

117031-3

수출전략기술사업 제3차 연도 최종보고서

발 간 등 록 번 호

11-1543000-003168-01

# 독소 산생 병원성 세균 예방 백신 개발 과 안전성 및 효능 평가 최종보고서

2020. 07. 10.

주관연구기관 / 전북대학교산학협력단  
협동연구기관 / (주)코미팜

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

독소 산생 병원성 세균 예방 백신 개발 과 안전성 및  
효능 평가 최종보고서

2020 농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘독소 산생 병원성 세균 예방 백신 개발 과 안전성 및 효능 평가’(연구개발 기간 : 2017. 04. 21. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 10부를 제출합니다.

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 조재영

세부연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 조재영

협동연구기관명 : ㈜코미팜 (대표자) 문성철

2020. 07. 10



주관연구기관책임자 : 허 진

세부연구기관책임자 : 박정희

협동연구기관책임자 : 정호경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

### 보고서 요약서

과제고유번호	117031-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 4. 21 ~ 2019. 12. 31	단 계 구 분	(33개월)/ (33개월)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	돼지에서 독소 산생 병원성 세균에 의한 급사 관련 질병 예방 백신 개발 및 사업화			
	세부 과제명	돼지에서 독소 산생 병원성 세균에 의한 급사 관련 질병 예방 백신 개발 및 사업화			
연구책임자	허진	해당단계 참여연구원 수	총: 26 명 내부: 26 명 외부:   명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 78 명 내부: 78 명 외부:   명	총 연구개발비	정부:825,000천원 민간:275,000천원 계:1,100,000천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 수의학과 전북대학교 생명공학부			참여기업명 (주)코미팜	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	3	10-20 0120, 10-20 77701,							KCTC 13847 BP, K C T C 14111 1BP		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)</p> <p>1. 돼지에서 독소 산생 병원성 세균에 의한 급사 관련 질병 백신 개발을 통한 산업체 기술이전 및 제품화  가. 산업체 기술이전 2건, 제품화 2건</p> <p>2. 돼지에서 독소 산생 병원성 세균에 의한 급사 관련 질병 백신 개발을 통한 지적재산권  가. 논문게재 3건, 특허 출원 및 등록 8건</p>	<p>보고서 면수</p>
--	---------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 독소를 산생하는 병원성 세균인 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 Stx2e가 혼합된 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 개발 및 사업화</li> <li>2. <i>Clostridium novyi</i> 신개념 사균체와 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 함유 전염성 가스 괴저 예방 단독 백신 개발 및 사업화</li> </ol>
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 특허 : 8건 (출원 6건, 등록 : 2)</li> <li>2. 기술이전 : 2건</li> <li>3. 논문게재 : 3건</li> <li>4. 학술발표 : 10건</li> <li>5. 제품화 : 2건 (3차년도 2건)</li> </ol>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 연구개발 결과의 활용계획             <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 현대지에서 부종병 및 돼지 전염성 가스 괴저를 예방할 수 있는 제품의 상품화를 통해 국내 및 해외 수출을 통해 산업적 활용도 상승</li> <li>나. 현세로운 타입의 백신 개발 및 질병관련 독소이드 함유 혼합 백신의 개발로 인한 수입 대체 효과 및 수출 효과 기대</li> <li>다. 현효능이 탁월한 새로운 백신 개발을 통한 양돈가의 질병 해소에 따른 양돈가에 경제적 도움 기대</li> </ul> </li> <li>2. 연구개발 결과의 기대효과             <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 현기술적 기대성과                 <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 창조기술을 도입한 재조합 AMPs를 통한 세균의 신개념 사균화 유도를 통한 맞춤형 백신개발 가능</li> <li>(2) 생균백신 수준의 방어력을 확보한 신개념 사균백신 개발 기술 확보</li> <li>(3) 발현이 어려운 독소의 대량 발현 시스템 구축을 통한 신개념 사균체와 불활화 독소이드가 함유된 방어력이 탁월한 혼합 백신의 방어효과 극대화</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>3. 경제 산업적 기대효과             <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 현제품의 산업화를 통한 동물의약품의 수출 기대</li> <li>나. 현단백질 구조 기반한 백신제조기술 분야의 첨단기술 전문가 배출</li> <li>다. 현 돼지에서 백신에 의한 불필요한 항생제 처치 및 성장 지연에 따른 경제적 손실을 최소화하여 이에 따르는 농가피해 및 국민 안전</li> </ul> </li> </ol>

	에 기여 효과 라. 현 백신 수입 대체 효과				
국문핵심어 (5개 이내)	부종병	전염성 가스 괴저	Stx2e	<i>Clostridium novyi</i> 알파 독소	예방 백신
영문핵심어 (5개 이내)	Edema disease	Infectious gas gangrene	Stx2e	<i>Clostridium novyi</i> alpha toxin	Vaccine

## < 목 차 >

제1장. 연구개발과제의 개요 .....	7
제1절. 연구개발 목적 및 내용 .....	7
제2절. 연구개발의 필요성 .....	10
제3절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계 .....	17
제2장. 연구수행 내용 및 결과 .....	23
제1절. 1차년도 연구수행 내용 및 결과 .....	23
제2절. 2차년도 연구수행 내용 및 결과 .....	40
제3절. 3차년도 연구수행 내용 및 결과 .....	55
제4절. 3년간 연구수행 결과 요약 및 평가 .....	67
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	81
제1절. 연차별 목표 및 내용 .....	81
제2절. 연구개발 평가방법 .....	93
제3절. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	98
제4장. 연구결과의 활용 계획 등 .....	106
제5장. 연구개발성과의 보안등급 및 LMO 연구시설 및 수입신고 .....	108
제6장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	109
붙임. 참고문헌 .....	113

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 제1장. 연구개발과제의 개요

## 제1절. 연구개발 목적 및 내용

### 1. 최종 목표

- 가. 독소를 산생하는 병원성 세균인 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 Stx2e가 혼합된 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 개발 및 사업화
- 나. *Clostridium novyi* 신개념 사균체와 *C. novyi* 알파 독소이드 함유 전염성 가스 괴저 예방 단독 백신 개발 및 사업화

### 2. 세부 목표

- 가. 독소 산생 병원성 세균의 신개념 사균 균체 생산 및 실험동물에서의 백신의 안전성 및 면역 반응 유도 여부 평가
  - (1) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체 유도에 적합한 AMP 선별
  - (2) 국내 돼지로부터 분리된 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 제작
  - (3) 신개념 사균체만을 혼합한 백신 후보군 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역 반응 유도 여부 평가
  - (4) 재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스에 접종하여 백신의 안전성 및 면역 반응 유도 여부 평가
  - (5) 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가
- 나. 부종병 관련 Stx2e 독소 대량 발현 시스템 구축 및 정제
  - (1) 발현 벡터 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선
  - (2) 발현 host 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선
  - (3) 발현된 Stx2e 독소 단백질의 Western blot을 통한 기능 확인
  - (4) 발현된 독소 정제과정 개선을 통한 간소화
- 다. 재조합 Stx2e 독소 단백질 대량 생산 및 불활화
  - (1) 재조합 Stx2e 발현 개선된 방법에 따라 대량 생산 시스템 구축
  - (2) 재조합 Stx2e 대량 생산 및 돼지를 이용한 재조합 Stx2e 독소 기능 확인
  - (3) 대량 생산된 Stx2e 독소 단백질 불활화 및 안전성 평가
- 라. 목적동물에서의 백신의 안전성 및 효능 평가 및 *Clostridium novyi* 배양 기술 개선 및 신개념 사균체화 유도
  - (1) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 돼지를 대상으로 접종량 결정 시험
  - (2) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유



- 유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 접종 횟수 및 시기 결정 시험
- (3) *Clostridium novyi* 배양 기술 개선을 통한 대량 배양 기술 확립
- (4) 개선된 대량 배양 기술에 기반한 *C. novyi* 신개념 사균체화 유도 및 신개념 사균체의 안전성 확인
- (5) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 백신의 돼지에서 효능 평가
- (6) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가

마. 전염성 가스 괴저 관련 독소 대량 발현 시스템 개선 및 기능 확인

- (1) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산을 위한 발현 시스템 개선
- (2) 발현된 재조합 *C. novyi*의 알파 독소의 단백질 구조 확인
- (3) 발현된 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 전염성 가스 괴저 돼지로부터 획득한 혈청을 이용한 Western blot을 이용한 기능 확인
- (4) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산을 위한 정제 방법 개선

바. 개발 백신의 시제품 제작 및 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산 및 불활화

- (1) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작
- (2) 제작된 시제품 안정성 평가
- (3) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산
- (4) 대량 생산된 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 불활화 및 안전성 평가

사. 전염성 가스 괴저 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가

- (1) 사균체 및 독소이드 혼합 백신과 국내 또는 국제적으로 효능이 인정된 돼지 부종병 예방 백신과의 효능 비교 평가
- (2) 사균체 및 독소이드 혼합 백신과 독소이드와 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ stx2e *E. coli* 각각과의 혼합 백신과의 비교 평가
- (3) 독소 중화 실험
- (4) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지부종병 혼합 백신 돼지에서의 안전성 시험
- (5) *C. novyi* 신개념 사균체와 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 효능 평가
- (6) *C. novyi* 신개념 사체와 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가

아. 재조합 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산을 위한 시스템 개선

- (1) 백신 제조 산업체에서 대량 생산을 위한 재조합 독소 발현 시스템 개선
- (2) 제조 공정 과정을 줄이기 위한 정제 방법 개선
- (3) 재조합 Toxoid의 독성 감소효과를 위한 mutagenesis 연구
- (4) 정제된 재조합 독소 단백질의 안정성 평가

자. 돼지 전염성 가스 괴저 백신 시제품 개발 및 양돈장에서의 백신의 효능

- (1) *C. novyi* 신개념 사균체와 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 함유 혼합 백신 시제품 제작
- (2) 제작된 시제품 안정성 평가
- (3) 돼지 부종병이 만연된 양돈장을 대상으로 백신의 안전성 및 효능 평가

## 제2절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 개요

- 가. 산업 동물에 있어서 자돈 시기에 폐사 및 증체율 저하의 가장 큰 원인 중 하나는 소화기 질병에 의한 설사로 인한 폐사 및 사료 효율의 저하에 따른 결과이다. 이처럼 양돈 산업에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 소화기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 소화기 점막은 대다수의 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방으로서 매우 중요한 곳이다.
- 나. 돼지에서 이유 후 설사병 및 부종병은 계속 증가하고 있는 실정이며 이를 예방하기 위한 예방 백신 개발이 활발히 수행되고 있지만 아직 상용화되어 판매되고 있는 제품은 극히 드문 실정이다. 이유 후 자돈에서의 대장균성 설사는 주로 F4+와 F18ac+ ETEC에 의해 주로 발생하며 부종병은 F18ab+ 및 Stx2e+ *E. coli*에 의해 주로 발병되는 것으로 보고되고 있다.
- 다. 특히 돼지 부종병은 최근 FMD와 PED에 이어 양돈가에 경제적으로 막대한 피해를 입히고 있는 주요 질병으로 돼지 부종병은 Stx2e 독소를 갖는 대장균 (부종 병원균) 이 상부 장관 내에서 급격하게 증식하여 독소가 혈중에 흡수됨으로써 발병되는 세균병으로, 4~12 주령의 자돈에게 다발하여, 안검 부종이나 신경 증상 등을 나타내고, 그 대부분은 발병 후 24 시간 이내에 폐사함.
- 라. 부종 병원균의 감염에 의한 치사율은 50 ~ 90 %로 매우 높고, 재발이나 발육 불량 등에 의한 생산성의 저하를 초래하기 때문에 경제적 손실이 큼.
- 마. Stx2e는 rRNA N-글리코시다아제 활성을 갖는 A subunit (Stx2eA)과 수용체 (globotetraosyl ceramide (Gb4)) 결합능을 갖는 B subunit 5량체 (Stx2eB)로 구성되는 전형적인 AB<sub>5</sub>형의 독소 단백질로 알려져 있음. 장관으로부터 흡수된 Stx2e는 B subunit에 의해 혈관 내피세포 등의 세포 표층과 접촉하고 Stx2e의 A subunit이 표적 세포질 내로 들어가 리보솜의 단백질 합성을 저해함으로써 부종병의 증상을 유발시킴.
- 바. 국내에서는 돼지 부종병 예방용 백신이 시판되지 않아 항생 물질로 치료하고 있지만, 발병 후 항생제 투여로는 치료 시기를 놓치는 경우가 많음. 또한 약제 내성균의 출현도 보고되어 있어 유효한 예방법이나 치료법의 개발이 절실히 요망됨.
- 사. 본 연구에서는 이유 후 자돈에서 주로 대장균에 의해 발생하는 돼지 부종병 및 이유후 자돈 설사를 예방하기 위해 ETEC F4ab, F4ac, F4ad와 ETEC F18ac 그리고 F18ab를 대상으로 하여 HDP 및 endolysin을 이용하여 이들 균주를 신개념 사균체화 한 후 Stx2e 외독소 구성 성분을 대량으로 발현할 수 있는 발현시스템을 구축하고 이 시스템으로부터 발현 정제된 재조합 독소를 불활화 한 후 이들을 혼합하여 근육 접종하여하여 면역 반응 유도 여부 및 야외균주에 대한 방어 여부를 확인하고자 함.
- 아. 최근 기후변화에 의해 하절기 동안 고온 다습한 환경이 장기간 지속됨에 따라 비육돈이나 모돈의 급사가 빈번히 보고 되고 있으며, 이러한 급사 케이스의 정밀한 진단과 원인체에 대한 정확한 분석이 필요.
- 자. 비육돈 및 모돈의 급사를 일으키는 원인체로는 주로 *Clostridium*과 Shiga toxin producing *E. coli* 같은 독소를 산생하는 세균이거나 *Salmonella Choleraesuis* 등의 폐혈증을 유발하

는 세균들이 중요한 질병 원인체로 정확한 감별진단이 필요한 실정.

- 차. *Clostridium novyi* (*C. novyi*)는 1894년 미시간 대학의 Frederick Novyi 박사가 기니피그에서 처음 분리. 이 세균은 절대 혐기 조건에서만 생육이 가능하며, 그람 양성균에 아포 형성함.
- 카. *C. novyi*는 현재 사람과 동물에게 모두 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있음. 또한 이 세균은 환경 조건에 널리 퍼져있으며, 특히 토양과 퇴적물에 많이 존재함.
- 타. *C. novyi*의 type 별로 보유하고 있는 독소 유형으로는 type A는 alpha, gamma, delta, epsilon이 있고, type B는 alpha, beta, zeta이다. Type C는 gamma만 보유함.
- 파. *C. novyi* type A, B 둘 다 강력한 alpha 독소를 가지며, 이는 bacteriophage에 내제되어있음. *C. novyi*의 alpha 독소는 불특정한 숙주 혈관내피세포 수용기에 결합하고 그 결과 혈관내피세포의 손실과 부종, 심각한 저혈압, 조직 손상과 급사를 초래함.
- 하. *C. novyi*는 *Clostridium botulinum* group III와 *Clostridium haemolyticum*과 유전학적으로 상동성이 매우 높기 때문에 이들과 구별할 필요가 있음. *C. novyi*와 이들의 구별은 alpha 독소의 여부로 판단할 수 있음. *Clostridium haemolyticum*의 경우에는 PCR로도 구별이 가능함.
- 거. 돼지의 경우, 강력한 alpha 독소를 가지고 있는 *C. novyi*는 주로 모돈에 영향을 끼치며 여름철에 보고가 많이 됨. *C. novyi*는 아포를 형성하며 전염성 있으며 모돈의 급사를 초래하기 때문에 돼지 사육농가의 경제적 손실을 야기하므로 이들 독소와 균체가 함유된 방어 효능이 탁월한 혼합 백신의 개발이 절실함.

## 2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### (1) 기술현황

- (가) 가축사료에 항생제 첨가가 금지된 이후 국내 양돈장에서 부종병 및 전염병 가스괴저의 꾸준한 증가로 인해 양돈가의 경제적 피해는 최근 증가하고 있는 추세.
- (나) 부종병 및 전염성 가스 괴저 발생에는 독소가 중요한 역할을 수행하고 있을 뿐만 아니라 이들 질병을 예방하기 위해서는 이들 독소가 불활화된 독소이드가 백신에 반드시 함유되어야 함.
- (다) 하지만 아직 국내 기술로는 이들 질병과 관련된 독소를 대량 발현할 수 있는 기술이 개발되어 있지 않아 아직까지 이들 질병을 예방할 수 있는 백신이 시판되고 있지 않음.
- (라) 현재 국내의 기술은 이들 질병의 원인균을 분리하는 수준에 머물고 있음.
- (마) 현재 국내에서 돼지 부종병 백신 개발 기술은 부종병을 일으키는 분리균을 포르말린 등으로 불활화 후 배양액에 포함되어 있는 Stx2e 등을 흡착물질을 이용해 획득한 다음 포르말린 등으로 불활화하여 불활화 균체와 혼합하여 양돈가에 공급하는 수준임.
- (바) 전염성 가스 괴저 백신 개발 기술은 *C. novyi*의 알파독소를 산생하는 이 균의 배양방법이 까다로워 아직까지 이 독소와 *C. novyi*에 의해 발생하는 전염성 가스괴저에 대한 백신 개발에 관한 연구는 시작단계라고 할 수 있음.

#### (2) 시장현황

- (가) 최근 국내에서 가축 사료 첨가제로 항생제 사용을 금지한 이후 그동안 항생제에 의해 그 발현이 억제되어 왔던 독소산생 병원성 세균에 의한 질병 특히, Stx2e를 산생하는 대장균에 의한 부종병과 알파독소를 산생하는 *C. novyi* 등에 의한 전염성 가스 괴저가 증가 하고 있으며 특히 이들 질병은 발병 후 치사률이 높아 양돈가에 경제적으로 막대한 경제적 손실을 야기 하고 있음. 하지만 이들 질병을 예방할 수 있는 백신은 현재 국내에서 자가 백신 형태로 주로 판매되고 있는 실정임.
- (나) 국내에서 시판되고 있는 부종병 백신은 자가백신의 일환으로 대개 부종병을 일으키는 분리균을 포르말린 등으로 불활화 후 배양액에 포함되어 있는 Stx2e 등을 흡착물질을 이용해 다운시킨 후 불활화 하여 불활화 균체와 혼합하여 양돈가에 공급하는 수준으로 현재 정식으로 돼지 부종병 백신은 판매되고 있지 않은 실정임.
- (다) *C. novyi*의 알파독소를 산생하는 이 균의 배양방법이 까다로워 아직까지 이 독소와 *C. novyi*에 의해 발생하는 전염성 가스괴저에 대한 백신 개발에 관한 연구는 시작단계라고 할 수 있음.

### (3) 경쟁기관현황

- (가) 현재 국내 많은 동물백신 제조회사들이 이들 독소를 대량 생산하기 위한 기술을 개발 하고는 있지만 현재까지 이들 독소를 대량 생산할 수 있는 기술이 부족한 상태임.
- (나) 즉, 국내에서 시판되고 있는 부종병 백신은 자가백신의 일환으로 대개 부종병을 일으키는 분리균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 균체와 이들 세균 배양액에 포함되어 있는 Stx2e 등을 흡착물질을 이용해 획득한 후 포르말린 등으로 후 불활화하여 불활화 균체와 혼합하여 양돈가에 공급하는 수준에 머물러 있음.
- (다) 전염성 가스 괴저의 원인균인 *C. novyi*의 배양방법이 까다로워 아직까지 이 독소와 *C. novyi*에 의해 발생하는 전염성 가스괴저에 대한 백신 개발에 관한 연구는 시작단계에 머물러 있음.
- (라) 따라서 국내에서 이들 독소를 대량생산하여 불활화 독소이드를 우리가 개발하고자 하는 생균 같은 사균체와의 혼합 백신을 개발하여 그 효능이 확인 된다면 다른 다국적 기업보다 먼저 국내에서 세계 최초의 부종병 및 전염성 가스괴저 예방 백신을 개발하여 이 분야에서 선진기술 확보하게 될뿐만 아니라 수입 대체 효과와 더불어 국외 수출을 통한 이화 획득의 기회가 될 것임.

### (4) 지식재산권현황

- (가) 돼지 부종병 및 전염성 가스괴저에 대한 백신에 관한 국내 동물약품 제조회사에 의한 특허 출원이나 등록은 없음.
- (나) 돼지 부종병과 관련된 Stx2e에 관한 발현 기술을 이용한 개발 기술을 2010과 2015년에 일본에서 국제특허 형식으로 국내에 특허를 출원한 적은 있지만 특허 등록까지는 진행 되지 못한 실정임.
- (다) 2010년 출원은 식물에서 Stx2e를 발현하여 사료첨가제 형식의 백신 제조에 관한 내용이며 2015년 출원은 폴리펩타이드와 Stx2e B subunit 융합 단백질을 발현시켜 돼지에 접종하여 높은 중화항체 역가만을 확인한 단계임.
- (라) *C. novyi*에 대한 전염성 가스 괴저 백신에 관한 국내 특허 출원 및 등록은 아직까지

전무한 실정임.

(5) 표준화현황

(가) 아직 상용화된 백신이 없어 표준화 현황이 없음

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- (가) 전 세계적으로 부종병과 전염성 가스괴저에 대한 질병이 발병하고 있음. 하지만 선진국에 비해 동남아시아나 남미와 같은 개발도상국에서 이 질병이 만연되고 있어 백신 개발이 시급한 실정임. 하지만 이들 독소의 대량 생산을 위한 발현시스템이 확립되어 있지 않아 많은 동물백신 다국적 기업에서 이 독소의 대량 생산을 위해 여러 가지로 연구가 진행되고 있지만 아직까지 한 다국적 동물약품 회사(IDT)에서만 Stx2e가 함유된 백신을 개발하여 현재 여러 나라에 판매를 위한 정보를 수집 중에 있음.
- (나) 부종병 및 전염성 가스 괴저 발생에는 독소가 중요한 역할을 수행하고 있을 뿐만 아니라 이들 질병을 예방하기 위해서는 이들 독소가 불활화된 독소이드가 백신에 반드시 함유되어야 함.
- (다) 하지만 아직 IDT라는 한 다국적 기업을 제외한 다른 곳에서는 이들 질병과 관련된 독소를 대량 발현할 수 있는 기술이 개발되어 있지 않으며 많은 연구가 수행 중에 있음.
- (라) 현재 국외에서는 IDT를 제외한 많은 다국적 기업들도 돼지 부종병 백신 개발 기술은 부종병을 일으키는 분리균을 포르말린 등으로 불활화 후 양돈가에 공급하는 수준임.
- (마) 전염성 가스 괴저 백신 개발 기술은 *C. novyi*의 알파독소를 산생하는 이 균의 배양방법이 까다로워 아직까지 이 독소와 *C. novyi*에 의해 발생하는 전염성 가스괴저에 대한 백신 개발에 관한 연구는 시작단계라고 할 수 있음.

(2) 시장현황

- (가) 최근 많은 나라에서 Stx2e를 산생하는 대장균에 의한 부종병과 알파독소를 산생하는 *C. novyi* 등에 의한 전염성 가스 괴저가 증가 하고 있으며 특히 이들 질병은 발병 후 치사율이 높아 양돈가에 경제적으로 막대한 경제적 손실을 야기 하고 있음. 하지만 이들 질병을 예방할 수 있는 백신은 현재 한 다국적 기업에서만 개발에 성공하여 판매를 위한 전 단계를 수행 중에 있음.
- (나) 그 외 다른 다국적 기업에서는 이유 후 자돈에서 설사 또는 부종병을 일으키는 대장균을 포르말린 등으로 불활화 후 양돈가에 공급하는 수준이며 독소 대량 생산을 위한 연구가 진행 중에 있음.
- (다) *C. novyi*의 알파독소를 산생하는 이 균의 배양방법이 까다로워 아직까지 이 독소와 *C. novyi*에 의해 발생하는 전염성 가스괴저에 대한 백신 개발에 관한 연구는 시작단계라고 할 수 있음.

(3) 경쟁기관현황

- (가) 현재 국외 다국적 기업 중 IDT를 제외한 많은 동물백신 제조 다국적 기업들도 Stx2e를 대량 생산하기 위한 기술을 개발하고는 있지만 현재까지 이들 독소를 대량 생산할

수 있는 기술이 부족한 상태임.

(나) 전염성 가스 괴저의 원인균인 *C. novyi*의 배양방법이 까다로워 아직까지 이 독소와 *C. novyi*에 의해 발생하는 전염성 가스괴저에 대한 백신 개발에 관한 연구는 시작단계에 머물러 있음.

(다) 따라서 다른 다국적 기업보다 먼저 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소를 대량 생산할 수 있는 시스템을 구축하여 이들 독소를 대량 생산 후 포르말린 등으로 불활화 후 우리가 개발하고자 하는 생균 같은 사균체와의 혼합 백신 접종을 통한 백신의 탁월한 효능이 확인된다면 국내뿐 아니라 국외에 수출하여 외화 획득에 좋은 기회가 될 것임.

#### (4) 지식재산권현황

(가) 일본에서 식물을 이용한 Stx2e를 발현하여 사료첨가제 형식의 백신 제조에 관한 내용으로, 다른 하나는 폴리펩타이드와 Stx2e B subunit 융합 단백질을 발현시켜 돼지에 접종하여 높은 중화항체 역가만을 확인하여 미국 등지에서 특허를 등록함.

(나) *C. novyi*에 대한 전염성 가스 괴저 백신에 관한 국내 특허 출원 및 등록은 아직까지 전무한 실정임.

#### (5) 표준화현황

(가)  $3.2 \times 10^4$  ELISA unit + 3.5 mg Aluminium hydroxide + 0.115mg Thiomersal 혼합물로서 4일령 이후의 돼지에 근육 접종

### 3. 연구개발의 중요성

#### 가. 연구의 필요성

- (1) 최근 기후변화에 의해 하절기 동안 고온 다습한 환경이 장기간 지속됨에 따라 비육돈이나 모돈의 급사가 빈번히 보고되고 있으며, 이러한 급사 케이스의 정밀한 진단과 원인체에 대한 정확한 분석이 필요.
- (2) 비육돈 및 모돈의 급사를 일으키는 원인체로는 주로 *Clostridium*과 Shiga toxin producing *E. coli* 같은 독소를 산생하는 세균이거나 *Salmonella Choleraesuis* 등의 폐혈증을 유발하는 세균들이 중요한 질병 원인체로 정확한 감별진단이 필요한 실정.
- (3) 최근 국내에서 돼지 부종병은 최근 양돈가에서 국내에서 FMD, PED에 이어 가장 주목받고 있는 주요 질병으로 가축 사료에 항생제 첨가가 금지 되면서 그 질병이 급증하고 있음.
- (4) 돼지 부종병은 Stx2e를 산생하는 F18+ *Escherichia coli*에 의해 주로 4~12 주령의 자돈에게 다발하여, 안검 부종이나 신경 증상 등을 나타내고, 그 대부분은 발병 후 24시간 이내에 폐사함.
- (5) 더불어 돼지 부종 병균의 감염에 의한 치사율은 50 ~ 90 %로 매우 높고, 재발이나 발육 불량 등에 의한 생산성의 저하를 초래하기 때문에 경제적 손실이 큼.
- (6) *C. novyi*의 alpha 독소는 불특정한 숙주 혈관내피세포 수용기에 결합하고 그 결과 혈관내피세포의 손실과 부종, 심각한 저혈압, 조직 손상과 급사를 초래.
- (7) 돼지의 경우, 강력한 alpha 독소를 가지고 있는 *C. novyi*는 주로 모돈에 영향을 끼치며 여름철에 보고가 많이 됨. 특히 *C. novyi*는 아포를 형성하며 전염성 있으며 모돈의 급사

- 를 초래하기 때문에 돼지 사육농가의 경제적 손실이 막대함.
- (8) 이들 질병을 예방하기 위해서는 백신 개발이 절대적으로 필요한 상황임. 돼지 부종병 및 전염성 가스 괴저를 예방하기 위한 백신에는 이들 독소를 산생하는 **불활화 F18+ *E. coli*와 *C. novyi* 균체와 더불어 이들 질병 발현에 중요한 역할을 수행하는 STx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소가 반드시 혼합된 형태의 백신이 필요함.**
  - (9) 하지만 지금까지 Stx2e를 대량 발현할 수 있는 시스템을 구축하지 못 했으며 (다국적 기업인 IDT의 시스템은 아직 알려지지 않았음) *C. novyi*의 알파 독소 또한 대량 발현 시스템을 구축하지 못 했음. 더불어 최근 국내에서는 이유 후 자돈에서 부종병과 더불어 비슷한 시기에 LT나 STa, STb 등을 산생하는 F4+ 또는 F18+ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)에 의한 설사 또한 증가하고 있어, LT나 STa, STb 산생 F4+ ETEC, F18+ ETEC 그리고 F18+과 Stx2e+ *E. coli* 불활화 균체와 Stx2e와 LT와 같은 독소이드가 함유된 **혼합 백신이 절실히 필요함.**
  - (10) 최근 그 질병이 증가하고 있는 전염성 가스 괴저 또한 *C. novyi*의 알파 독소와 더불어 **균체가 함유된 혼합 백신이 절실히 필요함.**

#### 나. 기존 연구 대비 연구의 차별성

- (1) 국내 이유 후 자돈은 병원성 대장균에 의해서 부종병 뿐만 아니라 이유 후 설사도 빈번하게 발생하여 양돈가에 경제적으로 막대한 손실을 일으키고 있음. 따라서 본 연구 팀은 이유 후 자돈에서 설사나 부종병과 관련된 병원성 대장균 즉, LT나 STa, STb 산생 F4+ ETEC, F18+ ETEC와 부종병과 관련된 F18+, Stx2e+ *E. coli* 모두를 불활화 하여 이들 균체가 함유된 백신을 개발하고자 함.
- (2) 그동안 병원성 세균을 불활화 하는 방법은 주로 원인균을 배양 후 포르말린으로 불활화 하였음. 하지만 포르말린은 발암성 물질임과 동시에 백신으로 중요한 역할을 수행하는 세포 외막 단백질을 미세하게 변화시켜 자염 상태의 병원성 세균과 달라져 백신의 효능이 떨어지는 단점이 있음. 따라서 우리는 antimicrobial peptide (AMP)를 이용하여 이들 세균에 구멍을 만들어 세포질 성분이 빠져 나가 결국은 세포가 죽는 그래서 **면원성에 있어 중요한 역할을 수행하는 세포 외막의 변화가 없는 신개념 사균체 백신으로 제조하고자 함.**
- (3) 더불어 설사를 일으키는 ETEC와는 달리 부종병에 있어 Stx2e와 같은 독소는 중요한 역할을 수행하기 때문에 이 질병을 예방하기 위해서는 Stx2e 독소이드가 반드시 포함되어야 함. 따라서 우리는 **Stx2e를 발현 할 수 있는 시스템을 대량 발현 할 수 있는 시스템으로 개선하고 정제 시스템 또한 개선하여 대량 발현을 통한 백신 단가를 낮출 수 있는 연구**를 진행하고자 함.
- (4) 돼지에서 전염성 가스 괴저를 일으키는 *C. novyi*의 배양이 까다로워 대량 배양이 어렵기 때문에 **그동안 *C. novyi*의 배양에 관한 축적된 기술을 바탕으로 배양 배지의 성분을 변화 시도 및 연속 계대 배양 등을 통한 균주의 개선을 통한 대량 배양이 가능하도록 연구**를 진행하여 이 균 또한 AMP를 이용하여 신개념 사균체 백신으로 제조하고자 함.
- (5) 그동안 다른 연구 팀에서 시도해 보지 않은 *C. novyi*의 알파 독소를 대량 생산할 수 있는 시스템을 구축하여 *C. novyi* 신개념 사균체와 독소가 혼합된 백신을 제조하고자 함.

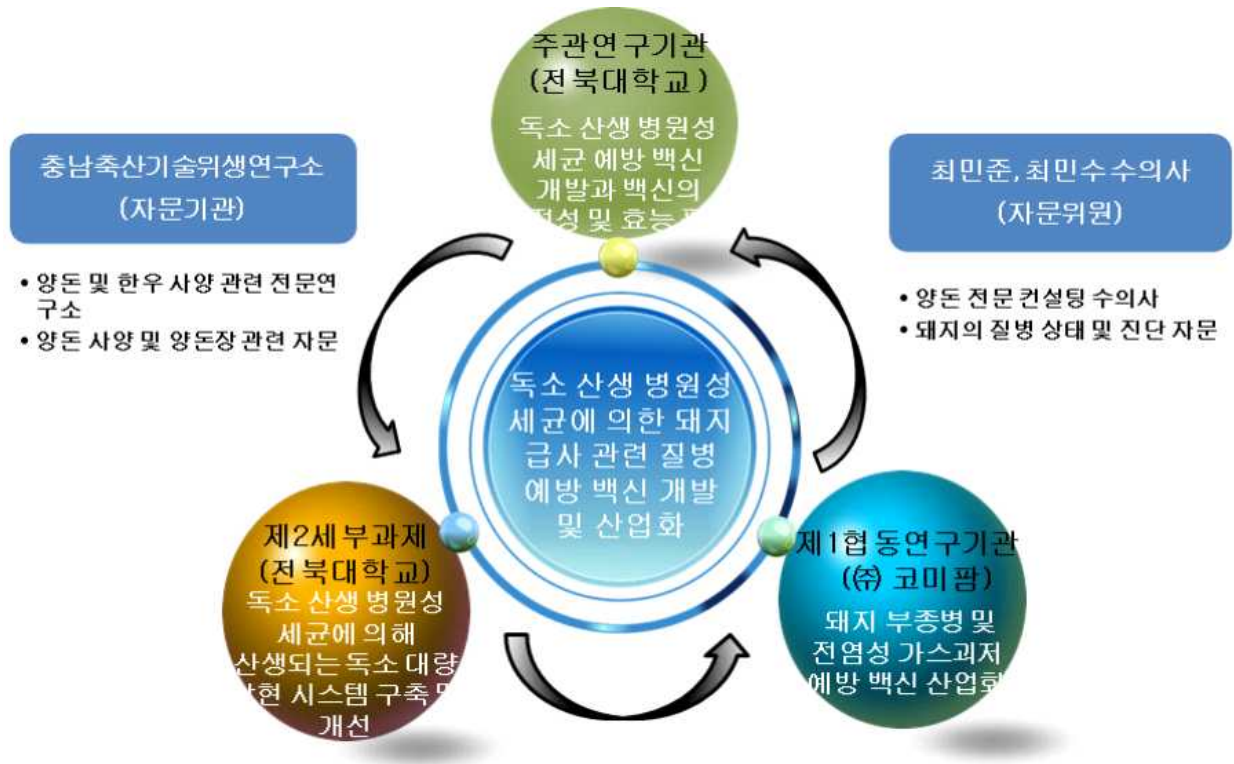


- (6) 그동안 예비 실험을 통해 확립한 대장균 및 부종병 등에 대한 확립된 질환 모델인 목적 동물인 이유 후 자돈 및 모돈을 대상으로 백신의 안전성 및 효능을 평가 하고자 함.

### 제3절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

#### 1. 연구개발 추진전략·방법

##### 가. 추진 전략 및 방법



## 2. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	독소 산생 병원성 세균에 의한 돼지 급사 관련 질병 예방 백신 개발	주관연구책임자 (허진)외 총 27명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업	1	10
대학	1	17
국공립(연)		
출연(연)		
기타		

전북대학교 산학협력단
독소 산생 병원성 세균에 의한 돼지 급사 예방 백신 개발
연구책임자명 (허진)외 17명
담당기술개발내용
1. Stx2e 및 <i>C. novyi</i> 발현 시스템 구축
2. 신개념 사균체와 재조합 독소이드 함유 부종병 및 전염성 가스 괴저 예방 백신 개발
3. 실험 및 목적동물에서의 백신의 안전성 및 효능 평가

(주)코미팜
돼지 부종병 및 전염성 가스괴저 예방 백신 산업화
연구책임자명 (장주현)외 10명
담당기술개발내용
1. Stx2e 및 <i>C. novyi</i> 대량 생산 및 불활화
2. 개발 백신 시제품 제작
3. 질병 만연 양돈장에서 백신의 안전성 및 효능 평가

제1세부과제
독소 산생 병원성 세균 예방 백신 개발 과 안전성 및 효능 평가
연구책임자명 (허진)외 11명
담당기술개발내용
1. AMP를 활용한 신개념 사균체 제작
2. 실험동물에서의 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가
3. 목적동물에서의 백신의 안전성 및 효능평가

제2세부과제
돼지 급사 관련 병원성 세균에 의해 산생되는 독소 대량 발현 시스템 구축
연구책임자명 (박정희)외 4명
담당기술개발내용
1. Stx2e 및 <i>C. novyi</i> 발현 시스템 구축
2. 대량 생산을 위한 발현 시스템 개선
3. 발현 독소 단백질의 구조 및 기능 확인

### 3. 연구개발 추진일정

1차년도															
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 유도에 적합한 AMP 선별				■	■								131,250	허진 (전북대학교 산학협력단)
2	국내 돼지로부터 분리된 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 백신 제작				■	■	■	■	■	■					
3	신개념 사균체만을 혼합한 백신 후보군 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가				■	■	■	■	■						
4	재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스에 접종하여 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가					■	■	■	■	■	■				
5	신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가										■	■	■		
6	발현 벡터 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선				■	■	■	■	■	■	■		56,250	박정희 (전북대학교 산학협력단)	
7	발현 host 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선				■	■	■	■	■	■					
8	발현된 Stx2e 독소 단백질의 Western blot을 통한 기능 확인							■	■	■	■	■			
9	발현된 독소 정제 과정 개선을 통한 간소화							■	■	■	■	■			
10	재조합 Stx2e 발현 개선된 방법에 따라 대량 생산 시스템 구축				■	■	■	■	■	■	■	■	112,500	장주현 (주)코미팜	
11	재조합 Stx2e 대량 생산 및 돼지를 이용한 재조합 Stx2e 독소 기				■	■	■	■	■	■	■	■			

	능 확인														
12	대량 생산된 Stx2e 독소 단백질 불활화 및 안전성 평가														

**2차년도**

일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 돼지를 대상으로 접종량 결정 시험														
2	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 접종 횟수 및 시기 결정 시험														
3	<i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선을 통한 대량 배양 기술 확립														
4	개선된 대량 배양 기술에 기반한 <i>C. novyi</i> 신개념 사균체화 유도 및 신개념 사균체의 안전성 확인														
5	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 백신의 돼지에서 효능 평가														
5	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴정 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가														
6	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산을 위한 발현 시스템 및 정제 시스템 개선														
7	발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소의 단백질 구조 확인														

8	발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 전염성 가스 괴저 돼지로 부터 획득한 혈청을 이용한 Western blot을 이용한 기능 확인																					
9	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소대량 생산을 위한 정제 방법 개선																					
10	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작																					
11	제작된 시제품 안정성 평가																				150,000	정호경 (주)코미팜
12	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산																					
13	대량 생산된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 불활화 및 안전성 평가																					

3차년도																						
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									
1	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 국내 또는 국제적으로 효능이 인정된 돼지 부종병 예방 백신 (IDT사의 ECOPORC SHIGA 등)과의 효능 비교 평가																				175,000	허진 (전북대학교 산학협력단)
2	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 독소이드와 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ stx2e <i>E. coli</i> 각각과의 혼합 백신과의 비교 평가																					
3	독소중화시험																					



## 제2장. 연구수행 내용 및 결과

### 제1절. 1차년도 연구 수행 내용 및 결과

#### 1. 주관연구기관

가. F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체 유도에 적합한 AMP 선별

(1) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 고스트 유도에 특화된 AMP 선별

(가) PMAP-36, GI24, PG1, 마스토과란, buforin II 등으로 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* (표 1 참조) 고스트화 유도하여 본 결과 PMAP-36과 GI24가 최적의 고스트화 유도 AMP임을 확인

표 1. AMP를 사용하여 고스트 불활화 백신 개발에 사용된 균주 목록

Strain	Description	Source
<i>E. coli</i>		
HJL593	Wild type F4ac (K88ac) <sup>+</sup> LT <sup>+</sup> Sta <sup>+</sup> ETEC isolate from pig	Lab stock
HJL565	Wild type F18 <sup>+</sup> Sta <sup>+</sup> ETEC isolate from pig	Lab stock
HJL909	F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> isolate from piglet	Lab stock

(2) 고스트화 유도 반응액의 배양을 통한 불활화 확인 실험

(가) 고스트화 반응을 LB agar 및 LB broth에 접종 후 5일간 배양하여 균이 배양되지 않았을 경우 불활화로 인정 및 백신으로 사용

(3) 고스트 유도화 사균체를 대상으로 투사 전자현미경 (TEM)을 이용한 고스트 사균체 확인

(가) 불활화가 확인된 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 고스트 균체를 TEM으로 확인하여 본 결과 세포질 성분이 빠져 나가고 세포 외형은 그대로 유지하고 있음을 확인 (그림 1 참조)



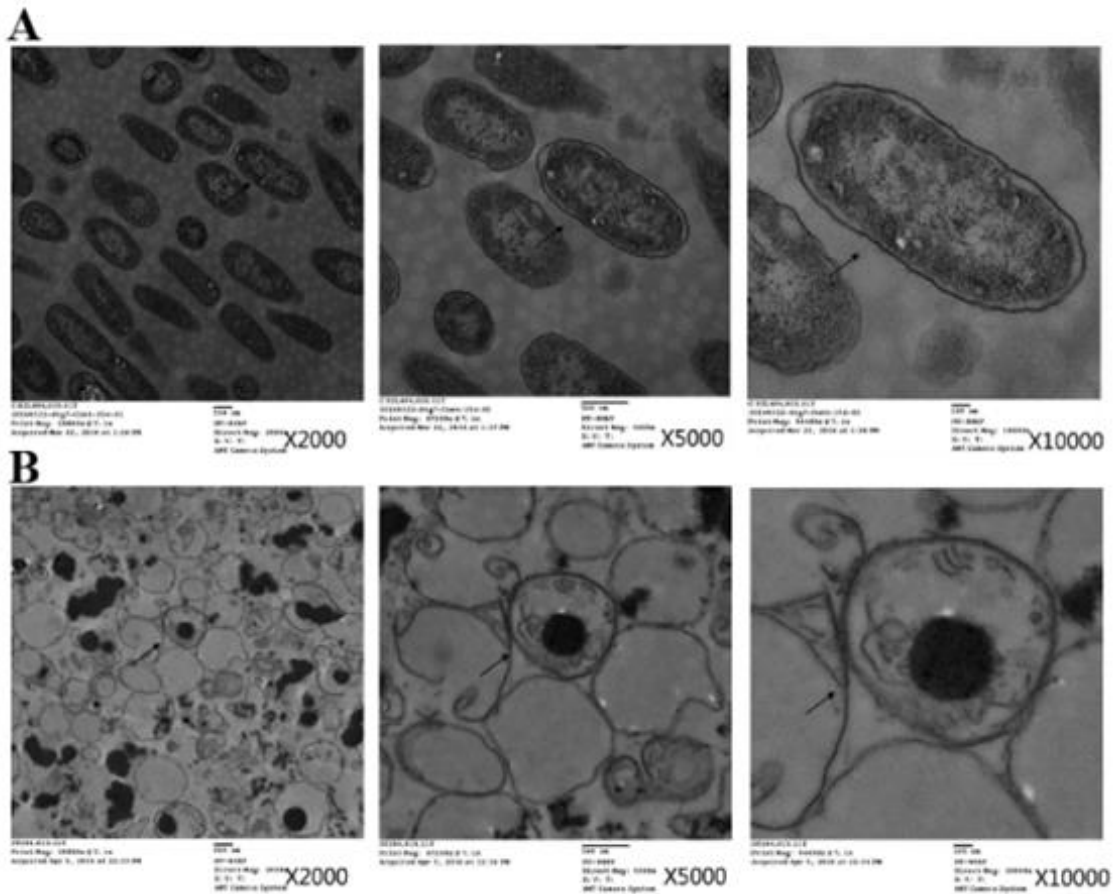


그림 1. GI24로 미처리균과 처리균에 대한 TEM 사진. (A) GI24 미처리 F18+ Sta+ ETEC, (B) GI24로 반응시킨 F18+ Sta+ ETEC

나. 국내 돼지로부터 분리된 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 제작

(1) GI24를 이용하여 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체 제조

(가) GI24를 이용하여 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 고스트화 유도하여 신개념 백신 사균체로 제작

(2) 각 lysed 된 균체 액체 배지에 접종, 배양하여 불활화 여부 확인

(가) Agar 배지 및 액체 배지에 각각 고스트 유도 사균체를 접종하여 5일간 배양하여 배양되지 않은 사균체를 백신으로 사용

(3) 불활화가 확인된 각 고스트 사균체를 같은 수가 되도록 혼합하여 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신으로 제작

(가) 불활화가 확인 되었을 경우 세 사균체가 각각 같은 균수가 되도록 혼합하여 고스트 사균체 혼합 백신으로 사용

다. 신개념 사균체만을 혼합한 백신 후보군 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역 반응 유도 여부 평가

(1) GI24를 이용하여 제작된 각 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체

혼합 백신을 마우스에 접종

(가) GI24를 이용하여 고스트 사균 혼합 백신으로 제조된 혼합백신을 6주령 마우스에 1차 그리고 8주령이 되었을 때 2차 접종한 후 2주간 마우스의 폐사, 운동실조, 식욕감퇴 등과 같은 부작용 발생이 없음.

(2) 정기적으로 가검물 채취 및 ELISA 수행

(가) 1차 접종 전, 2차 접종 전, 2차 접종 후 2주 후에 각각 채혈하여 혈청을 대상으로 재조합 F4ac 항원 및 FedA에 대한 항체 형성 유무를 확인하여 본 결과 백신 접종 군에서 비 백신 접종 그룹보다 높게 관찰. (그림 2 참조)

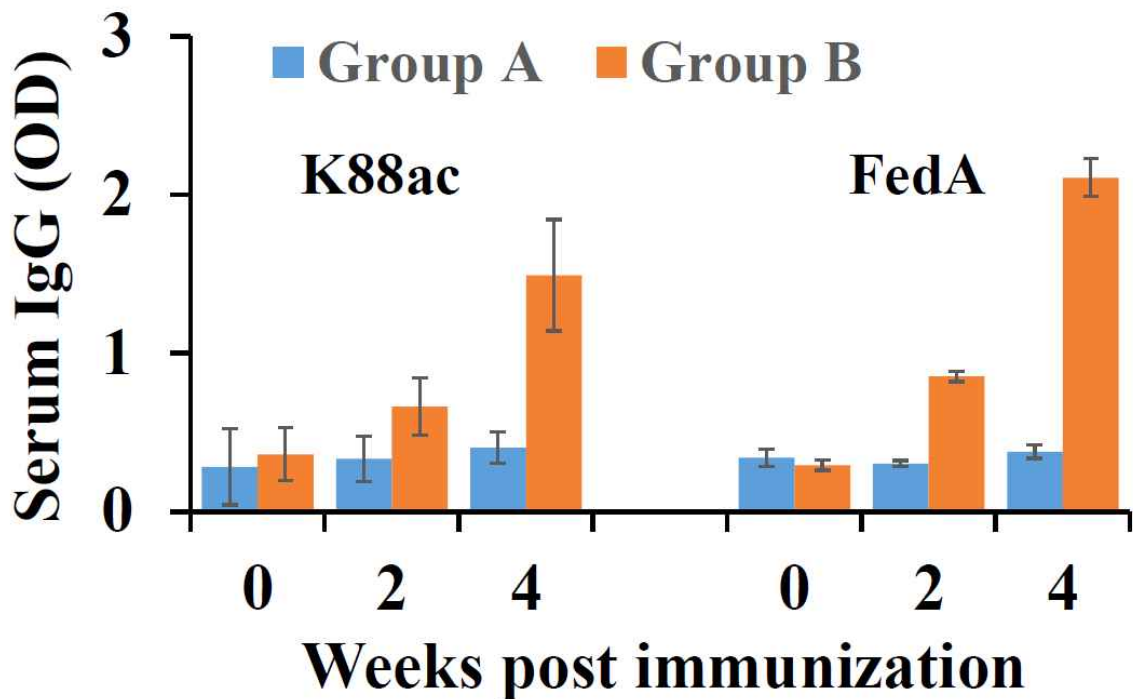


그림 2. 마우스에서 불활화 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ Stx2e+ *E. coli* 고스트 사균체 혼합 접종 후 각 그룹별 F4ac(K88ac), FedA에 대한 항체 역가

(3) 접종 전, 1차 접종 후 2주간 2차 접종 후 2주간 접종된 마우스 운동실조, 식욕감퇴, 폐사 여부 확인

(가) 1차 및 2차 접종 후 2주 간격으로 마우스 접종 후에 각각 운동실조 및 식욕 감퇴와 같은 부작용 여부를 확인하여 본 결과 아무런 임상 증상이 관찰되지 않아 백신의 안정성이 확인.

라. 재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스에 접종하여 백신의 안전성 및 면역 반응 유도 여부 평가

(1) 재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스 복강에 접종하여 안정성 확인

(가) 마우스 복강에 재조합 불활화 Stx2e를 복강에 접종하여 본 결과 부종병과 같은 질병이 발생하지 않아 안전성 확인

(2) 재조합 불활화 Stx2e 마우스에 2회 근육 접종

(가) 재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스가 6주령일 때 1회 8주령일 때 2회 접종하였으며, 1차 접종 후 2주간, 2차 접종 후 2주간 운동실조, 식욕부진과 같은 임상 증상 확인한 결과 아무런 임상 증상이 관찰되지 않음

(3) 정기적으로 채혈하여 ELISA로 유도된 항체 역가 측정

(가) 1차 접종 전, 2차 접종 전, 2차 접종 후 2주 째에 각각 채혈하여 ELISA를 이용하여 Stx2e에 대한 항체역가를 측정한 결과 대조군에 비해 높은 항체 역가가 관찰. (그림 3 참조)

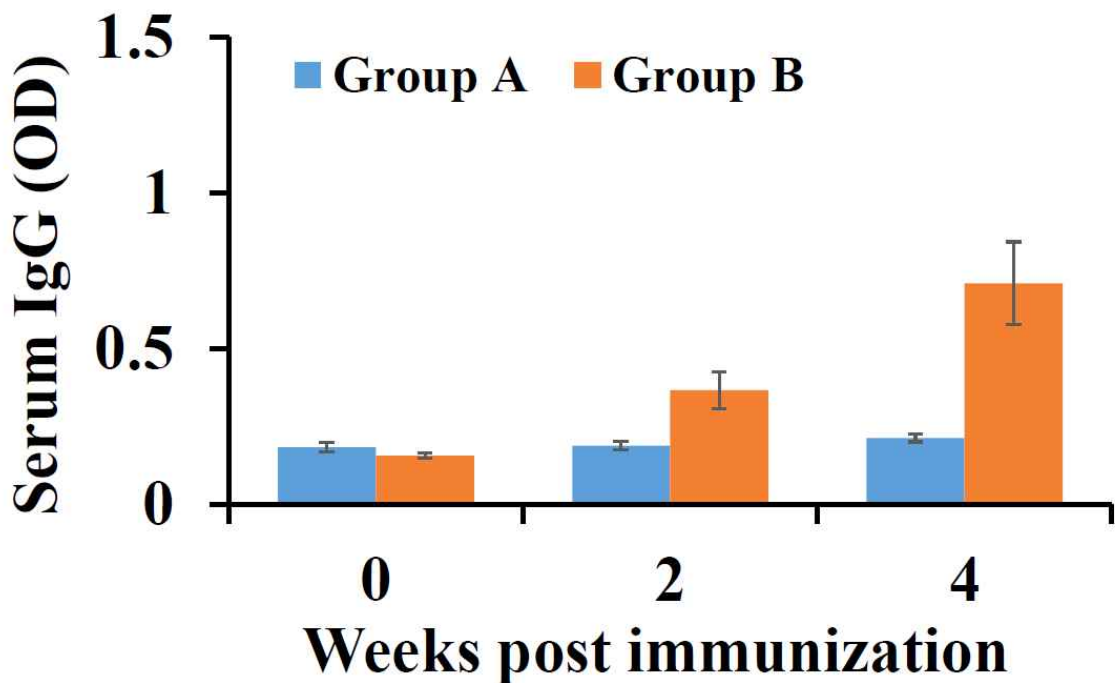


그림 3. 마우스에 불활화 재조합 Stx2e 독소이드를 접종 한 후 유도된 serum IgG 항체 역가

마. 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가

(1) GI24를 이용하여 제작된 각 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 불활화 Stx2eB 독소이드 혼합 백신을 마우스에 접종

(가) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 불활화 Stx2eB 독소이드 혼합 백신을 6주령 마우스에 1차, 8주령이 되었을 때 2차 접종

(2) 사균체와 독소이드 혼합 백신 접종 전 후 정기적으로 가검물 채취 및 ELISA 수행

(가) 사균체와 독소이드 혼합 접종 전, 2차 접종 전, 2차 접종 후 2주 째에 각각 채혈 및 K88ac, FedA (그림 4A 참조), Stx2e (그림 4B 참조)에 대한 항체 역가를 측정하여 본 결과 서로의 항원에 대한 간섭 없이 각 항원에 대해 음성 대조군에 비해 높은 항체 역가가 관찰 됨

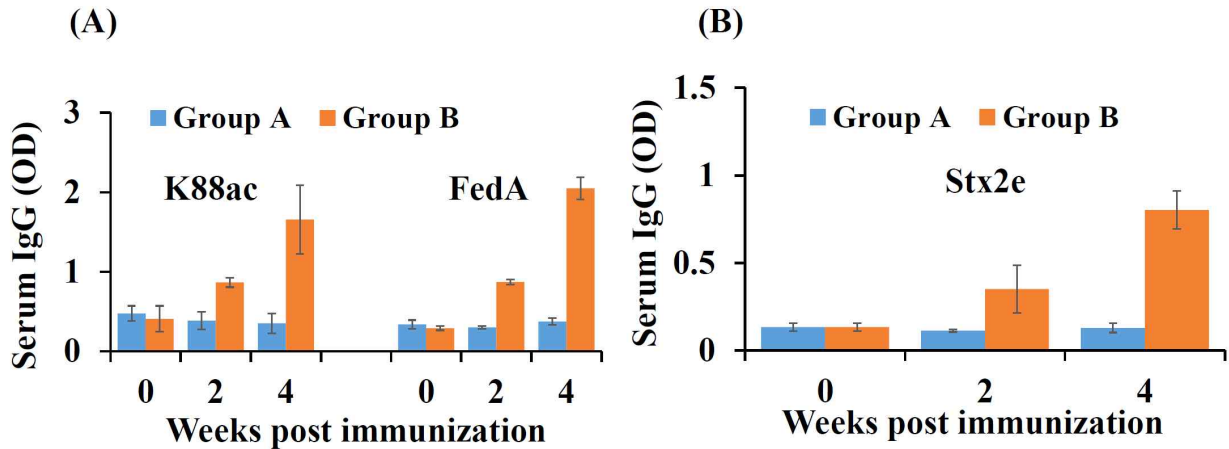


그림 4. 마우스에 불활화 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ Stx2e+ *E. coli* 고스트 사균체 및 불활화 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 접종 후 유도된 각 항원에 대한 항체 역가

(3) 사균체와 독소이드 혼합 백신 접종 전, 1차 접종 후 2주간 2차 접종 후 2주간 접종된 마우스 운동실조, 식욕감퇴, 폐사 여부 확인

(가) 사균체와 독소이드 혼합 백신 1차 접종 후 2주간 그리고 2차 접종 후 2주간 운동실조, 식욕감퇴 및 폐사 여부를 확인하여 본 결과 백신 접종에 따른 부작용이 관찰되지 않음

## 2. 세부연구기관

가. 발현 벡터 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선

(1) Stx2e의 A subunit (독성부분)과 B subunit (부착부위)의 유전자 확보 및 유전자 복제

(가) Stx2eAB<sub>5</sub>의 유전자 정보에 대한 삼차원적 구조 기반(Bioinformatic)을 이용 부종병 관련 Stx2e 독소 발생 A-subunit와 B-subunit 단백질들의 유전자를 확보하고 클로닝 벡터를 선정함 (그림 5-6 참조).

(나) Stx2e A full, Stx2e A fragment 와 Stx2e B의 유전자 복제를 위한 프라이머를 제작하여 PCR을 통해 증폭한 후 pTWIN vector 또는 pET30a vector에 도입함 (그림 7-8 참조).

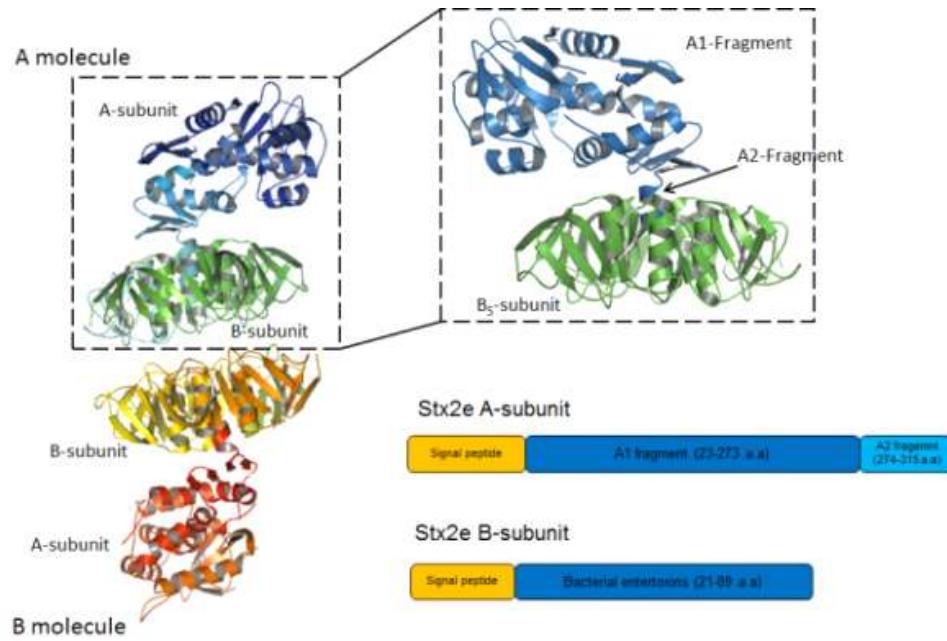


그림 5. Stx2eAB<sub>5</sub>의 아미노산 정보 및 각각의 기능성 영역 확인

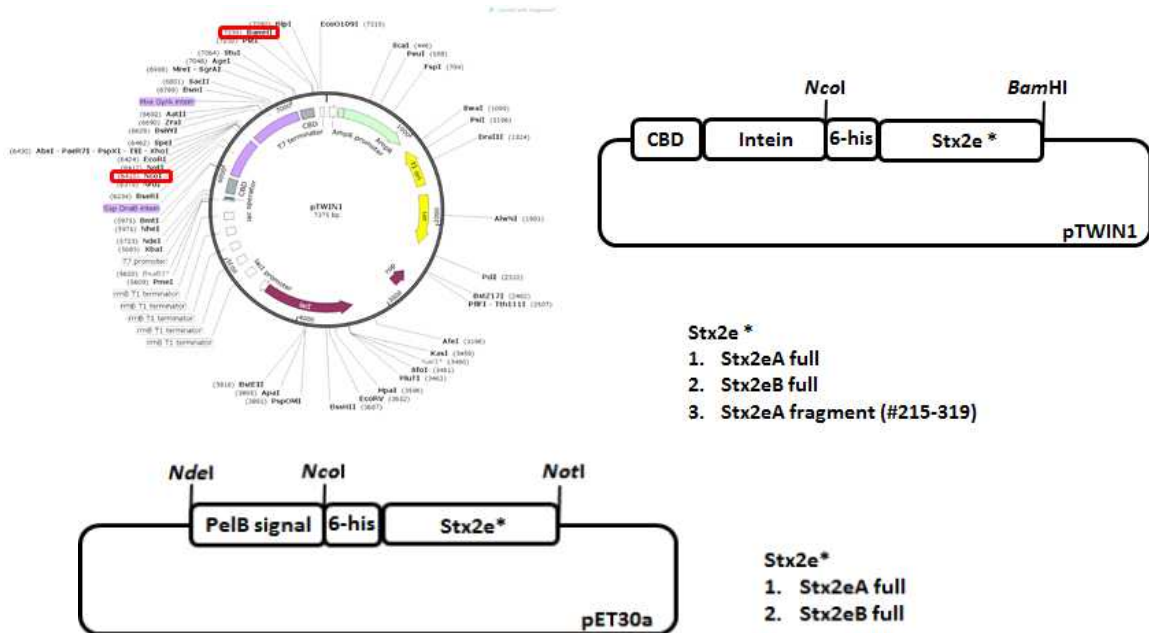


그림 6. Stx2eAB<sub>5</sub>의 유전자 정보 및 클로닝 벡터 선정 및 Construct

Primers

Stx2eA NcoI his F

GCACTC CCATGG CC CACCATCATCACCACCAT AAGTGTATATTGTAAAG

Stx2Afrag\_his\_NcoI\_F

GCACTC CCATGG GG CATCATCACCATCACCAT CCGGAAGACGTGGACCTCAC

Stx2eB NcoI his F

GCACTC CCATGG CC CACCATCATCACCACCAT AAGAAGATGTTTATAGC

stx2Afull\_BamHI\_R

GCACTC GGATCC TTA TCATTACCAGTTGTATATAAAG

Stx2eB\_BamHI\_R

GCACTC GGATCC TTA TCAGTTAAACTTCACCTGGGC

그림 7. Stx2eA와 Stx2eB의 유전자 복제를 위한 프라이머 정보

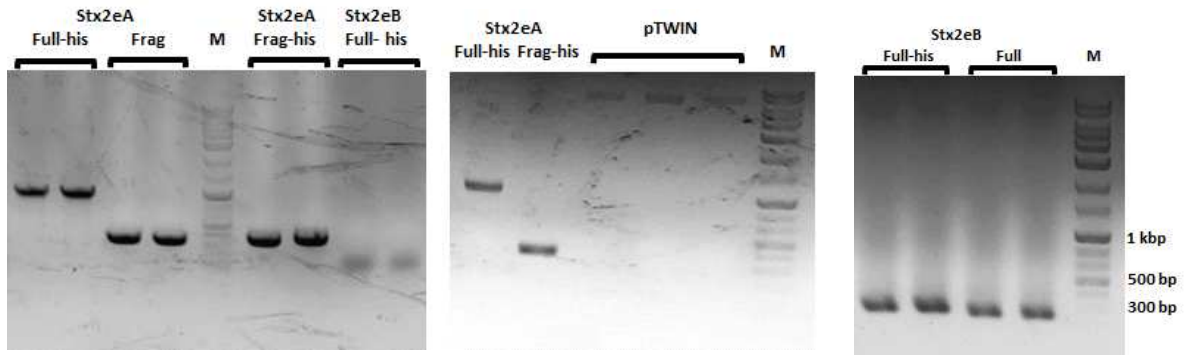


그림 8. Stx2eA와 Stx2eB의 유전자 증폭 및 pTWIN1 vector에 삽입

나. 발현 host 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선

- (1) Stx2e A full 유전자가 cloning 된 pTWIN1 벡터를 *E. coli* DH5a에 형질전환 후 sequencing을 통한 유전자 이상 유무 확인 및 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 및 F18+, Stx2e+ *E. coli* 야외 분리 주 (*E. coli* 150229)에 형질전환하여 발현 유무 확인
  - (가) Intein-Stx2e A full의 경우는 유전자 복제에 성공하였으나 *E. coli* BL21(DE3) pLysS를 이용한 발현 테스트에서 미발현 됨을 확인함.
  - (나) Stx2e A full 유전자가 cloning 된 벡터의 경우 F18+, Stx2e+ *E. coli* 야외 분리 주에서 발현을 확인한 결과 SDS-PAGE를 통한 발현 확인이 되지 않았지만 순수정제 후 독성이 증가하는 것을 통해 발현됨을 확인함 (그림 9, 10, 표2 참조).
  - (다) 독소 단백질의 대량 생산을 위해 다른 construct를 사용하기로 함.

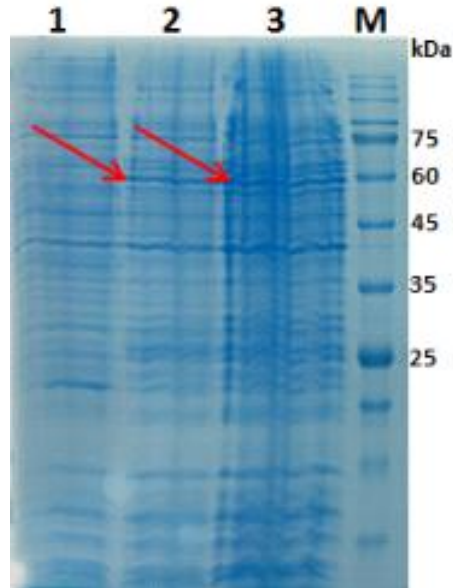


그림 9. 재조합된 Intein-STX2eA full-length 융합단백질의 발현양 조사를 위한 SDS-PAGE

- 1: BL21(DE3) plyss control induction at 18°C control
- 2: stx2eA full \_his expression in BL21(DE3) plyss 30°C
- 3: stx2eA full \_his expression in BL21(DE3) plyss 25°C

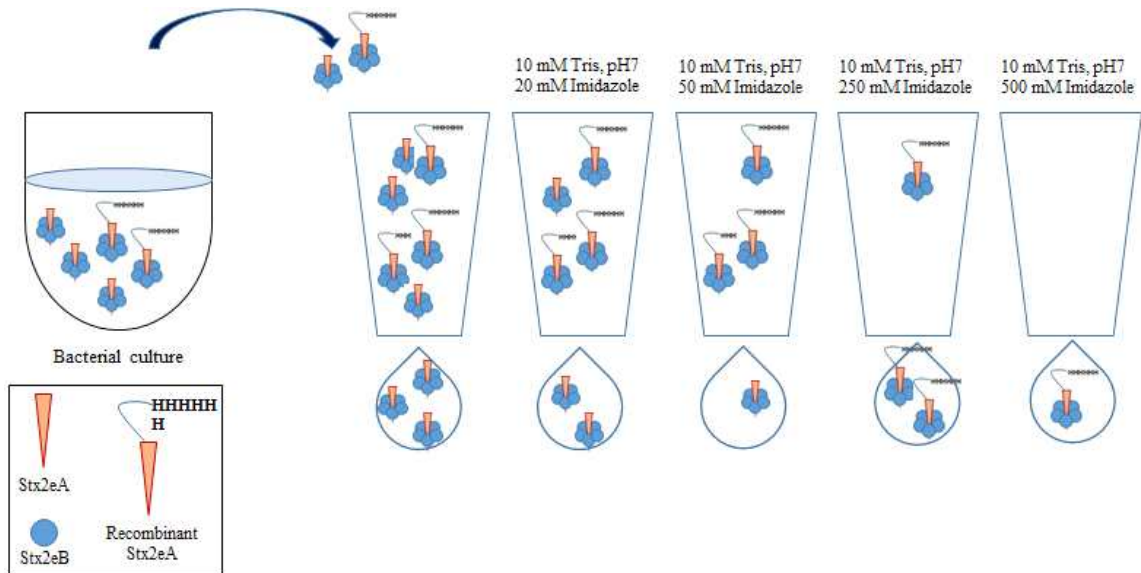


그림 10. 재조합 Stx2e A-subunit의 정제과정 모식도

표 2. 제조합 Stx2e 공동 배양후 부종병 대장균 150229주의 독소 발현량

Samples	Imidazole Conc. (mM)	10 fold dilutions					
		1	2	3	4	5	6
BL21		-	-	-	-	-	-
150229		+	+	+	+	-	-
BL21 + Stx2eA	flow	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
150229 + Stx2eA	flow	+	+	+	-	-	-
	20	+	+	+	-	-	-
	50	+	+	+	-	-	-
	250	+	+	+	+	-	-
	500	+	+	+	+	+	-
Elution buffer (Imidazole)	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
Control (vero-cell)		-	-	-	-	-	-

(2) Stx2e A fragment의 경우 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS에서 발현이 확인되었고, Stx2e B subunit의 경우 *E. coli* C43 (DE3)에서 발현됨을 확인.

(가) Intein-Stx2e A fragments의 경우는 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS를 이용한 발현 테스트에서 18℃의 저온에서 발현이 확인됨 (그림 11 참조).

(나) Intein-Stx2e B의 경우는 *E. coli* C43 (DE3)를 이용한 발현 테스트에서 30℃에서 발현을 유도하였을 때 soluble form으로 발현됨이 확인됨 (그림 12 참조).



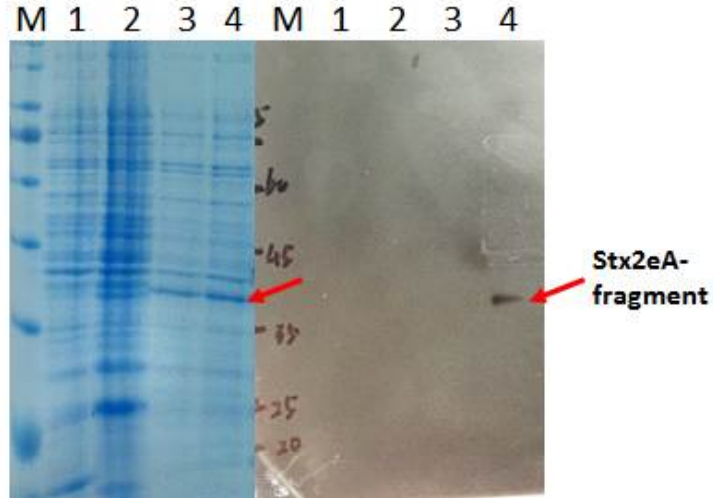


그림 11. 재조합된 Intein-STX2eA fragment 융합단백질의 발현양 조사를 위한 SDS-PAGE 및 western blotting  
 (1: BL21(DE3) plyss control induction at 18°C; 2: E. coli C43(DE3) control induction at 18°C; 3: stx2eA fragment\_his expression in BL21(DE3) plyss 25°C; 4: stx2eA fragment\_his expression in BL21(DE3) plyss 18°C)

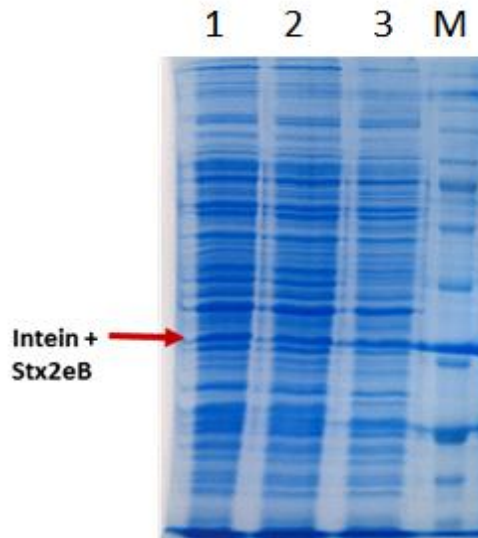


그림 12. 재조합된 Intein-STX2eB 융합단백질의 발현양 조사를 위한 SDS-PAGE  
 (1: Stx2eB supernatant in E. coli C43(DE3) at 30°C; 2: Stx2eB supernatant in E. coli BL21(DE3) pLysS at 30°C; 3: stx2eA supernatant in BL21(DE3) plyss 18°C)

다. 발현된 Stx2e 독소 단백질의 Western blot을 통한 기능 확인 및 정제과정 개선을 통한 간소화

- (1) Stx2e A fragment 및 Stx2e B 가 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 또는 *E. coli* C43 (DE3)에 strains을 적합한 antibiotics가 함유된 LB broth에 배양 및 발현 유도
  - (가) 재조합된 단백질은 성공적으로 발현될 경우 N-말단에 CBD-Intein 단백질이 결합된 융합 단백질이 만들어 짐 (그림 13 참조).
  - (나) 각각의 단백질의 발현을 유도하였을 때 Intein-Stx2eA full 단백질은 발현 되지 않음을

확인함.

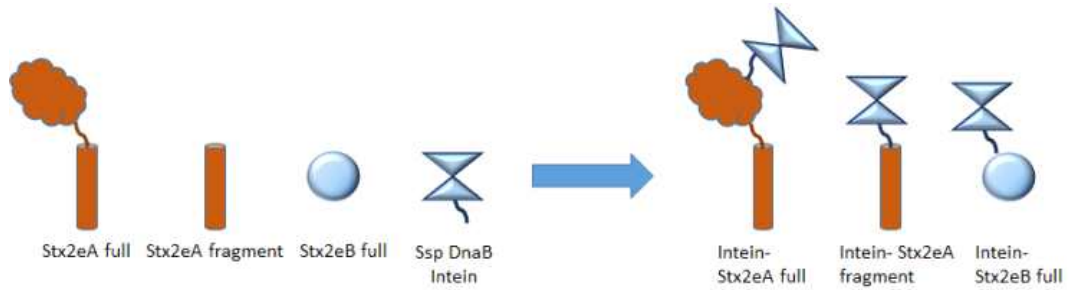


그림 13. 재조합된 Stx2eA와 Stx2eB의 디자인된 모형들

(2) 독소 단백질 발현 여부를 확인

- (가) Intein-Stx2e A fragment 단백질과 Intein-Stx2e B 단백질은 각각의 strain에서 성공적으로 발현되었음 (그림 11-12 참조).
- (나) Intein-Stx2e A fragment 단백질의 경우 Inclusion body를 형성하였으며, Intein-Stx2e B 단백질은 수용성으로 발현됨을 확인함.

(3) 정제된 고순도의 재조합 독소 단백질을 얻어내기 위해 친화성 또는 이온교환 수지 컬럼을 사용하여 분리 정제 및 최적공정 결정

- (가) Intein-Stx2e A fragment 단백질의 정제조건 확립을 위해 소량의 세포를 Urea에 녹여 정제를 시도하였으며, on column refolding 과정을 통해 성공적으로 정제됨을 확인함 (그림 14 참조).
- (나) Intein-Stx2e A fragment 단백질의 대량 정제를 위해 on column refolding 후 FPLC를 이용한 친화 크로마토그래피 정제 방법을 확립하였고, 성공적으로 단백질이 정제됨을 확인함 (그림 15 참조).
- (다) 친화 크로마토그래피를 이용한 Intein-Stx2e B 단백질의 정제 조건을 확립하였고, 정제과정 개선을 통한 간소화에 성공함 (그림 16 참조).

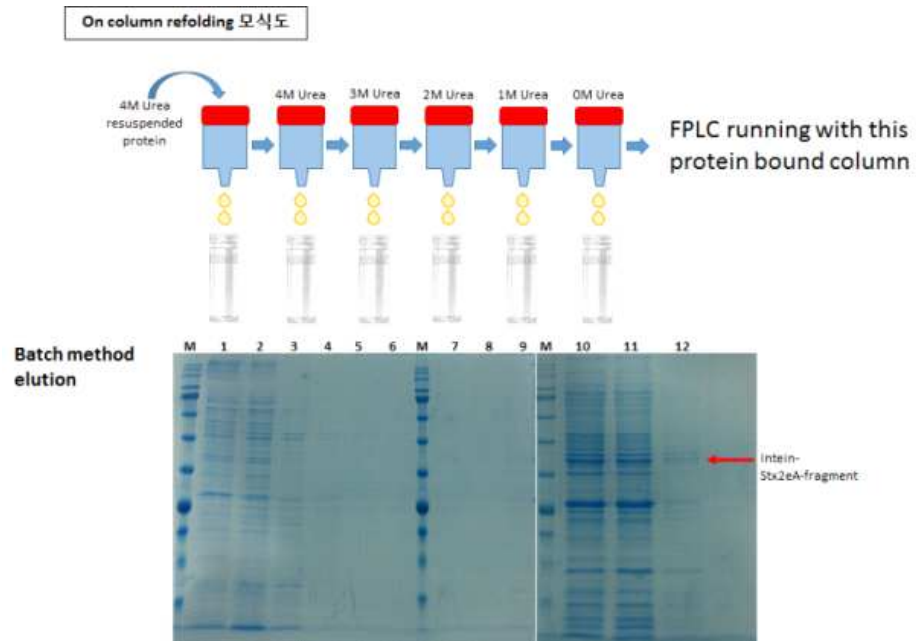


그림 14. 소량의 제조된 Intein-STX2eA fragment 융합 단백질의 정제 및 SDS-PAGE

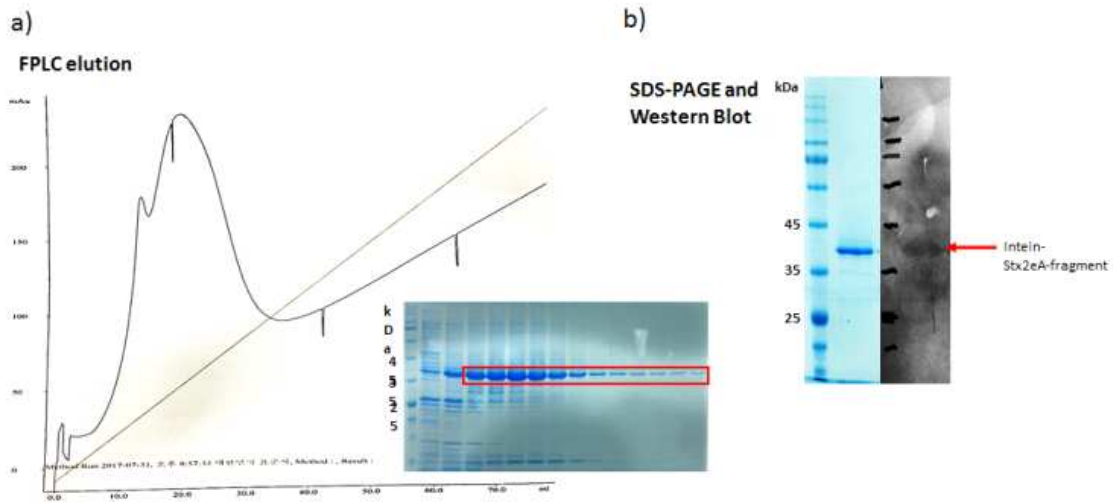


그림 15.. 대량 제조된 Intein-STX2eA fragment 융합 단백질의 정제 및 SDS-PAGE와 Western blotting 결과

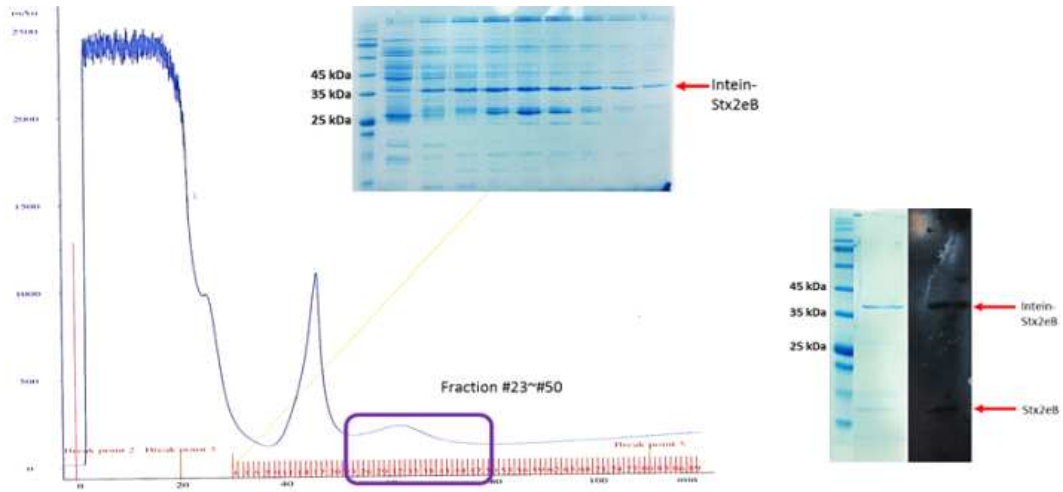


그림 16. 대량 재조합된 Intein-STX2eB full-length 융합 단백질의 정제 및 SDS-PAGE와 Western blotting 결과

라. 정제된 재조합 Intein-Stx2eA (fragment)와 Stx2eB (full-length)의 생리학적 assembly 분석  
 (1) 정제된 Intein-Stx2e A fragment와 Intein-Stx2e B 단백질이 Heterohexamer를 형성하는지 확인

(가) 순수 정제된 Intein-Stx2e A fragment와 Intein-Stx2e B 단백질을 혼합하여 complex를 형성하는지 확인한 결과 외부적으로는 결합하지 않는 것을 확인함 (그림 17 참조).

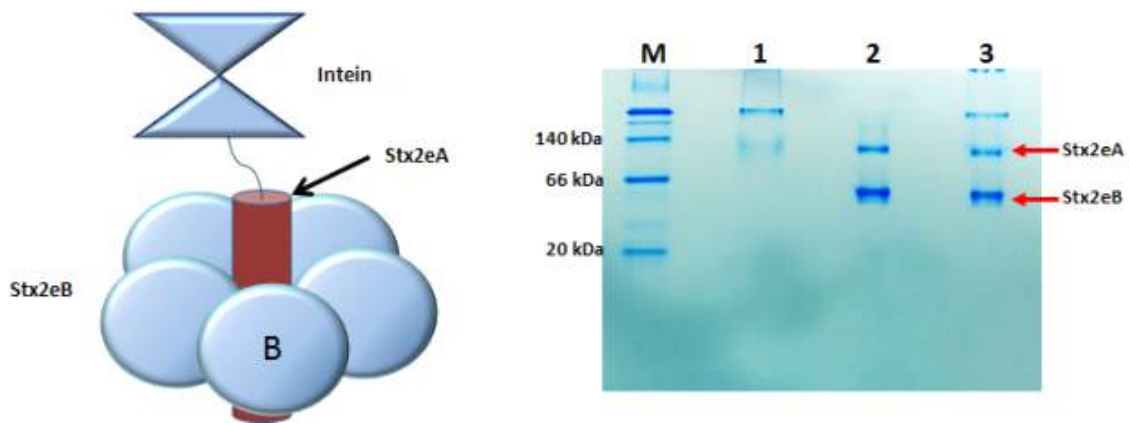


그림 17. Stx2eAB<sub>5</sub>의 Heterohexamer 형성 예측 모식도와 native-gel PAGE

마. 대장균 시스템에서 대상 질병의 toxoid에 의한 부작용 방지를 위한 연구

(1) 대장균 시스템에서 대상 질병의 toxoid에 의한 부작용을 일으키는 여지를 비교 분석하고 재조합 단백질의 독소 발생 여부를 확인함.

(가) Stx 2e A full subunit이 *E. coli* 야의 분리 주에 내재된 B-subunit와 heterohexamer를 형성하여 독성을 증가시킴을 확인함 (표 2 참조)

(나) 재조합 Stx 2e A fragment를 이용한 독성 분석에서는 세포 독성을 나타내지 않음이 확인됨 (표 3 참조).

표 3. Cytotoxic levels of recombinant Stx2e A-fragment and Stx2e B in Vero cell

Samples	Imidazole Conc. (mM)	10 fold dilutions					
		1	2	3	4	5	6
BL21		- <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-
150229		+ <sup>b)</sup>	+	+	+	-	-
BL21 + Stx2e A-fragment (pStx2eA-fusion)	flow	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
BL21 + Stx2e B (pStx2eB)	flow	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
Elution buffer	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
Control		-	-	-	-	-	-

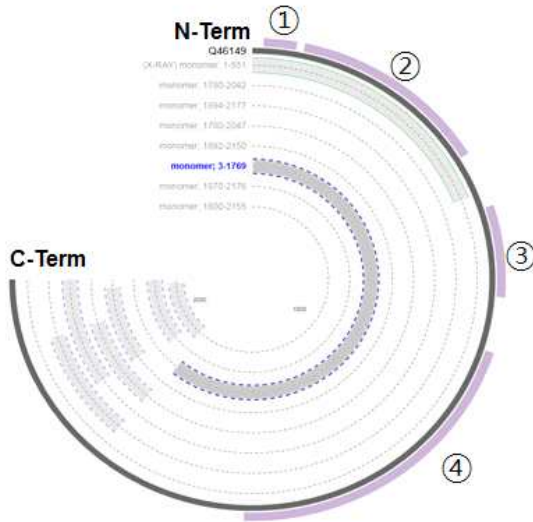
<sup>a)</sup> None cytotoxicity; <sup>b)</sup> Cytotoxicity

바. 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 생산을 위한 발현 시스템 구축

- (1) *C. novyi* 독소 단백질의 아미노산 서열 정보를 통해 기존에 보고된 3차원적 구조 정보 파악하여 현재까지 그 독소 단백질의 구성 요소로 4가지 domain들이 존재 할 것이라 확인함 (1. N-terminal helical domain; 2. catalytic glycosyltransferase domain; 3. cysteine protease (CPD) domain 그리고 4. pore forming domain) (그림 18-19 참조)
- (2) *C. novyi* 독소 단백질의 기능성을 지닌 상태에서 대량 발현을 위해 서로 다른 두 개의 표적유전자 영역을 선정하여 codon optimization하여 화학합성함. (Construct #1: a.a: 98-761 (Catalytic domain and Protease domain); Construct #2: a.a: 1778-2178 (Putative attached domain))
- (3) 확보된 *C. novyi*의 알파 독소 유전자를 상용화된 발현 벡터인 pET30a 등에 cloning  
(가) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 생산을 위한 발현 시스템 구축 완료 (그림 18-20 참조)

# Alpha-toxin from *Clostridium novyi*

Uniprot: >tr|Q46149|Q46149\_CLONO Alpha-toxin OS=Clostridium novyi (2178 a.a)



- ① TcdA/TcdB toxin, N-terminal helical domain (a.a: 22- 83)
- ② TcdA/TcdB toxin, catalytic glycosyltransferase domain (a.a: 98- 472)
- ③ CGT/MARTX, cysteine protease (CPD) domain (a.a: 582- 760)
- ④ TcdA/TcdB toxin, pore forming domain (a.a: 870- 1468)

Taken from: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q46149>

그림 18. *Clostridium novyi* 독소 단백질 아미노산 서열 및 구성요소 분석. *Clostridium novyi* 독소 단백질의 아미노산 서열 정보를 통해 기존에 보고된 3차원적 구조 정보 파악

## Alpha-toxin from *Clostridium novyi* 의 예측 구성 모식도

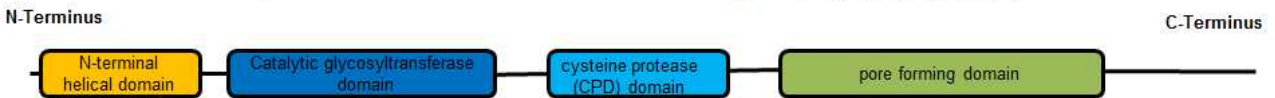
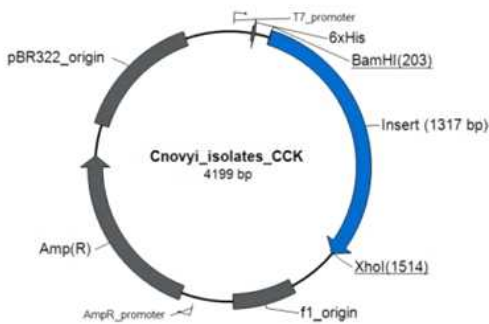


그림 19. *Clostridium novyi* 독소 단백질 예측 구성도.

A)



B)

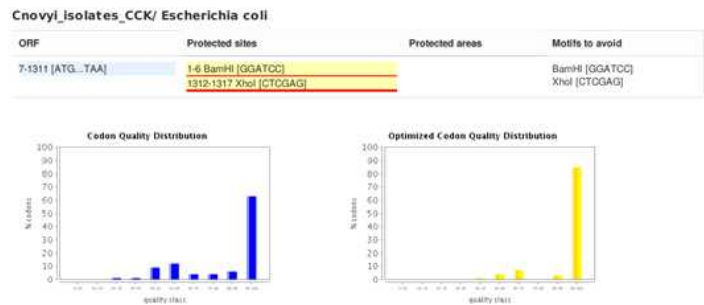


그림 20. *Clostridium novyi* 유전자 복제 벡터와 Construct 최적화

### 3. 협동연구기관

가. 재조합 Stx2e 발현 개선된 방법에 따라 대량 생산 시스템 구축

(1) 제 2 세부과제 연구기관으로부터 Stx2e 생산 공정 도입

(가) 박정희 교수님 연구팀으로부터 재조합 Stx2e 및 Stx2eB 발현 균주 획득

(2) Stx2e 및 Stx2eB 발현 대량 생산 공정과정 설계

(가) 재조합 Stx2e 및 Stx2eB 단백질을 대량 생산하여 간단한 과정을 통한 정제를 위해 제2 세부과제 연구팀과 협의 및 공정과정 설계 중

(3) Stx2e 대량 액체 배양을 통한 대량 생산 및 공정 시스템 구축

- (가) 재조합 Stx2e 및 Stx2eB 단백질을 대량 생산하여 간단한 과정을 통한 정제를 위해 주관연구기관인 전북대학교와 유기적인 협력을 통한 대량 생산 및 정제 공정 시스템 구축을 위해 전북대학교 특성화 캠퍼스에 연구소 브런치 개설 (그림 21 참조) 및 인원 충원



그림 21. ㈜ 코미팜 전북대학교 특성화캠퍼스 수의과대학 내 부설연구소 개원 (케이 이노베이션)

나. 재조합 Stx2e 대량 생산 및 돼지를 이용한 재조합 Stx2e 독소 기능 확인

- (1) 구축된 대량 생산 시스템을 통한 Stx2e 대량 액체 배양을 통한 대량 생산 및 정제  
 (가) ㈜코미팜의 대량 생산 공정을 통해 Stx2e를 대량 생산하여 비활화 또는 불활화 후 소분하여 냉동 건조시켜 주관연구기관인 전북대학교에 공급하여 실험 수행 중
- (2) 대량 생산된 재조합 Stx2e 단백질을 조직 세포를 이용하여 독소 기능 확인  
 (가) 대량 생산된 재조합 Stx2e를 조직 세포에 접종하여 자연 상태에서 획득한 Stx2e 접종 후 조직 변화와 재조합 Stx2e 단백질을 접종 후 조직 상태 변화를 관찰하여 본 결과 재조합 Stx2e를 접종한 조직에서 약 10배 정도의 희석배율에서도 조직에 변화가 되었음이 관찰되어 재조합 Stx2e의 독성 성분이 제대로 발현되었음이 확인 됨 (표 3, 그림 22 참조)

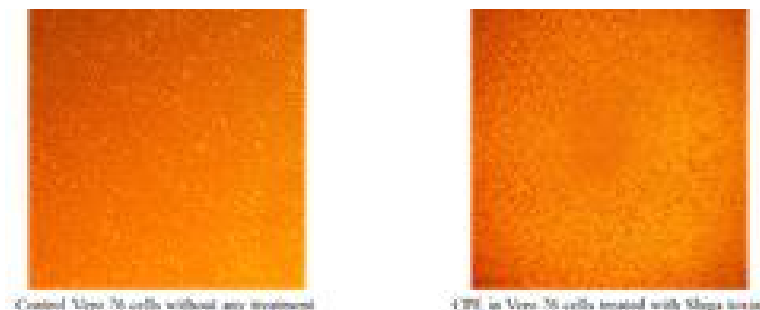


그림 22. Stx2e에 의한 세포 변성. (A) Control Vero-cell. (B) Stx2e에 의한 세포 변성

(3) 정제된 Stx2e 독소를 돼지에 접종하여 돼지에서 부종병 발생 유무 확인

(가) 대량 생산되어 정제된 재조합 Stx2e 단백질을 8주령 돼지에 근육 접종하여 부종병 발생 유무를 확인하여 본 결과 부종병의 특이적인 증상이 관찰 됨 (그림 23참조)



그림 23. 대량 생산된 재조합 Stx2e 단백질 질병 발생 유무 확인 시험 결과

다. 대량 생산된 Stx2e 독소 단백질 불활화 및 안전성 평가

(1) 대량 생산된 Stx2e 포르말린 등을 이용하여 불활화

(가) 독성성분이 확인된 대량 생산된 재조합 Stx2e를 포르말린 등으로 불활화

(2) 조직 및 실험 동물 및 목적 동물을 이용한 안정성 시험

(가) 불활화 후 조직세포에 접종하여 조직 변화가 발생하지 않았고, 6주령 마우스 복강에 접종하여 마우스 폐사가 관찰되지 않아 불활화가 확인됨



## 제2절. 2차년도 연구 수행 내용 및 결과

### 1. 주관연구기관

가. F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 돼지를 대상으로 접종량 결정 시험

(1) 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원을 이용한 돼지 부종병 진단을 위한 ELISA 진단법 개발

(가) 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원을 이용한 돼지 부종병 진단을 위한 ELISA 진단법을 확립하기 위해 SPF 돼지를 구입(그림 24 참조) 하여 표준 음성 혈청 확보



그림 24. SPF 자돈 백신 근육 접종

(나) 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원을 4주령, 6주령 때 각각 50ug을 alum과 혼합 하여 근육 접종하여 표준 양성 혈청으로 확보

(다) 확보된 표준 음성 및 양성 혈청으로 부종병 ELISA 진단법 확립 (그림 25 참조)

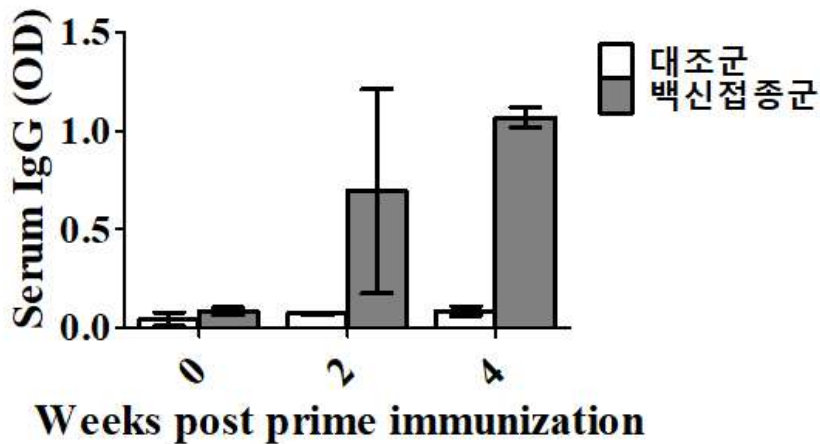


그림 25. SPF 자돈을 이용한 돼지 부종병 ELISA 진단 방법 확립

대조군 : 멸균 PBS 2ml, 그룹 C : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

(2) 부종병 음성인 자돈을 대상으로 5일령, 4주령일 때 각각 F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+

- E. coli* 신개념 사균체를 동량으로 하고 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 25ug, 50ug, 100ug씩 다르게 접종
- (3) 각각 다양한 재조합 독소이드 농도로 접종 후 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 4주, 도전감염 후 2주 째에 각각 채혈하여 항체 유도 여부 조사
- (가) 25ug을 접종한 그룹에서는 대조군과 유사한 항체 유도 여부를 확인하였고, 50ug 및 100ug을 접종한 그룹에서는 대조군에 비해 월등한 항체 여가가 유도됨을 확인할 수 있었다 (그림 26 참조).

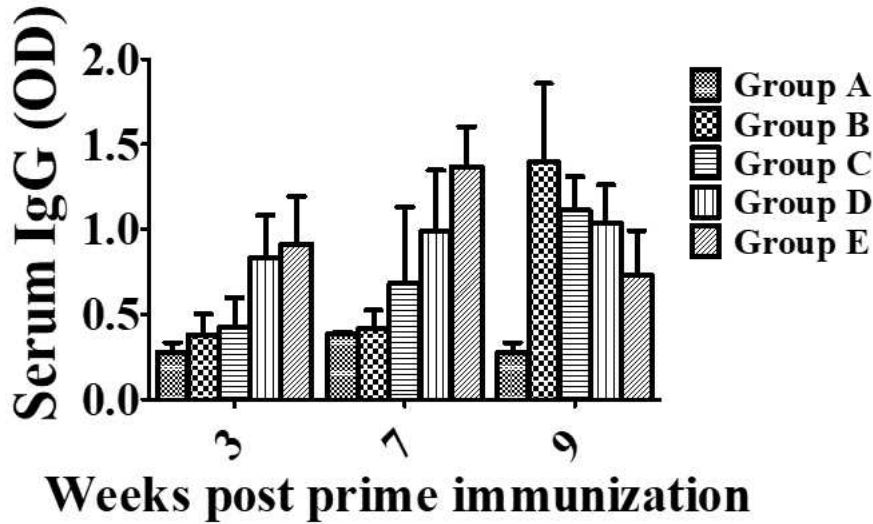


그림 26. 백신 접종 및 도전감염 후 혈청 항체 역가 (ELISA OD 값)

- 그룹 A : 멸균 PBS 2ml, 그룹 B : 멸균 PBS 2ml, 그룹 C : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 25ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종
- 그룹 D : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종
- 그룹 E : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 100ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

- (4) 면역 반응 측정 및 야외 독성 균주로 도전감염 후 폐사 여부로 방어 효과 평가
- (가) 50ug을 접종한 그룹에서는 6마리 중 2두 폐사하였고, 100ug을 접종한 그룹에서는 폐사가 관찰되지 않았다 (표 4 참조). 하지만 PBS를 접종한 대조군에서는 4마리 중 3두가 폐사하였고 25ug을 접종한 그룹에서도 5마리 중 4두가 폐사하였다.

표 4 동량의 신개념 사균체와 다양한 농도의 재조합 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 근육 접종 후 도전감염에 대한 임상 증상 결과

그룹	자돈수	폐사 자돈 수(%)
A	5	0
B	4	3 (75)
C	5	4 (80)
D	6	2 (33.3)
E	5	0

그룹 A : 멸균 PBS 2ml , 그룹 B : 멸균 PBS 2ml ,

그룹 C : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 25ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

그룹 D : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

그룹 E : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 100ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

나. F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 접종 횟수 및 시기 결정 시험

(1) 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원 음성 자돈 5일령, 및 4주령 자돈 구입

(2) 5일령과 4주령에 자돈에 F4<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> *E. coli*, F18<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> *E. coli* 신개념 사균체

$2 \times 10^9$  cells +Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 50ug을 각각 접종 (2회 접종 군)

(3) 4주령에만 F4<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> *E. coli*, F18<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells + Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 50ug을 1회 접종 (1회 접종군)

(가) 5일령 및 4주령 때에 각각 근육접종 한 그룹은 대조군에 비해 1차 접종 2주 후부터 항체 역가가 증가하기 시작하여 2차 접종 2주 후에는 대조군에 비해 월등한 항체 역가가 유도되었다. 하지만 4주령에만 접종한 그룹에서는 대조군에 비해 항체 역가가 유도되긴 하지만 2회 접종한 그룹에 비해서는 항체 역가가 낮게 유도되었다 (그림 27 참조).

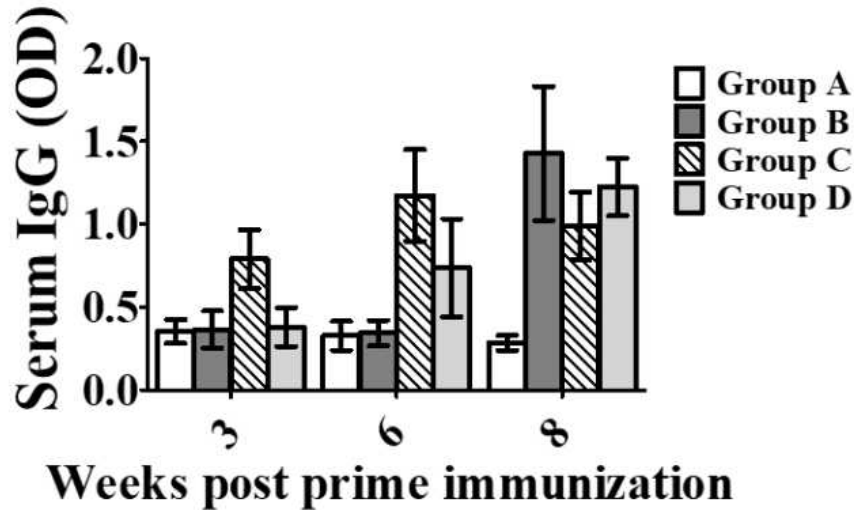


그림 27. 다양한 접종 횟수와 일령에 개발 백신을 접종 후 유도되는 항체 역가 (ELISA OD 값)

그룹 A : 멸균 PBS 2ml , 그룹 B : 멸균 PBS 2ml

그룹 C : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

그룹 D : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

- (4) 2주 후 야의 독성 F4<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> *E. coli*, F18<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> *E. coli* 균주가 각각  $2 \times 10^9$  CFU in 5ml 씩 함유 되도록 하여 총 5ml 경구 접종
- (가) 대조군은 야의 독성 균주로 도전감염 후 5마리 중에서 4두가 폐사하였고, 1회만 접종한 그룹에서는 5마리 중 3마리가 폐사 하였으며, 2회 접종한 그룹에서는 5마리 중 1마리만 임상 증상이 관찰되어 5일령일 때 1차 4주령일 때 2차 접종하였을 경우 우수한 효능 확인 됨 (표 5 참조, 그림 28 참조).

표 5. 다양한 접종 횟수와 일령에 개발 백신을 접종 후 야의 독성 균주로 도전감염 후 임상 증상 발현

그룹	자돈수	폐사 자돈 수(%)
A	5	0
B	5	4 (80.0)
C	5	1 (20.0)
D	5	3 (60.0)

그룹 A : 멸균 PBS 2ml , 그룹 B : 멸균 PBS 2ml

그룹 C : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종 - 2회접종군

그룹 D : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종 - 1회접종군

A 그룹	B 그룹
 <p data-bbox="363 768 619 801">코와 눈 부종 없음</p>	 <p data-bbox="756 768 1214 801">코 부종이 심하고 눈 부종이 있음</p>
C 그룹	D 그룹
 <p data-bbox="363 1377 619 1411">코와 눈 부종 없음</p>	 <p data-bbox="836 1377 1129 1411">눈, 코에 부종이 있음</p>

그림 28. 야외독성균주로 도전감염 후 임상 증상

다. *Clostridium novyi* 배양 기술 개선을 통한 대량 배양 기술 확립

- (1) *C. novyi* 배양 배지의 다양성을 통한 배양을 검증
- (2) Reinforced clostridial medium (RCM), Differential reinforced clostridial medium (dRCM) 사용
  - (가) 국내 야외분리 *C. novyi*를 RCM 및 dRCM 배지 배양함
  - (나) 37°C 조건에서 3~5일간 정치 배양 한 결과 RCM 과 dRCM 배지에서 3일, 4일, 5일 모두 비슷한 균수 (약  $10^{6-7}$  cfu/ml)를 확인함
- (3) RCM 배지의 성분 변화 및 배양 온도 변화에 따른 배양능 검증
  - (가) *C. novyi*는 agar plate에서 colony 모양이 명확하지 않고 smear 현상이 나타남
  - (나) serial dilution을 통해 *Clostridium novyi* colony가 나타나는 dilution factor로 균수를 간헐적으로 검증함

(다) 배양 온도는 30 ~ 40°C의 조건으로 배양한 결과 35~ 37°C에서 가장 높은 균수를 확인함

(4) Small scale up 배양 적용

(가) RCM 배지를 기본으로 37°C, 3일간 배양 조건으로 현재 scale up을 진행 중에 있음

라. 개선된 대량 배양 기술에 기반한 *C. novyi* 신개념 사균체화 유도 및 신개념 사균체의 안전성 확인

(1) 재조합 GI24를 활용하여 *C. novyi*를 신개념 사균체화 유도

(가) GI24로 신개념 *C. novyi*사균체를 유도 함 (그림 29 참조). 즉, *C. novyi*에 GI24를 처리하지 않은 균주는 세포막과 세포질이 원형대로 유지되는 것이 확인되었으며, GI24를 처리한 균주는 세포벽에 하나의 구멍이 생겨 세포질 성분이 빠져 나간 것을 확인 할 수 있음.

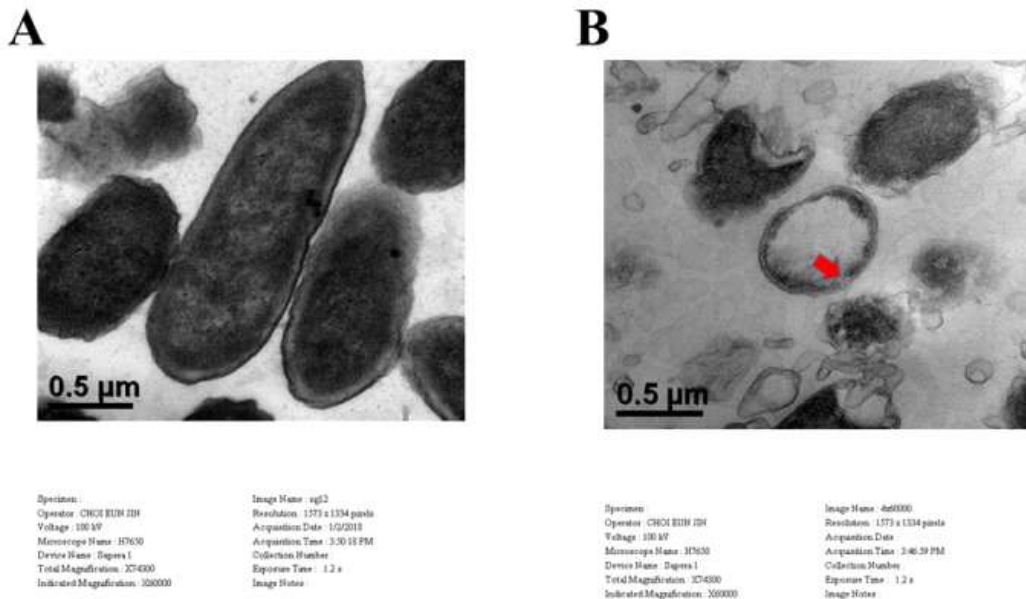


그림 29. GI24를 이용한 *C. novyi* 신개념 사균체의 전자현미경 사진.

A; GI24를 처리하지 않은 *C. novyi*

B; GI24를 처리하여 *C. novyi*의 세포벽에 작은 구멍이 생겨 (화살표) 세포질 성분이 빠져 나간 상태를 보여 주고 있음.

(2) 신개념 *C. novyi* 사균체를 돼지에 접종하여 발열, 설사 및 폐사 등의 여부를 확인하여 안전성 평가

마. 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 백신의 돼지에서 효능 평가

(1) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 항원에 음성인 자돈 구입

(2) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드를 4주령 및 6주령 돼지에 100ug로 2회 근육 접종

(가) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 100ug/ml를 동량의 alum과 혼합하여 4주령, 6주령 때에 각각 근육 접종한 후 유도되는 항체는 대조군에 비해 백신 접종 군이 접종 4주째에 유의있게 증가함을 확인할 수 있음 (그림 30 참조).

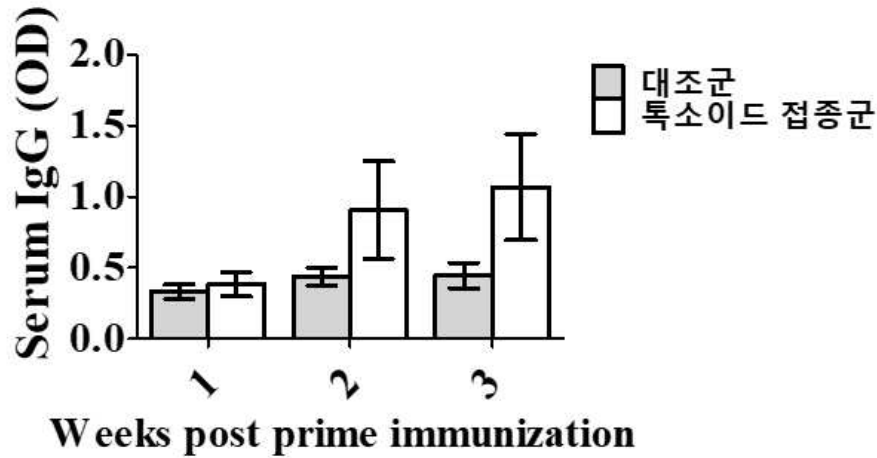


그림 30. 포르말린-불활화 재조합 *C. novyi* 알파독신 근육 접종 후 유도되는 항체 역가

대조군 : 멸균 PBS 2ml , 그룹 C : 포르말린-불활화 재조합 *C. novyi* 알파독신 50ug/ml를 동량의 alum과 혼합하여 접종

(3) 2회 접종 후 2주 째에 야외독소 *C. novyi* 균주를  $5 \times 10^9$  CFU in 5ml로 하여 경구 접종 후 설사, 폐사 여부 등의 임상 증상으로 효능 평가

(가) 2차 접종 후 2주 째에 야외독성 균주로 도전 감염하여 폐사 여부를 확인하여 본 결과 대조군에 비해 유의성 있는 효능이 관찰되지 않아 독소이드만으로는 우수한 효능이 관찰되지 않음이 확인 됨 (표 6 참조)

표 6. 포르말린-불활화 재조합 *C. novyi* 알파독신 50ug/ml를 동량의 alum과 혼합하여 접종

그룹	자돈수	폐사 자돈 수(%)
A	5	4 (80.0)
B	5	3 (60.0)

바. 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가

(1) 재조합 *C. novyi* 알파독소이드의 동물 세포주 vero cell에 대한 세포변성효과 검증

(가) 재조합 *C. novyi*의 알파독소이드의 독성 평가 결과 야외분리 *C. novyi*보다 10배 높은 세포독성이 확인됨

(나) 토끼에 재조합 *C. novyi* 알파독소이드를 접종한 결과, 토끼의 폐사는 없었지만, 토끼 혈청에서도 약한 세포독성이 나타남 (표 7 참조, 그림 31 참조)

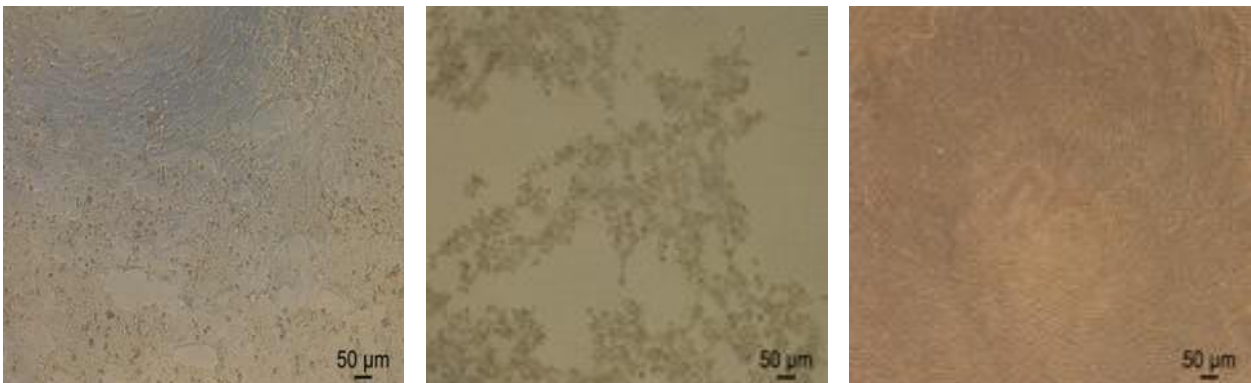
표 7. 야외분리 *C. novyi* 150557 및 재조합 *C. novyi* 알파독소이드의 세포변성효과 검증

Sample	10 fold dilution					
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
야외분리 <i>C. novyi</i> 150557	O <sup>a)</sup>	O	X	X	X	X
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드	O	O	O	X	X	X
야외분리 <i>C. novyi</i> 150557 +	O	O	O	O	O	O
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드						

Sample	2 fold dilution					
	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>
Negative 토끼 Serum	X <sup>b)</sup>	X	X	X	X	X
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드 접종 토끼 Serum (1week)	O	O	O			
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드 접종 토끼 Serum (3week)	O	O	O			
Vero cell	X	X	X	X	X	X

<sup>a)</sup>Cytotoxicity, <sup>b)</sup>None Cytotoxicity



재조합 *C. novyi* 알파독소이드

야외분리 *C. novyi* 150557

Vero cell

그림 31. 야외분리 *C. novyi* 150557 및 재조합 *C. novyi* 알파독소이드의 세포변성효과 검증

(2) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 항원에 음성인 자돈 구입

(가) 재조합 *C. novyi* 알파 독소이드를 위의 결과에서처럼 vero cell에서 안전성 평가를 수행하여 본 결과 원 균주에서 추출한 독소보다 강한 독성이 관찰 됨.

(나) 하지만 토끼에 접종 하였을 경우에는 아무런 임상 증상이 관찰되지 않아 돼지에서의 안전성 여부를 수행함



- (3) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드(50ug/dose)+신개념 *C. novyi* 사균체 ( $2 \times 10^9$  cells/dose) 혼합 백신을 4주령 및 6주령 자돈에 각각 근육접종
- (4) 근육접종 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 발열, 설사, 폐사, 침울, 의기소침 등 임상 증상 관찰
- (가) 근육 접종 후 2주 동안 발열, 설사 및 폐사와 같은 임상 증상이 관찰되지 않아 세포에서의 안전성 평가와는 다른 결과가 관찰 됨.

## 2. 세부연구기관

가. 대량 생산을 위한 재조합 *C. novyi*의 알파 독소의 정제 방법 확립

- (1) 재조합 *C. novyi* 알파 독소의 N-말단에 IF-his가 융합된 벡터가 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 kanamycin이 함유된 LB agar에 배양 및 단백질 발현을 유도하여 재조합 단백질이 합성됨을 확인함 (그림 32 참조).
- (2) 대량 생산을 위한 재조합 IF-his-*C. novyi* 알파 독소의 발현 조건을 확립하고 순수 정제 하였으나 단백질이 insoluble 상태로 발현되어 정제 단계가 증가함
- (3) 다른 construct를 제작하여 사용하기로 결정함.

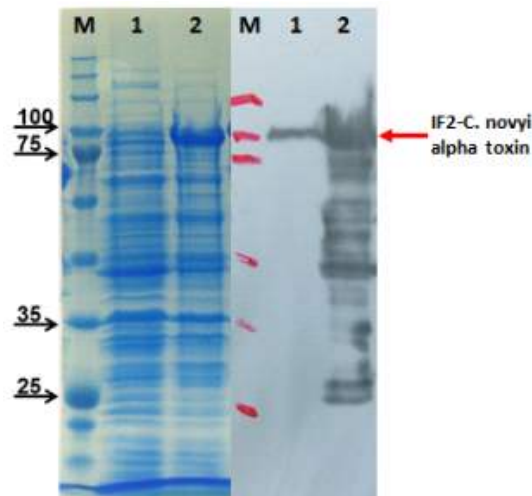


그림 32. 재조합 IF2-*C. novyi* 알파 독소 단백질의 발현을 SDS-PAGE와 Western blotting으로 확인. (1: induction 전, 2: induction 후)

나. 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산을 위한 발현 시스템 개선

- (1) 화학합성한 *C. novyi*의 알파 독소 유전자의 N-도메인 부분(a.a.: 98-761, Catalytic domain and Protease domain)을 다양한 벡터(pET30a, pTWIN1)에 삽입함.
- (가) 발현을 증진시킬 수 있는 단백질 서열 또는 단백질을 세포 밖으로 분비하도록 유도하는 펩티드 서열을 융합하고, 정제를 용이하게 하기 위한 히스티딘 태그의 위치를 변화시킨 네 종의 발현벡터를 확보함 (그림 33 참조).

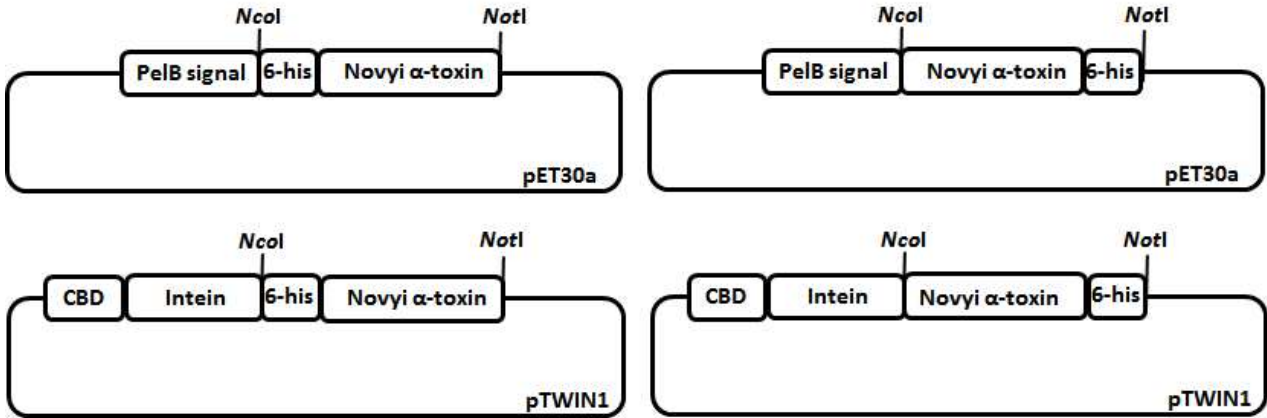


그림 33. *C. novyi* 알파 독소의 대량 발현을 위한 발현벡터 제작

(2) 상기의 알파 독소 이외에 돼지에서 직접 분리한 *C. novyi* 분리균주의 유전체에서 PCR을 이용하여 직접 알파 독소 유전자 획득

(가) 분리 균주 유래 알파 독소 유전자를 특이적 프라이머를 이용한 PCR을 통해 복제함. 프라이머의 서열은 다음과 같음 (Novyi-ori-NcoI-F

5 ‘-CCATGGCCatgctaaaaaatctattatc-3’ ; Novyi-ori-XhoI-R

5 ‘-CTCGAGattccttgaattaattgttg-3’ ).

(나) 세포 밖으로 분비하도록 유도하는 펩티드 서열을 융합하여 pET30a 벡터에 삽입하여 발현벡터를 확보함 (그림 34 참조).

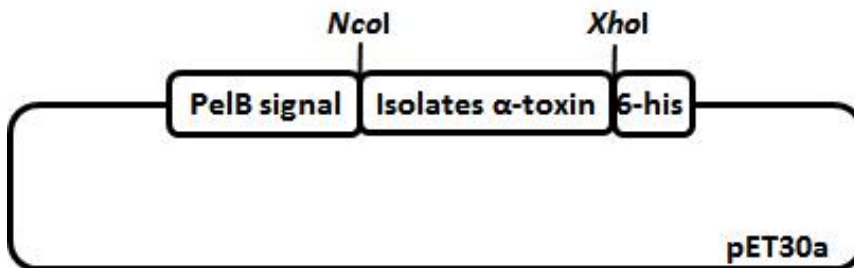


그림 34. *C. novyi* 분리 균주 유래 알파 독소 유전자를 삽입한 벡터의 모식도

다. 발현된 재조합 *C. novyi*의 알파 독소의 단백질 구조 확인

(1) *C. novyi* 알파 독소가 Cloning된 벡터를 *E. coli* BL21 (DE3) 및 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 세포에 도입한 다음 IPTG를 이용하여 알파 독소의 과발현 유도 후 발현 결과 확인.

(가) *E. coli* BL21 (DE3) 및 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 세포에서 모두 알파 독소가 과발현 됨을 확인함.

(나) SDS-PAGE 결과에서는 pET30a 벡터에 삽입한 알파독소가 과발현 된 것이 확인됨 (그림 35 참조).

(다) Western blot 결과를 보면 pET30a 벡터에 삽입한 C-말단 히스티딘 태그의 경우만 밴드가 확인됨에 따라 이후 C-말단 히스티딘 태그 벡터를 사용하기여 대량 배양 및 순

수정제를 진행함.

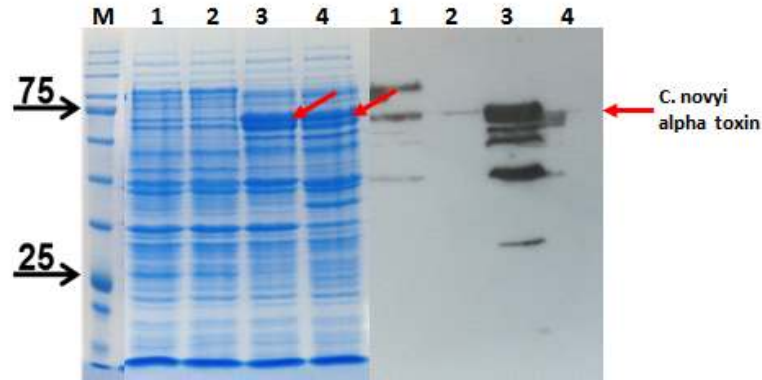


그림 35. *C. novyi*의 알파 독소 발현 여부를 SDS-PAGE 및 western blotting으로 확인. 과발현된 알파 독소를 화살표로 표기함. (M: size marker, 1: pTWIN1 C-ter histag, 2: pTWIN1 N-ter histag, 3: pET30a C-ter histag, 4: pET30a N-ter histag)

라. 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산을 위한 정제 방법 개선

- (1) 정제된 고순도의 재조합 독소 단백질을 얻어내기 위해 친화성 또는 이온교환 수지 컬럼을 사용하여 분리 정제 및 최적공정 결정
  - (가) 과발현 알파 독소 단백질의 분포를 확인해 본 결과 배양액으로 분비되지 않고 세포 내에 존재하는 것으로 확인됨.
  - (나) 세포 파쇄 후 histag 컬럼이 연결된 FPLC를 통해 순수정제를 시도하여 한번의 수행으로 순수 단백질을 분리할 수 있었음 (그림 36 참조).

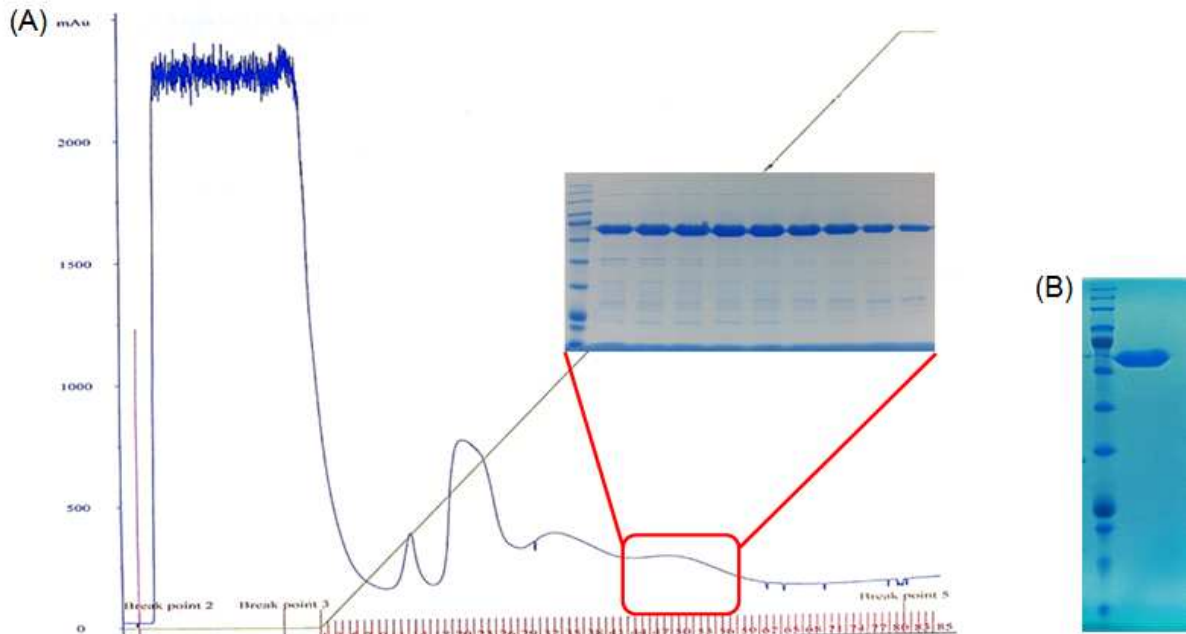


그림 36. *C. novyi* 알파독소 (pET30a C-ter histag)를 FPLC를 이용하여 순수정제 (A) FPLC 수행 후 얻은 결과의 프로파일. 빨간색 박스로 표시한 부분이 알파독소가 검출되는 부분으로 SDS-PAGE를 통해 단백질의 유무를 확인함. (B) 검출된 단백질을 모아서 농축하여 순수 정제된 고농도의 단백질을 획득함.

(2) 순수 정제된 알파 독소의 독성 시험을 통한 기능 상실 유무 확인

(가) 주관 연구팀에서 연구 진행 (표 7 참조)

마. 발현된 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 전염성 가스 괴저 돼지로부터 획득한 혈청을 이용한 Western blot을 이용한 기능 확인

(1) *C. novyi* 균주를 돼지에 먹인 후 항혈청 획득을 시도함.

(가) 돼지에서 알파 독소에 대한 항혈청을 획득하기 위해 균을 투여하였으나 증상이 나타나지 않음.

(2) *C. novyi* 알파 독소 단백질과 *C. novyi* 분리 균주를 토끼에 주사하여 항혈청 획득.

(가) 항혈청 획득을 위해 목적동물을 토끼로 변경하여 알파 독소 단백질과 *C. Novyi* 분리 균주를 먹여 항혈청 제작을 유도하였고, 각각의 항원에 대한 항혈청이 제작된 것을 western blot 기법으로 확인함 (그림 37 참조).

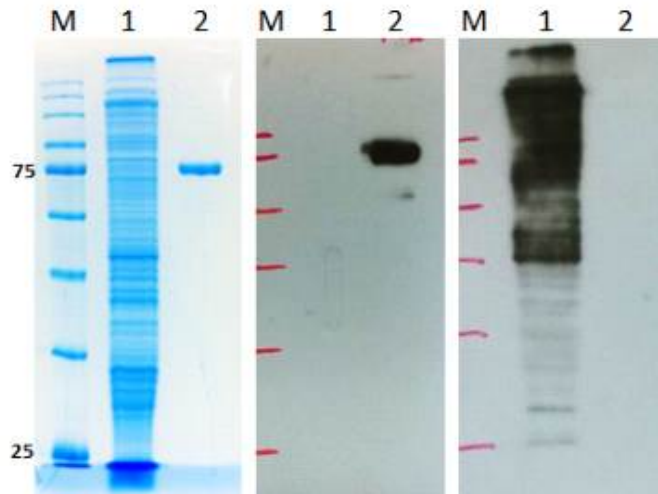


그림 37. *C. novyi* 균체와 정제된 알파 독소 단백질을 각각 투여한 토끼에서 얻은 혈청을 이용하여 독소 검출.

좌: SDS-PAGE, 중: 알파 독소 단백질을 투여한 토끼에서 얻은 혈청을 이용한 western blot, 우: *C. novyi* 균체를 투여한 토끼에서 얻은 혈청을 이용한 western blot. 각각의 항원에 대한 항혈청이 제작되었음을 확인함. (M: size marker, 1: *C. novyi* lysate, 2: 정제된 알파 독소 단백질)

바. Stx2eA fragment + Stx2eB 재조합 단백질을 이용한 항혈청 획득 (1차년도 계속)

(1) Stx2eA fragment (a.a. 215-319) 유전자를 pTWIN1 벡터에 삽입하고, Stx2eB 유전자를 pET30a 벡터에 삽입하여 각각 재조합 벡터를 제작함 (그림 38 참조).

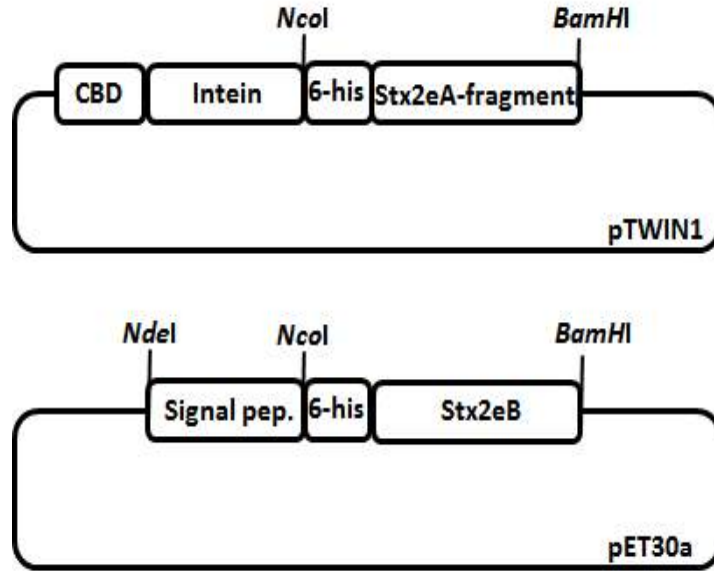


그림 38. Stx2eA-C-terminal fragment와 Stx2eB 단백질의 과발현을 위해 재조합 벡터 제작

- (2) Stx2eA fragment와 Stx2eB 단백질을 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 균주에 형질전환하여 동시에 발현을 유도하였고, FPLC로 순수정제한 후 anti-histag 항체를 이용하여 western blot 으로 단백질 유무를 확인함 (그림 39 참조).

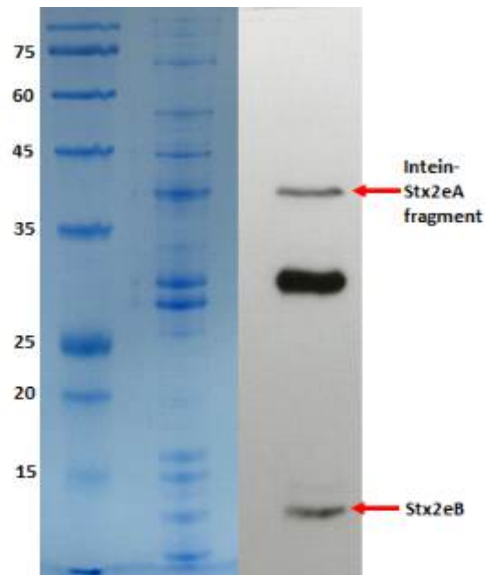


그림 39. 발현 후 정제한 단백질을 anti-histag antibody를 이용하여 western blot 기법으로 검출함.

- (3) 순수정제한 단백질을 돼지에 주사하여 얻은 혈청을 이용하여 주사한 단백질을 인식하는 항체의 생성 유무를 확인한 결과 western blot 으로 항원이 검출됨을 확인함 (그림 40 참조).
- (4) 순수정제한 단백질을 black mouse에 주사하여 얻은 혈청을 이용하여 F18+, Stx2e+ *E. coli* 야외 분리 주 (*E. coli* 150229)에서 생성하는 야생형 Stx2eA독소를 검출하였고, 1차

년도 연구 결과 독성 증가를 보였던 Stx2eA 과발현 분리주의 경우 독소의 양이 증가하였음을 확인함 (그림 41 참조).

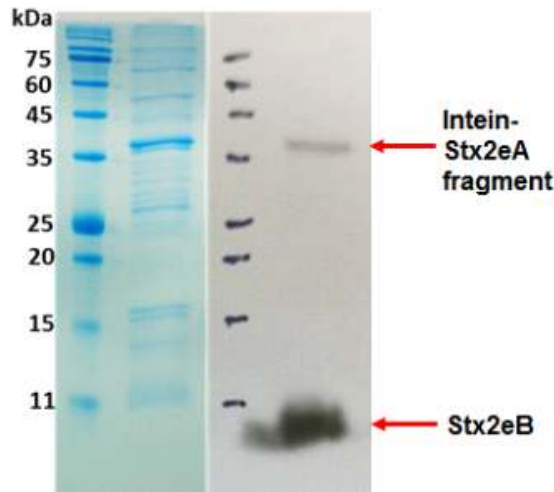


그림 40. 제조합 단백질을 돼지에 주사하여 얻은 항혈청을 이용하여 항원을 검출함.

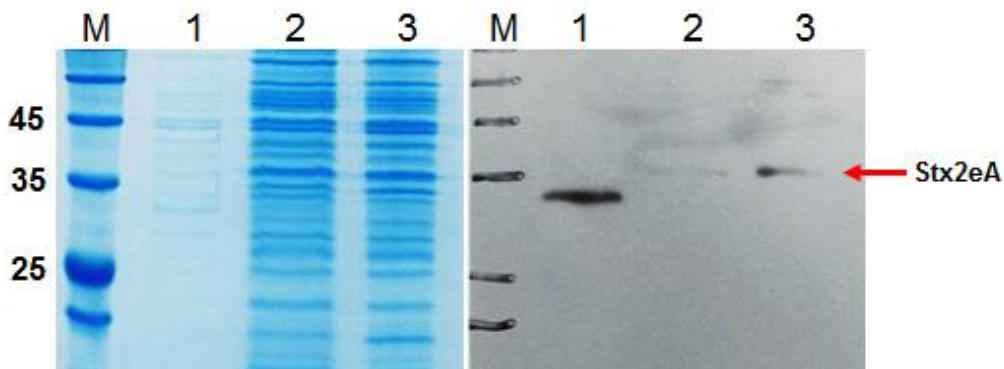


그림 41. 제조합 단백질을 Black mouse에 주사하여 얻은 항혈청을 이용하여 항원을 검출함. (M: size marker, 1: *E. coli* BL21(DE3) cell, 2: *E. coli* 150229 배양액 농축, 3: Stx2eA full 과발현시킨 *E. coli* 150229 배양액 농축)

- (5) 제조합된 Stx2e 및 Stx2eB의 공발현(co-expression; *E. coli* BL21(DE3) pLysS 균주 안에서 동시발현) 된 후 정제단계에서 많은 과정의 chromatography를 방법을 이용하여 시도하였으나 정제 순도가 60% 정도여서 기존에 알려진 Heterohexamer를 이루는지에 대한 native-gel이나 size-exclusion chromatography와 같은 실험 진행이 어려운 실정임.
- (가) 해결방안으로 현재 제조합된 Stx2e 및 Stx2eB의 공발현(co-expression; *E. coli* BL21(DE3) pLysS 균주 안에서 동시발현) 및 정제단계를 통해 얻어진 정제 순도를 보다 높여야 위와 같은 native-gel이나 size-exclusion chromatography와 같은 실험이 가능할 것이라 기대하며 이를 위해 정제조건을 현재보다 더 최적화하는 것이 필요함.
- (나) 제조합 Stx2e 제작을 통해 5량체 항원 제작 관련 추가 분석을 위해 제조합된 Stx2eA 및 Stx2eB의 정제 순도를 높일 수 있는 충분한 시간 필요함 따라서 정제 순도를 80%이상 향상시킨 후에 본 추가 요구사항 분석은 수행할 예정.

### 3. 협동연구기관

가. F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작

(1) 정제된 stx2e 독소이드 및 각각의 신개념 사균체를 일정 농도로 혼합하고 면역증강제 종류를 선택하여 백신 시제품 제작

(가) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드를 특정 비율로 혼합하고 선정된 면역 증강제를 포함하는 시험 백신의 제작 진행

(나) 면역반응의 최적 유도를 위한 면역증강제 후보(montanide 등)별 소량 시험하여 최종 물질의 선정 진행

나. 제작된 시제품 안정성 평가

(1) 생산 후 제조 시제품을 냉장 보관하며 1년간은 3개월 간격으로 보관하고 있는 백신의 일반 확인 시험 진행

(가) 백신의 분리 정도를 확인하는 육안평가 후 동물용 생물학적 제제 일반검정기준에 따라 평가시험 진행

(나) 각각의 평가 항목에 따른 시험 결과서 작성 예정

다. 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산

(1) 재조합 독소 단백질 발현 균주를 이용한 대량 생산 공정 연구 수행

(가) 협동연구기관에서 개발한 *C. novyi*의 알파 독소 발현 균주의 5L 이상 culture를 진행하여 최적화된 배양 조건 연구

(나) 발효조를 이용한 대량 배양조건 확립을 위한 공정 설계

라. 대량 생산된 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 불활화 및 안전성 평가

(1) 생산된 재조합 *C. novyi*의 알파 독소의 독성 평가

(가) 생산 정제된 재조합 단백질의 세포변성효과 검증 시험 (표 7 참조)

(나) 개선된 재조합 단백질 발현 균주를 이용한 대량 배양 및 정제 공정 설계

### 제3절. 3차년도 연구 수행 내용 및 결과

#### 1. 주관연구기관

가. 사균체 및 독소이드 혼합 백신과 국내 또는 국제적으로 효능이 인정된 돼지 부종병 예방 백신 (히프라사의 비 뷰어 등)과의 효능 비교 평가

- (1) Stx2e를 항원으로 한 ELISA에서 음성인 모돈에서 출생한 자돈을 실험에 사용함.
- (2) 부종병 음성인 자돈을 대상으로 5일령, 4주령일 때 각각 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 혼합 백신 그리고 포르말린 백신을 근육 접종.

(가) 히프라사의 히프라 비뷰어 백신 등과의 비교실험을 하려 했으나 국내 시판이 늦어 포르말린 백신으로 대체함. (그림 42 참조)

#### 부 표

업 체 명 : (주)한국히프라	최초허가일자 : 2019. 08. 20.
제 품 명 : 히프라 비뷰어(VEPURED)	변경허가일자 : 2019. 12. 26.
허 가 번 호 : 제 261 - 21 호	

1. 원료약품 및 분량 (1ml/1두분당)	
* 유전자재조합 Verotoxin 2e	..... RP ≥ 1.50*
* 수산화알루미늄	..... 적량
* DEAE-덱스트란	..... 적량
* 부형제	..... 적량
* RP=relative potency(ELISA)	

2. 제형 및 성상	
가. 제형 : 생물학적제제, 주사제	
나. 성상 : 흰색을 띠는 주사용 현탁액	

3. 제조방법	
* 제조사의 제조법에 따라 제조한다. 【별첨 1】	

4. 효능 및 효과	
* 돼지 : VT2e toxin에 대한 방어 및정균과 항체를 생산하여 돼지 부종병( <i>E.coli</i> )에 의해 생산되는 verotoxin 2e에 의해 발생)의 임상 증상 감소와 피사를 예방하고 도축시 까지 증체량 개선	

5. 용법 및 용량	
* 돼지 : 2 일령 이상의 자돈 경우 1두당 1ml를 근육 주사한다.	

6. 포장단위	
* 10두분/병(10ml), 50두분/병(50ml), 100두분/병(100ml), 250두분/병(250ml)	

7. 저장방법 및 유효기간	
----------------	--

그림 42. 히프라 비뷰어 백신의 허가 일자

2019.12.26. 허가 되어 2020년 초에 판매 시작

- (3) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 혼합 백신 그리고 포르말린 백신을 1차 접종 후 2주, 2차 접종 후 2주, 도전감염 후 2주째에 각각 채혈하여 항체 유도 여부 조사

(가) 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원을 이용한 항체 유도 여부 확인 결과 백신 접종 전 5일령 자돈에서는 모유에서 항체가 전달되어 모두 항체 여가가 유도 되었으나 이유 후부터 대조군과 포르말린 백신에 비하여 월등하게 항체 여가가 유도됨을 확인할 수 있었다 (그림 43 참조).



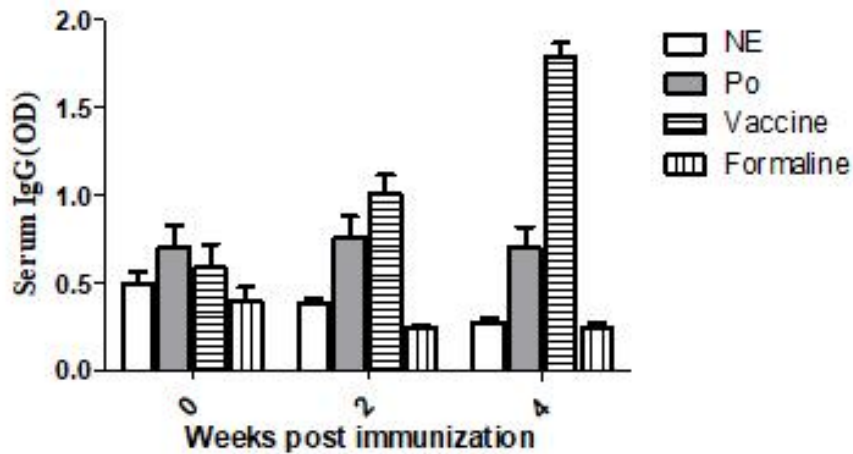


그림 43. 백신 접종 후 혈청 항체 역가 (ELISA OD 값)

나. 사균체 및 독소이드 혼합 백신과 독소이드와 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ stx2e *E. coli* 각각의 혼합 백신과의 비교 평가

- (1) 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원 음성 자돈 5일령 자돈 구입
  - (2) 5일령 자돈에 F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+ Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells에 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 각각 50ug, 75ug, 100ug을 혼합하여 1차 접종 하고 이유 후 자돈에(4주령) 2차 접종 한다.
  - (3) 각각 F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+ Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells에 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 50ug, 75ug, 100ug을 혼합백신을 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후에 각각 채혈하여 항체 유도 여부 조사.
- (가) 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원을 이용한 항체 유도 여부 확인 결과 백신 접종 전 5일령 자돈에서는 모유에서 항체가 전달되어 모두 항체 역가가 유도 되었으나 이유 후부터 대조군에 비하여 50ug, 75ug, 100ug 모두 월등한 항체 역가가 유도됨을 확인 할 수 있으나 그중 75ug을 접종한 그룹에서 가장 높게 나타난 것을 확인 할 수 있다. (그림 44 참조)

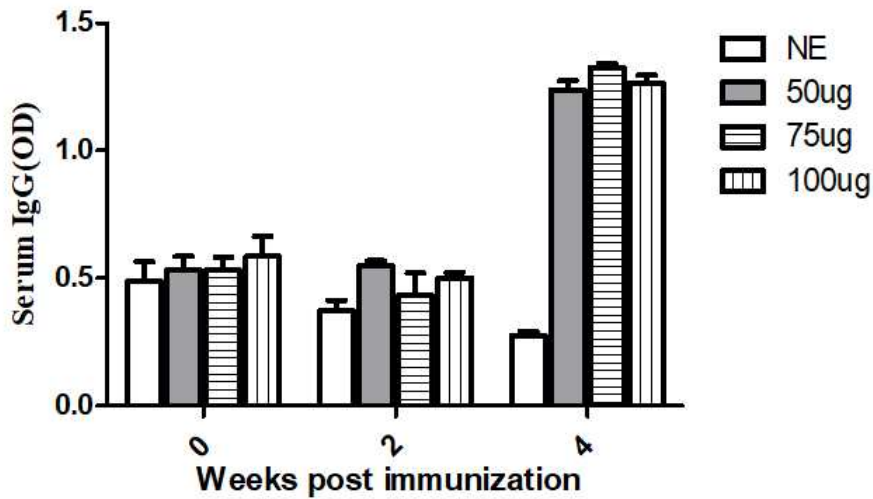


그림 44. 백신 접종 후 혈청 항체 역가 (ELISA OD 값)

- (나) F4<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> 항원을 이용한 항체 유도 여부 확인 결과 백신 접종 전 5일령 자돈에서는 모유에서 항체가 전달되어 모두 항체 역가가 유도 되었으나 이유 후부터 대조군에 비하여 75ug을 접종한 그룹에서 항체 역가가 월등하게 유도됨을 확인 할 수 있다. (그림 45 참조)
- (다) F18<sup>+</sup> Stx2e<sup>+</sup> 항원을 이용한 항체 유도 여부 확인 결과 백신 접종 전 5일령 자돈에서는 모유에서 항체가 전달되어 모두 항체 역가가 유도 되었으나 이유 후부터 대조군에 비하여 50ug, 75ug, 100ug을 접종한 그룹에서 항체 역가가 높게 유도됨을 확인 할 수 있다. (그림 45 참조)
- (라) fedA 항원을 이용한 항체 유도 여부 확인 결과 백신 접종 전 5일령 자돈에서는 모유에서 항체가 전달되어 모두 항체 역가가 유도 되었으나 이유 후부터 대조군에 비하여 50ug, 75ug을 접종한 그룹에서 항체 역가가 월등하게 유도됨을 확인 할 수 있다. (그림 45 참조)
- (마) K88ac 항원을 이용한 항체 유도 여부 확인 결과 백신 접종 전 5일령 자돈에서는 모유에서 항체가 전달되어 모두 항체 역가가 유도 되었으나 이유 후부터 대조군에 비하여 50ug, 75ug, 100ug을 접종한 그룹에서 항체 역가가 높게 유도됨을 확인 할 수 있다. (그림 45 참조)

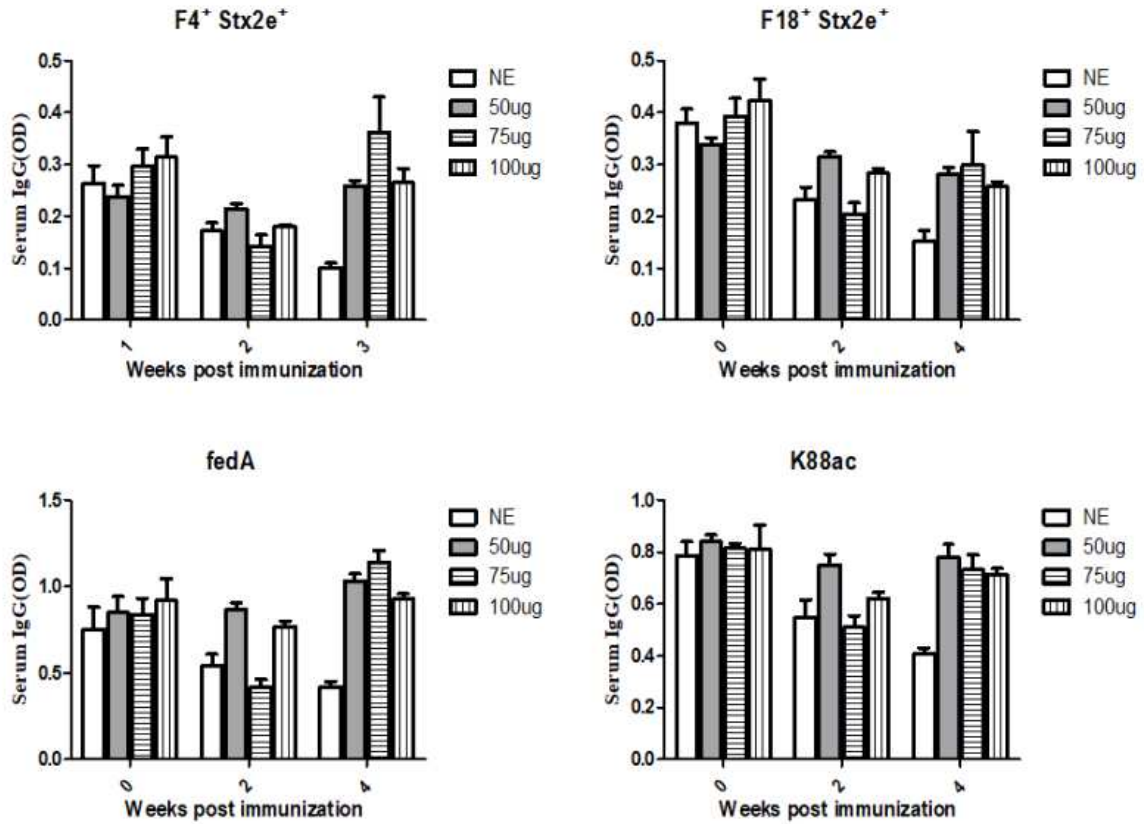


그림 45. 백신 접종 후 혈청 항체 역가 (ELISA OD 값)

(4) 면역 반응 측정 및 야외 독성 균주로 도전감염 후 부종 여부로 방어 효과 평가

(가) 도전감염 후 대조군에서는 5마리 중 5마리에서 코부종이, 3마리에서 눈부종이 확인되었고, 50ug을 접종한 그룹에서는 5마리 중 2마리에서 코부종이, 1마리에서 눈부종이 확인되었지만 75ug, 100ug 그룹에서는 5마리 모두 부종이 확인되지 않았다.(표 9 참조)

(나) 부검 당시 대조군에서는 5마리 중 5마리에서 코 부종이, 4마리에서 눈 부종이 확인되었고, 50ug을 접종한 그룹에서는 5마리 중 5마리에서 코 부종이, 3마리에서 눈 부종이 확인되었고 100ug 그룹에서는 5마리 중 2마리에서 코 부종만 확인되었지만 75ug 그룹에서는 5마리 모두 부종이 확인되지 않았다.(표 8, 그림 46 참조)

표 8 신개념 사균체와 다양한 농도의 재조합 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질을 근육 접종 후 도전감염에 대한 임상 증상 결과

그룹	도전감염 후		부검	
	코부종	눈부종	코부종	눈부종
대조군	5/5	3/5	5/5	4/5
50ug	2/5	1/5	5/5	3/5
75ug	0/5	0/5	0/5	0/5
100ug	0/5	0/5	2/5	0/5

대조군 : 멸균 PBS 2ml

50ug 그룹 : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 50ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

75ug 그룹 : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 75ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

100ug 그룹 : F4+ Stx2e+ *E. coli*, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells/dose (각 사균체는 동량의 균수로 혼합)와 Stx2eA-C 말단 단편-Stx2eB-5량체 단백질 100ug을 동량의 alum과 혼합하여 접종

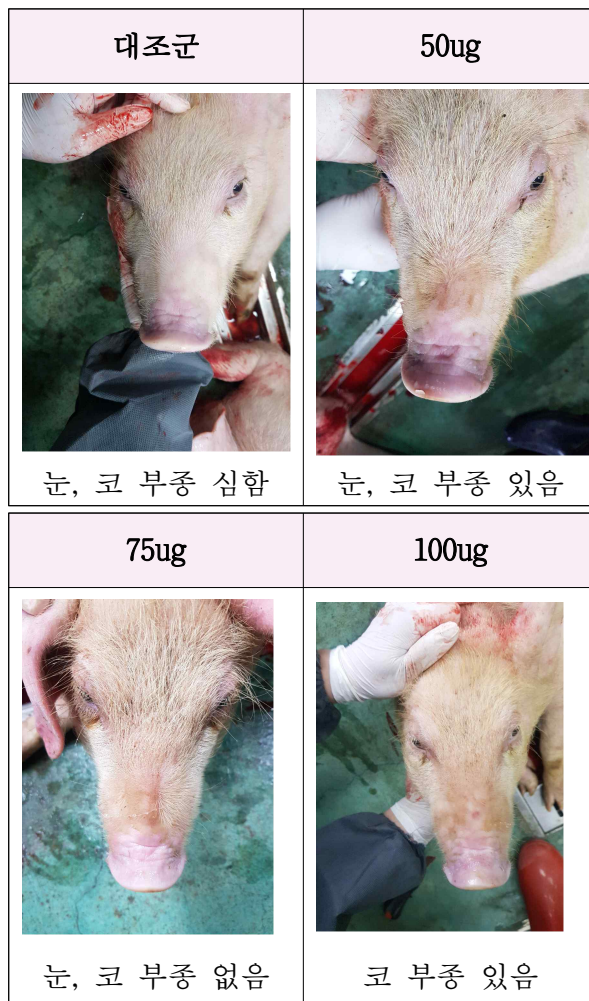


그림 46. 야외독성균주로 도전감염 후 임상 증상

다. 독소중화시험

(1) 재조합 Stx2eA fragment + Stx2eB를 이용한 독성 분석

(가) 재조합 Stx2e A<sub>6</sub>-His/B 및 야외균주 150229의 세포 독성 (표 9 참조)

표 9. Cytotoxic levels of recombinant Stx2e A<sub>6</sub>-His/B and STEC 150229 in Vero cell

Samples	Imidazole Conc. (mM)	10 fold dilutions					
		1	2	3	4	5	6
BL21		- <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-
150229		+ <sup>b)</sup>	+	+	+	-	-
BL21 + Stx2e A <sub>6</sub> -His (pStx2eA)	flow	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
150229 + Stx2e A <sub>6</sub> -His (pStx2eA)	flow	+	+	+	-	-	-
	20	+	+	+	-	-	-
	50	+	+	+	-	-	-
	250	+	+	+	+	-	-
	500	+	+	+	+	+	-
Elution buffer	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
Control		-	-	-	-	-	-

<sup>a)</sup> None cytotoxicity; <sup>b)</sup> Cytotoxicity

(나) 재조합 Stx2e A-fragment and Stx2e B의 세포 독성 (표 10 참조)

표 10. Cytotoxic levels of recombinant Stx2e A-fragment and Stx2e B in Vero cell

Samples	Imidazole Conc. (mM)	10 fold dilutions					
		1	2	3	4	5	6
BL21		- <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-
150229		+ <sup>b)</sup>	+	+	+	-	-
BL21 + Stx2e A-fragment (pStx2eA-fusion)	flow	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
BL21 +	flow	-	-	-	-	-	-

	20	-	-	-	-	-	-
Stx2e B	50	-	-	-	-	-	-
(pStx2eB)	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
Elution buffer	20	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
Control		-	-	-	-	-	-

<sup>a)</sup> None cytotoxicity; <sup>b)</sup> Cytotoxicity

(2) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드를 이용한 독성 분석

(가) 토끼에서 재조합 *C. novyi* 알파독소이드를 접종한 결과, 토끼의 폐사는 없었지만, 토끼 혈청에서도 약한 세포독성이 나타남(표 11 참조)

표 11. 야외분리 *C. novyi* 150557 및 재조합 *C. novyi* 알파독소이드의 세포변성효과 검증

Sample	10 fold dilution					
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
야외분리 <i>C. novyi</i> 150557	O <sup>a)</sup>	O	X	X	X	X
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드	O	O	O	X	X	X
야외분리 <i>C. novyi</i> 150557 +	O	O	O	O	O	O
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드						
Sample	2 fold dilution					
	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>
Negative 토끼 Serum	X <sup>b)</sup>	X	X	X	X	X
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드 접종 토끼 Serum (1week)	O	O	O			
재조합 <i>C. novyi</i> 알파독소이드 접종 토끼 Serum (3week)	O	O	O			
Vero cell	X	X	X	X	X	X

<sup>a)</sup>Cytotoxicity, <sup>b)</sup>None Cytotoxicity

라. *C. novyi* 신개념 사균체와 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 기니피그에서의 효능 평가

(1) 재조합 *novyi* 독소이드 함유 백신 효능 평가를 위해 4주령 Guinea pig를 실험에 사용함.

(가) 해외 균주 분양의 지연으로 인하여 충분한 시간적 여유가 없어 돼지에서 기니피그 실험으로 변경 됨.(그림 47 참조)

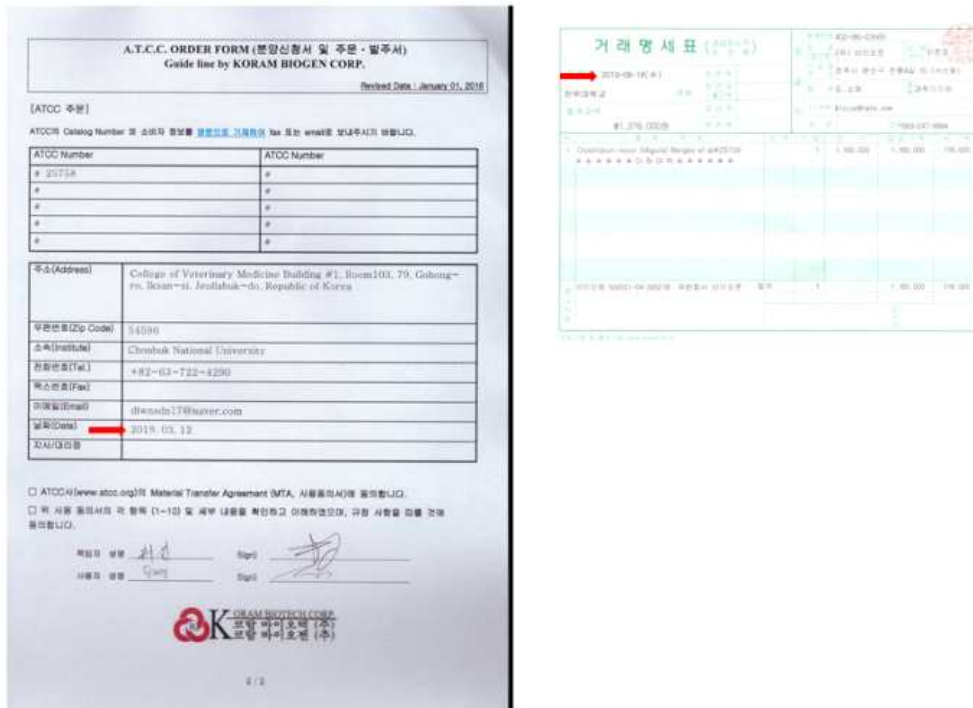


그림 47. ATCC 분양 균주 지연 여부  
 분양 신청 : 2019.03.12., 분양 완료 : 2019.08.14

(2) novyi 음성인 기니피그를 대상으로 4주령일 때 재조합 novyi 독소이드 함유 백신을 20ug/0.4ml이 되도록 근육 접종 후 2주 후에 2차 접종.(표 12 참조)

표 12. 재조합 novyi 독소이드 함유 백신 효능 실험

Group	마리수	접종균주	접종량	경로
A	5	Ne	-	-
B	5	PBS	0.4ml	근육
C	5	Vaccine	20 $\mu$ g/0.4ml	근육

(3) 재조합 novyi 독소이드 함유 백신을 1차 접종 후 2주, 2차 접종 후 2주, 도전감염 후 2주 째에 각각 채혈하여 항체 유도 여부 조사 중

## 2. 세부연구기관

가. 야외 분리주 유래 알파 독소의 발현 및 정제 (2차년도 계속)

(1) 야외 분리주 *C. novyi* 알파독소가 cloning된 벡터를 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS에 형질정환하여 발현을 유도하였을 때 발현됨을 확인함.

(2) 단백질이 발현된 세포를 친화 크로마토그래피 방법을 이용하여 정제한 결과 예상되는 크기인 49kDa 부근에 밴드가 확인됨 (그림 48 참조).

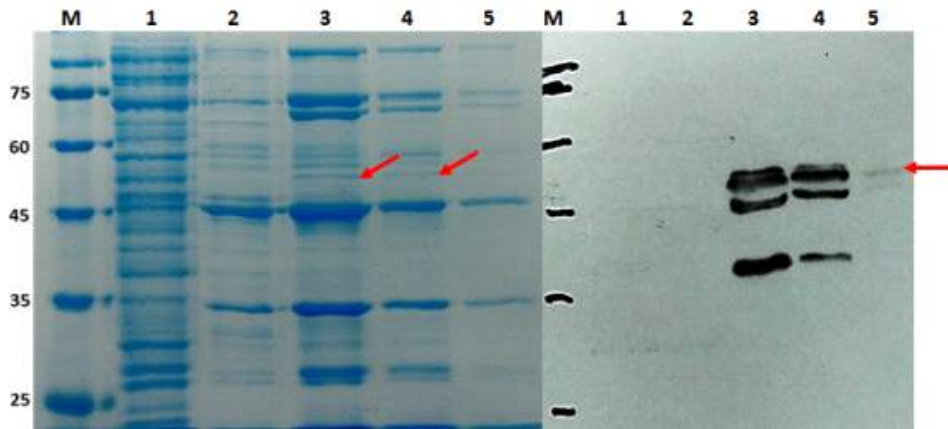


그림 48. 아의 분리주에서 유래한 *C. novyi*의 알파 독소 발현 여부를 SDS-PAGE 및 western blotting으로 확인. 과발현된 알파 독소를 화살표로 표기함. (M: size marker, 1: Flow though, 2: wash, 3-5: Elution)

(3) 정제된 재조합 단백질의 독성 영향을 확인함.

#### 나. 백신 제조 산업체에서 대량 생산을 위한 재조합 독소 발현 시스템 개선

(1) Stx2e 독소 발현 시스템 세부 과정 개선

(가) Stx2eA fragment를 포함하는 벡터와 Stx2eB를 포함하는 벡터를 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 균주에 도입하여 Chloramphenicol, Ampicillin, Kanamycin이 포함된 배지에서 선별함.

(나) 선별된 콜로니를 LB broth에 밤새 배양한 후 대용량 배지에 2차 접종 후 O.D.<sub>600</sub>=0.5가 되었을 때 적합한 농도(0.5~1 mM)의 IPTG를 이용하여 발현을 유도한 다음 18~25°C의 저온에서 16시간 이상 발현을 유도함.

(다) 과발현된 단백질은 세포 내부에 존재하기 때문에 세포를 원심분리로 획득하여 순수 정제함.

(2) *C. novyi* 알파독소 발현 시스템 세부 과정 개선

(가) C-말단에 histidin을 태깅한 *C. novyi* 알파독소를 포함하는 벡터를 *E. coli* BL21 (DE3) 균주에 도입하여 Kanamycin이 포함된 배지에서 선별함.

(나) 선별된 콜로니를 액체 배지에 접종하여 밤새 배양 후 배양액을 대용량 배지에 2차 접종 후 O.D.<sub>600</sub>=0.4~0.6이 되었을 때 적합한 농도의 발현유도 시약 (0.5~1 mM IPTG)을 배양액에 첨가하여 18~25°C의 저온에서 18시간 이상 발현을 유도함.

(다) 과발현된 단백질은 세포 내부에 존재하기 때문에 세포를 원심분리로 획득하여 순수 정제함.

#### 다. 제조 공정 과정을 줄이기 위한 정제 방법 개선

(1) Stx2e 독소 단백질의 정제 세부 과정 개선

(가) Stx2eA fragment + Stx2eB가 과발현된 세포를 초음파 분쇄법을 이용하여 파쇄한 후 원



심분리하여 단백질이 포함된 상등액을 분리함.

- (나) 친화 크로마토그래피(니켈 컬럼이 연결된 FPLC 사용)를 이용하여 한 번의 수행으로 목적 단백질을 순수 분리함 (그림 49 참조)
- (다) 정제된 목적 단백질이 포함된 fraction 만을 모아서 농축함.
- (라) Stx2e 독소를 순수 정제한 이후 농축 시에 침전이 생기는 것을 확인하여 이를 개선함. 순수 정제시에 사용하는 버퍼 시스템에서 NaCl의 농도를 높여 사용함으로써 정제 및 농축시에 침전으로 인한 손실이 줄어듦.

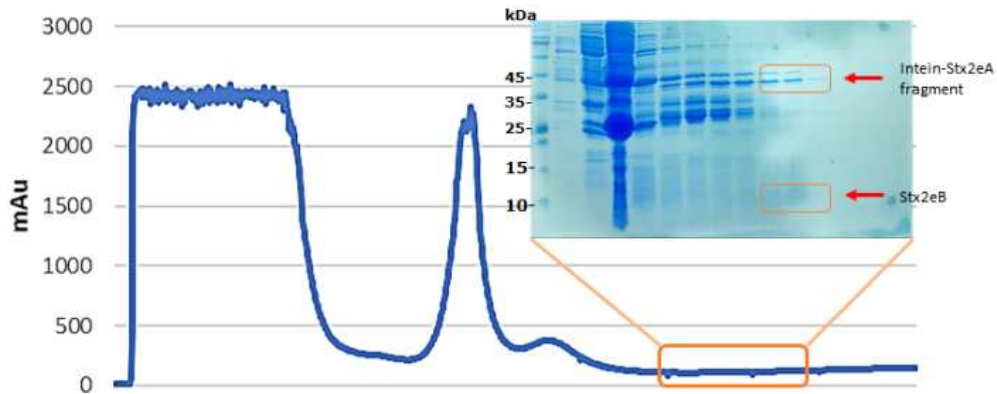


그림 49. Stx2eA fragment + Stx2eB를 니켈 컬럼이 연결된 FPLC 시스템을 통해 친화 크로마토그래피를 수행한 결과.

(2) *C. novyi* 알파 독소 단백질의 정제 세부 과정 개선

- (가) *C. novyi* 알파 독소가 과발현된 세포를 초음파 분쇄법을 이용하여 파쇄한 후 원심 분리하여 단백질이 포함된 상등액을 분리함.
- (나) 친화 크로마토그래피(니켈 컬럼이 연결된 FPLC 사용)를 이용하여 한 번의 수행으로 목적 단백질을 순수분리함.
- (다) 정제된 목적 단백질이 포함된 fraction 만을 모아서 농축함 (그림 50 참조).

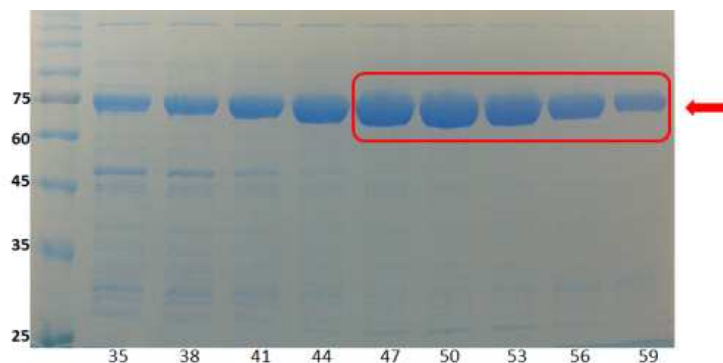


그림 50. *C. novyi* 알파 독소를 니켈 컬럼이 연결된 FPLC 시스템을 통해 친화 크로마토그래피를 수행한 결과 단백질이 포함된 fraction을 SDS-PAGE로 확인함.

라. 정제된 재조합 독소 단백질의 안정성 평가

- (1) 정제된 재조합 Stx2e 및 *C. Novyi* 알파 독소 단백질을 냉장 보관하면서 시간에 따른 단

백질의 분해를 확인함.

(가) Stx2e 단백질의 경우 냉장 보관시 한달까지 단백질의 양이 유지되는 것을 확인함.

(나) *C. novyi* 단백질의 경우 냉장에서 일주일 후 precipitation 되는 것을 확인함. 따라서 단백질 정제 후 바로 사용하거나 50% 글리세롤을 첨가하여 보존함.

마. Stx2eA fragment + Stx2eB 재조합 단백질을 이용한 항혈청 획득 (1차년도 계속)

(1) Stx2eA fragment + Stx2eB 재조합 단백질을 돼지에 주사하여 얻은 항혈청을 이용하여 F18+, Stx2e+ *E. coli* 야외 분리 주 (*E. coli* 150229)에서 생성하는 야생형 Stx2eA 독소를 검출함.

(2) 2차년도에 Black mouse 혈청을 이용한 결과와 마찬가지로 Stx2eA를 과발현시킨 *E. coli* 150229에서 더 많은 양의 Stx2eA가 검출됨 (그림 51 참조)

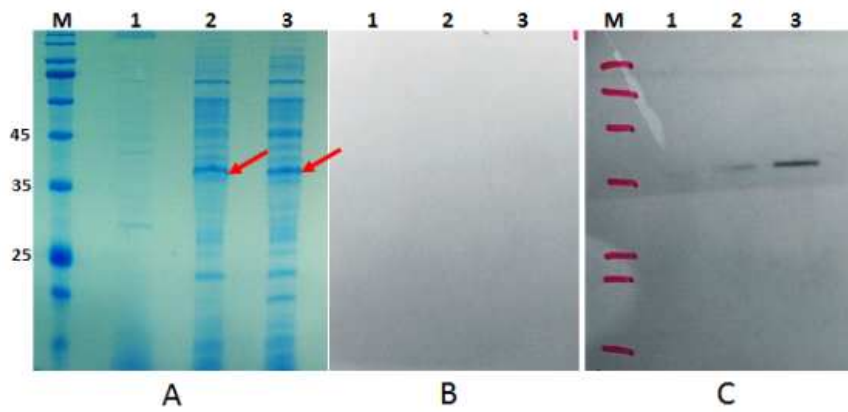


그림 51. 재조합 단백질을 돼지에 주사하여 얻은 항혈청을 이용하여 항원을 검출함. A: SDS-PAGE, B: 접종 전 혈액을 이용한 western blotting, C: 접종 후 혈액을 이용한 western blotting (M: size marker, 1: *E. coli* BL21(DE3) cell, 2: *E. coli* 150229 배양액 농축, 3: Stx2eA full 과발현시킨 *E. coli* 150229 배양액 농축)

### 3. 협동연구기관

가. *C. novyi* 신개념 사균체와 재조합 *C. novyi*의 알파 독소이드 함유 혼합 백신 시제품 제작

(1) *C. novyi* 신개념 사균체 제작

(가) ATCC에서 분양받은 *C. novyi* 균주를 배양, 불활화 하여 신개념 사균체 제작

(2) *C. novyi* 알파 독소이드 정제

(가) 정제한 *C. novyi* 알파 독소이드를 실험동물에 접종하여 독성을 확인한 결과 생체에는 독성을 나타내지 않는 것을 확인, 시험백신 제작에 사용

(3) *C. novyi* 신개념 사균체와 재조합 *C. novyi* 알파 독소이드를 혼합하여 가스괴저 백신의 실험실 스케일의 시험백신 제작

(가) 제조한 시험백신을 사용하여 실험동물에서의 안전성 및 효능 평가 진행

나. 제작된 시제품 안정성 평가

(1) *C. novyi* 신개념 사균체와 *C. novyi* 알파 독소이드를 포함하는 시험 백신 제조 후 보관

(2) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드를 동시에 함유한 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 백신과 재조합 stx2e 독소이드만을 함

유한 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 백신 제작 (그림 52, 53 참조)



그림 52. F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ E. coli 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드를 함유한 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 백신



그림 53. 재조합 stx2e 독소이드만을 함유한 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 백신

(3) 각각의 백신을 국가출하승인검정 기준에 기반 하여 안정성 시험 실시

- (가) 제조된 백신을 장기 보관하며 처음 1년간은 3개월 단위로 안정성 시험을 실시하고 시험 결과를 기록하여 시험성적서 작성 및 보관
- (나) 안정성 시험 결과를 확인하여 유효기간 설정을 위한 근거자료로 활용

다. 돼지 부종병이 만연된 양돈장을 대상으로 백신의 안전성 및 효능 평가

- (1) 목적동물을 활용한 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ E. coli 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 부종병 백신과 재조합 stx2e 독소이드만을 함유한 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 시험백신의 실험실내 안전성 평가
  - (가) 4주령 마우스에 백신당 8마리씩 한 그룹을 준비하여 피하 두 곳에 나누어 총 0.5 ml을 접종하고 7일간 이상이 없음을 확인
  - (나) 건강한 4~6주령 돼지 2마리에 백신 설정량의 2부분을 근육 접종하여 접종 1~2시간 후의 과민반응과 14일(오일 백신일 경우 21일) 이상 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용이 없음을 확인

## 제4절. 3년간 연구 수행 결과 요약 및 평가

### 1. 독소 산생 병원성 세균 예방 백신 개발과 안전성 및 효능 평가 (주관연구기관)

#### 가. 3년간 연구수행 내용 요약

##### (1) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체 백신 개발

- (가) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 고스트 유도에 특화된 PMAP-36, GI24, PGI, 마스토파란, buforin II 등 여러 AMP들 중에 최적의 고스트 유도 물질 PMAP-36, GI24 선별 하여 사균체 백신을 제작하고 투사 전자현미경(TEM)을 통해 확인하였다.
- (나) 선별한 AMP로 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 고스트 유도화 사균체 혼합 백신을 제조 하여 마우스에서 안전성 및 면역 반응 유도를 확인 한 결과 비백신 접종 그룹에 비하여 백신 그룹에서 면역 유도가 확인 되었다.
- (다) 재조합 Stx2e 독소이드를 마우스에 접종하여 백신의 안전성 및 면역 유도를 확인 한 결과 대조군 그룹에 비하여 독소이드 백신 그룹에서 항체 역가가 높게 확인되어 재조합 Stx2e 독소이드가 백신으로서의 효능을 확인함.

##### (2) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 개발

- (가) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신의 효능을 알아보기 위하여 재조합 Stx2eA 단백질+재조합 Stx2eB 항원을 이용한 돼지 부종병 진단을 위한 ELISA 진단법을 확립하였다.
- (나) 확립한 ELISA 진단법으로 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신을 이유 후 자돈에 접종하여 백신 항체 역가를 확인 함.
- (다) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신의 접종 횟수 및 시기 결정 실험을 해본 결과 5일령, 4주령에 2번 접종한 그룹에서의 항체 역가가 더 높은 것으로 확인되었다.
- (라) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 효능을 비교하기 위해 돼지 자돈에서 포르말린 백신과 비교 실험했을 때 포르말린 그룹에 비하여 월등히 높은 항체 역가를 확인 할 수 있었다.
- (마) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신의 농도 결정 실험에서 신개념 사균체  $2 \times 10^9$  cells에 재조합 Stx2e 독소이드 75ug이 가장 우수하게 백신 효능이 나타남을 확인하였다.

##### (3) *C. novyi* 신개념 사균체와 재조합 novyi 독소이드 혼합 백신 개발

- (가) *Clostridium novyi* 대량 배양을 위해 37°C 조건에서 3~5일간 정치 배양 한 결과 RCM 과 dRCM 배지에서 3일, 4일, 5일 모두 비슷한 균수 (약  $10^{6-7}$  cfu/ml)를 확인함.
- (나) AMP 중 GI24로 신개념 *C. novyi* 사균체 백신을 제조하여 투사 전자현미경(TEM)을 통해 고스트화를 확인하였다.
- (다) 재조합 novyi의 알과 독소이드의 안전성을 위해 음성 자돈에 2번 근육 접종한 결과 항체 역가는 높아지는 걸 확인 하였으나 야외독성 접종시 폐사율을 통하여 확인한 결과 독소이드 단독으로는 백신의 효능이 우수하지 않음을 확인하였다.

(라) 재조합 *C. novyi*의 알파독소이드의 독성 평가 결과 야외분리 *C. novyi*보다 10배 높은 세포독성이 확인되어 토끼에 재조합 *C. novyi* 알파독소이드를 접종한 결과 약한 세포 독성이 있음을 확인하여 vero cell에서의 안전성을 확인 재조합 *C. novyi*의 알파독소이드에서 야외분리 *C. novyi*보다 강한 독성이 확인되었다.

(마) 신개념 사균체와 재조합 *novyi* 독소이드 함유 백신 효능 평가를 위해 Guinea pig에 근육 접종한 결과

나. 대표적 연구성과

(1) 특허, 논문 등록 성과

No	논문명 (특허 제목)	학술지명	저자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI )	게재 일	등록번 호
1	Virulence-associated Genes and Antimicrobial Resistance of <i>Escherichia coli</i> Isolated From Post-weaning Piglets with Diarrhea in Korea	Journal of Bacteriology and Mycology	서병주, 문자영, 김원일, 정창기, 김원경, 허진	5(9)	미국	Austin Publishing Group	비SCI	2018. 12.26	
2	The protection efficacy of the enetrotoxic <i>Escherichia coli</i> vaccine candidate by GI24 against neonatal piglet colibacillosis	Korean Journal of Veterinary Service	최영환, 문자영, 서병주, 김원경, 조정상, 최민수, 임재삼, 김성복, 김원일, 허진	40(4)	대한 민국	Korean Veterinary Service	비 SCI	2017. 12.31	
3	개선된 고스트 장관 독소형 대장균을 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신		허진, 문자영, 김원경, 조정상, 문성철, 정호경		대한 민국		특허출원	2017. 11.10	10-201 7-0149 460

	조성물								
4	Stx2eA-C-말단 단편-Stx2eB-오량체 재조합 단백질을 항원으로 포함하는 돼지 부종병의 예방 또는 치료용 백신 조성물		허진, 박정희, 김원일, 김소영, 서병주, 정창기, 문자영, 김원경, 라오찌리, 문성철, 정호경, 박수연		대한민국		특허출원	2018.11.30	10-2018-0151647
5	개선된 고스트 장관 독소형 대장균을 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물		허진, 문자영, 김원경, 조정상, 문성철, 정호경		대한민국		특허출원	2019.05.09	10-2019-0054525
6	STX2EA-C-말단 단편-STX2EB-오량체 재조합 단백질을 항원으로 포함하는 돼지 부종병의 예방 또는 치료용 백신 조성물		허진, 박정희, 김원일, 김소영, 서병주, 정창기, 문자영, 김원경, 라오찌리, 문성철, 정호경, 박수연		국제특허		특허출원	2019.11.29	PCT/KR2019/016771
7	Stx2eA-C-말단 단편-Stx2eB-오량체 재조합 단백질 ; 및 F4를 발현하는 장관독소형 대장균 및		허진, 박정희, 김원일, 문성철, 정호경		대한민국		특허출원	2019.10.30	10-2019-0136134

	F18을 발현하는 장관독 소형 대장균 사균체 혼합 항원을 포함하는 돼지의 병원성 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물 돼지								
8	홍막폐렴균 (1형, 2형, 5형, 7형, 10형, 12형 및 15형) 불활화 사균체를 포함한 돼지 홍막폐렴 백신 조성물		허진, 김원일, 강은주, 문성철, 정호경		대한민국		특허출원	2020.02.10	10-2020-0015809
9	돼지 홍막폐렴균 (1형, 2형, 5형, 7형, 10형, 12형, 및 15형) 불활화 사균체를 포함한 돼지 홍막폐렴 백신 조성물		허진, 김원일, 강은주, 문성철, 정호경		대한민국		특허출원	2020.02.10	10-2020-0015809
10	이유 자돈의 대장균증을 예방하기 위한 재조합 P22 라이소자임-PM AP36 융합 단백질을 이용한		허진, 문성철, 정호경, 김미나		대한민국		특허등록	2019.07.09	10-2000120

	장내독소형 대장균 ETEC) 고스트 백신 조성물								
11	살모넬라 갈리나룸 사균체를 포함하는 가금 티푸스의 예방 또는 백신 조성물		허진, 탁동섭, 문자영, 문성철, 정호경, 박수연		대한 민국		특허등록	2019. 2.14	10-207 7701
12	개선된 고스트 장관 독소형 대장균을 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물		허진, 문자영, 김원경, 조정상, 문성철, 정호경		대한 민국		특허등록	2010. 04.07	110-21 00503
13	Stx2eA-C-말단 단편-Stx2eB-오 량체 재조합 단백질 ; 및 F4 를 발현하는 장관독소형 대장균 및 F18을 발현하는 장관독 소형 대장균 사균체 혼합 항원을 포함하는 돼지의 병원성 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물		허진, 박정희, 김원일, 문성철, 정호경		대한 민국		특허등록	2020. 04.14	10-210 3013
14	Stx2eA-C-말단 단편-Stx2eB-오 량체 재조합		허진, 박정희, 김원일,		대한 민국		특허등록	2020. 04.21	10-210 5021



	단백질을 항원으로 포함하는 돼지 부종병의 예방 또는 치료용 백신 조성물	김소영, 서병주, 정창기, 문자영, 김원경, 라오찌리, 문성철, 정호경, 박수연								
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

관인생략

**출원번호통지서**

출원 일자 2017.11.10  
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1063237)  
 출원 번호 10-2017-0149460 (잠수번호 1-1-2017-1117171-12)  
 출원인 명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9) 외 1명  
 대리인 성명 특허법인이클라온(9-2016-100061-5)  
 발명자 성명 허진 보지영 김원경 정호성 문성철 정호경  
 발명의 명칭 개선된 고스트 장관독소형 대장균을 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균  
 중의 예방 또는 치료용 백신 조성물

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행사항은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기리코드) - 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경경), 경정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
- 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받으지 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원용 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이며, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적요청서(PTO/SB359)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
- 본 출원 사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
- 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략

**출원번호통지서**

출원 일자 2018.11.30  
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1064972)  
 출원 번호 10-2018-0151647 (잠수번호 1-1-2018-1198856-45)  
 출원인 명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9) 외 1명  
 대리인 성명 특허법인이클라온(9-2016-100061-5)  
 발명자 성명 허진 박경희 김원영 김소영 서병주 정창기 문자영 김원경  
 라오찌리 문성철 정호경 박수연  
 발명의 명칭 Sst2eA-C-말단 단편 Sst2eB-오람체 재조합 단백질을 항원으로  
 포함하는 돼지 부종병의 예방 또는 치료용 백신 조성물

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행사항은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기리코드) - 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경경), 경정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
- 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받으지 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원용 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2019.05.09
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출조번호(1065749)
출원번호 10-2019-0054525 (접수번호 1-1-2019-0475926-29)
출원인명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9) 외 1명
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)
발명자성명 허진 문자영 김원경 조정상 문성철 정효경
발명의명칭 개선된 고스트 장관독소형 대장균을 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물

특허청장

<< 안내 >>

- 1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.

온라인제출 | 특허청 특허로

온라인제출 PCT-A/E로 작성된 PCT특허출원서류를 온라인으로 제출할 수 있습니다.
PCT 온라인제출안내

- 온라인 제출 절차 이해가 필요할 경우 문의하십시오.
- 제출물(도면)을 통해 접수하신 서류에 대한 접수결과 및 심사결과를 조회하실 수 있습니다.
- 수수료는 서식지침(가이드)에서 일정한 수수료 금액이며, 제출물자료의 허위작성 등 특허청 심사시스템에서 예상한 수수료와 다르거나 다를 수 있습니다.

접수일자: 2019년 11월 29일

Table with 5 columns: 접수번호, 국제출원번호, 접수일자, 국제출원일자, 수수료

- 1. 제출물(도면)을 통해 접수하신 서류에 대한 접수결과 및 심사결과를 조회하실 수 있습니다.
2. 제출물(도면)을 통해 접수하신 서류에 대한 접수결과 및 심사결과를 조회하실 수 있습니다.
3. 수수료는 서식지침(가이드)에서 일정한 수수료 금액이며, 제출물자료의 허위작성 등 특허청 심사시스템에서 예상한 수수료와 다르거나 다를 수 있습니다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2019.10.30
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출조번호(1066535)
출원번호 10-2019-0136134 (접수번호 1-1-2019-1109535-75)
출원인명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9) 외 1명
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)
발명자성명 허진 박정희 김원일 문성철 정효경
발명의명칭 Str2eA-C-말단 단편-Str2eB-오랑체 재조합 단백질; 및 F4를 발현하는 장관독소형 대장균 및 F18을 발현하는 장관독소형 대장균 사균체 혼합 항원을 포함하는 돼지의 병원성 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물

특허청장

<< 안내 >>

- 1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.02.10
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출조번호(1067054)
출원번호 10-2020-0015809 (접수번호 1-1-2020-0138945-40)
출원인명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9) 외 1명
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)
발명자성명 허진 김원일 강은주 문성철 정효경
발명의명칭 돼지 흉막외막균 (1형, 2형, 5형, 7형, 10형, 12형 및 15형)를 포함 사균체를 포함하는 돼지 흉막외막 백신 조성물

특허청장

<< 안내 >>

- 1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.

### 출원번호통지서

출원 일자 2020.02.10  
 특기 사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1067054)  
 출원 번호 10-2020-0015809 (접수번호 1-1-2020-0138945-40)  
 출원인 명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9) 외 1명  
 대리인 성명 특허법인이론티온(9-2016-100061-5)  
 발명자 성명 허진 김원일 강은주 문성철 정호경  
 발명의 명칭 돼지 흉막외형균 (1형, 2형, 5형, 7형, 10형, 12형 및 15형) 분  
 활화 사균체를 포함한 돼지 흉막외형 백신 조성물

### 특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) - 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록일 정 이점 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허 실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허마당-PCT/마드리드>  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출행위 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출행위 미공개상대이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자국고환허가서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.



**특허증**  
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2077701 호  
Patent Number

출원번호 제 10-2018-0163766 호  
Application Number

출원일 2018년 12월 18일  
Filing Date

등록일 2020년 02월 10일  
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention  
살모넬라 갈리나룸 사균체를 포함하는 기금 티푸스의 예방 또는 치료용 백신 조성물

특허권자 Patentee  
등록사항란에 기재

발명자 Inventor  
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.  
 This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2020년 02월 10일

**특허청장**  
COMMISSIONER,  
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

**박원주**

특허청  
Korean Intellectual Property Office



**특허증**  
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2000120 호  
Patent Number

출원번호 제 10-2017-0012339 호  
Application Number

출원일 2017년 01월 26일  
Filing Date

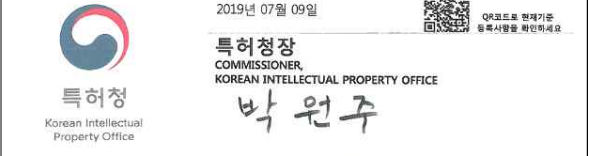
등록일 2019년 07월 09일  
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention  
이유 자원의 대장균증을 예방하기 위한 재조합 P22 라이소자임 - PMAP36 용합 단백질질을 이용한 장내독소형 대장균(ETEC) 고스트 백신 조성물

특허권자 Patentee  
등록사항란에 기재

발명자 Inventor  
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.  
 This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2019년 07월 09일

**특허청장**  
COMMISSIONER,  
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

**박원주**

특허청  
Korean Intellectual Property Office



**특허증**  
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2100503 호  
Patent Number

출원번호 제 10-2019-0054525 호  
Application Number

출원일 2019년 05월 09일  
Filing Date

등록일 2020년 04월 07일  
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention  
개신된 고스트 장관독소형 대장균를 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물

특허권자 Patentee  
등록사항란에 기재

발명자 Inventor  
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.  
 This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2020년 04월 07일

**특허청장**  
COMMISSIONER,  
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

**박원주**

특허청  
Korean Intellectual Property Office



(2) 학술대회 발표 성과

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국예방수의학회 2017년 추계학술대회	문자영, 김원경, Rao Zhili, 김소영, 박정희, 허진	2017. 11.3	청주, 충북대학교 계신문화관	대한민국
2	60주년 기념 (사)대한수의학회 국제학술대회	문자영, 김원경, 조정상, Enkhsaikhan Ochirkhuryag, 허진	2017.10.27	여수, 디오션리조트	대한민국
3	APVS2017 Wuhan China (Proceeding of the 8 <sup>th</sup> Asian Veterinary Society Congress)	문자영, 김원경, 조정상, 허진	2017.5.14	우한	중국
4	APVS2017 Wuhan China (Proceeding of the 8 <sup>th</sup> Asian Veterinary Society Congress)	정창기, 서병주, 김원일	2017.5.14	우한	중국
5	Conference Program	문자영, 조정상,	2018.02.24	방콕	대국

	TICEAS (The International Conference on Engineering and Applied Sciences), ICEASS (International Conference on Education and Social Sciences)	김원경, Enkhsaikhan Ochirkhuryag, 허진			
6	2018년 춘계학술대회	김원경, 문자영, 조정상, Enkhsaikhan Ochirkhuryag, 허진	2018.5.25	진주, 경상대학교 수의과대학	대한민국
7	APVS2019 (2019 아시아양돈수의사대회)	문자영, 김원경, Enkhsaikhan Ochirkhuryag, 이준우, 조영규, 김선민, 이제명, 문건일, 박소현, 이현민, 문성철, 정호경, 허진	2019.8.26	서울 Grand Hill Ton	대한민국

**포스터 제목:**

1. Expression of Recombinant Lysozyme-PMAP36 Fusion Protein and Protective Efficacy of the Fusion Protein-inactivated *Salmonella* Typhimurium Vaccine in a Murine Model
2. Generation of the Enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine candidate by lysozyme-PMAP36 fusion protein and protection efficacy against pig colobacillosis
3. Protection efficiency of a novel enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine candidate against pig colibacillosis
4. Characterization of *Clostridium novyi* isolated from sudden death cases in pigs in Korea
5. The Development of the Enterotoxigenic *Escherichia coli* ghost vaccine candidate by GI24 against post weaning piglet colibacillosis
6. The development of the enterotoxigenic *Escherichia coli* ghost vaccine candidate by GI24 against post weaning piglet colibacillosis
7. The protective efficacy of the recombinant B-subunit proteins of Stx2e against edema disease in post weaning piglets

#### 다. 종합평가

- (1) 본 연구과제를 통해 신개념 사균체 유도 AMP를 확립하여 성공적인 고스트화 유도를 할 수 있었음.
- (2) 또한 재조합 독소이드 백신 단독이 아닌 신개념 사균체와의 혼합 백신이 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방의 효과가 더 우수하다는 결과를 확인할 수 있었음.
- (3) 전염성 가스 괴저 예방 단독 백신은 목적동물인 돼지에서의 확인은 할 수 없었지만 재조합 독소이드와 신개념 사균체 혼합 백신으로의 효능이 있음을 시사하였다.
- (4) 결론적으로 본 연구과제를 통하여 Stx2e가 혼합된 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 개발 및 *C. novyi* 알파 독소이드 함유 전염성 가스 괴저 예방 단독 백신 개발을 성공적으로 수행하였다.

## 2. 돼지 급사 관련 병원성 세균에 의해 산생되는 독소 대량 발현 시스템 구축 (2세부연구기관)

### 가. 3년간 연구수행 내용 요약

#### (1) 부종병 관련 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소 대량 발현 시스템 구축

(가) Stx2eAB<sub>5</sub>의 유전자 정보에 대한 삼차원적 구조를 기반으로 부종병 관련 Stx2e 독소의 A-subunit와 B-subunit 단백질들을 발현하기 위한 재조합 벡터를 성공적으로 제작하였음. 각각의 벡터는 Stx2eA full, Intein-Stx2eA fragment, Intein-Stx2eB, Stx2eB-his 단백질을 발현하는데 사용되며 다양한 construct를 제작하여 그 중에서 발현 효율이 가장 높은 벡터를 선별하였음.

(나) 기존에 알려진 *C. novyi* 알파독소 및 분리 균주 유래 *C. novyi* 알파 독소를 발현하기 위한 재조합 벡터를 성공적으로 제작하였음. 알려진 *C. novyi* 알파 독소의 경우 N-도메인 부분만을 발현하도록 설계되어 Catalytic domain and Protease domain만을 포함하고 있고, C-말단에 histidine tag를 한 경우에 가장 높은 발현효율을 나타냄을 확인함.

(다) Stx2e 독소 및 *C. novyi* 알파 독소는 다양한 strain의 *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 발현 조건을 탐색하여 그 중 가장 높은 발현량을 갖는 세포주를 선별함. Stx2e 독소의 경우 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 및 *E. coli* C43 (DE3)에서 높은 발현량을 보였으며, *C. novyi* 알파 독소의 경우 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS에서 가장 높은 발현량을 나타냄.

#### (2) 재조합 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소 정제 시스템 구축

(가) Stx2e 독소를 순수정제하기 위해 단백질이 발현된 세포를 초음파 분쇄법으로 파쇄한 후 니켈 컬럼이 연결된 FPLC를 사용한 친화 크로마토그래피 방법으로 한 번의 수행으로 목적 단백질을 순수분리하는데 성공함. 목적 단백질이 포함된 fraction을 농축하여 항원으로 사용할 Stx2e 독소 단백질을 획득함.

(나) 알려진 *C. novyi* 알파독소를 순수정제하기 위해 앞서 사용했던 니켈 컬럼이 연결된 FPLC를 사용한 친화 크로마토그래피 방법으로 한 번의 수행으로 목적 단백질을 순수분리함. *C. novyi* 알파독소의 경우는 발현량이 높고 순수정제 후 순도가 높은 목적 단백질을 획득하였음.

#### (3) 재조합 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산을 위한 시스템 개선

(가) Stx2e 독소를 순수정제한 이후 농축 시에 침전이 생기는 것을 확인하여 이를 개선함. 순수 정제시에 사용하는 버퍼 시스템에서 NaCl의 농도를 높여 사용함으로써 정제 및

농축시에 침전으로 인한 손실이 줄어들.

(나) 알려진 *C. novyi* 알파독소의 경우 구축된 정제 시스템을 통해 고순도, 고농도의 목적 단백질을 수득할 수 있었음.

(다) 순수 정제된 재조합 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소의 경우 장기 보관시의 안정성을 증진시키기 위해 글리세롤을 첨가하여 안정성을 획득하였음.

나. 대표적 연구성과

(1) 특허, 논문 등록 성과(제7장 참조)

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Improved Expression and Functional Characterization of Recombinant Putative Lysozyme-PMA P36 Fusion Protein	Molecules and cells	Rao Zhil, 김소영, 박정희	42(3)	대한민국	The Korean Society for Molecular and Cellular Biology	SCI	2019. 3. 31	

(2) 학술대회 발표 성과

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2017 International Meeting of Federation of Korean Microbiological Societies	Rao Zhili, 김소영, 이하현, 허진, 박정희	2017.11.03	일산, KINTEX	대한민국
2	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	Rao Zhili, 김소영, Zhang Yixian, Lee Syotong, 김원일, 허진, 박정희	2018.10.12	The-K 호텔, 서울	대한민국
3	2019 한국생물공학회 추계 학술발표대회 및 국제심포지엄	김다솜, 김소영, 서병주, 문자영, Rao Zhili, 박민호, 정창기, 허진, 김원일, 박정희	2019.10.10	대구 EXCO	대한민국

다. 종합평가

- (1) 본 연구과제를 통해 재조합 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소의 유전체를 획득하여 발현 벡터를 제작하였고 이를 *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 성공적으로 발현하였음.
- (2) 발현된 재조합 Stx2e 및 *C. novyi*의 알파 독소는 한 번의 친화 크로마토그래피의 수행으로 간단하게 순수 정제하였으며 이를 농축하여 항원으로 사용하였음. 본 재조합 Stx2e 단백질 접종한 Black mouse, Rabbit, Pig에서 얻은 혈청은 재조합 단백질뿐만 아니라 F18+, Stx2e+ *E. coli* 야외 분리 주에서 분비하는 독소를 검출함으로써 백신으로 사용될 수 있음을 시사함.
- (3) 결론적으로 본 연구과제를 통해 달성하려는 최종 목표인 Stx2e가 혼합된 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 개발 및 *C. novyi* 알파 독소이드 함유 전염성 가스괴저 예방 단독 백신 개발에 요구되는 독소이드 항원의 생산을 성공적으로 수행하였음.

3. 돼지 부종병 및 전염성 가스괴저 예방 백신 사업화 (협동연구기관)

가. 3년간 연구수행 내용 요약

- (1) 재조합 stx2e 발현 개선된 방법에 따라 대량생산 시스템 구축
- (2) 재조합 stx2e 대량 생산 및 돼지를 이용한 재조합 stx2e 독소 기능 확인
  - (가) 세포독성을 나타내는 재조합 Stx2e를 불활화하여 백신에 사용하는 대신 독성이 없는 상태로 발현되는 stx2e toxoid를 백신 성분으로 사용 결정
- (3) 대량 생산된 stx2e 독소 단백질 불활화 평가 및 안전성 평가
- (4) F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작
- (5) 재조합 stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작
- (6) 제작된 시제품 안전성 평가
- (7) 재조합 *C. novyi*의 알파 독소 대량 생산
- (8) 대량 생산된 재조합 *Cl. novyi*의 알파 독소 불활화 및 안전성 평가
- (9) 돼지 부종병 백신의 임상시험 승인을 위한 계획서 작성

나. 대표적 연구성과

- (1) 제품 개발 성과

NO	품목명(임시)	품목명(영어)
1	프로백 부종병 고스트	PRO-VAC Edema ghost
2	프로백 부종병 독소	PRO-VAC Edema toxoid

다. 종합평가

- (1) 돼지 부종병에 대한 신개념 고스트 사균체와 재조합 독소이드 혼합 시험백신을 제조하여 안전성과 효능 확인
- (2) 돼지 부종병 재조합 독소이드 시험백신을 제조하여 안전성과 효능 확인



- (3) 두 백신이 모두 이류 자돈의 설사증상 안정화와 부종병 임상증상의 완화에 효능이 있음을 확인하였고, 각각의 백신에 대한 유효기간 설정을 위해 일정 기간마다 안전성 확인 시험 진행 중
- (4) 가스괴저에 대한 신개념 고스트 사균체와 재조합 독소이드 혼합 백신을 실험실내 시험 백신 형태로 제조하였으며 해당 백신의 실험동물에서 안전함이 확인됨

# 제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 제1절. 연차별 목표 및 내용

### 1. 1차년도

#### 가. 개발 목표 및 내용

##### (1) 선행연구

#### 선행 연구

가. 돼지에서 이유 후 자돈에서의 병원성 대장균에 의한 설사병 및 부종병 예방을 위한 백신 후보군 개발

○ F4+ ETEC 및 F18+ ETEC 그리고 F18+, Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체 백신 개발

- 이유 후 자돈은 F4+ ETEC 및 F18+ ETEC에 의해 설사를 야기함.
- F18+, Stx2e+ *E. coli*에 의해 부종병을 야기함.
- 따라서 이유 후 자돈에서의 병원성 대장균에 의한 설사와 부종병을 예방하기 위한 일환으로 우선 대장균에 특화된 antimicrobial peptide (AMP)의 한 종류인 GI24를 이용하여 F4+ ETEC 및 F18+ ETEC 그리고 F18+, Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균 백신을 제조하여 신개념 사균체 유도 여부를 전자현미경을 관찰함.
- 그림 1에서 보는 것처럼, GI24로 처리하지 않은 ETEC strain은 온전한 세포막과 세포내에 가득찬 세포 내용물이 관찰되었다 (그림 A). 반면, GI24에 의해 신개념 사균체화된 각 ETEC 균들은 그림 B에서 보는 것처럼 하나의 구멍이 뚫린 세포막과 더불어 빈 세포질 공간이 관찰되었다.

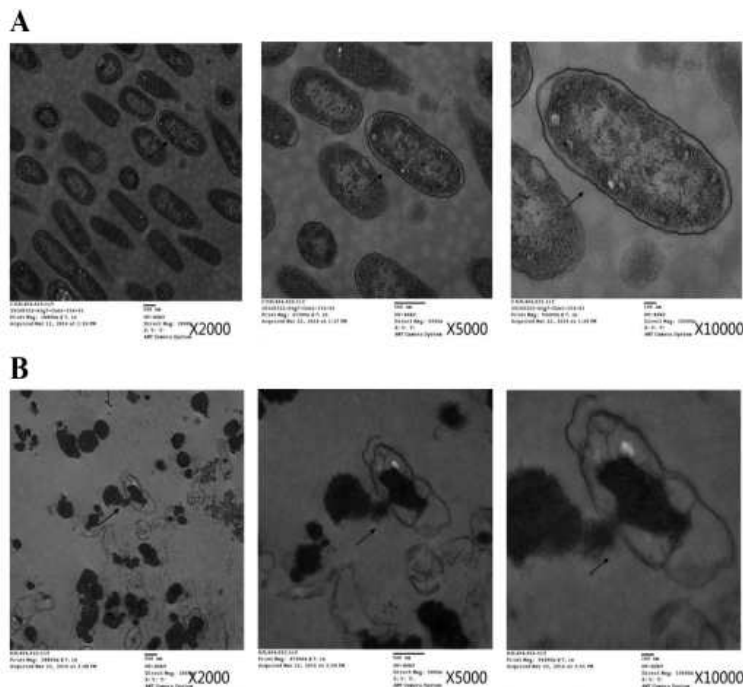


그림 1. 전자현미경 사진. (A) GI24 미처리 군 (B) GI24 처리 군

○ 자돈에서의 이들 신개념 사균체 백신의 효능 평가

- 포유자돈을 구입하여 그농도로 그룹별로 접종하였다. 즉, Group A의 돼지들은 control으로, 멸균 PBS 2ml로 접종했다. Group B 돼지들은 2ml의 PBS에  $2 \times 10^9$  the mixture of ETEC 선택백신으로 면역했다 (mixture는  $1 \times 10^9$  cells of each ETEC vaccine candidate 포함).
- 혈액 sample은 0 (immunization 전) 그리고 2 (도전감염 전) WPI (weeks post immunization)로 채취했다.
- 각 K88ac 및 FedA에 대한 항체 역가를 측정했다.
- 방어 효과를 확인해 보기 위해 병원성 대장균인 F4+, LT+, STa+ ETEC와 F18+, STa+ ETEC 균주로 경구 접종했다.
- **백신접종 후 유도된 면역 반응**

백신 접종 된 자돈을 대상으로 K88ac 및 FedA 항원에 대한 각 자돈 혈청 IgG의 항체 역가는 그림 2에 나타나 있다. 즉, K88ac 및 FedA에 대한 혈청 IgG의 역가들은 대조군에 비해 접종군에서 유의있는 항체 역가의 증가가 관찰되었다 ( $P \leq 0.05$ ).

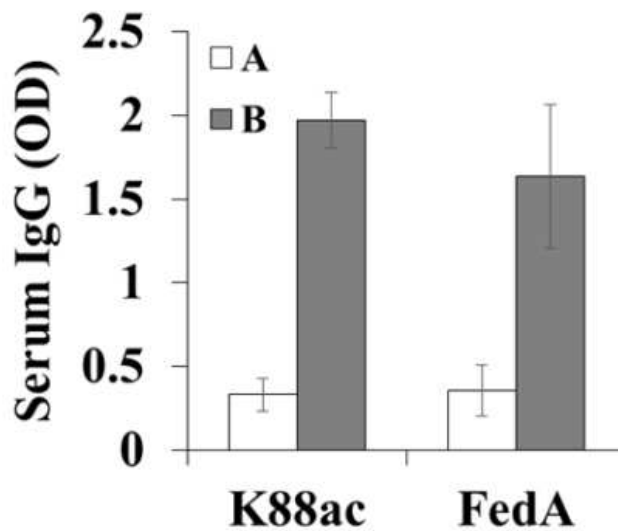


그림 2. 각 항원에 대한 혈청 항체 역가. Group A : 대조군, group B : 백신 접종군

- 도전감염에 대한 방어 효과

모든 포유자돈은 생후 4주령 쯤에 경구로 도전감염 되었다. Group B에 속해있는 10마리의 신생자돈 사이에서 단 한 마리도 설사를 하지 않았으며, 도전감염 14일 후까지 한 마리의 새끼돼지도 폐사하지 않았다. 이와 대조적으로, Group A의 자돈 10마리 중 7마리 (70%)에서 설사가 관찰됐으며(도전감염 3일 후), 3마리(30%)는 심한 설사로 사망하였다.

나. 이유후 자돈에서 부종병과 관련된 주요 독소인 Stx2e 재조합 단백질 발현 시스템 개발

○ Stx2e 유전자 확보

- 실험실에서 분리한 F18+, Stx2e+ 대장균을 선택하여 표 1에서와 같은 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 유전자를 확보하였다.

표 1. Stx2e 클로닝을 위해 사용된 프라이머

Target gene	Sequence	Size
Stx2eA NcoI F	GCA CTC CCA TGG CCA AGT GTA TAT TGT TAA AG	954
Stx2eA XhoI R	GCA CTC CTC GAG TTC ACC AGT TGT ATA TAA AG	
Stx2eB NcoI F	GCA CTC CCA TGG CCA AGA AGA TGT TTA TAG C	258
Stx2eB XhoI R	GCA CTC CTC GAG GTT AAA CTTT CAC CTG GGC	

- Stx2e 클로닝

확보된 Stx2e의 A subunit과 B subunit 그리고 Stx2e 전체 유전자를 상용화된 발현 벡터인 modified pET30a 등에 cloning 한 후 F18+, Stx2e+ 대장균에 형질전환 되었다.

○ 실험 결과

- 유전자 확보 : PCR을 통해 유전자를 확보 한 후 sequencing을 통해 최종 확인하였다.

**ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCCATGAAGTGTATATTGT**  
**TAAAGTGGATACTGTGTCTGTTACTGGGTTTTTCTTCGGTATCCTATTCCCAGGAGTTTA**  
**CGATAGACTTTTCGACTCAACAAAGTTATGTATCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGC**  
**GATATCGACCCCTCTTGAACATATATCTCAGGGAGCTACATCGGTATCCGTTATTAAT**  
**CATACACCACCAGGAAGTTATATTTCCGTAGGTATACGAGGGCTTGATGTTTATCAGG**  
**AGCGTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAACGAAATAATTTATATGTGGCTGGATTT**  
**GTTAATACGACAACAAATACTTTCTACAGATTTTCAGATTTTGCACATATATCATTGCC**  
**CGGTGTGACAACACTATTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTGTC**  
**GCAGCGCTGGAACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCACTCACTGGTTTCATCATATC**  
**TGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATAACAATGACCAGAGATGCATCAAGAGCAGTTC**  
**TGCGTTTTGTCACTGTCACAGCAGAAGCCTTACGGTTCAGGCAAATACAGAGAGAATT**  
**TCGTCTGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTTTATACGATGACGCCGGAAGACGTGGAC**  
**CTCACTCTGAACTGGGGGAGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGCT**  
**GGTGTCAAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTTGGTACTGTGG**  
**CCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGCGCGCGTTCGTTCGCGCCGTGAATGAAGA**  
**GAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAATAAACAATAC**  
**ATTATGGGAAAGTAATACAGCAGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTCTTTATAT**  
**ACAACCTGGTGAAGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAG** **CACCACCACCACCACCAC**  
**TGA**

그림 3. 확보된 Stx2A 유전자

- 발현 및 정제

발현 및 정제된 Stx2e 항원을 15% SDS-PAGE로 확인하였다.

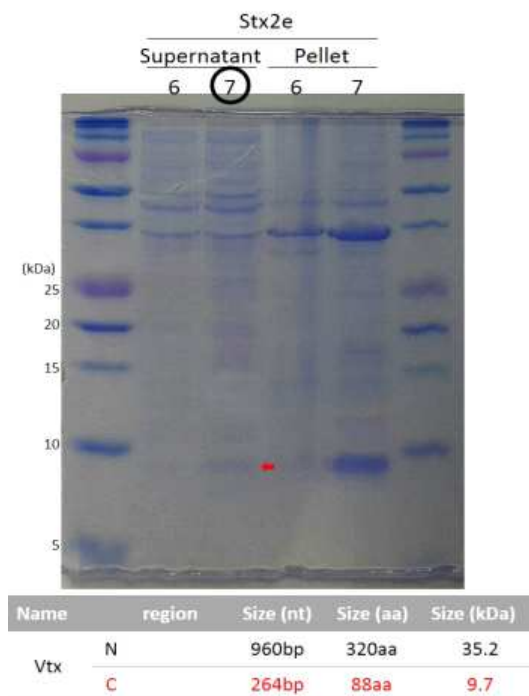


그림 4. 클로닝 후 발현 SDS-PAGE로 확인

○ 발현 정제된 재조합 Stx2e 독성 확인

- Circular dichroism spectroscopy

이 융합 단백질의 이차 구조와 folding properties를 평가하기 위해, 정제된 이 융합 단백질은 far-UV Circular dichroism (CD) spectroscopy (JASCO J-1500 spectropolarimeter, wavelength range of 190 nm to 260 nm)로 측정하여 본 결과, 그림 5에서 보는 바와 같이 PMAP36과 P22 lysozyme-PMAP36 융합 단백질에서는 208과 222nm에서 두 개의 전형적인 negative bands 관찰되어 helical 구조가 확인되었다. 다른 한편, 그림 5에서 보는 바와 같이 PMAP36과 P22 lysozyme-PMAP36과 큰 차이점이 발견 되지 않는다는 것은 융합에 따라 PMAP36의 helical 구조가 큰 영향을 받지 않았다는 것을 보여주는 결과이다.

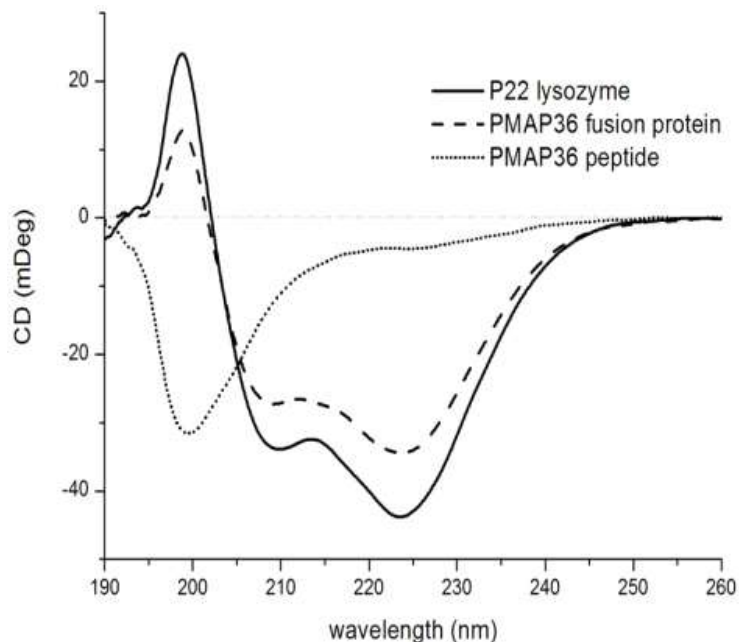


그림 5. P22 lysozyme, PMAP36 펩타이드 그리고 P22 lysozyme-PMAP36 융합 단백질의 이차 구조 확인을 위한 Circular dichroism (CD) spectroscopy

- 실험동물 및 목적동물에서의 Stx2e 독성 확인

- ① 발현 정제된 재조합 Stx2e와 F18+, Stx2e+ *E. coli*에서 획득한 Stx2e를 세포 독성시험으로 비교하여 본 결과, 재조합 Stx2e 단백질 또한 자연상태에서 발현된 Stx2e와 같은 세포 독성이 존재함을 확인하였다.
- ② 현재 발현된 재조합 Stx2e를 마우스 및 육성돈에 접종하여 부종병 및 폐사 여부를 확인해 본 결과, 접종된 마우스 5마리 모두 접종 다음 날 독성으로 인해 폐사하였으며, 접종된 돼지에서는 전형적인 돼지 부종병 증상이 관찰되었다.

- Western blot으로 Stx2e 확인

재조합 Stx2e 단백질을 SDS-PAGE 후 PVDF membrane으로 이 독성 단백질을 이동시킨

후 부종병이 확인된 돼지 혈청으로 반응 여부를 확인하여 본 결과, 단일 밴드가 확인되었다.

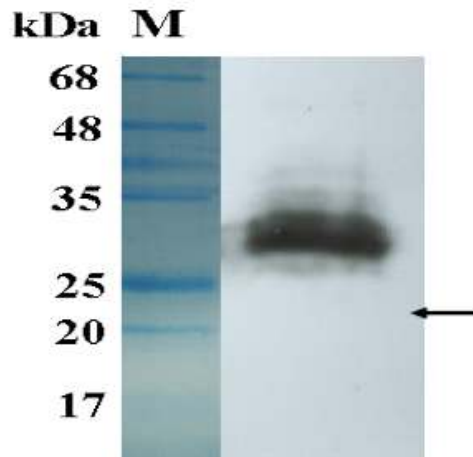


그림 6. Western blot 결과. 재조합 Stx2e 단백질에 대한 부종병이 발현된 돼지 혈청으로의 반응 여부 확인

○ 발현 정제된 재조합 Stx2e의 불활화 여부 확인

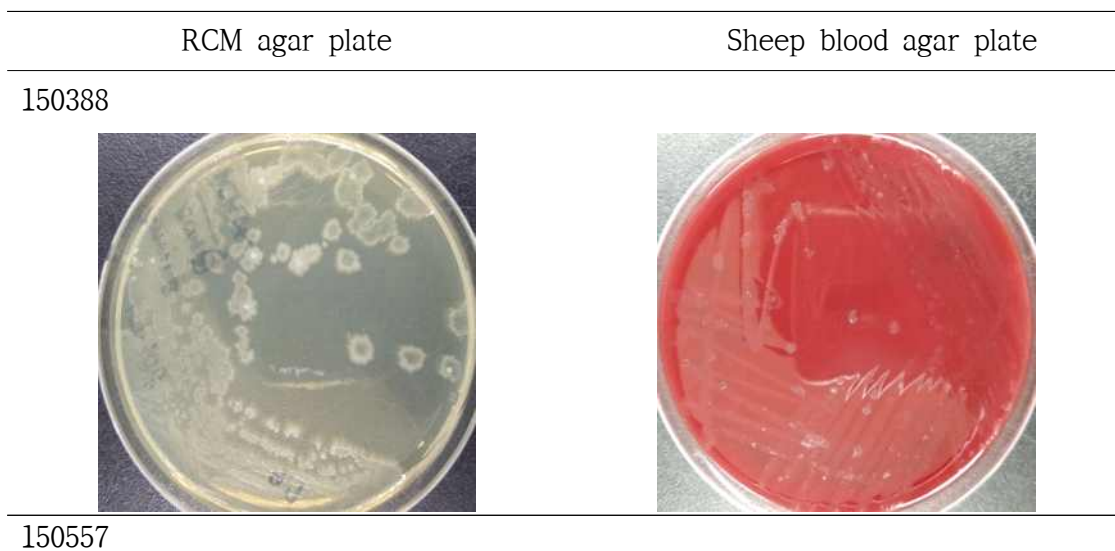
- 실험동물에서의 재조합 Stx2e 독소이드의 안전성 시험

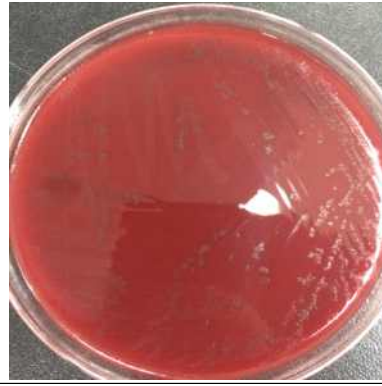
- ① 발현 정제된 Stx2e 재조합 독소 현재 포르말린으로 불활성화 시켰다.
- ② 이의 확인을 위해 토끼에 접종하여 본 결과, 아무런 임상 증상이 관찰됨 않아 불활성화를 확인할 수 있었다.

다. 전염성 가스괴저를 보이는 모든으로부터 *Clostridium novyi* 균 분리 및 특성분석

○ 급사한 13건의 모든으로부터 *C. novyi*를 분리하였다.

- *C. novyi*는 colony 모양은 불규칙적이며 colony 마다의 경계가 불분명하였다. 그리고 sheep blood agar plate에서 또한 colony 마다의 경계가 불분명하였고, beta-용혈을 관찰할 수 있었다. 또한 동일한 type의 균주도 고체 배지 상에서 증식하는 모양이 상이하였다 (그림 7).





150564



150775



그림7. 순수 분리한 *C. novyi*의 colony

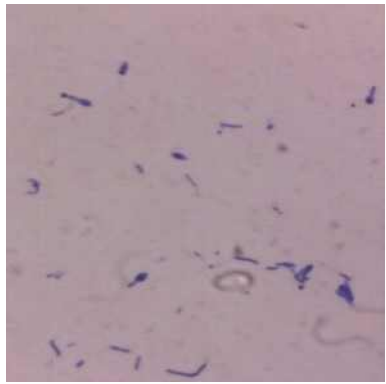
- 그람염색

그람염색 결과, 4개의 케이스 모두 그람양성(보라색) 간균을 관찰 할 수 있었고, 아포가 형성 중인 것으로 사료되어지는 균체들도 관찰되었다 (그림 8).

150388

150557





150564



150775



그림 8. crystal violet으로 염색된 *C. novyi*

- *Clostridium novyi* 감별 PCR

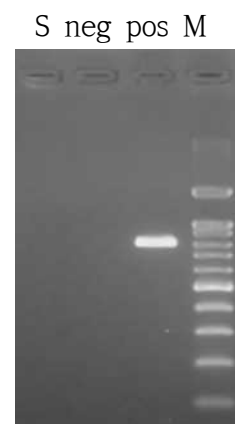
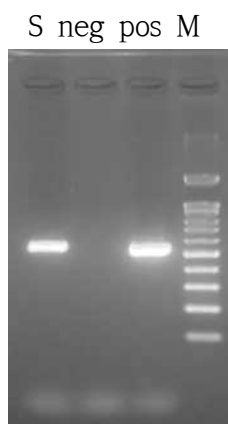
유전자 증폭은 *C. novyi*에 대한 specific primer을 사용하였고, 유전학적으로 상동성이 높은 *C. haemolyticum*에 대한 specific primer도 같이 사용하였다. 그 결과 총 4개의 케이스에서 *C. novyi* 양성으로 진단되었다 (그림 9).

*C. novyi* type A primer

*C. novyi* type B primer

*C. haemolyticum* primer

150388

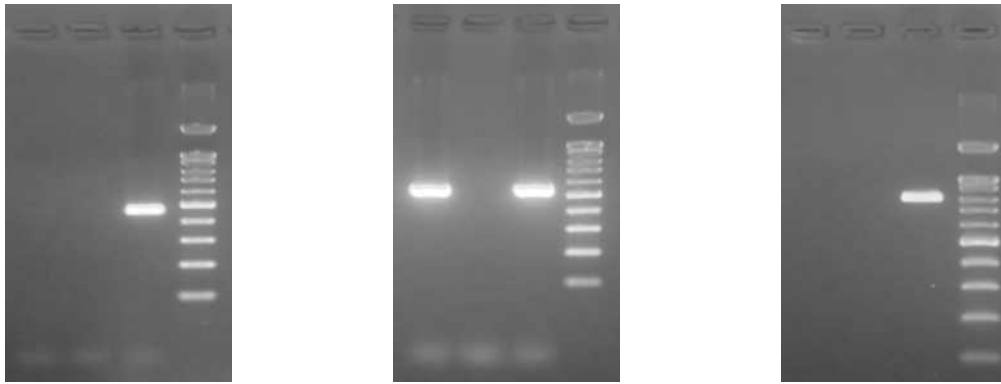


150557

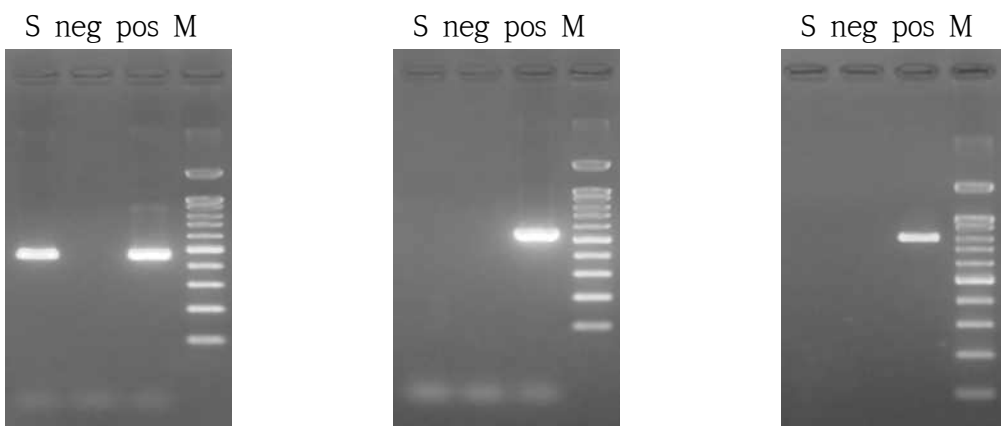
S neg pos M

S neg pos M

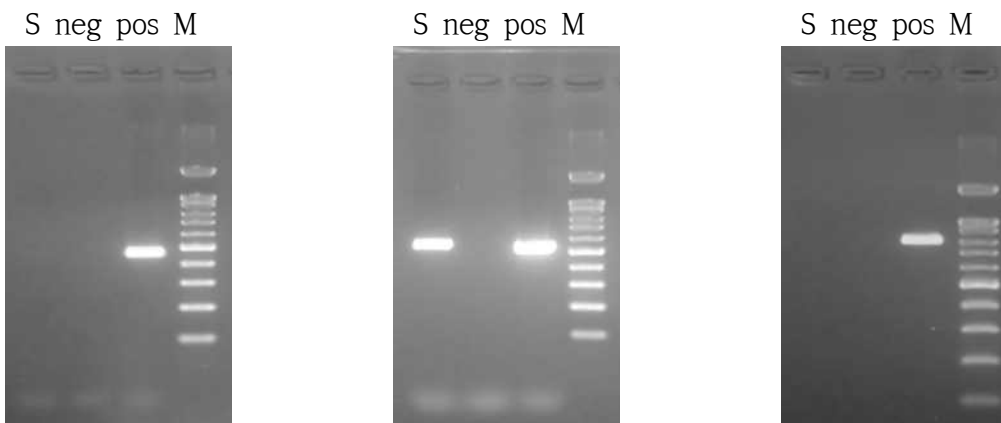
S neg pos M



150564



150775



S: Sample, neg: Negative, \*pos: Postive

\*pos : *C. novyi* type A-472bp, *C. novyi* type B-551bp, *C. haemolyticum*-819bp

그림 9. PCR 검사 결과

- 세균 동정

4개 케이스에서 분리된 *C. novyi*에 대한 분자생물학적 유사성을 확인한 결과, *C. novyi*

와 99% 이상의 유사성을 확인할 수 있었다.

1차 년도		
개발 목표	개발 내용	책임자(소속기관)
독소 산생 병원성 세균 예방 백신 개발 과 안전성 및 효능 평가	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 유도에 적합한 AMP 선별	허진 (전북대학교 산학협력단)
	국내 돼지로부터 분리된 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 백신 제작	
	신개념 사균체만을 혼합한 백신 후보군 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	
	재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스에 접종하여 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	
	신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	
부종병 관련 Stx2e 독소 대량 발현 시스템 구축 및 정제	발현 벡터 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선	박정희 (전북대학교 산학협력단)
	발현 host 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선	
	발현된 Stx2e 독소 단백질의 Western blot을 통한 기능 확인	
	발현된 독소 정제 과정 개선을 통한 간소화	
재조합 Stx2e 독소 단백질 대량 생산 및 불활화	재조합 Stx2e 발현 개선된 방법에 따라 대량 생산 시스템 구축	장주현 (주)코미팜
	재조합 Stx2e 대량 생산 및 돼지를 이용한 재조합 Stx2e 독소 기능 확인	
	대량 생산된 Stx2e 독소 단백질 불활화 및 안전성 평가	

## 2. 2차년도

### 가. 개발 목표 및 내용

2차 년도		
개발 목표	개발 내용	책임자(소속기관)
목적동물에서의 백신의 안전성 및 효능 평가 및 <i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선 및 신개념 사균체화 유도	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 돼지를 대상으로 접종량 결정 시험	허진 (전북대학교 산학협력단)
	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 접종 횟수 및 시기 결정 시험	
	<i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선을 통한 대량 배양 기술 확립	
	개선된 대량 배양 기술에 기반한 <i>C. novyi</i> 신개념 사균체화 유도 및 신개념 사균체의 안전성 확인	
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 백신의 돼지에서 효능 평가	
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가	
전염성 가스 괴저 관련 독소 대량 발현 시스템 개선 및 기능 확인	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산을 위한 발현 시스템 및 정제 시스템 개선	박정희 (전북대학교 산학협력단)
	발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소의 단백질 구조 확인	
	발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 전염성 가스 괴저 돼지로부터 획득한 혈청을 이용한 Western blot을 이용한 기능 확인	
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소대량 생산을 위한 정제 방법 개선	
개발 백신의 시제품 제작 및 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산 및 불활화	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작	장주현 (주)코미팜
	제작된 시제품 안정성 평가	
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산	
	대량 생산된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 불활화 및 안전성 평가	

### 3. 3차년도

#### 가. 개발 목표 및 내용

3차 년도		
개발 목표	개발 내용	책임자(소속기관)
전염성 가스 괴저 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 국내 또는 국제적으로 효능이 인정된 돼지 부종병 예방 백신 (IDT사의 ECOPORC SHIGA 등)과의 효능 비교 평가	허진 (전북대학교 산학협력단)
	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 독소이드와 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ stx2e <i>E. coli</i> 각각과의 혼합 백신과의 비교 평가	
	독소중화시험	
	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지부종병 혼합 백신 돼지에서 안전성 시험	
	<i>C. novyi</i> 신개념 사균체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 효능 평가	
재조합 Stx2e 및 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산을 위한 시스템 개선	백신 제조 산업체에서 대량 생산을 위한 재조합 독소 발현 시스템 개선	박정희 (전북대학교 산학협력단)
	제조 공정 과정을 줄이기 위한 정제 방법 개선	
	재조합 Toxoid의 독성 감소효과를 위한 mutagenesis 연구	
	정제된 재조합 독소 단백질의 안정성 평가	
돼지 전염성 가스 괴저 백신 시제품 개발 및 양돈장에서의 백신의 효능	<i>C. novyi</i> 신개념 사균체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 혼합 백신 시제품 제작	정호경 (주)코미팜
	제작된 시제품 안정성 평가	
	돼지 부종병이 만연된 양돈장을 대상으로 백신의 안전성 및 효능 평가	

## 제2절. 연구개발 평가방법

### 1. 연구개발 성과 목표 핵심사항 요약

- 가. F4+ ETEC, F18+ ETEC 신개념 사균체 예방 백신 개발 여부 : 균주 기탁 및 신개념 사균체 개발 특허 출원 (10-2017-0149460, 10-2019-0054525), 특허 등록 (10-2000120)
- 나. 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 개발 여부 : 발현 및 정제된 재조합 독소이드 부종병 예방 백신 국내 특 출원 (10-2018-0151647, 10-2019-0136134), 특허 등록 ( 및 국제 특허 출원 (PCT/KR2019/016771)
- 다. *Clostridium novyi* 신개념 사균체 예방 백신 개발 여부 : 신개념 사균체 돼지 가스 괴저 예방 백신 특허 출원 준비 중
- 라. 재조합 *C. novyi* 알파 독소이드 예방백신의 개발 여부 : 재조합 *C. novyi* 알파 독소이드 예방백신 특허 출원 준비 중
- 마. 개발 백신 산업체 기술이전 : 기술이전 2건 및 기술이전 된 백신개발 2건 시제품 제작

### 2. 연차별 평가방법 세부사항

연구기간 (년차)	평가 항목	평가방법
1차년도 ( '17)	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 유도에 적합한 AMP 선별	• 사업화에 최적인 신개념 사균체 유도에 적합한 AMP 및 화학제 선별 유무
	국내 돼지로부터 분리된 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 백신 제작	• 선별된 AMP 나 화학제를 이용한 신개념 사균체 백신 제작 여부
	신개념 사균체만을 혼합한 백신 후보군 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	• 마우스에서의 신개념 사균체 백신의 실험 여부
	재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스에 접종하여 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	• 재조합 Stx2e 독소이드 제작여부 • 마우스에 접종 여부
	신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 마우스 접종 여부
	발현 벡터 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선	• 대량 생산 여부
	발현 host 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선	• 대량 생산 여부
	발현된 Stx2e 독소 단백질의 Western blot을 통한 기능 확인	• Western blot 결과

	발현된 독소 정제 과정 개선을 통한 간소화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발현 간소화 여부</li> </ul>
	재조합 Stx2e 발현 개선된 방법에 따라 대량 생산 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2차년도 연구에 필요한 펩타이드 확보여부</li> </ul>
	재조합 Stx2e 대량 생산 및 돼지를 이용한 재조합 Stx2e 독소 기능 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지에서의 접종 여부</li> </ul>
	대량 생산된 Stx2e 독소 단백질 불활화 및 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포 조직 및 돼지를 대상으로 한 안전성 평가 여부</li> </ul>
2차년도 ( '18)	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 돼지를 대상으로 접종량 결정 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다양한 접종량으로 돼지 접종 여부</li> </ul>
	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 접종 횟수 및 시기 결정 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지를 대상으로 한 실험 여부 확인</li> </ul>
	<i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선을 통한 대량 배양 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 균체 배양 기술 개선 여부</li> </ul>
	개선된 대량 배양 기술에 기반한 <i>C. novyi</i> 신개념 사균체화 유도 및 신개념 사균체의 안전성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 신개념 사균체 유도 여부</li> </ul>
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 백신의 돼지에서 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지에서의 실험 수행 여부</li> </ul>
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지에 접종하여 안전성 평가 확인 여부</li> </ul>
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산을 위한 발현 시스템 및 정제 시스템 개선	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대량 생산 여부</li> </ul>
	발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소의 단백질 구조 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 단백질 구조 확인 여부</li> </ul>
	발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 전염성 가스 괴저 돼지로부터 획득한 혈청을 이용한 Western blot을 이용한 기능 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Western blot 결과 여부</li> </ul>
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소대량 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대량 생산 여부</li> </ul>

	을 위한 정제 방법 개선	
	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시제품 제작 여부</li> </ul>
	제작된 시제품 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시제품의 안정성 평가 결과</li> </ul>
	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대량 생산 여부</li> </ul>
	대량 생산된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 불활화 및 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 실험동물을 활용한 부작용 여부 관찰</li> </ul>
3차년도 ( '19)	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 국내 또는 국제적으로 효능이 인정된 돼지 부종병 예방 백신 (IDT사의 ECOPORC SHIGA 등)과의 효능 비교 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 시판 상업용 백신과의 효능 비교 여부</li> <li>• 국내 시판 백신 부재 시 대체 실험 수행 여부</li> </ul>
	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 독소이드와 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ stx2e <i>E. coli</i> 각각과의 혼합 백신과의 비교 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사균체만, 독소이드만 혼합 백신 접종 여부</li> </ul>
	독소중화시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 중화 항체를 이용한 실험 여부</li> </ul>
	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 혼합 백신 돼지에서의 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지에 접종 후 부작용 확인 여부</li> </ul>
	<i>C. novyi</i> 신개념 사균체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지에 접종 여부</li> <li>• 또는 대체 실험동물 (도전감염 후 증상이 발현되지 않을 경우)에서의 실험 수행 여부</li> </ul>
	<i>C. novyi</i> 신개념 사체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지에 접종 후 부작용 확인 여부</li> </ul>
	백신 제조 산업체에서 대량 생산을 위한 재조합 독소 발현 시스템 개선	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대량 생산 여부</li> </ul>
	제조 공정 과정을 줄이기 위한 정제 방법 개선	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다양한 정제 방법 시도 여부</li> </ul>
	재조합 Toxoid의 독성 감소효과를 위한 mutagenesis 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 변형 Stx2e 독소이드 돼지에서의 안전성 평가 여부</li> </ul>
	정제된 재조합 독소 단백질의 안정성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 안정성 평가 결과</li> </ul>



	평가	
	<i>C. novyi</i> 신개념 사균체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 혼합 백신 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 또는 대체 실험동물에서의 실험 여부</li> </ul>
	제작된 시제품 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>안정성 평가 결과</li> </ul>
	돼지 부종병이 만연된 양돈장을 대상으로 백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>양돈장에서의 실험 수행 여부</li> </ul>

### 3. 사업화 및 연구기반 평가지표

(단위 : 백만원, 건수, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10		5	15	40			20										
최종목표	3	2		1	83	2					5	1	2.5	6		4			
1차년도	1											1		2					
2차년도	1	1						1			2		1	2	2				
3차년도	1	1		1	83	1					3		1.5	2	2				
4차년도																			
5차년도																			
소 계	3	2		1	83	1					5	1	2.5	6		4			
종료 1차년도						1	10												
종료 2차년도							30												
종료 3차년도							60	15											
종료							1,2	90											

4차년도						00	0												
종료																			
5차년도																			
소 계						1													
합 계	3	2		1	83	2	2,200	1,050				5	1	2.5	6		4		

#### 4. 기술이전 계약서

<u>기술이전 계약서</u>	<u>기술이전 계약서</u>
<p>전북대학교 수의대학 교수 허진(이하, '발명자'라 한다)이 개발하여 전북대학교 산학협력단 (이하, '甲'이라 한다)이 보유하고 있는 "개신원 고스트 장관독소형 대장균을 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물 (특허출원번호: 10-2019-0054525)"의 3건(별첨 참고)에 관하여 ㈜코미팜(이하, '乙'이라 한다)에게 이전하기 위하여 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.</p> <p><b>제1조(목적)</b> 본 계약은 "甲"이 개발하여 보유하고 있는 특허출원번호 '10-2019-0054525' 의 3건 (이하 "계약 기술"이라 한다)에 대한 기술 및 노하우에 대해서 전용실시권 허여 및 이의 활용에 있어서 양 당사자의 권리 및 의무를 규정하는 것을 목적으로 한다.</p> <p><b>제2조(신의성실 및 상호협조)</b> ① "甲"과 "乙"은 신의를 가지고 본 계약의 내용을 성실히 이행하여야 한다. ② 양 당사자는 계약 기술 내용에 관하여 서로 협의하여야 하며, "甲"과 "乙"은 필요한 사항에 관하여 상호적극 협조하여야 한다. ③ "甲"과 "乙"은 계약 기술의 실시를 허여받지 아니한 제3자의 실시에 대한 증거확보에 노력하여야 하고, 확보된 증거에 대하여는 상호 이를 시면으로 통지하고 필요한 조치를 위하여 협조하여야 한다.</p> <p><b>제3조(지식재산권에 대한 보증)</b> ① "甲"은 계약 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의 변동 상황에 대해서는 책임지지 아니한다. 또한 계약 기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여도 "甲"은 책임지지 아니한다. ② 당사자 일방은 지식재산권에 대한 권리의 전부 또는 일부를 상대방의 동의 없이 포기할 수 있다. 단, 포기 2개월 전까지 그 사실을 상대방에게 서면 통지하여야 하며, 권리 이전에 따른 비용이 발생할 경우 인수자가 전액부담 한다.</p> <p><b>제4조(실시기간)</b> ① 전용실시권의 허여기간은 <u>계약체결일로부터 특허종속기간까지</u>로 하며, 계약 종료일까지 계약 기술에 대한 산업재산권 획득 및 유지비용은 "甲"과 "乙"의 공동부담으로 한다. ② "甲"은 본 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의 변동 상황에 대해서는 책임지지 아니한다. 또한 계약 기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여도 "甲"은 책임지지 아니한다.</p>	<p>전북대학교 수의대학 교수 허진(이하, '발명자'라 한다)이 개발하여 전북대학교 산학협력단 (이하, '甲'이라 한다)이 보유하고 있는 "Stx2eA-C-말단 단편-Stx2eB-오량체 제조합 단백질: 및 F4를 발현하는 장관독소형 대장균 및 F18을 발현하는 장관독소형 대장균 사균체 혼합 항원을 포함하는 돼지의 병원성 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물 (특허출원번호: 10-2019-0136134)"의 2건(별첨 참고)에 관하여 ㈜코미팜(이하, '乙'이라 한다)에게 이전하기 위하여 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.</p> <p><b>제1조(목적)</b> 본 계약은 "甲"이 개발하여 보유하고 있는 특허출원번호 '10-2019-0136134' 의 2건 (이하 "계약 기술"이라 한다)에 대한 기술 및 노하우에 대해서 전용실시권 허여 및 이의 활용에 있어서 양 당사자의 권리 및 의무를 규정하는 것을 목적으로 한다.</p> <p><b>제2조(신의성실 및 상호협조)</b> ① "甲"과 "乙"은 신의를 가지고 본 계약의 내용을 성실히 이행하여야 한다. ② 양 당사자는 계약 기술 내용에 관하여 서로 협의하여야 하며, "甲"과 "乙"은 필요한 사항에 관하여 상호적극 협조하여야 한다. ③ "甲"과 "乙"은 계약 기술의 실시를 허여받지 아니한 제3자의 실시에 대한 증거확보에 노력하여야 하고, 확보된 증거에 대하여는 상호 이를 시면으로 통지하고 필요한 조치를 위하여 협조하여야 한다.</p> <p><b>제3조(지식재산권에 대한 보증)</b> ① "甲"은 계약 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의 변동 상황에 대해서는 책임지지 아니한다. 또한 계약 기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여도 "甲"은 책임지지 아니한다. ② 당사자 일방은 지식재산권에 대한 권리의 전부 또는 일부를 상대방의 동의 없이 포기할 수 있다. 단, 포기 2개월 전까지 그 사실을 상대방에게 서면 통지하여야 하며, 권리 이전에 따른 비용이 발생할 경우 인수자가 전액부담 한다.</p> <p><b>제4조(실시기간)</b> ① 전용실시권의 허여기간은 <u>계약체결일로부터 특허종속기간까지</u>로 하며, 계약 종료일까지 계약 기술에 대한 산업재산권 획득 및 유지비용은 "甲"과 "乙"의 공동부담으로 한다. ② "甲"은 본 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의 변동 상황에 대해서는 책임지지 아니한다. 또한 계약 기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여도 "甲"은 책임지지 아니한다.</p>

### 제3절. 목표 달성도 및 관련분야 기여도

#### 1. 계획대비 달성도

##### 가. 주요 연구성과 목표 대비 달성도

연구 성과 목표	결과 및 실적	달성도 (%)
① 부종병 관련 Stx2e 독소 대량 발현 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량 생산된 변형 재조합 Stx2e 독소이드 돼지를 상대로 불활화 (재조합 독소이드 안전성) 확인</li> <li>- 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 시제품 제작</li> </ul>	100
② 재조합 Stx2e 독소 단백질 대량 생산 및 불활화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량 생산된 변형 재조합 Stx2e 독소이드 돼지를 상대로 불활화 (재조합 독소이드 안전성) 확인</li> <li>- 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 시제품 제작</li> </ul>	100
③ F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 균주 기탁 및 신개념 사균체 예방 백신 제작 기술 특허 출원</li> <li>- F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 예방 백신 시제품 제작</li> </ul>	100
④ <i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선 및 신개념 사균체화 유도	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선을 통해 배양 배지 및 조건 확립</li> <li>- <i>Clostridium novyi</i> 신개념 사균체 개발</li> <li>- <i>Clostridium novyi</i> 신개념 사균체 예방 백신 특허 출원 준비 중</li> </ul>	100
⑤ 부종병 및 돼지 급사 관련 재조합 Stx2e와 <i>C. novyi</i> 알파 독소 정제 과정 간소화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량 생산 및 사업화를 위한 일환으로 변형 재조합 Stx2e 독소이드와 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 정제 과정 간소화 진행</li> <li>- 간소화 과정으로 생산된 재조합 독소이드로 안전성 퓌 효능 평가 수행</li> </ul>	100
⑥ 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소 대량 생산 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 대량 발현 시스템 구축</li> <li>- 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 돼지 가스 괴저 예방 백신 특허 준비 중</li> </ul>	100
⑦ 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소 대량 생산 및 불활화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 전염성 가스 괴저 예방 백신 개발</li> <li>- 대량 발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이</li> </ul>	100

	드 돼지를 상대로 불활화 (재조합 독소이드 안전성) 확인	
⑧ 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 개발 및 전염성 가스 괴저 예방 단독 백신의 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 예방 백신 시제품 제작</li> <li>- 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 시제품 제작</li> <li>- <i>Clostridium novyi</i> 신개념 사균체 예방 백신 시제품 제작</li> </ul>	100
⑨ 실험동물에서의 안전성 및 면역 유도 여부 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험동물에서의 개발된 백신 안전성 확인</li> <li>- 실험동물에서의 개발된 각 백신의 면역 유도 실험 수행</li> <li>- 실험동물에서 획득한 각 재조합 항원에 대한 항혈청을 이용하여 제조된 각 재조합 독소이드에 대한 Western blot 항혈청으로 사용</li> <li>- 면역 유도된 각 재조합 독소이드 항혈청을 이용하여 돼지 부종병 및 돼지 가스 괴저 ELISA 진단 방법 확립</li> </ul>	100
⑩ 목적동물인 돼지에서의 백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 포유 자돈을 대상으로 돼지 부종병 및 이유자돈 병원성 대장균 설사병 예방 백신의 안전성 침 효능 평가 수행</li> <li>- 비육돈을 대상으로 돼지 가스 괴저 백신의 안전성 및 효능 (기니아피그) 평가 수행</li> </ul>	100
⑪ 목적동물에서 시판 돼지 부종병 백신 (IDT 사의 제품 등)과의 효능 비교 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IDT 사의 도재 부종병 백신 국내에서 판매하지 않아 시판 백신 확보 실패</li> <li>- 히프라에서 2020년 1월부터 돼지 부종병 백신 제품 국내 판매 시작 (본 과제 종료 후 국내 시판)</li> <li>- 다국적 기업의 돼지 부종병 백신의 국내 시판이 연기되거나 과제 종료 후 시판되어 시판 백신과의 효능 비교 평가 수행 불가</li> <li>- 포르말린-불활화 F4+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 및 F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 불활화 사균체로 제조된 백신과의 효능 비교 평가 수행</li> </ul>	100
⑫ 양돈장에서의 백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양돈장을 대상으로 이유 후 자돈 병원성 대장균증에 의한 설사 및 돼지 부종병에 대한 안전성 평가 수행</li> <li>- 양돈장을 대상으로 이유 후 자돈 병원성</li> </ul>	100

	대장균증에 의한 설사 및 돼지 부종병에 대한 효능 평가 수행	
--	-----------------------------------	--

나. 세부/협동과제별 목표 대비 달성도

(1) 제1세부 : 전북대학교

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	독소 산생 병원성 세균 예방 백신 개발 과 안전성 및 효능 평가	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 유도에 적합한 AMP 선별	100
		국내 돼지로부터 분리된 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체 백신 제작	100
		신개념 사균체만을 혼합한 백신 후보군 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	100
		재조합 불활화 Stx2e 독소이드를 마우스에 접종하여 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	100
		신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 혼합 백신 마우스를 대상으로 한 백신의 안전성 및 면역반응 유도 여부 평가	100
2차 년도	목적동물에서의 백신의 안전성 및 효능 평가 및 <i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선 및 신개념 사균체화 유도	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 돼지를 대상으로 접종량 결정 시험	100
		F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 접종 횟수 및 시기 결정 시험	100
		<i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선을 통한 대량 배양 기술 확립	100
		개선된 대량 배양 기술에 기반한 <i>C. novyi</i> 신개념 사균체화 유도 및 신개념 사균체의 안전성 확인	100
		재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 백신의 돼지에서 효능 평가	100
		재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가	100
3차 년도	전염성 가스 괴저 혼합 백신의 안전성 및 효능	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 국내 또는 국제적으로 효능이 인정된 돼지 부종병 예방 백신 (IDT사	100

평가	의 ECOPORC SHIGA 등)과의 효능 비교 평가	
	사균체 및 독소이드 혼합 백신과 독소이드와 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+ stx2e <i>E. coli</i> 각각과의 혼합 백신과의 비교 평가	100
	독소중화시험	100
	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지부종병 혼합 백신 돼지에서의 안전성 시험	100
	<i>C. novyi</i> 신개념 사균체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 효능 평가	100
	<i>C. novyi</i> 신개념 사체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 단독 백신의 돼지에서 안정성 평가	100

(2) 제2세부과제 : 전북대학교

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	부종병 관련 Stx2e 독소 대량 발현 시스템 구축 및 정제	발현 벡터 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선	100
		발현 host 개선을 통한 재조합 Stx2e 독소 대량 생산 개선	100
		발현된 Stx2e 독소 단백질의 Western blot을 통한 기능 확인	100
		발현된 독소 정제 과정 개선을 통한 간소화	100
2차 년도	전염성 가스 괴저 관련 독소 대량 발현 시스템 개선 및 기능 확인	재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산을 위한 발현 시스템 및 정제 시스템 개선	100
		발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소의 단백질 구조 확인	100
		발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 전염성 가스 괴저 돼지로부터 획득한 혈청을 이용한 Western blot을 이용한 기능 확인	100
		재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소대량 생산을 위한 정제	100

		방법 개선	
3차 년도	재조합 Stx2e 및 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산을 위한 시스템 개선	백신 제조 산업체에서 대량 생산을 위한 재조합 독소 발현 시스템 개선	100
		제조 공정 과정을 줄이기 위한 정제 방법 개선	100
		재조합 Toxoid의 독성 감소효과를 위한 mutagenesis 연구	100
		정제된 재조합 독소 단백질의 안정성 평가	100

(3) 참여기관(제2협동) : (주)코미팜

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	재조합 Stx2e 독소 단백질 대량 생산 및 불활화	재조합 Stx2e 발현 개선된 방법에 따라 대량 생산 시스템 구축	100
		재조합 Stx2e 대량 생산 및 돼지를 이용한 재조합 Stx2e 독소 기능 확인	100
		대량 생산된 Stx2e 독소 단백질 불활화 및 안전성 평가	100
2차 년도	개발 백신의 시제품 제작 및 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산 및 불활화	F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 함유 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방혼합 백신 시제품 제작	100
		제작된 시제품 안정성 평가	100
		재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 대량 생산	100
3차 년도	대량 생산된 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소 불활화 및 안전성 평가	<i>C. novyi</i> 신개념 사균체와 재조합 <i>C. novyi</i> 의 알파 독소이드 함유 혼합 백신 시제품 제작	100
		제작된 시제품 안정성 평가	100
		돼지 부종병이 만연된 양돈장을 대상으로 백신의 안전성 및 효능 평가	100

다. 사업화 및 연구기반 성과 평가

(단위 : 백만원, 건수, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		5	15	40			20											
최종목표	3	2		1	83	2			1		5	1	2.5	6	4					
연구기간내 달성실적	6	2		2	60	2			1		2	1	3.5 33	10	4					
달성율(%)	20 0	10 0		20 0		10 0			10 0		40	10 0	14 1	16 7	10 0					

라. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

(1) 돼지 부종병 백신

(가) 원인

- ① 변형 재조합 Stx2e 독소이드 추가적인 특허 출원 및 추가 실험 필요
- ② 돼지 부종병의 주요 수출국인 중국 및 동남아 등지에서 기술이전 기업인 (주)코미팜이 판매할 돼지 부종병 예방백신의 상품 보호를 위해 추가 필요한 국제특허 출원 및 등록을 위해 부종병 관련 논문 투고를 연기 중에 있으며, 국제특허가 마무리 되면 곧바로 투고 예정 (부종병의 상품 홍보를 위해서도 SCI급 국제저널 투고는 반드시 필요함)

(나) 차후대책

- ① 돼지 부종병 상품 보호를 위한 국내 및 해외 판매를 위한 국내외 추가 특허 출원
- ② 국내외 특허 출원 후 돼지 부종병 예방 백신 홍보를 위한 SCI 논문 투고

(2) 가스 괴저 예방 백신 개발

(가) 원인

- ① 국내 분리균주로부터 확보한 *Clostridium novyi* 균주의 알파독소 유전자를 비교 분석하여 본 결과 해외 수출을 위한 global 알파독소 유전자와 다른 형태로 구성되어 있으며 서로 교차 방어가 되지 않음을 확인
- ② 따라서 해외 수출 및 수입 돼지로부터 유입될 수 있는 global *C. novyi* 알파독소



를 가진 *Clostridium novyi* 균주를 확보하고자 하였으나 ATCC로부터 균주 확보가 늦어짐에 따라 현재 대체 실험동물인 기니아 피그를 대상으로 효능 평가를 진행 중에 있음

(나) 차후대책

- ① 대체 실험동물에서의 효능 평가와 완료되면 특허 출원과 동시에 동물의약품 제조회사에 기술이전을 실시할 예정
- ② 더불어 기술 이전 기업과 협의 하에 돼지를 대상으로 한 효능 평가 추가 실험 수행 예정임

2. 관련 분야 기여도 (국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가)

가. 돼지 부종병 및 돼지 가스괴저 예방 백신 개발

세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
돼지부종병 예방백신	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 불활화 사균체 예방백신 개발 : 이유 자돈에서의 병원성 대장균에 대한 백신 개발 연구 진행 중</li> <li>○ 재조합 독소이드 사균체 혼합 예방백신 개발 : 재조합 독소이드 발현 시스템 구축 시판 (다국적 기업인 IDT 및 히프라) 및 개발 연구 진행 중 (국내 동물용의약품 제조 회사)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 이유 후 자돈 설사 원 인체인 F4+ 병원성 대장균 및 F18+ 병원성 대장균 고스트 백신 개발</li> <li>- 재조합 독소이드 발현 시스템 구축 및 정제 시스템 구축</li> <li>- 사균체와 재조합 독소이드 혼합 백신으로 이유 후 자돈에서 병원성 대장균에 의한 설사 및 돼지 부종병 동시 예방 가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 새로운 방식의 병원성 세균 불활화 사균체 예방 백신 제조 기술</li> <li>- 병원성 세균에 의해 분비되는 독소의 항원 구조적 분석 기술</li> <li>- 재조합 독소이드 발현 시스템 구축 및 정제 시스템 구축</li> </ul>
돼지 가스괴저 예방백신	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>C. novyi</i> 고스트 사균체 예방백신 개발 : 현재 국내에서는 균 분리 및 배양 기술 부족</li> <li>○ 재조합 독소이드 사균체 혼합 예방백신 개발 : 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 함유 혼합 백신 개발 연구 진행 중임</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 분리주와 global <i>C. novyi</i> 알파 독소 유전자를 가지고 있는 ATCC 균주 확보</li> <li>- <i>C. novyi</i> 대량 배양을 위한 배지 조성 확보 및 고스트 사균체 개발 기술 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Global <i>C. novyi</i> 알파 독소 유전자를 가진 표준 균주 확보</li> <li>- <i>C. novyi</i> 대량 배양을 위한 배지 조성 확보</li> <li>- 재조합 독소이드 발현 기술 구축</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 재조합 global <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 발현 및 정제 시스템 구축</li> <li>- <i>C. novyi</i> 고스트 시균체와 재조합 global <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 함유 돼지 가스 괴저 예방 백신 최초 구축</li> </ul>	
--	--	--	--

## 제4장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 본 연구 과제를 통해 확보된 기술을 국내 양돈농가의 상황에 맞게 맞춤형 병원성 대장균증 예방백신으로 제작 판매
  - 가. 이유 자돈 병원성 대장균성 설사 만연 농장 : F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 포함 사료 첨가제로 개발 (경구투여용) 또는 근육 접종용 예방 백신 제조
  - 나. 이유 자돈에서 돼지 부종병 경증 농가 : 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 제조 (주사용)
  - 다. 이유자돈에서 병원성 대장균증에 의한 설사 및 돼지 부종병 만연 농장 : F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 및 변형 재조합 Stx2e 독소이드 함유 혼합 백신 제조
  
2. 본 연구 과제를 통해 확보된 변형 재조합 Stx2e 전달시스템 구축
  - 가. 본 연구 과제를 통해 개발된 변형 재조합 Stx2e 독소이드는 경구 투여시 단백질의 분해 없이 장점막을 통과할 수 있어 재조합 항원을 변형 재조합 Stx2e와 융합 단백질로 개발하여 경구투여용 전달시스템으로 활용하고자 함
  - 나. 주사제 일색인 돼지 백신을 이 경구용 전달시스템을 이용하여 접종경로를 다변화할 수 있을 것으로 기대
  
3. 본 연구 과제를 통해 확보된 기술을 국내 양돈농가의 상황에 맞게 맞춤형 *Clostridium* 균에 의한 질환 예방백신으로 제작하여 판매하고자 함
  - 가. *Clostridium novyi* 만연 농장 : *Clostridium novyi* 신개념 사균체 및 재조합 *C. novyi* 알파독소이드 함유 혼합 백신 제조
  - 나. *Clostridium perfringens* 만연 농장 : *Clostridium perfringens* 신개념 사균체 및 재조합 *C. perfringens* 알파-베타2 융합 독소이드 함유 혼합 백신 제조 (추가 연구 필요)
  - 다. *Clostridium novyi* 및 *Clostridium perfringens* 만연 농장 : *Clostridium novyi* 신개념 사균체 및 *Clostridium perfringens* 신개념 사균체와 재조합 *C. novyi* 알파독소이드 및 *C. perfringens* 알파-베타2 융합 독소이드 함유 혼합 백신 제조 (추가 연구 필요)  
=> 추가 연구를 통해 확보된 개발 백신을 기업체에 기술 이전 및 사업화 예정
  
4. 국내 및 해외 판매를 위한 사업화 추진
  - 가. 국내 야외 임상시험 진행 허가를 위한 계획서 작성
    - (1) 임상 결과를 바탕으로 개발한 F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ *E. coli* 신개념 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드 백신과 재조합 stx2e 독소이드만을 함유한 이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 백신 총 2종의 안전성 및 안정성 증명 및 야외 임상시험 계획서 작성
    - (2) 추진 일정  
전임상 효력 시험 완료

야외임상시험 신청 (농림축산검역검사본부에 제출 2021년 3월 22일)  
야외임상시험 승인 (2021년 8월 23일)  
야외임상시험 진행 (야외임상시험 3개 이상의 농장에서 실시, 2021년 12월 3일)  
품목허가 기술검토 서류 제출 (농림축산검역검사본부에 제출, 2022년 1월 27일)  
품목허가 취득 (2022년 10월 14일)  
제품생산, 국가검정 후 제품출시 (2023년 1월 21일) 예정

나. 수출용 해외 등록 절차

(1) 국내 허가 취득 후 목적 국가에 제품을 등록하는데 2년의 시간이 소요됨.

(2) 해외 등록 절차

등록서류검토

제품 효능평가(실험실 품질 평가)

목적 국가에서 야외 임상시험 실시함.

이 전체 기간은 약 2년이 소요되어 2024년 11월초 등록 가능할 것으로 예상됨.

(3) 수출전용 제품의 경우 등록시 자유판매증명을 요구하는 국가가 있어 국내 등록을 우선으로 실시하고 있음.

## 제5장. 연구개발성과의 보안등급 및 LMO 연구시설 및 수입신고

### 제1절. 연구개발성과의 보안등급

보안등급 분류	<input type="radio"/> 해당 사항 없음
---------	--------------------------------

### 제2절. LMO 연구시설 및 수입신고

시설번호	제LML18 - 519호	안전관리 등급	2등급
수입신고			

## 제6장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

이 규정은 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」, 「원자력안전법」, 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」, 「감염병 예방 및 관리에 관한 법률」에 의하여 전북대학교에 설치된 연구실의 안전한 환경을 조성하기 위하여 필요한 사항을 규정함을 목적으로 한다.(15.04.29)

### 제2장 조직과 직무

#### 제4조(연구실안전관리위원회)

- ① 연구실 안전에 관한 중요 사항을 심의하기 위하여 연구실안전관리위원회(이하 “위원회”)를 두며 당연직 위원은 연구실 안전관리센터 운영위원을 겸한다.(15.04.29, 15.08.25)
- ② 위원회는 위원장을 포함하여 11인 이상 16인 이내의 위원으로 구성한다.(15.04.29, 15.08.25)
- ③ 위원회는 산학연구본부장을 위원장으로 하고 연구실안전관리센터장을 부위원장으로 하며 교무학사부처장, 공간기획부처장, 연구윤리감사실장, 생물안전위원회 위원장, 시설관리과장, 연구실안전관리센터팀장은 당연직 위원이 되고 그 밖의 위원은 위원장의 추천으로 총장이 임명하며 임기를 2년으로 하되 연임할 수 있다.(13.02.26, 15.02.27, 15.04.29, 15.08.25, 17.05.16, 19.03.28)
- ④ 위원회는 다음 각 호의 사항을 심의한다.
  1. 안전관리규정의 작성 또는 변경
  2. 기본계획 수립·시행에 관한사항(15.08.25)
  3. 정기점검 결과에 따른 대책에 관한 사항(15.08.25)
  4. 정밀안전진단 결과에 따른 대책에 관한 사항(15.04.29, 15.08.25)
  5. 그 밖의 연구실의 안전환경 증진에 관한 사항(15.08.25)
- ⑤ 위원회에 간사를 두며 간사는 연구실안전관리센터 직원이 된다. (13.02.26,15.04.29)
- ⑥ 위원회는 위원장이 소집하고 재적위원 과반수의 출석으로 개최하며 출석위원 과반수의 찬성으로 의결한다.
- ⑦ 위원회의 운영에 관하여 그 밖의 필요한 사항은 위원회의 의결을 거쳐 위원장이 정한다.
- ⑧ 심의에 참여한 외부위원 및 외부 관계전문가에게는 예산 범위 내에서 심의비를 지급할 수 있다.(15.04.29)

#### 제5조(기관장의 책무)

- ① 기관장은 기관별 연구실안전관리위원회(이하 “소위원회”라 한다)를 구성하여 소속 연구실의 안전 정책의 수립 및 점검 체계를 구축하여야 한다. 단, 대학(원)을 제외한 기관장은 소위원회의 구성을 생략할 수 있다.(15.04.29, 15.08.25)
- ② 기관장은 소속 연구실의 안전관리를 위하여 다음 각 호의 임무를 수행한다. (15.04.29)
  1. 소속 기관의 연구실안전관리 업무 총괄(15.04.29)

2. 연구실책임자의 지정에 관한 사항(15.04.29, 15.08.25)
  3. 교육·훈련, 보험가입 및 건강검진 대상자의 선정 및 관리에 관한 사항
  4. 소속 기관의 위험물질·위험시설 관리
  5. 반기 1회 이상 연구실별 일상점검 및 교육·훈련 이행 여부에 대한 관리감독 (15.04.29)
  6. 취급자에 대한 건강검진
  7. 정기점검 및 정밀안전진단 결과 발견된 결함사항에 대한 보수·보강 등의 조치 및 이에 소요되는 예산의 확보(15.08.25)
  8. 사고 발생시 경위 조사 및 사후 처리 및 대책 강구
- ③ 기관장은 소속 연구실의 연구실책임자가 다음 각호의 경우 제3조 제3호에 따른 연구실책임자를 대체 지정하되, 대체 지정시까지 해당 연구실을 폐쇄할 수 있다.(신설, 19.09.30)
1. 1개월 이상의 국외출장, 휴직, 파견 등으로 연구실을 안전관리 할 수 없는 경우
  2. 파면, 해임, 강등, 정직 및 직위해제 등으로 안전관리 자격이 없는 경우

#### 제6조(연구실책임자의 책무)

- ① 연구실책임자는 연구실 내에서 이루어지는 교육 및 연구개발활동의 안전에 관한 책임을 지며, 담당 연구실에 대하여 다음 각 호의 임무를 수행한다.(15.04.29, 15.08.25, 19.09.30)
1. 연구실의 안전관리 총괄(15.04.29)
  2. 연구실안전관리담당자의 지정(15.04.29)
  3. 연구실의 안전사고 예방 및 사고발생 보고(별지 제1호 서식)(15.04.29)
  4. 연구실의 시설물, 실험장비 및 재료, 위험 기계·기구류, 화학약품, 고압가스, 병원체, 및 LMO 등의 취급 및 유지관리(15.04.29)
  5. 연구실 안전점검 결과에 따른 후속 조치에 관한 사항(15.04.29)
  6. 일상점검 실시사항 확인(15.04.29, 15.08.25)
  7. 반기별 6시간 이상 취급자를 대상으로 한 해당 연구실의 유해인자에 관한 교육 및 교육결과의 기록(15.08.25)
  8. 관련 법령에 따른 사전유해인자위험분석 및 결과의 보고.(15.08.25)
  9. 정기점검 및 정밀안전진단 결과 발견된 결함사항에 대한 보수·보강 등의 조치 (15.08.25)
  10. 취급자에 대한 개인보호장구 제공에 관한 사항(15.08.25)
  11. 각종 위험 기계·기구류, 기타 위험물 및 실험폐기물에 대한 취급 지도(15.08.25)
  12. 연구활동종사자의 법정 안전교육 이수 지도 및 이수결과 확인(17.05.16)
  13. 기타 연구실 안전관리에 필요한 각종 규정 및 법률이 정하는 사항 (17.05.16)
- ② 제5조제3항에 따라 대체 지정한 연구실책임자 또한 제1항을 준용한다.(신설, 19.09.30)

#### 안전관리

제10조(보험가입)

총장은 취급자의 상해·사망에 대비하여 취급자를 피보험자 및 수익자로 하는 보험에 가입하여야 한다. 단, 연구소(센터), 사업단 등에서 채용한 연구원 및 연구보조원의 경우에는 해당 채용 기관에서 보험에 가입하여야 한다.

제11조(안전점검 등)

- ① 총장은 연구실의 기능 및 안전을 유지관리하기 위하여 관련 법령에 따라 소관 연구실에 대한 안전점검 및 정밀안전진단을 실시하여야 한다.(15.04.29, 15.08.25)
- ② 안전점검 및 정밀안전진단의 실시 시기는 다음 각 호와 같다.
  1. 정기점검 : 매년 1회 이상
  2. 정밀안전진단 : 2년마다 1회 이상

제12조(교육·훈련 등)

- ① 연구실 안전사고 예방을 위해 연구활동종사자는 안전교육을 이수하여야 할 의무가 있다.
- ② 교육훈련 시간 및 내용은 별표 1과 같다.(15.04.29, 18.09.20.)
- ③ 교육·훈련의 방법은 총장이 주관하는 집체 및 사이버교육과 연구실책임자 또는 학과장이 실시하는 자체교육 등이 있다.(17.05.16)
- ④ 자체교육 시간(제6조제7호에 따른 교육시간 포함)은 제12조제2항에서 정한 교육시간으로 인정할 수 있으며 의무 교육시간 이상 실시한 경우 정기 안전교육을 이수한 것으로 한다. 이때 교육 실시자는 해당 교육시간을 안전교육 이수시간으로 간주한다.(17.05.16)

제13조(정보제공)

- ① 연구실안전관리센터는 안전관리규정 및 안전관련 정보를 연구활동종사자가 공람할 수 있도록 하여야 한다.(15.04.29)
- ② 각 연구실의 연구실안전관리담당자는 안전관리규정, 일일 안전점검표, 물질안전보건자료, 안전표식 등의 안전관련 자료를 연구활동종사자가 상시 확인할 수 있는 장소에 비치한다.(15.04.29, 19.09.30)

제14조(연구실 안전표식의 설치 또는 부착 등)

- ① 연구실책임자는 연구실 내 위험요인이 존재하거나 사고 발생 가능성이 있는 지역, 시설 및 물질 등에 대하여 사고 방지 차원에서 금지, 주의, 경고, 비상 시 조치·지시·안내사항 등을 안전 색, 그림, 기호, 글자 등으로 표현한 안전표식 및 표지를 연구 활동 종사자가 쉽게 식별할 수 있도록 설치·부착하고 유지·관리하여야 한다.(15.04.29, 15.08.25)
- ② 안전표식 및 표지의 구체적 종류는 별표 2와 같고, 각 연구실의 유형 및 특성에 맞도록 조정 또는 추가할 수 있다.(신설, 18.09.20.)



제15조(위험물, 유해물의 저장 및 취급)

- ① 위험물 및 유해물의 저장, 조작 및 처리를 하는 구역 내에서는 사고의 원인이 될 수 있는 물질을 두어서는 안된다.
- ② 위험물, 유해물을 처리·사용하고자 하는 자는 그 이전에 안전한 취급 및 사용에 관하여 충분히 교육을 받아야 한다.

제16조(보호구착용 및 관리)

- ① 취급자는 다음 각 호에 해당하는 실험의 경우에는 작업복 등 기타 필요한 소정의 보호구를 착용하여야 한다.(15.08.25)
  1. 다량의 고온 또는 저온 물체를 취급하는 경우
  2. 유해, 위험물질, 폐기물을 취급하는 경우
  3. 감전 또는 전기화상의 위험이 있는 경우
  4. 피부에 장해를 주는 물질을 취급하는 경우 또는 피부로부터 흡수 되거나 침입하여 중독 또는 감염 될 우려가 있는 물품을 취급하는 경우
  5. 기타 연구실책임자 또는 연구실안전관리담당자가 보호구 착용이 필요하다고 판단하는 경우(15.04.29, 15.08.25)

## 붙임. 참고문헌

1. 히프라 동물약품(주) 부표자료.
2. Amimoto K, et al. "The protective Effect of clostridium novyi type B alpha-toxoid against challenge with spores in guinea pigs." J Vet Med Sci. 1998 Jun;60(6):681-685.
1. Arora A, Rinehart D, Szabo G, Tamm, LK. 2000. Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. J Biol Chem 275: 1594-1600.
2. Ascón M, Hone DH, Walters N, Pascual DW. 1998. Oral immunization with a *Salmonella* Typhimurium vaccine vector expressing recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbriae elicits elevated antibody titers for protective immunity. Infect Immun 66: 5470-5476.
3. Baek JH, Lee SH. 2010. Isolation and molecular cloning of venom peptides from *Orancistrocerus drewseni* (Hymenoptera: Eumenidae). Toxicon 55: 711-718.
4. Bertschinger HU, Fairbrother JM. 1999. *Escherichia coli* infections. In: Straw, B.E., D' Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D. (Eds.), Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, IA: 431-468.
5. Brumme S, Arnold T, Sigmarsson H, Lehmann J, Scholz HC, Hardt WD, Hensel A, Truyen U, Roesler U. 2007. Impact of *Salmonella* Typhimurium DT104 virulence factors *invC* and *sseD* on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. Vet Microbiol 124: 274-285.
6. Busch C .et al. "Characterization of the Catalytic Domain of *Clostridium novyi* Alpha-Toxin" Infect Immun. 2000 Nov;68(11):6378-6383.
7. Carballar-Lejarazú R, Rodr ı́guez MH, de la Cruz Hernández-Hernández F, Ramos-Castañeda J, Possani LD, Zurita-Ortega M, Reynaud-Garza E, Hernández-Rivas R, Loukeris T, Lycett G, Lanz-Mendoza H. 2008. Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. Cell Mol Life Sci 65:3081-3092.
8. Causey RC, Artiushin SC, Crowley IF, Weber JA, Homola AD, Kelley A, Stephenson LA, Opitz HM, Guilmain S, Timoney JF. 2010. Immunisation of the equine uterus against *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus using an intranasal attenuated *Salmonella* vector. Vet J 184: 156-161.
9. Chen H, Schifferli DM. 2000. Mucosal and systemic immune response to chimeric fimbriae expressed by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. Infect Immun 68: 3129-3139.
10. Chen X, Gao S, Jiao X, Liu XF. 2004. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post weaning diarrhoea in eastern China. Vet Microbiol 103: 13-20.
- Deprez P, Van den Hende C, Muylle E, Oyaert W. 1986. The influence of the administration of sow' s milk on the post-weaning excretion of hemolytic

*E. coli* in the pig. Vet Res Commun 10: 469–478.

11. Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski Z. 2005. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. Mol Cell Biochem 276: 113–119.
12. Ewaschuk JB, Murdoch GK, Johnson IR, Madsen KL, Field CJ. 2011. Glutamine supplementation improves intestinal barrier function in a weaned piglet model of *Escherichia coli* infection. Br J Nutr 106: 870–877.
13. Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol 100: 255–268.
14. Haines LR, Thomas JM, Jackson AM, Eyford BA, Razavi M, Watson CN, Gowen B, Hancock RE, Pearson TW. 2009. Killing of trypanosomatid parasites by a modified bovine host defense peptide, BMAP-18. PLoS Negl Trop Dis 3:e373.
15. Halas D, Hansen CF, Hampson DJ, Mullan BP, Kim JC, Wilson RH, Pluske JR. 2010. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. Anim Feed Sci Technol 160:137–147.
16. Harmsen MM, van Solt CB, Hoogendoorn A, van Zijderveld FG, Niewold TA, van der Meulen J. 2005. *Escherichia coli* F4 fimbriae specific llama single-domain antibody fragments effectively inhibit bacterial adhesion in vitro but poorly protect against diarrhoea. Vet Microbiol 111:89–98.
17. Holmgren J, Czerkinsky C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. Nat Med 11: S45–S53.
18. Hur J, Lee JH. 2010. Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. Vet Microbiol 143: 270–276.
19. Hur J, Lee JH. 2011. Immune responses to new vaccine candidates constructed by a live attenuated *Salmonella* Typhimurium delivery system expressing *Escherichia coli* F4, F5, F6, F41 and intimin adhesin antigens in a murine model. J Vet Med Sci 73: 1265–1273.
20. Hur J, Lee JH. 2012. Development of a novel live vaccine delivering enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens to prevent post-weaning diarrhea in piglets. Vet Immunol Immunopathol 146: 283–288.
21. Hur J, Lee JH. 2013. Protection against neonatal *Escherichia coli* diarrhea by vaccination of sows with a novel multivalent vaccine candidate expressing *E. coli* adhesins associated with neonatal pig coli bacillosis. Res Vet Sci 94: 198–204.
22. Hussein MI, Hensel M. 2009. Evaluation of *Salmonella* live vaccines with chromosomal expression cassettes for translocated fusion proteins. Vaccine 27: 3780–3787.
23. Jalava K, Hensel A, Szostak M, Resch S, Lubitz W. 2002. Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. J Control Release 85: 17–25.
24. Jawale CV, Chaudhari AA, Jeon BW, Nandre RM, Lee HH. 2012. Characterization of a novel inactivated *Salmonella enteritica* serovar Enteritidis vaccine candidate generated

- using a modified  $\text{cl857}/\lambda\text{PR}/\text{gene } E$  expression. *Infect Immun* 80: 1502–1509.
25. Jawale CV, Lee JH. 2014. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ghost carrying the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses. *Clin Vaccine Immunol* 21:799–807.
  26. Kang HY, Srinivasan J, Curtis III R. 2002. Immune response to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Infect Immun* 70: 1739–1749.
  27. Katrien V, Vesna M, Eric C, Paul RJ, Chris V. 2011. Adjuvant effect of Gantrez® AN nanoparticles during oral vaccination of piglets against F4+enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol* 139: 148–155.
  28. Kim YJ, Kim JH, Hur J, Lee JH. 2010. Isolation of *Escherichia coli* from piglets in South Korea with diarrhea and characteristics of the virulence genes. *Can J Vet Res* 74:59–64.
  29. Kiros TG, van Kessel J, Babiuk LA, Gerdts V. 2011. Induction, regulation and physiological role of IL-17 secreting helper T-cells isolated from PMMC, thymus, and lung lymphocytes of young pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 144: 448–454.
  30. Kramer DR, Sutherland RM, Bao S, Husband AJ. 1995. Cytokine mediated effects in mucosal immunity. *Immunol Cell Biol* 73: 389–396.
  31. Lambert GP. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J Anim Sci* 87:E101–108.
  32. Lessard M, Dupuis M, Gagnon N, Nadeau E, Matte JJ, Goulet J, Fairbrother JM. 2009. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J Anim Sci* 87: 922–934.
  33. Li XQ, Zhu YH, Zhang HF, Yue Y, Cai ZX, Lu QP, Zhang L, Weng XG, Zhang F, Zhou D, Yang JC, Wang JF. 2012.
  34. Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: Intestinal microbiota and immune imbalances. *PLoS ONE* 7: e40666.
  35. Liao CW, Lin SH, Lin PY, Chiou HY, Chang WF, Weng CN. 2004. Orally administrable enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine encapsulated by ethylcellulose powder dispersion. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 295–300.
  36. Liu S, Li Y, Xu Z. 2013. Induction of specific immune responses in piglets by intramuscular immunization with fimbrial adhesin FaeG expressed in *Lactococcus lactis*. *Res Vet Sci* 95: 130–136.
  37. Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, Ma Q, Shan A. 2014. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential  $\alpha$ -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. *PLoS One* 9: e86364.
  38. MacLeod DL et al. “Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant.(STX2e)” *Vet Pathol*. 1991 Jan;28(1):66–73.
  39. Marciani D. 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today* 8: 934–943.

40. Matic JN, Terry TD, Bockel DV, Maddocks T, Tinworth D, Jennings MP, Djordjevic SP, Walker M. 2009. Development of non-antibiotic-resistant, chromosomally based, constitutive and inducible expression systems for *aroA* attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 77: 1817-1826.
41. Matisse I et al. "Vascular Ultrastructure and DNA Fragmentation in Swine Infected with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*" *Vet Pathol*. 2000 Jul;37(4):318-327.
42. Mayr UB, Haller C, Haidinger W, Atrasheuskaya A, Bukin E, Lubitz W, Ignatyev G. 2005a. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect Immun* 73: 4810-4817.
43. Mayr UB, Walcher P, Azimpour C, Riedmann E, Haller C, Lubitz W. 2005b. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 1381-1391.
44. Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev* 20:489.
45. Moreto M, Perez-Bosque A. 2009. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. *J Anim Sci* 87: E92-100.
46. Moyle PM, McGeary RP, Blanchfield JT, Toth I. 2004. Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems. *Curr Drug Deliv* 1: 385-396.
47. Nagy B, Fekete PZ. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in farm animals. *Vet Res* 30: 259-284.
48. Nagy B, Fekete PZ. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 443-454.
49. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
50. Pace JL, Rossi HA, Esposito VM, Frey SM, Tucker KD, Walker RI. 1998. Inactivated whole-cell bacterial vaccines: current status and novel strategies. *Vaccine* 16: 1563-1574.
51. Pascual DW, Trunkle T, Sura J. 2002. Fimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium abates initial inflammatory responses by macrophages. *Infect Immun* 70: 4273-4281.
52. Pathangey L, Kohler JJ, Isoda R, Brown TA. 2009. Effect of expression level on immune responses to recombinant oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines. *Vaccine* 27: 2707-2711.
53. Pui-prom O, Chantaroj S, Gangnonngiw W, Okada K, Honda T, Taniguchi T, Sawanpanyalert P. 2010. Identification of colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* with PCR-based technique. *Epidemiol Infect* 138: 519-524.
54. Remer KA, Barttrow M, Roeger B, Moll H, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA. 2009. Split immune response after oral vaccination of mice with recombinant *Escherichia coli* Nissle 1917 expressing fimbrial adhesin K88. *Int J Med Microbiol* 299: 467-478.
55. Rutter JM, Jones GW. 1973. Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli*-a model for vaccination with a virulence determinant? *Nature* 242: 531-532.
56. Singh SP, Williams YU, Miller S, Nikaido H. 2003. The C-terminal domain of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OmpA is an immunodominant antigen in mice but appears to be only partially exposed on the bacterial cell surface. *Infect Immun* 71: 3937-3946.

57. Snoeck V, Huyghebaert N, Cox E, Vermeire A, Vancaeneghem S, Remon JP, Goddeeris BM. 2003. Enteric-coated pellets of F4 fimbriae for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Vet Immunol Immunopathol* 96: 219-227.
58. Tabrizi CA, Walcher P, Mayr UB, Stiedl T, Binder M, McGrath J, Lubitz W. 2004. Bacterial ghosts – biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 15 530-537.
59. Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. 2012. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res* 51: 149-177.
60. Vila-Farres X, Garcia de la Maria C, López-Rojas R, Pachón J, Giralt E, Vila J. 2012. In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 18: 383-387.
61. Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J. 2007.
62. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in Slovakia. *Vet J* 174: 176-187.
63. Yang Y, Zhang Z, Yang J, Chen X, Cui S, Zhu X. 2010. Oral vaccination with Ts87 DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella* Typhimurium elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* larval challenge. *Vaccine* 28: 2735-2742.

# 붙임. 주관기관의 자체평가 의견서

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		117031-3	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	수출전략기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	돼지에서 독소 산생 병원성 세균에 의한 급사 관련 질병 예방 백신 개발 및 사업화			과제유형	(개발)
연구기관	전북대학교 산학협력단			연구책임자	허진
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.04.21.~2017.12.31	225,000	75,000	300,000
	2차연도	2018.01.01.~2018.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차연도	2019.01.01.~2019.12.31	300,000	100,000	400,000
	계		825,000	275,000	1,100,000
참여기업	(주)코미팜				
상대국				상대국연구기관	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 02. 15

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전북대학교 수의학과	부교수	허진

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	허진
----	----

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

제1세부 및 제2세부 그리고 제1협동 연구기관의 유기적인 협력하에 목표로 한 모든 세부 목표를 차질 없이 달성하였음, 더불어 본 연구 과제를 통해 개발된 변형 재조합 Stx2e 독소이드 및 재조합 *C. novyi* 알파 독소이드는 국내 최초로 개발되어 특허 출원되었으며 동시에 (주)코미팜에 기술 이전되었음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

국내 양돈가에서 최근 증가 추세인 돼지 부종병을 저렴하면서 효과적인 백신으로 보급함으로써 양돈농가에 출하시기를 앞당기고 부종병으로 인한 급사 두수의 감소로 인한 경제적 도움 및 국제 경쟁력 향상, 더불어 rlxams 제품의 국산화로 인한 수입대체 효과 및 해외 수출로 인한 외화 획득 가능성 증가. 최첨단 재조합 독소이드 개발 기술 확립을 통한 백신의 국산화 실현

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- 돼지에서 부종병 및 돼지 전염성 가스 괴저를 예방할 수 있는 제품의 상품화를 통해 국내 및 해외 수출을 통해 산업적 활용도 상승  
- 새로운 타입의 백신 개발 및 질병관련 독소이드 함유 혼합 백신의 개발로 인한 수입 대체 효과 및 수출 효과 기대  
- 효능이 탁월한 새로운 백신 개발을 통한 양돈가의 질병 해소에 따른 양돈가에 경제적 도움 기대



4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

제1세부 및 제2세부 그리고 제1협동연구 기관의 유기적인 협력을 통해 세부목표를 차질 없이 달성하여 최종목표를 성실히 수행하였으며 국내 최초 및 세계 최초의 연구 결과물을 만들어 냈으며, 그 결과물을 특허 출원 및 등록하여 (주)코미팜에 기술인전하여 사업화를 위한 기반 정보를 제공하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (보통)

(주)코미팜에 기술 이전한 기술 중에 변형 재조합 Stx2e 독소이드 발현 기술은 국내 및 세계 최초 (특허 등록 기준) 기술로 기술 이전 기업이 불이익 없이 사업화를 위해서는 추가 특허 출원이 필요한 상황이며, 동시에 그 특허들이 동시에 등록되어야 기술 이전 기업이 사업화 시 보호를 받을 수 있는 상황임. 따라서 아직 추가 특허가 준비 중이거나 현재 실험이 진행 중이기 때문에 특허에 대한 부분과 학술 발표를 통한 정보 교환 등에 대한 결과는 성과 이상이지만 아직 특허 출원된 모든 출원 건들이 등록이 완료되지 않은 상태로 논문을 투고하지 못하고 있는 실정으로 국내 및 국외 특허 출원 및 등록이 완료됨과 동시에 모든 연구 결과를 SCI(E) 급 저널에 투고 예정임.

II . 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
부중병 관련 Stx2e 독소 대량 발현 시스템 구축	10	100	- 대량 생산된 변형 재조합 Stx2e 독소이드 돼지를 상대로 불활화 (재조합 독소이드 안전성) 확인 - 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 시제품 제작
재조합 Stx2e 독소 단백질 대량 생산 및 불활화	8	100	- 대량 생산된 변형 재조합 Stx2e 독소이드 돼지를 상대로 불활화 (재조합 독소이드 안전성) 확인 - 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 시제품 제작
F4+ ETEC, F18+ ETEC, F18+Stx2e+ <i>E. coli</i> 신개념 사균체	6	100	- F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+

제작			ETEC (Stx2e+ 포함) 균주 기탁 및 신개념 사균체 예방 백신 제작 기술 특허 출원 - F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 예방 백신 시제품 제작
<i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선 및 신개념 사균체화 유도	8	100	- <i>Clostridium novyi</i> 배양 기술 개선을 통해 배양 배지 및 조건 확립 - <i>Clostridium novyi</i> 신개념 사균체 개발 - <i>Clostridium novyi</i> 신개념 사균체 예방 백신 특허 출원 준비 중
부종병 및 돼지 급사 관련 재조합 Stx2e와 <i>C. novyi</i> 알파 독소 정제 과정 간소화	8	100	- 대량 생산 및 사업화를 위한 일환으로 변형 재조합 Stx2e 독소이드와 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 정제 과정 간소화 진행 - 간소화 과정으로 생산된 재조합 독소이드로 안전성 펄프 효능 평가 수행
재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소 대량 생산 구축	10	100	- 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 대량 발현 시스템 구축 - 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 돼지 가스 괴저 예방 백신 특허 준비 중
재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소 대량 생산 및 불활화	8	100	- 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 전염성 가스 괴저 예방 백신 개발 - 대량 발현된 재조합 <i>C. novyi</i> 알파 독소이드 돼지를 상대로 불활화 (재조합 독소이드 안전성) 확인
이유 후 자돈 설사 및 돼지 부종병 예방 혼합 백신 개발 및 전염성 가스 괴저 예방 단독 백신의 시제품 제작	8	100	- F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 예방 백신 시제품 제작 - 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 시제품 제작 - <i>Clostridium novyi</i> 신개념 사균체 예방 백신 시제품 제작
실험동물에서의 안전성 및 면역 유도 여부 평가	8	100	- 실험동물에서의 개발된 백신

			<p>안전성 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험동물에서의 개발된 각 백신의 면역 유도 실험 수행</li> <li>- 실험동물에서 획득한 각 재조합 항원에 대한 항혈청을 이용하여 제조된 각 재조합 독소이드에 대한 Western blot 항혈청으로 사용</li> <li>- 면역 유도된 각 재조합 독소이드 항혈청을 이용하여 돼지 부종병 및 돼지 가스 괴저 ELISA 진단 방법 확립</li> </ul>
목적동물인 돼지에서의 백신의 안전성 및 효능 평가	12	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 포유 자돈을 대상으로 돼지 부종병 및 이유자돈 병원성 대장균 설사병 예방 백신의 안전성 침 효능 평가 수행</li> <li>- 비육돈을 대상으로 돼지 가스 괴저 백신의 안전성 및 효능 평가 수행</li> </ul>
목적동물에서 시판 돼지 부종병 백신 (IDT 사의 제품 등)과의 효능 비교 평가	6	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IDT 사의 도재 부종병 백신 국내에서 판매 하지 않아 시판 백신 확보 실패</li> <li>- 히프라에서 2020년 1월부터 돼지 부종병 백신 제품 국내 판매 시작 (본 과제 종료 후 국내 시판)</li> <li>- 다국적 기업의 돼지 부종병 백신의 국내 시판이 연기되거나 과제 종료 후 시판되어 시판 백신과의 효능 비교 평가 수행 불가</li> <li>- 포르말린-불활화 F4+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 및 F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 불활화 사균체로 제조된 백신과의 효능 비교 평가 수행</li> <li>- 현재 히프라사 돼지 부종병 예방 백신과의 효능 비교 평가를 수행 중에 있음 [(주) 코미팜과 협의 하에 진행 중임]</li> </ul>
양돈장에서의 백신의 안전성 및 효능 평가	8	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양돈장을 대상으로 이유 후 자돈 병원성 대장균증에 의한 설사</li> </ul>

			및 돼지 부종병에 대한 안전성 평가 수행 - 양돈장을 대상으로 이유 후 자돈 병원성 대장균증에 의한 설사 및 돼지 부종병에 대한 효능 평가 수행
합계	100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

<p>- 본 과제의 총괄 목표를 달성하기 위한 세부 연구목표를 제1세부 및 제2세부 그리고 제1협동 연구 기관이 유기적으로 협동하여 모두 완성하여 원래 목표로 정했던 최종 목표를 무사히 달성하였음</p> <p>- 당초 본 과제가 종료되기 전에 국내에 시판될 것으로 예상되었던 돼지 부종병 예방 백신이 다국적 기업의 사정과 국내 양돈업계의 사정 등으로 인해 IDT 사 제품은 현 결과보고서 작성 시점까지 국내에 판매되고 있지 않으며, 히프라 제품만 본 연구과제가 종료 된 2020년 1월부터 국내에 판매되기 시작하여 당초 IDT사 제품과의 효능 평가 평가를 F4+ Stx2e+ 대장균 및 F18+ Stx2e+ 대장균을 포르말린으로 불활화 한 후 본 과제를 통해 개발된 돼지 부종병 백신과의 효능 비교 평가는 다소 아쉬움이 남는다.</p> <p>- 하지만 돼지 부종병 예방 백신 기술을 (주)코미팜에 기술이전 하였고 향후 국내 판매를 위해서는 반드시 히프라사 제품과의 효능 비교 평가는 필요하여 본 연구과제가 종료되었지만 기술이전해 간 (주)코미팜과 협의하여 현재 효능 비교 평가 시험을 진행 중에 있음.</p>
--

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

<p>- 당초 본 과제가 종료되기 전에 국내에 시판될 것으로 예상되었던 돼지 부종병 예방 백신이 다국적 기업의 사정과 국내 양돈 산업의 사정 등으로 인해 IDT 사 제품은 현 결과보고서 작성 시점까지 국내에 판매되고 있지 않으며, 히프라 제품만 본 연구과제가 종료 된 2020년 1월부터 국내에 판매되기 시작하여 당초 IDT사 제품과의 효능 평가 평가를 F4+ Stx2e+ 대장균 및 F18+ Stx2e+ 대장균을 포르말린으로 불활화 한 후 본 과제를 통해 개발된 돼지 부종병 백신과의 효능 비교 평가를 수행함.</p> <p>- 하지만 돼지 부종병 예방 백신 기술을 기술 이전한 동물용 제조업체인 (주)코미팜에서 향후 국내 및 해외 판매를 위해서는 반드시 히프라사 제품과의 효능 비교 평가는 필요하여 본 연구과제가 종료되었지만 (주)코미팜과 협의하여 현재 효능 비교 평가 시험을 진행 중에 있음.</p>
---

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

◎ 본 연구 과제를 통해 확보된 기술을 국내 양돈농가의 상황에 맞게 맞춤형 병원성 대장균 증 예방백신으로 제작하여 판매하고자 함

○ 이유 자돈 병원성 대장균성 설사 만연 농장 : F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 포함 사료 첨가제로 개발 (경구투여용) 또는 근육 접종용 예방 백신 제조

○ 이유 자돈에서 돼지 부종병 경증 농가 : 변형 재조합 Stx2e 독소이드 예방 백신 제조 (주사용)

○ 이유자돈에서 병원성 대장균증에 의한 설사 및 돼지 부종병 만연 농장 : F4+ ETEC (Stx2e+ 포함), F18+ ETEC (Stx2e+ 포함) 신개념 사균체 및 변형 재조합 Stx2e 독소이드 함유 혼합 백신 제조

◎ 본 연구 과제를 통해 확보된 변형 재조합 Stx2e 전달시스템 구축

○ 본 연구 과제를 통해 개발된 변형 재조합 Stx2e 독소이드는 경구 투여시 단백질의 분해 없이 장점막을 통과할 수 있어 재조합 항원을 변형 재조합 Stx2e와 융합 단백질로 개발하여 경구투여용 전달시스템으로 활용하고자 함

○ 주사제 일색인 돼지 백신을 이 경구용 전달시스템을 이용하여 접종경로를 다변화할 수 있을 것으로 기대

◎ 본 연구 과제를 통해 확보된 기술을 국내 양돈농가의 상황에 맞게 맞춤형 *Clostridium* 균에 의한 질환 예방백신으로 제작하여 판매하고자 함

○ *Clostridium novyi* 만연 농장 : *Clostridium novyi* 신개념 사균체 및 재조합 *C. novyi* 알파독소이드 함유 혼합 백신 제조

○ *Clostridium perfringens* 만연 농장 : *Clostridium perfringens* 신개념 사균체 및 재조합 *C. perfringens* 알파-베타2 융합 독소이드 함유 혼합 백신 제조

○ *Clostridium novyi* 및 *Clostridium perfringens* 만연 농장 : *Clostridium novyi* 신개념 사균체 및 *Clostridium perfringens* 신개념 사균체와 재조합 *C. novyi* 알파독소이드 및 *C. perfringens* 알파-베타2 융합 독소이드 함유 혼합 백신 제조

#### IV. 보안성 검토

- 본 연구 과제는 보안이 절대적으로 필요 함
  - 국내에서 돼지 부종병 예방 백신 개발에 대한 연구는 많은 대학 및 동물용 의약품 제조업체 그리고 연구소 등에서 이루어지고 있음
  - 하지만 변형 재조합 Stx2e 독소이드를 발현하고 정제하는 시스템을 구축한 곳은 아직까지 없음
  - 현재 기술이전 기업인 (주)코미팜에서 임상실험 허가서를 제출하여 허가서에 따른 임상 실험을 수행하고 해당 제품이 국내 및 국외에 판매되기 전까지 모든 개발 정보에 대해 보안 처리를 요구하고 있음
  - 기술이전 기업인 (주)코미팜이 향후 본 과제에 의해 개발된 제품을 판매하면서 본 개발 제품을 보호받기 위해 국내 및 해외 특허 출원 및 등록이 더 필요하며, 현재 보호를 위해 더 필요한 특허 출원을 위한 시험이 진행 중이며 또한 특허 출원도 준비 중에 있음

##### 1. 연구책임자의 의견

- 현재 본 연구 과제를 통해 개발된 변형 재조합 Stx2e 독소이드 발현 시스템 구축은 국내 뿐만 아니라 세계 최초 (국외 특허 등록 기준)로 아직 그 기술이 공개되지 않았으며 공개가 된다면 다른 대학이나 동물용의약품 제조 회사, 연구소 등에서 쉽게 응용이 가능하여 본 연구 과제를 통해 기술 이전한 (주)코미팜에 불이익이 갈 수 있을 것으로 생각 됨
- 더불어 현재 개발된 변형 재조합 Stx2e 독소이드에 대한 기술이전 기업인 (주)코미팜의 제품 판매 전에 보호를 위해 추가 특허출원 및 특허 등록이 필요하여 현재 추가 특허 출원 준비 중에 있음
- 또한 본 연구 과제를 통해 개발된 변형 재조합 Stx2e 독소이드는 경구용 전달시스템으로 활용성이 인정되어 특허 출원을 위해 현재 실험이 진행 중임
- 따라서 본 연구 결과보고서는 추가 특허 출원이 끝나는 시점까지 보안이 필요하다고 생각 됨.

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

- 주관연구 책임자 및 기술이전 기업인 (주)코미팜의 요구에 따라 추가 특허 출원이 필요하다고 판단되어 보안이 필요할 것으로 생각 됨
- 특허법률사무소에 의견을 청취하여 본 결과, 기술이전 기업인 (주)코미팜에서 본 과제에 의해 개발된 변형 재조합 Stx2e 독소이드 제품을 제조 판매하기 위해 보호받기 위해서는 추가할 특허가 더 있기 때문에 추가될 특허 출원 시까지 보안이 필요하다고 판단 됨.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.