318039-3

구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축

2021

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개( )발간등록번호(○)

가축질병대응기술개발 사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003451-01

구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축

2021.04.09

주관연구기관/ 충남대학교
협동연구기관/ 코미팜(주)
협동연구기관/ 중앙백신연구소(주)

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축"(개발기간 : 2018.04.26 ~ 2020.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 04. 09

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단 (대표자) 손영아 (인)
협동연구기관명 : ㈜코미팜 (대표자) 문성철 (인)
협동연구기관명 : ㈜중앙백신연구소 (대표자) 윤인중 (인)
참여기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박봉균 (인)

주관연구책임자 : 이 종 수
협동연구책임자 : 김 주 헌
협동연구책임자 : 최 환 원
참여기관책임자 : 박 종 현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>318039-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2018.04.26
-
2020.12.31</td><td>단 계 구 분</td><td>3단계/
3단계</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">가축질병대응기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">이종수</td><td>해당단계
참여연구원 수</td><td>총: 41명
내부: 19명
외부: 22명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부: 660,000천원
민간: 220,000천원
계: 880,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원 수</td><td>총: 41명
내부: 19명
외부: 22명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 660,000천원
민간: 220,000천원
계: 880,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">충남대학교 수의과대학</td><td colspan="2">참여기업명
㈜코미팜
㈜중앙백신연구소</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

◎ 본 연구개발의 목표는 광범위 항원성을 지니는 구제역 O형과 A형의 고효율 재조합 백신 개발과,

◎ 신규 면역증강제를 포함하는 구제역 O형과 A형 재조합 혼합백신의 실험동물/목적동물 효능평가,

◎ 그리고 재조합 구제역 백신의 시제품 제작 및 임상시험 계획서 제출을 목표로 연구하였음.

◎ 연구의 성과로는 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼기술의 확립을 통해 O형과 A형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고,

◎ 신규의 분자면역증강제 단백질 역시 선별/발현/정제하였으며,

◎ 신규의 면역증강제가 포함된 O형과 A형 재조합 혼합항원에 대한 면역원성 효능검증을 실험동물(마우스)과 목적동물(돼지, 소)에서 검증하였고, 구제역바이러스에 대한 방어 효능(중화항체 형성능)을 검증하여 O형과 A형 재조합 혼합항원 백신에 대한 임상시험 계획서를 제출하였음.

◎ 또한, 재조합 항원의 대량생산 및 시제품을 제작하여 시제품의 효능과 안정성등을 확인하였음.

◎ 본 연구의 성과물로는 SCI급 저널 5편, 국제학술발표 25건 그리고 특허출원 3건 및 특허등록 2건의 결과를 얻었으며, 본 과제를 통한 인력양성의 결과로 박사 2명, 석사 5명의 인재를 양성하였음.

◎ 본 연구에 의해 개발된 기술인 “구제역바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도”에 관한 등록특허는 산업화를 위해 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소과 기술이전계약 3건을 체결하였음.

<요약문>

<table>
<tr><td>연구의
목적 및 내용</td><td colspan="5">▣ 광범위 항원성을 지니는 구제역 O형 고효율 재조합 백신 개발
▣ 광범위 항원성을 지니는 구제역 A형 고효율 재조합 백신 개발
▣ 신규 면역증강제 선발 및 효능 검증
▣ 신규 면역증강제를 포함하는 구제역 O, A형 고효율 재조합 백신 효능평가
▣ 개발된 재조합 구제역 백신의 대량 생산시스템 연구
▣ 재조합 구제역 백신의 임상시험 계획서 제출</td></tr>
<tr><td>연구개발성과</td><td colspan="5">1. 광범위 항원성을 지니는 구제역 O형 고효율 재조합 백신 개발
◎ O형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가
2. 광범위 항원성을 지니는 구제역 A형 고효율 재조합 백신 개발
◎ A형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가
3. 신규 면역증강제 개발
◎ 신규 면역증강제의 확보 및 실험동물을 통한 효능 검증
4. 신규 면역증강제를 포함하는 구제역 O, A형 고효율 재조합 백신 효능평가
◎ 신규 면역증강제가 포함된 O, A형 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물 효능평가
5. 개발 재조합 백신의 대량 배양 평가 및 임상시험 계획서 제출
◎ O형과 A형 재조합 항원에 대한 발현 최적화 및 대량생산 공정연구
◎ 대량 생산 가능한 플랫폼의 공장 단위 시제품 3개 Lot 생산
◎ 재조합 백신 임상시험 계획서 제출</td></tr>
<tr><td>연구개발성과의
활용계획
(기대효과)</td><td colspan="5">◉ 기존 백신과 차별화된 구제역 재조합백신 제작 플랫폼 기술 확보
◉ 구제역에 대한 신속 방어 및 지속면역 유도 가능 백신 후보물질 확보
◉ 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합백신 기술 확보
◉ 안전하고 경제적인 재조합백신 대량생산시스템 구축 및 활용
◉ 신규 면역증강제 개발과 관련한 생물학분야 연구 증대 및 적용
◉ 국내 동물백신회사를 통한 재조합백신의 제조 및 판매 승인을 통한 자체 제품화
◉ 국내 구제역백신 산업 시장 확대 및 수입 대체 효과
◉ 원가절감등에 의한 국내 구제역백신의 수출 경쟁력 강화
◉ 구제역 국가적 대유행 상황에 대한 억제력 및 백신 자주권 확보</td></tr>
<tr><td>국문핵심어
(5개 이내)</td><td>구제역</td><td>재조합백신</td><td>대량생산시스템</td><td>효능평가</td><td>면역증강제</td></tr>
<tr><td>영문핵심어
(5개 이내)</td><td>FMD</td><td>Recombinant vaccine</td><td>Mass production</td><td>effect evaluation</td><td>Immune stimulant</td></tr>
</table>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의 개요 ····· 1
제2장. 연구수행 내용 및 결과 ····· 18
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 113
제4장. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 115
붙임. 참고 문헌 ····· 117

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

◉ **기존의 불활화백신의 문제점을 보완하고, 장점은 부각시킬 수 있는 다른 형태의 백신 개발이 필요함. 즉 기존의 불활화백신이 임상적 감염을 막을 수 있음에도 불구하고 문제점과 불편함이 분명히 존재하기 때문에 차세대 백신 개발의 필요성은 끊임없이 제기되어 왔으며, 실제로 전 세계적으로 그에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 추세임.**

◉ 대표적으로, **① 기존의 백신은 구제역 병원체를 이용해 만들어진다는 점에서 그 위험성이 남아 있다는 문제점이 있음.** 백신접종으로 인해 상피세포에서 바이러스의 증식이 조금이나마 일어날 수 있는 가능성이 있고, 그로 인해 백신을 접종한 가축이 추후 실제 구제역 바이러스 감염에 대해 캐리어 상태로 남아있을 수 있는 가능성 역시 존재함.

◉ 그리고 **② 구제역 바이러스를 직접 이용해서 만드는 문제점의 연장선상에서, 기존의 백신은 제조공정에 있어 높은 방역수준을 갖춘 시설이 필요하다는 단점이 있음.** 실험실이나 백신 제조 공장에서 이용되는 바이러스가 밖으로 퍼져나가 감염원으로 작용할 수 있기 때문에 그 자체로 문제가 될 수 있으며 구제역이 발생하지 않는 청정국에서는 쉽게 백신제조를 결정하기 힘듦.

◉ 다음으로 백신의 효능이나 위험성을 검증하기 힘들다는 단점이 있음. **③ 위험성 검증을 위해 차폐된 시설에서의 동물실험이 항상 필요하고 각각 제조된 백신마다 그 성능을 일정하게 유지하기 어려움.**

◉ 대부분의 구제역 백신은 구제역바이러스를 감염시킨 세포의 상층액을 농축시켜 만들기 때문에 많은 양의 non-structural protein을 함유하기 때문에 **④ 실제로 구제역바이러스에 감염된 동물과 백신접종되어 면역성을 가진 동물을 구별하는 NSP-antibody test가 어려울 수 있음.**

◉ 따라서 **구제역바이러스에 대한 차세대 백신의 개발은 구제역바이러스 전체를 이용해 만들지 않으며, 혈청형에 따른 빠른 재생산이 가능하고, 균일한 성능의 백신 제조가 가능하며, 백신 접종된 동물과 자연감염 동물을 구별할 수 있는 방향으로 진행되어야 함.**

◉ 본 “구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축” 연구에서는 **본 연구팀이 수년간 연구한 항원발현 시스템들을 이용하여 효율이 보다 좋은 구제역 항원발현 및 전달시스템을 개발하고자 하며, 이를 바탕으로 재조합 구제역 백신을 개발하고자 함.**

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 배경

(1) 구제역 (Foot and Mouth disease; FMD)

◉ 구제역 (Foot and Mouth Disease)은 우제류 (Cloven hoofed animal)에 감염되는 질병으로 특히 소, 돼지, 양, 염소, 사슴등에 잘 감염하는 것으로 알려져 있음.

◉ 구제역은 수포성 질환으로 동물의 입술, 혀, 잇몸, 코, 발굽 사이 등에 물집 (수포)이 생기는 것이며, 체온이 급격히 상승하거나 식욕이 저하됨으로 인해 심하게 앓거나 죽게 되는 질병으로 국제수역사무국 (OIE)에서 A급 질병 (전파력이 빠르고 국제교역상 경제피해가 매우 큰 질병)으로 분류하며 우리나라 제1종 가축전염병으로 지정되어 있음. 발병한 환축에서는 24시간이내에 증상들이 나타나 유연, 수포발생이 관찰되며 발생한 수포는 곧 터져서 짓무르면서 환축의 보행 장애를 유발하게 됨. 6개월 미만의 송아지에서는 구제역 감염 시 심근염에 의해 죽는 경우가 있음.

◉ 구제역의 원인체는 Picornaviridae Aphthovirus속의 양성 단일가닥 RNA 바이러스로 envelope가 없는 구조단백질로 이루어진 캡시드 (capsid)로 이루어진 바이러스 이며, 7개의 혈청형 즉 A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3형으로 분류되고, 이 주요 혈청형은 다시 80여러 가지의 아형으로 나뉘며, 혈청형은 혈청 아형내에서 변이가 잘 일어나고, 혈청형간의 교차 면역은 이루어지지 않는 것으로 알려져 있음.

◉ 구제역 바이러스는 유기용매, 낮은 온도, 습기 있는 중성 pH의 환경에서 일반적으로 저항성을 나타내나, 열, 산 및 알칼리에 약하며, 특히 pH에 의한 감수성이 매우 높아 pH가 6.5 이하나 11이상일 때 빠르게 감염력이 소실됨.

◉ 구제역의 중요한 특징 중 하나는 빠른 전파력으로서 폐사율 자체가 높지는 않으나 높은 이환율 때문에 가축산업에 막대한 경제적 피해를 유발하며 또한, 혈청형 또는 혈청아형 내에서 변이가 잘 일어나지만, 혈청형간의 교차 면역은 잘 이루어지지 않기 때문에 그 예방 및 질병 발생의 조절이 매우 어려운 질병임.

◉ 따라서 구제역 예방 및 질병컨트롤을 위한 연구 및 개발은 계속적으로 이루어져야 하며, 그 필요성이 강조되고 있음.

(2) 구제역의 발생과 피해

◉ 구제역은 1514년 이탈리아 북부지역에서 최초 발생된 이후 19세기에는 전 세계적으로 발생하여 왔음. 구제역이 발생하였던 많은 나라에서는 다양한 근절 및 박멸정책으로 인해 현재

많은 나라에서 발생하지 않고 있으나, 아직까지 아프리카, 중동, 아시아 및 남미에서 만연하고 있음.

◉ 우리나라 주변 발생 현황은 중국에서 2010년 1월초부터 중국의 북경시, 광동성, 강서성, 귀주성, 티벳 등 여러지역에서 산발적으로 발생하였고, 몽골, 대만, 홍콩 등에서도 발생하였으며, 일본 미야자키현에서 O형 (Mya-98 lineage) 구제역 바이러스가 2010년 4월 9일 최초발생 이후 현재까지 지속적으로 발생하고 있는 것으로 보고됨.

◉ 한국은 1917년 소규모로 발생하기 시작하여 1934년까지는 전국적으로 발생하였으나, 그 이후 발생이 없다가 2000년 3월에 경기도, 충북 및 충남지역의 소에서 구제역 발생이 보고되었음. 3개도 6개 시군에서 발생하여 2216마리의 소가 살처분되어 약 3006억원의 경제적 손실을 입었음. 2002년 5월에는 경기도와 충북지역의 돼지에서 구제역이 발생 보고되었고, 16만두가 살처분되어 1058억원의 재정 소요가 부담되었음.

◉ 2010년 1월에는 경기도 포천의 소에서 8년 만에 6농가 29두에서 다시 발생하였으며, 또한 2010년 4월, 5월에 인천광역시 강화군, 경기도 김포시, 충청북도 충주시 및 충청남도 청양군 지역에서 11농가에서 총 26두가 발생한 것으로 보고됨. 2010년 11월에도 구제역이 발생하여 전국적으로 확산됨에 따라서 전국의 소350여만두와 돼지 820여만 두에 대하여 구제역 백신을 2차까지 접종함. 이 시기에 피해액이 3조가 넘는 것으로 추산됨.

◉ 2014년 5월 29일 백신 청정국으로 지정 되었지만, 2014년 12월에 충북 진천에서 구제역이 발생하여 2019년까지 지속적으로 발생되고 있음.

◉ 최근인 2018년 3월에는 경기도 김포의 돼지농장에서 A형 구제역이 최초로 발생하였음.

구분		발생 기간	발생 건수(축종)	혈청형	피해 규모
2000년		3.24 ~ 4.15 (23일간)	15건 (소 15건)	O형	-
2002년		5.2 ~ 6.23(53일간)	16건 (소 1두, 돼지 15건)	O형	-
2010년	1월(포천등)	1.2 ~ 1.29 (28일간)	6건 (소 6건)	A형	2조 7383억
	4월(강화등)	4.8 ~ 5.6 (29일간)	11건 (소 7건, 돼지 4건)	O형	
	10/11년(안동등)	'10.11.28. ~ '11.4.21 (145일간)	153건 (소 97건, 돼지 55건등)	O형	
2014년		7.23 ~ 8.6 (15일간)	3건 (돼지 3건)	O형	17억
2014~2015년		'14.12.3 ~ '15.4.28 (147일간)	185건 (돼지 180건, 소 5건)	O형	635억
2016년		1.11 ~ 3.29 (45일간)	21건 (돼지 21건)	O형	80억
2017년		2.5 ~ 2.13 (9일간)	9건 (소 9건)	O, A형	98억
2018년		3.26 ~ 4.1 (7일간)	2건 (돼지 2건)	A형	42억
2019년		1.28 ~ 1.31 (4일간)	3건 (소 3건)	O형	86억

그림 1. 구제역 발생현황 및 피해현황, 농림축산식품부

(3) 현 구제역 백신 및 그의 한계점

◉ 현재 구제역 발생에 대한 특별한 치료방법이 없기 때문에 구제역에 대한 대책은 질병의 발생 예방과 확산 방지에 중점을 두고 있음. 구제역 확산에 대한 대책으로는 감염동물의 살처분, 감수성동물의 이동통제, 축사와 차량의 철저한 소독 및 방역 등이 실시되고 있음. 더불어 질병의 발생 예방을 위한 백신 접종이 현재 실시되고 있음. 구제역 백신접종 미실시 농가는 500만원 이하의 과태료가 부과되며 백신접종을 하지 않은 구제역 감염농장은 살처분 보상금이 60%이하로 지급되는 등 정책적으로 백신접종을 의무화 하고 있음.

◉ 백신 접종은 구제역 예방에 필수적인 방책으로 전 세계적으로 백신청정국 (FMD-freee with vaccination) 또는 상재발생국 (endemic)은 백신접종을 통해 구제역을 예방하고 있으며, 구제역이 발생하지 않는 구제역 청정국 (FMD-free)에서도 긴급한 경우에 백신을 실시할 수 있도록 백신생산용 항원을 비축하고 있음. 구제역 백신생산은 국제적으로 세계동물보건기구 (OIE)에서 명확하게 규정하고 있음.

◉ 구제역 백신은 구제역 바이러스를 특수 시설 (BSL3)에서 증식시킨 후 이를 순수하게 정제한 후 농축 하여 화학제품 (Binary Etheleneimine)을 사용하여 불활화 시켜 제조함. 이렇게 정제된 불활화 바이러스 (항원)를 mineral oil에 섞어 미세한 입자로 만든 것이 구제역 불활화 백신임.

◉ 우리나라에서 사용하는 백신은 다음의 표와 같이 2가백신이 전량 수입되어 상용화 되어 있음.

표 1. 국내 구제역 백신 유형

현재의 구제역 백신	
O type + A type	O (O1 manisa + O3039) + A22 Iraq (영국 메리얼) O Primorsky + A Zabaikalsky (러시아 아리아) O Campus + A24 Cruzeiro + A Arg 2001 (아르헨티나 바고)

◉ 백신은 송아지의 경우 2개월령에 1차, 1개월 후 2차 접종이 권장되며, 모든 소는 4-7개월 간격으로 접종함. 돼지는 모돈의 경우 분만 약 1개월 (3-4)주 이전에 접종하며, 웅돈은 4-7개월 간격으로 접종, 자돈은 2-3개월령에 1차 접종함. 종돈장의 자돈중 암컷은 2개월령의 1차, 1개월후 2차 접종이 권장됨. 소는 O+A형 백신을, 돼지에는 O형 백신을 접종함.

그림 2. 국내 구제역 백신 접종 프로그램, 농림축산식품부

◉ 구제역은 혈청형 사이에 여러 변종이 있을 뿐 아니라 한 혈청형 내에서도 많은 변종이 존재하기 때문에 백신 생산에 어려움이 있음. 혈청형에 대한 교차면역이 되지 않으며, 같은 혈청형에 속하는 두 주(strain)가 가진 유전자 서열에서 전체 유전자의 30%까지 차이가 있는 경우도 있음. 따라서 구제역 백신은 혈청형 마다 적용되어야 한다는 것이 중논임. 따라서, 구제역 백신은 유행지역의 혈청형에 따라 선별되어 만들어져야 하며 발병중인 혈청형의 파악과 그에 따른 백신 제조까지 빠른 대처가 요구됨.

◉ 구제역 발생농장의 항체형성률은 0-80%까지 매우 다양하게 나타나고 있는데, 항체형성율이 낮은 농가는 물론이고 80% 이상의 높은 항체형성율을 나타내고 있는 농장에서도 구제역이 발생하고 있음.

◉ 구제역과 관련된 세계동물보건기구 (OIE)의 기술보고서에 따르면 6PD50 이상의 고역가백신을 접종받은 돼지라 할지라도 구제역 바이러스에 감염되어 임상증상을 나타내는 돼지와 접촉했을 경우 일반적으로 임상증상이 나타남, 이러한 현상은 백신의 질적 문제가 아니라 구제역에 감염된 돼지의 경우, 소에 비해 많은 양의 바이러스를 배출하거나 돼지를 감염시킨 구제역 바이러스의 병원성과 관련이 있다고 밝혀짐.

◉ 즉 백신접종에 의해 전반적인 구제역 항체수준이 높은 농가라 할지라도 일단 구제역 바이러스가 농가내로 유입되어 항체수준이 낮거나 허약하여 면역수준이 낮은 감수성 개체가 구제역에 감염될 경우, 폭발적인 바이러스 배출을 통해 동거축을 감염시킬 수 있음. 그렇기 때문에 항제형성율이 전반적으로 높은 농장이라 할지라도 구제역이 발생할 가능성을 완전히 배제할 수는 없는 상황임.

(4) 구제역 재조합 백신 개발의 중요성

◉ **기존의 구제역 불활화백신의 문제점을 보완하고, 장점은 부각시킬 수 있는 다른 형태의 백신 개발이 필요함. 즉 기존의 불활화백신이 임상학적으로 구제역 감염을 막을 수 있고 효과적임에도 불구하고 문제점과 불편함이 분명히 존재하기 때문에 차세대 백신 개발의 필요성은 끊임없이 제기되어 왔으며, 실제로 전 세계적으로 그에 대한 연구가 활발하게 진행되고**

있는 추세임.

◉ 대표적으로, **① 기존의 불화화백신은 구제역바이러스 자체를 대량 배양하여 만들어진다는 점에서 그 위험성이 남아 있다는 문제점이 있음.** 완벽하게 불활화되지 않았을 경우 백신접종으로 인해 상피세포에서 바이러스의 증식이 조금이나마 일어날 수 있는 가능성이 있고, 그로 인해 백신을 접종한 가축이 추후 실제 구제역 바이러스 감염에 대해 캐리어 상태로 남아있을 수 있는 가능성 역시 존재함.

◉ 그리고 **② 구제역 바이러스를 직접 이용해서 만드는 문제점의 연장선상에서, 기존의 불활화 백신은 제조공정에 있어 높은 방역수준을 갖춘 시설내에서 모든 과정이 이루어지므로 막대한 비용이 요구되는 시설이 필요하다는 단점이 있음.** 실험실이나 백신 제조 공장에서 이용되는 바이러스가 밖으로 퍼져나가 감염원으로 작용할 수 있기 때문에 그 자체로 문제가 될 수 있으며 구제역이 발생하지 않는 청정국에서는 쉽게 백신제조를 결정하기 힘듦.

◉ 다음으로 백신의 효능이나 위험성을 검증하기 힘들다는 단점이 있음. **③ 위험성 검증을 위해 차폐된 ABSL3 시설에서의 동물실험이 항상 필요하고, 각각 제조된 백신마다 그 효능을 검증하고 일정하게 유지하기가 어려움.**

◉ 대부분의 구제역 백신은 구제역바이러스를 감염시킨 세포의 상층액을 농축시켜 만들기 때문에 많은 양의 non-structural protein을 함유할 가능성이 높음 **④ 실제로 구제역바이러스에 감염된 동물과 백신접종되어 면역성을 가진 동물을 구별하는 NSP-antibody test가 어려울 수 있음.**

◉ 따라서 **구제역바이러스에 대한 차세대 백신의 개발은 구제역바이러스 전체를 이용해 만들지 않으며, 혈청형에 따른 빠른 재생산이 가능하고, 균일한 성능의 백신 제조가 가능하며, 백신 접종된 동물과 자연감염 동물을 구별할 수 있는 방향으로 진행되어야 함.**

그림 3. 구제역 재조합 백신 개발

(5) 본 구제역 재조합 백신의 핵심기술

(가) 대장균시스템에 의한 가용단백질 (soluble form)의 발현 및 정제를 이용한 재조합 구제역 백신의 개발

◉ 구제역 바이러스에서 가장 항원성이 높은 VP1을 이용한 백신연구가 진행되어 있음 (Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: Evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites, Virology, Volume 179, Issue 1, November 1990, Pages 26-34). 그중에서 VP1에서 가장 항원성이 높은 부위를 분석하여 펩타이드의 형태로 제작하여 백신에 이용한 연구들이 있음 (Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine, Vaccine 20 (2002) 2603-2610).

◉ VP1 부분에서도 항원성의 중요한 역할을 가지고 있는 G-H loop와 C-terminus 부분을 단백질로 발현 시켜 백신으로 사용한 연구가 있음 (Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs Antiviral Research 97 (2013) 145-153).

◉ 그러나 펩타이드의 한계성과 대장균 내 발현 시 불용성단백질 (Insoluble form)로의 발현에 따른 정제 및 대량생산의 어려움 등에 의해 현재까지 대장균 발현 항원의 재조합 구제역백신으로서의 개발에 한계가 있었음.

◉ 본 연구팀은 지난 수년 동안 구제역 재조합 백신 개발 연구를 수행해 왔으며, 다양한 구제역의 재조합 항원을 만들 수 있는 플랫폼 기술에 대해 연구를 수행해 오고 있음.

◉ 여러 종류의 플랫폼 기술들중 고효율의 대장균 발현시스템을 이용하여 가용성 (soluble)의 구제역 항원 epitope들을 발현시켜 이를 구제역 재조합 백신으로 개발 가능한 플랫폼 기술을 완성하였음.

◉ 본 연구팀은 FMDV의 O serotype용 재조합 항원 및 A serotype에 대한 specific 재조합 백신용 항원단백질을 제작하기 위해 발생가능한 지역형들의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위를 포함하는 O serotype용, A serotype용 Multi-VP1 epitope (OVM, AVM) 항원단백질을 가용단백질 (Soluble protein) 형태로 다량발현을 유도하고, 이를 정제하여 실험동물 및 목적동물에서의 백신효능을 검증하는 연구로, 경제적이고 안전한 재조합항원의 생산과 단기간 내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 예방용 재조합 항원 발현시스템의 구축 및 생산하고자 함.

◉ 또한 산업적으로 경제적인 구제역 재조합 항원의 정제 연구를 수행할 예정이며, 신규의 면역증강제를 선별하여 재조합 구제역 백신의 면역원성을 증대시키는 효과를 나타내고자 함.

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

◉ 국내에 수입되고 상용화되어 접종을 하고 있는 구제역 백신들은 모두 사독백신으로 불활화된 바이러스 항원에 오일(oil) 부형제를 혼합해 이중오일 형태로 제조된 형태임. 우리나라에서는 국산 구제역 불활화백신을 개발하고 있음. 검역본부에 따르면 구제역 백신의 경우 2020년까지 한국형 구제역 백신을 생산하겠다는 국정목표의 첫 관문인 백신생산 원천기술개발을 완료하였음. 검역본부에서 확보한 원천기술은 백신 생산용 종자바이러스, 종자바이러스 대량증식을 위한 부유세포 배양기술, 배양된 세포로부터 백신원료가 되는 항원을 고순도(2㎍/㎖)로 추출하는 전 과정을 포함하고 있음.

그림 4. 농림축산식품부, 구제역 백신 국산화 추진과정

◉ 검역본부의 원천기술은 지난 2014년 진천에서 발생한 O형 바이러스를 기반으로 개발해 향후 활용도를 크게 높였다는데 의미가 큼. 또한 이미 확보한 종자바이러스 외에도 해외에서 발생한 바이러스의 유전자 정보만으로도 새로운 종자바이러스를 개발할 수 있는 시스템을 구축해, 해외 구제역 발생에 따른 사전 대응 백신을 개발할 수 있는 가능성도 열어 놓음.

◉ 이번에 확보한 종자바이러스와 원천기술은 향후 백신공장 (충북 오송) 완공을 목표로 설립된 민간백신회사 (㈜에프브이씨, FVC)에 민관 공동연구 방식을 통해 이전함으로써 당초 목표인 국산백신생산을 차질 없이 추진해나갈 예정으로 알려져 있음.

◉ 불활화 백신에 대한 연구 이외에 바이러스 벡터를 이용한 구제역 백신과 재조합 단백질을 이용한 백신 연구가 진행되고 있음. 2016년 말, 바이오의약품 벤처기업 바이오큐어팜과 파로스백신은 유전자재조합 기술로 백신에 필요한 재조합 단백질 면역원을 생산하는데, 지역별 국가별 발생 중인 구제역 바이러스 타입에 따라 맞춤 제작하는 형태의 백신인 파로박스를 출시하고 해외시장에도 진출하였음.

◉ 이와 더불어 백신 보조제 개발 및 접종 방법의 개선, 항원뱅크 시스템 구축, 백신 효능 평가기술 시스템 등을 위한 연구가 활발히 진행되고 있음.

⑵ 시장현황

◉ 정부는 2017년 2월 1일부터 구제역 백신 2회 접종을 의무화하였음. 소의 경우 2개월에 1차 접종, 3개월에 2차 접종 이후 4-7개월 간격으로 지속 접종하며, 6개월 동안 사육 후 출하하는 비육돈의 경우 생 후 8주 전후하여 접종하고, 모돈의 경우 1년 2회 접종함. 전국 소 사육 농가 98,432개 농장 중 99.4% 백신 접종을 완료하였지만, 항체형성율이 많게는 87%(보은) 정도로 높지만 지역에 따라 5% 수준에 그치는 경우도 있었음.

◉ 2017년 방역 예산은 2032억원으로, 2회 접종 의무화에 따라 더 많은 백신 공급이 불가피해졌고, 그 비용 또한 만만치 않은 것으로 사료됨. 또한, 백신을 접종했다 하더라도, 항체형성율이 저조할 경우 구제역이 발생할 수 있기 때문에 국내 자체적인 그리고 더 효과적인 구제역 백신 개발이 요구됨.

⑶ 경쟁기관현황

◉ 국내에서 백신제조업체로는 고려비엔피, 녹십자수의약품, 코미팜, 바이오큐어팜, 파로스백신 등이 구제역 백신에 대한 품목 허가를 취득하였음. 대부분의 백신 회사가 불활화 백신을 제조하고 있으며, 바이오의약품 벤처기업인 바이오큐어팜과 파로스백신은 협업을 통해 유전자재조합 기술로 백신을 생산하고 있음. 대장균 발현 시스템을 이용하여 저비용으로 대량생산이 가능하며, 작년에는 해외 시장 진출을 꾀하기도 하였음.

⑷ 지식재산권현황

◉ 구제역 불활화 백신과 차별화된 백신 시스템이 요구되는 상황에서 새로운 재조합 백신에 관한 특허출원과 논문이 보고되고 있으나, 아직까지 그 효능과 효율성이 인정받지 못하고 있는 실정임.

⑸ 표준화현황

◉ 아직까지 국내 표준화 기준이 부재함.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 재조합 단백질을 이용한 백신

◉ 구제역 바이러스 전체 단백질을 재조합으로 발현시킨 사례는 기술적인 문제 등으로 현재까지 보고되어 있지 않은 상황이로 단지, B cell이나 T cell epitope로 구성된 단일 폴리펩타이드 체인이나 B cell과 T cell 모두에 대한 에피토프로 구성된 멀티펩타이드를 이용해 병원체에 대한 면역을 매개하는 백신법으로 FMD의 경우 지금까지의 연구에서 실험동물에서의 효과가 보고되어 있음.

◉ 구제역 바이러스의 capsid는 구제역 바이러스의 실제 감염과 같은 항체형성을 매개하는 것으로 밝혀져 있으며, B cell epitope (VP1, VP4)와 T cell epitope (2C, 3D)를 E. coli나 N. benthamiana에서 발현시킨 백신이 개발되어 있음. 추가적으로 기니피그에서 정제된 단백질에 의해 taiwan/O 타입 구제역 바이러스에 대한 면역이 형성되었음이 보고되었음.

◉ 하지만 실험동물에서의 실험 결과에도 불구하고 아직까지 농장동물에게 상업적으로 이용되고 있지 않는 상황임. 따라서 앞으로의 연구 성과에 따라 차세대 구제역 백신의 강력한 대안이 될 수 있는 가능성이 있음.

(2) 시장현황

◉ 2016년을 기준으로 69개국이 백신 비접종 구제역 청정국으로 지정되어 있고, 볼리비아, 브라질, 콜롬비아, 말레이시아 등 13개 국가는 백신 접종 구제역 청정국으로 지정됨. 러시아, 중국, 태국, 베트남 등을 포함한 많은 국가들이 여전히 구제역 발생지역으로 백신 접종을 실시하고 있는 것으로 사료됨.
출처 : OIE official disease status

◉ 세계적으로 구제역 백신 제조 기술 및 판매 허가를 보유하고 있는 백신 제조업체는 약 30개 이며, 다양한 국가에서 총 50개 이상의 제품이 판매 허가를 승인 받았음. 대부분 불활화 백신으로 oil adjuvant를 거의 사용하고 있음.

◉ 대표적으로 현재 국내에서는 베링거인겔하임이 제조하는 수입 백신을 사용 중이며, 러시아 국가연구기관인 FGBI ARRIAH에서 생산한 아리아백 2가 백신 또한 긴급백신으로 공급되고 있음. 동방에 따르면, 아리아백 2가 백신은 O형(O Primorsky)과 A형(A Zabaikalsky) 백신주를 함유하고 있는데, O형 프리모스키 백신주는 2014년 재발한 진천주와 유사하며 유전자형도 같고, A형 자바이칼스키 백신주는 기존에 국내에서 사용되던 A형 백신주(A22 Iraq)와는 다르지만, 지난 겨울 연천에서 발생했던 A형 구제역 바이러스와 같은 유전자형일 뿐만 아니라 염기서열이 99% 이상 일치한다고 보고됨. (2017.2, 농림축산식품부 보도자료)

◉ 2017년 기준으로 전 세계적으로 구제역 백신의 연간 접종 규모는 약 23억5000만 두분으로 추정됨. 이 중 68%에 달하는 16억두 분을 소비하는 곳이 바로 중국임. 1950년대부터 구제역 연구를 해온 중국은 우리와 달리 백신을 직접 생산하는 나라임. 중국은 OIE(국제수역사무국)에 구제역 발생 사항을 상세히 보고하지 않지만, 거의 매년 구제역이 발생하는 만큼 모든 돼지에게 O형 백신을 접종시키고, 모든 소에 O형과 아시아 1형 백신을 접종시키는 '필수 면역 정책'을 시행하고 있음. 백신은 중국 농업부 허가를 받은 7개 기업이 생산하는데, 중국 정부는 1997년부터 구제역 예방을 위한 백신 생산을 지원하고 있고, 현재 중앙 정부와 지자체가 농가의 백신 구입 비용 중 30~80%를 부담하고 있음.

(3) 경쟁기관현황

◉ 현재 국내 품목 허가된 구제역 백신은 크게 3종임. 베링거인겔하임이 제조해 국내 제약사들이 소분판매하고 있는 구제역 백신 5개 품목과 (주)동방이 유통하는 러시아산 백신 '아리아백', 케어사이드가 공급하는 아르헨티나산 백신 '아토젠'임. 구제역 백신의 국내 생산을 목표로 연구와 개발이 활발히 진행되고 있지만, 아직까지는 여러 나라에서 생산되는 백신을 수입하는 실정임. 따라서, 국내 자체 구제역 백신 개발을 위해서는 수입하고 있는 백신보다 항체 형성율, 안정성, 생산 효율, 이상육 발생 정도 등 여러 가지 측면에서 월등해야 함.

(4) 지식재산권현황

◉ 2000년 이후 유럽이나 미국에서 논문과 특허 출원이 증가하기 시작했으며, 중국에서도 재조합단백질에 대한 논문이 꾸준히 증가하고 있는 추세임. 구제역 구조 단백질의 재조합이나 수정 보완된 합성 단백질에 대한 논문이 급격히 증가함.

3. 연구개발 범위

가. 최종목표

▣ 구제역 발생 시 즉시 사용 가능한 재조합 백신 개발 및 대량생산 시스템 확립

나. 세부목표

(1) 광범위 항원성을 지니는 구제역 O형 고효율 재조합 항원 개발

◎ 광범위 항원성을 갖는 O형에 대한 최적의 재조합항원 발현 및 정제 (2OVM, 2J-OVM 항원)
◎ 재조합 O형 정제 항원에 대한 실험동물 효능평가
◎ 재조합 O형 백신항원에 대한 실험동물 효능평가

(2) 광범위 항원성을 지니는 구제역 A형 고효율 재조합 항원 개발

◎ 광범위 항원성을 갖는 A형에 대한 최적의 재조합 항원 발현 및 정제 (AVM 항원)
◎ 재조합 A형 정제 항원에 대한 실험동물 효능평가
◎ 재조합 A형 백신항원에 대한 실험동물 효능평가

(3) 신규 면역증강제 개발 및 메카니즘 연구

◎ 신규 면역증강제의 발굴 및 확보
◎ 신규 면역증강제의 실험동물을 이용한 효능 검증
◎ 신규 면역증강제의 메커니즘 연구

(4) 신규 면역증강제를 포함하는 구제역 O, A형 고효율 재조합 백신 효능평가

◎ 신규 면역증강제가 포함된 O형 재조합 백신에 대한 실험동물 및 목적동물(돼지) 효능평가
◎ 신규 면역증강제가 포함된 A형 재조합 백신에 대한 실험동물 및 목적동물(돼지) 효능평가
◎ 초기 면역 효능 평가 및 지속 면역 유도 평가
◎ 신규 면역증강제가 포함된 O형 재조합 백신에 대한 목적동물(mini-pig) 방어 효능평가
◎ 신규 면역증강제가 포함된 A형 재조합 백신에 대한 목적동물(mini-pig) 방어 효능평가

(5) 개발 재조합 백신의 대량 배양 평가 및 임상시험 계획서 제출

◎ O형과 A형 재조합 항원에 대한 발현 최적화
◎ O형과 A형 재조합 항원의 대량생산 공정 확립
◎ O형과 A형 재조합 항원의 정제화 공정 확립
◎ O형과 A형 재조합 백신의 안전성 검증
◎ 재조합 구제역 백신의 검정시험법 확립과 안정성 평가
◎ 생산 공정의 표준화 서류 완료
◎ 대량 생산가능한 플랫폼의 공장 단위 시제품 3개 롯트 생산
◎ 구제역 재조합 백신 임상시험 계획서 신청

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계

1. 연구개발의 추진전략·방법

◉ 본 과제인 **“구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축”**의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같이 주관기관인 충남대학교 수의과대학 이종수교수 연구팀의 **“구제역 예방 재조합 백신 개발 및 효능연구”**와 제1협동과제인 (주)코미팜 기술연구소의 김주헌 박사 연구팀의 **“구제역 재조합 백신의 제품화-I”** 및 제2협동과제인 ㈜중앙백신연구소의 최환원 박사 연구팀의 **“구제역 재조합 백신의 제품화-II”** 그리고 위탁과제인 농림축산검역본부 박종현연구관 연구팀의 **“구제역 재조합 백신의 효능검증 연구”**로 구성하여 연구를 수행하고자 함.

그림 5. 구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축 연구를 위한 과제구성

◉ 본 과제인 **“구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축”**의 성공적이고 원

활한 추진을 위하여 다음과 같은 협동기관들간의 기본 연구와 상호협력 체계를 구축하여 성공적인 연구를 수행하고자 함.

그림 6. 구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축 연구를 위한 상호협력 체계구성

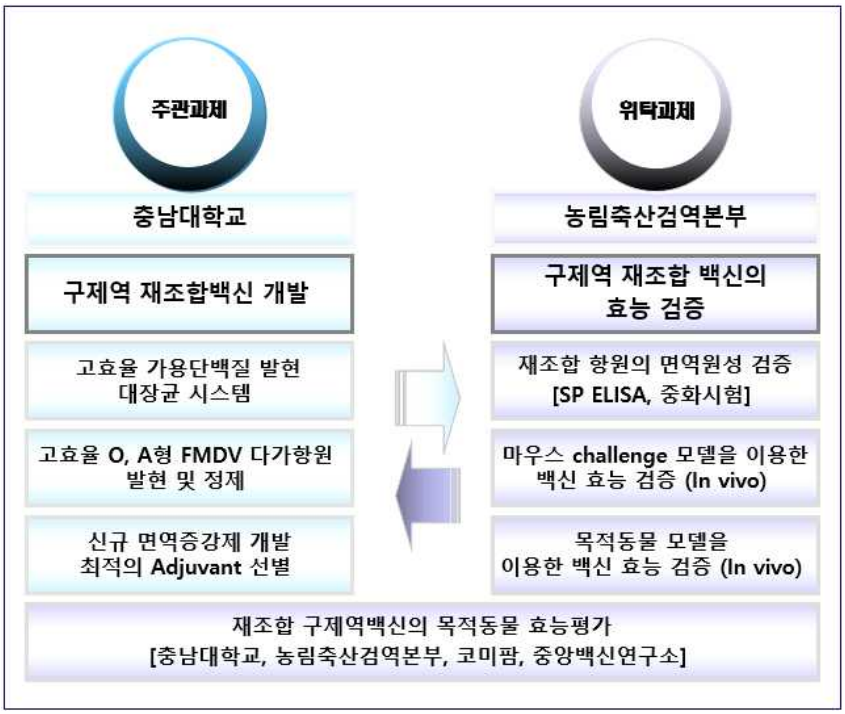


그림 7. 주관기관을 대상으로 한 구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축 연구의 상호협력 모식도

◉ 본과제의 성공을 위해 국내외 산·학·연의 관련 분야 전문가들과 전문토론그룹을 형성하고 기술교류를 수행할 예정임. 특히, 농림축산검역본부의 구제역백신센터와의 지속적이고 정기적인 교류를 통하여 성공적인 과제수행을 수행하려함.

◉ 각종 문헌 및 인터넷을 통한 자료조사 및 국내외 관련 분야 전문가와의 교류에 의해 구제역 예방에 관한 고급 정보를 체계적으로 수집, 확보할 예정임.

◉ 국외에 거주중인 한국인 전문가 및 외국 전문가의 유치, 초빙 또는 현지 활용을 통하여 최신 정보 및 기술을 확보하고, 취약기술을 보완할 수 있는 기술개발 시스템을 운영할 예정임.

◉ **전문가 활용방안**

전문가	소속	활용분야
구제역백신센터	농림축산검역본부	구제역바이러스에 관련한 모든 정보 논의
김명희박사	한국생명공학연구원	가용단백질 발현 대장균시스템 고도화 논의
◉ 국내 주요 백신연구기관과의 협력체계 구축 (농림축산검역본부, 국립보건원, 국제백신연구소, 대한백신학회, 면역백신기반기술센터)		

2. 연구개발의 추진체계

◉ 본 과제인 **“구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축”**의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같은 방법으로 연구를 수행하고자 함.

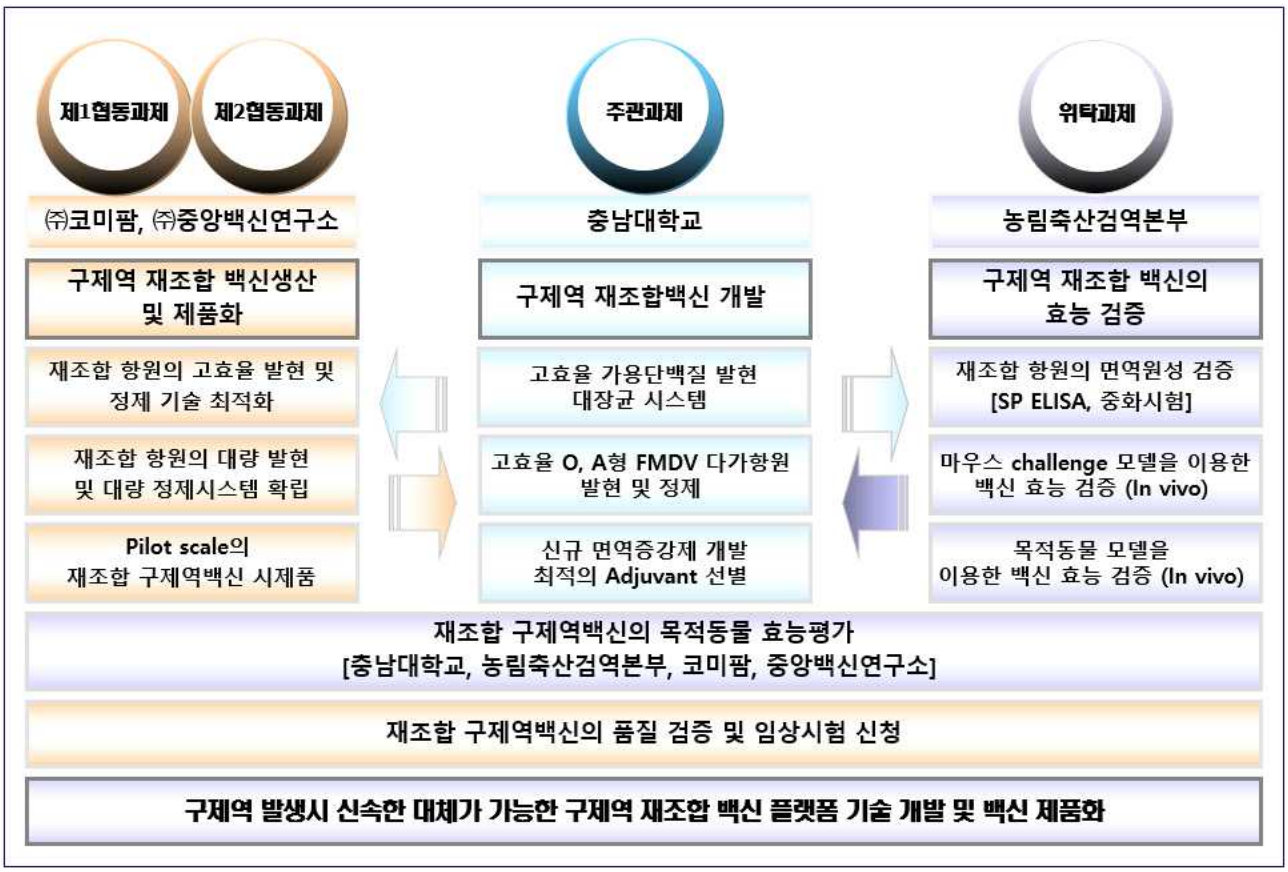


그림 8. 구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축 연구를 위한 추진체계

연구개발과제		총 참 여 연 구 원
과제명	구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축	주관연구책임자 (이종수)외

기 관 별 참 여 현 황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	2	11
대 학	1	6
국공립(연)		
출 연 (연)	1	4
기 타		

주관연구기관 : 충남대학교

구제역 예방 재조합 백신 개발 및 효능연구

연구책임자명
(이종수)외

담당기술개발내용

- ◉ 구제역 0형과 A형 재조합 항원 개발
- ◉ 신규 면역증강물질 선발 및 기작연구
- ◉ 구제역 0형과 A형 재조합 항원의 효능평가
- ◉ 구제역 0형과 A형 산업형 항원을 이용한 구제역백신 효능평가

협동연구기관 : 코미팜

구제역 재조합 백신의 제품화-I

연구책임자명
(김주헌)외

담당기술개발내용

- ◉ 재조합 구제역 항원의 정제 공정 및 정량법 표준화
- ◉ 재조합 구제역 백신 시제품 제조 및 대량 생산 공정 연구
- ◉ 재조합 구제역 백신의 대량 생산 공정 확립 및 제품화
- ◉ 재조합 구제역 백신 임상시험 신청

협동연구기관 : 중앙백신

구제역 재조합 백신의 제품화-II

연구책임자명
(최환원)외

담당기술개발내용

- ◉ 재조합 구제역 항원의 정제공정 및 정량법 표준화
- ◉ 재조합 구제역 백신 시제품 제조 및 대량 생산 공정 연구
- ◉ 재조합 구제역 백신의 대량 생산 공정 확립 및 제품화
- ◉ 재조합 구제역 백신 임상시험 신청

위탁연구기관:농림축산검역본부

구제역 재조합 백신의 효능검증 연구

연구책임자명
(박종현)외

담당기술개발내용

- ◉ 재조합 구제역 항원에 대한 실험동물 방어 효능평가
- ◉ 재조합 구제역 백신에 대한 실험동물 및 목적동물 효능평가

그림 9. 구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축 연구를 위한 추진체계

제 2 절 연구수행 내용 및 결과

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 구제역 O형과 A형 재조합 항원 개발 및 효능 검증 연구

◎ 본 연구결과는 2018년 8월 13일 종료된 농림축산식품부의 가축질병대응기술개발사업 **“구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증”** 과제의 연구내용을 약간 포함하고 있음.

◎ 즉, **“구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증”** 과제의 종료후 연구의 연속적이고 발전적인 결과 도출을 위하여 본 연구로 연결, 수행하여 결과를 도출하였음.

(1) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O-Jin/O-An/O-Man; OVM) 항원을 이용한 재조합 백신 개발 연구

◎ 본 연구에서는 기본적으로 광범위한 O serotype FMDV 방어용 재조합 백신을 위해 상기의 종료과제(**구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증**)에서 개발한 OVM 항원을 이용하여 실험을 계속적으로 수행하였음.

(2) O serotype용 Multi-VP1 epitope (OVM) 항원의 마우스 PD50 결정실험

◎ O serotype용 재조합 OVM 항원인 Multi-VP1 epitope 항원의 마우스에서의 PD50을 결정하여 면역증강제들에 의한 조기면역증강을 확인하기 위해 본 실험을 수행하였음.

◎ 정제된 OVM 항원 단백질의 마우스에서의 PD50을 확인하기 위해서 아래 그림에서 보는 바와 같이 5주령의 female C57BL/6N crljori 마우스에 ISA201 adjuvant를 OVM 단백질 (40ug)을 기준으로 4 fold로 희석하여 마우스의 근육으로 1번 접종을 수행하였음. 접종후 4주뒤에 lethal dose의 O형 베트남 2013 바이러스로 challenge 실험을 수행하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM
Route : IM
Days of inoculation : 0 day
Challenge : 28 dpi (O-Type FMDV)

Groups			ISA201	Antigen		Total amount	FMDV Challenge
				OVM	PBS		O-type
1	Adjuvant only		100 μl	-	100 ul	200 μl	5 heads
2	Commercial vac.		-	-	-	200 μl	5 heads
3	OVM	1	100 μl	40ug (66ul)	34 ul	200 μl	5 heads
4	OVM	1/4	100 μl	From (1 antigen dilution) 25 ul	75 ul	200 μl	5 heads
5	OVM	1/16	100 μl	From (1/4 antigen dilution) 25 ul	75 ul	200 μl	5 heads
6	OVM	1/64	100 μl	From (1/16 antigen dilution) 25 ul	75 ul	200 μl	5 heads

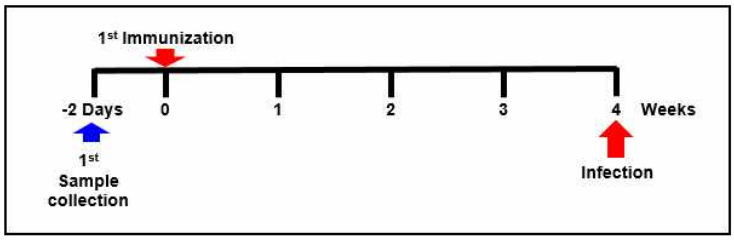


그림 10. 정제 OVM 항원 단백질의 마우스 PD50 실험스케줄

◎ 아래 그림에서 보는 바와 같이 O Vietnam 2013 FMDV를 challenge한 뒤 마우스의 생존율과 체중을 측정한 결과, OVM 단백질의 농도별로 O Vietnam 2013 FMDV에 대한 방어율이 비례하게 나타났고, 이를 기초로 하여 OVM 항원 단백질에 대한 마우스에서의 PD50을 확인하였음.

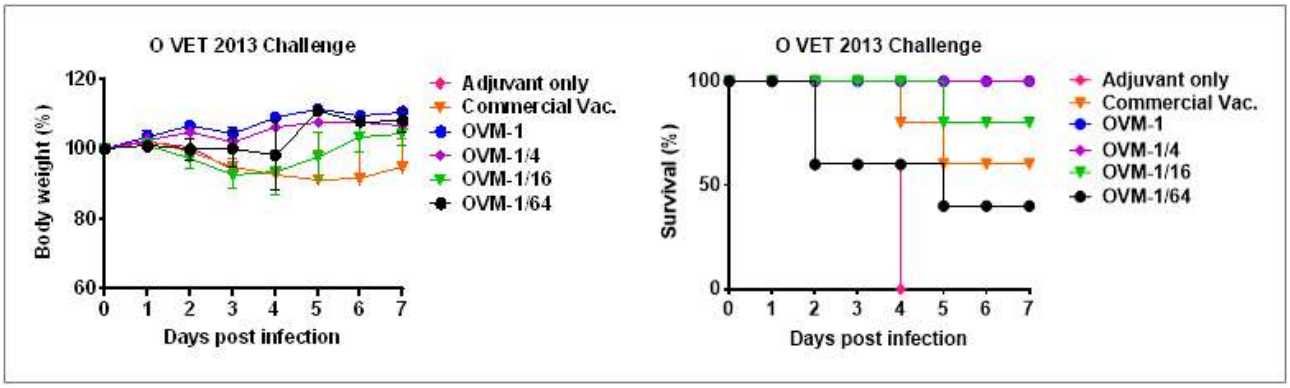


그림 11. O Vietnam Challenge Model을 이용한 OVM 항원단백질의 방어 효능 검증

(3) A serotype용 Multi-VP1 epitope (A/Poch-A/Mal-A/Iraq; AVM) 항원을 이용한 재조합 백신 개발 연구

(가) A serotype용 3가 Multi-VP1 epitope (AVM) 항원 단백질 발현/정제

◎ 본 연구에서는 광범위한 A serotype FMDV 방어용 재조합 백신을 위해 2018년 종료과제(구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증)에서 개발한 AVM 항원을 이용하여 실험을 이어서 수행하였음.

◎ 즉, 2018년 종료과제에서 제작하고 대장균에서 발현하여 정제한 FMDV A serotype을 위한 Multi-VP1e (A/Pocheon-A/Malay97-A/Iraq; AVM) 항원단백질을 이용하였음.

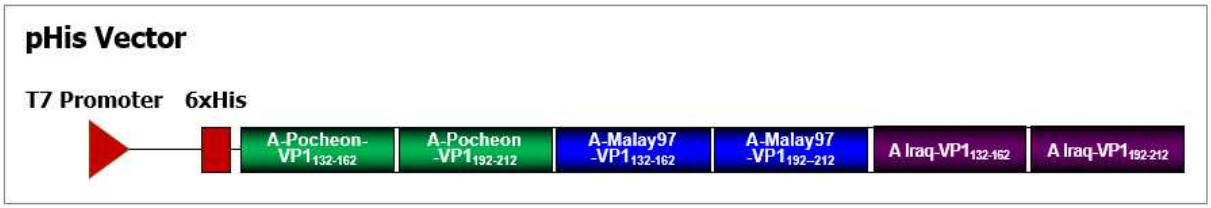


그림 12. 대장균으로부터 A serotype용 Multi-VP1e AVM 항원 정제를 위한 plasmid 구축

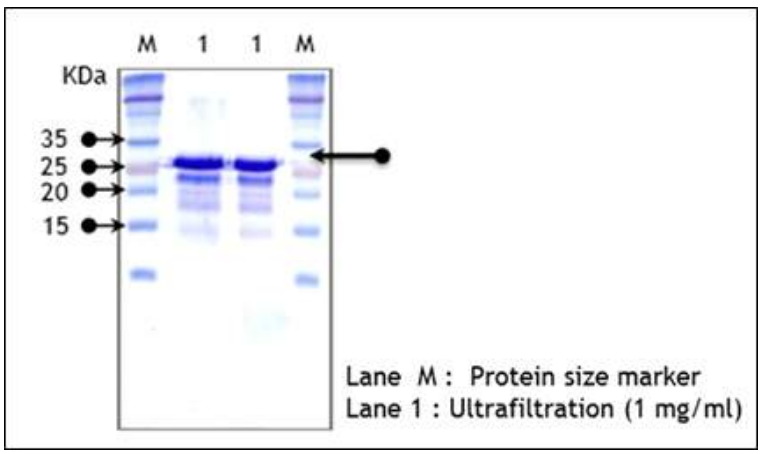


그림 13. 대장균으로부터 A serotype용 Multi-VP1e AVM 항원 정제

(나) A serotype용 3가 Multi-VP1 epitope (AVM) 항원 단백질의 산업형 항원 검증

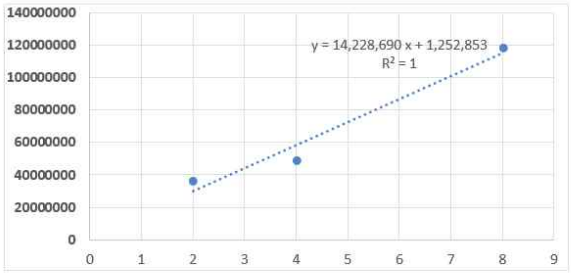
◎ 본 연구에서는 A serotype용 3가 Multi-VP1 epitope (AVM) 항원 단백질의 산업형 항원 개발을 위해 우선적으로 대장균의 세포질내 가용성의 AVM 항원단백질 양을 측정하였음.

◎ 우선, 대장균에서 가용성의 AVM 항원단백질을 발현시킨 후 대장균의 lysis 과정을 거쳐 soluble fraction내 단백질들중 가용성의 AVM 항원단백질 양을 측정하였음. 먼저 정제된 항원단백질을 2-fold dilution한 뒤 SDS-PAGE와 western blot을 통해 band intensity 값을 구하고 standard curve를 나타내었음. 그 후 soluble fraction을 용량별로 loading 한 뒤 western blot을 통해 band intensity를 구하고 standard curve에 대입후 농도를 구하였음.

◎ 상기의 방법으로 여러 차례 항원단백질의 양을 측정한 결과, 대장균의 soluble fraction 단백질 1ul에 약 0.48ug의 A serotype용 AVM 항원단백질이 포함되어 있음을 확인하였음.

AVM purified protein

Loading amount (ug)	Band density
2	35719434
4	49153808
8	118086970



Crude AVM

Loading Sample from WCL(800ul)					Cultured E.coli (200ml)/ OD : 0.4~0.5	
Loading volume (ul)	Band density	Protein (ug)	Protein (ug/ul)	Total (ug/800ul)	Protein (ug/200ml)	Protein (ug/ml)
5ul	44499305	2.180925124	0.436185025	348.9480199	9305.281693	46.52640846
10ul	94112713	5.306644239	0.530664424	424.5315391	11320.84246	56.60421229

0.483424724

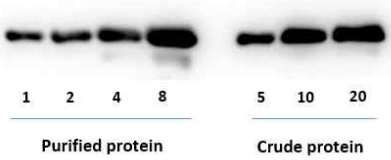


그림 14. 대장균의 soluble fraction 단백질내 포함된 AVM 단백질의 양 측정

(4) 정제 A serotype용 Multi-VP1 epitope (A/Poch-A/Mal-A/Iraq; AVM) 항원의 마우스 면역원성 및 FMDV 방어능 연구

◎ 2018년 종료과제(구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증)에서 이미 광범위한 A serotype FMDV 방어용 재조합 항원이 체액성면역과 세포성면역을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인한 바 있음. 이에 이어서 본 연구에서는 A serotype FMDV 방어용 재조합 항원인 AVM의 FMDV A serotype virus에 대한 방어 효능을 검증하였음.

◎ 정제된 3가 A serotype용 Multi-VP1 epitope (AVM)의 FMDV A serotype에 대한 방어능 실험 스케쥴로 음성대조군으로 ISA201 접종 그룹, 양성대조군으로 상용화 백신 접종 그룹, 실험군으로 30ug, 40ug의 AVM 항원을 그리고 30ug의 AVM 항원에 면역증강제를 혼합하여 각각 접종한 그룹으로 나누었다. 2주 간격으로 2회 접종하였으며, 2회 접종 후 2주 째 FMDV A type인 Malay97 strain을 공격 접종하였다 (그림 10).

-Mouse type: 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
-Inoculum: AVM (A-pocheon-Malay97-Iraq)
-Route of administration: Intramuscular
-Days of inoculation: 0, 14 dpi
-Challenge : 28 dpi - **Malay97 strain**

	ISA201	Antigen	A	PBS	Total amount	Inoculation time	Challenge
Adjuvant only	100ul	-	-	100ul	200ul	2	5 heads
Commercial vac.	-	-	-	-	100ul	2	5 heads
AVM	100ul	30ug (60ul)	-	40ul	200ul	2	5 heads
AVM	100ul	40ug (80ul)	-	20ul	200ul	2	5 heads
AVM+A	100ul	30ug(60ul)	30ug(30ul)	10ul	200ul	2	5 heads

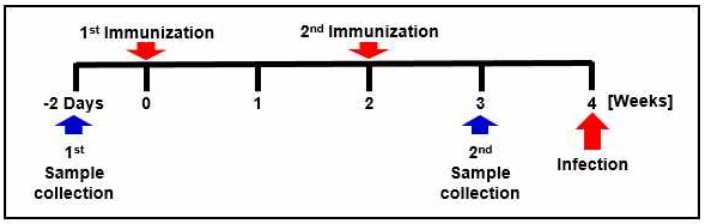


그림 15. pAVM의 마우스 challenge 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래 그림에서 보는 바와 같이 정제된 AVM 항원을 접종한 접종 그룹 모두 FMDV A type인 Malay97 strain 공격접종에서 체중 감소도 보이지 않았으며, 생존율에서도 100% 방어능을 보여주었음. 또한, 정제된 AVM 항원 30ug의 용량으로도 효과적인 방어가 이루어짐을 확인하였음.

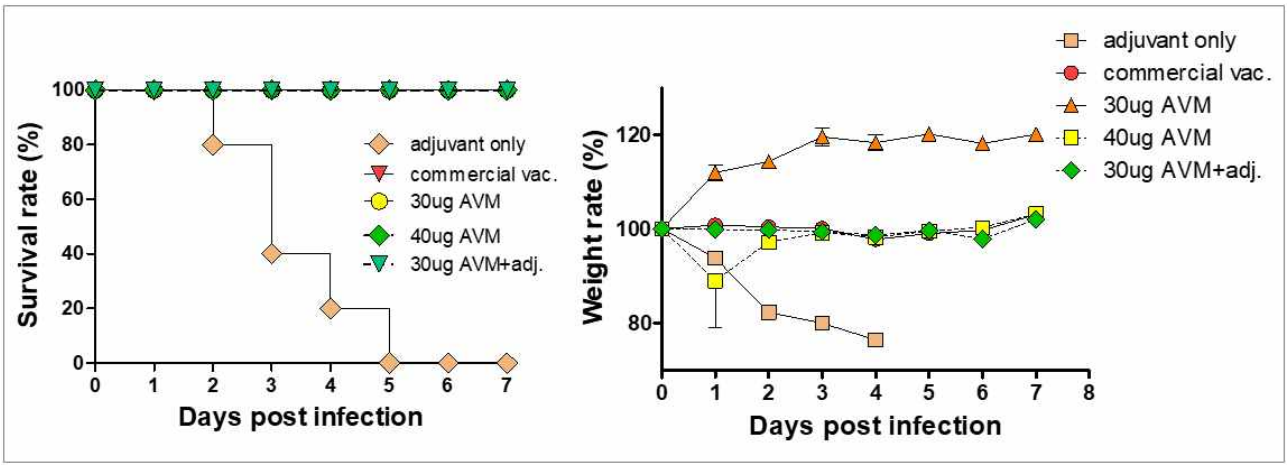


그림 16. FMDV A type인 Malay97 strain에 대한 AVM의 방어 효능 검증

◎ 다음으로 정제된 3가 A serotype용 Multi-VP1 epitope (AVM)과 산업용 항원인 cAVM의 면역원성과 FMDV A serotype에 대한 방어능을 검증하기 위하여 아래 그림과 같은 실험 스케쥴로 실험을 수행하였음. 음성대조군으로 ISA201 접종 그룹, 양성대조군으로 상용화 백신 접종 그룹, 실험군으로 40ug의 pOVM과 cOVM을 각각 접종한 그룹으로 나누었음. 항원은 2주 간격으로 2회 접종하였으며, 2회 접종 후 2주 째 FMDV A type인 Malay97 strain를 공격

접종하였음.

-Mouse type: 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
-Inoculum: Crude AVM & Purified AVM
-Days of inoculation: 0, 14 dpi
-Challenge : 28 dpi

Groups		Inoculum			Inoculum Volume	Route	No. of Mice
		ISA201	Antigen	PBS			
1	Adjuvant only	100ul	-	100ul	200ul	I.M	5
2	Commercial vac.	-	-	-	200ul	I.M	5
3	pAVM	100ul	40ug (80ul)	20ul	200ul	I.M	5
4	cAVM	100ul	40ug (100ul)	-	200ul	I.M	5

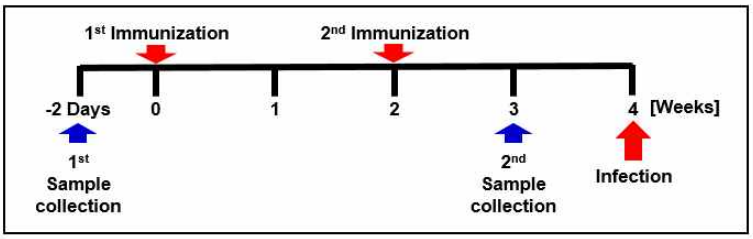


그림 17. pAVM과 cAVM의 마우스 challenge 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래 그림에서 보는 바와 같이 정제된 pAVM 항원과 마찬가지로 산업용 cAVM을 접종한 접종 그룹 모두 FMDV A type인 Malay97 strain 공격접종에서 체중 감소도 보이지 않았으며, 생존율에서도 100% 방어능을 보여주었음.

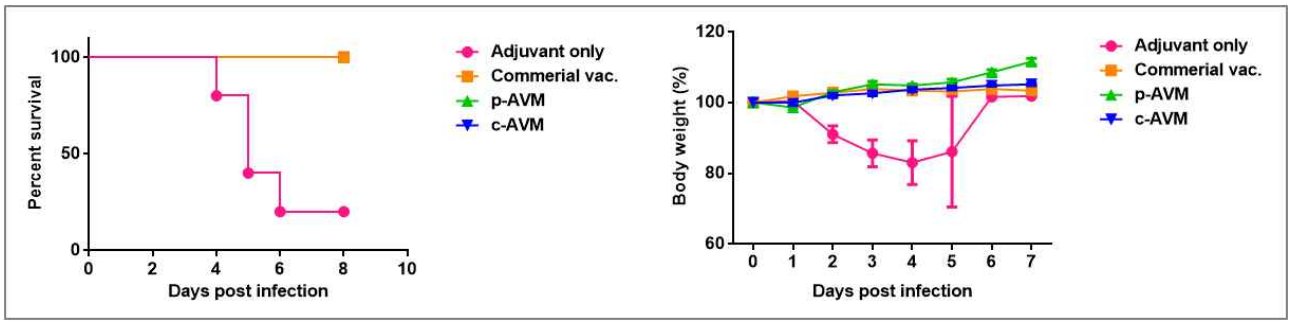


그림 18. FMDV A type인 Malay97 strain에 대한 pAVM, cAVM의 방어 효능 검증

◎ 다음으로 상기의 방어 효능이 항체에 의한 것임을 확인하기 위해, 접종 3주째 얻은 혈청을 이용하여, pAVM 항원을 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체 생성율을 비교 분석한 결과, 정제 단백질 pAVM)과 산업용 cAVM 항원 모두에 의해 상용화 백신보다 더 높은 항체가를 나타내었음.

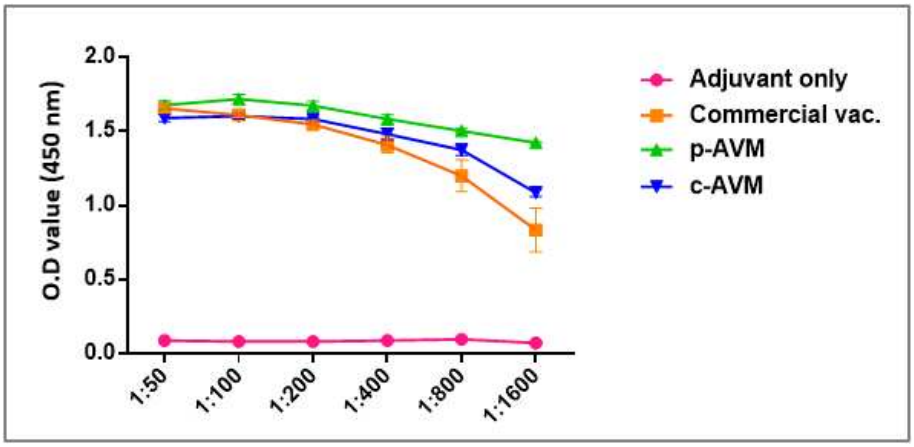


그림 19. 접종 3주 후 혈청 내 pAVM 그리고 cAVM에 대한 항체가 측정

(5) 정제된 3가 O serotype용 Multi-VP1 epitope (pOVM) 항원과 A serotype용 Multi-VP1 epitope (pAVM) 혼합접종을 통한 마우스 FMDV 방어 효능 검증 연구-1

◎ 지난해 2018년 우리나라에서는 돼지에서 최초로 A형 구제역바이러스가 발생을 하였음. 이에 기존의 O형 FMDV 백신과 더불어 A형의 FMDV 백신이 필요한 상황으로 바뀌면서 현재 A형 FMDV 백신이 혼합된 O-A형 FMDV 백신이 현재 수입되어 농가에 사용되어지고 있음.

◎ 이에 본 연구진에서는 현 상황에 따라 O형과 더불어 A형 FMDV를 혼합하여 광범위하게 FMDV를 방어할 수 있는 재조합 항원을 실험적으로 검증하기 위해 연구를 수행하였음.

◎ 정제된 3가 A serotype용 pAVM과 3가 O serotype용 pOVM 혼합 항원의 면역원성과 FMDV A serotype 및 FMDV O serotype에 대한 동시 방어 효능을 검증하기 위해, 아래 그림과 같은 실험 스케쥴로 실험을 수행하였음. 음성대조군으로 ISA201 접종 그룹, 양성대조군으로 상용화 백신 접종 그룹, 실험군으로 각각의 정제단백질 pOVM과 pAVM (20ug씩 또는 30ug씩)을 혼합하여 접종한 그룹 등 총 4개 그룹으로 나누었음. 2주 간격으로 2회 접종하였으며, 2회 접종 후 2주 째 FMDV O Jincheon strain과 FMDV A Malay97 strain를 각각 공격 접종하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Days of inoculation : 0, 14 dpi
Challenge : 28 dpi (**A-type FMDV Malay97 strain & O-Type FMDV Jincheon strain**)

Groups		ISA201	Antigen		PBS	Total amount	Inoculation time	FMDV Challenge	
			OVM	AVM				A-type	O-type
1	Adjuvant only	100 μl	-	-	100 μl	200 μl	2	5 heads	5 heads
2	Commercial vac.	-	-	-	-	200 μl	2	5 heads	5 heads
3	pAVM+pOVM-1	100 μl	20ug (33ul)	20ug (20ul)	47 μl	200 μl	2	5 heads	5 heads
4	pAVM+pOVM-2	100 μl	30ug (50ul)	30ug (30ul)	20 μl	200 μl	2	5 heads	5 heads

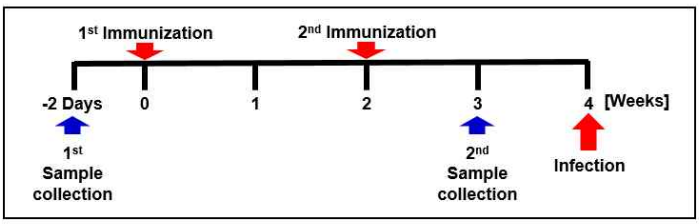


그림 20. pOVM과 pAVM 혼합 항원의 FMDV 공격접종에 대한 방어능 검증 실험

◎ 그 결과, 아래 그림에서 보는 바와 같이, pOVM과 pAVM의 혼합 접종 그룹 (20ug 및 30ug)은 FMDV O Jincheon strain 혹은 FMDV A Malay97 strain의 공격접종에서 모두 100% 방어능을 보여주었음.

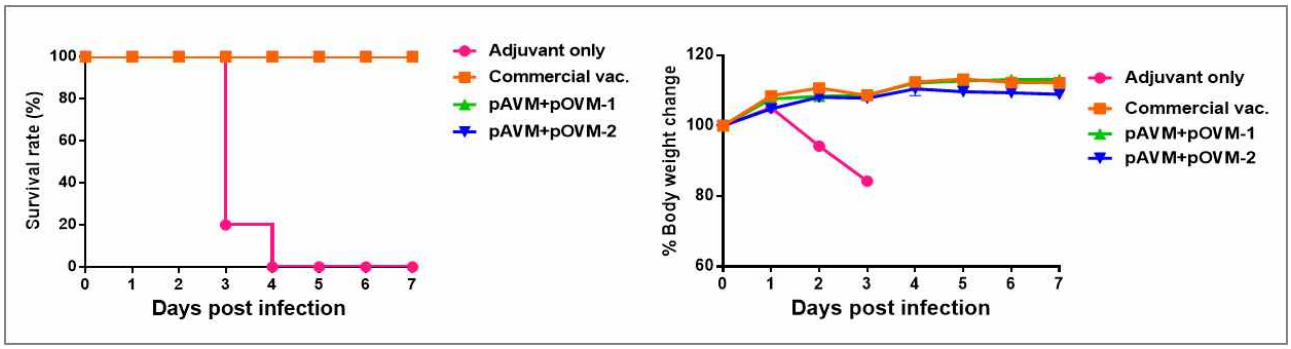


그림 21. FMDV O Jincheon 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

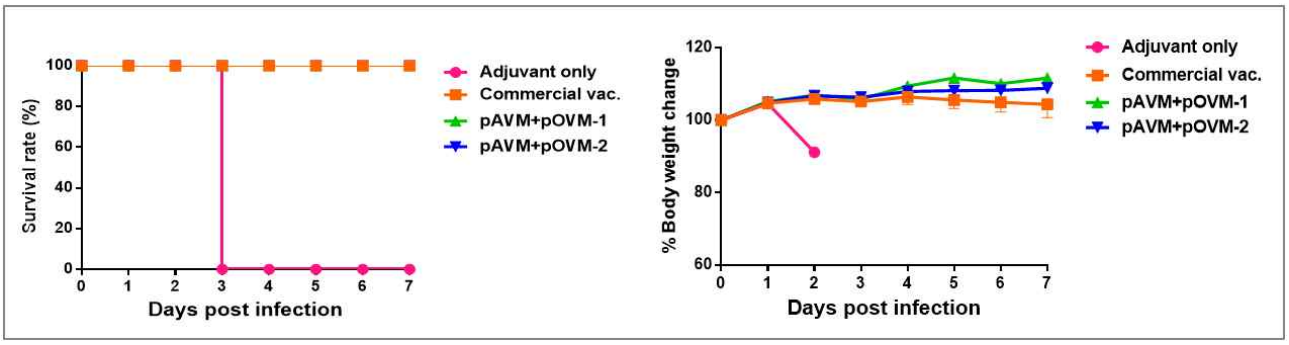


그림 22. FMDV A Malay97 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

◎ 다음으로 상기의 방어 효능이 항체에 의한 것임을 확인하기 위해, 접종 3주째 얻은 혈청을 이용하여, pAVM 항원 혹은 pOVM 항원을 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체 생성율을 비교 분석한 결과, 모두 상용화 백신보다 더 높은 항체가를 나타내었음. 결론적으로 pAVM 항원과 pOVM 항원의 혼합 접종 시에도 각각의 항원에 대한 항체 형성이 잘 일어남을 알 수 있음.

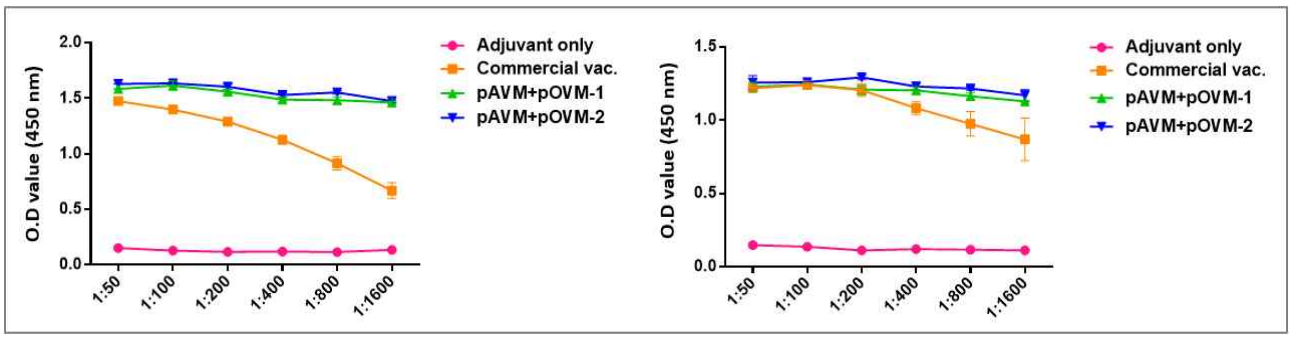


그림 23. pOVM(좌) 및 pAVM(우)에 대한 항체가 검증

(6) 정제된 pOVM 항원과 pAVM 항원 혼합접종을 통한 마우스 FMDV 방어 효능 검증 연구-2

◎ 상기의 실험처럼, 정제된 3가 A serotype용 pAVM과 3가 O serotype용 pOVM 혼합 항원의 면역원성과 FMDV A serotype 및 FMDV O serotype에 대한 동시 방어 효능을 다시 한번 검증하기 위해, 아래 그림과 같은 실험 스케쥴로 실험을 수행하였음. 음성대조군으로 ISA201 접종 그룹, 양성대조군으로 상용화 백신 접종 그룹, 실험군으로 각각의 정제단백질 pOVM과 pAVM (20ug)을 혼합하여 접종한 그룹 등 총 3개 그룹으로 나누었음. 2주 간격으로 2회 접종하였으며, 2회 접종 후 2주 째 이번에는 FMDV O VET 2013 strain과 FMDV A Malay97 strain을 각각 공격 접종하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified and Crude OVM + AVM
Days of inoculation : 0, 14 dpi
Challenge : 28 dpi (A-type & O-Type FMDV)

Groups		ISA201	Antigen		PBS	Total amount	Long lasting	
			pOVM	pAVM			O type Challenge	A type Challenge
1	Adjuvant only	100 μl	-	-	100 μl	200 μl	5 heads	5 heads
2	Commercial vac.	-	-	-	-	200 μl	5 heads	5 heads
3	pOVM + pAVM	100 μl	20ug (33ul)	20ug (33ul)	34 μl	200 μl	5 heads	5 heads

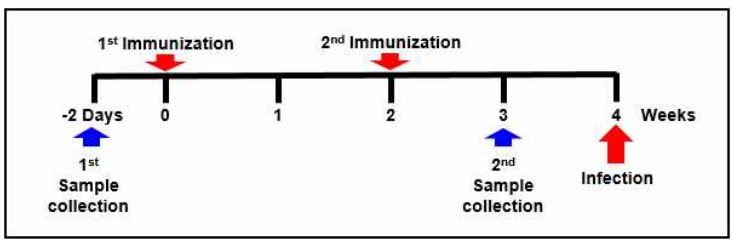


그림 24. pOVM과 pAVM 혼합 항원의 FMDV 공격접종에 대한 방어능 검증 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래 그림에서 보는 바와 같이, pOVM과 pAVM의 혼합 접종 그룹 (20ug)은 FMDV O VET 2013 strain 혹은 FMDV A Malay97 strain의 공격접종에서 모두 100% 방어능을 보여 주었음.

◎ 결론적으로, pOVM과 pAVM의 혼합 접종은 FMD O serotype과 A serotype 바이러스 모두에 대해 방어 효능이 있음을 다시 한번 확인하였음.

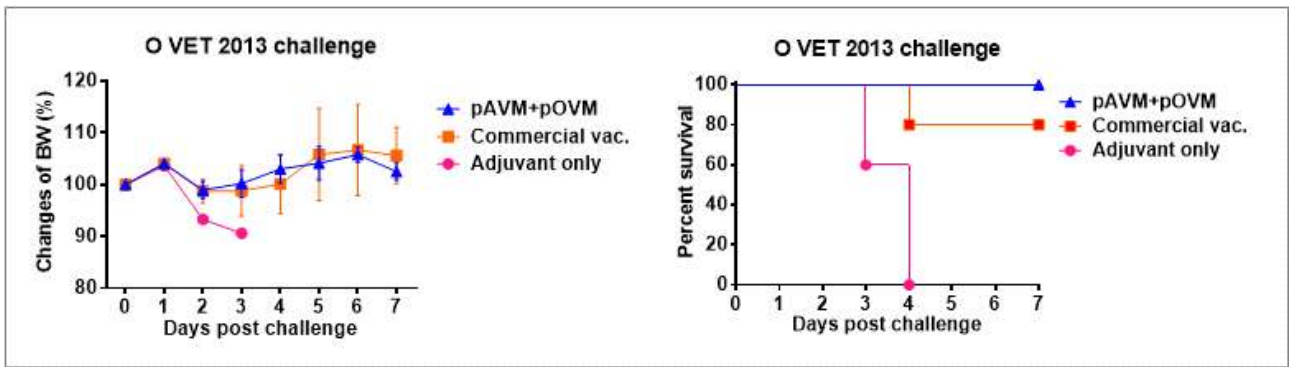


그림 25. FMDV O VET 2013 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

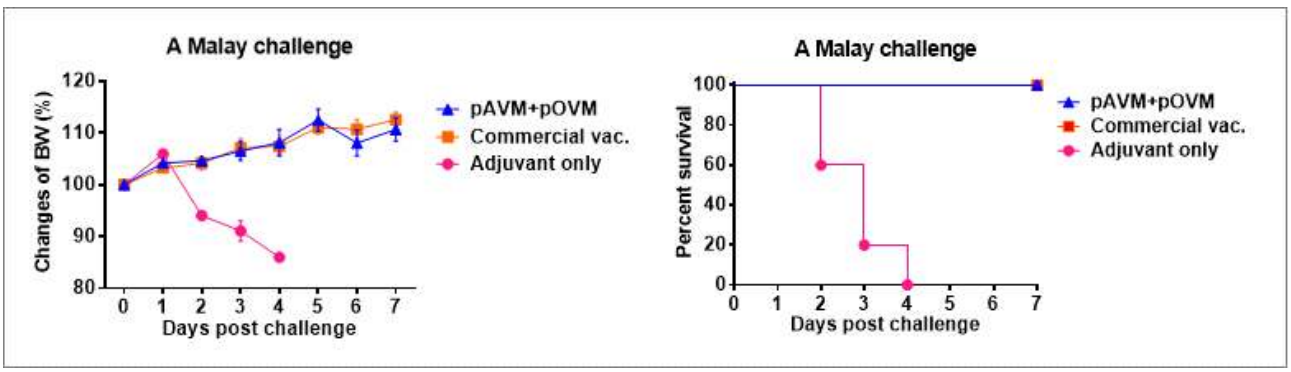


그림 26. FMDV A Malay97 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

(7) 정제된 pOVM 항원과 pAVM 혼합항원의 마우스 PD50 결정실험

◎ O serotype용 재조합 OVM 항원과 A serotype용 재조합 AVM 항원을 혼합한 혼합항원의 마우스에서의 PD50을 결정하여 면역증강제들에 의한 조기면역증강을 확인하기 위해 본 실험을 수행하였음.

◎ 정제 OVM 항원과 AVM 항원을 혼합한 혼합항원의 마우스 PD50을 확인하기 위해서, 아래 그림에서 보는 바와 같이 5주령의 female C57BL/6N crljori 마우스에 ISA201 adjuvant를 OVM 단백질 (40ug)을 기준으로 4 fold로 희석하여 마우스의 근육으로 1번 접종을 수행하였음. 접종후 4주뒤에 lethal dose의 O VET 2013 바이러스와 A형 Malay97 바이러스로 challenge 실험을 수행하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Route : IM
Days of inoculation : 0, 14 dpi
Challenge : 28 dpi (A-type & O-Type FMDV)

Groups			ISA201	Antigen		Total amount	FMDV Challenge	
				OVM	AVM		A-type	O-type
1	Adjuvant only		150 μl	-	-	300 μl	5 heads	5 heads
2	Commercial vac.		-	-	-	200 μl	5 heads	5 heads
3	pOVM+pAVM	1	150 μl	40ug (66ul)	40ug (80ul)	300 μl	5 heads	5 heads
4	pOVM+pAVM	1/4	150 μl	1 - 16.5 ul + PBS	1 - 20 ul + PBS	300 μl	5 heads	5 heads
5	pOVM+pAVM	1/16	150 μl	1/4 - 16.5 ul + PBS	1/4 - 20 ul + PBS	300 μl	5 heads	5 heads
6	pOVM+pAVM	1/64	150 μl	1/16 - 16.5 ul + PBS	1/16 - 20 ul + PBS	300 μl	5 heads	5 heads

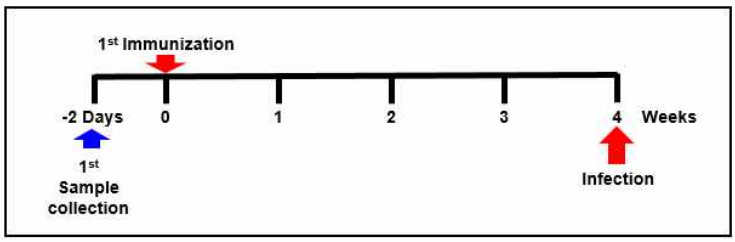


그림 27. 정제 OVM과 AVM 항원 단백질의 마우스 PD50 실험스케줄

◎ 아래 그림에서 보는 바와 같이, O VET 2013 FMDV와 A Malay97 FMDV를 challenge한 뒤 마우스의 생존율과 체중을 측정한 결과, OVM과 AVM 단백질의 농도별로 O Vietnam 2013 FMDV과 A Malay97 FMDV에 대한 방어율이 비례하게 나타났고, 이를 기초로 하여 OVM과 AVM 혼합항원에 대한 마우스에서의 PD50을 확인하였음.

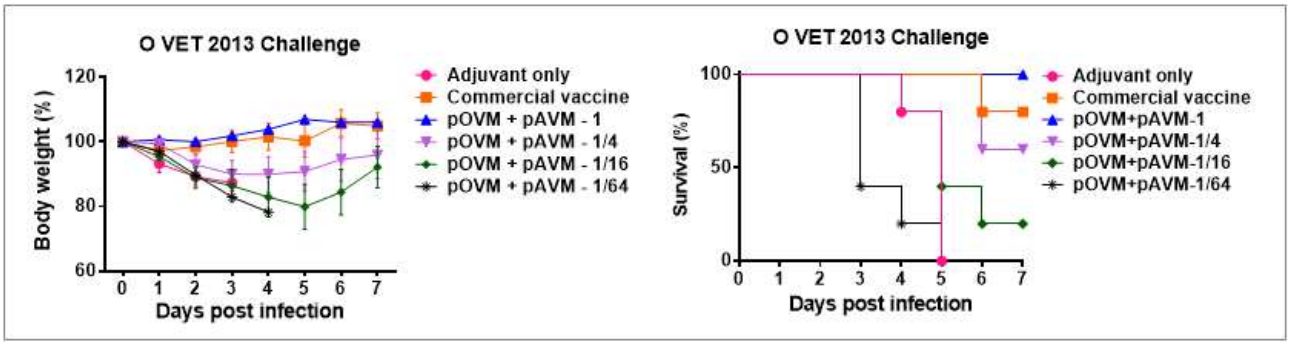


그림 28. FMDV O VET 2013 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

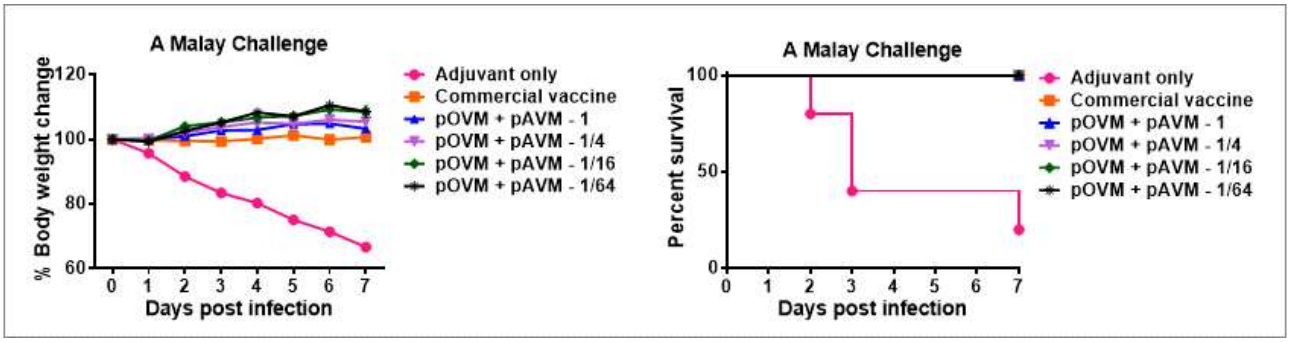


그림 29. FMDV A Malay97 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

(8) 정제된 pOVM 항원과 pAVM 항원 및 이들 각각에 대한 산업형 (crude) 항원들의 혼합항원 접종에 대한 마우스 면역원성 및 FMDV 방어능 검증 연구

◎ 상기의 방법으로 대장균의 soluble fraction 단백질내 가용성의 OVM과 AVM 항원단백질의 양을 측정하여 crude 단백질을 준비한 후, 마우스에서의 면역원성 실험을 정제된 OVM과 AVM 혼합항원과 비교하기 위해 아래와 같이 수행하였음.

◎ 정제된 OVM과 AVM 혼합항원처럼 OVM과 AVM crude 혼합항원의 면역원성 즉, 항체생성율과 세포면역 유도능등을 다시 한번 확인하기 위해 다음과 같은 스케쥴로 실험을 수행하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified and Crude OVM + AVM
Route : IM
Days of inoculation : 0, 14 dpi

Groups		ISA201	Antigen		PBS	Total amount	IgG ELISA SP ELISA ELISPOT VNT
			OVM/cOVM	AVM/cAVM			
1	Adjuvant only	100 μl	-	-	100 μl	200 μl	8 heads
2	Commercial vac.	-	-	-	-	200 μl	8 heads
3	pOVM + pAVM	100 μl	20ug (33ul)	20ug (33ul)	34 μl	200 μl	8 heads
4	cOVM + cAVM	100 μl	20ug (50ul)	20ug (50ul)	-	200 μl	8 heads

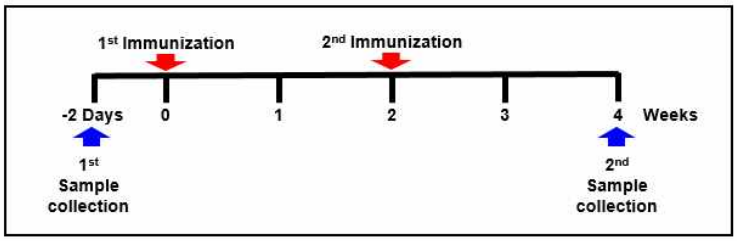


그림 30. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원의 면역원성 검증 실험스케줄

◎ 현재까지의 결과로 상기의 결과처럼 정제된 OVM과 AVM 혼합항원처럼 OVM과 AVM crude

혼합항원 역시 각각의 항원에 대한 항체 형성이 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA 법에서 잘 일어남을 확인할 수 있었음.

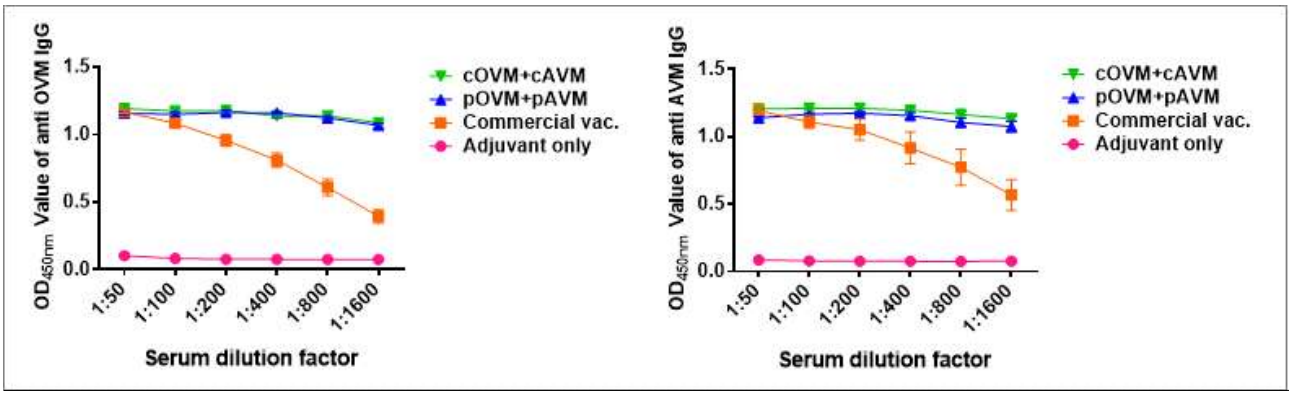


그림 31. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 항체가 검증

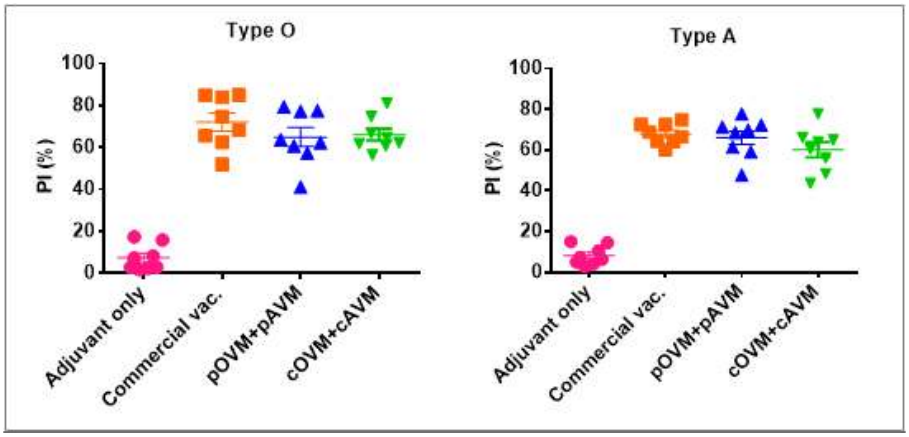


그림 32. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 SP 항체가 검증

◎ 항체생성율 검증에 이어 세포면역 유도 효능을 아래와 같이 측정하였음. T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 두번째 접종 후 2주째 마우스의 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 (OVM, AVM) 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 그리고 A pocheon, A Malay97, A Iraq 등 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

◎ 그 결과, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 정제된 OVM과 AVM 혼합항원처럼 OVM과 AVM crude 혼합항원 역시 각각의 항원에 대해 자극을 받아 IFN-r와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 spot을 확인하였고, 이를 분석하여 확인한 결과 세포성 면역이 증가되었음을 확인하였음.

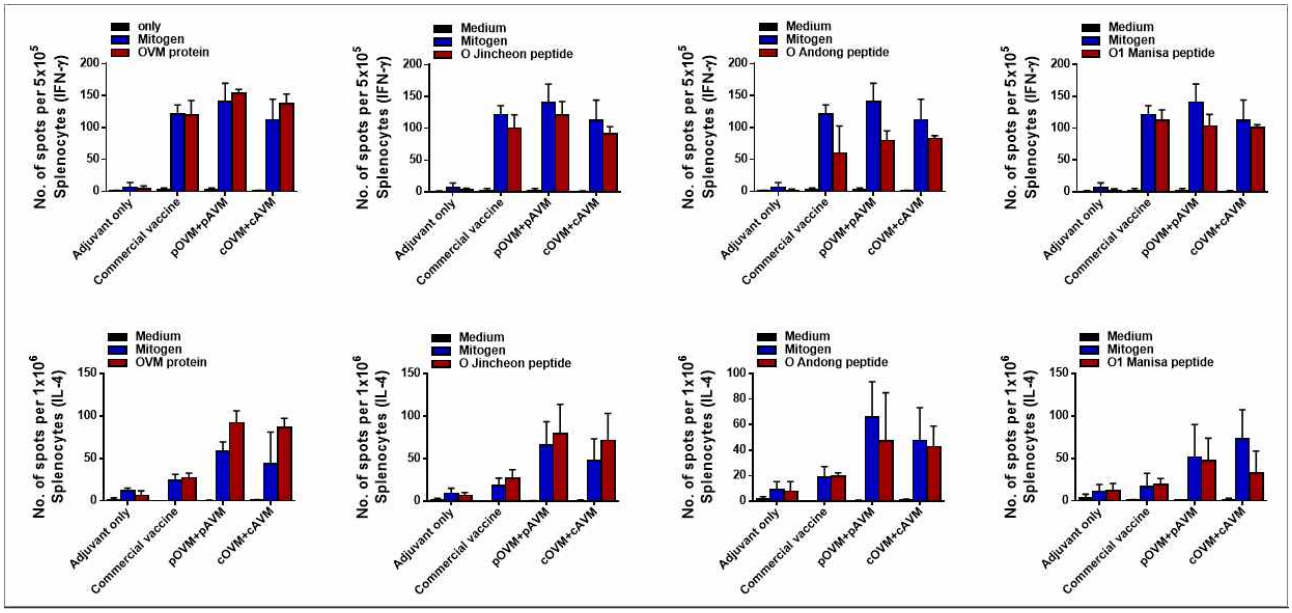


그림 33. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 세포성면역 검증

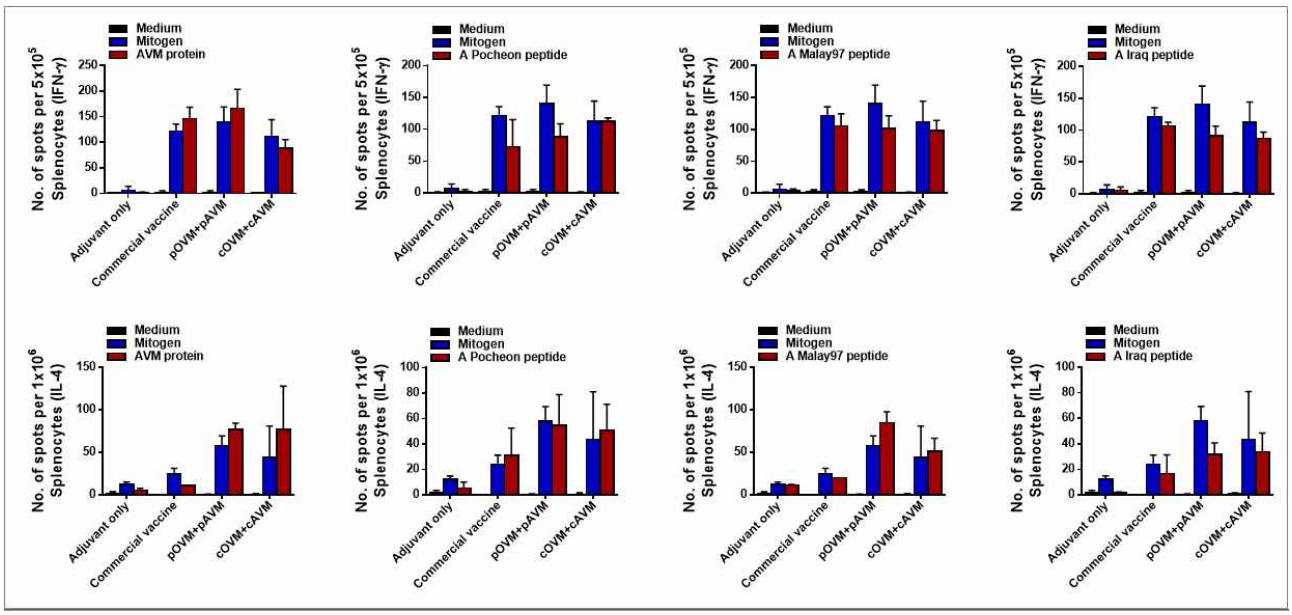


그림 34. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 세포성면역 검증

◎ 다음으로, 아래의 스케쥴대로 정제된 OVM과 AVM 혼합항원처럼 OVM과 AVM crude 혼합항원의 FMDV에 대한 방어효능을 검증하였음.

◎ 5주령 C57BL/6N에 OVM과 AVM crude 혼합항원과 정제된 OVM과 AVM 혼합항원을 각각 그룹별로 2회 접종하였음. negative control은 adjuvant만 접종하였고, positive control로 상용화 백신을 접종하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : pOVM-pAVM or cOVM-cAVM
Route : IM
Days of inoculation : 0, 14 dpi
Challenge : 28 dpi (A-type & O-Type FMDV)

Groups		ISA201	Antigen		PBS	Total amount	FMDV Challenge	
			OVM	AVM			A-type	O-type
1	Adjuvant only	100 μl	-	-	100 μl	200 μl	5 heads	5 heads
2	Commercial vac.	-	-	-	-	200 μl	5 heads	5 heads
3	pAVM + pOVM	100 μl	20 μg	20 μg	27 μl	200 μl	5 heads	5 heads
4	cAVM + cOVM	100 μl	20 μg	20 μg	-	200 μl	5 heads	5 heads

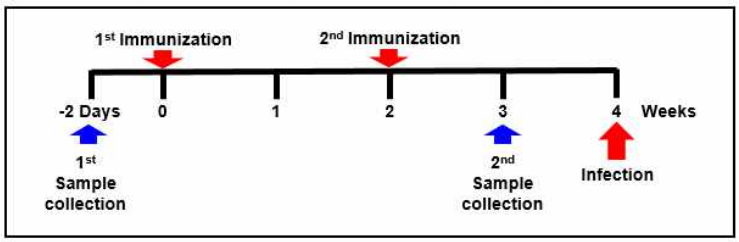


그림 35. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원의 FMDV 공격접종에 대한 방어능 검증 실험스케줄

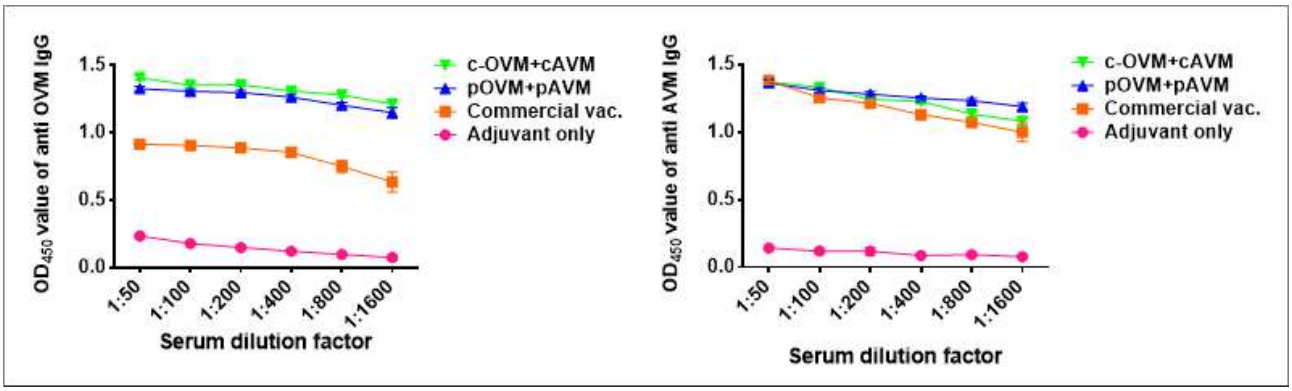


그림 36. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 항체가 검증

◎ FMDV에 대한 방어 효능이 항체에 의한 것임을 확인하기 위해, 접종 3주째 얻은 혈청을 이용하여, pAVM 항원 혹은 pOVM 항원을 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체 생성율을 비교 분석한 결과, 모두 높은 항체가를 나타내었음. 결론적으로 정제된 OVM과 AVM 혼합항원처럼 OVM과 AVM crude 혼합항원 역시 각각의 항원에 대한 항체 형성이 잘 일어남을 알 수 있었음.

◎ 마지막 항원 접종 2주후 O Jincheon strain과 A Malay97 strain을 공격접종한 후 각 그룹의 생존율을 확인하였음.

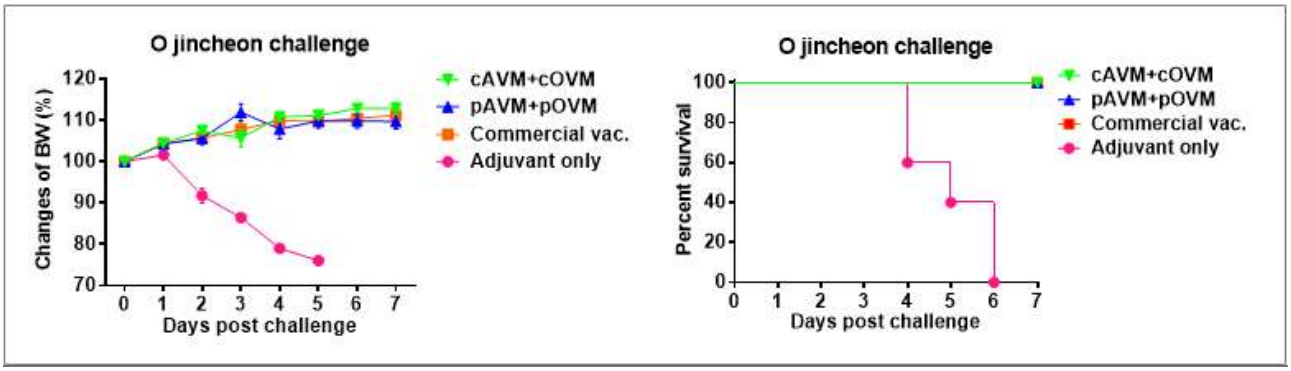


그림 37. FMDV O Jincheon 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

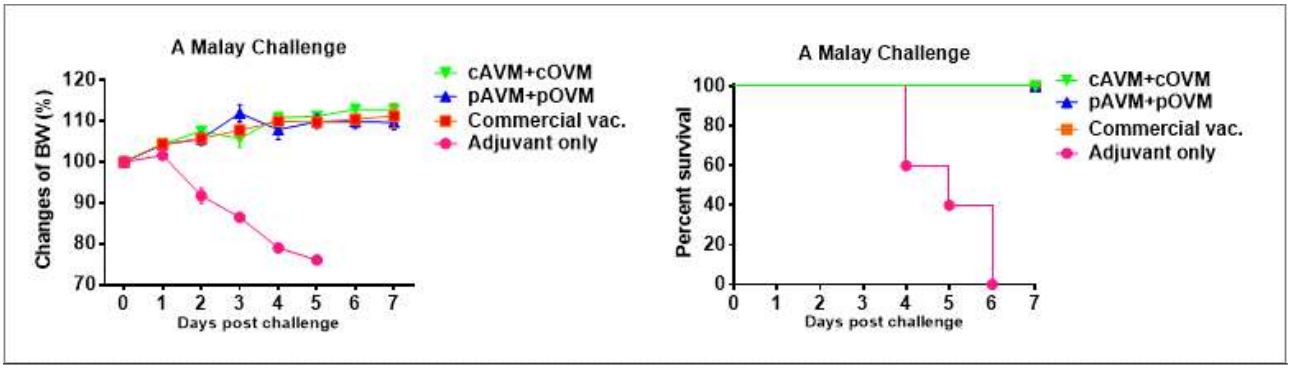


그림 38. FMDV A Malay97 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

◎ 그 결과, 위의 그림에서 보는 바와 같이, 정제된 OVM과 AVM 혼합항원 투여그룹과 비슷하게 OVM과 AVM crude 혼합항원 역시 FMDV O Jincheon 혹은 FMDV A Malay97의 공격접종에서 모두 100% 방어능을 보여주었음.

(9) 정제된 pOVM과 pAVM 항원 및 이들 각각에 대한 산업형 (crude) 항원들의 혼합항원 접종에 대한 마우스 지속 면역원성 검증 연구

◎ 다음으로 정제된 OVM과 AVM 혼합항원과 OVM과 AVM crude 혼합항원의 지속면역 효능을 검증하기 위해 2회 접종후 매월 얻은 마우스 혈청을 이용하여, pOVM 항원과 pAVM 항원으로 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체생성율을 비교 분석한 결과, 각 그룹 항원에 대해서 시간이 지날수록 약간의 감소경향은 있으나 높은 항체가의 지속성을 나타내고 있음이 확인되었음.

Animal: 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified and Crude OVM + AVM
Route: IM

Groups		Inoculum				Inoculum Volume	IgG ELISA SP ELISA ELISPOT	
		Antigen		Adjuvant	PBS			
		pOVM/cOVM	pAVM/cOVM	ISA201			O/type	A/type
1	Adjuvant only	-	-	100 μl	100 μl	200 ul	5 heads	5 heads
2	Commercial vaccine			-	-	200 ul	5 heads	5 heads
3	pOVM+pAVM	5 ug	150 ng	100 μl	80 μl	200 ul	5 heads	5 heads
4	cOVM+cAVM	5 ug	150 ng	100 μl	80 μl	200 ul	5 heads	5 heads

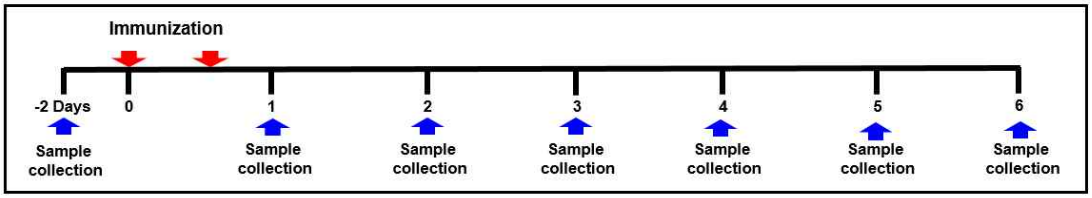


그림 39. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원의 지속면역 검증 실험스케줄

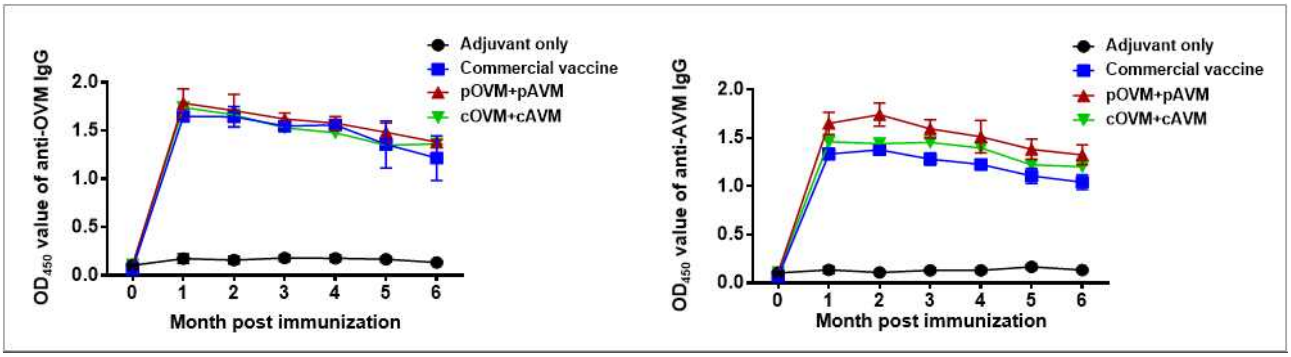


그림 40. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 지속면역 항체가 검증

◎ 항체생성의 지속성에 대한 검증에 이어 세포면역 유도 지속능을 아래와 같이 측정하였음. T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 두번째 접종 후 6달에 마우스의 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 (OVM, AVM) 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 그리고 A pocheon, A Malay97, A Iraq 등 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

◎ 그 결과, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 정제된 OVM과 AVM 혼합항원처럼 OVM과 AVM crude 혼합항원 역시 각각의 항원에 대해 자극을 받아 IFN-r와 IL-4가 생성되어 세포성 면역의 지속성을 확인하였음.

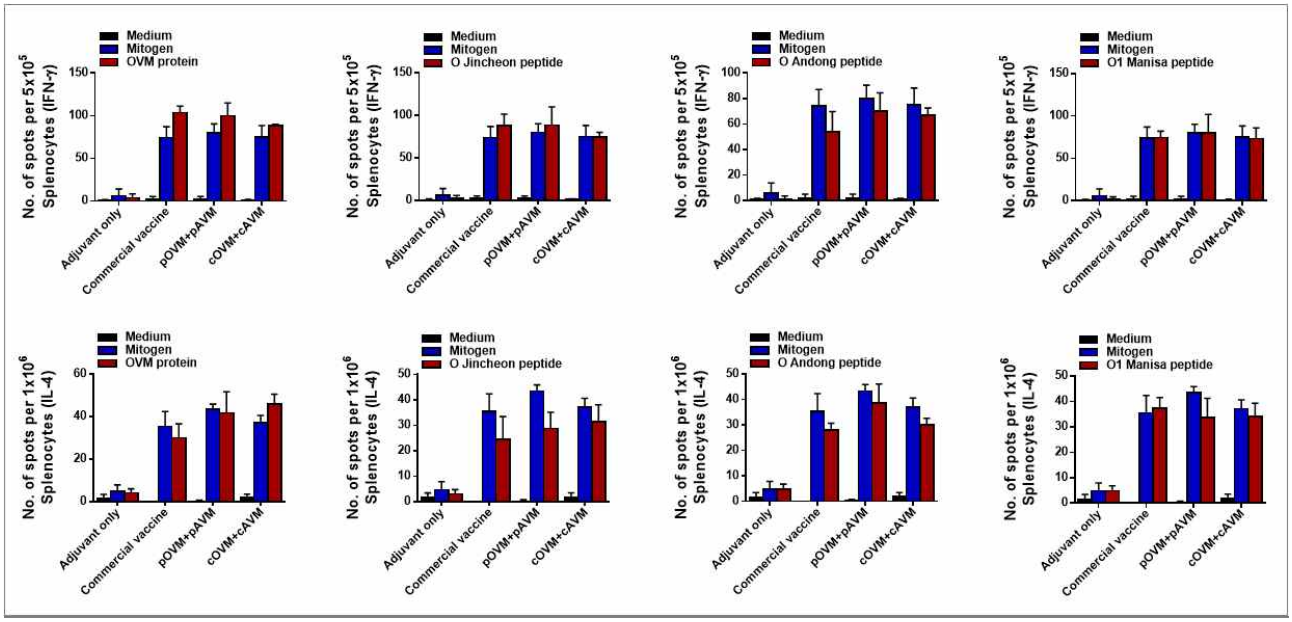


그림 41. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 세포성면역 검증

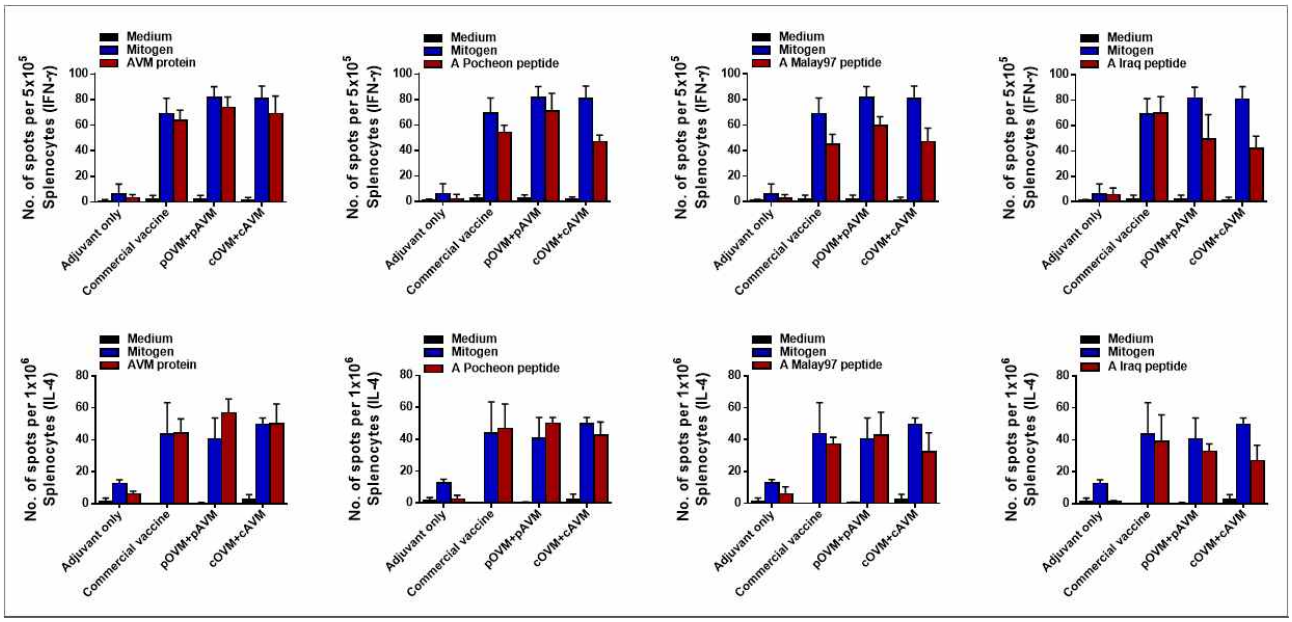
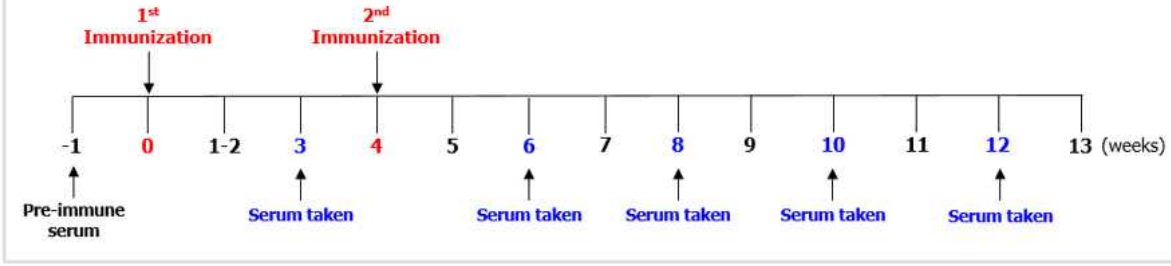


그림 42. 정제 혼합항원과 crude 혼합항원에 대한 세포성면역 검증

(10) 정제된 pOVM과 pAVM 혼합항원의 목적동물(돼지) 면역원성 검증실험 (㈜코미팜, 농림축산검역본부 연계)

◎ 정제된 구제역 재조합 단백질 (pAVM, pOVM)을 임시적으로 목적동물(돼지) 실험을 수행하였음.

◎ 실험동물을 선정하기 위하여 10주령 전후의 돼지 20두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 9마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 아래의 실험 스케줄처럼 백신은 1 두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 4주 간격으로 2회 접종 후, 2차 접종 4주차 까지 항체 지속 양상을 확인하였음.



Group		시험백신의 조성 (2 ml/회)		개체수 (일반돼지) 8-10주령	
		재조합 항원양	면역증강제	O type	A type
1	Control	-	ISA201	2 heads	
2	pOVM-pAVM	pOVM(300ug)-pAVM(300ug)	ISA201	7 heads	

그림 43. 재조합 혼합항원의 목적동물(돼지) 실험스케줄

◎ 각각의 주령에서 분리한 혈청으로부터 O serotype 및 A serotype에 대한 SP ELISA 항체가를 측정하였음. 그 결과, 아래의 그림에서 보는 바와 같이 정제된 구제역 재조합 단백질(pAVM, pOVM)에 의해 높은 수준의 항체가 유도되어 지속적으로 유지되고 있음을 확인하였음.

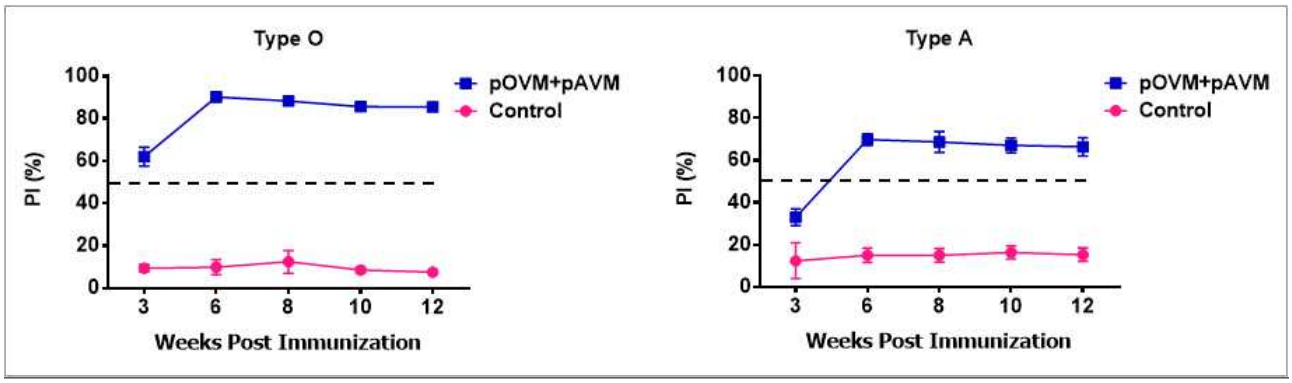


그림 44. 목적동물(돼지)에서의 재조합 혼합항원에 대한 항체가 검증

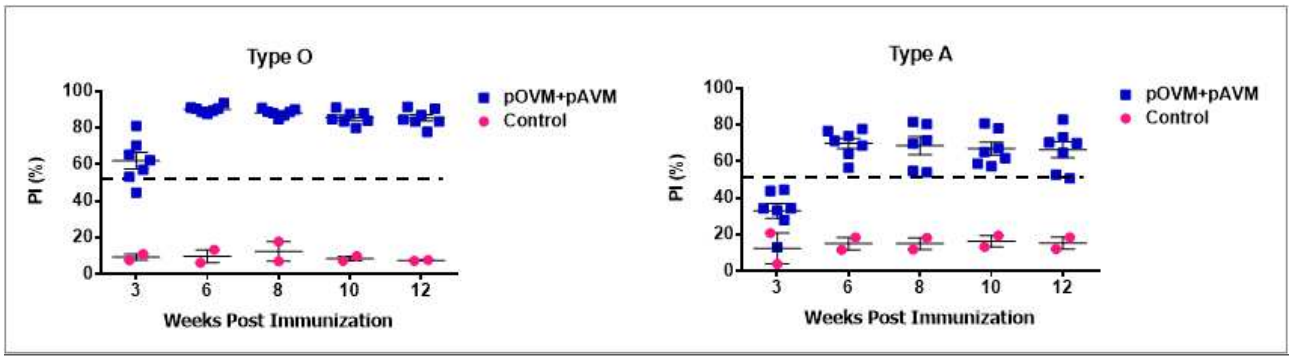


그림 45. 목적동물(돼지)에서의 재조합 혼합항원에 대한 항체가 검증

(11) 분자면역증강제 Porcine WRS 발현, 정제 및 면역증강 효능 연구

① 대장균 발현 시스템을 이용한 porcine WRS 단백질의 발현/정제 연구

◎ 2018년 종료과제(구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증)에서는 human WRS에 대한 면역증강 효능을 검증한 바가 있음.

◎ WRS (Tryptophan-tRNA synthetase)는 숙주세포에서 protein translation시 tRNA에 tryptophan을 연결해주는 효소로 알려져 있지만, 최근에는 세균이나 바이러스 감염시 면역세포의 세포 밖으로 분비되면서 면역반응 매개 역할을 하는 것으로 밝혀졌음. 따라서 본 연구진은 구제역 백신의 면역을 증강시킬 목적으로 돼지 유래의 porcine WRS를 이용하여 구제역 항원에 대한 FMDV 방어능을 극대화시키고자 연구를 시작하였음.

◎ 우선 porcine WRS을 합성한 유전자를 Histidine이 tag된 대장균 발현벡터에 삽입하여 porcine WRS를 발현하는 plasmid를 구축하였음. 구축된 porcine WRS 발현 plasmid를 대장균 균주에 transformation시킨 후 IPTG로 발현을 유도하여 soluble form의 porcine WRS 단백질 발현을 확인하였음.

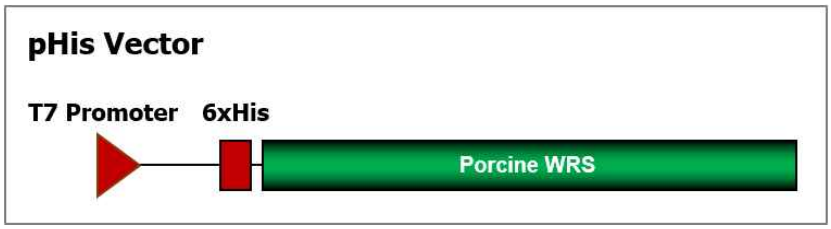


그림 46. Porcine WRS의 대장균 발현을 위한 plasmid 구축

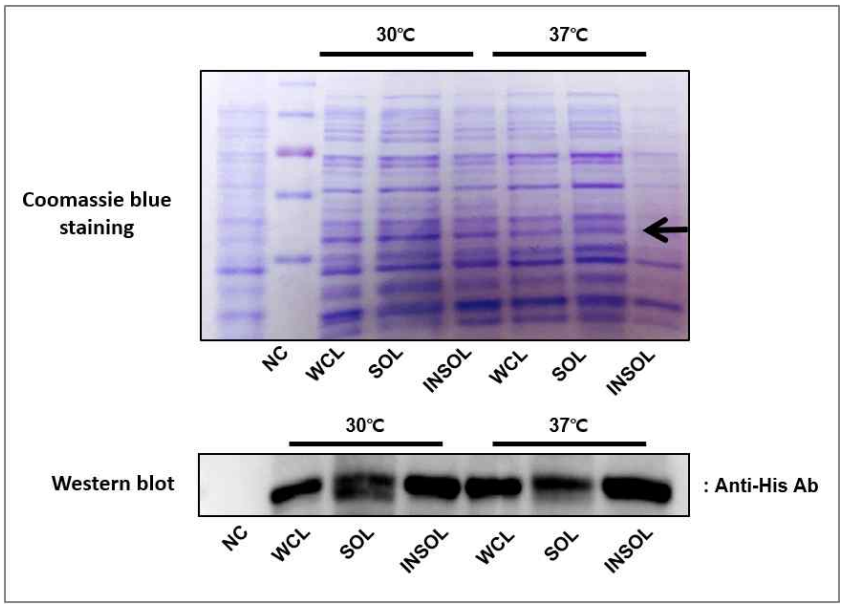


그림 47. 대장균으로부터 soluble 형태의 porcine WRS 발현 확인

◎ Soluble form의 porcine WRS 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과

Immobilized metal affinity chromatography를 이용하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 단백질을 정제하였음.

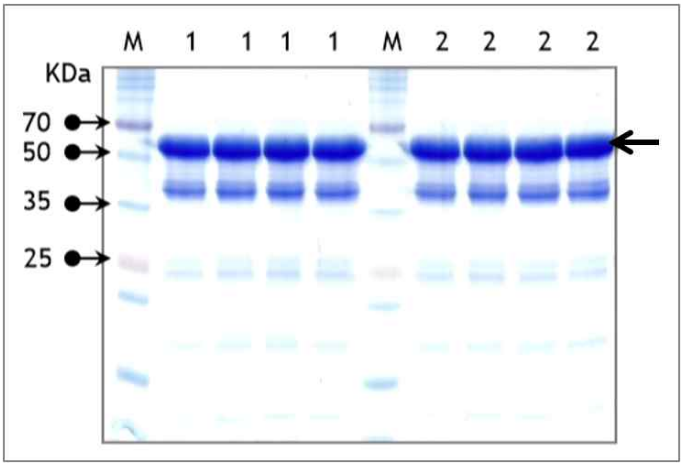


그림 48. 대장균으로부터 정제된 porcine WRS 단백질 확인

◎ 본 연구진은 대장균으로부터 정제된 Soluble form의 porcine WRS 단백질을 재조합의 구제역 항원들과 혼합 접종함으로써, 면역증강 효능을 입증할 예정임.

(12) 분자면역증강제 pWRS와 pWRS 융합 단백질들의 면역증강 효능연구 및 선별

◎ 본 연구진은 재조합 구제역 항원들의 면역원성을 증강시키기 위한 면역증강물질로 porcine WRS (pWRS) 단백질과 더불어 porcine WRS (pWRS) 단백질과 융합된 형태의 다른 면역증강물질들을 구축하여 효능 비교연구를 수행하였음.

◎ 본 연구에서는 porcine WRS (pWRS) 단백질의 융합단백질로 대장균의 중요한 병원성 인자로 대장균의 부착(attachment)에 중요한 pili(섬모) 단백질들중 하나인 K88을 이용하여 pWRS-K88 융합단백질을 대장균 발현시스템을 이용해 가용성 단백질 형태로 발현하였고 이를 정제하여 준비하였고, 더불어 돼지 유래의 IFN-lamda1을 이용하여 pWRS-IFNλ1 융합단백질을 대장균 발현시스템을 이용해 가용성 단백질 형태로 발현하였고 이를 정제하여 준비하였음.

◎ 즉, 마우스에서 구제역 재조합 항원에 대한 pWRS, pWRS-K88, pWRS-IFNλ1 단백질들의 면역증강 효과를 알아보기 위해 접종실험을 수행하였음. 백신항원으로서 대장균 발현시스템을 이용하여 발현, 정제한 최소한의 양인 pOVM 5ug와 pAVM 150ng을 사용하였고, 이에 발현 정제한 pWRS, pWRS-K88, pWRS-IFNλ1 단백질들과 W314을 각각 혼합하여 마우스에 접종하였음. 아래의 그림과 같이 10개의 그룹으로 1회 근육으로 접종후 1, 2, 4주뒤에 혈청내 혈청 항체가를 측정하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Route : IM

Groups		Inoculum							ELISA
		Antigen		Adjuvant					
		pOVM	pAVM	ISA201	pWRS	pWRS-K88	pWRS-IFNλ1	W314	
1	ISA201	-	-	100 ul	-	-	-	-	5
2	pOVM+pAVM+ISA201	5 ug	150 ng	100 ul	-	-	-	-	5
3	pOVM+pAVM+ISA201+pWRS-1	5 ug	150 ng	100 ul	10 ug	-	-	-	5
4	pOVM+pAVM+ISA201+pWRS-2	5 ug	150 ng	100 ul	20 ug	-	-	-	5
5	pOVM+pAVM+ISA201+pWRS-K88-1	5 ug	150 ng	100 ul	-	10 ug	-	-	5
6	pOVM+pAVM+ISA201+pWRS-K88-2	5 ug	150 ng	100 ul	-	20 ug	-	-	5
7	pOVM+pAVM+ISA201+IFNλ1-1	5 ug	150 ng	100 ul	-	-	10 ug	-	5
8	pOVM+pAVM+ISA201+IFNλ1-2	5 ug	150 ng	100 ul	-	-	20 ug	-	5
9	pOVM+pAVM+ISA201+W314-1	5 ug	150 ng	100 ul	-	-	-	30 ug	5
10	pOVM+pAVM+ISA201+W314-2	5 ug	150 ng	100 ul	-	-	-	60 ug	5

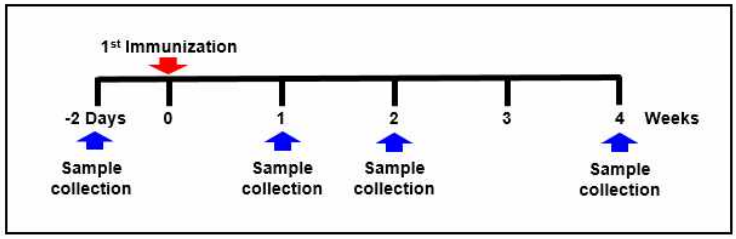


그림 49. 면역증강제 효능 검증을 위한 마우스 접종 스케줄

◎ 아래 그림과 같이, pOVM 및 pAVM에 대한 ELISA를 통해 혈청에서의 pOVM과 pAVM에 대한 항체가 측정 결과, pWRS-K88 단백질을 함께 접종한 그룹에서 높은 항체가를 나타내었음. 따라서, pWRS-K88 단백질을 면역증강물질중 하나로 선별하였음.

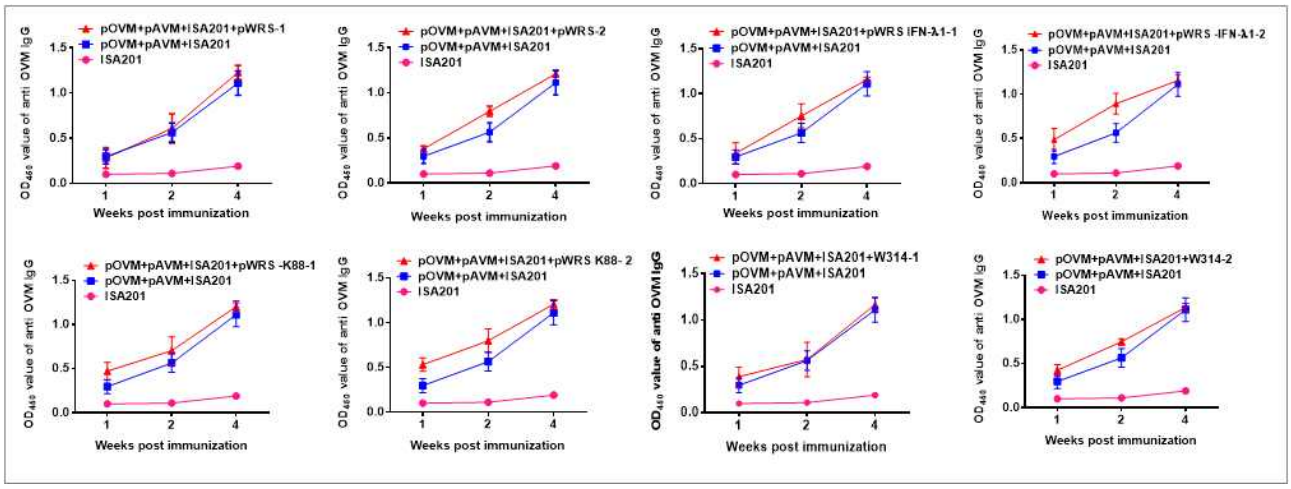


그림 50. OVM 항원에 대한 항체가 측정

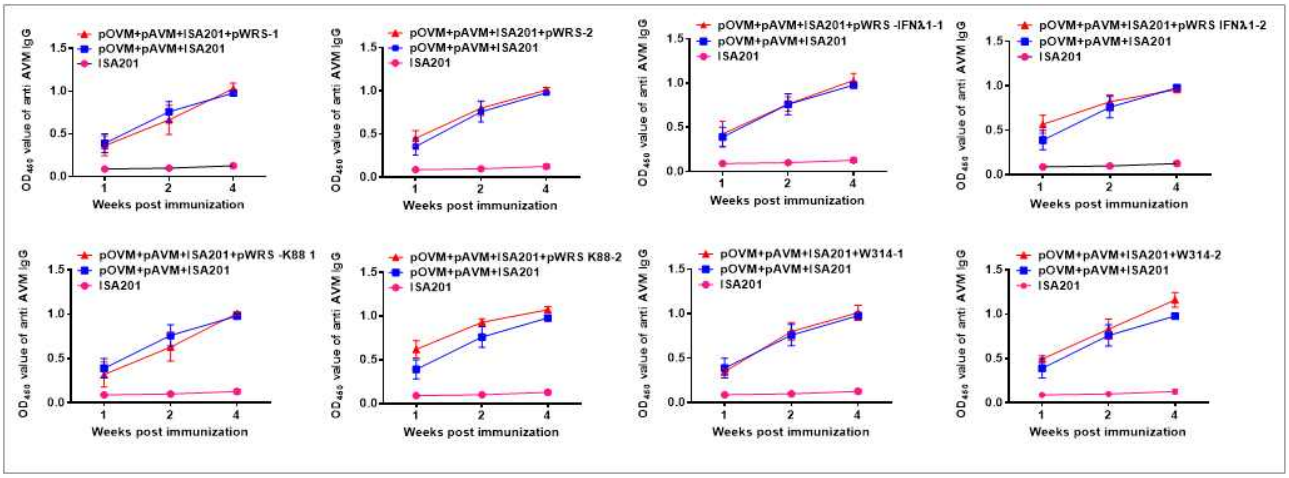


그림 51. AVM 항원에 대한 항체가 측정

(13) 선별 분자면역증강제 pWRS-K88의 면역증강 효능 검증

◎ 상기의 실험에서 선별한 분자면역증강제인 pWRS-K88 단백질의 면역증강 효능을 보다 명확하게 확인하기 위해, 아래의 스케쥴과 같이 5주령 C57BL/6N에 정제한 pOVM과 pAVM 혼합항원 그리고 OVM과 AVM crude 혼합항원의 면역원성 즉, 항체생성율과 세포면역 유도능의 향상등을 확인하기 위해 실험을 수행하였음.

◎ 항원의 접종은 1회 접종으로 negative control은 adjuvant만 접종하였고, 접종후 4주뒤에 혈청 및 splenocytes를 수집하여 면역원성을 측정하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Route : IM

Groups		Inoculum					ELISPOT SP ELISA VNT
		Antigen		Adjuvant		PBS	
		pOVM/cOVM	pAVM/cAVM	ISA201	pWRS-K88		
1	ISA201	-	-	50 ul	-	50 ul	8 heads
2	pOVM+pAVM+ISA201	5 ug	150 ng	50 ul	-	30 ul	8 heads
4	pOVM+pAVM+ISA201 + pWRS-K88	5 ug	150 ng	50 ul	20 ug	10 ul	8 heads
6	cOVM+cAVM+ISA201 + pWRS-K88	5 ug	150 ng	50 ul	20 ug	10 ul	8 heads

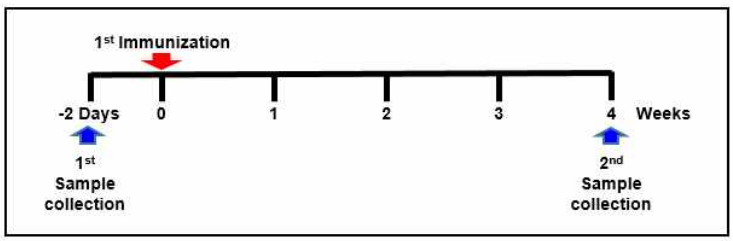


그림 52. 면역증강제 효능 검증을 위한 마우스 접종 스케줄

◎ 그 결과, 아래 그림과 같이, 정제된 OVM과 AVM 혼합항원과 OVM과 AVM crude 혼합항원 모두의 항체생성률이 pWRS-K99 단백질을 함께 혼합투여 했을 때 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서도 모두 증가했음을 확인할 수 있었음.

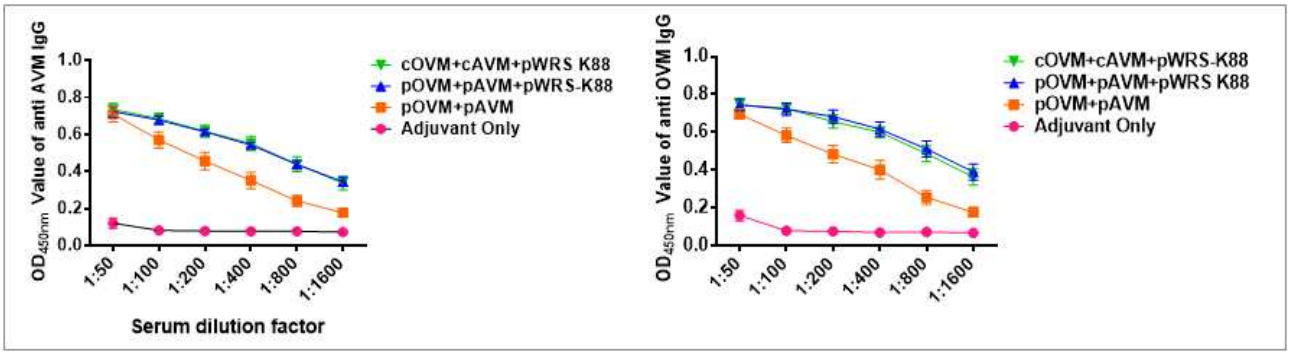


그림 53. pWRS-K88에 의한 재조합 항원의 면역증강 효능 검증

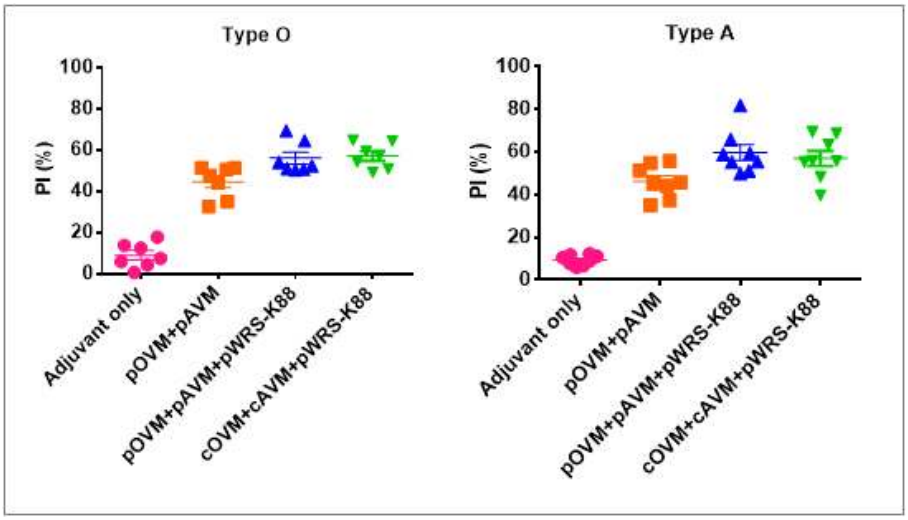


그림 54. pWRS-K88에 의한 재조합 항원의 SP ELISA 측정

◎ 항체가 비교 검증에 이어 세포면역 유도능을 비교 측정하였음. T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 첫번째 접종 후 4주째 마우스의 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 (OVM, AVM) 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 그리고 A pocheon, A Malay97, A Iraq 등 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

◎ 그 결과, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 아래 그림과 같이, 정제된 OVM과 AVM 혼합항원과 OVM과 AVM crude 혼합항원 모두의 세포면역 유도능이 pWRS-K99 단백질을 함께 혼합투여 했을 때 모두 증가했음을 확인할 수 있었음.

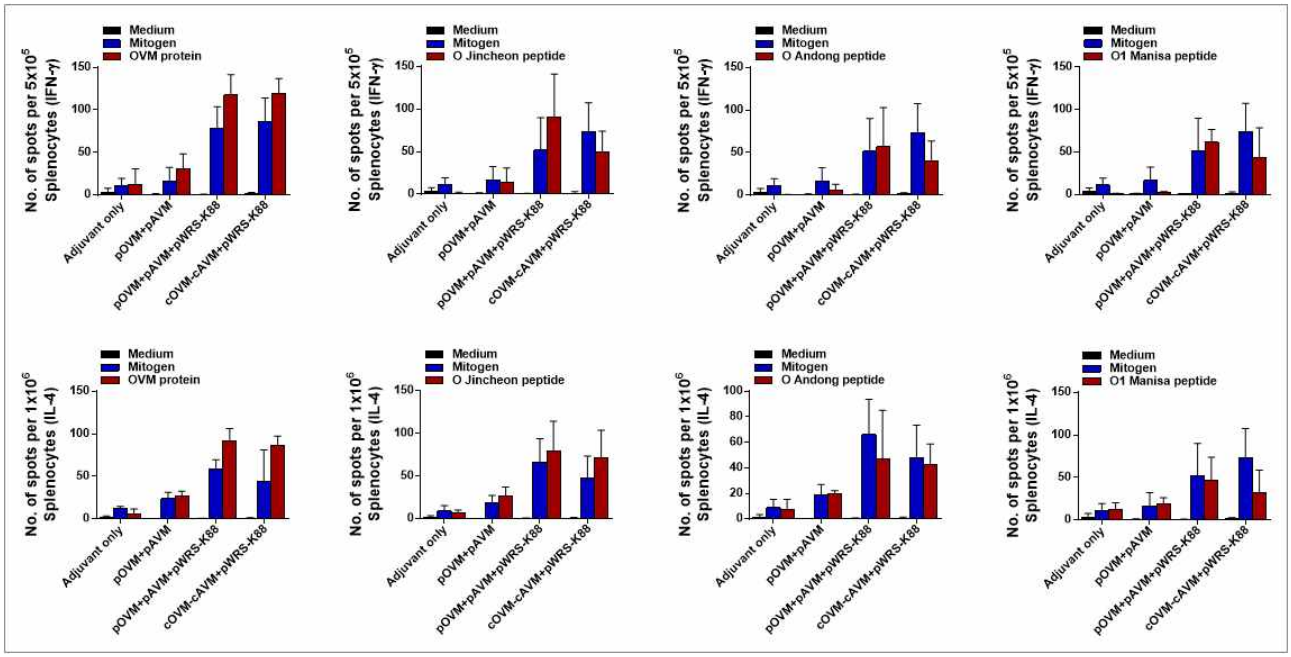


그림 55. pWRS-K88에 의한 재조합 항원의 세포성면역 효능 검증

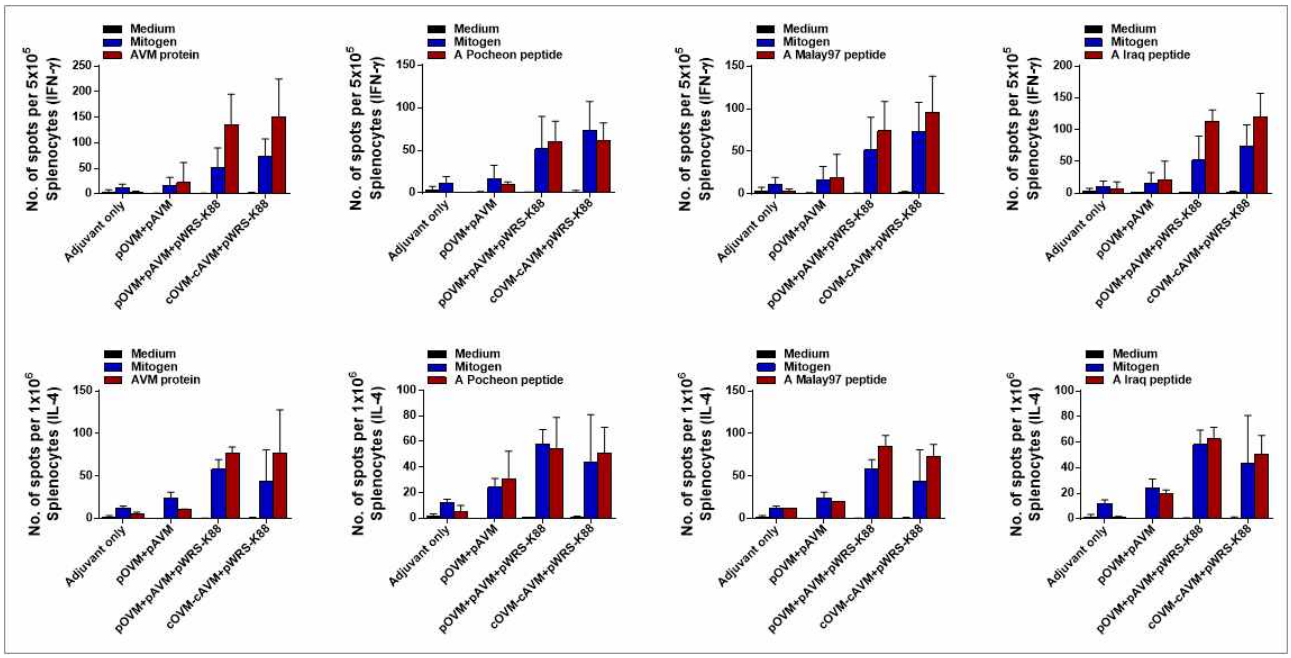


그림 56. pWRS-K88에 의한 재조합 항원의 세포성면역 효능 검증

(14) 분자면역증강제 pWRS-K88의 FMDV 방어능 검증 연구

◎ 다음으로 분자면역증강제인 pWRS-K88 단백질의 면역증강 효능에 의한 FMDV 방어효능을 검증하였음. 아래의 스케줄과 같이 5주령 C57BL/6N에 정제한 pOVM과 pAVM 혼합항원에 pWRS-K88 단백질을 혼합하여 1회 접종한 후 4주뒤에 O Vet 2013 strain과 A Malay97 strain을 공격접종한 후 각 그룹의 생존율을 확인하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Route : IM

Groups		Inoculum					Inoculum Volume	Challenge	
		Antigen		Adjuvant		PBS			
		pOVM	pAVM	ISA201	pWRS-K88			O type	A type
1	Adjuvant only	-	-	50 ul	-	50 ul	100 ul	5 heads	5 heads
2	pOVM+pAVM	5 ug	150 ng	50 ul	-	30 ul	100 ul	5 heads	5 heads
4	pOVM+pAVM +pWRS-K88	5 ug	150 ng	50 ul	20 ug	10 ul	100 ul	5 heads	5 heads

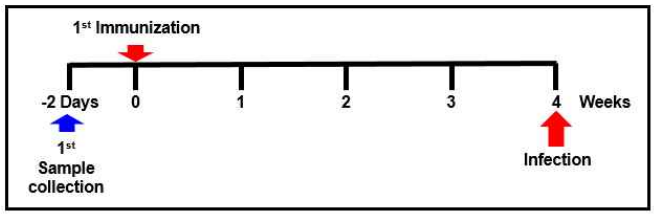


그림 57. pWRS-K88에 의한 재조합 항원의 방어효능 검증 실험스케줄

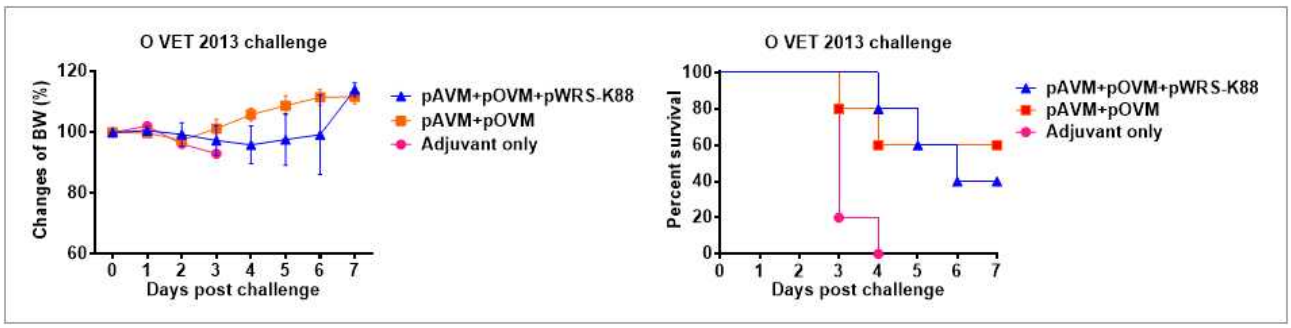


그림 58. FMDV O VET 2013 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

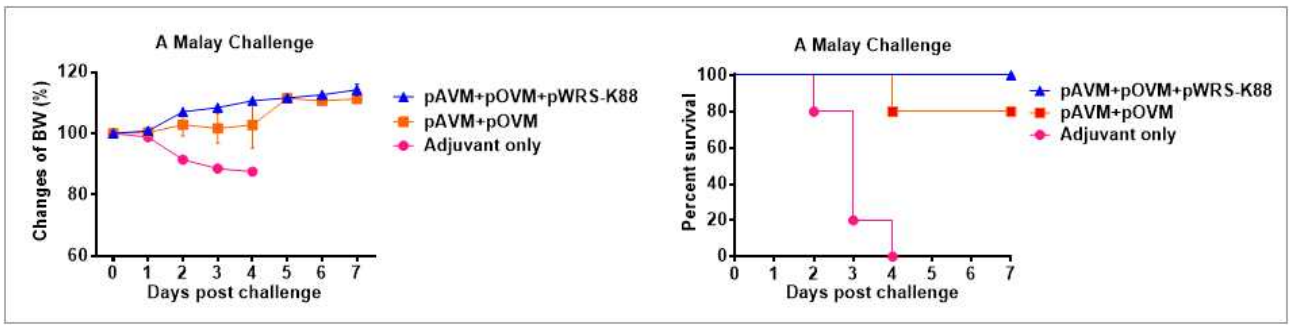


그림 59. FMDV A Malay 공격 접종 실험 결과 (생존율 및 체중 변화)

◎ 그 결과, 위의 그림에서 보는 바와 같이, pWRS-K88 단백질을 포함하는 pOVM과 pAVM 혼합항원 투여그룹dl 그렇지 않은 그룹에 비해 높은 방어효능을 나타내었음.

(15) 면역증강제를 포함하는 pOVM과 pAVM 혼합항원의 목적동물(돼지) 면역증강 효능 검증실험 (㈜코미팜, 농림축산검역본부 연계)

◎ 정제된 구제역 재조합 단백질 (pAVM, pOVM) 및 crude 정제된 재조합 단백질 (cAVM, cOVM) 그리고 pWRS 단백질을 이용하여 각각 표준품 3종과 시제품 3종을 제조하였으며, 상용화 구제역 백신 접종군과 비접종 대조군을 포함하여 총 7 그룹에 대한 동물 실험을 실시하였음.

◎ 실험동물을 선정하기 위하여 10주령 전후의 돼지 45두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 21마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 백신은 1 두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 4주 간격으로 2회 접종 후, 2차 접종 4주차 까지 항체 지속 양상을 확인하였음.

(가) 10주령 일반돼지에 대한 구제역 항체가 모니터링 결과

O형에 대한 ELISA 항체가

Group	name	OD	PI	Result
K1	1.00	1.42	35.20	-
	2.00	1.08	50.76	+
	3.00	2.11	4.07	-
	4.00	1.44	34.43	-
	5.00	2.15	2.16	-
	6.00	2.09	5.07	-
	7.00	1.94	11.54	-
	8.00	1.95	11.49	-
	9.00	1.18	46.53	-
	10.00	2.03	7.44	-
	11.00	2.00	8.99	-
	12.00	2.14	2.75	-
	13.00	2.12	3.48	-
	14.00	1.02	53.58	+
	15.00	1.71	22.05	-
	16.00	1.94	11.90	-
	17.00	1.11	49.40	-
	18.00	0.85	61.37	+
	19.00	1.58	28.05	-
	20.00	1.09	50.31	+
	21.00	1.01	53.86	+
	22.00	1.48	32.51	-
	23.00	0.88	59.86	+
	24.00	0.82	62.64	+
	25.00	1.38	37.02	-
	26.00	1.09	50.63	+
	27.00	0.71	67.51	+
	28.00	2.01	8.76	-
	29.00	1.11	49.67	-
	30.00	1.52	30.65	-
	31.00	0.66	70.06	+
	32.00	1.51	31.33	-

A형에 대한 ELISA 항체가

Group	name	OD	PI	Result
K1	1.00	2.81	(16.88)	-
	2.00	2.05	14.63	-
	3.00	2.16	9.88	-
	4.00	1.96	18.54	-
	5.00	2.17	9.58	-
	6.00	2.24	6.54	-
	7.00	2.10	12.63	-
	8.00	2.17	9.75	-
	9.00	2.22	7.54	-
	10.00	2.01	16.25	-
	11.00	2.28	4.83	-
	12.00	2.13	11.46	-
	13.00	2.07	13.63	-
	14.00	2.02	15.88	-
	15.00	2.19	8.83	-
	16.00	2.22	7.58	-
	17.00	1.96	18.25	-
	18.00	1.89	21.25	-
	19.00	2.02	15.88	-
	20.00	1.95	18.67	-
	21.00	1.84	23.46	-
	22.00	2.04	15.17	-
	23.00	1.96	18.17	-
	24.00	1.87	22.04	-
	25.00	1.83	23.71	-
	26.00	1.92	19.88	-
	27.00	2.00	16.79	-
	28.00	2.82	(17.63)	-
	29.00	1.86	22.42	-
	30.00	2.10	12.33	-
	31.00	1.83	23.67	-
	32.00	2.01	16.29	-

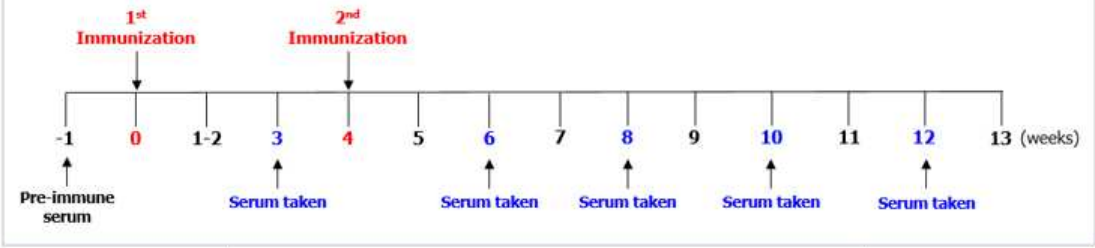
	33.00	0.95	56.81	+
	34.00	1.00	54.36	+
	35.00	1.09	50.49	+
	36.00	1.96	10.63	-
	37.00	1.04	52.49	+
	38.00	1.13	48.67	-
	39.00	0.65	70.33	+
	40.00	1.27	42.25	-
	41.00	1.90	13.49	-
	42.00	1.40	36.25	-
	43.00	1.21	44.85	-
	44.00	1.15	47.80	-
	45.00	1.25	43.30	-

	33.00	2.05	14.67	-
	34.00	1.82	24.25	-
	35.00	2.12	11.75	-
	36.00	2.26	5.67	-
	37.00	1.92	20.17	-
	38.00	2.03	15.63	-
	39.00	2.04	15.08	-
	40.00	1.97	17.83	-
	41.00	2.64	(10.13)	-
	42.00	2.20	8.50	-
	43.00	2.11	12.29	-
	44.00	2.19	8.83	-
	45.00	2.08	13.42	-

◎ 항체가 검사 검사 결과, FMDV O형에 대해서는 총 45두 중 14마리가 항체 양성, 31마리가 항체 음성으로 확인되었고, FMDV A형에 대해서는 45마리 모두 항체 음성으로 확인되었음. 이 중에서 O형에 대한 ELISA 항체가가 낮은 개체 21마리를 선정하여 최종 실험에 활용하였음.

(나) 목적동물(돼지) 실험계획

◎ 아래의 21마리를 대상으로 상기 표와 같이 그룹을 구성하였으며, 백신 비접종 대조군과, 상용화 백신 대조군을 포함시켰음.



Group	조성 (2 ㎖/1 dose)		개체수
	재조합단백질 항원량	면역증강제	
Group 1	PBS	ISA201	3
Group 2	Commercial Vaccine (O-A type 항원)	DOE	3
Group 3	pOVM+pAVM	ISA201	3
Group 4	pOVM+pAVM+pWRS	ISA201	3
Group 5	cOVM+cAVM	ISA201	3
Group 6	cOVM+cAVM	Adjuvant 1	3
Group 7	cOVM+cAVM	Adjuvant 2	3

그림 60. 면역증강제 효능 검증을 위한 돼지 접종 스케줄

◎ 먼저 스케쥴과 같이 각각의 주령에서 분리한 혈청으로부터 각 O serotype 및 A serotype에 대한 SP ELISA 항체가를 측정하였음. 그 결과 Crude 단백질을 접종한 그룹에서도 정제한 항원단백질과 높거나 비슷한 수준으로 항체가를 형성하는 것을 확인할 수 있었음.

◎ A형에 대한 SP ELISA 항체가

	Name	전채혈(5/15)		6/5,1차3주		6/12,1차4주		7/10,2차4주	
그룹	Label	05월 20일		06월 11일		06월 13일		07월 11일	
1	K20	27.90	-	38.86	-	26.59	-	15.70	-
	K29	34.61	-	32.15	-			23.71	-
	K35	37.35	-	39.34	-	27.35	-	11.79	-
2	K11	29.81	-	44.83	-	29.61	-	35.92	-
	K15	27.69	-	54.90	+	34.34	-	69.16	+
3	K3	51.47	+	54.42	+	57.16	+	63.54	+
	K7	19.33	-	48.05	-	69.57	+	68.75	+
	K9	12.27	-	48.59	-	57.51	+	71.08	+
	K19	16.04	-	31.60	-	58.74	+	52.71	+
4	K8	6.58	-	19.12	-	39.27	-	51.88	+
	K22	-0.75	-	26.11	-	18.85	-	68.47	+
	K28	9.60	-	53.19	+	43.80	-	76.63	+
5	K30	12.68	-	32.28	-	30.16	-	27.96	-
	K36	27.55	-	27.21	-	34.68	-	28.31	-
	K44	19.53	-	21.59	-	23.78	-	14.32	-
6	K1	47.64	-						
	K5	15.28	-	11.79	-	21.80	-	12.06	-
	K6	8.91	-	7.81	-	0.89	-	1.78	-
	K32	15.15	-	20.22	-	11.24	-	-6.65	-
7	K10	19.33	-	29.47	-	16.86	-	27.90	-
	K12	7.54	-	39.75	-	9.94	-	66.76	+

O형에 대한 SP ELISA 항체가

	Name	전채혈(5/5)		6/5,1차3주		6/12,1차4주		7/10,2차4주	
그룹	Label	05월 20일		06월 11일		06월 13일		07월 11일	
1	K20	22.14	-	4.45	-	6.55	-	6.73	-
	K29	15.05	-	8.09	-			17.00	-
	K35	25.59	-	57.05	+	10.77	-	30.82	-
2	K11	3.23	-	40.82	-	50.68	+	77.77	+
	K15	18.82	-	58.09	+	45.05	-	75.55	+
3	K3	11.55	-	43.59	-	58.14	+	90.23	+

	K7	18.14	-	77.32	+	60.59	+	90.09	+
	K9	-1.86	-	67.68	+	84.18	+	81.95	+
	K19	5.73	-	44.41	-	69.86	+	84.50	+
4	K8	40.14	-	55.50	+	59.32	+	74.95	+
	K22	12.91	-	42.18	-	69.86	+	84.18	+
	K28	1.73	-	63.77	+	54.59	+	81.77	+
5	K30	6.32	-	39.36	-	45.36	-	76.68	+
	K36	8.68	-	25.00	-	30.64	-		
	K41	9.55	-						
	K44	9.59	-	48.00	-	44.82	-	77.64	+
6	K1	13.91	-						
	K5	2.59	-	11.09	-	13.41	-	43.32	-
	K6	4.41	-	3.00	-	10.23	-	21.91	-
	K32	-0.50	-	7.50	-	13.45	-		
7	K10	4.68	-	2.77	-	16.45	-	56.18	+
	K12	14.50	-	11.45	-	20.41	-	38.91	-

◎ 상기의 SP ELISA 항체가중 1차접종 4주후 혈청과 2차접종 4주후 혈청을 이용하여 home ELISA와 SP ELISA 그리고 FMDV O Jincheon 혹은 FMDV A Malay97 strain을 이용한 중화항체가를 비교 분석한 결과, 아래의 그림에서와 같이 정제된 OVM과 AVM 혼합항원 투여그룹과 crude OVM과 AVM 혼합항원 투여그룹에서의 항체형성률 및 중화항체 형성률이 상용화 백신에 의해 유도되는 O type 혹은 A type에 대한 중화항체 형성률과 비슷하거나 혹은 높은 수준으로 유도됨을 확인할 수 있었음.

◎ pWRS 단백질의 혼합접종의 경우 항체형성률 및 중화항체 형성률에 있어 pWRS 단백질을 같이 투여하지 않은 그룹과 비교하여 의미 있는 항체유도능을 확인하지는 못하였음.

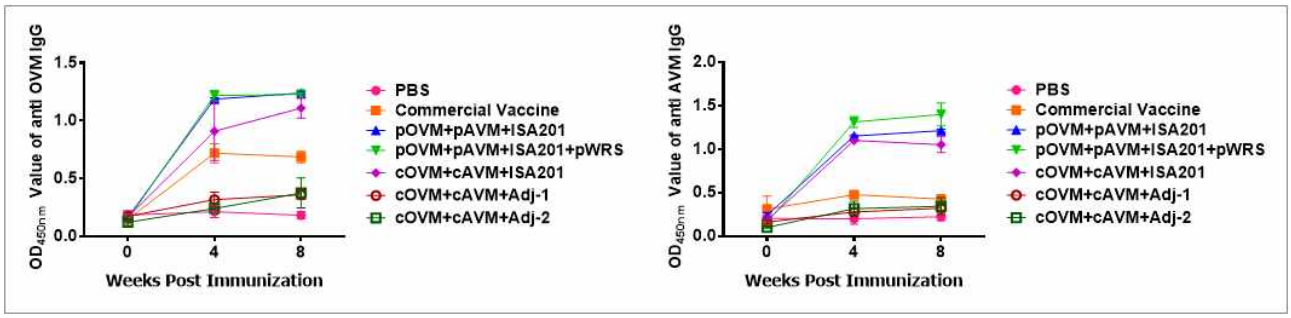


그림 61. OVM과 AVM에 대한 항체가 측정

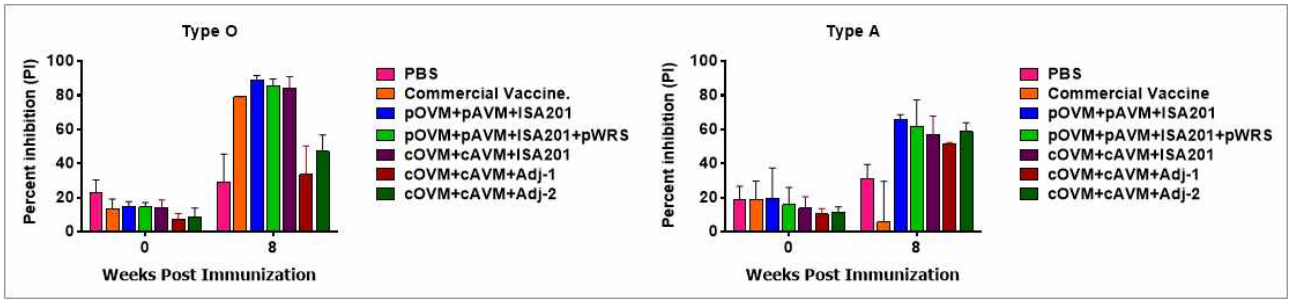


그림 62. OVM과 AVM에 대한 SP ELISA 측정

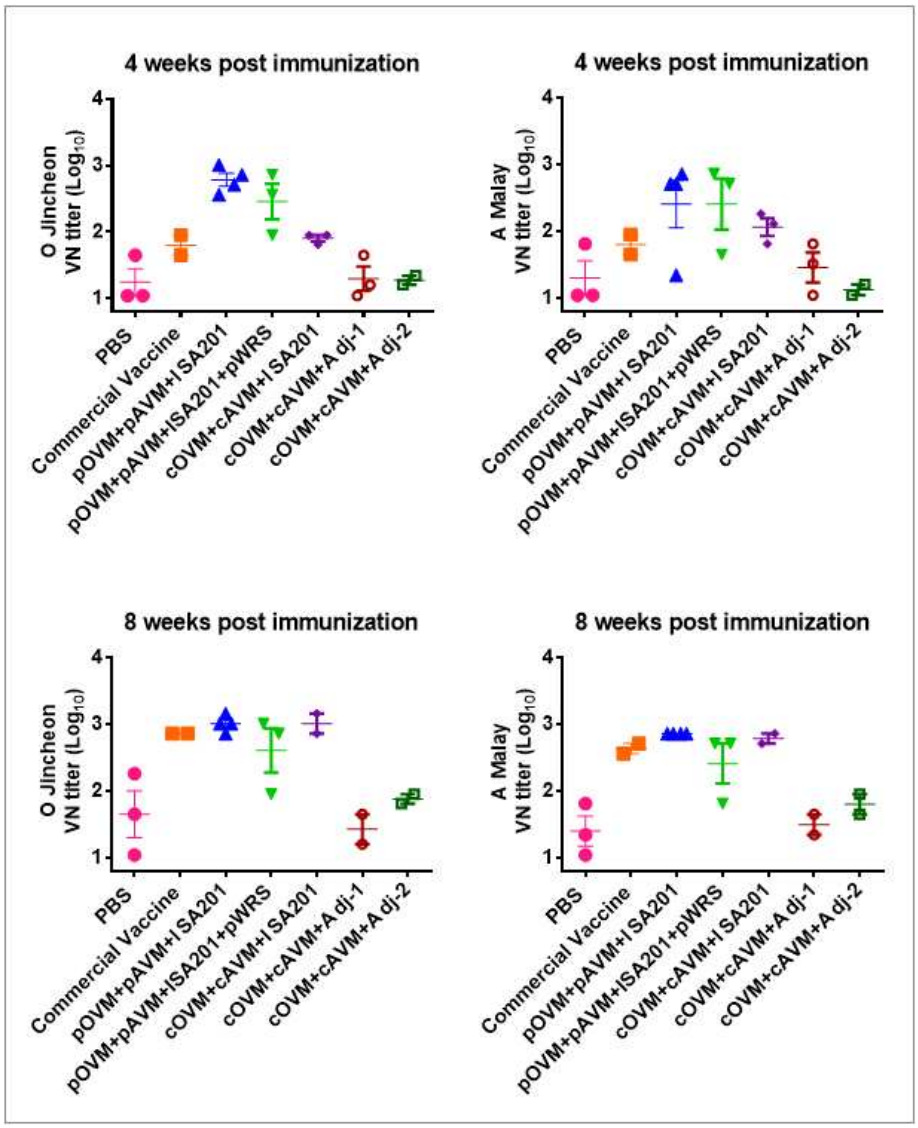


그림 63. O serotype과 A serotype에 대한 중화항체가 측정

(16) 천연물 면역증강제(W314)의 면역증강 효능 연구

(가) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질과 천연물의 혼합제제를 이용한 면역원성 및 FMDV 방어 효능 검증 - 1

◎ 본 연구진은 수년전부터 천연 한방생약소재 약 300여종의 추출물을 이용하여 항원제시세포(Antigen presenting cell; macrophage, dendritic cell)를 포함하는 면역세포를 자극함으로서 선천면역(Innate immunity)을 증가시킬 수 있는 한방생약소재들을 screening 하였고, 그들 중 20여종의 한방소재가 면역세포를 자극하여 선천면역과 관련한 cytokine의 분비능력이 탁월함을 확인하였음.

◎ 본 연구진은 선별된 20여종의 한방소재 추출물의 면역증강 효능 및 면역보조제로서의 효능을 In vivo에서 확인하기 위해 재조합 구제역 항원단백질을 이용한 FMDV challenge test를 수행하여 면역증강제로 개발 가능한 한방소재들을 선별하였음.

◎ 첫 번째로 선별된 20여종의 한방소재 추출물들중 W314의 면역증강효능을 FMDV challenge test를 통하여 예비적으로 확인하였음. 아래에서 보는 바와 같은 실험계획으로 수행을 하였음. 즉, 정제된 재조합 구제역항원 (pOVM)을 이용하여 W314와 상용화 adjuvant인 ISA201의 구제역바이러스에 대한 방어능을 비교 확인하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM
Days of inoculation : 0, 14 dpi
Challenge : 28 dpi

Groups		Inoculum				Inoculum Volume	Route	No. of Mice
		ISA201	Antigen (pOVM)	(W314)	PBS			
1	Adjuvant (ISA201)	100ul	-	-	100ul	200 ul	I.M	6
2	Commercial vaccine	-	-	-	-	200 ul	I.M	6
3	pOVM	-	20ug (33ul)	-	167ul	200 ul	I.M	6
4	pOVM+W314	-	20ug (33ul)	167ul	-	200 ul	I.M	6
5	pOVM+ISA201	100ul	20ug (33ul)	-	67ul	200 ul	I.M	6
6	pOVM+ISA201+W314	100ul	20ug (33ul)	67ul	-	200 ul	I.M	6

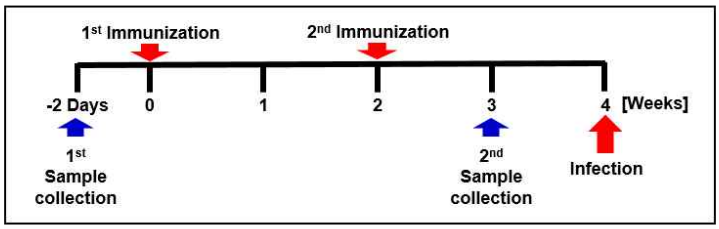


그림 64. 구제역 challenge 시스템을 이용한 한방소재의 면역증강효능 검증 스케줄

◎ 결과적으로, 아래의 그림과 같이 재조합 구제역항원 pOVM과 한방소재 추출물 W314로 혼합하여 투여한 마우스 그룹이 상용화 adjuvant인 ISA201와 재조합 구제역항원 pOVM을 혼합하여 투여한 마우스 그룹처럼 FMDV O Jincheon strain의 공격접종에서 모두 100% 방어능을 보여주었음 (그림 23).

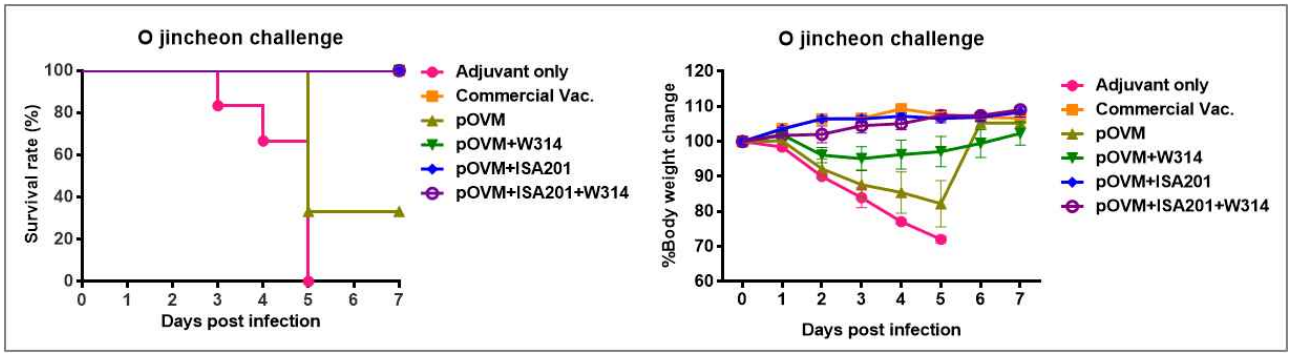


그림 65. 구제역 challenge 시스템을 이용한 한방소재 W314의 면역증강효능 검증

◎ 다음으로 상기의 방어 효능이 항체에 의한 것임을 확인하기 위해, 접종 3주째 얻은 혈청을 이용하여, pOVM 항원을 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체 생성율을 비교 분석한 결과, pOVM만 접종한 그룹보다 W314를 혼합접종한 그룹에서 항체가가 높게 나타남을 확인하였음.

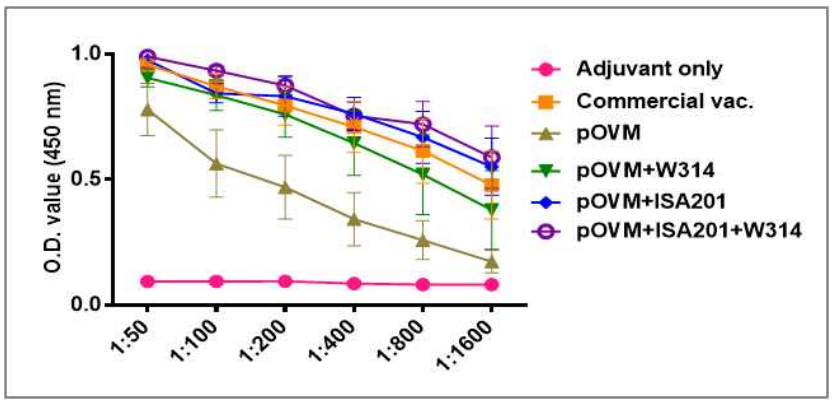


그림 66. W314에 의한 pOVM의 면역원성 증강 효능 검증

(나) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질과 천연물의 혼합제제를 이용한 세포성 면역증강 효능 및 long lasting 효능 검증

◎ 다음으로 아래와 같이, 천연물 소재 W314의 세포성 면역증강 효능 및 면역 지속성 효능을 검증하기 위해 정제된 O serotype용 pOVM 항원단백질과 W314를 혼합하여 마우스에 2회에 걸쳐 접종 후 혈청에서의 항체 농도와 비장에서의 CTL 면역반응을 측정을 위한 실험 스케쥴을 작성하였음. 비교 그룹으로서 상용화 백신 접종 그룹, pOVM 접종 그룹, pOVM+ISA201 접종 그룹, pOVM+ISA201+W314그룹을 포함하였음. pOVM antigen 농도는 20ug을 근육으로 투여하였음.

◎ T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 첫 번째 접종 후 4주째 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM
Days of inoculation : 0, 14 dpi

Groups		Inoculum				Inoculum Volume	Route	No. of Mice	
		ISA201	Antigen (pOVM)	(W314)	PBS			ELISPOT	Long lasting
1	Adjuvant (ISA201)	100ul	-	-	100 ul	200 ul	I.M	3	4
2	Commercial vaccine	-	-	-	-	200 ul	I.M	3	4
3	pOVM	-	20ug (33ul)	-	167 ul	200 ul	I.M	3	4
4	pOVM+W314	-	20ug (33ul)	167ul	-	200 ul	I.M	3	4
5	pOVM+ISA201	100ul	20ug (33ul)	-	67 ul	200 ul	I.M	3	4
6	pOVM+ISA201+W314	100ul	20ug (33ul)	67ul	-	200 ul	I.M	3	4

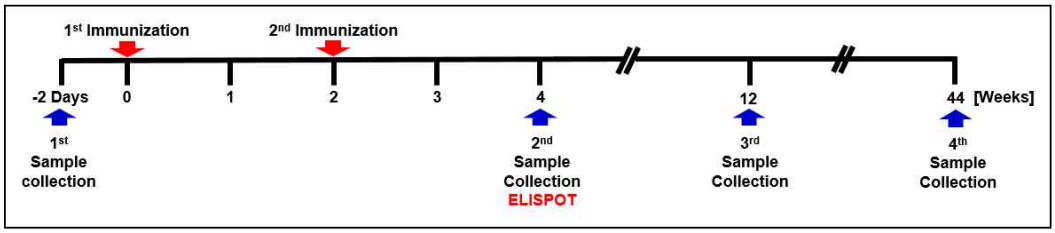


그림 67. W314에 의한 pOVM의 세포성면역 및 지속면역 증강 효능 검증 스케줄

◎ 그 결과, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN-r와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 spot을 확인하였고, 이를 분석하여 확인한 결과 W314dp 의해 pOVM에 대한 세포성 면역이 증가되었음을 확인하였음.

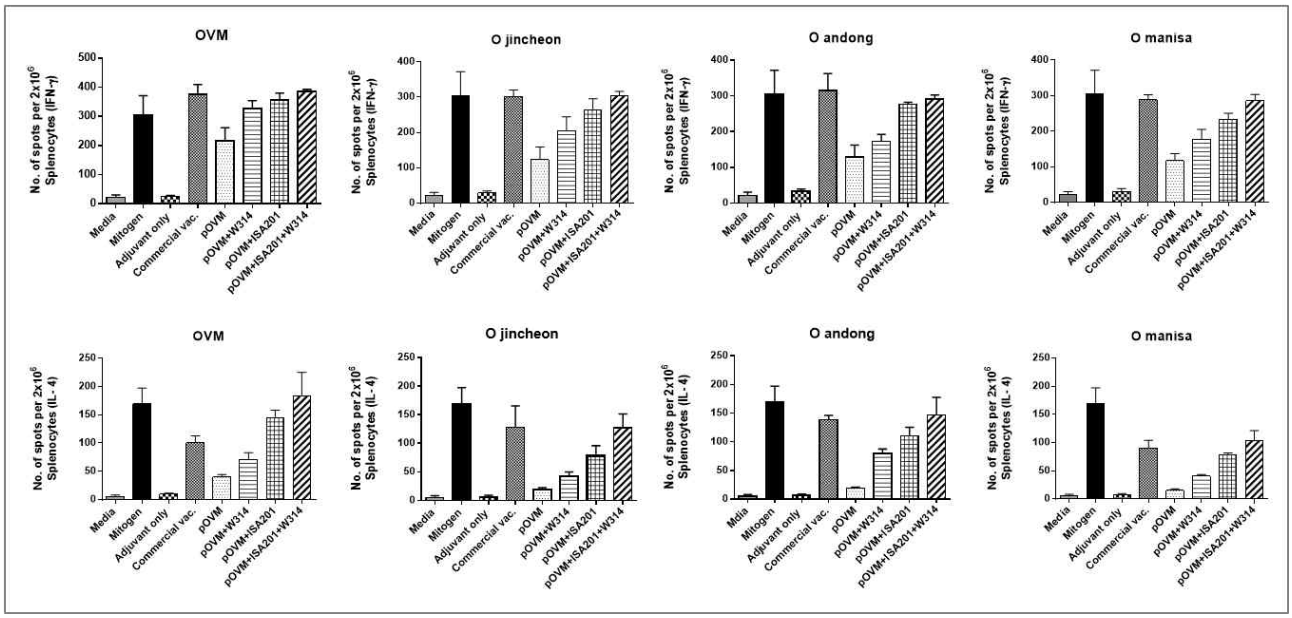


그림 68. W314에 의한 pOVM의 세포성면역 효능 검증

◎ 다음으로 W314에 의한 항원의 지속면역 효능을 검증하기 위해 매월 얻은 마우스 혈청을 이용하여, pOVM 항원으로 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체생성율을 비교분석한 결과, W314와 혼합하여 접종한 그룹에서 pOVM 항원에 대한 높은 항체가의 지속성

을 확인하였음.

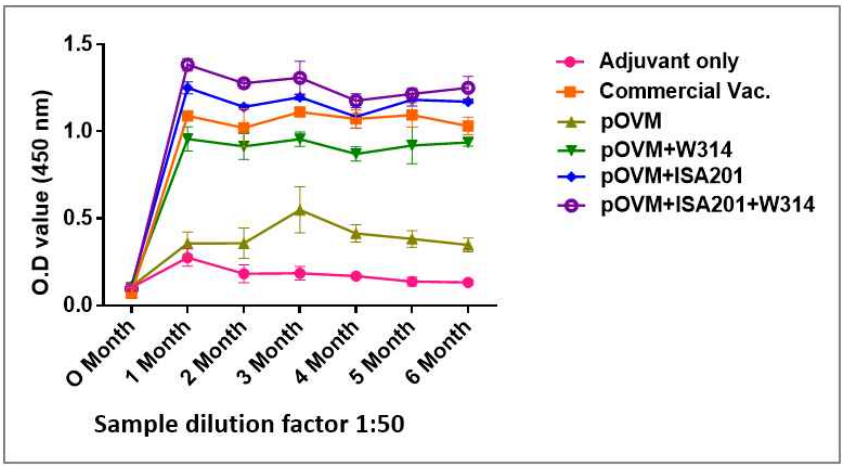


그림 69. W314에 의한 pOVM의 지속면역 증강 효능 검증

(다) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질과 천연물의 혼합제제를 이용한 면역원성 및 FMDV 방어 효능 검증 - 2

◎ 다음으로 정제된 O serotype용 pOVM 항원단백질을 고용량으로 1회 접종하였을 때 FMDV에 대한 방어 효능을 확인하기 위해 아래와 같은 스케쥴로 80ug의 pOVM을 1회 접종하고 4주 뒤에 FMDV를 공격 접종하였음. 또한 W314와 항원을 혼합 접종하여 FMDV에 대한 방어 효능이 증대되는지를 확인하고자 하였음. 음성대조군으로 Adjuvant 접종 그룹, 양성 대조군으로 상용화 백신 접종 그룹을 포함하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM
Days of inoculation : 0 days
Challenge : 28 dpi

Groups		Inoculum				Inoculum Volume	Route	No. of Mice
		ISA201	Antigen (pOVM)	W314	PBS			
1	Adjuvant (ISA201)	125ul	-		125ul	250ul	I.M	4
2	Commercial vaccine	-	-	-	-	250ul	I.M	4
3	pOVM	-	80ug (125ul)	-	125ul	250ul	I.M	4
4	pOVM+ISA201	125ul	80ug (125ul)	-	-	250ul	I.M	4
5	pOVM+ISA201+W314	125ul	40ug (66ul)	59ul	-	250ul	I.M	4

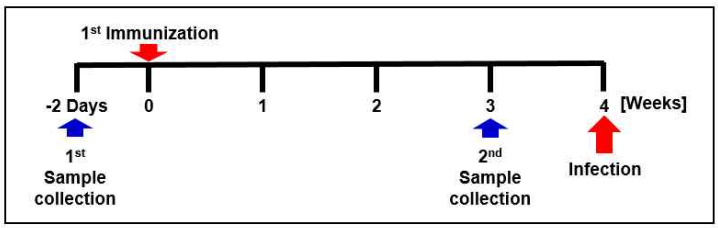


그림 70. 항원의 1회 접종에 의한 FMDV 방어 효능 마우스 실험 스케쥴

◎ 결과적으로, 아래 그림에서와 같이 pOVM만 1회 접종한 그룹에서는 50%의 방어능을 보였으

나, ISA201과 같이 혹은 ISA201+W314와 같이 접종한 그룹은 100% 방어능을 나타내었음. 이는 고용량의 재조합 구제역 항원 역시 adjuvant와 혼합투여하게 되면 FMDV에 대한 방어 효능이 나타남을 확인한 결과임.

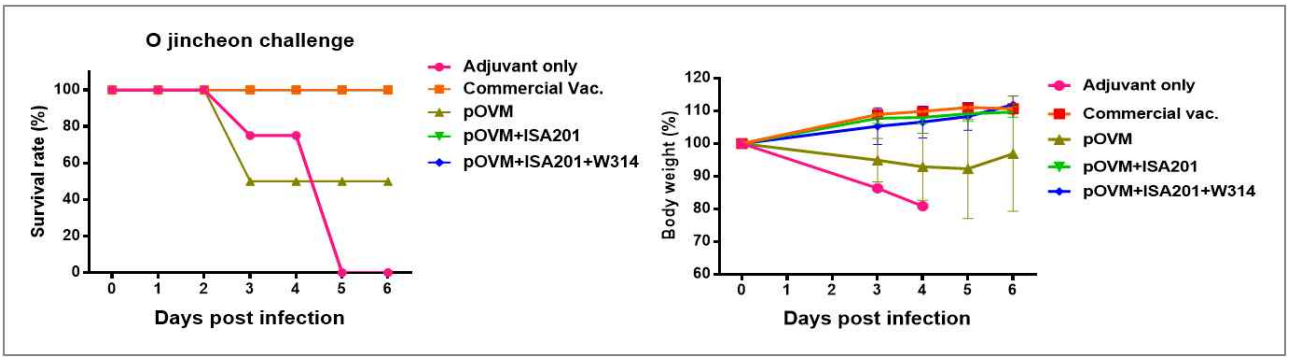


그림 71. 항원의 1회 접종에 의한 FMDV 방어 효능 검증

◎ 다음으로 상기의 방어 효능이 항체에 의한 것임을 확인하기 위해, 접종 3주째 얻은 혈청을 이용하여, pOVM 항원을 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체 생성율을 비교 분석한 결과, pOVM만 1회 접종한 그룹에서는 항체가가 아주 낮게 확인되었으나 adjuvant와 혼합하여 접종한 그룹에서는 높은 항체가를 나타내었음.

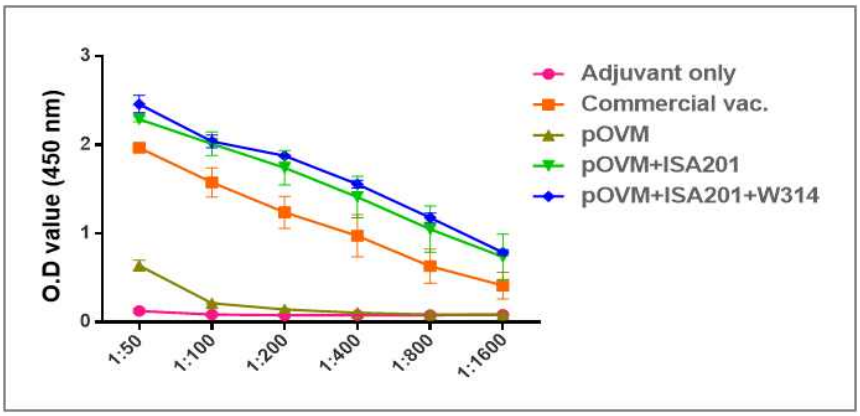


그림 72. 항원의 1회 접종에 의한 면역원성 검증

(라) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질과 천연물의 혼합제제를 이용한 면역원성 및 FMDV 방어 효능 검증 - 3

◎ 다음으로 정제된 O serotype용 pOVM 항원단백질을 고용량으로 1회 접종하였을 때 2주만에 FMDV에 대한 방어 효능을 확인하기 위해 아래와 같은 스케쥴로 80ug의 pOVM을 1회 접종하고 2주 뒤에 FMDV를 공격 접종하였음. 또한 W314와 항원을 혼합 접종하여 FMDV에 대한 방어 효능이 증대되는지를 확인하고자 하였음. 음성대조군으로 Adjuvant 접종 그룹, 양성 대조군으로 상용화 백신 접종 그룹을 포함하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM
Days of inoculation : 0 days
Challenge : 14 dpi

Groups		Inoculum				Inoculum Volume	Route	No. of Mice
		ISA201	Antigen (pOVM)	W314	PBS			
1	Adjuvant (W314)	-	-	125ul	125ul	250ul	I.M	4
2	Commercial vaccine	-	-	-	-	250ul	I.M	4
3	pOVM	-	80ug (125ul)	-	125ul	250ul	I.M	4
4	pOVM+ISA201	125ul	80ug (125ul)	-	-	250ul	I.M	4
5	pOVM+W314	-	80ug (125ul)	125ul	-	250ul	I.M	4

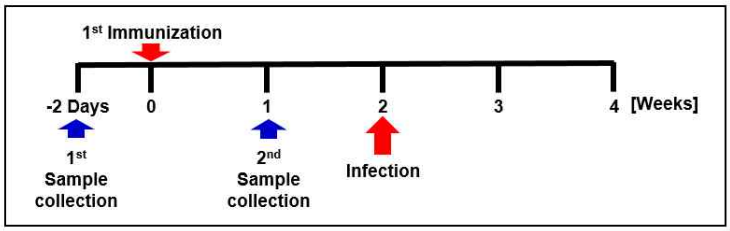


그림 73. 항원의 1회 접종후 2주뒤 FMDV 방어 효능 마우스 실험 스케줄

◎ 결과적으로, 아래 그림에서와 같이 pOVM만 1회 접종한 그룹에서는 50%의 방어능을 보였고, W314와 혼합하여 접종한 경우 방어능이 증대된 것을 확인할 수 있었음. 따라서 pOVM과 W314를 혼합 접종할 경우 1회 접종으로 2주 만에 바이러스에 대한 방어능이 생기는 것을 입증하였음.

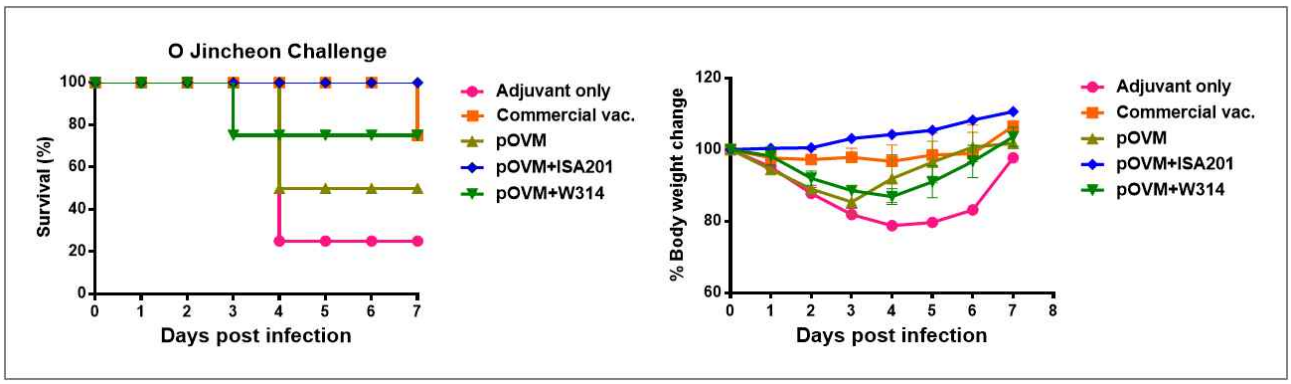


그림 74. 항원의 1회 접종후 2주뒤 FMDV 방어 효능 검증

◎ 다음으로 상기의 방어 효능이 항체에 의한 것임을 확인하기 위해, 접종 1주째 얻은 혈청을 이용하여, pOVM 항원을 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체 생성율을 비교 분석한 결과, pOVM만 1회 접종한 그룹에서는 항체가가 아주 낮게 확인되었지만 W314를 혼합하여 접종한 그룹에서는 더 높은 항체가를 나타내었음. 이로써 W314의 Adjuvant로서의 효능을 다시 한 번 확인하였음.

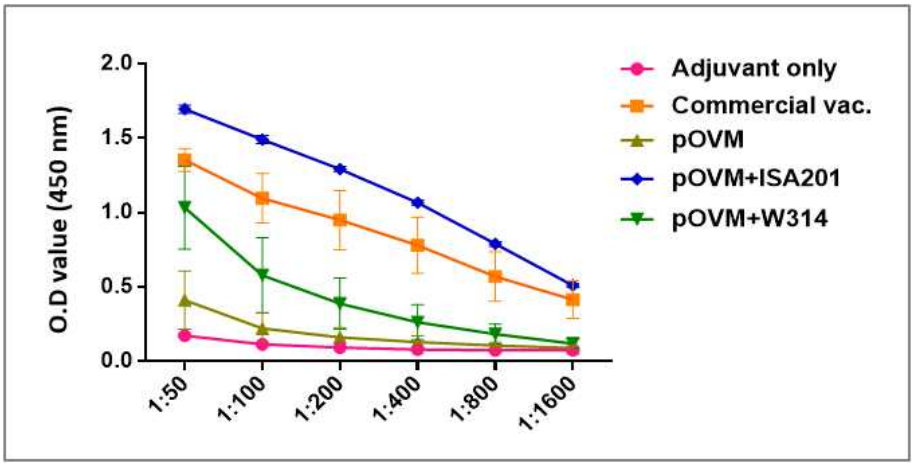


그림 75. 항원의 1회 접종후 pOVM에 대한 면역원성 검증

(17) 천연물 면역증강제(W314)의 면역증강 기전 연구

◎ 천연물 면역증강제인 W314에 의해 구제역 재조합 항원에 대한 면역원성의 증강 효능을 확인한 후, W314의 선천면역 자극 효능 즉, W314에 의해 면역세포의 자극효능을 In vitro에서 검증하였음.

◎ 처음으로 W314의 면역세포 자극 효능을 검증하기 위해, 돼지로부터 유래한 porcine bone marrow derived macrophage cell (pBMDM)에 농도별로 W314를 처리한 후 12시간 또는 24시간 뒤에 상층액을 얻어 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF-a, IL-12의 분비 정도와 Interferon-β의 분비를 ELISA로 측정하였음.

◎ 그 결과, 그림에서와 같이 W314를 처리한 돼지 유래 면역세포에서 염증성 사이토카인과 인터페론이 다량 분비된 것을 확인할 수 있었음.

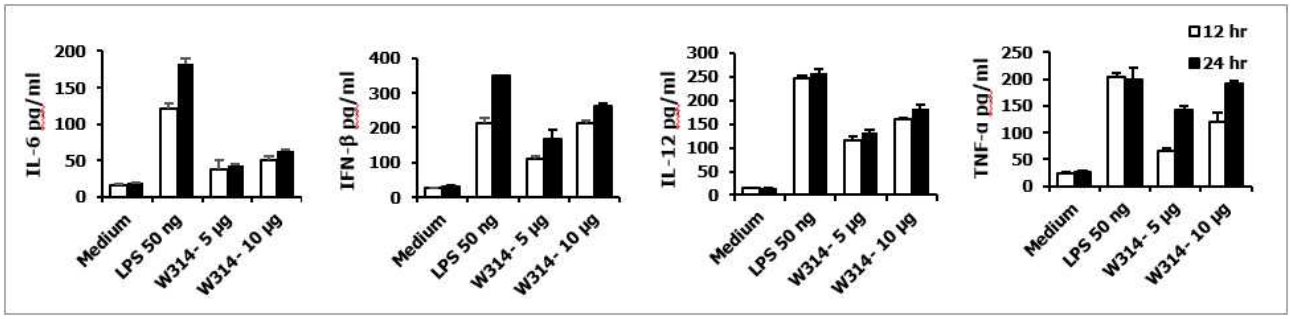


그림 76. Porcine BMDM cell에서 W314의 면역증강 효과

◎ 또한, porcine alveolar macrophage cell (PAM)에 W314의 처리시에도 비슷하게 염증성 사이토카인과 인터페론이 다량 분비된 것을 확인할 수 있었음.

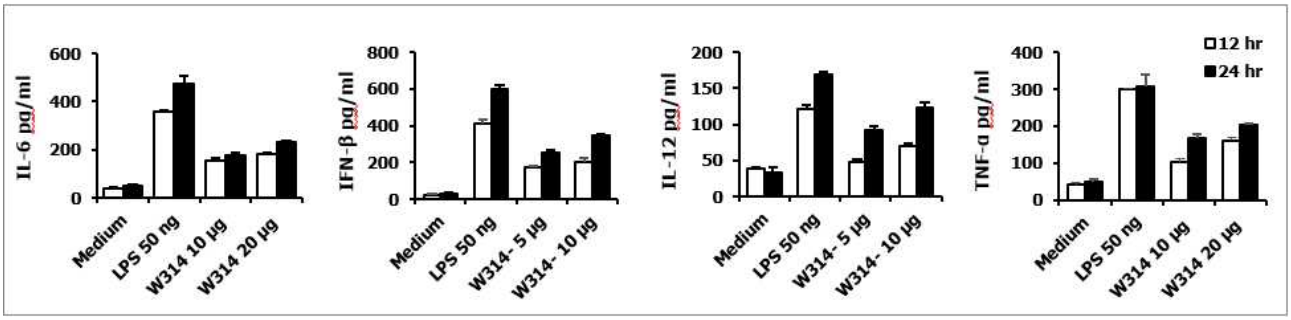


그림 77. PAM cell에서 W314의 면역증강 효과

◎ 돼지에서 분리한 porcine bone marrow derived macrophage cell (pBMDM)에 W314를 처리한 후 8시간 뒤에 세포에서 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 qPCR를 진행하였음. 면역 활성과 관련 있는 유전자 (IL-6, TNF-α, IFN-β, IFN-α, ISG-15, PKR, OAS-1)의 primer를 이용하여 각각의 유전자 유도능을 확인하였음.

◎ 그 결과, 아래의 그림에서와 같이 돼지 BMDM에서 W314의 자극에 의해 면역 사이토카인과 항바이러스 활성 유전자들의 상당한 유도를 확인할 수 있었음.

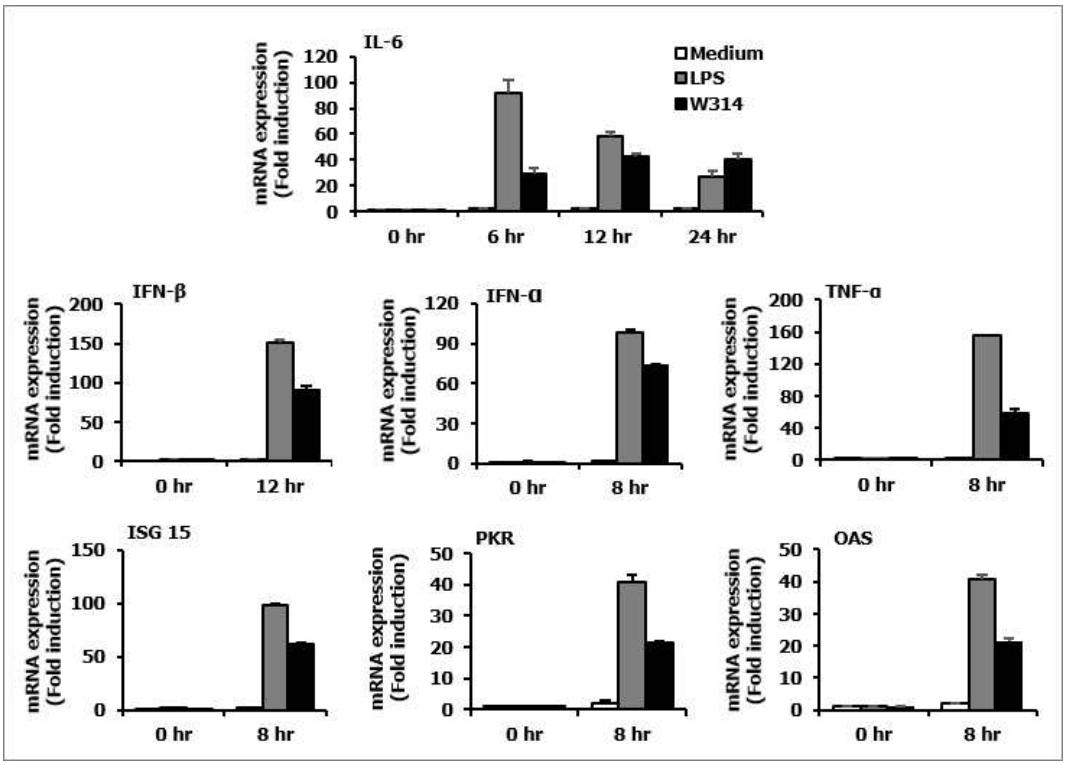


그림 78. 돼지 BMDM에서 W314의 사이토카인 유전자 유도 효능 검증

◎ 다음으로 Porcine peripheral blood mononuclear cell (PBMC)에 W314의 처리시에도 비슷하게 염증성 사이토카인과 인터페론이 다량 분비된 것을 확인할 수 있었음.

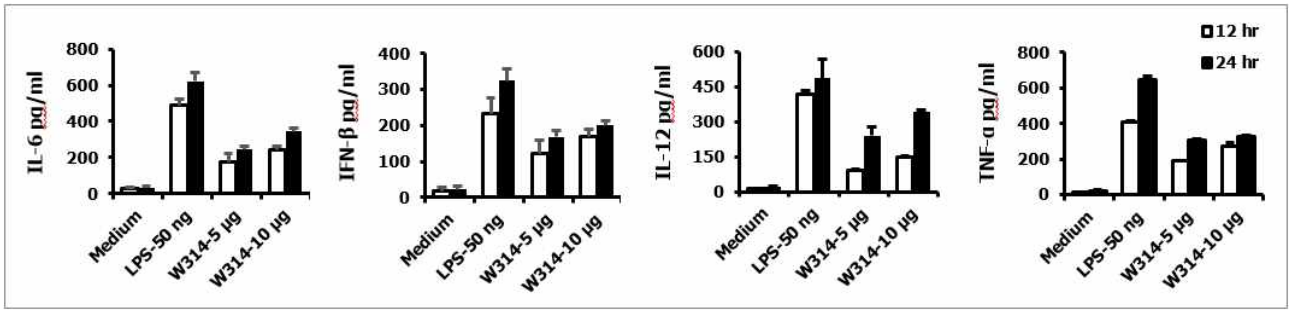


그림 79. Porcine PBMC에서 W314의 면역증강 효과

◎ 또한, porcine peripheral blood mononuclear cell (PBMC)에에 W314를 처리한 후 8시간 뒤에 세포에서 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 qPCR를 진행하였음. 면역 활성과 관련 있는 유전자 (IL-6, TNF-α, IFN-β, IFN-α, ISG-15, PKR, OAS-1)의 primer를 이용하여 각각의 유전자 유도능을 확인하였음.

◎ 그 결과, 아래의 그림에서와 같이 돼지 PBMC에서 W314의 자극에 의해 면역 사이토카인과 항바이러스 활성 유전자들의 상당한 유도를 확인할 수 있었음.

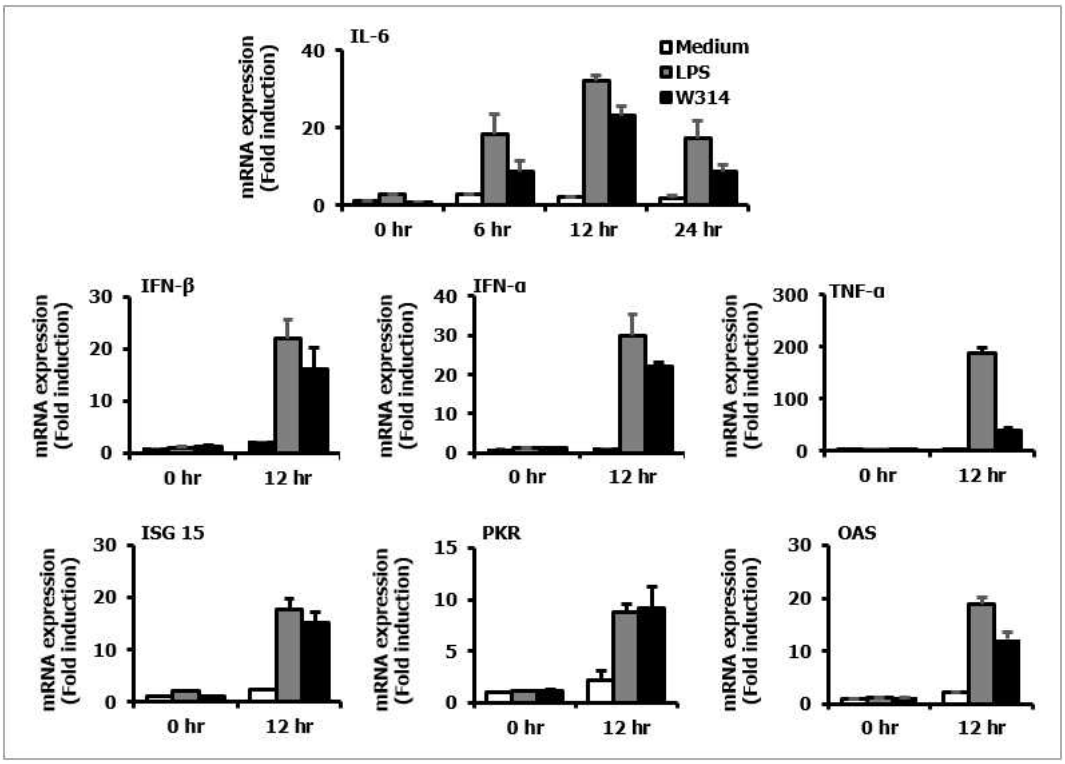


그림 80. 돼지 PBMC에서 W314의 사이토카인 유전자 유도 효능 검증

(18) 천연물 면역증강제(W314)의 유효성분 분석을 위한 분획연구

◎ 천연물 면역증강제인 W314에 의해 구제역 재조합 항원에 대한 면역원성의 증강 효능을 확인하였고, W314의 선천면역 자극 효능 역시 검증하였음. 그러나 W314는 천연물로 다양한 성분을 함유한 복합물질임. 따라서 면역증강 효능을 갖는 면역증강제제로의 개발을 위해서

는 W314내 유효성분 혹은 유효성분을 포함하는 분획의 검증과 효능의 확인이 요구됨.

◎ 따라서, 천연물인 W314를 1차적으로 water, Butanol, Ethyl acetate 그리고 Hexane등의 용매로 추출한 후 각각의 추출물들의 면역세포 자극 효능을 검증하였음.

◎ 그 결과 W314를 Butanol을 이용하여 녹였을 경우 positive control과 동일한 자극 효능을 확인할 수 있었음. 즉, W314를 Butanol로 녹였을 경우 유효물질이 포함되어 추출됨을 확인할 수 있었음.

◎ 향후 W314의 butanol 추출액을 이용하여 유효성분 혹은 유효성분을 포함하는 분획의 검증 연구를 수행할 예정임.

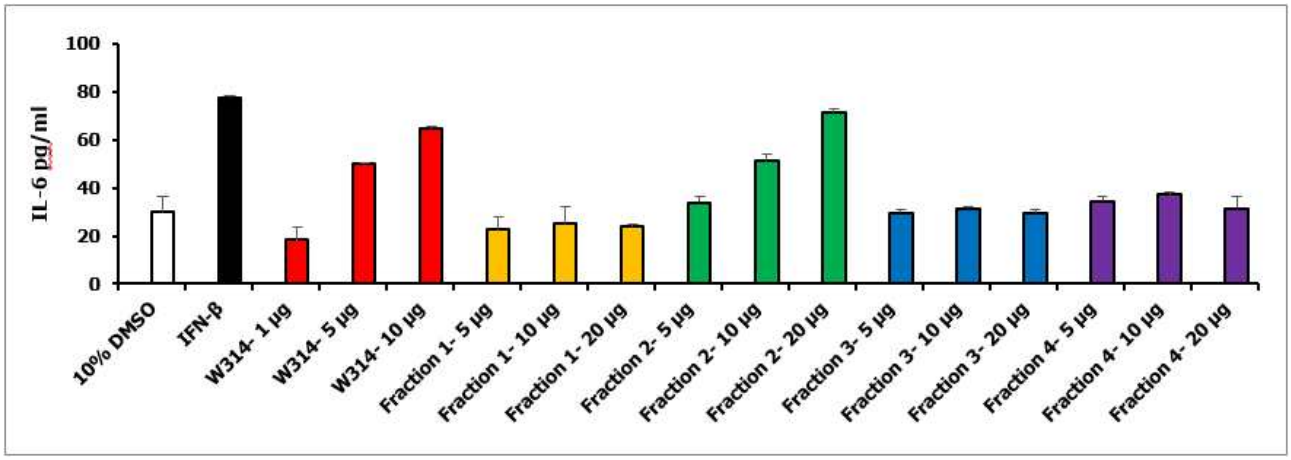


그림 81. 용매에 따른 W314 분획의 면역자극 효능 검증

(19) 최종 면역보좌제(adjuvant) 포함 구제역 0형과 A형 혼합항원에 대한 마우스 효능평가-1

◎ 지금까지의 구제역 0형과 A형 재조합항원에 대한 효능평가는 주로 ISA201을 ajuvant로 이용하여 실험을 진행하였음. 그러나 상기에서 효능을 확인한 분자면역증강제가 포함된 최종 면역보좌제(adjuvant)가 본 과제 기간중에 ㈜중앙백신연구소에서 개발되어 이 최종 aduvant인 SOE-X를 이용하여 재조합 구제역백신의 효능평가를 최종적으로 진행하였음.

◎ 처음으로 최종 면역보좌제(adjuvant)가 포함된 구제역 0형과 A형 재조합 혼합항원의 면역원성 즉, 항체생성율과 세포면역 유도능등을 ISA201 그룹과 비교 확인하기 위해 다음과 같은 스케줄로 실험을 수행하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Route : IM

Groups		Inoculum					Volume	ELISPOT SP ELISA & ELISA
		Antigen		Adjuvant		PBS		
		pOVM	pAVM	ISA201	SOE-X			
1	Control	-	-	-	-	100 ul	100 ul	8 heads
2	Commercial vaccine	-	-	-	-	-	100 ul	8 heads
3	pOVM+pAVM+ISA201	20 ug	20 ug	50 ul	-	10 ul	100 ul	8 heads
4	pOVM+pAVM+CAvant SOE-X	20 ug	15 ug	-	65 ul	-	100 ul	8 heads

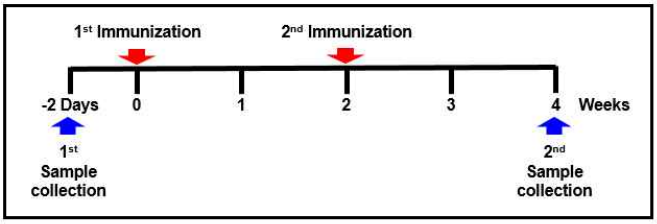


그림 82. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 면역원성 검증 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, SOE-X를 포함하는 재조합 구제역백신 그룹의 항체생성률이 ISA201를 포함하는 그룹보다 O형과 A형 모두 비슷하거나 약간 높은 항체형성률을 보임을 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서 확인할 수 있었음.

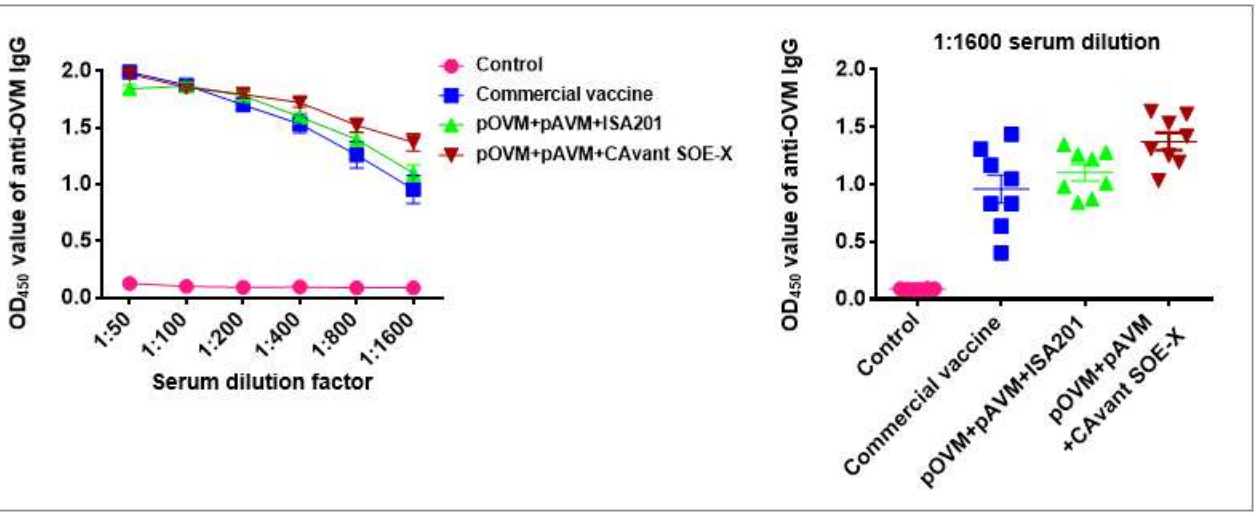


그림 83. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 항체가 검증

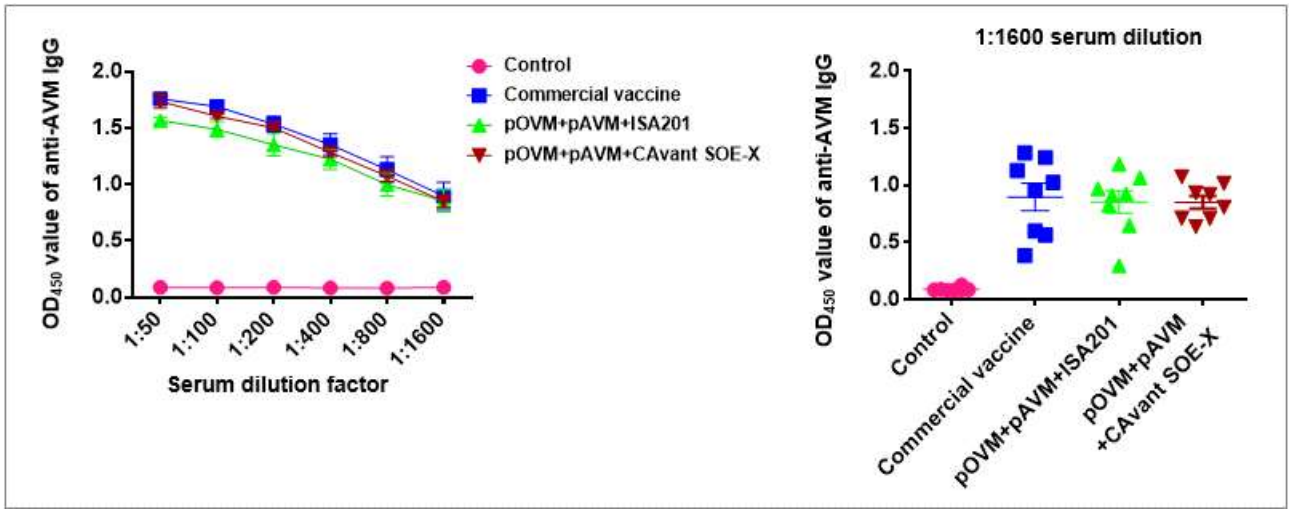


그림 84. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 항체가 검증

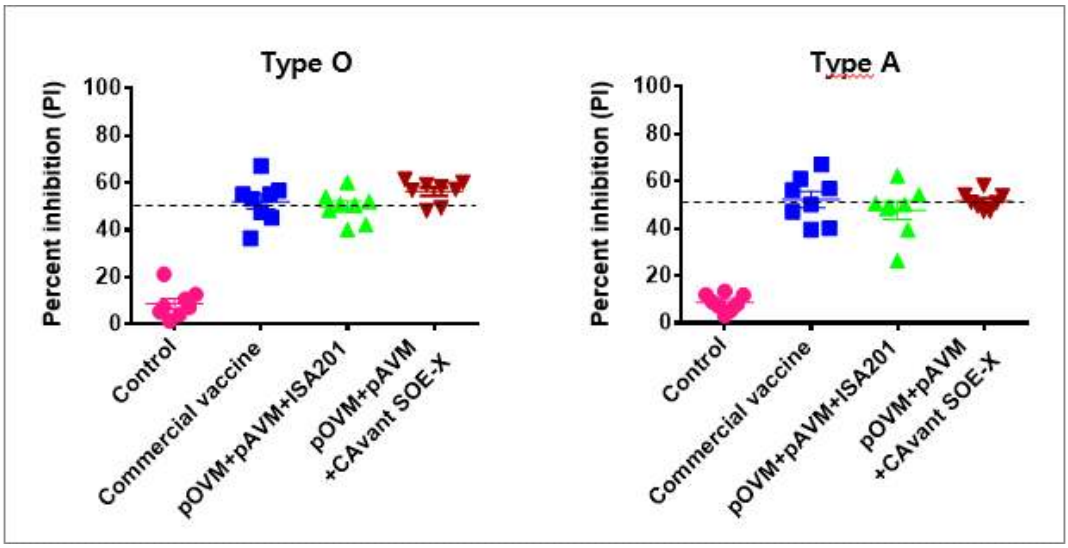


그림 85. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 SP 항체가 검증

◎ 항체생성율 검증에 이어 세포면역 유도 효능을 아래와 같이 측정하였음. T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 두번째 접종 후 2주째 마우스의 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 (OVM, AVM) 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 그리고 A pocheon, A Malay97, A Iraq 등 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

◎ 그 결과 아래의 그림에서 보는바와 같이, 항체생성률과 비슷한 경향으로 SOE-X를 포함하는 재조합 구제역백신 그룹의 세포면역 유도능이 ISA201를 포함하는 그룹보다 0형과 A형 모두 비슷하거나 약간 높은 유도능을 확인할 수 있었음.

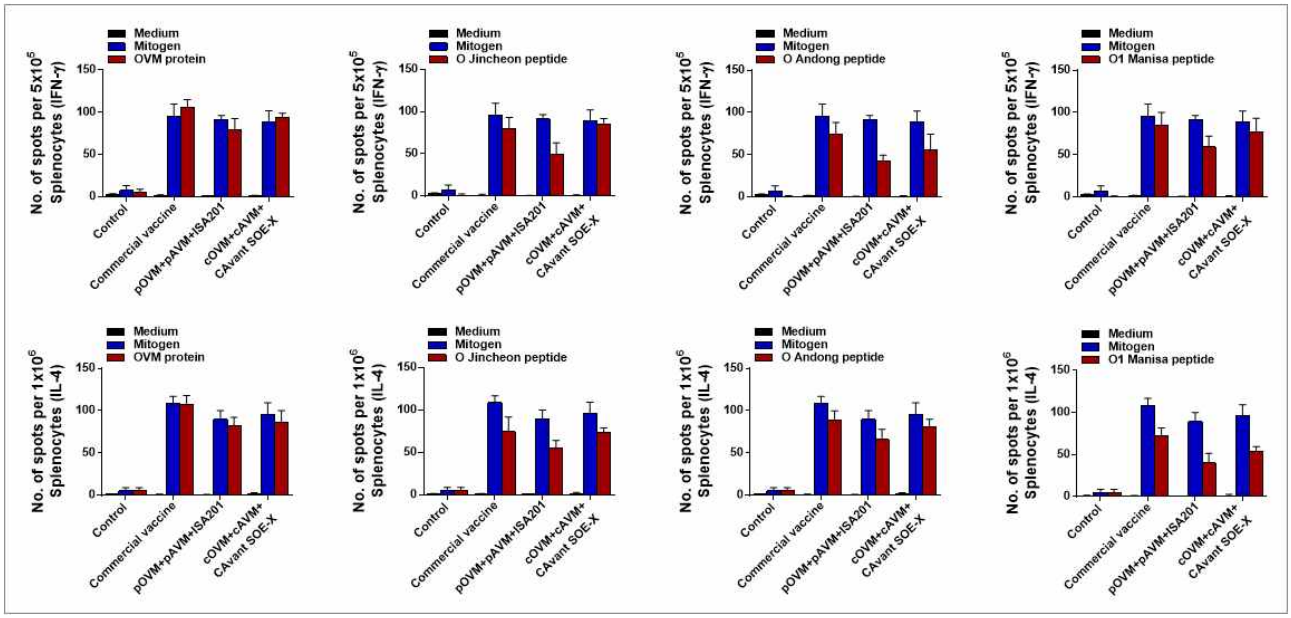


그림 86. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 세포성면역 효능 검증

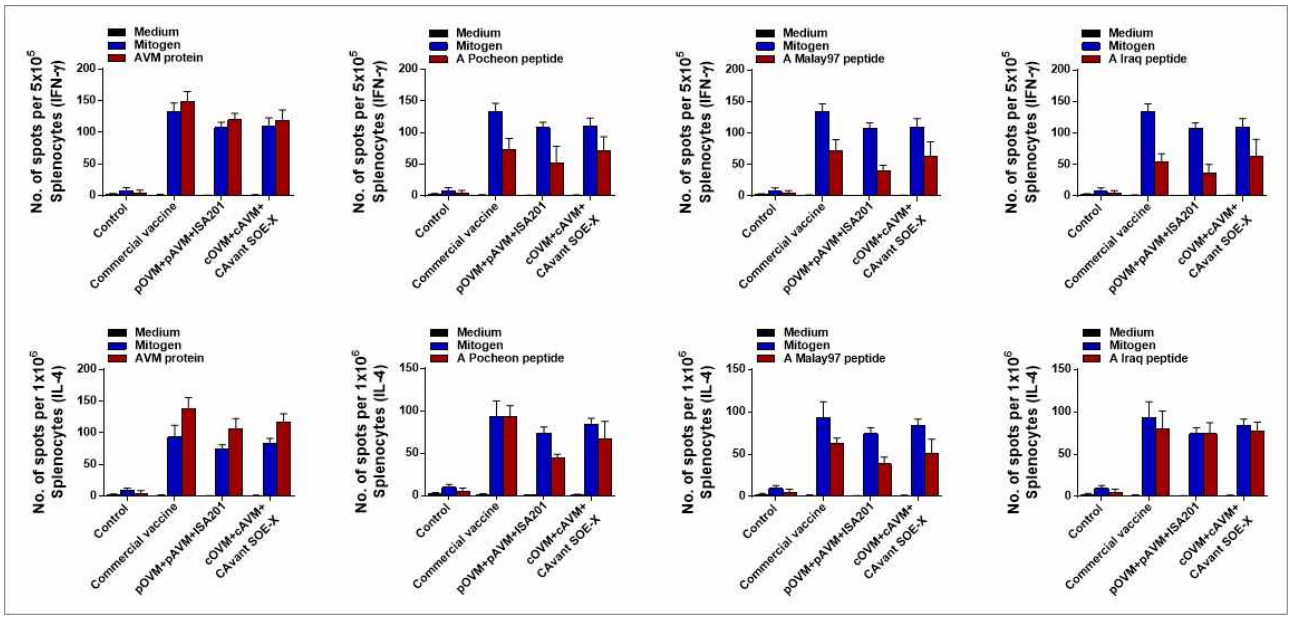


그림 87. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 세포성면역 효능 검증

(20) 최종 면역보좌제(adjuvant) 포함 구제역 O형과 A형 혼합항원에 대한 마우스 효능평가-2

◎ 다음으로 최종 면역보좌제(adjuvant)인 SOE-X의 면역원성 유도능을 다시 한 번 확인하기 위해 SOE-X가 포함된 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원의 면역원성 즉, 항체생성율과 세포면역 유도능등을 ISA201 그룹과 비교 확인하기 위해 다음과 같은 스케줄로 실험을 수행하였음.

◎ 상기의 실험과는 다르게 adjuvant가 포함된 혼합항원을 1회투여한 후 4주뒤에 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원에 대한 면역원성을 확인하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Route : IM

	Groups	Inoculum					Volume	ELISPOT SP ELISA & ELISA
		Antigen		Adjuvant		PBS		
		pOVM	pAVM	ISA201	SOE-X			
1	Control	-	-	-	-	100 ul	100 ul	6 heads
2	Commercial vaccine	-	-	-	-	-	100 ul	6 heads
3	pOVM+pAVM+ISA201	20 ug	20ug	50 ul	-	10 ul	100 ul	6 heads
4	pOVM+pAVM+CAvant SOE-X	20 ug	15ug	-	65 ul	-	100 ul	6 heads

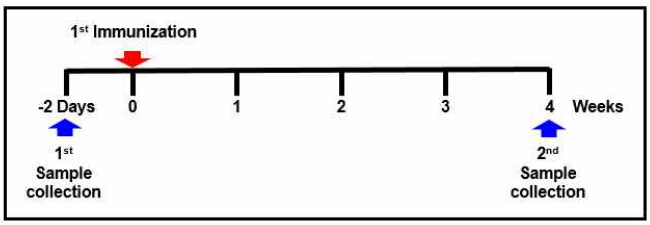


그림 88. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 1회접종 면역원성 검증 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, 상용화백신보다는 약하지만 SOE-X를 포함하는 재조합 구제역백신 그룹의 항체생성률이 ISA201를 포함하는 그룹보다 O형과 A형 모두 비슷하거나 약간 높은 항체형성률을 보임을 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서 확인할 수 있었음.

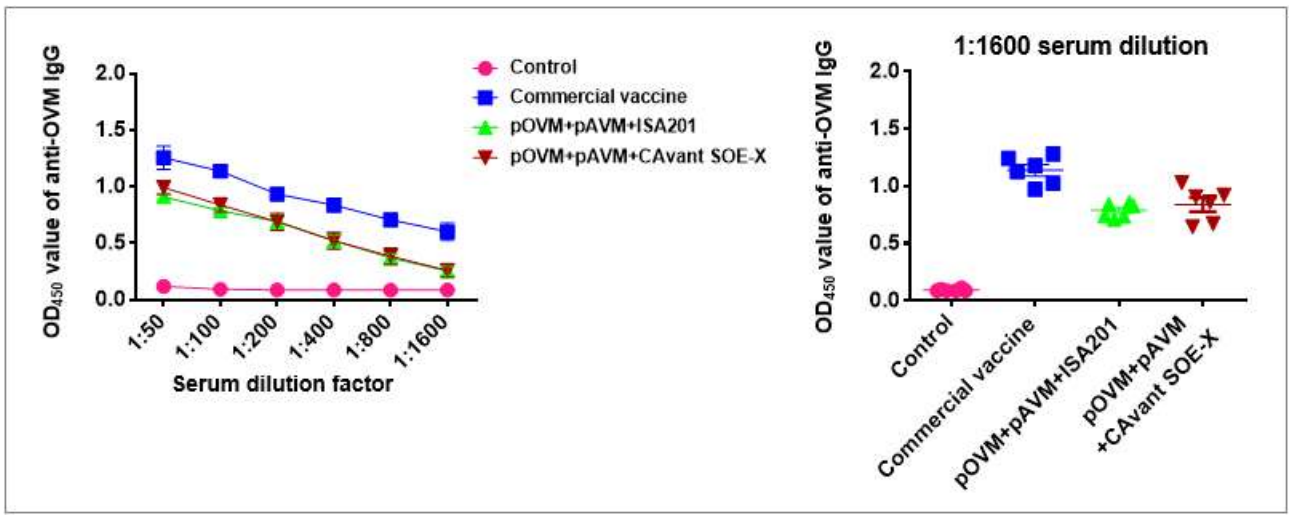


그림 89. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원 1회접종에 대한 항체가 검증

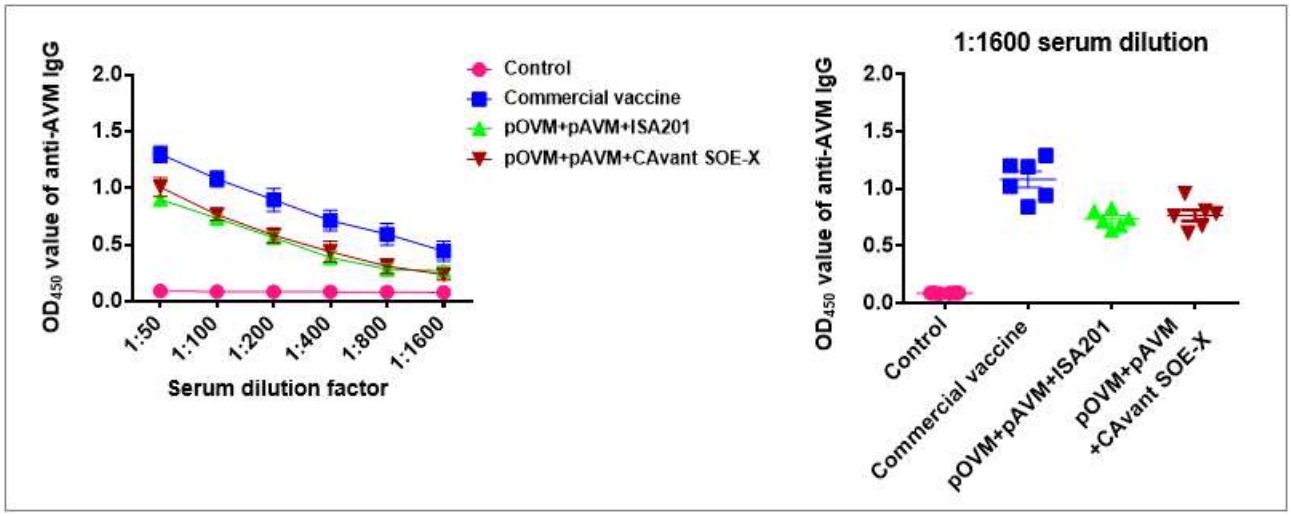


그림 90. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원 1회접종에 대한 항체가 검증

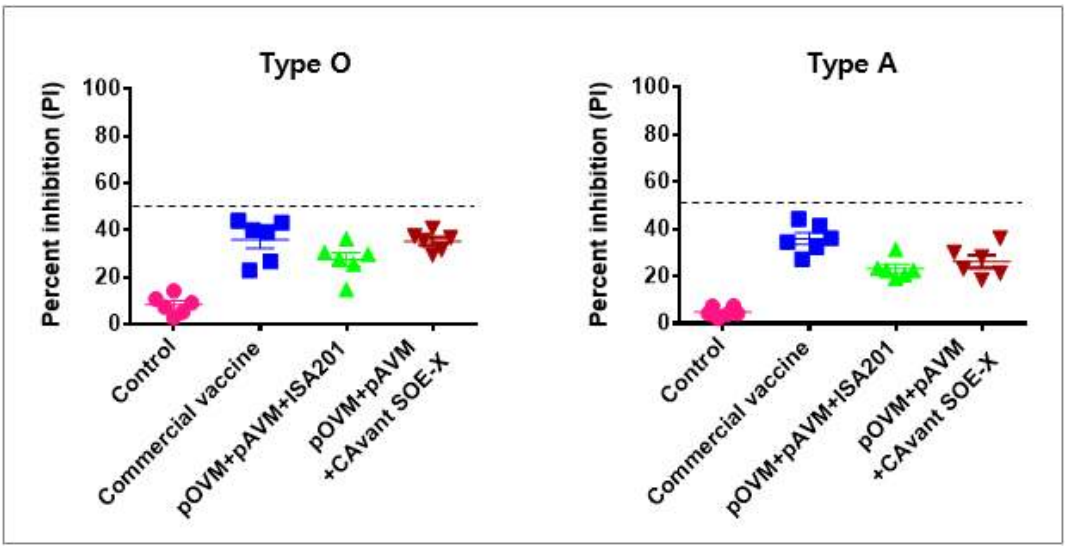


그림 91. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원 1회접종에 대한 SP항체가 검증

◎ 이어서 세포면역 유도 효능을 아래와 같이 측정하였음. T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 첫번째 접종 후 4주째 마우스의 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질(OVM, AVM) 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 그리고 A pocheon, A Malay97, A Iraq 등 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

◎ 그 결과 아래의 그림에서 보는바와 같이, 항체생성률과 비슷한 경향으로 SOE-X를 포함하는 재조합 구제역백신 그룹의 세포면역 유도능이 ISA201를 포함하는 그룹보다 0형과 A형 모두 비슷하거나 약간 높은 유도능을 확인할 수 있었음.

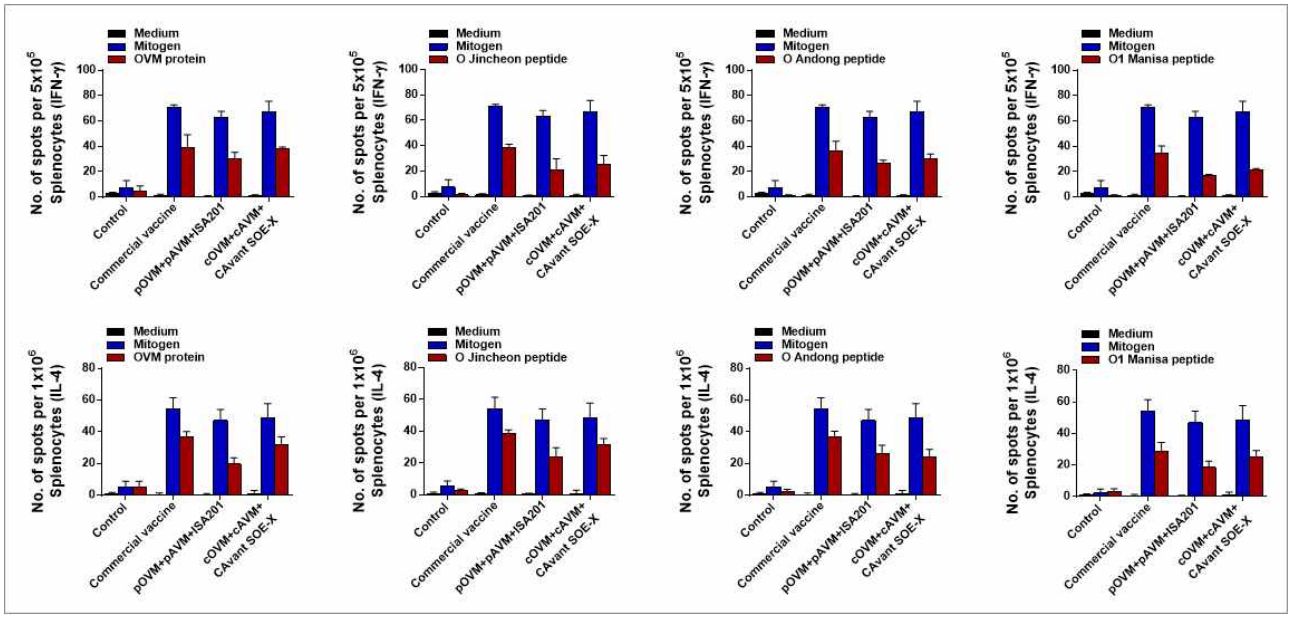


그림 92. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원 1회접종에 대한 세포성면역 효능 검증

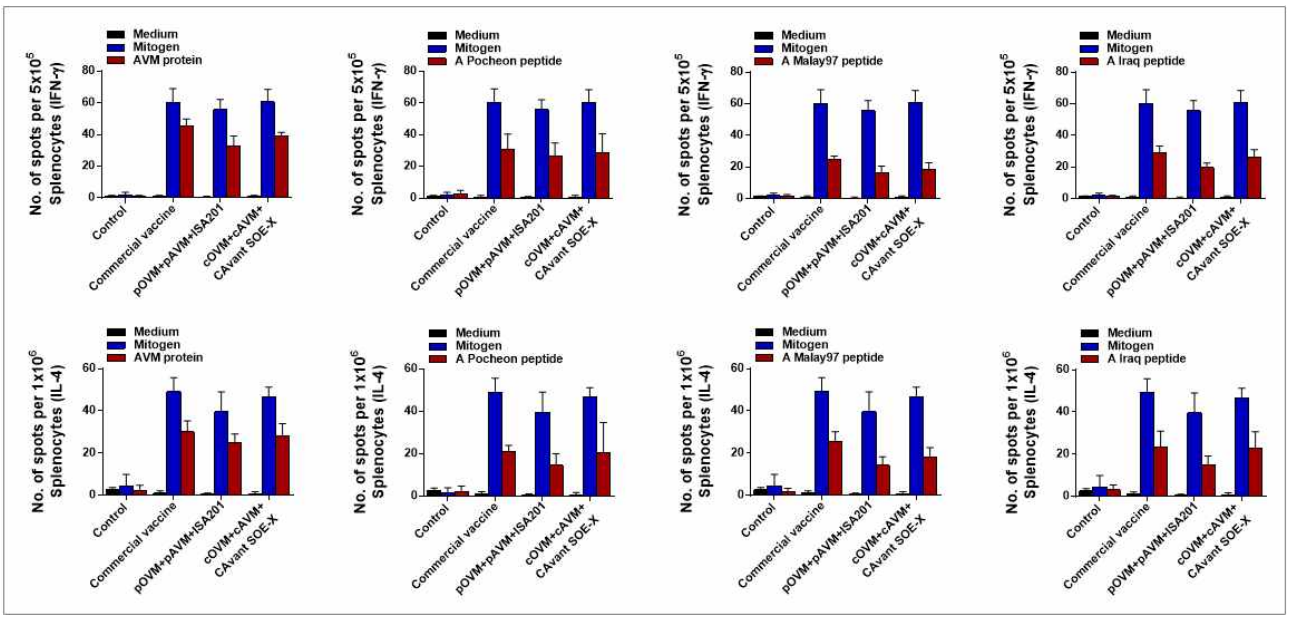


그림 93. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원 1회접종에 대한 세포성면역 효능 검증

(21) 최종 면역보좌제(adjuvant) 포함 구제역 O형과 A형 혼합정제항원의 지속면역원성 평가

◎ 다음으로 면역보좌제(adjuvant)인 SOE-X의 지속면역 효능을 확인하기 위해 아래의 스케줄대로 2회 접종후 매월 얻은 마우스 혈청을 이용하여 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원의 면역원성 즉, 항체생성율을 ISA201 그룹과 비교 확인하기 위해 다음과 같은 스케줄로 실험을 수행하였음.

Animal : 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
Inoculum : Purified OVM + AVM
Route : IM

Groups		Inoculum					Volume	ELISPOT SP ELISA & ELISA
		Antigen		Adjuvant		PBS		
		pOVM	pAVM	ISA201	SOE-X			
1	Control	-	-	-	-	100 ul	100 ul	5 heads
2	Commercial vaccine	-	-	-	-	-	100 ul	5 heads
3	pOVM+pAVM+ISA201	20 ug	20ug	50 ul	-	10 ul	100 ul	5 heads
4	pOVM+pAVM+CAvant SOE-X	20 ug	15ug	-	65 ul	-	100 ul	5 heads

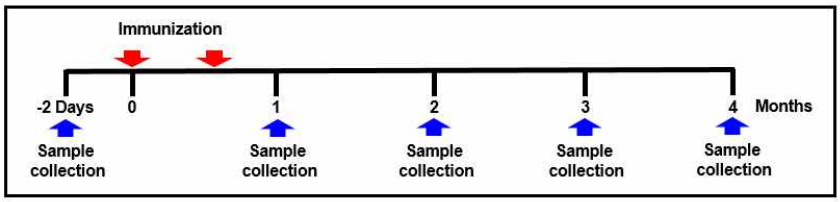


그림 94. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 지속면역원성 검증 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, SOE-X를 포함하는 재조합 구제역백신 그룹의 항체생성률이 ISA201를 포함하는 그룹과 상용화백신 그룹보다 0형과 A형 모두 비슷하거나 약간 높은 항체형성률을 보임을 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서 확인할 수 있었음.

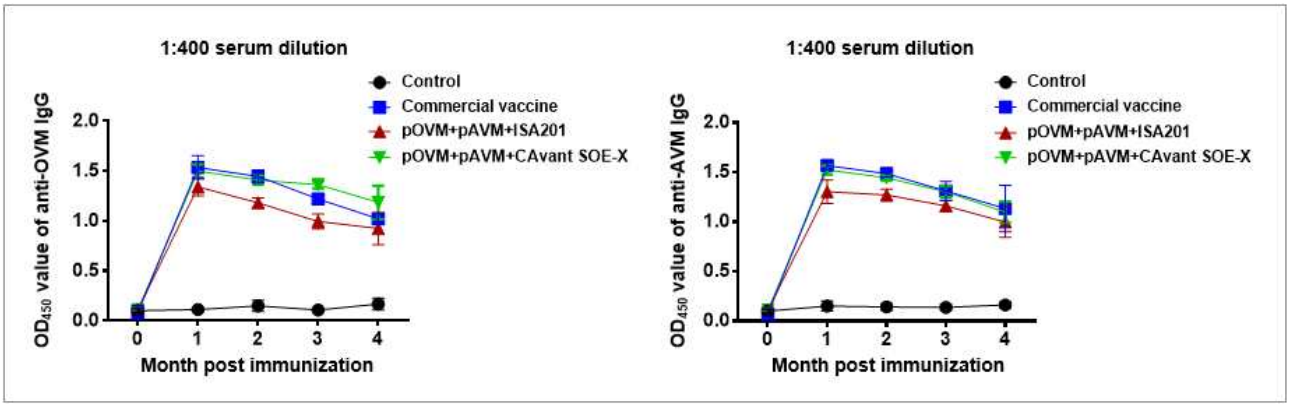


그림 95. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 지속면역에 대한 항체가 검증

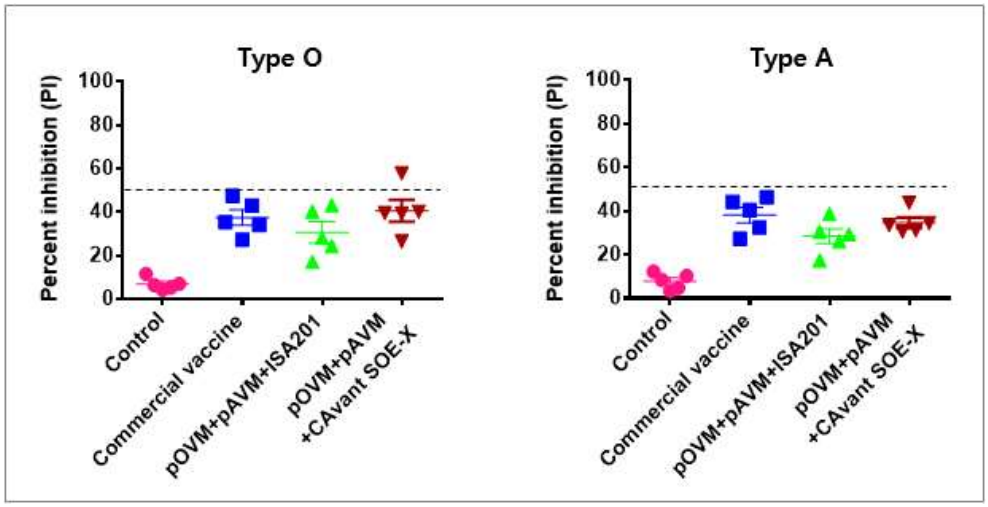
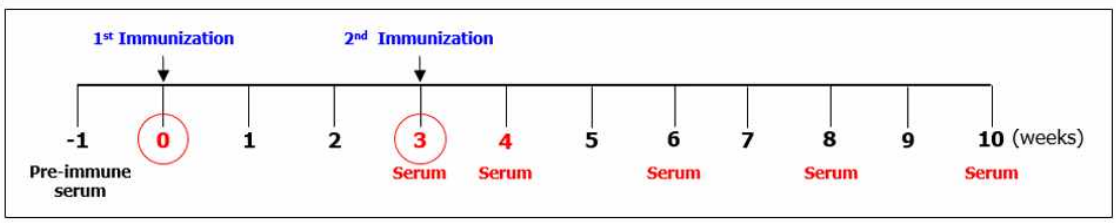


그림 96. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 지속면역에 대한 SP 항체가 검증

(22) 최종 면역보좌제(adjuvant) 포함 구제역 O형과 A형 혼합항원에 대한 돼지 효능평가 (접종 항원양 비교실험)(㈜코미팜, 농림축산검역본부 연계)

◎ 실험동물을 이용한 검증후 목적동물인 돼지에서 최종 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함된 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원 양에 따른 면역원성 즉, 항체생성율을 확인하기 위해 다음과 같은 스케줄로 실험을 수행하였음.

◎ 실험동물인 돼지를 선정하기 위하여 10주령 전후의 돼지 40두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 17마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 아래의 실험 스케줄처럼 백신은 1두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 3주 간격으로 2회 접종 후 항체 지속 양상을 확인하였음.



Group	시험백신의 조성 (2 ml/회)		개체수 (일반돼지: 8-10주령)
	항원	면역증강제	
Negative control (NC)	-		2 head
Positive control (PC)	상용백신 (O type-A type 항원)		3 head
Group-1	pOVM(250ug)-pAVM(150ug)	SOE-X	4 head
Group-2	pOVM(250ug)-pAVM(200ug)	SOE-X	4 head
Group-3	pOVM(250ug)-pAVM(250ug)	SOE-X	4 head

그림 97. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 항원양 비교검증 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, 재조합 구제역백신의 dose에 따라서 항체형성률의 증가현상을 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서 확인할 수 있었음.

◎ 상용화백신 그룹은 1회 투여한 그룹으로 항체가가 재조합 구제역백신 그룹들의 항체가보다 낮은 결과를 보이고 있음. 그러나 본 실험을 통해 목적동물인 돼지에서도 SOE-X를 포함한 재조합 구제역백신의 면역원성 유도능 이 효과적임을 확인할 수 있었으며 다음 목적동물 실험에서 사용할 재조합 구제역백신의 농도를 확인할 수 있었음.

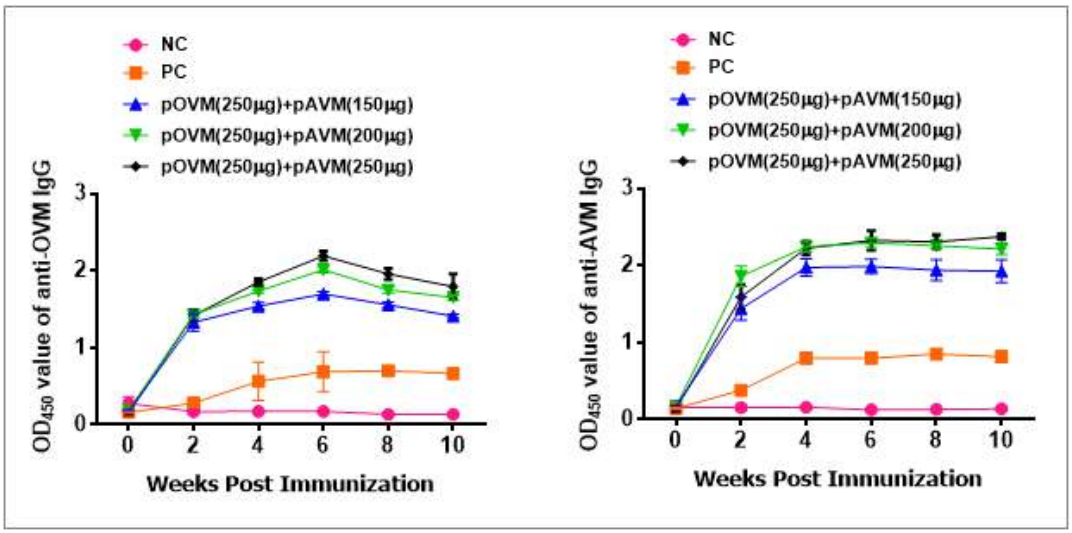


그림 98. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 항원양에 따른 항체가 검증

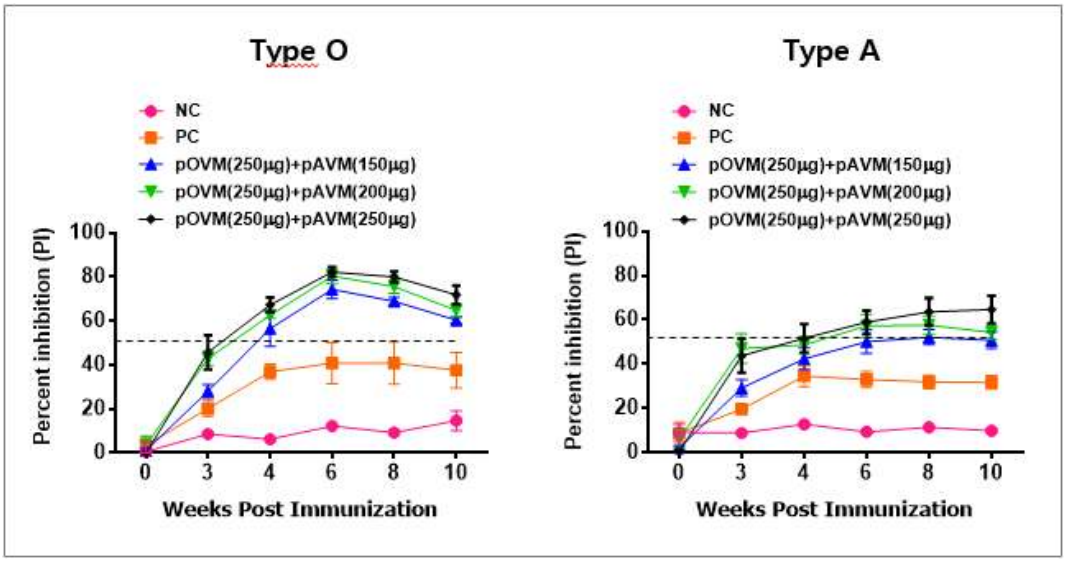


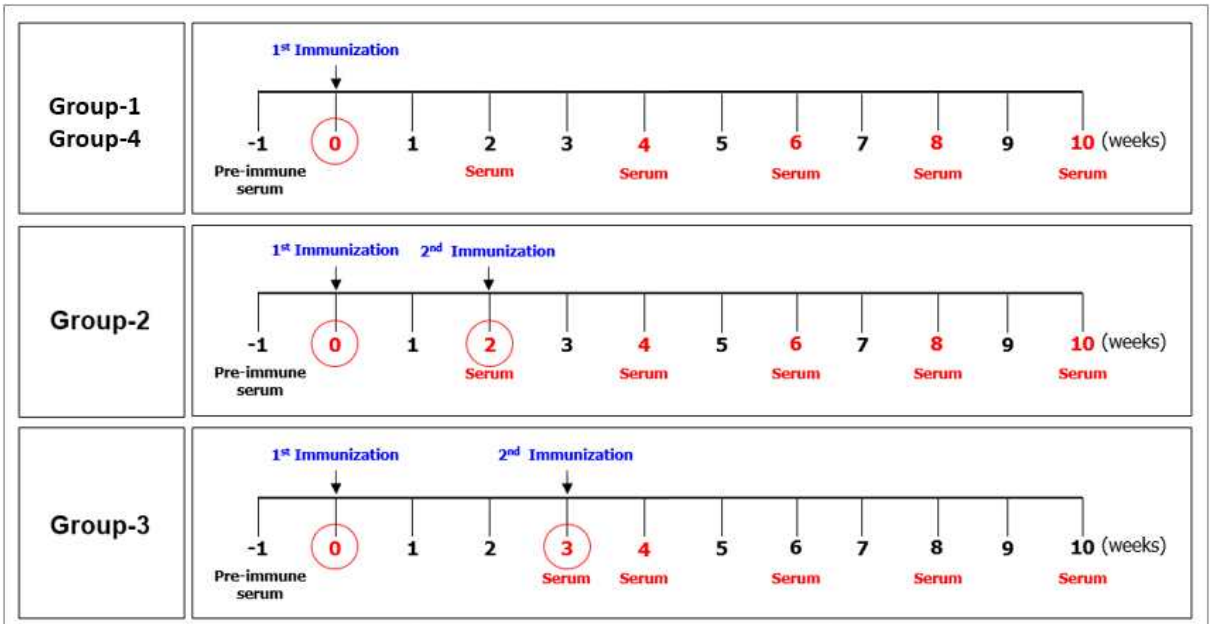
그림 99. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 항원양에 따른 SP 항체가 검증

(23) 최종 면역보좌제(adjuvant) 포함 구제역 O형과 A형 혼합항원에 대한 돼지 효능평가 (접종 횟수 및 간격 비교실험) (㈜중앙백신연구소, 농림축산검역본부 연계)

◎ 실험동물을 이용한 검증후 목적동물인 돼지에서 최종 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함

된 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원 양에 따른 면역원성 즉, 항체생성율을 확인하기 위해 다음과 같은 스케줄로 실험을 수행하였음.

◎ 실험동물인 돼지를 선정하기 위하여 10주령 전후의 돼지 30두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 15마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 아래의 실험 스케줄처럼 백신은 1두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 다양한 간격으로 1회 혹은 2회 접종 후 항체 지속 양상을 확인하였음.



Group	접종량	개체수 (일반돼지: 8-10주령)
Group-1	2ml/회(dose)	3 head
Group-2		3 head
Group-3		3 head
Group-4 (PC)		3 head
Group-5 (NC)	무접종군	3 head

그림 100. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 접종횟수 및 접종간격 비교검증 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, 재조합 구제역백신의 투여횟수에 따라서 항체형성률의 다른 양상을 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서 확인할 수 있었음.

◎ 결과적으로 1회투여군 보다는 2회투여군의 항체유도능이 높았으며, 2주간격으로 2회투여한 그룹과 3주간격으로 2회 투여한 그룹간의 항체유도능 차이는 크지 않음을 확인하였음.

◎ 상용화백신 그룹은 1회 투여한 그룹으로 항체가가 재조합 구제역백신 그룹들의 항체가보다 낮은 결과를 보이고 있음. 그러나 본 실험을 통해 목적동물인 돼지에서 SOE-X를 포함한 재조합 구제역백신의 면역원성 유도능이 3주간격으로 2회투여시에도 충분한 면역 효능이 나

타남을 확인할 수 있었음.

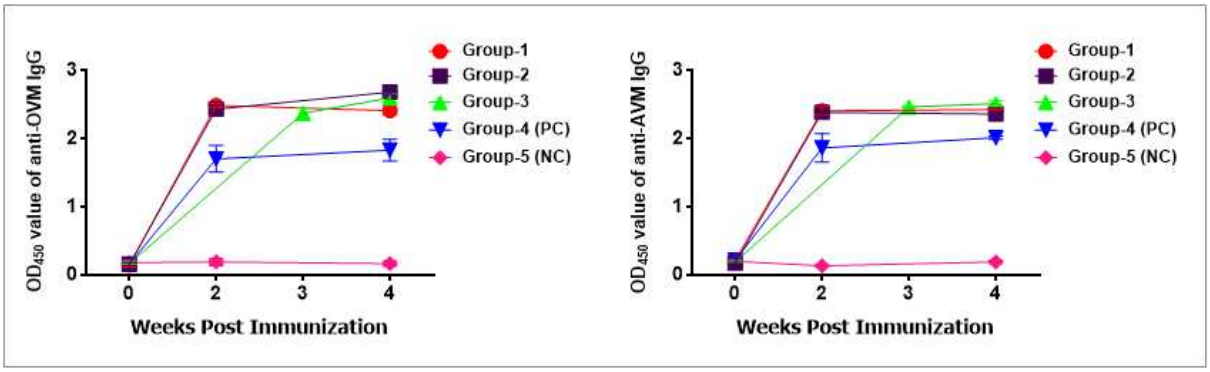


그림 101. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 접종횟수 및 접종간격에 따른 항체가 검증

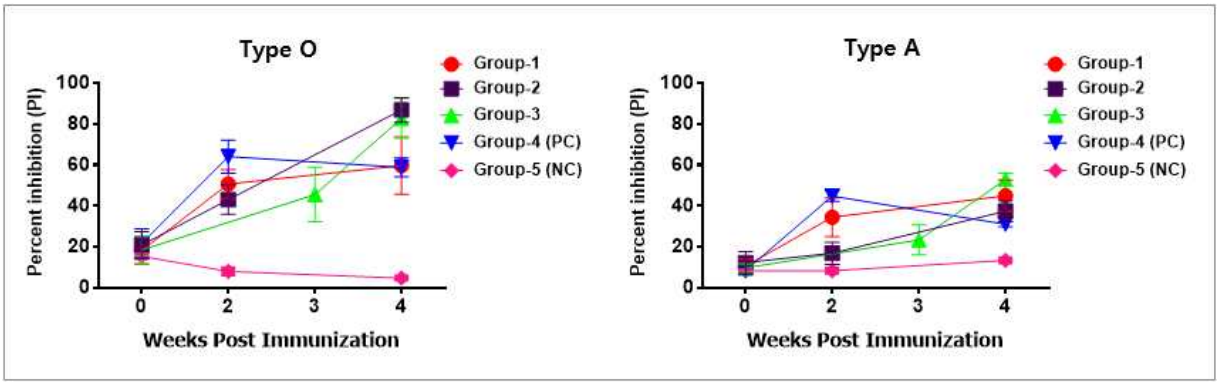
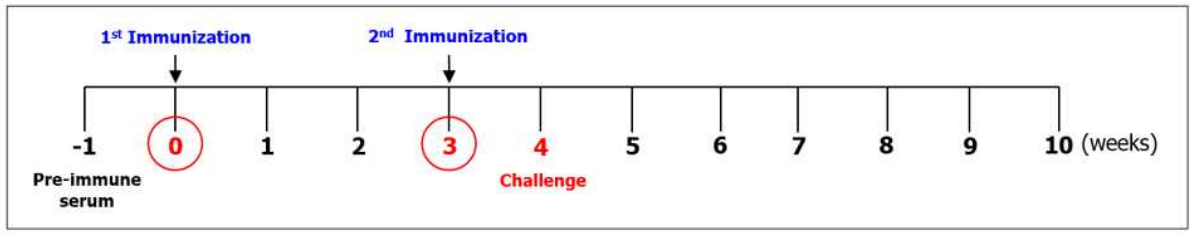


그림 102. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 접종횟수 및 접종간격에 따른 SP 항체가 검증

(24) 최종 면역보좌제(adjuvant)가 포함하는 구제역 O형과 A형 혼합항원의 돼지 PD50 평가 (O type FMDV) (㈜코미팜, ㈜중앙백신연구소, 농림축산검역본부 연계)

◎ 목적동물인 돼지에서 최종 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함된 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원의 O type FMDV에 대한 PD50 평가시험을 수행하였음.

◎ 실험동물인 돼지를 선정하기 위하여 10주령 전후의 돼지 30두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 15마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 아래의 실험 스케줄처럼 백신은 1두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 3주간격으로 2회 접종 후 1주뒤에 O type FMDV인 O Jincheon strain을 공격접종한 후 8일동안 clinical score, oral wab 및 sera에서의 virus titer를 측정함으로서 PD50를 측정하였음.



Group	시험백신의 조성 (2 ml/회)	개체수 (일반돼지: 8-10주령)
	항원 + 면역증강제	
Negative control (NC)	-	3 head
Group-1	pOVM-pAVM + SOE-X (1 dose)	4 head
Group-2	pOVM-pAVM + SOE-X (1/3 dose)	4 head
Group-3	pOVM-pAVM + SOE-X (1/9 dose)	4 head

그림 103. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 O type FMDV에 대한 돼지 PD50 평가 시험스케줄

◎ 아래의 그림은 FMDV를 공격접종하기 전 혈청내 항체가를 SP ELISA로 측정한 결과로 O type에 대한 항체생성률은 높은 것으로 확인이 되었음.

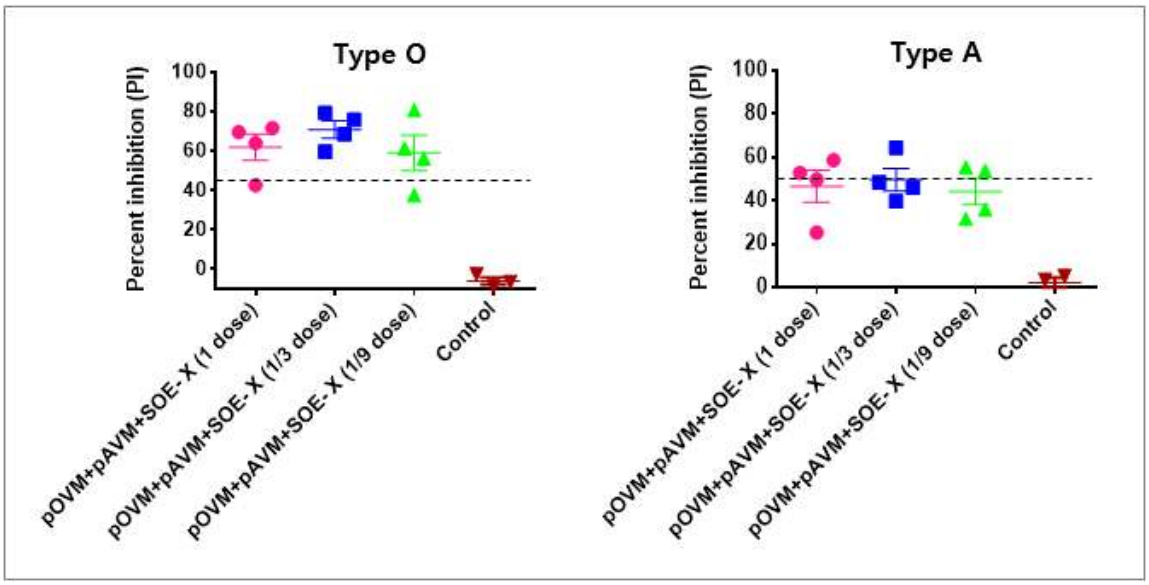


그림 104. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 SP 항체가 검증

◎ FMDV를 공격접종한 후의 결과를 아래의 그림에서 보면, 1 dose 그룹의 모든 개체에서는 clinical sign이 나타나지 않았으나 1/3 dose 그룹에서는 2마리의 개체에서 clinical sign이 나타났음.

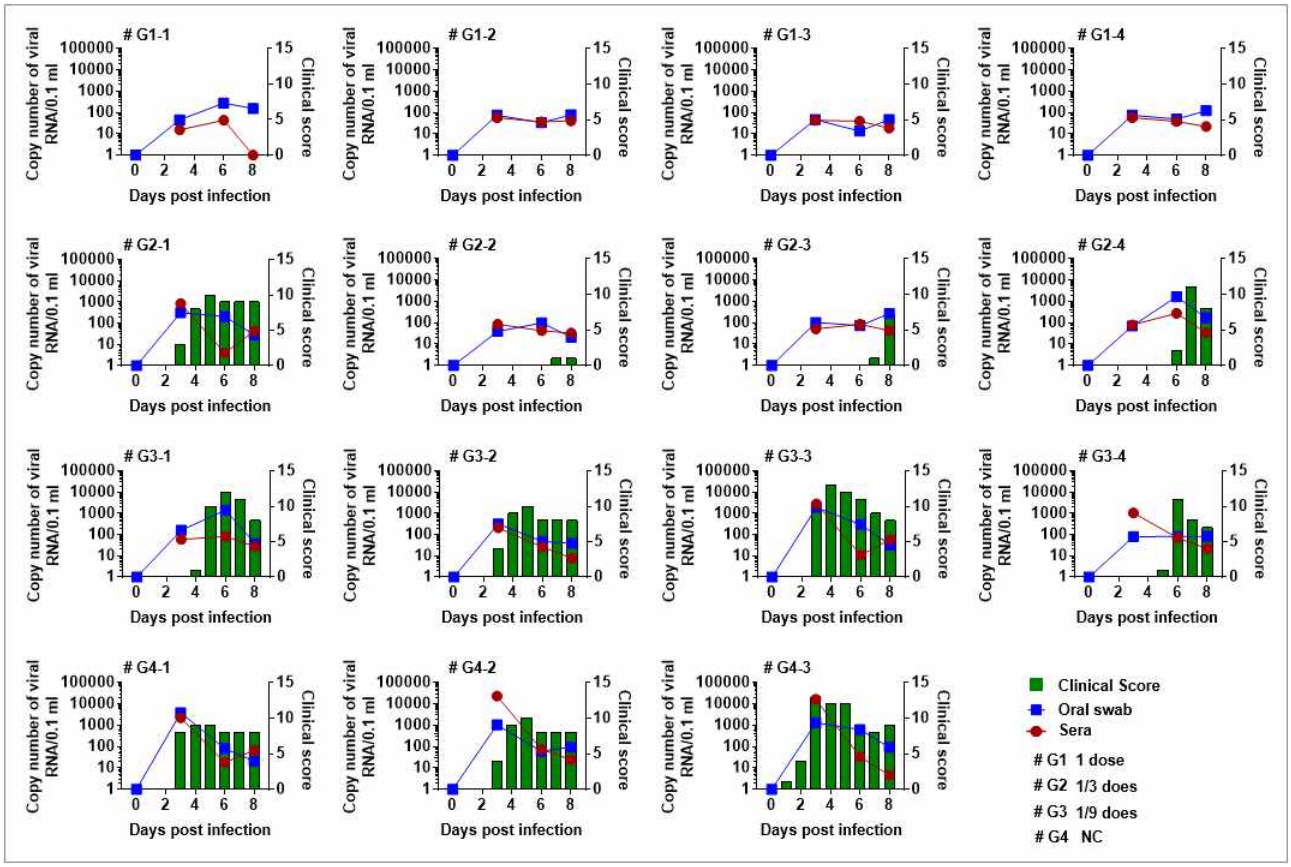
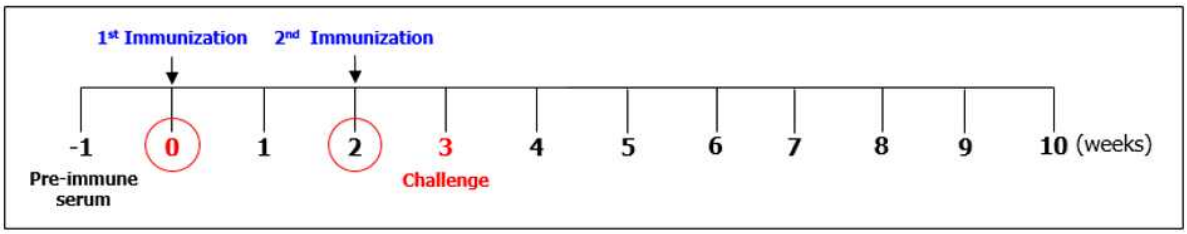


그림 105. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 O type FMDV에 대한 돼지 PD50 평가 검증

(25) 최종 면역보좌제(adjuvant)가 포함하는 구제역 O형과 A형 혼합항원의 돼지 PD50 평가 (A type FMDV) (㈜코미팜, ㈜중앙백신연구소, 농림축산검역본부 연계)

◎ 목적동물인 돼지에서 최종 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함된 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원의 A type FMDV에 대한 PD50 평가시험을 수행하였음.

◎ 실험동물인 돼지를 선정하기 위하여 10주령 전후의 돼지 40두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 18마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 아래의 실험 스케줄처럼 백신은 1두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 구제역백신센터의 ABSL3 실험실의 사정으로 인해 2주간격으로 2회 접종 후 1주뒤에 A type FMDV인 A 2018 kimpo strain을 공격접종한 후 8일동안 clinical score, oral wab 및 sera에서의 virus titer를 측정함으로서 PD50를 측정하였음.



Group	시험백신의 조성 (2 ml/회)	개체수 (일반돼지: 8-10주령)
	항원 + 면역증강제	
Negative control (NC)	-	3 head
Group-1	pOVM-pAVM + SOE-X (1 dose)	5 head
Group-2	pOVM-pAVM + SOE-X (1/3 dose)	5 head
Group-3	pOVM-pAVM + SOE-X (1/9 dose)	5 head

그림 106. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 A type FMDV에 대한 돼지 PD50 평가 시험스케줄

◎ 아래의 그림은 FMDV를 공격접종하기 전 혈청내 항체가를 SP ELISA로 측정한 결과로 A type에 대한 항체생성률은 그다지 높지 않은 것으로 확인이 되었음.

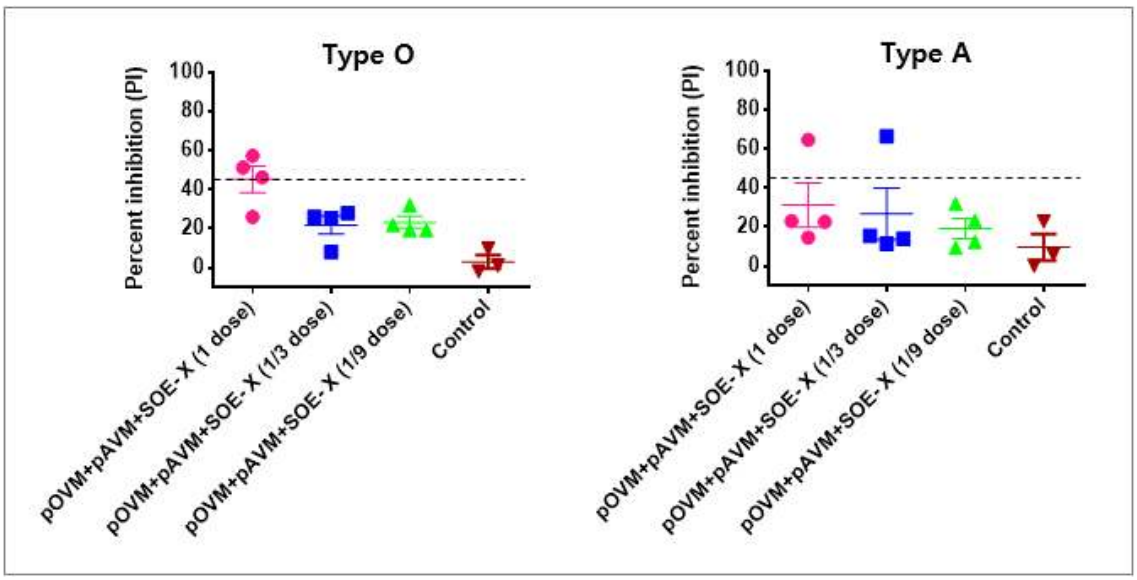


그림 107. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 SP 항체가 검증

◎ 그러나 FMDV를 공격접종한 후의 결과를 아래의 그림에서 보면, 1 dose 그룹의 모든 개체에서는 3마리가 clinical sign이 나타나지 않았으나 1/3 dose 그룹에서는 2마리의 개체에서 clinical sign이 나타났음.

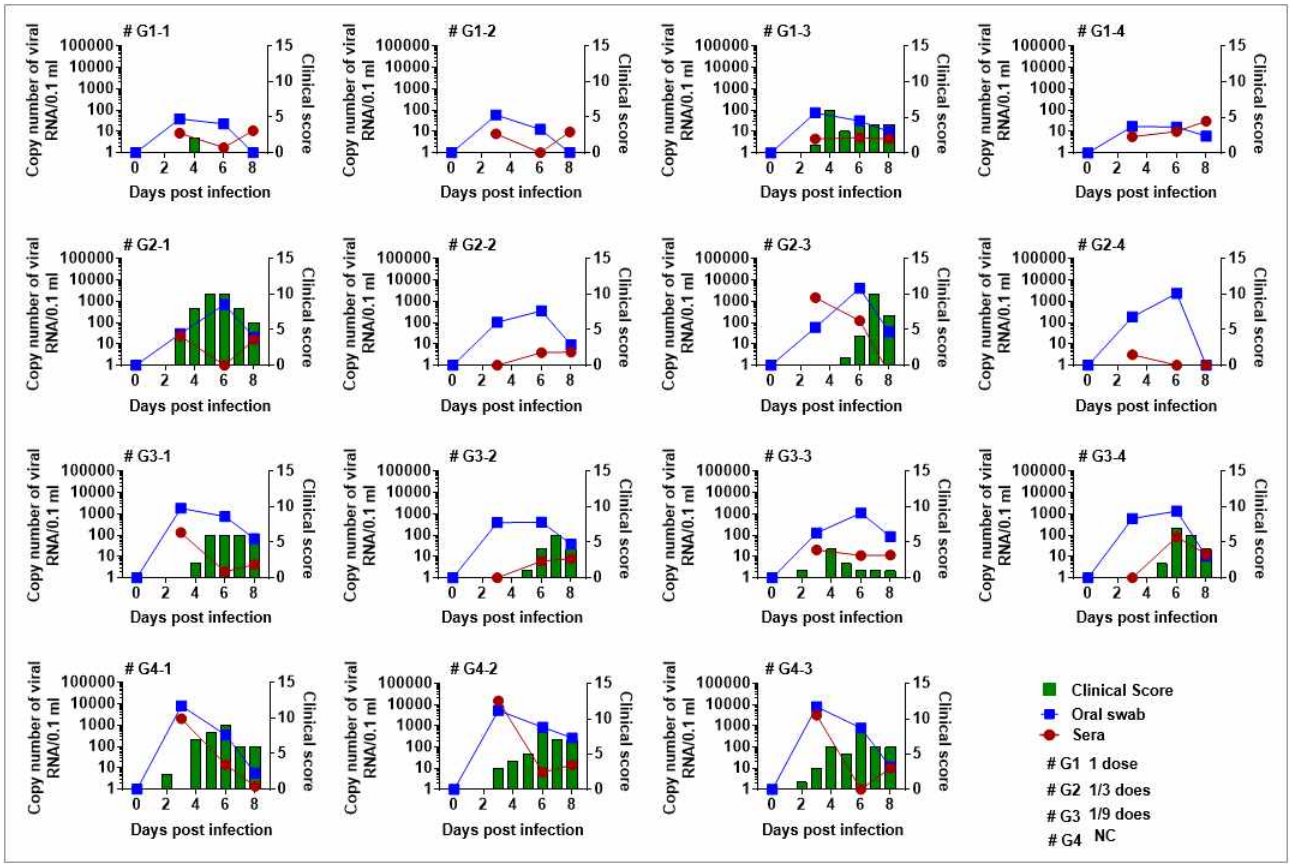


그림 108. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 A type FMDV에 대한 돼지 PD50 평가 검증

◎ 결론적으로 최종 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함된 구제역 0형과 A형 재조합 혼합항원은 O형 및 A 형 FMDV에 대해서 높은 방어 효능을 보이는 우수한 재조합 백신 candidate가 될 수 있음. 그러나 상기의 PD50 실험에는 방법상 보안해야하는 요소들이 많은 것으로 사료되며 향후 보다 구체적인 개선사항들을 반영한 목적동물 실험이 요구가 됨.

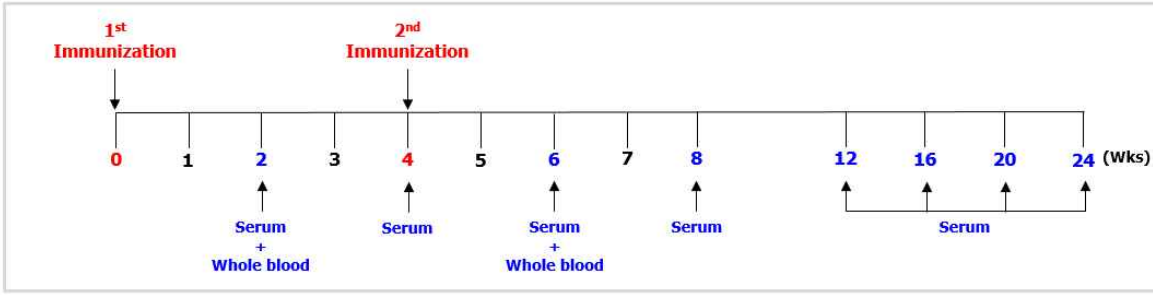
◎ 지금까지의 구제역 0형과 A형 재조합항원에 대한 효능평가를 ㈜중앙백신연구소에서 개발된 최종 aduvant인 SOE-X를 이용하여 진행하였음. 최종 aduvant인 SOE-X는 현재 prototype으로 효능평가는 완료된 상황이나 최종적인 구제역 재조합 백신을 위해서는 가격적인 면에서 향후 점검과 고려가 필요한 상황임. 그러나 현재의 prototype만으로도 가격적인 대폭 상승은 이루어지고 있지 않을 것으로 예상함.

(26) 최종 면역보좌제(adjuvant)가 포함하는 구제역 0형과 A형 혼합항원의 소 효능평가-1

◎ 목적동물인 돼지에서 최종 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함된 구제역 0형과 A형 재조합 혼합항원의 접종에 따른 면역원성 유도 및 FMDV 방어효능 검증실험을 수행후 다른 목적동물인 소에서의 동일한 효능을 검증하기 위해 다음과 같은 스케줄로 실험을 수행하였음.

◎ 실험동물인 소를 선정하기 위하여 120-150일령의 소 25두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 11마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 아

래의 실험 스케줄처럼 백신은 1두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 4주 간격으로 2회 접종 후 면역원성을 확인하였음.



1차접종 2주전 채혈후 항체가 검사 후 대상 소 선별
2주차, 6주차에는 혈청(10ml)과 전혈(20ml)을 채혈
총 9회 채혈

Group		시험백신의 조성 (2 ml/접종)		개체수(소) 연령 Total 11 head	
		재조합 항원	면역증강제		
1	P.C	상용화백신	-	37-1, 48	2 heads
2	pOVM-pAVM	pOVM(250ug)-pAVM(250ug)	CAvant SOE-X	24-1, 27-1, 49	3 heads
3	pOVM-pAVM	pOVM(250ug)-pAVM(250ug)	CAvant DOE	34, 50-1, 51-1	3 heads
4	Inactivated FMDV	Inactivated FMDV	CAvant SOE-X	54-1, 61, 63	3 heads

그림 109. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 소에 대한 면역원성 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, 재조합 구제역백신 그룹별로 항체형성률의 증가 현상을 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서 확인할 수 있었음.

◎ 돼지에서의 효능과 비슷하게 SOE-X를 포함한 재조합 구제역백신의 면역원성 유도능이 효과적임을 확인할 수 있었음.

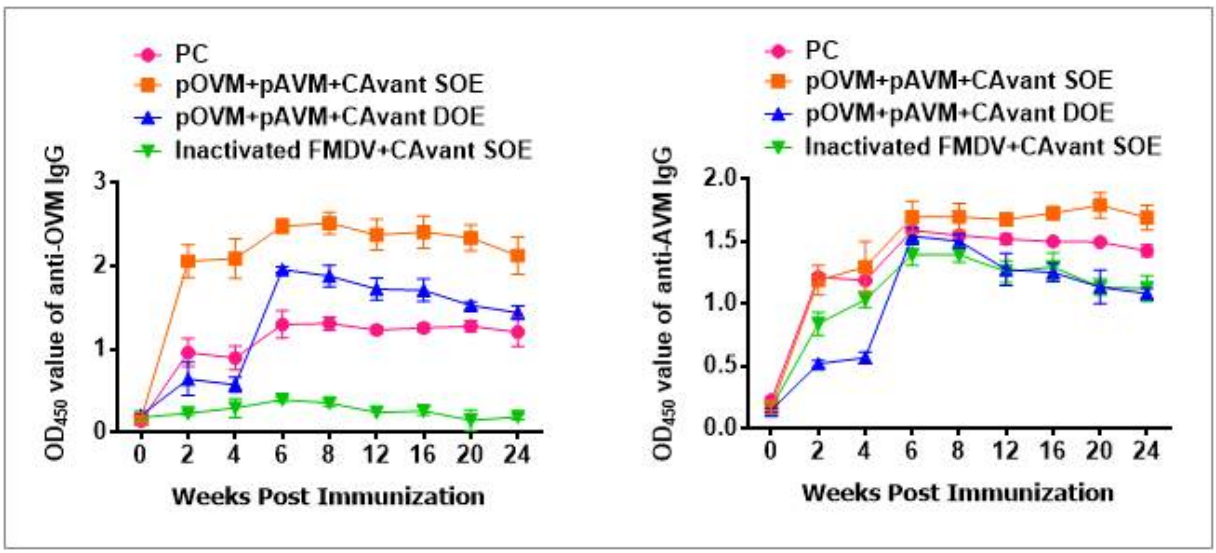


그림 110. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 항체가 검증

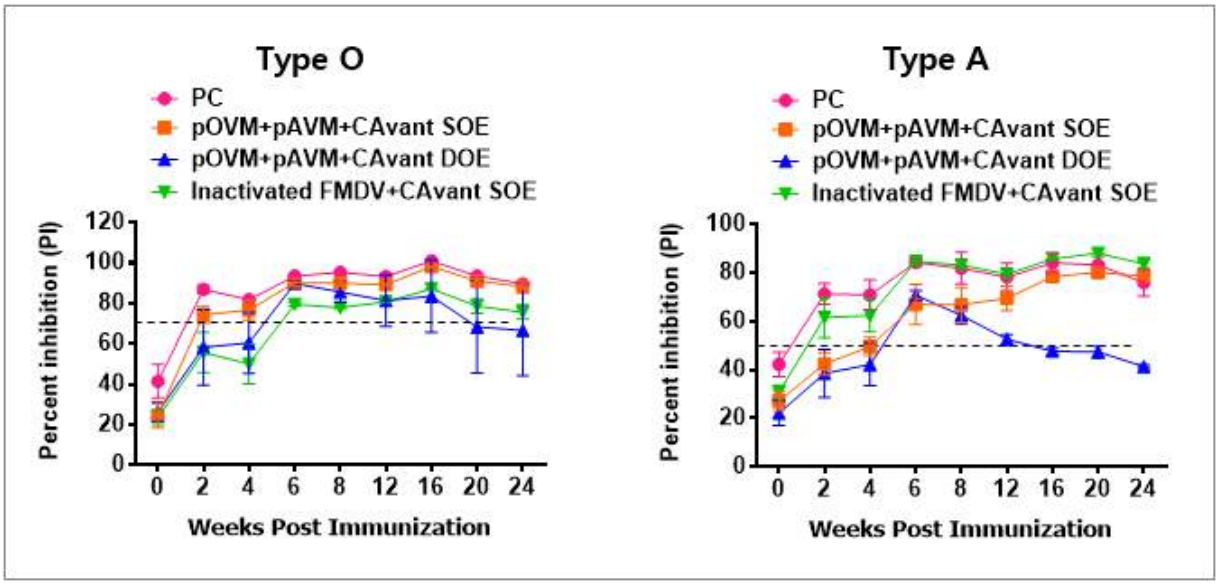


그림 111. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 SP 항체가 검증

◎ 이어서 소에서의 세포면역 유도 효능을 아래와 같이 측정하였음. T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 첫번째 접종 후 2주째, 두번째 접종후 2주째 각각의 소 PBMC를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 (OVM, AVM) 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 그리고 A pocheon, A Malay97, A Iraq 등 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

◎ 그 결과 아래의 그림에서 보는바와 같이, 항체생성률과 비슷한 경향으로 SOE-X를 포함하는 재조합 구제역백신 그룹의 세포면역 유도능이 2차접종후 보다 높게 유도됨을 확인할 수 있었음.

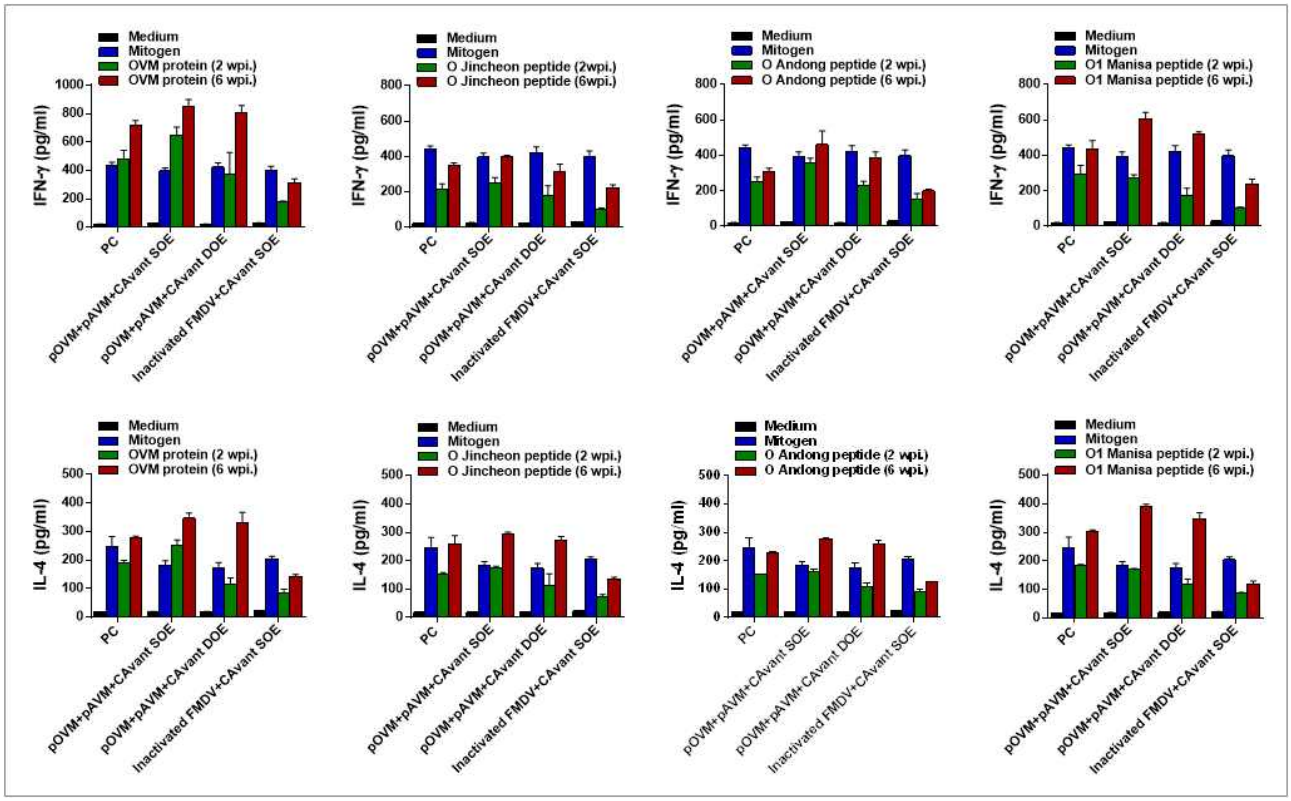


그림 112. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 세포성면역 유도능 검증

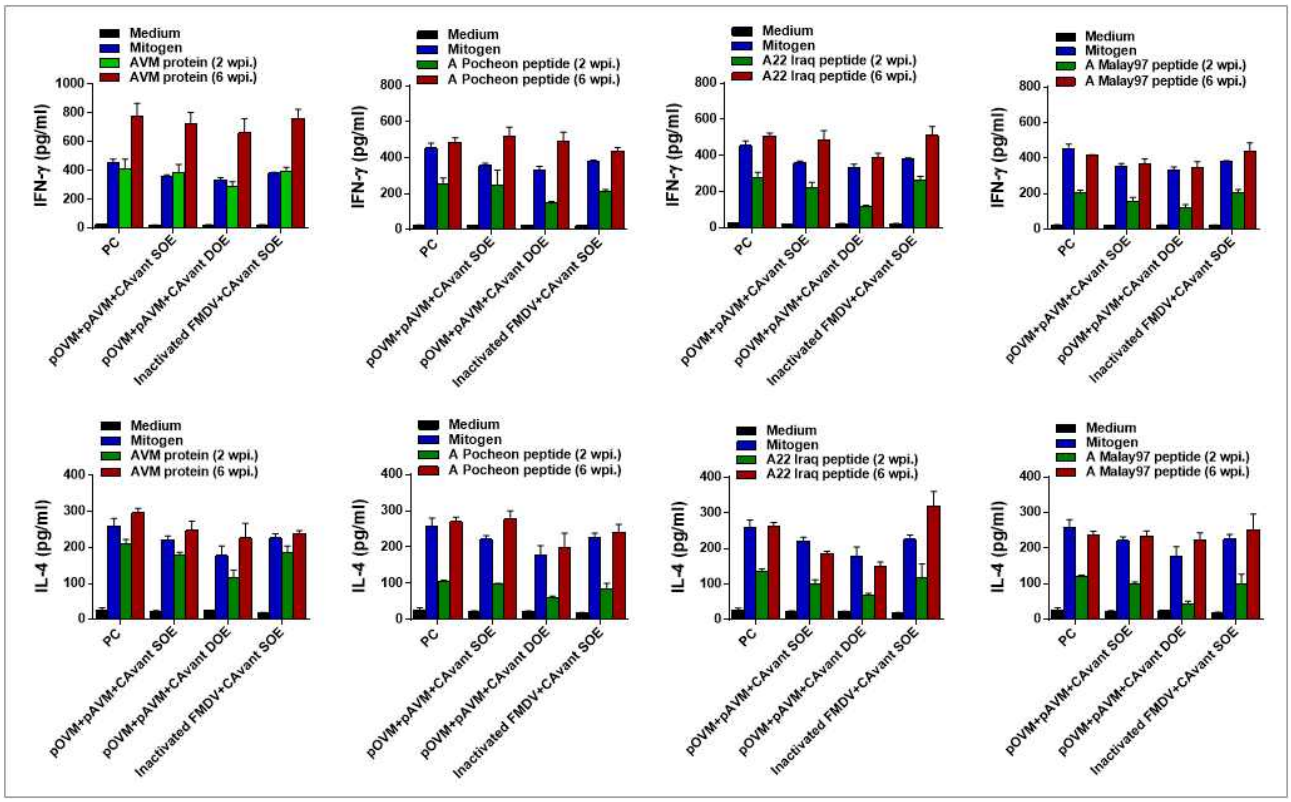
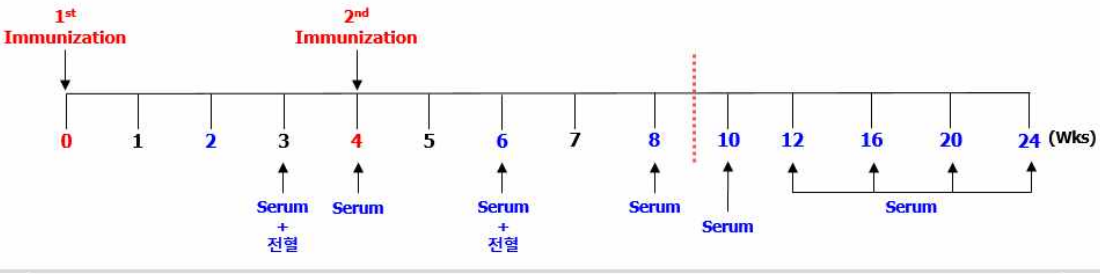


그림 113. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 세포성면역 유도능 검증

(27) 최종 면역보좌제(adjuvant)가 포함하는 구제역 O형과 A형 혼합항원의 소 효능평가-2

◎ 목적동물인 소에서 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함된 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원의 접종에 따른 면역원성 유도 효능을 다시 한 번 약간의 다른 조건으로 검증하기 위해 다음과 같은 스케줄로 실험을 수행하였음.

◎ 실험동물인 소를 선정하기 위하여 120-150일령의 소 30두에 대한 항체역가를 모니터링 하였고, 이 중 구제역 O형 및 A형에 대한 ELISA 항체가 낮은 개체 15마리를 최종 선정하여 실험에 사용하였음. 아래의 실험 스케줄처럼 백신은 1두 당 2 ㎖씩을 접종하였고, 4주 간격으로 2회 접종 후 면역원성을 확인하였음.



1차접종 2주전 채혈후 항체가 검사 후 대상 소 선별
3주차, 6주차에는 혈청(10ml)과 전혈(20ml)을 채혈

Group		시험백신의 조성 (2 ml/접종)		개체수 (소) 연령 (15 head)
		재조합 항원	면역증강제	
VAC1	Positive control	상용화백신	-	3 heads (3, 4, 5)
VAC2	rFMD+SOE	pOVM(300ug)-pAVM(300ug)	CAvant SOE	4 heads (6, 8, 20, 25)
VAC3	rFMD+SOE-X	pOVM(300ug)-pAVM(300ug)	CAvant SOE-X	4 heads (14, 41, 49, 52)
VAC4	A22+SOE-X	Inactivated FMDV (A22)	CAvant SOE-X	4 heads (11, 12, 13, 16)

그림 114. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원의 소에 대한 면역원성 실험스케줄

◎ 그 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, 재조합 구제역백신 그룹별로 항체형성률의 증가 현상을 home ELISA법에 의해서 그리고 SP ELISA법에서 확인할 수 있었음.

◎ 1차실험에서의 효능과 비슷하게 SOE-X를 포함한 재조합 구제역백신의 면역원성 유도능이 효과적임을 확인할 수 있었음.

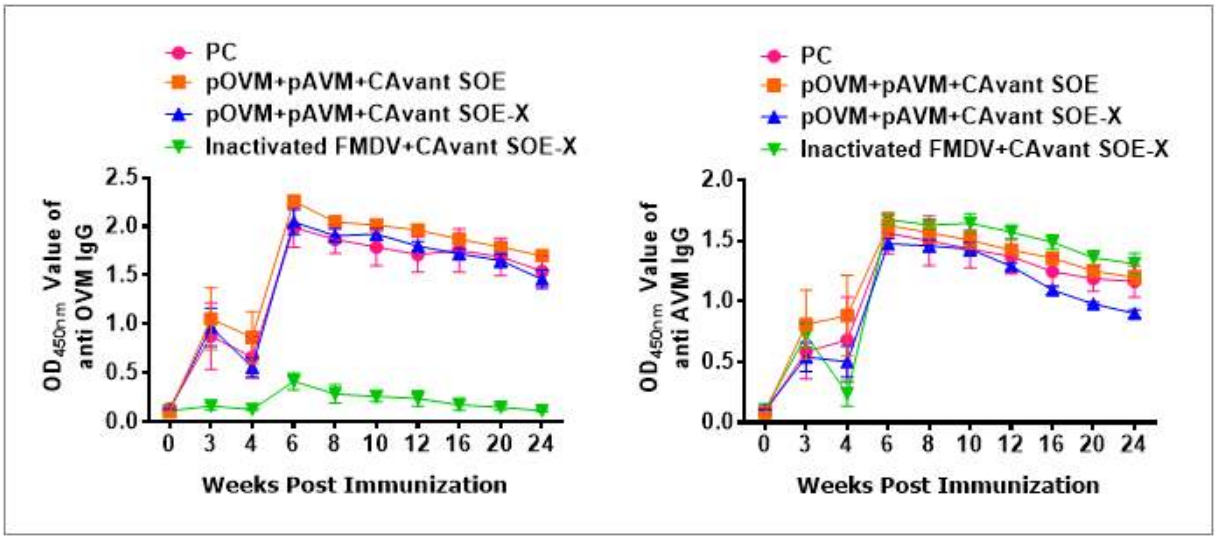


그림 115. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 항체가 검증

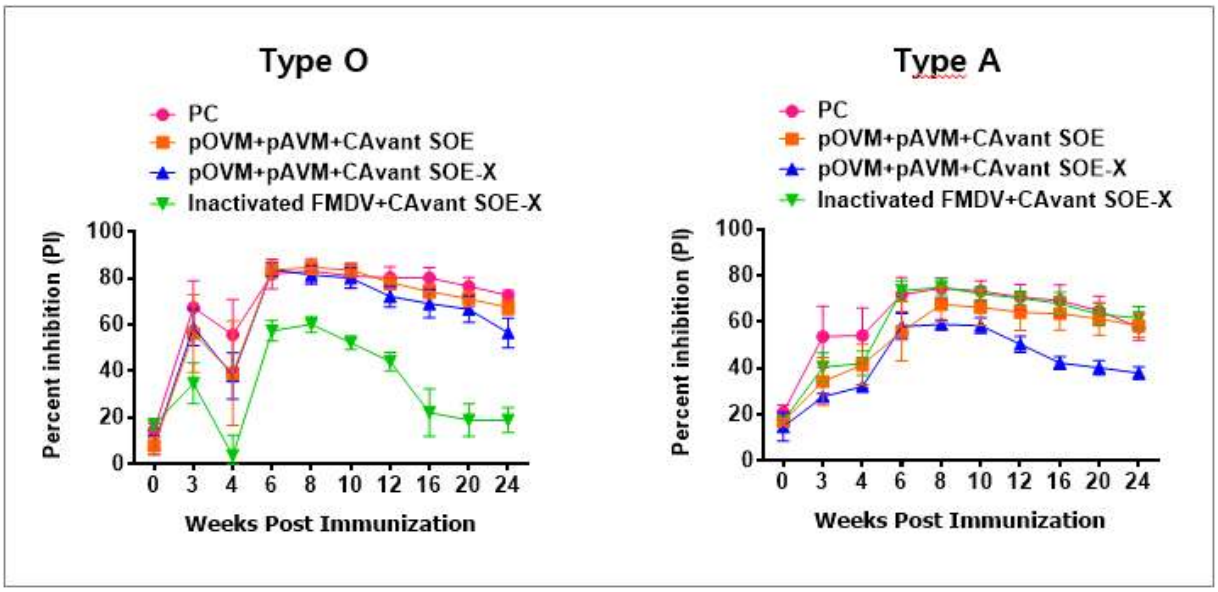


그림 116. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 SP 항체가 검증

◎ 역시 이어서 소에서의 세포면역 유도 효능을 아래와 같이 측정하였음. T 세포 면역반응의 활성화를 측정하기 위해 이번에는 첫번째 접종 후 3주째, 두번째 접종후 3주째 각각의 소 PBMC를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 (OVM, AVM) 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 그리고 A pocheon, A Malay97, A Iraq 등 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법으로 BD™ ELISPOT set을 이용하여 수행하였음.

◎ 그 결과 아래의 그림에서 보는바와 같이, 항체생성률과 비슷한 경향으로 SOE-X를 포함하는 재조합 구제역백신 그룹의 세포면역 유도능이 2차접종후 보다 높게 유도됨을 확인할 수 있었음.

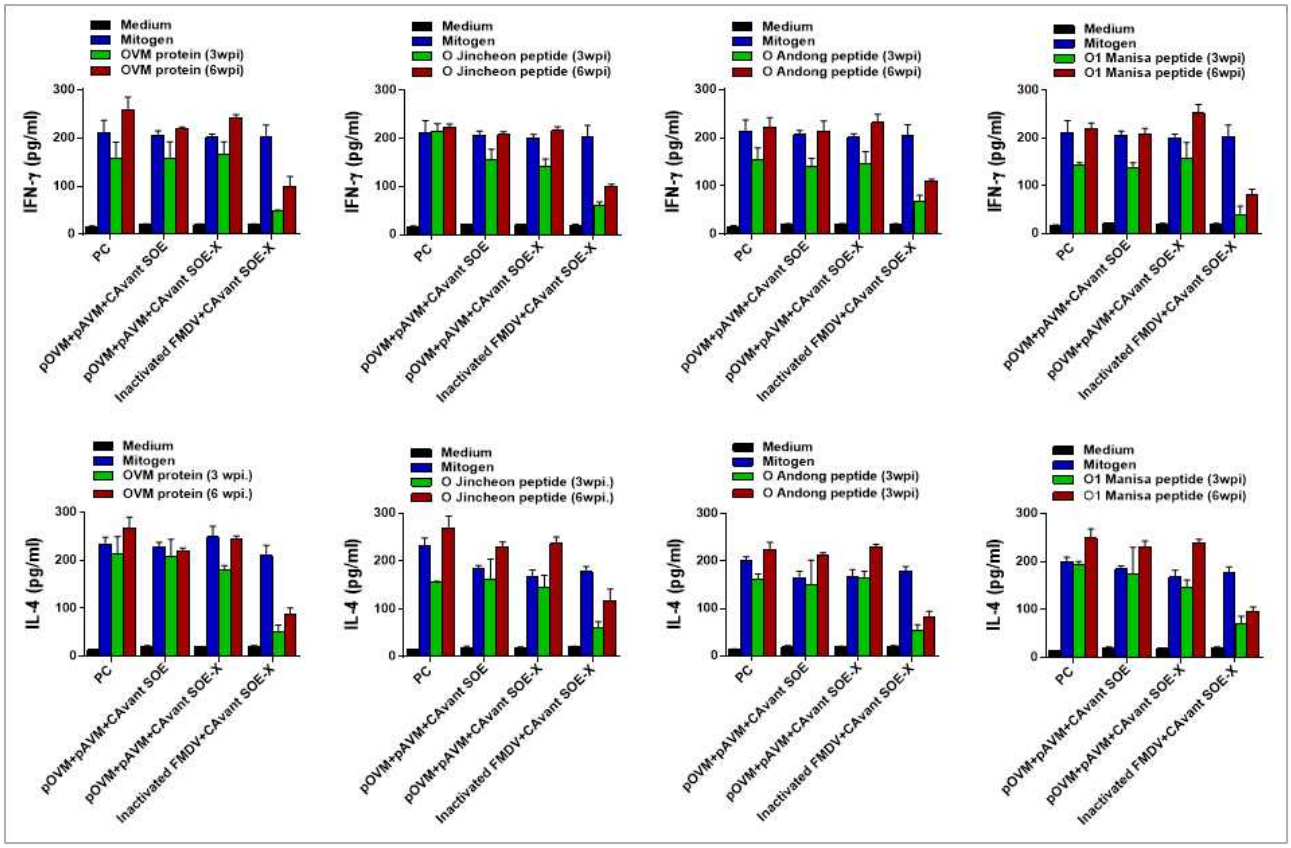


그림 117. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 세포성면역 유도능 검증

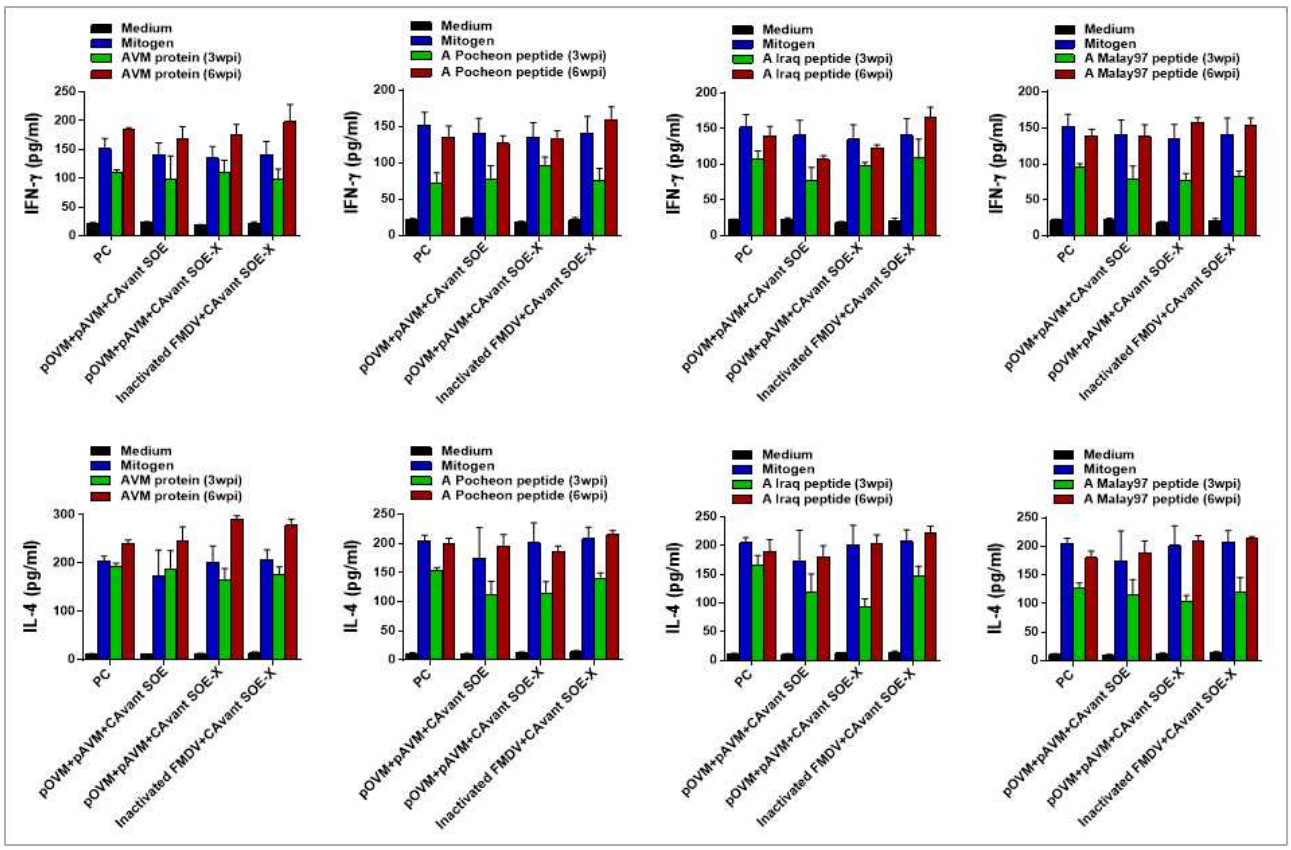


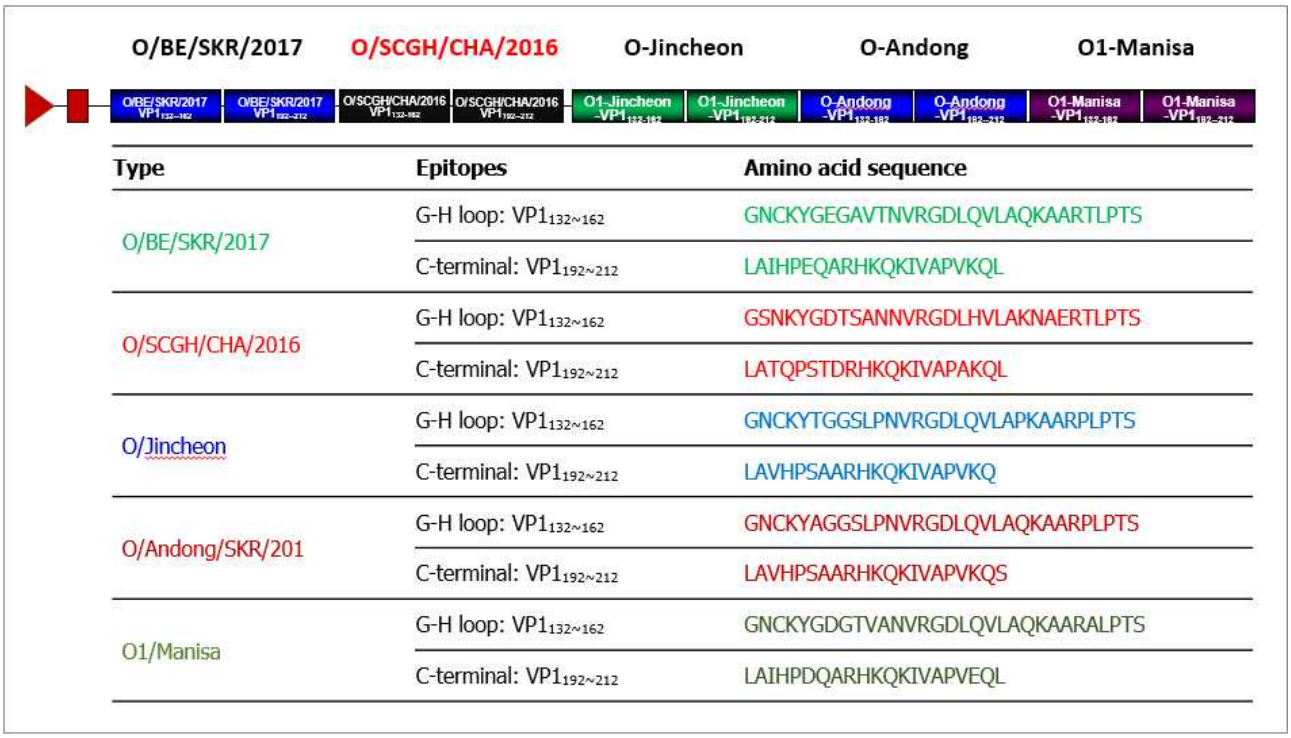
그림 118. Adjuvant 포함 재조합 혼합항원에 대한 세포성면역 유도능 검증

◎ 결론적으로 최종 면역보좌제(adjuvant) SOE-X가 포함된 구제역 0형과 A형 재조합 혼합항원은 소와 돼지에서 O형 및 A 형 FMDV에 대해서 높은 방어 효능을 보이는 우수한 재조합 백신 candidate가 될 수 있음.

(28) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O-BE/O-SCGH/O-Jin/O-An/O-Man; 5OVM-CHA) 항원을 이용한 재조합 백신 개발 연구

(가) O serotype용 5가 Multi-VP1 epitope (5OVM-CHA) 항원 단백질 발현/정제

◎ 본 연구팀은 FMDV의 다양한 O serotype들 즉, SEA, ME-SA, Cathay type 모두에 대해 광범위한 방어능 갖는 새로운 재조합 항원을 개발하기 위해 기존의 재조합 항원인 OVM (O-Jin/O-An/O-Man) 항원에 FMDV O/BE/SKR/2017 strain과 O/SCGH/CHA/2016 strain의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위 유전자를 합성하여 상기의 O serotype용 Multi-VP1 epitope (OVM) 항원 유전자 앞부분에 연결시켜 O serotype용 5가 Multi-VP1 epitope (5OVM-CHA)을 제작하였음.



Type	Epitopes	Amino acid sequence
O/BE/SKR/2017	G-H loop: $VP1_{132\sim162}$	GNCKYGEGAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPTS
	C-terminal: $VP1_{192\sim212}$	LAIHPEQARHKQKIVAPVKQL
O/SCGH/CHA/2016	G-H loop: $VP1_{132\sim162}$	GSNKYGDTSANNVRGDLHVLAKNAERTLPTS
	C-terminal: $VP1_{192\sim212}$	LATQPSTDRHKQKIVAPAKQL
O/Jincheon	G-H loop: $VP1_{132\sim162}$	GNCKYTGGSLPNVRGDLQVLAPKAARPLPTS
	C-terminal: $VP1_{192\sim212}$	LAVHPSAARHKQKIVAPVKQ
O/Andong/SKR/201	G-H loop: $VP1_{132\sim162}$	GNCKYAGGSLPNVRGDLQVLAQKAARPLPTS
	C-terminal: $VP1_{192\sim212}$	LAVHPSAARHKQKIVAPVKQS
O1/Manisa	G-H loop: $VP1_{132\sim162}$	GNCKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARALPTS
	C-terminal: $VP1_{192\sim212}$	LAIHPDQARHKQKIVAPVEQL

그림 119. O type OVM에 보은주와 SCGH주의 epitope들이 추가된 5OVM-CHA 발현 plasmid

◎ 결과적으로 대장균에서 5가지 FMDV의 다양한 O serotype들의 VP1 B cell epitope부분이 연결된 항원 단백질을 발현하는 plasmid를 제작하였고, 구축된 5OVM-CHA 단백질 발현 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 5OVM-CHA 항원 단백질 발현을 확인하였음.

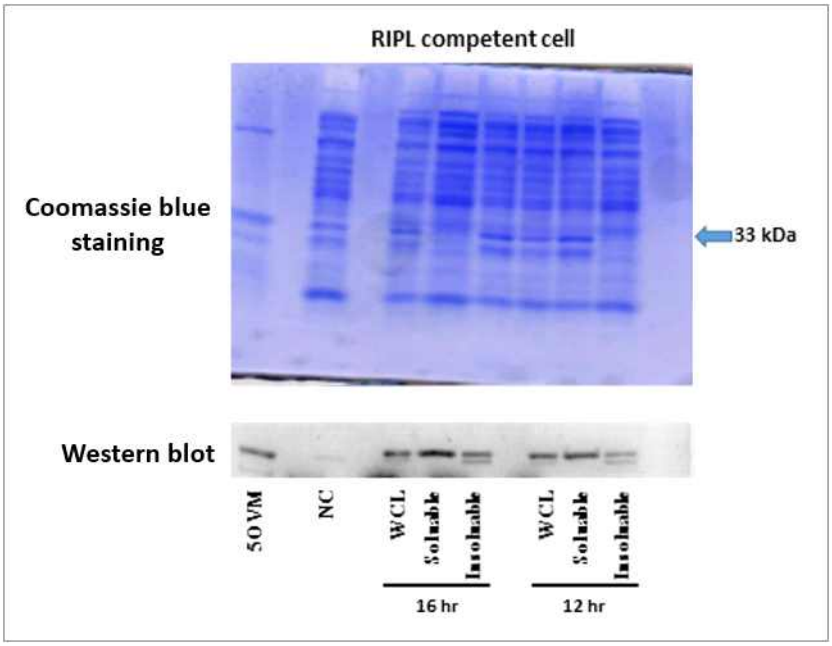


그림 120. 대장균에서 5OVM-CHA 항원 단백질의 soluble form 확인

◎ 대장균에서 발현된 soluble form의 5OVM-CHA 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography를 이용하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 단백질을 정제하였음.

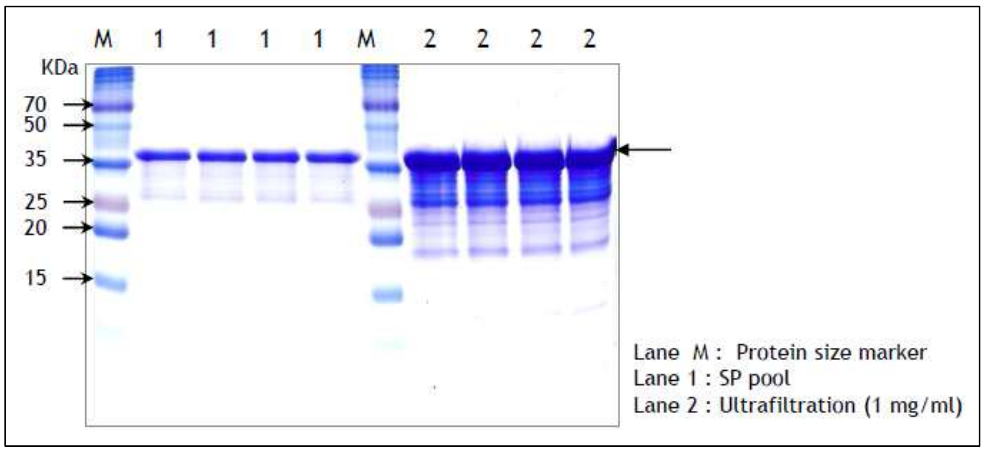


그림 121. 대장균으로부터 가용성의 5OVM-CHA 단백질 정제

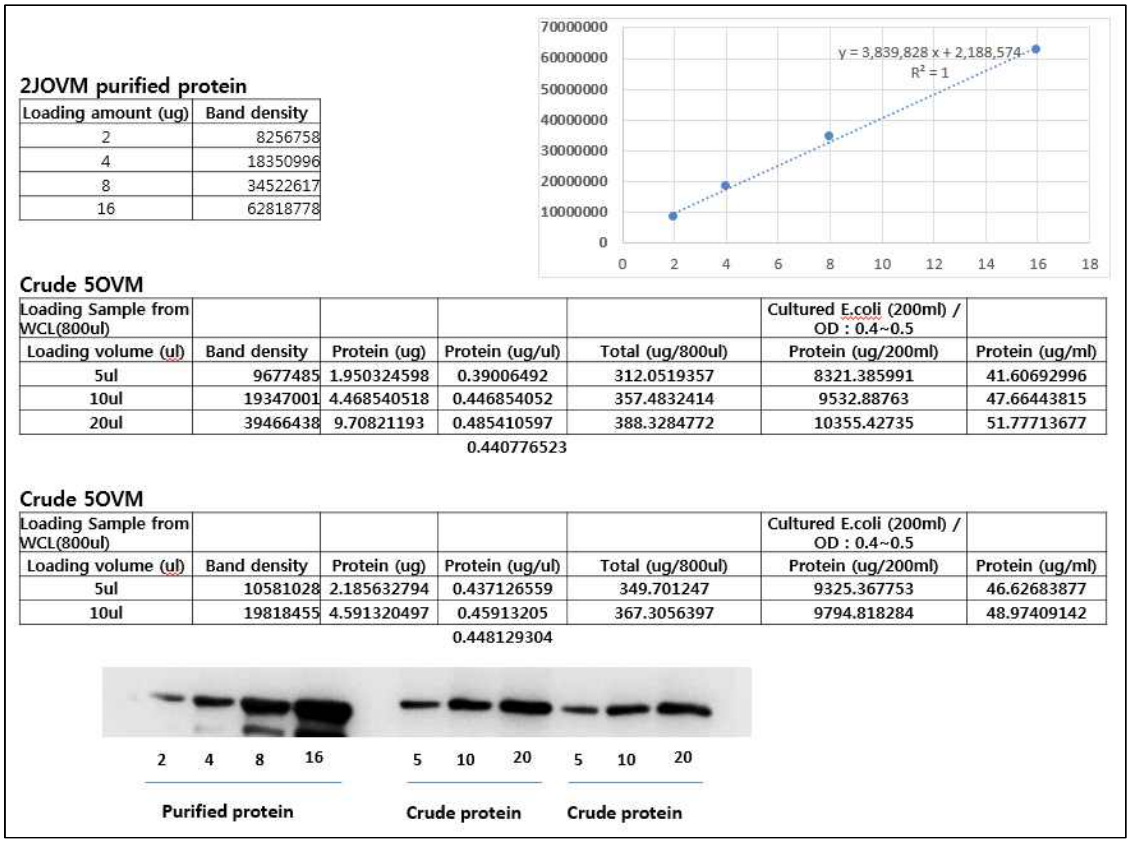
(나) O serotype용 5가 Multi-VP1 epitope (5OVM-CHA) 항원 단백질의 산업형 항원 검증

◎ O serotype용 5가 Multi-VP1 epitope (5OVM-CHA) 항원 단백질의 산업형 항원 개발을 위해 우선적으로 대장균의 세포질내 가용성의 5OVM-CHA 항원단백질 양을 측정하였음.

◎ 우선, 대장균에서 가용성의 5OVM-CHA 항원단백질을 발현시킨 후 대장균의 lysis 과정을 거쳐 soluble fraction내 단백질들중 가용성의 5OVM-CHA 항원단백질 양을 측정하였음. 먼저 정제된 항원단백질을 2-fold dilution한 뒤 SDS-PAGE와 western blot을 통해 band intensity 값을 구하고 standard curve를 나타내었음. 그 후 soluble fraction을 용량별로 loading 한 뒤 western blot을 통해 band intensity를 구하고 standard curve에 대입하여 농

도를 구하였음.

◎ 상기의 방법으로 여러 차례 항원단백질의 양을 측정한 결과, 대장균의 soluble fraction 단백질 1ul에 약 0.44ug의 O serotype용 5OVM-CHA 항원단백질이 포함되어 있음을 확인하였음.



2JOVM purified protein

Loading amount (ug)	Band density
2	8256758
4	18350996
8	34522617
16	62818778

Crude 5OVM

Loading Sample from WCL(800ul)					Cultured E.coli (200ml) / OD : 0.4~0.5	
Loading volume (ul)	Band density	Protein (ug)	Protein (ug/ul)	Total (ug/800ul)	Protein (ug/200ml)	Protein (ug/ml)
5ul	9677485	1.950324598	0.39006492	312.0519357	8321.385991	41.60692996
10ul	19347001	4.468540518	0.446854052	357.4832414	9532.88763	47.66443815
20ul	39466438	9.70821193	0.485410597	388.3284772	10355.42735	51.77713677
			0.440776523			

Crude 5OVM

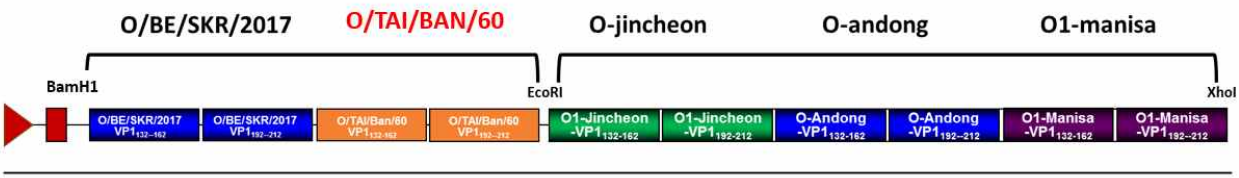
Loading Sample from WCL(800ul)					Cultured E.coli (200ml) / OD : 0.4~0.5	
Loading volume (ul)	Band density	Protein (ug)	Protein (ug/ul)	Total (ug/800ul)	Protein (ug/200ml)	Protein (ug/ml)
5ul	10581028	2.185632794	0.437126559	349.701247	9325.367753	46.62683877
10ul	19818455	4.591320497	0.45913205	367.3056397	9794.818284	48.97409142
			0.448129304			

그림 122. 대장균의 soluble fraction 단백질내 포함된 5OVM-CHA 단백질의 양 측정

(29) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O-BE/O-TAI/O-Jin/O-An/O-Man; 5OVM-TAI) 항원을 이용한 재조합 백신 개발 연구

(가) O serotype용 5가 Multi-VP1 epitope (5OVM-TAI) 항원 단백질 발현/정제

◎ 본 연구팀은 FMDV의 다양한 O serotype들 즉, SEA, ME-SA, Cathay type 모두에 대해 광범위한 방어능 갖는 새로운 재조합 항원을 개발하기 위해 기존의 재조합 항원인 OVM (O-Jin/O-An/O-Man)항원에 FMDV O/BE/SKR/2017 strain과 O/TAI/Ban/60 strain의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위 유전자를 합성하여 상기의 O serotype용 Multi-VP1 epitope (OVM) 항원 유전자 앞 부분에 연결시켜 O serotype용 5가 Multi-VP1 epitope (5OVM-TAI)을 제작하였음.



Type	G-H loop: VP1132~162	C-terminal: VP1192~212
O/BE/SKR/2017	GNCKYGEGAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPTS	LAIHPEQARHKQKIVAPVKQL
O/TAI/Ban/60	GSCRYSNSHVSNVRGDLQVLAQKAARALPTS	LAIHPSEARHKQKIVAPAKQL
O/Jincheon	GNCKYTGGSLPNVRGDLQVLAPKAARPLPTS	LAVHPSAARHKQKIVAPVKQ
O/Andong/SKR/201	GNCKYAGGSLPNVRGDLQVLAQKAARPLPTS	LAVHPSAARHKQKIVAPVKQS
O1/Manisa	GNCKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARALPTS	LAIHPDQARHKQKIVAPVEQL

그림 123. O type Multi-VP1e (OVM)에 FMDV 보은주와 대만주의 epitope들이 추가된 5OVM-TAI 발현 plasmid 구축

◎ 결과적으로 대장균에서 5가지 FMDV의 다양한 O serotype들의 VP1 B cell epitope부분이 연결된 항원 단백질을 발현하는 plasmid를 제작하였고, 구축된 5OVM-TAI 단백질 발현 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 5OVM-TAI 항원 단백질 발현을 확인하였음.

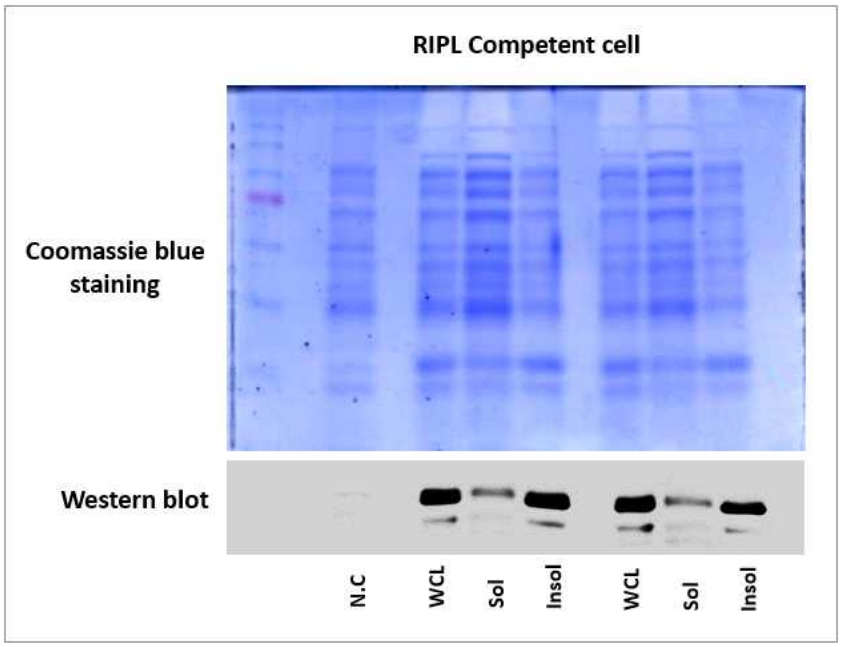


그림 124. 대장균에서 5OVM-TAI 항원 단백질의 soluble form 확인

(30) O topotype 용 Multi-VP1 epitope (Jincheon/Andong/Manisa/Panasia-2/TAI/Ban/60) 항원을 이용한 재조합 백신 개발 연구

◎ 본 연구팀은 FMDV의 O 혈청형 (serotype) 중에서 우리나라 또는 주변국에서 주로 발생했던 지역형 (topotype) 5 종류에 대한 백신개발의 기초 작업인 항원뱅크의 구축을 위해 각

각의 항원을 대장균 발현시스템을 이용하여 재조합단백질을 생산하도록 고안하였음. 각 지역형의 VP1 단백질 아미노산 서열 중에서 G-H loop (amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위 유전자를 합성하였고, 항원성을 증대시키기 위해 3회 반복적으로 대장균 발현 벡터에 삽입하였음.

(가) O topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (O-Jincheon) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림에서와 같이, O-Jincheon VP1 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 O-Jincheon VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography 및 ultrafiltration을 통하여 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

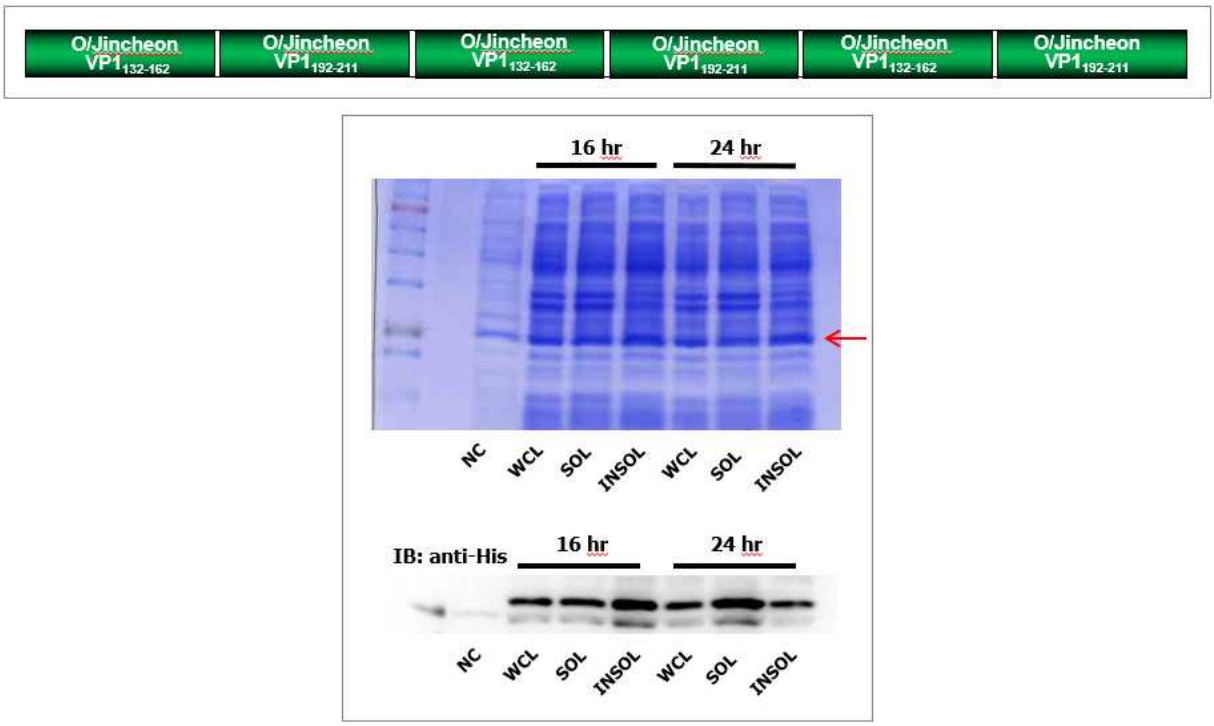


그림 125. O type Multi-VP1e (Jincheon)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(나) O topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (O-Andong) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림에서와 같이, O-Andong VP1 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로

Soluble form의 O-Andong VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

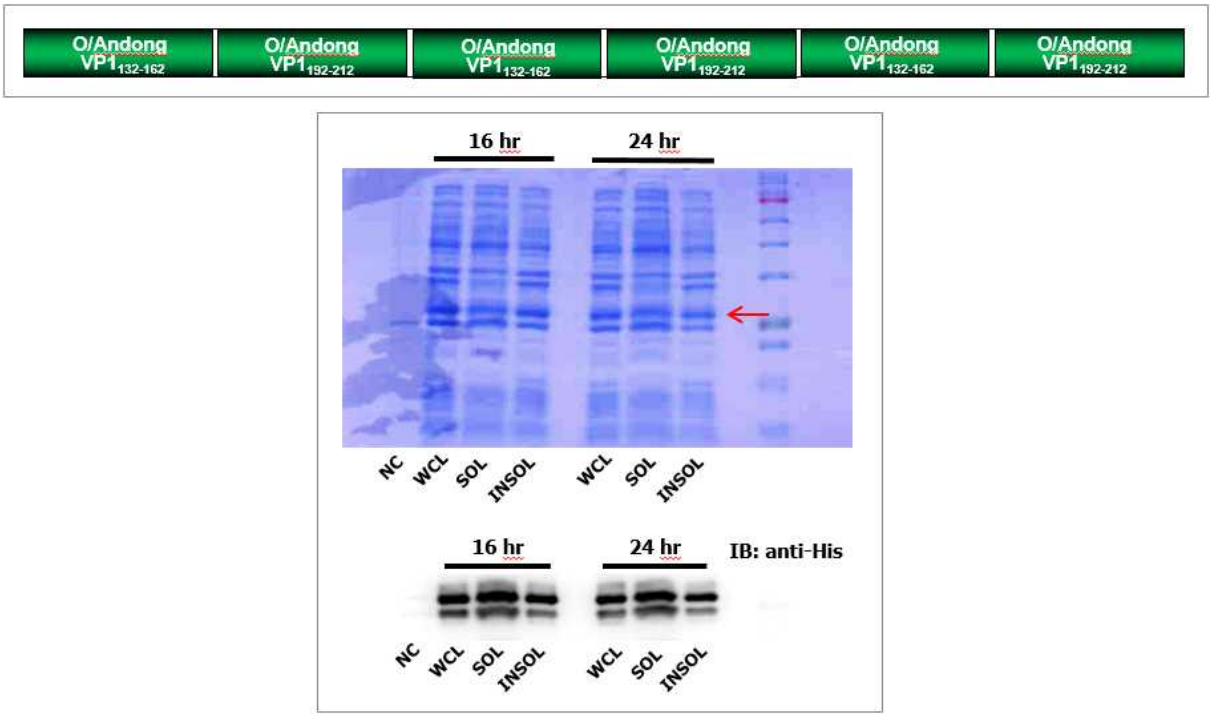


그림 126. O type Multi-VP1e (Andong)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(다) O topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (O1 Manisa) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림에서와 같이, O1-Manisa VP1 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 O1-Manisa VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

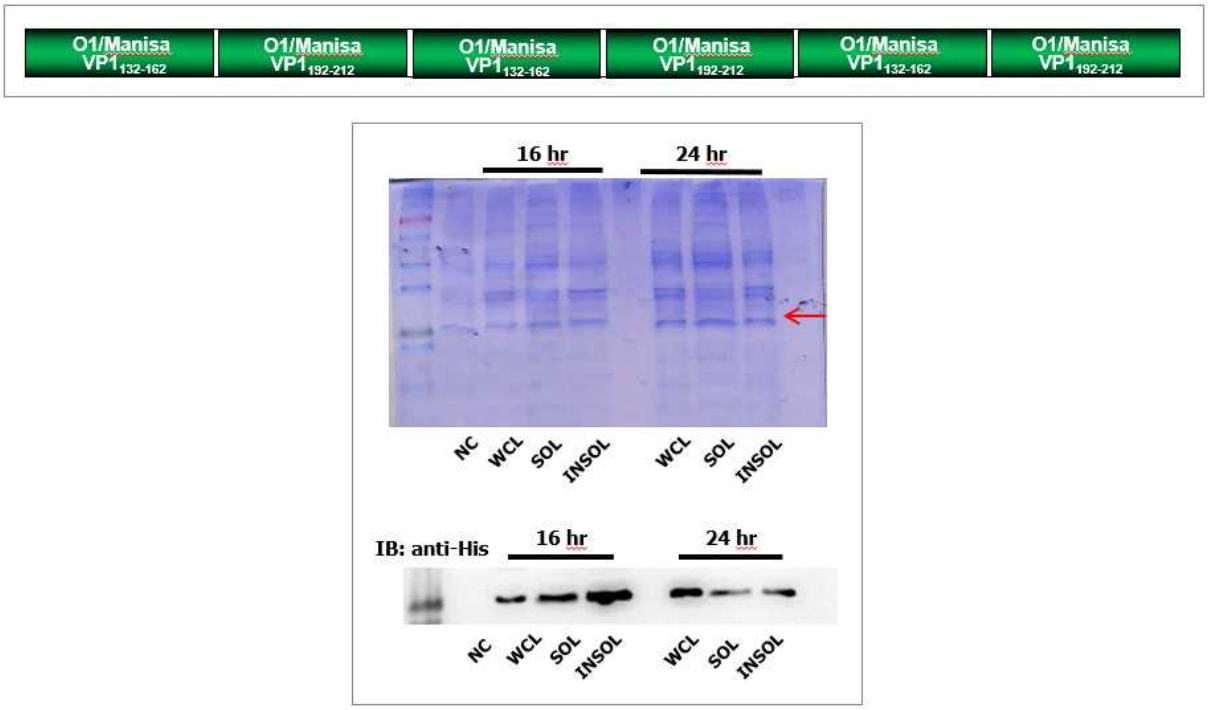


그림 127. O type Multi-VP1e (Manisa)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(라) O topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (Panasia-2) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림에서와 같이, O-Panasia-2 VP1 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 O-Panasia-2 VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography 및 ultrafiltration을 통하여 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

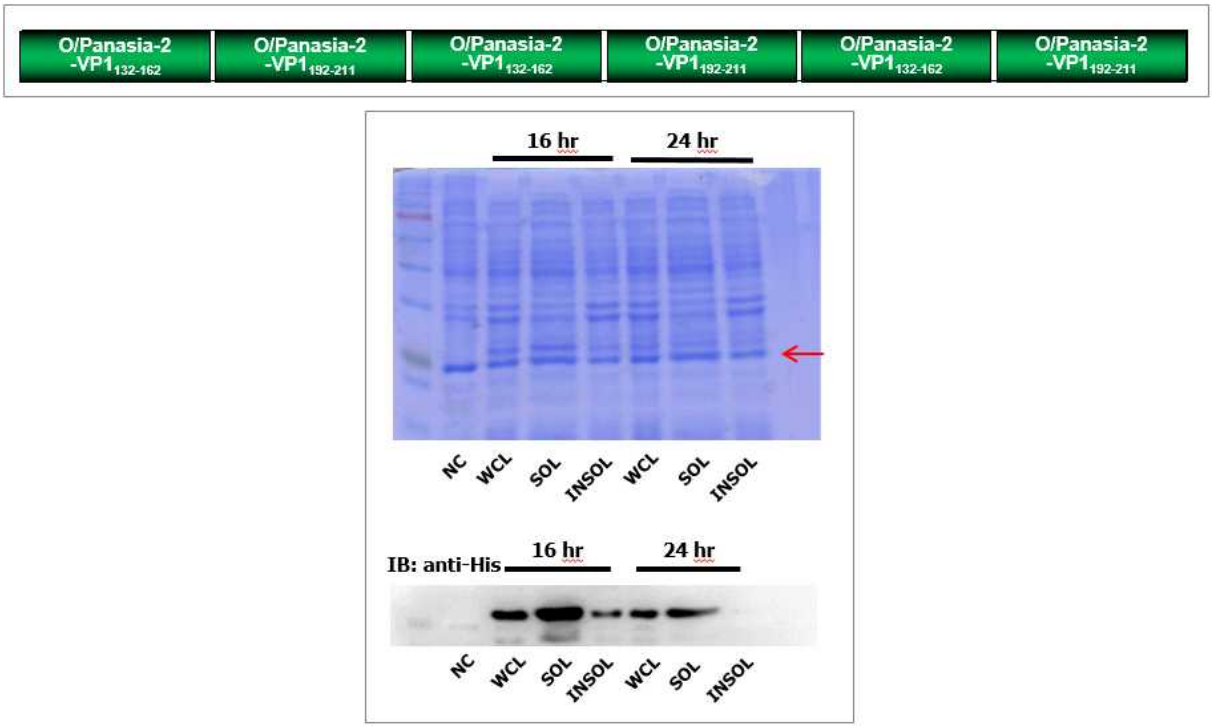


그림 128. O type Multi-VP1e (Panasia-2)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(마) O topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (O-TAI/Ban/60) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림에서와 같이, O-TAI/Ban/60 VP1 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 O-TAI/Ban/60 VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography 및 ultrafiltration을 통하여 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

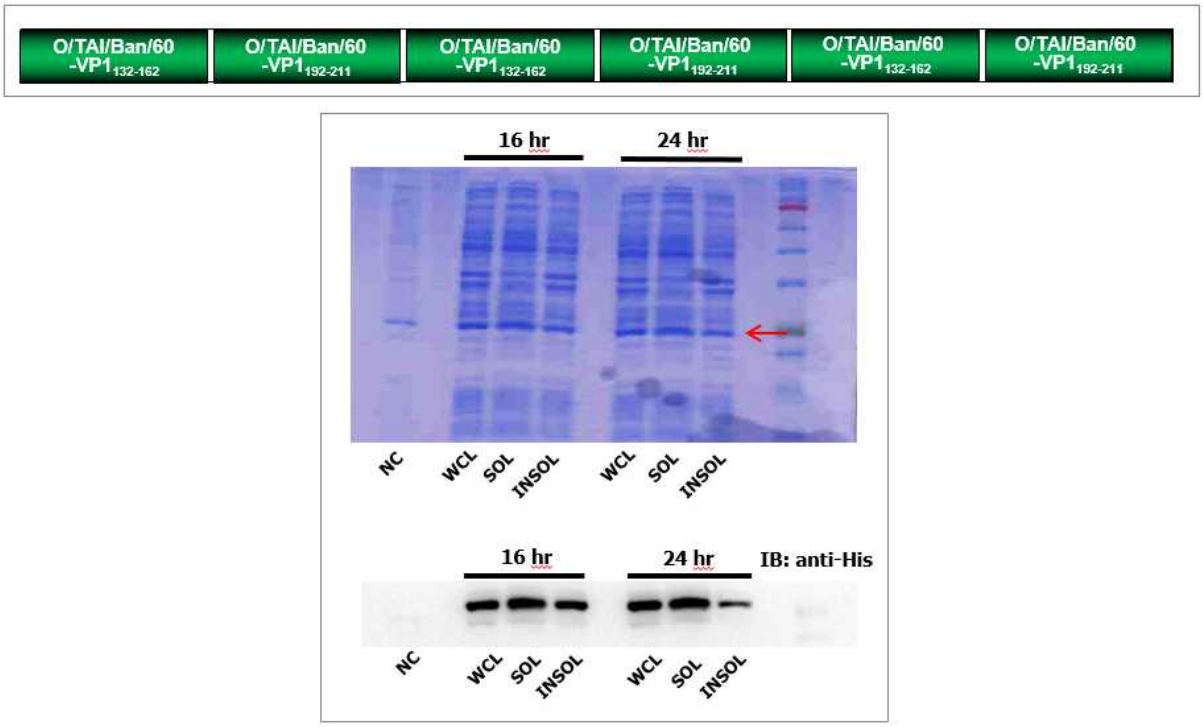


그림 129. O type Multi-VP1e (TAI/Ban/60)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(31) A topotype 용 Multi-VP1 epitope (Iraq22/Malay97/Pocheon/YC-SKR2017) 항원을 이용한 재조합 백신 개발 연구

◎ 본 연구팀은 FMDV의 A 혈청형 (serotype) 중에서 우리나라 또는 주변국에서 주로 발생했던 지역형 (topotype) 4 종류에 대한 백신개발의 기초 작업인 항원뱅크의 구축을 위해 각각의 항원을 대장균 발현시스템을 이용하여 재조합단백질을 생산하도록 고안하였음. O type과 마찬가지로 각 지역형의 VP1 단백질 아미노산 서열 중에서 G-H loop (amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위 유전자를 합성하였고, 항원성을 증대시키기 위해 3회 반복적으로 대장균 발현 벡터에 삽입하였음.

(가) A topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (Iraq22) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림에서와 같이, A-Iraq22 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 A-Iraq22 VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography 및 ultrafiltration을 통하여 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

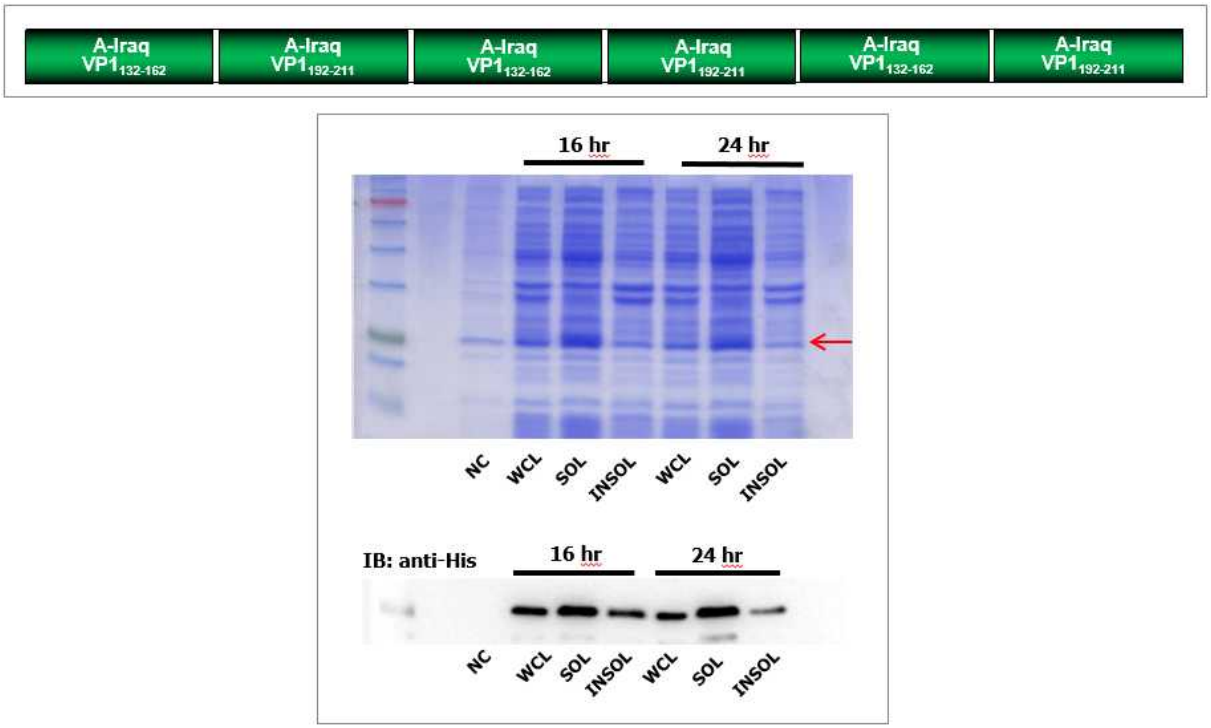


그림 130. A type Multi-VP1e (Iraq22)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(나) A topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (Malay97) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림에서와 같이, A-Malay97 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 O-Malay97 VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography 및 ultrafiltration을 통하여 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

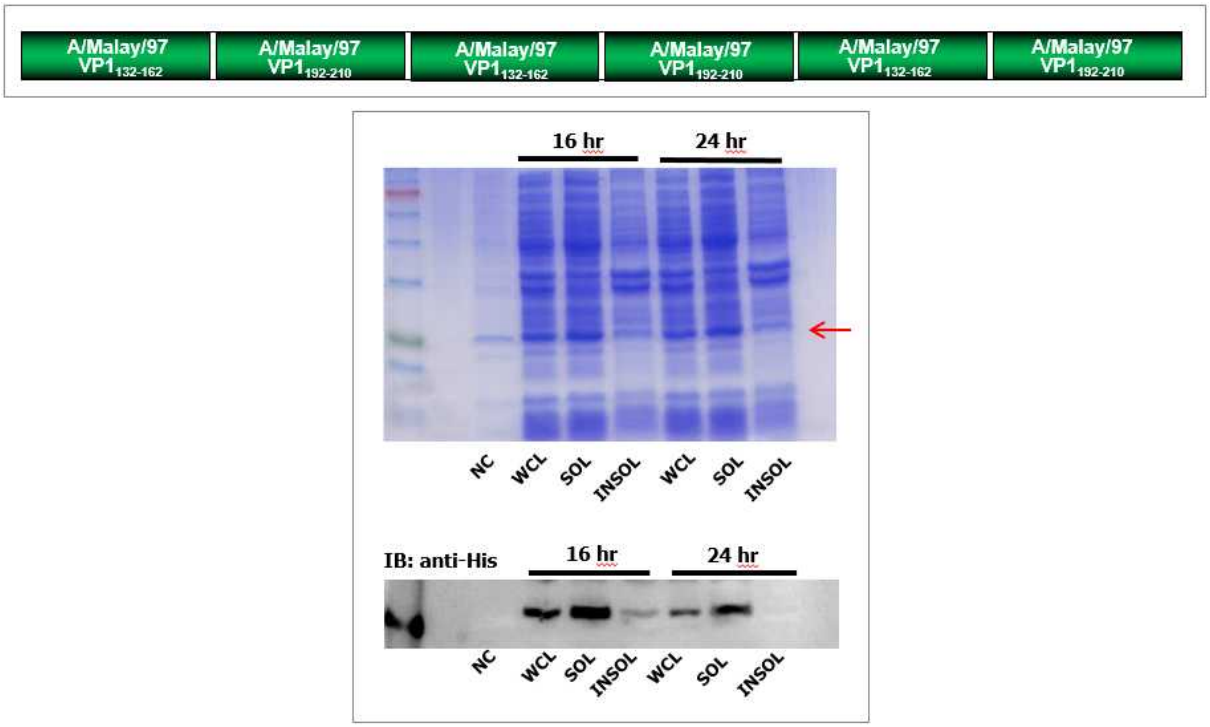


그림 131. A type Multi-VP1e (Malay97)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(다) A topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (Pocheon) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림 59에서와 같이, A-Pocheon 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 A-Pocheon VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography 및 ultrafiltration을 통하여 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

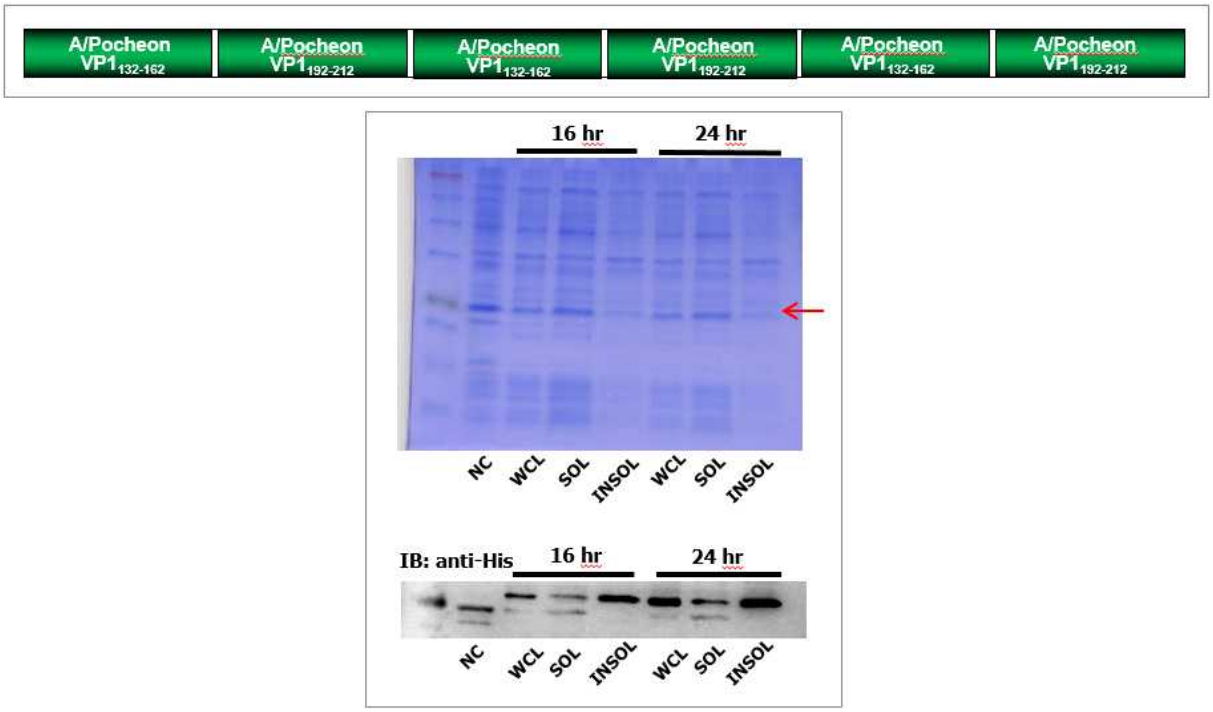


그림 132. A type Multi-VP1e (Pocheon)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(라) A topotype용 1가 Multi-VP1 epitope (YC-SKR2017) 항원 단백질 발현/정제

◎ 그림 61에서와 같이, A-YC-SKR2017 유전자의 2가지 epitope 부분을 3회 반복시켜 대장균 발현 벡터에 삽입하였음. 각 서열 중간에는 GCGCG 링커를 삽입하였음.

◎ 제작된 발현벡터 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 형질전환한 후 발현을 유도하여 Coomassie Blue 염색 및 western blot 기법을 통해 확인하였음. 결과적으로 Soluble form의 A-YC-SKR2017 VP1 epitope 항원단백질 발현을 확인하였음. 추후 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography 및 ultrafiltration을 통하여 고농도의 단백질을 정제할 예정임.

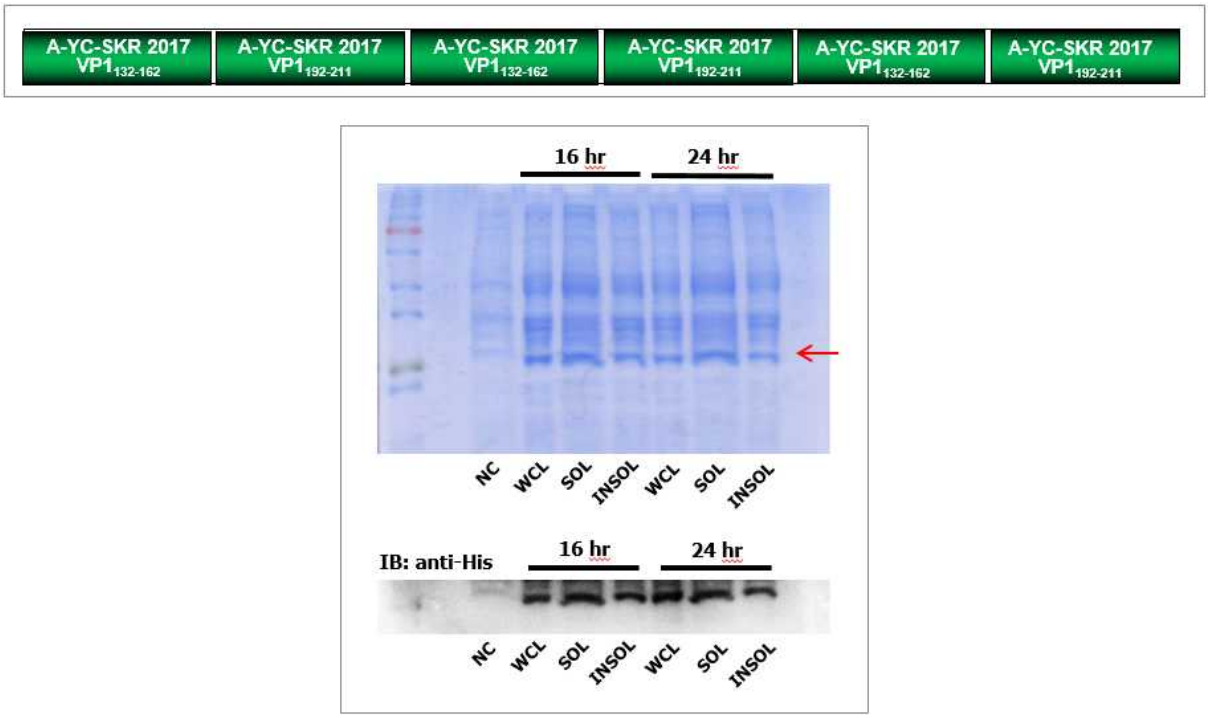


그림 133. A type Multi-VP1e (YC-SKR2017)의 발현벡터 제작 및 발현 검증

(32) Asia serotype용 Multi-VP1 epitope (AsiaVM) 항원을 이용한 재조합 백신 개발 연구

◎ 본 연구에서는 광범위한 Asia serotype FMDV 방어용 재조합 백신의 개발을 위해 2018년 종료과제(구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증)에서 개발한 Asia serotype용 Multi-VP1 epitope (Asia/sha-Asia/Mong-Asia/LC; AsiaVM) 항원을 이용하여 면역원성 실험을 계속적으로 수행할 예정임.

◎ 이전 과제에서 보고한 내용으로 Asia serotype에 대한 specific 재조합 백신용 항원단백질을 제작하기 위해 Asia/Shamir, Asia/Mongolia05, Asia/LC04의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위를 포함하는 Asia serotype용 Multi-VP1 epitope (Multi-VP1e) 항원단백질을 유전자 재조합기법으로 합성하였음.

◎ Multi-VP1e의 합성 유전자를 Histidine이 tag된 대장균 발현벡터에 삽입하여 Multi-VP1e를 발현하는 plasmid를 구축하였고 (그림 46), 구축된 Multi-VP1e 발현 plasmid를 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 발현을 확인하였음.

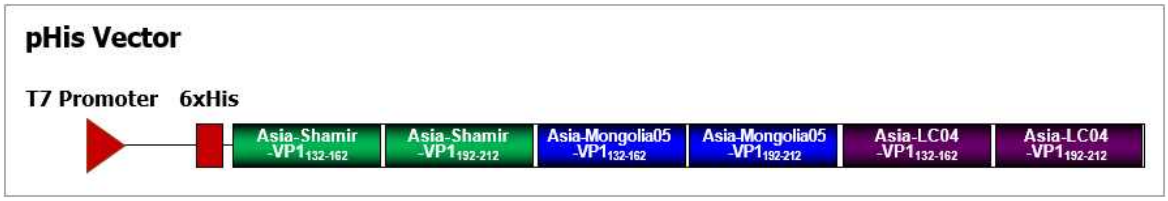


그림 134. 대장균으로부터 Asia serotype용 Multi-VP1e 정제를 위한 plasmid 구축

◎ Soluble form의 Multi-VP1e 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography를 이용하여 Multi-VP1e 단백질 fraction을 대장균 단백질들로부터 정제하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 Asia serotype용 Multi-VP1e 단백질을 정제하였음.

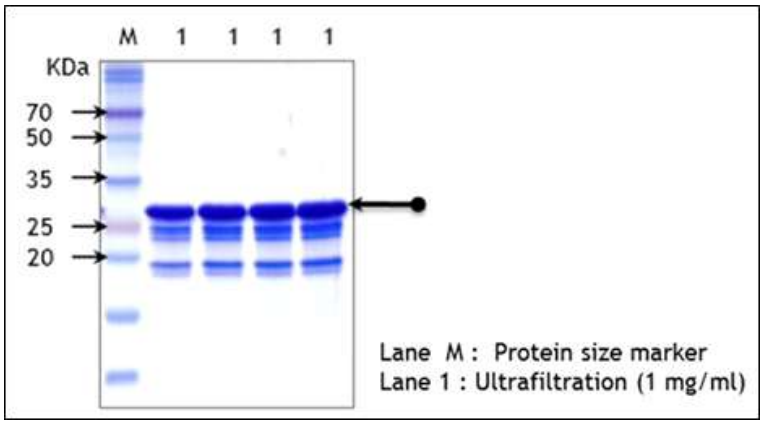


그림 135. 대장균으로부터 Asia serotype용 Multi-VP1e 정제

◎ 결론적으로 이전과제에서 FMDV Asia serotype용 Multi-VP1e 단백질을 대장균 발현시스템을 이용하여 순수 정제하였고, 이를 이용하여 향후 면역원성 실험을 수행할 예정임.

(2) 구제역 재조합 항원 대량 확보를 위한 최적 배양 및 정제조건 개발

(가) 재조합 항원의 대량 과발현 배양조건 확인

① Flask 배양에서의 발현 확인

◎ O type 항원; rFMDV-OVM/RIPL strain

○ 충남대학교로부터 분양 받은 rFMDV-OVM/RIPL strain에 대한 항원발현을 확인하기 위하여 200ml flask 수준에서 LB/Amp, 0.4mM IPTG: 30℃, 25℃ 조건으로 배양을 실시하여 발현 조건을 확인하였음. 그 결과 그림과 같이 induction 후 배양 온도에 따른 발현량에 차이가 없었음.

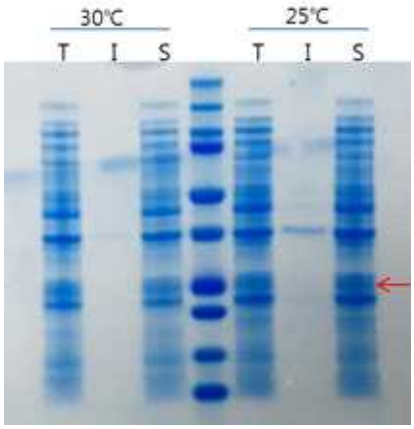


그림 136. Flask 수준 배양에서 배양온도에 따른 발현 확인 결과 (rFMDV-OVM)

○ 발현량을 높이기 위하여 중앙백신에 확립되어 있는 별도의 배지와 induction 조건 (CAVAC condition)을 적용하여 발현율을 확인한 결과 그림과 같이 LB 배양조건에서 보다는 발현량이 좋으나 100% 수용성으로 발현되지는 않았음. 100% 수용성으로 발현될 수 있는 조건을 추가로 탐색해갈 예정임.

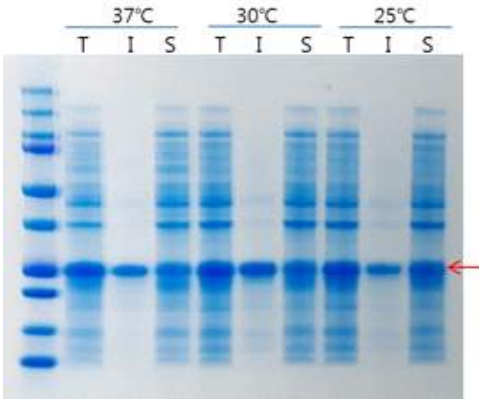


그림 137. Flask 수준 CAVAC 조건 배양에서 배양온도에 따른 발현 확인 결과 (rFMDV-OVM)

◎ A type 항원; rFMDV-AVM/RIPL strain

○ 충남대학교로부터 분양 받은 rFMDV-AVM/RIPL strain에 대한 항원발현을 확인하기 위하여 200ml flask 수준에서 LB/Amp, 0.4mM IPTG: 37℃, 30℃ 조건으로 배양을 실시하여 발현 조건을 확인하였음. 그 결과 그림과 같이 induction 후 배양 온도에 따른 발현량에 차이가 없었으나 37℃ 조건에서 증식속도가 더욱 빨랐음.

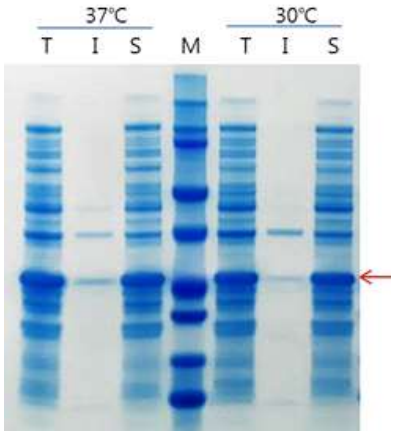


그림 138. Flask 수준 배양에서 배양온도에 따른 발현 확인 결과 (rFMDV-AVM)

② Jar fermenter에서 배양 확인

◎ O type 항원; rFMDV-OVM/RIPL strain

○ 10L jar fermenter 수준에서 LB/Amp, 0.4mM IPTG, 25℃ 조건으로 배양한 결과 OD67.2 수준으로 9L가 배양되었으며, 배양액으로부터 753g의 균체를 확보할 수 있었음 (그림). 확

보된 균체를 파쇄하여 단백질 발현을 확인한 결과 그림 37에서와 같이 100% 수용성으로 발현됨을 확인할 수 있었음.

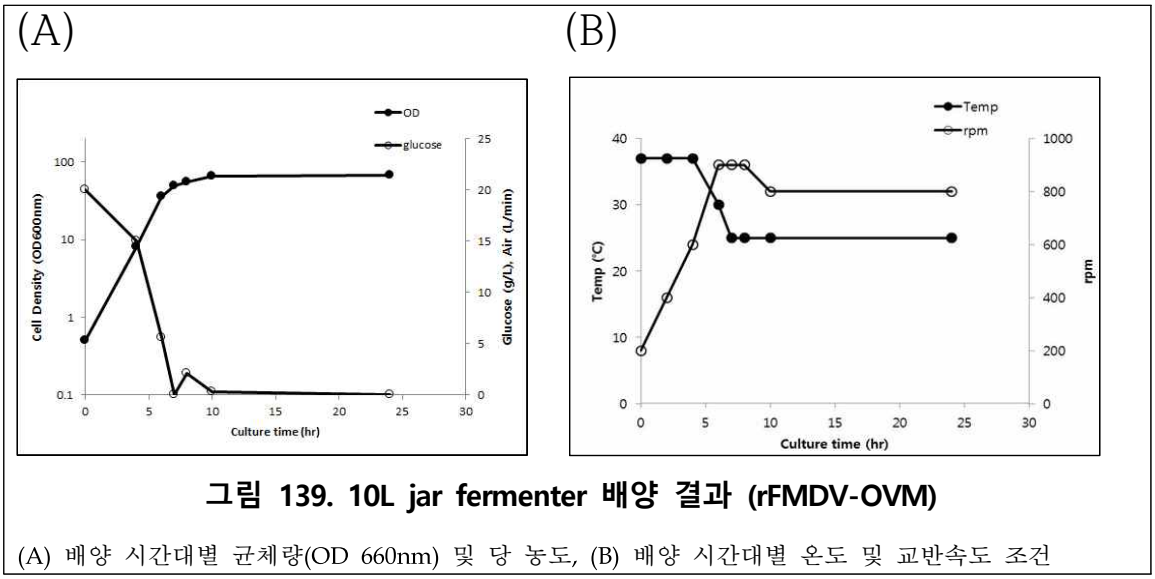


그림 139. 10L jar fermenter 배양 결과 (rFMDV-OVM)

(A) 배양 시간대별 균체량(OD 660nm) 및 당 농도, (B) 배양 시간대별 온도 및 교반속도 조건

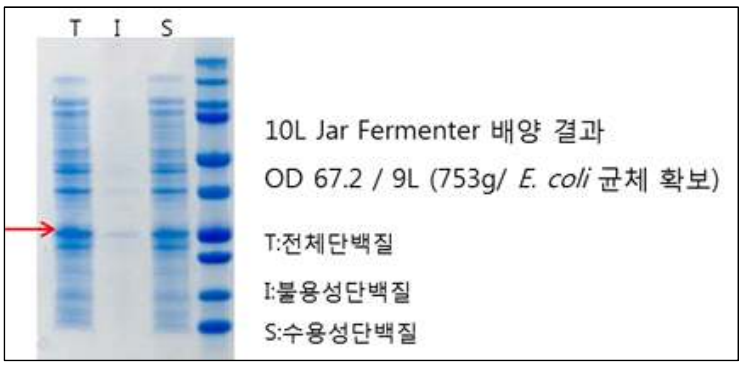


그림 140. 배양균체의 단백질 발현 확인 결과

◎ A type 항원; rFMDV-AVM/RIPL strain

○ 10L jar fermenter 수준에서 LB/Amp, 0.4mM IPTG, 37℃ 조건으로 배양한 결과 OD65.6 수준으로 9L가 배양되었으며, 배양액으로부터 748g의 균체를 확보할 수 있었음.

(A) (B)

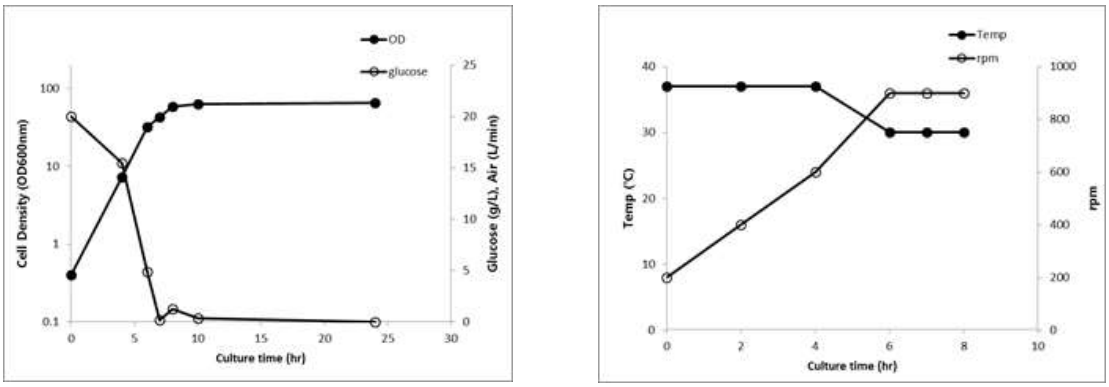


그림 141. 10L jar fermenter 배양 결과 (rFMDV-AVM)

(A) 배양 시간대별 균체량(OD 660nm) 및 당 농도, (B) 배양 시간대별 온도 및 교반속도 조건

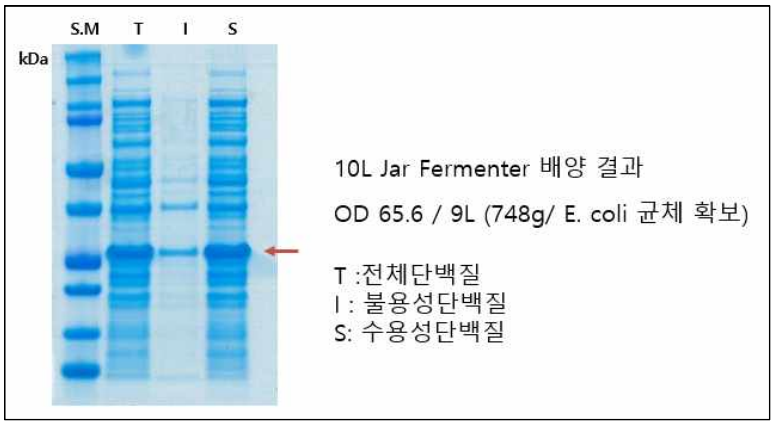


그림 142. 배양균체(rFMDV-AVM/RIPL)의 단백질 발현 확인 결과

③ 재조합 항원 10L 배양 수준에서의 정제 및 처리공정 확인

◎ 배양균체를 파쇄하고, 0.2㎛ 수준까지 단계 여과를 진행함. 니켈 친화 크로마토그래피 정제를 수행하여 발현단백질의 수율을 확인하였음.

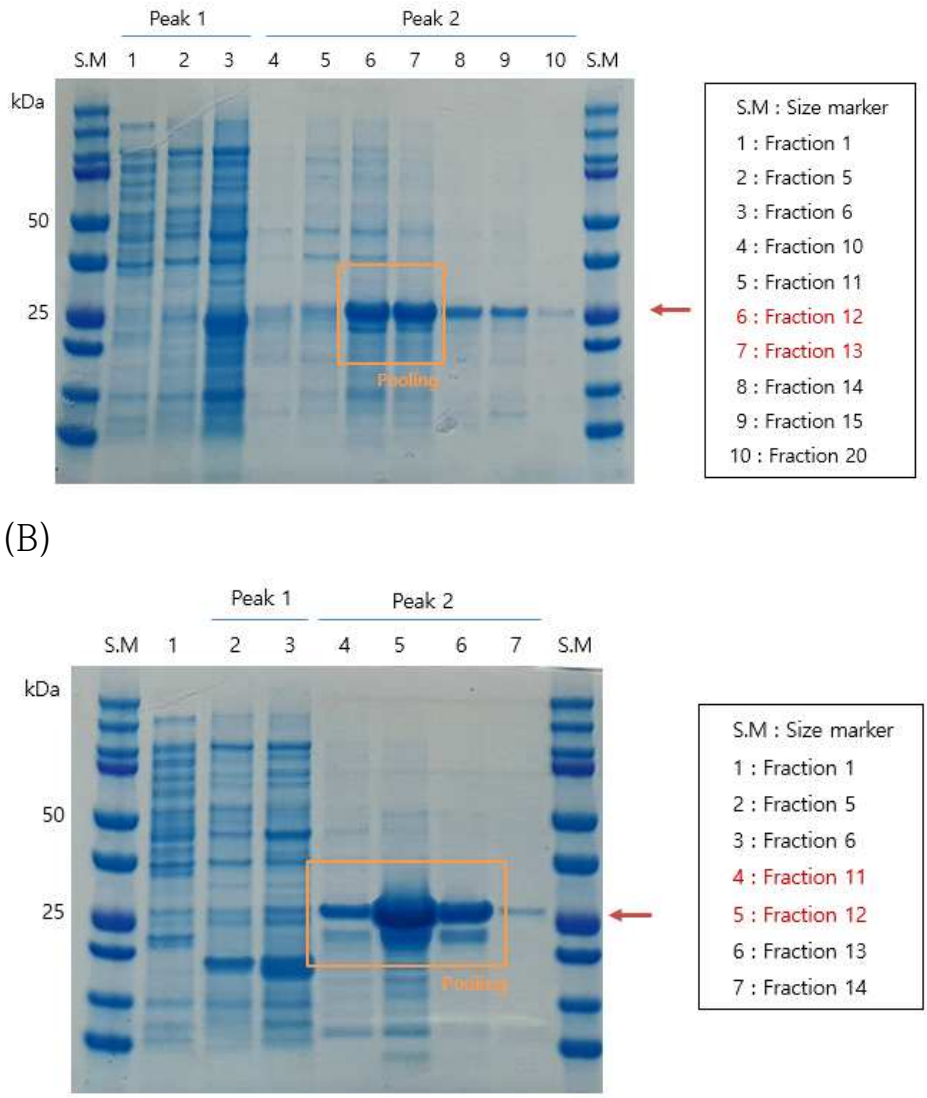


그림 143. 발현 단백질의 니켈 친화 크로마토그래피 정제 공정

(A) OVM 재조합 단백질의 정제 확인 (SDS-PAGE), (B) AVM 재조합 단백질의 정제 확인(SDS-PAGE)

◎ 10L jar fermenter 수준 배양에서 단백질 함량대비 OVM 단백질의 발현율은 약 10%가량으로 확인되었으며 10L 배양으로 753g (wet cell weight)의 균체를 확보하고, 생산수율을 확인해본 결과 **Table 1.**과 같이 10L 1회 배양시 2.289g의 정제단백질을 확보할 수 있었음.

◎ 10L jar fermenter 수준 배양에서 단백질 함량대비 AVM 단백질의 발현율은 약 10%가량으로 확인되었으며, 10L 배양으로 748g (wet cell weight)의 균체를 확보하고, 생산수율을 확인해본 결과 **Table 1.**과 같이 10L 1회 배양시 3.595g의 정제단백질을 확보할 수 있었음.

Table 1. 10L jar fermentor 수준에서의 생산수율 확인 결과

발현 단백질	단백질 함량	균체 1g당 수득량	10L 배양 시 총 단백질량	생산 가능 두수 (돼지)*
OVM	0.760 mg/ml	3.040 mg	2.289 g	9,156 두
AVM	0.801 mg/ml	4.806 mg	3.595 g	14,380 두

* 돼지 dose당 함량 (250ug/2ml/dose) 기준

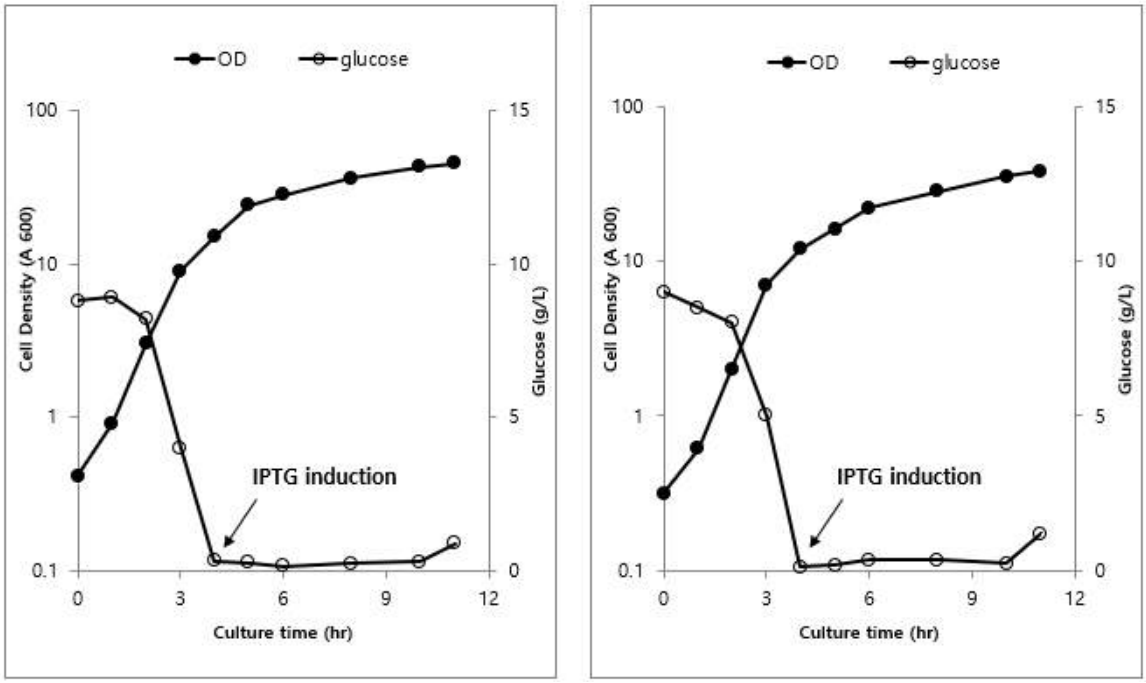
③ 200L fermenter에서의 배양 확인

◎ 항원단백질의 생산공정 스케일-업을 위해 300 L fermenter system을 사용하였음. 300 L fermenter에 200 L working volume으로 하여 균체 rFMDV-OVM/RIPL과 rFMDV-AVM/RIPL을 각각 약 200L씩 대량 배양하였음.

◎ 300L fermenter를 위한 1차 seed는 250 ml 플라스크 2개 각각에 10 ml의 LB 배지와 ampicillin를 첨가한 뒤 LB plate에서 자란 colony를 접종하여 37℃에서 5시간 배양하였음.

◎ 2차 seed는 1 L 플라스크 3개, 각 각에 100 ml의 LB 배지와 ampicillin을 첨가하여 37℃에서 3.5시간 배양하였음.

◎ 3차 seed는 70 L fermenter에 30 L의 LB 배지와 ampicillin을 첨가하여 37℃에서 17시간 배양한 뒤, 300 L fermenter에 200 L working volume으로 하여 접종량 10% (3차 seed, 20 L)를 접종 후 초기 포도당이 고갈되었을 때 유도물질인 IPTG를 첨가하여 발현을 유도하면서, 고농도의 포도당을 feeding media로 사용하였음. 배양 결과는 **그림**에 나타내었음.



(A) rFMDV-OVM 배양결과 (A600 및 당 농도)　　(B) rFMDV-AVM 배양결과 (A600 및 당 농도)

그림 144. 200L fermenter 배양 결과 (OVM/AVM)

◎ 200L fermenter 수준의 배양에서 단백질 함량대비 OVM 단백질 및 AVM 단백질의 발현율이 각각 약 10.5%, 11.2% 로 확인되었음.

Table 2. 항원단백질 OVM, AVM 생산결과

발현 단백질	OD(A600)	protein 농도	총 단백질량 (예상)
OVM	45.1	0.56 g/L	112.0 g
AVM	38.5	0.62 g/L	124.0 g

◎ 대량 생산 (200L scale) 진행을 통한 시제품 제작용 OVM 및 AVM 항원을 확보하였음.
1 batch 당 OVM 약 44.8 만 두분, AVM은 49.6 만 두분의 항원단백질을 생산가능한 균체를 확보하였음.

◎ 추후 단백질의 발현율을 높여 생산수율을 높이거나, 정제 수준에 따른 최적의 정제공정을 확립하는데 추가 연구가 필요할 것이라 생각됨.

(3) 구제역 재조합 백신의 제제화 및 평가

(가) 최종 백신 제형 완성 및 최적화

① 항원함량 설정시험

◎ 백신의 최종 항원 함량을 설정하는 시험을 진행하였음.

◎ 8주령의 돼지 8두를 준비하여 3두의 돼지에 AVM, OVM이 150㎍이 포함된 백신을 접종하고 다른 3두의 돼지에 AVM, OVM이 250㎍이 포함된 백신을 접종함. 남은 2두의 돼지는 무접종 대조군으로 둠. 1차 백신 접종 4주 후 2차 접종을 시행하며 2주 간격으로 채혈하여 혈청중화시험을 통해 중화항체역가를 측정하여 항체형성을 비교함.

◎ 혈청중화시험 결과 (OVM 항체역가)

Table 3. OVM 중화항체가 결과

구제역 O type 중화항체역가 (Log10, Positive>1.40)					
백신	개체번호	사전	1차 4주	2차 2주	2차 4주
TFMD1 (Ag 150μg)	1	<1.20	<1.20	1.65	1.95
	2	<1.20	<1.20	1.95	1.95
	3	<1.20	<1.20	1.81	1.81
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.80 ± 0.12	1.90 ± 0.07
TFMD2 (Ag 250μg)	1	<1.20	<1.20	2.56	2.11
	2	<1.20	1.34	2.71	2.26
	3	<1.20	1.34	1.81	2.41
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.23 ± 0.16	2.36 ± 0.39	2.26 ± 0.12
무접종 대조군	1	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	2	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

- AVM 항체역가

Table 4. AVM 중화항체가 결과

구제역 A type 중화항체역가 (Log10, Positive>1.60)					
백신	개체번호	사전	1차 4주	2차 2주	2차 4주
TFMD1 (Ag 150μg)	1	<1.20	1.34	2.26	1.95
	2	<1.20	1.51	2.41	1.81
	3	<1.20	<1.20	1.81	2.26
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.28 ± 0.21	2.16 ± 0.25	2.01 ± 0.19
TFMD2 (Ag 250μg)	1	<1.20	1.51	2.26	1.81
	2	<1.20	1.34	2.41	2.71
	3	<1.20	1.34	2.71	2.56
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.40 ± 0.08	2.46 ± 0.19	2.36 ± 0.39
무접종 대조군	1	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	2	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

◎ 시험결과 백신에 포함된 재조합단백질의 함량이 증가할수록 높은 항체가를 나타내며 함량에 관계없이 모두 양성으로 전환되는 것을 확인 하였음. 최종적으로 OVM과 AVM을 각각 1dose에 250㎍이 포함하도록 결정하였음.

② Adjuvant (백신보조제) 선정시험

◎ 목적동물에 적용하기에 앞서 백신에 사용될 Adjuvant를 선정하는 시험을 진행하였음. 시험에 사용된 시험백신은 동일한 함량의 재조합단백질 항원을 포함하고 있으며 각각의 Adjuvant에 따라 4종류로 제작하였음.

Table 5. 시험백신 그룹 내역

시험백신명	Adjuvant	항원함량	비고
TFMD1	CAvant®DOE 20%	AVM 250μg, OVM 250μg	-
TFMD2	CAvant®SOE-X 65%	AVM 250μg, OVM 250μg	-
TFMD3	CPNE-2 50%	AVM 250μg, OVM 250μg	-
TFMD4	ISA201 50%	AVM 250μg, OVM 250μg	-

◎ 구제역 O type과 A type에 대한 항체 음성인 8주령의 돼지를 20두 준비하여 4마리씩 5개의 그룹으로 나눈 뒤에 각각의 그룹에 시험백신을 접종함. 이때 남은 4두의 돼지는 무접종 대조군으로 함. 백신을 접종한 뒤 4주 후 2차 접종을 시행하였음. 이후 2주 간격으로 채혈하여 형성된 혈청 역가를 혈청중화시험을 통해 확인하였음.

◎ 혈청중화시험 결과 (OVM 항체역가)

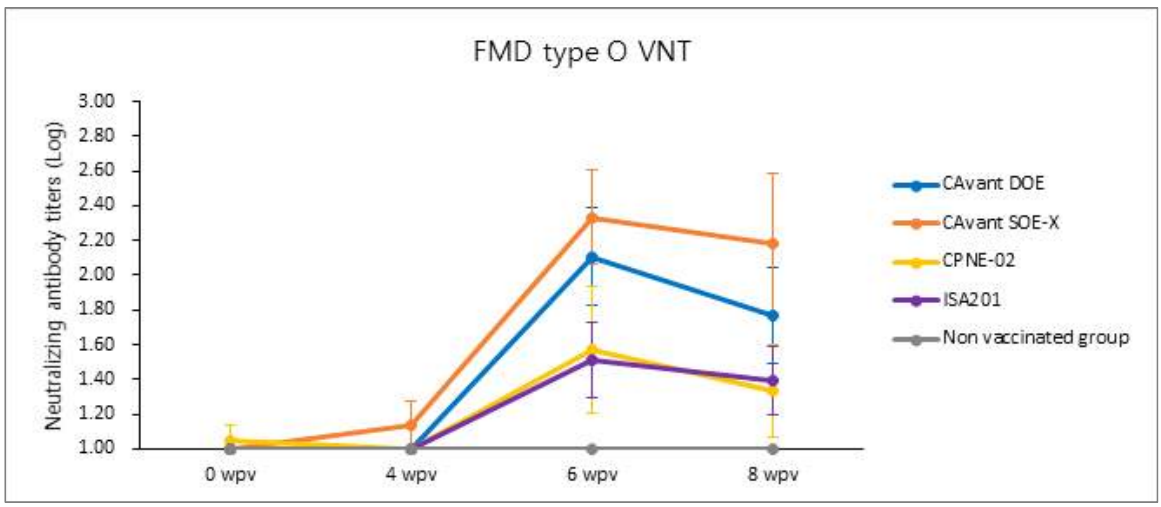


그림 145. OVM 중화항체가 결과

Table 6. OVM 중화항체가 결과

FMDV O type S/N test (Log10, Positive>1.40)					
접종백신	개체번호	접종일	1차 4주	2차 2주	2차 4주
TFMD1	1	<1.20	<1.20	2.11	2.11
	2	<1.20	<1.20	1.65	2.41
	3	<1.20	<1.20	2.41	1.81
	4	<1.20	<1.20	2.26	1.81
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.11 ± 0.28	2.04 ± 0.25
TFMD2	1	<1.20	1.34	2.41	1.95
	2	<1.20	<1.20	2.71	2.86
	3	<1.20	<1.20	2.26	1.81
	4	<1.20	1.2	1.95	2.11
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.14 ± 0.14	2.33 ± 0.27	2.18 ± 0.41
TFMD3	1	<1.20	<1.20	1.51	1,51
	2	<1.20	<1.20	1.95	1.65
	3	1.2	<1.20	1.51	1.95
	4	<1.20	<1.20	1.81	1.95
	Avg±SD	1.05 ± 0.09	1.0 ± 0.0	1.70 ± 0.19	1.85 ± 0.14
TFMD4	1	<1.20	<1.20	1.2	1.2
	2	<1.20	<1.20	1.81	2.11
	3	<1.20	<1.20	1.51	1.51
	4	<1.20	<1.20	1.51	1.81
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.51 ± 0.22	1.66 ± 0.34
무접종 대조군	1	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	2	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	3	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	4	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

- AVM 항체역가

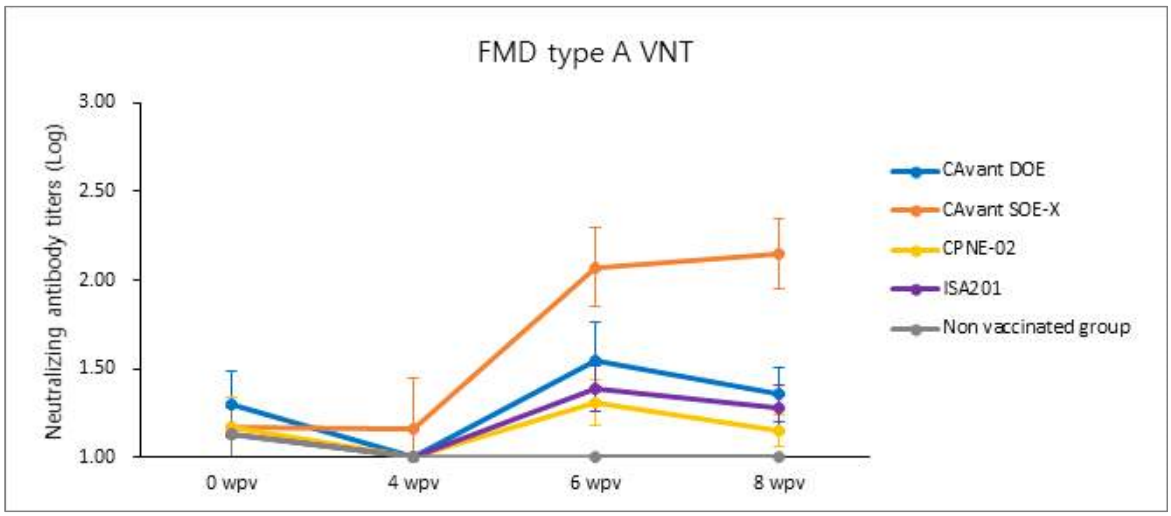


그림 146. AVM 중화항체가 결과

Table 7. AVM 중화항체가 결과

FMDV A type S/N (Log10, Positive>1.60)					
접종백신	개체번호	접종일	1차 4주	2차 2주	2차 4주
TFMD1	1	<1.20	<1.20	1.65	1.81
	2	<1.20	<1.20	1.51	1.81
	3	<1.20	<1.20	1.51	1.95
	4	<1.20	<1.20	1.81	2.11
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.62 ± 0.12	1.92 ± 0.12
TFMD2	1	<1.20	<1.20	2.41	2.26
	2	<1.20	<1.20	2.11	2.26
	3	<1.20	<1.20	1.95	2.26
	4	<1.20	1.65	1.81	1.81
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.16 ± 0.28	2.07 ± 0.22	2.15 ± 0.19
TFMD3	1	<1.20	<1.20	1.51	1.81
	2	<1.20	<1.20	1.2	1.65
	3	<1.20	<1.20	1.34	1.81
	4	<1.20	<1.20	1.2	1.95
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.31 ± 0.13	1.81 ± 0.11
TFMD4	1	<1.20	<1.20	1.34	1.81
	2	<1.20	<1.20	1.51	2.11
	3	<1.20	<1.20	1.2	1.81
	4	<1.20	<1.20	1.51	1.51
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.39 ± 0.13	1.81 ± 0.21
무접종 대조군	1	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	2	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	3	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	4	<1.20	<1.20	<1.20	<1.20
	Avg±SD	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

◎ 2차 백신접종 후 4주 뒤 채혈하여 혈청 역가를 측정한 결과 FMDV O type에 대한 중화항체역가는 75%의 양성을 보인 TFMD4 그룹을 제외한 나머지 그룹에서 100% 양성을 나타내었으며, FMDV A type에 대한 중화항체역가 또한 TFMD4 그룹에서 75%의 양성률 나타내고 나머지 그룹에서 100%의 양성을 확인하였음.

◎ 100%의 양성을 나타낸 3개의 그룹 중 평균 중화항체역가 수치가 가장 높게 형성된 TFMD2 그룹에 사용한 CAvant®SOE-X를 백신에 사용할 최종 adjuvant로 선정하였음.

(4) 구제역 재조합 백신의 시제품 제작 및 임상시험계획서 신청

(가) 구제역 재조합 백신 시제품 제작

◎ 시제품 제작: 임상시험용 구제역 재조합 시험백신 제조 (3 Lot.)

- 결정된 최종 제형을 대량생산 공정방법으로 3 Lot. 시제품((25두 분/병) * 50/Lot 수준)을 제작하였음.

Table 14. 구제역 재조합 백신의 임상시험용 시험백신 제조

Lot No.	항원함량	Adjuvant	접종 dose(돼지)	비고
T320FMDR01	OVM 250ug AVM 250ug	CAvant SOE-X, 65%	2ml/dose	1,250두분 (25두, 50병)
T320FMDR02	OVM 250ug AVM 250ug	CAvant SOE-X, 65%	2ml/dose	1,250두분 (25두, 50병)
T320FMDR03	OVM 250ug AVM 250ug	CAvant SOE-X, 65%	2ml/dose	1,250두분 (25두, 50병)

그림 147. 구제역 재조합 백신의 임상시험용 시험백신

(나) 3 Lot. 시험백신에 대한 품질평가

◎ 특성시험

- 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적 제제의 국가검정기준의 일반시험법에 따라 색, 혼탁도, 균일도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였음.
- 3 Lot의 시험백신 모두 백색의 유탁 주사액으로서 이물 및 이취가 없음을 확인하였음.

Table 15. 3 Lot 시험백신의 일반시험 결과

Lot No.	Tests				
	Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T320FMDR01	-*	-	-	-	-
T320FMDR02	-	-	-	-	-
T320FMDR03	-	-	-	-	-

* Normal or negative

◎ 수소이온농도시험

- 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법에 따라 시험

백신 각 Lot별로 백신의 수소이온농도를 측정하였음.

- 3 Lot의 시험백신 모두 수소이온농도가 pH 6.0~8.0 이내임을 확인하였음.

Table 16. 3 Lot 시험백신의 수소이온농도시험 결과

Lot No.	pH
T320FMDR01	7.5
T320FMDR02	7.4
T320FMDR03	7.6

◎ 무균시험

- 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준의 무균 시험법에 따라 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy borth (TSB), fluid thioglycollate medium (Thio) 에 접종하여 22℃와 32℃에서 14일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하였음.
- 3 Lot의 시험백신 모두에서 어떠한 세균발육도 관찰할 수 없었음.

Table 17. 3 Lot 시험백신의 무균시험 결과

Lot No.	22℃			32℃		
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio
T320FMDR01	-*	-	-	-	-	-
T320FMDR02	-	-	-	-	-	-
T320FMDR03	-	-	-	-	-	-

* Normal or negative

◎ 방부제정량시험

- 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준의 일반시험법에 따라서 포르말린 함량을 측정하였음.
- 3 Lot의 시험백신 모두 검사한 결과 포르말린 함량은 0.2% 이하임을 확인하였음.

Table 18. 3 Lot 시험백신의 방부제정량시험 결과

Lot No.	Formalin content
T320FMDR01	0.15%
T320FMDR02	0.16%
T320FMDR03	0.15%

◎ 안전성시험

- 생산된 시험백신 3 Lot에 대해 실험동물과 목적동물을 사용하여 안전시험을 실시하였음.
- 체중 15~20g의 마우스 8마리, 체중 300~350g의 기니픽 4마리, 8주령 이상 구제역 음성 돼지 2마리를 준비하여 Lot별로 마우스 8마리에는 복강으로 1㎖를 접종하고 7일간 관찰하며, 기니픽 4마리중 2마리에는 근육으로 4㎖를, 다른 2마리에는 복강으로 4㎖를 접종하고 7일간 관찰함. 목적동물인 돼지는 백신의 2두분을 근육접종하며 1~2시간 내에 과민반응이 없는지 관찰하고, 14일간 관찰함.
- 시험기간 동안 시험백신 3 Lot 모두 백신접종 후 이상 없이 생존하였음.

Table 19. 3 Lot 시험백신의 안전성시험 결과

Lot No.	Animals	No. of animals	Methods	Clinical signs (the No. of the abnormal / the No. of the tested)
T320FMDR01	Mouse	8	IP / 0.5 dose, 7days	0/8
	GP	2	IM / 2 dose, 7days	0/2
		2	IP / 2 dose, 7days	0/2
	Pig	2	IM / 2 dose, 14days	0/2
T320FMDR02	Mouse	8	IP / 0.5 dose, 7days	0/8
	GP	2	IM / 2 dose, 7days	0/2
		2	IP / 2 dose, 7days	0/2
	Pig	2	IM / 2 dose, 14days	0/2
T320FMDR03	Mouse	8	IP / 0.5 dose, 7days	0/8
	GP	2	IM / 2 dose, 7days	0/2
		2	IP / 2 dose, 7days	0/2
	Pig	2	IM / 2 dose, 14days	0/2

(다) 임상시험계획서 작성 및 신청

◎ 임상시험 진행 및 임상시험계획서 작성을 위한 전임상 자료를 확보하였음.

◎ 임상시험 진행을 위한 임상시험계획서를 작성하였고, 농림축산검역본부에 제출 및 접수를 완료하였음 (2021년 1월).

국민에게 사랑받는 세계적인 검역본부

농림축산식품부

농림축산검역본부

힘내라 대한민국

수신 (주)중앙백신연구소 귀하

(경유)

제목 **동물용의약품등 임상시험계획서 접수 확인 요청에 대한 회신**

1. 동물용의약품등 임상시험시험계획서 승인 신청 및 접수 확인 요청('21.2.5) 관련입니다.

2. 귀 사에서 확인 요청하신 사항에 대하여 아래와 같이 답변 드립니다.
   - 확인요청 사항 : 구제역 재조합단백질 백신(FMD-R) 임상시험계획서 접수 확인
   - 답변 내용 : 귀사에서 제출하신 **"구제역 재조합단백질 백신(FMD-R)"**의 임상시험계획서 승인 신청을 '21.2.5.(금)에 접수하였음을 알려 드립니다. 끝.

농림축산검역본부장 농림축산검역본부장인

주무관	박나래	수의사무관	권영진	동물약품관리과장	전결 2021.2.5. 김용상
협조자					
시행	동물약품관리과-2200 (2021. 2. 5.)			접수	

우 39660 경상북도 김천시 혁신8로 177 / http://www.qia.go.kr

전화번호 054-912-0542 팩스번호 054-912-0530 / paknale@korea.kr / 비공개(7)

1 - 1

그림148. ㈜중앙백신연구소 임상시험계획서 제출

주식회사 코 미 팜

우 429-450 경기도 시흥시 경제로 17(정왕동) /전화 (031) 498-6104 (158) /전송 (031) 498-6220 /담당: 김주헌

문서번호: 코미팜 제2021 - 002 호

시행일자: 2021. 01. 25

수 신: 농림축산검역본부

참 조: 동물약품관리과장

선결			지시		
접수	일자		결재		
	시간				
	번호		·		
처리과			공		
담당자			람		

제 목: 프로백™ 에프엠디백의 야외 임상시험 계획서 제출

1. 귀 본부의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 프로백™ 에프엠디백의 임상시험계획서를 붙임과 같이 제출하오니 조속히 검토하시어 승인하여 주시기 바랍니다.

붙임 : 프로백™ 에프엠디백의 임상시험계획서 3부.

경기도 시흥시 경제로 17
주식회사 코 미 팜
대표이사 문 성 철

그림149. ㈜코미팜 임상시험계획서 제출

4. 연구성과(해당되는 성과만 기재)

성과목표		사업화지표											연구기반지표								
		지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													5문		논문평균IF	학술발표					
		특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		10	30		40											10		10			
최종목표																					
1차연도	목표																				
	실적	2														7		4			
2차연도	목표	1											2			3		2			
	실적	1	2		1								3			13		2			
3차연도	목표	2	1		2								3			3		2			
	실적				2								2			5		1			
소계	**목표**	3	1		2								5			6		4			
	실적	3	2		3								5			25		7			
종료 1차연도			1		1		1														
종료 2차연도			1				1														
종료 3차연도																					
소 계																					
합 계		3	3		3		2						5			6		4			

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	SHP Controls the Virus-Mediated Antiviral Immune Response by Targeting CBP in the Nucleus	Cell Reports (IF: 7.81)	이종수	27			SCI	2019. 5.14	
2	Anti-Respiratory Syncytial Virus Activity of Plantago asiatica and Clerodendrum trichotomum Extracts In Vitro and In Vivo	Viruses (IF: 3.81)	이종수	11			SCIE	2019. 7.3	
3	Fas-associated factor 1 Mediates NADPH Oxidase-Induced Reactive Oxygen Species Production and Proinflammatory Responses in Macrophages against Listeria Infection	PLOS Pathogens (IF: 6.15)	이종수	14			SCIE	2019. 8.14	
4	Negative regulation of NEMO signaling by the ubiquitin E3 ligase MARCH2	EMBO JOURNAL (11.22)	이종수	39			SCI	2020. 9.16	
5	Foot-and-mouth disease virus VP1 target the MAVS to inhibit type-I interferon signaling and VP1 E83K mutation results in virus attenuation	PLOS Pathogens (IF: 6.15)	이종수	16			SCIE	2020. 11.24	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	KMB 2018 (3편 poster)	이종수외	2018.6.27-29	여수 EXPO	대한민국
2	2018 제13차 대한백신학회 (Oral presentation)	이종수외	2018.9.28	카톨릭대학교	대한민국
3	Cytokine 2018 (3편 poster)	이종수외	2018.10.27-30	보스턴	미국
4	KMB 2019 (Poster 6편)	이종수외	2019.06.24	제주	대한민국
5	2019 대한바이러스학회 (Oral presentation)	이종수외	2019.08.24	양양	대한민국
6	APVS 2019 (Poster 3편)	이종수외	2019.08.26	서울	대한민국
7	13th Vaccine Congress (Poster 3편)	이종수외	2019-09-16	방콕	태국
8	IUMS 2020 (Poster 5편, Oral presentation 1편)	이종수외	2020-11-16	대전	대한민국

다. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	구제역 바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도 (A type FMDV 항원단백질용)	대한민국	농림축산검역본부, 충남대학교	2018.06.14	10-2018-0067913	농림축산검역본부, 충남대학교	2019.04.30	10-1975895	40%
2	구제역의 가용 다가항원 제조 및 이를 이용한 구제역 백신 (Asia type FMDV 항원단백질용)	대한민국	농림축산검역본부, 충남대학교	2018.06.14	10-2018-0067917	농림축산검역본부, 충남대학교	2019.06.04	10-1987775	40%
3	트립토파닐-tRNA합성효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이의 용도	PCT	충남대학교	2018.09.07	PCT/KR2018/010461				
4	Vesatolimod를 함유하는 조성물의 백신보조제로서의 활용	대한민국	충남대학교, 한국화학연구원	2019.11.08	10-2019-0141604				

라. 전문연구 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
	수의예방학 인력양성	2018		2			O			O			
	수의예방학 인력양성	2019	2	2			O			O			
	수의예방학 인력양성	2020		1			O			O			

마. 기술거래(이전) 등

8	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	특허기술이전	“구제역 바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도” 국내등록특허 제 10-1975895호	㈜코미팜	2019년 10월 25일	10,000,000원	
2	특허기술이전	“구제역 바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도” 국내등록특허 제 10-1975895호	㈜중앙백신 연구소	20120년 4월 3일	10,000,000원	
3	특허기술이전	“구제역 바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도” 국내등록특허 제 10-1919002호	㈜중앙백신 연구소	20120년 4월 3일	10,000,000원	

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

연구개발의 최종목표
▣ 광범위 항원성을 지니는 구제역 O형 고효율 재조합 백신 개발 ▣ 광범위 항원성을 지니는 구제역 A형 고효율 재조합 백신 개발 ▣ 신규 면역증강제 선발 및 효능 검증 ▣ 신규 면역증강제를 포함하는 구제역 O, A형 고효율 재조합 백신 효능평가 ▣ 개발된 재조합 구제역 백신의 대량 생산시스템 연구 ▣ 재조합 구제역 백신의 임상시험 계획서 제출

3-2. 목표 달성여부

연구목표	달성도	달성한 연구내용
◉ 구제역 O형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가	100%	◎ 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼기술의 확립을 통해 O형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고, 실험동물에서의 면역원성과 FMDV 방어효능을 검증하였음.
◉ 구제역 A형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가	100%	◎ 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼기술의 확립을 통해 A형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고, 실험동물에서의 면역원성과 FMDV 방어효능을 검증하였음.
◉ 신규 면역증강제의 확보 및 실험동물을 통한 효능 검증	100%	◎ 신규의 분자면역증강제를 확보하였으며 이를 이용하여 O형과 A형 재조합 혼합백신의 면역원성 및 방어의 증가 효능을 검증하였음.
◉ 신규 면역증강제가 포함된 O형과 A형 혼합 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물 효능평가	100%	◎ 신규 면역증강제가 포함된 최종 면역보좌제(Adjuvant)을 포함하는 O형과 A형 혼합 재조합 백신의 면역원성을 실험동물(마우스)와 목적동물(돼지, 소)에서 검증하였으며, FMDV에 대한 방어효능을 실험동물과 목적동물(돼지)에서 검증하였음.
◉ 개발 재조합 백신의 대량 배양 평가 및 임상시험 계획서 제출	80%	◎ 대장균의 세포질에서 가용성으로 발현할 수 있는 발현시스템을 이용하여 대장균의 대량배양 조건등을 확립하였고, 이를 이용하여 구제역 백신의 시제품을 제작하여 평가를 수행하였음. 그러나 대량 생산시스템의 고도화를 위한 정제공정 확립은 연구가 더 필요함. ◎ 재조합 구제역 백신에 대한 임상시험 계획서는 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소 각각의 회사에서 제출하였고, 향후 임상시험계획서 승인, 야외 임상시험 실시 및 제조와 판매 승인을 위한 품목허가서류는 신청할 계획임.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

(1) 재조합 구제역항원의 대량 생산시스템 구축

① 목표 미달성 사유

◉ 재조합 항원의 대량 생산 공정을 연구하는 과정에서 대량배양 조건의 확립과 더불어 FPLC 등을 활용한 고순도 항원 정제를 목표로 대량의 항원을 정제함에 있어 각각의 생산 및 정제공정을 최적화하는데 시간적인 고려가 필요하였음.

② 차후 대책

◉ 기술이전을 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소에 한 만큼, 지속적인 연구로 재조합 항원의 대량 생산시스템을 구축할 예정임. 즉, 재조합 항원의 정제 수준을 낮춰 항원 발현 시스템의 특성을 최대한 살리고, 항원 제조 단가를 낮춰 백신의 생산 효율을 높이고자 함.

◉ 이를 위해 후속 연구를 수행 중에 있으며, 백신의 효력과 항원 정제 수준 및 함량과의 상관관계를 정확히 규명하여, 추후 제품화될 백신에 적용코자 함.

◉ 향후 상업화를 위한 재조합 항원의 효율 및 안정성 위해 심층적인 연구(재조합 항원 대량생산 공정 및 재조합 항원의 안정성연구)를 수행하여 상품화 목표를 위해 노력할 예정임.

◉ 즉, 재조합 항원의 대량생산을 위한 정제시스템 구축에 있어 대장균의 원심, 세척, 파쇄 및 다양한 membrane을 이용한 filtration, ultrafiltration등의 단계들에 대해 향후 고도화 연구를 수행하여 대장균의 LPS를 제거함과 동시에 경제적인 수준의 재조합 항원 수율을 높이는 노력을 할 예정임.

(2) 후속연구의 필요성

◉ 현재 실험실 scale에서 제조된 재조합항원을 이용하여 시제품을 만들었고, 이를 이용한 실험을 기초로 임상시험 계획서를 제출한 상태로 재조합 구제역 백신이 본격적인 제품화 단계에 돌입하였다고 생각이 되지만, 임상시험 계획서의 의견에 따라 향후의 과정 즉, 임상시험 계획서 승인, 야외 임상시험, 시험백신의 장기보존성 평가, 품목허가서류 제출 등등이 필요한 상황임.

◉ 따라서, 임상시험 계획서이후의 과정을 성공적이고 원활하게 추진하기 위해서는 후속의 대량생산 공정 확립을 포함하는 제품화연구가 필수적이라 사료되며, 야외 임상시험의 성공적인 수행을 위해서는 재조합 구제역백신의 효능 고도화 연구가 지속적으로 이루어져야 한다 사료됨.

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

가. 연구개발결과의 활용방안

◉ 현재 상용화되어 있는 불활화구제역 백신의 단점 부분을 보완해 줄 수 있는 새로운 형태의 차세대 재조합 구제역백신으로 대체가 가능한 기술력을 제공.
◉ 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 백신 플랫폼 기술 개발로 우리나라 실정 및 상황에 맞는 구제역 백신 제품화에 활용
◉ 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 백신항원 발현율 달성 기술의 확립으로 다른 동물질병에 대한 백신기술로의 활용
◉ 구제역 재조합 백신 개발 기술의 동물약품회사 기술이전을 통한 재조합 구제역 백신의 제조 및 판매등 제품화에 활용
◉ 국내 동물 백신 산업 시장으로의 확대 및 동물백신의 해외 수출로의 활용
◉ 특허등록을 통한 지적재산권 확보
◉ 국제저명학술지 논문발표를 통한 개발 원천기술의 우수성 활용

나. 연구개발결과의 기대성과

◉ 기술적 측면
◎ 대장균 가용성 단백질 발현 시스템 기술 활용을 통해 다른 동물 질병의 백신 개발이 가능한 기반기술(platform technology)를 확보
◎ 본 연구에 의해 제작된 항원 혹은 재조합백신의 개발은 현재 불활화백신이 갖고 있는 기술적 단점을 보완할 수 있을 것으로 기대
◎ 앞으로 있을 수 있는 구제역의 국가적 대유행 상황에 대한 억제력 및 백신주권 확보
◎ 효과적인 동물 질병 억제를 위한 백신 향상 기반기술의 확보
◎ 구제역 백신개발을 위한 안전하고 경제적이며 효과적인 재조합백신 생산시스템 확보
◎ 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 백신항원 발현율 달성 기술 구축
◎ 백신 제품 개발을 위한 다양한 유래의 항원 단백질 분리 정제 기술 구축
◎ 목적동물에 병원성이 없고, 안전하게 생산이 가능한 항원발현 시스템 구축
◎ 기존 백신항원 발현 시스템과 차별화된 차세대 구제역 백신 생산을 위한 원천기술 확보
◎ 구제역에 대한 신속 방어 및 지속면역 유도 가능 백신 후보물질 확보
◎ 단기간 내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 개발
◎ 신 변종 바이러스 출현에 따른 백신 개발에 신속하게 적용 가능한 기술적 확보
◎ 본 기술들은 구제역을 비롯한 축산에의 적용이외에 궁극적으로 인간의 다양한 질병을 예방하기 위해 활용될 수 있는 기술임.

◉ 경제적·산업적 측면
◎ 현재 전량 수입에 의존하고 있는 구제역백신에 대한 수입대체가 가능하여 백신 자주권을 확보할 수 있음.

◎ 자체 구제역 백신 생산 및 제품화에 따른 수입 대체효과 및 그에 따른 제반 비용을 감소시켜 기업의 이윤 창출

◎ 이러한 구제역백신 개발을 위한 연구 개발은 구제역의 발생을 예방하고 구제역의 확산을 신속하게 차단하게 함으로서 가축의 손실뿐 아니라 구제역 확산을 막기 위한 막대한 인원과 장비의 소요를 줄이고, 매몰보상비를 포함한 경제적 산업적 손실을 줄여 줄 수 있을 것으로 기대됨.

◎ 수입백신보다 가격경쟁력이 있는 백신을 공급함으로써 축산농가의 비용부담을 경감시킬 수 있음.

◎ 본 연구의 발현시스템 개발은 구제역뿐만 아니라 다른 수의학적 질병 원인체에 대해서 그 범위를 확대 적용이 가능하여 그 활용가치가 높을 것으로 기대됨.

◎ 본 연구개발로 새로운 구제역백신의 개발은 백신의 수입대체 효과 및 국내 고유의 기술 적용을 통하여 국제 시장에 기술 이전 및 해외수출을 통한 국부창출이라는 이중 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대됨.

◎ 비숙련자가 직접 실시간으로 바이오 리스크를 모니터링하고 관제기관과의 정보를 공유함으로서 감염성 질환이 발생 시 빠른 대처와 처방이 가능함으로서 이에 따른 경제적인 손실을 최소

붙임. 참고문헌

1. Yimei Cao, Zengjun Lu, Yanli Li, Pu Sun, Dong Li, Pinghua Li, Xingwen Bai, Yuanfang Fu, Huifang Bao, Chunxue Zhou, Baoxia Xie, Yingli Chen, Zaixin Liu. Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs. Antiviral Research (2013) 97.

2. Dandan Zhang, Hongmei Li, Zhongsheng Zhang, Shuhong Sun, Ziqiang Cheng, Jianzhu Liu, Peng Zhao, Qingya Ren, Huijun Guo. Antibody responses induced by recombinant ALV-A gp85 protein vaccine combining with CpG-ODN adjuvant in breeder hens and the protection for their offspring against early infection. Antiviral Research (2015) 116.

3. Yan-mei Dong, Guo-guang Zhang, Xiao-jun Huang, Liang Chen, Hao-tai Chen. Promising MS2 mediated virus-like particle vaccine against foot-and-mouth disease. Antiviral Research. (2015) 117 11;43.

4. Yu-Ching Sua, Kiew-Lian Wana, Rahmah Mohameda, Sheila Nathana. Immunization with the recombinant Burkholderia pseudomallei outer membrane protein Omp85 induces protective immunity in mice. Vaccine (2010) 28 11;5011.

5. Meng-Shiou Lee, You-Cheng Hseu, Guan-Hua Lai, Wen-Te Chang, Hsi-Jien Chen, Chi-Hung Huang, Meng-Shiunn Lee, Min-Ying Wang, Jung-Yie Kao, Bang-Jau You, Wen-Hsin Lin, Yi-Yang Lien and Ming-Kuem Lin. High yield expression in a recombinant E. coli of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development. Microbial Cell Factories. (2011) 10:56.

6. Kyoung Ok Jang, Jong-Hwa Park, Hyun Ho Lee, Dae Kyun Chung, Wonyong Kim, In Sik Chung. Expression and immunogenic analysis of recombinant polypeptides derived from capsid protein VP1 for developing subunit vaccine material against hepatitis A virus. Protein Expression and Purification. 100 (2014).

7. Verdaguer N, Mateu MG, Andreu D, Giralt E, Domingo E, Fita I. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. EMBO J (1995) 14:1690-6.

8. B. Mohana Subramanian, M. Madhanmohan, Rajan Sriraman, R.V. Chandrasekhar Reddy, S.Yuvaraj, Kankipati Manikumar, S. Rajalakshmi, S.B. Nagendrakumar, Samir Kumar Rana, V.A.Srinivasan. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. Antiviral Research. 96

(2012) 288-295.

9. Yimei Cao, Zengjun Lu, Pu Sun, Yuanfang Fu, Feipeng Tian, Xiaofang Hao, Huifang Bao, Xiangtao Liu, Zaixin LiuA. Pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of foot-and-mouth disease virus and a T-cell immunogen shows enhanced immunogenicity in mice. Virology Journal (2011) 8:77.

10. S.A. Bhat, P. Saravanan, M. Hosamani, S.H. Basagoudanavar, B.P. Sreenivasa, R.P. Tamilselvan, R. Venkataramanan. Novel immunogenic baculovirus expressed virus-like particles of foot-and-mouth disease (FMD) virus protect guinea pigs against challenge. Research in Veterinary Science 95 (2013) 1217-1223.

11. Kumar R, Hosamani M, Sreenivasa BP, Kotyal A, Venkataramanan R. Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural Protein, 3D in Insect Cells and its Application in Detection of Anti-FMDV Antibodies. Indian J Virol. (2012) 23(3):326-32.

12. Takeuchi, O. Akira, S. Pattern Recognition Receptor and Inflammation and Inflammation. (2010) Cell. 140(6):805-820.

13. Lee, T. H. Song, H. J. Park, C. S. Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma. (2014) Asia Pac Allergy. 4(4): 187-196.

14. Denis Gerlier, Douglas S. Lyles. Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: toward a rational model. (2011) Microbiology and Molecular Biology Reviews. 75(3): 468-490.

15. Lei, X. Xiao, X. Wang, J. Innate immunity evasion by Enteroviruses: insight into virus-host interaction. (2016) Viruses. 8(1): 10.3390/v8010022

16. Grubman, M. J. Moraes, M. P. Diaz-San Segundo, F. Pena, L. de los Santos, T. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. (2008) FEMS Immunol Med Microbiol. 53(1): 8-17.

17. Whitton, J. L. Cornell, C. T. Feuer, R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. (2005) Nat Rev Microbiol. 3(10): 765-776.

18. Gao, Y. Sun, S. Q. Guo, H. C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. (2016) Virol J. 13:107.

19. V. Quattrocchi, P. Molinari, C. Langellotti, V. Gnazzo, O. Taboga, P. Zamorano.

Co-inoculation of baculovirus and FMDV vaccine in mice, elicits very early protection against foot and mouth disease virus without interfering with long lasting immunity. Vaccine 31 (2013).

20. 농림축산검역본부 용역연구사업 “바이러스 벡터 및 재조합 기술 이용 구제역 백신 개발” 2015년 보고서.

21. 농림식품기술개발사업의 가축질병대응기술개발사업 “구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증” 2018년 최종보고서.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문) Evaluation of recombinant FMDV vaccine efficacy and development of large scale production system</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">충남대학교</td><td rowspan="2">주 관 연 구 책 임 자</td><td colspan="2">(소속) 충남대학교</td></tr>
<tr><td rowspan="2">참 여 기 업</td><td colspan="2">(주)코미팜</td><td colspan="2">(성명) 이종수</td></tr>
<tr><td colspan="2">㈜중앙백신연구소</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비
(880,000천원)</td><td>계</td><td>880,000 천원</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31
(2년 9개월)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>660,000 천원</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>41</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>220,000 천원</td><td>내부인원</td><td>19</td></tr>
<tr><td>연구기관
부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td>22</td></tr>
</table>

◉ 연구개발 목표 및 성과

◎ 본 연구개발의 목표는 광범위 항원성을 지니는 구제역 O형과 A형의 고효율 재조합 백신 개발과,

◎ 신규 면역증강제를 포함하는 구제역 O형과 A형 재조합 혼합백신의 실험동물/목적동물 효능평가,

◎ 그리고 재조합 구제역 백신의 시제품 제작 및 임상시험 계획서 제출을 목표로 연구하였음.

◎ 연구의 성과로는 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼기술의 확립을 통해 O형과 A형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고,

◎ 신규의 분자면역증강제 단백질 역시 선별/발현/정제하였으며,

◎ 신규의 면역증강제가 포함된 O형과 A형 재조합 혼합항원에 대한 면역원성 효능 검증을 실험동물(마우스)과 목적동물(돼지, 소)에서 검증하였고, 구제역바이러스에 대한 방어 효능(중화항체 형성능)을 검증하여 O형과 A형 재조합 혼합항원 백신에 대한 임상시험 계획서를 제출하였음.

◎ 또한, 재조합 항원의 대량생산 및 시제품을 제작하여 시제품의 효능과 안정성등을 확인하였음.

◎ 본 연구의 성과물로는 SCI급 저널 5편, 국제학술발표 25건 그리고 특허출원 3건 및 특허등록 2건의 결과를 얻었으며, 본 과제를 통한 인력양성의 결과로 박사 2명, 석사 5명의 인재를 양성하였음.

◎ 본 연구에 의해 개발된 기술인 “구제역바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도”에 관한 등록특허는 산업화를 위해 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소과 기술이전계약 3건을 체결하였음.

◉ 연구내용 및 결과

가. 구제역 O형과 A형 재조합 항원 개발 및 실험동물/목적동물 효능 검증 연구

1. O serotype용 Multi-VP1 epitope (O-Jin/O-An/O-Man; OVM) 항원을 이용한 재조합항원 개발
2. A serotype용 Multi-VP1 epitope (A/Poch-A/Mal-A/Iraq; AVM) 항원을 이용한 재조합항원 개발 및 마우스 면역원성과 FMDV 방어 효능 검증
3. O serotype용 OVM 항원과 A serotype용 AVM 항원 혼합접종을 통한 실험동물 면역원성 효능 검증 및 FMDV 방어 효능 검증
4. OVM 항원과 AVM 혼합항원의 마우스 PD50 결정실험

5. OVM 항원과 AVM 항원 및 이들 각각에 대한 산업형(crude) 항원들의 혼합항원 접종에 대한 마우스 지속 면역원성 검증
6. OVM 항원과 AVM 혼합항원의 목적동물(돼지) 면역원성 검증
7. 분자면역증강제인 porcine WRS 항원과 porcine WRS 융합단백질인 pWRS-K88 개발 및 실험동물 면역증강 효능과 FMDV 방어 효능 검증
8. 분자면역증강제 함유 OVM 항원과 AVM 혼합항원의 목적동물(돼지) 면역원성 검증
9. 천연물 면역증강제인 W314의 선별 및 실험동물 면역증강 효능과 FMDV 방어 효능 검증
10. 천연물 면역증강제인 W314의 면역증강 기전 검증
11. 최종 면역보좌제(adjuvant)을 포함하는 구제역 0형과 A형 혼합항원에 대한 실험동물 면역증강 효능과 FMDV 방어 효능 검증
12. 최종 면역보좌제(adjuvant)을 포함하는 구제역 0형과 A형 혼합항원에 대한 실험동물 지속면역원성 평가 검증
13. 최종 면역보좌제(adjuvant)을 포함하는 구제역 0형과 A형 혼합항원에 대한 목적동물(돼지) 면역원성 효능 검증 (접종양, 접종횟수, 접종간격 비교실험)
14. 최종 면역보좌제(adjuvant)을 포함하는 구제역 0형과 A형 혼합항원의 O형 FMDV에 대한 목적동물(돼지) PD50 평가
15. 최종 면역보좌제(adjuvant)을 포함하는 구제역 0형과 A형 혼합항원의 A형 FMDV에 대한 목적동물(돼지) PD50 평가
16. 최종 면역보좌제(adjuvant)을 포함하는 구제역 0형과 A형 혼합항원에 대한 목적동물(소) 면역원성 효능 검증
17. 구제역 0형 topotype 항원뱅크 구축을 위한 항원제작 및 발현 (5가 5OVM-CHA 항원, 5가 5OVM-TAI 항원, 1가 O-Jincheon, 1가 O-Andong, 1가 O1 Manisa, 1가 Panasia-2, 1가 O-TAI/Ban/60)
18. 구제역 A형 topotype 항원뱅크 구축을 위한 항원제작 및 발현 (3가 Iraq22/Malay97/Pocheon/YC-SKR2017 항원, 1가 Iraq22, 1가 Malay97, 1가 Pocheon, 1가 YC-SKR2017)

나. 구제역 O형과 A형 재조합 항원의 대량배양/정제 및 시제품제작 평가

1. 재조합 항원 10L 배양 수준에서의 정제 및 처리공정 확인
2. 재조합 항원들의 대량 배양조건 확립
3. 백신 제제화를 위한 백신보좌제(Adjuvant) 탐색 및 선별
4. 최종 백신 제형 완성 및 최적화
5. 구제역 백신 시제품 제작
6. 3 Lot. 시험백신에 대한 품질평가
7. 재조합 구제역 백신의 임상시험 계획서 작성 및 제출

◉ 연구성과 활용실적 및 계획

◎ 본 연구의 결과인, 실험동물과 목적동물에서 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원에 대한 면역원성과 방어면역 효능을 확인하여 재조합 구제역 백신의 임상시험 계획서를 농림축산검역본부에 제출된 상태로 향후 재조합 구제역 백신의 임상시험계획서 승인, 재조합 구제역 백신의 야외 임상시험 실시 및 재조합 구제역 백신의 제조 및 판매 승인을 위한 품목허가서류를 신청할 계획임.

◎ 본 연구에 의해 개발된 기술인 “구제역바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도”에 관한 특허는 산업화를 촉진하기 위해 통산실시권으로 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소에 기술이전계약을 체결하였고, 향후 다른 동물약품회사과도 기술이전계약을 체결할 예정임. 또한, 현재의 기술이전계약에 대한 기술은 O serotype용과 A serotype용에 대한 구제역 항원단백질에 대한 기술적 내용으로 향후 Asia serotype용 구제역 항원단백질에 대한 기술이전계약을 체결할 예정임.

◎ 본 연구와 관련된 결과물들로 SCI급 저널 5편에 게재가 되었으며, 국내외의 국제학술대회에서 25건이 발표되었고, 특허출원 3건 및 특허등록 2건의 결과를 얻었으며, 본 과제를 통해 구제역 재조합 백신에 대해 전문적인 지식을 가진 박사 2명과 석사 5명의 인력을 배출하였음.

◎ 연구자들은 본 과제의 연구를 지속적으로 수행하여 안전하게 생산이 가능한 재조합 구제역 백신 생산 기술 확보, 단기간내 방어항원 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 확보, 구제역에 대한 신속 방어가 가능한 백신 후보물질을 고도화하고 산업화하기 위해 지속적으로 연구할 계획임.

◎ 이러한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 및 백신은 국내 동물 백신 산업 시장 확대 및 수출의 가능성을 증대시킬 수 있으며, 구제역 국가적 대유행 상황에 대한 억제력 및 백신 자주권 확보 역시 기대할 수 있음.

◎ 또한, 본 과제에 의해 구축된 안전하고 효과적인 재조합 항원발현 시스템을 이용한 다른 동물용 혹은 사람용 백신 제품 개발에 활용이 기대됨.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호			318039-3	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사 업 명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	**구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축**			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	충남대학교			연구책임자	이종수
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018. 04. 26 - 2018. 12. 31	180,000천원	60,000천원	240,000천원
	2차연도	2019. 01. 01 - 2019. 12. 31	240,000천원	80,000천원	320,000천원
	3차연도	2020. 01. 01 - 2020. 12. 31	240,000천원	80,000천원	320,000천원
	4차연도				
	5차연도				
	계		660,000천원	220,000천원	880,000천원
참여기업	㈜코미팜, ㈜중앙백신연구소				
상 대 국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020년 12월 31일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충남대학교	교수	이종수

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.

확 약	이 종수

Ⅰ. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

◉ O형과 A형 구제역 바이러스에 대해 중화항체를 유도할 수 있는 재조합 항원을 개발 ◉ 단기간내 구제역에 대한 방어항원 교체가 가능한 재조합 백신제작 플랫폼 기술 확보 ◉ 기존의 불활화백신과는 다르게 안전하게 생산이 가능한 재조합 구제역 백신 생산 플랫폼기술 확보 ◉ 신규 분자면역증강제의 확보 및 효능검증

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

◉ 향후 있을지 모를 신변종 구제역바이러스에 대한 국가적 대유행 상황시, 신속하게 대응할 수 있는 긴급백신으로서 구제역 재조합 백신의 사용가능성 ◉ 전량 수입에 의존하는 구제역 백신 상황에 있어 자체적으로 생산할 수 있는 재조합 구제역백신 보유로 자주권의 확보 효과 ◉ 신규 분자면역증강제의 고도화에 의한 구제역이외 다른 동물용 백신의 백신보조제로 활용 가능 ◉ 본 과제에 의해 구축된 안전하고 효과적인 재조합 항원발현 플랫폼 기술을 이용한 다른 동물용 혹은 사람용 백신 제품 개발 이용 파급효과

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

◉ 구제역 바이러스에 대해 중화항체를 유도할 수 있고, 단기간내 방어항원 교체가 가능하며, 안전하게 생산할 수 있는 구제역에 대해 신속 방어가 가능한 재조합 구제역 백신으로 활용가능 ◉ 유전적, 혈청학적 변이가 많은 구제역바이러스의 국내 유입에 대응하여 신속하게 대응할 수 있는 긴급 구제역백신으로의 활용가능 ◉ 신규 분자면역증강제의 고도화에 의한 구제역이외 다른 동물용 백시의 백신보조제로 활용 가능 ◉ 재조합 항원발현 플랫폼 기술 및 재조합 항원발현의 대량생산 시스템 구축으로 인한 다른 동물용 혹은 사람용 백신 제품 개발에 활용가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

◉ 본 과제의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 협동기관들간의 상호협력 체계를 구축하였고, 연구를 수행함에 있어서 특히, 목적동물 (돼지, 소)실험의 수행과 재조합 항원의 발현/정제 과정에 대해 수시로 연락을 취하여 연구의 성공을 위해 성실하게 연구를 수행하였음 ◉ 성실하게 서로 협력하며 연구개발을 수행함으로서 과제목표로 했던 연구성과 이상의 성과를 창출하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, <u>우수</u>, 보통, 미흡, 불량)

◉ 본 연구와 관련된 성과물들은 SCI급 저널 5편에 게재가 되었으며, 국내외의 국제학술대회에서 25건이 발표되었고, 특허출원 3건 및 특허등록 2건의 결과를 얻었으며 본 과제를 통해 구제역 재조합 백신에 대해 전문적인 지식을 가진 박사 2명과 석사 5명의 인력을 배출하였음.

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
◉ 구제역 O형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가	10	10	◎ 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼 기술의 확립을 통해 O형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고, 실험동물에서의 면역원성과 FMDV 방어 효능을 검증하였음.
◉ 구제역 A형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가	20	20	◎ 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼 기술의 확립을 통해 A형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고, 실험동물에서의 면역원성과 FMDV 방어 효능을 검증하였음.
◉ 신규 면역증강제의 확보 및 실험동물을 통한 효능 검증	10	10	◎ 신규의 분자면역증강제를 확보하였으며 이를 이용하여 O형과 A형 재조합 혼합백신의 면역원성 및 방어의 증가 효능을 검증하였음.
◉ 신규 면역증강제가 포함된 O형과 A형 혼합 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물 효능평가	40	35	◎ 신규 면역증강제가 포함된 최종 면역보좌제(Adjuvant)을 포함하는 O형과 A형 혼합 재조합 백신의 면역원성을 실험동물(마우스)와 목적동물(돼지, 소)에서 검증하였으며, FMDV에 대한 방어효능을 실험동물과 목적동물(돼지)에서 검증하였음.
◉ 개발 재조합 백신의 대량 배양 평가 및 임상시험 계획서 제출	20	15	◎ 대장균의 세포질에서 가용성으로 발현할 수 있는 발현시스템을 이용하여 대장균의 대량배양 조건등을 확립하였고, 이를 이용하여 구제역 백신의 시제품을 제작하여 평가를 수행하였음. 그러나 대량 생산시스템의 고도화를 위한 정제공정 확립은 연구가 더 필요함. ◎ 재조합 구제역 백신에 대한 임상시험 계획서는 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소 각각의 회사에서 제출하였고, 향후 임상시험계획서 승인, 야외 임상시험 실시 및 제조와 판매 승인을 위한 품목허가서류는 신청할 계획임.
합계	100점	90점	

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

◎ 현재 국내의 구제역백신은 불활화백신으로 매년 전량을 수입에 의존하며, 자체 생산을 위해서는 제조공정에 있어 높은 방역수준을 갖춘 특수시설(BSL3)이 필요하고, 막대한 시설비 및 유지비와 외부 오염 등의 다양한 문제점을 갖고 있음.

◎ 본 연구개발의 목적은 기존의 불활화백신이 갖고 있는 문제점들을 보완하고, 장점은 부각시킬 수 있는 다른 형태의 백신 개발에 대한 지속적 요구와 신변종의 구제역바이러스 유입시 신속하고 안전하게 생산하여 구제역에 대해 신속 방어가 가능한 긴급백신으로서 사용 가능한 재조합 백신을 개발하는 것이 목적이었음.

◎ 이를 위해 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼기술의 확립을 통해 O형과 A형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고, 더불어 신규의 분자면역증강제를 개발하여 이를 포함하는 최종 면역보좌제(Adjuvant)을 이용하여 O형과 A형 혼합 재조합 백신의 면역원성을 실험동물(마우스)와 목적동물(돼지, 소)에서 검증하였으며, FMDV에 대한 방어효능을 실험동물(마우스)와 목적동물(돼지)에서 검증하였음.

◎ 재조합 항원의 대량생산 및 시제품을 제작하여 시제품의 효능과 안정성등을 확인하였고, 현재 재조합 구제역백신에 대한 임상시험서를 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소 각각의 회사에서 제출한 상태임.

◎ 본 연구의 성과물로는 SCI급 저널 5편, 국제학술발표 25건 그리고 특허출원 3건 및 특허등록 2건의 결과를 얻었고, 본 과제를 통한 인력양성의 결과로 박사 2명, 석사 5명의 인재를 양성하였음.

◎ 본 연구에 의해 개발된 기술인 “구제역바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도”에 관한 특허는 산업화를 위해 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소에 기술이전계약 3건을 체결하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

◎ 본 연구과제 기간중 농림축산검역본부내 구제역백신연구센터의 중대동물 대상 동물이용 생물안전 3등급 시설의 안전점검이 2019년 5월부터 7월까지 그리고 2020년 6월부터 8월까지 안전점검을 위해 사용할 수 없었음. 그에 따라 구제역백신센터 자체과제를 위한 평가일정들이 지원되고 겹치면서 본 연구과제의 돼지 효능평가 연구가 다소 지연되었음.

◎ 이에 더하여 예기치 않은 Covid-19 pandemic 상황이 발생하면서 실험계획의 차질이 불가피하여 실험계획에 다소 차질이 있었음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

◎ 본 연구의 결과인, 실험동물과 목적동물에서 구제역 O형과 A형 재조합 혼합항원에 대한 면역원성과 방어면역 효능을 확인하여 재조합 구제역 백신의 임상시험 계획서를 농림축산검역본부에 제출된 상태로 향후 재조합 구제역 백신의 임상시험계획서 승인, 재조합 구제역 백신의 야외 임상시험 실시 및 재조합 구제역 백신의 제조 및 판매 승인을 위한 품목허가서류를 신청할 계획임.

◎ 본 연구에 의해 개발된 기술인 “구제역바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도”에 관한 특허는 산업화를 촉진하기 위해 통산실시권으로 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소에 기술이전계약을 체결하였고, 향후 다른 동물약품회사과도 기술이전계약을 체결할 예정임. 또한, 현재의 기술이전계약에 대한 기술은 O serotype용과 A serotype용에 대한 구제역 항원단백질에 대한 기술적 내용으로 향후 Asia serotype용 구제역 항원단백질에 대한 기술이전계약을 체결할 예정임.

◎ 본 연구와 관련된 결과물들로 SCI급 저널 5편에 게재가 되었으며, 국내외의 국제학술대회에서 25건이 발표되었고, 특허출원 3건 및 특허등록 2건의 결과를 얻었으며, 본 과제를 통해 구제역 재조합 백신에 대해 전문적인 지식을 가진 박사 2명과 석사 5명의 인력을 배출하였음.

◎ 연구자들은 본 과제의 연구를 지속적으로 수행하여 안전하게 생산이 가능한 재조합 구제역 백신 생산기술 확보, 단기간내 방어항원 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 확보, 구제역에 대한 신속 방어가 가능한 백신 후보물질을 고도화하고 산업화하기 위해 지속적으로 연구할 계획임.

◎ 이러한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 및 백신은 국내 동물 백신 산업 시장 확대 및 수출의 가능성을 증대시킬 수 있으며, 구제역 국가적 대유행 상황에 대한 억제력 및 백신 자주권 확보 역시 기대할 수 있음.

◎ 또한, 본 과제에 의해 구축된 안전하고 효과적인 재조합 항원발현 시스템을 이용한 다른 동물용 혹은 사람용 백신 제품 개발에 활용이 기대됨.

Ⅳ. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

<table>
<tr><td>사업추진형태</td><td colspan="2">□자유응모과제 ■지정공모과제</td><td>분 야</td><td colspan="2">수의/수의예방/동물질병관리</td></tr>
<tr><td>연 구 과 제 명</td><td colspan="5">구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">충남대학교</td><td colspan="2">주관연구책임자</td><td>이종수</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 개 발 비</td><td>정부출연
연구개발비</td><td>기업부담금</td><td colspan="2">연구기관부담금</td><td>총연구개발비</td></tr>
<tr><td>660,000 천원</td><td>220,000 천원</td><td colspan="2"></td><td>880,000 천원</td></tr>
<tr><td>연구개발기간</td><td colspan="5">2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31 (2년 9개월)</td></tr>
<tr><td>주요활용유형</td><td colspan="5">■산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타(상품화)
□미활용 (사유:)</td></tr>
</table>

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 구제역 O형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가	◎ 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼기술의 확립을 통해 O형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고 실험동물에서의 면역원성과 FMDV 방어효능을 검증하였음.
② 구제역 A형에 대한 최적의 재조합 항원 개발 및 실험동물 효능평가	◎ 대장균 가용성단백질 발현시스템 플랫폼기술의 확립을 통해 A형 구제역바이러스에 대한 재조합 항원을 발현/정제하였고 실험동물에서의 면역원성과 FMDV 방어효능을 검증하였음.
③ 신규 면역증강제의 확보 및 실험동물을 통한 효능 검증	◎ 신규의 분자면역증강제를 확보하였으며 이를 이용하여 O형과 A형 재조합 혼합백신의 면역원성 및 방어의 증가 효능을 검증하였음.
④ 신규 면역증강제가 포함된 O형과 A형 혼합 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물 효능평가	◎ 신규 면역증강제가 포함된 최종 면역보좌제(Adjuvant)을 포함하는 O형과 A형 혼합 재조합 백신의 면역원성을 실험동물(마우스)와 목적동물(돼지, 소)에서 검증하였으며, FMDV에 대한 방어효능을 실험동물(마우스)와 목적동물(돼지)에서 검증하였음.
⑤ 개발 재조합 백신의 대량 배양 평가 및 임상시험 계획서 제출	◎ 대장균의 세포질에서 가용성으로 발현할 수 있는 발현시스템을 이용하여 대장균의 대량배양 조건등을 확립하였고, 이를 이용하여 구제역 백신의 시제품을 제작하여 평가를 수행하였음. 그러나 대량생산시스템의 고도화를 위한 정제공정 확립은 연구가 더 필요함. ◎ 재조합 구제역 백신에 대한 임상시험 계획서는 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소 각각의 회사에서 제출하였고, 향후 임상시험계획서 승인, 야외 임상시험 실시 및 제조와 판매 승인을 위한 품목허가서류는 신청할 계획임.

*** 결과에 대한 의견 첨부**

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표											구기반지표									
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	10	30		40											10		10			
최종목표	3	1		2								5			6		4			
연구기간내 달성실적	**3**	**2**		**3**								**5**			**25**		**7**			
달성율(%)	100	100		100								100			100		100			

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	단기간내 구제역 방어항원 교체가 가능한 가용성 다가 항원단백질 발현 플랫폼 기술
②	O형과 A형 구제역 바이러스에 대해 중화항체를 유도할 수 있는 재조합 백신개발 기술
③	분자면역증강 단백질 발현 및 적용 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술복제	외국기술소화흡수	외국기술개선개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술		v				v	v	v		
②의 기술		v				v		v		
③의 기술	v	v				v		v		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	◉ 본 기술은 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 항원을 발현시키고, 단기간내 방어항원의 교체가 가능하며 안전하게 구제역 재조합 백신을 생산할 수 있는 재조합 구제역 백신 개발의 플랫폼 기술임. ◉ 유전적, 혈청학적 변이로 신변종의 구제역바이러스 국내 유입에 대응하여 신속하게 대응항원을 준비할 수 있는 기술임. ◉ 재조합 항원발현 플랫폼기술은 다른 동물용 혹은 사람용 백신 제품 개발에 활용이 가능함.
②의 기술	◉ 산업화를 위해 통산실시권으로 ㈜코미팜과 ㈜중앙백신연구소에 기술이전계약을 체결하였고, 향후 다른 동물약품회사과도 기술이전계약을 체결할 예정임. 또한, 현재의 기술이전계약에 대한 기술은 O serotype용과 A serotype용 구제역 항원단백질에 대한 기술적 내용으로 향후 Asia serotype용 구제역 항원단백질에 대한 기술이전계약을 체결할 예정임. ◉ 본 기술을 통해 향후 재조합 구제역 백신의 임상시험계획서 승인, 재조합 구제역 백신의 야외 임상시험 실시 및 재조합 구제역 백신의 제조 및 판매 승인을 위한 품목허가서류를 신청할 계획임.
③의 기술	◉ 본 기술은 재조합 구제역 백신의 면역을 증강시켜줄 수 있는 분자면역증강제 개발 기술로 다른 동물용 혹은 사람용 백신 제품을 위한 면역증강제로의 활용이 기대됨

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명			
가중치	10	30		40											10		10			
최종목표	3	1		2								5			6		4			
연구기간내 달성실적	**3**	**2**		**3**								**5**			**25**		**7**			
연구종료후 성과창출 계획						1						2								

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]	**구제역바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도**		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	선급기술료 10,000천원 경상기술료 총매출액의 1.35%
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 ■통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	약 3-6개월	실용화예상시기[3]	2024년 이내 공정개선 및 상품화 최초출시 목표
기술이전시 선행조건[4]	기술의 지도		

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.