

319081-03

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서 (건고딕 13p)

발간등록번호

11-1543000-004127-01

생분해성 물질 기반 양돈용 범용 바이오일성 백신 보조제 개발

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

생분해성 물질 기반 양돈용 범용 바이오일성 백신 adjuvant 개발

2022.06.30.

주관연구개발기관 / (주)중앙백신연구소
공동연구개발기관 / 서울대학교

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

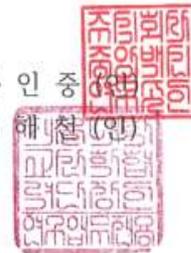
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "생분해성 물질 기반 양돈용 범용 비오일성 백신 adjuvant 개발"(개발기간 : 2019.05. ~ 2021.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.06.30.

주관연구기관명 : (주)중앙백신연구소 (대표자) 윤 인 중

협동연구기관명 : 서울대학교산학협력단 (대표자) 최



주관연구책임자 : 유 성 식

협동연구책임자 : 윤 철 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서										보안등급			
										일반[], 보안[]			
중앙행정기관명				사업명		사업명							
전문기관명						내역사업명 (해당 시 작성)							
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)									
				연구개발과제번호									
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710,100%	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%						
	농림식품과학기술분류	1순위 동물질병관리 100%	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%						
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문											
		영문											
연구개발과제명		국문		생분해성 물질 기반 양돈용 범용 바이오일성 백신 adjuvant 개발									
		영문		Development of universal non-oil porcine vaccine adjuvant based on biodegradable materials									
주관연구개발기관		기관명		(주)중앙백신연구소		사업자등록번호		305-81-19849					
		주소		(우)34055 대전시 유성구 유성대로 1476-37		법인등록번호		160111-0042533					
연구책임자		성명		유 성 식		직위		연구소장					
		연락처		직장전화		휴대전화							
				전자우편		국가연구자번호							
연구개발기간		전체		2019. 05. 27 - 2021. 12. 31(2년 8개월)									
		단계		1단계									
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계			연구개발비 외 지원금		
		현금		현금 현물		현금 현물 기타()		현금 현물 합계					
총계		590,000		19,800 178,200				609,800 1780,00 788,000					
1단계		1년차		150,000 5,000 45,000				155,000 45,000 200,000					
		2년차		220,000 7,400 66,600				227,400 66,600 294,000					
		3년차		220,000 7,400 66,600				227,400 66,600 294,000					
n단계		n년차											
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고	
		서울대학교		윤철희		교수						역할 기관유형	
		충남대학교		최준식		교수						공동 대학	
		연구개발기관 외 기관										위탁 대학	
연구개발담당자 실무담당자		성명		심영정		직위		과장					
		연락처		직장전화		휴대전화							
				전자우편		국가연구자번호							

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 02월 11일

연구책임자: 유 성 식 (인)

주관연구개발기관의 장: 윤 인 중 (직인)

공동연구개발기관의 장: 최 해 천 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 정 종 울 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호					
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710,100%	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	1순위 동물질병관리 100%	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		생분해성 물질 기반 양돈용 범용 바이오일성 백신 adjuvant 개발					
전체 연구개발기간		2019. 05. 27 - 2021. 12. 31(2년 8개월)					
총 연구개발비		총 788,000천원 (정부지원연구개발비: 590,000천원, 기관부담연구개발비: 198,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]	기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	○ 생분해성 물질 기반 양돈용 범용 바이오일성 백신 adjuvant 개발을 통하여 방어면역 형성 기전 및 특성을 규명하고 백신 효능의 증진 뿐만 아니라 안전성을 개선하여 신규 양돈용 백신보조제를 개발하는 것을 최종 목표로 함					
	전체 내용	<p>○ 신규 biodegradable polymer 백신보조제 개발 및 실험동물 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - Polymer 후보군의 확보 및 스크리닝 - Polymer 후보군의 제제화 및 효력평가 - 접종경로 (IM, nasal)에 따른 효능평가 - 항원별 (바이러스, 세균) 실험동물 효력평가 <p>○ 양돈용 핵심질병인 돼지열병 바이러스에서의 polymer 백신보조제의 안전성 및 유효성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신규 개발된 백신보조제가 포함된 양돈용 백신의 제제화 평가 - 신규 개발된 백신보조제가 포함된 양돈용 백신의 안정성(stability) - 신규 개발된 백신보조제가 포함된 양돈용 백신의 목적동물 안전성 및 유효성 평가 <p>○ 신규 개발된 바이오일성 adjuvant가 적용된 백신 시제품 생산 및 상용화 방안 마련</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최종 개발된 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 산업화 방안 연구 - 돼지열병 미끼백신의 품목허가 작성 및 제출을 통한 품목허가 취득 <p>○ 신규 바이오일성 nanoparticle 백신 adjuvant 개발 및 특성 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수용성 저점도 신규 바이오일성 nanoparticle adjuvant 연구 					

	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 바이오일성 nanoparticle adjuvant 효능 연구 - 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 점막면역 효능 개선 연구 <p>○ Nanoparticle adjuvant의 안전성 및 유효성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 효능 및 안전성 연구 - 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 신규항원 (MHP)과의 적용을 통한 방어면역 규명연구 - 비강백신 투여 적용에 따른 점막 면역 확설 비교 연구 <p>○ Nanoparticle adjuvant에 의한 방어 면역 획득 및 기전 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 방어 면역 형성 기전 연구 - 폐렴 감염 모델 항원에 nanoparticle adjuvant 적용 시 면역 활성 비교를 통한 방어면역 형성 기전 연구
--	---

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 백신보조제 메카니즘 연구로 기술력 확보 ○ 양돈용 불활화 백신에 적용가능한 백신보조제 개발 ○ 신규 개발된 폴리머 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 ○ 신규 개발된 폴리머가 적용된 “수이삿 돼지열병 생마커 미끼백신” 품목허가취득 ○ 양돈용 돼지열병 미끼백신에 적용한 신제품 출시 <p><정량적 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 특허출원 1건 (제10-2020-0112625호, 동물용 미끼백신 및 이의 제조방법) ○ 특허등록 1건 (제10-2355774호, 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 애주번트 조성물) ○ 상표출원 2건 (수이삿 돼지열병 생마커 미끼백신, CAvant PA) ○ SCI급 논문 4건 게재, 학술발표 4건 ○ 사업화 1건 (제품명: 수이삿 돼지열병 생마커 미끼백신) ○ 매출액 발생 (2021년도 국내 매출액: 751,669천원)
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 독자적인 국내 기술로 백신보조제 개발로 백신 보조제 수입대체 효과 ○ 원천 기술로 관련된 백신 및 백신보조제 연구개발에 플랫폼 기술로 활용 ○ 양돈용 폴리머 백신보조제를 발굴하여 기존 동물용 백신 보조제의 단점을 극복하고, 경구 투여를 통한 점막면역을 유도할 수 있는 제형 개발에 성공하여 차세대 동물용 백신 연구의 활성화에 기여할 것으로 판단됨. ○ 신규 개발된 백신보조제는 돼지열병 바이러스 백신에만 국한되지 않고, 양돈용 백신의 백신보조제로 활용 가능할 수 있도록 다양한 양돈 질병 백신에서의 효능성, 안전성 및 안정성을 분석할 예정임. ○ 신규 개발된 백신보조제를 포함하는 백신의 지식재산권 확보를 통해 국내 동물백신 산업 시장 확대 및 해외 수출로 활용될 수 있음. ○ 경제적 측면에서는 사업화 추진에 성공하여 폴리머 백신보조제를 포함하는 양돈용 돼지열병 생마커 미끼백신 품목허가를 취득하였음. 국내 최초 멧돼지용 백신 개발에 성공하였으며 이를 통해 국내 야생 멧돼지에서 돼지열병 근절에 기여할 것으로 기대함.
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	4	2										
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수 량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	비오일성		생분해성		백신보조제		양돈용 백신		에멀전			
영문핵심어 (5개 이내)	Non-oil based		Biodegradable		Adjuvant		Porcine vaccine		Emulsion			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	11
3. 연구개발과제의 수행결과 및 목표 달성 정도	55
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	61
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도	62
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	63

별첨 자료

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발의 필요성

면역증강제의 개념은 프랑스 의사인 Gaston Ramon의 우연적인 관찰에 의해 처음 발견 되었음. 디프테리아(Diphtheria)와 파상풍(Tetanus) 백신을 연구하는 과정 중, 접종부위에 염증이 생긴 동물에서 더 높은 항체가 만들어진 것을 알게 되었고, 염증을 유발하는 여러 가지 물질 들을 테스트하던 중 면역반응을 증가시키는 물질이 있다는 것을 발견한 것으로 알려져 있음. 비슷한 시기에 Alexander Glenny에 의해 aluminum salt가 면역반응을 증가시킨다는 것을 발견하게 되었고, 결국 alum은 1932년에 사람백신에 적용되는 첫 면역증강제가 되었으며, 현재 까지 가장 많은 백신에 사용되고 있는 실정임.

80여년이 지난 지금 전 세계적으로 인체의약품에 허가받은 백신보조제는 aluminum salts(1932), Liposome(1994), Oil-in-water emulsion (MF59(1997), AS03(2009), AF03(2010)), Monophosphoryl lipid A (MPL, 2005), GM-CSF(2010), Saponin(AS01B, QS21, 2015) 등이 있음.

동물용 백신보조제는 인체백신의 규정보다 완화되어 있어 위에 나열된 백신보조제들을 포함하여 오일이 포함된 에멀전 타입의 백신보조제도 많이 연구 및 사용되고 있음.

특히 오일함량이 가장 많은 W/O 에멀전 타입 백신보조제는 장기간 면역유지가 가능하고 면역유도가 강하여 양계용 백신에 많이 사용되고 있음.

백신보조제는 특성에 따라 분류할 수 있는데, 각 유형별 면역기작이 다름. 에멀전 타입 백신 보조제는 일반적으로 immunestimatory property를 가지고 있는 반면, 비오일성 liposome, microspheres, alum, nanoparticle 등은 depot effect 또는 특정 항원 또는 ligand target으로 carrier 역할을 하며, 일부 compound는 두 가지의 특성을 모두 가지는 반면 오직 하나의 특성을 가지고 있는 경우도 있음.

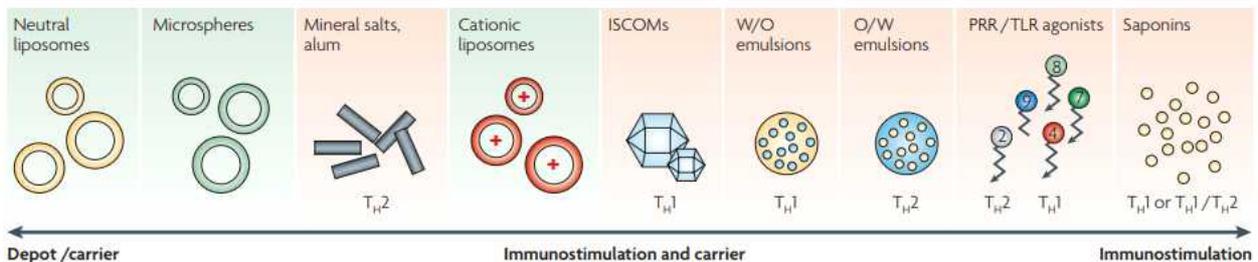


그림 1. Properties of adjuvant

산업적으로 많은 이슈가 되고 있는 구제역 백신의 경우에도 백신보조제로 오일 기반의 백신보조제가 사용되고 있는데, 일반적으로 사용되는 구제역 백신보조제는 Double oil emulsion (water-in-oil-in-water, W/O/W) 형태로 Seppic사의 Montanide ISA 206, ISA 201이며, 오일 기반의 백신 보조제로는 water-in-oil (W/O) 타입과 oil-in-water (O/W) 타입이 있음. 각각의 타입에 따라 면역원성과 안정성이 다르기 때문에 목적에 따라 적절히 사용해야 함.

하지만 이러한 오일 기반의 백신보조제는 alum에 비하여 백신 접종부위(local reaction)에 국소 반응을 발생시킴.

돼지의 경우 목에도 접종하는 W/O형태의 백신 접종이후 목 부분의 비화농성 육아종으로 인한 이상육 발생 현상이 나타나 농가의 피해를 주고 있음.

Oil Phase의 백신의 한계점인 염증반응으로 인한 이상육 문제와 백신자체의 낮은 항체생성을 및 짧은 지속시간을 개선한 대량생산이 가능한 국내 자체 기술의 백신보조제(adjuvant)의 개발이 필요함.

표 1. 백신보조제(adjuvant)의 개발 현황

Adjuvant name	Class	Mechanism or receptor	Type of immune response	Clinical phase or licensed product name
dsRNA analogues (for example, poly(I:C))	IM	TLR3	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 1
Lipid A analogues (for example, MPL, RC529, GLA, E6020)	IM	TLR4	Ab, T _H 1	Cervarix, Supervax, Pollinex Quattro, Melacine
Flagellin	IM	TLR5	Ab, T _H 1, T _H 2	Phase 1
Imidazoquinolines (for example, Imiquimod, R848)	IM	TLR7 and TLR8	Ab, T _H 1	Aldara
CpG ODN	IM	TLR9	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
Saponins (for example, QS21)	IM	Unknown	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
C-type lectin ligands (for example, TDB)	IM	Mincle, Nalp3	Ab, T _H 1, T _H 17	Phase 1
CD1d ligands (for example, α-galactosylceramide)	IM	CD1d	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ NKT cells	Phase 1
Aluminum salts (for example, aluminum oxyhydroxide, aluminum phosphate)	PF	Nalp3, ITAM, Ag delivery	Ab, T _H 2	Numerous licensed products
Emulsions (for example, MF59, AS03, AF03, SE)	PF	Immune cell recruitment, ASC, Ag uptake	Ab, T _H 1, T _H 2	Fluad, Pandemrix
Virosomes	PF	Ag delivery	Ab, T _H 1, T _H 2	Epaxal, Inflexal V
AS01 (MPL, QS21, liposomes)	C	TLR4	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
AS02 (MPL, QS21, emulsion)	C	TLR4	Ab, T _H 1	Phase 3
AS04 (MPL, aluminum salt)	C	TLR4	Ab, T _H 1	Cervarix
AS15 (MPL, QS21, CpG, liposomes)	C	TLR4 and TLR9	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
GLA-SE (GLA, emulsion)	C	TLR4	Ab, T _H 1	Phase 1
IC31 (CpG, cationic peptide)	C	TLR9	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ T cells	Phase 1
CAF01 (TDB, cationic liposomes)	C	Mincle, Ag delivery	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 1
ISCOMs (saponin, phospholipid)	C	Unknown	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ T cells	Phase 2

Ab, antibody; Ag, antigen; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain; C, combination of immunomodulatory molecule and particulate formulation; dsRNA, double-stranded RNA; IM, immunomodulatory molecule; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; PF, particulate formulation; TDB, trehalose dibehenate. Some particulate formulations (such as aluminum salts and emulsions) also generate immunomodulatory activity.

Reed, Steven G., Mark T. Orr, and Christopher B. Fox. "Key roles of adjuvants in modern vaccines." Nature medicine 19.12 (2013): 1597.

동물백신에 polymeric adjuvant를 적용하고 있는 다국적기업에는 조에티스(Zoetis), 베링거인겔하임(Boehringer Ingelheim Vetmedica), 메리알(Merial) 등이 있으며, 특히 베링거인겔하임사는 자체개발한 water-based polymer adjuvant인 Impran FLEX를 사용하고, 이는 양돈백신의 Ingelvac CircoFLEX, MycoFLEX 등 FLEX 시리즈 백신에 사용되고 있음. 또한 polymer 타입의 백신보조제를 생산하여 제품화하고 있는 기업은 Seppic사의 Montanide Gel 01, Gel 02, Montanide Pet gel A 제품이 있으며, MVP Laboratories사의 Carbigen 등이 있음.

다국적기업에서 사용중인 polymeric adjuvant는 원료 및 제조방법 등에 대해 비공개로 자체 기술력을 보유하고 있어 정보검색에 어려움이 있으나 특허조사 및 문헌검색 등의 결과로는 polymeric adjuvant의 base는 Lubrizol사의 Carbopol(상품명; ICID name Carbomer)로 추정

됨. Lubrizol사의 Carbopol은 polymer based한 물질로 용매를 흡수하면 cross-linked 되어 gel의 형태를 띄어, 이 특성을 이용해 화장품 원료나 제약업체에서 응용되어 사용있는 것으로 알려져 있음.

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 백신은 병원균 감염에 대한 방어를 목적으로 항원에 대한 면역반응을 생성하도록 하기 위해 사용되는 의약품임
- 최근 개발되고 있는 백신들은 주로 재조합 단백질(recombinant protein)을 항원으로 사용하고 있는데, 재조합 단백질은 세균 백신이나 약독화 생백신에 비하여 부작용이 적고 안전하지만 면역원성이 낮기 때문에 감염 방어에 충분한 면역력을 생성하기 위해 면역보조제를 함께 사용하여야 함
- 면역보조제는 그 스스로는 특이적인 항원-항체 면역반응을 가지지 않으면서 백신 항원에 대한 면역 반응을 자극시켜 증강된 면역력을 유도할 수 있는 일종의 백신 첨가제임
- 다양한 병원균에 대한 방어효능을 가진 백신개발을 위해 새로운 기능을 가진 면역보조제가 필요한 상황임

○ 시장현황

- 지난 몇 십 년간 면역보조제에 관한 활발한 연구가 이루어짐에도 불구하고 신규 면역보조제로서 승인을 받을 만한 안전성과 내약성을 모두 갖춘 효과적인 면역보조제를 개발하기 어렵기 때문에 여전히 80년 전 처음 활성이 밝혀진 알루미늄염을 기초로 한 면역보조제에 상당부분 의지하고 있음
- 현재 사용되고 있지만 효과가 미흡한 백신의 효능을 증진시키거나 개발이 어려운 감염성 질환에 대한 예방백신을 개발하기 위해서는 해당 병원균의 감염예방에 필요한 면역 활성을 유도하는 면역보조제의 개발이 매우 중요함

○ 경쟁기관현황

- 백신 면역증강제의 강력한 후보군으로 임상연구까지 진행되고 있는 PRR agonist들은 PolyI:C (TLR3), imidazoquinolines (small molecule immune potentiators, TLR7/8), CpG oligonucleotides (TLR9) 등이 있음
- TLR을 통해 면역반응을 강화하는 물질들 이외에도 RIG-I, STING, C-type lectin, CD1d 등의 PRR들을 자극하는 agonist들도 면역증강제 후보물질들로서 활발한 전임상 혹은 임상 연구가 진행되고 있음

○ 지식재산권현황

- TB의 경우, T 세포성 면역반응이 보호효과에 필수적인 것으로 보이며, 이에 따라 강한 세포성 면역반응을 일으키는 면역증강제(GLA-SE, IC31, AS01)와 함께 백신개발이 시도되고 있음
- alum, emulsion, liposome과 같은 전통적인 면역증강제(혹은 배달 시스템)에 MPL, QS-21, CpG와 같은 immunostimulatory molecule(면역 자극 분자)을 첨가하여 필요한 면역반응을 유

도할 수 있는 복합 면역증강제의 개념이 등장하게 되었고 다양한 PRR ligand들이 복합 면역증강제의 후보물질로 활발히 연구되고 있음

- LPS는 TLR4에 작용하여 항체성 면역반응의 향상뿐만 아니라 세포성 면역반응도 강화시키는 것으로 보고되었으나 LPS 자체의 독성이 매우 강하기 때문에, 독성을 일으키는 부분을 제거한 monophosphoryl Lipid A (MPL) 혹은 GLA가 새로운 면역 증강제로서 연구되고 있음

○ 표준화현황

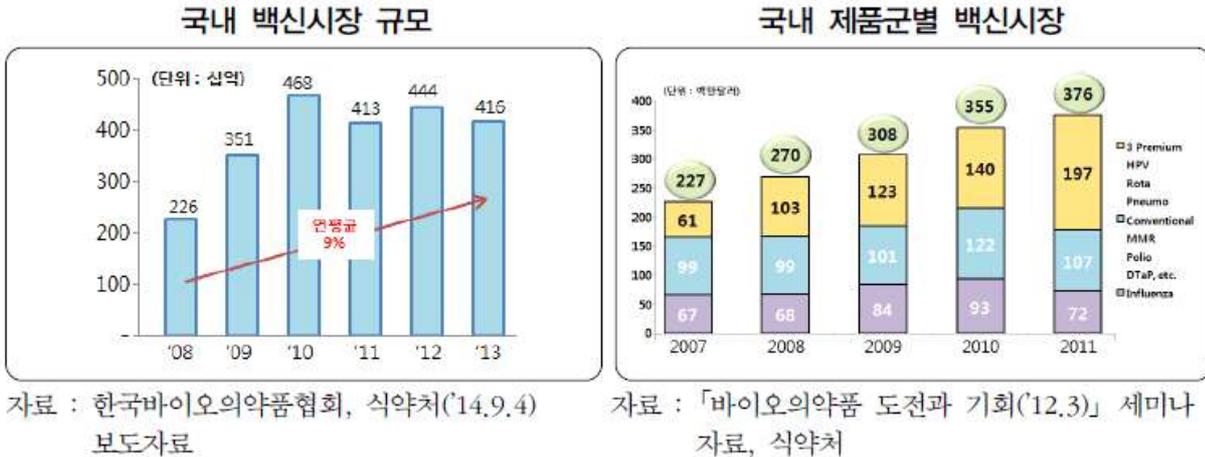


그림 2. 국내백신의 제품군별 시장 규모

- 국내 백신시장의 규모는 해마다 평균 9%씩 증가하는 경향을 보이고 있음
- 백신시장의 규모가 증가함에 따라 다양한 백신에 대한 백신 보조제의 개발 필요성이 더욱 중요해질 것으로 보임

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 1926년, 면역보조제로 개발된 알루미늄염은 현재 가장 널리 사용되는 면역보조제로서 지난 80여 년 동안 사람 백신에 거의 독점적으로 사용되고 있음
- 알루미늄염 이후 세균의 성분을 이용하거나 식물의 성분 및 지질 입자(리포솜, liposome)를 이용한 면역보조제가 개발되기 시작하였고, 다양한 병원균에 대한 방어효능을 가진 백신 개발을 위해 새로운 기능을 가진 면역보조제가 필요한 상황임

○ 시장현황

- 현재 유럽 및 미국에서 승인을 받아 백신에 사용되고 있는 면역보조제로는 알루미늄염, MF59, AS03, AS04 등이 있음
- 알루미늄염은 주로 Al(OH)₃ 또는 AlPO₄ 형태로 사용되는데 일반적으로 단백질 항원을 흡착하여 천천히 방출함으로써 면역증강효과를 나타내는 것으로 생겼으나 최근에 알루미늄염이 수지상세포를 활성화시키고 interleukin(IL)-1β와 IL-18과 같은 사이토카인 분비를 촉진시키는 것으로 알려짐
- 알루미늄염은 여러 백신에 널리 사용되며 매우 안전한 것으로 생각되고 있지만 알려지 반응을 유발하고 신경독성도 있는 것으로 추정되고 있으며 항체가 매개된 체액성 면역반응은 강하게 유

도하나 세포성 면역반응은 거의 유도하지 못하며, 동결보존이 불가능하다는 단점이 있음

○ 경쟁기관현황

- 강한 CD8 T 세포 반응을 일으키는 것으로 알려진 PRR agonist들이나 saponin(사포닌) 기반의 물질들, 예를 들어 Quillaja saponaria 21 (QS21)이나 ISCOMATRIX와 같은 면역증강제와 함께 효과적인 백신개발이 진행되고 있음
- 세포성 면역반응을 강하게 유발하는 여러 가지 면역 증강제들이 시험되었으며, 복합 면역증강제의 일종인 AS01와 RTS-S를 함께 사용하여 비교적 우수한 보호효과를 보이고 있음. 현재 phase 3 임상시험 중이어서 조만간 첫 번째 말라리아 백신이 허가를 받을 가능성이 높은 상황

○ 지식재산권현황

- 최근 두 번째 백신 보조제인 스쿠알렌을 함유한 oil-in-water emulsion 형태인 MF59가 개발되어 대유행 독감(pandemic flu)백신과 노년층을 위한 계절 독감(seasonal flu)백신에 사용허가를 받게 됨
- 2009년에 또 다른 emulsion형태인 AS03가 대유행 독감 백신의 면역증강제로 유럽에서 인증됨
- alum에 TLR4 agonist인 monophosphoryl lipid A (MPL)가 첨가된 복합 면역증강제 (combination adjuvant) AS04가 Hepatitis B virus (HBV, B형 간염) 백신과 Human papilloma virus (HPV, 인유두종 바이러스) 백신으로 각각 2005년과 2007년에 사용허가를 받음
- 영국의 G사에서 연구, 개발하고 있는 Adjuvant System (AS), AS01은 liposome에 MPL과 QS-21이 함께 들어가 있는 면역증강제로서 매우 효과적인 CD8 T cell 반응을 유도하여, 말라리아의 후보 백신인 RTS-S에 포함되어있고, 좋은 효과를 보여 현재 phase 3 임상시험이 진행 중임

○ 표준화현황

- 국외에서의 백신보조제에 대한 연구는 매우 활발하며 허가되거나 임상시험에 들어간 보조제의 수나 종류가 국내에 비해 많음
- 또한 phase 3 임상시험을 진행 중인 제품들이 많이 있어 빠른 시일 내에 새로운 보조제를 선보일 가능성이 높음

표 2. 면역 증강제 개발 임상단계

분류	면역증강제	작용기전 혹은 수용체	면역반응 형태	개발 단계
PF	Aluminum salts (aluminum phosphate or hydroxide)	Ag delivery, Nalp3 inflammasome, DAMPs release	Ab, TH2	Numerous licenced products
	Emulsions (MF59, AS03, AF03, SE)	Inflammation, DAMPs release	Ab, TH1, TH2	Fluad, Pandemrix
IM	dsRNA analogues (poly(I:C))	TLR3	Ab, TH1, CD8 T	Phase 2
	Lipid A analogues (MPL, GLA)	TLR4	Ab, TH1	Fendrix, Cervarix, Supravax, Pollinex Quattro
	Flagellin	TLR5	Ab, TH1, TH2	Phase 1
	Imidazoquinolines (Imiquimod, R848)	TLR7, TLR8	Ab, TH1	Aldara
	CpG ODN	TLR9	Ab, TH1, CD8 T	Phase 3
	Saponins (QS21)	Unknown	Ab, TH1, TH2, CD8 T	Phase 3
	C-type lectin ligands (TDB)	Mincle, Nalp3	Ab, TH1, TH17	Phase 1
	CD1d ligands (α -galactosylceramide)	CD1d	Ab, TH1, TH2, NKT	Phase 1
	AS01 (liposome, MPL, QS21)	TLR4	Ab, TH1, CD8 T	Phase 3 (Malaria, Herpes zoster)
	AS02 (emulsion, MPL, QS21)	TLR4	Ab, TH1	Phase 3
C	AS04 (alum, MPL)	TLR4	Ab, TH1	Cervarix
	AS15 (liposome, MPL, QS21, CpG)	TLR4, TLR9	Ab, TH1, CD8 T	Phase 3
	GLA-SE (emulsion, GLA)	TLR4	Ab, TH1	Phase 1
	IC31 (CpG, cationic peptide)	TLR9	Ab, TH1, TH2, CD8 T	Phase 2
	CAF01 (TDB, cationic liposome)	Mincle, Ag delivery	Ab, TH1, CD8 T	Phase 1
	ISCOMs (saponin, phospholipid)	Unknown	Ab, TH1, TH2, CD8 T	Phase 2

Ab, antibody; Ag, antigen; AS, adjuvant system; C, combination of immunomodulatory molecule and particulate formulation; IM, immunomodulatory molecule; PF, particulate formulation; TDB, trehalose dibehenate; TH, T helper

출처; 백신 면역증강제의 개발동향(김의호, 2018, BRIC 동향 report, Bric view 2018-T03)

다. 연구개발의 필요성

○ 부작용이 많은 오일 adjuvant를 사용하는 백신의 adjuvant를 대체하여 백신 접종의 효능증진 및 안전성을 높이기 위한 수용성, 저점도 비오일성 백신 adjuvant 개발 및 상용화 필요

○ 오일 adjuvant를 사용하는 양돈용 백신의 안전성 문제를 개선하고 접종경로를 다각화하기 위한 수용성, 저점도 비오일성 백신 adjuvant의 개발 및 상용화

2) 연구개발의 최종목표

가. 최종목표

생분해성(biodegradable) 물질 기반 비오일성(non oil-based) 백신보조제(adjuvant) 개발을 통하여 방어면역 형성 기전 및 특성을 규명하고 백신 효능의 증진뿐만 아니라 안전성을 개선하여 신규 양돈용 백신보조제를 개발하는 것을 최종 목표로 함.

나. 세부목표

- 신규 biodegradable polymer 백신보조제 개발 및 특성 연구
- 신규 비오일성 nanoparticle 백신 adjuvant 개발 및 특성 연구
- 신규 polymer 및 nanoparticle 백신보조제의 안전성 및 유효성 평가
 - 신규 비오일성 adjuvant와 기존 oil adjuvant와 효능 비교
 - 항원별 방어면역 규명 연구
 - 접종 경로에 따른 면역 활성화(세포성, 체액성면역, 면역지속성) 비교 연구
- 최적화된 양돈용 백신보조제의 전임상 실험동물(마우스, 기니픽) 안전성 및 효능평가
- 최적화된 양돈용 백신보조제의 전임상 목적동물(돼지) 안전성 및 효능평가
- 최적화된 양돈용 백신보조제의 임상 목적동물(돼지) 안전성 및 효능평가
- 최종 선정된 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 상용화



그림 3. 연구개발 목표 및 내용의 도식화

3) 연구개발의 개발목표 및 내용

[1차년도] 연구개발 목표

가. 주관연구기관 : 중앙백신연구소

○ 연구개발 목표 : 신규 biodegradable polymer 백신보조제 개발 및 실험동물 평가

○ 연구개발내용 및 범위

1) 생분해성 polymer 후보군의 확보 및 특성분석

- 합성물의 물리화학적 특성분석

: 분석장비(FT-IR, NMR)를 활용한 합성물의 화학적 구조 확인, 백신 주사제로서의 활용 확인을 위한 점도측정 등의 시험 수행

- 생분해성 폴리머의 안전성 확인(shelf life 등)

2) 생분해성 polymer 후보군의 제제화 및 선별시험

- 생분해성 폴리머의 안전성 및 효능평가(마우스 challenge 모델 활용)

- 항원(바이러스, 세균, 재조합 등)과의 백신보조제의 제제화

: Porcine Epidemic Diarrhea virus, Mycoplasma hyopneumoniae

- 항원 및 백신보조제의 혼합 비율에 따른 백신 안정성 평가

- 제제화에 따른 실험동물에서의 접종부위 안전성 확인

- 제제화에 따른 실험동물에서의 효능평가 (SN, ELISA, Challenge 등)

나. 협동연구기관 : 서울대학교

○ 연구개발 목표 : 신규 바이오일성 nanoparticle 백신 adjuvant 개발 및 특성 연구

○ 연구개발내용 및 범위

1) 수용성 저점도 신규 바이오일성 nanoparticle adjuvant 연구

- Emulsion 기술 활용 개선된 nanoparticle adjuvant 생산

: 1차년도에 서울대학교 협동연구기관에서는 Emulsion 기술을 이용하여, 수용성을 띄며, 점도가 낮은 바이오일성 나노 및 미립자 수준의 adjuvant를 생산.

- Nanoparticle adjuvant의 물리화학적, 생리학적 특성 및 안전성 연구

: 생산된 나노 및 미립자 수준의 adjuvant의 안정성을 확인하기 위해, 표면 전위 측정을 위한 Dynamic Light scattering (DLS), Nanoparticle의 형태학적 분석을 위한 Transmission electron microscopy (TEM) 및 Scanning electron microscopy (SEM) 등의 기술을 이용하여, 물리화학적, 생리학적 특성을 확인.

2) 신규 바이오일성 nanoparticle adjuvant 효능 연구

- 대상 백신활용 독성, reactogenicity, immunogenicity 평가

: 생산된 나노 및 미립자 수준의 adjuvant와 대상 백신(항원)을 개체별/ 접종 루트별로 독성 및 reactogenicity를 확인하여, 혈액 내 항체 형성뿐만 아니라 면역세포를 기반으로 immunogenicity를 확인.

3) 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 점막면역 효능 개선 연구

- 점막상피/면역세포 공동배양 모델 활용 nanoparticle의 점막면역 개선 효능평가

: 생산된 나노 및 미립자 수준의 adjuvant를 점막상피/면역세포 공동배양 모델에 적용하여, Transepithelial electrical resistance (TEER) 및 western blot을 통한 tight junction protein 발현 양상 확인 등을 통하여, 점막면역능력의 개선을 확인.

[2차년도] 연구개발 목표

가. 주관연구기관: 중앙백신연구소

○ 연구개발 목표 : 신규 polymer 백신보조제의 안전성 및 유효성 평가

○ 연구개발내용 및 범위

1) 신규 개발된 2종의 백신보조제의 양돈용 핵심 질병 (PEDV, MHP, PCV 등)과의 혼합백신 제제화 평가

- 선정된 백신보조제의 제제화, 시험백신 제조
- 백신 제제화 및 안정성(stability, shelf half-life) 평가

2) 신규 개발된 백신보조제가 포함된 양돈용 백신의 안전성 및 유효성 평가

- 실험동물(마우스, 기니픽)에서의 안전성 및 효능평가
- 목적동물(돼지)에서의 안전성 및 효능평가
- 접종부위 이상유 확인 및 체내 축적성 잔류검사

나. 협동연구기관: 서울대학교

○ 연구개발 목표 : Nanoparticle adjuvant의 안전성 및 유효성 평가

○ 연구개발내용 및 범위

1) 비오일성 nanoparticle adjuvant의 기존 oil adjuvant와 효능 비교

- 대식세포 및 수지상세포를 이용한 adjuvanticity 비교 (사이토카인, 염증매개인자 분석)

2) 항원 (PED, MHP)별 방어면역 규명 연구

- Nanoparticle adjuvant의 항원별 방어면역 형성 비교 (사이토카인 및 항원 특이적 항체 확인)

3) 접종 경로(IM, Nasal, Oral)에 따른 면역 활성화(세포성면역, 체액성면역, 면역지속성) 비교 연구

- 세포성 면역 분석 (선천성면역세포 및 T 세포의 사이토카인 및 보조자극분자 분석)
- 체액성 면역 분석 (혈액 내 항원 특이적 IgG, IgA, IgM 측정)
- 면역 지속성 분석 (항원 특이적 기억 T 세포 형성 분석)

다. 위탁연구기관: 충남대학교

○ 연구개발 목표 : 신규 polymer adjuvant의 특성규명

○ 연구개발내용 및 범위

1) 신규 polymer adjuvant 개발 과정 확립

- 생체 적합성(biocompatible) 및 생분해성(biodegradable) 특징을 가지는 생체 고분자 물질 후보 탐색 및 물질 확보

- 후보 물질로 확보된 생체 고분자를 이용한 신규 polymer adjuvant 합성 및 library 구축

2) 신규 polymer adjuvant 물리화학적 및 생리학적 특성규명

- 신규 adjuvant로 합성된 생체 고분자들의 구조 특성 및 물리 화학적 분석 규명
- 합성 완료된 생체 고분자 물질의 in vitro 상의 물성과 안정성 및 세포 독성 평가

[3차년도] 연구개발 목표

가. 주관연구기관: 중앙백신연구소

○ 연구개발 목표 : 신규 개발된 바이오일성 adjuvant가 적용된 백신 시제품 생산 및 상용화 방안 마련

○ 연구개발내용 및 범위

1) 최종 개발된 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 산업화 방안 연구

- 최종 개발된 백신보조제의 pilot scale up 생산조건 확립
- 백신보조제가 포함된 양돈용 백신의 시제품 생산
- 기존 제품과의 차별성 분석
- CRO 전문기관을 통한 개발된 백신보조제가 포함된 백신의 효능평가

나. 협동연구기관: 서울대학교

○ 연구개발 목표 : Nanoparticle adjuvant의 방어면역 형성 기전 규명

○ 개발 내용 및 범위

1) 항원(PED, MHP)별 방어면역 형성 기전 연구

- 장관면역 모델 활용 항원별 발병 기전에 따른 nanoparticle adjuvant의 방어면역 형성 기전 연구

2) 면역 활성화(세포성면역, 체액성면역, 면역지속성) 비교를 통한 방어면역 형성 기전 연구

- 선천성, 후천성 면역세포의 분자 면역학적 분석을 통한 nanoparticle adjuvant의 방어면역 형성 기전 규명

다. 위탁연구기관: 충남대학교

○ 연구개발 목표 : 신규 polymer adjuvant 대량 생산 및 사용화 연구

○ 개발 내용 및 범위

1) 국제 기준 가이드라인에 적합한 백신 보조제 개발

- 국제 기준 가이드라인에 따른 항체 반응 평가, 기능성 항체 역가 평가
- 혼합 백신 및 다른 백신과 병행 투여를 통한 간섭 및 시너지 효과 확인
- 국제 기준 가이드라인에 따른 안전성 및 polymer adjuvant의 효능 평가

2) 대량 생산 system 확립

- Scale up을 통한 대량 생산 가능성 확인

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

기관별 상세 연구결과 - (주)중앙백신연구소(제1세부)

연구결과 1. 비오일성 백신보조제 후보군 스크리닝

가. 돼지 흉막폐렴(PmA) 세균 항원을 이용한 polymeric adjuvant 스크리닝

- 돼지 흉막폐렴을 일으키는 *P. multocida* 항원의 마우스 공격접종 모델을 이용하여 본 과제 연구진들이 개발한 신규한 백신보조제의 효력평가를 실시함. 그룹당 15~20g 마우스 5마리에 0.2mL을 복강에 1회 접종하고 5마리의 마우스는 대조군으로 둔다. 1차 접종 7일 후에 대조군과 함께 *P. multocida* type A 100LD₅₀/dose를 복강에 공격접종한 뒤 10일간 생존율을 확인함.
- 시험결과, G2, G3을 제외한 모든 그룹에서 100% 폐사하였다. 폐사 원인은 백신 접종 후 항체 생성기간이 짧으며, 백신보조제의 조기 방어 면역효과를 기대하기는 어려운 것으로 판단됨.

표3. 마우스에서의 백신보조제 효력시험 결과(PmA)

Group	Group	No.	Death number after inoculation for 10days										Survival rate(%)	Death rate(%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
G1	CM-chitosan	5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
G2	CM-cellulose	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40%	60%
G3	CM-dextran	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	20%	80%
G4	CM-chitosan -COOH	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
G5	Glycol chitosan-gallic acid	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
G6	Nanoparticle PST	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
G7	Antigen only	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
대조군	challenge 대조군	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%

연구결과 2. 돼지열병 미끼백신의 개발 경위

- 본 연구진은 비오일성 백신보조제 후보군인 폴리머 개발을 위하여 세균항원을 활용한 마우스 공격접종 시험모델을 이용하여 스크리닝 시험을 진행하였으나, 원하는 수준의 백신보조제 후보물질 탐색에 어려움을 겪음. 이에 따라 바이러스 항원을 활용한 실험동물 및 목적동물에서의 효능평가를 수행함. 특히 본 연구진은 멧돼지에서 돼지 열병 바이러스 질병예방을 위한 백신개발을 진행중에 있어 멧돼지에 적합한 경구용 백신보조제 개발을 본격적으로 수행하였음.

- Classical swine fever(CSF)는 돼지열병(Hog cholera)이라 하며, 돼지에서 매우 전염력이 강하고 높은 치사율을 나타내는 질병으로, 한번 발생하면 치료방법이 없는 급성 폐사성 바이러스성 전염병으로 세계동물보건기구(OIE)에서 A급으로 분류하고 있고, 가축전염병예방법에서도 제1종 가축 전염병으로 취급하는 전염병임.
- 국내 질병 발생현황은 1947년 서울근교 농장 발생이 보고된 이후 최근 2016년에도 경기 연천 및 제주도에 산발적으로 발생하고 있어 질병의 근본적인 근절이 필요한 실정임. 근절을 위해서는 효능이 좋은 백신 접종, 방역 강화 등 일반적인 방법도 필수적으로 이루어져야 하지만, 돼지열병의 경우 사육돼지 뿐만 아니라 야생 멧돼지에서도 감염이 이루어지는 것으로 알려져 있어 야생 멧돼지로부터의 돼지열병 바이러스 전파를 방지하기 위해 미끼백신 형태로 개발 및 공급이 필요함.
- 본 연구진은 돼지열병 바이러스 질병 예방을 위한 백신개발을 위하여 경구(미끼)용 백신보조제에 관한 연구를 수행하였음. 그 결과 야생 멧돼지에 백신보조제가 포함된 경구백신 인허가를 취득하여 사업화에 성공하였음.

연구결과 3. 경구백신에 적합한 후보물질 탐색

- 처음 경구(Oral) 투여를 통한 점막백신이 개발된 이래, 많은 연구진들에 의해 비강(nasal), 직장(rectal), 질내(vaginal), 설하(sublingual) 등 다양한 점막루트들이 연구되었음. 하지만 현재까지 상용화 된 루트는 경구와 비강만이 이용되고 있음.
- 경구 투여의 경우, 장내에 존재하는 Peyer's patches에서 면역반응이 일어나며, 소화효소와 면역관용(tolerance)이 잘 발달되어 있어 면역반응을 유도하기 어렵기 때문에 항원을 잘 전달할 수 있는 formulation의 개발과 tolerance를 피할 수 있는 점막보조제의 개발이 동반되어 한다고 알려져 있음.

가. 비오일성 폴리머 기반 백신보조제 후보군 screening

- CSFV 항원과 폴리머 기반 백신보조제 4종을 각각 혼합하여 백신보조제 혼합에 따른 바이러스 함량변화를 관찰함. 또한 미끼백신의 특성상 야생 멧돼지가 백신을 경구로 섭취할 경우, 점도가 낮으면 흘러내려 적절한 점도를 갖고 있어야 구강에서 머무를 수 있어 각 그룹별 점도를 측정하여 적절한 백신보조제를 선별하고자 시험을 진행함(표4).

표4. 백신 제제화 후 바이러스 함량 및 점도 측정 결과

그룹	바이러스 함량 (TCID ₅₀ /mL)	점도 (cP)
CSFV bulk	10 ^{6.5}	N/T
CSFV+Polymer A	10 ^{6.3}	32
CSFV+Polymer B	10 ^{5.9}	77
CSFV+Polymer C	10 ^{6.3}	25.7
CSFV+Polymer D	10 ^{5.9}	9.45
Reference	기준값 10 ^{6.5} 결과값 10 ^{6.7}	N/T

○ 시험결과 polymer B, D는 바이러스 함량은 큰 차이 없으나 점도가 높거나 낮아 적합하지 않음.

나. 백신보조제 후보군의 온도 안정성 평가

○ 상대적으로 바이러스 함량변화가 적은 polymer A를 선정하여 -20℃, 5℃, 25℃ 보관 온도별 약 두달간 바이러스 함량평가를 수행함.

○ -20℃, 5℃ 보관조건에서는 58일간 안정성이 확보되는 것을 확인하였고, 25℃ 실온보관 조건에서는 14일간 안정성이 유지되나 이후 함량이 감소하는 것을 확인하였음(그림4).

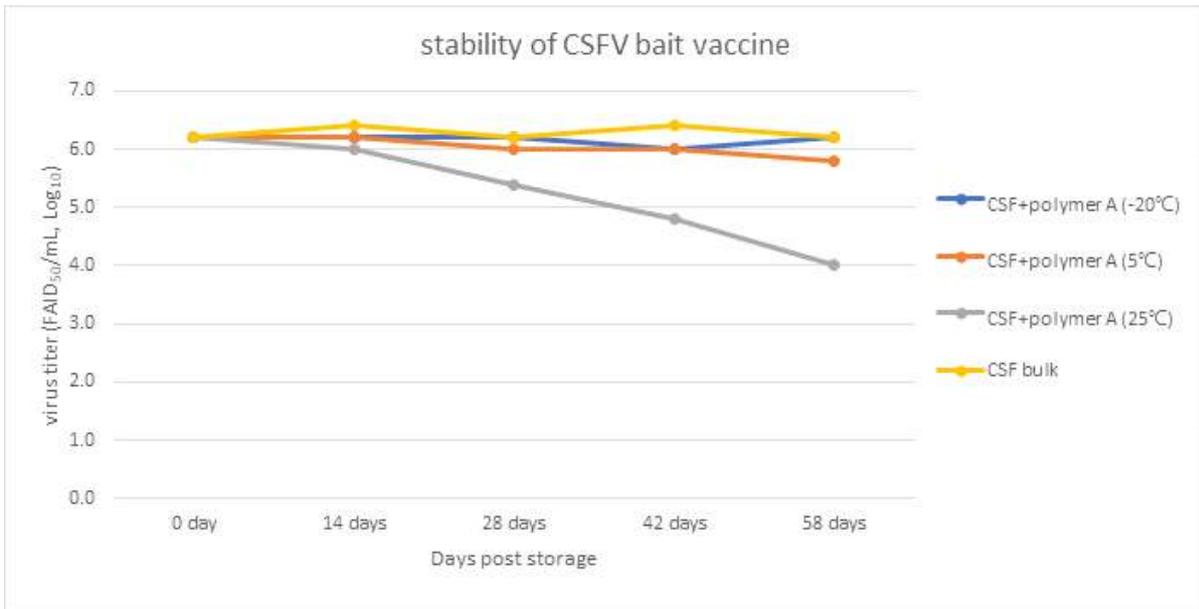


그림4. polymer A 적용 제조제품의 보관 온도조건별 안정성 시험

다. 경구용 백신보조제 선정시험 결과 종합

○ 상기 시험결과를 종합하여 볼 때, 돼지열병 바이러스(CSFV)와 제제화 하였을 때, 장기 안정성이 우수하고 온도조건에서도 함량변화가 가장 적은 polymer A가 가장 적합한 것으로 판단하였음. 또한 야생 멧돼지 경구백신으로 사용하기 위해서는 저점도의 백신은 흘러내려 섭취에 불리할 수 있고, 고점도의 경우에는 경구 섭취가 어려울 수 있는 반면 polymer A는 점막면역을 형성할 수 있는 적절한 점도를 가지고 있어 다른 polymer에 비하여 유리함.

- Biocompatible polymer A를 사용하여 cross-linking을 형성하여 중합체를 형성하도록 함. biocompatible polymer A는 물을 흡수하여 구조내에 많은 양의 수분을 함유하지만 물에 용해되지 않는 공극을 가진 삼차원 망상 구조(three-dimensional network structure)를 이루고 있는 특성이 있는 폴리머로, 독성이 적고 상체 적합성이 우수함.

연구결과 4. 시험백신의 돼지에서의 효능평가

- 돼지열병 바이러스에 적용한 폴리머의 효능을 확인하기 위하여 백신 조성 및 용기 형태가 각기 다른 4종류의 시험백신을 아래 표와 같이 제조함. 바이러스 함량은 동일하게 1두분 당 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상 포함되도록 하고, biocompatible polymer A가 포함된 그룹과 항원만 포함된 그룹 그리고 제품용기 형태에 따라 포켓 형태와 블리스터 형태로 나누어 시험을 진행함.

Group	용기 형태	Contents (per 1 dose)	Quantity (1 dose/ea)	Remark
Test - 1	포켓	돼지 열병 바이러스 (Flc-LOM-BE ^{ms}) $10^{5.0}$ TCID ₅₀ 이상 백신보조제 정량	100 ea	포켓+항원 +백신보조제
Test - 2		돼지 열병 바이러스 (Flc-LOM-BE ^{ms}) $10^{5.0}$ TCID ₅₀ 이상	100 ea	포켓+항원
Test - 3	블리스터	돼지 열병 바이러스 (Flc-LOM-BE ^{ms}) $10^{5.0}$ TCID ₅₀ 이상 백신보조제 정량	100 ea	블리스터+항원 +백신보조제
Test - 4		돼지 열병 바이러스 (Flc-LOM-BE ^{ms}) $10^{5.0}$ TCID ₅₀ 이상	100 ea	블리스터 +항원

- 돼지열병 항원 항체 음성인 55~70일령 일반돼지 19두를 공시하여 그룹당 4두씩 돼지를 배정 후 각 그룹에 해당하는 시험백신을 1두분 경구 투여 함. 나머지 3두는 무접종 대조군으로 두었음. 백신 접종 전, 백신 접종 후 21, 42일에 채혈하여 중화시험을 이용한 항체 검사를 수행함.
- 백신보조제(polymer A)를 처리한 그룹의 경우 3주차부터 항원 단독 처리 그룹 및 음성대조군에 비해 유의적으로 높은 중화항체를 보였으며 6주차에는 모든 그룹이 비슷한 수준의 중화항체를 보임. 그러나 포켓+항원 처리 그룹 중 1두는 접종 6주차에도 16배 정도의 낮은 항체를 보임. 용기 형태의 차이에 따른 중화항체가의 유의적인 차이는 확인되지 않았음.
- 시험백신 경구 급이 시 항원에 백신보조제(polymer A)를 첨가하면 항원만 단독으로 투여하는 것 보다 더 빠르고 고르게 중화항체를 형성하였으며 이는 백신보조제로 인해 바이러스가 편도에 좀 더 오래 유지되면서 면역 유도를 용이하게 하기 때문으로 추정됨.

Group	No. of pigs	S/N Antibody Titer for CSFV		
		0WPV	3WPV	6WPV
Test - 1 (포켓+항원+백신보조제)	4	<2	64	128
		<2	64	256
		<2	64	64
		<2	128	128
	GMT	<2	76.11 ^a	128.00 ^a
Test - 2 (포켓+항원)	4	<2	4	128
		<2	2	16
		<2	4	128
		<2	8	512
	GMT	<2	4.00 ^b	107.63 ^a
Test - 3 (블리스터+항원+백신보조제)	4	<2	64	128
		<2	32	128
		<2	128	256
		<2	64	128
	GMT	<2	64.00 ^a	152.22 ^a
Test - 4 (블리스터+항원)	4	<2	4	64
		<2	8	512
		<2	4	32
		<2	16	128
	GMT	<2	6.73 ^b	107.63 ^a
Control	3	<2	<2	<2
		<2	<2	<2
		<2	<2	<2
		<2	<2	<2
	GMT	<2	<2 ^c	<2 ^b

The different letters (a, b, c) indicate significant difference. $p < 0.05$

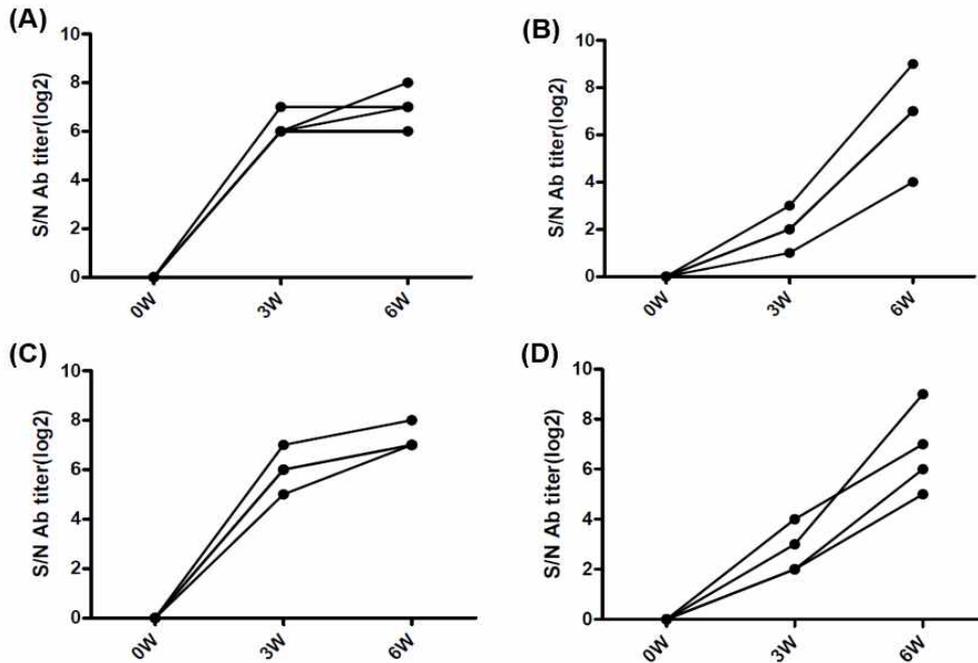


그림5. 조건별 돼지열병 바이러스에 대한 혈청중화항체가 비교
 ((A)포켓+항원+백신보조제 조합 백신, (B)포켓+항원 조합 백신,
 (C)블리스터+항원+백신보조제 조합 백신, (D)블리스터+항원 조합 백신)

연구결과 5. 돼지열병 경구백신 제조

가. 백신 제조를 위한 항원함량 결정시험

- 미끼백신 형태로 제조한 돼지 열병 바이러스 생독백신주(FIc-LOM-BE^{rns})의 일반돼지에서의 적절한 면역원성 및 효력을 발휘하기 위한 항원 함량을 결정하기 위하여, $10^{3.0} \sim 10^{6.0}$ TCID₅₀/dose의 함량으로 4종류의 시험 백신을 제조함.

Group	Contents (per 1 dose)		
Test - 1	돼지 열병 바이러스 (FIc-LOM-BE ^{rns}) $10^{3.0}$ TCID ₅₀	백신보조제	
Test - 2	돼지 열병 바이러스 (FIc-LOM-BE ^{rns}) $10^{4.0}$ TCID ₅₀	백신보조제	
Test - 3	돼지 열병 바이러스 (FIc-LOM-BE ^{rns}) $10^{5.0}$ TCID ₅₀	백신보조제	
Test - 4	돼지 열병 바이러스 (FIc-LOM-BE ^{rns}) $10^{6.0}$ TCID ₅₀	백신보조제	

- 돼지열병 항원, 항체 음성인 6~7주령 일반돼지 28두를 공시하여 접종군 그룹 당 7두씩 돼지를 배정 후 각 그룹에 해당하는 시험백신을 1두분 경구투여 함.
- 백신의 함량별 방어능을 확인하기 위하여 1차 접종 4주 후에 야외주인 YC11WB주를 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml로 두당 4ml (IM 2ml, PO 2ml) 씩 공격접종함. 백신 접종 전, 백신 접종 후 7, 14, 21, 28일에 채혈하여 중화시험을 이용한 항체 검사를 수행함. 공격접종 후 3주간 임상증상(식욕부진, 후구마비, 신경증상, 설사 등) 관찰 및 체온, 백혈구 수치를 측정함.
- 중화항체가 측정 결과, $10^{6.0}$ TCID₅₀/dose 함량의 백신 접종 시 접종 2주차부터 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 중화항체가 보였으며 $10^{5.0}$ TCID₅₀/dose 함량의 백신 접종시 3주차부터 그 이하의 함량 접종그룹에 비해 유의적으로 높은 중화항체가 보임.

Group (Virus quantity, TCID ₅₀ /dose)	No. of pigs	S/N Antibody Titer for CSFV				
		0WPV	1WPV	2WPV	3WPV	4WPV
Test- 1 ($10^{3.0}$ TCID ₅₀ /dose)	7	<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4
	GMT	<4	<4	<4^a	<4^a	<4^a
Test - 2 ($10^{4.0}$ TCID ₅₀ /dose)	7	<4	<4	<4	<4	4
		<4	<4	<4	<4	8
		<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	8
		<4	<4	<4	<4	4
	<4	<4	<4	<4	<4	
GMT	<4	<4	<4^a	<4^a	2.7^b	
Test - 3	7	<4	<4	<4	16	32

$10^{5.0}$ TCID ₅₀ /dose)		<4	<4	<4	8	32
		<4	<4	<4	4	16
		<4	<4	<4	16	64
		<4	<4	<4	4	32
		<4	<4	<4	8	32
		<4	<4	<4	16	32
	GMT	<4	<4	<4^a	8.8^b	32.0^c
Test - 4 ($10^{6.0}$ TCID ₅₀ /dose)		<4	<4	8	64	128
		<4	<4	8	32	256
		<4	<4	8	64	256
		<4	<4	16	64	128
		<4	<4	8	32	256
		<4	<4	<4	32	64
	GMT	<4	<4	6.6^b	47.6^c	156.0^d

<4 is regarded as 2^0 to calculate GMT.

The different letters (a, b, c) indicate significant difference. $p < 0.05$

○ 공격접종 후 3주간 임상증상을 관찰한 결과, $10^{5.0}$ TCID₅₀/dose 이상 함량의 백신 접종 그룹은 모두 다 생존 하였고 임상증상이 없었으나, $10^{4.0}$ TCID₅₀/dose 이하의 접종그룹은 발열 (40°C 이상), 식욕부진, 백혈구 감소, 신경증상 및 설사 등의 소견을 보였으며, $10^{4.0}$ TCID₅₀/dose 접종군에서 2두, $10^{3.0}$ TCID₅₀/dose 접종군에서 4두 씩 폐사함.

Group (Virus quantity, TCID ₅₀ /dose)	No. of pigs	Fever	Anorexia	Leukopenia	Paralysis	Neurological symptom	Diarrhea	Death
Test - 1 ($10^{3.0}$ TCID ₅₀ /dose)	7	7/7*	7/7	7/7	4/7	1/7	2/7	4/7
Test - 2 ($10^{4.0}$ TCID ₅₀ /dose)	7	7/7	7/7	7/7	4/7	4/7	1/7	2/7
Test - 3 ($10^{5.0}$ TCID ₅₀ /dose)	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
Test - 4 ($10^{6.0}$ TCID ₅₀ /dose)	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7

* : Clinical sign numbers / Test numbers

○ 일반돼지에서의 항원함량 결정시험 및 방어능 시험 결과 최종적으로 시험백신 3의 항원 함량인 $10^{5.0}$ TCID₅₀/dose 이상으로 백신 접종 시 CSFV 공격접종에 대한 방어능을 보이는 것으로 확인됨. 이와 같은 결과에 따라 이후 진행된 시험백신의 돼지열병 바이러스 함량은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/dose 이상으로 하여 시험을 진행하기로 결정함.

나. 멧돼지에서의 백신의 항원함량 결정시험

- 미끼백신 형태로 제조한 돼지 열병 바이러스 생독백신주(FIc-LOM-BE^{ms})의 멧돼지에서의 적절 한 면역원성 및 효력을 발휘하기 위한 항원 함량을 결정하기 위하여, 10^{4.0} ~ 10^{6.0} TCID₅₀/dose의 함량으로 3종의 시험 백신을 제조함.

Group	Contents (per 1 dose)	
Test - 1	돼지 열병 바이러스 (FIc-LOM-BE ^{ms})	10 ^{4.0} TCID ₅₀
Test - 2	돼지 열병 바이러스 (FIc-LOM-BE ^{ms})	10 ^{5.0} TCID ₅₀
Test - 3	돼지 열병 바이러스 (FIc-LOM-BE ^{ms})	10 ^{6.0} TCID ₅₀

- 돼지열병 항원 항체 음성인 6~7주령 멧돼지 11두를 공시하여 접종군 그룹 당 3두씩 멧돼지를 배정 후 각 그룹에 해당하는 미끼백신을 1두분 경구투여 하고, 나머지 2두는 무접종 대조군으로 둠. 백신의 함량별 방어능을 확인하기 위하여 1차 접종 6주 후에 야외주인 YC11WB주를 10^{6.0} TCID₅₀/ml로 두당 2ml (IM 1ml, PO 1ml) 씩 공격접종함.

- 백신 접종 전, 백신 접종 후 7, 14, 21, 28, 42일 및 공격접종 후 7, 14, 21일에 채혈하여 중화시험을 이용한 항체 검사를 수행하였으며 공격 접종 후 7, 14, 21일에는 비강/분변 스왑을 실시하여 항원검사를 실시함. 공격접종 후 3주간 임상증상(식욕부진, 후구마비, 신경증상, 설사 등), 체온, 백혈구 수치를 측정하였고, 공격접종 21일후의 개체 및 공격접종 후 폐사한 개체에 대해 부검을 통해 폐, 신장, 간, 비장, 신장, 방광, 회장, 편도, 악하, 서혜부, 장간막, 임파절을 채취하여 항원검사를 실시함.

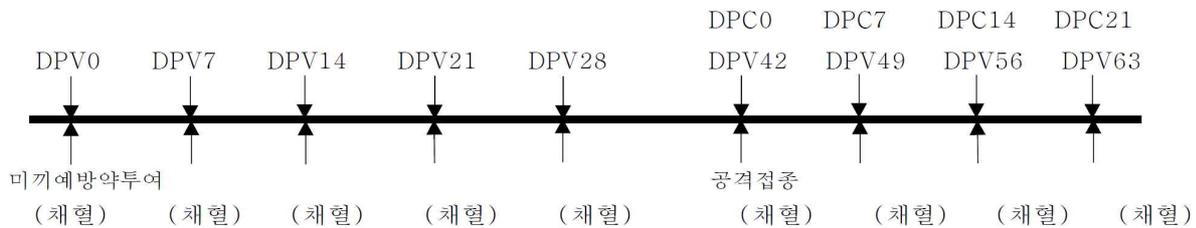


그림6. 멧돼지에서의 돼지열병 시험백신의 공격접종 일정

- 중화항체가 측정 결과, 백신 접종 후 3주 및 4주차에는 10^{6.0} TCID₅₀/dose의 함량의 백신 접종 시 다른 그룹에 비해 중화항체가 유의적으로 높았으며 공격접종 전인 6주차에는 10^{5.0} TCID₅₀/dose 이상의 함량을 가지는 백신 접종군이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 중화항체를 보임. 공격접종 이후에도 10^{5.0} TCID₅₀/dose 이상의 함량을 가지는 백신 접종군이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 중화항체를 보이는 것으로 확인됨.

Group (Virus quantity, TCID ₅₀ /dose)	No. of pigs	S/N Antibody Titer for CSFV								
		0WPV	1WPV	2WPV	3WPV	4WPV	6WPV (0WPC)	1WPC	2WPC	3WPC
Test- 1 (10 ^{4.0} TCID ₅₀ /dose)	3	<2	<2	<2	<2	<2	8	4	8	8
		<2	<2	<2	<2	<2	4	8	8	16

		<2	<2	<2	<2	<2	4	4	4	D
	GMT	<2	<2	<2 ^a	<2 ^a	<2 ^a	5.0 ^a	5.0 ^a	6.4 ^a	11.3 ^a
Test - 2 (10 ^{5.0} TCID ₅₀ /dose)	3	<2	<2	<2	2	16	128	2048	2048	2048
		<2	<2	<2	4	16	64	512	1024	1024
		<2	<2	<2	8	16	128	2048	2048	2048
	GMT	<2	<2	<2 ^a	4.0 ^b	16.0 ^b	101.6 ^b	1290.7 ^b	1625.5 ^b	1625.5 ^b
Test - 3 (10 ^{6.0} TCID ₅₀ /dose)	3	<2	<2	4	32	64	256	1024	2048	2048
		<2	<2	4	16	128	512	2048	2048	4096
		<2	<2	4	32	128	128	1024	1024	1024
	GMT	<2	<2	4 ^b	25.4 ^c	101.6 ^c	256.0 ^b	1290.2 ^b	1625.5 ^b	2048.0 ^b
Control	2	<2	<2	<2	<2	2	2	2	D	D
		<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	8	D
	GMT	<2	<2	<2 ^a	<2 ^{ab}	1.4 ^a	1.4 ^a	1.4 ^a	8.0	-

WPV: Weeks post vaccination, WPC: Weeks post challenge

GMT ; Geomean titer (<2는 1로 환산하여 계산함.)

Means within each column followed by dissimilar lowercase superscript letters are significantly different at p<0.05.

- 공격접종 후 3주간 임상증상을 관찰한 결과, 10^{5.0} TCID₅₀/dose 이상 함량의 백신 접종 그룹은 모두 생존 하였고 임상증상이 없었으나, 10^{4.0} TCID₅₀/dose 접종그룹은 발열 (40℃ 이상), 식욕부진, 백혈구 감소 및 설사 소견을 보였으며, 1개체는 공격접종 3주차에 폐사함. 공격접종 대조군의 경우 2두 모두 공격접종 후 발열(40℃ 이상), 식욕부진, 백혈구 감소 및 설사 소견을 보이다가 공격접종 12일차 및 18일차에 각각 1두씩 폐사함.

Group (Virus quantity, TCID ₅₀ /dose)	No. of pigs	Fever	Anorexia	Leukopenia	Paralysis	Neurological symptom	Diarrhea	Death
Test - 1 (10 ^{4.0} TCID ₅₀ /dose)	3	3/3*	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
Test - 2 (10 ^{5.0} TCID ₅₀ /dose)	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Test - 3 (10 ^{6.0} TCID ₅₀ /dose)	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Control	2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

* : Clinical sign numbers / Test numbers

- 공격접종 후 3주간 바이러스의 배출을 확인한 결과, 10^{5.0} TCID₅₀/dose 이상 함량의 백신 접종 그룹은 공격접종 후 바이러스 배출이 확인되지 않음. 반면 10^{4.0} TCID₅₀/dose 접종그룹 및 공격접종 대조군은 공격접종 1, 2, 3주차에 비강과 분변으로 바이러스 배출이 확인됨.

Group (Virus quantity, TCID ₅₀ /dose)	No. of pigs	1WPC		2WPC		3WPC	
		Nasal	Fecal	Nasal	Fecal	Nasal	Fecal
Test - 1 (10 ^{4.0} TCID ₅₀ /dose)	3	2/3*	2/3	2/3	3/3	1/2	1/2
Test - 2 (10 ^{5.0} TCID ₅₀ /dose)	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Test - 3 (10 ^{6.0} TCID ₅₀ /dose)	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Control	2	2/2	2/2	1/1	1/1	D	D

* : Clinical sign numbers / Test numbers

D: Death, WPC: Weeks post challenge

○ 공격접종 3주 후 부검 또는 폐사한 개체에 대한 부검 후 조직 내 항원 확인 결과, 10^{5.0} TCID₅₀/dose 이상 함량의 백신 접종 그룹은 공격접종 후 모든 조직에서 바이러스가 검출되지 않음. 10^{4.0} TCID₅₀/dose 접종그룹의 경우 폐, 심장, 간, 비장, 신장, 방광, 회장, 편도, 악하 및 서혜 림프절에서 항원이 검출되었으며 이중 비장, 신장, 편도, 악하 림프절에서 검출율이 높았으며, 공격접종 대조군의 경우 모든 개체의 모든 장기에서 항원이 검출되었음.

Group (Virus quantity, TCID ₅₀ /dose)	No. of pigs									Lymph node			
		Lung	Heart	Liver	Spleen	Kidney	Urinary bladder	Ileum	Tonsil	Submandibular	Inguinal	Mesenteric	
Test - 1 (10 ^{4.0} TCID ₅₀ /dose)	3	1/3*	1/3	1/3	3/3	3/3	1/3	1/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3
Test - 2 (10 ^{5.0} TCID ₅₀ /dose)	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Test - 3 (10 ^{6.0} TCID ₅₀ /dose)	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Control	2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

* : Clinical sign numbers / Test numbers

다. 보관온도 및 시간에 따른 바이러스 함량 변화 확인시험

○ 백신 조성물의 안정성 확인을 위하여 아래 표와 같이 돼지열병 바이러스 항원에 biocompatible polymer A 를 넣고 50~100rpm으로 20분간 교반하여 균질한 혼합액이 되도록 한 다음, linker supplement B를 천천히 투입시킴. Linker supplement B 투입에 따라 점성이 증가되기 때문에 적정 점도를 확인하면서 투입시킨 다음, 최종 혼합액의 pH를 7.0~7.5 수준으로 함.

Component	Content
CSFV (F1c-LOM-BE ^{rns})	10 ^{5.0} TCID ₅₀
Biocompatible polymer A	14%
Linker supplement B	6%

- 시험백신을 저온(10℃)과 실온(25℃)에 보관하면서 효소면역법(PLA법)에 의하여 보관 후 3주까지의 바이러스 함량(TCID₅₀)을 확인함.
- 시험결과 저온에서는 보관 후 21일까지 10^{5.0} TCID₅₀ 이상의 바이러스 함량을 보여 저온(10℃)에서는 약 21일 이상 바이러스의 함량이 되었으나, 실온(25℃) 조건에서는 7일까지는 10^{5.0} TCID₅₀ 이상의 바이러스 함량을 보였으나 14일에 1 Lot에서 10^{5.0} TCID₅₀ 미만의 바이러스 함량을 보여 실온 (25℃)에서는 약 7일 간 바이러스의 함량이 유지됨을 확인함.

온도조건	CSFV titer (TCID ₅₀ /dose)			
	0 days	7 days	14 days	21 days
실온(25℃)	10 ^{6.5}	10 ^{6.4}	10 ^{5.2}	10 ^{3.3}
저온(10℃)	10 ^{6.5}	10 ^{6.4}	10 ^{6.2}	10 ^{5.8}

연구결과 6. 돼지열병 경구백신의 안전시험

안전시험은 돼지열병 바이러스가 포함된 백신의 동물용의약품 국가출하승인검정기준(농림축산검역본부 고시 제2019-11호)에 의거하여 수행하였음.

가. 마우스에서의 안전시험

- 체중 15 ~ 20 g 의 마우스 8 마리를 준비하여, 8 마리의 마우스 복강에 시험백신에서 무균적으로 채취한 시험백신액을 멸균 PBS 를 이용하여 1:1로 희석한 뒤 0.5 ml를 접종하고 7 일간 관찰하고, 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 함. 마우스 안전시험 결과 시험백신을 접종한 접종군에서 관찰기간동안 부작용 없이 생존하는 것을 확인함.

Animals	Route	The numbers of abnormal animals / Total numbers of vaccinated animals
Mouse	IP	0/8

나. 기니픽에서의 안전시험

- 체중 300 ~ 350 g 의 기니픽 4 마리를 준비하여, 2 마리의 기니픽 피하에 시험백신에서 무균적으로 채취한 시험백신액을 멸균 PBS 를 이용하여 1:1로 희석한 뒤 2 ml를, 다른 2 마리의 기니픽 복강에 2 ml를 접종하고 7 일간 관찰하고, 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 함. 기니픽 안전시험 결과 시험백신을 접종한 접종군에서 관찰기간 동안 부작용 없이 생존하는 것을 확인함.

Animals	Route	The numbers of abnormal animals / Total numbers of vaccinated animals
GP	SC	0/2
	IP	0/2

다. 돼지에서의 안전시험

- 체중 35 ~ 40 kg(8 ~ 9 주령)의 돼지 열병 항체음성 건강한 돼지 2 마리에 5 일 동안 매일 백신 2 개씩 총 10 개를 경구 접종한 다음, 접종 후 1 ~ 2 시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 최종 접종일로 부터 14 일의 관찰하는 기간 동안 발열 및 설사 등의 부작용이 없어야 함. 돼지 안전 시험 결과 시험백신을 경구투여한 개체에서 관찰기간 동안 부작용 없이 생존하는 것을 확인 함.

Animals	Route	The numbers of abnormal animals / Total numbers of vaccinated animals
Pig	PO	0/2

연구결과 7. 모돈에서의 효능 평가시험

- 멧돼지 성돈의 경우 공격성이 강해 채혈 시 시험자의 안전사고 가능성이 높기 때문에 실제 야 외농장에서 혈청학적 효능 평가를 진행하기 어려움. 따라서 멧돼지 성돈과 유사한 크기 및 체 중의 일반돼지를 선정하여 수이샷® 돼지열병 생마커 미끼백신 경구투여에 따른 효능평가를 진 행함.
- 돼지열병 백신을 접종하지 않은 돼지열병 항원 항체 음성인 자돈 6두를 공시하여 220~230일 령 (약 130kg 전후)까지 격리 사육한 뒤 실험을 진행함. 접종군 4두에는 미끼백신 (T319CSFMB04) 1두분을 경구 접종하고 나머지 2두는 무접종 대조군으로 함. 백신 접종 전, 접종 후 21, 42일에 채혈하여 중화시험을 이용한 항체 검사를 수행함.
- 시험결과 미끼백신을 급이한 그룹의 경우 백신접종 후 3주차와 6주차에 90.51 (GMT) 및 152.22 (GMT)정도의 높은 중화항체를 보여 멧돼지 성돈과 유사한 크기 및 체중의 일반 돼지 성돈에서 적절한 면역원성을 유도하는 것으로 확인되었음.

Group	No. of pigs	S/N Antibody Titer for CSFV		
		0WPV	3WPV	6WPV
Vaccinated group	4	<2	64	256
		<2	128	128
		<2	64	128
		<2	128	128
	GMT	<2	90.51	152.22
Non-Vaccinated group	2	<2	<2	<2
		<2	<2	<2
	GMT	<2	<2	<2

연구결과 8. 돼지열병 경구백신의 안전성(safety) 시험

가. 일반돼지 과용량(10dose) 안전성 시험

- 미끼백신에 대한 일반돼지의 안전성을 평가하기 위해 시험백신을 55~70일령의 건강한 돼지 5두에 5일 동안 매일 2개씩 경구 급이 (총 10두분) 후 무접종 대조군 2두와 함께 21일간 임상 증상(발열, 과민반응, 설사, 화농, 괴사, 식불)을 관찰하고자 계획함.
- 미끼백신을 급이한 돼지 및 무접종 대조군 모두 발열, 과민반응, 설사, 화농, 괴사, 식불 등 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며 모두 이상 없이 생존하였음.

Group	No. of pigs	Methods	Temperature (°C)	H	Clinical signs (21days)				
					A	D	S	N	Ab
Vaccine treated group	5	PO, 10dose	38.8~39.6	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Non-treated group	2	PO, 10dose	39.0, 39.7	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

H : Hypersensitivity, * : Clinical sign numbers / Test numbers
 A ; Anorexia, D ; Diarrhea, S ; Suppuration, N ; Necrosis, Ab ; Abortion

나. 멧돼지 과용량(10dose) 안전성 시험

- 위의 일반 돼지 시험과 동일하게 멧돼지의 안전성을 평가하기 위해 시험백신을 건강한 멧돼지 4두에 5일 동안 매일 2개씩 경구 급이 (총 10두분) 후 무접종 대조군 2두와 함께 21일간 임상 증상(발열, 과민반응, 설사, 화농, 괴사, 식불)을 관찰하고자 계획함.
- 미끼백신을 급이한 멧돼지 및 무접종 대조군 모두 발열, 과민반응, 설사, 화농, 괴사, 식불 등 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며 모두 이상 없이 생존하였음.

Group	No. of pigs	Methods	Temperature (°C)	H	Clinical signs (21days)			
					A	D	S	N
Vaccine treated group	4	PO, 10 ea	38.7~39.6	0/4*	0/4	0/4	0/4	0/4
Non-treated group	2	PO, 10 ea	39.4, 39.9	0/2*	0/2	0/2	0/2	0/2

H : Hypersensitivity, * : Clinical sign numbers / Test numbers
 A ; Anorexia, D ; Diarrhea, S ; Suppuration, N ; Necrosis

연구결과 9. polymer가 포함된 돼지열병 경구백신의 안정성(stability) 시험

가. 2~8°C 에서의 안정성 시험

- Biocompatible polymer의 안정성을 확인하기 위하여 돼지열병 바이러스와 제제화하여 돼지

열병 시험백신을 제작한 뒤, 생산된 시험백신을 2~8℃ 냉장조건에 보존하면서 제조 직후 및 제조일로부터 1개월, 2개월, 3개월, 5개월 후에 각각 일반시험(특성 시험, 수소이온농도 시험, 바이러스 함량시험)을 실시함.

- 시험백신을 2~8 ℃의 냉장조건에 보존하면서 제조 직후 및 제조일로부터 1개월, 2개월, 3개월, 5개월 후에 동물용의약품 생물학적제제 검정기준에 따라 색상, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였음.
- 시험기간 동안 시험백신은 파란색의 액상제제이며, 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하였으며, 수소이온농도는 pH 7.3에서 6.1로 약간의 변화가 있으나 검정기준 pH6~8 내에 존재하는 것을 확인하였음.

항목	0 MPM	1 MPM	2 MPM	3 MPM	5 MPM
특성시험	-	-	-	-	-
pH	7.3	7.1	7.0	6.4	6.1

MPM ; Months Post Manufacture

- 항원과 백신보조제를 제제화한 시험백신에 대하여 바이러스 함량변화를 확인하기 위하여 2~8℃ 냉장조건에 보관하면서 제조 직후 및 1개월 단위로 백신의 바이러스 함량을 측정된 결과, 시험기간동안 백신 1두분 당 바이러스 함량이 검정기준인 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 이상으로 측정되었음.

Group	CSFV titer (TCID ₅₀ /dose)				
	0 MPM	1 MPM	2 MPM	3 MPM	5 MPM
시험백신	$10^{6.5}$	$10^{6.0}$	$10^{5.7}$	$10^{5.5}$	$10^{4.5}$

- 돼지열병 생마커 항원의 보관온도 및 기간별 항원성 확인을 위하여 돼지열병 감별 PCR 방법을 이용하여 마커 및 항원성 시험을 진행하였음. 시험결과 428bp와 486bp의 증폭산물이 관찰되었고, 양성대조군인 CSFV LOM strain에서는 428bp만 관찰되어, CSFV F1c-LOM BE^{ms}와 구분되는 것을 확인하였음. 음성대조군인 PBS에서는 밴드가 확인되지 않았음.

MPM	Group	PCR test	
		D1 primer	D2 primer
0 MPM	시험백신	428 bp	486bp
	Positive control	428 bp	-
	Negative control	-	-
1 MPM	시험백신	428 bp	486bp
	Positive control	428 bp	-
	Negative control	-	-
2 MPM	시험백신	428 bp	486bp
	Positive control	428 bp	-
	Negative control	-	-
3 MPM	시험백신	428 bp	486bp

	Positive control	428 bp	-
	Negative control	-	-
5 MPM	시험백신	428 bp	486bp
	Positive control	428 bp	-
	Negative control	-	-

나. -15℃ 이하에서의 안정성 시험

○ Biocompatible polymer의 백신 적용 후, 장기보존 안정성을 확인하기 위하여 시험백신을 제조한 뒤, -15℃ 이하의 냉동 조건에 보존하면서 제조 직후와 3개월, 6개월이 경과한 후에 백신의 안정성을 확인할 수 있는 특성시험, 바이러스 함량시험 등을 실시함.

○ 특성시험

- 시험백신을 -15℃ 이하의 냉동 조건에 보존하면서 제조 직후 및 3개월, 6개월 후에 동물용 의약품 생물학적제제 검정기준에 따라 색상, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였으며, 관찰결과 제조 후 6개월 까지 파란색의 액상제제이며, 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하였으며, 수소이온농도는 큰 변화 없는 것을 확인함.

	0 MPM	3 MPM	6 MPM
특성시험	-	-	
pH	7.5	7.3	7.2

○ 마이코플라즈마 부정시험

- 시험백신을 -15℃ 이하의 냉동 조건에 보관하면서 제조 직후, 3개월 및 6개월 후에 동물용 의약품 생물학적제제 국가검정기준에 따라 마이코플라즈마 오염을 확인을 확인하기 위하여 PCR을 진행함. PCR 결과 마이코플라즈마 양성대조에서는 464bp가 관찰되었고, 음성대조 (PBS) 및 시험백신에서는 증폭산물이 관찰되지 않았음.

○ 바이러스 함량시험

- 시험백신을 -15℃ 이하의 냉동 조건에 보관하면서 제조 직후, 3개월 및 6개월 후에 효소면역법(PLA법)에 의하여 바이러스 함량(TCID₅₀)을 측정한 결과, 제조 6개월 경과 후에도 10^{6.1}TCID₅₀/dose로 큰 함량변화 없이 바이러스 함량이 유지되는 것을 확인함.

Group	CSFV titer (TCID ₅₀ /dose)		
	0 MPM	3 MPM	6 MPM
시험백신	10 ^{6.3}	10 ^{6.1}	10 ^{6.2}

○ 마커 및 항원성 확인시험

- 3 Lot의 시험백신을 -15℃ 이하의 냉동 조건에 보관하면서 제조 직후, 3개월 및 6개월 후에 항원성 확인을 위하여 PCR을 실시하였음. 시험백신에서는 428bp와 486bp 의 증폭산물이 관

찰되었고, 양성대조군(LOM strain)에서는 428bp만 관찰되었으며, 음성대조군(희석액)에서는 증폭 산물이 관찰되지 않았음.

Group	PCR test					
	0 MPM		3 MPM		6 MPM	
	D1 primer	D2 primer	D1 primer	D2 primer	D1 primer	D2 primer
시험백신 (CSFV F1c-LOM BE ^{ms})	428 bp	486bp	428 bp	486bp	428 bp	486bp
Positive control (CSFV LOM)	428 bp	-	428 bp	-	428 bp	-
Negative control (PBS)	-	-	-	-	-	-

○ 실험동물에서의 안전시험

- 3 Lot의 시험백신을 -15℃ 이하의 냉동 조건에 보관하면서 제조 직후, 3개월 및 6개월에 실험동물에 접종경로별 투여한 뒤, 그에 따른 안전성을 확인함.

- 마우스에서의 안전성

체중 15~20 g 의 마우스 8 마리를 준비하여, 8 마리의 마우스 복강에 백신을 0.5 ml를 접종하고 7 일간 관찰함. 시험결과 관찰기간동안 부작용 없이 모두 생존한 것을 확인함.

- 기니픽에서의 안전성

체중 300~350 g 의 기니픽 4 마리를 준비하여, 2 마리의 기니픽은 피하에 백신 2 ml를 접종하고, 다른 2 마리의 기니픽 복강에 2 ml를 접종하고 7 일간 관찰함. 시험결과 관찰기간동안 부작용 없이 모두 생존한 것을 확인함.

Group	축종	Route	The numbers of abnormal animals / Total numbers of vaccinated animals		
			0 MPM	3 MPM	6 MPM
			시험백신	마우스	IP
기니픽	SC	0/2		0/2	0/2
	IP	0/2		0/2	0/2

MPM ; Months Post Manufacture, SC ; Subcutaneous, IP ; Intraperitoneal

연구결과 10. polymer adjuvant가 적용된 돼지열병 미끼백신의 임상시험

○ 야외적용시험을 수행하기 위하여 돼지를 사육하는 농장을 선정하여, 경구백신 급이군을 설정하고 시험백신 접종 후 안전성 및 면역원성 비교시험을 수행함.

가. 자돈에서의 효능 및 안전성 확인

○ 임상시험 진행에 앞서 돼지열병 ELISA 시험을 통해 돼지 열병 바이러스(CSFV) 모체이행항체가 음성인 구간을 확인하며 혈청 내 CSFV PCR을 통하여 CSFV 항원이 음성임이 검증된 돈군을 이용하였음.

- 시험백신 섭취 후 1~2시간 내에 과민반응이 보이는지 관찰하고, 접종 후 21일 간 호흡 양상 및 기침 여부, 활력, 피부, 분변 상태 등을 확인하여 기록하며, 임상증상이 보이는 개체에 대해서는 백신에 의한 영향 여부를 판단하고자 계획함.
- 백신 접종 전, 접종 3주 후, 출하 시의 혈액을 확보하여 돼지열병 바이러스(CSFV)에 대한 중화 항체가(S/N titer) 및 항체감별 ELISA 검사를 실시함.
- 시험백신 섭취 후 1~2시간 내, 임상증상 관찰 결과
 - 시험백신 섭취 후 1~2시간 내 임상증상을 관찰한 결과 섭취한 모든 돼지에서 과민반응 등의 임상증상이 관찰되지 않았음.

Group	Method	No. of animals	Clinical signs (Total no. of animals with clinical signs /Total no. of animals)
			Hypersensitivity ^a
시험백신 접종군	PO, 10 bait vaccines per 1 pig	8	0/8

^a : Within 1~2 hours, PO ; Per Oral

- 시험백신 섭취 후 21일간, 임상증상 관찰 결과
 - 시험백신 섭취 후 3주 내 임상증상을 관찰한 결과 섭취한 모든 돼지에서 호흡, 활력 등의 임상증상이 관찰되지 않았음.

C.S**	WPV*	Clinical signs at every weeks post vaccination			
		0	1	2	3
호흡	정상	-***	-	-	-
	복식	-	-	-	-
기침	정상	-	-	-	-
	간헐	-	-	-	-
활력	연속	-	-	-	-
	정상	-	-	-	-
피부	침울	-	-	-	-
	발적	-	-	-	-
분변	황달	-	-	-	-
	정상	-	-	-	-
분변	연변	-	-	-	-
	설사	-	-	-	-

WPV ; Weeks post vaccination, ** CS ; Clinical Signs. ***- ; none

- 돼지열병 바이러스(CSFV)에 대한 중화 항체가(S/N titer) 결과
 - 시험 백신을 섭취한 돼지 8두를 3주차에 항체가 검사한 결과 58.7 (GMT) 정도의 높은 항체가를 보였으나 1 개체에서 항체가 음성으로 확인되었고 이는 일부 자돈이 경쟁에 밀려 백신을

충분히 섭취하지 못했기 때문으로 보임. 출하 시에 8두의 항체가를 검사한 결과 2 개체에서 비교적 낮은 8, 16배의 항체가를 보였으나 나머지 개체에서는 매우 높은 항체가를 보여 평균적으로 83.0 (GMT)의 항체가를 보임.

Group	Method	No. of pigs	Serum neutralization titer for CSFV		
			Pre-vaccination	3 weeks post vaccination	Slaughter ages
시험백신 접종군	PO, 10 bait vaccines per 1 pig	8	<2	64	8
			<2	32	128
			<2	256	128
			<2	256	64
			<2	256	256
			<2	32	16
			<2	128	256
			<2	<2	256
GMT			<1	58.7	83.0

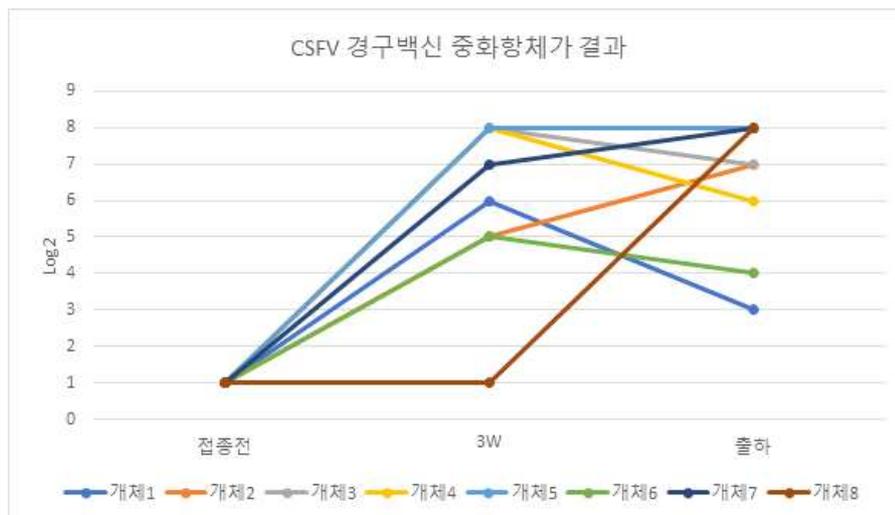


그림 7. 돼지열병 미끼백신의 개체별 중화항체가 결과

○ 돼지열병 바이러스(CSFV)에 대한 항체감별(CSFV E^{ms} ELISA) 결과

- 시험 결과 모든 개체에서 시험기간 동안 CSFV E^{ms} ELISA 양성 개체가 존재하지 않았음.

Group	Method	No. of pigs	CSFV E ^{ms} ELISA Result (the No. of the Positive / the No. of the tested)		
			Pre-vaccination	3 weeks post vaccination	Slaughter ages
시험백신 접종군	PO, 10 bait vaccines per 1 pig	8	0/8	0/8	0/8

나. 모돈에서의 안전성 확인

○ 시험백신 섭취 후 1~2시간 내에 과민반응이 보이는지 관찰하고, 접종 후 21일 간 호흡 양상 및 기침 여부, 활력, 피부, 분변 상태 등을 확인하여 기록하며, 임상증상이 보이는 개체에 대해서는 백신에 의한 영향 여부를 판단하고자 계획함.

○ 시험백신 섭취 후 1~2시간 내, 임상증상 관찰 결과

- 시험백신 섭취 후 1~2시간 내 임상증상을 관찰한 결과 섭취한 모든 돼지에서 과민반응 등의 임상증상이 관찰되지 않았음.

Group	Method	No. of animals	Clinical signs (Total no. of animals with clinical signs /Total no. of animals)
			Hypersensitivity ^a
시험백신 접종군	PO, 10 bait vaccines per 1 pig	5	0/5

^a : Within 1~2 hours, PO ; Per Oral

○ 시험백신 섭취 후 21일간, 임상증상 관찰 결과

- 시험백신 섭취 후 3주 내 임상증상을 관찰한 결과 섭취한 모든 돼지에서 호흡, 활력 등의 임상증상이 관찰되지 않았음.

C.S**	WPV*	Clinical signs at every weeks post vaccination			
		0	1	2	3
호흡	정상	-***	-	-	-
	복식	-	-	-	-
기침	정상	-	-	-	-
	간헐	-	-	-	-
	연속	-	-	-	-
활력	정상	-	-	-	-
	침울	-	-	-	-
피부	정상	-	-	-	-
	발적	-	-	-	-
	황달	-	-	-	-
분변	정상	-	-	-	-
	연변	-	-	-	-
	설사	-	-	-	-

WPV ; Weeks post vaccination, ** CS ; Clinical Signs. ***- ; none

다. 농장별 자돈에서의 돼지열병 바이러스 중화항체가 결과

- 시험백신 공급 후 출하된 돼지의 항체가를 검사한 결과 제 1농장의 경우, 55.7 (GMT) 정도의 항체가를 보였으나 1개체에서 8배의 낮은 항체가가 확인되었는데 이는 야외 환경에서 미끼백신 섭취의 불균등성으로 인한 결과로 생각됨.
- 제 2농장의 경우, 평균 39.01배의 중화항체가를 보였으며 제 1농장과 유사하게 일부 개체에서 4배, 8배의 낮은 항체가가 확인되었는데, 이는 야외 환경에서 미끼백신의 불균등성으로 인한 결과로 생각됨.

Group	Method	No. of pigs	Serum neutralization titer for CSFV	
			Slaughter ages	
제 1 농장	PO, 10 bait vaccines per 1 pig	5	128	
			128	
			64	
			64	
			8	
			GMT	
		55.7		
제 2 농장	PO, 10 bait vaccines per 1 pig	9	256	
			256	
			128	
			256	
			64	
			8	
			64	
			4	
			32	
		GMT		
		39.01		

연구결과 11. 수이샷 돼지열병 미끼백신의 품목허가 취득

- 돼지열병 미끼백신의 임상시험 진행 및 연구개발내용을 담은 품목허가서류를 농림축산검역본부에 제출 하였음.
- 검토결과, 본 연구진은 “수이샷 돼지열병 생마커 미끼백신”의 품목허가를 취득함.
- 품목허가를 취득한 신약은 「동물용 의약품등 취급규칙」 제7조의 2 및 농림축산검역본부 고시 제2021-63호 「신약 등의 재심사 기준」에 따라 품목허가일로부터 6년 동안 동물용 의약품 및 의료기기의 안전성 유효성에 관한 사항과 적절한 사용을 위해 필요한 정보를 수집, 검토하고 그 결과를 토대로 인체 또는 동물에 위해를 방지할 수 있도록 사용조사 성적서를 제출하게 되어 있음. 이에 따라 본 연구진은 돼지열병 미끼백신의 멧돼지에서 안전성 및 유효성을 지속 관찰할 계획임.

제 13 - 226 호

동물용의약품 [■]제조 []수입 **품목 허가증**

1. 업 체 명 : (주)중앙백신연구소

2. 업 종 : 동물용의약품등 제조업

3. 제 품 명 : 수이샷 돼지열병 생마커 미끼백신

4. 구 분 : 동물용의약품

5. 허 가 조 건 : _

6. 허가(신고)번호 : 제 13 - 226 호

7. 최초 허가(신고) 연 월 일 : 2020.02.25

8. 부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가(신고)합니다.

2020 년 5 월 7 일

농림축산검역본부


그림 8. 수이샷 돼지열병 생마커 미끼백신 품목허가증

수이샷® 돼지열병 생마커 미끼백신

2018년 9월 26일 만에 일본에서 돼지열병이 발생했습니다.

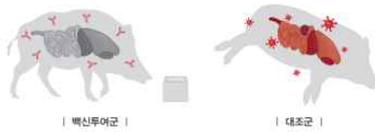
6개월 후, 일본 정부는 굵이지 않은 질병 전파에 못 이겨 야생멧돼지 대상 경구용 미끼백신 도입을 결정하였습니다. 이번 사태의 출발점으로 야생멧돼지를 지목한 결과입니다.

수이샷® 돼지열병 생마커 미끼백신은 이런 상황을 미연에 방지하기 위하여 개발된 제품입니다.



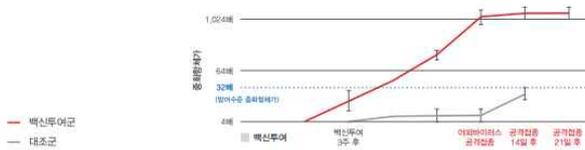
방어 효과

아외바이러스 공격접종 후, 백신투여군은 어떠한 임상증상도 나타나지 않은 반면 대조군은 100% 폐사하였습니다.



중화항체

백신투여군과 대조군은 시험기간 내내 중화항체 수치에서 유의적인 차이를 보였습니다. 공격접종 전 중화항체가는 64배까지 상승하였습니다.



아외바이러스 전파 차단

백신 1회 투여만으로 아외바이러스의 증식과 배설을 막았습니다. 백신에 의한 돼지열병 청정화의 가능성을 보여준 것입니다.



온도 저항성

미끼 백신이 효과를 발휘하려면 온도 저항성을 가져야 합니다. 수이샷® 돼지열병 생마커 미끼백신은 실온(25℃)에서 7일간, 저온(10℃)에서 21일 이상 최적의 효과를 보여줄 수 있습니다. 참고로 우리나라 폭(3~4월)과 가을(10~11월)의 일평균 기온은 7℃ ~14.5℃입니다.



안전성

백신의 안전성을 확인하기 위해 권장사용량의 10배 용량을 경구투여한 후 임상증상을 관찰했습니다. 발열, 과민반응, 설사, 화농, 과사, 식물 등의 증상이 보이지 않았습니다.

그림 9. 돼지열병 생마커 미끼백신 사진 및 제품 브로셔

기관별 연구 수행 과정 및 내용 - 서울대학교 (제1 협동)

1차년도 : 신규 바이오일성 nanoparticle 백신 adjuvant 개발 및 특성 연구

연구결과 1. 수용성 저점도 바이오일성 nanoparticle adjuvant 연구

- 세포 독성을 최소화하기 위한 LMW PEI를 이용하여, SDA와 4:1의 비율로 Michael addition반응을 통해 결합시켜 PST(Poly sorbitol transporter)를 합성하였으며, 이를 NMR을 통해서 확인함. LMW PEI와 SDA에서 확인되는 peak가 PST에서 확인되지 않았기 때문에 공유결합을 통해 PST가 안정적으로 합성되는 것을 확인 할 수 있음. 이때 LMW PEI와 SDA 간에 발생하는 에스터결합은 PST에 생분해성을 부여, 향상된 안전성으로 백신 adjuvant 물질로서 적합성을 보임 (그림 10).

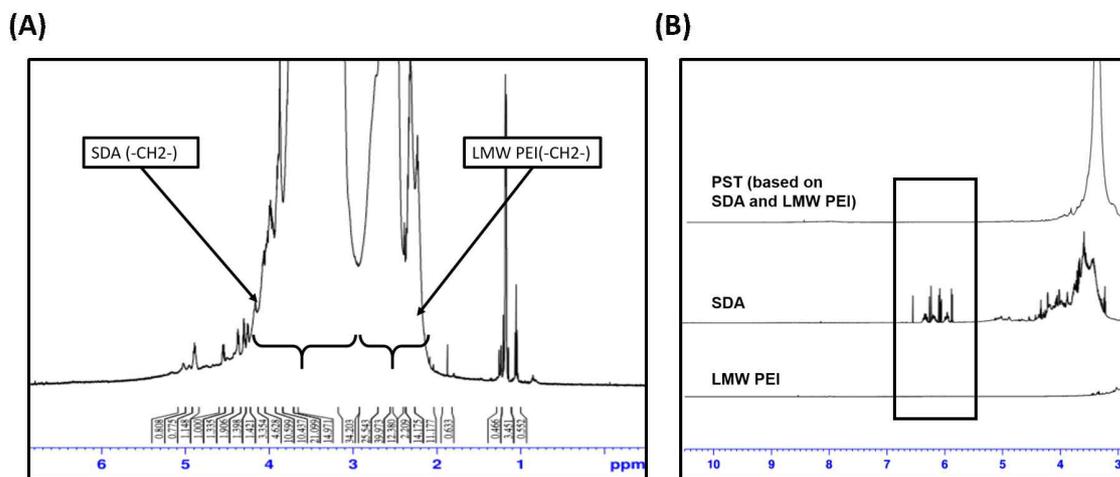


그림 10. NMR 분석을 통한 PST의 합성과 안정성 확인

연구결과 2. 신규 바이오일성 nanoparticle adjuvant 효능 연구

가. 모델항원(OVA)을 이용한 particle 형성 시험

- PST와 모델 항원인 OVA(ovalbumin)와 다양한 비율(OVA : PST = 2:1, 1:1, 1:5)로 합성하여 TEM 이미지 분석에서 나노입자의 형태를 보이는 조건을 확인하였을 때, 1:5의 비율에서 가장 적합함을 확인함.
- 또한 TEM 결과와 마찬가지로, 1:5의 비율의 합성에서 안정적으로 나노입자의 크기가 200 nm로 형성되는 것을 확인하였고, 단일 항원 OVA와 비교하여 이차구조 변화를 확인한 결과, 구조적으로 유사성을 갖음을 알 수 있었고, 항원으로써의 기능에 유지할 것을 예상할 수 있음. 따라서 본 결과를 통해 모델 항원 OVA에 적용 시, 1:5의 비율의 합성이 나노입자를 형성하며, 항원의 기능을 유지하는 적합한 조건임을 확인함 (그림 11).

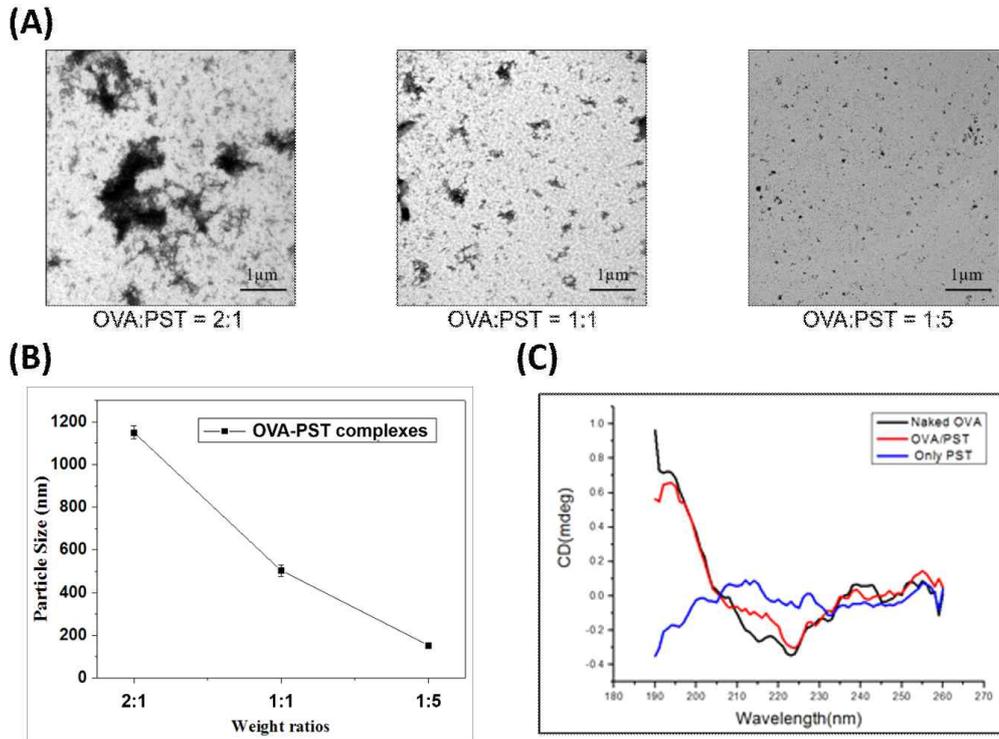


그림 11. Transmission electron microscopy, Dynamic light scattering, Circular dichroism spectroscopy 분석을 통한 PST와 모델 항원 OVA의 나노입자 성형 및 이차구조 변화 관찰

나. 모델 항원(OVA)을 이용한 수지상세포 모델에서의 세포독성 시험

- 앞서 확인한 모델 항원 OVA와 최적의 나노입자를 형성하는 PST의 비율(1:5)로 합성하여, 마우스 골수유래 수지상세포에 농도별로 24시간 처리 후 7-AAD/AnnexinV 동시 염색법을 활용, in-vitro 환경에서 세포의 viability에 주는 영향을 확인함 (그림 12).
- 다양한 농도의 단일 OVA (0.5, 5, or 10 ug/ml)의 항원 처리 시에 그룹간의 변화가 관찰되지 않았으며, 각각의 같은 농도의 OVA와 1:5의 비율로 PST (2.5, 25, or 50 ug/ml)을 합성한 항원 처리 시 유의미한 세포사멸(necrosis)이 관찰되진 않지만, 고농도인 50 ug/ml의 PST 처리 시 초기 세포자연사(early apoptosis)가 유도 되는 것을 확인. 이는 백신 효과 증진에서 긍정적인 영향을 주는 것으로 알려져 있음.

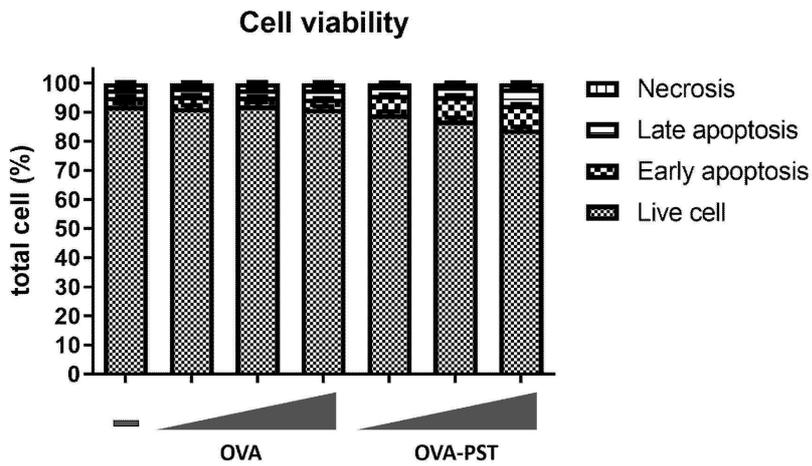


그림 12. 7-AAD/AnnexinV 동시 염색법을 통한 세포독성 연구

연구결과 3. 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 점막면역 효능 개선 연구

가. 폐렴구균 표면 단백질 A 항원(PspA)를 이용한 particle 형성 시험

○ 폐렴감염의 주요 원인균인 *Streptococcus pneumoniae* 의 표면 단백질 A 항원(PspA)를 점막면역 효능 개선 연구의 백신 후보항원으로 선정, TEM 이미지 분석과 DLS 분석을 통해 PST와 1:10 molecular weight 비율에서 안정적인 나노입자를 형성하는 것을 확인함 (그림 13).

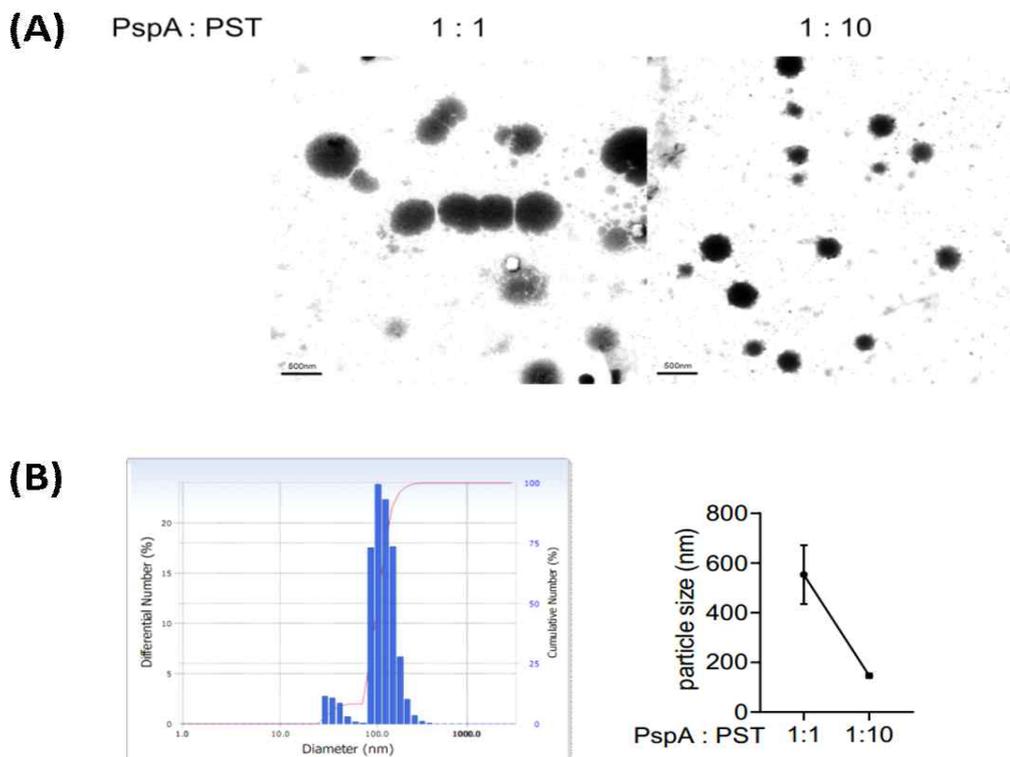


그림 13. TEM, DLS 분석을 통한 PST와 PspA의 안정적인 나노입자 형성 확인.

나. 폐렴 감염 모델에서의 PST의 비강백신의 효능 시험

- 앞서 확인한 PspA 와 1:10의 비율로 PST를 합성하여 만든 백신을 비강백신으로 적용하여 PST의 adjuvant 효능을 확인함. 널리 사용되는 강력한 점막백신 adjuvant인 CT를 positive control로 설정, 각각의 백신을 2주 간격으로 3번 비강 투여하였으며, 마지막 투여일로부터 21일째 되는 날 *S. pneumoniae*의 치사량을 접종함 (그림 14).
- 마지막 접종일로부터 각 그룹의 생존율을 확인한 결과, PspA+PST 그룹과 PspA+CT 그룹 모두 생존하였지만 그 외의 그룹들은 생존하지 못하였으며, 마지막 접종일로부터 각 그룹의 몸무게를 측정한 결과, 몸무게 감소는 감염으로 인한 것이며 PspA+PST그룹과 PspA+CT그룹의 몸무게는 회복됨을 확인함.
- 결과적으로 PST를 adjuvant로 활용 시, 폐렴 감염모델에서 효과적으로 방어면역을 유도할 수 있음을 확인함.

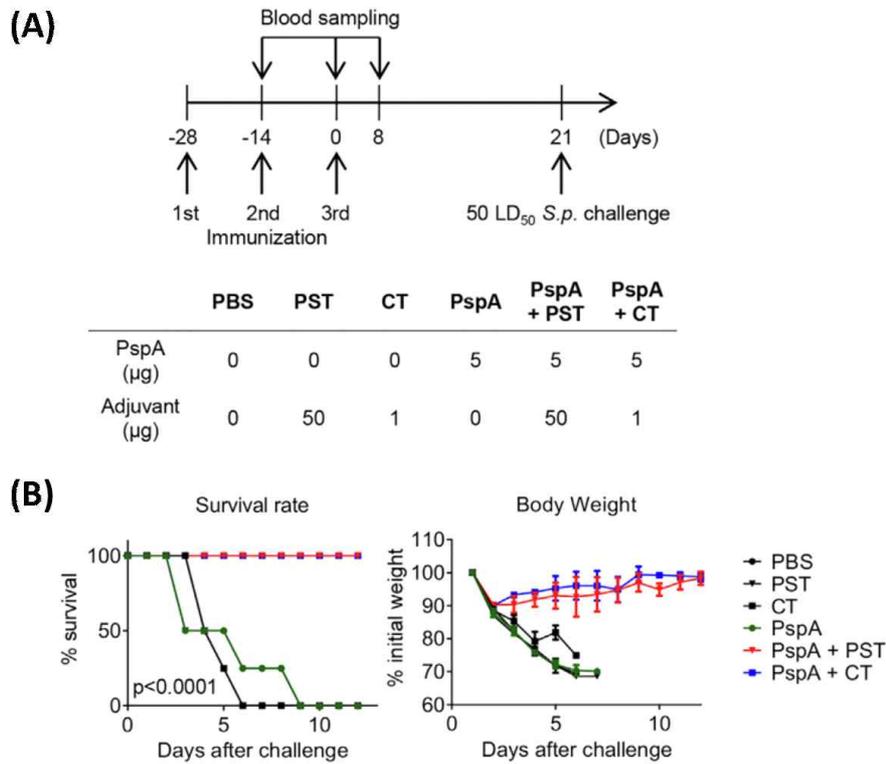


그림 14. 폐렴감염 모델에서의 PST의 비강백신 효능 시험 결과.

2차년도 : Nanoparticle adjuvant의 효능 및 안전성 연구

연구 결과 1. 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 효능 및 안전성 연구

가. 대식세포 및 수지상세포를 이용한 adjuvanticity 비교

- 1차연도에 확인된 최적의 나노입자 형성비율, 모델 항원 OVA: PST (1:5)를 합성하여 마우스

골수 유래 수지상세포에 처리한 후, co-stimulatory molecule, 사이토카인, 항원결정기의 발현 양상을 유세포분석를 통해 확인함 (그림 15).

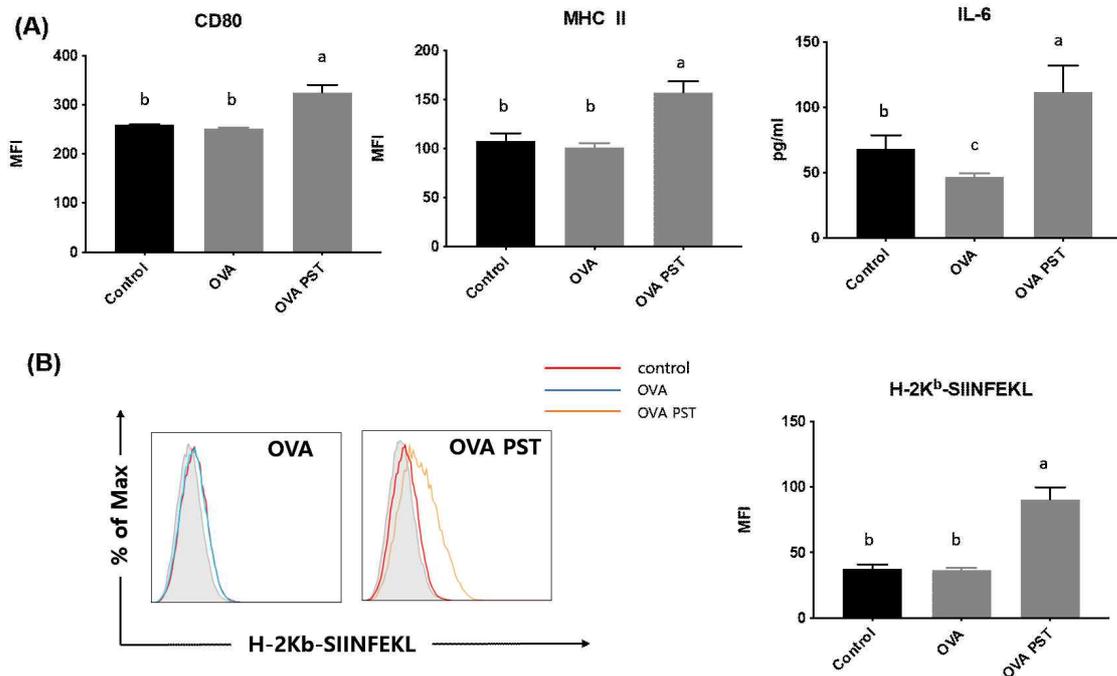


그림 15. 마우스 골수 유래 수지상세포 모델에서 유세포분석기를 이용한 PST의 adjuvanticity 확인.

○ 모델 항원 단독처리보다 PST를 이용한 나노입자 형성 시 CD80, MHC class molecule II 의 발현이 증가함으로써 세포 활성화도가 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있었으며, IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 발현 역시 증가 하는 것을 확인할 수 있음.

○ 나아가 모델항원 OVA의 항원결정기의 발현 (H-2Kb-SIINFEKL)을 확인 했을 때, PST 나노입 자에 의해서 발현이 크게 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이는 수지상세포의 교차항원제시능 력을 향상 시킬 수 있다는 것을 의미함.

나. 대식세포 및 수지상세포에서의 항원제시능력 평가

○ 앞서 확인한 최적의 나노입자를 형성하는 모델 항원 OVA와 PST의 비율 (1:5) 합성 시, 수지 상세포의 활성화 증가와 항원결정기 발현 향상을 기반으로 교차항원제시 능력을 조절할 수 있음 을 포착, 해당 효과를 항원에 특이적인 transgenic mouse의 T 세포(OT-I)와의 공동배양모델 을 통해 확인함.

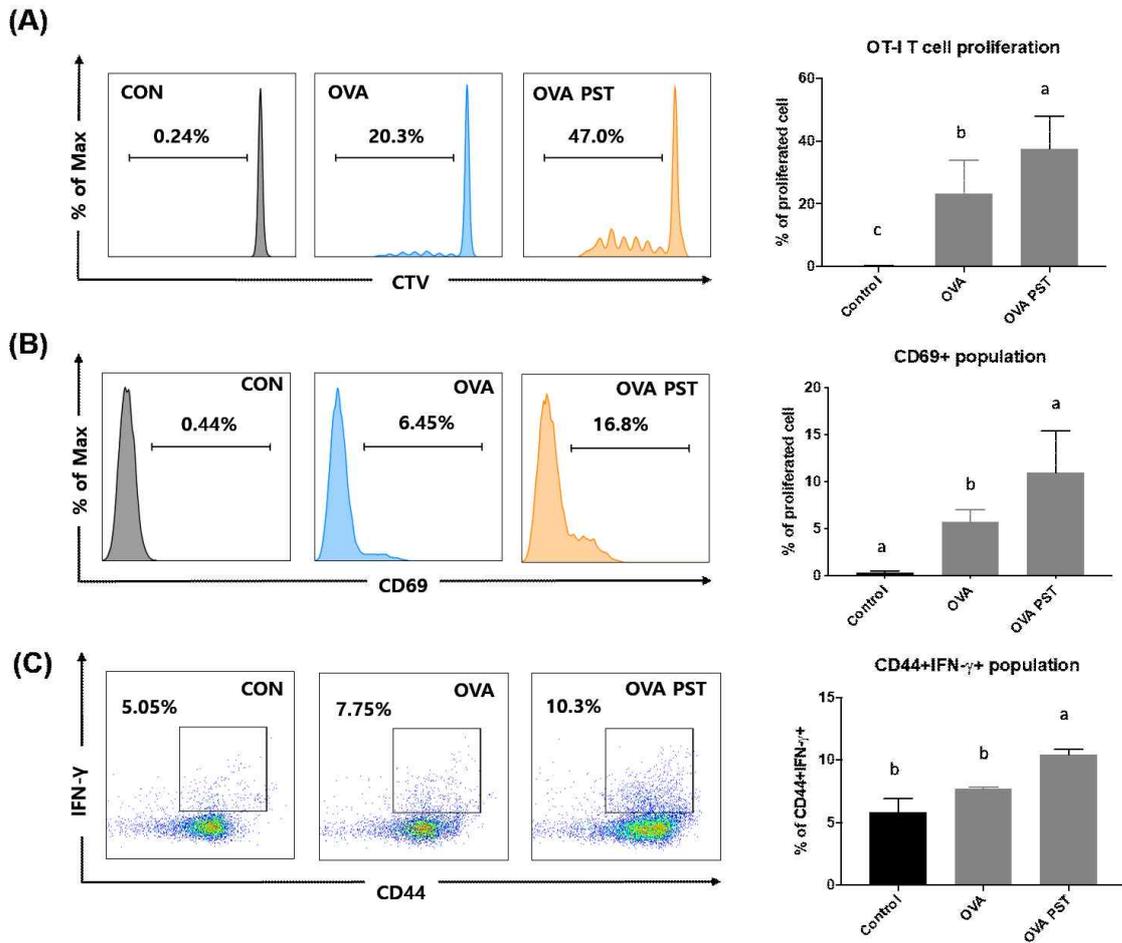


그림 16. OVA 특이성을 갖는 transgenic mouse T 세포와의 공동배양을 통한 PST의 교차항원제시 능력 조절 효과 확인.

○ 항원에 특이적인 transgenic mouse의 T 세포(OT-I)와의 공동배양모델에서 교차항원제시능력을 평가한 결과, 모델항원 단독 처리 보다 PST를 통해 나노입자 형성 시 T 세포의 분열이 증가하였으며(그림 16A), T 세포 활성화 마커인 CD69의 발현 역시 증가하는 것을 확인할 수 있었음(그림 16B). 나아가 세포 내 항체 염색법(intracellular staining, ICS)을 활용하여 IFN- γ 사이토카인 발현을 확인 한 결과, PST에 의해서 그 활성이 유의적으로 높게 증가하는 것을 확인 함 (그림 16C).

연구 결과 2. 비오일성 nanoparticle adjuvant의 신규항원 (MHP)과의 적용을 통한 방어면역 규명연구

가. Nanoparticle adjuvant의 신규항원 (MHP)와의 particle 형성 및 안정성 확인

○ 앞서 모델 항원을 이용한 연구 결과를 바탕으로, 주관 연구기관에서 제공하는 *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP) 균체항원과 PST와의 최적의 나노입자 형성 조건을 확인 (그림 17).

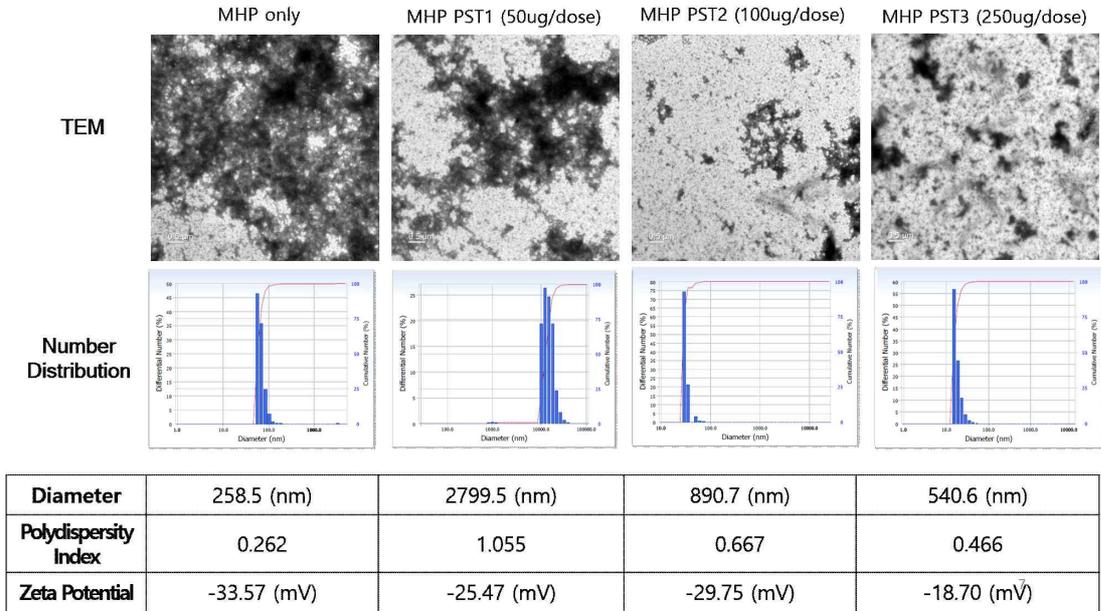


그림 17. TEM, ELS 분석을 통한 PST와 신규항원 (MHP)의 나노 입자 형성 확인.

○ TEM, ELS분석 결과, PST의 함량이 낮은 경우(50 ug/dose) 응집되는 현상 및 particle의 크기가 증가하는 것이 관찰되지만, PST의 dose가 증가함에 따라 particle의 균질화를 관찰할 수 있었으며, 크기 역시 약 500 nm로 줄어드는 것을 확인 할 수 있음. 이와함께 표면 전하 역시 증가하는 것을 확인할 수 있음 (그림 17).

나. Nanoparticle adjuvant의 신규항원 (MHP)의 실험동물에서의 효능평가

○ 주관연구기관인 (주)중앙백신연구소에서 돼지 마이코플라즈마성 폐렴 항원과 혼합하여 마우스 실험동물 모델에서 효능평가를 진행함. PST 농도별로 50ug/dose, 100ug/dose, 250 ug/dose로 근육접종한 결과, 250ug/dose 농도에서 가장 높은 항체를 보였으며, 50ug와 100ug간의 농도 구배에 따른 차이는 없는 것으로 확인됨(그림 18).

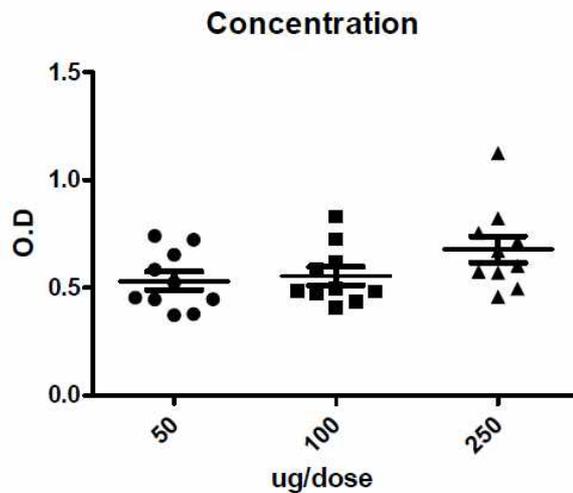


그림18. PST 농도별 MHP 항체 ELISA 결과

다. 접종경로에 따른 효능평가

- PST는 백신후보 항원과의 안정적인 복합체를 형성하고, 점막백신으로 적용시 독성이 매우 적고, 표적기관에 오래 머무르며 long-term 항체 반응을 통해 효과적인 방어면역획득을 하는 것으로 선행연구 결과 확인됨.
- 이에 따라 후보항원 중 하나인 마이코플라즈마 하이오뉴모니에(MHP) 항원과 PST를 혼합하여 시험백신을 제조함. 백신 제조 후, 연구결과2와 같이 실험동물인 마우스 모델에서 한 그룹은 근육으로 접종하고, 다른 한 그룹은 점막면역 형성에 유리한 비강투여 방법으로 백신을 투여함.

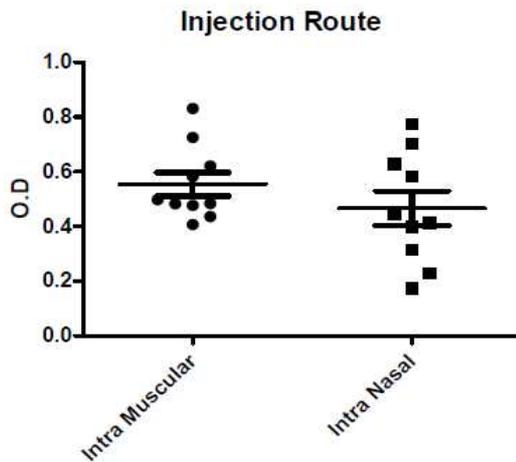


그림19. 접종경로에 따른 PST 효능비교

- T-test 검정결과 두 그룹 간 유의적 차이는 없는 것으로 확인되었으나, 비강투여로 백신을 접종한 경우에 개체별 항체가 차이가 큰 것으로 확인됨.
- 본 실험에서 설정한 250 ug/dose 의 PST 함량은 100 nm 근처의 나노 수준의 크기를 형성하기에는 부족한 것으로 보이며, 이는 전년도 주관기관의 백신접종 연구 결과에서 예상보다 다소 낮은 효과를 보인 부분과 일맥상통하는 것으로 보임.
- 필요한 경우, PST의 함량을 500 ug/dose, 1000 ug/dose로 높여 TEM, 및 ELS 분석을 통해 물성연구를 추가로 진행하여 적합한 나노 복합체를 형성하는 조건을 확인 후, 주관기관의 백신접종 연구에서도 이를 적용하여 추가 연구를 제안 함.

연구 결과 3. 비강백신 투여 적용에 따른 점막 면역 확설 (세포성면역, 체액성면역) 비교 연구

가. 선천성면역세포 및 T 세포 분석을 통한 세포성 면역 분석

- 폐렴감염의 주요 원인균인 *Streptococcus pneumoniae* 의 표면 단백질 PspA 와 1:10의 비율로 PST를 합성하여 만든 백신을 비강백신으로, 널리 사용되는 강력한 점막백신 adjuvant인 cholera toxin(CT)을 positive control로 설정, 각각의 백신을 2주 간격으로 3번 비강 투여 후, 항원 특이적 T 세포의 면역 반응을 확인함 (그림 20).

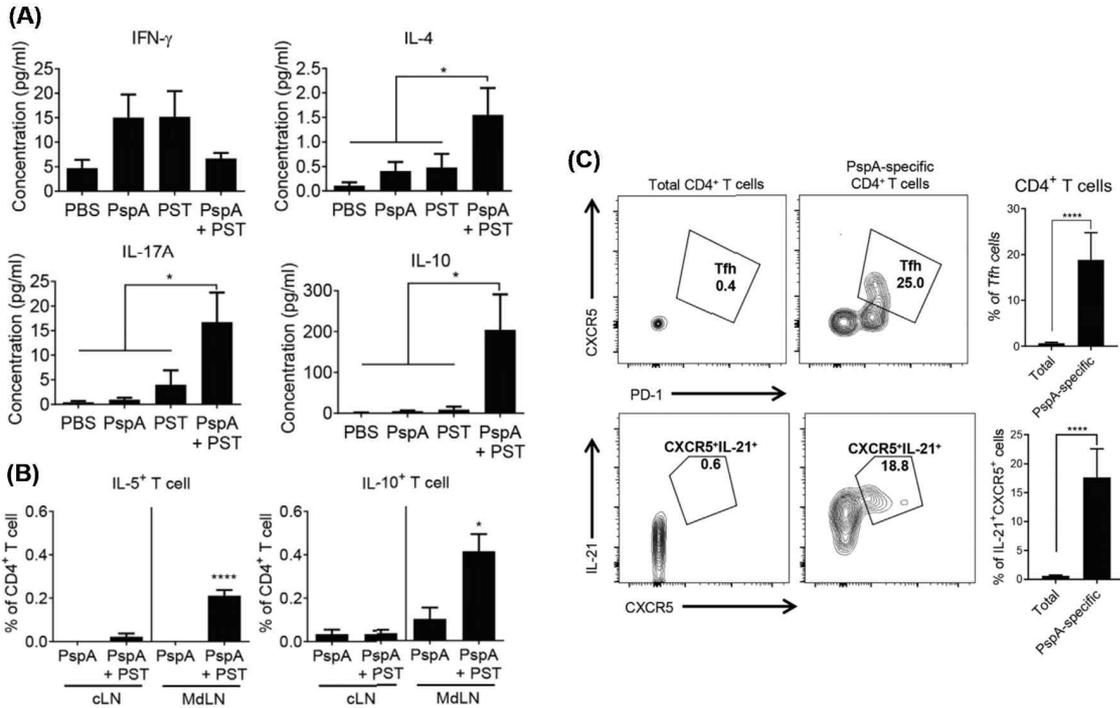


그림 20. 폐렴감염 모델에서 PST의 비강백신 적용 시 세포성 면역 활성화 확인.

- 백신에 사용된 항원인 PspA를 이용하여 draining lymph node의 T 세포를 재자극하였을 때, IFN- γ , IL-4, IL-17A 그리고 IL-10 과 같은 사이토카인들이 PST를 처리한 그룹에서 증가하는 것을 확인함 (그림 20A).
- PST 처리로 인한 사이토카인의 변화를 flow cytometry에 의한 intracellular staining 기법으로 확인하였을 때 이는 보조 T 세포에서 유래되었음을 확인함 (그림 20B).
- PST 처리는 항원 특이적인 면역반응을 일으키는데 중요한 CXCR5⁺PD-1⁺ T 세포인 follicular T 세포를 증가시키고, follicular T 세포의 주요 사이토카인으로 알려진 IL-21의 발현 또한 증가시킴을 확인함 (그림 20C).

나. 혈액 내 항원 특이적 항체 측정 및 B 세포의 활성화 분석을 통한 체액성 면역 분석

- *S. pneumoniae* 의 표면 단백질 PspA와 PST를 합성하여 만든 백신을 비강백신으로, cholera toxin (CT)을 양성대조군으로 설정, 각각의 백신을 2주 간격으로 3번 비강 투여 후, 마지막 투여일로부터 7일째 되는 날 폐 세척액, 폐, 비장, 림프절 내 항원 특이적 항체 반응을 확인함 (그림 21).

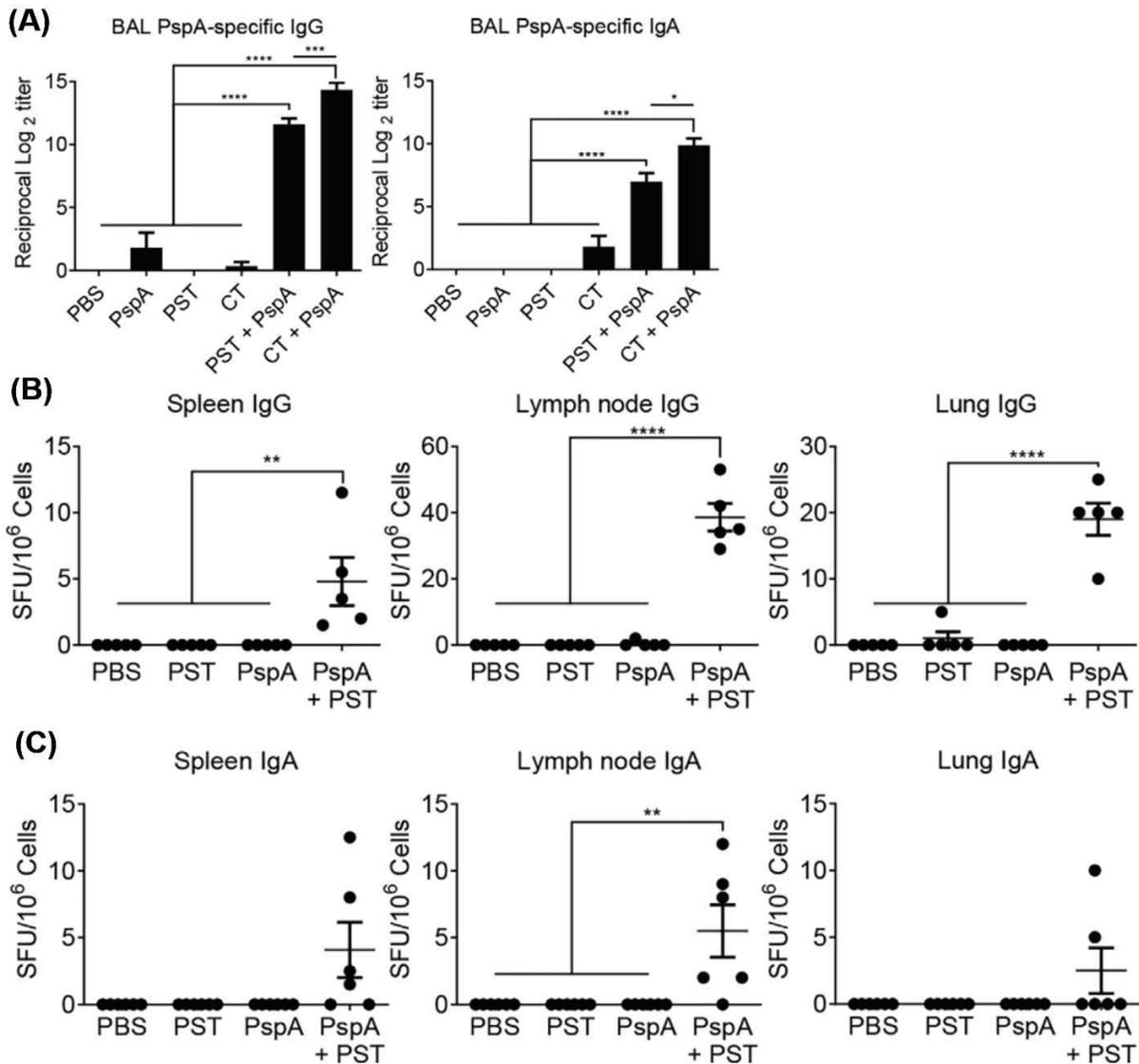


그림 21. 폐렴감염 모델에서 PST의 비강백신 적용 시 체액성 면역 활성 확인.

- 폐 세척액에서 항원 특이적 항체 반응을 확인한 결과, PspA+PST 그룹과 PspA+CT 그룹에서만 항원에 특이적인 IgG 및 점막 면역에 중요한 IgA가 생성되는 것을 확인함 (그림 21A).
- 또한 비장, 림프절, 폐 내에서도 항원 특이적 항체 반응을 확인하였을 때, PspA+PST 그룹에서만 유일하게 항원 특이적인 IgG (그림 21B)와 IgA (그림 21C)가 생성되는 것을 확인함.
- 결과적으로 1차년도에 확인한 PST가 폐렴 감염모델에서 효과적으로 생존율을 높여 방어 면역을 유도하는 것이, 구체적으로는 T 세포와 B 세포 반응을 통해 이루어지는 것을 확인할 수 있었으며, 앞선 PST가 수지상세포에 미치는 여러 효과들을 고려할 때, 해당 폐렴 감염 모델에서 이와 같은 효과 또한 수지상세포를 매개하는 것으로 생각되며, 뒤이어 3차년도에는 이와 관련된 기전을 밝히는 연구 수행을 목표로 하였음.

3차년도 : Nanoparticle adjuvant에 의한 방어 면역 획득 및 기전 연구

연구 결과 1. 비오일성 nanoparticle adjuvant의 방어 면역 형성 기전 연구

가. 수지상세포에서 nanoparticle adjuvant에 의한 항원 포식 및 delivery 효율 비교

- 1, 2 차년도에 확인된 PST에 의한 수지상세포의 활성화 및 교차항원제시능력 증가의 원인분석을 위해, 골수 유래 수지상세포에서 항원 포식 및 delivery 효율을 확인함 (그림22).

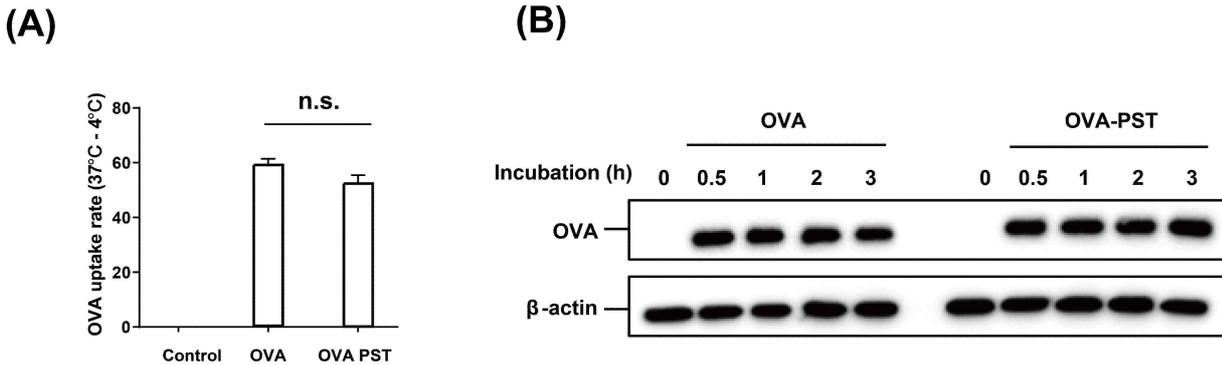


그림 22. PST에 의한 수지상세포의 항원 포식 효율 확인

- 형광 표지된 모델항원을 이용하는 항원 포식 분석법을 통해 확인하였을 때, PST에 의해서 항원 포식 정도에는 유의미한 영향을 주지 않는 것을 확인함 (그림 22A).
- 모델항원 처리 후 항원에 특이적인 항체를 이용하여 western blot 기법을 통해 항원의 포식 정도를 항원 처리 시간에 따라 확인하였을 때, PST에 의해서 항원 포식 효율에는 변화가 없음을 확인함 (그림 22B).
- 결과적으로 기존에 확인한 교차항원 제시능력의 증가는 단순히 항원의 포식 정도가 증가됨에 따라 나타난 것이 아니라, 포식된 항원의 세포내에서 processing 되는 과정과, 세포질 내 이동이 주요하게 작용하였을 것으로 예상됨.

나. 수지상세포에서 nanoparticle adjuvant에 의해 포식된 항원의 세포 내 이동 확인 및 in-vivo 모델에서의 교차항원제시능력 평가

- 교차항원제시능력 향상의 원인을 검증하기 위해 TEM을 이용하여, 수지상세포에 의해서 포식된 항원이 세포 내 포식소체에서 세포질로의 이동을 항원처리 시간 별로 확인하였을 때, 항원 처리 후 3시간 이후, 세포질로 이동된 항원을 다수 관찰할 수 있었음 (그림 23).

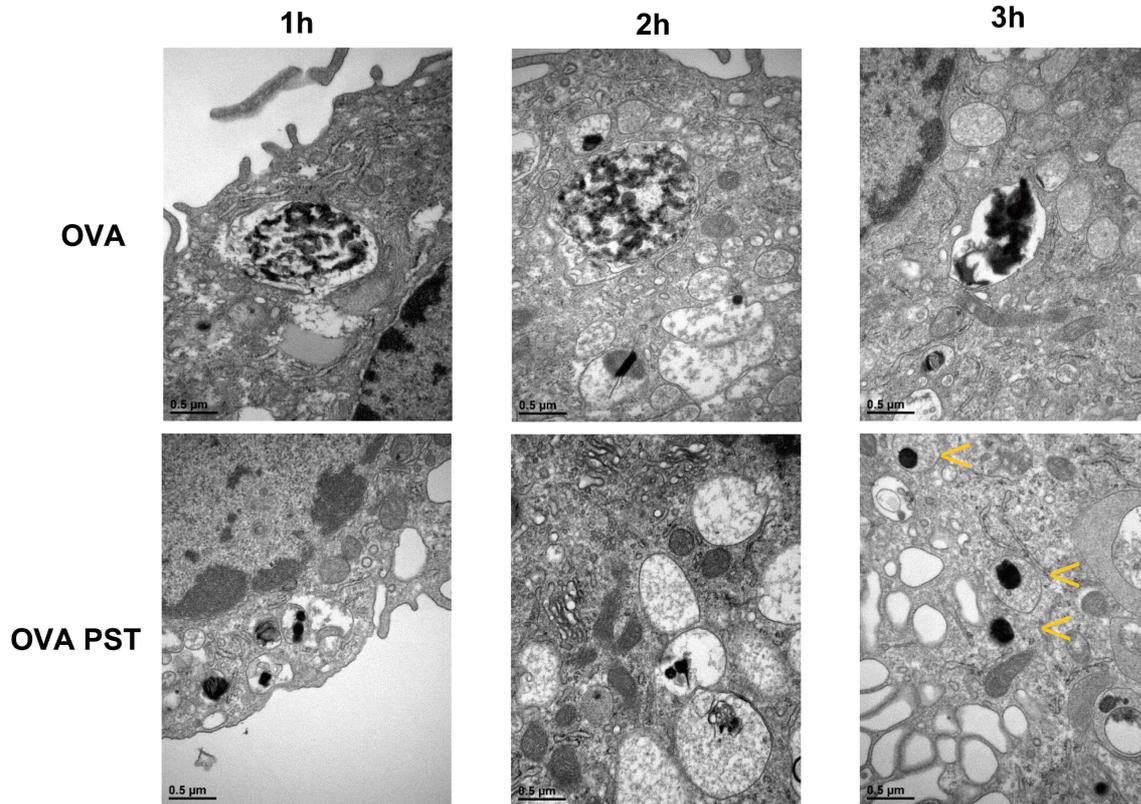


그림 23. TEM을 이용한 수지상포 내 항원 이동 확인

○ 나아가 수지상세포에 항원 및 PST를 처리 후 준 세포 분획법 (Subcellular fraction)을 통해서 세포소기관을 분리하여 western blot 기법을 활용해 포식소체 및 세포질의 항원 발현 정도를 측정하여 항원의 이동을 확인하였을 때, PST에 의해서 정량적으로도 항원이 세포질 내로 이동한 것을 검증하였음 (그림 24).

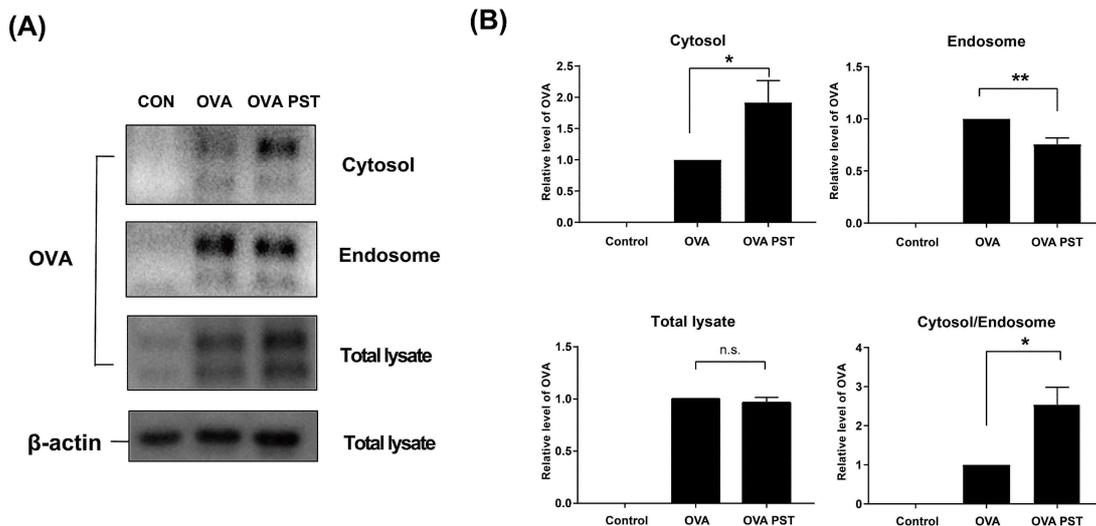


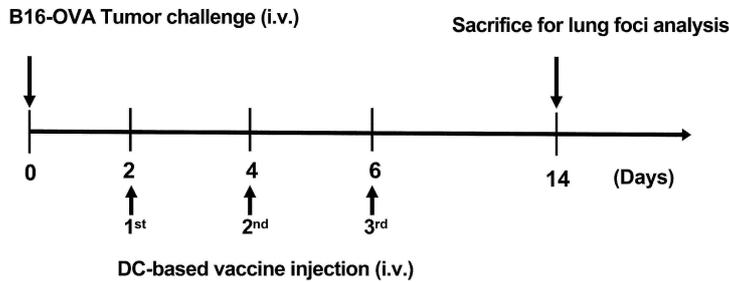
그림 24. 준 세포 분획법 및 western blot을 통한 항원의 세포내 이동 확인

○ 이를 통해 PST에 의한 세포질 내 이동이 수지상세포의 교차항원제시능력을 증가시킨 주요 요인임을 확인함.

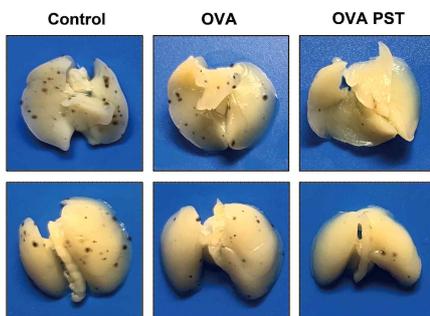
○ 이어 PST를 처리한 수지상세포를 DC-based vaccine에 적용, *in-vivo* 에서의 교차항원제시능력 효과 검증하고자 함.

○ OVA를 발현하는 B16-OVA 암세포 모델을 전이모델로 적용하여 폐에 생성되는 foci를 확인하였음. PST를 처리한 DC-based vaccine에서 효과적으로 암의 형성을 억제하는 것을 알 수 있었으며, 이를 통해 *in-vivo* 모델에서 교차항원제시능력 증진을 확인 할 수 있었음 (그림 25).

(A)



(B)



(C)

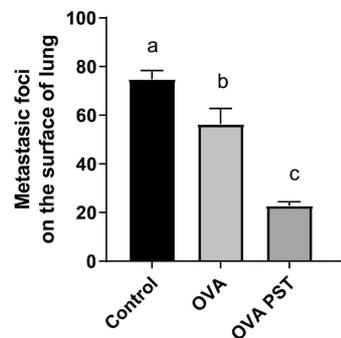


그림 25. B16-OVA 전이모델을 활용한 *in-vivo* 교차항원제시능력 효과 검증

연구 결과 2. 폐렴 감염 모델 항원에 nanoparticle adjuvant 적용 시 면역 활성화(세포성 면역, 체액성 면역, 면역지속성) 비교를 통한 방어면역 형성 기전 연구

가. PspA 항원을 이용한 폐렴감염 모델에서 PST에 의한 체액성면역, 세포성면역, 면역지속성 분석 및 면역세포 간 상호작용 규명을 통한 방어면역 형성 기전 확인.

○ PspA 항원을 이용한 폐렴감염 모델에 PST를 적용하여 백신효과를 단기 면역이 아닌, long-term 으로 분석하여 방어면역의 지속 정도를 확인하였음.

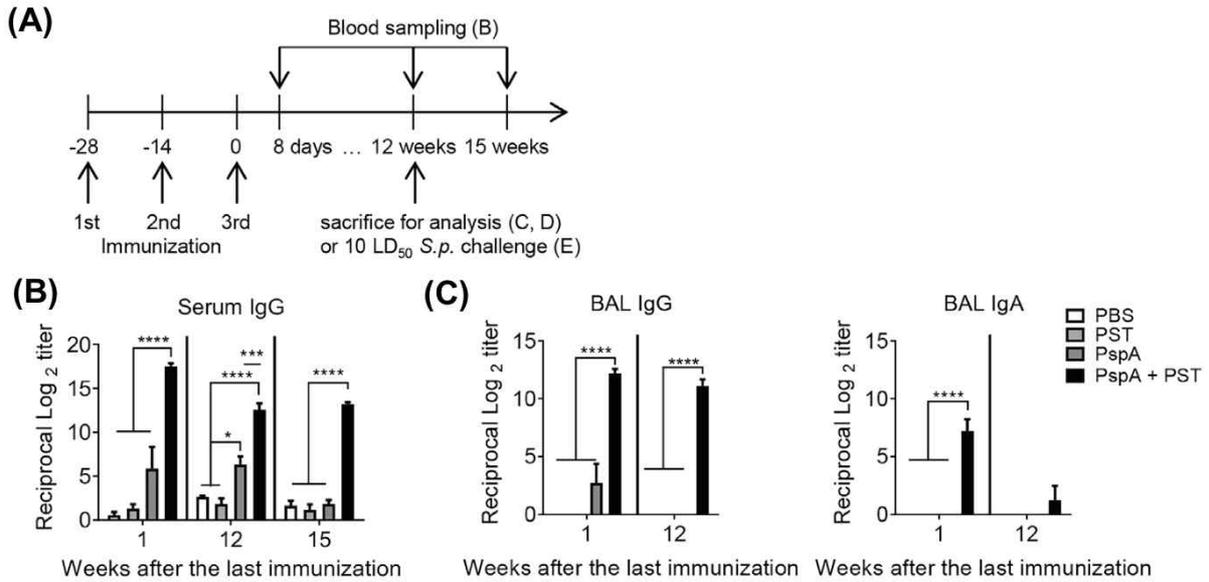


그림 26. 폐렴 모델에서 PST에 의한 long-term 항체 형성 효과 확인

- 12-15주 까지 항체 형성을 확인하였을 때, 항체의 생성이 지속적으로 유지되며, PST에 의해 획득된 방어면역이 long-term으로 작용 됨을 확인 함 (그림26).
- 나아가 수지상세포에 PspA-PST 복합체를 처리 후 유세포 분석기를 이용해 다양한 세포 표면 활성 물질인 MHC II, CD80, CD86, PDL-1, OX40L, CXCR3R1을 확인하고(그림 27A, B), ELISA를 통해 수지상세포 배양액에서 TNF- α , MCP-1, IL-6과 같은 cytokine을 확인함 (그림 27C).
- 수지상세포에서 확인되는 다양한 세포표면 활성물질 및 사이토카인의 발현 양상을 보았을 때, TH2 도움 T cell (Th2) 혹은 T follicular helper (Tfh) 세포를 유도할 수 있는 세포표면 활성 물질과 사이토카인을 분비하는 것이 확인되어, 전년도에 확인한 PST에 의한 Tfh 세포 및 Th2 CD4⁺ T 세포의 활성이 수지상세포의 매개를 통해 발생 할 수 있음을 확인함.

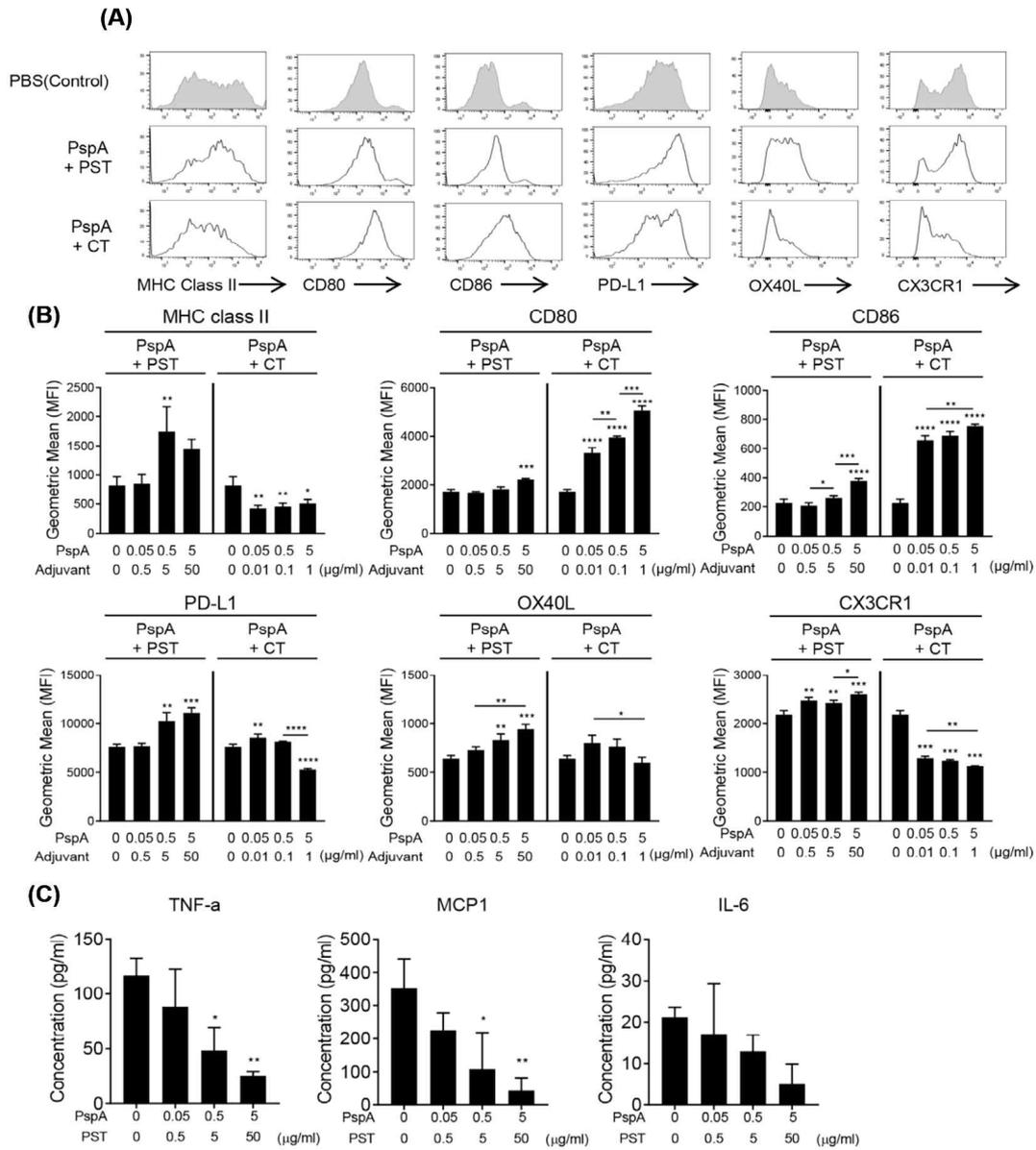


그림 27. PST-PspA에 의한 수지상세포의 표면인자 및 사이토카인 분비 확인

○ 세부 조절 기전을 확인하기 위해, anti-CD4 항체를 이용한 CD4⁺ T 세포를 걸여시키는 시키는 모델과, CD11c-DTR 마우스를 활용한 대식세포 및 수지상세포를 제거하는 모델에서 PST의 효과를 확인하였을 때, 각 모델에서 항체 형성 효과가 경감 되는 것을 알 수 있음. 따라서 PST에 의한 지속적인 PspA 특이적 항체 형성은 수지상세포 및 CD4⁺ T 세포의 상호작용에 의한 것임을 확인 함 (그림 28A, B).

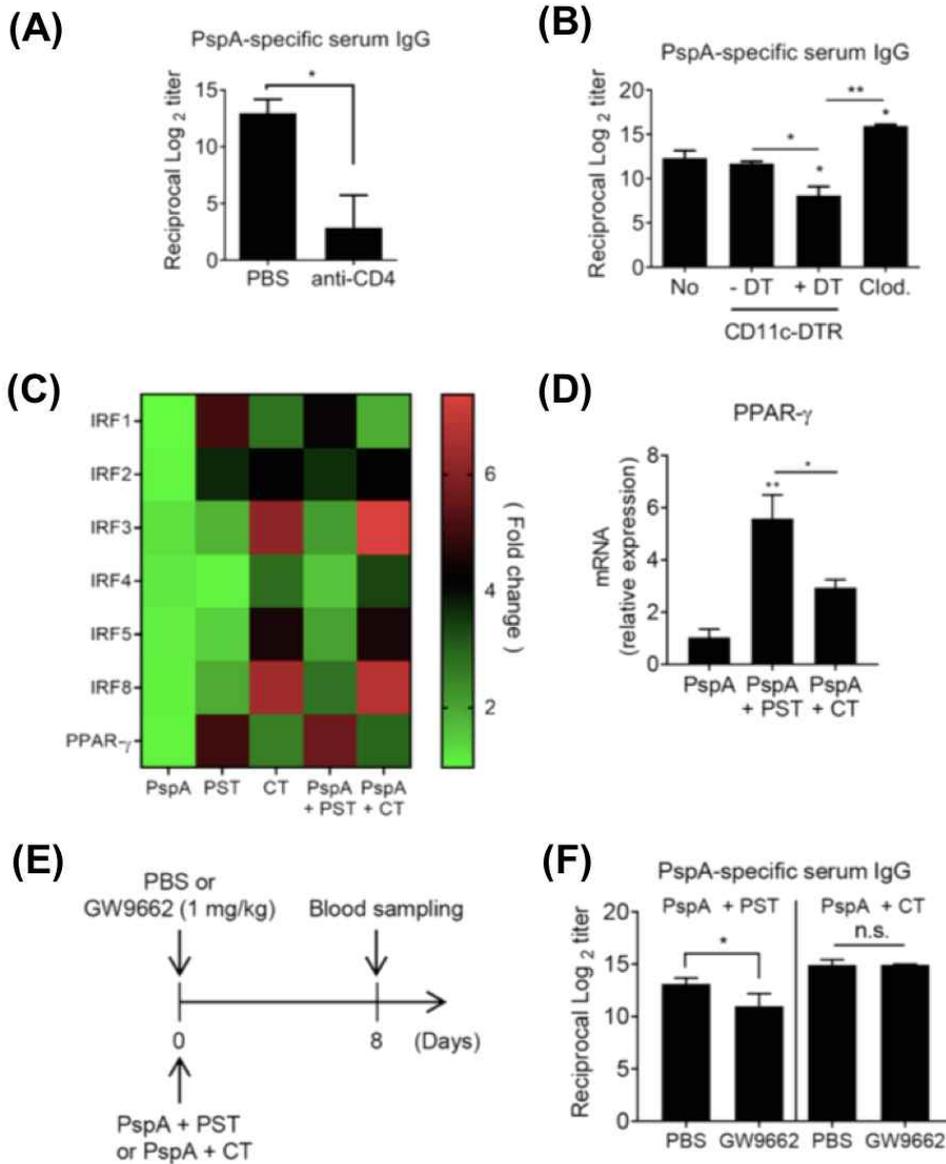


그림 28. PspA-PST 복합체에 의해 유도된 방어 면역을 매개하는 주요 전사인자 및 수지상세포와 CD4+ T cell 상호 작용에 대한 의존성 확인

- 전사인자 수준에서 PST가 유도하는 수지상세포의 표현형 및 기능적 활성의 원인을 탐구하기 위해, 다양한 전사인자의 변화를 확인하였을 때, 과산화체 증식자 활성화 수용체 감마 (PPAR- γ)의 mRNA 발현 정도가 PST에 의해 유의적으로 높게 증가한 것을 확인하였으며, 나아가 PPAR- γ agonist인 GW9662를 함께 처리 후 동일한 항원 및 PST를 접종하였을 때, 이전에 관찰되었던 것과 마찬가지로 항원 특이적인 항체의 형성기 경감되는 것이 확인되었음 (그림 28C-F).

기관별 상세 연구결과 - 충남대학교 (위탁)

[2차년도 연구개발 성과]

연구결과 1. 신규 polymer adjuvant 개발 과정 확립

○ Adjuvant의 이상적인 조건은 면역증진효과 외에도 생물체에서의 안정성, 백신 효율의 확장성과 물질의 생산과 보관이 용이해야함. 따라서 본 연구에서는 생분해성 (biodegradable)이 뛰어나고 안정하며 대량생산에서 경제적 비용이 낮은 후보군을 선정하여 library를 구성함. 추가로 기존 adjuvant 자체의 문제점인 독성 및 부작용을 줄이는 것을 중점적으로 연구를 진행함.

○ 면역강화제의 역할과 항원보호, 세포 흡수 · 침투를 높일 수 있는 생체적합성 양이온성 고분자로 알려진 키토산 (Chitosan)을 이용하였음. 기능성 치환기를 가진 키토산 유도체 (Carboxymethyl chitosan)를 구축하여 NMR, FT-IR의 분석을 통해 화학적 구조를 분석하고 합성률을 확인함. FT-IR의 peak 분석결과로 카복실 그룹이 확인됨을 알 수 있어 합성이 성공적으로 진행되었음을 확인함.

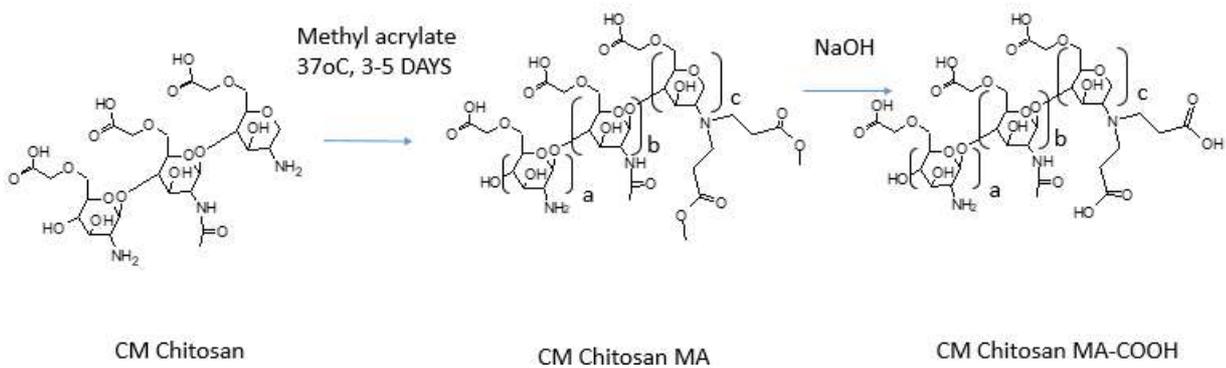


그림29. Carboxymethyl chitosan의 합성 과정

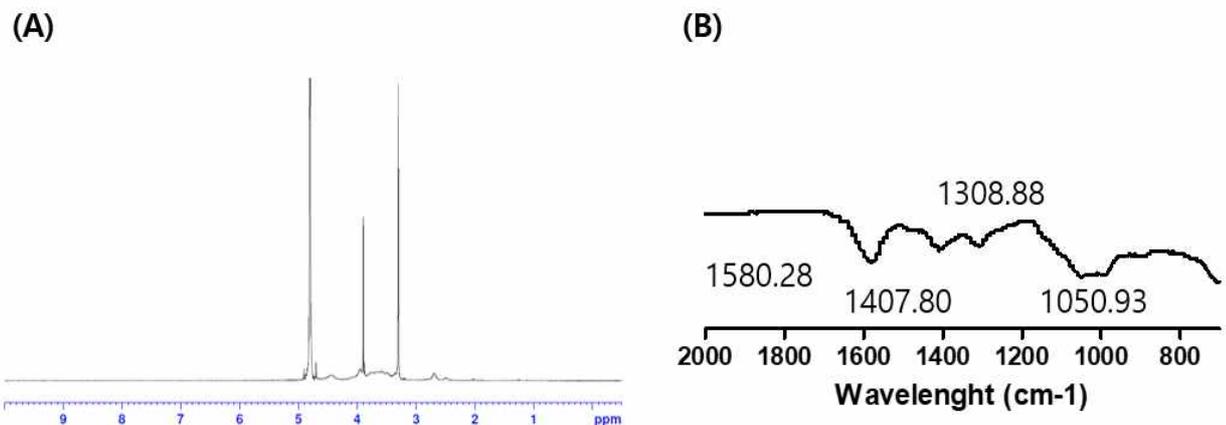


그림 30. NMR, FT-IR을 이용하여 carboxymethyl chitosan의 합성 확인 결과

○ 후보 물질 탐색과 확보를 통해 library를 넓혀나가 adjuvant 조건에 적합한 다양한 후보군의 물질을 확립하고자 함. CMC(carboxymethyl cellulose) 등 생체적합성 물질을 응용하고, 기능성 치환기인 ester기, anhydride기, amide기 등을 도입하여 물리학적, 화학적 환경에 따라 분해되는 특징을 가질 수 있도록 함.

연구결과 2. 신규 polymer adjuvant 물리화학적 및 생리학적 특성규명

○ 생체적합성 고분자를 이용하여 나노입자를 형성하는지 확인하기 위해 DLS(Dynamic Light Scattering)를 사용하여 700nm 이하의 입자가 형성되는 것을 확인하였으며, 고분자의 농도에 따라 입자의 구성이 조밀화되어 400nm이하까지 줄어드는 것을 확인함. 또한, 고분자의 pH가 10-8사이로 약염기성으로 유지되는 것으로 나타나 물리·화학적 특성을 알 수 있음.

○ 생분해성 microsphere adjuvant는 10 um 이하의 크기로서 점막표면에 항원을 표적지향적으로 전달할 수 있고, 효소, pH, 담즙산 등에 의한 분해를 방지하는 장점들이 있음. 키토산은 밀착 결합에서 높은 전달력을 갖는 특성으로 점막 약물 전달시스템에 효과적으로 적용되는 소재로 알려져 있음. 이러한 특성을 가진 나노입자를 형성하여 바이오일성 adjuvant를 개발할 수 있는 시료의 잠재적 가능성이 높아질 수 있음.

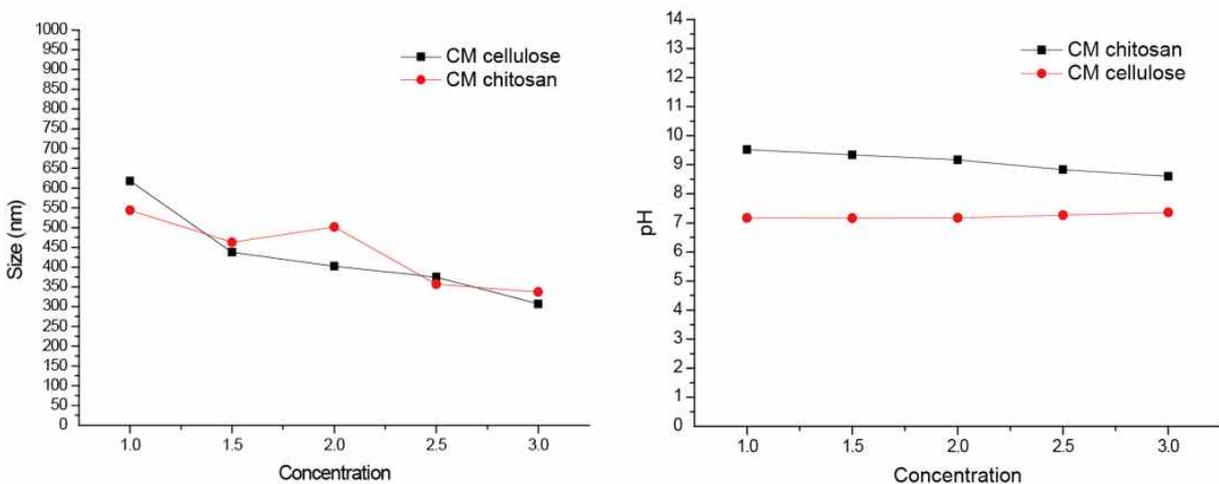


그림31. DLS를 이용한 후보군 물질의 크기, pH 농도 확인

[3차년도 연구개발 성과]

연구결과 1. 국제 기준 가이드라인에 따른 신규 polymer adjuvant의 동물실험 안정성 평가

○ 2차년도를 통해 신규 polymer adjuvant의 합성 scheme을 확립했으며, 이에 대한 실제 동물 모델에 대한 안정성 및 백신 보조제로서의 효능평가가 필요함. 이에 따라 Carboxymethyl (이하 CM)-chitosan, CM-cellulose, CM-dextran 그리고 CM-chitosan-COOH 및 아래 그림의 과정대로 추가 합성을 진행한 Gallic acid conjugated Glycol chitosans (GA-GCs)과의 안정성 비교 실험을 진행함.

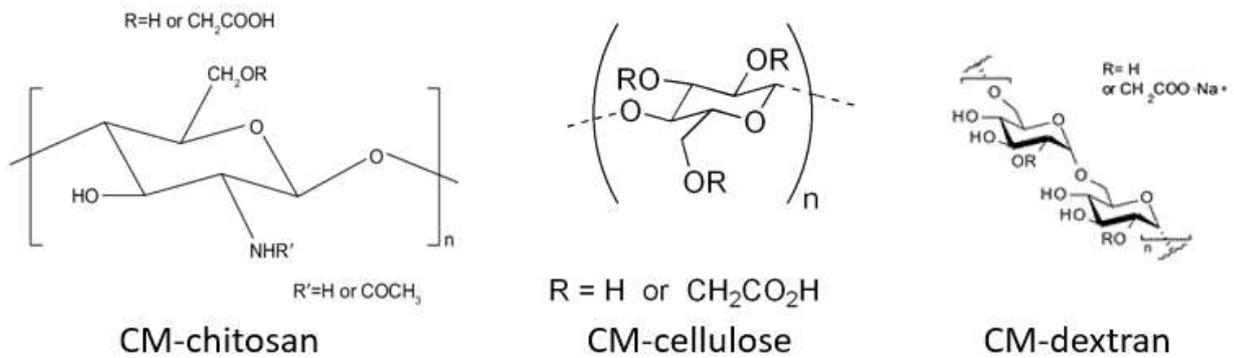
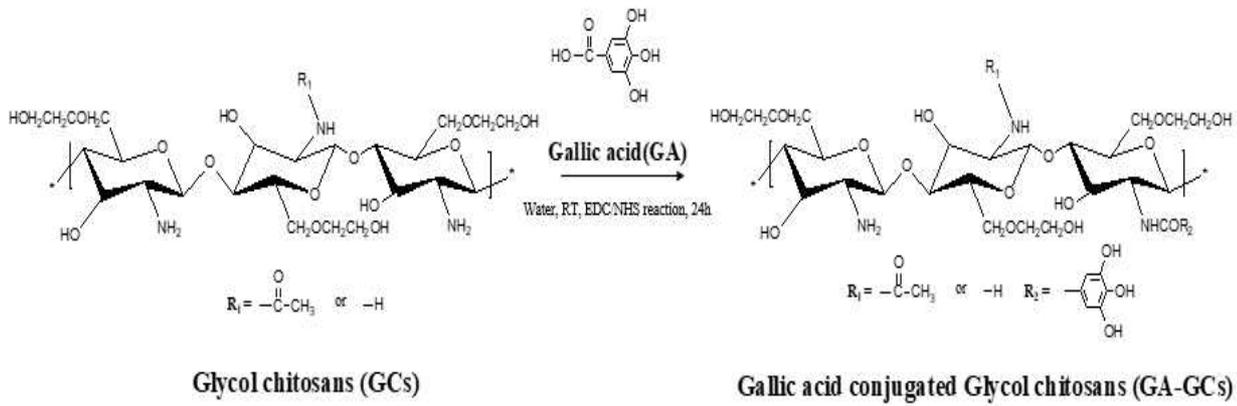


그림32. GA-GCs의 합성 과정과 사용한 고분자의 구조식

○ 실험에 사용한 동물은 Mice (15~20g)(n=5), non-vaccinated group (n=5)을 Challenge 균 주로는 *P. multocida* type A를 사용했으며 마우스에 0.2 ml씩 복강 접종한 다음 백신 접종 7 일 후에 대조군과 함께 *P. multocida* type A 100LD50/0.2ml을 복강에 공격 접종함. 이후 공격접종 후 10일간 경과를 지켜보며 생존율을 확인함.

Group	Antigen	Adjuvant	Dose	Mice No.	Note
Group 1	<i>P. multocida</i> type A (20억CFU/ml)	CM-chitosan	0.2ml/dose	5	2배희석
Group 2				5	5배희석
Group 3		CM-cellulose		5	2배희석
Group 4				5	5배희석
Group 5		CM-dextran		5	2배희석
Group 6				5	5배희석
Group 7		CM-chitosan-COOH		5	2배희석
Group 8				5	5배희석
Group 9		Glycol chitosan-gallic acid		5	2배희석
Group 10				5	5배희석
Group 11		-		5	1배원액
Group 12				5	2배희석
Group 13				5	5배희석
대조군	Non-vaccinated group		-	5	무접종군
				총	70 마리

Group	No.	Death number after inoculation for 10 days										Survival ¹⁾ rate (%)	Death ²⁾ rate (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Group 1	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 2	5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20%	80%
Group 3	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40%	60%
Group 4	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 5	5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20%	80%
Group 6	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 7	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 8	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 9	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 10	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 11	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 12	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
Group 13	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%
대조군	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	100%

¹⁾ Survival rate = 총 생존수/생존수 ²⁾ Death rate = 총 폐사수/생존수

그림33. Mice에 대한 신규 polymer 후보군의 효능평가 결과

○ 공격 접종 결과 대부분의 그룹에서 폐사하였으나, CM-chitosan, CM-cellulose, CM-dextran에서 생존율의 증가 및 폐사율의 감소를 보이고 있음. 백신 접종 후 항체 생성 기간이 짧고, 실험에 사용된 *P. multocida* type A 공격균주의 100LD₅₀ 농도가 높아 대조군마저 폐사율 100%가 나타났다는 가정하에 이런 생존율의 증가는 의미 있는 결과라고 사료되며, 실험에 사용된 조건들을 최적화하여 안정성을 높인다면 백신 효능의 증진 및 안전성이 개선된 신규 양돈용 백신 보조제 개발이 최종적으로 완성되리라 여겨짐.

연구결과 2. 개 인플루엔자 바이러스에서의 polymer adjuvant의 효능평가

1) 기니픽에서 CIV 백신의 면역원성 확인 시험

○ polymer 후보군의 세균 마우스 모델에서 효능평가가 기대에 미치지 못하였으나, 주관기관인 중앙백신연구소에서는 양돈 백신 뿐만 아니라 양계, 반려견 등의 다양한 축종에 대한 질병을 다루고 있어, polymer 후보군을 개 인플루엔자 바이러스 항원에 적용하여 효능평가를 진행하였음. 일반적으로 반려동물 개와 고양이 백신은 안전성이 우수해야 하므로 오일 기반의 백신보조제 보다는 안전성이 확보된 alum 또는 polymer 기반의 백신보조제를 사용하는 것으로 알려져 있음.

○ CIV (canine influenza virus) 백신의 기니픽에서의 면역원성 확인을 위하여 동물용 의약품 출하승인검정기준에 따라 시험을 실시함. 기니픽의 근육에 시험백신 1두분을 2주 간격 2회 근육접종하고 2차 접종 2주후에 접종군과 대조군을 각각 채혈하여 HI 항체가를 측정함.

Group	Adjuvant	Antigen	HA Unit	Exp. Animal	No. of animals
1	Montanide™ gel 01 5%	A/Canine/AS-11/ 2013(H3N2)	2 ⁶	Guinea pig	5
2	Glycol chitosan 1ml/ml		2 ⁶		5
3	Alum 5%		2 ⁶		5
4	Control		-		2

○ 시험결과 Alum은 면역유도능이 montanide gel 01과 glycol chitosan에 비하여 낮게 확인되었고, Group 1과 2 보조제는 통계학적 유의성이 있는 것으로 확인되어 기존에 상용화 되어 있는 Seppic사의 백신보조제를 대체하여 사용할 만한 것으로 판단함. 또한 접종부위 확인결과 백신접종에 의한 육아종 형성, 털 빠짐, 폐사 등은 관찰되지 않았음.

Group	Individual No.	HI titer (2WP2V)	GMT
Group 1 (2 ⁶ +Montanide™gel 01)	1	256	222
	2	256	
	3	512	
	4	128	
	5	128	
Group 2 (2 ⁶ +Glycol chitosan)	1	256	215
	2	128	
	3	256	
	4	256	
Group 3 (2 ⁶ +Alum)	1	64	90
	2	128	
	3	64	
	4	128	
대조군	1	<2	
	2	<2	

2) 개에서 CIV 백신의 면역원성 확인 시험

○ 기니픽 시험과 동일하게 목적동물인 개에서의 면역원성 확인을 위하여 백신 1두분을 근육 접종 후, 1차 접종 2주후 2차 접종, 2차 접종 2주후에 채혈하여 HI 항체가를 측정함.

Group	Vaccine	Exp. Animal	No. of animals	Remark
1	2 ⁶ +Montanide™gel 01	Conventional Dog	3	2nd vaccination after 2weeks post 1st vaccination (I.M. route)
2	2 ⁶ +Glycol chitosan		3	
3	2 ⁶ +Alum		3	Blood collection after 2weeks 1st and 2nd vaccination
4	Control		2	

○ 시험결과 백신보조제에 의한 면역반응을 HI 항체가로 비교했을 때 기니픽 결과와 다르게 montanide gel 01이 다른보조제에 비하여 좋지 않은 결과가 확인되었으며, Glycol chitosan은 Alum과 비슷한 면역반응이 확인되어 기니픽 결과와 개 결과를 종합하여 볼 때 개 인플루엔자 백신의 백신보조제로 Glycol chitosan이 적합한 것으로 판단됨.

Group (Adjuvant)	Individual No.	HI titer after vaccination and challenge		
		Before vaccination	2 WPV	2 WP2V
Group 1 (Montanide Gel 01)	1	8	128	32
	2	<2	4	8
	3	<2	4	32
GMT		2.0	12.7	20.2
Group 2 (Glycol chitosan)	4	<2	4	8
	5	4	256	64
	6	2	128	64
GMT		2.0	50.8	32.0
Group 3 (Alum 5%)	7	16	512	256
	8	2	4	8
	9	<2	16	32
GMT		3.2	32.0	40.3
Control	10	16	4	8
	11	<2	<2	<2
GMT		4.0	2.0	2.8

기관별 연구결과

연구기관	연구개발 성과	향후 활용 계획
중앙백신연구소	<ul style="list-style-type: none"> - Polymer type adjuvant 연구개발 - 양돈용 경구용 백신 적용 - 안전성 및 효능 평가를 통한 사업화 추진 	<ul style="list-style-type: none"> - 점막면역 및 경구용 백신영역의 활용 가능성 존재
중앙백신연구소 + 충남대학교	<ul style="list-style-type: none"> - Polymer type adjuvant 특성연구 - 반려동물 주사용 백신보조제 - 개인플루엔자 백신 적용, 사업화 진행중 	<ul style="list-style-type: none"> - 안전성이 우수하여, 개 및 고양이와 같은 반려동물 주사용 백신보조제로 적용, 활용 예정
서울대학교	<ul style="list-style-type: none"> - Nanoparticle adjuvant 연구개발 - 실험동물 모델을 통한 방어 면역 획득 및 기작연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 폐렴모델에서의 세포성, 체액성 방어기작 연구 - 목적동물 평가

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 정성적 기술개발 목표 및 평가방법

평가항목 (주요성능 Spec)	단위	비중 (%)	개발목표치	개발결과	평가방법	
백신보조제 Nanoparticle adjuvant	1. 점도	cp	10	<10	10 cP 이하	Brookfield 점도계
	2. pH	pH	10	6~8	pH 7	국가검정기준
	3. 성상	-	10	균일	균일	국가검정기준
	4. 크기	μm	10	<1	200nm	광산란법
	5. 안정성	Week	10	10	12 weeks	생물학제제 기준
멧돼지 경구백신	6. 점도	cp	10	<10	35cP	생물학제제 기준
	7. 안정성 (stability)	Month	10	12	12개월	국가검정기준
	8. 안전성 (safety)	적합	10	실험/목적동물 이상무	목적동물 돼지에서의 안전성 확인	국가검정기준
	9. 효능 (efficacy)	%	10	효력확인	목적동물 돼지에서의 중화항체가 확인	국가검정기준
10. 시제품 생산	dose	10	3 LOT 생산	정규 랫트 10 랫트 이상 생산	제조기록서	

비오일성 백신보조제 개발된 polymer는 멧돼지 경구용 백신에 활용되어 인허가를 취득하였으며, 신규 수용성 저점도 nanoparticle adjuvant이 개발되어 점막면역에 대한 효능 및 안전성 연구를 진행하였다.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건				
가중치	20	20	30	30																
최종목표	1	1	2	1		2			2			5								
1차년도 목표																				
1차년도 실적												1		4						
2차년도 목표	1											1								
2차년도 실적	1											1								
3차년도 목표		1	2 ¹⁾	1								2								
3차년도 실적		1	2	1		1						2								
소 계	1	1	2	1		0	0					3		0						
실적	1	1	2	1		1	751					4		4						
달성율 (%)	100	100	100	100		100	100					100		100						
종료 1차년도																				
종료 2차년도									1			1								
종료 3차년도						1	100		1											
종료 4차년도						1	250													
종료 5차년도												1								
소 계						2	350		2			2								
합 계	1	1	2	1		2	350		2			5								

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재 4건

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/ 비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	The Role of Nanovaccine in Cross-Presentation of Antigen-Presenting Cells for the Activation of CD8+ T Cell Responses	pharmaceutics	Cheol Gyun Kim, Yoon-Chul Kye, Cheol-Heui Yun	11			SCIE	2019.11.15	1999-4923	
2	Bacillus subtilis spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens	Veterinary research	Ji Eun Lee, Yoon-Chul Kye, Sung-Mo Park, Sungsik Yoo, Cheol-Heui Yun	51			SCIE	2020.05.24	1297-9716	
3	Immunosecurity: immunomodulants enhance immune responses in chickens	Animal Bioscience	Keesun Yu, Inhwan Choi, Cheol-Heui Yun	34			SCIE	2021.03.	2765-0235	
4	Intranasal Vaccination with Outer Membrane Protein of Orientia tsutsugamushi induces Protective Immunity Against Scrub Typhus	Immune network	Sung-Mo Park, Min Jeong Gu, Young-Jun Ju, Young Min Son, Woonhee Jeung, Cheol-Heui Yun	e14			SCIE	2021.04	2092-6685	

국내 및 국제 학술회의 발표 4건

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	KAI 대한면역학회	Yoon-Chul Kye	2019.10.30	세종대 컨벤션센터	대한민국
2	KAI 대한면역학회	Keesun Yu	2019.10.30	세종대 컨벤션센터	대한민국
3	KAI 대한면역학회	Min Jeong Gu	2019.10.30	세종대 컨벤션센터	대한민국
4	IUIS 2019 (European Journal of Immunology)	Cheol Gyun Kim	2019.10.21	베이징	중국

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램) 4건

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	동물용 미끼백신 및 이의 제조방법	대한민국	중앙백신	2020.09 .03	제10-2020-01126 25호				100	
2	CAvant PA	대한민국	중앙백신	2021.12 .09	제40-2021-02506 57호				100	
3	수이샷 돼지열병 생마커 미끼백신	대한민국	중앙백신	2021.12 .09	제40-2021-02506 61호				100	
4	글리콜 키토산 유도체를 포함하는 애주번트 조성물	대한민국	중앙백신 충남대	2018.11 .12	제10-2018-01377 88호	중앙백신 충남대	2022.01. 21	제10-235 5774호	100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√									

[경제적 성과]

□ 사업화 현황 1건

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	수이샷 돼지열병 생마커 미끼백신 사업화	야생 멧돼지의 돼지열병 을 예방할 목적으로 개발된 제품	중앙백신 연구소	751,669		2021	

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적) 1건

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
수이샷 돼지열병 생마커 미끼백신 사업화	2020	751,669		751,669	동물약품협회 신고자료 (2021.01~11)
합계					

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ Biocompatible polymer 후보군 확보	○ 특히, 논문 등을 통한 문헌 조사와 주관 및 협동기관에서 연구중인 생체적합성 물질 후보군을 확보함.	100
○ Biocompatible polymer 후보군의 실험동물에서의 평가	○ 돼지 마이크로프라즈마성 폐렴을 일으키는 MHP 세균항원과 혼합하여 polymer 후보군을 실험동물 모델에서 효능평가함. ○ 접종경로(근육 vs.비강접종)에 따른 마우스 모델에서의 효능평가를 실시함	100
○ 양돈용 경구백신의 안전성 및 유효성 평가	○ 경구용 백신개발을 위한 후보물질 탐색 ○ 백신보조제 및 항원결정 시험 ○ 백신보조제 및 항원 제제화 평가 ○ 돼지열병 경구백신의 안전시험 ○ 돼지열병 경구백신의 효능시험	100
○ 신규 개발된 백신보조제의 양돈용 핵심질병(돼지열병, Classical Swine Fever Virus)과의 혼합백신 제제화에 따른 안정성 평가	○ 제작한 시험백신의 장기보관 안정성(Stability) 평가 ○ 보관온도 조건별 백신의 안정성 평가	100
○ 신규 개발된 백신보조제가 포함된 돼지열병 미끼 백신의 안전성 및 유효성 평가	○ 일반돼지 및 멧돼지에 대해 5일간 매일 2개씩 경구 급이를 통한 안전성 평가	100
○ 신규 개발된 백신보조제가 포함된 돼지열병 미끼 백신의 임상시험	○ 임상농장(돼지)에서의 안전성 평가 ○ 임상농장(돼지)에서의 효능평가	100
○ 최종개발된 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 산업화 방안 연구	○ 백신보조제가 포함된 양돈용 백신의 품목허가 취득 ○ 백신보조제의 pilot scale up 생산조건 확립 ○ 백신 시제품 생산	100
○ 수용성 저점도 비오일성 nanoparticle adjuvant 연구	○ 수용성 저점도 비오일성 nanoparticle인 Polysorbitol transporter(PST) 합성 및 안정성 시험	100
○ 신규 비오일성 nanoparticle adjuvant 효능연구	○ 모델 항원(OVA)를 이용한 particle 형성 시험 ○ 모델 항원(OVA)를 이용한 수지상세포 모델에서의 세포독성 시험	100
○ 비오일성 nanoparticle adjuvant의 점막면역 효능개선 연구	○ 폐렴구균 표면 단백질 A 항원(PspA)를 이용한 particle 형성 시험 ○ 폐렴 감염 모델에서의 PST의 비강백신의 효능 시험	100
○ 비오일성 nanoparticle adjuvant의 효능 및 안전성 연구	○ 대식세포 및 수지상세포를 이용한 adjuvanticity 비교 ○ 대식세포 및 수지상세포에서의 항원제시능력 평가	100

○ 바이오일성 nanoparticle adjuvant의 신규항원(MHP)과의 적용을 통한 방어면역 규명 연구	○ Nanoparticle ajuvant의 신규항원 (MHP)과의 particle 형성 및 안정성 확인	100
○ 비강백신 투여 적용에 따른 점막 면역 활성화(세포성면역, 체액성면역) 비교 연구	○ 선천성면역세포 및 T 세포 분석을 통한 세포성 면역 분석 ○ 혈액 내 항원 특이적 항체 측정 및 B 세포의 활성화 분석을 통한 체액성 면역 분석	100
○ 신규 polymer adjuvant 개발 과정 확립	○ adjuvant의 조건에 적합한고분자 물질 문헌 조사 ○ FT-IR과 NMR을 이용한 기능성 치환기 분석	100
○ 신규 polymer adjuvant 물리화학적 및 생리학적 특성규명	○ DLS를 이용한 나노입자 형성 분석을 이용한 물리학적 물성 조사 ○ 농도에 따른 pH분석을 이용한 화학적 물성분석 조사	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

1) 기술적 측면

- 백신보조제 및 면역증강제의 연구 및 개발로 관련 생물학 분야 연구 증대
- 독자적인 국내 기술로 백신보조제 개발로 백신 보조제 수입대체 효과
- 원천 기술로 관련된 백신 및 백신보조제 연구개발에 플랫폼 기술로 활용
- 본 연구를 통하여 양돈에 적합한 폴리머 백신보조제를 발굴하여 기존 동물용 백신 보조제의 단점을 극복하고, 경구 투여를 통한 점막면역을 유도할 수 있는 제형 개발에 성공하여 차세대 동물용 백신 연구의 활성화에 기여할 것으로 판단됨.
- 신규 개발된 백신보조제는 돼지열병 바이러스 백신에만 국한되지 않고, 양돈용 백신의 백신 보조제로 활용가능할 수 있도록 다양한 양돈 질병 백신에서의 효능성, 안전성 및 안정성을 분석할 예정임.
- 신규 개발된 백신보조제를 포함하는 백신의 지식재산권 확보를 통해 국내 동물백신 산업 시장 확대 및 해외 수출로 활용될 수 있음.

2) 경제적·산업적 측면

- 경제적 측면에서는 사업화 추진에 성공하여 폴리머 백신보조제를 포함하는 양돈용 돼지열병 생마커 미끼백신 품목허가를 취득하였음. 국내 최초 멧돼지용 백신 개발에 성공하였으며 이를 통해 국내 야생 멧돼지에서 돼지열병 근절에 기여할 것으로 기대함.
 - 당 소는 동물용의약품 GMP 제조시설을 보유하고 있어 폴리머 백신보조제의 scale up 생산 조건을 확립하여 현재 자체 생산 및 대량생산이 가능해짐에 따라 원가절감 효과가 있음.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1) 본 연구팀의 연구개발 정량성과

성과지표명	세부항목	연구성과
백신보조제	1종 개발	<ul style="list-style-type: none"> 양돈용에 적합한 비오일성 백신보조제 개발 폴리머 기반의 차별화된 백신보조제
지식 재산권	국내 특허 출원 1건	<ul style="list-style-type: none"> 신규 개발한 폴리머가 포함된 백신 개발관련 신규 개발한 백신보조제 개발 관련
	국내 특허 등록 1건	
	상표 등록 2건	<ul style="list-style-type: none"> 신규 백신보조제 제품명 상표권 출원 신규 백신보조제가 포함된 백신 제품명 상표권 출원
기술실시	기술실시 1건	<ul style="list-style-type: none"> 양돈용 경구백신에 적합한 백신보조제 개발
논문	SCI급 4건	<ul style="list-style-type: none"> 비오일성, 폴리머 기반의 백신보조제의 면역기작 규명 관련 논문
학술발표	학술발표 4건	
사업화	제품화 1건	<ul style="list-style-type: none"> 신규 백신보조제가 포함된 백신 품목허가 취득 완료 사업화 성공에 따른 매출액 발생

2) 연구개발 종료 후 5년 이내

성과지표명	목표 기간	목표치
사업화 (매출액)	종료 1차년도	800,000 천원
	종료 2차년도	1,000,000 천원
	종료 3차년도	1,000,000 천원
	종료 4차년도	1,200,000 천원
	종료 5차년도	1,500,000 천원
제품화	종료 1차년도	-
	종료 2차년도	-
	종료 3차년도	1
	종료 4차년도	1
	종료 5차년도	-
고용창출	종료 1차년도	-
	종료 2차년도	1
	종료 3차년도	1
	종료 4차년도	-
	종료 5차년도	-

멧돼지용 돼지열병 미끼백신 사업화 성공으로 인하여 연구개발 종료 이후에도 지속적인 매출 창출이 가능할 것으로 기대함.

또한 본 과제를 통해 연구개발한 nanoparticle PST, polymer 의 양돈용 바이러스에 적용을 통하여 제품화 개발 가능성이 있음.

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구성과 증빙자료
2.	1)
	2)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업 “생분해성 물질기반 양돈용 범용 비오일성 백신 adjuvant 개발” 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림수산식품기술기획평가원)에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.