

121008-
1

긴급방역
용 식물
기반
아프리카
돼지열병
(ASF)
단백질
백신 항원
뱅크 개발

최
종
보
고
서

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004163-01

긴급방역용 식물 기반 아프 리카 돼지열병(ASF) 단백질 백신 항원 뱅크 개발

2022.09.14

주관연구기관 / (주)바이오엠플

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “긴급방역용 식물 기반 아프리카 돼지열병(ASF) 단백질 백신 항원뱅크 개발”(개발기간 : 2021.04.01 ~ 2022.03.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.09.14

주관연구기관명 : (주)바이오엠플 (대표자) 손은주



주관연구책임자 : 강향주

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

<첨부2> 최종보고서 표지 및 요약서(관리기준 별지 제 17호 참조)

최종보고서						보안등급		
						일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]		
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명			
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)	가축질병대응기술개발사업			
공고번호	제농축 2021-23호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
				연구개발과제번호	121008-1			
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	70%	LA9999	20%	LB9999	10%	
	농림식품과학기술분류	RB0201	70%	AA0399	20%	CA0106	10%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문							
	영문							
연구개발과제명	국문	긴급방역용 식물 기반 아프리카 돼지열병(ASF) 단백질 백신 항원 뱅크 개발						
	영문	Development fo antigen bank for plant based recombinant african swine fever vaccine						
주관연구개발기관	기관명	(주)바이오엠플		사업자등록번호	506-81-76875			
	주소	(우)37668 경북 포항시 남구 지곡로 394 포항테크노파크 내 바이오엠플		법인등록번호	171711-0095230			
연구책임자	성명	강항주		직위	이사			
	연락처	직장전화		휴대전화				
		전자우편		국가연구자번호				
연구개발기간	전체	2021. 04. 01 - 2022. 03. 31(12개월)						
	단계	1단계	2021. 04. 01 - 2022. 03. 31(12개월)					
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원	기관부담		그 외 기관 등의 지원금		합계		연구개발비 외 지원금
	연구개발비	연구개발비	지방자치단체	기타()				
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계	400,000	13,340	120,060			413,340	120,060	533,400
1단계	1년차	400,000	13,340	120,060		413,340	120,060	533,400
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		
공동연구개발기관						역할	기관유형	
위탁연구개발기관								
연구개발담당자 실무담당자	성명	박민희		직위	과장			
	연락처	직장전화		휴대전화				
		전자우편		국가연구자번호				

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

2022 년 9 월 14 일

연구책임자: 강 항 주

주관연구개발기관의 장: 손 은 주

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	가축질병대응기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)	검역방역기술			연구개발과제번호		121008-1	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	70%	LA9999	20%	LB9999	10%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	70%	AA0399	20%	CA0106	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	긴급방역용 식물 기반 아프리카 돼지열병(ASF) 단백질 백신 항원뱅크 개발						
전체 연구개발기간	2021.04.01.~2022.03.31.						
총 연구개발비	총 533,400 천원 (정부지원연구개발비: 400,000 천원, 기관부담연구개발비 : 133,400 천원, 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(5)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	자유공모						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		안전하고 효과적인 ASF 그린백신을 위한 식물기반 ASF 재조합 단백질 항원 뱅크 개발 1. 경제성 확보를 위한 ASF 항원 발현 벡터 개선 2. 식물기반 ASF 백신항원의 면역원성 검증 3. 식물기반 ASF 백신항원 조합에 따른 방어능 확인				
	전체 내용		1. 경제성 확보를 위한 ASF 항원 발현 벡터 개선 •ASF 항원 고발현 벡터 개발 •유효성 있는 항원의 융합벡터 개발 •ASF 항원 단백질 생산 2. 식물기반 ASF 백신항원의 면역원성 검증 •ASF 항원의 체액성, 세포성 면역반응 확인 3. 식물기반 ASF 백신항원 조합에 따른 방어능 확인 •ASF 항원 조합 후보백신의 방어능 확인용 공격접종 실험 •ASF 항원 최소조합 설정을 위한 공격접종 실험				
	1단계 (해당 시 작성)	목표					
		내용					
	n단계 (해당 시 작성)	목표					
내용							
연구개발성과	가. ASF 항원 고발현 벡터 개발 - ASFV 14개 항원 유전자 확보 및 식물 발현벡터 개발 완료 나. 유효성 있는 항원의 융합벡터 개발 - ASFV 외막에 존재하는 단백질인 Lectin과 CD2v가 융합된 발현 벡터 개발 완료 다. ASF 항원 단백질 생산 - 각 항원의 분리정제 기초공정 개발 완료 - 면역반응 확인을 위한 마우스 실험 및 공격접종실험을 위한 단백질 생산 라. ASF 항원의 체액성, 세포성 면역반응 확인 - 6종의 식물기반 ASF 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역반응 여부 확인함						

	<p>마. ASF 항원 조합 후보백신의 방어능 확인용 공격접종 실험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5종 항원 각테일 백신과 9종 항원 각테일 백신의 접촉감염모델 공격접종실험 수행 - 백신접종 돼지에서의 체액성 면역반응 확인 - 5종 항원 각테일 백신의 접촉감염을 막을 수 있는 방어능 확인 <p>바. ASF 항원 최소조합 설정을 위한 공격접종 실험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최소 백신 항원을 찾기 위해 5, 3, 2 항원 각테일 백신 및 신규 항원의 효과를 확인하기 위한 공격접종실험 수행 - 공격접종 실험 방법(공격접종 바이러스 양 조정, 체온측정방법, 접촉감염 여부의 확인 등)에 대한 사전 연구가 필요함 												
<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>- 연구개발성과의 활용방안</p> <ul style="list-style-type: none"> •본 연구과제를 통하여 아프리카 돼지열병 방어에 필수적인 항원 종류와 항원량 비율을 확인하여 향후 경제성 확보 및 극대화를 위한 fusion 항원 개발에 활용함 •과제 연구성과를 기본으로 2023년 국내 백신 허가 신청 시, 전임상 결과로 적극 활용 가능함 •논문 발표를 통하여 기술력을 알리고 해외시장 진출 기회를 만들고자 함 <p>- 연구개발성과의 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> •세계 최초 식물기반 아프리카 돼지열병 백신 개발을 기대할 수 있음 •점진적으로 남하하고 있는 아프리카 돼지열병 발생 피해가 예상되는 긴급상황에서 농가에 신속하게 공급, 사용 가능한 항원 बैं크 구축이 가능함 •재조합 단백질 백신 사용시, 야외 감염과 감별 가능한 감별 진단법 개발을 기대할 수 있음 												
<p>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</p>													
<p>연구개발성과의 등록·기탁 건수</p>	<p>논문</p>	<p>특허</p>	<p>보고서 원문</p>	<p>연구 시설·장비</p>	<p>기술 요약 정보</p>	<p>소프트웨어</p>	<p>표준</p>	<p>생명자원</p>		<p>화합물</p>	<p>신품종</p>		
		<p>1</p>	<p>1</p>					<p>생명 정보</p>	<p>생물 자원</p>		<p>정보</p>	<p>실물</p>	
<p>연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</p>	<p>구입 기관</p>	<p>연구시설·장비명</p>	<p>규격 (모델명)</p>	<p>수량</p>	<p>구입 연월일</p>	<p>구입가격 (천원)</p>	<p>구입처 (전화)</p>	<p>비고 (설치장소)</p>				<p>ZEUS 등록번호</p>	
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>아프리카 돼지열병</p>		<p>재조합 단백질</p>	<p>백신</p>	<p>항원 बैं크</p>	<p>그린 백신</p>							
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>African swine fever (ASF)</p>		<p>recombinant protein</p>	<p>vaccine</p>	<p>Antigen bank</p>	<p>green vaccine</p>							

< 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

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발과제의 필요성

(1) 아프리카 돼지열병 바이러스

- *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 작년 9월 독일에서 야생멧돼지 감염 사례가 확인된 바 있음.
- 2018년 8월 중국 랴오닝 성에서 처음 발생한 이후 그해만 7억 마리 돼지를 살처분 한 바 있고, 현재까지 직접적인 피해금액은 170조 원으로 그 피해 금액은 천문학적임.

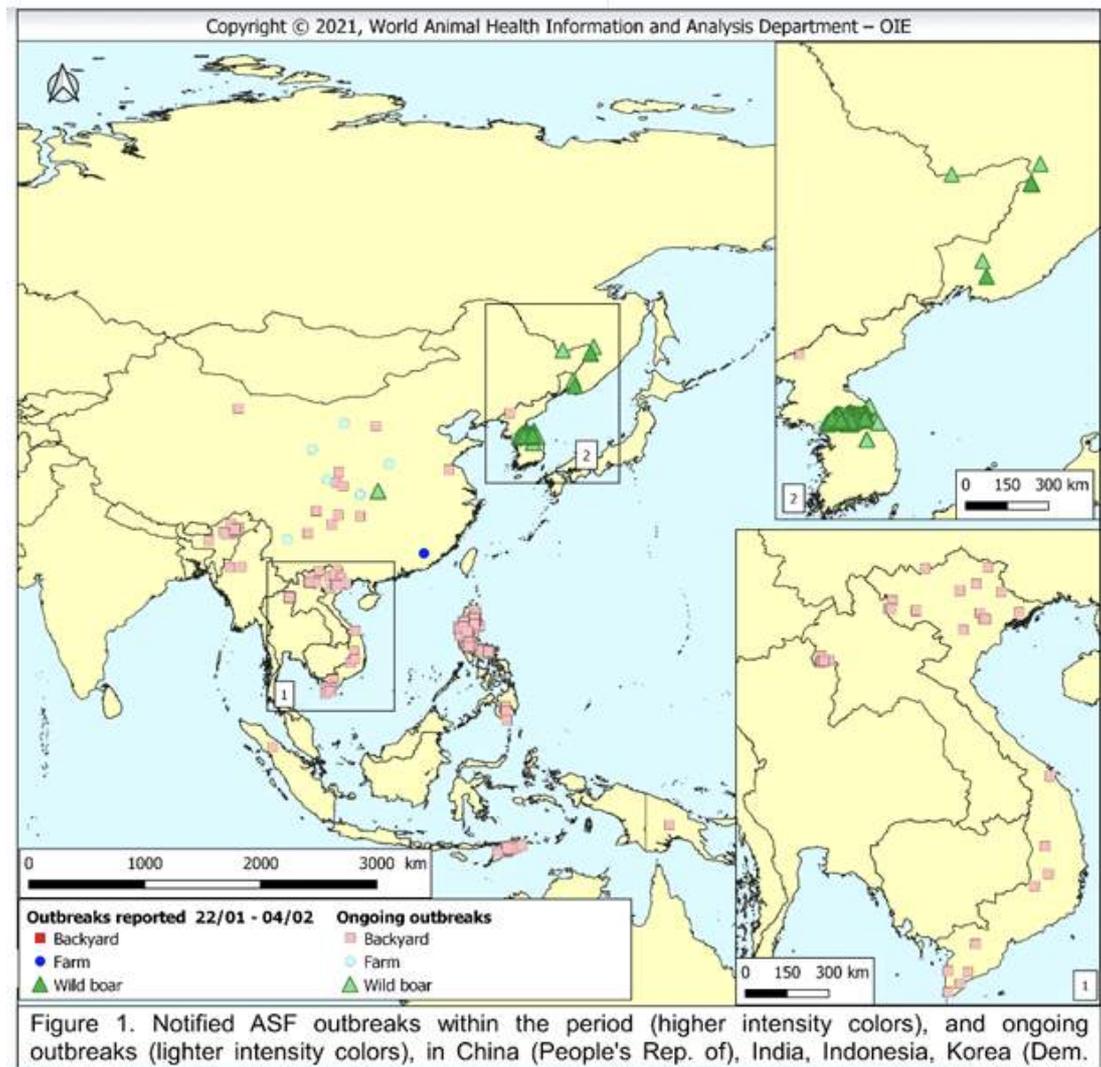


그림 1. 동아시아 ASF 발생현황

- 지난해 10월 이후 잠잠하였지만 지난 1월 중국 남부 광둥성에서 다시 발생하여 방역당국을 긴장시키고 있음.

(3) 국내 아프리카 돼지열병 발생

- 2019년 5월 북한 자강도에서 첫 발생이 확인되었고, 이후 9월 경기도 파주를 시작으로 경기 북부, 인천 강화지역을 중심으로 발생됨. 이후 경기 강원 북부 지역 야생멧돼지 폐사체에서 아프리카 돼지열병 바이러스가 검출되어 국내 유입에 대한 우려는 여전히 남아 있음.
- 2020년 10월 강원도 화천의 양돈농장에서 발생이 확인되었고, 2월 들어 강릉/춘천권내 멧돼지에서 신규 발생이 확인되고 있고 2월 15일 기준 총 1천 75건이 발생하였음.

○ 발생현황 지도

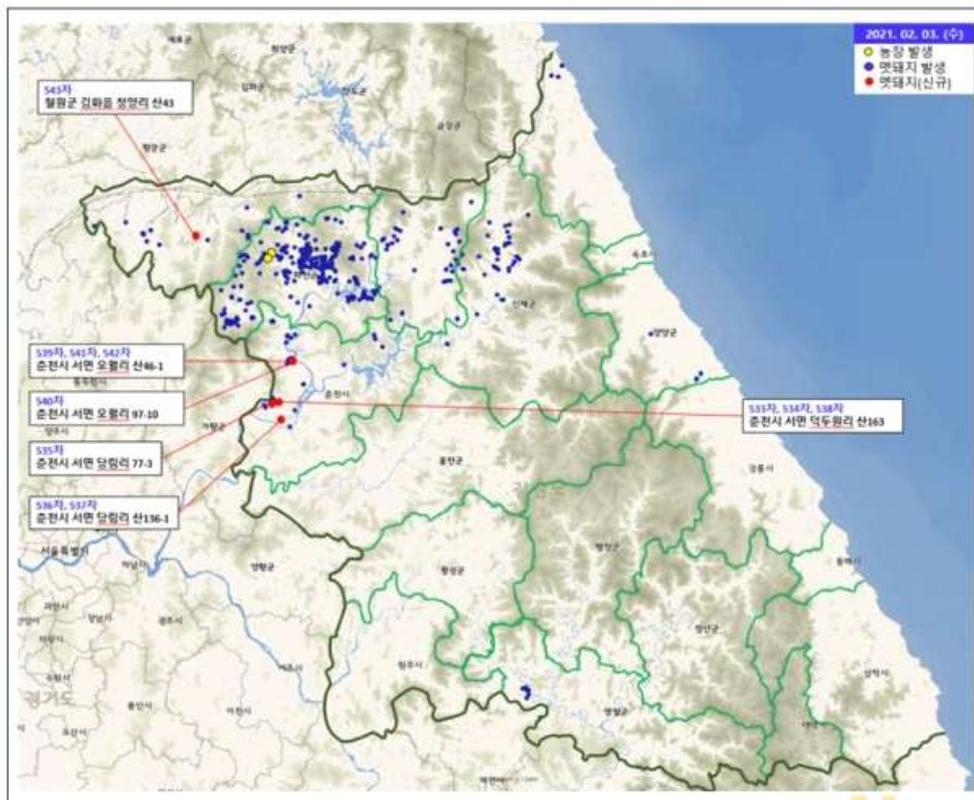


그림 2. 국내 ASF 발생현황 지도

(4) 아프리카 돼지열병 백신 개발 진행 현황

- 백신 개발이 활발하게 진행되고 있지만 현재까지 개발에 성공한 백신 제품은 없음.
- 면역반응이 복잡하고 현재까지 중화항체가 분석 방법이나 중화항체와 방어력간의 상관관계가 명확하지 않음.
- 방어에 효과적인 면역반응은 항체반응과 NK(natural killer) cell과 더불어 CD8+ 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 백신 개발이 진행 중이며 베트남과 중국에서 야외임상을 수행하고 있음.
- 영국 Pirbright 연구소에서 아데노바이러스와 MVA에 항원 유전자를 탑재한 백신 후보물질이 100% 방어력을 보인다는 보고가 있음.

(5) 아프리카 돼지열병 백신 개발 고려사항

- (유전자 편집) 생백신 안전성:
 - 생백신 접종으로 인한 부작용(독성 및 전파)이 없어야 함. 생백신의 경우, 돌연변이나 유

전자 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.

(6) 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 백신개발에 바이러스 공격접종 실험을 통한 방어효과 분석이 필수적으로 필요함.
- 식물 기반 재조합 서브유닛 백신의 경우, 생백신과는 달리 바이러스 배출이나 돌연변이 출현에 대한 우려가 근원적으로 차단됨. 또한 초기비용 및 세포배양비용이 비싼 동물세포 발현 재조합 백신에 비해 식물발현으로 경제적으로 생산이 가능할 것으로 예상함. 또한 형질전환식물이 아닌 임시발현을 통한 생산으로 식물재배부터 항원단백질 획득까지 약 7주의 짧은 시간이 소요됨.
- 현재 국내에서 아프리카 돼지열병 바이러스 공격접종을 위한 시설을 준비하고 있는 상황으로 시설 완공 전까지는 해외에서 공격접종 시험을 수행하여 백신 효능을 검증하여야 함.
- 본 연구팀은 러시아 연방바이러스미생물연구소와 미국 캔사스 주립대와 함께 공격접종 실험을 위한 네트워크를 구축하였고, 최근 미국에서 공격접종 실험에 착수한 상태라 본 과제를 통하여 체계적이고 신속한 연구가 절실하게 필요한 상황임.

2) 연구개발과제의 최종 목표

- 최종 목표: 안전하고 효과적인 ASF 그린백신을 위한 식물기반 ASF 재조합 단백질 항원뱅크 개발
 - 경제성 확보를 위한 ASF 항원 발현 벡터 개선
 - 식물기반 ASF 백신항원의 면역원성 검증
 - 식물기반 ASF 백신항원 조합에 따른 방어능 확인

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구개발과제의 추진전략 및 방법

- 식물기반의 ASF 재조합 단백질 백신을 위한 항원뱅크 개발은 1 항원 유전자 확보 및 발현 벡터 개발, 2 분리정제를 통한 항원 생산, 3 항원별 면역원성 검증 및 항원조합에 따른 방어능 평가로 나뉨.
- 항원 유전자 확보 및 발현 벡터 개발
 - 연구팀이 현재 13종의 ASF 항원 유전자를 *N. benthamiana*에 코돈 최적화된 서열로 확보 중. 문헌조사를 통해 좋은 백신 후보항원이 확인되면 마찬가지로 유전자 합성을 통해 확보 계획.
 - 연구팀은 식물 임시발현 벡터를 이미 확보하고 있음. 해당 벡터는 자체개발된 벡터로 특허출원 되어있으며 특허 이슈는 없을 것으로 판단됨. 또한 연구내용으로 제시된 세포소기관 타겟팅 기술이나 인간 샤페론 등도 연구팀이 이미 보유하고 있는 기술로서 ASF에 적용할 예정임
 - 항원 융합벡터는 방어능 평가에서 5종 항원접종 그룹과 9종 항원접종 그룹의 결과를 확인한 후 어떤 항원들을 조합하여 융합벡터를 제작할지 결정할 계획임

- 분리정제를 통한 항원 생산
 - 현재 연구팀은 1주일에 약 2000주의 식물을 재배 및 임시발현시킬 수 있는 시설을 갖추고 있음. 또한 분리정제 공정 개발 및 항원 생산을 위한 기술과 시설을 이미 확보함.
- 항원별 면역원성 검증 및 항원조합에 따른 방어능 평가
 - 연구팀은 포항 테크노파크의 동물사육시설을 활용하여 마우스, 랫드, 기니픽 등의 소동물을 대상으로 실험을 진행하고 있음. 본 연구과제에 해당하는 항원 면역원성 검증시험도 마찬가지로 진행될 계획임.
 - ASF 백신의 방어능 평가를 위해서는 반드시 목적동물인 돼지에 ASFV를 공격접종하여야 함. 공격접종을 위해서는 BSL-3 시설이 필요하며 이를 위해 미국 캔사스 주립대의 Jishu Shi 교수와 ASF 그린백신 개발을 위해 기밀유지 협약을 맺은 바 있고 추가적으로 공격접종실험을 수행하기 위한 research agreement 계약을 맺고 공격접종실험이 예정되어 있는 상태임. 결과 확인 후 최적의 항원 조합을 찾기 위한 추가적인 실험도 캔사스 주립대에서 수행할 예정임.

2) 연구내용

(1) 경제성 확보를 위한 ASF 항원 발현 벡터 개선

가. ASF 항원 고발현 벡터 개발

○ 본 연구팀은 몽고 등에서 ASF가 발병한 2017년부터 관련연구를 시작여 문헌조사를 통해 알려진 putative vaccine antigen 유전자 서열을 지속적으로 확보하고자 하였으며 선행연구를 통해 현재 아시아에서 유행하는 strain과 같은 유전형인 Georgia 2007/1 strain의 유전자를 총 13종 확보하였고 식물에서의 발현을 위한 벡터를 제작한바 있음. 본 연구과제에서는 연구팀이 보유한 다양한 벡터 시스템에 ASF 항원 유전자들을 적용하여 각 항원별로 최고의 발현을 나타내는 벡터를 개발하고자 함. 특히 중요항원으로 여겨지는 major capsid protein 인 p72의 발현수준이 매우 낮았으므로 p72를 다양한 형태의 벡터로 제작하여 test함

○ p72를 각각 소포체, 엽록체, 세포질로 타겟팅 되는 벡터를 제작하고 각 벡터의 발현수준을 확인함. 그림 3에서와 같이 His-tagging된 p72는 소포체 타겟팅 벡터인 NB:p72:Fol:8H만이 western blotting에서 약하게 단백질 band가 확인될 정도이며 엽록체나 세포질로 타겟팅 된 Rbc-p72:H나 13-p72:H는 western blotting에서 예상되는 위치에서 단백질이 검출되지 않음

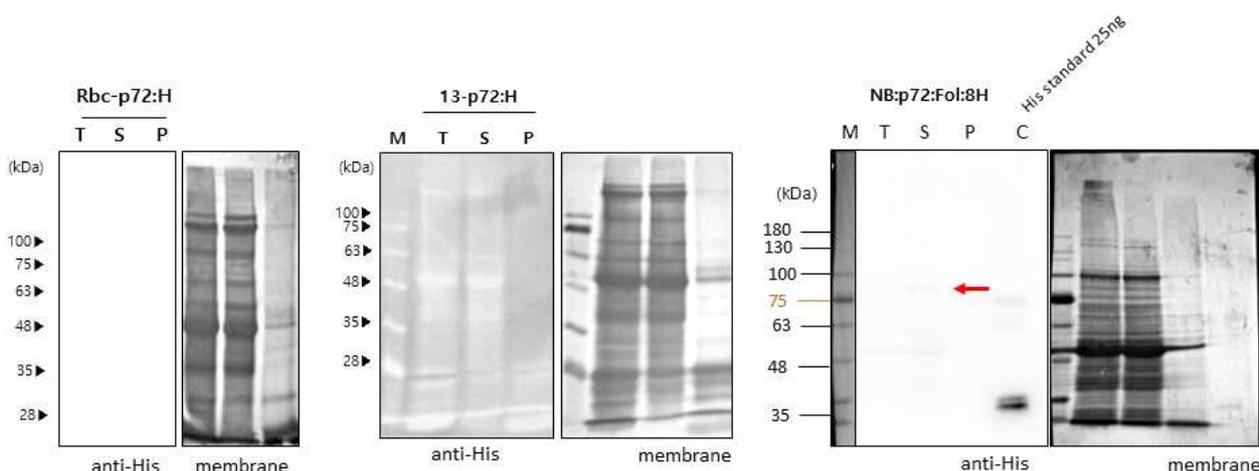


그림 3. p72의 세포소기관 타겟팅별 발현 확인(순서대로 엽록체, 세포질, 소포체)

○ p72의 발현수준을 향상시키기 위한 다른 방법으로 자체 연구에서 융합단백질의 안정화를 통해 발현수준을 향상시키는 역할이 있는 것으로 확인된 cellulose binding domain(또는 module; CBD/CBM3)을 p72에 융합한 벡터를 제작함. 샤페론과 같이 발현시키지 않는 경우 거의 발현확인되지 않았던 p72가 CBD 또는 CBM3를 p72에 융합한 벡터 단독으로 발현시켰을 때도 western blotting에서 발현되는 것이 확인됨(그림 4)

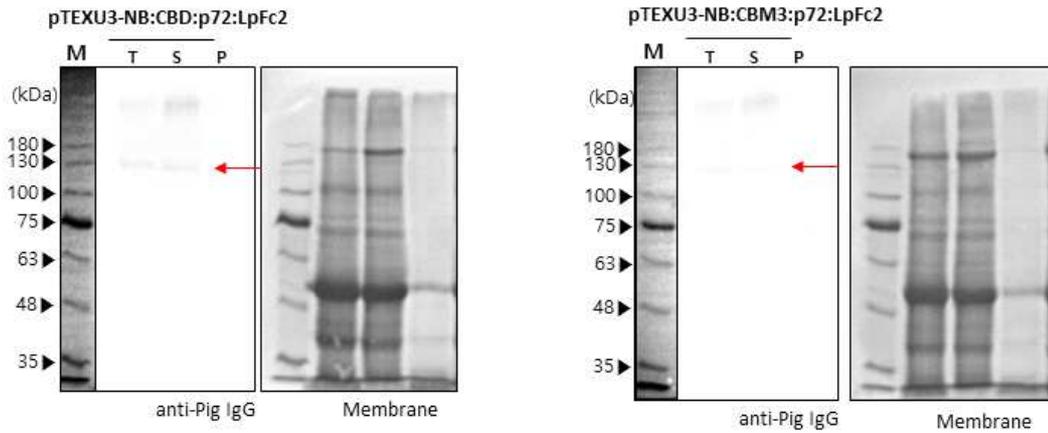


그림 4. CBD 또는 CBM3가 융합된 p72 벡터의 발현확인

○ p54의 경우는 기존에 제작한 p54dTM:pFc2의 stability가 매우 낮아 예상되는 단백질 보다 작은 크기의 단백질들이 majority로 관찰됨. 자체 연구결과 중 pFc2의 N-terminus에 적절한 peptide linker를 연결하면 단백질 발현수준이 증가한 경험이 있어 이를 p54에 적용한 결과 p54dTM:pFc2보다 p54dTM:LpFc2가 더 높은 안정성을 가지는 것으로 확인됨(그림 5).

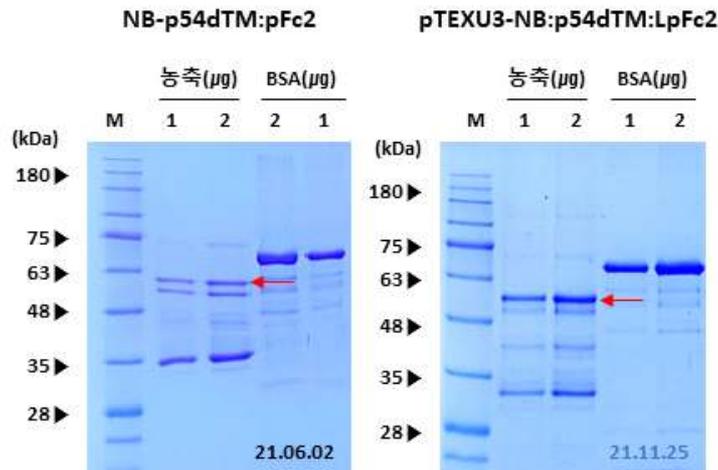


그림 5. p54dTM:LpFc2의 stability 향상(전체 단백질에서 full-length단백질의 비율 증가)

○ 다른 연구팀의 결과 중 I177L 유전자가 제거된 virus가 백신 후보주로 연구되고 있음 (USDA ARS Dr. Borca 연구팀). 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았으나 I177L유전자가 없는 바이러스를 감염시켜도 돼지가 발병하지 않고 이후 WT 바이러스를 감염시켜도 방어가 됨. 이에 착안하여 pI177L 에 대한 면역반응을 미리 일으켜 놓으면 이로 인해 이후 감염된 바이러스의 독성이 완화되어 백신에 긍정적인 역할을 할 것으로 생각하고 I177L 유전자를 확보하고자 함. I177L 유전자 서열을 확보하고 N. benthamiana에 맞게 codon-optimization하여 DNA를 합성하고 식물발현벡터에 클로닝함. His-tagging된 NB:I177L:L10H는 His특이적인 단

백질 band가 확인되지 않았고 Fc를 tagging한 NB:I177L:LpFc2는 발현수준이 높지는 않지만 50 kDa 부근에서 특이적 band를 확인할 수 있었음(그림 6).

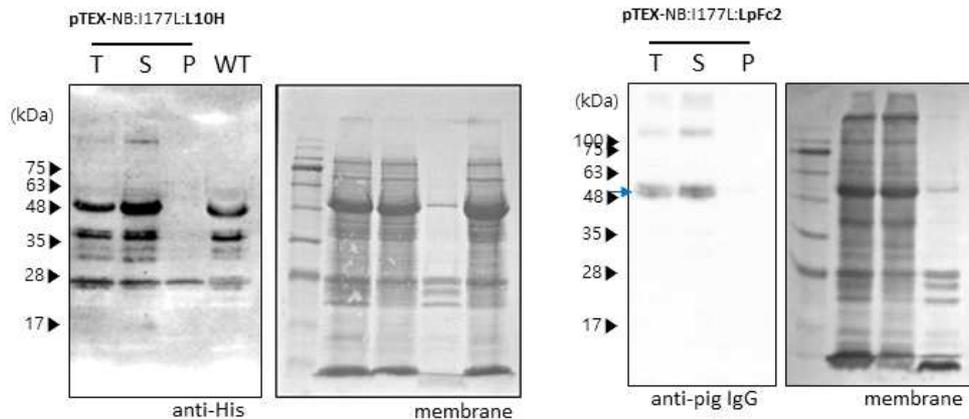


그림 6. I177L 유전자의 발현(His-tag/Fc-tag) 확인

나. 유효성 있는 항원의 융합벡터 개발

○ 보유 항원 유전자 중 바이러스의 중화에 중요할 것으로 여겨지는 항원은 ASFV 외막에 존재하는 CD2v와 Lectin임. 그리고 ASFV가 가지고있는 단백질 중 가장 많은 양을 차지하는 major capsid 단백질인 p72와 I177L까지 총 4종의 유전자를 조합한 융합벡터를 제작하고자 하였음. 2개의 항원이 융합된 벡터를 제작할 때 2개중 1개는 반드시 CD2v 또는 Lectin이 포함시켰으며 융합되는 순서도 상이하게 디자인하여 총 10개의 융합벡터를 제작함. 이전 construct의 구조에서 가장 효과적이었던 소포체 타겟팅되는 Fc 융합벡터에 융합된 항원1/2 유전자를 삽입함. 10개의 융합벡터 중 CD2v와 Lectin이 융합된 벡터는 발현되었으며 Lectin:CD2vN 순서로 융합된 경우 발현수준이 더 높았음(그림 7). I177L이 포함된 융합벡터 중 Lectin과 융합된 벡터는 발현확인되었으나 CD2vN과 융합된 경우 발현수준이 매우 낮거나(I177L:CD2vN) 발현되지 않음(CD2vN:I177L) (그림 8). 반면 p72가 융합된 벡터는 발현되지 않음.

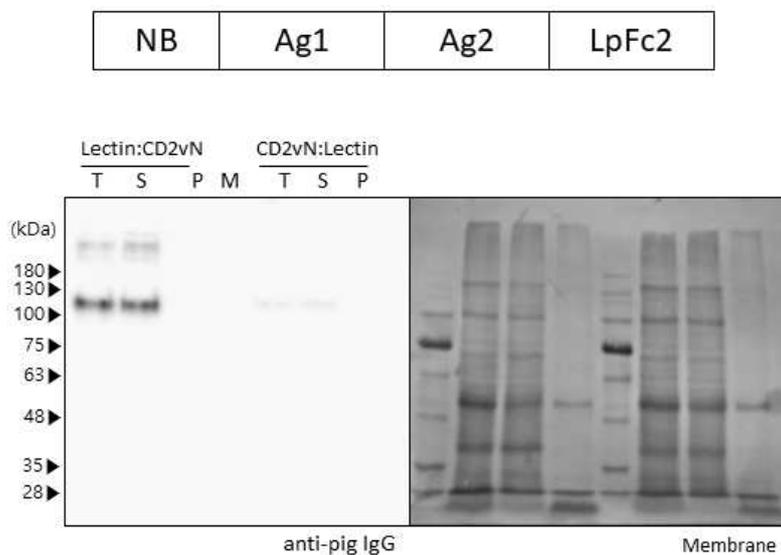


그림 7. 융합벡터의 구조(상), Lectin-CD2vN융합벡터의 발현확인

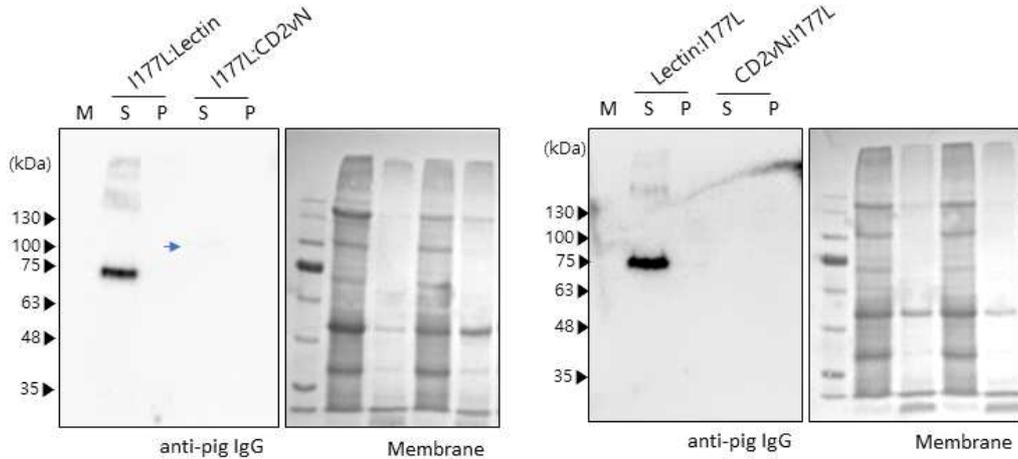


그림 8. I177L이 포함된 융합벡터의 발현확인

다. ASF 항원 단백질 생산

○ 선행연구를 통해 중요 백신 후보항원들에 대한 분리정제 공정은 이미 개발되었음. 그 외 항원들도 기보유한 벡터들과 비슷한 구조로 Fc를 융합하였거나 His를 융합하였기 때문에 같은 공정으로 분리정제 공정을 개발함. 14개의 항원 중 p30을 제외한 항원들은 모두 pFc2가 융합된 구조의 벡터가 최종발현벡터로 결정되었으며 p30은 His가 융합된 NB-p30:His가 선정됨.

○ 식물에서 단백질 생산공정은 크게 단백질을 발현하는 식물을 생산하는 상부공정과 식물로부터 단백질을 분리정제하는 하부공정으로 나뉨. 상부공정은 유전자를 주입한 WT 식물의 재배로부터 시작하여 유전자를 주입한 후 식물을 수확하는 단계로 WT 식물이 적절한 상태로 자라면 벡터가 형질전환된 Agrobacteria를 배양하고 Agrobacteria를 식물 조직내로 침투 시킴(vacuum transient expression). 일정시간(약 4일)후에 식물의 잎을 수확함. 하부공정은 수확된 잎의 파쇄 및 단백질 추출로부터 chromatography에 의한 분리 후 농축, 제균, formulation으로 이루어짐. pFc2가 융합된 단백질은 chromatography의 레진으로 protein A가 사용되며 his가 융합된 단백질은 Ni레진이 사용됨.

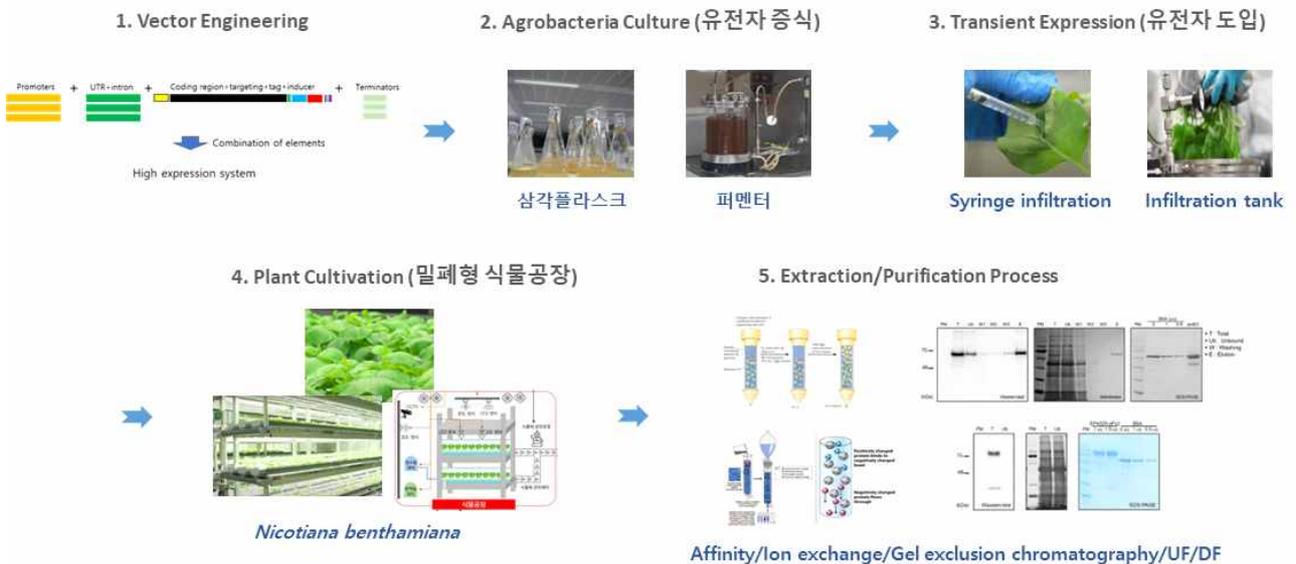


그림 9. 식물에서의 단백질 생산 모식도

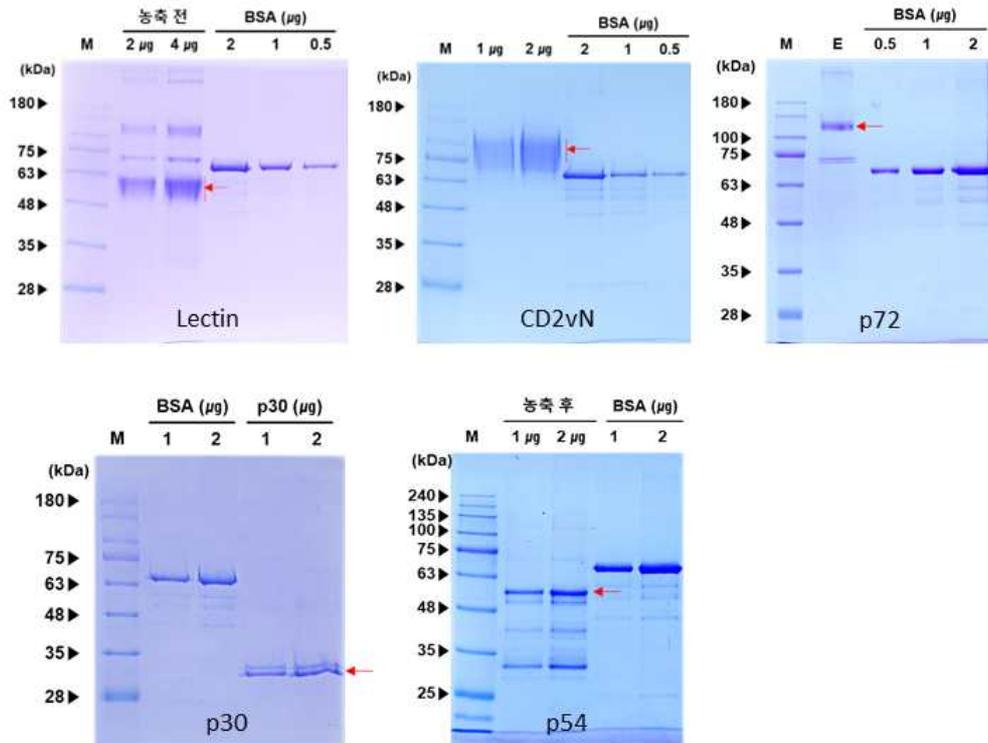


그림 10. 5종 항원(Lectin, CD2v, p72, p30, p54)의 분리정제 후 SDS-PAGE를 통한 확인

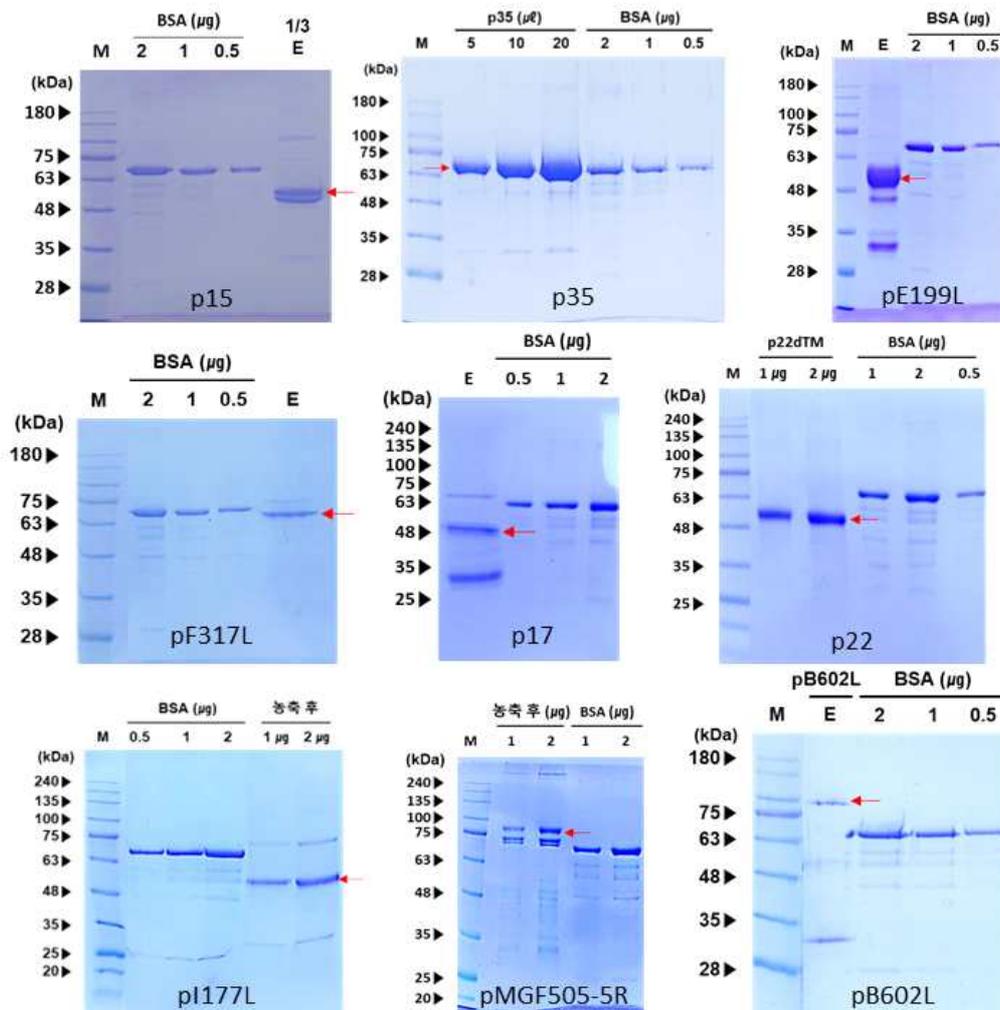


그림 11. 9종 항원의 분리정제 후 SDS-PAGE를 통한 확인

- 총 14종의 항원단백질의 분리정제 후 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과를 그림 10와 11에서 나타냄. 그림 10은 방어능 평가에서 사용한 5개 항원의 분리정제 결과이며 그림 11은 그 외에 확보한 9종 항원의 분리정제 결과임. 항원별로 발현의 고저의 차이가 있으며 이에 따른 단백질 분리정제 후 생산량의 차이가 있음. 동시에 단백질의 순도에도 영향을 미침. Lectin이나 CD2v와 같은 단백질은 다수의 N-glycosylation site들이 glycosylation됨에 따라 명확한 1개의 단백질 band로 나타나지는 않음. 그리고 일부 항원(p54, p17 등)은 낮은 stability에 의한 것으로 보이는 cleavage 패턴들도 관찰됨.
- 선행연구와 본 연구과제를 통해 구축된 식물기반 ASF 항원뱅크를 구성하는 유전자, 발현 벡터 및 생산성등을 표 1을 통해 종합적으로 정리하여 나타냄.

표 1. 식물기반 ASF 항원 뱅크

ASFV-G Ag (ORF)	식물 발현 벡터	식물 1kg당 항원량 평균(mg/kg)
lectin (EP153R)	pTEX-NBM:CD2vN:pFc2	36.18
CD2v (EP402R)	pTEX-NBH1:Lectin:pFc2	46.7
p72 (B646L)	pTAF-BiP:p72:pFc2	12.5
p54 (E183L)	pTEXU3-NB:p54dTM:LpFc2	82.4
p32;p30 (CP204L)	pTEX-NB:p30:His	27.9
p15 (CP530R)	NB-p15:pFc2	98.6
p35 (CP530R)	NB-p35:pFc2	116
pB602L (B602L)	NB-B602L:pFc2	2
p17 (D117L)	NB-p17dTM:pFc2	95
p22 (KP177R)	NB-p22dTM:pFc2	72
pE199L (E199L)	NB-E199L:pFc2	70.3
pF317L (F317L)	NB-F317L:pFc2	20.79
pMGF505-5R (MGF505-5R)	NB-MGF505-5R:pFc2	4.67 (농축전 31.3)
pI177L (I177L)	pTEXU3-NB:I177L:LpFc2	6.75

(2) 식물기반 ASF 백신 항원의 면역원성 검증

가. ASF 항원의 체액성, 세포성 면역반응 확인

- 본 연구팀은 선행연구에서 8종에 대한 면역원성을 마우스 실험을 통해 확인한 바 있음. 본 연구과제에서 나머지 6종 항원에 대한 면역원성을 확인함.
- BALB/c 마우스 3마리씩으로 구성된 시험군 12개군에 pE199L, pF317L, pI177L, p17, p22, pMGF505-5R 6종의 항원 1ug과 5ug을 각각 3주간격으로 2회 접종함. 시험백신은 각 항원 단백질에 방어능평가에서 사용하는 어쥬번트인 SEA-1을 혼합하여 제조함. 2회접종 1주후에 채혈 및 비장을 분리함. 채혈한 혈액은 혈청을 분리하여 체액성 면역반응 분석에 사용하였고 비장은 세포성면역반응 분석에 사용함
- in-house ELISA 방법으로 분석함. 백신에 사용한 항원을 ELISA plate well당 15ng/well로 코팅하고(37C, 1시간) skim milk로 blocking한 후 1:1000으로 희석한 2차접종 1주후의 혈청과 anti-mouse IgG F(ab') 2차항체를 순서대로 37C에서 30분씩 binding 시킨 후 TMB로 발색함. 접종 항원에 pFc2가 융합되어있기 때문에 마우스에서 pFc2에 대한 항체가 형성되었을

가능성이 있고 이를 분석에서 배제하기 위해 같은 양의 pFc2를 코팅하고 같은 방법으로 분석한 OD값을 빼주는 방법으로 normalize함. pE199L, pI177L, pMGF505-5R은 투여량에 관계 없이 높은 항체반응을 나타냄. pF317L, p17, p22는 항원량이 증가함에 따라 OD값이 증가함. 이로 미루어 pE199L, pI177L, pMGF505-5R의 면역원성이 높아 1ug의 양으로도 충분한 면역 반응을 일으키는 것으로 생각됨.

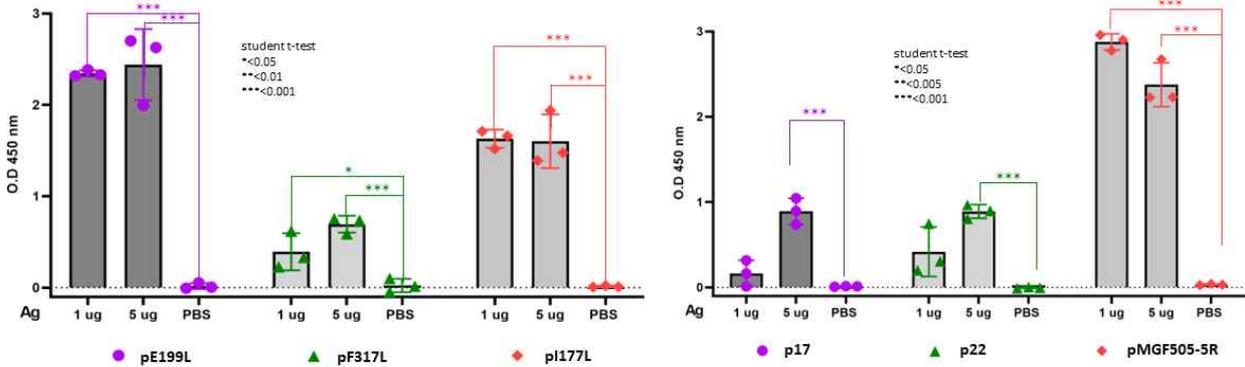


그림 12. 6개 항원의 면역원성(마우스)- 체액성 면역반응

○ 분리된 비장에서 splenocyte를 분리하고 면역한 항원으로 24시간 재자극함. 형광 항체로 staining 후 유세포분석을 통해 각각 CD4+, CD8+ T cell별로 IFN-g를 생성하는 세포의 비율을 측정함. 전체적으로는 각 항원별, CD4/8 T cell 별로 각기 다른 반응 패턴을 나타냄. pE199L과 pF317L은 1ug 투여군에서 PBS투여군 대비 CD8 T cell response가 더 높게 일어나지만 5ug 투여군은 PBS투여군과 큰 차이가 없어 저 항원량에서 더 높은 Th1 반응이 유도됨. 반면에 CD4 T cell은 5ug의 pF317L을 투여한 군에서 높은 IFN-g 생성 세포율을 나타냄.

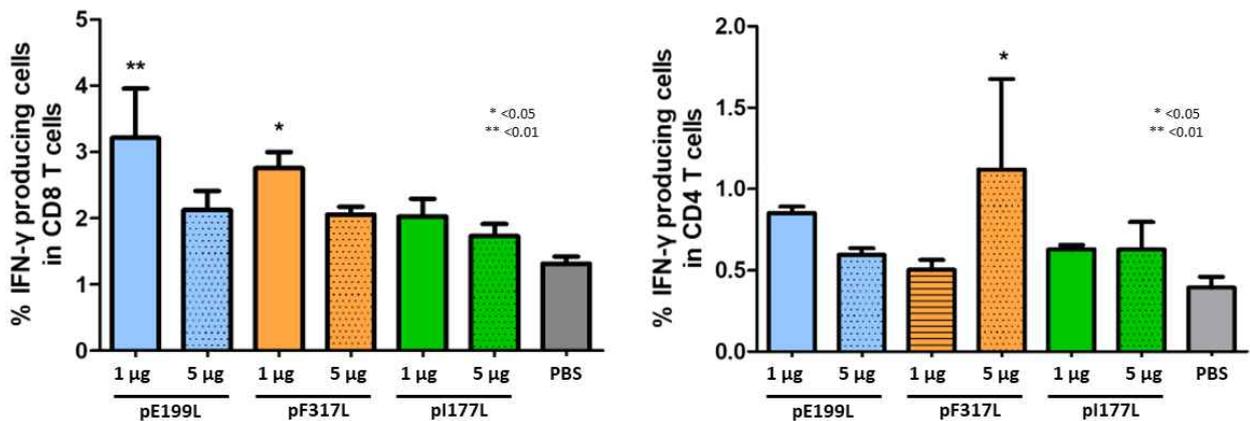


그림 13. 3개 항원(pE199L, pF317L, pI177L)의 면역원성(마우스)- 세포성 면역반응(IFN-g)

○ 다른 3개항원에 대한 실험에서도 pMGF505-5R을 1ug투여한 그룹에서 더 높은 CD8+/IFN-g+ 비율을 보임. p17과 p22는 CD8 T cell에 대해서는 PBS투여군과 큰 차이가 없음. 반면에 CD4+ T cell의 경우 p17은 1ug 투여군이 p22는 5ug 투여군의 반응성이 높았고 pMGF505-5R 투여군은 대조군과 차이가 없음.

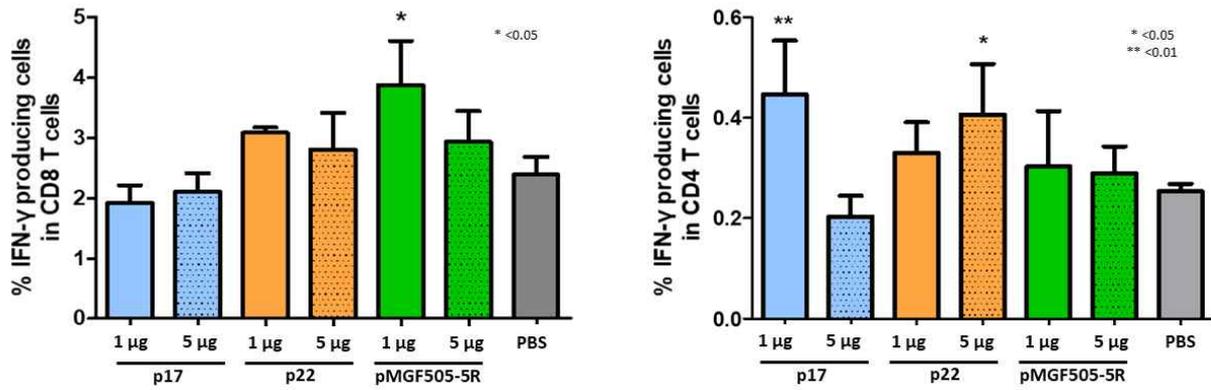


그림 14. 3개 항원(p17, p22, pMGF505-5R)의 면역원성(마우스)-세포성 면역반응(IFN-g)

○ 선행연구부터 본 연구과제까지의 면역반응을 종합하면, 비록 각 항원별로 백신 제조에 사용된 어쥬번트가 상이하고 분석방법이 다르지만 연구팀이 확인한 14개의 항원 중 대부분의 항원은 체액성 면역반응을 일으킨 반면 세포성 면역반응은 pB602L, p54 및 pF317L, p17등의 항원에서 확인됨. 이 결과들을 표 2에서 정리해서 나타냄.

표 2. 식물기반 ASF 항원 은행의 마우스 면역원성

ASFV-G Ag	사용 어쥬번트	체액성 면역(in-house ELISA)	세포성 면역	
			세포성 면역반응	비고
lectin	Seppic Montanide ISA 15A VG	2차투여 2주 후, Y	N	2차투여 2주 후, 혈청 IFN-g ELISA
CD2v		2차투여 2주 후, Y	N	
p72		2차투여 2주 후, N	N	
p54		2차투여 2주 후, N	Y	2차투여 2주 후, 비장 IFN-g ELISA
p30		2차투여 2주 후, Y	N	2차투여 2주 후 혈청 IFN-g ELISA 및 4주 후 비 장 IFN-g ELISA
p15		2차투여 2주 후, Y	N	
p35		2차투여 2주 후, Y	N	
pB602L	2차투여 2주 후, Y	Y	2차투여 2주 후, 비장 IFN-g ELISA	
p17	SEA-1	2차투여 1주 후, Y	N(CD8), Y(CD4)	2차투여 1주 후, 비장 FACS(CD4, CD8 T cell)
p22		2차투여 1주 후, Y	N(CD8), Y(CD4)	
pE199L		2차투여 1주 후, Y	Y(CD8), N(CD4)	
pF317L		2차투여 1주 후, Y	Y(CD8), Y(CD4)	
pMGF505-5R		2차투여 1주 후, Y	Y(CD8), N(CD4)	
pl177L		2차투여 1주 후, Y	N(CD8), N(CD4)	

(3) 식물기반 ASF 백신항원 조합에 따른 방어능 확인

가. ASF 항원 조합 후보백신의 방어능 확인용 공격접종 실험

○ 공격접종실험 디자인

- 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 활용 가능한 시설이 매우 적어 일찍이 러시아 연방 미생물 바이러스 연구소에서 두 차례 실험하였고 2020년 이후에는 미국 캔자스 주립대의 Jishu 교수 연구진에 공격접종실험용역을 진행하고 있음.
- 현재까지 재조합 단백질로 구성된 ASF 백신의 성공사례는 연구단계에서도 없음. 본 연구

진 또한 러시아 연방 미생물 바이러스 연구소에서 2종 또는 4종의 항원 콕테일 백신을 접종하고 근육으로 바이러스를 접종하였을 때 방어효과가 없는 것을 확인한 바 있음. 이에 따라 미국 캔자스 주립대에서 진행한 공격접종실험은 그룹당 6마리에 백신접종을 한 후 2마리에만 근육으로 ASFV를 감염시키고 같이 사육해 전통적인 공격접종방식으로 방어가 안되는 경우 ASFV에 감염된 돼지가 방출하는 바이러스를 접촉을 통해 감염되는 방식으로 디자인하였음. 실제로 농장에서 돼지가 ASFV에 감염될 때 근육으로 대량의 바이러스가 침입될 가능성이 거의 없기 때문에 이 방식은 실제 농장에서의 감염상황을 최대한 모방한 것으로 생각할 수 있음.

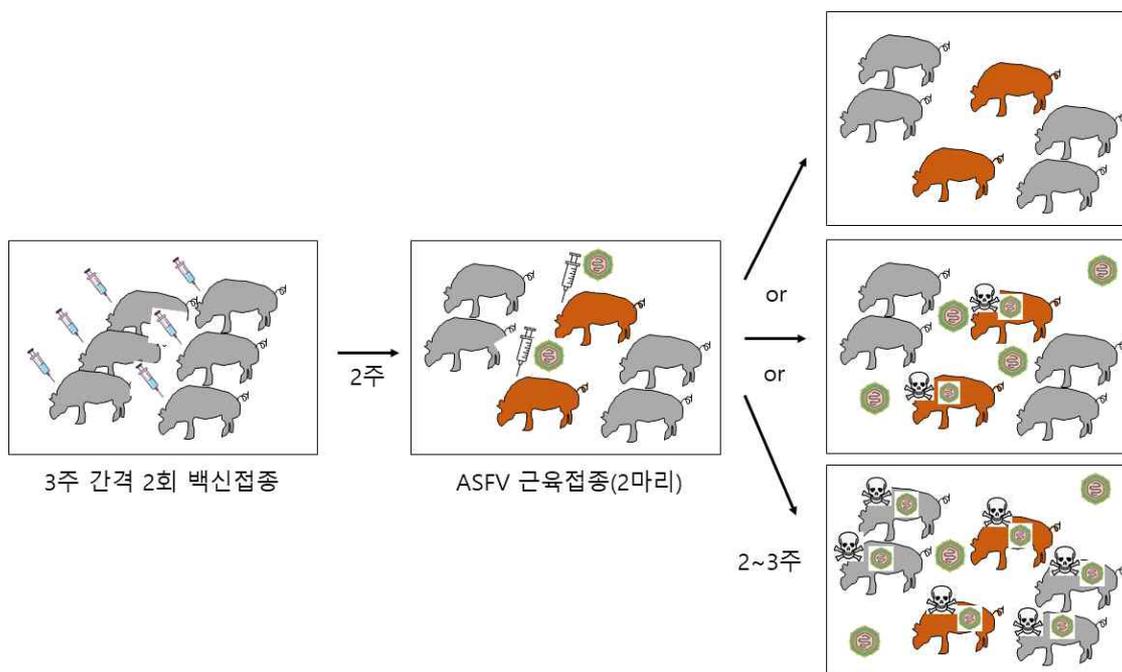


그림 15. 접촉에 의한 공격접종(contact-challenge)실험 모식도

○ 공격접종실험 결과-생존률, 체온, viremia

- 6마리씩 3그룹으로 나눠 그룹1은 5종 항원(Lectin, CD2v, p72, p54, p30) 콕테일 백신, 그룹 2는 9종 항원(그룹1에 p15, p35, pE199L, pF317L 추가) 콕테일 백신, 그룹 3은 PBS 접종 대조군으로 설정함. 백신별 항원량은 각 100ug씩임. 위의 그림 15와 같이 3주 간격으로 2회 접종 2주 후 그룹당 2마리씩 2019년 베트남 분리 ASFV 100 HAD₅₀/ml을 근육접종하고 그룹별로 같이 사육하면서 체온, 체중, 증상, 생존률 등을 관찰하고, 채혈 및 사후 부검 시 조직 채취하여 viremia 및 면역학적 분석을 진행.
- 근육으로 공격접종(ASFV-injected)한 6마리(그룹당 2마리씩)는 모두 공격접종 후 6~9일(DPC6~9)일째 사망함.
- G1의 contact-challenge 경우 4마리 모두 시험기간 중 정상체온이었고 혈중 바이러스 검출 없이(두마리에서 매우 약하게 검출되었으나 detection limit에 근접) 생존함.
- G2의 contact-challenge 경우 3마리 모두 DPC7~8부터 고열이 발생하였고 혈중 바이러스가 검출되었으며 DPC11에 모두 사망함.
- 대조군의 contact-challenge 경우 3마리(1마리는 공격접종 시험 전 사망) 중 한 마리(290)는 사망하였고 한 마리(293)는 DPC14에 상당한 혈중 바이러스가 검출되었으나 사망전에 실험이 종료되었고 나머지 한 마리(291)는 체온변화나 바이러스 검출 없는 상태로 실험 종료시까지 생존함.

Shi 21-36 scheduled Bleed Days: DPC0, DPC3, DPC7, DPC10 and DPC14													POSITIVE CONTROL		Cr	Quantity			
													ASFV plasmid	(10 ⁻¹ ng/ul)	21.14	1,543,118			
													21.24	1,448,220					
	Pig	GROUP	challenge	DPC0		DPC3		DPC7		DPC10		DPC14		Euthanasia					
				Cr	Quantity	Cr	Quantity	Cr	Quantity	Cr	Quantity	Cr	Quantity	Cr	Quantity				
Pen 1	276	Vax grp 1	ASFV-injected	UD		39.84	18.23	Euthanized DPC6						22.09	1,538,103				
				UD		38.82	34.87							22.11	1,524,807				
	UD				UD	UD	22.75	1,007,839	Euthanized DPC8						21.32	1,377,856			
	UD				UD	UD	22.7	1,041,955							21.39	1,325,324			
	277		contact-challenged	UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD				
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD				
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD				
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD				
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD				
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD				
Pen 2	282	Vax grp 2	ASFV-injected	UD		UD	UD	21.61	2,090,308	Euthanized DPC9						20.63	2,090,279		
				UD		UD	UD	21.78	1,871,643							20.64	2,087,051		
				UD		32.52	1,955.65	Euthanized DPC6						22.05	1,576,291				
				UD		32.53	1,949.33							22.05	1,584,292				
	283		contact-challenged	UD		UD	UD	35.97	195	21.05	1,623,685	Euthanized DPC11						20.84	1,843,519
				UD		UD	UD	37.29	88	20.97	1,705,141							20.59	2,154,053
				UD		UD	UD	38.86	34	23.76	316,236	Euthanized DPC11						20.85	1,839,654
				UD		UD	UD	UD	UD	23.74	319,380							20.84	1,844,539
				UD		UD	UD	33.5	870	21.99	920,814	Euthanized DPC11						21.37	1,339,334
				UD		UD	UD	34.16	583	21.96	938,973							21.38	1,334,006
Pen 3	288	PBS	ASFV-injected	UD		36.98	113.44	19.91	3,244,694	Euthanized DPC8						20.34	2,497,416		
				UD		38.97	31.77	19.93	3,203,574							20.42	2,384,711		
				UD		UD	UD	22.21	805,733	Euthanized DPC7						scheduled bleed day			
				UD		UD	UD	22.12	849,056										
	289		contact-challenged	UD		UD	UD	UD	UD	30.97	4,024	Euthanized DPC13						20.98	1,695,203
				UD		UD	UD	UD	UD	30.73	4,638							20.98	1,696,615
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD			
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD			
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD			
				UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD			
290	contact-challenged	UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
291	contact-challenged	UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
293	contact-challenged	UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					
		UD		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD					

CONFIDENTIAL



그림 16. 접촉감염 공격접종모델에서 혈중 viremia 및 생존일

Shi 21-36 Temperature (°C)																	
	Tag#	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	287	288	289	290	291	293
	Group	Vax1-ASF		Vax1				Vax2-ASF		Vax2			PBS-ASF		PBS		
	Pen	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
3/23/21	DPC -2	39.9	39.7	40.4	41.1	40.3	39.9	40.2	40.0	40.1	39.7	39.5	39.7	40.1	40.4	39.8	40.4
3/24/21	DPC -1	39.8	39.9	39.8	40.1	39.8	39.5	39.6	40.3	39.5	39.8	39.5	39.2	39.5	40.0	39.8	39.9
3/25/21	DPC0	39.9	40.4	40.0	40.4	39.8	40.0	39.9	39.9	39.4	39.5	39.4	40.1	39.7	40.0	39.4	39.7
3/26/21	DPC1	39.7	39.6	40.4	40.1	40.2	39.6	40.1	40.2	39.7	39.8	39.4	39.8	40.2	39.4	39.9	40.1
3/27/21	DPC2	39.8	40.1	39.8	40.4	40.3	39.9	39.8	40.0	39.7	40.2	39.3	39.7	40.0	39.8	39.6	40.2
3/28/21	DPC3	40.1	39.9	39.9	40.1	39.3	40.1	40.2	40.3	40.3	40.1	39.7	39.9	39.9	39.8	40.1	40.3
3/29/21	DPC4	41.6	40.1	39.9	40.1	39.8	40.1	40.3	41.6	40.3	40.1	40.3	41.0	39.8	39.4	39.7	39.8
3/30/21	DPC5	41.3	41.1	40.3	40.3	39.7	40.1	42.1	41.7	40.3	40.1	40.1	41.6	40.2	39.8	40.1	40.4
3/31/21	DPC6	41.7	41.5	40.1	39.7	39.5	39.9	41.9	41.4	40.0	39.8	39.8	41.2	42.0	39.7	39.6	40.2
4/1/21	DPC7		41.3	39.8	40.3	39.7	39.5	42.1		39.5	39.9	40.1	42.0	41.9	40.0	39.8	40.1
4/2/21	DPC8		41.9	39.8	40.1	39.7	40.4	41.8		41.3	40.3	41.1	41.6		39.7	39.8	39.8
4/3/21	DPC9			39.6	39.8	39.7	40.3	40.9		41.4	41.5	41.4			39.8	39.7	39.7
4/4/21	DPC10			39.9	39.7	39.7	39.8			40.4	40.9	40.6			40.4	39.7	39.8
4/5/21	DPC11			39.9	39.8	39.8	39.8			41.7	41.3	41.8			40.9	39.7	42.0
4/6/21	DPC12			39.8	39.7	39.4	39.5								41.7	39.9	41.5
4/7/21	DPC13			40.1	39.8	40.0	39.8								41.8	39.8	41.9
4/8/21	DPC14			39.8	39.8	39.3	39.7								39.6	42.1	

그림 17. 접촉감염 공격접종모델에서 체온변화

- 대조군 중 한 마리가 접촉방식으로 감염되지 않은 것으로 보이므로 실험방식 개선의 여지

가 있으나 G1에서 contact-challenge가 2주간 전개체 생존한 것은 해당 시험백신이 농장감염유사모델로 생각되는 본 방어능 실험 디자인에서 방어 효과를 보이는 것으로 생각할 수 있음.

○ 공격접종실험 결과-면역반응

- 접종한 백신이 면역반응이 일으키는지 확인하기 위해 백신에 사용된 자체 항원이 아닌 동물세포에서 만들어진 p30을 이용해서 ELISA를 진행함. 최초접종일부터 1주간격으로 채혈하여 공격접종시점까지 총 6개 time-point의 혈청에서 p30 항체가를 확인한 결과 일부 동물에서는 1차접종 3주후부터 p30 항체가 검출되었고 2차접종 1주후부터는 모든 접종개체에서 p30에 대한 항체반응이 나타남(그림 18). 세포성 면역반응을 확인하기위해 공격접종 전 PBMC를 분리하여 ASFV로 restimulation(18시간)한 후 ELISpot을 통해 IFN-g를 생산하는 PBMC의 수를 측정하였으나 전 군에서 IFN-g spot이 관찰되지 않음.

Group	Pig#	D0			D7			D14			D21			D28			D35		
		Test 1 (OD value)	Test 2 (OD value)	Results	Test 1 (OD value)	Test 2 (OD value)	Results	Test 1 (OD value)	Test 2 (OD value)	Results	Test 1 (OD value)	Test 2 (OD value)	Results	Test 1 (OD value)	Test 2 (OD value)	Results	Test 1 (OD value)	Test 2 (OD value)	Results
Vax grp1	276	0.2721	0.2088	-	0.2746	0.2586	-	0.2516	0.2789	-	0.5226	0.4511	+	3.1136	3.1858	+	2.8028	3.1508	+
	277	0.1359	0.1388	-	0.1626	0.1466	-	0.228	0.2576	-	0.255	0.2349	-	2.8758	3.0219	+	2.9396	3.2546	+
	278	0.1105	0.1193	-	0.1677	0.1529	-	0.3544	0.3834	-	0.602	0.5752	+	2.5633	2.7417	+	2.1961	2.9098	+
	279	0.1341	0.1588	-	0.1749	0.1606	-	0.3099	0.3628	-	0.1451	0.1396	-	1.0112	1.1737	+	1.1756	1.259	+
	280	0.1292	0.1554	-	0.2027	0.1902	-	0.2974	0.3342	-	0.2753	0.2674	-	1.6106	1.8276	+	1.5058	1.439	+
	281	0.0876	0.0973	-	0.1007	0.0959	-	0.231	0.2423	-	0.2921	0.279	-	3.0227	3.1169	+	2.7666	3.1497	+
Vax grp2	282	0.1083	0.1303	-	0.1196	0.1058	-	0.2307	0.2723	-	0.7303	0.6896	+	2.8756	3.1709	+	2.923	2.7956	+
	283	0.2058	0.248	-	0.2547	0.222	-	0.2909	0.304	-	0.3314	0.3424	-	2.7864	2.9812	+	1.9187	2.6282	+
	284	0.1353	0.132	-	0.1566	0.1521	-	0.2239	0.2277	-	0.2347	0.2169	-	1.2558	1.4076	+	1.1363	1.8343	+
	285	0.0914	0.1314	-	0.2078	0.1899	-	0.2053	0.2308	-	0.1623	0.1698	-	0.9757	1.0407	+	1.2979	1.256	+
	286	0.1324	0.1288	-	0.1357	0.1288	-	0.256	0.2538	-	0.1909	0.1848	-	NT	NT	-	NT	NT	-
	287	0.1584	0.1417	-	0.1825	0.1879	-	0.1914	0.1823	-	0.2324	0.2407	-	2.3693	2.4946	+	2.1984	2.2242	+
PBS	288	0.1573	0.1164	-	0.1552	0.165	-	0.1708	0.1802	-	0.1458	0.1185	-	0.1481	0.1217	-	0.1443	0.1751	-
	289	0.1321	0.1272	-	0.1497	0.1592	-	0.2461	0.2336	-	0.1815	0.1698	-	0.1935	0.2202	-	0.3443	0.3361	-
	290	0.1299	0.131	-	0.1797	0.183	-	0.1882	0.2059	-	0.1389	0.138	-	0.2137	0.2397	-	0.2473	0.2666	-
	291	0.1235	0.118	-	0.122	0.1273	-	0.1766	0.1879	-	0.1673	0.1692	-	0.1501	0.1593	-	0.2812	0.2673	-
	292	0.0848	0.0878	-	0.1083	0.1149	-	0.1385	0.145	-	0.2074	0.2059	-	0.1678	0.1887	-	ND	ND	-
	293	0.139	0.1468	-	0.2194	0.2381	-	0.2814	0.2888	-	0.1935	0.2065	-	0.1816	0.2082	-	0.3717	0.338	-
Negative Control		0.1874	0.197		0.1874	0.197		0.1874	0.197		0.1874	0.197		0.1874	0.197		0.1874	0.197	

그림 18. 공격접종 전 p30에 대한 항체반응(동물세포발현 p30을 이용한 in-house ELISA)

나. ASF 항원 최소조합 설정을 위한 공격접종 실험

○ 공격접종실험 디자인

- 1차실험에서 5개항원 각테일 백신의 접촉감염 방어능이 확인되었기 때문에 5개항원을 기준으로 그보다 적은 종류의 항원 각테일 백신이 효과적인지 확인하기 위한 실험을 디자인함. 동시에 앞서 언급한 p177L 단백질을 새롭게 선정하고 p177L의 백신항원으로서의 효능을 확인하기위해 p177L이 포함된 그룹을 포함하여 그룹을 결정함.
- 백신 접종 및 공격접종방법은 1차실험과 동일함. 1차실험에서 PBS 투여 대조군에서 접촉감염돼지 4마리 중 1마리는 미감염으로 생각되고 다른 1마리는 감염되었으나 폐사전에 실험이 종료되었기 때문에 공격접종 후 관찰일을 14일에서 21일로 연장함. 또한 1차실험시 공격접종 후 군별로 같이 사육하였으나 백신의 효능에 따라 접촉감염되는 정도가 다를 가능성이 있어 2차실험에서는 공격접종 돼지 1마리와 접촉감염돼지 2마리씩을 각 군에서 모아 18마리씩 2개의 무리로 구분하여 모아서 사육하면서 관찰함(그림 19).

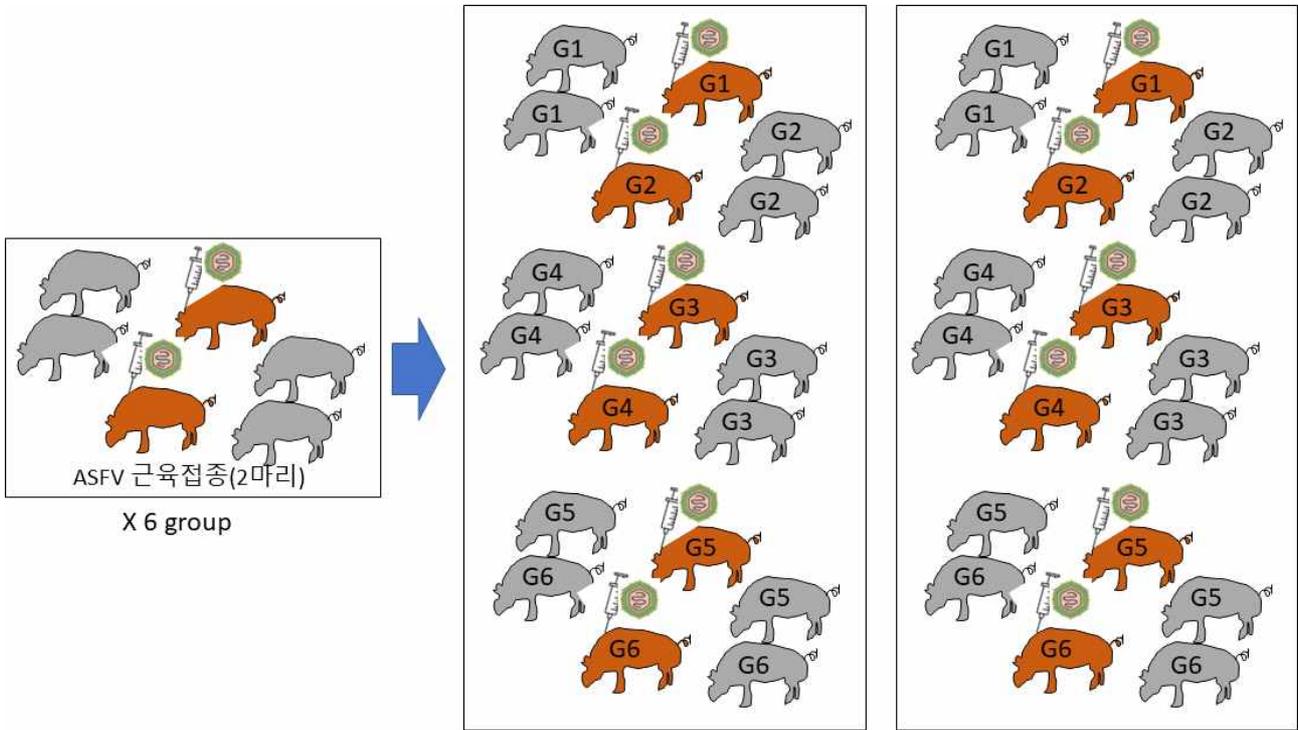


그림 19. 2차 공격접종 모식도

- 백신군은 1차실험에 사용한 5개항원그룹과 5개에서 각각 2개, 3개 항원을 제외한 그룹, 그리고 5개항원 및 2개항원에 pI177L을 추가한 그룹으로 대조군 포함 총 6그룹으로 진행함 (표 3).

표 3. 2차 공격접종실험 시험백신군별 항원조성

	Lectin	CD2v	p72	p30	p54	pI177L
G1	+	+	+	+	+	-
G2	+	+	+	+	+	+
G3	+	+	+	-	-	-
G4	+	+	-	-	-	-
G5	+	+	-	-	-	+
G6	-	-	-	-	-	-

○ 2차공격접종실험 결과

- 1차공격접종실험과 마찬가지로 근육으로 ASFV를 공격접종한 개체들은 모두 8~10일 사이에 폐사함(그림 20).
- 기대한 바와는 다르게 1차공격접종실험에서 확인된 5개항원 각테일 백신군에서도 1마리를 제외한 3마리가 13, 14, 16일째에 폐사함. G2에서는 전 개체가 폐사하였고, G3~G5까지 모두 2마리씩 생존하였음. 심지어 PBS를 투여한 백신 대조군도 2마리가 생존함. 하지만 생존률과는 다르게 모든 개체에서 최소한 한 시점에서는 100 copy이상의 바이러스가 검출됨.
- 특이하게도 생존개체 중 바이러스가 검출되었다가 바이러스 양이 줄어드는 개체들이 발견됨. 예를들어 G3의 484번의 경우 DPC10에 약 4000 copy의 바이러스가 검출되었고 14일때에도 4178 copy가 검출되었으나 18일째 2397 copy, 21일째에는 216 copy로 감소함(그림 20). 그리고 484번 개체는 체중도 DPC3, 7, 10, 14, 18, 21일째 46.5, 54.5, 59, 65, 70, 75로 꾸준히 증가함. 다른 감염개체들은 대부분 감염되어 열이 나면 식욕부진등의 이유로 체중이 늘지 않고 오히려 감소하고 폐사하는 경향이 나타남.
- 체온의 경우 2차 공격접종실험에서는 예상과 달리 전 그룹의 contact challenge 돼지들에

서 고열이 발생하는 것을 확인하고 직장체온측정시 cross-infection의 우려가 있어 11일째 부터 체온 측정을 중단함.

- 1차 실험과 마찬가지로 공격접종 직전에 PBMC를 분리해 IFN-g ELISpot을 수행하였으나 ASFV re-stimulation 여부에 상관없이 spot이 관찰되지 않음.
- 2차 공격접종 실험에서는 1차 실험과는 다른 housing 방법, 매우 많은 동물 개체수 등으로 실험동물의 care가 적절하지 않았던 것으로 추정됨. 이로 인해 직장을 통한 체온 측정시 생긴 상처를 통해 많은 양의 바이러스가 혈액으로 직접 침투했을 가능성이 있을 것으로 생각됨. 이를 해결하기 위해 다음 연구에서는 care 가능한 적절한 동물 마리수와 원격으로 체온을 측정할 수 있는 기기의 사용, 적절한 공격접종 바이러스 용량의 결정 등을 고려할 필요가 있음.

Shi 21-38 Viremia (RT-PCR data) - average values (HAD50/ml) shown

Tag#	DPC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
428	G1-ASF	0			0				13,226			1,917,392											
478	G1-ASF	0		17,855					2,434,734		1,513,771												
426	G1	0		0					0			0				347				4,683			5,321
427	G1	0		0					0			0				1,489			2,714				
476	G1	0		0					0			1,831				1,398,895							
477	G1	0		0					0			5,158			321,542								
429	G2-ASF	0			0				3,574		8,599												
479	G2-ASF	0			3,465				782,247	956,829													
430	G2	0		0					0			115				378,739	1,034,998						
431	G2	0		0					0			0				149,305			3,337,050				
480	G2	0		0					0			1,159			951,352								
481	G2	0		0					0			235				1,182,228							
434	G3-ASF	0			0				9,673,065		3,871,156												
482	G3-ASF	0			117				3,401,358		3,677,737												
432	G3	0		0					0			0				7,030,273	3,814,332						
433	G3	0		0					0			0				1,529,342			1,151,460				
483	G3	0		0					0			0				238					820		155
484	G3	0		0					26			3,985				4,178					2,397		216

Shi 21-38 Viremia (RT-PCR data) - average values (HAD50/ml) shown

Tag#	DPC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
437	G4-ASF	0			0				12,012,265		5,275,324												
485	G4-ASF	0			0				2,556,809		995,707												
435	G4	0			0				0			0				306					2,894		2,480
436	G4	0			0				27			0				3,350				412,464			
486	G4	0			0				0			20,384				2,496,755							
487	G4	0			0				29			586				2,299					2,342		20
440	G5-ASF	0			0				6,089,799		3,590,141												
488	G5-ASF	0			2,842				4,823,779	2,480,061													
438	G5	0			0				0			0				1,483					30,301		15,214
439	G5	0			0				49			0				526,126	2,613,476						
489	G5	0			0				0			66,233				1,454,389							
490	G5	0			0				0			71				1,162					2,155		193
442	PBS-ASF	0			0				2,792,558	1,933,873													
491	PBS-ASF	0			0				4,907,344	5,278,728													
441	PBS	0			0				26			0				790					2,799		220
443	PBS	0			0				0			8,304				2,049,814							
493	PBS	0			0				0			3,954				2,283,806							
494	PBS	0			0				0			0				1,810					1,841		19

그림 20. 2차 공격접종 실험의 혈중 viremia 및 생존일

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

가. ASF 항원 고발현 벡터 개발	- ASFV 14개 항원 유전자 확보 및 식물 발현벡터 개발 완료
나. 유효성 있는 항원의 융합벡터 개발	- ASFV 외막에 존재하는 단백질인 Lectin과 CD2v가 융합된 발현 벡터 개발 완료
다. ASF 항원 단백질 생산	- 각 항원의 분리정제 기초공정 개발 완료 - 면역반응 확인을 위한 마우스 실험 및 공격접종실험을 위한 단백질 생산
라. ASF 항원의 체액성, 세포성 면역반응 확인	- 6종의 식물기반 ASF 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역반응 여부 확인함
마. ASF 항원 조합 후보백신의 방어능 확인용 공격접종 실험	- 5종 항원 각테일 백신과 9종 항원 각테일 백신의 접촉감염모델 공격접종실험 수행 - 백신접종 돼지에서의 체액성 면역반응 확인 - 5종 항원 각테일 백신의 접촉감염을 막을 수 있는 방어능 확인
바. ASF 항원 최소조합 설정을 위한 공격접종 실험	- 최소 백신 항원을 찾기 위해 5, 3, 2 항원 각테일 백신 및 신규 항원의 효과를 확인하기 위한 공격접종실험 수행 - 공격접종 실험 방법(공격접종 바이러스 양 조정, 체온측정방법, 접촉감염 여부의 확인 등)에 대한 사전 연구가 필요함

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

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계 (2021.04-2022.03)	종료 후 5년 내	계	가중치 (%)
	목표(단계별)	실적(누적)				
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)				
	특허출원	목표(단계별)	1		1	10
		실적(누적)	1		1	
	특허등록	목표(단계별)		1		25
		실적(누적)				
최종보고서	목표(단계별)	1		1	20	
	실적(누적)	1		1		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	시제품제작	목표(단계별)	1		1	25
		실적(누적)	1		1	
	타연구개발 사업에의 활용	목표(단계별)	0		0	
		실적(누적)	1		1	
	계	목표(단계별)	3	2	5	100
		실적(누적)	4		4	

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 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

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	최종보고서	2022.09.14.	11-1543000-004163-01

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, 신제품, 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	(특허) 아프리카 돼지열병 바이러스 유래 항원 단백질을 포함하는 아프리카 돼지열병의 예방용 백신	대한민국	강향주, 최보화, 손은주	2021.08.27	10-2021-0114014				100	활용 (타연구 개발사업에의 활용)	

○ 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	√									√

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	식물기반 ASF 재조합단백질 (5 Ag) 시험백신-1	2021.09.09	자체제작		ASF 백신 개발			

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- * 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					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

고용 효과

고용 효과	구분	고용 효과(명)	
		개발 전	개발 후
	연구인력		
	생산인력		
	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)	명칭	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
1	농림축산식품부	가축질병대응기술고도화지원사업	식물기반 ASF 재조합 단백질백신 전임상 및 임상시험	강향주	총 909,000,000원

□ 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](해당 시 작성합니다)

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

<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)
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

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 경제성 확보를 위한 ASF 항원 발현 벡터 개선	○ 3개 항원을 제외한 나머지 항원의 생산량이 식물 1kg당 단백질 10mg이상을 달성	○ 100
○ 식물기반 ASF 백신항원의 면역원성 검증	○ 선행연구에서 확인하지 못한 식물기반 ASFV 단백질 항원 6종의 체액성, 세포성 면역반응 여부를 확인	○ 100
○ 식물기반 ASF 백신항원 조합에 따른 방어능 확인	○ 5개 항원을 조합한 식물기반 ASF 재조합단백질 시협백신이 접촉에 의한 감염에 대한 방어능을 나타냄	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- ASF백신 지금까지 불활화 백신, 약독화 생백신, 재조합 바이러스 생백신 및 subunit 백신 등의 개발시도가 있어왔음. 약 3년전까지는 모든 시도가 실패했으나 최근 3건의 기술개발 사례가 보고된 바 있음. 2건은 재조합 바이러스 생백신이고 1건은 아데노바이러스를 이용한 subunit 백신임. 아데노바이러스를 이용한 subunit백신은 최초 보고 후 후속연구에 대한 소식이 없음. 재조합 바이러스 생백신 중 1건은 최초 보고 후 자국내에서 미승인 사용 및 변이로 추정되는 바이러스가 발견되어 중단된 것으로 보임.
- 현재 상업화에 가장 근접한 백신은 특정유전자를 유전공학기술로 제거한 재조합 바이러스 생백신임. 해당 생백신은 미국에서 개발하여 현재 베트남에서 시험생산을 거쳐 연내 출시한다는 보도가 있음. 하지만 대한민국은 현재 지속적으로 ASFV 감염 멧돼지가 발견되지만 ASF의 농장발생은 1년 이상 일어나지 않을 정도로 농장 전파관리가 잘 되는 국가임. 생백신은 야생 바이러스와의 접촉등으로 인한 독력회복의 안전성의 문제와 백신주 생산시설의 생물안전등급 및 생산성등의 문제로 현재 대한민국에서는 활용하기 어려운 점이 있음. 따라서 미발생국에서는 생백신이 아닌 virus-free 재조합 항원백신의 개발이 필수적이며 본 과제를 통해 구축된 항원뱅크를 활용하여 효과적이며 안전한 최초의 ASF 재조합 단백질 백신 개발을 기대함.
- 몇몇 기업들이 해외에서 개발된 재조합 바이러스 생백신 주를 들여와서 국내에서 안전성 및 효능 평가를 진행중인 것으로 알려져 있으나 그 외 국내에서 자체적인 ASF 백신 개발에 대한 정보는 찾아보기 힘들. virus를 다루기 위해서는 BSL-3시설이 필요하며 개발한 백신의 효능을 평가하기 위해서는 ABL-3시설에서의 공격접종실험이 필수적이기 때문인 것으로 생각됨. 본 연구팀은 자체연구와 본 과제를 통해 다양한 항원 유전자 및 항원을 확보하

고 있으며 현재까지 다수의 공격접종실험을 진행한 바 있음.

- ASF백신은 1.명확한 방어항원이 알려져 있지 않고, 2.각 항원에 대한 면역반응과 방어능과의 상관관계가 불명확하며, 3.백신의 방어능 평가방법이 공격접종을 통한 생존률 확인 뿐이기 때문에 ASF 재조합 단백질 백신 개발에 많은 어려움이 있는 것이 현실임. 본 연구과제에서는 문헌조사를 통해 선별한 ASFV 구조단백질 14종의 식물발현벡터 및 분리정제 기초공정을 개발하였고 각 항원에 대한 기본적인 체액성, 세포성 면역반응 여부를 확인함으로써 항원뱅크를 개발함. 또한 지금까지 재조합 백신으로 가장 많이 사용된 항원들을 선별하여 공격접종실험을 진행함. 본 연구결과를 바탕으로 각 항원의 면역원성을 체계적으로 분석하여 항원 조합을 선정하고, 실험을 통해 적절한 항원 농도기준을 마련할 필요가 있음. 또한 백신의 평가방법의 개선이 필요함. 해당 내용은 선정된 가축질병대응기술고도화지원사업을 통해 진행할 계획임.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

- 본 연구개발성과를 바탕으로 연내 국외 SCIE 논문 1편을 게재할 예정
- 국내 출원된 특허의 국외(3국 이상) 출원 예정
- 국내 출원된 특허의 등록
- 본 연구개발성과 및 연계되는 가축질병대응기술고도화지원사업을 통해 식물기반 ASF 재조합 단백질 백신의 제품 출시

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

주 의

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