

120089-  
2

돼지  
바이러스성

설사병

대응연구

2021

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

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

발간등록번호

11-1543000-004139-01

# ‘돼지’ 바이러스성 설사병 대응 연구

2022.07.28.

주관연구기관 / (주)코미팜

협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 바이러스성 설사병 대응 연구”(개발기간 : 2020.04. ~ 2021.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 07. 28.

주관연구기관명 : (주)코미팜 대표이사 (문성철)  
협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (조기환)



주관연구책임자 : (주)코미팜 김주현  
협동연구책임자 : 전북대학교 탁동섭

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술개발			총괄연구개발 식별번호		
내역사업명					연구개발과제번호		120089-2
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	100%		%		%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	100%		%		%
연구개발과제명		생체분자 발현 기술을 이용한 경구용 PED 생백신 개발 및 Fc 면역증강 백신을 활용한 백신접종 프로그램 구축					
전체 연구개발기간		2020.04.29.~2021.12.31. (21개월)					
총 연구개발비		총 627,000 천원 (정부지원연구개발비: 467,000 천원, 기관부담연구개발비 : 160,000 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ V ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도		착수시점 기준( 3 ) 종료시점 목표( 6 )	
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 국내분리 PED 바이러스(Genotype 2b)를 이용한 경구백신용 strain 제작</li> <li>■ 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신 개발</li> <li>■ 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 안전성 및 유효성 평가</li> <li>■ Fc 면역증강 백신 2종 (경구용 생백신, 불활화 근육백신)을 이용한 돼지유행성 설사병 백신접종 프로그램 구축</li> </ul>					
	전체 내용	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 국내분리 PED 바이러스(Genotype 2b)를 이용한 경구백신용 strain 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 국내 분리 PED 바이러스(Genotype 2b)의 (High passage) 유전적 특성 확인</li> <li>◎ 항체음성 자돈에 대한 병원성 및 병원성 복귀 (virulence reversion) 실험</li> </ul> </li> <li>2. 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>◎ Fc 발현 PED 바이러스 제작 (PED-Fc 바이러스) 및 검증</li> <li>◎ PED-Fc 바이러스를 이용한 연속 3 Lot PED 경구백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lot 당 5 dose × 100 vial 이상 (목표 : 300 vial, 1,500 dose 이상)</li> </ul> </li> <li>◎ 연속 3 Lot PED 경구백신 시제품에 대한 물리, 화학적 성상 확인</li> </ul> </li> <li>3. 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 실험동물 (마우스, 기니픽)에 대한 안전성 평가</li> <li>◎ 항체음성 자돈 및 모돈에 대한 안전성 평가</li> </ul> </li> <li>4. 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 항체음성 자돈에 대한 면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 중화항체 형성능 확인 (목표 : 16배 이상)</li> <li>- 타사 상용화 백신과의 비교 평가</li> </ul> </li> <li>◎ 항체음성 모돈에 대한 최소면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 포유자돈의 병원성 야외분리주에 대한 방어력 확인 (목표 : 80% 이상 생존)</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>5. Fc 면역증강 백신 2종을 이용한 돼지유행성 설사병 백신 접종프로그램 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 경구용 생백신, 근육용 생백신, 근육용 사독백신의 병용 투여 효과 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 경구백신 투여 시 면역증강제 사용 효과 확인</li> </ul> </li> <li>◎ Fc 면역증강 백신 2종 (경구용 생백신, 불활화 근육백신)을 이용한 백신 접종 프로그램의 유효성 평가</li> </ul> </li> </ol>					

연구개발성과	<p>[정성적 성과]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내유행 G2b형 PEDV 분리 및 바이러스 약독화 전략 구축</li> <li>○ 담즙산 처리를 통한 고증식성 및 비병원성 PEDV attenuated strain 개발</li> <li>○ 생체분자 발현기술을 적용한 PEDV 생백신 시제품 제작과 평가</li> <li>○ 경구용 PEDV 생백신의 효능평가 및 제품화 가능성 확인과 백신 접종프로그램 연구</li> </ul> <p>[정량적 성과]</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>성과명</th> <th>성과</th> <th>성과명</th> <th>성과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>특허출원</td> <td>1건</td> <td>고용창출</td> <td>1인</td> </tr> <tr> <td>유전자원 기탁</td> <td>1건</td> <td>학술발표</td> <td>2건</td> </tr> <tr> <td>기술이전</td> <td>1건</td> <td>홍보전시</td> <td>2건</td> </tr> <tr> <td>기술료</td> <td>20백만원</td> <td>수상실적</td> <td>1건</td> </tr> <tr> <td>제품화(시제품 제작)</td> <td>1건</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>												성과명	성과	성과명	성과	특허출원	1건	고용창출	1인	유전자원 기탁	1건	학술발표	2건	기술이전	1건	홍보전시	2건	기술료	20백만원	수상실적	1건	제품화(시제품 제작)	1건		
	성과명	성과	성과명	성과																																
특허출원	1건	고용창출	1인																																	
유전자원 기탁	1건	학술발표	2건																																	
기술이전	1건	홍보전시	2건																																	
기술료	20백만원	수상실적	1건																																	
제품화(시제품 제작)	1건																																			
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 기존 백신과 차별화된 생백신 제조 원천기술 확보</li> <li>● 돼지유행성설사병에 대한 차세대 경구용 생백신 후보물질 확보</li> <li>● 참여기업(주관연구기관)을 통한 돼지유행성설사병 경구용 생백신의 제품화</li> <li>● 돼지유행성설사병에 대한 효과적인 백신 개발 및 접종 프로그램 구축을 통해 국내 대유행 상황에 대한 억제력 강화</li> <li>● 국내 돼지유행성설사병백신 산업 시장 확대 및 수입 대체 효과</li> <li>● 태국, 베트남 등 돼지유행성설사병 백신을 사용하는 동남아 국가로의 수출 확대</li> </ul>																																			
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	비공개 (사유 : 최종보고서 상의 주요 연구내용이 제품화 과정에서 기술자료로 활용될 예정이며, 경쟁사에 공개될 시, 기술유출이 우려됨)																																			
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화학물	신품종																									
		1(출원)						생명 정보	생물 자원		정보	실물																								
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호																											
국문핵심어 (5개 이내)	돼지유행성 설사병		경구용 백신		생체분자발현 기술		Fc 면역증강 백신		백신 프로그램																											
영문핵심어 (5개 이내)	PED		Oral vaccine		Fc technology		Fc immuno-enhancing vaccine		Vaccine program																											

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	18
2.1. 국내 유행 PEDV (Genotype 2b)에 대한 특성 확인	18
2.2. 경구백신 후보주 4종에 대한 항체음성 자돈 병원성 평가 결과	23
2.3. PEDV CKT-7_N strain (p150)에 대한 항체음성 자돈 안전성 평가 결과	30
2.4. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 1차 안전성 평가 결과	34
2.5. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 2차 안전성 평가 결과	37
2.6. PEDV CKT-7_N strain (p177)에 대한 병원성 복귀 시험 결과	41
2.7. Fc 바이러스 제작을 위한 Master 및 Working cell bank 제작	45
2.8. PEDV CKT-7_N strain (p177)의 Master 및 Working seed bank 제작	48
2.9. PEDV CKT-7_N strain (p177)을 이용한 PED-Fc 바이러스 제작 및 검증	53
2.10. PEDV CKT-7_N strain (p177) 경구 투여 시 임신모돈에 대한 방어효능 평가결과	58
2.11. 연속 3 Lot 시제품 제작 및 평가	88
2.12. Fc 면역증강 백신을 이용한 백신 접종 프로그램 연구	93
2.13. 경구투여 시 면역증강제 효과 확인	98
2.14. PED 생백신 후보주의 경구투여 유효성 검증	100
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	102
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	106
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	108
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	108
별첨 자료 (참고 문헌 등)	113

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1.1. 연구개발의 필요성

### 1.1.1. 연구개발의 개요

#### 1) 돼지유행성설사병 (Porcine epidemic diarrhea ; PED)

- 돼지유행성설사병의 병인체는 Porcine epidemic diarrhea virus (이하 PEDV)로 전염성위장염의 원인 바이러스와 형태가 같은 코로나바이러스과에 속하는 바이러스이다. 1971년 영국에서 최초로 발생한 이후 1970년대 후반에는 벨기에를 시작으로 체코, 헝가리 등지에서 보고되었다. 때로는 돼지유행성설사증후군이라고도 하며, 코로나바이러스로 인한 돼지의 전염성 바이러스성 질병으로 수양성 설사와 체중 감소가 특징이다. 거의 모든 연령대의 돼지에 영향을 미치지만, 신생아 새끼돼지에서 가장 심하게 증상이 나타나 사망률과 이환율이 거의 100%에 이르고, 나이가 들면서 사망률과 이환율이 줄어든다. 거의 대변과 구강 경로로 전염이 이루어지며 식욕부진, 구토, 설사, 탈수 등 돼지의 위장염과 임상적으로 비슷한 특징을 가진다.
- 설사 증상의 치료 및 2차 감염의 조절 이외에는 특별한 치료 방법은 없고, 대부분의 성장 돼지는 2차 감염이 발생하지 않는 한 7~10일 이내에 치료 없이 회복된다. 직접 감염은 바이러스로 오염된 대변을 섭취함으로써 발생하며, 간접 감염은 사료트럭, 서비스 차량, 인력, 장비 또는 기타 유형의 대변에 오염된 물건에 의해 발생한다. 오염된 돼지수송용 차량이 이 질병을 퍼뜨리는 중요한 위험 요인으로 확인되며, 잠복기는 1~4일 사이로 추산되고 감염 기간은 임상 징후가 처음 발생한 후 6~35일 동안 지속될 수 있다.
- 초유를 통한 모체항체가 신생아 감염을 막는 중요한 역할을 하며, 건강한 돈 군의 입식, 차량의 철저한 소독, 폐사체의 적절한 처리가 감염을 막는데 중요하다.

#### 2) 돼지유행성설사병의 국내 발생과 피해

- 우리나라에서 PED는 1992년에 최초로 발생하였으며, 2000년 1월 충청북도 제천에서 발생한 PED를 공식적인 통계로 처리한 이후 2018년 11월까지 총 1,043건에 236,467두의 돼지가 감염되었다. 2003년과 2014년에 걸쳐 큰 유행이 있었으며, 2000년 이후 2018년에 가장 많은 PED 건수를 기록하고 있다. (그림 1)
- 2003년의 PED 유행은 국내로 돼지유행성설사병바이러스가 처음으로 유입되어 양돈 산업에 큰 피해를 준 것이며, 2014년의 유행은 변이된 PEDV가 미국이나 중국에서 재차 유입되어 유행한 것이다. 실제로, 같은 시기에 미국, 중국, 한국에서 유행한 PED 바이러스의 유전자 정보를 분석해보면 98% 이상 일치하는 것을 확인할 수 있다. PED는 특히 겨울철에 발생 보고가 많은데, 이는 PEDV가 추운 겨울철에 오랫동안 야외에서 생존하기 때문인 것으로 여겨진다. (그림 2)

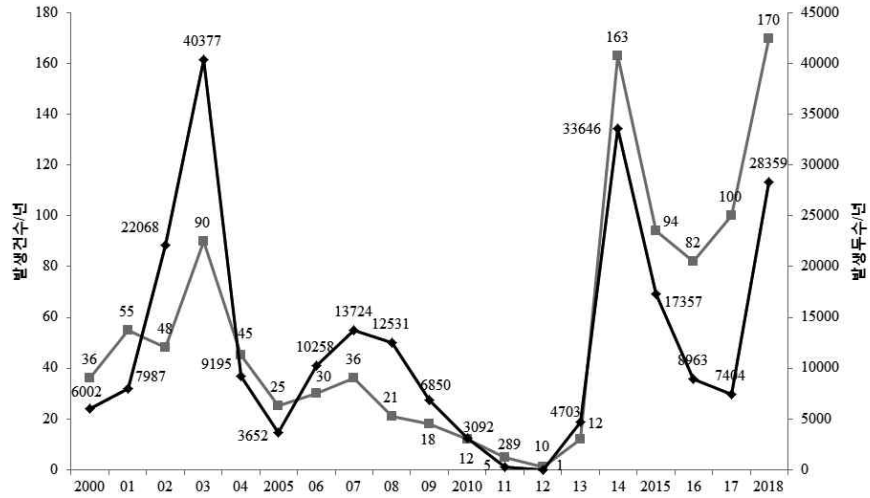


그림 1. 2000년 이후 국내 돼지유행성설사병 발생건수와 발생두수 (농림축산검역본부, KAHIS 제공)

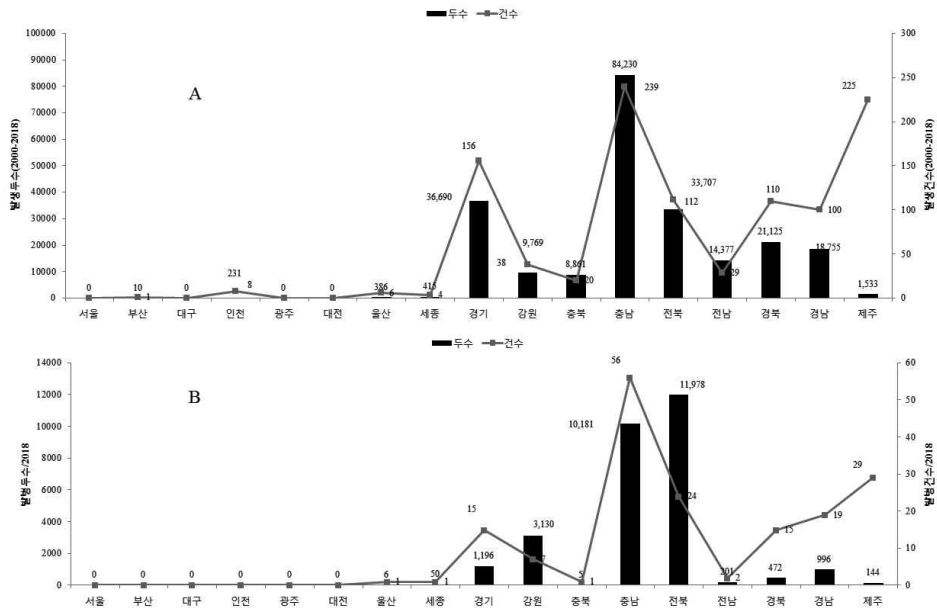


그림 2. 2000년 이후 국내 돼지유행성설사병의 월별 감염두수 분포 (농림축산검역본부, KAHIS 제공)

○ 2000년 이후 지역적 PED 발생을 살펴보면 충남이 239건으로 가장 많고, 제주 (225건), 경기 (156건), 전북 (112건), 경북 (110건) 순서로 이어진다. 발생 건수와 별개로 총 발병 두수에 대한 통계는 마찬가지로 충남이 84,230두로 가장 많았고, 경기 (36,690두), 전북 (33,707두), 경북 (21,125두), 경남 (18,755두) 순서였으며, 제주도의 경우, 사육 규모가 영세하여 발생 건 수 대비 발병 두수는 1,553건으로 적었다. (그림 3)

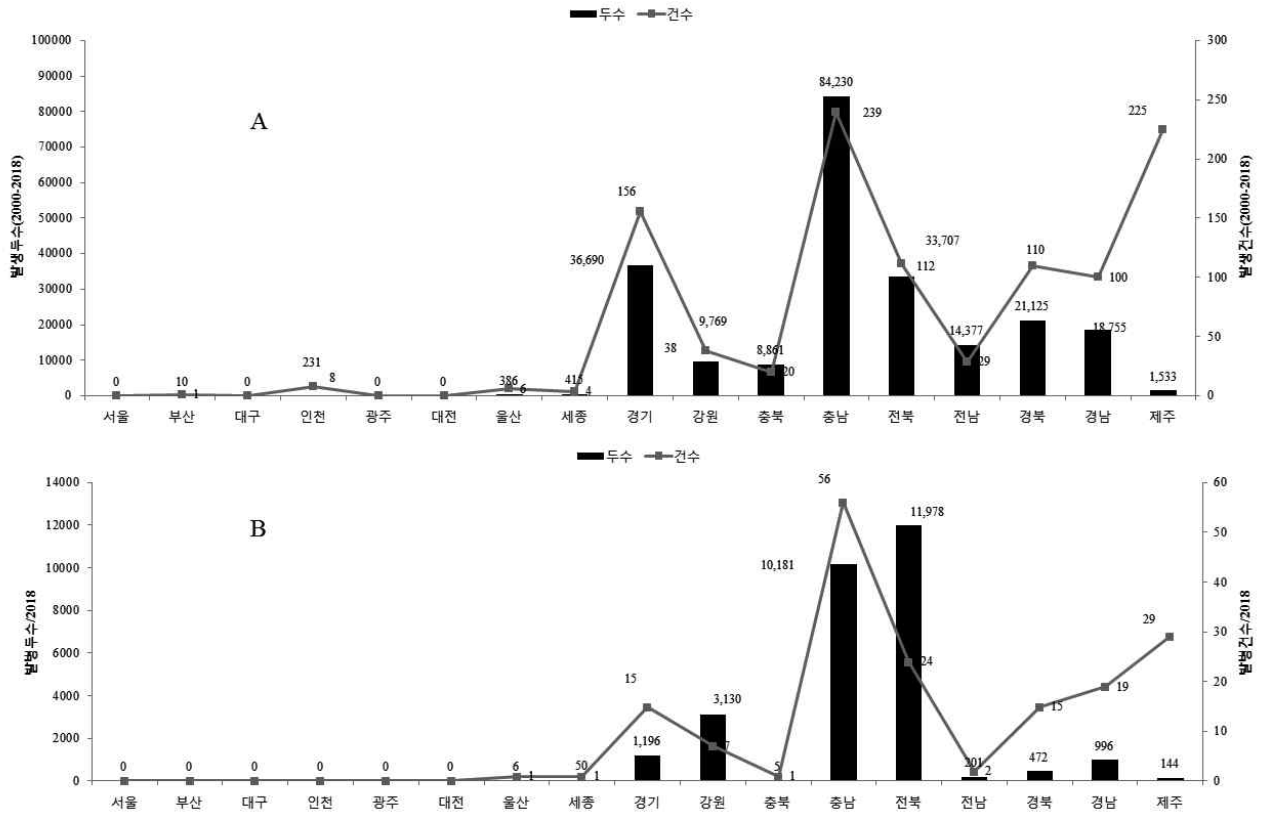


그림 3. 2000년 이후 국내 돼지유행성설사병의 지역적 발생건수(A) 및 2018년 발생건수(B)  
(농림축산검역본부, KAHIS 제공)

### 3) 돼지유행성설사병 바이러스의 특징

- 최근 유행하고 있는 PEDV를 분리하여 세포에서 증식시킨 후 2~5일령의 자돈에 경구로 투여하면 LD<sub>50</sub>값이 10<sup>2.0</sup>TCID<sub>50</sub>/두 전후로 형성될 정도로 매우 강한 병원성을 가지고 있으며 감염된 자돈은 심한 수양성 설사를 일으키면서 대부분 7일 이내에 모두 폐사한다. 해당 자돈들을 부검해보면, 위나 장이 심하게 부풀어 있고, (그림 4) 소장 상피 내 용모가 심하게 탈락되어 있는 것을 확인할 수 있다. (그림 5) 따라서 최근 유행하는 PEDV에 양돈농가의 자돈이 감염되었을 때 강한 병원성을 나타내는 것으로 확인되었다.

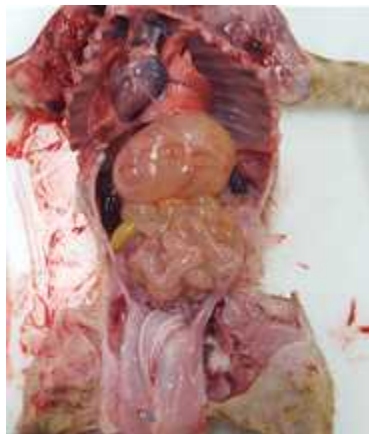


그림 4. PED 바이러스에 감염된 자돈의 부검 소견



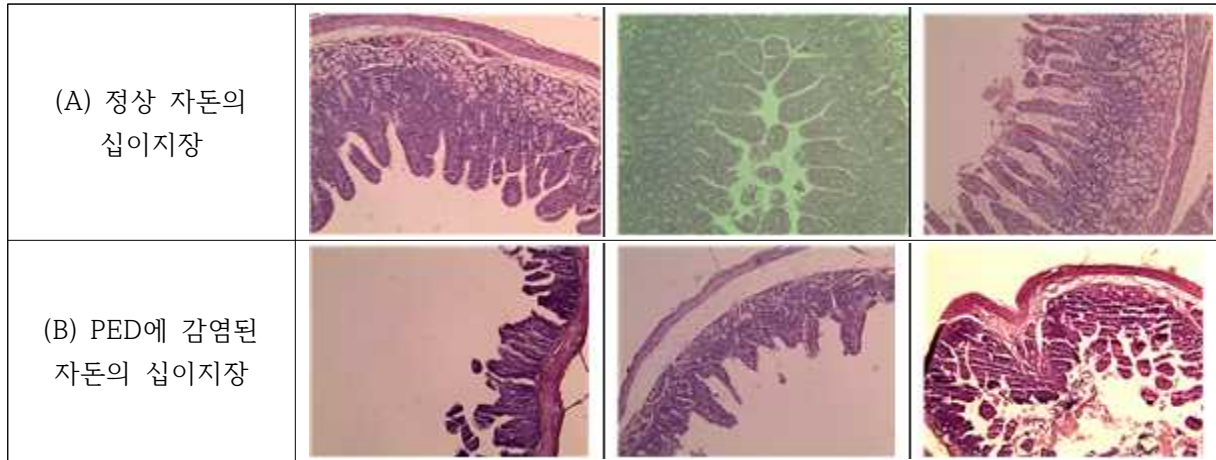


그림 5. PED 감염 유무에 따른 소장 조직 병변

- 이렇게 PED가 어린 자돈에 감염될 때 심한 설사를 나타낸 것처럼 육성돈도 PED에 감염되면 설사를 일으킨다. PED가 육성돈에 감염되면 약 15일간 설사를 하다가 멈추는데, 육성돈의 PED가 농장의 순환감염을 일으키는 원인이 되기도 한다. 그리고 모돈이 PED에 감염되면 발열, 불식, 설사, 무유증으로 자돈에게 젖을 공급하지 않아 폐사율을 높인다.
- 국내에서 유행하는 PEDV 유전자 변이를 확인한 결과 2013년도 이전에 분리 보고된 PED는 G1군으로 분류되고, 2013년에 유입된 PEDV는 G2군으로 분류되고 있다. 2017년에 분리된 PED의 경우 변이된 PEDV로 분류되는 G2b군이 우점종을 나타내고 있으나, 2003년도에 유행한 PED와 유사한 유전자를 소유하는 G1b군이 일부 확인되고 있다. 이러한 유전자의 변이 정보를 기초하여 양돈농가는 PED 예방을 위한 PED 백신 접종 프로그램을 전략적으로 수립할 필요가 있다. (그림 6)

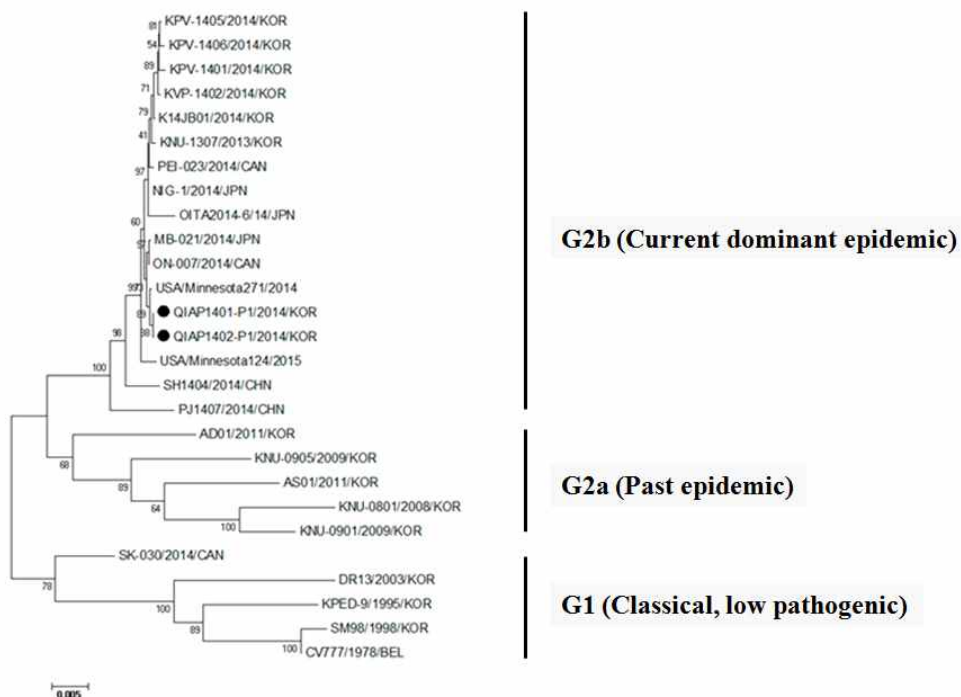


그림 6. 국내 유행 PED 바이러스의 phylogenetic analysis (Spike gene)

4) 돼지유행성설사병의 예방과 백신접종 프로그램 구축의 중요성

- 2018년 기준으로 돼지유행성설사병 예방 백신의 전체 시장 규모는 약 80억 원이며, 이 중 경구백신을 포함한 생독백신 시장은 14억 원으로 전체 시장규모의 17.5% 수준이다. (동물용의약품 등 수입판매 실적, 한국동물약품협회 제공) 대부분의 양돈농가에서 다양한 형태의 돼지유행성설사병 (이하 PED) 예방 백신을 사용하고 있지만, 백신에 대한 만족도는 높지 않다. 다만, 백신 접종을 통해 완전한 방어면역을 획득하지 못하더라도 바이러스 감염 시 PED 증상을 경감시켜 줄 수 있기 때문에 여전히 다양한 종류의 PED 백신들이 사용되고 있다. (그림 7)



그림 7. 국내 시판중인 돼지유행성설사병 예방백신 현황

- 일반적인 백신의 형태는 면역시키하고자 하는 개체에 백신을 직접 접종하여 질병을 예방하는 것이나, PED와 같은 질병은 특히 어린 일령에서 피해가 크며, 자돈에 백신을 직접 접종할 경우 면역을 획득하기 전에 PEDV가 감염되어 용모 상피조직을 파괴하고, 감염 자돈을 폐사시키기 때문에 자돈에 직접 백신을 접종하지 않는다. 대신, 모돈에 백신을 접종하여 모돈의 초유를 통해 자돈에 항체를 전달하는 간접적인 방식을 사용한다. 따라서, 모돈에 어떤 백신을 어떤 방법으로 접종하느냐에 따라서 (백신 접종프로그램) 그 결과가 크게 달라질 수 있다.

- 시판중인 PED 백신은 크게 약독화 생백신과 사독백신으로 나뉘며, 백신에 사용되는 strain 또한 다양하다. (그림 8) 각각의 백신은 자체적인 접종 프로그램을 가지고 있고, 대체적으로 임신모돈에 2회 반복접종을 통해 면역을 형성 후 초유를 통해 자돈에게 이행항체를 전달하는 기전을 가지고 있다. 보통 분만 4~5주 전에 1차 백신을 접종하고, 2~3주 후에 boosting 접종을 실시하게 되는데, 이 경우, 초유를 통해 전달된 중화항체가 PED에 취약한 3~4주령까지 최소 32배 이상은 유지되어야 PED로 인한 피해를 어느 정도 막을 수 있다. 또한, 백신 접종으로 IgA 항체를 얼마나 형성시키는지 PED 방어면역에 핵심이 된다.

백신 종류	PED 백신주	분리주	유전자형	생산 회사수
생백신	KPEDV-9	한국	G1a	5
	P-5V	일본	G1a	1
	DR13	한국	G1a	1
	SM98	한국	G1a	5
사백신	SM98	한국	G1a	5
	SM98-Fc	한국	G1a	1
	ISJ460651A13	미국	G2b	1
	QIAP1401	한국	G2b	4
	WGV-PED	한국	G2b	1

그림 8. 국내에서 사용중인 PED 백신의 종류와 유전자형 (농림축산검역본부 바이러스질병과 제공)

- 시판중인 모든 백신들이 상기 조건을 만족시키지는 못하며, 약독화 생백신의 경우에는 항체를 형성하고 지속시키는 능력이 부족하며, 사독백신은 항체형성능은 우수하지만, 세포성 면역 자극이 어렵고, 특히, IgA 항체 형성에 있어 단점이 있다. 또한, 백신의 종류, 백신접종 모돈의 면역상태, 농장 환경 등에 따라 백신의 효과가 각기 다르게 나타날 수 있기 때문에 백신접종 프로그램을 정형화시키기 어렵고, 상황에 따라 유동적인 것이 대부분이다. 한 예로, 농림축산검역본부에서 시판중인 백신을 대상으로 효능을 검사한 결과, 백신의 종류와 접종 방법에 따라 자돈 생존율이 36~90%로 매우 큰 차이를 보였다. (그림 9)

Group	Vaccination program	Number of Piglets	Number survived	% Survived
1	Oral-Oral	11 heads	4 heads	36.4 %
2	Live-Live	11 heads	10 heads	90.9 %
3	Live-Killed-Killed	11 heads	9 heads	81.8 %
4	Killed-Killed	11 heads	9 heads	81.8 %
5	Artificial infection	11 heads	10 heads	90.9 %
6	Control	11 heads	2 heads	18.2 %

그림 9. 국내 시판중인 돼지유행성설사병 백신의 효능 평가 결과 (농림축산검역본부 제공)

- 평가에 사용되는 백신의 종류와 실험 조건에 따라서 그 결과가 달라지지만, 대체적으로 생독백신만 접종하거나 혹은 사독백신만 접종한 그룹들에 비하여 생독백신과 사독백신을 병용 사용할 경우 항체 형성능과 지속능이 높게 나타나는 경향이 있으며, 농림축산검역본부에서도 이러한 백신접종 프로그램을 적극 권장하고 있다. 그럼에도 현재의 L-K-K (생독-사독-사독)와 같은 백신접종 프로그램이 소비자에게 100% 만족도를 주지는 못하며, 특히 반복적인 백신접종으로 인한 농가의 경제적 부담은 이를 더욱 어렵게 한다. 따라서, 기존의 백신접종 프로그램을 좀 더 최적화시키기 위한 새로운 백신의 개발과 병용 투여 연구가 필요한 시점이다.

#### 5) 효과적인 PED 백신 개발을 위한 핵심 기술

- IgG는 면역 글로불린 중에서 가장 큰 역할을 한다. 감염 방어에 도움이 되며, 주로 혈관 밖에서 세균이나 그 독소와 결합하여 그들의 침입을 방지한다. 특히, IgG는 외부에서 침입한 세균이나 그 독소와 결합하여 옹소닌화(Opsonization) 함으로써 항체-의존 세포-매개 세포독성 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, CDCC) 기전에 따라 대식세포에 의해 숙주로부터 이물질을 제거한다. IgG는 중쇄와 경쇄로 이루어지며, Y자형을 형성하는데 파파인에 의해서 Fab 부분과 Fc 부분으로 나누어진다. 이 중 Fab 부분의 가변영역은 여러 가지로 변화하여 대부분의 항원과 결합한다. Fc 부분은 대식구와 림프구의 수용체와 결합하여 세포의 활성화를 촉진한다.
- 문헌에 의하면, 세포 표면에 발현한 인간 IgG의 Fc 도메인이 탐식세포 표면의 Fc 수용체를 자극하여 탐식세포를 활성화시킨다고 보고된 바 있으며, (Stabila et al., Nat Biotechnol 1998, 16(13):1357-60) 마우스 IgG의 Fc 도메인을 돼지 신장세포주인 CPK와 토끼 신장세포주인 RK13 등의 세포 표면에 발현시키고, 상기 세포에 외피를 갖고 있는 바이러스를 감염, 증식시켜, 이로부터 얻어진 바이러스를 이용하여 불활성화 백신을 제작하고, 동물에 접종하여 면역시키면 항체생산의 유도가 증가되며, 공격접종에 대해서도 우수한 방어능을 갖게 됨을 보고된 바 있다. (Takashima et al., Vaccine 2005, 23:3775-82). 그러나, 돼지 항체 Fc 도메인에 대한 발현연구는 보고된 바가 없었다.
- 한편, TR은 세포외에서 철분을 운반하는 트랜스페린에 대한 세포막 수용체로서 당단백질의 일종이다. 상기 TR은 세포 표면에 존재하면서 트랜스페린과 강하게 결합하여 수용체 매개 세포내 이입을 통해 철 이온이 세포 안으로 들어가게 하는데 중요한 역할을 수행한다. 세포 표면에서 수용체로 작용하는 대부분의 TM 도메인들은 N-말단이 세포 바깥쪽으로 향하고, C-말단은 세포질 쪽으로 향하는 1형의 TM 도메인이지만, TR의 TM 도메인은 N-말단이 세포질 쪽을 향하고, C-말단이 세포바깥쪽을 향하는 2형의 TM 도메인인 특징을 갖고 있다.
- 코미팜에서는 돼지의 IgG Fc 도메인의 세포 표면 발현 방법을 연구하는 과정에서 돼지 TR의 TM 도메인을 코딩하는 유전자를 이용하여 돼지 IgG 항체의 Fc 도메인을 세포 표면에 발현되도록 하는 벡터를 제조하고, 이를 이용하여 형질전환한 세포주의 표면에 돼지 IgG Fc 도메인이 발현됨을 확인하였으며, 이러한 특징의 세포주를 이용하여 외피가 있는 돼지

질병 관련 바이러스를 감염시켜 증식시키면, 바이러스가 세포 밖으로 나오는 과정에서 입자 표면에 돼지 IgG의 Fc 도메인을 함유하게 되고, 이렇게 바이러스 외피에 돼지 IgG의 Fc 도메인을 함유한 바이러스로 제조한 생독백신 또는 불활성화 백신의 경우, 이들 백신을 돼지에 접종하면 돼지의 다양한 탐식세포로 구성되는 항원제시세포의 표면에 발현하고 있는 Fc 도메인에 대한 수용체를 자극하는 등 세포면역과 체액면역을 증가시킴으로서 면역 자극효과가 향상되는 것을 확인하였다. 따라서, 코미팜에서 보유한 돼지 IgG의 Fc 도메인이 세포 표면에 발현되는 세포주는 이 세포주에서 증식가능한 외피가 있는 다양한 돼지유래 바이러스에 (돼지유행성설사병 바이러스, 돼지호흡기생식기증후군 바이러스 등) 대하여 면역능이 우수한 다양한 종류의 백신을 손쉽게 생산할 수 있게 해준다.

- 코미팜에서는 상기 기술이 적용된 Vero cell line (Vero-Fc cell line), BHK-21 cell line (BHK21-Fc cell line) 등을 이미 보유하고 있으며, 이를 통해 Fc 면역증강 돼지유행성설사병 불활화 백신, Fc 면역증강 광견병 불활화 백신을 제품화한 바 있다. 특히 Fc 면역증강 돼지유행성설사병 불활화 백신은 그 기술의 우수성을 인정받아 “76차 IR52 장영실상”을 수상한 바 있으며, 중국 수출을 위한 등록절차를 진행 중에 있다. 본 과제를 통해 코미팜에서 이미 구축하고 있는 Fc 면역증강백신 제조기술을 생독백신, 특히, 경구용 백신으로 확대 적용하고자 한다.

### 1.1.2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

#### 1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### ○ 기술현황

##### ① 돼지유행성설사병 백신 기술현황

- 돼지유행성설사병의 피해를 최소화하기 위하여 백신접종을 권장하고 있으며, 각 농장의 상황에 맞게 결정한 백신 프로그램에 따라 생백신과 불활화 백신(사백신)을 혼용하여 사용한다. 백신을 반복적으로 사용할 경우 더 높은 항체가를 나타낸다. 추천되는 백신 프로그램은 생-사-사 백신 프로그램으로, 이를 사용하는 경우 생백신 2회 혹은 불활화 백신 2회만을 접종하는 돈군에 비하여 높은 수준의 항체가를 나타냈다.
- PED는 시기에 따른 유행주별 불활화 백신이 개발되어 있으며, 약독화 생백신의 경우, G2 유전형은 아직 시판되고 있지 않다. 약독화 생백신의 균주는 모두 국내 분리주이며, 불활화 백신의 균주는 국내 분리주와 수입균주 모두 해당된다.
- 국내 시판중인 PED 백신의 방어효능에 대한 의문이 제기되어 2014년 농림축산검역본부에서 수행한 방어효능평가 실험 결과, 주사용 백신의 폐사방어효력은 80% 내외로 확인되었다. PED 백신의 방어효과 유지를 위해서는 모든 혈액과 초유 내 높은 항체가 유지가 중요한 요소임이 확인되었다.
- 시판중인 주사용 PED 백신들이 질병의 방어에는 효과가 있음이 확인되었으나, 백신을 접종한 개체의 일부에서만 초유 내 항체가 생성됨이 확인되었다. PED 백신의 효능은 접종 경로와도 연관이 있는 것으로 추정된다.

② 돼지유행성설사병 백신 제조소 현황

- 국내 6개 제조사에서 돼지유행성설사병 불활화 백신에 대한 제조기술 보유 중이며, (코미팜 포함) 후발 업체 1~2개소에서 개발 진행 중
- 국내 5개 제조사에서 돼지유행성설사병 생독 백신에 대한 제조기술 보유 중이며, (코미팜 포함) 후발 업체 1~2개소에서 개발 진행 중
- 돼지유행성설사병 불활화 백신 제조와 관련하여 불활화 방법, 유효한 면역증강제 조성 등에 대하여 비교적 널리 알려져 있음
- 돼지유행성설사병 생독 백신 중 경구용 백신의 경우 국내 제조업체 1개소에서만 제조기술 보유 중 (녹십자수의약품)

③ Fc 면역증강 백신 기술 및 제조소 현황

- 코미팜이 보유한 독자 기술로 유사기술을 보유한 업체 없으며, 코미팜에서만 돼지유행성설사병 백신, 광견병 불활화 백신을 생산하고 있다.

○ 시장현황

- ① 돼지유행성설사병 불활화 백신 시장은 단가 백신과 혼합백신으로 양분화되어 있고, 시장 규모는 약 76억 원 수준임. 이 중 단가백신 시장이 63억 원으로 대부분을 차지하고 있고, 돼지전염성위장염 바이러스와의 복합백신이 13억 원 정도의 시장을 형성하고 있음 (2018년도 동물용의약품 등 수입·판매실적, 한국동물약품협회 제공)
- ② 돼지유행성 생독 백신 시장은 단가 백신과 혼합백신으로 양분화되어 있고, 시장 규모는 약 26억 원 수준임. 이 중 단가백신 시장이 14억 원으로 약 54%를 점유하고 있으며, 돼지전염성위장염 바이러스 혹은 돼지로타바이러스와의 혼합백신 시장이 12억 원 정도의 시장을 형성하고 있음 (2018년도 동물용의약품 등 수입·판매실적, 한국동물약품협회 제공)

○ 경쟁기관현황

- ① 돼지유행성설사병 불활화 백신 시장에서 단일백신의 경우, 국내 제조사 6개소가 경쟁 중에 있으며, 복합백신은 국내 제조사 5개소가 경쟁 중에 있음 (표 1)
- ② 돼지유행성설사병 생독 백신 시장에서 단일백신의 경우, 국내 제조사 5개소와 수입제품 1종이 경쟁 중에 있으며, 복합백신은 국내 제조사 5개소가 경쟁 중에 있음 (표 1)

표 1. 국내·외 제조사의 돼지유행성설사병 백신 보유 현황 (O ; 보유, X ; 미보유)

구분		사독백신		생독백신	
		단일	복합	단일	복합
국내 제조사	고려비앤피	O	O	O	O
	녹십자수의약품	O	O	O	O
	대성미생물연구소	O	O	O	O
	우진비앤지	O	X	X	X
	중앙백신연구소	O	O	O	O
	코미팜	O	O	O	O
	CTC 바이오	X	X	X	X
수입제품		X	X	O	X

○ 지식재산권현황

① 돼지유행성설사병과 관련된 주요 특허현황은 아래와 같으며, 백신 제조 기술과 관련된 내용보다 사독백신 혹은 생독백신으로 사용하기 위한 strain과 관련된 내용이 주가 된다.

(특허명, 출원번호, 발명자, 특허권자 순서)

- 돼지유행성설사바이러스 약독화주 및 불활화백신 조성물과 이를 이용한 경구투여용 백신 조성물 (10-2015-0149815, 장경수, 우진비앤지)
- 돼지유행성설사병바이러스 약독화주 및 이를 포함하는 돼지유행성설사병 백신 조성물 (10-2014-0020881, 신현진, 우진비앤지)
- 돼지유행성설사바이러스 백신 (10-2016-0132494, 헤르난데스 루이스 알레잔드로, 베링거인겔하임)
- 식물을 이용한 재조합 돼지유행성설사병바이러스 백신의 제조방법 및 그에 따른 PEDV 백신 (10-2012-0079784, 양문식, 전북대학교 산학협력단)
- 돼지유행성설사병바이러스의 N 말단 도메인을 유효성분으로 함유하는 경구 투여용 백신 조성물 (10-2017-0121180, 장용석, 전북대학교 산학협력단)
- 변이된 돼지유행성설사병바이러스 및 이를 이용한 유행성설사병 예방용 백신 조성물 (10-2018-0031966, 양동균, 농림축산검역본부)
- 신규 약독화 PEDV 균주 및 이를 포함하는 백신 조성물 (10-2019-0008508, 윤인중, 중앙백신연구소)
- 돼지전염성위장염바이러스, 유행성설사바이러스 및 로타바이러스의 혼합생백신 및 이를 이용한 백신접종방법 (10-2006-0022530, 탁동섭, 농림축산검역본부)
- 돼지유행성설사의 예방 또는 치료방법, 백신 및 백신 키트 (10-2019-7006764, 사또 테츠오, 닛세이켄 가부시키키가이샤)
- 돼지유행성설사병바이러스의 에피토프와 로타바이러스 유전자를 발현하는 형질전환체 및 이를 포함하는 백신 조성물 (10-2010-0127972, 황철호, 단국대학교 산학협력단)

- ② Fc 면역증강 백신과 관련된 특허현황은 아래와 같으며, 4개 축종 (돼지, 소, 닭, 개)에 대하여 모두 코미팜이 보유하고 있다. (특허명, 출원번호, 발명자, 특허권자 순서)
- 돼지 면역글로불린 지의 에프씨 도메인의 세포 표면 발현용 벡터, 상기 벡터에 의해 형질 전환된 숙주세포 및 상기숙주세포를 이용한 돼지 질병 관련 바이러스에 대한 백신의 제조법 (10-2007-0096699, 문성철, 코미팜)
  - 가금류 면역글로불린 지의 에프씨 도메인의 세포 표면 발현용 벡터, 상기 벡터에 의해 형질전환된 숙주세포 및 상기숙주세포를 이용한 돼지 질병 관련 바이러스에 대한 백신의 제조법 (10-2008-0022113, 문성철, 코미팜)
  - 소 면역글로불린 지의 에프씨 도메인의 세포 표면 발현용 벡터, 상기 벡터에 의해 형질 전환된 숙주세포 및 상기숙주세포를 이용한 돼지 질병 관련 바이러스에 대한 백신의 제조법 (10-2008-0009206, 문성철, 코미팜)
  - 개 면역글로불린 지의 에프씨 도메인의 세포 표면 발현용 벡터, 상기 벡터에 의해 형질 전환된 숙주세포 및 상기숙주세포를 이용한 돼지 질병 관련 바이러스에 대한 백신의 제조법 (10-2012-0087725, 신현진, 코미팜)

#### ○ 표준화현황

- ① 돼지유행성설사병 사독백신의 경우, 제품의 특성에 따라 1 dose 당 항원함량이  $10^{6.0} \sim 10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub> 수준으로 형성되어 있으며, 면역증강제로는 W/O emulsion, O/W emulsion, Polymer 등이 다양하게 사용되고 있음
- ② 돼지유행성설사병 생독백신의 경우, 제품의 특성에 따라 근육접종용은 1 dose 당 항원함량이  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>이상, 경구투여용은 최소  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>이상의 항원 함량이 요구된다. 동결 건조 보호제로는 LPGG, TPGG, Skim milk 등 제조사의 공정에 따라 다양하게 적용되고 있음

#### 2) 국외 기술 수준 및 시장 현황

##### ○ 기술현황

- ① 돼지유행성설사병이 처음 발생한 곳은 유럽이지만, 양돈 산업에 직접적인 피해를 입힌 곳은 한국, 일본, 중국을 포함하는 동남아시아 지역에 국한되어 있었기 때문에 미국, 유럽 등지의 다국적 기업에서는 돼지유행성설사병 예방 백신에 관심을 가지지 않았고, 한국, 일본, 중국에서 주로 백신 제조기술을 보유하고 있다.
- 2013년 이후, PEDV genotype 2형이 미국에서 크게 유행하면서 (Aisa-like strain) 베링거인겔하임, 조에티스와 같은 다국적 기업에서도 돼지유행성설사병 백신을 제조하기 위한 기술을 개발하였고, 한국과 같이 whole virus를 이용한 사독백신 혹은 생독백신 외에 PEDV의 주요 항원부위인 spike protein을 활용한 subunit 백신 등에 대한 제조기술



이 활발히 연구되고 있다.

- 중국에서 발생하고 있는 새로운 유행주에는 약독화 생백신의 야외 변이주로 추정되는 strain들도 포함되어 있다.
- Fc 면역증강 백신은 코미팜이 보유한 독자 기술로 유사기술을 보유한 해외업체는 없다.

## ○ 시장현황

- ① 최근 들어 돼지유행성설사병이 미국에서 대유행이 있었고, 여러 다국적 기업들에서 예방 백신을 생산하기 위한 기술을 개발하였지만, 미국 내 돼지유행성설사병 백신 사용에 있어서는 여전히 미온적인 입장이다. 이러한 이유로, 다국적 기업에서 아직 본격적으로 돼지유행성설사병 백신의 제조와 판매가 이루어지고 있지 않으며, 돼지유행성설사병 백신의 수요는 여전히 한국, 중국, 태국, 베트남 등 동남아시아 지역에 집중되어 있다.

## ○ 경쟁기관현황

- ① 태국, 베트남 등 동남아 시장에서 국내 제조업체 간의 경쟁이 치열하며, 한국 시장에서는 일본의 니찌세이겐 생독백신이 유일한 외국 백신으로 판매되고 있다.
- ② 다국적 기업에서 PED 백신을 국가별 (조건부 허가 포함) 판매중이나, 국내에는 PED 백신을 등록하지 않은 기업들이 많고, 국내 생산 제품이 주로 사용되고 있다.
  - 중국이 거대한 양돈백신 시장을 보유하고 있지만, 자국 산업에 대한 보호 정책으로 외국 제품에 대한 등록이 극히 제한적으로 이루어지고 있다. 또한, 지금까지는 다국적기업에서 돼지유행성설사병 백신에 대한 관심도가 극히 낮았기 때문에 중국 시장 대부분은 중국 제조업체 제품들이 선점하고 있는 상황이다. 코미팜은 지난 2014년부터 Fc 면역증강 돼지유행성설사병 불활화 백신 (제품명 : 프로백™ 피이디-에프씨)을 중국내에 등록하기 위한 절차를 진행 중에 있으며, 총 3단계로 이루어지는 허가단계 중에서 1단계 등록 절차를 마무리하고, 2단계 등록절차를 진행 중에 있다. 빠르면 2021년에는 중국내에서 코미팜의 Fc 면역증강 돼지유행성설사병 불활화 백신을 판매할 수 있으리라 기대하고 있다.

## ○ 지식재산권현황

- ① 돼지유행성설사병 예방 백신과 관련된 해외특허는 주로 중국에서 많이 출원되어 있으며, 2013년 이후 미국에서 해당 질병이 유행하면서 베링거인겔하임, 메리알과 같은 다국적 기업에서도 미국 혹은 다른 해외 국가에 돼지유행성설사병 예방 백신 제조와 관련된 특허를 보유하고 있다. 특히, 국내에서는 제품화되지 않은 subunit 백신에 대한 특허출원이 활발히 이루어지고 있으며, 주요 특허는 아래와 같다. (특허명, 출원번호, 특허권자 순서)

- Novel Vaccine Compositions for Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Porcine Deltacoronavirus (16282953, Zoetis Services LLC)
- Porcine Epidemic Diarrhea Preventative or Therapeutic Method, Vaccine, and Vaccine Kit (16325615, NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE NISSEIKEN CO., LTD.)
- Porcine epidemic diarrhea virus vaccine (14672631, Boehringer Ingelhei Vetmedica, Inc.)
- Vaccine for use in protecting a pig against porcine epidemic diarrhea virus (15509999, Intervet Inc. Universiteit Utrecht Holding B.V.)
- Recombinant spike protein subunit based vaccine for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) (14716481, Merial, Inc.)
- Immunogenicity of an Optimized Synthetic Consensus DNA Vaccine for Porcine Epidemic Diarrhea Virus (15545409, The Trustees of the University of Pennsylvania)

○ 표준화현황

- ① 특이사항 없음

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 2.1. 국내 유행 PEDV(G2b)를 이용한 경구백신용 strain 선발

#### 2.1.1. 국내 분리 PEDV (Genotype 2b)에 대한 특성 확인

##### 1) 국내 분리 PEDV 특성 분석

- 국내 양돈장에서 설사병으로 의뢰된 자돈의 장유제액으로부터 PEDV를 Vero cell을 이용하여 분리하였고, PEDV CKT-7 strain으로 명명한 후, 배양조건에 따른 6종의 약독화 백신 후보주를 확보함

표 2. 바이러스 약독화 전략(조건)

구분	첨가제	구분	첨가제
T15	Trypsin	NF	담즙산 + 혈청
T15N	Trypsin + 담즙산	F	혈청
N	담즙산	X	무처치군

- 분리된 바이러스에 대하여 Vero cell에서의 세포변성효과(CPE) 및 PEDV에 대한 특이 단클론 항체를 이용한 형광항체검사법을 통하여 모두 PEDV임을 확인함

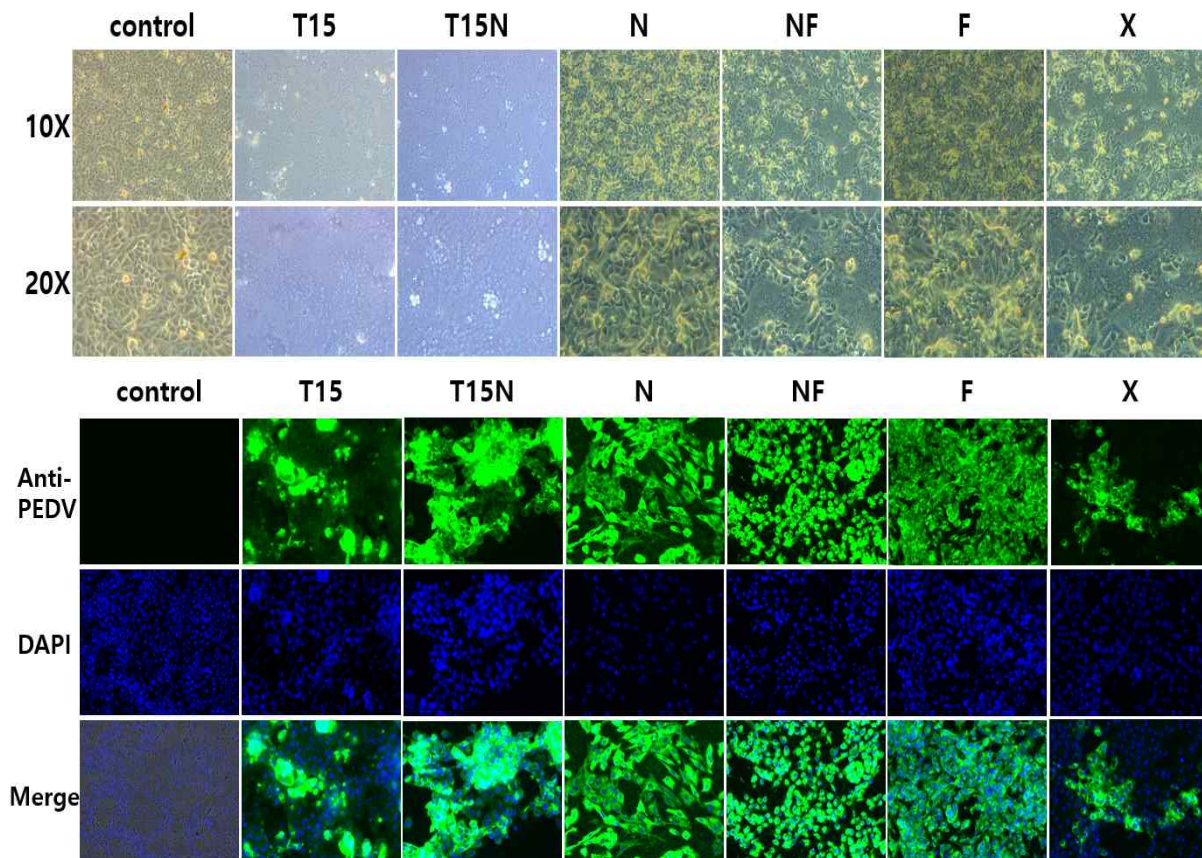


그림 . 현미경 및 형광항체법을 이용한 세포변성효과 확인 결과

- 분리된 바이러스를 6가지 배양조건으로 총 150 계대씩 배양한 결과, 최소  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상의 고역가 바이러스를 확보함
- 바이러스 계대별로 역가를 측정한 결과 70대 계대까지  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 정도의 역가를 갖는 것으로 조사되었으나 지속적인 연속계대를 통해  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml의 매우 우수한 증식성을 보인 PEDV를 확보할 수 있었음 (표 3)

표 3. 계대별 바이러스 역가측정 결과 ( $\log_{10}$ TCID<sub>50</sub>/ml)

T15		T15N		N		NF		F		X	
Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer	Passage No	Titer
10	3.5	10 (2)	4.25								
20	4.75	20 (12)	5.75								
30	6.5	30 (22)	6								
40	6.25	40 (32)	5								
50	6.75	50 (42)	6.5								
60	6.75	60 (52)	6.75								
70	5.75	70 (62)	6	67 (7)	5.25						
80	7	80 (72)	5.5	71 (11)	5.5						
90	6.75	90 (82)	6.5	87 (27)	7.75						
100	7.5	100 (92)	6.25	100 (40)	8.5	100 (37)	7.5	100 (30)	7.75	100 (31)	6.75
110	7.25	110 (102)	7.5	110 (50)	8.25	110 (47)	7.5	110 (40)	7.5	110 (41)	7.5
120	8	120 (112)	7	120 (60)	8.5	120 (57)	7	120 (50)	7.5	120 (51)	6.75
130	7	130 (122)	7.5								
140		140 (132)									
150	7.75	150 (142)	8.25	150 (90)	8.5	150 (87)	7.08	150 (80)	7.17	150 (81)	7.42

- 특히, 담즙산을 처리한 그룹과, 트립신과 담즙산을 동시에 처리한 그룹의 경우, 150계대 후  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상의 고역가를 유지하고 있어, 경구백신용 strain 후보주로 높은 가능성을 보였다. (표 4)

표 4. passage 150 바이러스 역가측정 결과 ( $\log_{10}TCID_{50}/m\ell$ )

Strains	T15	T15N	N	NF	F	X
Titer	$8.3 \pm 0.14$	$8.5 \pm 0$	$8.5 \pm 0.25$	$7.08 \pm 0.14$	$7.17 \pm 0.14$	$7.42 \pm 0.52$

2.1.2. 경구백신 후보주 (High passage) 5종에 대한 계대별 유전자 특성 확인

1) 계대별 유전자 특성 분석

○ 연속 150 계대 배양 결과, 바이러스 역가가 가장 낮았던 NF 그룹을 제외하고, 나머지 5종의 바이러스에 대하여 Spike gene에 대한 phylogenetic 분석을 실시한 결과, PEDV CKT-7 strain은 최근에 국내에서 유행하고 있는 G2b형 유전형으로 확인되었으며, 각각의 바이러스가 약독화 과정에서 S gene 상에 일부 유전자 변이가 있는 것으로 확인되었다. (그림 10)

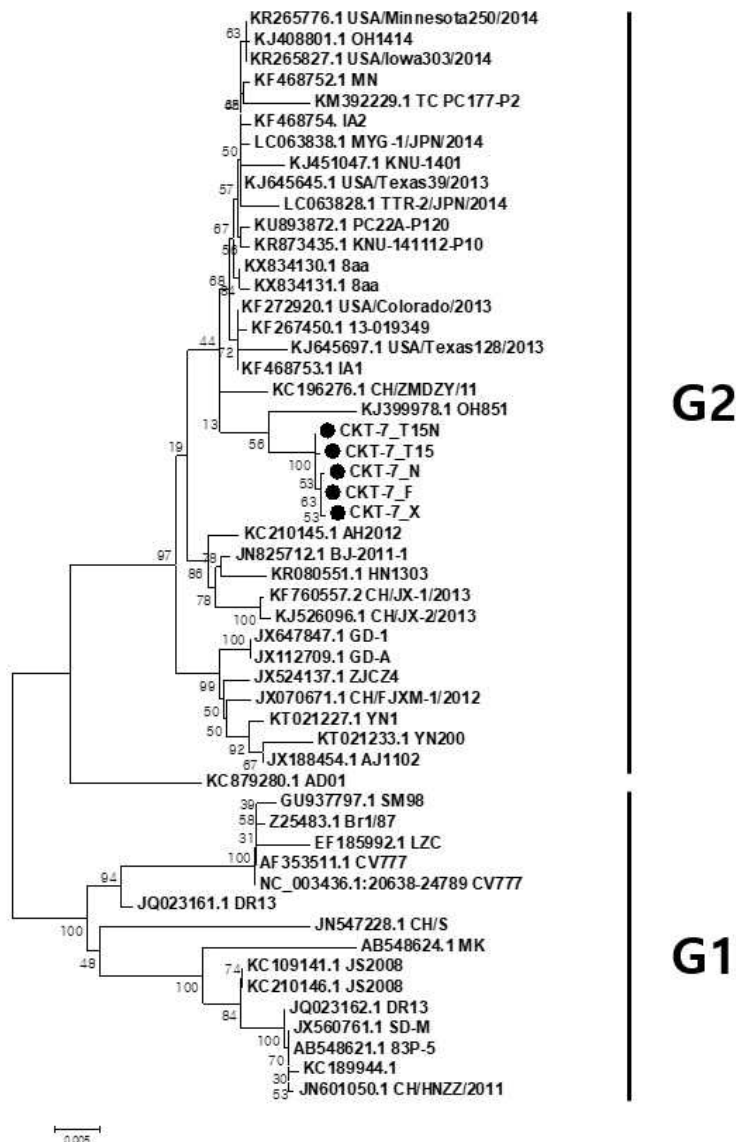


그림 10. phylogenetic tree

○ 서로 다른 약독화 방법을 적용한 5종의 PEDV에 대하여 S protein에 대한 multiple alignment를 수행한 결과, 바이러스 배양조건에 따라 spike 아미노산 서열의 일부가 변화됨을 확인하였으며, 이러한 아미노산의 변화가 PEDV의 병원성과 면역원성에 영향을 주었을 것으로 추측된다.

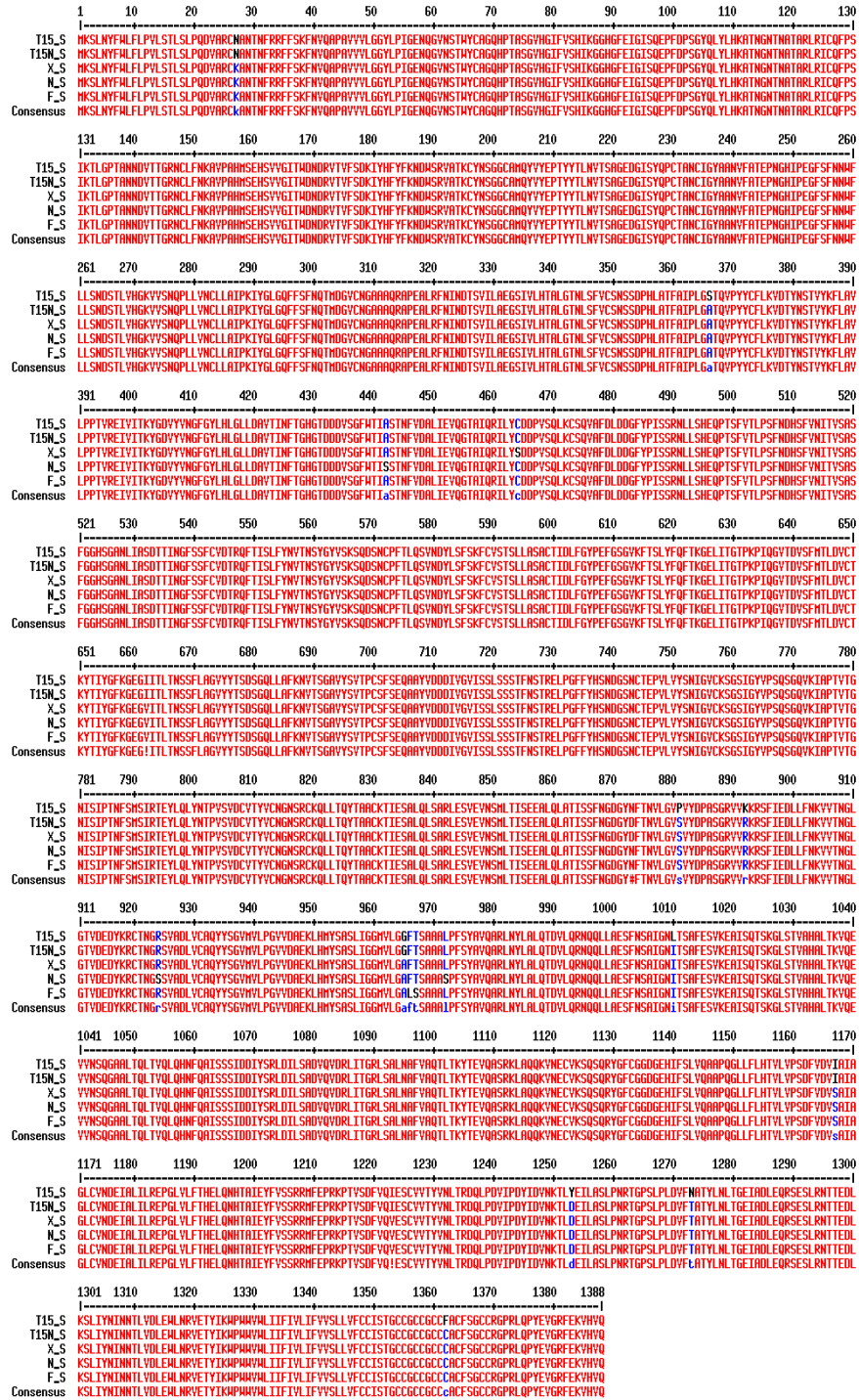


그림 11. spike protein의 아미노산 염기서열 alignment 결과

○ 이어서 5종의 PEDV 구조단백질의 (S, ORF3, E, M, N) nucleotide 및 아미노산 염기서열을 분석한 결과, 구조단백질을 구성하는 아미노산의 변화를 다수 관찰하였으며, spike protein을 포함한 구조단백질의 아미노산 변화가 바이러스 병원성 및 면역원성에 영향을 주었을 것으로 추측된다. (표 5)

표 5. 구조단백질의 nucleotide 및 아미노산 염기서열 변화

Gene	nucleotide position	amino-acid position	PEDV strains				
			T15	T15N	N	F	X
S	81	27	AAC(N)	AAC(N)	AAA(K)	AAA(K)	AAA(K)
	1096	366	TTC(S)	TGC(A)	TGC(A)	TGC(A)	TGC(A)
	1324	442	GCA(A)	GCA(A)	TCA(S)	GCA(A)	GCA(A)
	1390	464	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)	AGT(S)
	1984	662	ATC(I)	ATC(I)	GTC(V)	GTC(V)	GTC(V)
	2617	873	AAT(N)	GAT(D)	AAT(N)	AAT(N)	GAT(D)
	2641	881	CCT(P)	TCT(S)	TCT(S)	TCT(S)	TCT(S)
	2675	892	AAA(K)	AGA(R)	AGA(R)	AGA(R)	AGA(R)
	2770	924	CGC(R)	CGC(R)	AGC(S)	CGC(R)	CGC(R)
	2894	965	GGT(G)	GGT(G)	GCT(A)	GCT(A)	GCT(A)
	2898	966	TTT(F)	TTT(F)	TTT(F)	TTA(L)	TTT(F)
	2899	967	ACT(T)	ACT(T)	ACT(T)	TCT(S)	ACT(T)
	2915	972	TTG(L)	TTG(L)	TCG(S)	TTG(L)	TTG(L)
	3028	1010	TTA(L)	ATA(I)	ATA(I)	ATA(I)	ATA(I)
	3500	1167	ATT(I)	ATT(I)	AGT(S)	AGT(S)	AGT(S)
	3667	1123	ATT(I)	ATT(I)	GTT(V)	GTT(V)	GTT(V)
	3757	1253	TAT(Y)	GAT(D)	GAT(D)	GAT(D)	GAT(D)
	3818	1273	AAT(N)	ACT(T)	ACT(T)	ACT(T)	ACT(T)
	4085	1362	TTT(F)	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)	TGT(C)
	ORF3	559-560	-	GTT(V)	GTT(V)	T-T(-)	GTT(V)
563		187	GAG(E)	GAG(E)	GAC(D)	GAG(E)	GAG(E)
571		190	GAT(D)	GAT(D)	TAT(Y)	TAT(Y)	TAT(Y)
590		196	GTC(V)	GTC(V)	GTC(V)	GAC(D)	GTC(V)
592-593		197	TTT(F)	TTT(F)	TTT(F)	AGT(S)	TTT(F)
607		202	ATT(I)	GTT(V)	ATT(I)	ATT(I)	ATT(I)
E	209	70	CCT(P)	CCT(P)	CTT(L)	CCT(P)	CTT(L)
M	70	24	ATC(I)	TTC(F)	TTC(F)	TTC(F)	TTC(F)
	571	191	TCT(S)	GCT(A)	TCT(S)	TCT(S)	TCT(S)
	623	208	GTT(V)	GCT(A)	GCT(A)	GCT(A)	GCT(A)
	647-648	-	CT(-)	CAT(H)	GCT(A)	C-T(-)	GCT(A)
N	444	148	CGT(R)	CGA(R)	CGA(R)	CGT(R)	CGT(R)
	447	149	AGC(S)	AGT(S)	AGT(S)	AGC(S)	AGC(S)



## 2.2. 경구백신 후보주 4종에 대한 항체음성 자돈 병원성 평가 결과

### 2.2.1. 실험방법

서로 다른 약독화 방법을 적용하여 150계대 연속 계대한 4종의 PEDV에 대하여 5일령의 PEDV 항체음성 자돈을 이용하여 병원성을 평가하였다.

#### 1) 실험그룹

표 6. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Strains	Number
A	control	5
B	X	5
C	F	5
D	N	5
E	T15N	5

#### 2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, 각 바이러스 접종군 및 비접종 대조군에 대하여 5마리씩, 총 25마리를 공시하였다.

#### 3) 바이러스 접종 및 관찰

실험동물을 대상으로 포유자돈 1두 당 경구적으로  $10^{7.0} \sim 10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 고 역가 바이러스 접종하고 10일간 분변 및 돼지의 상태를 관찰하였다.

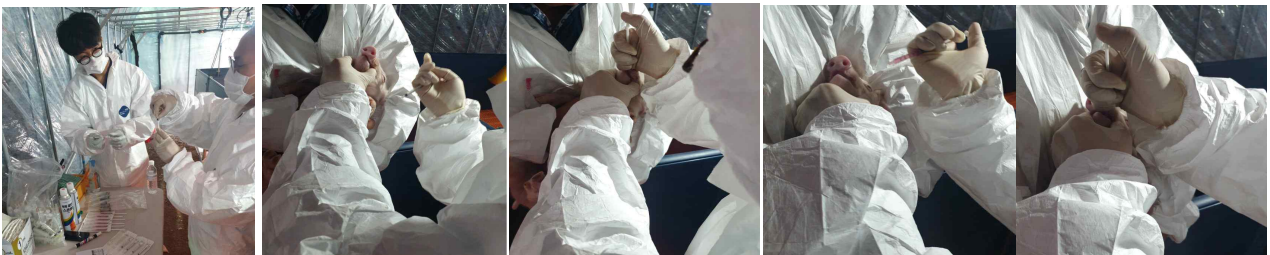


그림 12. 바이러스 준비 및 접종



그림 13. 분변 sawb 및 채혈



## 2.2.2. 실험결과

### 1) 바이러스 접종 후 임상증상(설사)

#### ○ 바이러스 접종 전

바이러스 접종 전 공시 자돈의 건강상태 및 분변은 모두 정상임을 확인하였다.

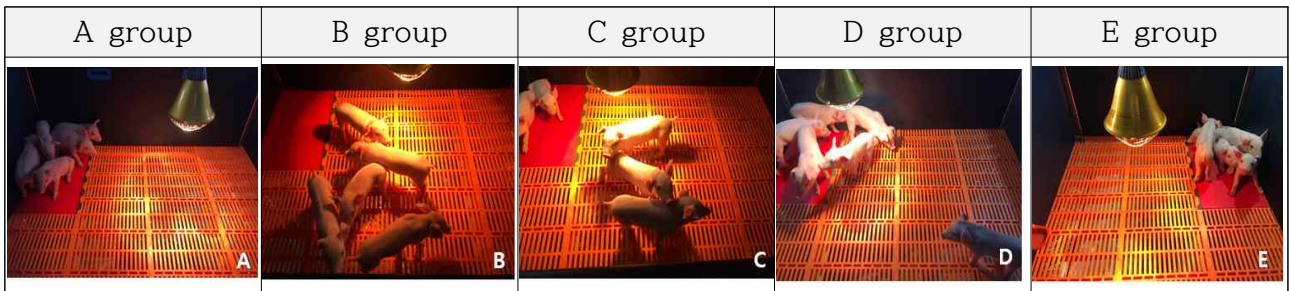


그림 14. 자돈 및 사육장

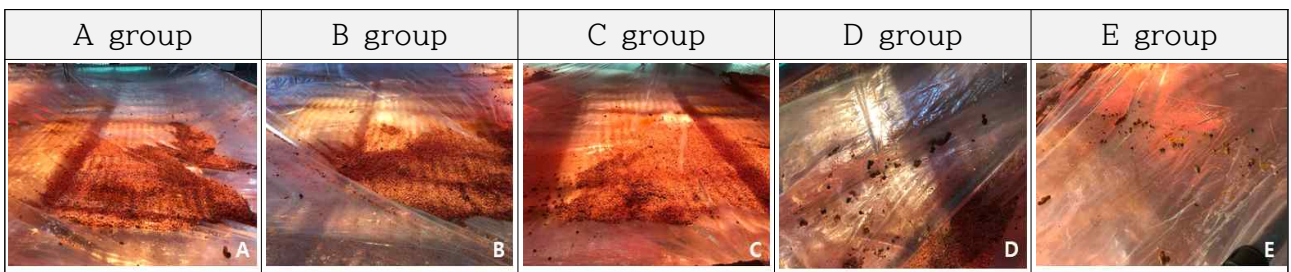


그림 15. 실험 자돈의 분변상태

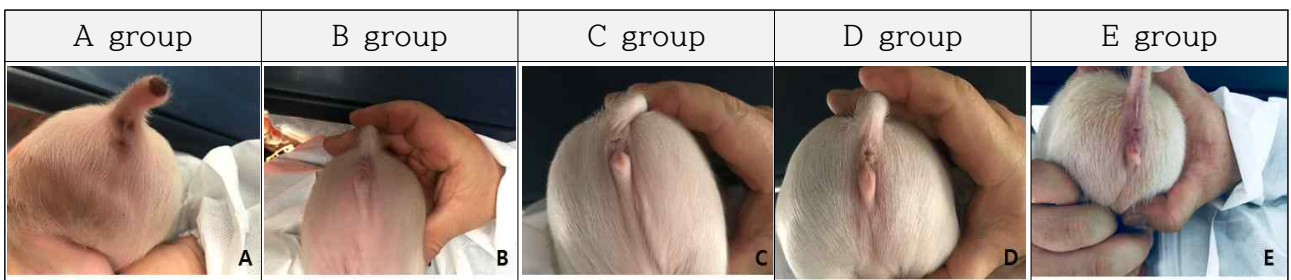


그림 16. 실험 자돈의 항문주위 관찰

#### ○ 바이러스 접종 1일 차

접종 1일차 관찰 결과, 공시자돈의 활동성이 높고, 식욕에 변화가 없었고, 자돈 사육 cage가 모두 깨끗하고, 설사하는 개체가 없었다.

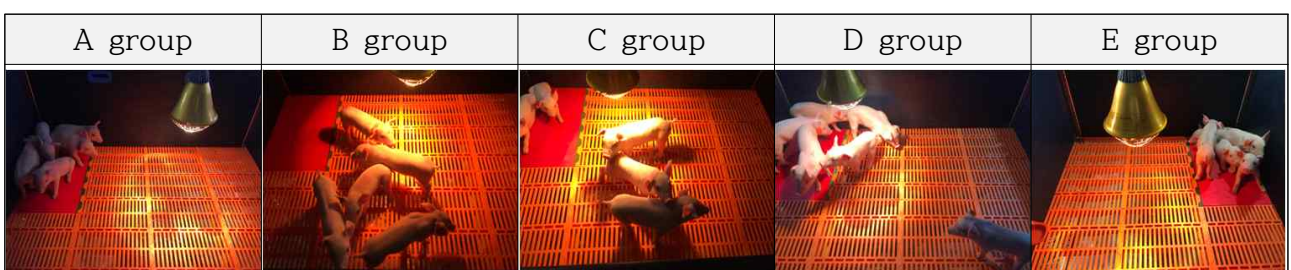


그림 17. 자돈 및 사육장

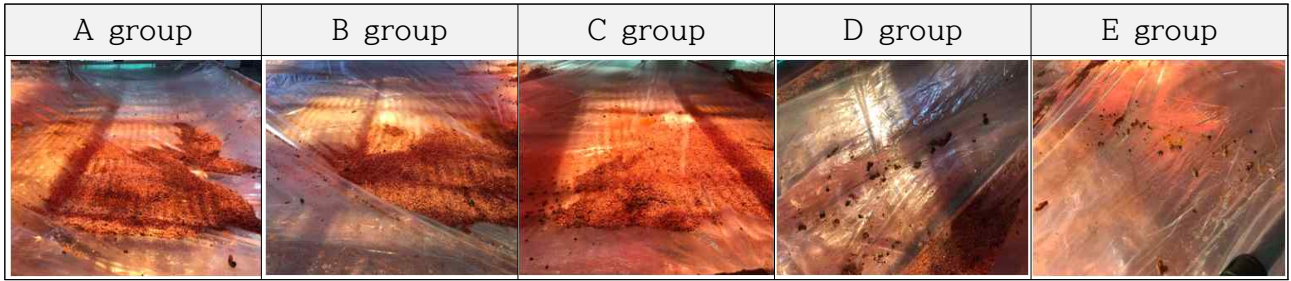


그림 18. 실험 자돈의 분변상태

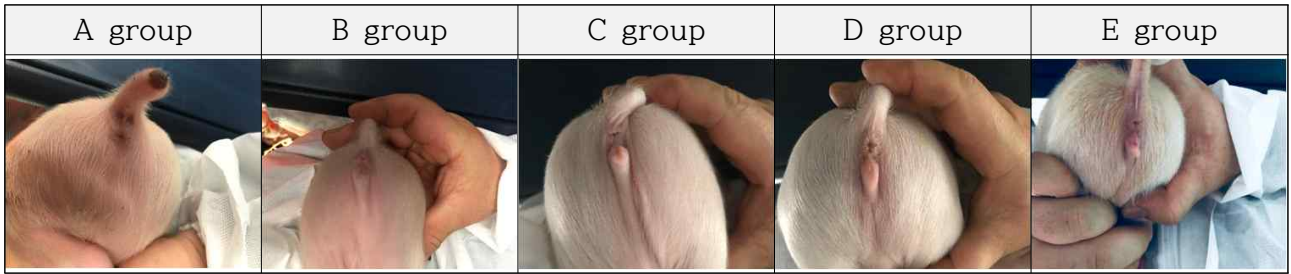


그림 19. 실험 자돈의 항문주위 관찰

1dpi

분변상태 \ 개체번호	groupA					groupB					groupC					groupD					groupE				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0 (solid)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 (pasty)																									
2 (semi-liquid)																									
3 (liquid)																									
4 (death)																									

그림 20. 설사지수 확인표

○ 바이러스 접종 2일 차

접종 2일차 관찰 결과, 그룹 A와 그룹 B에서 한 마리씩 설사 증상이 확인되었으나, 심하지 않았고, 환경적인 요인으로 판단 됨. 나머지 개체의 경우, 활동성 높고, 식욕에 변화가 없었으며, 분변 상태 정상이었음.

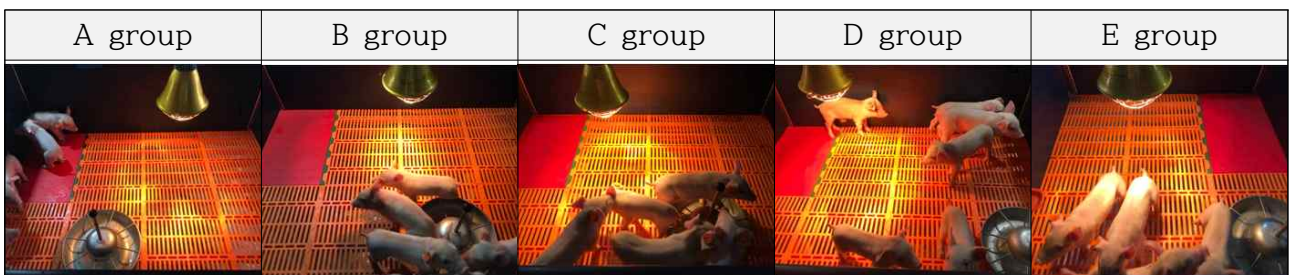


그림 21. 자돈 및 사육장



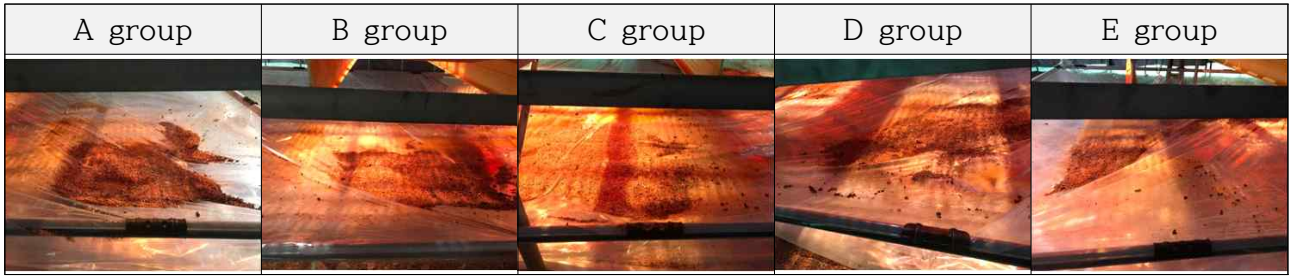


그림 22. 실험 자돈의 분변상태

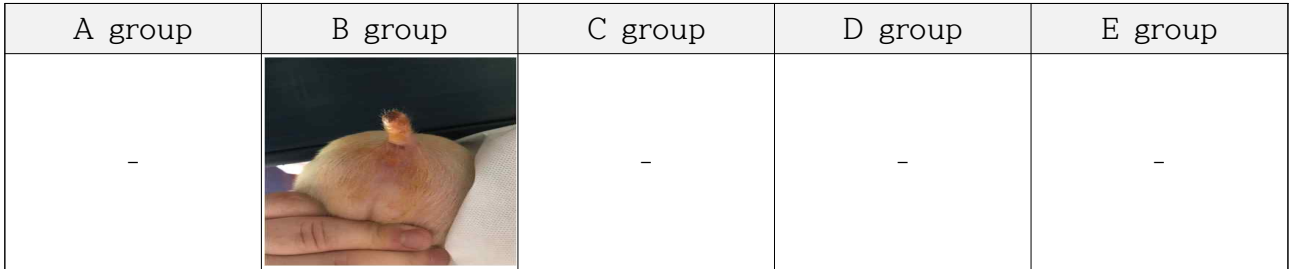


그림 23. 실험 자돈의 항문주위 관찰

2dpi

분변상태 \ 개체번호	groupA					groupB					groupC					groupD					groupE				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0 (solid)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 (pasty)		0				0																			
2 (semi-liquid)																									
3 (liquid)																									
4 (death)																									

그림 24. 설사지수 확인표

○ 바이러스 접종 3일 차

접종 3일차 관찰 결과, 그룹 A와 그룹 B에서 한 마리씩 설사 증상이 확인되었으나, 심하지 않았고, 환경적인 요인으로 판단 됨. 나머지 개체의 경우, 활동성 높고, 식욕에 변화가 없었으며, 분변 상태 정상이었음.

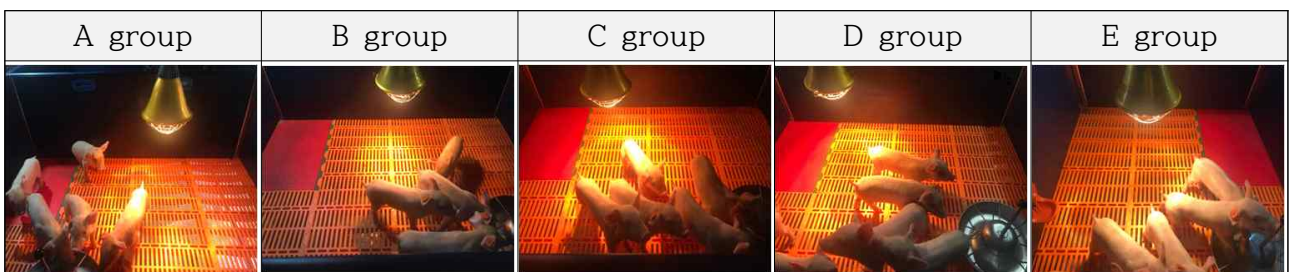


그림 25. 자돈 및 사육장

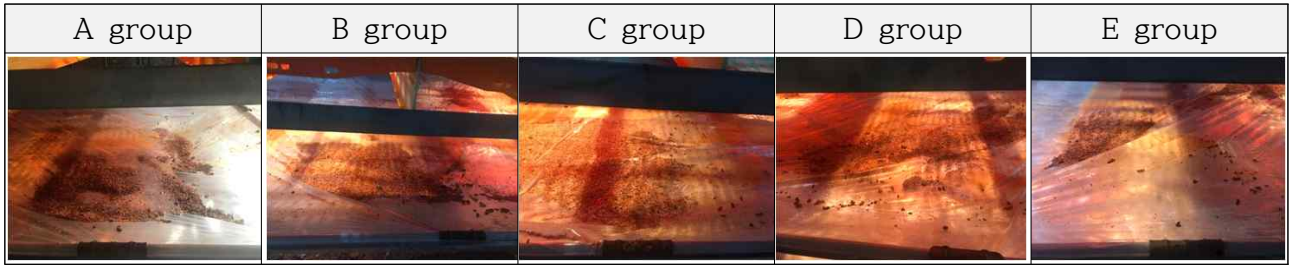


그림 26. 실험 자돈의 분변상태

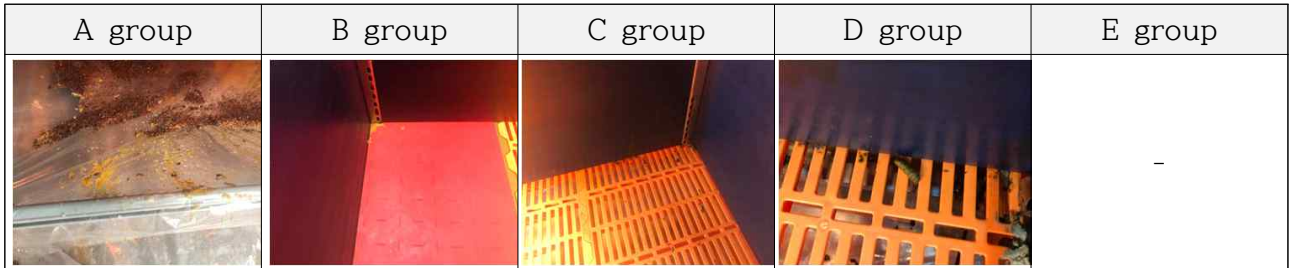


그림 27. 실험 자돈의 항문주위 관찰

3dpi

		groupA					groupB					groupC					groupD					groupE									
분변상태	개체번호	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	0 (solid)			0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1 (pasty)																															
2 (semi-liquid)		0								0																					
3 (liquid)																															
4 (death)																															

그림 28. 설사지수 확인표

○ 바이러스 접종 10일 차

접종 10일차 관찰 결과, 그룹 A에서 폐사한 개체가 3마리, 설사 개체가 2마리 있었고, 그룹 B에서 한 마리 설사 증상이 확인되었다. 그룹 A의 경우 비접종 대조군으로 환경적 요인에 의한 폐사로 판단되며, 나머지 개체의 경우, 활동성 높고, 식욕에 변화가 없었으며, 분변 상태 정상이었음.

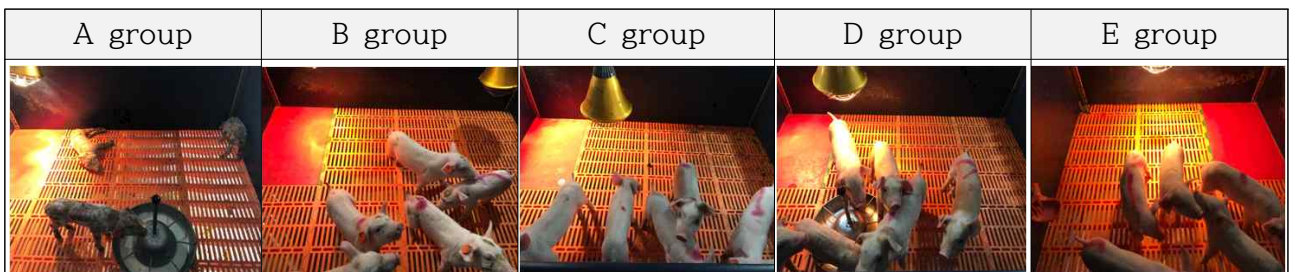


그림 29. 자돈 및 사육장

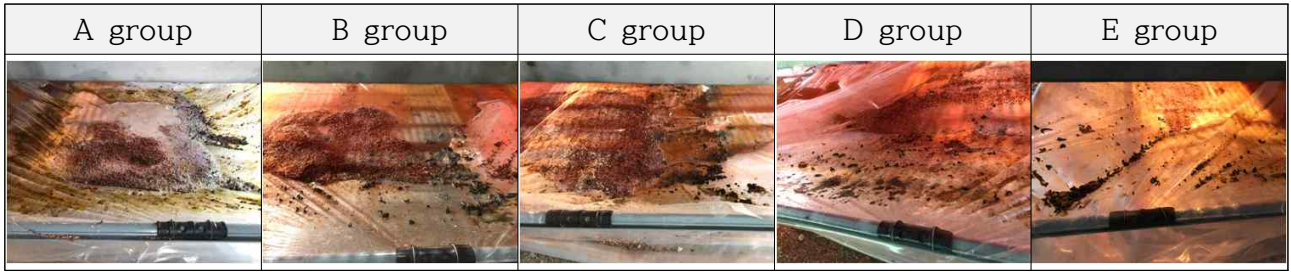


그림 30. 실험 자돈의 분변상태

10 dpi

개체번호 분변상태	groupA					groupB					groupC					groupD					groupE				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0 (solid)								0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 (pasty)																									
2 (semi-liquid)										0															
3 (liquid)				0	0																				
4 (death)	0	0		0																					

그림 31. 설사지수 확인표

2) 바이러스 접종 후 폐사율

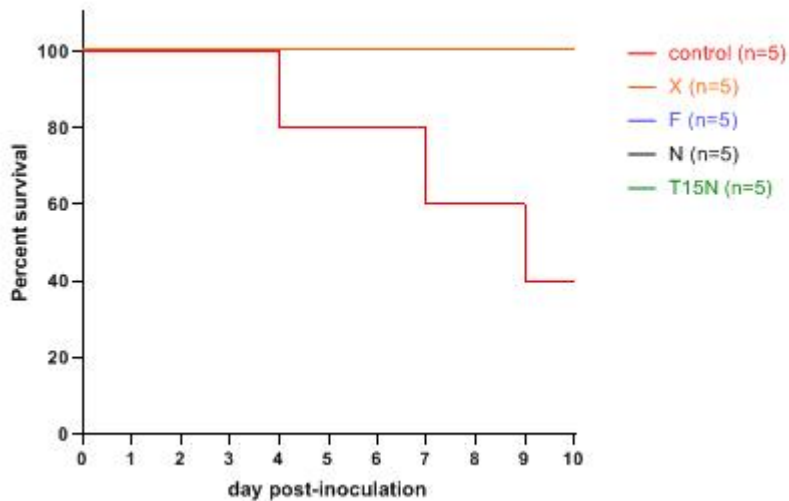


그림 32. 바이러스 접종 후 폐사율

4종의 백신 후보주에 대한 병원성 평가 결과, 바이러스 접종 후 10일 동안 폐사한 개체는 없었다. (다만, 비접종 대조군에서 환경적인 요인으로 5마리 중 3마리 폐사 있었음) 또한, 약독화 전 parent strain의 경우, 5일령 향체음성 자돈에 접종 시, 3일 이내에 100% 폐사한 결과를 보임



### 3) 바이러스 접종 후 설사 증상 유무

4종의 백신 후보주에 대한 병원성 평가 결과, 바이러스 접종 후 10일 동안 PEDV CKT-7\_F (Group C)와 PEDV CKT-7\_N (Group D) 접종 그룹의 경우, 전 실험 기간 동안 심한 설사 증상이 없었음은 물론 어떠한 임상증상도 보이지 않아 계대 배양을 통해 약독화가 완료된 것을 확인하였다.

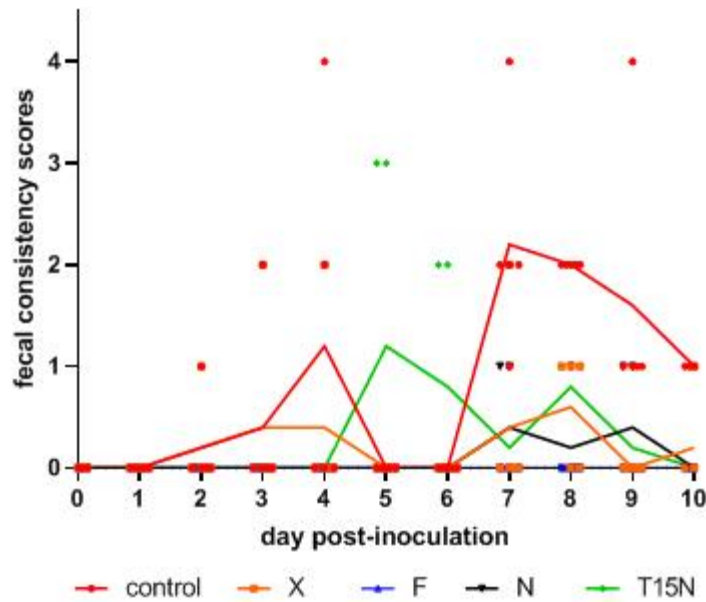


그림 33. 바이러스 접종 후 그룹별 설사지수

group	inoculum	No. of pigs	mortality rate [% (no/total)]	severe diarrhea rate** [% (no/total)]	clinical symptoms	Peak fecal virus shedding titer (log <sub>10</sub> copies/ml)
1	Mock	5	60 (3/5)*	0 (0/5)	diarrhea : 3-8 dpi	
2	CKT-7 X	5	0 (5/5)	0 (0/5)	diarrhea : 3-7 dpi	
3	CKT-7 F	5	0 (5/5)	0 (0/5)	No diarrhea	
4	CKT-7 N	5	0 (5/5)	0 (0/5)	No diarrhea	
5	CKT-7 T15N	5	0 (5/5)	40 (2/5)	diarrhea : 5-8 dpi	

\* non-PEDV related

\*\* Fecal consistency score : 0, solid; 1, pasty; 2, semi-liquid; 3, liquid; 4, death. Fc score of 3 were regarded as severe diarrhea

그림 34. 바이러스 접종 후 임상증상 종합표

### 2.2.3. 경구백신 후보주 선발 결과

야외에서 분리된 G2b형 PEDV인 PEDV CKT-7 strain에 대하여 서로다른 약독화 방법에 따른 4종의 백신 후보주를 1차 선발하였고, 이를 활용하여 5일령 PEDV 항체음성 자돈에 대한 병원성을 평가한 결과, 약독화 과정에서 담즙산을 사용한 PEDV CKT-7\_N strain과 혈청을 사용한 PEDV CKT-7\_F strain이 접종 후 폐사나 임상증상 없이 완전히 약독화 된 것으로 확인하였고, 이 중 PEDV CKT-7\_N의 경우, PEDV CKT-7\_F 보다 세포에서 10배 이상 증식성이 우수하여 백신 후보주로서 가장 적합한 것으로 판단되며, 이를 최종 백신 후보주로 선정하였다.

## 2.3. PEDV CKT-7\_N strain (p150)에 대한 항체음성 자돈 안전성 평가 결과

### 2.3.1. 실험 방법

PEDV CKT-7\_N strain (p150)의 병원성 확인 실험 시에 확보된 자돈의 장으로 10% 유제액을 만들어 5일령의 PEDV 항체음성 자돈에 경구로 투여하고, 병원성 유무를 확인하였으며, (생체계대 1, BP1) 동시에 비접종 동거돈을 추가하여 back passage 과정에서의 바이러스 shedding 유무를 확인하였다.

#### 1) 실험그룹

표 7. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Number	비고
CKT-7_N (p150) BP1	3	10% 장 유제액, 경구 투여
동거돈	3	접종 시 동거사육
비접종 대조군	3	-

#### 2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, PEDV CKT-7\_N (p150) 접종 자돈의 장 유제액 접종 그룹 3마리, 동거사육 그룹 3마리 및 비접종 대조군 3마리씩 총 9마리를 공시하였다.

#### 3) 바이러스 접종 및 동거사육

Back passage 그룹에 대하여 (BP1) RT-PCR로 PEDV 양성으로 확인된 10% 장 유제액 1 ml씩을 경구로 접종 후, 동수의 PEDV 항체음성 자돈을 동거사육하면서 10일간 관찰하였다.

#### 4) 샘플링 및 조직병리학적 검사

바이러스 접종 후 10일 동안 임상증상(설사)을 관찰하였고, 매일 항문 swab을 실시하여 PCR법으로 바이러스 shedding 유무를 확인하였다. 실험 기간 종료 후, 부검하여 위장 병변을 확인하고, 십이지장, 공장 및 회장을 10% 포르말린에 고정하여 H&E 염색을 실시하였다.

2.3.2. 실험 결과

1) 임상증상 관찰 및 바이러스 shedding 확인 결과

표 8. 그룹별 임상증상 관찰결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무											
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일	
CKT-7_N (p150) BP1	T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T3	N	N	N	N	D	D	N	N	N	N	N	N
동거돈	T4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	T7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T8	N	N	N	N	N	N	N	D	D	N	N	N
	T9	N	N	N	N	N	N	N	D	D	N	N	N

\* N : 이상없음, D : 설사

장 유제액 접종 후, 임상증상 관찰 결과, 1마리 개체에서 접종 4~5일째에 경미한 설사 증상이 확인되었으나 이내 회복하였고, 비접종 대조군의 경우에도 실험 개시 후 7~8일 시점에 2마리 개체에서 경미한 설사 증상이 관찰되었으나 곧 회복되었다.

표 9. 그룹별 바이러스 shedding 결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 바이러스 배출 유무											
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일	
CKT-7_N (p150) BP1	T1	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	T2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
동거돈	T4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	T5	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	T6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
비접종 대조군	T7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	T8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	T9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-



장 유제액 접종군과 동거돈 그룹 각 개체에 대한 virus shedding 확인 결과, 접종 2~5일차 분변에서 PEDV가 검출되어 분변을 통한 바이러스 배출 및 동거돈 감염이 있었음이 확인되었다. 또한, 비접종 대조군에서도 접종 7~9일차 분변에서 PEDV가 검출되었다.

2) 조직병리학적 검사 결과

○ 부검 소견



그림 35. 안락사 후 부검 사진 (접종 10일 후)

비접종 대조군의 경우, 일시적으로 설사 증상을 보였던 개체에서 소장 및 대장장벽이 약간 얇아진 경향은 있으나 정상 소견에 가까웠고, 장 유제액 접종군과 동거돈 그룹의 경우에도 분변으로 바이러스 shedding은 확인되었지만, 소장과 대장 모두 비교적 정상 소견을 보였다.



○ 조직병리학적 검사 결과

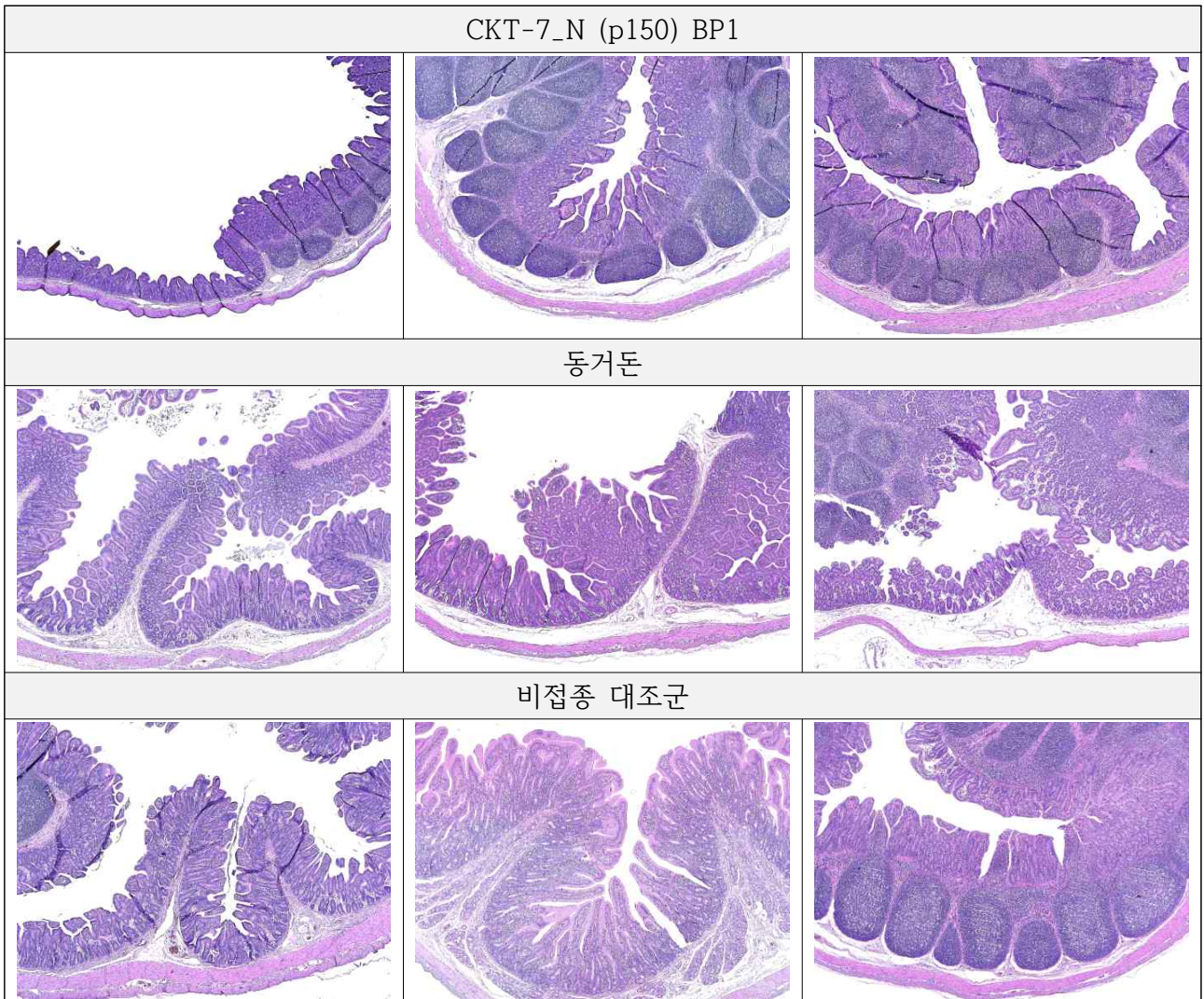


그림 36. 병리조직학적 소견 (H&E 염색)

장 유제액 접종군 중 1마리에서 용모위축 소견이 확인되었고, 장 유제액 접종군 나머지 2마리와 동거돈 및 비접종 대조군 모든 개체는 정상 소견으로 확인되었다.

2.3.3. PEDV CKT-7\_N strain (p150)에 대한 항체음성 자돈 안전성 평가 결론

연속 150계대 배양을 통해 약독화가 확인된 PEDV CKT-7\_N strain의 1차 병원성 복귀 실험 결과, 장 유제액 접종 그룹 중 1마리에서 경미한 설사 증상이 확인되었고, 해당 개체에 대한 병리조직학적 검사 결과, 용모가 위축되는 소견이 있었다. 또한, 장 유제액 접종 후 2~5일 차에 장 유제액 접종군과 동거돈 모두에서 분변 내에 PEDV 항원이 검출되었는데, 이러한 결과는 기존 병원성 실험 결과와 너무 상이하어 생체계대 1회만으로 PEDV CKT-7\_N strain (p150)의 병원성이 복귀했다기 보단, 다른 환경적 요인에서 원인을 찾아야 할 것이다. 실제로, 제한적 기간 내에 여러 가지 실험을 동시에 수행하려다 보니, 동일 실험 공간 내에서 다른 PEDV에 대한 병원성 평가가 동시에 수행되고 있었고, 해당 바이러스의 경우 약독화가 덜 되어 일부 병원성이 확인된 결과가 있었다. 결과적으로 해당 바이러스의 교차오염으로 인하여 비접종 대조군을 포함한 실험 그룹 모두가 영향을 받은 것으로 보인다.

## 2.4. PEDV CKT-7\_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 1차 안전성 평가 결과

### 2.4.1. 실험 방법

앞서, PEDV CKT-7\_N strain (p150)의 병원성 복귀 실험 결과, 다른 PEDV에 의한 교차오염이 의심되긴 했지만, 일부 접종 그룹과 동거돈에서 설사 증상 등이 확인됨에 따라, 백신 후보주를 좀 더 확실히 약독화 시키기 위하여 27회를 추가 계대배양하였고, 이를 통해 얻어진 PEDV CKT-7\_N strain (p177)에 대한 병원성 실험을 아래와 같이 수행하였다.

#### 1) 실험그룹

표 10. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Number	비고
CKT-7_N (p177)	3	$10^{8.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml, 경구투여
비접종 대조군	3	-

#### 2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, PEDV CKT-7\_N (p177) 바이러스 경구접종 그룹 3마리 및 비접종 대조군 3마리씩 총 6마리를 공시하였다.

#### 3) 바이러스 접종

바이러스 접종 그룹에 대하여  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 농도 이상으로 확인된 PEDV CKT-7\_N (p177) 바이러스 1 ml씩을 경구로 접종 후, 10일간 관찰하였다.

#### 4) 샘플링 및 조직병리학적 검사

바이러스 접종 후 10일 동안 임상증상(설사)을 관찰하였고, 매일 항문 swab을 실시하여 PCR법으로 바이러스 shedding 유무를 확인하였다. 실험 기간 종료 후, 부검하여 위장 병변을 확인하고, 십이지장, 공장 및 회장을 10% 포르말린에 고정하여 H&E 염색을 실시하였다.

2.4.2. 실험 결과

1) 임상증상 관찰 및 바이러스 shedding 확인 결과

표 11. 그룹별 임상증상 관찰결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무											
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일	
CKT-7_N (p177)	T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	T3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	C1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	C2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	C3	N	N	N	폐사								

\* N : 이상없음, D : 설사

바이러스 접종 후 임상증상 관찰 결과, 백신 접종군은 시험 기간 내내 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었고, 비접종 대조군의 경우 3일째에 환경적 요인으로 1마리가 폐사되긴 하였지만, 나머지 2마리는 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다.



그림 37. 바이러스 접종 6일차 항문 사진

표 12. 그룹별 바이러스 shedding 결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 바이러스 배출 유무											
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일	
CKT-7_N (p177)	T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
비접종 대조군	C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C3	-	-	-	폐사								



바이러스 접종군과 비접종 그룹 각 개체에 대한 virus shedding 확인 결과, 모든 개체의 분변에서 PEDV가 검출되지 않았다.

2) 조직병리학적 검사 결과

○ 부검 소견

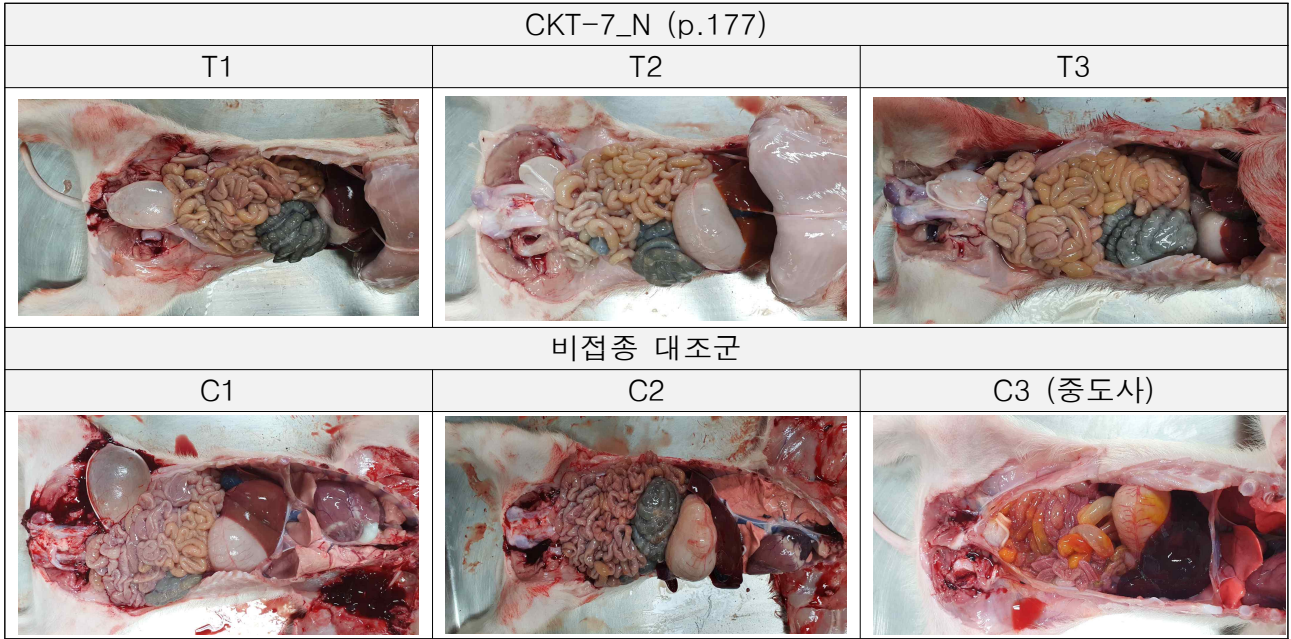


그림 38. 안락사 후 부검 사진 (접종 10일 후)

비접종 대조군 중 중도사한 1개 개체를 제외하고, 백신 접종군과 나머지 비접종 대조군은 소장과 대장 모두 정상 소견을 보였다.

○ 조직병리학적 검사 결과

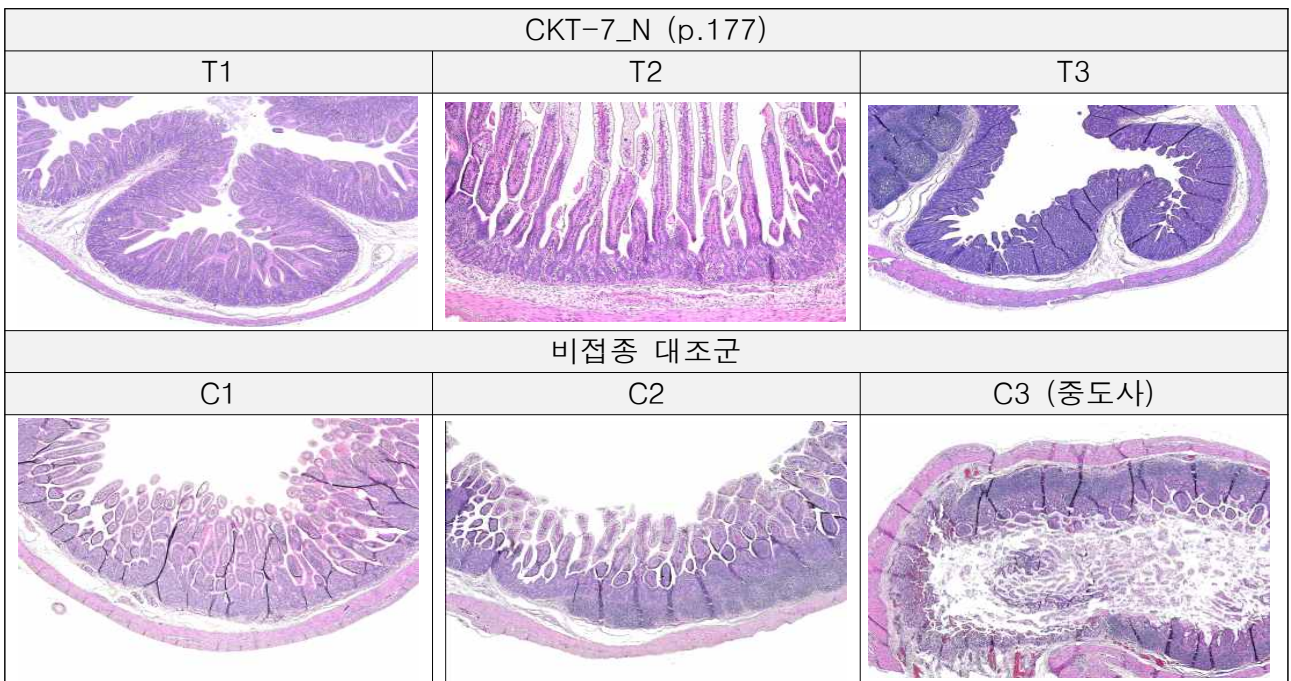


그림 39. 병리조직학적 소견 (H&E 염색)

비접종 대조군 중 중도사한 1개 개체의 경우, (C3) 용모 손상 및 괴사 소견이 확인되며, 백신 접종군과 나머지 비접종 대조군은 정상 소견으로 확인되었다.

### 2.4.3. PEDV CKT-7\_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 1차 안전성 평가 결론

담즙산 처리를 통해 연속 177 계대를 수행한 PEDV CKT-7\_N strain (p177)의 병원성 확인 실험 결과, 5일령의 PEDV 항체음성 자돈에  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/dose의 고역가 바이러스를 경구로 투여했음에도 이로 인한 어떠한 임상증상 발현이나 바이러스 shedding도 없었으며, 바이러스 접종 10일 후 부검하여 위장병변과 병리조직학적 병변 유무를 확인한 결과에서도 정상 소견을 보여, 바이러스가 완전히 약독화 되었음을 확인하였다.

### 2.5. PEDV CKT-7\_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 2차 안전성 평가 결과

#### 2.5.1. 실험 방법

PEDV CKT-7 strain (약독화 전 parent strain)과의 병원성 비교평가를 통해 경구백신용 후보주로 최종 선정된 PEDV CKT-7\_N strain (p177)의 안전성을 재확인하였다.

#### 1) 실험그룹

표 13. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Number	비고
CKT-7	4	장 유제액, 경구투여
CKT-7_N (p177)	3	$10^{8.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml, 경구투여
비접종 대조군	3	-

#### 2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, PEDV CKT-7 바이러스 (바이러스 감염 장유제액) 접종그룹 4마리, PEDV CKT-7\_N (p177) 바이러스 경구접종 그룹 3마리 및 비접종 대조군 3마리씩 총 10마리를 공시하였다.

#### 3) 바이러스 접종

약독화 전 parent strain 접종 그룹의 경우, 바이러스 분리 당시 사용된 장 유제액을 그대로 경구로 투여하였고, 약독화 바이러스 접종 그룹에 대해서는  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 농도 이상으로 확인된 PEDV CKT-7\_N (p177) 바이러스 1 ml씩을 경구로 접종 후, 7일간 관찰하였다.

#### 4) 샘플링 및 조직병리학적 검사

바이러스 접종 후 7일 동안 임상증상(설사)을 관찰하였고, 매일 항문 swab을 실시하여

Real-time PCR법으로 바이러스 shedding 유무 및 정도를 확인하고, 실험 기간 종료 후, 부검하여 위장 병변을 추가로 확인하였다.

### 2.5.2. 실험 결과

#### 1) 임상증상 관찰 및 바이러스 shedding 확인 결과

표 14. 그룹별 임상증상 관찰결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무								
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	
CKT-7 (Parent strain)	P1	N	D	D	D	폐사				
	P2	N	D	D	D	D	D	폐사		
	P3	N	D	D	D	D	D	D	폐사	
	P4	N	D	D	D	D	D	D	폐사	
CKT-7_N (p177)	T1	N	N	N	N	N	N	N	N	
	T2	N	N	N	N	N	N	N	N	
	T3	N	N	N	N	N	N	N	N	
비접종 대조군	C1	N	N	N	N	N	N	N	N	
	C2	N	N	폐사						
	C3	N	N	N	N	N	N	N	N	

\* N : 이상없음, D : 설사



그림 40. 바이러스 접종 3일차 항문 사진

바이러스 접종 후 임상증상 관찰 결과, 야외에서 분리된 CKT-7 parent strain의 경우, 접종 후 1일째부터 심한 설사 증상을 보이기 시작하여 4일 이후부터 폐사 개체가 발생하였고, 7일째에 모든 개체가 폐사하였다. 반면, 약독화 바이러스 접종 그룹과 비접종 대조군의 경우, (1마리는 접종 2일째 중도사) 시험 기간 내내 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. (접종 3일 차 항문 사진을 보면, CKT-7 parent strain 접종 개체들의 경우, 심한 설사로 인하여 항문 및 둔부가 젖어있고, 나머지 개체들의 경우, 깨끗한 상태를 유지하고 있다)

표 15. 그룹별 바이러스 shedding 결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 바이러스 배출 유무								
		0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	
CKT-7 (Parent strain)	P1	-	-	+	+	폐사				
	P2	-	-	+	+	+	+	폐사		
	P3	-	-	+	+	+	+	+	폐사	
	P4	-	-	+	+	+	+	+	폐사	
CKT-7_N (p177)	T1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	T2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	T3	-	-	-	-	-	-	-	-	
비접종 대조군	C1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C2	-	-	폐사						
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-	

Group	Inoculum	Route	No. of pigs	Mortality rate [% (no/total)]	Severe diarrhea rate* [% (no/total)]	Clinical symptoms	Virus shedding	Peak fecal virus shedding titer [ $\log_{10}$ copies/ul]; dpi
1	CKT-7 p0	Oral	4	100 (4/4)	100 (4/4)	Severe	Started at 2 dpi	4.03 ± 1.38, 4
2	Negative	Oral	3	33.3 (1/3)**	0 (0/3)	No diarrhea	N/D***	NA****
3	CKT-7 N	Oral	3	0 (0/3)	0 (0/3)	No diarrhea	N/D	NA

\* Fecal consistency score : 0, solid; 1, pasty; 2, semi-liquid; 3, liquid; 4, death. Fc score of 3 were regarded as severe diarrhea  
 \*\* Non-related PEDV  
 \*\*\* None detection  
 \*\*\*\* Not available

그림 41. 바이러스 접종 후 임상증상 종합표

야외에서 분리된 CKT-7 parent strain 그룹 각 개체에 대한 virus shedding 확인 결과, 장 유제액 접종 2일차부터 모든 개체의 분변에서 PEDV가 검출되기 시작하여 폐사 전 까지 지속적인 바이러스 shedding이 이루어진 반면, (최대 바이러스 역가는  $10^{4.03}$  copies/ $\mu$ l, 4 dpi) 약독화 바이러스 접종 그룹과 비접종 대조군의 경우, 모든 개체의 분변에서 PEDV가 검출되지 않았다.



2) 조직병리학적 검사 결과

○ 부검 소견

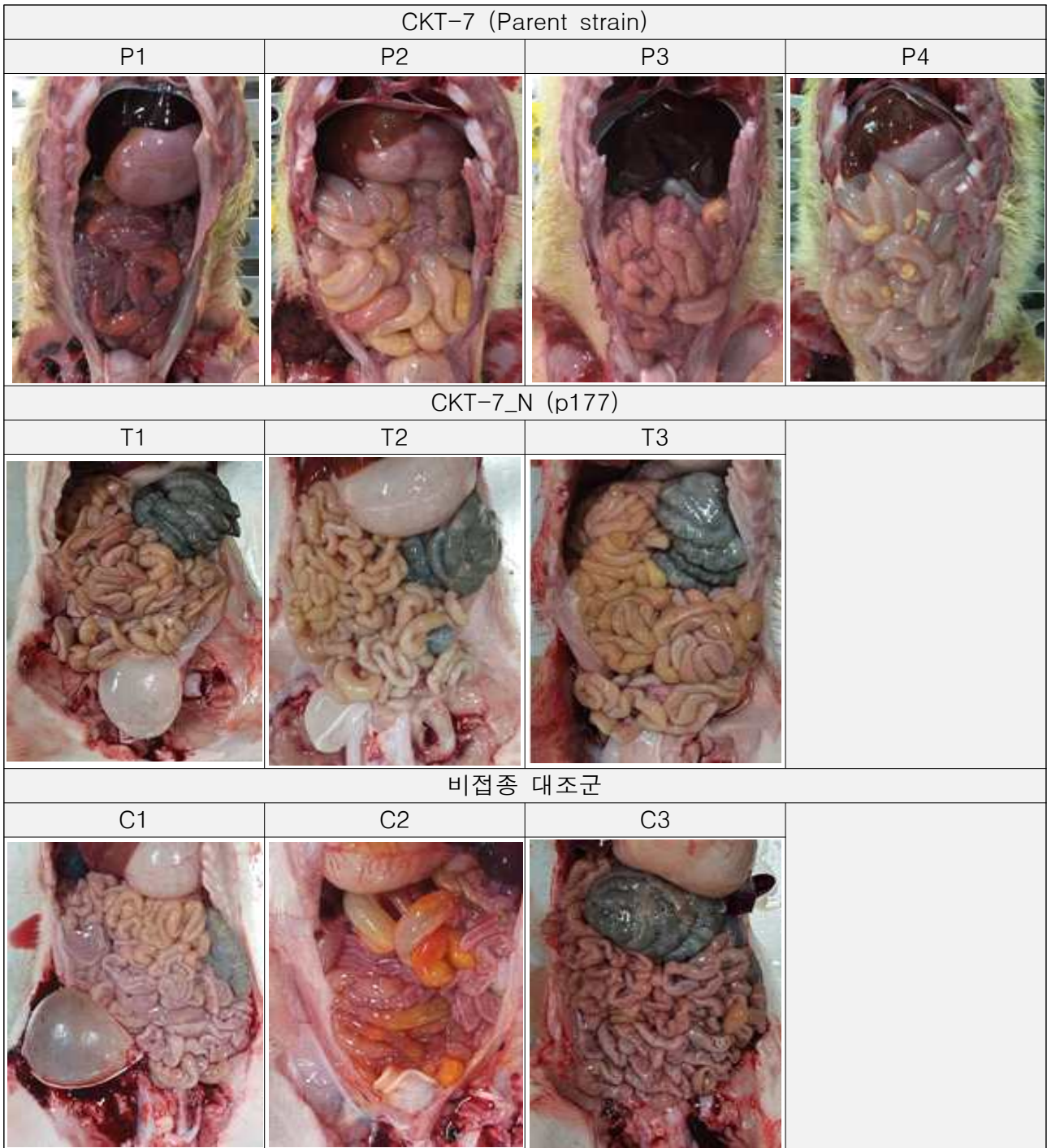


그림 42. 안락사 후 부검 사진 (접종 7일 후)

CKT-7 parent strain 접종 그룹의 경우, 부검 시 소장벽이 얇아지고, 장 내 수양성 액체가 총만한 전형적인 PEDV 감염 소견을 보였고, 중도사한 비접종 대조군 1마리를 제외한 나머지 개체들의 경우, 정상적인 소장 형태가 확인되었다.

### 2.5.3. PEDV CKT-7\_N strain (p177)에 대한 항체음성 자돈 2차 안전성 평가 결론

PEDV CKT-7 parent strain의 경우, 장 유제액 형태로 PEDV 항체음성 5일령 자돈에 접종 시, 심각한 설사증상과 함께 접종 7일 이내 100% 폐사하는 강한 병원성을 보여준 반면, 담즙산 처리를 통해 연속 177 계대를 수행한 PEDV CKT-7\_N strain (p177)의 경우, 5일령의 PEDV 항체음성 자돈에  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/dose의 고역가 바이러스를 경구로 투여했음에도 이로 인한 어떠한 임상증상 발현이나 바이러스 shedding도 없었으며, 바이러스 접종 7일 후 부검하여 위장병변과 병리조직학적 병변 유무를 확인한 결과에서도 정상 소견을 보여, 바이러스가 완전히 약독화 되었음을 다시 한 번 확인하였다.

## 2.6. PEDV CKT-7\_N strain (p177)에 대한 병원성 복귀 시험 결과

### 2.6.1. 실험 방법

경구백신용 후보주로 최종 선정된 PEDV CKT-7\_N strain (p177)의 병원성 복귀 유무를 확인하기 위하여 2차 병원성 평가 시 확보된 장 유제액을 이용하여 PEDV 항체 음성의 5일령 포유자돈을 대상으로 생체계대 안전성을 확인하였다.

#### 1) 실험그룹

표 16. 5일령 자돈 실험 그룹

Group	Number	비고
CKT-7_N (p177) BP 1	5	10% 장 유제액, 경구 투여
비접종 대조군	3	-

#### 2) 실험동물

PED 바이러스에 대하여 항체음성으로 확인된 5일령 포유자돈을 실험을 사용하였으며, PEDV CKT-7\_N (p177) 감염 장 유제액 접종그룹 5마리 및 비접종 대조군 3마리씩 총 8마리를 공시하였다.

#### 3) 바이러스 접종

Back passage 그룹에 대하여 (BP1) RT-PCR로 PEDV 양성으로 확인된 10% 장 유제액 1 ml씩을 경구로 접종 후, 14일간 관찰하였다.

#### 4) 샘플링 및 조직병리학적 검사

바이러스 접종 후 14일 동안 임상증상(설사)을 관찰하였고, 매일 항문 swab을 실시하여 PCR법으로 바이러스 shedding 유무를 확인하였으며, 실험 기간 종료 후, 부검하여 위장 병변을

추가로 확인하였다.

5) 2회 생체계대 (BP 2) 샘플 확보

PEDV CKT-7\_N (p177) 감염 장 유제액 접종그룹 중 2마리를 접종 5일 후에 안락사시켜 장 조직을 확보하였다.

2.6.2. 실험 결과

1) 장 유제액 내 PED 바이러스 유무 확인

장 유제액을 이용한 병원성 복귀 실험에 앞서, 확보된 장 유제액 내에 PEDV가 포함되어 있는지를 인트론 사의 “i-TGE/PED Detection kit”를 사용하여 RT-PCR법으로 분석하였으며, 그림과 같이 PEDV가 감염되어 있음을 확인하였다. (다만, 동일한 장 유제액을 세포에 접종하여 바이러스 함량을 측정한 결과에서는 바이러스가 검출되지 않았다)

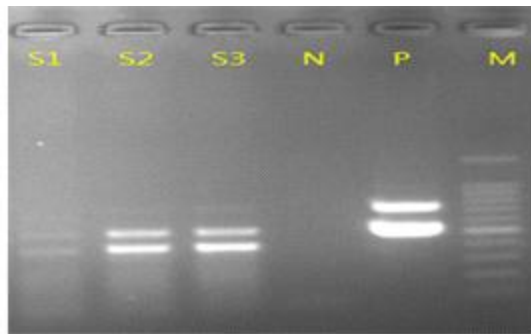


그림 43. 장 유제액에 (S1~S3) 대한 PEDV PCR 결과

2) 임상증상 관찰 및 바이러스 shedding 확인 결과

표 17. 그룹별 임상증상 관찰결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 임상증상 발현 유무															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
CKT-7_N (p177) BP1	T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	T3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	BP-2	N	N	N	N	N	N										
	BP-2	N	N	N	N	N	N										
비접종 대조군	C1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	C2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	C3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

\* N : 이상없음, D : 설사

바이러스 접종 후 임상증상 관찰 결과, 장 유제액 접종군과 비접종 대조군 모두 시험 기간 내내 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. (접종 6일차 항문 사진을 보면, 모든 개체들이 깨끗한 상태를 유지하고 있음)

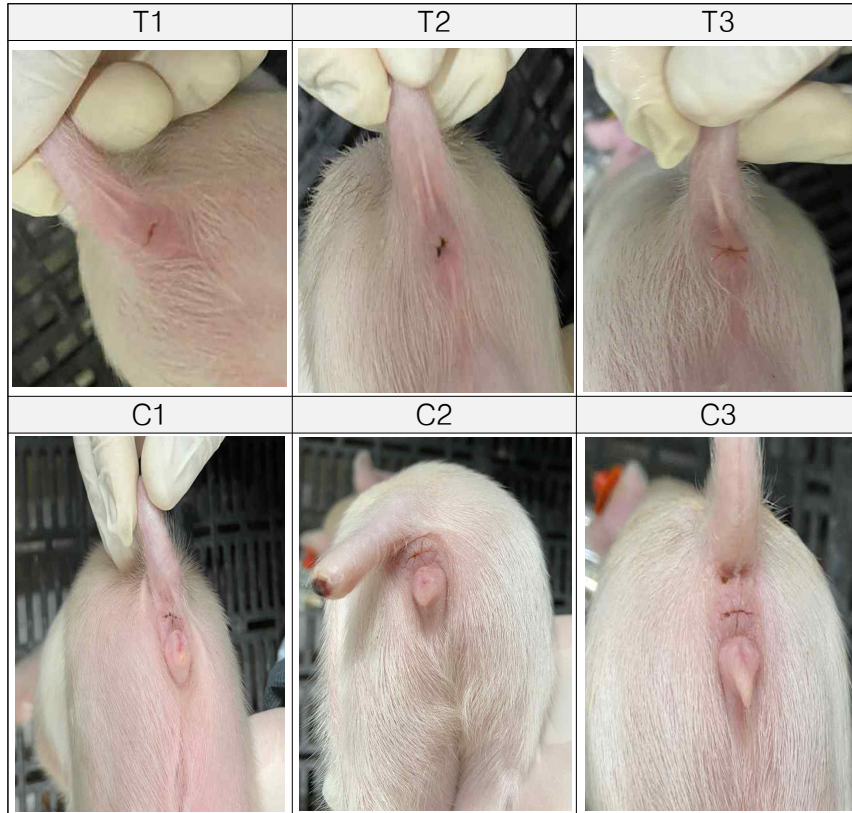


그림 44. 바이러스 접종 6일차 항문 사진

표 18. 그룹별 바이러스 shedding 결과

그룹	개체	접종 후 경과일별 바이러스 배출 유무														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CKT-7_N (p177) BP1	T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BP-1	-	-	-	-	-	-									
	BP-2	-	-	-	-	-	-									
비접종 대조군	C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

장 유제액을 접종한 그룹 각 개체에 대한 virus shedding 확인 결과, 모든 개체에서 전 실험 기간 동안 분변으로 PEDV가 전혀 배출되지 않았으며, 비접종 대조군 또한 동일한 결과였다.



### 3) 조직병리학적 검사 결과

#### ○ 부검 소견

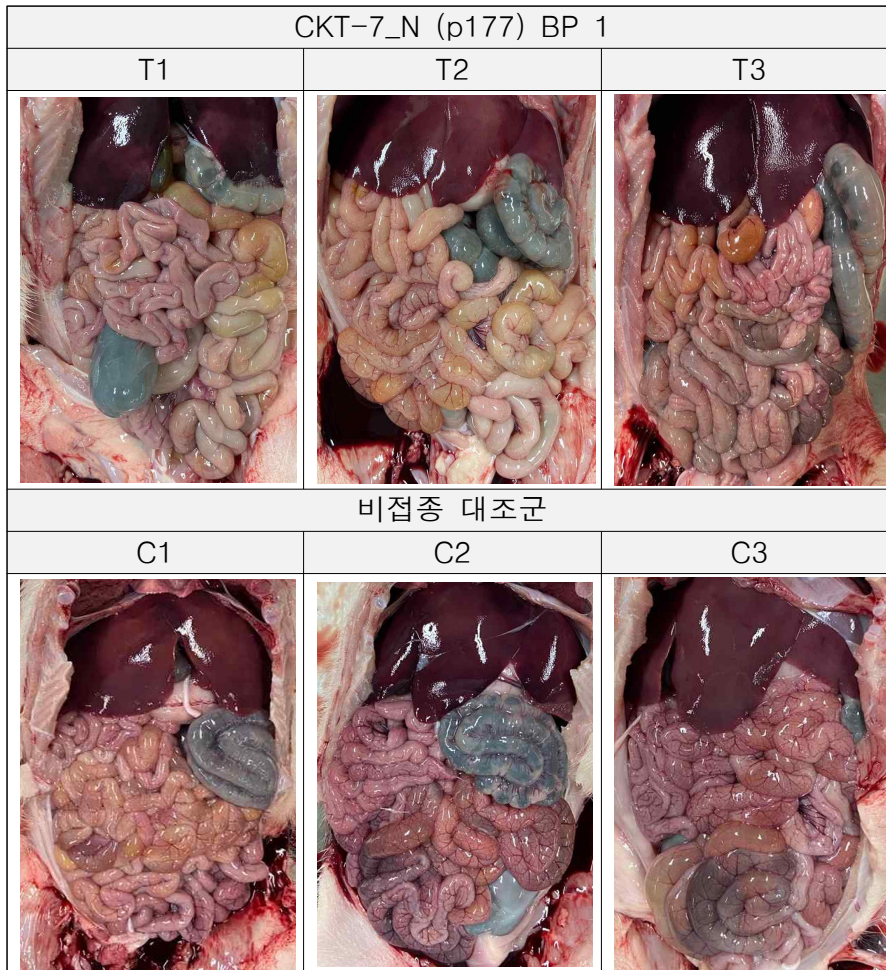


그림 45. 안락사 후 부검 사진 (접종 14일 후)

비접종 대조군의 경우, C2와 C3의 소장조직이 다소 충혈 증상을 보이긴 하나, 정상 소견에 가깝고, 장 유제액을 접종한 그룹의 경우에도 정상에 가까운 위장 형태가 확인되었다.

#### 2.6.3. PEDV CKT-7\_N strain (p177)에 대한 병원성 복귀 시험 결론

앞서, 2회에 걸쳐서 수행하였던 PEDV CKT-7\_N strain (p177)의 병원성 확인 실험 결과와 동일하게, 바이러스 감염 장 유제액을 이용하여 1회 생체계대를 진행한 결과에서도 바이러스 감염으로 인한 어떠한 임상증상이나 항원 배출이 확인되지 않았다. 특히, 2대 생체계대를 목적으로 감염 5일 후 2두에서 소장을 다시 채취하였으나, 장 내에 PED 바이러스가 검출되지 않아 (PCR negative) 추가 계대를 진행하지 않았고, 병원성 복귀 실험을 1대 생체계대에서 종료하였다. 결과적으로, PEDV CKT-7\_N strain (p177)의 경우, 약독화 생백신 strain으로써 요구되는 safety 관련 조건을 모두 충족하였다고 볼 수 있다.

## 2.7. Fc 바이러스 제작을 위한 Master 및 Working cell bank 제작

협동연구기관으로부터 분양받은 경구백신용 PEDV strain을 (PEDV CKT-7\_N, p177) 이용하여 Fc 발현 PED 바이러스를 (이하 PED-Fc 바이러스) 제작하기 위하여 Genotype 2b형의 PEDV가 증식 가능한 Vero-CCL81 cell line을 이용하여 Fc 발현 Vero cell (이하 Vero-Fc cell)을 제작한 바 있으며, 이를 경구용 PED 생백신 생산에 활용하기 위하여 Master cell bank 및 Working cell bank를 별도로 확립하였다.

### 2.7.1. Master cell bank의 제작

PED-Fc 불활화 백신을 제조하기 위하여 이미 구축해 놓은 Vero-Fc cell line 1 vial을 꺼내어 75 cm<sup>2</sup> T flask에 seeding 후, 3일간 배양하여 flask 바닥에 세포주가 mono-layer 되면, PBS buffer로 1회 washing 후, 5 ml의 trypsin-EDTA를 이용하여 세포주를 바닥에서 떼어낸다. Hemocytometer와 methylene blue 시약을 이용하여 총 세포수를 확인한 후, 175 cm<sup>2</sup> T flask에 2×10<sup>6</sup>개씩, 총 3개의 flask로 계대배양하였다. 이러한 과정을 1회 더 반복하여 최종적으로 175 cm<sup>2</sup> T flask 6개 분량에 해당하는 Vero-Fc cell line을 얻었으며, 이를 한데 모아 cryovial 당 1×10<sup>6</sup> 개씩 총 50개로 소분하고, (일부는 검정용으로 따로 보관) PED-O/MCB #1~#50까지 numbering 한 후, 액체 질소에 보관하였다.

### 2.7.2. Working cell bank의 제작

Master cell bank 1 vial을 꺼내어 75 cm<sup>2</sup> T flask에 seeding 후, 3일간 배양하여 flask 바닥에 세포주가 mono-layer 되면, PBS buffer로 1회 washing 후, 5 ml의 trypsin-EDTA를 이용하여 세포주를 바닥에서 떼어낸다. Hemocytometer와 methylene blue 시약을 이용하여 총 세포수를 확인한 후, 175 cm<sup>2</sup> T flask에 2×10<sup>6</sup> 개씩, 총 3개의 flask로 계대 배양하였다. 이러한 과정을 1회 더 반복하여 최종적으로 175 cm<sup>2</sup> T flask 12개 분량에 해당하는 Vero-Fc cell line을 얻었으며, 이를 한데 모아 cryovial 당 1×10<sup>6</sup> 개씩 총 100개로 소분하고, (일부는 검정용으로 따로 보관) PED-O/WCB #1~#100까지 numbering 한 후, 액체 질소에 보관하였다.

### 2.7.3. Master cell bank 및 Working cell bank의 검증

#### 1) 현미경 관찰

Master cell 및 Working cell을 75 cm<sup>2</sup> T flask에 단층이 형성될 때까지 배양하면서 세포주의 형태학적 특성을 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 그림 46와 같이 기존 Vero cell line과 형태학적으로 일치하는 결과를 보였다.

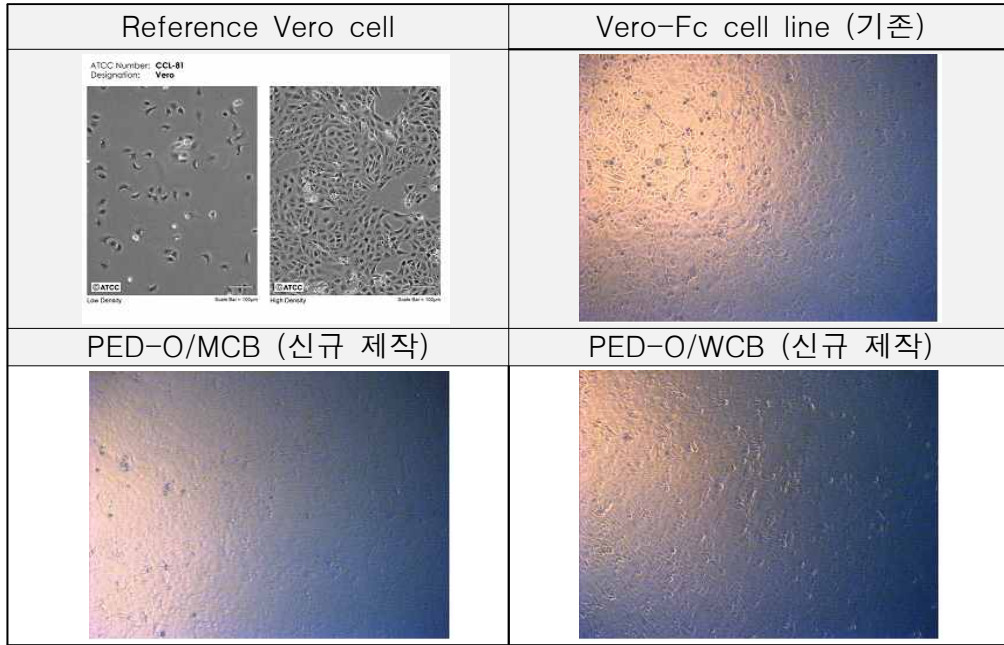


그림 46. Reference Vero cell 및 Vero-Fc cell line의 현미경 검사 결과

## 2) 무균시험

동물용 생물학적제제의 일반검사기준 중 “1-10-20-06 무균시험”에 근거하여 (실험샘플은 세포를 3회 동결 및 용해한 후 그 상등액을 사용) 세포 내 세균 및 곰팡이에 의한 오염 유무를 확인한 결과, 표 19와 같이 무균 상태가 잘 유지되고 있었다.

표 19. Vero-Fc cell line의 무균시험 결과

Cell line	무균시험 결과		
	배지	관찰결과 (관찰 기간 : 14일)	
		22℃	37℃
Vero-Fc cell line (기존)	Nutrient Agar	-*	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-
PED-O/MCB (신규 제작)	Nutrient Agar	-	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-
PED-O/WCB (신규 제작)	Nutrient Agar	-	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-

-\* : 어떠한 세균의 증식도 발견되지 않음

## 3) 마이코플라즈마 오염 유무 확인

동물용 생물학적제제의 일반검사기준 중 “1-10-20-07 마이코플라즈마 부정시험”에 근거하여 (실험샘플은 세포를 3회 동결 및 용해한 후 그 상등액을 사용) 세포 내 마이코플라즈마에 의한 오염 유무를 확인한 결과, 그림 47과 같이 마이코플라즈마가 검출되지 않았다.



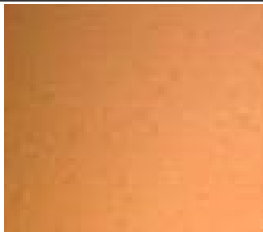
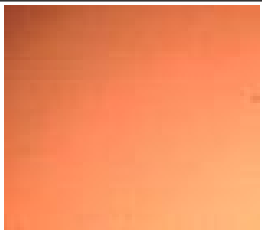
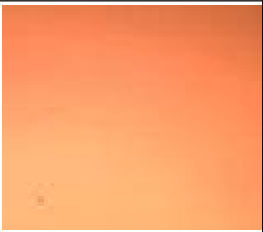
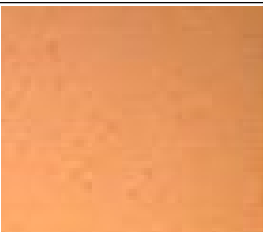

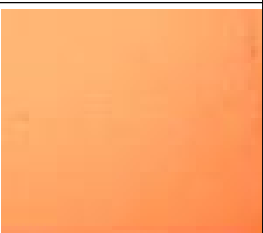

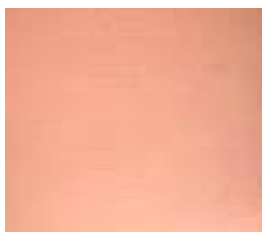
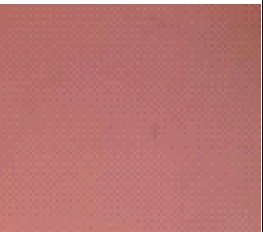
세포주	결과 (마이코플라즈마 오염유무)		
	양성 대조군	음성 대조군	시험품
Vero-Fc cell line (기준)	양성	음성	음성
			
PED-O/ MCB (신규 제작)	양성	음성	음성
			
PED-O/ WCB (신규 제작)	양성	음성	음성
			

그림 47. Vero-Fc cell line의 마이코플라즈마 오염유무 확인 결과

#### 4) 미입 바이러스 확인 실험

PCR법과 (실험샘플은 세포를 3회 동결 및 용해한 후 그 상등액을 사용) 형광항체법을 이용하여 세포 내 미입 바이러스에 의한 오염 유무를 확인한 결과, 그림 48, 49와 같이 BVDV, CPIV에 대한 오염이 확인되지 않았다.

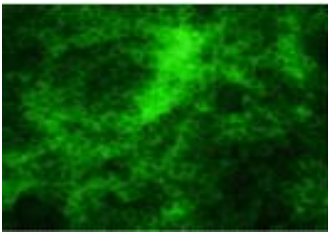



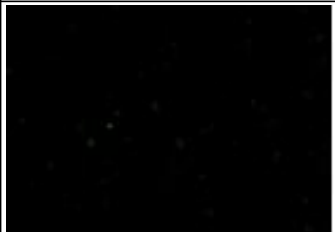
양성 대조군	음성 대조군	
		
Vero-Fc cell line (기준)	PED-O/ MCB (신규 제작)	PED-O/ WCB (신규 제작)
		

그림 48. 형광항체법을 이용한 BVDV 미입 유무 확인 결과

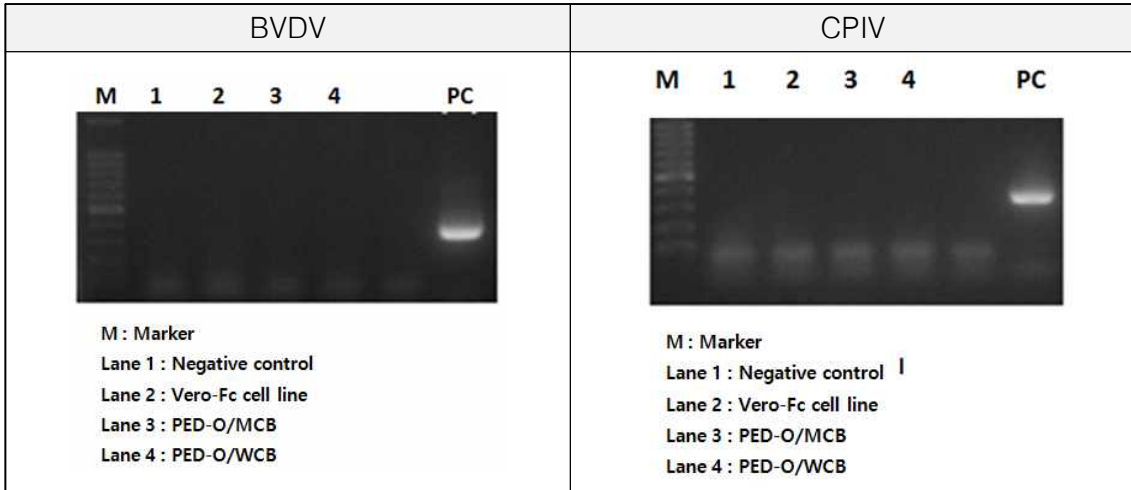


그림 49. PCR법을 이용한 BVDV 및 CPIV 미입 유무 확인 결과

## 2.8. PEDV CKT-7\_N strain (p177)의 Master 및 Working seed bank 제작

협동연구기관으로부터 분양받은 PEDV CKT-7\_N (p177) strain을 경구용 PED 생백신 생산에 활용하기 위하여 Master seed bank 및 Working seed bank를 확립하였다.

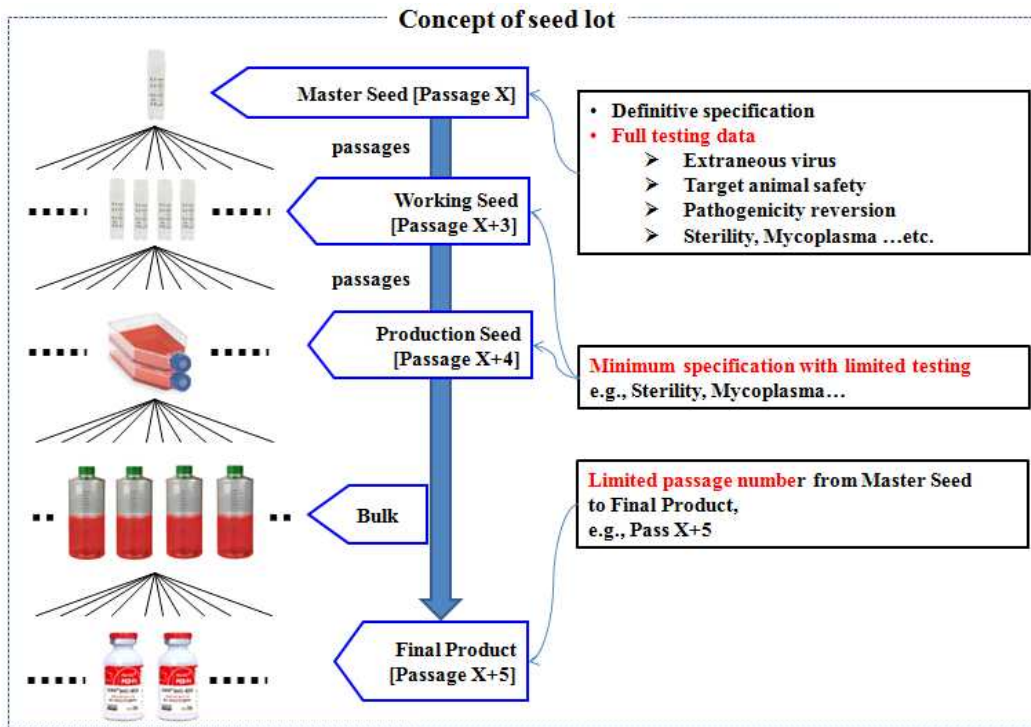


그림 50. Seed Lot system 모식도

### 2.8.1. Master seed bank(원종독)의 제작

#### 1) 원종독의 배양

전북대학교 인수공통전염병연구소로부터 분양받은 종독을 담즙산이 함유된 유지용 배지로 10배 희석하여 단층이 90% 이상 형성된 Vero CCL81 세포에 접종하였다. 37°C incubator에서 바이러스를 1시간 동안 흡착시킨 다음 접종액을 제거하고, 담즙산이 함유된 유지용 배지를 넣어 2~4일간 배양하면서 세포변성이 80% 이상 출현하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 채독하여 master seed로 하였다.

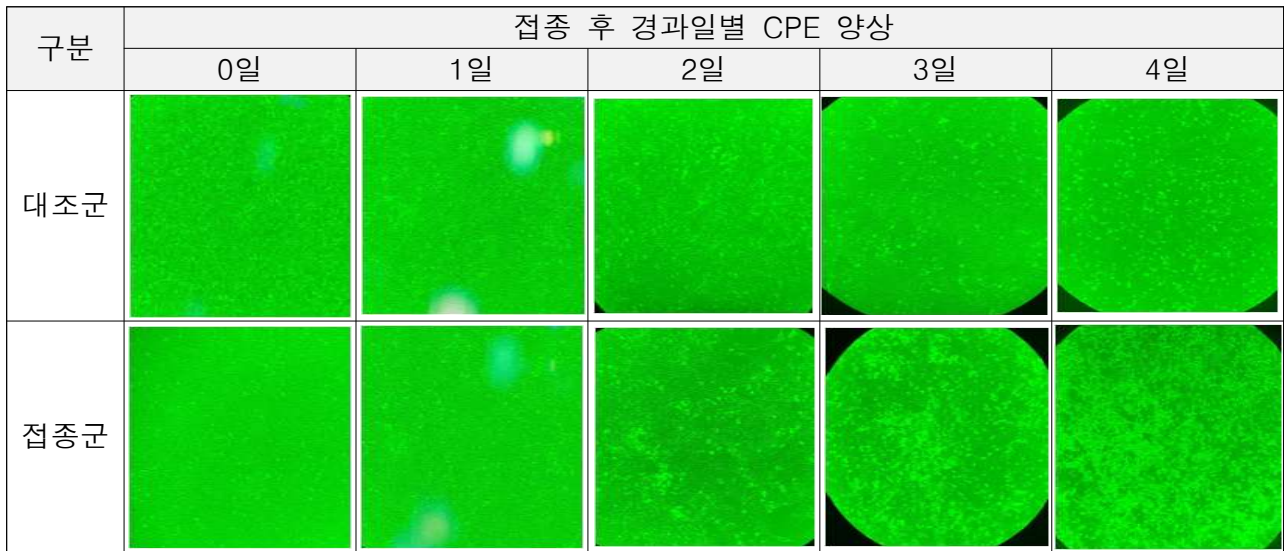


그림 51. PEDV CKT-7\_N (p177) strain 접종 후 경과일 별 세포변성효과

#### 2) 원종독의 명칭 및 보관

PEDV-O/MSV로 명명하고, 배양액을 1 ml씩 1 vial에 동결하여 PED-O/MSV #1~#50 까지 numbering 한 후, -80°C에 동결 보존하였다. 원종독의 계대는 5회 이내로 제한한다.

#### 3) 원종독의 무균 상태 확인

원종독 내 extraneous bacteria를 확인하기 위하여 동결되어 있는 master seed 1 vial을 꺼내어 10 ml의 멸균 증류수로 희석시킨 후, 0.2 ml을 덜어 40 ml의 Thioglycollate 액체 배지가 든 멸균 용기에 넣고, 30~35°C에서 14일 간 배양하였다. Extraneous fungi를 확인하기 위하여 희석액 0.2 ml을 따로 덜어 40 ml의 Soybean Casein Digest 액체 배지가 든 멸균 용기에 넣고 20~25°C에서 14일간 배양하였다. 14일 경과 후 현미경으로 관찰한 결과 어떠한 미생물의 증식도 확인할 수 없었다.

4) 원종독의 마이코플라즈마 미입 확인

원종독 내 마이코플라즈마 미입 유무를 확인하기 위하여 동결되어 있는 master seed 1 vial을 꺼내어 viral RNA를 추출 후, PCR을 진행한 결과 mycoplasma에 대한 오염은 확인되지 않았다.

5) 원종독의 미입 바이러스 확인

원종독 내 미입 바이러스 유무를 확인하기 위하여 동결되어 있는 master seed 1 vial을 꺼내어 viral RNA를 추출 후, PCR을 진행한 결과 CPIV, BVD, CSFV, PCV2에 대한 미입은 확인되지 않았다.

6) 원종독의 역가 확인

96 well cell culture에 Vero CCL81 세포주를 미리 monolayer 시켜 준비하고, 유지용 배지를 사용하여 바이러스를  $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 까지 10진 희석하여 희석 농도별로 4개의 Vero CCL81 세포주에 각각 접종하고, 7일간 배양하면서 세포변성유무를 관찰한다. 세포변성이 일어나는 것을 양성으로 인정하여 Karber method를 이용하여 바이러스 역가를 측정하였고, 그 결과  $10^{7.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  이상의 역가가 확인되었다.

2.8.2. Working seed bank(생산용 균주)의 제작

1) 생산용 균주의 배양

Master seed 1 vial을 담즙산이 함유된 유지용 배지로 10배 희석하여 단층이 90% 이상 형성된 Vero CCL81 세포에 접종하였다. 37°C incubator에서 바이러스를 1시간 동안 흡착시킨 다음 접종액을 제거하고, 담즙산이 함유된 유지용 배지를 넣어 2~4일간 배양하면서 세포변성이 80% 이상 출현하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 채독하여 working seed로 하였다.

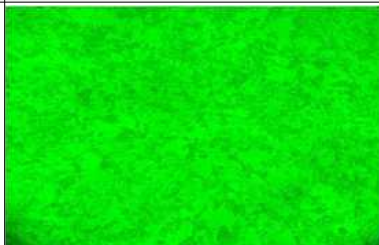
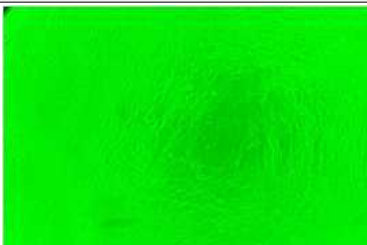
구분	PEDV-O/MSV 접종군	비접종 대조군
접종 4일 후 CPE 양상		

그림 52. PEDV CKT-7\_N (p177) strain 접종 후 세포변성효과

2) 생산용 균주의 명칭 및 보관

PEDV-O/WSV로 명명하고, 배양액을 1 ml씩 1 vial에 동결하여 PED-O/WSV #1~#100 까지 numbering 한 후, -80℃에 동결 보존하였다.

3) 생산용 균주의 무균 상태 확인

원종독 내 extraneous bacteria를 확인하기 위하여 동결되어 있는 working seed 1 vial을 꺼내어 10 ml의 멸균 증류수로 희석시킨 후, 0.2 ml을 덜어 40 ml의 Thioglycollate 액체 배지가 든 멸균 용기에 넣고, 30~35℃에서 14일 간 배양하였다. Extraneous fungi를 확인하기 위하여 희석액 0.2 ml을 따로 덜어 40 ml의 Soybean Casein Digest 액체 배지가 든 멸균 용기에 넣고 20~25℃에서 14일간 배양하였다. 14일 경과 후 현미경으로 관찰한 결과 어떠한 미생물의 증식도 확인할 수 없었다.

표 19. Vero-Fc cell line의 무균시험 결과

Cell line	무균시험 결과		
	배지	관찰결과 (관찰 기간 : 14일)	
		22℃	37℃
PED-O/MSB	Nutrient Agar	-*	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-
PED-O/WSB	Nutrient Agar	-	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-

-\* : 어떠한 세균의 증식도 발견되지 않음

4) 생산용 균주의 마이코플라즈마 미입 확인

원종독 내 마이코플라즈마 미입 유무를 확인하기 위하여 동결되어 있는 working seed 1 vial을 꺼내어 viral RNA를 추출 후, PCR을 진행한 결과 mycoplasma에 대한 오염은 확인되지 않았다.

5) 생산용 균주의 미입 바이러스 확인

원종독 내 미입 바이러스 유무를 확인하기 위하여 동결되어 있는 working seed 1 vial을 꺼내어 viral RNA를 추출 후, PCR을 진행한 결과 CPiV, BVD, CSFV, PCV2에 대한 미입은 확인되지 않았다.

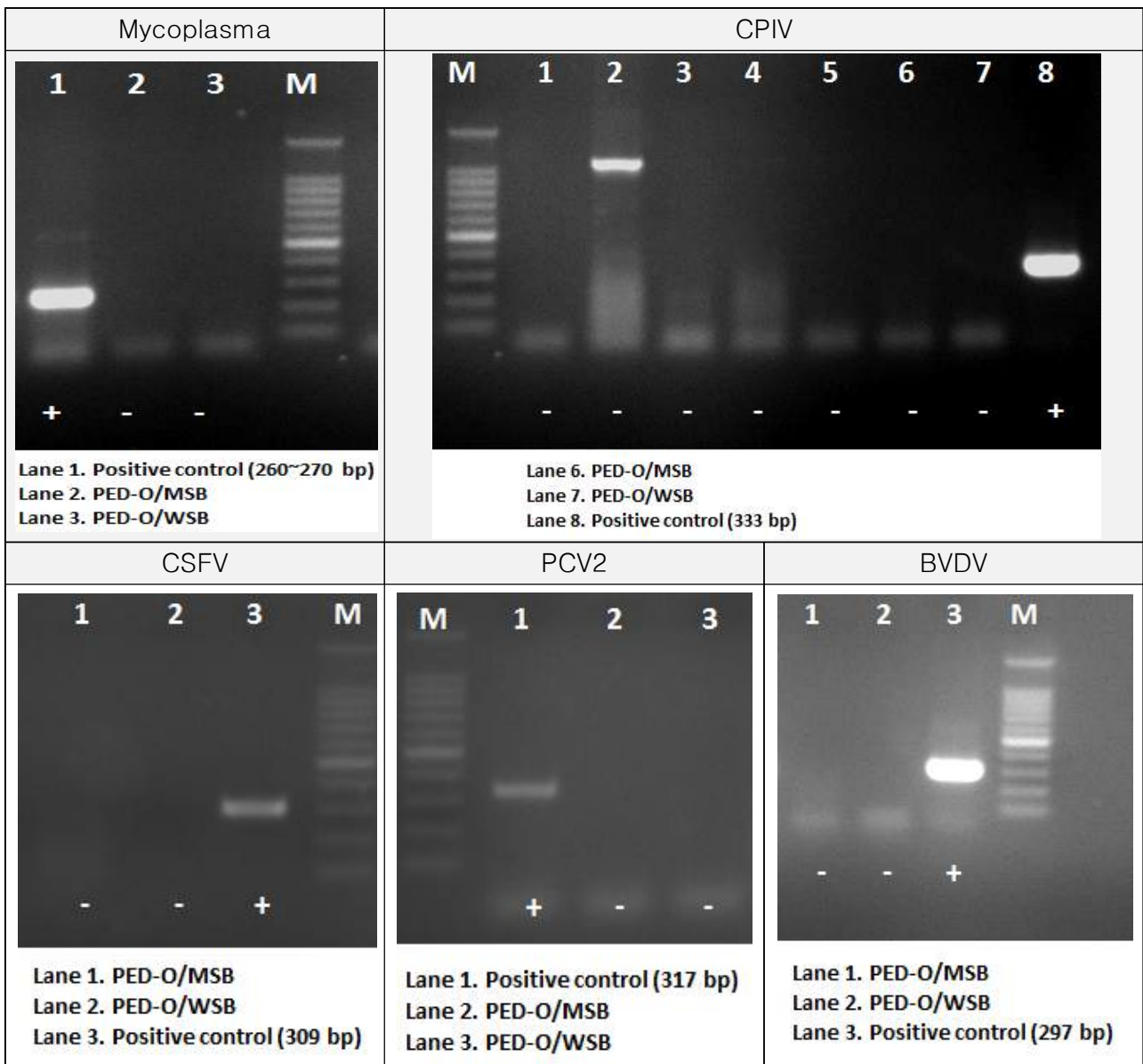


그림 53. PCR법을 이용한 seed bank 내 미입바이러스 확인 결과

#### 6) 생산용 균주의 역가 확인

96 well cell culture에 Vero CCL81 세포주를 미리 monolayer 시켜 준비하고, 유지용 배지를 사용하여 바이러스를  $10^{-1}$ ~ $10^{-7}$ 까지 10진 희석하여 희석 농도별로 4개의 Vero CCL81 세포주에 각각 접종하고, 7일간 배양하면서 세포변성유무를 관찰한다. 세포변성이 일어나는 것을 양성으로 인정하여 Karber method를 이용하여 바이러스 역가를 측정하였고, 그 결과  $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상의 역가가 확인되었다.

2.9. PEDV CKT-7\_N strain (p177)을 이용한 PED-Fc 바이러스 제작 및 검증

생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신 시제품을 제작하기 위하여, 기 확립된 백신 제조용 working seed (PEDV CKT-7\_N strain, p177) 및 working cell (Vero CCL81-Fc cell)을 사용하여 PED-Fc 바이러스를 제작하고, 이를 검증하였다.

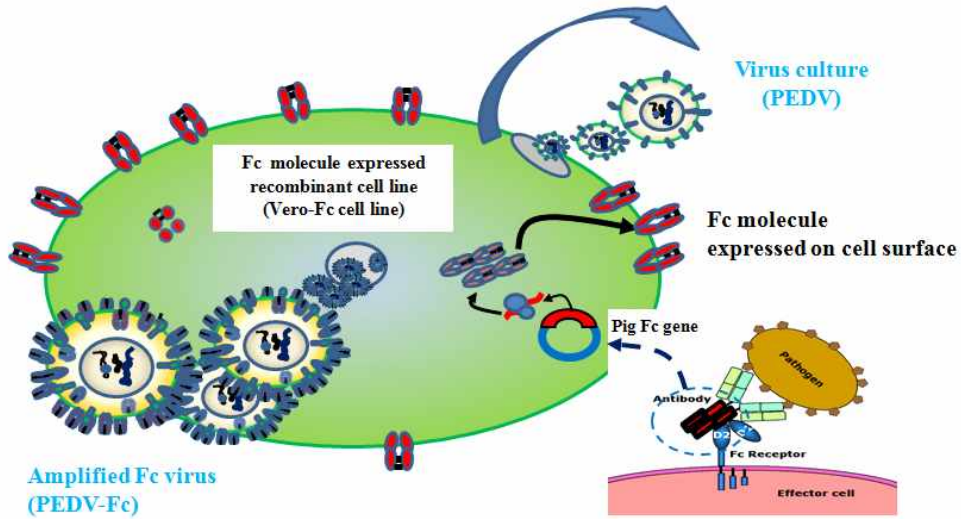


그림 54. Fc 발현 Host cell에서 Fc 바이러스가 생성되는 과정

2.9.1. Fc 발현 PEDV CKT-7\_N 바이러스의 생산

1) 실험재료

- 세포주 : Vero CCL81-Fc cell
- 바이러스 : PEDV CKT-7\_N strain (p177)

표 20. VeroCCL81-Fc 세포 배양용 배지 조성

Media	첨가제			
α-MEM	NaHCO <sub>3</sub> (7.5%)	항생제 (100X)	FBS	G418
	1.2%	1%	5%	100 μg/ml

표 21. PED CKT-7\_N strain 배양용 배지 조성 (감작 및 유지용)

Media	첨가제					
α-MEM	NaHCO <sub>3</sub> (7.5%)	항생제 (100X)	TPB (6%)	Yeast extract (2%)	MEM NEAA (100X)	NaGCDCa
	1.2%	1%	0.3%	0.02%	1%	100 μM



2) 바이러스 접종 및 채독

- 75T flask 2개에 Vero CCL81-Fc 세포를 monolayer 시킨 후, 하나는 비접종 대조군, 하나는 바이러스 접종군으로 한다. 바이러스 접종군에 대하여 PEDV CKT-7\_N strain을 MOI 0.1로 접종하고, (37°C에서 1시간 감각 후 제거하고, 유지용 배지 첨가) 매일 CPE 양상을 확인하면서 80% 이상 CPE가 확인되었을 때 채독한다. (접종 48시간 후부터 CPE 관찰되며, 보통 당일 채독) 바이러스 채독 시 -80°C에서 3회 F/T 수행 후, 상등액만 취한다.
- 그 결과, 바이러스 접종 후 2일째부터 세포 전반에 걸쳐 CPE 양상이 나타나기 시작하였고, 3일째에 80% 이상의 세포에서 CPE 현상이 관찰되어 바이러스를 채독하였다.

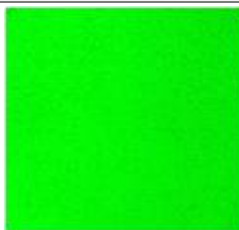
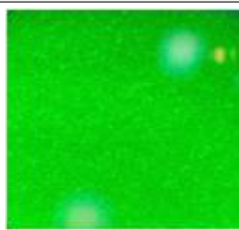
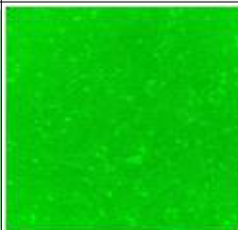
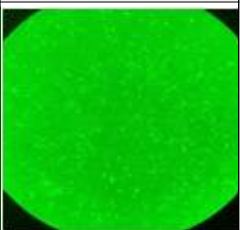
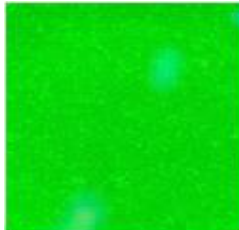
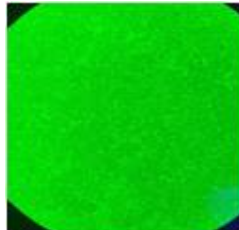
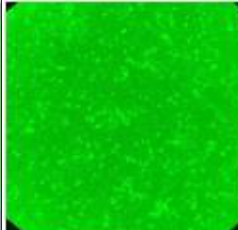
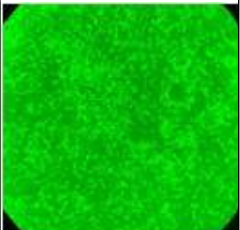
구분	접종 후 경과일별 CPE 양상			
	0일	1일	2일	3일
비접종 대조군				
바이러스 접종군				

그림 55. PEDV CKT-7\_N (p177) strain 접종 후 세포변성효과

3) PED-Fc 바이러스의 역가 확인

- 96 well microplate에 Veor-CCL81 세포를 미리 mono-layer 시킨 후, 48시간 후에 다음과 같은 방법으로 바이러스 역가를 측정하였다. 바이러스 배양액을 바이러스 감각 및 유지용 배지로 10배씩 단계 희석하여  $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 까지 준비하고, 미리 준비한 Vero-CCL81 세포에 접종 후, 5일 후에 CPE 유무로 end-point를 결정하여 TCID<sub>50</sub> 으로 바이러스 역가를 산출하였다. 이어서, 바이러스가 감염된 세포를 아세톤으로 고정시키고, PEDV nucleocapsid protein에 대한 특이항체를 이용하여 FA 방법으로 역가를 재확인하였다.
- 그 결과, 75T flask에서 MOI 0.1의 조건으로 증식시킨 PED-Fc 바이러스의 최종 역가는  $10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 로 master seed virus 보다는 10배 이상 낮은 역가로 확인되었다.

표 22. PED-Fc 바이러스의 역가 측정 결과

구분	역가 측정 결과 (TCID <sub>50</sub> /ml)	
	CPE	FA
바이러스 접종군	$10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	$10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$

### 2.9.2. Fc 발현 PEDV CKT-7\_N 바이러스의 검증

Vero CCL81-Fc cell에서 배양한 PEDV CKT-7\_N strain에 (PED-Fc 바이러스) pig IgG Fc 분자가 부착되었는지 확인하기 위하여 아래와 같은 방법으로 실험을 수행하였으며, 대조군으로 Fc 세포에 배양하지 않은 PEDV CKT-7\_N strain을 함께 사용하였다.

#### 1) Western blot을 이용한 Fc 발현 확인

- PED-Fc 바이러스 및 대조 바이러스를 초고속 원심을 통하여 10배 이상 농축 후, PEDV nucleocapsid protein과 돼지 IgG Fc protein에 특이적인 항체를 이용하여 western blot을 진행하였다.
- 그 결과, PEDV nucleocapsid protein에 특이적인 항체에는 PED-Fc 및 대조 바이러스 모두에서 특이 band가 확인되었고, 돼지 IgG Fc protein에 특이적인 항체에 대해서는 PED-Fc 바이러스에서만 Fc에 대한 특이적인 band가 확인되었다.

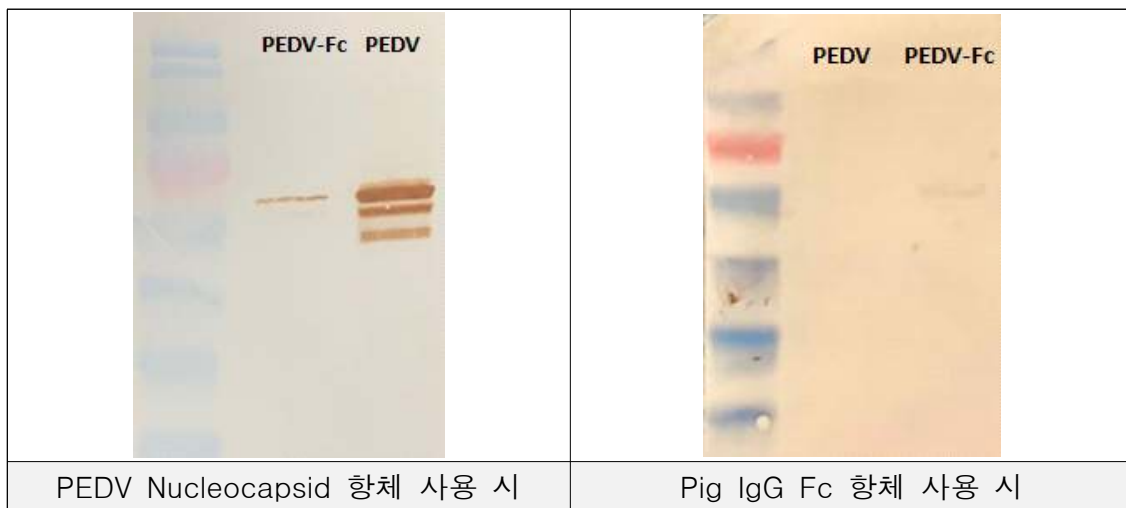


그림 56. Western blot을 통한 PED-Fc 바이러스 확인

#### 2) Sandwich ELISA법을 이용한 Fc 발현 확인

- PED-Fc 바이러스 및 대조 바이러스를 농축 없이 그대로 샘플로 사용하였고, Pig IgG Fc를 정량할 수 있는 상용화 ELISA kit (Bethyl lab, Cat.No E100-104)를 사용하여 결과 값을 확인하였다.

##### [Pig IgG Fc 단백질 정량법]

- 100  $\mu$ l의 coating buffer당 1  $\mu$ l의 Affinity purified Pig IgG Coating antibody를 희석시킨 후 (희석배수 1:100), 필요한 샘플의 수만큼 well에 코팅하고 실온에서 1시간 동안 incubation 시킨다.
- Coating buffer를 제거하고, well을 4회 washing 한 후, 200  $\mu$ l의 blocking buffer를 넣고,

실온에서 30분간 incubation 시킨다.

- Blocking buffer를 제거하고, well을 4회 washing 한 후, positive control과 negative control 및 정량할 sample을 well에 넣고, 실온에서 1시간 동안 incubation 시킨다.
  - \* Positive control : Pig reference serum 7.8 ng/ml
  - \* Negative control : Sample diluent
- Sample을 제거하고, well을 4회 washing 한 후, HRP conjugated Pig IgG Detection antibody를 Sample/Conjugate diluent에 1:1,000으로 희석하여 100  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 1시간 동안 incubation 시킨다.
- Detection antibody를 제거하고, well을 4회 washing 한 후, 각각의 well에 TMB substrate solution을 100  $\mu$ l씩 넣어주고, 실온의 어두운 곳에서 15분간 incubation 시킨다.
- 15분 경과 후, 각 well 당 100  $\mu$ l의 ELISA stop solution을 넣고, 가볍게 섞어주며, 색의 변화를 관찰한다.
- 반응 정지 후, 30분 이내에 ELISA plate reader기를 이용하여 450nm의 파장에서 OD값을 측정한다.

○ 그 결과, 실험에 사용된 바이러스 간에 역가 차이가 100배 정도 임에도 불구하고, 100배 역가가 적은 PED-Fc 바이러스가 대조 바이러스에 비해 3배 이상 높은 정량 값이 확인되었다.

표 22. Pig IgG Fc Quantitation kit를 통한 PED-Fc 바이러스 확인

Sample	O.D값	비고
PED virus	0.258	$10^{8.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
PED 채독 후 pellet	0.266	-
PED-Fc virus	0.812	$10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
PED-Fc 채독 후 pellet	0.301	-
Pig reference serum	Overflow	7.8 ng/ml

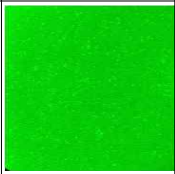
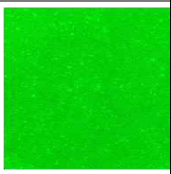
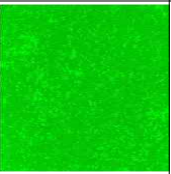
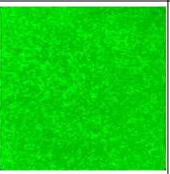
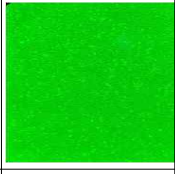
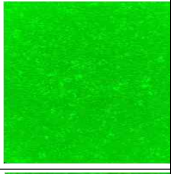
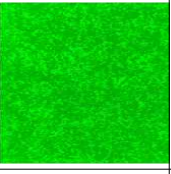
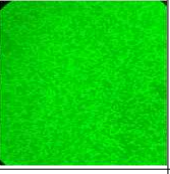
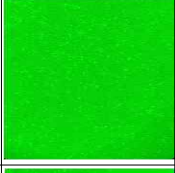
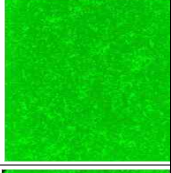
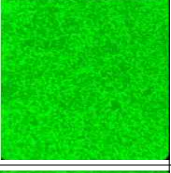
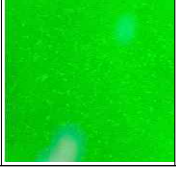
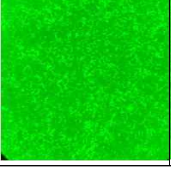
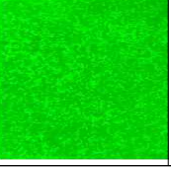
### 2.9.3. Fc 바이러스의 최적의 증식 조건 확인

- 앞서, 75T flask에서 MOI 0.1의 조건으로 증식시킨 PED-Fc 바이러스의 역가 수준이 master seed virus 보다 10배 정도 낮은 수준으로 확인되었기 때문에 바이러스 증식 조건에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단되어, 아래와 같은 실험을 수행하였다.
- 75T flask 4개에 Vero CCL81-Fc 세포를 mono-layer 시킨 후, 각각의 바이러스 접종군으로 하였다. 바이러스 접종군에 대하여 PEDV CKT-7\_N strain을 MOI 0.1, 1, 5, 10으로 각각 접종하고, (37°C에서 1시간 감작 후 제거하고, 유지용 배지 첨가) 매일 CPE 양상을 확인하면서 80% 이상 CPE가 확인되었을 때 채독하였다. 바이러스 채독 시 -80°C에서 3회 F/T 수행 후, 상등액만 취하였다.
- 역가 측정을 위하여, 96 well microplate에 Vero-CCL81 세포를 미리 mono-layer 시킨 후, 48시간 후에 다음과 같은 방법으로 바이러스 역가를 측정하였다. 바이러스 배양액을 바이러스

감작 및 유지용 배지 조성으로 10배씩 단계 희석하여  $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ 까지 준비하고, 미리 준비한 Vero-CCL81 세포에 접종 후, 5일 후에 CPE 유무로 end-point를 결정하여 TCID<sub>50</sub> 으로 바이러스 역가를 산출하였다. 이어서, 바이러스가 감염된 세포를 아세톤으로 고정시키고, PEDV nucleocapsid protein에 대한 특이항체를 이용하여 FA 방법으로 역가를 재확인하였다.

- 그 결과, seed 바이러스의 접종 농도가 높아질수록 감염된 세포의 CPE 발현 시간이 빨라지고, 채독한 바이러스의 역가 수준도 높아지는 양상을 보였다. MOI 0.1의 조건에서는 최소  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml의 농도로 확인되었고, MOI 10의 조건에서는 최대  $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스 역가가 확인되었다. 그럼에도, master seed의 최고 역가 수준인  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml 보다는 여전히 10배 정도 낮은 역가 수준을 보여, 향후, 생산 단계에서는 roller bottle 등을 적용하여 좀 더 고역가 바이러스를 생산할 수 있는 최적의 조건을 찾아야 할 것이다.

표 23. 바이러스 접종 농도별 (MOI) 증식성 확인 결과

구분	접종 후 경과일별 CPE 양상					역가측정 결과 (TCID <sub>50</sub> /ml)
	0일	1일	2일	3일	4일	
MOI 0.1	-					6.0
MOI 1	-					7.0
MOI 5	-					7.0
MOI 10	-				-	7.5

## 2.10. PEDV CKT-7\_N strain (p177) 경구 투여 시 임신모돈에 대한 방어효능 평가 결과

PED 바이러스는 돼지의 전 일령에 걸쳐 감염될 수 있지만, 신생아 새끼돼지에 감염될 시에는 심각한 임상증상 (심한 수양성 설사와 체중 감소)을 동반하며 높은 폐사율을 보인다. 때문에, 초유를 통한 모체항체가 신생아 감염을 막는 중요한 역할을 하며, 임신 모돈에 백신을 접종하여 초유 내 항체가 수준을 높이는 것이 예방백신의 주 목적이다. 따라서, 백신의 방어력 평가 시에는 임신 모돈에 백신을 접종하고, 초유를 충분히 섭취한 5일령 전후의 포유 자돈에 야외 강독주로 공격접종을 진행함으로써 백신의 방어력을 평가한다.

### 2.10.1. 시험백신 준비 및 실험 방법

#### 1) 시험백신 준비

담즙산을 처리하여 약독화시킨 Genotype 2b 유전형의 PEDV (CKT-7\_N strain, p177)와 이를 이용하여 생산한 PED-Fc 바이러스를 백신으로 사용하였으며, 동결건조 없이 바이러스 배양액 상태 그대로를 사용하였다.

표 24. 시험 백신의 조성

구분	항원	함량 (TCID <sub>50</sub> /dose)	비고
시험백신	PEDV CKT-7_N (p177)	7.0 log <sub>10</sub>	10 ml/1 dose
대조백신	PEDV CKT-7_N_Fc (p177)	7.0 log <sub>10</sub>	10 ml/1 dose

#### 2) 실험동물 선정 및 백신 접종 그룹

PED 백신을 접종하지 않은 임신모돈 6마리를 선정하여, 4마리는 백신 접종군, 나머지 2마리는 비접종 대조군으로 하였다. 백신 접종군은 다시 시험백신 접종군 2마리, 대조백신 접종군 2마리로 나누었다.

표 25. 실험동물 선정 및 백신접종 그룹

그룹	개체 번호	수정일	백신 접종일		분만일
			1차	2차	
시험백신 접종군	4	21.07.06	21.09.29	21.10.14	21.10.30
	30	21.07.06			21.10.29
대조백신 접종군	8	21.07.01			21.10.22
	18	21.06.29			21.10.22
비접종 대조군	25	21.06.28	-	-	21.11.05
	31	21.06.28	-	-	21.10.23

#### 3) 임신 모돈 백신 접종

분만 전 임신 모돈을 대상으로 2주 간격으로 2회 접종하였으며, 액상의 백신을 사료에 혼합하여 투여하였다. (백신 접종 하루 전 절식시켜 사료 완전히 섭취하도록 함)



- 백신 접종 시기 : (1차) 분만 4주 전 임신모돈, (2차) 분만 2주 전 임신모돈
- 접종량 : 10 ml/1 dose
- 접종방법 : 경구투여 (사료에 혼합투여)

표 26. 동물실험 디자인

그룹	접종 경로	접종 방법	접종시기	개체 수
시험백신	경구	2주 간격 2회	분만 4주 전,	2
대조백신			분만 2주 전	2
비접종 대조군				2

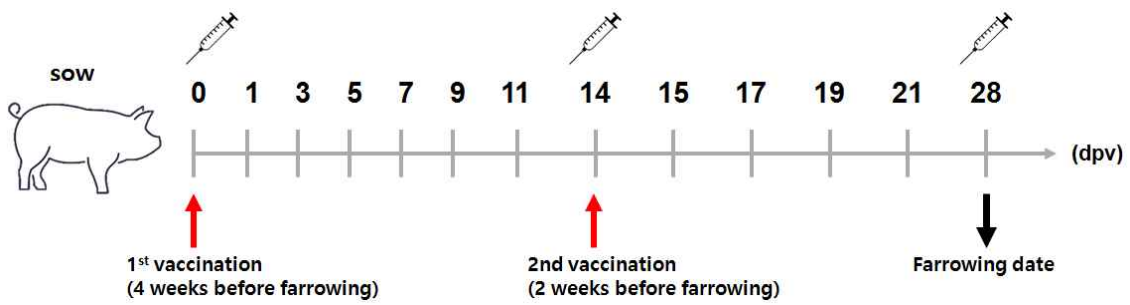


그림 57. 임신모돈 백신 접종 일정

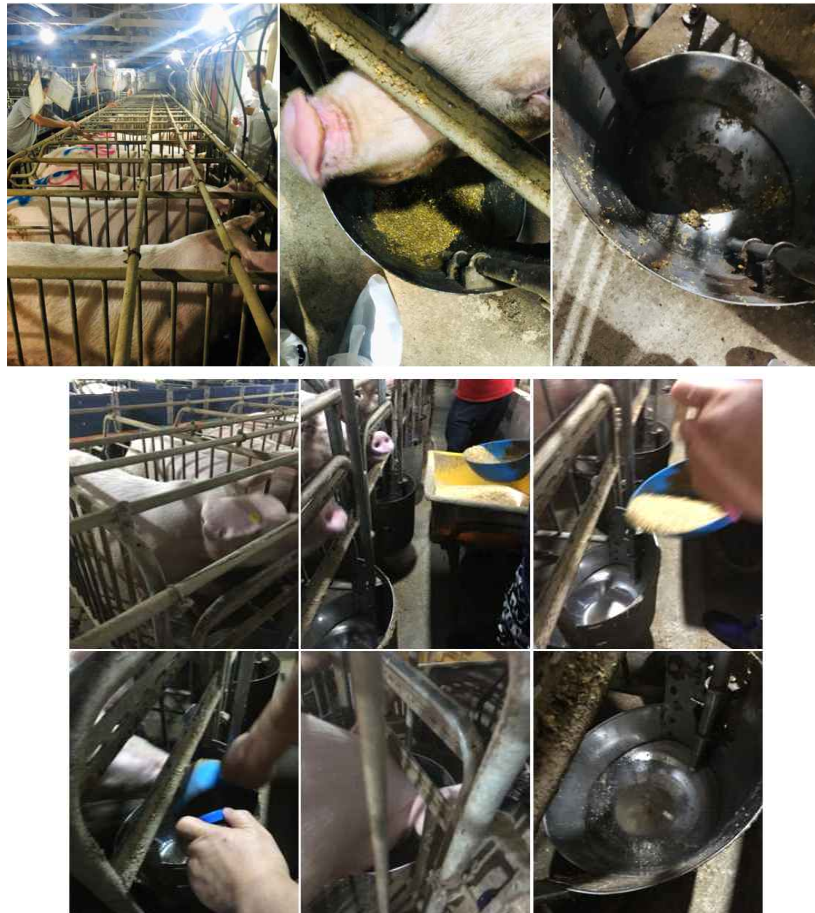


그림 58. 시험백신 접종 전경 (상 : 1차 백신, 하 : 2차 백신)

4) 임상증상 및 분만성적 확인

실험 모돈에 대하여 백신 접종 후 분만 전까지 14일 동안 임상증상 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사, 유사산 등) 유무를 확인하고, 분만 시 성적을 (실산 수, 사산 수) 추가로 확인하였다.

5) 채혈 및 초유 채취

백신 접종군 및 비접종 대조군 모돈에 대하여 1차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 전, 분만 당일 혈액을 채취하고 분만 시 초유를 채취하여 IgA, IgG 및 중화항체를 각각 측정하였다.

표 27. 모돈 샘플채취 일정

샘플명	채취 시기	용도	수량
혈액	1차 접종 전, 2차 접종 전, 분만 시	중화항체가 ELISA 항체가 (IgG, IgA)	각 5 ml
초유	분만 시		10 ml

6) 포유 자돈 공격접종

○ 공격접종 균주

PEDV Genotype 2b 야외 유행 주에 대한 백신의 방어력을 평가하기 위하여 공격접종 균주로 농림검역본부에서 분리된 PEDV QIAP1401 strain을 사용하였다.

○ 공격접종 자돈 선별

시험백신 접종군, 대조백신 접종군 및 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈을 복당 7~8마리씩 선별하여 그룹 당 15마리씩 공격접종에 사용하고자 하였으나, 모돈 복당 자돈 수가 상이하였고, 특히, 대조백신 접종군 모돈의 분만 자돈 수가 부족하였기 때문에 최종적으로 시험백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈 15마리, 대조백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈 12마리, 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈 16마리를 선정하여 공격접종에 사용하였다.

표 28. 공시 모돈의 분만 성적과 공격접종 자돈 선별

그룹	모돈 개체번호	분만 일	자돈 실산 수	자돈 사산 수	공격접종 자돈 공시 수
시험백신 접종군	4	21.10.30	20	0	7
	30	21.10.29	21	0	8
대조백신 접종군	8	21.10.22	5	0	5
	18	21.10.22	8	0	7
비접종 대조군	25	21.10.23	14	0	14
	31	21.11.05	5	0	2



그림 59. 공격접종 시 5~7일령 포유자돈 상태

○ 공격접종 방법

- ① 공격 접종 바이러스 : QIAP 1401 strain (P11, 농림축산검역본부 제공)
- ② 공격 접종량 :  $10^{3.0}$ TCID<sub>50</sub>/두 (약 10LD<sub>50</sub>)
- ③ 공격접종 방법 : 경구투여 (주사기로 직접 투여)
- ④ 공격접종 시기 : 생후 6일령 전 후
  - 공시 모든마다 분만 일자가 상이하여 포유자돈의 공격접종일자를 정확히 맞추진 못하였고, 분만 일자별로 세부그룹을 조정하여 총 3회에 걸쳐 공격접종을 실시함.

표 29. 자돈 공격접종 그룹

그룹	모든 개체번호	공시 자돈 수	공격접종 일령	공격접종 방법
시험백신	4	7 마리	6일령	PEDV QIAP 1401 (P11), $10^{3.0}$ TCID <sub>50</sub> /두, 경구
접종군	30	8 마리	7일령	
대조백신	8	5 마리	6일령	
접종군	18	7 마리	6일령	
비접종	25	14 마리	5일령	
대조군	31	2 마리	5일령	

○ 자돈 체중 측정

공격접종 전, 공격접종 후 3일, 7일, 9일, 13일째에 각각 자돈의 체중을 측정하였다.

○ 자돈 채혈

공격접종 전, 공격접종 후 14일째에 각각 채혈하여 혈중 중화항체가 및 ELISA 항체가 (IgA, IgG) 를 확인하였다. (폐사 자돈은 폐사 당일 채혈)

○ 설사 증상, 임상증상 및 폐사율 확인

공격접종 후 14일 동안 모든 공시자돈에 대한 설사 유무를 매일 확인하고, 임상 증상을 자돈의 위축 정도에 따라 0~3까지 점수화하여 기록하였다. (0 : Normal, 1 : Mild, 2 : Moderate, 3 : Severe) 또한, 공격접종 후 매일 폐사 유무를 확인하여 관찰 14일째에 그룹별 최종 폐사율을 확인하였다.

○ 자돈 분변 채취 및 바이러스 shedding 관찰

5~7일령 포유자돈 (공격접종 전)에서 분변을 채취하여 분변 중의 IgA 및 IgG 항체를 확인하고, 공격접종 후 3일, 7일, 10일, 14일째에 분변을 추가로 채취하여 분변으로의 PEDV 항원 배출 유무를 확인하였다.

○ 부검 및 조직학적 소견 관찰

공격접종 종료 후 (공격접종 후 14일째) 살아있는 자돈을 안락사 시킨 후 장 병변(장출혈, 장비후) 확인하여 수치화 하고, 십이지장, 공장, 회장을 채취하여 H&E 염색을 통한 조직 병변을 추가로 확인하였다. (총혈 및 팽만 정도에 따라 0~3점으로 구분, 그림 60) 또한, 동일한 샘플에 대하여 PEDV에 대한 단일클론 항체로 IHC를 실시하여, 조직 내 PEDV 항원 유무를 확인하였다. (폐사 자돈의 경우, 폐사 즉시 부검하여 동일한 방법으로 병변을 확인하고, 샘플을 채취하였다.)



그림 60. 장 병변 Index Score

7) PEDV에 대한 IgG 및 IgA ELISA 항체가 측정법

○ 실험재료

표 30. 주요 시약 목록

샘플명	조성
PED 항원	PEDV CKT-7_N 정제항원 <sup>a)</sup>
Coating buffer	0.05M Carbonate-Bicarbonate (Sigma, C3041)
Blocking buffer	1% BSA 포함 PBS (제조)
Washing buffer	0.05% Tween 20 포함 PBS (제조)
Sample/conjugate diluent	1% BSA 및 0.05% Tween 20 포함 PBS (제조)
Swine IgG conjugate	HRP conjugated pig IgG (KPL, 5220-0363)
Swine IgA conjugate	HRP conjugated pig IgA (Invitrogen, PA1-84625)
TMB substrate	-
Stop solution	-

a)  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 농도의 PEDV CKT-7\_N 항원을 0.1 μm 필터한 것을 100 kda membrane filter로 25배 농축한 항원

표 31. 표준샘플

구분	샘플번호
표준 양성샘플	PEDV 백신 접종 모돈의 초유를 1:100으로 희석한 것
표준 음성샘플	PEDV 백신 비접종 모돈에서 태어난 5일령 자돈의 혈청을 1:200으로 희석한 것

○ 실험 protocol

- ① 1,000 μl의 coating buffer당 2.5 μl의 정제 PED 항원을 희석시킨 후 (희석배수 1:400), well 당 100 μl씩 필요한 샘플의 수만큼 well에 코팅하고 37°C에서 1시간 동안 incubation 한 후, 4°C에서 overnight incubation 한다.
- ② 다음 날, plate를 꺼내어 실온에서 30분간 추가로 incubation 한다.
- ③ Coating buffer를 제거하고, well 당 300 μl의 washing buffer를 사용하여 3회 washing 한다.
- ④ Well 당 200 μl씩의 blocking buffer를 넣고, 37°C에서 1시간 동안 incubation 시킨다.
- ⑤ Sample/conjugate diluent로 실험 샘플을 200배 희석하여 준비한다.
- ⑥ Blocking buffer를 제거하고, well을 3회 washing 한 후, well 당 100 μl씩의 실험 샘플을 넣고, 37°C에서 1시간 동안 incubation 한다.
- ⑦ Sample를 제거하고, well을 3회 washing 한 후, HRP conjugated Pig IgG 및 IgA Detection antibody를 Sample/Conjugate diluent로 아래와 같이 희석하여 100 μl씩 넣고

실온에서 1시간 동안 incubation 시킨다.

- Pig IgA Detection antibody = 1:10,000

- Pig IgG Detection antibody = 1:20,000

- ⑧ Detection antibody를 제거하고, well을 3회 washing 한 후, 각각의 well에 TMB substrate solution을 100  $\mu$ l씩 넣어주고, 실온의 어두운 곳에서 15분간 incubation 시킨다.
- ⑨ 15분경과 후, 각 well 당 100  $\mu$ l의 ELISA stop solution을 넣고, 가볍게 섞어주며, 색의 변화를 관찰한다.
- ⑩ 반응 정지 후, 30분 이내에 ELISA plate reader기를 이용하여 450nm의 파장에서 O.D값을 측정한다.
- ⑪ 표준 양성샘플의 O.D값은 IgA 및 IgG가 각각 1.0 이상, 표준 음성샘플의 O.D값은 IgA 및 IgG가 각각 0.4 이하여야 한다.

## 2.10.2. 주요 실험 결과

### 1) 임신 모든 임상증상 관찰 결과

- 임신 모돈에 대하여 분만 4주 전에 각각의 백신 10 ml씩을 경구로 투여하고, 14일 간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 시험백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간 동안 태아의 안전성에도 문제가 없었다. (백신 접종에 사용된  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/dose의 농도는 상용화된 PED 경구용 생백신보다 50배 이상 높은 역가 수준임)

표 30. 1차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	개체 번호	공격접종 후 경과일별 임상증상 유무														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
시험백신 접종군	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
대조백신 접종군	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종 대조군	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

\* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

\*\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc

- 임신 모돈에 대하여 분만 2주 전에 각각의 백신 10 ml씩을 경구로 추가 투여하고, 14일 간 발열, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 등의 임상증상을 관찰한 결과, 시험백신 접종군과 대조백신 접종군 모두 아무런 임상증상 없이 건강한 상태를 유지하고 있었다. 동일 기간 동안 태아의 안전성에도 문제가 없었다. (비접종 대조군 모돈 중 1두에서 분만 당일 자궁이탈로 인한 폐사 개체 있었음)



표 31. 2차 백신 접종 후, 임신 모돈의 그룹별 임상증상 관찰 결과

그룹	개체 번호	공격접종 후 경과일별 임상증상 유무														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
시험백신	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
접종군	30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
대조백신	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
접종군	18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
비접종	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
대조군	31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

\* N : 임상증상 없음 (발열, 과민반응, 식욕부진, 구토, 설사 등)

\*\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc

2) 모돈 및 초유 중화항체가 측정 결과

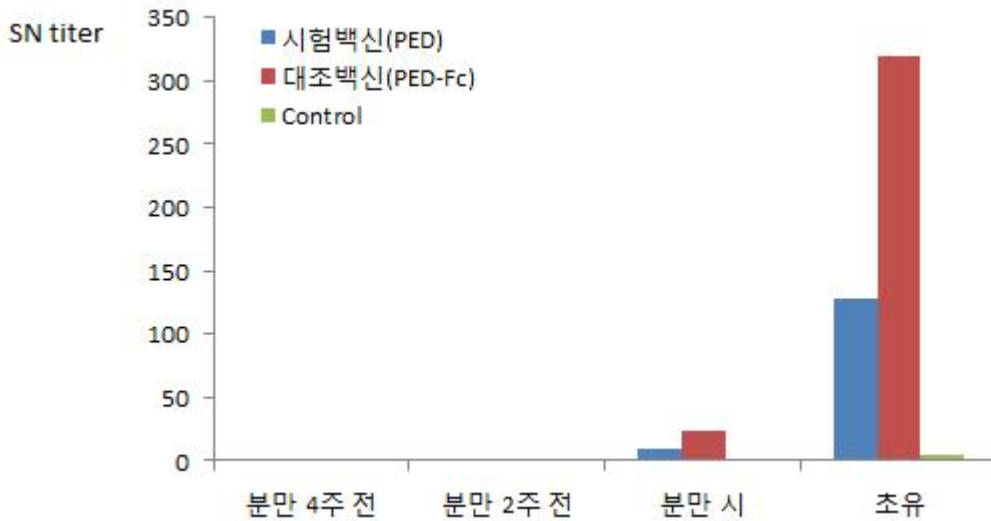


그림 61. 백신 접종 후 그룹별 평균 중화항체가 측정 결과

- 시험백신 접종군의 경우, 백신 2차 접종 완료 후, 분만 시 2~16배의 혈중 중화항체가 확인되었고, 초유에서는 128배의 중화항체가 확인되었다.
- 대조백신 접종군의 경우, 백신 2차 접종 완료 후, 분만 시 16~32배의 혈중 중화항체가 확인되었고, 초유에서는 128~512배의 중화항체가 확인되었다.
- 비접종 대조군 모돈의 경우, 분만 시 까지 PEDV 항체음성을 (중화항체가 4배 이하) 유지하고 있었고, 1마리의 경우, 초유에서 8배의 중화항체가 확인되었다.
- 결론적으로, PEDV에 대한 중화항체가 측정 결과에서는 Fc 백신을 경구로 투여한 대조백신 그룹이 시험백신 그룹보다 우수한 결과를 보였다.

표 32. 모든 및 초유 중화항체 측정 결과 raw data

그룹	개체 번호	시기별 중화항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
시험백신 접종군	4	< 2	< 2	2	128
	30	2	< 2	16	128
대조백신 접종군	8	2	< 2	32	512
	18	< 2	< 2	16	128
비접종 대조군	25	2	2	< 2	8
	31	< 2	< 2	< 2	2

\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc

3) 모든 및 초유 ELISA 항체가 측정 결과

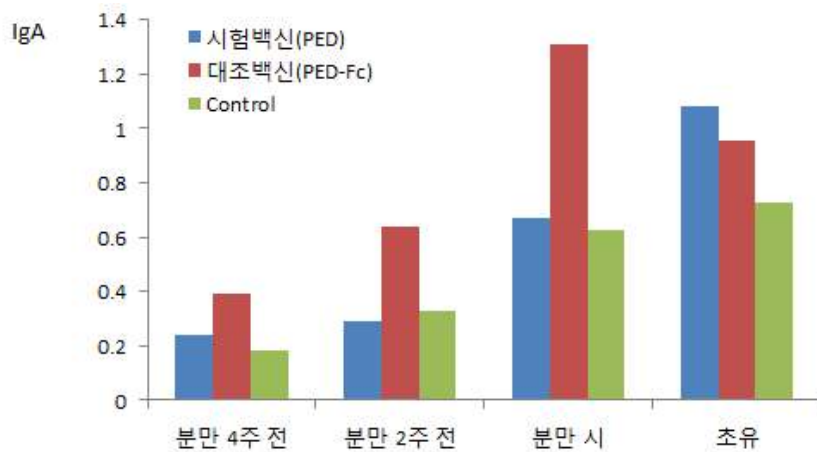


그림 62. 백신 접종 후 그룹별 평균 IgA ELISA 항체가 측정 결과

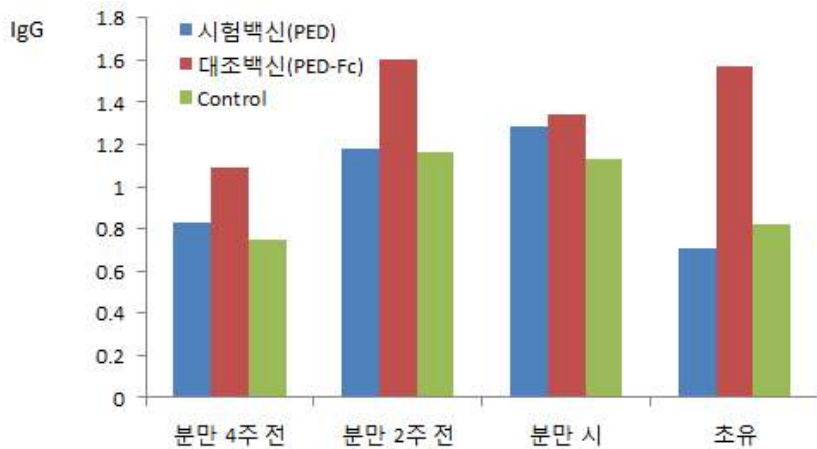


그림 63. 백신 접종 후 그룹별 평균 IgG ELISA 항체가 측정 결과

- In-house ELISA법으로 백신 접종 후 IgA ELISA 항체가를 측정한 결과, 분만 시까지는 대조백신 접종 그룹에서 가장 높은 IgA 항체가 수준을 유지하고 있었고, 초유 내에는 시험백신 접종그룹이 가장 높은 IgA 항체가를 나타내고 있었다.
- In-house ELISA법으로 백신 접종 후 IgG ELISA 항체가를 측정한 결과, 백신 접종 후 모든 시점에서 대조백신 접종그룹이 가장 높은 IgG 항체가 수준을 유지하고 있었고, 이는 앞서 확인된 중화항체 결과와도 일치하는 결과이다.
- 결과적으로, IgA 및 IgG ELISA 항체가 측정 결과에서도 시험백신 접종군보다 대조백신 접종군이 우수한 결과를 보였으며, 이는 앞서 확인된 중화항체 결과와도 일치하는 결과이다. 다만, 실험에 사용된 In-house ELISA법이 최적화된 조건이 아니었기 때문에 비접종 대조군에서도 비교적 높은 비특이 반응이 확인되어 각 그룹 간의 보다 명확한 항체 수준 비교는 ELISA 항체가보다 중화항체 결과를 우선시 해야 할 것이다.

표 33. 모돈 및 초유 IgA ELISA 항체가 결과

그룹	개체 번호	시기별 ELISA 항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
시험백신 접종군	4	0.273	0.339	0.698	1.553
	30	0.201	0.238	0.645	0.614
대조백신 접종군	8	0.526	1.004	1.616	1.317
	18	0.263	0.268	1.004	0.596
비접종 대조군	25	0.190	0.335	0.926	0.879
	31	0.178	0.318	0.323	0.579

\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc

표 34. 모돈 및 초유 IgG ELISA 항체가 결과

그룹	개체 번호	시기별 ELISA 항체가			
		분만 4주 전 (1차 접종 전)	분만 2주 전 (2차 접종 전)	분만 시	초유
시험백신 접종군	4	0.855	1.262	1.336	1.257
	30	0.803	1.090	1.238	0.155
대조백신 접종군	8	1.280	1.776	1.361	2.154
	18	0.896	1.427	1.326	0.988
비접종 대조군	25	0.810	1.458	1.312	1.094
	31	0.692	0.873	0.955	0.545

\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc

#### 4) 포유자돈 혈중 항체가

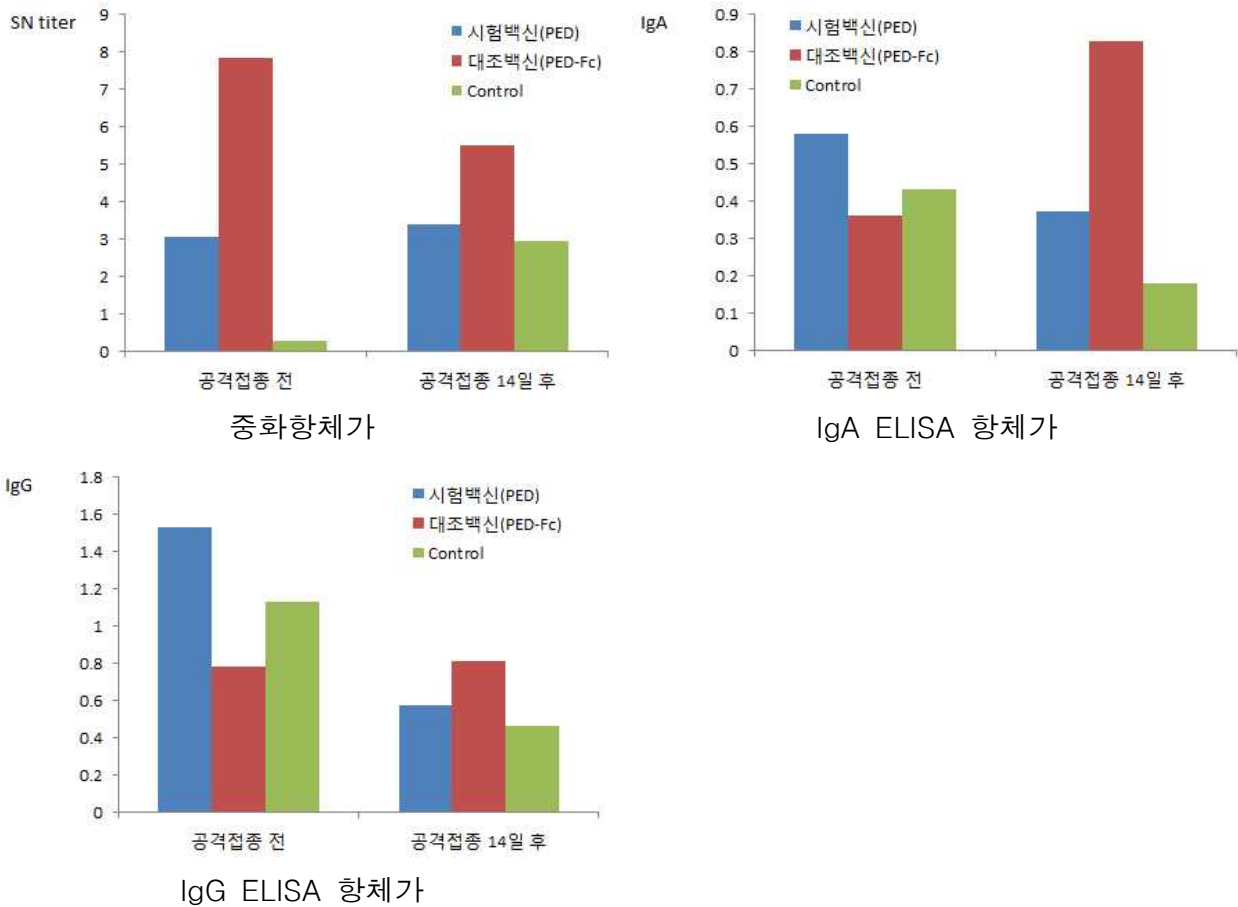


그림 64. 공격접종 전, 후 그룹별 포유자돈 평균 항체가 측정 결과

- 시험백신 접종 모돈과 대조백신 접종 모돈에서 태어난 자돈의 평균 이행 중화항체는 2~8배 수준이었다. 백신 접종 모돈의 경우, 분만 시와 초유에서 비교적 균일한 중화항체 형성이 확인되었으나, 포유 자돈들의 경우, 모돈 복 당 편차가 심하게 나타났다. (초유 섭취 유무 혹은 정도에 따른 개체차이로 추측됨) 시험백신 접종 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 최소 2배에서 최대 16배의 이행항체를 보유하고 있었고, 대조백신 접종 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 최소 2배에서 최대 32배의 이행항체를 보유하고 있었다. 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 모두 PEDV 항체 음성으로 확인되었다.
- IgA와 IgG ELISA 항체가 경우에도, 중화항체가 측정결과처럼 모돈 복당 혹은 자돈 개체 당 편차가 너무 심하여, 결과 값에 큰 의미를 부여하기 어려웠다.

표 35. 포유자돈 혈중 항체가 측정 결과

그룹	시기별 평균 항체가					
	공격접종 전			공격접종 14일 후		
	SN	IgA	IgG	SN	IgA	IgG
시험백신 접종군	3.06 (±7.41)	0.58 (±0.19)	1.53 (±0.26)	3.38 (±8.96)	0.37 (±0.28)	0.57 (±0.18)
대조백신 접종군	7.83 (±11.53)	0.36 (±0.22)	0.78 (±0.43)	5.50 (±5.36)	0.83 (±0.98)	0.81 (±0.35)
비접종 대조군	0.26 (±0.67)	0.43 (±0.16)	1.13 (±0.33)	2.93 (±3.08)	0.18 (±0.08)	0.46 (±0.12)

\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc

5) 포유자돈 분변 중 항체가 및 바이러스 shedding 결과

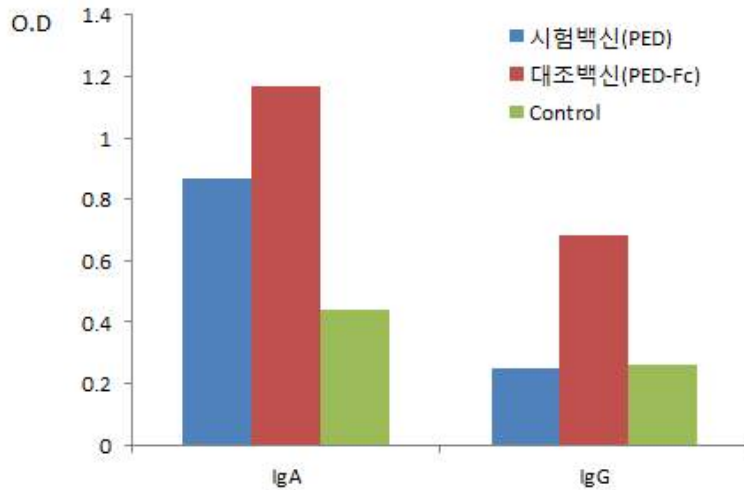


그림 65. 공격접종 전 그룹별 포유자돈 분변 내 항체가 수준

○ 공격접종 전, 포유자돈의 분변 중 존재하는 PEDV에 대한 IgA 및 IgG 항체가 수준을 In-house ELISA법으로 확인한 결과, “대조백신 접종군 자돈 > 시험백신 접종군 자돈 > 비접종 대조군 자돈” 순서로 확인되었으며, 자돈의 혈중 항체가 측정 결과와는 다소 상반된 결과를 보였다.

표 36. 포유자돈 분변 중 ELISA 항체가

그룹	공격접종 전 포유자돈 분변 중 평균 ELISA 항체가	
	IgA	IgG
시험백신 접종군	0.87 (±1.24)	0.25 (±0.36)
대조백신 접종군	1.17 (±1.05)	0.68 (±0.58)
비접종 대조군	0.44 (±0.72)	0.26 (±0.27)

\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc

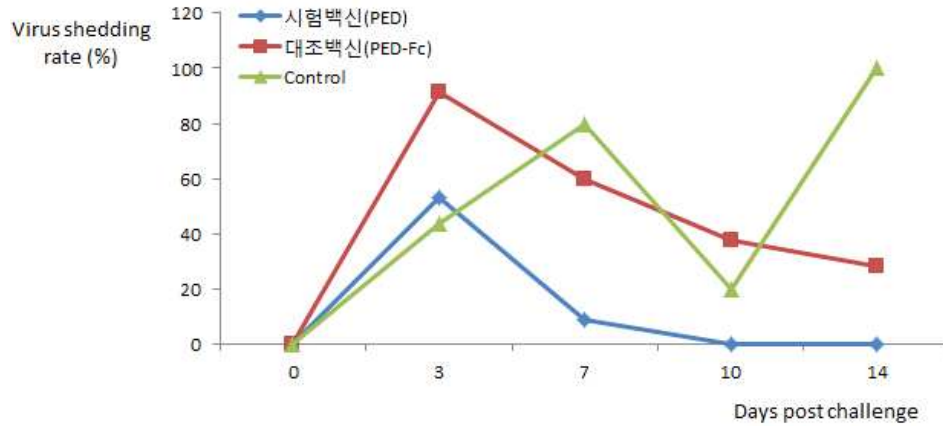


그림 66. 공격접종 후 분변으로의 virus shedding 결과

- 공격접종 후 분변을 통한 virus shedding을 확인한 결과에서는 시험백신 접종군의 경우, 공격접종 후 3일째에 50% 정도의 개체에서 분변 내 PEDV 항원이 검출되었고, 이후 급격히 감소하여 공격접종 10일째부터는 모든 생존개체가 바이러스 배출이 없었다.
- 대조백신 접종군의 경우, 시험백신 접종군과 유사한 패턴을 보여주긴 하였지만. 공격접종 3일째에 90% 이상의 개체가 바이러스를 배출하였고, 마지막 관찰시점인 공격접종 14일 경과시점까지도 30% 정도의 생존개체가 분변을 통해 바이러스를 배출하고 있었다.
- 비접종 대조군의 경우, 3일째부터 분변으로 바이러스를 배출하기 시작함과 동시에 폐사가 시작되었고, 마지막 관찰시점에서는 1마리를 제외한 모든 개체가 폐사하였다.

표 37. 포유자돈 분변으로의 바이러스 shedding

그룹	공격접종 후 시기별 바이러스 shedding 유무 (양성 개체 수/생존 개체 수)				
	0일	3일	7일	10일	14일
시험백신 접종군	0/15	8/15	1/11	0/11	0/11
대조백신 접종군	0/12	11/12	6/10	3/8	2/7
비접종 대조군	0/16	7/16	4/5	1/5	1/1

\* 시험백신 : PEDV CKT-7\_N, 대조백신 : PEDV CKT-7\_N\_Fc



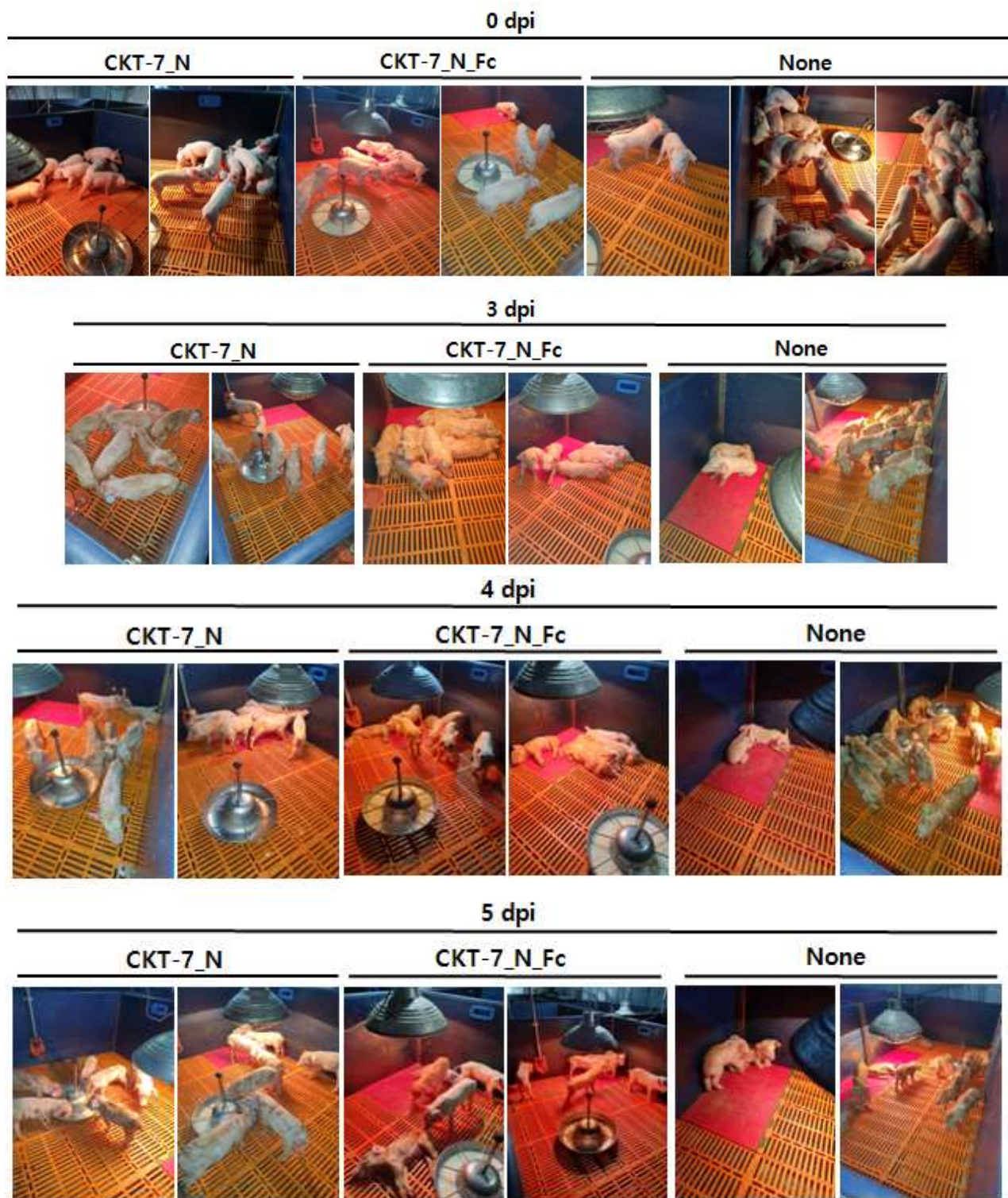


그림 67. 공격접종 후 각 그룹별 임상증상 관찰 결과 (0 DPI ~ 5 DPI)



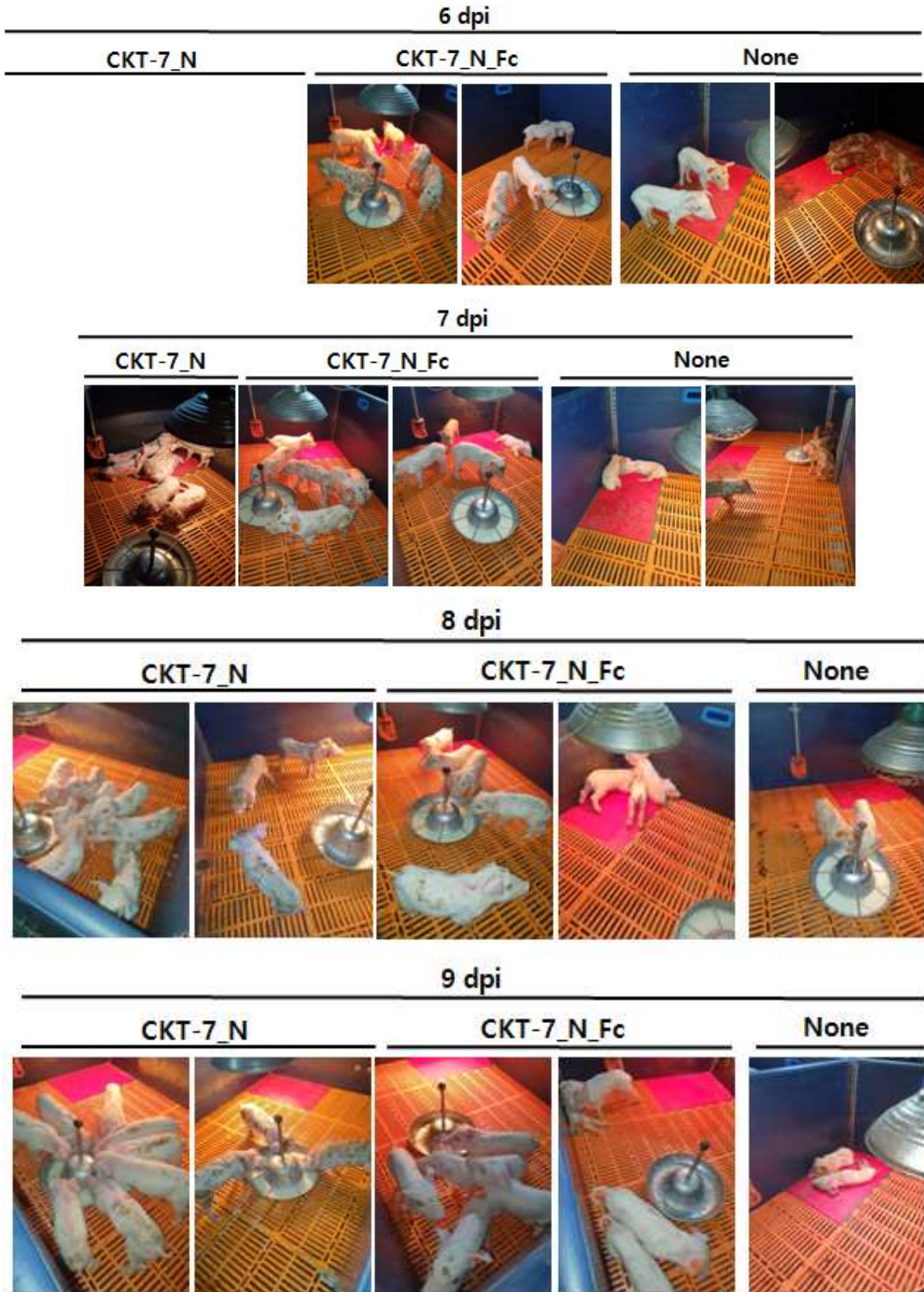


그림 68. 공격접종 후 각 그룹별 임상증상 관찰 결과 (6 DPI ~ 9 DPI)



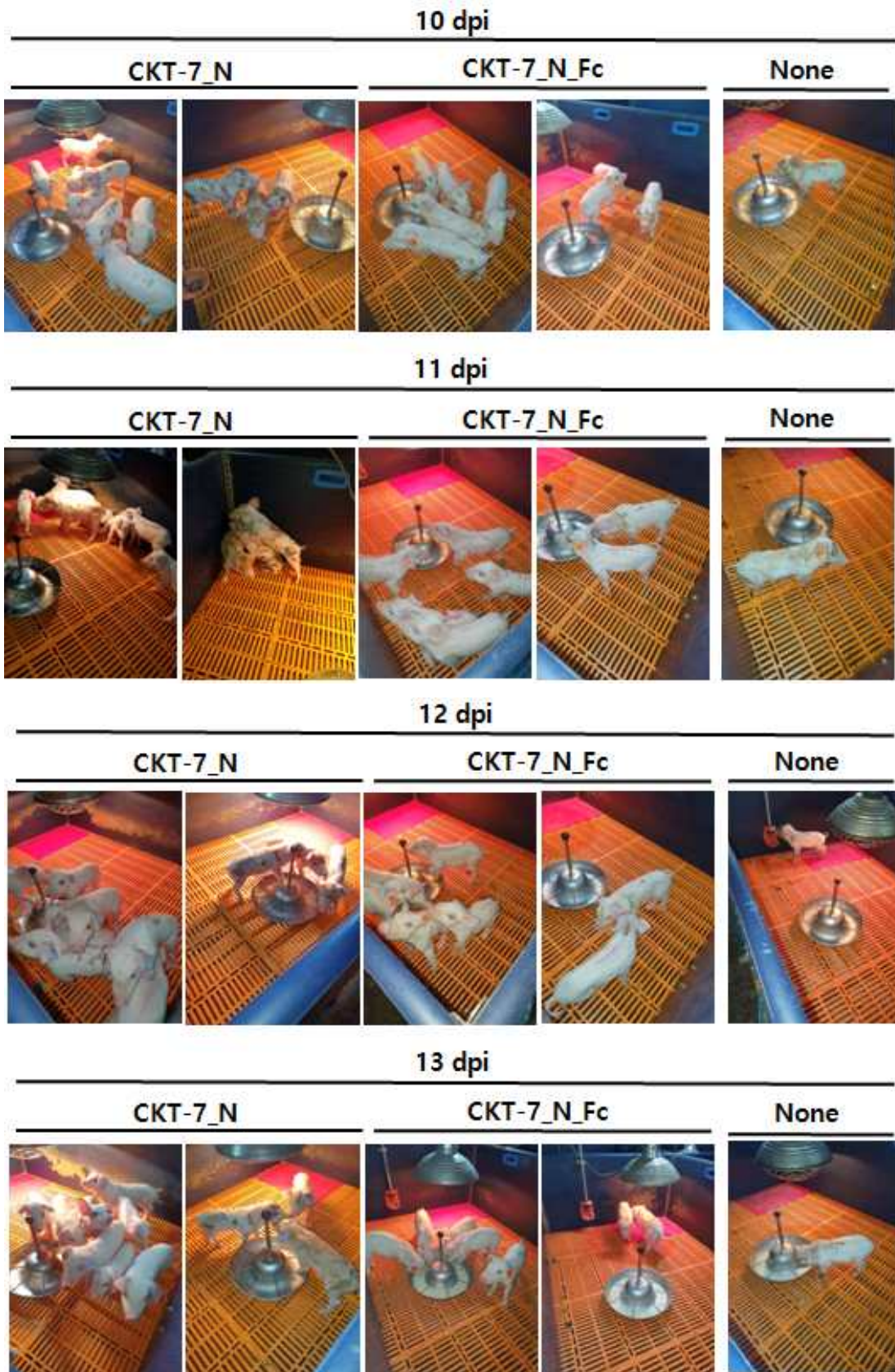


그림 69. 공격접종 후 각 그룹별 임상증상 관찰 결과 (10 DPI ~ 13 DPI)

6) 공격접종 후 자돈 생존율

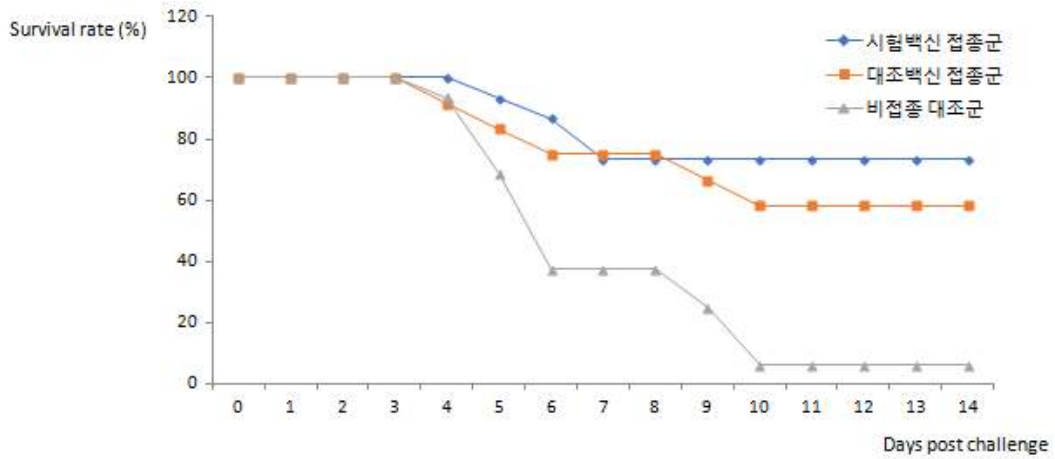


그림 70. 공시 자돈의 누적 생존율

- 시험백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종 후 최종 생존율 73.3%로 확인되었으며, 자돈 이행항체가 결과와 동일하게 모든 당 편차가 심하게 나타났다. (모돈 1복은 42.8% 생존, 나머지 모돈 1복은 100% 생존)
- 대조백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종 후 최종 생존율 58.3%로 시험백신 접종군 보다 결과가 좋지 않았고, 앞서 확인된 공격접종 후 분변으로의 바이러스 shedding 결과와도 경향성이 동일하다. 다만, 항체가 지표는 시험백신 접종군보다 대조백신 접종군에서 더 우수했다는 점과, 대조백신 접종군의 경우 모돈 복 당 분만 자돈 수가 적어 건강한 자돈의 선별과정 없이 모든 자돈을 실험에 사용했었다는 점 등을 감안할 필요가 있다.
- 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종에 대하여 전혀 방어를 하지 못하였고, 16마리 중 1마리가 생존하였지만, 나머지 15마리가 모두 폐사하여 10% 미만의 생존율을 보였다.

표 38. 공시 자돈의 누적 폐사율 raw data

그룹	공격접종 후 시기별 폐사 개체 수 (폐사 개체 수/생존 개체 수)							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
시험백신 접종군	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	1/14	2/13	0/11
대조백신 접종군	0/12	0/12	0/12	1/12	1/11	1/10	0/9	0/9
비접종 대조군	0/16	0/16	0/16	1/16	4/15	5/11	0/6	0/6
그룹	공격접종 후 시기별 폐사 개체 수 (폐사 개체 수/생존 개체 수)						누적 폐사율	
	9일	10일	11일	12일	13일	14일		
시험백신 접종군	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	26.7 %	
대조백신 접종군	1/9	1/8	0/7	0/7	0/7	0/7	41.7 %	
비접종 대조군	2/6	3/4	0/1	0/1	0/1	0/1	93.8 %	

7) 공격접종 후 자돈 증체율

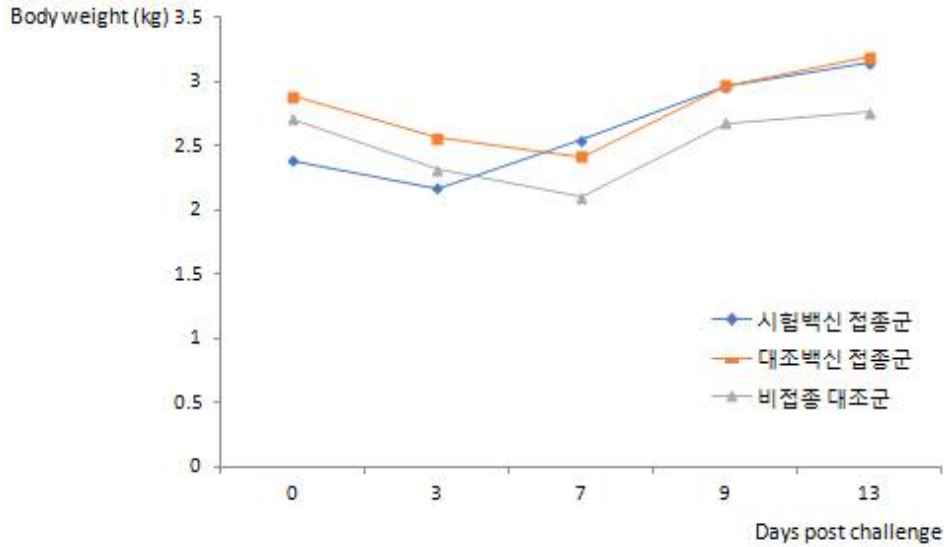


그림 71. 공시 자돈의 체중

- 시험백신 접종군의 경우, 공격접종 후 3일째까지 체중이 감소하다가 7일째부터 증가하기 시작하여 종료일에 평균 0.76 kg의 증체량을 보였고, 대조백신 접종군의 경우, 공격접종 후 7일째까지 체중이 감소하다가 9일째부터 회복하기 시작하여 종료일에 평균 0.30 kg의 증체량을 보였다.
- 비접종 대조군의 경우, 백신 접종군과 체중이 감소하고 증가하는 패턴은 유사하였지만, 심한 설사로 인한 체중 감소도중에 대부분 폐사하였고, 살아있는 개체도 백신 접종군과 비교하여 체중 회복이 매우 더디게 진행되었다.

표 39. 생존한 자돈의 일령별 평균 체중

그룹	공격접종 후 시기별 평균 체중 (kg)					증체량 (kg)
	0일	3일	7일	9일	13일	
시험백신 접종군	2.39 (±0.51)	2.17 (±0.45)	2.55 (±0.46)	2.96 (±0.49)	3.15 (±0.54)	0.76
대조백신 접종군	2.89 (±0.15)	2.56 (±0.18)	2.42 (±0.29)	2.97 (±0.59)	3.19 (±0.23)	0.30
비접종 대조군	2.71 (±0.36)	2.32 (±0.42)	2.10 (±0.41)	2.68 (±0.46)	2.76	0.05

표 40. 시험백신 접종군 자돈 체중 raw data

그룹	모돈 번호	자돈 번호	공격접종 후 경과일별 체중 (kg)				
			0일	3일	7일	9일	13일
시험백 신 대조군	4	1	2.36	2.12	2.46	2.8	3.16
		2	1.9	1.74	폐사		
		3	2.1	1.94	2.22	2.64	2.92
		4	2.24	2.06	2.26	2.82	2.96
		5	2.22	1.9	폐사		
		6	2.06	1.8	폐사		
		7	1.56	1.62	폐사		
	30	8	3.06	2.83	3.18	3.42	3.5
		9	2.5	2.26	2.36	2.62	2.64
		10	2.66	2.52	2.84	3.14	3.42
		11	2.42	2.28	2.5	3.04	3.16
		12	3.26	3.06	3.16	3.66	3.86
		13	3.06	2.58	2.96	3.46	3.68
		14	2.78	2.4	2.52	3.1	3.4
		15	1.68	1.5	1.64	1.9	1.92
평균			2.39	2.17	2.55	2.96	3.15
편차			±0.51	±0.45	±0.46	±0.49	±0.54



표 41. 대조백신 접종군 자돈 체중 raw data

그룹	모돈 번호	자돈 번호	공격접종 후 경과일별 체중 (kg)				
			0일	3일	7일	9일	13일
대조백신 대조군	8	1	2.94	2.8	2.9	3.58	3.44
		2	2.98	2.5	2.1	폐사	
		3	2.86	2.5	2.56	3.18	3.16
		4	3.06	2.76	2.44	2.92	2.92
		5	3	2.76	2.62	3.4	3.4
		6	2.98	2.36	폐사		
		7	2.58	2.44	2.52	2.98	3.2
	18	8	3.06	2.8	2.7	3.34	3.36
		9	2.72	2.52	2.09	폐사	
		10	2.96	2.36	폐사		
		11	2.75	2.34	2.04	2.7	2.86
		12	2.84	2.54	2.22	1.68	폐사
평균			2.89	2.56	2.42	2.97	3.19
편차			±0.15	±0.18	±0.29	±0.59	±0.23

표 42. 비접종 대조군 자돈 체중 raw data

그룹	모돈 번호	자돈 번호	공격접종 후 경과일별 체중 (kg)				
			0일	3일	7일	9일	13일
비접종 대조군	25	1	2.46	2.2	1.98	폐사	
		2	2.36	2.1	1.84	2.48	2.76
	31	3	2.94	2.8	2.62	3.08	폐사
		4	2.75	2.28	폐사		
		5	2.64	2.58	폐사		
		6	2.56	1.98	1.9	폐사	
		7	2.96	2.3	폐사		
		8	2.78	2.34	2.1	2.12	폐사
		9	2.9	2.56	2.3	폐사	
		10	2.1	1.7	폐사		
		11	2.7	1.56	1.5	폐사	
		12	2.7	2.42	폐사		
		13	3.62	3.24	2.8	3.02	폐사
		14	3.14	2.72	폐사		
		15	2.5	2.26	1.86	폐사	
		16	2.3	2	폐사		
평균			2.71	2.32	2.10	2.68	2.76
편차			±0.36	±0.42	±0.41	±0.46	-

8) 공격접종 후 자돈 임상증상

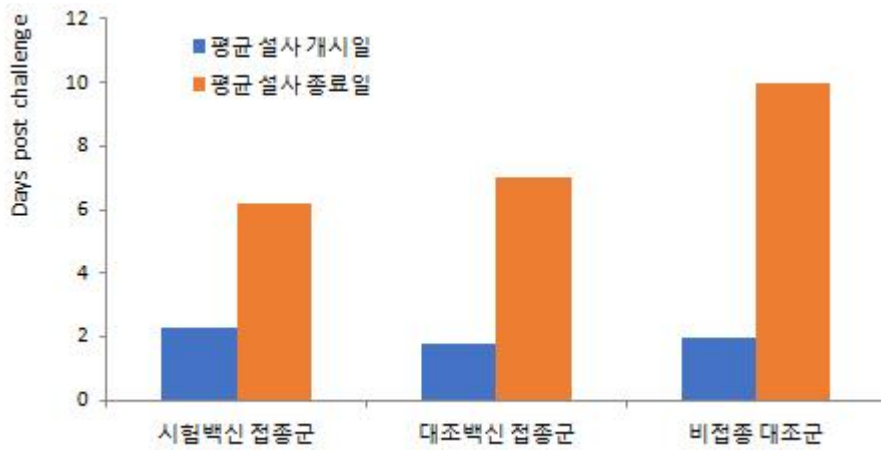


그림 72. 공시 자돈의 평균 설사 개시 및 종료일

- 시험백신 및 대조백신 모돈에서 태어난 자돈들과 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들 모두 공격접종 후 일정 수준 이상의 설사 증상을 보였다. 다만, 백신 접종군들의 경우, 설사 증상이 4~5일 지속되다가 멈추고, 체중이 회복한 반면, 비접종 대조군의 경우, 심한 설사 증상이 지속되면서 90% 이상이 폐사하였고, 살아남은 개체 또한 설사가 장기간 지속되었다.
- 시험백신 접종군의 경우, 설사 개시 후 종료까지 걸린 시간이 평균 6.2일로, 대조백신 접종군 7일, 비접종 대조군 10일보다 짧았다.

표 43. 공격접종 후 설사 증상

그룹	공격접종 후 시기별 설사 증상 개체 수 (설사 개체 수/생존 개체 수)							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
시험백신 접종군	0/15	11/15	15/15	15/15	14/14	13/13	2/11	0/11
대조백신 접종군	2/12	12/12	11/12	11/11	10/10	9/9	9/9	0/9
비접종 대조군	0/16	16/16	16/16	15/15	11/11	6/6	6/6	6/6
그룹	공격접종 후 시기별 폐사 개체 수 (폐사 개체 수/생존 개체 수)						평균 개시일	평균 종료일 *
	9일	10일	11일	12일	13일	14일		
시험백신 접종군	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	2.3일	6.2일
대조백신 접종군	0/8	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1.8일	7일
비접종 대조군	4/4	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	2일	10일

\* 설사증상 종료일은 각 그룹 당 생존 개체의 결과 값만 포함

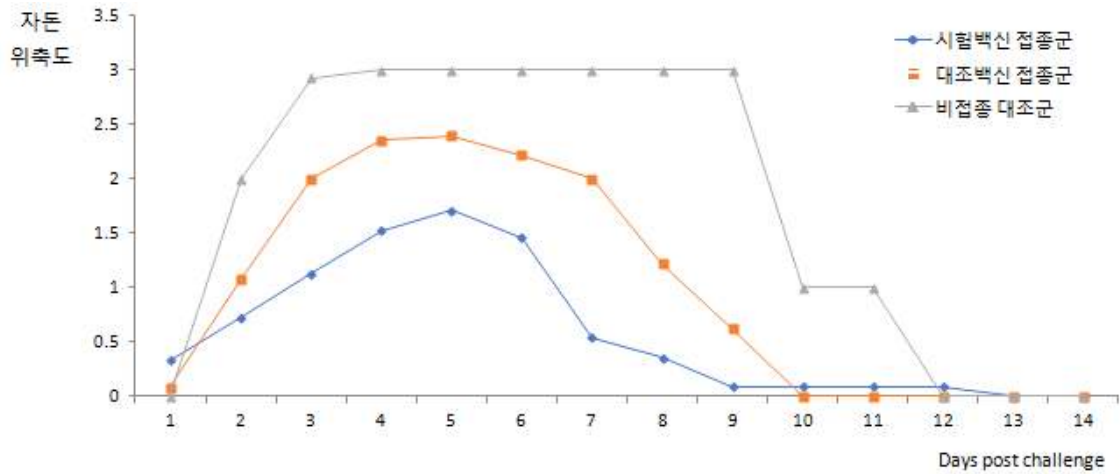


그림 73. 공격접종 후 공시 자돈의 평균 위축도

○ 공격접종 후 사료 섭취가 줄어들고, 설사 증상이 심할수록 공시 자돈의 위축 정도가 증가한다. 이를 0~3점으로 수치화하여 그룹 간 위축자돈 발생 정도를 비교한 결과, 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 공격접종 3일 이후 전 개체가 위축 정도가 심각했던 반면, (이후 90% 이상 폐사) 백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 약하거나 중등도의 위축 개체가 발생하였지만, 시험백신 접종군은 70% 이상, 대조백신 접종군은 50% 이상 정상으로 회복하였다.

표 44. 공격접종 후 자돈의 위축도

그룹	공격접종 후 시기별 자돈 평균 위축도							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
시험백신 접종군	0.33	0.73	1.13	1.53	1.71	1.46	0.54	0.36
대조백신 접종군	0.08	1.08	2.00	2.36	2.40	2.22	2.00	1.22
비접종 대조군	0.00	2.00	2.93	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
그룹	공격접종 후 시기별 자돈 평균 위축도							
	9일	10일	11일	12일	13일	14일		
시험백신 접종군	0.09	0.09	0.09	0.09	0.00	0.00		
대조백신 접종군	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
비접종 대조군	3.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00		

\* 위축도 : 0 ; Normal, 1 ; Mild, 2 ; Moderate, 3 ; Severe

표 45. 시험백신 접종군 자돈 위축도 raw data

그룹	모돈 번호	자돈 번호	공격접종 후 경과일 별 위축도 점수														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
시험백 신 접종군	4	1	0	0	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0
		2	0	0	1	2	2	2	폐사								
		3	1	0	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		4	1	0	1	1	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
		5	1	1	2	2	3	폐사									
		6	1	1	1	3	폐사										
		7	1	1	1	3	3	3	폐사								
	30	8	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		9	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		11	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		12	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		13	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		14	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		15	0	1	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
합계			5	11	17	23	24	19	6	4	1	1	1	1	0	0	
평균			0.33	0.73	1.13	1.53	1.71	1.46	0.54	0.36	0.09	0.09	0.09	0.09	0.00	0.00	

표 46. 대조백신 접종군 자돈 위축도 raw data

그룹	모돈 번호	자돈 번호	공격접종 후 경과일 별 위축도 점수														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
대조백 신 접종군	8	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	
		2	0	1	2	2	3	폐사									
		3	0	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	
		4	0	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
		5	0	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
		6	0	1	2	폐사											
	18	7	0	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
		8	0	1	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
		9	0	1	2	3	3	3	3	2	폐사						
		10	0	1	2	3	폐사										
		11	0	1	2	2	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
		12	0	1	2	3	3	3	3	3	3	폐사					
합계			1	13	24	26	24	20	18	11	5	0	0	0	0	0	
평균			0.08	1.08	2.00	2.36	2.40	2.22	2.00	1.22	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

표 47. 비접종 대조군 자돈 위축도 raw data

그룹	모돈 번호	자돈 번호	공격접종 후 경과일 별 위축도 점수															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
비접종 대조군	25	1	0	2	3	3	3	3	3	3	폐사							
		2	0	2	2	3	3	3	3	3	3	1	1	0	0	0		
	31	3	0	2	3	3	3	3	3	3	3	폐사						
		4	0	2	3	3	폐사											
		5	0	2	3	3	3	폐사										
		6	0	2	3	3	3	폐사										
		7	0	2	3	폐사												
		8	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	폐사					
		9	0	2	3	3	3	3	3	3	폐사							
		10	0	2	3	3	폐사											
		11	0	2	3	3	3	폐사										
		12	0	2	3	3	폐사											
		13	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	폐사					
		14	0	2	3	3	폐사											
		15	0	2	3	3	3	폐사										
		16	0	2	3	3	3	폐사										
		합계			0	32	47	45	33	18	18	18	12	1	1	0	0	0
		평균			0.00	2.00	2.93	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00



9) 부검 및 조직학적 소견



그림 74. 공격접종 종료 후 공시자돈의 장 병변 점수

- 공격접종 후 폐사한 개체 및 공격접종 종료 후 살아남은 개체를 안락사 후 부검하여 PEDV 감염에 의한 위장 병변을 확인하였다. 위장의 충혈과 팽만 정도에 따라 0~3점으로 수치화하였으며, 그 결과, 시험백신 및 대조백신 접종군 모돈에서 태어난 자돈들은 약하거나 중등도의 위장 병변을 보였고, 비접종 대조군 모돈에서 태어난 자돈들은 중등도에서 심각한 수준의 위장 병변을 보였다.

표 48. 부검 후 그룹별 임상점수

그룹	부검 후 평균 장 병변 점수*
시험백신 접종군	1.93
대조백신 접종군	1.83
비접종 대조군	2.26

\* 장 병변 점수 : 0 ; Normal, 1 ; Mild, 2 ; Moderate, 3 ; Severe

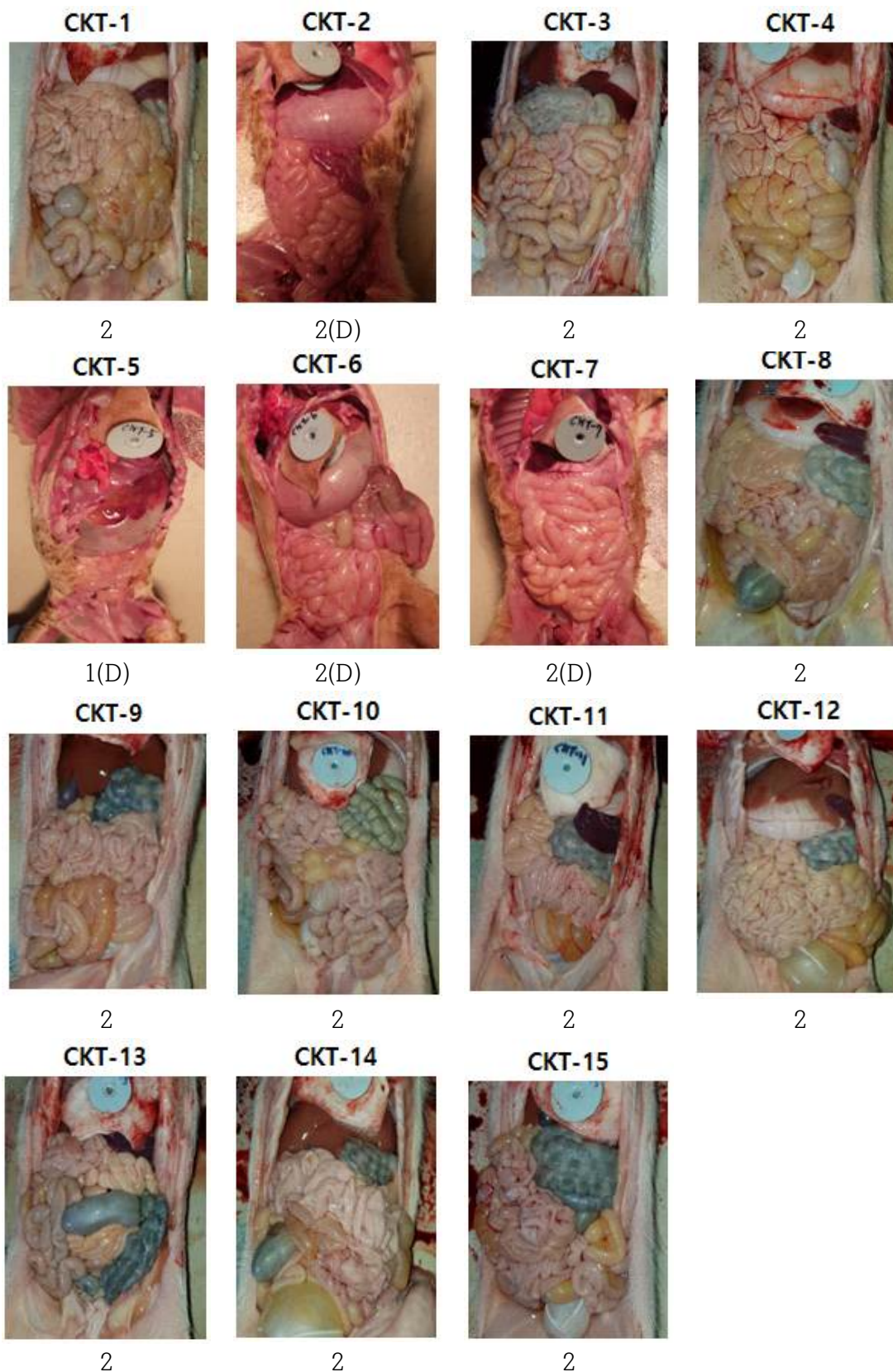


그림 75. 시험백신 접종군의 부검 후 그룹별 임상점수 raw data

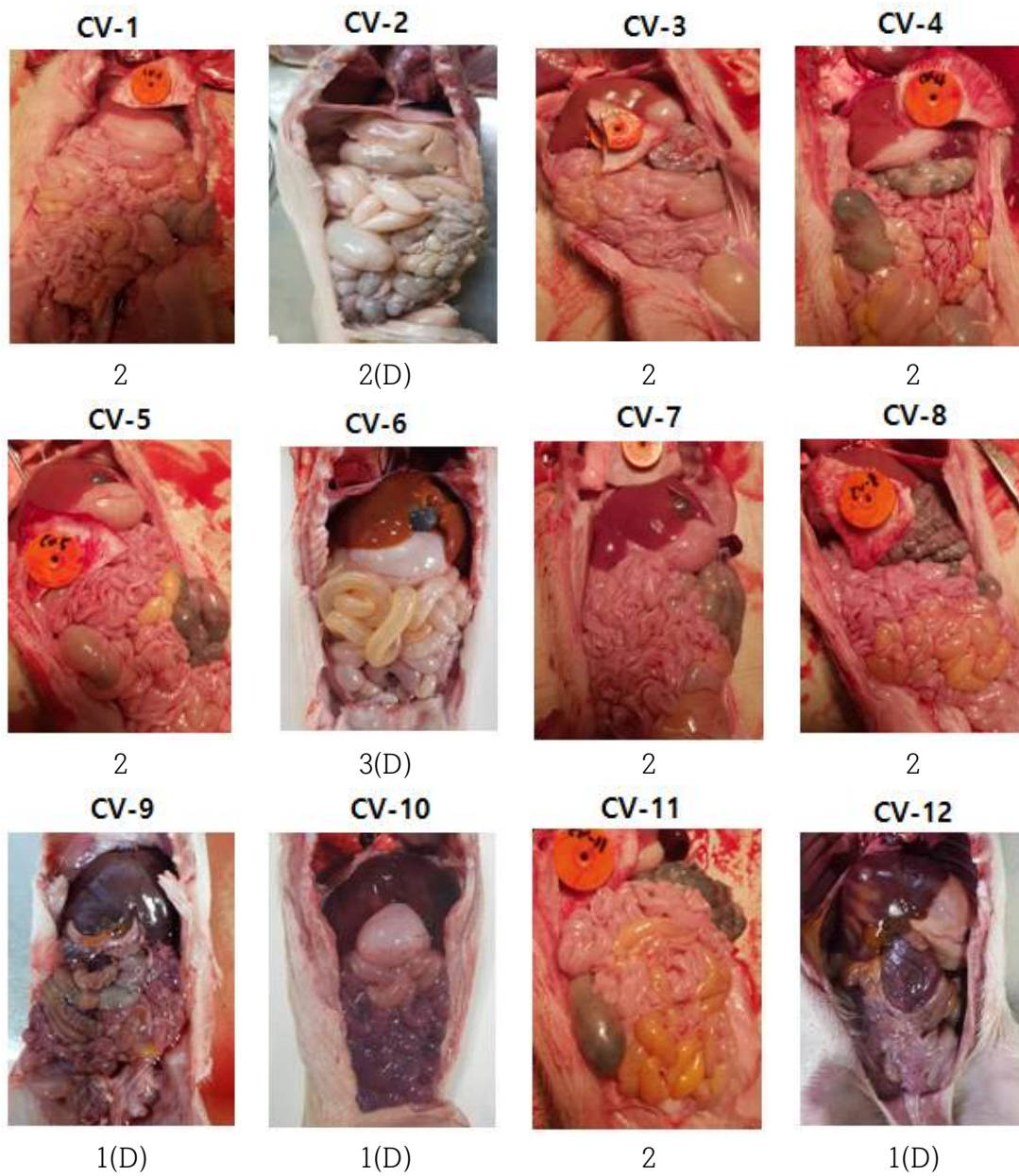


그림 76. 대조백신 접종군의 부검 후 그룹별 임상점수 raw data



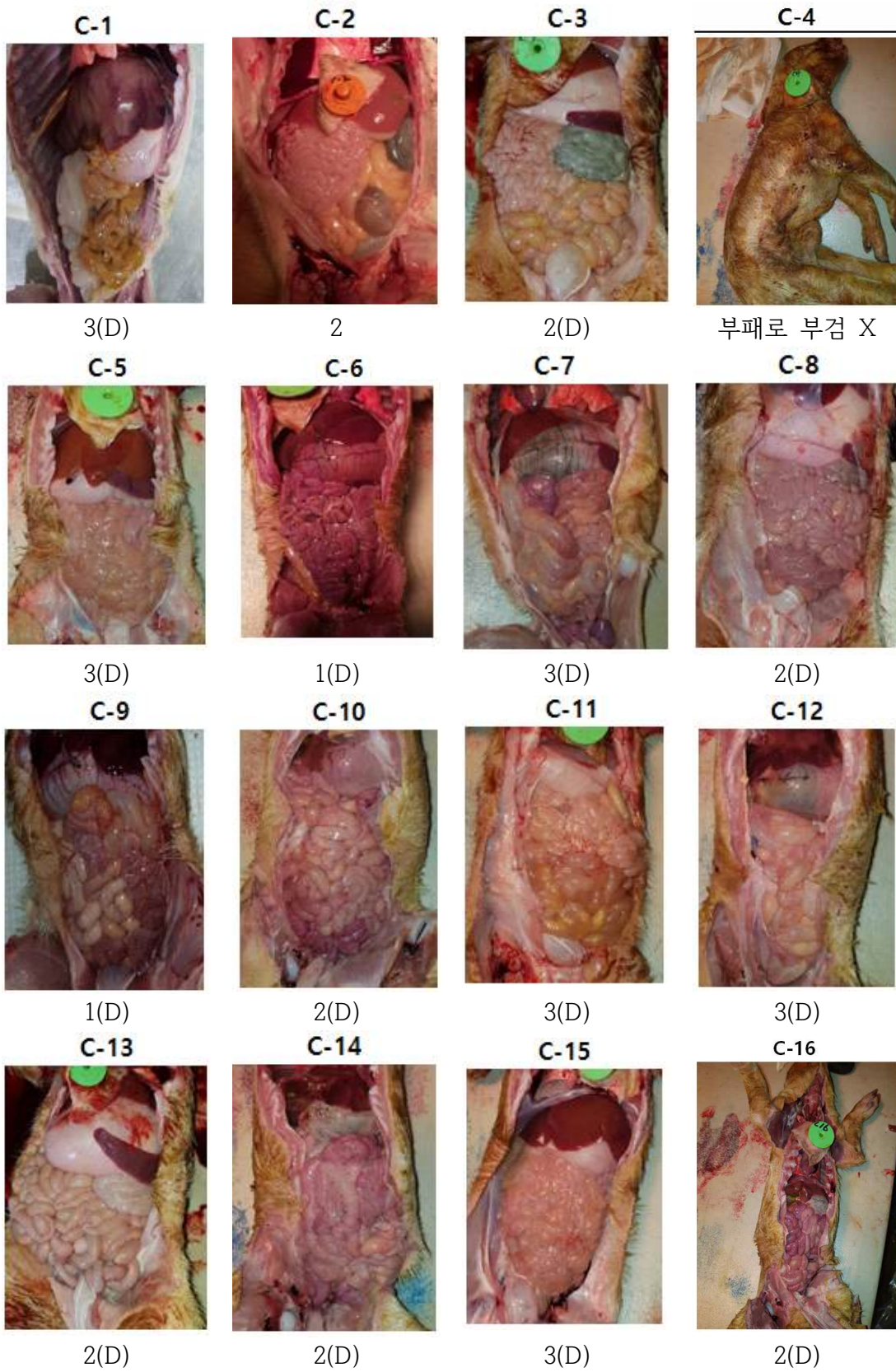


그림 77. 비접종 대조군의 부검 후 그룹별 임상점수 raw data

### 2.10.3. 임신 모돈 방어능 시험 결론

- 1) PED 경구용 생백신 제조에 사용되는 PEDV CKT-7\_N strain (p177)은  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/dose의 고 역가로 임신 모돈에 경구 투여하더라도 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 제작한 Fc 바이러스 또한 임신 모돈에서 동일한 결과를 얻었다. (기존에 시판중인 경구용 PED 생백신들의 경우, 1 dose 당 역가 수준이  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 수준으로 이번 실험에 사용된 바이러스 역가는 기존 제품들 대비 50배 이상 고역가 바이러스임)
- 2) Fc 바이러스를 임신 모돈의 경구로 투여했을 경우, 동일 strain, 동 역가의 바이러스를 경구로 투여했을 때 보다 임신 모돈의 혈중 중화항체, 초유 내 중화항체가 높게 형성되었음은 물론, 공격접종 전 포유 자돈의 중화항체 및 분변 내 IgA 항체가 수준 또한 높게 나타났다.
- 3) 백신 접종 모돈에서 태어난 6~7일령 포유 자돈을 대상으로 PEDV 야외 강독주로 공격접종을 실시한 결과, 중화항체가 결과와 달리, Fc를 포함하지 않은 생백신 투여 그룹에서 폐사 생존율, 설사 증상 경감, 바이러스 shedding 경감, 증체율 향상 등과 같은 대부분의 지표들이 더 우수한 결과를 보였다. 같은 기간 내 백신 비접종 모돈에서 태어난 자돈들의 경우, 90% 이상 폐사하여 다른 백신 접종군들과 확연한 차이를 보였다.
- 4) PED 근육백신 접종시에는 백신을 접종한 모돈의 혈중 중화항체가, 초유 내 중화항체가 및 IgA 항체가 수준이 높을수록 포유자돈의 공격접종 방어율 또한 높아지는 양상을 보였으나, 이번 PED 경구용 생백신 실험에서는 다소 상관관계가 떨어지는 결과를 얻었고, 이에 대한 원인을 분석한 결과, 첫 번째, 농장 사정으로 그룹 당 많은 수의 모돈을 선별하지 못하여 개체 편차가 컸던 점, 두 번째, 시험백신 접종군의 경우, 모돈 복 당 산자수가 많아서 건강한 자돈을 선별하여 실험에 사용했었던 반면, 대조백신 접종군의 경우, 모돈 복 당 산자수가 적어 분만된 대부분의 자돈을 모두 실험에 사용하여 허약자돈 등을 실험에서 제외하지 못한 점, 그리고, 실험 공간의 제약으로 포유자돈의 공격접종 시점이 5~7일로 그룹 간 차이가 있었던 점 등을 들 수 있다. (실제로, 시험백신 접종군 모돈 중 1마리에서 태어난 자돈들은 100% 생존한 반면, 나머지 1마리에서 태어난 자돈들은 대조백신 접종군 모돈 2마리에서 태어난 자돈들보다 생존율이 저조하였음)
- 5) 결론적으로, 시험디자인의 한계로 인하여 본 실험에서는 Fc 백신의 우수성에 대하여 명확히 입증하지는 못하였지만, 5일령 자돈과 임신 모돈 모두에서 안전하게 사용할 수 있는 고역가의 G2b형 PEDV master seed가 확보된 점과 이를 이용하여 Fc 바이러스가 정상적으로 만들어지고, 임신 모돈에서 고 역가의 중화항체가 형성된 점 등을 감안하면 향후 제품화에 큰 문제가 없으리라 판단된다.

## 2.11. 연속 3 Lot 시제품 제작 및 평가

### 2.11.1. 연속 3 Lot 시험백신 제조



그림 78. 임상시험용 백신 시제품 제작 결과

### 2.11.2. 연속 3 Lot 시험백신에 대한 물리·화학적 특성 확인

동물용의약품 국가출하승인검정 기준 중 “1-2-03-01 돼지 유행성 설사 바이러스 생건조백신 (경구용) 검정기준”에 준하여 아래와 같이 실험을 진행하였다.

#### 1) 특성시험

국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  냉암소에 보관하면서 특성시험을 진행하였다.

- 2개 이상의 백신에 대하여 무색투명한 용기의 백신은 백신 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18 ~ 20 mm의 무색투명한 유리 용기에 옮겨서 색조, 투명도(혼탁도), 이물, 이취, 내용물의 균일성에 대하여 검사한다.
- 그 결과, 3 Lot 모두 황백색의 건조괴로 용해용액으로 용이하게 용해되며, 이물 또는 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하였다.

표 49. 연속 3 Lot 시험백신에 대한 특성시험 결과

제조번호	제조직 후
KM-PEDM-01	적합
KM-PEDM-02	적합
KM-PEDM-03	적합



2) 진공도 시험

- 국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3℃ 냉암소에 보관하면서 진공도 시험을 진행하였다.
- 암실에서 백신으로부터 5~10 mm 떨어진 위치에 테스터 코일을 놓고 방전의 유무를 관찰한 결과, 모두 적합한 결과를 보였다.

표 50. 연속 3 Lot 시험백신에 대한 진공도 시험 결과

제조번호	제조직 후
KM-PEDM-01	적합
KM-PEDM-02	적합
KM-PEDM-03	적합

3) 수소이온농도시험

- 국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3℃ 냉암소에 보관하면서 수소이온 농도 시험을 진행하였다.

[수소이온농도 시험 방법]

① pH 표준액

- pH 표준액은 pH의 기준으로 쓴다. pH 표준액의 조제에 쓰는 물은 정제수를 증류하여 유액을 15분 이상 끓여서 이산화탄소를 날려 보내고 이산화탄소흡수관(소오다석회)을 달고 식힌다. 표 2의 pH 표준액은 경질유리병 또는 폴리에틸렌병에 보관한다. 장기간의 보관에 의해 pH가 변화될 때가 있으므로 보통 산성의 pH 표준액은 3개월 이내에 쓰고 염기성의 pH 표준액은 이산화탄소흡수관(소오다석회)을 달아 보관하며 1개월 이내에 쓴다. 제조한지 오래된 것은 새로 만든 것과 비교하여 pH가 같은지 확인한 다음 쓴다.

② 장치

- pH 측정기는 다음 조작법에 따라 임의의 한 종류의 pH 표준액의 pH를 매회 검출부를 물로 잘 씻은 다음 5 회 반복하여 측정 했을 때 그 재현성이 ±0.05 pH 이내의 것을 쓴다.

③ 조작법

- 유리전극은 미리 물에 수 시간 이상 담구어 둔다. pH 측정기는 전원을 넣어 장치가 안정된 것을 확인한 다음에 쓴다. 검출부를 물로 잘 씻고 부착한 물은 여과지 등으로 가볍게 닦아 낸다. 두 종류의 pH 표준액을 써서 pH 측정기를 보정하며, 다음과 같이 한다. 전극을 인산염 pH 표준액에 담그고 영점교정용다이어로 표의 pH에 일치시킨다. 다음에 예상되는 검액의 pH에 가까운 pH를 갖는 두 번째 pH 표준액을 사용하여 같은 조건으로 pH를 측정한다. 장치의 교정이 끝난 다음 검출부를 물로 잘 씻고 여과지 등으로 가볍게 닦

아낸다. 검출부를 검액에 담그고 안정된 지시 값이 얻어지는지를 확인한 다음 그 값을 읽는다. 또한 검액의 온도는 교정에 쓴 pH 표준액의 온도와 같게 한다. ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

○ 그 결과, pH 6.0~8.0 이내로 정상 범위를 유지하고 있었다.

표 51. 연속 3 Lot 시험백신에 대한 수소이온농도시험 결과

제조번호	제조직 후
KM-PEDM-01	7.12
KM-PEDM-02	7.20
KM-PEDM-03	7.15

#### 4) 함습도 시험

○ 국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  냉암소에 보관하면서 함습도 시험을 진행하였다.

[함습도 시험 방법]

칼-피쉬법 (Karl-Fischer method)에 따라 함습도를 측정하였다.

##### ① 장치

- 자동뷰렛 1개, 적정플라스크(250 ml), 교반기 및 정전압 전류적정 장치로 되어 있다. 칼-피쉬 시약은 흡습성이 매우 강하므로 외부로부터의 흡습을 방지하여야 한다. 방습 재료로는 실리카겔을 쓴다.

##### ② 칼-피쉬 시약

- pH범위 (5 ~ 7)를 적절히 조절할 수 있는 염기인 imidazole 이나 diethanolamine을 포함하고 있는 Hydranal composite 5 pyridine free 시약을 사용한다. 이외에 Hydranal-Solvent와 Hydranal-Titrant, Hydranal-Coulomat A와 Coulomat C을 사용하여 적정할 수도 있다.

##### ③ 조작법

- 뷰렛에 칼-피쉬 시약(Hydranal composite 5)을 넣는다.
- 적정용기에 용제인 methanol을 넣는다.
- 칼-피쉬 시약으로 methanol내의 수분을 제거한다.
- 시료를 가한다.
- 칼-피쉬 시약으로 시료내의 수분을 정량한다.
- 칼-피쉬 시약으로 hydranal composite 5외에 다른 시약을 쓸 경우는 그 시약에 맞는 적당한 용제로 바꾸어 쓰면 된다.

○ 칼 피쉬법에 의한 함습도 측정 결과, 3 Lot 모두 6% 이하로 정상을 유지하고 있었다.

표 52. 연속 3 Lot 시험백신에 대한 함습도 시험 결과

제조번호	제조직후
KM-PEDM-01	2.59
KM-PEDM-02	2.75
KM-PEDM-03	2.81

5) 무균시험

- 국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3℃ 냉암소에 보관하면서 무균 시험을 진행하였다.

[무균시험 방법]

① 백신의 개봉

- 시험은 무균실에서 엄격한 무균 조작법에 의하여 실시한다. 백신의 개봉 시에는 내용이 오염되든가, 소독제가 내부에 침입하지 않도록 주의하여야 한다.

② 배지

- 배지는 nutrient broth, nutrient agar 사면 및 액체 thioglycolate 배지를 사용한다. 액체 thioglycolate 배지의 상부에서 30% 이상이 핑크색으로 변한 것은 사용하여서는 안 되며 가열하여 산소를 제거하였을 때에는 무방하다. 단, 무균시험에 필요하다고 인정될 때에는 마이코플라스마 배지등 각종 다른 배지를 사용할 수 있다.

③ 배양재료

- 3개 이상의 백신에 대하여 액상 제제는 그대로, 건조제제는 첨부된 희석액으로, 첨부 희석액이 없는 건조제제는 규정량의 멸균 생리식염수로 용해한 후 다음 표와 같이 배양한다.
- 1개 당 배지량은 nutrient agar는 10 ml, nutrient broth는 10 ml, 액체 thioglycolate 배지는 10 ml 이상으로 한다.

표 53. 검사품의 표시량에 따른 배양 조건

검사품의 표시량	배양량	배지 개수	배양 내역
30 ml 이 상	6 ml	4개	2 ml - 2 개 1 ml - 2 개
30 ml 미 만	3 ml	4개	1 ml - 2 개 0.5 ml - 2 개

④ 배양

- 접종 후 충분히 혼합한 배양 시험관을 양분하여 32℃ 및 22℃에서 각각 7일간 배양 관찰한다. 단, 세균의 발육이 의심될 때 또는 제제에 의하여 배지가 혼탁할 경우 등 필요하다고 인정될 때에는 새로운 배지에 이식하여 4일간 관찰할 수 있다.

○ 그 결과, 3 Lot 모두 어떠한 세균 및 곰팡이의 발육도 없이 무균 상태가 잘 유지되고 있었다.

표 54. 연속 3 Lot 시험백신에 대한무균 시험 결과

제조번호	무균시험 결과		
	배지	관찰결과 (관찰 기간 : 14일)	
		22℃	37℃
KM-PEDM-01	Nutrient Agar	-*	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-
KM-PEDM-02	Nutrient Agar	-	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-
KM-PEDM-03	Nutrient Agar	-	-
	Nutrient Broth	-	-
	Liquid thioglycollate	-	-

-\* : 어떠한 세균의 증식도 발견되지 않음

6) 마이코플라즈마 부정시험

○ 국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3℃ 냉암소에 보관하면서 24개월 동안 마이코플라즈마 부정시험을 진행하였다.

[마이코플라즈마 부정시험 방법]

① DNA 추출

- 백신 희석액으로 용해시킨 공시품 1 ml을 12,000 g에서 30분 동안 원심분리한다. 상층액을 제거하고, 그 침전물에 25 μl lysis buffer(10mM Tris-HCl(pH 8.3), 100mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tween 20, 1% Triton X-100, proteinase K 120 μg/ml)를 첨가 혼합하여 60℃, 1시간 동안 정치시킨 후, 100℃ 10분간 가열한 다음 얼음에 정치시킨다. DNA 추출 방법은 상기와 동일한 방법 또는 그와 동등한 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 사용할 수 있다. 대조군으로는 양성대조군과 음성대조군(희석액)으로 하며, 상기의 추출법과 동일하게 적용한다. 양성 대조군의 공시균주로는 *Mycoplasma gallisepticum* 또는 *Acholeplasma laidlawii*로 한다.

② PCR

- 마이코플라즈마 오염을 확인하기 위하여 추출된 DNA 2 μl에 mycoplasma universal forward primer 및 reverse primer (별첨 1, 10 pmol/μl) 각각 1 μl와 PCR 반응액(H<sub>2</sub>O 12.9 μl, 10 x PCR buffer 1 μl, 10mM dNTPs 1 μl, Taq polymerase 0.1 μl) 16 μl을 첨가 혼합한 후, 94℃에서 5분간 denature시킨 후, 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초씩 반응되게 30 cycles 수행한 후 72℃에서 7분간 extension한다.

표 55. Mycoplasma 검출용 특이 PCR Primer 염기서열

Primer name	Nucleotide sequence(5'→3')
Universal forward primer	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
Universal reverse primer	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G

○ 그 결과, 3 Lot 모두 마이코플라즈마 미입 없이 무균 상태가 잘 유지되고 있었다.

표 56. 연속 3 Lot 시험백신에 대한 마이코플라즈마 부정시험 결과

제조번호	제조직 후
KM-PEDM-01	음성
KM-PEDM-02	음성
KM-PEDM-03	음성

## 2.12. Fc 면역증강 백신을 이용한 백신 접종 프로그램 연구

PED 백신의 접종 프로그램을 연구하기 위하여 경구용 생백신, 근육용 생백신 및 근육용 사독 백신을 활용하여 임신 모돈을 대상으로 접종 프로그램별로 백신을 접종하고, 포유 자돈에 대한 공격접종 방어능을 평가하여야 하나, 1년 9개월이라는 짧은 연구기간과 제한적인 연구비로 인하여 자돈에서 항체가를 측정하는 것으로 실험을 대체하였다.

### 2.12.1. 시험백신 준비 및 실험 방법

#### 1) 시험백신 준비

표 57. 시험백신 정보

백신명	투여경로	Virus	농도 (TCID <sub>50</sub> /dose)	접종량
LO1	경구(L)	CKT-7_N (P150)	7.0 log10	5 ml/1 dose
LO2	경구(L)	CKT-7_N (P160)	7.0 log10	5 ml/1 dose
LO3	경구(L)	CKT-7_N (P177)	7.0 log10	5 ml/1 dose
LM	근육(L)	CKT-7_N (P177)	7.0 log10	1 ml/1 dose
LOC	경구(L)	CKT-7_N-Fc*	7.0 log10	5 ml/1 dose
LMC	근육(L)	CKT-7_N-Fc	7.0 log10	1 ml/1 dose
KMC	근육(K)	PED-Fc(II)**	6.5 log10	2 ml/1 dose

\* CKT-7\_N-Fc : CKT-7\_N (P177)을 Vero-Fc cell line에 배양하여 제조

\*\* PED-Fc(II) : 기 허가된 코미팜의 G2b PEDV 사독백신

2) 실험동물 및 실험그룹

PEDV 백신을 접종하지 않은 모돈으로부터 태어난 4~6주령의 이유 자돈을 대상으로 하며, 총 30마리를 준비하여 27마리는 백신 접종군, 나머지 3마리는 비접종 대조군으로 한다. 백신 접종군은 다시 3마리씩 9그룹으로 세분화하여 각각의 시험백신에 대한 백신 접종 프로그램을 적용한다.

표 58. 실험그룹

그룹		접종방법	개체 수	비고
백신 접종군	경구 (LO1) + 경구 (LO1)	2주 간격 2회	3	
	경구 (LO2) + 경구 (LO2)		3	
	경구 (LO3) + 경구 (LO3)		3	
	경구 (LOC) + 경구 (LOC)		3	
	경구 (LO3) + 근육 (LM)		3	
	경구 (LO3) + 근육 (KMC)		3	
	근육 (LM) + 근육 (LM)		3	
	근육 (LMC) + 근육 (LMC)		3	
	근육 (KMC) + 근육 (KMC)		3	
비접종 대조군		-	3	

3) 백신접종

각각의 백신 접종군에 대하여 준비한 백신을 2주 간격으로 2회 투여한다. Oral 투여 군의 경우, 1 dose 당 volume은 5 ml, 근육 투여 군의 경우, 1 dose 당 volume은 사독은 2 ml, 생독은 1 ml로 한다.

4) 채혈

모든 개체에 대하여 백신 접종 전, 2차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 2 주 후에 각각 채혈하여 혈중 항체가 확인에 사용한다.

5) 분변 swb

모든 개체에 대하여 백신 접종 전, 1차 백신 접종 후 3일, 5일, 7일, 2차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 후 3일, 5일, 7일에 각각 분변을 채취하여 바이러스 shedding 및 IgA 측정에 사용한다.



## 2.12.2. 주요 실험 결과

### 1) 혈중 중화항체가 측정 결과



그림 79. 백신 접종 후 각 그룹별 혈중 중화항체가

- PEDV CKT-7\_N 바이러스를 경구로 2회 연속 투여한 경우, 혈중 중화항체가 평균 6~10배 수준으로 확인되었으며, 바이러스 passage 별 유의적 차이는 확인되지 않았다.
- PEDV CKT-7\_N\_Fc 바이러스를 경구로 2회 연속 투여한 경우, 혈중 중화항체가 평균 6배로 PEDV CKT-7\_N 바이러스 투여 그룹들과 유의적인 차이가 없었다. ( $p>0.05$ )
- 실험 그룹 중 혈중 중화항체가 가장 높게 확인된 그룹은 PEDV CKT-7\_N 바이러스를 근육으로 2회 접종했을 때로, 평균 64배의 중화항체가 형성되었고, PEDV CKT-7\_N\_Fc 바이러스를 동일하게 근육으로 2회 접종했을 경우는 평균 13배로 경구 투여 시와 큰 차이가 없었다. (다만, 그룹 별 개체 수가 적어 통계분석 시 모든 그룹 간에 통계적 유의성이 없는 것으로 확인 됨)
- 상용화된 Fc 불활화 백신이 사용된 그룹의 경우, 생백신 그룹과 유사한 중화항체 결과가 확인되었는데, 이는 중화용 바이러스가 서로 상이하야 상대적으로 중화항체 수준이 낮아진 결과로 볼 수 있다.

2) 혈중 ELISA 항체가 측정 결과

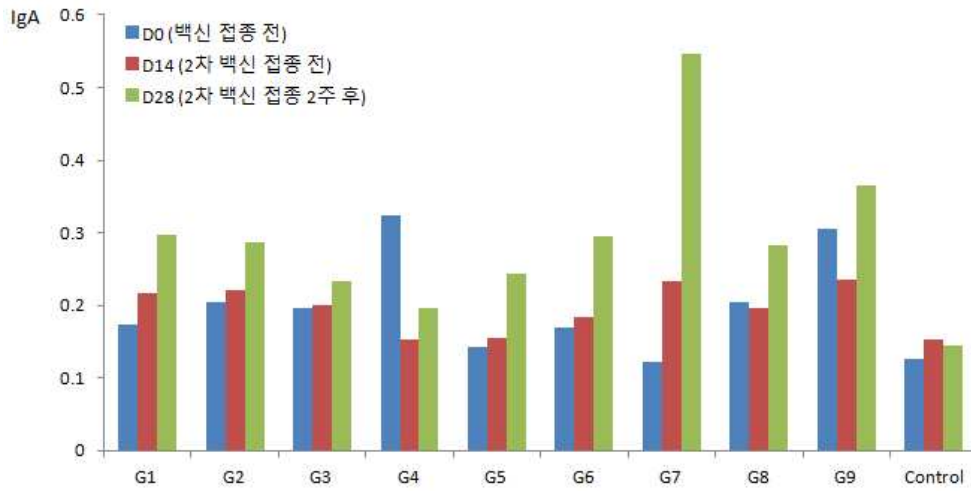


그림 80. 백신 접종 후 각 그룹별 IgA ELISA 항체가 결과

- IgA와 IgG ELISA 항체가의 경우에도 혈중 중화항체 결과와 유사한 패턴을 보였고, PEDV CKT-7\_N 바이러스를 근육으로 2회 접종한 그룹에서 가장 높은 값을 기록하였다.
- 기 허가된 PED 경구용 생백신의 경우, 중화항체가 외에 IgG ELISA 항체가로 백신의 면역원성을 평가하고 있는데, (200배 희석한 혈청의 IgG 항체가 기준) 백신 접종 전과 비교하여 IgG ELISA titer가 1.5배 이상 증가하여야 한다. 이에 따르면, PEDV CKT-7\_N 바이러스를 경구로 2회 접종한 그룹들의 경우, 각각 1.59배, 1.60배, 1.51배로 확인되며, PEDV CKT-7\_N\_Fc 바이러스를 경구로 2회 연속 투여한 그룹의 경우, 1.80배로 가장 양호한 항체형성능을 보여주었다.

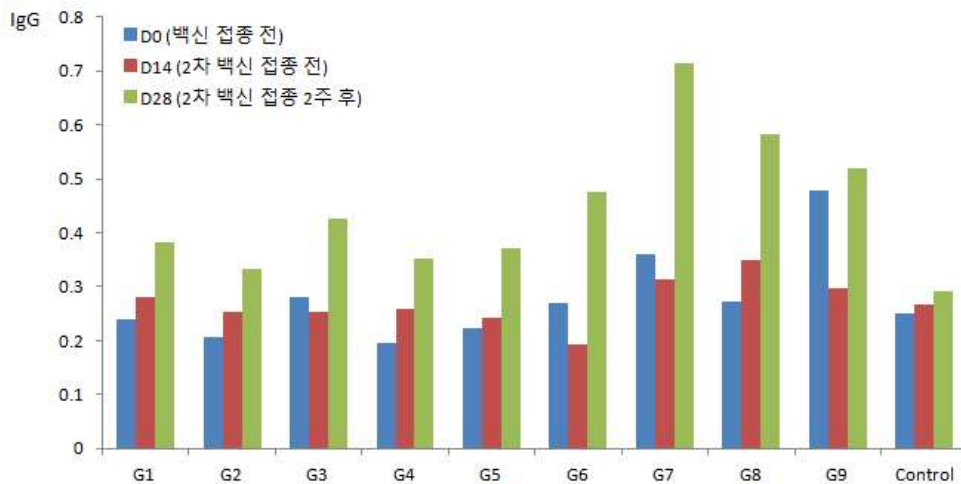


그림 81. 백신 접종 후 각 그룹별 IgG ELISA 항체가 결과

### 3) 분변 중 ELISA 항체가 측정 결과

모든 그룹에서 IgA 및 IgG ELISA 항체가 모두 전 기간에 걸쳐 항체 음성으로 확인 됨

### 4) 분변을 통한 바이러스 shedding 확인 결과

모든 그룹에서 전 기간에 걸쳐 분변을 통한 PEDV shedding은 없는 것으로 확인 됨

## 2.12.3. Fc 면역증강 백신을 이용한 백신 접종 프로그램 연구 결과 결론

- 1) 그룹 당 개체 수와 실험 방법적 한계 (공격접종 방어능이 아닌 항체 형성능 확인)로 인하여 Fc 면역증강 백신을 이용한 백신 접종 프로그램 평가라는 목표에는 다소 충분치 않은 결과를 얻었다.
- 2) 다만, 본 실험을 통해 임신모돈 방어능 실험과 동일하게 경구로 생백신을 2회 투여 시, Fc 면역증강 백신을 사용하는 것이 항체 형성에 유리하게 작용하는 것을 확인할 수 있었다.
- 3) 또한, PED 생백신을 사용하는데 있어서 경구용 백신 외에 근육 접종용 백신의 필요성 또한 확인할 수 있었다. (생백신 2회 투여 시, 근육-근육 접종군에서 가장 높은 중화항체 형성 됨)
- 4) 사독백신의 경우, 기 상용화된 백신을 사용하는 것도 좋지만, 동일한 strain을 기반으로 제조된 시험용 백신을 사용하여 평가하는 것이 중화항체 형성능 평가 등에서 좀 더 정확한 결과를 도출할 수 있을 것 같고, 상기 결과를 토대로 그룹을 축소하여 임신모돈을 대상으로 백신 접종 프로그램을 평가하는 것이 추가로 필요할 것이다.

### 2.13. 경구투여 시 면역증강제 효과 확인

면역증강제 혼합 투여를 통한 경구용 PED 생백신의 면역증강 효과를 확인하고, 이와 관련된 PED 백신의 접종 프로그램을 연구하기 위하여 경구용 생백신, 근육용 사독백신을 활용하여 PEDV 항체음성 자돈을 대상으로 접종 프로그램별로 백신을 접종하고, 항체 형성능을 평가하였다.

#### 2.13.1. 시험백신 준비 및 실험 방법

##### 1) 시험백신 준비

표 59. 시험백신 정보

백신명	조성 (2 ml/1 dose)	비고
CKT-A	PEDV CKT-7_N(P177) ----- $10^{7.0}$ TCID <sub>50</sub> IMS1313 ----- 1 ml	15 dose 필요
CKT-B	PEDV CKT-7_N(P177) ----- $10^{7.7}$ TCID <sub>50</sub> IMS1313 ----- 1 ml	6 dose 필요
Fc2	PEDV CH/SC/13 ----- $10^{6.5}$ TCID <sub>50</sub> IMS1313 ----- 1 ml	PRO-VAC™ PED-Fc(II)*

\* CKT-A, CKT-B : CKT-7\_N (P177)을 Vero cell line에 배양하여 제조

\*\* Fc2 : 기 허가된 코미팜의 G2b PEDV 사독백신

##### 2) 실험동물 및 실험그룹

PEDV 백신을 접종하지 않은 모돈으로부터 태어난 4~6주령의 이유 자돈을 대상으로 하며, 총 18 마리를 준비하여 15마리는 백신 접종군, 나머지 3 마리는 비접종 대조군으로 한다. 백신 접종군은 다시 3마리씩 5그룹으로 세분화하여 각각의 시험백신에 대한 백신 접종 프로그램을 적용한다.

표 60. 실험그룹

그룹		접종방법	개체 수	비고
LL-1	경구(CKT-A)+경구(CKT-A)	2주 간격 2회	3	
LL-2	경구(CKT-B)+경구(CKT-B)	2주 간격 2회	3	
LK-1	경구(CKT-A)+근육(Fc2)	2주 간격 2회	3	
LK-2	경구(CKT-A)+근육(Fc2)	4주 간격 2회	3	
LKK	경구(CKT-A)+근육(Fc2)+근육(Fc2)	2주 간격 3회	3	
Control		-	3	

##### 3) 백신접종

각각의 백신 접종군에 대하여 준비한 백신을 2주 간격으로 2회 투여한다. Oral 및 근육 투여 군

모두 1 dose 당 volume은 2 ml로 한다.

4) 채혈

모든 개체에 대하여 백신 접종 전, 2차 백신 접종 전, 2차 백신 접종 2 주 후, 3차 백신 접종 2주 후(3회 접종 그룹 한정)에 각각 채혈하여 혈중 항체가 확인에 사용한다.

2.13.2. 주요 실험 결과

1) 혈중 IgG 항체가 측정 결과

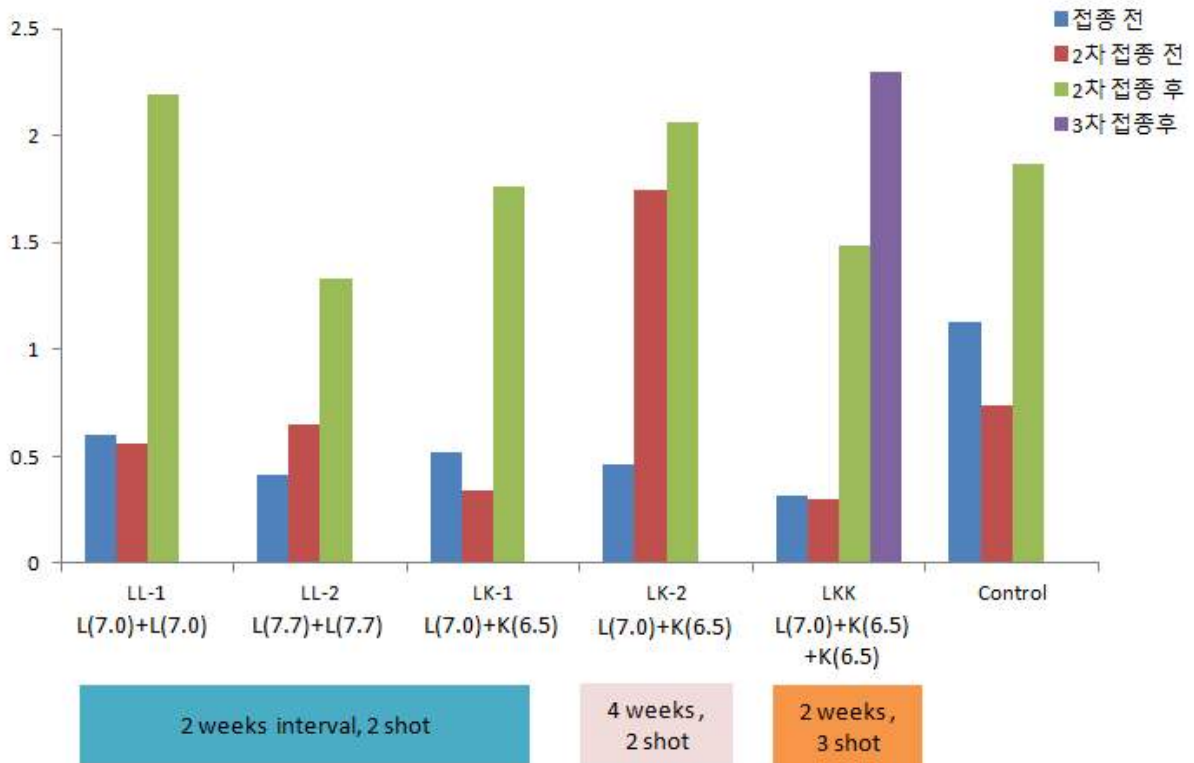


그림 82. 백신 접종 후 각 그룹별 혈중 중화항체가

- 약독화 바이러스를 경구로 단독으로 투여하는 것 보다, 면역증강제를 혼합하여 투여하는 것이 더 높은 혈중 IgG 항체를 유도하였음.
- 백신 1 dose 당  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub> 이상의 고 역가 바이러스를 경구로 투여 시, 농도에 비례하여 항체가 더 높아지진 않았음.
- 백신 2회 접종 그룹보다, 3회 접종 그룹 (LKK)에서 더 높은 혈중 IgG 항체가 형성되었고, 2회 접종 그룹 간에는 약독화 생백신을 경구로 2회 투여하는 것이, 사독백신을 근육으로 1회 병용 투여하는 것 보다 면역원성이 더 우수하였다.
- 경구용 약독화 생백신과 근육용 사독백신을 병용투여 시에는 2주 간격보다 4주 간격이 보다 효과적이었다.

## 2.14. PED 생백신 후보주의 경구투여 유효성 검증

PED와 같은 소화기성 질병에는 IgA 면역이 무엇보다 중요하고, 이는 경구 투여 방법을 통해 활성화 가능하다. 다만, 경구는 다양한 소화효소와 면역관용 (tolerance)이 잘 발달되어 있는 환경으로 면역반응 유도가 어려운 단점이 있고, 경구투여 생백신이 효과적으로 작용하기 위해서는 충분한 양의 바이러스가 장 점막을 통해 흡수되어야 한다. 이를 확인하기 위하여, PEDV CKT-7 strain의 약독화 조건에 따라 제작된 6종의 약독화 백신 후보주를 이용하여 자돈 1두 당  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>의 고역가 바이러스를 경구 투여 후, 7일 후에 안락사하여, 장 내 바이러스 분포를 확인하였다.

그 결과, PED 경구용 백신 후보주로 최종 선발된 PEDV CKT-7\_N strain의 경우, 십이지장 (Duodenum)과 회장(Ileum)의 용모에서 바이러스가 강하게 검출되는 것을 확인할 수 있었고, 그 외, trypsin 등을 처리하면서 계대배양한 바이러스들의 경우에도 십이지장과 회장을 포함하여 공장(Jejunum)에서도 바이러스 항원이 검출되는 결과를 확인할 수 있었다.

이를 통해, 특별한 보호제를 함께 투여하지 않더라도 바이러스를 경구로 고역가 접종할 경우, 장 점막을 통해서 흡수가 가능하며, 이를 통한 면역반응이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

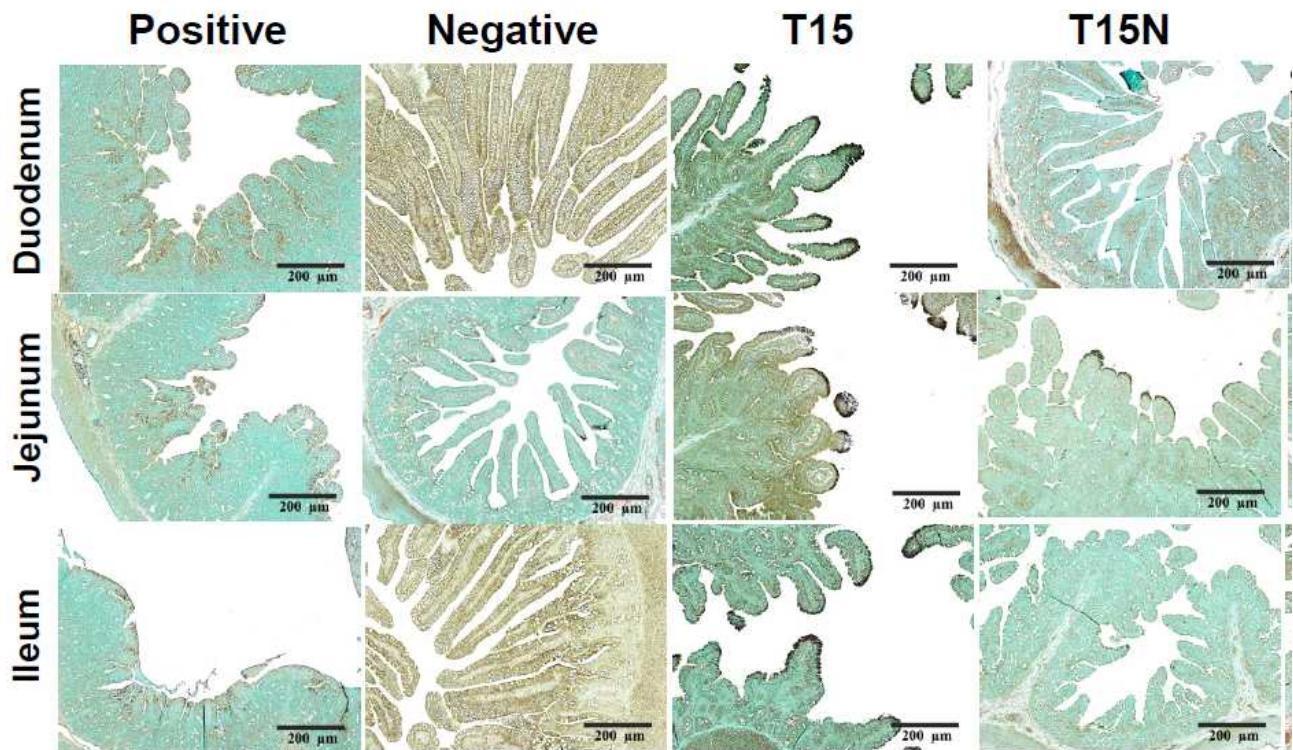


그림 83. PED 바이러스 경구 투여 시 장 내 분포 현황-1



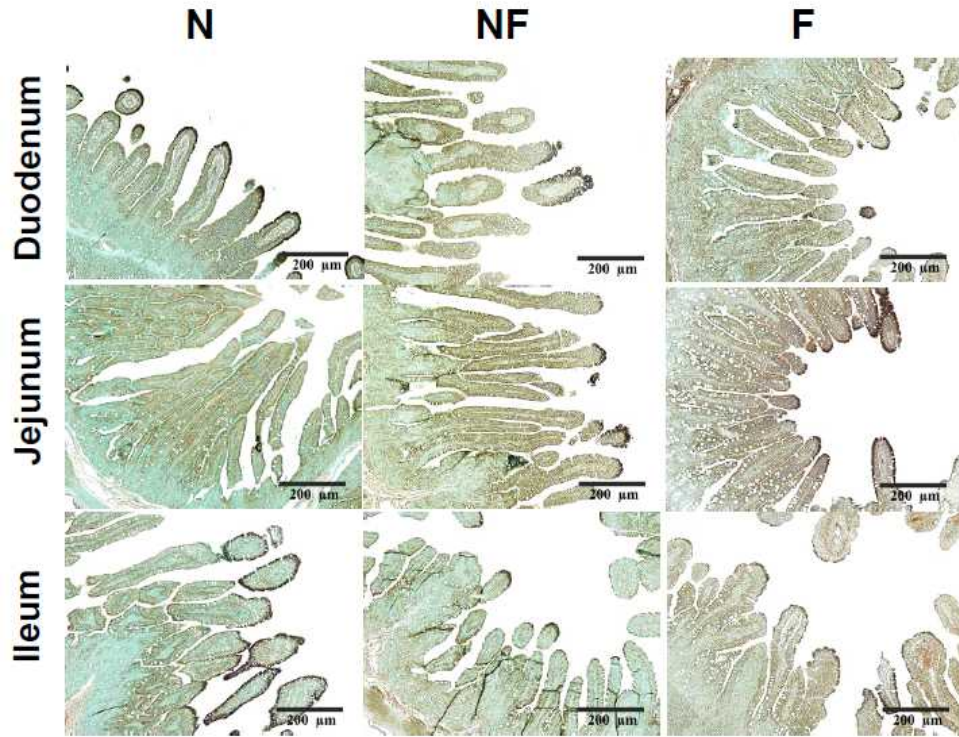


그림 84. PED 바이러스 경구 투여 시 장 내 분포 현황-2

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

- 국내 유행 G2b형 PEDV 분리 및 바이러스 약독화 전략 구축
- 담즙산 처리를 통한 고증식성 및 비병원성 PEDV attenuated strain 개발 (국내 최초)
- 생체분자 발현기술을 적용한 PEDV 생백신 시제품 제작과 평가
- 경구용 PEDV 생백신의 효능평가 및 제품화 가능성 확인과 백신 접종프로그램 연구

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

표 61. 정량적 연구개발 성과

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1차년도	2차년도	계	가중치 (%)
			(2020)	(2021)		
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허 (출원)	목표(연차별)	0	1	1	15
		실적(누적)	0	1	1	
	논문 (SCI)	목표(연차별)	0	1	1	
		실적(누적)	0	0	0	
	학술발표	목표(연차별)	0	2	2	10
		실적(누적)	0	2	2	
품종등록	목표(연차별)	0	0	0		
	실적(누적)	0	1	1		
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술실시 (이전)	목표(연차별)	0	1	1	20
		실적(누적)	0	1	1	
	사업화 (제품화)	목표(연차별)	0	1	1	40
		실적(누적)	0	1	1	
	사업화 (고용창출)	목표(연차별)	1	0	1	15
		실적(누적)	0	1	1	
	사업화 (기술료)	목표(연차별)	0	0	0	
		실적(누적)	0	20,000	20,000	
	홍보전시	목표(연차별)	0	0	0	
		실적(누적)	0	2	2	
수상	목표(연차별)	0	0	0		
	실적(누적)	0	1	1		
계	목표(연차별)	1	6	7		
	실적(누적)	0	11	11		

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

[과학적 성과]

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 대한바이러스학회 연구회연합 정기학술대회	김대민	2021.08.20	온라인	대한민국
2	2021 international conference of the korea society for molecular and cellular biology	김대민	2021.11.03	제주국제 컨벤션센터	대한민국

증빙자료는 Fris에 업로드 함

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Porcine epidemic diarrhea virus	KCTC 14834BP	Korea Collection for Type Cultures	2021

증빙자료는 Fris에 업로드 함

[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	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	약독화된 돼지 유행성 설사병 CKT-7N 바이러스 및 이를 포함하는 돼지 유행성 설사병 백신용 조성물	대한민국	탁동섭 김대민	2022. 01.13	10-2022 -000529 1					100%	Y

증빙자료는 Fris에 업로드 함

○ 지식재산권 활용 유형

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

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√		√							

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	프로백 피이디-맥스	2022.01.21	(주)코미팜	(주)코미팜	임상시험용 백신	2년		

증빙자료는 Fris에 업로드 함

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시	국내 유행 PEDV (G2b)를 이용한 경구백신용 약독화 strain 제작 및 이를 이용한 백신 제조법	(주)코미팜	2021.03.08	20,000,000원	

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등  
증빙자료는 Fris에 업로드 함

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년		
1	신규인력 채용	(주)코미팜	1		1
합계			1		1

증빙자료는 Fris에 업로드 함

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	9
		생산인력	-
	개발 후	연구인력	9 (퇴사인원 有)
		생산인력	-

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
2021						1	
2024	프로백 피이디-맥스 출시		100,000/년	200,000/년			

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	지방일간지	전주 매일신문	전북대 김대민 대학원생, 돼지유행성설사병 예방 연구 '우수'	2021.12.14
2	지방일간지	프레시안	대학원생이 돼지유행성설사병 경구 예방약바이러스 확보	2021.12.14

증빙자료는 Fris에 업로드 함

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	우수포스터 발표상	돼지유행성설사병을 예방하기 위한 예방약 제조용 바이러스 선발에 관한 연구 결과	김대민	2021.12.14	K2021 SMCB 국제학회

증빙자료는 Fris에 업로드 함

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 국내 분리 PED 바이러스(G2b)의 (High passage) 유전적 특성 확인	○ 6종에 대한 증식성, 5종에 대한 유전적 특성 확인	○ 100%
○ 항체음성 자돈에 대한 병원성 및 병원성 복귀 (Virulence reversion) 실험	○ 4종에 대한 병원성 평가 1회 선발된 1종에 대하여 passage 별로 병원성 평가 및 병원성 복귀 평가 총 5회 수행	○ 100%
○ Fc 발현 PED 바이러스 제작 (PED-Fc 바이러스) 및 검증	○ Master seed virus 이용하여 PED-Fc 바이러스 제작 및 Fc 발현 검증 완료	○ 100%
○ PED-Fc 바이러스를 이용한 연속 3 Lot PED 경구백신 시제품 제작 (300 vial, 1,500 dose 이상)	○ 연속 3 Lot 시제품 제작 완료 (300 vial, 1,500 dose)	○ 100%
○ 연속 3 Lot PED 경구백신 시제품에 대한 물리, 화학적 성상 확인	○ 특성, 함습도, pH, 진공도, 무균 및 마이코플라즈마 미입 확인	○ 100%
○ 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 안전성 평가 (실험동물, 항체음성 자돈 및 모돈)	○ 항체음성 자돈 및 모돈에 대한 평가 완료 (상용화 백신 대비 50배 이상 역가 수준)	○ 100%
○ 항체음성 자돈에 대한 면역원성 평가 - 중화항체 형성능 확인 (목표 : 16배 이상) - 타사 상용화 백신과의 비교 평가	○ 항체음성 자돈에서 바이러스 passage 별 경구 투여 시 면역원성 확인 (중화항체 6~10배, ELISA titer : 1.5배 이상) 항체음성 자돈에서 Fc 바이러스 경구 투여 시 면역원성 확인 (중화항체 6배, ELISA titer : 1.5배 이상)	○ 80 %
○ 항체음성 모돈에 대한 최소면역원성 평가 - 포유자돈의 병원성 야외분리주에 대한 방어력 확인 (목표 : 80% 이상 생존)	○ 항체음성 모돈에 대한 방어능 평가 - Fc 바이러스와의 비교 평가 (공격접종 후 58~73% 생존)	○ 80 %
○ Fc 면역증강 백신 2종을 이용한 돼지 유행성 설사병 백신 접종프로그램 구축	○ 코미팜의 상용화된 Fc 사독백신과 본 과제에서 개발한 Fc 생백신 시제품을 이용하여 자돈에서 항체형성능 평가	○ 60 %

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

2차 년도에 계획된 추진 목표들에 대해서는 계획된 실험을 수행하였으나, 실험 규모가 축소되거나, 목표한 성과지표를 100% 달성하지는 못하였음. 주요 원인 중 하나는 약독화 백신주를 최종 선발하는 과정에서 항체음성 자돈에 대한 병원성 평가 3회, 병원성 복귀 시험을 2회나 반복수행하여 (약독화 생백신주는 선발하는데 있어서 백신주의 안전성을 그만큼 중요하게 생각함) 2차년 도에 예정되었던 실험들이 계획된 스케줄대로 진행되지 못한 점이 크며, 이로 인해 제한된 시간 내에 목표를 달성하려다보니, 실험 규모를 축소하면서 한 번에 다양한 실험을 동시에 수행하였고, 이 과정에서 세심한 평가와 보완이 이루어지지 못하였음

##### ○ 항체음성 자돈에 대한 면역원성 평가 (목표 대비 50% 성과 달성)

- 기 허가된 경구용 PED 생백신의 항체 형성능 평가 기준을 근거로 본 과제에서 개발한 경구용 PED 생백신의 항체 형성능 목표 또한 중화항체가 16배 이상으로 설정하였으나, 결과에 미달하였음.
- 관련하여, 중화항체가 외에 ELISA 항체가를 통하여 경구용 PED 생백신의 항체 형성능을 평가하는 또 다른 기준이 존재하고, 이에는 적합한 결과를 얻었음. 그럼에도, 현행 PED 백신의 검정에 있어서 중화항체가 수준 또한 중요시 되는 요소이기 때문에 이에 대한 목표 달성이 미진했다고 판단하며, 면역증강제 등을 사용하여 중화항체 형성능을 높이기 위한 추가 연구가 필요함
- 타사 상용화 백신과의 면역원성 비교 평가를 수행하려 하였으나, 수행하지 못함

##### ○ 항체음성 모돈에 대한 최소면역원성 평가 (목표 대비 70% 성과 달성)

- 항체음성 모돈에 대하여 Fc 백신의 항원 함량별 면역원성을 평가하려 하였으나, 실험 디자인을 변경하여, PEDV CKT-7\_N strain에 기반을 둔 일반 경구용 PED 생백신과 Fc 생백신과의 효능 비교 평가를 수행하였음. 이유는, 최소면역원성 평가를 수행하기에는 확보된 항체음성 모돈이 적었고, (실험 일정이 계획보다 늦춰지면서 항체음성 모돈의 확보에도 차질이 생김) Fc 백신의 효능을 확인하기 위한 비교평가 그룹이 필요하다고 판단되어서 임
  - 실험 결과, Fc 백신을 경구투여할 경우에도 일반 생백신과 비교하여 항체형성능이 뛰어난 것을 확인하였으나, 실험에 사용된 개체 수가 적어 통계분석이 어려웠고, 이러한 결과가 실제 공격접종 방어능과는 다소 차이가 있어 Fc 백신의 비교우위를 입증하는데 다소 미흡한 실험이었다고 판단됨
  - 특히, 실험에 사용된 모돈 들의 자돈 산자 수가 상이하였고, 건강한 자돈을 선별하여 실험에 사용하지 못한 점 등이 백신에 의한 방어능 차이보다 모돈 및 자돈 상태에 따른 방어능 차이로 귀결된 점이 크게 작용함 (동일 백신 접종군에도 모돈 복 당 방어능 차이 편차가 심하였음)
-



- 
- Fc 면역증강 백신 2종을 이용한 돼지유행성 설사병 백신 접종프로그램 구축 (목표 대비 50% 성과 달성)
    - PEDV 항체음성 자돈을 이용하여 중화항체 형성능으로 최적의 백신 조합을 확인하려 한 실험 디자인에 문제가 있었던 것으로 판단됨. 경구 투여 시, 근육 백신 보다 중화항체 형성능이 크지 않아 그룹 간 뚜렷한 차이를 볼 수 없었고, 또한, 각 그룹 당 개체 수 또한 3두로 많지 않아, 결과에 대한 통계적 분석 또한 어려웠음
    - 실험 그룹을 축소하더라도 임신모돈을 대상으로 한 방어능 평가로 최적의 접종 프로그램을 구축하는 것이 필요할 것으로 생각됨
- 

## 2) 자체 보완활동

---

- 본 과제에서 확보된 연구 성과를 활용하여 후속 제품화를 추진하기 위하여 2022년도 가축질병대응기술고도화지원사업에 지원하여 최종 선정되었으며, (과제수행기간 : 2022.04.01.~2023.12.31., 1년 9개월) 본 과제와 동일하게 (주)코미팜이 주관연구기관, 전북대학교 산학협력단 소속 탁동섭 교수가 공동연구책임자를 맡아 이전 과제에서 다소 미진하였던 시판된 PED 경구용 생백신과의 효능 비교 평가, PED 백신에 대한 접종 프로그램 보완 연구를 수행할 수 있게되었습니다. 또한, 신규 과제를 통해서 궁극적으로는 면역증강 경구용 PED 생백신의 제품화를 이루고자 합니다.
- 

## 3) 연구개발 과정의 성실성

---

- 1년 9개월간의 짧은 연구기간이었음에도 불구하고, 실험실 내 실험을 최소화하고, 가능한 다양한 동물실험을 통해 약독화 백신주의 안전성과 효능을 평가하려 노력하였음.
  - 특히, 2차년 도에 들어서는 백신 후보주에 대하여 5회에 걸쳐 안전성 및 병원성 복귀 실험을 실시하였고, 그 과정에서 보다 안전한 백신 후보주 확보를 위해 2달 이상을 바이러스 추가 계대 배양에 할애하였음.
  - 동물실험 과정에서는 일반적으로 요구되는 평가 기준보다 더 엄격한 기준을 적용하려 하였고, 다각도의 샘플 분석을 통해 경구용 생백신의 작용 기전과 방어효능을 증명하려 노력하였음
-

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 국내에 시판되어 있는 경구용 PED 생백신들은 근육접종용과 비교하여 항원 함량에 큰 차이가 없으며, 경구용이라는 접종 경로의 특성을 감안하면 보다 고역가의 백신 제품 개발이 필요하다고 판단됨.
- 본 과제를 통해 확보된 PEDV CKT-7\_N strain은 기존 약독화 PED 바이러스들과 달리, trypsin이 아닌 담즙산 첨가를 통해 약독화 strain을 제작하였고, 이 과정에서 비병원성의 고역가 백신주가 선발되었음
- 상기 백신주를 활용하면 기존 상용화 PED 생백신들보다 고 역가의 백신 제품화가 가능하고 그 과정에서 Fc 기술이 적용되거나, 면역증강제 등이 추가되면 그 효과가 더욱 증대될 것으로 기대됨
- 또한, 후속 제품화 과정을 통해 기존의 다양한 백신들과 접종 프로그램을 보다 심도 있게 연구하여 PED 백신의 효과적인 현장 활용에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

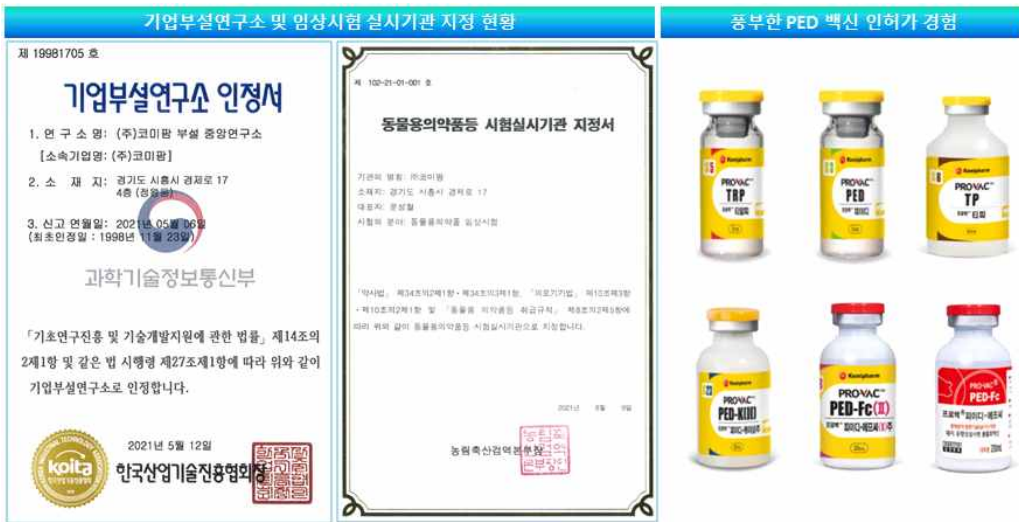
## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

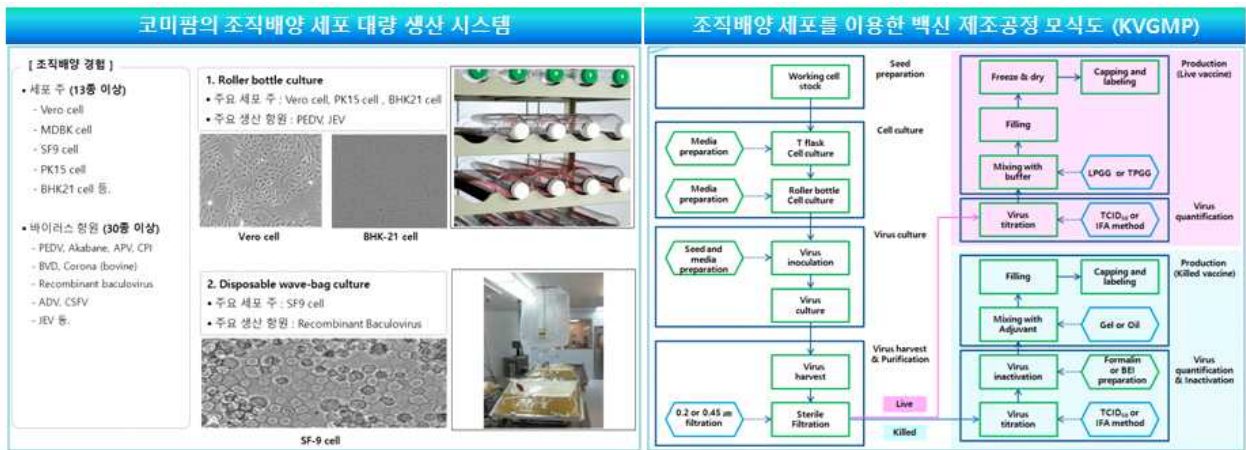
구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	종료 후 1년 : 1건
	비SCIE	0
	계	1
특허등록	국내	종료 후 1년 : 1건
	국외	0
	계	1
(아외)임상시험 실시		종료 후 2년 : 3개 소
사업화	상품출시	종료 후 3년 : 1건
	기술이전	0
	공정개발	0
성과홍보		종료 후 3년 : 1건
정성적 성과 주요 내용		고증식성 G2b형 PEDV를 이용한 고역가 경구용 PED 생백신 제품화

# 1) 사업화 달성 가능성

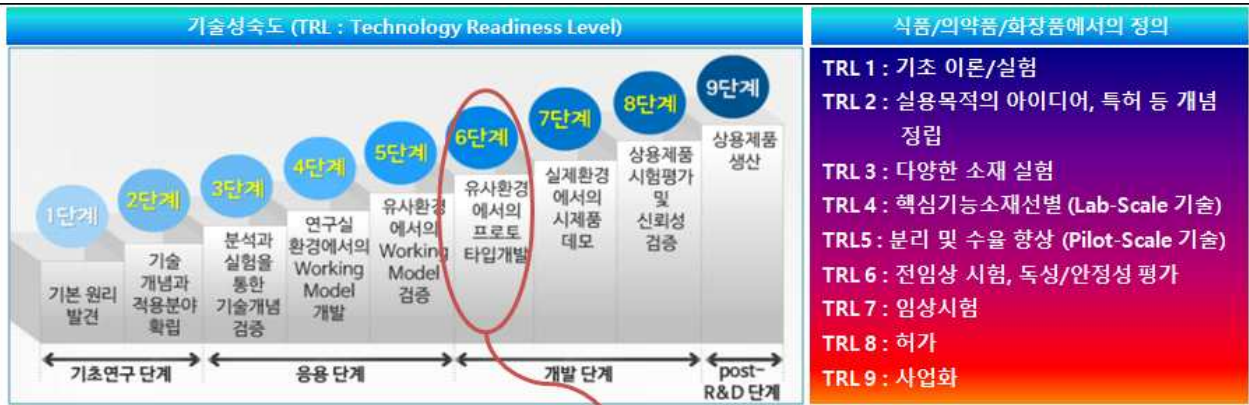
- 주관연구기관인 (주)코미팜은 기업부설연구소를 보유하고 있으며, 동물용의약품등 시험실시 기관으로 지정되어 있어 직접 임상시험 및 제품화가 가능함



- 또한, 주관연구기관이자 참여기업인 (주)코미팜은 100여개에 달하는 생물학적제제 허가품목을 보유하고 있는 동물용의약품 전문생산업체로 13종 이상의 조직배양 세포를 백신 생산에 직접 사용하고 있으며, 30여종 이상의 바이러스를 대량생산할 수 있는 시스템을 갖추고 있음. 특히, 조직배양 세포를 이용한 백신 제조공정은 KVGMP 시설을 보유하고 있으며, 6종의 PED 백신을 이미 생산중에 있음



- 선행연구 수행결과, 본 과제에서 달성하고자 하는 면역증강 경구용 PED 생백신의 제품화가 기술성숙도 6단계(TRL 6)에 이미 진입해 있으며, 후속 과제 종료 시 8단계까지 진입 가능할 것으로 판단하고 있음



경구용 PED 백신주를 이용한 Pilot-scale 시제품 제작과 경구투여 제형 연구

- 이를 통해, 후속과제가 종료되는 2023년도에 품목허가를 신청하고, 2024년도에 허가승인이 예상된다.

기술성숙도 (TRL)	과제 진도	동물용의약품(백신) 인허가 절차
TRL 1 (기초이론/실험)	<p>선행연구결과 (고증식성 G2b형 PEDV attenuated strain 개발 및 검증, 시제품에 대한 안전성 및 효능 평가)</p> <p>1차년도 (2022년) (연속 3 Lot 시제품 제작)</p> <p>2차년도 (2023년) (야외 임상시험 및 허가신청)</p> <p>중요 1차년도 (2024년) (품목허가 승인)</p> <p>중요 2차년도 (2025년) (국내 매출 발생)</p>	시장 조사
TRL 2 (아이디어/특허 등 개념정립)		개발 전략 수립
TRL 3 (다양한 소재 실험)		백신주 확보 및 검증
TRL 4 (핵심소재선별/Lab scale)		백신 조성 연구 (항원 함량, 면역증강제 등)
TRL 5 (분리 및 수율향상/Pilot scale)		시제품 제작 (연속 3 Lot)
TRL 6 (전 임상시험, 독성/안정성 평가)		시제품 평가 (특성, 안전성, 효능 등)
TRL 7 (임상시험)		야외 임상시험 (3개 농장)
TRL 8 (허가)		품목허가
TRL 9 (사업화)		국가출하승인합격 및 판매

< 별첨 자료 >

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

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	120089-2		
사업구분	농림축산식품 연구개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	생체분자 발현 기술을 이용한 경구용 PED 생백신 개발 및 Fc 면역증강 백신을 활용한 백신접종 프로그램 구축			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	(주)코미팜			연구책임자	김주현
연구기간	연차	기간	정부	민간	계
연구개발비 (천원)	1차년도	9개월	200,000	70,000	270,000
	2차년도	12개월	267,000	90,000	357,000
	계	21개월	467,000	160,000	627,000
참여기업					
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.02.10

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)코미팜	이사	김주현

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	
----	--



[별첨 1]

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

PED 야외 분리주를 세포에 적응시키고 약독화시키는 과정에서 기존의 전통적인 방법에서 (Trypsin 첨가)에서 탈피하여 국내 최초로 담즙산 첨가를 통한 세포적응 및 약독화 바이러스 제작에 성공하였고, 이렇게 제작된 PEDV CKT-7\_N strain은 Vero 세포에서 고역가로 (최대  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml) 증식이 가능하고, 어린 포유자돈에서 비병원성인 특성을 가지고 있다.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구과제를 통해 제품화하고자 하는 경구용 PED 생백신이 국내 최초는 아니며, 과제가 종료된 시점에서 이미 2개 이상의 제품이 상용화된 상태이다. 다만, 기 허가 제품들은 약독화 PED 바이러스만을 주 성분으로 하고, 바이러스 함량 또한 기존의 근육백신과 큰 차별성이 없다. PEDV CKT-7\_N strain을 활용하여 상용화하고자 하는 제품의 특성은 기 허가 제품 대비 10배 이상의 고역가 제품이며, Fc 기술이 적용되거나, 면역증강제 등이 추가되어(제품 희석액에 포함) 효과적인 측면에서 기존 제품들과 비교 우위에 있을 것이다.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

주관연구기관이자 직접 기술을 실시한 (주)코미팜은 PED 백신에 대한 다양한 제품화 경험을 보유하고 있으며, 특히, 또 다른 IPET 과제를 통해 Fc 면역증강 불활화 백신을 성공적으로 제품화하고, 출시 후 50 억원 이상의 누적 매출액을 기록하고 있으며, 태국 등 해외 국가로도 활발히 수출하고 있다. 본 과제의 수행기간이 21개월로 짧아 품목허가 승인까지 도달하진 못하였지만, 임상시험 승인을 위한 전 임상 시험을 충실히 수행하였고, 협동연구기관과 후속 연구과제 수행을 통해 향후 3년 이내에 제품을 출시할 계획을 가지고 있다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

1년 9개월의 짧은 연구기간이었음에도 불구하고, 실험실 내 실험을 최소화하고 가능한 다양한 동물실험을 통해 약독화 백신주의 안전성과 효능을 평가하려 노력하였다. 특히, 2차년도에 들어서는 백신 후보주에 대하여 5회에 걸쳐 안전성 및 병원성 복귀 실험을 실시하였으며, 그 과정에서 보다 안전한 백신 후보주 확보를 위해 2달 이상을 바이러스 추가 계대 배양에 할애하였다. 또한, 동물실험 과정에서 일반적으로 요구되는 평가 기준보다 더 엄격한 기준을 적용하였고, 다각도의 샘플 분석을 통해 경구용 생백신의 작용 기전과 방어효능을 증명하려 노력하였다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

성과지표 중 SCI 논문 1건의 달성이 다소 미뤄졌지만, 계획된 특허 출원 1건과 학술발표 2건을 성공적으로 수행하였고, 학술발표 과정에서 연구성과에 대한 우수발표상을 수상하였다. 또한, 상기와 같은 실적을 지방일간지를 통해 적극 홍보한 바 있다.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
국내분리 PED 바이러스(Genotype 2b)를 이용한 경구백신용 strain 제작	20	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 후보주 6종을 각각 150계대 후, 증식성을 확인하였고, 이 중 5종에 대한 유전적 특성을 분석하였음</li> <li>- 1차 선발된 4종에 대한 병원성 평가 결과를 거쳐 후보주 1종을 최종 선발하였고, passage 별로 병원성 평가 및 병원성 복귀 평가를 총 5회 수행하여 안전성이 확립된 경구백신용 약독화 strain을 확립함</li> <li>- 추진 목표를 성공적으로 달성하였으며, 세부 지표는 기존 목표 대비 초과 달성하였음</li> </ul>
생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신 개발	20	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Master seed virus 확립 후, 이를 이용하여 PED-Fc 바이러스를 제작하였고, Fc 발현을 성공적으로 확인하였음</li> <li>- 연속 3 Lot 시제품 제작을 완료하였음</li> <li>- 상기 시제품에 대한 특성, 함습도, pH, 진공도, 무균 및 마이코플라즈마 미입 여부 확인을 완료하였음</li> <li>- 추진 목표에 적합한 결과를 확보하였음</li> </ul>
생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 안전성 평가	20	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항체음성 자돈 및 모돈에 대한 백신의 안전성 평가를 수행하였고, 안전성이 확인되었음 (상용화 백신 대비 50배 이상의 고역가 함량 백신)</li> <li>- 추진 목표를 성공적으로 달성하였음</li> </ul>
생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 효능 평가	20	16	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항체음성 자돈에서 바이러스 passage별 경구 투여 시 면역원성을 중화항체 형성능과 IgG ELISA 항체가 측면에서 확인하였고, 항체음성 모돈에 대한 방어능 평가를 수행하였음 (Fc 바이러스와의 비교평가)</li> <li>- 추진 목표 대비 실험 방향이 일부 변경되었으나, 목표한 경구용 PED 생백신의 효능을 평가하는데에는 부족함이 없었고, 목표 대비 세부 성능지표가 미달인 부분에 대해서는 실험 환경적인 요인이 작용한 것으로 평가함</li> </ul>
Fc 면역증강 백신 2종을 이용한 돼지 유행성 설사병 백신 접종프로그램 구축	20	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 코미팜의 상용화된 Fc 면역증강 사독백신 1종과 본 과제에서 개발한 Fc 경구용 생백신 시제품을 이용하여 자돈에서 항체형성능 평가함</li> <li>- 계획대로 실험을 수행하였으나, 목표 성과를 달성하는데 미진하였고, 향후 실험 디자인 변경 후 재평가 필요할 것으로 판단됨</li> </ul>
합계	100점	88점	

### Ⅲ. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

국내 분리 PED 바이러스(G2b)를 이용하여 경구투여용 약독화 백신주를 개발하는 과제 본연의 목표를 충실히 달성하였고, 이 과정에서 국내에서 시도되지 않은 담즙산 첨가를 통한 고증식성, 비병원성 약독화 바이러스 확보에 성공하였다. 또한, 이를 주관연구기관이 보유하고 있는 생체분자 발현기술에 접목시켜, Fc 발현 PED 바이러스를 성공적으로 생산하였고, 이에 대한 목적동물 안전성과 방어효능 평가를 수행한 바 있다. 그 결과, 과제 수행 시 기대하였던 Fc 발현 PED 바이러스의 면역증강효과가 경구투여를 통해서도 재현되었으나, 그 효과가 공격접종 방어능으로 온전히 이어지진 못한 아쉬운 결과도 있었다. 상기와 같은 결과는 21개월이라는 제한적인 과제 수행기간 동안 약독화 바이러스를 제작함은 물론 이에 대한 안전성 및 효능 평가를 동시에 수행하다보니, 계획된 실험을 적기에 수행하지 못한 점과 이로 인해 충분한 실험동물 (PED 항체음성 모돈) 확보가 되지 못한 점이 복합적으로 작용하였다. 본 과제를 통해 달성하고자 한 최종 목표가 제품 출시가 아니라, 경구투여용으로 사용할 수 있는 약독화 백신주를 확립하고, 후속 제품화 연구가 가능한 단계까지 전 임상 평가를 수행하여 시제품을 제조하는 것이었기 때문에 이러한 측면에서는 과제가 성공적으로 수행되어 기대한 결과물이 확보되었다고 평가할 수 있다.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

최종 결과물의 세부 성과지표가 기존 목표 대비 일부 미달인 점은 있으나, 개발 제품의 성능의 문제라기 보단, 안전성을 최우선으로 한 신중한 strain 선발과정에서 생각보다 많은 시간이 소요된 점과 이후 계획된 실험을 충분히 수행하기에는 과제의 수행 기간이 21개월로 매우 짧았다는 점을 충분히 고려해주시기 바랍니다. 이러한 조건 내에서 최선의 결과를 얻으려 성실히 노력하였습니다.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 과제를 통하여 확보된 PEDV CKT-7\_N strain을 활용하여 기존 시판 제품들과 차별화되는 고성능의 제품을 상업화하기 위하여 후속 연구를 계속 수행할 것이며, 동일한 연구팀으로 2022년도 가축질병대응 기술고도화지원사업에 최우선 지원할 것이다. 후속 연구 과정에서는 경구용 PED 생백신의 효과를 보다 극대화할 수 있도록 기존 Fc 기술 적용 외에도 면역증강제와의 복합 사용에 대한 추가 연구를 진행할 계획이며, (일부는 이미 진행 중) 향후 3년 이내에 품목허가를 취득할 수 있도록 동물용의약품의 허가절차에 준한 전 임상 및 야외 임상시험을 단계적으로 수행할 것입니다. 또한, 제품화 과정에서 본 과제에서 미진했었던 백신 접종프로그램에 대한 평가를 보완하고자 합니다.

#### IV. 보안성 검토

- 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

- 최종보고서 상의 주요 연구내용이 제품화 과정에서 기술자료로 활용될 예정이며, 해당 내용이 공개될 시 경쟁사로 기술 유출이 우려됨에 따라 비공개 필요

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

- 연구책임자 의견과 동일

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	생체분자 발현 기술을 이용한 경구용 PED 생백신 개발 및 Fc 면역증강 백신을 활용한 백신접종 프로그램 구축			
주관연구개발기관	(주)코미팜		주관연구책임자	김주현
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	467,000	160,000	0	627,000
연구개발기간	2020.04.29.~2021.12.31. (1년 9개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(직접 기술실시)			
	<input type="checkbox"/> 미활용 (사유: )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 국내분리 PED 바이러스(Genotype 2b)를 이용한 경구백신용 strain 제작	- 후보주 6종을 각각 150계대 후, 증식성을 확인하였고, 이 중 5종에 대한 유전적 특성을 분석하였음 - 1차 선발된 4종에 대한 병원성 평가 결과를 거쳐 후보주 1종을 최종 선발하였고, passage 별로 병원성 평가 및 병원성 복귀 평가를 총 5회 수행하여 안전성이 확립된 경구백신용 약독화 strain을 확립함 - 추진 목표를 성공적으로 달성하였으며, 세부 지표는 기존 목표 대비 초과 달성하였음
② 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신 개발	- Master seed virus 확립 후, 이를 이용하여 PED-Fc 바이러스를 제작하였고, Fc 발현을 성공적으로 확인하였음 - 연속 3 Lot 시제품 제작을 완료하였음 - 상기 시제품에 대한 특성, 함습도, pH, 진공도, 무균 및 마이코플라즈마 미입 여부 확인을 완료하였음 - 추진 목표에 적합한 결과를 확보하였음
③ 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 안전성 평가	- 항체음성 자돈 및 모돈에 대한 백신의 안전성 평가를 수행하였고, 안전성이 확인되었음 (상용화 백신 대비 50배 이상의 고역가 함량 백신) - 추진 목표를 성공적으로 달성하였음
④ 생체분자 발현기술을 이용한 경구용 PED 생백신의 효능 평가	- 항체음성 자돈에서 바이러스 passage별 경구 투여 시 면역원성을 중화항체 형성능과 IgG ELISA 항체가 측면에서 확인하였고, 항체음성 모돈에 대한 방어능 평가를 수행하였음 (Fc 바이러스와의 비교평가) - 추진 목표 대비 실험 방향이 일부 변경되었으나, 목표한 경구용 PED 생백신의 효능을 평가하는데에는 부족함이 없었고, 목표 대비 세부 성능지표가 미달인 부분에 대해서는 실험 환경적인 요인이 작용한 것으로 평가함



[별첨 2]

⑤ Fc 면역증강 백신 2종을 이용한 돼지유행성 설사병 백신 접종프로그램 구축	- 코미팜의 상용화된 Fc 면역증강 사독백신 1종과 본 과제에서 개발한 Fc 경구용 생백신 시제품을 이용하여 자돈에서 항체형성능 평가함 - 계획대로 실험을 수행하였으나, 목표 성과를 달성하는데 미진하였고, 향후 실험 디자인 변경 후 재평가 필요할 것으로 판단됨
---	--

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (수상실적)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평균 I-F	학술 발표		정책 활용
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	건	
가중치	15		-		20	-	40			15				10						
최종 목표	1		0		1	0	1			1				2				0	0	
당해 년도	목표	1		0		1	0	1		1				2				0	0	
	실적	1		1		1	20	1		1				2				2	1	
달성률 (%)	100		-		100	-	100			100				100				-	-	

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	약독화된 돼지 유행성 설사병 CKT-7N 바이러스 및 이를 포함하는 돼지 유행성 설사병 백신용 조성물
②	돼지 면역글로불린 지의 에프씨 도메인의 세포 표면 발현용 벡터, 상기 벡터에 의해 형질 전환된 숙주세포 및 상기숙주세포를 이용한 돼지 질병 관련 바이러스에 대한 백신의 제조법

### 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	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		0			0	0	0			
②의 기술		0			0	0	0			

\* 각 해당란에 v 표시

[별첨 2]

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	경구용 PED 생백신 제품화에 핵심 기술로 활용
②의 기술	경구용 PED 생백신 제품화에 핵심 기술로 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문 SCI	비 SCI			논문 평균 IF	학 술 발 표	
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치																			
최종목표	1						1					1							
연구기간내 달성실적	0						1 (시제품 제작)					0							
연구종료후 성과창출 계획	1						1 (상품 출시)					1							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	국내 유행 PEDV (G2b)를 이용한 경구백신용 약독화 strain 제작 및 이를 이용한 백신 제조법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	1,792 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(직접실시)		
이전소요기간	즉시	실용화에상시기 <sup>3)</sup>	2025.02월 (상품출시일)
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	특이사항 없음		

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

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 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.