



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월17일
(11) 등록번호 10-2433177
(24) 등록일자 2022년08월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0069300
(22) 출원일자 2020년06월08일
심사청구일자 2020년06월08일
(65) 공개번호 10-2020-0142459
(43) 공개일자 2020년12월22일
(30) 우선권주장
1020190069632 2019년06월12일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160094674 A

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
홍민선
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미
래관 303호
전보영
강원도 원주시 단구로75번길 10-1 (일산동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

기술이전 희망 : 기술양도

전체 청구항 수 : 총 13 항

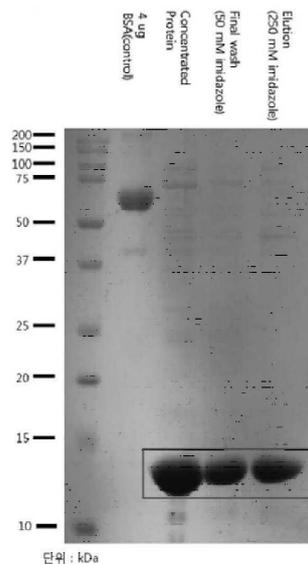
심사관 : 민경남

(54) 발명의 명칭 아프리카 돼지 열병 바이러스 유래 p104 단백질 절편 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단리된 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 유효성
분으로 포함하는 ASFV (African swine fever virus)에 대한 백신 조성물과 상기 폴리펩타이드를 이용한 동물 면
역화 방법, 및 상기 폴리펩타이드를 이용한 ASFV 감염 검출/진단 방법, 진단시약 및 키트를 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

A61K 2039/552 (2013.01)

C12N 2710/12034 (2013.01)

(72) 발명자

김명일

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미래
관 319호

박재완

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미래
관 319호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545022753
과제번호	320071022SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	가축질병대응기술개발(R&D)
연구과제명	돈군 구강액 이용 ASF 진단기법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 원주산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단리된 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 아프리카돼지열병 바이러스(African swine fever virus, ASFV)에 대한 면역원성(immunogenicity)을 가지는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 ASFV는 케냐 유래인 것을 특징으로 하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제4항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 6

제5항의 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 7

제1항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 보조제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것을 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 9

인간을 제외한 동물에서 아프리카 돼지열병에 대한 보호성 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 제1항의 폴리펩타이드의 면역 유효량을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 보호성 면역 반응의 유도법.

청구항 10

제1항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 아프리카 돼지열병 바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 11

제1항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약.

청구항 12

제11항의 진단 시약을 포함하는 진단 키트.

청구항 13

- (a) 동물의 시료를 제1항의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 시료 중 제1항의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 아프리카돼지열병 바이러스 감염 혈청 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아프리카 돼지열병 바이러스(African swine fever virus, ASFV) 유래 p104 단백질 절편 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단리된 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 ASFV에 대한 백신 조성물과 상기 폴리펩타이드를 이용한 동물 면역화 방법, 및 상기 폴리펩타이드를 이용한 ASFV 감염 검출/진단 방법, 진단시약 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아프리카 돼지열병(African swine fever, ASF)은, 아스파비리대(Asfarviridae)에 속하는 아프리카 돼지열병 바이러스(African swine fever virus, ASFV) 감염에 의한 돼지 전염병으로, 1921년 케냐에서 최초보고가 있은 후, 주로 사하라 이남지역에서 발생보고가 있었고, 2007년 이후로 흑해연안인 조지아, 아르메니아, 아제르바이잔 등 아프리카 이외 지역에서 그 발생 범위가 늘어나기 시작하였다. 특히 최근에는 러시아에서 동서로 그 발생이 확산되고 있으며, 우리나라와 교류가 많은 중국 및 동남아시아에서의 발생 사례가 급증하고 있다.

[0005] 아프리카돼지열병 바이러스는 일반환경에 매우 저항성이 강하여 실온에서 18개월 이상, 햄과 같은 식육제품에서도 6개월이상 감염력이 유지되며, 열에도 매우 강하여 56℃에서 최소 1시간 이상 노출하여야만 감염력을 잃는 특성을 가지고 있다(비특허문헌 1).

[0007] 아프리카 돼지열병은 돼지에 감염시 폐사율이 100%에 이르는 심각한 질병임에도 불구하고 이 질병에 대한 상용화된 백신은 없는 상태이다. 유럽지역에서 아프리카돼지열병이 다시 확산되고 아시아 대륙까지 전파되면서 과거 제대로 진행되지 못했던 백신에 대한 개발 연구에 이목이 집중되고 있다. 하지만 안전성 문제로 약독화 생독 백신은 개발이 제한적인 상황이고 이전의 실험적 연구에서도 큰 효과를 거두지 못하였다. 사독백신 또한 방어에 효과적인 제품을 개발하는데 넘어야 산이 많다. 예를 들면, ASFV는 다른 바이러스보다 크고 복잡한 구조를 가지고 있어 방어에 효과적인 부위를 찾고 있는 실정이다. 아프리카돼지열병바이러스의 유전자 크기는 일반적인 RNA바이러스들의 10배 수준으로 많은 유전자를 가지고 있다. 유전자가 크다 보니 유전자로부터 만들어질 수 있는 단백질 종류도 많으며, ASFV 계놈은 통상 적어도 151개의 ORF를 암호화하는 것으로 알려져 있다. 아프리카돼지열병바이러스는 구조 단백질도 개수가 많고 바이러스의 크기 자체도 다른 바이러스보다 훨씬 커서 써코바이러스의 10배 이상, PRRS바이러스의 4~5배 크기가 된다. 이렇게 아프리카돼지열병바이러스가 크고 복잡하다 보니 면역도 어려워 아직도 효과적인 백신이 개발되어 있지 못한 실정이다.

[0009] 또한 발생 즉시 돼지를 처분해야 하는 위험도가 높은 전염병이기 때문에 진단 또한 매우 중요하다. 아프리카돼지열병의 확진을 위해서는 공인된 실험실의 진단 검사가 필수적이다. 실험실 진단 검사는 혈액 및 내부 장기에

서 ASFV를 검출하거나 감염 돼지의 혈청에서 항체를 검출하는 방법이 있다. 백신이 아직 개발되지 않았으므로 항체검사서 양성반응은 야외 감염을 의미한다. 만약 혈액에서 바이러스를 분리해야 한다면 초기 발열 증상이 확인된 시기에 채혈한 가검물이 적합하며, 림프절이나 비장과 같은 면역장기는 냉장상태로 의뢰한다. 항체를 검사하기 위한 가검물은 감염 후 8~21일 사이의 회복기에 있는 감염 돼지의 혈청이 이상적이다. 감염돈의 혈청을 이용한 항체를 검출법은 OIE-ELISA(간접법)와 상용화된 항체검출용 ELISA를 이용하여 1차 선별검사를 진행하고 면역탁본법(IB), 면역과산화효소시험(IPT), 간접형광항체법(IFA)을 통해 최종 평가할 수 있다(비특허문헌 2 참조). ASF는 질병의 진행 단계가 빠르고 다양하며 불현성 감염된 돼지도 존재할 수 있으므로 실험실에서는 반드시 항원 및 항체검사를 함께 수행하여 정확하게 감염여부를 파악해야 한다.

[0011] 이에 상업적으로 보급될 수 있고 실효성 있는 ASFV 감염 예방 백신 및 ASFV 감염 진단 관련 기술 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) 이지연, 아프리카돼지열병(African swine fever) 진단 및 예방, Journal of Korean Veterinary Medical Association, Vol. 50_No.11 Nov 2014, 671-673.

(비특허문헌 0002) Daniel Beltran-Alcrudo et al., African swine fever: detection and diagnosis - A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual 2017. No. 19. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 88 pages.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 이에 본 발명자들은 상업적으로 보급될 수 있는 ASFV 감염 예방 백신 및 ASFV 감염 진단 방법을 제공하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명에서 제공하는 특유의 서열로 구성되는 폴리펩타이드가 ASFV 내의 천연형 단백질과 비교하여도 ASFV 감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수할 뿐만 아니라, 백신으로서 사용 가능성이 있고 또한 산업적 수준으로 생산성이 높은 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단리된 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은, 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 백신용 조성물을 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은, 동물에서 아프리카 돼지열병에 대한 보호성 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 폴리펩타이드의 면역 유효량을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 보호성 면역 반응의 유도법을 제공하는 것이다.

[0024] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스 감염 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0026] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 및 상기 진단 시약을 포함하는 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0028] 본 발명의 또 다른 목적은, (a) 동물의 시료를 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 시료 중 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 아프리카돼지열병바이러스 감염 혈청 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0030] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단리된 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 백신용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 동물에서 아프리카 돼지열병에 대한 보호성 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 폴리펩타이드의 면역 유효량을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 보호성 면역 반응의 유도법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 및 상기 진단 시약을 포함하는 진단 키트를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 동물의 시료를 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 시료 중 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 아프리카돼지열병바이러스 감염 혈청 검출 방법을 제공한다.
- [0044] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0046] 본 발명에서 용어 '항원'은 적당한 세포와 접촉하여 유입됨에 따라 민감성 및/또는 면역 반응성 상태를 유도시키고, 생체 내 또는 시험관 내에서 이와 같이 감각된 대상체의 면역 세포 및/또는 항체와 입증 가능한 방식으로 반응하는 모든 물질을 지칭한다. 본 발명에서 용어 '항원'은 '면역원'이라는 용어와 동일한 의미로 통칭되어 사용될 수 있으며, 바람직하게 숙주 면역 체계가 그 항원에 특이적인 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 일으키도록 촉진할 수 있는 하나 또는 그 이상의 에피토프를 포함하는 분자를 의미한다. 또한 본 발명에서 용어 '항원성' 또는 '면역원성'은 상기 항원 또는 면역원의 성질을 뜻하는 것으로 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 일으키는 성질을 의미한다.
- [0048] 상기 용어 '면역 반응'이란 동물 체내에 존재하는 자기방어체계로서, 외부로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 자기 자신과 구별해내어 이 침입자를 제거하는 생물학적 현상이다. 이러한 자기방어를 위한 감시 체계는 크게 두 가지 기작에 의해 이루어지는데 하나는 체액성 면역, 그리고 다른 하나는 세포성 면역이다. 체액성 면역은 혈청 내에 존재하는 항체에 의해 이루어지는데, 항체는 침입한 외부 항원물질과 결합하여 그것을 제거하는 중요한 기능을 한다. 한편, 세포성 면역은 림프계에 속하는 몇 종류의 세포에 의해 이루어지는데 이러한 세포는 침입해온 세포나 조직을 직접 파괴하는 기능을 담당한다. 그리하여 체액성 면역은 주로 세포 외부에 존재하는 세균이나 바이러스, 단백질, 복합탄수화물과 같은 외부물질에 대해 효과적이며, 세포성 면역은 각종 기생충, 조직, 세포 내 감염, 암세포 등에 그 기능을 발휘한다. 이러한 이중 방어체계는 B 세포나 T 세포 등의 주로 두 종류 림프구에 의해 수행되는데 B 세포는 항체를 생산하고, T 세포는 세포성 면역에 가담하고 있다. 이러한 B 세포나 T 세포에 의한 면역 반응은 일단 체내로 침입한 항원에 대하여 반응을 하되, 반드시 같은 종류의 항원이 계속 존재하거나 반복 침입해 왔을 경우에 작용하는 면역체계이다. 따라서, 이러한 면역 반응은 특정 항원에 대한 특이한 반응이다. 이러한 항원특이적 면역 반응 이외에도 체내에는 어떤 항원에 대해 노출되어진 경험이 없는 경우라도 직접적으로 반응하여 공격세포를 파괴하는 일종의 자연 면역 반응도 있는데, 이러한 면역반응에는 neutrophil, macrophage, NK(natural killer) 세포 등이 관여하여 공격대상 세포의 종류에 별로 구애됨이 없이 다양한 기능을 발휘하는 것이 특징이다.
- [0049] 바람직하게 본 발명에서 목적하는 면역반응은, 백신 중에 포함된 항원 또는 항원들에 대해 특이적으로 지시된 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 서프레스 T 세포, 세포독성 T 세포 및 감마-델타 T 세포의 생산 또는 활성화, 숙주에서 치료학적 또는 보호 면역학적 반응을 나타내어 새로운 감염에 대한 내성이 증진되거나 질환의 임상적 중증도가 감소되는 효과중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는 보호 면역 반응일 수 있다.
- [0050] 상기 보호는 감염된 숙주가 통상적으로 나타내는 임상적 징후의 감소 또는 부재, 보다 신속한 회복 시간 또는

보다 낮은 지속시간 또는 감염된 숙주의 조직 또는 체액 또는 배설물에서 보다 낮은 바이러스 역가에 의해 입증된다.

- [0052] 본 명세서 사용된 용어 ‘폴리펩타이드’ 및 ‘단백질’은 통상(종래)의 의미에 따라 사용되는 것으로, 즉 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 폴리펩타이드는 특정의 길이로 한정되지 않지만, 본 발명의 문맥에서는 일반적으로 전장(full length) 단백질의 단편을 지칭하는 것일 수 있다. 상기 폴리펩타이드 또는 단백질은 번역후의 수식, 예를 들면 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등 및 해당 분야에 공지된 다른 수식(자연적으로 발생하는 수식 및 비자연적 발생의 수식)을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드 및 단백질은 임의의 다양한 공지의 재조합 및/또는 합성의 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 용어 ‘폴리뉴클레오티드’, ‘핵산’은 단일-가닥 또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다
- [0056] 본 명세서에 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다: A(Ala): 알라닌; C(Cys): 시스테인; D(Asp):아스파르트산; E(Glu): 글루탐산; F(Phe): 페닐알라닌; G(Gly): 글라이신; H(His): 히스티딘; I(Ile): 이소류신; K(Lys): 라이신; L(Leu): 류신; M(Met): 메티오닌; N(Asn): 아스파라긴; O(Ply)피롤라이신; P(Pro): 프롤린; Q(Gln): 글루타민; R(Arg): 아르기닌; S(Ser): 세린; T(Thr): 트레오닌; U(Sec):셀레노시스테인, V(Val): 발린; W(Trp): 트립토판; Y(Tyr): 티로신.
- [0058] 본 명세서에서 용어 ‘발현(expression)’이라 함은 세포에서 단백질 또는 핵산의 생성을 의미한다.
- [0060] 본 발명자들은 케냐 유래 ASFV의 EP402R 단백질 및 P72 단백질로부터, ASFV 감염 혈청(즉, 혈청 내 ASFV에 대한 항체) 검출/진단 측면, 백신으로서의 이용 가능성 측면 및 상업적 보급을 위한 대량생산 가능성 측면 등에 있어서 우수한 장점을 지니는 단편으로서 각각 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩타이드를 신규하게 규명하였다. 상기 폴리펩타이드는 이들이 유래된 천연형 단백질 및 상기 단백질에서 유래된 다른 길이 및 서열구성의 폴리펩타이드(단편)과 비교하여도 전술한 측면들에 있어서 현저히 우수한 효과를 가지는 것이 특징이다.
- [0062] 이에 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단리된 폴리펩타이드를 제공한다. 상기 본 발명의 폴리펩타이드는 아프리카돼지열병 바이러스(African swine fever virus, ASFV)에 대한 면역원성(immunogenicity)인 것이 특징이며, 바람직하게는 케냐 유래 ASFV 특이적인 면역원성을 지니는 것이 특징이다. 한편, 본 발명의 폴리펩타이드는 아프리카에서 발행하고 있는 ASFV type6 뿐만 아니라 러시아, 조지아 등에서 발생하고 있으며 최근에 중국 및 아시아에서 발생하고 있는 ASFV type 2에 의한 ASFV의 검체들과 반응하는 면역원성도 지니는 것이 특징이다.
- [0064] 본원에서 기재되는 폴리펩타이드는 당분야의 숙련자에게 공지된 임의의 적합한 절차, 즉 유전공학적 방법, 예컨대 재조합 기법에 의해 제조(제작)될 수 있다. 예를 들면, 통상적인 방법에 따라 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 동등물을 암호화하는 핵산을 제작한다. 상기 핵산은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 제작할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(Biosearch 또는 Applied Biosystems 사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 핵산은 이에 작동가능하게 연결되어 (operatively linked) 핵산의 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 핵산이 발현되기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 핵산에 의해 발현된, 실질적으로 순수한 폴리펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 당업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 "실질적으로 순수한 폴리펩타이드(substantially pure polypeptide)"라 함은 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 숙주세포로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다.
- [0065] 본 발명의 폴리펩타이드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie & Fink(eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:12073-12080, 1990.
- [0067] 재조합 제조 방법 뿐만 아니라, 또한 본 발명의 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법에 의해 제조

될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다.

- [0068] 하나의 실시 양태에서, 일례로 본 발명의 폴리펩타이드는 고상 기법을 이용한 직접적 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)). 고체상 펩타이드 합성(SPPS) 방법은 작은 다공성의 비드(beads)에 링커(linkers)라 불리는 기능성 유닛(functional units)을 부착하여 펩타이드 사슬을 이어 나갈 수 있도록 유도함으로써 합성을 개시할 수 있다. 액체상 방법과 달리 펩타이드는 비드와 공유 결합하여 TFA(trifluoroacetic acid)와 같은 특정 반응물에 의해 절단되기 전까지 여과(filtration) 과정에 의해 떨어져 나가는 것을 방지한다. 고체상에 부착된 펩타이드의 N-말단 아민과 N-보호 아미노산 유닛(N-protected amino acid unit)이 결합하는 보호(protection) 과정, 탈보호(deprotection) 과정, 다시 드러난 아민 그룹(amine group)과 새로운 아미노산이 결합하는 커플링(coupling) 과정의 사이클(cycle, deprotection-wash-coupling-wash)이 반복되면서 합성이 이루어지게 된다. 상기 SPPS 방법은 마이크로파(microwave) 기술을 함께 이용하여 수행할 수 있으며, 마이크로파 기술은 펩타이드 합성 과정에서 열을 가해줌으로써 각 사이클의 커플링과 탈보호에 요구되는 시간을 단축시킬 수 있다. 상기 열 에너지는 확장되는 펩타이드 사슬이 접히거나(folding) 집합체를 형성하는 것(aggregation)을 방지하고 화학적 결합을 촉진시킬 수 있다.
- [0069] 또한 액체상 펩타이드 합성법에 의해 본 발명의 펩타이드를 제작할 수 있으며, 이의 구체적 방법은 하기의 문헌들을 참조로 한다: US 등록특허 제 5,516,891. 또한 본 발명의 펩타이드는 상기 고체상 합성법과 액체상 합성법을 혼합하는 방법 등의 다양한 방법으로 합성 가능하며, 본 명세서에 기술된 수단에 그 제조 방법이 제한되지 않는다.
- [0070] 단백질 합성은 수동 기법을 이용해서 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화된 합성은, 예를 들어 Applied Biosystems 431A 펩티드 합성기(Perkin Elmer)를 이용해서 달성될 수 있다. 대안적으로, 다양한 단편이 별도로 화학적으로 합성되고 화학적 방법을 이용하여 조합되어 목적 분자를 제조할 수 있다.
- [0072] 한편, 본 발명 폴리펩타이드의 범위에는 전술한 본 발명 폴리펩타이드의 기능적 동등물 및 그들의 염을 포함한다. 일례로 상기 "기능적 동등물"이란 전술한 본 발명의 폴리펩타이드와 적어도 80% 이상의, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 아미노산기 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 것을 포함하며, 본 발명의 폴리펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 상기에서 '실질적으로 동질의 생리활성'이란, 이에 제한되지 않으나, 일례로 동물의 체내에서 ASFV에 대한 보호성 면역반응을 유도하는 것일 수 있으며, 또 다른 일례로 ASFV 감염 동물의 혈청을 검출/진단하는 능력 등을 의미하는 것일 수 있다.
- [0073] 하나의 실시 양태에서, 본 발명에서 기능적 동등물은 전술한 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 삽입, 치환(비보전적 또는 보전적 치환), 결실 또는 이들의 조합에 의해 생성된 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환일 수 있다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 또한 상기 기능적 동등물에는, 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 본 발명에서 제공하는 폴리펩타이드의 생리활성(케도카인 활성)에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 아울러 상기 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다.
- [0074] 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 폴리펩타이드의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩타이드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩타이드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함된다.
- [0075] 하나의 실시 양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 경우에 따라 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

- [0077] 또한 본 발명은, 상기 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화(코딩)하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0079] 상기 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 한 폴리뉴클레오타이드의 염기 조합이 특별히 제한되지 않는다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함하여 단쇄 또는 이중쇄의 형태의 핵산분자로서 제공될 수 있다.
- [0080] 하나의 실시 양태에서, 일례로 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2으로 표시되는 염기서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0082] 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 이를 발현할 수 있는 벡터에 작동적으로 연결시켜 상기 본 발명의 폴리펩타이드를 제공할 수 있다. 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터 또는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0084] 본 발명에서 용어 ‘발현벡터’ 또는 ‘재조합 벡터’란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 말한다.
- [0085] 상기 용어 ‘작동가능하게 연결된(operably linked)’는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소등을 사용한다.
- [0087] 하나의 실시 양태에서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등 과 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.
- [0089] 시그널 서열에는 숙주가 에스케리치아 속(*Escherichia* sp.) 균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0091] 또한 본 발명은 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 즉, 본 발명은 상기 발현 벡터(재조합 벡터)로 형질전환된 형질전환체(숙주 세포)를 제공한다.
- [0093] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입할 수 있는 것으로 공지된 것이라면 어떤 방법이라도 사용가능하며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포솜 매개법(liposome-mediated method), 텍스트란 설페이트, 리포펙타민, 열충격법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.
- [0094] 상기 용어 ‘형질전환체’는 ‘숙주세포’ 등과 호환성 있게 사용될 수 있으며, 임의의 수단(예: 전기충격법, 칼슘 포스파타제 침전법, 미세주입법, 형질전환법, 바이러스 감염 등)에 의해 세포 내로 도입된 이중성 DNA를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포를 의미한다.
- [0095] 본 발명에서 상기 형질전환체는 클로닝 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 종류의 단세포 유기체, 예컨대 각종 박테리아 (예컨대, *Clostridia*속, 대장균, 등) 등의 원핵세포 미생물, 효모 등의 하등 진핵세포 미생물과 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로 당업자가 목적하는 바에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명의 상기 형질전환체는 바람직하게 형질전환 미생물을

의미하는 것일 수 있다. 구체적으로, 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 숙주세포로는 에스케리치아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포일 수 있다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 슈조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [0096] 본 발명의 형질전환체(또는 형질전환 미생물, 숙주세포)은 바람직하게 에스케리치아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*)일 수 있다. 상기 본 발명의 에스케리치아 콜라이 균주로는 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 Rosetta2(DE3), C41(DE3), SoluBL21 등이 사용될 수 있다.
- [0098] 또한 본 발명은 전술한 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스 에 대한 백신 조성물을 제공한다.
- [0100] 본 발명에서 용어 '백신' 또는 '백신 조성물'은 면역응답(immuno response)을 자극하는 조성물을 의미하는 것으로, 면역원성 조성물과 동일한 의미로서 본 명세서에서 혼용되어 사용된다. 상기 백신은 예방 백신과 치료 백신을 모두 포함한다. 예방 백신은 개체가 항원에 노출될 때 더 큰 면역 반응을 내재하게 하기 위해, 항원을 포함하는 물질에 노출되기 전에 면역 반응을 유도하고, 따라서 항원을 운반하는 물질 또는 세포에 저항하는 능력을 증가시키는 것을 의미한다. 치료 백신은 백신의 항원과 관련된 질환을 이미 가지고 있는 개체에 투여하는 방식으로 사용되는 것으로 상기 치료 백신은 항원을 운반하는 질환 또는 세포와 싸우기 위한 증가된 능력을 제공하여 항원에 대한 개체의 면역 반응을 증가시킬 수 있다.
- [0101] 하나의 실시 양태에서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스 감염 예방용 백신 조성물을 제공하는 것일 수 있다.
- [0103] 본 발명의 상기 백신 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여되어 면역반응을 유도할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 경피, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내 경로로 백신을 접종하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 1차 및 2차 접종 시 백신을 근육내 접종하는 것일 수 있다.
- [0105] 상기 백신은 당업계에 알려진 임의의 형태, 예를 들면, 액제 및 주사제의 형태 또는 현탁액에 적합한 고체 형태 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 제제는 또한 리포솜이나 가용 유리 내로 유화 또는 캡슐화되거나 에어로졸이나 스프레이 형태로도 제조될 수 있다. 이들은 경피 (transdermal) 패치에 함유시킬 수도 있다. 액제 또는 주사제의 경우, 필요시 프로필렌 글리콜 및 용혈 현상을 방지하는데 충분한 양 (예: 약 1%)의 염화나트륨을 함유할 수 있다.
- [0107] 본 발명의 백신 조성물은 전술한 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 보조제로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는" 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.
- [0109] 상기 담체(carrier)라 함은 세포 또는 조직 내로 목적물의 전달을 용이하게 하는 물질을 의미한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 일례로 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한, 담체는 티탄 또는 중합체로 제조된 코팅 패치와 같은 건식 제제(dry formulation)를 포함 할 수 있다. 백신에 적합한 담체는 기술분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 당 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액, 또는 비-수용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다.
- [0111] 또한 본 발명의 조성물에는 면역원성을 증가시키기 위한 면역보조제로서 정형 또는 비정형 유기 또는 무기 고분자등이 사용될 수 있다. 면역보조제는 일반적으로 항원에 대한 화학적 물리적 결합을 통해 면역반응을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서 사용된 면역보조제로서는 비정형 알루미늄 겔, 오일 에멀전, 또는 이중 오일 에멀전 그리고 이뮤노졸 등이 사용되었다. 또한 면역반응의 촉진을 위해 다양한 식물 유래 사포닌, 레바미솔, CpG 다이뉴클레오티드, RNA, DNA, LPS, 다양한 종류의 싸이토카인 등이 사용되었다. 위와 같은

면역 조성물은 다양한 보조제와 면역반응 촉진 첨가물의 조합에 의해 최적의 면역반응 유도를 위한 조성으로 사용될 수 있다.

- [0112] 이에 제한되지 않으나, 미네랄 염 보조제 (예를 들면, 알림-, 칼슘-, 철-, 지르코늄-기반 염 보조제), 계면활성 (tensioactive) 보조제 (예를 들면, Quil A, QS-21, 기타 사포닌), 세균-유래 보조제 (예를 들면, N-아세틸 뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(MDP), 지질 다당류(LPS), 모노포스포릴 지질 A, 트레할로스 다이마이콜레이트 (TDM), DNA, CpGs, 세균 독소), 보조제 에멀전(예를 들면, FIA, Montanide, Adjuvant 65, Lipovant), 리포솜 보조제, 폴리머 보조제 및 담체, 사이토킨 (예를 들면, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자), 탄수화물 보조제, 살아있는 항원 전달 시스템(예를 들면, 박테리아, 바이러스)등을 포함할 수 있다.
- [0114] 또한 백신에 추가될 있는 조성물로는 안정제, 불활화제, 항생제, 보존제, 등이 사용될 수 있다. 백신의 투여 경로에 따라 백신 항원은 증류수, 완충용액 등과도 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0116] 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 본원에 기재된 백신의 제형 및 투여 기술은 문헌 (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22판) 등을 참조로 하여 제공될 수 있다.
- [0118] 또한 본 발명의 면역원성 복합 단백질을 포함하는 백신 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하여 면역화하는데 사용할 수 있다. 즉, 본 발명은 동물에서 아프리카 돼지열병에 대한 보호성 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 전술한 본 발명의 폴리펩타이드의 면역 유효량을 돼지에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 보호성 면역 반응의 유도법을 제공한다.
- [0120] 상기 '개체(subject)' 는 동물, 바람직하게는 인간을 제외한 포유동물을 의미할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 개체는 바람직하게 돼지(pig)일 수 있다.
- [0121] 따라서 하나의 실시양태에서, 본 발명은 제1항의 폴리펩타이드를 동물(특히, 돼지)에 투여하는 것을 특징으로 하는, 동물(특히, 돼지)의 ASFV에 대한 면역력을 증진시키는 방법(즉, ASFV에 대해 동물을 면역화시키는 방법)을 제공한다.
- [0123] 본 명세서에서 용어 '면역화(immunization)' 는 본 발명에 따른 면역원성 복합 단백질을 개체에 투여했을 때, 개체 내에서 상기 면역원성 복합 단백질에 대한 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응이 유발되는 것으로, 이 같은 면역화를 통해 대상 질환(본 발명에서는 특히 ASFV 감염)에 대한 예방 또는 치료 효과가 나타나게 된다.
- [0125] 상기 '유효량' 은 본 발명의 상기 백신 조성물의 대상 질환(특히, ASFV 감염)에 대한 예방이나 치료 효과를 나타내는 양으로, 투여된 개체에서 본 발명의 폴리펩타이드가 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유도하기에 충분한 양을 의미한다.
- [0127] 본 발명의 폴리펩타이드의 총 유효량은 단일 투여량(single does)으로 개체에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 또한 투여 목적에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수도 있다. 상기 유효 용량은 대상 질환의 유형 및 중증도, 투여 경로 및 투여 횟수뿐 만 아니라 투여가 필요한 개체의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 각 개체에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 해당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 투여 목적에 따라 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 또한 본 발명에 따른 단백질을 투여한 후 면역 세포의 활성을 결정해주는 검정 방법(assay) 또는 널리 알려진 생체내 검정을 사용하여 요법의 효능을 모니터링함으로써 결정할 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0129] 전술한 본 발명의 폴리펩타이드는, 천연형 단백질 및 상기 단백질 유래 다른 길이/서열 구성의 폴리펩타이드들과 비교하여도, 특이적으로 ASFV 감염 혈청을 검출(진단)하는 효과가 현저하다. 본 발명에서 ASFV 감염 혈청을 검출(진단)한다는 것은, 개체의 혈액, 혈장 또는 혈청 내에 존재하는 항-ASFV 항체(아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 항체)와 상기 본 발명의 폴리펩타이드가 결합하여(항원-항체 복합체 형성) 상기 항체의 존재 유무 또는/및 존재량을 확인하는 것을 의미한다. 개체의 혈액, 혈장 또는 혈청 내에 항-ASFV 항체의 존재가 검출 또는/및 확인되는 경우, 해당 개체는 ASFV에 감염된 상태인 것으로 판정할 수 있다.
- [0130] 따라서 본 발명은, 전술한 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스 감염 진단용 조

성물을 제공한다.

- [0131] 또한, 본 발명은, 전술한 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 조성물 및 상기 진단 시약 조성물을 포함하는 진단 키트를 제공한다.
- [0132] 또한 본 발명은
- [0133] (a) 동물의 시료를 전술한 본 발명의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및
- [0134] (b) 상기 시료 중 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 아프리카돼지열병바이러스 감염 혈청 검출(진단) 방법을 제공한다.
- [0136] 특히, 본 발명의 폴리펩타이드들은 여러 종류의 ASFV에 대한 특이성이 현저하여, 이탈리아 유래 ASFV 뿐만 아니라, 최근 발생하고 있는 ASFV에 대해서 특이적으로 검출할 수 있다. 따라서 하나의 실시 양태에서, 바람직하게 본 발명은 전술한 본 발명의 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 조성물 및 이를 포함하는 진단 키트를 제공하는 것일 수 있으며, 또한 상기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 ASFV 감염혈청 검출(진단) 방법을 제공하는 것일 수 있다.
- [0138] 본 명세서에서 용어 ‘시료’는 고형 시료 또는 체액성 시료일 수 있으며, 바람직하게는 혈청, 혈장, 근육 조직, 전혈, 림프액, 비장 또는 이들의 균질화물 (homogenate) 일 수 있다.
- [0140] 본원에 따른 검출 또는 진단에 있어서, 당업계에 항원-항체 복합체를 검출하는 수단으로서 알려진 것이라면 그 방법 및 기구가 특별히 제한되지 않고 적용될 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 예를 들면 항원-항체 복합체는 방사상 면역확산 (Radial Immunodiffusion), 면역전기영동 또는 역전류 전기영동을 포함하는 면역침전분석, RIA (Radioimmunoassay), 경쟁적 간접면역형광법 (competition indirect immunofluorescent assay), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 또는 면역크로마틱 분석 (immunochromatic assay) 등의 방법으로 검출될 수 있다. 이런 방식의 검출은 특히 항원이 가용성 단백질로 제공되는 경우에 유리하며, 본원 발명의 폴리펩타이드는 이러한 특성을 만족한다. 본원에 따른 일구현예에서는 ELISA 방법, 특히 샌드위치 방식의 ELISA가 사용되며, 이 경우 후술하는 검출항체가 또한 함께 사용된다. 본 발명은 상기 방법을 이용하는 진단 키트를 제공하는 것으로 이해될 수 있으며, 각 방법에 따른 키트 구성품이 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0142] 본원에 따른 일 구현 예에서, 항원(본 발명 폴리펩타이드)-항체 복합체의 검출을 위해, 항원(본 발명 폴리펩타이드)이 표지물질로 표지될 수 있다. 즉, 본 발명의 폴리펩타이드는 검출가능한 표지에 링크(예: 공유 결합 또는 가교)되어 제공될 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 발색효소(예: 퍼옥시다제(oxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)), 방사성 동위원소(예: 124I, 125I, 111In, 99mTc, 32P, 35S), 크로모포어(chromophore), 바이오틴(biotin), 발광물질 또는 형광물질(예: FITC, RITC, 로다민(rhodamine), 텍사스레드(Texas Red), 플로레신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 퀀텀닷(quantum dots)), 자기공명영상조영제(예: 수퍼파라마그네틱 산화철(superparamagnetic iron oxides, SPIO), 울트라수퍼파라마그네틱 산화철(ultrasuperparamagnetic iron oxides, USPIO)), 금 입자(Gold particle) 등 일 수 있다. 유사하게, 상기 검출 가능한 표지는 ASFV와 관련 없는 다른 항체 에피토프(epitope), 기질(substrate), 보조인자(cofactor), 저해제 또는 친화 리간드일 수 있다. 이러한 표지는 본 발명의 폴리펩타이드를 합성하는 과정 중에 수행할 수도 있고, 이미 합성된 폴리펩타이드에 추가로 수행될 수도 있다.
- [0144] 본원에 따른 일 구현 예에서, 상기 항원(본 발명에 따른 폴리펩타이드)에 결합한 항체(1차 항체, 예를 들어 동물 혈청 내에 생성된 항체)를 검출하는 검출항체(2차 항체)가 표지될 수도 있다. 본원에 따른 방법에 사용될 수 있는 검출 항체(2차 항체)는, 진단 대상 동물에서 생성된 이뮤노글로불린(일례로, IgM, IgG)에 특이적으로 결합하며, 상기 검출항체는 시각적 또는 다양한 이미지 검출 장비를 이용하여 검출할 수 있는 물질로 표지될 수 있다. 이는 본 발명의 폴리펩타이드 표지물질에 대해 전술한 바를 참조로 하여 이해될 수 있다.
- [0146] 하나의 구체적 실시 양태에서 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체(2차 항체)는 표지물질로서 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)와 같은 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스태필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스-6-포스페이트 데하이드로지나아제(glucose-6-phosphate dehydrogenase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 그리고 아세틸콜린 에스터라아제(acetylcholine esterase)와 같이 특정 기질(substrate)의 존재하에서 화학반응을 촉매하여 검출가능한 발색반응 또는 광을 방

출할 수 있는 효소로 표지될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0148] 다른 구체적 실시 양태에서, 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체는 광의 조사에 의해 조사된 광과 상이한 파장의 광을 방출하는 바이로루미네스스, 케미루미네스스, 일렉트로루미네스스, 일렉트로케미루미네스스 및 포토루미네스스에 사용되는 발색단으로 예를 들면 단백질로서 그린형광단백질; 유기화합물로서 플루오르세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 파이코에리쓰린(phycoerythrin), 파이코시아닌(phycoyanin), 알로파이코시아닌(allophycocyanin), 그리고 플루오르카민(fluorecamine)을 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0150] 또 다른 구체적 실시 양태에서, 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체는 다양한 방사선 동위원소 물질로 표지될 수 있다. 본원에서 표지물질의 검출은 예를 들어 방사선동위원소인 경우 신틸레이션 카운터(scintillation counter)에 의해 수행할 수 있으며, 예를 들어 표지물질이 형광물질인 경우, 스펙트로스코피, 포스포이미징 장치 또는 형광계측기 등과 같은 방법에 의해 수행할 수 있다. 효소로 표지된 경우, 적절한 기질의 존재하에서 효소에 의한 발색성 기질의 변환에 의해 나타나는 발색 산물을 계측을 함으로써 수행할 수 있다. 또한, 적당한 표준 혹은 대조군과의 비교를 통해 효소반응에 의해 나타나는 발색 산물의 색 비교로서 탐지할 수 있다.

[0152] 구체적 실시 양태에서 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체를 표지하는 물질은 예를 들면 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 착색 라텍스입자 등과 같은 나노입자를 포함하는 물질을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0154] 본 발명의 키트에는 본 발명의 폴리펩타이드 이외에 상기 폴리펩타이드와 항-ASFV 항체의 결합 반응을 위한 적당한 완충용액 또는 배지 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 폴리펩타이드가 직접 표지되지 않은 채로 제공되는 경우에는, 폴리펩타이드의 표지를 위한 다른 검출가능한 표지 수단이 추가로 키트에 포함될 수 있다. 일례로 본 발명의 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등이 상기 키트에 추가로 포함될 수도 있다.

[0155] 또한 본 발명의 폴리펩타이드는 플레이트의 표면에 코팅된 형태로 제공될 수도 있다. 이 경우에는 상기 플레이트에 시료를 처리하여 적당한 조건에서 반응시킨 후, 플레이트의 표면상에서의 본 발명의 폴리펩타이드(항원)와 시료 내 항체의 결합을 관찰하여 ASFV 감염 여부를 진단할 수 있다. 이러한 본 발명의 폴리펩타이드는 96웰 마이크로웰플레이트와 같은 마이크로웰플레이트, 콜로이드성 금 입자 또는 착색 라텍스 입자를 포함하는 비드 또는 입자 또는 셀룰로스, 나이트로셀룰로스, 폴리에테르설폰, 폴리비닐리딘, 플루오라이드, 나일론, 하전나일론 및 폴리테트라플루오로에틸렌 등과 같은 멤브레인에 부착되어 제공될 수 있다. 상기 항원(본 발명의 폴리펩타이드)을 부착 또는 코팅하는 방법은 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들면 본원 실시예에 기재된 것을 참고할 수 있다.

[0157] 구체적 실시 양태에서 본 발명의 진단시약, 및 이를 포함하는 키트는 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RIA (Radio Immuno Assay) 등과 같은 샌드위치 방식의 면역분석방식으로 사용될 수 있다. 이러한 방법은 고상의 기질 예를 들면 글라스, 플라스틱 (예를 들면 폴리스티렌), 폴리스카라이드, 나일론 또는 나이트로셀룰로스로 제작된 비드, 멤브레인, 슬라이드 또는 마이크로웰플레이트에 결합된 항원에 검체를 추가한 후, 직접 또는 간접 검출이 가능한 표지물질 예를 들면 상술한 바와 같은 3H 또는 125I와 같은 방사성 물질, 형광물질, 화학발광물질, 헵틴, 바이오틴, 디옥시제닌 등으로 표지되거나 또는 기질과의 작용을 통해 발색 또는 발광이 가능한 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제, 말레이트 데하이드로게나아제와 같은 효소와 컨주게이션된 항체와의 결합을 통해 정성 또는 정량적으로 검출할 수 있다. 또한 면역분석 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984 등에 기재되어 있다. ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 등과 같은 상술한 물질로 표지된 2차 검출항체 및 검출에 사용되는 기질 등을 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0159] 본 발명에서 제공하는 특유의 서열로 구성되는 폴리펩타이드는 바이러스 내 천연형 단백질과 비교하여 발현 및 정제수율이 현저히 우수하고, 길이가 짧고, ASFV 내의 천연형 단백질과 비교하여도 ASFV 감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수할 뿐만아니라, 백신으로서 사용 가능성이 있으며 또한 산업적 수준에서 생산성이 높다.

도면의 간단한 설명

- [0161] 도 1은 천연형 EP402R 단백질(Kenya-asfv-p104로도 표기, 서열번호 3)를 대장균에서 발현시킨 뒤 정제하여, SDS-PAGE 전기영동 실시 후 Commassie 염색으로 폴리펩타이드를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 Kenya-asfv-pep104-1 단편 폴리펩타이드(서열번호 1)를 대장균에서 발현시킨 뒤 정제하여, SDS-PAGE 전기영동 실시 후 Commassie 염색으로 폴리펩타이드를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 ASFV 감염 혈청 검출/진단에 있어서, 본 발명의 Kenya-asfv-pep104-1 단편 폴리펩타이드(서열번호 1)의 효과를 이의 천연형 전장 단백질(Kenya-asfv-p104 천연형, 즉 EP402R 단백질)과 비교한 ID(indirect)-ELISA 결과를 나타낸다.
- 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 백신화 유도 과정에 대한 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 아프리카돼지열병 재조합단백질(kenya-asfv-p104와 kenya-asfv-pep104-1) 접종에 의한 IgG 생성에 대한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0162] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0163] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0165] **실시예 1: 케냐 유래 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV) EP402R 단백질 유래 고효율의 면역원성 단편 폴리펩타이드 발굴**
- [0167] **1-1. ASFV EP402R 단백질 유래 단편 폴리펩타이드 제작**
- [0168] 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 EP402R 단백질(NCBI GenBank: AJL34072.1)은 ASFV Ken05/Tk1 strain 및 BA71V strain에서 동일한 서열 구성을 가지는 것으로 발견된다. 그러나 상업적으로 사용하기 위한 수준으로 재조합 단백질을 생산하는 데에는 어려움이 있는 실정이다. EP402R 단백질(본 명세서에서, Kenya-asfv-p104로도 표기)서열을 기초로하여 다양한 폴리펩타이드 단편을 제작하였으며, 대표적인 몇가지 예들을 표 1에 도시하였다.

[0169]

표 1

[0170]

pep. fragment 명칭	서열정보	서열번호
Kenya-asfv-p104	STKKKPTITKQELYSLVAADTQLNKALIERIFTSQQKI IQNALKHNQEVII PPGIKFTVV TVKAKPARQGHNPATGEPI QIKAKPEHKAVKIRALKPVDMLN	서열번호3
Kenya-asfv-pep104-1	TKQELYSLVAADTQLNKALIERIFTSQQKI IQNALKHNQEVII PPGIKFTVVTVKAKPAR QGHNPATGEPI QIKAKPEHKA	서열번호1

[0172]

상기 단백질 및 폴리펩타이드들은, 간략하게 다음과 같은 방법으로 생산되었다. Kenya-asfv-p104 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA는(서열번호 4 참조) 마크로젠에 의뢰하여 합성하였다. Kenya-asfv-pep104-1 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA (서열번호 2)는 Kenya-asfv-p104 유전자 (서열번호 4)로부터 PCR(유전자증폭과정)을 통해 일부 유전자 조각을 증폭하는 방식으로 획득되었다. 각 단편 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 pET49b 벡터(Novagen)의 BamH1, SalI restriction site 사이에 클로닝되었다. 각 폴리펩타이드들은 Escherichia coli 균주인 BL21균주에서 과발현시켰다. 상기 벡터로 형질전환된 E. coli 세포들을 100 ug/ml kanamycin이 포함된 Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 37℃에서 OD600이 0.7이 될 때까지 성장 시켰고, 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)에 의해 단백질 발현이 유도되었다. IPTG를 넣은 후, 추가로 4시간 동안 배양한 다음, 5000rpm에서 20 분간 원심 분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 50ml의 IB buffer(pH8.0 Tris 0.1M, pH8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid 5mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1mM)에 재현탁 시킨 후, 초음파 처리로 세포를 깨우고 최종적으로 Denaturation buffer(6M Guanidine Hydrochloric acid, pH8.0 Tris 0.1M 및 pH8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid 2.5mM 조성의 Denaturation buffer를 사용)에 재현탁 시킨 후, 초음파 처리로 세포를 깨주었다. Kenya-asfv-p104의 경우 15,000rpm으로 원심분리하여 A280에서 농도를 측정해준 뒤, Snake skin tube에 상층액을 넣어주고 Refolding buffer (50 mM NaCl 100 mM Tris pH8.0 2.5

M EDTA pH 8.0, 0.6 M L-Arginine, 0.2 mM oxidized glutathione, 2 mM reduced glutathione) 에 1 mg/ml 로 희석시켜준다(10 °C, 48hrs). 다른 snake skin tube로 옮겨서, Urea buffer(20 mM Tris pH 8.0, 100 mM Urea) 를 4°C에서 12 시간 두 번 넣어 주고, 1 X Phosphate-buffered saline(PBS) 버퍼를 4 °C에서 12 시간 동안 두 번 넣어 준다. 이것을 다시 5,000rpm으로 20분동안 원심분리시킨 후, 상층액을 Ni-NTA에 처리하여 1시간 30분동안 결합시켰다(4°C). 50 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 washing해준 후, 250 mM Imidazole 및 500 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 용출시켰다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용해 폴리펩타이드를 확인하였으며, 폴리펩타이드들은 pH7.4 HEPES 20mM 및 Sodium chloride 150mM를 포함하는 버퍼에 수용되었다(4 °C, overnight). Kenya-asfv-pep104-1의 경우 5,000rpm으로 원심분리하여, Snake skin tube에 상층액을 넣어주고 20 mM HEPES pH 7.4 150 mM NaCl buffer 에 4 °C 14시간 넣어 준다. 이것을 다시 5,000rpm으로 20분동안 원심분리시킨 후, 상층액을 Ni-NTA에 처리하여 1시간 30분동안 결합시켰다(4°C). 50 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 washing해준 후, 250 mM Imidazole 및 500 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 용출시켰다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용해 폴리펩타이드를 확인하였으며(6M Guanidine Hydrochloric acid, pH8.0 Tris 0.1M 및 pH8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid 2.5mM 조성의 Denaturation buffer를 사용), 폴리펩타이드들은 pH7.4 HEPES 20mM 및 Sodium chloride 150mM를 포함하는 버퍼에 수용되었다(4 °C, overnight).

[0174] 1-2. EP402R 전장(full sequence) 단백질 대비 단편 폴리펩타이드 생산성 평가

[0175] 여러 가지 단편 폴리펩타이드들의 생산성을 정량적으로 비교 평가하였다. 그 결과, 여러 단편들 중에서도 특히 Kenya-asfv-pep104-1(서열번호 1)의 단편 폴리펩타이드는 EP402R 전장 단백질(Kenya-asfv-p104로 표기) 대비 짧은 소요시간에 발현량 및 정제 수율이 1.4배 이상 증가된 것을 확인하였다. 다른 단편 폴리펩타이드의 경우 발현이 않되거나 수율이 현저히 낮았다. 구체적으로 EP402R 전장 단백질의 발현 및 정제의 최종 수율은 7 mg protein /1L (LB culture) 였으며, 정제 과정까지(즉, 단백질을 수득하기까지) 총 6일이 소요되었다. 반면 본 발명의 Kenya-asfv-pep104-1(서열번호 1)의 단편 폴리펩타이드의 발현 및 정제의 최종 수율은 10 mg protein/1L(LB culture)로 현저히 상승되었으며, 정제까지(단백질을 수득하기까지) 소요되는시간이 1.5일~2일이었다. Kenya-asfv-pep104-1)는 천연형 EP402R 단백질 정제과정과 비교하여 높은 수율을 나타내었을 뿐만 아니라, 정제기간이 4일 짧았다.

[0176] 다른 조건으로 발현 및 정제하였을 때의 결과를 이를 도 1 및 도 2에 도시하였으며, EP402R 전장 단백질은 정제량이 매우 낮으나(도 1), Kenya-asfv-pep104-1(서열번호 1) 단편 폴리펩타이드는 정제량이 현저히 높다(도 2). 시간이 짧게 소요되는 정제 방법으로 EP402R의 발현 및 정제를 진행하였을 때 수율이 현저히 떨어져서 시간이 오래 소요되는 방법으로 발현 및 정제를 진행했다. 이처럼 본 발명의 Kenya-asfv-pep104-1(서열번호 1) 폴리펩타이드 단편은, 정제의 수율이 증가하고 정제 과정의 단축의 장점을 나타낸다(도 1 및 도 2 참조).

[0178] 1-3. EP402R 전장 단백질 대비 단편 폴리펩타이드들의 ASFV 감염 혈청 진단 능력 비교 평가

[0179] ID.vet社의 ID Screen® African Swine Fever Indirect Screening test kit를 이용하여, 상기 실시예 1-1에서 제작한 여러 가지 단편 폴리펩타이드들의 ASFV 감염 혈청내 항체와의 결합능력을 ID(indirect)-ELISA 방법으로 비교 평가하였다. 간략히 다음과 같은 방법으로 수행되었다. 먼저 96Well EIA/RIA plate에 Coating buffer(0.015M Sodium carbonate, 0.035M Sodium bicarbonate, Final pH 9.6)와 각각의 항원(실시예 1-1에서 제작한 여러 가지 단편 폴리펩타이드 각각, 2 ug/ml 또는 4 ug/ml 농도로 첨가)을 첨가 하고 4°C에서 overnight(16h) 으로 인큐베이션하여, 각각의 항원으로 well을 코팅하였다. 200ul의 PBST buffer(1XPBS + Tween20 0.05%)를 사용하여 각 well을 4번씩 세척해주었다. 각 well에 1차 항체를 100ul씩 첨가 후, 실온(22 °C)에서 1시간 인큐베이션하였다. 상기 1차 항체는 ID.vet社의 African Swine Fever Indirect Screening test kit 내에서 positive control로서 제공되는 ASFV 감염 돼지 혈청 형태로 처리되었다. 그 후 PBST buffer 200ul 로 각 well을 세척한 후, 각 well에 2차 항체를 100ul씩 첨가고 실온에서 1시간 인큐베이션해주었다. 각 well에 Substrate solution 100ul씩 첨가 후, 빛을 차단시키고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션 해주었다. 각 well에 Stop solution 100ul 씩 첨가하고, 450nm 에서 흡광도(Optical Density) 값을 측정하였다.

[0181] 실험결과, 도 3에서 보는 바와 같이 여러 단편들 중에서도 특히 Kenya-asfv-pep104-1(서열번호 1)의 단편 폴리펩타이드는 EP402R 전장 단백질('Kenya-asfv-p104' 로 표기)과 비교하여 유사 또는 동등한 수준으로 ASFV 감염 혈청에 대해서 높은 반응성을 나타내었다.

[0183] 실시예 2 : 아프리카돼지열병 단백질을 이용한 백신 효과 검증

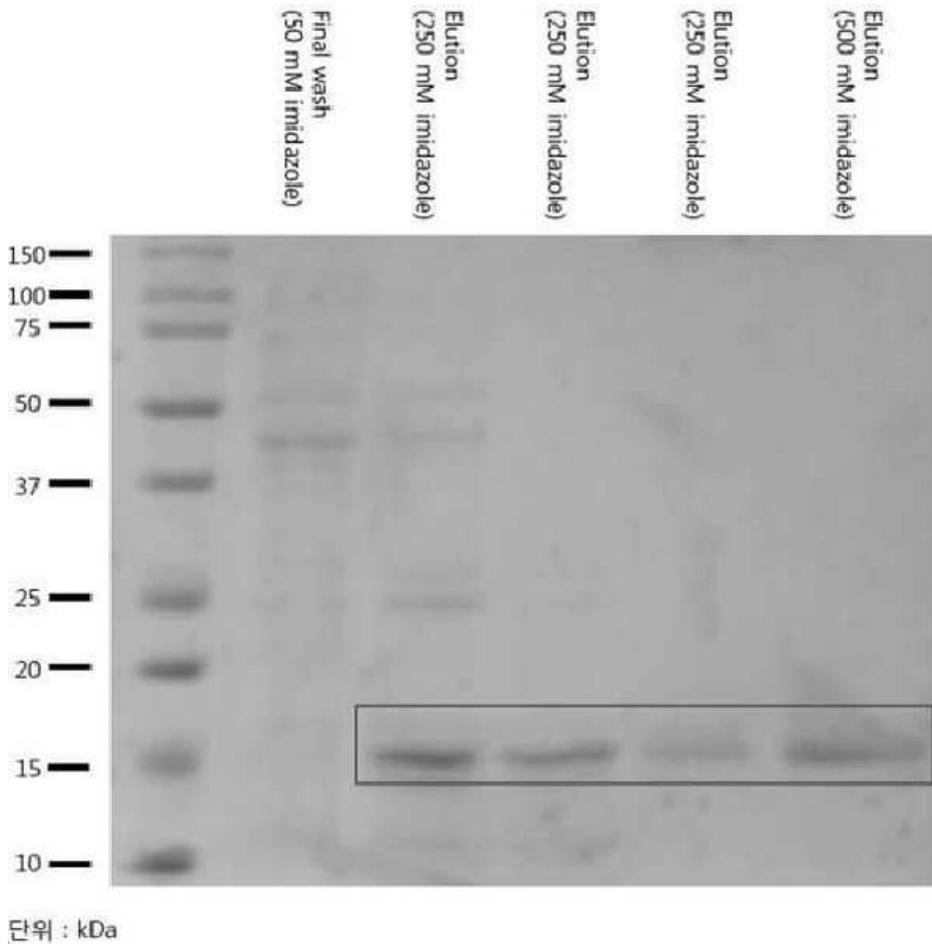
- [0184] 상기 실시예 1에서 제작한 아프리카돼지열병 재조합단백질의 백신 효과를 확인하기 위하여 도 4에 도시된 방법에 따라 면역한 후 ELISA 방법에 의해 검증하였다.
- [0185] 5-6주령의 암컷 C56BL/6 쥐에 아프리카돼지열병의 재조합 단백질인 kenya-asfv-p104, kenya-asfv-pep104-1을 프로인트 어주번트(Freund's adjuvant)와의 혼합액을 2주 간격으로 한 개체당 200 μ g을 피하 면역 주사 방법으로 접종하였다. 대조군으로는 PBS, 프로인트 어주번트를 동일한 방법으로 접종을 실시하였다.
- [0187] 상기 접종에 의해 1차 내지 3차 면역을 유발하고 2주 후 상기 개체의 혈액에서 통상의 방법에 의해 혈청을 얻은 후, IgG의 생성 정도를 확인하기 위하여 ELISA를 수행하였다.
- [0188] 상기 ELISA는 코팅용액(Na₂CO₃ 0.159g, NaHCO₃ 0.293g, 100ml 당, pH9.6)에 아프리카돼지열병 재조합단백질(kenya-asfv-p104, kenya-asfv-pep104-1)을 각각 3.0 μ g/ml의 농도로 희석한 후 96웰 플레이트에 100 μ l씩 각 well에 넣어 준 후, 4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 흡착과정을 거쳤다. 항원의 흡착이 완료된 상기 플레이트는 PBS를 이용하여 4회 세척 과정을 거친 뒤, 비특이적 결합을 배제하기 위하여 정상염소혈청이 5% 포함되어 있는 PBS를 각각의 플레이트에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 프로인트 어주번트 및 실시예 1의 재조합단백질 접종을 통해 얻은 쥐의 혈청을 PBS에 100배 희석하여 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, PBS로 4회 세척 과정을 거친 후 발색을 위한 효소가 결합되어 있는 항-쥐 IgG1 과 상온에서 1시간 동안 반응 시킨 뒤에 암실에서 기질 완충용액(3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) 및 과산화수소수)을 첨가하여 발색 시키고, 2N 황산을 가하여 발색 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0190] 도 5에서 보는 바와 같이, 음성대조군에 해당하는 PBS, 어주번트를 접종한 경우에는 항체반응이 거의 나타나지 않았으며, 아프리카돼지열병 재조합단백질(kenya-asfv-p104)은 1차 면역 후 항체반응이 약하게 나타났으며, 2차 면역 후 항체반응이 강하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 아프리카돼지열병 재조합단백질(kenya-asfv-pep104-1)은 1차 면역 후부터 항체반응이 매우 강하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0192] 상기 결과를 통하여, 본 발명에 따른 아프리카돼지열병 재조합단백질을 백신으로 사용하는 경우, 면역반응을 높게 일으킬 수 있는 것을 알 수 있다.
- [0193]
- [0194] 상기 결과를 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

산업상 이용가능성

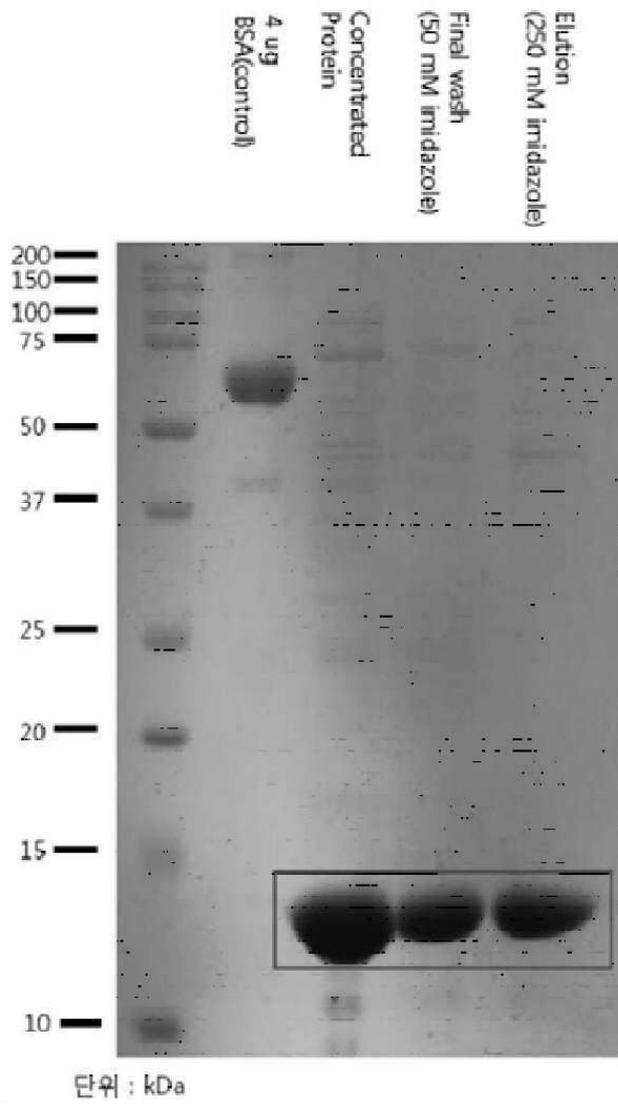
- [0196] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 아프리카 돼지열병 바이러스(African swine fever virus, ASFV) 유래 p104 단백질 절편의 재조합 항원으로서의 개발 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단리된 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 ASFV에 대한 백신 조성물과 상기 폴리펩타이드를 이용한 동물 면역화 방법, 및 상기 폴리펩타이드를 이용한 ASFV 감염 검출/진단 방법, 진단시약 및 키트에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 특유의 서열로 구성되는 폴리펩타이드는 바이러스 내 천연형 단백질과 비교하여 길이가 짧고, ASFV 내의 천연형 단백질과 비교하여도 ASFV 감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수할 뿐만아니라, 백신으로서 사용 가능성이 있으며 또한 산업적 수준에서 생산성이 높으므로 산업상 이용가능성이 크다.

도면

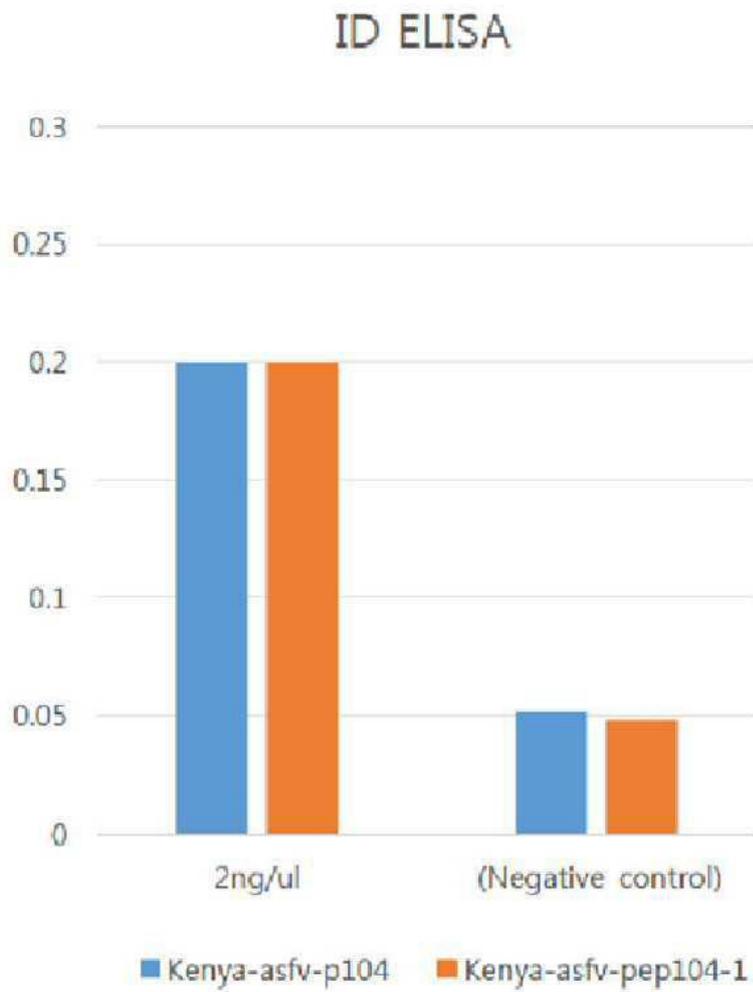
도면1



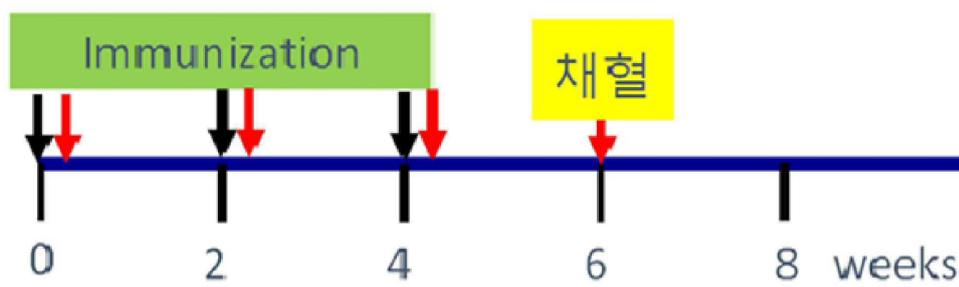
도면2



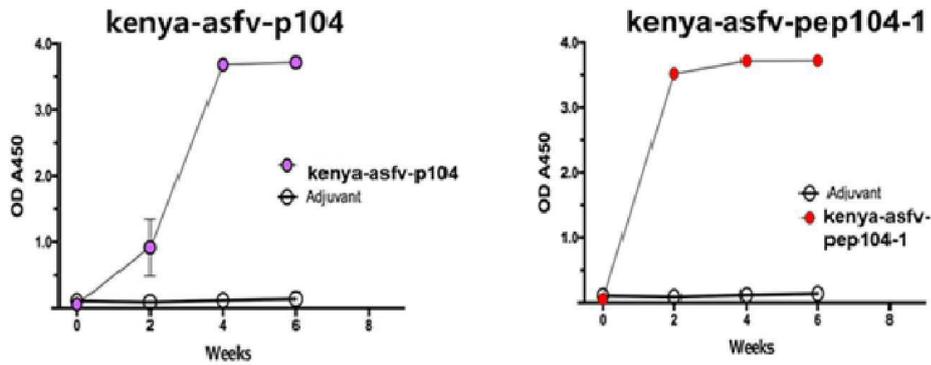
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Univerisity industry foundation, Yonsei university wonju campus
- <120> p104 protein fragment derived from African swine fever virus as recombinant antigen, and uses thereof
- <130> NP19-0003P
- <150> KR 10-2019-0069632
- <151> 2019-06-12
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 81
- <212> PRT
- <213> African swine fever virus
- <400> 1

Thr Lys Gln Glu Leu Tyr Ser Leu Val Ala Ala Asp Thr Gln Leu Asn

1 5 10 15

Lys Ala Leu Ile Glu Arg Ile Phe Thr Ser Gln Gln Lys Ile Ile Gln

20 25 30

Asn Ala Leu Lys His Asn Gln Glu Val Ile Ile Pro Pro Gly Ile Lys

35 40 45

Phe Thr Val Val Thr Val Lys Ala Lys Pro Ala Arg Gln Gly His Asn

50 55 60

Pro Ala Thr Gly Glu Pro Ile Gln Ile Lys Ala Lys Pro Glu His Lys

65 70 75 80

Ala

<210> 2

<211> 243

<212> DNA

<213> African swine fever virus

<400> 2

```

acaaaacagg aattatattc gttggtggcc gccgacacac aacttaataa ggcattgatt      60
gagcgtatct ttacatcgca gcagaagatt attcagaatg ctcttaagca taaccaggaa      120
gttattatcc cgctggcat caagtttact gttgttacag taaaagcgaa gccagcccgc      180
cagggtcaca atccggccac cggcgagcct atccaaatta aggctaaacc agagcacaag      240
gcc                                                                                   243
    
```

<210> 3

<211> 103

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 3

```

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Thr Ile Thr Lys Gln Glu Leu Tyr Ser Leu
  1           5           10           15
Val Ala Ala Asp Thr Gln Leu Asn Lys Ala Leu Ile Glu Arg Ile Phe
           20           25           30
Thr Ser Gln Gln Lys Ile Ile Gln Asn Ala Leu Lys His Asn Gln Glu
           35           40           45
Val Ile Ile Pro Pro Gly Ile Lys Phe Thr Val Val Thr Val Lys Ala
           50           55           60

Lys Pro Ala Arg Gln Gly His Asn Pro Ala Thr Gly Glu Pro Ile Gln
  65           70           75           80
Ile Lys Ala Lys Pro Glu His Lys Ala Val Lys Ile Arg Ala Leu Lys
           85           90           95
Pro Val His Asp Met Leu Asn
           100
    
```

<210> 4

<211> 309
 <212> DNA
 <213> African swine fever virus
 <400> 4

tcaaccaaga aaaagccaac catcacaaaa caggaattat attcgttggg gccgcccac 60
 acacaactta ataaggcatt gattgagcgt atctttacat cgcagcagaa gattattcag 120

aatgctctta agcataacca ggaagttatt atcccgcctg gcatcaagtt tactgttggt 180
 acagtaaaag cgaagccagc ccgccagggt cacaatccgg ccaccggcga gcctatcaa 240
 attaaggcta aaccagagca caaggccggt aaaattcgcg ctctgaagcc agtccacgac 300
 atgcttaat 309