

11-1543000
-002371-01

발간등록번호
11-1543000-002371-01

이상육 생성을 유발하지 않는 구제역 백신 보좌제 개발 최종보고서

2018

농림축산식품부

가축질병대응기술개발사업 R&D Report

이상육 생성을 유발하지 않는 구제역 백신 보좌제 개발 최종보고서

2018. 10. .

주관연구기관 / (주)코미팜
협동연구기관 / 강원대학교 산학협력단
협동연구기관 / 계명대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “이상육 생성을 유발하지 않는 구제역백신 보좌제 개발” (개발기간 : 2016. 09. 05 ~ 2018. 09. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 10. .

주관연구기관명 : 주식회사 코미팜

문성철



협동연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

남제열



강원대학교 산학협력단

윤경구



주관연구책임자 : 김주헌

협동연구책임자 : 이상길

협동연구책임자 : 오연수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316094-2	해 당 단 계 연 구 기 간	1단계 (2년)	단 계 구 분	1단계/1단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	이상육 생성을 유발하지 않는 구제역백신 보좌제 개발			
연구책임자	김주헌	해당단계 참여연구원 수	총 : 23 명 내부 : 13 명 외부 : 11 명	해당단계 연구개발비	정부 : 343,000 천원 민간 : 115,000 천원 계 : 458,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총 : 23 명 내부 : 13 명 외부 : 11 명	총 연구 개발비	정부 : 343,000 천원 민간 : 115,000 천원 계 : 458,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)코미팜, 중앙연구소			참여기업명 : (주)코미팜	
국제공동연구	상대국명 : 해당 없음			상대국 연구기관명 : 해당 없음	
위탁연구	연구기관명 : 해당 없음			연구책임자 : 해당 없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	2	2									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 신규 나노 백신보좌제 후보물질의 개발
 - Oil과 surfactant의 required HLB값 검증을 통해 Self-emulsifying drug delivery system (이하 SEDDS) 확립
 - SEDDS에 의한 지질기반 나노입자 백신보좌제 후보군 54종 제조 및 특성 확인
 - SEDDS에 의한 지질기반 나노입자 백신보좌제 후보군 54종의 마우스 안전성 평가 및 30종 후보물질 1차 선정
- 지질기반 나노입자 백신보좌제를 이용한 양돈 백신 시제품 제작 및 평가
 - PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae* 항원, 30종의 지질기반 나노입자 백신보좌제 후보군, 상용화 백신보좌제 3종을 이용한 시제품 33종 제조
 - O/W micro-emulsion 30종의 안정성 평가 (particle size 및 zeta potential)
 - *Mycoplasma hyopneumoniae* 항원에 대한 마우스 면역원성 평가 및 백신보좌제의 작용기전 검증
 - *Mycoplasma hyopneumoniae* 항원에 대한 돼지 안전성 및 면역원성 평가와 최종 후보물질 2종 선발
- 지질기반 나노입자 백신보좌제를 이용한 구제역 백신 시제품 제작 및 평가
 - A 포천주 불활화 정제 항원 및 최종 후보물질 2종을 이용한 시제품 제작 및 돼지 면역원성 평가
 - O 진천주 불활화 정제 항원 및 최종 후보물질 2종을 이용한 시제품 제작 및 돼지 면역원성 평가
 - A22 Iraq 불활화 정제 항원 및 최종 후보물질 2종, 개선품 2종을 이용한 시제품 제작, 돼지 안전성 (이상육) 및 면역원성 평가
 - 제품화를 최종 후보물질 1종 선발

보고서 면수

83 쪽

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구의 최종 목표는 이상육 생성을 유발하지 않는 안전한 구제역백신 보좌제를 개발하는 것으로 내용은 아래와 같음 ○ 나노~마이크로 크기의 입자성 백신보좌제 개발과 안전성 및 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 입자성 백신보좌제의 입자도, 표면전하 등과 같은 특성 확인 ○ 상용 백신 보좌제와의 비교 평가를 통해 시제품의 상용화 연구 (안전성, 면역원성, 면역지속성) ○ 상용 구제역 백신과의 비교 평가를 통해 구제역 백신 국산화 가능성 평가 (안전성, 면역원성, 면역지속성) 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새롭고 차별화된 이상육이 생성되지 않는 안전한 백신보좌제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS)을 이용한 백신 제조 공정 확립 - Squalene 및 carbomer 기반 O/W micro-emulsion 제조 기술 확립 (입자도 10~100 nm, Zeta potential >±20 mV, PDI <0.3) - <i>Mycoplasma hyopneumonia</i> 불활화 백신 제조 시, 상용화 면역보좌제 대비 (o/w emulsion) 우수한 면역원성 확인 - FMDV A 포천주 및 O 진천주 불활화 정제항원으로 백신 제조 시, 상용화 면역보좌제 (o/w emulsion) 대비 우수한 면역원성 확인 - FMDV A22 Iraq 불활화 정제항원으로 백신 제조 시, 상용화 면역보좌제 (w/o/w emulsion)와 동등한 면역원성 확인 - 백신 접종 시 접종 부위 이상 반응은 FMDV commercial vaccine, 상용화 면역보좌제 (w/o/w emulsion) 대비 경미함 ○ 이를 통해 다음과 같은 연구개발 성과를 얻음 <ul style="list-style-type: none"> - 특허출원 : 2건 - 논문 : SCI급 1편, 비SCI급 1건 - 학술발표 : 2건 * 기술이전 및 제품화 목표는 종료 1차년도 달성으로 설정되어 있음 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존 백신 항원의 효능을 저하시키지 않으면서 이상육 발생으로 인한 경제적 손실을 막을 수 있는 백신보좌제 후보물질을 개발하여 추후 구제역 백신 국산화를 위한 연구개발에 활용 가능할 것으로 기대됨 ○ 면역원성 및 지속성은 우수하나, 안전성 문제로 제한적으로만 사용되어 왔던 oil emulsion을 다양한 양돈 백신 제품에 확대 적용함으로써, 국산 백신의 효능을 증대시키고 다국적 기업 백신과 경쟁할 수 있는 시장 경쟁력 확보 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	구제역	백신	면역증강제	이상육	나노입자
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Foot and mouth disease	vaccine	adjuvant	granuloma	nano-particle

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	8
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	65
4. 연구결과의 활용 계획 등	69

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적

- 본 연구의 최종 목표는 이상육 생성을 유발하지 않는 안전한 구제역 백신 보좌제를 개발하는 것으로 개발하고자 하는 지질기반 나노입자 백신보좌제는 입자가 작아 주변 조직으로 육아종 형성 없이 흡수되는 특징을 가지고 있다.

제2절 연구개발의 필요성

- 백신 항원 전달체계를 위해 현재 사용 중인 동물용 백신보좌제로는 수산화 알루미늄 겔, 동물 또는 식물 유래의 오일, 미네랄 오일 등이 있으며, 특히 구제역 백신과 같이 강력한 면역원성 및 지속성을 요구하는 경우, water in oil in water (w/o/w) 혹은 water in oil (w/o) emulsion 형태의 백신보좌제를 많이 사용하고 있음.
- 백신의 항원성을 높이기 위해 사용되는 오일 부형제는 접종부위 육아종 등의 이상육을 형성시키고 산업동물의 접종 특징 상 다수 개체에 한꺼번에 접종하는 과정에서 세균감염이 있을 경우 병변이 농양형성으로 이어져 출하 시 경제적 손실을 일으키는 주범으로 작용하고 있음.
- 오일성 보좌제는 항원의 양이 충분하지 않거나 면역반응 지속기간을 늘리기 위해 사용되는데 오일 보좌제의 점도, 유제의 크기 (수백 나노미터에서 수 마이크로 수준의 크기가 일반적)가 일정한 분포도를 유지하는 것이 바람직하며 적당한 사이즈를 가져야 부작용을 줄일 수 있음.
- 지금까지 많은 백신 보좌제의 개발이 시도되고 있지만, 이러한 오일 부형제의 단점을 극복하고 장점을 극대화할 수 있는 새로운 백신 보좌제의 개발은 담보 상태에 있으며, 이를 해결하기 위한 새로운 전략이 필요함

제3절 연구개발 범위

- 이상육 생성을 억제하며 효능 좋은 백신보좌제 개발을 위한 입자시스템 공정 확립
- 백신보좌제 개발을 위한 지질기반 나노입자 독성 및 안전성 평가
- 백신보좌제의 구제역 백신에 대한 항체형성률 증강 확인 실험
- 기존 면역보좌제와의 비교 실험
- 임상시험을 통한 접종부위 안전성 확인 및 항체형성률 지속 기간 확인 실험

제2장 연구수행 내용 및 결과

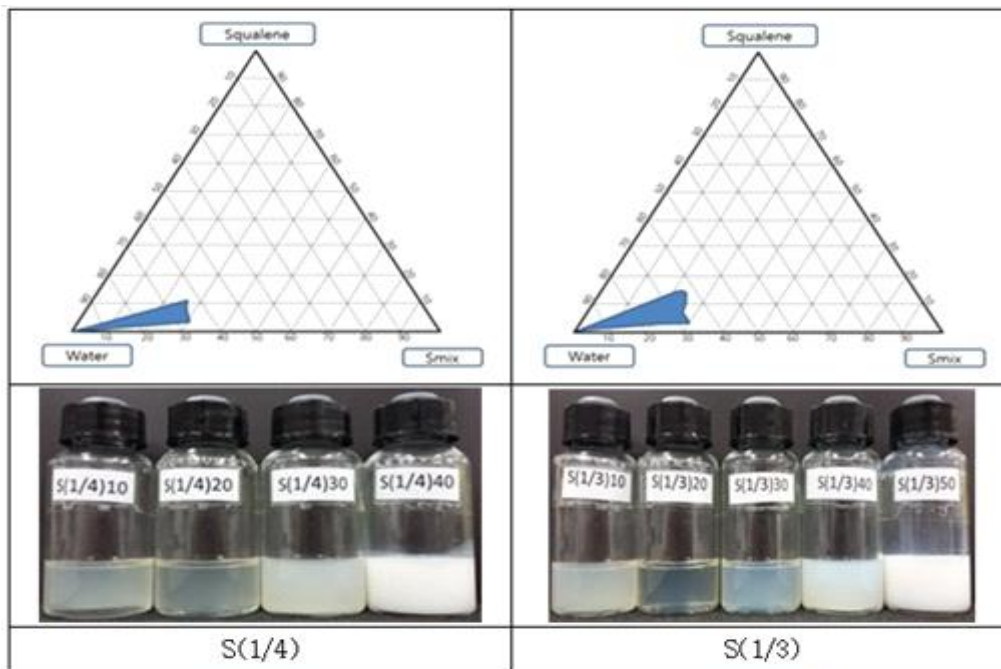
1절 신규 나노 백신보좌제 후보물질의 개발

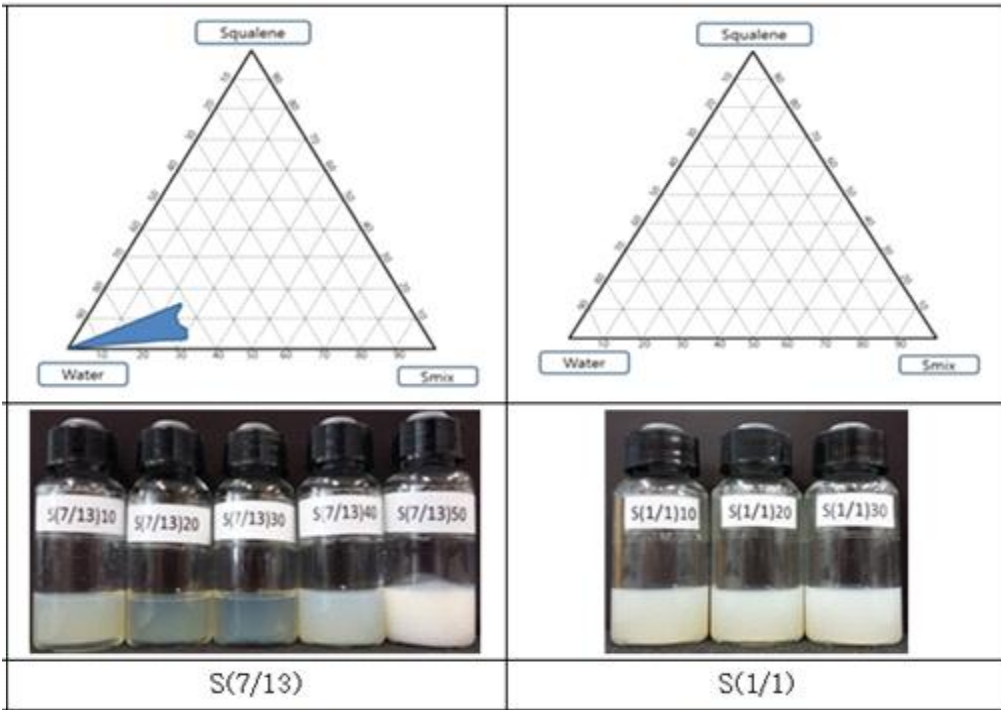
1. 신규 나노 백신보좌제 후보물질의 개발

가. 신규 나노 백신보좌제 설계를 위한 상평형도 작성

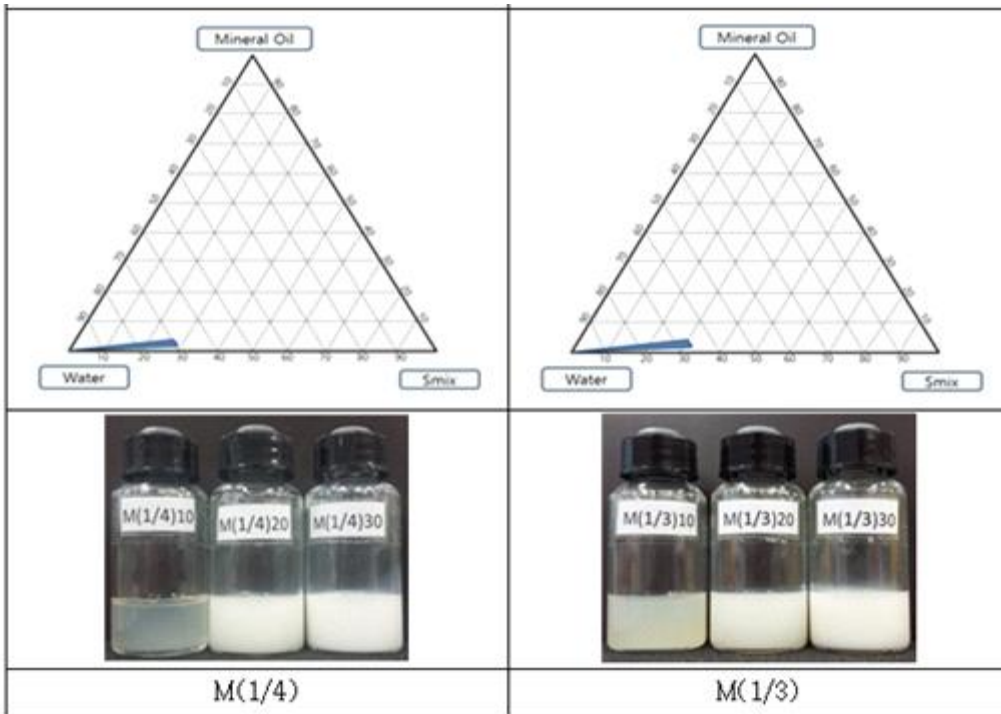
○ 최적의 HLB값 검증

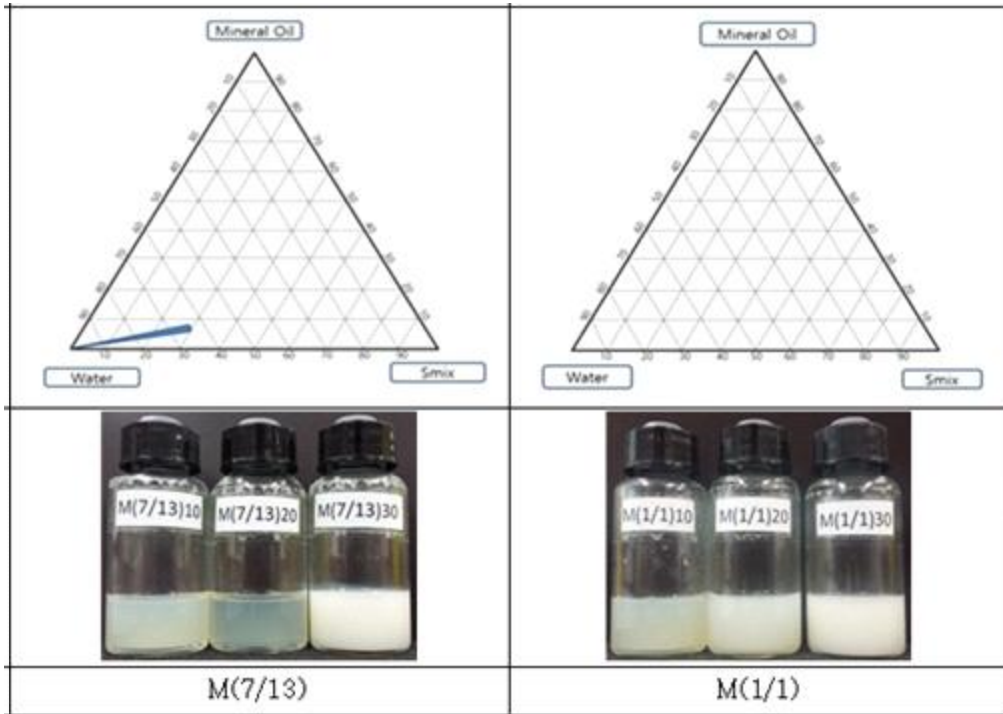
- 두 종류의 오일과 두 종류의 surfactant 혼합물을 사용하였으며, 오일의 required HLB에 맞는 계면활성제 혼합물의 HLB 값을 검증하였음
- Oil로는 Squalene, Mineral Oil을, Surfactant는 Span80/Cremophor ELP혼합물을 사용함.
- Span80/Cremophor ELP는 1:1~4를 사용, Squalene 및 Mineral Oil은 10~90%를 사용함.
- 사용하고자 한 두 오일 (Mineral oil, Squalene)의 required HLB를 확보하고, 이 HLB 값 전 후의 HLB를 갖는 계면활성제 조성을 설정하여 하기 그림 (그림 1, 그림 2) 과 같이 phase diagram을 작성하였고, 자발적인 유화에 의하여 마이크로에멀전을 형성하는 영역을 상평형도 상에 표시하였음.
- 상평형도와 육안관찰을 통해 S(1/4)10~40, S(1/3)10~50, S(7/13)10~50, S(1/1)10~30, M(1/4)10~30, M(1/3)10~30, M(7/13)10~30, M(1/1)10~30 실험군을 나노입자 백신보좌제 후보군으로 설정함.





<그림 1>. Squalene oil을 이용한 마이크로에멀전의 상평형도



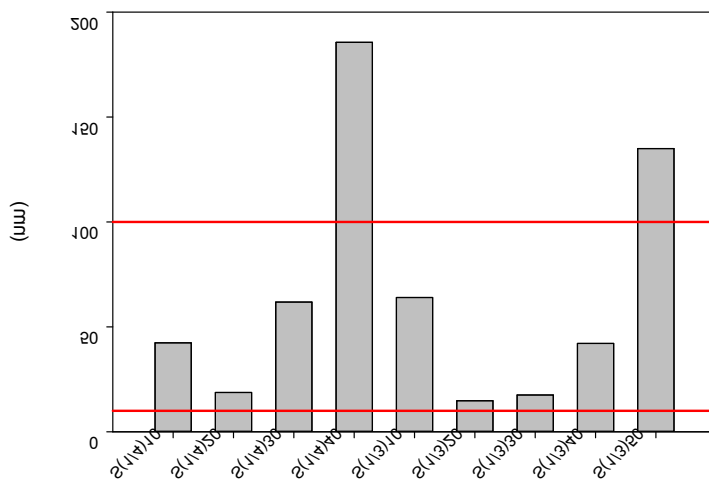


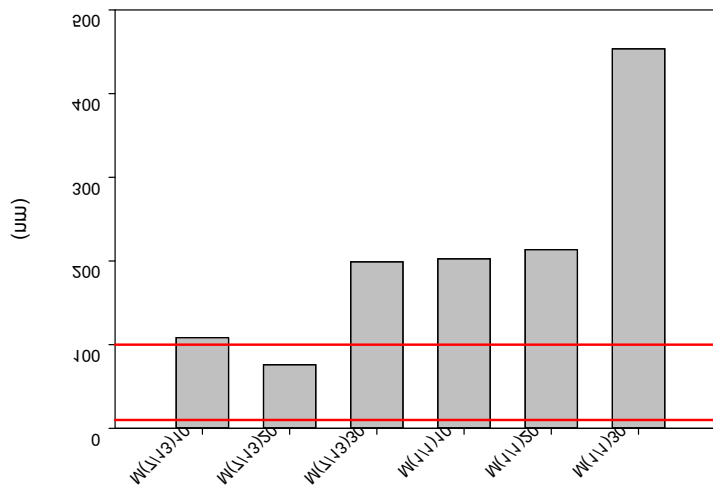
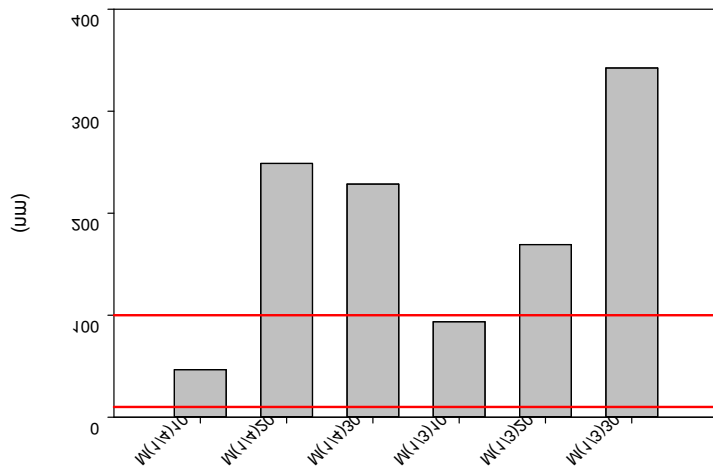
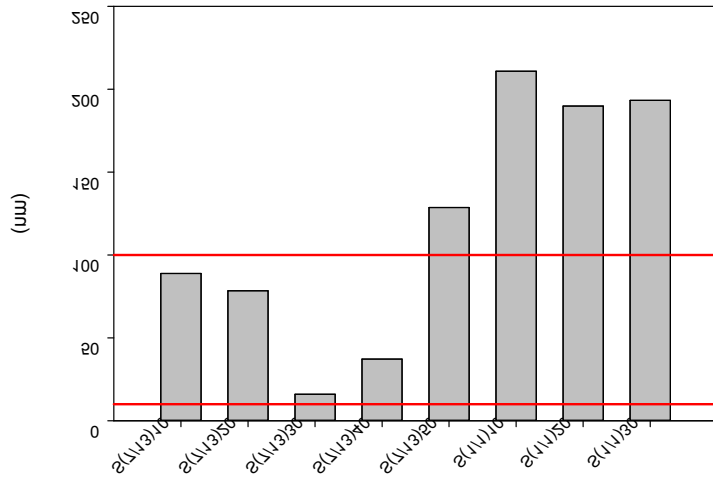
<그림 2>. Mineral oil을 이용한 마이크로에멀전의 상평형도

나. DLS (Dynamic light scattering)와 Zeta potential 측정을 통한 신규 나노 백신보좌제의 특성 평가

○ DLS를 이용한 특성 평가

- 나노입자의 Particle size, PDI를 측정하여 균질한 나노입자의 형성을 확인하고, 주사 가능한 입도의 나노입자 백신보좌제 후보군을 도출함
- 이 때 10~100nm인 나노에멀전과 100~1,000 nm 범위의 마이크로에멀전 제조가 모두 가능하였으며, 입자도 측정결과 모든 실험군에서 주사 가능한 50 μm이하 입도의 백신 보좌제 후보군을 확보함. (그림 3)

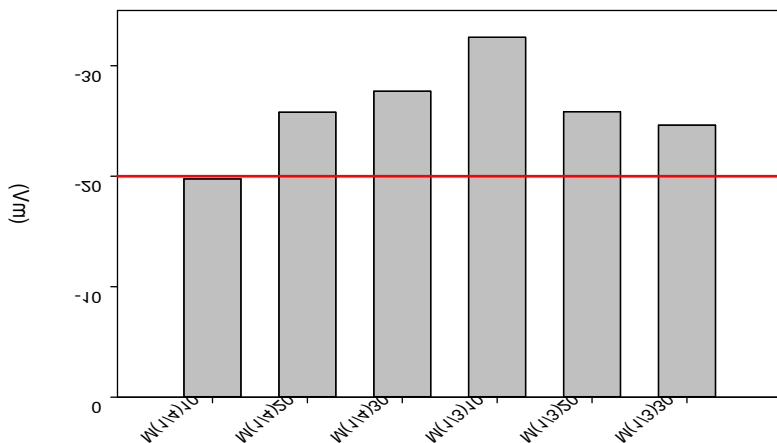
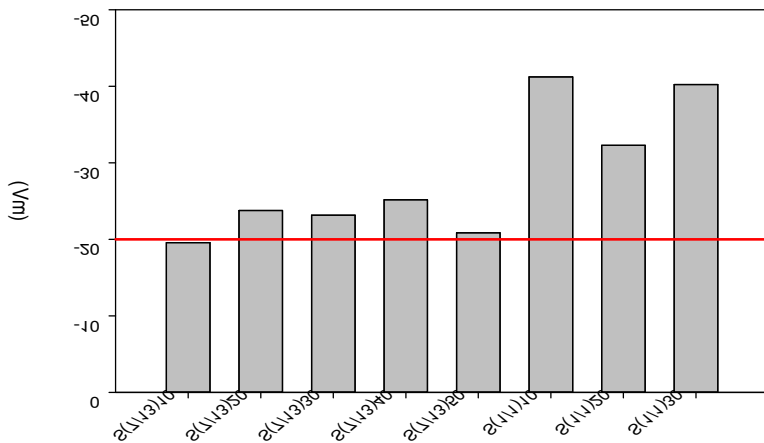
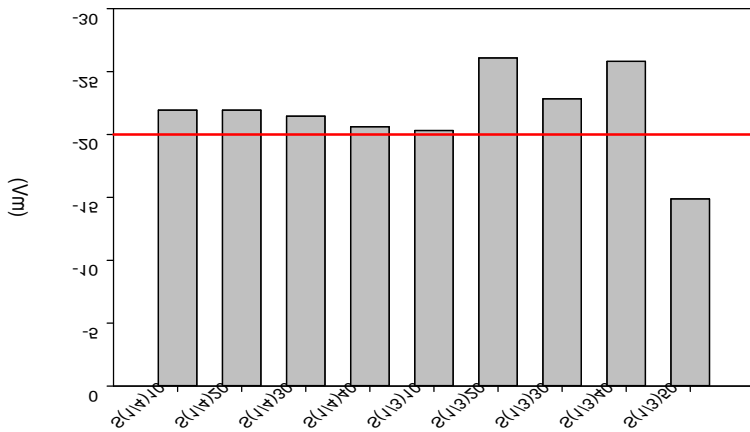


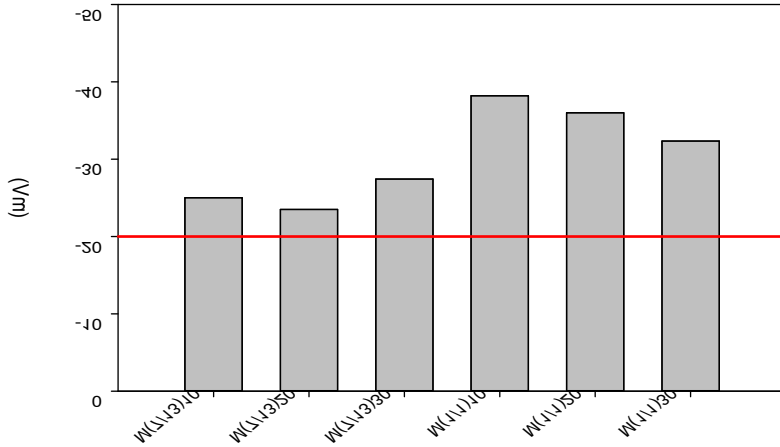


<그림 3>. 나노 및 마이크로에멀전의 입자도 측정결과

○ Zeta potential 측정

- 안정한 나노 백신보좌제 후보군을 도출하기 위한 목적으로 상평형도 작성 후 particle size (10~100nm), PDI(<0.3), Zeta potential(> $\pm 20\text{mV}$)이 나노 백신보좌제의 기준을 충족하는지 확인함.
- 모든 제제의 PDI값은 0.3이하, 제타전위 값의 절대값은 20mV 이상의 값을 나타내어 균일하고 안정한 나노 백신보좌제를 제조할 수 있었음. (그림 4)
- 이후 이 제제들의 보좌제로써의 기능을 더욱 강화하기 위하여 면역증강 고분자로써 Carbomer 2종 (Carbomer 940과 Carbomer 947P)을 다양한 농도로 배합 후, 안전성 평가를 실시하였음.





<그림 4>. 나노 및 마이크로에멀전의 제타전위 측정결과

다. 기업이 생산에 쉽게 활용할 수 있는 신규 나노 백신보좌제의 제조공정 확립

- Homomixer, homogenizer, high pressure homogenizer 를 이용하여 대량생산이 가능한 방법을 제안
 - 자발적으로 유화되는 특성의 시스템이므로 Homomixer, homogenizer, high pressure homogenizer를 이용하여 대량생산이 매우 용이함.
 - 멸균공정 적용이후에도 제제의 물리적 안정성이 확보됨.

2. 지질기반 나노입자 백신보좌제 1차 시험품 제작 및 특성 확인

가. 백신 보좌제의 조성 및 성상

- 1차 시험품 제작
 - Oil 및 surfactant 조성 비율에 따라 지질기반 나노입자 백신보좌제 27종을 시제조 하였음 (그림 5)
 - 후보물질 중 대부분의 경우 Autoclave 이후 변화가 없거나, 층 분리가 되더라도 흔들었을 때 다시 균질화되는 성상을 보임 (그림 6)
 - 일부 후보물질들의 경우, autoclave 이후 점성이 생기거나 (1 (간단히 섞임) ~ 5 (강하게 흔들어야 섞임)), 층 분리가 지속적으로 유지되거나, 섞이지 않는 침전물이 생기기도 하였으며, 이들은 후보물질에서 제외하였음. (그림 6, 7)

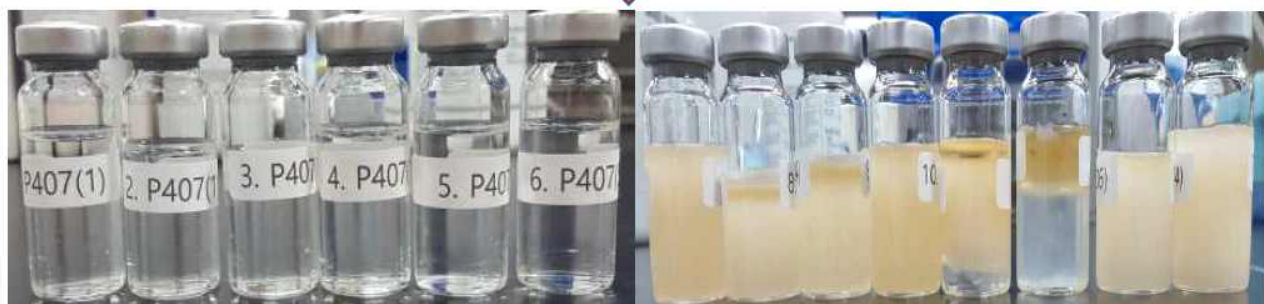
No	Adjuvant	pH	Autoclave 후
1	P407(1)	6.67	변화 없음
2	P407(1)(0.06)	6.26	변화 없음
3	P407(1)(0.04)	6.24	변화 없음
4	P407(1)(0.02)	6.37	투명한 물질 약간 분리
5	P407(3)	6.72	투명한 물질 약간 분리
6	P407(5)	6.77	투명한 물질 총 분리(흔들어도 잘 안 풀림)-4°C 보관후 풀림
7	M(7/13)20	6.68	점성 1
8	M(7/13)20(0.06)	6.19	점성 2-3
9	M(7/13)20(0.04)	6.16	점성 2-3
10	M(7/13)20(0.02)	6.39	점성 1
11	M(7/13)10	6.68	점성 2
12	M(1/3)10	6.70	점성 5
13	S(7/13)20(0.06)	5.84	점성 1
14	S(7/13)20(0.04)	6.43	점성 1
15	P188(1)	6.50	변화 없음
16	P188(3)	6.55	변화 없음
17	P188(5)	6.53	변화 없음
18	Gelucire 44/14 2%	-	투명한 물질 약간 분리
19	Gelucire 44/14 6%	-	투명한 물질 총 분리(흔들어도 잘 안 풀림)-4°C 보관후 풀림
20	Gelucire 44/14 10%	-	투명한 물질 총 분리(흔들어도 잘 안 풀림)-4°C 보관 해도 안풀림
21	Gelucire 50/13 2%	-	조금 탁한 물질 약간 분리
22	G44/14 2% + Carbomer 0.02%	-	침전물 약간, 잘 풀림
23	G44/14 2% + Carbomer 0.04%	-	침전물 약간, 잘 풀림
24	G44/14 2% + Carbomer 0.06%	-	침전물 약간, 잘 풀림
25	G50/13 2% + Carbomer 0.02%	-	침전물 약간, 섞어도 덩어리 양상 조금 남음
26	G50/13 2% + Carbomer 0.04%	-	변화 없음
27	G50/13 2% + Carbomer 0.06%	-	변화 없음
28	PBS	-	-

<그림 5>. 나노입자 백신보좌제 27종을 시제조 결과

Autoclave 이전



Autoclave 이후



Autoclave 이전



Autoclave 이후



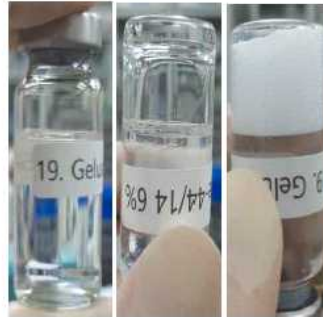
<그림 6>. Autoclave 전 후 성상 변화

층 분리 후 섞이지 않은 양상

No. 6



No. 19



No. 20



섞이지 않는 침전물

No. 25



<그림 7>. 특이 성상 그룹

나. 백신 보좌제의 실험동물 (마우스) 안전성

○ 복강 접종 후 임상증상 및 폐사 확인

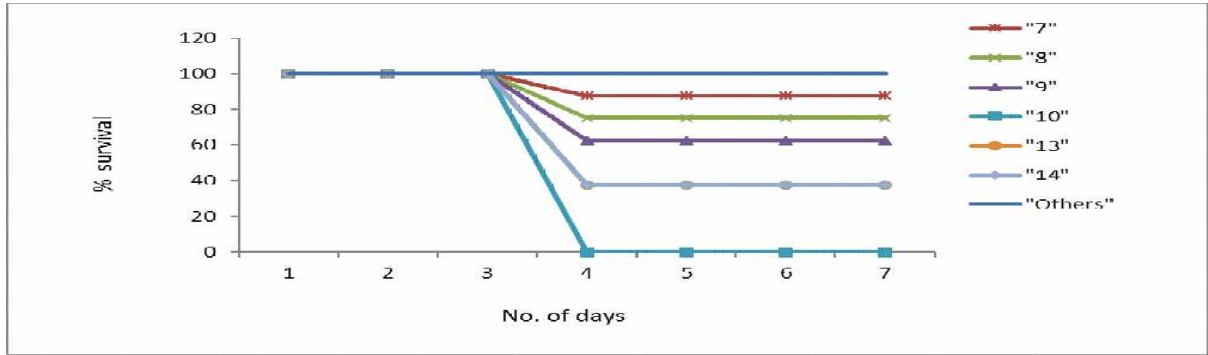
- 3주령의 암컷 Balb/c 마우스 280마리를 준비하여 그룹 당 10마리씩 배정하고, 각 그룹별로 8마리에 대해서는 시제품 0.5 ml씩을 복강으로 1회 접종하여 임상증상 (피모 및 활력상태) 및 폐사 유무를 확인하고, 나머지 2마리에 대해서는 0.1 ml씩을 근육으로 접종하여 접종 부위 이상육 생성 유무를 확인하였음
- 15~20g의 암컷 BALB/c mouse에 대한 후보 물질 복강 접종 이후 1주일 간 활력 및 피모상태, 폐사 여부를 확인한 결과는 그림8과 같으며, 접종 후 1일차에 폐사가 관찰되지 않아 접종으로 인한 쇼크사는 발생하지 않은 것으로 확인됨.
- 접종 4일차에 폐사가 관찰된 6종의 물질과 함께, 20번 물질의 경우 폐사가 발생하지는 않았지만 피모가 거칠어진 소견을 나타내었고, 보좌제로 부적합한 성상을 가지므로 후보에서 제외함. 그 외의 후보물질들은 모두 안전성을 가지는 것으로 확인 됨

Mouse 안전시험 평가

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2017.02.24	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	거침	거침	거침	-	-	거침	거침
2017.02.25	폐사두수														
	피모상태														
2017.02.26	폐사두수														
	피모상태														
2017.02.27	폐사두수	0	0	0	0	0	0	1	2	3	8	0	0	5	5
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2017.02.28	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2017.03.01	폐사두수														
	피모상태														
2017.03.02	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*20번 : 총 분리 후 섞이지 않음

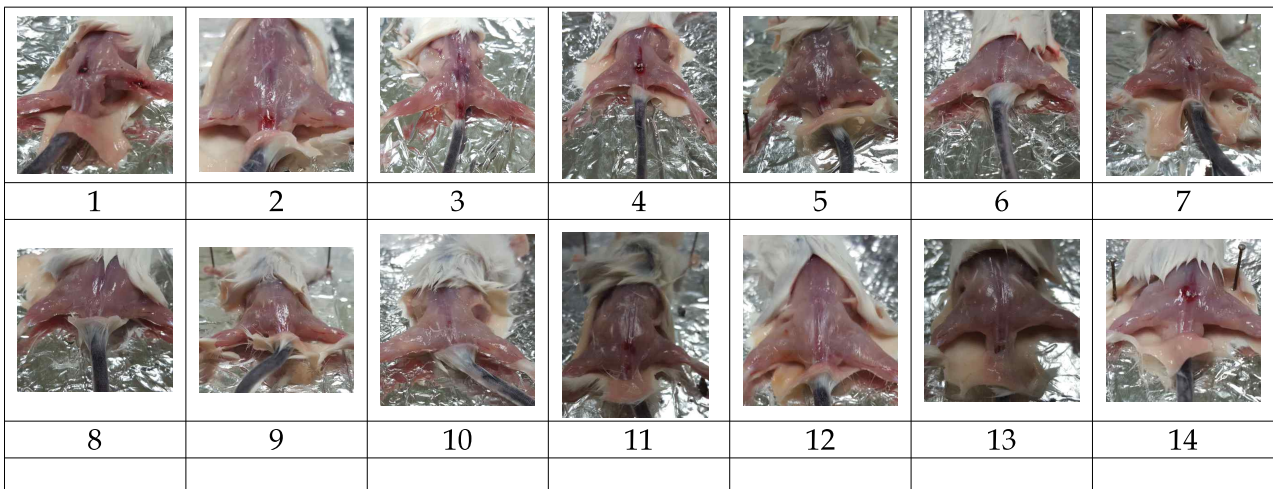
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
2017.02.24	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	거침	-	-	-	-	-	-	-	-
2017.02.25	폐사두수														
	피모상태														
2017.02.26	폐사두수														
	피모상태														
2017.02.27	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2017.02.28	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2017.03.01	폐사두수														
	피모상태														
2017.03.02	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

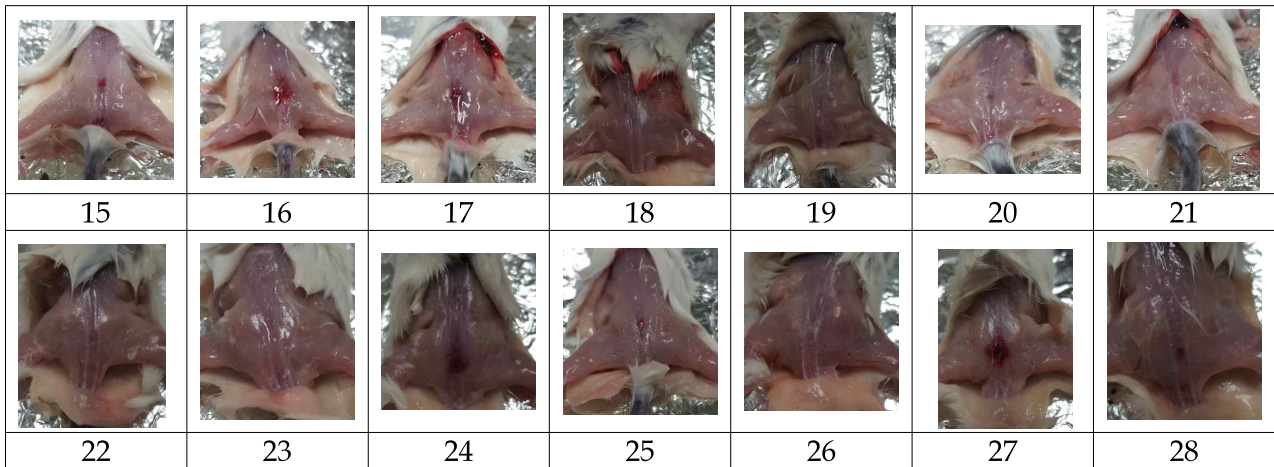


<그림 8>. 나노입자 백신보좌제 27종의 마우스 안전시험 결과 (임상증상 및 폐사율)

○ 근육 접종 후 이상육 형성 확인

- 나노입자 백신보좌제 후보물질들의 마우스 근육 내 접종 1주 후 부검을 통한 접종 부 육안 병변 확인을 실시하였고, 육안 상으로는 특별한 병변이 관찰되지 않았다. (그림 9)





<그림 9>. 나노입자 백신보좌제 27종의 마우스 안전시험 결과 (이상육)

3. 지질기반 나노입자 백신보좌제 2차 시험품 제작 및 특성

가. 백신 보좌제의 조성 및 성상

○ 2차 시험품 제작

- Carbomer의 종류와 농도에 따라 지질기반 나노입자 백신보좌제 신규 27종을 시제조 하였음 (그림 10)
- 후보물질 모두 Autoclave 이후 층 분리 없이 안정한 성상을 나타냄 층
- 일부 후보물질들의 경우, autoclave 이후 Gel 뭉침 현상이 있었고, 이들 그룹들은 마우스 안전시험 결과와 별개로 최종 후보군에서 제외하였다.

Adjuvant 성상 확인

No	Adjuvant	pH	Autoclave 후
1	S30, 3%(0.01%, C971P)	6.17	충분리X, 이물질X, 점성 약함
2	S30, 5%(0.01%, C971P)	6.23	충분리X, 이물질X, 점성 약함
3	S30, 10%(0.01%, C971P)	5.96	충분리X, 이물질 심함(병밀에 Gel이 용쳐 덩어리짐), 점성 약함
4	S30, 3%(0.02%, C971P)	5.79	충분리X, 이물질 보임(1cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
5	S30, 5%(0.02%, C971P)	5.98	충분리X, 이물질 보임(3cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
6	S30, 10%(0.02%, C971P)	6.24	충분리X, 이물질 보임(3cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약간 강함
7	S30, 3%(0.01%, C940)	6.53	충분리X, 이물질X, 점성 약함
8	S30, 5%(0.01%, C940)	6.56	충분리X, 이물질X, 점성 약함
9	S30, 10%(0.01%, C940)	6.46	충분리X, 이물질 보임(1cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약간 강함
10	S30, 3%(0.02%, C940)	6.37	충분리X, 이물질X, 점성 약함
11	S30, 5%(0.02%, C940)	6.23	충분리X, 이물질X, 점성 약함
12	S30, 10%(0.02%, C940)	6.40	충분리X, 이물질 심함(병밀에 Gel이 용쳐 덩어리짐), 점성 약함
13	S30, 3%S9	6.63	충분리X, 이물질X, 점성 약함
14	M20, 7%(0.01%, C971P)	6.48	충분리X, 이물질 심함(병밀에 Gel이 용쳐 덩어리짐), 점성 약함
15	M20, 5%(0.01%, C971P)	6.38	충분리X, 이물질 보임(0.5cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
16	M20, 3%(0.01%, C971P)	6.46	충분리X, 이물질X, 점성 약함
17	M20, 7%(0.02%, C971P)	6.46	충분리X, 이물질 심함(병밀에 Gel이 용쳐 덩어리짐), 점성 약함
18	M20, 5%(0.02%, C971P)	6.40	충분리X, 이물질 보임(1cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
19	M20, 3%(0.02%, C971P)	7.20	충분리X, 이물질 보임(1cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
20	M20, 7%(0.01%, C940)	6.54	충분리X, 이물질 보임(0.5cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약간 강함
21	M20, 5%(0.01%, C940)	6.51	충분리X, 이물질 심함(병밀에 Gel이 용쳐 덩어리짐), 점성 약함
22	M20, 3%(0.01%, C940)	6.70	충분리X, 이물질X, 점성 약함
23	M20, 7%(0.02%, C940)	6.40	충분리X, 이물질 심함(병밀에 Gel이 용쳐 덩어리짐), 점성 약함
24	M20, 5%(0.02%, C940)	6.24	충분리X, 이물질 보임(0.5cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
25	M20, 3%(0.02%, C940)	6.16	충분리X, 이물질X, 점성 약함
26	S30, 5%S9	6.53	충분리X, 이물질 보임(1cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
27	S30, 10%S9	6.32	충분리X, 이물질 보임(1cm정도의 Gel이 용액에 떠있고, 뭉침현상X), 점성 약함
28	PBS	-	-

<그림 10>. 나노입자 백신보좌제 27종을 시제조 결과



S30, 3%(0.01%, C971P), PH6.17 S30, 5%(0.01%, C971P), PH6.23 S30, 10% (0.01%, C971P), PH5.96 S30, 3%(0.02%, C971P), PH5.79 S30, 5%(0.02%, C971P), PH5.98



S30, 10% (0.02%, C971P), PH6.24 S30, 3%(0.01%, C940), PH6.53 S30, 5%(0.01%, C940), PH6.56 S30, 10%(0.01%, C940), PH6.46 S30, 3%(0.02%, C940), PH6.37



S30, 5%(0.02%, C940), PH6.23 S30, 10%(0.02%, C940), PH6.40 S30, 3%S9, PH6.63 M20, 7%(0.01%, C971P), PH6.48 M20, 5%(0.01%, C971P), PH6.38



M20, 3%(0.01%, C971P), PH6.46 M20, 7%(0.02%, C971P), PH6.46 M20, 5%(0.02%, C971P), PH6.40 M20, 3%(0.02%, C971P), PH7.20 M20, 7%(0.01%, C940), PH6.54



M20, 5%(0.01%, C940), PH6.51 M20, 3%(0.01%, C940), PH6.70 M20, 7%(0.02%, C940), PH6.40 M20, 5%(0.02%, C940), PH6.24 M20, 3%(0.02%, C940), PH6.16



S30, 5%S9, PH6.53 S30, 10%S9, PH6.32

<그림 11>. Autoclave 이후 성상 변화

나. 백신 보좌제의 실험동물 (마우스) 안전성

○ 복강 접종 후 임상증상 및 폐사 확인

- 3주령의 암컷 Balb/c 마우스 280마리를 준비하여 그룹 당 10마리씩 배정하고, 각 그룹별로 8마리에 대해서는 시제품 0.5 ml씩을 복강으로 1회 접종하여 임상증상 (피모 및 활력상태) 및 폐사 유무를 확인하고, 나머지 2마리에 대해서는 0.1 ml씩을 근육으로 접종하여 접종 부위 이상육 생성 유무를 확인하였음
- 15~20g의 암컷 BALB/c mouse에 대한 후보 물질 복강 접종 이후 1주일 간 활력 및 피모상태, 폐사 여부를 확인한 결과는 그림12와 같으며, 접종 후 1일차에 폐사가 관찰되지 않아 접종으로 인한 쇼크사는 발생하지 않은 것으로 확인됨.
- 접종 5일차에 폐사가 관찰된 6종은 후보에서 제외하였고, 그 외의 후보물질들은 모두 안전성을 가지는 것으로 확인 됨

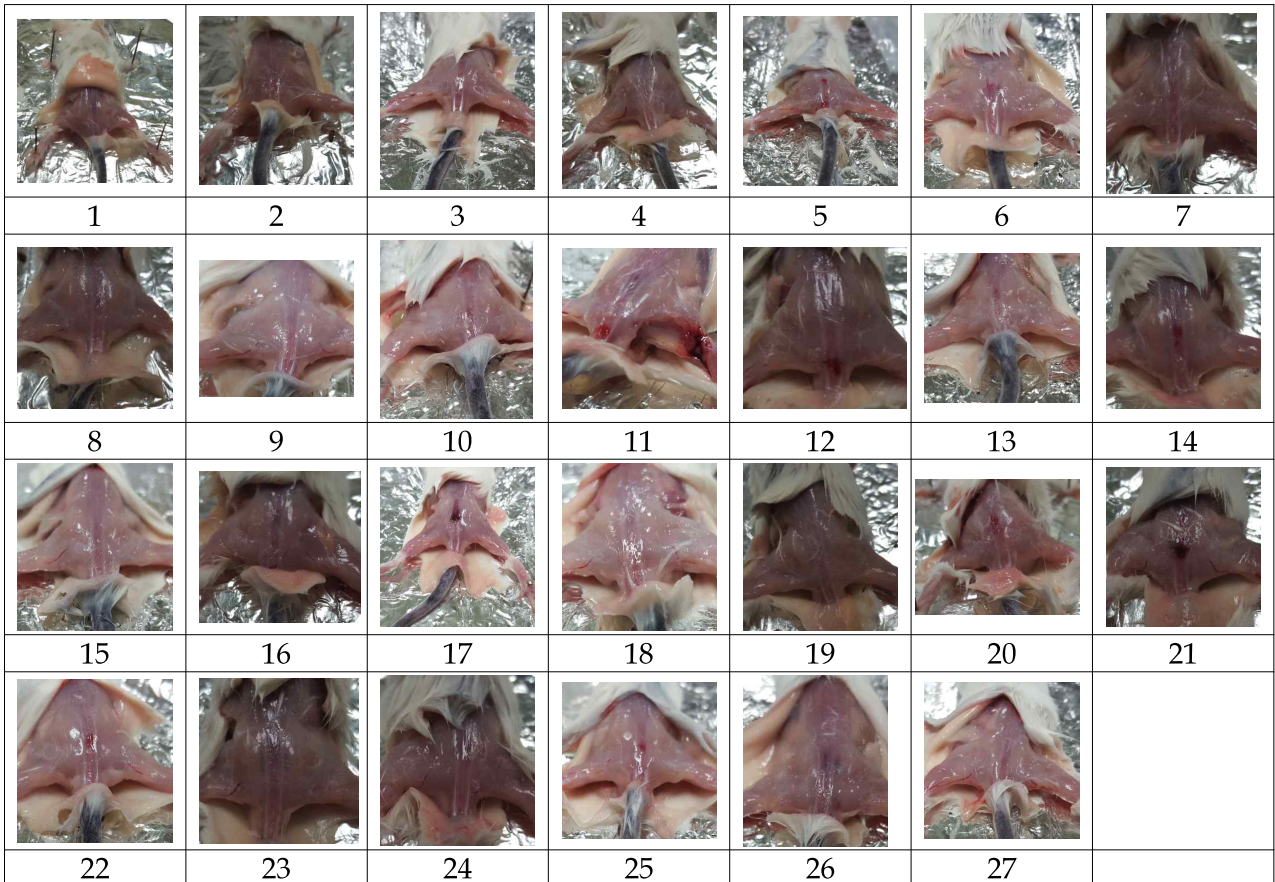
Mouse 안전시험 평가

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1일차	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	거침	-	거침	거침	-	-	거침	-	-	거침	-	거침	거침	-	거침	거침	-	거침	-	-	-	-	-	-	-	거침
2일차	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	거침	-	-	거침	-	-	거침	-	-	거침	-	거침	거침	-	거침	거침	-	거침	-	-	거침	-	-	-	-	거침
3일차	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	거침	-	-	거침	-	거침	거침	-	거침	거침	-	거침	-	-	거침	-	-	-	-	-
4일차	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	거침	-	거침	거침	-	-	거침	-	거침	-	-	거침	-	-	-	-	-
5일차	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	3	0	0	1	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6일차	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7일차	폐사두수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	피모상태	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

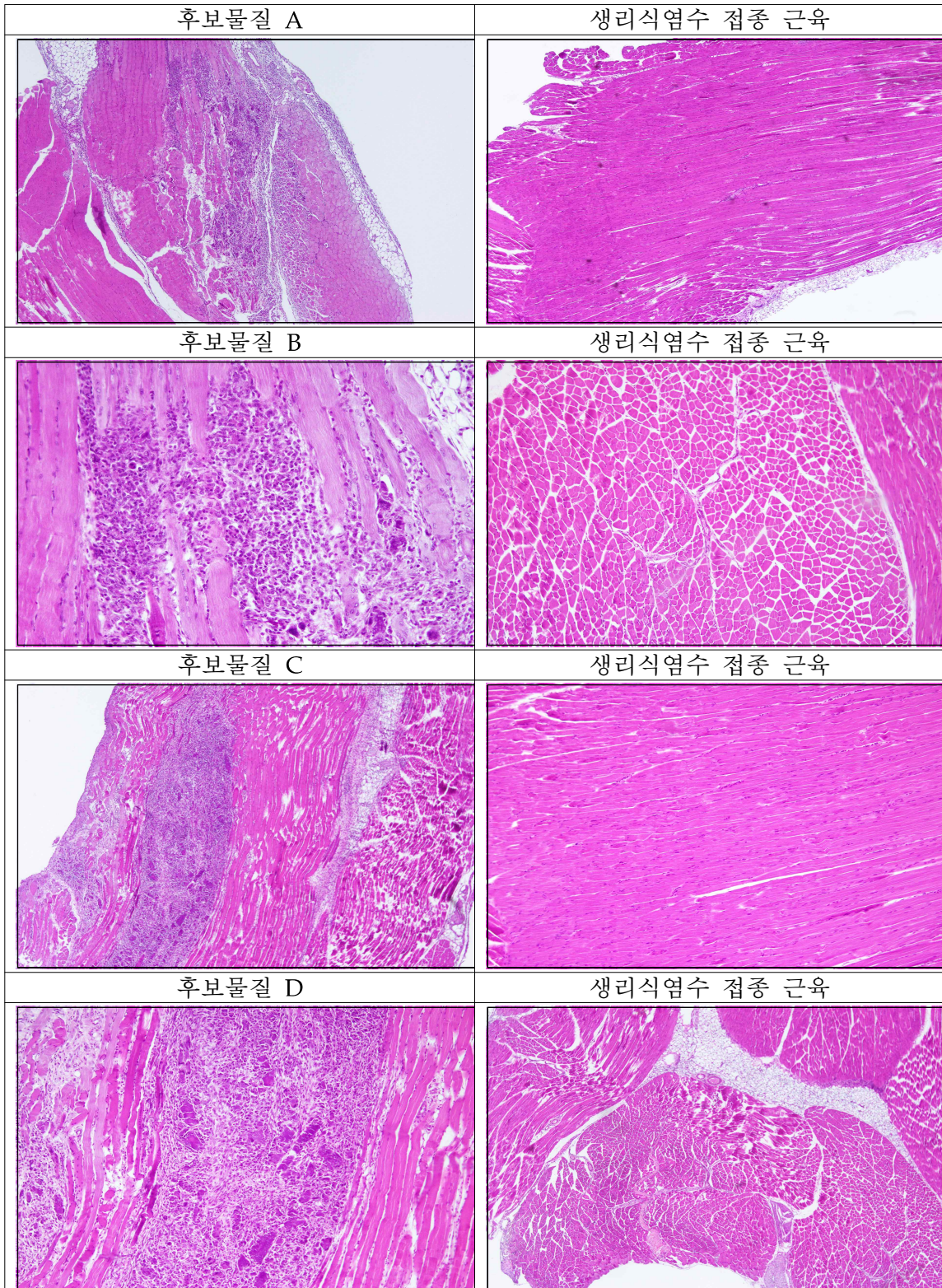
<그림 12>. 나노입자 백신보좌제 27종의 마우스 안전시험 결과 (임상증상 및 폐사율)

○ 근육 접종 후 이상육 형성 확인

- 나노입자 백신보좌제 후보물질들의 마우스 근육 내 접종 1주 후 부검을 통한 접종 부 육안 병변 확인을 실시하였고, 육안 상으로는 특별한 병변이 관찰되지 않음.
- 백신보좌제 접종 그룹 중 일부 그룹에 대해서 병리조직학적 검사를 함께 수행하였으며, 그 결과, 백신보좌제 후보물질을 접종한 근육에서는 단핵구 중심의 면역세포가 근육 내로 모여드는 모습이 관찰되었고, 이러한 경미한 염증반응을 통해 백신의 항원을 보다 효과적으로 전달할 수 있으리라 예상된다. 근육 내 항원전달기능을 가진 단핵구가 모여드는 것 외에 과도한 혈관반응이나 출혈, 염증의 부작용으로 볼 수 있는 섬유화 등의 소견은 관찰되지 않았다. (그림 13, 14)



<그림 13>. 나노입자 백신보좌제 27종의 마우스 안전시험 결과 (이상육)



<그림 14>. 나노입자 백신보좌제 접종 시 조직학적 병변

4. 지질기반 나노입자 백신보좌제의 대량생산을 위한 공정 연구

가. 자가유화능을 지닌 신규 백신 보좌제의 제조공정 수립

○ 자가유화 약물전달시스템의 특징

- 자가유화약물전달시스템은 오일, 비이온성 계면활성화제의 균질 혼합액으로서 오일에 대한 적절한 용해도를 지니는 지용성 약물의 혼합액을 수상에 노출시켰을 때 가벼운 교반에 의해 o/w emulsion을 형성시킨다.
- 자가유화약물전달시스템의 특성은 1)미세입자(<5 μ m)의 에멀전을 형성시키는 혼합물의 자가유화능 2)수상으로 빠르게 약물을 방출시키는 오일방울의 극성에 의존한다.
- 생성된 에멀전의 안정성은 1)분산된 오일상의 용적이 작을 때 2)입도분포가 좁을 때 증가하는 것으로 알려져 있다. 이 혼합물은 만일 분산을 선호하는 entropy변화가 분산의 표면적을 증진시키는데 필요한 에너지보다 더 크다면 자발적으로 유화되는 것으로 알려져 있다.
- 또한 오일의 성질, 계면활성화제의 type이나 농도에 의해 자가유화 정도가 달라진다.
- 자가유화약물전달시스템에 의해 형성된 에멀전은 많은 양의 계면활성화제와 물, 오일이 혼합된 투명하며 열역학적으로 안정함과 동시에 자발적으로 생성되는 시스템을 일컬으며, 자유에너지 ΔG 로 이 시스템의 안정성을 표현한다.

$$\Delta G = \lambda A - T\Delta S$$

(ΔG : free energy of emulsification, λ : interfacial tension, A : interfacial area, T : temperature, ΔS : entropy of mixing)

○ 자가유화 약물전달시스템을 이용한 보좌제의 제조공정

- 자가유화약물전달시스템은 상기의 내용에서 알 수 있듯이 자발적으로 유화가 되는 시스템이다. 따라서 교반기, 유화기 또는 온도상승을 위한 장치가 별도로 필요하지는 않는다.
- 비이커 등 필요한 기자재를 autoclave 시켜 준비시킨다.
- 우선 오일(미네랄 오일 또는 스쿠알렌 오일)상을 따로 준비하고 여기에 계면활성제를 첨가시킨 뒤 autoclave 시키다.
- 수상을 따로 준비한다. 수상은 항원을 의미하며, 최종 제형에 함유되는 항원의 농도나 양을 고려하여 농축된 항원 수용액을 준비한다. 수상은 무균 공정으로 제조되어 있는 것을 사용한다.
- 무균시설에서 수상에 오일상을 첨가하고 100 rpm 정도의 낮은 rpm을 이용하여 교반하면 최종 자가유화약물전달시스템이 적용된 보좌제를 제조할 수 있다.

2절 지질기반 나노입자 백신보좌제를 이용한 양돈 백신 시제품 제작 및 평가

1. PCV2+*Mycoplasma* 백신 시제품 제작

가. 시제품의 제작

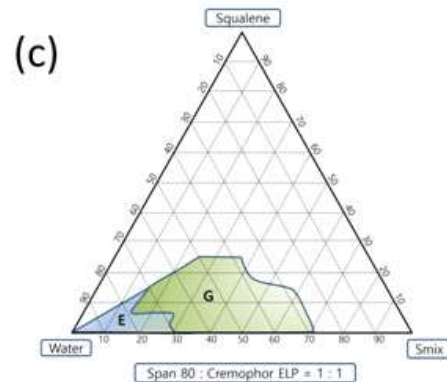
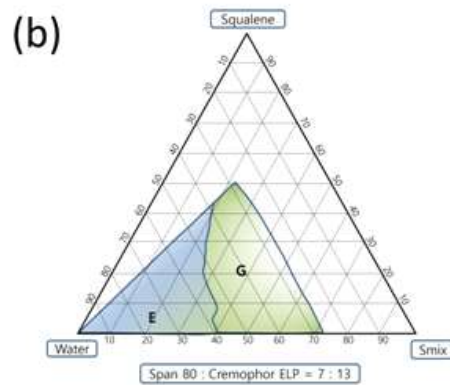
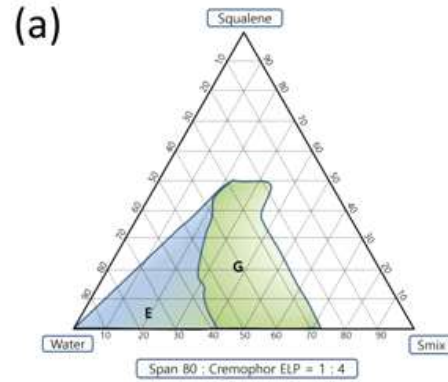
지질기반 나노입자 백신보좌제 조성을 결정하기 위하여 2회에 걸쳐 총 54종의 시제품을 제조하였으며, 이들의 물리화학적 성상 (autoclave 후 성상 변화 등), 실험동물 안전성 평가를 실시하였고, 그 결과 총 30종의 후보군을 선정하였다. 이들 후보군에 대해서는 실제 백신 항원을 포함하는 백신 시제품을 각각 제조하였으며, 백신 시제품에 대한 물리화학적 성상 (성상, pH, particle size, zeta potential), 실험동물 안전성, 그리고 실험동물 면역원성을 평가하였다.

(1) 실험재료

- PCV2 ORF2 antigen (코미팜 제조)
- *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (코미팜 제조)
- Squalene (오일)
- Mineral oil (오일)
- Span 80 (계면활성제)
- Cremophor ELP (계면활성제)
- Carbopol 971P NF (Carbomer)
- Carbopol 940C (Carbomer)

(2) 백신 제조 방법

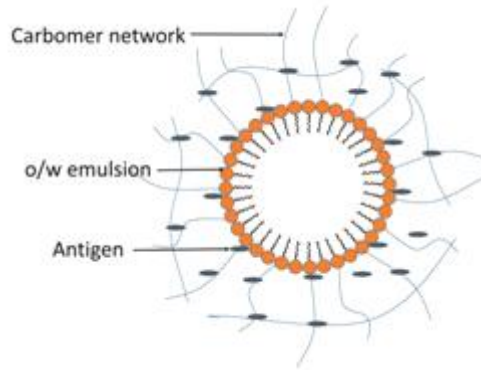
- 두 종류의 오일과 두 종류의 surfactant 혼합물을 사용하였으며, 오일의 required HLB에 맞는 계면활성제 혼합물의 HLB 값을 검증 후 Span80/Cremophor의 ratio가 7:13이 되도록 최종 비율을 결정하고, self-emulsification이 되는 영역에 포함되도록 나노입자 백신 보좌제를 제조하였다. (그림 15, b의 E area)
(Span80/Cremophor의 ratio가 1:4 혹은 1:1일 경우에도 self-emulsification이 되는 나노입자 백신 보좌제 제조 가능)
- 백신 제조를 위해 PCV2 및 *Mycoplasma* 항원과 adjuvant를 1:1의 비율로 (v/v%) 혼합하였다.



<그림 15>. Efficient self-emulsification area

(3) 시제품 제작 결과

- Squalene oil과 Mineral oil을 기반으로 carbomer 2종이 농도별로 포함된 30종의 시제품을 제조하였으며, (Table 1, 2, 3) 각각의 오일의 농도는 3%, 5%, 7%(10%)를 사용하였고, carbomer의 경우 C-971P NF와 C-940을 각각 0.01% 혹은 0.02% 포함되도록 하였다. 백신 제조 결과, 최종 백신의 조성의 O/W emulsion의 형태가 되며, (그림 16) 대조그룹으로 상용화 adjuvant 3종을 백신 시제조에 함께 사용하였다. (Emulsigen-D : O/W emulsion, Alum, ISA201 : W/O/W emulsion)



<그림 16> SEDDS에 의한 micro-emulsion 형성 (O/W emulsion)

Table 1. Results of self-emulsification study

Code	Percentage composition of SEDDS		Solutions used for self-emulsification test	Visual grade
	Smix	Squalene		
SQ1-SQ3	70%	30%	Water	A
MO1-MO3	80%	20%		B
SQ4-SQ6	70%	30%	C-971P NF solution (0.01% w/v)	B
MO4-MO6	80%	20%		B
SQ7-SQ9	70%	30%	C-971P NF solution (0.02% w/v)	B
MO7-MO9	80%	20%		B
SQ10-SQ12	70%	30%	C-940 solution (0.01% w/v)	B
MO10-MO12	80%	20%		B
SQ13-SQ15	70%	30%	C-940 solution (0.02% w/v)	B
MO13-MO15	80%	20%		B

Table 2. Composition of squalene emulsions

Ingredients (g)	SQ1	SQ2	SQ3	SQ4	SQ5	SQ6	SQ7	SQ8	SQ9	SQ10	SQ11	SQ12	SQ13	SQ14	SQ15
Span 80	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17
Cremophor ELP	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17
Squalene	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7
Water	90	83.33	66.67												
C-971P NF solution (0.01% w/v)				90	83.33	66.67									
C-971P NF solution (0.02% w/v)							90	83.33	66.67						
C-940 solution (0.01% w/v)										90	83.33	66.67			
C-940 solution (0.02% w/v)													90	83.33	66.67
Total (g)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

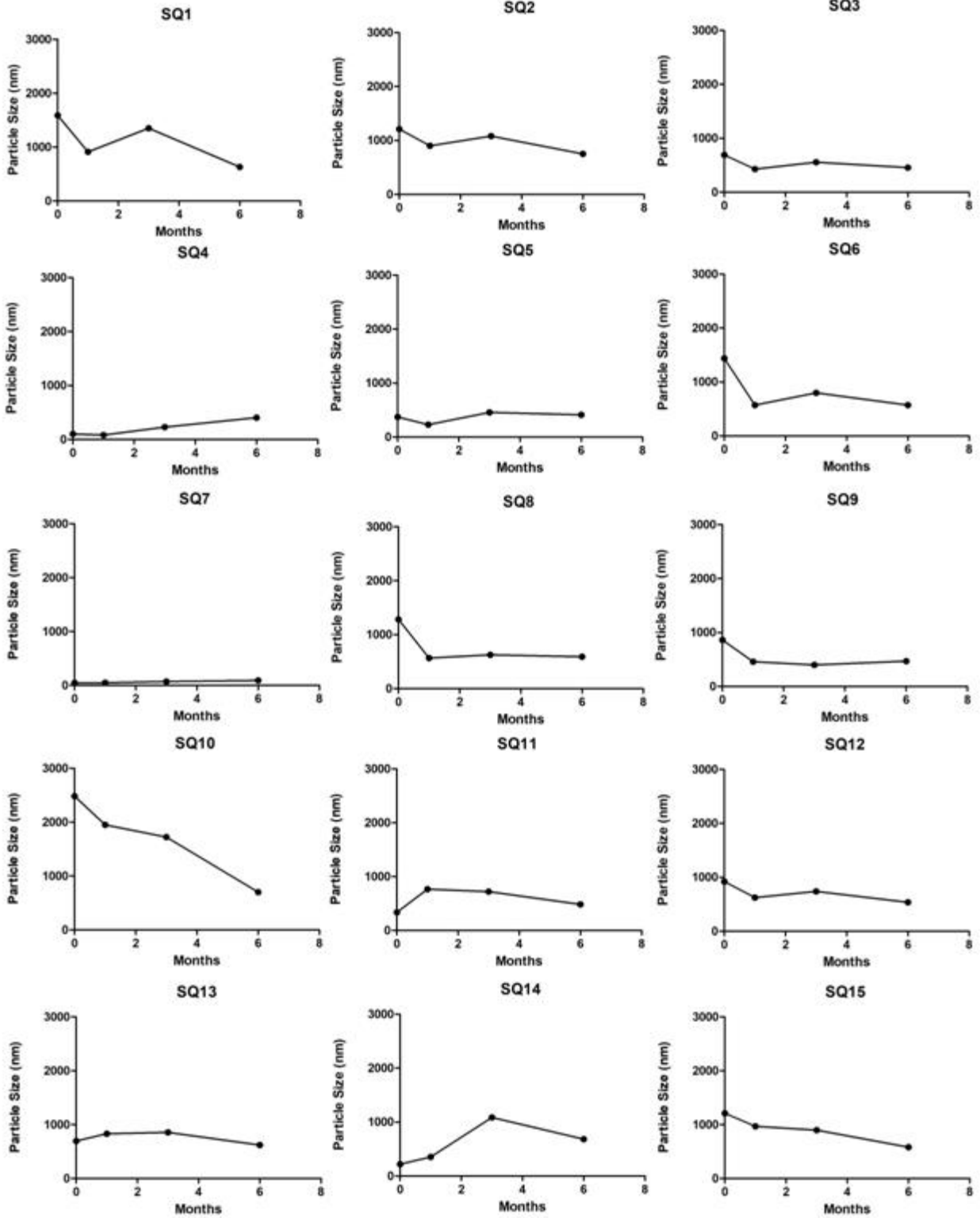
Table 3. Composition of mineral oil emulsions

Ingredients (g)	MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8	MO9	MO10	MO11	MO12	MO13	MO14	MO15
Span 80	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17	2.45	4.08	8.17
Cremophor ELP	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17	4.55	7.58	15.17
Mineral oil	3	5	10	3	5	10	3	5	10	3	5	10	3	5	10
Water	90	83.33	66.67												
C-971P NF solution (0.01% w/v)				90	83.33	66.67									
C-971P NF solution (0.02% w/v)							90	83.33	66.67						
C-940 solution (0.01% w/v)										90	83.33	66.67			
C-940 solution (0.02% w/v)													90	83.33	66.67
Total (g)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

나. 시제품의 특성 확인

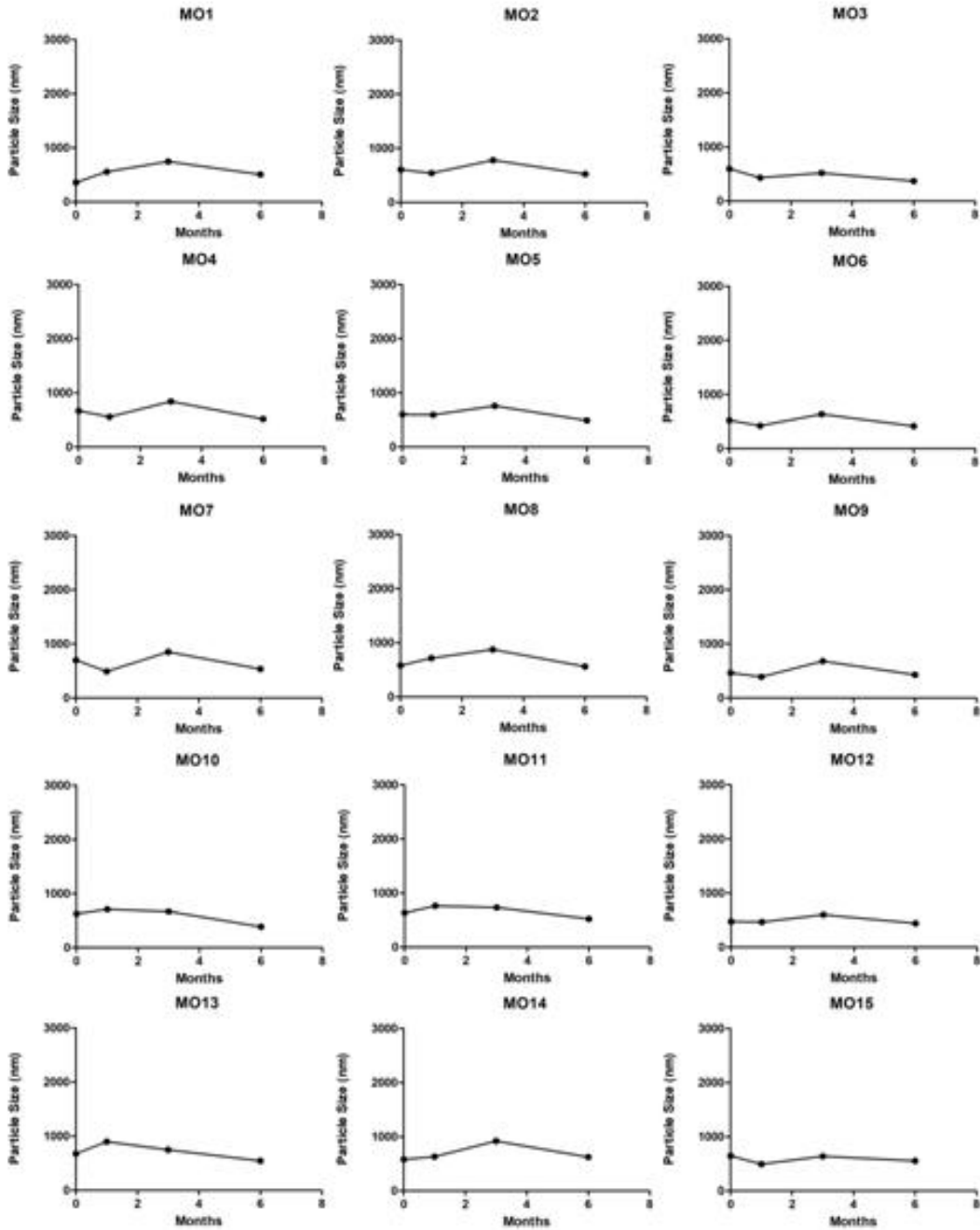
(1) Partocle size

- Squalene 기반 emulsion 15종에 대한 particle size를 측정하였으며, 시간 경과에 따른 size 변화를 6개월까지 확인하였다. (그림 17) 그 결과, 15종 모두 1,000~2,000 nm 범위의 마이크로에멀전으로 목표로 한 50 µm이하 입도의 백신 제조가 완료되었다.



<그림 17>. Particle size of squalene emulsions

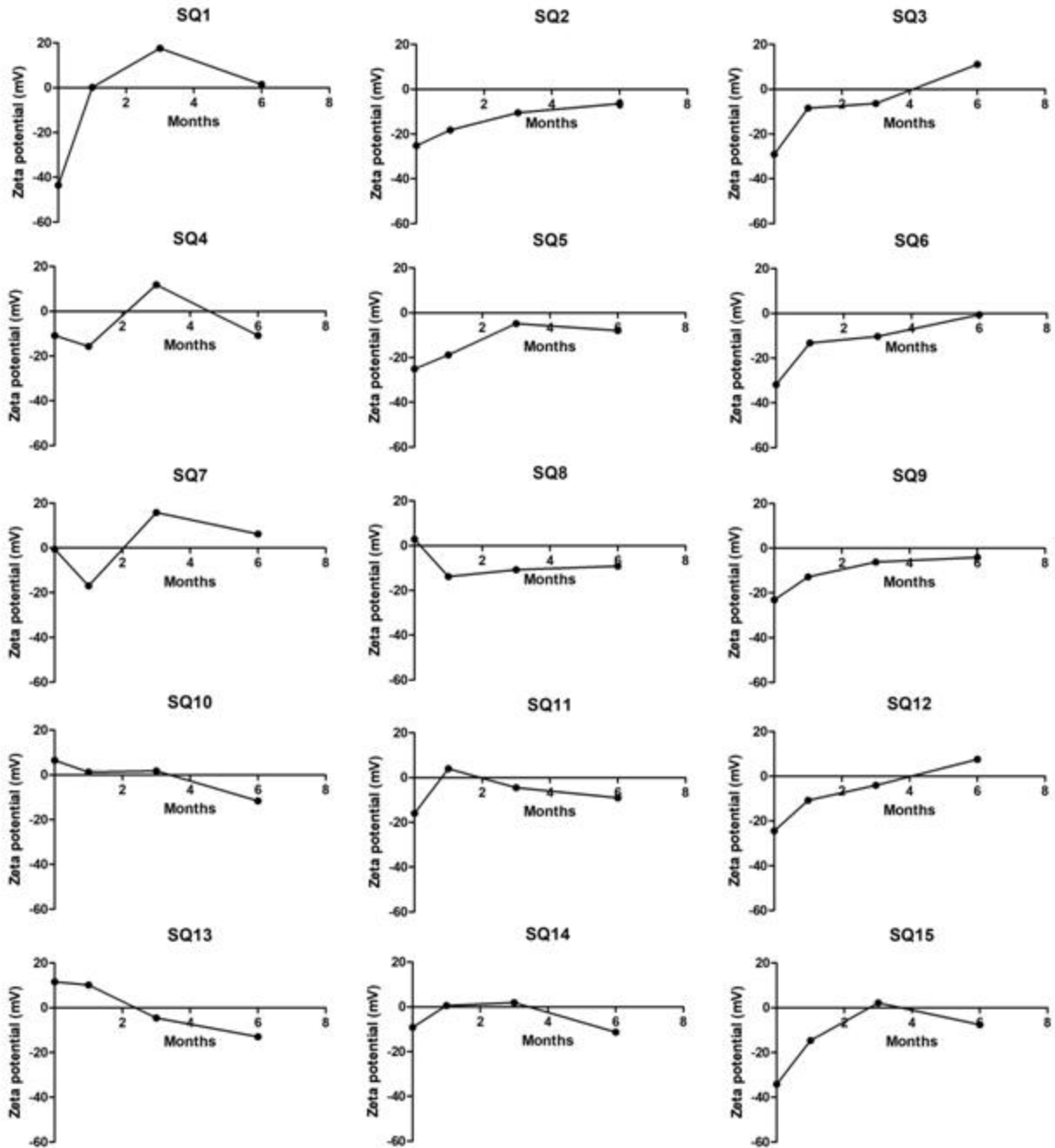
- Mineral oil 기반 emulsion 15종에 대한 particle size를 측정하였으며, 시간 경과에 따른 size 변화를 6개월까지 확인하였다. (그림 18) 그 결과, 15종 모두 1,000~2,000 nm 범위의 마이크로에멀전으로 목표로 한 50 μm 이하 입도의 백신 제조가 완료되었다.



<그림 18>. Particle size of mineral oil emulsions

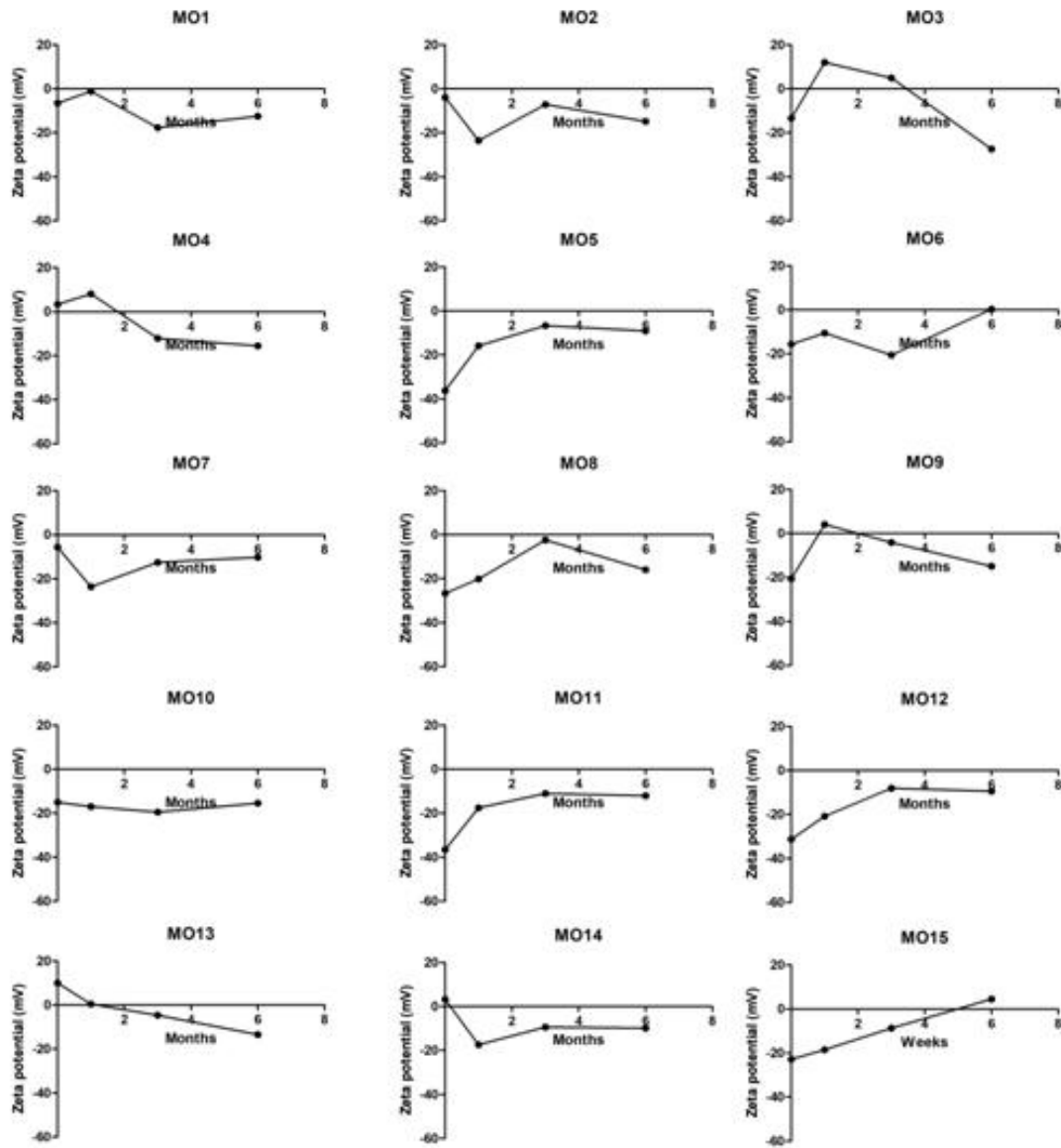
(2) Zeta potential

- Squalene 기반 emulsion 15종에 대한 zeta potential를 측정하였으며, 시간 경과에 따른 변화를 6개월까지 확인하였다. (그림 19) 그 결과, 15종 모두 30~60 mV범위로 (절대 값) 균일하고 안정한 나노 백신보좌제가 제조되었음을 확인하였다.



<그림 19>. Zeta potential of squalene emulsions

- Mineral oil 기반 emulsion 15종에 대한 zeta potential을 측정하였으며, 시간 경과에 따른 변화를 6개월까지 확인하였다. (그림 20) 그 결과, 15종 모두 30~60 mV범위로 (절대 값) 범위로 균일하고 안정한 나노 백신보좌제가 제조되었음을 확인하였다.



<그림 20>. Zeta potential of mineral oil emulsions

2. PCV2+*Mycoplasma* 백신 시제품의 실험동물 안전성 평가

가. 실험 방법

- 국가검정 동물용의약품 생물학적제제의 검정기준에 준하여 각 그룹별로 체중 15~20 g의 건강한 마우스 8마리씩을 공시하고, 복강에 각각의 시험백신 0.5 ml씩을 접종하고 7일간 임상증상을 확인하였다.

나. 실험 결과

- 실험 결과, 모든 백신 접종 그룹에 대하여 시험기간 동안 아무런 임상증상 없이 정상적으로 생존한 것으로 확인되어, 백신 제조에 사용된 농도에서 squalene, mineral oil, carbomer, span, cremophor ELP의 마우스 독성은 없는 것으로 확인되었다. (Table 4, 5)

Table 4. Squalene oil emulsion의 마우스 안전성 실험 결과

제조번호	마우스 접종수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 (생존 / 공시수)						
				1	2	3	4	5	6	7
SQ1	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ2	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ3	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ4	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ5	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ6	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ7	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ8	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ9	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ10	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ11	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ12	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ13	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ14	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
SQ15	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N

Table 5. Mineral oil emulsion 및 commercial adjuvant의 마우스 안전성 실험 결과

제조번호	마우스 접종수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 (생존 / 공시수)						
				1	2	3	4	5	6	7
MO1	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO2	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO3	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO4	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO5	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO6	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO7	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO8	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO9	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO10	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO11	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO12	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO13	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO14	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
MO15	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
Emulsigen-D	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
Alum	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
ISA201	8마리	복강, 0.5 ml	7일	N	N	N	N	N	N	N

3. PCV2+*Mycoplasma* 백신 시제품의 실험동물 면역원성 평가

가. 실험 방법

(1) 동물 실험

각 그룹별로 체중 15~20 g의 건강한 마우스 10마리씩을 공시하고, 이 중 5마리씩은 생물학적제제 국가검정 기준 중 *Mycoplasma* 불활화 백신의 국가검정 기준에 준하여 백신 0.5 ml을 복강에 1회 접종하고, 2주 후에 채혈하여 ELISA 항체를 측정하였으며, 나머지 5마리씩은 면역보좌제의 효능 및 특징을 확인하기 위하여 백신 0.5 ml씩을 2주 간격으로 2회 복강에 투여 후, 2차 접종 2주 후에 채혈하여, IgG, IgG1, IgG2a 항체를 각각 측정하였다.

(2) ELISA 항체 측정

Mycoplasma hyopneumonia 에 대한 Ab ELISA kit (IDEXX사)를 마우스 혈청에 맞게 변형하여 사용하였으며, *Mycoplasma hyopneumonia* 특이 항원이 coating 되어 있는

ELISA plate에 *mycoplasma* 항체 음성의 표준 음성혈청, 백신 접종군 혈청, 비접종 대조군 혈청을 각각 반응시키고, anti-mouse HRP conjugate를 희석하여 반응시킨 후, O.D값을 측정하였다. (백신 접종군 혈청의 경우, 512배 희석하고, 비접종 대조군 혈청은 10배 희석하여 반응시킨다.) 표준 음성혈청의 O.D 값을 기준으로 비접종 대조군의 항체가는 10배 이하일 때, 백신 접종군 혈청은 512배 이상이면, 시험백신이 *Mycoplasma hyopneumonia*에 대하여 효과가 있는 것으로 인정한다.

(3) IgG1, IgG2a 항체가 측정을 통한 면역보좌제의 작용기전 확인

SEDDS에 의해 micro-emulsion 형태로 제조된 각각의 시험백신에 대하여 면역보좌제의 작용 기전에 대한 실험실 내 연구를 위하여 각각의 백신 접종군에 대하여 IgG1과 IgG2a ratio 값을 확인하였다. 실험방법은 Stipkovits et al에서 보고된 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 일반적으로 IgG1의 경우, 체액성면역 자극의 지표, IgG2a의 경우, 세포성면역 자극의 지표로 인식된다.

나. 실험 결과

(1) 국가검정기준에 준한 *Mycoplasma hyopneumonia* 항체가 측정 결과

Table 6. Squalene emulsion 및 commercial adjuvant의 마우스 효능 실험 결과

제조번호	마우스 접종수	평균 O.D 값	비고
		백신 접종군 혈청 (512배 희석)	
PBS	5	0.193	검정기준 이상
Alum	5	0.196	검정기준 이상
ISA201	5	0.214	검정기준 이상
Emulsigen-D	5	0.196	검정기준 이상
SQ1	5	0.179	
SQ2	5	0.180	
SQ3	5	0.186	
SQ4	5	0.182	
SQ5	5	0.191	검정기준 이상
SQ6	5	0.193	검정기준 이상
SQ7	5	0.228	검정기준 이상
SQ8	5	0.196	검정기준 이상
SQ9	5	0.185	
SQ10	5	0.187	
SQ11	5	0.182	
SQ12	5	0.189	검정기준 이상
SQ13	5	0.182	
SQ14	5	0.181	
SQ15	5	0.188	검정기준 이상

* 표준음성 혈청의 평균 O.D값은 0.187

Squalene emulsion 15종에 대한 항체가 확인 결과, 6종에서 512배 이상의 항체가 확인되어 국가검정기준에 합격인 것으로 확인되었고, 이중 **SQ7 그룹**의 경우에는 비교 그룹으로 사용된 상용화 면역증강제 3종 보다 높은 항체가 형성된 것을 확인할 수 있었다. (Table 6)

Table 7. Mineral oil emulsion 및 commercial adjuvant의 마우스 효능 실험 결과

제조번호	마우스 접종수	평균 O.D 값	비고
		백신 접종군 혈청 (512배 희석)	
PBS	5	0.193	검정기준 이상
Alum	5	0.196	검정기준 이상
ISA201	5	0.214	검정기준 이상
Emulsigen-D	5	0.196	검정기준 이상
MO1	5	0.173	
MO2	5	0.175	
MO3	5	0.181	
MO4	5	0.186	
MO5	5	0.200	검정기준 이상
MO6	5	0.182	
MO7	5	0.188	검정기준 이상
MO8	5	0.194	검정기준 이상
MO9	5	0.185	
MO10	5	0.199	검정기준 이상
MO11	5	0.200	검정기준 이상
MO12	5	0.379	검정기준 이상
MO13	5	0.194	검정기준 이상
MO14	5	0.189	검정기준 이상
MO15	5	0.192	검정기준 이상

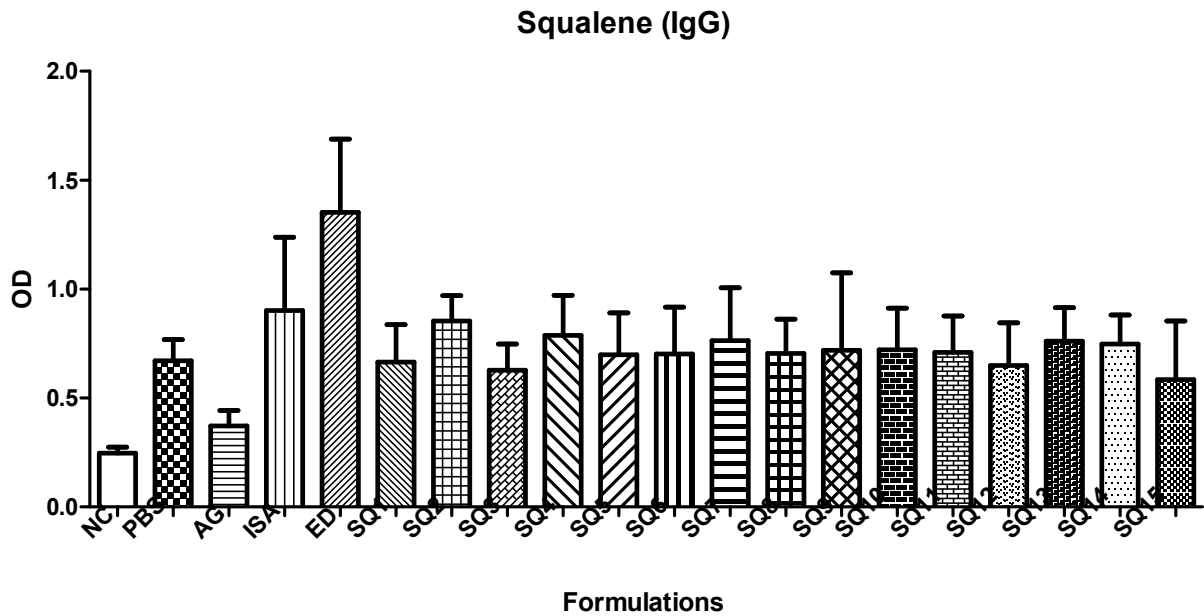
* 표준음성 혈청의 평균 O.D값은 0.187

Mineral oil emulsion 15종에 대한 항체가 확인 결과, 9종에서 512배 이상의 항체가 확인되어 국가검정기준에 합격인 것으로 확인되었고, 이중 **MO12 그룹**의 경우에는 비교 그룹으로 사용된 상용화 면역증강제 3종 보다 높은 항체가 형성된 것을 확인할 수 있었다. (Table 7)

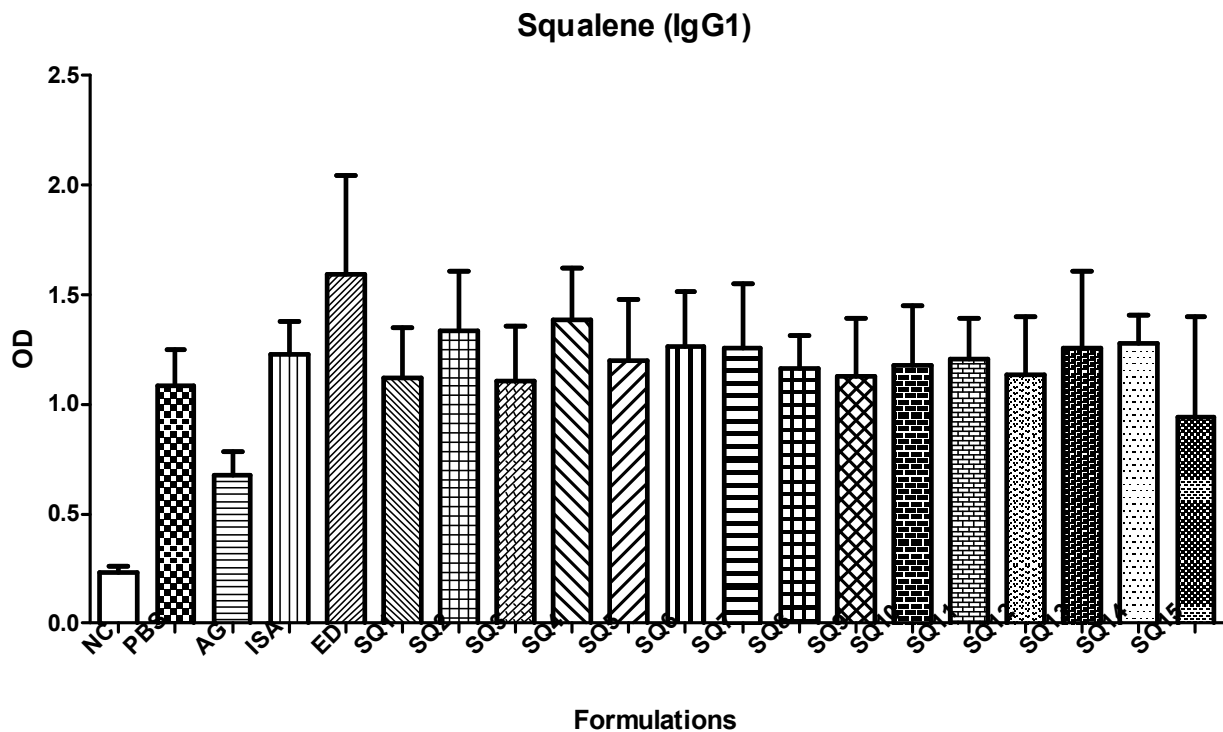
(2) IgG1, IgG2a 측정을 통한 면역보좌제의 작용기전 확인

특정 바이러스의 경우, 체액성 면역만으로 충분한 방어가 가능하지만, 일부 바이러스들의 경우, 방어 기전에 세포성 면역 자극이 반드시 필요하다. 불활화 백신의 경우, 일반적으로 세포성 면역을 자극하지 못하는 것으로 알려져 있고, 이 때문에 최근 사용되는

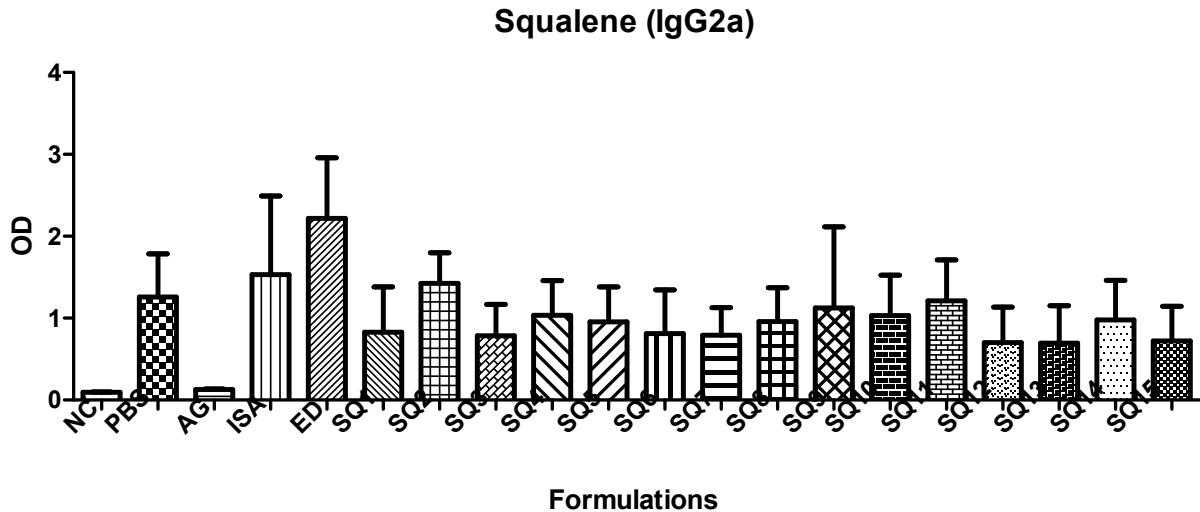
역보좌제들의 경우, 체액성 면역과 함께 세포성 면역을 함께 자극해 줄 수 있는 특성을 지니고 있다. SEDDS에 의해 micro-emulsion 형태로 제조된 각각의 면역보좌제 또한 체액성 면역 외에 세포성 면역을 추가로 자극할 수 있는지를 IgG1, IgG2a 항체가 측정을 통하여 확인하였고, 이 과정에서 상용화 면역증강제 3종을 비교 그룹으로 함께 사용하였다.



<그림 21>. Squalene emulsion의 IgG 항체가

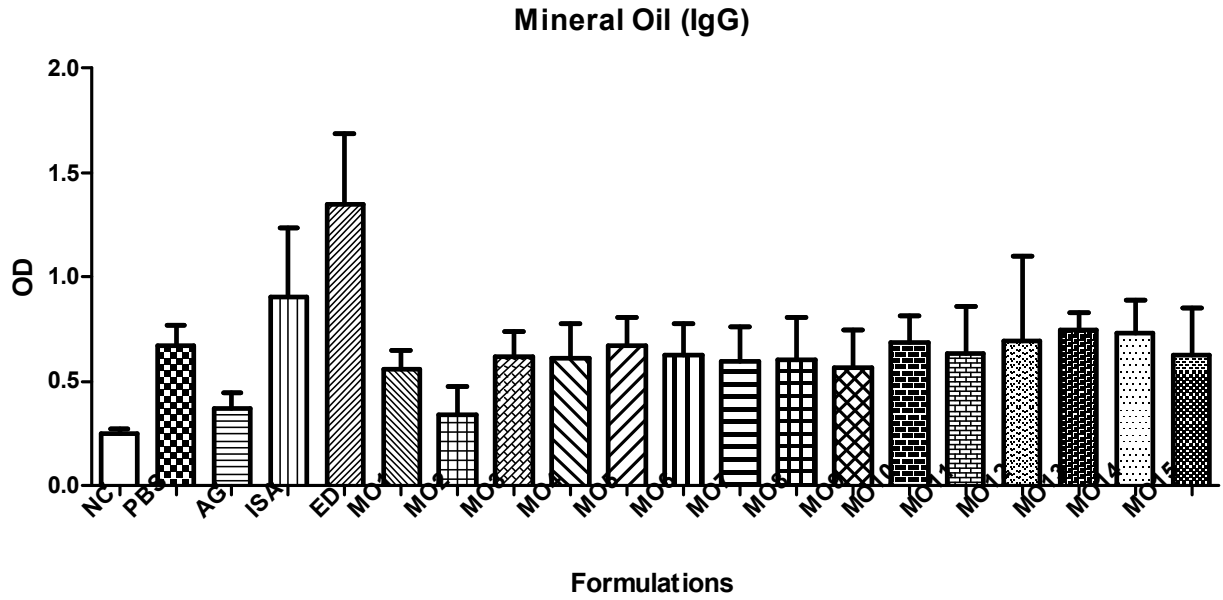


<그림 22>. Squalene emulsion의 IgG1 항체가

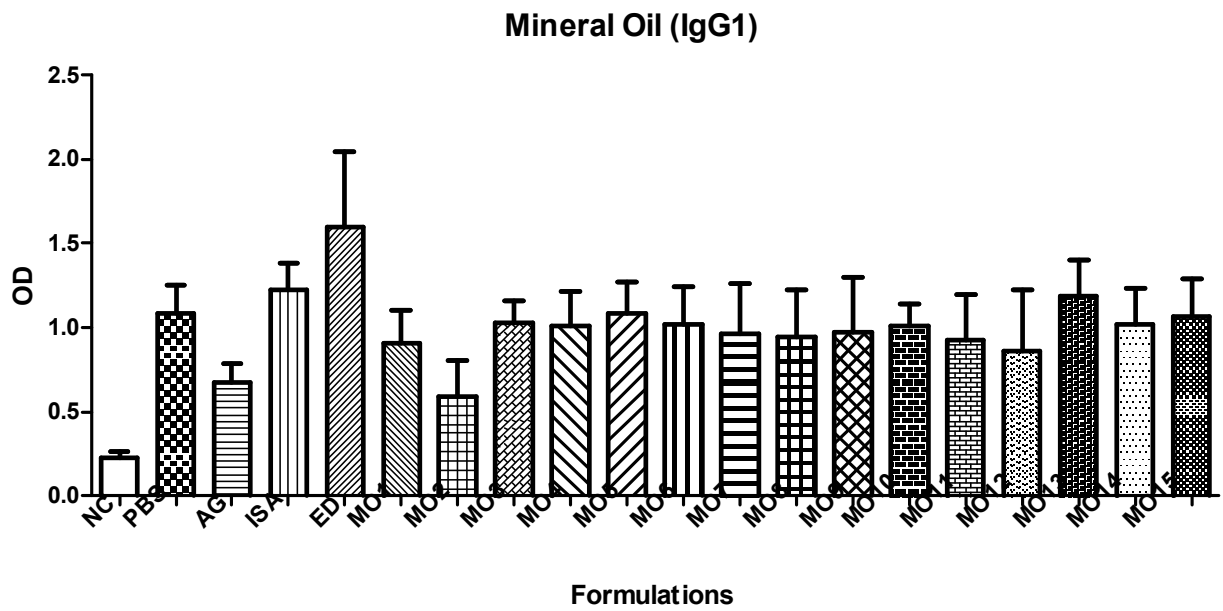


<그림 23>. Squalene emulsion의 IgG2a 항체가

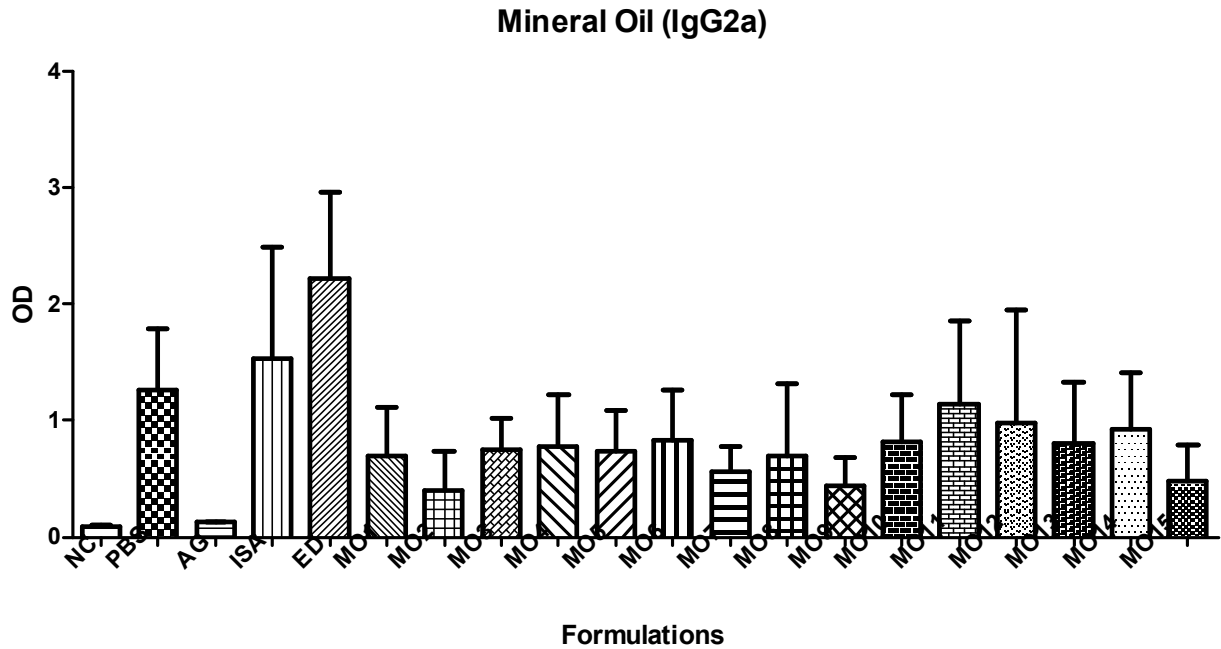
Squalene emulsion 15종과 상용화 면역증강제 3종의 IgG 항체가를 비교한 결과, ISA201 (W/O/W emulsion), Emulsigen-D (O/W emulsion)의 경우, squalene 기반 시험백신 15종 보다 높은 항체 수준을 보였고, aluminium gel은 시험백신 그룹보다 낮은 항체 수준을 보였다. IgG1와 IgG2a의 경우에도 IgG와 거의 유사한 양상을 보였지만, 상용화 면역증강제 사용 그룹 중 aluminium gel 사용 그룹의 경우, 유독 IgG2a 항체 수준이 낮은 것으로 확인되었다. Aluminium gel의 경우, 인체용 백신에도 허가된 안전한 면역증강제이지만, 일반적으로 oil 기반 면역증강제와 비교하여 항체 형성능이 낮은 것으로 알려져 있고, 특히 세포성 면역보다는 체액성 면역에 특화된 것으로 알려져 있다. 이번 실험에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었고, 시험백신의 경우, squalene oil이 적게는 3%, 많게는 7% 까지만 포함되었지만, 20~50%의 오일 함량을 포함하는 Emulsigen-D, ISA201과 비교하여 항체형성능, 세포성 면역 자극능이 크게 뒤처지지 않는 것으로 확인되었다. (그림 21~23) Mineral oil emulsion 15종의 경우에도 squalene과 실험 결과가 크게 다르지 않았다. (그림 24~26) 상기 실험들의 경우, 마우스에 백신을 2회 접종 후 확인한 결과로, 앞서 수행되었던 Mycoplasma hyopneumonia에 대한 국가검정기준에 준한 효능 평가 실험에서는 마우스에 백신을 1회만 접종 후 항체가 수준을 확인하였고, 그 결과에서는 squalene oil emulsion 1종 (SQ7), mineral oil emulsion (MO12) 1종이 상용화 면역증강제 3종 그룹보다 모두 높은 수준의 항체가를 보여, 실제 백신을 목적동물에 투여했을 경우에는 상용화 면역증강제와 동등 이상의 효과가 있으리라 예상된다.



<그림 24>. Mineral oil emulsion의 IgG 항체가



<그림 25>. Mineral oil emulsion의 IgG1 항체가



<그림 26>. Mineral oil emulsion의 IgG2a 항체가

4. PCV2+*Mycoplasma* 백신 시제품의 목적동물 안전성 및 면역원성 평가

가. 실험 방법

(1) 백신 후보군 선정

Squalene 및 mineral oil 기반으로 carbomer를 추가하여 SEDDS에 의해 micro-emulsion 형태로 제조된 30종의 시제품 후보군 중 상용화 면역증강제보다 항체 형성능이 우수했던 2종을 최종 선발하여 (SQ7, MO12) ISA201, Emulsigen-D 그룹과 목적동물에 대한 안전성 및 면역원성 평가를 수행하였다.

(2) 안전성 시험

각 그룹별로 체중 8~10 kg의 건강한 자돈 2마리씩을 준비하고, 백신 2두 분씩을 근육에 접종 후 21일간 관찰하였다.

(3) 면역원성 시험

① 실험동물 선정

- *Mycoplasma hyopneumoniae* 항체 음성의 3주령 자돈 45두를 공시하여 40두를 백신 접종군, 나머지 5두를 비접종 대조군으로 하였다. 백신 접종군은 다시 10두씩 4그룹으로 나누어 각각의 시험백신 1종씩을 접종하였다.

② 백신 접종 및 채혈

- 백신 접종군에 대하여 3주령 자돈을 대상으로 시험백신 각 1두 분을 이근부 근육에 접종하고, 2주 후에 반대편 근육에 1두 분을 보강 접종하였다. 3주령, 5주령, 9주령,

12주령, 15주령에 각각 채혈하여 *Mycoplasma hyopneumoniae*에 대한 항체가 확인에 사용하였다.

③ 항체가 측정

- *Mycoplasma hyopneumonia* Ab ELISA kit (IDEXX, 99-06733)를 사용하였고, 결과 값은 S/P ratio로 나타내었다.

나. 실험 결과

(1) 안전성 시험 결과

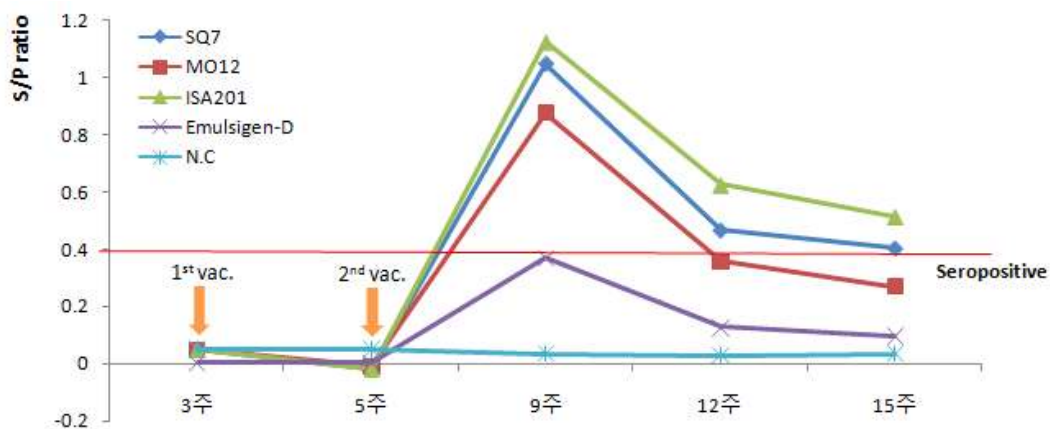
백신 접종 1~2시간 이내에 과민반응이 (쇼크) 나타나지 않았고, 21일간의 관찰 기간 동안 폐사 개체는 없었으며, 전신적인 증상 외 접종부위의 부종, 화농, 괴사 등의 국소부위 증상 없이 정상적으로 생존하였다.

Table 8. 자돈 안전성 시험 결과

제조번호	접종 경로	공시수	접종량	접종 횟수	임 상 증 상				
					접종 직후	접종 1시간	접종 2시간	접종 4시간	21일 이내
SQ7	근육	2	4.0 ml	1회	N	N	N	N	N
MO12	근육	2	4.0 ml	1회	N	N	N	N	N
ISA201	근육	2	4.0 ml	1회	N	N	N	N	N
Emulsigen-D	근육	2	4.0 ml	1회	N	N	N	N	N
NC	근육	2	4.0 ml	1회	N	N	N	N	N

(N : 부작용 없이 생존함 AN : 부작용 관찰됨 D : 폐사함)

(2) 면역원성 시험 결과



<그림 27>. *Mycoplasma hyopneumoniae* 항체가

PCV2+*Mycoplasma* 백신 제조에 사용된 항원은 코미팜에서 직접 제조한 것으로 PCV2 항원의 경우, 프로백 써코마스터 원 샷이라는 제품으로 이미 상용화되어 있으며, *Mycoplasma* 항원의 경우에도 프로백 MPS라는 제품으로 상용화되어 있다. 이번 실험을 통해서 시제조한 PCV2+*Mycoplasma* 백신의 경우, 코미팜에서 개발 진행 중인 신제품으로 각각의 단가 백신에는 carbomer, aluminium gel과 같은 상용화 면역증강제가 사용되고 있다. 모든 백신 접종 그룹에서 1차 백신 접종 이후 항체가에 큰 변화가 없었으며, 2차 보강 접종 이후에 항체가 급격히 증가하기 시작하여 Emulsigen-D 그룹을 제외하면 그룹의 평균 항체가가 S/P 값 0.4 이상으로 항체 양성으로 sero-conversion이 확인되었다. 모든 그룹에서 9주령 (2차 백신 접종 4주 후)이 혈중 최고 항체가를 기록하였으며, 이후 모든 그룹에서 항체가 점차 감소하는 양상을 보였다. ISA201 그룹과 SQ7 그룹의 경우, 마지막 관찰 시점인 15주령까지도 그룹의 평균 항체가가 S/P값 0.4 이상으로 항체 양성을 유지하여 다른 2그룹보다 항체 형성능 및 지속성이 우수한 것을 확인할 수 있었다. *Mycoplasma*의 경우, 백신의 효력을 항체가만으로 단정 지을 수 없고, challenge test를 통한 방어력 평가 결과가 가장 우선시 되어야 하지만, 항체가 또한 백신의 효력을 평가할 수 있는 중요 지표중에 하나이기 때문에 이 결과를 통해서 SEDDS에 의해 micro-emulsion으로 제조된 신규 면역보좌제 후보군이 돼지에서도 충분히 유효한 면역효과를 보이는 것을 확인할 수 있었고, 동일한 O/W emulsion의 상용화 면역증강제보다 우수한 효과를, 구제역 백신 등의 연구에 주로 사용되고 있는 W/O/W emulsion의 상용화 면역증강제와 비교하여도 손색없는 효과를 확인하였다.

제3절 지질기반 백신보좌제를 이용한 구제역 백신 시제품 제작 및 평가

1. A 포천주 항원을 이용한 구제역 백신 시제품 제작 및 평가

가. 시험백신 제조

(1) 시험백신의 제조

PCV2+*Mycoplasma* 혼합 백신 제조를 통해서 실험동물 및 목적동물에서 면역원성을 평가한 결과, 신규 면역보좌제 조성 중 SQ7과 MO12 조성에서 면역원성이 가장 우수한 것으로 확인 되었다. 이를 활용하여 FMDV A 포천주 정제항원에 대한 시험백신을 제조하였으며, 이 과정에서 상용화 면역보좌제 2종 (Emulsigen-D, ISA201)을 추가하여 총 4종의 시험백신 7 두 분씩을 제조하였다. (Table 9)

(2) 구제역 항원의 유래

구제역 백신 제조에 사용된 A 포천주 정제항원의 경우, 코미팜이 2016년~2017년까지 참여한 검역본부 공동연구과제 수행 결과 얻어진 것으로, 검역본부의 BSL3 lab 내에 bioresztor를 설치 후 세포주 배양부터 바이러스 접종, 불활화 및 정제 공정까지 직접 수행하여 얻은 것이다. 이를 본 과제에 활용하기 위하여 검역본부로부터 항원 사용과 관련된 별도 승인을 받은 바 있다. 추후 실험에 사용된 O 진천주 항원 역시 동일한 방법으로 확보된 것이며,

A22 Iraq 항원의 경우, 검역본부 seed बैं크로 보관중인 것을 분양받아 사용하였다. (그림 28)

Table 9. 시험백신 제조 내역

그룹		항원함량 (2 ml 당)	면역증강제	제조량
대조백신	CV-1	A 포천주 정제항원 10 µg	ISA201	7두 분
	CV-2	A 포천주 정제항원 10 µg	Emulsigen-D	7두 분
시험백신	TV-1	A 포천주 정제항원 10 µg	MO12 (7%)	7두 분
	TV-2	A 포천주 정제항원 10 µg	SQ7 (3%)	7두 분

[별지 제1호서식]

(산학연, 출연) 공동연구과제 연구계획서

□ 총괄표

과 세 명	구제역 백신생산을 위한 O형 및 A형 시험백신에 대한 산업화 평가					연구기간
세부과제명	1.백신종독주 scale-up 적합성 평가 및 선발 2.시험백신 생산 및 현장 적용 시험					'16.3~'17.12 (1년 10개월)
연구책임자	성 명	소 속	직 급	전 공	연구경력	
공동연구책임자	이광녕	구제역백신연구센터	수의연구사	동물생명공학	15년	
협동연구책임자1	이오수	(주)코미팜 중앙연구소	연구소장	수의학	33년	
협동연구책임자2						
위탁연구책임자						
연구비(천원)	1차년도('16)	2차년도('17)	3차년도('18)	4차년도('19)	계	
시험연구비	94,000천원	94,000천원			188,000천원	
출 연 금						
기업체 현금	61,500천원	61,600천원			123,100천원	
부담금 현금	32,500천원	32,400천원			64,900천원	
계	188 백만원	188 백만원			376 백만원	
참여 기관	기 관 명	(주)코미팜			대표자명	문성원
	연구책임자 연락처	성명: 이오수, 주소: 경기도 시흥시 정계로 17 전화: 031-498-2120 (0168), (Fax) 031-498-6220				
참여 기관	기 관 명				대표자명	(인)
	연구책임자 연락처	성명: 주소: 전화: (자택) (Fax)				
<p>관계규정과 제반협약사항을 준수하면서 본 연구과제를 성실히 수행하고자 연구계획서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">2016년 3월 일 공동연구책임자 이 광 녕</p> <p style="text-align: center;">농림축산검역본부장 귀하</p>						

<그림 28>. 검역본부 산업체 공동연구과제 참여 증빙

나. 동물실험 계획

(1) 백신 접종

10 주령의 구제역 항체 음성 자돈 28두를 준비하여 백신 접종군 24두, 비접종 대조군 4두로 구분하였다. 백신 접종군은 다시 6마리씩 4그룹으로 구분하여 대조백신 접종군 2그룹, 시험백신 접종군 2그룹으로 하였다. 모든 백신 접종 그룹에 대하여 백신 2 ml을 이근부 근

육에 1회 접종하고, 2주 후, 4주 후, 8주 후, 12주 후에 각각 채혈하여 혈중 항체를 확인하였다. (Table 10)

Table 10. 동물실험 그룹

그룹		주령	개체 수	채혈
비접종 대조군		10주령	4 두	접종 전 접종 2주 후 접종 4주 후 접종 8주 후 접종 12주 후
백신 접종군	CV-1	10주령	6 두	
	CV-2	10주령	6 두	
	TV-1	10주령	6 두	
	TV-2	10주령	6 두	

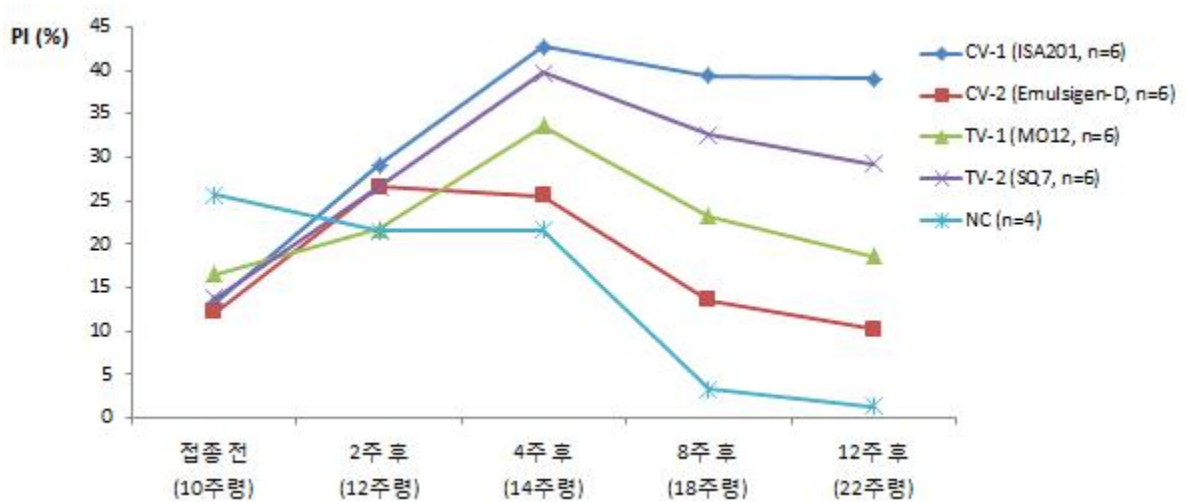
(2) 항체가 확인

상용화 ELISA kit를 이용하여 FMDV A Serotype에 대한 항체가 수준을 확인하였고, 일부 혈청들에 대해서는 검역본부의 BSL3 lab을 이용하여 A 포천주에 대한 혈중 중화항체를 추가로 확인하였다.

다. 실험 결과

(1) 항체가 확인 결과

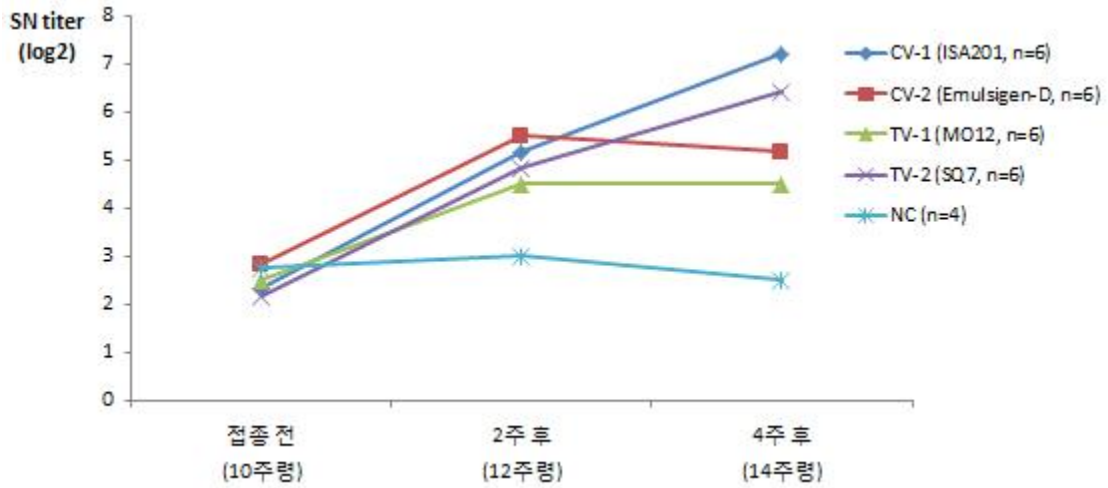
① Serotype A에 대한 ELISA 항체가



<그림 29>. Serotype A에 대한 ELISA 항체가 결과

- Priocheck FMDV type A Ab ELISA kit를 이용하여 각 시기별로 채혈한 혈청에 대한 ELISA 항체를 확인한 결과, 백신 접종군의 경우 접종 4주차에 혈중 최고 항체가를 기록하였으며, 이후 접종 그룹에 따라 항체가를 유지하거나, 감소하는 양상이 확인되었다. ISA201 상용화 면역증강제 그룹에서 항체가 수준이 가장 높게 확인되었으며, 이어서 SQ7, MO12, Emulsigen-D 상용화 adjuvant 그룹 순서로 나타났다. (그림 29)

② A 포천주에 대한 중화항체가



<그림 30>. A 포천주에 대한 중화항체가 측정 결과

- 검역본부의 BSL3 차폐실험실을 이용하여 A 포천주에 대한 중화항체를 측정하였다. 실험 여건 상 모든 혈청에 대한 중화항체를 한 번에 확인하진 못하였으며, 백신 접종 전부터 혈중 최고 항체가를 기록했었던 접종 4주 후까지를 먼저 확인하였다. 그 결과, ISA201, SQ7 그룹의 경우 백신 접종 이후 접종 4주차 까지 중화항체가 꾸준히 증가하는 양상을 보였고, MO12의 경우 접종 2주차에 이미 최고 항체가를 기록한 후 점차 유지되는 양상을 보였다. 마지막으로 Emulsigen-D 그룹의 경우, MO12와 마찬가지로 2주차에 최고 항체가를 기록하였으나, 이후 점차 감소하는 양상을 보였다. 구제역 바이러스에 대한 방어항체가 수준은 32~40배 정도로 실험 그룹 중 ISA201, SQ7 그룹에서 백신 접종 4주 후에 평균 32배 이상의 중화항체를 기록하여 구제역 백신 제조용 면역보좌제로써 가능성이 있음을 확인하였다. (그림 30)

구분	주령별 항체가										
	10주령		12주령		14주령		18주령		22주령		
	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN	
CV-1 (ISA201)	1	12.77	0	32.59	7	57.13	8	45.21		48.21	
	2	9.38	3	26.82	5	37.44	7	28.79		30.41	
	3	9.96	3	26.97	6	패사					
	4	12.1	2	35.41	6	50.12	7	33.65		35.69	
	5	14.96	3	28.12	4	34.56	7	45.12		42.15	
	6	20.24	3	25.01	3	34.05	7	43.97		38.46	
	평균	13.235	2.33333	29.1533	5.16667	42.66	7.2	39.348	#DIV/0!	38.984	#DIV/0!
CV-2 (Emulsigen-D)	1	18.49	3	29.15	6	29.51	5	17.05		13.05	
	2	8.63	2	26.54	5	32.12	7	20.15		13.26	
	3	14.25	3	26.32	6	24.51	5	8.65		7.46	
	4	10.02	3	29.57	6	21.34	6	13.16		10.45	
	5	10.76	3	21.2	5	22.2	3	8.91		6.78	
	6	11.13	3	26.71	5	23.63	5	13.46		10.24	
	평균	12.2133	2.83333	26.5817	5.5	25.5517	5.16667	13.5633	#DIV/0!	10.2067	#DIV/0!
TV-1 (MO12)	1	17.54	3	20.77	4	30.41	3	20.45		19.45	
	2	12.58	2	19.87	4	36.14	6	26.15		20.15	
	3	19.36	3	23.54	5	30.25	5	20.45		16.36	
	4	10.7	3	28.09	6	35.64	6	19.69		20.45	
	5	10.44	0	15.69	4	29.75	4	22.14		19.63	
	6	28.72	4	22.26	4	39.45	3	30.47		15.64	
	평균	16.5567	2.5	21.7033	4.5	33.6067	4.5	23.225	#DIV/0!	18.6133	#DIV/0!
TV-2 (SQ7)	1	16.75	3	23.05	5	37.8	6	30.25		28.45	
	2	10.26	3	33.16	6	43.25	7	35.45		32.14	
	3	16.35	1	21.45	4	36.47	6	29.63		26.11	
	4	19.02	3	32.75	7	35.53	6	27.45		25.32	
	5	16.27	0	24.59	3	패사					
	6	3.92	3	24.32	4	45.45	7	40.16		34.15	
	평균	13.7617	2.16667	26.5533	4.83333	39.7	6.4	32.588	#DIV/0!	29.234	#DIV/0!
NC	1	7.58	3	11.71	3	16.22	4	25.19		4.56	
	2	42.77	3	27.77	3	24.21	3	-6.71		4.13	
	3	45.84	5	28.4	3	20.24	0	4.36		2.16	
	4	6.57	0	18.39	3	26.02	3	-9.42		-5.64	
	평균	25.69	2.75	21.5675	3	21.6725	2.5	3.355	#DIV/0!	1.3025	#DIV/0!

<그림 31>. 백신 접종 그룹의 항체가 raw data

2. O 진천주 항원을 이용한 구제역 백신 시제품 제작 및 평가

가. 시험백신 제조

(1) 시험백신의 제조

SQ7, MO12 면역보좌제 조성으로 A 포천주 불활화 정제항원을 이용한 구제역 백신 시제품 제조 및 면역원성 평가를 수행하였고, 동일한 방법으로 O 진천주 불활화 정제항원을 이용한 구제역 백신 시제품 제조 및 면역원성 평가를 수행하였다. 동일하게 상용화 면역보좌제 2종 (Emulsigen-D, ISA201)을 추가하여 총 4종의 시험백신 7두 분석을 제조하였다. (Table 11)

(2) 구제역 항원의 유래

구제역 백신 제조에 사용된 O 진천주 정제항원의 경우, 코미팜이 2016년~2017년까지 참여한 검역본부 공동연구과제 수행 결과 얻어진 것으로, 검역본부의 BSL3 lab 내에 bioreactor를 설치 후 세포주 배양부터 바이러스 접종, 불활화 및 정제 공정까지 직접 수행하여 얻은 것이다. 이를 본 과제에 활용하기 위하여 검역본부로부터 항원 사용과 관련

된 별도 승인을 받은 바 있다.

Table 11. 시험백신 제조 내역

그룹		항원함량 (2 ml 당)	면역증강제	제조량
대조백신	CV-1	○ 진천주 정제항원 15 μ g	ISA201	7두 분
	CV-2	○ 진천주 정제항원 15 μ g	Emulsigen-D	7두 분
시험백신	TV-1	○ 진천주 정제항원 15 μ g	MO12 (7%)	7두 분
	TV-2	○ 진천주 정제항원 15 μ g	SQ7 (3%)	7두 분

나. 동물실험 계획

(1) 백신 접종

12 주령의 구제역 항체 음성 자돈 28두를 준비하여 백신 접종군 24두, 비접종 대조군 4두로 구분하였다. 백신 접종군은 다시 6마리씩 4그룹으로 구분하여 대조백신 접종군 2그룹, 시험백신 접종군 2그룹으로 하였다. 모든 백신 접종 그룹에 대하여 백신 2 ml을 이근부 근육에 1회 접종하고, 2주 후, 4주 후, 8주 후, 12주 후에 각각 채혈하여 혈중 항체가를 확인하였다. (Table 12)

Table 12. 동물실험 그룹

그룹	주령	개체 수	채혈
비접종 대조군	12주령	4 두	접종 전 접종 2주 후 접종 4주 후 접종 8주 후 접종 12주 후
백신 접종군	CV-1	6 두	
	CV-2	6 두	
	TV-1	6 두	
	TV-2	6 두	

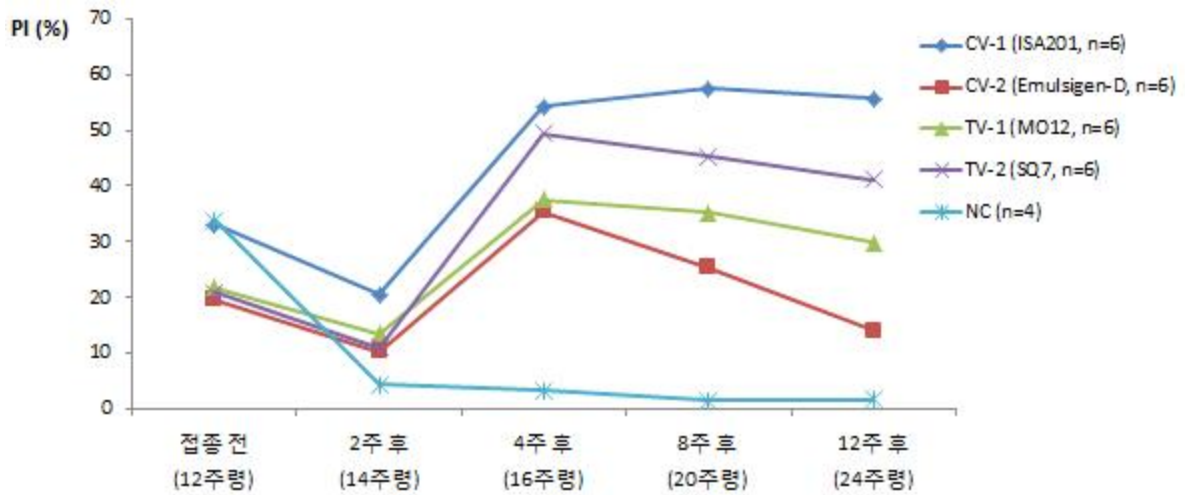
(2) 항체가 확인

상용화 ELISA kit를 이용하여 FMDV O Serotype에 대한 항체가 수준을 확인하였고, 일부 혈청들에 대해서는 검역본부의 BSL3 lab을 이용하여 O 진천주에 대한 혈중 중화항체가를 추가로 확인하였다.

다. 실험 결과

(1) 항체가 확인 결과

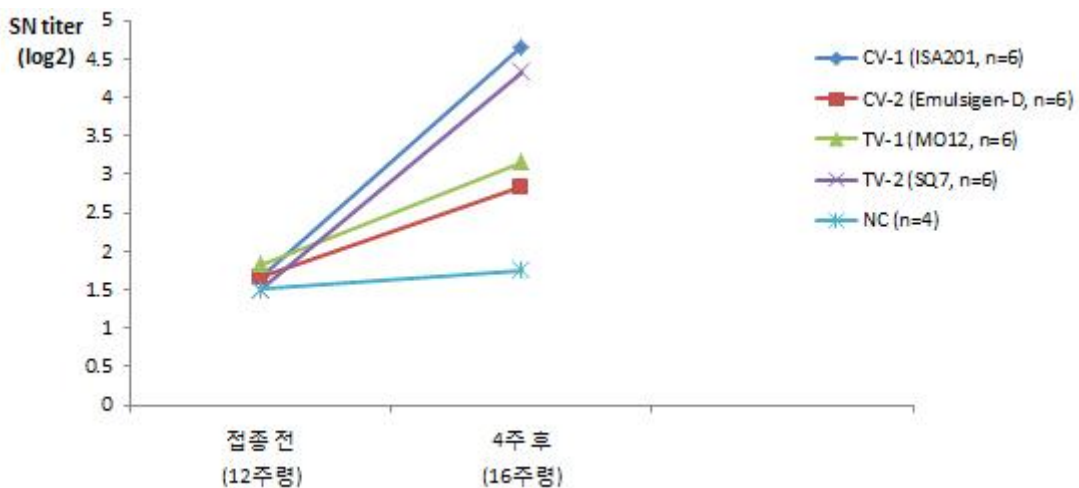
① Serotype O에 대한 ELISA 항체가



<그림 32>. Serotype O에 대한 ELISA 항체가 결과

- Priocheck FMDV type O Ab ELISA kit를 이용하여 각 시기별로 채혈한 혈청에 대한 ELISA 항체가를 확인한 결과, 백신 접종군의 경우 접종 4주차에 혈중 최고 항체가를 기록하였으며, 이후 접종 그룹에 따라 항체가를 유지하거나, 감소하는 양상이 확인되었다. 대체적으로 A 포천주 불활화 정제 항원을 포함하는 시험백신 결과와 동일한 경향성을 나타냈으며, ISA201 상용화 면역증강제 그룹에서 항체가 수준이 가장 높게 확인되었으며, 이어서 SQ7, MO12, Emulsigen-D 상용화 adjuvant 그룹 순서로 나타났다. (그림 32)

② O 진천주에 대한 중화항체가



<그림 33>. O 진천주에 대한 중화항체가 측정 결과

- 검역본부의 BSL3 차폐실험실을 이용하여 O 진천주에 대한 중화항체가를 측정하였다. 실험 여건 상 모든 혈청에 대한 중화항체가를 한 번에 확인하진 못하였으며, 백신 접종

전, 그리고 혈중 최고 항체가를 기록했었던 접종 4주차 혈청에 대해서 먼저 확인하였다. 그 결과, ISA201, SQ7 그룹의 경우 백신 접종 이후 접종 4주차 까지 중화항체가 꾸준히 증가하는 양상을 보였고, MO12, Emulsigen-D 그룹의 경우에도 증가하는 양상은 보였지만 그 증가폭이 매우 적었다. 다른 strain들과 비교하여 O 진천주에 대한 중화항체가는 상용화 구제역 백신을 접종하더라도 32~40배 이상의 방어항체가 수준으로 올라가기 어렵고, 이번 실험 결과에서도 O 진천주 불활화 정제 항원을 백신 1 dose 당 15 μg 씩 포함시켰음에도 중화항체가 생성 정도가 크지 않았다. 백신 접종 그룹 중에서는 ISA201과 SQ7 그룹에서 평균 16배 이상으로 상대적으로 높은 중화항체가 형성되어, 구제역 백신 제조용 면역보좌제로써 가능성이 있음을 확인하였다. (그림 33)

구분		주령별 항체가									
		12주령		14주령		16주령		20주령		24주령	
		ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN
CV-1 (ISA201)	1	31.28	2	48.45		74.27	6	86.65		75.26	
	2	36.92	1	6.82		42.83	4	40.21		38.56	
	3	35.51	1	6.71		41.03	5	40.26		38.45	
	4	35.09	2	12.29		58.58	4	63.55		60.47	
	5	30.41	2	18.21		59.12	5	64.15		66.54	
	6	28.92	2	30.45		50.14	4	50.26		55.26	
	평균	33.0217	1.66667	20.4883	#DIV/0!	54.3283	4.66667	57.5133	#DIV/0!	55.7567	#DIV/0!
CV-2 (Emulsigen-D)	1	12.92	0	5.27		35.67	3	30.14		15.55	
	2	22.02	2	4.91		40.12	4	33.26		22.58	
	3	11.45	1	24.79		37.54	3	21.56		9.63	
	4	21.81	2	9.56		30.25	2	20.45		10.16	
	5	20.87	3	16.53		29.36	2	19.65		11.45	
	6	29.24	2	1.08		40.12	3	27.54		15.53	
	평균	19.7183	1.66667	10.3567	#DIV/0!	35.51	2.83333	25.4333	#DIV/0!	14.15	#DIV/0!
TV-1 (MO12)	1	16.06	2	6.2		34.25	4	30.69		27.14	
	2	22.54	1	22.37		40.26	3	41.25		36.98	
	3	32.58	3	15.39		29.65	2	32.25		30.24	
	4	15.74	1	14.46		33.41	3	29.45		27.54	
	5	20.14	2	20.45		36.74	3	32.56		25.85	
	6	23.43	2	2.27		51.24	4	44.78		31.45	
	평균	21.7483	1.83333	13.5233	#DIV/0!	37.5917	3.16667	35.1633	#DIV/0!	29.8667	#DIV/0!
TV-2 (SQ7)	1	25.16	2	6.82		60.45	5	55.14		50.14	
	2	21.23	1	6.2		42.15	3	39.65		40.32	
	3	14.49	1	13.22		39.69	4	41.52		36.54	
	4	19.35	2	6.51		55.84	5	50.41		44.51	
	5	20.41	2	12.86		48.56	5	44.58		40.69	
	6	24.56	1	20.45		50.14	4	40.36		35.26	
	평균	20.8667	1.5	11.01	#DIV/0!	49.4717	4.33333	45.2767	#DIV/0!	41.2433	#DIV/0!
NC	1	36.54	1	2.48		-0.29	2	1.24		-0.15	
	2	41.55	2	3.82		0.56	2	0.15		1.25	
	3	26.93	1	0.98		8.69	1	3.26		2.14	
	4	30.25	2	10.45		4.15	2	1.25		3.69	
	평균	33.8175	1.5	4.4325	#DIV/0!	3.2775	1.75	1.475	#DIV/0!	1.7325	#DIV/0!

<그림 34>. 백신 접종 그룹의 항체가 raw data

3. A22 Iraq 항원을 이용한 구제역 백신 시제품 제작 및 평가

가. 시험백신 제조

(1) 시험백신의 제조

SQ7, MO12 면역보좌제 조성으로 A 포천주 및 O 진천주 불활화 정제 항원을 이용한 시험백신을 제조하여 면역원성 평가를 수행하였고, 그 과정에서 SQ7의 면역원성이 가장 우수하였지만, 면역원성 개선 필요성을 확인하였다. 이를 위해 기존 SQ7에 포함된 squalene 함량을 3%에서 35%로 증가시킨 그룹, MO12의 mineral oil 함량을 7%에서 35%로 증가시킨 그룹을 추가하였고, 상용화 면역보좌제 그룹으로는 항체 형성능과 지속성이 좋았던 ISA201 그룹을 대조그룹으로 하였다. 그리고, 이번 실험에서는 상용화 구제역 백신을 비교 그룹으로 추가하여 접종 부위 이상육 생성 유무, 면역원성 평가에 활용하였다. (상용화 구제역 백신의 경우, 시험백신과 FMDV 불활화 정제 항원 농도에 차이가 있기 때문에 안전성 측면에서만 동등한 비교가 가능할 것이다) (Table 13)

(2) 구제역 항원의 유래

구제역 백신 제조에 사용된 A22 Iraq 정제항원의 경우, 코미팜이 2016년~2017년까지 참여한 검역본부 공동연구과제를 수행하는 과정에서 검역본부 seed bank에 보관 중인 것을 실험용으로 분양받은 것으로, 본 과제를 위해 검역본부로부터 항원에 대한 사용 승인을 받았다. 항원의 제조 일자 2009년이며, 상용화 구제역 백신과 동등한 6PD50의 항원이 포함되어 있지만, 제조 후 10년 가까이 경과하였고, (제조년 2009년) 비록 질소탱크에 보관하였지만, 항원의 보존성에 대한 정확한 근거자료가 없기 때문에 상용화 백신과 동등한 항원 농도로 보기는 어려울 것이다. (그림 35)

Table 13. 시험백신 제조 내역

그룹		항원함량 (2 ml 당)	면역증강제	비고
대조백신	CV-1	A 22Iraq 6PD50	DOE	Commercial FMDV vaccine (Merial)
	CV-2	A 22Iraq 6PD50	ISA201	검역본부 항원뱅크
시험백신	TV-1	A 22Iraq 6PD50	SQ7 (3%)	검역본부 항원뱅크
	TV-2	A 22Iraq 6PD50	SQ35 (35%)	검역본부 항원뱅크
	TV-3	A 22Iraq 6PD50	MO35 (35%)	검역본부 항원뱅크

주식회사 코 미 팜

우 429-450 경기도 시흥시 경제로 17(평왕동) /전화 070-7166-8734 /전송 (031)498-6220 /담당: 김주현

문서번호: 코미팜 제2016 - 209호	선		지		
시행일자: 2016. 11. 03	결		시		
수 신: 농림축산검역본부 농림수산식품기술기획평가원장	접	일자	결		
	수	시간	재		
참 조: 구제역백신연구센터		번호			
	처리과		공		
	담당자		람		

제 목 : 검역본부 분양 구제역 불활화 항원(A22 Iraq)의 타 연구과제 사용 승인 요청

1. 귀 본부의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 코미팜에서는 2016.01월부터 귀 본부가 주관하는 “구제역백신생산을 위한 O형 및 A형 시험백신에 대한 산업화 평가” 과제에 참여하고 있으며, 이 과정에서 구제역 불활화 항원 (A22 Iraq, 2,000 dose)을 구제역백신연구센터로부터 분양 받은바 있습니다. (2016.06.09)
3. 또한, 코미팜에서는 아래와 같이 2016.09월부터 강원대학교 수의과대학, 계명대학교 약학대학과 함께 구제역 백신의 국산화와 관련된 아래 2가지 농림축산식품부 연구개발과제를 수행 중에 있으며 과제의 성공적인 수행을 위해 구제역 불활화 항원의 수급이 절실한 상황입니다. 이에, 구제역백신연구센터로부터 분양 받은 구제역 불활화 항원 (A22 Iraq)을 아래 연구과제에 사용할 수 있도록 승인하여 주시기 바랍니다.

아 래

과제명	이상육 생성을 유발하지 않는 신개념 구제역 백신 보좌제 개발
연구기간	2016.09.05~2017.09.04 (12개월)
과제명	구제역 백신 접종률 확인을 위한 표식인자 개발
연구기간	2016.09.05~2017.09.04 (12개월)

- 첨부 1. 수행중인 농림축산식품 연구개발과제의 협약서 사본 각 1부.
 첨부 2. 수행중인 농림축산식품 연구개발과제의 국문요약문 각 1부.

경기도 시흥시 경제로 17
 주식회사 코 미 팜
 대표이사 문 성 철

<그림 35>. A22 Iraq 항원 사용 요청 공문

나. 동물실험 계획

(1) 백신 접종

12 주령의 구제역 항체 음성 자돈 32두를 준비하여 백신 접종군 30두, 비접종 대조군 2두로 구분하였다. 백신 접종군은 다시 6마리씩 5그룹으로 구분하여 대조백신 접종군 2그룹, 시험백신 접종군 3그룹으로 하였다. 모든 백신 접종 그룹에 대하여 백신 2 ml을 이근부 근육에 1회 접종하고, 4주 후에 반대편 이근부 근육에 추가 접종을 실시하였다. 백신 접종 전, 접종 4주 후, 6주 후, 8주 후, 10주 후에 각각 채혈하여 혈중 항체가를 확인하였다.

(Table 14)

Table 14. 동물실험 그룹

그룹		주령	개체 수	백신접종	채혈	이상육 확인	
비접종 대조군		12주령	2 두	12주령, 16주령, 2회	접종 전 접종 4주 후 접종 6주 후 접종 8주 후 접종 10주 후	-	
백신 접종군	CV-1	12주령	6 두			접종 4주 후 접종 6주 후 접종 8주 후 접종 10주 후	접종 4주 후 각 2마리씩
	CV-2	12주령	6 두				
	TV-1	12주령	6 두				
	TV-2	12주령	6 두				
	TV-3	12주령	6 두				

(2) 항체가 확인

상용화 ELISA kit를 이용하여 FMDV A Serotype에 대한 항체가 수준을 확인하였다.

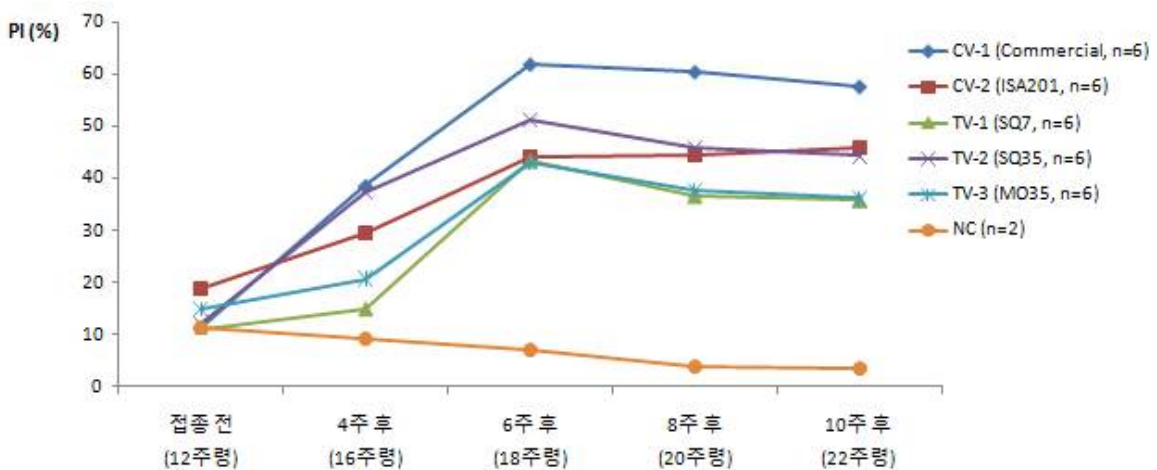
(3) 접종부위 이상육 확인

백신 접종 4주 후에 각각의 백신 접종 그룹에서 2마리씩을 안락사시킨 후, 접종 부위 이상육 생성 유무를 확인하였다.

다. 실험 결과

(1) 항체가 확인 결과

① Serotype A에 대한 ELISA 항체가



<그림 36>. Serotype A에 대한 ELISA 항체가 결과

- 이번 실험에서는 최종 후보 조성으로 선정된 SQ7 면역보좌제와 면역원성 개선을 위하여 oil 함량을 증가시킨 신규 시제품 2종에 대한 면역원성 평가를 상용화 구제역 백신 및 상용화 면역보좌제를 포함하는 시제품 그룹과 함께 수행하였으며, 실제 농장에서 구제역 백신을 사용하는 것과 동일한 방법으로 4주 간격으로 2회 보강 접종을 통해 항체가 양상이 어떻게 변화하는지 확인하였다. 시험백신과 동일하게 A22 Iraq 불활화 정제 항원을 6PD50 포함하고 있는 상용화 구제역 백신 접종그룹의 경우, 백신 접종

후 항체가 증가하기 시작하여 보강 접종 이후 모든 개체가 항체 양성으로 sero-conversion 되었으며, 혈중 최고 항체가를 기록한 이후 관찰 기간 동안 항체가 수준이 꾸준히 유지되는 양상이 확인되었다. 시제품 중 면역원성이 가장 우수했던 ISA201 상용화 면역보좌제를 포함하는 그룹의 경우, 상용화 구제역 백신 그룹과 유사한 양상을 보였다. SQ7에서 squalene oil의 함량을 35%로 증가시킨 신규 시제품 그룹의 경우, 혈중 최고 항체가 수준은 상용화 구제역 백신 다음으로 높았으며, 마지막 관찰 시점에서의 항체가는 ISA201 그룹과 동등하였다. SQ7 그룹의 경우, ISA201 그룹이나 SQ35 그룹 보다 항체 형성능이 낮았고, mineral oil을 35% 포함하는 MO35 그룹과는 동등한 면역원성을 보였다. (그림 36) 이번 실험을 통해 SQ7 조성에서 squalene oil 함량을 증가시킴으로써 상용화 면역보좌제와 동등한 수준의 면역원성 및 지속성 확보에 성공하였으며, MO35 그룹의 경우, oil 함량을 동등하게 증가시켰음에도 불구하고, 기존 MO12 조성과 비교하여 면역원성이 크게 향상되지 않았다는 점 등을 고려해볼 때, 단순히 oil 함량을 높이는 것이 아닌 SEDDS 내에서 항원의 방출과 면역세포 자극에 영향을 줄 수 있는 또 다른 연구가 추가적으로 필요하리라 판단된다. 또 하나, 이번 실험에서 상용화 구제역 백신 그룹보다 시험백신 그룹의 항체 형성능이 저조했던 이유는 동일한 A22 Iraq 불활화 정제 항원을 사용하고, 항원 농도 또한 6PD50으로 맞췄음에도 시험백신 제조에 사용한 항원은 보존기간이 10년 가까이 경과하여 항원의 보존성에 영향이 있었으리라 판단된다.

구분		주령별 항체가									
		12주령		16주령		18주령		20주령		22주령	
		ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN
CV-1 (상용화 FMDV 백신)	1	3.53		28.16		50.14		52.14		48.56	
	2	9.64		35.42		59.86		56.89		55.78	
	3	10.59		44.47		67.12		70.25		66.32	
	4	16.77		50.01		70.34		62.36		59.78	
	5	20.89		38.29							
	6	5.84		34.84							
	평균	11.21	#DIV/0!	38.5317	#DIV/0!	61.865	#DIV/0!	60.41	#DIV/0!	57.61	#DIV/0!
CV-2 (ISA201)	1	9.64		27.22		38.19		36.65		36.55	
	2	19.50		43.94		71.36		63.36		65.38	
	3	12.51		22.45		31.21		41.19		46.93	
	4	30.43		44.24		36.06		37.10		34.89	
	5	15.85		20.18							
	6	24.47		18.89							
	평균	18.7333	#DIV/0!	29.4867	#DIV/0!	44.205	#DIV/0!	44.575	#DIV/0!	45.9375	#DIV/0!
TV-1 (SQ7)	1	7.76		7.11		50.26		34.55		31.29	
	2	14.75		17.77		42.50		34.70		31.55	
	3	12.76		13.99		41.64		46.65		43.40	
	4	18.79		13.36		38.62		30.38		36.62	
	5	-0.55		12.48							
	6	13.01		24.82							
	평균	11.0867	#DIV/0!	14.9217	#DIV/0!	43.255	#DIV/0!	36.57	#DIV/0!	35.715	#DIV/0!
TV-2 (SQ35)	1	17.13		25.61		48.68		48.31		44.24	
	2	12.33		47.17		55.33		47.35		47.45	
	3	11.41		25.18		49.47		42.85		43.18	
	4	10.95		33.18		51.05		44.40		42.37	
	5	10.81		61.69							
	6	9.32		30.68							
	평균	11.9917	#DIV/0!	37.2517	#DIV/0!	51.1325	#DIV/0!	45.7275	#DIV/0!	44.31	#DIV/0!
TV-3 (MO35)	1	10.42		22.98		37.83		34.92		36.34	
	2	14.96		28.37		41.42		34.81		37.68	
	3	7.36		13.50		53.35		50.08		42.62	
	4	16.59		33.44		39.80		31.78		28.12	
	5	21.17		14.35							
	6	19.47		12.18							
	평균	14.995	#DIV/0!	20.8033	#DIV/0!	43.1	#DIV/0!	37.8975	#DIV/0!	36.19	#DIV/0!
NC	1	9.14		8.12		6.58		1.58		2.47	
	2	13.58		10.45		7.48		6.12		4.47	
	평균	11.36	#DIV/0!	9.285	#DIV/0!	7.03	#DIV/0!	3.85	#DIV/0!	3.47	#DIV/0!

<그림 37>. 백신 접종 그룹의 항체가 raw data

(2) 백신 접종 부위 이상육 확인 결과

① 상용화 구제역 백신 접종 그룹

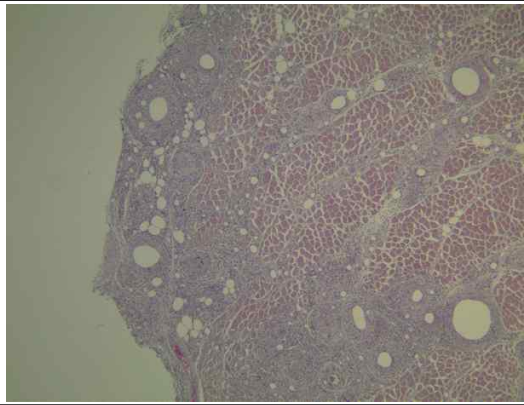
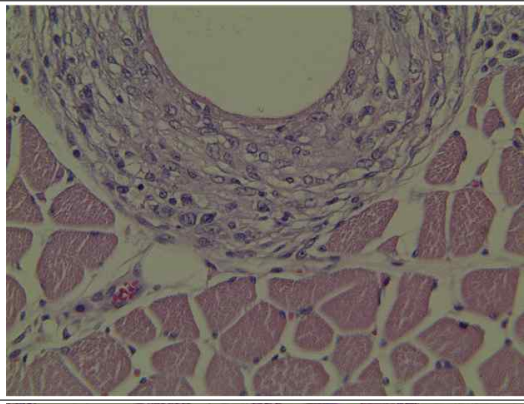
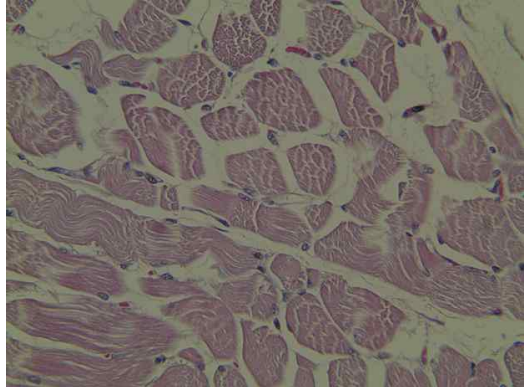
[접종부위 육안 소견]



<그림 37>. 상용화 구제역 백신 접종 그룹의 접종부위 육안 소견

- 메리알사의 상용화 구제역 백신 (코미팜 생산) 접종 그룹의 경우, 접종 4주 후 근육의 육안 관찰 결과 백신 자체는 근육으로 잘 접종된 것으로 관찰되나, 접종부위에 백신의 성분이 알갱이로 남아 있는 것이 관찰되었다.

[병리조직학적 소견]

	<p>×100 육안상으로 보였던 백신 잔류성분은 조직병리학적 관찰을 위해 슬라이드를 만드는 과정에서 vacuole의 형태로 나타났으며 접종부위를 중심으로 끊어진 근육다발 사이로 과도한 염증세포의 침윤이 관찰되었다.</p>
	<p>×400 고배율로 관찰한 결과 끊어진 근육다발 사이로 섬유화의 진행과 함께 조직간질 내 염증세포의 침윤이 관찰되었다.</p>
	<p>×400 접종 후 근육다발의 파열이 관찰되었고 파열된 근육다발 사이로 섬유화의 진행이 관찰된다.</p>

<그림 38>. 상용화 구제역 백신 접종 그룹의 병리조직학적 소견

② ISA201 상용화 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹

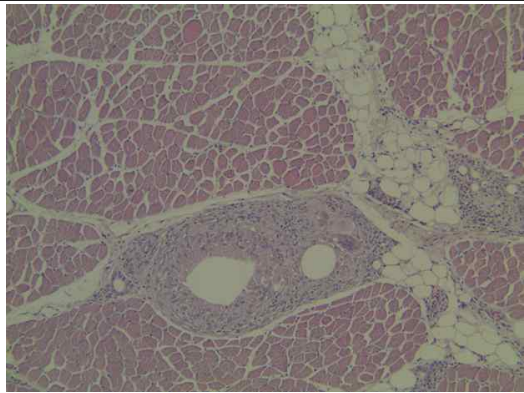
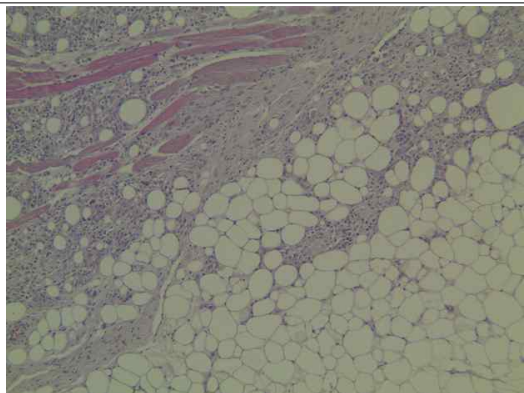
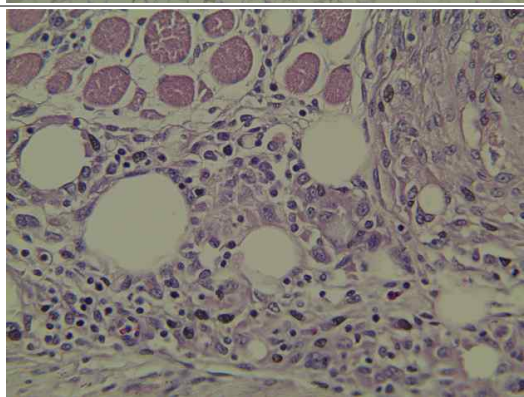
[접종부위 육안 소견]



<그림 39>. 상용화 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 접종부위 육안 소견

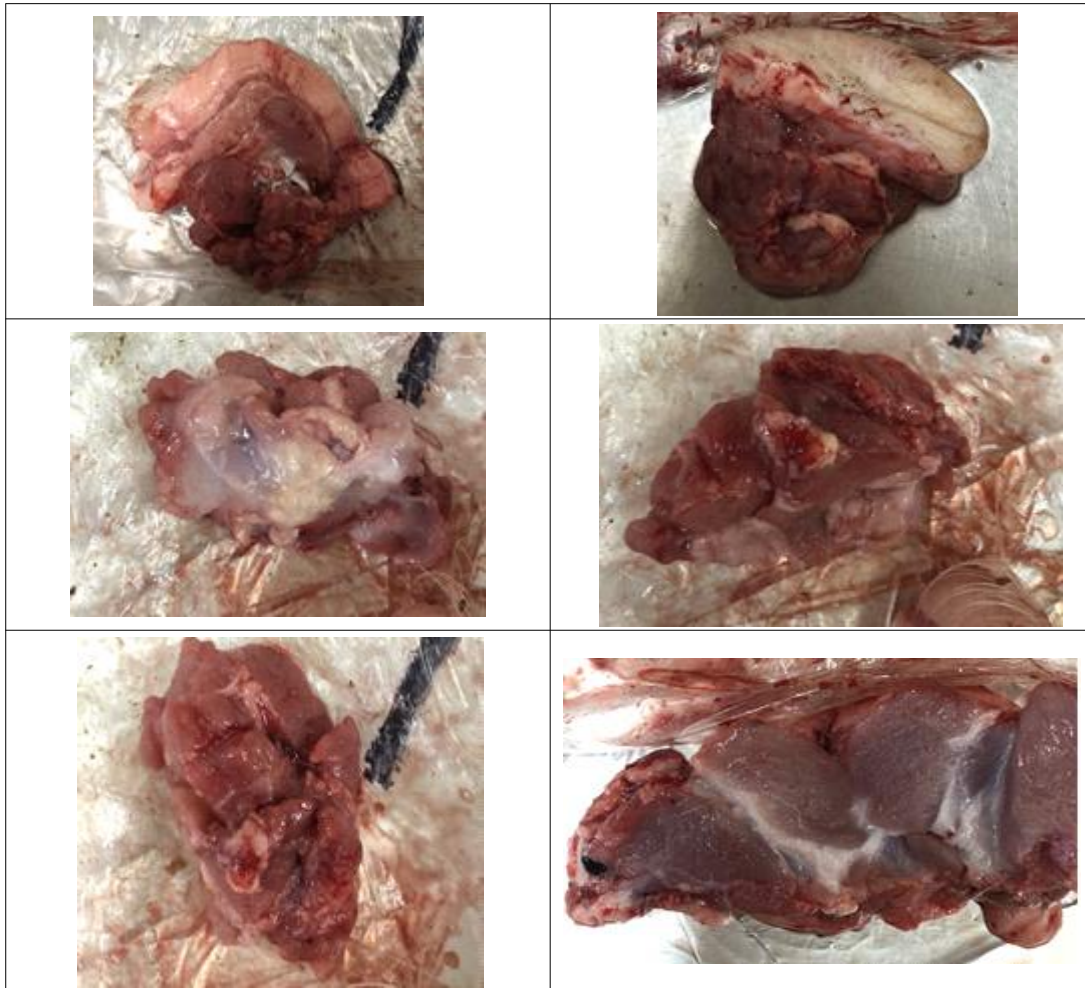
- Seppic사의 상용화 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 경우, 접종 4주 후 근육 내에 백신 잔유물이 잔류하고 있는 것으로 관찰되었다.

[병리조직학적 소견]

	<p>×100 접종 부위에 근육다발의 소실과 함께 섬유화가 진행되었고, 염증세포의 과도한 침윤이 관찰되었다.</p>
	<p>×100 접종 부위 근육다발이 깨지고 섬유화가 진행되었고 염증세포가 과도하게 침윤하였다. 조직에 존재하는 vacuole 들은 백신의 잔류물질이며 조직처리동안 지질성분은 날아가고 vacuole로 관찰된다.</p>
	<p>×400 백신 접종 부위의 염증세포의 침윤과 섬유화의 진행이 관찰된다.</p>

<그림 40>. 상용화 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 병리조직학적 소견

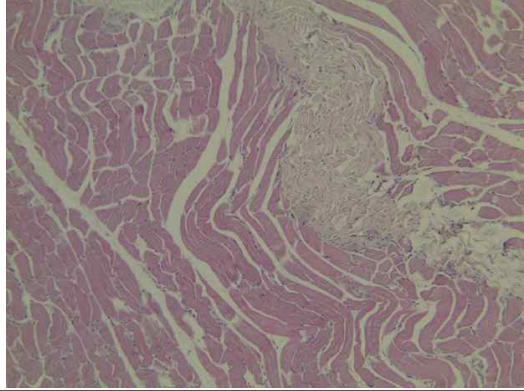
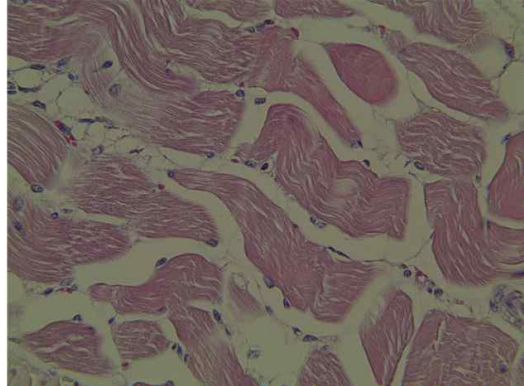
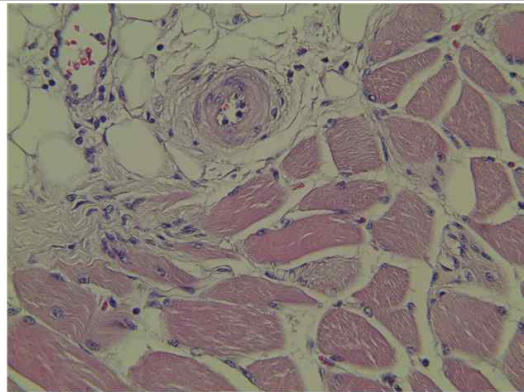
③ SQ7 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹
[접종부위 육안 소견]



<그림 41>. SQ7 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 접종부위 육안 소견

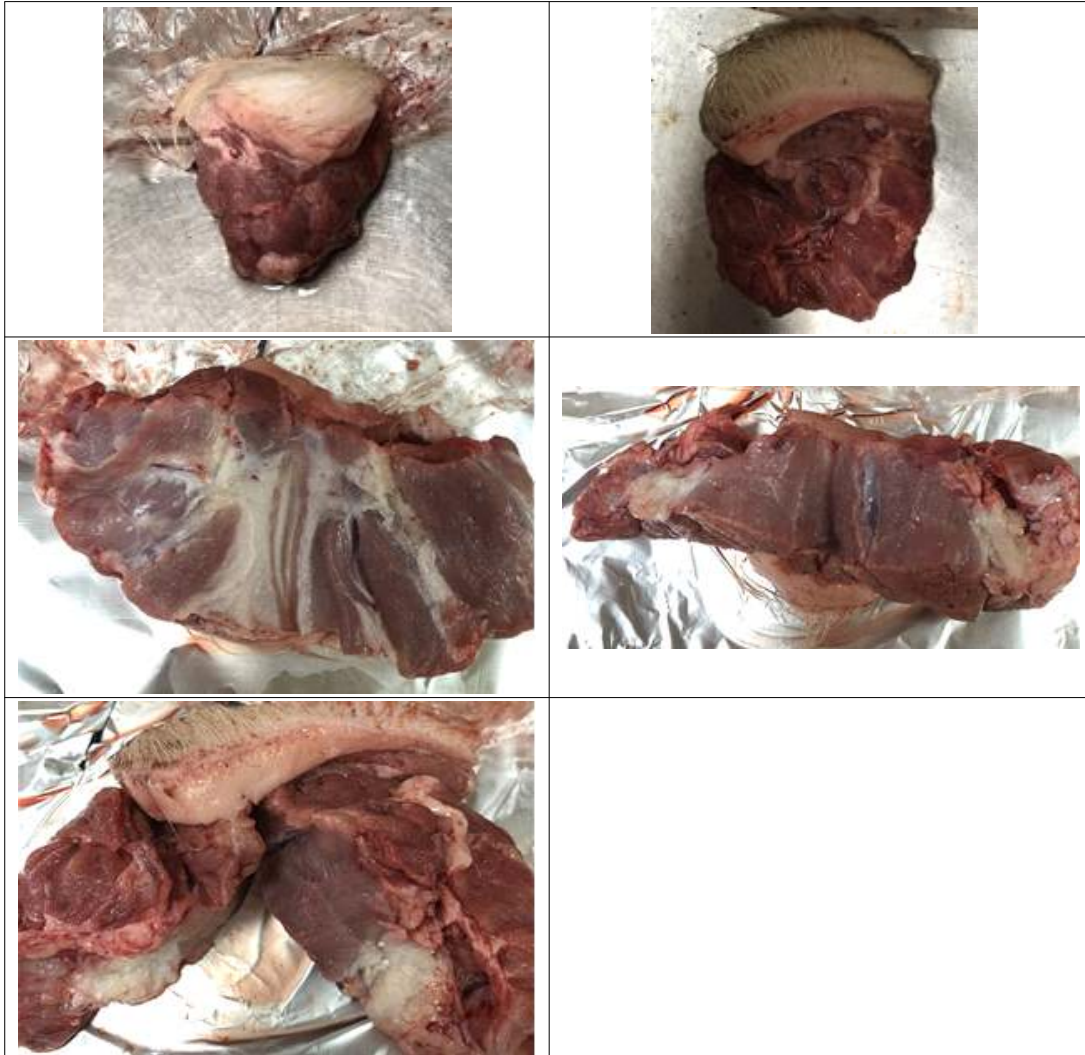
- SEDDS를 기반으로 제조된 지질기반 나노 면역보좌제 (SQ7) 포함 백신 접종 그룹의 경우, 접종 4주 후 근육내로 백신 접종이 잘 이루어진 것으로 관찰되었고, 백신의 잔류는 육안적으로 관찰되지 않았다.

[병리조직학적 소견]

	<p>×100 근육 내 끊어진 근육다발 사이로 재생되기 시작한 근육이 관찰된다. 근육의 손상 정도가 심하지 않아 곧 정상 근육다발로 재생되기 시작한 것으로 보인다.</p>
	<p>×400 조직 내 접종부위 사이에 약간의 조직의 손상은 있으나 근육의 재생이 일어나고 있는 모습으로 관찰된다.</p>
	

<그림 42>. SQ7 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 병리조직학적 소견

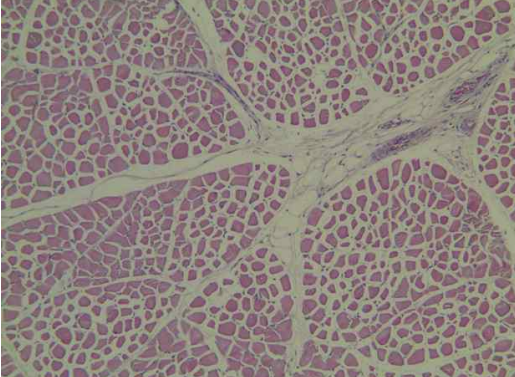
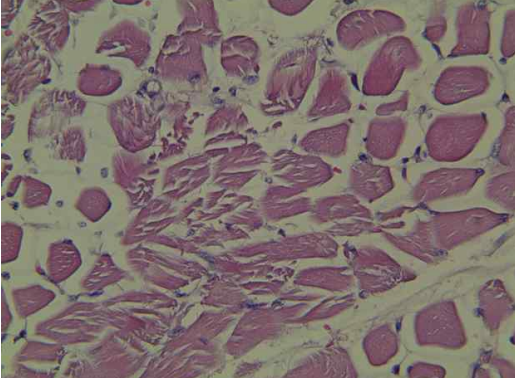
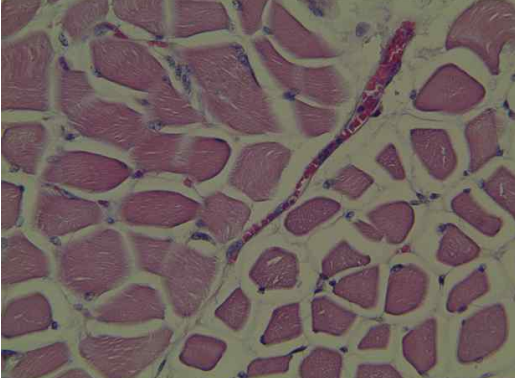
④ SQ35 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹
 [접종부위 육안 소견]



<그림 43>. SQ35 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 접종부위 육안 소견

- SEDDS를 기반으로 제조된 지질기반 나노 면역보좌제 (SQ35) 포함 백신 접종 그룹의 경우, 접종 4주 후 근육내로 백신 접종이 잘 이루어진 것으로 관찰되었고, 백신의 잔류는 육안적으로 관찰되지 않았다.

[병리조직학적 소견]

	<p>×100 접종부위 조직병리학적 병변이 크게 나타나지 않는다. 접종부위에 잔류된 백신의 성분이 관찰되지 않는다.</p>
	<p>×400 백신 접종 후 접종 부위 근육다발이 약간 끊어진 것으로 관찰되나 근육의 재생이 일어나고 있는 것으로 관찰된다.</p>
	<p>×400 접종 부위인 근육다발 사이로 약간의 염증반응이 진행되어 혈관이 늘어난 모습이 관찰된다. 백신접종으로 인한 면역반응의 증강을 위해 필요한 최소한의 반응으로 판단된다.</p>

<그림 44>. SQ35 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 병리조직학적 소견

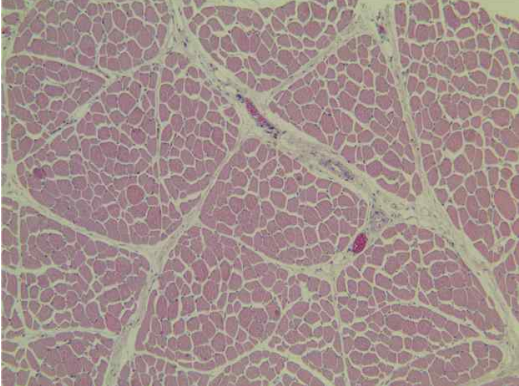

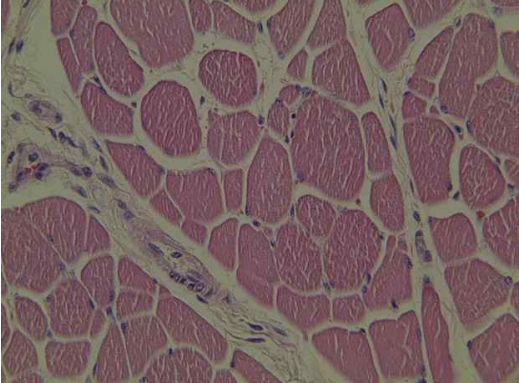
⑤ MO35 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹
[접종부위 육안 소견]



<그림 45>. MO35 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 접종부위 육안 소견

- SEDDS를 기반으로 제조된 지질기반 나노 면역보좌제 (MO35) 포함 백신 접종 그룹의 경우, 접종 4주 후 근육내로 백신 접종이 잘 이루어진 것으로 관찰되었고, 백신의 잔류는 육안적으로 관찰되지 않았다.

[병리조직학적 소견]

	<p>×100 백신의 접종은 근육내로 잘 이루어졌고 접종 부위의 근육사이로 약간의 혈관의 충혈이 관찰된다.</p>
	<p>×100 접종 후 약간의 조직반응으로 근육다발이 끊어진 형태가 관찰되었다. (화살표 표시) 또한, 접종에 의한 조직의 경미한 정도의 염증반응으로 인한 혈관이 충혈된 모습으로 비특이적 염증반응의 전형적인 반응이다. (동그라미 표시)</p>
	<p>×400 고배율로 본 접종부위의 조직병리학적 형태로 혈관반응 등 염증반응이 거의 관찰되지 않는다.</p>

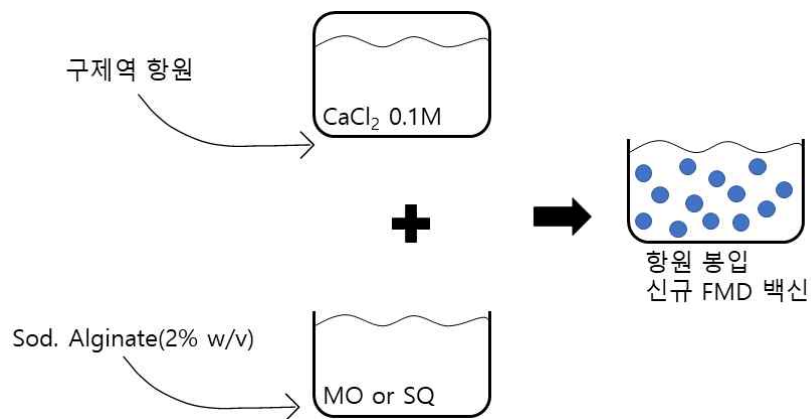
<그림 46>. MO35 면역보좌제 포함 백신 접종 그룹의 병리조직학적 소견

제4절 면역지속성 개선을 위한 신규 면역보좌제 조성 연구 계획

1. 천연소재 기반 백신보좌제 후보물질 개발 계획

가. 시험백신 제조

- 1차적으로 Alginate가 CaCl_2 와 만나면 Egg Box를 형성해 경화가 되는 원리를 응용하여 시험백신을 제조하였다.
- Alginate는 저렴하고, 생분해성이기 때문에 수용성 약물을 안전하고 서서히 전달할 수 있는 특징을 지니고 있다.
- 제법은 하기와 같다.



<그림 47>. Alginate를 이용한 약물 봉입 원리

- 상기의 신규백신 조성물을 돼지에 접종한 결과 동물 체내에서 항원을 지속적으로 유지시키는 것을 확인할 수 있었고, 기존에 개발된 지질기반 나노 백신보좌제와의 combination을 통해 면역지속성 부분을 좀 더 강화하여 궁극적으로는 백신 접종 횟수를 기존 2회에서 1회로 줄일 수 있는 가능성을 평가해보고자 한다.

제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절 목표

- 지질기반 나노입자 백신보좌제 개발
 - 분산도(PDI) 0.3 이하의 균질한 입자성 백신보좌제
 - 주사 가능한 입도의 입자성 백신보좌제 : Particle size 50 μm 이하
- 면역지속기간 증대 : 구제역 백신 접종 후 출하 (25주령)까지 최소 13주간 면역 지속기간 유지
- 항체 형성을 증가 : 기존 제품 대비 동등 이상
- 주사부위 육아종/농양억제 : 지질기반 나노입자 백신보좌제는 입자가 작아 주변 조직으로 육아종 형성없이 흡수되는 특징을 가지고 있으며 이를 목적동물에 대한 임상시험에서 확인
- 기술이전/제품화 : 기술 1건 / 제품화 2건 (과제 종료 1차년도)
- 돼지 60두, 염소 10두, 송아지 10두를 평가하여 면역유도능, 면역지속능, 즉시형 백신접종반응을 평가한 후 추적평가를 실시하고 도축 시 시료채취 후 백신 접종부위 이상육 평가

제2절 목표 달성여부

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1 차 년 도	면역증강물질을 이용한 시제품 제조 및 안전성 평가	구제역 백신 시제품 3종 제조 및 안정성 평가	100 %
		구제역 백신 시제품 3종의 마우스 면역원성 및 방 어력 평가	0 %
		신규 백신보좌제를 포함하는 양돈백신 개선품 2종 시제조	100 %
	지질기반 나노입자 백신보좌제의 실험실 내 안전성 평가	지질기반 나노입자 백신보좌제의 실험실내 세포, 실험동물을 이용한 안전성 평가	100 %
		지질기반 나노입자 백신보좌제의 조직내 육아종 형성유무 및 병리 조직학적 평가	100 %
		구제역 백신 시제품 3종의 안전성 및 조직내 육아 종 형성유무와 병리조직학적 비교 평가	100 %
	입자성 시스템을 이용한 지질기반 나노입자 대량생산 기술확립	입자성 시스템을 이용한 지질기반 나노입자 백신 보좌제의 실험실 내 공정기술 확립	100 %
지질기반 나노입자 백신보좌제의 대량생산을 위한 공정기술 확립		100 %	
2 차 년 도	구제역 백신 시제품의 대상 목적동물에 대한 임상시험 수행	구제역 백신 시제품의 목적동물 임상시험	100 %
		신규 백신보좌제를 포함하는 양돈 백신 개선품 2종에 대한 안전성 및 면역원성 평가	100 %
		신규 백신보좌제를 포함하는 양돈 백신에 대한 동물용 생물학적제제 수출품목 허가 또는 변경허가 착수	100 %
	신규 구제역 백신의 안전성과 효능 비교 분석 (기존 상용화 백신 대비)	구제역 백신 시제품의 목적동물 임상시험 (상용화 구제역 백신과의 비교평가) - 돼지 60두, 송아지 10두, 염소 10두 - 2회 접종 프로그램, 최대 24주령까지 평가	80 %
		지질기반 나노입자 백신보좌제의 대량생산을 위한 공정 확립	지질기반 나노입자 백신보좌제의 대량생산을 위한 공정 확립
	대량생산라인에서 생산된 백신의 물성 및 안정성 분석		100 %
백신 제품화를 위한 기술지원	100 %		

제3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 1차년도

- 연구개발의 내용 : 구제역 백신 시제품 3종의 마우스 면역원성 및 방어력 평가
- 달성도 (%) : 0 %
- 목표 미달성 사유 : 1차년도 연구수행 기간 동안 최적의 면역보좌제 후보군 선정에 대해 2회에 걸쳐 총 54개 조성에 대한 예비 평가를 수행하였고, 이 중 30개 조성에 대해서 양돈 백신 시제품을 제조하고, 마우스를 대상으로 안전성 및 면역원성 평가를 수행 후에 최종 선정된 면역보좌제 후보군 2종에 대하여 구제역 백신 시제품 제조를 실시하였다. (상용화 면역보좌제 그룹 2종을 포함하면 총 4종의 구제역 백신 시제품을 2차 년도에 제조) 이 과정에서 1차 년도에 계획된 구제역 백신 시제품 3종 제조가 2차 년도에 수행되었고, 구제역 백신 시제품을 평가할 시간이 넉넉하지 않아, 실험동물 실험을 생략하고 바로 목적동물 실험을 수행하였습니다.
- 차후대책(후속연구의 필요성) : 구제역 백신을 연구하는 과정에서 가장 기본이 되는 실험동물 모델은 마우스이며, 이후 기니픽, 일반돼지 순서로 연구가 진행됩니다. 일반적으로 목적동물에 대한 실험 결과를 보기 이전에 다양한 후보군을 간소화시키기 위한 목적으로 실험동물 실험을 수행하고, 마우스 방어력 평가의 경우, BSL3 차폐 시설에서 수행해야 한다는 점과 제품화 과정에서 백신의 방어력 평가 결과로 인정받지 못하는 점 등을 고려했을 때, 계획된 마우스 면역원성 및 방어력 평가는 생략하더라도 백신 개발 과정에서 문제가 되지 않습니다.

○ 2차년도

- 연구개발의 내용 : 구제역 백신 시제품의 목적동물 임상시험 (상용화 구제역 백신과의 비교 평가) / 돼지 60두, 송아지 10두, 염소 10두 / 2회 접종 프로그램, 최대 24주령까지 평가
- 달성도 (%) : 80 %
- 목표 미달성 사유 : 현재 시판되고 있는 구제역 백신의 경우, 돼지보다 소에 적합하며, 실제 허가 과정에서 확보된 백신의 안전성, 면역원성 및 방어력 실험 결과들 또한 대부분 돼지가 아닌 소를 대상으로 수행되었습니다. 또한, 소에 백신을 접종했을 때에는 항체 역가가 개체 편차 없이 매우 고르고 높게 형성되는데 반해, 돼지에 백신을 접종했을 때에는 개체 간의 편차가 심하고, 항체 또한 고역가로 올라가지 않는 문제가 있습니다. 이에 따라, 본 과제를 수행하는 과정에서 개발한 면역보좌제 및 이를 이용하여 제조한 구제역 백신 시제품의 효능 평가를 돼지에 집중적으로 수행하였고, 기존에 A22 Iraq 불활화 정제항원으로만 평가하기로 계획하였으나, A 포천주 및 O 진천주 불활화 정제 항원에 대해서도 돼지에서 면역원성을 추가로 확인하였습니다. 송아지와 염소에서 백신을 평가하진 않았지만, 돼지에서 기존 계획된 60두 보다 1.5배 많은 88두에 대한 평가를 수행하였고, PCV2+*Mycoplasma* 백신에 대한 평가 두수를 포함하면 120두를 상회합니다.
- 차후대책(후속연구의 필요성) : 구제역 백신의 적용 축종이 돼지, 소를 포함하고 있는 만큼, 백신의 제품화 과정에서 소에 대한 안전성 및 면역원성 평가는 반드시 필요하다고 생각됩니다.

다. 돼지에서 신규 면역보좌제의 안전성과 면역원성을 확인한 만큼, 과제 종료 이후 계획된 기술이전 및 제품화 과정에서 소에 대한 평가를 추가로 수행하고자 합니다.

제4장 연구결과의 활용 계획 등

제1절 연구결과의 활용 계획

- 구제역 백신의 국산화라는 궁극적인 목표에 도달하기 위해서는 구제역 항원의 국내 생산 기술 확립과 구제역 백신에 적합한 면역보좌제 개발이 동시에 이루어져야 한다. 하지만, 국내 대부분의 연구기관에서는 면역증강제 개발 보다는 항원 생산 기술 확보에 주력하고 있으며, 구제역 백신의 100% 국산화를 위해서는 면역증강제 개발이 반드시 병행되어야 함.
- 구제역 항원의 국내 생산 기술 확립과 관련해서 코미팜은 곤충세포 발현, 대장균 발현 시스템을 이용한 재조합 항원 생산 기술을 이미 보유하고 있으며, 구제역 바이러스 불활화 정제 항원 생산과 관련해서도 농림축산검역본부와 2년 동안 산업체공동연구과제 수행을 통해서 노하우를 익혔고, 구제역 백신 국내 생산 공장 구축을 위한 컨소시엄에도 정식 참여하여 구제역 백신 국산화를 위해 다방면에서 노력중이다.
- 본 과제를 통해 기존 백신 항원의 효능을 저하시키지 않으면서 이상육 발생으로 인한 경제성 손실을 막을 수 있는 백신보좌제 후보물질을 개발하였기 때문에 추후 구제역 백신 국산화를 위한 연구개발에 적극적으로 활용하고자 한다.
- 또한, 본 과제에 함께 참여했었던 계명대학교 약학대학 연구팀과 함께 2회 백신 접종 프로그램을 1회 접종 프로그램으로 줄이기 위한 면역 지속성이 보장된 면역보좌제 개선 연구계획을 수립 하여 후속 과제 추진을 계획 중에 있다.
- 한편, 면역원성 및 지속성은 우수하나 안전성 문제로 제한적으로만 사용되어 왔던 oil emulsion을 다양한 양돈 백신 제품에 확대 적용함으로써, 국내 백신의 효능을 증대시키고 다국적 기업 백신과 경쟁할 수 있는 시장 경쟁력을 확보하고자 한다.

제2절 제품화 전략

- 본 연구과제 수행을 통해 개발한 신규 면역보좌제는 상용화 면역보좌제와 비교하여 아래와 같은 장점을 지니고 있다.
 - i) SEDDS (자가유화시스템)가 적용되어 백신 제조 과정에서 공정이 매우 안전하고 편리하다.
 - ii) 상용화 면역보좌제를 크게 O/W, W/O, W/O/W emulsion으로 분류할 수 있고, 일반적으로 항체 형성능 및 지속성은 W/O > W/O/W > O/W emulsion 순서로 우수하며, 안전성은 그 반대로 알려져 있다. 상용화 구제역 백신의 경우, 효능을 가장 중요하게 생각하고 있기 때문에 W/O 혹은 W/O/W emulsion을 주요 면역보좌제로 사용중이며, 이로 인해 이상육 생성과 같은 안전성 문제가 발생하였다. 본 연구과제를 통해서 개발한 신규 면역보좌제의 경우, O/W emulsion의 특징을 가지면서 particle size가 기본 상용화 구제역 백신과 비교하여 작기 때문에 안전성 측면에서

특장점이 있으며, 면향체 형성능 및 지속성의 경우에도 상용화 O/W emulsion의 단점을 극복하고 W/O 혹은 W/O/W emulsion과 거의 동등한 수준까지 향상된 것을 확인할 수 있었다.

iii) 경제성 분석

현재 국내에서 판매되고 있는 구제역 백신에 실제로 적용되고 있는 면역보좌제의 상세한 조성은 알려진바 없지만, W/O 혹은 W/O/W emulsion의 형태가 사용되고 있다. 세계적으로 가장 많이 사용되는 Seppic 사의 (프랑스) 상용화 면역보좌제 가격을 기준으로 볼 때, 상용화 백신 1 dose에 사용되는 면역보좌제의 비용은 약 28~37 원 수준으로 볼 수 있고, 본 과제에서 개발한 Squalene 기반 O/W emulsion의 제조에도 유사한 비용이 소요된다. 다만, 부족한 면역지속성을 보강하기 위하여 squalene oil의 양을 높일 경우, 최대 2배 정도의 원가 상승이 예상되며, 그럼에도 불구하고, 순수 국내 기술로 제조되었다는 점, 구제역 백신 1 dose의 가격이 1300원 전후로 백신 가격에서 면역보좌제가 차지하는 비중이 매우 낮다는 점 등을 감안하면 국내 기술로 제대로된 면역보좌제만 만들어진다면 가격은 크게 고려할 요소가 아니라고 판단된다.

- 코미팜에서는 본 연구과제의 성과를 궁극적으로 구제역 백신 국산화를 위해 활용하고자 하며, 이를 위해 아래와 같은 과정을 통해 목표를 달성하고자 한다. 목표 달성에는 최소 3년 이상, 최대 5년의 시간이 소요될 것으로 예상된다.

1) 구제역 항원의 확보

① 재조합 구제역 항원 확보

- 코미팜에서는 구제역 백신 국산화를 최종 목표로 재조합 구제역 항원 생산 시스템을 구축하기 위한 다양한 노력을 하고 있다.
- 먼저, 또 다른 가축질병대응기술개발 사업 참여를 통해 대장균 발현 시스템을 이용한 재조합 구제역 항원 생산 기술을 이전 받은바 있으며, 코미팜의 장점인 배컬로바이러스 발현 시스템을 활용하여 재조합 구제역 항원을 생산하기 위한 자체 연구도 함께 수행 중에 있다.

② 불활화 정제 항원 확보

- 지난 2년 간 검역본부와의 산업체 공동연구 과제를 통해서 구제역 바이러스 배양과 불활화 및 정제와 관련된 기술을 익혔고, 이를 활용하기 위하여 구제역 백신의 국내 생산 공장 구축을 위한 컨소시엄에도 정식 참여하고 있다.

2) 기 개발된 면역보좌제의 개선

① 면역원성 및 지속성 강화

- 지난 2년간의 연구 결과에서 상용화 면역보좌제와의 비교 평가를 수행하면서 가장 아쉬웠던 점은 상용화 면역보좌제보다 항체 형성능이나 지속성 측면에서 유의적으로 뛰어난 효과를 확인하지 못했다는 점이다. 상용화 면역보좌제들이 사용된 구제역 백신조차도 실제 사용 과정에서 효과적인 측면에서 논란이 많은 만큼, 본 연구과제에서 개발된 신규 면역보좌제가 후에 구제역 백신 제조에 활

용되기 위해서는 면역원성과 면역지속성의 보장이 반드시 필요하리라 생각된다. 이를 위해 본 연구과제를 함께 수행하였던 계명대학교 약학대학 이상길 교수 연구팀과 함께 후속 과제를 준비 중에 있으며, 이를 통해 재조합 구제역 항원에도 효과적으로 적용할 수 있는 강력한 면역보좌제를 개발하기 위한 노력을 지속적으로 수행하고자 한다.

② 안전성 평가

- 본 과제를 수행하면서 또 하나 아쉬웠던 점은, 기존 상용화 면역보좌제와의 효능적인 비교 평가에만 집중한 나머지 실제로 개발된 면역보좌제의 안전성을 다양한 측면에서 확인하지 못한 점이다. 이를 보완하기 위해 실제 제품화 단계에서 야외 임상시험을 통해 백신 접종 후 경과 일수에 따른 접종 부위 이상육 생성 정도 등을 추가로 확인하고자 한다.

3) 구제역 백신 시제품 제작과 안정성 평가

상기 과정을 통해 재조합 구제역 항원 확보가 완료되고, 면역보좌제의 개선이 성공적으로 수행되면, 이를 조합하여 구제역 백신 허가를 위한 연속 3 Lot 시험백신을 제조할 것이다. 이를 활용하여 백신과 면역보좌제의 안정성을 (제조직후, 제조 후 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월) 확인하는 한편, 야외 임상시험 등에 활용하여 백신의 안전성과 면역원성을 평가하고자 한다.

4) 임상시험 신청 및 야외 임상시험

검역본부를 통해 야외 임상시험에 대한 승인을 받은 후, 3개의 야외 임상시험 농장에서 백신의 안전성과 면역원성에 대한 대규모 적용 평가를 수행할 것이다. 이 과정에서 실제 야외 돼지 및 소를 대상으로 구제역 백신 시제품을 접종 후, 항체 형성능 및 출하직전까지의 지속성을 확인하고, 이상육 생성 등의 안전성과 관련해서도 백신 접종 후 경과 시간에 따라 주기적으로 접종 부위를 관찰하고, 필요시 조직 소견 등을 추가로 확인하고자 한다.

6) 품목허가서류 제출 및 허가 승인

실험실 내 백신의 안정성 평가, 야외 임상시험을 통한 백신의 안전성 및 면역원성 평가 종료 후, 농림축산검역본부에 백신의 제조 및 판매 허가를 위한 기술검토 서류를 제출하고, 인허가 절차를 거쳐 정식으로 제품의 허가를 취득할 것이다.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 이상육 생성을 유발하지 않는 구제역백신 보좌제 개발				
	(영문) Development of the innovative FMD vaccine adjuvant not causing granuloma or abscess on an injection site				
주 관 연구 기관	(주)코미팜		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)코미팜	
참 여 기 업	(주)코미팜			(성명) 김주현	
총 연구개발비 (458,000 천원)	계	458,000 천원	총 연구 기간	2016. 09. ~ 2018. 09. (2년)	
	정부출연 연구개발비	343,000 천원	총 참 연 구 원 수	총 인 원	23명
	기업부담금	115,000 천원		내부인원	13명
	연구기관부담금			외부인원	11명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구의 최종 목표는 이상육 생성을 유발하지 않는 안전한 구제역 백신 보좌제를 개발하는 것으로 연구결과, Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS)을 이용한 백신 제조 공정을 확립하고, squalene 및 carbomer를 기반으로 한 지질기반 나노입자 면역보좌제 1종을 최종 선별하였으며, (O/W nano-emulsion) 상용화 면역보좌제 및 상용화 구제역 백신과의 비교 평가를 통해서 안전성과 면역원성을 입증하였다. <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 나노~마이크로 크기의 입자성 백신보좌제 개발과 안전성 및 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 입자도 10~100 nm, Zeta potential >±20 mV, PDI <0.3 - 제조 후 6개월 이상 제형의 안정성 유지 - 마우스 복강 접종 시 임상증상 및 폐사 없으며, 근육 접종 시 이상육 생성 없음 - 마우스 모델에서 체액성 및 세포성 면역 동시 자극 2) 상용화 백신 보좌제와의 비교 평가를 통해 시제품의 상용화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Mycoplasma hyopneumonia</i> 불활화 항원을 포함하는 시제품 제조 시 상용화 면역증강제 2종 대비 면역원성 우수함 - A 포천주 불활화 정제 항원을 포함하는 시제품 제조 시 o/w emulsion의 상용화 면역증강제 1종 대비 면역원성 우수함 - O 진천주 불활화 정제 항원을 포함하는 시제품 제조 시 o/w emulsion의 상용화 면역증강제 1종 대비 면역원성 우수함 3) 상용화 구제역 백신과의 비교 평가를 통해 구제역 백신 국산화 가능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - Oil 함량을 높인 개선품에 대하여 A22 Iraq 불활화 정제 항원을 포함하는 시제품 제조 시, w/o/w emulsion의 상용화 면역증강제와 동등한 면역원성 확인 - 상용화 구제역 백신, w/o/w emulsion의 상용화 면역증강제 대비 이상육 생성 현저히 감소 					

○ 연구 성과 활용실적 및 계획

1) 성과 실적

- 특허출원 2건
- 논문 2건 (SCI 1건, 비SCI 1건)
- 학술발표 2건

2) 활용 계획

- 기존 백신 항원의 효능을 저하시키지 않으면서 이상육 발생으로 인한 경제적 손실을 막을 수 있는 백신보좌제 후보물질을 개발하여 추후 구제역 백신 국산화를 위한 연구개발에 활용 가능할 것으로 기대됨
- 면역원성 및 지속성은 우수하나, 안전성 문제로 제한적으로만 사용되어 왔던 oil emulsion을 다양한 양돈백신 제품에 확대 적용함으로써 국산 백신의 효능을 증대시키고 다국적 기업 백신과 경쟁할 수 있는 시장 경쟁력 확보

[별첨 2]

자체평가의견서

1.

		과제번호	316094-2		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	동물용의약품		과제구분	단위	
사업명	가축질병대응기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	이상육 생성을 유발하지 않는 구제역백신 보좌제 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	(주)코미팜		연구책임자	김주헌	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	1년	143,000	48,000	191,000
	2차연도	1년	200,000	67,000	267,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계	2년	343,000	115,000	458,000
참여기업	(주)코미팜				
상대국		상대국연구기관			

2. 평가일 : 2018.10.15.일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)코미팜	이사	김주헌

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구 과제를 통해 개발한 Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS)에 의한 지질기반 나노입자 백신보좌제는 입자의 크기, 입자의 표면전하, 사용되는 소재의 극성, 소재의 분해기간 등을 자유롭게 조절할 수 있고, 백신 항원을 이들 시스템에 흡착시킴으로써 얻어지는 부가적인 면역증강 효능을 기대할 수 있으며, 다양한 항원을 병용한 복합시스템 디자인도 가능하게 하는 매우 창의적인 소재이다. 또한, 순수 국산 기술로 상용화 면역보좌제 대비 동등 이상의 효과와 안전성을 동시에 확보했다는 측면에서 성공적이라 할 수 있다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구 과제의 주관연구기관이자 참여기업으로 참여한 코미팜은 생물학적제제 생산이 가능한 국내 7개 기업 중 매출 상위 1~2위를 다투는 기업으로, 구제역 백신의 국산화를 위해 꾸준히 노력해왔다. 특히 구제역 백신 항원 생산 기술을 확립하기 위하여 지난 2년간 검역본부와 산업체 공동연구과제를 수행한 바 있으며, BSL3 제조시설을 구축하기 위한 컨소시엄에도 참여하여 한 축을 담당하고 있다. 한편, 기존 BSL2 제조시설에서 생산 가능한 재조합 구제역 항원 개발을 위한 연구개발 또한 지속적으로 수행하고 있다. 이러한 측면에서 코미팜이 국내 다른 어떤 기업들보다 구제역 백신 국산화에 가장 근접해 있으며, 구제역 백신에 적용 가능한 백신보좌제의 개발은 구제역 백신의 국산화를 더욱 촉진시켜 줄 것으로 기대된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

주관연구기관이자 참여기업인 코미팜이 동물용의약품, 특히 생물학적제제 생산이 가능한 KVGMP 제조시설을 갖추고 있다는 점과, 새로 개발된 백신보좌제를 제품화하기 위한 다양한 백신 항원을 이미 확보하고 있고, 제품 개발을 전담할 중앙연구소를 별도 보유하고 있다는 점 등에서 연구개발 결과에 대한 활용가능성은 매우 높다고 볼 수 있다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

최적의 백신보좌제 조성을 개발하기 위하여 총 2회에 걸쳐 54종의 시제품을 제조하고, 30종 이상에 대하여 시험백신 제조 및 효능 평가를 수행하였으며, 특히 구제역 백신 시제품 제작과 관련하여 계획되었던 A22 Iraq 불활화 정제 항원 외에 코미팜 자체적으로 확보한 A 포천주, O 진천주에 대한 추가 실험을 진행하는 등 과제 수행 전반에 걸쳐 성공적인 결과물을 얻기 위해 노력하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, **보통**, 미흡, 불량)

과제 협약 당시 제시하였던 연구개발성과와 대비하여 정책제안 2건이 미진한 상태이며, 논문 발표를 1건 초과 달성하였다. 정책제안의 경우, 백신 시제품 제조 등과 같은 개발 진도가 협약 당시와 비교하여 다소 지연되었고, 백신의 안전성 및 효능을 검증하는 과정에서 수 회 반복 실험이 이루어지면서 의미 있는 성과 확인이 늦어져 적극적으로 대응하지 못하였다.

II. 연구목표 달성도

세부 연구목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
신규 면역증강물질을 이용한 시제품 제조 및 안전성 평가	10 %	80 %	구제역 백신 시제품 3종과, 양돈백신 2종에 대한 시제조 및 평가 계획이 있었으나, 구제역 백신 시제품 12종, 양돈백신 시제품 33종으로 계획대비 목표 초과 달성함. 다만, 계획되었던 구제역 백신 시제품의 마우스 면역원성 및 방어력 평가를 수행하지 못 함
지질기반 나노입자 백신보좌제의 실험실 내 안전성 평가	10 %	100 %	지질기반 나노입자 백신보좌제 54종에 대한 마우스 안전성 확인 및 접종부위 이상육 평가를 수행하였고, 구제역 백신 시제품 5종에 대한 안전성 및 접종부위 이상육을 평가함으로써 계획대비 목표 초과 달성함.
입자성 시스템을 이용한 지질기반 나노입자 대량생산 기술확립	10 %	100 %	자가유화시스템은 (SEDDS) 오일, 비이온성 계면활성화제의 균질 혼합액으로서 오일에 대한 적절한 용해도를 지니는 지용성 약물의 혼합액을 수상에 노출시켰을 때 가변운 교반에 의해 쉽게 o/w emulsion을 형성한다.
구제역 백신 시제품의 대상 목적동물에 대한 임상시험 수행	30 %	100 %	A 포천주, O 진천주, A22 Iraq 불활화 정제항원을 이용한 구제역 백신 시제품 12종을 제조하였고, 구제역 백신 접종이력이 없는 10~14주령 돼지를 대상으로 면역원성을 평가하였음. 또한, <i>Mycoplasma hyopneumonia</i> 불활화 정제 항원을 포함하는 시제품 33종을 제조하여 생물학적제제 품목허가를 위한 동물용의약품 국가검정 기준에 준한 면역원성 실험을 수행하였다.
신규 구제역 백신의 안전성과 효능 비교 분석 (기존 상용화 백신 대비)	30 %	80 %	A22 Iraq 불활화 정제항원을 이용한 구제역 백신 시제품 4종과 함께 동일 항원을 포함하는 메리알사의 상용화 구제역 백신을 대조그룹으로 두어 2회 접종 시 항체 형성능과 지속성을 평가하였음. 다만, 구제역 백신에 의한 면역형성이 어려운 돼지에 대한 실험에 집중하여 당초 계획되었던 송아지와 염소에 대한 실험은 수행하지 못하였음 (돼지 실험 개체 수는 목표 초과 달성)
지질기반 나노입자 백신보좌제의 대량생산을 위한 공정 확립	10 %	100 %	지질기반 나노입자 백신보좌제의 대량생산을 위해 기존 코미팜의 제조시설을 100% 활용하여 기존 o/w emulsion의 제조 공정에 준해 생산 가능함을 확인 함

III. 종합의견

1. 대한 종합의견

본 연구과제의 목표는 이상육 생성을 유발하지 않는 구제역 백신 보좌제 개발이다. 최종적으로 SEDDS를 이용하여 squalene 및 carbomer 기반 O/W nano-emulsion 제제 1종을 최종 선별하였으며, *Mycoplasma hyopneumoniae* 불활화 항원, FMDV A 포천주 불활화 정제 항원, FMDV O 진천주 불활화 정제 항원, FMDV A22 Iraq 불활화 정제항원을 이용하여 제조한 각각의 백신 시제품이 상용화 백신 보좌제 대비 동등 혹은 그 이상의 면역원성이 확인된 점, 또한, 접종 부위 이상육 반응이 상용화 구제역 백신 및 상용화 백신 보좌제 대비 경미한 점 등을 종합적으로 고려했을 때 연구과제 목표에 부합하는 연구개발 성과를 확보했다고 할 수 있을 것이다. 다만, 이러한 신규 백신 보좌제가 구제역 백신 보좌제로 활용되기 위해서는 구제역 항원 생산 기술 확보가 선행되어야 할 것이다. 이번 과제를 수행하는 과정에서는 검역본부와의 산업체 공동연구 과제를 통해서 확보된 3종의 구제역 불활화 정제 항원을 사용할 수 있었지만, 백신 보좌제 혹은 구제역 백신의 제품화를 위해서는 생물학적제제의 인허가 조건에 준하는 다양한 실험 결과가 요구되며, 이 과정에서 다량의 구제역 불활화 정제항원이 추가로 요구된다. 현재로서는 이에 대한 확보 방안이 요원하다. 다만, 대장균 혹은 배큘로바이러스 발현 시스템을 이용한 재조합 구제역 항원에 대한 연구가 국내 여러 기관에서 수행 중에 있고, 코미팜 또한 해당 기술을 확보하고 있기 때문에 신규 백신 보좌제가 구제역 백신 개발에 적극 활용되기 위해서는 재조합 구제역 항원을 이용한 추가 연구가 필요할 것이다.

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

과제 수행 결과를 평가하는 과정에서 기술이전 및 제품화 실적은 매우 중요합니다. 하지만, 이번 과제의 경우 연구기간이 2년으로 짧았던 점, 그리고 구제역이라는 질병의 특성 상 제품화 성과를 확보하기가 현실적으로 매우 어렵다는 점을 감안하여 평가해주셨으면 합니다. (구제역 바이러스를 다루기 위해서는 BSL3급 연구시설, 동물실험사가 필요하며, BSL3 시설을 확보한다 하더라도 구제역 바이러스의 분양은 현실적으로 어렵습니다) 실제로 이러한 이유를 들어 과제 협약 과정에서도 제품화 및 기술이전 실적을 과제 기간 내가 아닌 과제 종료 이후로 잡았고, 제품화 또한 구제역 백신이 아닌 신규 백신 보좌제를 포함하는 양돈 백신으로 그 범위를 확장하였습니다.

3. 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

구제역 백신의 국산화라는 궁극적인 목표에 도달하기 위해서는 구제역 항원의 국내 생산기술 확립과 구제역 백신에 적합한 면역보좌제 개발이 동시에 이루어져야 한다. 구제역 항원의 국내 생산 기술 확립과 관련해서 코미팜은 곤충세포 발현, 대장균 발현 시스템을 이용한 재조합 항원 생산 기술을 이미 보유하고 있으며, 구제역 바이러스 불활화 정제 항원 생산과 관련해서도 농림축산검역본부와 2년 동안 산업체공동연구과제 수행을 통해서 노하우를 익혔고, 구제역 백신 국내 생산 공장 구축을 위한 컨소시엄에도 정식 참여하여 구제역 백신 국산화를 위해 다방면에서 노력 중이다. 본 과제를 통해 기존 백신 항원의 효능을 저하시키지 않으면서 이상육 발생으로 인한 경제적 손실을 막을 수 있는 백신보좌제 후보물질을 개발하였기 때문에 추후 구제역 백신 국산화를 위한 연구개발에 적극적으로 활용하고자 한다. 또한, 본 과제에 함께 참여했었던 계명대학교 약학대학 연구팀과 함께 2회 백신 접종 프로그램을 1회 접종 프로그램으로 줄이기 위한 면역 지속성이 보장된 면역보좌제 개선 연구계획을 수립 하여 후속 과제 추진을 계획 중에 있다. 한편, 면역원성 및 지속성은 우수하나 안전성 문제로 제한적으로만 사용되어 왔던 oil emulsion을 다양한 양돈 백신 제품에 확대 적용함으로써, 국내 백신의 효능을 증대시키고 다국적 기업 백신과 경쟁할 수 있는 시장 경쟁력을 확보하고자 한다.

IV. 보안성 검토

o 아래와 같음

※ 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 의견

최근 백신 개발 동향을 보면 프랑스 seppic 사 등에서 판매하는 상용화 백신 보좌제 대신 업체 스스로 개발한 백신 보좌제가 상용화 백신에 포함되어 있는 경우가 많으며, 이 경우, 백신 보좌제의 구체적인 조성은 제품의 비공개 부표 상에만 표기되어 회사의 기술 노하우로 남겨둔다. 본 연구팀이 개발한 신규 면역보좌제의 경우에도 주관연구기관인 코미팜이 기술이전을 통해 다양한 양돈 백신 신제품 개발에 적극 활용할 것이므로, 추후 회사의 기술 노하우가 될 수 있는 백신 보좌제의 상세한 제조방법이나, 조성 등은 외부로 공개가 되지 않는 것이 바람직하다.

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구책임자 의견과 같음

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2											1	2			2				
연구기간내 달성실적	2											1	1	2		0				
달성율(%)	100											100	100	100		0				

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS)을 이용한 나노~마이크로 크기의 입자성 백신보좌제 제조 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

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

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 기존 백신 항원의 효능을 저하시키지 않으면서 이상육 발생으로 인한 경제적 손실을 막을 수 있는 백신보좌제 후보물질을 개발하여 추후 구제역 백신 국산화를 위한 연구개발에 적극 활용 - 면역원성 및 지속성은 우수하나, 안전성 문제로 제한적으로만 사용되어 왔던 oil emulsion을 다양한 양돈 백신 제품에 확대 적용함으로써 국산 백신의 효능을 증대시키고 다국적 기업백신과 경쟁할 수 있는 시장 경쟁력 확보

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표		2		1	20	2						2	1						
연구기간내 달성실적		0		0	0	0						1	0						
연구종료후 성과창출 계획		2		1	20	2						1	1						

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자가 실시 예정)		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

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

주 의

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