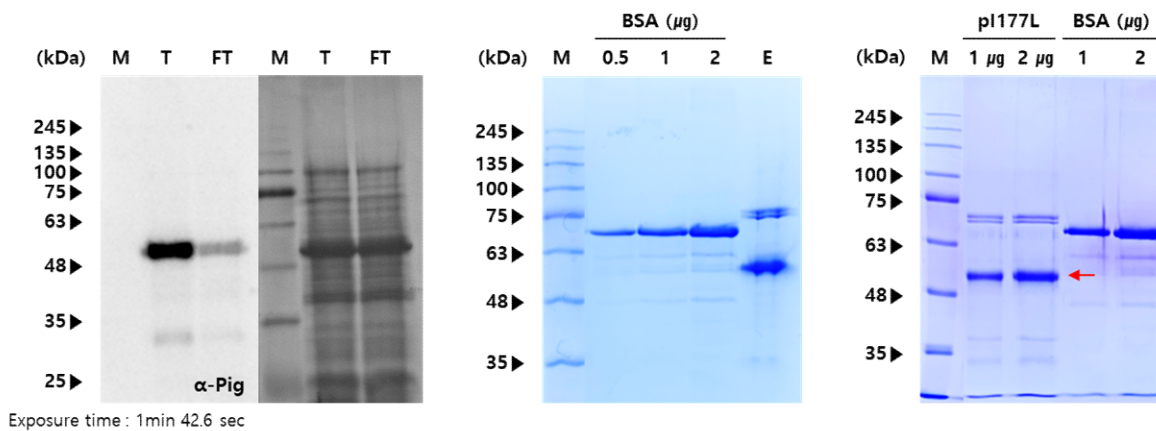


그림 30. p177L 분리정제 결과

○ 위탁연구기관

가. 아프리카돼지열병바이러스 돼지 혈청의 확보

- 7주령 돼지 (PRRS 및 PCV 음성 확인)에 시험백신 접종 95개 돼지혈청
- 아프리카돼지열병 바이러스(시험백신)을 102 TCID50/pig을 근육 접종한 다음 4주 후에 국내 분리주인 파주주 102 HAD50를 근육 접종
- 시험백신 접종 후 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21일째 채혈하였으며, 파주주로 공격접종한 다음 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21일에 채혈

나. ASF 혈청학적 분석기법 확립 및 비교 평가

① 항체검사 ELISA

a) 재료 및 시약

- 사용키트 : INGEZIM PPA COMPAC (11.PPA.K3, Ingenasa, Spain)
- ELISA type: blocking ELISA
- polystyrene plate에 VP72 major structural protein coating
- mab conjugated with peroxidase

b) 실험방법

- 키트 사용 전 실온 방치

- 각 well에 diluent 50 μ l 분주
- 37°C 1hr 또는 18~25°C overnight
- NaOH가 든 통에 plate 내용물을 버림
- 4회 washing
- conjugate 100 μ l씩 분주, 37°C에서 30분 반응
- 내용물 제거후 5회 washing
- substrate(TMB) 100 μ l씩 분주, 실온에 15분 반응
- stop solution 100 μ l씩 분주
- 450nm reading

d) 결과판정

- negative control OD가 positive control OD의 4배 이상 : 즉 NC/PC ≥ 4
- positive cut off = NC-[(NC-PC)x0.5]
- negative cut off = NC-[(NC-PC)x0.4]
- PI=(NC-sample OD/NC-PC)*100
- 샘플 OD가 positive cut off보다 낮으면 양성, negative cut off보다 높으면 음성

d) 결과

- 바이러스 공격접종 후 채취한 모든 돼지 혈청에서 시간 경과에 따라 바이러스 접종 후 10일째 26.43 \pm 22.81에서 접종 28일째 79.78 \pm 10.17으로 항체 역가가 증가하는 추이를 보임

표 6. ASF 바이러스 접종후 ELISA 항체가

일련 번호	혈청			ELISA 결과				
	혈청 번호	ASFV 접종후	돼지 개체 번호	1차	2차	평균	결과	그룹평균
1	017	10dpv	55	22.81	18.51	20.66	음성	26.43 \pm 22.81
2	018	10dpv	56	54.38	51.01	52.695	양성	
3	019	10dpv	57	16.95	18.38	17.665	음성	
4	020	10dpv	58	12.25	17.15	14.7	음성	53.76 \pm 21.52
5	029	14dpv	55	63.93	61.12	62.525	양성	
6	030	14dpv	56	76.45	76.5	76.475	양성	
7	031	14dpv	57	47.38	53.28	50.33	양성	78.56 \pm 11.72
8	032	14dpv	58	21.06	30.43	25.745	음성	
9	041	21dpv	55	75.22	72.3	73.76	양성	
10	042	21dpv	56	92.43	92.28	92.355	양성	79.78 \pm 10.17
11	043	21dpv	57	83.8	82.13	82.965	양성	
12	044	21dpv	58	63.92	66.39	65.155	양성	
13	053	28dpv	55	68.71	72.99	70.85	양성	79.78 \pm 10.17
14	054	28dpv	56	77.98	95.62	86.8	양성	
15	055	28dpv	57	89.83	90.58	90.205	양성	
16	056	28dpv	58	79.27	63.28	71.275	양성	

② 세포 및 PCR 이용 중화항체 검사법

a) 재료 및 세포

- 96well plate, MEM, FBS, NEAA, 0.05% tween-80, Reservoir

- 세포 : Cos-1 cell, PAM
- DNA prep kit, VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit (ThermoFisher)

b) 시험방법

- 혈청을 56°C에서 비동화 후 20% FBS + 1% A.A + 1% MEM-NEAA + 0.05% tween-80이 들어있는 RPMI1640 배지로 96 well plate에 1/8배 희석 (혈청 한 개당 두 반복으로 진행)
- $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml인 ASFV (Paju strain)를 0.01 MOI (Cos-1 cell은 0.1 MOI)로 희석해 혈청과 바이러스를 1:1로 반응
- 혈청과 바이러스를 반응시킨 96 well plate를 37°C CO₂ incubator에서 18시간 반응 (O/N)
- 혈청 개수에 맞게 PAM cell을 96 well plate에 seeding
- 18시간 후 PAM cell이 seeding 된 96 well plate를 무혈청 배지로 2회 washing
- 혈청과 바이러스 혼합액을 PAM cell에 100µl씩 접종
- 37°C CO₂ incubator에서 1시간 반응
- 무혈청 배지로 2회 washing
- 10% FBS 성장 배지에 1% pig red blood cell을 섞음
- 10% FBS 성장 배지와 1% pig red blood cell이 섞인 배지를 200µl씩 분주
- 37°C CO₂ incubator에서 3일 (72시간) incubation
- 3일 뒤, HAD 확인 후 freezing & thawing 3회 실시
- DNA prep kit (DNeasy blood & tissue kit, Qiagen)로 DNA를 추출한 후 ASFV RT-PCR 분석 kit (VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit, ThermoFisher)를 이용해 바이러스 검출 분석

c) 결과

- PAM세포를 이용하여 돼지 혈청 중 중화항체가 측정을 위해 8배 희석된 혈청과 바이러스를 반응시킨 다음 qRT-PCR을 이용하여 Ct값의 변화를 측정하여 Ct값의 증가는 혈청 중 ASFV 중화능을 갖는 항체가 존재한다는 것을 증명하고자 실험을 실시한 결과, ASFV 접종 10일째(22.02±0.48) 보다 28일째(22.86±0.71)에 Ct값의 차이가 거의 없는 것으로 판단되어 중화항체검사법으로는 적합하지 않는 검사법이라 판단됨
- PAM세포와 동일하게 COS-1세포를 이용하여 항체 존재여부를 qRT-PCR을 이용하여 Ct값의 변화를 분석한 결과 바이러스 감염 10일후 (28.22±1.59)와 28일 후 (28.31±0.391) 거의 차이가 없었으나, 바이러스 역가를 측정한 결과도 $10^{4.13}$ TCID₅₀/ml에서 $10^{3.88}$ TCID₅₀/ml로 바이러스 감염에 따른 경시적으로 증가하는 항체 형성 추이와도 결과가 일치하지 않고 상기에 언급한 ELISA 항체가의 추이와도 상관성이 없는 것으로 평가되어 정확한 ASF에 대한 항체가 측정방법으로는 적합하지 않은 검사법이라 판단됨

표 7. PAM 세포 및 PCR을 이용 중화항체 평가

혈청	qRT-PCR 결과 (Ct value)
----	--------------------------

일련 번호	혈청 번호	바이러스 접종후	돼지 개체번호	1차	2차	평균	그룹 평균
1	017	10dpv	55	22.698	22.607	22.652	
2	018	10dpv	56	21.775	21.780	21.778	22.02
3	019	10dpv	57	21.558	21.522	21.540	±0.48
4	020	10dpv	58	22.100	22.107	22.103	
5	029	14dpv	55	22.367	22.513	22.440	
6	030	14dpv	56	21.201	21.462	21.332	22.31
7	031	14dpv	57	23.593	23.394	23.494	±0.90
8	032	14dpv	58	21.930	22.049	21.990	
9	041	21dpv	55	22.268	22.417	22.342	
10	042	21dpv	56	22.494	22.375	22.434	22.02
11	043	21dpv	57	21.333	21.506	21.420	±0.47
12	044	21dpv	58	22.091	21.686	21.889	
13	053	28dpv	55	23.843	24.007	23.925	
14	054	28dpv	56	22.550	22.372	22.461	22.86
15	055	28dpv	57	22.585	22.604	22.594	±0.71
16	056	28dpv	58	22.455	22.455	22.455	

표 8. COS-1 세포 및 PCR을 이용 중화항체 평가

혈청				qRT-PCR 결과 (Ct value)		TCID ₅₀ /ml
일련 번호	혈청 번호	바이러스 접종후	돼지 개체번호	결과	그룹 평균	
1	017	10dpv	55	30.56		
2	018	10dpv	56	27.12		
3	019	10dpv	57	27.91	28.22±1.59	4.13
4	020	10dpv	58	27.32		
5	029	14dpv	55	27.56		
6	030	14dpv	56	28.11		
7	031	14dpv	57	27.28	27.63±0.34	4.38
8	032	14dpv	58	27.58		
9	041	21dpv	55	27.84		
10	042	21dpv	56	27.63		
11	043	21dpv	57	28.14	27.71±0.39	3.88
12	044	21dpv	58	27.22		
13	053	28dpv	55	28.15		
14	054	28dpv	56	27.96		
15	055	28dpv	57	28.87	28.31±0.391	3.88
16	056	28dpv	58	28.27		
positive control(0.01MOI)				25.07	25.07	4.5

③ ASF 혈청중화시험법(I)

a) 재료 및 세포

- 96 well plate, RPMI1640, FBS, Reservoir,
- PAM cell

b) Serum dilution

- 혈청비동화 : 실험 전 56°C, 30min incubation (Heat inactivation)
- 96 well plate에 무혈청 배지 80ul씩 분주
- A열에 80ul씩 비동화 된 혈청을 넣은 후 pipetting
- 아래의 그림과 같이 2-fold dilution, 마지막 80ul는 버림

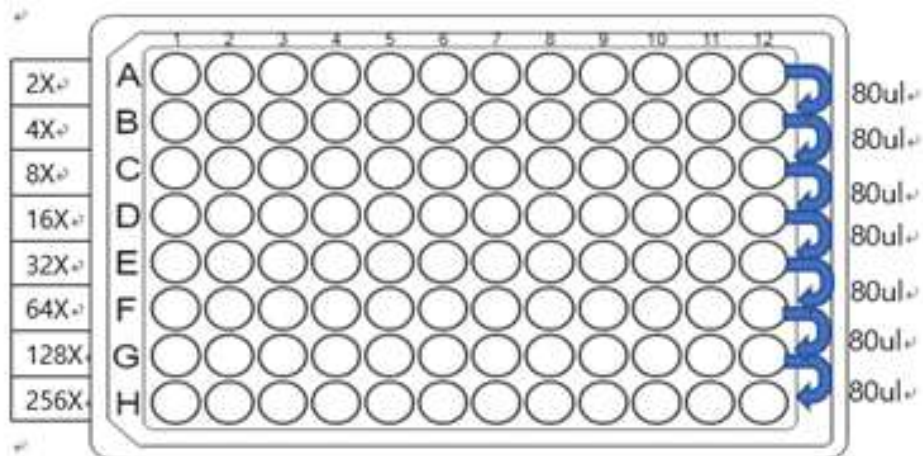


그림 31. 중화시험 디자인 모식도

c) 바이러스 Back titration

- 200TCID₅₀/0.1mL (500ul) + RPMI1640(무혈청 배지) (500ul)
- 100TCID₅₀/0.1mL (100ul) + RPMI1640 FBSX (900ul)
- 10TCID₅₀/0.1mL (100ul) + RPMI1640 FBSX (900ul)
- 0.1TCID₅₀/0.1mL (100ul) + RPMI1640 FBSX (900ul)

d) 혈청중화반응

- 희석된 혈청이 담긴 96 well Plate에서 전체 well 60ul씩을 새로운 96 well plate에 옮김
- 희석된 혈청 60ul씩 분주 된 96 well plate에 희석된 ASFV (200TCID₅₀/0.1mL)을 동량 분주 후 pipetting
 - * 1:1로 섞기 때문에 최종 virus 희석 배율은 100TCID₅₀/0.1mL이 됨
- Back titration을 위해 새 96 well plate에 각 TCID₅₀당 4 well 씩 100ul씩 희석된 virus 넣음
- 혈청 및 바이러스가 섞인 plate를 37°C CO₂ incubator에서 1h 반응
 - * 바이러스 Back titration도 동일하게 반응
- 1h 반응 최종 20분전 준비된 cell이 seeding 된 96 well plate를 무혈청 배지로 2회 washing
- 반응이 완료된 Mixture(혈청 + ASFV)를 cell이 seeding 된 96 well plate에 100ul씩 inoculation (Back titration도 포함)
- 37°C CO₂ incubator에서 1h 반응
- 접종액을 제거 후 무혈청 배지로 2회 washing
- Growth media를 200ul씩 분주 (Back titration도 포함)
 - * Growth media (RPMI1640 with 10% FBS) + 20ul1% RBC/well

e) 결과

- ELISA 항체 결과와는 다르게 ASF 바이러스 접종 후 시간이 경과하여도 모든 돼지 혈청에서 ASF 바이러스에 대한 항체가 음성으로 측정되어 상기와 같이 일반적으로 사용되는 바이러스 혈청중화시험법을 이용해서는 ASFV에 대한 중화항체 역가를 측정할 수 없음을 확인함

표 9. PAM 세포를 이용한 중화항체 검사 결과 (I)

일련번호	혈청			HAD 결과
	혈청번호	바이러스 접종후	돼지개체번호	중화항체결과
1	017	10dpv	55	음성 (< 2배)
2	018	10dpv	56	음성
3	019	10dpv	57	음성
4	020	10dpv	58	음성
5	029	14dpv	55	음성
6	030	14dpv	56	음성
7	031	14dpv	57	음성
8	032	14dpv	58	음성
9	041	21dpv	55	음성
10	042	21dpv	56	음성
11	043	21dpv	57	음성
12	044	21dpv	58	음성
13	053	28dpv	55	음성
14	054	28dpv	56	음성
15	055	28dpv	57	음성
16	056	28dpv	58	음성

④ ASF 혈청중화시험법(II)

a) 재료 및 세포

- 96 well plate, RPMI1640, FBS, Reservoir,
- PAM cell

b) 혈청중화반응

- 혈청을 56°C에서 비동화 후 RPMI1640 배지(20% FBS, 항생제, 비필수아미노산, 0.05% tween-80)로 96 well plate에 1/2배에서 1/256배까지 serial dilution
- ASFV (Paju strain)를 0.01 MOI로 희석해 혈청과 바이러스를 1:1로 반응
- 혈청과 바이러스를 반응시킨 96 well plate를 37°C CO₂ incubator에서 18시간 반응 (O/N)
- PAM cell을 96 well plate에 seeding
- 18시간 후 PAM cell이 seeding 된 96 well plate를 무혈청 배지로 2회 washing
- 혈청과 바이러스 혼합액을 PAM cell에 100μl씩 접종
- 37°C CO₂ incubator에서 1시간 반응
- 무혈청 배지로 2회 washing
- 10% FBS 성장 배지에 1% pig red blood cell을 섞음
- 10% FBS 성장 배지와 1% pig red blood cell이 섞인 배지를 100μl씩 분주
- 37°C CO₂ incubator에서 3일 (72시간) incubation

- 3일 뒤, HAD 확인
- c) 결과
 - 혈청과 바이러스를 18시간이상 반응시킨 이후 세포와 혼합하여 배양한 다음 중화항체여부를 판단한 결과 ELISA와 중화시험법 간의 특이도와 민감도는 각각 75%와 91.7%로 높은 상관성을 나타냈음
 - 55번 개체의 경우 바이러스 감염 10일째 ELISA의 경우 음성이었으나 중화시험법에서는 양성으로 판정되어 중화시험법이 더 민감함을 보였지만, 낮은 희석배수(4배)로 인한 비특이 반응을 배제할 수는 없기 때문에 향후 더 많은 시료를 통해 진단법의 민감도를 평가할 필요가 있었음
 - 또한 58번 개체의 경우 ELISA에서는 바이러스 접종 14일째에도 음성인 반면 중화시험법에서는 32배로 높은 양성항체를 검출함에 따라 중화시험법이 ELISA에 비해 더 민감함을 증명하였음
 - 이상의 결과를 종합하면 새로이 개발된 중화시험법의 경우 WOAH에서 표준법으로 제시하고 있는 ELISA법을 대체하면서 중화항체를 측정할 수 있음을 민감한 혈청진단법임을 증명하였음

표 10. PAM 세포를 이용한 중화항체 검사 결과 (II)

일련번호	혈청		돼지개체번호	HAD 결과
	혈청번호	바이러스 접종후		중화항체결과
1	017	10dpv	55	4x
2	018	10dpv	56	4x
3	019	10dpv	57	<2
4	020	10dpv	58	<2
5	029	14dpv	55	>256
6	030	14dpv	56	>256
7	031	14dpv	57	>256
8	032	14dpv	58	32x
9	041	21dpv	55	>256
10	042	21dpv	56	128x
11	043	21dpv	57	>256
12	044	21dpv	58	16x
13	053	28dpv	55	16x
14	054	28dpv	56	>256
15	055	28dpv	57	>256
16	056	28dpv	58	>256

표 11. ELISA 와 중화시험법 간의 특이도 평가

		predict negative	predict positive	predict data
		PN=0	PP=1	total
True negative	TN=0	3 (TN)	1 (FP)	4 (N)
True positive	TP=1	1 (FN)	11 (TP)	12 (P)
Actual data	total	4	12	16

* Specificity (%) : 75%

표 12. ELISA 와 중화시험법 간의 민감도 평가

		predict negative	predict positive	predict data
		PN=0	PP=1	total
True negative	TN=0	3 (TN)	1 (FP)	4 (N)
True positive	TP=1	1 (FN)	11 (TP)	12 (P)
Actual data	total	4	12	16

* sensitivity (%) : 91.7

(2) 연구내용(2차년도)

최종목표	목표	주요 연구개발 내용
안전하고 효과적인 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신 개발	신규 식물기반 ASF 재조합 면역원성 평가	ASF 시험백신 국내분리주 공격접종시험을 위한 시험백신 조성 결정
	ASF 재조합 단백질 백신 개발	ASF 시험백신의 동결건조 제형 개발
	국내분리주 방어능 평가	주요 ASF 백신용 항원의 동결건조 제형 개발
	방어능 평가	시험백신의 국내분리주(파주주19)에 대한 방어능 평가

○ 주관연구기관

가. ASFV 재조합 단백질 백신의 면역원성 평가

- ① 시험백신 제조 및 평가 계획
 - a) 시험백신 제조

표 13. 시험백신의 조성

Division		Composition (2 ml/dose)	
Monovalent Vaccine	Vaccine A	ASFV p30 protein -----	500 µg
		ISA201 -----	50% (w/w%)
	Vaccine B	ASFV p54 protein -----	500 µg
		ISA201 -----	50% (w/w%)
	Vaccine C	ASFV p72 protein -----	500 µg
	ISA201 -----	50% (w/w%)	
	Vaccine D	ASFV CD2v protein -----	500 µg
		ISA201 -----	50% (w/w%)
	Vaccine E	ASFV lectin protein -----	500 µg
		ISA201 -----	50% (w/w%)
Pentavalent Vaccine	Vaccine F	ASFV p30, p54, p72, CD2v, lectin (Each 100 µg) -----	500 µg
		ISA201 -----	50% (w/w%)
	Vaccine G	ASFV p30, p54, p72, CD2v, lectin (Each 100 µg) -----	500 µg
	O/W emulsion -----	25% (w/w%)	
		TRL agonist -----	200 µg
	Vaccine H	ASFV p30, p54, p72, CD2v, lectin (Each 100 µg) -----	500 µg
		SEA1 -----	50% (v/v%)

- ASFV 재조합 단백질 백신의 면역원성을 항원 및 면역증강제 조성에 따라 평가하기 위하여 상기 표와 같이 8종의 시험백신을 제조함. 식물발현 재조합 ASFV 항원은 p30, p54, p72, CD2v 및 Lectin 5종을 사용하였고, 면역증강제는 프랑스 seppic

사의 상용화 면역증강제 1종 (ISA201)과 시험연구 단계의 면역증강제 2종을 사용.

b) 실험동물 선정

- 본 실험을 위해 ASFV 항체음성의 6주령 자돈 45마리를 준비하여 40마리는 백신 접종군, 나머지 5마리는 비접종 대조군으로 하였으며, 백신 접종군은 다시 5마리씩 8그룹으로 나누어 각각의 시험백신 접종군으로 설정.

c) 백신접종 및 채혈

- 각각의 시험백신 접종군에 대하여 6주령에 백신 1두분 (2.0 ml)을 이근부 근육에 1차 접종하고, 이후 2주 간격으로 3회 추가접종을 실시함. 시험백신 접종군은 아래 일정에 따라 비접종 대조군과 함께 채혈하여 체액성 면역 및 세포성 면역분석에 사용함.

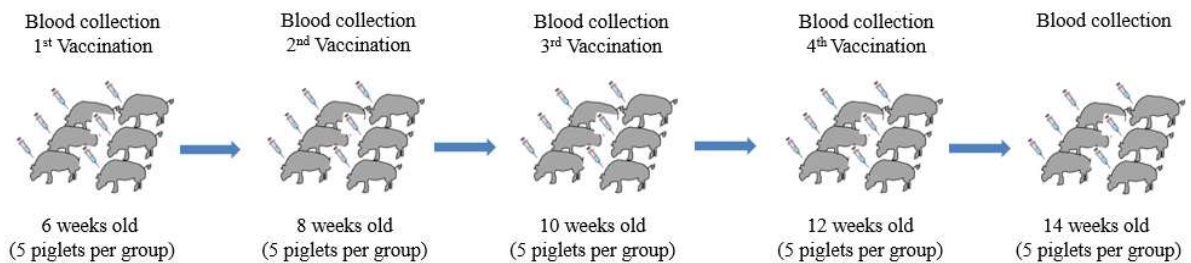


그림 32. 동물실험 그룹 및 채혈 일정

d) 체액성 면역지표 확인

- 시험백신 및 대조군 혈청에 대하여 백신 항원을 이용한 Indirect Ab ELISA 항체가 검사를 수행함.

e) 세포성 면역지표 확인

- 시험백신 및 대조군 전혈에 대하여 ASFV 각 항원에 특이적인 INF- γ 수준을 확인함.

② 실험 결과

a) 체액성 면역지표 확인 결과

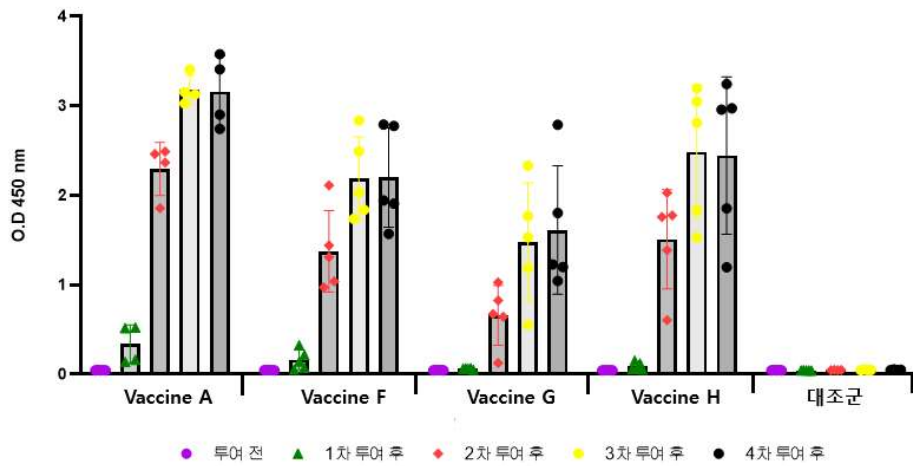


그림 33. ASFV p30 재조합 항원에 대한 ELISA 항체가 측정 결과

- ASFV p30 재조합 항원에 대한 ELISA 항체는 항원 함량이 많을수록 (Vaccine A와 Vaccine F 비교), 접종 횟수는 3회까지 증가하는 양상을 보였고, 면역증강제 중에서는 상용화 면역증강제 그룹 (Vaccine F)과 SEA1 그룹 (Vaccine H)에서 높게 확인됨.

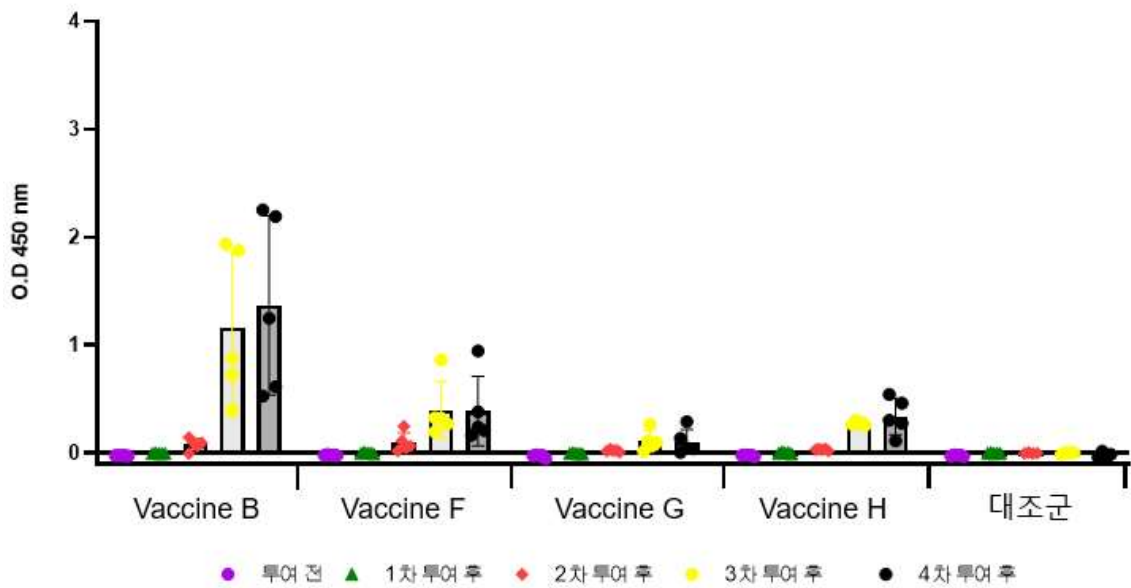


그림 34. ASFV p54 재조합 항원에 대한 ELISA 항체가 측정 결과

- ASFV p54 재조합 항원에 대한 ELISA 항체는 p30 결과와 유사하게 항원 함량이 많을수록 항체가 증가(Vaccine B와 Vaccine F 비교)하였고, 접종회수도 3회까지는 증가하였으나 3회 접종 혈청과 4회 접종 혈청간의 차이는 유의미 하지 않음. 상용화 면역증강제 그룹과 SEA1 그룹에서 보다 높은 항체가 생성됨.

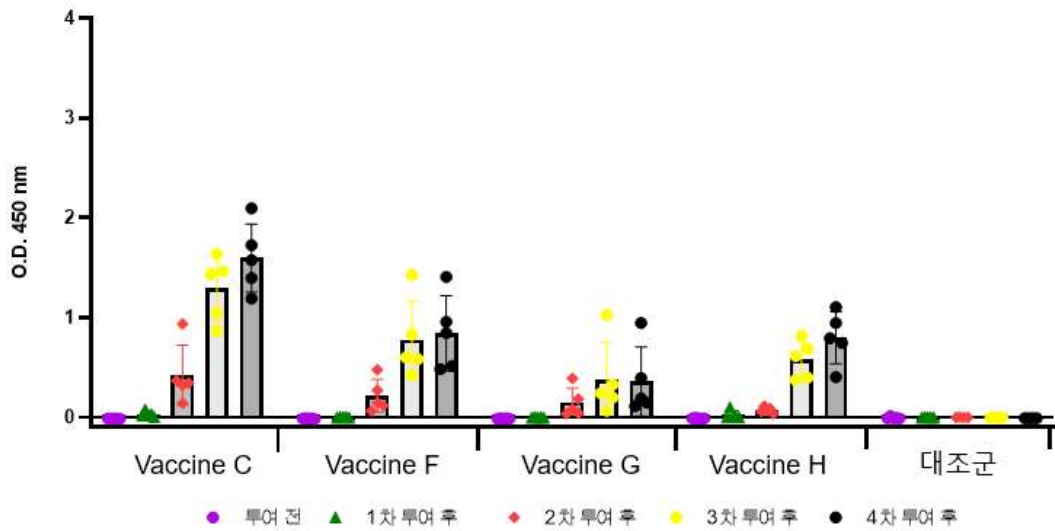


그림 35. ASFV p72 재조합 항원에 대한 ELISA 항체가 측정 결과

- ASFV p72에 대한 항체가 역시 앞서 확인한 p30 및 p54에 대한 항체와 유사한 양상을 보임.

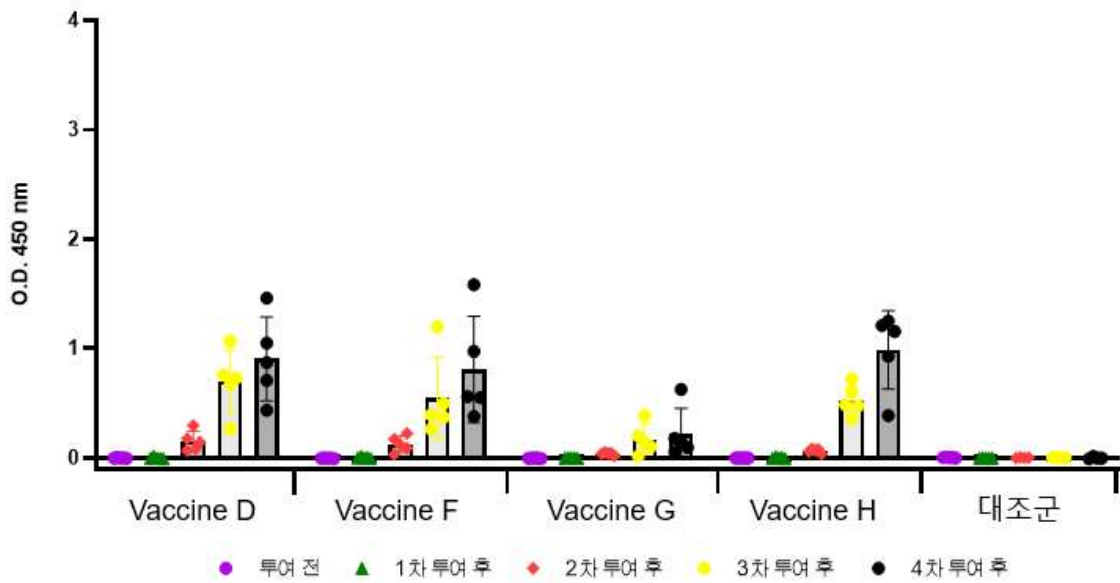


그림 36. ASFV CD2v 재조합 항원에 대한 ELISA 항체가 측정 결과

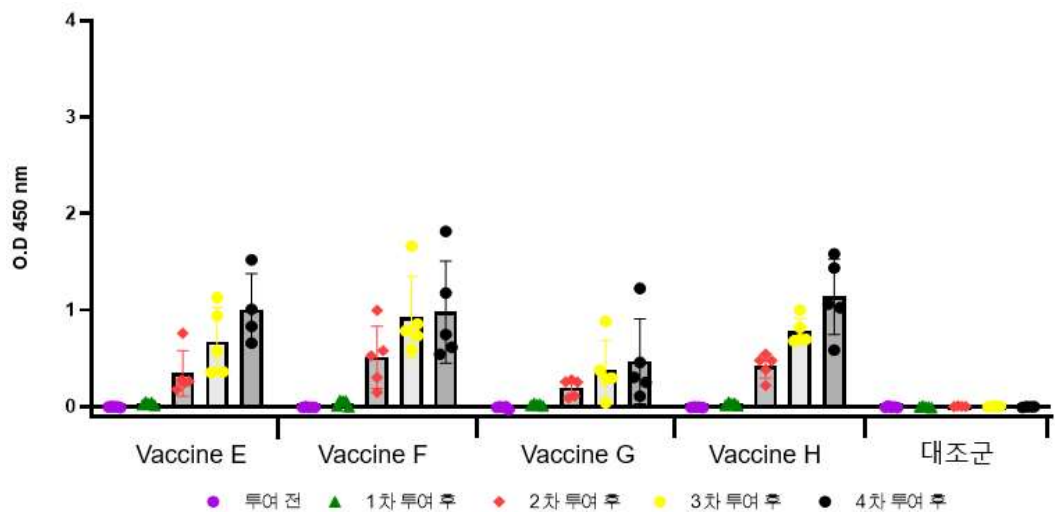


그림 37. ASFV lectin 재조합 항원에 대한 ELISA 항체가 측정 결과

- ASFV CD2v 및 lectin에 대한 항체가는 앞선 3개 재조합 항원과 유사하게 상용 면역증강제 그룹 및 SEA1이 연구용 면역증강제 그룹에 비교하여 높은 것을 확인함. 하지만 앞선 3개 항원과는 다르게 4회까지 접종횟수에 따라 증가하는 경향이 관찰되었고 항원량이 많았던 D 그룹(CD2v)이나 E 그룹(lectin)의 항체가가 항원량이 적은 F그룹과 큰 차이를 보이지 않음.

b) 세포성 면역지표 확인 결과

- 서로 다른 면역증강제를 포함하는 5가 백신 3종 (Vaccine F, Vaccine G, Vaccine H)에 대해서 항원에 특이적인 IFN- γ 생성 정도를 측정함. 이를 위해 2차 백신 접종 2주 후, 3차 백신접종 2주 후 및 4차 백신접종 2주 후에 얻어진 돼지의 전혈로부터 PBMC를 분리함. 그 결과, 각 백신의 항원 조성 및 함량은 동일하였지만, 면역증강제 종류에 따라서 IFN- γ 생성능 및 지속능에 차이를 보였으며, 상용화 면역증강제 사용 그룹 (Vaccine F)은 2차 백신접종 2주 후에만 IFN- γ 가 일시적으로 생성되고, 이후 boosting 접종 과정에서 상승하거나 지속되지 못한 것을 확인함. 반면, 시험연구 단계의 면역증강제 중 O/W emulsion과 TRL agonist를 조합한 그룹에서는 백신접종 횟수가 증가할수록 이에 비례하여 INF- γ 수치 또한 증가하는 양상을 보임. 특히, SEA1을 면역증강제로 사용한 백신 그룹의 경우, 2차 백신접종 2주 후에 가장 높은 INF- γ 가 생성되었고, boosting 과정에서도 동일한 수준의 INF- γ 농도가 일정하게 지속되어 평가에 사용된 3종의 면역증강제 중에서 항원 특이적인 IFN- γ 생성능이 가장 뛰어난 것으로 확인됨.

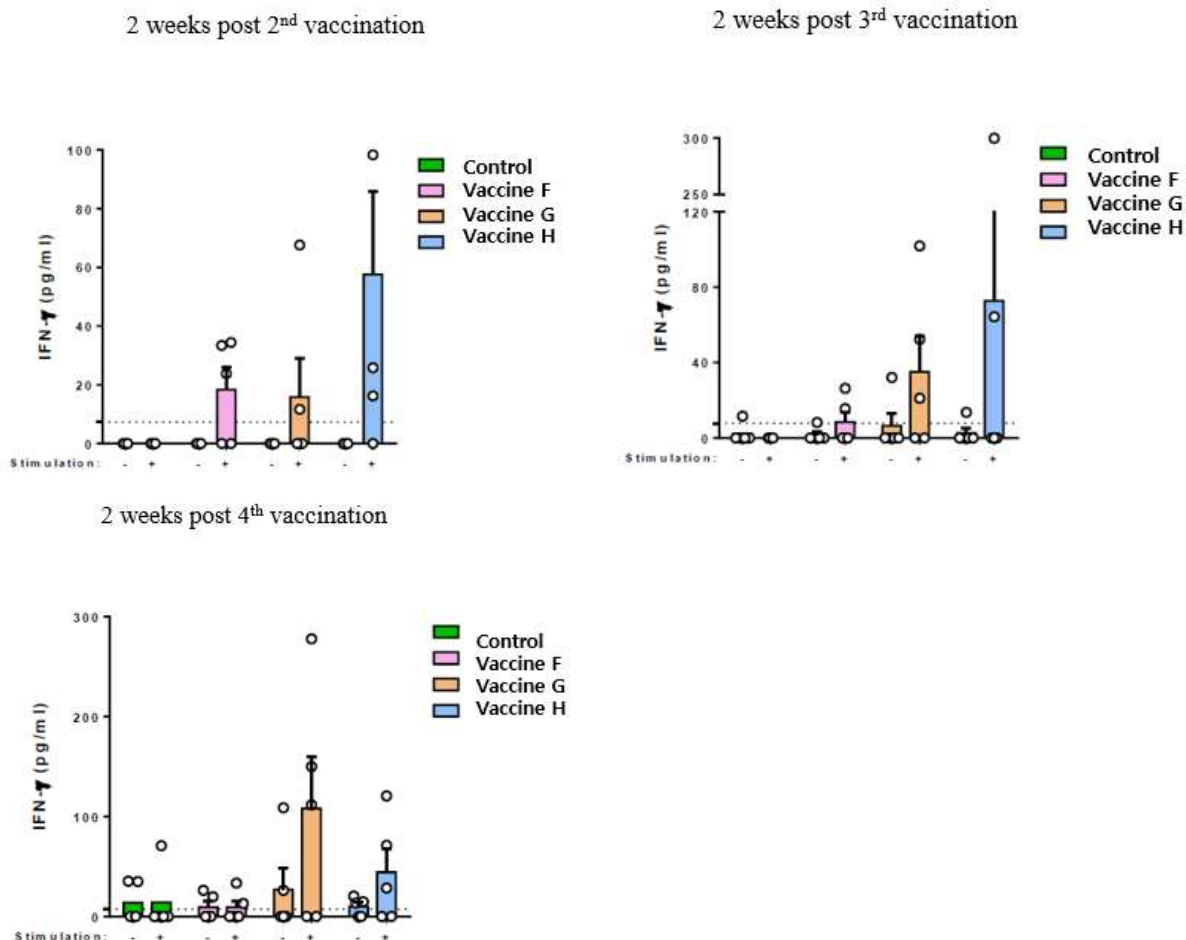


그림 38. 항원 특이적인 IFN- γ 측정 결과

나. ASF 시험백신의 동결건조 제형 개발 (추가)

① 항원의 실온 안정성 시험

a) 배경

- 본 과제에서 최종적으로 진행한 방어능 시험의 백신 시험군 중 하나는 오일 기반의 면역증강제를 사용하지 않은 그룹이 포함됨. 재조합 단백질 백신에서의 오일 기반 면역증강제의 역할 중 하나는 재조합 단백질의 안정성을 유지하는 것임. 따라서 오일 기반 면역증강제가 포함되지 않은 백신은 제조 후 접종까지의 기간동안 보관 조건에 따라서 항원이 안정적으로 존재하는지 확인할 필요가 있음

b) 시험방법

- 본 과제의 방어능 시험에서 오일 기반 면역증강제가 포함된 백신은 4회 접종분을 한번에 제조하여 접종한 반면에 항원 단백질로만 이루어진 시험군은 접종 직전에 제조하여 택배발송하여 하루~이틀 후 접종함.
- 따라서 제조~접종까지의 과정을 유사하게 검증하기 위해 포장용 아이스박스에 드라이아이스를 넣고, 항원이 담긴 튜브를 넣어 시간별로 온도를 측정하고, 각각 항원을 샘플링 하여 항원의 안정성을 확인함.

c) 결과

- 온도는 24시간까지 영하로 유지된 후 영상으로 바뀜. 그 후 지속적으로 증가하여 72시간에 실온에 가까워진 것이 확인됨.
- 항원 단백질은 p30을 제외하면 44~48시간까지는 큰 변화없이 유지되었지만 온도

가 실온수준으로 상승되는 48시간 이후에는 점차 감소되는 것이 확인됨. p30의 경우는 44시간째 50% 이상 감소되어 낮은 안정성을 가지는 것으로 보임.

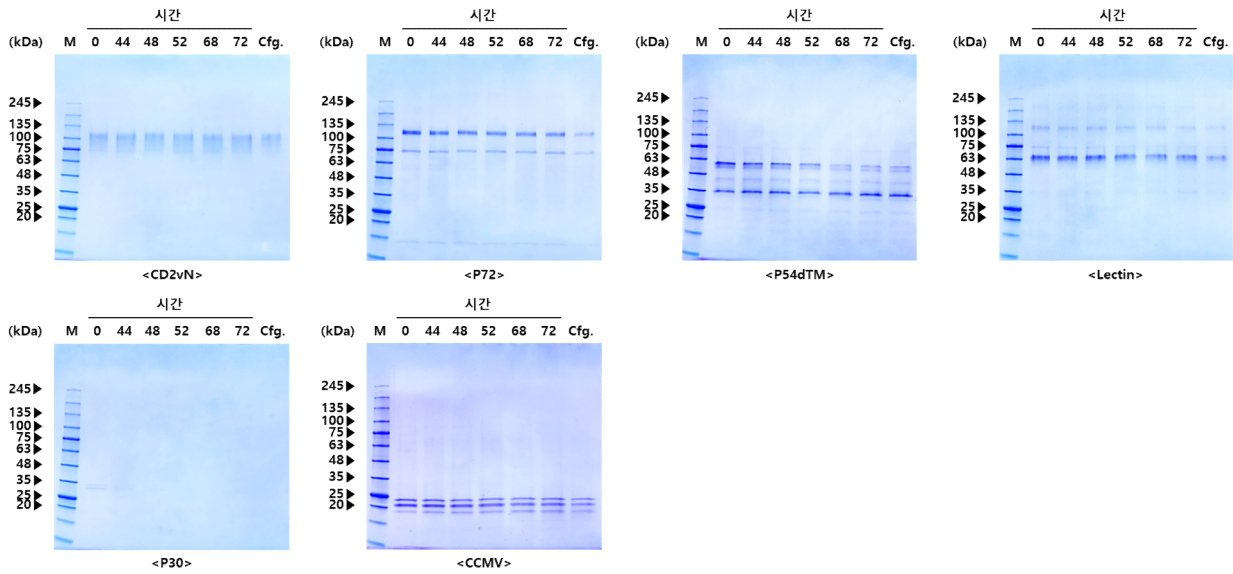


그림 39. ASFV 재조합 백신항원의 단기간 안정성 확인 결과

② 재조합 항원 단백질의 동결건조 제형 개발

a) 배경

- 위의 안정성 결과에서처럼 재조합 항원 단백질 단독으로는 용액 형태로 안정성이 담보되지 않음. 따라서 오일 기반 면역증강제가 없는 재조합 단백질 백신을 개발하기 위해서는 안정성이 유지되는 제형 개발이 필수적이며, 이를 가장 간단히 해결할 수 있는 방법은 동결건조 제형임. 일반적으로 동결건조의 경우 단백질의 경우에도 상온에서의 안정성이 상당 기간동안 유지되는 것으로 알려져 있음.

b) 시험방법

- 동결건조에서 사용되는 부형제를 첨가하여 동결건조를 진행하고, 동결건조 전후의 단백질의 성상을 SDS-PAGE로 비교함. 동결건조 시 단백질에 부정적인 영향이 있으면 단백질은 aggregation되어 침전되므로 손실이 관찰됨.

c) 결과

- 부형제는 10% sucrose로 선발.
- CD2v, lectin, p72, p54, p15, p17, p22, B602L, E199L, I177L의 총 10종의 항원 (p30, F317L, p35, MGF505-5R은 추가 시험 필요)은 동결건조 전후 비교 시 재조합 항원 단백질의 동결건조 안정성에 문제가 발견되지 않음.

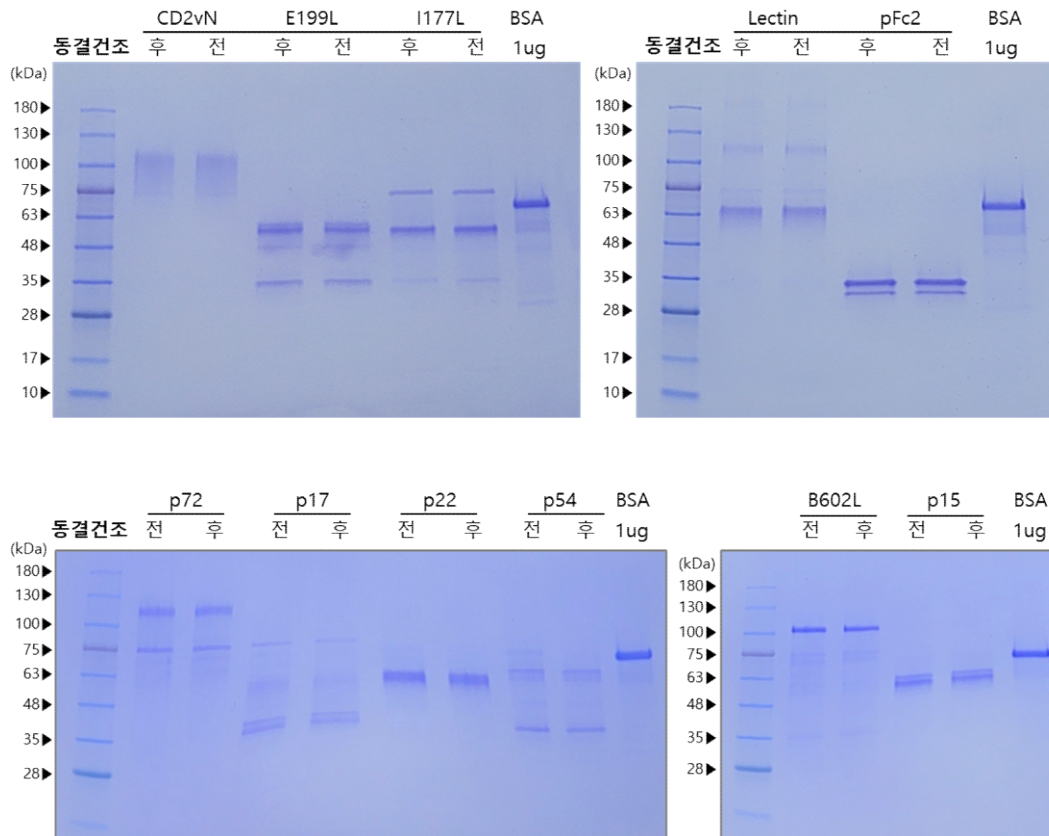


그림 40. 10종의 ASFV 재조합 항원 단백질의 동결건조 전후 비교 결과

○ 위탁연구기관

가. ASFV 재조합 단백질 백신 면역혈청의 중화항체가 측정

① 실험 재료 및 방법

a) 중화항체 시험법 및 중화용 바이러스

- 1차년도에 확립된 ASF 혈청중화시험법(II)를 사용하였으며, 중화용 바이러스는 국내에서 분리된 ASFV 야외 강독주인 파주 strain을 사용함

b) ASFV 재조합 단백질 백신 면역혈청의 선발

- 본 실험을 위해 주관기관이 미국에서 수행한 ASFV 재조합 단백질 백신 방어능 평가 과정에서 확보된 혈청들을 국내로 도입하였고, 실험에 사용된 20종의 혈청의 리스트는 아래와 같음.

표 14. 중화항체가 측정에 사용된 혈청 리스트 및 수량

구분	백신 조성	채혈 시기	수량
선행1 실험	p30+p54+p72+CD2v+Lectin	공격접종 전 (2차 백신접종 2주 후)	6
선행2 실험	p30+p54+p72+CD2v+Lectin		6
2차 실험	B602L+F317L		1
	CD2v+Lectin		1
	p54+p72		1
	I177L+MGF505-5R		1
	p17+p22		1
	비접종 대조군	-	3

② 실험 결과

표 15. 미국 1차 및 2차 실험 혈청에 대한 중화항체가 측정 결과

구분	개체 번호	ELISA 항체가 (미국 실험 시 확인된 결과)					중화 항체가
		p30	p54	p72	CD2v	Lectin	
선행1 실험	276	0.74	1.07	1.67	-	0.59	< 2
	277	0.62	1.38	1.69	-	0.69	< 2
	278	0.49	0.79	1.12	-	0.37	< 2
	279	0.34	0.24	0.54	-	0.22	< 2
	280	0.40	0.44	0.38	-	0.21	< 2
	281	0.63	0.61	1.20	-	0.30	< 2
선행2 실험	426	0.37	0.77	1.17	1.10	0.33	2
	427	0.40	0.40	0.88	1.22	0.31	2
	428	0.41	0.87	1.20	1.27	0.46	4
	476	0.21	0.37	0.50	1.03	0.46	4
	477	0.33	0.37	0.98	0.96	0.30	4
	478	0.26	0.60	0.53	1.20	0.35	2

- 선행실험들을 통해 확보된 혈청은 p30, p54, p72, CD2v 및 Lectin 5종 항원을 포함하는 시험백신 접종 후 얻어진 것들이며, 미국 실험 당시 측정된 재조합 항원 각각에 대한 ELISA 항체가는 모두 양성으로 확인됨. (비접종 대조군의 ELISA 항체가는 p30, p54, p72, Lectin의 경우 0.1 미만, CD2v의 경우 0.15 전후로 측정됨) 이들 혈청에 대하여 국내 분리 야외 강독주인 ASFV 파주 strain에 대한 중화항체 역가를 측정한 결과, 선행2 실험 혈청들에서 최대 4배의 중화항체 역가가 확인됨.

표 16. 2차 실험 혈청에 대한 중화항체가 측정 결과

구분	백신의 조성	개체 번호	중화 항체가
백신 접종군	B602L+F317L	160	< 2
	CD2v+Lectin	161	2
	p54+p72	162	8
	I177L+MGF505-5R	163	8
	p17+p22	164	< 2
비접종 대조군		165	< 2
		180	< 2
		181	< 2

- 2차 실험을 통해 확보된 혈청은 서로 다른 조합의 2종의 단백질을 포함하는 시험백신 접종 후 얻어진 것들이며, 미국 실험 당시 각각의 재조합 항원에 대한 ELISA 항체가는 따로 측정하지 않음. 이들 혈청에 대하여 국내 분리 야외 강독주인 ASFV 파주 strain에 대한 중화항체 역가를 측정한 결과, 최대 8배의 중화항체 역가가 확인됨.

나. ASFV 재조합 단백질 백신의 공격접종 방어능 평가

① 시험백신 제조 및 평가 계획

a) 시험백신 제조

표 17. 시험백신의 조성

Vaccine	Composition (2 ml/dose)
V1 (3 Ag+SEA1)	ASFV p30 ----- 100 µg ASFV p54 and p72 ----- Each 200 µg SEA1 ----- 50% (v/v%)
V2 (5 Ag+NP)	ASFV p30, p54, p72, CD2v, lectin ----- Each 100 µg NP ----- 50 µg
V3 (5 Ag+SEA1 +NP)	ASFV p30, p54, p72, CD2v, lectin ----- Each 100 µg SEA1 ----- 50% (v/v%) NP ----- 50 µg

- SEA1 : Double oil emulsion, Provided by Kansas States University
- NP : Nanoparticle adjuvant

- 국내 분리 야외 강독주에 대한 ASFV 재조합 단백질의 백신의 공격접종 방어능을 평가하기 위하여 상기 표와 같이 3종의 시험백신을 제조함. 시험백신에는 ASFV p30, p54, p72, CD2v 및 Lectin이 최소 3종에서 최대 5종 포함되었고, 면역증강제의 경우, SEA1이라는 W/O/W emulsion과 나노입자 크기 식물바이러스 유사입자 (VLP)가 단독 혹은 함께 사용됨.

b) 실험동물 선정

- 본 실험을 위해 ASFV 항체음성의 3주령 자돈 20마리를 선발하여 12마리는 백신 접종군, 나머지 8마리는 비접종 대조군으로 함. 백신 접종군은 다시 4마리씩 3그룹으로 구분하여 각각의 시험백신 접종군으로 하였고, 비접종 대조군은 4마리씩 2그룹으로 나누어 각각 공격접종 대조군과 비접종 대조군으로 설정함.

표 18. 동물실험 그룹

구분	일령	개체 수	백신접종	공격 접종	관찰항목	
시험백신 접종군	A	3주령	4	2주 간격 3회	3차 접종 1주 후, ASFV 파주 strain, IM, 10 HAD ₅₀ /두	공격접종 후 14일간 임상증상, 혈액, 체온, swab, 폐사 또는 안락사 시 부검 (비장, 림프, 신장, 심장 등)
	B	3주령	4			
	C	3주령	4			
공격접종 대조군	3주령	4	-	-		
비접종 대조군	3주령	4	-	-		

c) 백신접종 및 채혈

- 각각의 시험백신 접종군에 대하여 3주령에 시험백신 1두분 (2.0 ml)을 이근부 근육에 1차 접종하고, 이후 2주 간격으로 2회 추가 접종함. 항체가 측정을 위해 백신 접종 전, 1차 백신접종 2주 후, 2차 백신접종 2주 후 및 3차 백신접종 1주 후에 비접종 대조군과 함께 채혈함. 시험백신 접종은 ABL2 동물시설에서 실시하고, 3차 백신접종 4일 후, 실험동물을 ABL3 동물사로 이동하여 공격접종에 사용함.

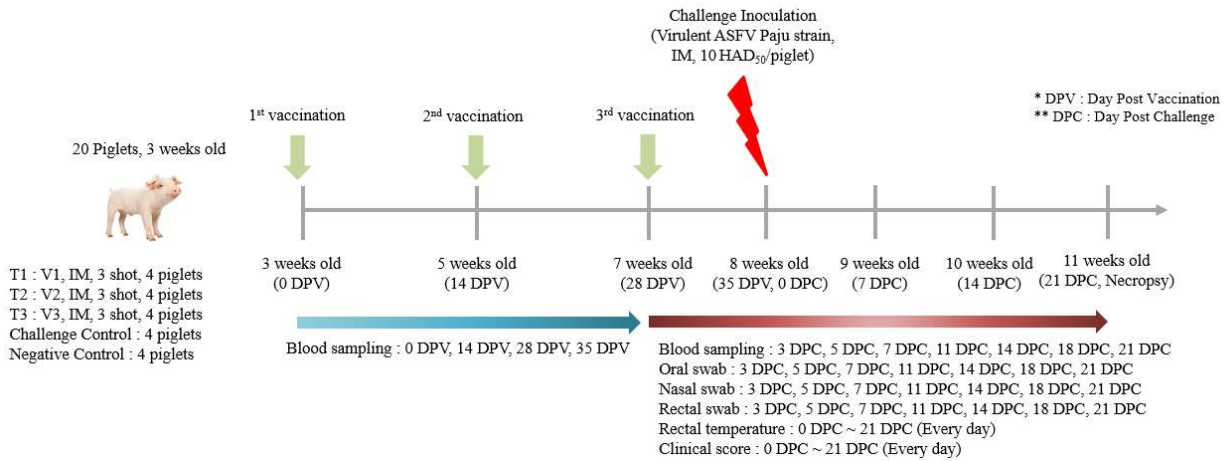


그림 41. 동물실험 디자인

d) 공격접종

- 시험백신 접종군 및 공격접종 대조군에 대하여 3차 백신접종 1주 후에 (8주령) ASFV 파주 strain을 10 HAD₅₀/두의 농도로 근육 접종함.

e) 임상증상 관찰 및 샘플링

- 아래 표에 따라 실험기간 동안 생존 개체들을 대상으로 수행하였으며, 임상증상 관찰 및 체온 측정은 공격접종 후 21일까지 매일 1회 수행하고, 항원 검사를 위한 swab 및 채혈은 2~4일 간격으로 정기적으로 수행함.

표 19. 샘플링 방법

구분	샘플링 간격	비고
임상증상 관찰	매일 (DPC 0 ~ DPC 21)	
직장 체온 측정		
Swab (비강, 구강, 항문)	DPC 0, 3, 5, 7, 11, 14, 18, 21일	매 채혈 시 5 ml 이상
채혈		

f) 항원 검사

- 혈액 및 swab 샘플 (비강, 구강 및 항문)에 대하여 real-time PCR법으로 ASFV p72 gene 유무 및 농도를 확인함.

g) 항체 검사

- 혈액에 대하여 commercial ELISA kit를 이용한 항체 검사를 수행함. (ID Screen African Swine Fever Indirect Screening test(Innovative Diagnostics))

② 실험 결과

a) 생존율 및 체온 측정 결과

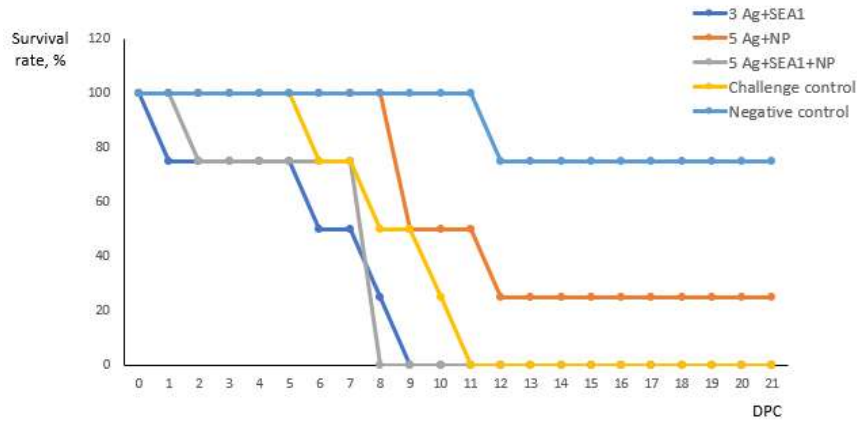


그림 42. 공격접종 후 그룹별 생존율 측정 결과

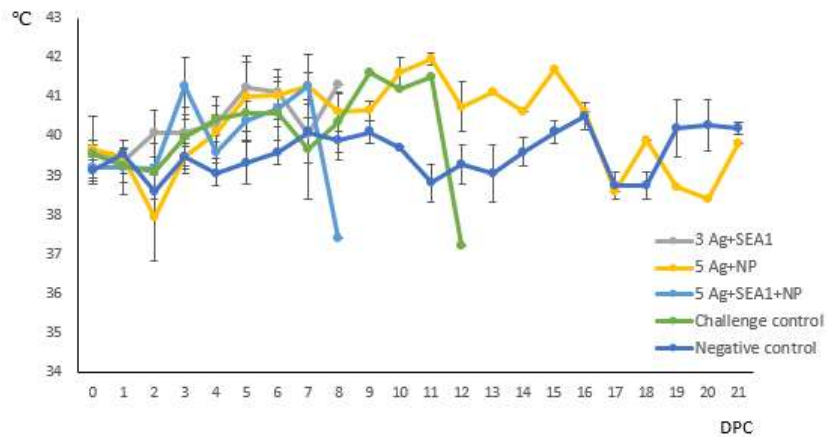


그림 43. 공격접종 후 그룹별 체온 측정 결과

- 각각의 시험백신을 2주 간격으로 3회 접종 후, 3차 백신접종 7일 후에 국내분리 ASFV 강독주인 파주 strain으로 공격접종을 실시한 결과, 백신 비접종 대조군의 경우, 10일 전후에 전형적인 ASFV 감염 증상을 보이며 모두 폐사하였고, 백신접종군 중 5종 항원과 nanoparticle adjuvant를 포함한 그룹에서 25%가 생존하는 결과를 확인함. (비접종 대조군 중 1마리 개체의 폐사는 ASFV와 무관한 환경적 요인으로 확인됨)

b) 항체가 측정 결과

- 각각의 시험백신에는 ASFV p30(p32)과 p72 항원이 모두 포함되어 있고, 항체가 측정을 위해 사용된 상용화 ELISA kit는 ASFV p30, p62 및 p72에 대한 항체를 동시에 확인할 수 있음. 비록, 이 kit를 통해서도 시험백신에 사용된 p54, CD2v 및 Lectin에 대한 항체 수준을 확인할 순 없지만, 사전 연구 결과를 통해서 5종 백신 접종 시 p32 및 p72에 대한 항체가 상승하면 백신에 포함된 다른 항원들에 대한 항체 수준 역시 동일하게 상승하는 것을 이미 확인하였기 때문에 본 실험에서는 상용화 ELISA kit만을 평가에 사용함.

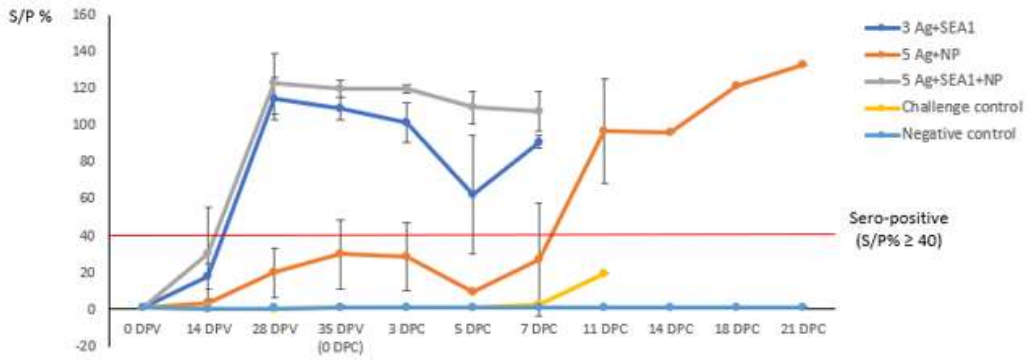


그림 44. ASFV p30(p32) 및 p72 항원에 대한 ELISA 항체가 측정 결과

- 그 결과, SEA1을 포함하는 2개 시험백신 그룹은 2차 접종 후부터 항체가 급격히 상승하여 양성으로 전환되었고, 공격접종 전에는 매우 높은 항체 수준을 유지하고 있는 것이 확인됨. 반면, SEA1을 포함하지 않고, nanoparticle adjuvant만을 포함한 시험백신 그룹의 경우, 공격접종 전까지는 항체가 거의 검출되지 않음.

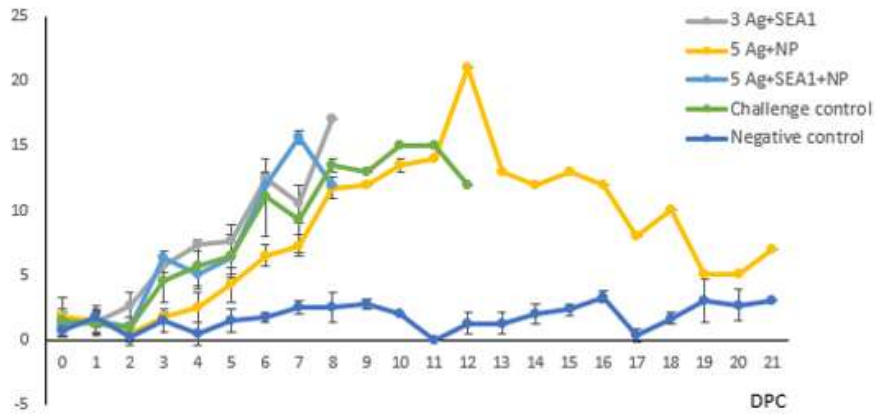
c) 임상증상 관찰 결과

- 아래 평가표에 따라 공격접종 후, 시험백신 접종군 및 비접종 대조군에 대한 임상 점수를 기록하였고, 그 결과는 다음과 같음.

Classification	Scores	Symptoms
1. Temp	0	< 39
	1	39.0 < to < 39.5
	2	39.5 ≤ to < 40
	3	40.0 ≤ to ≤ 40.5
	4	40.6 ≤ to ≤ 41
	5	> 41
2. Inappitence	0	Normal
	1	Reduced eating
	4, 6	Only picking at food Not eating
3. Recumbancy	0	Normal
	1	Lethargic
	2	Get up only when touched
	4, 6	Slow to get up when touched Remain ecumbent when touched
4. Skin Haemorrhage	0	Normal
	1	Haemorrhagic areas on ears and body
	3	Generalised haemorrhage all over body
5. Joint swelling	0	Normal
	1	a joint swelling
	4	Severe swelling with difficulty walking
6. Laboured breathing and/or coughing	0	Normal
	1	Mild
	3	Severe
7. Ocular discharge	0	Normal
	1	Gummed up eyes
8. Diarrhea	0	Normal
	1	Diarrhea
	4	Bloody diarrhea
9. Urine	4	Blood urine
10. Vomiting	4	Vomiting

Katherine King et al., 2011

그림 45. ASFV에 대한 임상점수 기준표



Max score : 40 points/day

그림 46. 공격접종 후 임상증상 기록 결과

- 앞서 생존율 평가 결과에서 1개 시험백신 접종 그룹 외에는 공격접종 후 모두 폐사한 것을 확인할 수 있었음. 특히, SEA1 adjuvant를 포함하는 시험백신 2종 접종 그룹의 경우, 항체가 수준은 매우 높았지만, 공격접종 대조군보다 오히려 폐사 속도가 더 빨랐으며, 임상증상 측정 결과에서도 유사한 양상이 확인됨. 반면, 25%가 생존한 5종 항원과 nanoparticle adjuvant를 포함한 시험백신 접종군의 경우, 나머지 2개 시험백신 접종군 및 공격접종 대조군보다 임상증상 발현 정도가 다소 낮았고, 생존한 개체의 경우, 공격접종 19일 이후부터는 비접종 대조군과 유사한 수준까지 임상증상 낮아진 것을 확인할 수 있음.

d) Viremia 및 shedding

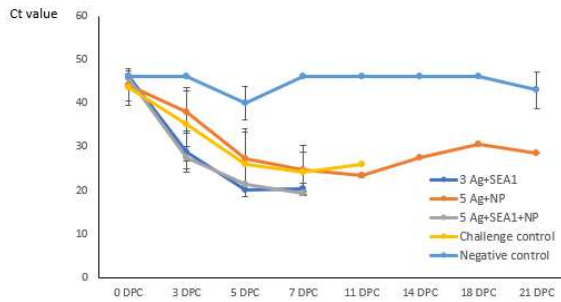


그림 47. 공격접종 후 viremia

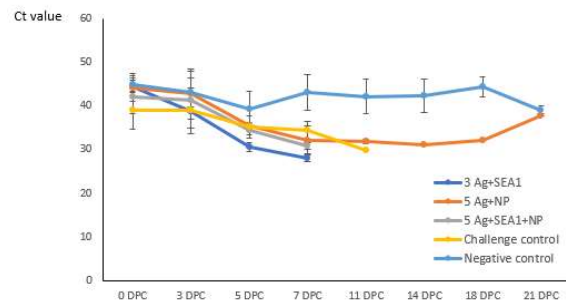


그림 48. 공격접종 후 oral shedding

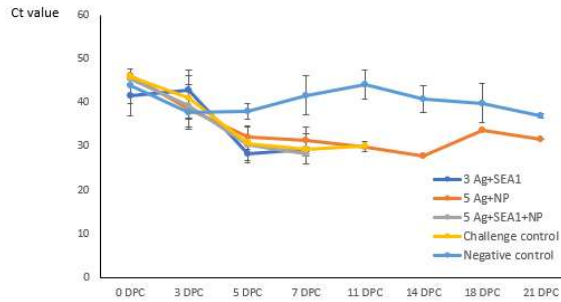


그림 49. 공격접종 후 fecal shedding

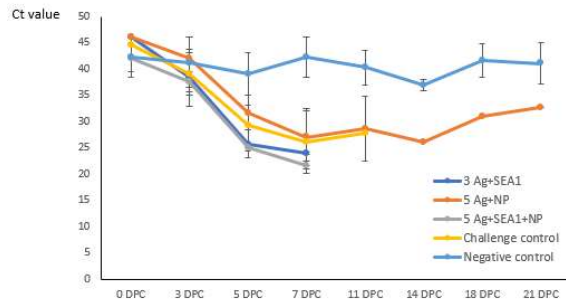


그림 50. 공격접종 후 nasal shedding

- 공격접종 대조군의 경우, 공격접종 후 3~5일째부터 ASFV에 대한 viremia 및 구강, 비강 및 분변을 통한 virus shedding이 급격히 증가하였고, 생존율이 0% 였던 2개 시험백신 접종군은 임상증상 결과와 유사하게 오히려 viremia와 virus shedding이 증가하는 경향을 보임. 한편, 공격접종 후 유일하게 생존하였던 5종 항원과 nanoparticle adjuvant를 포함한 시험백신 접종군의 경우 앞서 임상증상의 일부 개선 효과는 확인되었으나, viremia와 virus shedding 측정 결과에서는 공격접종 대조군과 거의 동일한 결과가 관찰됨.

③ 결과에 대한 고찰

식물발현 재조합 단백질과 미네랄 오일을 기반으로 한 전형적인 면역증강제를 사용하여 시험백신을 제조하였을 때, 백신접종 돼지에서 높은 수준의 IgG 항체가 생성되었지만, 공격접종 방어능과 직접적인 상관관계를 확인할 수 없었음. 오히려, 각 재조합 단백질에 대한 항체 수준이 높을수록 challenge virus의 병원성이 강해지는 ADE(Antibody Dependent Enhancement) 현상이 확인되기도 함. 반면, 식물바이러스 유사입자(VLP)에 기반한 신개념의 nanoparticle 면역증강제를 사용한 시험백신 접종 그룹의 경우, viremia나 virus shedding 억제와 같은 지표에서 뚜렷한 한계성을 보였지만, 공격접종 후 임상증상 발현 정도가 다소 감소하고, 실험 종료일까지 25%가 최종 생존하여 ASFV 재조합 단백질 백신의 새로운 가능성을 보여준 것으로 평가할 수 있음.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

상세한 연구결과는 위의 2. 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용에 작성함.

- 주관 연구기관
 - 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신 공격접종 실험 수행
 - 14종의 ASF 재조합 단백질 항원의 식물기반 대량 생산 공정 개발
 - 자체 개발한 p30, p72에 대한 항원 신속진단 키트의 평가
 - 항원에 대한 단기 안정성 시험 및 동결건조 제형 개발
 - 항원량 및 면역증강제 조합에 따른 시험백신 체액성, 세포성 면역원성 평가
- 위탁 연구기관
 - ASF백신의 혈청학적 검사법 비교 및 평가 기법 개발
 - 국내분리 ASFV 분리주인 파주주19 감염에 대한 백신 방어능 평가 진행

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

성과지표명	단계	1단계('22~'23)		종료 후 5년 이내		계		가중치(%)
		목표	실적	목표	실적	목표	실적	
전담기관 등록·기탁지표	논문	1	0			1	0	10
	특허출원	1	2			1	2	10
	특허등록			1		1	0	10
	연차보고서	1	1			1	1	10
	최종보고서	1	1			1	1	10
연구개발과제 특성 반영 지표	기술실시		1	1		1	1	20
	사업화			1		1	0	25
	고용창출		5	1		1	5	15
계		4	10	4		8	10	100

* 1」 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2」 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다
(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022 대한바이러스학회	구현지	2022.08.26	강원도 양양 을지인력개발원	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2022	연차보고서	-	-
2024	최종보고서	TBD	TBD

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	아프리카 돼지열병 바이러스 유래 항원 단백질을 포함하는 아프리카 돼지열병의 예방용 백신과 이를 기반으로하는 백신조성물 제조 방법	한국	주식회사 바이오맵	2022.08.04	10-2022-0097525					25%	활용
2	아프리카 돼지열병 바이러스 유래 항원 단백질을 포함하는 아프리카 돼지열병의 예방용 백신과 이를 기반으로하는 백신조성물 제조 방법	PCT	주식회사 바이오맵	2022.08.12	PCT/KR2022/012142					25%	미활용

지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√		√							
2										√

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	ASF 시험백신 A,B,C	2023.10.11	자체제작	-	전임상시험	-	-	-

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	자체실시	아프리카 돼지열병 그린백신 제조	자체실시	2023.10.11	-	-

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
무역 수지 개선 효과(천원)	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	-	-	2	3	5
합계			2	3	5

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황														
			학위별				성별		지역별								
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타				

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당없음)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

ASFV 국내분리주를 이용한 백신 방어능 평가결과를 통해 식물 바이러스 VLP를 면역증강제로 사용한 시험군에서 ASF백신에서 우려되는 ADE가 관찰되지 않았고, 비록 25%이긴 하지만, 안전하고 경제적인 식물기반 재조합 단백질 ASF 백신의 방어능이 확인됨. 식물 바이러스 VLP가 면역증강제로 포함된 시험군의 경우 기존 생백신에서 면역반응의 지표로 주장하던 항체기반의 체액성 면역반응은 거의 확인되지 않았음에도 불구하고 일부 방어효능이 확인되었으므로, 재조합 단백질 백신의 평가 방법은 달라야할 개연성을 확인함. 특히 특정 식물 바이러스는 암세포 사멸을 유도할 수 있는것으로 알려져 있어, 본 연구에서 사용한 식물 바이러스 VLP의 경우도 체액성 면역반응보다는 세포성 면역반응을 유도하고, 이 면역반응이 방어효능에 관여할 가능성이 있어, 향후 ASFV, 면역반응, 백신의 방어능 간의 상관관계에 대한 추가적인 연구에 단초를 제공했다고 볼 수 있음.

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함), 품종인 경우 품종보호권 등록증 또는 생산·판매 신고증명서
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 공격접종 실험을 통한 시험 백신 조성 결정	○ 2회에 걸쳐 ABL3시설인 미국 캔자스주립대 BRI에서 30여마리 자돈 규모의 공격접종 시험을 진행함	○ 90
○ 효능 및 경제성 확보를 위한 시험백신 최적화	○ 공격접종시험을 통해 100% 유효성 있는 백신 조성을 확보하지 못하여 최적화를 완성하지는 못하였으나 국내분리주 방어능 평가에 사용할 백신 조성결정을 위해 신규 면역증강제 3종 및 항원량 증량에 따른 면역원성(체액성, 세포성) 평가	○ 30
○ (대체)항원 신속진단 키트 개발	○ 자체 개발된 항원 신속진단 키트의 성능 평가 진행	○ 100
○ 항원 대량생산 공정 개발	○ 14종의 ASFV 항원 단백질에 대한 식물기반 대량 생산공정 개발	○ 100
○ 백신 평가기법 구축	○ 3가지 혈청학적 분석 기법을 개발하고 비교	○ 100
○ 국내분리 ASFV감염에 대한 방어능 확인	○ 파주주에 대해 3가지 시험백신의 방어능 평가를 진행하였고, 그 중 전통적인 면역보조제를 제외하고 식물 바이러스 VLP를 면역보조제로 사용한 시험군에서 25%의 방어능이 평가됨	○ 100
○ 시험백신 안정성 시험 (항원 동결건조 제형 개발)	○ 1차년도에 유효성 있는 백신 조성을 확보하는 것에 실패하였기 때문에 전통적인 안정성 시험은 진행하지 못하였으나 면역보조제 미사용시의 백신항원의 단기간 안정성 및 장기보관을 위한 동결건조 제형을 개발함	○ 50
○ 야외 임상시험 수행	○ 1차년도에서 다양한 조성의 시험백신의 방어능을 평가하였음에도 불구하고 적절한 백신 조성을 찾지 못하여 진행 불가하였음	○ 0

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

○ 논문 게재 : 원래 목표는 국내 분리 ASFV에 대한 방어능 평가 결과를 바탕으로 논문을 작성하려고 하였으나 방어능 평가가 2차년도 연말에 진행되었고, 결과를 과제 종료일에 가깝게 확보하여 현재 논문 작성이 진행중임. 국내에서 ASF백신 방어능 평가를 할 수 있는 기관이 한정되어있어 시험 일정 확보가 어려운것이 현실임. 추가적으로 진단키트 성능 평가에 대한 내용으로 Frontiers in Microbiology에 논문 투고함.

○ 계획한 연구의 미실시 : 당초의 연구계획은 1차년도에 두번의 방어능평가(KSU BRI에서)를 통해 방어능 확인된 백신 조성을 확정된 후 해당 항원 조합에 대한 항원량 조정 동물시험을 진행하여 최종 조성을 확정하고, 최종 결정된 시험백신으로 국내분리주 방어능 평가, 안정성 시험을 진행하는 것이었음. 그 후 그 결과들을 모아서 임상시험 신청하고 임상시험을 진행하는 것이 최종 목표였음. 하지만 방어능이 확인된 백신 조성을 확보하지 못하였고, 이에 따라 이후 연계된 시험들을 진행할 수 없게 되었음.

2) 자체 보완활동

○ 논문 게재 : 국내분리주에 대한 방어능 평가 결과를 바탕으로 현재 논문 작성중이며 연내 SCI급 저널에 게재를 목표로 함.

○ 계획한 연구의 미실시 : 정해진 최종 목표의 범위 내에서 연구내용을 대체하여 수행함.

- 항원량 조정을 위한 동물시험은 항원 신속진단 키트 개발(평가)로 대체하여 미국 방어능 평가시 공격접종 이후 혈청을 대상으로 평가를 진행함.

- 임상시험은 새로운 백신 조성을 찾기 위한 동물시험으로 대체하여 고용량의 단독항원 면역원성, 신규한 면역증강제 시험을 진행하였고 각각 체액성, 세포성 면역반응을 확인하고 그 결과를 국내분리주 방어능 평가에 활용함.

- 시험백신 안정성 시험은 제형개발로 대체함. 국내분리주 방어능 시험에서 사용한 시험백신 중 하나가 전통적인 오일기반의 면역증강제가 포함되지 않은, 재조합 단백질로만 이루어진 백신 조성이었으며, 그 시험군에서 일부 방어능이 확인됨. 면역증강제의 역할중 하나는 항원의 안정성 유지이기 때문에 재조합 단백질로만 이루어진 백신은 오래 보관하기 어렵기 때문에 오래 보관할 수 있는 제형이 필요하므로, 단기간동안 얼마나 유지되는지 확인하고, 오래보관 할 수 있는 동결건조 제형 개발을 진행하였음.

○ 향후 연구 계획

- 개별 항원 생산성 향상을 위해 지속적으로 항원 발현 벡터를 개량하고 생산공정을 최적화 하는 연구를 진행하겠음.

- 향후 추가연구에서는 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신개발에 있어 동물용 백신 개발이라는 점에 주안점을 두고 계획 및 진행 하겠음.

- 본 과제에서의 국내분리주 방어능 평가결과를 바탕으로 새로운 조성의 백신을 디자인하여 방어능 평가를 진행할 계획임. 최소 50% 이상의 방어능이 인정되면 항원 함량을 최소화 및 안전성 평가 실험 추가 진행. 최종 백신조성으로 야외임상시험을 농림축산 검역본부에 신청. 승인 후 동물용 의약품의 일반적인 야외임상시험 프로토콜(3개 농장에 각 40두 이상에 접종하여 안전성 및 유효성 평가)에 따라 야외 임상시험 진행

3) 연구개발 과정의 성실성

○ 비록 연구기간 내에 확실한 식물기반 ASF 재조합 백신 조성을 개발하지는 못하였으나 국내분리주 방어능 시험을 통해 반드시 개발이 필요한 ASFV-free 백신인 재조합 단백질 백신에 대한 단초는 마련하였다고 자평함.

○ 계획중 할 수 없었던 연구내용들을 정해진 최종 목표의 범위 내에서 연구내용을 대체하여 수행하여 정성적 연구결과를 창출 함.

○ 이를 위해서 본 연구진은 국내외 ASF 전문가들과 활발한 논의를 진행중임. 국내적으로는 2022, 2023년에 농림축산검역본부에서 주최한 ASF 전문가 세미나에 참석함. 해외에서는 캔자스 주립대의 Jishu 교수와 2020년부터 관련해서 논의를 진행하였고, ABL3시설인 BRI에서 총 4번의 방어능 평가를 진행한 바 있음. 그리고 2022, 2023년 개최된 GARA(Global ASF Research Alliance)에 연구기관의 장인 대표이사가 참석하였고, 그 후 영국 Pirbright 연구소의 Linda Dixon이나 독일 FLI(Friedrich-Loeffler-Institut)의 Sandra Blome, 케냐의 ILRI(International Livestock Research Institute)와 ASF 백신 및 진단에 대한 논의를 이어가고 있음.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 현재 전세계적으로 승인된 ASF 백신은 유전자 재조합 생 바이러스 백신이 유일함. 하지만 베트남에서 사용중인 해당 백신들의 안전성에 대한 이슈가 지속적으로 제기되고 있는 상황임. 또한 중국에서는 자체개발종이던 시험용 생 바이러스 백신 유출 의심 사건이 후로 해당 백신의 언급 자체가 중단된 상황임. 이런 상황을 비추어 보았을때 국내 및 다른 나라에서도 생 바이러스 백신을 사용하기에는 쉽지 않은 상황으로 보이며, ASFV-free 인 DNA백신, mRNA백신, 재조합 단백질 백신 등 다른 플랫폼의 백신이 개발이 여전히 필요한 상황임.

○ 본 연구과제에서 확인한 오일 기반 면역증강제가 없이 식물 바이러스 VLP를 면역증강제로 포함한 시험백신의 일부 방어능은 ASF 재조합 백신 개발에 있어 중요한 단서를 제공한다고 볼 수 있음. 오일 기반 면역증강제를 사용한 시험백신 접종군에서 면역항원에 대한 체액성 면역반응이 강력하게 유도된 것이 확인되었으나 오히려 공격접종시에는 더 심각한 증상 및 빠른 폐사가 관찰되어 ADE가 일어나는것이 의심되는 상황임. 이러한 결과를 바탕으로 향후 백신 항원 선택에 대한 추가 연구에 참고할 수 있음.

○ 본 연구과제에서 식물 바이러스 VLP를 면역증강제로 사용 시험군이 있고 이 시험군에서 일부 방어능이 확인됨. 식물 바이러스 VLP를 면역증강제로 사용하는 연구는 있어왔고, 또한 식물 바이러스를 암세포 치료제로 사용하는 연구가 진행되고 있으며, 미국에 관련 회사도 설립되어있음. 이는 식물 바이러스가 동물의 세포성 면역반응을 유도할 수 있기 때문임. 한편 ASF백신에 있어 체액성 면역반응이 중요한지 세포성 면역반응이 중요한지는 오래된 화두이지만 여전히 명확한 결론은 부재한 상태임. 본 연구과제에서 얻은 식물 바이러스 VLP의 효과에 대해 추가 검증이 필요한 상황이며, 추가 연구들을 통해 ASF 백신의 작용기전과 ASFV와 면역시스템과의 상관관계 등의 연구분야에 중요한 단서를 제공했다고 볼 수 있음.

○ 본 연구과제를 통해 개발된 식물기반 재조합 단백질의 대량생산 기술은 ASF 재조합 항원 단백질 뿐만 아니라 다른 단백질의 대량생산 기술에 적용이 가능함. 이를 활용하여 ASF뿐만 아니라 다른 동물질병에 대해서도 식물발현 단백질 기반 진단 및 치료제 개발을 지속적으로 시도할 계획임.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외	4	
	계		
특허등록	국내	1	
	국외	4	
	계	5	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1	
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발	1	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.