

818027-2

구제역 발생 초기 방어를 위한 돼지 IL2 체내 전달 벡터 개발 및 사업화

최종 보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

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

농식품연구성과후속지원사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003215-01

구제역 발생 초기 방어를 위한 돼지 IL2 체내 전달 벡터 개발 및 사업화

최종보고서

2020.07.17.

주관연구기관 / 주식회사 카브
협동연구기관 / 건국대학교 산학협력단

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “구제역 발생 초기 방어를 위한 돼지 IL2 체내 전달 벡터 개발 및 사업화”(개발기간 : 2018.04.30. ~ 2019.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 17.

주관연구기관명 : ㈜ 카브 (대표자) 송창선 (인)
협동연구기관명 : 건국대학교산학협력단 (대표자) 송창선 (인)
참여기관명 : ㈜ 왓슨알앤디 (대표자) 김봉운 (인)



주관연구책임자 : 박승용
협동연구책임자 : 이중복
참여기관책임자 : 김봉운

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	818027-2	해당단계 연구기간	2018.04.30. ~2019.12.31	단계구분	2/2
연구사업명	단위사업	농림축산식품연구개발사업			
	사업명	농식품연구성과후속지원			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	구제역 발생 초기 방어를 위한 돼지 IL2 체내 전달 벡터 개발 및 사업화			
연구책임자	박승용	해당단계 참여연구원 수	총: 15명 내부: 4명 외부: 11명	해당단계 연구개발비	정부: 262,000 천원 민간: 87,400 천원 계: 349,400 천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 15명 내부: 4명 외부: 11명	총연구개발비	정부: 262,000 천원 민간: 87,400 천원 계: 349,400 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)카브, 건국대학교 산학협력단			참여기업명 (주)카브 (주) 왓슨알앤디	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 과제, 공개
-------------------------	-----------

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		1									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약	보고서 면수
<p>돼지 인터류킨2 유전자 체내 전달 벡터를 구제역 백신과 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신에 함께 사용했을 때 면역학적인 보조 효과를 확인하였음. 특히 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 항체 형성 능력 향상 및 폐 병변 억제 능력이 탁월한 것으로 나타남. 또한, 벡터의 대량 생산 체계를 확립하여 산업적으로 사용 가능한 수준의 생산능력을 확보함. 이를 통해 돼지 면역증강제를 제 품화하였음.</p>	40

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역발생 초기 방어용 면역 증강제 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 대량 생산 체계 확립 - 돼지 인터류킨2의 구제역 백신 면역 보조능에 대한 확인 - 돼지 인터류킨2의 면역 보조 기작에 대한 실험적 확인 - 제품화를 위한 과용량 투여 시험 및 냉장 보관 시험 ○ 구제역 초기 방어 자극물질 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 인터류킨2과 함께 면역 보조 작용이 있는 신규 물질 신규 발굴 ○ 면역증강제 적용 확대 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신에 대한 돼지 인터류킨2의 면역 보조 효능 확인 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역발생 초기 방어용 면역 증강제 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 3D 세포 배양법을 이용한 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 대량 생산 체계 확립 - 구제역 백신과 동시 접종 했을 때 항체 형성 및 인터페론 유도 확인 - 돼지 인터류킨2 농도에 따른 면역 작용 차이 확인 - 과용량 투여 후 부작용 및 잔류 부재 확인 - 장기간 냉장 보관 안정성 확인 ○ 구제역 초기 방어 자극물질 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - TLR3 자극 물질(poly I:C)에 대한 구제역 초기 방어 효과 확인 - 항바이러스 가능 천연 물질(BSB) 발굴 ○ 면역증강제 적용 확대 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신과 동시 접종 했을 때 돼지 인터류킨2의 폐 병변 억제 효과 확인 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지 인터류킨2 면역 보조제 제품화 및 매출액 달성 ○ 학술 활동 및 정책 활용을 통한 돼지 인터류킨2 효능 홍보 ○ 면역 억제성 질병에 대한 방역 기술 향상 ○ 국내 양돈 산업 생산성 향상 및 소득 개선 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>돼지</p>	<p>인터류킨2</p>	<p>벡터</p>	<p>구제역</p>	<p>돼지 생식기 호흡기 증후군</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Pig</p>	<p>IL2</p>	<p>vector</p>	<p>FMD</p>	<p>PRRS</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	6
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	19
4. 연구결과의 활용 계획 등	21
붙임. 참고 문헌	22

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 가. 구제역발생 초기 방어용 면역 증강제 제품화
- 나. 구제역 초기 방어 자극물질 탐색
- 다. 면역증강제 적용 확대 연구

1-2. 연구개발의 필요성

가. 국내 구제역 발생 현황 및 전파 차단 중요성

- 구제역은 국내에서 박멸되었다고 생각되었으나 2000년 3월 O형 구제역 발생을 시작으로 지속적으로 발생하여 2018년 현재 까지 10건 발생 하였으며 그 피해액이 누적 3조 이상을 기록 하고 있음
- 구제역으로 인한 피해 사례 중 최악으로 꼽히는 2010년 하반기 구제역 발생의 경우 2조 7천억 원의 재정소요를 기록하였으며 조기에 전파를 차단하지 못할 경우 국가적 손실을 피할 수 없다는 점을 알 수 있음

역대 구제역 발생현황

발생기간	발생지역	살처분(두)	재정소요(원)
2000년3월24일~4월15일	23일 경기, 충남, 충북	2216	2725억
2002년5월2일~6월23일	53일 경기,충북	16만155	1058억
2010년1월2일~29일	28일 경기	5956	272억
2010년4월8일~5월6일	29일 인천, 경기, 충북, 충남	4만9874	1040억
2010년11월~2011년4월	145일 전국 1개시도	347만9962	2조7383억
2014년7월23일~8월6일	15일 경북, 경남	2009	17억
2014년12월~2015년4월	147일 전국 7개시도	17만2798	638억
2016년1월11일~1월13일	3일 김제, 고성	3만3073	59억
2016년2월17일~3월29일	41일 공주, 천안, 논산, 홍성		

자료 : 농림축산식품부

그림 2. 2000년 이후 구제역 발생 현황 및 피해 규모

나. 구제역 바이러스의 역학적 특성과 긴급 백신

- 구제역 바이러스는 감염 후 3~5일 사이에 분변과 수포를 통해 고농도로 배출되는 특성이 있는 반면 백신은 접종 7일 후부터 충분한 방어능을 형성하는 특성이 있음
- 구제역이 발생할 경우 발생 농장을 중심으로 반경 500m이내의 지역에 대해서 관리지역을 설정하고 살처분 할 수 있으며 반경 3km이내의 지역에 대해서 보호지역으로 설정하고 긴급백신(링백신)을 실시함

- 그러므로 구제역 발생 상황에서 긴급백신을 접종하더라도 바이러스가 고농도로 분비되는 3-5일 사이에 면역을 형성하지 못하게 되고 조기에 전파를 차단하지 못하는 원인이 될 수 있음

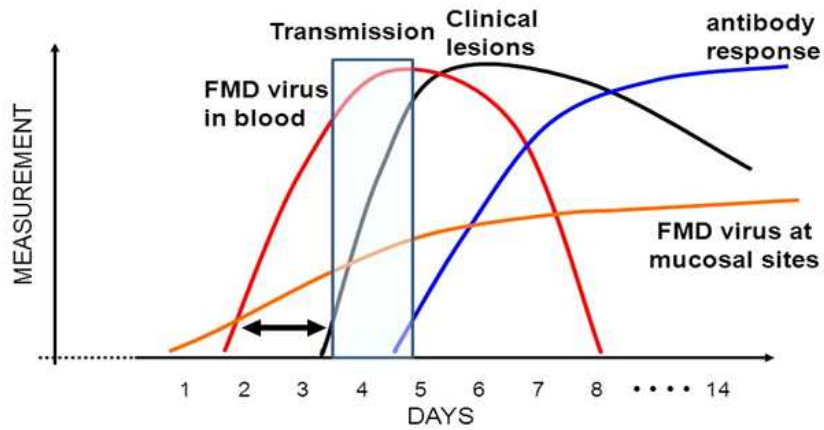


그림 3. 구제역 감염에 따른 바이러스 혈증, 임상증상, 항체 형성 양상

다. IL2 아데노바이러스의 효능과 효과적인 구제역 전파 차단

- 건국대학교 연구팀의 지난 연구(2015-2017) 결과 돼지 IL2를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 구제역 상용백신과 공동 접종했을 때 백신만 접종한 군에 비해 접종 후 3일에서 더 높은 구제역 항체가를 나타내었음
- 상기의 구제역 바이러스의 전파 특성과 IL2 아데노바이러스의 효능을 응용하면 구제역 바이러스의 전파를 조기에 차단하고 결과적으로 구제역으로 인한 직접적, 간접적 피해를 예방할 수 있음
- 본 연구팀은 추가적인 연구를 통해 IL2 아데노바이러스의 효능을 보강하고 이를 면역 증강제로서 제품화 하여 출시하는 것으로 구제역 방역 기술과 방역 정책의 발전에 기여하고자 함

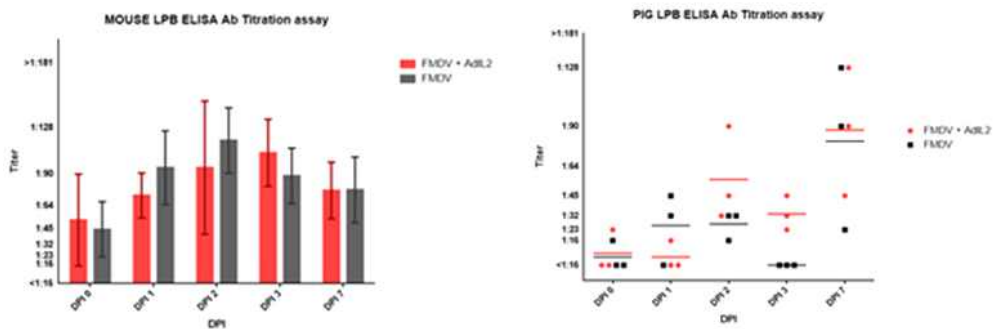


그림 4. 돼지 인터루킨2에 의한 항체 형성 보조 확인(마우스)

라. 면역 형성 지연 바이러스 백신에 대한 응용 연구

- PRRS바이러스는 돼지에서 모돈의 경우 유산을 일으키고 자돈의 경우 폐사를 일으키는 질병의 원인체로서 직접적인 경제적 손실을 야기할 뿐만 아니라 지속적인 생산성 감소로 인

해 농가 수익률에 악영향을 끼치고 있음

- PRRS바이러스 백신의 경우 접종 6주 후에 충분한 면역능이 형성하기 때문에 백신을 이용하여 질병을 통제하는데 어려움을 겪고 있음
- IL2 아데노바이러스 면역 증강제를 제품화 할 경우 PRRS와 같은 면역 형성이 지연되는 질병에 대해서도 적용이 가능할 것으로 보고 본 연구팀은 이번 연구 기간 동안 적용 확대 방안에 관한 연구를 진행할 예정임

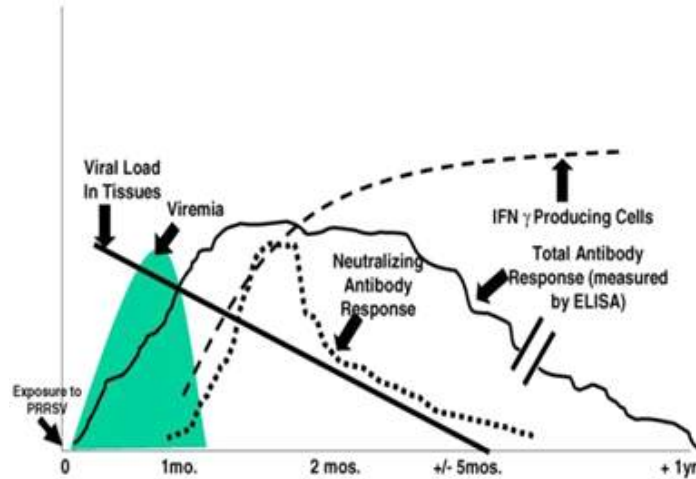


그림 5. 돼지생식기호흡기 증후군 바이러스의 면역 반응 양상

1-3. 연구개발 범위

가. 개발 내용 및 범위

- 돼지 IL2 아데노바이러스 대량 생산 시스템 확립
 - ▷ 건국대학교 연구팀은 돼지 IL2를 발현하는 아데노바이러스를 평판배양 조건에서 3×10^{10} TCID₅₀/ml의 농도로 배양할 수 있는 기술을 보유하고 있음
 - ▷ 상기의 농도는 실험실적 실험에서는 충분한 농도이나 사업화에는 부족한 농도임
 - ▷ 건국대학교 연구팀은 아데노바이러스의 대량 생산을 위하여 carrier를 이용한 tidecell perfusion system을 적용하여 대량생산 연구 중에 있음



그림 6. 3D 세포 배양 기법 개요

- ▷ 건국대학교 연구팀과 협력하여 돼지 IL2를 발현하는 아데노바이러스 벡터의 대량 생산능력을 확립하고 10¹¹TCID50/ml수준의 기술을 확보
- 돼지 IL2 아데노바이러스 벡터 면역 증강제 제품화
 - ▷ 면역 증강제 제품화를 위한 국내외 승인 기준 정보 조사
 - ▷ 1년차 연구 결과를 바탕으로 돼지 IL2 아데노바이러스 벡터 합제의 면역 증강제 시제품 제작
 - ▷ 상기의 시제품에 대한 안정성 및 안전성 시험 진행
- 돼지 IL2 아데노바이러스와 상용 구제역 백신의 공동 접종 효과
 - ▷ 지난 2년(2016-2017) 동안의 연구를 통해 건국대학교 연구팀은 돼지 IL2를 발현하는 아데노바이러스를 성공적으로 제작했으며 돼지와 마우스를 이용하여 상용 구제역백신과 공동 접종하여 접종 후 7일 까지 구제역 항체의 형성을 확인해 본 결과 3일부터 구제역 백신만 단독으로 접종한 군에 비해 높은 항체가를 형성하는 것을 알 수 있었음

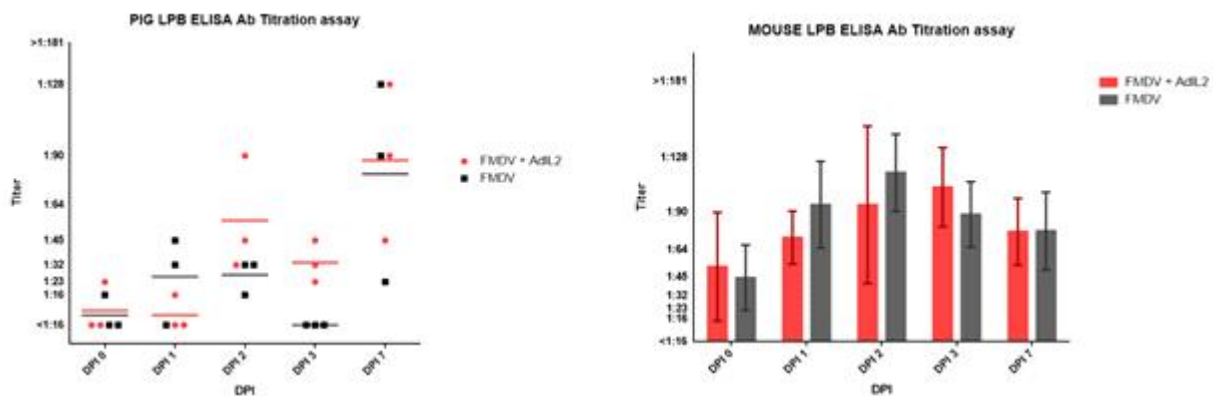


그림 7. 돼지 인터류킨2의 항체 형성 보조 효과(돼지)

- ▷ 돼지를 이용한 실험에서는 평균 1:45 이상의 항체가를 나타내었으며 결과적으로 구제역을 방어할 수 있는 수준의 면역을 확보했다고 볼 수 있음
- ▷ 돼지 IL2를 발현하는 아데노바이러스의 면역 증강 기능을 바탕으로 면역 자극 물질을 첨가하여 면역 증강제를 제품화 하고자 함
- 구제역 초기 방어 자극물질의 탐색
 - ▷ IL2의 작용 중의 하나인 helper T cell의 증식을 자극하여 종국적으로는 B cell의 증식을 통해서 항체의 양을 증가시키는 기전을 이용
 - ▷ 문헌에 의하면 인터페론을 접종한 후 구제역바이러스 감염시키면 첫 1~2일까지는 완벽한 방어가 가능하고, 3~6일까지는 부분적인 방어가 이루어지는 것으로 알려져 있음
 - ▷ 따라서 구제역 바이러스의 전파를 효과적으로 제어하기 위해서는 현재 사용하고 있는

- 백신으로 방어가 이루어지기 시작하는 7일 이전의 방어에 대한 방법이 마련되어야 함
- ▷ 바이러스 유래 및 합성 dsRNAs를 구제역 백신 혹은 돼지 인터류킨2와 공동 접종하는 방법으로 구제역 감염 첫 1~2일 동안을 안전하게 방어할 수 있는 최적의 물질을 선정하고자 함
- 구제역 초기 방어 자극물질의 최저 농도 탐색
 - ▷ 상기 과정에서 선정된 초기 방어 자극물질의 농도에 따른 효과를 확인하기 위하여 저농도에서 고농도까지의 다양한 농도를 돼지에 접종하여 최저 효과 농도를 확인
 - 마우스 공격 접종(challenge) 모델을 이용한 구제역 백신 초기 방어능 확인
 - ▷ 구제역의 경우 발생 초기(7일 이내) 전파를 차단하는 것이 전국적 발생을 막는 가장 중요한 단계라고 할 수 있음
 - ▷ 구제역 백신과 상기의 합제의 공동접종을 통한 백신 후 초기 구제역 방어능을 실험하기 위해서 참여기관인 (주)왓슨알앤디 및 농림축산검역본부와 협력하여 1차적으로 마우스 공격 접종(challenge)모델에 상기의 합제를 구제역 상용 백신과 공동 접종하고 구제역 야외주를 접종하여 임상증상과 폐사를 확인
 - 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 돼지 IL2 아데노바이러스 면역 증강제의 면역 증강 효과 확인
 - ▷ 1년차 연구 결과 발굴한 돼지 IL2 아데노바이러스 벡터 합제의 각종 백신과의 공동접종 효과를 구제역 이외의 다양한 항원에서 검증하기 위하여 돼지에 PRRS백신과 공동접종 실험을 진행
 - ▷ 돼지 생식기 호흡기 증후군의 경우 백신 접종 후 항체 형성까지 6주 이상 걸리는 특징이 있으므로 돼지 IL2 아데노바이러스 벡터 합제와의 공동접종 효과가 높을 것으로 기대
 - ▷ 기존 백신 대비 접종 후 항체 형성까지 시간을 1주 이상 감소 기대
 - 돼지 공격 접종(challenge) 모델을 이용한 구제역 백신 초기 방어능 확인 시험
 - ▷ 1년차 마우스 공격 접종 모델의 실험 결과를 바탕으로 농림축산검역본부 및 (주)왓슨알앤디와 협력하여 돼지 공격 접종 실험을 진행하여 접종 후 7일 이내 방어능을 확인
 - ▷ 돼지 실험모델에 상기의 합제를 구제역 상용 백신과 공동 접종하고 구제역 야외주를 공격접종하여 임상증상과 폐사를 확인

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 돼지 인터류킨2 전달 벡터 대량 생산 시스템 확립

- 돼지 인터류킨2 전달 벡터 및 대량 생산 시스템은 건국대학교 연구팀에서 개발이 진행 중이었으며 이를 (주)카브로 기술이전하는 형태로 협력 연구를 진행함
- 기술이전명: "바이오리액터를 이용한 면역 증강제 제조 방법"에 관한 기술이전 (발명의 명칭: 바이오리액터를 이용한 면역 증강제 제조 방법, 10-2018-0129840)

출원 번호 통지서

출원 일자	2018.10.29
특기사항	심사청구(무) 공개신청(무)
출원 번호	10-2018-0129840 (접수번호 1-1-2018-1066416-63)
출원인 명칭	건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인 성명	위병갑(9-2004-000155-3)
발명자 성명	강영임 박승용 송창선 이상원 이소현 이중복 정지윤 최인수 최종철 최취연
발명의 명칭	바이오리액터를 이용한 면역 증강제 제조 방법

특 허 청 장

그림 8. 면역 증강제 제조 방법에 관한 특허 출원 자료

- 돼지 인터류킨2 전달 벡터 대량 생산 시스템은 carrier와 tidal cell perfusion을 응용하여 기존 평판 배양 세포를 추가적인 단계 없이 3D 배양으로 전환할 수 있는 특징이 있음

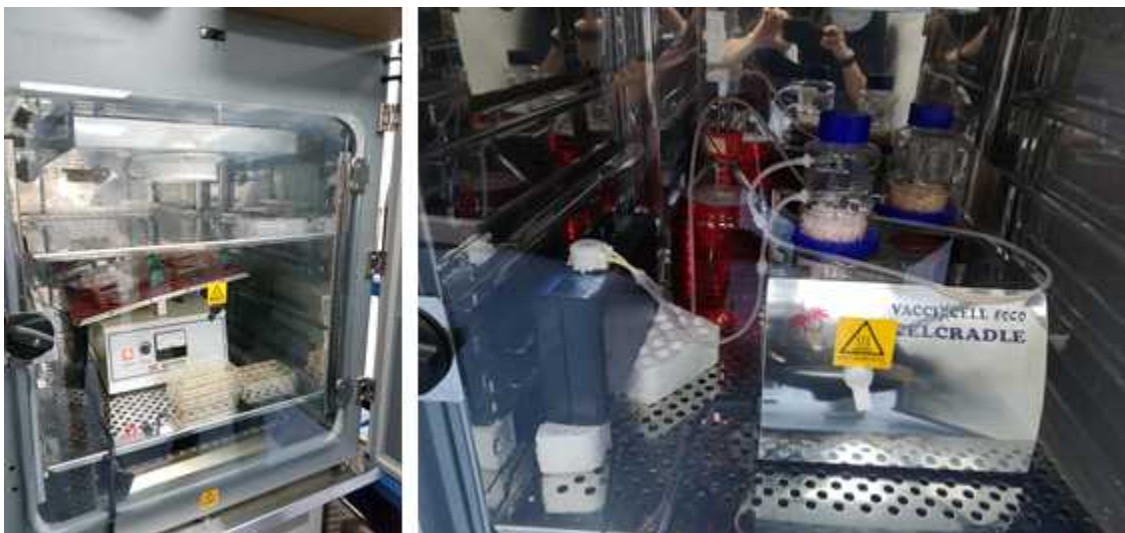


그림 9. 최적화 실험 과정

- 건국대학교 연구팀에서 이전한 설비와 시험 조건을 토대로 (주)카브에서 배양 농도, 시간, pH, Glucose 등을 최적화 진행함

Days	Glucose	Glucose (media change)	pH	pH (media change)	Cell number (Cells)	Seeding density (Cells / carrier)
0	285		8.23		100000000	117647
1	270		7.78		18133333	21333
2	315		7.71		68000000	80000
3	170		7.62		408000000	480000
4	88	381	7.38	7.99	131333333	213333

표 1. 3D 세포 배양 기법의 조건 최적화 시험

- 최적화 결과 6.8×10^9 IFU/ml (총 6.8×10^{10} IFU)의 돼지 인터류킨2 전달 벡터를 생산할 수 있었으며 이는 상업적으로 사용하기에 충분한 양임

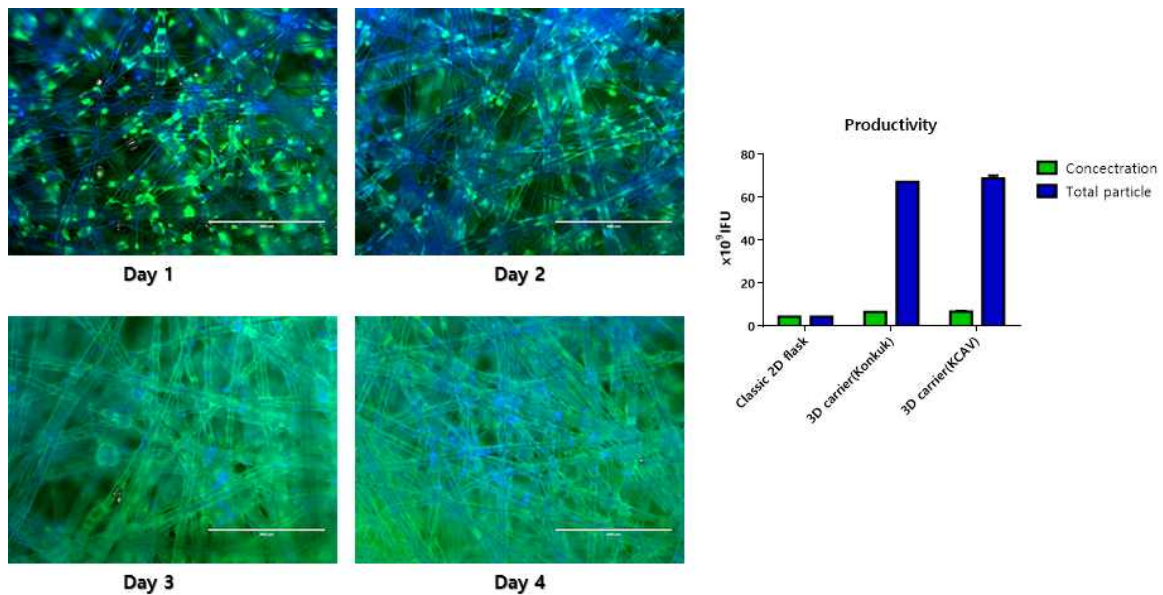


그림 10. Carrier 접종 후 세포 적응 관찰 및 생산성 개선

나. 마우스를 이용한 돼지 인터류킨2 전달 벡터의 최소 유효 농도 확인 시험

- 선행 연구에서 돼지 인터류킨2 전달 벡터가 구제역 백신과 함께 사용했을 때 면역을 보조한다는 간접적인 지표를 확인하였음
- 문헌 조사를 통해 인터류킨2는 농도에 따라 면역 작용 조절(modulation) 기능에 차이가 있음을 확인하였고 이에 따라 항체 형성 보조 효능이 나타나는 돼지 인터류킨2 전달 벡터의 최소 농도를 확인할 필요가 있음
- 농도에 따른 효능을 확인하여 최소 유효 농도를 확인하고 면역 보조 기작을 이해하기 위하여 마우스를 이용한 동물실험을 진행함

	8	9	10	VC	C
동물의 수	18	18	18	18	9
Ad.IL2	10 ⁸ IFU/dose	10 ⁹ IFU/dose	10 ¹⁰ IFU/dose	-	-
FMDV vaccine	100ul/dose	100ul/dose	100ul/dose	100ul/dose	-

표 2. 유효 농도 확인을 위한 마우스 실험 군 편성

- 3가지 농도의 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터(10⁸IFU, 10⁹IFU, 10¹⁰IFU)와 구제역 백신을 접종한 후 7일간 혈중 구제역 특이 항체 형성의 추이를 ELISA기법으로 확인한 결과 접종 3일차에서 돼지 인터류킨2 전달 벡터 10⁸IFU군에서만 유의미한 항체의 상승을 나타내었으며 접종 7일차에서도 10⁸IFU군의 유의미한 차이를 보이는 것을 확인하였음

FMDV SP ELISA

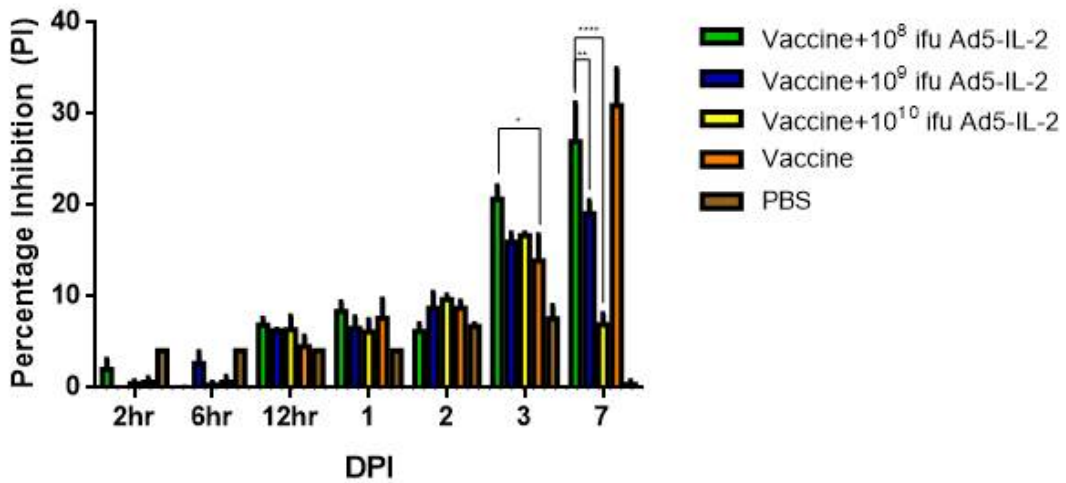


그림 11. 구제역 백신과 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 동시 접종 후 혈중 구제역 항체 변화 추이

- 항체 형성의 보조뿐 아니라 선천 면역의 보조 효능을 확인하기 위하여 인터페론 알파와 감마에 대해서 ELISA 기법을 이용하여 조사한 결과 10⁹IFU군과 10¹⁰IFU군에서 접종 후 12~24시간에 백신 접종군에 비해 유의미한 차이로 인터페론 알파와 감마가 유도되는 것을 확인하였으며 이는 상기의 항체 형성 보조 효과가 10⁸IFU군에서 나타난 것과는 상반되는 결과임

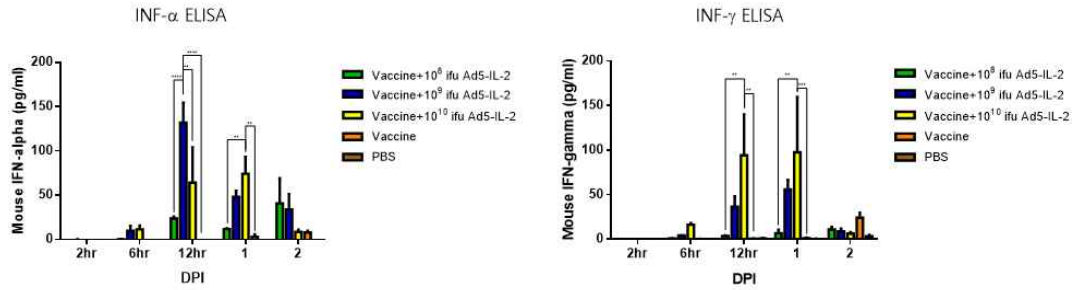


그림 12. 돼지 인터류킨2의 효능에 의한 인터페론 알파 및 감가 유도 양상

- 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터가 개별 면역 세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 혈액으로부터 말초 혈액 림프구(PBMC)를 분리하여 T세포와 B세포의 분포를 조사하였으며 10^8 IFU군에서 백신 접종군에 비해서 유의미하게 B세포 혹은 T세포의 비율이 증가한 것을 확인하였음

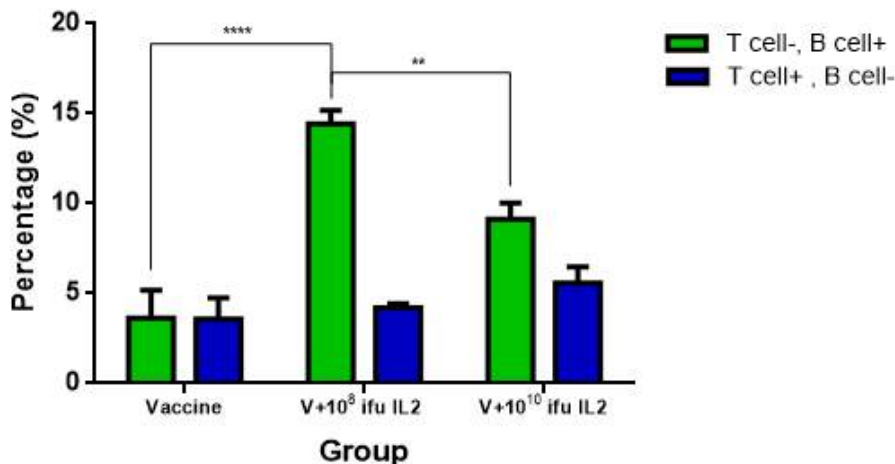


그림 13. 돼지 인터류킨2의 면역 보조 효과에 따른 T세포 와 B세포 분화 유도

다. 마우스를 이용한 구제역 초기 방어 물질 탐색

- 상기의 결과로부터 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 면역 보조 효능을 추가적으로 증폭할 수 있다는 여지를 발견하였으며 벡터와 함께 사용했을 때 동반 상승효과를 나타내는 물질에 대해서 연구를 진행함
- 돼지 인터류킨2 전달 벡터의 효능을 보조할 수 있는 첨가제를 탐색하기 위해 문헌조사를 통해 구제역의 경우에는 poly I:C와 같은 TLR3 자극 물질이 유효하다고 보고 마우스를 이용한 예비실험을 진행함

	IL2+Vaccine	IL2+Vaccine+Poly I:C	Vaccine	Control
동물의 수	10	10	10	10
Ad.II2	10 ⁸ IFU/dose	10 ⁸ IFU/dose	-	-
FMDV vaccine	100ul/dose	100ul/dose	100ul/dose	-
첨가제	-	Poly I:C	-	-

표 3. TLR3 자극 물질에 의한 면역 보조 효과 확인을 위한 동물실험 군 편성

- 각 약물 접종 후 3, 5, 7, 14, 21일 후에 채혈하여 혈중 항체를 SP ELISA 및 LPB ELISA 기법으로 구제역 특이 항체를 조사한 결과 이전 실험의 결과와 같이 돼지 인터류킨2 전달 벡터를 백신과 함께 접종 한 경우 항체 형성의 상승작용(동반 상승효과)이 발견되었으나 poly I:C를 첨가한 경우에는 유의미한 차이를 보이지 않았음

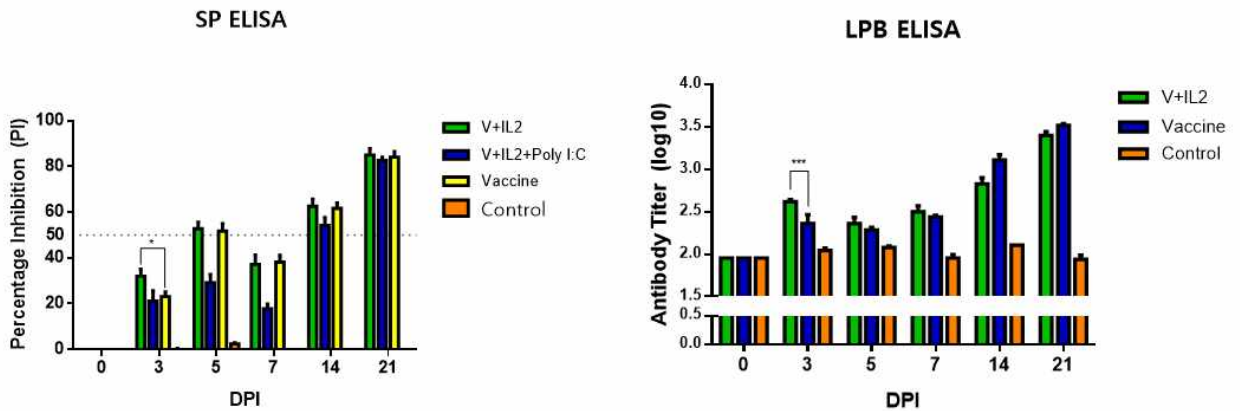


그림 14. TLR3 자극 물질에 따른 항체 형성 정도 변화 추이

- 상기 결과를 종합하면 poly I:C와 같은 TLR3 자극 물질은 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터와 유의미한 동반 상승작용(시너지)을 나타내지 않는 것으로 보임

라. 돼지를 이용한 구제역 백신 및 돼지 인터류킨2 전달 벡터 동시 접종 효능 시험

- 마우스를 이용한 동물실험(in vivo)에서 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 구제역 백신 면역 보조 효능이 확인됨에 따라 돼지에서도 동일하게 나타나는지 확인 시험을 진행함

	A9	A10	A11	AC	VC	NC
동물의 수	3	3	3	3	3	3
Ad.IL2	10 ⁹ IFU/dose	10 ¹⁰ IFU/dose	10 ¹¹ IFU/dose	-	-	-
Ad.NULL	-	-	-	10 ⁹ ifu/dose	-	-
FMD vaccine	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	-
PBS	-	-	-	-	-	2ml

표 4. 돼지 인터류킨2 전달 벡터의 최소 농도를 결정하기 위한 돼지 실험의 군 편성

- 세 가지 농도(10⁹IFU, 10¹⁰IFU, 10¹¹IFU)의 돼지 인터류킨 2 체내 전달 벡터 접종 군과 대조군(백신 대조, 벡터 대조, 음성대조)을 접종 후 4주간 채혈하여 SP ELISA와 LPB ELISA 기법을 이용하여 혈중 구제역 특이 항체의 추이를 관찰한 결과 10⁹IFU 군에서 항체의 상승이 나타났으나 유의미한 차이를 보이지 않음
- 또한 마우스에서 나타난 인터페론 알파의 변화 추이가 나타나는지 ELISA기법으로 조사하였으나 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 특이적으로 증가하는 양상이 나타나지 않음

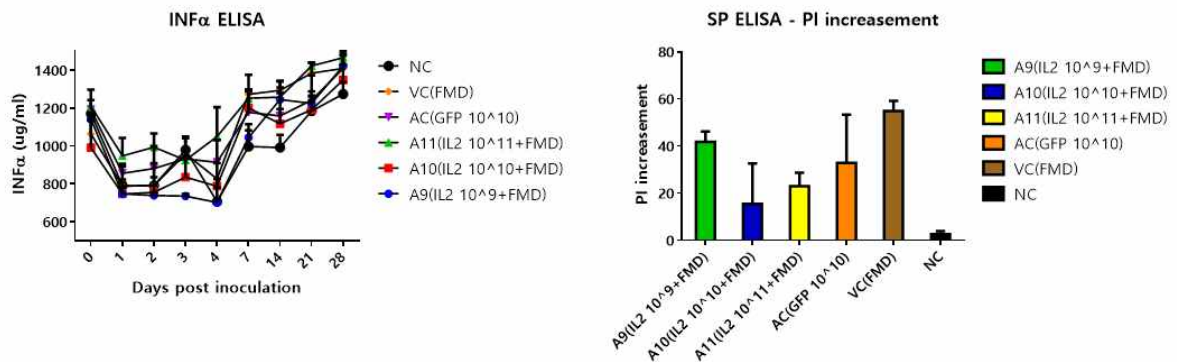


그림 15. 돼지 인터류킨2 전달 벡터의 효능에 따른 인터페론 알파 및 혈중 구제역 항체 추이 확인

마. 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신 및 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 동시 접종 시험

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 모돈에서 유산과 사산을 일으키고 자돈에서 호흡기 증상으로 증체량(사료전환율) 감소를 일으키는 질병으로 직접적인 피해를 입히지는 않지만 자돈의 손실과 출하 중량 감소로 인한 경제적 피해를 야기하는 질병임
- 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 백신 접종 후 충분한 방어능을 형성하지 못하며 바이러스가 잠복 감염하여 장기간 농장 내 상재하는 단계로 이행하여 방역에 어려움을 겪고 있음
- 본 연구팀은 돼지 인터류킨2의 작용이 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신의 효과를 보조해

줄 것으로 예측하고 돼지를 이용한 동물실험을 진행함

- 실험동물은 각 4마리, 4군으로 편성하고 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 백신과 돼지 인터류킨2 전달 벡터 접종 6주 후 야외주(LMY)를 접종하고 2주간 바이러스 혈증, 바이러스의 분비, 조직손상 등을 관찰함

	IL2+Vaccine	Vaccine	IL2	Control
동물의 수	4	4	4	4
Ad.IL2	10 ⁹ ifuIFU/dose	-	10 ⁹ IFU/dose	-
PRRS vaccine	접종	접종	-	-
공격접종	LMY	LMY	LMY	LMY

표 5. 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신에 대한 돼지 인터류킨2의 효능 확인을 위한 돼지 실험

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신과 돼지 인터류킨2 전달 벡터 동시 접종 후 6주간 바이러스 혈증을 qPCR기법과 세포를 이용한 역가 측정법으로 조사한 결과 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터를 접종한 군에서 바이러스 혈증이 감소하는 양상은 있었으나 특이적인 유의성은 발견되지 않았음

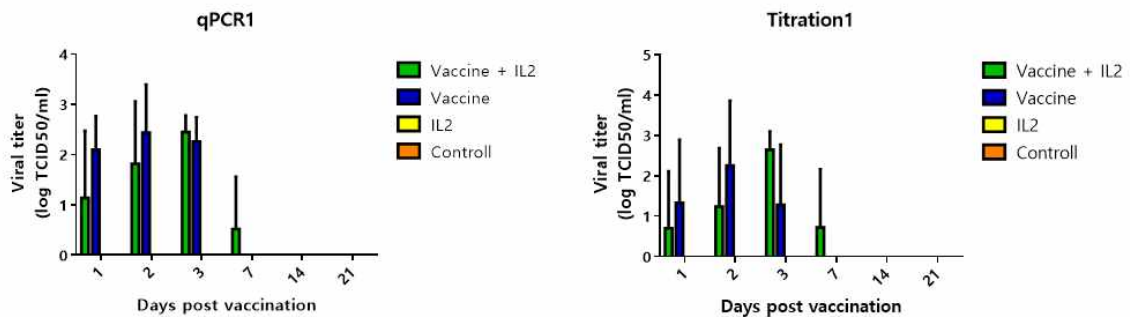


그림 16. 백신 접종 후 백신에 의한 바이러스 혈증 양상

- 접종 6주 후 돼지 생식기 호흡기 증후군 야외주(LMY)를 이용하여 공격접종 하였으며 3주간 바이러스 혈증을 qPCR기법과 세포를 이용한 역가 측정법으로 조사한 결과 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터를 접종한 군에서 바이러스 혈증이 억제되는 양상은 있었으나 유의적인 차이는 발견되지 않았음

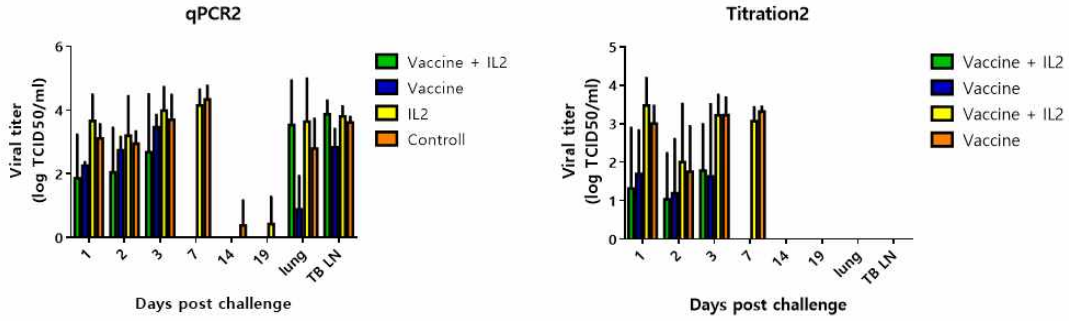


그림 17. 야외주(LMY) 접종 후 바이러스 혈증 양상

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 야외주(LMY)를 이용하여 공격접종 후 바이러스의 구강 및 분변을 통한 분비를 qPCR기법을 이용하여 조사한 결과 개별 군간 특이적인 유의성은 발견되지 않았음

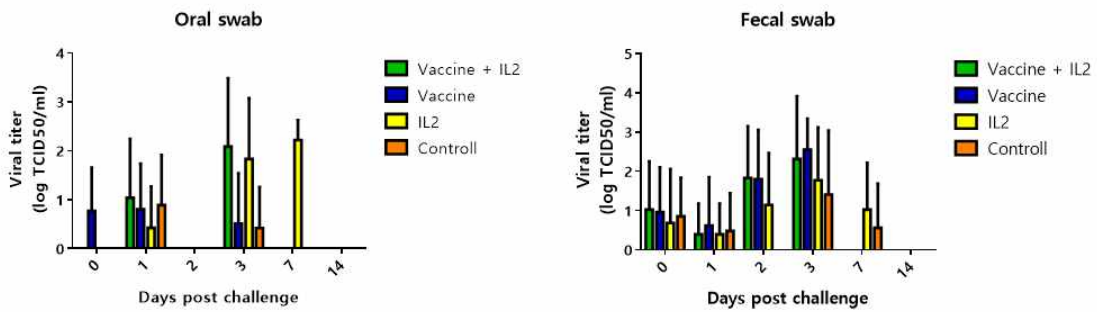


그림 18. 야외주(LMY) 접종 후 바이러스 분비 양상

- 백신 접종 후 6주와 공격접종 후 3주 간 혈중 항체의 변화 추이를 ELISA기법과 세포를 이용한 중화시험법으로 조사한 결과 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터를 접종한 군에서 항체의 유도가 빠르게 일어났으며 공격접종 19일 후 유의성이 있는 차이로 높은 항체가를 보였음

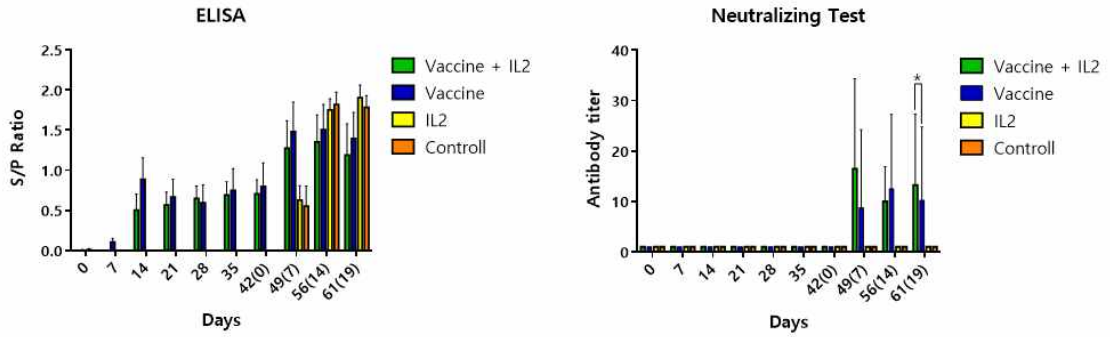


그림 19. 백신 접종 후 혈중 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 특이 항체의 변화 양상

- 공격 접종 19일 후 부검을 통한 폐 조직을 확보하고 육안병변과 미세병변을 조사한 결과 돼지 인터류킨2 전달 벡터와 백신을 공동접종한 군에서 유의적인 병변의 감소를 관찰 할 수 있었음

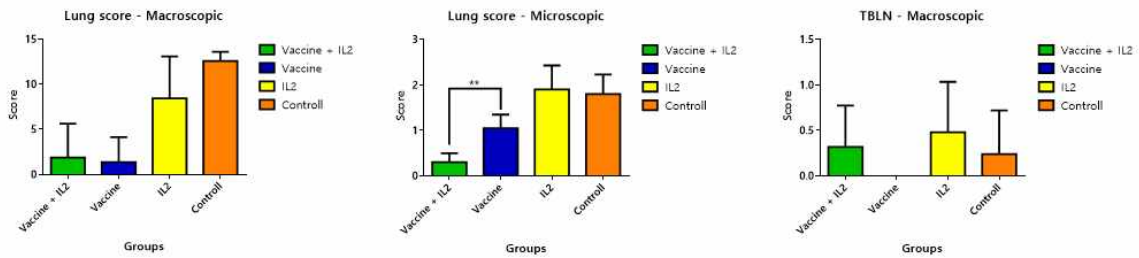


그림 20. 야외주(LMY) 접종 후 폐 병변 점수

- 상기 실험 결과를 종합하였을 때 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 백신과 함께 사용하였을 때 중화항체를 강하게 유도 하였으며 폐 조직 미세병변에서 유의미한 감소효과를 나타내었음

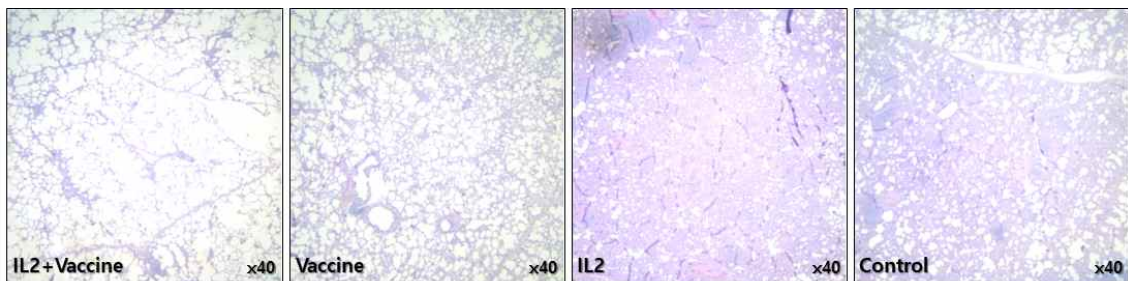


그림 21. 야외주(LMY) 접종 후 폐 미세 병변 현미경 화상

- 공격접종 후 항체 증가 양상과 미세 폐병변 감소 효과는 돼지 인터류킨2 전달 벡터가 돼

지 생식기 호흡기 증후군 백신의 효능을 보조했다고 볼 수 있으며 이전에 발견되지 않은 새로운 과학적 사실임

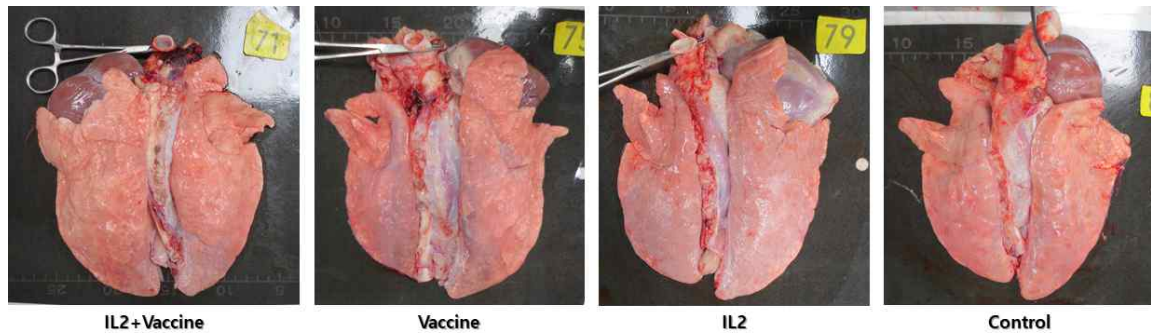


그림 22. 야외주(LMY) 접종 후 폐 거대병변 화상

바. 돼지를 이용한 돼지 바이러스 초기 방어 자극 물질 탐색

- 상기 연구에서 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터와 poly I:C와 같은 TLR 자극 물질은 협력 작용(시너지 효과)이 없는 것으로 확인됨
- 또한 연구 과정에서 정제된 화학물질은 동물용으로 사용하기에 경제성이 맞지 않는 것으로 확인됨
- 이에 따라 본 연구팀은 문헌 조사를 통해 천연 화합물 중 바이러스 억제 효과가 있는 생물전환 황금(bioconversion *scutellaria baicalensis*, BSB)을 발굴하고 유사 물질(Rottlerin, Baicallein)과 효능을 비교함
- 먼저 세포수준(in vitro)에서 유효 농도와 효능을 확인하기 위하여 MARC-145 세포와 PRRS 바이러스(LMY) 균주를 이용하여 직접효능(virucidal), 감염 전 효능(pre-infection), 감염 후 효능(post-infection) 검사를 진행 함
- 그 결과 Baicallein과 대조하여 생물전환 황금(BSB)는 10ug/ml의 농도에서 감염 전 (pre-infection) 바이러스 증식 억제 효능이 있는 것으로 나타남

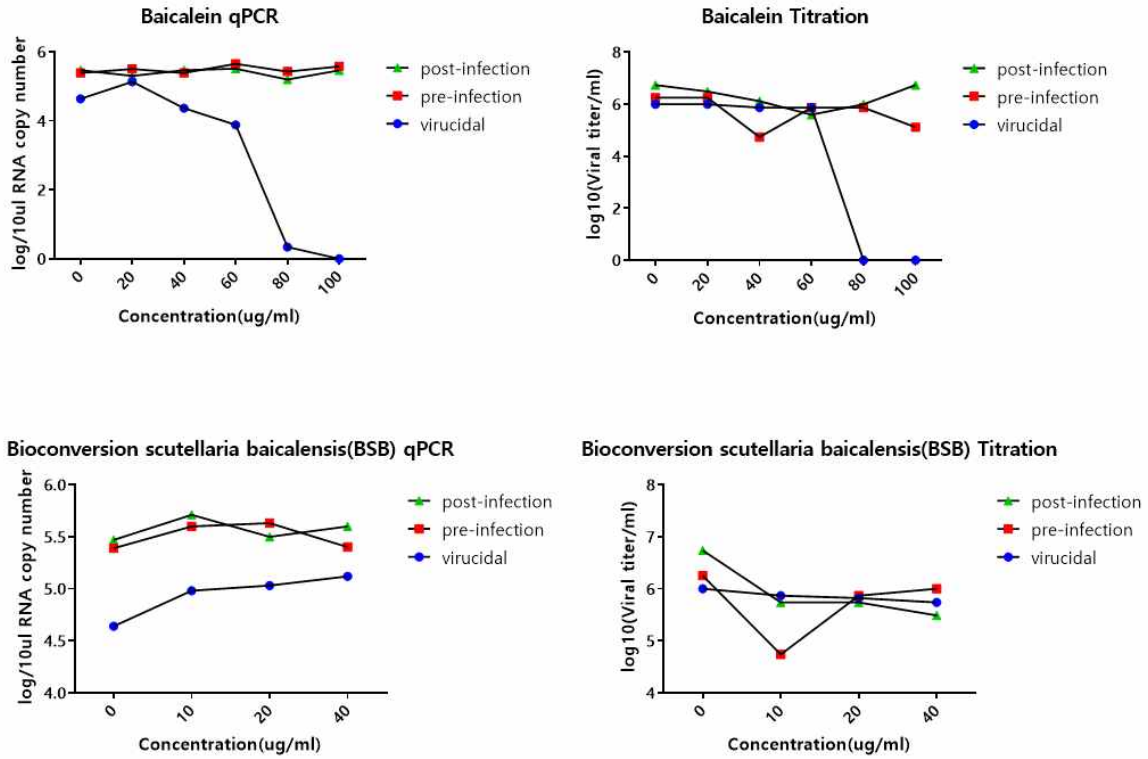


그림 23. 생물전환 황금(BSB)와 Baicalein의 바이러스 억제 효과(세포수준)

- 상기 세포 수준의 연구 결과를 바탕으로 돼지를 각 군 4마리, 4군으로 편성하여 감염 전 바이러스 증식 억제 효과에 대해서 시험을 진행함

	Baicalein	Bioconversion scutellaria baicalensis(BSB)	Rottlerin	Control
동물의 수	4	4	4	4
약물의 용량	4mg/pig	4mg/pig	2mg/pig	-
공격접종	LMY	LMY	LMY	LMY

표 6. 생물전환 황금(BSB)의 효능 확인을 위한 돼지 실험의 군 편성

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 야외주(LMY)를 공격접종 한 후 1, 2, 3 7, 14일에 바이러스 혈증을 확인한 결과 생물전환 황금(BSB)의 경우에서 접종 1일차에 다른 모든 군 대비 유효한 바이러스의 억제가 나타났음

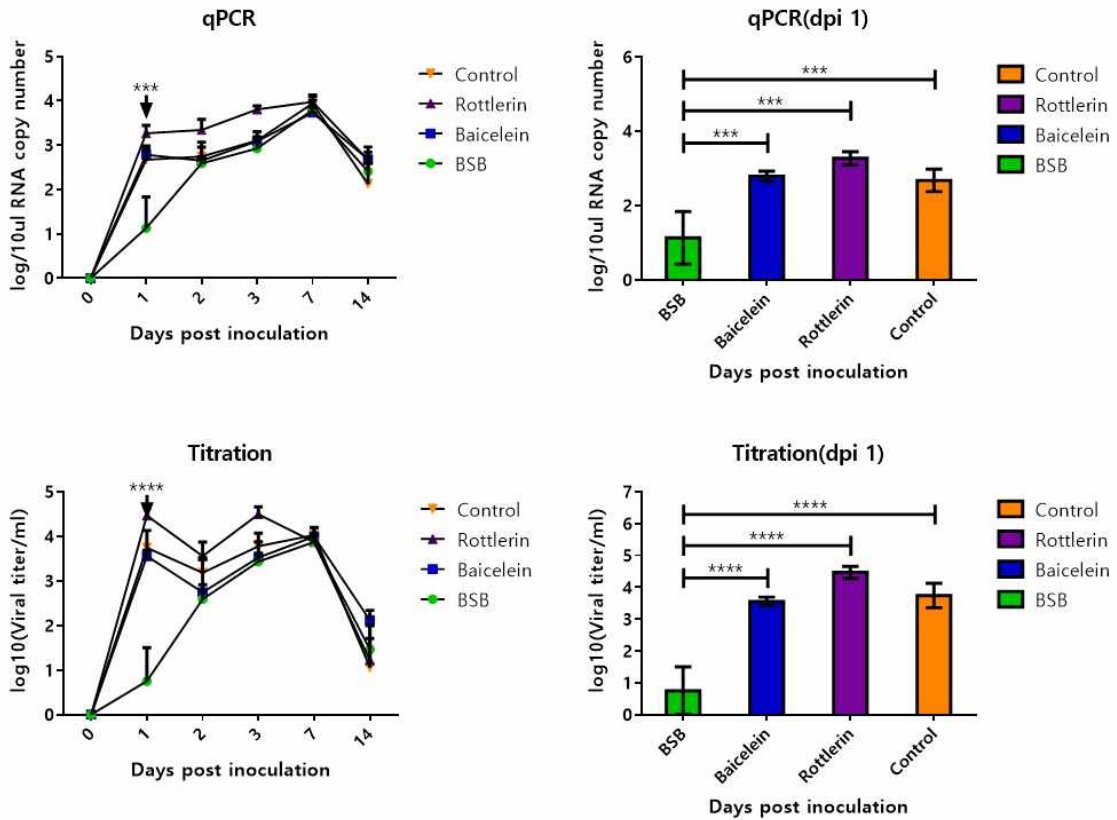


그림 24. BSB, Rottlerin, Baicalein의 바이러스 억제 효과 비교(동물 수준)

- 상기 결과를 종합했을 때 생물전환 황금(BSB)은 접종 1일차에 다른 약물에 비해 유효한 차이로 바이러스 혈증 감소 효과를 나타내고 있음
- 그러므로 생물전환 황금(BSB)는 바이러스 억제 효과가 있다고 볼 수 있으며 향후 추가적인 연구를 통해 백신 첨가제로 활용할 수 있을 것으로 보임

사. 돼지 인터류킨2 전달 벡터 사업화

- 생산 공정 안정화 및 완제품 공정 확립
 - ▷ 상기 방법으로 확립한 돼지 인터류킨2 전달 벡터 대량 생산 시스템을 도입하고, 최종적으로 완제품을 생산하기 위하여 반복 시험을 통해 시험용 돼지 면역 보조제를 생산하였으며 공정 안정화 완료



그림 25. 생산 공정 확립 후 완제품 생산

○ 과다 용량 접종에 따른 부작용 확인 시험

- ▷ 약물 안전성 및 벡터의 생체 잔류를 확인하기 위하여 10마리의 돼지에 접종 용량의 10배의 용량을 접종하고 발열과 혈중 벡터의 잔류를 qPCR기법으로 확인하였으나 발열 반응이 나타나지 않았으며 벡터가 검출되지 않음

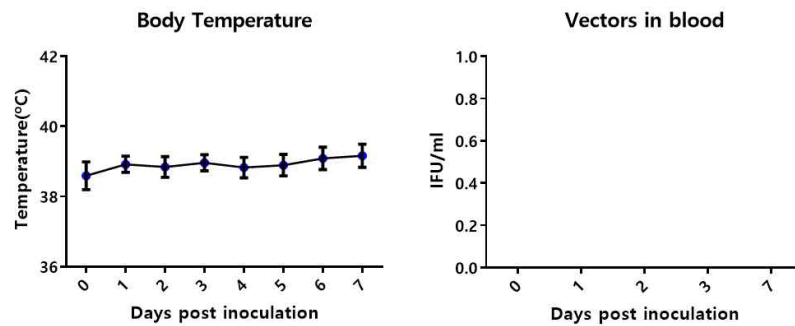


그림 26. 과용량 접종 후 체온 변화와 혈중 벡터 잔류량

○ 장기 보관에 따른 품질 보존 확인 시험

- ▷ 장기 냉장 보관상의 안정성을 확인하기 위하여 냉장 보관 0개월, 3개월 후 전달 벡터의 함량에 변화를 확인한 결과 유효 농도인 10^9 IFU/ml 이상으로 유지되는 것을 확인함

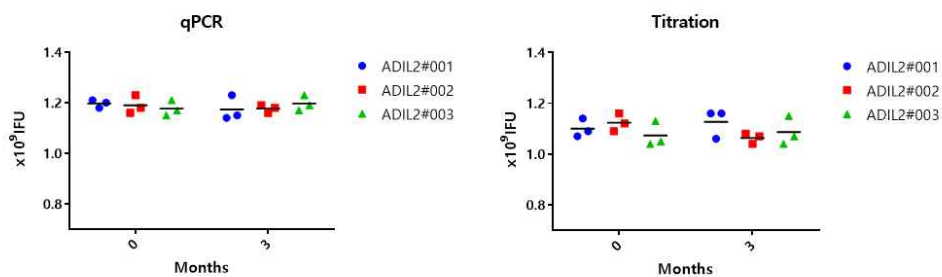


그림 27. 보존성 검사를 위한 함량검사 결과

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

성과 목표	사업화지표											연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시(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					
												SCI	비SCI				논문평균 IF	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	10			10		60			10						10				
최종목표	1			1		1	10		2						2	1			
1차년도	1			1															
2차년도						1			2						2				
3차년도																			
4차년도																			
5차년도																			
소계	1			1		1			2						2				
종료 1차년도												1				1			
종료 2차년도							10												
종료 3차년도																			
종료 4차년도																			
종료 5차년도																			
소계								10				1				1			
합계	1			1		1	10		2			1			2	1			

3-2. 목표 달성여부

성과 목표	사업화지표											연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시(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					
												SCI	비SCI				논문평균 IF	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	10			10		60			10						10				
최종목표	1			1		1	10		2						2	1			
1차년도	목표	1		1															
	실적	1		1															

2차 년 도	목표				1			2						2		
	실적															
소 계	목표	1		1	1			2						2		
	실적	1		1	1			6						2		
종료 1차년도										1					1	
종료 2차년도						10										
소 계						10				1					1	
합 계	1		1	1	10			2		1				2	1	

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

가. 연구 기간 중 목표 달성률 100%

- 연구기간(2018. 4. 30. ~ 2019. 12. 31.) 중 목표(특허출원 1, 기술이전 1, 제품화 1, 고용창출 2, 인력양성 2) 대비 달성률 100%

나. 연구 기간 종료 후 목표 달성 계획

- 연구 기간 종료 후 1차, 2차 년도 목표(SCI급 논문 1, 정책활용 1, 매출액 10)
- 본 연구과제는 연구 단계에 있는 돼지 인터류킨2 전달 벡터를 제품화하는 것을 목표로 계획되었음
- 연구 계획 당시 동물용 의약품의 통상적인 인허가 단계를 고려하면 연구기간(20개월) 내 매출액 달성이 어렵다고 판단함
- 이에 따라 연구 기간 종료 후 목표를 설정하게 되었으며 자세한 활용 계획은 후술되어 있음(4. 연구결과의 활용 계획 등)

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 과제 종료 후 성과 계획

○ SCI급 논문(종료 후 1년차 성과 목표)

- ▷ 이번 연구 기간 동안 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 돼지 폐 병변 발생 억제 효능에 관한 연구 결과를 도출하였음
- ▷ 해당 연구 결과는 기존 인터류킨2의 효능에 관한 연구 대비 신규성이 인정되는 내용임
- ▷ 현재 논문 투고를 위해 원고 작성 중에 있으며 BMC Veterinary Research 투고를 위해 진행 중에 있음

○ 정책활용(종료 후 1년차 성과 목표)

- ▷ 이번 연구 결과를 통해 생산성 억제 질병에 해당하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 증상 완화 효능이 있는 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터를 완성할 수 있었음
- ▷ 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 모돈에서 유산과 사산을 일으켜 출산되는 자돈의 수에 손해를 입히며 자돈에서는 사료 변환율을 억제하여 생산성 하락으로 이어짐
- ▷ 미국에서 조사된 바에 따르면 2003년 출하된 전체 돈육에서 5억 6천만 달러의 피해를 입히는 것으로 나타났으며 국내에서는 조사된 바가 없으나 전국 50%의 농가에 감염되어 있을 것으로 보고 있음
- ▷ 이를 바탕으로 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 통제하는 경우 유사산으로 손실되는 자돈 감소 및 증체량 개선을 통해 생산성 10% 향상을 예측할 수 있음
- ▷ 그러므로 돼지 인터류킨2 전달 벡터의 활용을 통한 생산성 증대 방안에 대해서 적극적으로 홍보할 수 있도록 세미나, 간담회, 정책 자료집 등을 통해 전파할 예정임

○ 사업화-매출액(종료 후 2년차 성과 목표)

- ▷ 돼지 인터류킨2 전달 벡터(Ad.II2)는 이번 연구를 통해 돼지 생식기 호흡기 증후군 (PRRS) 바이러스의 폐 병변을 유효하게 억제하는 효능이 검증되었음
- ▷ 뿐만 아니라 안전성 및 안정성에 관한 자료를 확보하였음
- ▷ 이를 토대로 동물용 의약품 허가 절차에 따라 등록 및 생산 예정
- ▷ 방역 기술이 향상된 현대의 양돈 업계에서는 폐사를 일으키는 질병은 대부분 근절되었음
- ▷ 이에 따라 생산성에 영향을 미치는 PRRS바이러스를 억제하는 방법에 관심이 높은 상황임
- ▷ 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 PRRS 증상 억제 효능을 적극 홍보하여 매출액 달성 계획

붙임. 참고문헌

- Krell, P. F. I., Reuther, S., Fischer, U., Keller, T., Weber, S., Gombert, M., ...Borkhardt, A. (2013). Next-generation-sequencing-spectratyping reveals public T-cell receptor repertoires in pediatric very severe aplastic anemia and identifies a chain CDR3 sequence associated with hepatitis-induced pathogenesis. *Haematologica*, *98*(9), 1388-1396. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.069708>
- Xiao, S., Jia, J., Mo, D., Wang, Q., Qin, L., He, Z., ...Chen, Y. (2010). Understanding PRRSV Infection in Porcine Lung Based on Genome-Wide Transcriptome Response Identified by Deep Sequencing. *PLoS ONE*, *5*(6), e11377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011377>
- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., ...Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *227*(3), 385-392. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>
- Kim, J., Lee, J.-A., Choi, H., Han, J., Huh, W., Pi, J.-H., ...Lee, J. (2017). In vitro and in vivo studies of deglycosylated chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a vaccine candidate and its realistic revenue impact at commercial pig production level. *Vaccine*, *35*(37), 4966-4973. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.075>
- Osorio, F. A., Galeota, J. A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., ...Laegreid, W. W. (2002). Passive Transfer of Virus-Specific Antibodies Confers Protection against Reproductive Failure Induced by a Virulent Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Establishes Sterilizing Immunity. *Virology*, *302*(1), 9-20. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1612>
- Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., & Rogan, D. (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology*, *145*(4), 659-688. <https://doi.org/10.1007/s007050050662>
- Kang, H., Yu, J. E., Shin, J.-E., Kang, A., Kim, W.-I., Lee, C., ...Cha, S.-H. (2018). Geographic distribution and molecular analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses circulating in swine farms in the Republic of Korea between 2013 and 2016. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1480-6>
- Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., & Zuckermann, F. A. (2003). Gradual development of the interferon- γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*, *309*(1), 18-31. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00009-6)
- de Lima, M., Pattnaik, A. K., Flores, E. F., & Osorio, F. A. (2006). Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, *353*(2), 410-421. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.036>
- Chen, Y.-M., Yang, W.-K., Ting, C.-C., Tsai, W.-Y., Yang, D.-M., Whang-Peng, J., & Perng, R.-P. (1997). Cross Regulation by IL-10 and IL-2/IL-12 of the Helper T Cells and the Cytolytic Activity of Lymphocytes From Malignant Effusions of Lung Cancer Patients. *Chest*, *112*(4), 960-966. <https://doi.org/10.1378/chest.112.4.960>
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, *4*(1), 129-154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 구제역 발생 초기 방어를 위한 돼지 IL2 체내 전달 벡터 개발 및 사업화				
	(영문) Development and industrialization of porcine IL2 gene delivery vector for protection of early 7 days of FMD				
주 관 연구 기관	(주)카브		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)카브	
참 여 기 업	(주)왓슨알앤디			(성명) 박승용	
총 연구개발비 (349,400천원)	계	349,400	총 연 구 기 간	2018. 4. 30. ~ 2019. 12. 31. (20개월)	
	정부출연 연구개발비	262,000	총 연 구 원 수	총 인 원	15
	기업부담금	87,400		내부인원	4
	연구기관부담금			외부인원	11
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>1) 구제역발생 초기 방어용 면역 증강제 제품화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 대량 생산 체계 확립 - 돼지 인터류킨2의 구제역 백신 면역 보조능에 대한 확인 - 돼지 인터류킨2의 면역 보조 기작에 대한 실험적 확인 - 제품화를 위한 과용량 투여 시험 및 냉장 보관 시험 <p>2) 구제역 초기 방어 자극물질 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 인터류킨2과 함께 면역 보조 작용이 있는 신규 물질 신규 발굴 <p>3) 면역증강제 적용 확대 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신에 대한 돼지 인터류킨2의 면역 보조 효능 확인 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>1) 구제역발생 초기 방어용 면역 증강제 제품화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3D 세포 배양법을 이용한 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 대량 생산 체계 확립 - 구제역 백신과 동시 접종 했을 때 항체 형성 및 인터페론 유도 확인 - 돼지 인터류킨2 농도에 따른 면역 작용 차이 확인 - 과용량 투여 후 부작용 및 잔류 부재 확인 - 장기간 냉장 보관 안정성 확인 <p>2) 구제역 초기 방어 자극물질 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> - TLR3 자극 물질(poly I:C)에 대한 구제역 초기 방어 효과 확인 					

- 항바이러스 가능 천연 물질(BSB) 발굴

3) 면역증강제 적용 확대 연구

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신과 동시 접종 했을 때 돼지 인터류킨2의 폐 병변 억제 효과 확인

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 1) 돼지 인터류킨2 면역 보조제 제품화 및 매출액 달성
- 2) 학술 활동 및 정책 활용을 통한 돼지 인터류킨2 효능 홍보
- 3) 면역 억제성 질병에 대한 방역 기술 향상
- 4) 국내 양돈 산업 생산성 향상 및 소득 개선

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	818027-2		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	[수의][수의예방][동물질병관리]		과제구분	단위	
사업명	농식품연구성과후속지원사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	구제역 발생 초기 방어를 위한 돼지 IL2 체내 전달 백신 개발 및 사업화		과제유형	(개발)	
연구기관	(주)카브		연구책임자	박승용	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018. 4. 30. ~ 2018. 12. 31.	115,000	38,400	153,400
	2차연도	2019. 01. 01. ~ 2019. 12. 31.	147,000	49,000	196,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계	2018. 4. 30. ~ 2019. 12. 31	262,000	87,400	349,400
참여기업	(주)왓슨알앤디				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020년 2월 12일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)카브	감사	박승용

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약 박승용 (인)

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

- 연구 과제를 진행하는 과정에서 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터는 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신과 함께 접종하였을 때 야외주 바이러스 감염에 의한 폐 병변을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었음
- 또한 바이러스의 감염을 억제할 수 있는 생물전환 황금(BSB)을 발견하였으며 실험적으로 그 효능을 입증하였음
- 상기의 결과는 과학적으로 신규성이 있는 사실로서 연구 활동의 창의성이 아주 우수하다고 인정됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

- 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 효능이 확인됨에 따라 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신의 보조제로 제품화가 가능했으며 매출이 발생할 예정임
- 체내 잠복 감염하고 장기간 분비하는 특징이 있는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 효능이 확인된 만큼 PCV, 마이코플라스마와 같은 질병에도 효능을 보일 것으로 기대함
- 상기의 결과는 생산성 개선의 한계에 도달한 국내 양돈 산업에서 생산성을 높일 수 있는 돌파구가 될 수 있으며 연구 개발 결과의 파급 효과가 아주 우수하다고 인정됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 연구 기간 동안 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터를 안정적으로 대량 생산하기 위한 준비가 되었으며 효능, 안전성, 안정성에 대한 검증이 진행되었음
- 이에 따라 동물용 의약품 등록을 위한 과정이 남은 상태이며 곧 매출로 이어질 것으로 보임
- 그러므로 연구개발결과 활용가능성이 우수하다고 인정됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

- 연구 기간 동안 연구 계획서상에 기재된 모든 연구를 진행하였으며 실험 결과가 미흡한 부분에 대해서 추가 실험을 통해 새로운 연구 결과를 도출하였음
- 그러므로 연구개발의 성실도가 아주 우수하다고 인정됨

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

- 연구 기간 내 공개 발표된 내용은 특허 출원 1건, 기술이전 1건이 있으며 이는 연구 계획에 따른 목표 성과임
- 또한 연구 기간 종료 후 2년 동안 논문 1건, 매출액, 정책 활용 목표 성과가 예정되어 있음
- 연구 결과 도출된 새로운 과학적 사실의 창의성과 매출액 발생 가능성을 고려하면 시장 공개 효과가 매우 높을 것으로 예측됨
- 또한 향후 기술 설명회 또는 공개 발표회 등을 개최하여 우리 기술을 적극 홍보할 계획임
- 아직 공개되지 않은 개발 성과가 있는 점을 고려하여 우수하다고 인정됨

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
돼지 IL2 아데노바이러스 대량 생산 시스템 확립	20	100	<ul style="list-style-type: none"> 초기 목표인 벡터 농도 10^{11} TCID₅₀/ml 이상 생산체계 도달
구제역 초기 방어 자극물질의 탐색	20	100	<ul style="list-style-type: none"> TLR자극 물질에 대한 연구를 진행하였으나 돼지 인터류킨2와 시너지 효과가 없는 것으로 확인됨 추가적인 실험을 통해 바이러스 억제 효과가 있는 생물전환 황금(BSB)을 발굴함
마우스 공격 접종(challenge) 모델을 이용한 구제역 백신 초기 방어능 확인	10	50	<ul style="list-style-type: none"> 마우스 접종 실험을 통해 돼지 인터류킨2가 구제역 백신의 면역을 보조하여 항체의 유도를 자극하는 것으로 확인 되었으나 그 항체의 정도가 구제역 방어 수준에 도달하지 못함
돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 돼지 IL2 아데노바이러스의 면역 증강 확인	15	100	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 폐 조직 손상 기작을 돼지 인터류킨2 전달 벡터가 억제하는 현상을 실험적으로 확인하였음
돼지 공격 접종(challenge) 모델을 이용한 구제역 백신 초기 방어능 확인 시험	15	50	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 접종 실험을 통해 돼지 인터류킨2가 구제역 백신의 면역을 보조하여 항체의 유도를 자극 하는 것으로 확인되었으나 그 항체의 정도가 구제역 방어 수준에 도달하지 못함
돼지 IL2 아데노바이러스를 이용한 면역 증강제 제품화	20	100	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 생산 공정을 완성하여 제품화 하였으며 판매를 위해 등록 단계 진행 중
합계	100점	87.5점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 연구 과제의 진행 과정에서 초기 계획한 모든 실험을 수행하였으며 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 돼지 인터류킨2의 폐 병변 억제 효능을 확인하여 새로운 과학적 사실을 발견하였음
- 구제역 백신의 면역 보조 효능에 대해서 마우스와 돼지를 이용하여 실험을 진행한 결과 백신만 사용한 경우에 비해 항체를 높게 유도하는 것으로 확인되었으나 그 정도가 방어능에 도달하지는 못함
- 돼지 인터류킨2 체내 전달 백터와 시너지 효과가 있는 물질을 발굴하기 위해서 여러 물질을 탐색했으며 그 결과 생물전환 황금(BSB)의 바이러스 복제 억제 효능을 신규로 발견할 수 있었음
- 정성 목표 또한 연구 기간 내 연구 성과 목표 대비 모두 완수 하였으며 연구 종료 후 성과 목표 달성 계획이 진행 중에 있음
- 상기 내용을 모두 고려할 때 연구의 내용과 연구 목표 달성이 모두 우수한 것으로 평가됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 연구 계획서 작성 당시에는 구제역 백신에 대한 면역 보조 효과에 대한 연구를 중심으로 구성되었으며 이는 건국대학교 연구팀의 선행연구 결과를 바탕으로 하고 있었음
- 연구를 진행하는 과정에서 구제역 백신과 돼지 인터류킨2 체내 전달 백터를 함께 사용하는 경우 항체 형성을 보조하는 것으로 확인되었으나 그 수준이 구제역 방어 수준에 도달하지 못했으며 이로 인해 구제역 바이러스 공격 접종 실험은 진행하지 못함
- 이는 공격접종 시험이 무의미한 상황에서 연구비의 손실을 막기 위한 결정이었음
- 그러나 추가적인 연구를 통해 돼지에서 바이러스 억제 효능이 있는 생물전환 황금(BSB)을 발굴하였으며 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 돼지 인터류킨2의 병변 억제 효능을 확인하였음
- 그러므로 연구 목표 달성도 평가 시 상기 내용을 고려하여 평가하기를 요청함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 돼지 인터류킨2 체내 전달 백터는 생산 공정이 준비되었으며 그 효능이 이번 연구를 통해 모두 입증되었음
- 상기 내용을 바탕으로 동물용 의약품 등록 과정을 진행할 예정임
- 또한 학술 발표 및 관계자 세미나를 통해 제품의 효능에 대해서 적극 홍보할 예정임

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

○ 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 폐 병변을 억제하는 효과는 과학적으로 신규성이 있는 실험결과로서 연구자의 학술 활동을 위해 공개를 유보할 필요가 있음

2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 연구 개발에 인력과 비용이 투자된 만큼 제품이 판매되는 시점까지 주관연구기관의 배타적 이익을 위해 보고서의 보안을 최소 2년 이상 유지할 필요가 있음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	수의학
연구과제명	구제역 발생 초기 방어를 위한 돼지 IL2 체내 전달 벡터 개발 및 사업화			
주관연구기관	(주)카브		주관연구책임자	박승용
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	262,000,000원	87,400,000원		349,400,000원
연구개발기간	2018. 4. 30. ~ 2019. 12. 31.(20개월)			
주요활용유형	<input checked="" 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 돼지 IL2 아데노바이러스 대량 생산 시스템 확립	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 초기 목표인 벡터 농도 10^{11}TCID₅₀/ml 이상 생산 체계 도달
② 구제역 초기 방어 자극물질의 탐색	<ul style="list-style-type: none"> ▪ TLR자극 물질에 대한 연구를 진행하였으나 돼지 인터류킨2와 시너지 효과가 없는 것으로 확인됨 ▪ 추가적인 실험을 통해 바이러스 억제 효과가 있는 생물전환 황금(BSB)을 발굴함
③ 마우스 공격 접종(challenge) 모델을 이용한 구제역 백신 초기 방어능 확인	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 마우스 접종 실험을 통해 돼지 인터류킨2가 구제역 백신의 면역을 보조하여 항체의 유도를 자극하는 것으로 확인 되었으나 그 항체의 정도가 구제역 방어 수준에 도달하지 못함
④ 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 돼지 IL2 아데노바이러스의 면역 증강 확인	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 폐 조직 손상 기작을 돼지 인터류킨2 전달 벡터가 억제하는 현상을 실험적으로 확인하였음
⑤ 돼지 공격 접종(challenge) 모델을 이용한 구제역 백신 초기 방어능 확인 시험	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 접종 실험을 통해 돼지 인터류킨2가 구제역 백신의 면역을 보조하여 항체의 유도를 자극 하는 것으로 확인되었으나 그 항체의 정도가 구제역 방어 수준에 도달하지 못함
⑥ 돼지 IL2 아데노바이러스를 이용한 면역 증강제 제품화	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터의 생산 공정을 완성하여 제품화 하였으며 판매를 위해 등록 단계 진행 중

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10			10		60			10						10					
최종목표	1			1		1			2						2					
연구기간내 달성실적	1			1		1			6						2					
달성율(%)	100			100		100			100						100					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터
②	돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 대량 생산 기술
③	돼지 생식기 호흡기 중후군 백신 면역 보조 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

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

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	돼지 인터류킨2를 돼지 면역 작용 보조 기능 연구
②의 기술	돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 상용화에 따른 매출액 발생
③의 기술	돼지 생식기 호흡기 증후군 방역 기술 개발

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표						10					1						1		
연구기간내 달성실적																			
연구종료후 성과창출 계획						10					1						1		

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	돼지 인터류킨2 체내 전달 벡터 대량 생산 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	50,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2022년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	설비 및 기술 정착을 위한 기술지도		

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

주 의

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