

| |
|--------|
| 발간등록번호 |
|--------|

| |
|----------------------|
| 11-1543000-000657-01 |
|----------------------|

고증식성 키메라 돼지췌코바이러스(PCV2) 벡터 개발 및
이를 이용한 다가 백신 개발

(Development of High yielding chimeric porcine circoviruses
type 2(PCV2) vectors and multi-valent vaccine of different
genotypes)

(주)바이오포아

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고증식성 키메라 돼지씨코바이러스(PCV2) 벡터 개발 및 이를 이용한 다가 백신 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 11월 23일

주관연구기관명 : (주)바이오포아
주관연구책임자 : 조 선 희
연 구 원 : 김 선 중
연 구 원 : 김 태 은
연 구 원 : 안 영 진
연 구 원 : 이 슬
연 구 원 : 장 혜 경
연 구 원 : 신 성 호
연 구 원 : 김 수 진
협동연구기관명 : 대성미생물연구소
협동연구책임자 : 허 원
연 구 원 : 문 영 식
연 구 원 : 박 병 순
연 구 원 : 이 승 섭
연 구 원 : 허 영 환
연 구 원 : 이 병 형
연 구 원 : 강 경 임
연 구 원 : 정 광 성
연 구 원 : 허 정
연 구 원 : 김 연 희
연 구 원 : 신 영 숙

요 약 문

I. 제 목

고증식성 키메라 돼지씨코바이러스(PCV2) 백신 개발 및 이를 이용한 다가 백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

PCV2는 만성호흡기성소모성 질병을 유발하는 원인균으로 6~12주령의 돼지에서 경제적으로 매우 중요한 질병임. 국내 사용백신 중 90%이상이 수입백신으로 매년 300억 이상 수입되고 있으며, 최근 유행하고 있는 PCV2는 현 백신주인 PCV2a와 다른 PCV2b와 PCV2d등 새로운 유전형들로 기존 백신주와 항원성에서 차이를 보이고 있어 기존 백신의 수입대체뿐 아니라 항원성을 개선하기 위해선 고품질의 새로운 씨코 백신개발이 필요한 상황임. 이러한 문제를 해결하기 위해 본 연구과제는 “항원 맞춤형 고증식성 키메라 돼지씨코바이러스(PCV2) 다가 백신 개발”을 주목표로 하고 있으며 개발된 백신의 과학적인 효과 검증을 통한 효율적인 마케팅을 위하여 “PCV2에 의한 질병진단 및 백신 개발을 위한 항원 항체 진단 기술의 개발”을 보조 목표로 하였음.

III. 연구개발 내용 및 범위

역유전학을 이용하여 증식성이 좋은 기 확보된 PCV2a 바이러스에 증식성이 낮은 PCV2b 등의 다른 유전형의 ORF2를 이식하여 씨코바이러스의 증식성을 개선된 각 유전형별 키메라 바이러스를 만들고, 백신의 항원량을 보강하기 위해 곤충세포에 발현된 PCV2 각 유전형별 VLP를 개발하여 최적 생산 조건을 확립하여 고증식성 PCV2b 키메라 바이러스 백신주에 첨가한 씨코바이러스 다가백신의 실험실 효능 시험 및 야외 임상시험을 수행 하였다. 또한 PCV2 ORF2에 대한 단클론항체를 개발하여 항원 항체를 정량할 수 있는 진단법을 개발하고, PCV2 면역회피항원 및 항체를 검출하고 정량할 수 있는 진단법을 개발하였음.

IV. 연구개발결과

초기 연구개발 목표대로 역유전학을 이용하여 증식성이 좋은 PCV2a 바이러스에 증식성이 낮은 PCV2b 등의 다른 유전형의 ORF2를 이식한 4종의 키메라 바이러스를 만들어 다가백신으로 개발하였음(시험백신1). 2종은 10^7 TCID₅₀/ml 이상의 증식성을 보였으며, 나머지 2종은 10^6 TCID₅₀/ml의 증식성을 보였음. 개발된 PCV2백신을 평가하기 위한 PCV2 진단법 개발을 위해 ORF2 유전형을 구분할 수 있는 마우스 단클론항체 11종을 확립하였음. 그 중 PCV2 각 유전형을 모두 검출할 수 있는 단클론 항체 6C8클론 및 Symbiotic사 ELISA kit을 이용하여 PCV2 백신의 항원량을 정량한 결과 바이러스를 배양해 생산한 백신은 항원량에서 제조합 VLP백신의 항원량에 1/10이하로 확인되었음. PCV2b 바이러스를 불활화 하여 제조한 시험백신1의 항원량을 보강하기 위하여 baculovirus vector를 이용하여 PCV2 각 유전형별 ORF2단백을 곤충세포에서 발현한 4종의 VLP항원을 추가로 개발하였음. 곤충세포에서의 제조합 항원 발현은 20L 생산

단위 까지 최적의 생산 조건을 확립하였으며, 시험백신1(PCV2b 키메라 virus)에 VLP type의 PCV2a, PCV2d항원을 첨가한 “시험백신 2” 를 개발하여 3개 batch를 생산하였다. 시험백신2를 기니피그 및 SFP닭에 접종하여 비교한 항체 형성능은 기존 다국적 백신과 동일 수준인 1024배 (IFA)이상 이였음. SPF 돼지에서의 효능평가 시험에서 PCV2b 야외주와 PRRSV를 함께 공격접종하고 thymus에서의 바이러스 배출 정도를 비교한 결과 대조군에 비해 시험백신2를 접종한 돼지에서 10,000배 이상의 PCV2 바이러스 감소 효과를 보였음. 또한 해외에서 새롭게 보고되고 있는 PCV2의 면역회피항원에 대한 재조합 항체 단백질 C4-1 및 C4-8을 개발하여 PCV2의 면역회피항원을 정량할 수 있는 기술을 확보하였음. 이를 이용하여 PCV2 백신 중 회피항원 노출정도를 검사할 수 있는 품질검사법이 확립되었으며, C4-1 및 C4-8 면역회피항원 특이 단백질을 이용한 경쟁 ELISA법 개발로 PCV2에 의한 항체진단에서 감염된 동물과 백신접종 동물의 혈청의 구별이 가능할 수 있는 기반 기술을 확보하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- **기술이전:** 고증식성 키메라 썬코바이러스 4주 및 Baculoviral vector를 이용한 PCV2 VLP생산기술(PCV2a, PCV2b, PCV2d, PCV2e type)등 2가지 기술에 대하여 참여기업인 (주)대성미생물 연구소에 기술이전 하였음.

- **특허:** PCV2 회피항원에 특이 재조합 단백질을 세계최초로 개발하여 국내특허 및 PCT출원 하였음.

“PCV2에 특이적인 단일클론항체 및 이를 이용한 PMWS의 진단 방법{PCV2-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR DIAGNOSING PMWS USING THE SAME}” 출원번호: 10-2014-0142442

*PCV2백신관련 특허는 야외 임상시험에 의한 결과가 정리되는 대로 “고증식성 키메라 돼지썬코바이러스(PCV2) 및 이를 이용한 다가 백신” 명으로 6개월 이내에 출원할 예정임.

- **논문:** PCV2 진단 관련 1건, PCV2 백신관련 1건 투고 예정임.

“A recombinant monoclonal antibody specific for PCV2 decoy epitope and it's use in the diagnosis of PCV2” 논문명으로 투고 예정.

“The different humoral immune response according to PCV2 antigen types in vaccinated animals” 논문명으로 투고 예정.

- 유전자원등록

GenBank Accession No.

키메라 썬코바이러스 4종: KM924364(BP-PCV2a-1), KM924366(BP-PCV2a-2),
KM924367(BP-PCV2b), KM924369(BP-PCV2d)

Baculovirus 발현용 코돈최적화 PCV2 VLP유전자 3종: KM924365(BP-PCV2a-1-opt),
KM924368(BP-PCV2b-opt), KM924370(BP-PCV2d-opt)

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of High yielding chimeric porcine circoviruses type 2(PCV2) vectors and multi-valent vaccine of different genotypes

II. Objective and demand for research and development

PCV2 is a pathogen causing chronic wasting disease in post weaning pigs and chronic respiratory disease mainly in 4 to 14 week old pigs and so finally such huge economic damage to swine farms. Over 90% of PCV2 vaccines being used are imported ones and the year total market is almost 40M Korean won. Meanwhile, those vaccines contains PCV2a, which is different from current epidemic field strains; PCV2b & PCV2d in terms of antigenicity. So, for not only substituting imported vaccines but also improving antigenic homology, there is a need to develop new high quality PCV vaccine in Korea. Meeting this demand, our research and development are mainly targeting to develop 'High yielding chimeric porcine circovirus type 2(PCV2) vectors and multi-valent vaccine of different genotypes' and moreover for effective marketing with proving its product efficacy based on science, we also targeting to improve 'antigen-antibody diagnostic techniques for disease diagnosis and vaccine development.

III. Content and scope of Research and development

Implementing ORF2 of different genotype(e.g. PCV2b) which is low proliferating to established PCV2a which is high proliferating with the reverse genetics, each genotype of good proliferating chimeric virus were developed and to improve better antigenicity, each genotype VLPs expressed in insect cells were also developed and finally optimal production environment has been established. And then lab test and on-farm trials were conducted with the high proliferating chimeric & multi-valent PCV2 vaccine. And with monoclonal antibody to PCV2 ORF2, diagnostic method to quantify antigen-antibody was developed and also how to detect and quantify PCV2 decoy antigen-antibody was also developed.

IV. Results of Research and development

As the original objective of this research and development, with the reverse genetics, low proliferating genotype ORF2 of such as PCV2b etc were implemented to high proliferating PCV2a and four kinds of chimeric virus, multi-valent vaccine was developed(Test vaccine 1). Two kinds of virus were showed a proliferation ability by over 10^7 TCID₅₀/ml and the rest two kinds of virus 10^6 TCID₅₀/ml. To set up diagnostic method to evaluate the vaccine, 11

kinds of mouse-derived monoclonal antibody were established, which could be differentiate each ORF2 genotype. With monoclonal antibody 6C8Clone and Symbiotic ELISA kit, that they could detect all genotype, antigen amount of PCV2 vaccine was quantified and it was found that antigen amount of the vaccine produced from whole virus culture was less than one of recombinant VLP vaccine by one tenth. To bolster antigen amount in Test vaccine 1(PCV2b killed vaccine), four kinds of VLP antigen which were each ORF2 protein of each genotype expressing in insect cells were additionally developed with baculovirus vector. Recombinant antigen expressing in insect cells has been established by 20L production unit and Test vaccine 2 has produced by three batch by adding VPP type PCV2a and PCV2d antigen to Test vaccine 1(PCV2b chimera virus). The antibody level by injecting Test vaccine 2 to guinea pigs and SPF chickens was the same to that of current multinational vaccines by 1024 times(IFA). In efficacy evaluation test in SPF pigs, which were challenged by PCV2b field strain and PRRSV at the same time, Test vaccine 2 group showed better PCV2 virus reduction than control group by 10,000 times through assaying virus level of each thymus. And qualifying method for PCV2 decoy antigen, which has been newly reported abroad, has been established by developing recombinant antibody protein C4-1 & C4-8 which are specific to PCV2 decoy antigen. Using this method, quality test on PCV2 vaccine has been set up to measure decoy antigen level. and by developing competitive ELISA test by using specific protein of C4-1 and C4-8 decoy antibody in terms of PCV2 antibody diagnosis, the basic technology to differentiate infected animal's serum from vaccinated animals has been secured.

V. Research performance and its planning

- **Technology transfer:** Two skills about four strains of high proliferative chimeric PCV and PCV2 VLP production with BAculoviral vector(PCV2a, PCV2b, PCV2d, PCV2e type) have been transfered to Daesung Microbiological Labs co.LTD.

- **Patent:** PCV2 decoy antigen specific recombinant protein has been developed for the first time and domestic patent and PCT have been applied. {PCV2-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR DIAGNOSING PMWS USING THE SAME} 10-2014-0142442.

*Patent on high proliferative chimeric and multi-valent PCV2 vaccine will be applied in 6 months as soon as on-farm trial results are analysed.

- **Paper:** one paper on PCV2 diagnosis & the other paper on PCV2 vaccine are being submitted.

“A recombinant monoclonal antibody specific for PCV2 decoy epitope and it's use in the diagnosis of PCV2”

“The different humoral immune response according to PCV2 antigen types in vaccinated animals”

-Registration of Genetic Materials

GenBank Accession No. 4 strains of Chimera Circovirus type2: KM924364(BP-PCV2a-1), KM924366(BP-PCV2a-2), KM924367(BP-PCV2b), KM924369(BP-PCV2d)

Codon optimized PCV2 ORF2 genes for Baculoviral expression systems :

KM924365(BP-PCV2a-1-opt), KM924368(BP-PCV2b-opt), KM924370(BP-PCV2d-opt)

Contents

| | | |
|-----------|---|-----|
| Chapter 1 | Research summaries | 9 |
| Chapter 2 | Studies on Domestic and Overseas in Research Progress | 16 |
| Chapter 3 | Contents of R&D performance and results | 19 |
| I. | Contents of R&D performance | 19 |
| II. | Results | 21 |
| 1. | Epidemiological study on porcine circovirus | 21 |
| 2. | Development of recombinant expression vector for preparing highly productive chimeric PCV2 | 24 |
| 3. | Characterization of highly productive chimeric PCV2 isolates | 32 |
| 4. | Enhanced replication of PCV2 in a newly constructed PK15 cell line | 42 |
| 5. | Generation of genotype-specific PCV2 ORF2 VLP | 48 |
| 6. | Preparation of experimental vaccine for PCV2 | 60 |
| 7. | Efficacy assessment of experimental vaccine | 66 |
| 8. | Development of Antigen/Antibody detection methods for diagnosis of PCV2 | 86 |
| A. | Development of a antigen detection kit for PCV2(Supervising authority) | 86 |
| B. | Development of a antibody detection kit for PCV2(Supervising authority) | 92 |
| C. | Development of PCV2 decoy antigen-specific antibody(scFV) | 98 |
| D. | PCV2 antigen and antibody analysis using PCV2 decoy antigen-specific antibody(scFV) | 109 |
| 9. | Clinical field trials | 113 |
| Chapter 4 | Goal attainment and contribution-level to related fields | 120 |
| Chapter 5 | R&D achievements, utilization plan | 122 |
| Chapter 6 | Current trends in science and technology | 125 |
| Chapter 7 | Research facilities and equipment | 127 |
| Chapter 8 | References | 130 |

목 차

| | | |
|-------|---|----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | 9 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 16 |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 | 19 |
| 1절 | 연구개발수행 내용 | 19 |
| 2절 | 연구결과 | 21 |
| 1. | 돼지썩코바이러스 역학연구 | 21 |
| (1) | 국내외 야외분리 PCV2 ORF2 게놈 염기서열 100개 이상 분석 | 21 |
| (2) | 돼지 썩코 바이러스(PCV2)의 각 유전형별 백신 후보주의 ORF2유전자 선발 | 22 |
| 2. | 고증식성 키메라 돼지썩코바이러스(PCV2) 벡터개발연구 | 24 |
| (1) | 고증식 돼지썩코바이러스 게놈 서열 분석 | 24 |
| (2) | 고증식성 돼지썩코바이러스 게놈 클로닝 | 25 |
| (3) | 돼지 썩코 바이러스(PCV2)의 각 유전형별 ORF2 유전자 인공합성 | 26 |
| (4) | PCV2 각 유전형별 ORF2를 갖는 고증식성 키메라 PCV2 작출 벡터 제작 | 27 |
| (가) | 고증식성 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터내의 PCV2 ORF2 교체 | 27 |
| (나) | 고증식성 키메라 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터 제작 | 28 |
| (5) | PCV2의 각 유전형별 ORF2 유전자를 갖는 고증식성 키메라 PCV2 작출 | 31 |
| 3. | 작출된 고증식성 키메라 PCV2의 특성 시험 | 32 |
| (1) | 작출된 고증식성 키메라 PCV2의 염기서열 분석 | 32 |
| (2) | 작출된 고증식성 키메라 PCV2의 PK-15세포주에서의 증식성 | 34 |
| (3) | 고증식성 키메라 돼지썩코바이러스(PCV2) 백신 후보주 생산 최적화 | 35 |
| 4. | PCV2의 고증식 PK15 세포 주 개발 | 42 |
| (1) | CSFV-NS2유전자 클로닝 | 43 |
| (2) | CSFV-NS2유전자 발현 벡터 작성 | 44 |
| (3) | CSFV-NS2유전자 발현 PK-15 단일 세포 클론 작성 | 44 |
| (4) | CSFV-NS2유전자 발현 PK-15 단일 세포 클론들의 특성 분석 | 45 |
| (5) | PK-15주의 증식 확인 및 보관 | 46 |
| (6) | 썩코바이러스(PCV2)의 증식성 조사 | 46 |
| 5. | PCV2 각 유전형별 ORF2 단백 VLP(Viral like particle) 제작 | 48 |
| (1) | PCV2 각 유전형별 ORF2 발현 baculovirus vector제작 | 48 |
| (2) | PCV2 각 유전형별 ORF2 발현 baculovirus 작출 | 49 |
| (3) | 세포주에서의 항원발현 및 VLP시험생산 | 53 |
| (4) | VLP의 면역원성 시험(기니피, SPF 닭) | 56 |
| (5) | PCV2 VLP 생산 최적화(주관, 협동) | 57 |
| 6. | 시험백신의 제조 | 60 |
| 가. | 고증식성 키메라 PCV2시험백신의 제조 | 60 |
| 나. | 고증식성 키메라 PCV2b 바이러스 및 VLP항원 보강 PCV2다가 백신의 제조 | 65 |
| 7. | 시험백신의 효능평가 | 66 |

| | |
|---|-----|
| 가. 시험백신 1의 효능평가 | 66 |
| (1) 고증식성 키메라 PCV2(시험백신1)의 면역원성 평가 | 66 |
| (2) 시험백신 1의 자돈에 대한 항체 형성능 및 효력시험(500배 이상) | 66 |
| (3) 시험백신 1의 보조제 비교시험 | 71 |
| 나. 시험백신 2의 효능평가 | 76 |
| (1) 실험동물에 대한 항체형성능 시험(500배 이상) | 76 |
| (2) SPF 자돈에 대한 효능평가(공격 접종시험) | 79 |
| 다. 시험백신 1,2 효능평가 요약 | 85 |
| (1) 시험백신 1,2의 자돈에 대한 항체 형성능 시험(500배 이상)결과 | 85 |
| (2) 자돈에 대한 효력시험 결과 | 85 |
| 8. PCV2 항원 항체 진단 법 개발 | 86 |
| 가. PCV2 항원 검출 kit 개발(주관) | 86 |
| (1) PCV2 ORF2특이 단클론 항체의 개발 | 86 |
| (2) PCV2 ORF2 항원 정량 kit의 개발 | 90 |
| 나. PCV2 항체 검출 kit 개발(주관) | 92 |
| (1) PCV2 total antibody 측정용 IFA kit개발 | 92 |
| (2) PCV2 total antibody 측정용 ELISA kit개발 | 93 |
| (3) PCV2 Decoy antibody(면역회피 항체) 측정용 ELISA kit개발 | 96 |
| 다. PCV2 decoy antigen 특이 항체(scFv) 개발 | 98 |
| (1) PCV2 면역 항체 라이브러리의 제작 | 99 |
| (2) 고정화된 항원 상에서의 라이브러리 패닝 (바이오 패닝, Bio-panning) | 102 |
| (3) 파아지 ELISA에 의한 클론의 선별 | 102 |
| (4) 재조합 항 PCV2 scFv-human Ck 융합 단백질 제작 | 103 |
| (5) scFv-Ck 융합 단백질의 결합능 측정 | 104 |
| (6) 항 PCV2-scFv-Ck 융합 단백질과 돼지 혈청 간의 Competition ELISA | 105 |
| 라. PCV2 decoy antigen 특이 항체(scFv)를 이용한 PCV2 항원 항체 분석 | 109 |
| 9. 야외임상시험 | 113 |
| | |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 120 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 | 122 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 125 |
| 제 7 장 연구시설·장비 현황 | 127 |
| 제 8 장 참고문헌 | 130 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 최종 목적 및 범위

- ① 항원 맞춤형 고증식성 키메라 돼지췌코바이러스(PCV2) 다가 백신 개발
- ② PCV2에 의한 질병진단 및 백신 개발을 위한 항원 항체 진단 기술의 개발

2. 연구개발의 필요성

(1) 각 유전형별 췌코바이러스 백신이 필요한 이유

(가) 췌코바이러스의 유전형

췌코바이러스 백신의 효능에 가장 중요한 부분이 항원성이므로 췌코백신은 최근 유행하는 바이러스와 항원성이 일치해야 최고의 백신이라 할 수 있음. 각 유전형별 췌코바이러스 백신이 안 되는 이유는 췌코바이러스를 충분히 증식시키지 못하기 때문이나, 바오포아와 대성미생물의 기 확립된 연구결과 및 축척된 기술로 각 유전형별 췌코바이러스 백신개발이 가능하기 때문임.

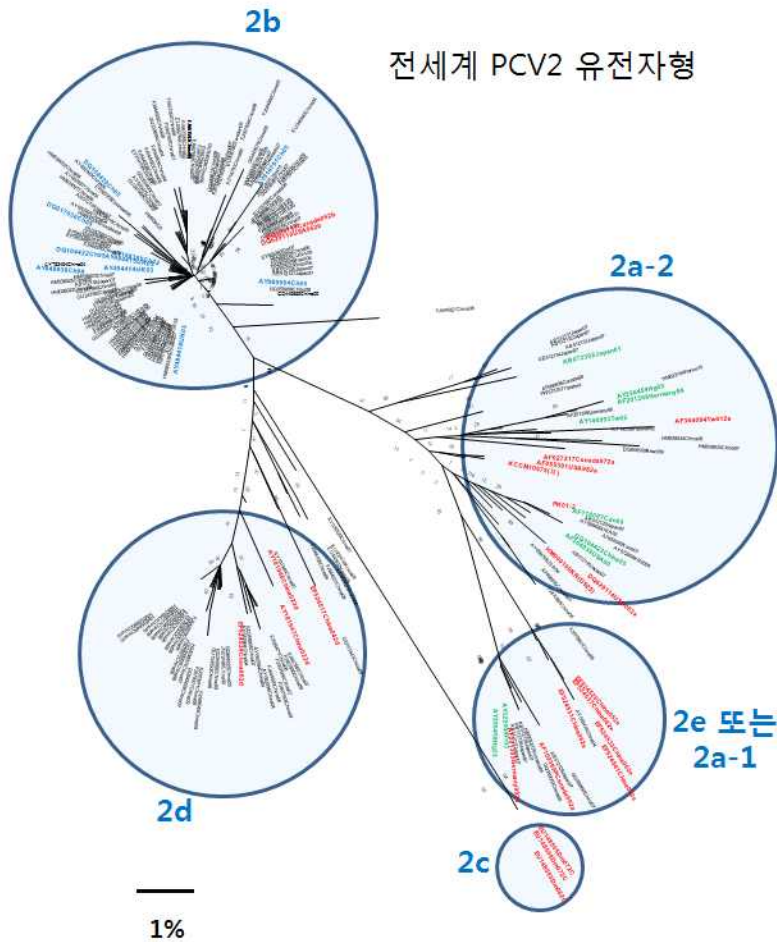


그림1. 전세계 PCV2 유전자형(ORF2의 아미노산 서열)

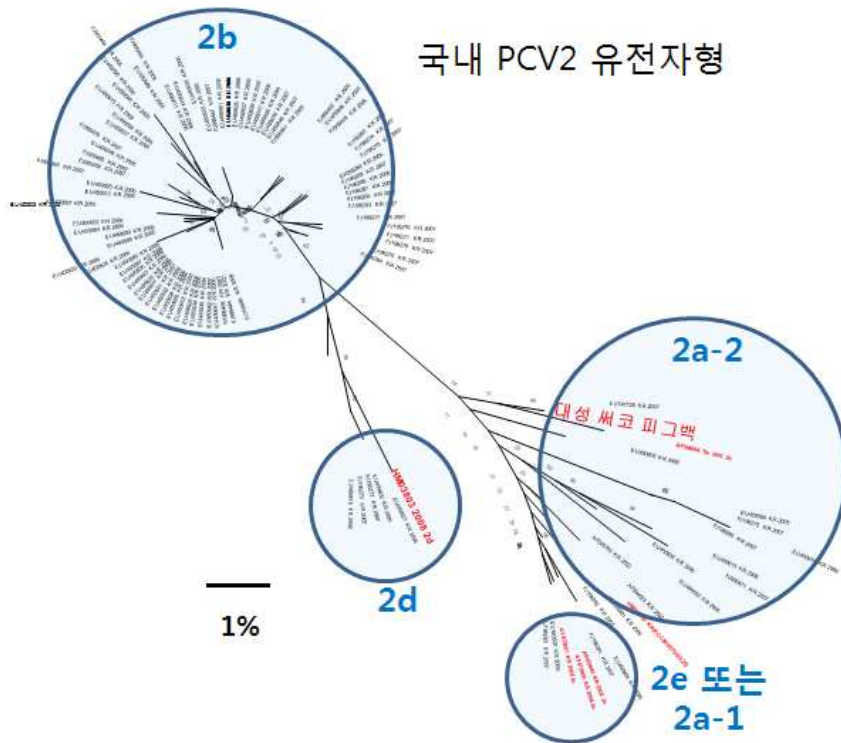


그림2. 국내분리 PCV2 유전자형(ORF2의 아미노산 서열)

돼지써코바이러스(Porcine circovirus: PCV)는 엔벨롭이 없는 한 가닥의 원형 DNA바이러스(non-enveloped circular single stranded DNA virus)로 게놈의 크기가 1767~1768개의 염기로 이루어져 있음. 3개의 주요 ORF(open reading frame)을 가지고 있으며, 이중 ORF2가 바이러스의 캡시드(capsid) 단백 유전자로 바이러스의 주요 혈청형 및 항원형을 나타냄. PCV는 돼지에서 비병원성인 PCV1과 돼지에서 PMWS를 일으키는 PCV2로 분류됨. PCV1과 PCV2 간에는 75% 게놈간 상동성이 있으나 바이러스의 중화항체를 생성하는 ORF2단백은 서로 간 약 40%의 아미노산서열에서 차이를 보여 혈청학적으로 큰 차이가 있음. 돼지에서 병원성이 있는 PCV2의 경우 ORF2단백의 아미노산 서열로 유전형의 차이를 분석해 본 결과 과거에는 2a type이 주류를 이루고 있었으나 PCV2a type백신이 접종되고 난 이후인 2000년 중반부터는 분리주의 대부분이 2b로 알려지고 있으며, 최근에는 2d type을 포함하여 2a(또는 2a-2), 2b, 2c, 2d(또는 mutnat PCV2b; mPCV2b), 2e(또는 2a-1)등 5개 type이 분리되고 있으며(그림 1. 참조) 국내에서도 2c를 제외한 모든 type이 분리되고 있음(그림 2. 참조). 각 type내에서는 약 99~96%의 아미노산 상동성이 있으나 각 type간에는 8~14%정도로 많은 차이를 보임.

(나) 써코바이러스의 유전형에 따른 기존백신의 방어효능

현재 국내외에서 PCV2백신에 사용되고 있는 ORF2단백 유전자는 모두 PCV 2a(또는 2a-2)에 속함. PCV2a유전형으로 만든 백신으로 최근까지 다양하게 출현하고 있는 모든 유전형에 대한 백신의 효능을 평가한 시험 결과는 아직 까지 보고되고 있지 않음. 다만 몇몇 유전형별에 대해서는 각 유전형별 백신의 방어효능을 평가한 보고가 있었음.

먼저 2008년 Meng, X.J.등이 보고한 결과를 살펴보면, 2a-2type으로 백신하고 2a-2 type 2종류와 2b type 2종류 총 4개의 PCV2 바이러스를 공격접종하고 20일 이후 혈청과 비강 및 분변

에서의 바이러스 검출율로 방어 효능을 측정했음(표2. 참조). 표 2. 결과를 보면 **현재 사용 중인 PCV2a-2 type**백신은 같은 type에는 효과적이거나 다른 type PCV2에 대해서는 비강과 분변 내에 공격 바이러스가 더 많이 검출 되는 등 그 효과가 더 떨어짐을 확인할 수 있었음.

표 2. **PCV 2a-2** type백신의 각 유전형별 방어 효능 비교 시험.
(Vaccine(2008)26, 1063~1071, Meng, X. J. et. al.)

| | | 혈청내 검출율 | | 비강내 검출율 | | 분변내 검출율 | |
|--------------------|-----------|---------|-----|---------|------------|---------|------------|
| 공격 접종 주의 종류 | | 대조군 | 백신군 | 대조군 | 백신군 | 대조군 | 백신군 |
| 2a-2 type | Buros | 70% | 0% | 85% | 30% | 60% | 0% |
| | STOON1010 | 40% | 0% | 70% | 30% | 90% | 0% |
| 2b type | I-12/11 | 80% | 0% | 100% | 70% | 70% | 15% |
| | M0/S-06 | 80% | 0% | 100% | 70% | 70% | 15% |

2010년 Yoichi Takahagi등은 PCV 2a-2백신을 접종한 후 2a-1, 2a-2, 2b등 3개 바이러스 type 별 방어 효능을 평균 폐사 감소율로 평가하여 보고하였음. 그 결과 PCV2a-2백신 사용 후, PCV2a-2와 PCV2b type 발생 농장에서는 약 50%정도의 폐사가 감소하여 상당한 경제적 효과가 있었으나, PCV2a-1 발생 농장에서는 백신 사용 전 후에 약 폐사율 감소가 거의 나타나지 않아 PCV2 백신은 유전형에 따라 백신의 효과가 다름을 보였음(표 3.참조).

표 3. PCV2 백신 사용 후 PCV2 유전형별 평균 폐사 감소율의 비교.
(J. Vet. Med. Sci. 72(1):35-41, 2010)

| | PCV2 바이러스 유전형 | | |
|-----------|---------------|---------|-------|
| | PCV2a-1 | PCV2a-2 | PCV2b |
| 평균 폐사 감소율 | 4% | 41.8% | 48.3% |

위 두 임상 시험 결과에서도 알 수 있지만, PCV2 바이러스의 방어와 관련된 ORF2단백의 아미노산 상동성이 현재 백신으로 사용 중인 PCV2a-2와 최근 야외에서 분리되고 있는 PCV2간에 상당한 차이(8~14%)를 보이고 있음.

연구과제가 시작되기전부터 알려졌던 PCV2a-1 및 PCV2b 유전형 외에도 최근 본연구과제가 시작된 이후인 2012년 부터는 기존 PCV2a유전형으로 제작한 백신으로는 방어가 어려운 것으로도 알려진 항원적 변이주, 즉 mutant PCV2b(mPCV2b) 혹은 PCV2d로 불려지는 유전형들이 출현하였다(Xiao CT등, J Vriol 2012,86(22):12469)

그러므로, 보다 효과적인 백신주의 개발을 위해서는 최근 유행하는 유전자 type의 PCV2를 추가로 백신주로 개발해야 현재 시장을 선점하고 있는 다국적 기업 백신과 차별화된 백신이 될 것임.

(2) 고중식성 썬코바이러스 생산기술이 필요한 이유

돼지췌코바이러스2형(PCV2)에 대한 백신은 ORF2 유전자를 곤충 세포에서 발현하여 정제된 재조합 단백 항원을 이용하거나 PCV2 바이러스 자체를 PK-15 세포주에서 배양하여 생산된 바이러스를 불활화한 항원으로 제조되고 있음. 현재 가장 많이 사용되고 있는 **재조합 단백 백신의 경우 발현 및 정제에 많은 비용이 소요될 뿐 아니라 PCV2에 대한 바이러스 중화 항체가 대부분 선형항원이 아닌 구조항원인 점을 비추어 볼 때 바이러스 입자를 그대로 불활화한 백신에 비해 항원성이 떨어질 수 있어 이를 극복하기 위해서는 바이러스 입자와 유사한 구조 VLP(virus like particle)로 발현될 수 있도록 고도의 발현기술이 필요하며, 다양한 유전형에 대한 재조합 항원 발현역시 요구되고 있음.**

백신의 항원성이 우수한 바이러스 입자를 이용한 불활화 백신은 PCV2 바이러스가 PK-15 세포주에서 잘 증식하지 못해(보통 10^{3-4} TCID₅₀/ml) 백신 항원으로 사용하기에 역가가 낮아 상용화가 어려움. 현재 이러한 문제를 극복하기 위해 **다국적 기업들은 PK-15세포주에서 PCV2 보다 잘 증식하는 PCV1에 PCV2의 ORF2를 조합한 키메라 바이러스를 이용하여 불활화 백신에 사용하고 있음.** 이러한 방법도 증식성이 10^4 TCID₅₀/ml 밖에 되지 않아 역시 항원을 농축해야 백신으로 사용가능하므로 생산원가가 매우 높음. 또한 PCV1과 PCV2를 이용한 키메라 제조법은 이미 국제특허에 등록되어 있어 국내 백신회사는 상용화 목적으로 사용이 불가능 함.

그러나 **본 연구팀은 PCV2바이러스를 PK-15세포주에 계대 배양하고 생산에 필요한 다양한 조건을 최적으로 조절한 결과 기존에 알려진 PCV2의 생산성의 한계를 넘어선(최소 100~1000 배 이상) 세계최고의 생산성을 갖는 (10^7 TCID₅₀/ml) 백신 바이러스를 개발하여 제조원가를 1/20로 낮추었음.** 본 연구팀 이 보유한 이 기술은 PCV2 백신의 상용화에 가장 중요한 기술이므로 **본 기술을 모든 췌코바이러스에 적용할 수 있는 기반 기술로의 연구개발이 절실함.**

(3) 역유전학을 이용한 고증식성 키메라 췌코 바이러스 작출 기술이 필요한 이유

현재 사용 중인 선진국의 백신과 차별화를 갖는 최고의 백신 개발을 위해서는 최근에 유행하고 있는 췌코바이러스와 항원성에 있어 일치해야 하므로 야외에서 유행하는 각 췌코바이러스의 주요 유전형이 모두 포함 되도록 불활화 백신을 개발해야 하며, 제품이 가격 경쟁력을 갖기 위해서는 각 췌코바이러스의 생산성이 최소 10^5 TCID₅₀/ml 이상에서 10^7 TCID₅₀/ml 정도가 되어야 함. 이러한 목표를 달성하기 위해선 **본연구팀이 보유한 세계최고의 생산성을 갖는 췌코바이러스를 골격으로하여 역유전학 기술을 이용한 키메라 췌코 바이러스 백신을 개발해야함.** 이 기술은 모든 췌코바이러스의 생산성을 향상할 수 있는 기반기술이 될 것임. 본 연구가 성공하면 세계최고의 생산성을 갖는 키메라 췌코 바이러스 제조 원천 기술을 확보하게 될 것임.

(4) 돼지 췌코바이러스 진단 kit를 새로 개발해야 하는 이유

(가)항체가의 정량이 가능한 진단 kit의 필요성.

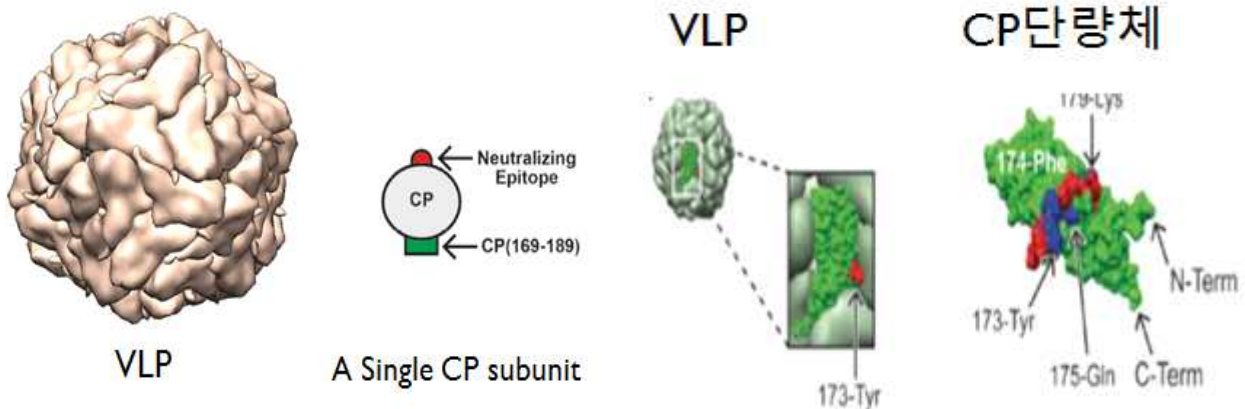
백신의 품질을 객관적으로 측정할 수 있는 진단 kit가 있어야 백신들 간의 정확한 효능 비교가 이루어질 수 있으며 이를 바탕으로 한 마케팅만이 국산 백신의 우수성을 효과적으로 홍보할 수 있음. 그러므로 시장을 선점한 선진국 제품과 비교해 장점을 홍보할 수 있는 확실한 마케팅 요소가 될 진단 kit의 개발은 국산 백신의 점유율 확대에 어려움을 겪고 있는 현재 매우 절실함.

현재 써코백신의 효력 측정을 위해 사용 중인 PCV2항체 측정 kit로 ELISA kit가 상용화 되어 있으나 항체의 역가를 측정하기 어렵고 PCV1과의 교차반응 등에 의해 백신의 품질 평가용으로의 사용은 거의 불가능함(PCV1과 PCV2의 ORF1은 90%정도의 아미노산 상동성이 있으며 ORF2의 경우 아미노산 상동성은 65%정도이나 일부 항원결정기가 서로 교차 반응하고 있음). 이러한 문제를 해결하기 위해 보다 정확한 IFA법을 몇몇 연구자들이 개발하여 사용하고 있으나 진단 kit로 제작되지는 못하고 있음. 그러므로 백신의 품질을 객관적으로 측정할 수 있도록 비특이 반응이 없으며 민감하고 측정 방법이 편리한 kit의 개발이 필요함.

(나) 항원 및 항체의 질을 평가 할 수 있는 진단 법 개발의 필요성.

PCV2는 약 1.76kb의 단일가닥의 환상 DNA 게놈을 함유하는 소형의 정이십면체의 비-외피형 바이러스로 써코비리데(Circoviridae)과로 분류되며 2개의 주요 전사기서자(ORF)가 있다. ORF1은 바이러스 복제 단백(Rep)을 만들며, ORF2는 캡시드단백(capsid protein; CP)를 만들어 낸다 (J. Gillespie등 J Vet Intern Med, 2009,23,1151-6, Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease).

PCV2의 ORF2가 전사되어 만들어진 캡시드 단백질(capsid protein: CP)은 3개씩 모여 1개의 면을 이루며 20면이 모인 정 20면체의 icosahedral 구조를 취하여 바이러스 유사입자(virus-like particles: VLP) 구조가 완성된다.



각 CP 서브 유닛을 이루는 아미노산 잔기 169에서 180은 강력한 주요항원 결정부위로 알려져 있음. 이 항원 결정부[CP(169~180)]는 VLP 구조에서는 안쪽에 묻혀있어 밖으로 노출되지 않아 항체의 접근이 어려워 바이러스를 중화항체와는 관계가 낮다. Baculovirus에서 발현된 CP로 만든 PCV2 VLP를 면역시킨 경우는 높은 중화항체가 만들어지는 반면 항 CP(169~180) 항체는 잘 만들어지지 않으나, CP 단량체를 면역한 경우 혹은 PCV2에 감염되어 PMWS 상태의 돼지들에서는 중화항체는 낮게 형성되는 반면 항 CP(169~180) 항체가 높게 만들어지는 경향을 보이므로 CP(169~180) 항원결정부는 면역학적인 회피(decoy)역할을 하는 것으로 추정됨(Trible BR 등, J Virol. 2012 86(24)13508-14, Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2).

그러므로 PCV2백신을 개발하고자 할 때 PCV2에 대한 중화항체는 높이 형성되고 항 CP(169~180) 항체는 잘 형성되지 않도록 PCV2 백신항원에 CP(169~180)잔기가 외부로 노출되지 않도록 VLP가 잘 형성된 항원원인지 확인할 수 있는 검출 기술이 필요함.

한편, PCV2의 항체 검출법은 IPMA(Immunoperoxidase monolayer assay) 및 PCV2 바이러스 입자 및 재조합 CP를 이용한 ELISA법이 개발되어 이용되고 있다(Pileri E등 Vet J. 2014, 201(3)429-32, Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2). 그러나 PCV2 VLP백신 접종된 돼지는 PCV2의 복제가 억제되며 높은 중화항체를 보이는 반면, PCV2에 감염되어 질병으로 진행된 돼지에서는 PCV2를 중화하지 못하는 항체 특히 CP의 C-말단에 대한 항체의 역할이 높기 올라가므로 PCV2에 대한 단순 항체가 만으로는 PCV2의 정확한 진단이 어렵다(Trible BR등, Vaccine 2012(30) 4079~85, Antibody responses following vaccination versus infection in a porcine circovirus-type 2 (PCV2) disease model show distinct differences in virus neutralization and epitope recognition).

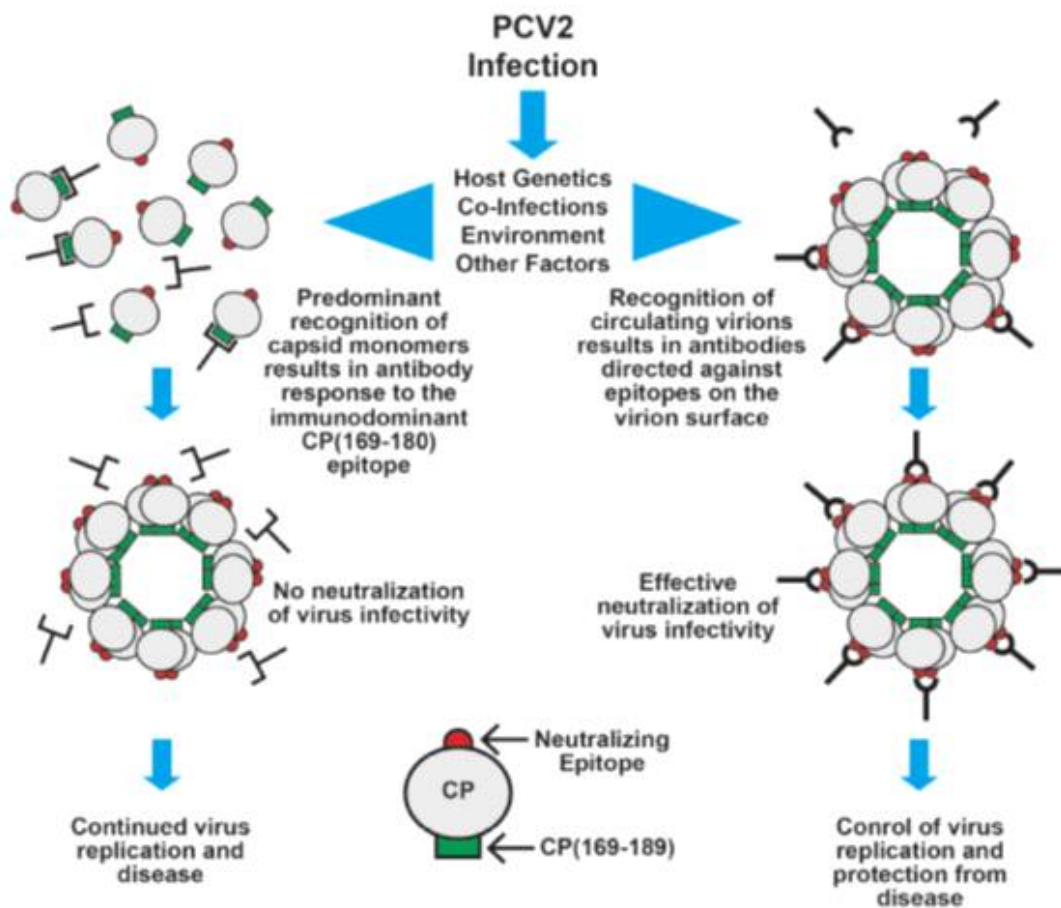


Figure 5: Structural form of PCV2 immunogen recognized by the host and relationship to outcome.

그러므로 PCV2의 항체진단에 있어서도 PCV2에 대한 항체의 역할만 측정할 것이 아니라 PCV2에 대한 항체가 중화항체인지 바이러스 중화와 관련이 낮은 CP의 C-말단의 면역 회피와 관련된 부위에 대한 항체인지 구분할 수 있는 기술개발이 필요함.

3. 정부지원의 필요성

- 기존 전통적인 방법에 의한 백신 개발 및 진단 기술로는 이와 같은 목적을 달성하기 어렵기 때문에 새로운 역유전학기술 및 항체검출 기술을 도입해야 함.

- 국내의 벤처 및 중소기업이 처한 열악한 상황으로는 의약품의 개발 및 허가에 많은 자본과 시간이 소요되는 새로운 기술은 다국적 기업이 아니고서는 선도적으로 투자하기 어려움.
- 이러한 국내의 현실상 국내 뿐 아니라 세계 시장을 이끌 수 있는 선도적인 신기술의 경우, 정부의 지원속에 연구역량이 높은 연구소와 산업화의 열망이 있는 산업체가 힘을 모아야만 사업화에 성공해 경제적으로 큰 파급효과를 이루어낼 수 있을 것임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 현황 및 문제점과 전망

(1) 돼지썩코백신의 현황 및 문제점과 전망

국내 양돈 산업은 사육돼지의 1/3이 구제역에 의해 매몰 되는 등의 최악의 상황에서 차츰 안정되어 가고 있음. 그러나 양돈 산업은 1종 전염병인 구제역 외에도 돼지의 썩코바이러스 2형(PCV-2; Porcine circovirus 2)과 같이 이유자돈의 전신성소모성증후군(Postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)을 일으키는 바이러스에 의해서도 위협받고 있음. PMWS에 걸리면 이유자돈에서 폐사나 위축, 증체량의 둔화, 쇠약, 설사를 초래하며 5~50% 폐사(보통15~20%)와 약 10%의 위축돈이 발생하므로 경제적 손실이 막대함. 이러한 문제를 해결하기 위해 다국적 기업의 제품을 포함하여 국내의 모든 백신 제조사가 제품을 출시하여 판매하고 있으나 최근 유전적으로 새로운 돼지썩코바이러스가 출현하고 있어 기존 백신만으로는 돼지썩코바이러스에 대한 피해를 완전히 막아주지 못하고 있음. 이러한 이유 때문에 **축산농가에서는 새로운 대안을 갈구 하고 있는 상황임.**

동물약품 산업 측면에서도 **돼지썩코바이러스 백신시장은 현재까지 국내에서만 1년에 400억 원, 전 세계적으로는 약 8000억 원**으로 단일 질병에 대한 동물용 백신으로는 가장 큰 시장을 형성하고 있음. 그러나 시장을 선점한 특정 다국적 제약사의 제품이 자돈 1두분당 약 3000원의 고가임에도 불구하고 국내 백신시장의 80%를 점유하고 있으며, 국산 제품의 경우 제품 가격이 약 절반에 불과 하나 점유율 합계는 10%대임. 이러한 원인은 국내 백신 제조사들이 국내 시장을 다국적 기업 제품에 미리 선점 당했을 뿐 아니라, 이후 이들 제품과 차별화된 경쟁력을 갖춘 제품을 출시하지 못한 채 오로지 낮은 가격으로만 경쟁하였고, 백신의 품질도 객관적으로 측정할 수 있는 진단 kit가 없어 백신들 간의 정확한 효능 비교가 이루어지지 못해 왔기 때문임. 결국 국산 백신은 시장을 선점한 선진국 제품과 비교해 장점을 홍보할 수 있는 확실한 마케팅 요소의 부재로 점유율 확대에 어려움을 겪고 있음. 실제로 **본 연구팀은 농림기술개발사업의 연구결과를 이전 받은 후 썩코바이러스 백신 주를** 장기간 계대 배양해 세포에 적응 시켰으며 생산에 필요한 모든 조건을 **최적화하여** 약 1000배 이상 생산성을 높였음(실시간 중합효소연쇄반응 측정법에 의해 확인한 결과 Ct 값이 기존Ct 20~24에서 Ct 9~10로 개선됨). 그 결과 썩코백신 **생산 원가를 1/20로 낮추어** 상용화가 가능한 백신으로 개발하였으며, 시장 1위 다국적 제약사 제품과 품질에서 동등하고 가격은 절반으로 낮추어 시장에 성공적으로 진입하여 **“대성썩코피그백” 제품으로 농림수산식품 과학기술대상을 수상(국무총리표창)**했음. 그러나 기존 제품과의 차별화 요소를 부각하지 못하여 매출은 현재 6%대에서 답보상태에 머무르고 있음(표 1 참조).

표1. 우리나라 쉘코백신 점유율 현황

| 제품명 | | 쉘코 피그백 | CF (수입) | CB (수입) | CV (수입) | CM | CD | CW | CN | CS | 총계 | |
|----------------------------|------|-----------|------------|------------|------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 업체명 | | 대성 미생물 | B | I | M | K | J | J | K | N | 100% | |
| 점 유 율 (%) (두분) | 2009 | 년간 | 1.60 | 79.60 | 3.00 | 8.40 | 5.60 | 1.00 | 0.80 | - | - | 100% |
| | 2010 | 1/4분기 | 7.23 | 70.95 | 6.95 | 2.63 | 5.07 | 3.76 | 3.41 | - | - | 100% |
| | | 2/4분기 | 5.64 | 74.18 | 6.91 | 1.64 | 3.50 | 4.23 | 2.90 | 0.64 | 0.30 | 100% |
| | | 3/4분기 | 5.74 | 76.80 | 6.95 | 1.28 | 2.62 | 2.44 | 2.57 | 1.10 | 0.50 | 100% |
| | | 4/4분기 | 6.33 | 78.08 | 6.09 | 0.82 | 1.65 | 2.65 | 2.34 | 1.50 | 0.48 | 100% |

다국적 기업인 M 회사에서는 쉘코바이러스 불활화백신을 상용화하여 모돈에 1두분당 25,000 원씩 판매하고 있고, B회사와 I회사는 유전자 재조합으로 ORF2 항원을 생산하여 자돈에 1두분당 3,000원씩 판매되고 있음. M 회사 백신은 고가이고 모돈에만 접종되는 백신으로 효과가 저조하여 점유율이 급속하게 떨어지고 있으나, B회사는 시장 선점 효과로 최근 오히려 매출이 증가하고 있음. I회사는 고가인 백신을 2회 접종함으로써 가격 경쟁력이 떨어져 점유율 증가가 보이지 않고 있음. 국내 5개회사도 모두 품목허가를 득하여 현재 시판 중에 있으나, 점유율은 출시 이후 급격히 줄어들고 있는 상황임. 다만 쉘코바이러스의 항원량을 높여 백신의 효력이 우수한 대성쉘코피그백 백신만은 점유율이 유지 또는 증가 되고 있으나 다국적 기업의 1위 제품을 넘어서기는 어려운 상황임.

그러므로 최근 유행하는 돼지쉘코바이러스에 대한 축산농가의 피해를 줄여주며, 국내동물약품 회사 제품의 백신 시장 점유율을 획기적으로 높일 수 있는 유일한 방안은 제품의 가격 경쟁력 뿐 아니라 현재 시장 1위 다국적 기업 백신 제품에 견주어 차별화된 우수한 품질의 백신 개발이 가장 중요 하며 또한 이를 효과적으로 검증하고 홍보 할 수 있어야 함.

이를 위해서는 첫째, 현재 시장을 선점한 다국적 제약사의 백신 항원과 항원성에 있어 우수한 차별점을 갖기 위해서는 사람의 계절성 독감 백신처럼 쉘코바이러스 백신도 국내외에서 유행하는 다양한 쉘코 바이러스의 각 유전형들을 포함하는 다가 백신 개발이 필요함.

둘째, 높은 면역원성 및 장기간의 면역 지속성을 달성하기 위한 높은 항원 역가의 백신이 필요하며 이러한 제품이 가격 경쟁력까지 갖추기 위해서는 고증식성 돼지쉘코바이러스 생산 기술이 필요함.

또한, 보다 효과적이고 특이성이 높은 공인된 돼지쉘코바이러스 진단 제품을 개발하여 국산 백신이 신뢰 받을 수 있도록 객관적으로 평가하고 공인되어야 국내 뿐 아니라 세계 시장에 국산 백신이 판매될 수 있을 것임.

(2) 쉰�코 항체진단 키트 국내외 현황 및 문제점과 전망

쉰�코 바이러스에 의한 질병을 연구하는데 가장 어려운 점은 정확한 쉰�코 항체가 측정방법이 없다는 점임. 단지 항체측정방법으로 ELISA(synbiotics사 제품 및 Biochek사 제품)법이 있으나 실험시마다 시험자마다 다른 결과가 나오기 때문에 항체양성과 음성을 구분하는 정도임으로 백신접종 시기 및 백신접종효과를 측정하기가 어려움. 또한 IFA 진단 키트가 있으나 보전성이 없어 각 실험실에서 필요시마다 제조하여 사용하는 실정임. 뿐만 아니라 IFA 진단 키트 제조 시 항원으로 PCV2를 직접 세포에 감염시켜 사용하는데 자연 상태에 많이 오염되어있는 PCV1와 병원성인 PCV2 간에 ORF1의 경우 아미노산 상동성이 85~90%에 이르기 때문에 교차 반응이 일어날 수 있으며, ORF2의 경우 65%의 상동성을 보이거나 서로 일부에서 항원결정기의 교차반응이 있음이 알려져 있어 그대로 사용할 경우 비특이 반응 문제를 해결하기 어려움. 때문에 질병에 의한 항체 및 백신접종에 의한 항체가 역시도 정확한 측정방법이 없는 실정임. 이러한 현상은 쉰�코 바이러스 양을 정확하게 측정 할 수 없다는데서 원인이 시작됨. 현재 바이러스 량 측정방법은 IFA를 통한 TCID₅₀법과 중합효소연쇄반응 측정법(PCR)이 있으나 정확한 방법이 아님. 이러한 이유 때문에 쉰�코 백신의 효과에 대한 연구가 잘 되고 있지 않음.

또한 PCV2는 이병율이 높고 대부분의 농장 환경에 오염되어 있어 돼지 사육 기간에 따라 6~10주령 이 후의 대부분의 돼지에서 PCV2 항체가 양성이 되어 기존 진단 방법만으로는 백신접종에 의한 항체인지 감염에 의한 항체인지 구분하기 어렵다. 이러한 이유로 PCV2항체 진단이 잘 이루어지지 않고 있는 있음. 그러므로 PCV2에 대한 단순한 항체의 역가뿐 아니라 감염과 백신에 의한 항체의 감별 방법이 매우 절실한 상황임.

제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과

1절. 연구범위 및 연구수행 방법

| 연구 범위 | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|--|--|---|
| 돼지썩코바이러스 역학연구 (주관) | 돼지 썩코 바이러스(PCV2)의 ORF2각 유전형별 백신 후보주 선 발 | 국내외 야외분리 PCV2 ORF2 게놈 염기 서열 100개 이상 분석 → Phylogenetic analysis(ORF2 gene) → Antigenic index(ORF2) → 돼지 썩코 바이러스 (PCV2)의 각 유전형별 백신 후보주의 ORF2유전자 선발 |
| ORF2 유전형별 고증식성 키메라 PCV2 작출 (주관) | 고증식 PCV2 바이러스 게놈 주 형에 각각의 유전형의 ORF2유전 자를 교체한 PCV2바이러스 작출 용 vector를 제작하여 역유전학 방법으로 각각의 바이러스 작출 | 고증식성 돼지썩코바이러스 게놈 클 로닝 → 돼지 썩코 바이러스(PCV2)의 각 유전형별 ORF2 유전자 인공합성 → 고증식성 키메라 돼지 썩코 바이 러스 작출 벡터 제작 → PCV2의 각 유전형별 ORF2 유전자를 갖는 고증 식성 키메라 돼지 썩코 바이러스를 PK-15세포주에 도입하여 작출(4종) |
| PCV2의 고증식 PK15 세포 주 개발 (주관) | PCV2 replication활성인자를 PK-15세포에 도입하여 PCV2바이 러스의 증식성을 증가시킴 | NF-kB를 활성화하여 세포분열 주기의 S phase 시기를 증가시키는 CSFV NS gene을 비롯한 PCV2 replication활성 인자가 도입된 PK15세포 주 확립 및 고증식성 세포주에서의 PCV2의 증식성 평가 |
| 고증식성 키메라 PCV2 백신 후보주 생산 최적화 (협동) | 4종의 키메라 썩코 바이러스를 이용 한 생산법 최적화 기술 확립 | 작출된 PCV2 바이러스의 배양조건 및 배지조성의 최적화를 통한 계대 배양으로 고증식성 백신 후보주의 생 산법 확립 |
| 작출된 고증식성 키 메라 PCV2의 특성 시험 (주관) | 작출된 PCV2 바이러스의 생물학 적, 물리적 및 화학적 특성 분석, 면역원성 및 항원정량 시험 | 염기서열 분석, PK-15 세포주에서의 증식성 평가 및 배양후 항원 정량(생 산성), 면역원성 시험(기니픽), mAb를 이용한 아형별 항원성 차이비교(PCV2 유전형별 항원성 차이 평가) |
| PCV2 각 유전형별 ORF2 단백 VLP 제작 | PCV2 ORF2의 각 아형별 공통유 전자를 최대로 포함하는 각각의 ORF2 유전자를 인공 합성하여 baculoviral vector에 클로닝하여 제조합 단백질을 발현함 | Baculoviral vector를 이용하여 PCV2 ORF2 subtype 4종에 대한 VLP(virus like particle)을 발현 및 정제하고 항 원량을 측정하고 SPF 닭 및 기니픽을 이용하여 면역원성 평가 |

| 연구범위 | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|--|---|--|
| PCV2 VLP 생산 최적화 (협동) | Baculovirus의 역가 및 곤충세포 배양 조건의 최적화를 통한 PCV2 VLP의 생산 최적화 확립 | Sf9, High5세포주 등의 곤충세포에서의 PCV2 ORF2 VLP의 최적 발현 조건을 확립함(감염 시 virus의 MOI, 세포수, 배양조건, 배양시간 등 결정) |
| PCV2 항원 검출 kit 개발 (주관) | PCV2의 ORF2 주요 아형(subtype)을 구분하는 단클론 항체 개발하여 PCV2 항원들의 항원성 차이를 정성적으로 확인 가능한 진단용 혈청 | PCV2-ORF2 단백질 특이 단클론 항체 11개 clone 제작 성공(PCV2의 ORF2의 모든 아형에 공통적인 단클론항체 5개, PCV2 a 특이 2개, PCV2 b 특이 2개, PCV2 a, b 공통 2개 등 선발). |
| | PCV2 백신항원의 항원량을 비교 정량할 수 있는 항원 정량 ELISA kit의 개발 | mAb를 이용한 PCV2-ORF2 단백질 정량 ELISA kit개발성공 (Antigen capture ELISA kit) |
| PCV2 항체 검출 kit 개발 (주관) | PCV2 total antibody 측정용 IFA kit개발 | PCV2-ORF2유전자 발현 Baculovirus를 이용하여 PCV2 ORF2 단백질 발현 세포를 메탄올로 고정하여 발현을 높임. |
| | PCV2 total antibody 측정용 ELISA kit개발 | PCV2 ORF2특이 mAb 및 제조항 PCV2 VLP antigen을 이용한 sandwich-ELISA |
| | PCV2 Decoy antibody 측정용 ELISA kit개발 | PCV2 ORF2 169~181aa peptide(decoy epitope)를 코팅한 decoy antibody 검출용 ELISA kit개발 |
| 고증식성 키메라 PCV2 다가 백신의 실험실 효능 평가 개시 (주관, 협동) | PCV2시험백신의 목적동물 및 시험 동물에서의 효력 및 안전성 시험 개시 | 시험백신 제조, 자돈에 대한 효력 시험, SPF 돼지를 이용한 효능시험, 독성에 관한시험, 안전성 시험, 면역원성 시험(기니피, 자돈에 대한 항체 형성능), 시험백신의 안정성(보존성) 시험 |
| 고증식성 키메라 PCV2 다가 백신의 야외시험 (협동, 주관) | 야외임상시험 계획서 제출 및 야외 농장시험 시작 | 야외농장시험 개시(임상시험) 야외 농장 시험(이지가족농장: 이지바이오 계열 농장 3곳) |

2절. 연구결과

1. 돼지썩코바이러스 역학연구

(1) 국내외 야외분리 PCV2 ORF2 계놈 염기서열 100개 이상 분석

돼지썩코바이러스(Porcine circovirus: PCV)는 돼지에서 이유후전신성 소모성증후군(PMWS), 돼지피부염신증후군(PDNS), 돼지호흡기질병복합체(PRDC), 소화기 장애, 그리고 모든 번식장애(Reproductive Disorder)를 일으키는 원인체이. 엔벨롭이 없는 한 가닥의 원형 DNA바이러스(non-enveloped circular single stranded DNA virus)로 계놈의 크기가 1767~1768개의 염기로 이루어져 있음. 3개의 주요 ORF(open reading frame)을 가지고 있으며, 이중 ORF2가 바이러스의 캡시드(capsid) 단백 유전자로 바이러스의 주요 혈청형 및 항원형을 나타냄.

PCV는 돼지에서 비병원성인 PCV1과 돼지에서 PMWS를 일으키는 PCV2로 분류됨. PCV1과 PCV2 간에는 75% 계놈간 상동성이 있으나 바이러스의 중화항체를 생성하는 ORF2단백은 서로 간 약 40%의 아미노산서열에서 차이를 보여 혈청학적으로 큰 차이가 있음. 돼지에서 병원성이 있는 PCV2의 경우 ORF2단백의 아미노산 서열로 유전형의 차이를 분석해 본 결과 2003년 이전까지는 2a type이 주류를 이루고 있었으나 2004년 이후 2b가 유행하기 시작했으며, 최근 새롭게 많이 출현하고 있는 2d type을 포함하여 2a(또는 2a-2), 2b, 2c, 2d, 2e(또는2a-1)등 5개 type이 분리되고 있음. 국내 PCV2의 역학을 확인하기 위하여 Gene-bank에 등록된 130주의 국내분리 PCV2의 genotype을 분석한 결과 2c type을 제외한 모든 type이 분리되고 있었음(그림 1참조). 각 type내에서는 약 99~96%의 아미노산 상동성이 있으나 각 type간에는 8~14%정도로 많은 차이를 보임.

현재 국내외에서 PCV2백신에 사용되고 있는 ORF2단백 유전자는 모두 PCV 2a(또는 2a-2)에 속함. PCV2a유전형으로 만든 백신으로 최근까지 다양하게 출현하고 있는 모든 유전형에 대한 백신의 효능을 평가한 시험 결과는 아직 까지 보고되고 있지 않음. 다만 몇몇 유전형별에 대해서는 각 유전형별 백신의 방어효능을 평가한 보고가 있었음.

먼저 2008년 Meng, X.J.등이 보고한 결과를 살펴보면, 2a-2type으로 백신하고 2a-2 type 2종류와 2b type 2종류 총 4개의 PCV2 바이러스를 공격접종하고 20일 이후 혈청과 비강 및 분변에서의 바이러스 검출율로 방어 효능을 측정했음(표1. 참조). 표 2. 결과를 보면 **현재 사용 중인 PCV2a-2 type**백신은 같은 type에는 효과적이거나 다른 type PCV2에 대해서는 비강과 분변 내에 공격 바이러스가 더 많이 검출 되는 등 그 효과가 더 떨어짐을 확인할 수 있었음.

표 1. **PCV 2a-2** type백신의 각 유전형별 방어 효능 비교 시험.

(Vaccine(2008)26, 1063~1071, Meng, X. J. et. al.)

| 공격 접종 주의 종류 | | 혈청내 검출율 | | 비강내 검출율 | | 분변내 검출율 | |
|--------------------|-----------|---------|-----|---------|------------|---------|------------|
| | | 대조군 | 백신군 | 대조군 | 백신군 | 대조군 | 백신군 |
| 2a-2 type | Buros | 70% | 0% | 85% | 30% | 60% | 0% |
| | STOON1010 | 40% | 0% | 70% | 30% | 90% | 0% |
| 2b type | I-12/11 | 80% | 0% | 100% | 70% | 70% | 15% |
| | M0/S-06 | 80% | 0% | 100% | 70% | 70% | 15% |

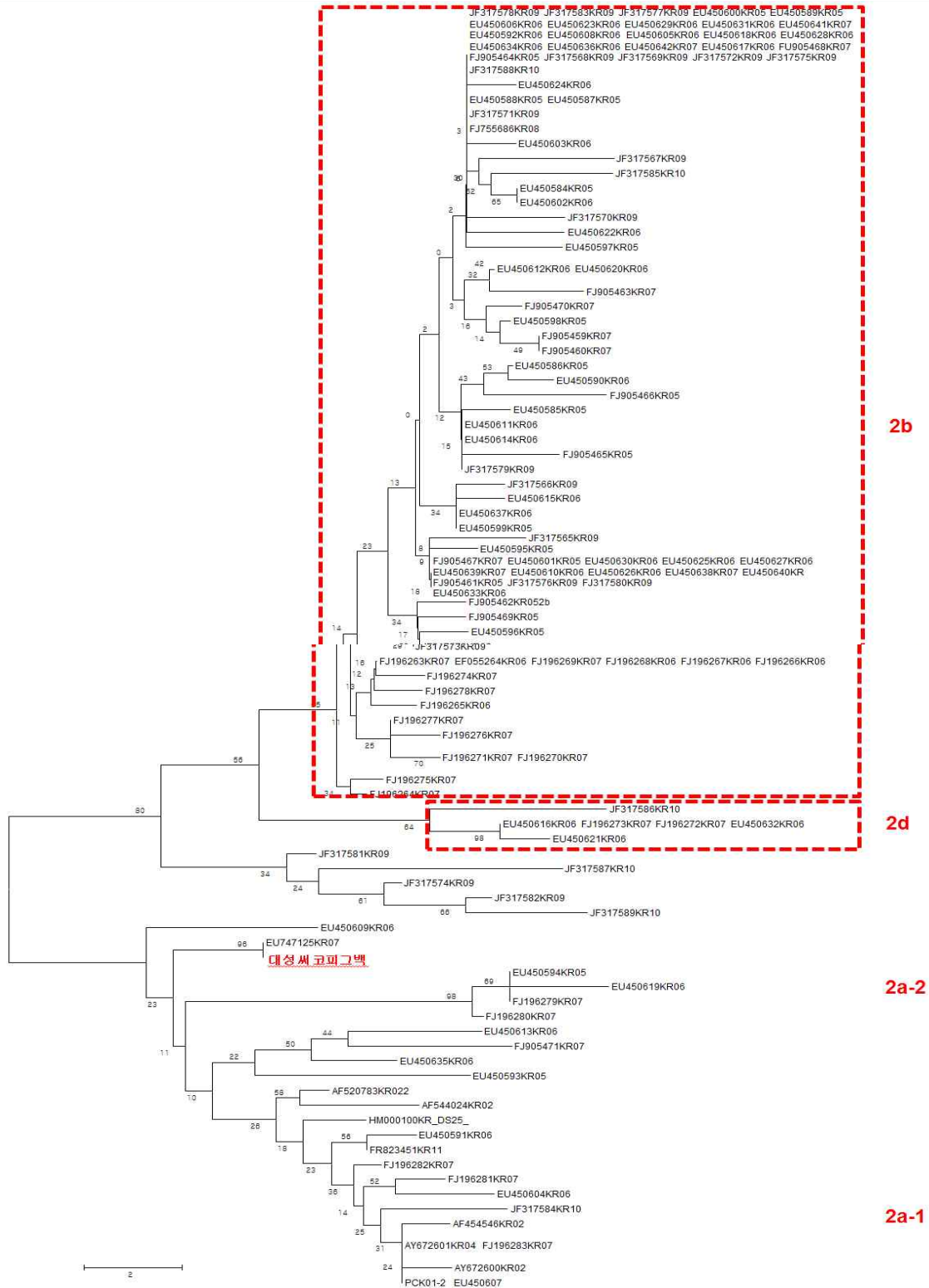


그림1. 최근 국내 유행 돼지싸코바이러스의 항원성 관련 ORF2 단백질의 유전형.

각 유전형별 유전자를 갖는 키메라 돼지싸코바이러스 작출을 위해 국내에서 분리된 130주의 돼지싸코바이러스 ORF2 단백질의 염기서열을 분석하였음.

- Phylogenetic analysis(ORF2 gene): Neighbor-Joining method (Mega ver. 4.0)
- Antigenic index(ORF2): Jameson and Wolf algorithm (DNASTAR ver. 3.1.2, Madison, WI)

2010년 Yoichi Takahagi등은 PCV 2a-2백신을 접종한 후 2a-1, 2a-2, 2b등 3개 바이러스 type 별 방어 효능을 평균 폐사 감소율로 평가하여 보고하였음. 그 결과 PCV2a-2백신 사용 후, PCV2a-2와 PCV2b type 발생 농장에서는 약 50%정도의 폐사가 감소하여 상당한 경제적 효과가 있었으나, PCV2a-1 발생 농장에서는 백신 사용 전 후에 약 폐사율 감소가 거의 나타나지 않아 PCV2 백신은 유전형에 따라 백신의 효과가 다름을 보였음(표 2.참조).

표 2. PCV2 백신 사용 후 PCV2 유전형별 평균 폐사 감소율의 비교.
(J. Vet. Med. Sci. 72(1):35-41, 2010)

| | PCV2 바이러스 유전형 | | |
|-----------|---------------|---------|-------|
| | PCV2a-1 | PCV2a-2 | PCV2b |
| 평균 폐사 감소율 | 4% | 41.8% | 48.3% |

표1과 2 두 임상 시험 결과에서도 알 수 있지만, PCV2 바이러스의 방어와 관련된 ORF2단백의 아미노산 상동성이 현재 백신으로 사용 중인 PCV2a-2와 최근 야외에서 분리되고 있는 PCV2간에 상당한 차이(8~14%)를 보였음. 현재 시장을 선점하고 있는 다국적 기업 백신과 차별화된 효과적인 백신주의 개발을 위해서 최근 유행하는 유전자 type의 PCV2를 추가로 백신주로 개발해야 함을 역학연구 및 문헌조사를 통해서 확인하였음.

(2) 돼지 썩코 바이러스(PCV2)의 각 유전형별 백신 후보주의 ORF2유전자 선발

국내에서 유행하는 PCV2의 genotype별 (2a-1, 2a-2, 2b, 2d 포함 4종) ORF2 유전자를 각 genotype의 대표성(평균적인)있는 아미노산 서열(consensus amino acid sequence) 을 갖도록 인공합성 할 ORF2유전자를 다음과 같이 결정하였음.

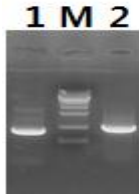
| | | | | | | | |
|--------------|-----|---------------|------------|------------|--------------|------------|--------------|
| 대성 썩코백 | 1 | MTYPRRRYRR | RRHRPRSHLG | QILRRRPWL | V HPRHRYRWRR | KNGIFNTRL | S RTFGYTVKAT |
| PCKD1-2 25P | 1 | | | | | |R. |
| 인공합성 PCV2a-1 | 1 |F.. | | | |A.. | |
| 인공합성 PCV2a-2 | 1 | | | | | |R. |
| 인공합성 PCV2b | 1 | | | | | |I.R. |
| 인공합성 PCV2d | 1 | | | | | |R. |
| 대성 썩코백 | 61 | TVRTPSWAVD | MMRFNIDDFV | PPGGGTNKIS | IPFEYYRIRK | VKVEFWPCSP | ITQGDRGVGS |
| PCKD1-2 25P | 61 | ..T..... |KL.... | | | | |
| 인공합성 PCV2a-1 | 61 | ..S..... | ..L...L... | | | | |
| 인공합성 PCV2a-2 | 61 | ..T..... |KL.... | | | | |
| 인공합성 PCV2b | 61 | ..K..... |N..L |S.PR. | V..... | | |
| 인공합성 PCV2d | 61 | ..K..... |N..L |S.PLT | V..... | | |
| 대성 썩코백 | 121 | TAVILDDNFV | TKATALTYDP | YVNYSSRHTI | PQPFSYHSRY | FTPKEVLDST | IDYFQPNNKR |
| PCKD1-2 25P | 121 | | P..N..... | | | | |
| 인공합성 PCV2a-1 | 121 | S.I..... | I....Q.... | | | | |
| 인공합성 PCV2a-2 | 121 | | P..... | | | | |
| 인공합성 PCV2b | 121 | S..... | | | T..... | | |
| 인공합성 PCV2d | 121 | | ...N..... | | T..... |R. | L..... |
| 대성 썩코백 | 181 | NQLWLRLQTS | RNVDHVGLGT | AFENSKYDQD | YNIRVTMYVQ | FREFNLKDP | LNP* |
| PCKD1-2 25P | 181 | | | | | | ...* |
| 인공합성 PCV2a-1 | 181 | ...M.... | | | | | ...K.* |
| 인공합성 PCV2a-2 | 181 | | | ...N.... | | | ...K.* |
| 인공합성 PCV2b | 181 |A G..... | | ...I...E | | | ...* |
| 인공합성 PCV2d | 181 |T G..... | | ...I.... | | | ...* |

그림. 국내 유행 PCV2의 각 genotype별 ORF2의 평균적인 아미노산 서열.

2. 고증식성 키메라 돼지췌코바이러스(PCV2) 벡터개발

(1) 고증성 돼지췌코바이러스 게놈 서열 분석

(주)대성미생물 연구소에서 26대 계대 배양하여 만들어낸 고증식성 돼지 췌코바이러스(PCV 01-2)로부터 추출한 게놈 DNA로부터 다음 프라이머를 사용하여 PCR SuperMix High Fidelity Kit로 PCR 증폭하여 PCR산물을 정제 후 염기서열을 분석하였음.



1 : PCV2 PCR products(51F~922R)
2 : PCV2 PCR products(851F~143R)
M : 1kb ladder

51F : 5' -ATGCCAGCAAGAAGAATGGA-3' 143R : 5' -TTTCTTGCCTCGTCTTCGGA-3'

851F : 5' -TGTCAGCTGTAGAAGCTC-3' 922R : 5' -GATTGTTCTGTAGCATTCTTCCA-3'

그림. 염기서열 분석을 위한 PCV2 PCR primer와 PCR산물

```

PCK 1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCAGCA
PCK 61 AGAAGAATGG AAGAAGCGGgA CCCCAACCAC ATAAAAGGTG GGTGTTTCAG CTGAATAATC
PCK 121 CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG AGCTCCCAAT CTCCCTATTT GATTATTTTG
PCK 181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
PCK 241 TTGTGAAGAA GCAAACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
PCK 301 AGAAAGCCAA AGGAACTGAT CAGCAGAATA AAGAATATTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
PCK 361 TTATTGAATG TGGAGCTCCT CGATCTCAAG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGTGTGA
PCK 421 GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGCACCTT GTAACGTTTG
PCK 481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAATAAT CAGAAGCGTG
PCK 541 ATTGGAAGAC CAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
PCK 601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
PCK 661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCGTGGG
PCK 721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
PCK 781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
PCK 841 CCTCAACTGC TGTCCAGCTG GTAGAAGCTC TCTATCggag gattaacttcc ttGGTAttTT
PCK 901 ggaagaATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
PCK 961 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
PCK 1021 TTTTATTTTT CATTTAGGGG TTAAGTGGGG GGTCTTTAAG ATTAAATTCT CTGAATTGTA
PCK 1081 CATACATGGT TACACGGATA TTGTAGTCCT GGTCGTATTT ACTGTTTTTCG AACGCAGTGC
PCK 1141 CGAGGCCTAC GTGGTCCACA TTTCTAGAGG TTTGTAGCCT CAGCCAAAGC TGATTCTTTT
PCK 1201 TGTTATTTGG TTGGAAGTAA TCAATAGTGG AGTCCAGAAC AGGTTTGGGT GTGAAGTAAC
PCK 1261 GGGAGTGGTA GGAGAAGGGT TGGGGGATTG TATGGCGGGA GGAGTAGTTT ACATATGGGT
PCK 1321 CATAGGTTAG GGCATTGGCC TTTGGTACAA AGTTATCATC TAGAATGACA GCAGTGGAGC
PCK 1381 CCACTCCCCT ATCACCTGG GTGATGGGGG AGCAGGGCCA GAATTCAACC TTAACTTTTT
PCK 1441 TTATTCTGTA GTATTCAAAG GGTATAGAGA TTTTGTGGT CCCCCCTCC GGGGGAACAA
PCK 1501 AGTCGTCAAG CTTAAATCTC ATCATGTCCA CCGCCAGGA GGGCGTTGTG ACTGTGGTAC
PCK 1561 GCTTGACAGT ATATCCGAAG GTGCGGGAGA GGCGGGTGTT GAAGATGCCA TTTTTCCTTC
PCK 1621 TCCAACGGTA GCGGTGGCGG GGTGAGGACA GCCAGGGGCG GCGGCGGAGG ATCTGGCCAA
PCK 1681 GATGGCTGCG GGGGCGGTGT CTTCTTCTGC GGTAACGCCT CTTGGATAC GTCATAGCTG
PCK 1741 AAAACGAAAG AAGTGCCTG TAAGTATT
    
```

그림. 고증식성 PCV2(PCV 01-02 26P)의 genome염기서열.

(2) 고증식성 돼지췌코바이러스 게놈 클로닝

■ PCR

(주)대성미생물 연구소에서 26대 계대 배양하여 만들어낸 고증식성 돼지 췌코바이러스(PCV 01-2)로부터 추출한 게놈 DNA로부터 다음 프라이머를 사용하여 PCR SuperMix High Fidelity Kit로 PCR 증폭하여 5' 끝에 제한효소 *Sac* II 인식 부위를 넣었다.

PCV2_SacII_F GAGACCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAG

PCV2-SacII_R TCTCCCGCGGAAATTTCTGACAAACGTTACAGG

94°C /5min-(94°C /20sec-60°C /20sec-72°C /2min)33cycles- 72°C /5min

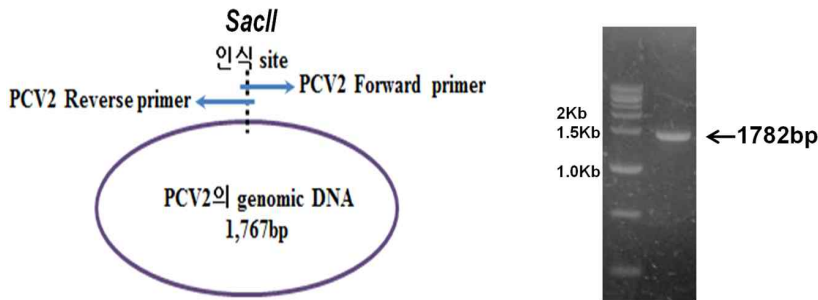


그림. 고증식성 돼지 췌코 바이러스 작출 벡터 PCR

PCR 단편은 아가로스 겔 전기영동 후에 고 순도 PCR 생성물 정제 키트 GENE CLEAN II Kit(Qbiogene)를 사용하여 정제했다.

■ TA-cloning

위의 방법으로 얻은 PCR 정제 산물을 Topo vector를 이용하여 TA cloning하였으며, M13 forward, M13 reverse primer PCR로 6개의 클론을 확보하여 plasmid를 추출 정제하여 염기서열 분석하였다. 염기서열 분석에는 M13 forward, M13 reverse, PCV2 F851 primer를 사용했다.

PCV2 F851 TGT CCC AGC TGT AGA AGC TC

94°C /5min-(94°C /20sec-48°C /20sec-72°C /2min)33cycles-72°C /5min

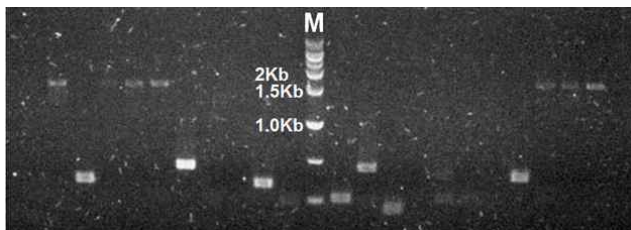


그림. 고증식성 돼지 췌코 바이러스 작출 벡터 PCR product TA 클로닝 확인

(3) 돼지 썩코 바이러스(PCV2)의 각 유전형별 ORF2 유전자 인공합성

국내에서 유행하는 PCV2의 genotype별 (2a-1, 2a-2, 2b, 2d 포함 4종) ORF2 유전자를 각 genotype의 대표성(평균적인)있는 아미노산 서열(consensus amino acid sequence)을 갖도록 ORF2유전자를 결정하였고, 인공합성을 위해 서로 겹치게 디자인하여 합성한 인공 올리고를 2 단계 PCR하여 유전자를 합성하는 PTDS(PCR-based Two-step DNA synthesis) 방법으로 r각각의 ORF2유전자를 인공합성 하였다. 인공합성 유전자 서열에는 인공합성 ORF2 유전자를 고증식성 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터에 도입하기 위한 *AccI*과 *BsmI* 제한효소인식부위가 포함되도록 하였으며, 인공합성 후 클로닝을 위해 pGEM T-vector에 클로닝하고 *E. coli* DH5 *a* 에 transformation 하여 ampicillin이 첨가된 LB agar에 도말하였으며, 37°C 에서 하룻밤 배양 후 colony를 분리하였다. 각 colony PCR을 통한 염기서열 분석을 통해 인공합성 시 PCR에 error에 의한 변이가 없는 완전한 유전자를 갖는 클론만을 골라 각 ORF2유전자를 갖는 plasmid vector를 NucleoBond® Xtra Midi Plus로 midi-prep하여 사용하였다.

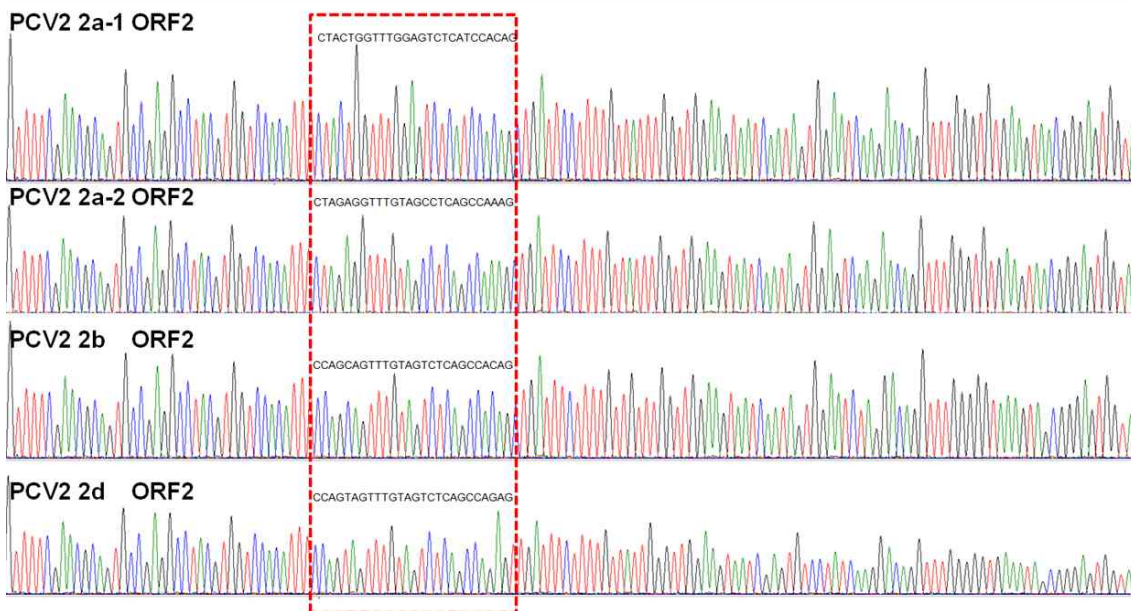
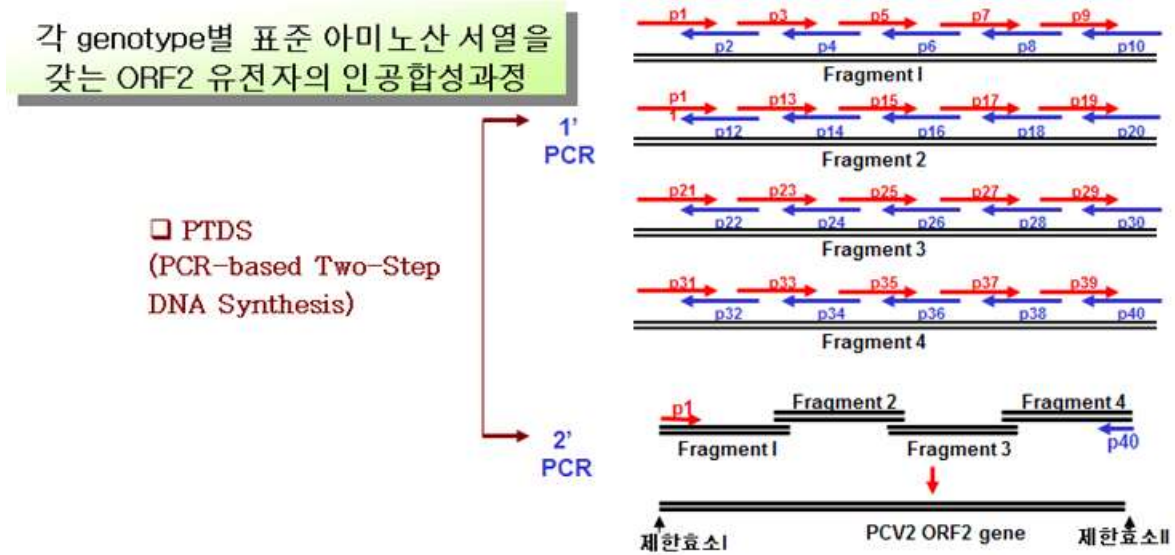
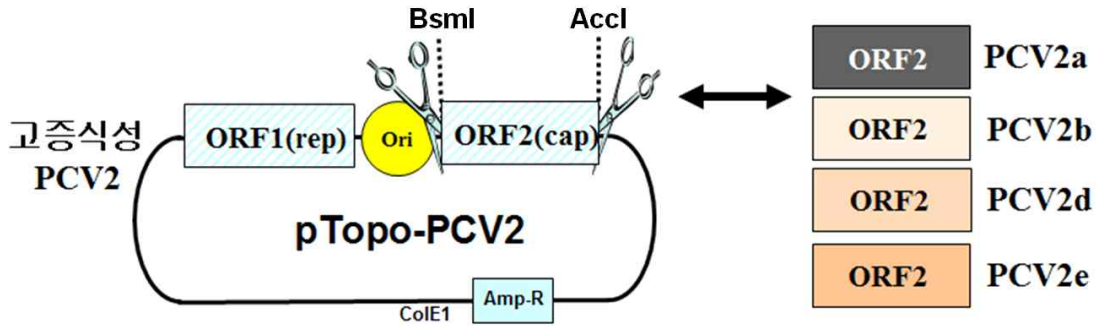


그림. 인공합성 과정 및 인공합성된 PCV2 genotype별 ORF2 유전자의 확인.

(4) PCV2 각 유전형별 ORF2를 갖는 고증식성 키메라 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터 제작
 (가) 고증식성 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터내의 PCV2 ORF2 교체



고증식성 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터 내 ORF2 부분을 인공합성한 돼지 썩코 바이러스 (PCV2)의 각 유전형별 ORF2 유전자로 교체하기 위해 바이러스 작출용 벡터와 ORF2 유전자가 들어있는 pGEM 벡터를 *AccI* 및 *BsmI* 제한효소로 처리하고 아가로스 겔 전기영동 후에 고 순도 정제 키트 MinElute Gel Extraction Kit(QIAGEN)를 사용하여 정제했다. 이들을 T4 DNA ligase를(NEB) 사용하여 16°C에서 1시간 반응 후 *E. coli* DH5 *α*에 transformation 하여 ampicillin이 첨가된 LB agar에 도말하였으며, 37°C에서 하룻밤 배양 후 형질전환 된 colony를 분리하였다.

AccI 5'...GT[↓]MKAC...3'
 3'...CAKM[↑]TG...5' *BsmI* 5'...GAATGCN[↓]...3'
 3'...CTTACGN...5'

분리된 클론은 PCV2(Sac II)-F/PCV2(Sac II)-R primer(ORF2 2b, 2d), PCV2 ORF2 -605F/PCV2 ORF2-697 primer(ORF2 2a-1, 2a-s)를 사용하여 MG-taq polymerase (macrogen)로 다음과 같이 PCR하여 확인했다.

94°C /5min-(94°C /20sec-48°C /20sec-72°C /2min)33cycles-72°C /5min

94°C /5min-(94°C /15sec-50°C /10sec-72°C /20sec)33cycles-72°C /5min

PCV2(Sac II)-F gagaccg^{ccg}gggctggctgaacttttgaag

PCV2(Sac II)-R tctccg^{ccg}gaaatttctgacaaacgttacagg

PCV2 ORF2-605F TCGAAAACAGTAWATACGACCAG

PCV2 ORF2-697R FFTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGAT

PCV2 F851 primer: 5'-TGTCCCAGCTGTAGAAGCTC-3'

확인된 균주는 플라스미드를 추출 정제하여 PCV2 F851 primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

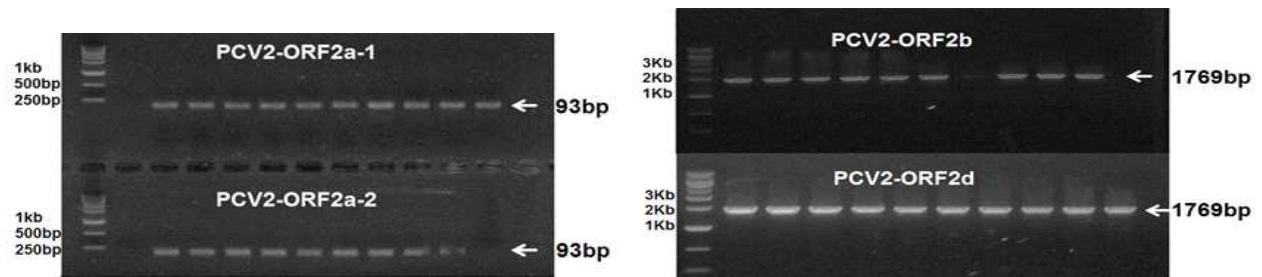
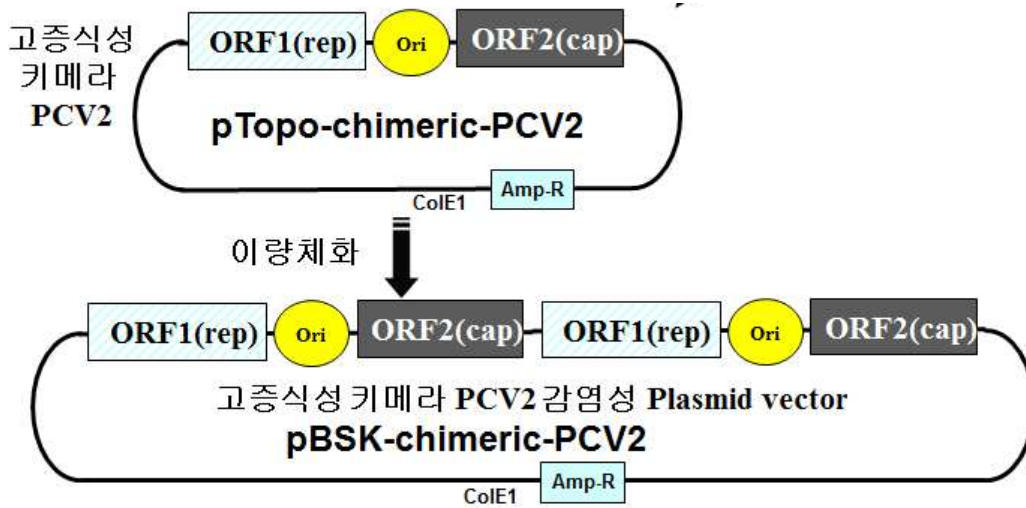


그림. 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터내 ORF2 유전자를 각 유전형별 ORF2 유전자로 교체한 클

론 확인 PCR.

(나) 고증식성 키메라 돼지 썬코 바이러스 작출 벡터 제작



■ 직렬 이량체 제작

① PCV2-Topo-PCV2 2a-1의 직렬 이량체 제작

확인된 PCV2-Topo-PCV2 2a-1클론을 제한효소 *Sac II*로 절단한 후 T4 DNA ligase로 연결하여 PCV2 게놈의 직렬 이량체를 제작하여 돼지 썬코 바이러스 작출 벡터를 제작하였다.

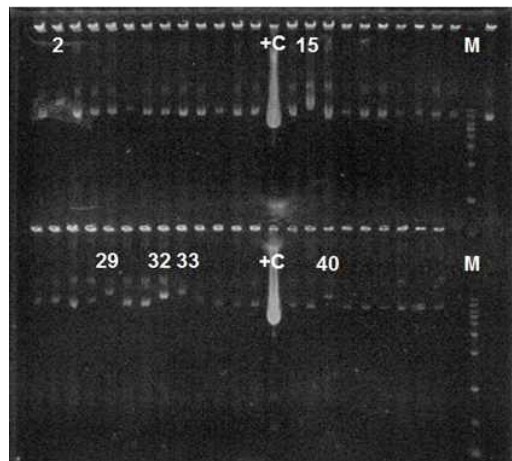
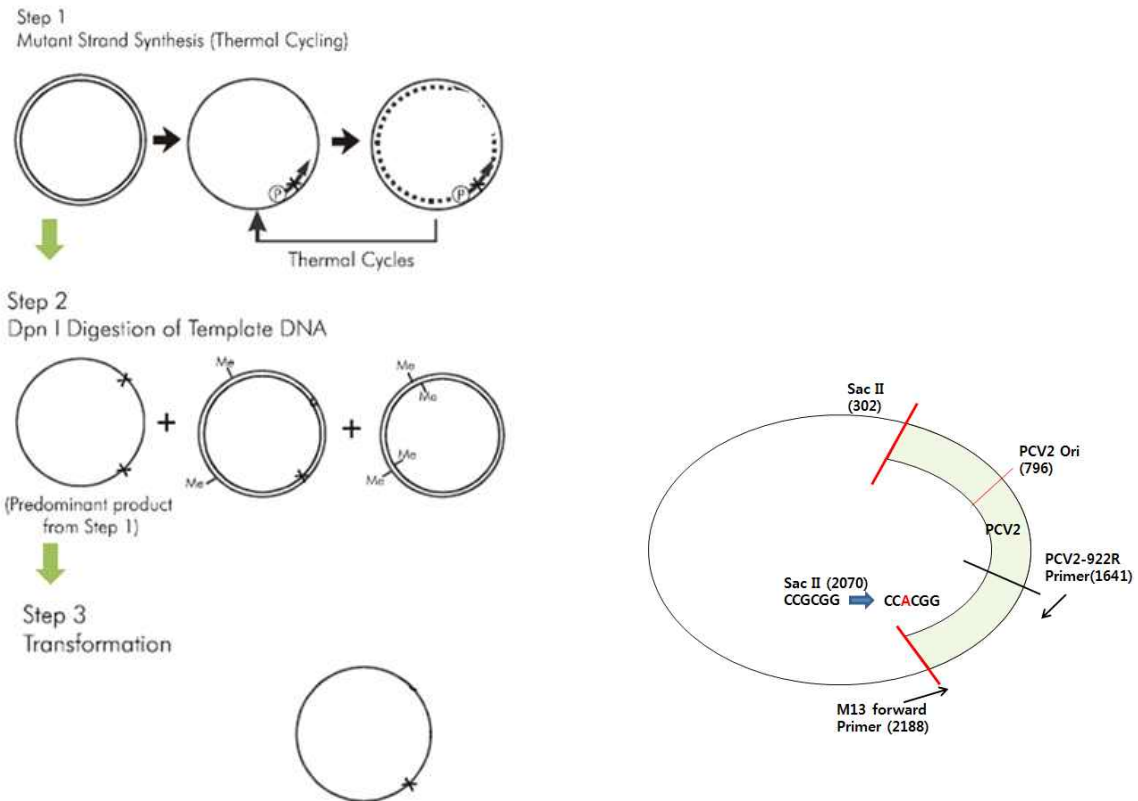


그림. PCV2-Topo-PCV2 2a-1의 직렬 이량체 클론 cracking

② PCV2-Topo-PCV2 2a-2, 2b, 2d의 직렬 이량체 제작

㉞ *Sac II* 제한효소 인식부위의 제거

*Sac II*를 이용하여 직렬이량체를 제작할 경우 서로 역전된 방향의 서열로 연결이 된 클론이 나올 수 있기 때문에 Quikchange II XL site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)을 이용하여 바이러스 작출 벡터내의 한쪽 *Sac II* 제한효소 인식부위를 제거하는 작업을 함.



DNA 100 ng을 mutagenesis primer를 사용하여 키트내의 PfuUltra HF DNA polymerase로 PCR(95°C /1min-(95°C /1min-55°C /1min-65°C /2min)30cycles)하고 Dpn I 처리한 후 XL-10 gold ultra competent cell에 transformation함. Ampicillin이 포함된 LB agar에 도말하여 37°C 에서 16 시간 배양 한 후 얻어진 클론을 M13-F/PCV2-922R primer로 PCR한 후 *Sac II* 제한효소를 처리하여 2시간 동안 반응 시킴. *SacII* 제한효소 인식부위가 제거된 클론을 선택하여 MG plasmid SV(Macrogen)키트로 plasmid DNA를 추출하고 PCV2-922R primer를 이용하여 염기서열 분석을 함.

$\Delta SacII(2070)(CCGCGG \rightarrow CCGTGG)$

Mutagenic primer CGCCCTTGAGACCGTGGGCTGGCTGAACTTTTG

PCV2-922R primer GATTGTTCTGTAGCATTCTTCCA



그림. 돼지 썩코 바이러스 작출 벡터 내 $\Delta SacII$ mutant 확인실험
M13-F/PCV2-922R primer PCR product를 *SacII* 제한효소 처리하여 비교함

④ PCV2-Topo-PCV2 2a-2, 2b, 2d의 직렬 이량체 작성 및 확인

각 유전형별 PCV2 ORF2를 가지는 $\Delta SacII$ 썬코바이러스 추출 벡터(2a-2, 2b, 2d)를 *BamHI* (253)과 *SacII*(302) 제한효소로 절단하고, PCV2-ORF2-2a-2, 2b, 2d-Topo는 *SacII*(302, 2070), *BclI*(474)(*BamHI*와 compatible sticky overhanging enzyme) 제한효소로 절단하였다. 절단된 DNA는 T4 DNA ligase로 연결하여 PCV2 계놈의 직렬 이량체를 제작하였으며, competent cell에 transformation하고 ampicillin이 포함된 LB agar에 도말하여 37°C에서 16시간 배양 한 후 얻어진 클론을 배양한 후 cracking하여 직렬 이량체를 선발하고 염기서열 분석으로 확인하였다.

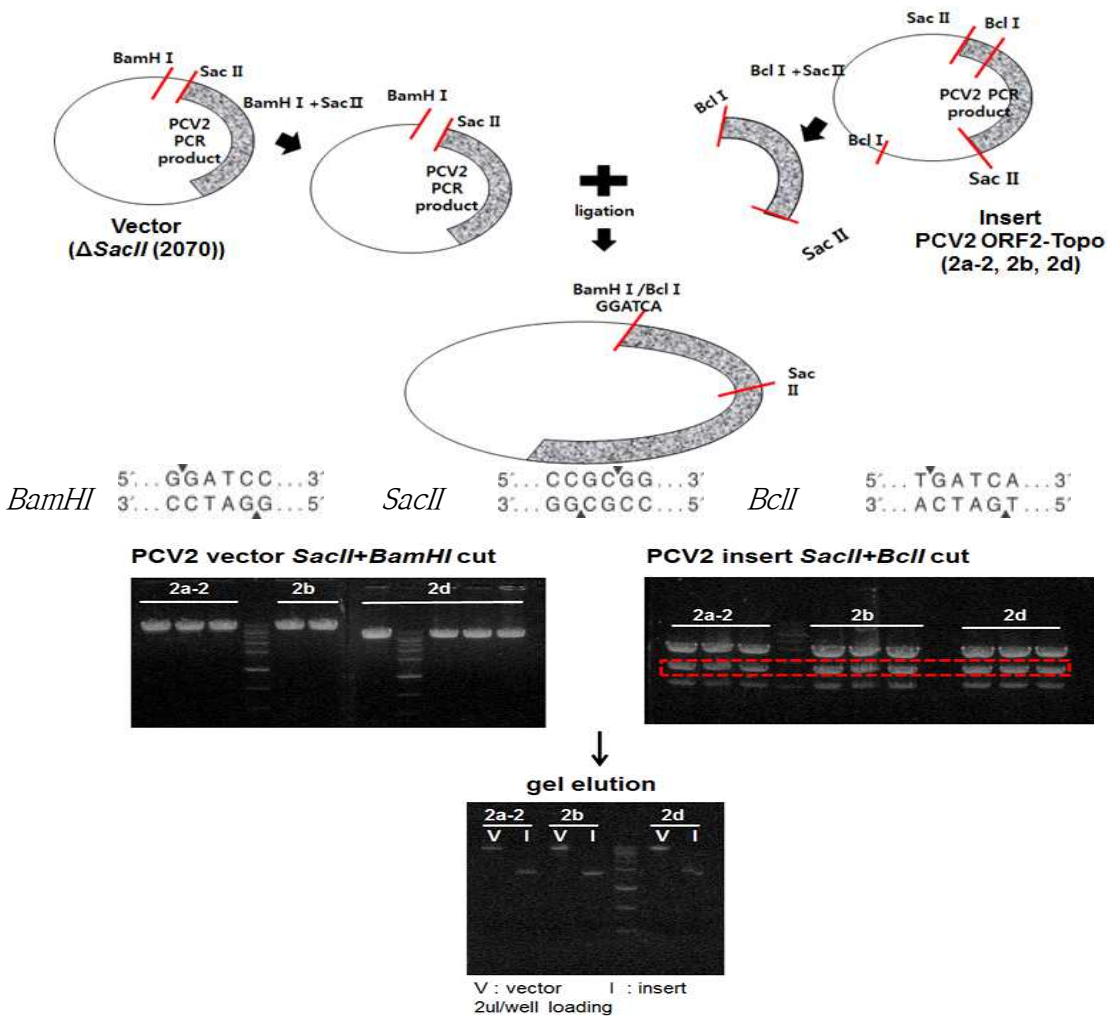


그림. PCV2-Topo-PCV2 2a-2, 2b, 2d의 직렬 이량체 제작을 위한 제한효소 처리

2a-2, 2b, 2d의 직렬 이량체 확인 cracking

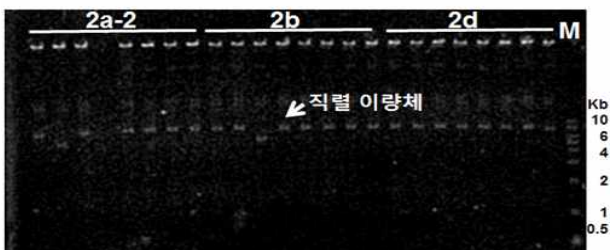


그림. PCV2-Topo-PCV2 2a-2, 2b, 2d의 직렬 이량체 클론 cracking

(5) PCV2의 각 유전형별 ORF2 유전자를 갖는 고증식성 키메라 돼지 썩코 바이러스 작출

PCV1이 오염되어 있지 않은 PK-15세포주를 6well plate에 배양하고 80%정도 자랐을 때, 각 유전형별 ORF2를 갖는 완성된 4종의 PCV2 직렬 이량체 plasmids들을 각각 liposome을 이용하여 transfection하고 24시간 뒤 300mM glucosamin을 첨가하여 PCV2의 replication을 활성화 시킨 후 다시 2일 뒤 작출된 PCV2바이러스를 수확하였다.

키메라PCV2 감염성 벡터



키메라PCV2 생성

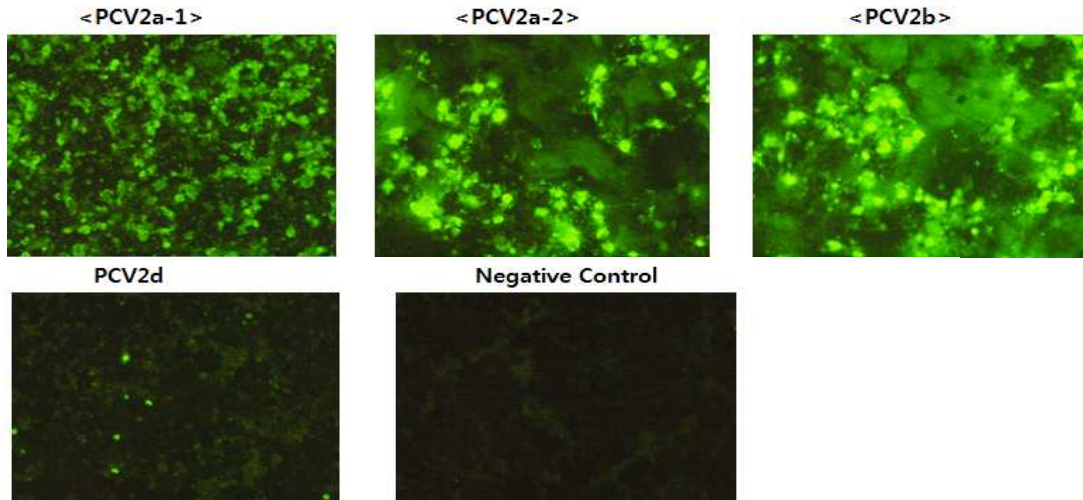


그림. 4종의 PCV2작출 vector를 PK-15세포주에 도입한 후 anti-PCV2 mAb를 이용하여 IFA PCV2 OFR2단백질 발현을 검출한 사진.

작출된 PCV2는 PK-15세포주에 재 감염시킨 후 IFA로 PCV2 ORF2단백을 확인함으로써 작출된 각각의 PCV2가 감염성이 있는지를 확인하였으며 염기서열 분석을 통해 4종의 genotype을 확인하였다.

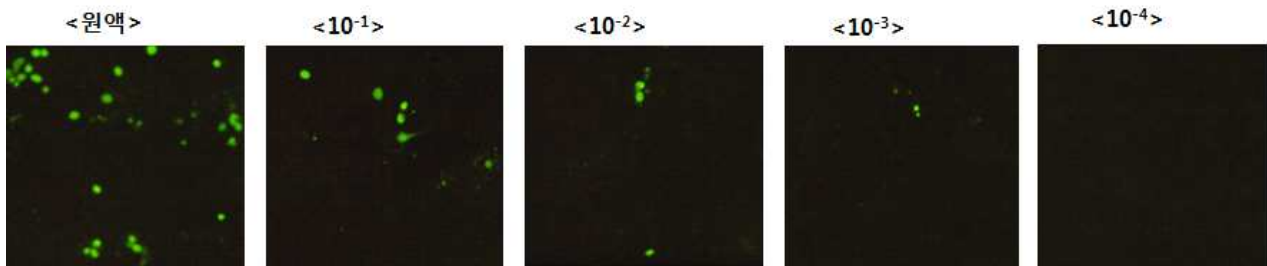


그림. 120402-transfection하여 얻은 PCV2b 바이러스를 PK15에 원액~10⁻⁷ 희석하여 25ul씩/96well에 동시감염 72시간 후 IFA하여 감염성 있는 각 유전형별 PCV2의 작출을

확인함.

3. 작출된 고증식성 키메라 PCV2의 특성 시험.

(1) 작출된 고증식성 키메라 PCV2의 염기서열 분석

| | | | | | | | |
|-----------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| PCK 01-02 | 1 | ACCAGCGCAC | TTCGGCAGCG | GCAGCACCTC | GGCAGCACCT | CAGCAGCAAC | ATGCCCAGCA |
| PCV2a-1 | 1 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 1 | | | | | | |
| PCV2b | 1 | | | | | | |
| PCV2d | 1 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 61 | AGAAGAATGG | AAGAAGCGGA | CCCCAACCAC | ATAAAAGGTG | GGTGTTCACG | CTGAATAATC |
| PCV2a-1 | 61 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 61 | | | | | | |
| PCV2b | 61 | | | | | | |
| PCV2d | 61 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 121 | CTTCCGAAGA | CGAGCGCAAG | AAAATACGGG | AGCTCCCAAT | CTCCCTATTT | GATTATTTTG |
| PCV2a-1 | 121 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 121 | | | | | | |
| PCV2b | 121 | | | | | | |
| PCV2d | 121 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 181 | TTGTTGGCGA | GGAGGGTAAT | GAGGAAGGAC | GAACACCTCA | CCTCCAGGGG | TTCGCTAATT |
| PCV2a-1 | 181 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 181 | | | | | | |
| PCV2b | 181 | | | | | | |
| PCV2d | 181 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 241 | TTGTGAAGAA | GCAAACTTTT | AATAAAGTGA | AGTGGTATTT | GGGTGCCCGC | TGCCACATCG |
| PCV2a-1 | 241 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 241 | | | | | | |
| PCV2b | 241 | | | | | | |
| PCV2d | 241 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 301 | AGAAAGCCAA | AGGAACTGAT | CAGCAGAATA | AAGAATATTG | CAGTAAAGAA | GGCAACTTAC |
| PCV2a-1 | 301 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 301 | | | | | | |
| PCV2b | 301 | | | | | | |
| PCV2d | 301 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 361 | TTATTGAATG | TGGAGCTCCT | CGATCTCAAG | GACAACGGAG | TGACCTGTCT | ACTGCTGTGA |
| PCV2a-1 | 361 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 361 | | | | | | |
| PCV2b | 361 | | | | | | |
| PCV2d | 361 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 421 | GTACCTTGTT | GGAGAGCGGG | AGTCTGGTGA | CCGTTGCAGA | GCAGCACCTC | GTAACGTTTG |
| PCV2a-1 | 421 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 421 | | | | | | |
| PCV2b | 421 | | | | | | |
| PCV2d | 421 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 481 | TCAGAAATTT | CCGCGGGCTG | GCTGAACTTT | TGAAAGTGAG | CGGGAAAATG | CAGAAGCGTG |
| PCV2a-1 | 481 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 481 | | | | | | |
| PCV2b | 481 | | | | | | |
| PCV2d | 481 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 541 | ATTGGAAGAC | CAATGTACAC | GTCATTGTGG | GGCCACCTGG | GTGTGGTAAA | AGCAAATGGG |
| PCV2a-1 | 541 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 541 | | | | | | |
| PCV2b | 541 | | | | | | |
| PCV2d | 541 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 601 | CTGCTAATTT | TGCAGACCCG | GAAACCACAT | ACTGGAAACC | ACCTAGAAAC | AAGTGGTGGG |
| PCV2a-1 | 601 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 601 | | | | | | |
| PCV2b | 601 | | | | | | |
| PCV2d | 601 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 661 | ATGTTACCA | TGGTGAAGAA | GTGGTGTGTA | TTGATGACTT | TTATGGCTGG | CTGCCGTGGG |
| PCV2a-1 | 661 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 661 | | | | | | |
| PCV2b | 661 | | | | | | |
| PCV2d | 661 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 721 | ATGATCTACT | GAGACTGTGT | GATCGATATC | CATTGACTGT | AGAGACTAAA | GGTGGAACTG |
| PCV2a-1 | 721 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 721 | | | | | | |
| PCV2b | 721 | | | | | | |
| PCV2d | 721 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 781 | TACCTTTTTT | GGCCCGCAGT | ATTCTGATTA | CCAGCAATCA | GACCCCGTTG | GAATGGTACT |
| PCV2a-1 | 781 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 781 | | | | | | |
| PCV2b | 781 | | | | | | |
| PCV2d | 781 | | | | | | |
| PCK 01-02 | 841 | CCTCAACTGC | TGTCCCAGCT | GTAGAAGCTC | TCTATCGGAG | GATTACTTCC | TTGGTATTTT |
| PCV2a-1 | 841 | | | | | | |
| PCV2a-2 | 841 | | | | | | |
| PCV2b | 841 | | | | | | |
| PCV2d | 841 | | | | | | |

(2) 작출된 고증식성 키메라 PCV2의 PK-15세포주에서의 증식성

PCV2 바이러스는 세포주에서 잘 증식하지 못해(보통 10^{3-4} TCID₅₀/ml) 바이러스를 이용한 불활화 백신 상용화가 어려움. 현재 이러한 문제를 극복하기 위해 **다국적 기업들은 PK-15세포주에서 PCV2 보다 잘 증식하는 PCV1에 PCV2의 ORF2를 조합한 키메라 바이러스를 이용하여 불활화 백신에 사용하고 있음.** 이러한 방법도 증식성이 10^{4-5} TCID₅₀/ml 밖에 되지 않아 역시 항원을 농축해야 백신으로 사용가능하므로 생산원가가 매우 높음. 또한 PCV1과 PCV2를 이용한 키메라 제조법은 이미 국제특허에 등록되어 있어 국내 백신회사는 상용화 목적으로 사용이 불가능 함. 그러나 **본 연구팀은 PCV2 바이러스를 PK-15 세포주에 계대 배양하고 생산에 필요한 다양한 조건을 최적으로 조절한 결과 기존에 알려진 PCV2의 생산성의 한계를 넘어선(최소 100~1000배 이상) 세계최고의 생산성을 갖는(10^7 TCID₅₀/ml) 바이러스를 개발한 바 있음.**

본 연구과제에서는 이미 확보한, 계대배양을 통해 고증식성을 보인 PCK 01-02(26대 계대주)를 back-bone으로 하고 ORF2유전자를 국내에서 유행하는 4종의 ORF2 유전형으로 교체하여 4종의 PCV2를 작출 하였고, 4주 중 첫 번째로 작출된 **BP-PCV2b주**를 PK-15 세포주에서 계대 배양 4번째 만에 증식성을 제1협동에서 확인해 본 결과 모 바이러스인 PCK 01-02(26대 계대주)와 동등한 **고 증식성($10^{7.25}$ TCID₅₀/ml)을 갖고 있음이 확인되었음.** 그러나 PCV2바이러스의 경우 다른 바이러스와 달리 세포 변성에 의한 바이러스의 감염역가 측정이 어려우며, 일반적인 바이러스와 달리 세포 배양시 PCV2가 세포에 감염이 되어도 2차 감염에 의한 감염세포 및 바이러스의 증가를 보이지 않는 특성이 있음. 또한, 세포내로 감염된 PCV2의 복제 및 전사가 세포내 환경에 절대적으로 영향을 받는 특성 때문에 감염된 모든 PCV2가 IFA로 검출되지 않으므로 IFA에 의한 측정 민감도가 매우 떨어져 감염 역가를 측정하기 어려움. 이러한 이유로 제1협동에서도 PCV2의 감염역가 측정을 IFA대신 PCV2를 각 10진 희석하고 각 희석 단계별 4반복 이상 PCR하여 바이러스 ml당 50%이상 PCR로 검출 되는 역가를 측정하는 방법(Genome Infectious Dose: GID₅₀/ml)을 개발하여 측정하였다. 본 제1세부에서는 real time PCR을 통해 바이러스의 genome copy 수를 확인하였다.

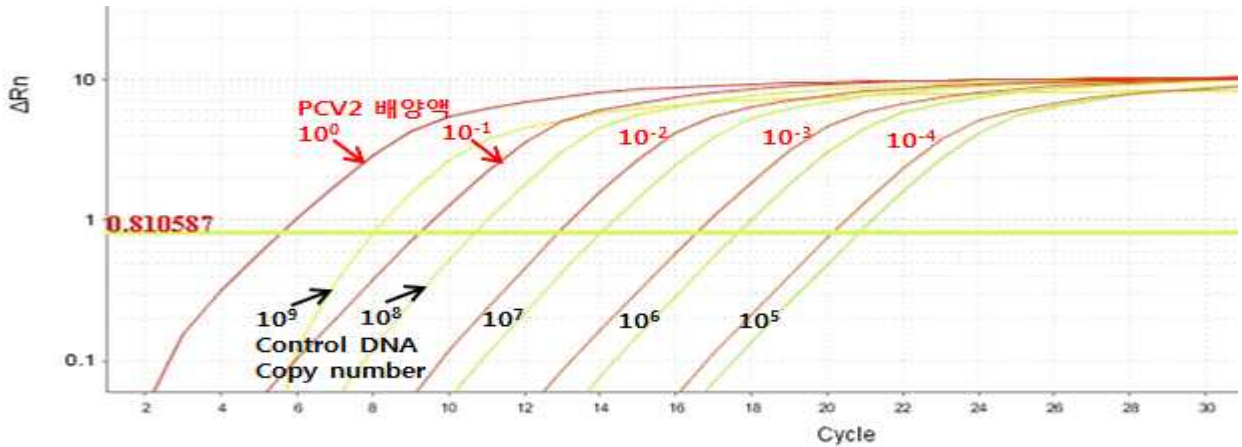
SYBR green Real-time PCR

| PCV2 viral DNA | 1회 | | 2회 | | 3회 | | 1ml당 Copy No. of gDNA | | | |
|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-----------------------|---------|---------|---------|
| | 정량값 | Ct | 정량값 | Ct | 정량값 | Ct | 1회 | 2회 | 3회 | 평균 |
| 원액 | 3.E+09 | 7.01 | 3.E+09 | 6.37 | 4.E+09 | 5.59 | 5.1E+11 | 4.3E+11 | 7.1E+11 | 5.5E+11 |
| 10 ⁻¹ | 3.E+08 | 10.63 | 2.E+08 | 10.08 | 3.E+08 | 9.23 | 4.3E+10 | 3.3E+10 | 5.6E+10 | 4.4E+10 |
| 10 ⁻² | 2.E+07 | 14.43 | 1.E+07 | 13.98 | 3.E+07 | 12.89 | 3.1E+09 | 2.2E+09 | 4.2E+09 | 3.2E+09 |
| 10 ⁻³ | 2.E+06 | 18.00 | 1.E+06 | 17.61 | 2.E+06 | 16.57 | 2.7E+08 | 1.8E+08 | 3.2E+08 | 2.6E+08 |
| 10 ⁻⁴ | 1.E+05 | 21.93 | 1.E+05 | 21.05 | 2.E+05 | 20.11 | 1.8E+07 | 1.7E+07 | 2.7E+07 | 2.0E+07 |

SYBR green Real-time PCR

원액은 viral DNA를 3배 농축시킨 후 2 ul 사용하였으며, 10진 희석시킨 용액들도 각각 2 ul 씩 이용하였다. 그러므로 virus 원액에서 6 ul를 사용한 것과 같은 조건.

따라서 바이러스 원액의 gDNA는 **2.0E+11copies/ml 내지 5.5E+11copies/ml** 정도 된다.

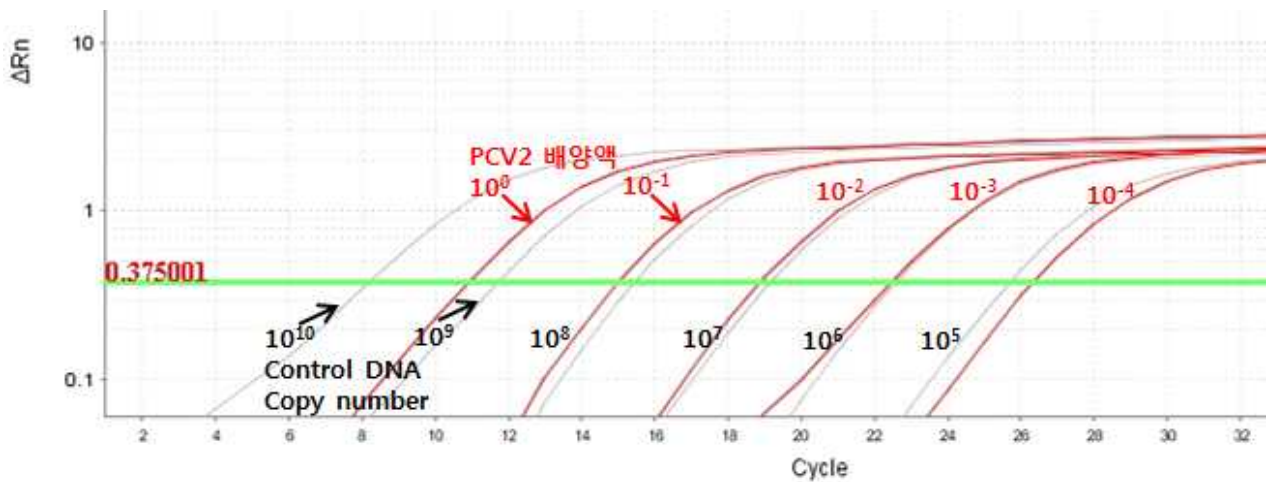


TaqMan probe를 이용한 real-time PCR

| PCV2 viral DNA | 1회 | | 2회 | | 3회 | | 1ml당 Copy No. of gDNA | | | |
|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-----------------------|---------|---------|---------|
| | 정량값 | Ct | 정량값 | Ct | 정량값 | Ct | 1회 | 2회 | 3회 | 평균 |
| 원액 | 2.E+09 | 10.68 | 2.E+09 | 10.87 | 2.E+09 | 10.98 | 3.5E+11 | 3.0E+11 | 3.0E+11 | 3.1E+11 |
| 10 ⁻¹ | 1.E+08 | 14.94 | 1.E+08 | 14.94 | 1.E+08 | 15.21 | 2.1E+10 | 2.1E+10 | 2.0E+10 | 2.1E+10 |
| 10 ⁻² | 1.E+07 | 18.77 | 1.E+07 | 18.85 | 1.E+07 | 19.11 | 1.6E+09 | 1.7E+09 | 1.6E+09 | 1.6E+09 |
| 10 ⁻³ | 9.E+05 | 22.44 | 1.E+06 | 22.40 | 8.E+05 | 22.94 | 1.4E+08 | 1.7E+08 | 1.4E+08 | 1.5E+08 |
| 10 ⁻⁴ | 7.E+04 | 26.16 | 8.E+04 | 26.29 | 7.E+04 | 26.82 | 1.2E+07 | 1.3E+07 | 1.2E+07 | 1.2E+07 |

원액은 viral DNA를 3배 농축시킨 후 2 ul 사용하였으며, 10진 희석시킨 용액들도 각각 2 ul 씩 이용하였다. virus 원액에서 6 ul를 사용한 것과 같은 조건.

따라서 바이러스 원액의 gDNA는 1.2E+11copies/ml내지 3.1E+11copies/ml 정도 된다.



동일한 용액이지만 정량 방법에 따라 2배정도의 차이가 나타났으나 PCV2 배양액 내의 계승 DNA의 숫자는 ml당 최소 10¹¹이상으로 PCV2 고역가를 달성했다는 기존 문헌들과 비교 했을 때 본 과제에서 개발한 PCV2가 최소 10배~100배 이상의 역가를 갖고 있음을 보여 주었음.

(3) 고증식성 키메라 돼지췌코바이러스(PCV2) 백신 후보주 생산 최적화

(가) BP-PCV2b 증독의 고 증식성 확인;

1차 년도에서 작출된 각 유전형별 췌코 바이러스 BP-PCV2a-1, BP-PCV2a-2, BP-PCV2b,

BP-PCV2d 종독을 4주를 PK-15 세포에 적응시켜 바이러스량을 높이 고자 시도하였다. 그 결과 **BP-PCV2-b 종독**은 $10^{7.25}$ TCID₅₀/ml 까지 증식성이 증가하였으며, **BP-PCV2-d 종독**은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 까지 증가하였으며 **BP-PCV2-a-1 종독**은 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 까지 증가하는데 그쳤고 또 다른 DS-PCV2-a-1의 경우만 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 까지 증가하였으며, **BP-PCV2-a-2 종독**은 증식성이 좋지 않고 오히려 계대에 따라 증식성이 떨어졌음. 그러나 증식성이 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml인 종독 들을 혼합 하여 제조한 시험백신1의 경우도 VLP type의 베링거 인겔백 항원량의 1/10에 불가하였기 **때문에 종독에 대한 재검토가 필요했다.**

BP-PCV2-b 종독 계대

| 종독명 | 계대수 | PCR시험 | TCID ₅₀ /ml | 배양용량 | 보관 | 결과 |
|---------------------|--------------|-----------------|--------------------------|---------|------|-------------|
| 10-BP-PCV2-b | 10대배양 | Ct-12.90 | $10^{6.5}$ | 200ml | -70℃ | |
| 15-BP-PCV2-b | 15대배양 | Ct-16.91 | 10^6 | 800ml | -70℃ | |
| 20-BP-PCV2-b | 20대배양 | Ct-10.46 | 10^7 | 1,600ml | -70℃ | |
| 21-BP-PCV2-b | 21대배양 | Ct-10.40 | 10^7 | 1,600ml | -70℃ | 종독보관 |
| 22-BP-PCV2-b | 22대배양 | Ct-10.43 | 10^7 | 1,600ml | -70℃ | 종독보관 |
| 23-BP-PCV2-b | 23대배양 | Ct-10.84 | 10^7 | 1,600ml | -70℃ | 종독보관 |
| 24-BP-PCV2-b | 24대배양 | Ct-10.54 | 10^7 | 1,600ml | -70℃ | 종독보관 |

BP-PCV2-d 종독 계대

| 종독명 | 계대수 | PCR시험 | TCID ₅₀ /ml | 배양용량 | 보관 | 결과 |
|---------------------|--------------|----------------|--------------------------|-------|------|-------------|
| 5-BP-PCV2-d | 5대배양 | Ct-22.33 | 10^4 | 400ml | -70℃ | |
| 10-BP-PCV2-d | 10대배양 | Ct-15.33 | 10^5 | 300ml | -70℃ | |
| 11-BP-PCV2-d | 11대배양 | Ct-15.70 | 10^5 | 400ml | -70℃ | |
| 12-BP-PCV2-d | 12대배양 | Ct-13.66 | 10^6 | 400ml | -70℃ | |
| 13-BP-PCV2-d | 13대배양 | Ct-16.00 | 10^5 | 800ml | -70℃ | |
| 14-BP-PCV2-d | 14대배양 | Ct-9.62 | 10^7 | 800ml | -70℃ | 종독보관 |

BP-PCV2-a-1 종독 계대

| 종독명 | 계대수 | PCR시험 | TCID ₅₀ /ml | 배양용량 | 보관 | 결과 |
|---------------|-------|----------|------------------------|--------|------|--------------------|
| 5-BP-PCV2-a1 | 5대배양 | - | 10 ⁶ | 120 ml | -70℃ | |
| 7-BP-PCV2-a1 | 7대배양 | Ct-21.94 | 10 ⁴ | 800ml | -70℃ | |
| 8-BP-PCV2-a1 | 8대배양 | Ct-21.46 | 10 ⁴ | 800ml | -70℃ | |
| 10-BP-PCV2-a1 | 10대배양 | Ct-19.36 | 10 ⁴ | 800ml | -70℃ | |
| 12-BP-PCV2-a1 | 12대배양 | Ct-19.17 | 10 ⁴ | 800ml | -70℃ | 종독보관 |
| 15-BP-PCV2-a1 | 15대배양 | Ct-18.87 | 10 ⁵ | 800ml | -70℃ | |
| 16-BP-PCV2-a1 | 16대배양 | Ct-15.64 | 10 ⁵ | 500ml | -70℃ | 계대종결 2013.1.15. |

BP-PCV2-a-2 종독 계대

| 종독명 | 계대수 | PCR시험 | TCID ₅₀ /ml | 배양용량 | 보관 | 결과 |
|--------------|------|----------|------------------------|--------|------|------------------------|
| 4-BP-PCV2-a2 | 4대배양 | Ct-21.89 | 10 ⁴ | 100 ml | -70℃ | |
| 5-BP-PCV2-a2 | 5대배양 | Ct-28.28 | 10 ³ | 400ml | -70℃ | |
| 6-BP-PCV2-a2 | 6대배양 | - | 10 ⁰ | 400ml | -70℃ | |
| 7-BP-PCV2-a2 | 7대배양 | Ct-34.87 | 10 ⁰ | 400ml | -70℃ | |
| 8-BP-PCV2-a2 | 8대배양 | - | 10 ⁰ | 200ml | -70℃ | 계대종결 2012.11.1 8 |

(나) 바이러스함유량시험; Gene Infectious Dose(GID₅₀/ml)

썬코바이러스량 측정 방법은 대성미생물연구소 실험실에서 기 확립된 방법으로 실시하였다. 썬코바이러스는 PK-15 세포 또는 다른어떤 세포에서도 세포변성효과(CPE)가 나타나지 않아 TCID₅₀를 산출 할 수가 없고, 혈구응집성 또한 없기 때문에 혈구응집반응도 사용할 수가 없어서, 썬코바이러스 연구에 어려움이 많았다. 다행히 PK-5주에서 썬코바이러스를 키울 수 있었던 것은, 썬코 바이러스 증식용 배지에 D-Glucosamin을 첨가함으로써 바이러스가 세포에 침투하기 쉽게 되었기 때문이었다. 그러나 D-Glucosamin을 첨가하여도 많은 량의 바이러스를 증식시키기 어려웠다. 그 이유는 썬코바이러스가 세포에 침투되는 능력이 바이러스 한 개가 있어도 세포에 침투되어 바이러스가 증식되어야 TCID₅₀를 산출 할 수가 있는데, 그렇지 못하기 때문에 어떠한 방법으로도 TCID₅₀를 산출 할 수가 없었다. 대성미생물연구소에서는 선행연구에서 PK-15주 세포에 실시한 IFA 법에 의한 TCID₅₀ 와 PCR을 이용한 GID₅₀ 비교치 차이가 10^{2.5}정도임을 확인한 바 있다. 이 결과에 의하여 GID₅₀ 가 10^{7.0}이면 썬코 백

신이 가능하다는 결과 역시 선행연구에서 확립되었다. 이 방법으로 BP-PCV2b 바이러스 함유량을 측정하였다.

표 12. PCV2 바이러스량 측정을 위한 PCR 조건

| | |
|-----------------------|---------------|
| ONE CYCLE | |
| Pre-denaturation | 94°C / 5 min |
| 3-STEP CYCLING | |
| Denaturation | 94°C / 30 sec |
| Annealing | 54°C / 30 sec |
| Extension | 72°C / 40 sec |
| Number of cycles : 40 | |
| ONE CYCLE | |
| Final extension | 72°C / 5min |

표 13. 1차 ABP-PCV2b 바이러스량 측정을 위한 PCR 결과

| | |
|----------------|-------------------------|
| | M. 100bp marker |
| | 1. 배양 원액 |
| | 2. 10 ⁻¹ 희석 |
| | 3. 10 ⁻² 희석 |
| | 4. 10 ⁻³ 희석 |
| | 5. 10 ⁻⁴ 희석 |
| | 6. 10 ⁻⁵ 희석 |
| | 7. 10 ⁻⁶ 희석 |
| | 8. 10 ⁻⁷ 희석 |
| | 9. 10 ⁻⁸ 희석 |
| | 10. 10 ⁻⁹ 희석 |
| | 11. PCV2 음성대조구 |
| 12. PCV2 양성대조구 | |

표 14. 2차 ABP-PCV2b 바이러스량 측정한 PCR 결과 와 판정

| | | |
|--|---------------------|----------------------|
| | M. 100bp marker | 9. 10 ⁻⁶ |
| | 1. 10 ⁻⁴ | 10. 10 ⁻⁶ |
| | 2. 10 ⁻⁴ | 11. 10 ⁻⁷ |
| | 3. 10 ⁻⁵ | 12. 10 ⁻⁷ |
| | 4. 10 ⁻⁵ | 13. 10 ⁻⁷ |
| | 5. 10 ⁻⁵ | 14. 10 ⁻⁷ |
| | 6. 10 ⁻⁵ | N. 씨코 음성대조 |
| | 7. 10 ⁻⁶ | P. 씨코 양성대조 |
| | 8. 10 ⁻⁶ | |

(다) 시험방법; 시험재료를 10진희석하여 각각의 샘플을 모두 표 12와 같은 PCR조건으로 PCR을 실시하였다. 그 결과가 표 13과 같이 10⁻⁶에서 유전자가 확인 되었다면, 2차 PCR에서 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ 희석액을 각각 4개의 시험관으로 나누고 각시험관의 희석액을 각각 PCR 하였다. 그 결과 orf2 유전자가 확인된 시험관을 유전자감염 양성시험관으로 확인하고 GID₅₀을 산출하였다.

(라) 시험결과; 상기 배양액의 GID_{50} 은 $10^{7.25}GID_{50}/1ml$ 이었으며, 선행연구 결과를 대비하여 형광항체법(IFA)으로 확인한 조직배양감염가($TCID_{50}$)은 $10^{4.75}TCID_{50}/1ml$ 이었다. 시험백신제조는 4종의 키메라썬코바이러스를 혼합하여 만들어야하나, 2종의 키메라바이러스는 목표로한 $10^7GID_{50}/ml$ 를 달성하지 못하였기 때문에 BP-PCV2b 종독 만으로 시험백신 제조에 관한 시험을 실시하였다.

① 작출된 PCV2 바이러스의 배양조건 및 배지조성의 최적화를 통한 계대 배양으로 고증식성 백신 후보주의 생산법 확립은 상기와 같이 BP-PCV2b 종독에 한하여 확립되었다.

② 백신 보존제에 관한시험을 위하여 $10^{7.25}TCID_{50}/ml$ ABP-PCV2b 배양액으로 하기 표와 같이 보존제를 다르게 한 3종의 백신을 소량 생산하였다.

표 15. 시험백신 제조 및 보존제 시험

| 항목 | | 부형제 량 | 항원종류 | 항원량 ($10^{7.25}GID_{50}/ml$) | 수량/(10ml) |
|----|-----------------|-------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| 1 | IMS 1313 오일백신 | 30% | ABP-PCV2b | 70% | 8 |
| 2 | Montanid Gel 백신 | 12% | ABP-PCV2b | 88% | 8 |
| 3 | DS 겔백신 | 20% | ABP-PCV2b | 80 | 9 |

(마) 썬코바이러스 백신간 항원 정량 비교 시험

PCV2백신의 품질을 평가하기 위하여 국내외에서 가장 많이 판매되고 있는 재조합단백질 VLP(viral like particle)형태의 베링거인겔하임의 썬코 백신 과 증식성을 높이기 위해 PCV1과 PCV2의 키메라 바이러스로 만든 화이자사의 백신, 그리고 대성 미생물에서 판매중인 PCV2 바이러스 불활화 백신인 대성 썬코백 과 본 과제 1차 년도에 개발된 PCV2 바이러스 아형 혼합 불활화 백신인 대성 썬코 멀티백(시험백신1), 재조합단백질 VLP로 항원량을 보강한 대성 썬코 멀티백(시험백신2)의 항원량을 상용 항원 capture-ELISA kit(symbiotic)를 이용하여 정량하였음(그림3).

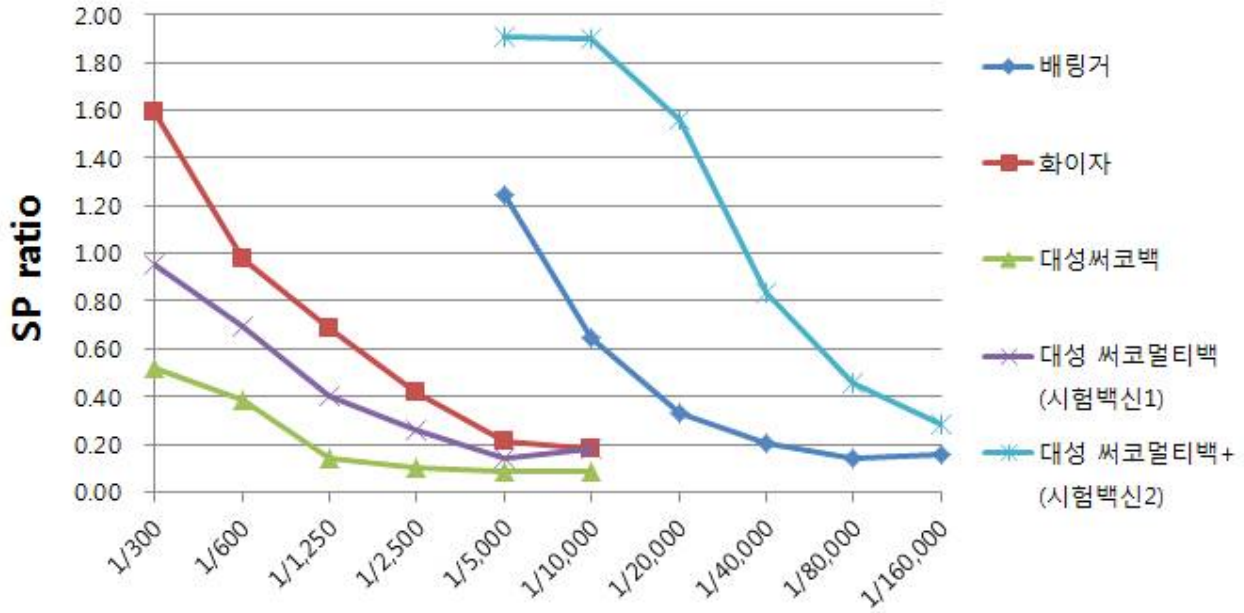


그림.3. 시판중인 PCV2백신과 시험백신의 항원량을 Symbiotic사의 PCV2 antigen capture ELISA로 정량한 그래프.

항원정량 결과 본 과제 1차년도에 개발한 시험백신1이 화이자의 키메라 바이러스 백신보다는 1/2정도 항원량이 적게 나타났으나 기존 제품인 대성 씨코백 보다 약 2~4배의 항원량을 보여 주었다. 그러나 이들 바이러스 불활화 제품들은 모두 재조합 씨코바이러스 VLP제품(베링거) 보다 항원량 1/10~1/100정도에 불과한 것으로 나타났다. 본 연구과제 당해연도에 개발중인 시험백신2 (고증식 PCV2b virus에 PCV2a VLP를 혼합하여 항원량을 증강한 다가백신: 대성 씨코멀티백+)의 경우는 현재 제품점유율 75%인 베링거인겔하임의 인겔백 보다 4배이상 항원량이 많은 것으로 나타났다.

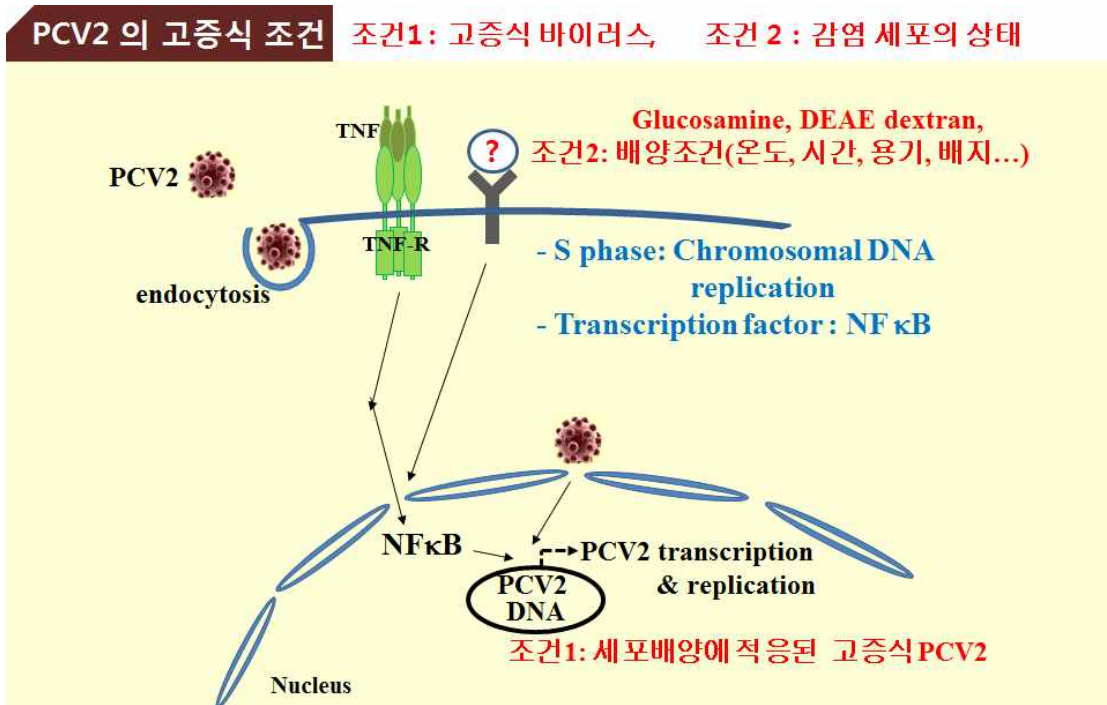
- 본 연구과제 목표는 고증식성 씨코 바이러스를 이용한 다가 백신개발이었음.
- PCV2의 경우 세포주에서의 증식성이 매우 낮은 바이러스로 일반적으로 세포배양 시 10^{3-5} TCID₅₀/ml 정도의 역가를 보여 백신 생산용으로는 부적절함.
- 1차 년도 개발 목표($10^{7.0}$ TCID₅₀/ml) 이상의 고 증식성 씨코 바이러스($10^{7.25}$ TCID₅₀/ml) 기술을 확보하여 시험백신1(씨코 멀티백)을 제조하였다.
- 그러나 항원을 정량한 결과 재조합항원으로 만든 바이러스 유사입자(VLP)백신에 비해 항원량이 절대적으로 적었음.
- PCV2의 증식성의 한계를 극복하기 위하여 증식성이 좋은 PCV1의 promoter 및 replicase backbone을 이용하여 증식성을 높인 화이자사의 키메라 바이러스 역시 베링거 제품에 비해 항원량이 수 십 분의 1에 불과하였음.

■ 시험백신1에 혼합된 PCV2는 $10^{7.0-7.25}$ TCID₅₀/ml로 PCV2로서는 고 증식성이었으며 세포배양액 원액을 희석 없이 사용하였으므로 백신 생산 원가를 고려할 때 썬코 바이러스의 배양을 통한 불활화 백신으로는 재조합항원 VLP백신의 항원량을 따라갈 수 없음이 확인됨.

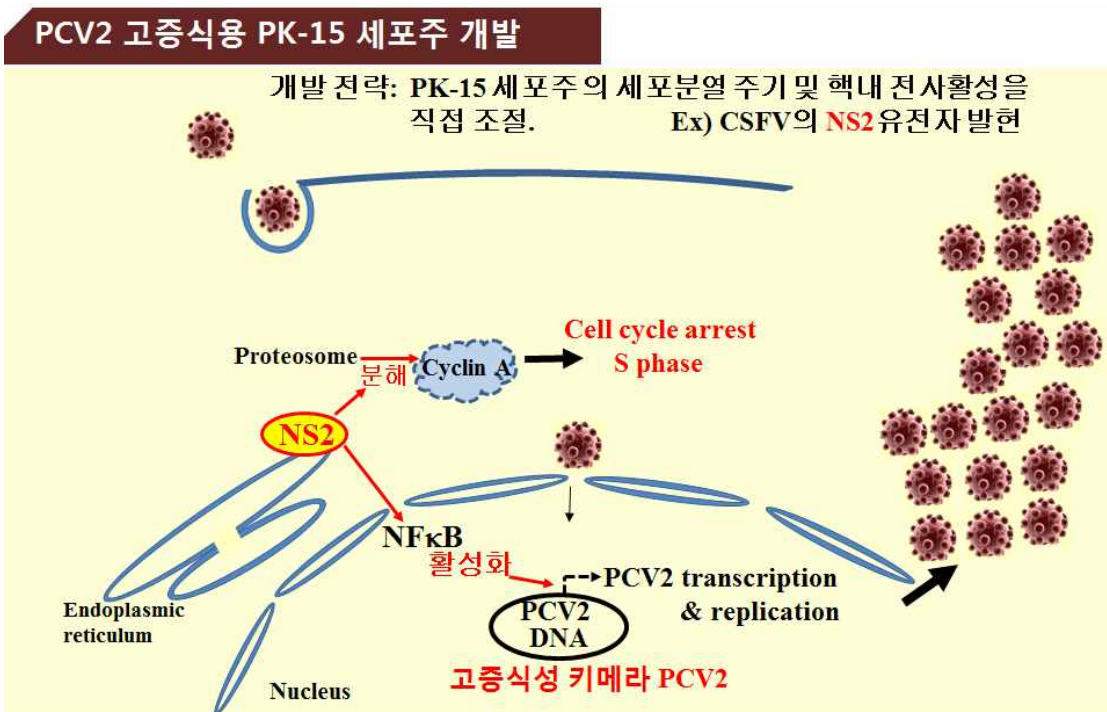
■ 썬코 바이러스의 특성상 ORF2단백으로 이루어진 바이러스 입자에 대한 면역이 썬코 바이러스의 방어에 가장 결정적인 영향을 미치므로 현재 국내 400억 썬코 바이러스 백신시장의 75%이상을 점유하는 VLP형 백신인 베링거 인겔백의 품질을 넘어서기 위해 본 연구과제에서 개발하고자 하는 썬코바이러스 백신은 역유전학으로 개발된 고역가의 PCV2b외 역가가 낮은 PCV2a, PCV2d등은 재조합 VLP를 추가로 개발하여 항원량을 보강하기로 목표를 수정하였음.

4. PCV2의 고증식 PK15 세포 주 개발

PCV2는 세포주에서의 증식성이 매우 낮은 바이러스로 세포배양에서 백신생산에 충분한 정도의 바이러스역가를 얻기가 매우 힘들다. 비록 세포배양에 적응된 고증식 PCV2를 본 연구팀에서 작출 해내었으나 세포배양 시 PCV2의 복제를 활성화시키기 위해 glucosamine 처리 등 많은 추가적인 조건이 필요하다(아래 그림 참조).



본 연구과제에서는 위 그림과 같이 기존의 복잡한 배양조건을 개선하고 더욱 역가를 높이기 위하여 PCV2 바이러스의 복제를 활성화 시킬 수 있는 NF-κB의 활성이 유도하기 위해 CSFV의 NS2 유전자를 발현하는 PK-15 세포주를 제작하였다(아래 그림 참조).



(1) CSFV-NS2유전자 클로닝

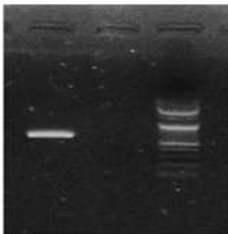
PCV2는 세포내 감염 후 세포내의 환경이 바이러스의 전사 및 복제의 시작에 많은 영향을 미친다. 일반적으로 세포의 세포분열 주기가 S phase일 때 그리고 핵내 NFkB가 활성화 되어 있을 때 PCV2의 전사 및 복제가 시작될 수 있다. 이러한 이유로 PCV2의 세포배양 배지 조성 및 배양 방법이 매우 까다로워 백신생산에 많은 어려움을 겪고 있다. 본 과제에서는 고배양성 PCV2의 개발을 위해 보다 배양이 쉽도록 PK-15세포주의 개선을 시도해 보았다. 즉, PK-15 세포가 S phase에 오래 머물러 있도록 해줄 뿐 아니라 PK-15 세포의 핵내 NF-kB가 증가된다면 PCV2의 복제가 증가될 수 있다는 점에 착안하여 세포주의 세포 분열 주기와 핵내 NF-kB를 증가 시킬 수 있는 것으로 알려진 HCV의 NS2유전자를 PK-15세포주에 도입하여 단일 세포 클론을 제작하였다.

HCV RNA를 추출하여 다음의 프라이머를 이용하여 RT-PCR하여 pCR2.1-topo에 TA 클로닝 하고 M13 forward primer로 염기서열을 확인 하였다.

| Primer | sequence | Tm |
|------------|-------------------------------------|------|
| CSFV-NS2-F | TTA TTT TTC TTC AAA GTC GGC AAG | 58.4 |
| CSFV-NS2-R | ACC ATG TGG TTA TGG AAG ACC AAC TTC | 66.4 |

- 조건 : 45°C/30min-94°C/5min

-(94°C/30sec-48°C/30sec-72°C/30sec)40cycles -72°C/10min



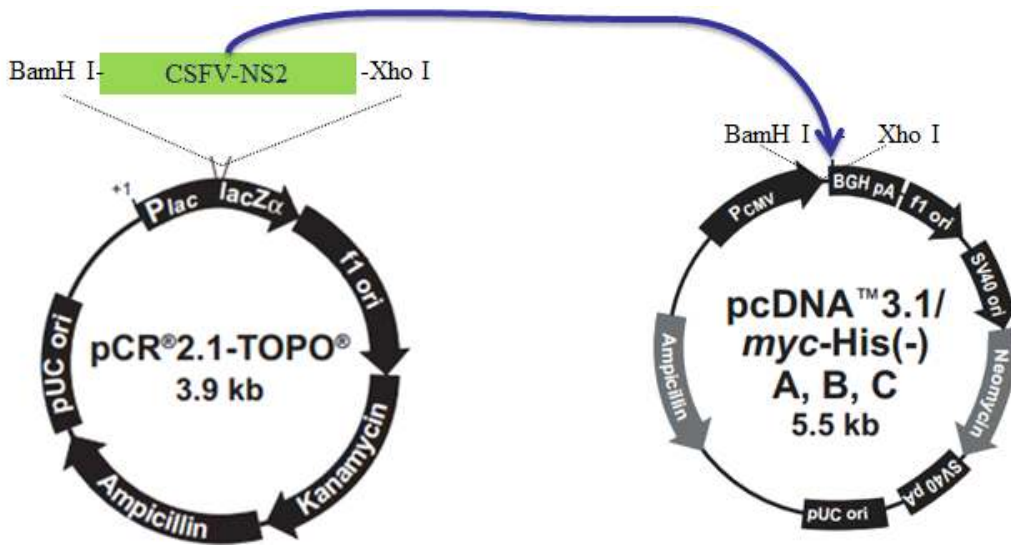
- size : 606bp

```

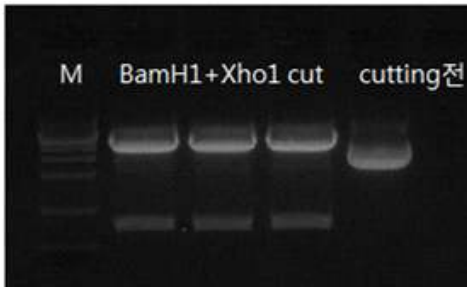
CSFV-NS2 gene atgtggttat ggaagaccaa cttcaagagg gtaaacgaca tatacagggt agaccaaget 60
CSFV-NS2 gene ggtgaagggg tatacctttt ccogtcaaaa caaaaaaaa gttcaataac aggtaccatg 120
CSFV-NS2 gene ttgccattga ttaaagccat actcatcagc tgcacagta ataagtggca gttcatatac 180
CSFV-NS2 gene ctattgtact tgatatttga agtgtottac tacctccaca agaagatcat agatgaaata 240
CSFV-NS2 gene gcaggaggga coaacttcat ctcaagactt gtagcogott tgatogaago caattgggoc 300
CSFV-NS2 gene tttgacaacg aagaagttag aggtttaaag aagttottoc tgttgtotag tagggttaaa 360
CSFV-NS2 gene gaactgatca tcaaacacaa agtgaggaat gaagtaatgg tccactggtt tggatgaogaa 420
CSFV-NS2 gene gaggtttatg ggatgccgaa gttggttggc ttagtcaagg cagcaacatt gagtaaaaaat 480
CSFV-NS2 gene aaacattgta ttttgtgcac cgtotgtgaa gacagagagt ggagaggaga aacctgocca 540
CSFV-NS2 gene aatgogggc gttttgggoc accaatgacc tgtggaatga cccttgocga ctttgaagaa 600
CSFV-NS2 gene aaataa 606
    
```

그림. 클로닝된 CSFV NS2유전자 염기서열.

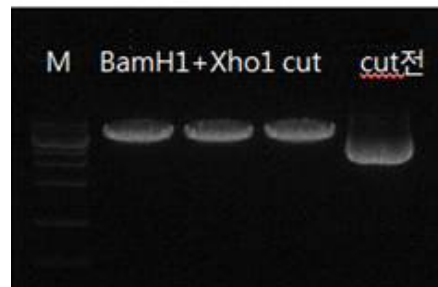
(2) CSFV-NS2유전자 발현 벡터 작성.



1) CSFV-NS2-topo enzyme cutting



2) pcDNA3.1(-)B cutting



3) Colony PCR(CSFV-NS2-F, BFH-R primer)



94°C -(94°C/30" -55°C/30" -72°C/30")40cycles-72°C

/5'

그림. CSFV-NS2유전자의 동물세포 발현벡터로의 클로닝 과정.

Topo클로닝 벡터의 CSFV-NS2유전자를 PK-15세포에서 발현가능한 pcDNA3.1발현 벡터로 subcloning하였으며 colony PCR로 선별된 클론은 염기서열을 분석하여 확인하였다.

(3) CSFV-NS2유전자 발현 PK-15 단일 세포 클론 작성.

PK15 cell을 6well plate에 2×10^5 /ml 로 subculture후 fugene6를 사용(fugene6 : DNA = 3:2, 3:1, 6:1)하여 transfection하였다. 다음날 3:1과 6:1을 75T flask에 subculture후 Geneticin 750ug/ml을 첨가하고 2주간 배양하여 Geneticin에 내성을 가진 세포들만 선별한 후, 96well plate에 각 well당 2cell, 1cell, 0.5cell이 되도록 희석하여 배양하였다. 현미경으로 관찰하여 single cell로 분리된 것만 표시하여 24well, 6well, 75T flask 순서로 배양하며 각 단일 세포 클

론을 작성 하였다. 선별된 세포 주 42개는 질소에 보관 후 사영하였다. 각 단일 세포 클론들의 RNA를 추출하여 NS2유전자의 발현여부를 확인하였다.

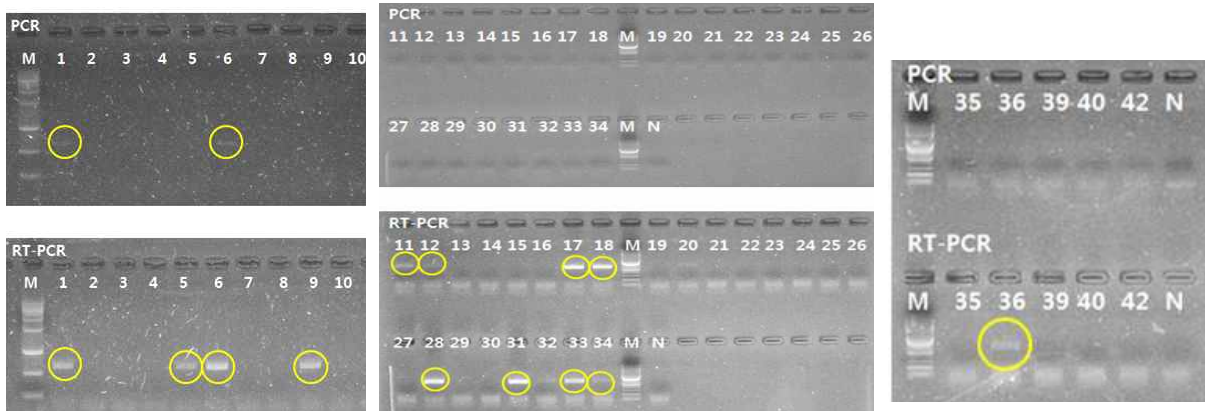


그림. Trizol을 이용하여 각 세포주들의 RNA를 추출하고 CSFV-NS2 F+R 프라이머를 이용하여 PCR 및 RT-PCR하였다.

각각의 PK-15 단일 세포 클론은 아래 그림과 같이 다양한 모양 크기 및 성장속도를 가지고 있었으며, PCV2의 증식에 최적인 세포주를 선발하기 위해 분리된 각각의 PK-15 단일 세포 클론의 doubling time을 측정하였으며, PCV2의 배양을 위한 조건을 확립 중에 있다.

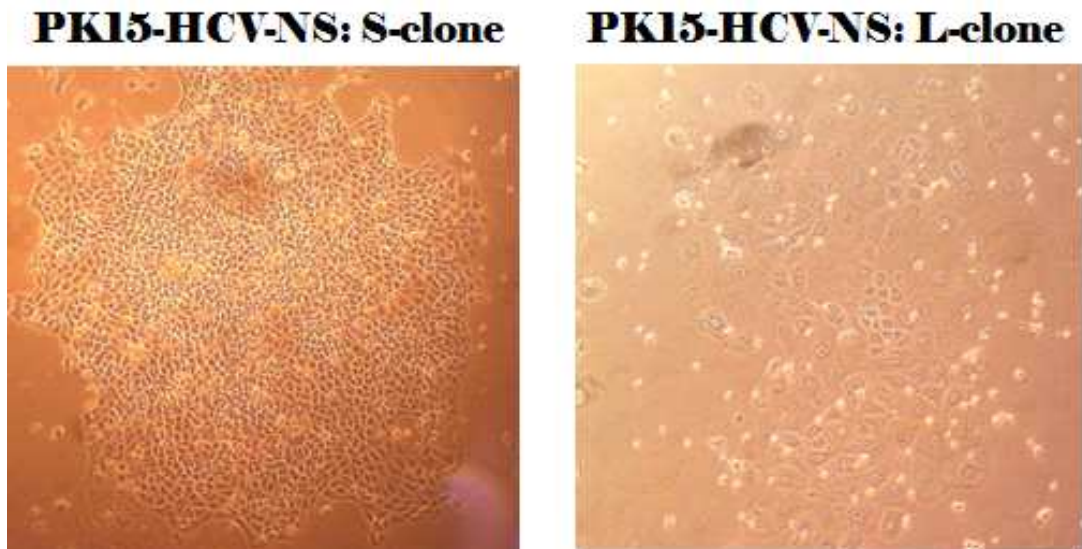


그림. CSFV의 NS2유전자가 발현되는 PK-15 단일 세포 클론들의 다양한 모양.

(4) CSFV-NS2유전자 발현 PK-15 단일 세포 클론들의 특성 분석.

<각 단일 세포 클론들의 doubling time 측정>

각 단일 세포 클론들의 배양세포수를 10^5 /ml로 시작하여 2~3일 후 세포수를 측정하였다.

$$- \text{doubling time} = 0.693 \times \text{총배양시간} / (2.3 \log(\text{종료시점세포수} / \text{시작세포수}, 10))$$

| 세포주번호 | 시작 세포수 | 배양시작시간 | 종료시점 세포수 | 배양종료시간 | 총배양시간 | Doubling Time |
|-------|---------|--------------------|----------|--------------------|-------|---------------|
| 1 | 7.0E+05 | 2012-05-08 오후 4:00 | 4.5E+06 | 2012-05-10 오후 3:00 | 47 | 17.5 |
| 2 | 1.0E+06 | 2012-05-14 오후 3:00 | 4.0E+06 | 2012-05-16 오후 3:00 | 48 | 24.2 |
| 3 | 1.1E+06 | 2012-05-08 오후 4:00 | 6.0E+06 | 2012-05-10 오후 3:00 | 47 | 19.2 |
| 4 | 1.0E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 5.4E+06 | 2012-05-25 오후 3:00 | 48 | 19.7 |
| 5 | 2.0E+06 | 2012-04-20 오후 3:00 | 2.1E+07 | 2012-04-23 오후 3:00 | 72 | 21.4 |
| 6 | 1.0E+06 | 2012-05-14 오후 3:00 | 4.8E+06 | 2012-05-16 오후 3:00 | 48 | 21.2 |
| 7 | 2.0E+06 | 2012-04-20 오후 3:00 | 6.9E+06 | 2012-04-23 오후 3:00 | 72 | 40.2 |
| 8 | 1.0E+06 | 2012-05-21 오후 3:00 | 4.1E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 48 | 23.4 |
| 9 | 1.0E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 3.9E+06 | 2012-05-25 오후 3:00 | 48 | 24.4 |
| 10 | 1.0E+06 | 2012-05-21 오후 3:00 | 2.4E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 48 | 37.7 |
| 11 | 2.0E+06 | 2012-04-20 오후 3:00 | 2.0E+07 | 2012-04-23 오후 3:00 | 72 | 21.7 |
| 12 | 1.1E+06 | 2012-05-08 오후 4:00 | 5.0E+06 | 2012-05-10 오후 3:00 | 47 | 21.5 |
| 13 | 1.0E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 2.6E+06 | 2012-05-25 오후 3:00 | 48 | 35.4 |
| 14 | 1.0E+06 | 2012-05-14 오후 3:00 | 3.4E+06 | 2012-05-16 오후 3:00 | 48 | 27.3 |
| 15 | 1.0E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 4.6E+06 | 2012-05-25 오후 3:00 | 48 | 21.9 |
| 16 | 1.0E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 4.4E+06 | 2012-05-25 오후 3:00 | 48 | 22.4 |
| 17 | 1.0E+06 | 2012-05-14 오후 3:00 | 3.9E+06 | 2012-05-16 오후 3:00 | 48 | 24.5 |
| 18 | 1.0E+06 | 2012-05-21 오후 3:00 | 5.3E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 48 | 19.9 |
| 19 | 1.0E+06 | 2012-05-21 오후 3:00 | 3.1E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 48 | 29.3 |
| 20 | 1.0E+06 | 2012-05-14 오후 3:00 | 3.0E+06 | 2012-05-16 오후 3:00 | 48 | 30.1 |
| 24 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 4.5E+06 | 2012-05-31 오후 4:05 | 48 | 40.8 |
| 25 | 1.0E+06 | 2012-05-21 오후 3:00 | 3.2E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 48 | 28.5 |
| 26 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 5.8E+06 | 2012-05-31 오후 4:07 | 48 | 31.5 |
| 27 | 1.0E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 3.8E+06 | 2012-05-25 오후 3:00 | 48 | 24.8 |
| 29 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 5.2E+06 | 2012-05-31 오후 4:06 | 48 | 35.1 |
| 30 | 1.0E+06 | 2012-05-21 오후 3:00 | 5.0E+06 | 2012-05-23 오후 3:00 | 48 | 20.6 |
| 31 | 1.0E+06 | 2012-05-14 오후 3:00 | 5.1E+06 | 2012-05-16 오후 3:00 | 48 | 20.4 |
| 32 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 6.4E+06 | 2012-05-31 오후 4:00 | 48 | 28.6 |
| 33 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 9.4E+06 | 2012-05-31 오후 4:04 | 48 | 21.5 |
| 36 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 8.3E+06 | 2012-05-31 오후 4:02 | 48 | 23.4 |
| 40 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 8.0E+06 | 2012-05-31 오후 4:01 | 48 | 24.0 |
| 42 | 2.0E+06 | 2012-05-29 오후 4:00 | 7.3E+06 | 2012-05-31 오후 4:03 | 48 | 25.7 |

세포증식속도가 단일 세포 클론별로 17시간에서 40시간까지 2배 이상 차이가 났으며, CSFV-NS2유전자의 발현정도도 클론별로 차이를 보였다. 2차년도 연구개발 과정에서는 각 세포별로 PCV2의 증식에 어떠한 차이가 나는지와 세포 분열 주기 및 핵내 NF-kB의 활성화에 미치는 영향등을 조사할 예정이다.

(5) PK-15주의 증식 확인 및 보관

주관기관으로부터 39종(번호1~42중)의 PK-15주(CSFV NS-2)를 받아 배양을 하였다. 배양액은 α -Minimum Essential Medium(α -MEM), Fetal Bovine Serum(FBS) 10%, L-Glutamine 1%, Non Essential Amino Acid(NEAA) 1%, Sodium Bicarbonate(SB) 1.5%, Stretomycin-Penicillin-Kanamycine(SPK) 0.2% 가 함유된 배지를 사용하였다. 상기 배지를 이용하여 분양받은 세포를 25cm² Flask 에 배양하여 증식시킨 후, 75cm² Flask 에 다시 증식시켰다. 75cm² Flask에서 회수한 세포는 다시 175cm² Flask 에 증식 시킨 후 회수하여 동결보존 하였다. 총 39종의 PK-5주 중 24번 세포는 오염으로 동결보존을 할 수가 없었다.

(6) 썬코바이러스(PCV2)의 증식성 조사

역유전학 방법으로 바이오포아에서 작출 된 썬코바이러스 (BP-PCV2b)를 PK-5주 1번부터 12

번까지에 접종하고 바이러스 증식성을 확인하여 백신생산에 적합한 세포주를 선별 하고자하였다.

썬코바이러스는 PK-15주에서 증식되지만 그 증식성이 저조하여 백신생산 및 시험연구에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 그나마 PK-15주에서 썬코바이러스를 키울 수 있었던 것은, 썬코 바이러스 증식용 배지에 D-Glucosamin을 첨가함으로써 바이러스가 세포에 침투하기 쉽게 되었기 때문이다. 이러한 성질을 이용하여 썬코바이러스가 잘 증식되는 PK-15주를 선별하고자 하였다. 즉 D-Glucosamin을 첨가하지 않고 작출 된 썬코바이러스(BP-PCV2b)를 PK-15주에 동시 접종하고 증식성을 확인하였다. 그 결과 세포별로 다른 증식성을 나타내는 현상을 아래 그림과 같이 확인하였다. 물론 이 방법이 합당한 것인지는 더 확인 되어야한다. 즉 39중중 이와 같은 현상이 확인된 세포를 1차선별하고, 정상적 방법으로 바이러스를 증식 시켰을 때 세포별 증식성이 다른 것임을 확인하고 1차적으로 12중 세포 중 4종의 세포(4번, 7번, 8번, 12번)를 IFA 방법으로 선별하였다.

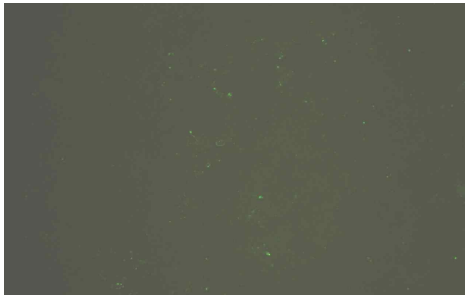
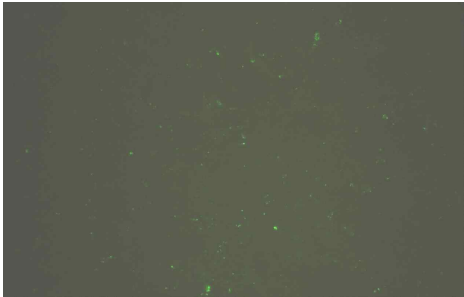
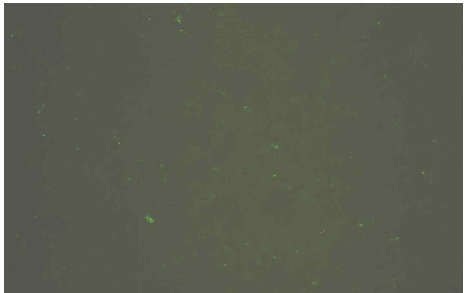
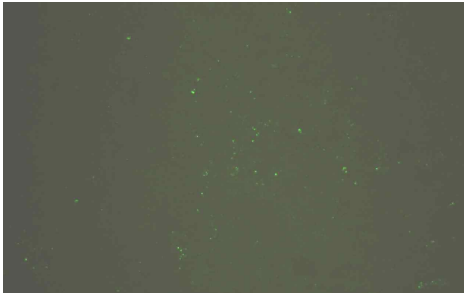
| | |
|---|--|
| 4번 PK-5 세포 | 7번 PK-5 세포 |
|  |  |
| 8번 PK-5 세포 | 12번 PK-5 세포 |
|  |  |

그림. 1차 선별된 PK-15 세포의 썬코바이러스(BP-PCV2b) 증식성: ABP-PCV2b 배양액을 10^{-2} 희석하여 감염 시킨 후 IFA test로 잘 감염되는 단일 세포 클론들을 선별하였다.

5. PCV2 각 유전형별 ORF2 단백 VLP(Viral like particle) 제작

(1) PCV2 각 유전형별 ORF2 발현 baculovirus vector 제작

① 1차 년도에 인공 합성하여 제작한 각 type별 키메라 PCV2 virus의 ORF2 유전자를 이용하여 다음 프라이머로 PCR하여 XL-Topo vector에 각각의 ORF2유전자를 TA cloning하였다.

| | | | |
|-------------|----|----------------------------------|----|
| PCV2-ORF2-F | 5' | AAGGATCC-ATGACGTATCCAAGGAGGCGTT | 3' |
| PCV2-a-R | 5' | GCTCTAGA-TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCT | 3' |
| PCV2-b-R | 5' | GCTCTAGA-TTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCT | 3' |
| PCV2-d-R | 5' | GCTCTAGA-TTAGGGGGTTAAGTGGGGGGTCT | 3' |

set1(2a-1) : PCV2-ORF2-F + PCV2-a-R

set2(2a-2) : PCV2-ORF2-F + PCV2-a-R

set3(2b) : PCV2-ORF2-F + PCV2-b-R

set4(2d) : PCV2-ORF2-F + PCV2-d-R

② M13 forward, M13 reverse primer를 이용하여 PCR한 후 12개의 클론을 확보하여 염기서열을 분석하였으며 유전자 변이가 생기지 않은 클론을 선발하였음.

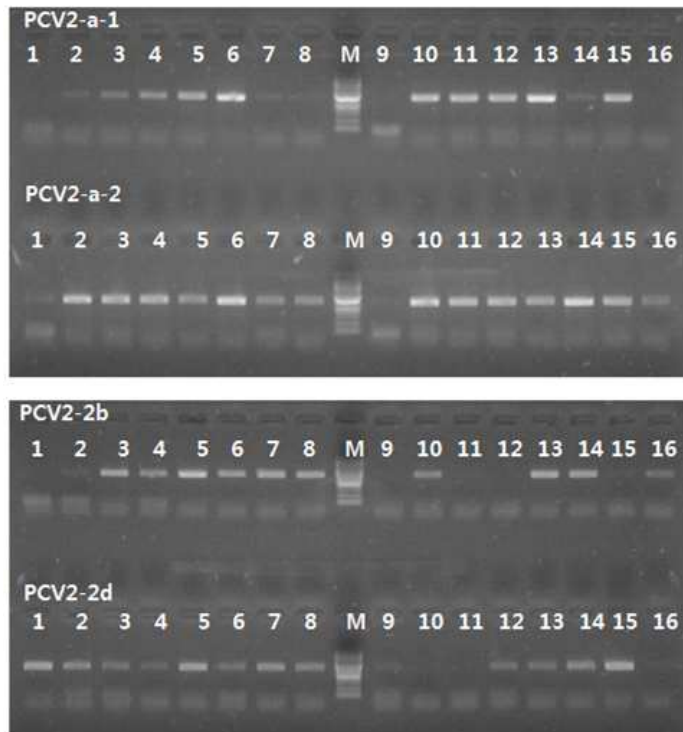


그림. PCV2 VLP를 제작하기 위해 각 유전형별 PCV2 ORF2유전자를 PCR하여 얻은 각각의 클론의 확인.

③ ORF2 유전자가 들어있는 vector와 baculovirus 발현용 vector(pFast Bac1)를 PCV2a-1은 *NotI* 과 *SpeI* 으로, PCV2a-2와 PCV2b 그리고 PCV2d는 *NotI* , *BamHI* 의 제한효소로 처리 후 T4 DNA ligase를 이용하여 16°C 에서 2시간30분 반응 후 *E. coli* DH5 α 에 transformation 하여 ampicillin이 첨가된 LB agar에 도말하였으며, 37°C 에서 하룻밤 배양 후 형질전환 된 colony를 분리하였다.

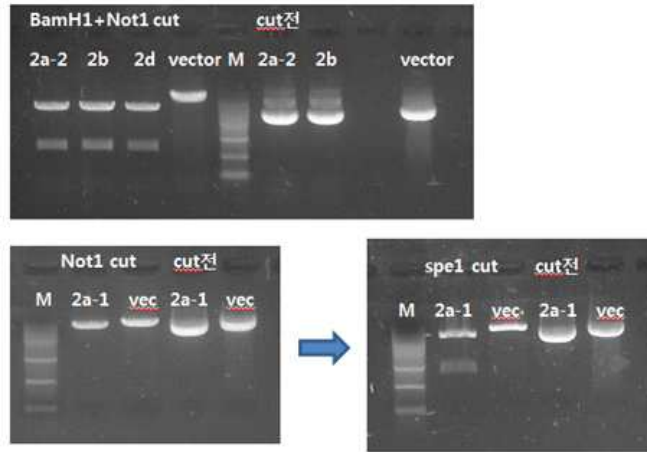


그림. 각각의 ORF2 유전자를 baculovirus 발현용 vector(pFast Bac1)로 subcloning하는 과정.

④ 분리된 plasmid vector는 transfection하기 위하여 NucleoBond® Xtra Midi Plus로 midi-prep하였다.

| | |
|---------------------|----------------------|
| 2a-1-① : 749.2ug/ml | 2a-1-② : 1408.6ug/ml |
| 2a-2-① : 924.6ug/ml | 2a-2-② : 821.6ug/ml |
| 2b-① : 914ug/ml | 2b-② : 1390.7ug/ml |
| 2d-① : 961.5ug/ml | 2d-② : 818.7ug/ml |

(2) PCV2 각 유전형별 ORF2 발현 baculovirus 작출

① Insect cell 배양

1) High5

- invitrogen (Lot. no : 1179361)에서 분양받은 High5 cell을 Express Five® SFM (L-glutamine 200mM) Media를 사용하여 배양하였다.

2) Sf9

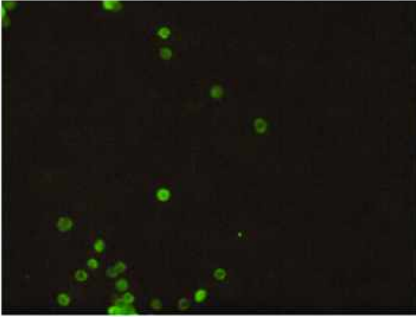
- invitrogen (Lot. no : 1211757)에서 분양받은 Sf9 cell을 Grace's Insect Medium (10% FBS)을 사용하여 배양하였다.

② Insect cell을 이용한 transfection

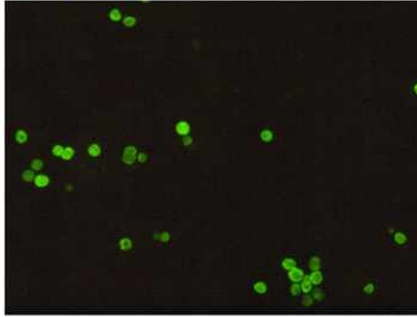
1) sf9을 6well plate 에 Sf-900 II Media를 사용하여 9×10^5 /well 배양 후 transfection하여 3일 후 virus를 수확하였다. transfection하고 난 후 그 sup은 보관하고 plate에 남아있는 cell은 IFA를 통해 transfection 성공여부를 판단하였다.

2) High5를 6well plate에 Express five SFM 배지를 사용하여 9×10^5 /ml 배양 후 transfection하여 3일 후 virus를 수확하였다. transfection하고 난 sup은 냉장보관 하고 plate에 남아있는 cell은 IFA를 통해 transfection 성공여부를 판단하였다.

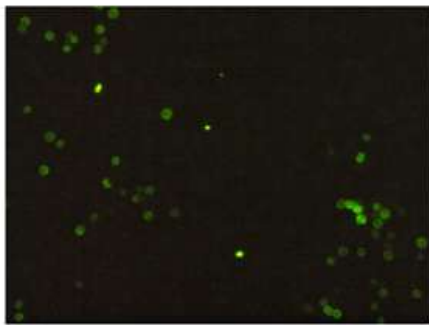
PCV2-2a-1



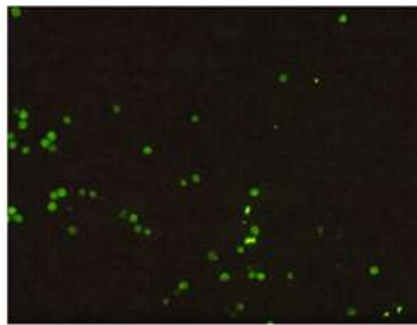
PCV2-2a-2



<2a-1>



<2a-2>



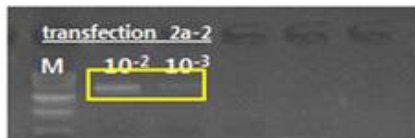
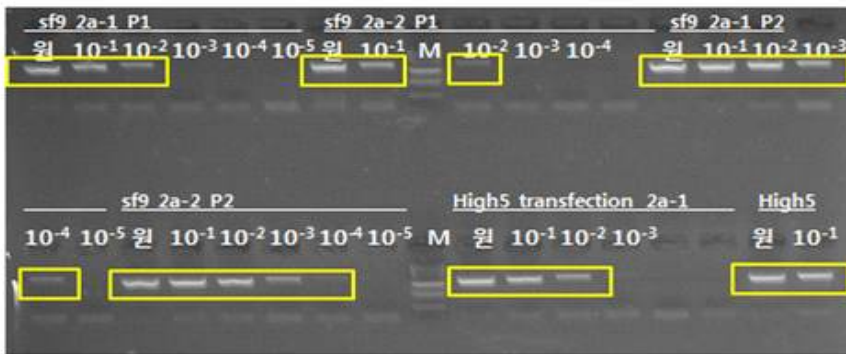
③ 재조합 바이러스의 증식

1) transfection하여 얻어진 virus를 sf9에 재감염 시켜 PCV를 통해 역가를 확인하였다.

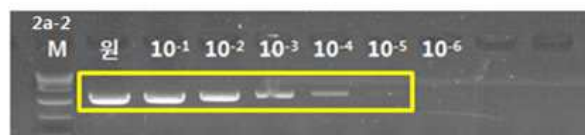
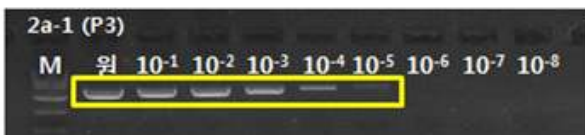
Primer : PCV2-ORF2-F + M13R(pUC)

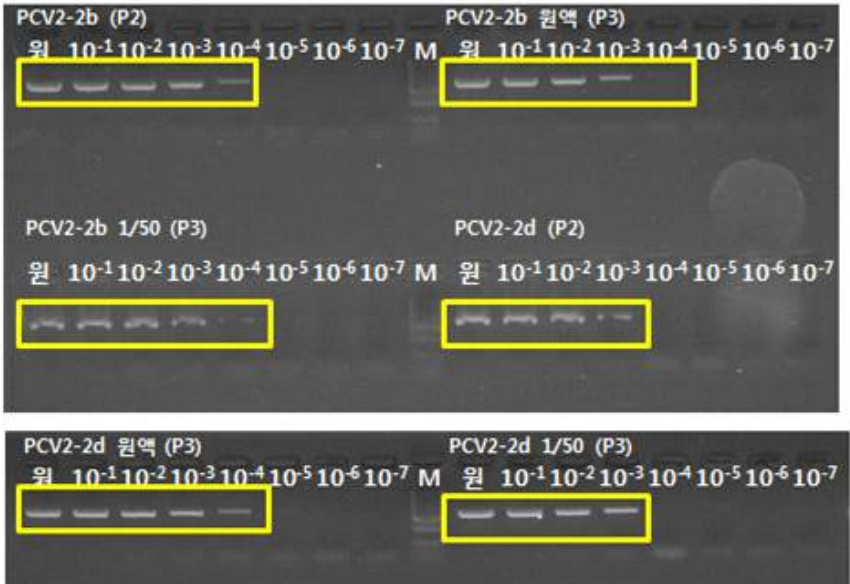
밑의 그림에서 보면 P1에서는 10⁻²까지 band가 관찰되었지만, P2에서는 10⁻⁴까지 band가 관찰되었다. 또한 한 번 더 passage를 했을 경우 10⁻⁵까지 band가 관찰되었다.

passage1



Passage2~3

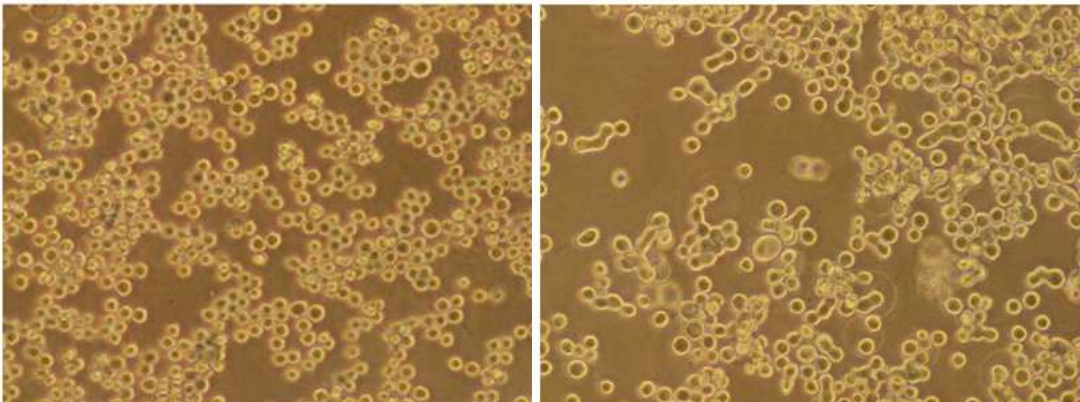




2) High5에 증식시켰을 경우 세포의 용해 및 크기 증가 등의 CPE도 관찰되었다.

<감염 전>

<감염 후>

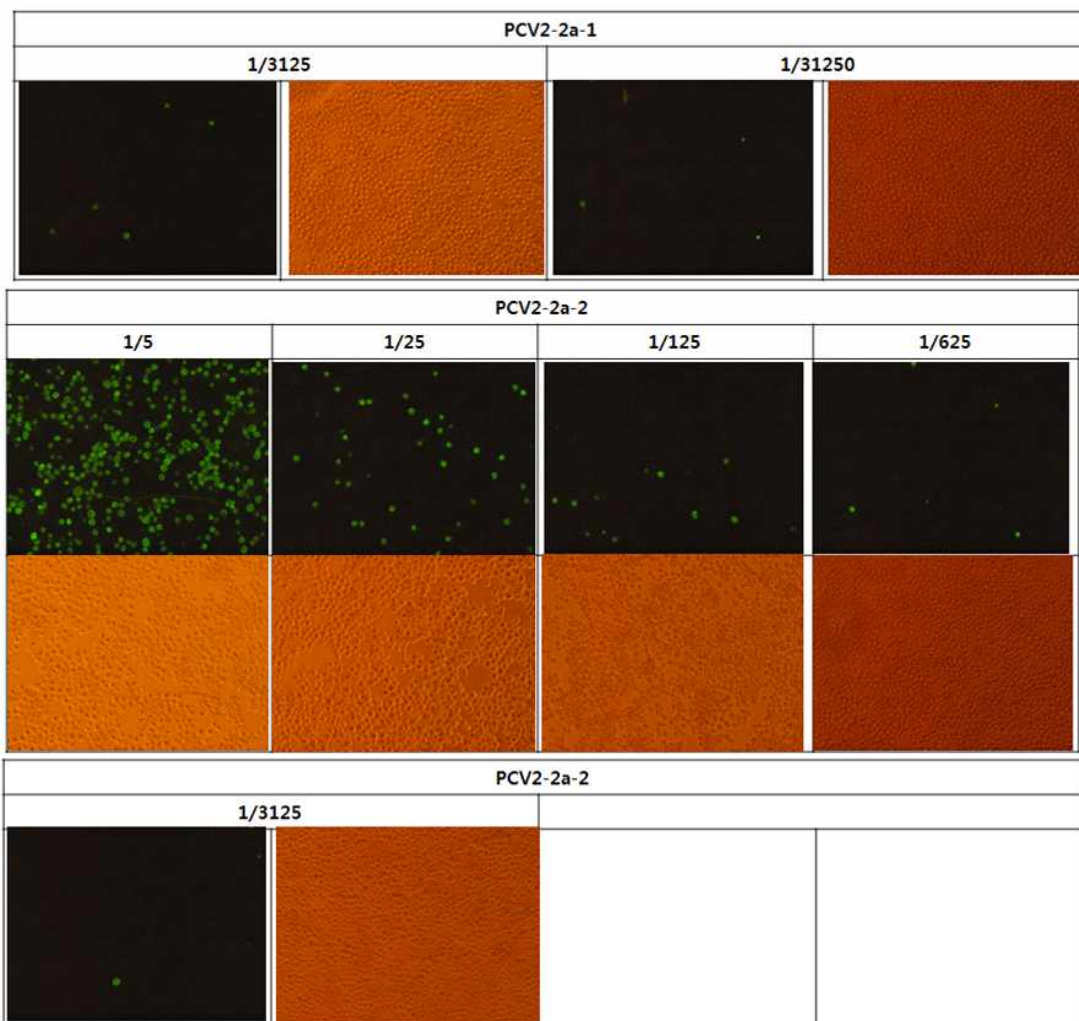


④ 재조합 바이러스의 역가측정

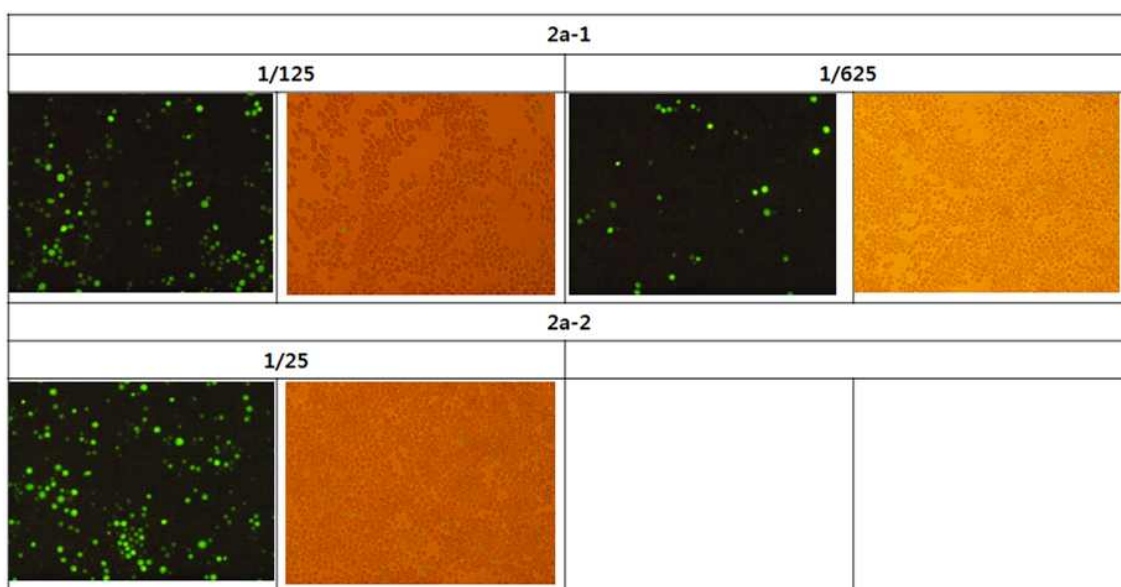
Sf9 cell을 96well plate에 80%/well(125ul/well) 되도록 배양하여 virus를 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/31250, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸로 희석하여 25ul/well로 감염시켰다.

<48시간 후>

| PCV2-2a-1 | | | |
|-----------|------|-------|-------|
| 1/5 | 1/25 | 1/125 | 1/625 |
| | | | |
| | | | |



<72시간 후>



(3) 세포주에서의 항원발현 및 VLP시험생산

<High5 cell을 이용한 재조합 단백질 생산>

- 1) 질소에 보관 된 cell을 flask에 배양한 후 $0.8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 spinner flask에 배양하여 Heparin으로 adaptation한 후 cell 수가 $0.8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 spinner flask에 재조합 virus를 동시감염 시켰다.
- 2) 배양하면서 날짜별로 일부 harvest하여 immunoblotting을 통해 항원 생산 여부를 판단 하였다.

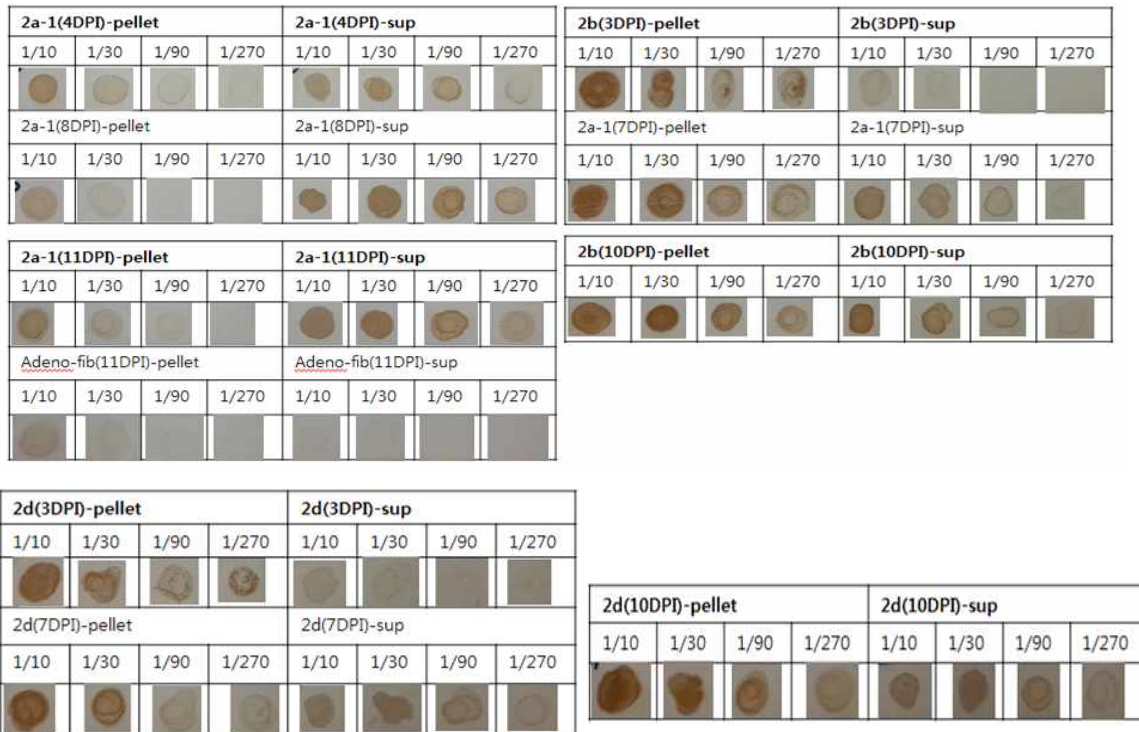
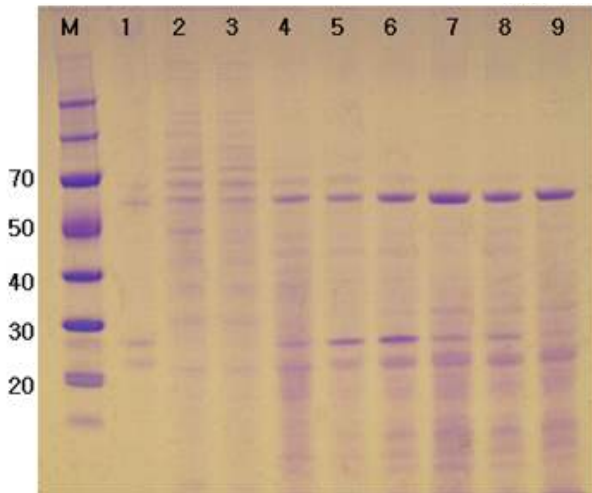


그림. Immunoblotting을 통한 재조합 PCV2 VLP(ORF2) 단백질의 발현량 확인.

Baculovirus감염 3일째부터 PCV2 VLP가 세포배양액으로 분비되어 7~10일에 최대에 이릅니다.

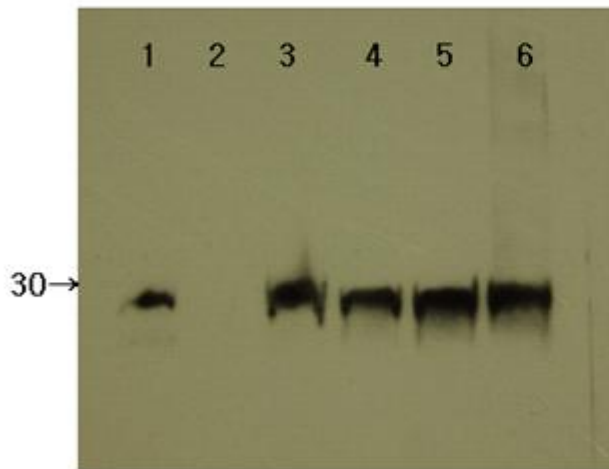
- 3) 재조합 단백질의 발현 및 항원성을 확인하기 위하여 단백질 전기영동 및 western blotting을 수행하였음.

A. Commassie blue staining

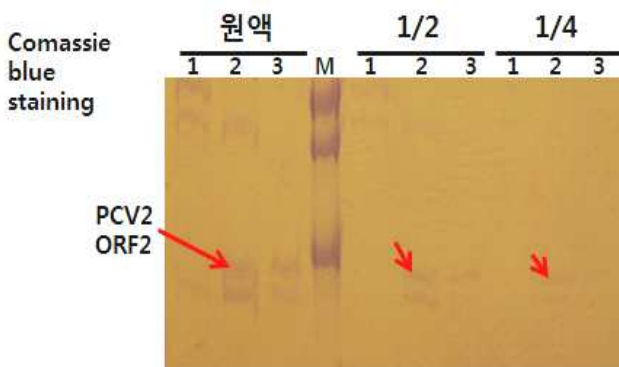


M : Marker (5 μ l)
 1 : 베링거
 2 : PCV2 2a-1 2DPI
 3 : PCV2 2a-1 3DPI
 4 : PCV2 2a-1 4DPI
 5 : PCV2 2a-1 5DPI
 6 : PCV2 2a-1 6DPI
 7 : PCV2 2a-1 7DPI
 8 : PCV2 2a-1 8DPI
 9 : PCV2 2a-1 9DPI

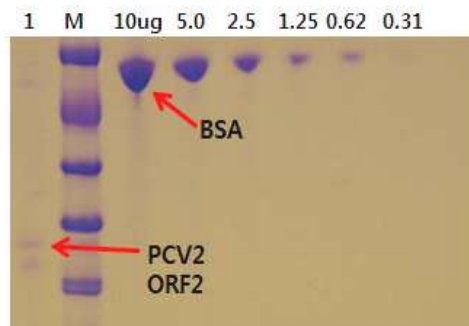
B. western blotting



1 : 베링거
 2 : PCV2 2a-1 3DPI
 3 : PCV2 2a-1 4DPI
 4 : PCV2 2a-1 5DPI
 5 : PCV2 2a-1 6DPI
 6 : PCV2 2a-1 7DPI



1. Adenovirus-fiber
 2. 시험백신2: Circo-mluti Vac+ (10ul)
 3. 베링거 CircoFLEX(10ul)



1. 시험백신2: 대성 Circo-multi Vac+ (10ul)
 M Size marker
 10~0.31ug of BSA

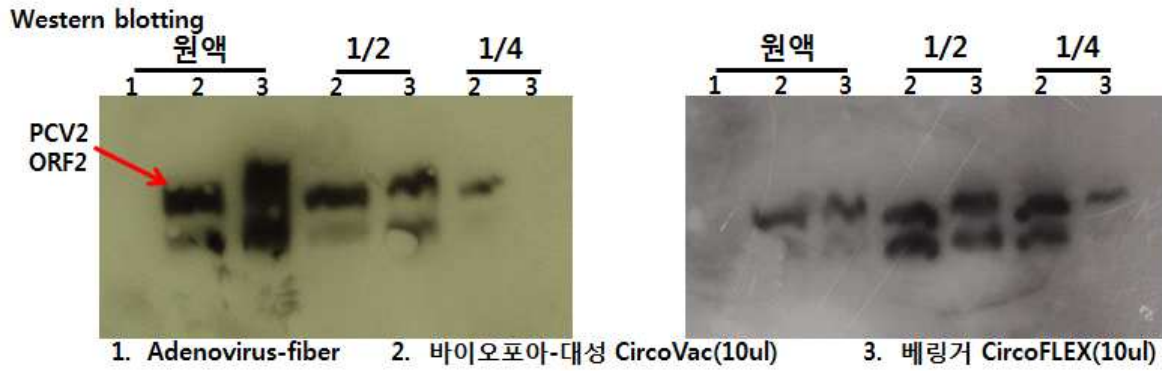


그림. 발현 재조합 단백질을 베링거 써코백신과 함께 전기영동 후 염색하여 발현 단백질이 크기가 약 30kd임을 확인하였음. 발현량은 베링거 백신 대비 2~6배였으며 baculovirus감염 후 약 6~9일 정도에서 세포배양 배지로 최대로 분비됨을 보였으며 정량된 단백질과 함께 전기영동하여 염색함으로써 대략의 단백량을 확인한 결과 세포배양 상층액 1ml당 약 120ug의 PCV2 VLP가 발현됨을 확인함.

(4) VLP의 면역원성 시험(기니픽, SPF 닭)

■ 4주령의 SPF닭에 바이오포아 씨코-VLP(Baculovirus 발현 제조합 씨코 VLP백신)를 피하 접종하고 3주 후 채혈하여 IFA 키트를 이용하여 항체가를 측정하였음.

항체 측정 결과 1/3200배 까지 희석된 혈청에서 양성 반응을 보여 매우 높은 항체가를 보였음.

| 바이오포아 씨코-VLP | | | | | |
|---|---|---|--|---|---|
| 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 |
|  |  |  |  |  |  |

그림. 4주령 SPF닭에 씨코 백신을 접종 후 3주 뒤 채혈하여 씨코백신의 항체가를 IFA법으로 비교 시험하여 형광 현미경으로 관찰한 사진. 1/3200배 이상의 매우 높은 항체가를 보였음.

(5) PCV2 VLP 생산 최적화(주관, 협동)

(가) PCV2 ORF2 VLP의 최적 발현 조건 확립

<High5를 이용한 PCV2 재조합 단백질 생산조건 측정>

- ① 24well plate에 High5 cell을 2×10^5 /well을 부착한 후 virus를 각MOI에 맞추어 넣어주었다.
- ② 2일후부터 각well을 harvest하여 immunoblotting을 통해 확인해보았다.

| High5 PCV2-2a-1 | 17.5MOI | | 5.8MOI | | 1.9MOI | | 0.6MOI | | 0.2MOI | | N.C | |
|-----------------|---------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|------|-------|
| 2DPI | A-1 | | A-2 | | A-3 | | A-4 | | A-5 | | A-6 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 3DPI | A-7 | | A-8 | | A-9 | | A-10 | | A-11 | | A-12 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 4DPI | A-13 | | A-14 | | A-15 | | A-16 | | A-17 | | A-18 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 5DPI | A-19 | | A-20 | | A-21 | | A-22 | | A-23 | | A-24 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |

| High5 PCV2-2b | 15MOI | | 5MOI | | 1.6MOI | | 0.5MOI | | 0.2MOI | | N.C | |
|---------------|-------|-------|------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|------|-------|
| 2DPI | A-1 | | A-2 | | A-3 | | A-4 | | A-5 | | A-6 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 3DPI | A-7 | | A-8 | | A-9 | | A-10 | | A-11 | | A-12 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 4DPI | A-13 | | A-14 | | A-15 | | A-16 | | A-17 | | A-18 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 5DPI | A-19 | | A-20 | | A-21 | | A-22 | | A-23 | | A-24 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |

| High5-PCV2-b 10DPI | | High5-Adeno 11DPI | |
|-----------------------|-------|----------------------|-------|
| 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | |

| High5 PCV2-2b | 3MOI | | 1.5MOI | | 0.75MOI | | 0.38MOI | | 0.19MOI | | N.C | |
|---------------|------|-------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|------|-------|
| 2DPI | A-1 | | A-2 | | A-3 | | A-4 | | A-5 | | A-6 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 3DPI | A-7 | | A-8 | | A-9 | | A-10 | | A-11 | | A-12 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 4DPI | A-13 | | A-14 | | A-15 | | A-16 | | A-17 | | A-18 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 5DPI | A-19 | | A-20 | | A-21 | | A-22 | | A-23 | | A-24 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |

| High5 PCV2-2a-1 | 2.5MOI | | 1.25MOI | | 0.62MOI | | 0.31MOI | | 0.16MOI | | N.C | |
|-----------------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|------|-------|
| 2DPI | A-1 | | A-2 | | A-3 | | A-4 | | A-5 | | A-6 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 3DPI | A-7 | | A-8 | | A-9 | | A-10 | | A-11 | | A-12 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 4DPI | A-13 | | A-14 | | A-15 | | A-16 | | A-17 | | A-18 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |
| 5DPI | A-19 | | A-20 | | A-21 | | A-22 | | A-23 | | A-24 | |
| | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | | | | | | | | |

| High5-PCV2-b 10DPI | | High5-Adeno 11DPI | | Boehringer | |
|-----------------------|-------|----------------------|-------|------------|-------|
| 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 | 1/20 | 1/100 |
| | | | | | |

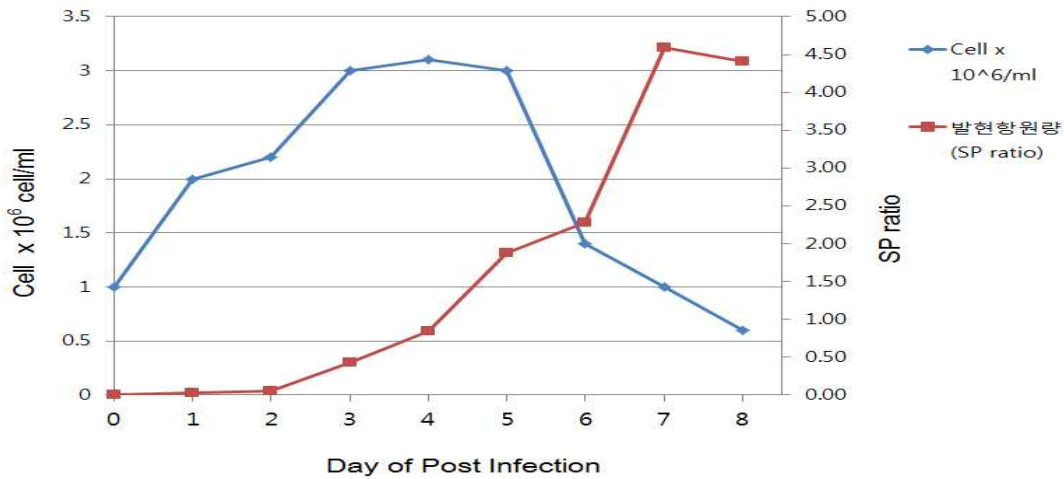
그림. 재조합바이러스별로 항원발현 최적 조건이 차이가 남을 확인 할 수 있었으며 0.5 MOI 이상으로 감염시킨 후 5일 이상 배양하여 최적 조건을 설정하였음.

(나) PCV2 ORF2 VLP의 대량생산 조건 확립

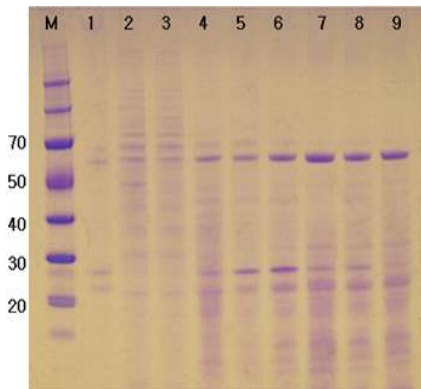
(감염 시 virus의 MOI, 세포수, 배양조건, 배양시간 등 결정)

: 24well plate에서 확인한 최적 농도와 96well plate에서 다시 titration한 TCID₅₀값을 토대로 하여 PCV2 VLP 발현 제조합 baculovirus를 감염시켰다.

- ① Heparin에 adaptation된 High5를 1 × 10⁶/ml 500ml을 spinner flask에넣고 최적 MOI로 감염.
- ② 1DPI부터 매일 sampling하여 보관하였고 cell count하여 cell상태를 확인하였다.
- ③ 배양 상층액을 Synbiotics PCV2 ELISA kit를 이용하여 항원량을 측정하고 전기 영동하여 확인함.

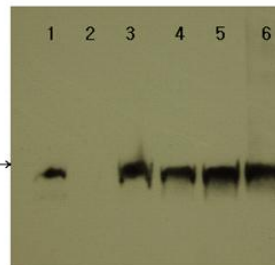


A. Commassie blue staining



M : Marker (5μl)
 1 : 배령거
 2 : PCV2 2a-1 2DPI
 3 : PCV2 2a-1 3DPI
 4 : PCV2 2a-1 4DPI
 5 : PCV2 2a-1 5DPI
 6 : PCV2 2a-1 6DPI
 7 : PCV2 2a-1 7DPI
 8 : PCV2 2a-1 8DPI
 9 : PCV2 2a-1 9DPI

B. western blotting



1 : 배령거
 2 : PCV2 2a-1 3DPI
 3 : PCV2 2a-1 4DPI
 4 : PCV2 2a-1 5DPI
 5 : PCV2 2a-1 6DPI
 6 : PCV2 2a-1 7DPI

- ④ 보관해 놓은 9DPI sup을 BEI를 이용하여 96시간 inactivation 하였다.

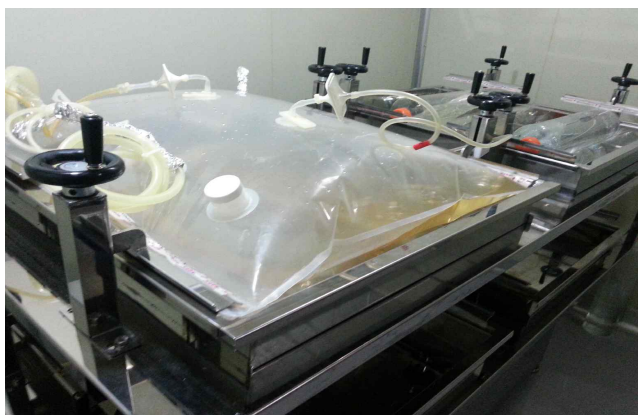


그림. 제조합 VLP의 최적 발현 조건이 설정되면 그림과 같이 웨이브 배양으로 한번에 20L이상

을 배양하여 시험백신을 대량 생산 하였음.

6. 시험백신의 제조.

가. 고증식성 키메라 PCV2시험백신의 제조 (시험백신1)

(1) ORF2 유전형별 고증식성 키메라 PCV2 인수; 연차 실적보고서를 작성하고 있는 현재 3종의 키메라 PCV2를 주관기관으로부터 인수받았다. BP-PCV2b는 4월 9일에 인수받았고, BP-PCV2a-1 과 BP-PCV2a-2 는 7월 4일 인수하였다. 인수받은 종독은 주관기관과의 구별을 위하여 A를 종독명칭앞에 붙여 종독명을 ABP-PCV2b seed라 하였다.

(2) ABP-PCV2b 종독에 관한 시험

(가) 종독의 ORF2 유전자 확인: 분양받은 BP-PCV2b 종독을 5대 계대하여 ABP-PCV2b seed라 종독 명칭을 부여하고 써코바이러스임을 확인하기위하여 PCR을 실시하였다. PCR조건은 하기 표 1 과 같았으며, 그 결과는 표 2와 같이 써코바이러스의 ORF2 유전자가 확인 되었다.

표 1. ABP-PCV2b 종독의 PCV2 ORF2유전자 확인 PCR 조건

| | |
|-----------------------|--------------|
| ONE CYCLE | |
| Pre-denaturation | 94℃ / 5 min |
| 3-STEP CYCLING | |
| Denaturation | 94℃ / 30 sec |
| Annealing | 54℃ / 30 sec |
| Extension | 72℃ / 40 sec |
| Number of cycles : 40 | |
| ONE CYCLE | |
| Final extension | 72℃ / 5min |

표 2. ABP-PCV2b 종독의 PCV2 ORF2 유전자 확인 결과

| | |
|--|--------------------------|
| | M. 100 bp marker |
| | 1. ABP-PCV2b seed |
| | N. PCV2 음성대조구 |
| | P. PCV2 양성대조구 |

(나) 종독의 순수성시험

마이코플라즈마 미입 부정시험;ABP-PCV2b seed 를 표3 PCR조건으로 PCR을 실시하여 종독에 마이코플라즈마가 혼입되었는지를 검사하였다. 그 결과 표 4와 같이 마이코플라즈마 유전자가 음성임을 확인하였다.

표 3. ABP-PCV2b 종독의 마이코플라즈마 검출 PCR조건

| | |
|-----------------------|--------------------|
| ONE CYCLE | |
| Pre-denaturation | 94℃ / 5 min |
| 3-STEP CYCLING | |
| Denaturation | 94℃ / 1 min |
| Annealing | 60℃ / 1 min |
| Extension | 72℃ / 1 min 30 sec |
| Number of cycles : 30 | |
| ONE CYCLE | |
| Final Extesion | 72℃ / 7 min |

표 4. PCR을 이용한 ABP-PCV2b 종독의 마이코플라즈마 검출 시험 결과

| | |
|--|---------------------|
| | M. 100bp marker |
| | 1. 22RABLO2 |
| | 2. 캄)22HC03 |
| | 3. 캄)22ADLV02 |
| | 4. 베)22PSM01 |
| | 5. ABP-PCV2b |
| | N. MG 음성대조구 |
| | P. MG 양성대조구 |

(다) ABP-PCV2b 종독의 미입 바이러스부정시험

①조직배양시험; 동물용 의약품 국가검정기준에 준하여 실시하였다. PK-15 세포주와 vero 세포주에 ABP-PCV2b 종독을 접종하고 세포변성(CPE)과 돼지혈구, 닭 혈구, 기니픽혈구에 대한 혈구응집성을 관찰하였다. 그 결과 표5와 같이 세포변성과 혈구응집성이 나타나지 않아 미

입 바이러스가 없음을 확인하였다.

표 5. 국가검정기준에 준한 종독의 미입바이러스 부정시험

| 검사항목 종독명 | 세포변성(CPE) | | 혈구 응집성 | | |
|---------------------|-----------|--------|--------|-------|-----|
| | PK-15세포 | Vero세포 | 돼지혈구 | 기니픽혈구 | 닭혈구 |
| ABP-PCV2b 종독 배양액 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 |
| 무접종 대조 PK-15 배양액 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 |

②PRRSV 미입바이러스 부정시험; ABP-PCV2b 종독에 대한 미입바이러스 부정시험에 적합하였으나, 종독으로 사용해야 하는 씨코바이러스 배양액이기 때문에 미입 바이러스 확인 가능한 여러 바이러스를 PCR로 확인하였다. PRRSV에 대한 ONE-STEP RT-PCR 조건은 표 6과 같이 실시하였고, 그 결과는 표 7과같이 PRRSV 음성임을 확인하였다.

표 6. PRRSV 미입부정시험을 위한 ONE-STEP RT-PCR 조건

| | |
|-----------------------|---------------|
| ONE CYCLE | |
| Reverse transcription | 45°C / 30 min |
| Pre-denaturation | 94°C / 5 min |
| 3-STEP CYCLING | |
| Denaturation | 94°C / 30 sec |
| Annealing | 54°C / 30 sec |
| Extension | 72°C / 40 sec |
| Number of cycles : 40 | |
| ONE CYCLE | |
| Final Extension | 72°C / 5min |

표 7. PRRSV 미입부정시험을 위한 ONE-STEP RT-PCR 시험 결과

| | |
|--|-------------------|
| | M. 100 bp marker |
| | 1. ABP-PCV2b seed |
| | N. PRRSV 음성대조구 |
| | P. PRRSV 양성대조구 |

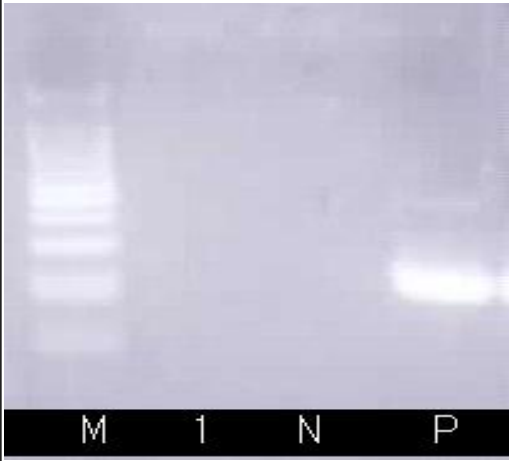
③돼지파보바이러스(PPV) 미입바이러스 부정시험; ABP-PCV2b 종독에 대한 미입바이러스 부정시험에 적합하였으나, 종독으로 사용해야하는 씨코바이러스 배양액이기 때문에 미입바이러스 확인 가능한 모든 바이러스를 PCR로 확인하였다. PPV에 대한 PCR 조건은 표 8과 같이 실

시하였고, 그 결과는 표 9과같이 PPV 음성임을 확인하였다.

표 8. PPV 미입부정시험을 위한 PCR 조건

| | |
|-----------------------|---------------|
| ONE CYCLE | |
| Pre-denaturation | 94°C / 3 min |
| 3-STEP CYCLING | |
| Denaturation | 94°C / 30 sec |
| Annealing | 56°C / 30 sec |
| Extension | 72°C / 30 sec |
| Number of cycles : 35 | |
| ONE CYCLE | |
| Final Extension | 72°C / 5min |

표 9. PPV 미입부정시험을 위한 PCR 결과


| | |
|---|-------------------|
|  | M. 100bp marker |
| | 2. ABP-PCV2b seed |
| | 3. PPV 음성대조구 |
| | 4. PPV 양성대조구 |

④PED/TGEV 미입 부정시험; ABP-PCV2b 종독에 대한 미입바이러스 부정시험에 적합하였으나, 종독으로 사용해야하는 썬코바이러스 배양액이기 때문에 미입바이러스 확인 가능한 모든 바이러스를 PCR로 확인하였다. 돼지 전염성설사(PED)바이러스와 돼지 전염성위장염(TGE) 바이러스에 대한 PCR 조건은 표 8과 같이 실시하였고, 그 결과는 표 9과같이 PED/TGEV 음성임을 확인하였다.

표 10. PED/TGEV 미입 부정시험을 위한 PCR 조건

| | |
|-----------------------|---------------|
| ONE CYCLE | |
| Reverse transcription | 45°C / 30 min |
| Pre-denaturation | 94°C / 5 min |
| 3-STEP CYCLING | |
| Denaturation | 94°C / 30 sec |
| Annealing | 50°C / 30 sec |
| Extension | 72°C / 40 sec |
| Number of cycles : 40 | |
| ONE CYCLE | |
| Final Extension | 72°C / 5min |

표 11. PED/TGEV 미입 부정시험을 위한 PCR 결과

| | |
|---|--------------------------|
|  | M. 100 bp marker |
| | 1. ABP-PCV2b seed |
| | N. PED/TGEV 음성대조구 |
| | P. PED/TGEV 양성대조구 |

나. 고증식성 키메라 PCV2b 바이러스 및 VLP(PCV2a, PCV2d)항원 보강 PCV2다가 백신의 제조

(1) 시험백신 제조

1차 년도에는 고증식성 PCV2바이러스 다가 백신인 시험백신1(대성 씨코 멀티백)을 제조하여 시험하였고, 2차 년도에는 고증식성 PCV2바이러스 다가 백신에 항원성을 증강하기 위하여 재조합 PCV2 VLP항원을 첨가한 **시험백신2**(대성 씨코 멀티백(+))를 시험백신으로 제조하였음.

대성 씨코+ 멀티백(+); 시험백신2(바이오포아 항원생산)

대성 PCV 멀티백-23 pcvAbD 06(2013.06.10.)-10ml-10병


PCV2-A,D 바이오포아 재조합 PCV2 VLP 배양(50ml)+PCV2(b)Bulk(50ml)

IMS 1313 오일 25% 첨가 2013.06.20 벌크 20ml 병*10ml 분병=10병

대성 PCV 멀티백-23 pcvAbD 07(2013.07.05)-10ml-78병

1. 2013.07.05. PCV2a, PCV2d 바이오포아 배양)Bulk-400ml 2013.07.09 BEI 불활화
2. 2013.03.12-03.27 PCK2-(b) Bulk Harvest 400ml 2013.07.08. 원심분리 2013.07.09 BEI 불활화
3. PCV2(a) VLP 배양(400ml)+PCV2(b)Bulk(400ml)

IMS 1313 오일 10% 첨가 2013.07.18 벌크원심하여 20ml 병*10ml 분병=78병

| | | |
|---|------|--------|
| 연구용백신 | 10ml | 동물용의약품 |
| 대성씨코멀티백(+) | | |
| 시험백신2 | | |
| IMS-10 | | |
|  | | |
| [용법·용량] 두당 1ml씩 근육접종 [주의사항] 1. 2~8℃의 냉장소에 보관하십시오. 2. 수의사의 지시에 따라 사용하십시오. 제조번호 : 23pcvAbD07 제조일자 : 2013.07.15 | | |

라벨

대성씨코멀티백(+), 야외 농장 시험용 백신 제조(시험백신2)

| 시험백신 3batch | Lot.No. | 제조일 | 생산량 |
|---------------------|------------|---------------|----------------|
| 대성씨코멀티백(+) 시험백신2 | 24VBBAD 01 | 2014. 07. 29. | 230병/10두분/10ml |
| | 24VBBAD 02 | 2014. 07. 29. | 230병/10두분/10ml |
| | 24VBBAD 03 | 2014. 08. 05. | 240병/10두분/20ml |



7. 시험백신의 효능평가.

가. 시험백신 1의 효능평가

(1) 고증식성 키메라 PCV2(시험백신1)의 면역원성 평가

보조제별 시험백신의 항체 형성능 시험

기니픽 에 대한 써코백신 시험 2012.07.09.시험

| 시험동물 | 시험백신명 | 기니픽 No | 접종부위 접종량 | | 접종일 | 채혈일 역가시험 일 | 가검혈청번호 IFA 항체가 | |
|-----------------|--|--------|-------------|-------|----------------|------------------|-------------------|------|
| | | | | | | | | |
| 기니 픽 350g | 22 PMWS 08 IMS-1313-2 5 (시험백신1) | 1 | 피하 | 0.5ml | 2012. 07.09 | 2012. 07.31 | 10 | 1024 |
| | | 2 | 피하 | 0.5ml | | | 11 | 2048 |
| | | 3 | 피하 | 0.5ml | | | 11 | 2048 |
| | 22 PMWS 09 Monta-gel-1 0 | 4 | 피하 | 0.5ml | | 2012. 08.01 | 11 | 2048 |
| | | 5 | 피하 | 0.5ml | | | 11 | 2048 |
| | | 6 | 피하 | 0.5ml | | | 11 | 2048 |
| | 22 PMWS 10 DS-gel-20 | 7 | 피하 | 0.5ml | | 9 | 512 | |
| | | 8 | 피하 | 0.5ml | | 10 | 1024 | |
| | | 9 | 피하 | 0.5ml | | 10 | 1024 | |

- 결과: 1. IMS-1313 멀티백신과 Monta-gel 멀티 백신의 기니픽에 대한 항체가는 1,024~2,048배로 동등한 항체 형성 능력을 발휘하였다.
2. DS-gel 멀티백신은 512배~1,024배로 항체가가 낮았으나 사용가능한 수준이기 때문에 자돈에 대한 시험을 같이 실시하였다.

(2) 시험백신 1의 자돈에 대한 항체 형성능 및 효력시험(500배 이상)

멀티써코백신(시험백신1) 동물시험 일지

2012년 07월 19일 시험자돈 혈청수령 및 검사의뢰(이 필수 선생님) : 14개
자돈 14두 동물번호 : 52, 53, 54, 57, 58, 60, 61
63, 64, 67, 69, 71, 75, 92

【참고사항】

- 자돈 타 백신 접종 없음
- 모돈 : 구제역, 써코, ART 접종

2012년 07월 27일 허원 부사장님, 정 광성 과장

* 1차 접종, 체중측정(7월27일)

| 항목 | | 자돈 No. | | 1차 채혈 접종 전 체중 |
|---------------------|---------------------|--------|----|------------------|
| 7.27. 1313 써코 | 8.03. IPA Gel | 1 | 53 | 5.8kg |
| | | 2 | 65 | 7.3kg |
| | | 3 | 70 | 5.4kg |
| | | 4 | 72 | 5.4kg |
| Mont.G el 써코 | IPA Gel | 5 | 78 | 5.0kg |
| | | 6 | 80 | 9.6kg |
| | | 7 | 81 | 6.5kg |
| | | 8 | 84 | 5.6kg |
| DS겔 써코 | IPA Gel | 9 | 83 | 8.4kg |
| | | 10 | 87 | 7.0kg |
| | | 11 | 88 | 9.6kg |
| | | 12 | 73 | 5.6kg |
| 대조구 | | 13 | 82 | 9.4kg |
| | | 14 | 51 | 5.2kg |

2012년 08월 10일 정 광성 과장, 문 영식

* 2차 접종 : 9,10,11,12 각 1ml

- DS 겔 써코(22 PMWS 12)

1차 접종 : 1 ~ 14 전체 각 1ml

- IPA Gel : 대성 PA페렴(B), 22 PAG 02

* 채혈 : 전 시험구

* 체온측정 데이터 수령

2012년 08월 24일 부사장님, 이 필수 선생님, 정 광성 과장

* 단열(22 SEHC 07-1) 접종 : 전 시험구 각 1ml/두

* 채혈 : 전 시험구

* 체중 측정

| 항목 | | 자돈 No. | | 8월 24일 | 10월 19일 |
|-------------------------|---------------------|--------|----|--------|---------|
| 7.27. 1313 써코(시험백신1) | 8.03. IPA Gel | 1 | 53 | 12.8kg | 58.00kg |
| | | 2 | 65 | 15.8kg | 55.05kg |
| | | 3 | 70 | 13.7kg | 50.80kg |
| | | 4 | 72 | 13.5kg | 56.75kg |
| Mont.Gel 써코 | IPA Gel | 5 | 78 | 10.3kg | 31.30kg |
| | | 6 | 80 | 18.7kg | 59.50kg |
| | | 7 | 81 | 14.3kg | 41.70kg |
| | | 8 | 84 | 10.6kg | 34.65kg |
| DS겔 써코 | IPA Gel | 9 | 83 | 18.9kg | 9/26 폐사 |
| | | 10 | 87 | 15.9kg | 10/5 폐사 |

| | | | | | |
|-----|--|----|----|--------|---------|
| | | 11 | 88 | 17.0kg | 29.45kg |
| | | 12 | 73 | 15.8kg | 28.25kg |
| 대조구 | | 13 | 82 | 19.8kg | 9/16 폐사 |
| | | 14 | 51 | 10.6kg | 32.75kg |

● 8월 24일 : 1차 채혈 접종 전 체중

- 2012년 09월 11일 이 필수 선생님, 정 광성 과장(09월 07일)* 채혈 : 전 시험구
 2012년 09월 16일 **대조구 82번 폐사**(9월 17일 연락받음)
 * 부검할 수 있도록 냉동보관 요청
 2012년 09월 19일 대조구 82번 폐사돈 부검(이승섭 부장, 강현정 계장)
 * 흉막균 분리(폐) * PCR : 폐, 분변(소장), 림프, 비장
 2012년 09월 21일 이 필수 선생님, 정 광성 과장, 허 정, 서 기범
 * 채혈 : 전 시험구(폐사돈 82번 없음)
 2012년 09월 26일 **DS겔 써코, PRRS 추가 IPA Gel 접종구**
83번 폐사(9월 26일 연락받음) : 부사장님 보고
 * 양성에서 처리지시
 2012년 10월 05일 **DS겔 써코, PRRS 추가 IPA Gel 접종구**
87번 폐사 : 부사장님 보고
 * 양성에서 처리지시
 2012년 10월 19일 채혈 및 체중 측정(전 시험구)
 이 필수, 정 광성, 허 정, 서 기범
 * 이표 탈락 6두(1 ~ 4 : 2두, 5 ~ 8 : 4두 전체)
 2012년 12월 14일 채혈 및 체중 측정(전 시험구)
 정 광성, 허 정, 서 기범, 권 봉진 * 시험종료

| 항목 | | 동물번호 | | 12월 14일 | 비 고 |
|---------------------|-------------------------|------|----|---------|------|
| 7.27. 1313 써코 | 8.03 · IPA Gel | 1 | 53 | 118.5kg | |
| | | 2 | 65 | 108.6kg | |
| | | 3 | 70 | 101.3kg | |
| | | 4 | 72 | 106.8kg | |
| Mont. Gel 써코 | IPA Gel | 5 | 78 | 73.4kg | |
| | | 6 | 80 | 84.6kg | |
| | | 7 | 81 | 89.4kg | |
| | | 8 | 84 | 추가 폐사 | 73kg |
| DS겔 써코 | IPA Gel | 9 | 83 | 폐사 | |
| | | 10 | 87 | 폐사 | |
| | | 11 | 88 | 54.2kg | |
| | | 12 | 73 | 46.5kg | |
| 대조구 | | 13 | 82 | 폐사 | |
| | | 14 | 51 | 83.7kg | |

【양성 채혈 및 체중측정 일정】

| | | | | | | | | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| 일령 기준 | 4주령 7/27 | 6주령 8/10 | 8주령 8/24 | 10주령 9/7 | 12주령 9/21 | 16주령 10/19 | 20주령 11/16 | 24주령 12/14 |
| 접종 기준 | 접종전 7/27 | | 4주후 8/24 | | | 12주후 10/19 | | 20주후 12/14 |
| 채혈 | ★ | ★ | ★ | ★ | ★ | ★ | ★ | ? |
| 체중 | ● | | ● | | | ● | | ● |

【체중 측정표】

2012. 12. 15 정리

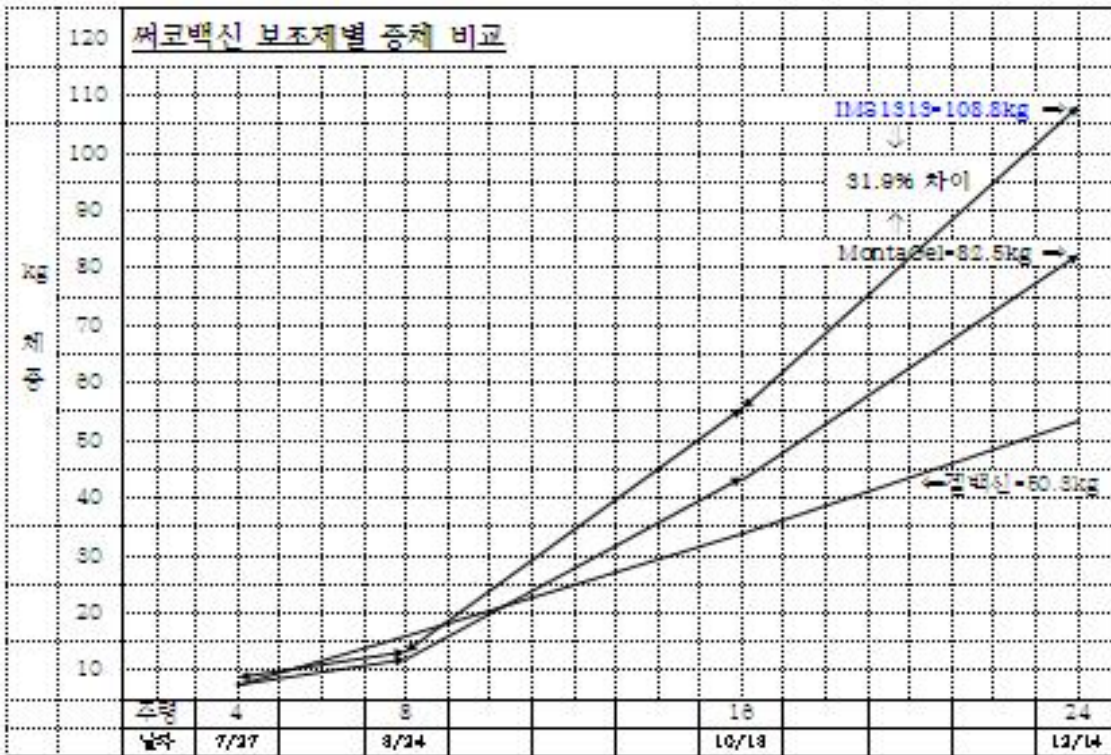
| 항목 | | 자돈 No. | | 7월 27일 | 8월 24일 | 10월 19일 | 12월 14일 |
|---------------|---------------|--------|----|--------|--------|---------|----------|
| 7.27. 1313 씨코 | 8.03. IPA Gel | 1 | 53 | 5.8kg | 12.8kg | 58.00kg | 118.5kg |
| | | 2 | 65 | 7.3kg | 15.8kg | 55.05kg | 108.6kg |
| | | 3 | 70 | 5.4kg | 13.7kg | 50.80kg | 101.3kg |
| | | 4 | 72 | 5.4kg | 13.5kg | 56.75kg | 106.8kg |
| Mont. Gel 씨코 | IPA Gel | 5 | 78 | 5.0kg | 10.3kg | 31.30kg | 73.4kg |
| | | 6 | 80 | 9.6kg | 18.7kg | 59.50kg | 84.6kg |
| | | 7 | 81 | 6.5kg | 14.3kg | 41.70kg | 89.4kg |
| | | 8 | 84 | 5.6kg | 10.6kg | 34.65kg | 폐사(73kg) |
| DS겔 씨코 | IPA Gel | 9 | 83 | 8.4kg | 18.9kg | 9/26 폐사 | 폐사 |
| | | 10 | 87 | 7.0kg | 15.9kg | 10/5 폐사 | 폐사 |
| | | 11 | 88 | 9.6kg | 17.0kg | 29.45kg | 54.2kg |
| | | 12 | 73 | 5.6kg | 15.8kg | 28.25kg | 46.5kg |
| 대조구 | | 13 | 82 | 9.4kg | 19.8kg | 9/16 폐사 | 폐사 |
| | | 14 | 51 | 5.2kg | 10.6kg | 32.75kg | 83.7kg |

【증체량 조사】 2012. 12. 26.

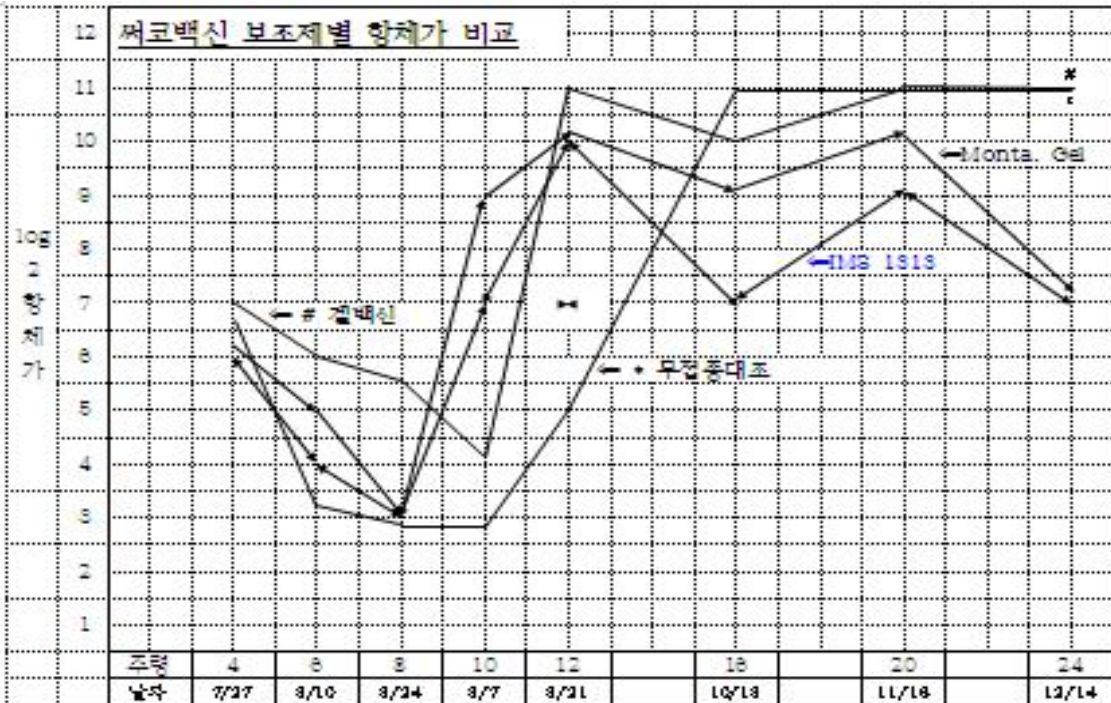
| 항목 | | 자돈 No. | | 체 중(kg) | | | 비 고 | |
|---------------|---------------|--------|-------|---------|----------|---------|------|------|
| 백신 | | 시험 전 | 시험 종료 | 증체량 | 일당증체량 | 평균일당증체량 | | |
| 7.27. 1313 씨코 | 8.03. IPA Gel | 1 | 53 | 5.8kg | 118.5kg | 112.7 | 0.70 | 0.64 |
| | | 2 | 65 | 7.3kg | 108.6kg | 101.3 | 0.63 | |
| | | 3 | 70 | 5.4kg | 101.3kg | 95.9 | 0.60 | |
| | | 4 | 72 | 5.4kg | 106.8kg | 101.4 | 0.63 | |
| Mont. Gel 씨코 | IPA Gel | 5 | 78 | 5.0kg | 73.4kg | 68.4 | 0.43 | 0.47 |
| | | 6 | 80 | 9.6kg | 84.6kg | 75.0 | 0.47 | |
| | | 7 | 81 | 6.5kg | 89.4kg | 82.9 | 0.52 | |
| | | 8 | 84 | 5.6kg | 폐사(73kg) | - | - | |
| DS겔 씨코 | IPA Gel | 9 | 83 | 8.4kg | 폐사 | - | - | 0.27 |
| | | 10 | 87 | 7.0kg | 폐사 | - | - | |
| | | 11 | 88 | 9.6kg | 54.2kg | 44.6 | 0.28 | |
| | | 12 | 73 | 5.6kg | 46.5kg | 40.9 | 0.26 | |
| 대조구 | | 13 | 82 | 9.4kg | 폐사 | - | - | 0.49 |
| | | 14 | 51 | 5.2kg | 83.7kg | 78.5 | 0.49 | |

* 시험기간 : 2012년 7월 27일 ~ 12월 14일(160일)

시험일령별 증체를 그래프로 표시.



자돈의항체가



결과

- ① 증체량 비교에서 현재 사용하고 있는 오일 백신을 기준으로 할 때 Mont.Gel 사용 백신과 DS겔 사용백신의 증체량이 현저히 저하됨을 확인하였다.
- ② 써코 양성 돈군에 백신접종시험을 하였기 때문에 자연적 공격시험이 이루어진 상태이며, 폐사율에서도 Mont.Gel 사용 백신과 DS겔 사용백신이 현재 백신보다 효과가 적었음을 확인하였

다.

③ 씨코 양성 돈군이기에 때문에 항체가는 대조군은 12주령에 상승하기 시작하여 16주령에 제일 높게 상승하였다.

반면에 백신접종 효과가 높은 순서로 24주령 항체가가 낮게 유지되었다.

즉 겔백신 접종구와 대조구는 씨코 야외 바이러스에 직접 공격을 받았기 때문에 12~16주령의 항체가가 높게 형성 된 것으로 판단된다.

(3) 대성 씨코멀티백(시험백신1) 보조제 비교시험

씨코 바이러스 및 항체 양성인 농장의 4주령자돈 20두를 4개시험구로 나누어 시험을 실시하였다. 시험구는 현재 시판되고있는 “대성씨코피그백” 백신(B구름)과 수입백신인 “베링거 씨코플렉스” 백신(C 구름)들과 시험제조한 “대성 씨코 멀티백” 시험백신(A구름)을 식염수접종 대조구와 같이 비교 시험하였다. 7월 현재 12주령까지 씨코 항체가, 및 혈액과 비즙에서 씨코 바이러스를 PCR로 유무를 검사하였고, 체중도 측정하였다.

12주령까지 씨코멀티백(시험백신1) 씨코항체가 종합

| 시험구 | 번호 | ELISA 항체가 | 씨코 IFA 항체가(주령) | | | | | |
|------------------------------|------|-----------|----------------|-------|------|----|----|----|
| | | 4주령 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 |
| A 대성 PCV멀티백 (시험백신1) | R 01 | 512 | 128 | < 16 | 64 | 진행 | 진행 | 진행 |
| | R 02 | 1,024 | < 16 | < 16 | < 16 | | | |
| | R 03 | 64 | < 16 | >2048 | 1024 | | | |
| | R 04 | 256 | < 16 | 2048 | 1024 | | | |
| | R 05 | 32 | 64 | 64 | 512 | | | |
| B 대성씨코피 그백 | R 06 | 256 | 128 | < 16 | 512 | | | |
| | R 07 | 32 | < 16 | 128 | 256 | | | |
| | R 08 | 16 | 64 | >2048 | 2048 | | | |
| | R 09 | 64 | 64 | < 16 | < 16 | | | |
| | R 10 | 512 | 128 | < 16 | < 16 | | | |
| C 베링거씨코 플렉스 | L 11 | 256 | 128 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 12 | 64 | 16 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 13 | 1,024 | 64 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 14 | 32 | 16 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 15 | 128 | 16 | < 16 | < 16 | | | |
| D 식염수 | L 16 | 256 | 64 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 17 | 1,024 | 64 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 18 | 1,024 | 64 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 19 | 128 | 32 | < 16 | < 16 | | | |
| | L 20 | 32 | 32 | < 16 | < 16 | | | |
| 대조 | 양성 | | 512 | 512 | 512 | | | |

대성 PCV멀티백 보조제 비교시험 1회차

2013. 4. 25 시험자: 허 정 (인)

| 시험구 | 번호 | 썬코항체가 | | PRRS 항체 가 | 썬코바이러스 검사 (PCR) | | | | | | 비고 |
|-----|------|-----------|------|-----------------|-----------------|------|------|------|------|------|----|
| | | ELIS A | IFA | | 혈액 | | | 비즙 | | | |
| | | | | | PCV2 | PRRS | MYCO | PCV2 | PRRS | MYCO | |
| A | R 01 | 512 | 128 | 2배이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | R 02 | 1,024 | 16이하 | 16 | - | - | - | + | - | - | |
| | R 03 | 64 | 16이하 | 8 | - | - | - | - | - | - | |
| | R 04 | 256 | 16이하 | 4 | + | - | - | - | - | + | |
| | R 05 | 32 | 64 | 32 | - | - | - | - | - | - | |
| B | R 06 | 256 | 128 | 2 | - | - | - | - | - | - | |
| | R 07 | 32 | 16이하 | 8 | + | - | - | - | - | + | |
| | R 08 | 16 | 64 | 64 | + | - | - | - | - | - | |
| | R 09 | 64 | 64 | 2배이하 | + | - | - | - | - | + | |
| | R 10 | 512 | 128 | 2배이하 | - | - | - | - | - | - | |
| C | L 11 | 256 | 128 | 2배이하 | + | - | - | - | - | - | |
| | L 12 | 64 | 16 | 8 | - | - | - | - | - | - | |
| | L 13 | 1,024 | 64 | 16 | - | - | - | - | - | - | |
| | L 14 | 32 | 16 | 4 | - | -+ | - | - | - | - | |
| | L 15 | 128 | 16 | 16 | - | - | - | - | - | - | |
| D | L 16 | 256 | 64 | 2배이하 | + | - | - | - | - | - | |
| | L 17 | 1,024 | 64 | 16 | - | - | - | - | - | - | |
| | L 18 | 1,024 | 64 | 2 | - | - | - | - | - | - | |
| | L 19 | 128 | 32 | 8 | - | - | - | - | - | - | |
| | L 20 | 32 | 32 | 8 | - | - | + | - | - | + | |
| 열외 | 00 | 512 | 64 | 8 | + | - | - | - | - | - | |
| 대조 | 양성 | | 512 | 256이상 | + | + | + | + | + | + | |

대성 PCV멀티백 보조제 비교시험 2회차

2013. 5. 21 시험자: 허 정 (인)

| 시험구 | 번호 | 써코 항체가 | | 써코바이러스 검사 (PCR)W | | | | | | 비고 |
|-----|------|-----------|--------|------------------|------|------|------|------|------|----|
| | | | | 혈액 | | | 비즙 | | | |
| | | ELISA | IFA | PCV2 | PRRS | MYCO | PCV2 | PRRS | MYCO | |
| A | R 01 | | 16이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | R 02 | | 16이하 | -+ | -+ | - | + | - | + | |
| | R 03 | | 2048이상 | - | + | - | + | - | + | |
| | R 04 | | 2048 | + | -+ | - | + | - | + | |
| | R 05 | | 64 | -+ | - | - | + | - | + | |
| B | R 06 | | 16이하 | -+ | + | - | -+ | - | + | |
| | R 07 | | 128 | - | - | - | + | - | + | |
| | R 08 | | 2048이상 | + | - | - | -+ | - | + | |
| | R 09 | | 16이하 | - | - | - | + | - | + | |
| | R 10 | | 16이하 | - | - | - | - | - | + | |
| C | L 11 | | 16이하 | -+ | - | - | - | - | + | |
| | L 12 | | 16이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | L 13 | | 16이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | L 14 | | 16이하 | - | - | - | + | - | + | |
| | L 15 | | 16이하 | - | - | - | - | - | + | |
| D | L 16 | | 16이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | L 17 | | 16이하 | - | + | - | - | - | + | |
| | L 18 | | 16이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | L 19 | | 16이하 | + | - | - | - | - | + | |
| | L 20 | | 16이하 | + | - | - | - | - | + | |
| 대조 | 양성 | | 512 | + | + | + | + | + | + | |

대성 PCV멀티백 보조제 비교시험 3회차

2013. 6. 20 시험자: 허 정 (인)

| 시험구 | 번호 | 써코 항체가 | | 써코바이러스 검사 (PCR) | | | | | | 비고 |
|-----|------|--------|-------|-----------------|------|------|------|------|------|----|
| | | | | 혈액 | | | 비즙 | | | |
| | | ELISA | IFA | PCV2 | PRRS | MYCO | PCV2 | PRRS | MYCO | |
| A | R 01 | | 64 | - | --+ | - | - | - | + | |
| | R 02 | | 16 이하 | - | + | - | - | - | - | |
| | R 03 | | 1024 | - | - | - | - | - | + | |
| | R 04 | | 1024 | - | - | - | - | - | + | |
| | R 05 | | 512 | - | --+ | - | - | - | + | |
| B | R 06 | | 512 | - | + | - | - | - | + | |
| | R 07 | | 256 | - | + | - | - | - | + | |
| | R 08 | | 2048 | - | + | - | - | - | + | |
| | R 09 | | 16 이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | R 10 | | 16 이하 | - | + | - | - | - | + | |
| C | L 11 | | 16 이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | L 12 | | 16 이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | L 13 | | 16 이하 | - | --+ | - | - | - | + | |
| | L 14 | | 16 이하 | - | + | - | - | - | + | |
| | L 15 | | 16 이하 | - | + | - | - | - | + | |
| D | L 16 | | 16 이하 | - | + | - | - | - | + | |
| | L 17 | | 16 이하 | - | + | - | - | - | + | |
| | L 18 | | 16 이하 | - | + | - | - | - | + | |
| | L 19 | | 16 이하 | - | - | - | - | - | + | |
| | L 20 | | 16 이하 | + | - | - | + | - | + | |
| 대조 | 양성 | | 512 | + | + | + | + | + | + | |

시험 일지(체중 측정/kg)

시험개시일 : 2013.04.22. 최종시험일: 05.20, 07.15 확인자: 김 홍집(인)

| 돈사분류 | 개체번호 | 1차체중 04. 22 | 2차체중 05. 20 | 3차체중 07.15 | 4차 | 5차 | 6차 |
|----------------|------|----------------|----------------|---------------|----|----|----|
| 멀티백 (시험백신1) | R01 | 8.45 | 24.65 | 93 | 진행 | 진행 | 진행 |
| | R02 | 6.80 | 20.10 | 65 | | | |
| | R03 | 6.60 | 18.70 | 65 | | | |
| | R04 | 6.00 | 21.75 | 71 | | | |
| | R05 | 5.80 | 19.55 | 66 | | | |
| 구간평균 | | 6.73 | 20.95 | 72.00 | | | |
| 대성 | R06 | 8.20 | 19.45 | 70 | | | |
| | R07 | 7.10 | 23.60 | 67 | | | |
| | R08 | 6.50 | 17.75 | 68 | | | |
| | R09 | 6.05 | 16.45 | 59 | | | |
| | R10 | 5.65 | 20.10 | 75 | | | |
| 구간평균 | | 6.70 | 19.47 | 67.80 | | | |
| 베링거 | L11 | 7.90 | 24.65 | 73 | | | |
| | L12 | 7.20 | 21.00 | 71 | | | |
| | L13 | 6.45 | 23.00 | 71 | | | |
| | L14 | 6.20 | 16.05 | 64 | | | |
| | L15 | 5.25 | 16.70 | 60 | | | |
| 구간평균 | | 6.60 | 20.28 | 67.80 | | | |
| 대조구 | L16 | 7.60 | 21.65 | 68 | | | |
| | L17 | 7.30 | 21.95 | 폐사 | | | |
| | L18 | 6.40 | 21.50 | 71 | | | |
| | L19 | 6.30 | 16.60 | 67 | | | |
| | L20 | 5.25 | 19.35 | 60 | | | |
| 구간평균 | | 6.57 | 20.21 | 66.50 | | | |

* 5월 20일 체중측정은 못하게 되어 영국식 간이 체중 측정자를 이용함(7.15).

나. 시험백신 2의 효능평가

(1) 실험동물에 대한 항체형성능 시험(500배 이상)

■ 4주령의 SPF닭에 백신 4종(아래 1~4)를 피하 접종하고 3주 후 채혈하여 IFA 키트를 이용하여 각각의 항체가를 측정하였음.

- 1) 시험백신1(1차년도에 개발된 씨코멀티백):고증식 씨코 바이이러스 2종 혼합 불활화 백신
- 2) 바이오포아 씨코-VLP: Baculovirus 발현 제조합 씨코 VLP
- 3) 시험백신2(씨코멀티백+): 시험백신1에 바이오포아 씨코 VLP로 항원량 보강한 백신
- 4) 베링거인겔하임의 씨코백신

항체 측정 결과 바이오포아의 씨코 -VLP백신과 시험백신2가 1/3200배 까지 희석된 혈청에서 양성 반응을 보여 항체가가 가장 높았고, 그 다음으로는 베링거 씨코 백신이 1/1600배 까지 양성 있었고, 시험백신1이 1/800배 까지 양성을 보여 혈청 역가가 가장 낮았음.

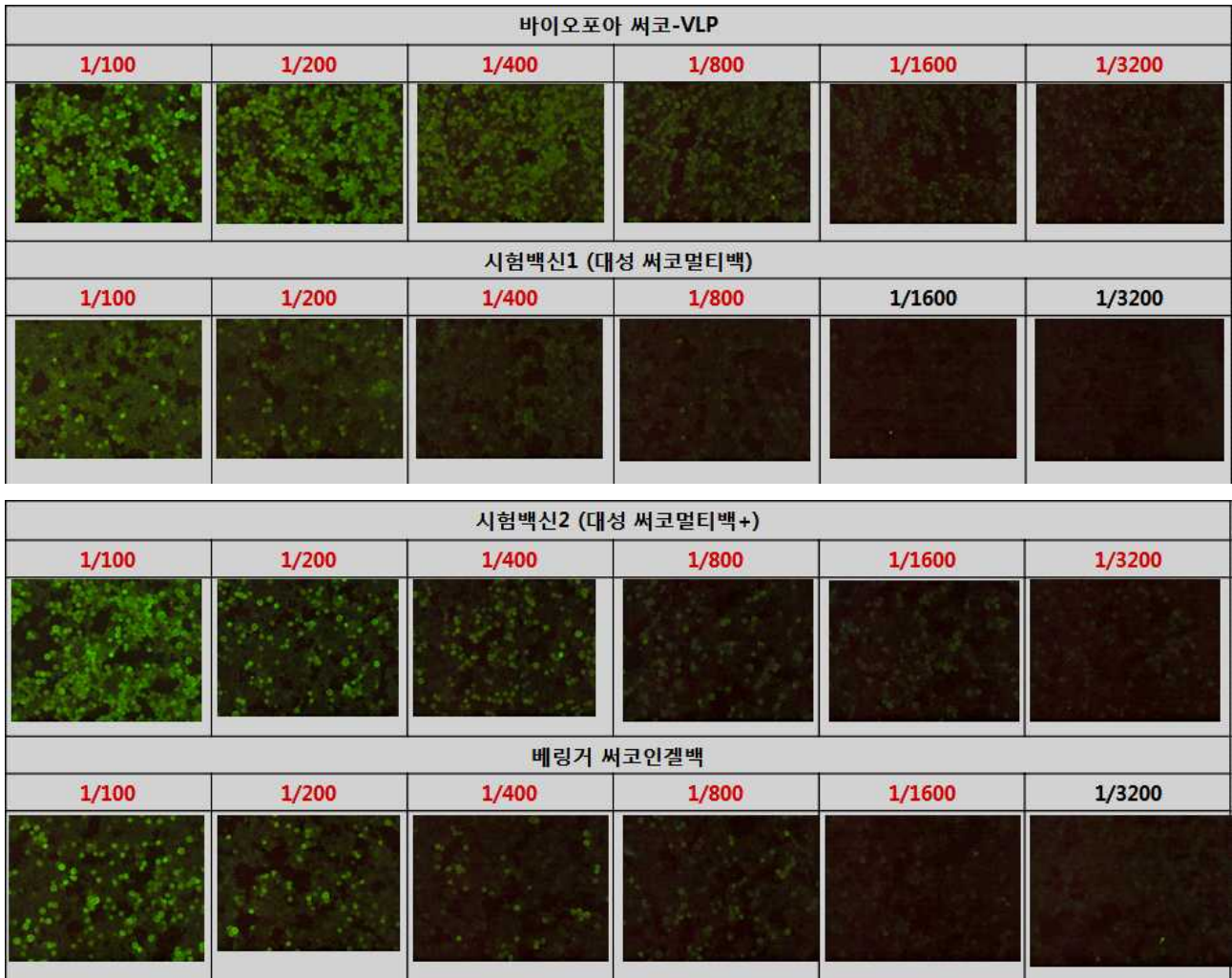


그림. 4주령 SPF닭에 4종의 씨코 백신을 접종 후 3주 뒤 채혈하여 각 씨코 백신의 항체가를 IFA법으로 비교 시험하여 형광 현미경으로 관찰한 사진. 시험백신2 와 바이오포아-씨코 VLP 백신이 1/3200배 이상의 항체가를 보여 가장 우수하였음.

| 백신접종 후 2주차 혈청 희석배수 1/500 | 개체번호 | | | | | 평균 |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 시험백신1 | 0.424 | 1.003 | 0.108 | 0.169 | 0.338 | 0.408 |
| 시험백신2 | 1.017 | 1.041 | 0.997 | 0.904 | 1.036 | 0.999 |
| 바이오포아 PCV2 VLP | 1.000 | 1.011 | 1.042 | 1.023 | 1.051 | 1.025 |
| 베링거 백신 | 0.808 | 0.942 | 1.015 | 0.495 | | 0.815 |
| 면역전 | 0.048 | 0.046 | 0.047 | 0.045 | 0.055 | 0.048 |

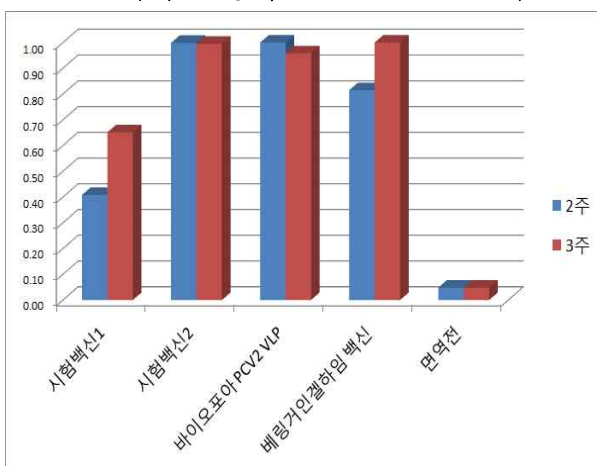
| 백신접종 후 2주차 혈청 희석배수 1/5,000 | 개체번호 | | | | | 평균 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 시험백신1 | 0.090 | 0.310 | 0.048 | 0.055 | 0.074 | 0.115 |
| 시험백신2 | 1.017 | 0.456 | 0.802 | 0.287 | 0.508 | 0.614 |
| 바이오포아 PCV2 VLP | 0.432 | 0.659 | 0.536 | 0.748 | 0.466 | 0.568 |
| 베링거 백신 | 0.218 | 0.401 | 0.463 | 0.099 | | 0.295 |
| 면역전 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.044 | 0.047 | 0.043 |

| 백신접종 후 3주차 혈청 희석배수 1/500 | 개체번호 | | | | | 평균 |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 시험백신1 | 0.165 | 1.042 | 0.562 | 0.996 | 0.492 | 0.651 |
| 시험백신2 | 1.027 | 0.983 | 1.012 | 1.028 | 0.924 | 0.995 |
| 바이오포아 PCV2 VLP | 0.817 | 0.945 | 0.937 | 1.042 | 1.050 | 0.958 |
| 베링거 백신 | 1.011 | 1.032 | 1.055 | 0.960 | | 1.015 |
| 면역전 | 0.048 | 0.046 | 0.047 | 0.045 | 0.055 | 0.048 |

| 백신접종 후 3주차 혈청 희석배수 1/5,000 | 개체번호 | | | | | 평균 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 시험백신1 | 0.053 | 0.378 | 0.115 | 0.504 | 0.100 | 0.230 |
| 시험백신2 | 0.833 | 0.892 | 0.819 | 0.847 | 0.966 | 0.871 |
| 바이오포아 PCV2 VLP | 1.073 | 0.942 | 0.883 | 0.811 | 0.605 | 0.863 |
| 베링거 백신 | 0.620 | 0.526 | 0.825 | 0.469 | | 0.610 |
| 면역전 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.044 | 0.047 | 0.043 |

표) 4주령 닭에 각각의 백신 접종 후 개발 중인 항체정량 ELISA로 정량한 결과.

A) 1/500희석 혈청의 PCV2 ELISA 결과



B) 1/5,000희석 혈청의 PCV2 ELISA 결과

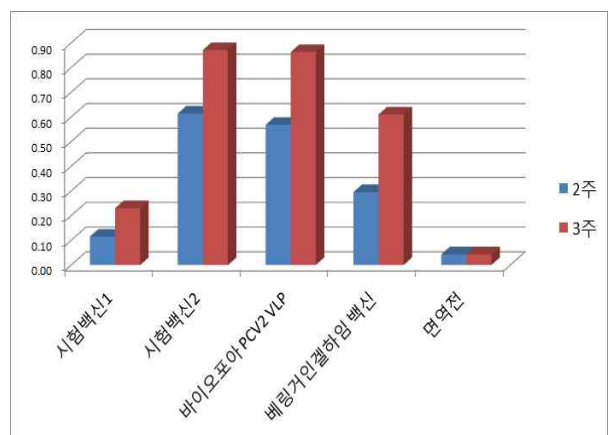


그림. 각각의 백신접종 후 2주, 3주 후 채혈하여 개발 중인 항체 정량 ELISA로 PCV2특이 항체를 정량한 결과(각 그룹별 평균 역가)

1/500으로 희석한 혈청에서는 시험백신1을 제외하고는 항체역가의 차이를 보이지 않았으나 1/5,000으로 희석한 혈청에서는 시험백신2와 BP-PCV VLP가 베링거 백신보다 높은 항체 역가

를 보여 주었음.

- 기니픽을 이용한 각 써코 백신의 항체 역가 시험.

| 시험백신명 시험동물 | | 기니픽 No | 접종부위 접종량 | | 접종일 | 채혈일 역가시험 일 | ELISA역가 (Biopoa kit) |
|-----------------|-------|-----------|-------------|-------|----------------|------------------|----------------------------|
| 기니 픽 350g | 시험백신1 | 1 | 피하 | 0.5ml | 2013. 07.02 | 2013. 07.23 | 0.375 |
| | | 2 | 피하 | 0.5ml | | | 0.512 |
| | | 3 | 피하 | 0.5ml | | | 0.339 |
| | | 4 | 피하 | 0.5ml | | | 0.594 |
| | | 5 | 피하 | 0.5ml | | | 0.336 |
| | 시험백신2 | 6 | 피하 | 0.5ml | | | 0.812 |
| | | 7 | 피하 | 0.5ml | | | 0.850 |
| | | 8 | 피하 | 0.5ml | | | 0.847 |
| | | 9 | 피하 | 0.5ml | | | 0.872 |
| | | 10 | 피하 | 0.5ml | | | 0.746 |
| | 대조군 | 11 | 피하 | 0.5ml | | | 0.256 |
| | | 12 | 피하 | 0.5ml | | | 0.235 |

시험결과 VLP가 보장된 시험백신 2를 접종한 시험동물에서 시험백신 1접종 동물보다 높은 PCV2 특이항체역가를 보였음.

-야외임상시험용 시험백신 3개 batch에 대한 기니픽에 대한 항체가

| 백신별시험구 | | 항목 | 기니픽 NO | 접종 | | | 채혈일 | IFA 항체가 |
|------------|------------|----|-----------|-------|------------|------------|-------|------------|
| | | | | 부위 | 량 | 년월일 | | |
| 기니픽 접종구 | 24VBBAD 01 | 1 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | 1,024 | |
| | | 2 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | 1,024 | |
| | 24VBBAD 02 | 3 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | 1,024 | |
| | | 4 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | 512 | |
| | 24VBBAD 03 | 5 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | 1,024 | |
| | | 6 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | 1,024 | |
| 무접종 대조구 | 식염수 | 7 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | <16 | |
| | | 8 | 피하 | 0.5ml | 2014.08.20 | 2014.09.03 | <16 | |

(2) SPF 자돈에 대한 효능평가(공격 접종시험).

SPF Mini Pig 시험

* 사육장소 : Container Isolator A, B(2대)

* 동물공급 : (주)바이오포아

* 시험구 A : Cabomer

시험구 B : 5% IMS1313+15% DS Gel

2014. 04. 04. Mini Pig 입식(8두, (주)옵티팜), No. W14-019 ~ W14-26

- A Isolator : 4두(W14-021, 022, 025, 026)

** W14-021 : 검은 점이 많음(대조구)

- B Isolator : 4두(W14-019, 020, 023, 024)

** W14-024 : 갈색(대조구)

문영식,허영환,허정,

2014. 04. 08. Mini Pig 시험개시 : PPS 접종 및 시험백신 1차 접종

* 시험백신 BP-PCV2-1 Lot No. 24 AaBbD 01-1(2014. 03. 11)

- A Isolator : 4두(W14-021, 022, 025, 026)

** W14-021 : 검은 점이 많음(대조구)

* 시험백신 BP-PCV2-3 Lot No. 24 AaBbD 01-3(2014. 03. 11)

- B Isolator : 4두(W14-019, 020, 023, 024)

** W14-024 : 갈색(대조구)

허원,조선희,문영식,정광성,허영환,허정.

2014. 05. 07. Mini Pig 채혈, 공격 접종

허원,조선희,문영식,이승섭,허영환,정광성,신영숙

2014. 05. 21. 시험종료, 채혈 및 부검

조선희,문영식,이승섭,허영환,정광성,허정,신영숙

멀티백 접종 후 안전성(℃체온 측정)

시험자: 허영환, 신영숙

| '14 월 일 | 요일 | A Isolator | | | | | B Isolator | | | | |
|---------------|----|------------|-------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 접종구 | | | | 대조 | 접종구 | | | | 대조 |
| | | 022 | 025 | 026 | 평균 | | 021 | 019 | 020 | 023 | |
| 4. 8 | 화 | 39.89 | 39.91 | 39.78 | 39.86 | 39.68 | 40.06 | 40.18 | 39.68 | 39.97 | 39.44 |
| 9 | 수 | 40.13 | 40.26 | 40.02 | 40.14 | 39.44 | 39.82 | 40.28 | 39.47 | 39.86 | 39.26 |
| 10 | 목 | 40.11 | 40.28 | 40.73 | 40.37 | 40.19 | 39.77 | 40.01 | 39.80 | 39.86 | 39.78 |
| 11 | 금 | 39.46 | 39.75 | 39.55 | 39.59 | 39.68 | 39.98 | 39.81 | 39.82 | 39.87 | 40.17 |

| | | | | | | | | | | | |
|----|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12 | 토 | 39.71 | 40.05 | 39.32 | 39.69 | 39.29 | 39.67 | 39.48 | 39.30 | 39.48 | 39.17 |
| 13 | 일 | 39.48 | 39.57 | 39.97 | 39.67 | 39.69 | 39.69 | 39.51 | 39.18 | 39.46 | 38.89 |
| 14 | 월 | 40.49 | 40.47 | 40.21 | 40.39 | 40.01 | 39.85 | 40.05 | 39.72 | 39.87 | 40.33 |
| 15 | 화 | 40.07 | 40.09 | 39.99 | 40.05 | 39.79 | 39.96 | 39.89 | 40.00 | 39.95 | 39.86 |
| 평균 | | | | | 39.97 | 39.72 | | | | 39.79 | 39.61 |

* 접종 후 매일 4시에 7일간 체온을 측정한다.

멀티백 접종 후 안전성시험(임상증상 관찰)

시험자: 이승섭,허영환,신영숙

| 월 일 | 요일 | A Isolator | | | | B Isolator | | | |
|--------|----|------------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|
| | | 접종구 | | | 대조구 | 접종구 | | | 대조구 |
| | | 022 | 025 | 026 | 021 | 019 | 020 | 023 | 024 |
| 4. 8 | 화 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | 수 | 설사 | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 목 | - | - | 설사 | - | - | - | - | - |
| 11 | 금 | - | - | 설사 | - | - | - | - | - |
| 12 | 토 | - | - | 설사 | - | - | - | - | - |
| 13 | 일 | - | 설사 | 설사 | - | 설사 | - | - | - |
| 14 | 월 | - | 설사 | - | - | 설사 | 설사 | - | - |
| 15 | 화 | - | - | 설사 | - | - | - | - | - |
| | | | | | 검은점 | | | | 갈색 |

* 매일 4시에 체온을 측정한 후에 과민반응 등 임상증상을 기록한다.

* 구토, 사료섭취 불량, 기침, 재치기, 침울, 보행불편 등으로 표시하고 이상없을 시에는 “ - ” 를 표시한다.

멀티백 접종 후 안전성시험(kg체중 측정)

시험자: 허영환, 신영숙

| 월일 | A Isolator | | | | | B Isolator | | | | |
|---------------------------------|------------|------|------|-------|------------|------------|------|------|-------|-------------|
| | 접종구 | | | | 대조구 | 접종구 | | | | 대조구 |
| | 022 | 025 | 026 | 평균 | 021 | 019 | 020 | 023 | 평균 | 024 |
| 4.08 입식 | 입식 | 입식 | 입식 | 입식 | 입식 | 입식 | 입식 | 입식 | 입식 | 입식 |
| 16 접종 | 8.4 | 8.9 | 9.0 | 8.77 | 8.1 무접종 | 10.0 | 9.3 | 11.1 | 10.13 | 10.0 무접종 |
| 23 | 10.7 | 11.1 | 11.1 | 10.97 | 10.0 | 12.1 | 12.1 | 13.4 | 12.53 | 12.1 |
| 30 | 12.5 | 12.9 | 13.3 | 12.90 | 12.0 | 12.7 | 12.6 | 15.0 | 13.43 | 12.6 |
| 5.07 | 13.5 | 14.8 | 15.2 | 14.50 | 13.0 | 15.7 | 15.3 | 17.5 | 16.17 | 15.9 |
| 14 | 15.5 | 17.0 | 18.0 | 16.83 | 16.0 | 19.0 | 18.0 | 20.0 | 19.00 | 20.0 |
| 21 | 17.5 | 19.4 | 19.3 | 18.73 | 17.1 | 22.2 | 21.2 | 23.5 | 22.30 | 23.0 |
| 평균 | | | | 12.79 | 11.82 | | | | 14.25 | 14.12 |
| 입식 시(2014. 04. 04, 45일령;옵티팜) 체중 | | | | | | | | | | |
| 4.04 | 4.99 | 4.93 | 5.14 | 5.02 | 4.95 | 5.80 | 5.77 | 6.35 | 5.97 | 6.00 |
| | | | | | 검은점 | | | | | 갈색 |

* 매주 수요일 체중을 측정한다.

멀티백 보존제 별 IFA 항체가

| 월 | 일 | A Isolator | | | | B Isolator | | | |
|---|----|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | 접종구 | | | 대조구 | 접종구 | | | 대조구 |
| | | 022 | 025 | 026 | 021 | 019 | 020 | 023 | 024 |
| 4 | 8 | 16배 이하 | 16배 이하 | 16배 이하 | 16배 이하 | 16배 이하 | 16배 이하 | 16배 이하 | 16배 이하 |
| 4 | 16 | 접종 | 접종 | 접종 | 무접종 | 접종 | 접종 | 접종 | 무접종 |
| 5 | 14 | 1024배 | 512배 | 512배 | 16배 이하 | 256배 | 256배 | 256배 | 16배 이하 |
| | | 평균; log2 ^{9.0} | | | | 평균; log2 ^{7.3} | | | |
| | 14 | 공격 | 공격 | 공격 | 공격 | 공격 | 공격 | 공격 | 공격 |
| 5 | 21 | 1024배 | 1024배 | 1024배 | 128배 | 512배 | 1024배 | 512배 | 128배 |
| | | 평균; log2 ^{8.6} | | | | 평균; log2 ^{8.3} | | | |
| | | | | | 검은점 | | | | 갈색 |

- 활력도로 보아 B 군이 더 좋을 것으로 판단 했으나 B군이 조금 낮아서,
- IFA항체가를 다시 시도 할 계획임.
- 또한 ELISA항체가를 비교 할 필요가 있음.
- 공격 후 항체가가 많이 올라가는 것은 방어능이 적다는 뜻도 됨.

(병 성 감 정) 결 과 통 보 서

SPF biopsy

| | | | | | |
|----------|----------------|-----|-------|------|--|
| 농 장 명 | | 축 종 | 돼지 | 사육두수 | |
| 대 표 (이사) | | 전 화 | | FAX | |
| 주 소 | | | | | |
| 접 수 일 | 2014년 05월 21 일 | | 가검물종류 | | |

1. 시료내역

1-1. 대조군 및 시험군

| 구분 | A group | B group |
|-----|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 대조군 | 21 | 24 |
| 시험군 | 22, 25, 26 | 19, 20, 23 |
| | 시험백신 Lot No.24 AaBbD 01-1, 1mL씩 접종 | 시험백신 Lot No.24 AaBbD 01-3, 1mL씩 접종 |

1-2. 조직시료

| No. | Sample | No. | Sample |
|-----|---------------------|-----|--------|
| 1 | Thymus | 5 | Liver |
| 2 | Lung | 6 | Spleen |
| 3 | Mandibular | 7 | Kidney |
| 4 | Inguinal lymph node | | |

* 7개 시료는 유제 후,

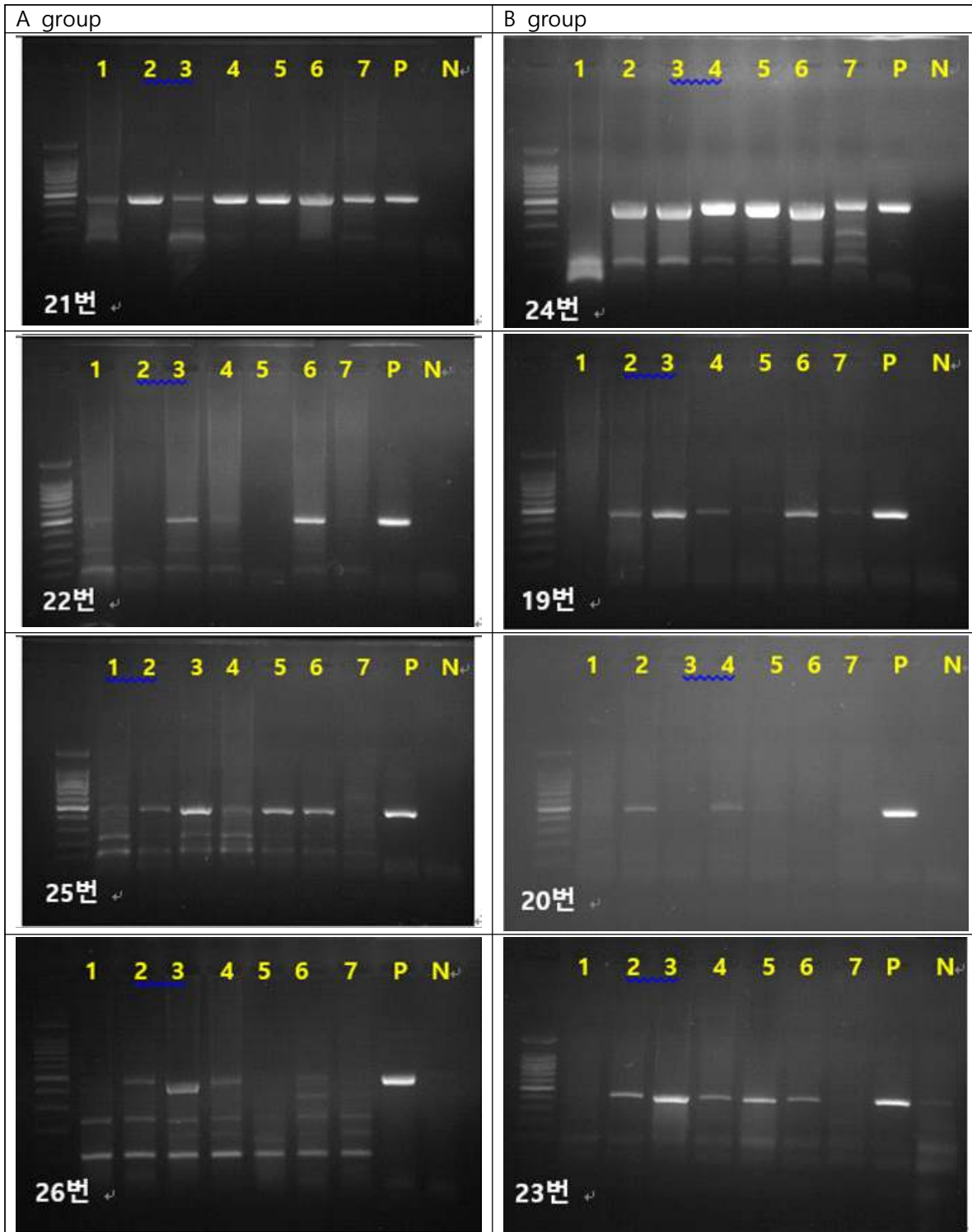
QIAgen Blood& Tissue kit로 DNA extraction을 수행

2. PCV2 PCR

2-1. 조직 PCR 결과

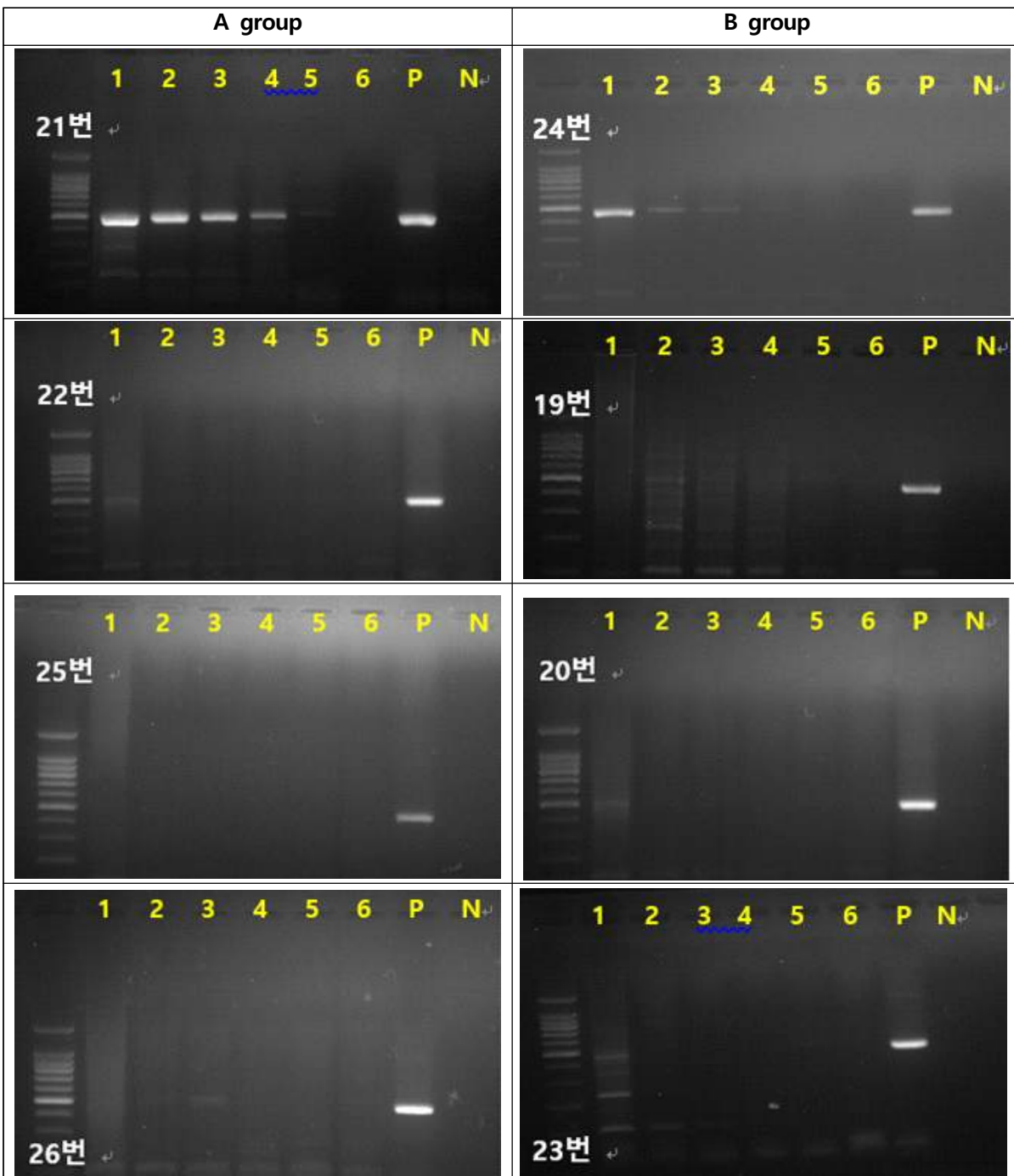
| 조직 시료 | A group | | | | B group | | | |
|----------|---------|----|----|----|---------|----|----|----|
| | 21 | 22 | 25 | 26 | 24 | 19 | 20 | 23 |
| 1 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 2 | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 3 | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 4 | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 5 | + | - | + | - | + | + | - | + |
| 6 | + | + | + | - | + | + | - | + |
| 7 | + | - | - | - | + | + | - | - |

* ND: Not test



2-2. Thymus 10진희석 결과

| 조직 시료 | 희석 배수 | A group | | | | B group | | | |
|----------|------------------|---------|----|----|----|---------|----|----|----|
| | | 21 | 22 | 25 | 26 | 24 | 19 | 20 | 23 |
| 1 | 10 ⁻¹ | + | - | - | - | + | - | - | - |
| 2 | 10 ⁻² | + | - | - | - | + | - | - | - |
| 3 | 10 ⁻³ | + | - | - | - | + | - | - | - |
| 4 | 10 ⁻⁴ | + | - | - | - | + | - | - | - |
| 5 | 10 ⁻⁵ | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 10 ⁻⁶ | - | - | - | - | - | - | - | - |



다. 시험백신 1,2 효능평가 요약

(1) 시험백신 1,2의 자돈에 대한 항체 형성능 시험(500배 이상)결과

시험백신 1에 대한 항체 형성능 결과(1024~2048배 이상이었음)

시험백신 2에 대한 기니픽 및 자돈에 대한 항체 형성능 (1024배 이상).

(2) 자돈에 대한 효력시험 결과

시험백신 1에 대한 효력시험 결과 체중 증가율과 폐사율 감소 효과 뛰어남

시험백신 2에 대한 자돈에 대한 효력 시험 SPF를 이용한 공격 시험결과 백신을 접종한 모든 SPF자돈의 thymus에서 공격 바이러스 감소율이 백신 미접종 자돈에 비해 10,000~100,000 배 이상 감소하였음을 확인하였음.

8. PCV2 항원 항체 진단 법 개발

가. PCV2 항원 검출 kit 개발(주관)

(1) PCV2 ORF2특이 단클론 항체의 개발

돼지췌코바이러스(Porcine circovirus: PCV)는 외막(envelope)이 없으며 ORF2단백(capsid protein) 60개가 모여 만든 정20면체 입자 구조로 이루어진 바이러스로 ORF2단백이 항원성과 면역원성을 결정짓는다고 할 수 있음.

PCV2 ORF2단백을 기초로한 역학 연구에서 2000년대 중반 이후부터 국내외 대부분의 국가에서 PCV2a 보다는 PCV2b형이 주로 발생하고 있으며, PCV2d PCV2e(PCV2a-2) 등의 아형(subtype)도 간혹 분리되고 있다. 특히 최근 2012년 이후 미국 등에서 발생한 PCV2b 아형 중 항원 변이형은 기존 PCV2a type백신 1번 접종으로는 방어되지 않으며 2번 이상 접종해야 방어됨이 보고되고 있다.

- PCV2 ORF특이 단클론 항체의 제작

본 과제에서는 PCV2 ORF2 protein의 항원성의 차이를 규명하고 항원을 정량 할 수 있는 항원 검출 ELISA kit제조에 필수적인 단클론 항체를 다음과 같이 제작하였다.

① 고증식성 PCV2a, PCV2b 바이러스를 Freund' s complete adjuvant와 함께 0.5ml씩 6주령 Balb/c에 각각 3수씩 복강으로 면역하고 3주 후 Freund' s incomplete adjuvant와 함께 0.5ml씩 각각 재접종한 후 2주 뒤 같은 방법으로 반복 접종하였으며 마지막 접종 2주 뒤 순수 정제 및 농축된 PCV2a, PCV2b 바이러스 입자를 각각 0.1cc씩 복강에 접종한 후 5일 뒤 비장을 적출하여 myeloma와 fusion하여 하이브리도마를 만들었다.

② 만들어진 하이브리도마는 96well 플레이트에 well당 각 1개의 세포가 들어가도록 희석하였으며 1주일 후부터 각각의 클론을 PCV2각 아형의 바이러스가 감염된 PK-15세포를 이용한 IFA(Immunofluorescence assay)법으로 PCV2 특이 하이브리도마를 탐색하였다.

③ 총 84개의 하이브리도마 클론이 작성되었으며, 각각의 하이브리도마가 PCV1 혹은 PCV2의 공통항원과 각 아형(2a-1, 2b, 2d, 2a-2) 그리고 decoy epitope 혹은 PK-15 세포주 자체 중에서 어떤 항원에 특이적인지를 확인하기 위하여 각 하이브리도마의 배양액을 1/5로 희석하여 각 항원을 발현하는 총 7종의 IFA용 plates로 각각의 특이성 여부를 확인하였다(그림1).

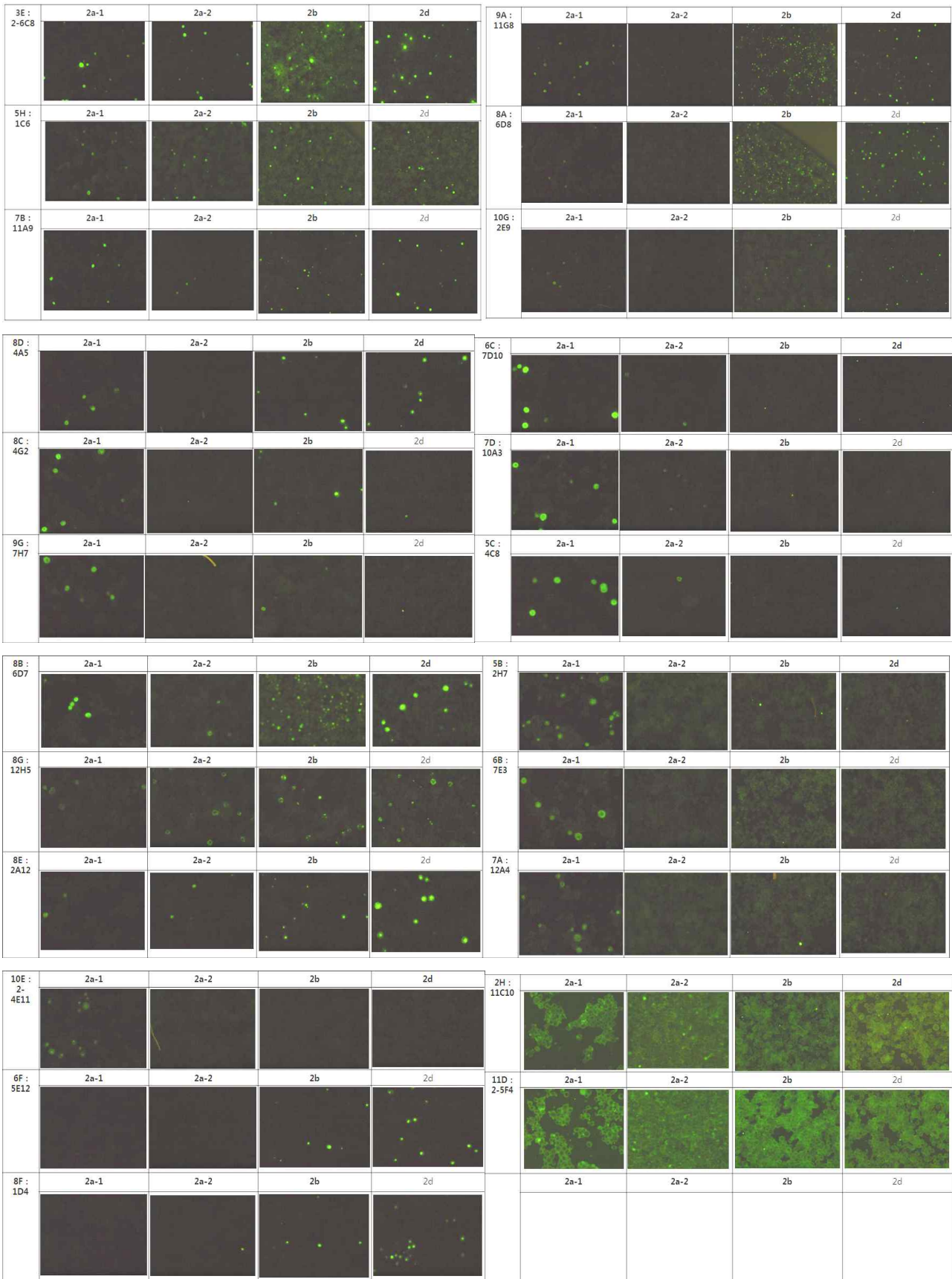


그림.1. PCV2 각각의 유전형이 발현된 PK-15세포주를 이용하여 IFA방법으로 하이브리도마 단클론항체 스크리닝한 형광현미경 사진.

④ 각 항원별 특이성이 확인된 총 22개의 하이브리도마를 다시 1/5, 1/25, 1/125, 1/625로 희석하여 각각의 항원 발현 IFA plates로 특이성 정도를 확인하였고,

⑤ 각 항원별로 특이성이 있는 하이브리도마 11주를 선발하였다(표1).
 선발된 하이브리도마의 단클론 항체는 PK-15 세포주에 대한 비특이 반응이 없음이 확인되었으며 PCV1이 감염된 PK-15세포주에도 IFA결과 모두 음성 반응을 보였음. 모든 PCV2 아형에 공통적으로 특이적인 단클론 항체가 5종이 확보 되었으며, 각각의 아형별로 특이적인 단클론 항체들도 확보되었음. 각각의 반응 특이성은 표1.에 나타내었음. 시험결과 PCV2a-1과 PCV2e(a-2) 유전형 그리고 PCV2b와 PCV2d 유전형이 각각 여러 단클론 항체와 공통적으로 반응하여 각각 2개의 유전형씩 항원적 유사성이 있음을 확인하였음.

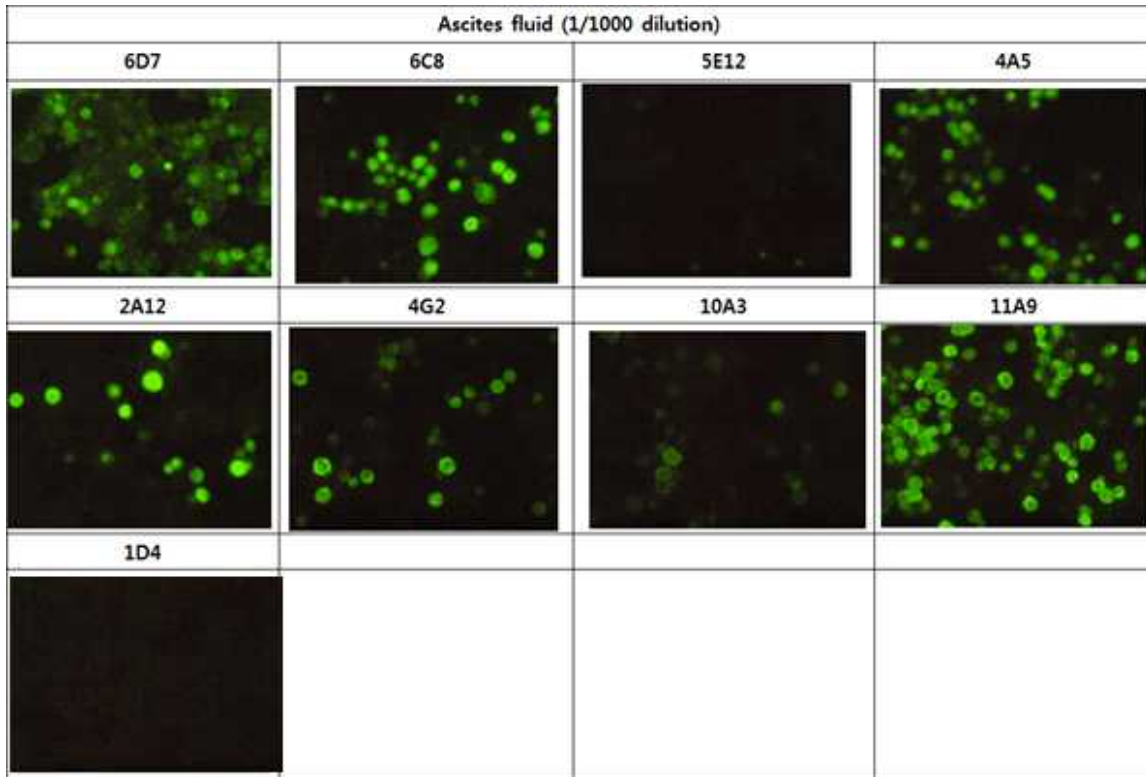
| IFA용 항원 | PCV2a 감염된 PK-15 | PCV2b 감염된 PK-15 | PCV2d 감염된 PK-15 | PCV2e 감염된 PK-15 | PCV1 감염 PK15 | Decoy epitope | PK-15 세포주 | 특이성 |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|------------------|--------------|------------|
| 단클론항체 I 하이브리도마 | 2-6C8 | 625 | 635 | 625 | 625 | - | - | PCV2 공통 |
| | 1C6 | 25 | 25 | 25 | 25 | - | - | |
| | 11A9 | 125 | 125 | 625 | 125 | - | - | |
| | 6D7 | 125 | 625 | 625 | 125 | - | - | |
| | 2A12 | 125 | 625 | 625 | 125 | - | - | |
| | 4A5 | 125 | 625 | 125 | - | - | - | 2a,2b,2d |
| | 4G2 | 625 | 625 | - | - | - | - | 2a, 2b |
| | 7D10 | 625 | - | - | 25 | - | - | 2a, 2e |
| | 10A3 | 625 | - | - | 25 | - | - | |
| | 5E12 | - | 625 | 625 | - | - | - | 2b, 2d |
| | 1D4 | - | 125 | 625 | - | - | - | |

표1. 각각의 IFA용 항원에 특이적으로 반응한 각 하이브리도마 세포배양액의 최대 역가(양성 측정값 최대 희석배수의 역수) 및 특이성.

- 단클론항체의 대량 생산

- ① 8주령의 BALB/C 마우스 복강에 Freund' s incomplete adjuvant를 22.5gauge 바늘로 0.5cc 씩 주사하고,
- ② 1주일 후에 각각의 하이브리도마를 5×10^6 cells/0.5cc 씩 마우스 복강에 접종하고
- ③ 마우스의 움직임이 둔해지는 7~10일 후 18gauge의 needle을 이용하여 복강에서 복수를 채취하였다.

④ 채취된 각 하이브리도마의 복수는 PCV2 항원에 대한 IFA로 특이성을 확인하였다(그림 2)
 PCV2a IFA



PCV2b IFA

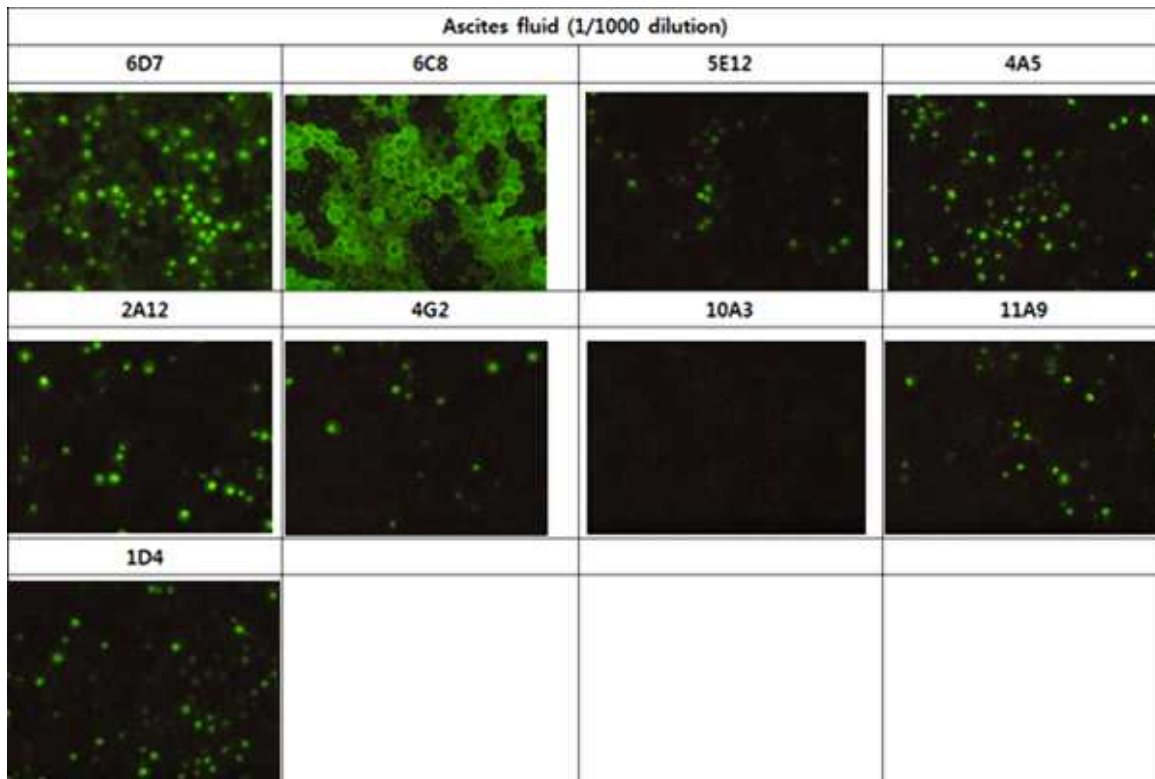


그림2. 마우스 복수로부터 얻어진 단클론항체를 이용한 PCV2a, PCV2b항원에 대한 IFA시험 후 찍은 형광현미경 사진(100배).

(2) PCV2 ORF2 항원 정량 kit의 개발

돼지 쉼코바이러스(PCV2)는 돼지에서 만성소모성 질병의 원인체로 양돈산업의 경제성을 저해하는 매우 중요한 질병원인체다. 그러나 대부분의 돼지에서 PCV2가 임상증상을 일으키지 않는 매우 낮은 수준의 감염인 비임상 감염을 가지고 있어 높은 감염수준인 임상감염과의 감별이 가능한 항원정량법이 필요하다.

과거 PCV2의 항원 진단법으로 사용된 PCR법은 항원정량이 불가능해 진단으로서의 가치가 없으며, Real-time PCR에 의한 PCV2 DNA정량법과 면역조직화학법(Immunohistochemistry: IHC)법, 그리고 항원-capture-ELISA에 의한 감별진단이 이용되고 있음.

Real-time PCR법은 바이러스의 DNA정량은 가능하나 단백질의 직접적인 정량이 아니므로 백신속의 단백질 항원 정량용으로는 부적절하다. 그러므로 본 과제에서 개발한 항원 capture-ELISA법은 숙련된 연구자 없이 대부분의 실험실에서 보유하고 있는 기본 장비로 진단이 가능하므로 가장 이상적이라 할 수 있음.

- mAb를 이용한 PCV2-ORF2 단백질 정량 ELISA kit개발

① 단클론항체의 정제: 마우스 복수로부터 얻어진 단클론 항체를 HiTrap Protein G HP컬럼을 이용하여 Antibody를 정제하였다. 정제과정을 간략히 요약하면 10 컬럼 부피의 20mM sodium phosphate (pH7.0) binding 버퍼로 컬럼을 평형을 만든 후 동일한 binding buffer로 희석한 마우스 복수를 컬럼에 부착하고 동일한 한 버퍼 10컬럼 부피로 세척 후 Elution 버퍼(0.1M glycine-HCl pH2.7)를 이용하여 컬럼으로부터 단클론 항체를 elution하고 1M Tris-HCl (pH9.0) 버퍼로 pH를 약 7.0이 되도록 적정하였다.

② 정제된 PCV2특이 단클론 항체를 적당한 희석 배수로 희석하여(1~16ug/ml) ELISA용 plate에 코팅하여 antigen capture용 ELISA plate를 제작하였다.

③ 제조한 PCV2 VLP항원을 적당한 배율로 희석(1/100~1/10,000)하여 antigen capture ELISA에 반응하고

④ PCV2특이 단클론 항체에 HRP conjugation하고 적당히 희석하여(1/100~1/1000) 발색하여 항원 정량을 확인하였다. 정제된 단클론 항체의 HRP conjugation은 Innova Biosciences사의 Lighting-Link HRP Conjugation kit를 이용하여 제조사에서 제시한 방법대로 수행 하였다.

| 2차 항체 희석배율 ↓ | Antibody(6D7) coating농도 | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|---------------------|---------|---------|--------|---------------------|---------|---------|---------|---------------------|---------|---------|
| | 1ug/ml | | | | 4ug/ml | | | | 16ug/ml | | | |
| | Adeno | High5 PCV2-2a-1 sup | | | Adeno | High5 PCV2-2a-1 sup | | | Adeno | High5 PCV2-2a-1 sup | | |
| | 1/100 | 1/100 | 1/1,000 | 1/0,000 | 1/100 | 1/100 | 1/1,000 | 1/0,000 | 1/100 | 1/100 | 1/1,000 | 1/0,000 |
| 1/100 | 0.179 | 0.342 | 0.198 | 0.082 | 0.262 | 0.770 | 0.274 | 0.104 | 0.376 | 0.991 | 0.647 | 0.138 |
| 1/500 | 0.114 | 0.182 | 0.074 | 0.048 | 0.089 | 0.266 | 0.104 | 0.054 | 0.118 | 0.328 | 0.121 | 0.052 |
| 1/1000 | 0.067 | 0.069 | 0.053 | 0.049 | 0.056 | 0.112 | 0.064 | 0.044 | 0.072 | 0.136 | 0.063 | 0.051 |

⑤ 새로 만든 단클론항체 중 PCV2항원 검출에 가장 효과적인 단클론 항체를 선별하기 위해 96well plate에 각각을 코팅하고 제조합 PCV2 VLP항원(PCV2a-1)과 대조 항원으로 baculoviral vector로 발현된 adenovirus fiber단백을 1차 반응한 후 6D7 HRP conjugate 단클론항체를 이용하여 2차 반응 후 발색하였다. 비특이 반응이 없으며 PCV2a-1항원에 반응성이과 특이성이 가장 큰 단클론 항체 **6C8**를 선별하였다.

| Antibody | Adeno 1/100 | | | | | | 2a-1 1/2000 | | | | | |
|-------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1/25 | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/25 | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 |
| 6C8 | 0.076 | 0.083 | 0.070 | 0.068 | 0.071 | 0.070 | 0.140 | 0.171 | 0.178 | 0.158 | 0.153 | 0.143 |
| 11A9 | 0.069 | 0.065 | 0.064 | 0.063 | 0.062 | 0.066 | 0.093 | 0.107 | 0.116 | 0.133 | 0.128 | 0.128 |
| 6D7 | 0.164 | 0.195 | 0.221 | 0.237 | 0.228 | 0.207 | 0.176 | 0.206 | 0.217 | 0.219 | 0.206 | 0.187 |
| 2A12 | 0.068 | 0.074 | 0.071 | 0.072 | 0.072 | 0.066 | 0.123 | 0.147 | 0.155 | 0.142 | 0.131 | 0.126 |
| 4A5 | 0.065 | 0.065 | 0.058 | 0.057 | 0.056 | 0.055 | 0.074 | 0.090 | 0.093 | 0.088 | 0.096 | 0.107 |
| 4G2 | 0.082 | 0.074 | 0.082 | 0.072 | 0.066 | 0.064 | 0.084 | 0.077 | 0.076 | 0.072 | 0.069 | 0.068 |
| JBT | 0.068 | 0.072 | 0.067 | 0.074 | 0.059 | 0.055 | 0.114 | 0.109 | 0.107 | 0.107 | 0.117 | 0.125 |

⑥ 위에서 선별된 PCV2 ORF2단백에 가장 반응성과 특이성이 좋은 단클론항체 **6C8**을 코팅한 항원 capture ELISA plate를 제작하고 각 백신항원을 정량하였다(그림4).

새로개발된 Antigen capture-ELISA는 기존 수입제품에 비하여 비특이 반응과 background가 거의 없이 항원 희석 배수에 비례하여 정확하게 항원이 정량됨을 보여 주었으며, 새로 개발된 **시험백신2**는 다국적 기업사인 베링거인겔하임의 **써코인겔백** 보다 항원량이 약 4배 더 우수하였음.

| 항원희석배수 | 1/10,000 | 1/20,000 | 1/40,000 | 1/80,000 | 1/160,000 | 1/320,000 | 1/640,000 | 1/1,280,000 | 1/2,560,000 |
|------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| 베링거인겔하임 써코 인겔백 | 0.942 | 0.499 | 0.246 | 0.128 | 0.068 | 0.035 | 0.023 | 0.021 | 0.021 |
| 시험백신2 (써코 멀티백+) | 1.860 | 1.395 | 0.873 | 0.487 | 0.265 | 0.142 | 0.075 | 0.038 | 0.020 |
| Adenovirus fiber | 0.004 | 0.002 | 0.003 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.001 |
| 대성 써코백 | 0.016 | 0.010 | 0.007 | 0.001 | 0.003 | 0.002 | 0.003 | 0.001 | 0.007 |

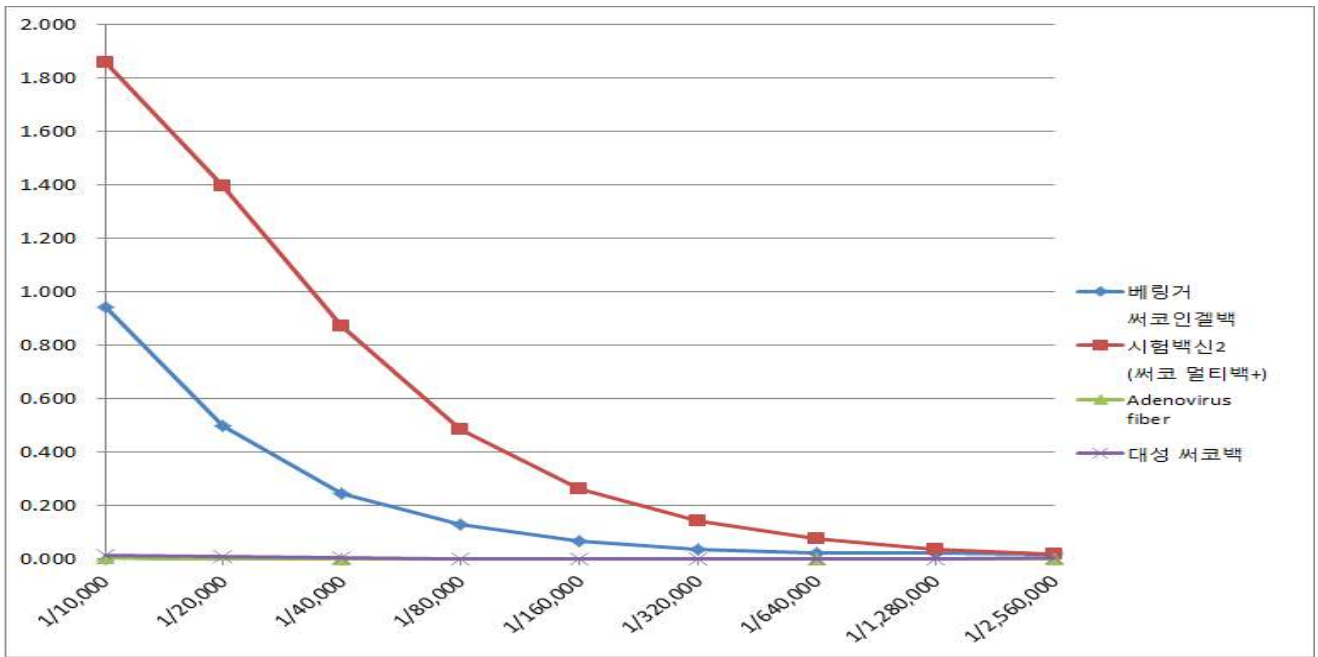
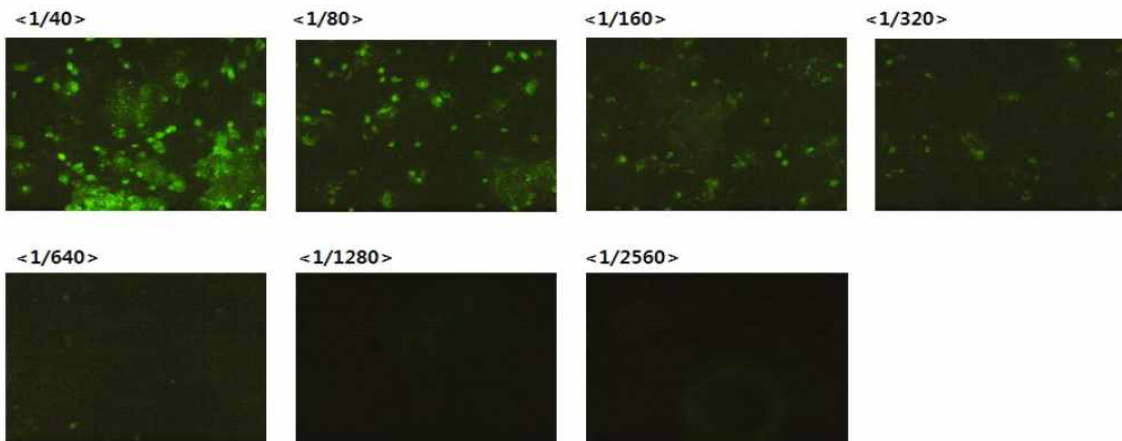


그림4. mAb 6C8가 코팅된 PCV2 antigen capture ELISA를 이용하여 각 백신의 항원을 정량한 그래프.

나. PCV2 항체 검출 kit 개발(주관)

(1) PCV2 total antibody 측정용 IFA kit개발

A (대성미생물 PCV2 IFA 진단 키트)(×100)



B (VMRD사의 Porcine Circovirus (PCV) FITC FA Conjugate 키트)

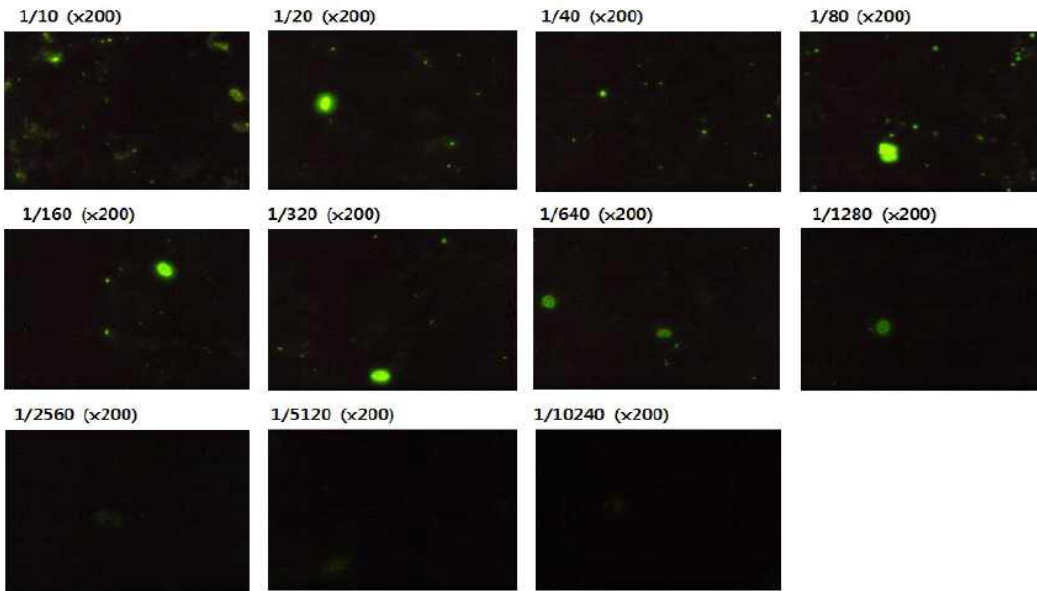


그림5. 대성미생물과 바이오포아가 공동 개발한 PCV2 IFA 진단키트(A)와 VMRD사의 PCV2 FITC FA conjugate 키트(B)의 비교.

- 위 그림5. 에서와 같이 2012년 중기청 융복합기술개발과제를 통해 대성미생물과 바이오포아가 공동으로 PCV2 IFA 키트를 개발하였음.
- IFA 키트의 경우 외국회사인 VMRD사의 제품과 달리 시야 대부분에서 양성 반응을 쉽게 관찰 가능한 장점이 있음.
- 그러나 역가를 측정하기 위해선 혈청을 희석하여 많은 well을 사용하여 시험해야 함.
- 또한 양성 반응의 최대 희석역가를 결정할 때 관찰자의 주관적 해석으로 결정하므로 객관성이 결여됨.
- 그러므로 보다 객관적이고 대량의 시료를 쉽게 측정할 수 있는 항체정량 ELISA kit의 개발이 필요함.

(2) PCV2 total antibody 측정용 ELISA kit개발

- 썬코바이러스 항체 정량용 키트는 국내에서 개발이 성공된 제품은 없으며 해외제품이 다수 있으나 완전한 항체정량은 어려워 썬코 바이러스의 진단 및 썬코바이러스 백신의 품질비교에 사용되기 어려움.
- 그러므로 본 과제에서는 IFA법처럼 항체역가의 상대비교가 가능하면서도 보다 객관적이고 대량의 시료의 측정이 편리한 ELISA kit를 개발하고자함.
- mouse에서 얻어낸 Ascites fluid중 모든 PCV2 유전형에 공통적으로 특이성 가지며 매우 강한 반응성을 보인 단클론 항체인 6C8을 96well plate에 코팅하여 baculoviral vector를 이용하여 발현된 PCV2 VLP항원을 부착 후 SPF 닭 혈청(PCV2 음성 대조혈청), PCV2b 닭 면역혈청 (4주차, 7주차: 양성혈청)로 1차 반응하여, Goat Anti-chicken HRP conjugate로 2차 반응 후 발색하여 확인하였다.

| SPF | | | | | | | |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 |
| 0.112 | 0.090 | 0.074 | 0.056 | 0.049 | 0.046 | 0.044 | 0.049 |
| PCV2-b 닭 면역혈청 4주차-1 | | | | | | | |
| 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 |
| 1.027 | 1.009 | 1.053 | 1.116 | 1.260 | 1.357 | 1.326 | 1.211 |
| PCV2-b 닭 면역혈청 4주차-2 | | | | | | | |
| 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 |
| 1.177 | 1.098 | 1.114 | 1.114 | 1.136 | 1.234 | 1.362 | 1.292 |
| PCV2-b 닭 면역혈청 7주차-1 | | | | | | | |
| 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 |
| 1.131 | 1.110 | 1.147 | 1.126 | 1.159 | 1.300 | 1.414 | 1.361 |
| PCV2-b 닭 면역혈청 7주차-2 | | | | | | | |
| 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 |
| 1.088 | 1.073 | 1.100 | 1.173 | 1.302 | 1.338 | 1.295 | 1.097 |

■ 위의 실험에서 제작된 ELISA plate는 PCV2음성혈청에는 전혀 반응하지 않으며 PCV2양성 혈청에만 양성 반응을 보였음. 그러나 혈청희석 배수와 상관없이 동일한 양성반응을 보여 항체 검출은 가능하나 정량은 불가능 하였음.

■ 위의 실험에서 제작된 ELISA plate가 항체정량이 가능한지의 여부를 확인하기 위하여 PCV2b 닭 면역혈청을 1/1,000부터 1/3,125,000배까지 5진 희석하여 1차 반응하고, Goat Anti-chicken HRP conjugate로 반응 후 발색하여 다시 확인하였다. 그 결과 아래와 같이 항체의 정량은 가능한 것으로 확인 되었으나 일반적인 혈청검사 시 사용되는 혈청 희석 배수(1/500 배)에서는 검사가 불가능 할 정도로 너무 민감하였음.

| | 1/1,000 | 1/5,000 | 1/25,000 | 1/125,000 | 1/625,000 | 1/3,125,000 |
|-------|---------|---------|----------|-----------|-----------|-------------|
| 4주차-2 | 1.375 | 1.348 | 0.896 | 0.334 | 0.104 | 0.055 |

■ 혈청반응에 대한 민감도를 낮추기 위하여 ELISA plate에 코팅하는 항원의 양과 2차 항체의 양을 단계적으로 희석하여 다시 plate를 제조하였고, IFA법으로 측정하였을 때 썬코바이러스에 대한 항체의 역가가 서로 16~32배 정도 차이를 보였던 고 역가 양성 혈청과 중간 역가의 양성 혈청을 가지고 항체정량이 가능한지 재시험을 실시하였다. 다음의 표에서와 같이 plate에 코팅하는 항원을 1/2,000이상 희석하고 2차 항체를 1/20,000이상 희석하여 사용할 때부터는 일반적인 항체 검사에 사용되는 희석 배수인 1/500배 내외에서 항체의 양에 따른 OD값의 변화를 확인 할 수 있을 뿐 아니라 두 개의 혈청역가가 차이도 IFA에서의 역가 차이와 유사한 정도임을 확인 할 수 있었음.

| | | 닭 면역혈청 써코 고역가(IFA) | | | | | | | | | | | |
|---------|----------|----------------------|-------|---------|---------|----------|----------|----------------|-------|---------|---------|----------|----------|
| | | 2차 항체 1/20,000 | | | | | | 2차 항체 1/40,000 | | | | | |
| | | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 |
| antigen | 1/2,000 | OUT | OUT | OUT | OUT | OUT | OUT | OUT | 2.941 | 2.177 | 1.906 | 1.806 | 1.579 |
| | 1/4,000 | OUT | OUT | OUT | 2.765 | 2.528 | 2.248 | 2.931 | 2.641 | 2.019 | 1.534 | 1.297 | 1.181 |
| | 1/8,000 | OUT | OUT | OUT | 2.609 | 2.125 | 1.623 | 2.910 | 2.597 | 1.820 | 1.175 | 0.848 | 0.793 |
| | 1/16,000 | OUT | OUT | OUT | 2.457 | 1.653 | 1.181 | 2.994 | 2.783 | 1.799 | 1.131 | 0.606 | 0.559 |
| | | 닭 면역혈청 써코 중간 역가(IFA) | | | | | | | | | | | |
| | | 2차 항체 1/20,000 | | | | | | 2차 항체 1/40,000 | | | | | |
| | | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 |
| antigen | 1/2,000 | OUT | OUT | 2.764 | 2.024 | 0.950 | 0.371 | 1.912 | 1.871 | 1.594 | 0.922 | 0.385 | 0.163 |
| | 1/4,000 | 2.621 | 2.583 | 2.199 | 1.550 | 0.673 | 0.267 | 1.299 | 1.209 | 1.032 | 0.597 | 0.263 | 0.127 |
| | 1/8,000 | 2.034 | 1.840 | 1.615 | 1.027 | 0.462 | 0.206 | 0.835 | 0.786 | 0.625 | 0.422 | 0.200 | 0.107 |
| | 1/16,000 | 1.416 | 1.172 | 1.001 | 0.702 | 0.345 | 0.164 | 0.535 | 0.450 | 0.369 | 0.242 | 0.139 | 0.088 |
| | | 닭 면역혈청 써코 고역가(IFA) | | | | | | | | | | | |
| | | 2차 항체 1/10,000 | | | | | | 2차 항체 1/20,000 | | | | | |
| | | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 |
| antigen | 1/500 | OUT | OUT | OUT | OUT | OUT | OUT | 2.998 | 2.909 | 2.864 | 2.887 | 2.908 | 2.739 |
| | 1/1,000 | OUT | OUT | OUT | 2.988 | 2.934 | 2.856 | 2.948 | 2.851 | 2.757 | 2.699 | 2.775 | 2.725 |
| | 1/2,000 | OUT | 2.950 | 2.869 | 2.743 | 2.703 | 2.553 | 2.906 | 2.762 | 2.557 | 2.438 | 2.473 | 2.317 |
| | 1/4,000 | OUT | OUT | 2.946 | 2.691 | 2.535 | 2.380 | 2.971 | 2.870 | 2.572 | 2.227 | 2.122 | 1.917 |
| | | 닭 면역혈청 써코 중간 역가(IFA) | | | | | | | | | | | |
| | | 2차 항체 1/10,000 | | | | | | 2차 항체 1/20,000 | | | | | |
| | | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 | 1/200 | 1/600 | 1/1,800 | 1/5,400 | 1/16,200 | 1/48,600 |
| antigen | 1/500 | OUT | OUT | OUT | 2.746 | 1.993 | 0.956 | 2.828 | 2.822 | 2.621 | 2.164 | 1.282 | 0.550 |
| | 1/1,000 | OUT | 2.929 | 2.835 | 2.558 | 1.674 | 0.759 | 2.604 | 2.607 | 2.446 | 1.888 | 1.042 | 0.447 |
| | 1/2,000 | 2.827 | 2.645 | 2.616 | 2.261 | 1.400 | 0.611 | 2.270 | 2.299 | 2.140 | 1.572 | 0.810 | 0.340 |
| | 1/4,000 | 2.647 | 2.594 | 2.433 | 2.098 | 1.096 | 0.459 | 1.935 | 1.984 | 1.662 | 1.254 | 0.602 | 0.277 |

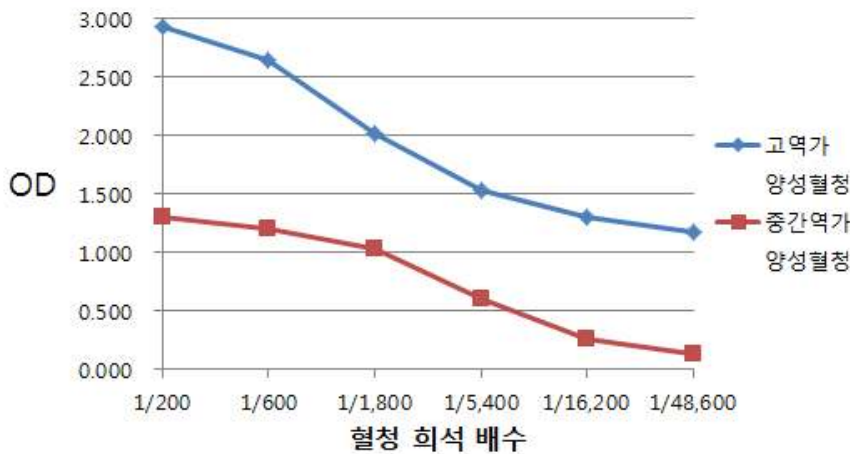


그림6. PCV2항체 정량 ELISA plate를 이용한 PCV2양성혈청의 항체 정량 그래프. 그림과 같이 약1/500희석된 항체의 정량 결과가 두 개의 혈청의 항체역가가 차이가 약 27배정도로 IFA에서의 항체 정량 결과(16~32배 차이)와 유사함을 확인할 수 있었음.

■ 위의 실험 결과 단큰론 항체 6C8 와 PCV2 VLP항원을 이용하여 새로 개발된 PCV2 항체 정량 ELISA kit는 IFA kit와 거의 유사한 항체 정량 능을 보여 주었음. 향 후 다양한 시료를 이용하여 민감도와 특이성을 평가한다면 매우 훌륭한 항체 정량 kit로 개발 될 수 있을 것임.

(3) PCV2 Decoy antibody(면역회피 항체) 측정용 ELISA kit개발

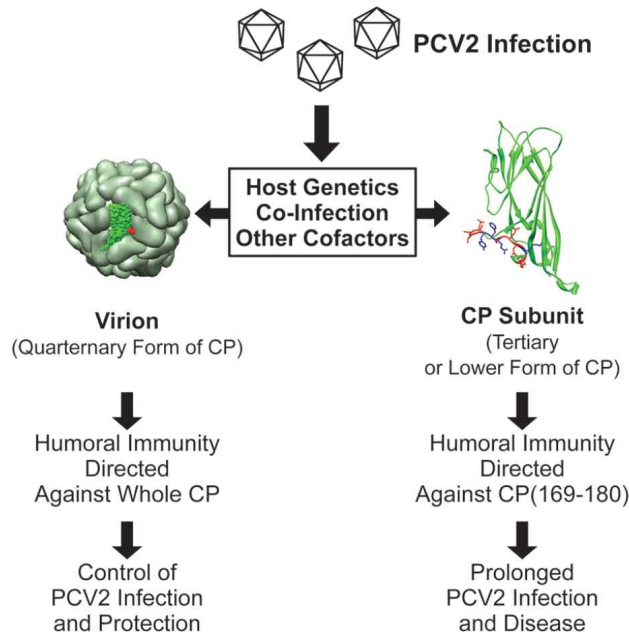


그림. 면역세포에 인지되는 PCV2 항원의 구조적 형태와 PCV2 감염 후 예후에 대한 관계.

참고문헌: Benjamin R. Tribble. 등, J. Virol. 2012, 86(24) 13508

- 쉘코 바이러스는 엔벨롭이 없으며 1.7kb의 원형의 단일 가닥 DNA게놈을 가지고 3개의 ORF(Open reading frame)를 가지고 있음.
- 가장 큰 ORF1은 복제효소를 만들어내며, ORF3는 apoptosis와 관련 있으며, ORF2는 233~234개의 아미노산으로 구성된 capsid단백을 만들어냄.
- Capsid 단백질(capsid protein: CP)은 자동적으로 3개씩 모여 1개의 면을 이룬 정 20면체의 바이러스 구조 입자(CP입자)를 구성하게 됨.
- CP입자는 바이러스가 숙주세포에 부착, 입장, 핵막 안으로의 수송과 관련됨.
- 면역세포에 인식되는 쉘코 바이러스의 항원 구조에 따른 생성되는 항체의 종류가 결정되며 그에 따라 쉘코 바이러스 감염증의 예후도 결정되게 됨. 즉, 면역세포가 인지하는 항원 형태가 Capsid 단백질 60개가 모인 CP입자인 경우 위 그림 7의 왼쪽 경로처럼 중화항체가 만들어져 쉘코 바이러스의 감염증을 예방할 수 있음. 그러나, 단일 capsid 단백질 상태로 숙주 면역세포에 노출되면 169~180사이의 면역회피 항원부위(169-STIDYFQPNNKR-180)가 노출되므로 그림 7의 오른쪽 경로처럼 면역회피항체가 주로 만들어지게 되어 쉘코 바이러스에 의한 면역억제 및 소모성 질병으로 발전함.
- 면역회피 항체에 의한 면역 회피는 체액성 면역에 의해 쉘코 바이러스가 제거 되지 않고 오랜 기간 돼지에 감염되어 있도록 하며, 심지어 포유 시 모돈 에서 자돈으로 항체뿐 아니라 바이러스도 동시에 자돈으로 옮겨져 자돈에서 만성 소모성 질병을 일으킴.
- 그러므로 쉘코 바이러스의 진단을 위한 항체 검사 시 쉘코 바이러스에 대한 전체 항체역가의 측정뿐 아니라 면역회피항체(decoy antibody)의 측정이 이루어져야 쉘코 바이러스 감염증에 대한 예후를 판단 할 수 있음.

■ 썬코 바이러스의 면역회피항체를 측정하기 위하여 면역회피 항원부위 169~180사이의 아미노산 서열(STIDYFQPNNKR) peptide를 합성 하여 ELISA용 plate에 코팅하여 사용하였음.

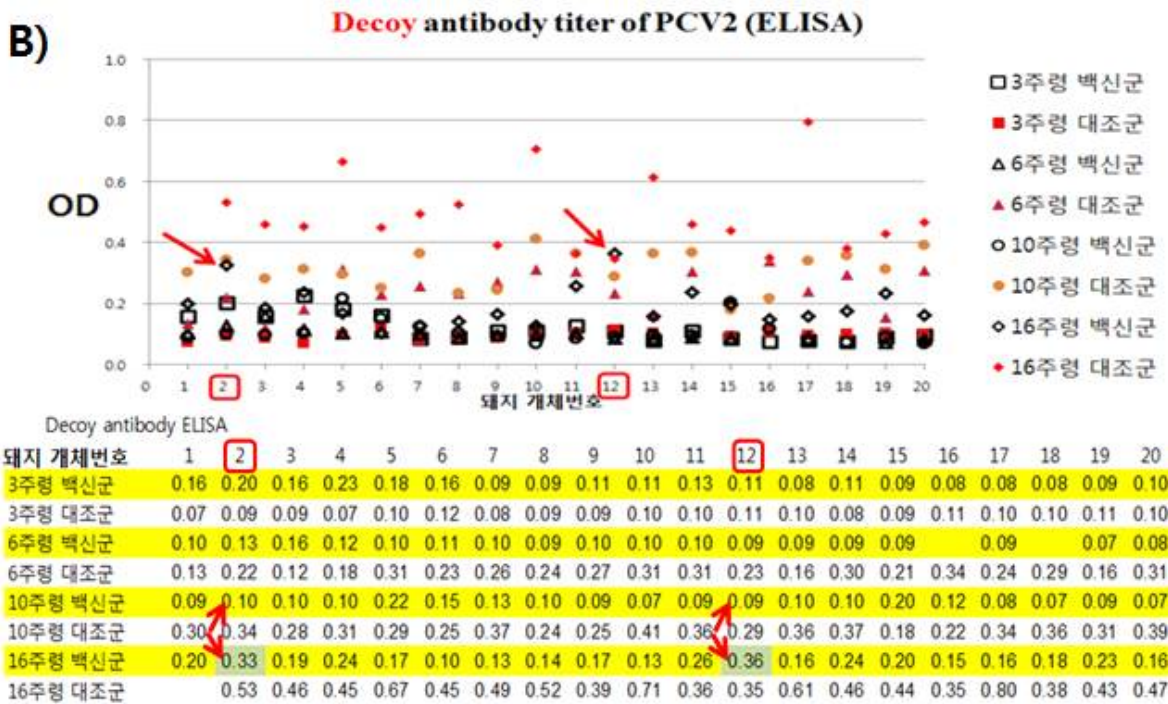
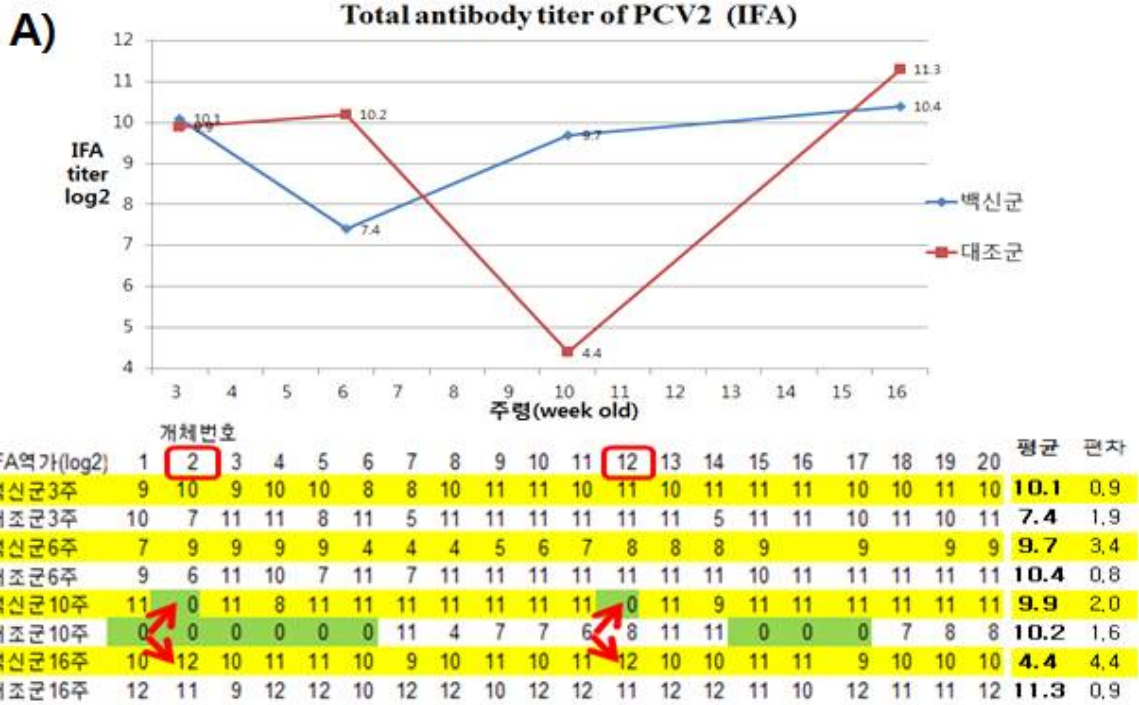


그림. 3주령의 자돈 40두를 20두씩 각각 백신접종 및 비접종 대조군 그룹으로 나누고, 백신접종군에는 시험백신(대성 썬코백)을 접종하고 3주, 6주, 10주, 16주령에 각각 개체를 표시하고 채혈한 후 썬코 바이러스에 대한 전체항체 검사와 면역회피항체를 각각 IFA법과 면역회피 epitope peptide가 코팅된 ELISA plate로 측정하였다.

■ 그림8. A)에서 전체 항체역가의 측정 시, 3주령의 모든 자돈은 모체이행항체로 인해 썬코 바이러스에 대해 높은 항체 역가를 보였음. 그러나 6주령 이후 대조군에선 항체가가 떨어지기 시작하여 10주령이 되면 항체역가가 바닥권으로 떨어지다가 16주령에는 다시 매우 높은 항체 역가를 보였다. 반면 백신접종군의 경우 6주령(백신 접종 후 3주)부터 항체가가 떨어지지 않고 완만하게 올라 16주까지 높은 항체가를 유지하였음.

■ 대조군은 모체이행항체 역가가 떨어진 10주령 이후 야외 썬코 바이러스의 감염에 의해 16주령의 항체가가 높게 형성된 것으로 판단됨. 그러나 백신접종군의 경우 10주령에 높은 백신항체에 의해 썬코 바이러스의 감염이 효과적으로 차단되어 16주령에는 대조군보다 상대적으로 낮은 항체역가를 보인 것으로 추론 할 수 있음. 썬코 바이러스의 면역회피 항체 역가가 대조군은 경우 10주령부터 증가하기 시작하여 16주령에 크게 증가한 반면, 백신 접종군에서는 16주까지 낮게 유지 되는 점도 썬코 바이러스의 자연감염 여부에 의한 차이로 보임.

■ 백신 접종군 20두 중 10주령에 낮은 PCV2 항체역가(0)를 보인 2번 과 12번 돼지가 16주령에 항체역가 증가한 것은 야외 감염에 의한 항체역가의 증가로 볼 수밖에 없음. 이는 백신접종군의 면역회피 항체 역가가 10주까지 모두 낮았으나 유일하게 10주령에 썬코바이러스 전체 항체 역가가 0으로 떨어진 두 개체(2번, 12번)에서만 16주에 면역회피 항체 역가가 증가된 사실과 관련이 있을것임. 이러한 사실은 썬코 바이러스의 자연감염에 의해 면역회피 항체가 증가할 때 썬코 바이러스에 의한 감염증으로 발전한다는 연구결과를 뒷받침 한다고 할 수 있을 것임.

■ 그러므로 본 연구에서와 같이 PCV2 전체 항체역가와 면역회피 항체역가를 측정한다면 돼지의 PCV2감염증의 예후를 예측할 수 있을 것임.

다. PCV2 decoy antigen 특이 항체(scFv) 개발.

PCV2 ORF2 capsid protein(CP)의 각 CP 서브 유닛을 이루는 아미노산 잔기 169에서 180은 강력한 주요항원 결정부위로 알려져 있음. 이 항원 결정부[CP(169~180)]는 VLP 구조에서는 안쪽에 묻혀있어 밖으로 노출되지 않아 항체의 접근이 어려워 바이러스를 중화항체와는 관계가 낫다. 그러나 PCV2에 감염된 세포에서는 완전한 PCV2입자뿐 아니라 미성숙 CP 단량체가 만들어지게 되고 면역세포에 노출되면 강력한 항원결정부로 알려져 있는 CP(169~180)에 대한 항체가 만들어지는데 이들 항체는 썬코바이러스 중화와는 관계가 없어 이들 항체가 아무리 많이 생성되어도 썬코바이러스가 중화되지 않고 혈 중에 viremia상태로 지속 감염될 수 있게 됨.

Baculovirus에서 발현된 CP로 만든 PCV2 VLP를 면역시킨 경우는 높은 중화항체가 만들어지는 반면 항 CP(169~180) 항체는 잘 만들어지지 않으나, CP 단량체를 면역한 경우 혹은 PCV2에 감염되어 PMWS 상태의 돼지들에서는 중화항체는 낮게 형성되는 반면 항 CP(169~180) 항체가 높게 만들어지는 경향을 보임(Trible BR등, J Virol. 2012 86(24)13508~14, Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2). 그러므로 PCV2백신을 개발할 때 면역학적인 회피(decoy)역할을 하는 것으로 추정되는 CP(169~180) 항원결정부가 외부로 노출되지 않는 VLP형태의 항원으로 개발하는 것이 매우 중요함.

Baculovirus로 만든 썬코바이러스의 항원도 제조 공정에서 VLP harvest 시점을 놓치거나 정제가 불완전하면 미성숙 CP 단량체가 유입되어 백신의 항원성이 불량해지는 결과를 초래할 수 있음.

CP(169~180)이 노출된 항원을 정량할 수 있는 기술 개발은 고 품질의 PCV2 백신 항원의 개발에 매우 중요한 기술임.

그러므로 본 과제에서는 썬코 바이러스의 회피 항원인 CP(169~180) epitope에 대한 특이적인 단클론항체를 개발하여 백신 개발 및 진단에 응용하고자 하였음.

(1) PCV2 면역 항체 라이브러리의 제작

(가) 면역용 항원 제작

① 펩타이드 합성

Porcine circo virus type2의 decoy epitope으로 알려진 169번에서 180번 위치의 12개 아미노산의 끝에 Cysteine을 첨가해 펩타이드 형태로 합성 하였다(Peptron, Korea). C 말단의 Cysteine에 BSA 및 KLH를 conjugation 하여 항체 스크리닝 및 닭의 면역에 대한 항원으로 사용되었다. 이후 STIDYFQPMMKR 펩타이드는 Circovirus Peptide를 줄여 CP-BSA 혹은 CP-KLH로 명명하였다(그림 1 참조).

A

PCV2a

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|
| 1 | 11 | 21 | 31 | 41 | 51 |
| MTYPRRRYRR | RRHRPRSHLG | QILRRRPWLV | HPRHRYRWRR | KNGIFNTRLS | RTFGYTVKAT |
| 61 | 71 | 81 | 91 | 101 | 111 |
| TVRTPSWAVD | MMRFNIDDFV | PPGGGTNKIS | IPFEYYRIKK | VKVEFWPCSP | ITQGDRGVGS |
| 121 | 131 | 141 | 151 | 161 | 171 |
| TAVILDDNFV | TKATALTYDP | YVNYSSRHTI | PQPFYSHSRY | STPKPVLDT | <u>IDYFQPNNKR</u> |
| 181 | 191 | 201 | 211 | 221 | 231 |
| NQLWLRLQTS | RNVDHVGLGT | AFENSIYDQD | YNIRVTMYVQ | FREFNLKDPP | LKP |

B

CP-BSA : STIDYFQPNNKRC-BSA

CP-KLH : STIDYFQPNNKRC-KLH

그림 1. A. PCV2 ORF2 capsid protein아미노산 서열 중 PCV2의 감염이 되었을 때만 노출되는 decoy epitope의 아미노산 서열(및 줄 부분)위치, B. CP-BSA 및 CP-KLH의 아미노산 서열.

② PCV2 재조합 단백질 (Monomer)

PCV2 N 말단의 아미노산을 deletion 시켜 20면체 구조를 만들지 못하고, monomer 형태로 존재하여 CP(169~180) decoy epitope이 노출 되도록 하여 대장균에서 발현한 recombinant protein으로 PCV2의 CP의 아미노산 잔지가 43번에서 233번까지 포함하도록 하였고, 대장균에 발현하여 정제하여 사용하였다.

③ PCV2 VLP (Virus like particle, Icosahedral)

시험백신2에 항원보강용으로 개발한 PCV2 VLP(PCV2a, PCV2b, PCV2d) 발현 baculoviral vector 3종을 각각 Express Five® SFM (L-glutamine 200mM) Media를 사용하여 배양된 invitrogen (Lot. no : 1179361) High5 cell에 0.5MOI로 감염시킨 후 8일간 배양한 세포배양액으

로부터 얻은 PCV2 VLP를 시험에 사용하였다.

(나) 실험동물 면역

합성된 펩타이드 KLH conjugate(CP-KLH) 50 μ g을 항원으로 750 μ l의 인산완충식염수(PBS)와 혼합하여, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양 후, 2% 스쿠알렌 중에 독소가 제거된 내독소인 MPL(monophosphorylate lipid A species) 및 마이코박테리아(mycobacteria)의 세포벽 성분인 TDW 및 CWS를 함유하는 유중수 유화액인 보조제(RIBI+MPL+TDM+CWS adjuvant, Sigma, St. Louis, Mo, USA)에 유화시킨 다음, 3마리의 닭 피하여 주사하였다. 동일 방법으로 3주 후 및 2주 후에 추가 접종 함으로서 총 3회의 면역을 수행하였다. 면역화된 닭의 항체 역가(titer)는 이차 항체로 HRP(Horseradish peroxidase) conjugated 항-닭 IgG(Y) 다클론 항체(Rabbit anti-chicken IgG(Y)-HRP, Millipore corporation, Billerica, MA, USA)를 사용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)에 의해 결정되었다.

(다) 닭 단일쇄 Fv라이브리지 제작

상기 (나)에서 면역화된 닭의 지라, 비장, 활액낭 및 골수로부터 TRI 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA USA)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 올리고-dT 프라이머 및 SuperscriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 사용하여 First strand cDNA를 합성하였다.

닭의 면역 기관으로부터 얻어진 cDNA에 대해 Expand High Fidelity PCR 시스템(Roche Molecular Systems, IN, USA)을 이용해 면역 글로블린의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역에 특이적인 하기 표의 프라이머를 사용하여 단일쇄 Fv(scFv) 라이브러리를 제작하였다.

각 반응에서, 1 μ l의 cDNA를 60 pmol의 각 프라이머, 10 μ l의 10X 반응 완충액, 8 μ l의 2.5mM dNTP(Promega, Madison, WI, USA), 0.5 μ l의 Tap DNA 중합 효소 및 물과 혼합하여 최종 부피를 100 μ l로 하였다. PCR 반응은 하기 조건에 의해 수행되었다: 30사이클 15초 94 $^{\circ}$ C, 30초 56 $^{\circ}$ C, 및 90초 72 $^{\circ}$ C에 이어서 최종 연장 10분 72 $^{\circ}$ C. 약 350bp의 길이를 갖는 단편을 1.5% 아가로스 젤에 로딩하여 전기 영동한 후, QIAGEN II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 OD 260nm에서 판독하여 정량 하였다. (1 OD 단위 = 50 μ g/ml).

두 번째 PCR에서 첫 번째 V_L 및 V_H 생성물은 중복 연장 PCR(Overlap extension PCR)에 의해 무작위적으로 연결되었다. 각각의 PCR 반응은 100ng의 정제된 V_L 및 V_H 생성물, 60pmol의 각각의 프라이머, 10 μ l의 10X 반응 완충액, 8 μ l의 2.5mM dNTP 및 0.5 μ l의 Taq DNA 중합효소 및 물과 혼합하여 최종 부피 100 μ l의 혼합물로 수행되었다. PCR은 하기 조건에서 수행되었다: 25 사이클 15초 94 $^{\circ}$ C, 30초 56 $^{\circ}$ C, 및 2분 72 $^{\circ}$ C, 이어서 최종 연장 10분 72 $^{\circ}$ C. 약 700bp의 길이를 갖는 단일쇄 Fv 절편을 1.5% 아가로스 젤에 로딩하여 전기 영동한 후, QIAGEN II Gel Extraction Kit (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 OD 260nm에서 판독하여 정량 하였다. (1 OD 단위 = 50 μ g/ml).

닭 단일쇄 Fv 라이브러리의 V_λ 및 V_H를 위한 프라이머

| V _λ Primers | |
|---------------------------|--|
| CSCVK (sense) | GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC |
| CKJo-B (reverse) | GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G |
| V _H Primers | |
| C S C V H o - F L (sense) | GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GGC GGT GGT GGC AGC TCC GGT GGT GGC GGT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG |
| CSCG-B (reverse) | CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC |
| Overlap Extension Primers | |
| CSC-F (sense) | GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG |
| CSC-B (reverse) | GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG |

(라) 라이브러리 라이게이션 및 형질 전환

PCR 산물인 scFv 절편 및 pComb3X-SS 벡터(The Scripps Research Institute, CA, USA)를 클로닝을 위해 *Sfi I* 제한 효소로 절단하였다. 10µg의 정제된 오버랩 PCR 산물을 360 유닛의 *Sfi I* (µg DNA 당 16 유닛, Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA), 20µl의 10X 반응 완충액 및 물과 혼합하여 최종 부피를 200µl로 조정하였다. 20µg의 pComb3X-SS 벡터를 120 유닛의 *Sfi I* (µg DNA 당 6 유닛), 20µl의 10X 반응 완충액 및 물과 혼합하여 최종 부피를 200µl로 조정하였다. 상기 혼합물을 8시간 동안 50° C에서 절단하였다. 약 700bp 길이의 scFv 절편 및 3400bp 길이를 갖는 벡터를 1% 아가로즈 젤에 로딩하여 전기 영동한 후, QIAGEN II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제하였다.

1400ng의 *Sfi I*-절단된 pComb3X 벡터 및 700ng의 scFv 절편을 40µl의 5X 라이게이즈 완충액, 10µl의 T4 DNA 라이게이즈(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 물과 혼합하여 최종 부피를 200µl로 맞추어 16° C에서 16시간 동안 배양하여 라이게이션을 수행하였다. 이후 에탄올로 침전하여 DNA 펠렛만을 15µl의 물에 용해시켰다.

상기 라이게이션된 라이브러리 샘플은 *E.coli* 균주인 ER2738(New England Biolabs Inc, Hitchin, Hertfordshire, SG4 OTY, England, UK)에 유전자 진동기(Gene pulser: Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용해 전기 천공법에 의해 형질전환 시켰다. 세포는 37° C, 5ml Super Broth(SB) 배지에서 혼합되었으며, 1시간 동안 250rpm으로 교반하며 배양되었고, 그 후 10ml SB 배지 및 3µl의 100mg/ml 카베니실린이 배양액에 첨가되었다. 50µg/ml의 카베니실린을 함유하는 Luria Broth(LB) agar 플레이트에 상기 배양물 0.1µl, 1µl 및 10µl를 도말하여 라이브러리 크기를 결정하였다. 배양물을 1시간 동안 추가 교반 후 상기 배양물에 4.5µl의 100mg/ml 카베니실린을 첨가하여 1시간 더 교반하였다. 상기 배양물에 2ml의 VCM13 헬퍼 파아지(>10¹¹cfu/ml), 183ml의 미리 가온된 SB 및 92.5µl의 100mg/ml 카베니실린을 첨가하여 250rpm, 37° C에서 2 시간 동안 교반 하였다. 상기 배양물에 280µl(50mg/ml)의 카나마이신을 첨가하고, 250rpm, 37° C에서 밤새 교반 하였다. 다음날, 배양물을 고속 원심분리기(Beckman, JA-10 rotor)를 이용해 3,000g, 4° C에서 원심 분리한 후 박테리아 펠렛은 phagemid DNA 제조를 위해 저장되었고, 상층액은 멸균된 원심분리 병으로 옮겼다. 이후 8g 폴리에틸렌 글리콜-8000(PEG-8000, Sigma) 및 6g의 염화나트륨(NaCl, Merck)을 첨가하고, 얼음에서 30분간 보관한 후, 상층액을 15,000g, 4° C에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고, 파지 펠렛은 1% BSA를 함유하는 트리스-완충 식염수(TBS)에 재 현탁시켰다.

(2) 고정화된 항원 상에서의 라이브러리 패닝 (바이오 패닝, Bio-panning)

자성 비드(Dynabeads M-270 Epoxy, Invitrogen)을 이용하여 바이오 패닝을 수행하였다. 1×10^7 비드에 $3 \mu\text{g}$ 의 CP-BSA(Peptide) 및 PCV2 재조합 단백질(monomer)을 실온에서 20시간 동안 회전 교반시키면서 항원을 코팅하였다. 코팅된 비드를 PBS로 4회 세척한 후 3%BSA를 함유하는 인산완충식염수(PBS)로 상온에서 한 시간 동안 블로킹한 후 상기 (라)에서 수득한 Phage-displayed scFv와 함께 실온에서 두 시간 동안 배양하였다. 비드에 코팅된 항원에 결합되지 않은 phage를 제거하기 위해 0.05% Tween20/PBS로 세척한 후, 결합된 파지를 $50 \mu\text{l}$ 의 0.1M 글리신/염화 수소(0.1M Glycine-HCl, pH 2.2)를 이용하여 용출시키고, $3 \mu\text{l}$ 의 2M 트리스-염화 수소(Tris-HCl, pH 9.1)로 중화 시켰다. 이러한 파지 함유 상등액을 사용하여 *E. coli* ER2738을 감염시키고, 파지의 밤샘 증폭을 위해 VCSM13 헬퍼 파지를 이용하여 rescue 하였다. 또한 상기 파지로부터 감염된 배양물을 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 카베니실린을 함유하는 LB agar 플레이트 상에 도말하여 투입(input) 및 생산(output) 파지 역가를 결정하였다. 다음날, PEG-8000 및 NaCl를 첨가하여 파지만을 침전시키고, 이 침전된 파지는 다음 차수 바이오 패닝에 사용되었다. .

상기 과정을 반복하여 1차에서는 CP-BSA 펩타이드를 2차에서는 PCV2 재조합 단백질을 항원으로 3차에서 7차까지 펩타이드와 재조합 단백질을 번갈아 패닝을 수행하였다. 또한 세척 단계를 1차에서는 1회 이후 세척 회수를 점차적으로 증가시켜 7차에서는 10회로 수행하면서 높은 친화도를 갖는 파지의 선별 및 enrichment 시켜 나갔다.

(3) 파이지 ELISA에 의한 클론의 선별

바이오 패닝으로부터 선별된 클론을 분석하기 위하여 무작위로 선택된 phage-displayed scFv 개별 클론 중 PCV2 CP-BSA 펩타이드 및 PCV2 재조합 단백질(monomer)에 동시에 결합력을 갖는 지를 확인하고자 ELISA를 수행하였다.

CP-BSA(Peptide)와 PCV2 재조합 단백질(monomer)을 0.1M NaHCO_3 완충액에 희석하여 96well 마이크로타이터 플레이트에 100ng/well 로 4°C 에서 16시간 동안 코팅한 후 다음날 3%BSA/PBS로 37°C 에서 1시간 동안 블로킹하였다. 이후, 파지 상등액을 6%BSA/PBS와 동일하게 혼합하고, 37°C 에서 2시간 동안 배양하였다. 0.05% Tween20/PBS로 세척한 후, 플레이트에 HRP conjugated 항-M13 항체(α -M13-HRP, Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA)를 1/5000으로 희석하여 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가 후 1시간 동안 37°C 에서 배양하였다. 배양이 끝나고 세척을 수행한 후에 색상 반응을 위해, 0.05M 구연산 완충 용액 내, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS, Amresco, Solon, OH, USA) $1 \mu\text{g/ml}$ 및 0.1% H_2O_2 를 각각의 well에 첨가하고 발색하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과를 그림 2에 나타내었다.

그림 2의 a는 6차 b는 7차 바이오 패닝의 생산 파지(output)에서 각각 48개씩의 클론을 분석하였다. CP-BSA 펩타이드와 PCV2 재조합 단백질에 동시에 결합하는 클론 중 흡광도가 높은 10개의 클론의 유전자 서열을 분석한 결과 총 3종의 서로 다른 서열을 가진 scFv 클론을 수득하였고, 이후 실험을 수행함에 있어 C4-1과 C4-8 두 가지 클론이 사용되었다.

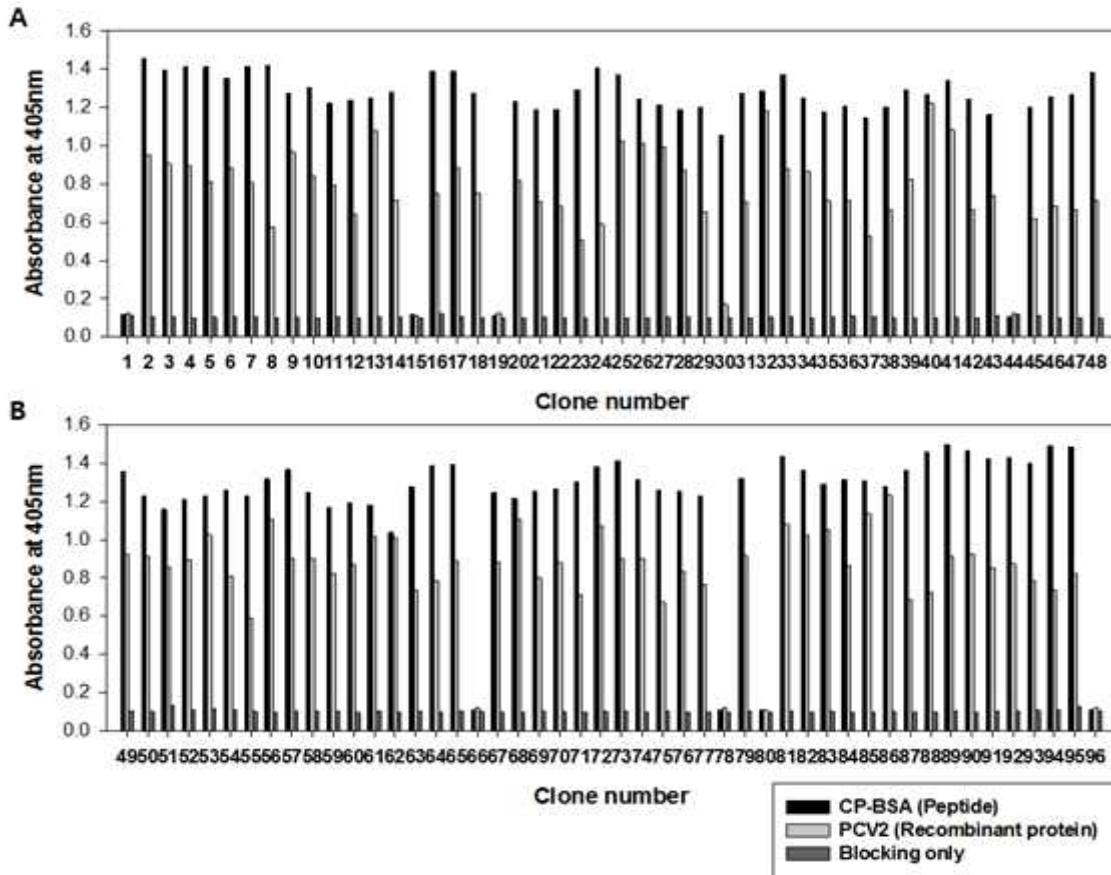


그림2. 닭의 면역 라이브러리를 이용한 바이오 패닝(Bio-panning)으로부터 무작위로 선별된 96 개 클론의 흡광도를 나타내는 그림.

(4) 재조합 항 PCV2 scFv-human C κ 융합 단백질 제작

(가) 포유류 발현 벡터로 항 PCV2 scFv 서브 클로닝 (scFv-C κ)

클로닝이 용이하도록 제한효소 부위를 변형시킨 포유세포 발현 벡터인 pCEP4(Invitrogen)에 인간 면역글로블린 C κ 를 코딩하는 유전자를 HindIII 및 Xho I (New England Biolabs, UK) 제한 효소에 의해 삽입 되었다. 항-PCV2 scFv를 코딩하는 유전자는 pComb3X 벡터로부터 두 Sfi I 제한 효소 부위에 의해 인간 C κ 영역의 5' 말단으로 서브 클로닝 되었다.

(나) 형질 주입 및 단백질 정제

pCEP4-항 PCV2 scFv-human C κ 를 단백질 형태로 발현 및 정제하고자 포유 세포 형질 주입 및 과발현 시스템을 사용하였다. 배양 부피의 ml당 2 μ g의 포유류 발현 벡터와 4 μ g의 폴리에틸렌이민(PEI, Polysciences, Warrington, PA, USA)을 세포 배양부피의 1/10에 해당하는 150mM 염화나트륨(NaCl, Merck)에 혼합하였고, 상온에서 15분간 방치되었다. 단백질 과발현 시스템에 사용되는 포유세포 HEK293F(2X10⁶세포/ml, Invitrogen)에 상기 혼합물을 첨가하여, 6일 동안 100U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신(Invitrogen)을 함유하는 Freestyle™293발현 배양액(Invitrogen)에서, 37 ° C, 7% CO₂ 및 135rpm의 교반 조건하에 배양되었다. 세포 배양액을 원심분리 후 상층액으로부터 발현된 항 PCV2 scFv-C κ 형태의 융합 단백질만을 정제하고자 Kappaselect(GE Healthcare Bio science, Sweden)를 이용한 친화도 젤 크로마토그래피 방법을

사용하였다.

(5) scFv-C κ 융합 단백질의 결합능 측정

(가) 항 PCV2-scFv-C κ 융합 단백질의 PCV2 결합 부위 확인

앞선 (4)의 방법으로 생산된 scFv-C κ 융합 단백질 형태의 항체가 CP-BSA 펩타이드 및 epitope으로 예상되는 169에서 180번 아미노산이 노출되어있는 형태에서만 결합능을 갖는지 확인하고자 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하였다. 코팅하는 항원의 종류로는 CP-BSA 펩타이드 및 PCV2 재조합 단백질(monomer), PCV2 VLP(Virus like particle, icosahedral)를 0.1M NaHCO₃에 희석하여 96well 마이크로타이더 플레이트에 100ng/well로 4° C에서 16 시간 동안 코팅하였다. 항 PCV2 scFv-C κ 융합 단백질은 1 μ g/ml 농도로 3%BSA/PBS에 희석하여 각 well당 50 μ l씩 첨가해 두 시간 동안 반응 시켰다. 배양이 끝나고 0.05% Tween20/PBS로 세척한 후 HRP conjugated 항-인간 C κ 항체(Goat anti-human C κ -HRP, Abcam, Cambridge, UK)를 1/5000로 희석하여 50 μ l/well로 첨가하여 1시간 배양 후 세척하고, Tetramethylbenzidine(TMB, Gendepot, Barker, TX, USA)를 첨가하여 발색한 후 650nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과는 그림3.에 나타내었다. 실험은 duplicate로 진행되었으며, 평균값으로 그래프를 그리고, 표준 편차로 오차 범위를 표시하였다.

CP-BSA 펩타이드 및 PCV2 재조합 단백질(monomer) 형태에서만 항-PCV2-scFv-C κ 융합 단백질이 결합하며, epitope이 숨어있는 PCV2 VLP(Virus like particle, icosahedral)에는 결합하지 못하는 것을 통해 PCV2에서의 결합 부위가 PCV2 decoy epitope인 169번에서 180번 위치의 아미노산임이 확인되었고, 감염된 돼지의 혈청과 competition 할 수 있는 클론으로 예상되었다.

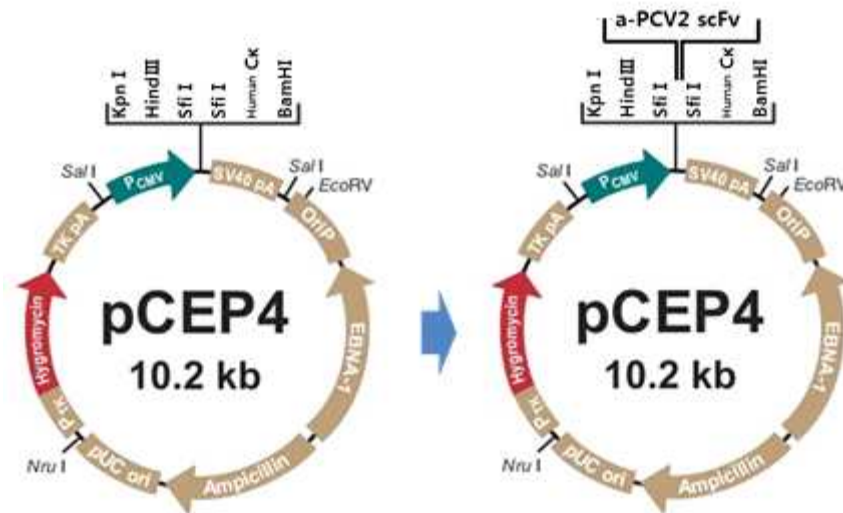


그림 3. 선별된 C4-1 및 C4-8 클론의 scFv를 포유 세포에서 인간 면역글로블린 C κ 융합 형태의 단백질로 발현시키기 위한 서브 클로닝 벡터 정보를 나타내는 그림.

(나) scFv-C κ 융합 단백질의 결합능 측정

앞선 (3)의 방법으로 생산된 scFv-C κ 융합 단백질 형태의 항체를 CP-BSA 펩타이드에 대한 결합능을 측정하고자 ELISA를 수행하였다. CP-BSA 펩타이드를 0.1M NaHCO₃에 희석하여 25ng/well로 4° C에서 16 시간 동안 코팅한 96well 플레이트에 scFv-C κ 융합 단백질이

CP-BSA 펩타이드의 epitope 수의 100배 mole수가 50 μ l 부피에 들어가는 농도인 7500nM에서 1/10씩 serial dilution 하여 0.00075nM 까지 8point 농도로 첨가하여 두 시간 동안 반응 시켰다. 첨가되는 scFv-C κ 융합 단백질의 종류로는 CP-BSA 펩타이드에 대한 결합력을 갖는 클론인 C4-1과 C4-8 그리고 음성 대조군으로서 CP-BSA 펩타이드에 결합하지 않는 Control-scFv-C κ 를 사용하였다. 이후 과정은 상기 (가)와 동일하다.

결과는 그림 4.에 나타내었다. 실험은 duplicate로 진행되었으며, 평균값으로 그래프를 그리고, 표준 편차로 오차 범위를 표시하였다.

C4-1이 C4-8에 비해 친화도가 좋은 클론임이 확인되었다.

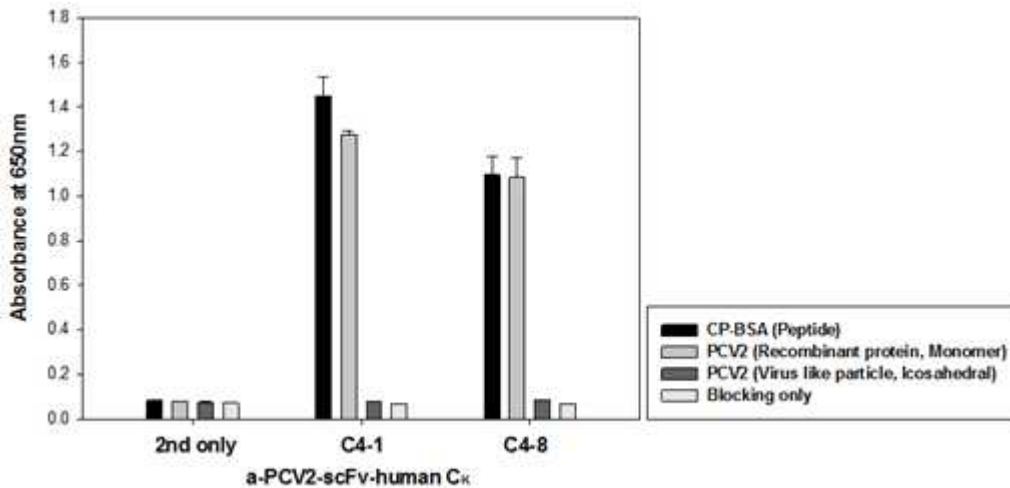


그림 4. 선별된 C4-1 및 C4-8의 scFv-human C κ 융합 재조합 단백질 형태가 169번에서 180번 위치의 아미노산에 특이적으로 결합하는 것을 확인하는 흡광도 측정 결과를 나타내는 그림.

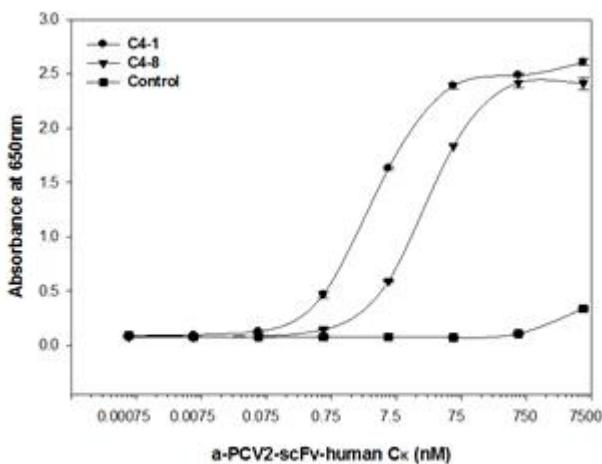


그림 5. C4-1 및 C4-8의 scFv-human C κ 융합 재조합 단백질 형태가 CP-BSA 펩타이드에 대한 친화도를 확인하는 흡광도 측정 결과를 나타내는 그림이다.

(6) 항 PCV2-scFv-C κ 융합 단백질과 돼지 혈청 간의 Competition ELISA

(가) 항 PCV2-scFv-C κ 융합 단백질의 농도에 따른 돼지 혈청 간의 competition ELISA

위 (3)의 방법으로 생산된 항 PCV2-scFv-C κ 융합 단백질 형태의 항체를 이용하여 감염에 의해 노출되는 부위인 169에서 180번 아미노산에 대해 생성된 혈청 내 존재하는 돼지 항체와 침

가되는 항 PCV2-scFv-C κ 의 competition 효과가 양에 따라 농도 gradient가 걸리는지를 확인하고자 하였다. 예비실험을 통해 코팅하는 항원의 양을 100ng에서 1/2씩 dilution 하여 가장 signal이 급격히 변화되는 point를 잡았고, 그 조건인 25ng/well로 0.1M NaHCO₃에 희석하여 96well 마이크로타이터 플레이트에 4° C에서 16 시간 동안 코팅하였다. 다음날 Germ free porcine (무균돼지, Seoul national university, Korea), Vaccinated porcine (백신균 돼지), Infected porcine(야외 감염 돼지) 각각의 serum은 1/50로 3%BSA/PBS에 희석하고, 항 PCV2-scFv-C κ 및 음성 대조군 Control scFv-C κ 를 15000nM에서 1/10씩 serial dilution 하여 0.0015nM 까지 8 point 농도로 준비하여 serum과 항 PCV2-scFv-C κ 를 25 μ l 씩 동일 부피로 섞었다. 최종 농도로 혈청은 1/100 항 PCV2-scFv-C κ 는 7500nM에서 0.00075nM 까지 8point로 첨가하여 두 시간 동안 반응 시켰다. Plate를 0.05% Tween20/PBS로 세척 후 이차 항체로서 HRP conjugated 항-돼지 면역글로블린 항체(goat anti-swine IgG-HRP, Santacruz, CA, USA)를 1/4000로 희석하여 50 μ l/well로 사용하고, 한 시간 배양 후 Tetramethylbenzidine(TMB, Gendepot, Barker, TX, USA)를 첨가 및 발색하여 650nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과는 그림 6.에 나타내었다. A는 첨가된 돼지 혈청이 없으며, B는 무균 돼지 혈청, C는 백신을 접종한 돼지 혈청, D는 감염된 돼지의 혈청이 사용되었다. 실험은 duplicate로 진행되었으며, 평균값으로 그래프를 그리고, 표준 편차로 오차 범위를 표시하였다.

무균 혹은 백신을 접종한 돼지 혈청은 CP epitope에 대한 항체가 생성되지 않기 때문에 scFv-C κ 융합 단백질이 과량으로 첨가되어도 competition이 일어나지 않고, 낮은 signal로 유지된다. 반면, 감염된 돼지의 경우 CP epitope에 대한 항체가 생성되기에 같은 epitope을 갖는 scFv-C κ 융합 단백질과 competition이 일어나며, 첨가되는 scFv-C κ 의 농도가 증가할수록 돼지 혈청내 존재하는 항체에 대한 signal이 competition에 의해 감소하는 결과를 보인다.

750nM의 항체가 첨가되었을 때, C4-1의 경우 signal이 70% 낮아지며, 보다 친화도가 낮은 C4-8의 경우 signal이 51% 감소하며, CP-BSA에 결합하지 않는 대조군 scFv-C κ 융합 단백질의 경우 competition에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

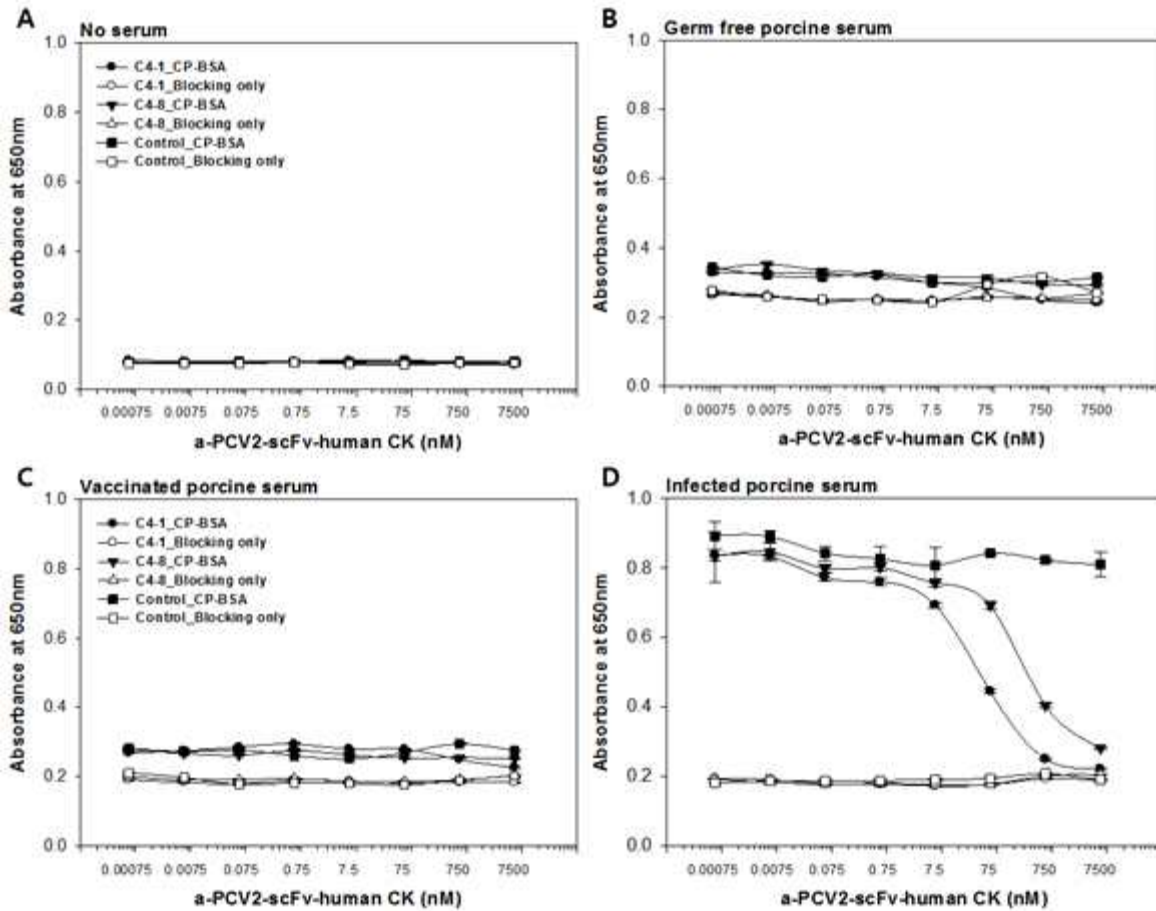


그림 6. 확보된 C4-1 및 C4-8의 scFv-human C κ 융합 재조합 단백질형태가 CP-BSA 펩타이드에 대해 돼지 혈청과 competition 하는 것을 확인하는 흡광도 측정 결과를 나타내는 그림이다

(나) 항 PCV2-scFv-C κ 융합 단백질과 돼지 혈청 간의 competition ELISA

상기 (가)와 동일한 방법으로 수행되었으며, 코팅하는 항원의 양은 25ng/well로 고정시키고, 일차 항체의 최종 농도는 돼지 혈청이 1/100, 항 PCV2-scFv-C κ 융합 단백질이 750nM이 되도록 하였다. 한 마리의 무균 돼지가 대조군으로 사용되었으며, 20마리의 백신 접종 돼지군의 혈청과 백신을 처리하지 않아 야외감염의 가능성이 있는 20마리의 돼지군 혈청을 사용하여 총 41마리의 돼지에 대한 실험을 수행하였다.

결과는 그림 7.에 나타내었다. 그림 7. A는 CP-BSA 펩타이드를 항원으로서 그림 7. B는 항원을 코팅하지 않은 블로킹 컨트롤에 백신 접종 돼지군의 혈청으로 실험을 수행한 결과이다. 그림 7. C는 CP-BSA 펩타이드를 항원으로서 그림 7. D는 항원을 코팅하지 않은 블로킹 컨트롤에 백신을 접종하지 않은 돼지군의 혈청으로 실험을 수행한 결과이다. 실험은 triplicate로 진행되었으며, 평균 값으로 그래프를 그리고, 표준편차를 오차 범위로 표시하였다.

백신을 접종한 돼지군 혈청의 경우 첨가하는 항체에 의해 signal의 변화가 거의 없지만, 백신 접종을 하지 않은 돼지군의 경우 야외 감염으로 인한 아미노산 169번에서 180번에 대한 항체가 형성되어 첨가하는 항 PCV2 scFv-C κ 융합 단백질과 competition 하여 signal이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

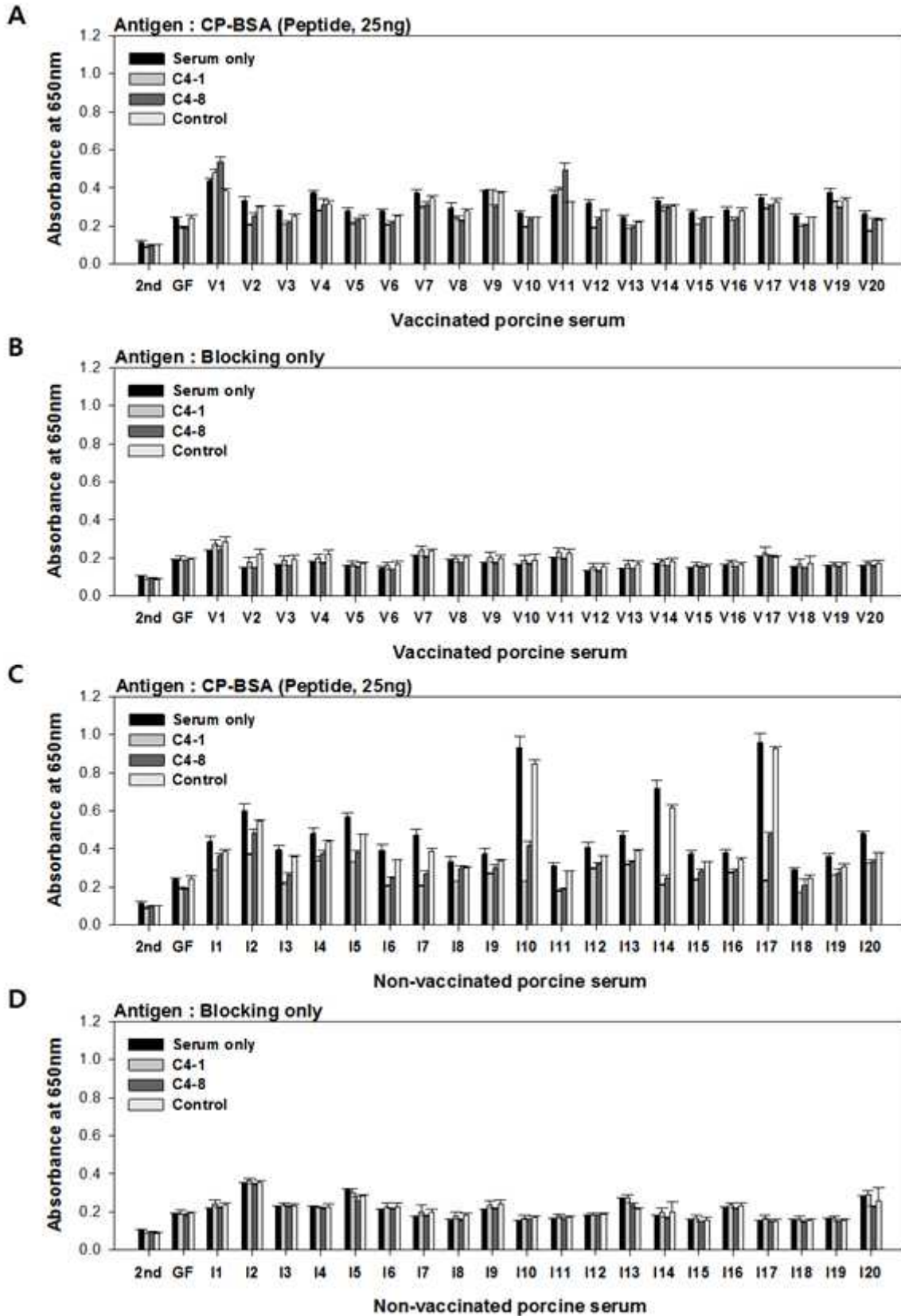


그림 7. 확보된 C4-1 및 C4-8의 scFv-human C α 융합 재조합 단백질형태가 CP-BSA 펩타이드에 대해 PCV2 VLP로 백신을 접종한 20마리의 돼지군과 백신 접종을 하지 않아 PCV2의 감염에 노출된 20마리의 돼지군에 대한 competition ELISA의 흡광도 측정 결과를 나타내는 도이다.

라. PCV2 decoy antigen 특이 항체(scFv)를 이용한 PCV2 항원 항체 분석.

(1) C4-1 및 C4-8의 scFv-human C κ 융합 재조합 단백질 항체를 이용하여 각 백신의 decoy epitope의 노출 정도를 ELISA법으로 정량하였다.

시험에 사용한 항원은 시중에서 판매되고 있는 수입백신 및 본 과제에서 개발된 시험백신 1(PCV2b virus)과 시험백신2(PCV2b virus + PCV2a VLP+ PCV2d VLP혼합 백신) 그리고 PCV2 VLP제조 과정 중 세포성분이 혼합된 정제되지 않은 항원과 마지막으로 PCV2 capsid protein 43~231아미노산 부분을 대장균에서 발현한 CP단량체 항원을 사용하였으며 이들 백신 항원을 1/100으로 0.1M NaHCO₃에 희석하여 ELISA plate에 50 μ l/well씩 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 코팅하고 1차 항체는 C4-8의 scFv-human C κ 융합 재조합 단백질은 1 μ g/ml을 50 μ l/well씩 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하였으며, 2차 항체는 2차 AbHRP α -humankappa-HRP를 1:4000으로 희석하여 사용하였다.

함께 비교한 PCV2 전체 단백질에 대한 정량시험은 사용된 각 백신 항원을 1:10,000으로 희석하여 PCV2 Ag ELISA kit(SynBiotics)을 이용해 시험하였다.

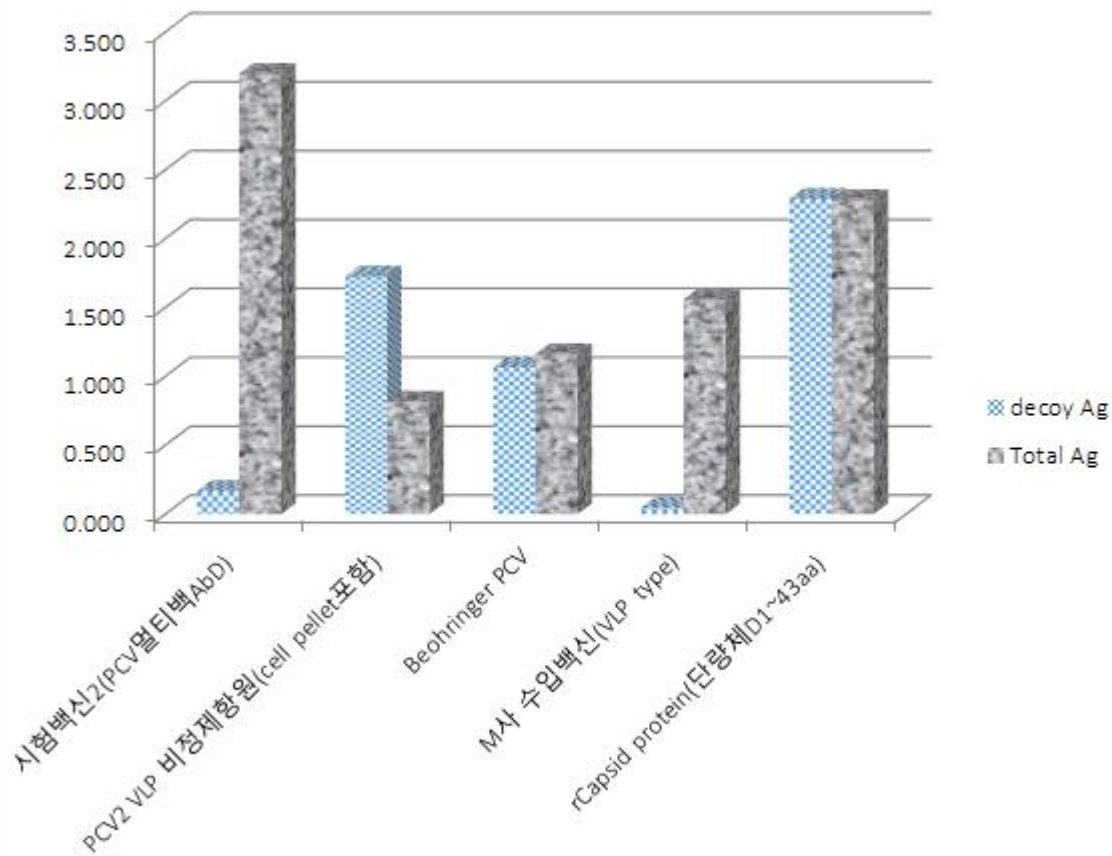


그림. 각 백신의 PCV2 total 항원량 과 노출된 decoy epitope의 정도비교 시험.

시험 결과 대장균 발현 CP단량체에서 decoy epitope이 매우 높게 검출되었을 뿐만 아니라 PCV2 VLP제조 과정중 제대로 정제하지 않은 항원에서도 decoy epitope이 매우 많이 검출되었다. 반면 본 과제에서 개발된 시험백신 2 및 M사 수입백신 등에서는 PCV2 total 항원량에 비해 매우 낮은 decoy epitope의 검출 결과를 보여 주었으며 오히려 현재 국내외에서 가장 많이 사용되고 있는 다국적 기업 B사 제품보다도 시험백신2가 항원의 양과 질에서 품질이 우수함을 보여 주었음.

(2) 백신접종 항원별 PCV2에 대한 total 면역항체 정량 및 회피항원(decoy epitope)특이 항체의 정량.

현재 시판되고 있는 PCV2백신 및 시험백신2의 항체 형성능 및 회피항원에 대한 항체형성 정도를 비교하기 위하여 시중에서 판매되고 있는 주요 수입백신 2종 및 본 과제에서 개발된 시험백신2(PCV2b virus + PCV2a VLP+ PCV2d VLP혼합 백신)와 PCV2 capsid protein의 아미노산 서열의 43부터 231번 까지를 대장균에서 발현한 CP단량체 항원(PCV2 ORF2 aa43~231)을 각각 백신항원으로 하여 기니픽 내지 6주령 SPF닭에 각 백신별로 4~5수씩 접종하고 28일 후 채혈하여 시험에 사용하였다.

PCV2에 대한 면역항체를 정량은 본 연구팀이 개발한 PCV2 IFA진단 키트를 이용하여 측정 하였으며, 회피항원(decoy epitope)특이 항체를 정량하기 위해서 다음과 같은 방법으로 decoy antibody를 정량 하였다.

-Decoy antibody 정량법.

① Antigen coating

CP-BSA(2mg/ml) => 4ug/ml in 0.1M NaHCO₃ 3.5ml

4° C, O/N incubation (20ul/well, 80ng/well)

② Blocking (3%BSA/PBS, 150ul/well) 37° C, 1hr incubation / 50ml

③ Primary serum dilution in 3%BSA/PBS (3ul+297ulBSA)

- Sample 50ul/well, 37° C, 2hr incubation

④ 0.05% PBST, 150ul/well X3 washing

⑤ Secondary antibody

- a-기니픽-HRP (Bethyl 1:8000 dilution in 3%BSA/PBS)

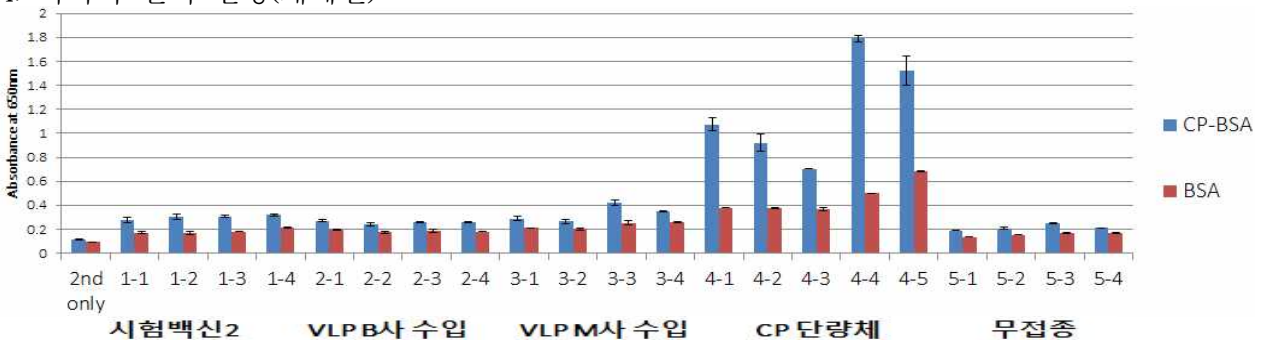
- a-Chicken IgY (Chemicon, 1:5000 dilution in 3%BSA/PBS)

=> 50ul/well, 37° C, 1hr incubation

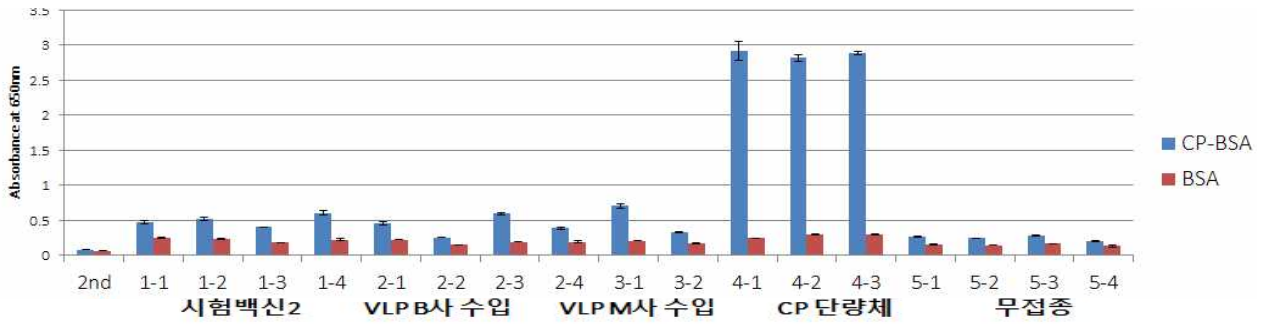
⑥ 0.05% PBST, 150ul/well X 3 washing

⑦ 발색 및 Reading: TMB, 50ul/well, Absorbance at 650nm

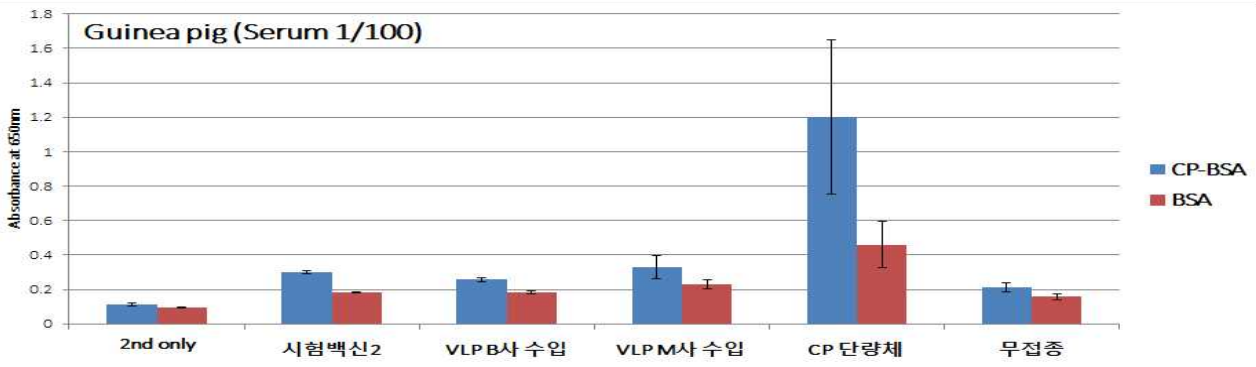
A: 기니픽 면역 혈청(개체별)



B: SPF닭 면역 혈청(개체별)



C: 기니픽 면역 혈청(평균)



D: SPF 닭 면역 혈청(평균)

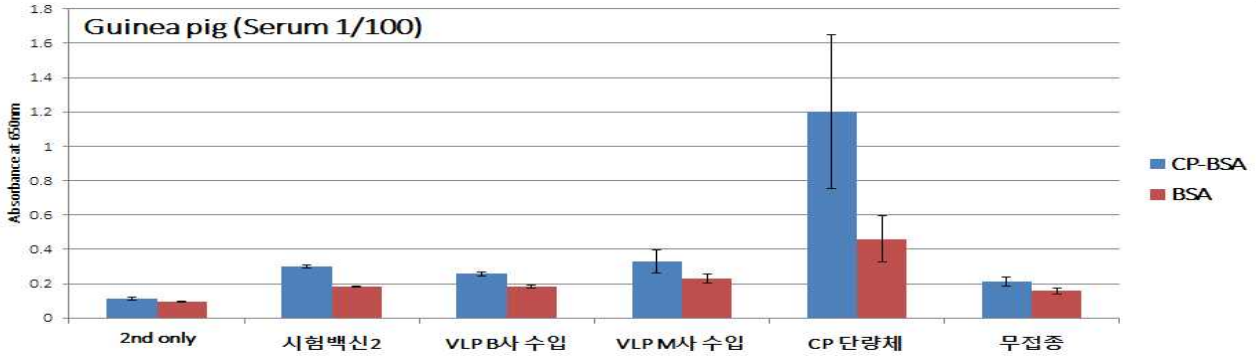
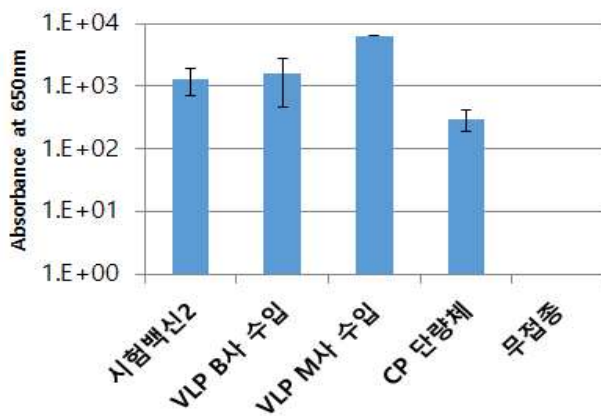


그림. 기니픽 및 닭에 각각의 PCV2백신을 접종하고 4주 후에 채혈하여 회피항체를 ELISA법으로 정량한 그림.

IFA: PCV2 항체(기니픽 면역)역가 측정



IFA: PCV2 항체(SPF닭 면역)역가 측정

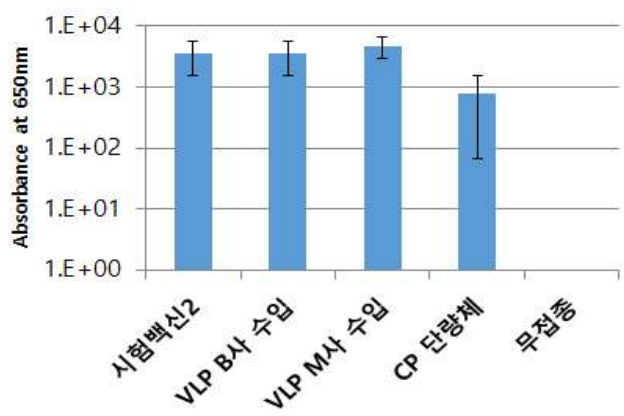


그림. 기니픽 및 닭에 각각의 PCV2백신을 접종하고 4주 후에 채혈하여 PCV2 IFA kit를 이용하여 PCV2 면역항체를 정량한 그림.

<결과 분석>

- 회피항체에 대한 역가 측정 결과 대장균에서 발현된 PCV2 capsid protein(43~231번 아미노산 부분)을 면역한 기니피그와 SPF닭에서만 높은 회피항체가 검출되었고 시판되고 있는 다국적 기업 제품 및 본 과제에서 개발된 시험백신2는 회피항체가 역가가 낮게 검출되어 백신의 품질에 이상이 없었음.

- 각 백신면역 혈청에 대한 PCV2 특이 항체를 IFA법으로 정량한 결과 수입백신 중 M사의 제품이 가장 높은 역가를 보였으며 현재 국내에서 80%이상 판매되고 있는 B사 백신과 본 과제에서 새로 개발된 시험백신2는 거의 동일한 항체역가를 보였고, 대장균 발현 PCV2백신(Capsid Protein 단량체)는 항체 역가가 4배에서 8배 이상 낮은 역가를 보였음. M사 백신이 B사 및 시험백신2보다 높은 PCV2 특이 항체 역가를 보인 이유로는 백신항원과 함께 사용하는 부형제(adjuvant)의 차이 때문에 면역이 보다 강하게 일어났을 것을 추정됨(M사 제품은 부형제에 의해 백신이 접종된 돼지에서 높은 접종 반응 및 쇼크 등이 동반되는 것으로 알려지고 있음).

9. 야외임상시험

- 시험백신 무균시험

표2. 시험백신 무균시험

| 시험 백신 | 22℃ | | | 37℃ | | | 판 정 |
|---------|---------------|----------------|-------------|---------------|----------------|-------------|------|
| | Nutrient Agar | Nutrient Broth | Thio-Medium | Nutrient Agar | Nutrient Broth | Thio-Medium | |
| PCV2 01 | - | - | - | - | - | - | 미 배양 |
| PCV2 02 | - | - | - | - | - | - | 미 배양 |
| PCV2 03 | - | - | - | - | - | - | 미 배양 |

- 시험백신 안전시험

1) 동물: 체중 13~15g의 마우스 10마리, 체중 300~350g의 기니픽 6마리를 선정하여 사용한다. 돼지는 체중 15~20Kg의 건강한 자돈 4마리를 사용한다.

2) 시험: 마우

스 10마리에는 0.5ml를 복강에, 기니픽 2마리는 피하에 1ml, 2마리는 복강에 1ml, 2마리는 피내 0.1ml 접종하고 7일간 관찰한다. 시험돈 4마리에 공시품 5두분씩을 각각 근육 접종하고 3주간 관찰한다.

3) 판정: 시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

표3. 마우스 안전시험 (복강 0.5ml 접종)

| 시험 백신 | 복강 접종 | | | | | | | | | | 결 과 | |
|------------|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 24VBBAD 01 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 이상 없음 |
| 24VBBAD 02 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 이상 없음 |
| 24VBBAD 03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 이상 없음 |

표4. 기니픽 안전시험 (피하 1ml, 복강 1ml, 피내 0.1ml 접종)

| 시험 백신 | 피하 접종 | | 복강 접종 | | 피내 접종 | | 결 과 |
|------------|-------|---|-------|---|-------|---|-------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | |
| 24VBBAD 01 | - | - | - | - | - | - | 이상 없음 |
| 24VBBAD 02 | - | - | - | - | - | - | 이상 없음 |
| 24VBBAD 03 | - | - | - | - | - | - | 이상 없음 |

표5. 자돈 안전시험 (근육 5두분 접종)

| 시험 백신 | 근 육 접 종 | | | | 결 과 |
|------------|---------|---|---|---|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 24VBBAD 01 | - | - | - | - | 이상 없음 |
| 24VBBAD 02 | - | - | - | - | 이상 없음 |
| 24VBBAD 03 | - | - | - | - | 이상 없음 |

-이행항체 보유자돈에서의 시험백신 효능 및 안전시험

표1. 백신접종 후 1주간 임상증상(안전성시험)

시험개시일 : 2014.7.26 최종시험일 확인자 : 남 란 순 (인)

| 항목 시험구 | 자 돈 수 | 백신접종 후 임상증상(일) | | | | | | | | | | 비고 | |
|---|-------------|----------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| | | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 06 | 10 | - * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 없음 |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 07 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 없음 |
| 써코플렉스 마이코플렉스 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 없음 |
| 무접종 대조구 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 없음 |

*: 이상없음

표2. 백신접종 전, 후 체온측정

시험개시일 : 2014.7.26 최종시험일 : 확인자 : 남 란 순 (인)

| 항목 시험구 | 자 돈 수 | 백신접종 전 후 체온 | | | | | | | | | | 비고 | |
|---|-------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-------------------|-------|----|
| | | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 06 | 3 | 39.82 | 39.82 | 39.83 | 39.82 | 39.83 | 39.82 | 39.82 | 39.82 | 39.82 | 39.8 ₂ | 39.82 | 정상 |
| | | 39.85 | 39.85 | 39.84 | 39.84 | 39.84 | 39.85 | 39.85 | 39.85 | 39.85 | 39.8 ₅ | 39.85 | 정상 |
| | | 39.93 | 39.93 | 39.93 | 39.92 | 39.92 | 39.93 | 39.93 | 39.92 | 39.92 | 39.9 ₂ | 39.93 | 정상 |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 07 | 3 | 39.91 | 39.91 | 39.92 | 39.92 | 39.92 | 39.91 | 39.91 | 39.91 | 39.9 ₂ | 39.92 | 39.92 | 정상 |
| | | 39.48 | 39.48 | 39.48 | 39.48 | 39.47 | 39.47 | 39.48 | 39.48 | 39.4 ₈ | 39.48 | 39.48 | 정상 |
| | | 39.16 | 39.16 | 39.15 | 39.15 | 39.15 | 39.16 | 39.16 | 39.16 | 39.1 ₅ | 39.16 | 39.16 | 정상 |
| 써코플렉스 마이코플렉스 | 3 | 39.58 | 39.58 | 39.58 | 39.58 | 39.57 | 39.57 | 39.57 | 39.58 | 39.5 ₈ | 39.58 | 39.58 | 정상 |
| | | 39.29 | 39.29 | 39.29 | 39.28 | 39.28 | 39.28 | 39.28 | 39.28 | 39.2 ₉ | 39.29 | 39.29 | 정상 |
| | | 39.48 | 39.48 | 39.48 | 39.48 | 39.48 | 39.49 | 39.49 | 39.48 | 39.4 ₈ | 39.48 | 39.48 | 정상 |
| 무접종 대조구 | 3 | 39.52 | 39.52 | 39.52 | 39.53 | 39.53 | 39.53 | 39.53 | 39.52 | 39.5 ₂ | 39.52 | 39.52 | 정상 |
| | | 39.68 | 39.68 | 39.68 | 39.67 | 39.67 | 39.67 | 39.68 | 39.68 | 39.6 ₇ | 39.67 | 39.67 | 정상 |
| | | 39.82 | 39.83 | 39.83 | 39.83 | 39.82 | 39.82 | 39.82 | 39.83 | 39.8 ₃ | 39.83 | 39.83 | 정상 |

표3. 체중 측정 및 채혈

시험개시일 : 2014.7.26 최종시험일 : 확인자 : 남 란 순 (인)

| 항목 시험구 | 자 돈 수 | 채혈, 체중측정, 비즙채취 주령 | | | | 비고 |
|---|-------------|---------------------------------|--------------------------------------|--|----|-------------------|
| | | 접종전 | 8 | 12 | 16 | |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 06 | 10 | 84.8 (≒8.48) 채혈(7/26) | 194 (≒19.4) 채혈(8/26) | 334.0 (≒ 33.4) 채혈(9/25) | - | - |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 07 | 10(-2) | 84.1 (≒8.41) 채혈(7/26) | 150.4 (≒ 18.8) 채혈(8/26) | 257.92 (≒ 32.24) 채혈(9/25) | - | 2 두 폐 사 (8/27) |
| 써코플렉스 마이코플렉스 | 10 | 83.1 (≒8.31) 채혈(7/26) | 185 (≒18.5) 채혈(8/26) | 319.4 (≒ 31.94) 채혈(9/25) | - | - |

| | | | | | | |
|---------|----|-------------------------|------------------------|---------------------------------|---|---|
| 무접종 대조구 | 10 | 80.9(≒8.09) 채혈(7/26) | 171(≒17.1) 채혈(8/26) | 279.64(≒ 27.964) 채혈(9/25) | - | - |
|---------|----|-------------------------|------------------------|---------------------------------|---|---|

표4. 위축 및 폐사두수

시험개시일 : 2014.7.26 최종시험일 : 확인자 : 남 란 순 (인)

| 시험구 | 항목 | 자 돈 수 | 폐사 또는 위축돈 두수 (주령) | | | | 비고 |
|------------------------------------|----|-------------|-------------------|---------------|----------------------|----|---------------|
| | | | 접종전 | 8 | 12 | 16 | |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 06 | | 10 | - | - | - | - | - |
| 대성PCV멀티백 (시험백신2) 23pcvAbD 07 | | 10 | - | 2두 폐사 (5주) | - | - | 더위,채혈 스트레스 |
| 썬코플렉스 마이코플렉스 | | 10 | - | - | 1두위축(10) 2두허약(12) | - | - |
| 무접종 대조구 | | 10 | - | 4두위축(6주) | 4두위축 지속 | - | - |

□ 야외농장시험(임상시험)-최소 3개 농장 이상 반복 시험함.

가)체중 체크: 시험백신 야외농장 자돈 실험시 접종전(1주령), 1차 접종 2주후(3주령), 2차 접종 2주 후(5 주령), 7주령 시험군, 대조군 체중 체크를 한다. 시험농장 출하일령을 체크한다.

표 6. 자돈 체중 체크

| 시험 백신 | | 시험군 항체가 | | | | | 대조군 | | | | | 결 과 |
|-------|------|---------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 01 | 1 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 3 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 5 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 7 주령 | | | | | | | | | | | |
| 02 | 1 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 3 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 5 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 7 주령 | | | | | | | | | | | |
| 03 | 1 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 3 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 5 주령 | | | | | | | | | | | |
| | 7 주령 | | | | | | | | | | | |

나) 체온 체크

시험백신 야외농장 모든, 자돈 안전실험시 접종전, 접종 1시간 후, 접종 1일 후 시험군 및 대조군 체온 체크를 한다.

다) PCV2와 PRRSV PCR 항원 검사

야외농장 모든, 자돈 시험시 시험백신 접종전, 1차 접종 2주후, 2차 접종 2주후 EDTA-tube에 혈액을 채취하여 PCV2 와 PRRSV 항원 존재 유무를 확인한다.

표7. 자돈 체온 체크

| 시험백신 | 자돈 | 접종부위 | 체온측정 | | | |
|------------|----|------|---------|-------------|------------|----|
| | | | 접종 전 체온 | 접종 1시간 후 체온 | 접종 1일 후 체온 | 결과 |
| 24VBBAD 01 | 1 | | | | | |
| | 2 | | | | | |
| | 3 | | | | | |
| 24VBBAD 02 | 1 | | | | | |
| | 2 | | | | | |
| | 3 | | | | | |
| 24VBBAD 03 | 1 | | | | | |
| | 2 | | | | | |
| | 3 | | | | | |

- 시험백신 최소면역원성 시험

가) 기니픽 : 불활화전 PCV2 바이러스 함량 $10^{5.0} \sim 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 로 시험백신을 제조하여 300~350g 체중 기니픽 15마리중 시험군 10마리에 1ml 근육 접종하고 접종 3주 후 채혈하여 항체가를 측정한다. 5마리는 대조로 둔다.

표8. 시험백신 최소면역원성 기니픽시험

| 구분 | 바이러스 함량 | 시험군 항체가 | | | | | | | | | | 대조군 | | | | | 비 고 | |
|------|---------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|---|---|---|---|-----|--|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 시험백신 | 10^5 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10^6 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10^7 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10^8 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

나) 자돈: 활화전 PCV2 바이러스 함량 $10^{5.0} \sim 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 로 시험백신을 제조하여 3~4주령 자돈 10마리중 시험군 7마리에 1ml 근육 접종하고 접종 3주 후 채혈하여 항체가를 측정한다. 3마리는 대조로 둔다.

표9. 시험백신 최소면역원성 자돈시험

| 구분 | 바이러스 함량 | 시험군 항체가 | | | | | | | 대조군 | | | 비 고 |
|------|---------|---------|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 | 3 | |
| 시험백신 | 10^5 | | | | | | | | | | | |
| | 10^6 | | | | | | | | | | | |
| | 10^7 | | | | | | | | | | | |
| | 10^8 | | | | | | | | | | | |

- 시험백신 면역원성 시험-3개 농장 이상 반복 시험함.

- 1) 시험동물: 300~350g 체중 기니픽에 대해 2주 간격으로 2차 접종 3주후, 접종군 10마리와 대조군 5마리의 혈청에 대하여 항체가를 측정한다.
- 2) 임신모돈: 초산돈(종부 4주, 2주전 접종), 경산돈(종부 2주전 접종) 백신접종 모돈의 항체가 및 백신 접종한 모돈의 자돈에 대한 이행항체가 측정한다.
- 3) 자돈: 자돈 1주령에 1차 접종, 3주령에 2차 접종하고, 접종 3, 6주, 9주, 12주 후 채혈 하여 백신 항체가를 측정한다.
- 4) 판정: 시험 기니픽에 대한 IFA 항체가와 IPMA 항체가 128배 이상이고, 대조군은 음성이어야 한다.

표10. 시험백신 자돈 이행항체가 시험

| 시험 백신 | | 시험군 항체가 | | | | | 대조군 | | | | | 결과 |
|-------|-----|---------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 01 | 초유 | | | | | | | | | | | |
| | 3주령 | | | | | | | | | | | |
| | 6주령 | | | | | | | | | | | |
| | 9주령 | | | | | | | | | | | |
| 02 | 초유 | | | | | | | | | | | |
| | 3주령 | | | | | | | | | | | |
| | 6주령 | | | | | | | | | | | |
| | 9주령 | | | | | | | | | | | |
| 03 | 초유 | | | | | | | | | | | |
| | 3주령 | | | | | | | | | | | |
| | 6주령 | | | | | | | | | | | |
| | 9주령 | | | | | | | | | | | |

표11. 시험백신 자돈 항체가 시험

| 시험 백신 | | 시험군 항체가 | | | | | 대조군 | | | | | 결과 |
|-------|-------|---------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 01 | 3주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 6주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 9주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 12주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 15주 후 | | | | | | | | | | | |
| 02 | 3주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 6주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 9주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 12주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 15주 후 | | | | | | | | | | | |
| 03 | 3주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 6주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 9주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 12주 후 | | | | | | | | | | | |
| | 15주 후 | | | | | | | | | | | |

자돈 항체가 실험(농장시험) 3개 농장 이상 반복시험.

| 구분 | 구분 | 개체 | 초유 | 3주령 | 6주령 | 9주령 | 비고 | |
|------------|-----|----|----|-----|-----|-----|----|--|
| 24VBBAD 01 | 접종군 | 1 | | | | | | |
| | | 2 | | | | | | |
| | | 3 | | | | | | |
| | | 4 | | | | | | |
| | | 5 | | | | | | |
| | 대조군 | 1 | | | | | | |
| | | 2 | | | | | | |
| | | 3 | | | | | | |
| | | 4 | | | | | | |
| | | 5 | | | | | | |
| 24VBBAD 02 | 접종군 | 1 | | | | | | |
| | | 2 | | | | | | |
| | | 3 | | | | | | |
| | | 4 | | | | | | |
| | | 5 | | | | | | |
| | 대조군 | 1 | | | | | | |
| | | 2 | | | | | | |
| | | 3 | | | | | | |
| | | 4 | | | | | | |
| | | 5 | | | | | | |
| 24VBBAD 03 | 접종군 | 1 | | | | | | |
| | | 2 | | | | | | |
| | | 3 | | | | | | |
| | | 4 | | | | | | |
| | | 5 | | | | | | |
| | 대조군 | 1 | | | | | | |
| | | 2 | | | | | | |
| | | 3 | | | | | | |
| | | 4 | | | | | | |
| | | 5 | | | | | | |

특이사항:

-시험백신 공격접종 시험: 시험백신을 자돈 3주령에 1차 접종 한 후, 2주 후에 PCV2 강독 바이러스를 이용하여 공격접한 후, 4주간 PCV2 임상증상을 관찰하고, 접종군 및 대조군을 부검하여 조직병변 소견을 관찰한다.

표12. 공격접종 후 임상증상 관찰

| 구분 | 개체 번호 | 접종 방법 | 접종 일령 | 임 상 증 상 | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|---------|----|----|----|-------|-----|----|----|
| | | | | 쇼크 | 발열 | 침울 | 구토 | 식욕 저하 | 유사산 | 폐사 | 기타 |
| 시험군 | 1 | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | | | | |
| 대조군 | 1 | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | | | | |

표13. 부검소견 관찰

| 구분 | 개체번호 | 부검 소견 | | | | | | 비 고 |
|-----|------|-------|---|----|----|----|----|-----|
| | | 폐 | 간 | 심장 | 편도 | 림프 | 신장 | |
| 시험군 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 대조군 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |

- 시험백신 안정성 시험: 시험백신을 2 ~ 8℃ 냉장 보관하면서, 제조당시, 제조 3월 후, 제조 6월 후, 제조 9월 후, 제조 12월 후, 제조 18월 후, 제조 24월 후, 300~350g 체중 기니픽 7수에 시험백신을 1회 접종하고 3주후 대조군 3수와 함께 채혈하여 항체가를 측정한다.

표14. 시험백신 안정성 시험

| 시험백신 | 기니픽 | 항체가 | | | | | | |
|------------|-----|------|---|---|---|----|----|----|
| | | 제조당시 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| 24VBBAD 01 | 1 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | |
| | 6 | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | |
| | 평균 | | | | | | | |
| 대조군 | 1 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | |
| 24VBBAD 02 | 1 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | |
| | 6 | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | |
| | 평균 | | | | | | | |
| 대조군 | 1 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | |
| 24VBBAD 03 | 1 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | |
| | 6 | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | |
| | 평균 | | | | | | | |
| 대조군 | 1 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | |

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

| 구분 | 목표 | 성과지표 | | | |
|------------|---|---|--|--|--|
| | | 성과지표 (단위) | 성과 목표치 | 실적 | 중요도 가중치 |
| 1년차 ('11년) | • 돼지썩코바이러스 역학연구 | <ul style="list-style-type: none"> • 국내 야외분리주 ORF2 게놈 염기서열 분석 • ORF2 genotype별 유전자 확보 | <ul style="list-style-type: none"> • 100주 • 4종 | 460주 4종 | <ul style="list-style-type: none"> • 10% • 10% |
| | • 고증식성 키메라 돼지썩코바이러스(PCV2) 백터개발 | • 고증식성 돼지썩코바이러스 게놈 클로닝 | • 1개 | 1개 | • 10% |
| | | • PCV2의 각 유전형별 ORF2 유전자 인공합성 | • 4종 | 4종 | • 10% |
| | | • 고증식성 키메라 돼지 썩코 바이러스 작출 백터 제작 | • 4종 | 4종 | • 10% |
| | | • PCV2의 각 유전형별 ORF2 유전자를 갖는 고증식성 키메라 돼지 썩코 바이러스 작출 | • 4종 | 4종 | • 20% |
| | • 고증식성 키메라 돼지썩코바이러스(PCV2) 백신 후보주 생산 최적화 | • 4종의 키메라 썩코 바이러스를 이용한 생산법 최적화 기술 확립 | • 1×10^7 TCID ₅₀ /ml | 1×10^7 TCID ₅₀ /ml | • 30% |
| 소계 | | | | | 100% |

| 구분 | 목표 | 성과지표 | | | |
|------------|--|---|------------|---------|---------|
| | | 성과지표 (단위) | 성과 목표치 | 실적 | 중요도 가중치 |
| 2년차 ('12년) | • PCV2 항원 검출 kit 개발 | • PCV2 바이러스 항원 정량 법 개발에 의한 정량법 확립 | • 개발성공 | 성공 | • 10% |
| | | PCV2 특이 단클론항체 개발 (각 유전형별 특이성 확보) | 개발과정 중 추가됨 | 11개 | |
| | PCV2 재조합 VLP (Virus like particle) 개발 | PCV2의 각 유전형별 ORF2 발현 baculovirus vector 제작 및 재조합 baculovirus 작출 및 항원 발현 | 개발과정 중 추가됨 | 4종 | |
| | • PCV2 항체 검출 kit 개발 | • PCV2 특이성을 갖는 PCV2 ORF2 유전자 탐색 및 클로닝 | • 1개 | 1개 | • 10% |
| | | • PCV2 특이성을 갖는 PCV2 ORF2 유전자 발현 PK-15 세포주 | • 세포주 확립 | 확립 | • 10% |
| | • 각 작출된 고증식성 키메라 돼지썩코바이러스의 특성 시험 | • 염기서열 분석 | • 분석 | 분석 | • 5% |
| | | • 세포주에서의 증식성 평가 | • 분석 | 분석 | • 5% |
| | | • 면역원성 시험(기니피) | • 분석 | 분석 | • 5% |
| | | • PCV2 유전형별 항원성 평가 | • 분석 | 분석 | • 5% |
| | • 고증식성 키메라 돼지썩코바이러스(PCV2) 다가 백신의 실험실 효능 평가 | • 시험백신 제조 | • 시제품 제작 | 제작 | • 10% |
| | | • 기니피에 대한 항체형성능 시험 | • 500배 | >1000배 | • 10% |
| | | • 자돈에 대한 항체형성능 시험 | • 500배 | >500배 | • 10% |
| | | • 자돈에 대한 효력시험(공격접종후 흡선에서의 바이러스량 차이확인) | • 100이상 | >10,000 | • 10% |
| | | • 야외임상시험 승인 신청 | • 신청 | 신청 | • 5% |
| 소계 | | | | | 100% |

| 구분 | 목표 | 성과지표 | | | |
|--|--|--|--|--|--|
| | | 성과지표 (단위) | 성과 목표치 | 실적 | 중요도 가중치 |
| 3년차 ('13년) | <ul style="list-style-type: none"> PCV2 특이성을 갖는 IFA용 진단 kit 개발 | <ul style="list-style-type: none"> 진단 kit의 유효성 및 안정성 평가 | <ul style="list-style-type: none"> 6개월 | >6개월 | <ul style="list-style-type: none"> 20% |
| | | <ul style="list-style-type: none"> 시제품 생산 | <ul style="list-style-type: none"> 시제품 제작 | 제작완료 | <ul style="list-style-type: none"> 10% |
| | PCV2 회피항원 및 회피항원 특이항체 정량 법 개발 | PCV2 회피항원(Decoy epitope) 특이 재조합항체 개발(scFV) | 개발과정 중 추가됨 | 2중 | |
| | | 회피항원 정량 법 개발 및 제조공정 적용 | | 성공 | |
| | | 회피항체 정량 법 개발 및 진단 법 적용 | | 성공 | |
| | PCV2 재조합 VLP 생산 최적화 | 곤충세포이용 PCV2 VLP 최적 발현 조건 확립 및 대량생산조건 확립 | 개발과정 중 추가됨 | >20 Liter | |
| | <ul style="list-style-type: none"> 고증식성 키메라 돼지췌코바이러스(PCV2) 다가 백신의 야외농장 시험 | <ul style="list-style-type: none"> 시험백신의 안정성 시험 | <ul style="list-style-type: none"> 18개월 | 시험중 | <ul style="list-style-type: none"> 10% (5%) |
| | | <ul style="list-style-type: none"> 시험백신의 유효성 시험 | <ul style="list-style-type: none"> 시험 | 시험완료 | <ul style="list-style-type: none"> 20% |
| | | <ul style="list-style-type: none"> 시험백신의 안전성 시험 | <ul style="list-style-type: none"> 시험 | 시험완료 | <ul style="list-style-type: none"> 20% |
| | | <ul style="list-style-type: none"> 야외 시험 결과분석 및 서류작성 | <ul style="list-style-type: none"> 작성 | 작성 중 | <ul style="list-style-type: none"> 10% (0%) |
| <ul style="list-style-type: none"> 백신의 허가 신청/등록 | | <ul style="list-style-type: none"> 등록 | 신청 중 | <ul style="list-style-type: none"> 10% (0%) | |
| 소계 | | | | | 75% |

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 국내외 관련분야 환경변화 및 산업화 계획(기술실시)

표. 우리나라 쉘코백신 점유율 현황(금액기준, 단위: 백만원)

| 제품명 | | 쉘코 피그백 | CF (수입) | CB 수입 | CV 수입 | CM | CD | CN | CS | 총계 |
|--------------------|------|------------------------|--------------------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|-------------------|
| 업체명 | | 대성 미생물 | B | I | M | KM | JB | KB | N | 100% |
| 점 유 율 (%) | 2009 | 년간 1.6% 329백만원 | 80.4% 16,861백만원 | 3.1 | 8.5 | 5.7 | 0.8 | 0 | 0 | 100% 20,996백만원 |
| | 2010 | 년간 4.3% 1,556백만원 | 74.9% 27,378백만원 | 5.2 | 6.0 | 5.6 | 2.6 | 0.7 | 0.7 | 100% 36,564백만원 |
| | 2011 | 년간 3.7% 1,328백만원 | 81.4% 29,934백만원 | 5.0 | 3.9 | 1.8 | 2.5 | 0.5 | 0.3 | 100% 36,795백만원 |

다국적 기업인 M 회사에서는 쉘코바이러스 불활화백신을 상용화하여 모돈에 1두 분당 25,000원씩 판매하고 있고, B회사와 I회사는 유전자 재조합으로 ORF2 항원을 생산하여 자돈에 1두분 당 3,000원씩 판매되고 있음. M 회사 백신은 고가이고 모돈만 접종되는 백신으로 효과가 저조하여 점유율이 급속하게 떨어지고 있으나, 다국적 기업인 B회사는 시장 선점 효과로 최근 오히려 매출이 증가하고 있음. 국내 5개회사도 모두 품목허가를 득하여 현재 시판 중에 있으며, 1두분 당 1,500원으로 제품의 가격을 낮추어 시장경쟁력을 갖추고자 했으나 점유율은 출시 이후 급격히 줄어들고 있는 상황임. 대성미생물의 쉘코 피그백은 국내 회사 중 최대 점유율을 보이고 있으나 다국적 기업의 제품에 밀려 매우 어려운 상황임. 또한 **2013년 8월부터 수의사 처방제를 시행하게 되어있어 제품 효과 및 마케팅 능력이 뛰어난 다국적 기업제품이 시장 경쟁력을 더욱 강화 될 수밖에 없는 상황임.**

그러므로 최근 유행하는 돼지 쉘코 바이러스에 대한 축산농가의 피해를 줄여주며, 국내동물약품회사 제품의 백신 시장 점유율을 획기적으로 높일 수 있는 유일한 방안은 제품의 가격 경쟁력뿐 아니라 현재 시장 1위 **다국적 기업 백신 제품에 견주어 차별화된 우수한 품질의 백신 개발**이 가장 중요 하며 또한 **이를 효과적으로 검증하고 홍보 할 수 있는 기술도 동시에 개발**되어야 양돈 수의사를 설득하고 가장 많은 처방을 받는 백신이 될 수 있을 것임.

이러한 상황에서 본 연구과제에서 개발된 쉘코 바이러스 다가 백신인 **쉘코 멀티백+(시험백신2)**은 기존 다국적기업 제품이 단일 유전형 백신인 반면 최근 야외에서 분리되는 쉘코 바이러스를 효과적으로 예방할 수 있는 **다양한 항원형을 포함하는 항원 맞춤형 다가 백신**이라는 장점 뿐 아니라 기존 백신의 월등한 항원량을 포함한 백신의 생산 기술을 확보함으로써 제품의 효능 뿐 아니라 가격 경쟁력도 확보할 수 있는 제품이 될 것임. 2013년 종독에 대한 기술을 참여기업인 (주)대성미생물연구소에 이전하였으며, 2014년 의약품 품목허가 신청을 통해 국내 시장을 90%이상을 차지하고 있는 수입제품으로부터 쉘코 백신시장을 되찾아 올 것임.

표. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

| 항 목 | 산업화 기준 | | | | | |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | 1차년도 | 2차년도 | 3차년도 | 4차년도 | 5차년도 | 계 |
| 직접 경제효과 | 3,000 | 5,000 | 10,000 | 15,000 | 20,000 | 53,000 |
| 경제적 파급효과 | 5,000 | 10,000 | 20,000 | 30,000 | 40,000 | 105,000 |
| 부가가치 창출액 | | 2,000 | 3,000 | 5,000 | 10,000 | 20,000 |
| 합 계 | 8,000 | 17,000 | 33,000 | 50,000 | 70,000 | 178,000 |

- ※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- ※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

(가) 특허

- ① PCV2 회피항원에 특이 재조합 단백질을 개발하여 다음의 특허명으로 국내특허 및 PCT출원 하였음.
 특허명: PCV2에 특이적인 단일클론항체 및 이를 이용한 PMWS의 진단 방법{PCV2-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR DIAGNOSING PMWS USING THE SAME}
 출원번호: 10-2014-0142442
- ② PCV2백신관련 특허는 야외 임상시험에 의한 결과가 정리되는 대로 6개월 이내에 출원할 예정임.
 특허명: 고증식성 키메라 돼지췌코바이러스(PCV2) 및 이를 이용한 다가 백신

(나) 논문

: PCV2 진단 관련 1건, PCV2 백신관련 1건 투고 예정임.

“A recombinant monoclonal antibody specific for PCV2 decoy epitope and it’s use in the diagnosis of PCV2” 논문명으로 투고 예정.

“The different humoral immune response according to PCV2 antigen types in vaccinated animals” 논문명으로 투고 예정.

| 구분 | 특허 | | 신품종 | | | | 유전자원 등록 | 논문 | | 기타 |
|----|-------|----|------------|--------------------|------|----|------------|------|------|----|
| | 출원 | 등록 | 품종 명칭등록 | 품종생산 수입판매 신고 | 품종보호 | | | SCI | 비SCI | |
| | | | | | 출원 | 등록 | | | | |
| 목표 | 2 | 1 | | | | | 3 | 2 | | |
| 실적 | 1(1)* | | | | | | 7 | (2)* | | |

*6개월 이내 실적 발생 예정

| 구분 | 기술실시 (이전) | 상품화 | 정책자료 | 교육지도 | 언론홍보 | 기타 |
|----|--------------|-----|------|-------|-------|----|
| 목표 | 2건 | 2건 | | 1건 이상 | 1건 이상 | |
| 실적 | 2건 | (2) | | | | |

기술이전 2건 :1. 고증식성 PCV2 키메라 바이러스 4종.

2. PCV2a, PCV2b, PCV2d ORF2발현 baculovirus발현 기술.

(다) 유전자원 등록

총 7건으로 고증식성 키메라 PCV2 바이러스 4건 및 PCV2 VLP 생산을 위한 codon 최적화된 PCV2 ORF2유전자 3종.

LOCUS BP-PCV2a-1 1768 bp DNA circular 13-OCT-2014
 DEFINITION Porcine circovirus type 2 strain BP-PCV2a-1.
 ACCESSION KM924364

LOCUS BP-PCV2a-1 714 bp DNA linear 14-OCT-2014
 DEFINITION Porcine circovirus type 2 strain BP-PCV2a-1.
 ACCESSION KM924365

LOCUS BP-PCV2a-2 1768 bp DNA circular 13-OCT-2014
 DEFINITION Porcine circovirus type 2 strain.
 ACCESSION KM924366

LOCUS BP-PCV2b 1768 bp DNA linear 14-OCT-2014
 DEFINITION Porcine circovirus type 2 strain BP-PCV2b.
 ACCESSION KM924367

LOCUS BP-PCV2b 714 bp DNA linear 14-OCT-2014
 DEFINITION Porcine circovirus type 2 strain BP-PCV2b.
 ACCESSION KM924368

LOCUS BP-PCV2d 1768 bp DNA linear 14-OCT-2014
 DEFINITION Porcine circovirus type 2 strain BP-PCV2d.
 ACCESSION KM924369

LOCUS BP-PCV2dm 717 bp DNA linear 14-OCT-2014
 DEFINITION Porcine circovirus type 2 strain BP-PCV2dm.
 ACCESSION KM924370

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

가. 쉐코바이러스의 새로운 유전형 바이러스(항원적 변이주의 출현)

① Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging geno-types in China. *Virology Journal* 2010, 7:273 : 2004-2008년 사이에 PMWS 임상 증상을 보이는 돼지에서 분리된 샘플에서 PCV2로 진단된 바이러스들의 전체 염기 서열분석결과 기존에 분리되던 PCV2a, PCV2b와 구별되는 항원적 변이주 PCV2d 유전형이 분리됨.

② Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J. Virol.* 2012, 86(22):12469

: PCV2a-1 및 PCV2b 유전형 외에도 2012년 부터는 기존 PCV2a유전형으로 제작한 백신으로는 방어가 어려운 것으로도 알려진 항원적 변이주, 즉 mutant PCV2b(mPCV2b) 혹은 PCV2d 로 불리는 유전형들이 출현함.

나. 유전형에 따른 PCV2 백신효과 시험

① Porcine circovirus type 2(PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* (2008)26, 1063—1071.

: 2a-2type으로 백신하고 2a-2 type 2종류와 2b type 2종류 총 4개의 PCV2 바이러스를 공격 접종하고 20일 이후 혈청과 비강 및 분변에서의 바이러스 검출율로 방어 효능을 측정. 현재 사용 중인 PCV2a-2 type백신은 같은 type에는 효과적이거나 다른 type PCV2에 대해서는 비강과 분변 내에 공격 바이러스가 더 많이 검출 되는 등 그 효과가 더 떨어짐을 확인.

② Differential Effects of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccination on PCV2 Genotypes at Japanese Pig Farms. *J. Vet. Med. Sci.* 72(1): 35-41, 2010.

: PCV 2a-2백신을 접종한 후 2a-1, 2a-2, 2b등 3개 바이러스 type별 방어 효능을 평균 폐사 감소율로 평가. 그 결과 PCV2a-2백신 사용 후, PCV2a-2와 PCV2b type 발생 농장에서는 약 50% 정도의 폐사가 감소하여 상당한 경제적 효과가 있었으나, PCV2a-1 발생 농장에서는 백신 사용 전 후에 약 폐사율 감소가 거의 나타나지 않아 PCV2 백신은 유전형에 따라 백신의 효과가 다름을 보임.

다. 항원 및 항체의 질을 평가 할 수 있는 진단 법 개발

PCV2백신을 개발하고자 할 때 PCV2에 대한 중화항체는 높이 형성되고 항 CP(169~180) 항체는 잘 형성되지 않도록 PCV2 백신항원에 CP(169~180)잔기가 외부로 노출되지 않도록 VLP가 잘 형성된 항원원인지 확인할 수 있는 검출 기술이 필요함

① Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011 18,749-18,757.

: 항원 결정부[CP(169~180)]는 VLP 구조에서는 안쪽에 묻혀있어 밖으로 노출되지 않아 항체의 접근이 어려워 바이러스를 중화항체와는 관계가 낮음.

② Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2). J Virol. 2012 86(24)13508~13514.

: Baculovirus에서 발현된 CP로 만든 PCV2 VLP를 면역시킨 경우는 높은 중화항체가 만들어지는 반면 항 CP(169~180) 항체는 잘 만들어지지 않으나, CP 단량체를 면역한 경우 혹은 PCV2에 감염되어 PMWS 상태의 돼지들에서는 중화항체는 낮게 형성되는 반면 항 CP(169~180) 항체가 높게 만들어지는 경향을 보이므로 CP(169~180) 항원결정부는 면역학적인 회피(decoy)역할을 하는 것으로 추정됨.

③ Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2. Vet J. 2014, 201(3)429-432.

: IPMA(Immunoperoxidase monolayer assay) 및 PCV2 바이러스 입자 및 재조합 CP를 이용한 ELISA법을 통해 PCV2의 항체검출이 가능함.

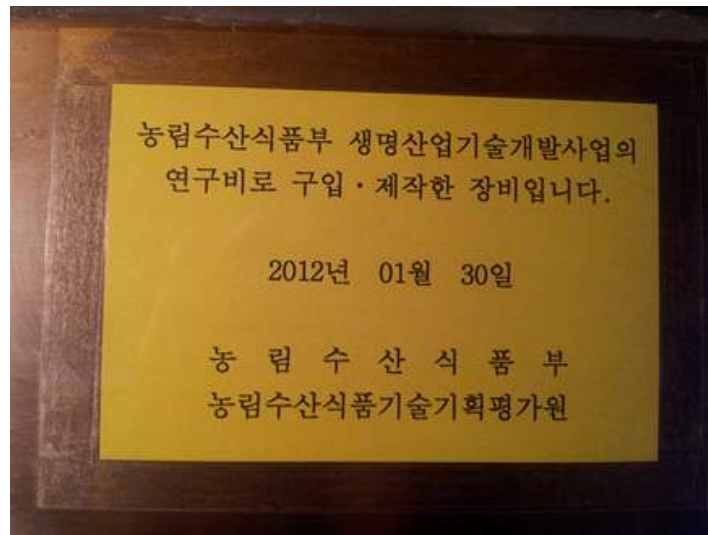
④ Antibody responses following vaccination versus infection in a porcine circovirus-type 2 (PCV2) disease model show distinct differences in virus neutralization and epitope recognition. Vaccine 2012(30) 4079~4085.

: PCV2 VLP백신 접종된 돼지는 PCV2의 복제가 억제되며 높은 중화항체를 보이는 반면, PCV2에 감염되어 질병으로 진행된 돼지에서는 PCV2를 중화하지 못하는 항체 특히 CP의 C-말단에 대한 항체의 역가가 높이 올라가므로 PCV2에 대한 단순 항체가 만으로는 PCV2의 정확한 진단이 어려움.

제 7 장 연구시설·장비 현황

제1협동기관(대성미생물연구소) 구입 연구기자재

1차년도 구입 연구기자재



품 명 : Mini Pig Isolator(1) 구입일자 : 2012. 01. 30
구입가격 : 24,000,000원 구입처 : (주)쓰리샤인(TEL : 042-933-3361)
사용목적 : 미니 피그를 타 미생물의 감염없이 무균적으로 사육하는 기기

2차년도 구입 연구기자재



품 명 : Mini Pig Isolator(2) 구입일자 : 2013. 03. 19
구입가격 : 20,000,000원 구 입 처 : (주)쓰리샤인(TEL : 042-933-3361)
사용목적 : 미니 피그를 타 미생물의 감염없이 무균적으로 사육하는 기기

3차년도 구입 연구기자재



품 명 : Homogenizer 구입일자 : 2013. 12. 09
구입가격 : 5,200,000원 구 입 처 : (주)에스솔루션(TEL : 032-831-2611)
사용목적 : 생산된 항원과 Adjuvant를 균질하게 혼합하여 백신을 제조하는 기기

제 8 장 참고문헌

Fort M. et al, Porcine circovirus type 2(PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins, *Vaccine* (2008)26, 1063~1071.

Gillespie et al, Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease, *J Vet Intern Med*, 2009,23,1151-6.

Guo L.J. et al, Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal* 2010, 7:273.

Pileri E. et al, Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2. *Vet J.* 2014, 201(3)429-432.

Takahagi Y. et al, Differential Effects of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccination on PCV2 Genotypes at Japanese Pig Farms, *J. Vet. Med. Sci.* 72(1): 35–41, 2010.

Trible BR. et al, Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2, *J Virol.* 2012 86(24)13508~14.

Trible BR. et al, Antibody responses following vaccination versus infection in a porcine circovirus-type 2 (PCV2) disease model show distinct differences in virus neutralization and epitope recognition., *Vaccine* 2012(30) 4079~85

Trible BR. et al, Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011 18,749–18,757.

Xiao CT. et al., Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States, *J Virol* 2012, 86(22); 12469

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.