

122004-2

고증식성
G2b형
PEDV
attenuated
strain을
이용한
면역증강
경구용
PED
생백신
제품화

최
종
보
고
서

2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

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

발간등록번호

11-1543000-004644-01

고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화

2024. 06. 18.

주관연구기관 / (주)코미팜
공동연구기관 / 전북대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고증식성 G2b형 PEDV 약독화 주를 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화”(개발기간 : 2020. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 18.

주관연구기관명 : (주)코미팜 대표이사 문성철 (인)
공동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 손정민 (인)

주관연구책임자 : (주)코미팜 한장혁
공동연구책임자 : 전북대학교 탁동섭

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

최종보고서										보안등급		
										일반[■], 보안[]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		가축질병대응기술고도화 지원사업			
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원					내역사업명 (해당 시 작성)		-			
공고번호		농축 2022-34호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-		122004-2			
					연구개발과제번호							
기술분류	국가과학기술 표준분류		LB0710	100%								
	농림식품과학기술분류		RB0201	100%								
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문										
		영문										
연구개발과제명		국문		고중식성 G2b형 PED attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화								
		영문		Commercialization of Immune-enhancing live PED vaccine for oral use using highly proliferative G2b PED attenuated strain								
주관연구개발기관		기관명		(주)코미팜		사업자등록번호		133-81-23355				
		주소		(15094) 경기도 시흥시 경제로 17		법인등록번호		110111-0134372				
연구책임자		성명		한장혁		직위		상무				
		연락처		직장전화		휴대전화						
				전자우편		국가연구자번호						
연구개발기간		전체		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)								
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2022. 04. 01. - 2022. 12. 31.(9개월)						
		2단계		2023. 01. 01. - 2023. 12. 31.(12개월)								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원		기관부담		그 외 기관 등의 지원금		합계			연구개발 외 지원금	
		연구개발비		연구개발비		지방자치단체 기타()						
		현금		현금		현물		현금		현물		합계
총계		700,000		10,000		165,000		0		0		710,000
1단계		1년차		300,000		0		75,000		0		300,000
		2년차		400,000		10,000		90,000		0		410,000
												500,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고
												역할
												기관유형
공동연구개발기관		전북대학교 산학협력단		탁동섭		교수						공동 대학
연구개발담당자 실무담당자		성명		이수진		직위				과장		
		연락처		직장전화		휴대전화		국가연구자번호				

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

2024 년 06 월 18 일

연구책임자: 한 장 혁 (인)

주관연구개발기관의 장: (주) 코미팜 (직인)

공동연구개발기관의 장: 전북대학교 산학협력단 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술 고도화지원사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
내역사업명 (해당 시 작성)		-		연구개발과제번호		122004-2	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0170	100 %				
	농림식품 과학기술분류	RB0201	100 %				
연구개발과제명		고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화					
전체 연구개발기간		2022.04.01. ~ 2023.12.31. (21개월)					
총 연구개발비		총 875,000 천원 (정부지원연구개발비: 700,000 천원, 기관부담연구개발비 : 175,000 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[V] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(6) 종료시점 목표(8)	
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제작 및 최적화 ■ 야외 임상시험을 통한 면역증강 경구용 PED 생백신의 안전성 및 효능 평가 ■ 면역증강 경구용 PED 생백신의 유효기간 확인 ■ 면역증강 경구용 PED 생백신과 상용화 백신과의 효능 비교 평가 ■ 면역증강 경구용 PED 생백신을 포함하는 최적의 백신 면역프로그램 구축 ■ 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화를 위한 품목허가서류 제출 					
	전체 내용	<ol style="list-style-type: none"> 1. 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 시제품 제작과 자돈 면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ◎ 생체분자 발현기술 적용 Fc 백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 항원 함량별 3 Lot (Lot 당 5 dose x 5 vial) ◎ 면역증강제 포함 경구용 PED 생백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 항원 함량별 3 Lot (Lot 당 5 dose x 5 vial) ◎ 면역증강 경구용 PED 생백신 2종에 대한 자돈 면역원성 평가 2. 면역증강 경구용 PED 생백신의 최소면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ◎ 항원 함량별 3 Lot 시제품에 대한 항체음성 모든 최소면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 백신 접종 모돈에 대한 중화항체가 및 IgA 항체가 확인 (혈액, 초유) - 5일령 포유자돈에 대한 공격접종 방어능 평가 (생존율, 증체량, 임상증상 및 부검 소견 확인 통해 방어유무 평가) - 10LD₅₀ 농도의 PEDV 야외 강독주를 효과적으로 방어할 수 있는 최소 항원함량 확인 3. 야외 임상시험을 위한 연속 3 Lot 백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> ◎ 최소면역원성 결과에 근거하여 백신의 최종 조성 확립 ◎ 연속 3 Lot 백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 형태 : 동결건조 백신 (면역증강제 등 포함한 희석액 별도) - 수량 : Lot 당 5 dose x 100 vial 4. 연속 3 Lot 백신 시제품에 대한 장기보존성(안정성) 평가 <ul style="list-style-type: none"> ◎ 제조직후, 제조 후 3개월, 6개월, 9개월 및 12개월에 대한 안정성 평가 ◎ 물리화학적 성상, 안전성, 면역원성 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 특성, pH, 진공도, 함유도, 미입바이러스, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 실험동물 및 목적동물 안전성, 자돈 면역원성 포함 5. 면역증강 경구용 PED 생백신에 대한 임상시험 신청 및 3개 농장 야외 임상시험 <ul style="list-style-type: none"> ◎ 임상시험을 위한 3개 농장 계약 체결 ◎ 임상시험 신청서 제출 및 보완 사항 대응 (허가기관 : 농림축산검역본부) 					

	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 3개 농장에 대한 야외 임상시험 <ul style="list-style-type: none"> - 과용량 접종에 대한 안전성 (임상증상 유무, 분만성적 등 확인) - 규정용량 접종에 대한 효능 (항체형성능 및 지속능, 자돈이행항체가 및 유지기간 등 확인) 6. 면역증강 경구용 PED 생백신과 상용화 경구용 PED 생백신의 효능 비교평가 <ul style="list-style-type: none"> - 상용화된 경구용 PED 생백신 1종 선정 (매출액 기준) - 임신모돈을 대상으로 한 안전성 및 효능 비교 평가 7. 면역증강 경구용 PED 생백신을 활용한 돼지유행성 설사병 백신 접종프로그램 평가 <ul style="list-style-type: none"> - PED 근육용 생백신, PED 경구용 생백신, PED 근육용 불활화 백신을 활용한 최적의 백신 면역프로그램 구축 - 후보돈을 대상으로 한 면역원성 평가 8. 면역증강 경구용 PED 생백신의 품목허가 신청 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 허가를 위한 허가서류 신청서 작성 및 제출 (허가기관 : 농림축산검역본부) - 해외 등록을 위한 수출용 허가 확보
--	---

연구개발성과	[정성적 성과]
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 전략 확보 ○ 면역증강 경구용 PED 생백신에 대한 임상시험과 제품화 ○ PED 백신에 대한 최적의 백신 면역프로그램 구축
	[정량적 성과]

성과명	성과	성과명	성과
제품화(시제품 제작)	1건	제품화(허가 신청, 내수)	0건
제품화(허가 승인, 수출)	1건	고용창출	2건
학술발표	2건	홍보전시	2건
SCI 논문	1건	기술이전	1건
유전자원 기탁	1건	기술이전 비용 (2024년 예정)	10백만원

1. 본 연구를 통해 신개념의 PED 경구용 생백신을 개발하고, 궁극적으로는 돼지유행성설사병을 제어할 수 있는 효과적인 백신접종 프로그램을 제시함.

2. 연구수행을 통해 제품화 2건 (시제품 제작, 해외 수출용 허가확보), 기술이전 1건 (실시료 10백만원, 2024년 예정), 고용창출 2건, SCI 논문 1건, 학술발표 2건, 홍보전시 2건의 연구개발성과가 있었음.

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ● 돼지유행성설사병에 대한 차세대 경구용 생백신 제조 기술 확보 ● 참여기업(주관연구기관)을 통한 면역증강 경구용 PED 생백신의 제품화 ● 돼지유행성설사병에 대한 효과적인 백신 개발 및 접종 프로그램 구축을 통해 국내 대유행 상황에 대한 억제력 강화 ● 국내 돼지유행성설사병백신 산업 시장 확대 및 수입 대체 효과 ● 태국, 베트남 등 돼지유행성설사병 백신을 사용하는 동남아 국가로의 수출 확대
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유: 최종보고서 상의 주요 연구내용이 제품화 과정에서 기술자료로 활용될 예정이며, 해당 내용이 공개될 시 경쟁사로 기술 유출이 우려됨에 따라 비공개 필요

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	1								1			
국문핵심어 (5개 이내)	돼지유행성 설사병		약독화 생백신		경구 투여		면역증강		제품화			
영문핵심어 (5개 이내)	PED		Live attenuated vaccine		Oral administration		Immune-enhancing		Commercialization			

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	5
1.1. 연구개발의 필요성	5
1.2. 선행연구 결과	12
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	
2.1. 연구개발 과제의 목표	45
2.2. 연구개발 과제의 수행 내용	47
2.2.1. 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 시제품 제작 및 자돈 면역원성 평가	47
2.2.2. 면역증강제 포함 경구용 PED 생백신 시제품 2차 제작 및 자돈 면역원성 평가	55
2.2.3. 면역증강 경구용 PED 생백신 3차 시제품 제작 및 최소면역원성 평가	63
2.2.4. 연속 3 Lot 시제품에 대한 항체음성 모돈 최소면역원성 평가(근육)	75
2.2.5. 항체음성 자돈을 이용한 다양한 접종 프로그램의 유효성 평가.	82
2.2.6. 항체음성 자돈을 이용한 다양한 접종 프로그램의 유효성 평가 2차(부형제포함)	89
2.2.7. 항체음성 자돈을 이용한 다양한 접종 프로그램의 유효성 평가(모돈)	95
2.2.8. 야외 임상시험을 위한 연속 3 Lot 백신 시제품 제작	97
2.2.9. 연속 3 Lot 백신 시제품에 대한 시험성적 확인	99
2.2.10. 연속 3 Lot 백신 시제품을 이용한 야외임상시험 및 품목허가 계획	101
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	104
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	108
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	109
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	109
별첨 자료 (참고 문헌 등)	110

1. 연구개발과제의 개요

1.1. 연구개발의 필요성

1.1.1. 돼지유행성설사병 (Porcine epidemic diarrhea ; PED)

- 돼지유행성설사병의 병원체는 Porcine epidemic diarrhea virus (이하 PEDV)로 전염성위장염의 원인 바이러스와 형태가 같은 코로나바이러스과에 속하는 바이러스이다. 1971년 영국에서 최초로 발생한 이후 1970년대 후반에는 벨기에를 시작으로 체코, 헝가리 등지에서 보고되었다. 때로는 돼지 유행성설사 증후군이라고도 하며, 코로나바이러스로 인한 돼지의 전염성 바이러스성 질병으로 수양성 설사와 체중 감소가 특징이다. 거의 모든 연령대의 돼지에 영향을 미치지만, 신생아 새끼돼지에서 가장 심하게 증상이 나타나 사망률과 이환율이 거의 100%에 이르고, 나이가 들면서 사망률과 이환율이 줄어든다. 거의 대변과 구강 경로로 전염이 이루어지며 식욕부진, 구토, 설사, 탈수 등 돼지의 위장염과 임상적으로 비슷한 특징을 가진다.
- 설사 증상의 치료 및 2차 감염의 조절 이외에는 특별한 치료 방법은 없고, 대부분의 성장 돼지는 2차 감염이 발생하지 않는 한 7~10일 이내에 치료 없이 회복된다. 직접 감염은 바이러스로 오염된 대변을 섭취함으로써 발생하며, 간접 감염은 사료 트럭, 서비스 차량, 인력, 장비 또는 기타 유형의 대변에 오염된 물건에 의해 발생한다. 오염된 돼지수송용 차량이 이 질병을 퍼뜨리는 중요한 위험 요인으로 확인되며, 잠복기는 1~4일 사이로 추산되고 감염 기간은 임상 징후가 처음 발생한 후 6~35일 동안 지속할 수 있다.
- 초유를 통한 모체항체가 신생아 감염을 막는 중요한 역할을 하며, 건강한 돈 군의 입식, 차량의 철저한 소독, 폐사체의 적절한 처리가 감염을 막는 데 중요하다.

1.1.2. 돼지유행성설사병의 국내 발생과 피해

- 우리나라에서 PED는 1992년에 최초로 발생하였으며, 2000년 1월 충청북도 제천에서 발생한 PED를 공식적인 통계로 처리한 이후 2018년 11월까지 총 1,043건에 236,467두의 돼지가 감염되었다. 2003년과 2014년에 걸쳐 큰 유행이 있었으며, 2000년 이후 2018년에 가장 많은 PED 건수를 기록하고 있다. (그림 1)
- 2003년의 PED 유행은 국내로 돼지유행성설사병 바이러스가 처음으로 유입되어 양돈 산업에 큰 피해를 준 것이며, 2014년의 유행은 변이된 PEDV가 미국이나 중국에서 재차 유입되어 유행한 것이다. 실제로, 같은 시기에 미국, 중국, 한국에서 유행한 PED 바이러스의 유전자 정보를 분석해보면 98% 이상 일치하는 것을 확인할 수 있다. PED는 특히 겨울철에 발생 보고가 많은데, 이는 PEDV가 추운 겨울철에 오랫동안 야외에서 생존하기 때문으로 여겨진다. (그림 2)

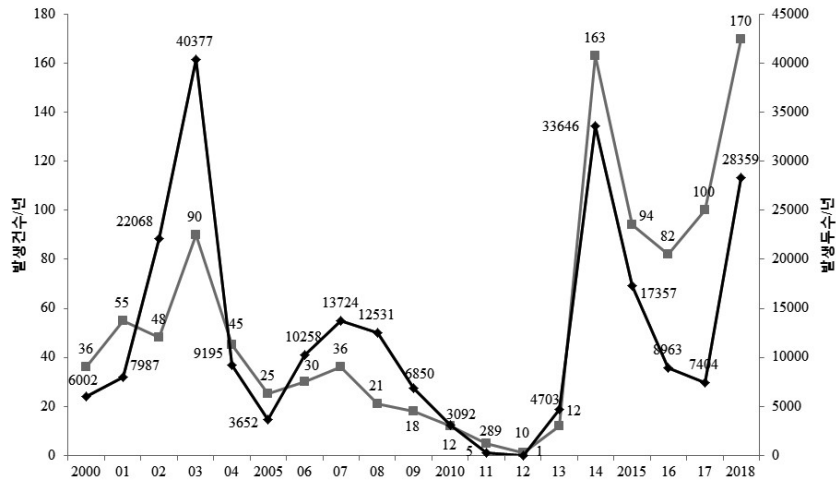


그림 1. 2000년 이후 국내 돼지유행성설사병 발생건수와 발생두수 (농림축산검역본부, KAHIS 제공)

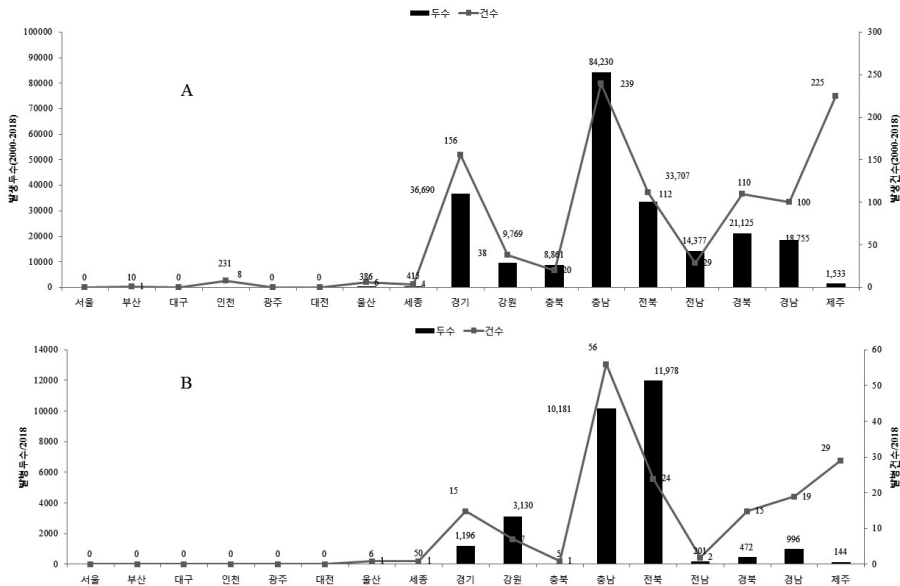


그림 2. 2000년 이후 국내 돼지유행성설사병의 월별 감염두수 분포 (농림축산검역본부, KAHIS 제공)

○ 2000년 이후 지역적 PED 발생을 살펴보면 충남이 239건으로 가장 많고, 제주 (225건), 경기 (156건), 전북 (112건), 경북 (110건) 순서로 이어진다. 발생 건수와 별개로 총 발병 두수에 대한 통계는 마찬가지로 충남이 84,230두로 가장 많았고, 경기 (36,690두), 전북 (33,707두), 경북 (21,125두), 경남 (18,755두) 순서였으며, 제주도의 경우, 사육 규모가 영세하여 발생 건수 대비 발병 두수는 1,533건으로 적었다. (그림 3)

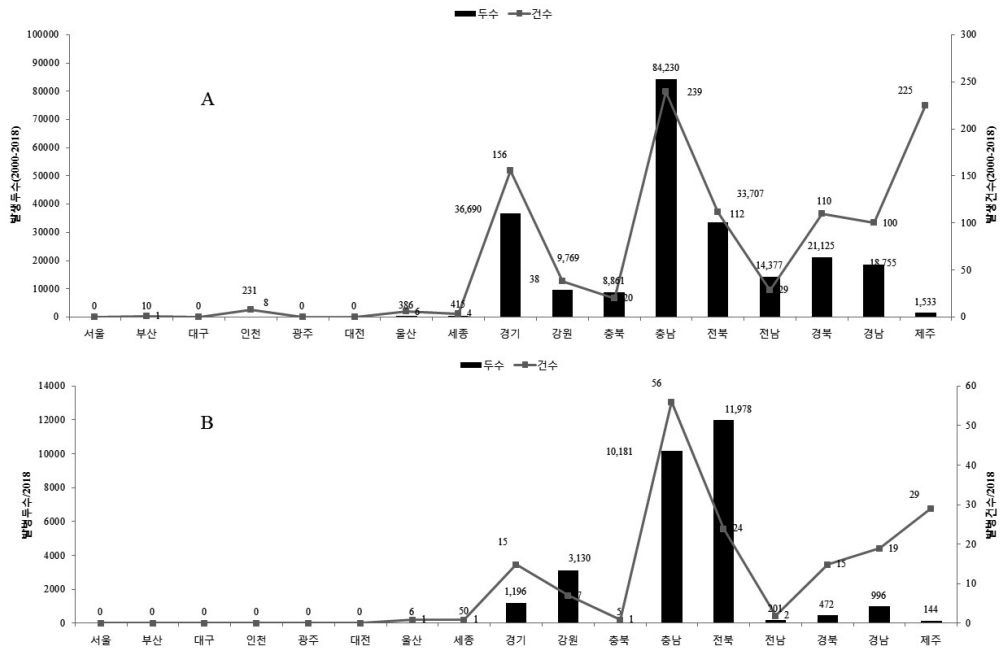


그림 3. 2000년 이후 국내 돼지유행성설사병의 지역적 발생건수(A) 및 2018년 발생건수(B) (농림축산검역본부, KAHIS 제공)

1.1.3. 돼지유행성설사병 바이러스의 특징

○ 최근 유행하고 있는 PEDV를 분리하여 세포에서 증식시킨 후 2~5일령의 자돈에 경구로 투여하면 LD₅₀값이 10^{2.0}TCID₅₀/두 전후로 형성될 정도로 매우 강한 병원성을 가지고 있으며 감염된 자돈은 심한 수양성 설사를 일으키면서 대부분 7일 이내에 모두 폐사한다. 해당 자돈들을 부검해보면, 위나 장이 심하게 부풀어 있고, (그림 4) 소장 상피 내 용모가 심하게 탈락하여 있는 것을 확인할 수 있다. (그림 5) 따라서 최근 유행하는 PEDV에 양돈 농가의 자돈이 감염되었을 때 강한 병원성을 나타내는 것으로 확인되었다.

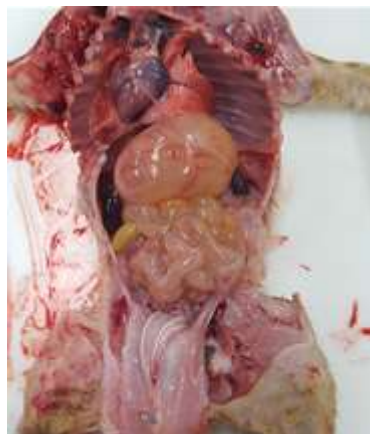


그림 4. PED 바이러스에 감염된 자돈의 부검 소견

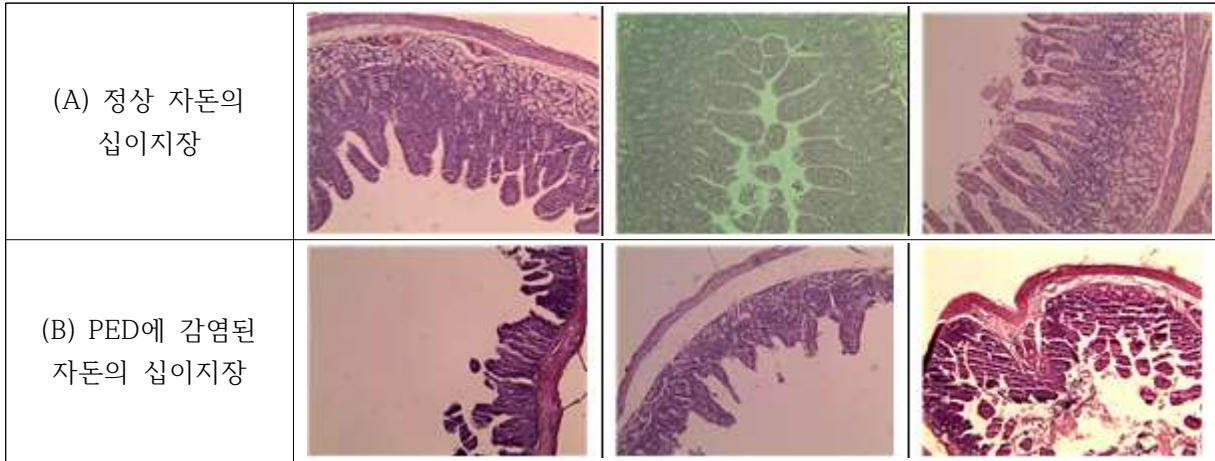


그림 5. PED 감염 유무에 따른 소장 조직 병변

- 이렇게 PED가 어린 자돈에 감염될 때 심한 설사를 나타낸 것처럼 육성돈도 PED에 감염되면 설사를 일으킨다. PED가 육성돈에 감염되면 약 15일간 설사를 하다가 멈추는데, 육성돈의 PED가 농장의 순환 감염을 일으키는 원인이 되기도 한다. 그리고 모돈이 PED에 감염되면 발열, 불식, 설사, 젖마름증으로 자돈에게 젖을 공급하지 않아 폐사율을 높인다.
- 국내에서 유행하는 PEDV 유전자 변이를 확인한 결과 2013년도 이전에 분리 보고된 PED는 G1군으로 분류되고, 2013년에 유입된 PEDV는 G2군으로 분류되고 있다. 2017년에 분리된 PED의 경우 변이된 PEDV로 분류되는 G2b군이 우점종을 나타내고 있으나, 2003년도에 유행한 PED와 유사한 유전자를 소유하는 G1b군이 일부 확인되고 있다. 이러한 유전자의 변이 정보를 기초하여 양돈농가는 PED 예방을 위한 PED 백신 접종프로그램을 전략적으로 수립할 필요가 있다. (그림 6)

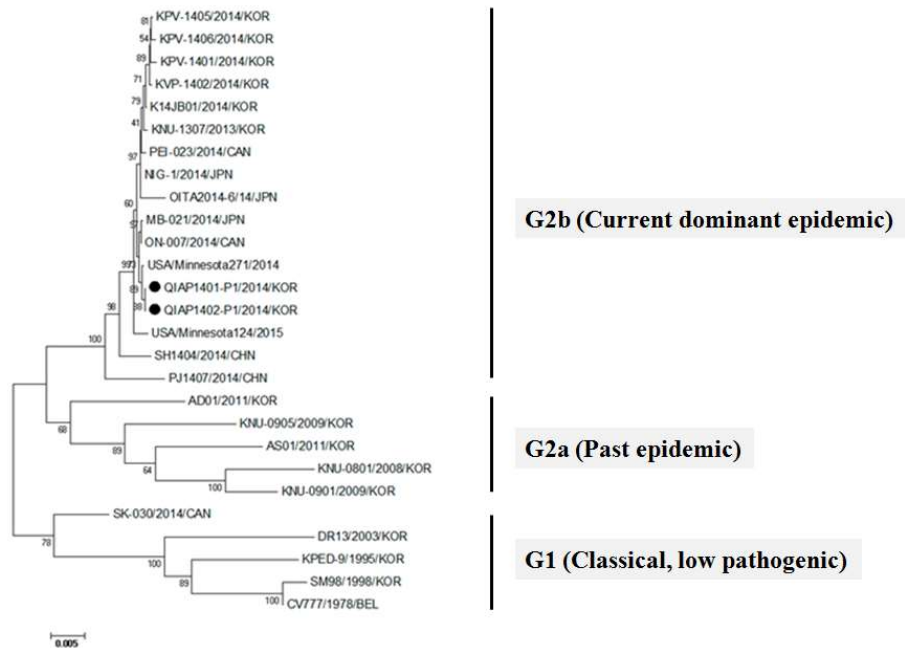


그림 6. 국내 유행 PED 바이러스의 phylogenetic analysis (Spike gene)

1.1.4. 돼지유행성설사병의 예방과 백신 접종프로그램 구축의 중요성

- 2020년 기준으로 돼지유행성설사병 예방 백신의 전체 시장 규모는 약 68억 원이며, 이 중 경구백신을 포함한 생독백신 시장은 12억 원으로 전체 시장 규모의 17.6% 수준이다. (동물용의약품 등 수입판매 실적, 한국동물약품협회 제공) 대부분의 양돈 농가에서 다양한 형태의 돼지유행성설사병 (이하 PED) 예방 백신을 사용하고 있지만, 백신에 대한 만족도는 높지 않다. 다만, 백신 접종을 통해 완전한 방어면역을 획득하지 못하더라도 바이러스 감염 시 PED 증상을 경감시켜 줄 수 있으므로 여전히 다양한 종류의 PED 백신들이 사용되고 있다. (그림 7)



그림 7. 국내 시판중인 돼지유행성설사병 예방백신 현황

- 일반적인 백신의 형태는 면역시키고자 하는 개체에 백신을 직접 접종하여 질병을 예방하는 것이나, PED와 같은 질병은 특히 어린 일령에서 피해가 크며, 자돈에 백신을 직접 접종할 경우 면역을 획득하기 전에 PEDV가 감염되어 용모 상피조직을 파괴하고, 감염 자돈을 폐사시키기 때문에 자돈에 직접 백신을 접종하지 않는다. 대신, 모돈에 백신을 접종하여 모돈의 초유를 통해 자돈에 항체를 전달하는 간접적인 방식을 사용한다. 따라서, 모돈에 어떤 백신을 어떤 방법으로 접종하느냐에 따라서 (백신 접종프로그램) 그 결과가 크게 달라질 수 있다.
- 시판 중인 PED 백신은 크게 약독화 생백신과 사독백신으로 나뉘며, 백신에 사용되는 strain 또한 다양하다. (그림 8) 각각의 백신은 자체적인 접종프로그램을 하고 있고, 대체로 임신 모돈에 2회 반복접종을 통해 면역을 형성 후 초유를 통해 자돈에게 이행 항체를 전달하는 기전을 가지고 있다. 보통 분만 4~5주 전에 1차 백신을 접종하고, 2~3주 후에 boosting 접종을 하게 되는데, 이 경우, 초유를 통해 전달된 중화항체가 PED에 취약한

3~4주령까지 최소 32배 이상은 유지되어야 PED로 인한 피해를 어느 정도 막을 수 있다. 또한, 백신 접종으로 IgA 항체를 얼마나 형성시키는지 PED 방어면역에 핵심이 된다.

백신 종류	PED 백신주	분리주	유전자형	생산 회사수
생백신	KPEDV-9	한국	G1a	5
	P-5V	일본	G1a	1
	DR13	한국	G1a	1
	SM98	한국	G1a	5
사백신	SM98	한국	G1a	5
	SM98-Fc	한국	G1a	1
	ISJ460651A13	미국	G2b	1
	QIAP1401	한국	G2b	4
	WGV-PED	한국	G2b	1

* 최근 G2b형 PEDV 생백신이 시판되어 판매 중이나, 현장 활용도는 아직 낮음

그림 8. 국내에서 사용 중인 PED 백신의 종류와 유전자형
(농림축산검역본부 바이러스질병과 제공)

○ 시판 중인 모든 백신이 상기 조건을 만족시키지는 못하며, 약독화 생백신의 경우에는 항체를 형성하고 지속시키는 능력이 부족하며, 사독 백신은 항체 형성능은 우수하지만, 세포성 면역 자극이 어렵고, 특히, IgA 항체 형성에 있어 단점이 있다. 또한, 백신의 종류, 백신 접종 모돈의 면역상태, 농장 환경 등에 따라 백신의 효과가 각기 다르게 나타날 수 있으므로 백신 접종프로그램을 정형화시키기 어렵고, 상황에 따라 유동적인 것이 대부분이다.

한 예로, 농림축산검역본부에서 시판 중인 백신을 대상으로 효능을 검사한 결과, 백신의 종류와 접종방법에 따라 자돈 생존율이 36~90%로 매우 큰 차이를 보였다. (그림 9)

Group	Vaccination program	Number of Piglets	Number survived	% Survived
1	Oral - Oral	11 heads	4 heads	36.4 %
2	Live - Live	11 heads	10 heads	90.9 %
3	Live - Killed - Killed	11 heads	9 heads	81.8 %
4	Killed - Killed	11 heads	9 heads	81.8 %
5	Artificial infection	11 heads	10 heads	90.9 %
6	Control	11 heads	2 heads	18.2 %

그림 9. 국내 시판중인 돼지유행성설사병 백신의 효능 평가 결과 (농림축산검역본부 제공)

○ 평가에 사용되는 백신의 종류와 실험 조건에 따라서 그 결과가 달라지지만, 대체로 생독 백신만 접종하거나 혹은 사독 백신만 접종한 그룹들에 비하여 생독 백신과 사독 백신을 병용 사용할 경우 항체 형성능과 지속능이 높게 나타나는 경향이 있으며, 농림축산검역본부에서도 이러한 백신 접종프로그램을 적극적으로 권장하고 있다. 그런데도 현재의 L-K-K (생독-사독-사독)와 같은 백신 접종프로그램이 소비자에게 100% 만족도를 주지는

못하며, 특히 반복적인 백신 접종으로 인한 농가의 경제적 부담은 이를 더욱 어렵게 한다. 따라서, 기존의 백신접종 프로그램을 좀 더 최적화시키기 위한 새로운 백신의 개발과 병용 투여 연구가 필요한 시점이다.

1.1.5. 효과적인 PED 백신 개발을 위한 핵심 기술

- (주)코미팜과 전북대학교 인수공통전염병연구소 탁동섭 교수 연구팀은 2020년 가축질병대응 기술개발사업에 공동으로 참여하여 (참여기간 : 2020.04.01.일~2021.12.31.일) 21개월의 연구 동안 국내 유행 G2b형 PEDV 분리 및 바이러스 약독화 전략을 구축한 바 있으며, 특히 담즙산 처리를 통한 고증식성 및 비병원성 PEDV attenuated strain을 개발하여 PEDV CKT-7_N strain이라 명명한 바 있다.
- 상기 바이러스에 대한 유전적, 분자생물학적 특성을 분석함과 동시에, 약독화 생백신 strain에 요구되는 안전성 및 병원성 복귀 (Virulence reversion test) 평가를 완료하였으며, 이를 토대로 백신 제조용 master seed bank를 구축한 바 있다. 특히, master seed virus의 병원성을 평가하는 과정에서 5회에 걸친 안전성 및 병원성 복귀 평가를 하여 해당 바이러스가 비병원성으로 약독화 생백신 strain에 적합함을 증명하였다.
- 효과적인 PED 백신 개발을 위하여 백신주의 면역원성을 높이는 것이 무엇보다 중요하다. 이를 위해, 일반적인 사독 백신의 경우, 백신의 항원 함량을 높이거나, 효과적인 면역증강제를 혼합 사용하는 방법을 택하고 있으며, 약독화 생백신의 경우에는 면역증강제의 사용보다 백신의 항원 함량을 높이는 것이 일반적이다. 다만, 백신주의 증식성 한계와 제조단가 문제 등이 현실적으로 풀어야 할 숙제이다.
- (주)코미팜에서는 생체분자발현기술이라는 특허기술을 보유하고 있으며, 상기에 언급된 방법 외에 백신 바이러스에 Fc 분자를 부착시킴으로써, 항원 함량 증가나 면역증강제의 추가 사용 없이도 면역증강 백신을 제조할 수 있는 기술을 이미 보유하고 있다. 해당 기술을 사용하여 돼지유행성설사병 사독 백신과 광견병 사독 백신을 이미 제품화한 경험이 있으며, (그림 10) 전북대학교 인수공통전염병연구소와 함께 참여한 2020년 가축 질병 대응 기술개발사업에서도 상기 기술을 적용한 경구용 PED 백신 개발 과제를 수행한 바 있다.



그림 10. 코미팜의 Fc 면역증강 백신

- 해당 과제 수행을 통해서, Fc 면역증강 경구용 생백신이 기존의 경구용 생백신과 비교하여 높은 면역원성이 있다는 것을 확인하였고, 효과적인 경구용 PED 생백신 개발을 위한 하나의 대안이 될 수 있음을 확인하였다. 다만, Fc 바이러스 제작 과정에서 master seed virus의 증식성이 10배 정도 낮아진다는 단점이 있었다. 반면, master seed virus 자체의 (PEDV CKT-7_N strain)의 증식성이 탁월하여서(ml 당 최대 $10^{8.5}$ TCID₅₀ 농도까지

증식) 기존 약독화 생백신에서 숙제였던 백신의 항원 함량을 높이는 데 부담이 없고, 경구용 PED 생백신이라는 특성을 고려하면, 면역증강제를 혼합하여 면역을 높이는 것도 가능하므로 상기와 같은 다양한 가능성을 염두에 두고 최적의 면역증강 효과를 유도하는 방법을 찾아본 과제를 통해 제품화를 진행하고자 한다. (현재 시판된 PED 생백신의 항원 함량은 백신 1 dose 당 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 수준으로 높지 않음)

1.2. 선행연구 결과

아래의 선행연구 결과는 주관연구기관 ((주)코미팜) 및 협동연구기관 (전북대학교 산학협력단)이 함께 수행한 농림축산식품부 가축 질병 대응 기술개발사업에서 (과제수행 기간 : 2020.04.01.~2022.12.31., 총 21개월, 연구개발과제번호 : 120089-2) 확보된 것이며, 이 결과를 토대로 본 사업에서 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화를 추진하고자 합니다.

1.2.1. 국내 유행 PEDV(G2b)를 이용한 경구 백신용 strain 선발

1.2.1.1. 국내 분리 PEDV (Genotype 2b)에 대한 특성 확인

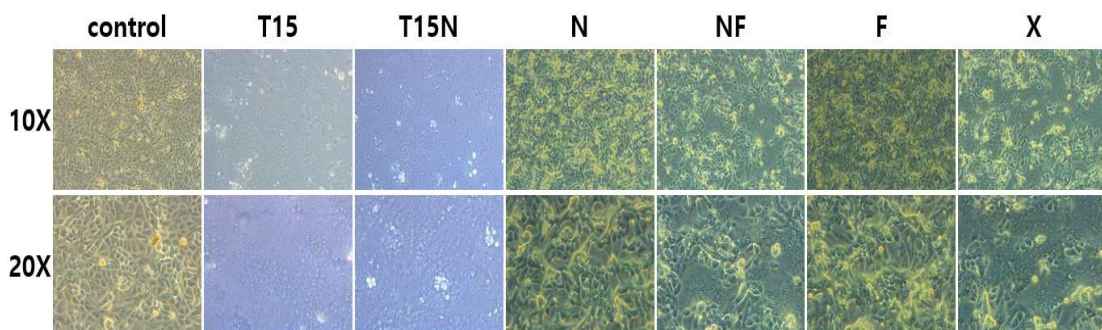
1) 국내 분리 PEDV 특성 분석

- 국내 양돈장에서 설사병으로 의뢰된 자돈의 장유제액으로부터 PEDV를 Vero cell을 이용하여 분리하였고, PEDV CKT-7 strain으로 명명한 후, 배양조건에 따른 6종의 약독화 백신 후보주를 확보함

표 1. 바이러스 약독화 전략(조건)

구분	첨가제	구분	첨가제
T15	Trypsin	NF	담즙산 + 혈청
T15N	Trypsin + 담즙산	F	혈청
N	담즙산	X	무처리군

- 분리된 바이러스에 대하여 Vero cell에서의 세포변성효과(CPE) 및 PEDV에 대한 특이 단클론 항체를 이용한 형광항체검사법을 통하여 모두 PEDV임을 확인함



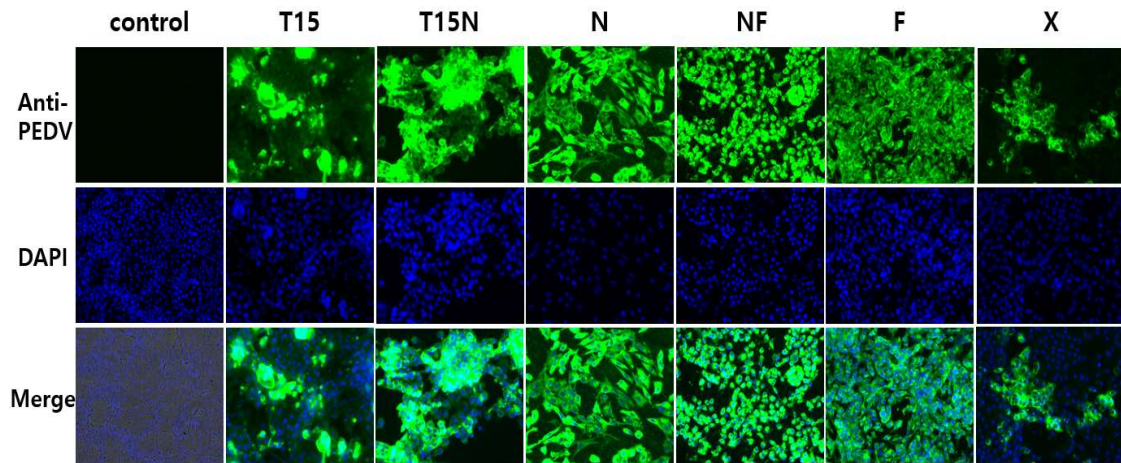


그림 11. 현미경 및 형광항체법을 이용한 세포변병효과 확인 결과

- 분리된 바이러스를 6가지 배양조건으로 총 150 계대씩 배양한 결과, 최소 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 이상의 고역가 바이러스를 확보함
- 바이러스 계대별로 역가를 측정한 결과 70대 계대까지 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 정도의 역가를 갖는 것으로 조사되었으나 지속적인 연속 계대를 통해 $10^{8.5}$ TCID₅₀/ml의 매우 우수한 증식성을 보인 PEDV를 확보할 수 있었음
- 특히, 담즙산을 처리한 그룹과, 트립신과 담즙산을 동시에 처리한 그룹의 경우, 150계대 후 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 이상의 고역가를 유지하고 있어, 경구백신용 strain 후보주로 높은 가능성을 보였다.

표 2. passage 150 바이러스 역가측정 결과 (\log_{10} TCID₅₀/ml)

Strains	T15	T15N	N	NF	F	X
Titer	8.3 ± 0.14	8.5 ± 0	8.5 ± 0.25	7.08 ± 0.14	7.17 ± 0.14	7.42 ± 0.52

표 3. 계대별 바이러스 역가측정 결과 ($\log_{10}TCID_{50}/ml$)

T15		T15N		N		NF		F		X	
Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer
10	3.5	10 (2)	4.25								
20	4.75	20 (12)	5.75								
30	6.5	30 (22)	6								
40	6.25	40 (32)	5								
50	6.75	50 (42)	6.5								
60	6.75	60 (52)	6.75								
70	5.75	70 (62)	6	67 (7)	5.25						
80	7	80 (72)	5.5	71 (11)	5.5						
90	6.75	90 (82)	6.5	87 (27)	7.75						
100	7.5	100 (92)	6.25	100 (40)	8.5	100 (37)	7.5	100 (30)	7.75	100 (31)	6.75
110	7.25	110 (102)	7.5	110 (50)	8.25	110 (47)	7.5	110 (40)	7.5	110 (41)	7.5
120	8	120 (112)	7	120 (60)	8.5	120 (57)	7	120 (50)	7.5	120 (51)	6.75
130	7	130 (122)	7.5								
140		140 (132)									
150	7.75	150 (142)	8.25	150 (90)	8.5	150 (87)	7.08	150 (80)	7.17	150 (81)	7.42

1.2.1.2. 경구 백신 후보주 (High passage) 5종에 대한 계대별 유전자 특성 확인

1) 계대별 유전자 특성 분석

- 연속 150 계대 배양 결과, 바이러스 역가가 가장 낮았던 NF 그룹을 제외하고, 나머지 5종의 바이러스에 대하여 Spike gene에 대한 phylogenetic 분석을 한 결과, PEDV CKT-7 strain은 최근에 국내에서 유행하고 있는 G2b형 유전형으로 확인되었으며, 각각의 바이러스가 약독화 과정에서 S gene 상에 일부 유전자 변이가 있는 것으로 확인되었다. (그림 12)
- 서로 다른 약독화 방법을 적용한 5종의 PEDV에 대하여 S protein에 대한 multiple alignment를 수행한 결과, 바이러스 배양조건에 따라 spike 아미노산 서열의 일부가 변화됨을 확인하였으며, 이러한 아미노산의 변화가 PEDV의 병원성과 면역원성에 영향을 주었을 것으로 추측된다. (그림 13)

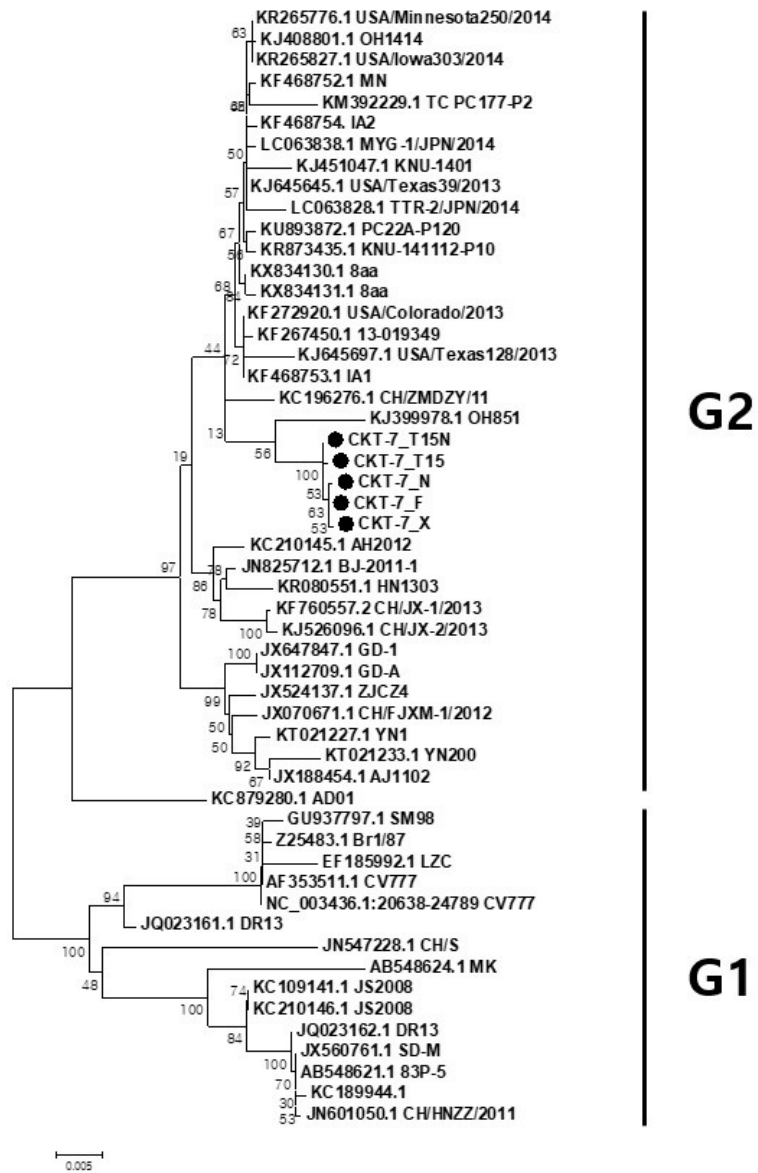


그림 12. phylogenetic tree

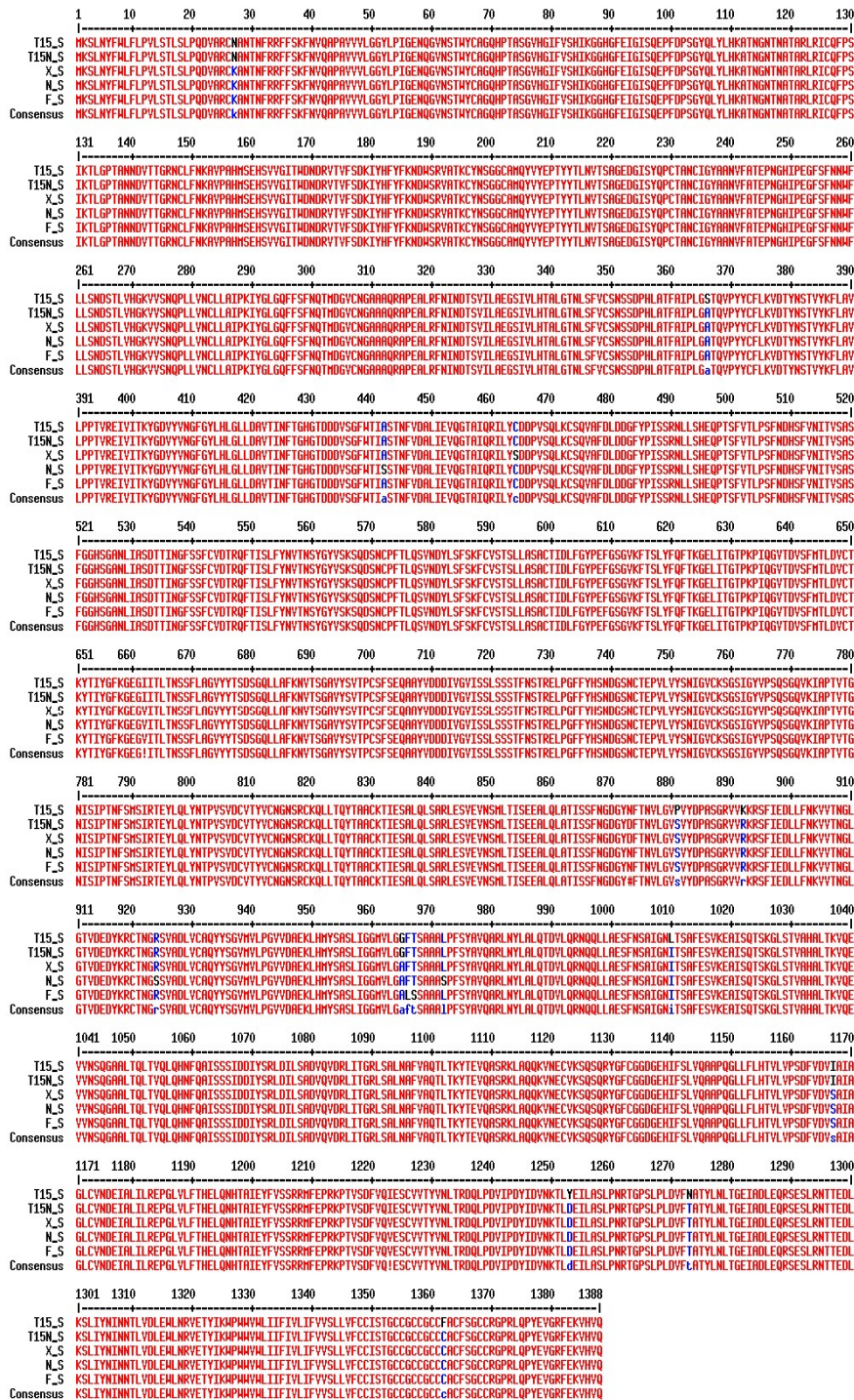


그림 13. spike protein의 아미노산 염기서열 alignment 결과

○ 이어서 5종의 PEDV 구조단백질의 (S, ORF3, E, M, N) nucleotide 및 아미노산 염기서열을 분석한 결과, 구조단백질을 구성하는 아미노산의 변화를 다수 관찰하였으며, spike protein을 포함한 구조단백질의 아미노산 변화가 바이러스 병원성 및 면역원성에 영향을 주었을 것으로 추측된다. (표 4)

표 4. 구조단백질의 nucleotide 및 아미노산 염기서열 변화

Gene	nucleotide position	amino-acid position	PEDV strains				
			T15	T15N	N	F	X
S	81	27	AAC(N)	AAC(N)	AAA(K)	AAA(K)	AAA(K)
	1096	366	TTC(S)	TGC(A)	TGC(A)	TGC(A)	TGC(A)
	1324	442	GCA(A)	GCA(A)	TCA(S)	GCA(A)	GCA(A)
	1390	464	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)	AGT(S)
	1984	662	ATC(I)	ATC(I)	GTC(V)	GTC(V)	GTC(V)
	2617	873	AAT(N)	GAT(D)	AAT(N)	AAT(N)	GAT(D)
	2641	881	CCT(P)	TCT(S)	TCT(S)	TCT(S)	TCT(S)
	2675	892	AAA(K)	AGA(R)	AGA(R)	AGA(R)	AGA(R)
	2770	924	CGC(R)	CGC(R)	AGC(S)	CGC(R)	CGC(R)
	2894	965	GGT(G)	GGT(G)	GCT(A)	GCT(A)	GCT(A)
	2898	966	TTT(F)	TTT(F)	TTT(F)	TTA(L)	TTT(F)
	2899	967	ACT(T)	ACT(T)	ACT(T)	TCT(S)	ACT(T)
	2915	972	TTG(L)	TTG(L)	TCG(S)	TTG(L)	TTG(L)
	3028	1010	TTA(L)	ATA(I)	ATA(I)	ATA(I)	ATA(I)
	3500	1167	ATT(I)	ATT(I)	AGT(S)	AGT(S)	AGT(S)
	3667	1123	ATT(I)	ATT(I)	GTT(V)	GTT(V)	GTT(V)
	3757	1253	TAT(Y)	GAT(D)	GAT(D)	GAT(D)	GAT(D)
	3818	1273	AAT(N)	ACT(T)	ACT(T)	ACT(T)	ACT(T)
	4085	1362	TTT(F)	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)
	ORF3	559-560	-	GTT(V)	GTT(V)	T-T(-)	GTT(V)
563		187	GAG(E)	GAG(E)	GAC(D)	GAG(E)	GAG(E)
571		190	GAT(D)	GAT(D)	TAT(Y)	TAT(Y)	TAT(Y)
590		196	GTC(V)	GTC(V)	GTC(V)	GAC(D)	GTC(V)
592-593		197	TTT(F)	TTT(F)	TTT(F)	AGT(S)	TTT(F)
607		202	ATT(I)	GTT(V)	ATT(I)	ATT(I)	ATT(I)
647-648		-	CT(-)	CAT(H)	GCT(A)	C-T(-)	GCT(A)
E	209	70	CCT(P)	CCT(P)	CTT(L)	CCT(P)	CTT(L)
	70	24	ATC(I)	TTC(F)	TTC(F)	TTC(F)	TTC(F)
M	571	191	TCT(S)	GCT(A)	TCT(S)	TCT(S)	TCT(S)
	623	208	GTT(V)	GCT(A)	GCT(A)	GCT(A)	GCT(A)
	647-648	-	CT(-)	CAT(H)	GCT(A)	C-T(-)	GCT(A)
	444	148	CGT(R)	CGA(R)	CGA(R)	CGT(R)	CGT(R)
N	447	149	AGC(S)	AGT(S)	AGT(S)	AGC(S)	AGC(S)

1.2.2. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 1차 안전성 평가 결과

1.2.2.1. 실험 방법

앞서, PEDV CKT-7_N strain (p150)의 병원성 복귀 실험 결과, 다른 PEDV에 의한 교차오

염이 의심되긴 했지만, 일부 접종 그룹과 동거돈에서 설사 증상 등이 확인됨에 따라, 백신 후보주를 좀 더 확실히 약독화 시키기 위하여 27회를 추가 계대배양하였고, 이를 통해 얻어진 PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 병원성 실험을 아래와 같이 수행하였다.

1) 실험그룹

표 5. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Number	비고
CKT-7_N (p177)	3	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /ml, 경구투여
비접종 대조군	3	-

2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, PEDV CKT-7_N (p177) 바이러스 경구접종 그룹 3마리 및 비접종 대조군 3마리씩 총 6마리를 공시하였다.

3) 바이러스 접종

바이러스 접종 그룹에 대하여 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 농도 이상으로 확인된 PEDV CKT-7_N (p177) 바이러스 1 ml씩을 경구로 접종 후, 10일간 관찰하였다.

4) 샘플링 및 조직병리학적 검사

바이러스 접종 후 10일 동안 임상증상(설사)을 관찰하였고, 매일 항문 swab을 실시하여 PCR법으로 바이러스 shedding 유무를 확인하였다. 실험 기간 종료 후, 부검하여 위장 병변을 확인하고, 십이지장, 공장 및 회장을 10% 포르말린에 고정하여 H&E 염색을 실시하였다.

1.2.2.2. 실험 결과

1) 임상증상 관찰 및 바이러스 shedding 확인 결과

표 6. 그룹별 임상증상 관찰결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무										
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
CKT-7_N (p177)	T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	C1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	C2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

	C3	N	N	N	폐사
--	----	---	---	---	----

* N : 이상없음, D : 설사

바이러스 접종 후 임상증상 관찰 결과, 백신 접종군은 시험 기간 내내 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었고, 비접종 대조군의 경우 3일째에 환경적 요인으로 1마리가 폐사되긴 하였지만, 나머지 2마리는 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다.

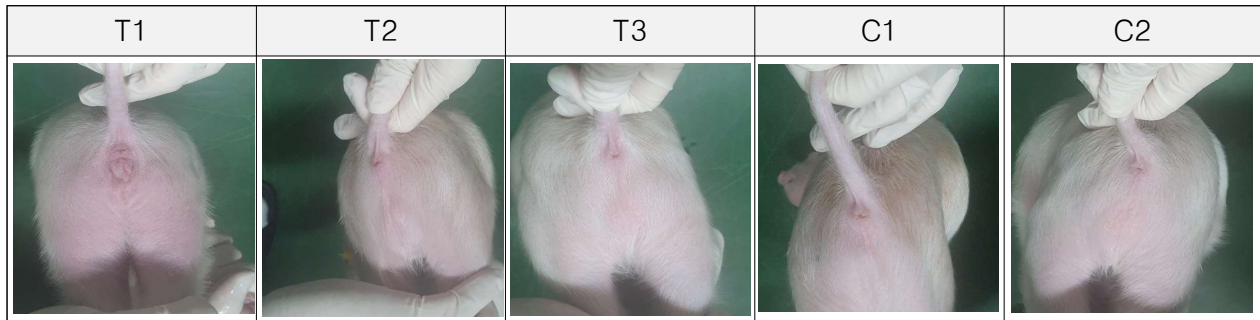


그림 14. 바이러스 접종 6일차 항문 사진

표 7. 그룹별 바이러스 shedding 결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 바이러스 배출 유무										
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
CKT-7_N (p177)	T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
비접종 대조군	C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C3	-	-	-	폐사							

바이러스 접종군과 비접종 그룹 각 개체에 대한 virus shedding 확인 결과, 모든 개체의 분변에서 PEDV가 검출되지 않았다.

2) 조직병리학적 검사 결과

○ 부검 소견

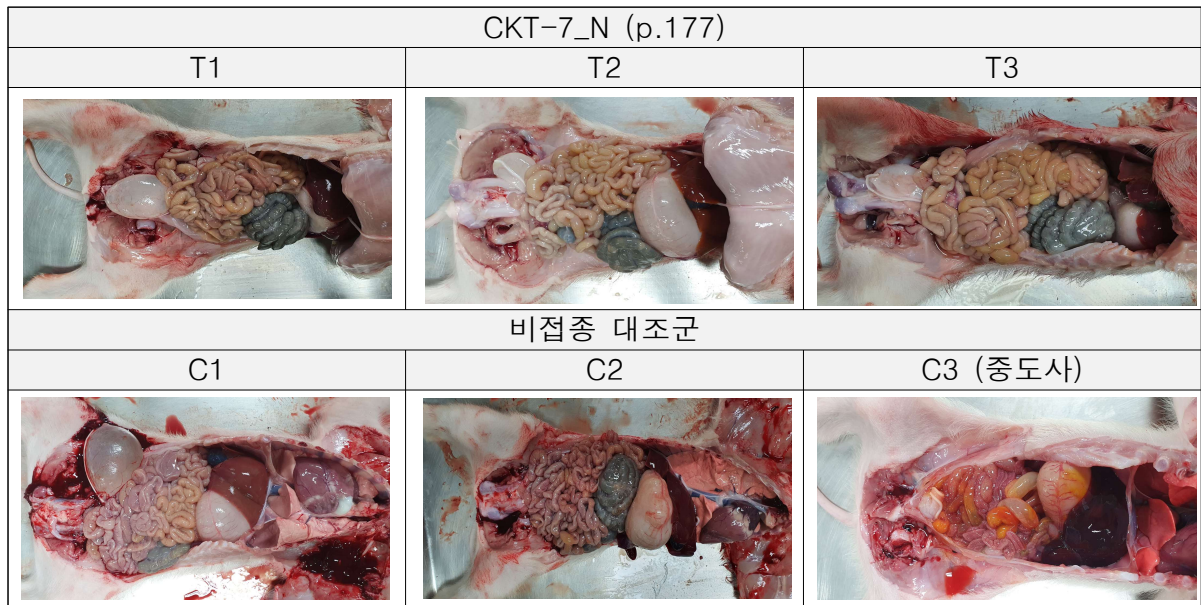


그림 15. 안락사 후 부검 사진 (접종 10일 후)

비접종 대조군 중 중도사한 1개 개체를 제외하고, 백신 접종군과 나머지 비접종 대조군은 소장과 대장 모두 정상 소견을 보였다.

○ 조직병리학적 검사 결과

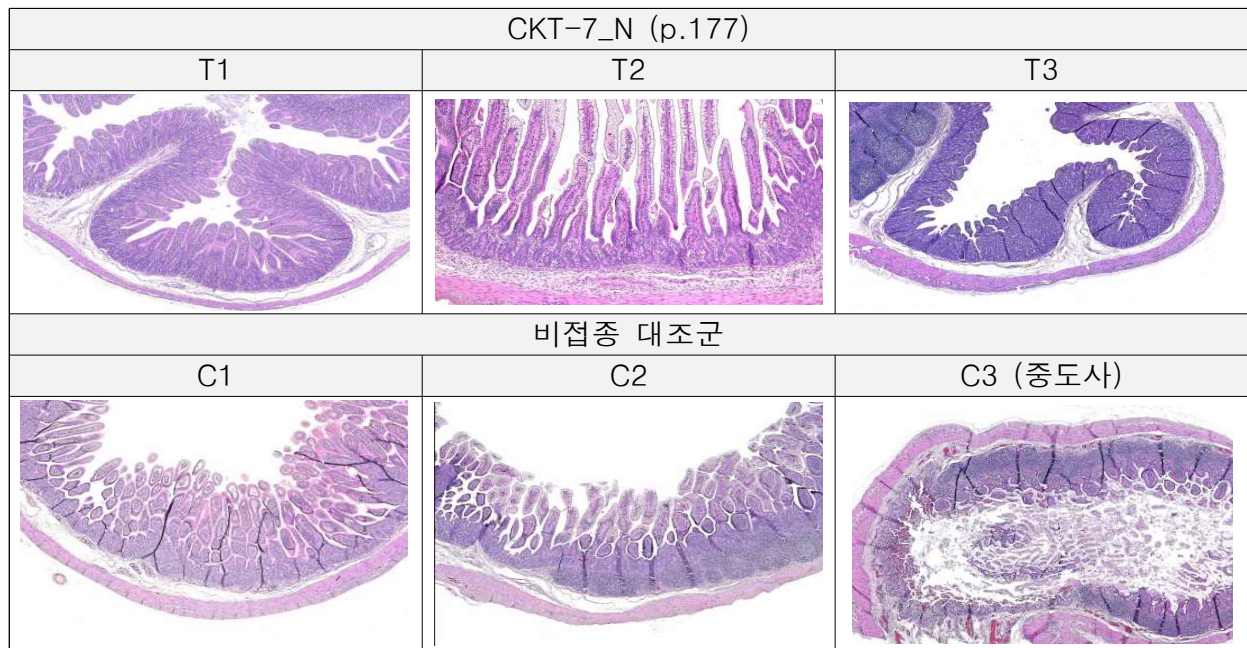


그림 16. 병리조직학적 소견 (H&E 염색)

비접종 대조군 중 중도사한 1개 개체의 경우, (C3) 용모 손상 및 괴사 소견이 확인되며, 백신 접종군과 나머지 비접종 대조군은 정상 소견으로 확인되었다.

1.2.2.3. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 1차 안전성 평가 결론

담즙산 처리를 통해 연속 177 계대를 수행한 PEDV CKT-7_N strain (p177)의 병원성 확인 실험 결과, 5일령의 PEDV 항체음성 자돈에 $10^{8.0}$ TCID₅₀/dose의 고역가 바이러스를 경구로 투여했음에도 이로 인한 어떠한 임상증상 발현이나 바이러스 shedding도 없었으며, 바이러

스 접종 10일 후 부검하여 위장병변과 병리조직학적 병변 유무를 확인한 결과에서도 정상 소견을 보여, 바이러스가 완전히 약독화 되었음을 확인하였다.

1.2.3. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 2차 안전성 평가 결과

1.2.3.1. 실험 방법

PEDV CKT-7 strain (약독화 전 parent strain)과의 병원성 비교평가를 통해 경구백신용 후보주로 최종 선정된 PEDV CKT-7_N strain (p177)의 안전성을 재확인하였다.

1) 실험그룹

표 8. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Number	비고
CKT-7	4	장 유제액, 경구투여
CKT-7_N (p177)	3	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /ml, 경구투여
비접종 대조군	3	-

2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, PEDV CKT-7 바이러스 (바이러스 감염 장유제액) 접종그룹 4마리, PEDV CKT-7_N (p177) 바이러스 경구접종 그룹 3마리 및 비접종 대조군 3마리씩 총 10마리를 공시하였다.

3) 바이러스 접종

약독화 전 parent strain 접종 그룹의 경우, 바이러스 분리 당시 사용된 장 유제액을 그대로 경구로 투여하였고, 약독화 바이러스 접종 그룹에 대해서는 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 농도 이상으로 확인된 PEDV CKT-7_N (p177) 바이러스 1 ml씩을 경구로 접종 후, 7일간 관찰하였다.

4) 샘플링 및 조직병리학적 검사

바이러스 접종 후 7일 동안 임상증상(설사)을 관찰하였고, 매일 항문 swab을 실시하여 Real-time PCR법으로 바이러스 shedding 유무 및 정도를 확인하고, 실험 기간 종료 후, 부검하여 위장 병변을 추가로 확인하였다.

1.2.3.2. 실험 결과

1) 임상증상 관찰 및 바이러스 shedding 확인 결과

표 9. 그룹별 임상증상 관찰결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무							
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일

CKT-7 (Parent strain)	P1	N	D	D	D	폐사			
	P2	N	D	D	D	D	D	폐사	
	P3	N	D	D	D	D	D	D	폐사
	P4	N	D	D	D	D	D	D	폐사
CKT-7_N (p177)	T1	N	N	N	N	N	N	N	N
	T2	N	N	N	N	N	N	N	N
	T3	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	C1	N	N	N	N	N	N	N	N
	C2	N	N	폐사					
	C3	N	N	N	N	N	N	N	N

* N : 이상없음, D : 설사

바이러스 접종 후 임상증상 관찰 결과, 야외에서 분리된 CKT-7 parent strain의 경우, 접종 후 1일째부터 심한 설사 증상을 보이기 시작하여 4일 이후부터 폐사 개체가 발생하였고, 7일째에 모든 개체가 폐사하였다. 반면, 약독화 바이러스 접종 그룹과 비접종 대조군의 경우, (1마리는 접종 2일째 중도사) 시험 기간 내내 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. (접종 3일차 항문 사진을 보면, CKT-7 parent strain 접종 개체들의 경우, 심한 설사로 인하여 항문 및 둔부가 젖어있고, 나머지 개체들의 경우, 깨끗한 상태를 유지하고 있다)

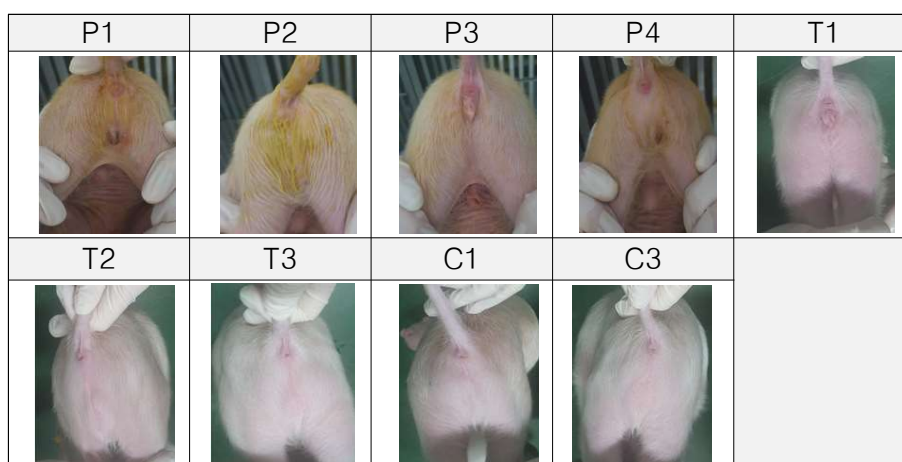


그림 17. 바이러스 접종 3일차 항문 사진

표 10. 그룹별 바이러스 shedding 결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 바이러스 배출 유무							
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일
CKT-7 (Parent strain)	P1	-	-	+	+	폐사			
	P2	-	-	+	+	+	+	폐사	
	P3	-	-	+	+	+	+	+	폐사
	P4	-	-	+	+	+	+	+	폐사
CKT-7_N (p177)	T1	-	-	-	-	-	-	-	-
	T2	-	-	-	-	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-	-	-	-	-

비접종 대조군	C1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	-	-	폐사					
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-

야외에서 분리된 CKT-7 parent strain 그룹 각 개체에 대한 virus shedding 확인 결과, 장 유제액 접종 2일차부터 모든 개체의 분변에서 PEDV가 검출되기 시작하여 폐사 전 까지 지속적인 바이러스 shedding이 이루어진 반면, (최대 바이러스 역가는 $10^{4.03}$ copies/ μ l, 4 dpi) 약독화 바이러스 접종 그룹과 비접종 대조군의 경우, 모든 개체의 분변에서 PEDV가 검출되지 않았다.

2) 조직병리학적 검사 결과

○ 부검 소견

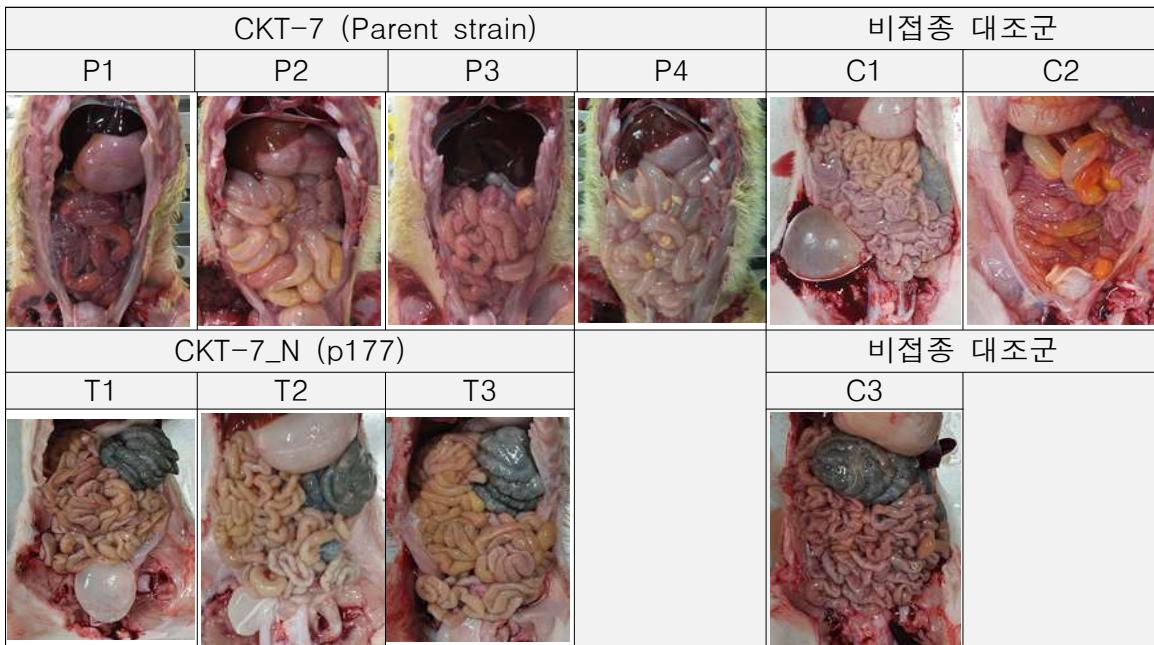


그림 18. 안락사 후 부검 사진 (접종 7일 후)

CKT-7 parent strain 접종 그룹의 경우, 부검 시 소장벽이 얇아지고, 장 내 수양성 액체가 총만한 전형적인 PEDV 감염 소견을 보였고, 중도사한 비접종 대조군 1마리를 제외한 나머지 개체들의 경우, 정상적인 소장 형태가 확인되었다.

Group	Inoculum	Route	No. of pigs	Mortality rate [% (no/total)]	Severe diarrhea rate* [% (no/total)]	Clinical symptoms	Virus shedding	Peak fecal virus shedding titer [\log_{10} copies/ul]; dpi
1	CKT-7 p0	Oral	4	100 (4/4)	100 (4/4)	Severe	Started at 2 dpi	4.03 ± 1.38 , 4
2	Negative	Oral	3	33.3 (1/3)**	0 (0/3)	No diarrhea	N/D***	NA****
3	CKT-7 N	Oral	3	0 (0/3)	0 (0/3)	No diarrhea	N/D	NA

* Fecal consistency score : 0, solid; 1, pasty; 2, semi-liquid; 3, liquid; 4, death. Fc score of 3 were regarded as severe diarrhea
 ** Non-related PEDV
 *** None detection
 **** Not available

그림 19. 바이러스 접종 후 임상증상 종합표

1.2.3.3. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 2차 안전성 평가 결론

PEDV CKT-7 parent strain의 경우, 장 유제액 형태로 PEDV 항체음성 5일령 자돈에 접종 시, 심각한 설사증상과 함께 접종 7일 이내 100% 폐사하는 강한 병원성을 보여준 반면, 담즙산 처리를 통해 연속 177 계대를 수행한 PEDV CKT-7_N strain (p177)의 경우, 5일령의 PEDV 항체음성 자돈에 $10^{8.0}$ TCID₅₀/dose의 고역가 바이러스를 경구로 투여했음에도 이로 인한 어떠한 임상증상 발현이나 바이러스 shedding도 없었으며, 바이러스 접종 7일 후 부검하여 위장병변과 병리조직학적 병변 유무를 확인한 결과에서도 정상 소견을 보여, 바이러스가 완전히 약독화 되었음을 다시 한 번 확인하였다.

1.2.4. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 병원성 복귀 시험 결과

1.2.4.1. 실험 방법

경구백신용 후보주로 최종 선정된 PEDV CKT-7_N strain (p177)의 병원성 복귀 유무를 확인하기 위하여 2차 병원성 평가 시 확보된 장 유제액을 이용하여 PEDV 항체 음성의 5일령 포유자돈을 대상으로 생체계대 안전성을 확인하였다.

1) 실험그룹

표 11. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Number	비고
CKT-7_N (p177) BP 1	5	10% 장 유제액, 경구 투여
비접종 대조군	3	-

2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, PEDV CKT-7_N (p177) 감염 장 유제액 접종그룹 5마리 및 비접종 대조군 3마리씩 총 8마리를 공시하였다.

3) 바이러스 접종

Back passage 그룹에 대하여 (BP1) RT-PCR로 PEDV 양성으로 확인된 10% 장 유제액 1 ml씩을 경구로 접종 후, 14일간 관찰하였다.

4) 샘플링 및 조직병리학적 검사

바이러스 접종 후 14일 동안 임상증상(설사)을 관찰하였고, 매일 항문 swab을 실시하여 PCR법으로 바이러스 shedding 유무를 확인하였으며, 실험 기간 종료 후, 부검하여 위장 병변을 추가로 확인하였다.

5) 2회 생체계대 (BP 2) 샘플 확보

PEDV CKT-7_N (p177) 감염 장 유제액 접종그룹 중 2마리를 접종 5일 후에 안락사시켜 장 조직을 확보하였다.

1.2.4.2. 실험 결과

1) 장 유제액 내 PED 바이러스 유무 확인

장 유제액을 이용한 병원성 복귀 실험에 앞서, 확보된 장 유제액 내에 PEDV가 포함되어 있는지를 인트론 사의 “i-TGE/PED Detection kit”를 사용하여 RT-PCR법으로 분석하였으며, 그림과 같이 PEDV가 감염되어 있음을 확인하였다. (다만, 동일한 장 유제액을 세포에 접종하여 바이러스 함량을 측정 한 결과에서는 바이러스가 검출되지 않았다)

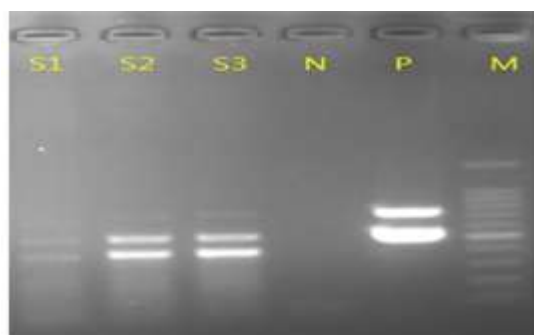


그림 20. 장 유제액에 (S1~S3) 대한 PEDV PCR 결과

2) 임상증상 관찰 및 바이러스 shedding 확인 결과

표 12. 그룹별 임상증상 관찰결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
CKT-7_N (p177) BP1	T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	T3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	BP-2	N	N	N	N	N	N										
	BP-2	N	N	N	N	N	N										
비접종 대조군	C1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	C2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	C3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

* N : 이상없음, D : 설사

바이러스 접종 후 임상증상 관찰 결과, 장 유제액 접종군과 비접종 대조군 모두 시험 기간 내내 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. (접종 6일차 항문 사진을 보면, 모든 개체들이 깨끗한 상태를 유지하고 있음)

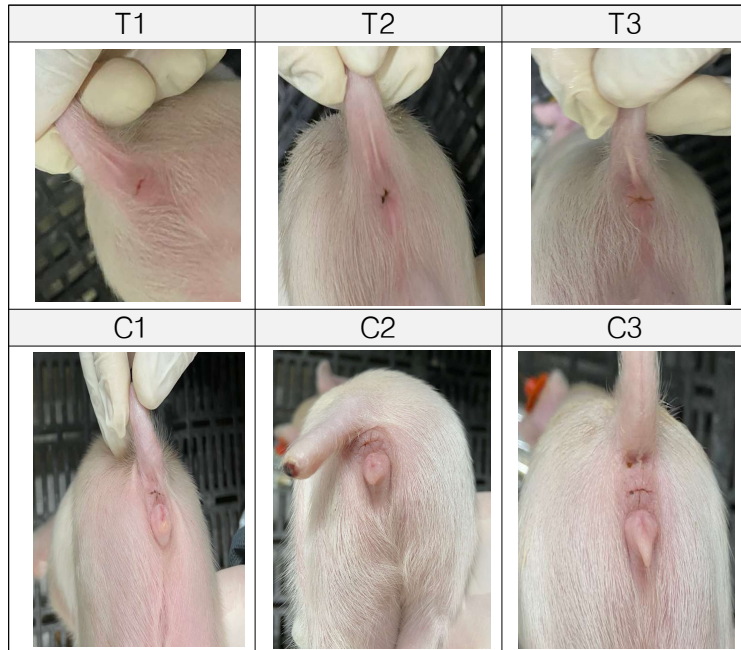


그림 21. 바이러스 접종 6일차 항문 사진

표 13. 그룹별 바이러스 shedding 결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 바이러스 배출 유무															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
CKT-7_N (p177) BP1	T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	BP-1	-	-	-	-	-	-										
	BP-2	-	-	-	-	-	-										
비접종 대조군	C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

장 유제액을 접종한 그룹 각 개체에 대한 virus shedding 확인 결과, 모든 개체에서 전 실험 기간 동안 분변으로 PEDV가 전혀 배출되지 않았으며, 비접종 대조군 또한 동일한 결과였다.

3) 조직병리학적 검사 결과

○ 부검 소견

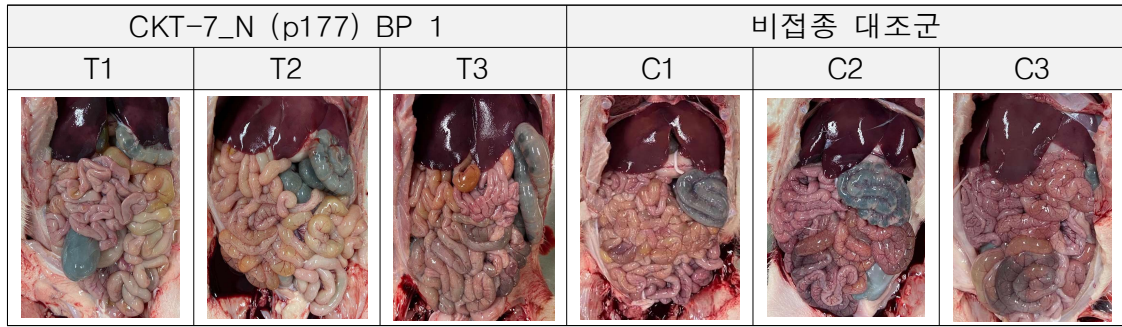


그림 22. 안락사 후 부검 사진 (접종 14일 후)

비접종 대조군의 경우, C2와 C3의 소장조직이 다소 충혈 증상을 보이긴 하나, 정상 소견에 가깝고, 장 유제액을 접종한 그룹의 경우에도 정상에 가까운 위장 형태가 확인되었다.

1.2.4.3. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 병원성 복귀 시험 결론

앞서, 2회에 걸쳐서 수행하였던 PEDV CKT-7_N strain (p177)의 병원성 확인 실험 결과와 동일하게, 바이러스 감염 장 유제액을 이용하여 1회 생체계대를 진행한 결과에서도 바이러스 감염으로 인한 어떠한 임상증상이나 항원 배출이 확인되지 않았다. 특히, 2대 생체계대를 목적으로 감염 5일 후 2두에서 소장을 다시 채취하였으나, 장 내에 PED 바이러스가 검출되지 않아 (PCR negative) 추가 계대를 진행하지 않았고, 병원성 복귀 실험을 1대 생체계대에서 종료하였다. 결과적으로, PEDV CKT-7_N strain (p177)의 경우, 약독화 생백신 strain으로써 요구되는 safety 관련 조건을 모두 충족하였다고 볼 수 있다.

1.2.4. PEDV CKT-7_N strain (p177) 경구 투여 시 임신모돈에 대한 방어효능 평가 결과

PED 바이러스는 돼지의 전 일령에 걸쳐 감염될 수 있지만, 신생아 새끼돼지에 감염될 시에는 심각한 임상증상 (심한 수양성 설사와 체중 감소)을 동반하며 높은 폐사율을 보인다. 때문에, 초유를 통한 모체항체가 신생아 감염을 막는 중요한 역할을 하며, 임신 모돈에 백신을 접종하여 초유 내 항체가 수준을 높이는 것이 예방백신의 주 목적이다. 따라서, 백신의 방어력 평가 시에는 임신 모돈에 백신을 접종하고, 초유를 충분히 섭취한 5일령 전후의 포유 자돈에 야외 강독주로 공격접종을 진행함으로써 백신의 방어력을 평가한다.

1.2.4.1. 시험백신 준비 및 실험 방법

1) 시험백신 준비

담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV (CKT-7_N strain, p177)와 이를 이용하여 생산한 PED-Fc 바이러스를 백신으로 사용하였으며, 동결건조 없이 바이러스 배양액 상태 그대로를 사용하였다.

표 14. 시험 백신의 조성

구분	항원	함량 (TCID ₅₀ /dose)	비고
시험백신	PEDV CKT-7_N (p177)	7.0 log ₁₀	10 ml/1 dose
대조백신	PEDV CKT-7_N_Fc (p177)	7.0 log ₁₀	10 ml/1 dose

2) 실험동물 선정 및 백신 접종 그룹

PED 백신을 접종하지 않은 임신모돈 6마리를 선정하여, 4마리는 백신 접종군, 나머지 2마리는 비접종 대조군으로 하였다. 백신 접종군은 다시 시험백신 접종군 2마리, 대조백신 접종군 2마리로 나누었다.

표 15. 실험동물 선정 및 백신접종 그룹

그룹	개체 번호	수정일	백신 접종일		분만일
			1차	2차	
시험백신 접종군	4	21.07.06	21.09.29	21.10.14	21.10.30
	30	21.07.06			21.10.29
대조백신 접종군	8	21.07.01			21.10.22
	18	21.06.29			21.10.22
비접종 대조군	25	21.06.28	-	-	21.11.05
	31	21.06.28	-	-	21.10.23

3) 임신 모돈 백신 접종

분만 전 임신 모돈을 대상으로 2주 간격으로 2회 접종하였으며, 액상의 백신을 사료에 혼합하여 투여하였다. (백신 접종 하루 전 절식시켜 사료 완전히 섭취하도록 함)

- 백신 접종 시기 : (1차) 분만 4주 전 임신모돈, (2차) 분만 2주 전 임신모돈
- 접종량 : 10 ml/1 dose
- 접종방법 : 경구투여 (사료에 혼합투여)

표 16. 동물실험 디자인

그룹	접종 경로	접종 방법	접종시기	개체 수
시험백신	경구	2주 간격 2회	분만 4주 전,	2
대조백신			분만 2주 전	2
비접종 대조군				2

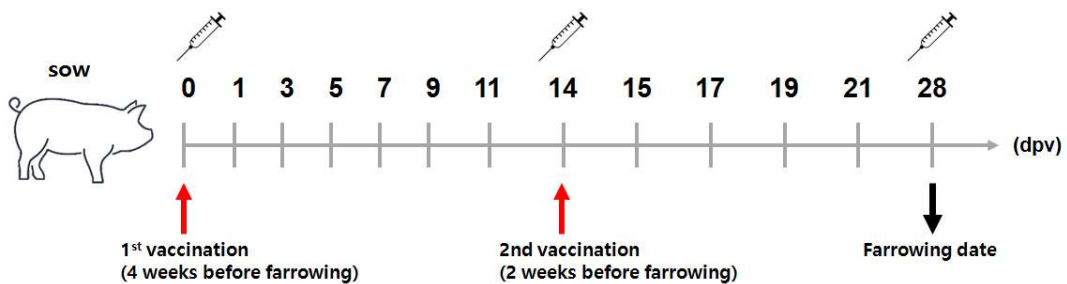


그림 23. 임신모돈 백신 접종 일정

4) 임상증상 및 분만성적 확인

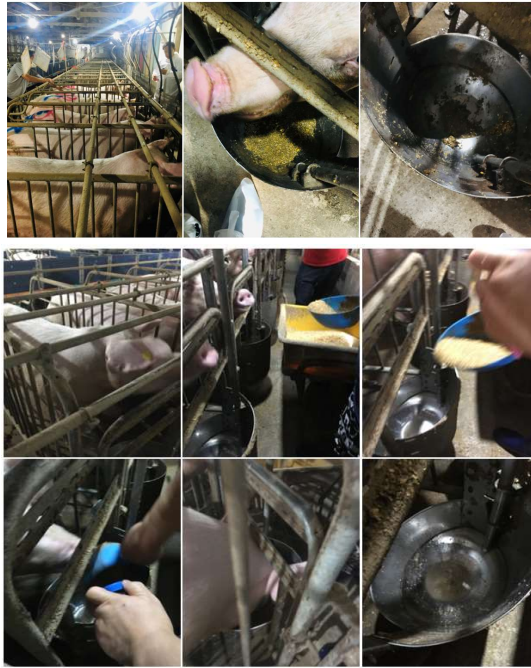


그림 24. 시험백신 접종 전경 (상 : 1차 백신, 하 : 2차 백신)

실험 모돈에 대하여 백신 접종 후 분만 전까지 14일 동안 임상증상 (발열, 과민반응, 식욕 부진, 구토, 설사, 유사산 등) 유무를 확인하고, 분만 시 성적을 (실산 수, 사산 수) 추가로 확인하였다.

5) 채혈 및 초유 채취

백신 접종군 및 비접종 대조군 모돈에 대하여 1차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 전, 분만 당일 혈액을 채취하고 분만 시 초유를 채취하여 IgA, IgG 및 중화항체를 각각 측정하였다.

표 17. 모돈 샘플채취 일정

샘플명	채취 시기	용도	수량
혈액	1차 접종 전, 2차 접종 전, 분만 시	중화항체가 ELISA 항체가 (IgG, IgA)	각 5 ml
초유	분만 시		10 ml

6) 포유 자돈 공격접종

○ 공격접종 균주

PEDV Genotype 2b 야외 유행 주에 대한 백신의 방어력을 평가하기 위하여 공격접종 균주로 농림검역본부에서 분리된 PEDV QIAP1401 strain을 사용하였다.

○ 공격접종 자돈 선별

시험백신 접종군, 대조백신 접종군 및 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈을 복당 7~8마

리씩 선별하여 그룹 당 15마리씩 공격접종에 사용하고자 하였으나, 모든 복당 자돈 수가 상이하였고, 특히, 대조백신 접종군 모돈의 분만 자돈 수가 부족하였기 때문에 최종적으로 시험백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈 15마리, 대조백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈 12마리, 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈 16마리를 선정하여 공격접종에 사용하였다.

표 18. 공시 모돈의 분만 성적과 공격접종 자돈 선별

그룹	모돈 개체번호	분만 일	자돈 실산 수	자돈 사산 수	공격접종 자돈 공시 수
시험백신 접종군	4	21.10.30	20	0	7
	30	21.10.29	21	0	8
대조백신 접종군	8	21.10.22	5	0	5
	18	21.10.22	8	0	7
비접종 대조군	25	21.10.23	14	0	14
	31	21.11.05	5	0	2



그림 25. 공격접종 시 5~7일령 포유자돈 상태

○ 공격접종 방법

- ① 공격 접종 바이러스 : QIAP 1401 strain (P11, 농림축산검역본부 제공)
- ② 공격 접종량 : $10^{3.0}$ TCID₅₀/두 (약 10LD₅₀)
- ③ 공격접종 방법 : 경구투여 (주사기로 직접 투여)
- ④ 공격접종 시기 : 생후 6일령 전 후

- 공시 모돈마다 분만 일자가 상이하여 포유자돈의 공격 접종 일자를 정확히 맞추진 못하였고, 분만 일자별로 세부그룹을 조정하여 총 3회에 걸쳐 공격접종을 실시함.

표 19. 자돈 공격접종 그룹

그룹	모돈 개체번호	공시 자돈 수	공격접종 일령	공격접종 방법
시험백신 접종군	4	7 마리	6일령	PEDV QIAP 1401 (P11), $10^{3.0}$ TCID ₅₀ /두, 경구
	30	8 마리	7일령	
대조백신 접종군	8	5 마리	6일령	
	18	7 마리	6일령	
비접종 대조군	25	14 마리	5일령	
	31	2 마리	5일령	

○ 자돈 체중 측정

공격접종 전, 공격접종 후 3일, 7일, 9일, 13일째에 각각 자돈의 체중을 측정하였다.

○ 자돈 채혈

공격접종 전, 공격접종 후 14일째에 각각 채혈하여 혈중 중화항체가 및 ELISA 항체가 (IgA, IgG)를 확인하였다. (폐사 자돈은 폐사 당일 채혈)

○ 설사 증상, 임상증상 및 폐사율 확인

공격접종 후 14일 동안 모든 공시자돈에 대한 설사 유무를 매일 확인하고, 임상 증상을 자돈의 위축 정도에 따라 0~3까지 점수화하여 기록하였다. (0 : Normal, 1 : Mild, 2 : Moderate, 3 : Severe) 또한, 공격접종 후 매일 폐사 유무를 확인하여 관찰 14일째에 그룹별 최종 폐사율을 확인하였다.

○ 자돈 분변 채취 및 바이러스 shedding 관찰

5~7일령 포유자돈 (공격접종 전)에서 분변을 채취하여 분변 중의 IgA 및 IgG 항체를 확인하고, 공격접종 후 3일, 7일, 10일, 14일째에 분변을 추가로 채취하여 분변으로의 PEDV 항원 배출 유무를 확인하였다.

○ 부검 및 조직학적 소견 관찰

공격접종 종료 후 (공격접종 후 14일째) 살아있는 자돈을 안락사 시킨 후 장 병변(장출혈, 장비후) 확인하여 수치화 하고, 십이지장, 공장, 회장을 채취하여 H&E 염색을 통한 조직 병변을 추가로 확인하였다. (총혈 및 팽만 정도에 따라 0~3점으로 구분, 그림 60) 또한, 동일한 샘플에 대하여 PEDV에 대한 단일클론 항체로 IHC를 실시하여, 조직 내 PEDV 항원 유무를 확인하였다. (폐사 자돈의 경우, 폐사 즉시 부검하여 동일한 방법으로 병변을 확인하고, 샘플을 채취하였다.)

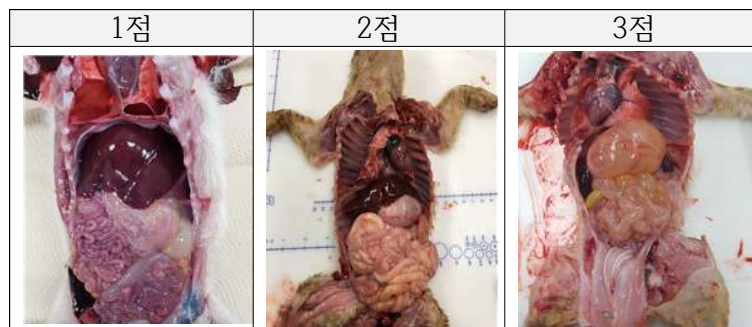


그림 26. 장 병변 Index Score

7) PEDV에 대한 IgG 및 IgA ELISA 항체가 측정법

○ 실험재료

표 20. 표준샘플

구분	샘플번호
표준 양성샘플	PEDV 백신 접종 모돈의 초유를 1:100으로 희석한 것
표준 음성샘플	PEDV 백신 비접종 모돈에서 태어난 5일령 자돈의 혈청을 1:200으로 희석한 것

표 21. 주요 시약 목록

샘플명	조성
PED 항원	PEDV CKT-7_N 정제 항원 ^{a)}
Coating buffer	0.05M Carbonate-Bicarbonate (Sigma, C3041)
Blocking buffer	1% BSA 포함 PBS (제조)
Washing buffer	0.05% Tween 20 포함 PBS (제조)
Sample/conjugate diluent	1% BSA 및 0.05% Tween 20 포함 PBS (제조)
Swine IgG conjugate	HRP conjugated pig IgG (KPL, 5220-0363)
Swine IgA conjugate	HRP conjugated pig IgA (Invitrogen, PA1-84625)
TMB substrate	-
Stop solution	-

a) $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 농도의 PEDV CKT-7_N 항원을 0.1 μ m 필터한 것을 100 kda membrane filter로 25배 농축한 항원

○ 실험 protocol

- ① 1,000 μ l의 coating buffer당 2.5 μ l의 정제 PED 항원을 희석시킨 후 (희석배수 1:400), well 당 100 μ l씩 필요한 샘플의 수만큼 well에 코팅하고 37°C에서 1시간 동안 incubation 한 후, 4°C에서 overnight incubation 한다.
- ② 다음 날, plate를 꺼내어 실온에서 30분간 추가로 incubation 한다.
- ③ Coating buffer를 제거하고, well 당 300 μ l의 washing buffer를 사용하여 3회 washing한다.
- ④ Well 당 200 μ l씩의 blocking buffer를 넣고, 37°C에서 1시간 동안 incubation 시킨다.
- ⑤ Sample/conjugate diluent로 실험 샘플을 200배 희석하여 준비한다.
- ⑥ Blocking buffer를 제거하고, well을 3회 washing 한 후, well 당 100 μ l씩의 실험 샘플을 넣고, 37°C에서 1시간 동안 incubation 한다.
- ⑦ Sample를 제거하고, well을 3회 washing 한 후, HRP conjugated Pig IgG 및 IgA Detection antibody를 Sample/Conjugate diluent로 아래와 같이 희석하여 100 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 동안 incubation 시킨다.
 - Pig IgA Detection antibody = 1:10,000

- Pig IgG Detection antibody = 1:20,000

- ⑧ Detection antibody를 제거하고, well을 3회 washing 한 후, 각각의 well에 TMB substrate solution을 100 μ l씩 넣어주고, 실온의 어두운 곳에서 15분간 incubation 시킨다.
- ⑨ 15분경과 후, 각 well 당 100 μ l의 ELISA stop solution을 넣고, 가볍게 섞어주며, 색의 변화를 관찰한다.
- ⑩ 반응 정지 후, 30분 이내에 ELISA plate reader기를 이용하여 450nm의 파장에서 O.D값을 측정한다.
- ⑪ 표준 양성샘플의 O.D값은 IgA 및 IgG가 각각 1.0 이상, 표준 음성샘플의 O.D값은 IgA 및 IgG가 각각 0.4 이하여야 한다.

1.2.4.2. 주요 실험 결과

1) 임신 모돈 임상증상 관찰 결과

- 임신 모돈에 대하여 분만 4주 전에 각각의 백신 10 ml씩을 경구로 투여하고, 14일 간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 시험백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간 태아의 안전성에도 문제가 없었다. (백신 접종에 사용된 $10^{7.0}$ TCID₅₀/dose의 농도는 PED 경구용 생백신보다 50배 이상 높은 역가 수준임)

표 22. 1차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	개체 번호	공격접종 후 경과일별 임상증상 유무														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
시험백신 접종군	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
대조백신 접종군	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

** 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

- 임신 모돈에 대하여 분만 2주 전에 각각의 백신 10 ml씩을 경구로 추가 투여하고, 14일 간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 시험백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간 태아의 안전성에도 문제가 없었다.(비접종 대조군 모돈 중 1두에서 분만 당일 자궁이 탈로 인한 폐사 개체 있었음)

표 23. 2차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	개체 번호	공격접종 후 경과일별 임상증상 유무															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
시험백신 접종군	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
대조백신 접종군	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
비접종 대조군	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

** 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

2) 모돈 및 초유 중화항체가 측정 결과

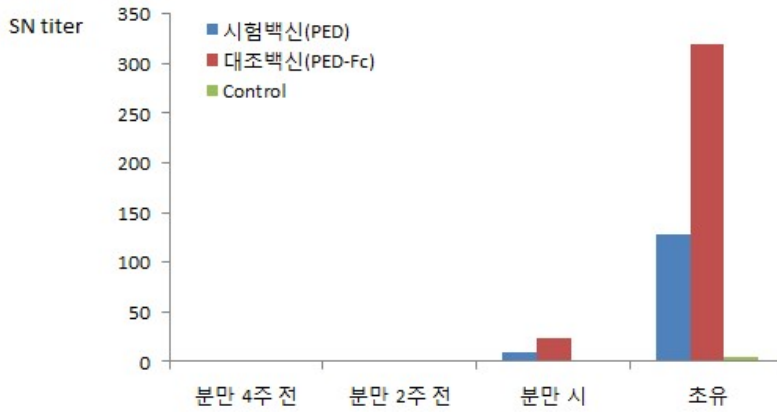


그림 27. 백신 접종 후 그룹별 평균 중화항체가 측정 결과

- 시험백신 접종군의 경우, 백신 2차 접종 완료 후, 분만 시 2~16배의 혈중 중화항체가 확인 되었고, 초유에서는 128배의 중화항체가 확인되었다.
- 대조백신 접종군의 경우, 백신 2차 접종 완료 후, 분만 시 16~32배의 혈중 중화항체가 확인되었고, 초유에서는 128~512배의 중화항체가 확인되었다.
- 비접종 대조군 모돈의 경우, 분만 시 까지 PEDV 항체음성을 (중화항체가 4배 이하) 유지하고 있었고, 1마리의 경우, 초유에서 8배의 중화항체가 확인되었다.
- 결론적으로, PEDV에 대한 중화항체가 측정 결과에서는 Fc 백신을 경구로 투여한 대조백신 그룹이 시험 백신 그룹보다 우수한 결과를 보였다.

표 24. 모든 및 초유 증화항체 측정 결과 raw data

그룹	개체 번호	시기별 증화항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
시험백신 접종군	4	< 2	< 2	2	128
	30	2	< 2	16	128
대조백신 접종군	8	2	< 2	32	512
	18	< 2	< 2	16	128
비접종 대조군	25	2	2	< 2	8
	31	< 2	< 2	< 2	2

* 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

3) 모든 및 초유 ELISA 항체가 측정 결과

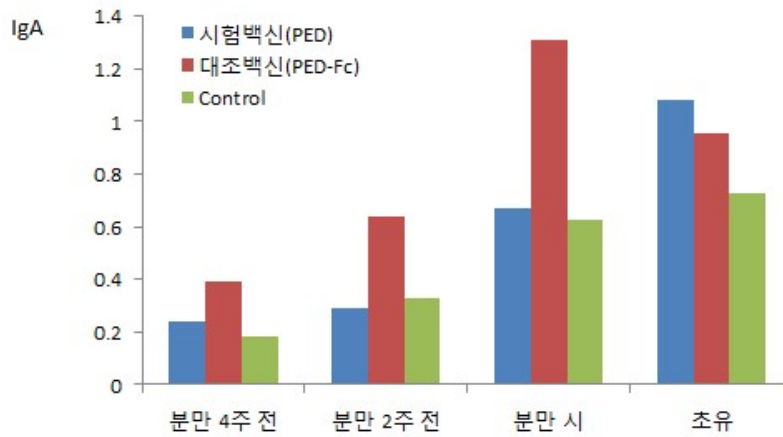


그림 28. 백신 접종 후 그룹별 평균 IgA ELISA 항체가 측정 결과

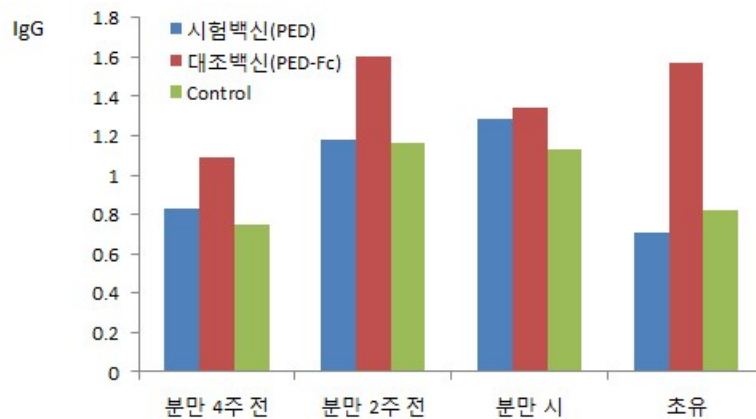


그림 29. 백신 접종 후 그룹별 평균 IgG ELISA 항체가 측정 결과

- In-house ELISA법으로 백신 접종 후 IgA ELISA 항체가를 측정한 결과, 분만 시까지는 대조백신 접종 그룹에서 가장 높은 IgA 항체가 수준을 유지하고 있었고, 초유 내에는 시험 백신 접종그룹이 가장 높은 IgA 항체가를 나타내고 있었다.
- In-house ELISA법으로 백신 접종 후 IgG ELISA 항체가를 측정한 결과, 백신 접종 후 모든 시점에서 대조백신 접종그룹이 가장 높은 IgG 항체가 수준을 유지하고 있었고, 이는 앞서 확인된 중화항체 결과와도 일치하는 결과이다.
- 결과적으로, IgA 및 IgG ELISA 항체가 측정 결과에서도 시험백신 접종군보다 대조백신 접종군이 우수한 결과를 보였으며, 이는 앞서 확인된 중화항체 결과와도 일치하는 결과이다. 다만, 실험에 사용된 In-house ELISA법이 최적화된 조건이 아니었기 때문에 비접종 대조군에서도 비교적 높은 비특이 반응이 확인되어 각 그룹 간의 보다 명확한 항체 수준 비교는 ELISA 항체가보다 중화항체 결과를 우선시해야 할 것이다.

표 25. 모돈 및 초유 IgA ELISA 항체가 결과

그룹	개체 번호	시기별 ELISA 항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
시험백신 접종군	4	0.273	0.339	0.698	1.553
	30	0.201	0.238	0.645	0.614
대조백신 접종군	8	0.526	1.004	1.616	1.317
	18	0.263	0.268	1.004	0.596
비접종 대조군	25	0.190	0.335	0.926	0.879
	31	0.178	0.318	0.323	0.579

* 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

표 26. 모돈 및 초유 IgG ELISA 항체가 결과

그룹	개체 번호	시기별 ELISA 항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
시험백신 접종군	4	0.855	1.262	1.336	1.257
	30	0.803	1.090	1.238	0.155
대조백신 접종군	8	1.280	1.776	1.361	2.154
	18	0.896	1.427	1.326	0.988
비접종 대조군	25	0.810	1.458	1.312	1.094
	31	0.692	0.873	0.955	0.545

* 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

4) 포유자돈 혈중 항체가

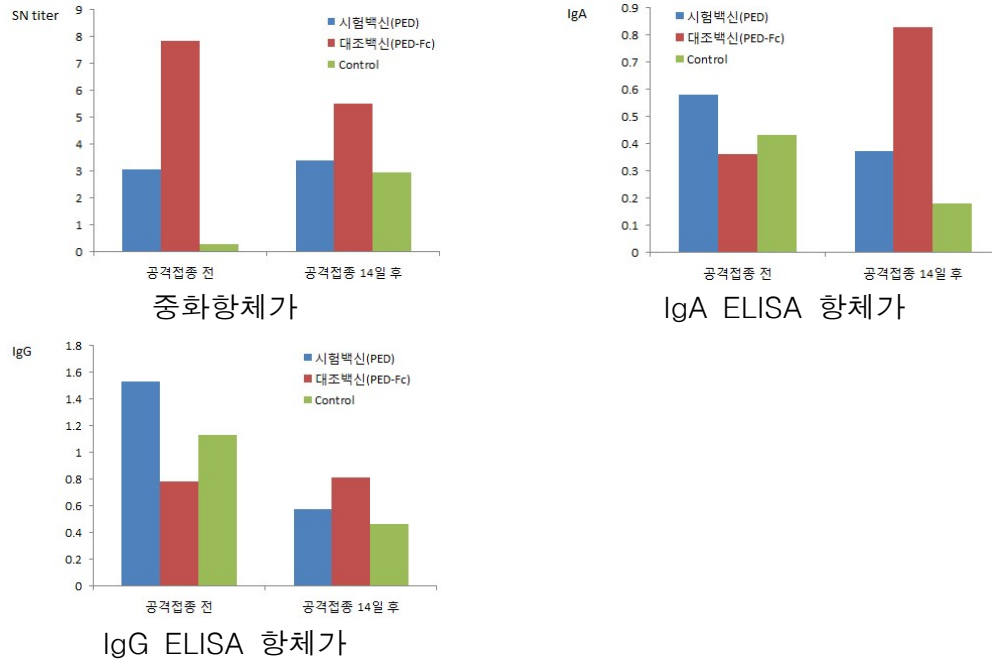


그림 30. 공격접종 전, 후 그룹별 포유자돈 평균 항체가 측정 결과

- 시험 백신 접종 모돈과 대조 백신 접종 모돈에서 태어난 자돈의 평균 이행 중화항체가는 2~8배 수준이었다. 백신 접종 모돈의 경우, 분만 시와 초유에서 비교적 균일한 중화항체 형성이 확인되었으나, 포유 자돈들의 경우, 모돈 복 당 편차가 심하게 나타났다. (초유 섭취 유무 혹은 정도에 따른 개체 차이로 추측됨) 시험 백신 접종 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 최소 2배에서 최대 16배의 이행항체를 보유하고 있었고, 대조 백신 접종 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 최소 2배에서 최대 32배의 이행항체를 보유하고 있었다. 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 모두 PEDV 항체 음성으로 확인되었다.
- IgA와 IgG ELISA 항체가의 경우에도, 중화항체가 측정 결과처럼 모든 복당 혹은 자돈 개체당 편차가 너무 심하여, 결과 값에 큰 의미를 부여하기 어려웠다.

표 27. 포유자돈 혈중 항체가 측정 결과

그룹	시기별 평균 항체가					
	공격접종 전			공격접종 14일 후		
	SN	IgA	IgG	SN	IgA	IgG
시험백신 접종군	3.06 (±7.41)	0.58 (±0.19)	1.53 (±0.26)	3.38 (±8.96)	0.37 (±0.28)	0.57 (±0.18)
대조백신 접종군	7.83 (±11.53)	0.36 (±0.22)	0.78 (±0.43)	5.50 (±5.36)	0.83 (±0.98)	0.81 (±0.35)
비접종 대조군	0.26 (±0.67)	0.43 (±0.16)	1.13 (±0.33)	2.93 (±3.08)	0.18 (±0.08)	0.46 (±0.12)

* 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

5) 보유자돈 분변 중 항체가 및 바이러스 shedding 결과

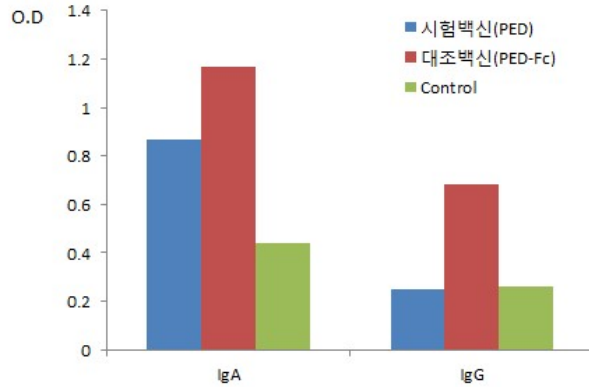


그림 31. 공격접종 전 그룹별 보유자돈 분변 내 항체가 수준

○ 공격 접종 전, 보유자돈의 분변 중 존재하는 PEDV에 대한 IgA 및 IgG 항체가 수준을 In-house ELISA법으로 확인한 결과, “대조 백신 접종군 자돈 > 시험 백신 접종군 자돈 > 비접종 대조군 자돈” 순서로 확인되었으며, 자돈의 혈중 항체가 측정 결과와는 다소 상반된 결과를 보였다.

표 28. 보유자돈 분변 중 ELISA 항체가

그룹	공격접종 전 보유자돈 분변 중 평균 ELISA 항체가	
	IgA	IgG
시험백신 접종군	0.87 (±1.24)	0.25 (±0.36)
대조백신 접종군	1.17 (±1.05)	0.68 (±0.58)
비접종 대조군	0.44 (±0.72)	0.26 (±0.27)

* 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

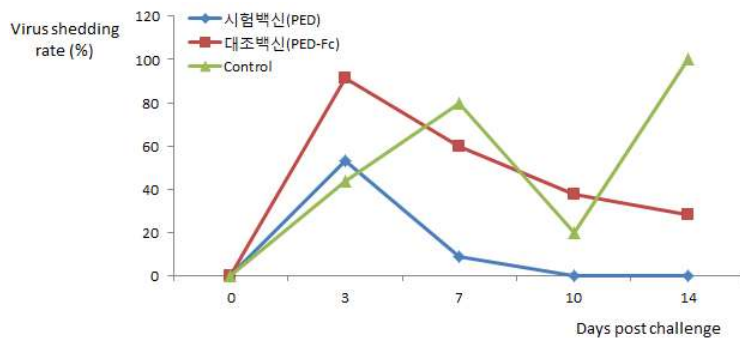


그림 32. 공격접종 후 분변으로의 virus shedding 결과

○ 공격 접종 후 분변을 통한 virus shedding을 확인한 결과에서는 시험 백신 접종군의 경우, 공격 접종 후 3일째에 50% 정도의 개체에서 분변 내 PEDV 항원이 검출되었고, 이후 급격히 감소하여 공격 접종 10일째부터는 모든 생존 개체가 바이러스 배출이 없었다.

- 대조 백신 접종군의 경우, 시험 백신 접종군과 유사한 패턴을 보여주긴 하였지만, 공격 접종 3일 째에 90% 이상의 개체가 바이러스를 배출하였고, 마지막 관찰 시점인 공격 접종 14일 경과 시점까지도 30% 정도의 생존 개체가 분변을 통해 바이러스를 배출하고 있었다.
- 비접종 대조군의 경우, 3일째부터 분변으로 바이러스를 배출하기 시작함과 동시에 폐사가 시작되었고, 마지막 관찰 시점에서는 1마리를 제외한 모든 개체가 폐사하였다.

표 29. 포유자돈 분변으로의 바이러스 shedding

그룹	공격접종 후 시기별 바이러스 shedding 유무 (양성 개체 수/생존 개체 수)				
	0일	3일	7일	10일	14일
시험백신 접종군	0/15	8/15	1/11	0/11	0/11
대조백신 접종군	0/12	11/12	6/10	3/8	2/7
비접종 대조군	0/16	7/16	4/5	1/5	1/1

* 시험백신 : PEDV CKT-7_N, 대조백신 : PEDV CKT-7_N_Fc

6) 공격접종 후 자돈 생존율

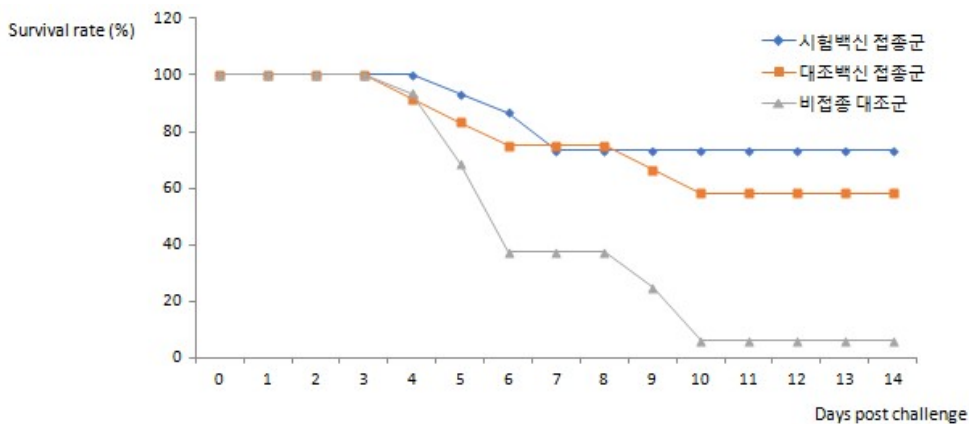


그림 33. 공시 자돈의 누적 생존율

- 시험백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종 후 최종 생존율 73.3%로 확인되었으며, 자돈 이행항체가 결과와 동일하게 모돈 당 편차가 심하게 나타났다. (모돈 1복은 42.8% 생존, 나머지 모돈 1복은 100% 생존)
- 대조백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종 후 최종 생존율 58.3%로 시험 백신 접종군 보다 결과가 좋지 않았고, 앞서 확인된 공격접종 후 분변으로의 바이러스 shedding 결과와도 경향성이 동일하다. 다만, 항체가 지표는 시험백신 접종군보다 대조백신 접종군에서 더 우수했다는 점과, 대조백신 접종군의 경우 모돈 복 당 분만 자돈 수가 적어 건강한 자돈의 선별 과정 없이 모든 자돈을 실험에 사용했었다는 점 등을 감안할 필요가 있다.
- 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종에 대하여 전혀 방어를 하지 못하였고, 16마리 중 1마리가 생존하였지만, 나머지 15마리가 모두 폐사하여 10% 미만의

생존율을 보였다.

표 30. 공시 자돈의 누적 폐사율 raw data

그룹	공격접종 후 시기별 폐사 개체 수 (폐사 개체 수/생존 개체 수)							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
시험백신 접종군	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	1/14	2/13	0/11
대조백신 접종군	0/12	0/12	0/12	1/12	1/11	1/10	0/9	0/9
비접종 대조군	0/16	0/16	0/16	1/16	4/15	5/11	0/6	0/6
그룹	공격접종 후 시기별 폐사 개체 수 (폐사 개체 수/생존 개체 수)						누적 폐사율	
	9일	10일	11일	12일	13일	14일		
시험백신 접종군	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	26.7 %	
대조백신 접종군	1/9	1/8	0/7	0/7	0/7	0/7	41.7 %	
비접종 대조군	2/6	3/4	0/1	0/1	0/1	0/1	93.8 %	

7) 공격접종 후 자돈 증체율

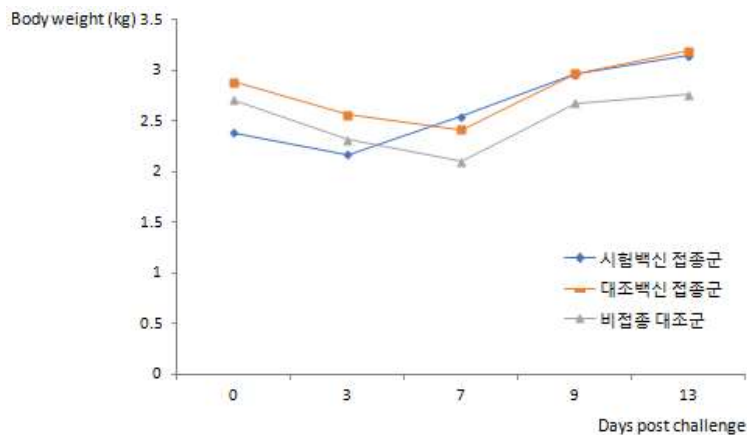


그림 34. 공시 자돈의 체중

- 시험백신 접종군의 경우, 공격접종 후 3일째까지 체중이 감소하다가 7일째부터 증가하기 시작하여 종료일에 평균 0.76 kg의 증체량을 보였고, 대조백신 접종군의 경우, 공격접종 후 7일째 까지 체중이 감소하다가 9일째부터 회복하기 시작하여 종료일에 평균 0.30 kg의 증체량을 보였다.
- 비접종 대조군의 경우, 백신 접종군과 체중이 감소하고 증가하는 패턴은 유사하였지만, 심한 설사로 인한 체중 감소 중에 대부분 폐사하였고, 살아있는 개체도 백신 접종군과 비교하여 체중 회복이 매우 더디게 진행되었다.

표 31. 생존한 자돈의 일령별 평균 체중

그룹	공격접종 후 시기별 평균 체중 (kg)					증체량 (kg)
	0일	3일	7일	9일	13일	
시험백신 접종군	2.39 (±0.51)	2.17 (±0.45)	2.55 (±0.46)	2.96 (±0.49)	3.15 (±0.54)	0.76
대조백신 접종군	2.89 (±0.15)	2.56 (±0.18)	2.42 (±0.29)	2.97 (±0.59)	3.19 (±0.23)	0.30
비접종 대조군	2.71 (±0.36)	2.32 (±0.42)	2.10 (±0.41)	2.68 (±0.46)	2.76	0.05

8) 공격접종 후 자돈 임상증상

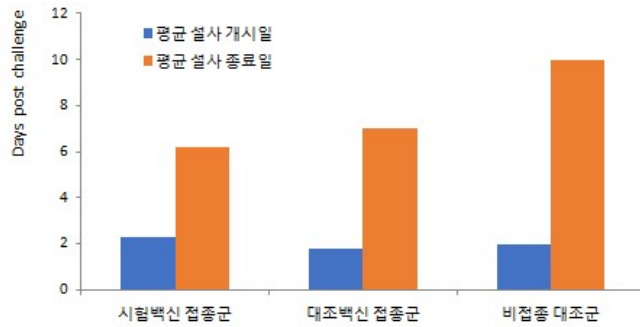


그림 35. 공시 자돈의 평균 설사 개시 및 종료일

- 시험백신 및 대조백신 모돈에서 태어난 자돈들과 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들 모두 공격접종 후 일정 수준 이상의 설사 증상을 보였다. 다만, 백신 접종군들의 경우, 설사 증상이 4~5일 지속되다가 멈추고, 체중이 회복한 반면, 비접종 대조군의 경우, 심한 설사 증상이 지속되면서 90% 이상이 폐사하였고, 살아남은 개체 또한 설사가 장기간 지속되었다.
- 시험백신 접종군의 경우, 설사 개시 후 종료까지 걸린 시간이 평균 6.2일로, 대조백신 접종군 7일, 비접종 대조군 10일보다 짧았다.

표 32. 공격접종 후 설사 증상

그룹	공격접종 후 시기별 설사 증상 개체 수 (설사 개체 수/생존 개체 수)							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
시험백신 접종군	0/15	11/15	15/15	15/15	14/14	13/13	2/11	0/11
대조백신 접종군	2/12	12/12	11/12	11/11	10/10	9/9	9/9	0/9
비접종 대조군	0/16	16/16	16/16	15/15	11/11	6/6	6/6	6/6
그룹	공격접종 후 시기별 폐사 개체 수 (폐사 개체 수/생존 개체 수)						평균 개시일	평균 종료일 *
	9일	10일	11일	12일	13일	14일		
시험백신 접종군	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	2.3일	6.2일
대조백신 접종군	0/8	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1.8일	7일
비접종 대조군	4/4	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	2일	10일

* 설사증상 종료일은 각 그룹 당 생존 개체의 결과 값만 포함

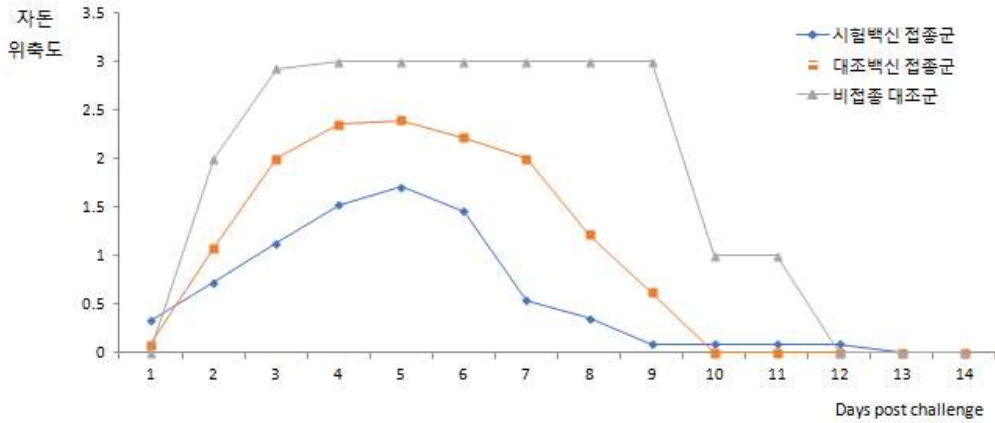


그림 36. 공격접종 후 공시 자돈의 평균 위축도

○ 공격접종 후 사료 섭취가 줄어들고, 설사 증상이 심할수록 공시 자돈의 위축 정도가 증가한다. 이를 0~3점으로 수치화하여 그룹 간 위축자돈 발생 정도를 비교한 결과, 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종 3일 이후 전 개체가 위축 정도가 심각했던 반면, (이후 90% 이상 폐사) 백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 약하거나 중등도의 위축 개체가 발생하였지만, 시험백신 접종군은 70% 이상, 대조백신 접종군은 50%이상 정상으로 회복하였다.

표 33. 공격접종 후 자돈의 위축도

그룹	공격접종 후 시기별 자돈 평균 위축도							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
시험백신 접종군	0.33	0.73	1.13	1.53	1.71	1.46	0.54	0.36
대조백신 접종군	0.08	1.08	2.00	2.36	2.40	2.22	2.00	1.22
비접종 대조군	0.00	2.00	2.93	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
그룹	공격접종 후 시기별 자돈 평균 위축도							
	9일	10일	11일	12일	13일	14일		
시험백신 접종군	0.09	0.09	0.09	0.09	0.00	0.00		
대조백신 접종군	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
비접종 대조군	3.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00		

* 위축도 : 0 ; Normal, 1 ; Mild, 2 ; Moderate, 3 ; Severe

9) 부검 및 조직학적 소견

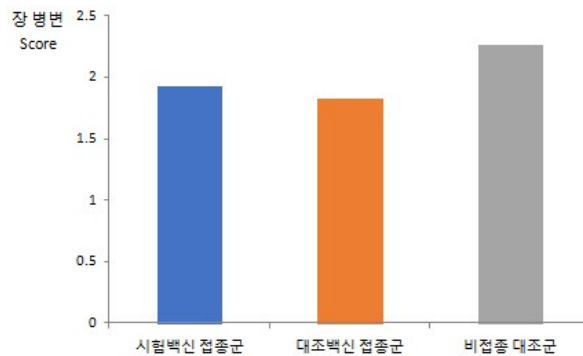


그림 37. 공격접종 종료 후 공시자돈의 장 병변 점수

○ 공격접종 후 폐사한 개체 및 공격접종 종료 후 살아남은 개체를 안락사 후 부검하여 PEDV 감염에 의한 위장 병변을 확인하였다. 위장의 충혈과 팽만 정도에 따라 0~3점으로 수치화하였으며, 그 결과, 시험백신 및 대조백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들은 약하거나 중등도의 위장 병변을 보였고, 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들은 중등도에서 심각한 수준의 위장 병변을 보였다.

표 34. 부검 후 그룹별 임상점수

그룹	부검 후 평균 장 병변 점수*
시험백신 접종군	1.93
대조백신 접종군	1.83
비접종 대조군	2.26

* 장 병변 점수 : 0 ; Normal, 1 ; Mild, 2 ; Moderate, 3 ; Severe

1.2.5.3. 임신 모돈 방어능 시험 결론

- 1) PED 경구용 생백신 제조에 사용되는 PEDV CKT-7_N strain (p177)은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/dose 의 고 역가로 임신 모돈에 경구 투여하더라도 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 제작한 Fc 바이러스 또한 임신 모돈에서 동일한 결과를 얻었다. (기존에 시판중인 경구용 PED 생백신들의 경우, 1 dose 당 역가 수준이 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 수준으로 이번 실험에 사용된 바이러스 역가는 기존 제품들 대비 50배 이상 고역가 바이러스임)
- 2) Fc 바이러스를 임신 모돈의 경구로 투여했을 경우, 동일 strain, 동 역가의 바이러스를 경구로 투여했을 때 보다 임신 모돈의 혈중 중화항체, 초유 내 중화항체가 높게 형성되었음은 물론, 공격접종 전 포유 자돈의 중화항체 및 분변 내 IgA 항체가 수준 또한 높게 나타났다.
- 3) 백신 접종 모돈에서 태어난 6~7일령 포유 자돈을 대상으로 PEDV 야외 강독주로 공격접종을 실시한 결과, 중화항체가 결과와 달리, Fc를 포함하지 않은 생백신 투여 그룹에서 폐사 생존율, 설사 증상 경감, 바이러스 shedding 경감, 증체율 향상 등과 같은 대부분의 지표들이 더 우수한 결과를 보였다. 같은 기간 내 백신 비접종 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 90% 이상 폐사하여 다른 백신 접종군들과 확연한 차이를 보였다.
- 4) PED 근육백신 접종시에는 백신을 접종한 모돈의 혈중 중화항체가, 초유 내 중화항체가 및 IgA 항체가 수준이 높을수록 포유자돈의 공격접종 방어율 또한 높아지는 양상을 보였으나, 이번 PED 경구용 생백신 실험에서는 다소 상관관계가 떨어지는 결과를 얻었고, 이에 대한 분석한 결과, 첫 번째, 농장 사정으로 그룹 당 많은 수의 모돈을 선별하지 못하여 개체 편차가 컸던 점, 두 번째, 시험백신 접종군의 경우, 모돈 복 당 산자수가 많아서 건강한 자돈을 선별하여 실험에 사용했었던 반면, 대조백신 접종군의 경우, 모돈 복 당 산자수가 적어 분만된 대부분의 자돈을 모두 실험에 사용하여 허약자돈 등을 실험에서 제외하지 못한 점, 그리고, 실험 공간의 제약으로 포유자돈의 공격접종 시점이 5~7일로 그룹 간 차이가 있었던 점 등을 들 수 있다. (실제로, 시험백신 접종군 모돈 중 1마리에서 태어난 자돈들은 100% 생존한 반면, 나머지 1마리에서 태어난 자돈들은 대조백신 접종군 모돈 2마리에서 태어난 자돈들보다 생존율이 저조하였음)
- 5) 결론적으로, 시험디자인의 한계로 인하여 본 실험에서는 Fc 백신의 우수성에 대하여 명확히 입증하지는 못하였지만, 5일령 자돈과 임신 모돈 모두에서 안전하게 사용할 수 있는 고역가의 G2b형 PEDV master seed가 확보된 점과 이를 이용하여 Fc 바이러스가 정상적으로 만들어지고, 임신 모돈에서 고 역가의 중화항체가 형성된 점 등을 감안하면 향후 제품화에 큰 문제가 없으리라 판단된다.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2.1. 연구개발 과제의 목표

표 35. 1차년도 연구개발 목표 및 내용

[1차년도] 연구개발 목표	
◎ 주관연구기관: (주)코미팜	◎ 면역증강 경구용 PED 생백신 제조 및 특성 확인
◎ 협동연구기관: 전북대학교	◎ 면역증강 경구용 PED 생백신 최적화
연구개발 내용 및 범위	
◎ 주관연구기관: (주)코미팜	<p>1. 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 시제품 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 생체분자 발현기술 적용 Fc 백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 항원 함량별 3 Lot (Lot 당 5 dose × 5 vial) ○ 면역증강제 포함 경구용 PED 생백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 항원 함량별 3 Lot (Lot 당 5 dose × 5 vial) <p>2. 야외 임상시험을 위한 연속 3 Lot 백신 시제품 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 면역증강 경구용 생백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 최소면역원성 결과에 근거하여 백신의 최종 조성 확립 - 동일 조성의 연속 3 Lot (Lot 당 5 dose × 100 vial) - 백신의 장기보존성(안정성) 평가 및 야외 임상시험에 활용 <p>3. 연속 3 Lot 백신 시제품에 대한 시험성적 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 향후 허가에 대비한 자체 평가 기준 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 시제품 제조직후 특성, 안전성, 면역원성 확인 (성상, pH, 진공도, 함습도, 미입바이러스, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 실험동물 및 목적동물 안전성, 자돈 면역원성 포함) * 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준 참고하여 백신의 특성에 맞게 최적화
◎ 협동연구기관: 전북대학교	<p>1. 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신의 자돈 면역원성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 면역증강 경구용 PED 생백신 2종에 대한 자돈 면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 자돈 면역 후, 중화항체 형성능, IgG ELISA 항체, IgA ELISA 항체 확인 <p>2. 면역증강 경구용 PED 생백신의 최소면역원성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 항원 함량별 3 Lot 시제품에 대한 항체음성 모돈 최소면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 분만 4주 전, 분만 2주 전에 각각 경구로 백신 투여 - 백신 접종 후 임신모돈의 안전성 확인 (임상증상, 유사산, 분만 성적 등 확인) - 백신 접종 모돈에 대한 중화항체가 및 IgA 항체가 확인 (혈액, 초유) - 5일령 포유자돈에 대한 공격접종 방어능 평가 (생존율, 증체량, 임상증상 및 부검 소견 확인 통해 방어유무 평가) * 10LD₅₀ 농도의 PEDV 야외 강독주를 효과적으로 방어할 수 있는 백신 1 dose 당 최소 항원함량을 확인하기 위한 목적

표 36. 2차년도 연구개발 목표 및 내용

[2차년도] 연구개발 목표	
<p>● 주관연구기관: (주)코미팜</p>	<p>○ 면역증강 경구용 PED 생백신 장기보존성 평가 및 제품화</p>
<p>● 협동연구기관: 전북대학교</p>	<p>○ 돼지유행성설사병 백신 접종프로그램 구축</p>
연구개발 내용 및 범위	
<p>● 주관연구기관: (주)코미팜</p>	<p>1. 연속 3 Lot 백신 시제품에 대한 장기보존성(안정성) 평가</p> <p>○ 시제품의 유효기간 확인을 위한 정기적 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제조 후 3개월, 6개월, 9개월 및 12개월 경과 후 특성, 안전성 및 면역원성 확인 (성상, pH, 진공도, 함습도, 미입바이러스, 무균시험, 마이크로플라즈마 부정시험, 실험동물 및 목적동물 안전성, 자돈 면역원성 포함) <p>2. 면역증강 경구용 PED 생백신에 대한 임상시험 신청 및 3개 농장 야외 임상시험</p> <p>○ 임상시험을 위한 3개 농장 계약 체결</p> <ul style="list-style-type: none"> - 코미팜 중앙연구소는 임상시험 실시기관으로 지정되어 있어 직접 허가 목적의 임상시험 수행이 가능함 <p>○ 임상시험을 위한 임상시험 계획서 작성 및 제출 (농림축산검역본부)</p> <p>○ 3개 농장에 대한 야외 임상시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 과용량 접종에 대한 안전성 확인 (임상증상 유무, 분만성적 등) - 규정용량 접종에 대한 효능 확인 (항체형성능 및 지속능, 자돈이행항체가 및 유지기간 등 확인) <p>3. 면역증강 경구용 PED 생백신의 품목허가 신청</p> <p>○ 국내 허가를 위한 허가서류 신청서 작성 및 제출 (농림축산검역본부)</p> <p>○ 해외 등록을 위한 수출용 허가 확보</p>
<p>● 협동연구기관: 전북대학교</p>	<p>1. 면역증강 경구용 PED 생백신과 상용화 경구용 PED 생백신의 효능 비교평가</p> <p>○ 상용화된 경구용 PED 생백신 1종 선정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최근 출시된 G2b형으로 선정하고, 현장 사용 빈도 고려 <p>○ 임신모돈을 대상으로 한 안전성 및 효능 비교 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 분만 4주 전, 분만 2주 전에 각각 경구로 백신 투여 - 백신 접종 후 임신모돈의 안전성 확인 (임상증상, 유사산, 분만 성적 등 확인) - 백신 접종 모돈에 대한 중화항체가 및 IgA 항체가 확인 (혈액, 초유) - 5일령 포유자돈에 대한 공격접종 방어능 평가 (생존율, 증체량, 임상증상 및 부검 소견 확인 통해 방어유무 평가) <p>2. 면역증강 경구용 PED 생백신을 활용한 돼지유행성설사병 백신 접종프로그램 평가</p> <p>○ PED 근육용 생백신, PED 경구용 생백신, PED 근육용 불활화 백신을 활용한 최적의 백신 면역프로그램 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 후보돈을 대상으로 한 면역원성 평가 (항체형성능 및 지속능)

2.2. 연구개발 과제의 수행 내용

[본 연구과제는 선행 연구(연구개발과제번호 : 120089-2)에서 협동연구기관으로부터 분양 받은 경구백신용 PEDV strain을 이용하였다.]

2.2.1. 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 시제품 제작 및 자돈 면역원성 평가

[1] 생체 분자기술 접목 Fc 백신 및 면역 증강제를 포함한 6종의 경구용 시제품 제작 (주관연구기관 : (주)코미팜)

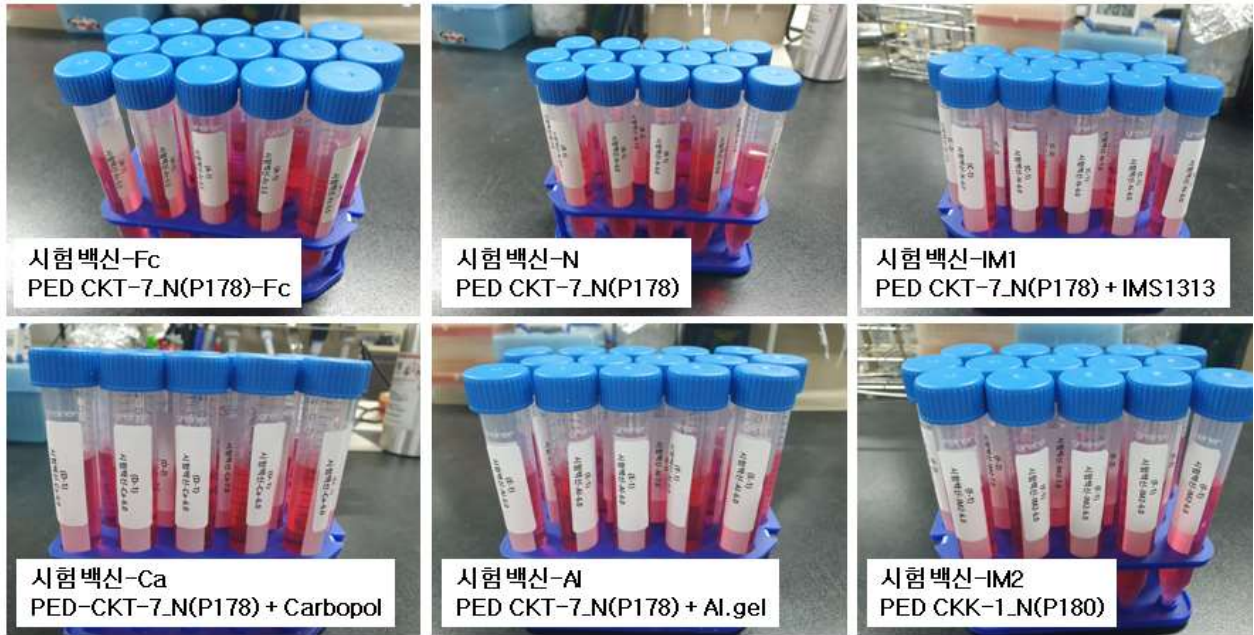
PED strain은 담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV 2종(CKT-7_N strain_P178, CKK-1_N_P180)과 이를 이용하여 생산한 PED-Fc 바이러스를 백신으로 사용하였으며, 동결건조 없이 바이러스 배양액 상태 그대로 제조하였다. 이후 최소면역원성 실험을 위하여 백신 함량은 예상 유효 항원 기준으로 10배 낮은 함량과 10배 높은 함량으로 준비하였다.

표 37. 면역증강 경구용 PED 생백신 6종에 대한 시제품 조성

구분		항원	보조제	함량 (TCID ₅₀ /dose)	비고
A-1	시험백신-Fc-5.5	PED_ CKT-7_N -Fc (P178)	-	5.5 log10	2 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
A-2	시험백신-Fc-6.5			6.5 log10	
A-3	시험백신-Fc-7.5			7.5 log10	
B-1	시험백신-N-6.0	PED_ CKT-7_N (P178)	-	6.0 log10	2 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
B-2	시험백신-N-7.0			7.0 log10	
B-3	시험백신-N-8.0			8.0 log10	
C-1	시험백신-IM1-6.0	PED_ CKT-7_N (P178)	IMS1313 (50%)	6.0 log10	2 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
C-2	시험백신-IM1-7.0			7.0 log10	
C-3	시험백신-IM1-8.0			8.0 log10	
D-1	시험백신-Ca-6.0	PED_ CKT-7_N (P178)	Carbopol (10%)	6.0 log10	2 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
D-2	시험백신-Ca-7.0			7.0 log10	
D-3	시험백신-Ca-8.0			8.0 log10	
E-1	시험백신-AI-6.0	PED_ CKT-7_N (P178)	Aluminum gel (10%)	6.0 log10	2 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
E-2	시험백신-AI-7.0			7.0 log10	
E-3	시험백신-AI-8.0			8.0 log10	
F-1	시험백신-IM2-6.0	PED_ CKK-1_N (P180)	IMS1313 (50%)	6.0 log10	2 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
F-2	시험백신-IM2-7.0			7.0 log10	
F-3	시험백신-IM2-8.0			8.0 log10	

시제품은 각 백신 당 3개의 항원 함량별로 5개씩 제조하였으며, 동결 건조 없이 제조 후 -80℃에서 보관하였다.

그림 38. 면역증강 경구용 PED 생백신 6종에 대한 시험 백신



[2] 생체 분자기술 접목 Fc 백신 및 면역 증강제를 포함한 6종의 경구용 시제품을 이용한 자돈 면역원성 평가 (협동연구기관 : 전북대학교)

■ 실험목표

담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV 2종(CKT-7_N strain_P178, CKK-1_N_P180)을 이용하여 Fc 면역증강 및 면역증강제 포함 시제품을 제조하여 확보된 생백신 strain의 면역원성을 최대화할 수 있는 구성을 결정하기 위함이다.

■ 실험계획

(1) 시험백신

(주)코미팜에서 제공한 백신으로 담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV 2종(CKT-7_N_p178, CKK-1_N_p180 strain)과 이를 이용하여 생산한 PED-Fc 바이러스를 이용하여 제조한 백신이다. 이 백신은 동결건조 없이 바이러스 배양액 그대로 사용하였고 보조제를 포함하는 조성은 백신접종 전 섞는 형태로 활용하였다. 이번 자돈 실험은 유효한 면역증강제 선정이 목적이므로 시제품 중 예상 유효항원에 해당하는 함량만 실험하였다.

표 38. 면역증강 경구용 PED 생백신 6종에 대한 시험 백신 조성

구분	항원	함량 (TCID ₅₀ /dose)	비고	
A	시험백신-Fc	PED CKT-7_N-Fc	6.5 log10	2 ml/1 dose
B	시험백신-N	PED CKT-7_N	7.0 log10	2 ml/1 dose
C	시험백신-IM1	PED CKK-7_N + IMS1313	7.0 log10	2 ml/1 dose

그룹			접종방법	개체 수	비고
A	시험백신-Fc	$10^{6.5}$ TCID ₅₀ /dose	경구, 2주 간격 2회	10	경구백신 접종 후, 2주 간격으로 사독백신 2회 접종(근육)
B	시험백신-N	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose		10	
C	시험백신-IM1	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose		10	
D	시험백신-Ca	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose		10	
E	시험백신-AI	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose		10	
F	시험백신-IM2	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose		10	
비접종 대조군				10	



그림 40. 면역증강 경구용 PED 생백신 6종에 대한 접종 후 사진

(4) 임상증상 확인 (백신의 안전성 평가)

실험 자돈에 대하여 백신 접종 후 14일(백신 4회 접종, 총 56일)동안 임상증상 (발열, 과민 반응, 식욕부진, 구토, 유사산 등) 유무를 확인하였다.

(5) 채혈 (백신의 면역원성 평가)

백신 접종군 및 비접종 대조군 자돈에 대하여 백신 접종 전에 채혈(4회 접종, 4회 채혈)하고 마지막 백신 접종 2주 후에 혈액을 채취하여 IgA, IgG 및 중화항체를 각각 측정하였다.

표 41. 면역증강 경구용 PED 생백신 6종에 대한 샘플채취 일정

샘플명	채취 시기(총 5회)	용도	수량
혈액	백신 접종 전(4회 접종, 4회 채혈), 마지막 백신 접종 2 주후	중화항체가 ELISA 항체가 (IgG, IgA)	각 5 ml

■ 실험결과

(1) 임상증상

▷ 임상증상 관찰 결과 (접종 후 14일 간, 총 56일 간)

자돈에 대하여 각각의 생독 백신을 2ml씩을 경구로 투여하고, 14일간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 전체 백신 접종군에서 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하였다.

표 20. 면역증강 경구용 PED 생백신 1차 접종 후, 자돈 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무(발생 두수/실험 두수)														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CKT-7_N-Fc (P178)	N*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Carbopol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Aluminum gel	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKK-1_N (P180) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* 'N' = 모든 개체에서 임상증상이 관찰되지 않음

자돈에 대하여 1차 경구 생독 백신 접종 2주 후에 각각의 백신 2 ml씩을 경구로 추가 투여하고, 14일간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 모든 백신 접종 그룹에서 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하였다.

표 42. 면역증강 경구용 PED 생백신 2차 접종 후, 자돈 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무(발생 두수/실험 두수)														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CKT-7_N-Fc (P178)	N*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Carbopol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Aluminum gel	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKK-1_N (P180) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* 'N' = 모든 개체에서 임상증상이 관찰되지 않음

자돈에 대하여 2차 경구 생독 백신 접종 2주 후에 사독백신(코미팜, PED-Fc 백신) 2 ml씩을 근육으로 주사 투여하고, 14일간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 모든 백신 접종 그룹에서 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하였다.

표 43. 면역증강 경구용 PED 사독 1차 접종 후, 자돈 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무(발생 두수/실험 두수)														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CKT-7_N-Fc (P178)	N*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Carbopol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Aluminum gel	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKK-1_N (P180) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* 'N' = 모든 개체에서 임상증상이 관찰되지 않음

자돈에 대하여 1차 사독 백신 접종 2주 후에 2차 사독백신(코미팜, PED-Fc 백신) 2 ml씩을 근육으로 주사 투여하고, 14일간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 모든 백신 접종 그룹에서 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하였다.

표 44. 면역증강 경구용 PED 사독 2차 접종 후, 자돈 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무(발생 두수/실험 두수)														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CKT-7_N-Fc (P178)	N*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Carbopol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKT-7_N (P178) + Aluminum gel	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CKK-1_N (P180) + IMS1313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* 'N' = 모든 개체에서 임상증상이 관찰되지 않음

(2) 자돈 항체가

자돈 항체를 측정하기 위하여 총 5구간에서 채혈을 진행하였다. 1구간은 경구 1차 백신 접종 전, 2구간은 1차 생독 백신 접종 2주 후, 3구간은 2차 생독 백신 접종 2주 후, 4구간은 사독 백신 접종 2주 후, 5구간은 2차 사독 백신 접종 2주후였다. 각 실험 혈청을 이용하여 중화항체와 IgA, IgG 항체를 측정하였다.

▷ 중화항체가

PED 생백신 접종 후 혈청을 이용한 중화항체 시험결과에서는 접종 전과 유의미한 변화를 찾아보기 어려웠다. 하지만 생독 2회 접종 후 사독을 접종한 결과에서는 보조제를 첨가하여 생독백신을 한 그룹(C그룹-IMS1313, E그룹-Aluminum gel)에서 유의미한 중화항체를 확인하였다.

표 45. 면역증강 경구용 PED 생백신 자돈의 그룹별 평균 중화항체가

그룹		시기별 중화항체가				
		1차 (경구 1차 접종 전)	2차 (경구 1차 접종 2주후)	3차 (경구 2차 접종 2주후)	4차 (사독 1차 접종 2주후)	5차 (사독 2차접종 2주후)
A	CKT-7_N-Fc (P178)	0.00±0.00	0.90±0.99	0.20±0.63	1.80±2.39	5.20±3.05
B	CKT-7_N (P178)	0.00±0.00	1.00±1.05	0.10±0.32	1.30±1.95	4.60±2.55
C	CKT-7_N(P178) + IMS1313	0.00±0.00	0.60±0.84	0.00±0.00	1.60±2.59	8.90±6.81
D	CKT-7_N(P178) + Carbopol	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.10±1.60	2.80±1.93
E	CKT-7_N(P178) + Aluminum gel	0.00±0.00	0.30±0.95	0.10±0.32	1.40±1.07	9.40±7.80
F	CKT-7_N(P178) + IMS1313	0.00±0.00	0.60±1.26	0.20±0.63	0.90±1.29	7.80±6.83
N	비접종 대조군	0.00±0.00	0.40±1.26	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.32

보조제를 첨가한 백신 중, 사독 2차 접종 2주 후 결과 기준에서는 Aluminum gel을 첨가한 그룹이 가장 우수했지만, 사독 1회 접종 2주차 개체 별 결과에서는 IMS1313이 더 우수한 것을 확인하였다.

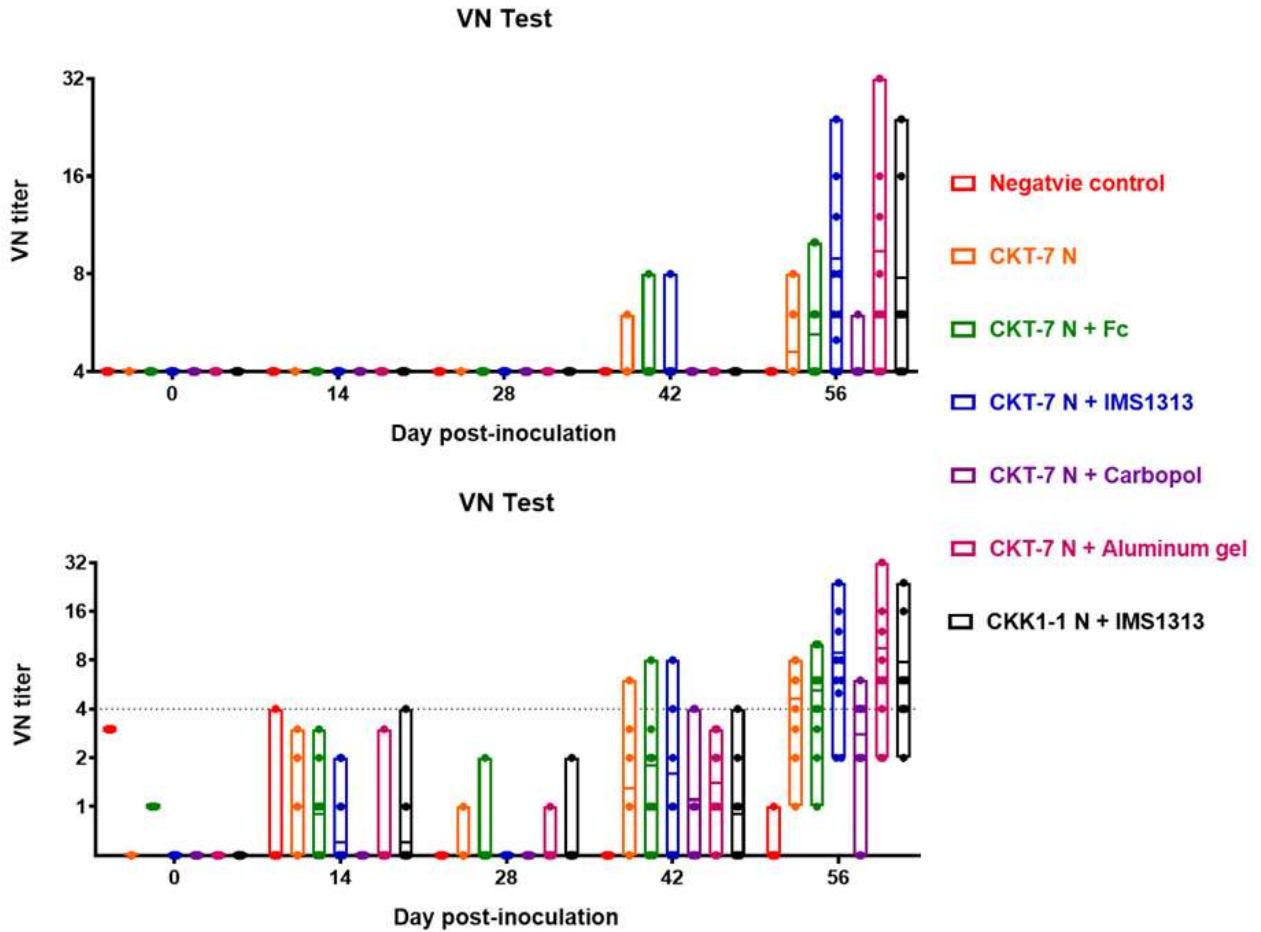


그림 41. 면역증강 경구용 PED 생백신 자돈의 그룹별 평균 중화항체가

경제적인 측면을 고려하였을 때, 전체 용량에 10%만 첨가되는 Aluminum gel을 사용하는 것이 효율적일 수 있지만, 실제 백신 접종 시에 Aluminum gel을 잘 섞지 않을 경우 층이 분리되는 반면 IMS1313은 바로 혼합이 되는 장점을 확인하였다. 보조제가 혼합되어 공급되는 것이 아닌 백신 접종 전에 바로 혼합하여 사용해야 된다는 점에서 IMS1313이 적합하다고 결론을 내렸다.

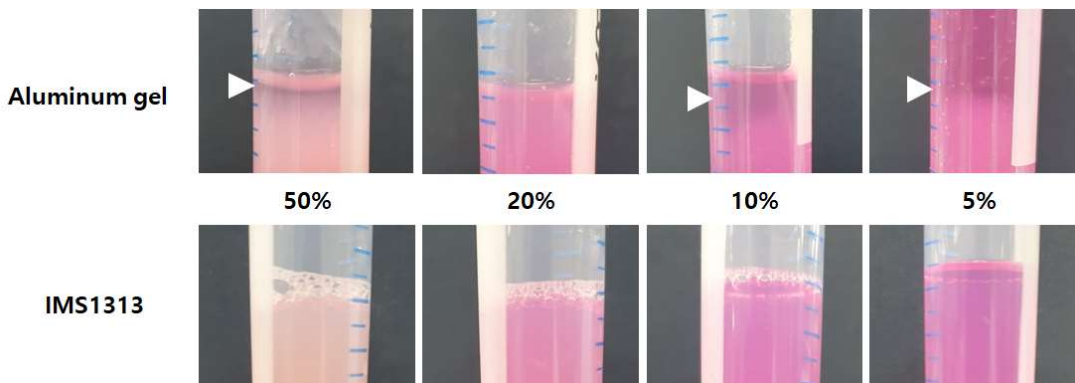


그림 42. 백신 혼합 10분 후, Aluminum gel과 IMS1313 성상 사진

위 자돈 실험 결과에서 생독 백신 2회만으로는 충분치 않고, 사독백신까지 1~2회 추가 접종해야 중화항체 형성능이 최고 기댓값에 도달하는 것을 확인하였다. 또한 생독 백신의 종류에 따라서도 그 기댓값이 변화 될 수 있는 것을 확인하였다. 이는 백신 프로그램의 중요성을 보여주는 결과이며, 본 과제에서 최적의 백신 접종 프로그램을 구축하려는 이유이기도 하다.

▷ IgA 항체가(실험 진행 중)

2차 경구 접종 2주차까지 모든 백신 그룹에서 유효한 항체가가 확인되지 않았다. 전 구간 혈청에 대하여 실험 진행 중에 있으며, 실험 완료 후 추가 분석이 필요하다.

표 46. 면역증강 경구용 PED 생백신 자돈의 그룹별 평균 IgA 항체가

그룹		시기별 IgA ELISA 항체가				
		1차 (경구 1차 접종 전)	2차 (경구 1차 접종 2주후)	3차 (경구 2차 접종 2주후)	4차 (사독 1차 접종 2주후)	5차 (사독 2차접종 2주후)
A	CKT-7_N-Fc (P178)	N.D.	0.011±0.0 22	0.008±0.0 15	N.D.	N.D.
B	CKT-7_N (P178)	N.D.	0.207±0.0 28	0.182±0.5 56	N.D.	N.D.
C	CKK-7_N(P178) + IMS1313	N.D.	0.007±0.0 28	0.013±0.0 23	N.D.	N.D.
D	CKT-7_N(P178) + Carbopol	N.D.	0.004±0.0 16	0.010±0.0 25	N.D.	N.D.
E	CKT-7_N(P178) + Aluminum gel	N.D.	0.000±0.0 03	0.024±0.0 44	N.D.	N.D.
F	CKT-7_N(P178) + IMS1313	N.D.	0.003±0.0 14	0.003±0.0 14	N.D.	N.D.
N	비접종 대조군	N.D.	0.010±0.0 17	0.015±0.0 26	N.D.	N.D.

[3] 실험 결론

위 실험은 178번을 계대한 PED CKT-7_N을 이용하여 다양한 조성으로 실험을 진행하였다. 그 결과, 생백신 접종 후 사독 백신접종 그룹에서 중화항체가 확인되었으며, 그 중에서도 IMS1313과 Aluminum gel이 효과적인 것으로 판단되었다. 다만, 생백신 접종만으로는 면역 형성이 되지 않은 것으로 보이며, 이는 외부 환경적인 요인 외에도 세포에 추가 계대 하면서 병원성뿐 아니라 면역원성까지도 약화되어 항체 형성이 되지 않는 것으로 판단된다.

2.2.2. 면역증강제 포함 경구용 PED 생백신 시제품 2차 제작 및 자돈 면역원성 평가

앞서, P178을 이용한 자돈 면역원성 평가 결과에서, 생백신 접종만으로는 면역 형성이 제대로 되지 않은 결과와 관련하여 외부 환경적인 요인 외에 cell line에서의 바이러스 계대 배양이 너무 과하여 약독화 바이러스의 면역원성에 영향을 주었을 가능성도 함께 확인하기

위하여 이전 계대의 바이러스를 활용하여 제조한 시제품에 대한 안전성 및 면역원성을 추가로 확인하였다.

[1] 면역증강제 포함 경구용 PED 생백신 시제품 2차 제작(주관연구기관 : (주)코미팜)

PED strain은 담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV(CKT-7_N strain)의 100 계대수와 130 계대수를 사용하였으며, 동결건조 없이 바이러스 배양액 상태 그대로를 활용하였다. 보조제가 첨가되는 백신도 동결건조 없이 바이러스 배양액 상태로 제조하였다. 이후 최소면역원성 실험을 위하여 시제품은 예상 유효 항원기준과 기준에서 10배 낮은 함량과 10배 높은 함량으로 준비하였다.

표 47. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 시제품 조성

구분		항원	보조제	함량 (TCID ₅₀ /dose)	비고
A-1	시험백신-N1-6.0	PED_ CKT-7_N (P100)	-	6.0 log10	5 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
A-2	시험백신-N1-7.0			7.0 log10	
A-3	시험백신-N1-8.0			8.0 log10	
B-1	시험백신-N2-6.0	PED_ CKT-7_N (P130)	-	6.0 log10	5 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
B-2	시험백신-N2-7.0			7.0 log10	
B-3	시험백신-N2-8.0			8.0 log10	
C-1	시험백신-IM1-6.0	PED_ CKT-7_N (P100)	IMS1313 (50%)	6.0 log10	5 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
C-2	시험백신-IM1-7.0			7.0 log10	
C-3	시험백신-IM1-8.0			8.0 log10	
D-1	시험백신-IM2-6.0	PED_ CKT-7_N (P130)	IMS1313 (50%)	6.0 log10	2 ml/1 dose, 각 5 dose x 5병
D-2	시험백신-IM2-7.0			7.0 log10	
D-3	시험백신-IM2-8.0			8.0 log10	

시제품은 각 백신 당 3개의 항원 함량별로 5개씩 제조하였으며, 동결 건조 없이 제조 후 -80℃에서 보관하였다.

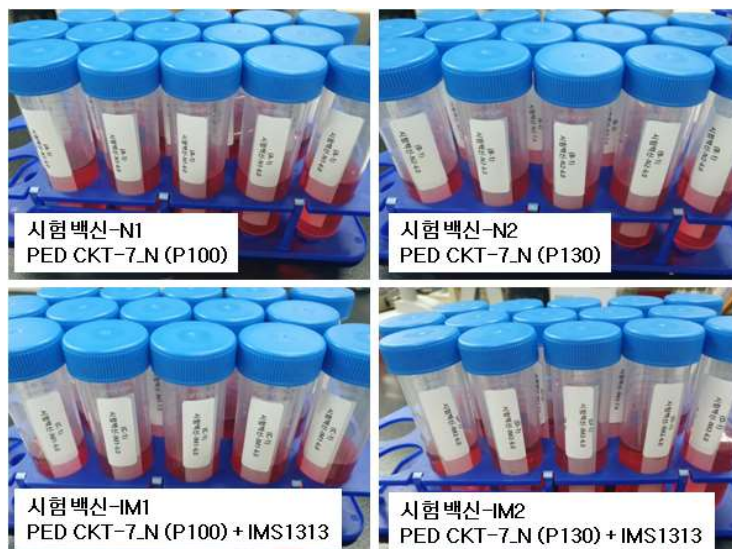


그림 43. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 시험 백신

[2] 면역증강제 포함 경구용 PED 생백신 2차 시제품 4종을 이용한 자돈 면역원성 평가 (협동연구기관 : 전북대학교)

■ 실험목표

담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV(CKT-7_N) 계대수 100과 계대수 130으로 제조한 백신의 안전성 및 면역원성, 보조제 효능을 비교 평가하여 실험 백신의 최적 조성을 결정하기 위함이다.

■ 실험계획

(1) 시험백신의 제조

PED바이러스는 담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV(CKT-7_N) 100계대수와 130계대수를 사용하였으며, 동결건조 없이 바이러스 배양액 상태 그대로를 활용하였다. 보조제가 포함된 조성은 백신 접종 전 혼합하여 사용하였다. 이번 실험은 계대수 선별과 면역증강제 평가를 목적으로 시제품 중 예상 유효항원에 해당하는 함량만 실험하였다.

표 48. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 시험 백신 조성

구분		항원	함량 (TCID ₅₀ /dose)	비고
A	시험백신-N1	PED CKT-7_N P100	7.0 log10	5 ml/1 dose
B	시험백신-N2	PED CKT-7_N P130	7.0 log10	5 ml/1 dose
C	시험백신-IM1	PED CKT-7_N P100 + IMS1313	7.0 log10	5 ml/1 dose
D	시험백신-IM2	PED CKT-7_N P130 + IMS1313	7.0 log10	5 ml/1 dose

(2) 실험동물 선정 및 그룹

PED 백신 접종을 하지않은 모돈에서 분만한 5일령 포유자돈 29마리를 이용하여 실험하였다. 29마리는 다시 24마리는 백신 접종군, 나머지 5마리는 비접종 대조군으로 하였다. 백신 접종군은 다시 시험백신-N1, 시험백신-N2, 시험백신-IM1, 시험백신-IM2 백신 접종군으로 6마리씩 나누었다.

표 49. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 실험동물 선정

구분	개체 번호	주령	두수	비고
A	시험백신-N1	A1 ~ A6	5일령	6두

B	시험백신-N2	B1 ~ B6		6두	
C	시험백신-A1	C1 ~ C6		6두	
D	시험백신-A2	D1 ~ D6		6두	
N	비접종	1 ~ 5		5두	

(3) 백신 접종

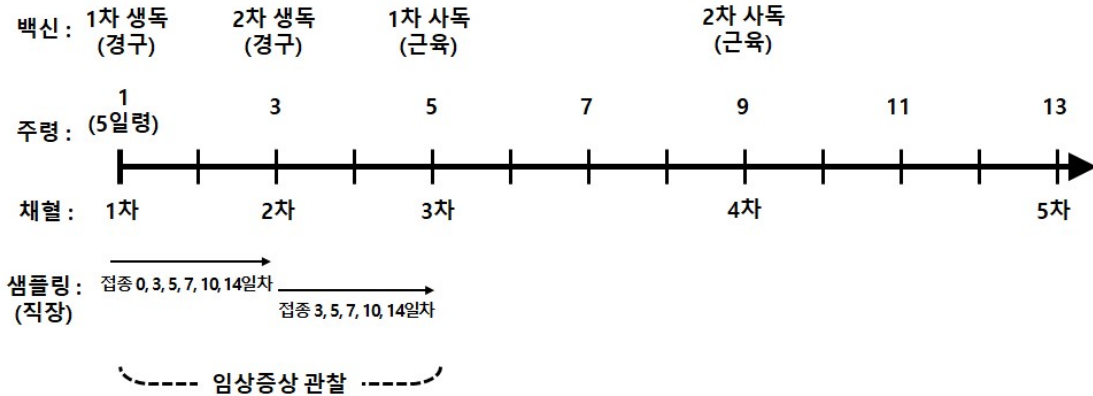


그림 44. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 동물 실험 디자인

PED 항체 음성인 포유자돈 대상으로 각 그룹의 백신을 2주 간격으로 2회 접종하였다. 백신 프로그램 실험을 위하여 경구 백신 접종 2주 후, 사독백신(코미팜 PED-Fc 백신)을 4주 간격으로 2회 접종하였다.

- ▷ 백신 접종 시기 : 생후 5일령 (최종 분만자돈 출생시간으로부터 120시간 이후)
- ▷ 접종량 : 5 ml/dose(생독), 2 ml/dose(사독)
- ▷ 접종방법 : (생독)경구투여, (사독)근육투여

표 50. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 동물 실험 디자인

그룹		접종방법	개체 수	비고
A	시험백신-N1	경구, 2주 간격 2회	6	(프로그램 실험) 경구백신 접종 2주 후, 사독백신 2회를 4주 간격으로 접종(근육)
B	시험백신-N2		6	
C	시험백신-IM1		6	
D	시험백신-IM2		6	
비접종 대조군			5	



그림 45. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 접종 후 사진

(4) 임상증상 확인 및 병원성 확인(백신의 안전성 평가)

실험 자돈에 대하여 생백신 접종 후 14일(생백신 2회, 28일간)동안 임상증상 (침울, 식욕 부진, 설사 등)을 매일 확인하였다. 설사하는 개체는 0~3까지 점수화하여 기록하였다. 또한, 공격접종 후 매일 배설 유무를 확인하여 관찰 14일째에 그룹별 최종 배설량을 계산하였다.

백신 접종후 3일, 5일, 7일, 10일, 14일째에 분변을 추가로 채취하여 분변으로의 PEDV 항원 배출 유무를 확인하였다.

표 51. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 동물 실험 임상증상 관찰(설사 Index score)

0	1	SCORE
		0 : 면봉 swab시 분변이 정상적으로 묻어나옴 1 (연변) : 면봉 swab 시 분변이 부드럽게 묻어나옴 2 (보통설사) : 면봉 swab 시 설사가 항문 밖으로 흐름 3 (심한설사) : 면봉 swab 시 설사가 뿜어져 나옴
2	3	

(5) 채혈 (백신의 면역원성 평가)

백신 접종군 및 비접종 대조군 포유 자돈에 대하여 백신 접종 전에 채혈(4회 접종, 4회 채혈)하고 마지막 백신 접종 4주 후에 혈액을 채취하여 IgA, IgG 및 중화항체가를 각각 측정한다. (총 5회 채혈)

표 52. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 동물 실험 샘플채취 일정

샘플명	채취 시기(총 5회)	용도	수량
혈액	백신 접종 전(4회 접종, 4회 채혈), 마지막 백신 접종 4 주후	중화항체가 ELISA 항체가 (IgG, IgA)	각 5 ml

■ 실험결과

(1) 포유자돈 임상증상 관찰 결과 (접종 후 28일 간)

5일령 포유자돈에 경구로 각 백신 5ml를 접종하였고, 14일간 발열, 과민반응, 식용부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰하였다. 관찰 결과, A그룹(CKT-7_N, P100)에서는 백신 접종 3일차에 6마리 중 2마리에서 경미한 설사를 하였으며, 5일부터 4, 5마리에서 경미한 설사가 확인 되었다. B그룹(CKT-7_N, P130)은 5일차부터 1마리에서 경미한 설사를 일으킨 후, 7일차부터 5마리에서 설사가 확인되었다. C그룹은 B그룹과 유사하게 5일차부터 시작하였으나 10일차부터 5마리에서 설사가 확인되었다. 마지막 D그룹과 대조그룹에서는 7, 10일차에 설사가 시작되었다.

표 53. 경구 1차 접종 후, 포유자돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹		접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무(발생 두수/실험 두수) (임상 점수 평균±편차)					
		0일	3일	5일	7일	10일	14일
A	CKT-7_N(P100)	0/6	2/6 (0.3±0.5)	5/6 (1.2±0.8)	4/6 (1.2±1.0)	4/6 (0.7±0.5)	N.D.
B	CKT-7_N(P130)	0/6	0/6	1/6 (0.2±0.4)	5/6 (0.8±0.4)	5/6 (0.8±0.4)	N.D.
C	CKT-7_N(P100) + IMS1313	0/6	0/6	2/6 (0.5±0.8)	1/6 (0.2±0.4)	5/6 (1.3±1.0)	N.D.
D	CKT-7_N(P130) + IMS1313	0/6	0/6	0/6	0/6	3/6 (0.5±0.5)	N.D.
N	비접종 대조군	0/5	0/5	0/5	1/5 (0.4±0.9)	2/5 (0.4±0.5)	N.D.

(3) 포유자돈 혈중 항체가

5일령 포유자돈 항체가를 측정하기 위하여 총 5구간에서 채혈을 진행하였다. 1구간은 경구 1차 백신 접종 전, 2구간은 1차 생독 백신 접종 2주 후, 3구간은 2차 생독 백신 접종 2주 후, 4구간은 사독 백신 접종 4주 후, 5구간은 2차 사독 백신 접종 4주후였다. 각 실험 혈청을 이용하여 중화항체가와 IgA, IgG 항체가를 측정하였다.

▷ 중화항체가

2차 경구 접종 2주차 결과 중화 항체 수치가 백신 접종한 모든 그룹에서 유효 한 것으로 보여지나, 그룹 A(CKT-7_N, P100)가 오염되어 다른 개체에 영향을 주었을 가능성이 높아

보인다. 나머지구간 혈청에 대하여 실험 진행 중에 있으며, 실험 완료 후 추가 분석이 필요하다.

표 54. 포유자돈의 그룹별 평균 증화항체가

그룹		시기별 증화항체가				
		1차 (경구 1차 접종 전)	2차 (경구 1차 접종 2주후)	3차 (경구 2차 접종 2주후)	4차 (사독 1차 접종 4주후)	5차 (사독 2차접종 4주후)
A	CKT-7_N(P100)	31.33±17.60	18.33±15.82	64.00±49.57	N/D	N/D
B	CKT-7_N(P130)	20.67±7.34	10.33±4.46	37.33±16.52	N/D	N/D
C	CKT-7_N(P100) + Aluminum gel	5.50±2.35	8.33±1.97	76.00±70.06	N/D	N/D
D	CKT-7_N(P130) + Aluminum gel	8.00±11.88	3.33±3.72	82.67±112.87	N/D	N/D
N	비접종 대조군	4.00±4.69	1.60±3.58	19.20±28.62	N/D	N/D

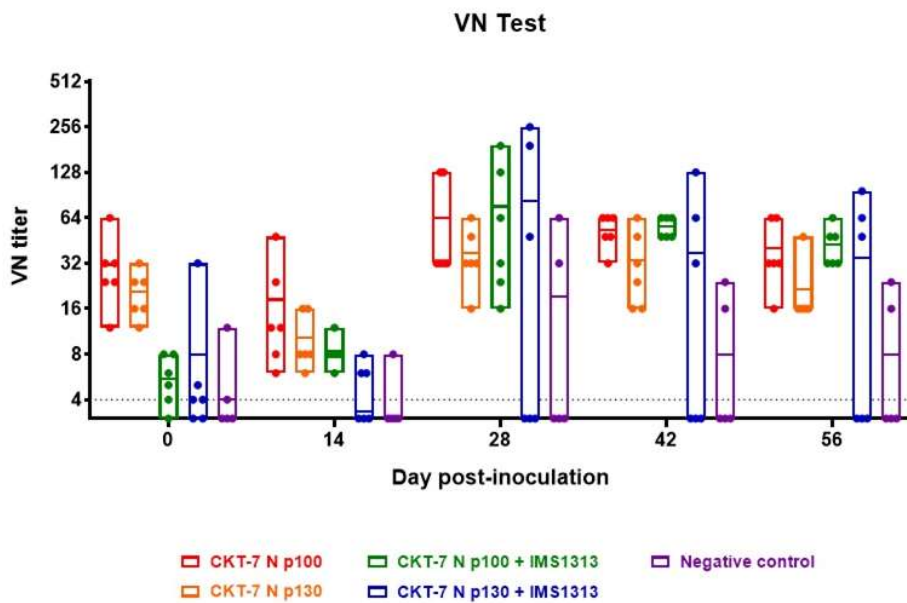


그림 46. 포유자돈의 그룹별 평균 증화항체가

▷ IgA 항체가(실험 진행 중)

2차 경구 접종 2주차 결과 IgA ELISA 항체수치가 백신 접종한 모든 그룹에서 유효 한 것으로 보여지나, 그룹 A(CKT-7_N, P100)가 오염되어 다른 개체에 영향을 주었을 가능성이 높아 보인다. 나머지구간 혈청에 대하여 실험 진행 중에 있으며, 실험 완료 후 추가 분석이 필요하다.

표 55. 포유자돈의 그룹별 평균 IgA 항체가

그룹	시기별 IgA ELISA 항체가				
	1차	2차	3차	4차	5차

		(경구 1차 접종 전)	(경구 1차 접종 2주 후)	(경구 2차 접종 2주 후)	(사독 1차 접종 4주 후)	(사독 2차접종 4주 후)
A	CKT-7_N(P100)	N/D	N/D	2.589±0.974	N/D	N/D
B	CKT-7_N(P130)	N/D	N/D	2.910±1.205	N/D	N/D
C	CKT-7_N(P100) + Aluminum gel	N/D	N/D	2.790±1.756	N/D	N/D
D	CKT-7_N(P130) + Aluminum gel	N/D	N/D	2.302±2.612	N/D	N/D
N	비접종 대조군	N/D	N/D	0.688±1.246	N/D	N/D

▷ IgG 항체가(실험 진행 중)

2차 경구 접종 2주차 결과 IgG ELISA 항체가 백신 접종한 모든 그룹에서 유효 한 것으로 보여지나, 그룹 A(CKT-7_N, P100)가 오염되었을 가능성이 높아 보인다. 나머지구간 혈청에 대하여 실험 진행 중에 있으며, 실험 완료 후 추가 분석이 필요하다.

표 56. 포유자돈의 그룹별 평균 IgG 항체가

그룹		시기별 IgG ELISA 항체가				
		1차 (경구 1차 접종 전)	2차 (경구 1차 접종 2주 후)	3차 (경구 2차 접종 2주 후)	4차 (사독 1차 접종 4주 후)	5차 (사독 2차접종 4주 후)
A	CKT-7_N(P100)	N/D	N/D	3.197±0.912	N/D	N/D
B	CKT-7_N(P130)	N/D	N/D	2.813±1.057	N/D	N/D
C	CKT-7_N(P100) + Aluminum gel	N/D	N/D	3.589±1.077	N/D	N/D
D	CKT-7_N(P130) + Aluminum gel	N/D	N/D	2.366±2.089	N/D	N/D
N	비접종 대조군	N/D	N/D	1.857±2.001	N/D	N/D

(4) 백신접종 후 바이러스 shedding

바이러스를 접종하는 0일과 14일 이후 바이러스 shedding 양이 모든 그룹에서 증가하는 걸 확인 할 수 있다.

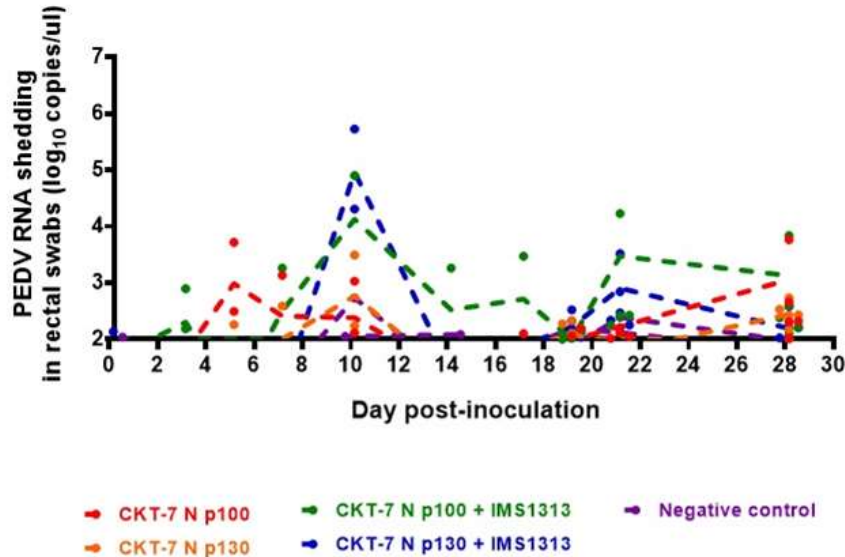


그림 47. 1, 2차 경구 백신 접종 후 분변 내 바이러스 shedding

[3] 실험 결론

5일령 포유잔돈에서 설사가 발생한 원인은 100회 계대한 PED-CKT 바이러스에 병원성이 남아있었을 가능성이 가장 높다. 또한 100회 계대한 PED-CKT가 shedding되어 130회 계대 그룹에 영향을 주었을 것으로 보이지만, 130회 계대된 PED-CKT에서 설사가 발생한 것에 대하여 병원성이 남아있어 설사할 가능성은 배제 할 수는 없을 것이다. 그러므로 확실한 안정성을 위해서는 130회 이상 계대하였으며, 안전성이 확인된 150회 계대 바이러스를 사용하여 추가 실험 진행이 필요하다.

2.2.3. 면역증강 경구용 PED 생백신 3차 시제품 제작 및 최소면역원성 평가

지금까지의 시제품(1, 2차)을 이용하여 실험한 결과 보조제는 IMS1313이 효율적이며, 계대수는 178계대는 면역원이 부족해 보이고, 130대까지는 안전성이 부족하다는 결론이었다. 이와 같은 안전성과 면역원성의 문제는 선행 연구(연구개발과제번호 : 120089-2)에서 안전성 자료를 바탕으로 병원성 복귀 실험까지 완료 한 가장 빠른 계대 수인 150대를 사용하는 것으로 결론을 내렸다.

[1] 면역 증강제를 포함한 경구용 PED 생백신의 항원 함량별 3 Lot 시제품(3차 시제품) (주관연구기관 : ㈜코미팜)

PED strain은 담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV(CKT-7_N strain, P150)를 사용하였으며, 동결건조 없이 바이러스 배양액 상태 그대로를 활용하였다. 보조제는 백신 접종 전 혼합하여 사용하였다. 시제품은 예상 유효 항원기준과 기준에서 10배 낮은 함량과 10배 높은 함량으로 준비하였다.

표 57. 면역증강 경구용 PED 생백신에 대한 3차 시제품 조성

구분	항원	보조제	함량	비고
----	----	-----	----	----

				(TCID ₅₀ /dose)	
A-1	시험백신-6.0	PED_ CKT-7_N (P150)	IMS1313 (50%)	6.0 log10	10 ml/1 dose, 각 2 dose x 5병
A-2	시험백신-7.0			7.0 log10	
A-3	시험백신-8.0			8.0 log10	

시제품은 3개의 항원 함량별로 7개 이상 제조하였으며, 동결 건조 하여 4℃에서 보관하였다.



그림 48. 면역증강 경구용 PED 생백신 항원 함량별 3차 시제품

[2] 항원 함량별 3 Lot 시제품에 대한 항체음성 모돈 최소면역원성 평가
(협동연구기관 : 전북대학교)

■ 실험계획

(1) 시험백신의 제조

담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV (CKT-7_N strain, p150)백신은 면역증강제(IMS1313, 50%)와 혼합하여 사용하였다. PEDV 백신은 동결 건조 상태로 준비하였으며, 백신 접종 전 희석액으로 완전히 용해하여 준비하였다. 용해된 PEDV 백신은 준비된 면역증강제와 혼합하여 활용하였다.

표 58. 면역증강 경구용 PED 생백신의 모돈 시험 백신 조성

구분	항원	면역증강제	함량 (TCID ₅₀ /dose)	비고
G1(저농도)	CKT-7_N (P150)	IMS1313 50%	6.0 log10	10 ml/1 dose
G2(중농도)			7.0 log10	10 ml/1 dose
G3(고농도)			8.0 log10	10 ml/1 dose

(2) 실험동물 선정 및 그룹

PED 백신을 접종하지 않은 임신모돈 11마리를 선정하여, 9마리는 백신 접종군, 나머지 2마리는 비접종 대조군으로 하였다. 백신 접종군은 다시 시험백신 접종군 2마리, 대조백신 접종군 2마리로 나누었다.

표 59. 면역증강 경구용 PED 생백신의 모든 시험동물 선정

그룹	개체 번호	수정일	백신 접종일		분만예정일	공격접종일	
			1차	2차			
접종군	G1 (6.0)	3-1	22.08.01	22.10.27	22.11.10	22.11.22	22.11.29
		2-1	22.08.01			22.11.22	
		17	22.08.03			22.11.24	
	G2 (7.0)	3-8	22.08.09	22.11.03	22.11.17	22.11.30	22.12.07
		16	22.08.10			22.12.01	
		12	22.08.11			22.12.02	
	G3 (8.0)	3-5	22.08.24	22.11.17	22.12.01	22.12.15	22.12.22
		2-4	22.08.25			22.12.16	
		3-12	22.08.25			22.12.16	
비접종 대조군	3-13	22.07.12	-	-	22.11.02	22.11.09	
	2-6	22.07.12	-	-	22.11.02		

(3) 임신 모든 백신 접종

분만 전 임신 모돈을 대상으로 2주 간격으로 2회 접종하였다.

- ▷ 백신 접종 시기 : 분만 4~5주 전 임신모돈
- ▷ 접종량 : 10 ml/1 dose
- ▷ 접종방법 : 경구투여

표 60. 면역증강 경구용 PED 생백신의 모든 실험 디자인

그룹(TCID ₅₀ /dose)		접종방법	개체 수	포유자돈 공격접종
접종군	G1	6.0 log10	경구, 2주 간격 2회	복당 5~6두씩, 15두
	G2	7.0 log10		
	G3	8.0 log10		
비접종 대조군			2	복당 7~8두씩, 15두

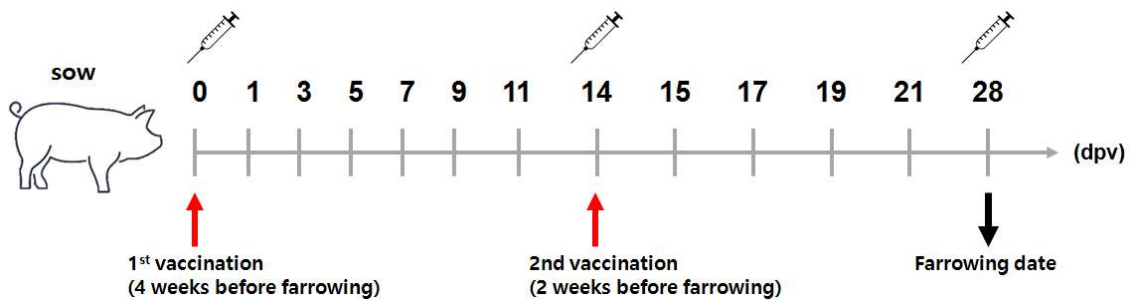


그림 49. 면역증강 경구용 PED 생백신의 모든 접종 일정

(4) 임상증상 및 분만성적 확인 (백신의 안전성 평가)

실험 모돈에 대하여 백신 접종 후 분만 전까지 14일 동안 임상증상 (발열, 과민반응, 식욕 부진, 구토, 유사산 등) 유무를 확인하고, 분만 시 성적을 (실산 수, 이유 수) 추가로 확인하였다.

(5) 채혈 및 초유 채취 (백신의 면역원성 평가)

백신 접종군 및 비접종 대조군 모돈에 대하여 1차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 전, 분만 당일 혈액을 채취하고 분만 시 초유를 채취하여 IgA, IgG 및 중화항체를 각각 측정하였다.

표 61. 면역증강 경구용 PED 생백신의 모돈 실험 샘플채취 일정

샘플명	채취 시기	용도	수량
혈액	1차 접종 전, 2차 접종 전, 분만 시	중화항체가 ELISA 항체가 (IgG, IgA)	각 5 ml
초유	분만 시		10 ml

(6) 공격접종 실험 (백신의 방어력 평가)

▷ 공격접종 균주

PEDV Genotype 2b 야외 유행 주에 대한 백신의 방어력을 평가하기 위하여 공격접종 균주로 농림검역본부에서 분리된 PEDV QIAP1401 strain을 사용하였다.

▷ 공격접종 자돈 선별

시험백신 및 대조백신 접종군과 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈을 선별(접종군은 복당 5~6마리, 비접종 대조군은 복당 7~8마리)하여 그룹 당 15마리씩 공격접종에 사용하였다.

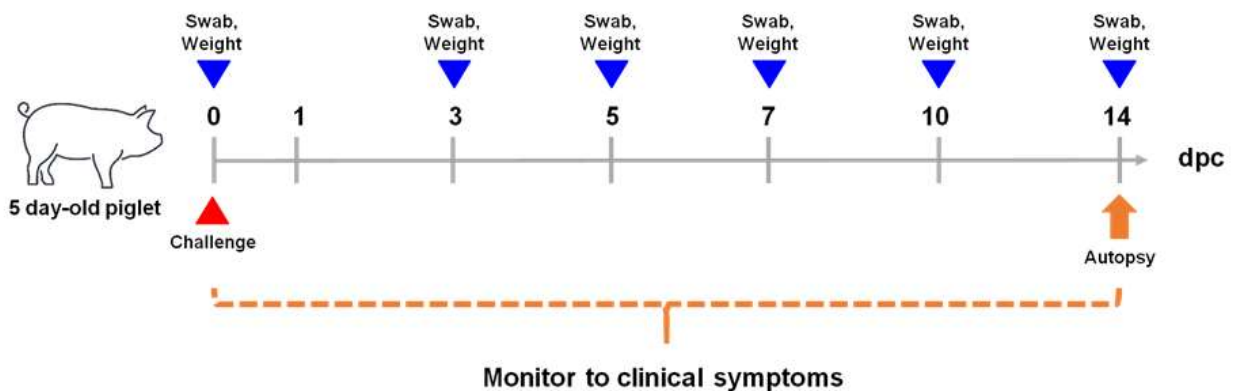


그림 50. 면역증강 경구용 PED 생백신 접종 모돈의 분만 자돈 실험 일정

▷ 공격접종 방법

표 62. 공격접종 방법 및 시기

공격접종 바이러스	접종량	접종 방법	접종 시기
QIAP 1401 (P11)	10 ^{3.0} TCID ₅₀ /두 (약 10 LD ₅₀)	경구	생후 5일령 (최종 분만 출생시간으로부터 120시간 이후)

- ① 공격 접종 바이러스 : QIAP 1401 strain (P11, 농림축산검역본부 제공)
- ② 공격 접종량 : 10^{3.0}TCID₅₀/두 (약 10LD₅₀)
- ③ 공격접종 시기 : 생후 5~7일령 (최종 분만자돈 출생시간으로부터 120시간 이후)에 두 당 QIAP 1401 strain 10^{3.0}TCID₅₀을 경구 투였다. 공격 접종 시 모든 모돈은 광범위 항생제 및 해열제를 처방하고, 자돈은 철분주사를 실시하였다.

▷ 자돈 체중 측정

공격접종 전, 공격접종 후 3일, 5일, 7일, 10일, 14일째에 각각 자돈의 체중을 측정하였다.

▷ 자돈 채혈

공격접종 전, 공격접종 후 14일째에 각각 채혈하여 혈중 중화항체가 및 ELISA 항체가 (IgA, IgG)를 확인하였다. 폐사 자돈은 폐사 당일 채혈하였다.

▷ 설사 증상 관찰 및 폐사율 확인

공격접종 후 14일 동안 모든 공시자돈에 대한 설사 유무를 매일 확인하고, 임상증상을 자돈 활력저하(depression) 정도에 따라 0~3까지 점수화하여 기록하였다(0 : Normal, 1 : Mild, 2 : Moderate, 3 : Severe). 또한, 공격접종 후 매일 폐사 유무를 확인하여 관찰 14일째에 그룹별 최종 폐사율을 계산하였다.

▷ 자돈 분변 채취 및 바이러스 shedding 관찰

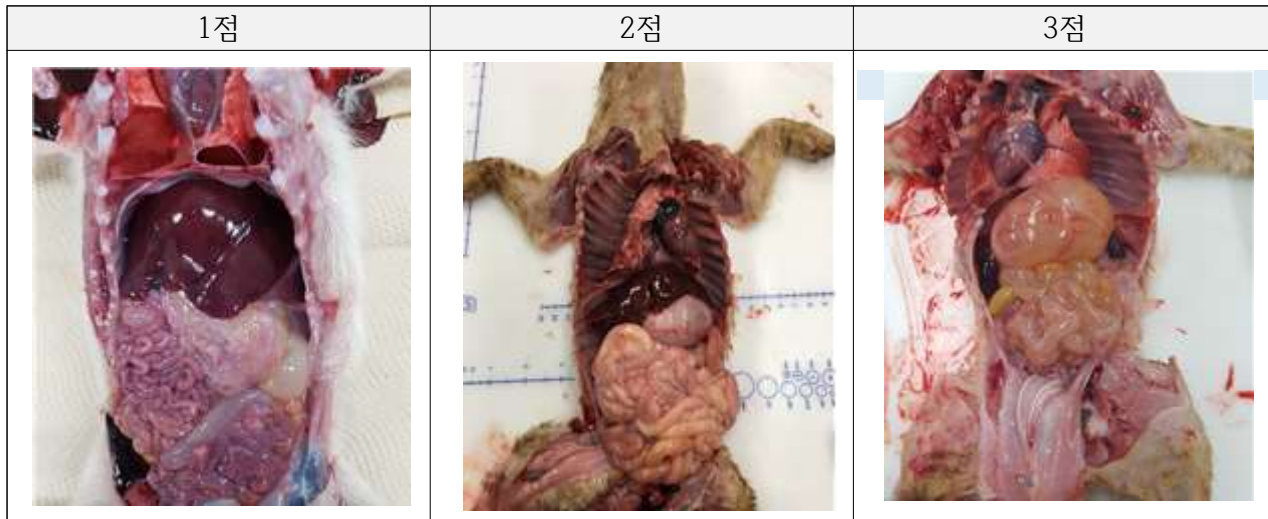
5~7일령 포유자돈 (공격접종 전)에서 분변을 채취하여 분변 중의 IgA 및 IgG 항체가를 확인하였고, 공격접종 후 3일, 5일, 7일, 10일, 14일째에 분변을 추가로 채취하여 분변으로의 PEDV 항원 배출 유무를 확인하였다.

▷ 부검 및 조직학적 소견 관찰

공격접종 종료 후 (14일째) 살아있는 자돈을 안락사 시킨 후 각 조직의 병변(장출혈, 장비후)*을 확인하여 수치화 하고, 십이지장, 공장, 회장을 채취하여 H&E 염색을 통한 조직 병변(v/c ratio)**을 추가로 확인한다. 또한, 동일한 샘플에 대하여 PEDV에 대한

단일클론 항체로 IHC를 실시하여, 조직 내 PEDV 항원 유무를 확인하였다. 폐사 자돈의 경우, 폐사 즉시 부검하여 동일한 방법으로 병변을 확인하고, 샘플을 채취 하였다.

표 63. 면역증강 경구용 PED 생백신의 모돈 실험 임상증상 관찰 (장 병변 Index score)



* 충혈, 팽만 정도에 따라 0~3점으로 구분

** V/C ratio (Villus/Crypt ratio, 융모/선와의 비) = 장변을 확인하는 지표로 병변이 심할수록 v/c ratio가 감소함

■ 실험 결과

(1) 임상증상 및 분만성적

▷ 1차 백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

임신 모돈에 대하여 분만 4주전에 각각의 백신 10ml씩을 경구로 투여하고, 14일 간 발열과 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상 증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간동안 태아의 안전성에도 문제가 없었다.

표 64. 1차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	개체 번호	백신접종 후 경과일별 임상증상 유무															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
접종군	G1 (6.0)	3-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	G2 (7.0)	3-8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	G3 (8.0)	3-5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2-4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3-12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

비접종 대조군	3-13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	2-6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

▷ 2차 백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

임신 모돈에 대하여 분만 2주전에 각각의 백신 10ml씩을 경구로 투여하고, 14일 간 발열과 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상 증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간동안 태아의 안전성에도 문제가 없었다.

표 65. 2차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	개체 번호	백신접종 후 경과일별 임상증상 유무															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
접종군	G1 (6.0)	3-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	G2 (7.0)	3-8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	G3 (8.0)	3-5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2-4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3-12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	3-13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2-6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

(2) 모돈 및 초유 항체가

VN Test (Sow, Serum)

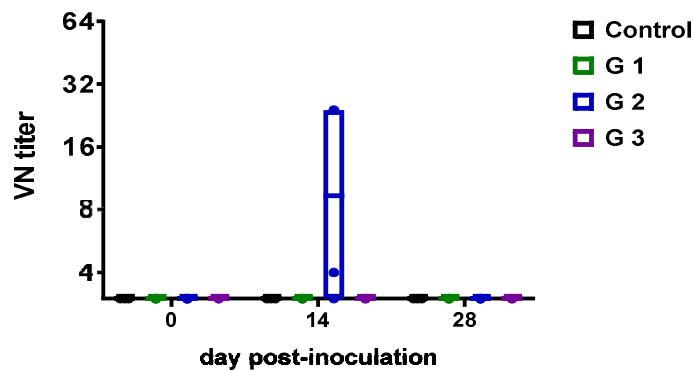


그림 51. 모돈 혈중 중화 항체가 측정 결과

모돈 혈청을 이용하여 실험한 결과, G2(중농도) 백신 접종 그룹에서만 백신 접종 2주차에 모돈 혈중 중화항체가 4~32배 사이에서 확인되었으며, 나머지 그룹에서는 중화항체가 확인

되지 않았다.

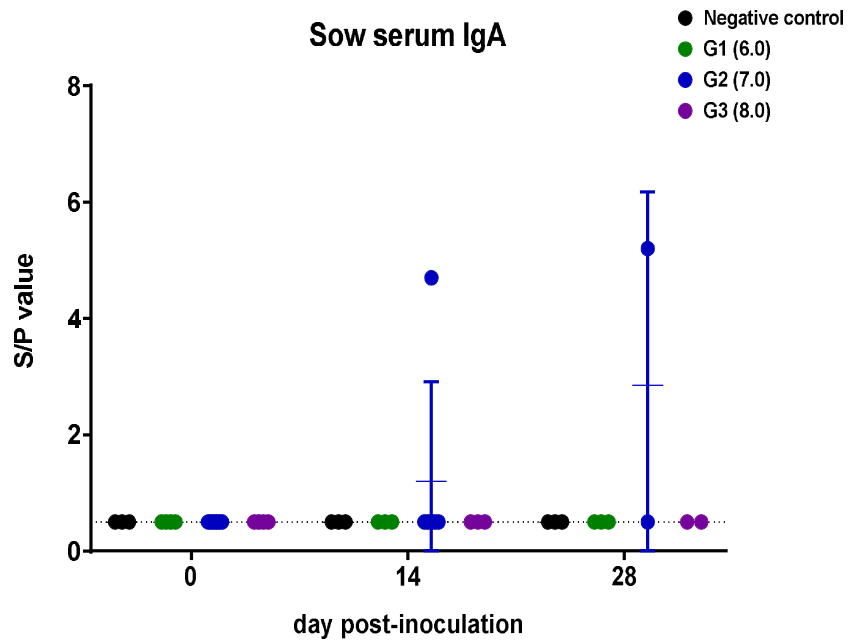


그림 52. 모돈 혈청 IgA 항체가 측정 결과

모돈 혈청을 이용하여 PED IgA commercial ELISA kit로 실험한 결과, G2(중농도) 백신 접종 개체의 초유에서는 항체가 확인되었으며, 나머지 그룹에서는 확인되지 않았다.

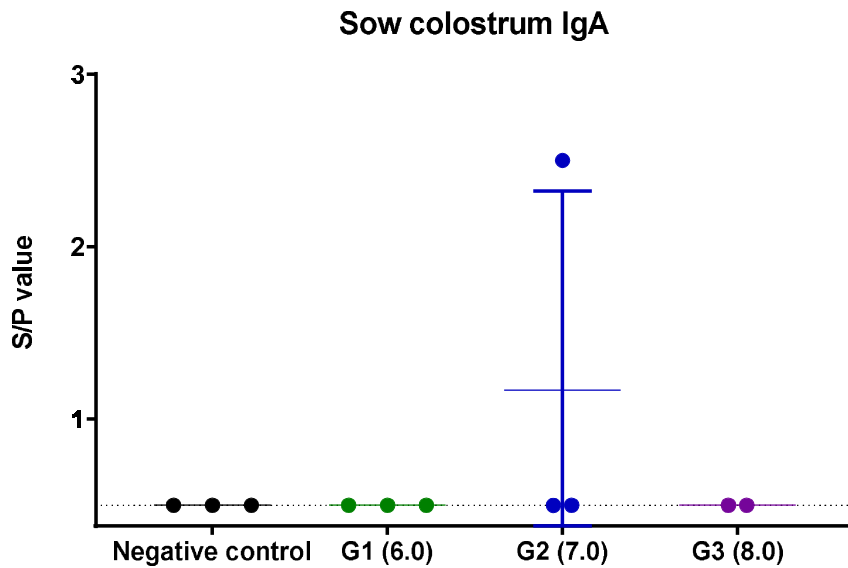


그림 53. 모돈 초유 중화 항체가 측정 결과

모돈 초유를 이용하여 PED IgA commercial ELISA kit로 실험한 결과, 모돈 혈청 결과와 유사하게 G2(중농도) 백신 접종 개체의 초유에서는 항체가 확인되었으며, 나머지 그룹에서는 확인되지 않았다.

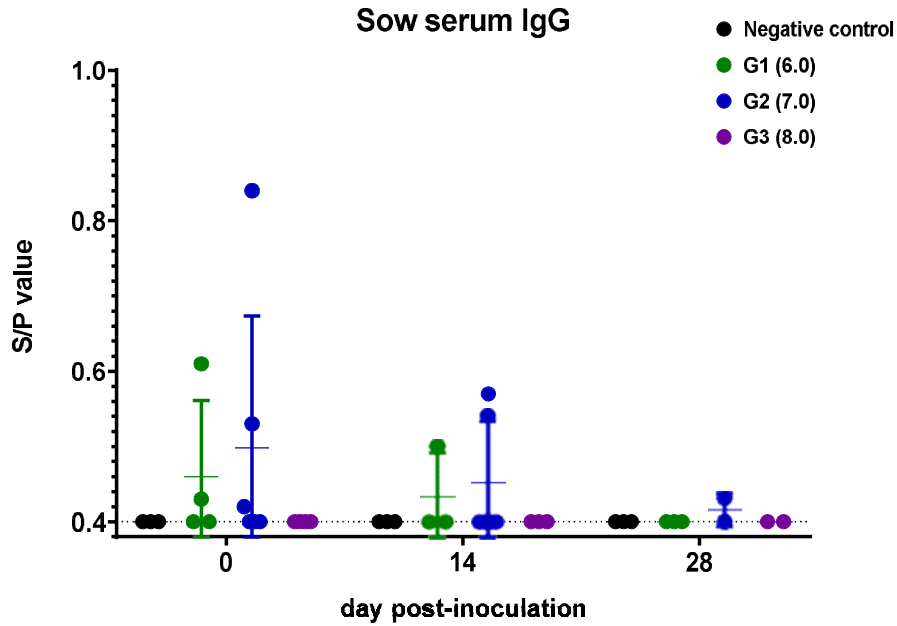


그림 54. 모돈 혈청 IgG 항체가 측정 결과

모돈 혈청을 이용하여 PED IgG commercial ELISA kit로 실험한 결과, 14일차, 28일차로 갈수록 IgG 항체가가 줄어드는 것을 확인하였다.

(3) 포유자돈 혈중 항체가 (공격접종 전, 공격접종 후 14일)

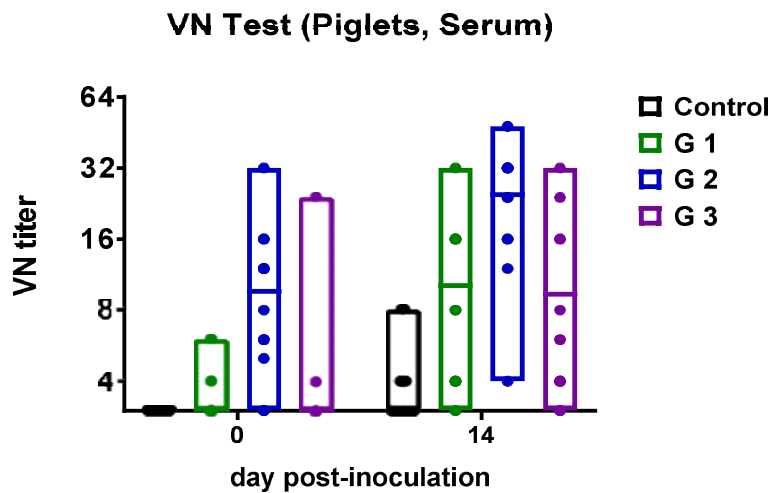


그림 55. 포유자돈 혈중 중화 항체가 측정 결과

포유자돈 혈중 중화항체가 확인 결과, 초유 섭취 직후 G1(저농도) 그룹은 0~6배, G2(중농도) 그룹은 5~32배, G3(고농도) 그룹은 4~24배로 확인되었다. 공격접종 후 14일차에서는 모든 그룹에서 공격접종 전 보다 높은 중화항체가를 확인하였다.

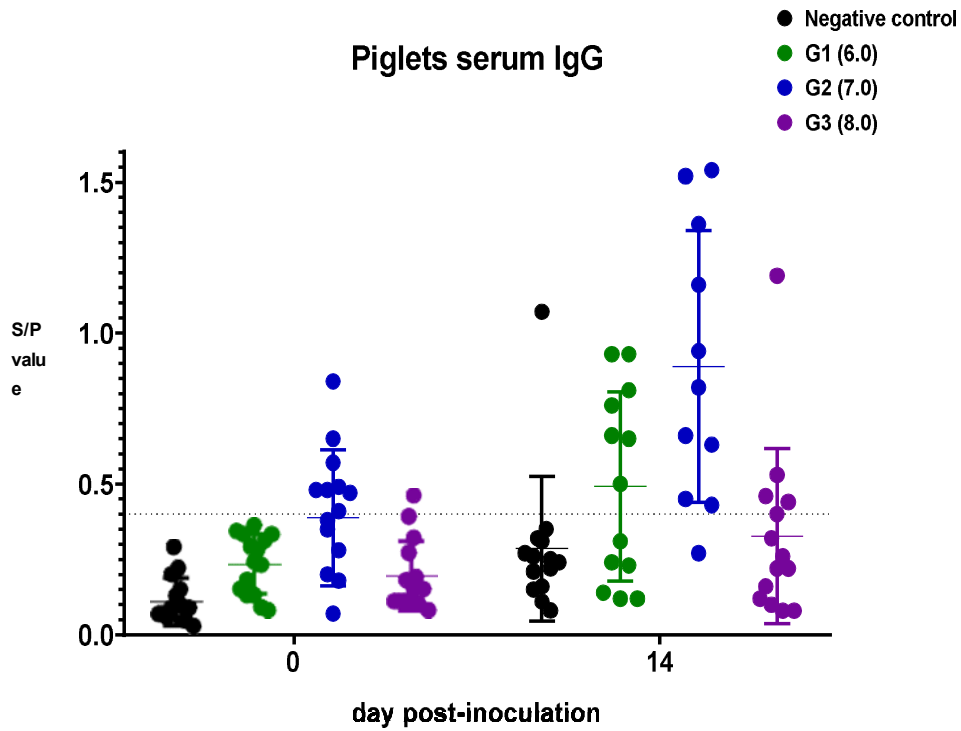


그림 56. 포유자돈 혈중 IgG 항체가 측정 결과

포유 자돈 혈청을 PED IgG commercial ELISA kit로 측정한 결과, 대조 그룹 대비 모든 그룹에서 높은 항체가 수준을 확인하였으며, 공격접종 이후에는 전체적으로 항체가가 상승하였다.

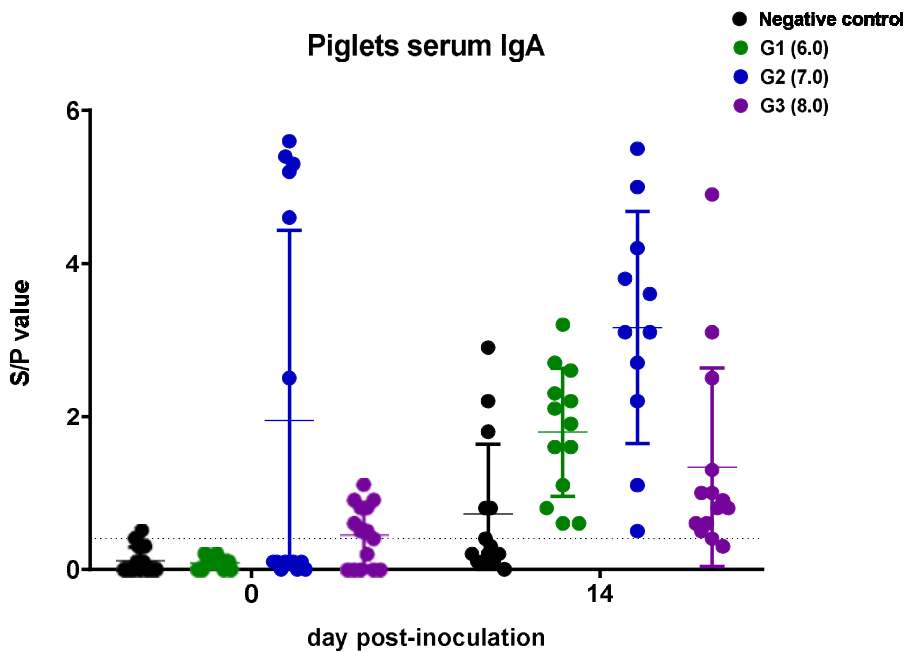


그림 57. 포유자돈 혈중 IgA 항체가 측정 결과

포유 자돈 혈청을 PED IgA commercial ELISA kit로 측정한 결과, 2번 그룹 분만 개체에서 유의미한 증가를 확인하였으며, 공격 접종 이후에는 전체적인 항체가 상승을 확인하였다.

(4) 포유자돈 분변 바이러스 배출 및 임상증상(설사) 결과

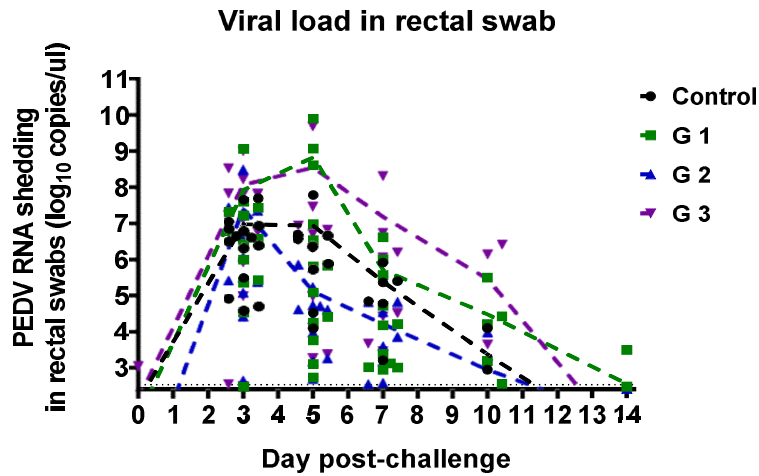


그림 58. 포유자돈 분변으로의 바이러스 배출

공격 접종 후, 일정한 간격으로 포유자돈 분변 바이러스 배출을 확인한 결과, 3~5일 차까지 배출량이 증가하다가 이후 천천히 감소하는 것을 확인하였다. 배출량은 대조 그룹 대비 G2(중농도) 그룹은 전체적으로 줄었으나, G1(저농도)과 G3(고농도) 그룹에서는 전체적으로 증가한 것으로 확인되었다.

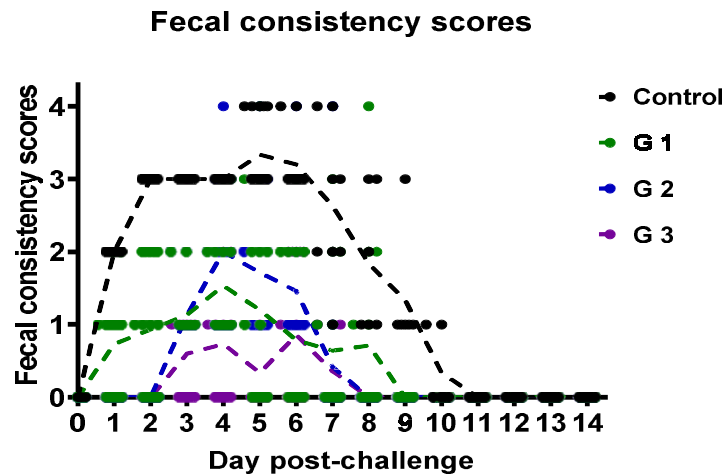


그림 59. 포유자돈 분변 임상증상(설사) 결과

공격 접종 후, 대조 대비 모든 백신 그룹에서 설사하는 개체가 감소하였으며, 대조 대비 G2(중농도)와 G3(고농도) 그룹은 설사 발생일이 그룹 평균 2일 정도 미루어지고 3일 정도 당겨졌으며 임상증상(설사)도 감소 되었다. G1(저농도) 그룹도 대조 대비 설사 정도는 감소 하였으나, 설사 시작일은 G2와 G3 그룹보다는 2일 빨리하였으며, 하루 더 설사하였다.

(5) 공격접종 후 자돈 누적 폐사율

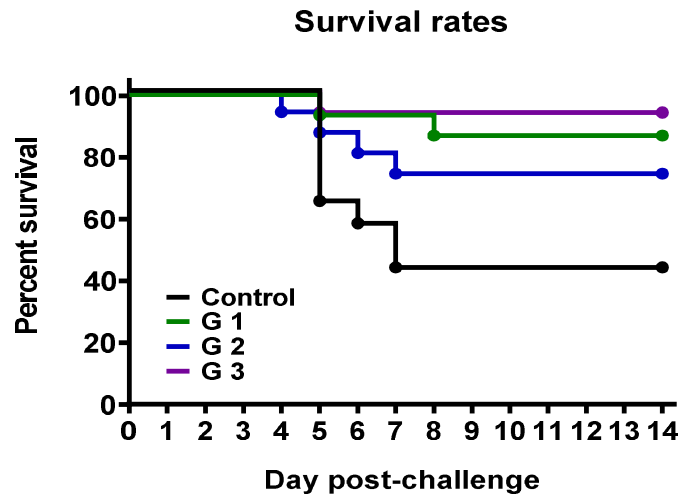


그림 60. 포유자돈 분변 임상증상(설사) 결과

공격접종 후, 대조그룹은 50%이상 폐사하였으며, G1그룹은 약 15%, G2그룹은 약 25%, G3 그룹은 약 10% 정도 폐사가 발생하였다.

(6) 자돈 체중 변화 (공격접종 전, 공격접종 후 3일, 7일, 10일, 14일)

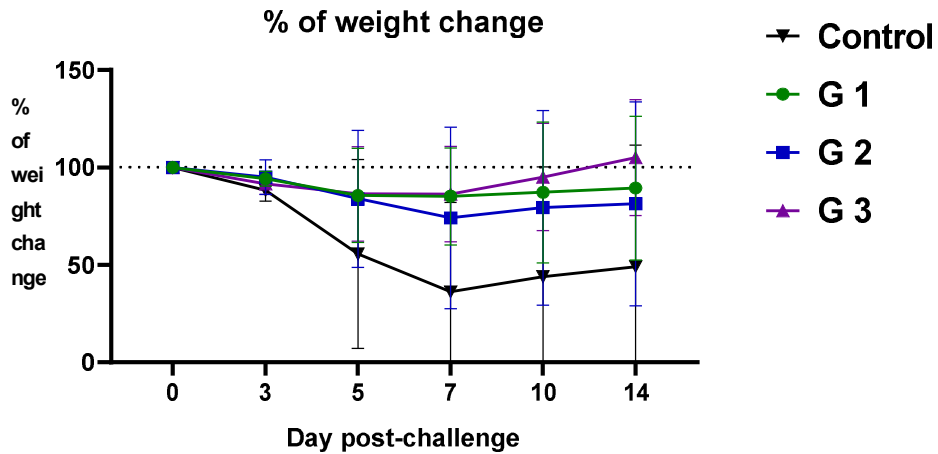


그림 61. 포유자돈 분변 임상증상(설사) 결과

공격접종 후, 자돈의 체중변화는 모든 그룹에서 7일까지 감소하다가 7일차 이후부터는 회복하였다. 체중의 감소율은 대조 대비 모두 모든 백신 그룹에서 감소하였으며, G3(고농도), G1(저농도), G2(중농도) 그룹 순으로 체중 감소율이 줄어들었다.

[3] 실험 결론

위 모든 실험 결과로 본 연구에서 개발하고자 하는 PED 백신의 방어능은 확인되었으나, 과제의 목표종인 하나인 임상시험 신청을 위한 검정기준에 해당하는 항체 수준을 평가하기 어려웠다. 이 같은 이유와 품목허가 부표상(사용방법) 근육접종을 추가하기 위하여 모든 근육 접종 실험을 추가 진행하였다.

2.2.4. 항원 함량별 3 Lot 시제품에 대한 항체음성 모돈 최소면역원성 평가(근육) (주관연구기관 : (주)코미팜)

모든 경구 백신 실험 결과 항체 수준의 검출이 미비한 점을 보완하기 위하여 근육접종 실험을 수행하였으며, 이는 항체 수준 검사의 미비한 점과 함께 산업화 과정 중 부표 접종방법상 근육 접종을 추가하여 다양한 백신 접종프로그램 구상이 가능하게 하기 위하여 수행하였다.

■ 실험계획

(1) 시험백신의 제조

담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV (CKT-7_N strain, p150)백신을 동결건조하여 활용한다. 동결 건조된 백신은 목적에 맞게 희석하여 접종한다.

표 66. 시험 백신의 조성

구분	항원	면역증강제	함량 (TCID ₅₀ /dose)	비고
G1(접종군)	CKT-7_N (P150)	-	6.0 log ₁₀	2 ml/1 dose

(2) 실험동물 선정 및 그룹

PED 백신을 접종하지 않은 임신 모돈 5마리를 선정하여, 3마리는 백신 접종군, 나머지 2마리는 비접종 대조군으로 한다. 백신 접종군은 다시 시험 백신 접종군 2마리, 대조 백신 접종군 2마리로 나눈다.

표 67. 실험동물 선정

그룹		개체 번호	수정일	백신 접종일		분만에정일
				1차	2차	
접종군	G1 (6.0)	75-15(3산)	23.08.14	23.11.08	23.11.22	23.12.06
		53-35(5산)	23.08.14			23.12.06
		75-24(2산)	23.08.16			22.12.08
비접종 대조군		71-32(2산)	23.08.21	-	-	22.12.13
		71-46(2산)	23.08.21	-	-	22.12.13

(3) 임신 모든 백신 접종

분만 전 임신 모든을 대상으로 2주 간격으로 2회 접종한다.

- 백신 접종 시기 : 분만 4~5주 전 임신모돈
- 접종량 : 2 ml/1 dose
- 접종방법 : 근육접종

표 68. 실험 디자인

그룹(TCID ₅₀ /dose)		접종방법	개체 수	포유자돈 실험 수
접종군	G1 6.0 log ₁₀	근육 2주 간격 2회	3	복당 5~6두씩, 15두
비접종 대조군			2	복당 7~8두씩, 15두

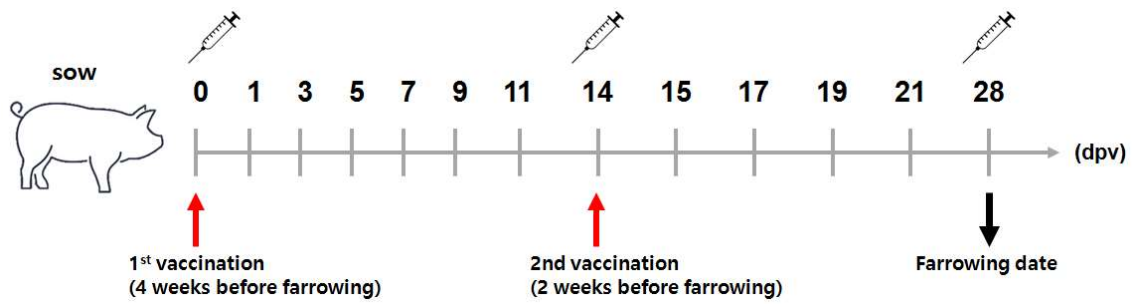


그림 62. 임신모돈 백신 접종 일정

(4) 임상증상 및 분만 성적 확인 (백신의 안전성 평가)

실험 모돈에 대하여 백신 접종 후 분만 전까지 14일 동안 임상증상 (발열, 과민반응, 식욕 부진, 구토, 유사산 등) 유무를 확인하고, 분만 시 성적을 (실산 수, 이유 수) 추가로 확인한다.

(5) 채혈 및 초유 채취 (백신의 면역원성 평가)

백신 접종군 및 비접종 대조군 모돈에 대하여 1차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 전, 분만 당일 혈액을 채취하고 분만 시 초유를 채취하여 IgA, IgG 및 중화항체를 각각 측정한다.

표 69. 샘플 채취 일정

샘플명	채취 시기	용도	수량
혈액	1차 접종 전, 2차 접종 전, 분만 시	중화항체가 ELISA 항체가 (IgG, IgA)	각 5 ml
초유	분만 시		10 ml

(6)자돈 채혈

초유 섭취 5일 차에 채혈하여 혈중 중화항체가 및 ELISA 항체가(IgA, IgG)를 확인한다.

■ 실험결과

(1) 임상증상 및 분만성적

▷ 1차 백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

임신 모돈에 대하여 분만 4주전에 각각의 백신 2ml씩을 근육으로 투여하고, 14일 간 발열과 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상 증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간동안 태아의 안전성에도 문제가 없었다.

표 70. 1차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹		개체 번호	백신접종 후 경과일별 임상증상 유무													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
접종군	G1 (6.0)	75-15 (3산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		53-35 (5산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		75-24 (2산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군		71-32 (2산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		71-46 (2산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

▷ 2차 백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

임신 모돈에 대하여 분만 2주전에 각각의 백신 2ml씩을 근육으로 투여하고, 14일 간 발열과 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상 증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간동안 태아의 안전성에도 문제가 없었다.

표 71. 2차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹		개체 번호	백신접종 후 경과일별 임상증상 유무													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
접종군	G1 (6.0)	75-15 (3산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		53-35	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

	(5산)															
	75-24 (2산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	71-32 (2산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	71-46 (2산)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

(2) 분만성적

백신 접종그룹과 비접종 대조그룹 모돈에서 13마리 이상의 자돈을 실산 하였으며, 그중 12마리 이상이 이유를 시작하였다. 하지만 백신 그룹 중 1개체(53-35)에서 공태가 발생하여 초유 항체 결과와 자돈 실험 결과에서 제외하게 되었다.

표 72. 임신 모돈의 분만 성적

그룹		개체	실산 수	유사산 수	이유 수
접종군	G1 (6.0)	75-15(3산)	13		13
		53-35(5산)		공태	
		75-24(2산)	13		12
비접종 대조군		71-32(2산)	15	2	13
		71-46(2산)	13		13



그림 63. 임신 모돈 그룹별 분만 후 사진

(3) 모돈 및 초유 항체가

▷ 중화항체가

모돈 실험 일정 별 혈청과 초유를 이용하여 중화 항체가를 확인한 결과, 접종군의 혈청은

백신접종 2주부터 2배 이상의 항체가를 확인되었으며, 분만 시에는 모든 개체에서 16배 이상의 항체가를 확인하였다. 공태를 제외한 백신 2개체에서는 초유에서 128배의 항체가 확인되었으며, 대조그룹에서는 혈청과 초유에서 모두 유의미한 중화항체가 확인되지 않았다.

표 73. 모든 및 초유 중화항체 결과

그룹	개체 번호	시기별 중화항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
접종군 G1 (6.0)	75-15(3산)	<2	16	64	256
	53-35(5산)	<2	4	16	공태
	75-24(2산)	<2	2	32	128
비접종 대조군	71-32(2산)	<2	<2	<2	2
	71-46(2산)	<2	<2	<2	4

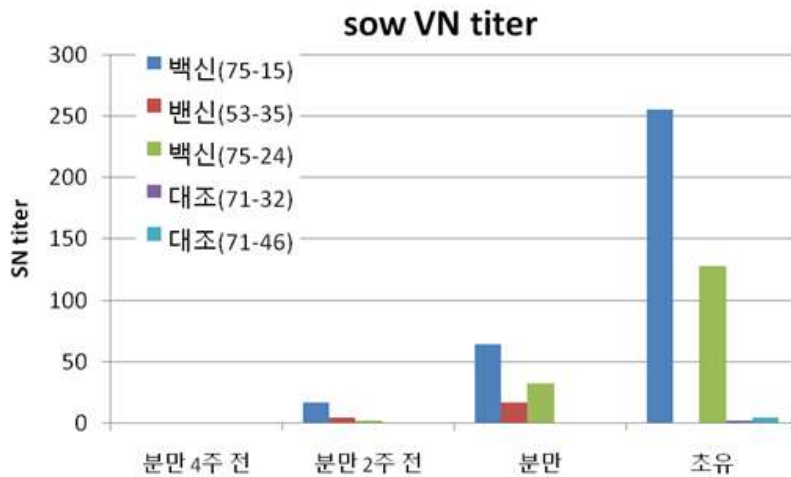


그림 64. 임신 모든 그룹별 중화실험 결과

▷ IgA ELISA 결과

모든 실험 일정 별 혈청과 초유를 이용하여 IgA ELISA 항체가를 확인한 결과, 백신접종 그룹과 대조그룹간에 유의미한 차이를 확인하지 못하였으며, 초유에서도 백신접종으로 인한 항체가 차이를 확인하지 못하였다.

표 74. 모든 및 초유 IgA ELISA 항체가 결과

그룹	개체 번호	시기별 ELISA 항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
접종군 G1 (6.0)	75-15(3산)	0.292	0.323	0.323	0.265
	53-35(5산)	0.242	0.143	0.115	공태
	75-24(2산)	0.119	0.238	0.524	0.325
비접종 대조군	71-32(2산)	0.118	0.281	0.245	0.325

71-46(2산)	0.222	0.158	0.288	0.381
-----------	-------	-------	-------	-------

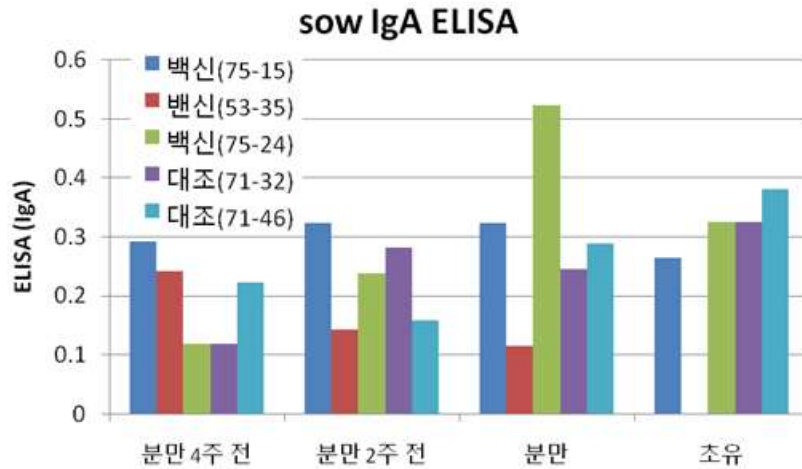


그림 65. 임신 모돈 그룹별 IgA ELISA 결과

▷ IgG 항체가

모돈 실험 일정 별 혈청과 초유를 이용하여 IgG ELISA 항체가를 확인한 결과, 백신접종 그룹에서 분만 시에 유의미한 IgG 항체를 확인하였으나, 초유에서는 한 개체만이 유의미한 항체가 형성된것을 확인하였다.

표 75. 모돈 및 초유 IgG ELISA 항체가 결과

그룹	개체 번호	시기별 ELISA 항체가				
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유	
접종군	G1 (6.0)	75-15(3산)	0.114	0.323	0.710	1.111
		53-35(5산)	0.458	0.385	0.597	-
		75-24(2산)	0.197	0.222	0.889	0.664
비접종 대조군		71-32(2산)	0.402	0.175	0.324	0.757
		71-46(2산)	0.118	0.324	0.258	0.345

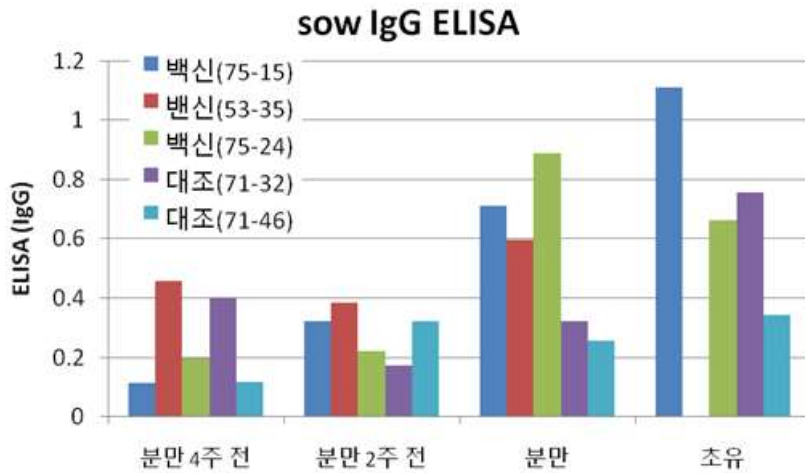


그림 66. 임신 모든 그룹별 IgG ELISA 결과

(4) 포유자돈 혈중 항체가

초유를 섭취한지 5일차에 채혈한 혈청을 이용하여 중화항체와 IgA ELISA, IgG ELISA 실험을 수행하였으며, 실험 결과 중화항체는 유의미하게 상승한 것을 확인하였다. 또한, IgG 항체도 2개체 중 한 개체에서 유의미하게 증가한 것을 확인하였다. 반면에 나머지 한마리와 IgA 항체가에서는 유의미한 변화를 확인 할 수 없었다.

표 76. 포유자돈 혈중 항체가 측정 결과

그룹		개체 번호	시기별 평균 항체가		
			초유 섭취 후		
			SN	IgA	IgG
접종군	G1 (6.0)	75-15(3산)	8.60±5.50	0.267±0.076	0.784±0.178
		53-35(5산)	공태		
		75-24(2산)	7.40±4.99	0.254±0.096	0.496±0.223
비접종 대조군		71-32(2산)	0.40±0.84	0.228±0.086	0.440±0.161
		71-46(2산)	0.60±0.97	0.272±0.097	0.441±0.087

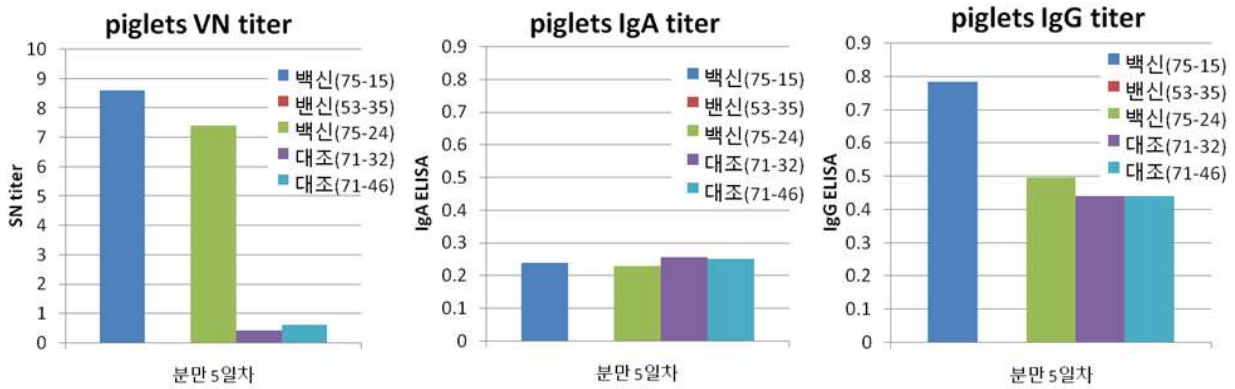


그림 67. 포유자돈 그룹별 혈청 검사 결과

■ 실험 결론

PED 경구용 바이러스 백신의 모든 근육 접종 실험에서 면역원성(항체 형성능)은 중화항체 기준으로 우수하였으며, 태어난 자돈으로의 이행도 의미있게 전달되어지는 것을 확인하였다. 다만, PED 공격접종이 어려운 실험 농장 상황상 자돈의 방어능까지 확인하지 못하여 형성된 항체가 방어에까지 관여하는지 확인은 어려우나, 국가검정기준 상으로 중화항체가 8 배 이상에서 유의미한 방어 효능을 보이는 것으로 보이므로, 유의미한 방어능을 보일 것으로 사료된다. 하지만 PED 경구 백신에서는 근육접종에서 두드러지게 나타났던 IgG 항체의 증가 보다는 IgA가 일부 백신접종군에서 높게 측정되었으며, 초유에서도 일부 개체에서 IgA 항체가 높게 측정되었다. 방어능 시험에서도 IgA가 높게 측정되었던 개체에서 방어능이 높게 평가되었다. 하지만 분만 기준으로 IgG와 중화항체는 어디에서도 검출되지 않았다. 이러한 결과는 돼지유행성 설사병(PED) 예방약의 척도는 중화항체나 IgG가 아닌 IgA 혹은 실제 방어력 등을 평가해야 가장 효과적인 백신개발이 될 것으로 사료된다.

2.2.5. 항체음성 자돈을 이용한 다양한 접종 프로그램의 유효성 평가
(협동연구기관 : 전북대학교)

(1) 실험 목적

다양한 접종 프로그램의 유효성을 평가하여 가장 효과적인 돼지 유행성 설사병(PED) 바이러스 예방에 적용하기 위하여 실험하였다.

(2) 시험백신의 준비

표 77. 다양한 PED 백신에 대한 시제품 제조

백신명	투여경로	Virus	농도 (TCID ₅₀ /dose)	접종량	필요량
LO	경구(L)	CKT-7_N (P150)	7.0 log10	5 ml/1 dose	6 dose
LM	근육(L)	CKT-7_N (P150)	7.0 log10	1 ml/1 dose	9 dose

LOFc	경구(L)	CKT-7_N-Fc*	7.0 log10	5 ml/1 dose	6 dose
LMFc	근육(L)	CKT-7_N-Fc	7.0 log10	1 ml/1 dose	6 dose
KM	근육(K)	PED-Fc(II)**	6.5 log10	2 ml/1 dose	9 dose

* CKT-7_N-Fc : CKT-7_N (P150)을 Vero-Fc cell line에 배양하여 제조

** PED-Fc(II) : 기 허가된 코미팜의 G2b PEDV 사독백신

(3) 실험그룹

표 78. 다양한 PED 백신 프로그램 그룹

그룹		접종방법	개체 수	비고
백신 접종군	G1	경구 (LO) + 경구 (LO)	2주 간격 2회	3
	G2	경구 (LO-Fc) + 경구 (LO-Fc)		3
	G3	경구 (LO) + 근육 (LM)		3
	G4	경구 (LO) + 근육 (KM)		3
	G5	근육 (LM) + 근육 (LM)		3
	G6	근육 (LM-Fc) + 근육 (LM-Fc)		3
	G7	근육 (KM) + 근육 (KM)		3
비접종 대조군		-	3	

(4) 실험방법

▷ 실험동물

PEDV 백신을 접종하지 않은 모돈으로부터 태어난 4~6주령의 이유자돈을 대상으로 하며, 총 24마리를 준비하여 21마리는 백신 접종군, 나머지 3 마리는 비접종 대조군으로 한다. 백신 접종군은 다시 3마리씩 7그룹으로 세분화하여 각각의 시험백신에 대한 백신 접종 프로그램을 적용한다.

▷ 백신접종

각각의 백신 접종군에 대하여 준비한 백신을 2주 간격으로 2회 투여한다. Oral 투여 군의 경우, 1 dose 당 volume은 5 ml, 근육 투여 군의 경우, 1 dose 당 volume은 사독은 2 ml, 생독은 1 ml로 한다.

▷ 채혈

모든 개체에 대하여 백신 접종 전, 2차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 2주 후에 각각 채혈하여 혈중 항체가 확인에 사용한다.

▷ 분변 swab

모든 개체에 대하여 백신 접종 전, 1차 백신 접종 후 3일, 5일, 7일, 2차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 후 3일, 5일, 7일에 각각 분변을 채취하여 바이러스 shedding 및 IgA 측정에 사용한다.

(5) 샘플분석

▷ 중화항체가 측정

모든 그룹에서 얻어진 혈청에 대하여 PEDV CKT-7_N strain (P150)을 사용하여 혈중 중화 항체가를 측정한다.

▷ ELISA 항체가 측정

모든 그룹에서 얻어진 혈청 및 분변에 대하여 코미팜에서 자체 제작한 ELISA kit로 IgG 및 IgA 항체가를 확인한다.

(6) 실험일정

표 78. PED 백신 프로그램 그룹 실험 일정

Day 0	Day 3	Day 5	Day 7	Day 14	Day 17	Day 19	Day 21	Day 28
전 채혈, 분변 swab, 백신 접종	분변 swab	분변 swab	분변 swab	채혈, 분변 swab, 백신 접종	분변 swab	분변 swab	분변 swab	채혈

(7) 실험결과

▷ 중화항체가 측정 결과

중화항체 실험결과, 생백신 근육 접종이 포함된 그룹에서는 모두 유효한 항체(중화항체가 평균 8배 이상)가 확인되었으나, 경구 혹은 사독, Fc가 포함된 백신주 같은 경우 유효한 결과에 도달하지는 못하였다.

표 79. PED 백신 프로그램 그룹별 중화실험 결과

그룹		개체 번호	중화항체가 (log2)		그룹 평균
			접종전	2차접종 2주차	
G1	경구 (LO) + 경구 (LO)	1	< 2	2	3.33±1.15
		2	< 2	4	
		3	< 2	4	

G2	경구 (LO-Fc) + 경구 (LO-Fc)	4	< 2	2	3.33±1.15
		5	< 2	4	
		6	< 2	4	
G3	경구 (LO) + 근육 (LM)	7	< 2	4	9.33±6.11
		8	< 2	16	
		9	< 2	8	
G4	경구 (LO) + 근육 (KM)	10	< 2	4	4.00±0.00
		11	< 2	4	
		12	< 2	4	
G5	근육 (LM) + 근육 (LM)	13	< 2	128	64.00±55.43
		14	< 2	32	
		15	< 2	32	
G6	근육 (LM-Fc) + 근육 (LM-Fc)	16	< 2	4	6.67±2.31
		17	< 2	8	
		18	< 2	8	
G7	근육 (KM) + 근육 (KM)	19	< 2	8	6.67±2.31
		20	< 2	4	
		21	< 2	8	
비접종 대조군 (G8)		22	< 2	2	2.00±0.00
		23	< 2	2	
		24	< 2	2	

▷ 혈중 ELISA 항체가 측정 결과

혈중 ELISA 항체가로 비교 평가한 결과, IgG ELISA 항체가는 사독, 생독보다는 근육으로 2회 접종하였을 때 유효한 항체가가 확인되었으며, 그 중에서도 PED CKT-7_N(P150)주로 2회 근육 접종한 결과에서 가장 유의미한 항체가 결과를 확인하였다. 반면에, IgA ELISA 항체가는 모든 유의미한 증가가 확인되는 그룹은 없었다.

◦ 혈중 IgA ELISA 항체가

표 80. PED 백신 프로그램 그룹별 IgA ELISA 결과

그룹	개체 번호	시기별 IgA ELISA 항체가						
		D0		D14		D28		
G1	경구 (LO) + 경구 (LO)	1	0.163	0.174	0.165	0.216	0.158	0.298
		2	0.175		0.231		0.275	
		3	0.184		0.251		0.462	
G2	경구 (LO-Fc) + 경구 (LO-Fc)	10	0.130	0.324	0.137	0.153	0.171	0.196
		11	0.115		0.169		0.207	
		12	0.728		0.154		0.209	
G3	경구 (LO) + 근육 (LM)	13	0.112	0.143	0.115	0.155	0.123	0.244
		14	0.154		0.178		0.323	
		15	0.162		0.171		0.287	

G4	경구 (LO) + 근육 (KM)	16	0.236	0.170	0.200	0.183	0.337	0.295
		17	0.159		0.276		0.348	
		18	0.116		0.073		0.201	
G5	근육 (LM) + 근육 (LM)	19	0.118	0.122	0.131	0.233	0.299	0.546
		20	0.106		0.331		0.498	
		21	0.142		0.238		0.840	
G6	근육 (LM-Fc) + 근육 (LM-Fc)	22	0.127	0.204	0.172	0.196	0.228	0.283
		23	0.332		0.272		0.306	
		24	0.154		0.143		0.315	
G7	근육 (KM) + 근육 (KM)	25	0.148	0.305	0.249	0.236	0.303	0.366
		31	0.594		0.268		0.572	
		27	0.174		0.191		0.222	
비접종 대조군 (G8)		28	0.096	0.127	0.158	0.249	0.379	0.513
		29	0.105		0.309		0.489	
		30	0.179		0.281		0.67	

◦ 혈중 IgG ELISA 항체가

표 81. PED 백신 프로그램 그룹별 IgG ELISA 결과

그룹	개체 번호	시기별 IgG ELISA 항체가						
		D0		D14		D28		
G1	경구 (LO) + 경구 (LO)	1	0.222	0.239	0.16	0.282	0.308	0.382
		2	0.226		0.354		0.424	
		3	0.268		0.332		0.413	
G2	경구 (LO-Fc) + 경구 (LO-Fc)	10	0.152	0.195	0.199	0.259	0.273	0.352
		11	0.192		0.305		0.427	
		12	0.241		0.274		0.355	
G3	경구 (LO) + 근육 (LM)	13	0.225	0.222	0.288	0.241	0.29	0.372
		14	0.261		0.22		0.422	
		15	0.18		0.216		0.403	
G4	경구 (LO) + 근육 (KM)	16	0.273	0.269	0.213	0.194	0.385	0.477
		17	0.352		0.229		0.521	
		18	0.181		0.141		0.526	
G5	근육 (LM) + 근육 (LM)	19	0.433	0.359	0.435	0.315	0.85	0.714
		20	0.197		0.291		0.579	
		21	0.448		0.218		0.712	
G6	근육 (LM-Fc) + 근육 (LM-Fc)	22	0.195	0.273	0.208	0.349	0.35	0.583
		23	0.41		0.577		0.698	
		24	0.213		0.261		0.702	
G7	근육 (KM) + 근육 (KM)	25	0.239	0.478	0.289	0.296	0.505	0.519
		31	0.936		0.386		0.522	
		27	0.258		0.213		0.531	
비접종 대조군 (G8)		28	0.174	0.251	0.233	0.267	0.401	0.422

	29	0.176		0.252		0.42	
	30	0.402		0.317		0.446	

▷ 분변 ELISA 항체가 측정 결과

분변 ELISA 항체가로 비교 평가한 결과, IgA, IgG 모두 유의미하게 증가하는 그룹은 없었다.

- 분변 중 IgA ELISA 항체가

표 82. PED 백신 프로그램 그룹별 분변 IgA ELISA 결과

그룹		개체 번호	시기별 IgA ELISA 항체가							
			D0	D3	D5	D7	D14	D17	D19	D21
G1	경구 (LO) + 경구 (LO)	1	0.092	0.169	0.075	0.068	0.058	0.09	0.068	0.078
		2	0.06	0.071	0.06	0.069	0.09	0.066	0.063	0.111
		3	0.061	0.224	0.099	0.074	0.05	0.079	0.076	0.072
G2	경구 (LO-Fc) + 경구 (LO-Fc)	10	0.104	0.086	0.074	0.064	0.052	0.102	0.063	0.073
		11	0.168	0.063	0.072	0.095	0.057	0.264	0.092	0.057
		12	0.074	0.106	0.086	0.069	0.080	0.062	0.066	0.060
G3	경구 (LO) + 근육 (LM)	13	0.068	0.067	0.12	0.065	0.053	0.068	0.070	0.065
		14	0.067	0.088	0.083	0.067	0.050	0.057	0.082	0.055
		15	0.058	0.062	0.096	0.068	0.135	0.114	0.089	0.062
G4	경구 (LO) + 근육 (KM)	16	0.141	0.074	0.113	0.081	0.070	0.083	0.064	0.061
		17	0.094	0.062	0.117	0.059	0.064	0.12	0.676	0.070
		18	0.059	0.061	0.084	0.083	0.091	0.093	0.092	0.085
G5	근육 (LM) + 근육 (LM)	19	0.063	0.069	0.071	0.124	0.061	0.062	0.053	0.060
		20	0.057	0.071	0.085	0.064	0.053	0.106	0.058	0.068
		21	0.162	0.070	0.100	0.145	0.083	0.082	0.064	0.111
G6	근육 (LM-Fc) + 근육 (LM-Fc)	22	0.088	0.092	0.071	0.068	0.053	0.061	0.058	0.074
		23	0.049	0.097	0.077	0.211	0.058	0.079	0.06	0.086
		24	0.06	0.070	0.123	0.134	0.099	0.087	0.077	0.143
G7	근육 (KM) + 근육 (KM)	25	0.077	0.066	0.09	0.064	0.060	0.168	0.485	0.350
		31	0.091	0.064	0.066	0.116	0.056	0.078	0.071	0.083
		27	0.065	0.088	0.143	0.067	0.061	0.086	0.080	0.077
비접종 대조군 (G8)		28	0.071	0.338	0.117	0.065	0.056	0.22	0.335	0.579
		29	0.072	0.075	0.08	0.066	0.162	0.096	0.124	0.206
		30	0.083	0.114	0.126	0.061	0.068	0.073	0.056	0.112

◦ 분변 중 IgG ELISA 항체가

표 83. PED 백신 프로그램 그룹별 분변 IgG ELISA 결과

그룹		개체 번호	시기별 IgG ELISA 항체가							
			D0	D3	D5	D7	D14	D17	D19	D21
G1	경구 (LO) + 경구 (LO)	1	0.059	0.066	0.060	0.061	0.056	0.066	0.056	0.067
		2	0.051	0.048	0.077	0.058	0.047	0.060	0.051	0.058
		3	0.052	0.084	0.066	0.059	0.050	0.061	0.051	0.054
G2	경구 (LO-Fc) + 경구 (LO-Fc)	10	0.073	0.07	0.056	0.073	0.049	0.079	0.049	0.062
		11	0.058	0.057	0.054	0.093	0.068	0.09	0.065	0.054
		12	0.053	0.056	0.049	0.052	0.054	0.066	0.055	0.054
G3	경구 (LO) + 근육 (LM)	13	0.048	0.047	0.078	0.056	0.049	0.057	0.056	0.050
		14	0.055	0.047	0.056	0.062	0.053	0.058	0.058	0.053
		15	0.059	0.064	0.076	0.074	0.056	0.067	0.062	0.057
G4	경구 (LO) + 근육 (KM)	16	0.075	0.050	0.067	0.06	0.055	0.06	0.061	0.057
		17	0.058	0.047	0.055	0.052	0.05	0.058	0.204	0.058
		18	0.059	0.093	0.072	0.058	0.052	0.074	0.073	0.101
G5	근육 (LM) + 근육 (LM)	19	0.054	0.054	0.091	0.05	0.05	0.063	0.054	0.049
		20	0.047	0.048	0.054	0.055	0.061	0.067	0.056	0.059
		21	0.078	0.050	0.082	0.118	0.073	0.063	0.053	0.075
G6	근육 (LM-Fc) + 근육 (LM-Fc)	22	0.052	0.056	0.053	0.072	0.051	0.053	0.052	0.058
		23	0.051	0.068	0.071	0.062	0.108	0.070	0.051	0.066
		24	0.058	0.050	0.091	0.100	0.056	0.067	0.067	0.063
G7	근육 (KM) + 근육 (KM)	25	0.066	0.052	0.067	0.059	0.089	0.075	0.155	0.088
		31	0.056	0.053	0.058	0.049	0.067	0.054	0.057	0.061
		27	0.048	0.050	0.066	0.056	0.056	0.065	0.053	0.051
비접종 대조군 (G8)		28	0.051	0.118	0.082	0.052	0.065	0.086	0.067	0.091
		29	0.066	0.052	0.057	0.057	0.053	0.106	0.067	0.074
		30	0.053	0.060	0.067	0.066	0.053	0.067	0.061	0.081

(8) 실험 결론

다양한 형태의 PED 백신 프로그램을 실험한 결과, 항체 형성 기준으로 PED CKT-7_N (P150)만을 생백신 형태로 2회 근육으로 접종하였을 때가 가장 효과적이었다. 하지만, 근육으로 2회 접종한 그룹에서조차 분변 샘플링에서 IgG가 검출되지 않았다는 것은 여러가지로 해석 가능하다. IgG는 혈중 면역체계이기 때문에 점막으로는 분비가 되지 않았을 가능성과 점막까지 분비될 만큼 많은양의 항체가 형성되지 않았을 가능성이 있다. 추가 실험을 더 진행하여 비교 평가를 해야겠지만, 만약 점막으로 분비가 되지 않는다면 근육 접종으로 생성된 PED 항체는 점막 면역이 필요한 포유 돼지에게 의미를 부여하기 어려울 것으로 생각한다.

2.2.6. 항체음성 자돈을 이용한 다양한 접종 프로그램의 유효성 평가 2차(부형제 포함)
(협동연구기관 : 전북대학교)

(1) 실험 목적

다양한 접종 프로그램의 유효성을 평가하여 가장 효과적인 돼지 유행성 설사병(PED) 바이러스 예방에 적용하기 위하여 실험하였다. 이번 실험에서는 최적화된 백신 부형제 3종을 함께 평가하였으며, 생독-생독-사독-사독으로 프로그램을 고정하고 백신 접종 방법과 상용화된 백신을 비교하여 평가하였다.

(2) 시험백신 (항원)

표 83. 접종 프로그램에 사용된 시험 백신 항원

구분	항원	함량 (TCID50/dose)	비고
1	CKT-7_N_p150	7.0 log10	

(3) 시험백신

표 83. 접종 프로그램에 사용된 시험 백신 조성 및 투여경로

구분	항원	투여경로	adjuvant	Conc.	접종량	필요량
A			Carbigen	10 %		
B		Oral	Aluminum gel	20 %		
C			IMS1313	50 %		
D	CKT-7_N _p150	Oronasal	Carbigen	10 %	5 mL/dose	10 dose*
E			Aluminum gel	20 %		
F			IMS1313	50 %		
G			None	-		
H		I.M.	None	-	2 mL/dose	
I	Commercial		-	-		

* 5 마리씩 2 회 접종

(4) 실험그룹

표 84. 접종 프로그램에 사용된 실험 그룹

그룹	접종방법	개체 수	비고
A		5	
B		5	
C		5	생백신 접종
D		5	2주 후,
백신접종군 E	2주 간격 2회	5	사백신 2회를
F		5	2주 간격으로
G		5	접종**
H		5	
I		5	
비접종대조군	-	5	

** PED-Fc(II) : 기 허가된 코미팜의 G2b PEDV 사독백신 (2 mL/dose)

(5) 실험방법

▷ 실험방법

PEDV 항체 음성의 4~6주령 이유자돈을 대상으로하며, 총 50마리를 준비하여 45마리는 백신 접종군, 나머지 5마리는 비접종 대조군으로 한다. 백신 접종군은 다시 5마리씩 9그룹으로 세분화하여 각각의 시험 백신을 평가한다.

▷ 백신접종

각각의 백신 접종군에 대하여 준비한 백신을 2주 간격으로 2회 접종한다. 이후에 사독백신을 2주 간격으로 2회 접종한다 (LLKK). Oral & Oronasal의 경우 1 dose 당 volume을 5 mL, I.M.의 경우 1 dose 당 volume을 2 mL로 한다. (Oral & Oronasal의 접종군은 전날 금식하도록 한다.)

▷ 채혈

모든 개체에 대하여 0, 14, 28, 42, 56 dpv에 각각 채혈하여 혈중 항체가 확인에 사용한다.

▷ 실험 계획 모식도

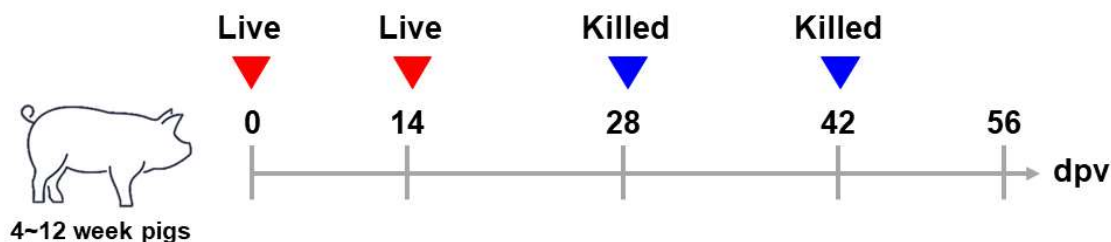


그림 68. 백신 프로그램 실험 계획 모식도

▷. 샘플 채취

표 85. 샘플 채취 일정

샘플명	채취시기	용도	수량
혈액	0, 14, 28, 42, 56 dpi	중화항체가, ELISA 항체가 (IgG, IgA)	5 mL

▷ 샘플분석

- 중화항체가 측정 : 모든 그룹에서 얻어진 혈청에 대하여 PEDV 바이러스를 사용하여 중화항체 역가를 측정한다.
- ELISA 항체가 측정 : 모든 그룹에서 얻어진 혈청에 대하여 in house ELISA 및 commercial kit로 IgG 및 IgA 항체가를 확인한다.

(6) 실험 결과

▷ 중화실험 결과

다양한 백신 프로그램 그룹별 실험 결과, H그룹(생독 근육) 접종에서 유의미한 항체 증가가 접종 2주차부터 확인되었으며, 추가 사독 백신 1차 접종 후 부터는 안정적으로 64배 이상의 중화항체가가 확인되었다. 추가 비교 그룹에서는 경구와 비경구, 대조백신, 부형제 종류와는 큰 차이 없이 개체 별로 중화항체가 차이나게 확인되었으며, 대조 백신이 평균적으로 높은 수준의 항체가가 확인되었다. 오히려 IMS1313을 제외한 다른 면역증강제를 첨가한 백신 그룹(D,E)에서는 2 이하의 중화항체 배수를 확인하였다.

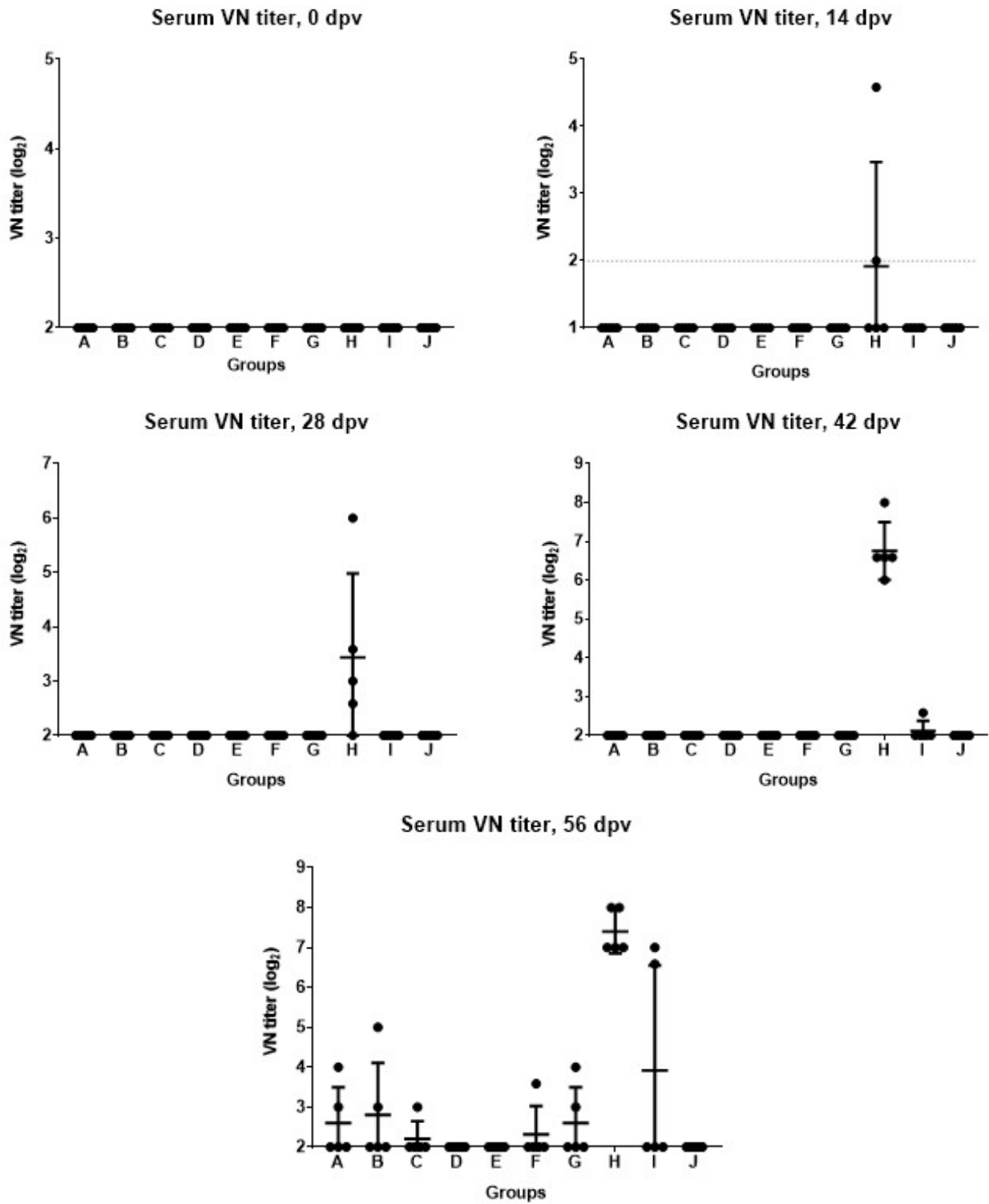


그림 69. 백신 프로그램 그룹별 중화항체 결과

▷ IgG ELISA 실험 결과

다양한 백신 프로그램 그룹별 실험 결과, IgG ELISA 실험에서 중화항체와 유사하게 H 그룹에서 유의한 항체 변화가 확인되었다. 백신 접종 4주차(2차 접종 2주차, 접종 28일차)에서는 대부분의 개체가 항체 양성이 확인되었으며, 2회의 사독백신 접종 후(접종 56일차)에서는 모두 양성으로 전환되었다. 반면 경구와 비경구, 대조백신은 백신 접종 4주차에서는 모두 음성으로 확인되었으며, 사독 백신 접종 후 2주차에 일부 양성을 전환되는 것을 확인하였다. 그 중 대조백신은 백신 접종 26일차에 근육접종 백신보다 더 높은 수준의 항체가 일정하게 확인(ELISA 측정 한계값으로 예상됨)되었다.

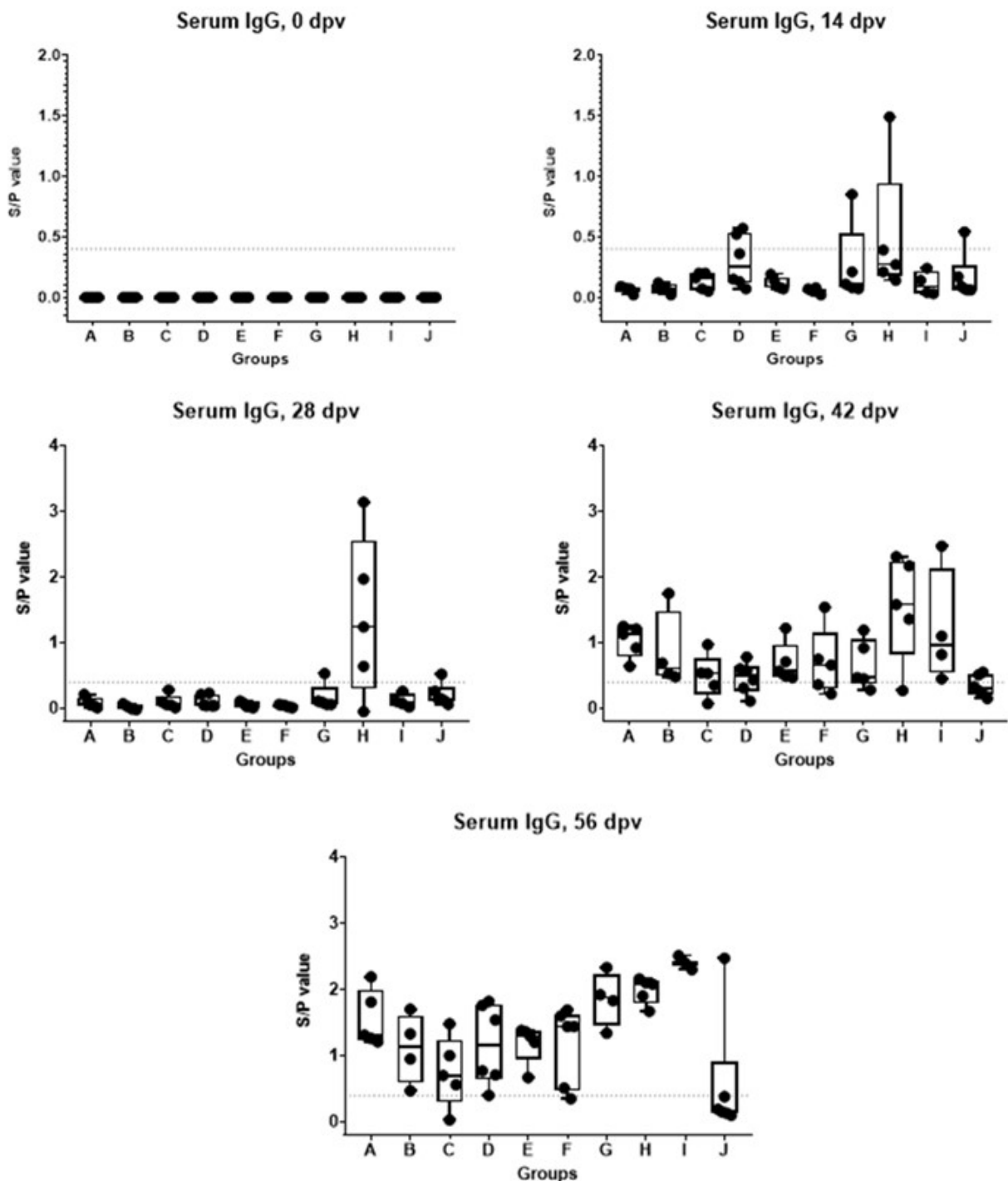


그림 70. 백신 프로그램 그룹별 IgG ELISA 실험 결과

▷ IgA ELISA 실험 결과

다양한 백신 프로그램 그룹별 실험 결과, IgA ELISA 실험에서는 중화 실험과 IgG ELISA 실험과 같이 근육접종 그룹(H)만이 유효하게 하에가가 확인되지 않았으며, 전체적으로 모두 혈청에는 Ig 항체 형성이 되지 않은 것으로 보여진다. 백신접종 28일차에 D와E그룹 일부 개체, 56일차에 B와 D그룹에서 일부개체에서 순간 면역이 증가하는것으로 보여진다.

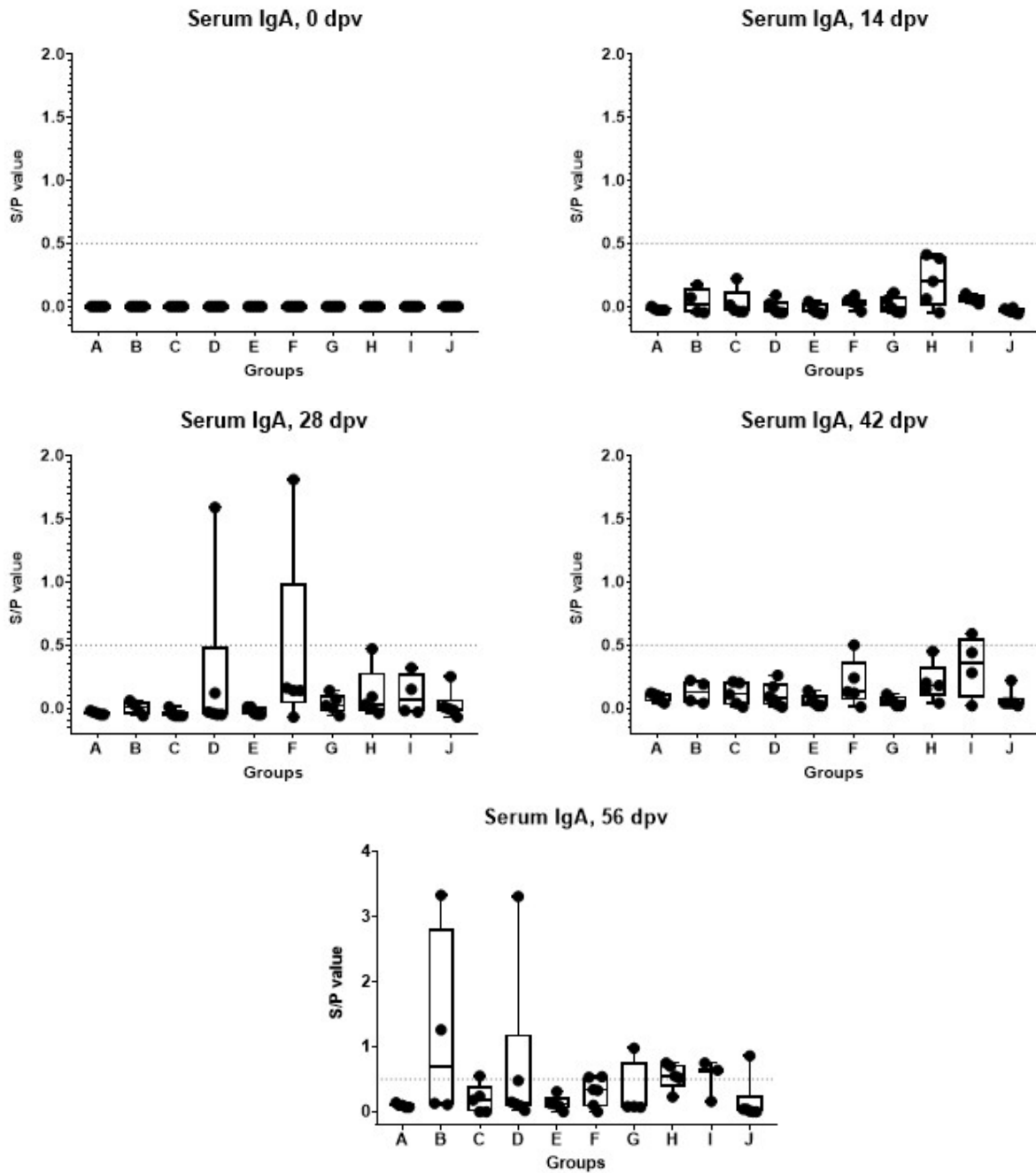


그림 71. 백신 프로그램 그룹별 IgA ELISA 실험 결과

2.2.7. 항체음성 자돈을 이용한 다양한 접종 프로그램의 유효성 평가(모돈)
(협동연구기관 : 전북대학교)

[2024년 4~5월 중, 임신 모돈이 준비되는 일정에 맞추어 실험 예정]

(1) 실험목적

자돈 실험에서 유효성이 평가된 후보군 2종과 사용화 백신 1개를 모돈 수준에서 비교 평가하여 접종 프로그램의 항체 효과 뿐아니라 방어능에도 효과적인것을 확인하기 위하여 수행하였다.

(2) 실험동물

PEDV 항체 음성 임신 모돈 및 자돈

(3) 동물실험 (Sows)

표 85. 모돈 시험 계획

Number	Group	함량 (log10TCID50/dose)	Volume	Route	Heads
1	Candidate 1	7.0	5 mL	-	2
2	Candidate 2	7.0	5 mL	-	2
3	Commercial	-	-	-	2
4	Negative control	-	-	-	2

- 임신 모돈 대상으로 분만 4주 전, 2주 전에 2회 백신 접종한다.
- 백신은 면역원성 평가에서 가장 높은 면역원성을 보인 백신 후보 주 선발 예정이다.

(4) 실험 계획 모식도

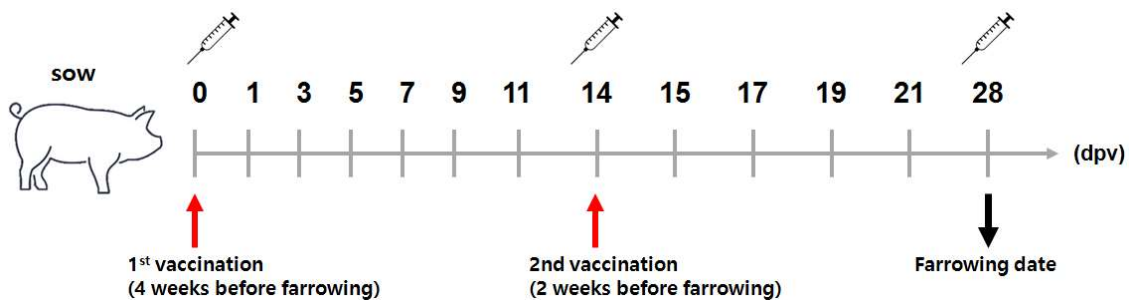


그림 72. 모돈 백신 프로그램 실험 계획 모식도

(5) 샘플 채취 계획

표 86. 샘플 채취 계획 및 일정

샘플명	채취시기	용도	시료
혈액	1차 접종 전, 2차 접종 전, 분만 시	증화항체가, ELISA	5 mL
초유	분만 시	항체가 (IgG, IgA)	10 mL

(6) 공격접종

표 87. 공격접종 바이러스 및 접종 용량

바이러스	접종량	시기
QIAP1401 strain (p11)	$10^{3.0}$ TCID ₅₀ /두 (10LD50)	5~7일령

- 모돈에서의 분만 자돈 5~7일째에 대하여 공격 접종한다.

(7) 공격 접종 그룹 (piglets)

표 88. 공격접종 계획

Number	Group	합량 (log ₁₀ TCID ₅₀ /dose)	Volume	Route	Heads
1	Candidate 1				10
2	Candidate 2	3.0	1 mL	Oral	10
3	Commercial				10
4	Negative control	-			10

(8) 공격 접종 계획 모식도

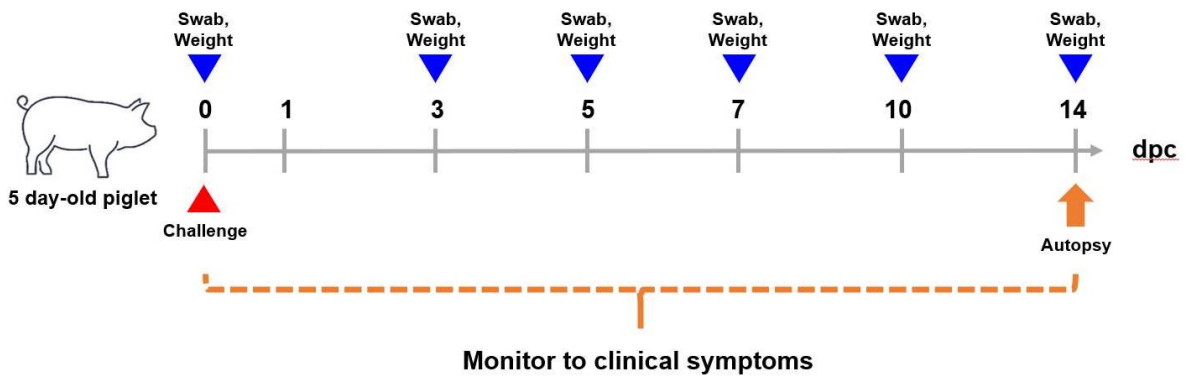


그림 73. 모돈 백신 프로그램 공격 접종 계획 모식도

(9) 샘플 채취

표 89. 샘플 채취 계획 및 일정

샘플명	채취시기	용도
Rectal swab	Daily	Measurement of virus shedding (qRT-PCR)
Body weight	0, 3, 7, 10, 14 dpc	증체량 확인
Blood	공격접종 전, 공격접종 후 14 일	중화항체가, ELISA 항체가 (IgG, IgA)
Tissue (Duodenum, Jejunum, Ileum)	Autopsy	10% formalin for IHC & HE, -80℃ for isolation of virus

- 임신 모든 대상으로 백신을 진행한 다음 혈액 및 초유에서 항체 수준을 평가한다.
- 분만 이후 자돈에 대하여 공격접종을 실시하며, 백신에 대한 효능평가를 진행한다.
- 각 모돈으로부터 태어난 자돈 10마리를 대상으로 공격접종 후 14일간 임상증상을 확인한다. (Survival rate, consistency scores)
- 매일 rectal swab을 진행하여 바이러스 정량분석을 하고, 0, 3, 7, 10, 14 dpc에 체중 측정을 통한 증체량을 확인한다.
- 공격접종 전, 후 14일째에 채혈 후 항체 수준을 평가한다.
- 14일 이후 자돈을 부검하여 조직 샘플링을 진행하고, 조직 염색 및 바이러스 분리를 통한 분석을 진행한다.

2.2.8. 야외 임상시험을 위한 연속 3 Lot 백신 시제품 제작

■ 면역증강 경구용 생백신 시제품 제작 (주관연구기관 : ㈜코미팜)

○ 사용균주

협동연구기관인 전북대학교로부터 선행연구(연구개발과제번호 : 120089-2)에서 분양받은 PEDV-CKT-7_N_P150(이하 PED-CKT)을 원종독(master seed)으로 하였다. PEDV-CKT의 원종독은 Vero CCL81 세포에서 배양하여 무균적으로 채득하고 동결건조하거나 -80℃에 동결 보존하였다. 생산용 독주(working seed)는 종독을 같은 방법으로 배양하여 -80℃에 동결 보존하며 사용하였다.

○ 시제품 항원 생산

PEDV-CKT의 생산용 독주를 담즙산이 함유된 유지용 배지로 10배 희석하여 단층이 90% 이상 형성된 vero CCL81 세포에 접종한다. 37℃ 항온배양기에서 바이러스를 1시간 동안

흡착시킨 다음 접종액을 제거하고, 담즙산이 함유된 유지용 배지를 넣어 2~4일간 배양하면서 세포변성이 80% 이상 출현하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 본배양 독주로 사용하였다. PEDV-CKT 본 배양 독주는 회전병에서 생산용 독주와 같은 방법으로 배양하고 무균적으로 채득하여 시제품 항원으로 사용하였다. 시제품 항원은 Bulk라고 표현하며, Bulk는 검사에 사용할 일부 샘플을 제외하고 나머지는 -40℃에 동결 보관한다.

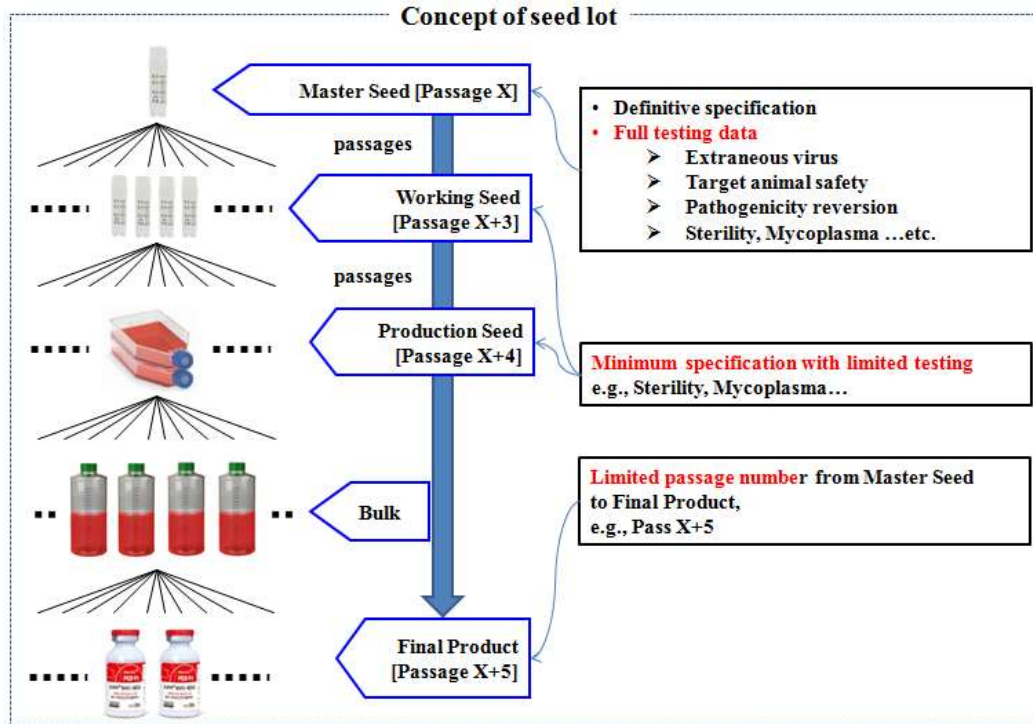


그림 74. PED-CKT 백신 생산 모식도

○ 연속 3 Lot 백신 시제품 제조

이전 실험 결과들을 바탕으로 야외 임상시험에 사용될 시험백신 3 Lot를 연속으로 제조하였다. 백신 1두 당 항원 함량은 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 이상이며, 면역원성을 높이기 위하여 IMS1313 adjuvant를 50% 동양을 백신 접종 전 혼합하여 사용하게 준비하였다.

표 90. 면역증강 경구용 PED 생백신 연속 3 Lot 시제품 정보

제조 번호	항원 함량	제조 일자	제조 수량
KOMI-PED-L-01	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose	2022.09.15	1두 분 × 500 vial
KOMI-PED-L-02	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose	2022.09.19	1두 분 × 500 vial
KOMI-PED-L-03	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /dose	2022.09.22	1두 분 × 500 vial



그림 75. 면역증강 경구용 PED 생백신 4종에 대한 시험 백신

2.2.9. 연속 3 Lot 백신 시제품에 대한 시험성적 확인

■ 시제품 제조 직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 특성 확인 (주관연구기관 : ㈜코미팜)

○ 백신 제조 직후와 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 간격으로 생산되었던 3 Lot 시험백신에 대한 자가 검정시험을 실시하였다. (성적서는 별첨 자료로 첨부)

(1) 특성시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조 직후 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물과 이물의 유무를 1000룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사하였다.

(2) 진공도시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조직후 암실에서 백신으로부터 5~10mm 떨어진 위치에 테스트코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하였다.

(3) 수소이온농도시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 각 Lot에 대한 수소이온농도를 측정하였다.

(4) 함습도시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 각 Lot에서 3개 이상의 백신 내용물을 이용하여 Karl Fisher 수분측정기로 측정하였다.

(5) 무균시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 각각의 Lot에 대하여 제조직후 무균검사법에 따라 Lot별로 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22 °C 및 37 °C에서 각각 배양 관찰하였다.

(6) 마이코플라스마 부정시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 각 Lot에서 유전자를 추출하여 PCR 기법으로 마이코플라스마에 대한 검사를 하였다.

(7) 안전시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조직후 백신을 이용하여 마우스, 기니픽, 자돈에 대하여 안전성 시험을 진행하였다.

(8) 미입바이러스 부정시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조직후 백신을 희석배지로 규정량 희석한 후 PED에 대한 고도의 면역혈청으로 동량 혼합하여 37℃, 1시간 감작시킨 다음 돼지 콩팥 세포에 7일간 배양하여, CPE 및 혈구응집성 바이러스의 미입을 확인하였다.

(9) 바이러스 함량 시험

동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조직후 백신을 10진법에 의하여 10^{-7} 까지 희석하여 0.1 ml씩을 단층이 형성된 Vero CCL81 세포에 접종한 다음 증식용 배양액을 적당량 첨가하여 배양한 후 세포변성효과를 7일간 관찰하여 바이러스 함량을 계산하였다.

2.2.10. 연속 3 Lot 백신 시제품에 대한 야외 임상시험 및 품목 허가 계획

■ 임상시험 실시기관 재지정(24.5.7)

▶ 임상시험 실시기관 지정서

제 102-24-05-001 호

동물용의약품등 시험실시기관 지정서

기관의 명칭 : (주) 코미팜
소재지 : 경기도 시흥시 경제로 17
대표자 : 문성철
시험의 분야 : 동물용의약품등 임상시험

「약사법」 제34조의2제1항·제34조의3제1항, 「의료기기법」 제10조제3항·제10조의2제1항 및 「동물용 의약품등 취급규칙」 제8조의2제5항에 따라 위와 같이 동물용의약품등 시험실시기관으로 지정합니다

2024 년 05 월 07 일

농림축산검역본부

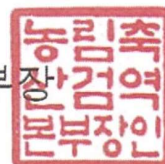


그림 76. 동물용의약품 시험실시기관 지정서

■ 임상시험 실시 단계

[동물용의약품(생물학적제제)의 인허가 절차]

● 1 단계 : 임상시험 신청 및 승인

1. 신청자료 리스트 : 임상시험 계획서 및 신청 공문

2. 임상시험 계획서의 구성

1) 야외 임상시험 계획

- 임상시험계약서 (임상시험실시 승인기관과의 계약서)
- 농장사용 계약서 (3개 농장에 대한 사용 계약서)
- 농장시험 계획서 (3개 농장에 대한 백신의 안전성 및 효능 확인하기 위한 실험 계획)

2) 제품의 부표

- 공개부표 : 원료약품 및 분량, 성상, 효능 및 효과, 용법 및 용량, 주의 사항 등 포함
- 비공개 부표 : 의약품 제조법, 시험기준 및 시험방법

3) 개발경위

4) 백신주의 제작 및 특성에 관한 자료

5) 백신 제조와 관련된 자료 (불활화 백신 기준)

- 벌크 생산법, 불활화 방법, 면역증강제 선정 결과, 백신의 항원 함량 결정 시험 (병원성 강독주를 이용한 방어력 실험 결과에 근거), 백신의 과용량 안전 시험 결과 (실험동물 및 목적동물), 백신의 면역원성 확인 결과 (실험동물 및 목적동물)

6) 연속 3 Lot 시험백신 제조 성적 (KVGMP 승인 제조소)

7) 연속 3 Lot 시험백신에 대한 자가시험 성적 (비공개 부표 상의 시험기준 및 시험방법에 따라)

상기 1)~7)의 내용 외 검역본부에서 의약품의 안전성과 유효성 확인에 필요하다고 요구하는 자료 일체 제출 (약독화 생백신의 경우, 상기 자료에서 백신주의 안전성을 증명하기 위한 자료 추가됨)

3. 소요 기간

- 임상시험 계획서 검토 기간 : 제출 후 30일 (업무일 기준)
- 기술검토 보완 횟수 : 제한 없음
- 기술검토 보완 회신 기한 : 기한 없음

● 2 단계 : 품목허가 신청 및 승인

1. 신청자료 리스트 : 품목허가 신청서 (검역본부 전자민원을 통해 온라인 제출)

2. 품목허가 신청서의 구성

- 1) 임상시험 계획서에 포함된 내용 일체
- 2) 3개 농장에 대한 야외 임상시험 결과 (임상시험에 보통 5개월 소요됨)
 - 3개 농장에서 수행한 임상시험 성적 및 결과 분석 자료 (Raw data 일체 포함, 통계분석 결과 포함)
- 3) 의약품의 장기보존성 자료 (비공개 부표 상의 시험기준 및 시험방법에 따라 정해진 기간에 따라 수행)
 - 의약품의 유효기간을 설정하기 위한 장기보존성 자료
 - 24개월 유효기간 설정 시 필요한 성적
 - : 제조직후, 제조 후 3개월, 제조 후 6개월, 제조 후 9개월, 제조 후 12개월, 제조 후 18개월, 제조 후 24개월

상기 1)~3)의 내용 외 검역본부에서 의약품의 안전성과 유효성 확인에 필요하다고 요구하는 자료 일체 제출

3. 소요 기간

- 품목허가서류 검토 기간 : 제출 후 90일 (업무일 기준)
- 기술검토 보완 횟수 : 1회
- 기술검토 보완 회신 기한 : 60일 (필요 시 1회 연장신청 가능)

■ PED 경구용 백신에 대한 임상시험 실시 및 품목허가 계획

- ▶ 야외임상시험 승인: 2025년 1분기
- ▶ 야외임상시험 기간: 2025년 1분기~3분기
- ▶ 품목허가 승인: 2026년 3분기

표 91. PED 경구용 백신 개발에 대한 임상시험 실시 및 품목허가 계획표

일정		기간								
		2024년		2025년				2026년		
		3분기	4분기	1분기	2분기	3분기	4분기	1분기	2분기	3분기
야외 임상시험 계획서	작성 및 제출									
	보완 수정 및 제출									
	승인									
야외 임상 시험										
품목허가	작성 및 제출									
	보완									
	보완 제출									
	승인									

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 국내 유행 G2b형 PED 생백신 제조 및 특성 확인
- 국내 유행 G2b형 PED 생백신과 면역증강제 혼합 백신 가능성 확인(자돈, 모돈)
- 국내 유행 G2b형 PED 생백신과 면역증강제 혼합 백신 제품화(장기보존성, 유효성 등)
- 국내 유행 G2b형 PED 생백신을 포함하는 백신 접종 프로그램 구축
- 추가 신규 G2b형 PED 바이러스 발굴(CKK strain)

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

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계	2단계	계	가중치 (%)
			(2022)	(2023)		
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 (SCI)	목표(단계별)	0	1	1	
		실적(누적)	0	2	2	
	품종등록	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	1	0	1	
	학술발표	목표(단계별)	0	2	2	10
		실적(누적)	1	1	2	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시 (이전)	목표(단계별)	0	1	1	20
		실적(누적)	0	1	1	
	제품화	목표(단계별)	1	2	3	50
		실적(누적)	1	1	2	
	고용창출	목표(단계별)	0	1	1	10
		실적(누적)	0	2	2	
	홍보전시	목표(단계별)	0	2	2	10
		실적(누적)	0	2	2	
	계	목표(단계별)	1	9	10	100
		실적(누적)	3	9	12	

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

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

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거	
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2022)	2단계 (2023)		
1	면역원성	배	50	다국적기업	16배 이상	16배 이상	-	16배이상	
2	방어능	%	50	다국적기업	80%	80%	-	80% 이상	

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Genome characterization of a Korean isolate of porcine epidemic diarrhea virus	Microbiology Resource Announcements	Dae-Min Kim	-	대한민국	American society for microbiology	SCIE	2023.12.20	1225-7842	100
2	Development of Effective PEDV Vaccine Candidates Based on Viral Culture and Protease Activity	MDPI vaccines	Dae-Min Kim	11(5)	대한민국	MDPI	SCIE	2023.06.30	2036-5195	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022 대한바이러스학회 연구회연합 정기학술대회	김대민	2022.08.26	강원도 양양 을지인력개발원	대한민국
2	13th European Symposium of Porcine Health Management	Dae-Min Kim	2023.06.01.	그리스, 데살로니키	그리스

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Porcine Epidemic Diarrhea Virus(PEDV)	KCTC 14982BP	생물자원센터	2022

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	PED-L(live)	2022-09-15	(주)코미팜	(주)코미팜	임상시험 백신	2년		
2	PROVAC PED-LME	2024-01-03	(주)코미팜	(주)코미팜	수출용	1년		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시	새로운 국내 유행 PEDV(G2b)를 이용한 경구백신용 약독화 strain 제작 및 이를 이용한 백신 제조법	(주)코미팜	2023-12-28	1,000,000 (2024년 예정)	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	직접실시	신제품 개발	국외	PROVAC PED-LME	해외 수출 전용	(주)코미팜	0	0	미발생	10년

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		-국내 야외임상시험 신청을 위한 전임상 실험 마무리 단계 - 해외 수출 전용 백신 허가 완료		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2		
	소요예산(천원)	200,000		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		0	200,000	200,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내		0	3.7	3.7
국외		-	-	-
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		개발된 제품을 포함하는 백신 프로그램을 홍보하여 PED 백신의 가장 효과적인 사용을 계획 중		
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
		-	-	-
수출		0	100,000	200,000

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	신규 인력 채용	(주)코미팜	1	0	1
2	신규 인력 채용	(주)코미팜	1	0	1
합계			2	0	2

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	11	
		생산인력	-	
	개발 후	연구인력	12	
		생산인력	-	

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
2024						1	
2025	프로백 피이디-라이브 출시					1	
2026			100,000/년	200,000/년			

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	축산경제신문	코미팜 '경구용 PED 생백신' 개발 속도	2023.12.29
2	Internet/PC통신	돼지와사람	중화항체를 획기적으로 올려줄 수 있는 PED 백신 개발 중이다	2024.01.02

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달 성 내 용	달성도(%)
○ 고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 시제품 제작과 자돈 면역원성 평가	○ 생체분자 발현기술 적용 Fc 백신 시제품과 면역증가제를 포함하는 경구용 PED 생백신 시제품을 제작 완료하였으며, 이를 이용하여 자돈 면역원성 평가 완료	100%
○ 면역증강 경구용 PED 생백신의 최소면역원성 평가	○ PED 백신을 접종하지 않은 모돈을 이용하여 분만 4주전에 2주 간격으로 2회 항원 함량별로 PED 경구용 백신을 접종하였으며, 분만한 자돈에 공격접종하여 유효성을 확인	100%
○ 야외 임상시험을 위한 연속 3 Lot 백신 시제품 제작	○ 자돈 면역원성 평가 결과로 확정된 조성을 이용하여 연속 3 Lot 시제품 제조 완료(lot 당 1dose x 500 vial)	100%
○ 연속 3 Lot 백신 시제품에 대한 장기보존성(안정성) 평가	○ 제조 직후부터 3개월과 6개월, 9개월, 12개월까지 물리 화학적 성상, 안전성 확인	100%
○ 면역증강 경구용 PED 생백신에 대한 임상시험 신청 및 3개 농장 야외 임상시험	○ 임상시험 계획서 작성 및 농장 3개 선정 완료	50%
○ 면역증강 경구용 PED 생백신과 상용화 경구용 PED 생백신의 효능 비교 평가	○ 상용화된 경구용 PED 생백신 1종을 선정하여 자돈을 대상으로 안정성 및 효능 비교 평가	80%
○ 면역증강 경구용 PED 생백신을 활용한 돼지유행성 설사병 백신 접종프로그램 평가	○ PED 근육용 생백신, PED 경구용 생백신, PED 근육용 불활화 백신을 활용하여 백신 면역프로그램 실험 및 평가	80%
○ 면역증강 경구용 PED 생백신의 품목허가 신청	○ 해외 수출용 허가 확보 완료	50%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

이번 과제에 계획된 목표들 중 1차 년도의 목표는 대부분 달성하였으나, 2차 년도 목표에 대하여 실험 목적 주령이 변동되고, 수행하지 못한 부분이 발생하였다. 주요 원인 중 하나는 1차 년도 목표인 면역원성 확인과 면역증강제 혹은 생체분자 기술을 도입한 바이러스 선정 과정에서 면역원성(항체)이 확인되지 않았으며, 이 원인은 안전성을 높이기 위하여 추가 20회 이상 바이러스를 계대하면서 면역원성이 감소되었다고 판단되었다. 이를 보완하기 위하여 면역원성과 안전성이 모두 충족하는 계대수를 선별하기 위한 동물 실험이 2번 추가로 발생하였으며, 이로 인해 추후 진행 목표인 2차년도 목표가 뒤로 미루어졌다. 이와 동시에 야외임상시험을 수행하기 위한 필수 조건인 야외임상시험실시기관 지정이 회사 내부 사정으로 인하여 자진 취하되어, 자사에서 수행될 수 없게 되어 허가와 관련된 실험이 연기 되었다. 이러한 이유로 목표한 계획대로 진행되지 못하였으며, PED 백신을 접종하지 않았거나 음성인 모돈과 후보돈을 확보할 시간적 여유가 부족하여 자돈 실험으로 대체되어, 계획된 2차년도 목표를 일부 달성하지 못하였다.

- 면역증강 경구용 PED 생백신에 대한 임상시험 신청 및 3개 농장 야외 임상시험(목표 대비 50% 성과 달성)
 - 임상시험 신청을 위한 임상시험 실시기관을 자사 내부로 선정하여 진행하고자 계획하였으나 회사 내부 사정으로 임상시험 실시기관 선정을 자진 취하하게 되었음. 이에 따라 외부 임상시험 실시기관을 알아보고 외부 임상시험 실시기관과 회의도 진행하였으나 금액적인 협의를 보지 못하였고, 자사 임상시험실시기관을 재인증 받는 것으로 내부 결정되어 진행하지 못하였음.
 - 면역증강 경구용 PED 생백신과 상용화 경구용 PED 생백신의 효능 비교평가(목표 대비 80% 성과 달성)
 - 비교평가를 위한 백신 실험을 모돈에서 수행하기로 하였으나, PED 백신을 사용하지 않거나 항체 음성인 모돈을 보급이 어려워 PED 백신을 접종하지 않은 10주 이내의 자돈을 사용하여 실험하게 되었으며, 이에 따라 계획상의 모돈 안전성 평가를 수행하지 못함.
 - 면역증강 경구용 PED 생백신을 활용한 돼지유행성 설사병 백신 접종프로그램 평가(목표 대비 80% 성과 달성)
 - 접종 프로그램 평가 실험 또한 후보돈에서 수행하기로 되어있었으나 PED 항체 음성인 후보돈 확보가 일정상으로 어려워 PED 백신을 접종하지 않은 10주 이내의 자돈을 사용하여 실험하게 되었으며, 이에 따라 계획상의 후보돈 면역원성 평가를 수행하지 못함.
 - 면역증강 경구용 PED 생백신의 품목허가 신청(목표 대비 50% 성과 달성)
 - 품목허가를 위하여 야외임상시험이 선 수행되어야 했으나 임상시험 실시기관 선정 문제로 수행되지 못함.
-

2) 자체 보완활동

본 과제에서 확보한 연구 성과를 바탕으로 백신화를 지속적으로 수행할 예정이다. 2024년도 3월에 임상시험 실시기관으로 재선정될 예정이며, 기 확보된 농장 3곳을 이용하여 과제를 통해 수행된 전임상 시험 결과를 바탕으로 임상시험을 수행할 예정이다. 계획상으로 수행되지 못했던 모돈과 후보돈 실험 또한 야외임상시험농장에 추가로 실험하여 결과를 확보할 예정이며, 이러한 후속 조치를 통하여 경구용 PED 생백신의 제품화를 이루고자 한다.

3) 연구개발 과정의 성실성

- 21개월이라는 짧은기간동안 동물 실험을 7회 진행하였으며, 그중에 2회는 모돈을 이용한 실험을 수행하며 약독화 백신주의 산업화를 성실하게 수행하였음.
- 임상시험 실시기관 선정 문제로 계획상의 실험을 달성할 수 없는 상황에서도 백신의 효과적인 사용을 위하여 모돈 근육 접종 실험을 추가로 수행하였으며, 이는 돼지유행성설사병의 예방에 효과적인 백신 프로그램 구축 시에 다양한 방법으로 적용이 가능함.
- PED 경구용 백신의 다양한 가능성을 확보하기 위하여 2021년도에 분리한 PED 바이러스를 통하여 새로운 바이러스를 확보하였으며, 생물자원등록 하였음.
- 임상시험과 동물실험에 집중하기 위하여 백신허가 담당자와 동물실험 담당자를 추가로 고용하였음.(고용창출: 목표 1건, 성과 2건)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 본 과제를 통해 확보된 돼지유행성설사병 바이러스(PEDV CKT-7_N P150)는 기존 약독화 PED 바이러스들과 달리, Trypsin이 아닌 담즙산을 첨가하여 약독화 주를 제작하였고, 이 과정에서 비병원성의 고역가 백신주가 선별되었음. 고역가 백신은 높은 농도의 백신 제조가 가능해졌으며, 경구 투여의 한계(위산에 의한 바이러스 감소)를 극복할 수 있는 접근임.
- 본 과제를 통해 확인된 경구 백신용 부형제는 새로운 개념의 백신으로 적용될 것으로 보이며, 국내 허가된 백신에서는 최초 도전이 될 것임. 부형제를 혼합한 생백신이 효과적으로 사용 될 경우 기존 허가 PED 제품에도 적용이 가능함(백신 사용 비용 감소).
- 백신 프로그램의 구축으로 돼지유행성설사병의 예방에 효과적인 현장 활용에 기여할 것으로 기대 함.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	종료 후 2년 이내 : 1건
	비SCIE	0
	계	1
사업화	상품출시	종료 후 2년 이내 : 1건
	기술이전	0
	공정개발	0
제품개발	시제품개발	종류 후 2년 이내 : 1건
성과홍보		종류 후 2년 이내 : 2건
정성적 성과 주요 내용		고증식성 G2b형 PEDV를 이용한 고역가 경구용 PED 생바이러스와 부형제 혼합 바이러스 제품화

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	122004-2		
사업구분	농림축산식품부 연구개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술 고도화지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	(주)코미팜			연구책임자	한장혁
연구기간	연차	기간	정부	민간	계
연구개발비 (천원)	1차년도	9개월	300,000	75,000	375,000
	2차년도	12개월	400,000	100,000	500,000
	계	21개월	700,000	175,000	875,000
참여기업					
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024.02.28

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)코미팜	상무	한장혁

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	한 장 혁
----	-------

[별첨 1]

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

PED 아외 분리주를 세포에 적응시키고 약독화시키는 과정의 전통적인 방법에서 탈피하여 국내 최초로 담즙산을 첨가를 통한 세포적응 및 약독화 바이러스 제작에 성공하였으며, 증식성이 높아 고농도 생백신 사용이 가능하다. 이와 더불어 경구 접종 백신의 효율을 높이는 방법으로 사용 직전에 부형제를 혼합하여 사용함으로써 면역원성을 높이는 효과를 보았으며, 이를 자돈에서 중화항체 증가로, 어미돼지에서는 분만 자돈의 방어력으로 확인하였다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

PED 생백신의 경우 국내 최초는 아니지만, 부형제를 혼합하여 면역원성과 안정성을 높이는 백신의 형태는 국내 PED 생백신에서는 최초 적용이다. 또한, 다른 PED 생백신 바이러스보다 높은 농도로 생산되는 특징을 제품에 반영하여 타사 제품보다 최소 10배이상의 바이러스가 들어가는 고역가 제품이며, 이는 근육뿐만 아니라 경구에서도 효과적인 사용이되어 타 제품과 비교 우위에 있을 것이다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

주관연구기관이자 직접 기술을 실시한 (주)코미팜은 PED 백신에 대한 다양한 제품화 경험을 보유하고 있으며, 이외에 다양한 기술이전 산업화 경험을 갖고 있다. 특히, 또 다른 iPET 과제를 통하여 제품화하고, 출시한 Fc 면역증강 불활화 백신은 50억 이상의 매출을 기록하고 있으며 해외 국가에도 수출중에 있다. 본 실험 기간동안 품목허가를 위한 실험을 최대한 진행하였으나, 아직 품목허가까지는 진행하지 못하였지만, 향후 1년안에 제품화 하여 출시할 계획을 가지고 있다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

산업화를 위한 동물실험을 적극적으로 수행하였으며, 실험실 단위 실험이 어려운 모든 실험을 2회에 걸쳐 진행하였다. 또한, 면역증강제 종류를 다양하게 선정하고 이를 동물 실험에 직접 도입하여 가능성을 확인하였다. 다만, 항체수준의 확인이 되지 않아 아쉬움이 있지만, 이를 극복하기 위하여 다양한 종류의 프로그램 실험을 수행하였고, 근육접종과 병행하였을 때 항체 수준이 확인되는 것을 확인하였다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

유럽 양돈 학회에서 PED 경구 백신 포스터로 구두 발표자로 선정되어 우수성을 인정받았으며, SCI 논문에도 투고되어 성과지표를 문안하게 달성하였다. 또한, 지방일간지를 통해 적극적으로 홍보하여 우수성을 널리 알린바 있다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제작 및 최적화	40	40	- 다양한 후보주와 다양한 면역증강제를 포함하는 경구용 PED 생백신을 항원함량별로 시제품으로 제작하였음 - 다양한 후보주와 다양한 면역증가제를 포함하는 경구용 PED 생백신 시제품을 이용한 면역원성 평가 및 최적화하였음 - 모돈을 이용하여 부형제를 포함하는 PED 경구용 백신의 항원함량별 유효성 평가하였음
야외 임상시험을 통한 면역증강 경구용 PED 생백신의 안전성 및 효능 평가	20	15	- 야외 임상시험용 연속 3 lot 시제품 제조 완료하였음(lot 당 1 dose x 500 vial) - 3개 농장 섭외 완료 하였음.
면역증강 경구용 PED 생백신의 유효기간 확인	10	10	- 야외 임상시험용 연속 3 lot 시제품에 대하여, 제조 직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 안정성 확인 하였음
면역증강 경구용 PED 생백신과 상용화 백신과의 효능 비교 평가	10	8	- 상용화된 경구용 PED 생백신 1종을 선정하여 본 과제에서 선정한 백신과 자돈을 대상으로 안정성 및 효능 비교 평가함
면역증강 경구용 PED 생백신을 포함하는 최적의 백신 면역프로그램 구축	10	8	- PED 근육용 생백신, PED 경구용 생백신, PED 근육용 불활화 백신을 활용하여 백신 면역 프로그램 실험 및 비교 평가함
면역증강 경구용 PED 생백신 제품화를 위한 품목허가서류 제출	10	5	- 태국과 베트남에서 수입의향서를 확보하였으며, PED 경구용 백신의 수입허가를 승인 받았음.
합계	100점	86점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제는 ‘고증식성 G2b형 PEDV 약독화주를 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화’입니다. 이 제품화를 위하여 허가에 필수적인 전임상 실험(최소면역원성 실험, 안전성 실험, 시제품 안전성 실험)을 본 과제 동안 수행하였고, 경구 백신의 제품화의 가능성을 더 구체화 시킬 수 있었습니다. 또한, 백신의 효과적인 사용을 위하여 백신 프로그램을 구축 실험을 수행하였고, 면역증강제를 이용한 경구 백신을 사용하였을 때에 더 효과적이라는 결과를 확인하였습니다. 비록, 바이러스 조성(부형제, 바이러스 계대수) 최적화를 위한 추가 실험과 회사 내부 사정으로 인하여 계획된 내용을 모두 수행하지는 못하였지만, 면역증강제가 포함된 PED 경구 백신의 필요성을 높이고, 더 나아가 발전된 PED 경구 백신 플랫폼을 보여줬다는 측면에서 과제가 성공적으로 수행되었다고 판단되며, 이 제품의 산업화가 기대된다고 평가됩니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

세부 성과지표 대비 일부 부족한 점은 있으나, 제품화하려고 하는 PED 바이러스의 문제라기보다는 PED 생백신을 평가하는 방법이 올바르지 않아 발생한 문제라고 판단됩니다. PED 경구용 생백신을 평가하는 기준은 근본적으로 방어력이긴 하지만, 품목허가 서류 준비 시에 항체 수준을 요구하는 경우가 많이 있습니다. 이는 국가 검정기준으로 허가를 진행하다 보니, 면역원성(항체) 기준 자료로 요구되고 있습니다. 하지만, 경구용 PED 백신은 장 점막을 자극하여 점막 면역과 세포성 면역을 향상하지만, 이는 혈청검사 기준에서는 검출되지 않을 가능성이 큽니다. 이번 모든 경구 최소면역원성 실험에서 보인 것과 같이 항체 평가(중화실험, IgA, IgG)실험에서는 검출되지 않은 개체가 많았지만, 분만한 자돈의 방어력 실험에서는 모든 개체에서 유효한 방어능이 확인되었습니다. 이는 항체 평가가 아닌 다른 평가 방법이 필요할 것으로 보이지만, 백신의 유효성을 평가하는 대표적인 방법은 항체가 검사이며 이를 대체하는 방법은 아직 확보되지 않았스니다. 이러한 한계점을 극복하기 위하여 모든에 근육으로 접종하는 실험을 추가로 수행하였으며, 이후 계획된 실험을 충분히 하기에는 과제의 수행 기간이 21개월로 매우 짧았다는 점을 충분히 고려해주시기 바라며, 이러한 조건 내에서도 최선의 결과를 얻으려 노력하였습니다.

3. 연구결과와 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 과제를 통하여 확보된 결과를 바탕으로 종료 1년 차에는 야외임상시험을 수행하고, 야외임상시험 중에는 계획상에서 부족하였던, 모돈과 후보돈의 추가 실험을 함께 수행할 예정입니다. 종료 2년 차에는 품목허가를 완료하여 국내에 판촉을 진행하고, 종료 3년 차에는 수출요구가 있었던 태국과 베트남에 수출 판촉을 계획하고 있습니다. 이와 함께 과제를 통하여 확인한 백신 프로그램을 홍보와 마케팅 자료로 사용하여 효과적인 백신 프로그램을 홍보할 계획이며, 이와 더불어 추가 선정된 PED 신규 바이러스도 유효성 확인 실험을 진행하여, 변이가 많은 돼지유행성 설사 바이러스(돼지 코로나 바이러스로 변이가 많아 회피 주가 주기적으로 발생)를 선제적으로 막을 수 있는 백신주를 지속해서 선별하고 백신화하는 방향으로 연구 결과를 활용할 계획입니다.

[별첨 1]

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

최종 보고서 상의 주요 연구내용이 제품화 과정에서 기술자료로 활용될 예정이며, 해당 내용이 공개될 시 경쟁사로 유출이 우려됨에 따라 비공개 필요.

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

연구 책임자 의견과 동일

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	고증식성 G2b형 PED attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제품화			
주관연구개발기관	(주)코미팜		주관연구책임자	한장혁
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	700,000	175,000	0	875,000
연구개발기간	2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(직접 기술실시)) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain을 이용한 면역증강 경구용 PED 생백신 제작 및 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 후보주와 다양한 면역증강제를 포함하는 경구용 PED 생백신을 항원함량별로 시제품으로 제작하였음 - 다양한 후보주와 다양한 면역증가제를 포함하는 경구용 PED 생백신 시제품을 이용한 면역원성 평가 및 최적화하였음 - 모돈을 이용하여 부형제를 포함하는 PED 경구용 백신의 항원함량별 유효성 평가하였음
야외 임상시험을 통한 면역증강 경구용 PED 생백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 야외 임상시험용 연속 3 lot 시제품 제조 완료하였음(lot 당 1 dose x 500 vial) - 3개 농장 섭외 완료 하였음.
면역증강 경구용 PED 생백신의 유효기간 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 야외 임상시험용 연속 3 lot 시제품에 대하여, 제조 직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 안정성 확인 하였음
면역증강 경구용 PED 생백신과 상용화 백신과의 효능 비교 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 상용화된 경구용 PED 생백신 1종을 선정하여 본 과제에서 선정한 백신과 자돈을 대상으로 안정성 및 효능 비교 평가함
면역증강 경구용 PED 생백신을 포함하는 최적의 백신 면역프로그램 구축	<ul style="list-style-type: none"> - PED 근육용 생백신, PED 경구용 생백신, PED 근육용 불활화 백신을 활용하여 백신 면역 프로그램 실험 및 비교 평가함
면역증강 경구용 PED 생백신 제품화를 위한 품목허가서류 제출	<ul style="list-style-type: none"> - 태국과 베트남에서 수입의향서를 확보하였으며, PED 경구용 백신의 수입허가를 승인 받았음.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표				연구기반지표			
	지식	기술	사업화	기	학술성과	교 인	정책	기

	재산권				실시 (이전)							논문		특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	술인증	SCI	비SCI	논문평균인-F	학술발표	육지도	력양성	활용·홍보		타 (타연구활용예외) (이탈연구활용예외)					
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	술인증	SCI																			비SCI	논문평균인-F		학술발표	육지도	력양성	정책 활용	홍보 전 시
	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건																			건	건		명	건	건		
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건																					
가중치					20		50			10				10				10																					
최종 목표					1		3			1		1		2				2																					
당해 년도	목표				1		3			1		1		2				2																					
	실적				1		2			2		1		2				2																					
달성률 (%)					100		66			100		100		100				100																					

[별첨 2]

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	약독화된 돼지 유행성 설사병 CKT-7_N 바이러스 및 이를 포함하는 돼지 유행성 설사병 백신용 조성물
②	새로운 국내 유행 PEDV(G2b)를 이용한 경구백신용 약독화 strain 제작 및 이를 이용한 백신 제조법
③	돼지 면역글로블린 지의 에프씨 도메인 세포 표면 발현용 벡터, 상기 벡터에 의해 형질 전환된 숙주세포 및 상기숙주세포를 이용한 돼지 질병 관련 바이러스에 대한 백신의 제조법

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v			v	v	v			
②의 기술		v			v		v			
③의 기술		v			v	v	v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	경구용 PED 생백신 제품화의 핵심기술로 활용
②의 기술	차세대 경구용 PED 생백신 제품화의 핵심기술로 활용
③의 기술	차세대 경구용 PED 생백신 제품화의 핵심기술로 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용등) (명)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
													SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표					10		150	500				1								
연구기간내 달성실적					0		0	0				0								
연구종료후 성과창출 계획					10		150	500				1								

[별첨 2]

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	새로운 국내 유행 PEDV(G2b)를 이용한 경구백신용 약독화 strain 제작 및 이를 이용한 백신 제조법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(직접 실시)		
이전소요기간	즉시	실용화예상시기 ³⁾	2029년 2월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	특이사항 없음		

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	✓	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	✓	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	✓	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	✓	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	✓	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	✓	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	✓	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	✓	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	✓	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	✓	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 02. 27.

기관명 : (주)코미팜

점검자 : 한 장 혁



농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	✓	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	✓	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	7	2차 문헌을 활용하면서재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	✓	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	✓	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	✓	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	✓	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	✓	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	✓	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	✓	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	✓	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 02 . 28 .

기관명 : 전북대학교 산학협력단

점검자 : 탁 동 섭

(서명) 탁 동 섭

농림식품기술기획평가원장 귀하

주 의

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