

11-1543
000-002
367-01

발 간 등 록 번 호
11-1543000-002367-01

구
제
역

백
신

대
량
생
산
을

위
한

동
물
세
포
배
양
기
술

확
립

최
종
보
고
서

2018

농
림
축
산
식
품
부

구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립 최종보고서

2018.09.27.

주관연구기관 / 한국생명공학연구원
협동연구기관 / 농림축산검역본부
참여기관 / (주)중앙백신연구소

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가축질병대응기술개발사업”(개발기간 : 2015.08. ~ 2018.08. 36개월)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 09. 27.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김장성



협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박봉균



참여기관명 : (주)중앙백신연구소 (대표자) 윤인중

주관연구책임자 : 이은교

협동연구책임자 : 고영준

참여기관책임자 : 유성식

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정
제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가축질병대응기술개발사업”(개발기간 : 2015.08. ~ 2018.08. 36개월)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 09. 27.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김장성 (인)

협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박봉균 (인)

참여기관명 : (주)중앙백신연구소 (대표자) 윤인중 (인)

주관연구책임자 : 이은교

협동연구책임자 : 고영준

참여기관책임자 : 유성식

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정
제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	315039-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.08.14.~ 2018.08.13.	단 계 구 분	3 단계/ 총 3 단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립			
연구책임자	이은교	해당단계 참여연구원 수	총: 29명 내부: 29명 외부: 0명	해당단계 연구개발비 (천원)	정부 : 390,000 민간 : 130,000 계 : 520,000
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비 (천원)	정부 : 1,170,000 민간 : 390,000 계 : 1,560,000
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 바이오상용화지원센터			협동기관 : 농림축산검역본부 참여기업명 : (주)중앙백신연구소	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	ISSN 0916-7250 ISSN 0166-3542	특허출원(2건) 10-2016-0101758 10-2017-0070818 특허등록(1건) 10-1812223-0000									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

1. 논문(SCI 2 건)

- 1) J Vet Med Sci. 2017 Nov 10;79(11):1822-1825.
 - Determination of optimal age for single vaccination of growing pigs with foot-and-mouth disease bivalent vaccine in South Korea.
- 2) Antiviral Res. 2017 Jul;143:134-141.
 - Antiviral activity of ovine interferon tau 4 against foot-and-mouth disease virus.

2. 특허(출원 2건, 등록 1건)

- 1) 특허출원(10-2016-0101758)
 - 무혈청 배지에서 현탁 배양이 가능한 신규 BHK-21 세포주 및 이를 이용한 구제역 백신 제조방법
- 2) 특허출원(10-2017-0070818)
 - 신규한 재조합 항원 단백질을 포함하는 구제역 백신 조성물
- 3) 특허등록(10-1812223-0000)
 - 무혈청 배지에서 현탁 배양이 가능한 신규 BHK-21 세포주 및 이를 이용한 구제역 백신 제조방법

3. 학술대회 발표(해외 1건, 국내 5건)

- 1)해외(포스터 발표 1건)
 - FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINE PRODUCTION IN CELL CULTURE
- 2)국내(포스터 발표 5건)
 - Verification of Proper Vaccination Time for Porkers with Foot-and-mouth Disease Vaccine
 - A Comparison of Methods for Purification and Concentration of Foot-and-mouth Disease Virus
 - Chromatographic Analysis of Foot and Mouth Disease Virus
 - Evaluation for Inactivation of Foot and Mouth Disease Virus
 - Large-scale production of foot-and-mouth disease vaccine in serum-free and suspension culture of BHK-21 cell

4. 고용창출(정규직 채용 2건)

- 홍진우(중앙백신연구소)
- 문경민(중앙백신연구소)

5. 정책활용(1건 예정)

- 동물세포 기반 부유세포 대량배양 기술을 농림축산검역본부 표준기술로 채택하여 농식품부 국가 연구기술개발사업에 활용 계획
- 농림축산검역본부 2018년도 표준기술활용집(2018년 말 게재)

〈요약문〉

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>〈최종목표〉</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 무혈청배지기반 회분식 배양공정기술개발 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 무혈청배지기반 유가식 배양공정기술개발 - 고농도 동물세포(BHK-21) 배양기술 확립 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 세포배양 배지 최적화 - 구제역 백신 대량생산을 위한 세포배양 스케일업(200L) <p>〈1차년도 목표〉</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 현탁세포배양 적합 배지 최적화 ○ 구제역 바이러스 생산성 평가기술확립 ○ 바이러스감염기술개발 <p>〈2차년도 목표〉</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역백신 생산 세포주의 배지개발 ○ 개발 배지의 바이러스 생산성 평가 ○ 유가식 배양공정 최적화 ○ 바이러스 감염조건 확립 <p>〈3차년도 목표〉</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 대량배양공정검증 ○ 배양공정기술확립 ○ 제품화기술 검증 <p>〈연구개발내용〉</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ BHK-21 세포주 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 현탁배양적응 BHK-21세포주 비교평가를 통한 최종 세포주 선정 ○ 배지평가를 위한 표준배지선정 및 평가기준확립 <ul style="list-style-type: none"> - 표준배지선정 - 세포성장성 평가기준확립 ○ 배지 라이브러리에서 현탁배양적응 시험 및 세포성장성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 세포배지 라이브러리에서 현탁배양적응 - 최대세포배양농도 및 비성장속도 평가 ○ 배지라이브러리평가를 통한 기본배지선별
------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- 최대세포배양농도 및 비성장속도 평가
- 구제역 바이러스 생산성 평가를 통한 기본배지 선별
- 구제역 바이러스 생산성 평가기술 확립
 - 구제역 바이러스 증식 평가기법 확립
 - 세포배지성분에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가기법 적용
- 무혈청배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립
 - 각 무혈청배지에 증식된 부착세포에서의 바이러스 감염 감수성 확인
 - 무혈청 배지와 혈청첨가배지의 바이러스 증식성 비교 확인
- 개발된 동물용 부유세포의 백신 생산의 적용(Lab scale)
 - Shaking flask(Lab scale)에서의 증식 배양조건 확립
 - 바이옱액터(Lab scale)를 이용한 증식성 확인
- 개발된 동물용 부유세포의 회분식 배양공정 최적화(Lab scale)
 - Cas system의 배양 환경조건 변화를 통한 공정 최적화
 - 배양온도 및 agitation 등의 배양환경조건의 변화를 통한 공정 최적화
- 기본배지선정
 - 구제역 바이러스 생산성 평가를 통한 1차배지 선별 완료
- 혼합배지평가
 - 첨가물 및 합성배지혼합에 의한 배지평가
 - 구제역 바이러스 생산성 평가결과 리뷰
- 유가식 배양첨가물선정
 - 세포성장속도 및 세포최대농도를 극대화하기 위한 배지 선별
- 선정배지에 대한 바이옱액터평가
 - 플라스크 배양에 의한 배지 평가 완료
 - 바이옱액터(2~5 L)에서의 세포배양기술 확립
- 세포배지조건에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가
 - 세포배지 라이브러리에서 부유세포배양용 배지선발을 위한 구제역 바이러스 생산성 평가
 - 상용화 후보 부유세포 배지선정
- 개발된 동물용 부유세포의 유가식 배양공정 최적화
 - 세포 배양에 적합한 배지첨가물의 선정
 - 배양 산물 분석을 통한 배지첨가물의 첨가 조건 확립
- 개발된 부유 세포에 적합한 바이러스의 선정
 - 각 바이러스 감수성 확인을 위한 실험 기법 확립
 - Canine virus의 바이러스 감수성 조사

- Porcine virus의 바이러스 감수성 확인
- 부유세포기반 동물 세포주의 회분식 감염공정 최적화(Lab scale)
 - 바이러스 감염조건 확립
 - MOI(Multiplicity of infections)에 따른 바이러스 증식성 확인
 - 바이러스의 면역원성 확인
- 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 회분식 감염 공정 확립
 - 선별된 무혈청 배지를 이용한 바이러스 감염 공정별 증식성 확인
 - 배지첨가물 첨가된 배지를 이용한 회분식 감염 배양의 증식성 비교를 통한 감염 공정 확립
- 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 유가식 감염 공정 확립
 - 선별된 감염배지에서 세포주의 유가식 배양 및 대사산물 확인
 - 배지첨가물 별 바이러스 증식성 확인
 - 감염 공정의 배지첨가물의 첨가 조건 확립
- 최적 제품화 배지선정
 - 세포의 성장속도 및 구제역 바이러스 생산성을 고려한 최적 배지 선정
 - 기본배지 및 배지첨가물 선정
- 배지 영양요구성분 분석
 - 세포 증식과정에서 소모되는 영양요구성분 분석 및 보강
- 바이오리액터 스케일업
 - 50 L, 200 L 규모 스케일업
 - 공정 최적화를 위한 스케일업 파라미터 연구
- 구제역 백신 생산을 위한 동물세포배양기술 확립
 - 바이오리액터에서의 세포배양기술 확립
 - 배양 파라미터 결정
- 부유세포주의 동물세포 대량배양기술 확보
 - 동물세포기반 구제역백신 생산을 위한 세포배양공정 기술 확립
 - 스케일업에 적합한 바이오리액터의 선정
 - 선정된 바이오리액터를 활용한 세포증식조건 확립
 - 부유세포 대량배양기술 확립
 - 부유세포의 대량배양을 통한 구제역 바이러스 생산성 평가
- 개발된 동물용 부유세포의 생산 공정 스케일업
 - 스케일업에 적합한 바이오리액터의 선정
 - 선정된 바이오리액터를 활용한 세포증식조건 확립

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 부유세포기반의 동물 세포주를 이용한 바이러스 대량감염공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 접종 MOI 확립 - 바이러스 growth curve 확립 - 채독 공정 확립 - 불활화 공정 확립 ○ 무혈청 배지를 이용한 대량 감염공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 대량배양(부착 또는 부유 배양공정)에서의 구제역 바이러스 증식성 확립 - 구제역 바이러스 접종 MOI 확립 - 최종 백신 산물의 면역원성 확인
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<p><1차년도 연구개발성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역 백신생산 동물 세포 BHK-21 세포주 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 부유배양 적응 세포주의 단일 클론을 선별하여 백신생산 부유 세포주 확립 ○ BHK-21 세포주의 표준배지 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 총 20 종의 상업용 배지 중, BHK-21의 활성을 최대화하는 표준배지 선정 - 최고 세포농도에 도달한 무혈청, 동물유래물질 불포함, 화학적 특성이 규정된 배지인 VP6, VP8, VP5, VP7, VP9 배지를 선별 - 선별된 배지들의 구제역 바이러스 역가 평가 완료 - 최고 세포농도, 세포활성도, 비성장 속도(μ), 세포 증배 시간을 이용한 배지개발에 대한 기준과 평가방법 확립 ○ BHK-21 세포주의 표준배지첨가물 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 10 종의 상업용 배지첨가물 중, BHK-21의 활성을 최대화하는 배지첨가물 선정 - 최고 세포농도, 세포활성도, 비성장 속도(μ), 세포 증배 시간을 이용한 배지첨가물개발에 대한 기준과 평가방법 확립 ○ 다양한 세포배양배지에 따른 적합성 평가를 위한 구제역 바이러스 분석기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 0.1부터 0.001MOI까지 구제역 바이러스 접종량에 따른 바이러스 역가차이 없음 - 현탁세포수가 증가할수록 신생 구제역 바이러스의 역가 상승

- 부착배양세포는 세포수가 한정적인 반면에 현탁배양은 동일 부피 당 세포수를 확장할 수 있기 때문에 부착배양세포보다 세포수를 높이는 경우 바이러스 역가가 부착배양보다 상대적으로 상승
- 구제역 바이러스 농축 후 초고속원심분리법으로 **바이러스 입자 검출기법 확립**
- 세포배지성분에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가
 - 바이러스 접종시, 일반 배지류가 필수적이며 배지종류에 따라 바이러스 생산성 차이 확인
- **무혈청 배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립**
 - 각 무혈청배지에 증식된 부착세포에서의 바이러스 감염 감수성 시험 완료
 - 각 무혈청배지에 증식된 부유세포에서의 바이러스 감염 감수성 확인 완료
 - 무혈청 배지와 혈청첨가배지의 바이러스 증식성 비교 완료
- 개발된 동물용 부유세포의 백신생산의 적용(Lab scale)
 - Shaking flask(Lab scale)에서의 증식 배양조건 확립함
 - **10 L Wavebioreactor에서 부유세포의 증식 배양 조건 확립**
- 개발된 동물용 부유세포의 회분식 배양공정 최적화(Lab scale)
 - Glucose, Lactate, Glutamine, Ammonia와 같은 대사산물을 측정하여 바이러스 증식을 확인

<2차년도 연구개발성과>

- 구제역 백신생산 세포주의 배지 개발
 - 13종의 CD와 14종의 AF배지를 DWP를 사용하여 1차적으로 배지를 선별하고, Shake flask로 검증하여 최종적으로 **CD35와 AF20을 선정**하여 배지 성분의 강화를 통한 배지개발 수행
 - 위 Shake flask에서 선별된 배지의 재현성 평가를 수행하였고, 검역본부에서 구제역 바이러스 역가를 측정하여 CD35와 AF20 배지에 문제없음을 확인
 - CD35와 AF20배지에 CD 첨가물, SM(영양소모분석) 첨가물, peptone blend 등 여러 가지 첨가물로 **배지의 성분을 강화하여 세포성장 능력을 향상**
 - 성분이 강화된 8종의 CD와 8종의 AF 배지의 재현성 실험을 수행하였고, 검역본부에서 바이러스 역가를 측정 중에 있음
 - 최종 선별된 CD와 AF배지의 유가식 배양을 위한 배지첨가물

	<p>개발을 수행</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 배지 첨가물인 CB feed1의 농도 선별 <ul style="list-style-type: none"> - 기존 50 g/L의 고농도 CB feed1에 대한 용해성 문제와 가격문제를 해결하기 위하여 최적 농도 선별을 수행 - <u>25 g/L CB feed1를 배양 배지에 5% 첨가하는 것을 최적 조건</u>으로 선별하여, 용해도 문제와 가격 문제를 해결 ○ 표준작업지시서 작성 및 실험 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 실험적 변수를 최소화 하고, 재현성을 높이며, <u>효율적인 기술 이전을 위하여 표준작업지시서를 작성</u> - 작성된 지시서를 이용하여 Shake flask 단계에서 세포 성장 실험을 수행하여 높은 재현성을 확인 ○ <u>생명연 특허세포주와 검역본부 특허세포주 비교</u> <ul style="list-style-type: none"> - 생명연에서 개발된 세포주가 세포 성장, 세포 활성도, 현탁도, 구제역 바이러스 생산성 모두에서 월등히 높음을 확인 ○ 바이오리액터 배양 공정 <ul style="list-style-type: none"> - 2 L 바이오리액터 공정에서 CO2나 Base에 의한 <u>pH 조절을 최소화 하는 것이 세포 활성도의 안정에</u> 유리한 영향을 미침 - 배양 공정에서 Osmolality가 340 mOsm/kg 이하로 유지하는 것이 중요 ○ 생산 공정 최소화 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 중간에 첨가물의 첨가 없이, 배양 초기에 모든 첨가물을 적정한 농도로 첨가하는 것이 기존 배양 보다 더 높은 세포 농도로 성장함 - <u>배양 공정의 최소화</u>를 통하여 배양 과정 중 첨가물에 의한 오염을 최소화 할 수 있다고 사료됨 ○ 세포배지 조건에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 세포배지 라이브러리에서 구제역 바이러스 생산배지 후보군 선별기준 정립 ○ <u>개발된 동물용 부유세포의 배양공정 최적화</u> <ul style="list-style-type: none"> - 무혈청 배지 및 배지첨가물 첨가에 따른 부유세포 배양성 비교평가 - 배지첨가물의 첨가 조건 확립완료 ○ 개발된 부유 세포에 적합한 바이러스의 선정 <ul style="list-style-type: none"> - BHK-21 부유 세포를 이용하여 Canine virus와 구제역 바이러스의 감수성 확인완료 ○ 부유 세포기반 동물 세포주의 회분식 감염공정 최적화
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- BHK-21의 부유배양 조건에서는 바이러스 접종 23시간째에 가장 높은 $10^{6.23}$ TCID₅₀/ml의 항체가를 확인
- 시험결과 0.01 MOI 조건에서 평균 약 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 의 항체가를 형성
- 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 회분식 감염 공정 확립
 - BHK-21 세포는 0.3×10^6 cells/ml을 배양하여 5×10^6 cells/ml 이상의 세포농도에서는 배지교체 없이 구제역 바이러스를 접종하여 17 ~ 20시간 사이에 채독하는 조건을 확립
- 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 유가식 감염 공정 확립
 - 2 L 바이오리액터를 이용하여 0.42×10^6 cells/ml로 접종하여 5일째에 무혈청 배지 0.5 L, 4 mM Glutamine과 4 mM Glucose를 첨가하여 7일간 배양하였을 경우 7일째 최대 6.2×10^6 cells/ml의 세포를 수득

<3차년도 연구개발성과>

- 최적 제품화 배지선정
 - 구제역 바이러스 생산성이 탁월한 CD 계열 배지인 DOE1 기본 배지개발
 - 총 10종의 배지첨가물을 선별하여 세포 성장 및 바이러스 생산성이 우수한 Feed 6 배지를 개발하여 기존 바이러스 생산량 대비 약 4.6 배의 생산성을 보임
 - 배지첨가물의 첨가전략 개발을 통하여 배양 0일 차에 배양부피 대비 배지 첨가물 10%를 첨가하여 배양함으로써 배양 4일 차 최고세포농도 8.4×10^6 cells/ml 까지 성장
- 배지 영양요구성분 분석
 - 세포가 성장함에 따라 배지 영양소모분석을 통하여 부족한 영양분을 첨가하여 배지성분을 강화시킴
 - 메타볼라이트 분석을 통하여 N-소스와 C-소스인 Glutamine과 Glucose의 소모성을 분석하여 Glutamine은 최소 8 mM이상 Glucose는 최소 5 g/L 이상이 기본배지에 포함되어야 함
- 바이오리액터 스케일업
 - 표준배지 중 하나인 CD-BPM배지를 이용하여 50 L 바이오리액터에서 배양 공정 조건 확립
 - 배양 3일차 세포회수 후 검역본부로 이송하여 구제역 바이러스 생산성 평가 수행
 - 초기 Lactate 축적을 억제함으로써 세포 성장성을 증대시킬 수

	<p>있을 것으로 사료됨</p> <ul style="list-style-type: none"> - DOE1 기본배지를 이용한 200 L 바이옱어액터에서 배양 공정 확립 - 200 L 바이옱어액터 배양 표준작업절차서를 작성 <p>○ 구제역 백신 생산을 위한 동물세포배양기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 표준배지 중 하나인 CD-BPM 배지를 이용하여 2 L 바이옱어액터에서 배양조건 확립 - Flask배양과 달리 바이옱어액터에서는 Shear stress를 최소화하는 것이 중요 - Shear stress를 줄여주는 방안으로 Pluronic F-68을 1 g/L로 첨가함으로써 flask 배양보다 높은 성장효과를 보임 <p>○ 부유세포주의 대량동물세포배양기술 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 시판배지 대상 구제역 바이러스 역가 및 항원 생산량 비교하여 바이러스 생산성이 우수한 ProBHK-1 : CD-BPM = 1 : 1 혼합배지 확인 - 다양한 표준배지의 바이러스 생산성을 평가하여 배지의 수급 문제에 대비가능 - DOE1 기본배지를 이용하여 생명연에서 200 L 배양공정 확립하였고 배양 3일차 세포를 회수하여 25 L는 파일럿 스케일의 RM 장비에서 나머지는 검역본부 200 L 바이옱어액터에서 구제역 바이러스 생산성 검증 <p>○ 무혈청 배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 부착세포는 1×10^6 cells/ml 이상 증식되지 않았으나, 부유세포의 경우 최대 3.3×10^6 cells/ml 수준까지 배양되는 것을 확인 - 3종의 바이러스 접종 배지(Gibco-A, Gibco-B, CSTL-B)를 선별하여 접종 4일째 가장 높은 titer를 보인 Gibco-A 선정 - 바이러스 접종 시 세포 농도가 높을수록 접종 24시간에 바이러스 증식성이 가장 높음 <p>○ 개발된 동물용 부유세포의 백신 생산의 적용(Lab scale)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 L Lab-scale의 Wavebioreactor에서 회분식 배양을 하여 배양 2일차 3.6×10^6 cells/ml 까지 성장함 - Cas system의 배양 환경조건 변화를 통한 공정 최적화 - 바이러스 접종 시에는 바이러스에 의한 세포활성도, 세포수의 변화와 세포 대사산물의 수치가 변화됨을 확인하여, 이를 기반으로 바이러스의 증식성을 높이기 위한 배지첨가물의 선정에 반영
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 동물용 부유세포의 생산 공정 스케일업 <ul style="list-style-type: none"> - 바이옱리액터를 이용한 구제역 바이러스의 배양 및 불활화, 정량 시험 ○ 부유 세포기반의 동물 세포주를 이용한 바이러스 대량 감염공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Canine virus, Porcine virus의 바이러스 감수성 확인을 통하여 부유세포에 적합한 바이러스의 선정 ○ 무혈청 배지를 이용한 대량 감염공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - BHK-21 부유세포의 바이러스 접종 23시간째에 가장 높은 $10^{6.23}$TCID₅₀/ml의 항체가를 보임 - MOI를 각각 0.1, 0.01, 0.001로 달리하여 바이러스 접종 조건을 확인하였을 경우 0.01 MOI 조건에서 평균 약 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml의 높은 항체가를 형성 ○ 돼지에서 구제역 백신 보조제 선정 및 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 구제역 백신에 적합한 백신보조제 선정을 위해 emulsion type 별로 시험백신을 제조한 후 목적동물인 돼지에서 시험하여 ELISA와 VNT로 항체가를 측정함
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 과제의 수행으로 얻어질 신규 무혈청 부유배양 기반 동물세포배양기술은 동물용 바이러스 백신 대량생산에 있어서 핵심 기술로써 국내 동물용 백신 생산에 있어 처음으로 시도되고 있는 기술이라 볼 수 있다.</p> <p>본 과제의 수행으로 확립될 무혈청 부유형 동물세포배양 기반 동물용 바이러스 백신 생산기술은 구제역 백신이외에도 다양한 가축질병관련 바이러스 백신 생산에 폭넓게 이용될 수 있으며 국내외 특허등록을 통해 독점적인 권리를 얻고 이를 기반으로 사업화 가능성이 높은 분야라고 볼 수 있다. 또한, 기존의 부착형 동물세포 배양기술의 한계를 뛰어 넘어 바이러스 백신 대량생산기술 확보, 독자배지개발을 통한 생산단가의 절감, GMP 기준에 부합한 설비 활용 등 독자적 생산기술의 완성도를 높이게 되면 다국적 백신기업과의 기술 경쟁력을 확보할 수 있을 뿐더러 국내수의 백신산업의 성장에 크게 기여할 것으로 예상된다.</p>
----------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

국문핵심어 (5개 이내)	구제역	백신	BHK-21	부유배양	무혈청배지
영문핵심어 (5개 이내)	foot-and-mouth disease	vaccine	BHK-21	suspension culture	serum-free media

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	13
2. 연구수행 내용 및 결과	18
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	112
4. 실적자료	119
5. 연구개발보고서 초록[별첨 1]	148
6. 자체평가의견서[별첨 2]	153
7. 연구결과의 활용 계획[별첨 3]	160
붙임. 참고 문헌	164

1. 연구개발과제의 개요

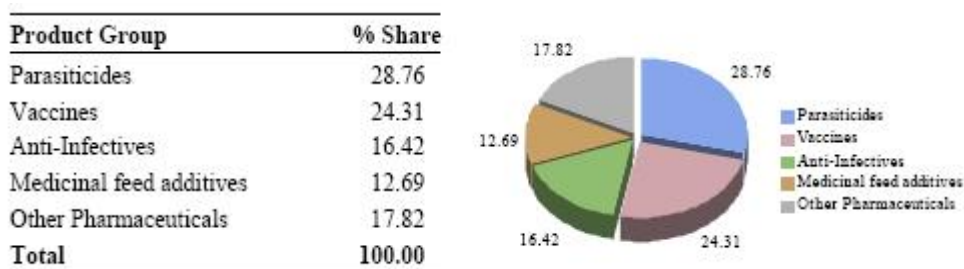
1-1. 연구개발 목적

- 구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립
 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 무혈청배지기반 회분식 배양공정기술개발
 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 무혈청배지기반 유가식 배양공정기술개발
 - 고농도 동물세포(BHK-21) 배양기술 확립
 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 세포배양 배지 최적화
 - 구제역 백신 대량생산을 위한 세포배양 스케일업

1-2. 연구개발의 필요성

- 동물용 백신 산업의 개요
 - **동물용 백신 산업의 중요성:** 백신 산업은 예방이 가능한 질병의 99%까지 발병률을 줄일 수 있는 비용 대비 효과가 가장 큰 의약품으로서 동물의 항생제 남용에 대한 국제적인 규제로 날로 그 중요도가 증가하고 있는 제약부문임
 - **차세대 백신 개발의 상용화 추세:** 최근 바이오 기술에 기반한 지속적인 신기술 개발로 동물용 백신도 단순한 고전적인 불활화, 약독화 백신뿐만 아니라 서브유닛 백신, Marker 백신과 같은 차세대 백신이 상용화되고 있는 상황임
 - **세계 동물용 백신 시장 점유율 24%:** 동물용 의약품 시장은 유럽, 북미, 남미, 그 외 시장 등으로 나눌 수 있으며, 동물용 백신 시장은 그 중 24%를 차지하고 있음(표 1)

표 1. Global Animal Health Products Market by Product Group (2010): Percentage Share Breakdown by Value Sales for Parasiticides, Vaccines, Anti-Infectives, Medical Feed Additives and Other Pharmaceuticals



- Veterinary vaccines A global strategic business report. 2010 GIA 인용

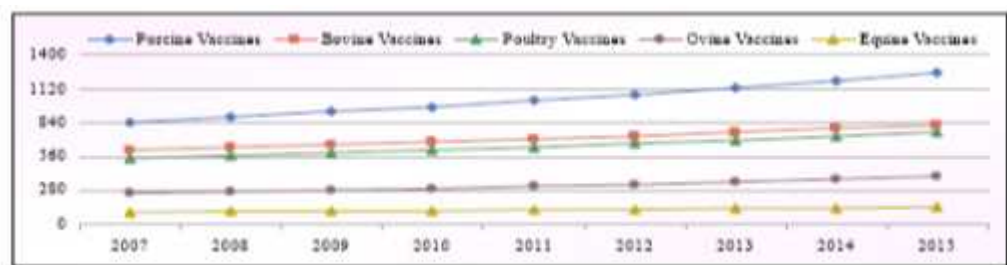
- **신규 백신 adjuvant 개발 경쟁 가속화:** 전통적으로 사용되어 오던 알루미늄 염, Freund' adjuvant 등은 물론 liposome, ISCOMs, microsphere 등의 새로운 adjuvant들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음

- **경쟁력이 있는 산업:** 동물용 백신은 인체 백신과 달리 신제품 연구 개발이 3~5년 정도로 연구 개발이 상용화하는 시간과 제품의 안전성과 효능의 확인, 그리고 시장에서의 반응도 수년 내에 확인할 수 있음. 유전공학기술과 약물전달기술이 발달한 우리나라로서는 다국적 기업과 대등한 경쟁력을 갖출 수 있는 산업임
- **바이오 기술 기반 성장산업:** 포스트게놈 시대의 새로운 패러다임을 주도하기 위한 국가의 바이오산업 진흥정책에 힘입어 최근 제약업체들은 신약개발의 제품 파이프라인 강화를 위하여 바이오 벤처업체에 대한 투자를 활발하게 하고 있음. 신약의 연구개발과 마케팅 등에 대한 바이오 업체와 제약업체의 역할분담으로 그 시너지 효과는 보다 커질 것으로 기대됨
- **과점 시장:** 동물백신 시장은 다국적 업체가 국내외 시장을 대부분 차지하는 과점 시장 구조로서 기술개발기간이 길고, 연구개발과 제조설비에 대한 투자비가 많이 소요되며, 상당한 노하우가 필요하므로 여타 제약업체 등의 초기 진입장벽이 상당히 높음. 생물학적 체제로서의 유통과정 리스크에 대한 규제 등으로 시장진입이 어려워 6개 다국적 기업이 70% 이상 시장을 지배해 왔음.

○ 산업의 성장성

- **2011년 세계시장규모는 약 2872 million USD, CAGR (2007-2015) 4.5% 전망:** 전 세계 동물용 백신 시장은 2007년부터 2015년까지 매년 성장하여 2011년에는 US\$ 2872 million을 기록하고 매년 4.5% 성장하여 2015년에는 US\$ 3440 million으로 확대될 전망이다(표 2)

표 2. World Recent Past, Current & Future Analysis for Veterinary Vaccines by Geographic Region - US, Europe and Rest of World Market Independently Analyzed with Annual Sales Figures in US\$ Million for Years 2007-2015



- Veterinary vaccines A global strategic business report. 2010 GIA 인용

○ 경기변동의 특성

- 지속적인 시장 성장: 백신 시장은 세계경제의 침체에도 불구하고 일반적인 경제 동향에 별로 영향을 받지 않는 특성 때문에 타 산업부문에 비해서 상대적으로 견재할 뿐만 아니라 지구상에서 전염병이 근절되지 않는 한 신규수요가 계속 창출되는 시장임(표 3)

표 3. Tabula Analysis on Select Animal Diseases Controlled by Vaccines

Species	Diseases
Pigs	Parvovirus, Enteritis, Colibacillosis, PRRS, Clostridial disease, Porcine Pneumonia, Atrophic Rhinitis and Erysipelas
Fish	Furunculosis, Vibriosis, Moratella Viscosus and Enteric Redmouth disease
Cattle	Infectious Bovine Rhinotracheictis (IBR), Respiratory Syncytial Virus, Blackleg, Tetanus, lungworm disease (husk), Enteritis, Leptospirosis, Ringworm, Rotavirus, E Coli, Pasteurellosis, Mastitis, BVD, Salmonella, PI3 and Coronavirus
Poultry	Pasteurellosis, Chicken Anaemia virus, Duck Virus Enteritis, Avian Coccidiosis, Avian Encephalomyelitis, Avian Infectious Bronchitis, Avian Infectious Bursal Disease, Avian Reovirus, Marek's disease, Egg Drop Syndrome 1976, Turkey Rhinotracheitis, turkey Haemorrhagic Enteritis, Erysipelas, Infectious Laryngotracheitis, Newcastle disease, Salmonellosis, swollen head syndrome and post-natal Colibacillosis
Sheep and Goats	Chlamydiosis and Toxoplasmosis, Footrot, Clostridial diseases, contagious Pustular Dermatitis Pasteurellosis and Louping ill

- Veterinary vaccines A global strategic business report. 2010 GIA 인용

- 신규 백신에 의한 시장 확대: 아울러 향후 다양한 복합 백신, 바이러스 백신 등과 관련된 신약 개발로 시장이 한층 더 성장할 것으로 기대됨. 2011년도 국내 구제역 발생으로 구제역 백신을 전량 수입하게 되어 국내 시장 지위가 바뀌었으나 2012년부터 구제역 백신의 국내 생산 통해 국내에서의 시장 지위를 다시금 되찾을 것으로 기대됨
- 종란 생산 배양의 한계점
 - 종란을 이용한 생산방법은 원재료가 되는 유정란의 공급이 필요하며 이로 인해 무균시설의 양계장이 확충되어야 함
 - 무균시설에서 사육된 닭은 일반 닭에 비해 면역적 저항력이 약하며 공간적 한계로 인해 지속적인 확장이 필요하기 때문에 경제적인 제한사항과 인력적인 부분 등 많은 기반 사항이 필요함
- 세포배양의 필요성
 - 세포 배양을 통한 방법은 종란을 이용하거나 숙주를 이용한 생산법의 한계와 문

제점을 개선하기 위한 방법으로 많이 사용되고 있음. 세포 배양을 통한 백신 생산은 무균상태에서 세포를 대량 배양 후 바이러스를 접종하여 백신을 생산하는 방식으로 현재 많은 동물 백신 회사들이 이와 같은 방법으로 백신 생산을 하고 있음. 동물세포 배양을 통한 백신 제조의 가장 큰 장점은 생산규모의 확장성과 공간의 조절이 가능한 것에 있음

○ 부착세포 기반 배양의 한계점

- 동물 백신 개발은 인체 백신과 달리 개발이 용이하고 짧은 시간에 백신 생산허가를 얻을 수 있는 장점이 있음. 물론 가격적인 부분 또는 많은 질병을 제어하기 위해 소규모의 다 품종 생산 시설의 한계점도 가지고 있음. 동물 백신 생산은 세포 배양을 이용한 생산법을 주로 이용하고 있으며 부착형 세포를 이용한 방법이 가장 많이 사용되고 있음. 부착형 세포를 이용한 방법은 복잡한 생산 시설이 필요치 않으며, 육안적 관찰을 통해 형태적 관찰이 용이한 장점을 가지고 있음
- 하지만 처리된 용기, 지속적인 계대, 소규모의 배양 단위의 단점으로 인해 바이러스 접종에 중요한 세포의 유지와 고밀도 배양이 어려운 단점을 가지고 있음. 또한 부착형 배양을 위해 안전성에 많은 단점을 가지고 있는 고가의 소태아 혈청(FBS)이 필요함. 현재의 세포 배양방법은 기존 종란을 이용한 방법보다는 많은 장점을 보유하고 있지만 여러 가지 문제점과 배양의 한계점을 가지고 있어 한 단계 발전된 기술력이 필요함

○ 부유세포 기반 배양의 필요성

- 세포 배양방법 중 부유세포를 이용한 방법은 계대의 용이성, 공간의 활용성, 인력적 경제성, 대량배양(scale-up)의 용이성, 배양 방법의 다양성(연속배양, 회분식 배양 등)등의 많은 장점이 있음. 물론 부유성에 적응된 세포를 만들기가 어렵고 성장에 따른 생존율확인과 증식성 확인이 어려운 부분이 있음. 현재 여러 기술적 장비를 통해 생존율과 증식성 확인이 용이하게 되었지만 아직까지도 적응된 부유성 세포를 획득하기 어려운 부분을 가지고 있음
- 본 연구 개발을 통한 부유성 세포의 확립은 부유 배양의 핵심적 부분이며 이를 통한 여러 가지 배양방법이 용이하게 될 것으로 사료됨. 또한 소 태아 혈청이 들어가지 않은 배양법은 백신정제가 용이하고 동물의 안전성을 확보할 수 있는 좋은 기회를 가질 수 있을 것으로 사료됨

- 현재 많은 동물 백신 회사들이 수출을 통한 경제적 영역을 확장하기 위해 노력하고 있음. 백신 수출을 위해선 수출국의 많은 요구사항 들이 충족되어야 하며 이 중 GMP는 가장 중요한 사항 중 하나임. GMP적 요구사항을 충족하기 위해 현재의 생산방법은 많은 어려움이 있음. 본 연구를 통한 부유성 배양 공정 확립은 이러한 요구사항을 위한 좋은 충족조건이 될 것으로 생각되며 회사의 큰 경제적 향상의 기회가 될 수 있는 좋은 계기가 될 것으로 사료됨

1-3. 연구개발 범위

구분	년도	연구개발 세부목표	연구개발내용 및 범위	수행기관
1차 년도	2015	현탁세포배양 적합 배지 최적화	-혈청배지와 무혈청배지에 대한 비교평가 -고농도 세포배양을 위한 배지 평가	생명(연)
		구제역 바이러스 생산성 평가기술확립	-다양한 세포배양배지에 따른 적합성 평가를 위한 구제역 바이러스 생산성 평가를 위한 분석기술 확립 -세포배지성분에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가	검역본부
		바이러스 감염기술개발	-BHK-21세포주를 활용한 바이러스 감염조건 최적화	중앙백신연구소
2차 년도	2016	고농도 세포배양기술 확립	-영양요구성(아미노산, 탄수화물, 비타민, 미네랄 등) 분석 -최적 배지 선정 -2~5 L 바이옱어액터 배양 평가	생명(연)
		구제역 바이러스 생산성 평가	-세포배지 라이브러리에서 구제역 바이러스 생산 배지 평가 -상용화 후보 배지 선정	검역본부
		세포배양기반 백신생산기술개발	-BHK-21 세포주를 활용한 백신생산기술개발	중앙백신연구소
3차 년도	2017	대량배양공정검증	-생산성을 고려한 상용화 배지 선정 -200 L 규모 바이옱어액터에서 배양공정검증	생명(연)
		배양공정기술확립	- 동물세포기반 구제역백신 생산을 위한 세포배양공정 확립	검역본부
		제품화기술 검증	- 구제역백신 생산기술에 대한 평가 - 동물세포배양기반 제품화 기술 검토	중앙백신연구소

2. 연구수행 내용 및 결과

<주관연구기관 : 한국생명공학연구원>

1. 구제역 백신 생산 세포주의 상업용 배지 평가

가. 상업용 배지 선정 및 특성

- 현재 세계적인 배지회사의 상업용 배지 중, 바이러스 백신 생산에 사용되어졌던 배지(VP : virus production) 20 종류를 선택하여, 구제역 바이러스 백신 생산 세포주인 BHK-21의 표준배지 선별 (표 1.1)
- 20종의 배지 중 VP12를 제외한 나머지 모두 CD(chemically defined) 배지
- 동물유래물질의 경우, 정제공정과 최종 의약품의 안정성에 문제를 일으킴으로 기본적으로 AOF(animal origin free) 배지를 사용
- Growth factor의 경우 배지회사에서 그 성분과 양을 공개하지 않지만, fibroblast growth factors 같은 몇몇 growth factor의 경우 BHK-21의 성장을 촉진시킴
- BHK-21 세포주에 대한 배지개발은 CD와 AOF를 기본 특성으로 개발

표 1.1 바이러스 백신 생산용 배지 선별 및 특성

#	Name	Medium Platform	CD*	AOF**	Growth Factor
1	VP1	Viral vaccine Production	○	○	○
2	VP2	Viral vaccine Production	○	○	○
3	VP3	Viral vaccine Production	○	○	○
4	VP4	Viral vaccine Production	○	○	○
5	VP5	Viral vaccine Production	○	○	×
6	VP6	Viral vaccine Production	○	○	×
7	VP7	Viral vaccine Production	○	○	○
8	VP8	Viral vaccine Production	○	○	○
9	VP9	Viral vaccine Production	○	○	○
10	VP10	Viral vaccine Production	○	○	○
11	VP11	Viral vaccine Production	○	○	×
12	VP12	Antibody Production	×	○	×
13	VP13	Viral vaccine Production	○	○	×
14	VP14	Viral vaccine Production	○	○	×
15	VP15	Viral vaccine Production	○	○	×
16	VP16	Viral vaccine Production	○	○	×
17	VP17	Viral vaccine Production	○	○	×
18	VP18	Viral vaccine Production	○	○	×
19	VP19	Viral vaccine Production	○	○	×
20	VP20	Viral vaccine Production	○	○	×

* CD : chemically defined

** AOF : animal origin free

나. 표준배지 선별 및 평가 기준 확립

○ 표준배지 선별 실험(그림 1.1)

- BHK-21 세포주를 20 종류의 배지에 최소 5 계대 동안 적응시킴
- BHK-21을 50 ml/250 ml Erl flask에 0.3×10^6 cell/ml로 접종
- 5% CO2 shaking incubator에서 37°C, 100 rpm으로 6일간 키움
- 매일 세포 농도 및 세포활성도 측정
- 3 반복하여 평균 및 표준오차 산정 후, 성장성에 따라 4 그룹으로 나눔(그림 1.2, 1.3, 1.4, 1.5)
- VP6, VP8, VP5 배지가 배양 5일째 MVCC(maximum viable cell concentration) 14.9 ± 0.1 , 14.2 ± 0.5 , $13.8 \pm 1(\times 10^6$ cell/ml)로 가장 높음

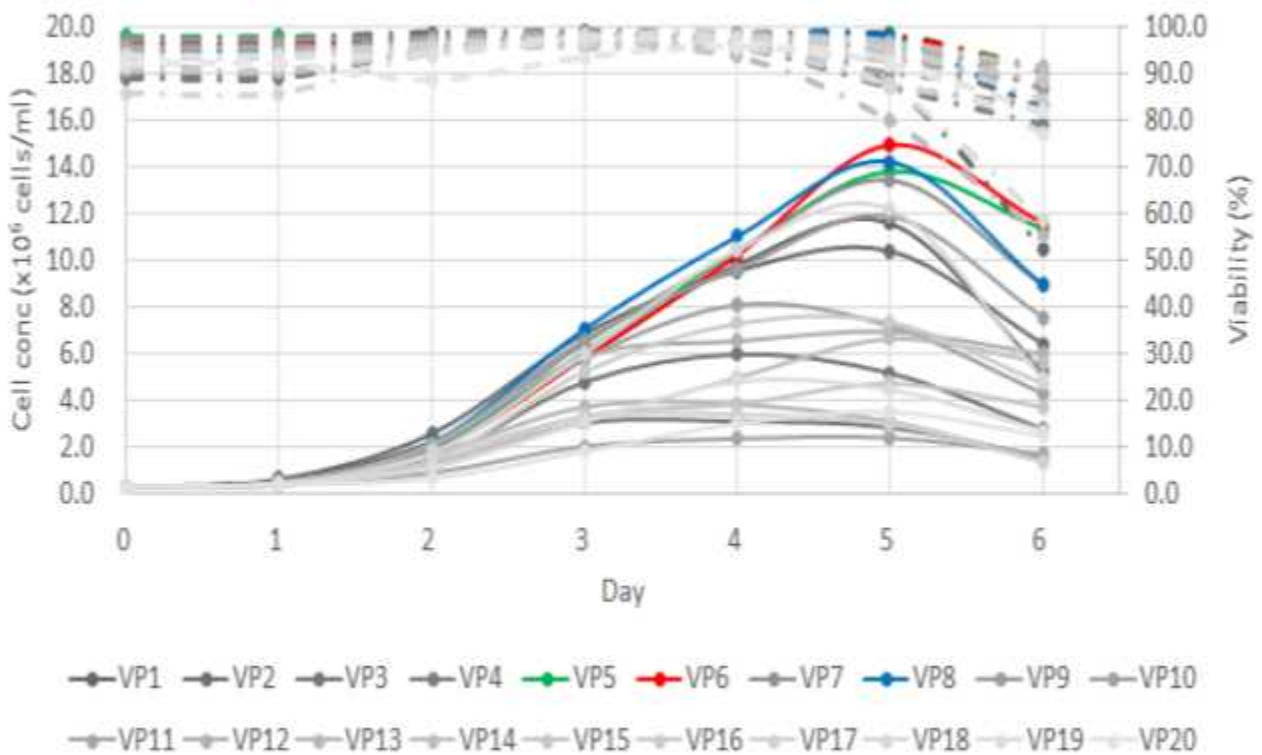


그림 1.1 표준배지선별에서 BHK-21 세포주의 성장 및 세포활성도

○ 표준배지 평가기준 확립

- 표준 배지에서 BHK-21의 특성을 분석하기 위하여, 배양 3일과 4일째 Specific growth rate(μ) 와 doubling time(DT)을 산정

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{dt} \quad (X = \text{cell concentration})$$

$$DT = \frac{dt * \ln 2}{\ln X_2 - \ln X_1}$$

표 1.2 BHK-21 세포의 Specific growth rate(μ) 와 doubling time(DT)

	VP1	VP2	VP3	VP4	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10
μ (h^{-1})	0.021	0.014	0.009	0.001	0.022	0.023	0.020	0.019	0.016	0.014
DT (h)	32.3	50.3	75.3	662.1	31.0	29.7	34.9	37.2	43.8	49.3
	VP11	VP12	VP13	VP14	VP15	VP16	VP17	VP18	VP19	VP20
μ (h^{-1})	0.006	0.004	0.001	0.020	0.006	0.014	0.001	0.023	0.019	0.021
DT (h)	112.2	155.5	647.3	35.5	116.4	50.1	535.8	30.1	36.9	32.9

- MVCC가 가장 높은 A그룹에서는 VP6, 8, 5, 7, 9배지가 포함됨(그림 1.2)
- MVCC는 배양 5일째 $12\sim 15 \times 10^6$ cell/ml의 분포를 가지며, 배양 6일째 세포활성도는 모두 80% 이상
- A그룹의 배지를 사용하여 바이러스 역가 시험 및 상업용 배지첨가물 평가

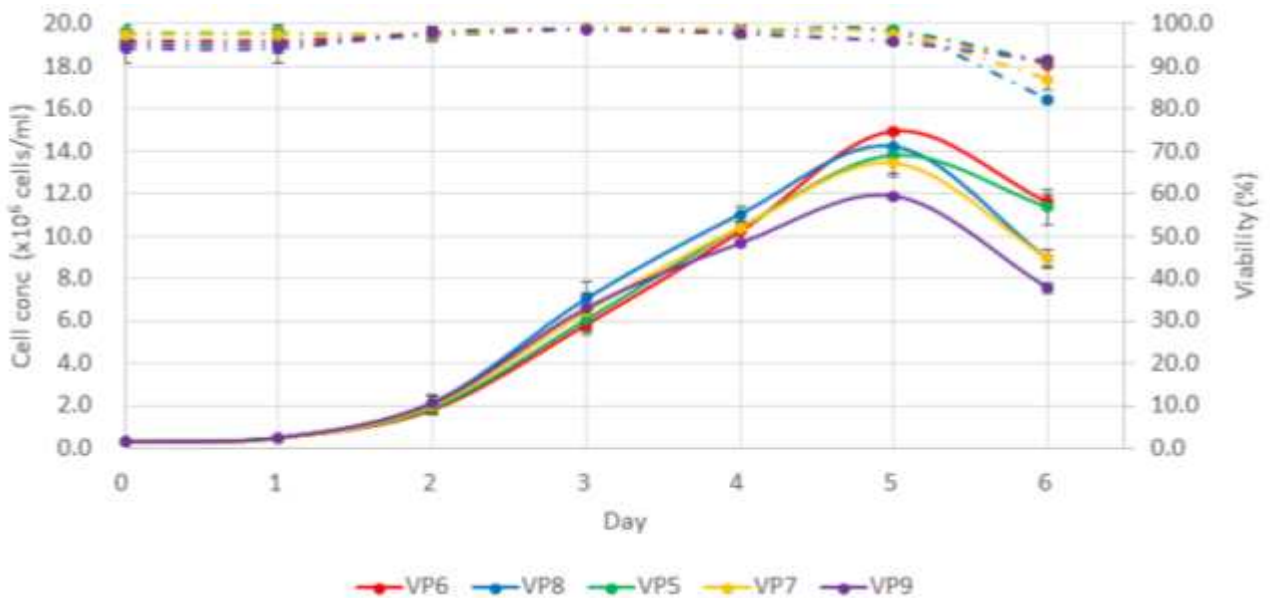


그림 1.2 그룹 A 배지의 BHK-21 성장과 세포활성도

- 배지 B그룹에서는 VP18, 1, 2, 10, 16배지가 포함됨(그림 1.3)
- MVCC는 배양 5일째 $7\sim 12 \times 10^6$ cell/ml의 분포를 가지며, 배양 6일째 세포활성도는 80% 이상은 VP2, 10, 16이고 그 이하는 VP18, 1로 급격히 떨어짐

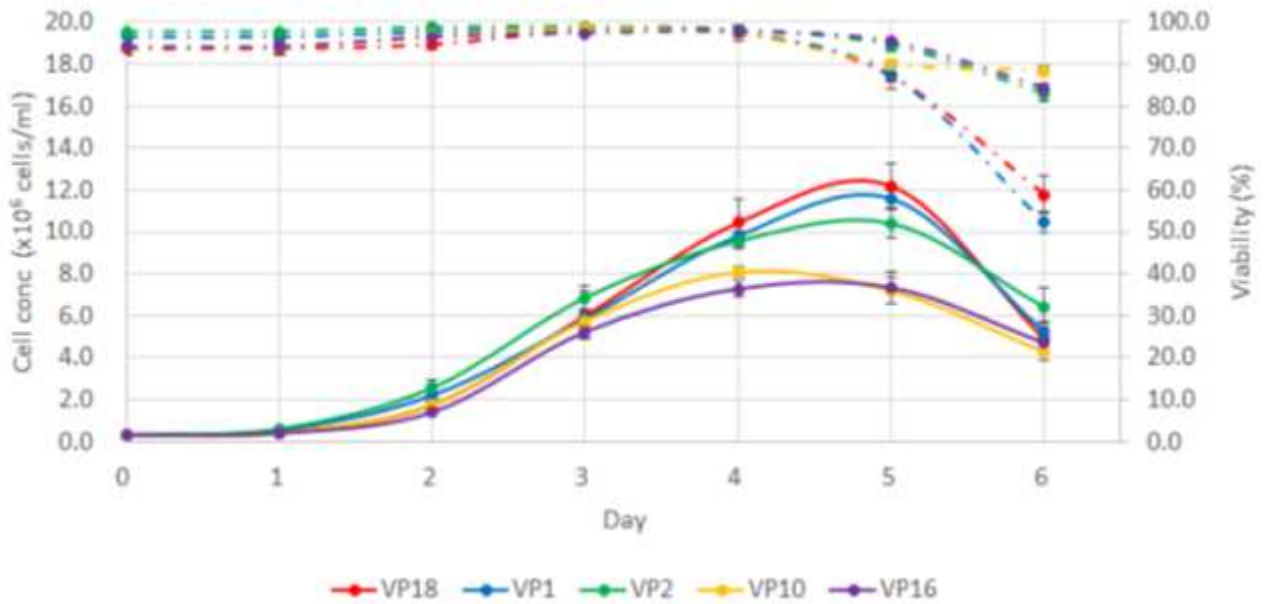


그림 1.3 그룹 B 배지의 BHK-21 성장과 세포활성도

- 배지 C그룹에서는 VP12, 14, 3, 15, 19배지가 포함됨(그림 1.4)
- MVCC는 배양 5일째 $4\sim7\times 10^6$ cell/ml의 분포를 가지며, MVCC는 낮지만 배양 6일째 세포활성도는 VP19를 제외한 모두 80% 이상 유지

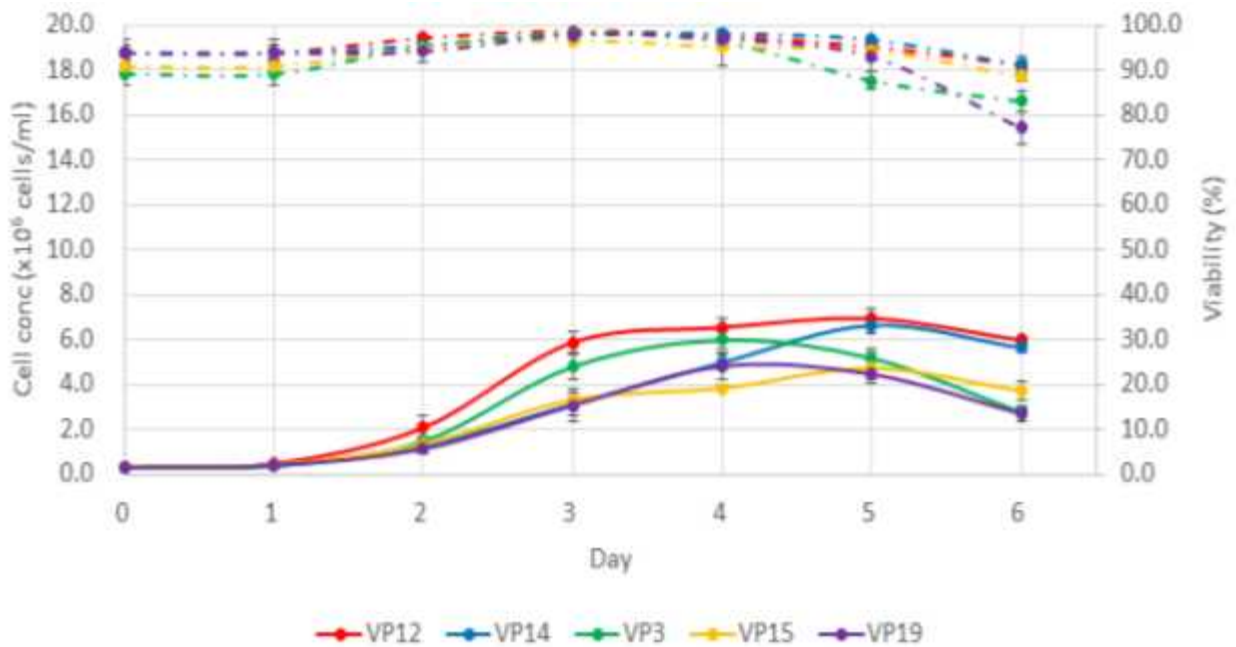


그림 1.4 그룹 C 배지의 BHK-21 성장과 세포활성도

- 배지 D그룹에서는 VP20, 13, 17, 4, 11배지가 포함됨 (그림 1.5)
- MVCC는 $2\sim4\times 10^6$ cell/ml로 가장 낮지만, 배양 6일째 세포활성도는 VP13를 제외한 모두 80% 이상 유지

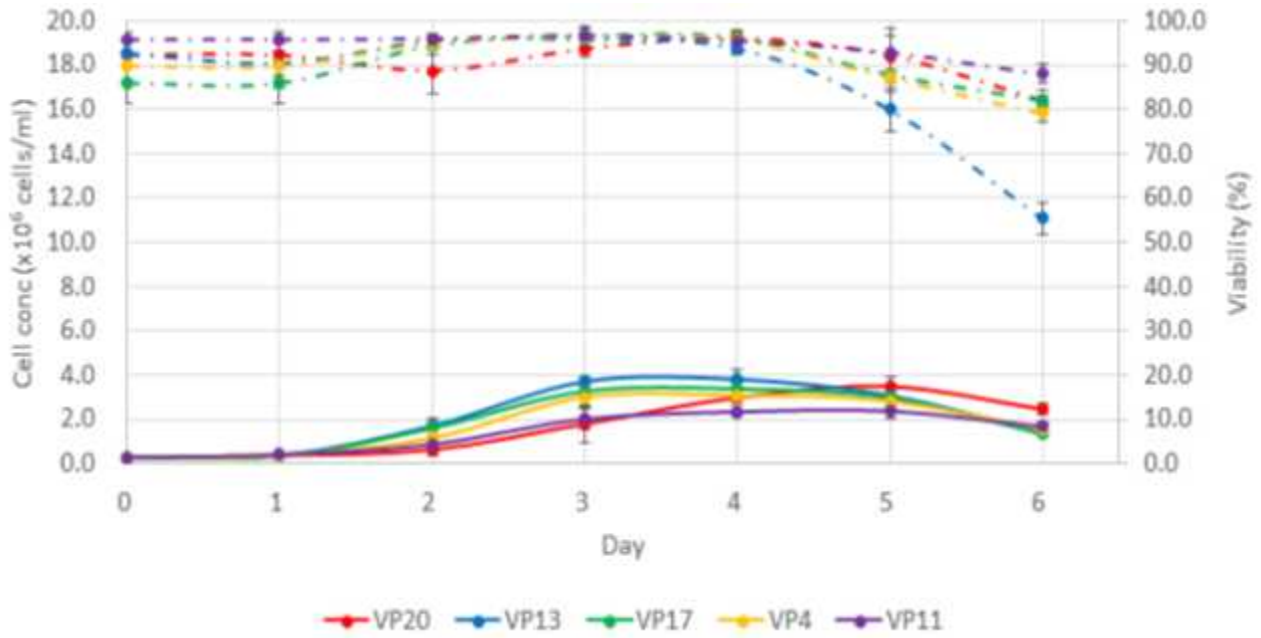


그림 1.5 그룹 D 배지의 BHK-21 성장과 세포활성도

2. 구체역 바이러스 역가 측정

○ 바이러스 감염 시 Fresh media와 PBS 차이 분석

- reovirus 감염을 통한 transfection 실험에서 PBS가 감염단계에 쓰여지는 protocol 이 존재
- 바이러스 감염 시 Fresh media와 PBS 사이에 감염의 차이가 있는지 확인하고자 실험함(그림 2.1)
- PBS를 바이러스 감염에 사용시, virus titer가 거의 나오지 않음
- 바이러스 감염 시간을 24시간으로 하고 있어 그 사이 영양분이 없어 virus가 합성되기전에 세포가 죽는 것으로 사료되어 다음 실험에서는 DMEM이나 RPMI같은 배지를 바이러스 감염 단계에 사용하여 감염율을 확인하고자 함

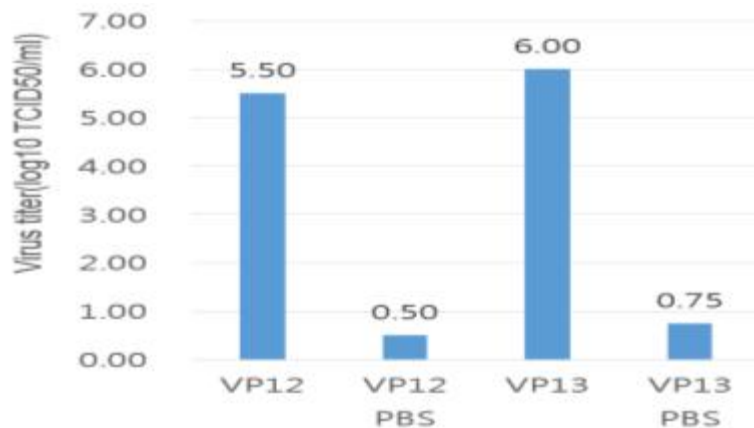


그림 2.1 BHK-21 세포주의 바이러스 감염에서 배지와 PBS 차이

3. 배양 초기 배지첨가물의 효과

- 배양 초기 배지첨가물 첨가에 의한 세포배양 안정화
 - 배양 초기 Feed 8의 첨가가 전체 세포배양에 안정화를 야기하는지 실험
 - BHK-21을 50 ml/250 ml Erl flask에 0.3×10^6 cell/ml로 접종
 - Feed 8 (50 g/L)을 배양 부피 대비 5%를 배양 0일에 첨가(2.5 ml 첨가)
 - 5% CO2 shaking incubator에서 37°C, 100 rpm으로 7일간 키움
 - 매일 세포 농도 및 세포활성도 측정(그림 3.1)
 - 3 반복하여 평균 및 표준오차 산정하여 MVCC 기준 상위 5종 분석(그림 3.2)
 - 배양 초기 첨가물의 첨가에 의하여 비첨가시 보다 MVCC 상위 10종에서 평균 11.7×10^6 cell/ml에서 14.6×10^6 cell/ml로 2.9×10^6 cell/ml 증가함
 - 배양 마지막 날 세포활성도의 경우, MVCC 상위 10종에서 평균 94.2%에서 95.1%로 배지첨가물에 의하여 0.9% 증가함
 - MVCC 상위 5종에서 μ 값은 평균 0.02 h^{-1} 에서 0.024 h^{-1} 로 0.004 h^{-1} 증가, DT의 경우 평균 35.3시간에서 29.4시간으로 5.9시간 빨라짐

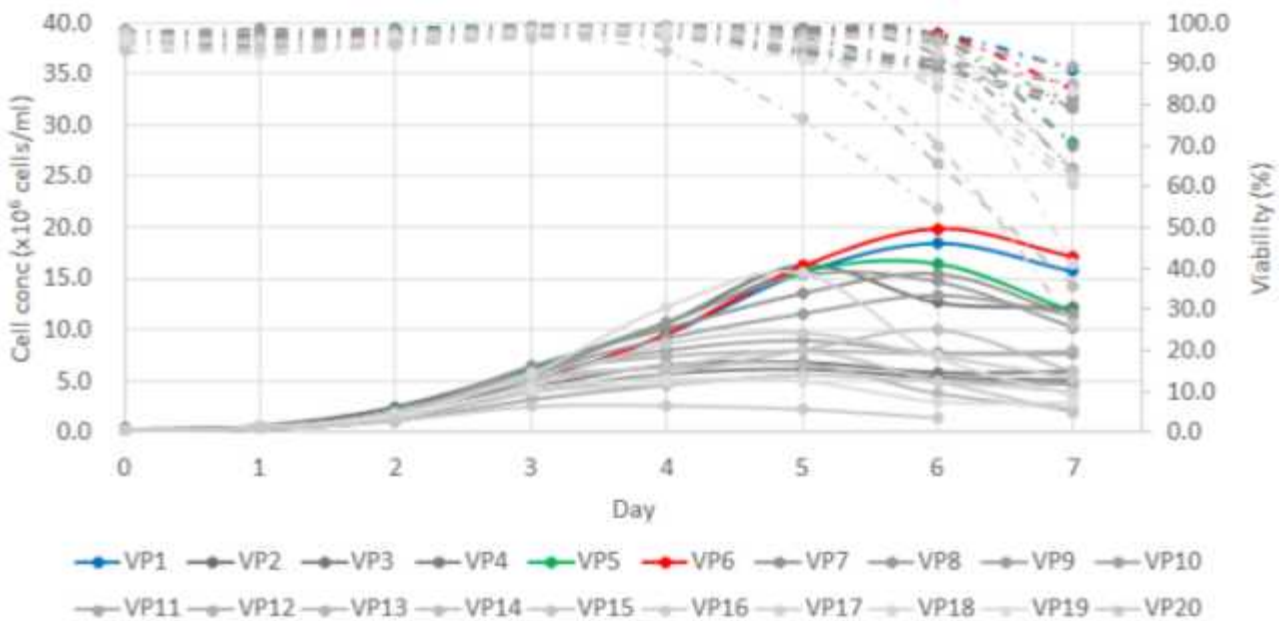


그림 3.1 배지첨가물의 초기배양이 세포 성장에 미치는 영향

표 3.1 배양 초기 배지첨가물 첨가에 의한 BHK-21 세포의 Specific growth rate(μ) 와 doubling time(DT)

	VP1	VP2	VP3	VP4	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10
μ (h^{-1})	0.027	0.022	0.017	0.015	0.023	0.029	0.019	0.026	0.019	0.015
DT (h)	25.3	31.1	40.8	47.5	29.7	24.2	36.8	26.3	36.4	47.3
	VP11	VP12	VP13	VP14	VP15	VP16	VP17	VP18	VP19	VP20
μ (h^{-1})	0.015	0.010	0.007	0.016	0.010	0.025	0.007	0.031	0.007	0.001
DT (h)	45.5	67.4	100.2	43.6	68.4	27.7	99.4	22.1	95.2	531.6

- 상위 5종의 MVCC의 경우 16×10^6 cell/ml에서 20×10^6 cell/ml로 분포하며, VP6가 $19.9 \pm 1.1 (\times 10^6$ cell/ml)로 여전히 가장 높음(그림 3.2)
- 배양 초기 배지첨가물에 의해 B그룹에 있던 VP1과 VP2가 상위 5종에 포함된 것으로 보아 배지첨가물과 배지의 상호작용이 증가됨

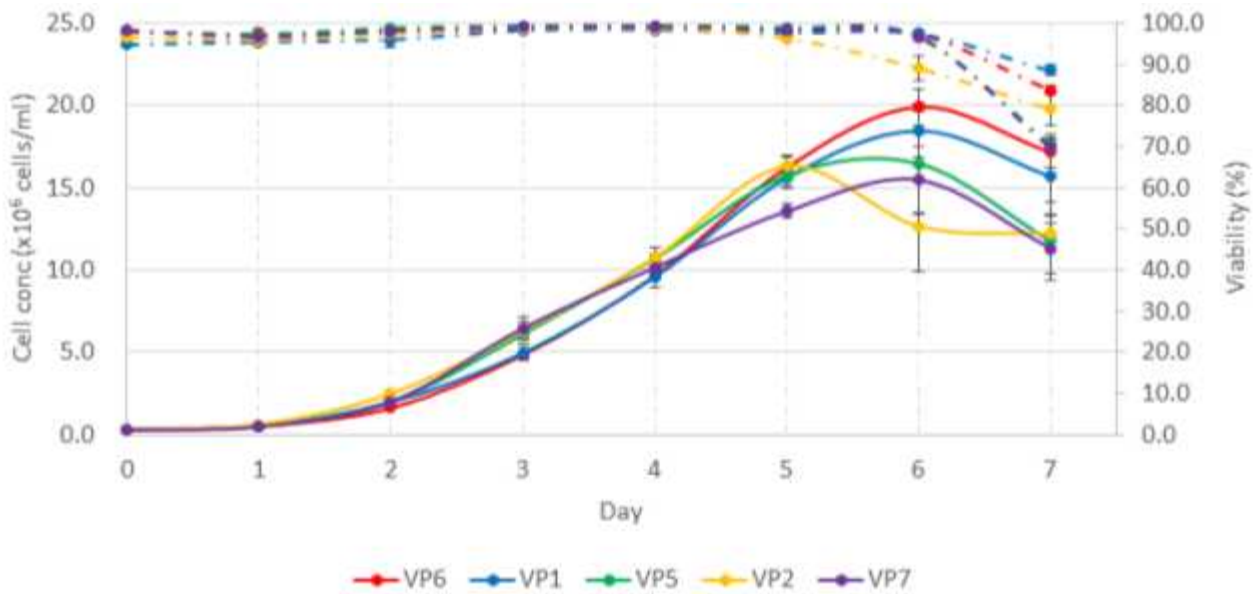


그림 3.2 배양초기 배지첨가물에 의한 상위 5종 배지 선별

4. 구제역 백신 생산 세포주의 배지첨가물 평가

가. 상업용 배지첨가물 선정 및 특성

- 현재 세계적인 배지회사의 상업용 배지첨가물 중, BHK-21 세포주용 첨가물이나, 바이러스 백신 생산에 사용되어졌던 첨가물(F : Feed) 10 종류를 선택하여, 구제역 바이러스 백신 생산 세포주인 BHK-21의 배지첨가물 선별 (표 4.1)
- F8, F9, F10 만 CD 첨가물

- 모든 첨가물의 경우 기본적으로 AOF와 PF(protein free)로 정제 공정이나 의약품 안정성에 나타날 문제를 배제시킴
- F2, F8, F9의 경우 Growth factor가 포함되어 있음
- F9, F10의 경우 Lipid가 강화된 첨가물
- Glucose와 glutamine의 경우 배양과정 동안 각각 1 g/L와 1 mM 이상 유지함
- Control로써 배지첨가물의 첨가 없이 glucose와 glutamine만 첨가함

표4.1 구제역 백신 세포주의 배지첨가물 선별 및 특성

#	Name	CD	AOF	PF [§]	Growth Factor
1	Feed 1(F1)	×	○	○	×
2	Feed 2(F2)	×	○	○	○
3	Feed 3(F3)	×	○	○	×
4	Feed 4(F4)	×	○	○	×
5	Feed 5(F5)	×	○	○	×
6	Feed 6(F6)	×	○	○	×
7	Feed 7(F7)	×	○	○	×
8	Feed 8(F8)	○	○	○	○
9	Feed 9(F9)	○	○	○	○
10	Feed 10(F10)	○	○	○	×

§ PF : protein free

나. 배지첨가물 선별 및 평가 기준 확립

- 배지첨가물 선별 실험(그림 4.1)
 - 표준 배지 선별에서 MVCC가 가장 높았던 VP6 배지를 이용하여 실험(그림1.1, 3.1)
 - BHK-21을 50 ml/250 ml Eri flask에 0.3×10^6 cell/ml로 접종
 - Feed stock (50 g/L)을 배양 부피대비 5%(2.5 ml)를 배양 0, 2, 4, 6일 째 첨가
 - 5% CO2 shaking incubator에서 37°C, 100 rpm으로 7일간 키움
 - 매일 세포 농도 및 세포활성도 측정
 - 3 반복하여 평균 및 표준오차 산정
 - F9, F10, F8 배지가 배양 6일째 MVCC 26.1 ± 3.3 , 26.5 ± 2.5 , 25.5 ± 4 ($\times 10^6$ cell/ml)로 가장 높음
 - Control의 경우 glucose와 glutamine의 조절만으로 기존 MVCC 14.9×10^6 cell/ml에서 17.8×10^6 cell/ml로 2.9×10^6 cell/ml 증가함

- Feed 첨가로 인한 MVCC의 경우 상위 5종의 평균이 24.2×10^6 cell/ml로 Con에 비하여 6.4×10^6 cell/ml 증가
- MVCC 상위 5종에서 μ 값은 평균 0.03 h^{-1} , DT 평균 21.4시간으로 Control이 각각 0.038 h^{-1} , 18.1시간인 것에 비해 떨어졌지만, 배양 전반에 안정적인 성장이 가능

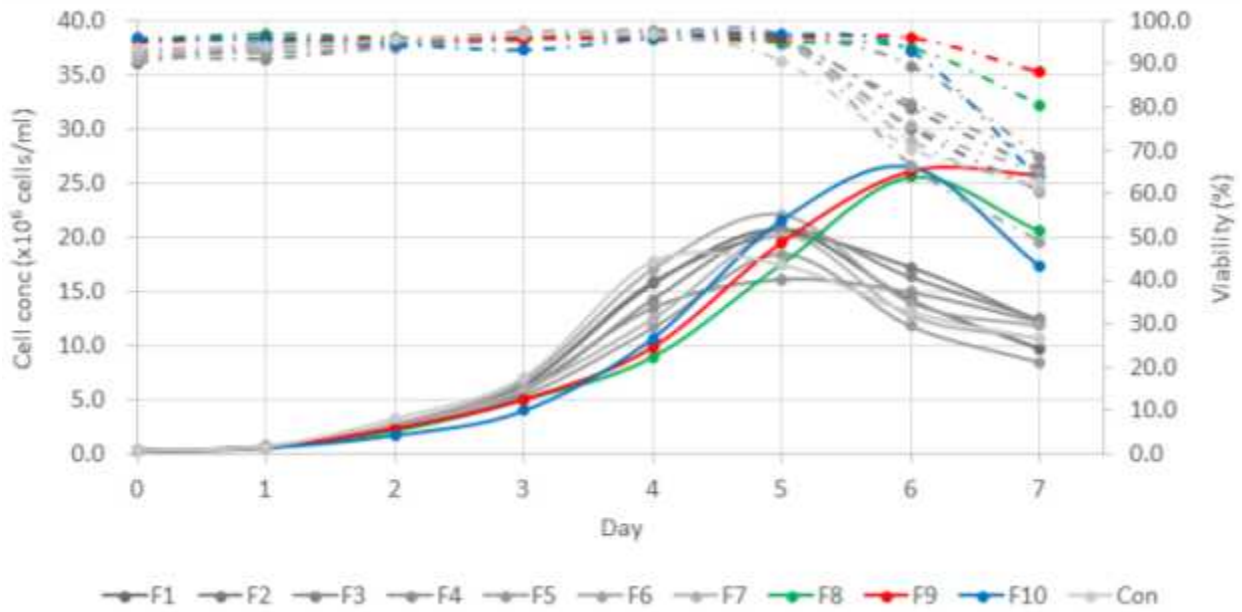


그림 4.1 배지첨가물 선별에서 BHK-21 세포주의 성장 및 세포활성도

표 4.1 배지첨가물 첨가에 의한 BHK-21 세포의 Specific growth rate(μ) 와 doubling time(DT)

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	Con
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.037	0.038	0.038	0.033	0.032	0.038	0.031	0.024	0.028	0.041	0.038
DT (h)	18.5	18.4	18.3	21.0	21.7	18.2	22.6	28.7	24.9	17.0	18.1

- Lipid가 강화된 F9와 F10이 배양후반에 안정화를 가져오는 것으로 보아 고농도 세포 배양시 lipid의 역할이 중요한 것으로 사료됨(그림 4.2)

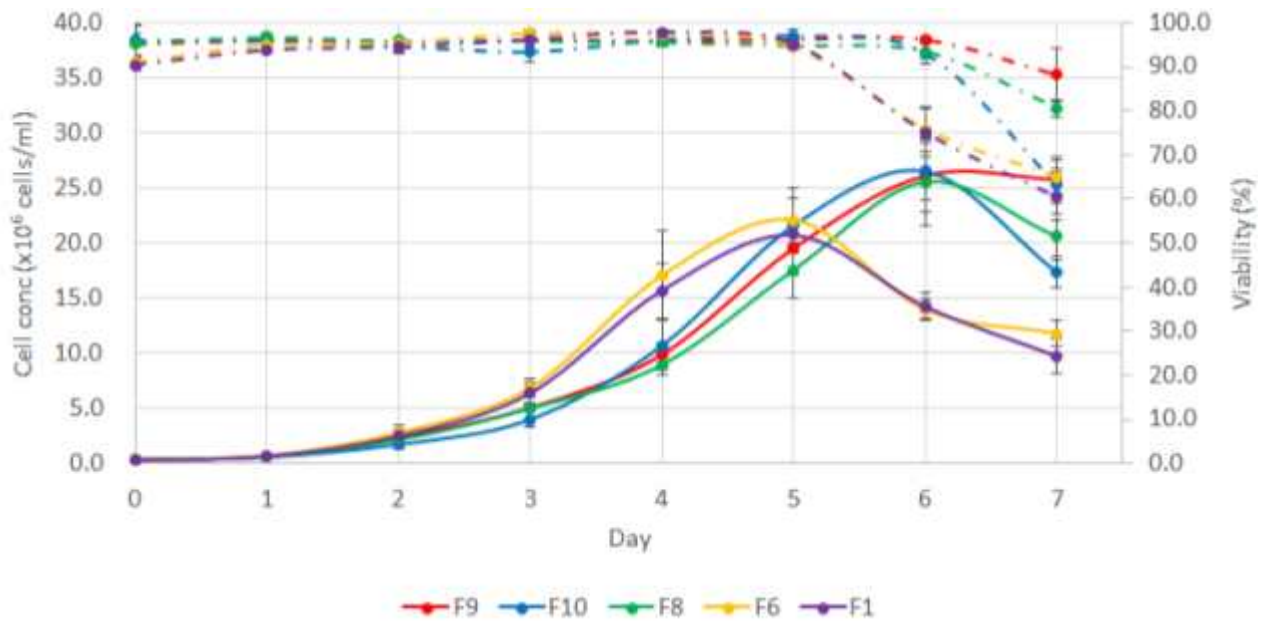


그림 4.2 배지첨가물에 의한 상위 5종 배지첨가물 선별

- F4와 같은 배지첨가물의 첨가에 의하여 control보다 성장이 억제되는 것으로 보아, 배지와 배지첨가물의 상호작용이 중요하다고 사료됨(그림 4.3)

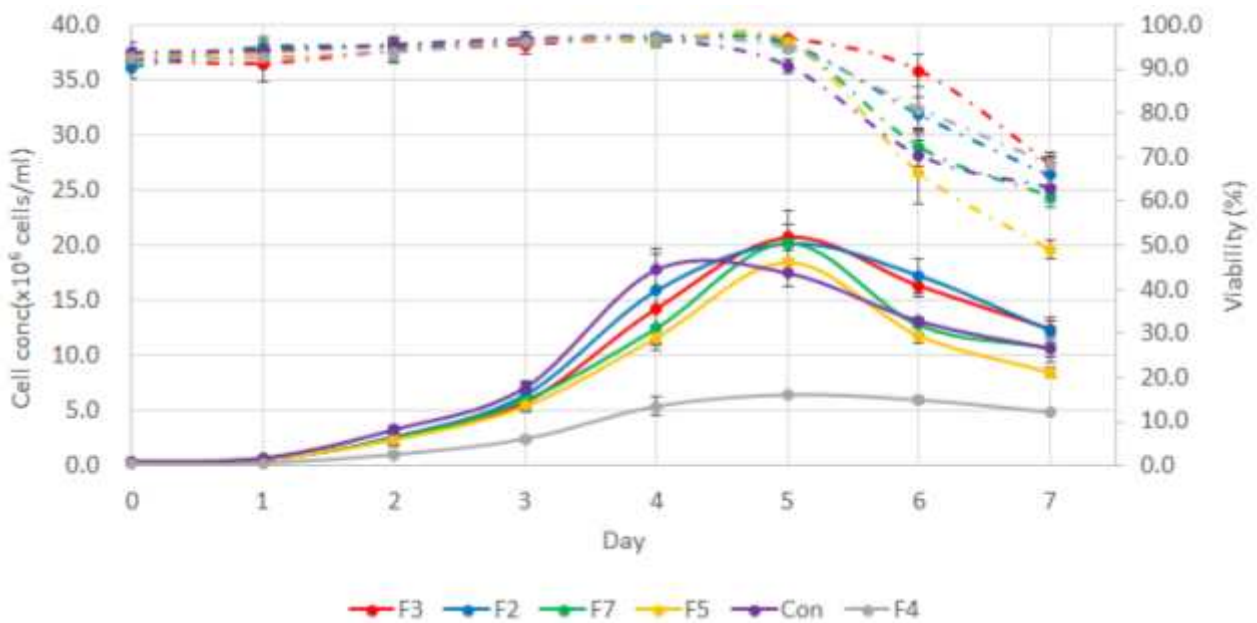


그림 4.3 배지첨가물에 의한 하위 5종 배지첨가물과 control

5. 표준배지의 구축

- 상업용 배지의 단독 및 혼합, 첨가물혼합을 통한 다양한 표준배지 구축 및 평가
- 표준배지의 다양한 구축을 통하여 상업배지의 단종 및 수급 문제 대비
- 표준배지의 배양법, 바이러스 역가 측정법 확립

표 5.1 표준배지 구축 및 구제역 바이러스 접종을 위한 배지교체

세포주	기본배양배지	바이러스접종 시 세포농도	원심분리	원심분리 후 사용배지종류
KCTC12945BP	ProBHK-1(A)	전체 세포	○	A
	CD-BPM(B)			A
	A:B Mix (7:3)			B
	A:B Mix (5:5)			A
	ProBHK-EB			A

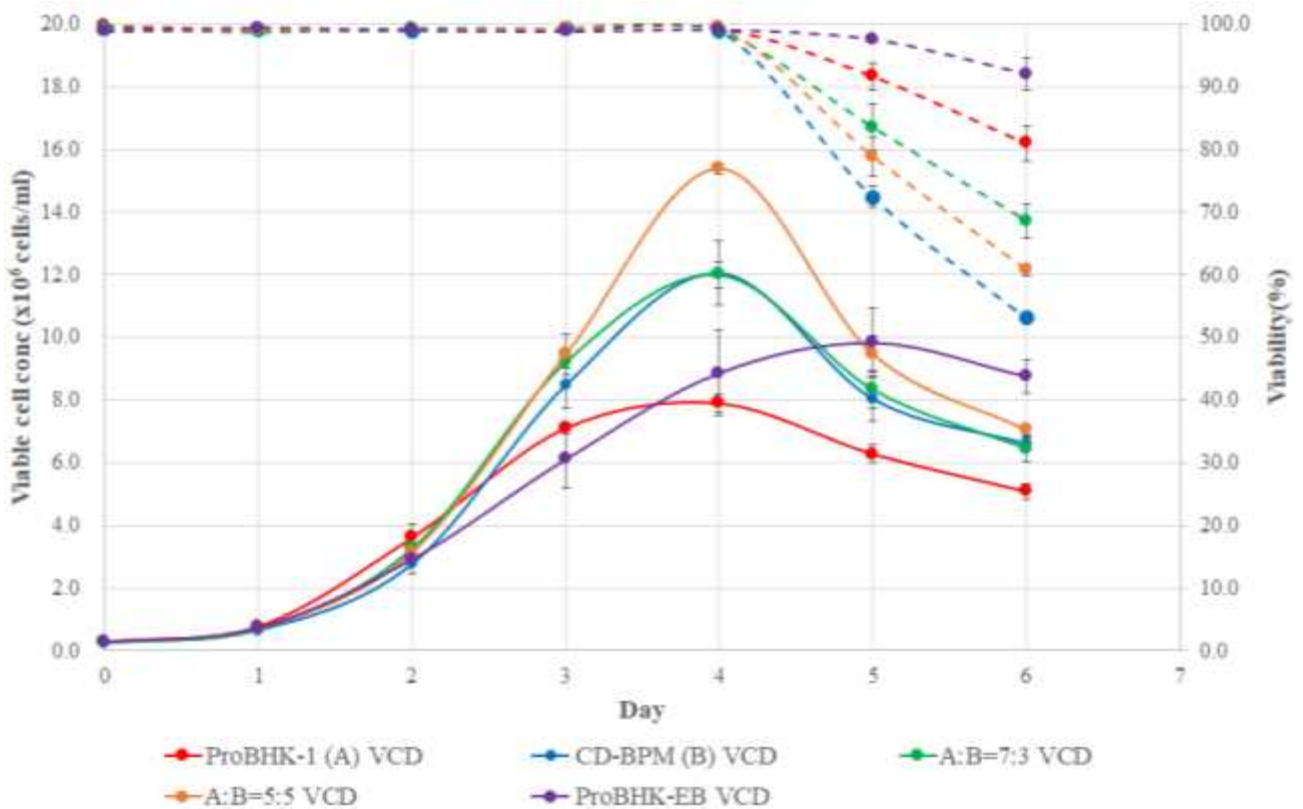


그림 5.1 표준배지에 따른 세포 농도 및 세포활성도

- 다양한 표준배지에서 A:B=5:5 혼합배지가 배양 4일차 가장 높은 세포농도인 15.38×10^6 cell/ml 까지 성장

- ProBHK-EB(Enhanced batch)의 경우 배양 5일차 최고세포농도에 도달
- ProBHK-EB를 제외한 나머지 표준배지는 배양 5일 차부터 세포활성도가 90% 이하로 떨어짐

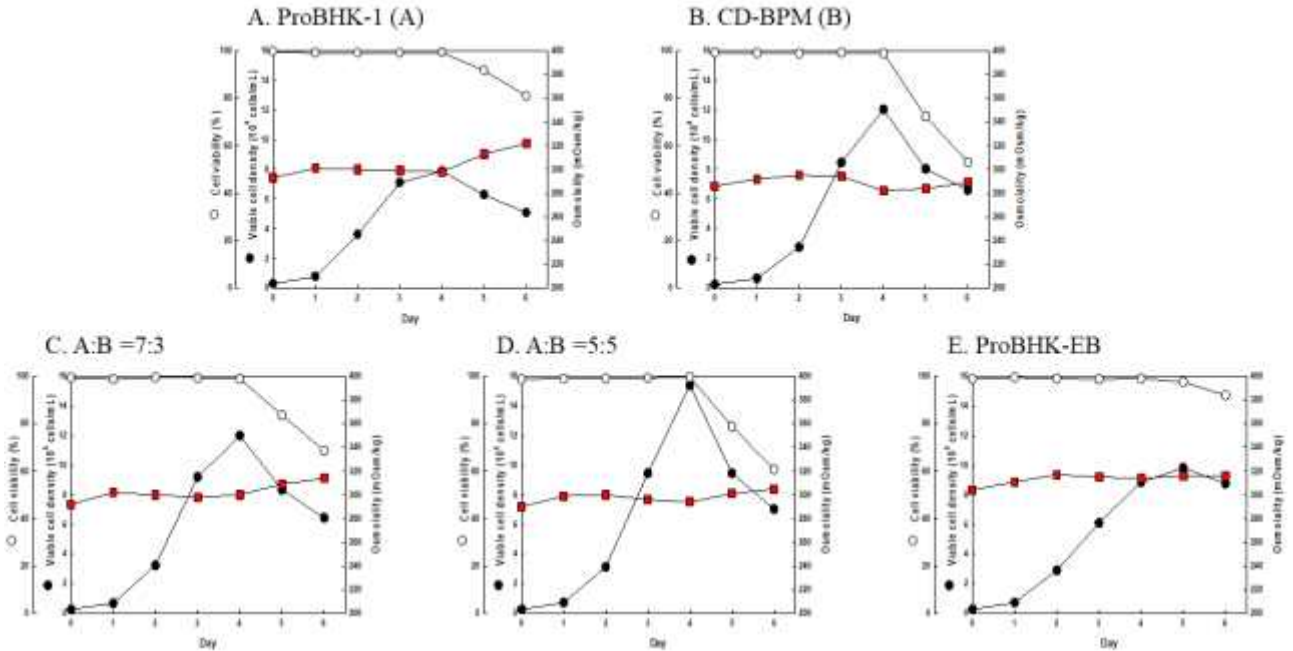


그림 5.2 표준배지에 따른 Osmolality 변화

- 모든 표준배지의 Osmolality는 280~320 mOsm/kg 사이로 유지됨

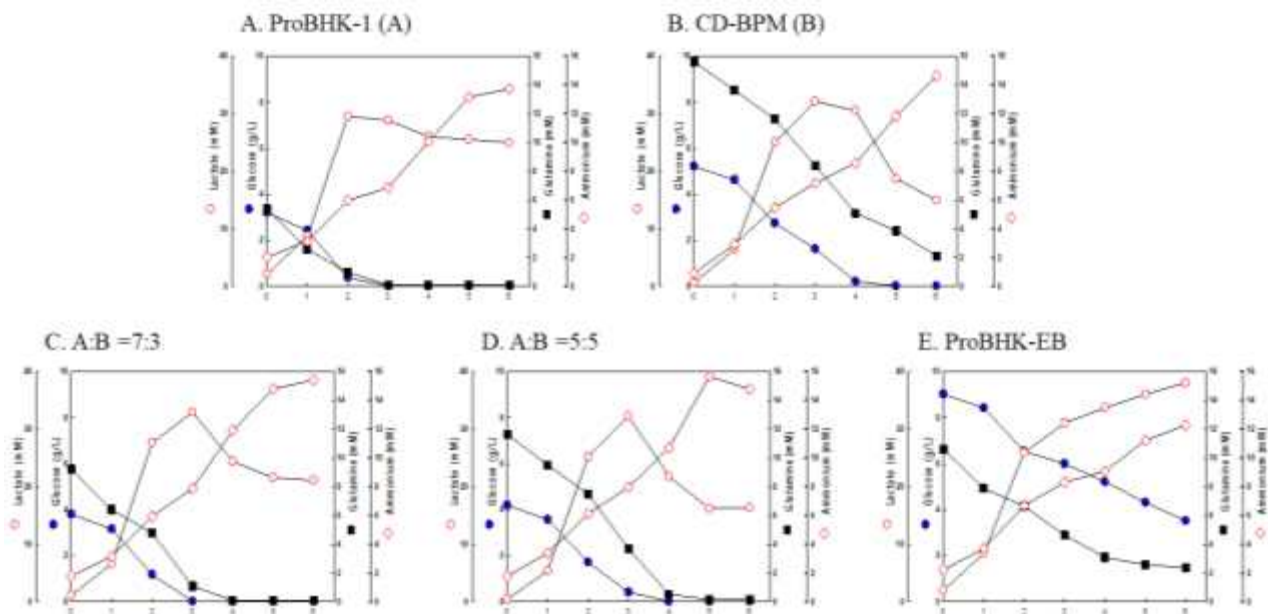


그림 5.3 표준배지에 따른 배양 메타볼라이트 분석

- ProBHK-1은 배양 3일부터 Glucose와 Glutamine 모두 고갈됨

- 7:3 혼합배지, 5:5 혼합배지는 배양 4일부터 Glucose와 Glutamine 모두 고갈됨
- ProBHK-EB는 배양 종료까지 Glucose와 Glutamine 고갈이 없음
- CD-BPM 은 Glucose만 배양 4일차에 고갈되고 Glutamine 고갈 없이 배양 종료

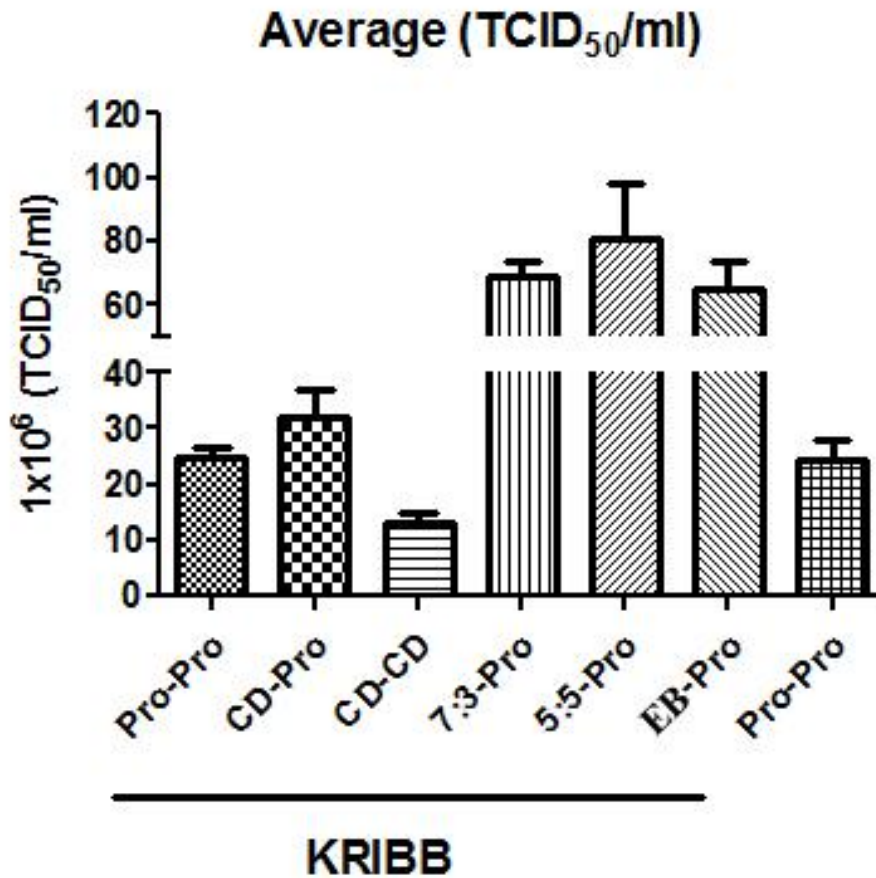


그림 5.4 표준배지에 따른 구제역 바이러스 역가 측정

- 배양 4일차 배지교환 후 구제역 바이러스 역가 평가
- 5:5 혼합배지에서 80×10^6 TCID₅₀/ml로 가장 높은 바이러스 생산성을 보이며 7:3 혼합배지, ProBHK-EB가 그 다음으로 높은 바이러스 생산성을 보임
- CD-BPM 배지의 경우 교체배지가 ProBHK-1일 때 더 높은 역가를 보임

6. 유가식배양첨가물선정

가. 구제역 백신생산 세포주의 첨가 배지인 CB feed1 최적 농도 선별

- 기존 50 g/L CB feed1(pH7.2)에서 발견된 문제점인 용해도를 해결하기 위하여 세포 성장에 최적의 농도를 선별
- 25, 30, 35, 40, 50 g/L로 CB feed1 (pH 7.2)를 만들어 배양 0일에 배양액 부피 대비 5%를 첨가하여 실험

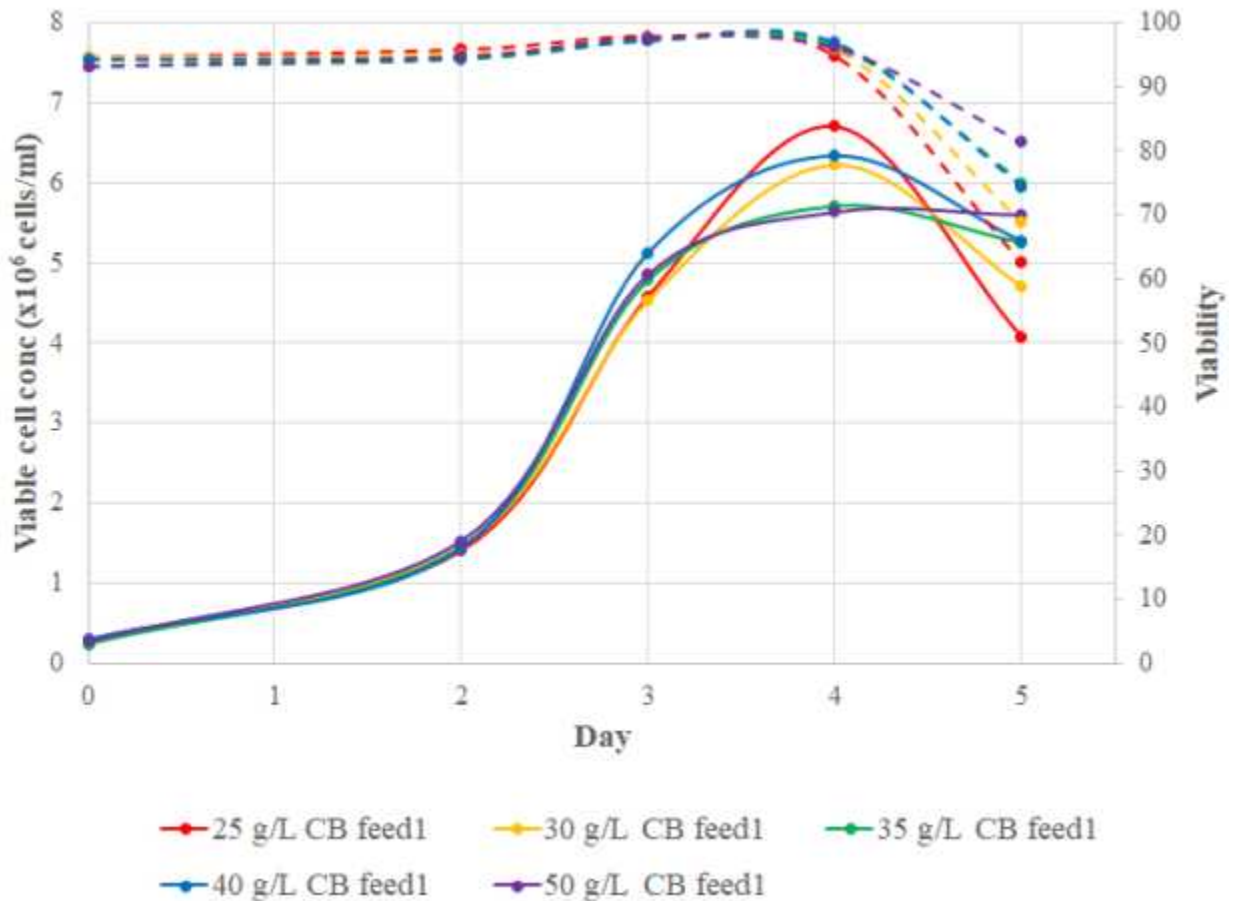


그림 6.1 Cell Boost의 농도별 세포 성장 및 세포 활성도

- 농도가 35 g/L 이하일 때, 용해되지 않는 물질 없이 모두 녹음
- 배양 4일째 25 g/L CB feed1가 6.6×10^6 cells/ml로 가장 높지만 영양분 고갈 문제로 세포활성도가 5일째 가장 많이 떨어짐
- Fed-batch 배양을 통하여, 25 g/L CB feed1의 문제점이 해결될 것으로 판단되며, Osmolality를 낮게 유지하기 위하여 25 g/L CB feed1를 사용

7. 선정배지에 대한 바이오리액터평가

가. 표준작업지시서(Standard Operating Procedure)

- 다른 협동기관과의 실험적 변수를 줄이고, 효율적인 기술이전을 위하여 표준작업지시서를 작성하여 실험 수행
- 세포 농도 및 세포활성도 측정
- Glucose, Glutamine, Lactate, Ammonium, Osmolality를 측정

나. Simple fed-batch protocol

#	단계	실험방법
1	플라스크 준비	- Erl flask 125 ml
2	배지 준비	- ProBHK-1 28.5 ml + 1.5 ml CB feed1 (25g/L) - 37°C CO2 incubator에서 warming
3	세포 접종	- 0.3×10^6 cells/ml - 3세대 이상, 3~4일 배양세포, - 세포농도 $> 3 \times 10^6$ cells/ml, 세포활성 $> 95\%$, 접종량 < 1.5 ml
4	Glucose 첨가	- 200 g/L stock - 배양 2, 4일에 glucose stock 0.6 ml 첨가
5	Glutamine 첨가	- 200 mM stock - 배양 2, 4일에 glutamine stock 0.6 ml 첨가
6	Sampling	매일 세포농도 및 세포 활성도 측정
7	Termination	- Viability 80% $<$

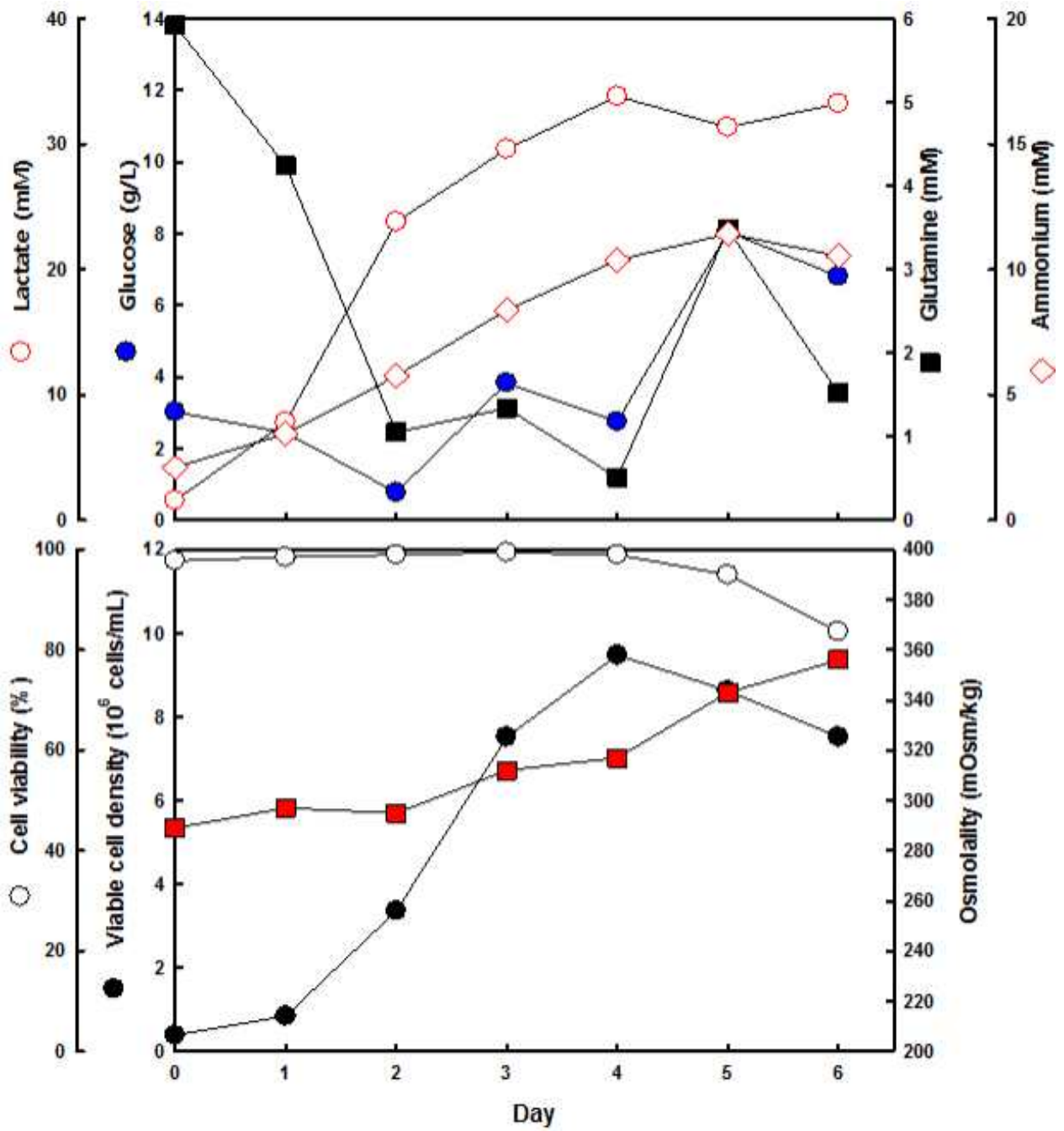


그림 7.1 Simple fed-batch protocol에 따른 세포 성장 및 메타볼라이트 분석

- Simple fed-batch 배양의 경우 최대세포농도는 배양 4일에 9.5×10^6 cells/ml, 세포 활성도는 95% 이상
- Glucose와 Glutamine의 고갈은 없음
- Lactate는 최대 33 mM을 넘지 않고, Ammonium은 최대 11mM을 넘지 않음

다. Fed-batch protocol

#	단계	실험방법
1	플라스크 준비	- Erl flask 125 ml
2	배지 준비	- ProBHK-1 28.5 ml + 1.5 ml CB feed1 (25 g/L) - 37°C CO2 incubator에서 warming
3	세포 접종	- 0.3×10^6 cells/ml - 3계대 이상, 3-4일 배양세포, - 세포농도 $> 3 \times 10^6$ cells/ml, 세포활성 $> 95\%$, 접종량 < 1.5 ml
4	CB feed1 첨가	- 25 g/L CB feed1, pH 7.4 - 배양 2, 4일에 CB feed1 1.5 ml 첨가
5	Glucose 첨가	- 200 g/L stock - 배양 2, 4, 7일에 glucose stock 1 ml 첨가
6	Glutamine 첨가	- 200 mM stock - 배양 2, 4, 7일에 glutamine stock 1 ml 첨가
7	Sampling	매일 세포농도 및 세포 활성도 측정
8	Termination	- Viability 80% <

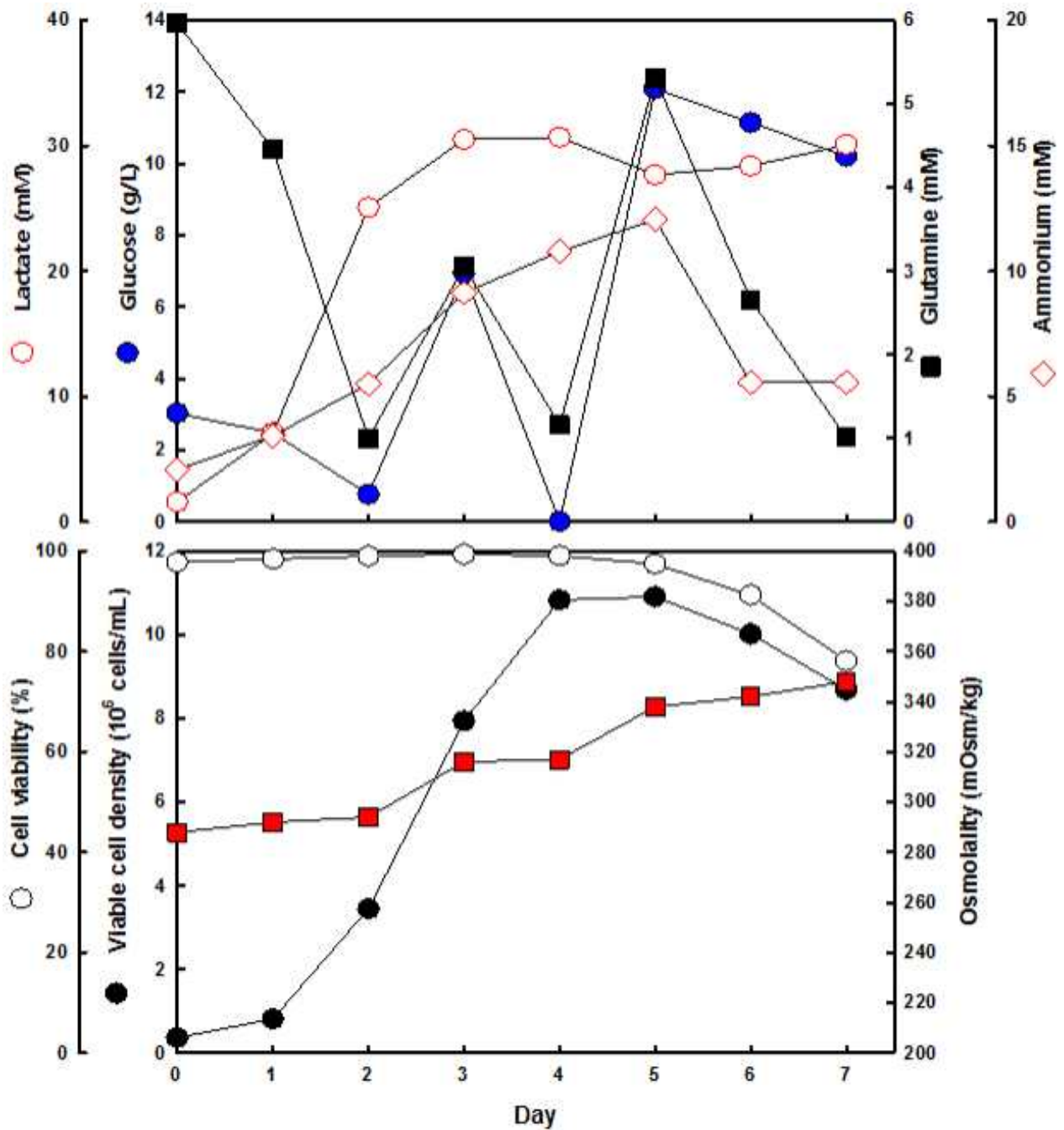


그림 7.2 Fed-batch protocol에 따른 세포 성장 및 메타볼라이트 분석

- Fed-batch 배양의 경우 최대세포농도는 배양 4일에 10.9×10^6 cells/ml, 세포 활성도는 95% 이상
- Glucose의 경우 배양 4일에 고갈되므로 배양 2, 3, 4일에 1 ml 첨가로 변경
- Glutamine의 고갈은 없음
- Lactate는 최대 31 mM을 넘지 않고, Ammonium은 최대 12.6 mM을 넘지 않음

라. Simple fed-batch와 Fed-batch배양 비교

- 최대세포농도(MVCC), 최대세포농도 도달 배양일, 비성장 속도(μ), 세포 증배시간 (DT, doubling time)을 비교

표7.1 Simple fed-batch와 Fed-batch배양 비교

	Simple Fed-batch	Fed-batch
MVCC (10^6 cells/ml)	9.48	10.9
MVCC day	4	4
μ (h ⁻¹)	0.022	0.024
DT (h)	20.7	19.9

- 비성장속도는 Fed-batch는 0.024로 Simple fed-batch의 0.022보다 조금 더 빠름
- 세포 증배시간은 Fed-batch가 0.8시간 더 빠름

마. 2 L 바이오리액터에서 pH 공정 확립

- 2 L 바이오리액터를 이용하여 배양공정 pH 조절을 확립
- Fed-batch protocol에 따라 수행
- 50 ml/250 ERK flask를 이용하여 6~12시간 간격으로 pH를 측정

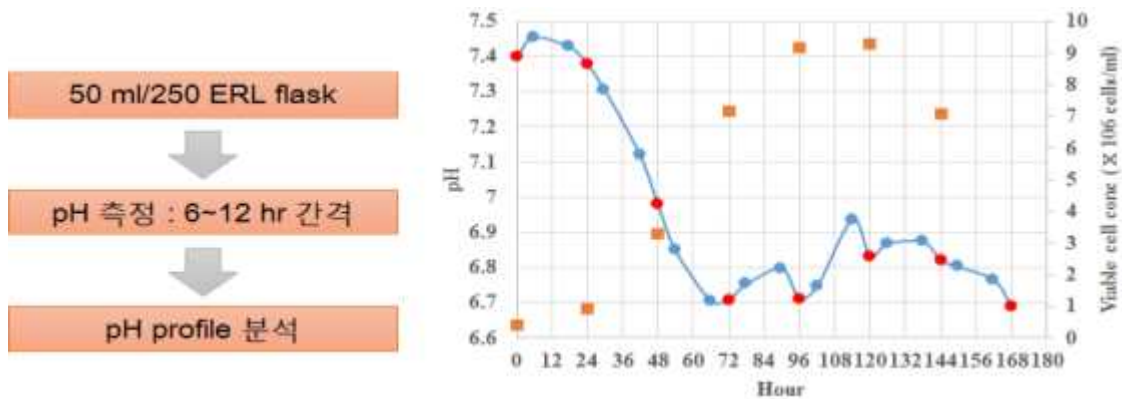


그림 7.3 Shake flask배양의 세포 농도 및 pH profile 분석

바. Flask pH profile을 바이오리액터 배양에 적용

- Flask pH profile을 바이오리액터 배양에 적용하여, 기존 방식인 pH7.2로 일정하게 유지하여 배양하였을 경우와 비교

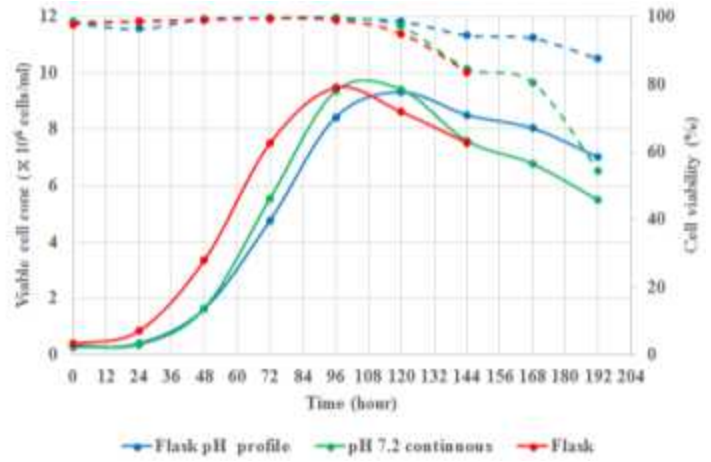


그림 7.4 Flask 배양, Flask pH profile 적용 바이오리액터, Continuous pH 적용 바이오리액터의 세포 성장 및 세포 활성도 비교

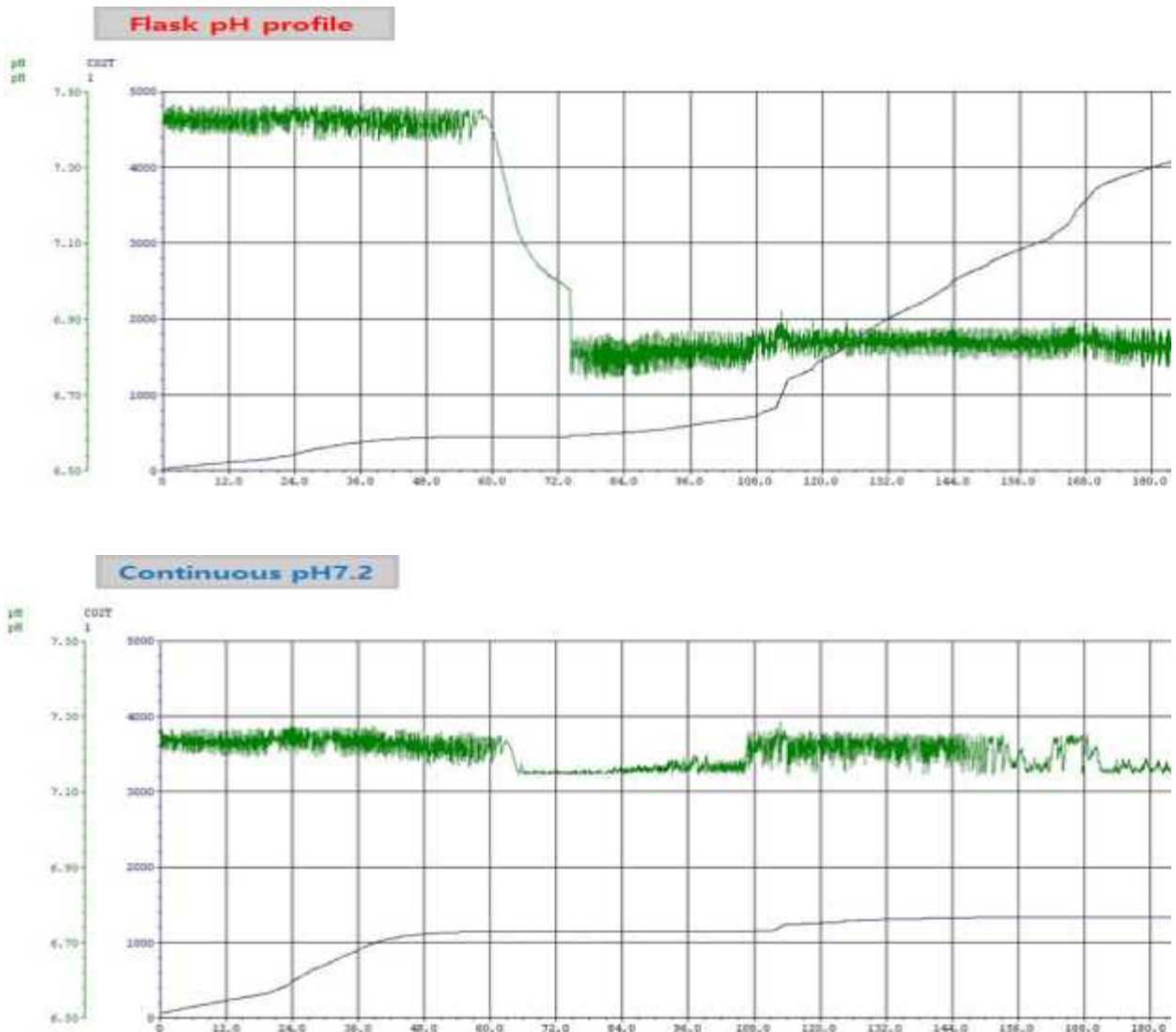


그림 7.5 바이오리액터의 pH control

- Flask에서 pH profile을 측정하였을 경우, pH7.4로 시작하여 24시간 후부터 떨어지기 시작하여 60시간부터 pH6.7에서 pH6.9사이로 유지됨
- Flask pH profile을 바이오리액터에 적용하여 pH7.4로 시작하여 자연적으로 pH6.8까지 떨어지도록 배양하고, 그 이후 pH6.8을 유지하도록 1 M carbonate 용액으로 pH 조절하여 배양
- Flask 배양과 Continuous pH7.2 의 경우, 배양 4일에 9.5×10^6 cells/ml까지 자랐으나, Flask pH profile은 그보다 24시간이 지연된 5일에 최대세포 농도에 도달함
- 최대세포농도에 도달하는 시간은 24시간 늦었지만, 세포활성도에서는 배양 7일까지 90% 이상을 유지하여, 세포에 안정성을 가짐

사. 바이오리액터 배양의 메타볼라이트 분석 비교

- 바이오리액터 배양의 Flask pH profile공정과 Continuous pH7.2공정의 Glucose, Glutamine, Lactate, Ammonium, Osmolality를 측정

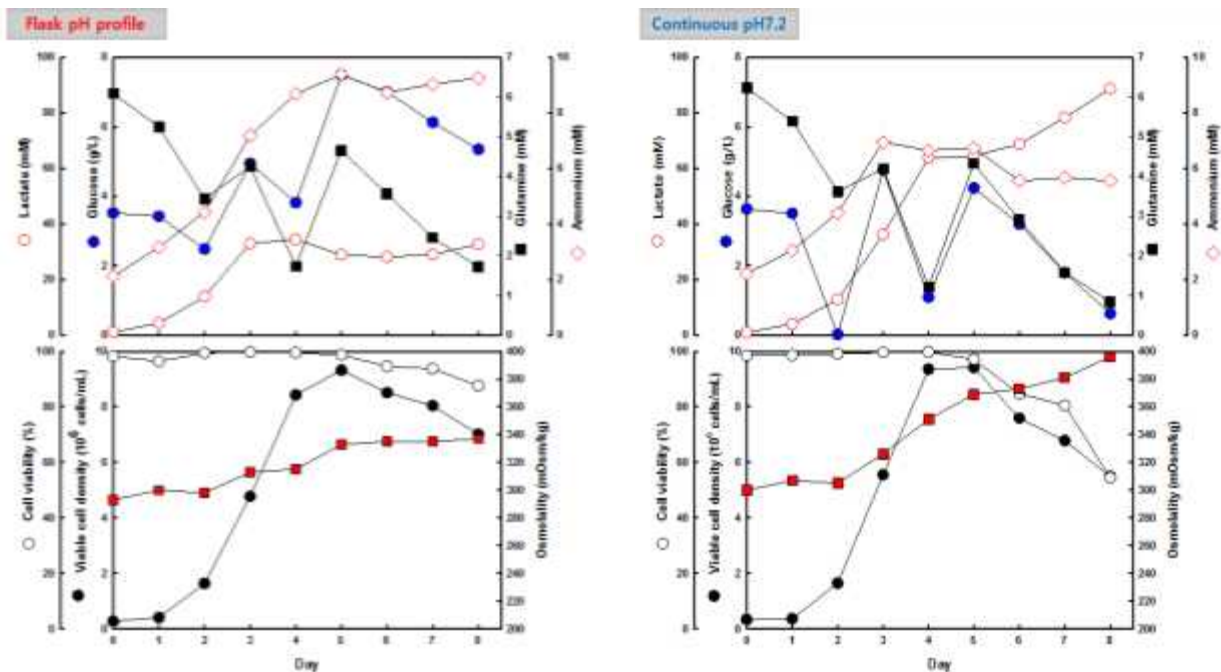


그림 7.6 바이오리액터의 메타볼라이트 분석

- Flask pH profile공정에서는 배양 마지막까지 Glc, Gln의 고갈은 없었으나, Continuous pH7.2공정에서는 배양 2일에 Glc가 고갈 됨
- Continuous pH7.2공정에서는 Glc 소모가 매우 빠르고, Lac가 배양 3일에 70 mM 이상으로 과도하게 쌓여 Base가 과량 들어갔으며, Osmolality도 배양 3일 이후, 340 mOsm/kg 이상이 되어 세포활성도가 배양 5일 이후 급격하게 떨어짐
- Flask pH profile공정이 Continuous pH7.2공정보다 메타볼라이트 측면에서는 안정적으로 이루어짐

○ 바이오파이액터 배양에서는 초기 세포 농도를 0.3×10^6 cells/ml에서 0.4×10^6 cells/ml 또는 그 이상으로 높여 키워 lag phase 지연을 줄이고, pH를 하한선을 6.8에서 6.9로 유지하여 Osmolality를 낮게 유지하도록 공정조건을 변경하여 실험수행

아. 배지 첨가물의 첨가 공정 최소화 시험

- 바이오파이액터공정에서 오염을 최소화하기 위하여 배양초기에 첨가물인 Glucose, Glutamine, CB feedl를 한꺼번에 넣고 배양 비교
- Shake flask를 이용하여 배양 초기에 Glucose, Glutamine, CB feedl의 양을 달리하여 한 번에 첨가하여 배양
- 배양 중간에 첨가물은 들어가지 않음

표 7.2 초기 첨가물 첨가량

Glc-Gln-CB feedl	첨가량 (ml)			
	ProBHK-1	Glucose (200 g/L)	Glucose (200 mM)	CB feedl (25 g/L, pH7.2)
5-5-5	27	0.75	0.75	1.5
5-5-10	25.5	0.75	0.75	3
5-5-15	24	0.75	0.75	4.5
5-5-20	22.5	0.75	0.75	6
10-10-5	25.5	1.5	1.5	1.5
20-20-5	22.5	3	3	1.5

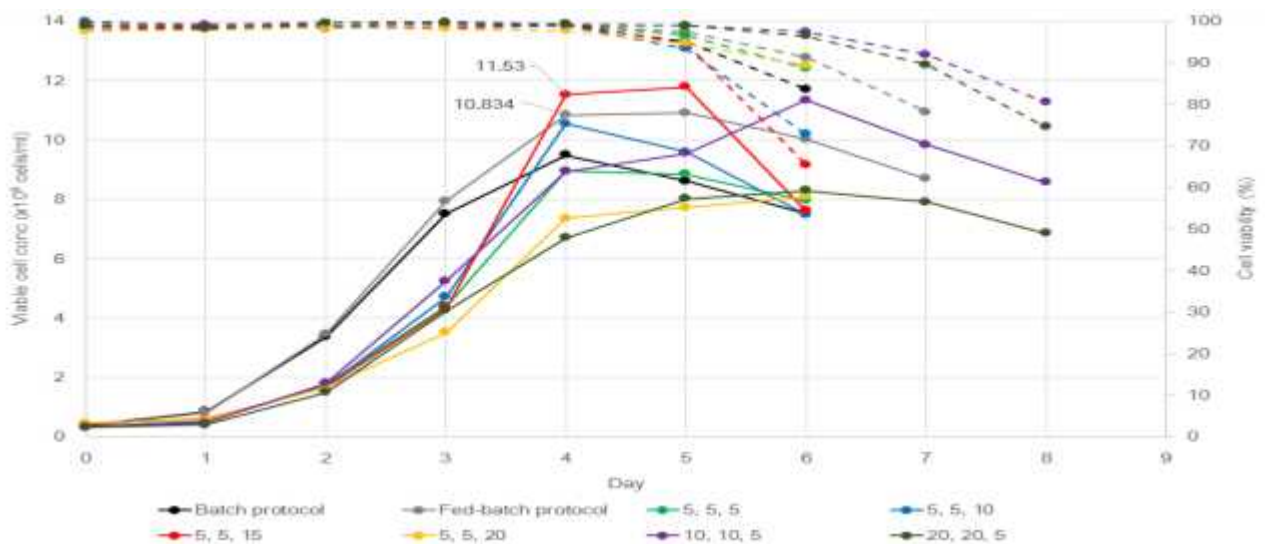


그림 7.7 초기 첨가물의 첨가량 선별

- 배양 초기에 첨가물을 한꺼번에 첨가하였을 경우, lag phase가 길어졌으나 5-5-15 배양에서 배양 4일에 11.5×10^6 cells/ml의 최고세포농도에 도달하여 기존 Fed-batch 배양 보다 0.7×10^6 cells/ml 더 높게 자람
- Glucose, Glutamine, Lactate, Ammonium, Osmolality를 측정하여 비교함

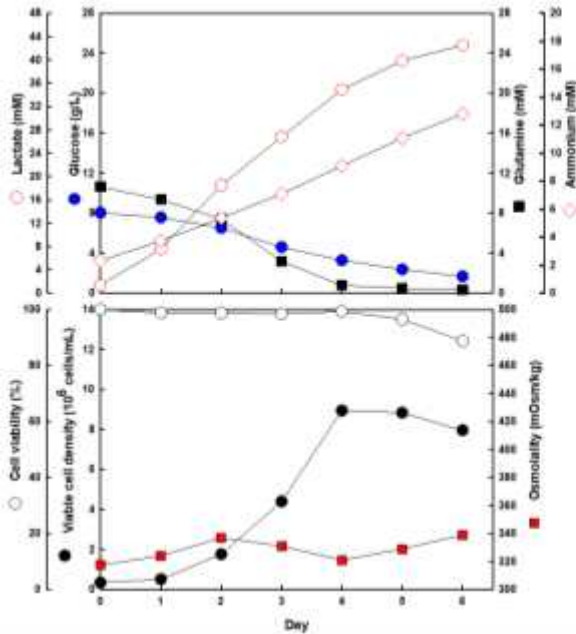


그림 7.8 5-5-5 배양

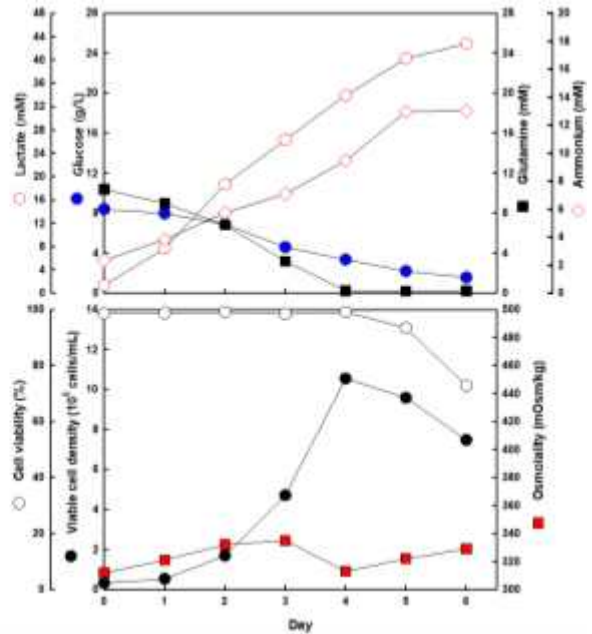


그림 7.9 5-5-10 배양

- 5-5-5 배양과 5-5-10 배양은 배양 종료일까지 Glc의 고갈은 없으나, Gln의 경우 배양 4일부터 고갈됨
- Osmolality는 340 mOsm/kg 이하로 유지됨

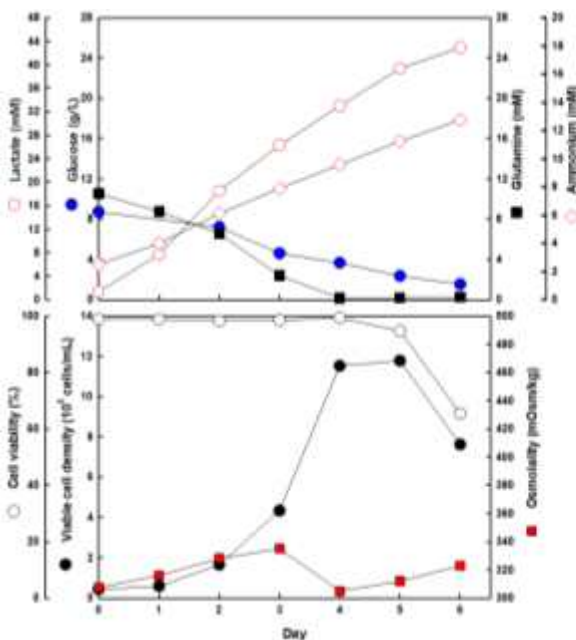


그림 7.10 5-5-15 배양

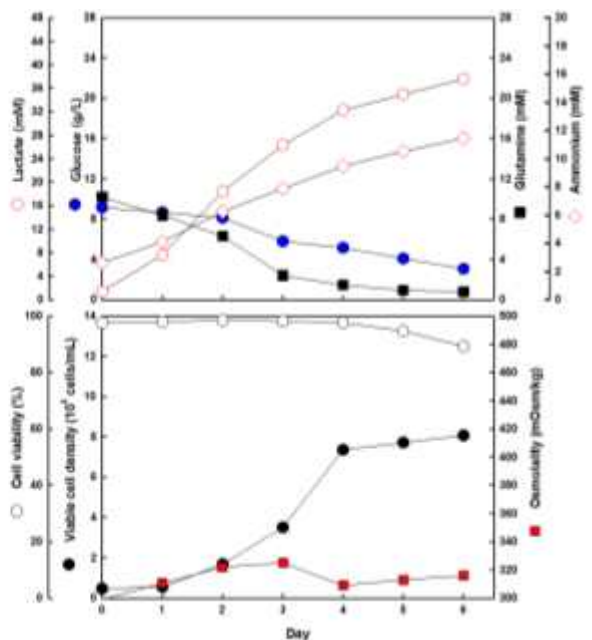


그림 7.11 5-5-20 배양

- 5-5-15 배양은 배양 종료일까지 Glc의 고갈은 없으나, Gln은 4일째부터 고갈됨
- 5-5-10 배양은 배양 종료일까지 Glc와 Gln의 고갈이 없음
- Osmolality는 340 mOsm/kg 이하로 유지됨

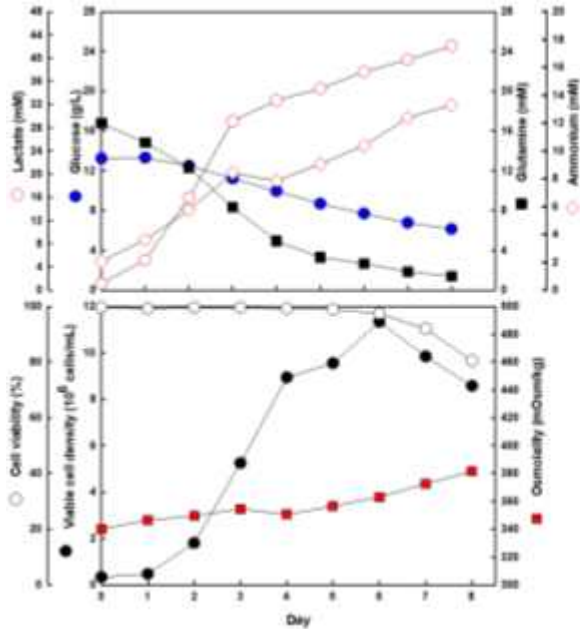


그림 7.12 10-10-5 배양

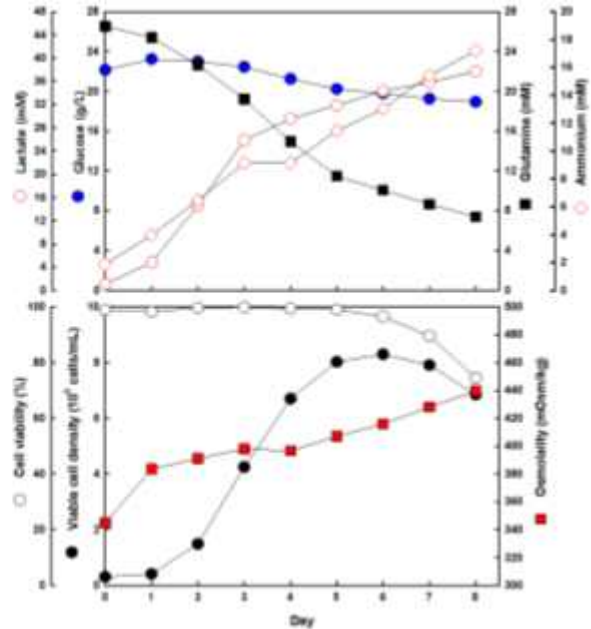


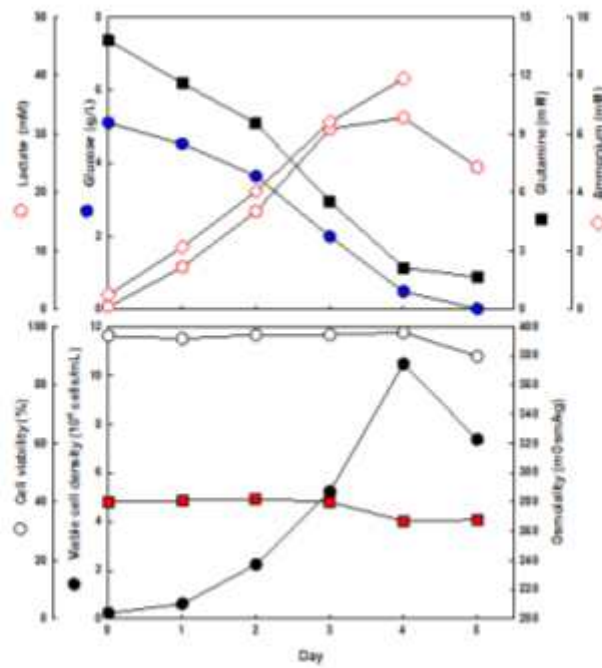
그림 7.13 20-20-5 배양

- 10-10-5 배양과 20-20-5 배양은 Glucose농도와 Glutamine 농도가 과도하게 들어가 배양 마지막까지 고갈되지 않음
- 배양 0일에 Osmolality가 340 mOsm/kg으로 높게 시작되어 계속 증가하여 세포 증식에 악영향을 미침

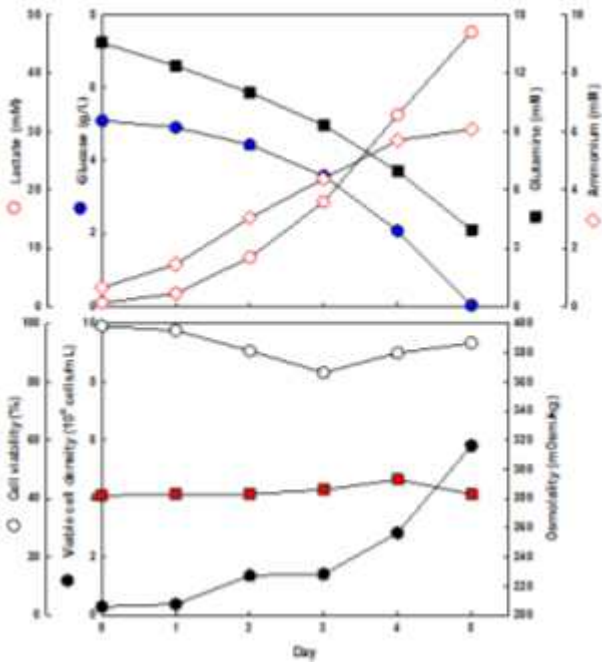
자. CD-BPM 표준배지의 바이옱액터 배양 공정 확립

- CD-BPM 표준배지를 이용한 1 L 바이옱액터 배양 공정 확립
- CD-BPM 표준배지를 이용한 50 L 바이옱액터 배양 공정 확립 및 구제역 바이러스 생산성 평가
- 계면활성제인 Pluronic F-68의 Shear stress에 대한 효과 평가

Flask



1L reactor (-PF) 0.3X10⁶ cells/ml



1L reactor (-PF) 0.5X10⁶ cells/ml

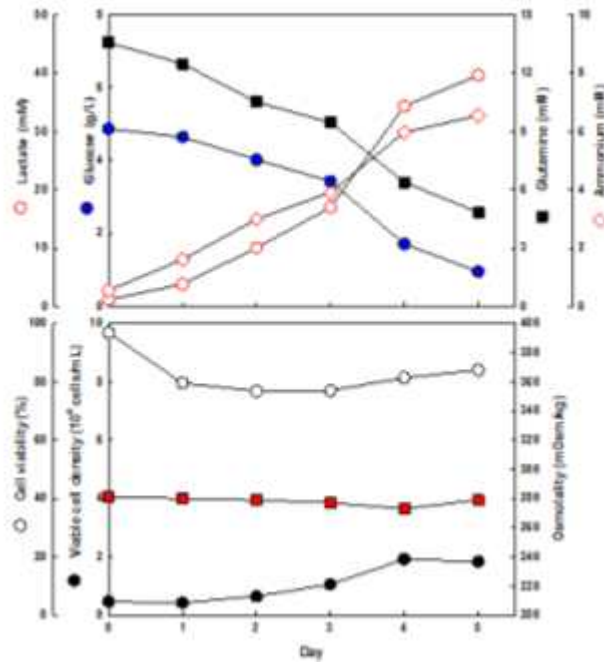


그림 7.13 CD-BPM 표준 배지의 flask 배양과 1 L 바이옱랙터 배양

- Flask 배양에서는 CD-BPM 표준배지에 Pluronic F-68(PF)이 없어도 배양 4일 차에 10.5×10^6 cells/ml로 자람
- 1 L 바이옱랙터에서 PF가 없으면 접종 농도에 상관없이 배양 4일차에 3×10^6 cells/ml 이하로 성장이 억제되며 세포응집이 발생함

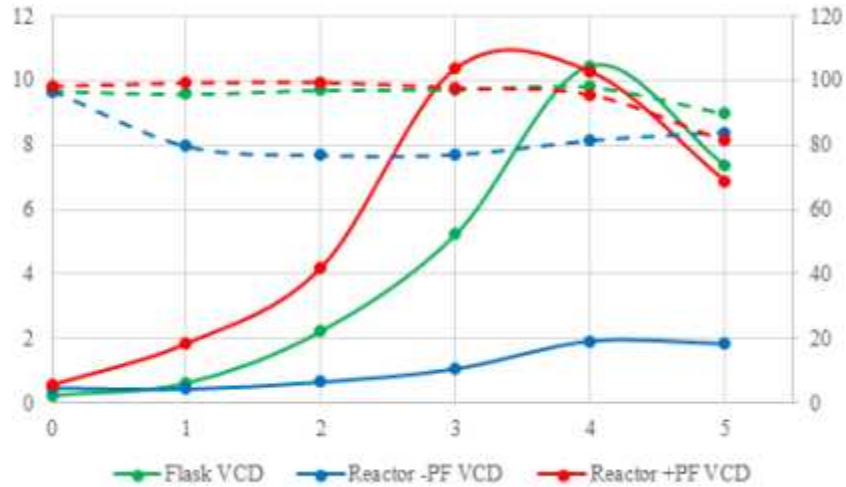


그림 7.14 Pluronic F-68 첨가에 따른 1 L 바이옱어액터 비교

- CD-BPM 표준배지에 Pluronic F-68을 1 g/L로 첨가하였을 경우 바이옱어액터 배양 시 배양 3일차에 10.4×10^6 cells/ml 세포 성장
- Pluronic F-68 첨가를 통하여 Lag phase를 단축시켜 최고세포농도에 이르는 시간을 단축가능하며 세포활성도도 90% 이상으로 안정됨

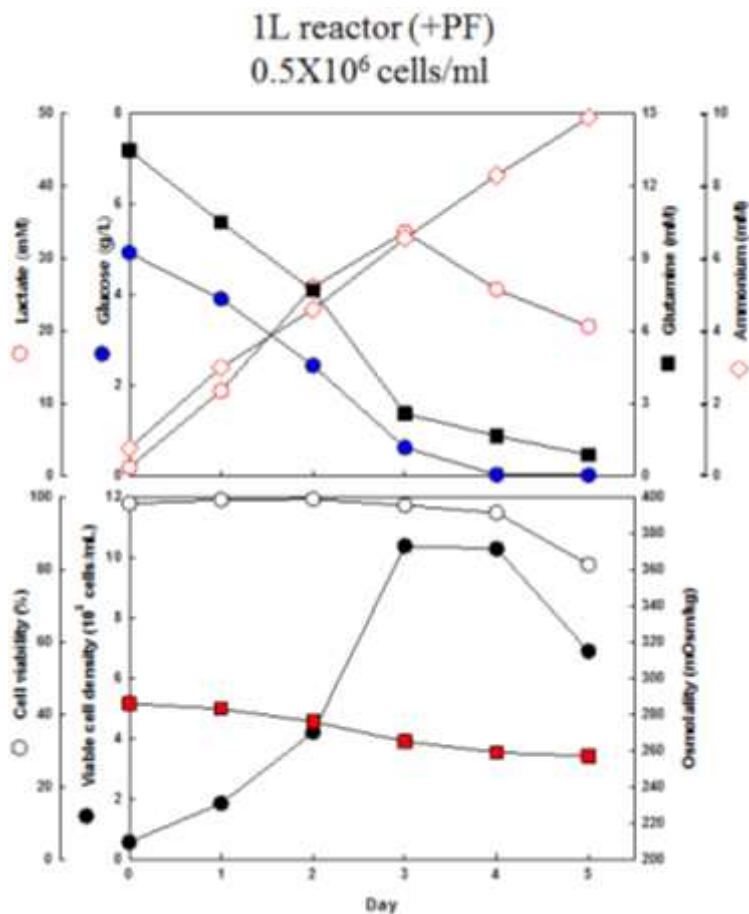


그림 7.15 Pluronic F-68 첨가에 따른 1 L 바이옱어액터 배양 메타볼라이트 분석

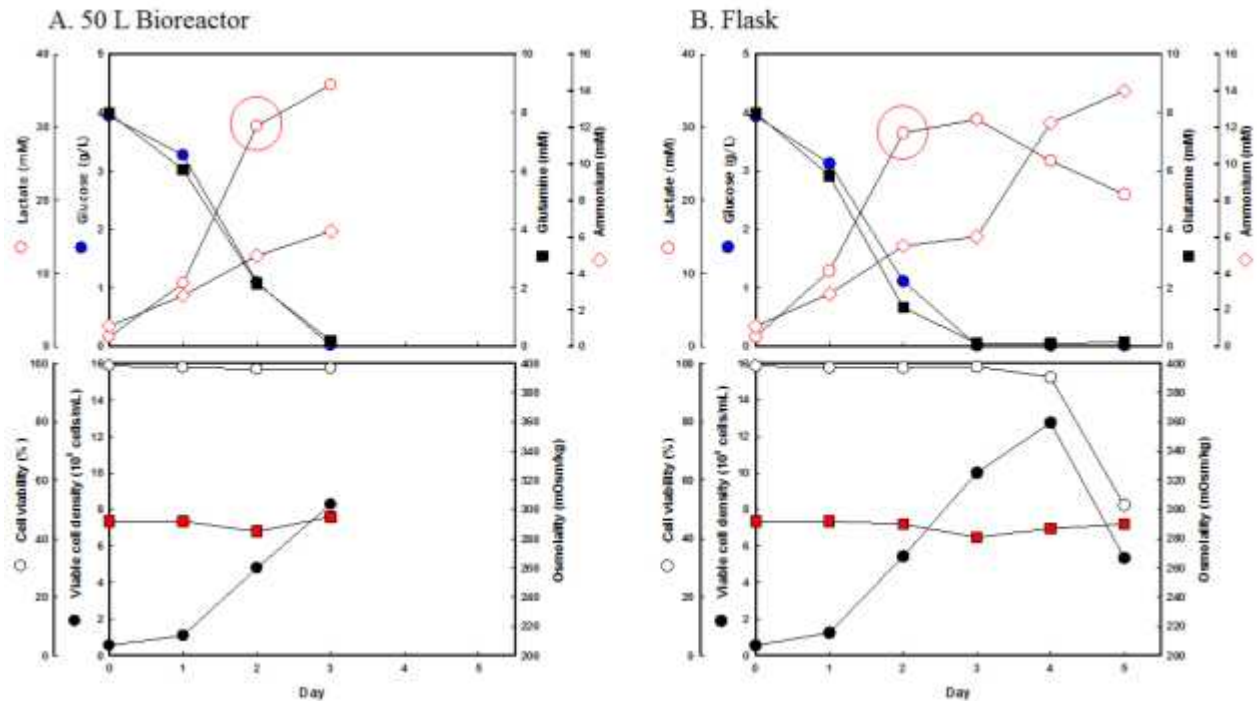


그림 7.16 CD-BPM 표준배지를 이용한 50 L 바이옱어액터 배양(1차)

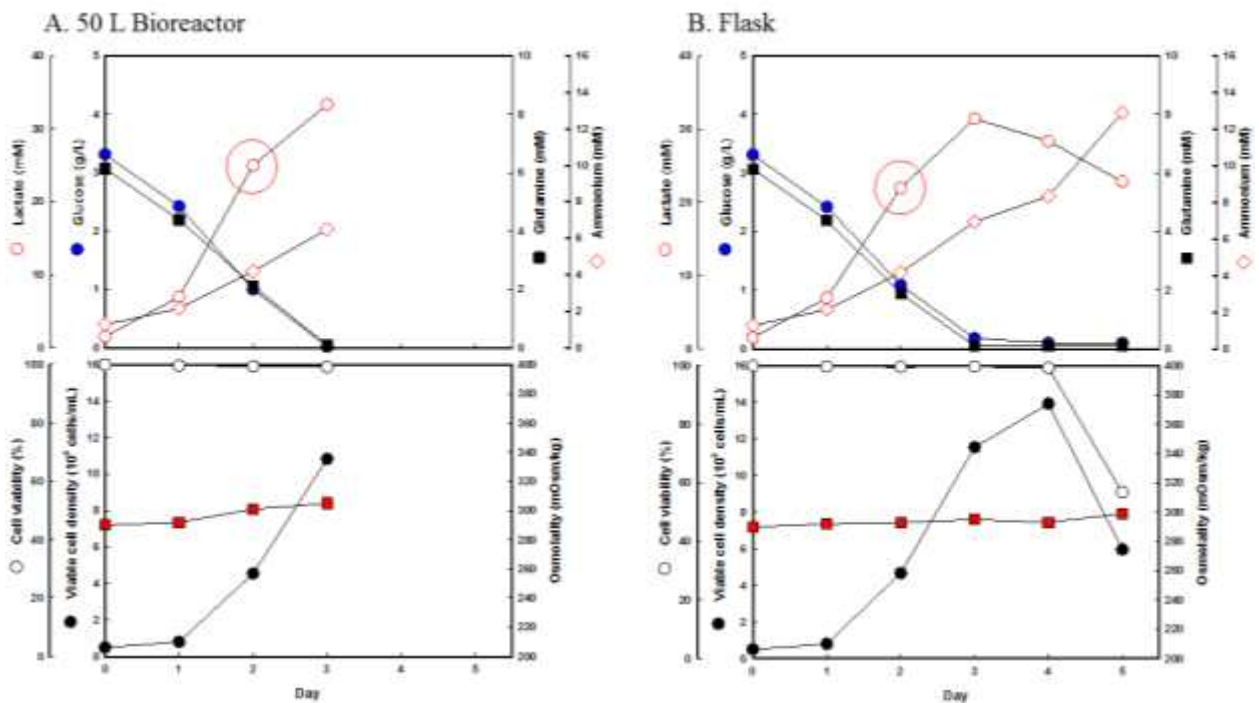


그림 7.16 CD-BPM 표준배지를 이용한 50 L 바이옱어액터 배양(2차)

- CD-BPM 표준배지로 50 L 바이옱어액터 배양 후 배양 3일차에 모든 세포를 회수하고 검역본부 이송하여 구제역 바이러스 생산성 평가 수행
- 배양 0일에 세포 접종 후 50 L 바이옱어액터에서 무균적 샘플링을 통하여 얻은 배양액을 Shake flask에 키워 비교

- 50 L 바이옱어터의 1차 배양은 배양 3일차 8.3×10^6 cells/ml 1차 배양은 배양 3일차 10.8×10^6 cells/ml 세포농도까지 성장
- 2차 배양에서 초기 Glucose와 Glutamine의 양이 각각 0.7 g/L와 0.9 mM이 적었으며, 배양 2일차 Lactate 축적량이 1차 31 mM에서 2차 26 mM로 줄어듦
- 배양 3일차 세포 농도 차이가 나는 이유로 Lactate 축적량의 적어 세포성장 억제가 약한 것으로 사료됨

8. 생명연 특허세포주와 검역본부 특허세포주 비교(특허출원기술)

가. 세포 성장 비교

- 생명연의 구제역 백신생산 세포주인 KCTC12945BP와 검역본부 구제역 백신생산 세포주인 BHK-QV34, BHK-QVS42의 세포 성장 및 세포활성도를 Shake flask에서 비교함
- 세 세포주 모두 현탁 배양으로 자라는 세포이며, KCTC12945BP와 BHK-QVS42는 무혈청 배지, BHK-QV34는 혈청 배지에서 적응하여 자람

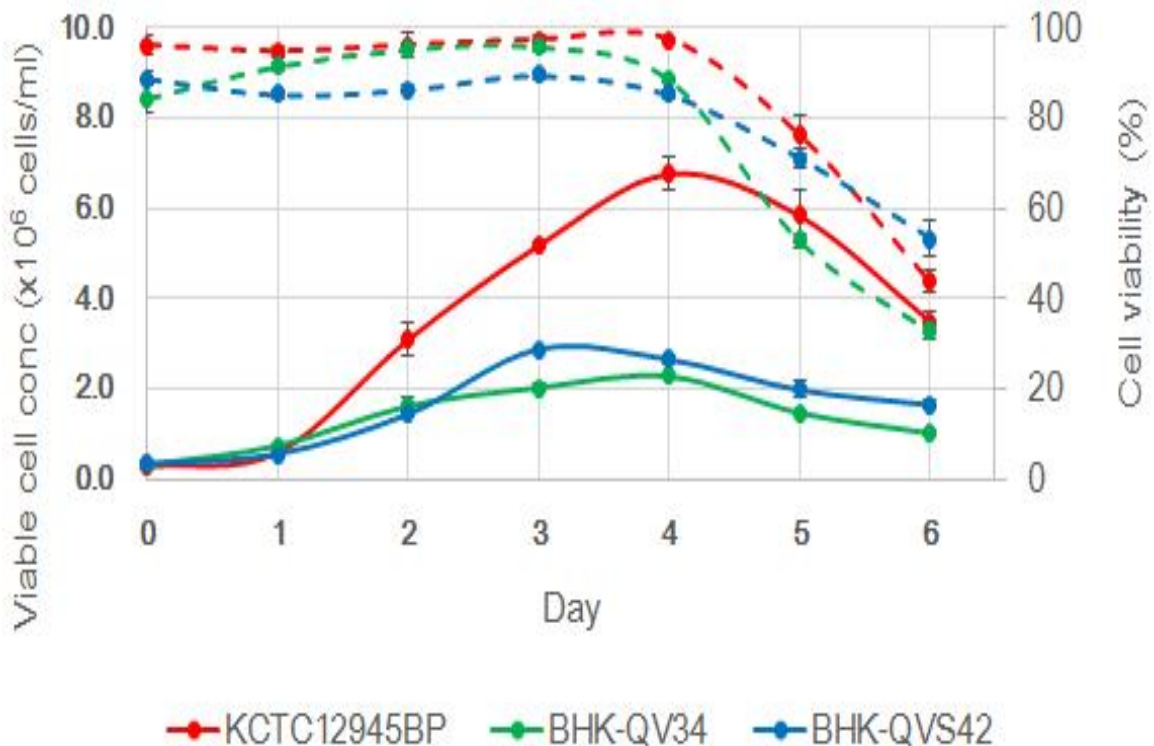


그림 8.1 특허세포주의 세포성장 비교

- KCTC12945BP 세포주의 경우 배양 4일째 6.5×10^6 cells/ml 까지 성장하며, 세포활성도 95% 이상 유지됨
- BHK-QV34와 BHK-QVS42는 배양 4일에 각각 2.1×10^6 cells/ml (88%), 2.3×10^6

cells/ml(83%)로 생명연 세포주의 삼분의 일 수준으로 성장
나. 현탁도 비교

- 배양 3일과 4일에 현탁도를 측정
- 현탁도는 전체 세포에서 3개 이상 뭉친 세포의 비율을 뺀 값임

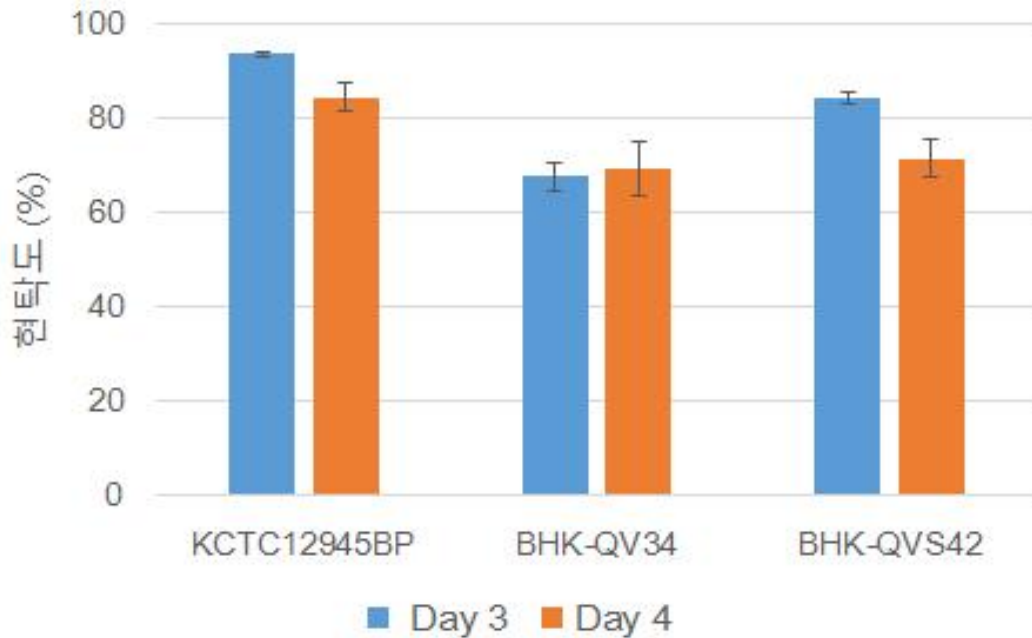


그림 8.2 특허세포주의 현탁도 비교

- KCTC12945BP는 4일까지 80% 이상의 현탁도를 가지며, BHK-QV34와 BHK-QVS42는 배양 4일에 70% 정도의 현탁도를 보임
- 육안으로 flask를 보았을 때, KCTC12945BP는 세포 뭉침 현상이 보이지 않지만, BHK-QV34와 BHK-QVS42는 육안으로 확인될 정도로 뭉침 현상이 나타남
- 세포 뭉침 현상은 세포수 측정도 쉽지 않고, 뭉쳐진 세포 안쪽에 존재하는 세포가 영양분과 산소를 받아들이지 못해 세포농도가 높게 자랄 수 없고 세포활성도도 빠르게 떨어져 백신 생산에 불리함

다. 세포막 단백질 비교

- 세포 부착에 알려져 있는 세포막 단백질인 Fibronectin, Collagen I, Collagen IV, Laminin I, Fibrinogen의 발현양을 비교함
- 부착세포인 WT BHK-21 세포와 특허 세포주를 비교
- BSA는 negative control로 사용됨

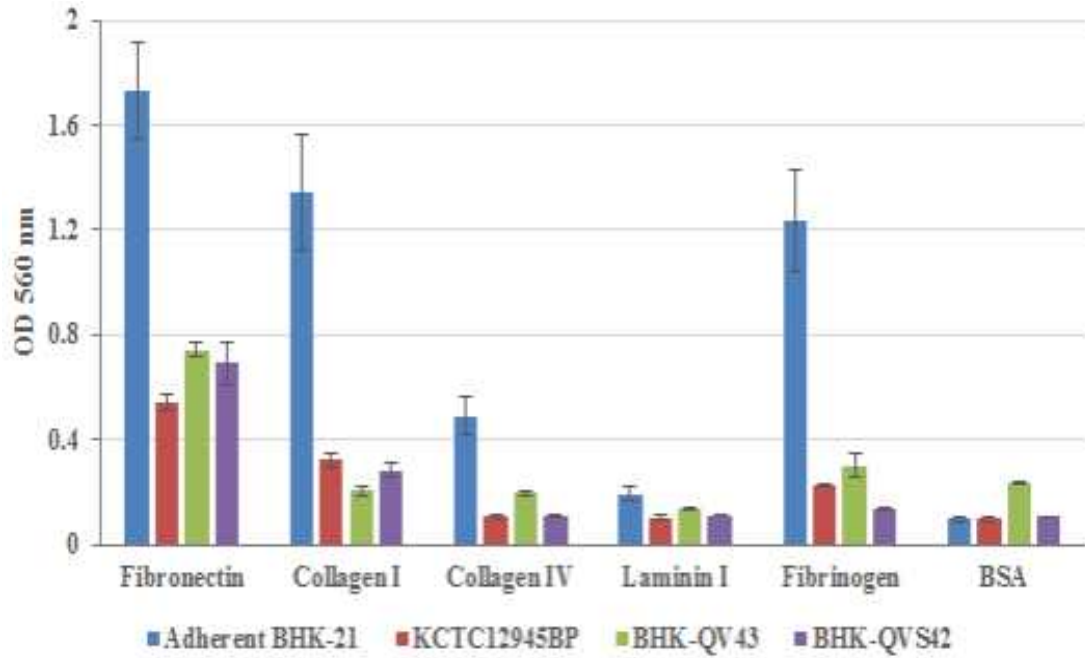


그림 8.3 특허세포주의 세포막 부착단백질 비교

- 부착세포에 비해 현탁세포의 경우 모든 부착 단백질이 50~80% 감소를 보임
- 특허세포주의 비교에서는 무혈청 배지에 적응된 KCTC12945BP와 BHK-QVS42에서 혈청 배지에 적응된 BHK-QV34보다 부착단백질의 발현이 줄어든 현상을 보임

라. 구제역 바이러스 생산성 비교

- 배양 4일째 모든 세포를 회수하여, 구제역 바이러스 역가를 측정
- 각각 키우던 배지를 교체 배지로 사용하여 실험 수행

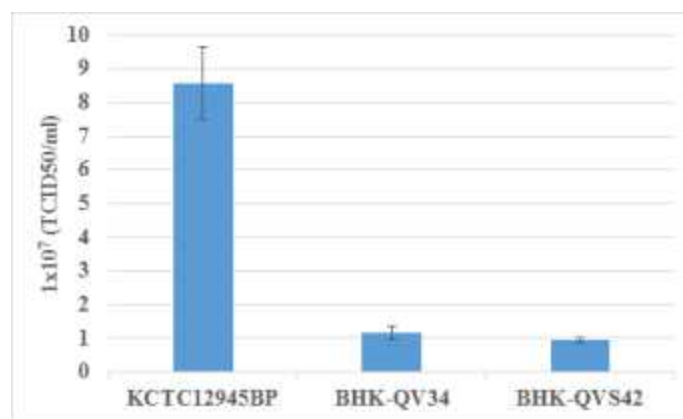


그림 8.4 특허세포주의 바이러스 역가 비교

- 구제역 바이러스 역가는 KCTC12945BP에서 8.5×10^7 TCID50/ml로 BHK-QV34와 BHK-QVS42보다 약 8배 높은 역가를 나타내어 KCTC12945BP 세포주가 백신생산에 유리함을 보임

9. 기본배지 개발

가. DWP를 이용한 BD 프로토타입 배지 선별

- 13종의 CD (chemically defined)와 14종의 AF (animal component free)배지를 DWP (Deep-well plate)를 사용하여 1차적으로 배지 선별
- 24 well의 DWP를 사용하여, 각 well당 배지 4 ml을 넣고 300 rpm으로 현탁배양
- 배양 0, 4, 7, 10일에 세포농도 측정
- 배양 4, 7일에 4 mM glutamine과 2 g/L glucose를 첨가
- 배지 선별 기준은 배양 4일째 10×10^6 cells/ml 이상, 세포활성도 90% 이상을 목표로 설정

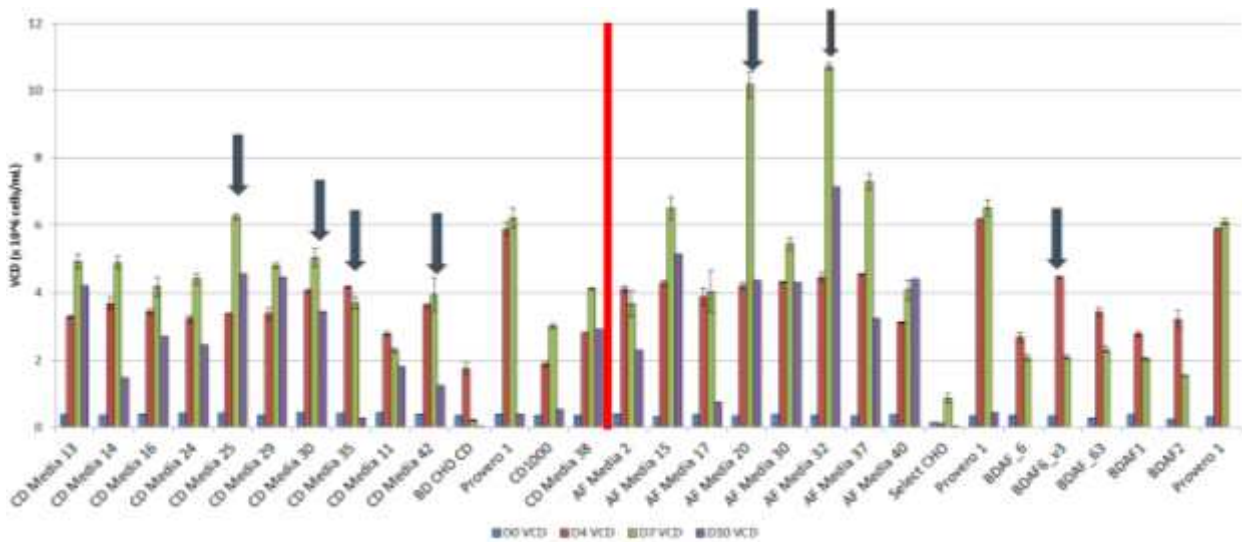


그림 9.1 DWP를 이용한 프로토타입 배지 선별

- CD 배지 선별
 - 배양 4일에서 세포농도가 높은 CD30, 35, 42와 배양 7일에서 세포농도가 가장 높은 CD25를 선별하여 scale-up 시험
- AF 배지 선별
 - 프로토타입 배지에서 배양 7일에서 세포농도가 가장 높은 AF20, 32를 선별하여 scale-up 시험
 - 기존 다른 백신생산 세포주에서 개발되었던 BDAF 배지 중, 배양 4일에 세포농도가 가장 높은 BDAF6_v3를 선정하여 scale-up 시험
- 기본배지인 ProBHK-1과 비교하였을 경우, 배양 4일 세포농도가 더 높은 배지는 없음

나. Shake flask를 이용한 BD 프로토타입 배지 선별

- DWP에서 선별된 4종의 CD 배지(25, 30, 35, 42)와 3종의 AF 배지(32, 20, AF6-v3)를 Shake flask를 이용하여 선별
- 배양 7일까지 매일 세포농도 측정
- 매일 metabolite를 측정하여 glucose는 1 g/L 이상, glutamine은 1 mM 이상 유지

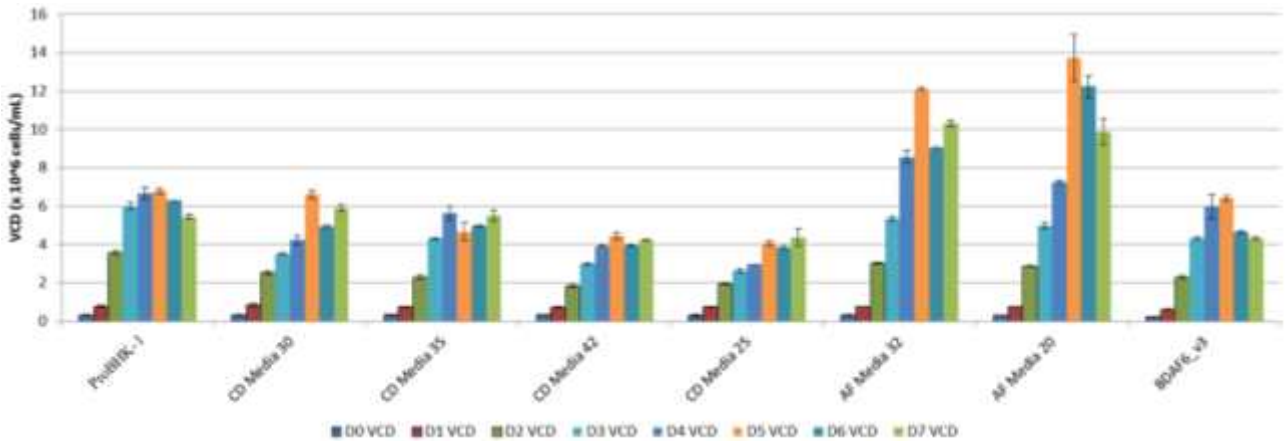


그림 9.2 Shake flask를 이용한 프로토타입 배지 선별(세포 농도)

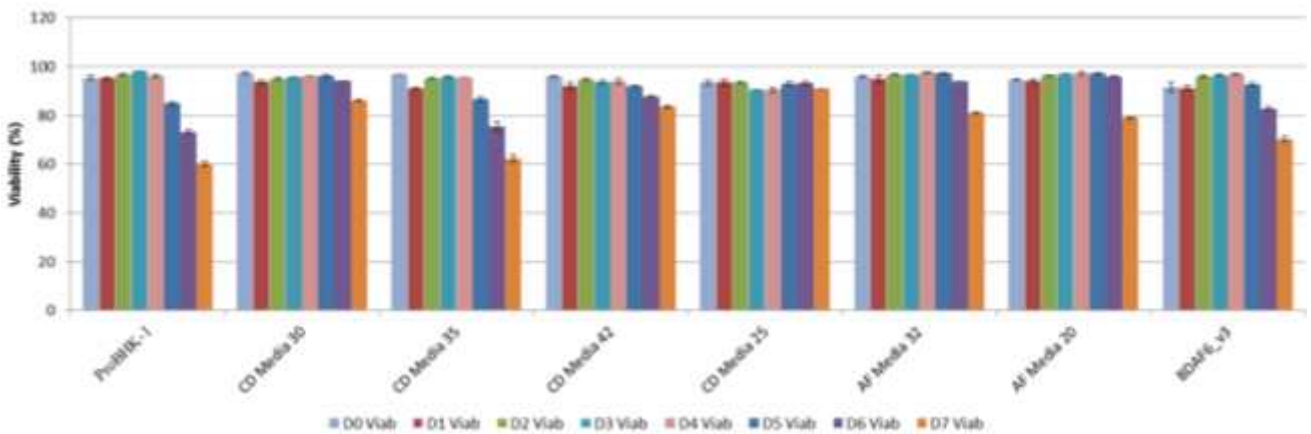


그림 9.3 Shake flask를 이용한 프로토타입 배지 선별(세포 활성화도)

- 프로토타입 배지 선별에서 기본배지인 ProBHK-1과 비교하였을 경우, 배양 4일째 세포농도가 낮아 배지의 성분 강화를 통한 세포 성장을 높일 필요가 있음
- 배지의 성분강화를 위한 프로토타입 배지에서 CD 1종과 AF 1종을 선별
- Shake flask를 통한 scale-up 시험에서는 CD배지는 배양 4일째 세포농도가 가장 높은 CD35를 선별하였고, AF배지에서는 배양 4일과 최고세포농도를 종합적으로 판단하여 AF20을 선별함
- DWP의 특성상 shake flask의 세포성장 패턴은 완전히 일치 하지는 않음으로 단순히

스크리닝용으로 사용가능

- 선별된 프로토타입 배지의 성분강화를 진행하기 전, 구제역 바이러스의 생산성 평가를 통하여 배지 성분에서 바이러스 감염에 방해되는 인자 여부를 판단

다. BD 프로토타입 배지의 구제역 바이러스 역가 측정

- 3종의 AF 배지와 7종의 CD 배지를 구제역 역가 실험에 수행
- Shake flask를 이용하여 세포성장의 재현성을 확인 후, 구제역 바이러스의 역가 측정 실험을 수행

표 9.1 프로토타입 배지의 특성

Media	pH	Osmolality (mOsm/kg)	Glutamine (mM)	Glucose (g/L)
AFL 20	6.9	323	5.01	5.56
AFL 32	6.9	324	5.07	5.78
AFL 100	7.5	310	7.24	5
CDL 13	7	317	4.96	5.7
CDL 25	6.9	317	4.61	6.03
CDL 29	7	321	5.06	5.9
CDL 35	7.6	315	4.96	6.2
CDL 42	6.9	319	4.94	6.17
CDL 43	7.6	324	4.96	5.56
CDL 44	7.6	315	4.89	7.38

- 바이러스 역가 실험에 사용된 배지의 pH, osmolality, glutamine, glucose를 측정하였을 경우, CD35, CD43, CD44의 경우 pH가 7.6으로 높았으며, AF의 경우 glutamine가 7.2 mM로 가장 많이 첨가되어 있음

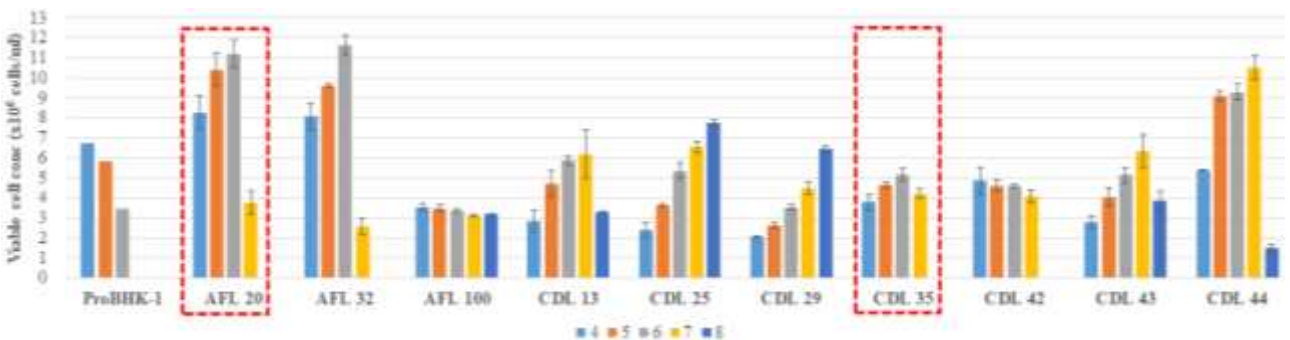


그림 9.4 바이러스 역가 측정을 위한 Shake flask 시험(세포 농도)

- 세포 성장패턴은 AF배지 20과 32에서 기본배지인 ProBHK-1 보다 배양 4일째 세포 농도가 1.4×10^6 cells/ml 더 높게 자라고, 그 이후 배양 6일까지 11×10^6 cells/ml 이상

으로 성장함

- CD배지의 경우, CD35 보다 CD42와 CD44에서 배양 4일째 세포 농도가 약 1×10^6 cells/ml 더 높음
- CD 44는 배양 7일째 10.5×10^6 cells/ml까지 성장하며, 기존 CD배지보다 월등한 세포 성장 능력을 지님

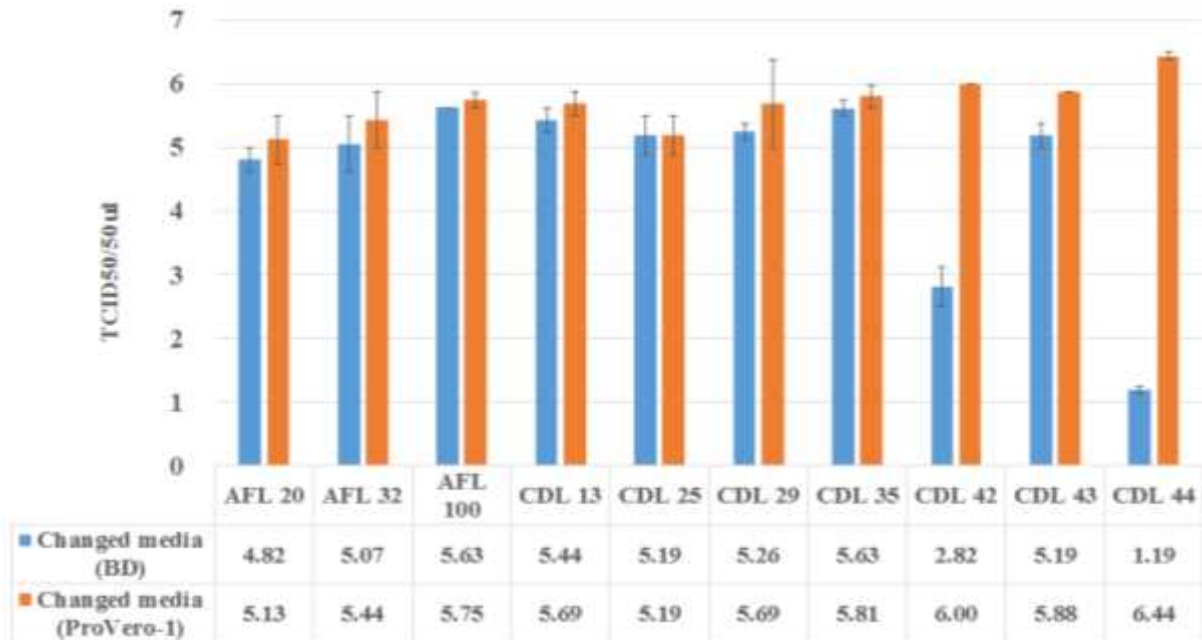


그림 9.5 프로토타입 배지의 바이러스 역가 측정

- 배양 4일째 세포농도를 3×10^6 cells/ml로 일정하게 맞춘 후, 구제역 바이러스 역가 측정
- 교체배지를 배양했던 배지로 교체하였을 경우와 기본 배지인 ProBHK-1으로 교체하였을 경우를 비교
- 백신 생산 공정에서 교체배지는 세포를 배양했던 배지로 교체하는 것을 기본 목표로 함
- AF 배지의 경우 배지 성분에 바이러스 감염을 방해하는 성분은 없는 것으로 판별되어 AF20을 배지 성분 강화에 사용함
- CD배지에서 세포 성장이 좋았던 CD42와 CD44에서 바이러스 역가가 다른 CD 배지보다 50% 이상 역가가 줄어들어 배지 성분에 감염 억제 인자가 존재하는 것으로 사료됨
- 다른 CD 배지에서는 특별히 바이러스 감염에 영향을 주는 인자가 없는 것으로 판단되어 CD35를 배지 성분 강화에 사용함

표 9.2 프로토타입 배지의 바이러스 역가 순위

Brand Name	MVCC (10 ⁶ cells/ml)(day)	Virus titer /BD	Virus titer /ProBHK
AFL 20	11.21 (d6)	4.82 (8)	5.13 (10)
AFL 32	11.64 (d6)	5.07 (7)	5.44 (8)
AFL 100	3.54 (d4)	5.63 (1)	5.75 (5)
CDL 13	6.19 (d7)	5.44 (3)	5.69 (6)
CDL 25	7.77 (d8)	5.19 (5)	5.19 (9)
CDL 29	6.43 (d8)	5.26 (4)	5.69 (6)
CDL 35	5.15 (d6)	5.63 (1)	5.81 (4)
CDL 42	4.85 (d4)	2.82 (9)	6.00 (2)
CDL 43	6.37 (d7)	5.19 (5)	5.88 (3)
CDL 44	10.52 (d7)	1.19 (10)	6.44 (1)

10. 혼합배지평가

가. AF20 프로토타입 배지의 성분 강화

- AF20 배지에 CD 첨가물과 펩톤 첨가물을 사용하여 배지성분을 강화
- 영양요구성 분석을 통하여 배양과정 중 고갈된 배지 성분(SM, spent media)을 첨가하여 배지 성분을 강화

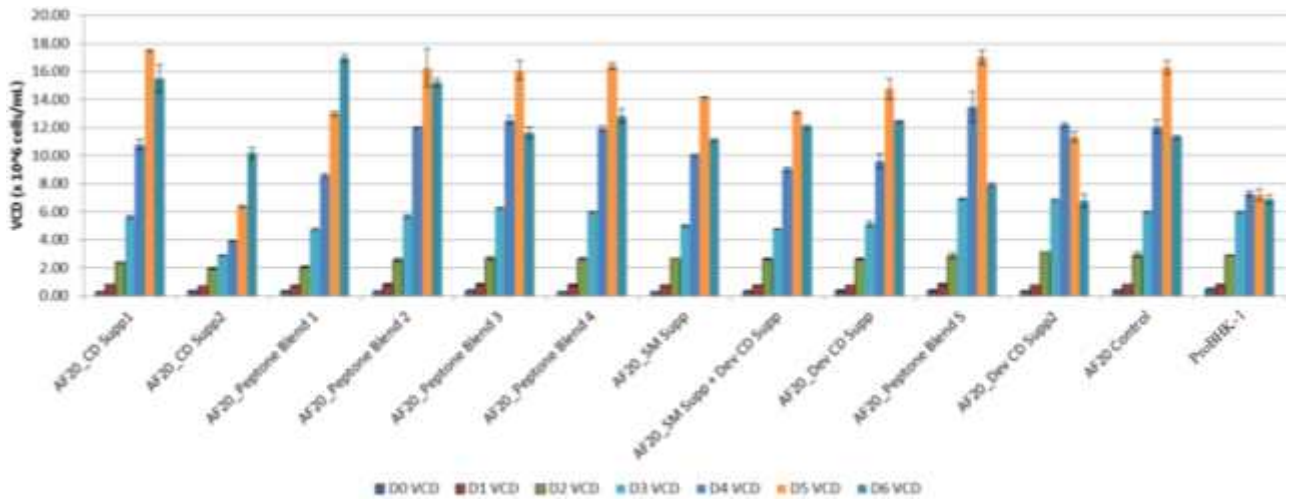


그림 10.1 AF20 배지의 성분강화를 통한 배지 선별(세포 농도)

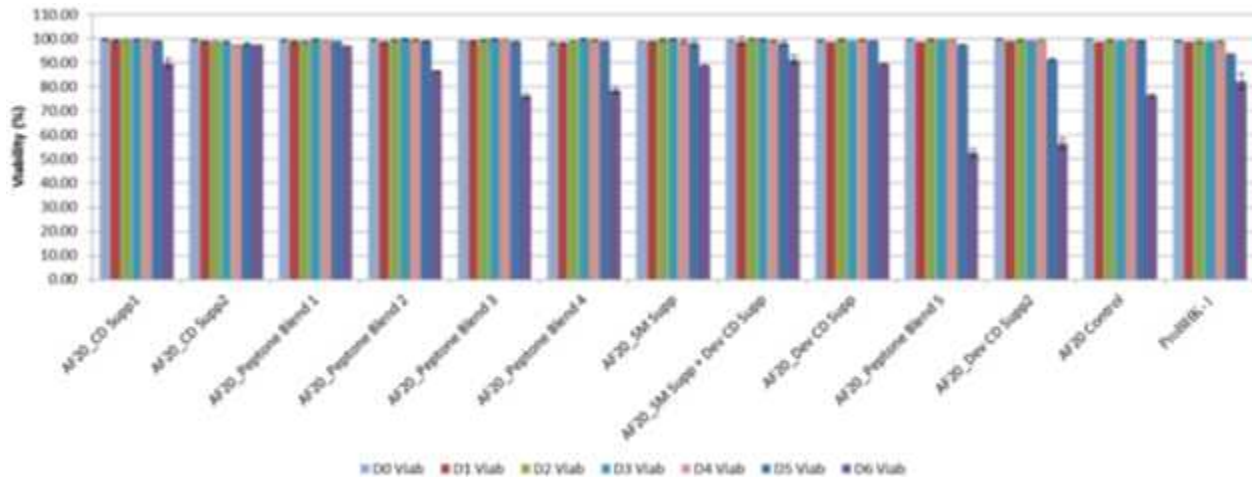


그림 10.2 AF20 배지의 성분강화를 통한 배지 선별(세포 활성도)

- AF 배지에 각종 첨가물을 통한 배지 성분을 강화하였을 경우, ProBHK-1 배지보다 세포 성장이 월등이 높아짐
- 대부분의 배지에서 배양 4일째 선별 기준인 10×10^6 cells/ml 이상을 넘었고, 세포활성도도 90% 이상을 유지함
- AF 20 control에서 기존 BD의 shake flask배양 보다 더 높은 세포 성장을 보였으며, CD Suppl, peptone blend 2, 3, 4, 5를 첨가하였을 경우, 배양 5일째 16×10^6 cells/ml 이상 성장하였음
- CD supp2를 첨가하였을 경우, 세포 성장이 반으로 줄어드는 것으로 보아, 특정 배지 성분은 세포성장에 악영향을 줌

나. 선별된 CD 프로토타입 배지의 성분 강화

- CD 35 배지에 CD 첨가물을 사용하여 배지성분을 강화
- 영양요구성 분석을 통하여 배양과정 중 고갈된 배지 성분(SM, spent media)을 첨가하여 배지 성분을 강화
- CD 배지 외, DOE를 위한 배지 blend를 사용하여 세포 성장을 시험함

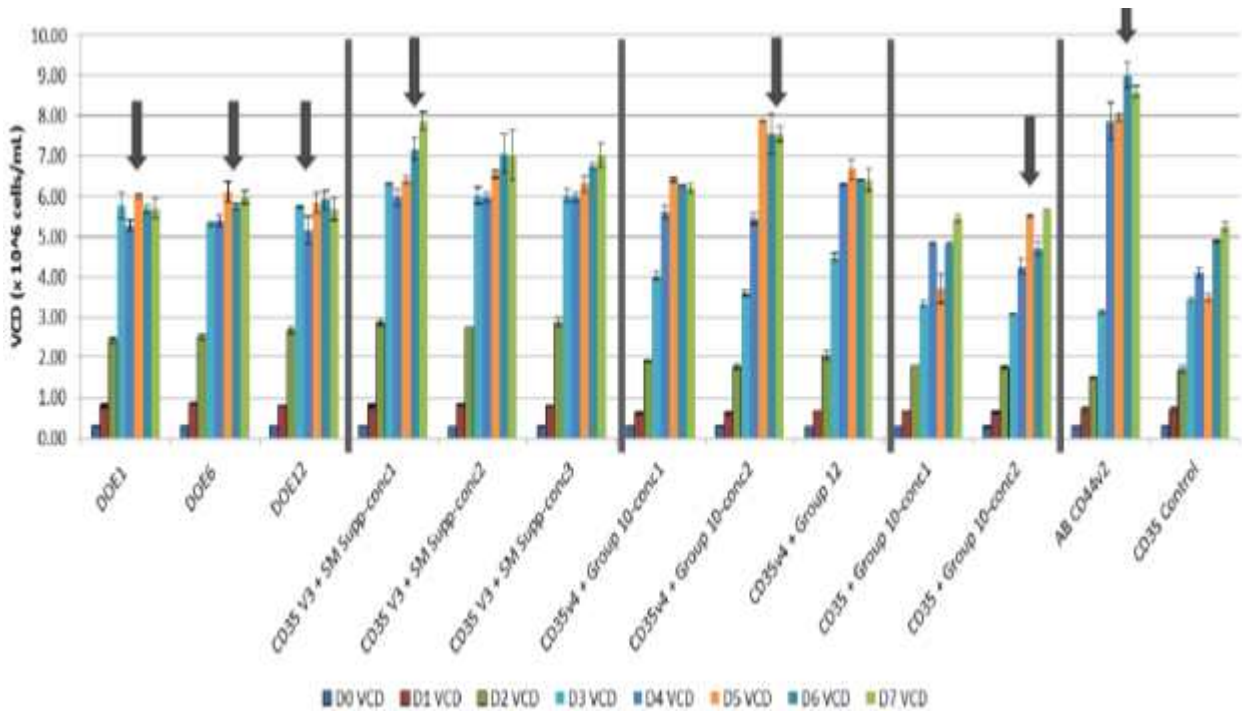


그림 10.3 CD 배지의 성분강화를 통한 배지 선별(세포 농도)

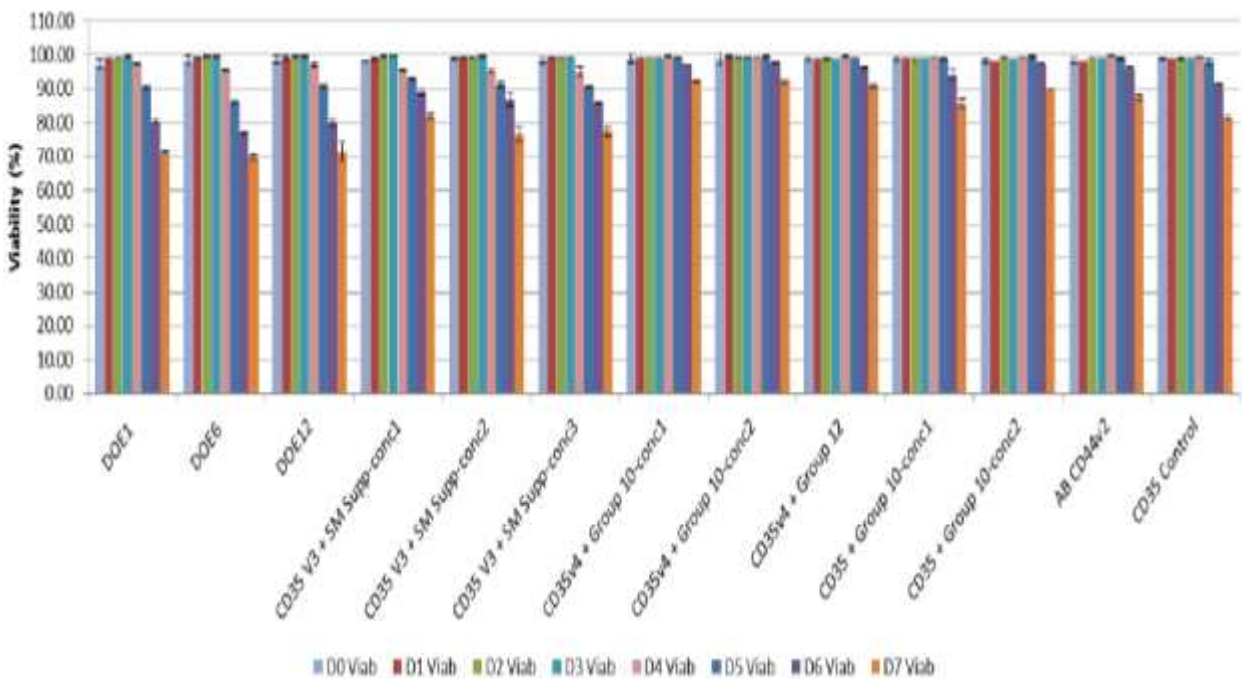


그림 10.4 CD 배지의 성분강화를 통한 배지 선별(세포 활성화도)

- 대부분의 CD배지에서, 배지 선별기준인 배양 4일째 10×10^6 cells/ml에 반정도 밖에 자라지 못함
- CD35 control에 비교하여, 배지 성분을 강화하였을 때 배양 4일째 5×10^6 cells/ml 이

상 성장하여 성분강화 효과를 봄

: CD35+Group 10-conc1, CD35+Group 10-conc2 제외

- AB CD44v2는 배양 4일째 7.8×10^6 cells/ml로 CD 배지 중 가장 높은 세포성장을 보임
- 8종의 CD 배지와 8종의 AF 배지로 구제역 바이러스 역가 측정 후, 최종 선별된 배지로 배지 성분 강화를 수행하여 배지 선별 목표 기준으로 보강
 - : DOE1, DOE6, DOE12, CD35v3+SM Supp-conc2, CD35v4+Group 10-conc2, CD35+Group 10-conc2, AB CD44v2, CD35 control
 - : AF20_CD Supp1, AF20_Peptide Blend 2, 3, 4 and 5, AF20_SM Supp, AF20_Dev CD Supp2, AF20 control

다. 성분 강화된 배지의 재현성 평가

- 8종의 AF 배지를 shake flask에 키워 재현성 확인
- 8종의 CD 배지를 shake flask에 키워 재현성 확인

표 10.1 선별된 성분강화배지의 명명 및 특성 분석

Media ID	Data Review ID	Lot#	pH	osmo (mOsm/kg)	glucose (g/L)	glutamine (mM)
AB AF20	AF20 Ctrl	17-0309	6.96	323	6.8	6
AB AF20.001	AF20_CD Supp1	17-0310	6.96	323	6.8	6
AB AF20.002	AF20_Peptide Blend 2	17-0311	6.96	323	6.8	6
AB AF20.003	AF20_Peptide Blend 3	17-0312	6.96	323	6.8	6
AB AF20.004	AF20_Peptide Blend 4	17-0313	6.96	323	6.8	6
AB AF20.005	AF20_Peptide Blend 5	17-0314	7.06	321	6.3	6
AB AF20.006	AF20_SM Supp	17-0315	6.96	323	6.8	6
AB AF20.007	AF20_Dev CD Supp2	17-0316	7.15	313	6.2	6
AB CD35	CD35 Ctrl	17-0283	6.95	332	6	6
AB CD35.001	DOE1	17-0303	6.95	332	6	6
AB CD35.002	DOE6	17-0304	6.95	332	6	6
AB CD35.003	DOE12	17-0305	6.95	332	6	6
AB CD35.004	CD35v3 + SM Supp conc2	17-0306	7.15	319	5.6	6
AB CD35.005	CD35v4 + Group 10 conc2	17-0307	6.96	324	5.5	6
AB CD35.006	CD35 + Group 10 conc 2	17-0308	6.95	332	6	6
AB CD44.001	AB CD44v2	17-0302	7.2	328	8	6

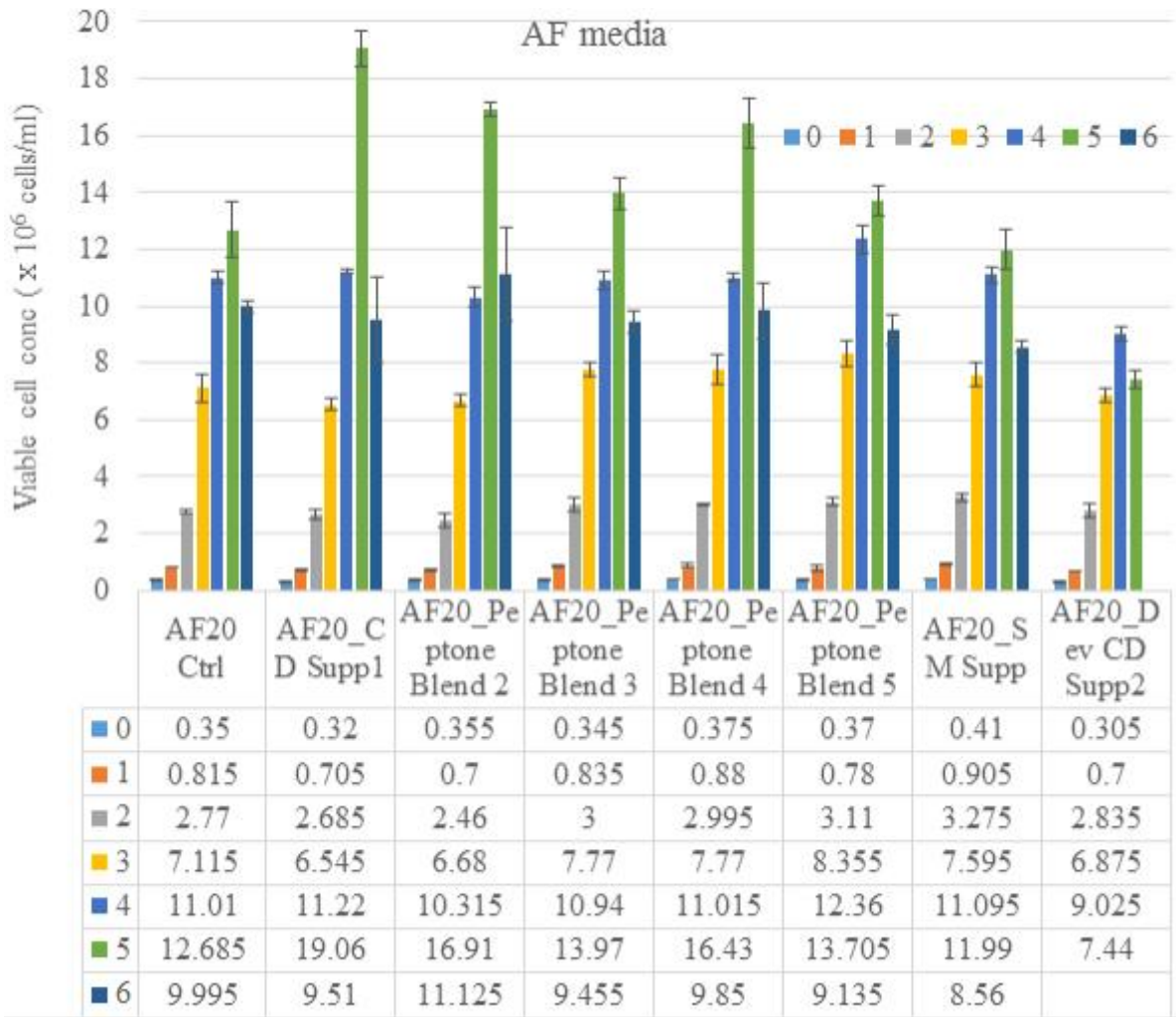


그림 10.5 바이러스 역가 측정을 위한 선별된 AF배지의 Shake flask 시험(세포 농도)

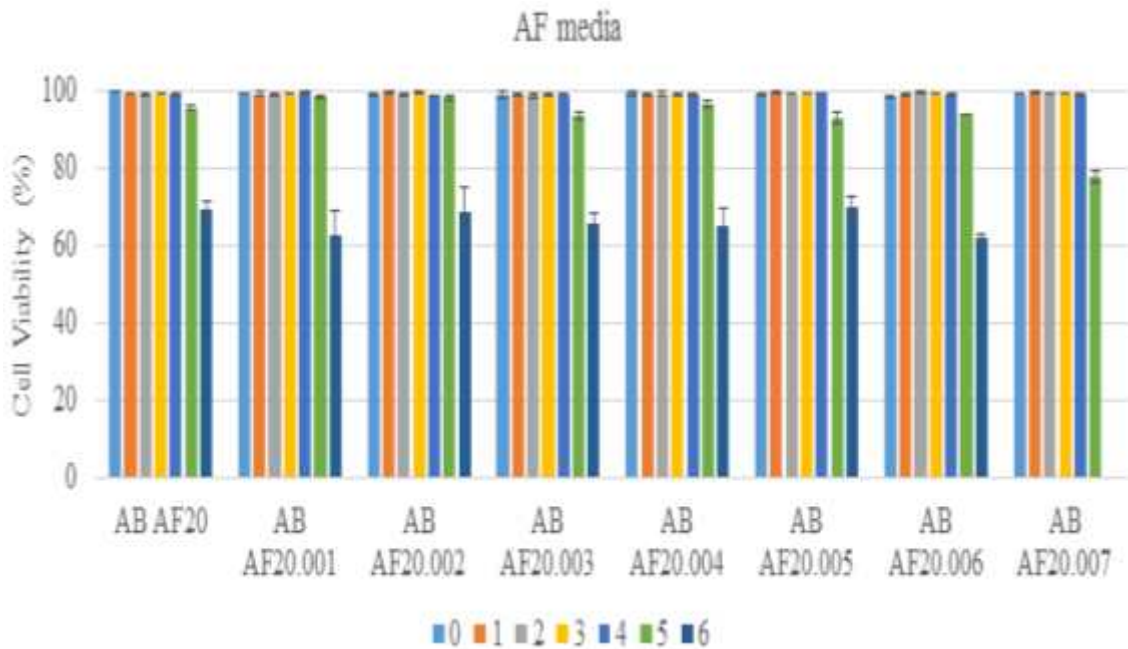


그림 10.6 바이러스 역가 측정을 위한 선별된 AF배지의 Shake flask 시험(세포 활성도)

- AF20_Dev CD supp2를 제외한 나머지 모든 AF 배지에서 배양 4일째 10×10^6 cells/ml 이상 성장하였고, 세포활성도 또한 95% 이상으로 유지됨
- 세포 성장에 유리한 배지 순위(우선순위 Day4 > Day5)
 - AF20_Peptide Blend 5 > AF20_CD Suppl1 > AF20_Peptide Blend 2
- 배양 4일차 세포 농도
 - AF20_Peptide Blend 5 : 12.36×10^6 cells/ml
 - AF20_CD Suppl1 : 11.22×10^6 cells/ml
 - AF20_Peptide Blend 2 : 10.32×10^6 cells/ml

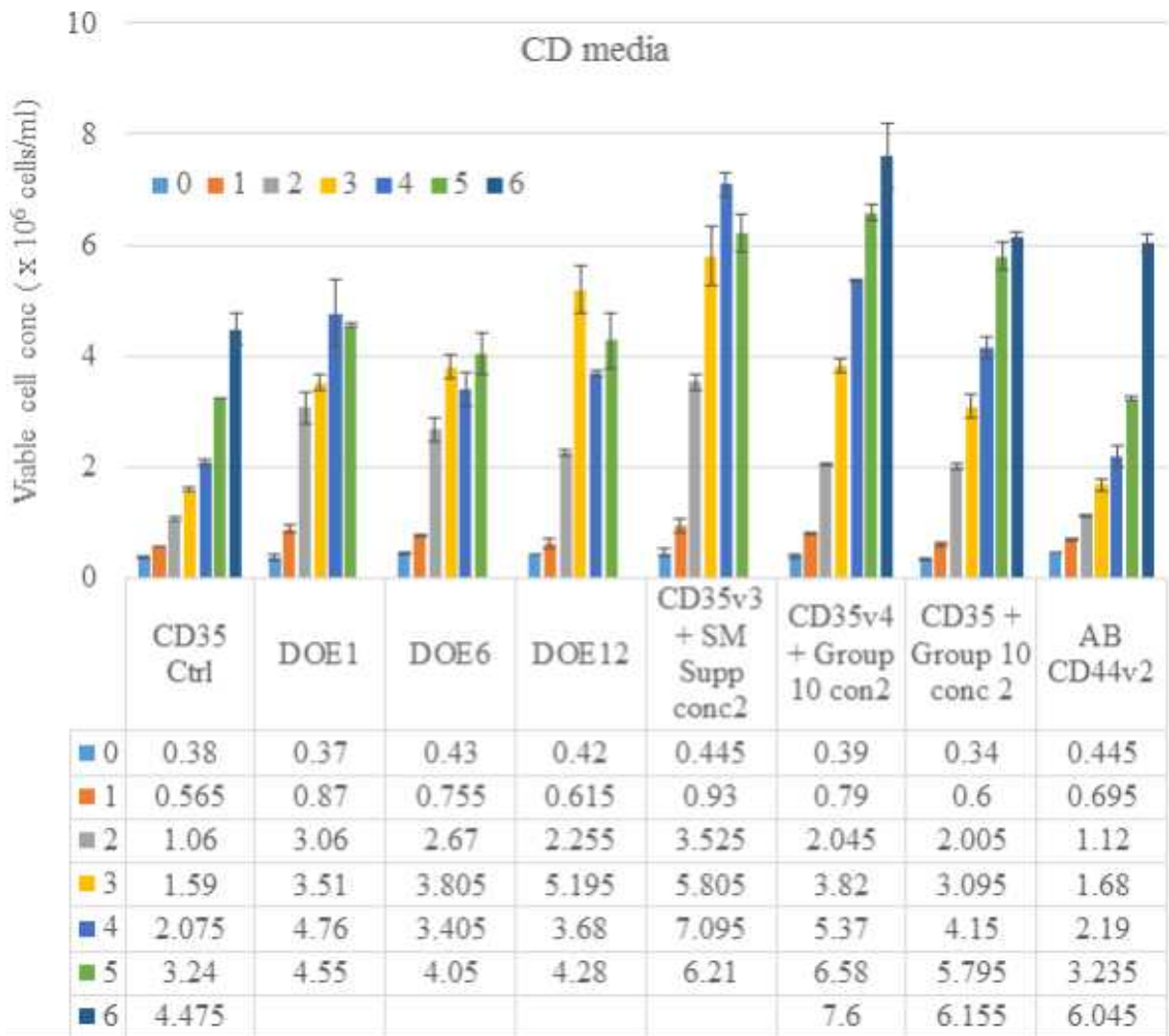


그림 10.7 바이러스 역가 측정을 위한 선별된 CD배지의 Shake flask 시험(세포 농도)

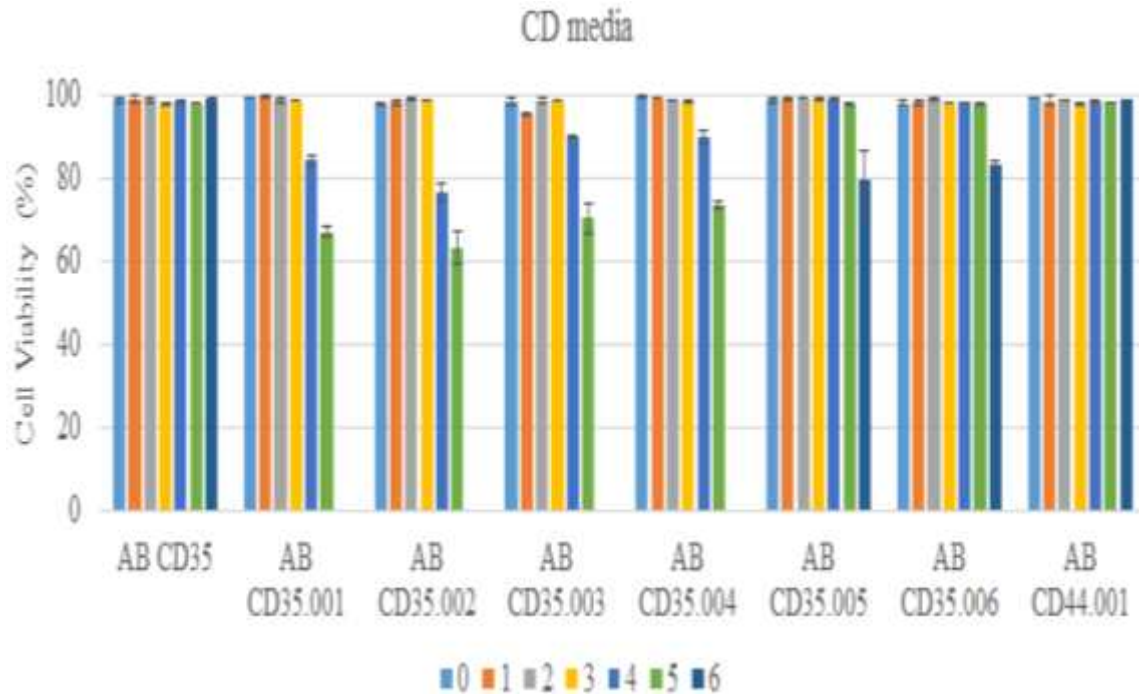


그림 10.8 바이러스 역가 측정을 위한 선별된 CD배지의 Shake flask 시험(세포 활성화도)

- CD배지는 배양 4일째 5×10^6 cells/ml 수준까지 자라지 못했고, DOE1, DOE6, DOE12 배지에서 배양 4일째 세포활성도가 90% 아래로 내려감
- CD배지의 경우 배지 성분의 강화 및 배지 첨가물 개발을 통하여 최고세포 농도를 목표 수준(10×10^6 cells/ml)으로 높일 필요성이 있음
- 세포 성장에 유리한 배지 순위(우선순위 Day4 > Day5)
 - CD35v3+SM Supp conc2 > CD35v4+Group10 con2 > DOE1 > CD35+Group10 conc2
- 배양 4일차 세포 농도
 - CD35v3+SM Supp conc2 : 7.09×10^6 cells/ml
 - CD35v4+Group10 con2 : 5.37×10^6 cells/ml
 - DOE1 : 4.76×10^6 cells/ml
 - CD35+Group10 conc2 : 4.15×10^6 cells/ml

라. 성분 강화된 배지의 구제역 바이러스 역가 측정을 통한 배지 선별

- 배양 4일에 검역본부에 세포 전달하여 구제역 바이러스 역가 측정 진행
- 배양 4일 째, 전체 세포를 원심분리를 통하여 세포를 회수하고, 새로운 배지로 교환하여 접종
- 교환배지는 세포를 키우던 기본배양배지와 같은 종류로 같은 양을 교환

표 10.2 구제역 바이러스 역가 측정을 위한 배지교환

세포주	기본배양배지	바이러스접종시 세포농도	원심분리	원심분리후 사용배지종류
KCTC12945BP	ProBHK-1 (5% CB feed1)	전체 세포	○	ProBHK-1
	BD 배지 16종		○	BD 배지 16종

표 10.3 구제역 바이러스 접종 시, 세포 농도 및 세포활성도

배지	Viable cell concentration (X10 ⁶ cells/ml)	Cell Viability (%)
AF20 Ctrl	11.6	99
AF20_CD Supp1	10.72	99.1
AF20_Peptide Blend 2	11.49	98.9
AF20_Peptide Blend 3	13.29	98.8
AF20_Peptide Blend 4	12.66	99
AF20_Peptide Blend 5	13.01	98.8
AF20_SM Supp	12.89	98.9
AF20_Dev CD Supp2	9.47	96.6
CD35 Ctrl	4.62	98.4
DOE1	3.16	94.1
DOE6	4.01	89.8
DOE12	3.38	93.4
CD35v3 + SM Supp conc2	6.97	99.1
CD35v4 + Group 10 con2	5.55	98.8
CD35 + Group 10 conc 2	4.5	97.3
AB CD44v2	4.22	99
ProBHK-1	6.57	98.4

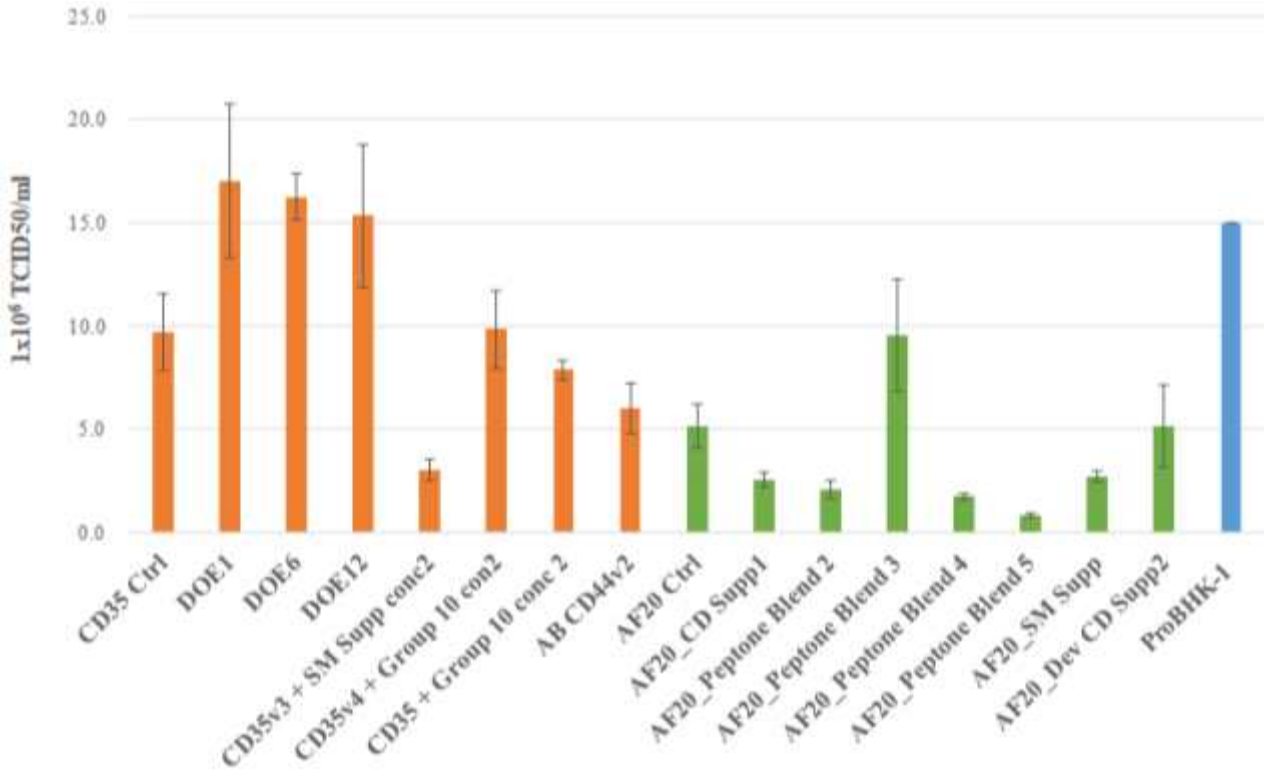


그림 10.9 성분강화배지의 구제역 바이러스 역가 평가

- CD35v3+SM Supp conc2를 제외한 대부분의 CD계열 배지에서 AF 배지 보다 우수한 바이러스 역가를 보임
- CD 배지의 경우, DOE계열 배지 3종이 세포농도가 낮음에도 불구하고 ProBHK-1 배지보다 높거나 유사한 바이러스 역가를 보임
- AF 배지의 경우, 최고 세포 농도가 10×10^6 cells/ml 이상으로 성장함에도 불구하고 저조한 바이러스 생산성을 나타내어 바이러스 감염 억제자 또는 바이러스 복제 억제자가 배지에 존재하는 것으로 판단됨
- Osmolality 문제
 - 성분강화된 AF와 CD배지 대부분의 Osmolality가 Cell Boot5를 포함하고 있는 ProBHK-1 배지보다 약 20~40 mOsm/kg이상 높음
 - ProBHK-1(CB feed1) 배지의 경우 약 292.5 ± 2.7 mOsm/kg로 340 mOsm/kg 이상일 때 세포성장저해가 됨
 - AF 배지와 CD 배지의 경우 313 ~ 332 mOsm/kg의 Osmolality범위를 가짐
- 구제역 백신 생산에 유리한 배지 순위
 - CD : DOE1 > DOE6 > DOE12 > CD35v4 + Group10 conc2 > CD35 Ctrl
 - AF : AF20_Peptide Blend 3

11. 배지첨가물 개발

가. 배지첨가물 선별

- 배지첨가물도 모든 성분을 알 수 있는 CD 계열 배지첨가물로 개발
- CD 계열의 배지첨가물 20 종을 DWP(Deep-well plate)로 1차 선별(DWP study1)
- 1차 선별된 배지첨가물을 DWP를 이용하여 농도 선별(DWP study2)
- Study1, 2를 통해 선별된 배지첨가물과 첨가물의 농도를 Shake flask에서 스케일업하여 첨가전략 선별(Shake study1, 2)
- 배지첨가물 선별(DWP study1)
 - 단일 농도의 배지첨가물을 배양 2, 4일째 배양 부피대비 10% 첨가
 - 7종의 배지첨가물 선정

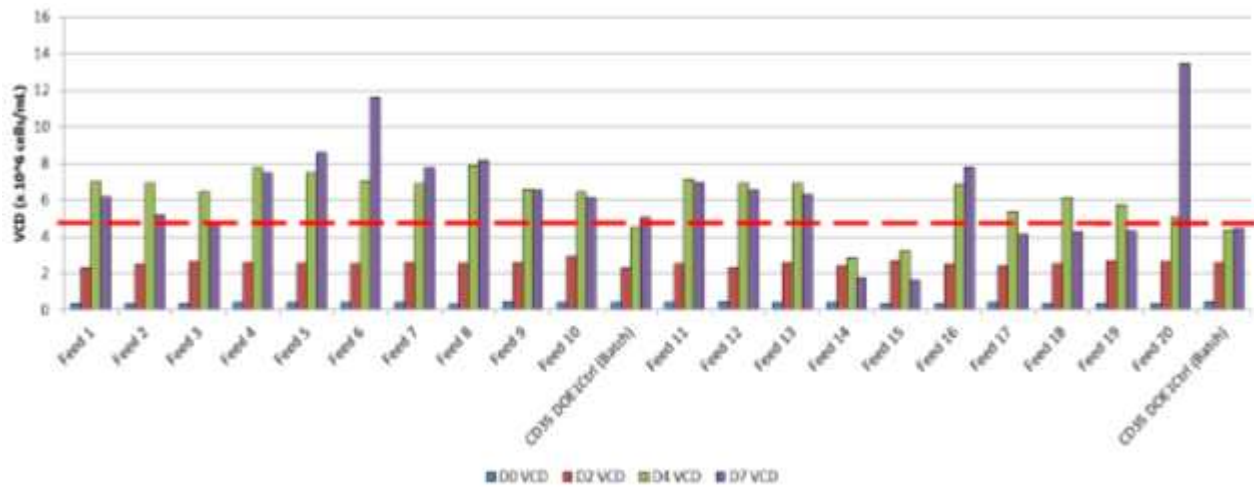


그림 11.1 DWP를 이용한 배지첨가물 20종의 세포 농도(DWP study1)

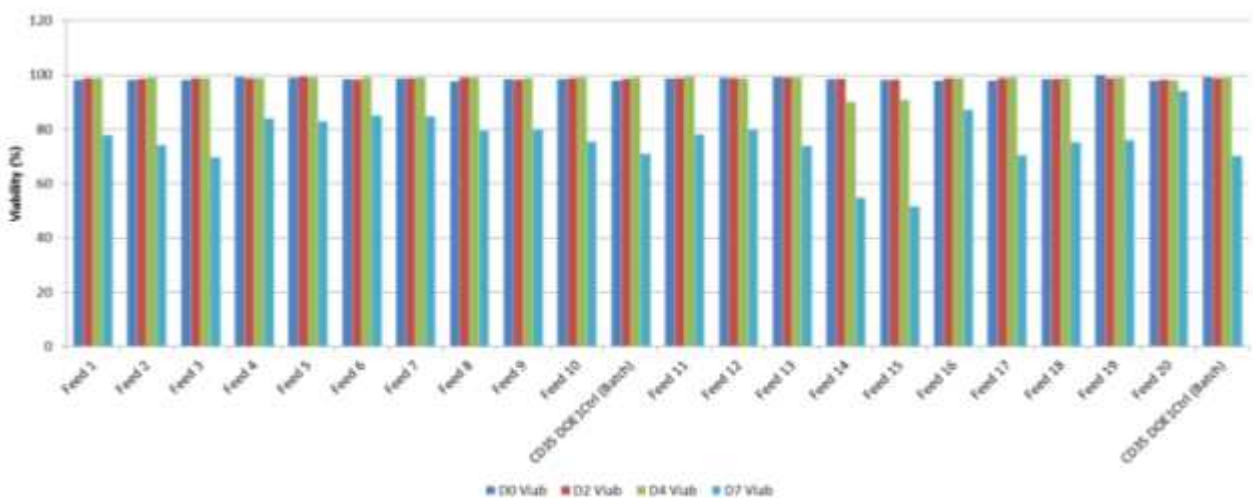


그림 11.2 DWP를 이용한 배지첨가물 20종의 세포 활성도(DWP study1)

○ 배양 4일차 세포농도를 1순위로 하고, 배양 7일차 세포 농도를 2순위로 하여 배지 첨가물 7종을 선별

○ Feed 4, 5, 6, 7, 8, 16, 20을 선정하여 배지첨가물의 농도 선별 수행

○ 배지첨가물의 농도 선별(DWP study2)

- 배지첨가물의 3 가지 농도를 배양 2, 4일째 배양 부피대비 10% 첨가
- 선별된 배지첨가물 각각의 제조 농도를 선정
- Feed 16의 경우 배지첨가물의 성분을 변형하여 Feed 16b, c, d를 제조하여 농도 평가
- Feed 16을 농도별로 배양 0일에만 첨가하여 세포 성장 평가

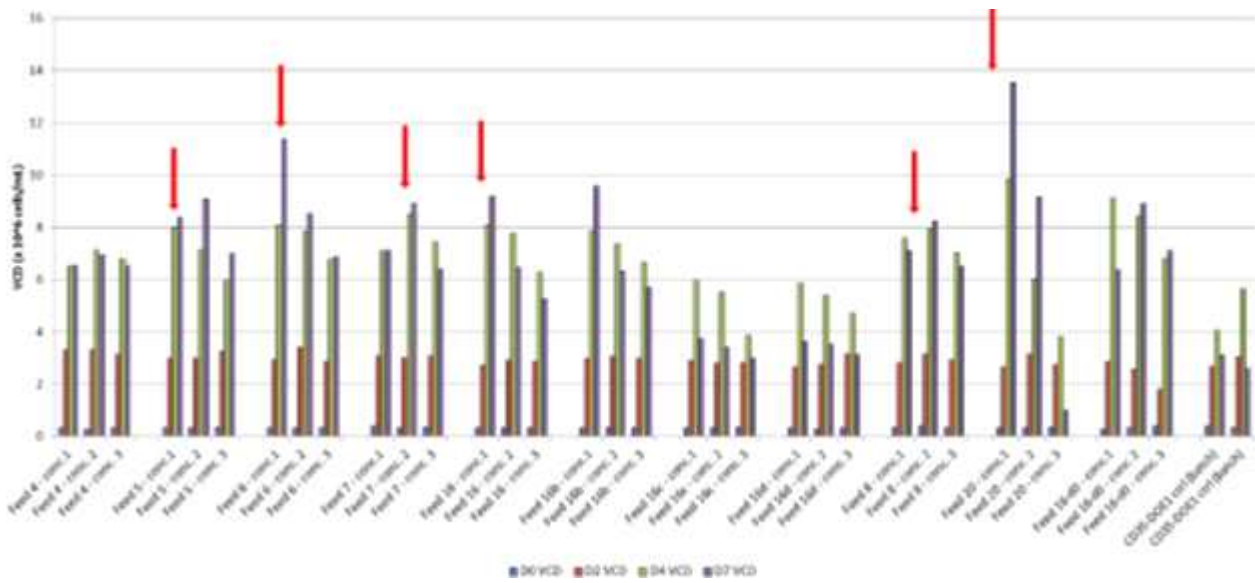


그림 11.3 배지첨가물의 제조 농도별 세포 농도(DWP study2)

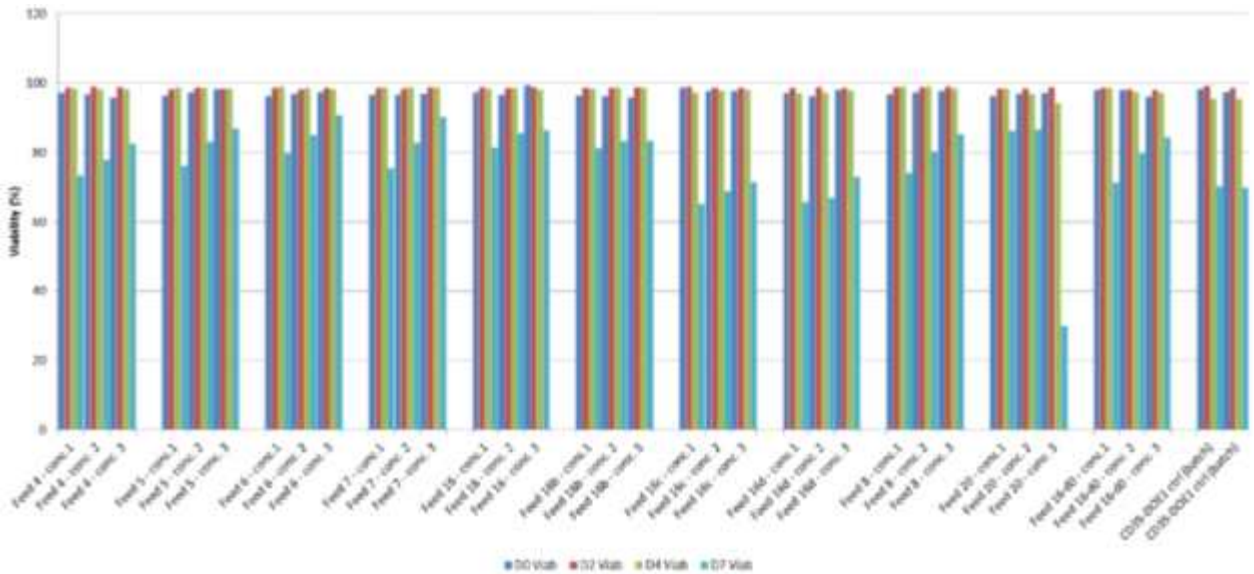


그림 11.4 배지첨가물의 제조 농도별 세포 활성도(DWP study2)

- Feed 5, 6, 16, 20은 conc1에서 배양 4일차에 가장 높은 세포성장을 보임
- Feed 4, 7, 8은 conc2에서 가장 높은 세포 성장을 보임
- Feed 16의 변형인 b, c, d에서 세포성장의 이득보다는 오히려 성장저해를 받음
- Feed 16을 배양 0일 차에만 첨가하여도 conc1에서 배양 4일차에 세포농도가 9×10^6 cells/ml 이상으로 성장하는 것으로 보아 배지첨가물의 첨가전략을 통한 고농도 세포배양이 가능한 것으로 사료됨
- 모든 조건에서 배양 4일차 세포활성도는 90% 이상으로 유지됨
- 배지첨가물의 첨가 전략 선정(Shake study1)
 - Shake flask로 스케일업하여 Feed 평가
 - Feed 5, 6, 7, 8, 16, 20의 6종에 대하여 평가
 - 배지첨가물을 배양 0일, 배양 0, 2일, 배양 0, 2, 4일, 배양 2일, 배양 2, 4일차에 배양 부피대비 10% 첨가하는 전략으로 세포 성장성 평가

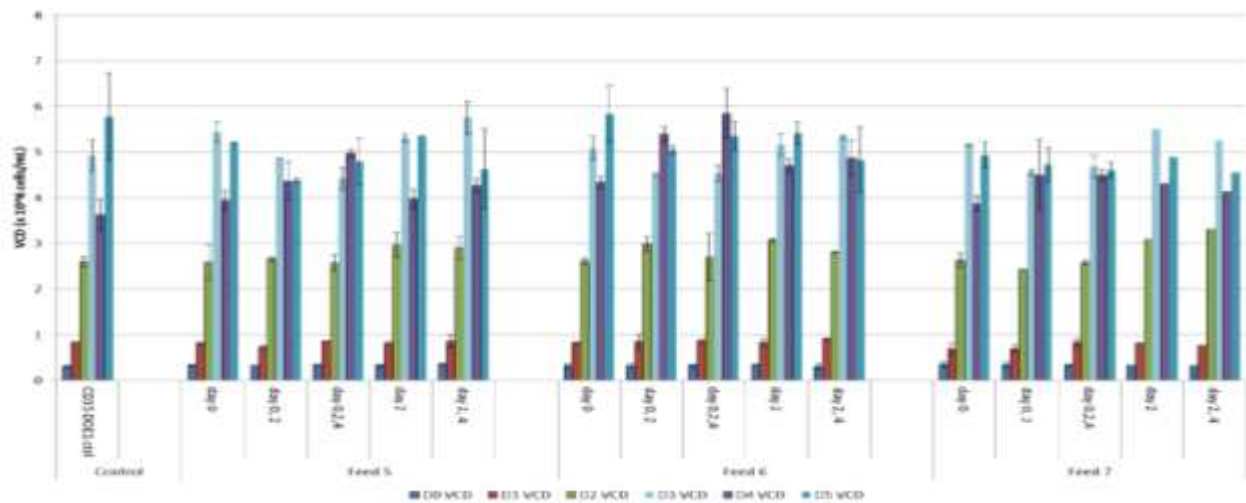


그림 11.5 배지첨가물(Feed 5, 6, 7)의 첨가 전략 선정을 위한 세포 농도 평가 (Shake study1)

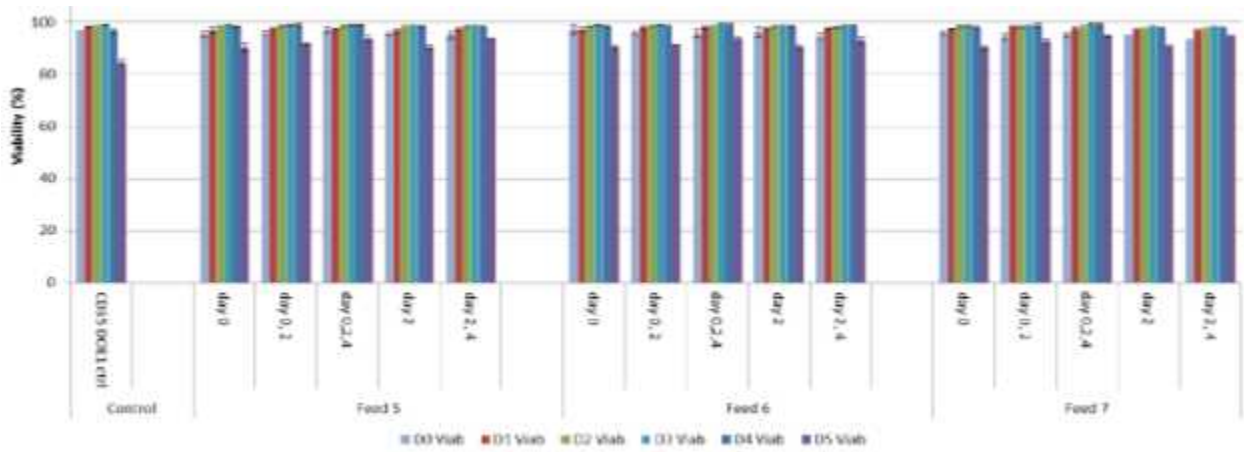


그림 11.6 배지첨가물(Feed 5, 6, 7)의 첨가 전략 선정을 위한 세포활성도 평가 (Shake study1)

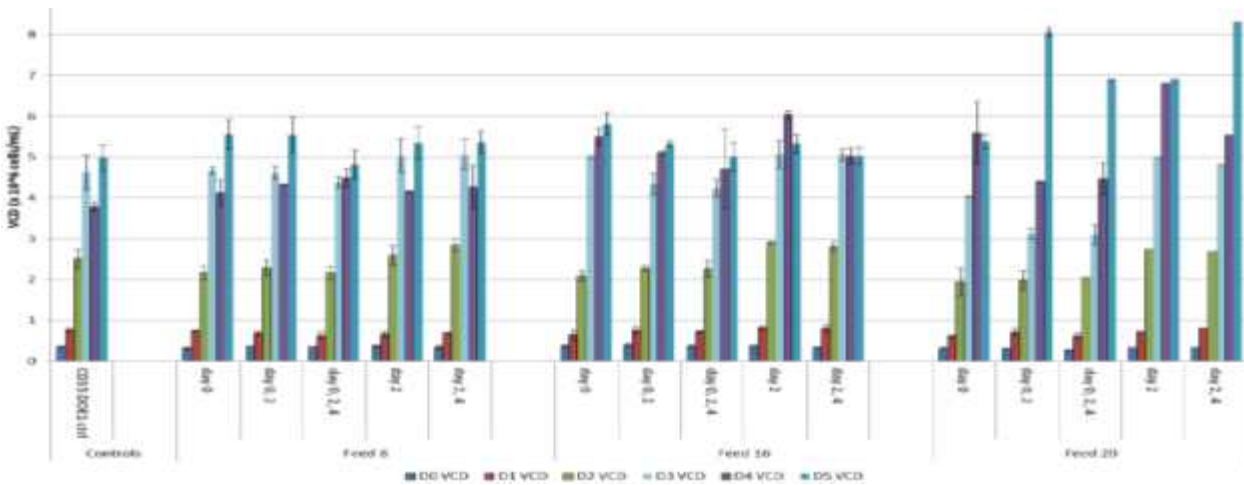


그림 11.7 배지첨가물(Feed 8, 16, 20)의 첨가 전략 선정을 위한 세포 농도 평가 (Shake study1)

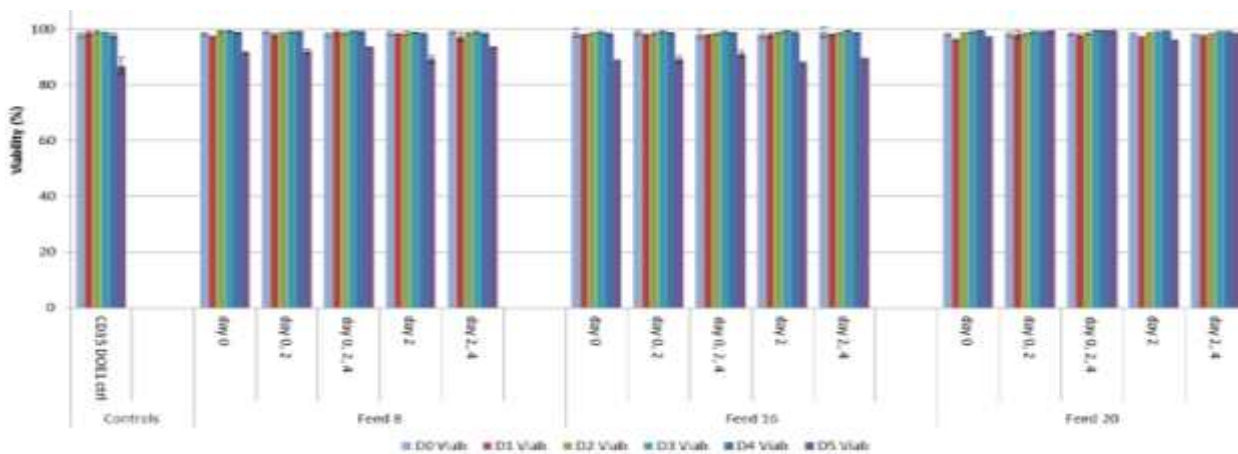


그림 11.8 배지첨가물(Feed 8, 16, 20)의 첨가 전략 선정을 위한 세포 활성도 평가 (Shake study1)

○ 배지첨가물의 첨가 전략 선정(Shake study2)

- Shake flask로 스케일업하여 Feed 평가
- Feed 5, 6, 8, 16, 16-2, 20의 6종에 대하여 평가
- 배지첨가물을 배양 0일, 배양 2일, 배양 1, 2, 3일, 배양 1, 3일, 배양 2, 3일차에 배양 부피대비 10% 첨가하는 전략으로 세포 성장성 평가

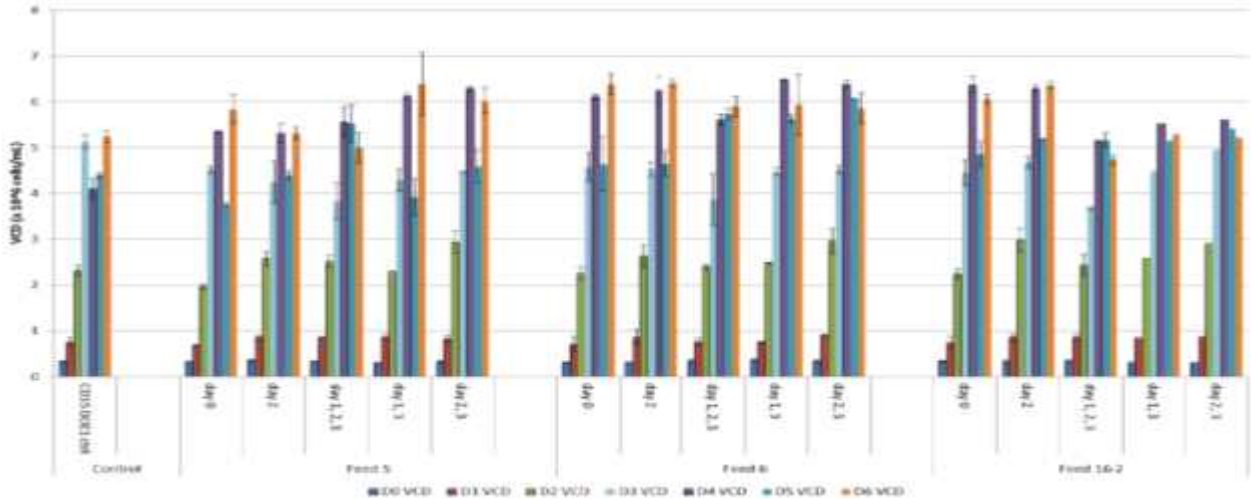


그림 11.9 배지첨가물(Feed 5, 6, 16-2)의 첨가 전략 선정을 위한 세포 농도 평가 (Shake study2)

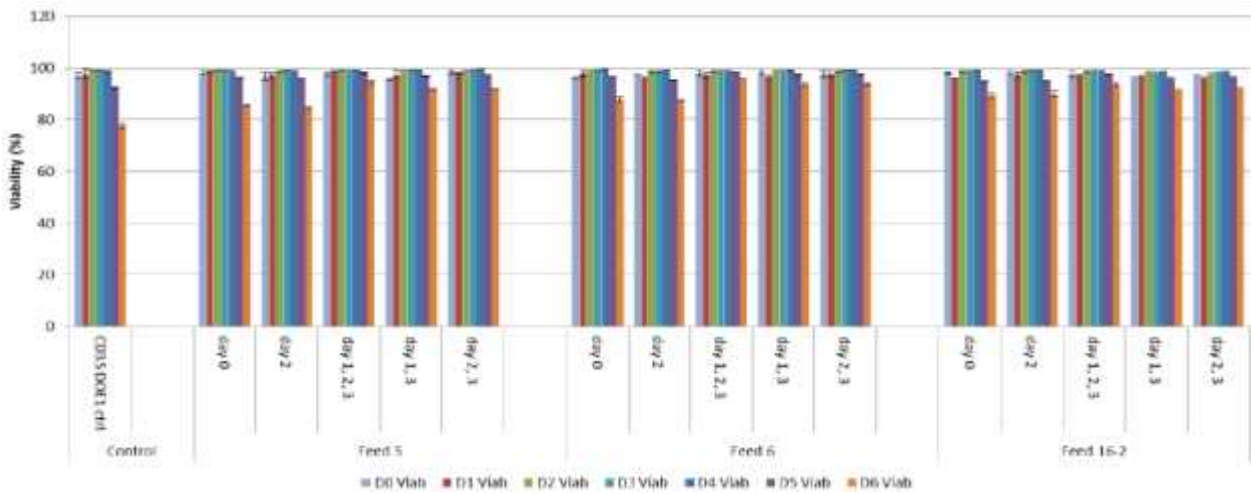


그림 11.10 배지첨가물(Feed 5, 6, 16-2)의 첨가 전략 선정을 위한 세포 활성도 평가 (Shake study2)

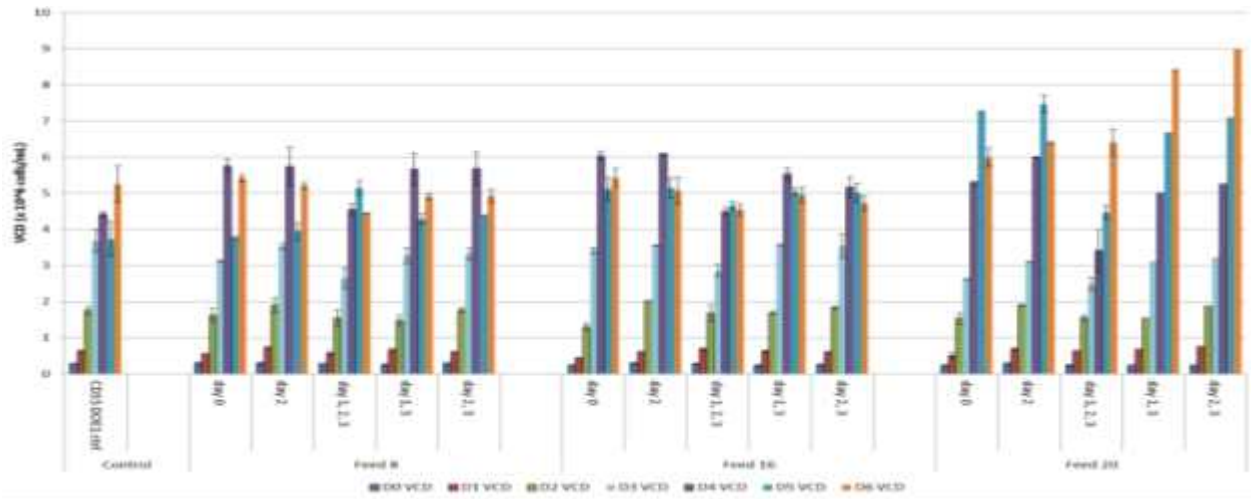


그림 11.11 배지첨가물(Feed 8, 16, 20)의 첨가 전략 선정을 위한 세포 농도 평가 (Shake study2)

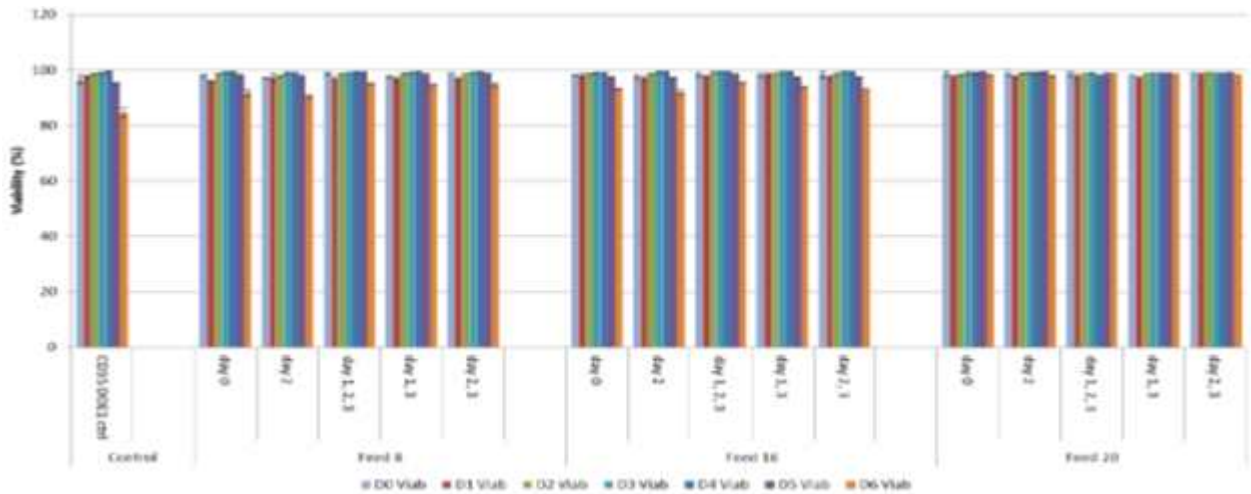


그림 11.12 배지첨가물(Feed 8, 16, 20)의 첨가 전략 선정을 위한 세포 활성도 평가 (Shake study2)

- DWP에서 Shake flask로 스케일업 후, 세포배양 4일째 세포 응집현상을 보임
- DWP의 경우 Shake flask 배양보다 높은 RPM으로 배양을 하기 때문에 세포의 응집 현상을 극복하는 방법으로 배양 교반을 높을 필요성이 있을 것으로 사료됨
- CD계열 배지첨가물로 첨가전략을 다양한 방식으로 시도하였으나 기본배지를 사용한 Batch 배양보다 세포성장성이 높아진 Fed-batch 배양법은 없음
- CB feed1와 같은 상업용 배지첨가물에는 성장 인자가 포함되어 있기 때문에 세포 성장성이 좋으며, 성장인자가 불포함된 CD계열 배지첨가물로는 세포성장을 높이는 데는 한계가 있음
- 선정된 6개의 배지첨가물을 가지고 생명연에서 재연성 시험 수행

- 기본배지에 배지첨가물을 10% 첨가하여 Metabolites 분석을 통하여 특성 규명

표 11.1 배지첨가물이 첨가된 기본배지의 특성 분석

	Glc (mM)	Gln (mM)	Lac (mM)	NH3 (mM)	Osmo (mOsm/kg)
DOE1	38.14	6.76	0.04	0.27	303
DOE1+Feed5	40.61	5.45	0.04	0.27	284
DOE1+Feed6	39.27	5.37	0.04	0.27	285
DOE1+Feed7	40.96	5.29	0.04	0.27	288
DOE1+Feed8	42.11	5.5	0.04	0.27	288
DOE1+Feed16	47.18	5.47	0.04	0.27	291
DOE1+Feed20	46.51	5.8	0.04	0.27	301
ProBHK-1 + CB feed1	20.09	8.17	1.09	1.26	277

- DOE1 기본배지에 비하여 Feed를 첨가하였을 때, Feed20을 제외한 나머지에서 Osmolality가 낮아짐
- Glucose는 ProBHK-1(CB feed1)은 약 20 mM이고 Feed가 첨가된 DOE1의 경우 평균 40 mM로 Glucose함량이 높음
- Glutamine은 ProBHK-1(CB feed1) 약 8.2 mM로 DOE1 기본배지의 Glutamine을 함량을 더 높게 넣을 필요성이 있음

- 배지첨가물을 배양 0, 2일과 배양 1, 3일에 배양 부피대비 10% 첨가하는 전략으로 배양 4, 5일차 세포 성장성을 비교 평가수행

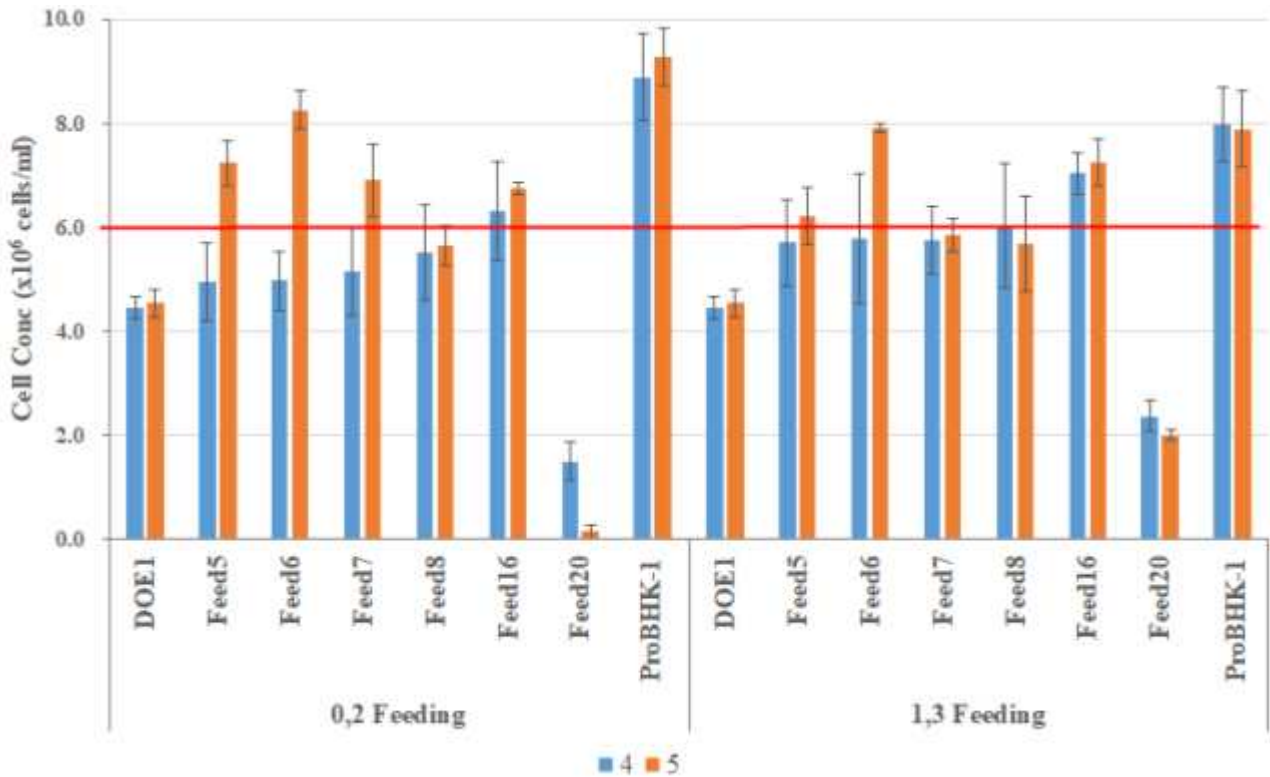


그림 11.13 배지첨가물의 첨가전략에 따른 세포성장성 비교

- 배지첨가물의 첨가를 배양 1, 3일차에 첨가하는 것이 배양 0, 2일차에 첨가하는 것보다 세포 농도가 더 높음
- Feed 20의 경우 재연성 실험에서 세포성장이 억제되어 재연성이 떨어짐
- Feed 16만 두가지 첨가 전략 모두에서 배양 4일차에 6×10^6 cells/ml 이상 성장함

- 배양 1, 3일차에 배지첨가물을 첨가 배양하여 구제역 바이러스 역가평가 수행
- 배양 4일 차에 모든 세포를 회수하여 DOE1 기본배지로 배지교체 후 구제역 바이러스 접종

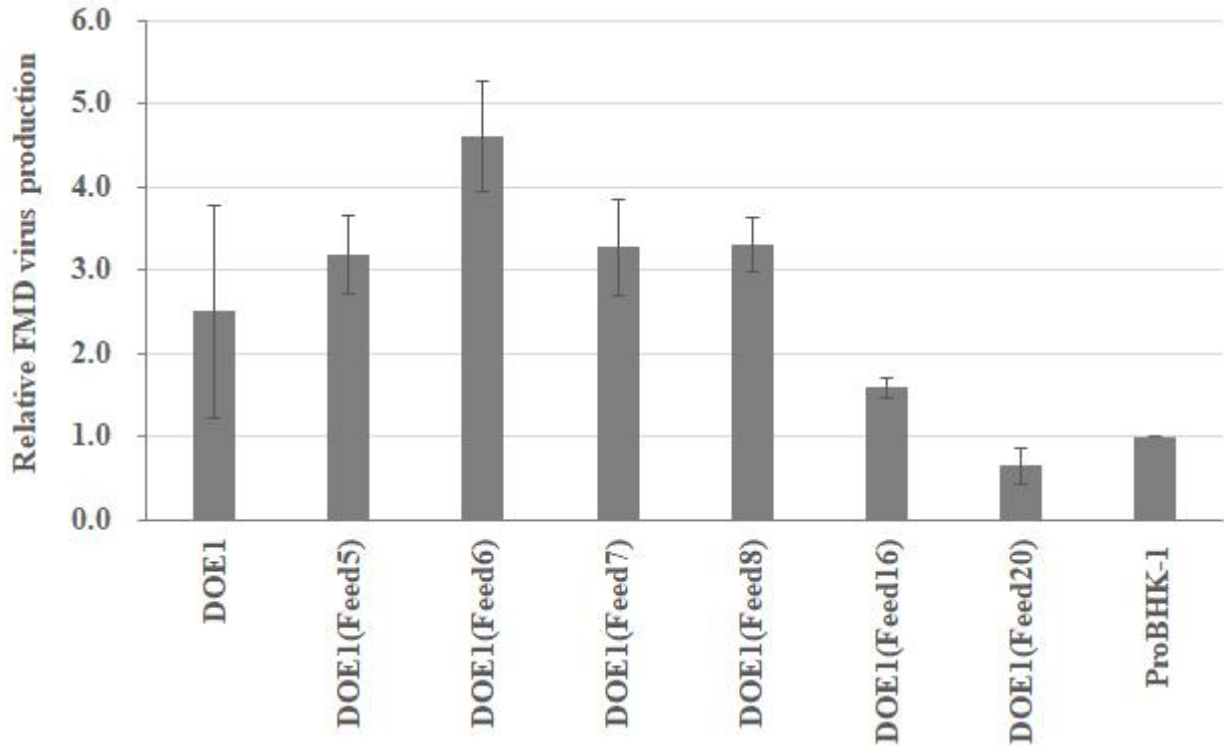


그림 11.14 배지첨가물의 첨가(배양1, 3)를 통한 구제역 바이러스 생산성 상대 평가

- 구제역 바이러스 역가 평가는 ProBHK-1 배양을 통한 바이러스 역가 측정 결과를 바탕으로 상대 평가
- Feed 16이 가장 높은 세포성장성을 보였으나, Feed 6를 첨가한 배양에서 구제역 바이러스 생산성이 가장 높게 나옴
- ProBHK-1 배지에 비하여 Feed 6에서 약 4.6 배 이상 바이러스 생산성이 높음

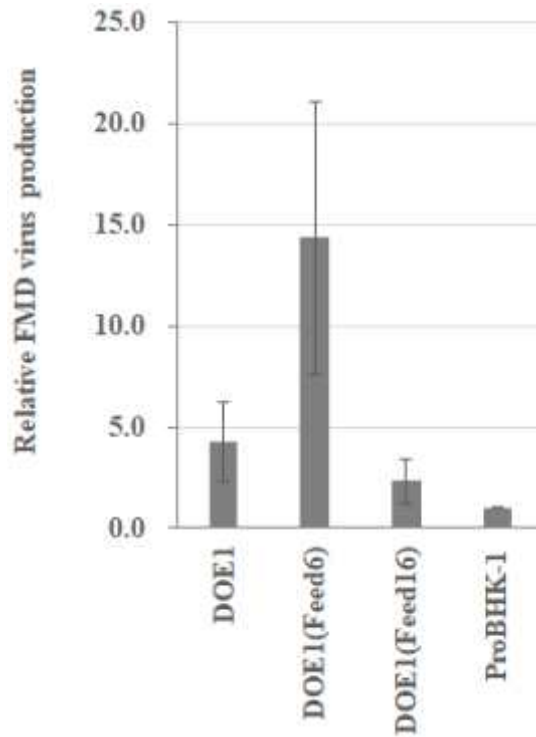


그림 11.15 Feed 6와 16을 이용한 세포배양의 구제역 바이러스 역가 반복평가

- 세포 성장이 가장 좋은 Feed 16과 바이러스 생산성이 가장 좋은 Feed 6을 선별하여 바이러스 역가를 재평가 수행
- Feed 6에서 Feed 16보다 약 5.6배 이상의 구제역 바이러스 생산성을 보임

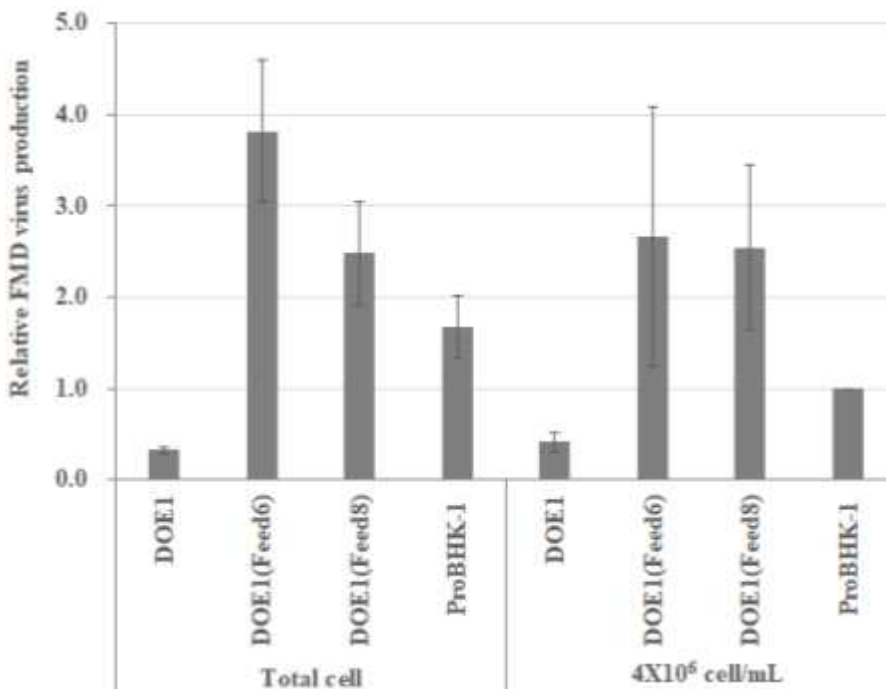


그림 11.16 Feed 6와 8을 이용한 세포배양의 구제역 바이러스 역가 반복평가

- 배양 4일차 세포성장과 바이러스 역가 평가에서 2번째로 결과가 좋았던 Feed8과 바이러스 생산성이 가장 좋은 Feed 6을 선별하여 바이러스 역가를 재평가 수행
- 전체 세포와 접종시 세포농도를 4×10^6 cells/ml로 통제하여 구제역 바이러스 생산성을 평가
- 전체 세포수로 바이러스 생산성을 비교하였을 경우, Feed 6가 Feed 8보다 높은 생산성을 보임
- 세포수를 동일하게 통제하여 배지 자체만 비교하였을 경우에도 Feed 6가 Feed 8보다 높은 생산성을 보임
- 실제 공정에서는 세포 농도의 제한 없이 전체 세포에 바이러스를 접종할 것임

표 11.2 첨가 전략에 따른 최고세포농도 및 구제역 바이러스 역가 상대 평가 요약

Feed Media	MVCC (10^6 cells/ml, day4)		Relative FMD virus production
	Feeding day 0, 2	Feeding day 1, 3	
DOE1	4.46	4.46	2.5
Feed5	4.94	5.70	3.2
Feed6	4.97	5.77	4.6
Feed7	5.14	5.76	3.3
Feed8	5.51	6.02	3.3
Feed16	6.32	7.03	1.6
Feed20	1.50	2.37	0.6
ProBHK-1(CB feed1)	8.89	7.97	1.0

- 배지첨가물의 첨가전략은 배양 1, 3일 차에 첨가하는 것이 배양 0, 2일 차에 첨하는 것보다 유리함
- 구제역 바이러스 역가 측정으로 통한 배지첨가물 선별은 Feed 6가 가장 우수함

- 대량배양의 공정을 단순화하기 위하여 배양 0일에 모든 첨가물을 첨가하여 세포성장성을 향상시키는 공정 선별
- 배지첨가물(Feed 6, 8), Glucose, Glutamine을 농도별로 첨가하여 최적 공정 선별

표 11.3 Enhanced batch 배양을 위한 첨가물 농도 선별

		Gln (mM)	Glc (g/L)	Feed (%)
1	No Feed	0	0	0
2	Feed6	0	0	5
3		0	0	10
4		5	5	5
5		5	5	10
6		10	5	5
7		10	5	10
8	Feed8	0	0	5
9		0	0	10
10		5	5	5
11		5	5	10
12		10	5	5
13		10	5	10

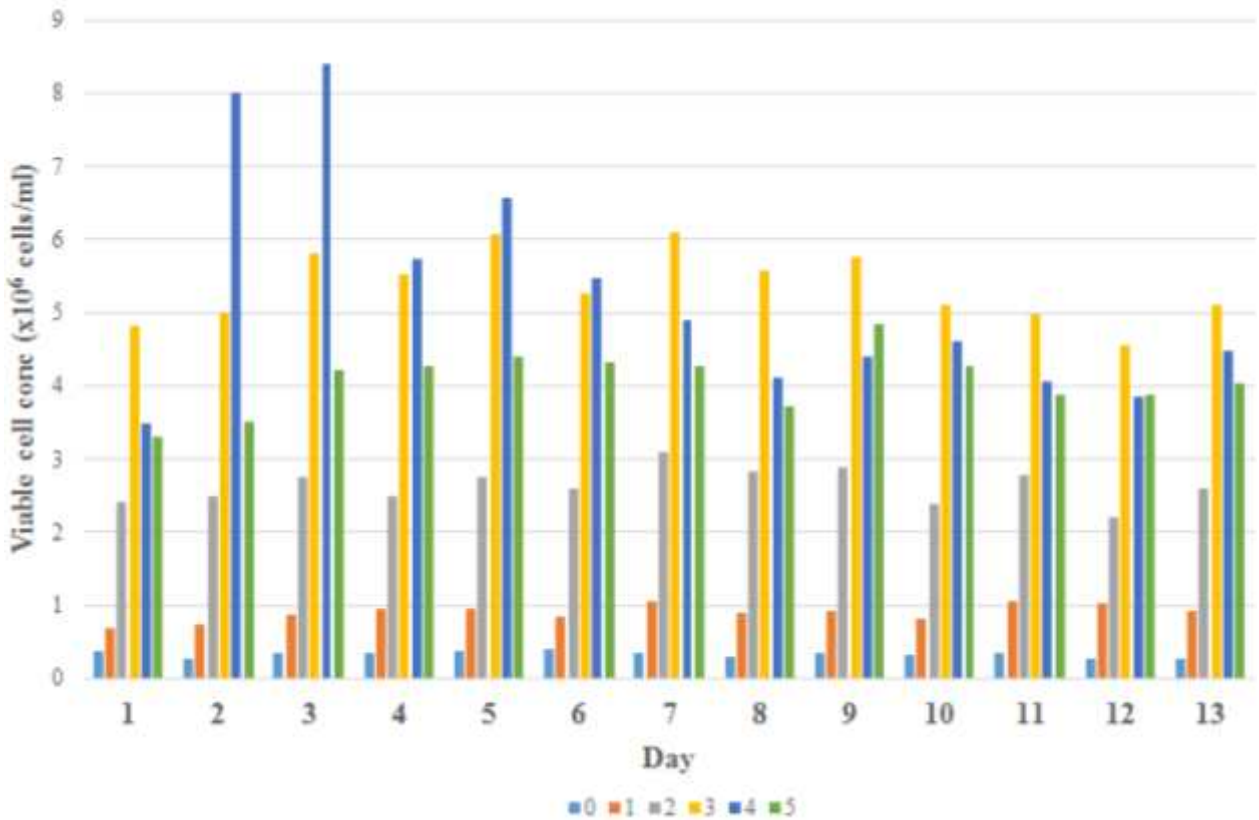


그림 11.17 Enhanced batch 배양을 위한 첨가물 농도에 따른 세포 성장 평가

- 배양 초기 Glucose와 Glutamine의 추가 첨가는 세포성장을 유의미하게 높이지 못함
- 배양 0일에만 Feed 6를 첨가하는 것으로 배양 4일차 최고세포농도를 높이는데 유리함

12. 200 L 바이옱어액터를 이용한 구제역 바이러스 생산 세포의 대량 배양법 구축

- DOE1 기본배지와 Feed6 배지첨가물을 이용하여 200 L 바이옱어액터에서 배양 수행
- 정책활용을 위한 대량배양 작업절차서에 따라 배양 수행
- 배양 0일에 Feed 6를 배양액 대비 10% 첨가하여 배양 공정을 단순화 함
- 배양 0일에 세포 접종 후 200 L 배양기에서 무균적 샘플링을 통하여 얻은 배양액을 Shake flask에 키워 비교
- 2개의 Shake flask중 하나는 200 L 배양과 같은 조건으로 배양 수행하고 나머지 flask에서는 배양 2일차에 Feed 6와 4 mM glutamine을 추가로 첨가하여 비교
- 세포활성도 80% 이하까지 배양하며 매일 샘플링하여 세포농도, 세포활성도, Metabolites를 분석
- 기본 배양 조건
 - 세포접종 : 0.5×10^6 cells/ml
 - Temp 37°C, Stirr 30 rpm, Air flow 10 lpm, pH 7.2 ± 0.2 , DO 50%

표12.1 200 L 배양과 flask 배양 비교

	Medium	Feed
200 L Bioreactor	DOE1	Feed6(d0, 10%)
Flask1	DOE1	Feed6(d0, 10%)
Fkask2	DOE1	Feed6(d0 10%, d2 5%) Gln(d2 4 mM)

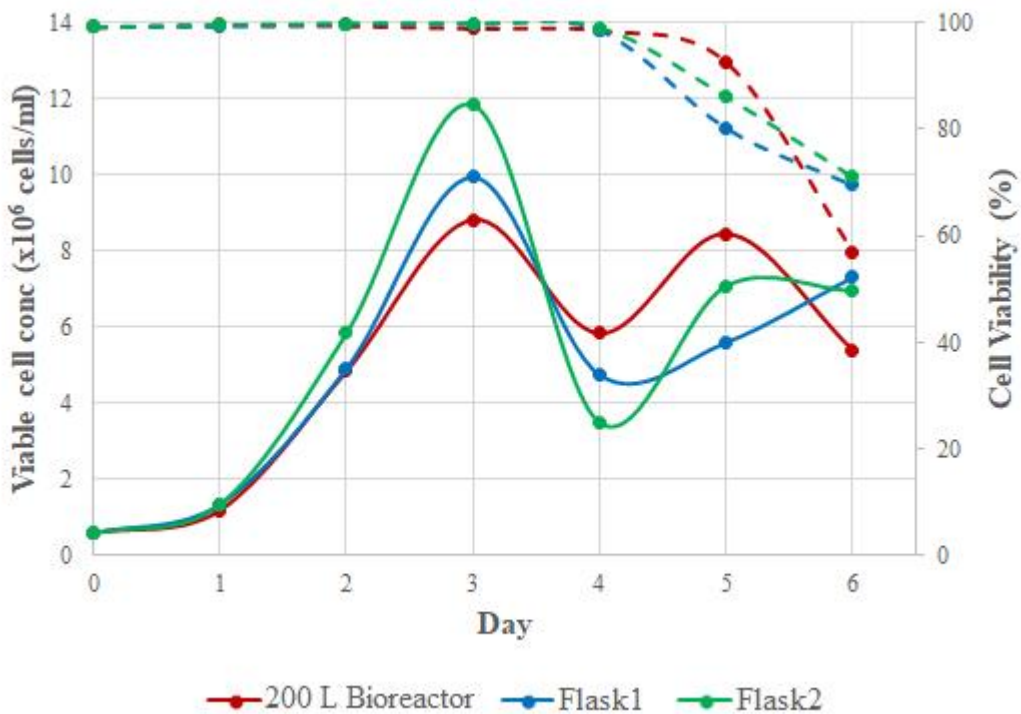


그림 12.1 200 L 배양과 flask 배양의 세포 농도와 세포활성도

- 배양 3일차 200 L 배양은 8.8×10^6 cells/ml, Flask1은 9.9×10^6 cells/ml, Flask2는 11.84×10^6 cells/ml로 배양 2일차에 첨가물을 추가한 배양에서 세포농도가 가장 높게 성장
- 모든 배양에서 배양 4일차 세포 응집이 생겼으며 배양 5일차 이후 세포활성도가 90% 이하로 떨어짐
- 배양 0일차 Feed 6의 첨가만으로 8.8×10^6 cells/ml이상 성장하였고 공정 개발 및 Fed-batch 배양을 통해 최고세포농도를 더 높일수 있을 것으로 사료됨
- 배양 4일차 세포 응집을 해결하기 위하여 배양 현탁속도를 더 높이거나 배지혼합 및 세포응집을 야기할 수 있는 영양소 소모를 분석하여 첨가함으로써 세포응집해결이 필요함

○ 대량 배양을 반복실험하여 구체역 바이러스 생산평가 수행

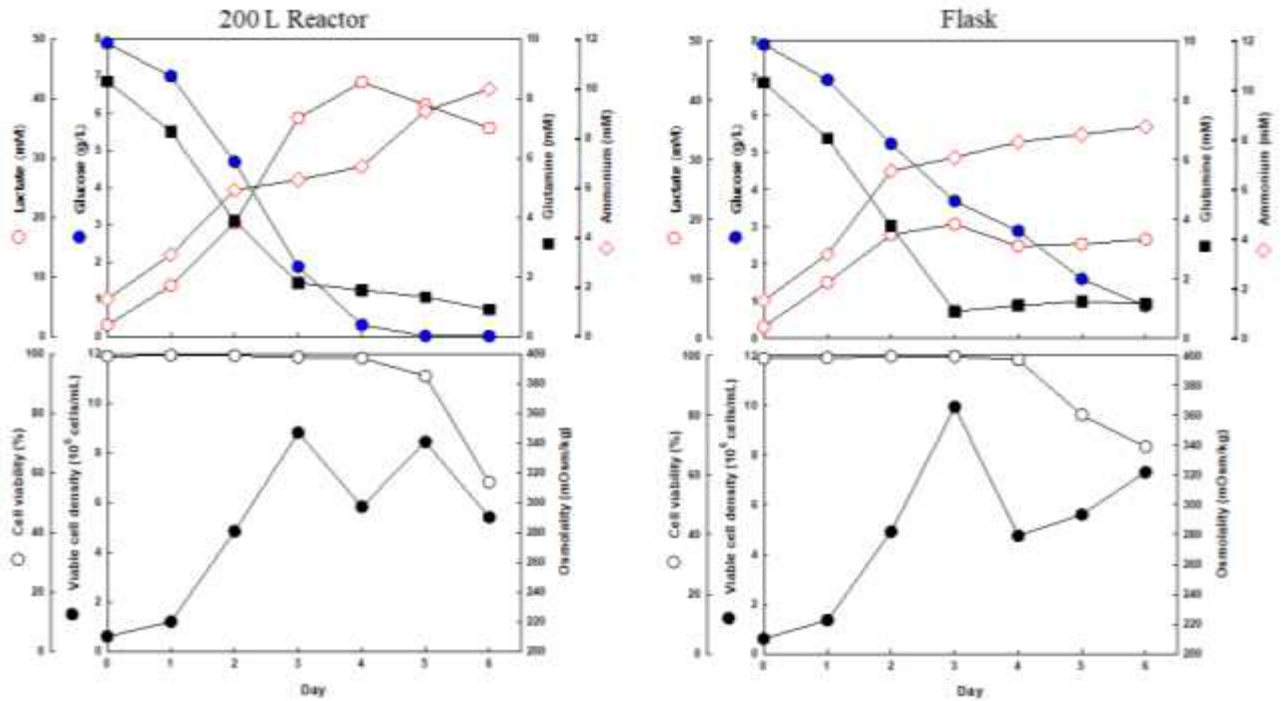


그림 12.2 200 L 배양과 flask 배양의 메타볼라이트 분석

- Glucose의 농도는 Flask 배양에서는 배양 종료까지 고갈이 없으나 200 L 대량배양에서 Glucose의 농도가 배양 4일 차 이후 고갈됨
- 200 L 대량배양에서 Glucose의 고갈이 심화됨에 따라 Lactate가 배양 4일차에 40 mM까지 축적됨
- 200 L 대량배양과 Flask 배양 모두 Glutamine의 고갈은 없었으며 Ammonium 농도도 10 mM 이하로 유지됨
- DOE1 기본배지와 Feed6 배지첨가물을 이용하여 200 L 바이옱랙터에서 배양 수행하여 배양 3일차 검역본부로 세포를 이송하여 구체역 바이러스 역가 측정
- Flask2에서 배양 2일차에 5% Feed 6, 4 mM Glutamine, 4 g/L Glucose를 추가로 첨가
- 기본 배양 조건
 - 세포접종 : 0.5×10^6 cells/ml
 - Temp 37°C, Stirr 30 rpm, Air flow 10 lpm, pH 7.2 ± 0.2 , DO 50%

표 12.2 200 L 배양과 flask 배양 비교

	Medium	Feed
200 L Bioreactor	DOE1	Feed6(d0, 10%)
Flask1	DOE1	Feed6(d0, 10%)
Fkask2	DOE1	Feed6(d0 10%, d2 5%) Gln(d2 4 mM) Glc(d2 4g/L)

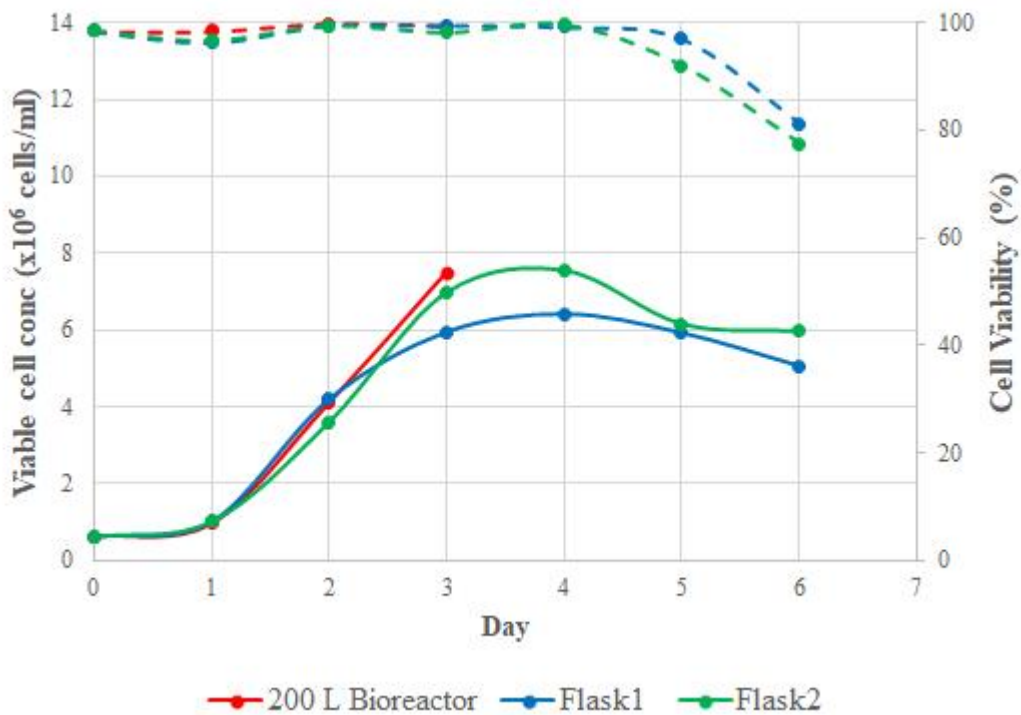


그림 12.3 200 L 배양과 flask 배양의 세포 농도와 세포활성도

- 배양 3일차 200 L 배양은 7.5×10^6 cells/ml, Flask1은 7.0×10^6 cells/ml, Flask2는 6.0×10^6 cells/ml로 200 L 대량 배양에서 세포농도가 가장 높게 성장
- Flask 배양에서 배양 4일차 세포 응집이 생겼으며 배양 5일차 이후 세포활성도가 90% 이하로 떨어짐
- 배양 3일차 모든 세포를 회수하여 검역본부로 세포를 이송 후 구제역 바이러스 역가 측정

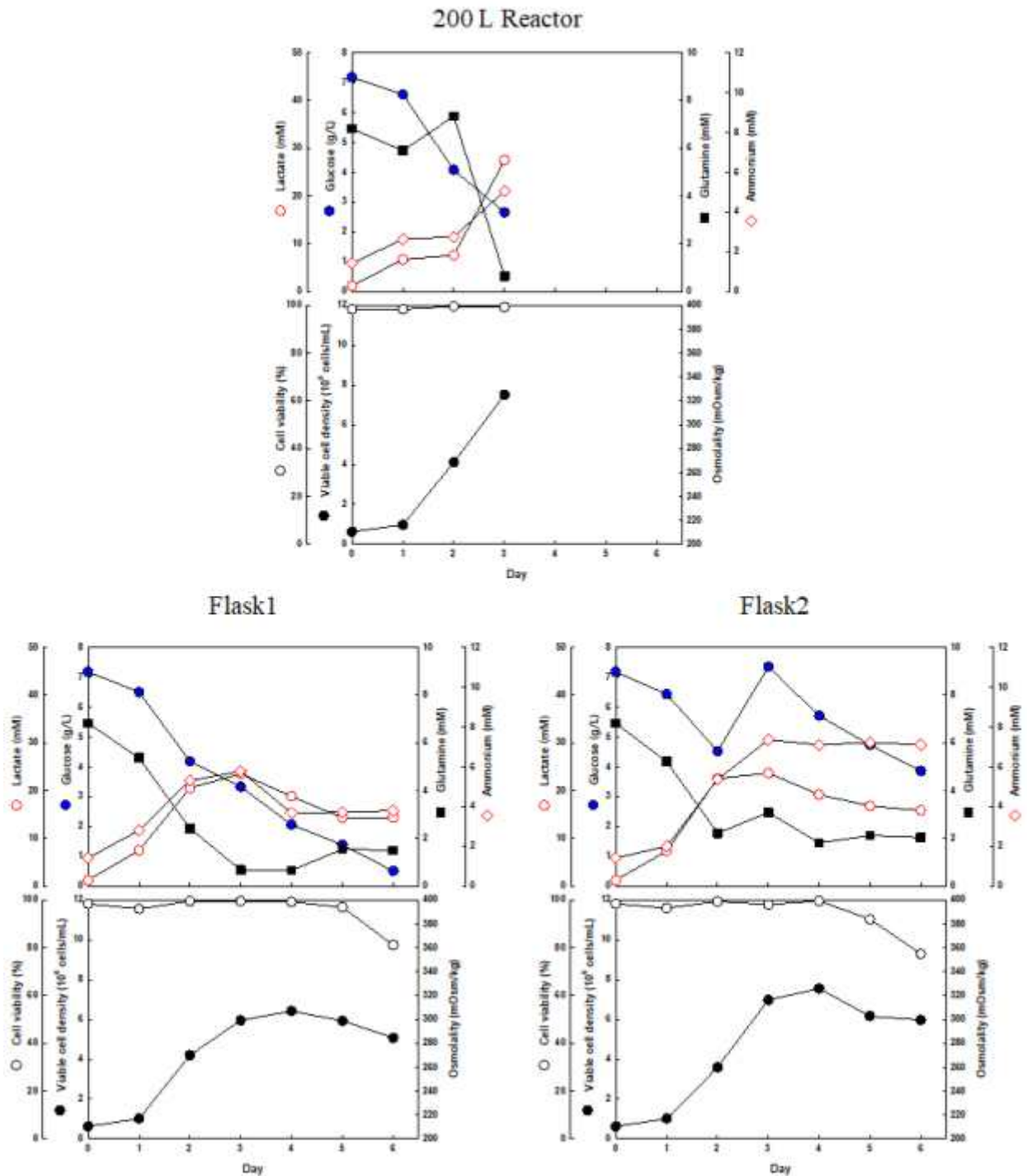


그림 12.4 200 L 배양과 flask 배양의 메타볼라이트 분석

- Glucose의 농도는 Flask 배양에서는 배양 종료까지 고갈이 없고 200 L 대량배양에서 Glucose의 농도는 배양 3일까지 고갈이 없음
- Flask 배양에서 Lactate는 배양 3일까지 약 25 mM까지 축적되었다가 그 이후 소모되어 배지 내 축적량이 감소
- 200 L 대량배양과 Flask 배양 모두 Glutamine의 고갈은 없었으며 Ammonium 농도도 10 mM 이하로 유지됨

<제1협동연구기관 : 농림축산검역본부 1차 년도 연구수행>

1. 최적의 구제역 바이러스 접종량 선정

- 구제역 바이러스를 0.001MOI, 0.01MOI, 0.1MOI 접종량으로 20 ml 부피의 현탁세포(6.0×10^6 cells/ml)에 접종
- 바이러스 접종량에 따른 신생 구제역 바이러스의 역가 차이가 없음

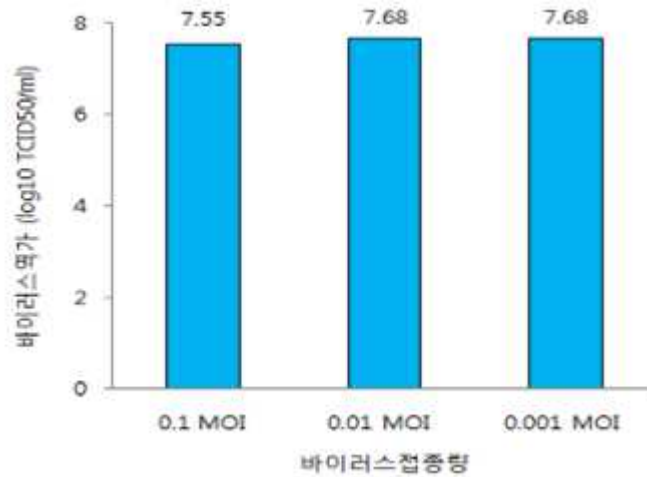


그림 1. 최적의 구제역 바이러스 접종량 선정

2. 현탁세포수에 따른 구제역 바이러스 역가차이

- 구제역 바이러스를 0.01MOI 접종량으로 20 ml 부피 현탁세포(10^5 cells/ml vs 10^6 cells/ml vs 10^7 cells/ml)에 접종
- 현탁세포수가 증가할수록 신생 구제역 바이러스의 역가 상승
- 1×10^6 이상의 세포농도에서는 바이러스 역가의 상승 정도가 완만해지는 경향을 나타냄

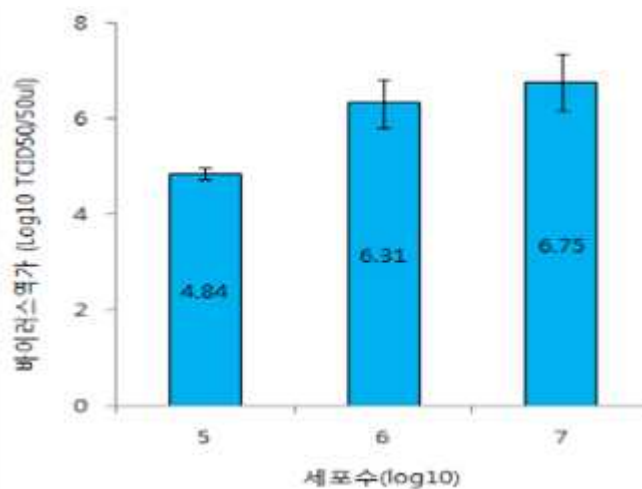


그림 2. 현탁세포수에 따른 구제역 바이러스 역가차이

3. 부착세포와 현탁세포의 바이러스생산성 비교

- 구제역 바이러스를 0.01MOI 접종량으로 부착세포 접종농도(0.9×10^6 cells/ml) vs. 현탁세포 접종농도(4.5×10^6 cells/ml)
- 부착배양세포는 배양용기에 따라 세포수가 한정적인 반면에 현탁배양의 경우에는 동일부피내 세포수를 확장할 수 있기 때문에 현탁배양에서 부착배양세포보다 세포수를 높이는 경우, 바이러스 역가가 부착배양시보다 상승

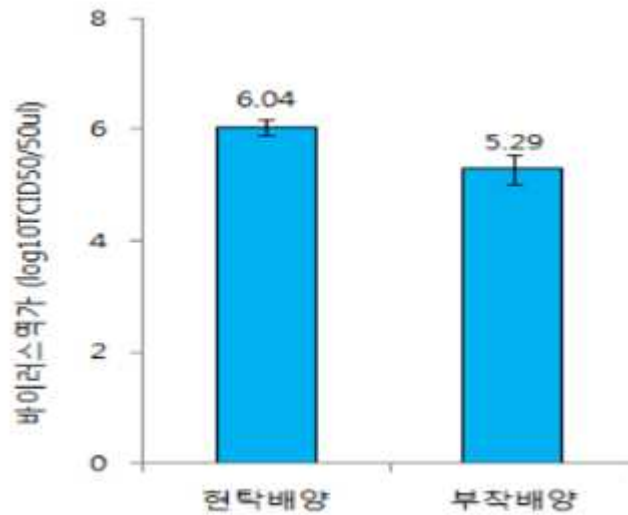


그림 3. 부착세포와 현탁세포의 바이러스생산성 비교

- 기존의 부착배양 방식과 달리 부유배양 방식을 통해 동일 시간내 배양이 가능한 세포수가 5배 이상 증가
- 동량의 바이러스를 접종시 세포농도에 비례하여 부유(현탁)배양방법이 부착배양보다 바이러스 증식성이 높았음

4. 바이러스 입자 검출기법 확립

- 바이러스를 접종한 세포에서 1일이내에 상층액을 회수한 후 PEG 처리하고 overnight 후 원심분리하여 항원 농축 후 완충용액으로 부유
- 부유한 항원은 다시 원심분리하여 insoluble material 제거하고 상층액 회수
- 상층액을 원심분리하여 침전된 항원을 회수한 다음 완충용액 1ml 첨가하여 냉장 조건에서 overnight 처리한 후 침전물을 resuspension
- 밀도구배 초고속원심분리 분획에 대해서 259nm 흡광도를 측정하여 바이러스 입자 정량

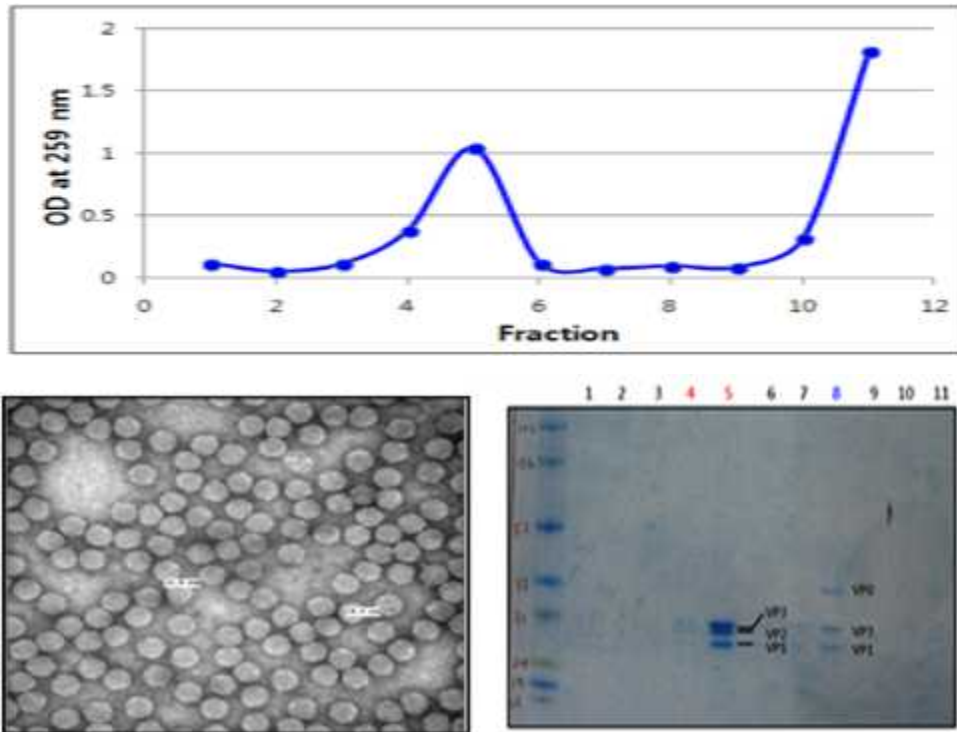


그림 4. 바이러스 입자 검출기법 확립

5. 부착세포와 현탁세포의 바이러스생산성 비교

- 구제역 바이러스를 0.01MOI 접종량으로 20 ml 부피의 현탁세포(3.0×10^6 cells/ml)에 접종
- 바이러스 접종시 세포배양에 사용한 종전 배지를 우측표의 배지 및 배지조성으로 변경하여 신생 바이러스의 역가를 측정
- 일반 배지 첨가가 필수적이며 배지종류에 따라 바이러스 생산성 차이 확인 (표 5.1)

표 5.1 배지 종류에 따른 바이러스 생산성

배지종류	배지 조성	역가(-log10)
ProBHK1	Fresh media	-6
	PBS	-0.75
	PBS+CB feed1	-0.5
	PBS+2g/l Glc	-0.75
	PBS+4 mM Gln	-0.875
	PBS+2g/l Glc+4mM Gln	-0.75
SFM4CHO	Fresh media	-5.5
	PBS	-0.5
	PBS+CB feed1	-0.5
	PBS+2g/l Glc	-0.5
	PBS+4 mM Gln	-0.5
	PBS+2g/l Glc+4mM Gln	-0.5
ProMDCK	Fresh media	-3.375
VPSFM	Fresh media	-6
SFM4HEK293	Fresh media	-3.875

<제1협동연구기관 : 농림축산검역본부 2차 년도 연구수행>

1. 기본 배지 및 교체 배지 평가 : ProBHK-1

No.	기본배양배지	바이러스 접종시 세포농도 ($\times 10^6$ cells/ml)	원심분리 활용 유무	원심분리후 사용배지종류
1	ProBHK-1	6.07 (total cell)	x	-
2	ProBHK-1	6.07 (total cell)	o	ProBHK-1
3	ProBHK-1	3	o	ProBHK-1
4	ProBHK-1	3	o	CD-BPM
5	ProBHK-1	3	o	DMEM (-FBS)
6	ProBHK-1	3	o	DMEM (+10% FBS)
7	ProBHK-1	3	o	ProBHK-1 (+5% CB feed1)
8	ProBHK-1	3	o	1/5 diluted ProBHK-1 in PBS
9	ProBHK-1	3	o	MEM alpha

○ 바이러스 역가

- 바이러스 접종전 배지 교환이 필수적임
- 동일 조건에서는 바이러스 접종시 세포가 고농도일 때 증식성이 더 좋음
- 교환배지에 혈청 포함될 경우 바이러스 증식이 더 잘 됨

2. 기본 배지 및 교체 배지 평가 : CD-BPM

No.	기본배양배지	바이러스 접종시 세포농도 ($\times 10^6$ cells/ml)	원심분리 활용 유무	원심분리후 사용배지종류
10	CD-BPM	6.65 (total cell)	x	-
11	CD-BPM	6.65 (total cell)	o	CD-BPM
12	CD-BPM	3	o	CD-BPM
13	CD-BPM	3	o	ProBHK-1

○ 바이러스 역가

- 바이러스 접종전 배지 교환이 필수적임
- 세포농도와 역가 사이 비례적 상관관계 없음

3. 기본 배지 및 교체 배지 평가 : ProBHK-1 vs. CD-BPM

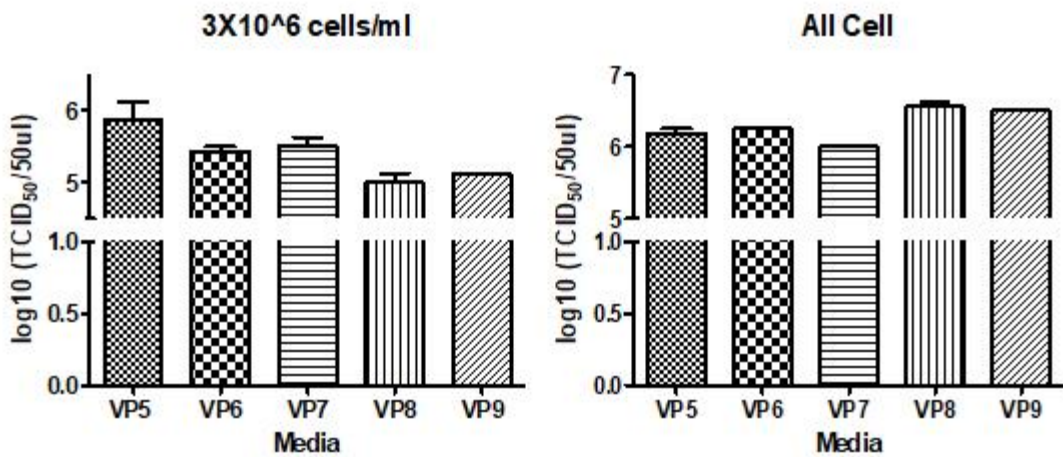
No.	기본배양배지	바이러스 접종시 세포농도 ($\times 10^6$ cells/ml)	원심분리 활용 유무	원심분리 후 사용배지종류
1	ProBHK-1	3	o	ProBHK-1
2	ProBHK-1	5.81 (total cell)	o	ProBHK-1
3	ProBHK-1	5.81 (total cell)	o	CD-BPM
4	CD-BPM	3	o	CD-BPM
5	CD-BPM	6.6 (total cell)	o	CD-BPM
6	CD-BPM	6.6 (total cell)	o	ProBHK-1
7	ProBHK-1	3	o	DMEM (-FBS)
8	ProBHK-1	3	o	DMEM + 2.5% FBS
9	ProBHK-1	3	o	DMEM + 5% FBS
10	ProBHK-1	3	o	DMEM + 7.5% FBS
11	ProBHK-1	3	o	DMEM + 10% FBS

○ 바이러스 역가

- 세포수와 바이러스 역가 사이 유의적인 상관관계 없음
- 교환배지가 ProBHK인지 CD-BPM인지에 따른 차이 미미함
- 교환배지의 혈청 함량 높아질수록 바이러스 역가 증가하는 경향 나타남

4. 기본 배지 및 교체 배지 평가 : VP series

BHK21	All Cell	3×10^6
VP5	4.67×10^6	3×10^6 Cells/ml
VP6	6.17×10^6	
VP7	5.92×10^6	
VP8	6.57×10^6	
VP9	5.32×10^6	



○ 바이러스 역가

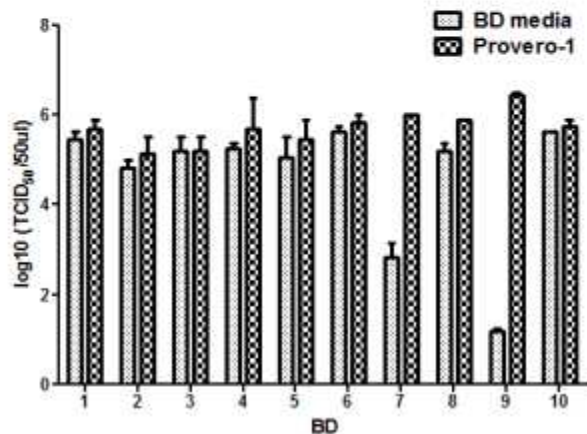
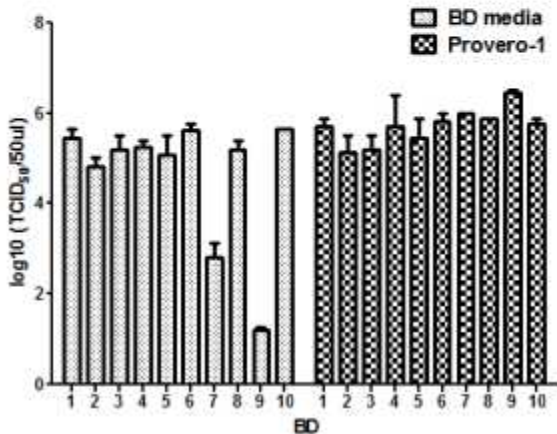
- 세포수와 바이러스 역가 사이 비례적 상관관계 없음
- 세포수 최대시와 고정시 최적배지 조성 동일하지 않음

5. 기본 배지 및 교체 배지 평가 : BD series

BHK21	Day 3		Day 4	
BD 1	1.06×10 ⁶	97 %	3.32×10 ⁶	96 %
BD 2	5.03×10 ⁶	99 %	7.12×10 ⁶	93 %
BD 3	2.42×10 ⁶	98 %	3.13×10 ⁶	98 %
BD 4	1.58×10 ⁵	98 %	2.99×10 ⁶	96 %
BD 5	3.65×10 ⁶	98 %	8.0×10 ⁶	93 %
BD 6	2.43×10 ⁶	98 %	3.58×10 ⁶	96 %
BD 7	1.95×10 ⁶	99 %	3.94×10 ⁶	99 %
BD 8	1.75×10 ⁶	97 %	3.67×10 ⁶	99 %
BD 9	3.16×10 ⁶	99 %	4.2×10 ⁶	96 %
BD 10	1.70×10 ⁶	98 %	2.35×10 ⁶	96 %

배지	교체배지	Titer (TCID ₅₀ /50ul)		Average
BD1	BD1	5.25	5.63	5.44
BD2	BD2	4.63	5.00	4.81
BD3	BD3	4.88	5.50	5.19
BD4	BD4	5.13	5.38	5.25
BD5	BD5	4.63	5.50	5.06
BD6	BD6	5.50	5.75	5.63
BD7	BD7	2.50	3.13	2.81
BD8	BD8	5.00	5.38	5.19
BD9	BD9	1.13	1.25	1.19
BD10	BD10	5.63	5.63	5.63

배지	교체배지	Titer (TCID ₅₀ /50ul)		Average
BD1	provero-1	5.50	5.88	5.69
BD2		4.75	5.50	5.13
BD3		4.88	5.50	5.19
BD4		5.00	6.38	5.69
BD5		5.00	5.88	5.44
BD6		5.63	6.00	5.81
BD7		6.00	6.00	6.00
BD8		5.88	5.88	5.88
BD9		6.38	6.50	6.44
BD10		5.63	5.88	5.75

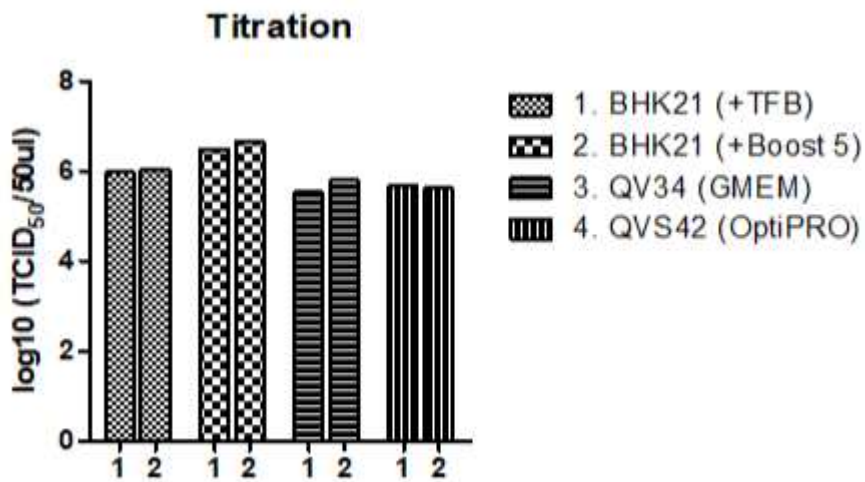


○ 바이러스 역가

- 3×10⁶ cells/ml로 세포수를 동일하게 맞춰 실험 수행 시 세포증식효율과 바이러스 생산효율 사이 상관관계 불명확
- 세포증식배지가 동일하더라도 바이러스 접종전 교체배지에 따라 바이러스 생산효율 차이가 현저함

6. 부유세포주별 구제역 바이러스 생산 효율 비교 평가


		1차 (2017.05.11)	2차 (2017.05.19)
Cell Counting		Cells/ml	Cells/ml
BHK21 (+TFB)	1-1	6.11×10^6	6.75×10^6
	1-2	6.32×10^6	6.50×10^6
BHK21 (+Boost 5)	2-1	4.11×10^6	4.28×10^6
	2-2	4.32×10^6	4.18×10^6
QV34 (GMEM)	3-1	1.22×10^6	1.45×10^6
	3-2	1.29×10^6	1.61×10^6
QVS42 (OptiPRO)	4-1	1.89×10^6	2.26×10^6
	4-2	1.97×10^6	2.40×10^6



○ 바이러스 역가

- 각 배지별 최대증식 세포로 바이러스 생산시 세포수와 바이러스 증식성 사이 비례관계 없음
- BHK21(+TFB)와 BHK21(+CB feed1)는 세포증식배지만 다르고 바이러스 접종 전 교환 배지는 동일하나 TFB 세포증식배지에 포함된 고영양 첨가물이 바이러스 증식에는 부정적 영향을 미친 것으로 추정됨
- 2종의 부유세포주(QV34 및 QVS42)에 비해 현재 배지선정에 사용 중인 특허세포주 (BHK21)가 가장 바이러스 증식능이 우수함

7. 구제역 바이러스 입자(146S) 정량적 평가기법 정립

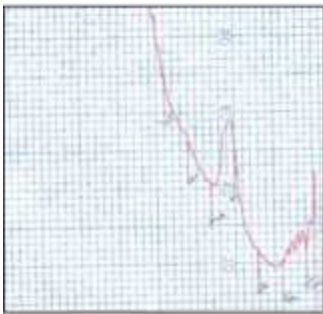


The size of the Peak on the chart recorder is proportional to the quantity of virus

$$\frac{FR \times PA \times FSD \times 1000}{S \times PL \times E \times W}$$

- FR: flow rate of sucrose through the cell (ml/min) → 2
- PA: Peak area (in square inches)
- FSD: full scale sensitivity setting (Absorbance units) → 1
- S: speed (60cm/h → inch/min) → 0.39
- PL: path length of the flow cell (cm) → 0.2
- E: E²⁵⁴ → 72
- W: weight or volume of sample applied to the gradients (g or ml) → 1

Dev Biol Stand. 1981;50:209-19

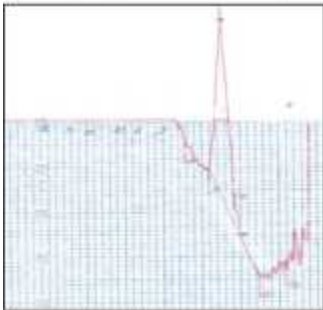


- Sensitivity setting: 0.1
- PA

		cm	Inch
a	cm를 Inch 변환	0.5	0.197
b	cm를 Inch 변환	3.2	1.260
inch	a*b=계산		0.248

$$\frac{2 \times 0.248 \times 0.1 \times 1000}{0.39 \times 0.2 \times 72 \times 2}$$

$$=(49.6/11.232) = 4.42 \text{ ug/ml}$$



- Sensitivity setting: 0.05
- PA

		cm	Inch
a	cm를 Inch 변환	0.4	0.158
b	cm를 Inch 변환	8	3.15
inch	a*b=계산		0.4977

$$\frac{2 \times 0.4977 \times 0.05 \times 1000}{0.39 \times 0.2 \times 72 \times 2}$$

$$=(49.77/11.232) = 4.43 \text{ ug/ml}$$

○ 구제역 바이러스 입자(146S) 정량법을 밀도구배분석기로 확립함

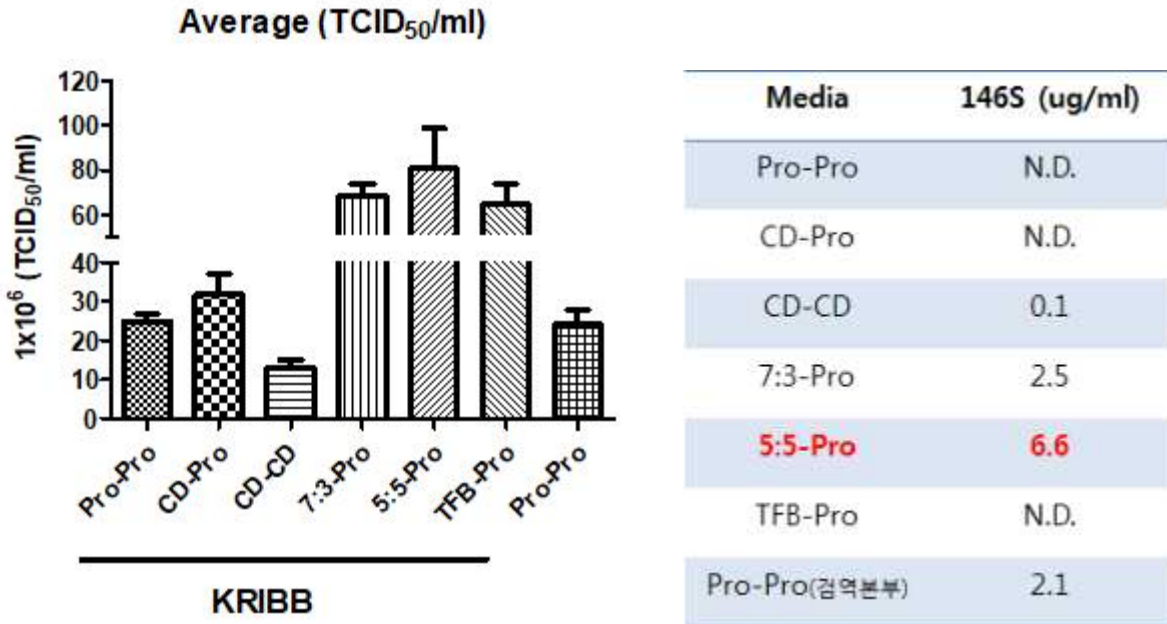
- 바이러스 상층액 및 불활화, 농축, 정제를 모두 거친 바이러스에 대해 모두 적용이 가능
- 바이러스 역가로 추정된 바이러스 생산성을 실제 백신항원으로 기능하는 구제역 바이러스 입자(146S) 정량을 통해 재확인하는 방법을 정립

<제1협동연구기관 : 농림축산검역본부 3차 년도 연구수행>

1. 세포배양배지 및 바이러스접종전 교체배지 조합 선정

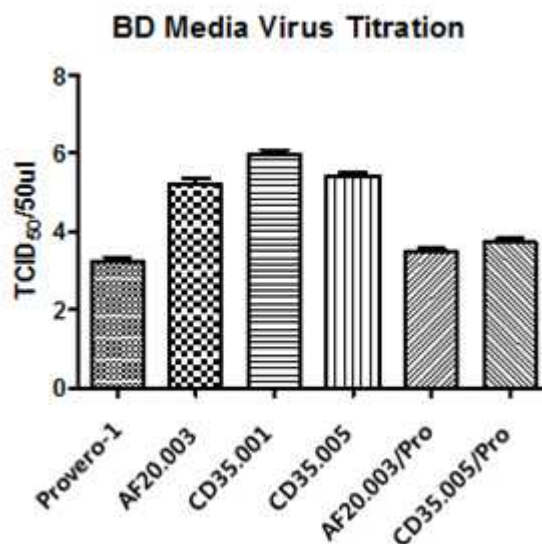
○ 기존 시판배지 대상 구제역 바이러스 역가 및 항원 생산량 비교

- CD-BPM 배지와 ProBHK-1 배지를 동량으로 섞은 경우 가장 우수한 바이러스 역가 및 146S 항원 생산량(상층액 기준)을 보임

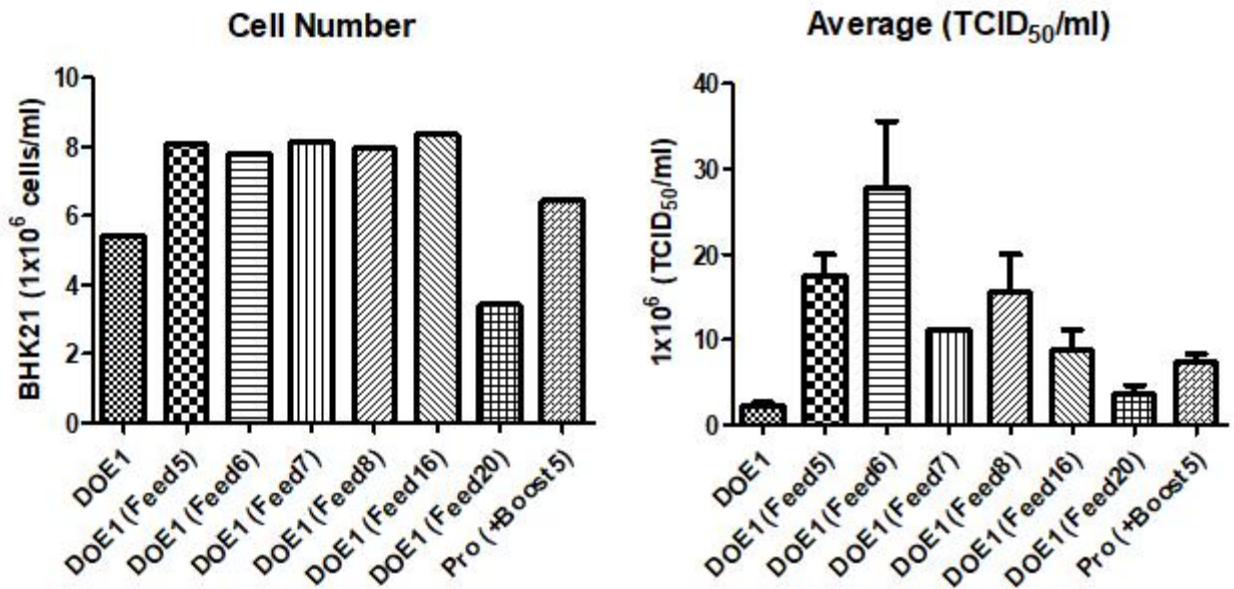


○ 신규 개발 배지(BD) 특성별 구제역 바이러스 증식성 비교

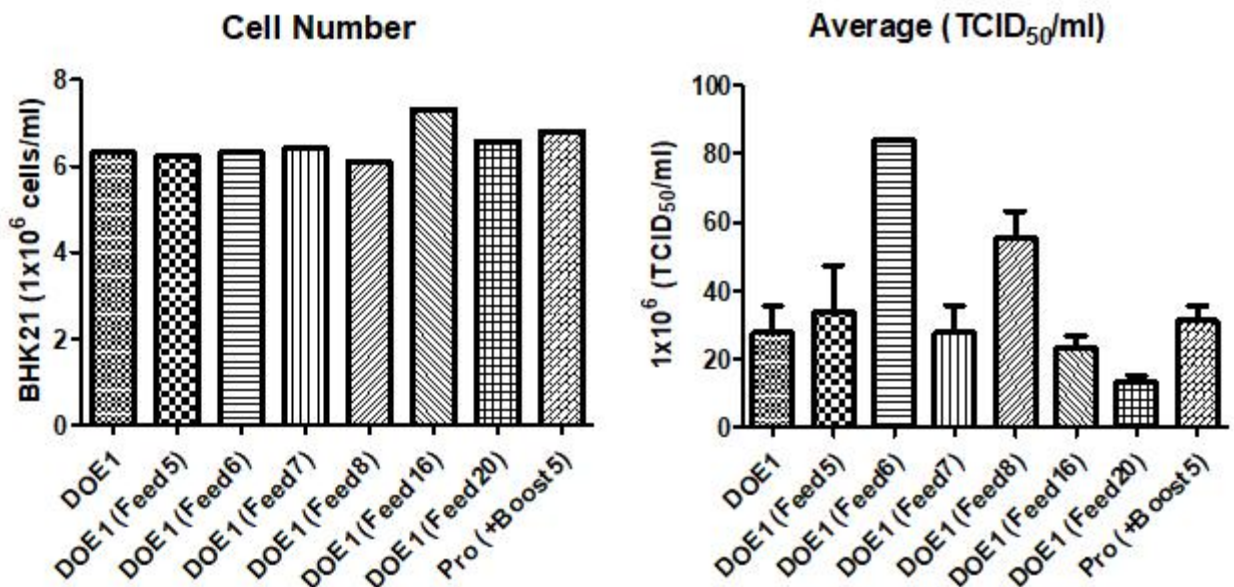
- 양성대조군인 ProBHK-1(기존 시판배지) 대비 동물유래 성분 무포함(AF) 배지류 및 화학조성배지류(CD) 적용시 화학조성배지인 CD35.001(=DOE1) 배지가 가장 우수하여 기본 배지로 선정



- [BD-TEST 1] 후보 기본배지(DOE1)에 다양한 Feed 조합시 동일시간내 최종 도달 세포수 및 바이러스 역가 비교
 - 양성대조군인 ProBHK-1 배지에 비해 DOE1에 Feed 6을 사용한 그룹에서 가장 높은 바이러스 역가를 나타냄
 - 동일시간내 세포성장에 가장 좋은 조건은 Feed 16이었으나 바이러스 역가는 그에 미치지 못함

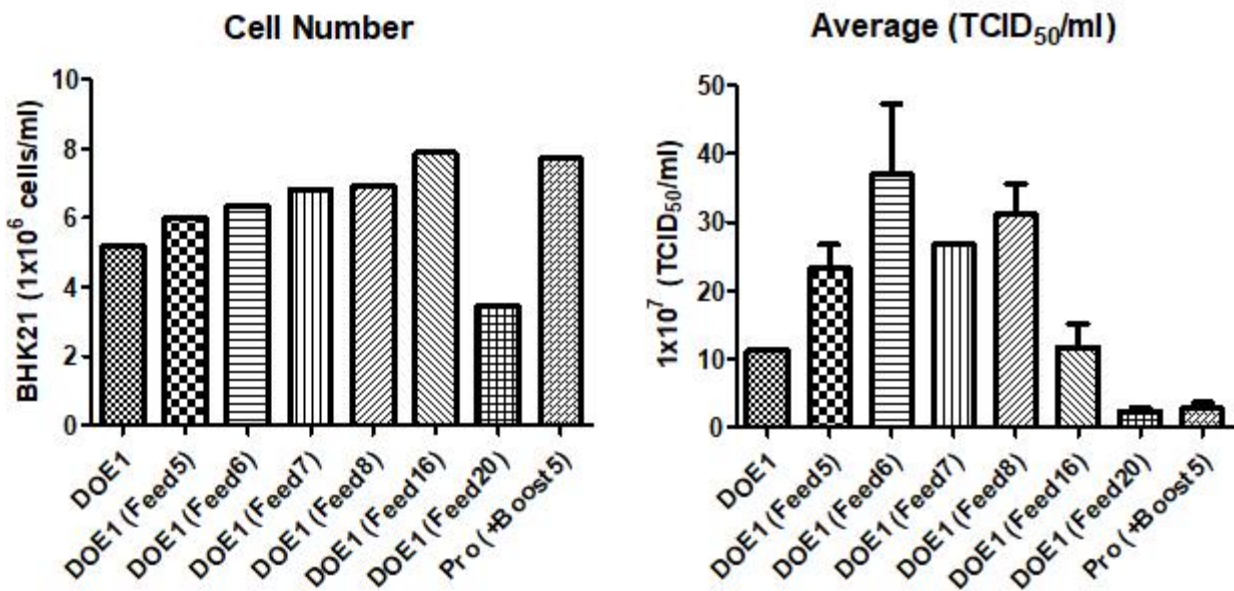


- [BD-TEST 2] 후보 기본배지(DOE1)에 다양한 Feed 조합시 동일시간내 최종 도달 세포수 및 바이러스 역가 비교
 - 첫번째 테스트와 마찬가지로 양성대조군인 ProBHK-1 배지에 비해 DOE1에 Feed6>Feed8을 사용한 순으로 높은 바이러스 역가를 나타냄



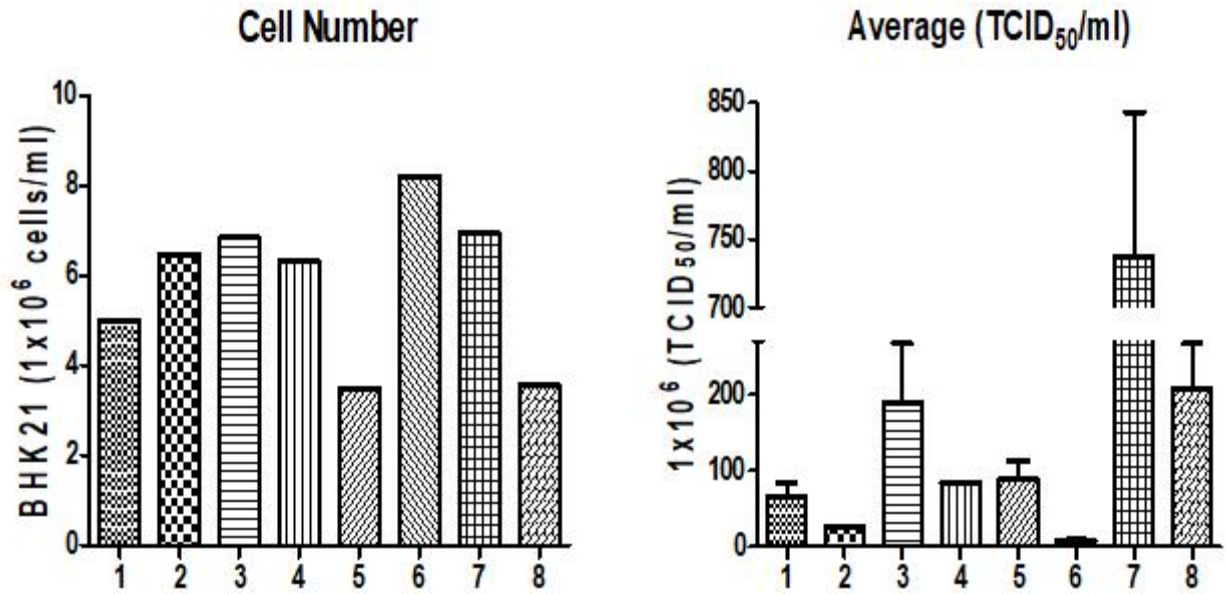
○ [BD-TEST 3] 후보 기본배지(DOE1)에 다양한 Feed 조합시 동일시간내 최종 도달 세포수 및 바이러스 역가와 항원량 비교

- 앞선 테스트 결과와 상응하는 경향성을 나타내었음
- 바이러스 역가가 뛰어난 Feed 조합의 바이러스 상층액 및 PEG 농축정제 샘플에서 각각 146S 항원량을 분석한 결과, 바이러스 역가와 백신항원량이 정확한 비례 관계를 보이지는 않았으나 대체적으로 높은 역가를 보이는 배지조합에서 항원량도 우수한 것을 확인함
- Feed 6를 사용하는 경우, 상층액 및 농축정제 항원 모두에서 목표기준치인 2ug/ml 이상을 나타냄



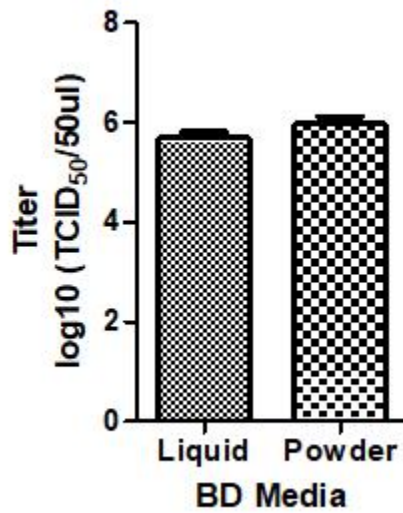
○ [BD-blind test 3회 수행] 검증을 위한 blind test 반복 수행 (대표도)

- 주관연구기관(생명공학연구원)이 각각의 배지가 기명되지 않은 샘플을 제1협동기관(검역본부)에 제공하면 제1협동기관(검역본부)에서 미지의 샘플에 각각 동일한 바이러스를 접종후 분석하였음
- 제1협동기관(검역본부)의 어떠한 주관도 반영되지 않은 맹검에서도 기존에 실시하였던 시험과 유사한 경향을 나타내었으며 이전 결과와 마찬가지로 Feed6(블라인드 샘플 7번)가 가장 우수한 결과를 나타냄



○ [BD-포맷 비교 실험] 액상 배지 및 분말 배지 성능 비교

- 액상으로 공급된 DOE1 및 Feed6 vs. 분말로 공급되어 사용처에서 제조된 DOE1 및 Feed6 성능에 차이가 없는지 비교한 결과, 바이러스 증식능에서 유의적인 차이를 보이지 않았음



2. 기존 시판배지 및 신규 개발 배지를 활용한 파일럿규모 구제역 백신항원 제조

1) 기존 시판배지 활용

가) CD-BPM/ProBHK-1(1:1 mix)+ProBHK-1 media 조합

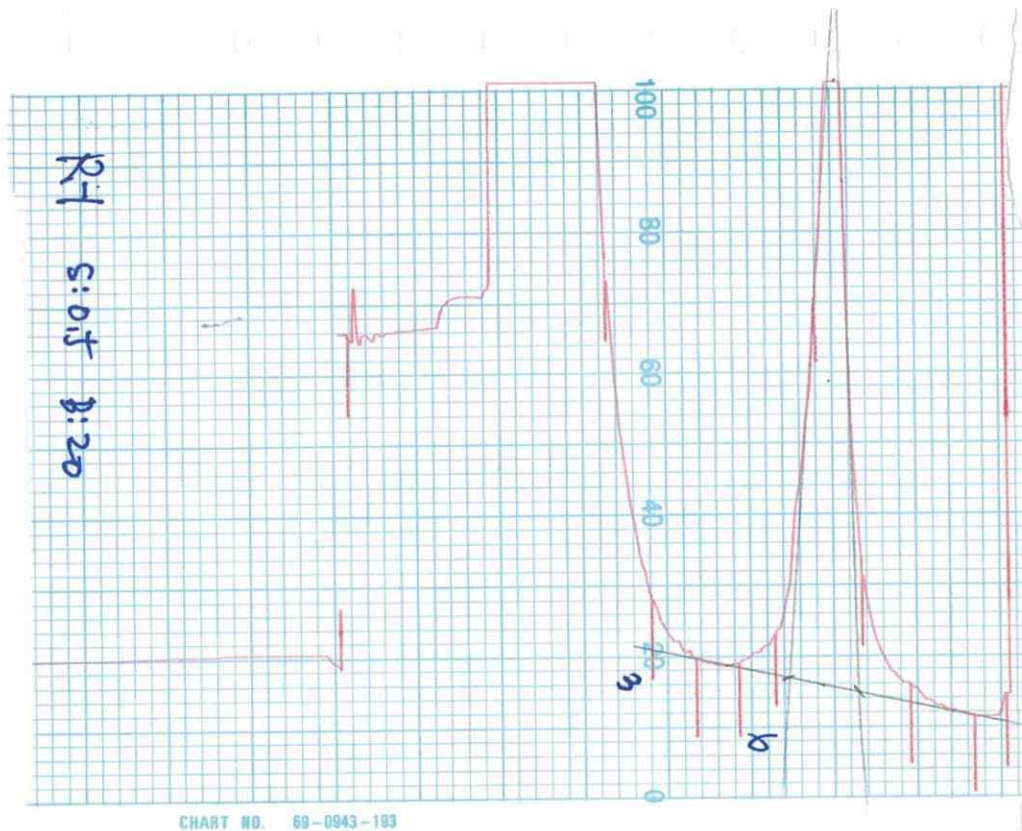
□ 주관연구기관(생명공학연구원)에서 CD-BPM/ProBHK-1(1:1 mix) 배지로 4일간 배양한 50리터의 부유세포를 제1협동기관(검역본부)로 이송하여 일회용 백을 활용한 RM 장비에서 배지교체후 바이러스 접종하여 증식시킴

- 바이러스 역가: $9.7 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ TCID₅₀/ml (2회 반복실험 결과)
- 최종 농축·정제후 백신항원량(146S 함량): 2.56ug/ml

나) CD-BPM+ProBHK-1 media 조합

□ 주관연구기관(생명공학연구원)에서 CD-BPM 배지로 4일간 배양한 200리터의 부유세포를 제1협동기관(검역본부)로 이송하여 그 중 20리터는 일회용 백을 활용한 RM 장비에서, 나머지 180리터는 200리터 바이옱액터에서 ProBHK-1으로 배지교체 후 바이러스 접종하여 증식시킴

- RM배양(20리터)



- 이송투입 직후 cell density는 6.16×10^6 cells/ml (viability 96.2%)
- 90% 배지교체후 O형 진천주 0.002MOI 접종 16시간째 채득
- 바이러스 역가: 1.1×10^7 TCID₅₀/ml
- 최종 농축·정제후 146S 항원량: 2.1ug/ml

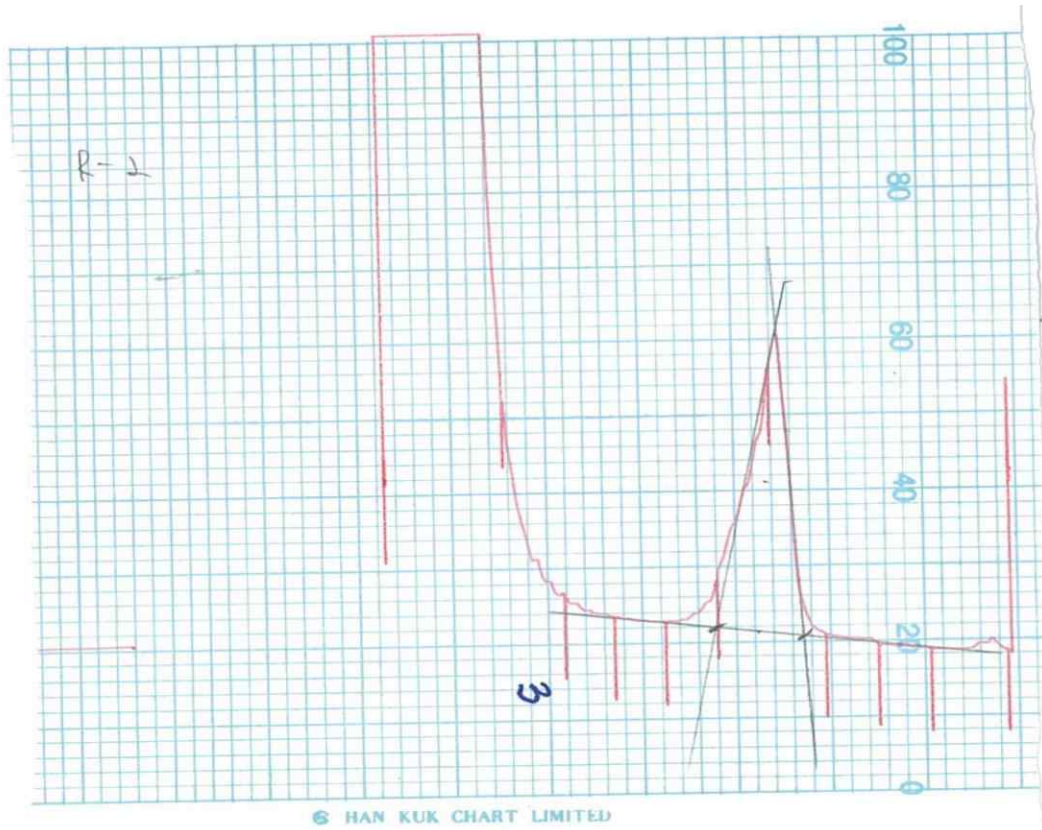
○ 바이옱어액터 배양(180리터)

- 이송투입 직후 cell density는 $3.06 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ (viability 73.6%)
- 70% 배지교체후 O형 진천주 0.002MOI 접종 16시간째 채득
- 바이러스 역가: $2 \times 10^6 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$

2) 신규 개발 배지 활용: DOE1(+Feed 6 media)

□ 주관연구기관(생명공학연구원)에서 DOE1+Feed6 배지로 4일간 배양한 200리터의 부유세포를 제1협동기관(검역본부)로 이송하여 그 중 20리터는 일회용 백을 활용한 RM 장비에서, 나머지 180리터는 200리터 바이옱어액터에서 DOE1으로 배지교체 후 바이러스 접종하여 증식시킴

○ RM배양(20리터)



- 이송투입 직후 cell density는 $6.45 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ (viability 89%)
- 80% 배지교체후 O형 진천주 0.002MOI 접종 16시간째 채득
- 바이러스 역가: $4.1 \times 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$
- 최종 농축 · 정제후 146S 항원량: $1.96 \mu\text{g}/\text{ml}$

○ 바이옱어액터 배양(180리터)

- 이송투입 직후 cell density는 $2.81 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ (viability 55.8%)
- 70% 배지교체후 O형 진천주 0.002MOI 접종 16시간째 채득

- 바이러스 역가: 2×10^5 TCID₅₀/ml

○ 구제역 바이러스 백신 대량 생산 결론

- 해외(대부분 사기업) 실적은 주로 기업이익과 직접적 연관이 되므로 비공개 자료임
- 해외제조사에서 입수한 정보, 리뷰논문, OIE manual에 따르면 세포수 3×10^6 /ml, 바이러스역가 10^7 /ml, 바이러스입자량 1 μ g/ml가 기준량으로서 본 연구과제의 결과물이 이러한 통상적인 국제기준을 모두 충족하였음
- Foot and mouth disease (Infection with foot and mouth disease virus), OIE Terrestrial Manual 2017

<제2협동연구기관 : 중앙백신연구소>

1. 무혈청 배지 배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립

1) 각 무혈청배지에 증식된 부착세포에서의 바이러스 감염 감수성 확인

무혈청배지 조건에서 기존 부착세포와 부유세포의 세포 증식성을 확인하였다. 세포 배양조건의 특성상 부착세포의 경우 6-well plate에서 배양하였고, 부유세포의 경우에는 shaking flask에서 배양하였다. 세포는 3×10^5 cell/ml로 동일하게 seeding하여 5일 동안의 세포 증식성을 확인하였다.

시험결과 부착세포는 10×10^5 cell/ml 이상 증식되지 않았으나, 부유세포의 경우 최대 33×10^5 cell/ml 수준까지 배양되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 부착세포 대비 3배 이상의 세포증식성을 보이는 것으로 바이러스 백신 생산성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

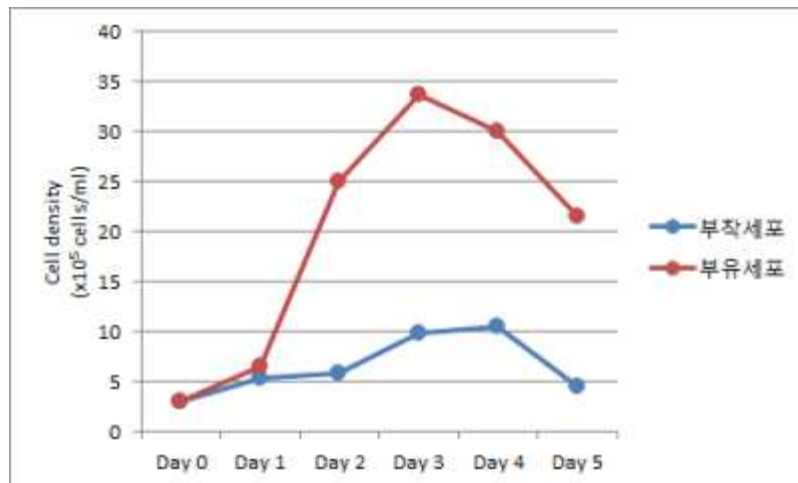


그림 1. 부유세포 및 부착세포의 증식성 비교

2) 무혈청배지에 증식된 부유세포에서의 바이러스 감염 감수성 확인

무혈청배지를 이용하여 부착세포 대비 증식성이 높은 부유배양 세포의 증식을 확인한 후 바이러스 증식을 위한 무혈청배지 선정을 위한 실험을 다음과 같이 실시하였다. 백신 생산을 위해서는 부유세포의 증식뿐만 아니라 바이러스의 증식이 필요하므로 두 가지 요소를 만족시킬 수 있는 배지를 선정하는 것이 중요하다. 세포배양배지와 세포수를 동일하게 하여 부유시킨 BHK-21 세포를 3일간 배양한 다음 바이러스 접종 배지를 Gibco-A, Gibco-B, CSTL-B(Cell Science & Technology Inst., Inc) 3가지로 다르게 하여 부유접종 시켜 바이러스 접종 후 시간 단위로 바이러스 함량을 측정하였다.

Cell	MOI	접종방법	세포수	세포배양배지	바이러스 접종배지
BHK-21 P31	0.05 MOI	Suspension	6x10 ⁵ cells/ml	Gibco-A	Gibco-A
				Gibco-A	Gibco-B
				Gibco-A	CSTL-B

시험결과 모든 시험그룹에서 접종 2일째 바이러스 함량이 10^{3.5}TCID₅₀/ml로 측정되었고, 이후 Gibco-B와 CSTL-B는 바이러스 증식이 더 이상 이루어지지 않았으나 Gibco-A는 접종 4일째 가장 높은 titer를 보여 세포배양배지와 바이러스 접종배지는 동일한 Gibco-A로 선정하였다.

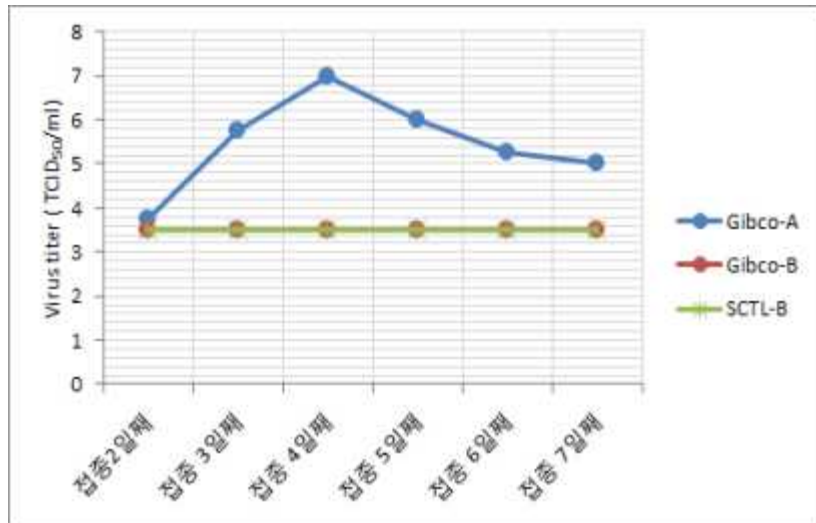


그림 2. 바이러스 접종 배지에 따른 바이러스 함량 측정

3) 무혈청 배지와 혈청첨가배지의 바이러스 증식성 비교 확인

기존 상업용 백신 생산 세포 배양에는 alpha-MEM + 5% FBS를 많이 사용하는데 세포성장성에는 영향이 크지 않으나 부유배양 적응성에서 한계를 보인다. 선행 시험을 통해 결정된 무혈청배지를 이용하여 바이러스 증식성 비교를 확인하고자 시험을 실시하였다. BHK-21 세포에 감수성이 있는 유행열 바이러스를 사용하여 접종하였으며, 대조군으로 사용한 혈청 첨가 배지는 Gibco-A에 혈청(FBS)이 3% 포함된 조성이다.

시험결과 바이러스 접종 2일차까지는 비슷한 titer를 보였으나 접종 3일차에 무혈청 배지 조성에서 10^{7.0} TCID₅₀/ml의 높은 titer를 보였다. 그림 3과 같이 혈청배지와 무혈청 배지 사이에 최고 수준의 바이러스 titer를 보이는 시간이 상이함을 알 수 있었으며, 이를 기반으로 바이러스의 harvest time을 결정할 수 있게 된다.



그림 3.혈청 유무에 따른 바이러스 함량 측정

4) 세포 접종 수에 따른 바이러스 증식성 확인

구제역 바이러스 백신 생산 BHK-21 부유세포에 감수성이 있는 동물용 바이러스 (BEFV; Bovine Ephemere Fever Virus) 감염 조건 확립을 위하여 세포 접종 수를 6×10^5 , 10×10^5 , 20×10^5 cell/ml로 하여 각각 MOI 0.15, 0.31, 0.5가 되도록 접종하였다.

시험결과 바이러스를 감염시킨 후 2일차에 가장 높은 바이러스 titer를 보였으며, MOI가 가장 낮고 cell density가 가장 높은 조건(20×10^5 cell/ml)에서 높은 바이러스 titer로 측정되었다.

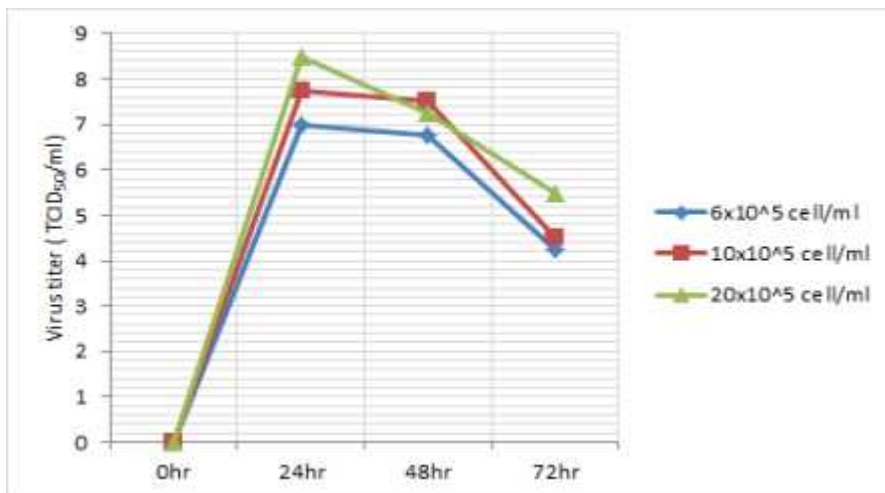


그림 4. MOI에 따른 바이러스 함량 측정

2. 개발된 동물용 부유세포의 백신 생산의 적용(Lab scale)

1) Bioreactor(Lab scale)를 이용한 증식성 확인

대량 생산을 위해 spinner flask에서 실시한 데이터를 10 L Lab scale의 Wavebioreactor에 적용하여 무혈청 부유배양 BHK-21 세포주의 회분식 배양 결과는 다음과 같다. 10 L Wavebioreactor를 이용한 회분식 배양결과 배양 3일차 세포활성도율이 90% 이상 유지되었고, cell density는 2일차에 가장 높게 측정되었다.

조 건	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
생존세포수 (x10 ⁵ cell/ml)	2.5	16.2	36.5	35.1	21	10.9
세포활성도(%)	97%	96%	98%	99%	61%	31%

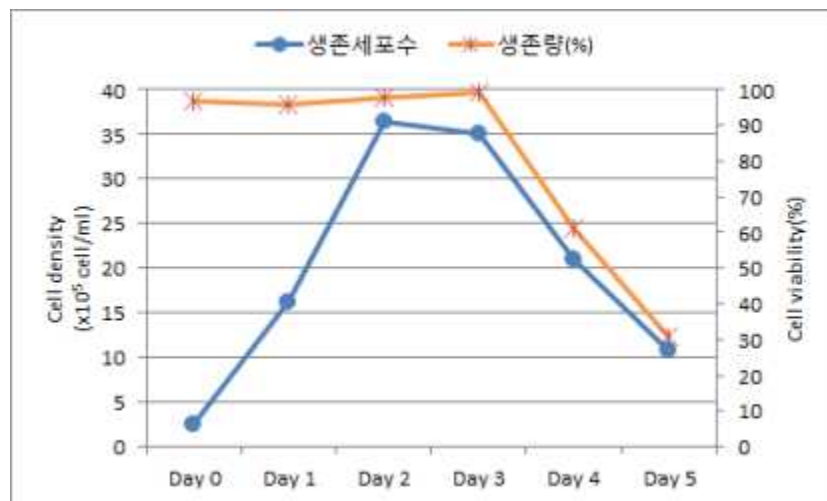


그림 5. Wavebioreactor에서 배양한 무혈청 부유배양 BHK-21 세포 성장 곡선

3. 개발된 동물용 부유세포의 회분식 배양공정 최적화(Lab scale)

1) Cas system의 배양 환경조건 변화를 통한 공정 최적화

선택된 무혈청기반 Gibco-A 배지에 부유배양조건으로 배양한 BHK-21 세포의 세포 증식성 및 Glucose, Lactate, Glutamine, Ammonia와 같은 대사산물을 측정하여 최적의 공정조건을 확립하고자 하였다. 이러한 대사 산물의 분석을 통해 배지에 첨가해야 될 첨가물의 시점과 농도를 결정할 수 있다.

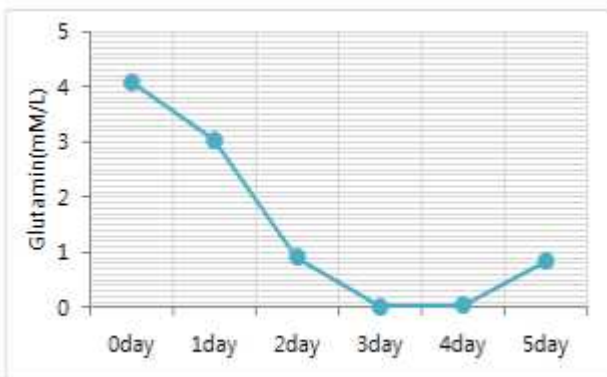


그림 6. 세포 성장 곡선 및 대사산물 측정

2) 바이러스 감염 조건 확인 및 대사산물 측정

위의 무혈청기반 부유배양 세포에 유행열 바이러스를 감염시킨 다음에 일어나는 세포증식성 및 Glucose, Lactate, Glutamine, Ammonia와 같은 대사산물을 측정하였다. 바이러스 접종시에는 바이러스에 의한 세포활성도, 세포수의 변화와 세포 대사산물의 수치가 변화됨을 확인할 수 있게 되었고, 이를 기반으로 바이러스의 증식성을 높이기 위한 additive의 선정에 반영할 수 있게 되었다.

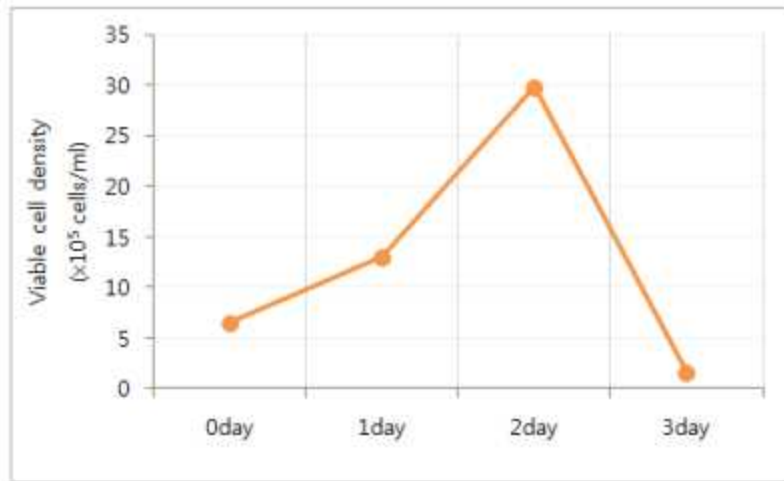


그림 7. 시간에 따른 바이러스 함량 및 대사산물 측정

본 과제 내용 중 구제역 바이러스 감염과 관련된 내용은 BL3 (생물안전 3등급) 시설이 마련되어 있는 농림축산검역본부의 구제역백신연구센터 내의 중앙백신연구소 연구원이 7개월간 (2016.09~ 2017.04) 파견 근무하여 직접 수행하였음

4. 개발된 동물용 부유세포의 배양공정 최적화

- BHK-21 부유세포의 배양 공정 확립을 위하여 2L bioreactor에 서로 다른 additive를 첨가하여 부유세포(57.0×10^5 cells/ml)를 배양한 다음, 서로 다른 배지 및 additive를 첨

가하여 Foot and mouth Disease virus (strain; 포천) 감염 조건을 달리하여 접종한 결과, group 2의 무혈청 배지-A 및 group3의 무혈청배지-A+additive CB feed1를 넣은 조건에서 바이러스 역가가 높은 것을 확인함. 반면 DMEM으로 접종한 group 1에서는 항체가 전혀 형성되지 않음. 무혈청배지-B에서도 $10^{5.82}$ TCID₅₀/ml로 낮은 항체를 형성하였음.

- 구제역 바이러스 감염시 additive인 CB feed1를 추가로 첨가하기로 함.

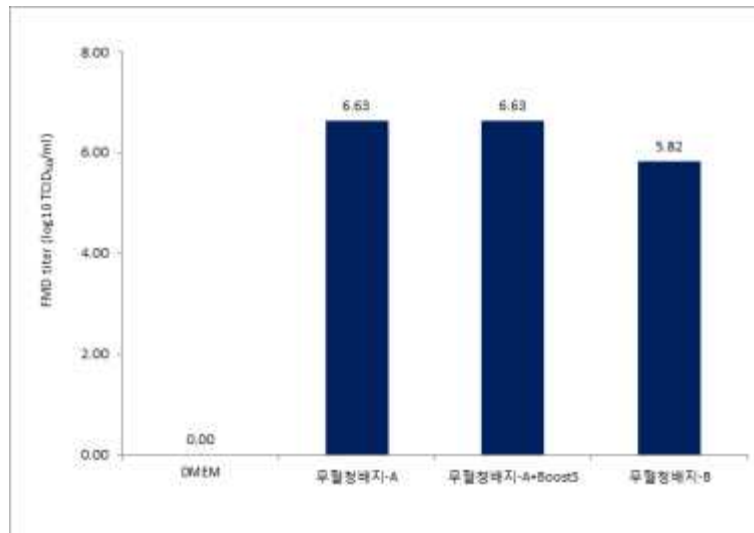


그림 8. 구제역 바이러스 감염배지 선정

5. 부유세포에 적합한 바이러스의 선정

1). Canine virus의 바이러스 감수성 조사

- 각 바이러스 감수성 확인을 위하여 BHK-21 세포를 부유 배양하여 Canine virus 중 하나인 Rabies Virus(광견병 바이러스)를 접종하고 증식성 확인하고자 함.
- BHK-21(7.37×10^5 cells/ml) 세포를 10 L Wavebioreactor에 부유시켜 4일간 배양한 결과, 43.7×10^5 cells/ml의 density와 96% cell viability를 보임.
- BHK-21 세포의 바이러스 감수성을 확인을 위하여 Rabies virus (Seed titer $10^{7.5}$ FAID₅₀/ml)를 0.1 MOI로 접종하고 24시간마다 바이러스 titer를 측정된 결과, 4일째 가장 높은 $10^{8.0}$ FAID₅₀/ml로 확인됨
- 결과적으로 BHK-21 부유 세포는 canine virus에서도 감수성을 확인.

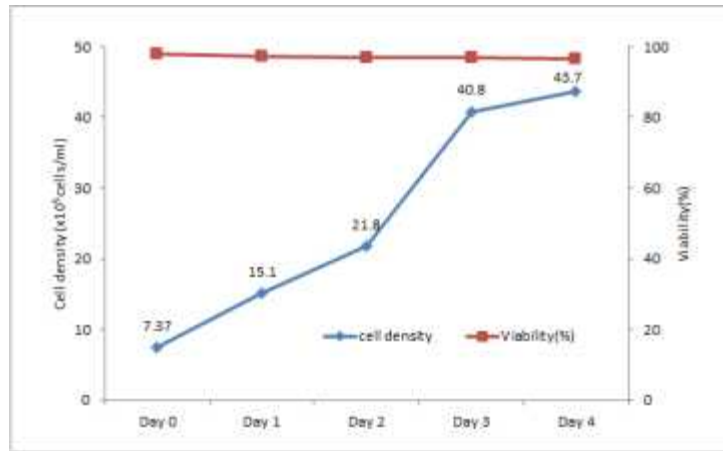


그림 9. BHK-21 세포의 성장곡선

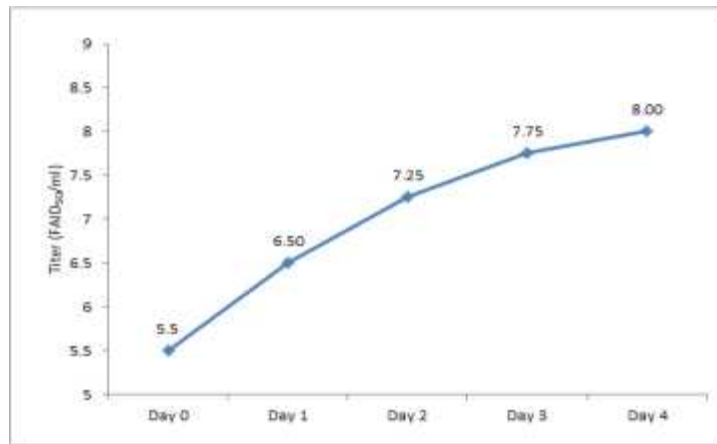


그림 10. 광견병 바이러스 증식곡선

2) Porcine virus의 바이러스 감수성 확인

- 본 과제 의 최종 목표인 구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포배양기술 확립을 위하여 BHK-21 세포를 부유 배양하여 FMDV(포천)를 접종하고 증식성을 확인함.
- BHK-21 (3.2×10^5 cells/ml) 세포를 2L bioreactor에 부유시켜 3일간 배양 (66.4×10^5 cells/ml)하여 0.01 MOI로 FMDV를 접종함. 접종 후 시간대별 바이러스 함량을 측정 한 결과, 17~19시간 사이에 바이러스 함량이 가장 높은 것을 확인함.

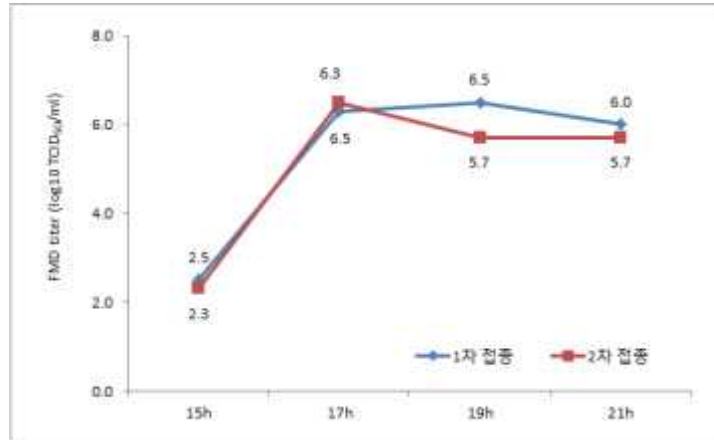


그림 11. 구제역 바이러스의 접종 후 시간대별 바이러스 함량

6. 부유 세포기반 동물 세포주의 회분식 감염공정 최적화

1). Bioreactor 배양조건

- 회분식 배양은 2L bioreactor의 pH, DO probe를 연결하여 준비한 다음 PBS 및 bioreactor에 연결된 tubing을 포함하여 멸균을 실시함. PBS를 제거하고 무혈청 배지 800ml를 saturation 시킨 다음 probe의 calibration을 실시함.
- BHK-21 부유세포의 배양은 Erlenmeyer flask에서 배양한 200ml의 세포를 bioreactor에 주입한 다음 아래 표와 같은 조건에서 배양함.

표 1. Bioreactor 배양조건

구분	Agitation	Temperature	pH	DO
세포배양	150 rpm	37°C	7.0	45%
바이러스배양	150 rpm	37°C	7.0	45%

2) 구제역 바이러스 감염조건 확립

- 62.0×10^5 cells/ml로 준비된 부유 세포에 FMDV(포천)를 0.01 MOI로 접종한 다음, 접종 후 시간별로 sampling 하여 바이러스 함량을 측정하여 harvest time을 확인하고자 함.
- 시험결과 부유 세포(Suspension cell) 조건에서는 바이러스 접종 23시간째에 가장 높은 $10^{6.23}$ TCID₅₀/ml의 항체를 보임. 부착 세포(Attachment cell) 조건에서는 19시간

째에 가장 높은 항체가를 보여, 세포 조건별 바이러스 함량 값이 다른 것을 확인할 수 있음.

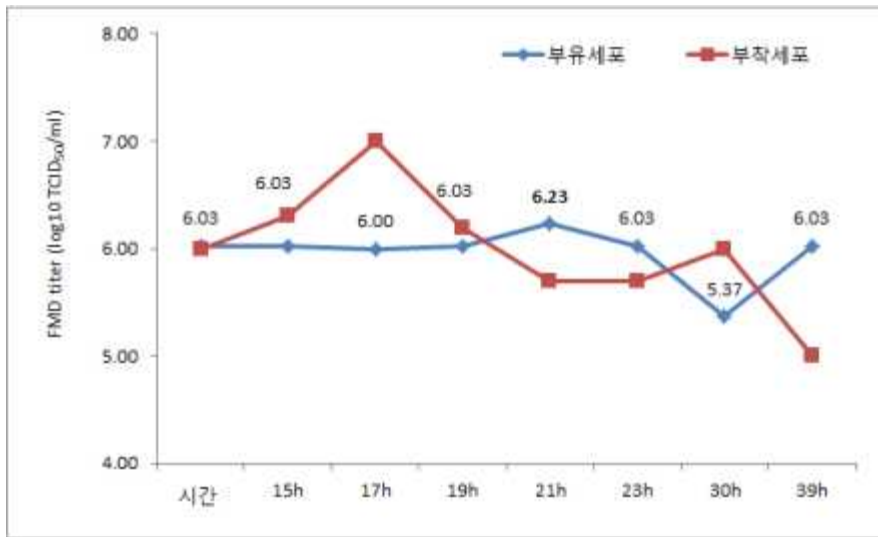


그림 12. 부유 및 부착 세포에서의 FMDV 항체가 비교

3) MOI (Multiplicity of infections)에 따른 FMD(포천)바이러스 증식성 확인

- 1L bioreactor에 세포 및 배양조건을 동일하게 한 다음, $10^{7.2}$ TCID₅₀/ml 의 seed를 사용하여 MOI를 각각 0.1, 0.01, 0.001로 달리하여 바이러스 접종 조건을 확인함.
- 시험결과 0.01 MOI 조건에서 평균 약 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 의 항체가를 형성하는 것으로 확인되어, 이후 시험에서는 바이러스 접종 조건은 0.01 MOI로 하여 진행함.

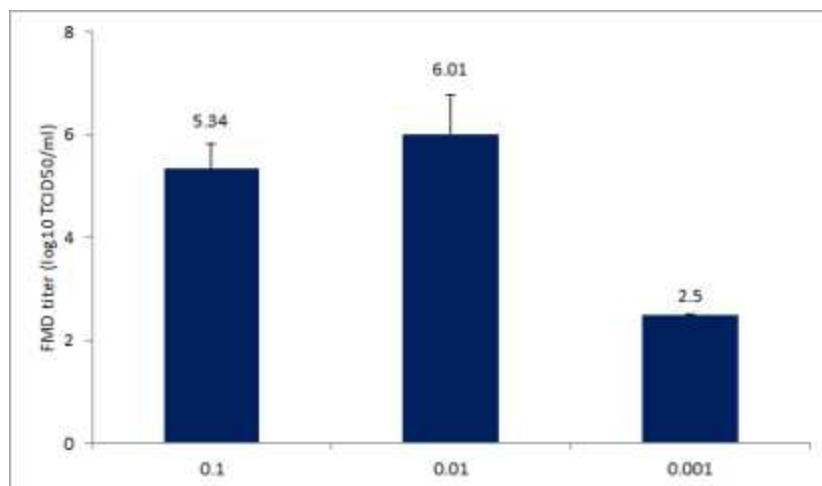


그림 13. MOI에 따른 바이러스 항체가 비교

7. 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 회분식 감염 공정 확립

- Media change에 따른 바이러스 감작율을 비교하기 위해 바이러스 접종시 1번 bioreactor는 배지 교체를 실시하였고, 2번 bioreactor는 배지를 교체하지 않고 배양함. 배지교체에 따른 비교를 위해 glutamine, glucose 조건은 동일하게 표 2와 같이 첨가함.

표 2. Media change 유무에 따른 바이러스 역가 비교 조건 표

조건	Cell density at harvest time (x10 ⁶ cells/ml)	Viability	FMDV titer (TCID ₅₀ /ml)	비고
Media change O	33.0	53%	10 ^{5.5}	4mM Gln 4mM Glu
Media change X	36.0	56%	10 ^{5.63}	4mM Gln 8mM Glu

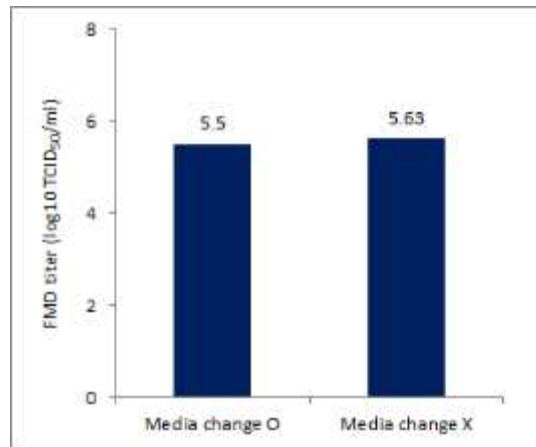


그림 14. Media change 유무에 따른 바이러스 역가 비교

- 위의 시험결과들을 토대로 회분식 배양은 BHK-21 세포는 3~5x10⁵ cells/ml를 배양하여 50x10⁵ cells/ml 이상의 density를 보일 때 배지교체를 하지 않고 FMD 바이러스를 접종하여 17h~20h 사이에 채득하는 조건을 확립함.

8. 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 유가식 감염 공정 확립

- Bioreactor를 이용하여 배양액 1L에 4.17x10⁵ cells/ml로 seeding하고 7일간 배양함. 5일째에 무혈청 배지 0.5L, 4mM Glutamine과 4mM Glucose를 feeding하여 7일째 최대 62.0x10⁵ cells/ml의 세포를 수득함.

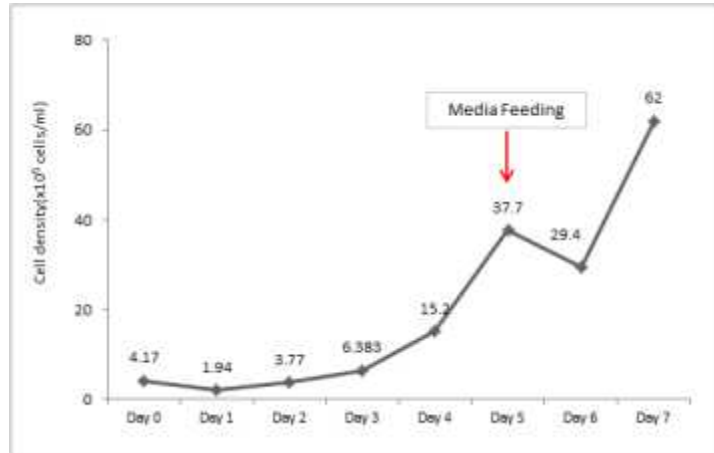


그림 15. 유가식 배양 세포 증식 곡선

9. 바이오리액터를 이용한 구제역 바이러스의 배양 및 불활화, 정량 시험

- 선행 시험에서 확립된 시험조건에 따라 2 L bioreactor에 세포를 부유시켜 구제역 바이러스(포천주) 0.02 MOI로 접종하고 16~18시간 배양하였음.

- BEI로 불활화공정을 거친 후 농축 및 정제를 통해 146S를 정량하였음

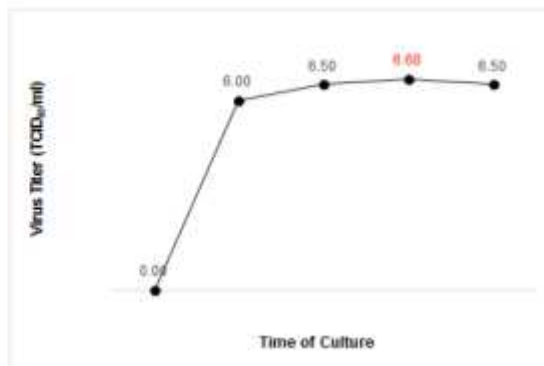
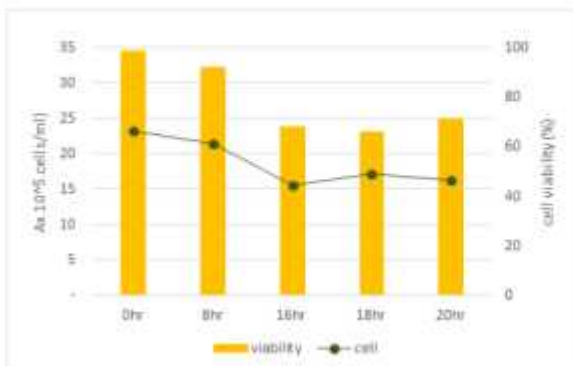
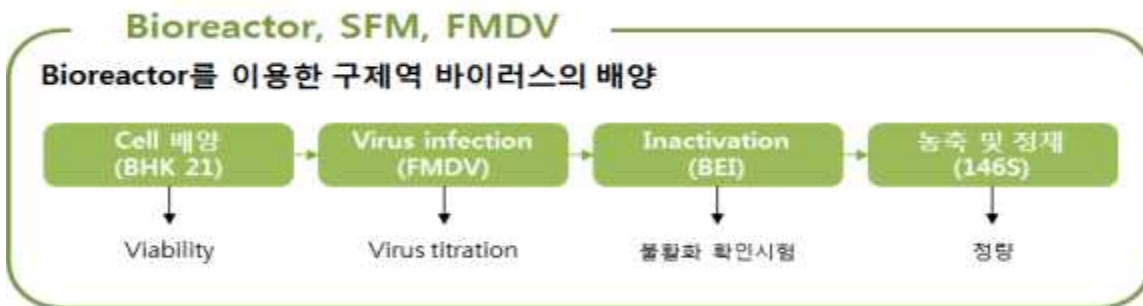


그림 16. 바이오리액터 (2L)를 이용한 구제역 바이러스 배양

10. 돼지에서 구제역 백신 보조제 선정 및 효능 평가

1) 구제역 포천 A형 항원의 adjuvant 결정시험(돼지)

- 시험백신 조성 : 항원함량 결정시험에 의해 결정된 항원 함량 1 dose(10 μ g/dose)를 가지고 여러 Adjuvant 조성으로 각각의 시험백신을 제조한다.

그룹	항원	두수	항원 / 접종량	Adjuvant	
Group 1	10 μ g/dose	5	one dose /2ml	ISA 201	50%
Group 2	10 μ g/dose	5	one dose /2ml	Combination	40%
Group 3	10 μ g/dose	5	one dose /2ml	OW	65%
Group 4	10 μ g/dose	5	one dose /2ml	WO	80%
Control		5			

- 동물시험 : 10~11주령의 구제역 항체 음성인 건강한 돼지 22두를 이용하여 위의 그룹과 같이 각각 백신을 1두분 근육접종한 뒤 4주 후에 채혈하여 Priocheck FMDV Type A을 이용하여 항체가를 측정한다.

- 결과 : 백신 접종 전에는 모든 개체에서 항체가 음성이 관찰되었으며 백신 접종 4주 후 Vaccine 1 그룹(ISA 201 그룹)에서 1개체 양성전환, Vaccine 4 그룹(WO 그룹)에서 모든 개체가(G4-1 개체는 폐사) 양성전환이 관찰되었다. 다른 그룹 및 음성 대조군에서는 접종 4주 후에 항체가 양성전환이 관찰되지 않았다.

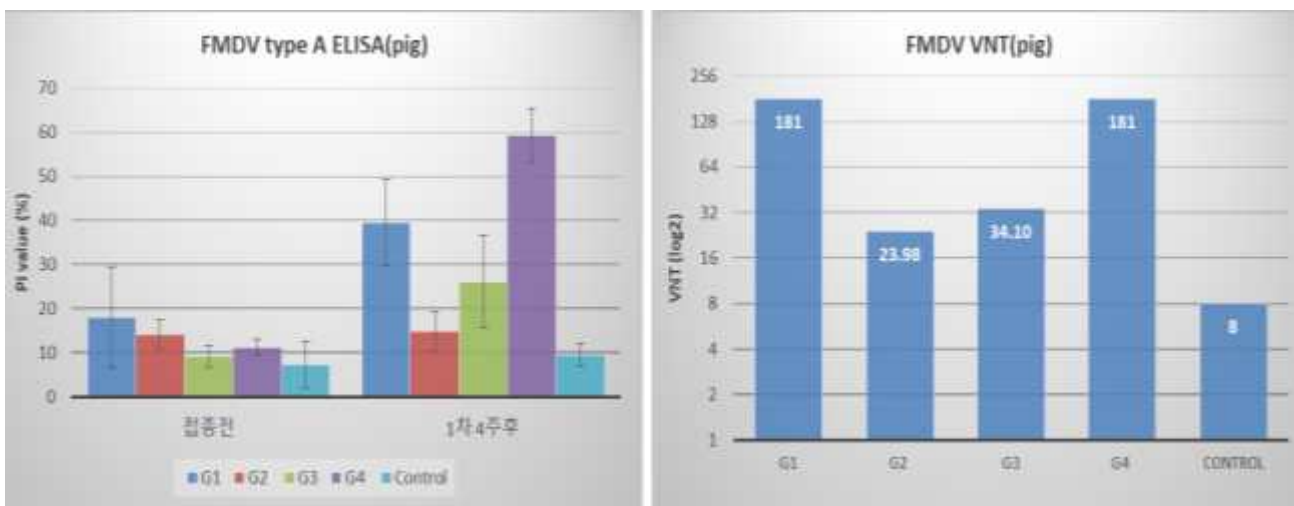


그림17. 돼지(목적동물)에서의 FMDV type A ELISA 및 VNT 결과

그룹	개체번호	백신 접종 전	백신접종 4주 후	Average		SD	
				백신 접종 전	백신 접종 4주 후	백신 접종 전	백신 접종 4주 후
Group 1	G1-1	33.1	42.0	18.0	39.5	11.5	9.8
	G1-2	27.2	53.5				
	G1-3	8.7	37.4				
	G1-4	7.6	38.5				
	G1-5	13.2	26.3				
Group 2	G2-1	18.7	9.5	14.1	14.9	3.3	4.4
	G2-2	14.7	18.9				
	G2-3	12.9	18.5				
	G2-4	9.5	16.7				
	G2-5	14.7	10.9				
Group 3	G3-1	11.4	29.7	9.2	26.0	2.4	10.5
	G3-2	6.9	24.8				
	G3-3	9.4	11.5				
	G3-4	6.6	40.4				
	G3-5	11.8	23.5				
Group 4	G4-1	12.8	폐사	11.2	59.3	1.8	6.1
	G4-2	9.4	66.7				
	G4-3	9.8	61.4				
	G4-4	10.5	52.5				
	G4-5	13.4	56.7				
Control	G5-1	1.9	8.5	7.3	9.5	5.4	2.6
	G5-2	3.2	9.5				
	G5-3	13.4	6.2				
	G5-4	12.6	13.4				
	G5-5	5.1	9.9				

2) 구제역 진천 O형 항원의 adjuvant 결정시험(돼지)

- 시험백신 조성 : 항원함량 결정시험에 의해 결정된 항원 함량 1 dose(10 μ g/dose)를 가지고 여러 Adjuvant 조성으로 각각의 시험백신을 제조한다.

그룹	항원	두수	항원 / 접종량	Adjuvant	
Group 1	10 μ g/dose	4	one dose / 2ml	ISA 201	50%
Group 2	10 μ g/dose	4	one dose / 2ml	WO	80%
Control		4			

- 동물시험 : 10~11주령의 구제역 항체 음성인 돼지를 이용하여 위의 그룹과 같이 각각 백신을 1두분 근육접종한 뒤 4주 후에 채혈하여 항체가를 측정한다.

- 중화항체가 결과

개체번호	시험내역	중화항체가	
		접종 전	접종 후
89	ISA201	<8	<8
90		<8	<8
92		<8	<8
94		<8	<8
98	WO	<8	181
99		<8	90
101		<8	128
103		<8	90
88	Control	<8	<8
91		<8	<8
95		<8	<8
97		<8	<8

*32배 이상을 양성으로 판단함

- ELISA 결과

시험군	개체번호	OD	Sam.OD-OD450 blank	PI	양, 음성 판정 (>=50)
ISA201	89	0.9592	0.85925	59.70125	+
	90	0.9118	0.81185	61.9243	+
	92	0.8908	0.79085	62.9092	+
	94	1.2827	1.18275	44.52912	-
Mean PI				57.26597	
SD				8.596587	
WO	98	0.6363	0.53635	74.84523	+
	99	0.4636	0.36365	82.94485	+
	101	0.9773	0.87735	58.85236	+
	103	0.6808	0.58085	72.75818	+
Mean				72.35015	
SD				10.01382	
Control	88	1.5402	1.44025	32.4524	-
	91	1.5327	1.43275	32.80415	-
	95	1.757	1.65705	22.28449	-
	97	1.6089	1.50895	29.23037	-
Mean PI				29.19285	
SD				4.878281	

그림18. 돼지(목적동물)에서의 FMDV type O ELISA 결과

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

3-1-1. 연차별 연구개발 목표

구분	연도	연구개발의 목표
1차년도	2015	BHK-21 세포주 확립
		배지평가를 위한 표준배지선정 및 평가기준확립
		세포배지 라이브러리에서 현탁배양적응 테스트 및 세포성장성 평가
		배지라이브러리평가를 통한 기본배지선별
		구제역 바이러스 생산성 평가기술 확립
		무혈청 배지 배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립
		개발된 동물용 부유세포의 백신 생산의 적용(Lab scale)
		개발된 동물용 부유세포의 회분식 배양공정 최적화
2차년도	2016	기본배지선정
		혼합배지평가
		유가식배양첨가물선정
		선정배지에 대한 바이오리액터평가
		세포배지조건에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가
		개발된 동물용 부유세포의 유가식 배양공정 최적화
		개발된 부유세포에 적합한 바이러스의 선정
		부유 세포기반 동물 세포주의 회분식 감염공정 최적화(Lab scale)
		무혈청 배지를 이용한 부유세포의 회분식 감염 공정 확립
		무혈청 배지를 이용한 부유세포의 유가식 감염 공정 확립
3차년도	2017	최적 제품화 배지선정
		배지영양요구성분분석
		바이오리액터 스케일업
		구제역 백신 생산을 위한 동물세포배양기술 확립
		부유세포주의 대량동물세포배양기술 확보
		개발된 동물용 부유세포의 생산 공정 Scale-up
		부유 세포기반의 동물 세포주를 이용한 바이러스 대량 감염공정 개발
		무혈청 배지를 이용한 대량 감염공정 개발

3-1-2. 연차별 연구 성과 목표

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표									연구기반지표								
	지식 재산권		기술 이전		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
										SCI	비SCI							
최종목표	3	1	1				3			2	1	2			1			
1차년도	목표	1	0	0				0		0	0	0			0			
	실적	0	0	0				0		0	0	0			0			
2차년도	목표	1	0	0				1		1	0	1			0			
	실적	2	0	0				1		1	0	5			0			
3차년도	목표	1	0	0				1		1	1	1			1			
	실적	0	1					1		1	0	1			1			
소계	목표	3	0	0				2		2	1	2			1			
	실적	2	1	0				2		2	0	6			1			
종료 1차년도		0	1	1				0										
종료 2차년도		0	1	0				1										
종료 3차년도		0	1	0				0										
소계		0	3	1				1		0	0	0			0			
합계		3	3	1				3		2	1	2			1			

3-2. 목표 달성여부

3-2-1. 연차별 연구개발 달성여부

구분	연도	연구개발의 목표	달성여부
1차년도	2015	BHK-21 세포주 확립(생명연)	- 구제역 바이러스 백신 생산용 단일 클론의 부유 배양 적용 BHK-21 세포주 확보 - 한국생명공학연구원 생물자원센터 특허세포주 기탁(KCTC12945BP)
		배지평가를 위한 표준배지선정 및 평가기준확립(생명연)	- 20 종의 상업용 배지 선별 - MVCC기준 상위 5종 배지 선별 및 특성 규명 - 바이러스 역가 평가 완료
		세포배지 라이브러리에서 현탁배양적용 테스트 및 세포성장성 평가(생명연)	- 배지개발서비스 회사인 BD와 실험 계획 회의 추진 - 향후 개발목표 및 방향 설정 - 배지개발을 위한 BHK-21 세포주의 미생물 오염 부정시험 및 마이코플라즈마 오염여부 검증 완료
		배지라이브러리 평가를 통한 기본배지선별(생명연)	○ 배지평가를 위한 최적의 세포주 공급 ○ 구제역 바이러스 생산성 평가를 통한 기본배지 선별
		구제역 바이러스 생산성 평가기술 확립(농림축산검역본 부)	- 접종 바이러스 농도 및 세포수 변화에 따른 신생 바이러스의 역가 차이 분석 - 바이러스입자 검출기법 확립 - 바이러스 접종시, 일반 배지가 필수적이며 배지종류에 따라 바이러스 생산성 차이 확인
		무혈청 배지 배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립(중앙백신연구소)	- 각 무혈청배지에 증식된 부착세포에서의 바이러스 감염 감수성 시험 완료 - 각 무혈청배지에 증식된 부유세포에서의 바이러스 감염 감수성 확인 완료 - 무혈청 배지와 혈청첨가배지의 바이러스 증식성 비교 완료
		개발된 동물용 부유세포의 백신 생산의 적용(Lab scale)(중앙백신연구소)	- Shaking flask(Lab scale)에서의 증식 배양조건 확립함 - 10L Wavebioreactor에서 부유세포의 증식 배양 조건 확립
		개발된 동물용 부유세포의 회분식 배양공정 최적화(Lab scale)(중앙백신연구소)	- Glucose, Lactate, Glutamine, Ammonia와 같은 대사산물을 측정하여 바이러스 증식을 확인

2차년도	2016	<p>기본배지선정(생명연)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CD 배지 13종, AF 배지 14종의 세포 성장 및 세포활성도를 실험하여 바이러스 생산성 평가를 위한 배지 선정 - 3종의 AF 배지와 7종의 CD 배지를 구제역 역가 실험에 사용하여 최종 CD35배지와 AF20배지를 선정 - 선정된 배지의 배지성분 강화를 통한 평가 수행
		<p>혼합배지평가(생명연)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CD35와 AF20 배지의 첨가물 및 합성배지혼합을 통한 성분 강화를 통하여 8종의 CD와 8종의 AF 배지를 바이러스 생산성 평가를 위해 선정 - 선정된 배지의 구제역 바이러스 역가 측정 완료
		<p>유가식배양첨가물선정 (생명연)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 생산성 평가에서 최종 선정된 1종의 CD와 1종의 AF배지에 대한 유가식 배양 첨가물 선정 완료 - 기본 배지에 대한 유가식 첨가물의 첨가 공정 확립
		<p>선정배지에 대한 바이오리액터평가 (생명연)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 표준작업지시서 작성 후, shake flask 단계에서 재현성을 확인 하였고, 메타블라이트 분석을 통한 표준작업지시서 수정 및 완료 - 2 L 바이오리액터에서 pH 조절 공정을 확립 - 최종 개발된 배지로 5 L 바이오리액터 공정개발 완료
		<p>세포배지조건에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가 (농림축산검역본부)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 구제역 바이러스 생산을 위한 세포주의 배지개발 단계별 바이러스 생산성 평가 완료 - 최종 CD 및 AF 배지 개발을 위한 바이러스 역가 측정을 실험 중에 있음 - 5 L 바이오리액터에서 개발된 배지에서 키운 세포로 바이러스 역가 측정 - 세포배양 공정 중 및 바이러스 접종 전 사용 배지 조합에 따른 구제역 바이러스 생산 배지 평가 - 부유세포주별 구제역 바이러스 생산 효율 비교 평가 - 구제역 바이러스 입자(146S)의 정량 분석법 정립

<p>개발된 동물용 부유세포의 유가식 배양공정 최적화 (중앙백신연구소)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 무혈청 배지 및 additive 첨가에 따른 부유세포 배양성 비교평가 - Additive feeding 조건 확립완료
<p>개발된 부유 세포에 적합한 바이러스의 선정(중앙백신연구소)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - BHK-21 부유 세포를 이용한 Canine virus 광견병 바이러스 감수성 확인완료 - BHK-21 부유 세포를 이용한 구제역 바이러스 감수성 확인완료
<p>부유 세포기반 동물 세포주의 회분식 감염공정최적화(Lab scale)(중앙백신연구소)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오리액터를 이용한 회분식 세포배양 공정 및 바이러스 감염조건 확립 - MOI별 구제역 바이러스 증식성 비교 평가 후, MOI 결정
<p>무혈청 배지를 이용한 부유세포의 회분식 감염 공정 확립 (중앙백신연구소)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선별된 무혈청 배지를 이용한 배지교환 유무에 따른 바이러스 감염 증식성 확인
<p>무혈청 배지를 이용한 부유세포의 유가식 감염 공정 확립 (중앙백신연구소)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선별된 감염배지에서 세포주의 유가식 배양 확인 - 유가식 배양 대사산물 확인 및 바이러스 증식성 확인

3차년도	2017	최적 제품화 배지선정 (생명연)	- 세포 성장 및 구제역 바이러스 역가 평가를 통한 DOE1 기본배지 개발완료
		배지영양요구성분분석 (생명연)	- 세포 성장에 따른 영양소모분석을 통한 영양분 보충으로 기본배지성분을 강화 - 메타볼라이트 분석을 통한 C-소스와 N-소스 농도 분석 완료
		바이오리액터 스케일업 (생명연)	- 표준배지를 이용한 50 L 배양 공정 개발 완료 - 표준배지 및 기본배지를 이용한 200 L 배양 공정 개발 완료 - 스케일업 팩터 분석 완료
		구제역 백신 생산을 위한 동물세포 배양기술 확립 (생명연)	- 2 L 바이오리액터에서의 pH, DO, Mixing, Shear stress를 고려한 세포배양기술 확립 완료 - 배양 표준작업지시서 작성 완료
		부유세포주의 대량동물세포배양기술 확보(농림축산검역본부)	- 표준배지를 이용한 50 L 배양을 통한 구제역 바이러스 생산 평가 완료 - 표준배지 및 기본배지를 이용한 200 L 배양을 통한 구제역 바이러스 생산 평가 완료
		개발된 동물용 부유세포의 생산 공정 Scale-up (중앙백신연구소)	- 2 L 바이오리액터를 이용한 부유세포 생산 공정 확립
		부유 세포기반의 동물 세포주를 이용한 바이러스 대량 감염공정 개발(중앙백신연구소)	- 바이러스 접종 MOI를 0.01로 접종 - 바이러스 접종 시간별 바이러스 growth curve를 평가하여 바이러스 회수 시점 확립 - 채독 공정 확립 - 불활화 공정 확립
		무혈청 배지를 이용한 대량 감염공정 개발 (중앙백신연구소)	- 대량배양에서의 부유배양 세포의 바이러스 증식성 확인 - 부유배양세포의 바이러스 생산성이 부착세포보다 우수함을 확인 - 부유배양세포에서 바이러스 접종 MOI 확립 - 목적동물인 돼지에서 최종 백신 면역원성이 양성 대조군과 동등한 효능을 확인

3-2-2. 연차별 연구 성과 목표 달성여부

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권		기술 이전		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
										SCI	비SCI							
소계	목표	3	0	0				2			2	1	2			1		
	실적	2	1	0				2			2	0	6			1		

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

- 구제역 바이러스 VLP(Virus like particle) 백신에 관한 특허 출원 준비중(2018년 말)
- 구제역 바이러스 백신 대량 생산 공정개발 관련 논문 준비중(2019년 초)

4. 연구결과의 활용 계획 등

본 과제에 의해 얻어질 신규 무혈청 부유배양 기반 동물세포배양기술은 동물용 바이러스 백신 대량생산에 있어서 핵심 기술로써 국내 동물용 백신 생산에 있어 처음으로 시도되고 있는 기술이라 볼 수 있다.


본 과제에 의해 확립될 무혈청 부유형 동물세포배양 기반 동물용 바이러스 백신 생산기술은 구제역 백신이외에도 다양한 가축질병관련 바이러스 백신 생산에 폭넓게 이용될 수 있으며 국내외 특허등록을 통해 독점적인 권리를 얻고 이를 기반으로 사업화 가능성이 높은 분야라고 볼 수 있다. 또한, 기존의 부착형 동물세포 배양 기술의 한계를 뛰어 넘어 바이러스 백신 대량생산기술 확보, 독자배지개발을 통한 생산단가의 절감, GMP 기준에 부합한 설비 활용 등 독자적 생산기술의 완성도를 높이면 다국적 백신기업과의 기술 경쟁력을 확보할 수 있을 뿐더러 국내 수의 백신 산업의 성장에 크게 기여할 것으로 예상된다.

4. 실적 자료

1. 논문(SCI 2 건)

1) J Vet Med Sci. 2017 Nov 10;79(11):1822-1825.

- Determination of optimal age for single vaccination of growing pigs with foot-and-mouth disease bivalent vaccine in South Korea.



NOTE
Virology

Determination of optimal age for single vaccination of growing pigs with foot-and-mouth disease bivalent vaccine in South Korea

Ah-Young KIM¹*, Dongseob TARK²#, Hyejin KIM^{1,3}], Jae-Seok KIM¹], Jung-Min LEE¹], Minhee KWON¹], Soohyun BAE¹], Byoungghan KIM¹] and Young-Joon KO¹)*

¹Center for FMD Vaccine Research, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Gyeongsangbuk-do 39660, Republic of Korea
²Korea Zoonosis Research Institute, Chonbuk National University, Iksan, Jeollabuk-do 54531, Republic of Korea
³College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

J. Vet. Med. Sci.
79(11): 1822-1825, 2017
doi: 10.1292/jvms.17-0338

Received: 18 June 2017
Accepted: 7 September 2017
Published online in J-STAGE:
22 September 2017

ABSTRACT. In South Korea, pigs were vaccinated once between 8 and 12 weeks of age because of the injection-site granulomas. Therefore this study was performed to determine the optimal age for single vaccination of growing pigs with the currently used type O FMD vaccine. With 498 pigs divided into four groups, seroprevalence of the antibody was analyzed with enzyme-linked immunosorbent assay. Although double vaccination is necessary to completely protect growing pigs from FMD virus infection with the current vaccine, the age of 8 weeks can be considered as the optimal age for piglet vaccination if the booster injection is unavailable.

KEY WORDS: foot-and-mouth disease, pig, seroprevalence, vaccine

- 본 연구과제에서 개발한 세포주를 이용하여 생산한 구제역바이러스를 이용한 백신 효능실험에 앞서 사전실험 형식으로 진행된 결과를 논문으로 게재한 것이고 본 과제의 연구기간 중에 수행한 사항으로서 본 과제와 깊은 관련이 있음

2) Antiviral Res. 2017 Jul;143:134-141.

- Antiviral activity of ovine interferon tau 4 against foot-and-mouth disease virus.



Antiviral activity of ovine interferon tau 4 against foot-and-mouth disease virus



Jayaramaiah Usharani ^{a,1}, Sun Young Park ^{a,1}, Eun-Ju Cho ^a, Chungsu Kim ^a,
Young-Joon Ko ^a, Dongseob Tark ^b, Su-Mi Kim ^a, Jong-Hyeon Park ^a, Kwang-Nyeong Lee ^a,
Myoung-Heon Lee ^a, Hyang-Sim Lee ^{a,*}

^a Foot-and-mouth Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 177, Hyeonjin 8-ro, Gimcheon-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

^b Korea Zoonosis Research Institute, Chonbuk National University, Ma-dong, Icheon-si, Jeollabuk-do, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history

Received 5 April 2016
Accepted 25 January 2017
Available online 27 January 2017

Keywords:

Foot-and-mouth disease virus
Ovine interferon tau 4
Antiviral agent

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease (FMD) is an economically important disease in most parts of the world and new therapeutic agents are needed to protect the animals before vaccination can trigger the host immune response. Although several interferons have been used for their antiviral activities against Foot-and-mouth disease virus (FMDV), ovine interferon tau 4 (OvIFN-τ4), with a broad-spectrum of action, cross-species antiviral activity, and lower incidence of toxicity in comparison to other type I interferons, has not yet been evaluated for this indication. This is the first study to evaluate the antiviral activity of OvIFN-τ4 against various strains of FMDV. The effective anti-cytopathic concentration of OvIFN-τ4 and its effectiveness pre- and post-infection with FMDV were tested *in vitro* in LFBK cells. *In vivo* activity of OvIFN-τ4 was then confirmed in a mouse model of infection. OvIFN-τ4 at a concentration of 500 ng protected mice until 5 days post-FMDV challenge and provided 90% protection for 10 days following FMDV challenge. These results suggest that OvIFN-τ4 could be used as an alternative to other interferons or antiviral agents at the time of FMD outbreak.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

- 본 연구과제에서 개발한 세포주를 이용하여 생산한 구제역바이러스를 백신으로 활용시에 통상적으로 백신 접종후 7일째부터 효과가 있기 때문에 백신항체 형성 이전의 방어효과를 유도하기 위한 제제로 인터페론타우을 활용한 논문으로서 본 과제에서 개발한 구제역 백신과의 병용효과를 목적으로 개발한 것이고 본 과제의 연구기간 중에 수행한 사항으로서 본 과제와 깊은 관련이 있음

2. 특허(출원 2건, 등록 1건)

1) 특허출원(10-2016-0101758)

- 무혈청 배지에서 현탁 배양이 가능한 신규 BHK-21 세포주 및 이를 이용한 구제역 백신 제조방법

관인생략

출원번호통지서

출원일자	2016.08.10
특기사항	심사청구(우) 공개신청(우) 참조번호(1434)
출원번호	10-2016-0101758 (접수번호 1-1-2016-0776508-71)
출원인명칭	한국생명공학연구원(3-1999-034166-5) 외 1명
대리인성명	특허법인 태평양(9-2006-100042-1)
발명자성명	이은교 박순용 탁동섭 이항실 고영준 김연구 박선영 김충수 류경화 이영현
발명의명칭	무혈청 배지에서 현탁 배양이 가능한 신규 BHK-21 세포주 및 이를 이용한 구제역 백신 제조방법

특 허 청 장

2) 특허출원(10-2017-0070818)

- 신규한 재조합 항원 단백질을 포함하는 구제역 백신 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2017.06.07
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0070818 (접수번호 1-1-2017-0541508-61)
출원인명칭 대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)(2-1998-106445-5)
대리인성명 김순웅(9-2006-000534-4)
발명자성명 고영준 김아영 이항심 김병한
발명의명칭 신규한 재조합 항원 단백질을 포함하는 구제역 백신 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

- 본 연구과제에서 개발한 세포주를 이용하여 생산한 구제역바이러스를 백신으로 활용하는 것과 유전자재조합 단백질 백신간의 효능을 비교하고자 사전실험 형식으로 진행된 유전자재조합 단백질 백신 결과를 우선적으로 특허출원한 것이고 본 과제의 연구기간 중에 수행한 사항으로서 본 과제와 깊은 관련이 있음

3) 특허등록(10-1812223-0000)

- 무혈청 배지에서 현탁 배양이 가능한 신규 BHK-21 세포주 및 이를 이용한 구제역 백신 제조방법
- 본 특허 자료를 기반으로 논문투고 예정(2019년 3월)



발명의 명칭 Title of the Invention

무혈청 배지에서 현탁 배양이 가능한 신규 BHK-21 세포주 및 이를 이용한 구제역 백신 제조방법

특허권자 Patentee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2017년 12월 19일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

성 문 보

3. 학술대회 발표(해외 1건, 국내 5건)

1) 해외(포스터 발표 1건)

- Foot and mouth disease vaccine production in cell culture

ESACT 2017 - Abstract submission

Cell culture based vaccines

ESACT2017-1389

FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINE PRODUCTION IN CELL CULTURE

Soonyong Park¹, Ah-Young Kim², Young-Joon Ko², Eun Gyo Lee¹

¹Biotechnology Process Engineering Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Ochang, 28116, ²Center for FMD Vaccine Research Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea, Republic Of

Presentation Preference: Poster only

Background and novelty: Foot and mouth disease virus (FMDV) is a highly contagious and acute viral affliction of cloven footed animals [1]. The seven distinct virus serotypes of FMD including A, O, C, Asia-1, and the Southern African Territories types 1 to 3 as well as multiple subtypes are endemic globally. Although South Korea had remained FMD-free for 66 years, however since 2000, six FMD epidemics have been recorded [2]. Since then, the Korean government has adopted vaccine strategy for FMD. We have developed a new technology for FMDV vaccine production by utilizing serum-free cell culture platform, which can promote the rapid preparation of vaccine against new viral strains.

Experimental approach: Baby Hamster Kidney (BHK-21, clone 13) cell line which act as a host, was developed to be a suspension-adapted cell line in serum-free medium (BHK-S). Twenty media were screened for maximum viable cell concentration using BHK-S, and then, feeding strategy was developed using selected basal media.

Results and discussion: BHK-S has a high growth rate and is highly sensitive to domestic FMDV strain. Compared to the adherent BHK cells, most of the attachment proteins on the extracellular membrane showed decreased expression level in BHK-S. The titer of FMDV increased with the viable cell concentration. Inoculating 0.01 MOI of FMDV to 10^5 , 10^6 , and 10^7 cells/ml BHK-S resulted in 4.84 ± 0.1 , 6.31 ± 0.5 , and 6.75 ± 0.6 TCID₅₀, respectively. The animal component free basal media and additive feeding media were screened to obtain higher viable cell concentration and better FMD viral production. Additionally, the feeding strategy was developed to augment maximum viable cell concentration up to 2.5×10^7 cells/ml within six days. This cell culture based-FMDV production technology can attribute to develop an effective viral vaccine in case of FMD outbreak.

Bibliography, Acknowledgements: 1. 2010 Report from Global foot-and-mouth disease research alliance (GFRA)
2. Jong-Hyeon Park et al, Clin Exp Vaccine Res, 2016, 5, 83-87

Keywords: Foot and mouth disease virus, BHK cell, Suspension cell culture, Serum-free culture

2)국내(포스터 발표 5건)

- Verification of Proper Vaccination Time for Porkers with Foot-and-mouth Disease Vaccine

D019

Verification of Proper Vaccination Time for Porkers with Foot-and-mouth Disease (FMD) Vaccine

Ah-Young Kim¹, Hyejin Kim^{1,2}, Jae-Seok Kim¹, Jung-Min Lee¹,
Minhee Kwon¹, Soohyun Bae¹, Byoungan Kim¹, and Young-Joon Ko^{1*}

¹Animal and Plant Quarantine Agency, ²College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University

Double vaccination with an interval of 4 weeks at ages between 2 and 3 months has been recommended for FMD-susceptible domestic animals in Korea. However, fattening pigs are vaccinated only once between 8 and 12 weeks of age because of the side effect such as injection-induced granulomas. Therefore, this study was aimed to verify the most proper time of single vaccination for fattening pigs with the currently used FMD vaccine consisting of 2 strains of serotype O virus. Pigs were divided into four groups and vaccinated at the ages of 8 weeks, 10 weeks, 12 weeks, and 14 weeks, respectively. All pigs were regularly bled after vaccination until 24 weeks. Antibody levels against FMDV were detected using commercial type O enzyme-linked immunosorbent assay. Although pigs vaccinated at 8 weeks (group I) had the highest maternally derived antibody level at the vaccination point, they exhibited higher vaccine-induced antibody level than the other groups ($p < 0.05$). Double vaccination is required to completely protect finishing pigs from FMD virus infection with the current FMD bivalent vaccine. However, the age of 8 weeks can be considered as the proper time for piglet single vaccination.

- 본 연구과제에서 개발한 세포주를 이용하여 생산한 구제역바이러스를 이용한 백신 효능실험에 앞서 사전실험 형식으로 진행된 결과를 논문으로 게재한 것이고 본 과제의 연구기간 중에 수행한 사항으로서 본 과제와 깊은 관련이 있음

- A Comparison of Methods for Purification and Concentration of Foot-and-mouth Disease Virus

D021

A Comparison of Methods for Purification and Concentration of Foot-and-mouth Disease Virus

Hyejin Kim^{1,2}, Ah-Young Kim¹, Jae-Seok Kim¹, Jung-Min Lee¹,
Minhee Kwon¹, Soohyun Bae¹, Byoungan Kim¹,
Choi-Kyu Park², and Young-Joon Ko^{1*}

¹Animal and Plant Quarantine Agency, ²College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease, which cause substantial economic loss to livestock. However, little is known about the efficient method to study the purification and concentration of FMD virus-like particles, 146S, including the removal of non-structural proteins (NSPs). The 146S particles of FMD virus (FMDV) were concentrated through polyethylene glycol (PEG), ammonium sulfate (AS) treatment or ultrafiltration (UF). Several methods for purification and concentration of 146S particles were evaluated by spectrophotometer to measure the amount of the purified 146S particles. The purified FMDV 146S particles were confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results of the current study revealed that 146S particles concentrated by PEG showed the highest purity. Thus, PEG concentration is proposed to a reliable and efficient method for FMDV purification.

- 본 과제에서 배양한 구제역바이러스를 최종 효능평가 가능한 백신항원 형태로 만들기 위한 연구 내용임

D022

Chromatographic Analysis of Foot and Mouth Disease Virus

Jung-Min Lee¹, Ah-Young Kim¹, Hyejin Kim^{1,2}, Jae-Seok Kim¹,
Minhee Kwon¹, Soohyun Bae¹, Byoungchan Kim¹, and Young-Joon Ko^{1*}

¹Animal and Plant Quarantine Agency, ²College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University

To distinguish the infected animals with vaccinated ones, non-structural protein (NSP) should be eliminated from the FMD vaccines. Herein, different types of columns were tested to find the suitable column for 146S isolation. In this study, we used five different columns for analyses of foot and mouth disease virus purification. Five types of columns were used for AKTA purifier150 chromatographic system. With resultant fractions of each column, 146S quantitative sucrose density gradient analysis was done. Among five columns used for chromatographic analyses, a few columns exhibited marked isolation between NSP and structural protein (146S). Each fraction was concentrated to confirm if 146S was found on the SDS page. Other columns were not available because both NSP and SP were detected in the same fractions. Herein, chromatographic purification of 146S from crude FMD viruses was confirmed using a suitable column (confidential before publication) with general phosphate buffer. It will be applicable to the foot and mouth vaccine production process.

- 본 과제에서 배양한 구제역바이러스를 최종 효능평가 가능한 백신항원 형태로 만들기 위한 연구 내용임

- Evaluation for Inactivation of Foot and Mouth Disease Virus

D020

Evaluation for Inactivation of Foot and Mouth Disease Virus

Jae-Seok Kim¹, Ah-Young Kim¹, Hyejin Kim^{1,2}, Jung-Min Lee¹,
Minhee Kwon¹, Soohyun Bae¹, Byoungan Kim¹, and Young-Joon Ko^{1*}

¹Animal and Plant Quarantine Agency, ²College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University

Inactivation of the foot-and-mouth (FMD) virus was done by formalin initially. However, it was revealed that the formalin treatment is not highly effective for virus inactivation. Subsequently, binary ethyleneimine (BEI) was found as an effective inactivation reagent for FMD virus. The validation of BEI is essential to ensure the quality of the inactivating agent and the validity of the process. In this experiment, the inactivation kinetics of FMD virus O (Jincheon strain) were determined for different concentrations of BEI (0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, and 3 mM), reaction times (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h and 24 h) and temperature (37°C and 26°C). The result showed that FMD virus inactivation times were reduced depending on the increases of BEI concentration. The difference according to the temperature was also appeared. BEI at 3 mM was able to completely inactivate the FMDV within 8 h in 37°C. On the other hand, in 26°C, FMD virus was start to be inactivated from 15 h. This study can be used as a guideline for routine procedures for validating the quality of BEI and the inactivation process.

- 본 과제에서 배양한 구제역바이러스를 최종 효능평가 가능한 백신항원 형태로 만들기 위한 연구 내용임

- Large-scale production of foot-and-mouth disease vaccine in serum-free and suspension culture of BHK-21 cell

P0128 Large-Scale Production of Foot-and-Mouth Disease Vaccine in Serum-Free and Suspension Culture of BHK-21 Cell

Large-scale production of foot-and-mouth disease vaccine in serum-free and suspension culture of BHK-21 cell

Soonyong Park¹, Eunsil Kim¹, YoungJi Lee¹,
Ah-Young Kim², Young-Joon Ko², and Eun Gyo Lee¹

*¹Biotechnology Process Engineering Center, KRIBB,
Ochang, 28116, Republic of Korea*

*²Animal and Plant Quarantine Agency, Department of Animal and Plant Health Research,
Gimcheon, 39660, Republic of Korea*

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a highly contagious and acute viral affliction of cloven footed animals [1]. The seven distinct virus serotypes of FMD including A, O, C, Asia-1, and the Southern African Territories types 1 to 3 as well as multiple subtypes are endemic globally. Although South Korea had remained FMD-free for 66 years, however since 2000, six FMD epidemics have been recorded [2]. Since then, three of the serotypes, O, A, and Asia 1 have continued to be vaccinated. We have developed a new technology for FMDV vaccine production by utilizing serum-free cell culture platform, which results in evaluating the vaccination through new viral strains. This technology also serves as a control of domestic FMD outbreak. Baby Hamster Kidney (BHK-21, clone 13) cell line which act as a host, was developed to be a suspension-adapted cell line in serum-free medium (BHK-S). BHK-S has a high growth rate and is highly sensitive to domestic FMDV strain. Compared to the adherent BHK cells, most of the attachment proteins on the extracellular membrane showed decreased expression level in BHK-S. The titer of FMDV was increased with the viable cell concentration. Inoculating 0.01 multiplicity of infection of FMDV to 10^5 , 10^6 , and 10^7 cells/ml BHK-S, log₁₀ tissue culture infective dose 50% (TCID₅₀/50 ul) was increased 4.84 ± 0.1 , 6.31 ± 0.5 , and 6.75 ± 0.6 , respectively. Development of scale-up process from flasks to 50 L bioreactor was carried out. Large-scale culture using 50 L bioreactor had similar productivity of FMDV vaccine with flask culture. This cell culture based-FMDV production technology can attribute to develop an effective viral vaccine for a short period against newly spread FMD.

References

1. 2010 Report from Global foot-and-mouth disease research alliance (GFRA)
2. Jong-Hyeon Park et al, Clin Exp Vaccine Res, 2016, 5, 83-87

4. 고용창출(정규직 채용 2건)

- 홍진우(중앙백신연구소)
- 문경민(중앙백신연구소)

출력일시 : 2018.09.03 15:42

4대 사회보험 사업장 가입자 명부						
발급번호	20180903237525	발급일시	2018-09-03 15:42	사업장 관리번호	30581198490	
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험		
사업장등록번호	305-81-19849	305-81-19849	305-81-19849	305-81-19849		
사업장 명칭	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준)					1 / 7	
연번	주인(외국인) 등록번호	성명	차 격 취 득 일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						



※ 위 사업장 가입자 명부는 4대사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단과 가입자 정보를 실시간 연계받아 제공하는 것이며, 발급사실 여부는 발급일로부터 90일까지 4대 사회보험 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 [발급사실확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.

연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격 취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
110						
111						
112						
113						
114						
115						
116						
117						
118	890215-1*****	문경민	2017.09.04	2017.09.04	2017.09.04	2017.09.04
119						
120						
121						
122						
123						
124						
125						
126						
127						
128						
129						
130						
131	900418-1*****	홍진우	2016.09.19	2016.09.19	2016.09.19	2016.09.19
132						
133						
134						
135						
136						
137						
138						
139						



※ 위 사업장 가입자 명부는 4대사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계받아 제공되는 것이며, 발급사실 여부는 발급일로부터 90일까지 4대사회보험 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 [발급사실확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.

5. 정책활용(1건 예정)

- 동물세포 기반 부유세포 대량배양 기술을 농림축산검역본부 표준기술로 채택하여 농식품부 국가연구기술개발사업에 활용 계획
- 농림축산검역본부 2018년도 표준기술활용집

표준작업절차서
(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : AI	개정번호(Revision No.) : 0
	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 1/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		

작성자 (Prepared By)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명/날짜 (Signature/Date)
바이오상용화지원센터	연구원	박순용	/2018.8.10.

검토자 (Reviewed By)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명/날짜 (Signature/Date)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명/날짜 (Signature/Date)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명/날짜 (Signature/Date)

승인자 (Approved By)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명/날짜 (Signature/Date)
바이오상용화지원센터	책임기술원	이은교	/2018.8.14.

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 2/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		

1. 목적

- 200 L 바이오리액터(배양기)를 이용한 동물세포 배양공정 수행을 위한 일련의 작업과정을 표준화함
- 구제역 백신 원료의 제조 공정을 체계화함

2. 범위

- 이 절차는 원자재 수령부터 배양 및 배양액의 회수에 이르기까지 전반적인 제조과정에 적용함
- 배양공정은 종배양, 본배양, 회수의 3단계로 이루어짐

3. 책임

- 배양팀은 이 절차서에 따라 제조 공정을 수행하고, 공정 수행 중 일어난 일탈을 책임자에게 보고할 책임이 있음
- 책임자는 공정 수행 중 일어난 일탈에 대하여 적절한 조치를 취할 책임이 있음
- 동물세포 배양공정 관련 작업원은 이 절차서에 따라 교육을 받고, 관련 절차를 준수할 의무가 있음
- 이 문서는 사내 문서관리 규정에 의하여 분류되며, 이 문서의 일부의 복사, 분출 및 대외활용은 총괄책임자의 승인 없이는 불가함

4. 참고 문헌

- 해당사항없음

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 3/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		

5. 원자재 및 장비

5.1 원자재

	Chemicals	Supplier	Cat. No.
1	DOE1 medium	BD Biosciences	18ABP434
2	Feed 6	BD Biosciences	18ABP435
3	Sodium bicarbonate	SIGMA	S5761
4	L-Glutamine, 200mM Solution	Hyclone	SH30034.02
5	Sodium Carbonate	SIGMA	13418
6	Sodium hydroxide	SIGMA	795429
7	Hydrochloric acid 32%	Merck Millipore	1.00319.1011
8	Glucose Bio HT	Roche Custom Biotech	06608418001
9	Glutamine V2 Bio HT	Roche Custom Biotech	07395612001
10	Lactate Bio HT	Roche Custom Biotech	06608485001
11	NH3 Bio HT	Roche Custom Biotech	06608515001
12	Osmometer tube and cleanser	Advanced Instruments	110825
13	125 ml Erlenmeyer Flask	Corning	431143
14	2 L Erlenmeyer Flask	Corning	431255
15	Bottle-top vacuum filters	Corning	430513
16	1L Storage Bottle	Corning	8396
17	Silicone tubing	AdvantaPURE	APST-0250-0438L
18	Connector 1/4" ID	Cole-Parmer	30703-05
19	C-Flex tubing ID:1/8" & OD1/4"	Saint-Gobain	374-125-2
20	C-Flex tubing ID:1/4" & OD7/16"	Saint-Gobain	374-250-3
21	Sartopore 2 300	Sartorius	5441307H5

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 5/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		

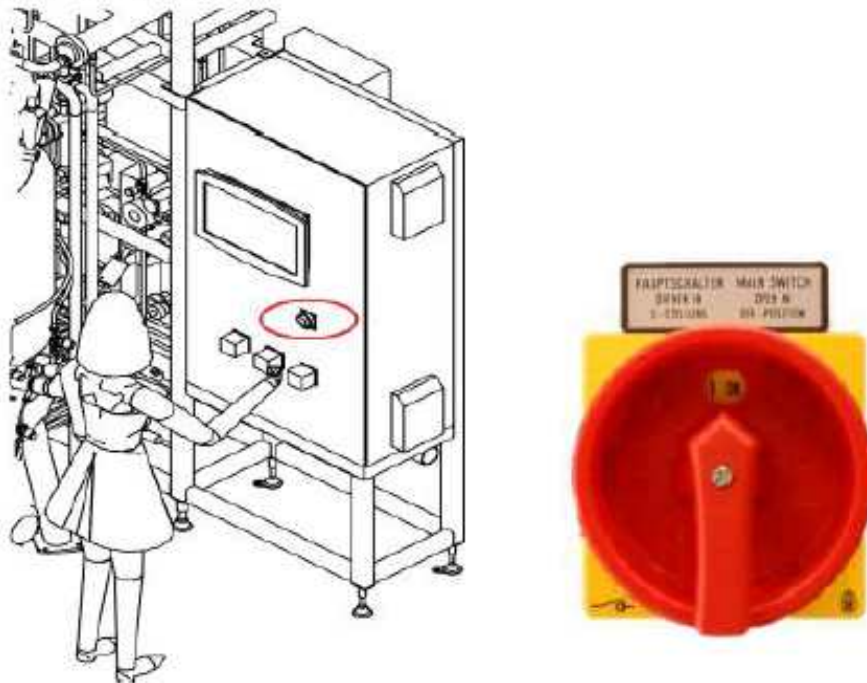
7. 절차

7.1 배양공정 사전 준비

- 배양공정 담당자는 배양실에 위치한 기계들의 전기적 물리적 이상 유무를 확인하고 제조지원시설(가스, 스팀, 공기압, 대기온도, 공조, 주사용수, 증류수)이 정상적으로 공급되고 있음을 확인함

7.2 장비 시동

- 본체의 메인 스위치(Fig.1)를 ON 방향으로 틀어서 가동
- 메인 화면의 User 선택 후, 로그인 입력(Fig.2)
: User(admin), Password()

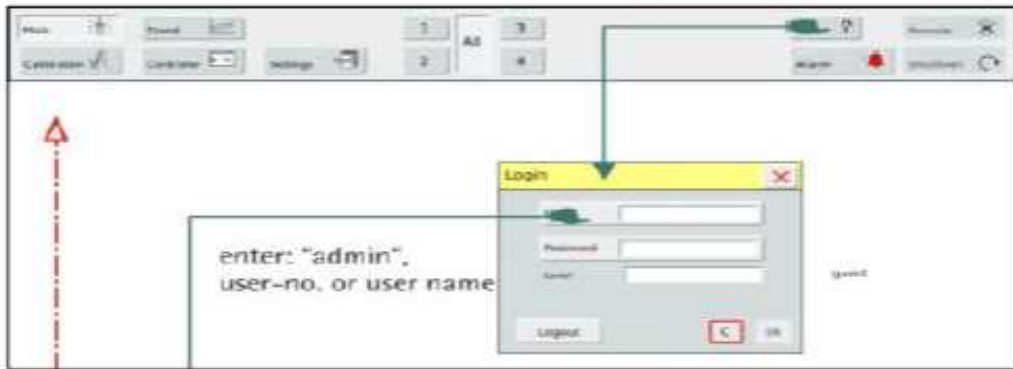


〈Fig.1 배양기 메인 스위치〉

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 6/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



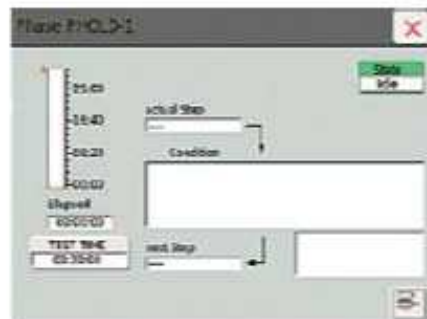
〈Fig.2 장비화면 로그인〉

7.3 유틸리티 가동 및 확인

- Clean 스팀의 밸브를 열어 스팀압력 2 bar 확인
- Plant 스팀의 밸브를 열어 스팀압력 2 bar 확인
- 냉각수 밸브 열기
- CO2, O2, Air 밸브를 열어 가스압력 2 bar를 확인

7.4 Pressure Hold test

- 배양기 각종 부품의 연결에서 누수가 있는지 확인
- 장비화면의 Phase에서 PHOLD를 클릭하여 시험(Fig.3)
- 2 bar 압력으로 12시간 시험하여 종료 시 1.8 bar 이상 유지



〈Fig.3 장비화면의 Pressure Hold test〉

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : A1 시행일자(Effective date) : 2018.10.1	개정번호(Revision No.) : 0 페이지번호(Page No.) : 8/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



<Fig.5 Sacoba valve>



<Fig.6 SACOVA valve의 세결>

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 9/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



〈Fig.7 Sparger, Overlay, Exhaust filter〉



〈Fig.8 필터 하우스〉

표준작업절차서

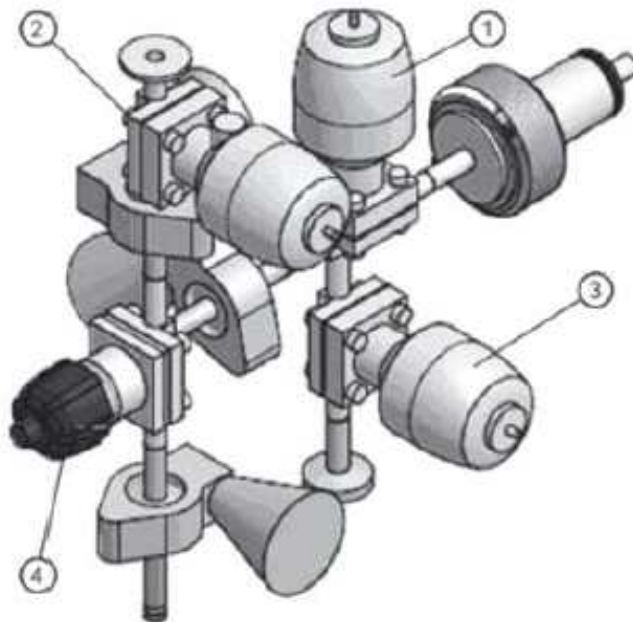
(Standard Operating Procedure)

회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 12/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		

- Additive valve(B)의 제균여과필터를 이용하여 배지를 배양기로 주입
- 배지가 배양기내부의 Probe 연결 부위이상 주입되고 장비 화면의 pH, DO값이 읽힘을 확인
- 여과전의 배지에서 pH미터를 이용하여 pH를 측정하여 장비화면의 Calibration을 클릭(Fig.13)하여 Probe Re-Calibrate에서 pH값을 적용(Fig.14)



<Fig.11 장비화면의 ADD 밸브 자동개폐 버튼>



<Fig.12 Additive group의 자동밸브와 수동밸브>

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : A1 시행일자(Effective date) : 2018.10.1	개정번호(Revision No.) : 0 페이지번호(Page No.) : 13/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



<Fig.13 pH Re-Calibrate>



<Fig.14 pH Re-Calibrate 설정>

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

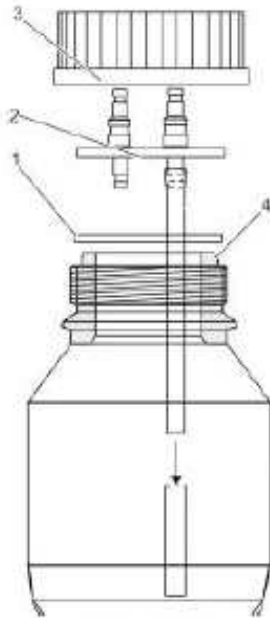
회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 16/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		

- 장비의 Base pump에 배양기 주입방향을 고려하여 실리콘 튜빙을 체결(Fig.17)
- SACOVA valve의 주입밸브(Fig.6-3)를 시계방향으로 돌려 개방
- 장비화면에서 BASET의 펌프 아이콘을 클릭하여 On 설정 후 NaOH 용액이 주입되는지 확인(Fig.18)
- 누수가 없는지 확인 후 BASET의 펌프 아이콘을 클릭하여 Auto 설정
- 사용하지 않는 SACOVA valve의 주입관은 클립을 이용하여 막음
- Antiform 용액 및 다른 첨가용액이 있을 경우 SACOVA valve의 남은 주입관 사용

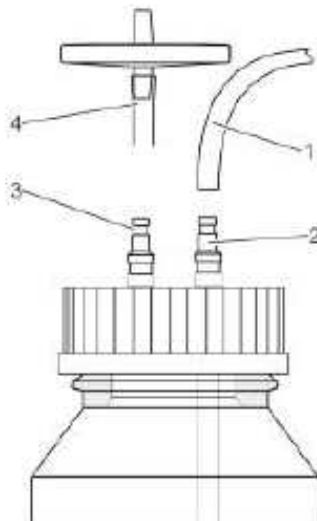
표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : A1 시행일자(Effective date) : 2018.10.1	개정번호(Revision No.) : 0 페이지번호(Page No.) : 17/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



<Fig.15 2-port Pyrex bottle 구성 >



<Fig.16 2-port Pyrex bottle의 튜빙설치 >

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 18/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



<Fig.17 Base pump에 튜빙 연결>



<Fig.18 Base용액 흐름 확인>

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : A1 시행일자(Effective date) : 2018.10.1	개정번호(Revision No.) : 0 페이지번호(Page No.) : 19/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		

7.12 Sampling

- Sampling bottle set의 Hand-Valve(Fig.19-4)를 시계방향으로 잠그고 고압증기멸균을 수행
- Sample bottle set의 위쪽 접속관을 배양기 sampling 접속관에 체결(Fig.20-5)하고 set의 옆쪽 접속관은 스팀 용축관에 체결(Fig.20-6)
- 스팀관의 Hand-Valve(Fig.20-2)와 스팀용축관 Hand-Valve(Fig.20-3)를 반시계방향으로 풀어 25분 동안 스팀을 흘려 Sampling관을 멸균 수행
- 멸균 수행 후 스팀관의 Hand-Valve(Fig.20-2)와 스팀용축관 Hand-Valve(Fig.20-3)를 시계방향으로 잠그고 최소 30분 동안 관의 온도를 낮춰줌
- Sampling bottle set의 Sampling Hand-Valve(Fig.20-4)를 반시계방향으로 풀고 배양기의 Sampling Hand-Valve 반시계방향(Fig.20-1)으로 열어 필요한 만큼의 배양액을 받으면 각각의 Hand-Valve를 역순으로 시계방향으로 잠금
- Sample bottle set의 위쪽 접속관(Fig.20-5)과 옆쪽 접속관(Fig.20-6)을 풀어 Sampling bottle set을 BSC로 옮겨 배양액을 회수

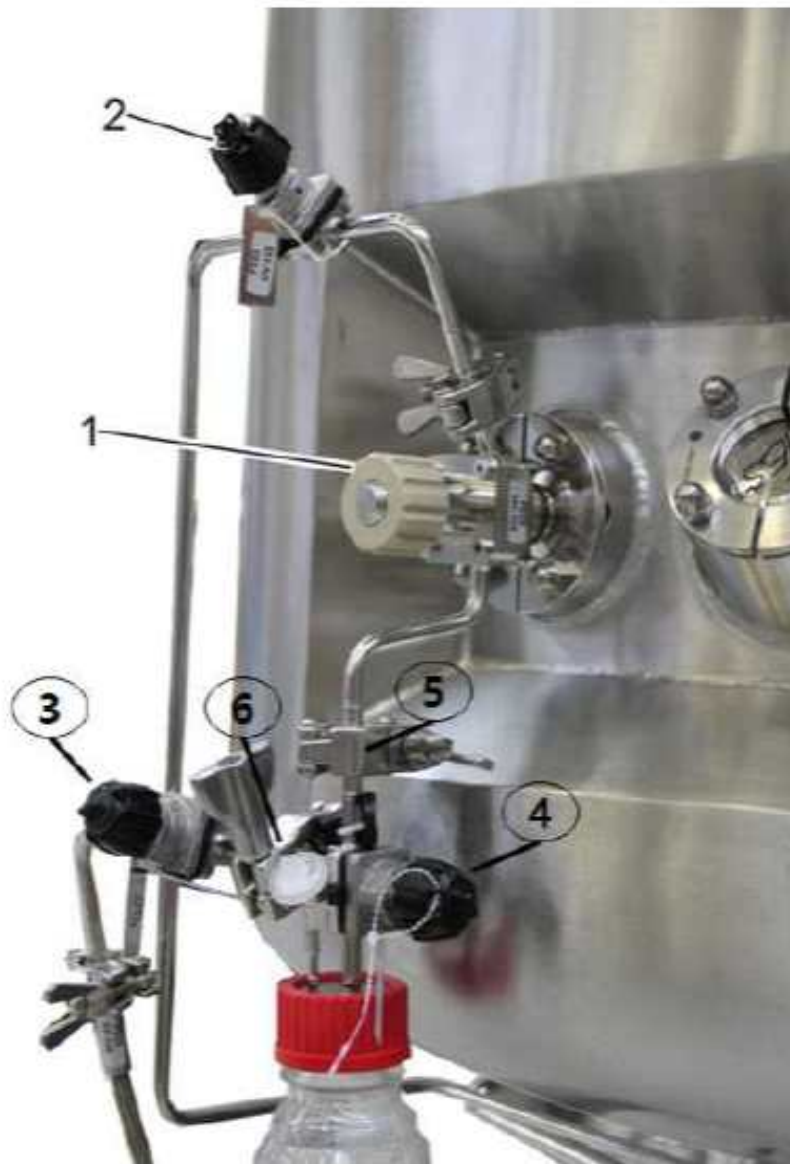


〈Fig.19 Sampling bottle set〉

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 20/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



<Fig.20 Sampling bottle set의 배양기 연결>

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 :	문서번호(Document No.) : A1	개정번호(Revision No.) : 0
한국생명공학연구원	시행일자(Effective date) : 2018.10.1	페이지번호(Page No.) : 23/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



<Fig.22 배양기의 Mobile CIP 배관 연결부위>



<Fig.23 배양기의 Mobile CIP 시그널 커넥터 연결>

표준작업절차서

(Standard Operating Procedure)

회사명 : 한국생명공학연구원	문서번호(Document No.) : A1 시행일자(Effective date) : 2018.10.1	개정번호(Revision No.) : 0 페이지번호(Page No.) : 24/24
제목 (Title) : 구제역백신 생산을 위한 200 L 동물세포배양		



〈Fig.24 CIP cap 연결〉

7.15 종료 SIP(Sterilisation-In-Place)

- Mobile CIP 장비를 통한 세척이 종료되면 DO와 pH probe를 분리하여 보관법에 따라 보관하고 배양기 Probe 포트는 더미 플러그로 막음
- 7.7항에서 필터결합 없이 CIP cap(Fig.24)이 체결된 상태로 ESIP를 수행

7.16 폐기물 처리

- 배양 공정에서 사용되어지고 버려지는 소모품의 경우 고압증기멸균기에서 121℃, 30분간 멸균하여 폐기
- 버려지는 소모품 : 실리콘 튜빙, C-Flex 튜빙, 제균 필터, Airfilter cartridge, 배지 제조백
- Additive valve, SACOVA valve, Sampling bottle, 필터 하우징은 따로 세척하여 건조 후 보관

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립				
	(영문) Mammalian cell cultivation technology for the foot-and-mouth disease vaccine production				
주관연구기관	한국생명공학연구원		주 관 연 구	(소속) 바이오상용화지원센터	
참 여 기 업	농림축산검역본부 (주)중앙백신연구소		책 임 자	(성명) 이은교	
총연구개발비 (천원)	계	1,560,000	총 연구 기간	2015.8.14. ~ 2018.8.13. (36 개월)	
	정부출연 연구개발비	1,170,000	총 연 구 원 수	총 인원	29 명
	기업부담금	390,000		내부인원	29 명
	연구기관부담금	0		외부인원	0 명

○ 연구개발 목표 및 성과

- 구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립
 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 무혈청배지기반 회분식 배양공정기술개발
 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 무혈청배지기반 유가식 배양공정기술개발
 - 고농도 동물세포(BHK-21) 배양기술 확립
 - 구제역 바이러스 백신생산을 위한 세포배양 배지 최적화
 - 구제역 백신 대량생산을 위한 세포배양 스케일업(200L)
- 논문
 - SCI논문 2 건
- 특허
 - 특허 출원 2건
 - 특허 등록 1건
- 학술대회 발표
 - 국제학회 포스터 발표 1건
 - 국내학회 포스터 발표 5건
- 고용창출
 - 정규직 채용 2건
- 정책활용
 - 농림축산검역본부 2018년도 표준기술활용집 정책건의 1건 예정

○ 연구내용 및 결과

<1차년도 연구개발성과>

- 구제역 백신생산 동물 세포 BHK-21 세포주 확립
 - 부유배양 적응 세포주의 단일 클론을 선별하여 **백신생산 부유세포주 확립**
- BHK-21 세포주의 표준배지 선정
 - 총 20 종의 상업용 배지 중, **BHK-21의 활성을 최대화하는 표준배지 선정**
 - 최고 세포농도에 도달한 무혈청, 동물유래물질 불포함, 화학적 특성이 규정된 배지인 VP6, VP8, VP5, VP7, VP9 배지를 선별
 - 선별된 배지들의 구제역 바이러스 역가 평가 완료
 - 최고 세포농도, 세포활성도, 비성장 속도(μ), 세포 증배 시간을 이용한 배지개발에 대한 기준과 평가방법 확립
- BHK-21 세포주의 표준배지첨가물 선정
 - 10 종의 상업용 배지첨가물 중, **BHK-21의 활성을 최대화하는 배지첨가물 선정**
 - 최고 세포농도, 세포활성도, 비성장 속도(μ), 세포 증배 시간을 이용한 배지첨가물개발에 대한 기준과 평가방법 확립
- 다양한 세포배양배지에 따른 적합성 평가를 위한 **구제역 바이러스 분석기술 확립**
 - 0.1부터 0.001MOI까지 구제역 바이러스 접종량에 따른 바이러스 역가차이 없음
 - 현탁세포수가 증가할수록 신생 구제역 바이러스의 역가 상승
 - 부착배양세포는 세포수가 한정적인 반면에 현탁배양은 동일 부피 당 세포수를 확장할 수 있기 때문에 부착배양세포보다 세포수를 높이는 경우 바이러스 역가가 부착배양보다 상대적으로 상승
 - 구제역 바이러스 농축 후 초고속원심분리법으로 **바이러스 입자 검출기법 확립**
- 세포배지성분에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가
 - 바이러스 접종시, 일반 배지류가 필수적이며 배지종류에 따라 바이러스 생산성 차이 확인
- **무혈청 배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립**
 - 각 무혈청배지에 증식된 부착세포에서의 바이러스 감염 감수성 시험 완료
 - 각 무혈청배지에 증식된 부유세포에서의 바이러스 감염 감수성 확인 완료
 - 무혈청 배지와 혈청첨가배지의 바이러스 증식성 비교 완료
- 개발된 동물용 부유세포의 백신생산의 적용(Lab scale)
 - Shaking flask(Lab scale)에서의 증식 배양조건 확립함
 - **10 L Wavebioreactor에서 부유세포의 증식 배양 조건 확립**
- 개발된 동물용 부유세포의 회분식 배양공정 최적화(Lab scale)
 - Glucose, Lactate, Glutamine, Ammonia와 같은 대사산물을 측정하여 바이러스 증식을 확인

<2차년도 연구개발성과>

- 구제역 백신생산 세포주의 배지 개발
 - 13종의 CD와 14종의 AF배지를 DWP를 사용하여 1차적으로 배지를 선별하고, Shake flask로 검증하여 최종적으로 **CD35와 AF20을 선정**하여 배지 성분의 강화를 통한 배지개발 수행

- 위 Shake flask에서 선별된 배지의 재현성 평가를 수행하였고, 검역본부에서 구제역 바이러스 역가를 측정하여 CD35와 AF20 배지에 문제없음을 확인
- CD35와 AF20배지에 CD 첨가물, SM(영양소모분석) 첨가물, peptone blend 등 여러 가지 첨가물로 **배지의 성분을 강화하여 세포성장 능력을 향상**
- 성분이 강화된 8종의 CD와 8종의 AF 배지의 재현성 실험을 수행하였고, 검역본부에서 바이러스 역가를 측정 중에 있음
- 최종 선별된 CD와 AF배지의 유가식 배양을 위한 배지첨가물 개발을 수행
- 배지 첨가물인 CB feed1의 농도 선별
 - 기존 50 g/L의 고농도 CB feed1에 대한 용해성 문제와 가격문제를 해결하기 위하여 최적 농도 선별을 수행
 - **25 g/L CB feed1를 배양 배지에 5% 첨가하는 것을 최적 조건으로 선별하여, 용해도 문제와 가격 문제를 해결**
- 표준작업지시서 작성 및 실험 수행
 - 실험적 변수를 최소화 하고, 재현성을 높이며, **효율적인 기술 이전을 위하여 표준작업지시서를 작성**
 - 작성된 지시서를 이용하여 Shake flask 단계에서 세포 성장 실험을 수행하여 높은 재현성을 확인
- **생명연 특허세포주와 검역본부 특허세포주 비교**
 - 생명연에서 개발된 세포주가 세포 성장, 세포 활성화, 현탁도, 구제역 바이러스 생산성 모두에서 월등히 높음을 확인
- 바이오리액터 배양 공정
 - 2 L 바이오리액터 공정에서 CO₂나 Base에 의한 **pH 조절을 최소화 하는 것이 세포 활성도의 안정에 유리한 영향을 미침**
 - 배양 공정에서 Osmolality가 340 mOsm/kg 이하로 유지하는 것이 중요
- 생산 공정 최소화
 - 배양 중간에 첨가물의 첨가 없이, 배양 초기에 모든 첨가물을 적정한 농도로 첨가하는 것이 기존 배양 보다 더 높은 세포 농도로 성장함
 - **배양 공정의 최소화**를 통하여 배양 과정 중 첨가물에 의한 오염을 최소화 할 수 있다고 사료됨
- 세포배지 조건에 따른 구제역 바이러스 생산성 평가기술 확립
 - 세포배지 라이브러리에서 구제역 바이러스 생산배지 후보군 선별기준 정립
- **개발된 동물용 부유세포의 배양공정 최적화**
 - 무혈청 배지 및 배지첨가물 첨가에 따른 부유세포 배양성 비교평가
 - 배지첨가물의 첨가 조건 확립완료
- 개발된 부유 세포에 적합한 바이러스의 선정
 - BHK-21 부유 세포를 이용하여 Canine virus와 구제역 바이러스의 감수성 확인완료
- 부유 세포기반 동물 세포주의 회분식 감염공정 최적화
 - BHK-21의 부유배양 조건에서는 **바이러스 접종 23시간째에 가장 높은 10^{6.23}TCID₅₀/ml의 항체를 확인**

- 시험결과 0.01 MOI 조건에서 평균 약 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 의 항체가를 형성
- 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 회분식 감염 공정 확립
 - BHK-21 세포는 0.3×10^6 cells/ml을 배양하여 5×10^6 cells/ml 이상의 세포농도에서는 배지 교체 없이 구제역 바이러스를 접종하여 17 ~ 20시간 사이에 채독하는 조건을 확립
- 무혈청 배지를 이용한 부유세포의 유가식 감염 공정 확립
 - 2 L 바이오리액터를 이용하여 0.42×10^6 cells/ml로 접종하여 5일째에 무혈청 배지 0.5 L, 4 mM Glutamine과 4 mM Glucose를 첨가하여 7일간 배양하였을 경우 7일째 최대 6.2×10^6 cells/ml의 세포를 수득

<3차년도 연구개발성과>

- 최적 제품화 배지선정
 - 구제역 바이러스 생산성이 탁월한 CD 계열 배지인 DOE1 기본배지개발
 - 총 10종의 배지첨가물을 선별하여 세포 성장 및 바이러스 생산성이 우수한 Feed 6 배지를 개발하여 기존 바이러스 생산량 대비 약 4.6 배의 생산성을 보임
 - 배지첨가물의 첨가전략 개발을 통하여 배양 0일 차에 배양부피 대비 배지 첨가물 10%를 첨가하여 배양함으로써 배양 4일차 최고세포농도 8.4×10^6 cells/ml 까지 성장
- 배지 영양요구성분 분석
 - 세포가 성장함에 따라 배지 영양소모분석을 통하여 부족한 영양분을 첨가하여 배지성분을 강화시킴
 - 메타볼라이트 분석을 통하여 N-소스와 C-소스인 Glutamine과 Glucose의 소모성을 분석하여 Glutamine은 최소 8 mM이상 Glucose는 최소 5 g/L 이상이 기본배지에 포함되어야 함
- 바이오리액터 스케일업
 - 표준배지 중 하나인 CD-BPM배지를 이용하여 50 L 바이오리액터에서 배양공정조건 확립
 - 배양 3일차 세포회수 후 검역본부로 이송하여 구제역 바이러스 생산성 평가 수행
 - 초기 Lactate 축적을 억제함으로써 세포 성장성을 증대시킬 수 있을 것으로 사료됨
 - DOE1 기본배지를 이용한 200 L 바이오리액터에서 배양 공정 확립
 - 200 L 바이오리액터 배양 표준작업절차서를 작성
- 구제역 백신 생산을 위한 동물세포배양기술 확립
 - 표준배지 중 하나인 CD-BPM 배지를 이용하여 2 L 바이오리액터에서 배양조건 확립
 - Flask배양과 달리 바이오리액터에서는 Shear stress를 최소화 하는 것이 중요
 - Shear stress를 줄여주는 방안으로 Pluronic F-68을 1 g/L로 첨가함으로써 flask 배양보다 높은 성장효과를 보임
- 부유세포주의 대량동물세포배양기술 확보
 - 기존 시판배지 대상 구제역 바이러스 역가 및 항원 생산량 비교하여 바이러스 생산성이 우수한 ProBHK-1 : CD-BPM = 1 : 1 혼합배지 확인
 - 다양한 표준배지의 바이러스 생산성을 평가하여 배지의 수급문제에 대비가능
 - DOE1 기본배지를 이용하여 생명연에서 200 L 배양공정 확립하였고 배양 3일차 세포를 회수하여 25 L는 파일럿 스케일의 RM 장비에서 나머지는 검역본부 200 L 바이오리액터에서 구제역 바이러스 생산성 검증

- 무혈청 배지를 이용한 바이러스 감염공정 확립
 - 부착세포는 1×10^6 cells/ml 이상 증식되지 않았으나, 부유세포의 경우 최대 3.3×10^6 cells/ml 수준까지 배양되는 것을 확인
 - 3종의 바이러스 접종 배지(Gibco-A, Gibco-B, CSTL-B)를 선별하여 접종 4일째 가장 높은 titer를 보인 Gibco-A 선정
 - 바이러스 접종 시 세포 농도가 높을수록 접종 24시간에 바이러스 증식성이 가장 높음
- 개발된 동물용 부유세포의 백신 생산의 적용(Lab scale)
 - 10 L Lab-scale의 Wavebioreactor에서 회분식 배양을 하여 배양 2일차 3.6×10^6 cells/ml 까지 성장함
 - Cas system의 배양 **환경조건 변화를 통한 공정 최적화**
 - 바이러스 접종 시에는 바이러스에 의한 세포활성도, 세포수의 변화와 세포 대사산물의 수치가 변화됨을 확인하여, 이를 기반으로 바이러스의 증식성을 높이기 위한 배지첨가물의 선정에 반영
- 개발된 동물용 부유세포의 생산 공정 스케일업
 - 바이옱액터를 이용한 구제역 바이러스의 배양 및 불활화, 정량 시험
- 부유 세포기반의 동물 세포주를 이용한 **바이러스 대량 감염공정 개발**
 - Canine virus, Porcine virus의 바이러스 감수성 확인을 통하여 부유세포에 적합한 바이러스의 선정
- 무혈청 배지를 이용한 대량 감염공정 개발
 - BHK-21 부유세포의 바이러스 접종 23시간째에 가장 높은 $10^{6.23}$ TCID₅₀/ml의 항체가를 보임
 - MOI를 각각 0.1, 0.01, 0.001로 달리하여 바이러스 접종 조건을 확인하였을 경우 0.01 MOI 조건에서 평균 약 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 의 높은 항체가를 형성
- **돼지에서 구제역 백신 보조제 선정 및 효능 평가**
 - 구제역 백신에 적합한 백신보조제 선정을 위해 emulsion type별로 시험백신을 제조한 후 목적동물인 돼지에서 시험하여 ELISA와 VNT로 항체가를 측정함

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본 과제의 수행으로 얻어질 신규 무혈청 부유배양 기반 동물세포배양기술은 동물용 바이러스 백신 대량생산에 있어서 핵심 기술로써 국내 동물용 백신 생산에 있어 처음으로 시도되고 있는 기술이라 볼 수 있다.

본 과제의 수행으로 확립될 무혈청 부유형 동물세포배양 기반 동물용 바이러스 백신 생산기술은 **구제역 백신이외에도 다양한 가축질병관련 바이러스 백신 생산에 폭넓게 이용될 수** 있으며 국내외 특허등록을 통해 독점적인 권리를 얻고 이를 기반으로 사업화 가능성이 높은 분야라고 볼 수 있다. 또한, 기존의 부착형 동물세포 배양기술의 한계를 뛰어 넘어 바이러스 백신 대량생산기술 확보, 독자배지개발을 통한 생산단가의 절감, GMP 기준에 부합한 설비 활용 등 독자적 생산기술의 완성도를 높이게 되면 다국적 백신기업과의 기술 경쟁력을 확보할 수 있을 뿐더러 국내 수의 백신산업의 성장에 크게 기여할 것으로 예상된다.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		315039-3	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총관과제	기재하지 않음			총관책임자	기재하지 않음
과제명	구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포배양기술 확립			과제유형	연구 개발
연구기관	한국생명공학연구원			연구책임자	이은교
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2015.8.14. - 2016.8.13.	390,000	130,000	520,000
	2차연도	2016.8.14. - 2017.8.13.	390,000	130,000	520,000
	3차연도	2017.8.14. - 2018.8.13.	390,000	130,000	520,000
	계	2015.8.14. - 2018.8.13. (36 개월)	1,170,000	390,000	1,560,000
참여기관	농림축산검역본부, (주)중앙백신연구소				
상대국				상대국연구기관	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018년 9월 21일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
한국생명공학연구원	책임기술원	이은교

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 이 은 교

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

확약	
----	---------------------------------------------------------------------------------------

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		315039-3	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립			과제유형	연구 개발
연구기관	한국생명공학연구원			연구책임자	이은교
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2015.8.14. ~ 2016.8.13.	390,000	130,000	520,000
	2차연도	2016.8.14. ~ 2017.8.13.	390,000	130,000	520,000
	3차연도	2017.8.14. ~ 2018.8.13.	390,000	130,000	520,000
	계	2015.8.14. ~ 2018.8.13. (36 개월)	1,170,000	390,000	1,560,000
참여기관	농림축산검역본부, (주)중앙백신연구소				
상대국				상대국연구기관	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018년 9월 21일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
한국생명공학연구원	책임기술원	이은교

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 이 은 교

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

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 부유세포 기반 구제역 백신 대량생산 기술의 국내 최초 확보
- 구제역 백신 부유적응 세포주 확보 및 특허 등록
- 고농도 세포 배양을 통한 구제역 백신 생산성 증가 기술 확보
- 구제역 백신 생산성 제고를 위한 합성 배지 및 배지첨가물의 확보
- 200 L 바이옱어랙터를 이용한 구제역 백신 대량 생산 공정 기술 개발 및 농림축산검역본부 백신생산연구센터에서의 3차례 검증
- 구제역 바이러스 감작 조건 기술 확보 및 바이러스 입자 검출법 확립
- 본 기술을 바탕으로 생산된 구제역 백신의 목적 동물에서의 실증

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 환경파괴와 동일한 수준의 동물전염병의 유행이 반복적으로 발생하고 있고 이에 대응한 동물백신기술은 휴먼백신개발과 유사한 수준으로 점차 발전되고 있음. 영국, 러시아, 아르헨티나, 중국 등의 기업에서 기술적 우위를 지니고 있어 백신 수입국에 머물렀으나 국내에서 반복적으로 발생하고 있고 토착화하여 바이러스의 변형이 발생할 우려가 지속적으로 커지고 있어 국내 독자적 구제역 백신 기술을 확보할 필요가 있음. 이에 따라 국내에서 분리된 구제역 항원인 진천주를 기반으로 백신생산기술을 독자적으로 확립하는데 목적을 두고 본 사업을 수행하였으며 그 결과 독자적 세포주와 독자적 배지를 사용한 동물세포배양법과 이에 따른 백신생산법을 구축하였기에 농림축산검역본부에서 구축한 구제역백신시설내에서 파일럿 규모 생산이 가능할 것으로 기대됨
- 본 연구에서 확보된 세포주와 동물백신생산용 배지는 다른 종류의 백신개발 에 폭 넓게 활용이 가능함
- 본 연구에서 확립된 백신 대량생산 기술을 활용한다면 인플루엔자 및 폴리오 백신 등에 많이 활용되는 Vero 및 MDCK 세포주를 활용한 백신생산연구에도 적용이 가능할 것으로 기대하며 향후 신규 개발 중인 백신의 안정적 생산성을 확보함으로써 백신의 국산화와 선진국과의 기술격차를 줄일 수 있을 것으로 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- 해외 백신의 수입에만 의존하고 있는 구제역 백신을 국내 독자적 생산 가능
- 국내에서 주로 발생한 구제역 바이러스 타입뿐만 아니라 국내 유입후 변형된 신규 구제역 바이러스에 대한 신속 대응 및 지속적인 구제역 바이러스 연구 개발 가능
- 구제역 백신뿐 아니라 포유류 세포기반의 동물백신의 국내 생산기지화 가능
- 구제역 질병 발발에 따른 신속한 백신화 기술 가능
- 동물질병이외에 사람의 유행성 질병에 대한 백신 자립화에 기여 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 구제역 백신 생산에 적합한 현탁배양이 가능하면서도 무혈청 배지에서의 고성장이 가능한 세포주의 독자적 확보
- 구제역 백신의 경제적 생산이 가능한 무혈청 합성배지의 확보
- 고농도 세포 배양 및 바이러스 생산이 가능한 동물세포기반 백신생산기술 확보
- 생산된 구제역 백신의 정성 및 정량 분석기술을 확립하였으며 목적 동물에서의 검증 완료

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

1. SCI 논문 2 건

- Journal of Veterinary Medical Science. 2017 Nov 10;79(11):1822-1825.
- Antiviral Research 2017 Jul;143:134-141.

2. 특허 출원 2건

- 10-2016-0101758
- 10-2017-0070818

3. 특허 등록 1건

- 10-1812223-0000

4. 국외학술발표 1건

- FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINE PRODUCTION IN CELL CULTURE

5. 국내학술발표 5건

- Verification of Proper Vaccination Time for Porkers with Foot-and-mouth Disease Vaccine
- A Comparison of Methods for Purification and Concentration of Foot-and-mouth Disease Virus
- Chromatographic Analysis of Foot and Mouth Disease Virus
- Evaluation for Inactivation of Foot and Mouth Disease Virus
- Large-scale production of foot-and-mouth disease vaccine in serum-free and suspension culture of BHK-21 cell

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
현탁세포배양 적합 배지 최적화	10	100	- 구제역 바이러스 백신 생산을 위한 현탁세포주 개발 및 표준배지 확보
구제역 바이러스 생산성 평가기술확립	10	100	- 구제역 바이러스 생산성 평가를 위한 활성 바 이러스 정량법 및 146S 입자 검출법 확립
바이러스감염기술개발	5	100	- 바이러스 감염 최적 MOI 확립
고농도 세포배양기술 확립	15	100	- 기본배지 및 배지첨가물 개발을 통한 고농도 세포배양기술 확립 - 영양요구성분석 및 공정 파라미터 분석을 통한 고농도 세포배양법 확립
구제역 바이러스 생산성 평가	15	100	- 최적의 배양 공정을 통한 구제역 바이러스의 접종 농도, 회수 시기 결정
세포배양기반 백신생산기술개발	10	100	- 부착세포와 부유세포 비교를 통한 부유세포의 백신생산 우수성 검증
대량배양공정검증	15	100	- 200 L 바이오리액터에서 세포배양 공정 확립 및 구제역 바이러스 생산 기술 확립
배양공정기술확립	15	100	- 플라스크 배양에서 2, 10, 50, 200 L 바이오리 액터 배양까지의 스케일업 공정기술 개발 완료
제품화기술 검증	5	100	- 목표 동물인 돼지에서 본과제를 통해 생산된 구제역 백신의 효능 검증 완료
합계	100점	100	

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제를 통하여 종단과 부착세포를 통한 백신생산의 한계점을 극복하고 세계 백신 산업의 트렌드인 부유세포 기반 백신 생산에 관련된 세포주 개발부터 배지개발, 공정개발을 통한 대량생산까지 백신 산업의 핵심 기술을 개발하고 확보하였다. 전염률이 높고 경제적으로 타격이 큰 구제역 바이러스 백신 생산에 대한 국산화 기술을 확보하여 국내 특이적 구제역 바이러스에 대하여 신속하게 대응하고 새로운 구제역 바이러스에 대한 지속적인 연구개발을 할 수 있을 것으로 기대 된다. 향후 본 기술을 바탕으로 여러 동물 질병에 대한 백신 개발부터 인간 질병에 대한 백신 개발까지 여러 백신 연구에 적극적으로 활용할 수 있을 것으로 기대 된다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 구제역백신 생산 세포주 개발을 통한 특허 출원 및 등록
- 세포의 대량배양 및 백신 대량생산 기술 확보를 위한 기본배지 개발 및 공정개발

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 구제역 백신 대량생산 공정기술 개발에 관한 논문 발표 예정
- 농림축산검역본부 정책활용 예정
- 차세대 백신인 구제역 바이러스의 VLP(Virus like particle) 백신 개발에 관한 특허 출원 준비
- 대량배양기술에 대한 기술 이전 계획

Ⅳ. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

지적재산권 확보 및 기술이전 협의 후 공개

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	가축질병대응기술개발사업	
연구과제명	구제역 백신 대량생산을 위한 동물세포 배양기술 확립			
주관연구기관	한국생명공학연구원	주관연구책임자	이은교	
연구개발비 (천원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,170,000	390,000	0	1,560,000
연구개발기간	2015.8.14. ~ 2018.8.13.(36 개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 현탁세포배양 적합 배지 최적화	- 구제역 바이러스 백신 생산을 위한 현탁세포주 개발 및 표준배지 확보
② 구제역 바이러스 생산성 평가기술확립	- 구제역 바이러스 생산성 평가를 위한 활성 바이러스 정량법 및 146S 입자 검출법 확립
③ 바이러스감염기술개발	- 바이러스 감염 최적 MOI 확립
④ 고농도 세포배양기술 확립	- 기본배지 및 배지첨가물 개발을 통한 고농도 세포배양 기술 확립 - 영양요구성분분석 및 공정 파라미터 분석을 통한 고농도 세포배양법 확립
⑤ 구제역 바이러스 생산성 평가	- 최적의 배양 공정을 통한 구제역 바이러스의 접종 농도, 회수 시기 결정
⑥ 세포배양기반 백신생산기술개발	- 부착세포와 부유세포 비교를 통한 부유세포의 백신생산 우수성 검증
⑦ 대량배양공정검증	- 200 L 바이옱어터에서 세포배양 공정 확립 및 구제역 바이러스 생산 기술 확립
⑧ 배양공정기술확립	- 플라스크 배양에서 2, 10, 50, 200 L 바이옱어터 배양까지의 스케일업 공정기술 개발 완료
⑨ 제품화기술 검증	- 목표 동물인 돼지에서 본과제를 통해 생산된 구제역 백신의 효능 검증 완료

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표									연구기반지표					
	지식 재산권		기술 실시 (이전)		사업화					학술성과			정책 활용·홍보		
	특 허 출 원	특 허 등 록	건 수	기술 료	제품 화	매출 액	수출 액	고 용 창 출	투자 유치	논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표	정책 활용	홍보 전시
								SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건		건	건	건
가중치															
최종목표	3	1						2		2	1		2	1	
연구기간내 달성실적	2	1						2		2	0		6	1	
달성율(%)	67	100						100		100	0		300	100	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	구제역 백신 생산 부유세포주 개발
②	구제역 백신 생산 세포주의 성장 및 바이러스 생산 최적화 배지 개발
③	구제역 백신 생산 세포주 대량배양공정 기술
④	구제역 백신 대량생산공정 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소 화 흡 수	외국기술 개 선 개 량	특 허 출 원	산업체이전 (상 품 화)	현 장 애 로 해 결	정 책 자 료	기 타
①의 기술		V				V				
②의 기술		V					V			
③의 기술		V							V	
④의 기술		V							V	

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 신종 구제역 바이러스에 대한 백신 연구 및 생산 활용 - 동물 및 사람 질병에 대한 백신 개발 연구
②의 기술	- 구제역 백신 생산 세포주의 고농도 배양 및 바이러스 생산 활용 - 구제역 외 백신 생산 세포주의 배양 최적화 연구
③의 기술	- 구제역 백신 생산 세포주의 고농도 대량 배양을 통한 바이러스 백신 생산 활용
④의 기술	- 대량배양공정을 통한 바이러스 백신 대량 생산 활용 - 신종 구제역 바이러스 발발에 대한 초기 대응용 백신 생산

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표									연구기반지표					
	지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화					학술성과			정책 활용·홍보		
	특허출원	특허등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	논문		논문평균IF	학술발표	정책활용	홍보전시
SCI	비SCI	SCI	비SCI	SCI	비SCI	SCI	비SCI	SCI	비SCI	SCI	비SCI	SCI	비SCI	SCI	비SCI
단위	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건		
가중치															
최종목표		3	1					1		0					
연구기간내 달성실적															
연구종료 후 성과창출 계획		2	1					1		1					

붙임. 참고문헌

* BHK-21 FMD

1. Fowler VL, Bankowski BM, Armson B, Di Nardo A, Valdazo-Gonzalez B, Reid SM, Barnett PV, Wadsworth J, Ferris NP, Mioulet V, King DP. Recovery of viral RNA and infectious foot-and-mouth disease virus from positive lateral-flow devices. *PLoS One*. 2014 Oct 14;9(10):e109322.
2. Ma X, Li P, Bai X, Sun P, Bao H, Lu Z, Cao Y, Li D, Chen Y, Qiao Z, Liu Z. Sequences outside that of residues 93-102 of 3A protein can contribute to the ability of foot-and-mouth disease virus (FMDV) to replicate in bovine-derived cells. *Virus Res*. 2014 Oct 13;191:161-71.
3. Chang Y, Dou Y, Bao H, Luo X, Liu X, Mu K, Liu Z, Liu X, Cai X. Multiple microRNAs targeted to internal ribosome entry site against foot-and-mouth disease virus infection in vitro and in vivo. *Virology*. 2014 Jan 6;11:1.
4. Mohapatra JK, Pandey LK, Pattnaik B. RNA structure disrupting G320-T transversion within the short fragment of the 5' untranslated region prevents rescue of infectious foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*. 2014 Feb;196:100-3.
5. Bisht P, Mohapatra JK, Subramaniam S, Das B, Pande V, Biswal JK, Sharma GK, Rout M, Ranjan R, Dash BB, Sanyal A, Pattnaik B. Efficient rescue of foot-and-mouth disease virus in cultured cells transfected with RNA extracted from clinical samples. *J Virol Methods*. 2014 Feb;196:65-70.
6. Sarangi LN, Mohapatra JK, Subramaniam S, Sanyal A, Pattnaik B. Antigenic site variation in foot-and-mouth disease virus serotype O grown under vaccinal serum antibodies in vitro. *Virus Res*. 2013 Sep;176(1-2):273-9.
7. Yin S, Yang S, Shang Y, Sun S, Zhou G, Jin Y, Tian H, Wu J, Liu X. Characterization of Asia 1 sdAb from camels bactrianus (*C. bactrianus*) and conjugation with quantum dots for imaging FMDV in BHK-21 cells. *PLoS One*. 2013 May 30;8(5):e63500.
8. Chang H, Ma Y, Lin T, Cong G, Du J, Ma J. Foot-and-mouth disease virus carrier status in *Bos grunniens* yaks. *Virology*. 2013 Mar 11;10:81.
9. Dar PA, Ganesh K, Nagarajan G, Sarika S, Reddy GR, Suryanarayana VV. Sindbis virus replicase-based DNA vaccine construct encoding FMDV-specific multivalent epitope gene: studies on its immune responses in guinea pigs. *Scand J Immunol*. 2012 Oct;76(4):345-53.
10. Li P, Bai X, Lu Z, Sun P, Qi G, Han C, Liu Z. Construction of a full-length infectious cDNA clone of inter-genotypic chimeric foot-and-mouth disease virus. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2012 Jan;52(1):114-9.
11. Martín-Acebes MA, Vázquez-Calvo A, González-Magaldi M, Sobrino F. Foot-and-mouth disease virus particles inactivated with binary ethylenimine are efficiently internalized into cultured cells. *Vaccine*. 2011 Dec 6;29(52):9655-62.
12. Li P, Lu Z, Bao H, Li D, King DP, Sun P, Bai X, Cao W, Gubbins S, Chen Y, Xie B, Guo J, Yin H, Liu Z. In-vitro and in-vivo phenotype of type Asia 1 foot-and-mouth disease

- viruses utilizing two non-RGD receptor recognition sites. *BMC Microbiol.* 2011 Jun 29;11:154.
13. Cao Y, Lu Z, Sun P, Fu Y, Tian F, Hao X, Bao H, Liu X, Liu Z. A pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of foot-and-mouth disease virus and a T-cell immunogen shows enhanced immunogenicity in mice. *Virology*. 2011 Feb 23;8:77.
 14. Maree FF, Blignaut B, de Beer TA, Visser N, Rieder EA. Mapping of amino acid residues responsible for adhesion of cell culture-adapted foot-and-mouth disease SAT type viruses. *Virus Res.* 2010 Oct;153(1):82-91.
 15. Construction of a multiple targeting RNAi plasmid that inhibits target gene expression and FMDV replication in BHK-21 cells and suckling mice. *Vet Res Commun.* 2010 Apr;34(4):335-46. Cong W, Cui S, Chen J, Zuo X, Lu Y, Yan W, Zheng Z.
 16. Li S, Zhang R, Song G, Gao M, Liu X, Wang J. Rescue of bovine Asia 1 serotype foot-and-mouth disease virus from a full-length cDNA clone. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2009 Nov;25(11):1621-6.
 17. Xin A, Li H, Li L, Liao D, Yang Y, Zhang N, Chen B. Genome analysis and development of infectious cDNA clone of a virulence-attenuated strain of foot-and-mouth disease virus type Asia 1 from China. *Vet Microbiol.* 2009 Sep 18;138(3-4):273-80.
 18. Bi Y, Shen X, Cong G, Liu X, Chang H, Cai X. Establishment of BHK-21 cell lines stably expressing FMDV 3Dpol gene by retroviral-mediated gene transfer technique. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2008 Aug;48(8):1115-20.
 19. Joyappa DH, Sasi S, Ashok KC, Reddy GR, Suryanarayana VV. The plasmid constructs producing shRNA corresponding to the conserved 3D polymerase of Foot and Mouth Disease virus protects guinea pigs against challenge virus. *Vet Res Commun.* 2009 Mar;33(3):263-71.
 20. Choudary S, Ravikumar P, Ashok Kumar C, Suryanarayana VV, Reddy GR. Enhanced immune response of DNA vaccine (VP1-pCDNA) adsorbed on cationic PLG for foot and mouth disease in guinea pigs. *Virus Genes.* 2008 Aug;37(1):81-7.
 21. Vagnozzi A, Stein DA, Iversen PL, Rieder E. Inhibition of foot-and-mouth disease virus infections in cell cultures with antisense morpholino oligomers. *J Virol.* 2007 Nov;81(21):11669-80.
 22. Liu M, Chen W, Ni Z, Yan W, Fei L, Jiao Y, Zhang J, Du Q, Wei X, Chen J, Liu Y, Zheng Z. Cross-inhibition to heterologous foot-and-mouth disease virus infection induced by RNA interference targeting the conserved regions of viral genome. *Virology.* 2005 May 25;336(1):51-9.

*** FMD vaccine production cell line**

1. Ramírez-Carvajal L, Díaz-San Segundo F, Hickman D, Long CR, Zhu J, Rodríguez LL, de los Santos T. Expression of porcine fusion protein IRF7/3(5D) efficiently controls foot-and-mouth disease virus replication. *J Virol.* 2014 Oct;88(19):11140-53.

2. Nanda RK, Hajam IA, Edao BM, Ramya K, Rajangam M, Chandra Sekar S, Ganesh K, Bhanuprakash V, Kishore S. Immunological evaluation of mannosylated chitosan nanoparticles based foot and mouth disease virus DNA vaccine, pVAC FMDV VP1-OmpA in guinea pigs. *Biologicals*. 2014 May;42(3):153-9.
3. Liang T, Yang D, Liu M, Sun C, Wang F, Wang J, Wang H, Song S, Zhou G, Yu L. Selection and characterization of an acid-resistant mutant of serotype O foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*. 2014 Apr;159(4):657-67.
4. Mignacqui AC, Ruiz V, Perret S, St-Laurent G, Singh Chahal P, Transfiguracion J, Sammarruco A, Gnazzo V, Durocher Y, Wigdorovitz A. Transient gene expression in serum-free suspension-growing mammalian cells for the production of foot-and-mouth disease virus empty capsids. *PLoS One*. 2013 Aug 20;8(8):e72800.
5. Dar PA, Suryanaryana VS, Nagarajan G, Reddy GR, Dechamma HJ, Kondabattula G. DNA prime-protein boost strategy with replicase-based DNA vaccine against foot-and-mouth disease in bovine calves. *Vet Microbiol*. 2013 Apr 12;163(1-2):62-70.
6. Dar PA, Ganesh K, Nagarajan G, Sarika S, Reddy GR, Suryanarayana VV. Sindbis virus replicase-based DNA vaccine construct encoding FMDV-specific multivalent epitope gene: studies on its immune responses in guinea pigs. *Scand J Immunol*. 2012 Oct;76(4):345-53.
7. D'Antuono A, Laimbacher AS, La Torre J, Tribulatti V, Romanutti C, Zamorano P, Quattrocchi V, Schraner EM, Ackermann M, Fraefel C, Mattion N. HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. *Vaccine*. 2010 Oct 28;28(46):7363-72.
8. Choudary S, Ravikumar P, Ashok Kumar C, Suryanarayana VV, Reddy GR. Enhanced immune response of DNA vaccine (VP1-pCDNA) adsorbed on cationic PLG for foot and mouth disease in guinea pigs. *Virus Genes*. 2008 Aug;37(1):81-7.
9. Li Z, Yi Y, Yin X, Zhang Z, Liu J. Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PLoS One*. 2008 May 28;3(5):e2273.
10. Vagnozzi A, Stein DA, Iversen PL, Rieder E. Inhibition of foot-and-mouth disease virus infections in cell cultures with antisense morpholino oligomers. *J Virol*. 2007 Nov;81(21):11669-80.
11. Cheng G, Zhao X, Yan W, Wang W, Zuo X, Huang K, Liu Y, Chen J, Wang J, Cong W, Liu M, Gao H, Chen J, Lu Y, Zheng Z. Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of in vivo immune response. *Vaccine*. 2007 Jul 9;25(28):5199-208.

주 의

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