

319082-03

해외 주요 구제역 혈청형 백신 생산 기술 개발

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

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

발간등록번호

11-1543000-004108-01

해외 주요 혈청형 바이러스 유입에 대응한 구제역 백신 생산 기술 개발

2022.09.26

주관연구기관 / (주) 파로스백신
공동연구기관 / (주) 씨티씨백

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

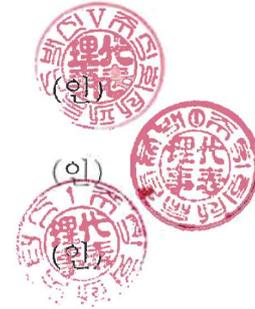
본 보고서를 “해외 주요 혈청형 바이러스 유입에 대응한 구제역 백신 생산 기술 개발”(개발기간 : 2019.05.27 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 09. 26.

주관연구기관명 : (주)파로스백신

공동연구기관명 : (주)씨티씨백

위탁연구기관명 : (주)노터스



주관연구책임자 : 문상범

공동연구책임자 : 오성창

위탁기관책임자 : 고현규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[v], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		가축질병대응기술개발사업		
전문기관명		농림식품기술기획평가원			내역사업명						
공고번호					총괄연구개발 식별번호						
					연구개발과제번호		319082-03				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	100%	2순위	소분류 코드명	%	3순위	소분류 코드명	%		
	농림식품과학기술 분류	RB0201	100%	2순위	소분류 코드명	%	3순위	소분류 코드명	%		
총괄연구개발명		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		해외 주요 혈청형 바이러스 유입에 대응한 구제역 백신 생산 기술 개발							
		영문		Development of the recombinant protein vaccine production system against inflow of the foreign major serotype virus							
주관연구개발기관		기관명		주식회사 파로스백신			사업자등록번호		120-87-66724		
		주소		(13201)경기도 성남시 중원구 갈마치로 288번길 14, 1311호			법인등록번호		110111-4576009		
연구책임자		성명		문상범			직위		이사		
		연락처		직장전화		휴대전화		-			
				전자우편		국가연구자번호		-			
연구개발기간		전체		2019. 05. 27 - 2021. 12. 31(2년 8개월)							
		단계		1단계		2019. 05. 27 - 2021. 12. 31(2년 8개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금	
		현금		현금		현물		합계			
		현금		현금		현물		현금		현물	
총계		590,000		45,000		405,000		635,000		405,000	
1단계		1년차		150,000		15,000		135,000		165,000	
		2년차		220,000		15,000		135,000		235,000	
		3년차		220,000		15,000		135,000		235,000	
공동연구개발기관 등		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		공동연구개발기관		㈜파로스백신		문상범		이사		비고	
				㈜씨티씨백		오성창		이사		역할	
		위탁연구개발기관		㈜노터스		고현규		이사		기관유형	
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자		성명		김영훈			직위		책임연구원		
실무담당자		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 9월 26일

연구책임자: 문 상 범

주관연구개발기관의 장: 전 철 민

공동연구개발기관의 장: 성 기 흥

위탁연구개발기관의 장: 김 도 형

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호		319082-03
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	100%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	100%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		가축질병대응기술개발사업					
연구개발과제명		해외 주요 혈청형 바이러스 유입에 대응한 구제역 백신 생산 기술 개발					
전체 연구개발기간		2019.05.27 - 2021.12.31					
총 연구개발비		총 1,040,000 천원 (정부지원연구개발비: 590,000천원, 기관부담연구개발비: 450,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(4) 종료시점 목표(6)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							

연구개발 목표 및 내용	최종 목표		주변국 발생 구제역 바이러스 혈청형에 신속대응이 가능한 재조합 단백질 기반의 구제역백신 개발 및 생산 시스템 구축				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> -주변국 발생 구제역 바이러스 유전자 데이터베이스 구축 -주요 주변국 발생 구제역 바이러스 혈청형 대응 재조합 단백질 항원 생산 균주 및 항혈청 은행 구축 -대장균 기반의 신속 항원 설계, 클로닝, 안정성/유효성 평가, 대량 생산 기술 확보 				
	1년차 (해당 시 작성)	목표	<ul style="list-style-type: none"> -재조합 단백질 항원의 구조 최적화 개발 및 주변국 발생 구제역 바이러스 적용 최적화 재조합 단백질 항원 개발 -재조합 단백질 항원 생산의 극대화를 위한 배양법 및 정제법 탐색 연구 				
		내용	<ul style="list-style-type: none"> -2017년 이후 2019년 주변국 발생 구제역 바이러스 유전자 정보 조사 및 적용 재조합 단백질 항원 적용 epitope 설계 -주변국 발생 구제역 바이러스 주요 혈청형 대응 재조합 단백질 항원 후보 개발 및 효능 비교 -재조합 단백질 항원 생산 증대를 위한 배양조건 및 정제방법 비교 				
	2년차 (해당 시 작성)	목표	<ul style="list-style-type: none"> -주변국 발생 구제역 바이러스 대응 재조합 단백질 항원의 추가 개발 및 목적 동물의 효능시험, 중화항체 시험 -재조합 단백질 백신 공정 최적화 및 대량생산시스템 개발 				
		내용	<ul style="list-style-type: none"> -주변국 발생 구제역 바이러스 유전자형 조사 및 적용 후보 항원 추가 설계 및 시험 백신의 제조 -재조합 단백질 후보 항원에 따른 다양한 배양 및 정제 조건 비교 -후보 백신의 실험동물 및 목적 동물에 대한 효능시험 -항혈청을 이용한 백신의 평가(효능, 안전, 안정성 등) -대량생산을 위한 고농도 대장균배양 기술 개발 -고순도의 정제공정 기술 개발 -각 생산단계별 규모에 따른 개발기술의 적용 				
	3년차 (해당 시 작성)	목표	<ul style="list-style-type: none"> -주변국 발생 구제역 바이러스 유전정보 최종문서 확보 -최적 대응 재조합 단백질 생산 균주 및 항혈청 확보 -구제역 재조합 단백질 백신 대량생산공정 구축 및 경제성 평가 				
		내	-2017년 이후 발생된 구제역 바이러스 유전자 정보 갱신				

		용	<ul style="list-style-type: none"> -신속한 균주개발 및 대량생산 기술자료 확보 -대량생산공정 비교 및 검증 -최적 구제역 재조합 단백질 백신의 목적 동물 효능시험 및 공격접종 시험 -항혈청을 이용한 항체 형성능 및 중화능 평가 및 기준설정 -주변국 발생 구제역 대응 재조합 단백질 백신의 제조판매를 위한 서류 준비
--	--	---	--

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> -각 연차에 해당하는 과제 결과를 이용하여 관련 학회지에 논문 기재(총 2편) -재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물, 구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 제조방법 및 정제법(특허출원 2건) -해외 주변국 유입으로 발생 가능하거나 이와 유사한 국내 기 발생 구제역에 대응 할 수 있는 구제역 백신의 개발 -재조합 단백질 구제역백신의 대량생산을 위한 공정 확립 -재조합 단백질 구제역백신의 평가 기준 확립
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> -다양한 구제역 바이러스에 방어력을 가지는 구제역백신으로 국외 유입 및 국내 번이 발생 바이러스에 대응 가능 수단 확보 -구제역백신의 국산화 및 상시 백신으로 활용하여 구제역 관리 및 방역체계의 공고화 -번이 바이러스의 유전정보를 이용한 백신의 신속한 개발 및 생산으로 조기 대처 가능 -다양한 구제역 바이러스 지역형에 대한 백신 개발로 주변국 수출 및 국내 동물약품산업의 국제화 -재조합 단백질 백신 플랫폼으로 다양한 바이러스성 질병 백신에 응용
---------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신제품	
								생명정보	생물자원		정보	실물
	2	2	1					1				
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	구제역 바이러스	백신	재조합 항원	지역형 바이러스	다가항원							
영문핵심어 (5개 이내)	Foot and mouth disease virus	Vaccine	Recombinant antigen	topotype virus	Polyvalent antigen							

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1. 연구개발과제의 개요

구제역(Foot and mouth disease)은 소, 돼지, 양, 염소, 사슴 및 야생 반추류 등과 같이 발굽이 둘로 갈라진 우제류 동물에서 체온이 급격히 상승하고 거품 섞인 침흘림, 입, 혀, 발굽 또는 젖꼭지 등에 물집, 가피, 궤양 등이 나타나며, 식욕이 저하되어 심하게 앓거나 죽게 되는 전파력이 매우 강한 전염병으로, 우리나라에서는 가축전염병 예방법상 제1종 가축전염병, 세계동물보건기구(OIE)에서 발생시 OIE에 필수보고 및 관리대상질병(List A)으로 분류·지정하고 있으며 축산물 국제교역에서 동등성의 원칙에 따라 수출입 제한 대상이 되는 질병임.

구제역 바이러스는 7개의 혈청형(A, O, C Asia1, SAT1, SAT2 및 SAT3)이 있는데, 우리나라 및 동남아시아 지역이 속하는 Pool1, Pool2에서는 주로 3개의 혈청형(A, O, Asia1)이 발병하고 있음. 또한 구제역 바이러스의 VP1 단백질에 해당하는 유전자(약639bps) 부위의 염기서열 유사도가 상호간에 대략 85% 이상인 경우 하나의 분류를 형성하는데 이 분류는 지역성을 나타내어 지역형(topotype)으로 불리고 있으며 동남아시아 주변국에서는 하나의 혈청형 안에서도 여러 개의 지역형이 혼재되어 발병하고 있음. 혈청형이 다른 바이러스 간에는 혈청학적으로 중화가 되지 않고 백신에 의한 방어가 되지 않으며 지역형간 바이러스에 따라 백신의 방어율이 다르게 나타나고 있음.

우리나라는 2010년 전국적인 발생 이후 고역가의 구제역 바이러스 불활화백신 접종을 의무화하여 근절에 노력하고 있음에도 가축 질병 피해액은 지난 10년간 2조 1,378억원 규모임. 2014년 청정국 지위를 2달간 유지하고, 이후 매년 구제역이 발생하고 있음. 14년 이후 국내에서 발생한 6차례 구제역 중 4차례가 겨울철에 발생('14.12.23~'15.4.28, '16.1.11~3.29, '17.2.5~2~13, '19.1.28~1.31.) 하였기에 매년 11~12월에 정부 관리 아래 전국 단위의 일제 접종을 실시하고 있음에도 2020년 1월에는 강화군에서 감염 항체(비구조단백질, NSP)가 다수 검출되었는데, NSP 검출은 구제역 바이러스에 감염된 적이 있었음을 의미함. 현재 국내 사용백신 제조과정에서는 백신 불활화 과정 후에 NSP 항체를 제거하므로 해당 농장에서 과거 구제역 발병 이력이 없음을 고려하면 임상 증상이 없거나 매우 미약한 상태로 구제역 바이러스에 노출되었음을 말해주고 있음. 방역 당국이 구제역 발생 원인을 해외에서 바이러스가 유입된 이후 다양한 경로를 통해 전국적으로 확산된 것으로 추정하고 있는 상황에서 정기 바이러스 순환검사(반기별) 결과로 볼 때, 2021년 10월 기준으로 경기도 안성시(소 74두), 충청남도 홍성군(소 37두)에 NSP 항체 양성 개체가 남아 있는 것으로 예찰되고 있어 구제역 바이러스가 인후두 등에 잔존하여 지속적으로 개체 간 노출되며 순환 감염되는 것으로 예상됨. 방역 당국은 공식 구제역 발병은 인정하지 않으나(정책적 미발생) 이는 구제역 바이러스가 상존하며 번이될 가능성이 높아짐을 의미함.

외부적으로 중국의 경우 2005년 이전에는 구제역 발생 시 OIE에 공식보고를 하지 않았으나, 2006년부터 공식 발생 보고를 하고 있으며, 2021년 12월 기준으로 중국 내 구제역은 확산 추세에 있으며 3가지 혈청형(O, A, Asia1형)이 모두 발생하고 있음.

2009년 A형(A/HuNWH/CHA/2009)의 새로운 유입은 동남아시아에서 동물 구입 시 유입된 것으로 추정되고 있으며, 최근 중국의 구제역 발생건수 증가와 전국적 발생상황으로 볼 때, 인적·물적 교류가 많은 우리나라로 유입될 가능성은 항상 존재함. 일본의 경우, 수입건초 등에 의해 중국, 한국 등의 바이러스와 유사한 지역형(SEA형)이 발병이 확인되어 확산차단을 위한 방역정책이 강화되기도 하였음. 최인접국가인 북한은 2007년 중국으로부터 감염된 가축을 반입하여 Asia1형의 감염이 보고된 이후, 2008년 이후부터 현재까지 발생이 보고되지 않아 바이러스 유입 가능성을 측정할 수조차 없음. 대만은 2009년에 동아시아에서 유행하는 바이러스가 아닌 Cathay지역형의 발병이 확인되었고, 몽골, 러시아, 중국의 접경지역에서 Asia1 혈청형의 발생이 보고되는 등 여러 국가의 발병 위험성이 나날이 증가하고 있음.

표1. 국내 구제역 발생 현황

구분	2000년	2002년	2010년			2014년	2014~15년
			'10.1월 (포천)	'10.4월 (강화)	'10/'11 (안동)		
발생	3.24~4.15 (23일간)	5.2~6.23 (53일간)	1.2~1.29 (28일간)	4.8~5.6 (29일간)	'10.11.28~'114.21 (145일간)	7.23~8.6 (15일간)	12.3~4.28 (147일간)
	15건 (소15)	16건 (소1, 돼지15)	6건 (소6)	11건 (소7, 돼지4)	153건 (소97, 돼지55, 염소1)	3건 (돼지3)	185건 (돼지180, 소5)
	3개도 6개 시·군	2개도 4개 시·군	1개도 2개 시·군	4개 시·도, 4개 시·군	11개 시·도, 75개 시·군	2개도 3개 시·군	7개 시·도, 33개 시·군
	경기 파주·화성·용인, 충남 홍성·보령, 충북 충주	경기 안성·용인·평택 충북 진천	경기 포천·연천	인천 강화, 경기 김포, 충북 충주, 충남 청양	부산1, 대구1, 인천 3, 울산1, 대전1, 경 기19, 강원13, 충북 8, 충남10, 경북16, 경남2	경북 의성·고령, 경남 합천	인천2, 세종2, 경기 56, 강원11, 충북 36, 충남70, 경북8
발생 형	O형 (PanAsia)	O형 (PanAsia)	A형 (A/Asia/Sea-97)	O형 (SEA)	O형 (SEA)	O형 (SEA)	O형 (SEA)
구분	2016년	2017년		2018년	2019년	2020년	2021년
발생	1.11~3.29 (68일간)	2.5~13 (9일간)	2.8	3.26~4.1 (7일간)	1.28~31 (4일간)	1.10	07.26
	21건(돼지)	8건(소)	1건(소)	2건(돼지)	2건(소)	11건(소)	1건(소)
	2개 도, 6개 시·군	2개 도, 2개 시·군	1개 도, 1개 군	1개 도, 1개 시·군	2개 도, 2개 시·군	1개 도·1개 군	1개 도·1개 군
	김제1, 고창1, 공주 2, 천안1, 논산14, 홍성2	충북 보은, 전북 정읍	경기 연천	김포2	안성2, 충주1	강화1	홍성1
발생 형	O형 (SEA)	O형 (O/MESA/InD2001e)	A형 (A/Asia/Sea-97)	A형 (A/Asia/Sea-97)	O형 (O/MESA/InD2001e)	NSP검출, 무증상 공식발병(X)	NSP검출, 무증상 공식발병(X)

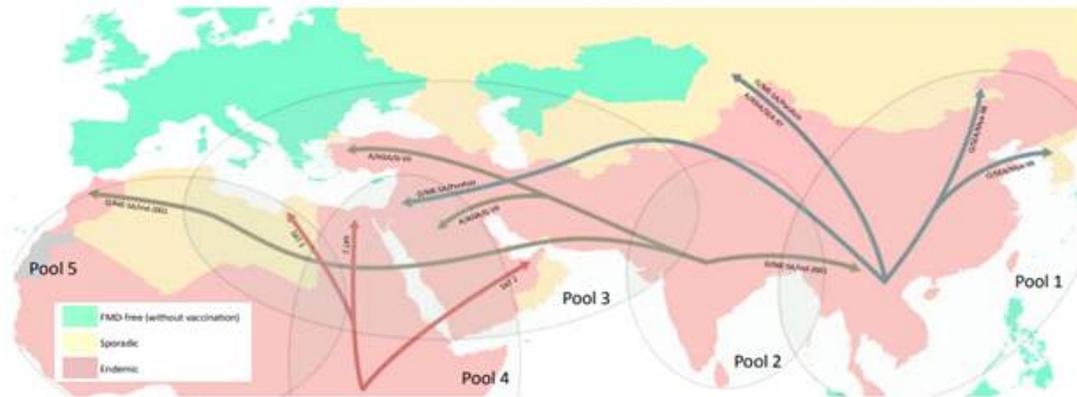


그림1. Asia, Africa 지역 내에서의 FMD의 이동(2009-2016)(OIE/FAO Foot and mouth Disease reference Laboratory Network, Annual Report 2016)

실제로 국내 구제역의 발생은 밀접국가의 구제역 역학 상황과 매우 밀접하게 연관되어 있는데, 동아시아에서 분리된 구제역 바이러스의 유전적 상관관계를 분석하면, 2000년 이래 국내 구제역과 인접한 동아시아 국가들이 통계적으로 양의 상관관계(positive, 비례)를 가지는 것으로 확인되고 있음. 1999~2000년 중국, 대만, 일본, 태국에서 발생한 균주와 2000~2002년 국내 발생 구제역 균주는 PanAsia 균주로 매우 높은 유전적 상관성이 있었으며, 2010년 러시아, 중국, 홍콩, 베트남 등지에서 분리된 균주와 2010년 국내 최악의 구제역 사태를 일으킨 O형 균주로 유전적 연관성이 매우 높았음. 유전자 상동성만으로 바이러스의 유입경로나 발생 예상지역을 단정할 수는 없지만, 국제교역 규모가 확대되고 인적 물적 교류가 급증하는 상황에서 구제역 발생원인을 유추해 볼 때 인접 국가의 역학적 상황을 고려해야 할 필요성이 있음.

2018년 농림축산검역본부 구제역백신 연구센터가 발표한 “구제역 국내 상시 백신 선정을 위한 평가 기준”에 의하면 주변국 발생 바이러스 중 중점 평가대상 바이러스(최근 2분기 내 발생 바이러스)와 추가 평가 대상 바이러스(3년 내 발생 바이러스)에 대한 매칭을 요구하여 방역 당국에서 주변국으로부터의 유입을 대비하고자 하였으나, 2020년 개정되어 최근 국내 발생 바이러스에 대한 매칭 및 공격접종시험 만을 인정하는 것으로 변경 되었음. 이는 기 발생 구제역 바이러스에

적합성을 가지는 백신주만을 사용할 수 있도록 하고 있는데, 주변국의 구제역 상황을 파악하여 유입 가능성이 높은 균주에 대한 선제적인 백신 항원을 선정하고 백신을 개발하여 능동적인 대처하는 본래의 백신의 개념과는 방향성이 달라 위험요인이 증가할 가능성이 있음. 또한 국내에서 사용중인 구제역백신은 모두 수입 백신으로 2010년 수입을 시작한 후, 2015년 수입 구제역백신(O1 Manisa)과 국내 발병 구제역 바이러스(O/SKR/2014)의 면역학적 상관성(r-value)이 낮아 백신 접종 후에도 구제역이 대규모로 발생하여 경제적 손실을 입게 된 후에야 수입 백신주를 혼합백신(O1 Manisa+O 3039)로 교체한 바가 있음. 2016년부터 백신의 수입선을 다변화하여 3종의 수입백신(영국 베링거인겔하임 백신(SVC), 러시아 아리아백(동방), 아르헨티나 아토젠 올레오(케어사이드))을 상시 백신으로 사용하고 있음. 각각의 수입 백신은 국내 발생주와 유사한 해외 백신주의 혼합으로 구성되어 있으나 다른 지역형 바이러스에 방어 여부를 확신할 수 없으며, 백신 균주개발에 긴 시간이 소요되어 백신주 변경이 어렵고 수급이 자유롭지 못함. 농가의 모체이행항체, 외부요인(ASF 등)으로 인한 출하지연, 면역력을 저하시키는 다른 질병의 발생 등을 고려하지 않은 일괄적인 접종정책, 각 백신주의 종류에 상관없이 수입 사용되고 있는 단일 항체검사용 키트와 이를 고려하지 않은 강화된 과태료 규정 등으로 농가의 어려움은 커져만 가고 있음.

표2. 구제역 상시백신 선정을 위한 적합성 평가 기준

구분	기존 평가 기준(2018)	개정 평가 기준(2020.01 개정)
적합성 평가 실험법	백신 매칭, 공격접종, 중화시험결과 등 매년 제출	1.농림축산검역본부 자체 매칭 결과로 평가 2.농림축산검역본부 자체 실험결과 비매칭일 경우 공격접종 결과 제출시 적합함으로 인정
평가대상 바이러스	최근 국내·외 발생 바이러스(pool1 & 2)	최근 발생 국내 발생 바이러스
적합기준	필수 항목 60% 적합	최근 발생 바이러스와 매칭 성립 또는 공격 접종 실험에서 방어

표3. 구제역 백신 전문가 협의회에서 지정한 구제역 바이러스(2020년 1월 기준)

구분	O형 백신	A형 백신
시험대상 바이러스	-안성주(2019) -보은주(2017) 또는 정읍주(2017) -김제주(2016) 또는 고창주(2016) -진천주(2014) -안동주(2010) 총5종	-김포주(2018) -연천주(2017) -포천주(2010) 총 3종
적합기준	-5종 중 3종과 매칭 성립 또는 공격접종 시 방어 -안성주와 공격 접종 시 방어	-3종 중 2종과 매칭 성립 또는 공격 접종 시 방어 -김포주와 공격 접종 시 방어

표 4. 국내 구제역 발생현황에 따른 수입구제역 백신주의 변화

시기	주요 내용	축종	
		돼지	소
2010.12.~2011.08.	단가 백신(12월 소, 1월 돼지 접종)	O1 Manisa	
2011.09.~2011.12.	3가 혼합백신(아시아 유형 반영)	O1 Manisa, A22 Iraq, Asia1 Shamir	
2012.01.이후	3가 혼합백신(돼지 1회 접종 조정)	O1 Manisa, A Malaysia, Asia1 Shamir	
2014.05.	백신 접종 구제역 비발생국가 인정		
2014.07.~08.	의령, 고성, 합천 발병(O형)		
2014.12.~2015.04	진천 등 33개 시군 발병(O형)		

2015.03.~2015.12.	돼지와 소 백신 종류 분리	O1 Manisa, O 3039	O1 Manisa, A22 Iraq, Asia1 Shamir
2016.01.~03.	김제 등 6개 시군 발병(O형)		O1 Manisa,
2016.01	소 2가 혼합백신		O3039, A22 Iraq
2016.10.이후	O형 단가 백신 추가(돼지)	O1 Manisa, O 3039, O Campos, O Primorsky	O1 Manisa, O3039, A22 Iraq
2016.11.~2017.01.	O형 단가 백신 추가(돼지)	O1 Manisa, O 3039, O Primorsky, O Campos	O1 Manisa, O 3039, A22 Iraq, O Primorsky, A Zabaikalsky
2017.02~2018.09	보은, 정읍(O형), 연천(A형)	O1 Manisa, O 3039, O Primorsky, O Campos	O1 Manisa, O 3039, O Primorsky, O Campos, A22 Iraq(소-->연천 중심 우제류)
2018.10.~2019.05		O1 Manisa, O 3039, A22 Iraq, O Primorsky, A Zabaikalsky	
2019.06~현재		O1 Manisa, O 3039, A22 Iraq, O Primorsky, A Zabaikalsky O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001 Argentina	

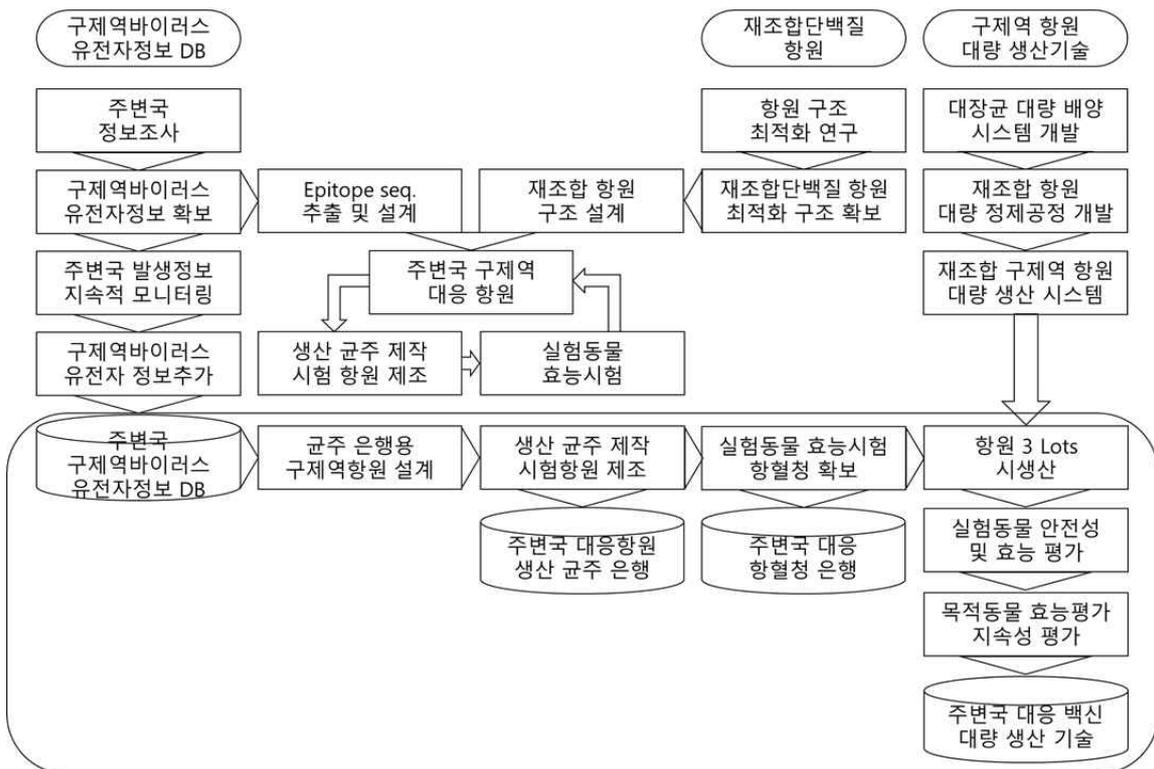


그림2. 연구개발 개념도

본 연구개발과제에서는 현행 시스템상에서 발생할 수 있는 문제점과 수입 구제역백신의 한계를 극복하기 위해, 해외 유입 구제역 바이러스에 대해 선제적이며 신속한 대응을 위한 제조합 단백

질 기반의 구제역백신과 그 생산 기술을 개발하고자 함. 구체적으로 본 과제에서는 국내 유입 가능성이 높은 구제역 바이러스 혈청형, 지역형 및 변이주를 조사하고, 이에 대응할 수 있는 epitope을 적용하고 면역력 강화를 위해 운반 단백질(carrier protein) 부분을 개선한 항원을 설계하고 효능을 평가하여 새로운 변이주 출현에 신속 대응할 수 있는 백신을 개발했으며, 재조합 단백질 대량생산 기술을 확립하여 이를 기반으로 한 백신생산체계를 구축하였음. 그 과정에서 확보된 주변국 발생 구제역 바이러스 데이터베이스와 이를 방어할 수 있는 구제역 재조합 단백질의 신속개발 기술, 대량생산을 위한 공정기술 등을 활용하여 향후 구제역 대응체계로 발전할 수 있기를 기대함.

2. 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용

2.1. 선행연구

본 연구개발과제의 주관기관 (주)파로스백신은 구제역 바이러스 O혈청형과 A혈청형을 동시에 방어할 수 있는 구제역 재조합 단백질 백신 기술을 개발하고 해당 기술을 사용한 구제역백신에 대한 품목허가를 득하였음. 개발된 기술은 특이 면역을 유도하는 펩티드와 운반체 단백질을 결합해 면역원성과 체내 안정성을 증가시킨 재조합 단백질을 면역원으로 사용함. 재조합 단백질 면역원은 구제역 바이러스 VP1의 epitope들과 목적 동물의 IgG 중쇄불변영역(constant domain)을 결합하여, 목적 동물의 체내에서 단백질의 안정성을 강화하여 지속적인 면역반응을 유도하도록 설계되어 있음(그림3). 또한 구제역 바이러스 혈청형별 수종의 바이러스에 대한 중화항체역가 측정을 통하여 다양한 혈청형 및 지역형, 변이형에 대한 방어 가능성을 보여주었음(그림4). 단백질 면역원 내 epitope의 조합 및 변경으로 방어할 구제역 바이러스 혈청형 및 지역형, 변이주 등의 범위와 대상을 조정하여 구제역 바이러스 혈청형 또는 지역형 2종 이상의 구제역 바이러스들을 방어할 수 있는 단일 항원 구제역백신도 제조가 가능하며, epitope의 변경으로 변이종에 적합한 구제역백신을 단기간에 개발할 수 있음.

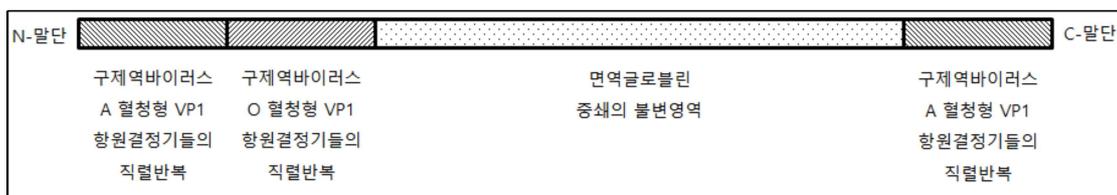


그림3. 구제역 O/A 혈청형 2가 재조합 단백질 백신용 항원의 구조

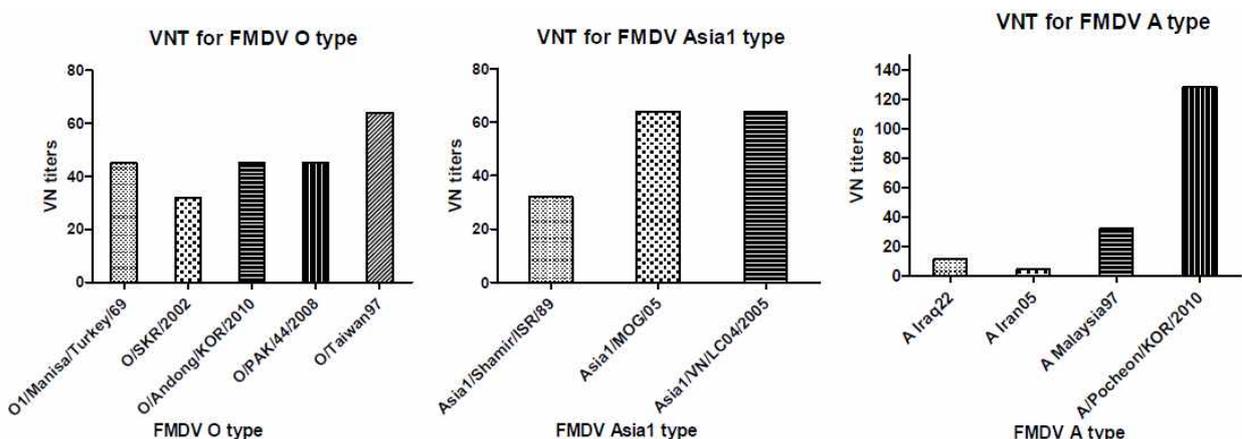


그림4. 구제역 재조합 단백질 백신으로 면역시킨 소 혈청의 중화항체역가

2.2. 구제역 바이러스 유전자 정보 확보

최근 5년 이내 주변국 발생 구제역 바이러스 유전자 정보를 확보하였으며, 이를 위해 과제 종료 시점 기준으로 2017년부터 2021년까지의 중국, 극동 아시아, 대만 등 동아시아와 동남아시아에서 발생하는 구제역 바이러스의 종류와 유전자 정보를 조사하였음. WAHID(OIE World Animal Health Information Database), FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations), WRLFMD(FAO World Reference Laboratory for FMD), EMPRES-i(FAO Global Animal Disease Information System), FGBI ARRIAH, Pirbright Institute, FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations), NCBI 등을 활용하여 조사하고 혈청형, 지역형 별로 분류하였고, 주변국은 자주적으로 순환하며 발생·진화하는 FMDV genotype에 따라 분류한 pool1(southeast asia, central asia, east asia), pool2(south asia)를 포함(표5)하여 조사하였음.

표 5. FMDV pools 분류표

pool	Region (Country)	Serotypes
1	SouthEast Asia/Central Asia/East Asia (Cambodia, China, China (Hong Kong, SAR), Taiwan Province of China, Democratic People's Republic of Korea, Republic of Korea, Laos People's Democratic Republic, Malaysia, Mongolia, Myanmar, Russian Federation, Thailand, Viet Nam)	A, Asia 1 & O
2	SOUTH ASIA (Bangladesh, Bhutan, India, Mauritius, Nepal, Sri Lanka)	A, Asia 1 & O
3	WEST EURASIA/MIDDLE EAST (Afghanistan, Algeria, Armenia, Azerbaijan, Bahrain, Egypt, Georgia, Iran (Islamic Republic of), Iraq, Israel, Jordan, Kazakhstan, Kuwait, Kyrgyzstan, Lebanon, Libya, Morocco, Oman, Pakistan, Palestine, Qatar, Saudi Arabia, Syrian Arab Republic, Tajikistan, Tunisia, Turkey, Turkmenistan, United Arab Emirates, Uzbekistan)	A, Asia 1 & O
	North Africa (Algeria, Egypt, Libya, Morocco, Tunisia)	A, O and SAT2
4	EASTERN AFRICA (Burundi, Comoros, Democratic Republic of Congo, Djibouti, Egypt, Eritrea, Ethiopia, Kenya, Libya, Rwanda, Somalia, Sudan, South Sudan, United Republic of Tanzania, Uganda, Yemen)	A, O, SAT1, SAT2 & SAT3
5	WEST/CENTRAL AFRICA (Benin, Burkina Faso, Cameroon, Cabo Verde, Central Afr. Rep., Chad, Democratic Republic of Congo, Congo, Côte d'Ivoire, Equatorial Guinea, Gabon, Gambia, Ghana, Guinea-Bissau, Guinea, Liberia, Mali, Mauritania, Niger, Nigeria, Sao Tome Principe, Senegal, Sierra Leone, Togo)	A, O, SAT1 & SAT2
6	SOUTHERN AFRICA (Angola, Botswana, Congo D. R., Malawi, Mozambique, Namibia, South Africa, Zambia, Zimbabwe)	A, O, SAT1, SAT2 & SAT3
7	SOUTH AMERICA (Colombia, Venezuela)	A & O

수집된 주변국 발생 구제역 현황 및 구제역 유전자 정보를 매년 갱신하여 문서화 하여 본 연구개발과제에 활용하였음. FMDV genotype에 따라 분류한 pool에 따른 국가별 발생현황은 Pool 1 에서는 O/MESA/PanAsia, O/MESA/Ind2001e, O/SEA/Mya-98, O/Cathy, A/ASIA/Sea-97이 주로 발생하고, Pool 2에서는 O/MESA/PanAsia, O/MESA/Ind2001d, O/MESA/Ind2001e, O/MESA/SA-2019, O/Cathy, ASIA1/ASIA/G-IX가 발생하였음. 특징적으로는 Pool 1에서는 O/Cathy가 중국, 베트남을 거쳐 확산되는 양상이며, 발생 국가에서는 4종류 이상의 지역형이 동시 또는 순차적으로 발병하였으며 근접한 시기에 재발병되었음. 2019년 코로나바이러스 감염증 (COVID-19)의 전세계적 확산으로 인하여 국가간 인적·물적 교류가 제한됨에 따라 지역 간 바이러스의 이동이 감소하고, 지역 내에서 기 발병하였던 지역형 만이 재발병되는 양상을 보이는 등 구제역 발병이 감소하였음.

표 6. FMDV pools에 따른 국가별 발생 FMDV 종류 (X: 미발생)

분류	국가	연도					
		2017	2018	2019	2020	2021	
pool1	대만	X	X	X	X	X	
	라오스	O/MESA/PanAsia			O/MESA/Ind2001e	X	
	말레이시아	O/ME-SA/PanAsia					
		O/ME-SA/Ind2001e					
	몽골	O/MESA/PanAsia		X	X	O/MESA/PanAsia	
		O/MESA/Ind2001e		X	X	O/MESA/Ind2001e	
		O/SEA/Mya-98		X	X	X	
	미얀마	X	O/MESA/Ind2001d			X	X
		O/ME-SA/Ind2001e				X	X
		O/SEA/Mya-98				X	X
	베트남	O/MESA/PanAsia					X
		X	X	X	O/MESA/Ind2001e		
		X	X	O/SEA/Mya-98			
		X	O/Cathy			X	X
	홍콩	O/Cathy			X	X	
	중국	O/ME-SA/PanAsia					X
		O/ME-SA/Ind2001					
		O/SEA/Mya-98				X	
		O/Cathy				X	
	캄보디아	O/MESA/PanAsia				X	
	태국	O/MESA/Ind2001e				X	
		O/SEA/Mya-98			X	X	
		A/ASIA/Sea-97					
러시아	O/MESA/PanAsia		X	X	X		
	O/MESA/Ind2001d			X	X		
	O/SEA/Mya-98				X		
한국	O/MESA/Ind2001d	X	X	X	X		
	X	O/MESA/Ind2001e			X	X	
	X	A/ASIA/SEA-97	X	X	X		
pool2	네 팔	O/MESA/Ind2001d			X	O/MESA/Ind2001d	
		O/MESA/Ind2001e			X	O/MESA/Ind2001e	
		A/ASIA/G-VII	X	X	X	X	
	방글라데시	ASIA1/ASIA/G-IX			X	X	
	부탄	O/MESA/Ind2001e				X	X
		A/ASIA/G-VII	X	X	X	X	
	스리랑카	O/MESA/Ind-2001d		X	X	X	
		O/MESA/SA-2019		X	X	X	
	인도	X	X	X	O/MESA/PanAsia	X	
		O/ME-SA/Ind2001d				X	
O/ME-SA/Ind2001e				X			
X		X	X	O/MESA/SA-2019	X		

표 7. 주변국 발생 구제역 바이러스 유전정보 (2017~2021)

Serotype/Topotype	Isolate Name	Accession No.	Epitope 1
			Epitope 2
O/Cathy	O/HKN/21/70	AJ294911	MSNVRGDLQVLTQKASRALP RHKQKIVAPAKQLL
	O/HKN/6/83	AJ294919	VSNVRGDLQVLAQKAERTLP RHKQKIVAPAKQLL
	GZSD/CHA/2018	MG840803	ANNVRGDLHVLAKNAERTLP RHKQKIVAPAKQLL
O/Middle East-South Asia	PanAsia, O/UKG/35/2001	AJ539141	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP

(ME-SA)			RHKQKIVAPVKQLL
	PanAsia, O/LAO/2/2006	EU667451	VTSVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
	Ind-2001d,O/BHU/3/2009	KM921814	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
	Ind-2001/e, O/VIT/8338/2017	MH891503	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
	Ind-2001/e, O/XJ/CHA/2017	MF461724	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
	Ind-2001/e, Mya/1/2017 ~MYA/17/2017	MG972517 ~ MG972528	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
	Ind-2001/e, SKR/1/2017	MG972599	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
	Ind-2001/e, SKR/2/2017	MG972600	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
O/South East Asia (SEA)	Mya-98, O/MYA/7/98	DQ164925	LTNVRGDLQVLAQKAARPLP RHKQKIVAPVKQSL
	Mya-98, O/BY/CHA/2010	JN998085	LPNVRGDLQVLAQKAARPLP RHKQKIVAPVKQSL
A/Africa	G-VII,-, A/UGA/13/66	KF561705	AAPRRGDLGSLAARVAAQLP RHKQKIAPAKQLL
A/Sea-97	SKR/2/2010	JQ070331.1	PAT-RRGDLGSLAARLAAQLP RHKQKIAPAKQLL
	A/GZCS/CHA/2018	MG840802.1	PQNRRGDLGPLAARLAAQLP RHKQKIAPAKQLL
	YC/SKR/2017	KY766148	PQNRRGDLGPLAARLAAQLP RHKQKIAPAKQLL
Asia1/ASIA/G-IX	BAN/DH/Sa-318/2018	MN366244.1	TTSRRGDLAALAQVRVSRQLP RRKQEIIAPEKQVL

Pool1, Pool2의 총 19개의 국가 중 17개국에서 3개 혈청형, 6개의 지역형으로 분류되었음. NCBI database를 이용하여 분류된 주변국 발생 구제역 바이러스의 유전정보를 추가하고 재조합 단백질 항원 설계에 활용한 VP1 epitope를 구분하여 표시하였으며, 조사된 주변국 발생 구제역 바이러스의 정보는 다음과 같음(표7).

“구제역 국내 상시 백신 선정을 위한 평가 기준”을 위해 구제역백신 전문가 협의회에서 지정한 국내 기 발생 구제역 바이러스와 본 연구개발과제 종료 기준 5년 이내의 주변국 발생 구제역 바이러스의 VP1 epitope를 비교하였음(표8). FMDV O형은 3개의 지역형이 발생하고 있으며 같은 지역형에서도 백신의 방어능에 영향을 미칠 수 있는 VP1 epitope 부분이 변이된 바이러스가 매년 (2014~2016) 발생하고 있었으며, FMDV A형은 국내 및 주변국에 2개의 지역형이 발생하고 있었음. 주변국 발생 바이러스가 국내로 유입되어 발생하는 것은 물론 2018년 김포지역에서 발생한 FMDV A 혈청형의 변이는 국내에 상존하고 있는 구제역 바이러스가 변이를 하며 내부적으로 순환할 가능성이 있음을 보여주었음.

백신의 기본 개념은 질병을 일으키는 미생물 병원체에 대한 면역력을 획득하여 미래에 침범하게 될 병원체에 빠르게 대처하기 위함이며, 올바른 방역수단으로서의 구제역백신은 기 발생 바이러스뿐만 아니라 유입될 가능성이 있는 바이러스까지 대응할 수 있는 지역형을 포함해야 하므로 본 연구개발과제의 구제역 백신에는 각 혈청형별로 상기의 다양한 지역형이 포함될 수 있도록 재조합 단백질 항원을 설계하였음.

표8. 국내 기발생 구제역 바이러스와 주변국 발생 구제역 바이러스 유전정보 비교(2017~2021)

혈청형	국내 기 발생 바이러스(2010-2019) accession no.	주변국 발생 바이러스 Topotype(Isolated) accession no.	Epitope 1 (139~158)
			Epitope 2 (199~212)

O형	안성주(2019): (O/AS.SKR/2019)	MESA/PanAsia, (O/UKG/35/2001) AJ539141	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
	보은주(2017) 또는 정읍주(2017): (O/BE/SKR/2017) KY766147	MESA/Ind-2001/e, (O/VIT/8338/2017) MH891503	VTNVRGDLQVLAQKAARTLP RHKQKIVAPVKQLL
		(O/VN/PT555/2018)	LPNVRGDLQVLAPKTARPLP RHKQKIVAPVKQSL
		O/SEA/Mya98 JN998085	LPNARGDLQVLAOKAARPLP RHKQKIVAPVKQSL
	김제주(2016) 또는 고창주(2016) : (O/SKR/GJ/2016) KX534089		LPNARGDLQVLAPKAARPLP RHKQKIVAPVKQSL
	진천주(2015) : (O/SKR/2015) MG257786		LPNVRGDLQVLAPKAARPLP RHKQKIVAPVKQSL
	의성주(2014) : 지정바이러스 제외 O/SKR/2014 KY322674		LPNVRGDLQVLAPKAARPLP RHKQKIVAPVKQSL
	안동주(2010) : O/SKR/2010 KU991737	SEA/Mya-98, (O/BY/CHA/2010) JN998085	LPNVRGDLQVLAQKAARPLP RHKQKIVAPVKQSL
A형	김포주(2018) : A/SKR/4/2018 MK463492		PQNRRGDSGPLVVKPATQLP RHKQKIAPAKQLL
	연천주(2017) : A/YC/SKR/2017 KY766148	A/Sea-97 (A/GZCS/CHA/2018) MG840802.1	PQNRRGDLGPLAARLAAQLP RHKQKIAPAKQLL
	포천주(2010) : A/SKR/2010 MK463490	A/Asia/Malaysia97 MK463490	PATRRGDLGSLAARLAAQLP RHKQKIAPAKQLL

2.3. 주변국 발생 구제역 바이러스 주요 혈청형 대응 재조합 단백질 항원 개발

2.3.1. Epitope 등의 1차 구조 및 배치, 링커 등 재조합 단백질 항원의 최적화 개발

주변국 발생 구제역 바이러스 주요 2개 혈청형에 대응하는 2가 재조합 단백질 항원 개발을 개발하였으며, 이를 위해서 우선 epitope들의 1차 구조 및 배치, 링커 등의 개선 연구를 통해 재조합 단백질 항원을 최적화하고, 최적화된 항원 구조에 주요 주변국 구제역 바이러스 epitope를 적용하여 대응 항원 생산 균주를 제작하여 시험 항원을 제조하였음. 선행연구를 통해 개발된 구제역 재조합 단백질 백신으로 사용된 항원은 2010년 국내 발생 구제역 바이러스의 VP1 epitope를 기반으로 설계되어 FMDV O/SKR/2010(안동주), FMDV A/SKR/2010(포천주)에 대한 효능이 확인되었고, 이를 기반으로 재조합 단백질 항원을 이루는 epitope 부분의 반복수 및 epitope 부분과 운반체 단백질의 배치를 달리한 후보항원을 설계하여 비교연구를 수행하였음. 정제된 재조합 단백질인 후보항원은 위탁기관 (주)노터스에 전달되어 실험동물인 기니피그에 접종하여 면역혈청을 획득하였고, 면역혈청의 ELISA 시험은 Priocheck FMDV type O ELISA(Prionics, Switzerland)와 Priocheck FMDV A type ELISA(Prionics, Switzerland)를 이용하였음.

재조합 단백질 항원의 유효성을 증가시키고자 1차 구조 및 epitope의 반복횟수, 배치, epitope 과 carrier protein 사이의 링커 등을 변경하여 비교하였고, 기 개발 재조합 단백질 항원 A6O3-SIC을 기본 구조로 하여 epitope 반복수, 배치를 변경하여 총 4종의 후보 재조합 단백질을 설계하여 발현 정제하였음(표 9).

표 9. 구조 변경 2가 항원-1(epitope 반복횟수, 배치 변경)

항원명	특징 및 차이점
O4A4	carrier protein을 중심으로 FMDV A epitope 2회, FMDV O epitope 2회씩 연속 반복하여 양옆으로 배치
O4A5	carrier protein의 N-term에 FMDV A epitope 1회, FMDV O epitope 1회씩 교차 반복하여 배치
O4A6	carrier protein을 중심으로 N-term에 FMDV O epitope 4회, C-term에 FMDV A epitope

	6회 연속 반복하여 각각 배치
O6A6	carrier protein을 중심으로 FMDV A epitope 3회, FMDV O epitope 3회씩 연속 반복하여 양옆으로 배치

정제된 재조합 단백질 항원은 효능시험을 위해 실험동물인 기니피그에 접종하고자 실험동물의 체중을 고려하여 항원량을 반복 항원수로 산술적으로 계산하여 조정하였고 시험 백신 제조 후 위탁기관에 전달하여 기니피그를 이용한 효능 비교시험을 통해 항혈청을 받아 Priocheck FMDV type O ELISA(Prionics, Switzerland)와 Priocheck FMDV type A ELISA(Prionics, Switzerland)로 분석하였음. 접종 후 시기별 PI값은 증가하는 양상을 보였으며, 투여 5주에는 모든 군의 PI값이 양성으로 확인되었음(그림 5). FMDV O epitope 증가 횟수에 따라 PI와 양성률이 증가하는 양상으로 나타나며, FMDV A epitope의 경우 4회 반복횟수일 때 가장 높은 PI를 보여주고 있으며, 투여 후 5주까지의 혈청 분석 결과, O6A6가 비교군 중 가장 우수한 것으로 확인되었음.

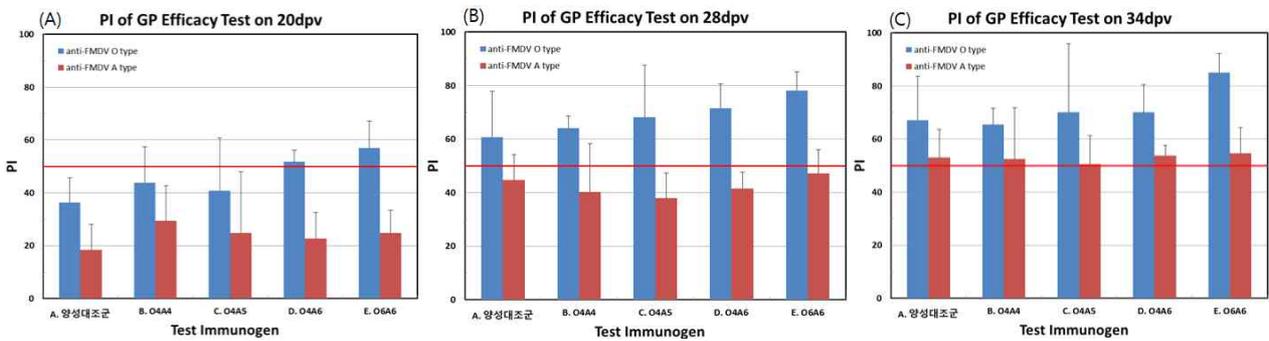


그림 5. 구조 변경 2가 항원-1 개선 비교시험(2가 항원)

(A) 접종 3주차 PI, (B) 접종 4주차 PI, (C): 접종 5주차 PI

1차 구조개선 비교시험을 통해 선정된 O6A6를 양성대조군으로 하여 epitope 반복수 증가, 배치를 변경하여 총 6종의 후보 재조합 단백질을 추가 설계하여 발현 정제하였음(표 10).

표 10. 구조 변경 2가 항원-2(epitope 반복횟수 증가, 배치 변경)

항원명	특징 및 차이점
O6A6(2)	carrier protein의 N-term에 FMDV A epitope 2회, FMDV O epitope 2회, FMDV A epitope 2회씩 연속 반복 배치하고 C-term에 FMDV O epitope 2회, FMDV A epitope 2회, FMDV O epitope 2회씩 연속 반복 배치
O6A6(3)	carrier protein의 N-term에 FMDV A epitope 4회, FMDV O epitope 2회 연속 반복 배치하고 C-term에 FMDV A epitope 2회, FMDV O epitope 4회씩 연속 반복 배치
O6A6(4)	carrier protein의 N-term에 FMDV A epitope 6회 연속 반복 배치하고 C-term에 FMDV O epitope 6회 연속 반복 배치
O6A6(5)	carrier protein의 N-term에 FMDV O epitope 6회 연속 반복 배치하고 C-term에 FMDV A epitope 6회 연속 반복 배치
O7A7	carrier protein의 N-term에 FMDV A epitope 4회, FMDV O epitope 3회 연속 반복 배치하고 C-term에 FMDV A epitope 3회, FMDV O epitope 4회 연속 반복 배치
O8A8	carrier protein의 N-term에 FMDV A epitope 4회, FMDV O epitope 4회 연속 반복 배치하고 C-term에 FMDV A epitope 4회, FMDV O epitope 4회 연속 반복 배치

정제된 재조합단백질 항원은 효능시험을 위해 실험동물인 기니피그에 접종하고자 실험동물의 체중을 고려하여 항원량을 반복항원수로 산술적으로 계산하여 조정하였고 시험 백신 제조 후 위탁기관에 전달하여 기니피그를 이용한 효능비교시험을 통해 항혈청을 받아 Priocheck FMDV type O ELISA(Prionics, Switzerland)와 Priocheck FMDV type A ELISA(Prionics, Switzerland)로

분석하였음. 접종 후 시기별 PI값은 증가하는 양상을 보였으며, 투여 3주에 이미 모든 군에서 FMDV type O 양성으로 나타났고(그림 6), 크게 증가한 FMDV type O와 달리 FMDV type A에 대한 PI는 양성전환 개체가 상대적으로 적고(3~4마리) 실험군간의 차이가 크지 않았으며, 이는 분석에 사용한 Priocheck FMDV type A ELISA의 특성으로 인한 것으로 보임.

재조합 단백질 O6A6의 epitope 배치를 변형한 단백질 중에서는 O6A6(4)가 가장 높은 PI평균과 함께 개체간의 PI 차이도 작아서 효능이 비교적 우수한 것으로 판단되며, FMDV epitope 반복횟수를 7~8회 증가시킨 것에서는 PI가 증가하지 않거나 낮아지는 경향이 있어 개선효과가 없는 것으로 확인되었음.

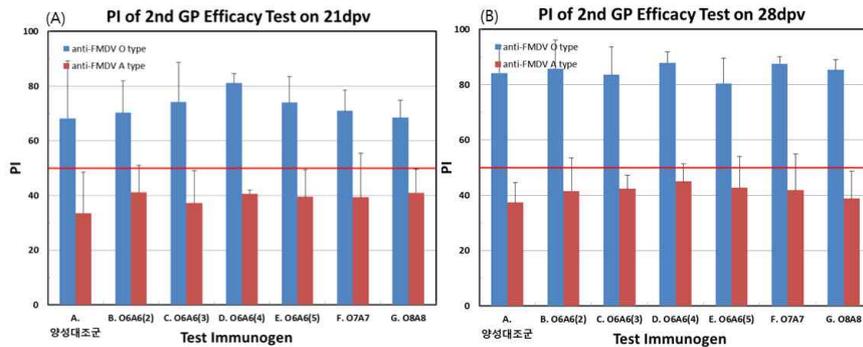


그림 6. 구조 변경 2가 항원-2 개선 비교시험(2가 항원)
(A) 접종 3주차 PI, (B) 접종 4주차 PI

재조합 단백질을 구성하는 epitope과 carrier protein 사이의 링커를 개선하기 위하여 기개발한 단가항원(FMDV serotype O/A)을 대조군으로 하여 총 8종의 linker 적용 단가항원을 설계하여 발현 정제하였음(표 11).

표 11. Linker 적용 단가 항원 (FMDV serotype O/A)

항원명	특징 및 차이점
FO3-SIC-IA	FMDV O epitope 2의 cleavable site 제거
FA3-SIC-VA	FMDV A epitope 2의 cleavable site 도입
FO3-SIC(G4S)3	epitope와 carrier 사이에 long flexible linker 도입
FO3-SIC(H4)2	epitope와 carrier 사이에 long rigid linker 도입
FO3-SIC(VA)1	epitope와 carrier 사이의 linker 중앙에 cleavable site 도입
FO3-SIC(VA)2	epitope와 carrier 사이의 linker c-term에 cleavable site 도입
FO3-SIC(VA)3	epitope 2 linker와 carrier의 linker c-term 3곳에 cleavable site 도입
FO3-SIC(VA)4	epitope 2 linker와 carrier의 linker c-term 3곳에 cleavable site 도입 epitope 2 내의 cleavable site 제거

정제된 재조합 단백질 항원은 효능시험을 위해 실험동물인 기니피그에 접종하고자 실험동물의 체중을 고려하여 항원량을 반복항원수로 산술적으로 계산하여 조정하였고 시험 백신 제조 후 위탁기관에 전달하여 기니피그를 이용한 효능비교시험을 통해 항혈청 받아 Priocheck FMDV type O ELISA(Prionics, Switzerland)와 Priocheck FMDV type A ELISA(Prionics, Switzerland)로 분석하였음. 분석한 PI값을 기개발 단가항원과 비교한 결과, epitope와 carrier 사이에 long rigid linker를 도입한 단가항원이 개선 효과가 비교적 크며 epitope내의 cleavable site를 제거하고 epitope 사이에 도입하는 것이 개선 효과가 높은 것으로 확인되었음(그림 7).

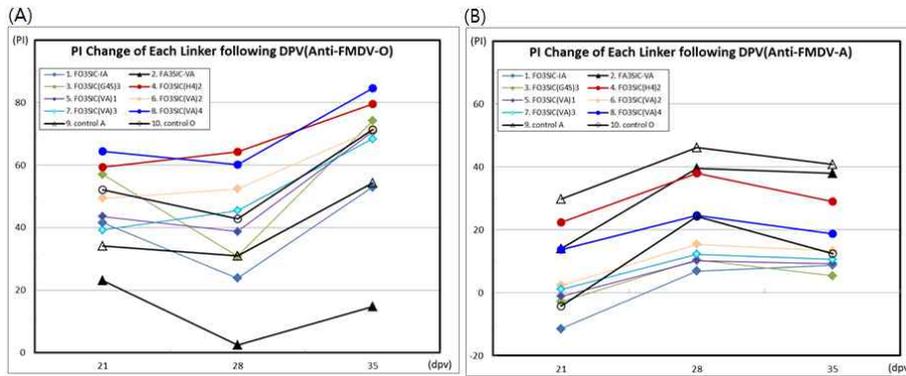


그림 7. 재조합 단백질 항원 개선 비교시험(linker적용 단가항원)
(A) Anti FMDV-O PI 변화, (B) Anti FMDV-A PI 변화

기개발 재조합 단백질 항원 A6O3-SIC을 기본 구조로 하여 epitope 반복수, 배치를 고정하고 linker를 추가 변경·조합하여 총 4종의 후보 재조합 단백질을 설계하여 발현 정제하였음(표 12).

표 12. Linker 변경 2가 항원(linker 추가 및 조합 변경, FMDV serotype O/A)

항원명	특징 및 차이점
A6O3-SIC	기개발 재조합단백질 항원 구조로서 변경 Linker를 적용한 2가 항원과 비교함.
A6O3-SIC-LRL	carrier protein을 중심으로 long rigid linker를 N-term과 C-term에 배치하고 N-term에 FMDV A epitope 3회, FMDV O epitope 3회, C-term에 FMDV A epitope 3회 반복함. 각 epitope는 기존 linker로 연결하여 배치함.
A6O3-SIC-L2-LRL	carrier protein을 중심으로 flexible linker와 long rigid linker를 연속하여 N-term과 C-term에 배치함. N-term에 FMDV A epitope 3회, FMDV O epitope 3회, C-term에 FMDV A epitope 3회 반복하고 각 epitope는 기존 linker로 연결하여 배치함.
A6O3-SIC-CL-LRL(1)	carrier protein을 중심으로 cleavable linker와 long rigid linker를 연속하여 N-term과 C-term에 배치함. N-term에 FMDV A epitope 3회, FMDV O epitope 3회, C-term에 FMDV A epitope 3회 반복하고 각 혈청형의 epitope set을 cleavable linker로 연결하여 배치함.
A6O3-SIC-CL-LRL(2)	carrier protein을 중심으로 cleavable linker와 long rigid linker를 연속하여 N-term과 C-term에 배치함. N-term에 FMDV A epitope 3회, FMDV O epitope 3회, C-term에 FMDV A epitope 3회 반복하고 각 epitope를 cleavable linker로 연결하여 배치함.

정제된 재조합단백질 항원들의 효능을 비교 평가하기 위해 기니피에서 효능시험을 진행하였으며, 시험백신은 실험동물의 체중을 고려하여 항원량을 목적동물 투여량의 1/30로 감량하고 동일한 분자수의 항원이 접종되도록 항원의 분자량에 따라 항원량을 조정하여 제조하였음.

제조된 시험백신은 위탁기관에 전달하여 기니피그를 이용한 효능비교시험을 통해 항혈청과 항혈청에 대한 분석결과를 받아 Priocheck FMDV type O ELISA(Prionics, Switzerland)와 Priocheck FMDV type A ELISA(Prionics, Switzerland)로 분석하였음. 모든 접종군은 접종 후 시기별 PI값은 증가하는 양상을 보였으며, epitope 반복수와 위치를 고정하였음에도 linker를 추가 변경하여 조합한 모든 후보항원에서 대조항원에 비하여 구제역 O, A 혈청형 SP ELISA 분석에 의한 PI값이 빠르게 증가하는 경향이 나타났음. 후보항원 접종 후 4주차에는 FMDV type O ELISA의 PI값이 70%이상을 나타냈으며, A6O3-SIC-L2-LRL 군에서 접종후 2주차에 FMDV type O 항

체에 대한 양성률이 50%, 3주차에는 양성률 100%로 분석되었음. FMDV type A 항체에 대한 양성률에서도 대조항원에 비하여 후보항원을 투여한 군에서 우수한 항체 양성률을 나타내었음(그림 8).

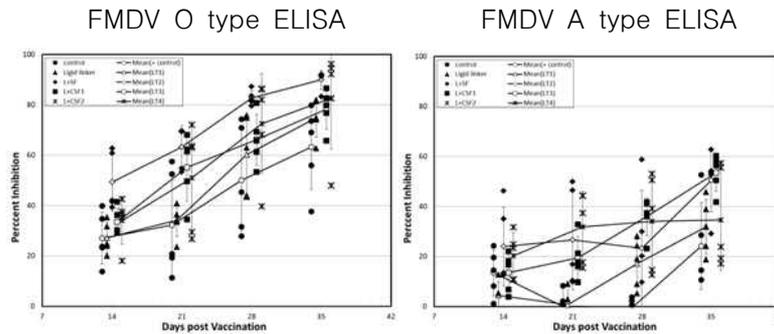


그림 8. Linker 변경 2가 항원 비교시험(ELISA)

항원을 이루는 VP1 epitope 부분과 IgG 중쇄 불변영역의 연결부에 다양한 linker를 적용하는 연구를 수행하여 대량생산 시 생산효율에 영향을 주는 단백질 물성을 개선하고 재조합 단백질 항원의 체내 안정성을 높여 재조합 단백질 백신의 안정성을 개선하고자 하였으며, 이러한 linker는 재조합 융합단백질의 구조에 영향을 주어 생물학적 활성 및 체내 전달에 영향을 주는 것으로 알려져 있기에 추가적인 긍정적인 영향을 기대하였음. 적용한 linker의 종류로는 flexible linker(G-S linker), rigid linker(alpha helix-forming linker (EAAAKn), Pro-rich sequence(XPn), In Vivo cleavable linker(disulfide linker)으로 기개발 재조합 단백질 항원 A6O3-SIC을 기본구조로 하여 epitope 반복수, 배치를 고정하고 linker를 추가 변경·조합하여 후보 재조합 단백질을 설계, 발현, 정제하여 비교연구를 수행하였음. 후보 항원에 의한 면역혈청은 실험동물인 기니피그에 접종 후 14일, 21일, 28일, 35일, 42일 동안 채혈하여 ELISA 시험법 및 바이러스 중화시험으로 분석하였음(표13, 표14). ELISA 시험법에 의한 분석결과, 후보항원 접종 후 14일부터 PI 값이 양성으로 판정되었으며 접종 21일~28일 후에는 80~100%의 개체가 구제역항체 양성이었고, Linker 적용한 모든 후보군에서 대조 항원에 비하여 PI값이 빠르게 증가하는 경향을 보였으며, 이것은 *In vivo* cleavable linker에 의해 재조합 단백질 항원에 포함된 항원결정기 부분의 제시가 신속히 이루어졌을 가능성을 시사함. 실험동물 기니피그에 접종된 후보 재조합단백질 항원의 함량은 실험동물의 체중을 고려하여 목적동물 투여 함량의 1/30로 감량하고 동일한 분자수의 항원이 접종되도록 항원의 분자량에 따라 조정하였고, 접종 후 28일 후에 50%만 양성 전환 되도록 설정(ID50)되었음에도 불구하고 rigid linker와 cleavable linker를 조합 배치하여 적용한 재조합 단백질 항원군 모두에서 우수한 PI값으로 분석되어 ELISA 시험법에 의하여 적용 linker를 선정할 수 없었음. 접종 후 21일차의 면역혈청을 바이러스 중화시험으로 분석한 결과, ELISA 시험법의 구제역 O 혈청형의 높은 PI값과는 달리 구제역 A 혈청형에 대한 높은 중화항체가를 보인 후보군의 적용 linker 조합을 선정하였음(표 13, 표 14).

표13. 재조합 단백질 내 link종류에 따른 후보백신 면역혈청의 ELISA 시험 결과

Group	이표	PI of PrioCHECK FMDV type O SP ELISA					PI of PrioCHECK FMDV type A SP ELISA					
		14dbv	21dpv	28dpv	35dpv	42dpv	14dbv	21dpv	28dpv	35dpv	42dpv	
Positive control	GP01	13.8	11.3	45.3	69.0	95.0	10.0	11.1	7.9	6.2	21.9	
	GP02	23.7	20.8	31.6	37.7	60.3	14.8	23.1	16.9	19.5	42.1	
	PC	GP03	39.9	19.3	27.9	56.0	91.4	33.0	18.3	22.0	62.3	68.0
	GP04	23.4	52.5	70.9	73.6	87.6	22.5	23.1	24.7	30.9	43.0	
	GP05	34.7	57.5	74.3	79.9	94.1	21.7	8.5	15.3	26.4	17.9	
Average		27.1	32.3	50.0	63.2	85.7	20.4	16.8	17.4	29.1	38.6	
Standard deviation		10.3	21.1	21.7	16.7	14.5	8.7	6.8	6.5	20.8	20.0	
Positive ratio		0%	40%	40%	80%	100%	0%	0%	0%	20%	20%	
Ligid linker	GP06	24.1	36.5	63.0	81.5	95.0	11.7	21.7	54.1	37.0	50.4	
	LT1	GP07	31.7	40.8	74.8	81.8	95.1	15.5	19.8	38.0	30.7	34.5
	GP08	24.8	36.4	75.9	74.2	92.1	13.6	13.9	38.3	39.9	48.7	
	GP09	35.3	33.5	43.5	62.8	79.5	28.1	27.9	21.9	19.3	25.8	
	GP10	20.0	23.6	44.1	74.3	91.4	23.7	13.2	21.9	20.8	34.9	
Average		27.2	34.2	60.2	74.9	90.6	18.5	19.3	34.8	29.6	38.9	
Standard deviation		6.2	6.5	15.9	7.7	6.4	7.0	6.0	13.5	9.3	10.4	
Positive ratio		0%	0%	60%	100%	100%	0%	0%	20%	0%	20%	
L+SF	GP11	41.6	69.6	87.3	91.3	98.4	52.9	65.9	69.6	64.4	59.0	
	LT2	GP12	42.1	69.3	81.9	91.9	96.9	29.1	17.8	19.6	61.1	37.3
	GP13	62.8	69.7	83.6	83.3	97.3	50.3	42.9	51.5	55.0	44.2	
	GP14	60.9	53.3	81.3	91.4	95.7	21.8	15.1	28.5	25.1	33.9	
	GP15	39.3	54.8	79.6	92.2	92.2	26.2	24.6	48.2	52.0	52.1	
Average		49.3	63.3	82.7	90.0	96.1	36.1	33.3	43.5	51.5	45.3	
Standard deviation		11.5	8.5	2.9	3.8	2.4	14.4	21.2	19.7	15.6	10.4	
Positive ratio		0%	100%	100%	100%	100%	40%	20%	40%	80%	40%	
L+CSF1	GP16	41.5	68.2	80.8	86.6	92.7	36.4	28.9	28.5	45.2	51.1	
	LT3	GP17	30.2	34.4	53.3	65.8	84.7	20.1	26.4	49.5	56.2	53.9
	GP18	29.1	62.3	69.4	79.8	82.2	29.8	24.6	43.7	46.4	50.3	
	GP19	30.2	61.5	65.7	82.6	84.2	31.4	31.1	44.0	55.4	50.7	
	GP20	36.3	49.7	61.4	76.7	84.3	28.1	39.3	41.9	56.3	47.7	
Average		33.5	55.2	66.1	78.3	85.6	29.2	30.1	41.5	51.9	50.7	
Standard deviation		5.3	13.4	10.2	7.9	4.1	6.0	5.7	7.8	5.6	2.2	
Positive ratio		0%	60%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	60%	80%	
L+CSF2	GP21	37.7	63.8	82.0	94.6	95.6	27.0	33.0	48.5	24.0	45.0	
	LT4	GP22	42.7	29.5	86.2	96.3	96.9	17.1	52.4	11.7	31.7	29.8
	GP23	36.7	63.0	68.2	82.6	87.1	23.5	28.3	18.0	23.0	21.9	
	GP24	18.1	26.7	39.7	48.0	45.8	42.8	63.4	57.7	64.9	56.5	
	GP25	35.5	72.1	86.4	92.2	95.6	49.0	54.9	55.9	64.6	53.2	
Average		34.1	51.0	72.5	82.7	84.2	31.9	46.4	38.4	41.7	41.3	
Standard deviation		9.4	21.2	19.8	20.1	21.8	13.5	15.1	21.9	21.4	14.9	
Positive ratio		0%	60%	80%	80%	80%	0%	60%	40%	40%	40%	

표14. 재조합 단백질 내 link종류에 따른 후보백신 면역혈청의 바이러스 중화시험 결과

Group	이표	VN titer		
		O/안동	A/포천	
Positive control	GP01	32	64	
	GP02	16	45	
	PC	GP03	23	32
	GP04	<8	23	
	GP05	16	91	
Ligid linker	GP06	32	64	
	LT1	GP07	11	181
	GP08	<8	128	
	GP09	<8	<8	
	GP10	<8	64	
L+SF	GP11	23	<8	
	LT2	GP12	23	16
	GP13	32	<8	
	GP14	11	45	
	GP15	64	181	
L+CSF1	GP16	<8	45	
	LT3	GP17	<8	32
	GP18	<8	<8	
	GP19	16	<8	
	GP20	1	91	
L+CSF2	GP21	16	362	
	LT4	GP22	23	256
	GP23	11	181	
	GP24	<8	181	
	GP25	<8	<8	

구제역백신의 항원으로써 설계된 재조합 단백질의 구성요소 중, 면역원성을 제공하는 역할을 하는 epitope을 목적동물의 체내에서 항원제시세포들에게 잘 전달하고 재조합 단백질의 안정성을 향상시키는 역할을 하는 운반체 단백질(carrier protein)로서 면역글로블린 G 중쇄의 불변영역이 사용되고 있으며, 기 개발 구제역 재조합 단백질 항원은 면역글로블린 G 중쇄영역의 전부를 사용하고 있어, epitope 보다 전달단백질이 차지하는 크기가 큰 편임. 면역원성을 강화하기 위해

epitope의 반복수 또는 크기를 늘릴 경우, 재조합단백질의 크기가 커져 발현 및 정제효율이 감소할 가능성이 높으며, 면역글로블린 G 중쇄 불변영역의 일부 도메인만으로도 운반체 단백질로서의 역할이 수행할 가능성이 있음을 확인하기 위해 비교실험을 수행하였음. 면역글로블린 G 중쇄영역을 알려진 역할에 따라 3가지 도메인(1st constant Ig domain(IgC Ch1), immunoglobulin domain 1, immunoglobulin domain 2)으로 나누어 조합하여 FMDV O epitope와 결합한 단가항원 12종을 설계하여 비교 실험하였고, 정제된 재조합단백질 항원은 구제역 재조합단백질 O형 단가항원과 함께 위탁기관 (주) 노터스에 전달하여 실험동물 기니피그에 접종하여, 접종 후 14일, 21일, 28일, 35일에 채혈하여 ELISA 시험법 및 바이러스 중화시험으로 분석하였음(표15).

표 15. 재조합단백질 내 전달단백질 domain에 따른 후보백신 면역혈청의 ELISA 및 바이러스 중화시험 결과

Group	이표	PI of PrioCHECK FMDV-O SP ELISA				VN titer(A안동)	
		14dbv	21dvp	28dvp	35dvp		
C	GP11	23.3	24.4	53.3	52.9	<8	
	GP12	32.9	39.9	55.9	70.0	16	
	D3a	GP13	37.1	56.7	80.4	87.0	22
	GP14	25.2	29.3	49.8	61.7	<8	
	GP15	29.8	55.6	75.4	77.6	45	
Average		29.7	41.2	63.0	69.8		
Standard deviation		5.6	14.8	13.9	13.3		
Positive ratio		0%	40%	80%	100%		
F	GP26	44.9	42.3	73.0	66.3	32	
	GP27	46.0	57.9	71.8	70.2	22	
	D1+D3a	GP28	26.5	33.8	60.6	60.4	16
	GP29	56.7	51.7	68.6	76.7	64	
	GP30	47.2	63.3	73.3	72.6	45	
Average		44.2	49.8	69.4	69.2		
Standard deviation		11.0	11.9	5.3	6.2		
Positive ratio		20%	60%	100%	100%		
J	GP46	19.6	26.7	60.1	75.5	11	
	GP47	16.5	33.6	54.0	59.3	22	
	D1+D2b	GP48	30.4	52.8	75.7	83.1	11
	GP49	24.4	22.5	67.8	75.2	8	
	GP50	49.6	58.4	67.2	65.8	45	
Average		28.1	38.8	65.0	71.8		
Standard deviation		13.1	16.0	8.3	9.3		
Positive ratio		0%	40%	100%	100%		
M(PC)	GP61	26.5	53.6	72.9	77.6	16	
	GP62	66.5	61.9	52.6	51.7	8	
	D1+D2+D3	GP63	19.7	40.3	62.2	72.8	16
	GP64	30.7	50.7	47.9	46.4	32	
	GP65	21.8	27.3	50.6	68.5	8	
Average		33.0	46.8	57.2	63.4		
Standard deviation		19.2	13.3	10.3	13.6		
Positive ratio		20%	60%	80%	80%		

ELISA 실험결과, 전달 단백질인 면역글로블린 G 중쇄 불변영역의 단독 또는 2가지 도메인 조합을 포함하고 있는 항원에 의한 면역혈청이 3가지 도메인을 모두 포함하고 있는 O형 단가항원에 의한 면역혈청과 유사하거나 더 높은 양성전환률을 보여주었으며, 특히 1st constant Ig domain와 immunoglobulin domain 2을 포함하는 단가항원은 접종 후 14일부터 표준편차 이내에서 양성전환이 가능한 개체가 80%로 분석되어 빠른 면역반응을 유도하는 것으로 확인됨. 바이러스 중화시험으로 중화항체역가를 확인한 결과, ELISA 시험법에 의한 결과와 동일하게 1st constant Ig domain와 immunoglobulin domain 2을 포함하는 단가항원(F group)을 이용한 비교군에서 대조군(3가지 도메인을 모두 포함하고 있는 O형 단가항원, M group)보다 높은 중화항체역가를 확인하였다. 상기 실험을 통하여 재조합단백질 항원의 운반체 단백질인 면역글로블린 G 중쇄영역의 일부 또는 일부 조합을 사용하여도 면역글로블린 G 중쇄영역의 전부를 사용한 재조합단백질 항원과 동일 이상의 양성전환률 및 중화항체역가를 확인하였음. 다종의 바이러스에 대한 면역원성 확보 및 면역원성의 강화를 위하여 epitope 부분의 비율을 최대로 확보해야 하므로, 전달단백질의 비율을 감소시킬 수 있는 운반체 단백질로서 면역글로블린 G 중쇄불변영역의 1st constant Ig domain와 immunoglobulin domain 2 조합을 선정하였음.

구제역 재조합단백질 항원의 면역 특이성을 강화하기 위하여 epitope 1, epitope 2 부분에 대한 항체 형성능을 비교하기 위하여 단일 epitope를 특징으로 하는 단가항원을 설계하여 비교실험하

였음(표 16). 구제역 O혈청형과 A혈청형의 epitope 각 부분을 3회 반복배열하고 전달단백질인 면역글로블린 G 중쇄영역 전부를 연결하여 정제하였음.

표 16. 단일 epitope 단가 항원 (FMDV serotype O/A)

항원명	특징 및 차이점
O/AD ep1r3-SIC	FMDV O epitope 1 부분을 3회 반복하고 carrier protein과 연결
O/AD ep2r3-SIC	FMDV O epitope 2부분을 3회 반복하고 carrier protein과 연결
A/PC ep1r3-SIC	FMDV A epitope 1 부분을 3회 반복하고 carrier protein과 연결
A/PC ep2r3-SIC	FMDV A epitope 2 부분을 3회 반복하고 carrier protein과 연결

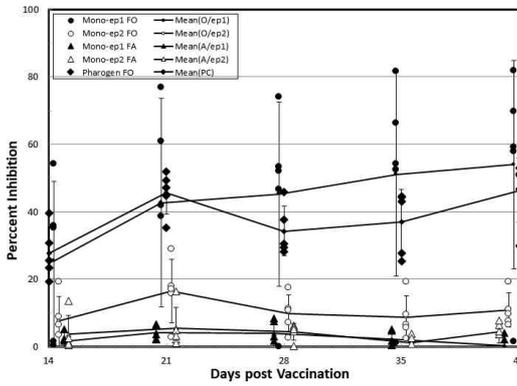
기니픽의 체중을 고려하여 목적 동물 투여량의 1/30로 감량하고 동일한 분자수의 항원이 접종되도록 항원의 분자량에 따라 항원량을 조정하여 시험 백신을 제조하였고, 구제역 재조합 단백질 O형, A형 단가항원과 함께 (주)노터스에 전달하여 실험동물인 기니픽에 접종하여 효능시험을 진행하였음. 위탁기관인 (주)노터스는 접종 후 21일, 28일, 35일에 채혈하여 항혈청을 ELISA 시험법(그림 9) 및 바이러스 중화시험으로 분석하였음(표 17).

표 17. 재조합단백질 epitope에 따른 후보백신 면역혈청의 ELISA, 바이러스 중화시험 분석결과

- 구제역바이러스 O혈청형 항체							- 구제역바이러스 A혈청형 항체								
Group	이표	21dpv		28dpv		35dpv		Group	이표	21dpv		28dpv		35dpv	
		PI	VNT	PI	VNT	PI	VNT			PI	VNT	PI	VNT	PI	VNT
A Mono-ep1 FO	A01	77.0	45	74.1	45	81.5	45	C Mono-ep1 FA	A11	8.2	16	9.1	32	-6.7	32
	A02	-5.0	23	0.1	16	1.2	32		A12	34.2	11	53.8	32	41.2	23
	A03	61.0	23	53.4	32	66.3	45		A13	33.5	23	40.6	11	40.2	32
	A04	38.7	16	52.1	23	54.2	23		A14	9.3	32	2.5	45	-3.8	16
	A05	41.9	32	46.6	45	52.5	23		A15	41.5	32	55.5	45	55.8	11
Average		42.7	1.41	45.3	1.48	51.1	1.51	Average		25.3	1.32	32.3	1.48	25.4	1.32
Standard deviation		30.8	-	27.3	-	30.2	-	Standard deviation		15.5	-	25.0	-	28.6	-
Positive ratio		40%	100%	60%	100%	80%	100%	Positive ratio		0%	80%	40%	80%	20%	80%
B Mono-ep2 FO	A06	18.0	11	11.3	23	2.5	16	D Mono-ep2 FA	A16	15.2	16	2.4	16	5.8	11
	A07	29.0	23	17.6	23	9.5	11		A17	13.5	11	0.6	16	11.3	8
	A08	2.8	11	7.2	32	6.6	23		A18	18.0	<8	-0.4	<8	12.0	11
	A09	15.9	16	10.9	16	19.2	11		A19	14.3	16	1.0	8	13.4	23
	A10	17.1	11	2.6	32	5.6	16		A20	15.8	8	2.4	8	-1.6	8
Average		16.6	1.14	9.9	1.38	8.7	1.17	Average		15.4	0.87	1.2	0.84	8.2	1.05
Standard deviation		9.3	-	5.5	-	6.4	-	Standard deviation		1.7	-	1.2	-	6.2	-
Positive ratio		0%	40%	0%	100%	0%	60%	Positive ratio		0%	40%	0%	100%	0%	20%
E Pharogen FO	A21	44.9	23	29.5	23	44.4	45	F Pharogen FA	A26	24.4	11	21.5	23	35.8	64
	A22	49.4	23	45.8	23	44.7	45		A27	37.4	23	31.0	45	40.6	45
	A23	47.1	23	30.5	64	25.4	45		A28	51.6	64	52.1	23	60.4	23
	A24	35.3	16	28.1	16	27.7	32		A29	39.1	23	29.0	32	28.8	32
	A25	51.9	23	37.8	23	43.0	32		A30	17.0	23	21.5	23	27.8	91
Average		45.7	1.32	34.3	1.41	37.0	1.60	Average		33.9	1.38	31.0	1.44	38.7	1.66
Standard deviation		6.4	-	7.4	-	9.6	-	Standard deviation		13.5	-	12.5	-	13.2	-
Positive ratio		20%	100%	0%	100%	0%	0%	Positive ratio		20%	80%	20%	100%	20%	0%

ELISA 실험결과, 단일 epitope 적용한 시험 백신에 의한 면역혈청은 구제역 바이러스 혈청형간의 cross reactivity는 없었으며, 단일 epitope 적용 시험 백신은 혈청형과는 상관없이 epitope 2는 항체형성에는 영향을 미치지 않으며, epitope 1만이 항체형성에 영향을 주는 것으로 보였음. 항체형성과 PI 평균 등으로 볼 때, epitope 1 적용 시험 백신이 기개발한 단가항원(epitope 1+ epitope 2)와 동등 또는 동등 이상의 효능을 보이는 것으로 분석되었고, 동일한 면역혈청을 바이러스 중화시험으로 중화항체지수를 확인한 결과, ELISA 결과와는 다르게 epitope 2 적용 시험백신의 면역 혈청에서도 상대적으로 낮은 중화항체역가가 측정되었음. ELISA 시험법은 효소를 표식자로 하여 항원항체반응을 이용한 항원 또는 항체량을 측정하는 시험법으로 총 항체와 중화항체가 비례할 가능성이 높으며, ELISA 분석 결과와 비교하면 중화항체역가는 최소역가 이하가 측정되어야 함에도 불구하고 구제역 O 혈청형, A혈청형 바이러스에 의한 바이러스중화시험에서는 최소역가 이상의 역가가 측정되었음. 따라서 구제역 재조합 단백질 항원의 epitope 2는 중화항체형성에 영향을 미치는 것으로 예상되어 면역원성의 강화를 위하여 epitope 1 부분만을 사용한 항원설계는 적합하지 않았음.

Priocheck FMDV O type ELISA



Priocheck FMDV A type ELISA

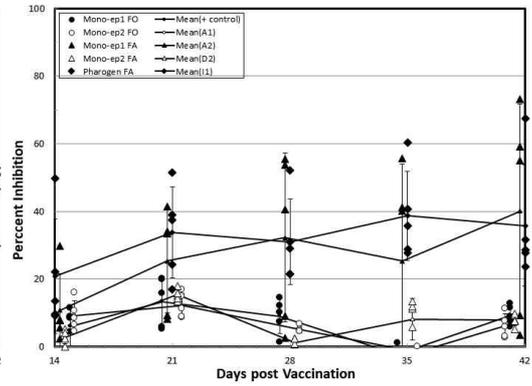


그림 9. 단일 epitope 적용 단가 항원 비교시험(ELISA)

본 연구개발과제에서는 주변국 발생 및 국내 기발생 구제역 바이러스 주요 2개 혈청형 및 5개 지역형에 대하여 공통적으로 대응할 수 있는 O 혈청형 O/MESA/PanAsia, O/MESA/Ind-2001/e, O/SEA/Mya98, A 혈청형 A/sea-97, A.Asia/Malaysia97의 epitope 부분을 적용하여 재조합 단백질 항원을 설계하였고, 설계된 재조합 단백질의 구조는 각 혈청형 및 지역형의 epitope 중 면역 특이성 및 항체형성에 영향을 주는 것을 확인된 epitope1을 반복 배치하고 중화항체역가에 영향을 주는 지역형에서 공통된 epitope 2를 반복 배치하여 *In vivo* cleavable linker를 추가하여 연결하였음. 전달 단백질 면역글로블린 G 중쇄영역 1st constant Ig domain와 immunoglobulin domain 2을 중심으로 N-terminal과 C-terminal에 각각 epitope 반복 세트를 rigid linker(alpha helix-forming linker (EAAAKn)로 조합하여 설계하였고, 각 재조합단백질 항원의 아미노산 서열로 이론적인 분자량(MW) 및 등전점(pI)을 확인하였음(표 18). 설계된 재조합 단백질 항원은 숙주세포 *E.coli* BL21(DE3)에 형질전환되어 발현 정제하여 준비하였음.

표 18. 구제역 재조합 단백질 후보 항원의 구조 및 특성(분자량, 등전점)

번호	구조	MW (kDa, 분자량)	pI (등전점)
1	Ndel → 6x His → A/Sea-97 epi 1 → A/Sea-97 epi 2 → O/SEA/Mya98 epi 1 → O/SEA/Mya98 epi 2 → Carrier → A/Sea-97 epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 2 → XhoI	81.6	10.27
2	Ndel → 6x His → A/Sea-97 epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 2 → Carrier → A/Sea-97 epi 2 → A/Sea-97 epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 1 → XhoI	75.3	10.14
3	Ndel → 6x His → A/Sea-97 epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 1 → A/Sea-97 epi 2 → Carrier → A/Sea-97 epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 2 → XhoI	75.4	10.10
4	Ndel → 6x His → A/Sea-97 epi 1 → O/SEA/Mya98 epi 1 → O/SEA/Mya98 epi 2 → A/Sea-97(m) epi 1 → A/Sea-97(m) epi 2 → O/MESA/PanAsia epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 2 → Carrier → XhoI	76.8	10.53
5	Ndel → 6x His → O/SEA/Mya98 epi 1 → O/MESA/Ind-2001e/epi 1 → O/SEA/Mya98 epi 2 → Carrier → O/MESA/PanAsia epi 1 → O/MESA/PanAsia epi 2 → XhoI	67.4	9.94
6	Ndel → 6x His → A/Sea-97 epi 1 → A/Sea-97(m) epi 1 → A/Sea-97 epi 2 → Carrier → A/Asia/Malaysia97 epi 1 → A/Asia/Malaysia97 epi 2 → XhoI	67.1	10.02

2.4. 실험동물에 대한 시험 백신의 효능시험 및 시험법 탐색 연구(협동기관: (주)노터스)

2.4.1. 항원 최적화를 위한 기니피그 효능 시험

구조 및 배치, 링커 등을 개선한 재조합 단백질 백신의 효능비교시험을 위하여 주관기관에서 특별하게 조정된 항원량을 포함하는 재조합 단백질 백신을 제공받음. 약효 및 독성시험에 널리 사용되며 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어, 시험결과의 해석 및 평가가 용이한 기니피그를 실험동물로 선정하였음.

280~330g 내외의 기니피그(female)를 입식하여 순화과정을 거쳐 건강한 개체를 선별하여 체중

에 따라 균일하게 분포하도록 균을 나누어 사용함. 선별된 기니피그는 미부 표식법을 사용하여 개체를 식별하였고, 각 개체에 재조합 단백질 백신을 0.5 mL, 1회, 근육 접종하였음. 투여 3주, 4주 및 5주 경과 시 경정맥에서 전혈 약 5 mL 채혈 후 혈청을 수득하여 주관기관에 제공 하였음.

2.5. 재조합 단백질 항원 생산의 극대화를 위한 배양법 및 정제법 탐색 연구

2.5.1. 재조합 단백질 항원 생산의 극대화를 위한 배양조건 탐색(협동기관:(주)빔스바이오)

2.5.1.1. 재조합 단백질 발현율, E.coli 생산성 개선을 위한 배양조건 탐색

재조합 단백질의 발현율을 증가시키기 위해 배양온도 및 IPTG에 의한 발현농도, 배양 배지 등을 변경하여 비교실험을 수행하였음.

주관기관이 제공한 재조합 단백질 백신의 기 발현조건에서 배양온도(37°C, 30°C, 25°C), IPTG 처리농도(0.5 mM, 0.3 mM, 0.1 mM)를 추가하여 비교실험. 37°C 이하 배양온도에서는 발현효율이 급격히 낮아지고 적합한 배양온도는 37°C로 확인(그림 10A, 녹색화살표)하였음. 또한 0.5 mM와 0.3 mM IPTG 처리농도에서는 발현효율에 큰 차이가 없었으나, 0.1 mM IPTG 처리농도에서는 발현효율이 감소(그림 10A, 적색화살표)함. 재조합단백질 발현에 적당한 IPTG 처리농도를 0.3 mM로 판단됨.

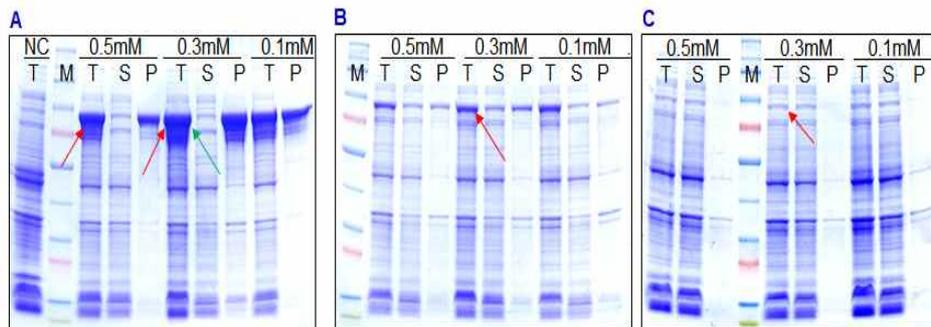


그림 10. 재조합단백질 발현 비교시험(배양온도, IPTG 농도 영향 비교)

A: 37°C 배양온도에서 IPTG 처리농도 비교, SDS-PAGE

B: 30°C 배양온도에서 IPTG 처리농도 비교, SDS-PAGE

C: 25°C 배양온도에서 IPTG 처리농도 비교, SDS-PAGE

;M: Molecular weight marker

;NC: Non-IPTG induced control, T: Total lysate

;S: Soluble supernatant fraction, P: Insoluble pellet fraction

표 19. 재조합 단백질 발현 배양배지 조성

배 지 명	조 성
LB (Luria Broth)	Tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, Yeast extract 5.0 g/L
TB (Terrific Broth)	Yeast extracts 24 g/L, Soy Peptone 12 g/L, K ₂ HPO ₄ 5 g/L, KH ₂ PO ₄ 6.75 g/L, 0.4% Glycerol
mTB (modified TB)	Yeast extracts 24 g/L, Soy Peptone 12 g/L, K ₂ HPO ₄ 5 g/L, KH ₂ PO ₄ 6.75 g/L, 2.0% Glycerol

기존 배양배지인 LB, 개선 배지인 TB, mTB(표 19) 를 비교 시험한 결과, 각 배지 종류별 발현 효율은 비슷한 수준으로 확인(그림 11) 확인되었고, 더 많은 wet cell을 제조할 수 있는 mTB 배지가 발현에 유리할 것으로 판단함.

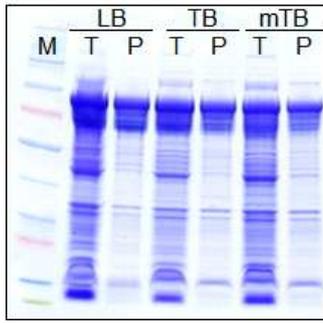


그림 11. 재조합단백질 발현조건 최적화(배지 종류별 영향)

;M: Molecular weight marker
;T: Total lysate, P: Insoluble pellet fraction

주관기관의 기 발효조건과 위탁기관에서 개발된 발효조건으로 실험실 규모(5 L)의 배양을 진행하여 발현을 검증하고, 개발된 발효배지의 탄소원과 발효운전 방식을 변경하여 발현 및 wet cell 제조수율을 비교함.

IPTG 처리농도만을 변경한 기 발현조건과 개발된 발효조건을 적용하여 성장곡선과 발현율을 비교 결과, pH와 DO조건이 발현에 영향을 끼치므로 pH6.8, DO 30~50%로 유지하였을 때 동일한 성장곡선(그림 12)을 나타냄. 재조합 단백질 발현시점에 추가 탄소원을 공급해 주는 실험실 규모의 기 발효조건과 달리 개발된 발현조건은 추가 탄소원 공급 없이 유사한 발현율(그림 13)을 나타내어 실험실 규모의 배양은 물론 대량생산 시에도 적용 가능할 것으로 사료됨.

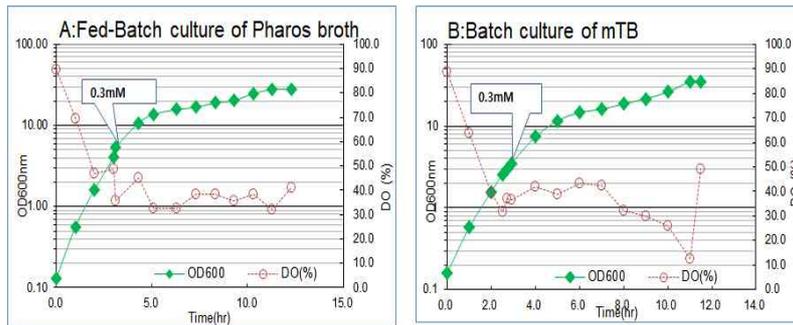


그림 12. 재조합단백질 발현 E.coli. 성장곡선(5L)

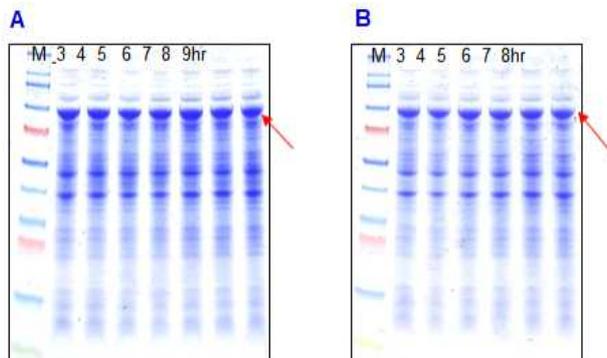


그림 13. 재조합 단백질 발현 E.coli. 발현을 확인(5L)

A: 4% Glucose 기 발효조건, B: mTB 개선 발효조건

2.5.2. 재조합 단백질 백신 공정 최적화 및 대량 생산 시스템 개발 (협동기관:(주)씨티씨백)

2.5.2.1. 재조합 단백질 항원 및 백신의 공정최적화

재조합 단백질 백신 생산 극대화를 위한 배양법 및 정제법 탐색연구를 위해 실험실 규모 및 중규모에서 배양법 및 정제법을 개선·검증하고 대량배양규모에 적용하였음.

실험실 규모에서 재조합 단백질 발현 균주의 성장에 영향을 주는 환경요인(pH, DO, 탄소원 등)에 대한 연구를 진행하였음. 기 개발 배양배지와 mTB 배지에서 pH 영향을 비교하였을 때, 발현 균주가 성장함에 따라 pH가 낮아져 성장과 발현효율이 현저하게 낮아지는 것을 확인하였음. 또한 발현균주 세포성장기에 용존산소량(DO, dissolved oxygen)이 급속히 감소하는 것을 확인하였고 이에 따라 air 공급 및 교반속도를 조정하여 적정 DO(30~50%)를 유지할 필요성이 있음.

표 20. 배양환경요인 실험

Exp.#	Batch #2	Batch #4	Batch #6	Batch #1	Batch#8
배지	기개발 배양배지(4% Glucose)			mTB(2% Glycerol)	
pH	uncontrolled	pH6.8	pH6.8	uncontrolled	pH6.8
DO	uncontrolled	uncontrolled	30~50%	uncontrolled	30%~50%
Induction OD _{600nm}	4.9	5.5	5.3	2.6	3.5
최종 OD _{600nm}	5.7	11.2	27.7	7.4	34.6
발현유도 배양 시간	5.5hr	6.3hr	9hr	6hr	8hr
Cell Mass(g/L)	20	38	66	19	63.5

기개발 배양배지를 기본으로 하여 탄소원을 변경실험을 수행하고, 탄소원이 glucose에서 glycerol 로 변경하여도 세포성장 및 발현효율이 유사함을 확인하였음(그림 14)

표 21. 배양배지 탄소원 변경 실험

Exp.#	Batch #4	Batch #3	Batch #6	Batch #5
배지	기 개발 배양배지(4% Glucose)			
탄소원	4% Glucose	2% Glycerol	4% Glucose	2% Glycerol
pH	pH6.8 Control			
DO	Uncontrolled (Air 0.5VVM 공급)		30~50%	
Induction OD _{600nm}	5.5	5.1	5.3	5.1
최종 OD _{600nm}	11.2	9.7	27.7	26.7
발현유도 배양 시간	6.3hr	6hr	9hr	8hr
Cell Mass (g/L)	38	39	66	61

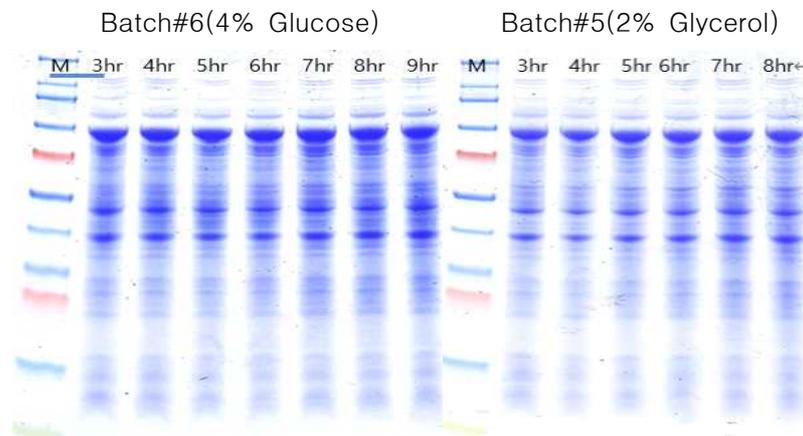


그림 14. 탄소원 변경 배양배지 재조합 단백질 발현을 확인

기개발 배양배지를 기본으로 하여 발현 최적화 과정을 거쳐 최적배지로 선정된 mTB(2% glycerol)에 DO 30~50%, 0.3mM IPTG 조건을 발효공정에 적용하였음. pH 6.8 조건의 배양배지에서 최종 OD 34.6으로 배양균주 254g(63.5g/L)을 회수하여 기개발 배양배지와 유사 또는 향상된 수준으로 판단됨(표 22, 그림 15).

표 22. 본배양 배지 비교 실험

Exp.#	Batch #7	Batch #1	Batch #8
배지	Modified TB (2% glycerol)		
pH	6.8	7.3~7.7	6.8
DO	30~50%	Uncontrolled (Air 0.5VVM 공급)	30~50%
Induction OD _{600nm}	-	2.6	3.5
최종 OD _{600nm}	28.6	7.4	34.6
발현유도 배양 시간	-	6hr	8hr
Cell Mass(g/L)	-	19	63.5

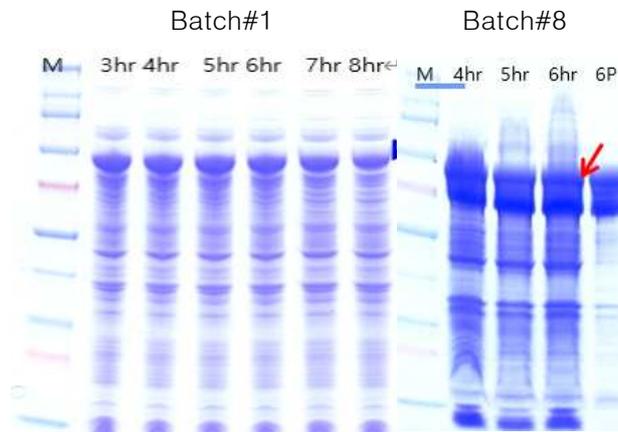


그림 15. 본배양 배지 재조합 단백질 발현을 확인
;6P: insoluble pellet fraction(6hr)

본 배양에서 지속적인 성장과 발현유도를 위해 feed medium을 설계하고 재조합 단백질 발현에 적합한 조성을 선정하기 위해 비교 실험함. mTB(2% glycerol)를 기초로 농축배지 2TB4G와 glycerol을 제외한 2TB, soy peptone을 제외한 glycerol과 yeast extract를 기본으로 구성된 10G10Y와 glycerol 만으로 구성된 10G 총 4종류 feed medium을 설계함(표 23).

표 23. Feed medium 구성표

Feed medium	조 성
2TB4G	4% glycerol, 48g/L Yeast Extract, 24g/L soy peptone
2TB	48g/L Yeast Extract, 24g/L soy peptone
10G10Y	10% glycerol, 10% Yeast Extract, 5g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O
10G	10% glycerol, 5g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O

Feed medium은 재조합 단백질 발현 시점에서 전량 일시 투여하였으며, 발현 후 7~8시간 동안 배양하였음. 10G10Y feed medium 조건에서 세포성장 및 발현이 가장 좋은 것으로 확인되었으

며, 2TB4G와 2TB feed medium 조건에서는 발현유도 6시간 후에는 발현효율이 저하됨을 확인함(표 24, 그림 16).

표 24. Feed medium 비교 실험

Exp.#	Feed medium	Induction (OD ₆₀₀)	Feed (OD ₆₀₀)	Feed medium Vol. (mL)	Cell Mass (g/L)	OD ₅₈₀ (Final)
Batch #9	2TB4G	6.4	6.4	500	64 (7hr)	30
Batch #10	2TB	6.5	6.5	500	52 (7hr)	31
Batch #11	10G10Y	6.2	4.1	500	86 (8hr)	33
Batch #12	10G	6.7	4.1	500	41 (7hr)	20

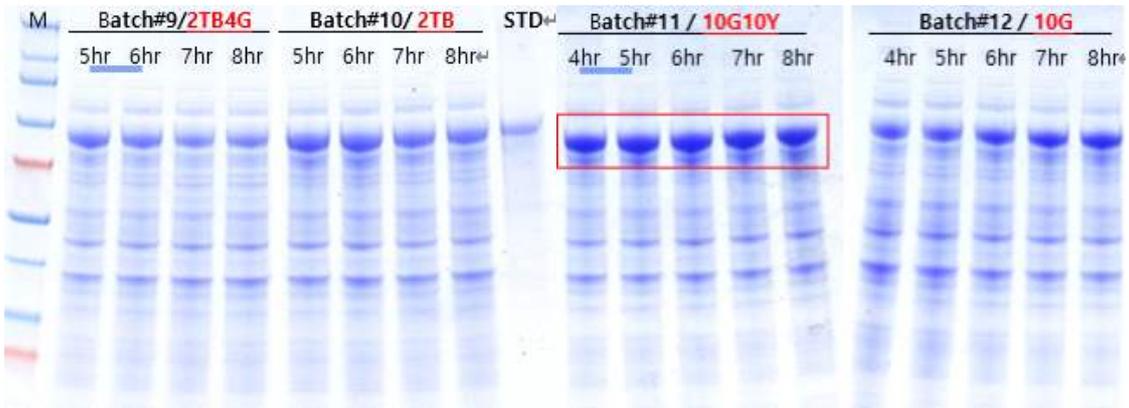


그림 16. Feed medium 비교 실험 발현을 확인

Feed medium 투입방식에 따른 발현균주의 성장 및 발현율을 조사하기 위하여, feed medium 을 전량을 일시에 투입하는 일시투입과 일정시간동안 일정한 속도로 투입(1.0L/5hr)하는 정속투입의 2가지 방식으로 비교 실험함. feed medium 10G10Y를 선정하여 실험하였음. 일시투여 방식의 경우 기개발 배양 방식보다 발현균주의 성장이 개선되고 발현율은 유사한 것으로 보여짐. 정속투입방식의 경우 10G10Y 정속투여 방식이 일시투여 방식보다 발현균주 성장이 우수하나 발현율이 재조합 단백질 발현 유도 6시간 이후부터 감소함을 확인함(표 25, 그림 17).

표 25. Feed medium 투입방식 실험

Exp.#	FBM	Induction (OD ₅₈₀)	Feed Start (OD ₅₈₀)	Feeding Time	FBM Vol. (L)	Feeding Rate	Cell Mass (g/L)	OD ₅₈₀ (Final)
Batch #13	2TB4G	6.2	4.4	5hr	1.0	200ml/hr	71 (7hr)	31
Batch #14	10G10Y	6.1	4.5	5hr	1.0	200ml/hr	97 (8hr)	46



그림 17. Feed medium 비교 실험 발현을 확인

Feed medium 정속투입 시 투입량 투입속도에 따른 발현균주의 성장 및 발현율을 조사하기 위하여, 투입량과 투입시간(0.5~1.0 L/5hr)을 비교 시험함. feed medium을 1.0 L 로 하여 5~7시간 이내에 투입한 조건이 발현 균주의 성장은 개선되고, 발현율이 유사한 것으로 확인됨(표 26, 그림 18).

표 26. Feed medium 투입량 및 투입속도 비교 실험

Exp.#	Induction (OD ₅₈₀)	Feeding				Cell Mass (g/L)	OD580 (Final)
		OD ₅₈₀	Time	Vol (L)	Rate (ml/hr)		
Batch #15	6.3	4.3	5hr	0.5	100	77 (8hr)	36
Batch #16	10.5	4.3	5hr	0.5	100	74 (7hr)	37.5
Batch #17	14.9	4.0	6.6hr	1.0	100(3hr) & 200(3.6hr)	92 (11hr)	41.4
Batch #18	16.4	4.2	5hr	1.0	200	93 (9hr)	39.4

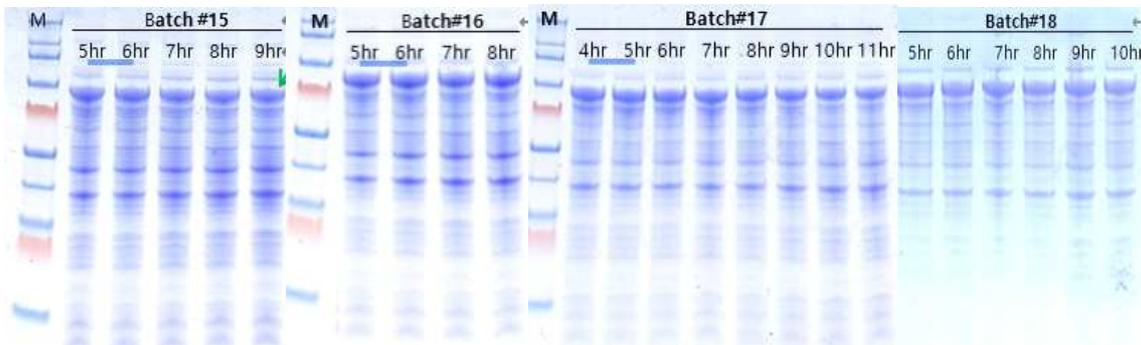


그림 18. Feed medium 투입량 및 투입속도 비교 실험 발현을 확인

Feed medium 최적 투입시점을 선정하기 위해 OD 4, 6, 8 조건에서 투입효과를 조사하였음. OD8 조건 투입 시에는 발현균주의 성장을 지속적으로 유지하기 어려우며, OD 4, 6 조건 투입 시 발현균주 성장에 유리한 것으로 판단됨(표 27, 그림 19).

표 27. Feed medium 투입시점 비교 실험

Exp.#	Induction (OD ₅₈₀)	Feeding				Cell Mass (g/L)	OD ₅₈₀ (Final)
		OD ₅₈₀	Time	Vol (L)	Rate (mL/hr)		
Batch #18	16.4	4.2	5hr	1.0	200	93 (9hr)	39.4
Batch #19	20	8.1	5hr	1.0	200	53 (6hr)	22
Batch #20	15	6.1	5hr	1.0	100(3hr) & 200(3.6hr)	97 (10.5hr)	40.7

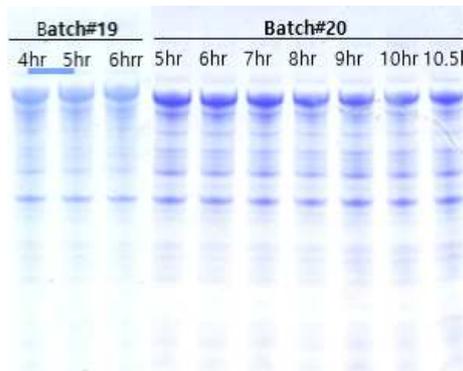


그림 19. Feed medium 투입 시점 비교실험 발현을 확인

구제역 재조합 단백질 발현을 유도하기 위한 inducer인 IPTG 최적 투여 시점을 선정하기 위해 OD 6, 10, 15, 20 조건에서 투입 효과를 조사하였음. OD 6, 10 투여 조건보다 OD 15~16.4 투여 조건이 발현 균주의 성장에 가장 유리하였고 발현율도 유지되는 것으로 확인됨(표 28).

표 28. IPTG 투입 시점 비교실험

Exp.#	Induction (OD ₅₈₀)	Feeding				Cell Mass (g/L)	OD ₅₈₀ (Final)
		OD ₅₈₀	Time	Vol (L)	Rate (ml/hr)		
Batch #15	6.3	4.3	5hr	0.5	100	77 (8hr)	35.5
Batch #16	10.5	4.3	5hr	0.5	100	74 (9hr)	37.5
Batch #18	16.4	4.2	5hr	1.0	200	93 (9hr)	39.4
Batch #19	20	8.1	5hr	1.0	200	53 (6hr)	22
Batch #20	15	6.1	5hr	1.0	100 & 200	97 (10.5hr)	40.7

본배양 조건에서 pH 제어 범위에 관한 영향을 조사하고자 pH6.8, pH 6.8~7.2, pH7.2 유지 조건을 비교 실험하였음. 3가지 조건 모두에서 발현균주 성장과 발현율이 유사한 수준으로 확인되었음(표 29, 그림 20).

표 29. pH 제어조건 비교 실험

Exp.#	pH	Induction (OD ₅₈₀)	Feeding				Cell Mass (g/L)	OD580 (Final)
			OD ₅₈₀	Time	Vol (L)	Rate (mL/hr)		
Batch #17	6.8	14.9	4.0	6.6hr	1.0	100 & 200	92 (11hr)	41.4
Batch #21	6.8~7.2	14.5	5.7	5.7hr	1.0	100 & 200	96 (10hr)	37.5
Batch #22	7.2	15.5	5.9	5.9hr	1.0	100 & 200	97 (8.4hr)	37.5

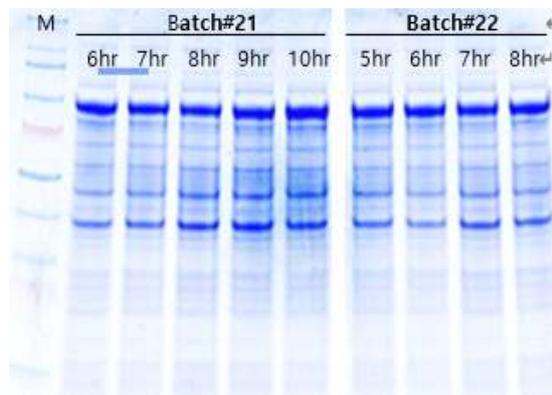


그림 20. pH 제어조건 비교실험 발현을 확인

구제역 재조합 단백질 항원을 불용성 단백질로 발현되기 때문에 순도가 높은 봉입체(IB, Inclusion body)를 수거하기 위한 공정을 연구하였음. 기계발 공정을 기본으로 하여 배양 균주의 파쇄조건, 원심분리 조건을 비교 실험함. 파쇄조건 30,000psi, 3회 후, 3회 세척과정을 거쳐 3,500~4,000rpm으로 원심 분리하였을 때 순도가 향상된 IB를 수거할 수 있음을 확인함(표 30, 표 31, 그림 21). 또한 IB wash 과정에서 배양균주의 LPS를 제거하기 위해 Triton X-100을 첨가하여 IB의 세척을 진행하였음.

표 30. 배양균주 파쇄 및 IB 정제 조건-1

Step	압력(psi)	파쇄 횟수	원심분리(g force / min)
Wet cell 파쇄	30,000	2 cycle	4,500 / 40
IB Washing I (1st)	30,000	2 cycle	3,500 / 40
IB Washing II (2nd)	30,000	1 cycle	3,500 / 30
IB Washing III (3rd)	-	-	3,500 / 30

표 31. 배양균주 파쇄 및 IB 정제 조건-2

Step	압력(psi)	파쇄 횟수	원심분리(g force / min)
Wet cell 파쇄	30,000	3 cycle	4,000 / 40
IB Washing I (1st)	30,000	1 cycle	3,500 / 30
IB Washing II (2nd)	30,000	1 cycle	3,500 / 30
IB Washing III (3rd)	-	-	3,500 / 30

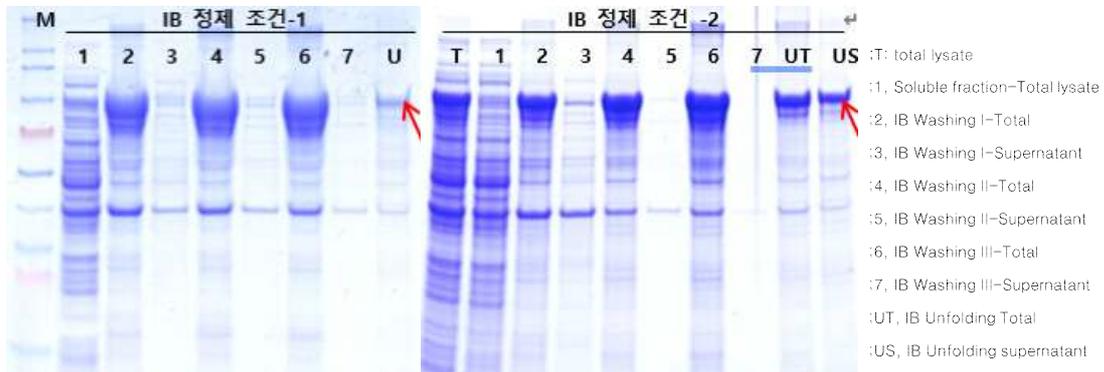


그림 21. pH 제어조건 비교실험 발현을 확인

IB를 재조합 단백질 정제하기 위해서는, IB를 가용화하여 unfolding 상태로 만들어 정제공정을 거쳐야 함. 가용화 과정에서 회수율을 향상시키고자 가용화 buffer 조성 및 첨가물 처리에 관하여 비교 실험함(표 32, 그림 22).

표 32. 가용화 buffer 조성

Unfolding 버퍼	버퍼 조성
Unfolding #1	8 M Urea, 10 mM Tris, 50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH8.0)
Unfolding #2	2 mM DTT, 8 M Urea, 10 mM Tris, 50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH8.0)
Unfolding #3	8 M Urea, 50 mM Tris(pH8.0)
Unfolding #4	2 mM DTT, 8 M Urea, 50 mM Tris(pH8.0)

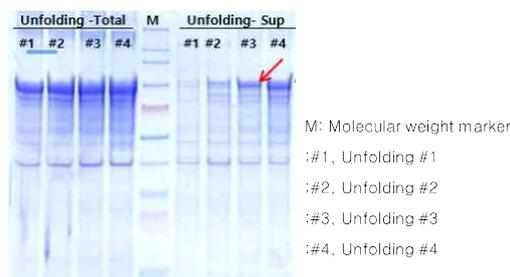


그림 22. 가용화 buffer 조성 비교 실험 발현을 확인

DTT 처리 농도에 따른 IB 가용화율을 비교하고자 2, 5, 10mM DTT 처리 조건으로 실험하였을 때, 2mM DTT 처리 조건에서 IB 용해율 및 회수율이 가장 우수함을 확인하였음(표 33).

표 33. DTT 농도별 IB 회수율

조건	시료	회수율(%)
2 mM DTT	Total Unfolding solution	100
	Supernatant	82.3
5 mM DTT	Total Unfolding solution	100
	Supernatant	54.1
10 mM DTT	Total Unfolding solution	100
	Supernatant	58.4

가용화된 IB로부터 구제역 재조합 단백질 회수하기 위해서 니켈 친화성 크로마토그래피 (Ni-affinity chromatography) 정제방법을 사용하고 있음. 높은 순도의 재조합 단백질을 얻기 위해서 정제과정 중의 사용되는 buffer, 재조합 단백질의 용출조건(imidazole 농도) 등에 대해 비교 실험함(표 34, 그림 23).

구제역 재조합 단백질의 용출조건시험에서 50mM~300mM imidazole에서 용출되어 적정 농도 조사의 필요성이 있음.

표 34. 구제역 재조합 단백질 정제 용출조건시험

정제 단계	버퍼 조성
Equilibration buffer	6 M Urea, 0.3 M NaCl in 50 mM Tris (pH8.0)
Loading sample	구제역 재조합단백질 가용화 IB / 6 M Urea, 0.3 M NaCl in 50 mM Tris(pH8.0)
Washing 1 buffer	50 mM IMDZ in EQ buffer
Washing 2 buffer	150mM IMDZ in EQ buffer
Washing 3 buffer	300mM IMDZ in EQ buffer
Regeneration buffer	0.1N NaOH

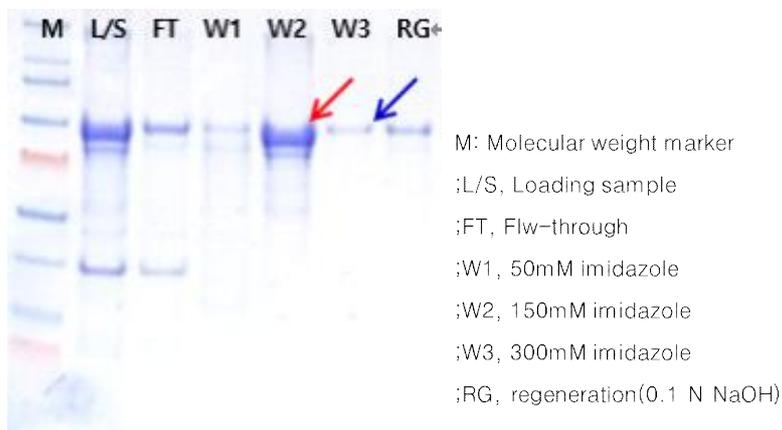


그림 23. 구제역 재조합 단백질 정제 용출 조건시험 확인

재조합 단백질 항원 대량생산을 위한 E.coli 배양에 관한 개선 조건을 위탁기관을 통해 탐색하였음. 개발된 발효조건(mTB, 2% Glycerol)과 기 발효조건(4% glucose)을 모두 Large scale(60 L) 규모에 적용하여 성장곡선(그림 24)과 발현효율(그림 25)을 비교한 결과, 실험실 규모 배양조건(5 L)과 유사한 결과로 나타남. 개선 발효조건 배양 중 재조합 단백질 발현 후 5시간째에 DO를 유지하지 못하였음에도 불구하고 성장곡선과 발현율이 유사하게 나타난 것으로 볼 때, 후속실험으로 DO를 유지할 경우 더 많은 cell mass를 확보할 수 있을 것으로 예상되어 E.coli 배양 생산성을 더 개선할 수 있음.

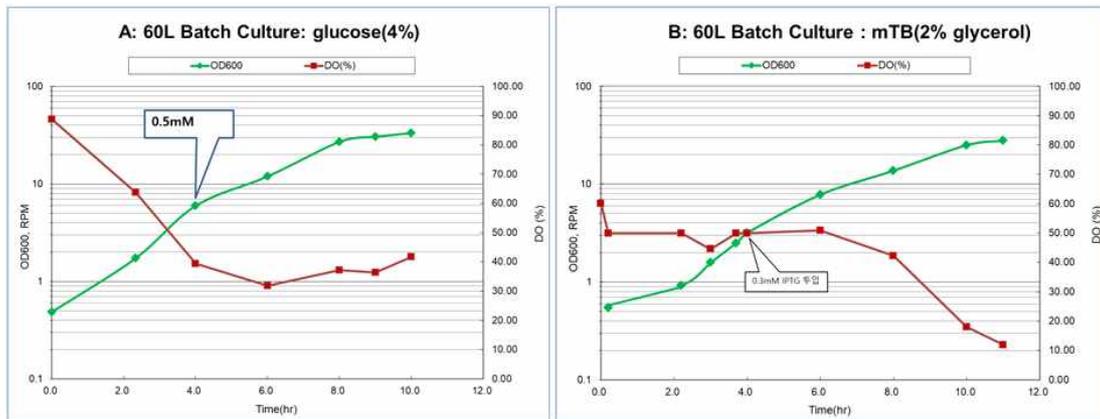


그림 24. 재조합 단백질 발현 E.coli. 성장곡선(60 L)
A: 4% Glucose 기 발효조건, B: mTB (2% Glycerol) 발효조건

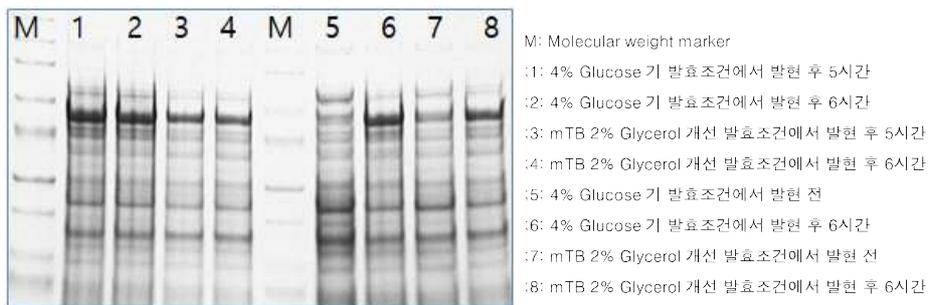


그림 25. 재조합 단백질 발현 E.coli 발현을 확인(60 L)

2.5.2.2. 후보백신의 제조 및 공정평가

주관기관에서 선정된 후보 재조합단백질 항원을 중규모로 배양 및 정제과정을 거쳐 후보백신을 생산하고 각 공정을 실험실 규모와 비교·분석

실험실 규모 및 중규모에서 검증된 배양법을 대량배양규모에 적용하여 배양을 실시하고 각 공정을 실험실 규모와 비교함. 약 10%에 해당하는 규모로 1차, 2차, 3차 증배양을 거쳐 대량배양으로써 400 L, 600 L 본배양을 실시하였음. 600 L 본배양을 실시하여 재조합단백질 발현 균주의 성장 곡선과 배양환경을 모니터링하고 배양균주를 23.98 kg 회수하였음. 재조합단백질의 발현정도를 SDS-PAGE를 통해 확인하였으며 실험실 규모 및 중규모에 비하여 발현율이 감소함을 확인하였음. 이후 400 L 본배양을 실시하여 배양균주 8kg을 회수하고 600 L 배양규모에 비하여 재조합 단백질 발현 정도가 개선됨을 확인하였음. 400 L 배양 균주 중 1316g을 파쇄하여 봉입체(Inclusion body)를 232.3 g(17%) 회수하였음. 대량 배양 규모의 배양환경 모니터링 자료와 성장 곡선 등을 분석한 결과, 실험실규모 및 중규모 배양시와 대량배양 시 상이함을 확인하였음(그림 26, 27). 배양 규모가 증가함에 따라 증배양 횟수 증가와 본배양시 낮은 교반수 등이 원인으로 예상되며 추가 원인을 분석하고 개선을 위한 연구를 진행하였음.

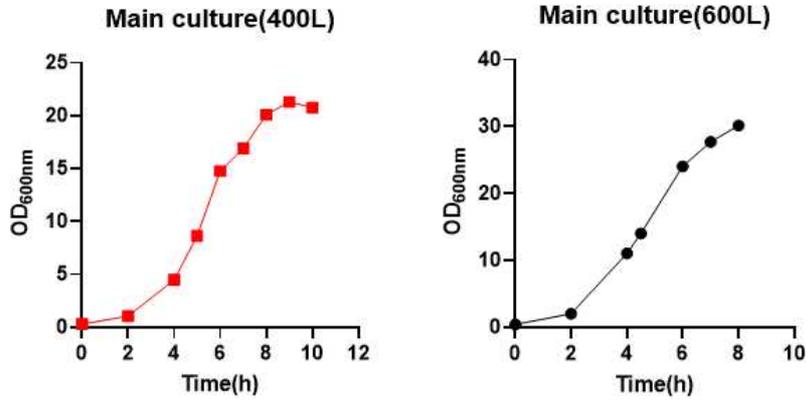


그림 26. 구제역 재조합 단백질 대량배양 시험

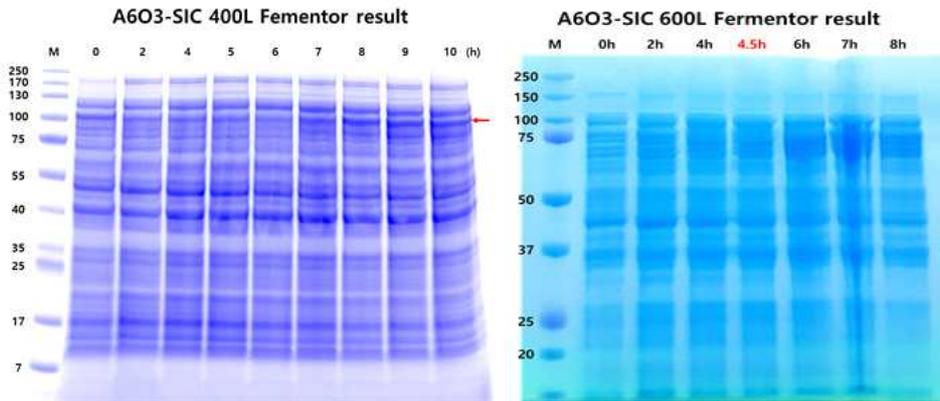


그림 27. 구제역 재조합 단백질 대량배양 시험 확인

대량생산을 진행하기 전 60 L 개발공정을 토대로 단계별 생산 수율을 비교하였으며, 이에 따라 600 L 대량생산 공정에 대한 수율을 예측하여 생산공정을 진행하였음(표35).

표 35. 구제역 재조합 단백질 백신 공정 수율 비교

공정		60L		600L		
		PMB	mPMB	PMB	mPMB	
배양	Wet cell(g)	2438.95	1810.41	24389.5	18104.1	균주파쇄: 243L
세포파쇄 및 IB 분리	IB(g)	370	90.11	3700	901.1	
항원 가용화	농도(mg/ml)	3.95	4	3.95	4	가용화 IB 148L
	부피(ml)	14800	3604.4	148000	36044	
	총량(mg)	58460	14417.6	584600	144176	
니켈친화크로마토그래피	정제(mg)	12000	12000	112500	112500	정제버퍼:30L(1.6L column), 300L(15L column)
	농도(mg/ml)	0.51	0.63	0.51	0.63	
	총량(mg)	2550	3150	25500	31500	
투석	UF/DF(mg)	1912.5	2362.5	19125	23625	용출항원: 50L, 5회 정제 250L DF 버퍼: 50L (1회), 5회 DF buffer 250L
공정반복	횟수	4.87	1.20	5.20	1.28	
원액	예상(mg)	9,317	2,838	99,382	30,277	
완제	dose	14,117	4,301	150,579	45,874	

2.5.2.3. 구제역 항원 대량생산기술 개발

재조합 단백질 구제역 항원의 대량생산시스템을 최적화하여 개발하였음. 실험실 수준에서 정립된 기존 생산기술을 개선하여 고농도/고효율 대장균 대량배양기술과 재조합 단백질 항원 대량정제공정을 개발하였음. 재조합 단백질 항원을 KvGMP에서 대량생산하여 개발된 대량생산시스템의 제조공정 적합성과 생산성을 확인하고, 생산공정에 대한 경제성을 평가하였음. 제조 목표로서 완제 100,000 doses 이상으로 하고, 배양규모는 working volume 600 L, cell mass 20 kg 이상을 설정하였음. 정제원료의약품 60 L, 재조합 단백질 기준 70 g 이상(1.2 mg/mL, 순도 80% 이상)

을 생산하여 formulated bulk 200 L 이상을 제제화하고 완제품 50 mL 용량 4,000 vials를 생산하고자 하였고, 구제역 재조합 단백질 백신 원액 및 완제의 공정도는 아래와 같다(표 36, 그림 28, 29).

표 36. 구제역 재조합 단백질 백신 공정 규모 및 목표

구분	공정	규모	비고
원액	Primary seed culture	50 mL	500 mL flask
	Secondary seed culture	60 L	100L fermenter
	Main culture	600 L	Main culture vol. 의 30%
	Cell disruption	180 L	
	Inclusion body solubilization	200 L	Solubilization buffer 40ml/g IB
	LC loading	200 L	15L Ni-IDA column 사용 5회
	Elute	150 L	
	Diafiltration	750 L	Elute vol.의 5배
	Concentration	60 L	≥1.2 mg protein/mL
완제	Formulation	200 L	Emulsification, 정제 원액 30# + 부형제 70%
	Vialing	4,000vials	50ml/vials

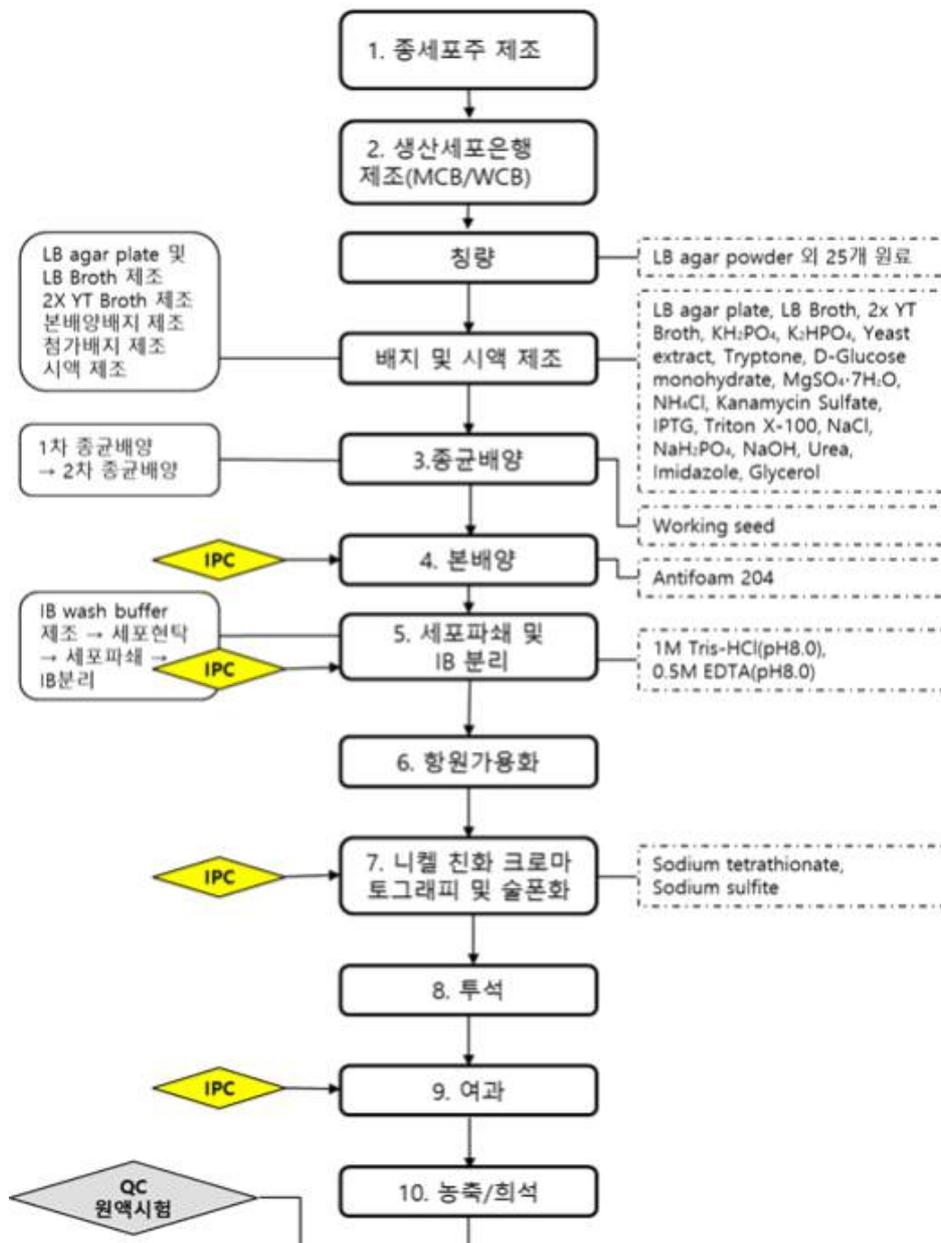


그림 28. 구제역 재조합 단백질 백신 원액 제조공정도

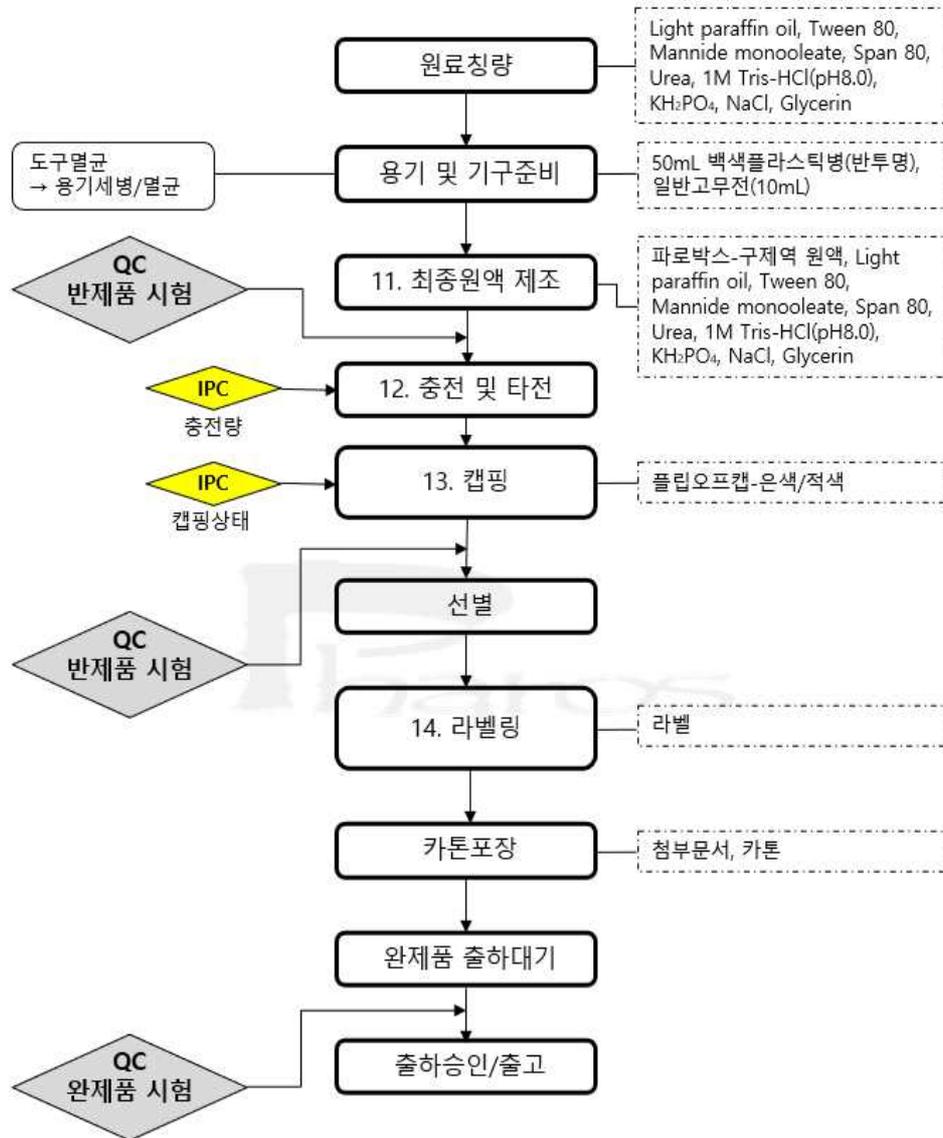


그림 29. 구제역 재조합 단백질 백신 완제 제조공정도

구제역 재조합 단백질 백신의 원액생산을 위하여 협동기관 (주)씨티시백은 흥천백신공장(강원도 흥천군 흥천읍 생명과학길 94)의 kvGMP 시설내에서 약 20일(working time 200hr) 동안 최종 제조공정을 수행하였음. 실험실 수준에서 정립된 기존 생산기술은 배양규모 3L 수준으로 7일 동안 원액 및 완제 생산이 가능하였으나, 본 과제의 재조합 단백질 구제역 항원의 대량생산시스템 개발 및 검증은 실험실 규모의 본배양 기준 200배에 해당하는 규모로써 정립된 기존 생산일정과 동일하고자 하였으나 보유기기 및 가용 인력 등을 고려하여 실현가능한 일정으로 조정하였음.

- 균주의 안정성 확인: WCB(Working Cell Bank)을 통상적으로 계대 배양하여 유전자 서열 확인 결과 안정성에 대한 문제가 없었음. E.coli는 광범위한 유전자 클로닝과 발현 벡터를 증식하는데 생물학적으로 안전한 생물체로 분류되었으며 다수의 상업적 적용분야에서 단백질 생산용으로 안전하게 사용되어 왔음. 본 과제의 구제역 재조합 단백질을 발현하기 위해 사용된 pET-28b(+) 계열의 plasmids는 IPTG를 이용하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 유도인자 비례(dose-dependent)하게 조절하도록 구축되어 있음. 또한 N-말단에 6개의 Histidine이 발현되고 재조합 단백질 발현 유전자가 포함된 plasmids에 의해 형질전환된 대장균이 항생제 저항성을 갖도록 설계되어 있어 형질전환체의 선별이 용이함(그림 30, 31).

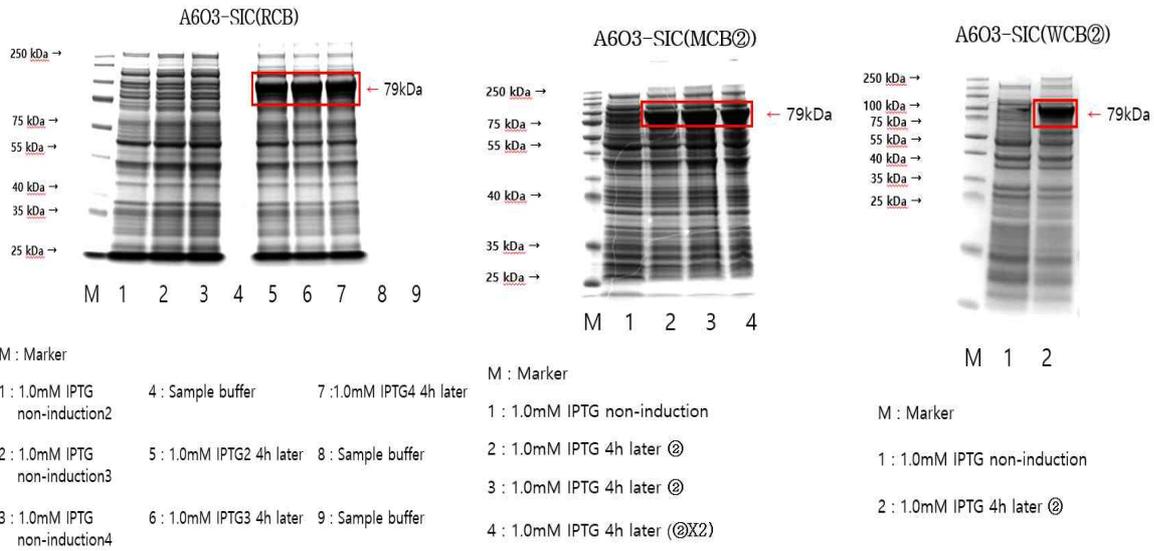


그림 30. Working Cell bank 제작 및 발현확인

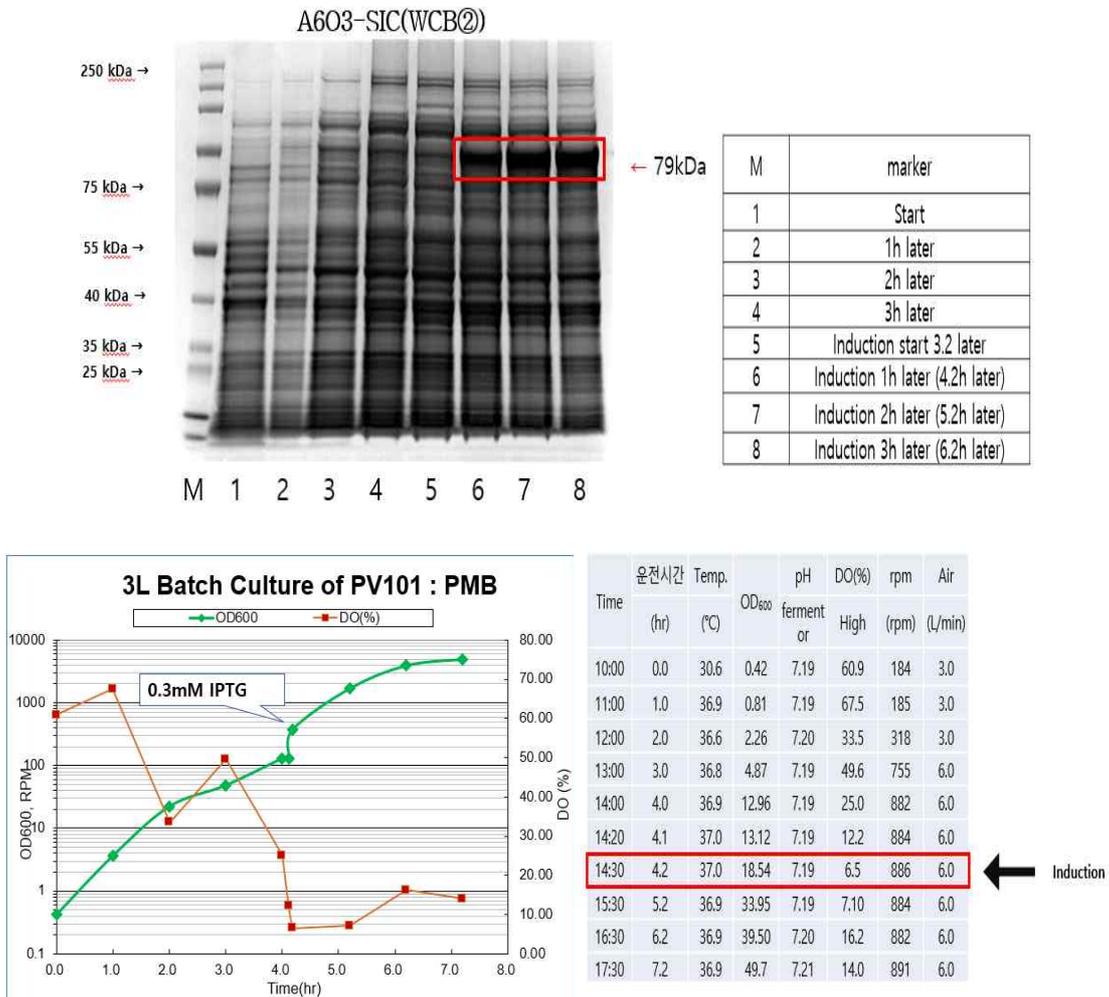


그림 31. 3 L 배양 테스트(WCB)

- 배양: 실험실 규모에서 설정된 배양방법은 유가식 배양(fed-batch culture)으로 회분식 배양(batch culture)에 비하여 대사산물의 생성을 유도하기에 용이하기 때문에 적용되었으며, 유가식 배양법을 적용하되 필요한 영양원을 일시적 또는 지속적 투여를 비교하여 생성된 IB의 총량 및 가용화도에 차이가 없었음. 또한 유가식 배양에 의하여 struvite(마그네슘 인산염)가 형성되는 것을 확인하였으며, struvite는 배양배지 인산염의 암모니아성 용액과 추가 영양원인 마그네슘 용액과의 화학적 반응으로 생성되거나, 여러 가지 유기화합물에 의하여 생성되기도 하는 것으로 알려져 있음. 협동기관 (주)시티씨백에서는 kVGMP 시설이므로 배양이 완료된 배양액을 내부 연결관을 통하여 이동 후 연속원심분리기를 사용하여 수득하여야 하므로 침전물을 생성하지 않는 회분식 배양을 선정하였음.

회분식(batch) 발효에 의해 이루어지며, 종배양(1차, 2차, 3차), 본배양 공정으로 구성되었음. 1차 종배양은 WCB 1 vial을 꺼내서 해동시킨 후 접종 loop를 이용(10 μ L)하여 종균배양 고체배지(LB agar/1X Kanamycin sulfate)에 도말 한 후 37 $^{\circ}$ C 항온배양기 에서 밤샘(overnight) 배양함. 2차 종균배양은 10 mL의 2차 종균배양 배지(LB broth/ 1x kanamycin sulfate) 에 모두 접종 (1ml/vial)한 후 37 $^{\circ}$ C 진탕배양기에서 OD600=0.4~0.6이 될 때까지 배양함. 3차 종균배양은 2차 종균배양액을 6 mL를 취하여 60 L 의 3차 종균배양배지(2X YT broth/1X kanamycine sulfate)에 접종한 후 27 $^{\circ}$ C 진탕배양기에서 OD600=4.0~6.0이 될 때까지 배양함. 본 배양은 멸균이 완료된 본배양배지(600 L)가 들어있는 배양조(fermenter vessel)과 장비 제어반 (control unit)을 연결/설치하고 각 배양조건(Temperature: 37 $^{\circ}$ C, pH: 6.6~7.0, DO(%): 50, Auto speed: 500~900 rpm, Feed: Antifoam, 28~30% Ammonia solution)을 설정한다. 본배양배지에 500 mL의 영양소배지와 1X Kanamycin, 그리고 100~500 μ L Antifoam을 첨가한 후 배양조건에 맞도록 안정화 시킨다. 2차 종균배양액 200 mL을 배양조의 본배양배지에 접종하여 배양을 시작함. 배양 중 매 2시간 마다 배양액을 채취하여 OD600 값과 pH, rpm, DO(%), 특이사항 등을 측정하여 기록한다. 본배양의 OD600 값이 5~7 사이일 때, 1 M IPTG 용액을 0.5 mM이 되도록 넣고 목적단백질의 발현을 유도시킨다. 매 2시간 마다 OD 값을 측정하여 세포의 증식이 멈추면 배양을 종료함(표 37, 그림 32).

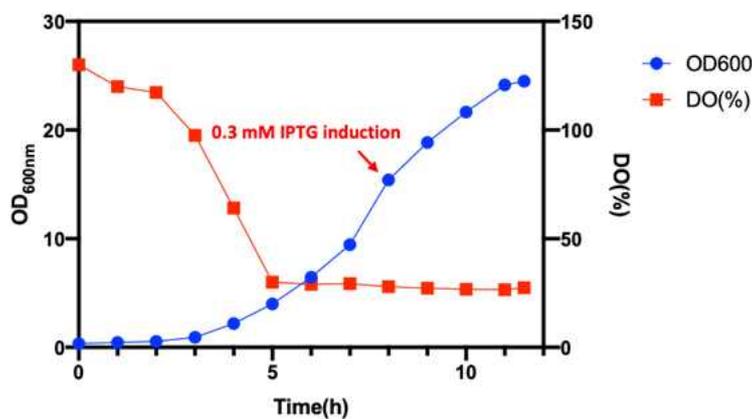


그림 32. 구제역 재조합단백질 발현 균주의 성장곡선(본배양: 600L)

표 37. 구제역 재조합단백질 발현 균주의 배양(본배양: 600 L)

Batch Manufacturing Record (BMR)							
1. 항원명 : A6O3-SIC							
2. Fermentation							
1) Seed culture(1st)		작업일: 2021.07.05			작업자: 이용재(김영훈)		
① 배지명	LB broth						
② 배양 Vol.	50 mL						
③ WCB No./접종량	1 mL						
④ 배양온도/RPM	37°C / 200rpm						
⑤ 배양시작시간	13:00	OD600		0.47			
⑥ 배양종료시간	17:30						
2) Seed culture(2nd)		작업일: 2021.07.05			작업자: 한상준(김영훈)		
① 배지명	2X YT						
② 배양 Vol.	60 L						
③ WCB No./접종량	18 mL						
④ 배양온도/RPM	30°C / 150rpm(144rpm)						
⑤ 배양시작시간	18:00	OD600		2.7			
⑥ 배양종료시간	2021.07.06 (09:30)						
2) Main culture		작업일: 2021.07.06			작업자: 김영훈		
① 배지명	PMB						
② 배양 Vol.	600 L						
③ Seed 접종량	60 L						
④ 배양온도	37°C						
⑤ 배양시작시간	10:00						
⑥ 배양 모니터링	1 페이지						
No.	시간	OD600	DO(%)	pH	RPM	Temp(°C)	비고
1	10:00(0h)	0.354	130	7.21	99.8	37	1wm, 660.2 L
2	11:00(1h)	0.443	120	7.2	99.8	36.6	1wm, 658.6 L
3	12:00(2h)	0.536	117.3	7.22	99.8	36.8	1wm, 653.8 L
4	13:00(3h)	0.923	97.6	7.2	99.8	37.3	1wm, 652.2 L
5	14:00(4h)	2.185	64.1	7.2	99.8	36.8	1wm, 651.6 L
6	15:00(5h)	4	30	7.2	99.8	37.4	1wm, 654.7 L
7	16:00(6h)	6.46	29	7.22	99.8	37.3	1wm, 645.3 L
8	17:00(7h)	9.46	29.3	7.2	149.7	36.9	1wm, 646.6 L
9	18:00(8h)	15.4	27.9	7.22	179.9	37.2	0.3mM IPTG, 1wm, 649.3 L
10	19:00(9h)	18.85	27.2	6.89	179.7	37.2	1wm, 645.1 L
11	20:00(10h)	21.65	26.7	7.22	179.9	36.7	1wm, 643.0 L
12	21:00(11h)	24.15	26.5	7.19	179.7	36.8	1wm, 641.4 L
13	21:30(11.5h)	24.5	27.4	7.29	180	36.7	1wm, 645.4 L
⑦ 배양종료시간	21:30:00						
3) Harvest		작업일:			작업자:		
RPM	온도	시간					비고
Cell wet weight		g (g/L)					
3. 세포파쇄		작업일: 2021.07.07			작업자:		
사용장비					파쇄압력/횟수		
IB weight	Before wash			After wash			

- 세포파쇄 및 단백질 봉입체(IB: Inclusion body)분리: 본배양액을 원심분리하여(8,000 rpm, 4℃ 30분) 세포를 수거한 후 세포의 무게를 측정하고, 검체를 채취하여 SDS-PAGE로 IPTG induction 전후 목적단백질의 발현 여부를 검사함. 회수한 세포를 IB wash buffer 에 현탁하여, 세포파쇄기(900-1,100 bar 고압균질기)에 2회 통과시켜 세포를 파쇄한 후, 원심분리 (8,000 rpm, 4℃ 30분)하여 IB pellet을 수거하였음. IB pellet의 무게를 측정하고, IB wash buffer II에 현탁한 후 원심분리(8,000 rpm, 4℃ 30분)하여 IB를 분리하고, 소량의 IB를 검체로 채취하여 SDS-PAGE로 분자량 및 순도를 확인하였음. IB는 -80℃에 보관하거나 다음 공정을 진행함(그림 33, 34).



(1) 배양액 수거(0hr)

(2) 배양액 수거(14hr)

그림 33. 구제역 재조합단백질 배양액의 보관

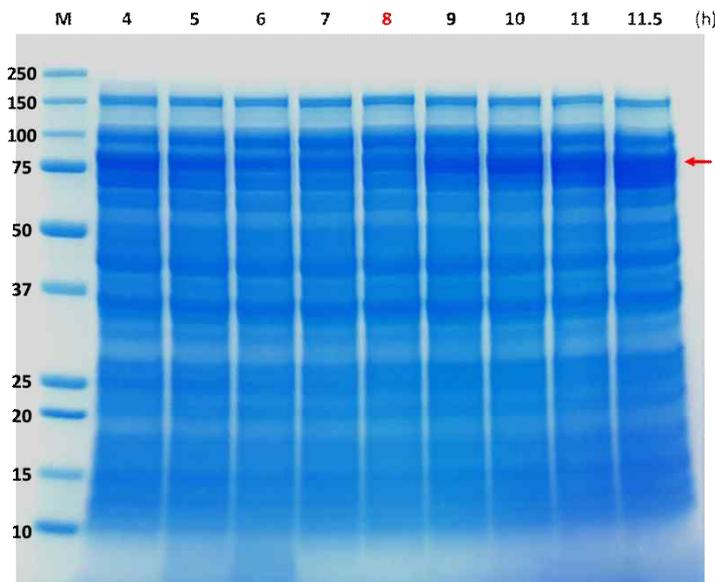


그림 34. 구제역 재조합 단백질의 발현 확인(SDS-PAGE)

- 항원 가용화: 세척 완료된 IB를 적정량의 10% WFI/90% Solubilization buffer로 현탁한 후 교반하여 완전히 녹이고 원심분리(12,000 rpm, 4℃ 30분)하여 상등액을 수거하였음. IB 상등액을 여과지(filter paper)와 0.8 μm 필터로 순차적으로 여과시키고 니켈 친화 크로마토그래피를 준비하고, 소량의 IB 상등액을 검체로 취하여 단백질 정량시험으로 농도를 확인하였음.

- 니켈 친화 크로마토그래피 및 술폰화: 니켈 수지(Ni-IDA resin)가 충전된 컬럼 및 AZURA Pilot LC 1000 HPG system(Knauer) 를 이용하여 다음과 같이 정제를 진행하였음(표 38). 0.1N NaOH 와 WFI를 사용하여 FPLC 세척하고 3CV (Column volume) running buufer를 이용하여 컬럼을 평형화하여, 정화된 IB 상등액을 컬럼에 주입하여 Ni-IDA에 IB 상등액을 결합시킨 후, 2CV

running buffer를 이용하여 다시 컬럼을 평형화 하였음. Running buffer와 Elution buffer를 혼합하여 unspecific Ag을 제거하기 위한 washing step(20% imidazole)를 2CV 세척하고, target Ag의 용출을 위하여 elution step(50% imidazole)을 3CV 용출하여 수거하였음. 재조합 단백질이 용출 완료된 컬럼은 세척 및 재평형화 방법에 따라 처리하고 실온에 보관하였음. 각 재조합 단백질 용출액을 검체로 재취하여 SDS-PAGE로 분석하고, 단백질 농도를 측정하여 목적 단백질 분획을 혼합하고, 총 단백질량을 측정하였음. 단백질 슬폰화를 위해 수거한 재조합 단백질 용출액에 10 mM Sodium tetrathionate, 100 mM Sodium sulfite를 넣고 4°C에서 밤샘 교반하였음.

표 38. 가용화 용액의 니켈 친화 크로마토그래피 (AZURA Pilot LC 1000 HPG system)

Step	Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)		CV		
1	Initial	100		400			Start	A1
2	37.5	100		400	15000 mL	1.00	Equilibration	A1
3	37.6	100		300			Sample binding start	A2
4	112.6	100		300	22500 mL	1.50	Sample binding end	A2
5	112.7	100		400			column wash start	A1
6	300.2	100		400	75000 mL	5.00	column wash end	A1
7	300.3	90	10	400			50mM imidazole wash start	A1
8	487.8	90	10	400	75000 mL	5.00	50mM imidazole wash end	A1
9	487.9	90	10	300			50~500mM imidazole elution start	A1
10	537.9	0	100	300	15000 mL	1.00	50~500mM imidazole elution	B
11	587.9	0	100	300	15000 mL	1.00	50~500mM imidazole elution end	B
12	588	100	0	400			column wash start	A1
13	663	100	0	400	30000 mL	2.00	column wash end	A1

- 투석: 정제 및 슬폰화된 재조합 단백질 용액은 제형화 완충액으로 30 kDa 필터가 장착된 TFF (tangential flow filtration) 시스템을 이용하여 투석하였음. 먼저 단백질 용액과 Running buffer를 TFF 필터에 연결하여 용액 중의 Imidazole을 제거한 후 단백질 농도가 1.5 mg/mL이 되도록 부피를 조정하고, Dialysis buffer를 TFF 필터에 연결하고 단백질 용액의 3배 부피로 투석하였음.
- 여과: 투석 후 회수한 재조합 단백질 용액에 침전물이 있는지 확인하고, 무균조건(생물안전 작업대, BSC) 하에서 0.2 μm 필터로 여과한 후, 소량 검체로 채취하여 SDS-PAGE 및 단백질 농도를 측정하였음.
- 농축/희석: 재조합 단백질 용액의 농도 조절이 필요한 경우 원심분리 또는 제형화 완충액을 이용하였음.
- 재조합 단백질 원액의 확인: 기개발된 구제역 재조합 단백질 원액에 대한 기준 및 시험방법에 준하여 후보 재조합 단백질의 원액을 확인하였음. 성상은 pH7.0~9.0인 무색 또는 연한 미색의 투명한 용액이며, 농도는 원액 1 mL을 취하여 BSA를 표준단백질로 한 Bradford 법으로 측정하여 1.2 mg/ml 이상이어야 함. 단백질 총합량을 3ug이 되도록 준비한 원액과 표준단백질액 BSA 3 ug을 SDS-PAGE gel(12%)에 전기영동 후, 염색하여 준비하고, 단백질이 분리 전개된 gel 이미지를 이미지 분석 프로그램(Carestream Molecular Imaging Software) 으로 분석하여 분자량 및 순도를 측정하였음(그림 35, 36).

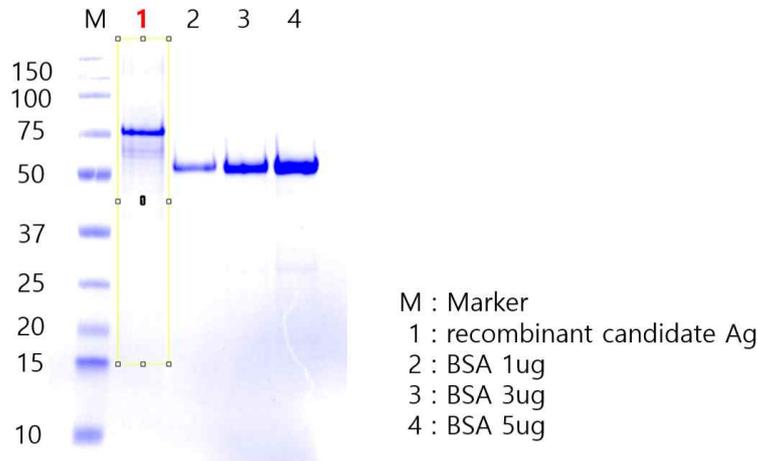


그림 35. 구제역 재조합단백질 원액의 확인(SDS-PAGE)

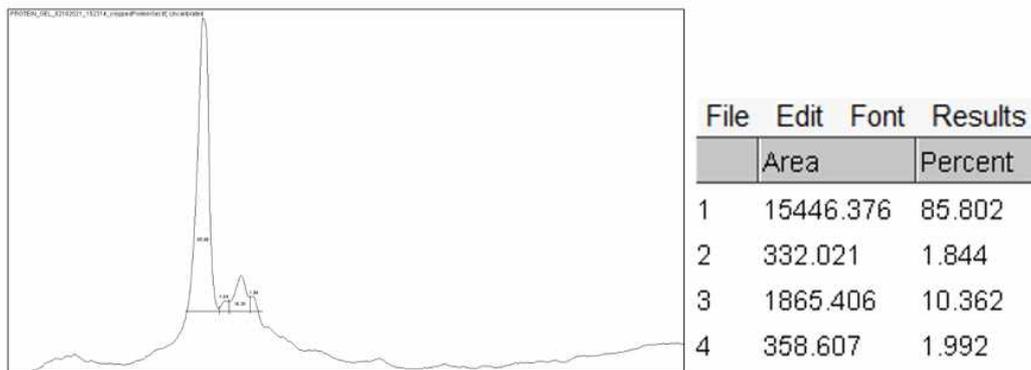


그림 36. 구제역 재조합단백질 원액의 확인(순도)

- 최종 원액의 제조: 모든 원료 및 자재는 멸균된 상태로 준비(표 39)하고, 모든 공정은 무균 조작으로 진행하였음. 수상(Water phase)용 초자에 계산된 필요량의 재조합 단백질 원액을 넣고 필요시 제형화 완충액을 첨가하여 제조량(mL)의 30%(v/v)로 맞춘 후 잘 혼합하고, 균질기(Homogenizer)에 tool을 장착한 후, 준비된 원액에 장치하였음. 제조량(mL)의 1.6%(w/v) 양(g)의 Tween 80(Polysorbate 80)을 첨가하고 5,000 rpm으로 약 3분간 균질화(homogenization)하여 잘 혼합하고, 제조량(mL)의 1.4%(w/v) 양(g)의 Arlacel A(Mannide monooleate)를 추가로 첨가하고 18,000 rpm으로 약 10분간 균질화하여 혼합하였음. 유상(Oil phase)의 제조를 위하여 제제화용 초자에 제조량(mL)의 54.5%(w/v) 양(g)의 mineral oil(light paraffin oil)을 넣고, 제조량(mL)의 2.1%(w/v) 양(g)의 Span® 80(Sorbitan monooleate)을 첨가하였음. 균질기에 tool을 장착한 후, 원료 첨가 과정시에 18,000 rpm으로 약 10분간 균질화 함. 혼합 과정 시에는 24,000 rpm으로 약 20분간 균질화 함. 최종원액은 제제화용 초자에 준비된 oil phase를 5,000 rpm으로 균질화하면서, water phase를 천천히 첨가함. Water phase의 첨가가 완료되면 5,800 rpm로 10분간 균질화 함. 만약 온도가 40℃ 이상으로 상승하면 작업을 중단하고 상온으로 낮아질 때까지 기다리며, Emulsion 상태를 육안으로 관찰하면서 3~4회 반복한다. 밀봉하여 21 ± 1℃, 직사광선이 없는 곳에서 하룻밤(12시간) 놓아두며, Emulsion 상태를 관찰하여 이상이 있으면 위의 과정을 2~3회 반복한 다음 10 mL 을 취하여 5,000 rpm에서 30분 원심분리 하여 이상이 없으면 실제 제조량(mL)을 기록하고 제제화를 완료하였음. 혼합(유화)이 적합한 경우 12시간동안 상온에서 정치하여 상태를 확인 후 다음 공정을 진행하였음.

표 39. 구제역 재조합단백질 완제의 조성

구분	원료명	규격	분량(%)
주성분	재조합단백질 용액	별규	30.0
부형제	Light paraffin oil	제조사규격	65.0
	Sorbitan monooleate		2.0
	Polysorbate 80		1.5
	Mannide monooleate		1.5

- 충전 및 타전, 캡핑, 라벨링: 목표 충전/타전 수량, 충전량(50-51 mL), 속도 등의 충전/타전기 조건을 설정하고 충전을 실시하였음. 충전 및 타전 공정 초/중/말에 각 3개의 샘플을 취하여 공정 검사를 실시하였고, 충전/타전 수량, 속도 등의 캡핑기 조건 설정하고 캡핑을 실시하였음. 먼저 바이알 10개를 로딩하여 시험 캡핑한 결과가 양호한 경우 본캡핑을 진행하였고, 캡핑이 진행될 때 캡핑 상태에 대해 지속적으로 확인하고, 공정 초/중/말로 구분하여 결과를 기록하였음. 육안으로 성상, 캡핑상태 및 기타 불량에 대해 전수 검사하여 불량제품을 선별하도록 하였으며, 바이알 전량에 라벨을 부착하였음(그림 37).



(1) 충전

(2) 타전 및 캡핑

(3) 선별

(4) 보관(라벨링)

그림 37.

그림 37. 구제역 재조합단백질 백신의 대량생산

- 대량생산 백신에 대한 돼지 안전시험: 후보백신 투여일 기준 10주령의 구제역 바이러스 음성인 건강한 돼지로 선정하고, 선정된 시험동물의 이근부에 근육내 주사함. 1회 접종량(2 mL)에 해당하는 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응이 없으며 목적동물 관찰기간(14일) 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 설사 등의 부작용이 없어야 함. 재조합 단백질 후보 백신에 대한 안전시험 결과, 전 개체 이상증상이 없었음을 확인하였음(표 40).

표 40. 과민반응 및 부작용 관찰기록표

돼지번호	S/N ratio	판정*	비고
A12	1.05	구제역 음성	
A13	1.03	구제역 음성	

돼지번호	과민반응	접종 후 경과 시간			특이 사항
		30 분	1 시간	2 시간	
A12	쇼크	-	-	-	없음
	발열	-	-	-	
	활동성 저하	±	-	-	
	기타	없음	없음	없음	
A13	쇼크	-	-	-	없음
	발열	-	-	-	
	활동성 저하	±	±	-	
	기타	없음	없음	없음	

돼지번호	임상증상	접종 후 경과 일수														특기 사항
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A12	발열	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	없음
	설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	접종부위 화농/괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	구제역 임상증상	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	기타	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A13	발열	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	없음	
	설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	접종부위 화농/괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	구제역 임상증상	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	기타	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

2.6. 목적동물에서의 효능시험

재조합 단백질 항원생산 기술을 통해 제조된 구제역 백신에 대한 효능을 평가하였음. 구체적으로는 실험동물에서의 안전시험 및 효능시험, 목적동물에서의 안전시험, 효능시험 및 구제역바이러스 중화시험, 목적동물에 대한 6개월 이상의 중화항체 지속성시험을 실시하였음.

2.6.1. 실험동물 안전시험 및 효능시험

구조 및 배치, 링커 등을 개선한 재조합 단백질 항원 후보의 효능비교시험을 위하여 주관기관 (주)파로스백신에서 특별하게 조정된 항원량을 포함하는 재조합 단백질 백신을 위탁기관 (주)노터스에 제공하였음. 약효 및 독성시험에 널리 사용되며 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어, 시험 결과의 해석 및 평가가 용이한 기니피그를 실험동물로 선정하였음. 280~330g 내외의 기니피그 (female)를 입식하여 순화과정을 거쳐 건강한 개체를 선별하여 체중에 따라 균일하게 분포하도록 군을 나누어 사용하였음.

- 안전시험: 선별된 기니피그는 순화기간, 투여 및 관찰기간동안 등부위표식법을 사용하여 식별하였으며, 사육상자에는 색으로 구별되는 개체식별카드를 부착하고 사육실 입구에는 동물실 사용 기록지를 부착함. 순화기간중에 건강상태를 확인하여 건강한 기니피그 8마리를 선정하여 0.5ml/guinea pig로 용량을 고정하여 근육투여(IM) 및 복강투여(IP)하였음. 농림축산검역본부에서 2019년 5월 배포한 동물용의약품 안전성·유효성시험 가이드라인에 따라 투여 경로를 설정하였고, 식약처에서 배포한 생물학적제제 기준 및 시험방법의 이상독성부정시험법에 따라 투여용량을 고정하였음. 투여 전 투여부위를 70% 알코올을 이용하여 소독하고 조심스럽게 보정된 실험동물 기니피그의 근육 및 복강에 천천히 투여함. 투여 후 14일간 실험동물의 이상반응, 체중, 빈사 등을 포함한 사망여부를 매일 관찰함. 재조합 단백질 후보 백신에 대한 안전시험 결과, 전 개체 이상증상이 없었음을 확인하였음.

- 효능시험: 선별된 기니피그는 미부표식법을 사용하여 개체를 식별하였고, 각 개체에 재조합 단백질 백신을 0.5 mL, 1회, 근육 접종하였음. 투여 2주, 3주, 4주 및 5주 경과시 경정맥에서 전혈 약 3 mL씩 채혈하여 혈청을 수득하였고, 수득한 혈청은 56℃, 30분동안 비동화 과정 후 동결하

여 보관하였음. 수득한 항혈청은 Priocheck FMDV type O ELISA 와 Priocheck FMDV type A ELISA를 이용하여 분석하였음.

2.6.2. 목적동물 안전시험 및 효능시험

- 안전시험: 후보백신 투여일 기준 10주령의 구제역 바이러스 음성인 건강한 돼지로 선정하고, 선정된 시험동물의 이근부에 근육내 주사함. 1회 접종량(2 mL)에 해당하는 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응이 없으며 목적동물 관찰기간(14일) 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 설사 등의 부작용이 없어야 함. 재조합 단백질 후보 백신에 대한 안전시험 결과, 전 개체 이상증상이 없었음을 확인하였음.
- 효능시험: 구제역 항체 음성인 8주령의 돼지를 선별하여 준비함. 준비된 돼지에 후보 백신 2 mL을 근육주사하고 접종 후, 4주차에 후보백신 2 mL을 주사하여 시기별로 채혈함. 채혈방법은 실험축의 입안을 단단히 보정하고 경정맥에서 전혈 6 mL씩 채혈하여 혈청을 수득함. 수득한 혈청은 56℃, 30분 동안 비동화 과정 후 동결하여 보관하였음. 수득한 항혈청은 Priocheck FMDV type O ELISA 와 Priocheck FMDV type A ELISA를 이용하여 분석하였음. ELISA 분석결과, 모든 재조합 단백질 후보 백신 접종 후 2주차부터 PI값이 상승하여 양성전환되기 시작하였음. 특히 Priocheck FMDV type O ELISA로 분석하였을 경우, 2가 재조합 단백질 후보항원 A FOA1, D FAO4 가 80%이상 양성에 가까워졌으며, 단가 재조합단백질 후보항원 F FO 는 오차범위내 100% 양성전환하였음. Priocheck FMDV type A ELISA 로 분석하였을 경우, 2가 재조합단백질 후보항원 B FAO2, D FAO4 가 60~80% 이상 양성에 가까워졌으며, 단가 재조합단백질 후보항원 G FA는 50% 양성전환 하였음. 구제역 혈청형에 관계없이 1차 접종 후 4주차에 2차 접종을 실시하였는데, 1차 접종 기준 5주차부터 빠르게 PI값이 상승하였고 전 개체 100% 양성전환 하였음(표 41).

표 41. 재조합 단백질 후보 항원의 목적동물에서의 효능시험(Priocheck O type & A type)

- FMDV type A SP ELISA PI Change of Each Group								- FMDV type O SP ELISA PI Change of Each Group							
Group	이표	PI of PrioCHECK FMDV A type SP EL						Group	이표	PI of PrioCHECK FMDV O type SP EL					
		6dbv	14dpv	21dpv	28dpv	35dpv	42dpv			6dbv	14dpv	21dpv	28dpv	35dpv	42dpv
A	16	34.8	28.7	12.0	25.6	26.1	27.4	A	16	32.4	40.1	19.3	27.7	47.6	56.3
FAO1	25	37.1	13.0	10.7	17.4	41.5	44.3	FAO1	25	20.9	42.6	48.0	69.4	81.0	81.5
	54	25.8	52.1	26.0	33.5	32.0	31.3		54	27.3	51.0	31.3	39.0	61.7	67.6
	56	9.1							56	2.6					
	61	16.7	55.8	40.3	56.6	65.3	67.5		61	11.7	46.6	29.5	56.1	84.1	84.1
	82	11.5	16.7	13.2	33.8	37.3	39.4		82	11.5	9.5	3.1	55.2	83.7	84.8
Average		22.5	33.3	20.4	33.4	40.4	42.0	Average		17.7	38.0	26.2	49.5	71.6	74.9
Std. dev.		11.9	19.8	12.7	14.6	15.1	15.7	Std. dev.		11.1	16.5	16.5	16.2	16.3	12.5
Positive ratio		0%	40%	0%	20%	20%	20%	Positive ratio		0%	20%	0%	60%	80%	100%
B	04	24.3	19.4	12.6	26.2	30.0	36.2	B	04	26.5	50.6	41.1	47.0	56.9	57.6
FAO2	09	30.5	51.4	31.1	46.0	50.3	54.0	FAO2	09	27.4	33.6	18.3	12.8	36.4	48.8
	53	9.1	56.8	49.0	59.8	62.4	65.6		53	4.0	52.3	50.9	47.8	62.4	64.3
	75	17.7	42.0	18.7	31.1	39.4	44.6		75	9.6	19.0	6.0	5.0	41.1	46.4
	91	38.8	35.4	22.5	31.4	43.0	44.8		91	25.1	32.7	20.5	13.0	56.8	59.4
	98	24.6	50.2	33.7	22.2	23.9	30.7		98	12.9	17.7	3.0	1.0	37.9	47.4
Average		24.2	42.5	27.9	36.1	41.5	46.0	Average		17.6	34.3	23.3	21.1	48.6	54.0
Std. dev.		10.2	13.6	13.0	14.1	13.9	12.5	Std. dev.		10.0	14.9	19.1	20.9	11.3	7.4
Positive ratio		0%	50%	0%	17%	33%	33%	Positive ratio		0%	33%	17%	0%	50%	50%

C	01	21.9	23.3	16.9	26.3	40.5	48.4	C	01	34.0	13.0	12.0	25.8	28.2	31.5
FAO3	19	32.4	23.2	26.9	46.2	66.4	72.7	FAO3	19	38.8	19.2	13.6	27.8	48.7	50.6
	37	26.4	32.2	6.2	16.4	68.9	72.8		37	25.0	30.9	20.2	44.4	63.9	70.5
	55	19.3	26.5	15.0	32.2	66.1	67.5		55	23.2	21.8	11.8	29.4	32.9	42.8
	59	5.4	59.9	48.4	50.7	58.4	66.2		59	11.7	55.6	46.0	52.8	56.5	66.7
	79	7.2	24.1	13.8	16.4	42.2	58.5		79	14.0	40.7	30.9	44.9	44.9	47.9
Average		18.8	31.6	21.2	31.4	57.1	64.4	Average		24.4	30.2	22.4	37.5	45.9	51.7
Std. dev.		10.7	14.3	14.9	14.6	12.7	9.4	Std. dev.		10.7	15.8	13.7	11.3	13.6	14.7
Positive ratio		0%	17%	0%	17%	67%	83%	Positive ratio		0%	17%	0%	17%	33%	50%
D	14	29.6	57.9	54.4	52.9	73.5	79.4	D	14	39.6	62.2	53.7	54.0	52.8	56.1
FAO4	15	21.6	42.8	37.9	33.3	63.8	67.7	FAO4	15	32.4	40.5	16.6	30.9	34.9	39.8
	46	21.0	54.0	49.8	51.9	71.3	71.6		46	24.5	37.8	26.0	37.5	46.8	44.7
	57	5.9	49.1	33.0	45.5	59.4	66.7		57	17.7	43.7	23.0	34.3	36.8	45.9
	63	5.8	30.1						63	13.2	33.0				
	65	20.3	48.2	61.3	69.9	90.7	90.6		65	26.0	31.8	32.7	48.7	55.8	57.6
Average		17.4	47.0	47.3	50.7	71.7	75.2	Average		25.6	41.5	30.4	41.1	45.4	48.8
Std. dev.		9.5	9.8	11.7	13.3	12.0	10.0	Std. dev.		9.6	11.1	14.2	9.8	9.3	7.7
Positive ratio		0%	33%	40%	60%	###	100%	Positive ratio		0%	17%	20%	20%	40%	40%
E	39	27.1	30.0	8.5	5.0	32.8	44.9	E	39	30.4	41.5	30.1	36.6	35.5	39.6
FAO0	47	37.2						FAO0	47	38.4					
(Positive control)	72	11.7	25.0	19.5	35.5	45.9	57.1	(Positive control)	72	32.6	23.7	11.1	22.9	35.4	45.5
	80	4.4	31.5	11.0	36.6	74.4	75.3		80	15.8	37.5	32.1	45.5	51.1	48.7
	103	13.4	36.6	35.8	30.8	61.5	62.6		103	27.1	21.3	17.1	28.8	55.5	55.5
	106	9.6	23.4	5.6	5.0	44.7	55.4		106	14.0	23.0	20.9	28.6	37.5	39.6
Average		17.3	29.3	16.1	22.6	51.8	59.1	Average		26.4	29.4	22.3	32.5	43.0	45.8
Std. dev.		12.4	5.3	12.2	16.2	16.2	11.1	Std. dev.		9.7	9.4	8.8	8.8	9.6	6.7
Positive ratio		0%	0%	0%	0%	40%	80%	Positive ratio		0%	0%	0%	0%	40%	20%
F	13	14.5	70.8	50.8	62.1	82.1	85.2	F	13	30.4	19.4	15.0	39.7	50.9	55.8
FO1	60	0.2	47.6	30.2	44.1	79.4	84.2	FO1	60	13.1	31.1	17.0	20.5	46.6	44.9
	66	19.2	41.5	24.6	39.1	75.0	89.2		66	47.2	45.6	24.4	36.1	37.3	44.3
	70	8.9	58.3	31.7	47.1	92.9	89.4		70	21.1	36.7	20.9	36.9	40.8	40.6
	71	21.6	42.7	26.2	40.9	74.0	76.0		71	44.2	26.3	15.6	18.3	26.9	21.9
	95	28.5	53.1	54.6	64.2	80.1	72.7		95	32.2	51.3	34.8	37.9	41.2	34.4
Average		15.5	52.3	36.3	49.6	80.6	82.8	Average		31.4	35.1	21.3	31.6	40.6	40.3
Std. dev.		10.0	11.1	13.0	10.9	6.8	6.9	Std. dev.		13.1	12.0	7.5	9.5	8.2	11.4
Positive ratio		0%	50%	33%	33%	100%	100%	Positive ratio		0%	17%	0%	0%	17%	17%
G	02	40.7	48.6	41.4	35.0	48.2	47.1	G	02	39.5	41.5	27.8	31.7	48.0	53.8
FA1	06	46.1	54.8	46.8	55.8	57.0	56.5	FA1	06	38.9	45.3	35.6	53.7	72.1	68.6
	07	31.1	24.8	4.0	30.4	50.3	58.4		07	28.0	10.8	13.1	41.8	64.6	68.2
	58	18.3	16.9	3.0	22.2	51.2			58	12.7	19.7	9.7	22.9	45.5	
	84	14.3	27.4	2.7	6.4	78.2	81.2		84	20.8	59.2	53.8	61.5	70.0	74.4
	96	4.8	28.1	16.6	29.7	58.1	55.5		96	-9.6	27.4	28.4	34.5	48.3	45.1
Average		25.9	33.5	19.1	29.9	57.2	59.7	Average		21.7	34.0	28.1	41.0	58.1	62.0
Std. dev.		16.1	14.8	20.1	16.2	11.0	12.7	Std. dev.		18.5	17.9	16.0	14.4	12.1	12.1
Positive ratio		0%	17%	0%	17%	83%	80%	Positive ratio		0%	17%	17%	33%	50%	80%

2.6.3. 바이러스 중화시험

감수성 동물에 구제역 바이러스가 감염되면 혈청내 특이항체가 형성되므로 구제역 감염여부 및 백신 접종 후 항체형성 여부를 확인하기 위해 수행됨. 특히 구제역바이러스에 대한 중화항체생성 정도를 판단하기 위하여 구제역바이러스 감수성 세포에 배수 희석한 면역혈청에 노출시킨 구제역 바이러스를 고의 감염하여 CPE(Cytopathic effect, 세포변성효과) 정도를 관찰함. 면역혈청은 세포 유지용 배양액으로 4~128배까지 2진 희석하여 준비하고 중화시험용 구제역 바이러스액(200TCID₅₀/0.1mL)을 동량 혼합하여 37℃에서 60분간 감작함. 감작 후 5.0 x10⁵cells/ml로 조정된 구제역바이러스에 감수성이 있는 세포 0.05 mL을 넣어 37℃에서 3일간 배양함. 구제역바이러스 감수성 세포의 CPE 50%이상 저해되었을 때, 혈청의 중화항체가(Virus Neutralizing titer, VNT)는 CPE를 저지한 최고 혈청희석배수의 역수로 나타냄(표 42). 중화항체가가 16이상이면 중화항체 양성으로 판정하고, 바이러스 중화시험이 최소 혈청희석배수 미만이면 음성으로 판정함. 실험의 최소 희석배수가 1/16 미만이고 중화항체가가 16 미만인 경우 의양성(pseudo positive)로 판정함. 시험군 별 중화항체가의 평균은 중화항체가의 기하평균, 즉 개체별 중화항체가의 Log₁₀값의 평균으로 함. 바이러스 중화시험을 실시할 때는 사용하는 구제역 바이러스의 역가검정을 위해 back titration을 매번 실시함. 구제역 바이러스 중화시험은 일반 실험실에서 시행할 수 없어 농림축산검역본부 구제역백신연구센터 내 차폐시설인 BL3(Biosafety Level 3) 시설에서 수행하였음.

표 42. 바이러스 중화시험 시 희석배수에 따른 중화항체가

starting dilution	final dilution	end point	Log2 VNT	VNT	Log10 VNT
4	8	single	3	8	0.90
4	8	double	3.5	11	1.04
8	16	single	4	16	1.20
8	16	double	4.5	22	1.34
16	32	single	5	32	1.51
16	32	double	5.5	45	1.65
32	64	single	6	64	1.81
32	64	double	6.5	90	1.95
64	128	single	7	128	2.11
64	128	double	7.5	181	2.26
128	256	single	8	256	2.41
128	256	double	8.5	362	2.56

표 43. 재조합 단백질 후보 항원의 목적동물에서의 효능시험(VNT-O/AS, A/GP)

- Anti-FMDV O/Ansung VNT Change of Each Group					- Anti-FMDV A/Gimpo VNT Change of Each Group				
Group	이표	Virus Neutralizing Titer			Group	이표	Virus Neutralizing Titer		
		21dpv	42dpv	88dpv			21dpv	42dpv	88dpv
A	16	90	181	181	A	16	64	362	181
FAO1	25	90	128	256	FAO1	25	362	256	256
	54	64	128			54	256	362	
	56					56			
	61	128	362	362		61	362	362	362
	82	362	64	90		82	64	362	362
Log10 of GMT		2.08	2.17	2.29	Log10 of GMT		2.23	2.53	2.45
Std. dev.		0.29	0.27	0.26	Std. dev.		0.39	0.07	0.14
<hr/>									
B	04	128	181	90	B	04	256	362	362
FAO2	09	64	362	90	FAO2	09	45	181	362
	53	128	90	64		53	362	362	181
	75	90	362	256		75	128	362	128
	91	64	362	128		91	362	256	362
	98	64	90	90		98	362	362	128
Log10 of GMT		1.93	2.31	2.03	Log10 of GMT		2.31	2.48	2.36
Std. dev.		0.15	0.30	0.21	Std. dev.		0.37	0.13	0.23
<hr/>									
C	01	362	90	362	C	01	128	128	362
FAO3	19	64	90	181	FAO3	19	181	362	362
	37	32	45	90		37	362	128	362
	55	45	181			55	256	256	
	59	90	181	128		59	362	128	362
	79	11	128	64		79	362	362	362
Log10 of GMT		1.75	2.03	2.14	Log10 of GMT		2.41	2.31	2.56
Std. dev.		0.50	0.23	0.29	Std. dev.		0.19	0.23	0.00

D	14	362	128	181	D	14	64	362	362
FAO4	15	128	90	128	FAO4	15	32	362	256
	46	45	64	128		46	362	362	256
	57	128	128	128		57	256	362	256
	63					63			
	65	128	128	64		65	362	256	362
Log10 of GMT		2.11	2.02	2.08	Log10 of GMT		2.17	2.53	2.47
Std. dev.		0.32	0.13	0.16	Std. dev.		0.48	0.07	0.08
E	39	22	32	90	E	39	8	16	8
FAO0	47				FAO0	47			
(Positive control)	72	90	362	128	(Positive control)	72	11	16	8
	80	90	64	256		80	11	22	8
	103	90	64	45		103	11	22	16
	106	362	362	90		106	8	16	11
Log10 of GMT		1.95	2.05	2.02	Log10 of GMT		0.99	1.26	0.99
Std. dev.		0.43	0.48	0.27	Std. dev.		0.08	0.08	0.13
F	13	128	64	90	F	13	11	22	11
FO1	60	64	256	256	FO1	60	8	32	22
	66	362	256	181		66	32	64	32
	70	90	362	64		70	11	45	22
	71	64	362	90		71	8	45	22
	95	256	128	90		95	16	32	16
Log10 of GMT		2.11	2.31	2.06	Log10 of GMT		1.10	1.58	1.30
Std. dev.		0.32	0.30	0.23	Std. dev.		0.23	0.16	0.16
G	02	16	45	45	G	02	128	362	362
FA1	06	45	64	22	FA1	06	362	128	362
	07	32	64	45		07	64	256	362
	58	45				58	45		
	84	<8	32	22		84	362	362	256
	96	11	45	11		96	128	362	362
Log10 of GMT		1.41	1.68	1.41	Log10 of GMT		2.05	2.44	2.53
Std. dev.		0.28	0.13	0.26	Std. dev.		0.35	0.20	0.07

표 44. 재조합 단백질 후보 항원의 목적동물에서의 효능시험(VNT-O 5 strains & A 3 strains)

- Anti-FMDV O strains VNT of Each Group on 42dpv							- Anti-FMDV A strains VNT of Each Group on 42dpv				
Group	이표	Virus Neutralizing Titer					Group	이표	Virus Neutralizing Titer		
		Ansung	Boeun	Gimjae	Jinchun	Andong			Gimpo	Younchun	Pochun
A	16	181	128	64	90	90	A	16	362	90	128
FAO1	25	128	362	128	362	90	FAO1	25	256	90	181
	54	128	90	90	128	128		54	362	128	181
	56							56			
	61	362	256	64	90	128		61	362	64	90
	82	64	128	128	64	90		82	362	64	256
Log10 of GMT		2.17	2.23	1.96	2.08	2.02	Log10 of GMT		2.53	1.93	2.20
Std. dev.		0.27	0.25	0.15	0.29	0.08	Std. dev.		0.07	0.13	0.17
B	04	181	128	128	64	181	B	04	362	362	90
FAO2	09	362	128	90	128	64	FAO2	09	181	32	128
	53	90	128	128	362	64		53	362	90	128
	75	362	256	181	128	64		75	362	181	128
	91	362	64	128	362	128		91	256	45	181
	98	90	128	90	90	64		98	362	362	362
Log10 of GMT		2.31	2.11	2.08	2.18	1.93	Log10 of GMT		2.48	2.08	2.18
Std. dev.		0.30	0.19	0.11	0.31	0.20	Std. dev.		0.13	0.45	0.21
C	01	90	128	128	64	181	C	01	128	64	90
FAO3	19	90	90	128	64	64	FAO3	19	362	128	128
	37	45	64	128	128	64		37	128	32	90
	55	181	128	181	90	181		55	256	45	90
	59	181	362	90	256	90		59	128	64	90
	79	128	362	32	362	90		79	362	64	32
Log10 of GMT		2.03	2.18	2.01	2.11	2.01	Log10 of GMT		2.31	1.78	1.90
Std. dev.		0.23	0.31	0.26	0.32	0.21	Std. dev.		0.23	0.20	0.21

D	14	128	90	90	128	90
FAO4	15	90	128	181	128	64
	46	64	362	128	64	128
	57	128	362	181	128	90
	63					
	65	128	128	128	64	128
Log10 of GMT	2.02	2.26	2.14	1.99	1.99	
Std. dev.	0.13	0.28	0.13	0.16	0.13	

D	14	362	64	90
FAO4	15	362	45	128
	46	362	181	90
	57	362	64	128
	63			
	65	256	64	90
Log10 of GMT	2.53	1.87	2.02	
Std. dev.	0.07	0.23	0.08	

E	39	32	362	64	128	64
FAO0	47					
(Positive control)	72	362	128	32	64	181
	80	64	362	128	64	128
	103	64	90	32	90	45
	106	362	181	128	128	64
Log10 of GMT	2.05	2.29	1.81	1.96	1.93	
Std. dev.	0.48	0.27	0.30	0.15	0.25	

E	39	16	64	181
FAO0	47			
(Positive control)	72	16	90	128
	80	22	64	181
	103	22	64	362
	106	16	90	362
Log10 of GMT	1.26	1.87	2.35	
Std. dev.	0.08	0.08	0.20	

F	13	64	128	181	64	90
FO1	60	256	45	64	22	128
	66	256	128	128	362	181
	70	362	90	181	128	128
	71	362	32	128	90	90
	95	128	362	128	64	128
Log10 of GMT	2.31	1.98	2.11	1.93	2.08	
Std. dev.	0.30	0.37	0.16	0.40	0.11	

F	13	22	32	22
FO1	60	32	16	32
	66	64	64	32
	70	45	32	32
	71	45	32	11
	95	32	64	45
Log10 of GMT	1.58	1.56	1.43	
Std. dev.	0.16	0.23	0.21	

G	02	45	128	128	181	45
FA1	06	64	362	362	181	90
	07	64	90	128	256	64
	58					
	84	32	128	181	362	256
	96	45	362	32	90	90
Log10 of GMT	1.68	2.26	2.11	2.29	1.96	
Std. dev.	0.13	0.28	0.38	0.22	0.28	

G	02	362	45	64
FA1	06	128	64	64
	07	256	90	64
	58			
	84	362	128	128
	96	362	128	245
Log10 of GMT	2.44	1.93	1.98	
Std. dev.	0.20	0.20	0.26	

2가 재조합단백질 후보 백신 4종과 단가 재조합단백질 후보 백신 2종은 모두 중화항체가 우수 한 결과(Log10 of GMT: 1.0~2.5)를 나타내었음(표 43, 44). 특히 2가 후보항원 B FAO2, D FAO4가 우수하였으나, 모두 유효한 수준의 중화항체를 나타나 목적동물을 이용한 바이러스 중 화시험을 통해 선별할 필요성이 있었음.

2.6.4. 목적동물 안정성시험

우리나라는 2011년부터 백신 정책을 통해 모든 소와 돼지에 대해 매년 4월 10월에 정기적으로 백신을 접종하도록 하고 있으며, 소의 경우 생후 2개월 1차 접종을 하고 다시 1개월 뒤에 2차 접 종을 실시하고 있음. 이후 6개월 단위로 주기적인 백신 접종이 필요함. 돼지의 경우 모체이행항 체의 효력이 떨어지는 자돈 8주령에 1차 접종을 하고 다시 1개월 뒤 자돈 12주령에 2차 접종을 실시함. 비육돈의 경우 생후 6~7개월에 시장 출하를 하므로 추가 접종이 의무는 아니지만 비육 돈은 출하시기에 백신 효력이 떨어져 구제역에 잘 걸리는 것으로 알려져 있어 검역원은 비육돈 출하전 추가접종을 권고하고 있으나, 양돈시장에서는 돼지 생육 품질이 저하되어 상품성이 떨어 젢 반대하고 있음. 구제역이 고착화되어 주기적으로 발병하고 바이러스의 순환감염이 일어나고 있는 상황이라면 방역행정을 위해 추가적인 접종이 필요하다는 전문가의 의견이 있는 상황임. 목 적동물 안정성시험은 각 주기별(3개월, 6개월, 9개월, 12개월 등)백신접종군의 혈청형 별 중화 항체역가가 구제역 재조합 단백질 백신 오일 백신의 기준역가와 동등 또는 동등 이상이어야 한 다. 농림축산검역본부고시(제2021-12호) 구제역 재조합단백질 오일백신 검정기준에 따르면, 판 정기준은 구제역 바이러스 O 혈청형(O/SKR/2010) 중화항체 1.4 log10 이상, A 혈청형)A/SKR/2010) 중화항체 1.6 log 10 이상이어야 함. 본 연구과제에서 개발한 구제역 재조합 단백

질 백신은 접종 후 88일까지 구제역 재조합 단백질 오일백신의 검정기준을 만족하였음(그림 38).

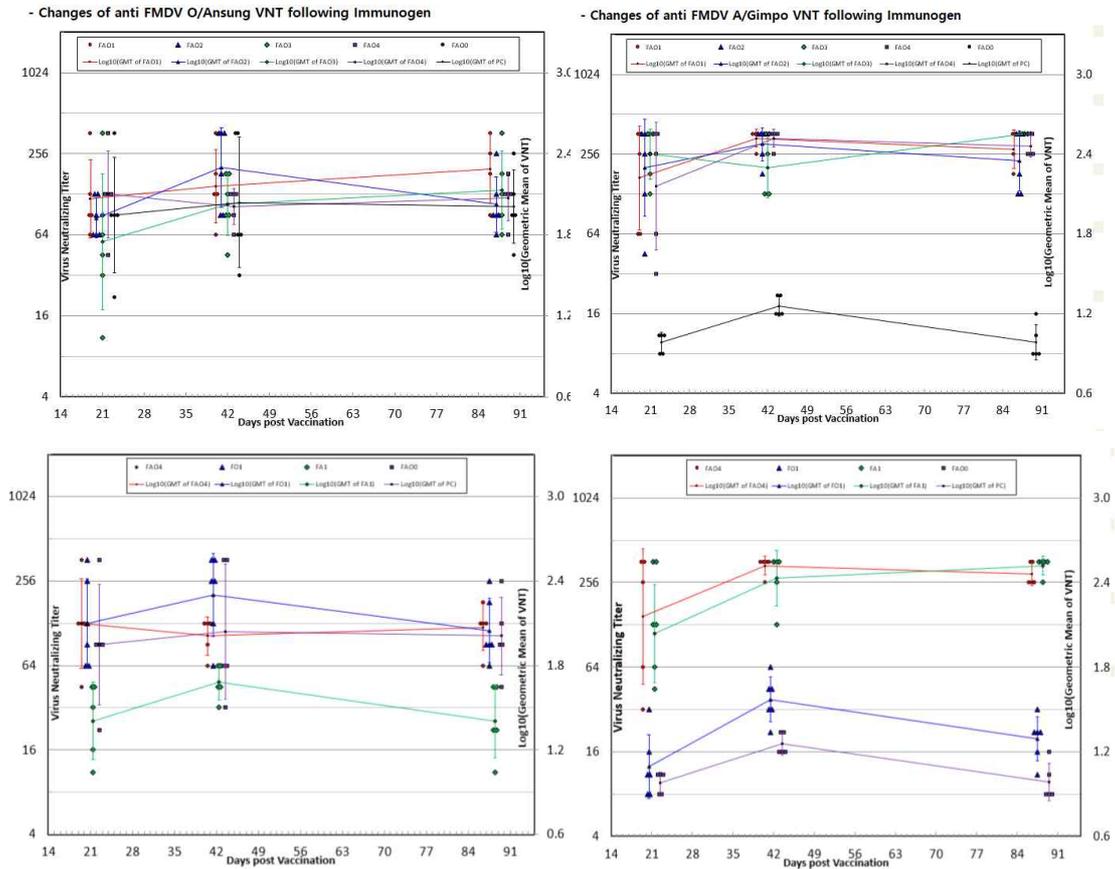


그림 38. 재조합단백질 후보 항원의 목적동물에서의 안정성 시험

2.6.5. 목적동물 공격접종시험

목적동물 공격접종시험은 목적동물에서 감염을 일으킬 수 있는 충분한 양의 구제역바이러스를 목적동물에 고의 감염하여 구제역 바이러스에 대한 방어력을 임상지수로 확인함. 구제역 바이러스 공격접종시험은 OIE Terrestrial Manual(chapter 2.1.5. Foot and mouth disease) 에 따라 실시하였음. 공격접종시험에 사용하는 바이러스는 실험동물과 동일한 동물인 돼지에게 접종하여 수득한다. 수득한 구제역바이러스는 실험실내에서 감수성 세포를 이용하여 TCID50(Tissue Culture Infectious dose 50, 50% CPE를 나타내는 바이러스 희석배수)를 확인하고, 돼지에서 ID50(Infective dose 50, 50%에 해당하는 개체를 감염시키는 데 필요한 바이러스의 양, 최소감염량보다 재현성이 뛰어나)를 확인함. 목적동물에서 감염을 일으킬 수 있는 충분한 양의 바이러스는 1×10^3 PID50로 설정함. 후보백신을 접종한 후, 20일차에 동물사에 입식하여 안정화시킨 후, 공격접종용 바이러스 1×10^6 PID50를 각각의 돼지 제구부의 표피내에 투여함. 다른 혈청형의 바이러스를 동시에 시험하지 않으며, 매 시험마다 비접종 대조군을 포함함. 공격접종 후 다음날부터 체온 및 구제역 임상증상을 관찰하여 기록하고, 구제역 발병(임상지수 4이상)이 확인된 돼지는 즉시 격리 또는 안락사하여 사체를 처리함(표 45). 목적동물 공격접종시험은 일반 실험실에서 시행할 수 없어 농림축산검역본부 구제역백신연구센터 내 차폐시설인 ABL3(Animal Biosafety Level 3) 시설에서 수행하였다.

표 45. 구제역 공격접종시험 시 구제역 임상증상에 따른 점수 기준표

임상증상		기준 및 점수	
수포	발굽 및 발	오른쪽 앞다리	1개 1점 2개 이상 2점
		왼쪽 앞다리	1개 1점 2개 이상 2점
		오른쪽 뒷다리	1개 1점 2개 이상 2점
		왼쪽 뒷다리	1개 1점 2개 이상 2점
	구강 주위	코	1점
		입술	1점
		혀	1점
발열		40℃이상, 40.5℃ 미만 1점 40.5℃ 이상, 41℃ 미만 2점 41℃ 이상 3점	
식욕부진		1점	
파행		1점	
종합		최대 16점	

표 46. 재조합 단백질 후보 항원의 목적동물에서의 FMDV O type 공격접종시험

Group	이표	PI of O ELISA			PI of A ELISA			FMD Onset (Clinical Score)							Comment	
		2dbrv	14dpv	19dpv	2dbrv	14dpv	19dpv	1dpc	2dpc	3dpc	4dpc	5dpc	6dpc	7dpc		
A	27	5.9	38.4	25.2	27.3	36.8	15.0			5	10					4dpc 안락사
FAO1	61	20.0	51.5	45.5	47.9	41.7	40.7						3	8	4dpc까지 구제역 증상 없음.	
	71	16.7	37.4	36.7	21.8	22.2	16.3		2	8	9				4dpc 안락사	
	90	9.5	58.8	62.9	19.6	43.2	28.2		1	3	8				4dpc 안락사	
	119	30.6	81.2	73.5	37.0	32.5	18.3			1	2	10	11		4dpc까지 접종다리 외 수포 없음.	
Average		16.5	53.5	48.7	30.7	35.3	23.7	0	0	60	60	100	100		<-발병률(%)	
Std. dev.		9.6	17.9	19.5	11.7	8.4	10.8	-	100	40	40	0	0		<-방어률(%)	
Positive rate		0%	60%	40%	0%	0%	0%									
B	05	5.8	20.8	13.3	19.3	19.0	5.5	1	2	9	10				4dpc 안락사	
FAO2	37	34.1	52.0	45.1	47.7	56.0	40.1		1	8	8				4dpc 안락사	
	39	15.3	49.1	43.7	18.8	52.3	47.9			3	9				4dpc 안락사	
	46	8.3	33.2	16.0	20.0	24.2	8.5		2	7					3dpc 폐사	
	85	15.9	30.0	44.3	37.6	25.9	24.7		1	9					3dpc 폐사	
Average		15.9	37.0	32.5	28.7	35.5	25.3	0	20	100	100				<-발병률(%)	
Std. dev.		11.1	13.2	16.3	13.2	17.3	18.7	-	80	0	0				<-방어률(%)	
Positive rate		0%	20%	0%	0%	40%	0%									
C	28	20.9	37.1	29.8	38.0	31.6	20.5			1	6		10		3dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
FAO3	64	14.9	57.9	51.9	16.5	52.3	47.2		1	9	10				4dpc 안락사	
	70	19.1	50.7	42.5	30.7	34.7	24.7			5	10				4dpc 안락사	
	74	12.7	45.2	47.0	20.8	46.4	42.7			2	5		8		3dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
	128	9.5	43.1	38.9	8.8	48.7	46.5					2	8		4dpc까지 구제역 증상 없음.	
Average		15.4	46.8	42.0	23.0	42.7	36.3	0	0	40	80	100	100		<-발병률(%)	
Std. dev.		4.7	7.9	8.4	11.5	9.1	12.7	-	100	60	20	0	0		<-방어률(%)	
Positive rate		0%	40%	20%	0%	20%	0%									
D	23	10.2	37.5	48.6	9.3	17.6	10.2		1	4	9				4dpc 안락사	
FAO4	49	22.6	46.4	25.2	38.4	33.2	5.1		1	2	5		7		3dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
	75	23.1	40.6	31.8	25.3	20.0	11.6		1	1	0	0	1	0	5dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
	98	14.3	64.6	48.1	25.3	43.3	24.9	1	1	2	12		10		3dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
	161	32.2	55.3	n/a	62.5	51.4	n/a			4	1	6	6		4dpc까지 접종다리 외 수포 없음.	
Average		20.5	48.9	38.4	32.2	33.1	13.0	0	0	20	60	80	100	80	<-발병률(%)	
Std. dev.		8.5	11.1	11.8	19.8	14.6	8.5	-	100	80	40	20	0	20	<-방어률(%)	
Positive rate		0%	40%	0%	20%	20%	0%									
F	59	25.4	57.6	35.7	72.7	41.9	16.8		2	2	1	2	5	5	5dpc까지 접종다리 외 수포 없음	
FO1	83	9.6	48.5	53.7	21.3	33.0	15.6				1	0	7	9	5dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
	99	11.0	55.6	48.9	24.3	37.7	22.5					1	10	9	5dpc까지 수포 발생 없음	
	105	19.8	70.3	46.4	48.8	30.6	5.8			2	9		9		3dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
	152	5.6	65.3	66.2	16.9	39.3	30.5			2	1	0	2	8	5dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음	
Average		14.3	59.5	50.2	36.8	36.5	18.2	0	0	0	20	20	100	100	<-발병률(%)	
Std. dev.		8.1	8.5	11.1	23.6	4.6	9.1	-	100	100	80	80	0	0	<-방어률(%)	
Positive rate		0%	80%	40%	20%	0%	0%									
N	PH3	n/a	4.0	-2.3	n/a	7.5	-1.5		3	8					3dpc 폐사	
NC	PH7	n/a	-2.1	-0.2	n/a	0.3	-7.6		7	10	10				4dpc 안락사	
Average			1.0	-1.3		3.9	-4.5	0	100	100	100				<-발병률(%)	
Std. dev.			4.3	1.5		5.1	4.3									
Positive rate			0%	0%		0%	0%									

표 47. 재조합 단백질 후보 항원의 목적동물에서의 FMDV A type 공격접종시험

Group	이표	PI of O EUISA			PI of A EUISA			FMD Onset (Clinical Score)							Comment	
		2d/bv	14d/pv	19d/pv	2d/bv	14d/pv	19d/pv	1dpc	2dpc	3dpc	4dpc	5dpc	6dpc	7dpc		
A	08	13.3	54.1	62.6	35.5	43.3	32.9									구제역 증상 없음
FAO1	09	18.7	33.1	43.7	19.6	37.5	28.9									구제역 증상 없음
	14	10.5	24.2	16.0	10.7	38.7	30.3									구제역 증상 없음
	48	20.6	49.9	48.6	22.9	44.7	18.8									구제역 증상 없음
	79	14.9	58.7	65.3	32.6	57.5	53.1									구제역 증상 없음
Average		15.6	44.0	47.2	24.3	44.4	32.8	0	0	0	0	0	0	0	0	<발병률(%)
Std. dev.		4.1	14.7	19.7	10.1	8.0	12.5	-	100	100	100	100	100	100	100	<방어률(%)
Positive rate		0%	40%	40%	0%	20%	20%									
B	22	7.2	22.9	16.7	5.9	27.0	14.8		1	7						3dpc 안락사
FAO2	45	13.5	49.7	18.7	31.9	58.3	50.1		2	2	4	2	4	4		5dpc까지 접종다리 외 수포 없음
	87	22.9	42.8	50.2	23.1	50.6	33.9		1	2	2	2	4	4		5dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음
	110	6.0	44.1	45.6	24.5	49.6	37.5							1	1	5dpc까지 구제역 증상 없음 6dpc 원리
	132	2.8	25.0	14.7	15.9	20.7	23.9									구제역 증상 없음
Average		10.5	36.9	29.2	20.3	41.3	32.0	0	0	20	20	20	80	80		<발병률(%)
Std. dev.		7.9	12.1	17.2	9.8	16.4	13.4	-	100	80	80	80	20	20		<방어률(%)
Positive rate		0%	0%	20%	0%	40%	20%									
C	02	12.7	31.7	30.0	9.6	34.5	23.8						2	2		접종다리 수포 외 증상 없음
FAO3	73	9.9	44.8	42.0	24.4	49.5	42.3						1	1		5dpc까지 구제역 증상 없음 6dpc 원리
	107	5.5	22.1	17.8	19.1	41.4	26.2									구제역 증상 없음
	111	9.2	48.0	48.0	18.3	56.0	52.1				1			2		6dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음
	121	27.5	45.6	43.3	39.0	53.0	53.3									구제역 증상 없음
Average		13.0	38.4	36.2	22.1	46.9	39.5	0	0	0	0	0	20	40		<발병률(%)
Std. dev.		8.5	11.1	12.3	10.8	8.8	14.0	-	100	100	100	100	80	60		<방어률(%)
Positive rate		0%	0%	0%	0%	40%	40%									
D	03	8.9	18.8	33.6	21.1	21.6	12.9		1	2	2	2	5	5		5dpc까지 접종다리 수포 외 증상 없음
FAO4	53	20.7	48.5	29.8	46.1	42.3	35.6									구제역 증상 없음
	82	33.8	46.2	43.3	43.2	60.1	45.9									구제역 증상 없음
	194	12.9	44.6	46.3	18.8	31.3	34.2									구제역 증상 없음
	197	5.7	48.9	55.7	16.5	42.5	38.3									2dpc 폐사
Average		16.4	41.4	41.7	29.1	39.6	33.4	0	0	0	0	0	25	25		<발병률(%)
Std. dev.		11.2	12.8	10.4	14.3	14.4	12.3	-	100	100	100	100	75	75		<방어률(%)
Positive rate		0%	0%	20%	0%	20%	0%									
G	10	12.2	17.7	18.7	30.7	46.6	40.1			1	3	2	2	2		접종다리 외 수포 없음
FA1	47	14.9	56.8	16.7	21.7	59.7	48.3						2	1		접종다리 수포 외 증상 없음
	55	7.0	36.2	45.1	22.7	56.4	45.9			1	2	4	4	4		4dpc까지 접종다리 외 수포 없음 5dpc
	156	92.4	85.8	67.8	22.3	82.8	72.1		1	0	1	0	0	0		접종다리 수포 외 증상 없음
	200	4.3	52.0	44.8	12.1	50.9	45.7		4	4	2	2	2	0		수포 발생없음. 발열 및 식욕 부진
Average		26.2	49.7	38.6	21.9	59.3	50.4	0	0	0	0	20	20	20		<발병률(%)
Std. dev.		37.2	25.3	21.2	6.6	14.1	12.5	-	100	100	100	80	80	80		<방어률(%)
Positive rate		20%	60%	20%	0%	80%	20%									
N	PH1	n/a	0.6	-0.9	n/a	-4.9	6.7		2	8						3dpc 안락사
NC	PH8	n/a	7.9	-0.8	n/a	-2.2	-2.3		3	9						3dpc 안락사
Average			4.3	-0.9		-3.6	2.2	0	50	100						<발병률(%)
Std. dev.			5.2	0.1		1.9	6.4									
Positive rate			0%	0%		0%	0%									

구제역 바이러스 O 혈청형 공격접종시험에서 D FO1 단가 항원의 방어력이 가장 우수하였으며, 구제역 바이러스 접종 5일후(5dpc)까지 4마리가 접종 다리 외 수포 발생이 없어 5dpc 기준 방어율은 80% 였음. 재조합 단백질 2가 항원 중 상대적으로 방어력이 우수한 것은 A FAO1 와 FAO2 였으며, 4dpc까지 2마리가 접종 다리 외 수포가 없어 4dpc 기준 방어율을 40%였음. 구제역 바이러스 A혈청형 공격접종시험에서는 재조합 단백질 후보항원의 방어력이 우수한 것으로 판단되

있음. A FAO1 의 방어력이 가장 우수하여, 시험 종료시까지 5마리 모두 구제역 증상이 없었으며 방어율은 100%였음. G FA1 단가항원도 방어력이 우수하여 공격접종시험 종료시까지 4마리가 접종 다리 외 수포발생이 없어 방어율은 80%였음. 재조합단백질 후보항원 A FAO1 이오 모든 2가 후보항원도 B FAO2 접종군의 1두를 제외하면 5dpc까지 접종다리 외 수포발생이 없었음(표 46, 47). 농림축산검역본부내 구제역백신연구센터 차폐시설 ABSL3에는 총 4개의 동물실험공간이 있으나 각 실험공간에 수용할 수 있는 동물은 목적동물 돼지 기준 20두 내외임. 목적동물인 돼지 또는 소를 대상으로 공격접종실험을 수행할 수 국내 유일한 시설로서 사용가능 일정이 매우 적어 (4~8주/1년), 규모에 비하여 많은 실험동물을 밀사하여 실험하였음 이는 개체간의 교차오염의 가능성을 높였으며, 짧은 시설 사용 일정으로 인하여 접종, 채혈, 이송, 최소한의 안정화기간(1일 이하)등 실험동물에 악영향을 주는 요인은 증가할 수 밖에 없어 환경 변수를 제거한 실험 진행이 향후 필요할 것으로 보임. 그러나 ELISA 시험 결과에서 백신 접종 후 2주차(14dpv)의 PI와 항체양성율이 공격접종 시점일 백신 접종 후 3주차(19dpv)에 비해 높은 것으로 나타나 구제역에 대한 조기면역을 획득할 수 있는 가능성을 보였으며, 우리나라 사용하고 수입 불활화 백신의 경우 2회 접종을 기본 접종으로 설정하고 있어 동일한 접종 횟수를 적용할 경우 혈청형에 관계없이 80~100% 이상의 방어율을 보일 것으로 예상됨. 또한 ELISA 분석시험 결과인 PI값과 양성전환률은 방어력과 비례 상관관계가 아니므로 혈청학적 분석결과와 방어력의 상관관계를 보기 위해서는 공격접종 바이러스에 대한 바이러스 중화항체가의 측정이 필수적이지만, 당 공격접종시험의 경우 부족한 사용일정으로 인하여 중화항체가의 측정을 실시하지 못하였으므로 향후 바이러스 공격접종시험은 바이러스 중화항체가 측정이 선행되어야 할 것으로 판단됨. 재조합 단백질 후보 2가 항원 중 D FAO4가 전체적으로 가장 우수한 방어력을 보여 이에 대한 최적도스 결정시험 및 최적화된 공격접종시험을 진행할 필요성이 있으며, 단가 항원의 경우 각각의 혈청형에 우수한 방어력을 보여 각 단가항원에 대한 적절한 도스를 포함하는 혼합백신을 완성할 경우 2가 백신 대비 방어력이 더 우수한 구제역 백신을 완성할 수 있을 것으로 보임.

2.7. 대량생산 공정 기술자료 확보 및 경제성 평가

구제역 재조합단백질 항원생산 및 백신 생산공정 기술을 협력기관 (주)씨티씨백의 KvGMP 시설에서 검증하고 이에 관한 제조지시서를 확보하였음. 각 공정별 수립한 기준에 대해서도 모두 만족하여 이에 대한 시험성적서를 확보하였음. 구제역 재조합단백질 백신의 대량생산을 위하여 KvGMP 시설내 마그네틱 믹서를 사용하여 혼합하고 인라인믹서를 사용하여 혼합을 순차적으로 진행하여 성공적인 유화진행을 확인하였으나, 충전기 연결 및 시험충전단계에서 손실이 발생(-11.7%)하여 개선이 필요하였음. 현재 우리나라 및 각국에서 사용중인 구제역백신은 바이러스 불활화 백신으로서 우리나라를 포함하여 많은 국가에서 다가 백신을 사용하고 있음. 이것은 다른 혈청형의 구제역 발생을 대비하기 위해서 뿐만 아니라 교차방어의 효과를 기대하는 것임. 그러나 단가항원에 비해 다가항원은 제조공정이 복잡하고 높은 비용을 요구하므로 전 축종에 적용하는 것은 경제적이지 않음. 단가백신은 백신 검정뿐만 아니라 예찰이 용이하여 우리나라의 경우에도 구제역 O혈청형, A혈청형을 포함하는 2가 백신을 접종하지만 구제역 O혈청형에만 예찰을 진행하고 있는 실정임. 2021년 기준 우리나라에서 사용 중인 3종의 수입백신 단가는 아래와 같음. 본 연구과제에서 개발한 구제역 재조합 단백질 백신의 생산공정에 따른 제조경비는 dose당 405원, 협동기관 (주)씨티씨백에서 산정한 위작제조수수료를 포함하여 675원으로 국내 유통 수입백신 판매가격의 30~50% 해당하였음. 국내 구제역백신 유통은 전량 국가기관인 조달청을 통해 이루어진다는 특수성과 다가 항원도 단가항원의 생산비용이 유사하며 품질관리 비용에 차이가 없는 점을 고려하였을 때, 본 과제를 통하여 제조된 구제역 재조합 단백질 백신은 생산성과 공정상 제품 제조에 대한 경제성이 있음으로 판단됨.

표 48. 국내 구제역 백신 유통판매 가격

단계 구분	(영국)메리알		(러시아)아리아	(아르헨티나)바고
	2가 백신(O + A형)	단가 백신(O형)	단가 백신(O형)	
국내 공급 가격	1,700	1,430	1,100	1,100
전업농 소비자가격	1,980	1,650	1,320	1,320

표 49. 구제역 재조합단백질 백신 직접제조비용

구분	공정	금액(원)
원부재료비	배양	1,142,500
	정제 및 여과	4,562,700
	정량 및 순도측정	2,363,100
	제제화	7,125,000
소모품비	배양	212,800
	정제 및 여과	5,094,200
	정량 및 순도 측정	105,100
설치장치 유지관리비		3,685,500
① 1batch (2400 vial = 60,000 dose) 합계		24,290,900
② Per dose (① / 60,000 dose)		405
③ 위탁제조수수료 / dose		270
직접제조비용 (② + ③) = 원 / dose		675

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

본 연구과제는 주변국 발생 구제역바이러스 혈청형에 신속대응이 가능한 재조합 단백질 기반의 구제역 백신 개발 및 생산 시스템 구축을 목표로 수행되었음. 이를 위하여 최근 5년이내의 주변국 발생 구제역 바이러스 유전자 정보를 확보하고, 이를 기반으로 대장균 기반의 재조합단백질 항원 설계, 생산균주 확보 및 대량생산 공정을 확보하였음. 또한 이에 대한 안전성, 안정성, 주변국 발생 동일 지역형 구제역 바이러스에 대한 유효성 평가를 완료하였음. 주변국 발생 구제역 바이러스 지역형과 국내 상시백신 선정 적합성 평가기준 바이러스는 동일한 지역형 바이러스이므로, 주변국 발생 구제역 바이러스의 지역형에 대한 유효성 평가를 위하여 현재 국내 상시백신 선정 적합성 평가기준으로 사용되고 있는 기발생 국내 바이러스주를 사용하였음. 이로써 최종 개발완료된 구제역 2가 백신을 위한 재조합단백질 항원 4종, 단가백신을 위한 재조합단백질 항원 2종은 다양한 혈청형, 지역형 구제역 바이러스에 방어력을 가져 기 유입 바이러스와 유입 가능한 바이러스에 대비할 수 있는 수단으로 사용가능하며, 각 혈청형, 지역형 구제역 바이러스에 대한 중화항체가 분석결과로 미루어 상시백신으로도 활용될 수 있는 가능성을 보여주었음. 이는 국내 생산 구제역 바이러스 백신으로서 구제역 발생시 조기 대처가 가능하여 구제역 관리 및 방역체계에 도움이 될 수 있으며, 재조합 단백질 백신 플랫폼 개발로 구제역 이외 다양한 바이러스성 가축질병을 위한 백신개발에 활용할 수 있음.

(2) 정량적 연구개발성과

본 연구과제로 구제역 재조합 단백질 백신 항원 개발에 대한 논문을 국내 관련 학회지에 2편 게재하고, 백신생산공정 경제성 보고서 1부, 주변국 구제역 바이러스 유전정보 Data 를 확보하였음. 구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 제조방법 및 정제법, 재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물 특허 2건을 출원하였음.

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명				연도	1차년도 (2019)	2차년도 (2020)	3차년도 (2021)	계	가중치 (%)	
전담기관 등록·기탁 지표 1)	학술 성과	논문	SCI	목표(단계별)			1	1		
				실적(누적)			0	0		
			비SCI	목표(단계별)	1	1		2		
				실적(누적)	1	1		2		
		논문평균IF		목표(단계별)						
				실적(누적)						
		학술발표		목표(단계별)						
				실적(누적)						
	교육 지도	건수		목표(단계별)						
				실적(누적)						
	인력 양성	명		목표(단계별)						
				실적(누적)						
	정책 활용· 홍보	정책 활용		목표(단계별)						
				실적(누적)						
		홍보전시		목표(단계별)						
				실적(누적)						
	기타 (타 연구 활용 등)	백신생산공정 경제성 보고서		목표(단계별)			1	1		
				실적(누적)			1	1		
		구제역 바이러스 유전정보		목표(단계별)			1	1		
				실적(누적)			1	1		
지식 재산권		특허출원		목표(단계별)	1	1		2	50	
				실적(누적)	0	0	2	2	50	
	특허등록		목표(단계별)			1	1	30		
			실적(누적)			0	0	0		
	품종등록		목표(단계별)							
			실적(누적)							
기술 실시 (이전)	건수		목표(단계별)							
			실적(누적)							
	기술료		목표(단계별)							
			실적(누적)							
사업화	제품화		목표(단계별)							
			실적(누적)							
	매출액		목표(단계별)							
			실적(누적)							
	수출액		목표(단계별)							
			실적(누적)							
	고용창출		목표(단계별)	2	2	2	6	20		
			실적(누적)	2	2	2	6	20		
	투자유치		목표(단계별)							
			실적(누적)							
기술인증		목표(단계별)								
		실적(누적)								
계										

구제역 백신 생산공정 관련 생산성 분석 보고서

사업명: 가축질병대응기술개발사업

국가과제명: 해외 주요 혈청형 바이러스 유입에 대응한 구제역 백신 생산 기술 개발

참여기관: ㈜씨티씨백

참여기관 과제책임자: 오성창



1. 구제역 바이러스와 백신

1.1. 구제역

구제역(Foot and Mouth disease)이란 소, 돼지, 양, 염소 등 우제류 동물에서 발생하는 질병으로 알려져 있다. 구제역 주요 임상증상은 체온상승, 식욕부진, 물집발생 등이 있다. 이에 따라 생산성 하락과 젖소의 경우 산유량 감소로 이어진다. 폐사율이 높지는 않으나 어린가축은 폐사하고 임신축은 유사산이 발생하는 경우가 있다.

구제역은 전염성이 매우 높아 우리나라에서는 1종 가축전염병으로 지정되어 관리하고 있다. 또한 국제동물보건기구(OIE)에서도 중요 가축전염병으로 지정하고 있다.

구제역에 감염된 동물은 수포액, 타액, 분변, 호흡 등을 통해 구제역 바이러스를 배출한다. 바이러스의 전파는 감염된 동물의 이동, 분변이 묻은 차량 등을 통해 전파되며, 최대 50km까지 전파된 사례가 있다.

국내 FMD 발병현황



년도	축종	발생두수	년도	축종	발생두수	비고
1911	소	15	1924	소	177	
1912	소	15	1925			
1913	소	1,015	1926	소	128	
1914	소	9,182	1927	소	1	
1915	소	1,202	1928		0	
1916	소	802	1929		0	
1917	소	870	1930		0	
1918	소	36,397	1931	소	968	평안남북도, 함경남북도
1919	소	317	1932		0	
1920	소	634	1933	소, 돼지	2,383	돼지 12두 포함
1921	소	181	1934	소	3	
1922	소	27	1935~		0	1935년부터 1999년까지 없음
1923	소	37	1999			

구제역은 1514년 이탈리아 북부지역에서 최초 발생된 이후 19세기에는 전 세계적으로 발생하였다. 우리나라의 최초 구제역은 1911년으로 기록되어 있으며, 1934년 이후 발생기록이 없다가 2000년에 다시 발병하고 2010년에는 사상최대의 피해가 발생하였다.

1.2. 구제역 바이러스

구제역 바이러스는 Picornaviridae Aphthovirus 속에 속하며 크기가 약 23nm이고 single-stranded RNA(8Kb)의 핵산을 가지며 외피가 없고 구조단백질(structural proteins; VP1, 2, 3, 4)와 여러 종류의 비구조단백질(non-structural proteins)로 구성되어 있다. 구제역 바이러스는 상피세포에 높은 친화성이 있다.

구제역 바이러스 7개의 혈청형(A, Asia1, O, C, SAT1, SAT2, SAT3)과 80여종의 아혈청으로 분류된다. 이 중 O, A형은 우리나라에서 발병하였다.

구제역 바이러스는 산과 알칼리에 취약하고, 습도에 민감하며 건조한 환경에서 생존력이 저하됨. 열에 약하여 고온(50°C)에서는 급격히 생존율이 떨어지나 저온(냉장, 냉동)에서 감염력과 생존성이 유지되는 것으로 알려져 있다.

구제역 바이러스는 변이가 빈번하게 발생을 하기에 다수의 변종이 존재한다. 또한 서로 다른 혈청형 간 교차면역이 불가능한 것으로 알려져 있다.

1.3. 구제역 백신

제품명	업체명	제조사	유통처	비고
원백 데코엠티(Hirvac FMD)	고려비앤피			
대성 데코엠티 백신(DS FMD vaccine)	대성미생물연구소	메리앙, 프랑스	Omanisa, Amary(97), Asat(Shank)	
데코엠티-100(FMD-100)	중앙백신연구소			
뉴수 데코엠티 백신(GVP FMD vaccine)	뉴삼자수의약품			
프로백 데코엠티(Pro-vac FMD)	코티셀			
아리아백(ARRIAH-VAC)	유일	FGEI ARRIAH, 러시아	O(Primorsky)	
아리아백 플러스 두(ARRIAH-VAC Plus 1y)	유일		O(Primorsky), Arzabakulsky	
마노젠 올레오(JATOGEN OLEO)	케어사이드	Biogenisis Bago, 아르헨티나	O(Campos)	
대시백-데코엠티(Décivac-FMD)	한국MSD동물약품		O, A, C, Asia1	
바이노백 구제역 사육백신(Bayovac FMD vaccine)	한국MSD동물약품	MSD, 미국	O, A, C, Asia1	
아프포(Atopon)	메리앙코리아		O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3	
아프와스피(Afrovaxpi)	메리앙코리아	메리앙, 프랑스	O, A, C	

구분	백신주	축종	비고
상시백신	영국 OManisa+O3039	돼지	
	러시아 O Primorsky, 아르헨티나 O Campos		

페이지 3 / 8

	영국 O Manisa+O3039+A 22 Iraq	스	
	러시아 O Primorsky+A Zabaikalsky		

현재 우리나라에서 사용하고 있는 구제역 백신은 바이러스를 대량으로 배양하여 불활화 시킨 다음, 농축 및 정제과정으로 거친 바이러스 항원과 오일성분의 면역증강제 (Adjuvant)가 혼합된 불활화 오일백신이다. 현재는 메리알사에서 bulk를 수입해오고 국내 제조사에서 공급하는 형태이다.

구제역 바이러스는 혈청형간 교차방어가 안되기 때문에 구제역 혈청형 별 항원을 혼합하여 백신을 제조하는 것이 일반적이다. 구제역 백신의 면역지속기간은 수개월에 불과하기에 주기적인 백신 접종은 필수적이다. 현재 우리나라도 백신 접종 프로그램은 6개월 간격을 권고하고 있다.

축종	예 방 접 종 시 기	접종량(1회)
소	① 송아지 - 2개월령 1차, 4주 후 2차 접종 ② 모든 소(송아지 제외) - 4~7개월 간격으로 접종	2ml/두
돼지	① 모든 - 분만 3~4주전 접종 ② 옹돈 - 4~7개월 간격으로 접종 ③ 자돈 - 8~12주령 1차만 접종 ④ 종돈장의 자돈중 암컷(후보 모든 예정) - 2개월령 1차, 4주후 2차 접종	2ml/두
염소	① 어린 염소 - 2개월령 1차, 4주후 2차, 2차접종 4~7개월후 보강 ② 1세이상 - 1년 간격으로 접종	1ml/두
혹돼지· 멧돼지	생후 8~12주 1차, 1차 접종 후 4~7개월 간격으로 접종	2ml/두

우리나라에서 발생한 구제역 혈청형은 O형과 A형이 있다. 8번의 구제역 발생 중, 7번은 혈청형 O

	2003	2005	2011	2014	2011.1	2014.7	2014.12	2016.1
혈청형	O	O	A	O	O	O	O	O
발병기간 (일)	22	53	28	26	145	15	147	79
매몰규모 (마리)	2,216	160,155	5,956	46,874	3,479,962	2,009	172,738	30,823
재정지출 (억 원)	3,006	1,434	272	1,040	27,383	17	638	59

형으로 보고되었고, 2010년 1월 발병한 구제역은 혈청형 A형으로 확인되었다.

구제역 O형은 발병지역이 가장 넓게 분포되어 있다. 우리나라를 포함하여 동북아시아 지역에도 광범위하게 발병하였고, 동남, 중앙아시아, 중동지역 등지에서도 발병하고 있다.

구제역 A형도 발병지역이 넓은 편이다. 우리나라를 포함하여 중국, 대만, 북한에서 발병사례가 있다.

우리나라에서 발병한 A형 구제역은 2010년 1월 포천에서 최초 분리되었으며, 젓소농장에서 발병하여 인접지역(연천)으로 전파되었다. 감염이 확인된 가축은 소이며 돼지에서는 확인되지 않았다.

O형과 A형 구제역은 우리나라에서 발병하였고 또, 최근 인접국가에서도 발병이 지속되고 있다.

1.4. 국내 구제역 시장

국내 구제역 시장은 외산제품이 유일하다. 현재까지 상용화 된 국산 구제역백신은 없다. 수입국가는 유럽, 아르헨티나, 러시아 이렇게 분포하고 있으며, 2019년까지 주로 메이알사 구제역 백신만을 사용하다가 케어사이드, 아리아백 제품이 수입되면서 독점 시장 구조가 변경이 되었다.

국내 FMD 시장현황 및 전망 - 1

국내		국외	
경쟁 기업명	제품명	경쟁 기업명(국명)	제품명
-	-	메리알(프랑스, 영국)	AFTOPOR
-	-	아르헨티나	AFTOGEN
-	-	러시아	ARRIAH-VAC

국가통계포털에 따르면 소와 돼지 사육 규모는 매년 증가하고 있는 추세이다. 이에 따라 백신의 요구도 증가될 것으로 추정한다.

국내 FMD 시장현황 및 전망 - 2



연간 사육두수 추정량, 출처: 국가통계포털(www.kosis.kr), 농림부

국내 FMD 시장현황 및 전망 - 3



연간 사용 추정량, 출처: 국가통계포털(www.kosis.kr), 농림부

1.5. 국가별 주요 백신주 사용형태

국가	상시백신			긴급백신 (항원뱅크)	비고
	단가백신	2가 백신	3가 백신		
중국	- O(돼지만 사용) - A	- O+Asia1 - O+A	- O+A+Asia1		단가 및 다가백신 혼합사용
대만	- O			항원 O	
홍콩			- O+A+Asia1		
러시아			- O+A+Asia1		
베트남	- O (2종 혼합)			O+A+Asia1	
태국			- O+A+Asia1		
이스 라엘	- O (3종 혼합) - A (1종) *양, 염소에 사용	- O+A *3-4종 항원혼합 돼지 에 사용	- O+A+Asia1 *향 6종 항원 혼합 소에 사용		

<2015년 검역본부 분석자료>

해외여러나라에 구제역 백신 사용 유형은 우리나라를 포함하여 상당수 국가에서 다가백신을 사용하고 있다. 단가 백신을 사용하는 국가도 있다. 이는 서로 다른 혈청형의 구제역 발생을 대비하여 혈청형이 다른 항원을 혼합한 다가 백신을 사용하는 것이 일반적이다.

구분	장점	단점
① O형 단가백신	· 비용 절감 · 백신검정 및 예찰 용이 · 제조공정이 비교적 단순하여 안정적 · 품질기대	· 비점종 혈청형(A형 등) 발생시 대처지연 · 신속한 초동방역 및 철저한 · 차단방역 등이 요구됨 · 항원뱅크 보강 및 긴급백신 비축 요구됨
② O형 포함 다가백신	· 주변국 유행 혈청형에 대한 평시대비 · 초기발생시 방어유리, 교차방어효과 기대 · 긴급 보강접종시 신속한 면역증강효과 기대	· 비용 상승 · 제조공정이 복잡하여 엄격한 · 품질관리 요구

페이지 7 / 8

1.6. 구제역 백신 유통 판매 가격 및 생산 단가

단계 구분	(영)메리알사		(러)아리아사	(아)바고사	비고
	2가 백신 (O+A형)	단가 백신 (O형)	단가 백신(O형)		
국내 공급가격	1,700	1,430	1,100	1,100	
전업농 소비자가격	1,980	1,650	1,320	1,320	

[파로박스-구제역 제조 경비]

구분	공정	금액(원)
원부재료비	배양	1,142,500
	정제 및 여과	4,562,700
	정량 및 순도측정	2,363,100
	제제화	7,125,000
소모품비	배양	212,800
	정제 및 여과	5,094,200
	정량 및 순도측정	105,100
설비장치 유지관리비		3,685,500
① 1batch (2400 vial = 60,000 dose) 합계		24,290,900
② Per dose (① / 60,000 dose)		405
③ 위탁제조수수료 / dose		270
직접제조비용 (② + ③) = 원 / dose		675

구제역 백신의 국내 공급 가격은 다가 백신의 경우, 1,700원/두당으로 형성되어 있다. 단가백신은 1,100 ~ 1,430원/두당으로 형성되어 있다. 금번 과정을 통하여 제조된 시제품의 경우, 단가가 675원/두로 생산성과 공정상 제품 제조에 대한 경제성은 충분한 것으로 사료된다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.08.24
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(A1)
 출원번호 10-2022-0106068 (접수번호 1-1-2022-0886856-43)
 (DAS접근코드EECO)
 출원인명칭 주식회사 파로스백신(1-2013-015579-3)
 대리인성명 제일특허법인(유)(9-2010-100081-2)
 발명자성명 김영훈 박미나 이정임
 발명의명칭 재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통행된 날일영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
 ※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

2022-08-24

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	A1
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 파로스백신
【특허고객번호】	1-2013-015579-3
【대리인】	
【명칭】	제일특허법인(유)
【대리인번호】	9-2010-100081-2
【지정된면리사】	조형은, 이현실, 이원상
【표광취일등록번호】	2013-022551-0
【발명의 국문명칭】	재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물
【발명의 영문명칭】	Recombinant proteins and vaccine composition against foot-and-mouth disease comprising the same
【발명자】	
【성명】	김영훈
【성명의 영문표기】	KIM, Young Hoon
【주민등록번호】	
【우편번호】	
【주소】	
【발명자】	

【**성명**】 박미나
 【**성명의 영문표기**】 PARK, Mi Na
 【**주민등록번호**】
 【**우편번호**】
 【**주소**】

【**발명자**】

【**성명**】 이정일
 【**성명의 영문표기**】 LI, Jing Lin
 【**주소**】

【**출원언어**】 국어

【**이 발명을 지원한 국가연구개발사업**】

【**과제고유번호**】 1645022842
 【**과제번호**】 319082033SB010
 【**부처명**】 농림축산식품부
 【**과제관리(전문)기관명**】 농림식품기술기획평가원
 【**연구사업명**】 가축질병 대응기술개발(R&D)
 【**연구과제명**】 해외 주요 할청형 바이러스 유입에 대응한 구제역백신 생산
 기술 개발
 【**기여율**】 1/1
 【**과제수행기관명**】 (주)파로스백신

【연구기간】 2019.05.27 ~ 2021.12.31

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 제일특허법인(유)

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】	0	면	46,000	원
【가산출원료】	19	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】			46,000	원
【감면사유】			중기업(70%감면)[1]	
【감면후 수수료】			13,800	원

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물(Recombinant proteins and vaccine composition against foot-and-mouth disease comprising the same)

【기술분야】

<0001> 본 발명은 구제역 바이러스에 관한 재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

<0002> 동물의 A 클래스 전염성 질병 중에서 가장 심각한 질병인 구제역(FMD)은 돼지, 소, 양 등과 같은 우제 동물에게 심각한 영향을 미치는 급격히 진행되는 전염성 질병이다. 최근, 많은 국가의 가축 산업이 FMD의 발발 및 유행으로 인한 막대한 경제적 손실을 겪고 있다.

【발명의 내용】

【과제의 해결 수단】

<0003> 본 발명은 구제역 바이러스에 관한 재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 재조합 단백질은 면역원으로서 접종된 동물에서 구제역 바이러스에 대한 특이적 면역반응을 보다 효과적으로 유발할 수 있을 뿐만 아니라, 변종 등에 대응하여 특정 요구조건을 만족하도록 설계할 수 있는 장점이 있다.

【발명의 효과】

<0004> 본 발명에 따른 재조합 단백질은 면역원으로서 접종된 동물에서 구제역 바이러스에 대한 특이적 면역반응을 유발할 수 있다. 또한, 상기 재조합 단백질을 포함하는 백신 조성물은 백신 및 그 제조과정에서 살아있는 바이러스를 전혀 사용하지 않기 때문에, 제조하고 사용하기에 매우 안전한 뿐만 아니라 상대적으로 낮은 비용으로 백신의 제조가 가능한 장점이 있다. 또한, 본 발명에 따른 재조합 단백질은 구제역 바이러스의 변이나 변종에 대응하여 특정 요구 조건을 만족하도록 설계할 수 있고, 하나의 재조합 단백질로 2종 이상의 혈청형 또는 아형에 대응하도록 설계할 수 있어, 국가별, 지역별로 최적의 효능을 가지는 백신을 공급하는 것이 가능하다.

【도면의 간단한 설명】

- <0005> 도 1은 본원발명의 재조합 단백질의 구조 및 특성을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본원발명의 단백질 서열 1을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본원발명의 단백질 서열 2를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본원발명의 단백질 서열 3을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본원발명의 단백질 서열 4를 나타낸 것이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

- <0006> 상기 유효성분의 제조방법
- <0007> 1. 재조합 단백질의 제조
- <0008> 1) 재조합 유전자, 발현벡터의 구축 및 재조합 단백질의 제조
- <0009> (1) 재조합 단백질 아미노산 서열의 결정 및 정렬

<0010> 구제역 바이러스 O 혈청형과 A 혈청형에 동시에 대응하는 재조합 단백질 항원을 제작하기 위해 각 혈청형의 VP1 단백질 아미노산 서열을 확보하였다. A 혈청형에 대해서는 VP1 단백질의 139-158의 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 항원결정기 및 199-212의 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 항원결정기를 사용하였으며, O 혈청형에 대해서는 VP1 단백질의 141-160의 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 항원결정기 및 200-213의 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 항원결정기를 사용하였다. 면역글로불린 중쇄의 불변영역으로는 돼지 IgG의 면역글로불린 중쇄의 불변영역중 constant Ig 도메인과 면역글로불린 도메인 일부 아미노산 서열을 사용하였다. 각각의 항원결정기들과 면역글로불린 중쇄의 불변영역을 연결하기 위해서는 in vivo cleavable linker와 rigid linker를 사용하였다.

<0011> 구제역 바이러스 A 혈청형의 항원결정기 2종의 직렬연결 후 3회 직렬반복, 구제역 바이러스 O 혈청형의 항원결정기 2종의 직렬연결 후 3회 직렬반복, 돼지 IgG의 면역글로불린 중쇄의 불변영역, 구제역 바이러스 A 혈청형의 항원결정기 2종의 직렬연결 후 3회 직렬반복의 순서대로 N-말단부터 C-말단까지 재조합 단백질의 아미노산 서열정렬하였다.

<0012>

<0013> (2) 재조합 단백질을 암호화하는 DNA의 합성

<0014> 재조합 단백질 아미노산 서열에 대해 코돈 최적화를 수행하고, 이렇게 도출된 재조합 유전자 염기서열의 5' -말단에 제한효소 NdeI, 3' -말단에 제한효소 XhoI의 절단부위를 추가하여 최종 합성할 재조합 유전자의 염기서열을 결정하였다.

μl씩 분주하고, 글리세린을 30% 첨가하여 -70℃에 보관하였다.

<0021>

<0022> (5) 재조합 단백질의 수득

<0023> 냉동보관한 균주를 해동하여 카나마이신이 첨가된 L-배양배지 300 mL에 접종하고 37℃에서 하룻밤 진탕 배양하여 종균을 준비하였다. 5 L 발효조에 2xYT배지(+)(LPS solution, YT-05) 3 L를 멸균하여 준비하고 카나마이신을 50 ug/mL가 되도록 첨가한 후 종균을 접종하였다. 600 rpm에서 흡광도가 5~10이 되었을 때 0.5 mM의 IPTG를 배지에 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도시키고, 흡광도가 증가하지 않을 때까지 배양하여 박테리아 세포를 회수하였다. 박테리아 세포를 IB완충액(50 mM Tris, 0.1 NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁시키고 세포파쇄기를 사용하여 박테리아 세포를 파쇄한 후, 8,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 용입체(Inclusion body)를 회수하였다.

<0024> 가용화완충액(8 M Urea, 10 mM Tris, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0)을 적당량 첨가하고 4℃에서 하룻밤 교반하여 용입체를 현탁시켰다. 그 후, 8,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 버리고 상등액을 회수하여 재조합 단백질을 함유하는 단백질 용액을 수득하였다. 단백질 용액을 니켈 친화성 컬럼(Ni affinity column)을 통과시켜 재조합 단백질을 컬럼에 붙이고 가용화완충액으로 세척한 후, 용출완충액(8 M Urea, 10 mM Tris, 50 mM NaH₂PO₄, 250mM Imidazole, pH 8.0)을 이용하여 컬럼으로부터 용출시켰다. 용출된 단백질을 숯분화하고 컷오프(Cut-off) 분자량 30,000인 한외여과막(Ultra-filter)을 이용하여 최종완충액(2 M Urea, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM

Glycine, 240 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 8.0)으로 투석하여, 이미다졸(Imidazole)을 제거하고 요소(Urea)를 낮춰 최종 재조합 단백질 원액을 제조하였다.

<0025>

<0026> (6) 재조합 단백질의 순도 확인 및 정량

<0027> 재조합 단백질 원액을 브래드포드법(Bradford assay)로 정량하여 원액 중 단백질의 농도와 총량을 계산하였다. 단백질의 양이 3~5 μg 가 되도록 재조합 단백질 원액의 시료를 채취하여 SDS-PAGE를 하여 재조합 단백질의 분자량을 확인하고, 단백질밴드를 비교하여 순도를 측정하였다. 재조합 단백질의 분자량은 예측한 대로 약 79 kD로 분석되었으며, 순도는 90% 이상인 것으로 확인되었다.

<0028>

<0029>

사용된 단백질 1 내지 4의 서열은 다음과 같다.

단백질 번호	서열
1	MGHIIIIHPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGS VARHKQKI IAPAKQLGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVLPNVRGDLQVLA PKAARPLPGG GGSVLPNVRGDLQVLA PKAARPLPGGGGSVALPNVRGDLQVLA PKAARPLPGGGGSVARHKQKI VAPVKQSLGGGGSVARHKQKI V APVKQSLGGGGSVARHKQKI VAPVKQSLGGGGSVALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKEAEAP SVYPLAPCGRDVSGPNVALGCLASSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHTFPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTTK VTKRVPQVYTLPPAEELSRSKVTLTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPEPTYRTTTPPQQDVGDTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECA VMHEALHNHYTQKSI LEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKE PATQLPGGGGSVAPQNRIGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAPQNRIGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLP GGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARHKQKI VAPVKQLGGGGSVARHKQK I VAPVKQLGGGGSVARHKQKI VAPVKQLL
2	MGHIIIIHPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGS VAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARHKQ KI VAPVKQLGGGGSVARHKQKI VAPVKQLGGGGSVARHKQKI VAPVKQLGGGGSVALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKEAE AAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAPSVYPLAPCGRDVSGPNVALGCLASSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHTFPSVLQPSGLYSLSSM VTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTTKVKRVPQVYTLPPAEELSRSKVTLTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPEPTYRTTTPPQQD GTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAVMHEALHNHYTQKSI LEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE ALEGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVAPQNRIGDLGFLAAR LAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLP GGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLP
3	MGHIIIIHPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGS VAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARHKQ KI IAPAKQLGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKEAE AAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAPSVYPLAPCGRDVSGPNVALGCLASSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHTFPSVLQPSGLYSLSSM VTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTTKVKRVPQVYTLPPAEELSRSKVTLTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPEPTYRTTTPPQQD GTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAVMHEALHNHYTQKSI LEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE ALEGGGGSVAPQNRIGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAPQNRIGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAPQNRIGDSGPLVVKPATQLPGGG GSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARH KQKI VAPVKQLGGGGSVARHKQKI VAPVKQLGGGGSVARHKQKI VAPVKQLL
4	MGHIIIIHPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRIGDLGFLAARLAAQLPGGGGS VLPNVRGDLQVLA PKAARPLPGGGGSVALPNVRGDLQVLA PKAARPLPGGGGSVALPNVRGDLQVLA PKAARPLPGGGGSVARHKQ KI VAPVKQSLGGGGSVARHKQKI VAPVKQSLGGGGSVARHKQKI VAPVKQSLGGGGSVAPQNRIGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAPQ NRIGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAPQNRIGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVARHKQKI IAPAKQL GGGGSVARHKQKI IAPAKQLGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVR GDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARHKQKI VAPVKQLGGGGSVARHKQKI VAPVKQLGGGGSVARHKQKI VAPVKQLGGGGSVALE AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAPSVYPLAPCGRDVSGPNVALGCLASSYFPEPVTVTWNS GALTSGVHTFPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTTKVKRVPQVYTLPPAEELSRSKVTLTCLVIGFYPPDI HVEWKSNGQPEPEPTYRTTTPPQQDVGDTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAVMHEALHNHYTQKSI

<0030>

<0031>

2. 백신 조성물의 제조

<0032>

1) 백신의 제조

<0033>

(1) 백신 조성물의 제조

<0034>

백신 제조를 위해 필요한 만큼 재조합 단백질 용액을 준비하였다. 이때 재조합 단백질 용액의 단백질 농도가 백신 조성물 제조에 필요한 농도보다 낮으면 한외 여과(컷오프 분자량 10,000)하여 농축하고, 높으면 최종완충액을 적당량 첨가하여 재조합 단백질 용액의 단백질 농도를 적합하게 조정하였다. 미네랄 오일, 계면활성제를 적당량 첨가하고 교반기로 수 차례 잘 섞어 주어 최종 백신용액을 제조한 후, 바이알에 적당량씩 분주하여 냉장 보관하였다.

<0035>

<0036>

3. 백신 조성물의 효능확인

<0037>

1) 구제역 백신의 효능

<0038>

구제역 재조합 단백질 백신 조성물의 효능을 확인하기 위하여 실험동물과 특적동물에게 백신 조성물을 투여하고 혈액을 채취하여 항체 역가를 측정하였다. 면역된 혈청에 대해 구제역 바이러스를 사용하여 바이러스 중화시험(Virus Neutralization test)를 하여 생성된 항체가 구제역 바이러스에 대한 중화 능력을 가지는지를 확인하여 방어력을 측정하였다. 또한 생체 내에서 구제역 바이러스가 실제로 방어되는지를 구제역 동물 모델인 마우스에서 확인하였다.

<0039>

<0040>

(1) 기니피그 항체 역가시험

<0041>

기니피그(Guinea pig)는 구제역 백신의 효능시험에 많이 이용하는 모델이르

로, 재조합 단백질 구제역 백신 조성물의 효능을 시험하기 위해 기니피그에서 효능 시험을 실시하였다.

<0042> 체중 300 g 내외의 기니피그 20 마리를 준비하였다. 백신 조성물을 투여하기 전에 채혈을 하여 항체 역가를 확인하였다. 백신 조성물의 일종인 실시예 2.에서 제조된 구제역 바이러스 O 혈청형, A 혈청형 단일 재조합 단백질 백신 조성물을 5 마리의 기니피그에게 0.5 mL씩 뒷다리에 근육내(Intra-muscle) 투여하였다. 양성대조군 5 마리에게는 시판 중인 구제역 불활화 바이러스 O 혈청형 및 A 혈청형 2가 백신을 동일한 방법으로 투여하였다.

<0043> 또한, 비교를 위해 5 마리에게 구제역 바이러스 O 혈청형 재조합 단백질과 A 혈청형 재조합 단백질을 혼합한 2가 백신을 동일한 방법으로 투여하였다. 아울러, 음성대조군 5 마리에게는 최종 완충액, 미네랄 오일, 계면활성제 등으로 이루어진 가(假)백신(Mock vaccine)을 동일한 방법으로 투여하였다. 투여 후 4주에 채혈하여 혈청을 분리하고 프리오닉스(Prionics)사의 구제역 바이러스 O 혈청형 항체 ELISA 키트(PrioCHECK FMDV O type ELISA)와 A 혈청형 항체 ELISA 키트(PrioCHECK FMDV A type ELISA)로 분석하여 항체 역가를 측정 하여, 그 결과를 표 1, 표 2에 나타내었다.

<0044> [표 1]

<0045> 재조합단백질 내 epitope 배치 및 반복수에 따른 후보 면역혈청의 ELISA 시험결과

시험군	이표	% of ProCHECK FMDV type O SP ELISA					% of ProCHECK FMDV type A SP ELISA				
		0mpv	0.5mpv	1mpv	1.5mpv	2mpv	0mpv	0.5mpv	1mpv	1.5mpv	2mpv
FOA36 홍두수 7 두 Lot170402	P10	3.4	71.3	87.3	98.0	96.0	11.5	31.1	45.8	77.0	73.2
	P11	1.6	51.7	67.3	80.2	78.3	10.8	35.2	35.3	53.0	47.7
	P13	18.1	69.6	78.0	93.0	91.9	6.0	32.2	50.9	72.8	73.9
	P30	16.7	43.9	73.0	83.8	86.4	1.1	47.4	49.0	76.7	69.9
	P39	23.8	44.1	73.0	84.4	75.3	1.0	27.1	43.3	54.2	53.1
	P52	11.8	30.0	55.2	74.9	76.4	0.8	23.9	29.0	42.4	31.9
P75	13.0	62.5	78.1	82.3	81.0	6.3	32.0	43.3	81.0	77.3	
Average		12.3	53.3	72.1	85.2	83.6	5.3	32.9	42.4	65.3	61.0
Standard deviation		7.7	15.2	10.0	7.8	8.0	4.6	7.5	7.7	15.1	17.1
Positive ratio		0%	57%	100%	100%	100%	0%	0%	14%	80%	71%
FOA66 홍두수 5 두	P15	21.1	24.2	46.5	46.3	63.9	3.9	22.8	25.3	32.3	61.7
	P44	11.5	22.3	43.5	80.9	79.7	-0.9	23.9	24.5	51.7	40.5
	P49	14.2	31.5	45.1	32.4	40.1	16.4	23.0	18.8	24.9	9.0
	P59	9.3	52.3	63.6	85.1	83.7	4.6	18.2	9.2	35.6	25.0
	P60	21.5	54.2	66.4	85.4	89.4	4.2	34.1	20.4	58.8	54.8
	Average		15.3	36.9	53.0	70.0	71.4	5.6	24.4	21.5	44.8
Standard deviation		5.8	15.3	11.0	19.1	19.9	6.4	5.9	7.8	13.9	21.6
Positive ratio		0%	40%	40%	80%	80%	0%	0%	0%	60%	40%
FOA223 홍두수 5 두	P18	13.9	35.5	58.6	79.5	78.0	16.0	27.7	36.3	51.3	39.7
	P27	16.2	68.7	78.0	79.4	69.2	13.2	44.8	35.5	45.0	35.4
	P28	20.0	26.6	63.1	64.4	65.1	6.9	24.8	42.1	57.2	54.5
	P47	21.8	69.4	90.5	92.5	92.8	-2.1	33.6	29.5	59.8	46.9
	P51	10.2	65.9	74.9	80.9	73.8	6.9	32.7	26.4	50.1	41.1
	Average		18.4	53.2	73.4	79.4	75.8	8.2	32.7	34.0	51.5
Standard deviation		4.7	20.5	12.3	10.0	10.7	7.0	7.7	6.2	4.5	7.4
Positive ratio		0%	60%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	80%	20%
FOA77 홍두수 5 두	P07	22.3	42.0	74.9	96.2	96.5	-3.0	32.3	32.2	67.9	61.0
	P09	11.7	42.2	78.6	79.9	74.6	6.9	20.7	53.7	73.0	65.6
	P61	17.2	55.2	63.1	91.5		11.5	24.1	14.6	59.3	
	P67	13.0	59.5	66.0	92.4	89.4	16.8	27.2	16.8	61.2	49.8
	P77	19.0	64.1	60.5	83.0	75.2	2.1	24.9	28.9	52.8	47.6
	Average		16.6	52.6	68.6	88.6	83.9	6.9	25.8	29.3	62.8
Standard deviation		4.3	10.1	7.8	6.8	10.8	7.8	4.3	15.6	7.8	8.7
Positive ratio		0%	60%	100%	100%	100%	0%	0%	20%	100%	50%

<0046>

<0047>

[표 2]

<0048>

재조합단백질 내 link 종류에 따른 후보백신 면역혈청의 ELISA 실험결과

Group	이표	PI of PrioCHECK FMDV type O SP ELISA				
		14dbv	21dpv	28dpv	35dpv	42dpv
Positive control	GP01	13.8	11.3	45.3	69.0	95.0
	GP02	23.7	20.8	31.6	37.7	60.3
	PC	39.9	19.3	27.9	56.0	81.4
	GP04	23.4	52.5	70.9	73.6	87.6
	GP05	34.7	57.5	74.3	79.9	94.1
Average		27.1	32.3	50.0	63.2	85.7
Standard deviation		10.3	21.1	21.7	16.7	14.5
Positive ratio		0%	40%	40%	80%	100%
Ligid linker	GP06	24.1	36.5	63.0	81.5	95.0
	LT1	31.7	40.8	74.8	81.8	95.1
	GP08	24.8	36.4	75.9	74.2	92.1
	GP09	35.3	33.5	43.5	62.8	79.5
	GP10	20.0	23.6	44.1	74.3	91.4
Average		27.2	34.2	60.2	74.9	90.6
Standard deviation		6.2	6.5	15.9	7.7	6.4
Positive ratio		0%	0%	60%	100%	100%
L+SF	GP11	41.6	69.6	87.3	91.3	98.4
	LT2	42.1	69.3	81.9	91.9	98.9
	GP13	62.8	69.7	83.6	83.3	97.3
	GP14	60.9	53.3	81.3	91.4	95.7
	GP15	39.3	54.8	79.6	92.2	92.2
Average		49.3	63.3	82.7	90.0	96.1
Standard deviation		11.5	8.5	2.9	3.8	2.4
Positive ratio		0%	100%	100%	100%	100%
L+CSF1	GP16	41.5	68.2	80.8	86.6	92.7
	LT3	30.2	34.4	53.3	65.8	84.7
	GP18	29.1	62.3	69.4	79.8	82.2
	GP19	30.2	61.5	65.7	82.6	84.2
	GP20	36.3	49.7	61.4	76.7	84.3
Average		33.5	55.2	66.1	78.3	85.6
Standard deviation		5.3	13.4	10.2	7.9	4.1
Positive ratio		0%	60%	100%	100%	100%
L+CSF2	GP21	37.7	63.8	82.0	94.6	95.6
	LT4	42.7	29.5	86.2	96.3	96.9
	GP23	36.7	63.0	68.2	82.6	87.1
	GP24	18.1	26.7	39.7	48.0	45.8
	GP25	35.5	72.1	86.4	92.2	95.6
Average		34.1	51.0	72.5	82.7	84.2
Standard deviation		9.4	21.2	19.8	20.1	21.8
Positive ratio		0%	60%	80%	80%	80%

<0049>

<0050>

(2) 목적동물 효능시험

<0051>

구제역 항체 음성인 8주령의 돼지를 선별하여 준비한다. 준비된 돼지에 후보 백신 2ml을 근육주사하고 접종 후, 4주차에 후보백신 2ml을 주사하여 시기별로 채혈한다. 채혈방법은 실험축의 입안을 단단히 보정하고 경정맥에서 전혈 6ml씩 채혈하여 혈청을 수득한다. 수득한 혈청은 56℃, 30분 동안 비동화 과정 후 동결하여

보관하였다. 수득한 항원청은 Priocheck FMDV type O ELISA 와 Priocheck FMDV type A ELISA를 이용하여 분석하였다. ELISA 분석결과, 모든 재조합단백질 후보 백신 접종 후 2주차부터 PI값이 상승하여 양성전환되기 시작하였다. 특히 Priocheck FMDV type O ELISA 로 분석하였을 경우, 2가 재조합단백질 후보항원 A FOA1, D FA04 가 80%이상 양성에 가까워졌으며, 단가 재조합단백질 후보항원 F FO 는 오차 범위내 100% 양성전환하였다. Priocheck FMDV type A ELISA 로 분석하였을 경우, 2가 재조합단백질 후보항원 B FA02, D FA04 가 60~80% 이상 양성에 가까워졌으며, 단가 재조합단백질 후보항원 G FA는 50% 양성전환 하였다. 구제역 일정형에 관계없이 1차 접종 후 4주차에 2차 접종을 실시하였는데, 1차 접종 기준 5주차부터 빠르게 PI값이 상승하였고 전 개체 100% 양성전환 하였다.

<0052>

[표 3]

<0053>

재조합단백질 후보항원의 특적동물에서의 효능시험

- FMDV type O SP ELISA Pi Change of Each Group										- FMDV type A SP ELISA Pi Change of Each Group									
Group	PI	Pi of PreCHECK FMDV O type SP EL						Group	PI	Pi of PreCHECK FMDV A type SP EL									
		Subje	14days	21days	28days	35days	42days			Subje	14days	21days	28days	35days	42days				
A	18	32.4	45.1	19.1	27.7	47.0	51.0	A	18	34.0	26.7	32.0	23.0	28.1	27.4				
FAC1	25	29.4	43.6	40.0	34.0	41.0	41.4	FAC1	25	37.1	13.0	10.7	17.4	43.3	44.3				
	34	27.3	51.1	31.3	39.0	31.7	47.6		FAC2	34	25.8	32.3	26.0	32.5	33.0	31.3			
	36	2.8								36	9.1								
	41	11.7	40.8	29.5	36.1	44.1	44.1			41	16.7	31.4	40.1	34.4	40.1	47.3			
42	11.5	9.5	3.1	35.2	48.7	44.8	42	15.5	16.7	13.2	33.8	37.2	39.4						
Average		17.7	30.0	26.2	40.3	71.0	74.9	Average		22.5	33.3	29.4	33.8	45.4	42.0				
Std dev		11.1	16.5	10.5	19.2	16.3	12.1	Std dev		15.9	19.8	12.7	14.6	15.1	15.1				
Positive ratio		0%	20%	0%	60%	100%	100%	Positive ratio		0%	40%	0%	20%	20%	20%				
B	14	26.5	30.4	41.3	47.0	34.0	37.0	B	14	24.3	19.4	32.8	25.2	35.0	36.2				
FAC3	19	27.4	33.8	38.1	32.0	36.4	40.0	FAC3	19	30.5	31.4	31.1	40.0	30.7	34.0				
	33	4.2	32.1	31.9	47.0	32.4	34.1		FAC4	33	6.1	34.0	40.0	39.0	32.4	35.4			
	35	6.8	19.0	6.0	3.0	41.1	40.4			35	17.7	40.0	18.7	31.1	35.4	44.1			
	37	26.1	32.7	30.9	13.0	36.0	30.4			37	30.0	35.4	22.5	31.4	43.0	44.0			
38	53.9	37.7	33.0	7.0	37.0	40.4	38	24.6	30.0	33.7	32.2	23.0	30.7						
Average		17.8	34.2	25.3	21.1	48.0	34.0	Average		24.2	42.3	27.9	36.1	41.3	40.0				
Std dev		10.0	14.9	10.1	20.0	11.2	7.4	Std dev		15.2	13.8	13.0	14.1	11.0	12.1				
Positive ratio		0%	20%	17%	0%	100%	100%	Positive ratio		0%	50%	0%	17%	20%	20%				
C	19	21.0	23.3	16.0	26.3	40.1	40.4	C	19	24.0	13.0	12.0	21.0	30.1	31.1				
FAC5	19	32.4	27.2	36.9	40.0	34.1	22.7	FAC5	19	30.8	14.2	13.4	27.0	40.7	40.0				
	37	26.4	32.2	6.2	16.4	30.5	23.8		FAC6	37	25.0	30.0	30.0	44.4	31.1	29.0			
	35	18.3	26.4	15.2	33.7	30.1	31.5			35	23.2	21.8	13.8	29.4	32.9	40.0			
	39	3.4	30.0	40.4	30.7	30.4	30.2			39	13.7	31.4	40.4	31.4	30.1	34.7			
39	2.2	24.1	13.9	16.4	42.2	30.3	39	14.0	40.1	30.9	44.0	44.9	47.6						
Average		16.8	31.8	21.2	31.4	37.1	44.4	Average		24.8	20.2	21.4	37.9	40.9	37.7				
Std dev		10.7	14.3	14.0	14.0	12.7	5.4	Std dev		10.7	15.8	13.2	11.3	13.6	14.7				
Positive ratio		0%	17%	0%	17%	67%	60%	Positive ratio		0%	17%	0%	17%	20%	20%				
D	14	28.4	31.3	34.3	33.3	71.3	78.4	D	14	29.0	32.7	33.3	39.0	32.0	30.7				
FAC7	15	21.6	42.8	37.9	33.3	33.1	31.7	FAC7	15	32.4	40.1	19.4	30.9	34.4	38.8				
	40	21.0	34.1	40.0	31.9	71.3	71.4		FAC8	40	34.5	37.8	20.0	37.5	40.4	44.1			
	52	3.0	40.1	32.0	46.5	30.4	36.1			51	11.7	44.2	23.0	34.3	30.4	40.0			
	62	5.8	30.1							53	13.2	33.0							
65	20.1	40.2	31.1	30.9	40.2	40.8	65	20.0	31.0	32.7	40.7	31.0	33.0						
Average		17.4	41.0	42.1	30.7	71.2	71.2	Average		25.4	41.3	30.4	41.1	41.4	40.2				
Std dev		9.3	6.0	11.7	11.3	12.0	12.0	Std dev		9.8	11.1	14.2	9.0	9.1	7.2				
Positive ratio		0%	33%	60%	100%	100%	100%	Positive ratio		0%	17%	20%	20%	40%	40%				
E	19	27.1	30.0	8.5	3.0	31.0	44.0	E	19	30.4	41.3	30.1	34.0	23.3	19.4				
FAC9	47	37.2						FAC9	47	38.4									
	52	13.7	25.0	18.3	25.3	40.0	31.5		FAC10	52	32.0	23.7	11.1	23.0	15.4	45.3			
	60	4.4	21.5	11.0	36.4	34.4	28.3			60	17.8	27.9	21.1	24.0	31.1	40.7			
	101	13.4	36.8	35.8	30.8	31.1	31.0			101	27.1	21.9	17.1	28.0	30.0	30.0			
106	9.5	23.4	5.6	5.0	44.7	33.4	106	14.0	23.0	20.0	20.0	17.3	19.4						
Average		17.1	28.3	16.1	22.0	31.0	30.1	Average		26.4	28.4	22.3	31.0	43.0	45.8				
Std dev		12.4	5.3	12.2	16.2	16.2	11.1	Std dev		8.7	5.4	6.0	6.0	6.0	6.7				
Positive ratio		0%	0%	0%	0%	40%	100%	Positive ratio		0%	0%	0%	0%	40%	20%				
F	13	35.8	19.4	15.0	20.7	30.1	33.0	F	13	35.8	19.4	15.0	20.7	30.1	33.0				
FAC11	40	13.1	21.1	17.0	20.1	40.0	44.0	FAC11	40	13.1	21.1	17.0	20.1	40.0	44.0				
	44	27.2	45.6	24.4	36.1	37.3	44.7		FAC12	44	27.2	45.6	24.4	36.1	37.3	44.7			
	70	27.1	36.7	20.9	30.9	40.0	40.0			70	27.1	36.7	20.9	30.9	40.0	40.0			
	71	44.2	26.3	15.6	18.1	26.0	25.9			71	44.2	26.3	15.6	18.1	26.0	25.9			
90	32.2	33.0	34.8	37.8	41.2	34.4	90	32.2	33.0	34.8	37.8	41.2	34.4						
Average		31.4	25.1	21.3	21.8	40.6	40.1	Average		31.4	25.1	21.3	21.8	40.6	40.1				
Std dev		13.1	12.0	7.9	6.5	8.2	11.4	Std dev		13.1	12.0	7.9	6.5	8.2	11.4				
Positive ratio		0%	17%	20%	0%	17%	17%	Positive ratio		0%	17%	20%	0%	17%	17%				
G	10	30.3	45.3	27.8	31.7	40.0	33.0	G	10	30.3	45.3	27.8	31.7	40.0	33.0				
FAC13	30	30.9	45.2	25.8	30.7	32.1	30.0	FAC13	30	30.9	45.2	25.8	30.7	32.1	30.0				
	37	20.0	18.0	14.1	21.0	19.0	16.7		FAC14	37	20.0	18.0	14.1	21.0	19.0	16.7			
	38	12.7	19.7	8.7	22.9	43.5				38	12.7	19.7	8.7	22.9	43.5				
	84	20.8	30.2	33.0	31.3	29.0	24.4			84	20.8	30.2	33.0	31.3	29.0	24.4			
86	8.6	27.8	28.8	34.5	40.1	45.1	86	8.6	27.8	28.8	34.5	40.1	45.1						
Average		25.7	38.0	28.1	47.0	50.1	52.0	Average		25.7	38.0	28.1	47.0	50.1	52.0				
Std dev		18.3	17.9	16.8	14.4	12.1	12.1	Std dev		18.3	17.9	16.8	14.4	12.1	12.1				
Positive ratio		0%	17%	17%	17%	100%	100%	Positive ratio		0%	17%	17%	17%	100%	100%				

<0054>

【요약서】

【요약】

본 발명은 구제역 바이러스에 관한 재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【도면】

【도 1】



【도 2】

MGHHHHHPQNRGDLGPLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRGDLGPLAARLAAQLPGGGGSV
 APQNRGDLGPLAARLAAQLPGGGGSVARHKQKIAPAKQLLGGGGSVARHKQKILAPAKQLL
 GGGSVARHKQKIAPAKQLLGGGGSVALPNVRGDLQVLAPKAARPLPGGGGSVALPNVRGDLQ
 VLAPKAARPLPGGGGSVALPNVRGDLQVLAPKAARPLPGGGGSVARHKQKIVAPVKQSLGGG
 GSVARHKQKIVAPVKQSLGGGGSVARHKQKIVAPVKQSLGGGGSVLEAEAAAKEAAAKEAA
 AKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAPSVYPLAPCGRDVS GPNVALGCLASSY
 FPEPVTVTWNSGALTSGVHTFSPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTTKV
 DKRVPQVYTLPPPAEELSRSKVTLTCLVIGPYPPDIHVEWKSNGQPEPENTYRTTPPQQDVDG
 TFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAVMHEALHNHYTQKSILEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAA
 KALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEGGGGSVAPQNRGDSGPLVVKPATQLPGGGGSV
 APQNRGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAPQNRGDSGPLVVKPATQLPGGGGSVAVTNVRG
 DLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQ
 KAARTLPGGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVARHKQKI
 VAPVKQLL

【도 3】

MGHHHHHPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSV
APQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRG
DLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARHKQKIVAPVKQLL
GGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVALEEAAAKEAAAK
EAAAKEAAA KALEAAA KEEAAA KEEAAA KALEAPSVYPLAPCGRDVS GPNVALGCLA
SSYFPEPVTVTWNSGALTS GVHTFPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSSKSYTCNVNHPATT
TKVDKRV PQVYTLPPAEELSR SKVTLTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPENTYRTTTPPQQD
VDGTFPLYSKLAVDKARWDHGDKFECAMHEALHNHYTQKSILEEAAA KEEAAA KEEAAA K
AAKALEEAAA KEEAAA KEEAAA KALEGGGGSVARHKQKIIAPAKQLLGGGGSVARHK
QKIIAPAKQLLGGGGSVARHKQKIIAPAKQLLGGGGSVAPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGS
VAPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVAVTNVRG
DLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQ
KAARTLP

【도 4】

MGHHHHHPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSV
APQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRG
DLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARHKQKIIAPAKQLL
GGGGSVARHKQKIIAPAKQLLGGGGSVARHKQKIIAPAKQLLGGGGSVALEEAAA KEEAAA K
AAKALEEAAA KEEAAA KEEAAA KALEAPSVYPLAPCGRDVS GPNVALGCLAS
SYFPEPVTVTWNSGALTS GVHTFPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTT
KVDKRV PQVYTLPPAEELSR SKVTLTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPENTYRTTTPPQQDV
DGTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAMHEALHNHYTQKSILEEAAA KEEAAA KEEAAA K
AAKALEEAAA KEEAAA KEEAAA KALEGGGGSVAPQNRRLD SGPLVVKPATQLPGGGG
SVAPQNRRLD SGPLVVKPATQLPGGGGSVAPQNRRLD SGPLVVKPATQLPGGGGSVAVTNVR
GDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRGDLQVLA
QKAARTLPGGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVARHKQK
IVAPVKQLL

【도 5】

MGHHHHHPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVAPQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSV
APQNRRLDGLAARLAAQLPGGGGSVLPNVRDLQVLAPKAARPLPGGGGSVALPNVRDL
QVLAPKAARPLPGGGGSVALPNVRDLQVLAPKAARPLPGGGGSVARHKQKIVAPVKQSLGG
GGSVARHKQKIVAPVKQSLGGGGSVARHKQKIVAPVKQSLGGGGSVAPQNRRLDGLVVKP
ATQLPGGGGSVAPQNRRLDGLVVKPATQLPGGGGSVAPQNRRLDGLVVKPATQLPGGG
GSVARHKQKIIAPAKQLLGGGGSVARHKQKIIAPAKQLLGGGGSVARHKQKIIAPAKQLLGGGG
SVAVTNVRDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNVRDLQVLAQKAARTLPGGGGSVAVTNV
RDLQVLAQKAARTLPGGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVARHKQKIVAPVKQLLGGGG
SVARHKQKIVAPVKQLLGGGGSVALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAEAAAKEAAAKE
AAAKEAAAKEAPSVYPLAPCGRDVSQPNVALGCLASSYFPEPVTVTWNSGALTSVHTFP
SVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTTKVDKRVQVYTLPPPABEELSRSKVT
LTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPENTYRTPPQQDVGTFPLYSKLAVDKARWDHGDKFE
CAYMHEALHNHYTQKSI

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.08.24
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(A2)
 출원번호 10-2022-0106069 (접수번호 1-1-2022-0886857-99)
 (DAS접근코드BCBD)
 출원인명칭 주식회사 파로스백신(1-2013-015579-3)
 대리인성명 제일특허법인(유)(9-2010-100081-2)
 발명자성명 김영문 박미나 이정임
 발명의명칭 구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 제조 방법 및 정제법

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원번호와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 날일영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
 ※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

2022-08-24

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	A2
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 파로스백신
【특허고객번호】	1-2013-015579-3
【대리인】	
【명칭】	제일특허법인(유)
【대리인번호】	9-2010-100081-2
【지정된변리사】	조형은, 이현실, 이원상
【포괄취임등록번호】	2013-022551-0
【발명의 국문명칭】	구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 제조 방법 및 정제법
【발명의 영문명칭】	Manufacturing Method of Recombinant Protein Antigen for Foot-and-mouth Disease Vaccine
【발명자】	
【성명】	김영훈
【성명의 영문표기】	KIM, Young Hoon
【주민등록번호】	
【우편번호】	
【주소】	
【발명자】	

【성명】 박미나
 【성명의 영문표기】 PARK, MI Na
 【주민등록번호】
 【우편번호】
 【주소】

【발명자】

【성명】 이정일
 【성명의 영문표기】 LI, Jing Lin
 【주소】

【출원언어】 국어

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545022842
 【과제번호】 319082033SB010
 【부처명】 농림축산식품부
 【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
 【연구사업명】 가축질병대응기술개발(R&D)
 【연구과제명】 해외 주요 열형형 바이러스 유입에 대응한 구제역백신 생산
 기술 개발
 【기여율】 1/1
 【과제수행기관명】 (주)파로스백신

【연구기간】 2019.05.27 ~ 2021.12.31

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 제일특허법인(유)

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】 14 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 46,000 원

【감면사유】 중소기업(70%감면)[1]

【감면후 수수료】 13,800 원

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 제조 방법 및 정제법(Manufacturing Method of Recombinant Protein Antigen for Foot-and-mouth Disease Vaccine)

【기술분야】

<0001> 본 발명은 구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 효율적인 정제방법에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

<0002> 동물의 A 클래스 전염성 질병 중에서 가장 심각한 질병인 구제역(FMD)은 돼지, 소, 양 등과 같은 우제 동물에게 심각한 영향을 미치는 급격히 진행되는 전염성 질병이다. 최근, 많은 국가의 가축 산업이 FMD의 발발 및 유행으로 인한 막대한 경제적 손실을 겪고 있다.

【발명의 내용】

【과제의 해결 수단】

<0003> 본 발명은 구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 효율적인 정제방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 니켈-친화성 크로마토그래피를 실시하여 구제역 재조합 단백질 항원 제조방법을 제공한다. 구제역 재조합 단백질 항원은 발현벡터를 포함하는 재조합 대장균에서 발현된 융합단백질의 봉입체(inclusion body)로부터, 니켈-친화성 크로마토그래피 방법을 통해 결합된 용출 방식으로 용이하게 제조한다. 구제역 재조합 단백질 항원을 제조하는 경우, 경제성과 안전하며 효과적인 국내 구제

역 백신 재조합 단백질 항원 제조 기술로 활용 가능하다.

【발명의 효과】

<0004> 본 발명에 따른 재조합 발현벡터는 미생물 배양, 경제를 통하여 재조합 항원 단백질을 저렴하고 안전하게 대량 생산할 수 있다. 생산된 재조합 단백질 항원은 면역원으로서 접종된 동물에서 구제역 바이러스에 대한 특이적 면역반응을 유발할 수 있다. 또한, 상기 재조합 단백질을 포함하는 백신 조성물은 백신 및 그 제조과정에서 살아있는 바이러스를 전혀 사용하지 않기 때문에, 제조하고 사용하기에 매우 안전할 뿐만 아니라 상대적으로 낮은 비용으로 백신의 제조가 가능한 장점이 있다. 또한, 본 발명에 따른 재조합 단백질은 구제역 바이러스의 변이나 변종에 대응하여 특정 요구 조건을 만족하도록 설계할 수 있고, 경제적으로 대량 경제한다.

【도면의 간단한 설명】

- <0005> 도 1은 유전자지도를 나타낸 것이다.
도 2는 본원발명에서 사용된 유전자 서열을 나타낸 것이다.
도 3은 본원발명에서 사용된 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
도 4는 구제역 재조합 단백질 백신의 원액 제조공정도를 나타낸 것이다.
도 5는 DO-stat 유가식 배양방법-구제역 재조합 단백질 항원 발현 균주 성장곡선을 나타낸 것이다.
도 6은 구제역 재조합 단백질 항원의 발현을 확인한 것이다(SDS-PAGE).
도 7은 경제 step 구제역 재조합 단백질 항원을 확인한 것이다(SDS-PAGE).

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

- <0006> 상기 유효성분의 제조방법
- <0007> 1. 재조합 단백질의 제조
- <0008> 1) 재조합 유전자, 발현벡터의 구축 및 재조합 단백질의 제조
- <0009> (1) 재조합 유전자가 삽입된 발현벡터의 제작
- <0010> 확보한 DNA를 제한효소 NdeI/XhoI으로 처리하여 재조합 유전자 DNA 단편을 만들고, NdeI/XhoI으로 처리하여 절단한 대장균 발현용 벡터인 pET-28a(+)(Novagen, 69865-3)에 삽입하여, 재조합 단백질 발현 플라스미드(Plasmid) pFOA를 완성하였다. 추가적인 특징으로 단백질 발현 시 재조합 단백질의 N-말단과 C-말단에 각각 6개의 Histidine tag이 융합된 형태로 발현되도록 고안되었다.
- <0011>
- <0012> (2) 생산균주의 제작
- <0013> 속주세포로 대장균 BL21을 이용하였다. 미리 준비하여 냉동 보관한 수용성 세포(Competent cell) 0.2 mL를 녹인 후, 실시예 1.3.에서 준비한 플라스미드 pFOA를 넣고 얼음에서 20분간 경치하였다. 그 후, 42℃ 항온 수조에서 2분간 열충격(Heat shock) 처리를 하였다. 1 mL의 L-배양배지(LB)를 첨가하고 37℃에서 1시간 진탕 배양한 후, 카나마이신(Kanamycin)이 50 ug/mL의 농도로 첨가된 L-고체배지(LB agar)에 도말하여, 30℃에서 하룻밤 배양하였다. 형성된 콜로니들을 각각 37℃에서 진탕 배양하여 플라스미드를 추출한 후 DNA 서열을 분석하고, 정확한 서열을 갖는 플라스미드를 함유하는 균주를 선택하였다. 선택한 균주를 L-배양배지에 접종하여 37℃에서 600 nm에서 흡광도가 0.5가 되도록 진탕 배양하였다. 그 후 250

μl씩 분주하고, 글리세린을 30% 첨가하여 -70℃에 보관하였다.

<0014>

<0015> (3) 재조합 단백질의 수득

<0016> 냉동보관한 균주를 해동하여 카나마이신이 첨가된 L-배양배지 300 mL에 접종하고 37℃에서 하룻밤 진탕 배양하여 종균을 준비하였다. 5 L 발효조에 2xYT배지(+)(LPS solution, YT-05) 3 L를 멸균하여 준비하고 카나마이신을 50 ug/mL가 되도록 첨가한 후 종균을 접종하였다. 600 nm에서 흡광도가 5~10이 되었을 때 0.5 mM의 IPTG를 배지에 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도시키고, 흡광도가 증가하지 않을 때까지 배양하여 박테리아 세포를 회수하였다. 박테리아 세포를 IB완충액(50 mM Tris, 0.1 NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁시키고 세포파쇄기를 사용하여 박테리아 세포를 파쇄한 후, 8,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 용입체(Inclusion body)를 회수하였다.

<0017> 가용화완충액(8 M Urea, 10 mM Tris, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0)을 적당량 첨가하고 4℃에서 하룻밤 교반하여 용입체를 현탁시켰다. 그 후, 8,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 버리고 상등액을 회수하여 재조합 단백질을 함유하는 단백질 용액을 수득하였다. 단백질 용액을 니켈 친화성 컬럼(Ni affinity column)을 통과시켜 재조합 단백질을 컬럼에 붙이고 가용화완충액으로 세척한 후, 용출완충액(8 M Urea, 10 mM Tris, 50 mM NaH₂PO₄, 250mM Imidazole, pH 8.0)을 이용하여 컬럼으로부터 용출시켰다. 용출된 단백질을 숄론화하고 컷오프(Cut-off) 분자량 30,000인 한외여과막(Ultra-filter)을 이용하여 최종완충액(2 M Urea, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM

Glycine, 240 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 8.0)으로 투석하여, 이미다졸(Imidazole)을 제거하고 요소(Urea)를 낮춰 최종 재조합 단백질 원액을 제조하였다.

<0018>

<0019> (4) 재조합 단백질의 순도 확인 및 정량

<0020> 재조합 단백질 원액을 브래드포드법(Bradford assay)로 정량하여 원액 중 단백질의 농도와 총량을 계산하였다. 단백질의 양이 3~5 μg 가 되도록 재조합 단백질 원액의 시료를 채취하여 SDS-PAGE를 하여 재조합 단백질의 분자량을 확인하고, 단백질밴드를 비교하여 순도를 측정하였다. 재조합 단백질의 분자량은 예측한 대로 약 79 kD로 분석되었으며, 순도는 90% 이상인 것으로 확인되었다.

<0021> 사용된 유전자 서열 및 아미노산 서열을 표 1에 나타낸다.

<0022> **【표 1】**

유전자 서열	ATGCACCACCACCACCATCACCCGCAGAACCGTCGTGGCGATAGCGGTCCGCTGGTAGTTAAACCGGCTA CCCAGCTGCCGGGTGGTAGCTCTGGTGGCCGTCACAAAACAAAAATCATTGGCCCGGCGAAACAGCTGCT GGGTGGCAGCTCCGGCGGTCCGCAGAACCGTCGTGGCGATAGCGGCCCGCTGGTTGTTAAACCGGGGACC CAGCTGCCGGGCGGTAGCTCCGGCGGTCCGTCATAAACAGAAAATCATCGCTCCGGCGAAGCAGCTGCTGG GCGGCTCTAGCGGTGGCCCGCAGAACCGCGGTGGTACTCTGGCCCGCTGGTAGTTAAACCGGGGACTCA GCTGCCGGGCGGCAGCTCGGGTGGTCGCCACAAACAGAAGATCATCGCTCCGGCGAAACAGCTGCTGGGC GGCAGCAGCGCGGTGTACCAACGTTTCGTGGCGACCTGCAGGTACTGGCGCAGAAAGCAGCGGTACCC TGCCGGGTGGCTCCAGCGGCGGTCTCACAAACAGAAAATGTTGCTCCGGTGAACAACCTGTAGGTGG CTCTAGCGGCGGCTTACTAACGTTCCGGCGATCTGCAGGTTCCTGGCACAGAAAGCGGCGGTACCCCTG CCGGCGGTAGCTCCGGCGGCGCTCACAAACAGAAAATCGTTGCTCCGGTTAAACAACCTGCTGGGTGGTT CTAGCGGTGGTGTACTAACGTGCGGTGGCGATCTGCAGGTTCCTGGCGCAGAAAGCGGCGGTACCTTGGC GGGTGGTAGCAGCGGTGGCCGCCAAGCAGAAAATGTTGCACCGGTAACAACAGCTCTCTGGGTGGCAGC TCTGGCGGTGCCCGAAAACCGCGCGGAGCGTTTACCCGCTGGCGCGGTGCGGCGCGATGTTTCTGGCC CGAACGTTGGCTGGGTGCTGGCATCTAGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGGTGACCTGGAACCTCTGG CGCGTGCACAGCGGCTGCACACCTTCCCGAGCGTTCTGCAGCGCTCCGGTCTGTATAGCCTGTCTAGC ATGGTTACCGTTCCGGCGAGCTCTCTGTCCAGCAAAGCTACACCTGCAACGTTAACCCACC CGGCGACCA CCACCAAAGTGGCAAACGTTGTTGATCCATCAGCCGAGACCTGCCCGATCTGTCCGGGTTGTGAAGT TGCGGGTCCGCTGTTTTCATCTTCCCGCGAAAACCGAAAGACACCTTGATGATCTCCAGACCCCGGAA GTTACCTCGTGTGTTGATGTGTCTAAAGAACAGCTGAAGTTCAAGTTCAAGTTCAAGTTAACAACGTTGATG TGGAAGTTCACACCGCTGAGACCCGCGCGAAAGAGGAGCAATCAACTCTACCTATCGCGTAGTGTCTGT GCTGCCGATCCAGCACCAGGATGGCTGAAGGGTAAAGAATTCAGGTGAAGGTTAACAACGTTGATCTG COGGCCCGATCACCCGCACATTTCTAAAGCGATCGGCCAGAGCCGGAACCGCAAGTTTACACCCCTGC CGCCCGCGGCGAAGAAGTGCAGCCGCTCCAAAGTGACGCTGACCTGCCTGGTTATCGGTTTCTACCCGCG GGATATTCATGTGGAATGAAAAAGCAACGGCCAGCCGGAACCGGAAAAACCTACCGTACCACCCCGCG CAGCAGGATGTGGATGTTACTTCTCTGTACAGCAAACCTGGCGGTGACAAAGCCGTTGGGACACAG GGACAAAATTCGAATGCGCGGTTATGCACGAAAGCGCTGCACAAACACTATACCCAGAAAAGCATCAGCAA AACCCAGGGCAAAGGTGGCAGCTCTGGTGGCCCGCAAAACCGTCTGGTGGTACTCCGGTCCGCTGGTAGTC AAACCGGGGACCCAGTTGCCGGTGGCTTAGCGGGGTCGTCATAAACAGAAAATCATTGGCCGGCAA AGCAGCTGCTGGGCGGCACTCTGGTGGCCCGCAGAAATCGTCTGGCGATAGCGGCCCGCTGGTTGTGAA ACCGGCCACCCAGCTGCCGGTGGTAGTAGTGGCGGTAGGCATAAACAAAAATAATAGCACCAGCTAAA CAGCTCTGGGCGGTAGCAGCGGTGGCCCGCAGAACCGTCCGGGTGATAGCGGCCCATTTGGTAGTTAAAC CGGCTACGCAGTTACCTGTTGGTAGTAGCGGGGCGGTCACAAACAGAAAATAATAGCGCCCGCTAAACA GCTGCTGCACCACCATCACCACCATAA
아미노산 서열	HHHHHPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRHKQKI IAPAKQLLGGSSGGPQNRGDSGPLVVKPATQ LPGGSSGGRHKQKI IAPAKQLLGGSSGGPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRHKQKI IAPAKQLLGG SSGGVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGSSGGRHKQKI IAPVKQLLGGSSGGVTNVRGDLQVLAQKAARTLP GGSSGGRHKQKI IAPVKQLLGGSSGGVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGGSSGGRHKQKI IAPVKQLLGGSS GGAPETAPSVYPLAPCGRDVSGPNVALGLASSYFPEVTVTNVNSGALTSVHTFSPVLPQSLYLSLSSM VTVPASSLSSESYTCNVNHPATTTKVDKRVGIHQPTCPICPGCEVAGPSVFIFPPEPKDTLMSIQTEV TCVVVDVSKHAENVQFS#VVDGVEVHTAETRPKEBQFNSTYRVVSVLP IQHQDNLKGEFKCKVNVNDLP APITRTISKAIGQSRPQVYVLPPEELSRSKVLTCLVIGFVFPDIHVEWKSNGQPEPENTYRITPPQ QDVDGTFFLYSKLAVDKARN#DHGDKFECAMHEALHNHYTQESI SKTGKGGSSGGPQNRGDSGPLVVK PATQLPGSSGGRHKQKI IAPAKQLLGGSSGGPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRHKQKI IAPAKQ LLGGSSGGPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRHKQKI IAPAKQLLHHHHH

<0023>

<0024>

2. 백신 조성물의 제조

<0025>

1) 백신의 제조

<0026>

(1) 백신 조성물의 제조

<0027>

백신 제조를 위해 필요한 만큼 재조합 단백질 용액을 준비하였다. 이때 재조합 단백질 용액의 단백질 농도가 백신 조성물 제조에 필요한 농도보다 낮으면 한외 여과(컷오프 분자량 10,000)하여 농축하고, 높으면 최종완충액을 적당량 첨가하여 재조합 단백질 용액의 단백질 농도를 적합하게 조정하였다. 미네랄 오일, 계면활성제를 적당량 첨가하고 교반기로 수 차례 잘 섞어 주어 최종 백신용액을 제조한 후, 바이알에 적당량씩 분주하여 냉장 보관하였다.

【요약서】

【요약】

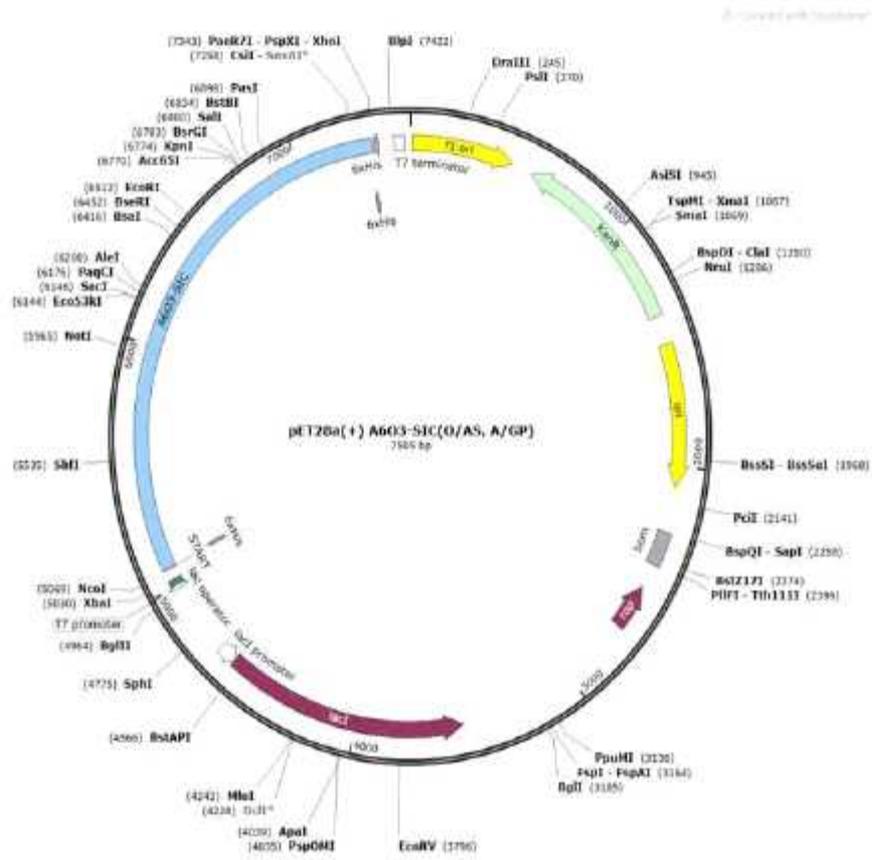
본 발명은 구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 제조 방법 및 정제법에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【도면】

【도 1】



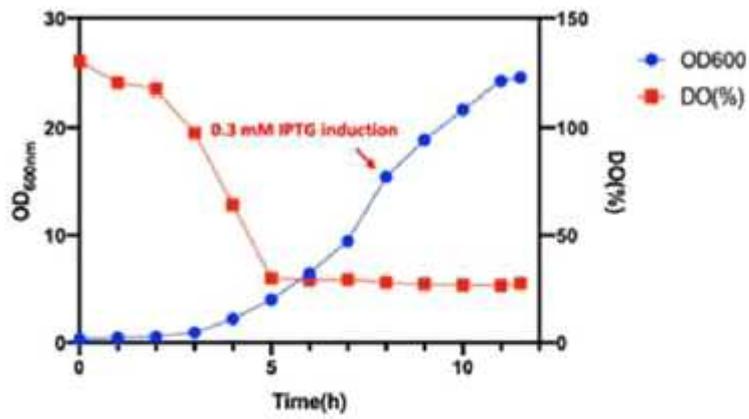
【도 2】

ATGCACCACCACCACCATCACCCGCAGAACCGTCGTGGCGATAGCGGTCCGCTGGTAGTT
AAACCCGGCTACCCAGCTGCCGGGTGGTAGCTCTGGTGGCCGTCACAAAACAAAAATCATT
GCGCCCGCGAAACAGCTGCTGGGTGGCAGCTCCGGCGGTCCGCAGAACCGTCGTGGCGAT
AGCGGCCCGCTGGTTGTTAAACCGGCGACCCAGCTGCCGGGGCGTAGCTCCGGCGGTCTGT
CATAAACAGAAAATCATCGCTCCGGCGAAGCAGCTGCTGGGGCGCTCTAGCGGTGGCCCG
CAGAACCAGCGGTGGTACTCTGGCCCGCTGGTAGTTAAACCGGCGACTCAGCTGCCGGGC
GGCAGCTCGGGTGGTCGCCACAAACAGAAGATCATCGCTCCGGCGAAACAGCTGCTGGGC
GGCAGCAGCGCGGTGTACCAACGTTCTGGCGACCTGCAGGTACTGGCGCAGAAAGCA
GGCGTACCCTGCCGGGTGGCTCCAGCGCGGTCTGTCACAAACAGAAAATTGTTGCTCCG
GTGAAACAACGTGTTAGTGGCTCTAGCGCGCGCTTACTAACGTTCCGCGCGATCTGCAG
GTTCTGGCACAGAAAGCGCGCGCTACCCTGCCGGCGGTAGCTCCGGCGCGGTCACAAA
CAGAAAATCGTTGCTCCGGTTAAACAACGCTGGGTGGTTCTAGCGGTGGTGTACTAAC
GTGCGTGGCGATCTGCAGGTTCTGGCGCAGAAAGCGCGCGTACCTTGCCGGGTGGTAGC
AGCGGTGGCCGCCACAAGCAGAAAATTGTTGCACCGGTAAAACAGTCTCTGGGTGGCAGC
TCTGGCGGTGCCCCGAAAACCGCGCGAGCGTTTACCCGCTGGCGCGGTGCCGCCGCGAT
GTTTCTGGCCCGAACGTTGCGCTGGGTGGCTGGCATCTAGCTATTTCCGGAACCGGTG
ACCGTGACCTGGAACTCTGGCGCGCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGAGCGTCTG
CAGCCGTCCGCTCTGTATAGCCTGTCTAGCATGGTTACCGTTCCGCGAGCTCTCTGTCC
AGCAAAAGCTACACCTGCAACGTTAACCCCGCGACACCACCACCAAAAGTGGACAAACGT
GTTGGTATCCATCAGCCCGCAGACCTGCCGATCTGTCCGGGTGTGAAGTTGCGGGTCCG
TCTGTTTTCATCTTCCCGCGAAAACCGAAAAGACACCCGTGATGATCTCCAGACCCCGAA
GTTACCTGCGTGTGTTGTGATGTGTCTAAAGAACACGCTGAAGTTCAGTTCAGCTGGTA
TGTTGATGGTGTGAAGTTCACACCGCTGAGACCCGCCGAAAAGAGGAGCAATTCAACTC
TACCTATCGCGTAGTGTCTGTGCTGCCGATCCAGCACCAGGATTGGCTGAAGGTAAGA
ATTCAAGTGAAGGTTAAACAACGTTGATCTGCCGGCCCGATCACCCGCACCATTTCTAA
AGCGATCGGCCAGAGCCGCGAACCGCAAGTTTACACCCCTGCCCGCGCCGGCGGAAGAACT
GAGCCGCTCCAAAAGTGACGCTGACCTGCCTGGTTATCGGTTTCTACCCCGCGGATATTCA
TGTGGAATGGAAGCAACCGCCAGCCGGAACCGGAAAACACCTACCGTACCACCCCGCC
GCAGCAGGATGTGGATGGTACCTTCTTCTGTACAGCAAACTGGCGGTGCACAAAGCCCG
TTGGGACCACGGCGACAAATTCGAATGCGCGGTTATGCACGAAGCGCTGCACAACCACTA
TACCCAGAAAAGCATCAGCAAAACCCAGGGCAAAGGTGGCAGCTCTGGTGGCCCGCAAAA
CCGTCGTGGTACTCCGGTCCGCTGGTAGTCAAACCGCGACCCAGTTGCCGGGTGGCTC
TAGCGCGGTCTGCATAAACAGAAAATCATTGCCCGGCAAAAGCAGCTGCTGGGCGGCAG
CTCTGGTGGCCCGCAGAAATCGTCTGTGGCGATAGCGGCCCGCTGGTTGTGAAACCGGCCAC
CCAGCTGCCCGGTGGTAGTAGTGGCGGTAGGCATAAAACAAAAATAATAGCACCAGCTAA
ACAAGCTCCTGGCGGTAGCAGCGGTGGCCCGCAGAACCGTCGCGGTGATAGCGGCCATT
GGTAGTTAAACCGGTACGCAGTTACCTGGTGGTAGTAGCGGGGGCGTACAAAACAGAA
AATAATAGCGCCGGCTAAACAGCTGCTGCACCACCATCACCCACTAA

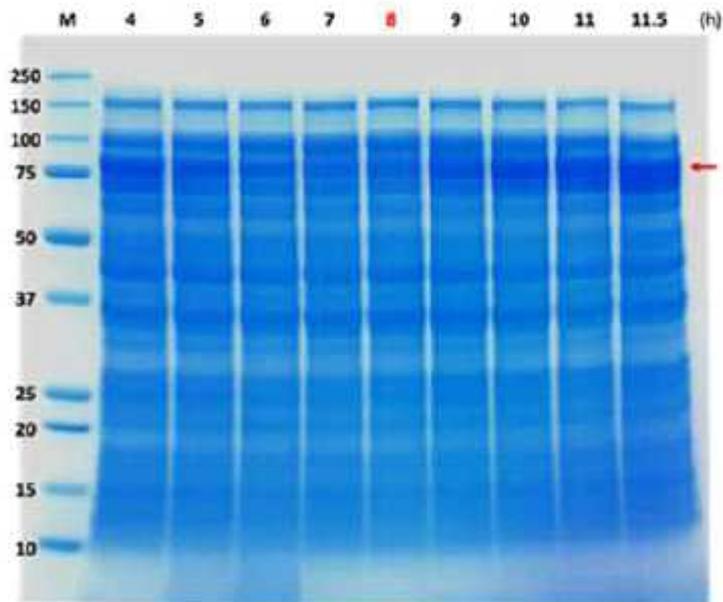
【 ㉔ 3】

HHHHHPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRHKQKIAPAKQLLGGSSGGPQNRGDSGPL
VVKPATQLPGSSGGRHKQKIAPAKQLLGGSSGGPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRH
KQKIAPAKQLLGGSSGGVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGSSGGRHKQKIVAPVKQLLGGSSG
GVTNVRGDLQVLAQKAARTLPGSSGGRHKQKIVAPVKQLLGGSSGGVTNVRGDLQVLAQKA
ARTLPGSSGGRHKQKIVAPVKQLLGGSSGGAPKTAPSVYPLAPCGRDVS GPNVALGCLASSY
FPEPVTVTWNSGALTSGVHTFPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSSKSYTCNVNHPATTTKV
DKRVGIHQPTCPICPGCEVAGPSVFIFPPKPKDTLMISQTPEVTCVVVDVSKEHAEVQFSWY
VDGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLKGKEFKCKVNNVBLPAPITRTISKAIG
QSREPQVYTLPPPAEELSRSKVTLTCLVIGFYPPDIHVWKSNGQPEPENTYRTTTPPQQDVDG
TFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAVMHEALHNHYTQKSISKTQGGSSGGPQNRGDSGPL
VVKPATQLPGSSGGRHKQKIAPAKQLLGGSSGGPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRH
KQKIAPAKQLLGGSSGGPQNRGDSGPLVVKPATQLPGSSGGRHKQKIAPAKQLLHHHHHH

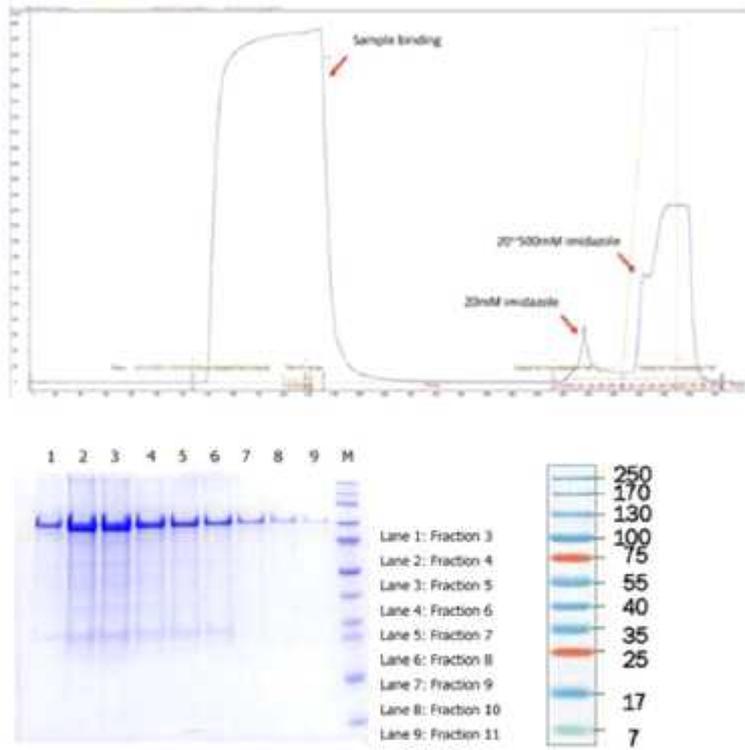
【도 5】



【도 6】



【도 7】



(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Cross Protection of a Recombinant Protein Vaccine against Challenges with Foot and Mouth Disease type O Virus of Three Lineages in swine	KSBB Journal	이혜영	volume 34 Issue 4	대한민국	한국생물공학회	비SCIE	2019.12	1225-7117	100%
2	Protective effect of Foot and Mouth Disease virus serotype A and O epitope-constituted recombinant protein vaccine	KSBB Journal	박미나	volume 35 Issue 4	대한민국	한국생물공학회	비SCIE	2020.12	1225-7117	100%

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원번호	등록번호	등록인	등록일	등록번호		
1	재조합 단백질 및 이를 포함하는 구제역 백신 조성물	대한민국	파로스 백신	2022.08.24	10-2022-0106068					100%	
2	구제역 백신용 재조합 단백질 항원의 제조방법 및 정제법	대한민국	파로스 백신	2022.08.24	10-2022-0106069					100%	

[경제적 성과]

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2019년	2020년	2021년	
1	주변국 발생 구제역바이러스 주요 2개 혈청형 대응 2가 재조합단백질 백신 개발	(주)파로스백신	2	2	2	6
2	재조합단백질 구제역 백신 대량 생산 시스템 개발	(주)씨티씨백	2	2	2	6
합계			4	4	4	12

고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	3
		생산인력	3
	개발 후	연구인력	7
		생산인력	5

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 주변국 발생 구제역바이러스 혈청형에 신속대응이 가능한 재조합 단백질 기반의 구제역백신 개발 및 생산 시스템 구축	○ 주변국 발생 다양한 변이종에 대응할 수 있는 FMDV O type 및 A type 등 구제역 2가 및 단가 재조합 단백질 면역원을 개발 완료하였으며, 제조공정의 최적화 연구를 하여 대량생산에 적합한 제조공정을 확립하고 600L 배양 규모로 생산을 진행하여 생산성을 확인함.	○ 80%
- 주변국 발생 구제역바이러스 유전자 데이터베이스 구축	- 2017년~2021년에 동북아시아, 동남아시아, 중앙아시아, 남아시아 등 주변국 17개국에서 발생한 3종의 혈청형 및 6종의 지역형 구제역바이러스에 대해 유전자 정보 등의 조사 및 list-up을 완료하여 데이터베이스화 하였으며, 백신의 효능에 영향을 미치는 VP1 epitopes를 조사하여 18개 주요 변이형을 도출함.	- 100%
- 주요 주변국 발생 구제역바이러스 혈청형 대응 재조합 단백질 항원 생산균주 및 항혈청 은행 구축	- 구제역 재조합 단백질 면역원의 carrier protein, epitopes의 배치, epitopes의 반복수, linker 등을 최적화하고 주변국 발생 변이주들의 변이를 반영하여 이들을 방어할 수 있도록 설계한 구제역바이러스 O혈청형과 A혈청형에 대한 2가 및 단가 면역원 총 6종을 개발하였으며, 돼지에서 이들의 면역원성과 구제역바이러스에 대한 방어력을 확인함. 이들 시험과정에서 확보된 항혈청을 균주, 시험성적과 함께 보관하여 생산균주 및 항혈청 은행으로 구축함.	- 90%
- 대장균 기반의 신속 항원설계, 클로닝, 안정성/유효성 평가, 대량생산 기술 확보	- 최적화한 면역원 구조와 epitopes의 선정 및 구성 방법 등을 자료화하고 관련 개발 인력들의 경험으로 향후 새로운 구제역 변이 바이러스가 발생하였을 때 효능 확인시험을 포함하여 약 2개월이면 변이 바이러스에 대한 면역원성이 추가된 구제역 재조합 단백질 면역원을 제조할 수 있음. 또한 재조합 단백질 대량 생산 공정이 확립되고 이에 대한 SOP 및 제조지시기록서가 확보됨으로써 대량생산을 위한 추가적인 연구는 최소화할 수 있는 기술이 확보됨.	- 70%

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 본 과제의 최종목표인 해외 주요 혈청형으로 선정된 6종의 후보항원(2가 항원-4종, 단가항원-2종)의 항원조합, dose 및 바이러스 유입에 대응한 구제역 백신 생산 기술 개발을 위하여 최종 항원 1종을 확정하지 못하였고, 접종주기 등을 결정할 수 있는 추가적인 동물시험이 필요함. 또한 재조합단백질 항원 설계를 위해 본 과제에서 수행되었던 구조 등에 관한 연구결과를 기초로 추가적인 항원의 설계 및 이에 관한 연구가 가능할 것임. 그러나 현재 국내에서 구제역 바이러스를 이용한 동물실험을 수행할 수 있는 차폐시설은 검역본부의 구제역백신연구센터 ABSL3, BSL3 이 유일하여, 본 과제 진행시에도 많은 어려움을 겪었으며, 매년 국내 다수의 연구기관이 시설사용을 위해 대기중이며, 최근 국내에서 산발하고 있는 아프리카돼지열병(ASF, African Swine Fever) 에 관한 국가연구도 진행되고 있어 사용상의 어려움이 증가하고 있음.
 - 본 과제 성과로 설정된 특허 2건은 출원 하였으나, 등록은 못하였음.
 - SCI급 논문은 달성하지 못하였지만, 비 SCI급 논문은 2건 게재하였음.
-

2) 자체 보완활동

- 추가적인 동물시험을 위해 구제역백신연구센터와 협동 연구 및 일정에 관한 논의를 진행하고 있으며, 이를 통해 국내 환경에 최적화된 최종 구제역백신이 개발 완료된 후, 국내 임상 및 허가를 진행할 예정임. 주관기관 (주)파로스백신은 재조합단백질 항원에 관한 원천기술을 바탕으로 구제역백신에 대한 국내 품목허가(2019년 12월)을 획득한 바 있으므로 본 과제에서 최종 개발한 구제역백신의 국내 임상 및 허가를 진행하는데 어려움이 없을 것으로 판단됨.
 - 2020년 초 발생한 코로나로 인하여, 국내외 연구기관과의 항혈청에 관한 연구를 진행할 수 없었음. 코로나 백신 접종 및 방역 정책으로 코로나로 인한 대외활동의 제약이 감소하는 시기를 맞추어 연구를 재개할 수 있도록 국내외 연구기관과의 네트워크를 공고히 하고 있음.
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 본 연구개발과제의 성공적인 수행을 위하여, 주관기관인 (주)파로스백신은 재조합 단백질 플랫폼기술을 바탕으로 구제역항원 개발을 위해 재조합단백질 구조에 관한 연구를 지속적으로 진행하였으며, 이를 시험백신으로 제조하고 목적동물을 이용하여 효능을 평가하였음. 위탁기관 (주)노터스는 실험동물을 이용한 시험백신의 효능을 검증하였고, 실험동물 및 목적동물을 이용한 동물실험에 관하여 자문하였음. 협동기관 (주)씨티씨백은 주관기관에서 개발된 실험실 수준의 재조합 단백질 항원 생산 공정을 pilot 규모로 개선하였으며 이를 검증 및 재개선했음. 대량생산의 공정상 과제에 배정된 예산보다 많은 재료비 및 노동력이 요구되었으나, 과제연구에 대한 지원을 아끼지 않았음. 각 연구기관은 전문역량을 바탕으로 영역별 연구내용을 충실히 이행하여 과제연구목표달성을 위해 노력하였음.
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 구제역백신의 개발을 위한 재조합 단백질 구조에 관한 연구를 통해 얻은 연구결과는 다른 바이러스성 질병의 예방을 위한 백신 개발에 응용가능함. 동물용 의약품 뿐만 아니라 인간의 바이러스성 질병에 관한 연구에 적용할 수 있을 것으로 판단됨.
- 주변국 유입에 대응 가능한 구제역 백신은 주변국에서 발생하는 바이러스에 대한 방어력을 획득하게 하므로 주변국에서는 방역정책의 수단으로 활용할 수 있으며, 이를 통해 백신 수입국에서 수출국으로 전환할 수 있음.
- 재조합 단백질 생산 공정에 관한 연구는 구제역백신의 생산 효율을 증대시킬 뿐만 아니라, 재조합 단백질을 이용한 치료제, 백신, 동물사료 제조, 제빵산업, 모직, 포도주산업, 폐수처리 분야 등에 응용할 수 있음.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 구제역 발생이 주변국에서 산발하고 있는 현재 상황에서 구제역바이러스 유전정보의 지속적인 업데이트 및 새로운 재조합단백질 항원을 개발하고, 새로운 변이주에 대한 개발백신의 방어력 검증은 지속해야만 한다. 주관기관에서 품목허가를 진행한 구제역백신과 동일한 원료인 재조합단백질을 항원으로 사용함으로 평가기준 및 인허가 기준을 동일하게 진행할 예정이다. 효율적인 품질관리를 위한 평가기준의 추가설정이 필요하다.
- 본 연구개발과제가 완료된 이후에도 추가적인 재조합단백질 항원 개발 및 동물실험을 실시하여 과제에서 특허등록, 논문발표 등을 진행할 예정이다.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계	1	
특허출원	국내	1	
	국외		
	계	1	
특허등록	국내	1	
	국외		
	계	1	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전	1	
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

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

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	319082-02		
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제				총괄책임자	
과제명	해외 주요 혈청형 바이러스 유입에 대응한 구제역백신 생산 기술 개발			과제유형	개발
연구개발기관	(주)파로스백신			연구책임자	문상범
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019.05.27. ~ 2019.12.31.	150,000	150,000	300,000
	2차년도	2020.01.01. ~ 2020.12.31.	220,000	150,000	370,000
	3차년도	2021.01.01. ~ 2021.12.31.	220,000	150,000	370,000
	4차년도				
	5차년도				
계	2019.05.27. ~2021.12.31.	590,000	450,000	1,040,000	
참여기업	(주)노터스, (주)씨티씨백				
상대국	상대국연구개발기관				

2. 평가일 : 2022년 9월 7일(목)

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)파로스백신	책임연구원	김영훈

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	
----	---

1. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

불활화 바이러스를 면역원으로 사용하는 국내 시판 구제역백신과는 차별화된 구제역 재조합단백질 면역원을 사용하는 구제역백신을 개발함으로써 구제역바이러스로부터 기인하는 위험성을 배제하고 BSL3 이상이 요구되는 생산시설의 고도화를 일반 의약품 GMP수준으로 낮춰 생산 난이도를 크게 낮췄음. 또한 주변국 발생 다양한 변이종의 유전정보를 확보하고, 넓은 범위의 변이 바이러스를 방어할 수 있는 백신을 개발하여 변이에 대한 효율적인 대응은 물론 새로운 변이 바이러스의 발생에도 신속히 대응할 수 있는 가능성을 확보하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

전량 수입제품인 국내 시판 구제역백신을 대체 할 수 있는 국내 기술로 개발된 백신으로 수입대체는 물론 백신을 기반으로 하는 자주적인 구제역 방역정책의 추진, 국내 구제역바이러스 발생에 적합한 백신으로 효과적인 구제역 억제 가능함. 또한 재조합단백질 기반의 신속한 구제역백신 개발 기술과 대량 생산기술을 확보함으로써, 주변국에서 구제역이 지속적으로 발생하는 국제적인 환경에서 국내 유입의 차단은 물론 주변국으로의 구제역백신 기술 또는 제품 수출을 할 수 있는 기반이 마련됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 보통

구제역의 발생이 계속되고 있는 주변국 환경에서 이번 과제로 구축된 구제역바이러스 데이터베이스의 지속적인 업데이트, 새로운 변이주에 대한 개발 백신의 방어력 평가, 필요시 새로운 재조합단백질 면역원의 개발 및 평가, बैं킹 등은 그 활용성을 유지하기 위해 필수적임. 또한 국내에서 개발된 구제역백신을 사용하도록 하기 위해서는 기존 바이러스 백신과는 다른 재조합단백질 백신의 특성에 적합한 평가기준을 정립하여야 함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

연구기간 동안 구제역 재조합단백질 면역원의 최적 구조를 개발을 위해 약 10 cycles에 달하는 면역원의 설계, 시험백신의 제조, 시험백신의 평가(동물시험)를 진행하였으며, 이는 약 30개월의 연구기간을 감안하여도 많은 노력을 경주하였다고 판단됨. 또한 공정개발을 위해서도 실험실 수준의 연구, pilot 규모의 공정 검증 및 적합화, 대량생산 등 모든 과정을 진행하여 연구목표에 따른 성실한 연구를 수행하였다고 사료됨. 참여기관 또한 각 기관의 전문역량에 의해 동물시험, 공정개발 등에 성실히 참여하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 보통

논문에서는 2편의 국내 논문을 발표하여 계획된 성과 목표에 미달함.
특허는 출원을 2건 출원하였음(과제종료 후).
다만 본 과제의 원천기술을 바탕으로 한 구제역백신이 2019년 12월 국내 품목허가를 획득한 바 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체 평가
주변국 발생 구제역바이러스 유전자 데이터베이스 구축	20	100	목표로 했던 2017년에서 2021년까지 pool1 및 pool2 지역의 발생현황 및 구제역바이러스 유전자 정보를 확보하여 list-up함으로써 목표했던 바를 달성했다고 판단됨.
주요 주변국 발생 구제역바이러스 혈청형 대응 재조합단백질 항원 생산균주 및 항혈청 은행 구축	40	90	연구 진행 과정에서 다양한 구제역바이러스 변이종의 epitope를 반영한 재조합단백질 면역원을 설계하여 균주를 제작보관하고 있으며 이들에 대한 동물시험을 통해 확보한 항혈청도 함께 보관함으로써 균주 및 항혈청 은행으로 활용 가능함.
대장균 기반의 신속 항원설계, 클로닝, 안전성/유효성 평가, 대량생산 기술 확보	40	70	수차례의 항원 개선, 후보면역원 개발 경험을 바탕으로 약 2개월이면 새로운 구제역 재조합단백질을 설계, 제조, 평가할 수 있는 기술을 개발함. 또한 대장균 기반의 대량생산 공정을 확립함. 다만 이에 대한 안전성/유효성 평가시험을 진행하지 못하였으나, 재조합단백질을 사용한 기 허가제품을 확보함으로써 안전성/유효성 평가에 문제가 없을 것으로 기대됨.
합계	100	80	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구목표에 따른 연구개발을 성실히 수행하였으며, 그 결과도 대부분의 목표를 달성하였다고 생각됨. 특히 재조합단백질의 구조 및 설계, 제조, 평가와 그 대량생산 공정을 확립한 것은 큰 성과라고 판단됨. 다만 최종적으로 구제역백신에 적용할 면역원을 확정하지 못했으며, 제품화를 위해 필요한 임상 등에 진입하지 못한 점은 개발의 속도가 부족하였다고 생각됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

구제역바이러스를 다뤄야 하는 실험이 연구개발에 필수적임에도 불구하고 국내에서는 농림축산검역본부의 구제역백신연구센터 내 시설만이 유일하여 개발에 속도를 내기가 어려움. 또한 2020년 초에 발생한 코로나19로 인하여 대외적인 활동에 제약이 커서 연구의 효율이 떨어졌음. 내부 통제가 불가능한 이러한 요인들에 대해 평가시 고려가 필요함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

현 단계에서 개발된 결과를 바탕으로 최종 구제역백신을 확정할 수 있음. 그러나 연구개발 결과를 바탕으로 국내 구제역백신 평가기준에 따른 최종적인 면역원 설계와 제조, 평가를 진행하고 이를 가지고 임상, 허가를 진행하는 것이 국내 환경에 최적화된 구제역백신을 개발하는 방안이 될 것으로 사료됨.

IV. 보안성 검토

--

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

--

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	동물용의약품	
연구과제명	해외 주요 혈청형 바이러스 유입에 대응한 구제역 백신 생산 기술 개발			
주관연구개발기관	(주)파로스백신	주관연구책임자	문상범	
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	590,000,000	450,000,000	0	1,040,000,000
연구개발기간	2019년 5월 27일 ~ 2021년 12월 31일			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체 사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 주변국 발생 구제역바이러스 유전자 데이터베이스 구축	2017년~2021년 주변국 17개국에서 발생한 3종의 혈청형 및 6종의 지역형 구제역바이러스에 대해 유전자 정보 등의 조사 및 list-up을 완료.
② 주요 주변국 발생 구제역바이러스 혈청형 대응 재조합단백질 항원 생산균주 및 항혈청 은행 구축	최적화된 구조 및 주변국 발생 변이를 반영한 2가 및 단가 면역원 6종 개발 완료. 이들에 대한 생산균주와 항혈청을 확보하여 보관함.
③ 대장균 기반의 신속 항원설계, 클로닝, 안정성/유효성 평가, 대량생산 기술 확보	연구자료와 경험을 기반으로 효능 확인시험을 포함하여 약 2개월이면 새로운 면역원 개발 가능하며, 대량생산 기술 및 SOP, 제조지시기록서 확보하였음

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문				학술발표	정책활용	
											SCI		비SCI	논문평가기	IF				
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건		
가중치	50	30								20									
최종목표	2	1								6		1	2					2	
당해년도	목표	2	1							2		1	2					2	
	실적	2	0							2		0	2					2	
달성률(%)	100	0								100		0	100					100	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	최적화된 구조의 구제역 재조합단백질 면역원
②	약 2개월이면 새로운 변이에 대응한 백신 개발이 가능한 신속 항원 설계 및 백신제조 기술
③	검증된 대량생산 기술 및 관련 기술문서

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	신업체인전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	√					√	√			
②의 기술		√					√			
③의 기술		√					√	√		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	구제역백신에 적용 및 타 질병에 대한 확장
②의 기술	구제역바이러스 변이주 발생 시 신속 대응 및 구제역백신의 해외 현지화 개발
③의 기술	상품화

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	비SCI			논문평균IF	학술발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	20	20					50												10
최종목표	1	1					1					1							1
연구기간내 달성실적	0	0					0					0							0
연구종료후 성과창출 계획	1	1					1					1							1

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.