

발간등록번호
11-1541000-001349-01

생체분자 발현기술을 이용한 돼지 PRRS, PED  
면역효과 강화 백신 개발

Development of enhanced immunoeffective vaccine for  
swine PRRS and PED using bio-molecular expressing  
technology

(주)코미팜

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를“생체분자 발현기술을 이용한 돼지 PRRS, PED 면역효과 강화 백신 개발”과제의 보고서로 제출 합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명:(주)코미팜

주관연구책임자: 장 현

세부과제 책임자: 장 현

연구원: 신현진

연구원: 김주현

연구원: 김효승

연구원: 양정웅

연구원: 박정은

협동연구기관명: 농림수산검역검사본부

협동연구책임자: 현방훈

협동연구기관명: 전북대학교

협동연구책임자: 장형관

# 요 약 문

I. 제목: 생체분자 발현기술을 이용한 돼지 PRRS, PED 예방백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 기술적 측면

PRRS, PED 바이러스 감염으로 인한 질병은 백신이 개발되어 사용되고 있는 현재에도 여전히 많은 농가에서 피해를 입고 있다. PRRSV 감염 예방을 위한 생백신이 개발되어 사용되고 있으나 여전히 백신접종으로 인한 바이러스 중화항체 유도가 약하고 바이러스 감염을 막을 수 있는 세포성 면역 반응을 유도하는데에도 충분한 역할을 하지 못하고 있다. 특히 PRRSV는 감염 이후 여러 가지 면역 반응을 방해하는 기전을 가지고 있어 바이러스 감염 이후에 중화항체 형성을 방해하고 세포성 면역 자극에 필수적인 면역 호르몬 분비도 방해하는 것으로 알려져 있다. 특히 현재 사용되고 있는 PRRS 생백신의 경우 비접종 돼지에 바이러스가 전파되는 등 안전성에도 문제가 있는 것으로 알려져 있다. PED 바이러스 감염예방을 위한 생백신과 사백신이 개발되어 사용되고 있으나 바이러스 자체의 면역원성 문제로 인해 생백신과 사백신을 여러 번 접종해야만 충분한 면역반응을 이끌어 낼 수 있는 단점이 있어 질병의 피해를 알면서도 백신 접종을 기피하는 상황에 이르고 있다. 이러한 두 바이러스 예방 백신의 단점을 극복하고자 하는 많은 노력이 있으나 아직 이렇다 할 방안을 내놓지 못하고 있는 것이 현실이다.

최근 면역 반응에 관련된 여러 가지 단백질 분자를 이용하여 백신의 효능을 향상시키고자 하는 노력이 이루어지고 있다. Innate immunity와 adaptive immunity를 효율적으로 자극하기 위해 면역호르몬과 항원 단백질을 결합한 형태의 키메라 단백질을 만들어 백신 개발에 이용하고 점막면역자극을 위해 콜레라독소단백질을 이용하는 등 여러 가지 단백질 분자를 직접 혹은 간접적으로 항원 분자와 결합하여 백신 항원으로 사용하고자 하는 노력이 이루어지고 있다. 1998년 발표된 논문을 통해 항원 결합 항체의 Fc 도메인이 대식세포의 활성을 높여준다는 발표가 있는 후 백신의 효능을 향상시키기 위하여 Fc 분자를 이용하고자 하는 노력이 이루어지고 있다. Fc 분자는 IgG 분자의 constant 부위의 CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> 부위로 항원 결합 이후 여러 면역세포의 Fc receptor에 결합하여 대식작용, 면역 호르몬 분비 촉진 등을 유발한다. 일반적으로 엔벨로프가 있는 바이러스는 숙주세포에 감염되고 바이러스 증식이 이루어진 후 바이러스 엔벨로프를 감염되었던 숙주세

포의 세포막을 사용하여 증식한다. 따라서 Fc 분자가 발현된 바이러스 숙주세포를 제작하고 이러한 세포주에서 PRRS, PED 바이러스를 배양하여 바이러스 표면에 Fc 분자가 부착된 바이러스를 이용하여 백신을 제조할 경우 기존의 바이러스 항원을 사용하는 것보다 더 높은 수준의 항체를 유도할 수 있으며 면역호르몬 분비 촉진을 통해 세포성 면역, 그리고 면역 기억 능력을 향상시킬 수 있다. 특히 백신의 안전성 확보 차원에서 최근 불활화 백신 개발이 활발하게 이루어지고 있으나 불활화 백신이 가지고 있는 단점을 극복하는 점에서도 Fc 분자를 이용한 백신 개발 기술 개발은 중요한 연구라 하겠다.

#### 나. 경제 산업적 측면

최근 자유시장 경제의 확산 및 무역시장 세계화의 물결로 농업분야에 대한 우리나라의 시장개방 압력 등이 거세지고 있다. 특히 축산분야에서도 피해갈 수 없는 현실이며, 우리나라의 축산기반은 식육생산을 위한 소, 돼지, 닭 등의 주요 품종이 국제적인 경쟁력 열세를 만회하지 못한 채 급격한 변화를 맞이하고 있다. 따라서 우리 축산업의 장래는 우리나라 풍토와 기후에 잘 적응하면서 국내의 경쟁력을 가지고 있는 고부가가치가 가능한 가축을 선별하여 집중적으로 육성하는 기술적·정책적 뒷받침이 시급하다. 양돈업은 국내 축산업 중 다른 축종에 비해 국제 경쟁력이 높은 것으로 조사된 바 있다. 최근 양돈농가들은 기존의 소규모 사육에서 탈피 기업화된 대규모 생산방식으로 옮겨가고 있다. 이러한 추세는 우리나라뿐만 아니라 동남아시아를 비롯한 거의 모든 축산업 현장에서 일어나고 있는 변화이다. 최근 교통의 발달로 인한 질병의 확산이 빠르게 일어나고 있으며 전염성 질병의 발생은 대규모 축산현장에서 절대적으로 예방해야 할 중요한 사안으로 떠오르고 있다. 최근에 조류독감과 같은 질병의 전파로 막대한 농가 피해는 물론 사회적으로도 막대한 직접 혹은 간접적 피해를 발생시키는 중요한 사회적 이슈가 되어 있다. 따라서 가축전염병의 예방은 축산업 발전뿐만 아니라 국민들의 안전한 먹거리 보호, 친환경적인 축산환경의 조성 등을 위하여 반드시 선행되어야 할 중요한 분야이다.

양돈분야에서 문제시되는 질병은 매우 다양하다. 돼지의 만성소모성 질병이란 현재 양돈현장에서 문제되고 있는 질병(또는 증후군) 중 돼지유행성설사병(PED), 돼지생식기호흡기증후군(PRRS), 이유후전신소모성증후군(PMWS), 돼지호흡기복합병(PRDC) 등을 통칭하는 것으로 그중 최근에는 소위 “4P질병”이라 불리고 있다. 이러한 만성소모성 질병들에 의한 양돈현장에서의 돼지의 폐사 등 피해가 지속적으로 보고되고 있다.

이중에서 PRRS와 PED로 인한 추정 피해액은 연간 500~670억원 정도인 것으로 보고되고 있다. 그러나 치료비용 등 직간접적인 피해액까지 지출되는 비용은 2,800억원에 달하는 것으로 보고되었다. 이와 같은 막대한 피해를 입히는 질병의 피해를 막기 위해 가장 경제적이고 효과적인 방법은 백신 접종을 통한 질병의 예방 방법이다. 특히 백신접종을 통한 질병의 예방은 질병 발생으로 인한 2차적인 사회적 피해를 예방할 수 있다.

### III. 연구개발의 내용

#### 1.Fc 분자발현 PED 백신의 개발

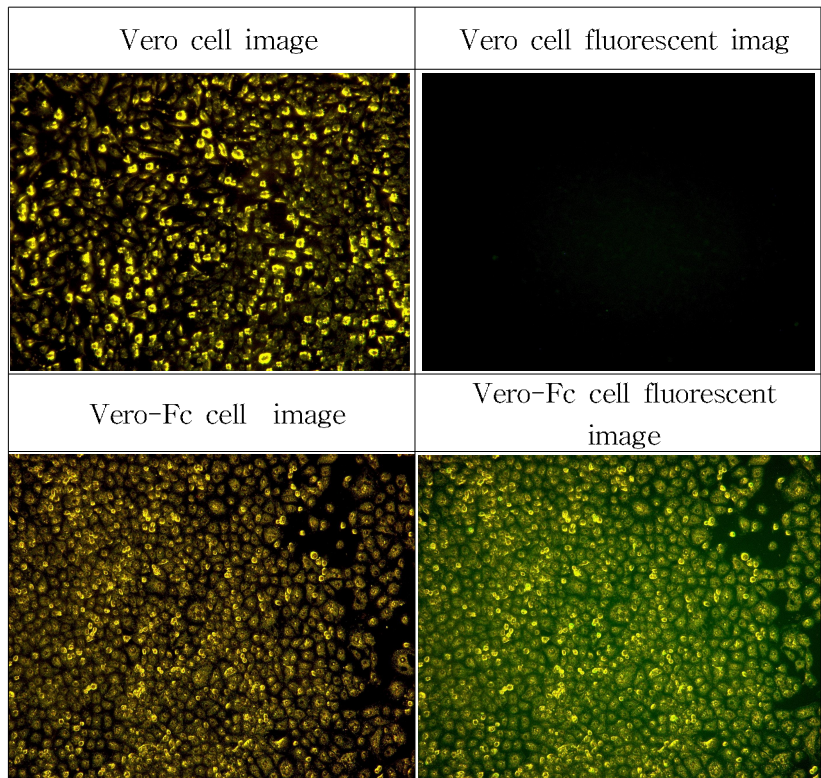
##### 가. Fc 분자발현 Vero 세포주의 작성

###### (1) Fc 분자발현 vector의 제작

돼지 IgG의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자와 돼지 트랜스페린 수용체 (TR)의 트랜스멤브레인 도메인 (TM)을 코딩하는 유전자를 라이게이션하고, 이를 벡터에 삽입함으로써, 재조합 단백질의 N-말단에 위치하는 돼지 트랜스페린 수용체의 트랜스멤브레인 도메인이 세포막에 고정되고, 재조합 단백질의 C-말단에 위치하는 돼지 IgG의 Fc 도메인을 구성하는 CH2 및 CH3이 세포 표면에 발현되도록 벡터를 제조하였다. 트랜스멤브레인 도메인과 Fc분자의 유전자는 모두 돼지의 간 조직과 비장에서 추출된 RNA로부터 reverse-transcriptase PCR을 수행하고 cDNA를 제작하여 발현 벡터로 삽입하여 최종 발현 벡터에 삽입하는 방식으로 제작하였다.

###### (2) Vero-Fc 세포주의 작성

미리 준비된 Vero 세포에 제작된 Fc 발현 plasmid 형태의 vector를 lipopectamine을 이용하여 transfection 시킨 후 Fc 발현 vector가 transfection된 세포주 즉 Fc 분자가 발현된 vero 세포주를 선택해 내기 위해 500ug/ml의 Zeocine이 포함된 배지에서 배양하며 세포주를 선정하였다. Zeocine이 포함된 배지에서 증식된 vero 세포의 Fc 분자발현을 확인하기 위하여 western blotting과 형광항체를 이용하였다.



Fc 발현 Vero cell의 형광 현미경 관찰

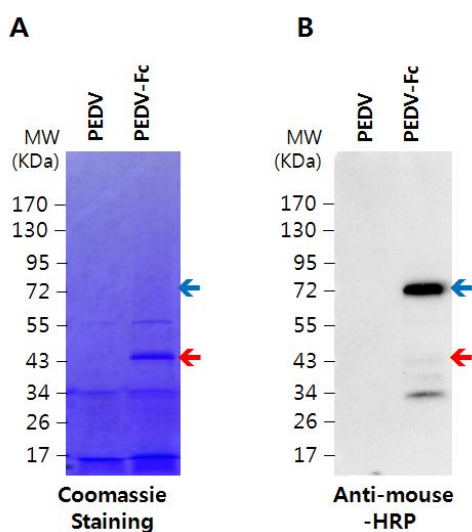
#### 나. PED-Fc 바이러스 배양

최근 국내 야외분리주로부터 백신주로 제가된 PED SM98P strain을 Fc 분자가 표면 발현된 Vero-Fc 세포주에 감염시켜 바이러스를 배양하였다. Vero cell을 75T flask 혹은 175T flask에 mono layer 될 수 있도록 seeding 한 후, 10ug/ml의 trypsin이 함유된 MEM 배지에 PED 바이러스를 희석하여, 접종 M.O.I가 0.01~0.1이 되도록 접종한다. 1시간 30분 동안 감작시킨 후, 역시 10ug/ml의 trypsin이 함유되어 있는 MEM 배지로 갈아주고, incubator에서 3일간 배양하면서 전체적으로 CPE가 확인되면, harvest 한다.

#### 다. PED 바이러스 표면에 harboring 된 Fc 분자의 확인

Vero-Fc 세포주에서 배양된 PED 바이러스 표면에 harboring 된 Fc 분자를 확인하기 위하여 ELISA, Western blotting 그리고 형광항체법을 이용하여 관찰하였다. Fc 분자가 harboring 된 PED 바이러스를 농도별로 준비한 후 Fc 분자 특이항체를 이용하여 ELISA 시험을 실행하였을 때 Fc 농도 즉 바이러스 농도

에 비례하여 ELISA값이 측정되는 것을 관찰하였으며 정제된 Fc harboring PED 바이러스를 이용한 weatern blotting 시험결과 바이러스 표면에 Fc 분자가 harboring 한 것을 확인할 수 있었다. 또한 Anti swine IgG Fluorescence conjugate 항체를 이용하여PED-Fc 바이러스가 접종된 정상적인 Vero cell 표면에 Fc 분자 흔적이 남아있는 것을 확인하였다. 이는 바이러스 엔벨로프 표면에 anchoring 되어 있던 Fc 분자가 세포에 감염될 때 세포 표면에 바이러스 엔벨로프를 남겨 놓으면서 이에 따라 Fc 분자도 남겨 놓은 것으로 판단된다.



PEDV, PEDV-Fc의 SDS-PAGE분석 및 Western 분석

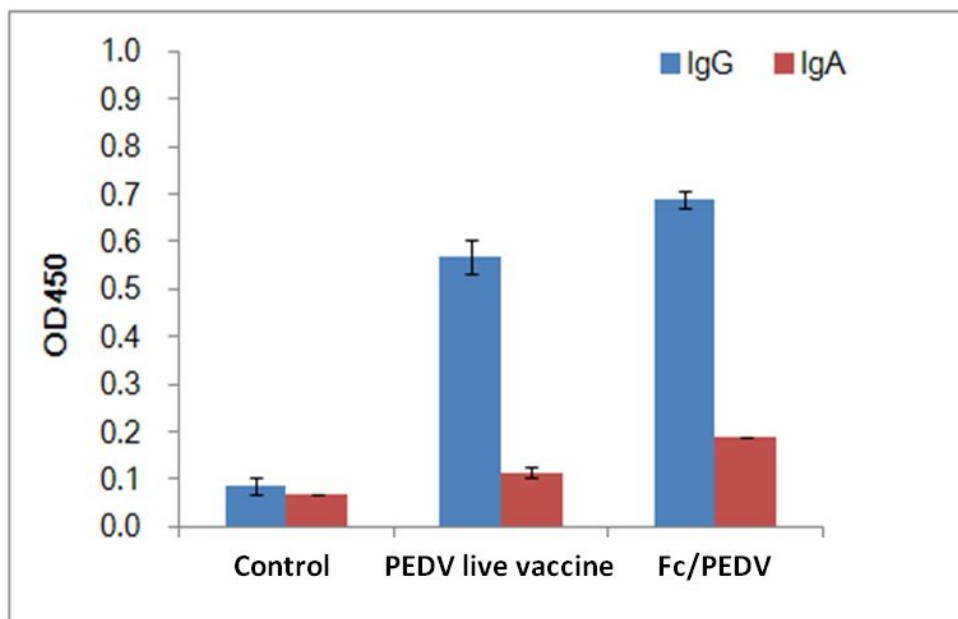
#### 라. PED-Fc 바이러스의 면역학적 효능 평가

Fc 분자로 인하여 PED 바이러스의 면역학적 효능이 얼마나 개선되었는지 확인하기 위하여 기존의 PED 바이러스와 같은 농도로 제조된 시험백신을 이용하여 마우스와 돼지에 백신을 접종하여 혈중 항체가, 면역호르몬의 변화 그리고 면역세포의 활성화 등을 비교 관찰하였다. 제조된 시험백신의 바이러스 농도는  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 하였으며 Fc의 면역학적 효능만을 비교하기 위하여 불활화 백신의 경우 adjuvant는 사용하지 않았다.

PED-Fc 바이러스의 경우 마우스실험과 돼지 실험에서 모두 기존의 PED 바이러스를 이용한 백신에 비해 높은 IgG 항체를 유도하는 것으로 관찰되었다. 특히 백신 접종 이후 CD4+ T-cell과 CD19+ B-cell 숫자가 PED 바이러스 접종군 보다 높게 측정되는 것을 확인할 수 있었으며 T-cell proliferation assay에서도 Fc분자가 harboring된 PEDV에 의해서 T-cell의 숫자가 보다 빨리 증폭 되는 것을 관찰할 수 있었다.

이러한 마우스 실험결과를 바탕으로 목적동물인 돼지에서도 이와 같은 면역학적 효능 개선 효과가 있는지 확인하였다.

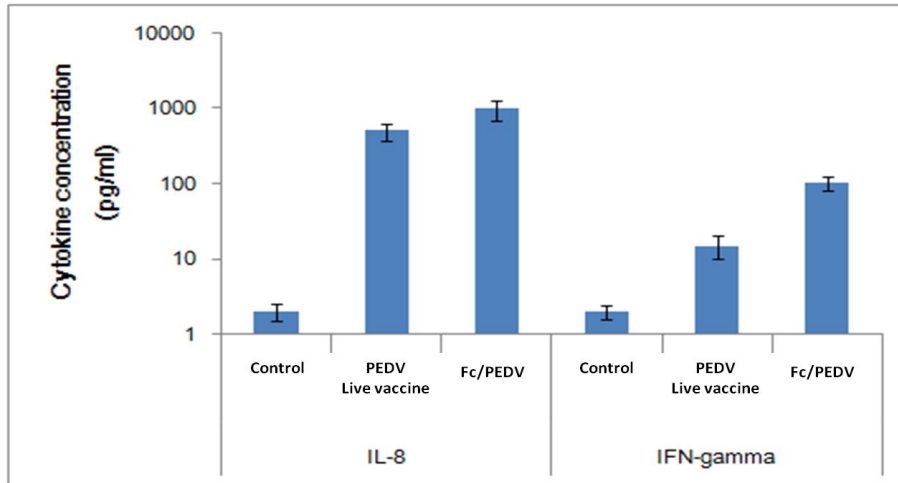
PED 백신은 주로 모돈에 백신을 접종하여 형성된 항체가 초유를 통해 자돈에 전달되고 이렇게 전달된 모체이행항체를 통해 어린 일령의 자돈의 PED 감염을 예방하는 것이다. 따라서 PED 및 PED-Fc 백신을 모돈에 접종하고 자돈의 항체가를 측정하여 비교시험을 하였다. 비교실험 결과 PED-Fc 백신은 기존 PED 백신에 비해 모돈의 혈중 항체가 그리고 초유의 항체가 등이 높게 형성되는 것으로 관찰 되었으며 특히 장내 바이러스 감염 예방에 중요한 역할을 하는 IgA의 유도효과도 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다



초유 내 IgG 및 IgA

특히 innate immunity와 adaptive immunity 자극에 중요한 역할을 하는 IL-8과 INF-gamma의 유도 효과도 PED-Fc에서 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.





모든 혈청 내 IL-8 및 IFN-gamma 생성능

#### 마. PED-Fc 백신의 제조 방법 및 임상시험을 통한 백신 상용화

PED-Fc 바이러스의 면역학적 효능이 우수함을 확인하고 이에 따라 PED-Fc 바이러스를 이용한 불활화 백신 개발에 필요한 연구를 진행하였다

##### (1) 시험백신 제조를 위한 바이러스 배양시험 및 항원량 결정 그리고 adjuvant의 선정 시험

Vero-Fc cell line에 PED virus를 서로 다른 MOI로 접종하여, 얻어지는 PED-Fc virus의 titer를 확인하였다.

실험은 75T 플라스크에서 배양된 Vero-Fc 세포를 사용하였으며, 플라스크 당  $3 \times 10^6$ 개의 Vero-Fc 세포를 seeding 하고, 3일이 경과 후 세포가 플라스크에 mono-layer 되면, PED 바이러스를 각각 MOI 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 로 설정하여 10ug/ml의 trypsin과 함께 세포에 접종하고 CPE를 관찰하였다. 접종 하루째 CPE가 나타나기 시작하여 이틀째에 모든 세포에 CPE가 일어나고, 플라스크 바닥에서 세포가 탈락하였다. 접종 후, 이틀날 저녁에 바이러스를 채독하고, 4°C에 보관 후, 다음날 바로 titration을 시작하였다.

Titer를 확인해 본 결과, 접종 MOI에 따라서 PED-Fc 바이러스의 농도는  $10^{3.75} \sim 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml로 나왔으며, 접종 MOI가 0.1 이상일 때 PED-Fc virus의 titer가  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상으로 나왔고, 접종 MOI가 1이상으로 높아져도  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상으로는 잘 올라가지 않았다.

접종 MOI (PED virus)	얻어진 PED-Fc virus의 titer
0.01	$10^{3.75}$ TCID <sub>50</sub> /ml
0.05	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
0.1	$10^{4.5}$ TCID <sub>50</sub> /ml
0.5	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
1	$10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
2	$10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml

Fc 분자 발현 Vero 세포주의 안전성을 확인하기 위하여 세포주의 유전적, 형태학적 안정성을 확인 하였으며 백신의 효능을 높여주기 위해 aluminum hydroxide gel, IMS 1313, Carbomer 등 adjuvant를 이용하여 면역유도능은 비교 평가한 후 최종 adjuvant로 IMS1313을 선정하였다. 기니픽을 이용한 항체가와 항원량의 상관관계를 시험하여 최종 백신의 항원량은  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml으로 결정 하였다.

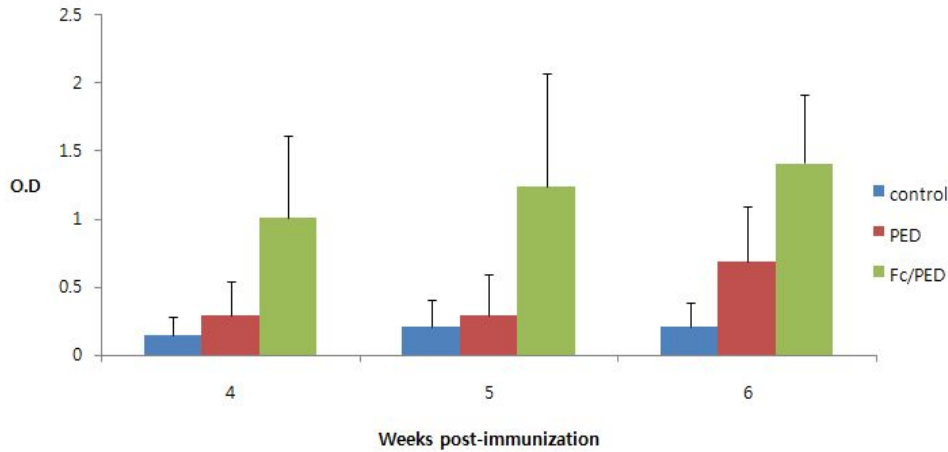
## (2) 시험백신의 전임상 시험

시험 제조된 백신의 안전성을 확인하기 위하여 마우스, 기니픽, 돼지를 이용한 안전시험을 실시하였다. 시험 제조된 백신을 국가검정 기준에 따라 마우스 복강에 0.5 ml, 기니픽 근육에 2.0 ml을 돼지 근육에 2.0 ml을 접종하여 21일간 임상 증상을 관찰 하였으나 백신 접종으로 인한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다.

백신의 효능을 확인하기 위해 돼지에 시험백신을 접종한 후 바이러스 감염 예방에 가장 중요한 중화항체를 측정하였다. 측정된 중화항체는 모두 64배에서 128배 이상으로 측정되어 충분한 방어력을 가질 수 있는 수준의 중화항체가 유도 가능한 것으로 확인되었다.

백신 접종 후 백신에 의해 유도된 중화항체가로 충분한 방어가 가능한지를 확인하기 위하여 야외병원성 균주를 이용한 공격접종 시험을 통해 방어력을 확인하였다. 2차 백신 접종 2주 후 병원성 PED바이러스에 감염된 돼지의 장기에 서 분리한 PED바이러스를  $10^{3.0}$ - $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 경구 감염시켜 자돈의 설사 유무를 확인하였다. 공격 접종 후 임상증상, 바이러스 배출 유무, 조직학적 검사를 통해 백신의 방어력을 확인하였다. 공격접종 한 결과 백신을 접종한 그룹에서는

분변을 통해 바이러스가 배출 되지 않았으며 백신을 접종하지 않은 그룹에서는 분변을 통해 바이러스가 배출되는 것을 확인 하였다. 장조직에 대한 바이러스를 조사한 결과 백신을 접종받은 돼지는 검출되지 않았으나 백신 미접종 그룹에서는



PED-Fc 시험백신 접종 후 ELISA 항체가 변화>

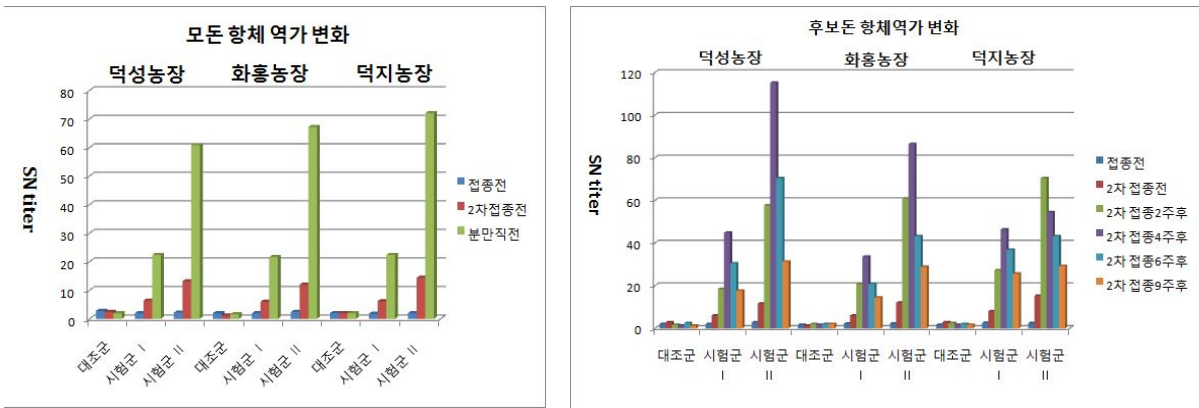
바이러스가 검출되었다. 부검과 조직검사를 통한 백신 접종 군과 비접종군간의 장 병변을 비교한 결과 백신접종군의 돼지는 정상 소견을 보이는 반면 백신을 접종하지 않은 돼지의 장은 비정상적인 용모 및 장상피 세포병변 증상을 보여주고 있다. 이와 같은 공격실험결과를 통해 시험백신 접종을 통해 바이러스의 감염과 증식을 막을 수 있음을 알 수 있었다.

### (3) 시험백신의 임상시험 및 야외 적용시험 제품의 허가

야외임상시험은 실험실 내 시험에서 시험동물 및 목적동물을 대상으로 입증한 백신의 안전성과 효능을 실제 돼지농장에서 다수의 목적동물에 적용함으로써 제품으로 제조된 백신의 효능과 안전성을 검증하기 위해 실시하였다.

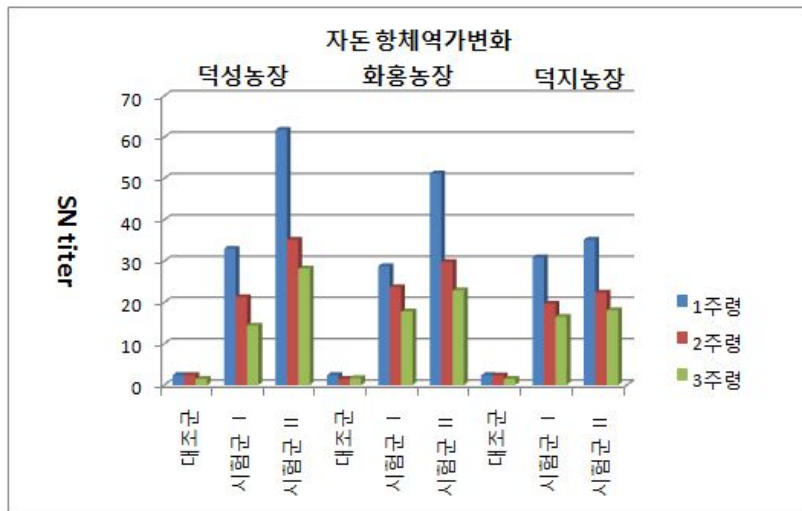
야외임상시험 농장은 PED 발병 여부에 상관없이 각기 다른 성적과 조건을 가진 3개 농장을 선정하여 각각의 농장에 모돈, 자돈을 백신 접종군과 비접종군으로 나누어 실시하고 두 그룹간의 혈중 항체가, 백신 접종으로 인한 생산성 향상, 그리고 안전성 등을 확인하였으며 시험 돼지의 일부를 실험실로 도입 공격시험을 실시하여 방어력을 확인하였다.

모돈과 후보돈에 대한 백신 접종을 통해 혈중 항체가가 70배 이상 상승하는 것을 확인 할 수 있었으며 후보돈에서도 백신 접종으로 인해 60배에서 120배 까지 중화항체가 상승하는 것을 관찰할 수 있었다.



PED-Fc 백신 접종으로 인한 모든 및 후보돈의 항체가 상승

자돈에서의 모체이행항체 수준을 3주에 걸쳐서 확인하였다. PED 백신 접종군의 경우 갓 태어났을 때 30배 정도의 중화항체를 지니고 있었으며 주령이 지남에 따라 점점 감소하는 양상을 보여 3주째에는 평균 15배의 중화항체를 가지고 있었다. PED-Fc 백신 접종군의 경우 모체이행항체 또한 PED 백신 접종군에 비해서 높게 나타났으며, 평균 50배 정도의 중화항체를 가지고 태어났다. 그 후 역시 점차 감소하여 3주째에는 20배 정도의 중화항체를 지니고 있었다.



PED-Fc 백신 접종 모돈에서 태어난 자돈의 혈중 항체가

야의 임상시험을 통해 PED 백신과 PED-Fc 백신 접종군 모두 시험백신의 접종 후 나타나는 역가변화는 1차 접종 때 보다 2차 접종 후에 더 큰 역가의 상승이 나타났으며, 후보돈에서 나타난 결과를 살펴볼 때, 2차 접종 2~4주후에 가장 높은 역가를 나타내고 있었다. 이 결과를 미루어 보아 모든접종의 경우 최소 분만 2주전까지 2차 접종을 완료해야하며, 분만 3주전에 접종을 완료하는 것을 권장해야 한다는 결과를 얻을 수 있었다. 역가의 측정은 중화항체 시험법을 사용하

였으며, 모돈 뿐만 아니라 후보돈에서도 국가검정 기준인 8배를 훨씬 상회하는 결과를 얻을 수 있었다. 두 백신의 효능을 비교해 본 결과 세 농장 모두에서 모돈 및 후보돈에서 PED-Fc 백신이 3배 이상의 높은 항체가를 유도하였다. 모돈의 경우 분만시에 초유를 받아 자돈으로 이행되는 항체의 수준을 알아보았으며, 이는 분만직후 측정된 모돈의 항체역가보다 2~3배 높았으며, 고역가의 이행항체가 자돈으로 전달되는 것을 확인할 수 있었다. 이 또한 PED-Fc 백신 접종군에서 2~3배 정도 높게 나타났다.

자돈 설사증상에 대한 관찰결과에서도 세 농장 모두 간간히 설사 증상이 나타나긴 하였으나, 주로 대장균에 의한 설사였고, PED 바이러스에 의한 설사 증상은 확인되지 않았다.

실험실내에서 이루어진 공격실험 결과를 통하여 PED-Fc 백신의 방어력을 확인하였다. 공격접종 결과 양성 대조군에서는 접종 직후 발열 증상과 2~4일 동안의 설사 증상이 관찰되었으나, 모체 이행항체를 가진 자돈의 경우는 발열과 설사 증상이 거의 나타나지 않았으며, 부검 결과에서도 양성 대조군에서는 소장 벽이 얇아지고 수양성 내용물의 전형적인 PED 임상증상을 보였으나, 모체 이행항체를 가진 자돈의 경우에는 공격접종으로 인한 PED 감염증이 나타나지 않았다.

이로서 시험백신에 대한 안전성과 효능을 입증할 수 있었고, PED-Fc 백신이 기존의 PED 백신보다 더 효과적으로 PED 바이러스를 예방할 수 있음을 확인하였다.

임상 시험을 완료한 PED-Fc 백신은 2011년 10월 17일 농림수산검역검사본부에 제출되어 1차 검토를 완료 보완자료 제출 후 2012년 4월 중 품목허가가 이루어질 것이다. 새롭게 제품화된 PED-Fc 백신은 기존의 백신이 여러 번(생백신 2회, 사백신 2회) 접종해야만 얻을 수 있었던 중화항체를 2차 접종으로도 충분히 유도하고 방어력도 향상시켜 PED 질병 예방에 많은 기여를 할 것으로 예상된다.

## 2. Fc 표면 발현 PRRS 백신의 개발

### 가. 백신 균주의 제작

PRRSV는 현재 국내에 많은 유전적 변종이 많이 존재하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 유전형이 실제 혈청학적으로 얼마나 다른지에 대한 연구가 충분히 이루어지지 않았으나 상용화된 백신의 개발에 있어 야외에 만연하고 있는 바

이러스에 대한 방어력을 가질 수 있는 PRRSV의 분리 및 배양은 Fc발현 백신제조에 있어 가장 중요한 일이라 할 수 있다. 야외주로부터 백신주를 선별하기 위해 PCR 검사를 통한 양성 조직의 확보 및 바이러스 분리 PRRSV 감염으로 인한 피해가 있는 농장의 돼지로부터 적출된 폐조직을 유제하여 PRRSV 특이성을 가지는 PCR primer를 이용하여 PCR 검사를 실시하였다. 총 117개의 EU type(유럽형) 양성 조직과 198개의 NA type(북미형) 조직을 확보하여 바이러스 분리에 사용하였다. PCR 검사에서 양성을 보인 조직을 처리하여 일단 PAM cell에서 계대한 다음 PAM cell 배양액을 Marc145 세포주에서 다시 여러대 계대배양하여 CPE가 나오는 바이러스를 선별하였다. 배양된 바이러스는 다시 제작된 Marc145-Fc 세포주에서 배양시험을 거쳐 최종 후보주로 선발하고자 하였다.

최종 선발된 후보주는 북미형 2개주와 유럽형 1개주로 한국형 segment 1과 segment 2에 속하는 유전형을 가지고 있으며 유럽형의 경우 대그룹에 속하는 유전형으로 판명되었다.

분리 배양된 바이러스는 Marc145-Fc 세포주에서 계대 배양 시험을 통해  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상으로 증식될 때까지 배양시험을 지속한다.

#### (1) 백신 균주의 병원성 시험

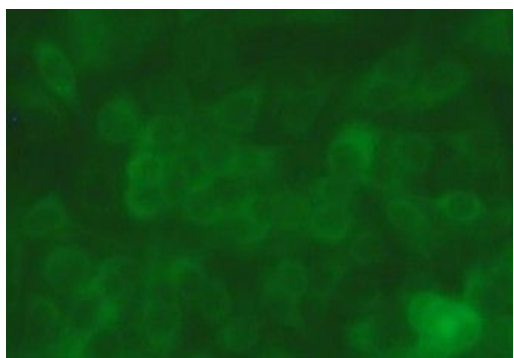
북미형 PRRSV 2개 후보주에 대한 병원성을 시험하기 위해  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스액을 2.0 ml 씩 돼지 기관을 통해 접종하였다. 실험용 돼지는 체중 8~10 kg 정도의 PRRS 음성 돼지를 사용하였으며 총 6마리를 세 그룹으로 나누어 2마리는 Komi-NA263 주를 접종하고 2마리는 Komi-NA316주를 접종하였다. 2마리는 비 접종 대조군으로 관찰하였다. 공격 접종 후 돼지간의 바이러스 감염을 방지하기 위하여 각각의 독립된 공조 시설을 갖춘 실험실에 2마리씩 사육하면서 관찰하였다. 병원성 시험 결과 바이러스 접종 후 비강과 항문을 통해 바이러스 배출이 3에서 5일간 지속되었으며 공격 접종 후 체온이 41.5°C에 이를 정도로 고온 증상을 보여 주었다. 바이러스 접종 후 혈중 항체가 변화가 관찰되었으며 이는 일반적으로 알려진 것과 같이 바이러스 감염 후 3주 이상 지난 후 혈중 항체가 검출되는 양상을 보여주었다. 조직 검사를 통해서 폐, 비장 등에서 바이러스 감염이 확인되었다.

#### (2) Fc 표면발현 Marc145 세포주의 제작

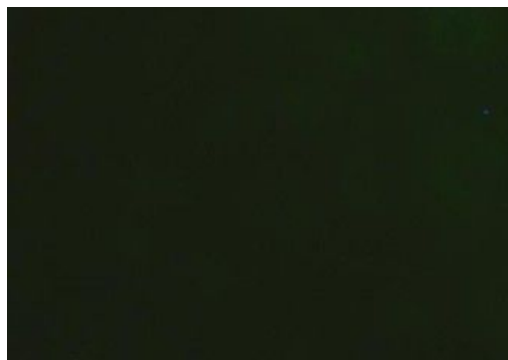
Fc 분자 표면발현 Marc145 세포주를 제작하기 위해 돼지 transmembrane

domain과 IgG Fc domain 유전자를 cloning 하여 retroviral vector를 이용한 방법으로 Marc145 세포주에 transfection을 실시하였다. 작성된 pFNpTRFcDCH1 및 gag-pol, 수포성구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus; VSV)의 envelope 유전자가 함유된 3종 plasmid 이용하여 293T 세포주에 transfection 후 제조된 retrovirus를 작성하였으며 작성된 retrovirus를 target cell인 Marc145 세포주에 infection 후 geneticin (G418) 이용 하여 Fc 발현 Marc145 세포주 (Marc145/Fc)를 선별하였다.

A.



B.



Anti-porcine (H+L) FITC conjugate 이용 IFA로 Fc 발현 Marc145 세포주 작성 확인.

A: Fc 발현 Marc145 (Marc145/Fc), B: 대조 Marc145

(3)야외분리 PRRSV의 Marc145-Fc 세포주 배양 및 PRRSV 표면 harboring Fc 분자의 확인

#### IV. 연구개발의 결과

PRRS와 PED는 국내 양돈 산업에 있어 지속적으로 피해를 입히고 있는 질병이나 아직 효능이 확실하고 안전성이 뛰어난 백신이 없어 질병 예방에 많은 어려움을 겪고 있다.

본 연구 과제를 통해 Fc 분자 발현 Vero cell과 Marc145 cell을 제작하여 Fc 분자가 세포 표면에 발현되는 것을 확인할 수 있었으며 이러한 세포주에서 백신주가 증식되면 증식된 바이러스 표면에 Fc 분자가 harboring 되는 것을 확인할 수 있었다. PED-Fc 바이러스의 경우 일반 바이러스와 같은 증식성을 보여 주었으며 면역원성 시험 등에서 백신 균주로의 안전성을 확보했을 뿐만 아니라 뛰어난 효능이 있음을 실험실내 실험과 전임상 임상 시험을 통해 입증할 수 있었다. 특히 야외 적용 시험을 통해 기존의 백신이 4회 이상의 많은 접종을 통해 얻을 수 있는 방어력을 단 2회 접종으로 얻을 수 있는 획기적인 결과를 보여주었다. PRRSV의 경우 국내 다양한 유전형형을 고려하여 야외 분리주 중 백신주 선발을

위해 유전형 분석을 하였으며 이를 통해 국내 유행하는 PRRSV에 대한 유전적 정보를 얻을 수 있었다. 특히 국내에 많이 감염되어 있는 것으로 알려진 유럽형 PRRSV의 유전적 특징에 대한 정보를 얻을 수 있어 앞으로의 백신 개발에 유용한 정보가 될수 있으리라 생각된다.

특히 이번 연구는 Fc 분자 등 면역학적 기능이 있는 분자를 이용한 새로운 백신 adjuvant 시스템 개발에 관한 기초적인 정보와 가능성을 보여주었다.

## V. 연구 성과 및 성과 활용 계획

### 1. 연구 성과

- 돼지 Fc 분자 표면발현 Vero-Fc, Marc145-Fc 세포주의 제작 및 배양 기술 확립
- Fc 발현 세포를 이용한 PEDV, PRRSV 바이러스의 배양기술 확립 및 바이러스 표면 anchoring Fc 분자의 확인
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스의 면역학적 효능 입증
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스를 이용한 PED 불활화백신 개발
- PRRSV 국내 유행 바이러스의 유전적 특성 분석
- PRRSV 백신 후보주 선발

### 2. 연구 성과 활용 계획

- PED-Fc 바이러스를 이용한 PED 예방 백신 제조기술 특허 출원
- PED-Fc 바이러스를 이용한 예방 백신 상품화 및 판매
- PRRSV-Fc 백신의 효능 평가를 통해 PRRSV 불활화 백신 제조기술개발 및 특허 출원
- 엔벨로프를 가지고 있는 바이러스에 대한 예방 백신 제조에 Fc 발현 기술을 이용한 기반 기술화



## SUMMARY (영문 요약문)

Opsonization of foreign materials with IgG enhances their removal from the host by macrophages through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Currently various Fc receptors discovered on the diverse immune cells and they has own immunological roles. Fc part of the antigen binding IgG interacts with Fc receptor(FcRs) on the diverse immune cells influence immune reactions. For example, cytokine secretion, antigen re-presentation and phagocytosis are activated. This is due to an increased uptake of antigen-antibody complex into antigen presenting cells (APC) through the APC cell surface FcRs resulting in increased processing and presentation. Therefore if we make Fc molecules expressed on the viral surface it can be used for more efficacious vaccine antigen. Most enveloped virus use host cell membrane for making their own envelop. So if we make swine IgG Fc molecules expressed on the surface of the mammalian cell and then enveloped virus propagate on this transformed cell, virus has reverse oriented Fc molecules on the virus envelop. In this study, We make Fc molecules expressed Vero cell and Marc145 cell using swine IgG Fc gene expression vector and porcine epidemic disease virus(PEDV) and Porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV) are grown in genetically modified Vero cells and PED virus and PRRS virus may acquire Fc on the viral envelop. We test the immunological enhancement of the Fc molecules acquired PED virus as an inactivated antigen. Swine IgG Fc molecule expression vector (pBudCE4.1 GFP-Fc) was constructed using Fc and transferrin receptor gene amplified from swine spleen. Vero cells were transformed with Fc expression vector and transformed cells were selected in the Zeocine containing media. PED virus propagated on the transformed Vero cells. Fc molecules on the Vero cell and PED virus were tested by ELISA, Western blot analysis and immunofluorescent analysis. Immunological enhancement test of the Fc harboring PED virus(PED-Fc) was performed using the titration of the serum antibody of the mouse immunized with PED-Fc virus. Immune cell proliferation, cytokine secretion, Serum neutralization antibody titer were measured in the serum of the pig immunized with PED-Fc virus. Immunofluorescent analysis showed that transformed Vero cells successfully

express swine IgG Fc molecules on the cell membrane. PED virus harboring Fc molecules on the virus envelop was identified by ELISA assay. Vero cells transiently transformed by the plasmid vector and PED-Fc virus, the expression of approximately 50 kDa molecules containing Fc was detected by Western blotting assay in reduced condition. The size of detected band was same to the expected molecular weight of the chimera Fc monomer. PED-Fc virus showed more strong immune stimulations in the mouse immunization test. IgG antibody titer increase 2 times, virus neutralization titer increase 16 times compare with normal PED virus. At the T cell proliferation assay also show PED-Fc virus increase 3 times compare with normal PED virus. Immunization with PED-Fc virus showed higher IgG2a/IgG1 ratio comparing with normal PED virus. The result indicates that PED-Fc induces Th1 biased immune responses. In the swine model, when the animals are immunized with PED-Fc virus( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), serum neutralization antibody titer was 64 through 128. This SN titer 4 times higher than that of the same does normal PED immunization pigs. In this study, we found that PED-Fc virus elect more strong immune responses compare with normal PED virus. PED-Fc virus immunized mouse and pig show more strong humoral as well as cellular immune responses. The PED- Fc has a possibility as an inactivated vaccine, which have comparable effect to live attenuate vaccines to prevent PED disease. In addition, the newly established vaccines strategy might be able to apply for other viruses, which contain host cell derived envelope, using Vero cells or other host cells expressing Fc molecules

## CONTENTS(영문 목차)

Chapter 1. Introduction of research and development -----	p.19
Chapter 2. Current research and development activities -----	p.30
Chapter 3. Results of research and development -----	p.36
Chapter 4. Research goal attainment and contribution to the relate field --	p.140
Chapter 5. Achievement of research and plan for utilization of the results -	p.143
Chapter 6. Collected scientific and technical information during the research -----	p.144
Chapter 7. References -----	p.145

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요 -----	p. 19
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	p. 30
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 -----	p.36
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	p.140
제 5 장 연구개발의 성과 및 성과활용 계획 -----	p.143
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	p.144
제 7 장 참고문헌 -----	p.145

# 제 1 장 연구개발 과제의 개요

## 1. 경제 사회적 측면

최근 자유시장 경제의 확산 및 무역시장 세계화의 물결로 농업분야에 대한 우리나라의 시장개방 압력 등이 거세지고 있다. 특히 축산분야에서도 피해갈 수 없는 현실이며, 우리나라의 축산기반은 식육생산을 위한 소, 돼지, 닭 등의 주요 품종이 국제적인 경쟁력 열세를 만회하지 못한 채 급격한 변화를 맞이하고 있다. 따라서 우리 축산업의 장래는 우리나라 풍토와 기후에 잘 적응하면서 국내외 경쟁력을 가지고 있는 고부가가치가 가능한 가축을 선별하여 집중적으로 육성하는 기술적·정책적 뒷받침이 시급하다. 양돈업은 국내 축산업 중 다른 축종에 비해 국제 경쟁력이 높은 것으로 조사된 바 있다. 최근 양돈농가들은 기존의 소규모 사육에서 탈피 기업화된 대규모 생산방식으로 옮겨가고 있다. 이러한 추세는 우리나라뿐만 아니라 동남아시아를 비롯한 거의 모든 축산업 현장에서 일어나고 있는 변화이다. 특히 교통의 발달로 인한 질병의 확산이 빠르게 일어나고 있으며 전염성 질병의 발생은 대규모 축산현장에서 절대적으로 예방해야 할 사안이다. 최근에 조류독감과 같은 질병의 전파로 막대한 농가 피해는 물론 사회적으로도 막대한 직간접적 피해를 발생시키는 중요한 사회적 이슈가 되어 있다. 따라서 가축전염병의 예방은 축산업 발전뿐만 아니라 국민들의 안전한 먹거리 보호, 친환경적인 축산환경의 조성 등 반드시 선행되어야 할 중요한 분야이다.

양돈분야에서 문제시되는 질병은 매우 다양하지만, 돼지의 만성소모성 질병이란 현재 양돈현장에서 문제되고 있는 질병(또는 증후군) 중 돼지유행성설사병(PED), 돼지생식기호흡기증후군(PRRS), 이유후전신소모성증후군(PMWS), 돼지호흡기복합병(PRDC) 등을 통칭하는 것이다[1][2]. 그중 최근에는 소위 “4P질병”이라 불리는 만성소모성 질병들에 의한 양돈현장에서의 돼지의 폐사 등 피해가 지속적으로 보고되고 있다. 돼지의 만성소모성 질병이란 현재 문제시되는 질병 또는 증후군 중, 현재 양돈 농가에서 가장 큰 피해를 발생시키는 질환은 이유후 전신 소모성 증후군(PMWS; post-weaning multi-systemic wasting syndrome) 및 돼지 호흡기 복합병(PRDC; porcine respiratory disease complex) 등이다. 이 두 질환의 공통적인 병인균으로 알려진 PRRS 바이러스는 현재 시급히 효능이 있는 백신의 개발이 필요한 질병이다. 현재 위 두 질환의 또 하나 중요한 원인균으로 알려진 돼지썩코바이러스의 백신이 상용화되어 현장에 적용됨으로서 폐사율감소, 증체율향상등의 효과를 보고 있다[3]. 그러나 PMWS, PRDC 모두 여러 바이러스와 세균의 감염으로 인해 발생하는 질환으로 특히 PRRS 바이러스 감염으로 인한 질병의 발생을 차단하는 것이 매우 중요하다. PRRS 바이러스는 법정 전염병은 아니지만 현재 중점 관리대상 질병원 중 하나로 관리되는 바이러스 중 하나이다. 돼지의 호흡기와 유행성 설사병(PED; porcine epidemic diarrhea)의 원인균으로 알려진 PED 바이러스는 코로나바이러스가 원인체로서 주로 어린자돈에서 설사병을 유발하고 모돈의 유즙 항체를 부여받지 못한 자돈은 대부분이 폐사하게 되는 등 평균 산자수 대비 평균 이유두수의 감소로 양돈농가에 많

은 직·간접적인 경제적 피해는 물론 돼지고기 수급에도 많은 영향을 미치고 있다[4]. 또한 PED는 감염된 돼지 또는 감염돼지의 분변 등에 오염된 사람, 차량 등에 의해 전파되며 연중 발생되고 있으며, 소독 등에 의한 차단방역이 어렵고 추위에 의한 스트레스가 많은 동절기를 전후로 다발하고 있는 양돈현장의 고질적인 풍토성 질병으로 간주되기에 이르렀다[5].

PRRS와 PED로 인한 양돈산업에서의 추정 피해액은 연간 500~670억원 정도의 피해를 입히는 것으로 보고되었다. 그러나 치료비용 등 직간접적인 피해액까지 지출되는 비용은 2천8백억원에 달하는 것으로 보고되었다. 이와 같은 막대한 피해를 입히는 질병을 효과적으로 차단하기 위해 적절하고도 효과적인 대처방안을 수립하는데 백신의 사용은 필수적인 요소로 고려해야한다.

현재까지도 질병 통제의 대표적인 두가지 방법은 예방과 치료의 두 가지 방법을 고려할 수 있다. 이 두 가지 방법 중 예방은 치료보다 효과적이고 경제적인 방법으로 알려져 있으며 질병을 사전에 예방함으로써 2차적인 사회적 피해를 예방할 수 있다. 질병의 예방은 항상 질병 발생에 관한 역학조사를 통해 질병발생의 기전을 연구하고 적절한 백신접종 방법을 택해야만 효과를 볼 수 있다. 현재까지도 백신의 사용은 그 어떤 방법보다 경제적이고 효과적인 방법으로 알려져 있다. 특히 효과적인 백신의 사용은 질병 발생을 막을 뿐만 아니라 궁극적으로 청정화의 단계에 필수적인 방법이다. 이러한 효과적이고도 경제적인 백신사용에 있어서 확실한 효능과 안전성이 입증된 백신의 개발과 사용은 또 하나의 중요한 선결과제이다. 최근 분자생물학의 발달로 인하여 genomics, proteomics 등 학문적 발전이 이루어지고 특히 reverse genetics 등의 발달로 꼭 면역학적 발달에 힘입어 자세한 기전이 밝혀짐에 따라 합성 Adjuvant, 또는 생체분자를 이용한 adjuvant가 개발되고 있고 사용되고 있다[6]. 이번 연구에서 면역자극의 가장 중요한 분자인 항체 Fc 도메인을 이용한 Fc분자 표면발현 바이러스를 이용한 PRRS, PED 예방백신의 개발은 바이러스의 기본적인 항원성에는 영향을 주지 않으면서 Fc분자의 면역증강 효과만을 첨가한 새로운 백신개발 기술이라 하겠다.

## 2. 기술적 측면

최근 분자 생물학과 면역학, 그리고 단백질체학(Proteomics)의 발달에 따라 백신 개발 기술은 날로 발전하고 있다. 순화주와 병원성주를 불활화하여 백신의 항원으로 사용하여 백신이 개발되었던 지난 오랜 기간 동안 성공적으로 질병 예방에 백신이 사용되어 오고 있다. 그러나 최근 새로운 질병원에 대한 백신 개발을 통한 예방은 새로운 전환기를 맞고 있다. 특히 백신은 질병 예방이라는 효능적인 측면 뿐만 아니라 안전성을 우선하는 방향으로 발전하고 있으며 생백신(Live vaccine)에서 불활화(Inactivated vaccine) 백신으로 또 특정 항원을 이용하는 단위체백신(Subunit vaccine)으로 발전하고 있다. 이러한 특정 분자를 이용하거나 전 바이러스 항원을 이용한 불활화 백신은 안전성 뛰어난 장점이 있으나 여전히 다양한 면역반응을 유발시키는데 한계가 있는 것으로 알려져 있다.

이러한 단점을 극복하기 위해 가장 처음으로 사용되어 온 것은 백신에 첨가되는

adjuvant 라 할 수 있겠다. adjuvant는 그 자체로는 면역반응에 관여하지 않지만 항원과

### 백신의 종류

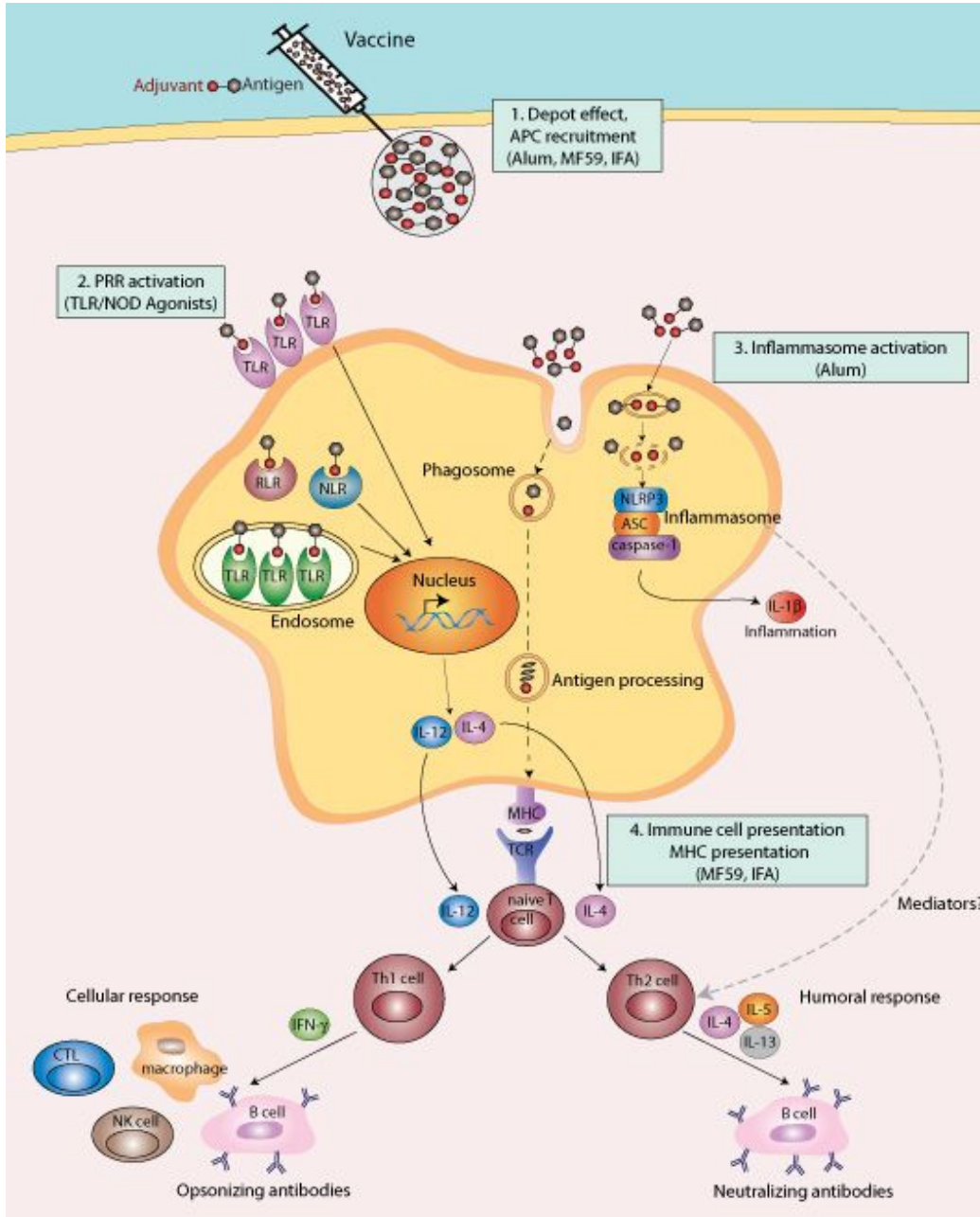
- **순화백신(Attenuated vaccine)**
- **불활화백신(Inactivated or Killed Vaccine)**
- **톡소이드 백신(Toxoid vaccine )**
- **특이항원추출백신(Subunit vaccine)**
- **유전공학백신(Genetic engineering vaccine)**
- **DNA 백신(유전자 백신)**

혼합되어 사용되는 경우 면역 반응을 촉진시키는 특징이 있다. adjuvant의 주용 성분으로는 oil adjuvant 그리고 alumimum hydroxide gel과 부정형 다공성 물질로 주요한 기능은 항원과 결합하여 항원의 방출 속도를 조절하여 면역 반응의 지속기간을 늘리고 접종 부위의 염증 반응을 촉진시키고 면역반응에 관련된 몇몇 면역호르몬의 분비도 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 일반적으로 사용되는 adjuvant는 질병원의 감염 메카니즘에 따른 특정 면역시스템만을 선택적으로 자극하는 것이 아니고 전체 면역 반응을 촉진시키는 역할을 하기 때문에 adjuvant 사용으로 인한 부작용도 수반되는 약점을 가지고 있다. 특히 PRRSV와 PEDV와 같이 주요 감염 경로가 호흡기나 장관막과 같은 특정 경로를 통해 이루어지는 경우 1차적인 감염 예방에 중용한 역할을 하는 점막면역 시스템이 바이러스 감염 예방에 아주 중용한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 adjuvant의 개발 방향에 있어 기존의 화학물질 기반의 adjuvant보다 특정 면역 시스템을 선택적으로 자극할 수 있는 생체분자를 이용한 adjuvant 개발이 이루어지고 있다.

#### 가. PED 백신 개발의 기술적 요구

1976년 돼지 설사병의 원인균으로 영국에서 처음 보고된 PED 바이러스는 전 유럽에 전파되어 질병을 발생시켰고 이후 한국, 일본 중국 등 동북아시아에 전파되어 지난 20년간 양돈 산업에 큰 피해를 입히고 있는 질병이다 최근 PED 바이러스는 동남아시아의 태국, 베트남, 필리핀 등지에서도 발생하여 양돈산업에 큰 피해를 입히고 있다. PED 바이러스는 코로라바이러스에 속하는 바이러스로 엔벨로프를 가지고 있으며 단일가닥 RNA를 유전자로 가지고 있는 비교적 큰 바이러스에 속한다. 국내에서 PED는 제 2종 법정전염병으로 분류되어 있어 발생에 따른 신고 의무화 질병으로 규정하고 있으나, 실제로는 발생 신고를 기피함에 따라 통계수치 상으로는 발생사례가 감소해 나타나는 것으로 판단하고 있다. 최근 PED의 발생동향은 지속적으로 매년 발생하여 피해를 주고 있으며

최근 10년간 발생 건수는 줄고 있으나 여전히 발생이 지속되고 있다. 전 술한 바와 같이 PED 바이러스는 가장 문제시 되는 돼지의 주요 바이러스성 설사의 원인체로서 PED 발생 시 현재까지 특정한 치료방법이 없어 효과적인 예방백신 개발이 무엇보다도 중요하다는 점에 주목해야 한다. 하지만 양돈농가에서는 현재 사용되고 있는 PED 백신 접



백신 접종에 따른 Adjuvant의 역할

종 프로그램을 현실성 결여로 실천하기 어려워 PED 예방에 커다란 문제점으로 작용하고 있다. 따라서 실제적으로 대부분의 양돈농가에서는 아예 백신접종 자체를 기피하거나, 또는 PED 등 자동설사 피해가 겨울철에만 발생하는 것으로 오인하고 겨울철에 한하여 1회만을 접종하고 마는 추세에 놓여있다.



년도	발생건수	발생두수
2000	38	6002
2001	57	7987
2002	52	22068
2003	91	40377
2004	45	9195
2005	25	3652
2006	31	10258
2007	38	13724
2008	21	12531
2009. 2월 현재	6	810

최근 국내 PED 발생현황

이와 같은 양돈현장의 문제점을 해결하기 위해서는 1회 내지 2회 접종만으로는 PED에 대한 충분한 면역력을 부여하지 못하고 지속적인 경제적 피해를 매년 감수하고 있는 현행백신의 한계점을 극복하고 탁월한 면역력을 부여할 수 있는 새로운 대체백신의 연구개발이 필요하다. 특히 PED 질병의 특징은 바이러스 감염이 모든 또는 비육돈에 감염되었을 경우 폐사율은 3 % 이하로 낮은 반면 이러한 감염 돈군이 전체 농장에 바이러스를 전파시켜 어린 자돈에 감염되는 경우 100 % 가까운 폐사를 발생시키는 매우 위험한 질병이다. 이러한 특성 때문에 백신은 주로 모돈에 접종하여 자돈에 초유항체를 전달 어린 자돈의 PED 바이러스 감염을 예방하는 방법이 가장 우수한 방법으로 알려져 있다. 그러나 현재 상용화되어 사용되고 있는 PED 생백신과 불활화백신은 바이러스 자체의 면역원성이 떨어지는 약점으로 인해 생백신과 불활화백신을 이용한 4차례 이상의 백신 접종이 이루어져야 충분한 방어 면역을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 백신이 약점을 극복하기 위해 경구 투여 백신이 개발되어 사용되고 있으나 경구투여의 불확실성과 백신 균주가 분변을 통해 배출되는 문제점으로 이 역시 사용에 문제가 있다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위해 세포성 면역과 점막면역 자극 효과가 뛰어나고 안전성이 우수한 불활화 백신의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

## 나. PRRS 백신 개발의 기술적 요구

1991년 캐나다에서 최초로 보고된 PRRSV는 지난 20여년간 양돈 산업에 가장 큰 문제를 일으키는 질병으로 유사산과 호흡기 질환을 유발하는 질병이다. 아테리바이러스에 속하는 단일가닥 RNA를 유전자로 가지고있는 바이러스로 유전적 변이가 가장 빠른 바이러스 중 하나이다[8].

PRRSV 감염 예방을 위한 효과적인 백신 개발 노력이 전세계적으로 이루어지고 있으나 아직 효과적인 백신은 상용화되지 않고 있다. PRRSV 백신 개발의 가장 큰 장애물은 첫째 돌연변이에 의한 유전적 다양성이다. 유전적 다양성은 혈청학적 다양성으로 표현된 한 종류의 항원으로 다양한 야외 바이러스에 대한 면역반응을 이끌어내지 못해 백신 접종으로 방어가 되지 않는 문제를 만들고 있다[9]. 둘째 PRRSV가 가지고 있는 숙주에 대한 면역회피 기작이다. PRRSV의 면역회피 기작은 여러 가지 형태로 나타나는데 바이러스 감염으로 인한 면역반응의 지연이다. 일반적으로 바이러스 감염으로 인해 유발되는 면역반응이 감염 후 일주일 이내에 완성되는 반면 PRRSV의 감염으로 인한 면역반응은 3주 이후에 일어나고 특히 바이러스 감염 예방에 중요한 중화항체 반응은 4주 이후 그리고 매우 낮게 발생되어 바이러스 감염 예방에 어떠한 역할도 할 수 없는 것으로 보고되고 있다. 이러한 면역 반응의 지연 및 중화항체 반응 약화는 항원 단백질로 알려진 ORF5 단백질이 주요 Epitope 부위에 glycosylation이 되어있고 이러한 glycosylation이 항체 반응을 방해하는 glycan shedding 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 또 하나 PRRSV 감염은 면역반응을 지연시키고 약화시키기 위해 바이러스 감염으로 분비가 촉진되어야 할 INF-gamma 와 같은 면역호르몬의 자극을 억제하고 오히려 IL-10과 같은 면역억제 반응에 관여하는 호르몬의 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다.

PRRSV 백신은 생백신과 불활화백신 모두가 개발되어 있고 국내에도 상용화되어 사용되고 있다. 그러나 생백신의 경우 백신 접종으로 중화항체 형성이 되지 않고 백신주가 증식 및 다른 돼지에 전파되는 안전성에 문제가 있고 이러한 백신 바이러스가 야외바이러스주와 다양한 유전적 변종 유발을 가속화시키는 것으로 알려져 있다. 불활화 백신은 안전성에는 문제가 없으나 다양한 변종에 대한 방어력이 제한적이고 중화항체 유발 효과도 없는 것으로 알려져 있다.

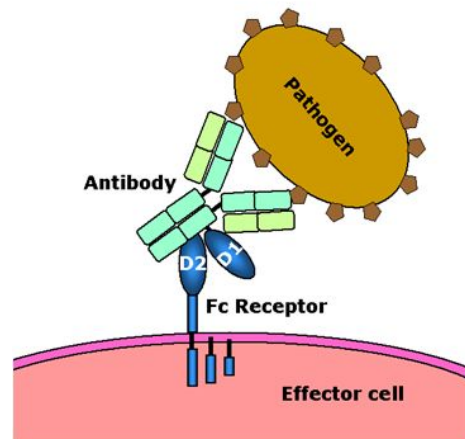
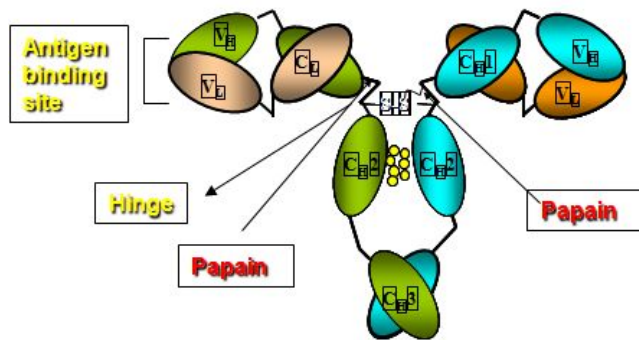
이와 같은 백신의 단점을 극복하기 위해 PRRSV 감염에 의한 면역반응 연구가 활발히 진행되고 있고 이러한 연구를 바탕으로 면역호르몬 또는 바이오 분자를 이용한 PRRSV 백신의 Adjuvant 개발 연구가 진행되고 있다. PRRS 백신의 효능을 개선하기 위해 가장 많이 사용되고 있는 바이오 분자는 PRRSV 감염에 관련된 면역호르몬이다. 바이러스 감염 이후 빠르게 면역반응을 이끌어낼 수 있도록 하기 위하여 Innate immune 를 자극할 수 있는 IL-1, IL2, IL6, IL-12 그리고 항체 반응과 Inflammation 반응을 촉진하는 Interferon 계열의 면역호르몬을 백신 접종과 같이 투여하거나 항원분자와 같이 주사 또는 항원분자와 키메라 형태의 단백질로 만들어 항원으로 사용하는 방법이 연구되고 있다. 두 번째로 콜레라독소, LPS, CpG 등과 같은 TLR recetor를 자극하여 면역 반응을 이끌

어 내는 방법도 연구되고 있다. 그러나 이러한 연구는 아직 특정 면역반응에 관련되 면역 호르몬의 분비 촉진, 임파구 분화와 증식 향상 등의 부분적인 결과는 가져오고 있으나 아직 감염을 예방할 수 있는 세포성 면역이나 중화항체 형성에는 이르지 못하고 있으며 실제 방어력 시험을 통해 감염 예방을 이끌어낸 연구 결과는 아직 없는 것으로 보고되고 있다.

이러한 PRRS 연구에 있어서도 Fc 분자를 표면에 발현한 바이러스를 이용한 면역활성 증가를 통해 중화항체 형성 및 세포성 면역증가를 가져올 수 있는 항원으로 개발하여 백신으로 제조하는 것이 시급한 문제라 할 수 있다.

#### 다. Fc 분자를 이용한 면역활성 백신 개발 연구

Fc 분자는 항체의 constant domain인 CH2, CH3로 구성된 부분으로 특히 IgG 분자의 말단에 단백질을 분해 효소인 Papain으로 절단되는 부위로 쉽게 단백질 크리스탈을 형성할 수 있는 부위로서 Fragment of crystalline(Fc)이라 한다. Fc 부위는 항원과 결합



된

IgG 항체의 구조

항원 결합 항체의 Fc receptor 결합

면역 반응에 관련된 여러 Effector 세포에 결합하여 항원 opsonization, Antibody dependent cell cytotoxicity, 면역호르몬 분비 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.

**Table 1**  
Experimental vaccine adjuvants utilized in other swine vaccines.

Adjuvant					Vaccine <sup>a</sup>	Day of challenge	Adjuvant effects	References
Type	Form	Route	Dose/ administration	Day <sup>b</sup>				
IL-1 $\beta$	rb Protein <sup>c</sup>	Lm.	10 $\mu$ g/kg	0, 1, 2	<i>S. suis</i>	21	↑CD8 <sup>+</sup> T cells; Ab; ↓mortality	Blecha et al. (1995)
IL-2	Plasmid DNA	Lm.	200 $\mu$ g	0, 28	FMDV DNA (d 0, 28)	38	↑T cell proliferation	Wong et al. (2002)
	rp Protein <sup>d</sup>	Lm.	2 $\times$ 10 <sup>5</sup> units	0, 7, 14	PRV inactivated	56	↑Neutralizing Ab; cytotoxicity and IFN $\gamma$ production of PBMC; ↓nasal virus excretion	Lin et al. (2005)
	rh Protein <sup>e</sup>	s.c.	10 <sup>5</sup> unit/kg	0, 1, 2, 3, 4 21, 22, 23, 24, 25	PRV subunit (d 0, 21)	42	↑Neutralizing Ab	Kawashima and Platt (1989)
	rb Protein <sup>c</sup>	Lm.	25 $\mu$ g/kg	0, 1, 2	<i>S. suis</i>	21	↑CD8 <sup>+</sup> T cells; NK activity of PBMC; Ab	Blecha et al. (1995)
	rh Protein <sup>e</sup>	Lm.	10 <sup>5</sup> unit/kg	0, 1, 2, 3, 4	<i>E. coli</i> J5	-	↑NK activity of PBMC	Hennessy et al. (1990)
	Plasmid DNA	Lm.	200 $\mu$ g	0	PRV DNA	21	No	Somasundaram et al. (1999)
	Plasmid DNA	Lm.	10 $\mu$ g	0	PRV MLV	-	↑Ab; lymphocyte proliferation	Ling-Hua et al. (2006)
IL-6	rp Protein <sup>d</sup>	Lm.	2 $\times$ 10 <sup>5</sup> units	0, 7, 14	PRV inactivated	56	No	Lin et al. (2005)
	Plasmid DNA	Ld.	7.5 $\mu$ g	0, 27	Swine influenza virus HA-DNA (d 0, 27)	48	No	Larsen and Olsen (2002)
IL-12	rh Protein <sup>e</sup>	Lm.	2 $\mu$ g	0, 14 (2 h before and after each vaccination)	PRV inactivated (d 0, 14)	35	↑IFN $\gamma$ -secreting PBMC	Zuckermann et al. (1998)
	IL-12p35-and IL-12p40-Encoded plasmid DNA	Lm.	500 $\mu$ g each	0, 21, 42	<i>S. japonicum</i> DNA (d 0, 21, 42)	51, 82	↑#Hepatic <i>S. japonicum</i>	Zhu et al. (2004)
IFN $\gamma$	Plasmid DNA	Lm.	200 $\mu$ g	0	PRV DNA	21	No	Somasundaram et al. (1999)
IFN $\alpha$	Plasmid DNA	Lm.	200 $\mu$ g	0	PRV DNA	28	No	Dufour et al. (2000)
Poly IC	-	Lp.	1 mg/kg	0	FMDV	28	↑Neutralizing Ab	Cunliffe et al. (1977)
Poly ICLC	-	Orally	0.25 $\mu$ g/kg	0	TGEV MLV (d 0,10)	-	↑Neutralizing Ab	Denbyshire and Lesnick (1990b)
IMS	-	Lm.	2.5 mg/kg	-3, -2, -1	<i>E. coli</i>	7	↑T cell and macrophage activation and migration to MLN and ileal Peyer's patches	Bozic et al. (2003); Bozic et al. (2006)
CpG ODN	ssDNA	s.c.	10 $\mu$ g	0	PRV MLV	-	↑Ab; lymphocyte proliferation	Ling-Hua et al. (2006); Linghua et al. (2006a)
	Plasmid DNA	Lm.	200 $\mu$ g	0	PRV DNA	21	↑Ab; IFN $\gamma$ expression of PBMC; ↓nasal virus excretion and mortality	Dory et al. (2005)
	ssDNA	Lm.	500 $\mu$ g/kg	0, 14	SSSK (d 0, 14)	-	↑Ab; proliferation, IFN $\gamma$ , IL-6, MHC II, and CD14 expression by PBMC	Linghua et al. (2006c, 2007b); Linghua et al. (2006b)
	ssDNA	Lm.	250 $\mu$ g/kg	0	<i>P. multacida</i>	-	↑Ab; proliferation, IFN $\gamma$ , and IL-6 of PBMC	Zhang et al. (2007)
CpG ODN (cont)	ssDNA	s.c.	1 mg	0, 21	<i>A. pleuro-pneumoniae</i> Om1A (d 0,21)	35	↑Ab; ↓pneumonia	Alcon et al. (2003)
	ssDNA	Lm.	500 $\mu$ g	0, 17	<i>E. coli</i> F4 fimbriae (d 0,17)	25	↑Proliferation of PBMC; ↓fecal <i>E. coli</i> shedding	Van der Stede et al. (2005)
CT	Commercial (Sigma)	Lm.	25 $\mu$ g	0, 21, 35	<i>A. saum</i> antigens (d 0, 21, 35)	42	↑Ab; IL-4 and IL-10 expression of PBMC	Tsuji et al. (2004)
	Source not available	Orally	50 $\mu$ g	0, 1, 2, 16, 35	F4(HSA)	-	Ab	Verdonck et al. (2005a)
	Source not available	Orally	25 $\mu$ g	0, 1, 2, 16	RecombinantFaeC	34	↑Ab; proliferation of PBMC; ↓fecal <i>E. coli</i> shedding	Verdonck et al. (2005b)

<sup>a</sup> In case of repeated vaccinations, the days of vaccination are placed in the parenthesis.

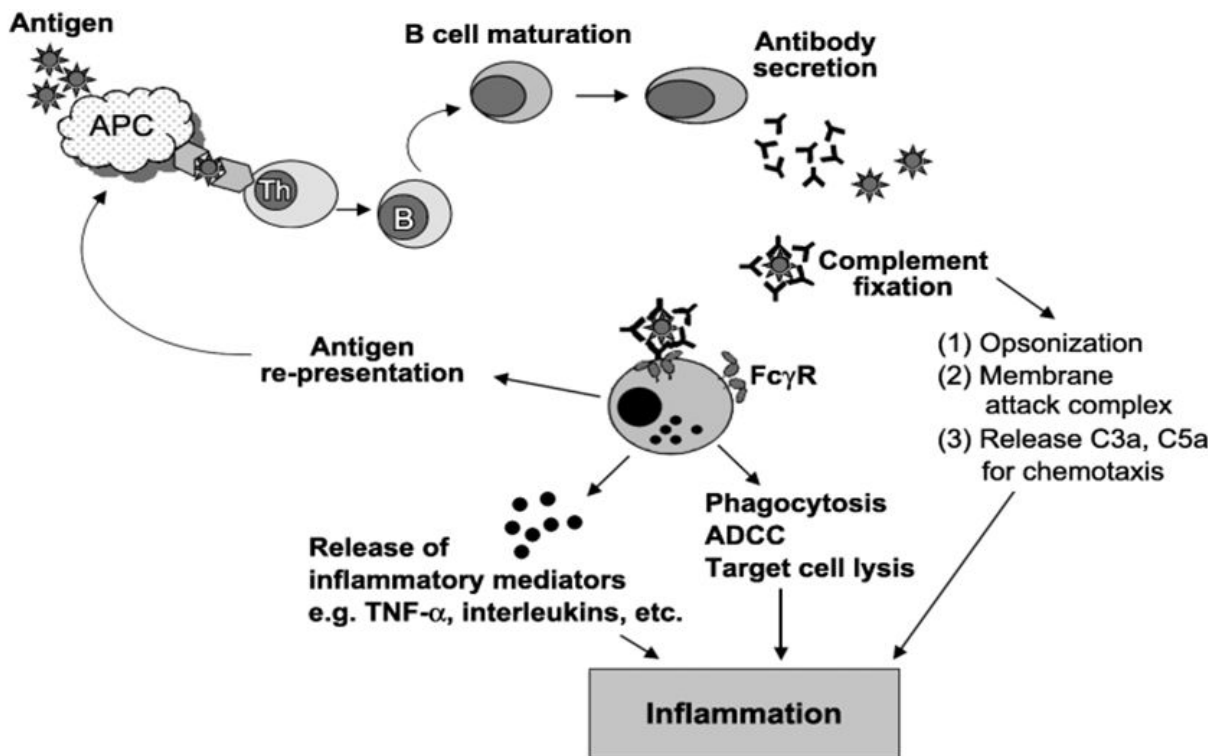
<sup>b</sup> Day of vaccine adjuvant administration after vaccination. Vaccination day refers to day 0 of the experiment.

<sup>c</sup> Recombinant protein expressed in *E. coli* (rb, recombinant bovine; rh, recombinant human).

<sup>d</sup> Recombinant protein expressed in *Pichia pastoris* (rp, recombinant porcine).

<sup>e</sup> Recombinant protein expressed in Sf21 insect cells.

### <생리활성 분자를 분자를 이용한 PRRS 면역활성 연구>



특히 항원과 결합된 Fc분자는 Phagocytosis, ADCC, 감염세포 분해 등에 영향을 미치고 여러 IgG 분자가 결합된 항원의 opsonization을 유발한다, 또한 보체 반응을 유발하여 감염 세포를 공격하거나 C3a, C5a 분비를 촉진하여 임파구를 면역반응 부위로 infiltration 시키는 작용에 관련되어 있다. Fc분자에 의해 processing 된 항원은 antigen

## FC receptors and Function

### Leukocyte Fc receptors

FcR	Cell Distribution	Function
Fc $\gamma$ RI(CD64)	Macrophage, neutrophils, eosinophils	Phagocytosis; activation of phagocytes
Fc $\gamma$ RIIA(CD32)	Macrophage, neutrophils, eosinophils platelets	Phagocytosis; cell activation
Fc $\gamma$ RIIB(CD32)	B lymphocyte	Feedback inhibition of B cell
Fc $\gamma$ RIIA(CD16)	NK cell	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
Fc $\gamma$ RIIB(CD16)	Neutrophils, other cells	Phagocytosis
Fc $\epsilon$ RI	Mast cell, basophils, eosinophils	Cell activation
Fc $\epsilon$ RII(CD23)	B lymphocyte, eosinophils, Langerhans cells	unknown
Fc $\alpha$ R (CD89)	Neutrophils, eosinophils, monocyte	Cell activation(?)

presenting

Fc receptor와 기능

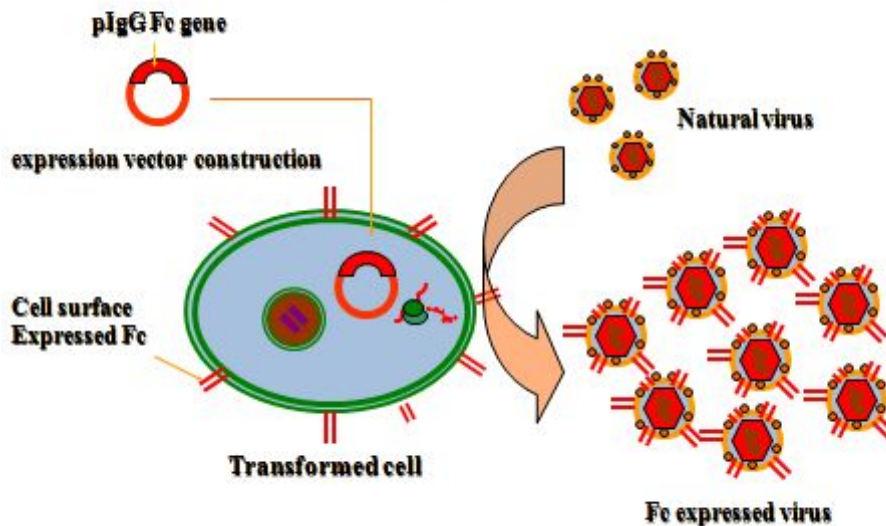
세포에 다시 보여지면서 항체를 생성하는 B-cell을 자극하여 더 많은 B-cell이 항체를 발현하도록 한다. 중요한 사실은 Fc분자에 의해 항체 반응만이 활성화되는 것이 아니라

TNF-alpha(tumor necrosis factor-alpha), Interleukins 등의 분비를 촉진시켜 염증 반응을 활성화 하여 면역반응을 촉진 시킨다. 최근 연구에 의하면 항체의 Fc 분자와 결합하는 Fc receptor가 B-lymphocyte, 대식세포(Macrophage) Natural killer cell, monocyte, 염색구 등의 표면에 발현되어 있으며 Fc분자와 결합하여 면역세포 활성화, cytotoxicity, 대식세포 작용, ADCC 등을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

Fc 분자의 이러한 면역활성 기능은 이전의 이용 대상이던 면역호르몬 등에 비해 다양한 면역활성을 유도할 수있는 장점이 있고 작은 분자로 쉽게 발현이 가능한 장점도 있다

Fc 분자를 역방향(reverse oriented)으로 바이러스 표면에 발현시킬 경우 Fc 분자의 면역활성 효과를 이용한 백신제조가 가능할 것으로 판단되었다. 표면발현 방법은 크게 Fc 분자를 바이러스 표면 단백질에 직접 연결하여 발현하는 방법이 있고 본 연구진에 의해서 고안된 숙주세포 표면에 발현하여 Fc 분자가 표면 발현된 숙주세포에서 바이러스를 배양하여 증식된 바이러스 표면에 Fc 분자를 anchoring 시키는 방법이 있을 수 있다.

## Fc molecule anchoring on the surface of virus



첫 번째 Fc 분자를 바이러스 표면에 직접 발현하는 경우 바이러스 표면단백질과 같은 부분자의 유전자에 Fc 유전자를 삽입 같이 발현할 수 있는 경우인데 이는 유전자 재조합 바이러스를 제작해야하고 RNA를 유전자로 가지는 바이러스의 경우 모든 유전자를 cDNA 로 만들어야 하는 어려움이 있다. 이는 최근 재조합 바이러스를 만드는 reverse genetics와 같은 방법으로 많은 시간과 어려움이 따르는 방법이다 또 하나 단점은 재조합된 바이러스 대부분이 재조합되지 않은 바이러스에 비해 증식성이 떨어지는 문제점을 가지고 있다. 그러나 본 연구에서는 엔벨로프(Envelope)를 가지고 있는 바이러스

의 경우 바이러스 증식과정에서 새롭게 증식되는 바이러스의 엔벨로프가 숙주세포의 세포막에서 유래한다는 사실에 의해 숙주세포에 Fc 유전자를 도입하고 발현된 Fc 분자가 자연스럽게 세포막 표면에 발현되고 이러한 세포주에서 증식된 바이러스가 Fc 발현된 숙주세포의 세포막을 가지고 나와 바이러스 표면에 Fc 분자가 anchoring 된 바이러스를 만들 수 있다는 구상을 가지고 본 연구에서 Fc 분자 발현 세포주 및 Fc 발현 바이러스 제작에 관한 기술을 개발하게 되었다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

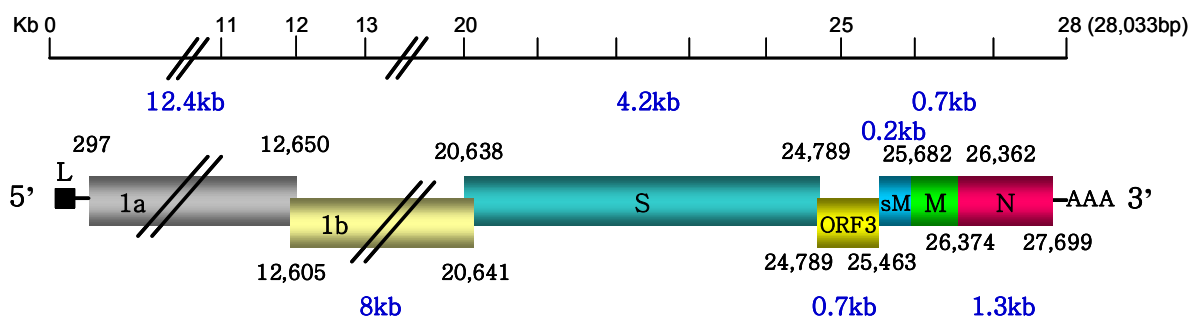
### 1. Fc 관련 연구 현황

항체 분자를 이용한 연구는 유전자 및 단백질 재조합 기술의 발전과 더불어 무수히 많은 연구가 진행되었거나 진행 중에 있으나, 대부분 Fab 또는 scFv 등의 재조합 항체 분자 또는 유전공학적으로 조작된 변이분자(diabodies, tribodies, minibodies) 및 single-domain 항체 등이며, 의학 분야에서는 약 18종 정도의 단클론항체가 상품화되어 있으며 약 100종 이상이 임상시험 중인 것으로 알려져 있다[10].

IgG의 재조합 Fc 분자와 관련한 활용연구에 대해서는 1998년에 처음으로 세포표면에 transferrin receptor와 융합된 형태의 사람의 IgG Fc 영역을 발현시켜 Fc 수용체를 매개한 암식세포의 활성화를 보고하였다[11]. 마우스의 IgG Fc 영역을 세포표면에 발현시킨 후, 돼지 오제스키병 바이러스를 감염시켜 바이러스의 외피막에 Fc 분자를 함유한 바이러스를 불활화 처리하여 백신으로서의 효능을 분석한 보고가 있었다[12].

### 2. PED 백신 개발 현황

PED는 1978년 이후로 양돈산업이 발전한 몇몇 국가에서 발생이 보고된 바 있으며, 특히 유럽과 우리나라, 일본, 중국을 포함한 아시아 지역에 걸쳐 문제가 되고 있는 돼지의 급성 소화기계 질병이다[13]. *Coronaviridae* 과에 속하는 PED의 원인 바이러스는 주로 장관에 병원성을 나타내며 수양성 설사 등 돼지의 소화기 질병을 일으키는 원인체의 하나로서 약 28kb의 (+)ssRNA 게놈에는 바이러스 단백을 코딩하는 7종의 유전자(ORF; open reading frame)로 구성되어 있다.



PED는 1971년 영국에서 육성 및 비육돈에서 TGE와 유사한 급성의 수양성 설사를 일으키나 4~5주령 이하의 돼지에서는 발병되지 않는다는 점에서 TGE나 rotavirus 감염증과는 다른 질병으로 최초 보고되었고, 1982년에 그 원인체가 coronavirus로 밝혀지면서 돼지 유행성 설사(PED; porcine epidemic diarrhea)로 명명되었다.



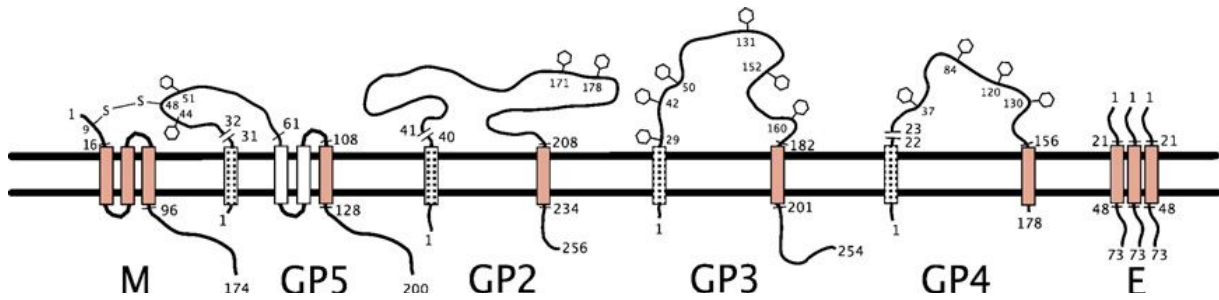
- ORF1a : replicase, three protease, growth factor-like motif
- ORF1b: polymerase, metal ion-binding domain and helicase motif
- Spike protein (S) : forms the surface projection, inducing neutralizing antibody
- ORF3 : function unknown
- Small membrane protein (sM) and Membrane protein (M)
- Nucleocapsid protein (N) : binding to viral RNA

PED 바이러스 입자는 95~190nm의 크기이며, 바이러스 외피단백질 표면에는 방사상의 돌출된 spike를 가진 다형태로 관찰되며, 단일사 RNA 게놈을 가지는 것으로 밝혀졌다. PED가 1971년 최초 발생 보고된 이래 조직배양세포를 이용한 원인 바이러스의 분리배양을 시도하였으나 성공하지 못하여 무균폐지에 접종하여 바이러스를 배양하게 되었고, 그 후 1988년에 trypsin이 함유된 배지의 Vero 세포를 이용하여 in vitro 바이러스 배양법을 확립하게 되었다. PED 바이러스 항원에 대한 실험실 진단법으로는 형광항체법 (FA; 소장조직의 동결절편), 바이러스 입자 확인법(전자현미경), 항원 ELISA법, RT-PCR 법 및 조직배양을 이용한 바이러스 분리법 등이 이용되고 있다. 또한 PED 바이러스 항원에 대한 항체검사법으로는 간접형광항체법, ELISA 및 혈청중화시험법이 확립되어 사용되고 있으며, 2001년에는 PED 바이러스 게놈의 전 염기서열이 분석·보고되었다 [14][15][16]. 포유자돈에 PED에 자연 감염된 모돈의 초유를 급여하면 PED 바이러스 감염을 예방할 수 있었다는 보고와 더불어 PED 바이러스를 면역한 소의 초유를 경구 투여한 자돈의 경우 PED 감염을 예방하고 폐사율을 낮출 수 있었다는 보고도 있었다. 또한 최근에는 면역기전 중 림프구의 증식에 의한 T-림프구의 역할 및 장간 림프절의 isotype 특이 항체수준 등이 PED 감염에 대한 방어능 형성에 중요하다고 보고하였다. 항체분자를 이용한 연구는 유전자 및 단백질 재조합 기술의 발전과 더불어 무수히 많은 연구가 진행되었거나 진행 중에 있으나, 대부분 Fab 또는 scFv 등의 재조합 항체분자 또는 유전공학적으로 조작된 변이분자(diabodies, tribodies, minibodies) 및 single-domain 항체 등이며, 의학 분야에서는 약 18종정도의 단클론항체가 상품화되어 있으며 약 100종 이상이 임상시험 중인 것으로 알려져 있다. 국내에서의 PED는 1993년에 처음으로 그 발생 및 바이러스 분리 보고가 이루어졌으나, 그 이전인 1987년에 이미 국내에 유입되어 발생하고 있었음이 확인되었다. 또한 1993년에 분리한 국내 야외주인 KPEDV-9주에 대한 세포증식성 및 혈청학적 역학조사와 더불어 당시의 PED 발생 동향도 보고되었다. 국내의 PED와 관련한 연구는 세계적인 수준이며 이와 관련한 많은 연구가 활발히 진행된 바 있고 현재에도 진행 중이며, 실험실 진단법 및 항체검사법 등은 외국과 동일하게 확립되어 있다.

PED에 대한 항혈청요법과 치료와 관련한 연구로는 난황 IgY를 이용한 자돈에서의 PED 면역치료 적용 효과와 항혈청 투여에 따른 PED의 예방효과와 관련한 임상증상 및 병리 조직학적·면역조직학적 검사결과 등에 대해 보고된 바 있다. 또한 PED 예방백신 개발 연구로는 순화한 PED 생백신, 경구용 PED 생백신 및 TGE와 PED 혼합 불활화 백신 등이 개발되어 현재 국내 양돈현장에서 사용 중에 있다.

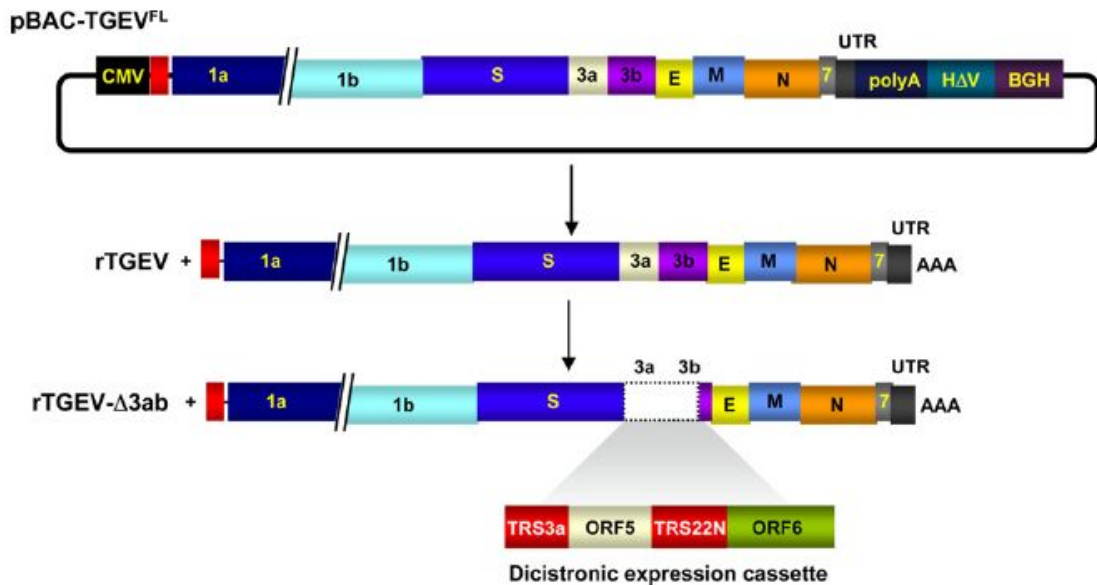
### 3. PRRS 백신 개발현황

PRRS 바이러스 감염에 의한 Innate immune response는 매우 약하게 유발된다. 이에 따라 관련된 세포성 면역반응과 체액성면역반응 역시 매우 느리고 약하게 반응한다. 숙주의 항바이러스 면역반응에 가장 중요한 INF- $\alpha$  분비가 억제되고 염증반응에 관련된 면역호르몬의 분비가 최소화되며 NK cell의 반응도 최소화된다. 체액성 면역에 있어 감염 초기 바이러스 중화 능력이 없는 항체 반응이 있으나 감염 후 3주 이상 지난 후 바이러스 중화항체가 매우 약하게 생성된다. PRRSV 감염에 의한 항체 진단은 일반적으로 ELISA에 의해 민감하게 검출될 수 있으나 아직 중화항체를 측정하는 방법은 이에 미치지 못하고 있으며 이에 대한 연구가 추가적으로 진행되고 있다. 최근 GP5 단백질 이외에 M, GP3 그리고 GP4에 대한 중화항체가 생성된다는 보고에 따라 이러한 단백질을 이용한 중화항체가 측정에 대한 연구가 진행되고 있다. PRRSV 감염을 완벽하게 막을 수 있는 중화항체는 32배 이상으로 알려져 있으며 백신에 의한 중화항체가 유도 역시 이 항체가 수준을 넘어야 확실한 감염 예방을 할 수 있다. PRRSV 감염에 의한 세포성 면역반응 역시 매우 느리고 약하게 유발되는 특징이 있다 그러나 이러한 T-cell 면역반응을 충분히 자극하지 않는 한 감염된 바이러스를 완전히 제거하는 것은 매우 어려운 일이다. T-cell 면역반응 억제는 중요한 두 가지 면역호르몬과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. INF의 분비 억제 그리고 이와 반비례 관계에 있는 IL-10의 분비 촉진이다. 최근 M 단백질이 T-cell proliferation에 inducer로 작용한다는 사실이 보고되었으며 GP2, Gp3 그리고 GP5 단백질이 바이러스 감염 제거에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 최근 IL-2와 CpG를 이용한 백신 개발이 진행되고 있다. PRRS바이러스에 대한 구조적 연구를 통해 바이러스 표면에 발현되어 있는 다양한 단백질에 대한 구조적 연구가 되어 있다[17]. 특히 PRRSV의 주요한 항원 분자로 알려져 있는 GP5 단백질과 M 단백질에 대한 연구를 통해 어떻게 중화항체 유도를 방해하는지에 대한 보고가 되고 있다. 이러한 연구 배경을 통해 GP5 단백질을 이용한 단위체 백신 개발 노력이 이루어지고 있으며 주요 방법으로는 GP5 단백질을 재조합 대장균이나 배큘로바이러스 시스템을 이용하여 발현하고자 하는 연구가 진행되고 있다[18]. 그러나 그림에서와 같이 GP5 단백질은 발현과정 주 M 단백질과 같이 발현되고 상호작용도 있는 것으로 추측되고 있다. 또 하나 수용성 단백질 분자로 발현하기 어려운 점은 작은 항원부위(epitope)에 비해 상당히 큰 부분의 도메인이 세포막에 결합하고 있는 소수성 부위가 많아 발현과정 중 insoluble 침전물로 발현되는 경우가 많다.



<PRRSV 표면 발현 단백질>

단위체 단백질을 이용한 백신 개발 연구와 더불어 최근 바이러스 벡터를 이용한 PRRS 백신 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이는 단위체 또는 불활화 바이러스를 이용한 백신의 효능에 있어 한계가 있다는 가정하에 병원성이 없는 vector 바이러스에 PRRSV의 주요 항원르 발현하여 생백신으로 이용하고자 하는 방법으로 주로 Pox 바이러스, 아데노 바이러스, Pseudorabies 바이러스 등을 이용한 연구가 진행되고 있다. 최근에는 TGE 바이러스를 이용한 백신 개발 연구가 진행되고 있다.



<Design of rTGEV expressing PRRSV antigens.>

병원성이 제저된 TGEV는 호흡기 친화성이 있는 바이러스로서 rTGEV를 만들고 이 바이러스에 PRRSV의 GP5와 M 단백질을 발현하여 생백신으로 개발하는 것이다. 이러한 방법의 장점은 TGEV가 INF 분비를 촉진시키는 특징이 있어 PRRSV 감염에 의한 면역반응 저해를 극복할 수있다는 장점에 근거한 것이다.

PRRSV 백신 개발에 있어 여전히 가장 큰 문제가 되는 것은 다양한 유전형에 대한 대책이다. 현재 사용되고 있는 백신은 물론 현재까지 개발 중인 백신도 다양한 변종에 대한 방어력은 극히 제한적이고 따라서 자가백신 형태의 불활화백신이 사용되고 있는 경우도 있다.

PRRSV 감염에 대한 면역학적 이해는 아직도 많은 연구가 이루어져야 한다. 그럼에도 불구하고 북미형(North american type)과 유럽형(European type) 바이러스 순화주(attenuated)를 이용한 생백신이 사용되고 있다. Ingelvac(Boehringer Ingelheime), Amerivac-PRRS(Hipra), Pyrsvac-183(Syva lab.) 등이 상용화되어 사용되고 있으며 Progress(Merial), Ingelvac-PRRS KV(Boehringer Ingelheim), Suipravac-PRRS(Hipra) 등 불활화 백신도 상용화되어 사용되고 있다. 생백신이 우선적으로 사용되고 있고 어느정도 공격접종을 통해 조직과 혈중 바이러스 감소 효과가 있는것이 확인되었으나 여전히 현재 상용화 백신은 효능에 있어 매우 제한적인 것으로 알려져 있다. 일반적으로 생백신의 경우에 homo type은 물론 hetero type에 대한 방어력이 있는것으로 알려져 있으나 감염에 의한 증상의 완화 효과는 있으나 감염을 막지는 못하는 것으로 알려져 있다. 또한 백신에 의한 면역반응이 자연감염과 같이 높은 수준의 중화항체를 유도하지 못한다. 더욱 더 중요한 것은 백신주가 병원성 주로 다시 변이할 수 있다는 위험성이 있다. 불활화 백신은 생백신에 비해 증상완화나 감염 예방효과가 더욱 낮은 것으로 알려져 있다.

#### 4. 연구배경에 따른 연구의 범위

##### 가. PED 백신 개발

현재 사용되고 있는 PED 백신의 가장 큰 약점은 면역원성이 떨어져 여러번 백신 접종을 해야하는 문제점과 체액성면역 반응 및 전신성 면역반응에만 국한된 백신이 사용되고 있다는 약점이다. 따라서 이러한 약점을 극복할 수 있는 백신 개발을 위해 다음과 같은 연구가 이루어져야 한다

- Fc 분자 표면발현 Vero cell 제작
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스 배양
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스의 증식성 조사
- Fc 분자의 면역학적 특성 규명
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스의 면역학적 활성 개선 효과
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스의 안전성 및 효능 입증
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스를 이용한 PED 불활화 백신 개발
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스를 이용한 백신과 기존 PED 백신과의 비교 평가

나. PRRSV 백신 개발 연구 범위

- 국내 유행 PRRSV의 유전적 다양성 연구(EU, NA type)
- Fc 표면발현 Marc145 세포주 제작
- 국내 분리주로부터 PRRSV-Fc 후보주 선발
- 후보주의 면역원성 및 병원성 시험
- Fc 분자 표면 anchoring PRRSV 제작
- Fc 분자 표면 anchoring PRRSV의 면역학적 효능 평가
- Fc 분자 표면 anchoring PRRSV의 유전적 변이주에 대한 방어력 시험
- Fc 분자 표면 anchoring PRRSV를 이용한 백신 개발

## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 1절 PED-Fc 백신의 개발

#### 1. 백신 균주의 제작

##### 가. 백신 균주의 유래

백신 균주는 1998년 2월 경남 김해지역 1개 양돈장의 설사 포유자돈에서 분리된 SM98P 균주를 사용하였으며, Fc가 발현된 Vero 세포주에서 배양하여 Fc 표면발현 PED 바이러스를 생산한다.

##### 나. Fc 표면발현 Vero 세포주의 제작

Vero 세포의 표면에 돼지의 IgG Fc 분자를 안정적으로 발현하는 Vero-Fc cell line을 확립한 후에, 여기에 PED virus를 접종하여, Fc를 harboring하는 PED-Fc virus를 얻는다.

#### (1) 세포 표면 발현용 Fc plasmid vector의 cloning

돼지 IgG의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자와 돼지 트랜스페린 수용체 (TR)의 트랜스멤브레인 도메인 (TM)을 코딩하는 유전자를 라이게이션하고, 이를 벡터에 삽입함으로써, 재조합 단백질의 N-말단에 위치하는 돼지 트랜스페린 수용체의 트랜스멤브레인 도메인이 세포막에 고정되고, 재조합 단백질의 C-말단에 위치하는 돼지 IgG의 Fc 도메인을 구성하는 CH2 및 CH3이 세포 표면에 발현되도록 벡터를 제조하였다.

#### (가) 돼지 TR 및 돼지 IgG의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자들의 클로닝

돼지 TR 및 IgG의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위해 RT-PCR 방법을 이용하였으며, 이를 위해 각각에 대한 mRNA가 풍부한 세포로부터 총 RNA를 분리하여 cDNA를 제작하였다. 이에 따라 돼지 TR 유전자를 클로닝하기 위해 돼지 간조직의 간세포 또는 돼지 신장세포주로부터 총 RNA를 추출하였다. 또한, 돼지 IgG의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위해 조혈장기인 돼지 비장조직의 비장세포에서 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA의 추출은 RNeasy 미니 키트를 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였고, 추출한 총 RNA는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관, 사용하였다.

(나) 돼지 TR 및 TM 도메인을 코딩하는 유전자의 클로닝

돼지 TR 유전자를 클로닝하기 위해 돼지 TR 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 다음과 같은 방법으로 제작하였다. Stabila 등이 보고한 논문, GenBank accession number X010606의 hTR 염기서열, Stabila 등이 보고한 hTR의 TM 도메인 유전자 증폭용 프라이머 정보를 참고로 하여 Python 등이 보고한 GenBank accession number AF416763의 돼지 TR 유전자의 염기서열에서 돼지 TR의 TM 도메인 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 설계하였다. 돼지 TR 센스 프라이머(pTRf)는 Not1 싸이트, Kozk 염기서열과 개시코돈 순으로 5' 말단에 연장시켜 설계 하였으며, (5'-AGCGGCCGC-GCCACC-ATG-ATGGATCAAGCTAGA-3') pTR 안티센스 프라이머(pTRr)는 BamH1 싸이트를 연장시켜 설계하고, (5'-CGCGGATCC-ATCTGTTTTTGGATTCTACACG-3') 올리고핵산을 주문합성하여 사용하였다.

돼지 간조직의 간세포 또는 PK-15 세포주로부터 추출한 총 RNA 2 ug, 2 pmole의 pTRr 프라이머 및 SuperScript II 역전사효소를 사용하여 제조사의 방법에 따라 42°C에서 50분간 반응하여 일차 가닥 cDNA를 제조하였다.

돼지 TR 유전자의 cDNA 5ul, 10pmole/ul의 pTRf 및 pTRr 프라이머 각 1ul와 Expand Long Template PCR system을 사용하여 제조사의 방법에 따라 PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 94°C 10초, 54°C 30초, 68°C 4분 조건에서 10 사이클 실시 후, 94°C 15초, 54°C 30초, 68°C 4분을 시작으로 매 사이클마다 20초를 증가시키는 조건에서 20 사이클을 실시한 후, 68°C에서 8분 연장 반응을 실시하였다. PCR 실시 후, 증폭된 유전자를 EcoR1으로 절단하고, 전기영동으로 그 크기를 확인하였다. 그 결과, 아래 사진의 레인 1 및 레인 2와 같이 돼지 간조직과 돼지 신장세포주 모두에서 약 320bp에 해당하는 밴드를 확인할 수 있었다. 각각의 증폭된 유전자를 pGEMTeasy에 TA 클로닝하여 "pGpTRR2" 플라스미드를 제조하고, 염기서열을 분석하여 확인하였다. 돼지 TR의 염기서열 및 "pGpTRR2" 플라스미드의 유전자 지도는 아래와 같다.

*NotI*            *Kozak*

```

1  AGCGGCCGC-GCCACCATGATGGATCAAGCTAGATCAGCATTCTCTAGTTTGTGTTGGCGGA  60
1  M M D Q A R S A F S S L F G G  15

61  GAACCATTGTCATACACCCGGTTTAGTCTGGCTCGGCAGGTAGATGGTGATAACAGTCAT  120
15  E P L S Y T R F S L A R Q V D G D N S H  35

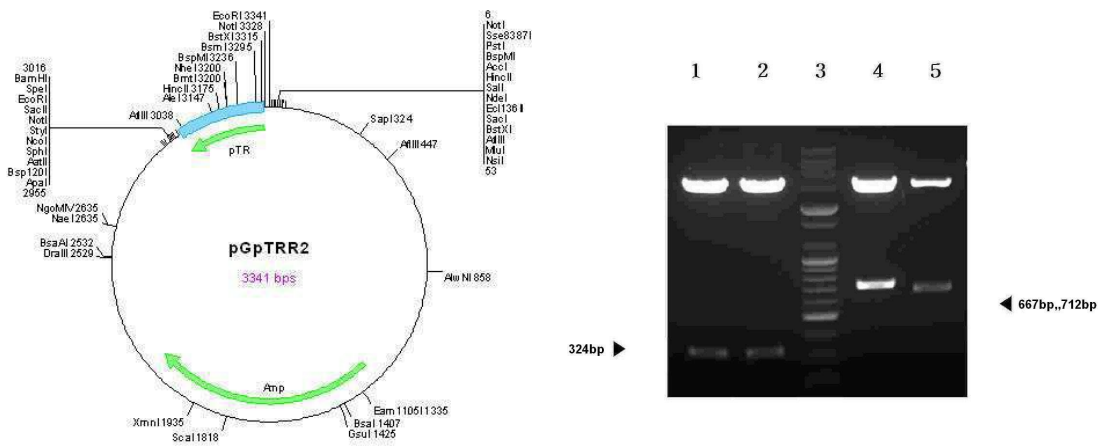
121  GTGGAGATGAAGCTAGCAGCAGATGAAGAAGAAAATGTTGACAGCAACAAGGAGTAAC  180
35  V E M K L A A D E E E N V D S N T R S N  55

181  CACATCGGTGTCGAAAACAAAAAGGCTAAATGGATATGTCTGCTATGGGATTATTGCT  240
55  H I G V A K P K R L N G Y V C Y G I I A  75

241  GTAATCACCTTTTCTTGATTTGATTTATGATTGGCTACTTGGCCTATTGTAAACGTGTA  300
75  V I T F F L I G F M I G Y L A Y C K R V  95

                               BamHI
301  GAATCAAAAACAGATGGATCCGCGG  324
95  E S K T D  100

```



(다) 돼지 IgG의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자의 클로닝

돼지 IgG의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위해, 돼지 IgG의 Fc 도메인 유전자 증폭용 프라이머를 다음의 방법으로 설계하였다. Kacs Kovics 등이 보고한 GenBank accession number U03778의 유전자의 유전정보 및 염기서열을 참고하여 돼지 IgG의 Fc 도메인 유전자를 증폭하기 위한 2종의 프라이머를 설계하였다. 돼지 IgG의 힌지를 제외한 CH1 및 CH2 도메인에 해당하는 Fc 도메인 유전자 부위 (“pIgG-dHFc”)를 클로닝하기 위해 센스 프라이머 (“pIgG-dHFcf”)와 안티센스 프라이머 (“pIgG1r”)를 사용하였다. 센스 프라이머는 BamHI 사이트를 5' 말단에 연장시켜 설계하였고 안티센스 프라이머는 중지 코돈 뒤로 PmeI 사이트를 연장시켜 설계하고 올리고핵산을 주문 합성하여 사용하였다.





*BamHI*

```

1  CGCGGATCCGTGGCCGGGCCCTCGGTCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCCTC 60
1  S V A G P S V F I F P P K P K D T L 19

61  ATGATCTCCCAGACCCCGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGACGAAGGAGCACGCC 120
19  M I S Q T P E V T C V V V D V S K E H A 39

121 GAGGTCCAGTTCTCCTGGTACGTGGACGGCGTAGAGGTGCACACGGCCGAGACGAGACCA 180
39  E V Q F S W Y V D G V E V H T A E T R P 59

181 AAGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGTGTGGTACGCGTCCATCCAGCACCAG 240
59  K E E Q F N S T Y R V V S V L P I Q H Q 79

241 GACTGGCTGAAGGGGAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACGTAGACTCCCAGCCCC 300
79  D W L K G K E F K C K V N N V D L P A P 99

301 ATCACGAGGACCATCTCCAAGGCTATAGGGCAGAGCCGGGAGCCGAGGTGTACACCCCTG 360
99  I T R T I S K A I G Q S R E P Q V Y T L 119

361 CCCCCACCCGCCGAGGAGCTGTCCAGGAGCAAAGTCACGCTAACCTGCCCTGGTCATTGGC 420
119 P P P A E E L S R S K V T L T C L V I G 139

421 TTCTACCACCTGACATCCATGTTGAGTGGAAGGCAACGGACAGCCGGAGCCAGAGAAC 480
139 F Y P P D I H V E W K S N G Q P E P E N 159

481 ACATACCGCACCACCCGCCCCAGCAGGACGTGGACGGGACCTTCTTCTGTACAGCAAA 540
159 T Y R T T P P Q Q D V D G T F F L Y S K 179

541 CTCGCGGTGGACAAGGCAAGATGGGACCATGGAGACAAATTTGAGTGTGCGGTGATGCAC 600
179 L A V D K A R W D H G D K F E C A V M H 199

601 GAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCATCTCCAAGACTCAGGGTAAATGA-GTT 660
199 E A L H N H Y T Q K S I S K T Q G K * 218

661 TAAACCG 667

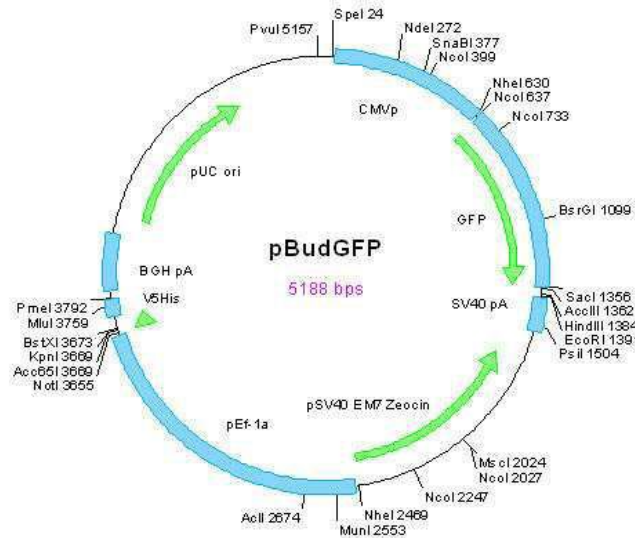
```

*PmeI*

(라) GFP 유전자의 클로닝

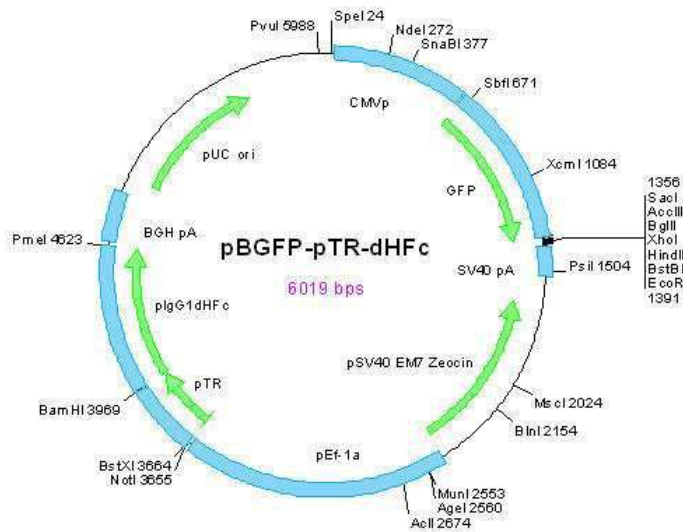
배양세포에 대한 형질전환 효율을 형광현미경으로 바로 확인하기위한 마커 단백질로서 GFP사용하고자 GFP 유전자를 증폭, 클로닝하고 이를 포함하는 플라스미드를 제조하였다. GFP 유전자의 증폭을 위해 먼저 프라이머를 다음과 같이 설계하였다. phrGFP-N1 플라스미드부터 제조사의 염기서열 및 유전자 지도를 참고로 CMV 프로모터 앞에 존재하는 NsiI 사이트로부터 SV40 폴리아데닐레이션 시그널 뒤쪽의 MluI 사이트까지 PCR 증폭이 가능하도록 센스 프라이머 “GFPnsiF” 및 안티센스 프라이머 “SV40mluR”을 설계하고 올리고핵산을 주문합성하여 사용하였다. 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머 각 100pM, phrGFP-N1 플라스미드 DNA 0.1ug 을 사용하고, 어닐링 온도를 60°C조건으로 30 사이클 수행하여 CMV 프로모터로 GFP가 발현되도록 하는 유전자를 PCR 증폭하였다. PCR 증폭 산물을 전기영동한 결과, 약 1.8kb에 해당하는 밴드를 확인할 수 있었으며, 이를 pGemTeasy에 TA 클로닝하여 “pGGFPR” 플라스미드를 제작하였다. 이것을 SpeI 및 EcoR1으로 처리하여 CMV 프로모터-GFP유전자-SV40p를 포함하고 있는 약 1.3kb의 유전자 분절을 수득하고, 이를 “pBudCE4.1” 플라스미드를 SpeI 및

EcoR1으로 처리하여 수득한 3.8kb의 유전자 분절과 라이게이션함으로써 "pBudGFP" 플라스미드를 제조하였으며 플라스미드의 유전자 지도는 아래와 같다.



(마) 돼지 TR의 TM 유전자, IgG의 Fc 도메인 유전자 및 GFP 유전자를 포함하는 플라스미드의 제조

돼지 TR의 TM 유전자와 "pIgG-dHFc" 유전자를 연결한 후 pRudGFP에 삽입하여 "pBGFP-pIgGdHFc"를 제조하였다. 먼저, "pIgG-dHFc" 유전자를 포함하는 "pGpIgG1dHFcR" 플라스미드를 BamHI 및 SacII로 처리하여 671bp의 유전자 단편을 수득하고, "pGpTRR2" 플라스미드를 BamHI 및 SacII로 처리하여 수득한 3.3kb의 유전자 단편과 라이게이션하므로써 "pGpTRpIgGidHFc" 플라스미드를 제조한 다음 제한효소 분석으로 확인하였다. 확인된 "pGpTRpIgGidHFc" 플라스미드를 NotI과 PmeI으로 처리하여 966bp의 유전자 단편을 수득하고, pBudGFP 플라스미드를 역시 NotI과 PmeI으로 처리하여 수득한 5.0kb의 유전자 단편과 라이게이션하여 돼지 IgG1 항체의 Fc를 세포표면에 발현하도록 유도하는 최종적인 플라스미드인 "pBGFP-pTR-dHFc" 를 제조하였다. 유전자 지도는 아래와 같다.



## (2) Vero-Fc cell line의 확립

### (가) Zeocin 농도의 결정

#### ① Zeocin 농도 결정

Fc plasmid vector 내에는 Zeocin 내성 유전자가 포함되어 있다. Vero cell에 Fc를 transfection 시킨 후, Fc가 transfection되지 않은 cell을 selection 하기 위해서 Zeocin을 사용하였고, Zeocin의 최소 억제 농도를 정하기 위한 실험을 먼저 실시하였다. 그 결과, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 결정되었다.

㉞ 전날, 6 well에 각 well 당 25% 정도의 density가 되도록 vero cell 을 seeding 하고, 24시간 동안 incubator에서 배양한다. 총 8 well이 필요하다.

㉟ Media를 제거하고, Zeocin이 다양한 농도로 포함된 media를 각각의 plate에 넣어준다. (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

㊱ 3~4일 마다 Zeocin이 함유된 media를 새것으로 갈아주고, 살아있는 세포의 양을 관찰한다.

㊲ 약 1~2주 가량 관찰하며, 이 기간 동안 대부분의 세포가 죽은 Zeocin의 농도를 선택한다.

## ② Vero cell에 transfection

세포 표면 발현용 Fc plasmid vector를 lipofectamine을 이용하여, transfection 시켰다.

- ㉠ 하루 전에 6 well에  $5 \times 10^5$ 개의 cell을 미리 seeding 한다.
- ㉡ 실험 당일, 기존의 media를 suction하고, Opti-MEM 1 ml로 한 번 washing 한다. 그리고, 800  $\mu$ l의 Opti-MEM을 채워둔다.
- ㉢ Fc 발현용 DNA 4ug을 100  $\mu$ l의 Opti-MEM media에 희석시키고 가볍게 섞어 준다.
- ㉣ Lipofectamine 2000 reagent 10  $\mu$ l를 역시 100ul의 Opti-MEM media에 희석시키고 가볍게 섞어 준다. 그리고 상온에서 20분간 incubation 시킨다.
- ㉤ ㉢과 ㉣를 잘 섞은 후, 상온에서 20분간 더 incubation 시킨다.
- ㉥ 위의 혼합액 200  $\mu$ l를 잘 점적한 후, 골고루 섞어 준다.
- ㉦ 37°C에서 incubation 시키고, 5시간 후에 5 % FBS를 함유한 MEM media로 바꿔 준다.
- ㉧ 48시간 동안 incubator에서 배양한다.

## ③ Untransfected cell selection

Zeocin을 이용하여 selection을 진행하였고, 500  $\mu$ g/ml의 농도를 사용하였다.

- ㉠ Zeocin 500  $\mu$ g/ml을 함유한 선택용 MEM media를 이용하여 transfection 시킨 세포를 100 mm dish로 계대한다.
- ㉡ 3~4일 마다 새로운 선택용 배지로 갈아주고, colony가 형성되는 것을 관찰한다.
- ㉢ Colony 형성이 확인되면 그것을 떼어내 96 well로 옮기고 적당한 양이 확보되면, 48 well, 6well 으로 옮겨 충분한 양을 확보한다.

### (나) Vero-Fc cell line의 확인

위의 과정을 통해서 확립한 cell line의 표면에 Fc 분자가 안정적으로 발현되어 있는지를 확인하기 위하여, Western blot과 형광항체법을 사용하였다.

#### ① Western blot

- ㉠ 75T flask에 mono-layer 가 되게 ( $3 \sim 4 \times 10^6$ 개) cell을 seeding 한다. Control로 일반 Vero cell도 함께 샘플을 준비하였다.
- ㉡ 다음날, media를 suction 해내고, PBS 5 ml로 2번 washing 한 후, 5 ml의 PBS를

넣고 스크래퍼로 셀을 긁어 낸다.

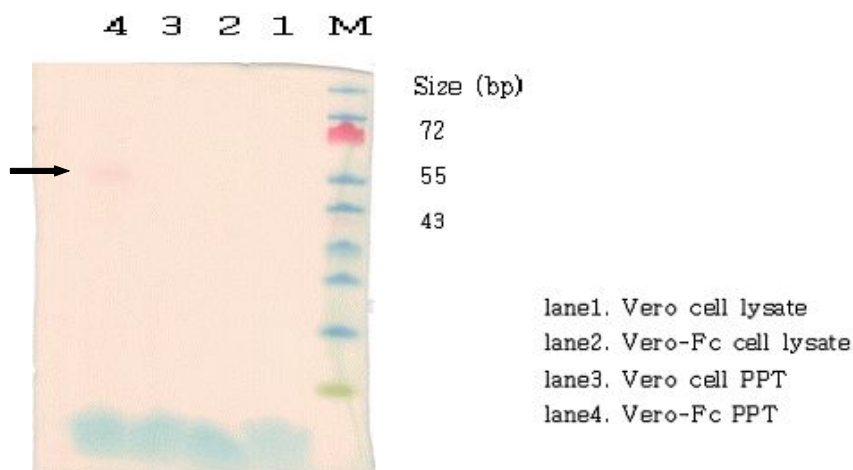
㉔ 15 ml tube에 담고, 1500rpm에서 cell down 시킨 후, 2 ml의 PBS에 cell pellet을 잘 풀어준다.

㉕ 액체 질소에서 freeze and thaw 과정을 3번 반복한 후, 이것을 13000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 상등액과 pellet을 나누고, 상등액을 cell lysate, pellet을 PPT로 한다. PPT는 다시 1 ml의 PBS로 잘 suspension 하였다.

㉖ Cell lysate 및 PPT를 각각 20  $\mu$ l씩 따서, 4X sample buffer와 10X reducing agent를 섞어 total 30  $\mu$ l의 volume으로 맞추고, 70°C에서 10분간 샘플을 끓이고, 이것으로 western blot을 진행하였다.

㉗ Alkaline phosphate가 conjugation 되어 있는 Pig IgG Fc antibody를 (Bethyl Lab) 1:1000으로 희석하여 antibody로 사용하였다.

### 실험 결과



Western blot 결과, 50 kDa 근처에서 목적 band를 확인할 수 있었다.

### ② 형광항체법

㉔ 전날, 6 well에  $5 \times 10^5$ 개의 cell을 seeding 한다. Control로 일반 Vero cell도 함께 준비하였다.

㉕ 다음 날, media를 suction 해내고, 1 ml의 PBS로 2번 washing 한다.

㉖ 차가운 90% acetone을 준비한 후, well 당 1 ml씩 넣고 -20°C에서 20분간 incubation 시켜서 cell을 고정시킨다.

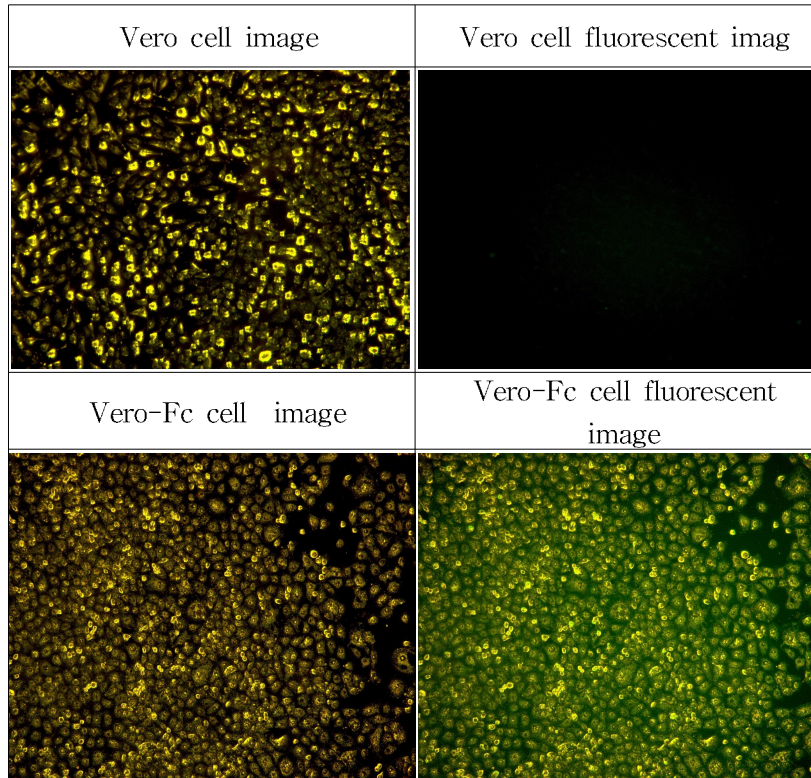
㉗ Acetone을 잘 건어낸 후, 상온에서 10분간 plate를 잘 말려준다.

㉘ PBS로 3회 washing 한 후, FITC가 conjugation 되어 있는 Porcine IgG antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고, 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시킨다.

㉙ 1 ml의 PBS로 5회 washing 한 후, 형광을 관찰한다.

## 결과

Vero cell과 달리, Vero-Fc cell line에서만 형광을 관찰할 수 있었다.



### (3) PED virus 접종

전날 Vero cell을 75T flask 혹은 175T flask에 mono layer 될 수 있도록 seeding 한 후, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 trypsin이 함유된 MEM 배지에 PED 바이러스를 희석하여, 접종 M.O.I가 0.01~0.1이 되도록 접종한다. 1시간 30분 동안 감각시킨 후, 역시 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 trypsin이 함유되어 있는 MEM 배지로 갈아주고, incubator에서 3일간 배양하면서 전체적으로 CPE가 확인되면, harvest 한다.

#### (4) PED virus에 harboring 된 Fc의 확인

세포 표면에 Fc 분자가 발현된 Vero cell line에 PED virus를 접종하여 얻어진 PED virus (이하 PEDV-Fc)가 Fc 분자를 지니고 있음을 ELISA와 형광항체법을 통하여 확인하였다.

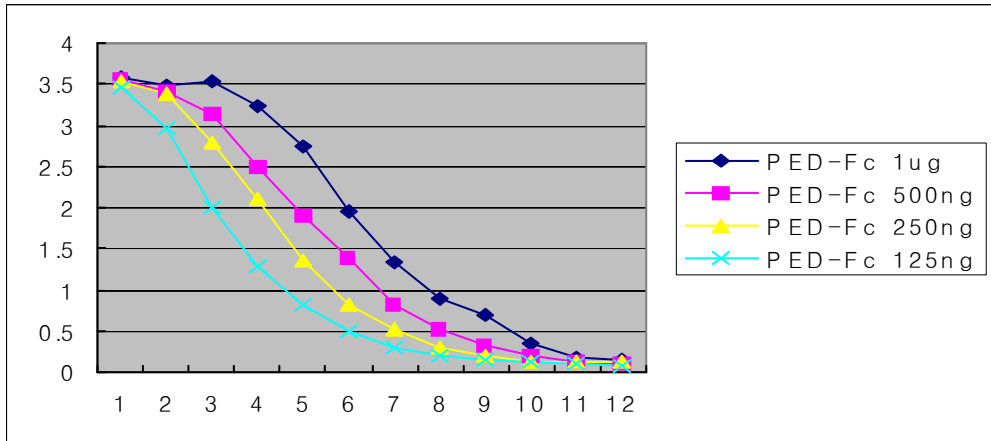
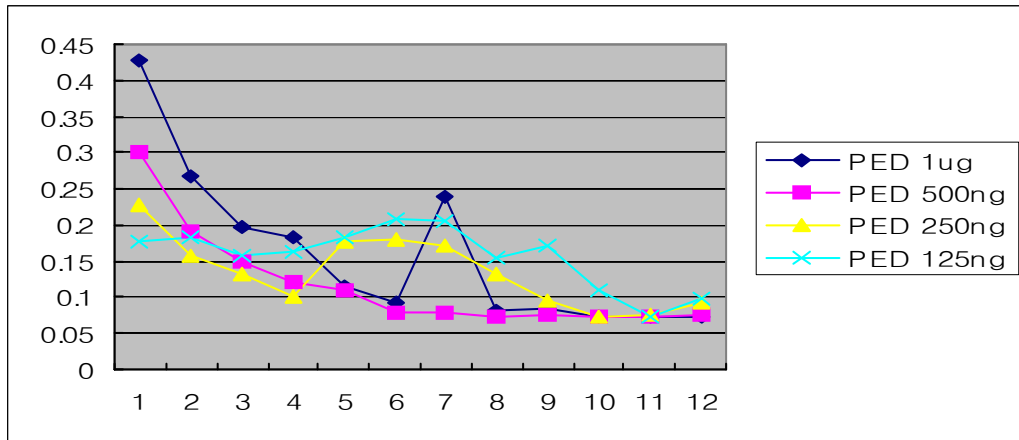
##### (가) ELISA

일반 PED virus와 Fc를 지니고 있는 PED virus를 plate에 coating 한 후, Pig IgG Fc 항체와의 반응성을 관찰하였다.

- ① Plate에 coating 할 virus를 준비한다. 준비한 PEDV와 PEDV-Fc의 titer는 모두  $10^{4.75}$ TCID<sub>50</sub>/ml이다. 각각의 virus 10 ml 씩을 4℃, 90,000g에서 3시간 동안 원심 분리하여 농축시킨 후, 가라앉은 virus를 PBS에 잘 suspension하여 단백질량 결과 최종 농도가 1 µg/0.1 ml이 되도록 희석하였다.
- ② 1 µg/0.1 ml의 농도로 희석한 virus는 다시 2배씩 단계 희석하여, 각각이 500 ng/0.1 ml, 250 ng/0.1ml, 125 ng/0.1 ml 의 농도를 가지도록 하였다.
- ③ 위에서 준비한 4가지 농도의 virus (1 µg, 500 ng, 250 ng, 125 ng/0.1 ml)를 100 µl 씩 취하여 초기 농도로 두고, 2배씩 단계 희석하여 plate에 coating 하였다.
- ④ 각 well을 PBS-T 200ul로 3회 washing 한 후, 2 % BSA가 함유된 PBS를 well 당 100 µl씩 처리하여 상온에서 1시간 incubation 시킨다.
- ⑤ 각 well을 PBS-T 200 µl로 3회 washing 한 후, Goat Anti pig IgG (Fc) antibody를 blocking buffer에 1:500으로 희석하여 well 당 100 µl씩 처리하고, 37℃에서 1시간 incubation 시킨다.
- ⑥ 각 well을 PBS-T 200 µl로 3회 washing 한 후, Anti goat IgG : HRP를 blocking buffer에 1:1000으로 희석하여 well 당 100 µl씩 처리하고, 37℃에서 1시간 incubation 시킨다.
- ⑦ 각 well을 PBS-T 200ul로 3회 washing 한 후, TMB solution을 100 µl씩 처리하고, 상온에서 10분간 incubation 시킨다.
- ⑧ Stop solution 100 µl를 처리한 후, 450nm에서 OD 값을 측정한다.



## 결과



초기 농도에서 PED-Fc 항원을 coating 한 경우가, PED 항원을 coating 한 경우보다, OD값이 10배 이상 높게 나오는 것을 확인하였고, coating한 항원의 농도가 감소됨에 따라서 그 값이 linear하게 감소하는 양상을 나타내었다.

### (나) 형광항체법

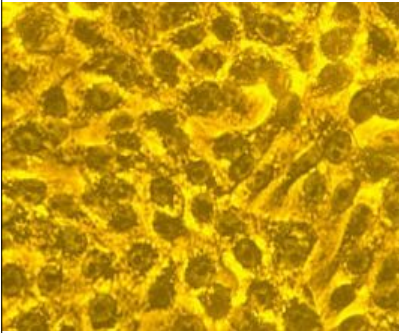

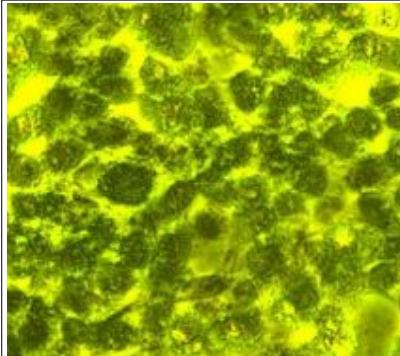
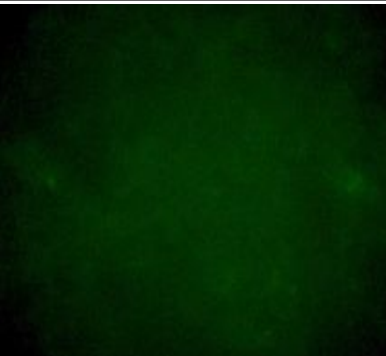
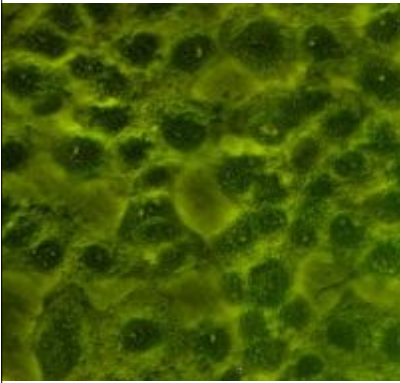
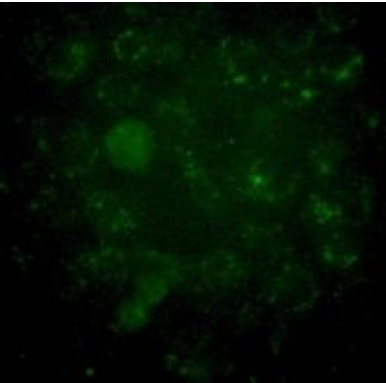
Fc 분자를 harboring 하고 있는 PED virus가 세포감염 시에 viral capsid를 벗고 viral nucleic acid 만 세포내로 주입된다. 때문에 capsid에 harboring 되어 있는 Fc 분자를 세포 표면에서 검출이 가능할 것으로 예상되어, 이를 FA method 형광 항체로 확인하였다.

- ① 전날, 6 well에 well 당  $5 \times 10^5$ 개의 Vero cell을 미리 seeding 한다. Control과 PED virus 접종군, PED-Fc virus 접종군을 각각 준비한다.
- ②  $10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상의 PED virus 및 PED-Fc virus를 각각 1 ml씩 준비한다.
- ③ Media를 suction 해내고, 1 ml의 PBS로 1회 washing 한다.
- ④ Control에는 10  $\mu$ g/ml의 trypsin이 함유되어 있는 MEM media를 넣어주고, PED virus

와 PED-Fc virus에도 trypsin을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 넣어준다.

- ⑤ 준비된 virus와 control media를 1 ml씩 접종시키고, 37°C에서 1시간 30분 동안 감작시킨다.
- ⑥ 감작액을 suction 해내고, well 당 1 ml의 PBS로 2회 washing 한다.
- ⑦ 차가운 90% acetone을 준비한 후, well 당 1 ml씩 넣고 -20°C에서 20분간 incubation 시켜서 cell을 고정시킨다.
- ⑧ Acetone을 잘 건어낸 후, 상온에서 10분간 plate를 잘 말려준다.
- ⑨ PBS로 3회 washing 한 후, FITC가 conjugation 되어 있는 Porcine IgG antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고, 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시킨다.
- ⑩ 1 ml의 PBS로 5회 washing 한 후, 형광을 관찰한다.

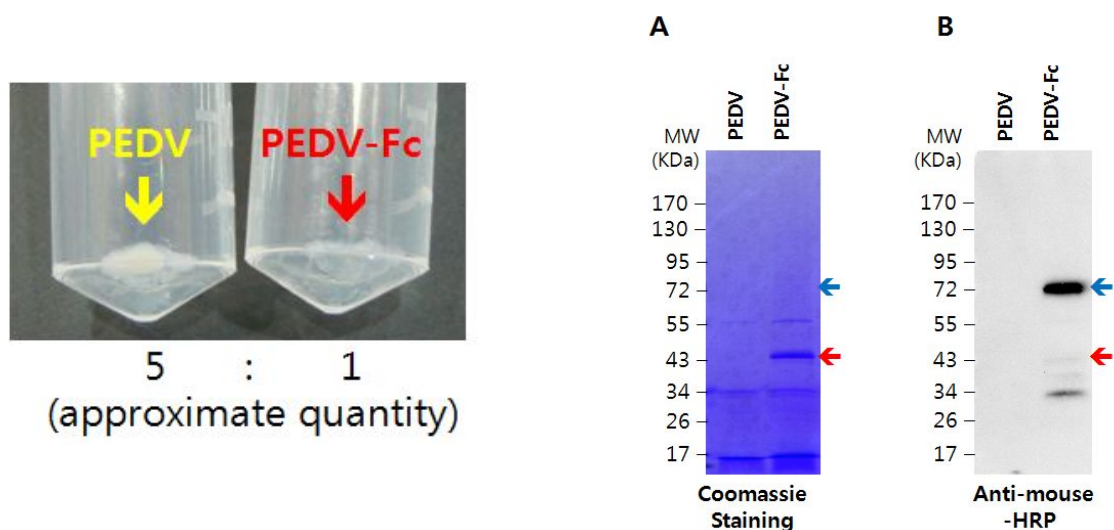
결과

Control Vero cell	
Cell Image	Fluorescent Image
	
PED virus 접종군	
Cell image	Fluorescent Image
	
PED-Fc virus 접종군	
Cell Image	Fluorescent Image
	

PED virus 접종군에서는 Vero cell 표면에서 아무런 형광이 관찰되지 않았으나, PED-Fc virus 접종군에서는 virus가 Vero cell에 감염되면서 가지고 있던 Fc 분자를 Vero cell 표면에 남겨두고 감으로써, Vero cell 표면에 형광 양성으로 확인되었다. 이것으로 PED virus가 Fc 분자가 harboring 되어 있다는 있음을 재증명 하였다.

(다) PEG 침전법 & western blot assay

Fc/vero 세포와 vero 세포에서 각각 증식시킨 PEDV를 대상으로 Fc harboring 여부를 확인하였다. 분석에 사용한 시료는 PEDV 생백신과 PEDV-Fc 생백신 으로 바이러스의 역가는 각각  $10^{5.75}$ TCID<sub>50</sub>/ml 와  $10^{5.50}$ TCID<sub>50</sub>/ml이었다. 분석을 위하여 polyethylene glycol(PEG, MW20,000) 용액을 이용하여 PEDV의 aggregation을 유발하고 원심 분리하여 PEDV pellet을 회수하였다. 바이러스 농축 결과 5배정도의 양적인 차이가 있어 이의 양을 보정하여 SDS-PAGE와 western 분석에 사용하였다.



회수된 바이러스는 SDS-PAGE를 실시하여 coomassie blue 염색을 실시하여 PEDV, PEDV-Fc의 loading양을 확인하였다. 34 kDa 크기의 단백질이 PEDV 기원인 것으로 판단되며, 이의 band intensity로 보아 PEDV와 PEDV-Fc간에 loading된 양적인 차가 없는 것으로 판단되었다. 또한 PEDV-Fc는 45kDa 크기의 불특정 단백을 함유하고 있어 이에 대한 추가적인 분석이 필요할 것으로 판단되었다. 동시에 전개한 SDS-PAGE gel의 단백을 PVDF membrane으로 transfer하고 돼지 면역글로불린에 교차반응 하는 horse radish peroxidase가 표지된 anti-mouse IgG 항체를 이용하여 Fc의 존재여부를 확인하였다. 이결과 PEDV-Fc 만이 돼지 면역글로불린의 Fc를 함유하고 있음을 알 수 있었다.

다. PED-Fc 바이러스의 배양 특성 및 증식성에 대한 연구

PED 생건조 백신의 경우, 1두 당  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub> 이상의 virus를 함유하도록 되어 있다. 1두당 1 ml의 백신을 접종한다고 할 때, 생산 시 요구되는 virus의 농도는  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상이다. PED-Fc 생백신의 경우에도 기준을 1두당  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub> 이상으로 설정하고, 원하는 농도의 PED-Fc 바이러스를 얻기 위해서는 어떠한 배양 조건이 필요한지 실험하였다. 구체적으로, Vero-Fc cell line에 PED virus를 서로 다른 MOI로 접종하

여, 얻어지는 PED-Fc virus의 titer를 확인하였다. 실험은 75T 플라스크에서 배양된 Vero-Fc 세포를 사용하였으며, 플라스크 당  $3 \times 10^6$ 개의 Vero-Fc 세포를 seeding 하고, 3일이 경과 후 세포가 플라스크에 mono-layer 되면, PED 바이러스를 각각 MOI 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 로 설정하여  $10 \mu\text{g/ml}$ 의 trypsin과 함께 세포에 접종하고 CPE를 관찰하였다. 접종 하루째 CPE가 나타나기 시작하여 이틀째에 모든 세포에 CPE가 일어나고, 플라스크 바닥에서 세포가 탈락하였다. 접종 후, 이튿날 저녁에 바이러스를 채독하고,  $4^\circ\text{C}$ 에 보관 후, 다음날 바로 titration을 시작하였다. Titer를 확인해 본 결과, 접종 MOI에 따라서 PED-Fc 바이러스의 농도는  $10^{3.75} \sim 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 로 나왔으며, 접종 MOI가 0.1 이상 일 때 PED-Fc virus의 titer가  $10^{4.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  이상으로 나왔고, 접종 MOI가 1이상으로 높아져도  $10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  이상으로는 잘 올라가지 않았다.

접종 MOI (PED virus)	얻어진 PED-Fc virus의 titer
0.01	$10^{3.75} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$
0.05	$10^{4.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$
0.1	$10^{4.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$
0.5	$10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$
1	$10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$
2	$10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$

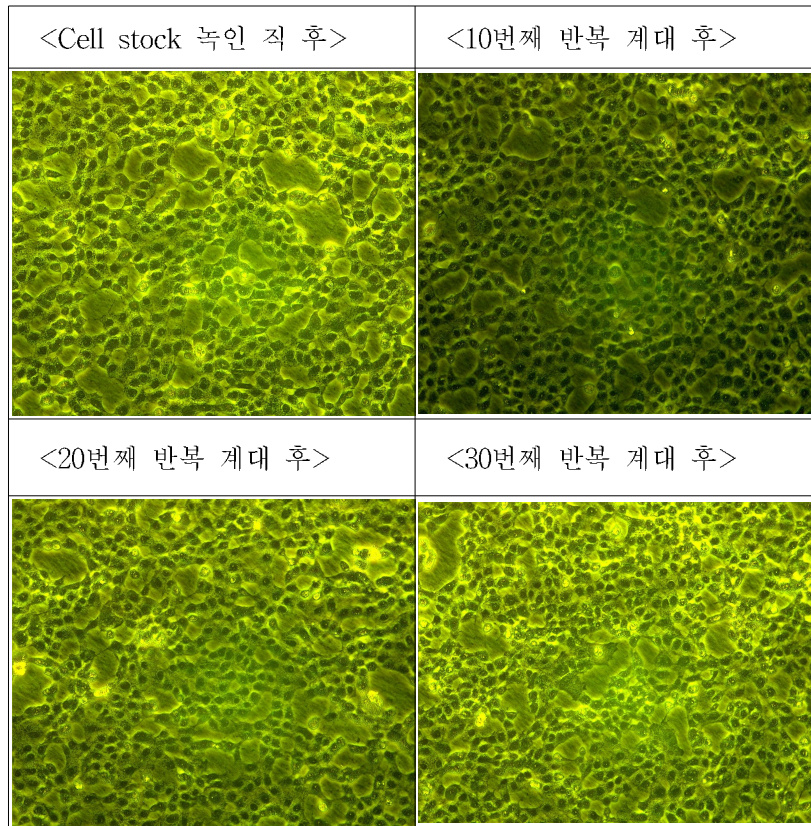
위의 결과를 토대로, 시험백신을 생산하였다.

#### 라. Fc 발현 Vero 세포의 형태학적 특성과 유전적 안정성

Fc plasmid vector를 발현시켜 확립한 Vero-Fc cell line의 형태학적인 특성과 표면에 발현 중인 Fc 분자의 유전적 안정성이 반복 계대를 통해서 어떻게 변하는지를 확인하는 실험을 하였다.

##### (1) 형태학적 특성

광학 현미경을 통해서 세포의 형태를 관찰하였으며, 질소탱크에 보관되어 있던 cell stock을 녹여서 그 형태를 관찰한 후, 총 30번 반복 계대를 하는 동안 정기적으로 형태 변화를 관찰하였다. 75T 플라스크에서 반복 계대를 진행하였으며, 3일에 한 번씩 계대 작업을 하였고, 계대할 때마다 6well에 일부 세포를 seeding하여 광학 현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다. 아래에는 10번, 20번, 30번째 계대 시 관찰한 세포의 사진을 첨부하였으며, 총 30번의 반복 계대를 거치는 과정에서 어떠한 형태학적인 변화도 관찰할 수 없었다.



## (2) Fc 분자의 유전적 안정성

해당 세포주에 PED 바이러스를 접종하여, PED 바이러스가 세포 표면에 발현된 Fc 분자를 가지게 하는 것이 PED-Fc 백신의 핵심 기술인만큼, Vero-Fc 세포를 반복 계대하였을 때, 표면에 발현중인 Fc 분자가 얼마만큼 안정적으로 유지되는지가 관건이다. 이것을 확인하기 위해서 각 계대 별로 세포 주에서 Fc DNA를 추출한 후, Fc 유전자의 염기서열을 확인하였다. 위와 마찬가지로, cell stock을 녹인 직 후와 10번째, 20번째, 30번째 계대를 거친 후의 세포주에서 Fc 유전자를 추출하여 염기서열을 서로 비교하였다.

### (가) DNAzole을 통한 Fc 유전자의 추출

#### ① 시료의 전처리

- ㉞ 75T 플라스크의 세포 배양액을 건어내고 5ml의 PBS로 세포를 1회 세척한다.
- ㉞ PBS 5 ml을 넣고, 스크래퍼를 이용하여 플라스크 바닥에 붙어 있는 세포를 떼어낸 후, 피펫으로 잘 suspension 한다.
- ㉞ 세포 혼합액을 15 ml tube에 담고, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여, 세포와 PBS를 분리해낸다.

① PBS를 버리고, 1 ml의 PBS로 세포를 다시 잘 suspension 한다.

② DNA 추출

ET tube에 TRIzol Reagent 750  $\mu$ l를 넣고 전처리한 시료를 250  $\mu$ l 첨가하고 Inverting 한다. 실온에 5분간 정치하고 클로르포름을 200  $\mu$ l 첨가하여 15초간 Inverting 한다. 실온에 약 2분간 정치하고 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한다.

③ DNA 침전

새 튜브에 아이소프로판올 500  $\mu$ l를 넣고 추출된 상층액 500  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한다. 실온에서 약 10분간 정치한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한다.

④ DNA 세척

상층액을 조심히 버린 후, 75%의 차가운 에탄올 1 ml을 첨가하고 혼합한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한다.

⑤ 재용해

상층액을 버린 후 내벽에 묻은 용액을 가라앉혀 뽑아내고 5~15분간 완전히 건조한다. 여기에 멸균 D.W를 25  $\mu$ l 첨가하여 pellet을 잘 용해시킨다.

(나) PCR 통한 유전자 증폭 및 염기 서열의 확인

앞서, Fc 발현용 plasmid vector의 제작에 있어, 돼지 Fc 유전자를 cloning 하는 과정에서 사용되었던 프라이머를 그대로 사용하여 PCR을 진행하였으며, 위에서 추출한 DNA 5  $\mu$ g을 template로 사용하였다.

PCR 반응조건은 94°C 6분 반응 후, 94°C 50초, 54°C 50초, 74°C 50초의 조건에서 32 사이클과 72°C에서 5분 연장 반응을 실시하였다. PCR 산물을 pGemTeasy에 TA 클로닝하여 염기서열의 분석에 사용하였으며, 염기서열의 분석은 (주)바이오닉스 (<http://www.bionicsro.co.kr/>)에 의뢰하였다. DNASTAR의 MegAlign 프로그램을 이용하여 위의 4가지 유전자 염기 서열을 비교 분석한 결과 100% 일치하는 것으로 나타났다.

		Percent Identity				
		1	2	3	4	
Divergence	1	100.0	100.0	100.0	100.0	1 After 10 passage
	2	0.0	100.0	100.0	100.0	2 After 20 passage
	3	0.0	0.0	100.0	100.0	3 After 30 passage
	4	0.0	0.0	0.0	100.0	4 cell stock
		1	2	3	4	



## 2. FED- FC 전입상 시험 결과

### 가. 전입상 시험의 배경과 목적

Fc 분자가 바이러스 표면에 발현된 PED바이러스 SM98P-Fc strain의 면역학적 효능을 검사하여 표면 발현된 Fc분자의 효능을 입증하기 위한 시험을 수행하였다. 또한 면역학적 효능 검사는 기존의 PED 바이러스와 비교실험을 통해 Fc분자가 바이러스 표면에 발현됨으로써 얻어지는 면역반응의 상승효과와 이로 인해 예상되는 백신주로서의 이익을 규명하는데 필요한 실험을 수행하였다. Fc 분자의 면역학적 활성이 바이러스 표면에 발현 되었을 때 얻어질 수 있는 항체가 상승, 중화항체가 상승, 면역세포의 활성화, 사이토카인 발현의 활성화 그리고 IgG subclass의 변화를 비교 관찰하여 Fc 분자 표면발현 PED 바이러스의 우수성을 입증하려 하였다. 각각의 면역학적 활성 시험은 마우스를 이용하여 같은 농도의 PED 바이러스와 PED-Fc 바이러스를 접종하고 이로 인해 유발되는 면역학적 활성을 각각의 실험방법에 의해 측정하여 비교하였다. 불활화 바이러스와 생바이러스를 이용한 비교시험을 통해 백신의 제형을 결정하기 위한 시험을 기니픽을 이용한 ELISA 항체와 중화항체가 비교시험을 통해 수행하였으며 각각의 항원에 의한 항체형성 정도를 시험하여 임상시험용 백신의 항원 농도를 결정하려 하였다. 항체 형성에 관한 시험은 목적 동물인 돼지를 이용하여 다시 수행하였으며 시험백신 접종 후 병원성 PED 바이러스를 이용하여 공격시험을 실시하여 백신의 방어력을 시험하였다.

PED-Fc 시험백신의 formulation이 결정된 후 실험동물과 목적동물을 이용한 백신의 안전시험을 수행하였다.

### 나. 부형제 비교 실험

#### (1) 목적

항원량 결정시험을 통해 결정된 항원함량( $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml)을 이용하여 가장 효과적인 방어력을 만들 수 있는 부형제를 결정하고자 하였다.

#### (2) 시험방법

(가) 프랑스 'Seppic'사에서 제조한 IMS1313(oil adjuvant), 동물 백신 뿐 아니라 인체백신에서 유일하게 사용되고 있는 Aluminium hydroxide, 최근 각광받고 있는 Carbopol 741p 의 3가지 부형제를 이용하여 아래와 같이 시험백신을 제조하였다.

시험백신	PED-Fc 바이러스 함량 (TCID <sub>50</sub> /ml)	Adjuvant	Formalin
A	10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	IMS1313 49.8 %	0.2%
B	10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Aluminum hydroxide gel 10%	0.2%
C	10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Carbopol 741p 4mg	0.2%
D	10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	PBS	0.2%

(나) 준비된 각각의 시험백신을 PED 항체 음성인 3주령 실험군 자돈 각 2두(총 8두)의 이근부에 접종하고, 대조군 2두에는 동량의 saline을 같은 부위에 접종하였다. 접종 2주 후에, 반대쪽 이근부에 같은 용량으로 2차 접종을 실시한다.

(다) 백신 접종 전, 1차백신 접종 2주 후, 2차백신 접종 2주 후, 2차백신 접종 4주 후에 채혈을 실시하여 중화항체 실험을 통하여 기간별로 중화항체의 변화를 관찰하였다. (Porcine epidemic diarrhea의 경우 epitope에 특이적인 중화항체가 오염원에 대한 방어에 직접적으로 작용한다고 알려져 있다.)

### (3) 결과 및 고찰

동일한 항원을 가지고 부형제를 달리하여 측정된 위 실험에서, 1차 접종과 2차 접종 후에 IMS1313을 부형제로 이용한 A 그룹에서의 중화항체가가 다른 그룹에 비하여 약간 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 2차접종 4주후에 모든 그룹에서 항체가가 감소하였지만, A 그룹의 항체가가 가장 높은 값을 나타낸 것으로 보아 타백신보다 항체가가 오랫동안 지속될 것으로 예상할 수 있었다.

이처럼 IMS1313은 숙주의 면역성을 증가시킴으로써 동일한 양의 백신으로 더 강한 면역성을 일으키도록 도와주는 역할을 한다. Montanide IMS 제품은 Nano-particle 크기의 Immunosol 타입으로서 antigen media를 단순히 섞음으로서 쉽게 백신을 제조할 수 있다. 제조 공정상 특별한 장비가 필요치 않으며 단순한 stirring만으로도 10cps 이하의 안정한 백신이 제조 가능한 장점이 있다. 이러한 근거로 볼 때 IMS1313이 PED-Fc killed 백신의 부형제로 적합한 것으로 판단된다.

#### 다. 기니픽을 이용한 시험백신의 항원량 결정 시험

시험백신에 사용될 백신 항원량을 결정하기 위해 Fc분자가 표면 발현된 PED 바이러스를 이용하여 기니픽 항체가 시험을 수행하였다. 항원의 종류는 포르말린에 의해 불활화된 바이러스와 살아있는 생바이러스를 이용하였다. 사용된 바이러스는 SM98P-Fc주로서 SM98P 바이러스를 Fc분자가 발현되어 있는 Vero 세포에서 배양하여 준비하였다. 시험백신의 항원량은 생백신의 경우  $10^{3.0}$ ,  $10^{4.0}$ , 그리고  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 양 결정은 각각의 항원을 농도별로 제조한 시험백신을 기니픽에 접종한 후 혈 중 항체가를 측정하여 결정하였다.

##### (1) 생백신의 제조

시험백신의 항원별 농도는 표와 같으며 혼합비율은 PED-Fc 항원 99.9% Formalin 0.1%로 하였다.

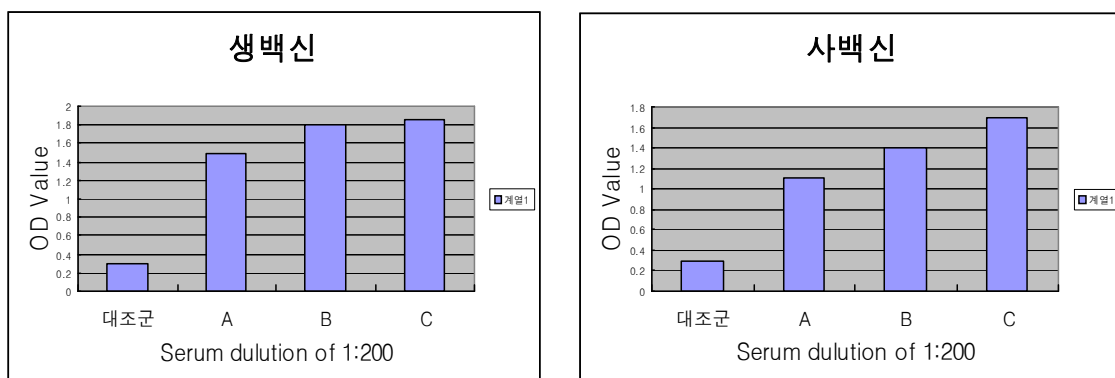
백신 그룹	항원
A	$10^{3.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
B	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
C	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml

##### (2) 사백신의 제조

시험백신의 항원별 농도는 표와 같으며 혼합비율은 PED-Fc 항원 90 %에 부형제를 9.9 % 로 Formalin 0.1%로 하였다.

백신 그룹	항원
A	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
B	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml
C	$10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml

(3) 결과



생백신의 경우 PED-Fc 항원  $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml,  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 으로 제조한 B와 C가 가장 높게 나왔으며 사백신의 경우  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 으로 제조한 C 그룹이 가장 높게 나왔다.

라. 시험백신의 제조

항원량 결정 시험에 따라 각 균주의 바이러스 역가를 결정하여 시험백신 3 lot를 제조하였으며, 이는 실험실내 안전시험과 효능시험에 사용되었다.

제조번호 (Lot No.)	생산일	생산 수량
KM-PED-Fc-Live 01	2010년 3월	50 ml X 1,000병
KM-PED-Fc-Live 02	2010년 3월	50 ml X 1,000병
KM-PED-Fc-Live 03	2010년 3월	50 ml X 1,000병

제조번호 (Lot No.)	생산일	생산 수량
KM-PED-Fc-Killed 01	2010년 3월	50 ml X 1,000병
KM-PED-Fc-Killed 02	2010년 3월	50 ml X 1,000병
KM-PED-Fc-Killed 03	2010년 3월	50 ml X 1,000병

#### 마. 시험 백신의 안전시험

실험동물과 목적 동물을 이용한 시험백신의 안전성을 확인한 결과 모든 실험동물에서 백신 접종으로 인한 어떠한 이상 반응도 관찰되지 않았다.

##### (1) 안전시험 방법

(가) 마우스 : 체중 15~20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 0.5 ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

(나) 기니픽 : 체중 300~350 g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2 ml(2두분)를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2 ml(2두분)를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

(다) 자 돈 : 체중 8~10 kg (4~6주령)의 유행성설사 바이러스 항체음성 건강한 돼지 2마리에 백신의 2두분을 근육 접종한다. 접종 후, 1~2시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 21일간의 관찰하는 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 설사 등의 부작용이 없어야 한다.

(2) 마우스에 대한 안전성 시험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 시험백신에 대하여 체중 15~20 g의 건강한 마우스 8마리를 Lot별로 공시하여 복강에 0.5 ml씩 각각 접종하고 7일간 임상관찰 하였던 바, 아래와 같이 시험기간 동안 아무런 임상증상이 없이 생존 하였다

제조번호	마우스 접종수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 ( 생존 / 공시수 )						
				1	2	3	4	5	6	7
KM-PED-Fc-Live 01	8마리	복강접종 0.5ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
KM-PED-Fc-Live 02	8마리	복강접종 0.5ml		N	N	N	N	N	N	N
KM-PED-Fc-Live 03	8마리	복강접종 0.5ml		N	N	N	N	N	N	N

( N : 부작용 없이 생존함      AN : 부작용 관찰됨      D : 폐사함 )

제조번호	마우스 접종수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 ( 생존 / 공시수 )						
				1	2	3	4	5	6	7
KM-PED-Fc-Killed 01	8마리	복강접종 0.5ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
KM-PED-Fc-Killed 02	8마리	복강접종 0.5ml		N	N	N	N	N	N	N
KM-PED-Fc-Killed 03	8마리	복강접종 0.5ml		N	N	N	N	N	N	N

( N : 부작용 없이 생존함      AN : 부작용 관찰됨      D : 폐사함 )

(3) 기니픽에 대한 안전성 시험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반 검정기준에 준하여 체중 300~350 g의 건강한 기니픽 4마리를 공시하여 2마리는 근육에 2마리는 복강에 각각의 시험백신 2.0 ml씩 접종하여 7일간 임상 관찰하였던 바, 아래와 같이 시험기간 동안 아무런 임상증상 없이 생존하였다.

제조번호	기니픽 접종수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 ( 생존 / 공시수 )						
				1	2	3	4	5	6	7
KM-PED-Fc-Live 01	2마리	근육접종 2.0ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
	2마리	복강접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
KM-PED-Fc-Live 02	2마리	근육접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
	2마리	복강접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
KM-PED-Fc-Live 03	2마리	근육접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
	2마리	복강접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N

( N : 부작용 없이 생존함      AN : 부작용 관찰됨      D : 폐사함 )

제조번호	기니픽 접종수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 ( 생존 / 공시수 )						
				1	2	3	4	5	6	7
KM-PED-Fc-Killed 01	2마리	근육접종 2.0ml	7일	N	N	N	N	N	N	N
	2마리	복강접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
KM-PED-Fc-Killed 03	2마리	근육접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
	2마리	복강접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
PED-Fc-Killed 03	2마리	근육접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N
	2마리	복강접종 2.0ml		N	N	N	N	N	N	N

( N : 부작용 없이 생존함      AN : 부작용 관찰됨      D : 폐사함 )



(4) 자돈에 대한 안전성 시험 (PED-Fc Live)

PED-Fc Live 백신의 안전성 검사는 국가검정 동물용의약품 생물학적제제 검정 기준에 따라서 자돈 2두를 이용하였으며, Live 백신의 특성을 고려하여 접종량의 10배를 접종하였다.

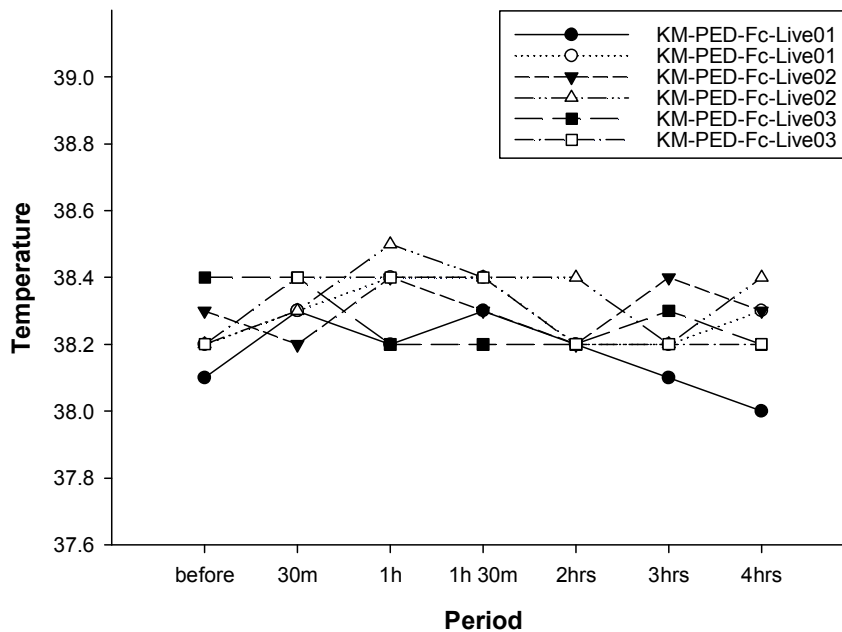
시험백신	접종수	접종부위	접종량	관찰기간	접종 후 과민반응 관찰 결과						
					접종후	30분	1시간	1시간 30분	2시간	3시간	4시간
PED-Fc Live	2두	근육	10두분	4H	N	N	N	N	N	N	N
Control	2두	근육	10두분	4H	N	N	N	N	N	N	N

( N : 부작용 없이 생존함, AN : 부작용 관찰됨, D : 폐사함 )

접종 후 21일 동안 부작용 유무

시험백신	접종수	관찰기간	임상 관찰 결과																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
PED-Fc Live	2두	21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Control	2두	21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

자돈 체온 변화



(5) 자돈에 대한 안전성 시험 (PED-Fc Killed)

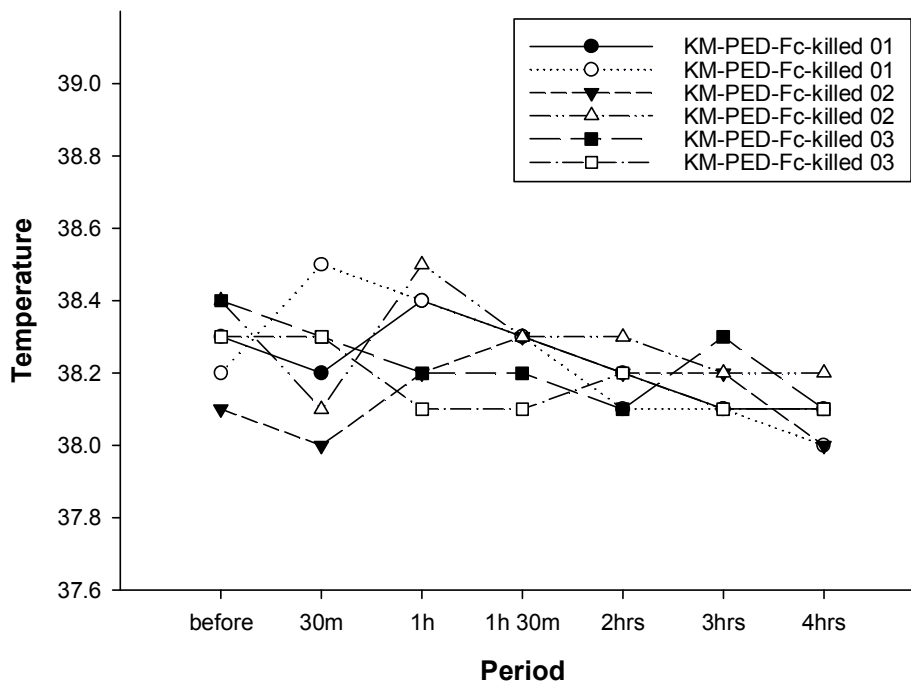
PED-Fc Killed 백신의 안전성 검사는 국가검정 동물용의약품 생물학적제제 검정 기준에 따라서 자돈 2두를 이용하였으며, Killed 백신이므로 접종량의 2배를 접종함으로써 안전성을 확인하고자 한다.

시험백신	접종수	접종 부위	접종량	관찰 기간	접종 후 과민반응 관찰 결과						
					접종 직후	30분	1시간	1시간 30분	2시간	3시간	4시간
PED-Fc Killed	2두	근육	2두분	4H	N	N	N	N	N	N	N
Control	2두	근육	2두분	4H	N	N	N	N	N	N	N

( N : 부작용 없이 생존함, AN : 부작용 관찰됨, D : 폐사함 )

시험백신	접종수	관찰 기간	임상 관찰 결과																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
PED-Fc Killed	2두	21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Control	2두	21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

백신 접종 후 관찰기간(21일) 중 자돈의 체온 변화



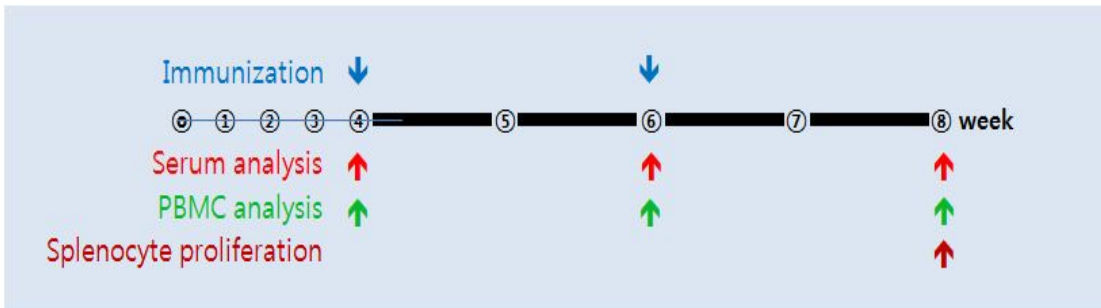
VERO-Fc cell에서 배양한 후, IMS1313과 Formalin을 혼합하여 제조한 PED-Fc Killed 백신을 이용한 안전성 시험 결과는 접종 직후(4시간 이내)와 접종 후 21일간에 걸쳐서 Live 백신의 시험과 동일한 과정으로 진행되었다. 접종 직후, 접종 부위 근육의 발적, 괴사와 체온의 변화를 4시간에 걸쳐서 지속적으로 관찰하였으나 어떤 과민반응도 나타나지 않았으며, 21동안 화농, 괴사, 발열 및 호흡기 질환을 관찰하고 직장 체온을 측정 한 결과 또한 대조군과 마찬가지로 정상 수치를 나타내었다. 게다가, 관찰기간 내내 식욕 상태가 좋은 것으로 볼 때, 외적으로 관찰할 수 없는 내부 장기에다 이상이 없는 것으로 보여 진다. 즉, 3주령 자돈을 대상으로 한 안전성 시험 결과, 규정량의 2배를 접종한 결과 자돈의 건강에 어떤 영향도 미치지 않았다.

(6) 안전성 시험 결과

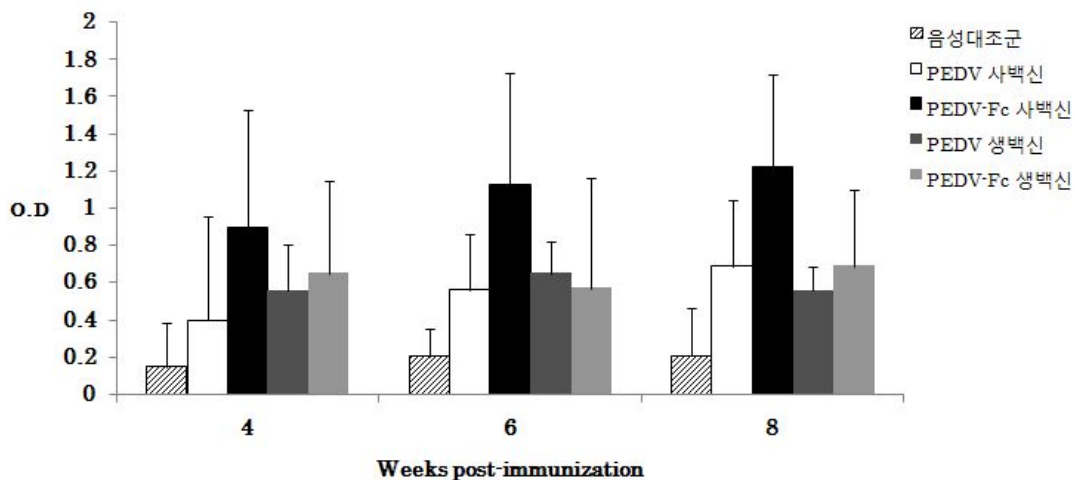
시험백신에 대한 각 Lot. 별 안전성 시험 결과 마우스, 기니픽, 자돈에 대하여 아무런 부작용 없이 안전한 제품임이 입증 되었다.

바. 마우스 모델을 이용한 PEDV, PEDV-Fc의 생백신 및 사백신 효능검정

마우스 모델을 이용하여 대조군, 생백신(PEDV, PEDV-Fc) 사백신(PEDV, PEDV-Fc)에 대한 면역학적인 조사를 실시하였다. 4주령 마우스에 각각 1차 백신접종 (0.2 ml)하고 2주후 채혈하며 6주령 시기에 2차 백신접종을 실시한 후 8주령에 채혈 및 splenocyte proliferation assay를 수행하도록 설계하였다.



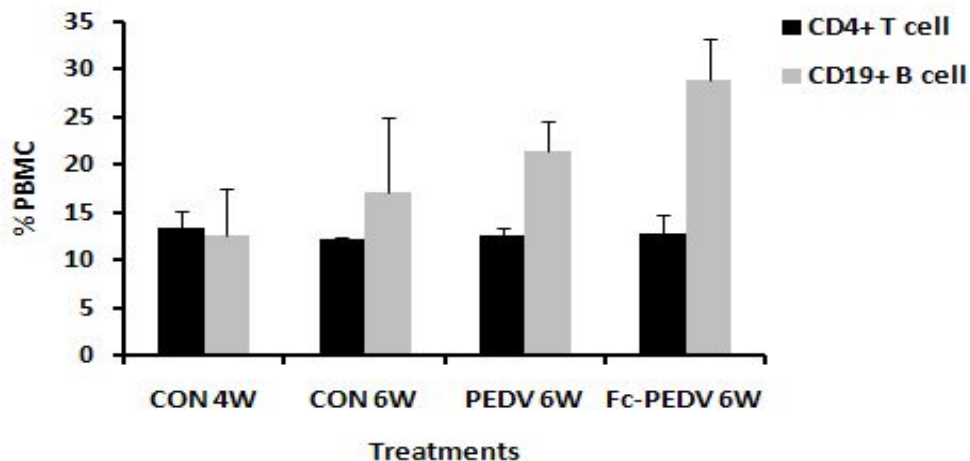
채혈된 혈액은 항응고제 처리하여 실험실로 옮긴 후 원심 분리하여 혈장을 분리 하였다. PEDV에 대한 항체가는 ELISA법에 준하여 실시하며, 이는 항원-특이 항체(IgG)를 분석하여 PEDV에 대한 면역 반응을 살펴보았다. 요약하면, 우선 ELISA plate에 항원 Ag protein(200 ng/well)을 4°C에서 overnight하여 coating 하였다.



ELISA plate는 다시 PBS-0.05% tween 20 (PBST)로 3번 washing 후, dehydrate milk를 이용하여 blocking하였다. 혈청시료는 2배 단계적으로 희석하여 blocked plate에 처리하고, 다시 2시간 동안 37 °C에서 배양한다. 혈청내의 IgG antibody의 양은 2차 항체로서 goat anti-mouse IgG-conjugated HRP(IgG-HRP)를 1시간 처리 후 측정하였다. PEDV-Fc 사백신은 비교적 높은 수치를 보였으나, PEDV 사백신과 PEDV 생백신, PEDV-Fc 생백신은 비슷한 수준을 보였다.

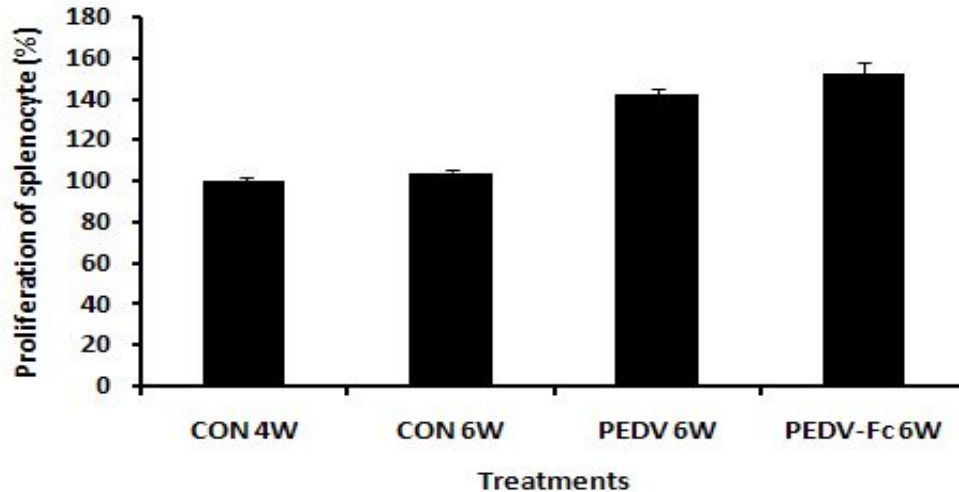
FACS analysis를 위해 사용할 monoclonal antibody는 anti-mouse CD4-FITC, anti-mouse CD19-PE를 사용하였다. 염색을 위해 준비된 세포를 PBS에  $10^6 \sim 10^7/ml$ 로 재부유시켜 고정한 후, staining buffer(PBS containing 1% bovine serum albumin, 0.05% NaN<sub>3</sub>)에 재부유 하였다. 적당한 monoclonal antibody로 4°C에서 30분간 염색한 후 staining buffer로 3회 씻어낸 후 재고정 하였다. 염색된 세포들은 PBS에 재부유한 후 FACScan cytometer를 이용하여 분석하였다.

마우스에서 사백신에 대한 분석결과, CD4+ PBMC의 빈도는(% , mean+SD)는 백신접종 전 대조군, 대조군 접종 후 2주, PEDV 사백신 1차 백신 접종후 2주, PEDV-Fc 사백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에서 각각 13.4+1.8, 12.1+0.2, 12.5+0.8, 12.7+2.0으로 나타났다. CD19+ PBMC의 빈도는(% , mean+SD)는 백신접종 전 대조군, 대조군 접종 후 2주, PEDV 사백신 1차 백신 접종후 2주, PEDV-Fc 사백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에서 각각 12.5+4.9, 17.0+8.0, 21.3+3.2, 28.8+4.3로 나타났다. 조사기간 동안에 CD4+ T cell 빈도는 시험군별로 차이를 나타나지 않았으나, CD19+ B cell 빈도는 백신 접종전 대조군, 대조군 접종 후 2주에 비하여 PEDV 사백신 1차 백신 접종후 2주, PEDV-Fc 사백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에서 증가된 양상을 보이며, 특히 PEDV-Fc 사백신 1차 백신접종 후 2주 실험군에서 가장 높은 CD19+ B cell 빈도를 나타내었다.

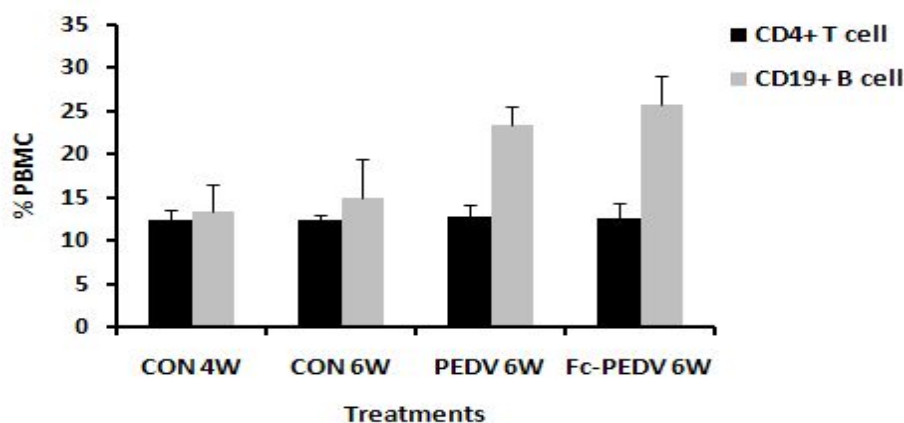


또한, splenocyte proliferation 분석결과, 백신 접종전 대조군의 splenocyte proliferation을 100 %로 하였을 때, 대조군 접종 후 2주 실험군은 104 %, PEDV 사백신

1차 백신 접종 후 2주 실험군은 142 %, PEDV-Fc 사백신 1차 백신접종 후 2주 실험군은 152 %를 보이며, 특히 PEDV-Fc 사백신 1차 백신접종 후 2주 실험군이 PEDV 사백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에 비해 소폭 증가함을 나타내었다.



마우스에서 생백신에 대한 분석결과, CD4+ PBMC의 빈도는(% , mean+SD)는 백신 접종전 대조군, 대조군 접종 후 2주, PEDV 생백신 1차 백신 접종후 2주, PEDV-Fc 생백신 1차 백신접종 후 2주 실험군에서 각각 12.4+1.2, 12.3+0.6, 12.8+1.3, 12.6+1.8으로 나타났다. CD19+ PBMC의 빈도는(% , mean+SD)는 백신접종 전 대조군, 대조군 접종 후 2주, PEDV 생백신 1차 백신 접종후 2주, PEDV-Fc 생백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에서 각각 13.3+3.2, 15.0+4.5, 23.3+2.2, 25.8+3.3로 나타났다.



조사기간 동안에 CD4+ T cell 빈도는 시험군별로 차이를 나타나지 않았으나, CD19+ B cell 빈도는 백신 접종전 대조군, 대조군 접종 후 2주에 비하여 PEDV 생백신

1차 백신 접종후 2주, PEDV-Fc 생백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에서 증가된 양상을 보이며, 특히 PEDV-Fc 생백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에서 가장 높은 CD19+ B cell 빈도를 나타내었다. 또한, splenocyte proliferation 분석결과, 백신 접종전 대조군의 splenocyte proliferation을 100 %로 하였을 때, 대조군 접종 후 2주 실험군은 103 %, PEDV 생백신 1차 백신 접종후 2주 실험군은 123 %, PEDV-Fc 생백신 1차 백신 접종후 2주 실험군은 131 %를 보이며, 특히 PEDV-Fc 생백신 1차 백신접종 후 2주 실험군이 PEDV 생백신 1차 백신 접종후 2주 실험군에 비해 소폭 증가함을 나타내었다.

#### 사. 목적 동물을 이용한 혈청 역가 실험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반 검정기준에 의하여, 체중 8~10kg의 PED 항체음성의 건강한 돼지 6마리(각 시험백신당 2마리)를 사용하여, 2주 간격으로 1 ml의 백신을 이근부에 접종하고 2차 접종 후 2주후에 혈액을 채취하여 ELISA와 중화항체가의 2가지 방법을 이용해서 항체가를 확인하였다.

##### (1) ELISA

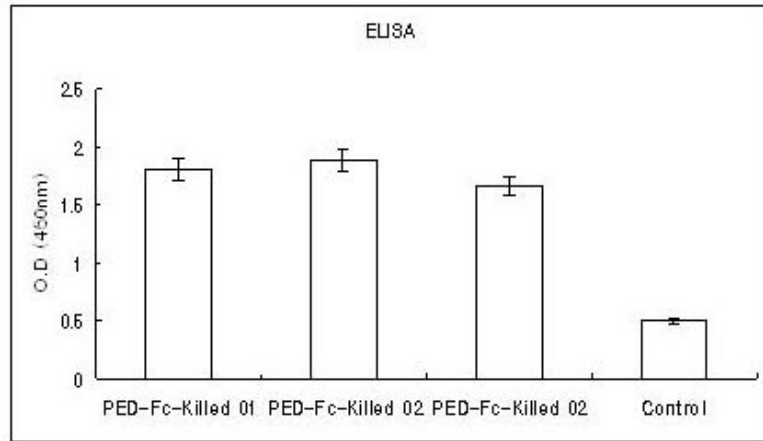
ELISA의 방법으로 항체가를 확인할 경우, 가검 혈청을 200배 희석한 접종군과 대조군의 반응이 1.5배 이상 차이가 나야한다. 실험은 triplicate로 진행하였다.

##### (가) 방법

- ① Plate에 coating 할 virus를 준비한다. 준비한 PED virus의 titer는  $10^{4.75}$ TCID<sub>50</sub>/ml이다. Virus 10ml 을 4℃, 90,000g에서 3시간 동안 원심 분리하여 농축시킨 후, 가라앉은 virus를 PBS에 잘 suspension하여 단백질량 하였고, 최종 농도가 50 ng/0.1 ml이 되도록 희석하였다.
- ② 농축하여 희석한 virus를 96well 1well 당 100  $\mu$ l씩 coating하고, 4℃에서 overnight incubation 시켰다.
- ③ 다음날, coating 액을 suction 한 후, 각 well을 PBS-T 200  $\mu$ l로 3회 washing 한 후, 2% BSA가 함유된 PBS를 well 당 100  $\mu$ l씩 처리하여 상온에서 1시간 incubation 시킨다.
- ④ 각 well을 PBS-T 200  $\mu$ l로 3회 washing 한 후, control 그룹에는 PBS 100  $\mu$ l를 처리하고, 시험백신 접종군의 혈청은 PBS로 200배 희석하여 100  $\mu$ l를, 비접종군은 혈청 원액 그대로 100ul를 처리하고, 37℃에서 1시간 동안 incubation 시켰다.
- ⑤ 각 well을 PBS-T 200  $\mu$ l로 3회 washing 한 후, Goat anti swine IgG : HRP를 blocking buffer에 1:1000으로 희석하여 well 당 100  $\mu$ l씩 처리하고, 37℃에서 1시간 incubation 시킨다.

- ⑥ 각 well을 PBS-T 200  $\mu$ l로 3회 washing 한 후, TMB solution을 100  $\mu$ l씩 처리하고, 상온에서 10분간 incubation 시킨다.
- ⑦ Stop solution 100  $\mu$ l를 처리한 후, 450nm에서 OD 값을 측정한다.

(나) 결과



계산 결과, 접종군의 200배 희석한 혈청의 OD 값이 비 접종군보다 3배 정도 높게 나타났으며, Lot 별로 유의성 있는 차이는 없었다.

(2) 중화항체

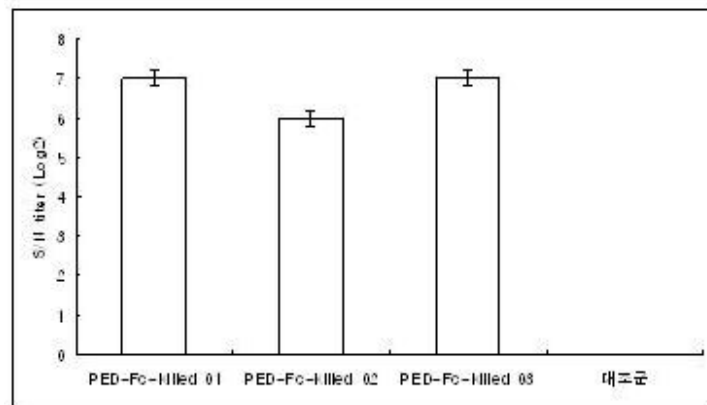
혈청 중화항체시험법에서 접종군의 혈청 중화 항체가는 16배 이상이어야 하며 대조군은 2배 미만이어야 한다.

(가)방법

- ① 배양세포 부유액은 증식용 배지에 Vero 세포 ml 당  $3 \times 10^5$ 개가 되도록 세포수를 조정한다.
- ② 채혈된 혈액의 혈청을 분리하여 57°C에서 30분간 비동화 한 후 10  $\mu$ g/ml의 trypsin이 함유된 MEM 배지로 2진 희석한다.
- ③ 각 희석혈청에 200TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 의 제조용 바이러스와 동일한 바이러스를 동량 혼합하여 37°C에서 90분간 중화시킨다.
- \* 혈청의 중화에 사용한 바이러스는 SM-98주이다.
- ④ Miroplate의 well에 이 중화액 0.1 ml와 배양세포 부유액 0.1 ml씩 넣어 7°C에서 7일간 배양 관찰한다.
- ⑤ 배양세포에 CPE를 저지하는 혈청의 최고희석배수를 중화항체로 한다.



(나) 결과



측정 결과, 대조군은 모두 중화항체가 0 이었으며, 백신 접종군에서는 64~128배 까지 확인되었으며, Lot별로 유의성 있는 차이는 나타내지 않았다.

(3) CD4+ T cell assay

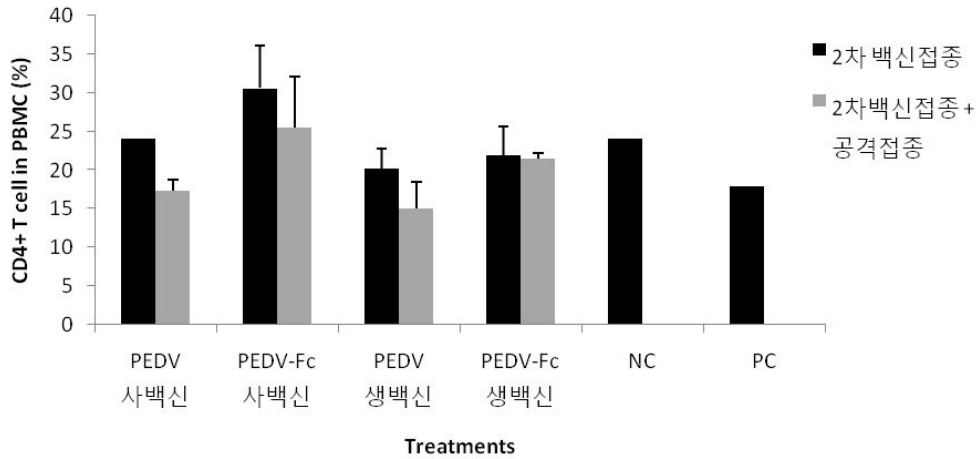
시험군 별 돼지에 면역접종을 실시하고 혈장의 면역원성 분석을 실시하고자 하였다. 시험군은 무처리 대조군(NC, 1수), 공격 접종 대조군(PC, 1수), PEDV 사백신 접종군(2수), PEDV-Fc 사백신 접종군(2수), PEDV 생백신 접종군(2수), PEDV-Fc 생백신 접종군(2수)으로 구분하였다. 돼지에서 접종 전, 1차 면역접종 2주후, 2차 면역접종 2주후, 공격접종 1주후에 각각 채혈하였다.



시험군별 돼지의 면역학적 분석은 FACs 분석을 실시하였다. Histopaque을 이용하여 돼지혈액에서 PBMC를 분리하고 FBS blocking한 후 staining buffer(PBS containing 1% bovine serum albumin, 0.05% NaN3)에 재 부유한 후 anti-CD4-PE를 사용하여 4 °C에서 30분간 표지하였다. 표지 후 staining buffer로 3회 세척 후 고정하고 FACScan cytometer를 이용하여 분석하였다.

CD4+ PBMC분석 결과 2차 백신접종 2주후(0729) PEDV 사백신 접종군(2수), PEDV-Fc 사백신 접종군(2수), PEDV 생백신 접종군(2수), PEDV-Fc 생백신 접종군(2수), 무처리 대조군(Neg, 1수), 공격 접종 대조군(Pos, 1수)에서 빈도(% , mean+SD)가 각각 24.1+0, 30.6+5.5, 20.2+2.6, 21.9+3.7, 24.1+0, 17.9+0으로 나타났고, 공격접종 후 1주후 (0804) PEDV 사백신 접종군(2수), PEDV-Fc 사백신 접종군(2수), PEDV 생백신 접종군(2수), PEDV-Fc 생백신 접종군(2수)에서 mean+SD 값이 각각 17.4+1.5, 25.6+6.6,

15.1+3.4, 21.5+0.7로 나타났다.



분석결과 PEDV-Fc 사백신 접종군에서 CD4+ T-cell 빈도가 증가된 것으로 나타났다. 따라서 PEDV-Fc 사백신 접종군에 의해 유도되는 면역이 helper T cell를 효과적으로 자극시키는 것으로 판단되었다.

#### 아. 시험백신의 실험실내 목적동물을 이용한 공격시험

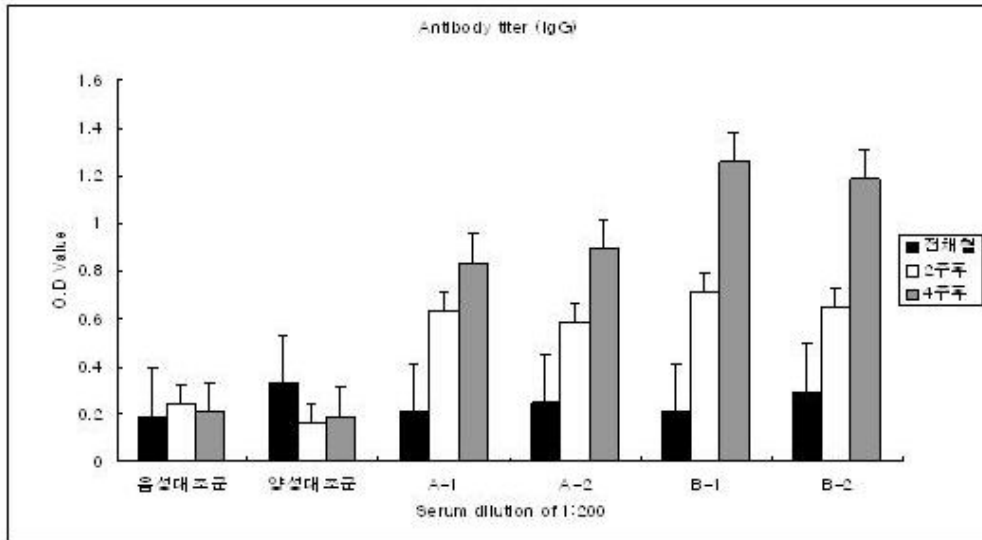
제조된 시험 백신 중 PED-Fc-Killed 01 과 기존 PED (SM98)백신을 PED 음성으로 확인 된 모돈에서 출아한 15~20일령 포유자돈에 1 ml씩 2주 간격으로 이근부에 접종한 후 2차 접종 2주 후 백신 접종군에 PED 양성( $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상) 으로 확인된 장유제액 2 ml을 기관 튜브를 이용하여 경구로 공격접종 하였다.

#### (1) 사독백신 공격 시험

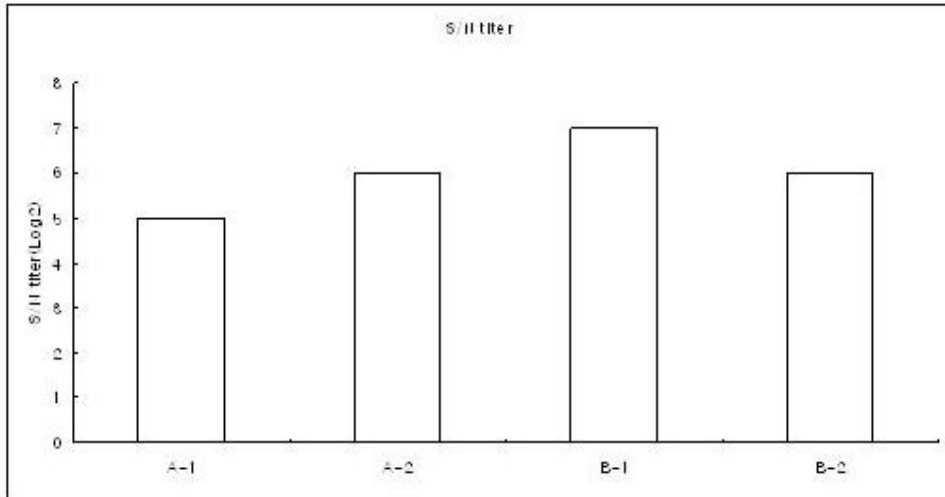
그룹	개체번호	항원	백신접종 (근육접종)	공격 접종	
				경구	접종
A	A-1	PED	2주간격 2회	PED 항원 양성 장유제액 ( $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml)	
	A-2	기존백신			
B	B-1	KM-PED			
	B-2	-Fc-killed 01			
대조군	양성대조 군	-	-	-	-
	음성대조 군	-	-	-	-

(가) 공격 접종 전 항체가 변화

① ELISA 항체가



② 중화 항체가



(나) 공격 접종 후 PCR 검사를 통한 바이러스 배출 확인

공격 접종 후 분변 샘플과 혈중 바이러스 배출 여부를 RT-PCR (reverse-transcriptase PCR) 검사를 통해 실시하였다. 증폭된 target 유전자의 size는 651 bp이다.

Primer	F: 5' - TTC TGA GTC ACG AAC AGC CA - 3'
	R: 5' - CAT ATG CAG CCT GCT CTG AA - 3'

공격 접종(경구) 후 항원 배출 확인 (RT-PCR) 결과

접종 후	A-1 PED 기존백신		A-2 PED 기존백신		B-1 KM-PED-Fc -killed		B-2 KM-PED-Fc -killed		Positive Control		Negative Control	
	분변	조직	분변	조직	분변	조직	분변	조직	분변	조직	분변	조직
1일	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) (조직)	(-)	(-)
2일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(-)	
3일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(+)	
4일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(+)	
5일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(+)	
6일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(-)	
7일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(-)	
8일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(-)	
9일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(-)	
10일	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(-)	

(다) 임상증상

① Faecal score ( 설사 유무)

접종 후	A-1 PED 기존백신	A-2 PED 기존백신	B-1 KM-PED- Fc-killed	B-2 KM-PED- Fc-killed	Positive Control	Negative Control
1일	x	x	x	x	x	x
2일	x	x	x	x	x	x
3일	x	x	x	x	o	x
4일	x	x	x	x	o	x
5일	x	x	x	x	o	x
6일	x	x	x	x	x	x
7일	x	x	x	x	x	x
8일	x	x	x	x	x	x
9일	x	x	x	x	x	x

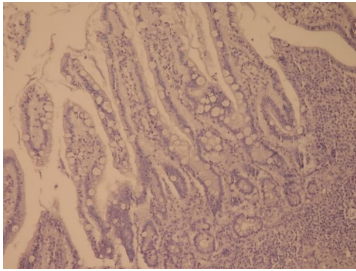
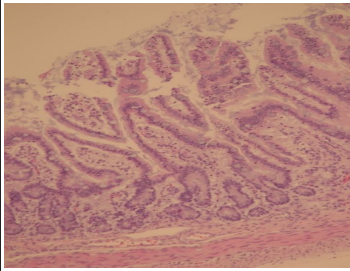
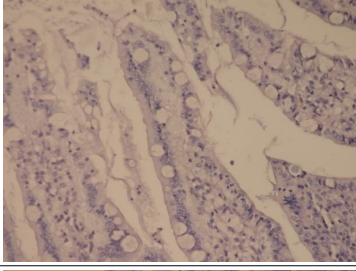
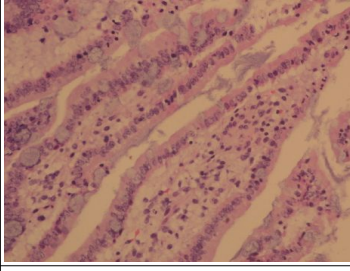
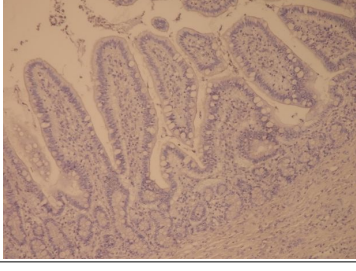
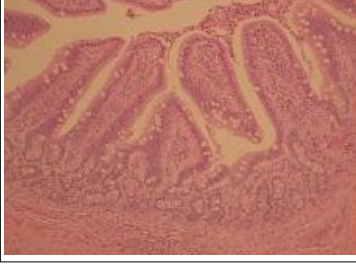
(라) 공격 접종 후 부검결과 및 조직검사

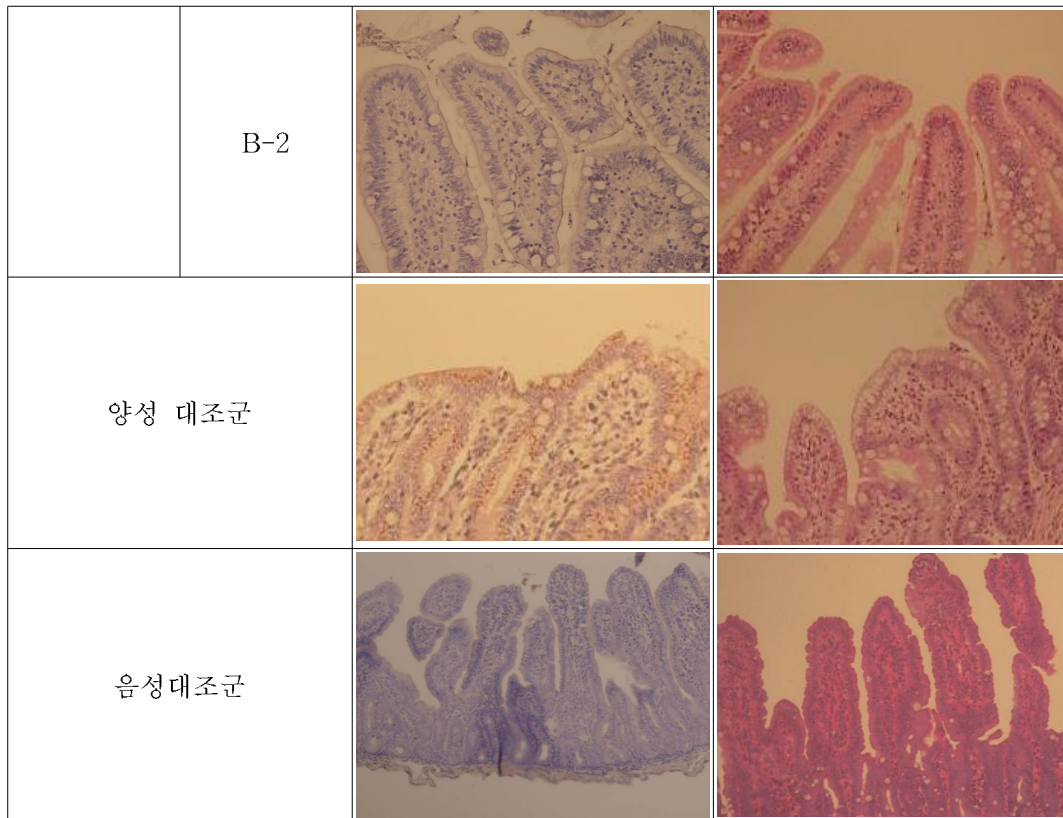
① H & E (Hematoxylin&Eosin) 염색

각 그룹의 개체를 부검 후, 장조직을 분리하여 회장 (회맹연접부로부터 상부 10 cm) 1부위, 공장 (소장 전체길이의 중간부) 1부위를 채취하여 즉시 10% 중성완충 포르말린에 고정한 후 일반적인 조직처리방법에 따라 H&E 염색을 실시하여 광학현미경으로 검경하였다.

② 면역조직화학 염색

각 군의 소장 조직 슬라이드에 대해 Envision polymerreagent method (Dako, USA) 로 PED virus 항원에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 1차 항체로는 Anti-PEDV monoclonal antibody (Jenobiotech) 를 1:1,000으로 희석하여 사용하였다.

그룹	개체번호	IHC	H&E
A PED 기존백신	A-1		
	A-2		
B KM-PED-Fc -Killed 01	B-1		



각 개체에 대한 H & E 염색결과 A그룹 (PED 기존백신) B그룹 (KM-PED-Fc-Killed 01) 에서는 용모 및 장상피 세포에서 모두 정상 소견을 보이는 반면에 양성대조군 (백신 미접종 후 공격접종) 에서는 용모의 길이가 정상에 비해서 짧아졌고 장상피 세포는 정상에 비해 납작해져 있으며, 세포질에 공포를 함유하는 소견을 보이고 있다. 면역조직화학 염색결과에서도 양성대조군에서만 PED 항원 양성으로 확인되며 나머지 그룹은 모두 음성으로 확인되었다.

(마) 고찰

각각 기존백신과 시험백신을 접종 후 혈중 항체가 및 중화 항체를 확인한 결과 백신 미접종 그룹에서는 항체가 생성 되지 않았으며 PED 기존백신 보다 KM-PED-Fc-Killed에서 항체가 및 중화항체가 일부 높게 생성 되었고 두 백신 접종 그룹 모두 모두 국가 검정 기준 이상으로 확인 되었다.

공격접종 한 결과 백신을 접종한 A,B 그룹에서는 분변을 통해 바이러스가 배출 되지 않았으며 백신을 접종하지 않은 그룹에서는 분변을 통해 바이러스가 배출되는 것을 확인 하였다. 장조직에 대한 바이러스를 조사한 결과 백신을 접종받은 돼지는 검출되지 않았으나 백신 미접종 그룹에서는 바이러스가 검출되었다. 부검과 조직검사를 통한 백신 접종 군과 미접종군간의 장병변을 비교한 결과 백신접종군의 돼지는 정상 소견을 보이는 반면 백신을 접종하지 않은 돼지의 장은 비정상적인 용모 및 장상피 세포병변 증상을 보

여주고 있다. 이와 같은 공격실험결과를 통해 시험백신 접종을 통해 바이러스의 감염과 증식을 막을 수 있음을 알 수 있었다.

### 3. PED-Fc 백신 전임상 시험 고찰

효능이 뛰어나고 안전한 백신을 개발하는데 있어 가장 중요한 것은 백신 항원에 있다. 백신 항원은 고전적인 원형 그대로의 박테리아나 세균을 이용하는 수준에서 최근 분자 면역학적 효능이 인정된 면역 관련 Biomolecules을 adjuvant 또는 항원과 물리화학적 결합을 통해 백신 개발에 이용하는 수준으로 발전하고 있다. Fc 분자 역시 여러 가지 면역학적 작용이 알려져 있으며, 이러한 작용 중 백신의 효능을 높일 수 있는 기능에 근거하여 PED 바이러스 표면에 발현시켜 기존의 백신에 사용된 PED 바이러스와의 비교를 통해 백신의 효능 향상을 시험하였다. Fc 분자는 항원의 opsonization을 활성화하고 항원의 면역자극을 높여 항체 생성에 기여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 이번 실험에서도 항체가와 중화항체가 비교시험에서 증명되었다. Fc 분자 표면발현 PED 바이러스와 일반 PED 바이러스를 이용한 시험백신을 마우스에 접종한 후 측정된 혈 중 항체가는 Fc 분자를 발현된 PED 바이러스가 3배 이상 높은 항체가를 보여주었다. 또한 중화항체가 생성에서도 Fc 발현 PED 바이러스가 16배(2,3배 Log<sub>2</sub> 기준) 더 높게 형성되었다. 이러한 면역원성 향상효과는 T-cell 증식 효과나 사이토카인 발현 등에서도 같은 결과를 보여주었다. T-cell의 경우 항체 반응 뿐만 아니라 세포성 면역을 자극하는데 필수적인 세포로서 일반적으로 면역반응에 비례하여 population이 증가하는 것으로 알려져 있다. Fc 분자를 표면발현한 PED 바이러스의 경우 그렇지 아니한 PED 바이러스와 비교하였을 때 2배 이상 높은 증가를 보여주었다. 특히 CD4 T-cell의 비중이 PED-Fc의 경우에 38 % 높게 나와 Fc 분자로 인한 면역자극의 향상을 확인할 수 있었다. 인터페론 감마의 경우에서도 역시 PED-Fc 바이러스를 이용한 경우에 200pg/ml 이상 높게 분비되는 것을 알 수 있었다. 위와 같은 면역원성 활성화에 Fc 분자의 역할을 확인할 수 있었고 Fc 분자의 백신 효능에 기여할 수 있음을 알 수 있었다. Fc 분자의 세포성 면역 활성화 효과는 주로 모돈에 백신을 접종하고 자돈에 면역력을 전달해 주는 경우 모돈의 초유를 통해 면역력을 전달해 주게 된다. 초유를 통한 주요한 자돈의 면역력 획득은 초유에 포함되어 있는 IgG, IgM, IgA와 같은 항체와 T-cell에 의한 것이다. 따라서 Fc 분자발현을 통한 PED 바이러스의 체액성 면역활성화 뿐만 아니라 세포성 면역의 활성화는 PED 감염 예방에 많은 기여를 할 것으로 예상된다. 기니픽을 이용한 항원량 결정 시험을 통해 생백신의 경우 105.0TCID<sub>50</sub>/ml에서 항체가 증가가 포화되는 것을 알 수 있었으며 사백신의 경우 106.0 TCID<sub>50</sub>/ml에서 포화됨을 알 수 있었다. 항체가 측정은 일반적인 ELISA 방법을 사용하여 측정하였다. 시험 제조된 백신은 실험 동물과 목적동물에 접종하여 안전성을 확인하였다. 마우스, 기니픽, 자돈에 시험백신을 접종하고 관찰한 결과 어떠한 특이 증상 없이 이상이 없었다. 시험백신을 목적동물에 접종하고 항체가와 중화항체가를 측정한 시험에서 3lot의 시험백신 모두 높은 O.D. 값을 보여 주었을 뿐만 아니라 중화항체가도 64배 이상

높게 형성되었다. 자돈의 시험백신 접종 후 공격시험을 통해 백신의 방어력을 시험한 결과 기존의 PED 바이러스만을 이용한 백신보다 중화항체가가 2배 이상 높게 형성되었으며 공격 접종 후 분변을 통한 바이러스 배출을 확인한 결과 백신 접종그룹에서는 바이러스 배출이 확인되지 않았다. 공격 접종 후 장내 바이러스 감염여부를 확인하기 위한 실험에서도 백신 접종 그룹에서는 바이러스 감염을 확인할 수 없었다. 이러한 결과를 종합해 볼때 Fc분자를 표면 발현한 PED 바이러스의 경우 기존의 PED 바이러스를 이용한 것보다 높은 면역자극을 통해 높은 항체가와 세포성 면역활성화를 확인할 수 있었으며 이로 인한 백신의 효능 향상이 확인되었다. 특히 재조합 Vero cell을 이용한 PED 바이러스 생산을 통해 바이러스 자체를 유전 조작하지 않고 Fc분자가 표면에 발현된 PED 바이러스를 생산할 수 있어 안전성에도 문제가 없음을 확인할 수 있었다.



#### 4. PED-Fc 백신의 야외 임상 시험

##### 가. 야외임상시험의 목적

본 야외임상시험은 실험실 내 시험에서 시험동물 및 목적동물을 대상으로 입증한 백신의 안전성과 효능을 실제 돼지농장에서 다수의 목적동물에 적용함으로써 다시 한번 입증하고자 하기 위함이다. 야외임상농장의 선정에 있어서는 백신의 적용 범위를 증명하기 위하여 PED 발병 여부에 상관없이 각기 다른 성적과 조건을 가진 3개 농장을 선정하고자 하였다.

임상시험을 위해 아래와 같이 생산된 시험백신은 3개 농장의 후보돈 및 모돈에 접종할 예정이며, 백신 접종으로 인한 안전성에 대한 시험은 백신 기준 용량의 2배 용량을 근육 접종한 후 10일 동안 체온 및 임상증상의 변화를 관찰하고자 하였다. 백신의 효능에 대한 시험은 백신 접종 이후 농장의 질병 발생 여부 및 질병 발생의 추이를 관찰하고 모돈, 후보돈, 자돈으로부터 채혈을 실시하고 모돈으로부터 초유를 채취함으로써 각 시기별 항체 역가를 통하여 입증하고자 한다. 또한, 항체 역가 농도와 방어력 사이의 관련성을 입증하기 위하여 (주)코미팜 내 동물 실험실에서 항체 역가별로 그룹을 나누어 검역원에서 분양받은 병원성 높은 야외 분리주를 이용하여 공격접종을 실시하고 증상을 관찰함으로써 효능을 입증하고자 한다.

##### 나. 시험백신의 조성

###### (1) 불활화 백신의 성분 및 함량

PED-Fc(PED SM98P) 항원( $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml)	-----	50 %
Adjuvant	-----	49.8 %
Formalin	-----	0.2 %이하

###### (2) 용법 및 용량

경산돈과 후보돈에 대하여 분만 5주 전에 1차 2.0 ml, 분만 3~2주전에 2차 2.0 ml씩 근육에 주사한다.

##### 다. 시험백신의 안전성 시험

본 시험은 공시 모돈에 시험백신 접종 후 발열, 발적, 접종부 화농 유무 등 접종 후 부작용에 대해 관찰하고, 안전성 유무 확인을 목적으로 한다.

### (1) 실험동물

기존의 PED 백신을 접종하지 않은 시험농장을 선정하였으며, 각 시험농장 별로 사육중인 건강한 모돈(분만 5주 전) 및 후보돈(180~210일령)을 각각 10두, 5두를 실험군으로 선정하고 동일 사육공간의 실험군을 제외한 모돈을 대조군으로 선정한다.

### (2) 공시 백신 접종

각 농장별로 건강한 공시돈에 기준 용량의 2배 용량을 근육으로 1회 접종한다.

### (3) 관찰

접종전 공시돈의 건강상태와 직장 체온을 측정한다. 접종 후 1~2시간 이내 쇼크, 발열, 발적, 구토 여부를 관찰하고, 10일 후 실험군의 식욕변화, 접종부위의 화농소, 열반응, 종창 유무를 관찰 기록한다.

### 라. 백신의 효능 시험

PED-Fc 불활화 시험백신에 대한 접종을 실시하고, 접종 전과 접종 후 항체역가를 측정하고 접종 모돈의 초유 및 분만한 자돈에 대한 이행항체 수준을 알아본다. 또한, 항체 역가에 따른 방어효능 유무를 확인하기 위하여 각 농장별로 항체가 수준이 유사한 자돈을 5두씩 3그룹으로 하여 동물 실험실 내에서 공격접종을 통한 방어력을 확인한다.

### (1) 실험동물 선정

#### (가) 항체 형성능 확인

기존의 PED 백신을 접종하지 않은 시험농장을 선정하였으며, PED-Fc 불활화 백신의 항체 형성능 확인을 위해 각 농장별 유행성설사 바이러스 항체음성의 후보돈(180~210일령) 10두와 분만 5주 전 모돈 10두를 선정하여 PED 백신 접종군(시험군 I)으로 지정하고, 동일한 조건의 후보돈 10두와 모돈 10두를 PED-Fc 백신 접종군(시험군 II) 또한 동일 공간 사육 후보돈 5두와 모돈 5두를 대조군으로 한다.(농장상황에 따라 해당 바이러스에 대한 낮은 항체 수준을 보유한 개체에 적용할 수 있다.)

#### (나) 초유 및 혈청 내 모체이행항체 확인

초유 내 항체 역가를 확인하기 위하여 모돈 시험군 I 과 시험군 II에서 각각 5마리

를 선택하여 초유의 역가를 측정하고, 동일 모돈에서 분만된 자돈 5마리씩을 선정(총25두)하여 이행항체의 역가를 측정한다. 대조군의 측정은 대조 모돈 3마리를 선택하고 복당 5마리씩을 선정(총15두)하여 이행항체 역가를 측정한다.

(다) 공격접종에 따른 방어력의 확인

모체이행항체를 측정한 개체 중에서 항체 역가 수준이 유사한 3마리씩을 한 그룹으로 하여 3그룹(총 9두)을 지정하고, 대조군으로 백신접종을 하지 않은 모돈에서 분만된 자돈 2그룹(총 6두)을 지정한다.

(2) 시험백신 접종

모돈 중에서 시험군 I, II에 대해 분만 5주 전 시험백신 1두분을 이근부에 접종하고, 분만 2~3 주 전에 2차 접종을 반대편 이근부 근육에 1두분을 접종한다. 후보돈 중 시험군 I, II에서 180~210일경에 1차 1두분을 이근부에 접종하고, 2차 백신은 1차접종 2주 후 반대편 이근부 근육에 1두분을 접종한다.

(3) 관찰 및 시료 채취

구 분	채혈부위	채혈량	채혈시기	비고
모 돈	jugular vein	5 ml	1차 접종 전, 2차 접종 전, 분만 직후	초유는 분만직후 5 ml
후보돈	jugular vein	5 ml	1차 접종 전, 2차 접종 전 2차 접종 후 2주, 4주, 6주, 9주	
자 돈	jugular vein	3 ml	분만 후 1주, 2주, 3주	

(가) 채혈

실험실에서 혈청분리 후 56 ℃, 30분간 비동화 처리한 후 -20 ℃에 보관한다.

(나) 초유의 전처리 과정

얻어진 초유는 먼저, 12,000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액만을 분리해 낸

후, 56 °C에서 30분간 비동화 한 후 사용한다.

#### (다) 모체이행항체 측정

모든의 경우 자돈으로 전달되는 이행항체 수준을 알아보기 위해 분만 후 초유 3~5 ml를 채취하고, 포유자돈의 이행항체 수준은 1주, 2주, 3주 채혈하여 알아본다. (초유의 경우 모든 전체를 대상으로 한다.)

#### (라) PED 설사 증상 관찰

시험농장 전체에 대한 시험기간 중 설사증상 발생유무를 관찰하고 설사증상이 발생 시 분변을 채취하여 설사관련 원인을 밝히고, 기록한다.

#### (4) 항체 역가 측정

채혈 시기별로 준비한 혈청 및 초유에 대해 PED에 대한 중화항체 역가 측정한다.

#### (가) PED 중화항체 측정

- ① 배양세포 부유액은 증식용 배지에 Vero 세포가 ml 당  $3 \times 10^5$ 개가 되도록 세포수를 조정한다.
- ② 채혈된 혈액의 혈청을 분리하여 57 °C에서 30분간 비동화 한 후 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 trypsin 이 함유된 MEM 배지로 2진 희석한다.
- ③ 각 희석혈청에 200TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 의 제조용 바이러스와 동일한 바이러스를 동량 혼합하여 37 °C에서 90분간 중화시킨다.  
\* 혈청의 중화에 사용한 바이러스는 SM-98주이다.
- ④ Miroplate의 well에 이 중화액 0.1 ml와 배양세포 부유액 0.1 ml씩 넣어 7 °C에서 7일간 배양 관찰한다.
- ⑤ 배양세포에 CPE를 저지하는 혈청의 최고희석배수를 중화항체로 한다.

#### (5) 공격접종 실시

각 시험농장으로부터 항체 역가별로 가져온 시험군 3그룹과 양성 대조군 1그룹을 대상으로 하며, 돼지의 공격접종에 사용할 바이러스는 PED 양성으로 확인된 돼지의 장 유제액을 사용하였고, 바이러스의 역가는 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml 이상으로 준비하였다. 바이러스의 접종은 장 유제액 2 ml을 기관 튜브를 이용하여 경구로 공격접종 실시하였다. 이후,

발열, 설사 유무 등을 관찰하고 공격접종 30일 후 부검을 실시하여 간, 비장 및 소화기계의 병변을 확인하고 병변의 채취를 통한 배양을 통해서 면역력 형성 유무를 확인한다.

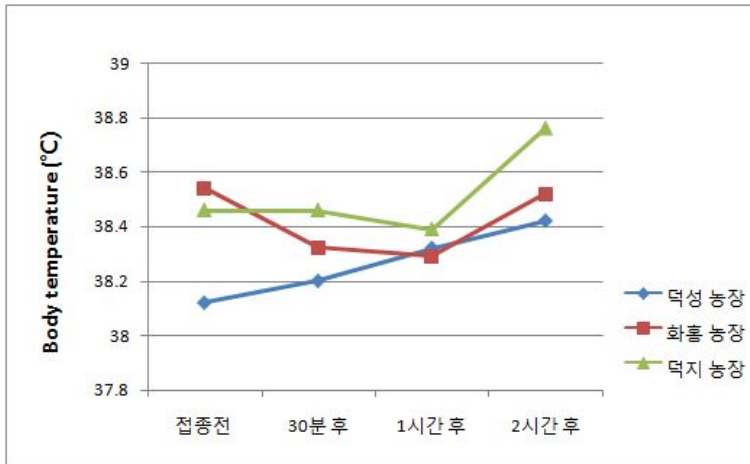
## 5. 야외 임상 시험 결과

### 가. 안전성 실험

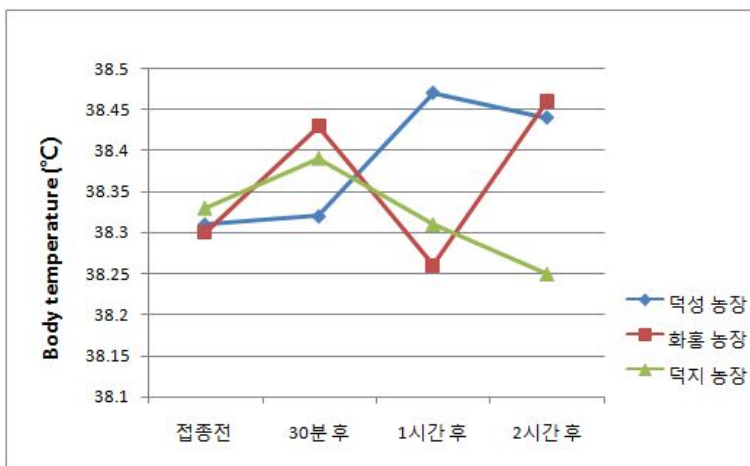
농장명	구분	공시 두수	임상 증상 발현 두수									
			급성 반응				지연형 반응				체온	
			쇼크	발열	발적	구토	식욕 저하	화농	설사	폐사	접종전	접종 2시간
덕성농장	모든	10	N	N	N	N	N	N	N	N	38.12	38.42
	후보 돈	5	N	N	N	N	N	N	N	N	38.31	38.44
	대조 군	5	N	N	N	N	N	N	N	N	38.15	38.24
화흥농장	모든	10	N	N	N	N	N	N	N	N	38.54	38.52
	후보 돈	5	N	N	N	N	N	N	N	N	38.30	38.46
	대조 군	5	N	N	N	N	N	N	N	N	38.61	38.54
덕지농장	모든	10	N	N	N	N	N	N	N	N	38.46	38.76
	후보 돈	5	N	N	N	N	N	N	N	N	38.63	38.21
	대조 군	5	N	N	N	N	N	N	N	N	38.33	38.25

구분	개체 번호	체온 ( °C )											
		덕성농장				화홍농장				덕지농장			
		집중 전	30분	1시 간	2시 간	집중 전	30분	1시 간	2시 간	집중 전	30분	1시 간	2시 간
모 든	1	38.12	38.24	38.44	38.45	38.50	38.22	38.11	38.42	38.78	38.22	38.35	38.76
	2	38.28	38.51	38.46	38.48	38.34	38.21	38.25	38.45	38.46	38.25	38.64	38.65
	3	38.24	38.21	38.31	38.50	38.70	38.45	38.45	38.48	38.58	38.27	38.37	38.64
	4	38.02	38.65	38.20	38.42	38.12	38.64	38.26	38.51	38.06	38.84	38.84	38.79
	5	38.12	38.03	38.36	38.38	38.02	38.27	38.44	38.54	38.42	38.56	38.12	38.89
	6	38.06	38.16	37.74	38.37	38.35	38.17	38.36	38.56	38.46	38.42	38.24	38.84
	7	38.10	38.23	38.56	38.37	38.65	38.23	38.28	38.46	38.56	38.96	38.18	38.76
	8	38.07	38.35	38.80	38.42	38.44	38.53	38.15	38.72	38.38	37.60	38.44	38.73
	9	38.07	38.34	38.11	38.40	38.54	38.38	38.47	38.54	38.44	38.21	38.65	38.79
	10	38.12	38.11	38.24	38.44	37.54	38.12	38.12	38.52	38.46	38.33	38.13	38.76
평균		38.12	38.20	38.32	38.42	38.54	38.32	38.29	38.52	38.46	38.46	38.39	38.76
후 보 돈	1	38.33	38.13	38.64	38.50	38.33	38.14	38.64	38.46	38.30	38.43	38.66	38.20
	2	38.37	38.34	38.42	38.52	38.26	38.54	38.10	38.52	38.31	38.47	38.31	38.24
	3	38.23	38.31	38.46	38.40	38.45	38.42	38.17	38.42	38.36	38.25	38.29	38.30
	4	38.30	38.25	38.52	38.38	38.14	38.65	38.17	38.44	38.35	38.27	38.18	38.38
	5	38.31	38.61	38.31	38.40	38.32	38.42	38.26	38.46	38.29	38.55	38.15	38.13
평균		38.31	38.32	38.47	38.44	38.30	38.43	38.26	38.46	38.33	38.39	38.31	38.25

시험 백신의 모든 접종 후 체온 변화



시험 백신의 후보돈 접종 후 체온 변화

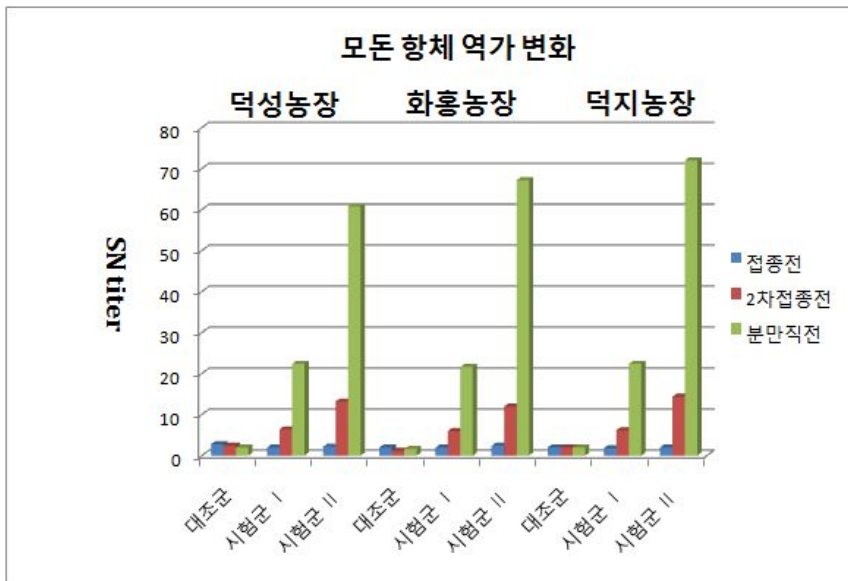


나. 항체형성능

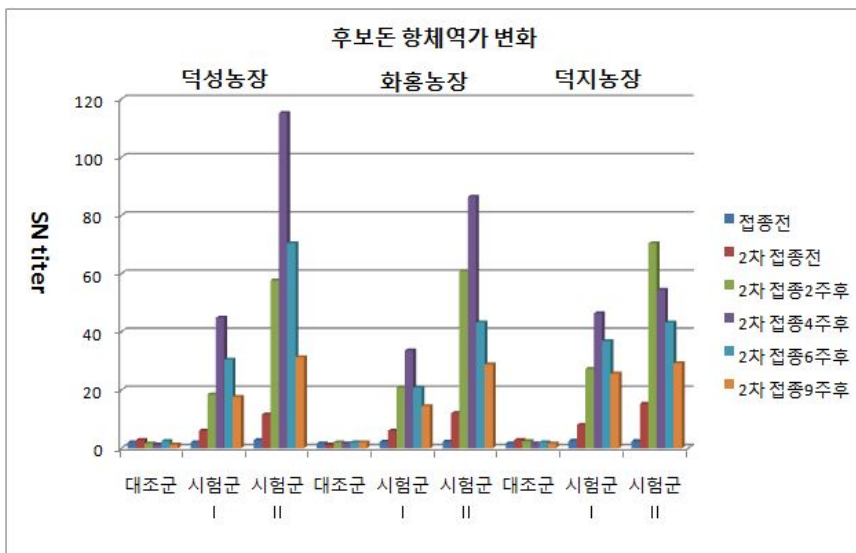
각 농장별 모돈과 후보돈에 대한 평균 항체 역가 (SN titer) 변화를 비교한다.

구 분	채혈시기	덕성농장			화홍농장			덕지농장		
		시험군 I	시험군 II	대조군	시험군 I	시험군 II	대조군	시험군 I	시험군 II	대조군
모 돈	접종 전	2	2.2	2.8	2	2.4	2	1.8	2	2
	2차 접종 전	6.4	13.2	2.4	6	12	1.2	6.2	14.4	2
	분만직후	22.4	60.8	2	21.6	67.2	1.6	22.4	72	2
후보 돈	접종 전	2	2.8	2	2.2	2.2	1.6	2.6	2.4	1.6
	2차 접종 전	6	11.6	2.8	6	12	1.2	8	15.2	2.8
	2차 접종 2주후	18.4	57.6	1.6	20.8	60.8	2	27.2	70.4	2.4
	2차 접종 4주후	44.8	115.2	1.2	33.6	86.4	1.6	46.4	54.4	1.6
	2차 접종 6주후	30.4	70.4	2.4	20.8	43.2	2	36.8	43.2	2
	2차 접종 9주후	17.6	31.2	1.2	14.4	28.8	2	25.6	29.2	1.6
자 돈	초 유	89.6	179.2	10.6	83.2	153.6	13.3	76.8	89.6	5.3
	1주령	33	61.8	2.4	28.8	51.2	2.4	30.9	35.2	2.4
	2주령	21.3	35.2	2.4	23.7	29.8	1.5	19.7	22.4	2.3
	3주령	14.4	28.2	1.5	17.8	22.9	1.7	16.5	18.1	1.5

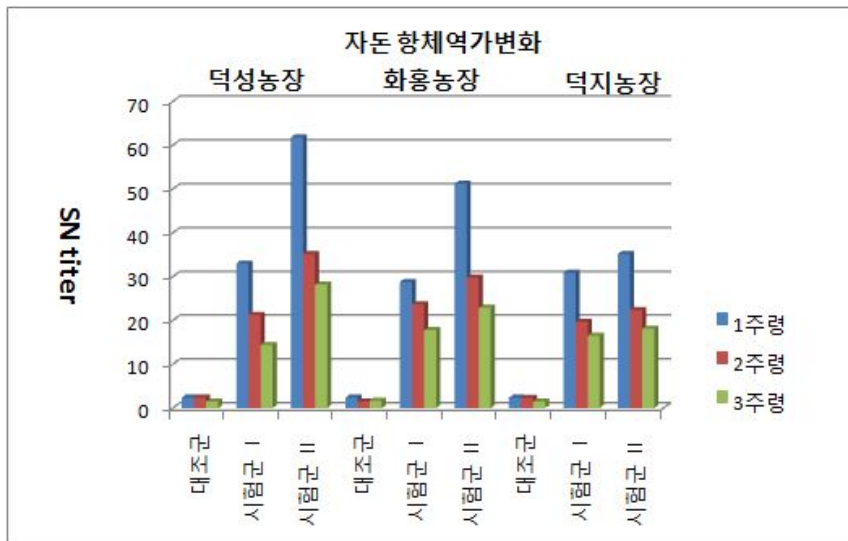




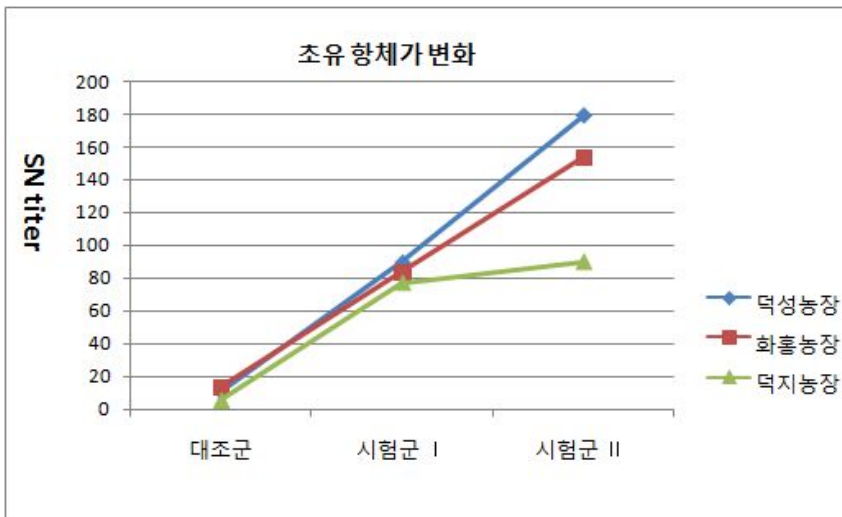
세 농장 모두 백신 접종에 의해서 혈중 중화항체가 서서히 증가하는 양상을 관찰할 수 있었고, PED 백신 접종군의 경우 농장별로 차이는 있으나 1차 접종 후 6배, 2차 접종 후 20배까지 중화항체가 증가한 것을 볼 수 있고, PED-Fc 백신 접종군의 경우 1차 접종 후 10배, 2차 접종 후 70배까지 중화항체가 증가한 것을 확인할 수 있었다.



모돈에서의 결과와 마찬가지로 후보돈에서도 1, 2차 백신 접종에 의해서 혈중 중화항체가 서서히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 모돈과는 달리, 2차 백신 접종 후 9주째까지 혈중 중화항체를 확인하였으며, 2~4주째까지는 중화항체가 증가하다가 서서히 감소하는 양상이 나타났다. PED 백신 접종군의 경우 평균 40배 정도까지 중화항체가 증가하였다가 다시 감소하는 양상을 보였으며, PED-Fc 백신 접종군의 경우는 농장마다 편차가 있었으나, 50배에서 110배 까지도 중화항체가 증가하였다.



자돈에서의 모체이행항체 수준을 3주에 걸쳐서 확인하였다. PED 백신 접종군의 경우 갓 태어났을 때 30배 정도의 중화항체를 지니고 있었으며 주령이 지남에 따라 점점 감소하는 양상을 보여 3주째에는 평균 15배의 중화항체를 가지고 있었다. PED-Fc 백신 접종군의 경우 모체이행항체 또한 PED 백신 접종군에 비해서 높게 나타났으며, 평균 50 배 정도의 중화항체를 가지고 태어났다. 그 후 역시 점차 감소하여 3주째에는 20배 정도의 중화항체를 지니고 있었다.



모체이행항체 수준을 가늠해보기 위해서 모돈에서 채취한 초유에서의 중화항체를 확인하였다. 세 농장 모두 분만 직전의 모돈에서 확인한 중화항체보다 높은 수준의 중화항체가 초유에서 확인되었으며, 덕성, 화홍 농장에 비해서 덕지 농장의 경우 상대적으로 낮은 초유 중화항체를 보였다. 초유에서의 중화항체 역시 PED 백신 접종군보다 PED-Fc 백신을 접종한 그룹에서 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.

다. 설사증상 관찰

시험 기간 동안 설사 관련 사항을 기록하고 발생 원인별 결과를 기록한다.

(1) 덕성농장

시험기간 : 2010. 11. 01 ~ 2011. 04. 30

관찰기간 : 모든 : 분만 4주전부터 분만 직후까지 (약4주)

후보돈 : 1차접종부터 2차접종 9주 후까지 (11주)

구분	일령	공시수	발병 건수	원인별 분류						
				TGE	Rota	PED	E.coli	Salmonell a	콕시듐	기타
시험군	모든	10	2				1			원인불명(1)
	후보돈	10	5				1			Law(2) 원인불명(2)
대조군	모든	5	3				2			원인불명(1)
	후보돈	5	7				3	2		Law(1) 원인불명(1)

날짜	의뢰 가검물	구분	세균분리	PCR 검사	기타
2010.11.13	분변 6	모든 (시험군 대조군)	모든(시) : 대장균 모든(대) : 대장균	-	병원성 대장균으로 인한 설사
2010.11.24	컬쳐렛 2	모든 (대조군)	모든(대) : 대장균	-	병원성 대장균으로 인한 설사
	컬쳐렛 6	후보돈 (시험군 대조군)	후보돈(시) : 미분리 후보돈(대) : 살모넬라	-	살모넬라균으로 인한 설사
2010.11.27	컬쳐렛 5	모든 (시험군 대조군)	모든(시) : 미분리 모든(대) : 미분리	-	세균검사결과 특정한 병원균이 분리되지 않았음
2011.01.14	분변 10	후보돈 (시험군, 대조군)	후보돈(시) : 미분리 후보돈(대) : 대장균	시험군 : Law (+)	대조군에서 병원성 대장균이 분리되었고, 시험군에서 PCR

					결과 Law 증식성 회장염 양성이 나타남
2011.02.10	컬쳐렛 5	후보돈 (시험군, 대조군)	후보돈(시) : 대장균 후보돈(대) : 대장균	-	병원성 대장균으로 인한 설사로 진단
2011.02.15	컬쳐렛 3	후보돈 (대조군)	후보돈(대) : 대장균	-	병원성 대장균으로 인한 설사로 진단
2011.02.26	분변 6	후보돈 (시험군, 대조군)	후보돈(시) : 미분리 후보돈(대) : 미분리	-	특정 병원균 미분리
2011.03.15	분변 3	후보돈 (대조군)	후보돈(대) : 살모넬라	-	살모넬라성 설사
2011.03.19	컬쳐렛 10	후보돈 (시험군, 대조군)	후보돈(시) : 미분리 후보돈(대) : 미분리	Law (+)	시험군과 대조군에서 증식성 회장염 양성

(2) 화홍농장

시험기간 : 2010. 11. 01 ~ 2011. 04. 30

관찰기간 : 모든 : 분만 4주전부터 분만 직후까지 (약4주)

후보돈 : 1차접종부터 2차접종 9주 후까지 (11주)

구분	일령	공시수	발병 건수	원인별 분류						
				TGE	Rota	PED	E.coli	Salmonella	콕시듐	기타
시험군	모든	10	3				1			원인불명(2)
	후보돈	10	5				2	1		원인불명(2)
대조군	모든	5	4				1			원인불명(3)
	후보돈	5	7		1		4	1		원인불명(1)

날짜	의뢰 가검물	구분	세균분리	PCR 검사	기타
2010.11.10	분변 9	후보돈 (시험균, 대조균) 모돈 (대조균)	후보돈(시) : 대장균 후보돈(대) : 대장균 모돈(대) : 미분리	-	후보돈은 병원성 대장균에 의한 설사, 모돈은 원인불명
2010.11.13	컬처렛 3	후보돈 (대조균)	후보돈(대) : 대장균	-	병원성 대장균에 의한 설사
2010.11.15	음수 3 분변 15	모돈 (시험균, 대조균) 후보돈 (시험균, 대조균)	모돈(시) : 대장균 모돈(대) : 미분리 후보돈(시) : 대장균 후보돈(대) : 대장균	-	병원성 대장균이 분리되었고, 음수에 대해서도 대장균이 분리
2011.11.28	분변 10	모돈 (시험균, 대조균) 후보돈 (시험균)	모돈(시) : 미분리 모돈(대) : 대장균 후보돈(시) : 미분리	-	모돈 대조균에서 병원성 대장균이 분리되었으나 숫자가 미미함
2011.12.01	분변 4	모돈 (시험균, 대조균)	모돈(시) : 미분리 모돈(대) : 미분리	-	세균검사 결과 원인균 분리 못함, PCR 결과도 마찬가지
2011.02.15	컬처렛 5	후보돈 (시험균, 대조균)	후보돈(시) : 미분리 후보돈(대) : 미분리	후보돈 Rota (+)	후보돈 대조균에서 Rota에 대한 양성
2011.02.22	분변 5	후보돈 (시험균, 대조균)	후보돈(시) : 살모넬라 후보돈(대) : 살모넬라	-	살모넬라균이 분리됨
2011.03.19	컬처렛 4	후보돈 (대조균)	후보돈(대) : 미분리	-	원인파악못함
2011.04.23	컬처렛 3	후보돈 (대조균)	후보돈(대) : 대장균	-	병원성 대장균 분리

(3) 덕지농장

시험기간 : 2010. 11. 01 ~ 2011. 04. 30

관찰기간 : 모든 : 분만 4주전부터 분만 직후까지 (약4주)

후보돈 : 1차 접종부터 2차 접종 9주 후까지 (11주)

구분	일령	공시수	발병 건수	원인별 분류						
				TGE	Rota	PED	E.coli	Salmonella	톡시독	기타
시험군	모든	10	3				1			원인불명(2)
	후보돈	10	4				2			원인불명(2)
대조군	모든	5	3				2			원인불명(1)
	후보돈	5	2				1			원인불명(1)

날짜	의뢰 가검물	구분	세균분리	PCR 검사	기타
2010.11.05	분변 15	모든 (시험군 대조군) 후보돈 (시험군)	모든(시) : 미분리 모든(대) : 미분리 후보돈(시) : 미분리	-	원인 병원체 미분리
2010.11.15	분변 10	모든 (시험군 대조군) 후보돈 (시험군, 대조군)	모든(시) : 대장균 모든(대) : 대장균 후보돈(시) : 대장균 후보돈(대) : 미분리	-	후보돈 시험군을 제외하고 모든 그룹에서 병원성 대장균 분리
2010.11.18	컬쳐렛 5	모든 (시험군)	모든(시) : 미분리	-	원인 병원체 미분리
2011.11.25	컬쳐렛 3	모든 (대조군)	모든(대) : 대장균	-	병원성 대장균이 분리되었음
2011.02.05	분변 5	후보돈 (시험군, 대조군)	후보돈(시) : 미분리 후보돈(대) : 대장균	-	병원성 대장균이 분리되었음
2011.03.14	분변 2	후보돈 (시험군)	후보돈(시) : 대장균	-	병원성 대장균이 분리되었음

라. 공격 접종 후 임상 증상 관찰

구분	개체	임상 증상	공격접종 후									
			1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
시험군 A	1	발열	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	발열	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	발열	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
시험군 B	1	발열	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	발열	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	발열	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
시험군 C	1	발열	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	발열	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	발열	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
양성 대조군	1	발열	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	2	발열	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	발열	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
음성 대조군	1	발열	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	발열	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	발열	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

마. 공격접종 후 부검 소견

구 분	개체 구분	소장 병변	배양 및 분리에 의한 원인체 분류						
			PED	Rota	TGE	<i>E.coli</i>	Salmonella	콕시듐	기타
시험군 A	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
시험군 B	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
시험군 C	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
양성 대조군	1	소장벽 얇아짐 수양성 내용물	+	-	-	-	-	-	-
	2	소장벽 얇아짐 수양성 내용물	+	-	-	-	-	-	-
	3	소장벽 얇아짐 수양성 내용물	+	-	-	-	-	-	-
음성 대조군	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-



## 5. PED-Fc 백신의 야외 임상시험 고찰

본 실험은 PED-Fc 불활화백신에 대한 야외 안전시험 및 효능평가에 대한 실험이며, 3개 농장을 선정하여, 안전시험과 효능평가를 실시하였다. PED-Fc 백신의 상대적 우수성을 입증하기 위하여 PED 백신 접종 군과 비교 실험을 진행하였다. 실험동물은 분만 4~5주전 모돈과 후보돈이며, 안전시험의 경우 각 농장 별로 모돈 10마리, 후보돈 5마리를 선정하여 실시하였다. 시험백신은 2배 용량으로 이근부에 1회 접종하여, 접종 2시간까지 나타나는 급성형 반응과 이후 지속적으로 나타나는 지연형 반응을 관찰 기록하였다. 급성형 반응에서는 접종 전과 접종 후 2시간까지 체온을 측정하여 시험백신이 체온에 미치는 영향에 대하여 알아보았으며, 접종 후 일어나는 쇼크 및 식욕부진, 침울 등의 부작용 발생여부를 함께 관찰 기록하였다. 관찰 결과 주목할 만한 체온변화 및 부작용은 나타나지 않았으며, 지연형 반응을 매일 관찰한 결과에서도 접종에 대한 부작용은 나타나지 않았다.

효능 시험의 경우 안전시험과 동일하게 분만 4~5주전 모돈과 후보돈을 공시하였으며, 2차에 걸쳐 백신 접종을 실시하고, 시기에 따른 중화항체 역가 변화를 측정하였다. 역가의 측정은 모돈과 후보돈에 접종 후 나타나는 역가변화와 모돈에서 자돈으로 이어지는 이행항체를 측정하여, 모돈에서 형성된 항체가 얼마나 효과적으로 자돈으로 이어지는가를 알아보았다. PED 백신과 PED-Fc 백신 접종군 모두 시험백신의 접종 후 나타나는 역가변화는 1차 접종때 보다 2차접종 후에 더 큰 역가의 상승이 나타났으며, 후보돈에서 나타난 결과를 살펴볼 때, 2차 접종 2~4주후에 가장 높은 역가를 나타내고 있었다. 이 결과를 미루어 보아 모돈접종의 경우 최소 분만 2주전까지 2차 접종을 완료해야하며, 분만 3주전에 접종을 완료하는 것을 권장해야 한다는 결과를 얻을 수 있었다. 역가의 측정은 중화항체 시험법을 사용하였으며, 모돈 뿐만 아니라 후보돈에서도 국가검정 기준인 8배를 훨씬 상회하는 결과를 얻을 수 있었다. 두 백신의 효능을 비교해 본 결과 세 농장 모두에서 모돈 및 후보돈에서 PED-Fc 백신이 3배 이상의 높은 항체가를 유도하였다. 모돈의 경우 분만시에 초유를 받아 자돈으로 이행되는 항체의 수준을 알아보았으며, 이는 분만직후 측정된 모돈의 항체역가보다 2~3배 높았으며, 고역가의 이행항체가 자돈으로 전달되는 것을 확인할 수 있었다. 이 또한 PED-Fc 백신 접종군에서 2~3배 정도 높게 나타났다.

자돈 설사증상에 대한 관찰결과에서도 세 농장 모두 간간히 설사 증상이 나타나긴 하였으나, 주로 대장균에 의한 설사였고, PED 바이러스에 의한 설사 증상은 확인되지 않았다.

실험실내에서 이루어진 공격실험 결과를 통하여 PED-Fc 백신의 방어력을 확인하였다. 공격접종 결과 양성 대조군에서는 접종 직후 발열 증상과 2~4일 동안의 설사 증상이 관찰되었으나, 모체 이행항체를 가진 자돈의 경우는 발열과 설사 증상이 거의 나타나지 않았으며, 부검 결과에서도 양성 대조군에서는 소장벽이 얇아지고 수양성 내용물의 전형적인 PED 임상증상을 보였으나, 모체 이행항체를 가진 자돈의 경우에는 공격접종으

로 인한 PED 감염증이 나타나지 않았다.

이로서 시험백신에 대한 안전성과 효능을 입증할 수 있었고, PED-Fc 백신이 기존의 PED 백신보다 더 효과적으로 PED 바이러스를 예방할 수 있음을 확인하였다.

## 6. PED-Fc 백신의 비교 임상 시험

### 가. Fc/PED 백신 접종 프로그램

1차, 2차 년도에서 개발한 Swine Fc 발현 PEDV 백신의 효능검증을 위하여 실제 돼지를 이용한 농장에서의 효능성 평가를 실시하였다. 실험 디자인은 임신돈 중 그 이전에 일반적인 commercial한 PED 백신을 접종한 적이 없는 후보돈 5두를 선발하여, Fc/PEDV 백신을 분만 4주전과 분만 2주전에 2회에 걸쳐서 각각 근육주사 하였다. 임신돈들의 안전을 위하여, 충분한 음수, 사료, 공간을 확보하여, 백신 스트레스를 최소한으로 줄이고자 노력하였으며, 접종된 임신돈들의 상태를 매일같이 체크하면서 실험을 진행하였다.

### 나. 분만 후 샘플링

분만 당일 모든의 초유를 각각 최소 5 ml 이상씩을 채취하였으며, 모돈을 채혈하여, 혈청을 분리하였다. 채취된 초유와 모돈의 혈청은 실험실로 옮겨서 실험이 진행될 때까지, -20 °C에 냉동보관 하였다.

### 다. 자돈의 샘플링

Fc/PED 백신이 접종된 후 태어난 자돈들에서의 면역활성 효능을 검증하기 위하여, 모돈 1두당 각각 5두의 자돈을 분만 7일 후에 채혈하여, 혈청을 분리하고 이를 실험실로 옮겨서 실험이 진행될 때까지, -20 °C에 냉동보관 하였다.

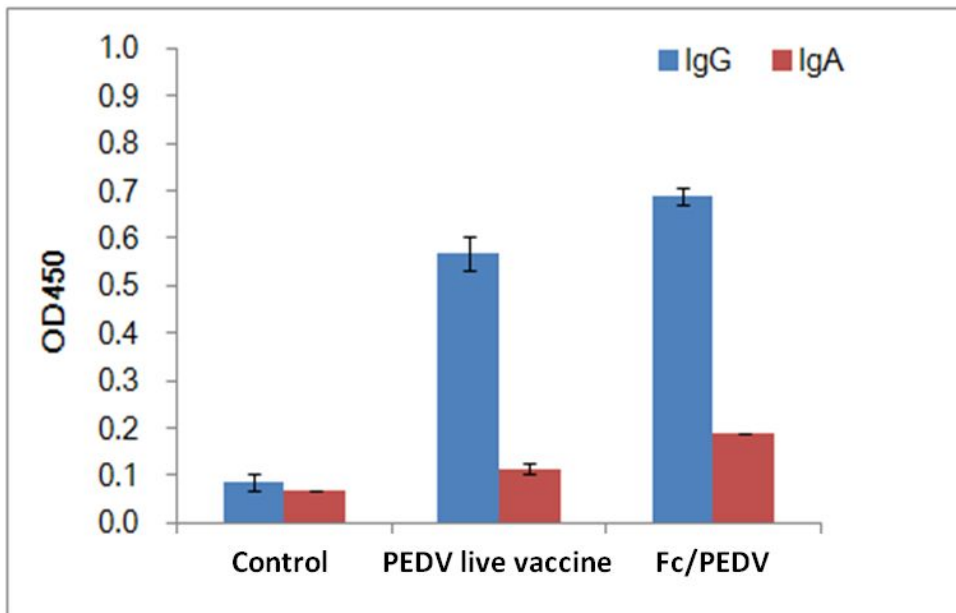
### 라. ELISA를 이용한 모돈 및 자돈에서의 항체 생성능 평가 결과

본 연구실에서는 PEDV에 대한 ELISA를 매우 주기적으로 실시 해 오고 있기 때문에 이 실험에 대한 기본적인 set up은 이미 매우 잘 되어 있기에, 별도의 standard 잡기 위한 추가적인 실험은 실시하지 않았다. 기본적인 ELISA 방법은 conventional method에 입각하여 실시하였다. Purified PEDV 바이러스를 0.1M sodium bicarbonate buffer (pH 9.6)를 이용하여 96-well microtiter plate (Nunc, Denmark)에 4 °C 12시간을 incubation하여 coating하였다. 3회 washing을 0.05 % Tween 20 (PBS-T)가 포함된 PBS를 이용하여 실시하였고, skim milk로 blocking하였다. PBS-T 를 이용하여 3분씩 3

회 washing 을 수행한 뒤, 혈청 및 초유 sample 을 PBS-T 를 이용하여 1:1000 이 되도록 희석한 뒤 0.1 ml 씩 넣었다. 실험의 정확성을 높이기 위해 각 sample 당 3개의 well 에 로딩한 후 37°C에서 한 시간 반응시켰다. 한 시간 후, 다시 PBS-T를 이용하여 3회 washing 을 수행한 뒤 HRP comjugated swine IgG 및 IgA 를 PBS-T 에 1:20000이 되도록 희석한 뒤 0.1 ml 씩 넣었다. 37°C에서 한 시간 반응시킨 뒤 다시 PBS-T를 이용하여 3회 washing 을 수행하였다. TMB substrate (eBioscience) 를 0.1 ml 씩 넣고 15 분 반응한 뒤, 2N H2SO4를 이용하여 반응을 멈추고 450nm에서 OD를 측정하였다. 세 개의 well 의 평균값 및 표준편차를 구한 뒤 결과 분석에 사용하였다.

마. PED-Fc 백신의 비교 임상시험 결과

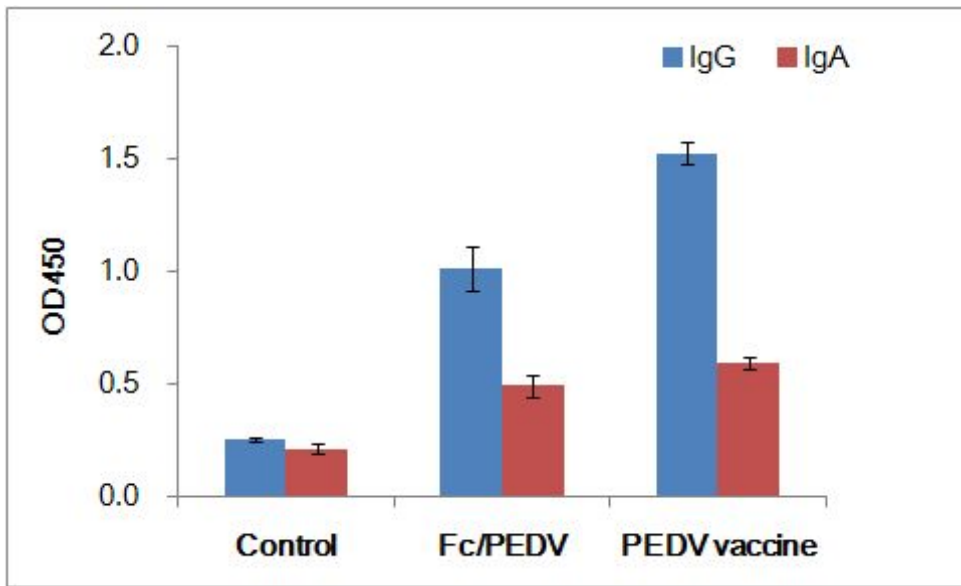
(1) 초유에서의 항체 생성능



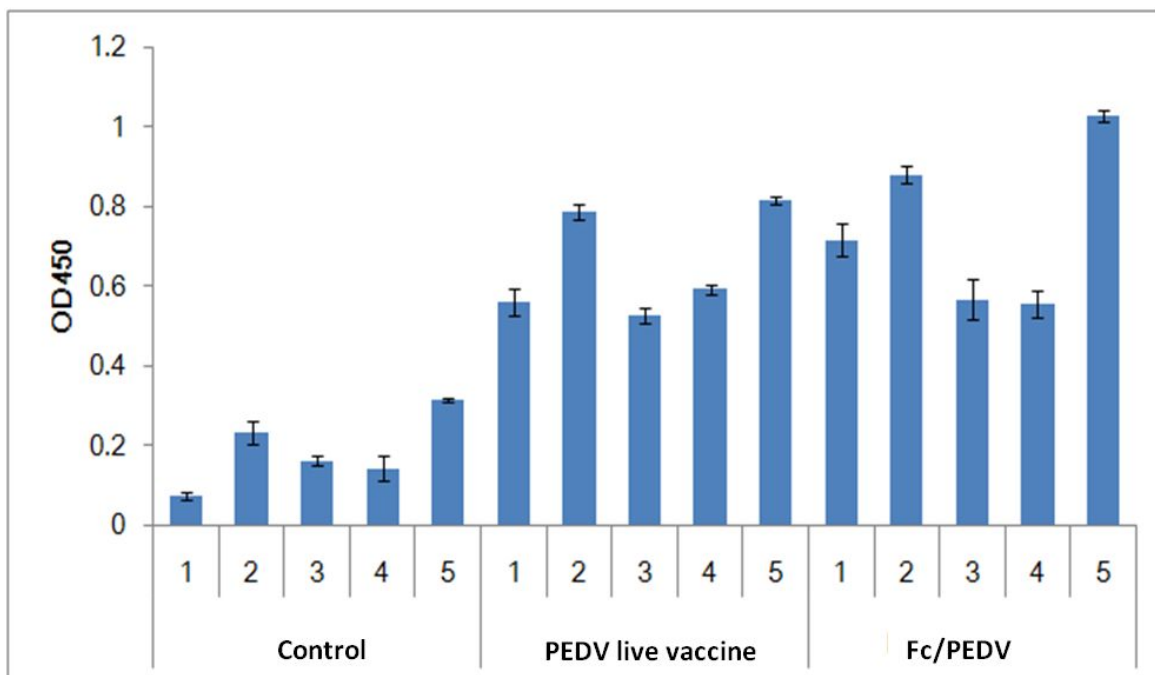
초유 내 IgG 및 IgA 생성능을 비교해본 결과, Fc/PEDV vaccine 을 접종한 군에서 commercial 한 생독백신을 사용한 군과 비슷한 정도의 IgG 및 IgA 가 생성되는 것을 확인할 수 있었다. vaccine 을 하지 않은 control group 에서는 PEDV에 대한 IgG 및 IgA 가 검출되지 않았다.

(2) 모돈의 항체 생성능

모돈의 혈청 내 IgG 및 IgA 생성능을 비교해본 결과, 초유에서와 마찬가지로 commercial 한 생독백신을 한 경우와 비슷한 정도의 IgG 및 IgA가 검출되었으며 control group 에서는 낮은 항체가를 나타냈다.



(3) 자돈의 항체 생성능

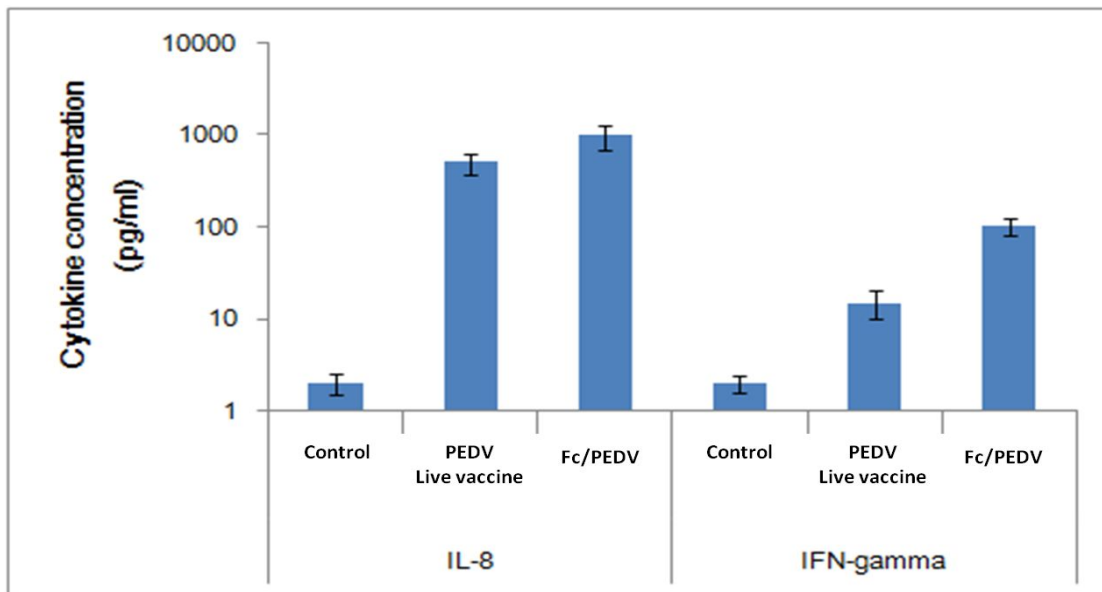


자돈의 혈청 내 IgG에 대한 ELISA 를 수행한 결과, 모돈과 마찬가지로 자돈의 혈청 내 IgG도 Fc/PEDV를 접종한 경우 PEDV live vaccine 을 접종한 경우와 비슷하거나 더 높은 정도의 항체 생성능을 보였다.

모돈의 초유 및 혈청, 그리고 자돈의 혈청 내 항체가를 비교해 본 결과, 일반적인 PEDV 백신을 접종한 group 보다는 Fc/PEDV 백신을 접종한 group에서 더 많은 IgG 및 IgA 가 생성되는 것을 확인 할 수 있었다. Fc/PEDV 백신이 기존의 백신보다 더 효과적으로 바이러스의 감염을 방어할 수 있을 것으로 생각된다.

#### (4) Fc/PEDV 접종군에서의 cytokine 유도율 비교

Fc/PEDV 백신 접종군에서의 cytokine 유도를 검증하기 위하여 Invitrogen사에서 판매하고 있는 Swine cytokine ELISA kit를 구매하여 혈중 cytokine을 비교하였다. 여러 가지 cytokine 중 T cell을 인지하는 IFN- $\gamma$  그리고 B cell을 인지하는 IL-8에 대한 kit를 구매하여 실험을 수행하였다. 실험 방법은 제조사에서 제공하는 manual을 이용하여 실시하였다.



모든 혈청 내 cytokine 을 ELISA kit 을 이용하여 검출해본 결과, Fc/PEDV 백신을 접종한 group에서 높은 IL-8 및 IFN-gamma 가 검출되었으며 이로 인해 더 많은 항체가 생성된 것으로 생각되었다.

#### (5) 바이러스 중화능 검증 시험

앞의 결과들로 볼 때 Fc/PEDV 백신을 접종한 경우 보다 높은 cytokine 생성능 과 높은 항체가를 보이므로 직접적으로 바이러스 감염을 방어할 수 있는지 살펴보기 위해 추가적으로 바이러스 중화능 검사를 수행중이다.

## 2절 PRRS-Fc 백신의 개발

### 1. PRRSV 백신 후보주의 선정

가. 국내 유행 분리주의 유전형에 따른 유전자 계통수 분석

#### (1) 분석 방법

(가) Outgroup: Lelystad virus strain(유럽형 prototype)

(나) Alignment : CLUSTAL X 1.81

(다) Neighbor-joining method : PHYLIP 3.572c

(라) Bootstrap analysis : 1,000 replications

(마) Graphic output : TreeView 1.6.1

#### (2). PRRSV type 1(European type)

(가) 분석대상 : 117개의 국내분리주 PRRSV 유럽형

(나) 표준서열 : 세계 각국에서 보고된 46개의 PRRSV strains(NCBI 유전자은행)

(다) 분석결과 : 대 클러스터 1개(I : 90% 이상 차지), 소 클러스터 2개(II, III)

#### (3) PRRSV 북미형 (type 2)

(가) 분석대상 : 198개의 국내분리주 PRRSV 북미형

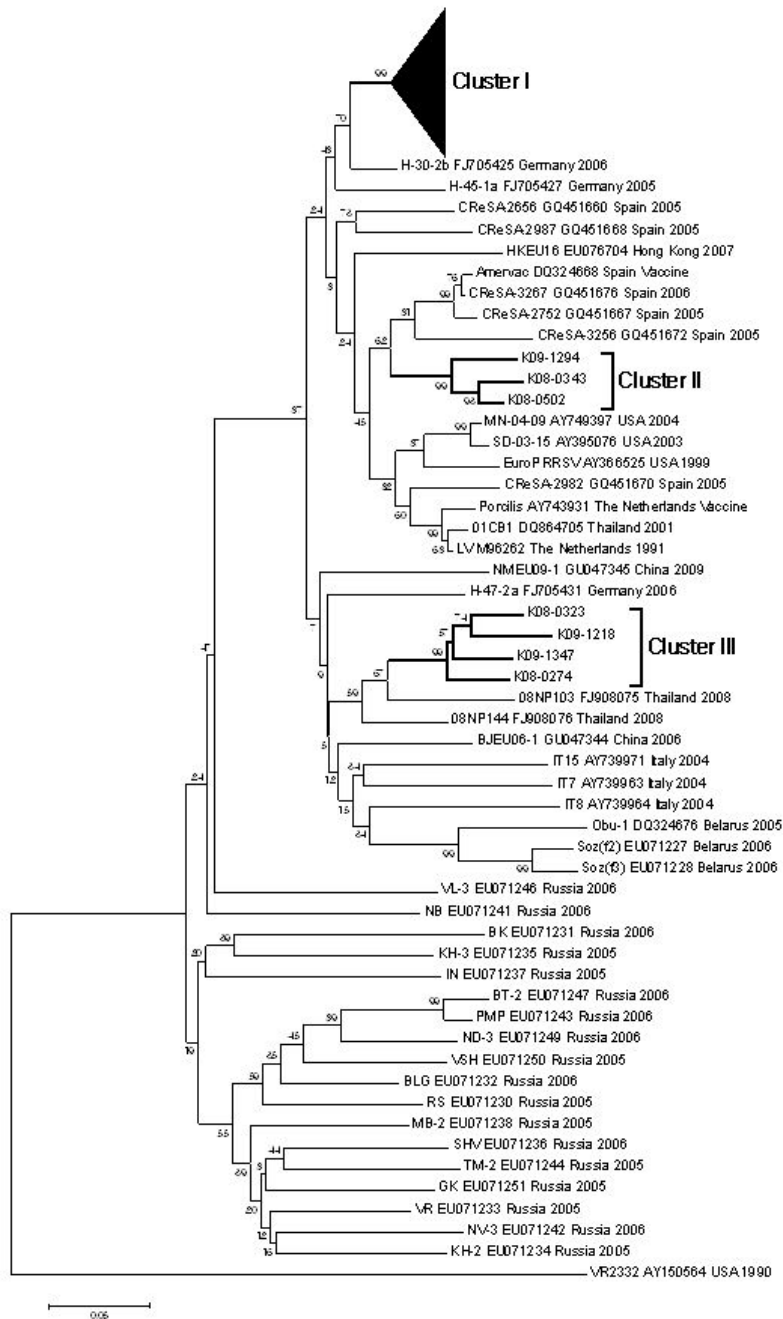
(나) 표준서열 : 세계 각국에서 보고된 57개의 PRRSV strains(NCBI 유전자은행)

(다) 분석결과 : 대 클러스터 3개(I, II, III), 소 클러스터 1개(IV), 기타 그룹

Genetic cluster classification of type 1 PRRSVs from Korea based on a phylogenetic analysis of the ORF 5 gene

Cluster	Isolates Name	Number (%)
I	K07-0604, K07-2212, K07-2222, K07-2223, K07-2228, K07-2231, K08-0287, K08-0290, K08-0297, K08-0307, K08-0316, K08-0317, K08-0322, K08-0324, K08-0325, K08-0332, K08-0333, K08-0335, K08-0334, K08-0351, K08-0355, K08-0373, K08-0374, K08-0376, K08-0387, K08-0401, K08-0419, K08-0435, K08-0436, K08-0439, K08-0457, K08-0460, K08-0471, K08-0475, K08-0493, K08-0495, K08-0500, K08-0509, K08-0524, K08-0642, K08-0705, K08-0773, K08-0812, K08-0825, K08-0909, K08-0915, K08-0958, K08-1069, K08-1087, K08-1088, K09-1219, K09-1233, K09-1238, K09-1244, K09-1245, K09-1247, K09-1249, K09-1251, K09-1253, K09-1263, K09-1264, K09-1268, K09-1270, K09-1271, K09-1275, K09-1277, K09-1289, K09-1290, K09-1295, K09-1296, K09-1297, K09-1298, K09-1302, K09-1304, K09-1305, K09-1307, K09-1308, K09-1309, K09-1313, K09-1315, K09-1317, K09-1321, K09-1326, K09-1329, K09-1332, K09-1333, K09-1334, K09-1336, K09-1338, K09-1339, K09-1341, K09-1343, K09-1349, K09-1351, K09-1352, K09-1357, K09-1365	109 (93.1)
II	K08-0343, K08-0502, K09-1294	3 (2.6)
III	K08-0274, K08-0323, K09-1218, K09-1347	5 (4.3)

Phylogenetic analysis of the ORF 5 gene in Korean type 1 PRRSVs. The phylogenetic tree was constructed with 117 PRRSV isolates from Korea and 46 PRRSV strains isolated from around the world.

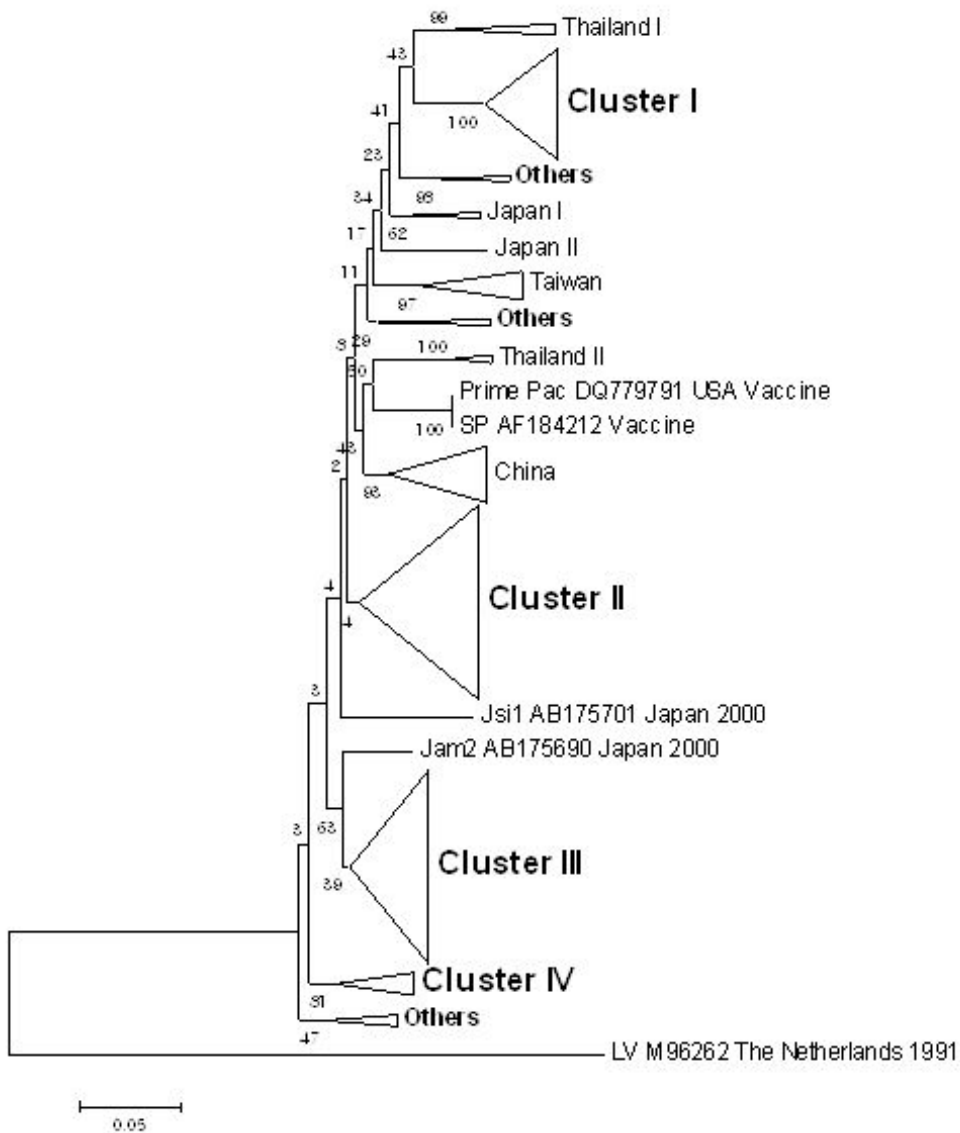




Genetic cluster classification of type 2 PRRSVs from Korea based on a phylogenetic analysis of the ORF 5 gene

Cluster	Isolates Name						Number (%)
I	K05-0008,	K05-0078,	K05-0114,	K05-0212,	K05-0239,	K05-0246,	44 (22.2)
	K05-0251,	K05-0262,	K05-0265,	K05-0992,	K05-2265,	K06-0007,	
	K06-0010,	K06-0013,	K06-0014,	K06-0927,	K06-0946,	K06-1173,	
	K07-2267,	K07-2268,	K07-2269,	K07-2271,	K07-2272,	K07-2273,	
	K08-0148,	K08-0149,	K08-0150,	K08-0936,	K09-1230,	K09-1235,	
	K09-1249,	K09-1259,	K09-1267,	K09-1268,	K09-1273,	K09-1277,	
	K09-1280,	K09-1288,	K09-1297,	K09-1341,	K09-1354,	K09-1357,	
	K09-1363,	K09-1365					
II	K05-0026,	K05-0043,	K05-0076,	K05-0123,	K05-0132,	K05-0136,	79 (39.9)
	K05-0137,	K05-0138,	K05-0146,	K05-0162,	K05-0165,	K05-0170,	
	K05-0200,	K05-0216,	K05-0225,	K05-0234,	K05-0237,	K05-0253,	
	K05-0263,	K05-0267,	K06-0017,	K06-0018,	K06-0041,	K06-0168,	
	K06-0691,	K06-0694,	K06-0915,	K06-0917,	K06-0919,	K06-0921,	
	K06-0924,	K06-1039,	K06-1040,	K06-1042,	K06-1043,	K06-1044,	
	K06-1230,	K06-1595,	K06-1600,	K07-0009,	K07-0017,	K07-0219,	
	K07-0486,	K07-0487,	K07-0564,	K07-0593,	K07-2247,	K07-2249,	
	K07-2250,	K07-2422,	K07-2512,	K08-0151,	K08-0552,	K08-0911,	
	K08-1001,	K08-1073,	K09-1232,	K09-1233,	K09-1241,	K09-1242,	
	K09-1255,	K09-1260,	K09-1261,	K09-1279,	K09-1286,	K09-1290,	
	K09-1298,	K09-1300,	K09-1302,	K09-1303,	K09-1318,	K09-1320,	
	K09-1331,	K09-1334,	K09-1338,	K09-1348,	K09-1350,	K09-1351,	
	K09-5070						
III	K05-0122,	K05-0205,	K05-0221,	K05-0982,	K05-0983,	K05-0984,	60 (30.3)
	K05-0988,	K05-0993,	K05-0998,	K05-1002,	K05-1006,	K06-0008,	
	K06-0328,	K06-0564,	K06-0578,	K06-0687,	K06-0689,	K06-1015,	
	K06-1020,	K06-1024,	K06-1026,	K06-1028,	K06-1032,	K06-1035,	
	K06-1036,	K06-1038,	K06-1041,	K06-1045,	K06-1046,	K06-1047,	
	K06-1048,	K06-1050,	K06-1171,	K06-1423,	K06-1511,	K06-1826,	
	K06-1827,	K06-1832,	K07-0778,	K07-2332,	K08-0146,	K08-0147,	
	K08-0915,	K08-1054,	K09-1228,	K09-1239,	K09-1243,	K09-1250,	
	K09-1251,	K09-1257,	K09-1262,	K09-1276,	K09-1284,	K09-1311,	
K09-1316,	K09-1326,	K09-1340,	K09-1343,	K09-1355,	K09-5121		
IV	K05-0053,	K05-0056,	K05-0124,	K05-0250,	K05-0259,	K09-1282,	7 (3.5)
	K09-1306						
Others	K05-0050,	K09-1264	K05-0143,	K09-1248,	K05-0986,	K05-0987,	8 (4.0)
	K06-1833,	K09-1345					

Phylogenetic analysis of the ORF 5 gene in Korean type 2 PRRSVs. The phylogenetic tree was constructed with 198 Korean PRRSV isolates and 57 PRRSV strains isolated from around the world.



나. 국내 유행 분리주와 각 유전형 원형과의 유전자 유사성 비교 분석

Sequence identity between each prototype and the respective PRRSV isolates

Genotype	Prototype	Number of isolates	Nucleotides (%)	Amino acids (%)
Type 1	LV	117	85.6-90.8	85.1-91.6
Type 2	VR-2332	198	84.7-99.8	83.1-99.5

다. 국내분리주의 혈청학적 그룹 조사

현재 국내에서 사용하고 있는 (주)베링거인겔하임의 약독화된 live vaccine주인 MLV strain에 대한 항혈청에 대하여 국내분리주의 중화되는 수준에 따라 다음 표와 같이 4개의 그룹으로 구분됨을 확인함

Serologic difference of Korean PRRSV isolates

Group*	I	II	III	IV
Korean PRRSV isolates	LMY, K07-0643, K08-0374, K08-0401, K08-0642, K08-0773, K08-0977, K08-1063, K08-1087, K08-1092, K09-1237, K09-1330, K09-1331, K09-1343, K09-1365	K08-0909, K08-0921, K08-0936, K08-1001, K08-1044, K08-1069, K08-1073, K08-1078, K09-1319, K09-1334, K09-1341, K09-1354, K09-1357, K09-5121	K08-0911, K08-0930, K08-0981, K08-1042, K08-1067, K09-5181	K08-0860, K08-0917, K08-0925, K08-0942, K08-0991, K08-1054, K08-1066
Total	15	14	6	7

※ Group I :  $10^1$ TCID<sub>50</sub>이하 중화, II:  $10^1$ - $10^2$ TCID<sub>50</sub> III:  $10^2$ - $10^4$ TCID<sub>50</sub>  
IV:  $10^4$ TCID<sub>50</sub>이상

## 라. Fc발현세포 적응 백신 후보주 선정

### (1) 유럽형 백신 후보주

돼지폐포탐식세포에서 2대 계대 후 MARC145 세포에서 3대 계대 적응 Fc 발현 MARC145 세포에서 증식성에 따라 1개주 선정 (K07-0643)

### (2) 북미형 백신 후보주

주요 유전자 분석 클러스터, 주요 혈청학적 특성, Fc발현 MARC145 세포 증식성에 따라 우선 2개주 선정 (LMY, K08-1001)하였으며 추후 2개주 더 선정할 예정이다. 선정된 LMY와 K08-1001은 (주) 코미팜으로 분양되어 각각 Komi-NA263과 Komi-NA316으로 재 명명 되었고, 증식 실험 및 병원성 확인 실험을 거친 후, 시험 백신의 제조에 사용되었다.

## 마. 바이러스 감염 확인

### (1) FA Test

#### 실험 방법

- ① PRRS 바이러스의 정확한 감염 확인을 위해 FA 방법을 이용하여 확인한다. PRRSV가 접종된 plate에 상층액을 버리고 PBS로 3회 washing한다.
- ② 냉동에서 보관중인 90% acetone을 일정량을 plate에 넣고 -20 °C 냉동고에 넣고 20분 동안 반응시킨다.
- ③ 20분 후 acetone을 제거하고 상온에서 plate를 건조시킨다.
- ④ 1차 항체 Anti-PRRSV NC 단클론 항체 (Geno Cat.No. 9043)를 PBS에 500 배 희석하고 이것을 plate에 일정량을 넣어준 후, 37 °C에서 1시간 30분 동안 반응시킨다. PBS로 4회 washing한다.
- ⑤ 2차 항체 FITC conjugated goat Anti-mouse IgG + IgM(H+L) (KPL cat.no. 02-18-09)을 PBS에 100 배 희석하고 이것을 plate에 일정량을 넣고 37 °C에서 1시간 30분 반응시킨다.
- ⑥ PBS로 4회 washing한다.
- ⑦ 형광현미경으로 관찰한다.

(2) 분리주의 Marc145 세포배양을 통한 증식

양성 조직의 유제액을 0.2  $\mu\text{m}$  pore size syringe filter를 이용하여 여과한 다음 미리 준비된 PRRS 음성돈으로부터 분리된 PAM cell에 접종하여 2~3일 후 상층액을 분리하여 다시 Marc145 세포에서 배양한다. 이 후 바이러스 배양액을 Marc145 세포에서 연속 계대하면서 바이러스 역가를 측정하여 바이러스의 역가가 상승하는지 관찰한다.

계대배양에 따른 바이러스 역가의 상승

바이러스 균주	PRRSV Komi-NA263	
계대 번호	바이러스 함량 (TCID <sub>50</sub> /ml)	배양세포
1	10 <sup>3.0</sup>	Marc145
2	10 <sup>3.0</sup>	"
3	10 <sup>3.0</sup>	"
4	10 <sup>3.0</sup>	"
5	10 <sup>4.0</sup>	"
6	10 <sup>4.5</sup>	"
7	10 <sup>4.75</sup>	"
8	10 <sup>4.75</sup>	"
9	10 <sup>5.0</sup>	"
10	10 <sup>5.25</sup>	"
11	10 <sup>5.25</sup>	"
12	10 <sup>5.5</sup>	"
13	10 <sup>6.0</sup>	"
14	10 <sup>6.5</sup>	"

바이러스 균주	PRRSV Komi-NA316	
계대 번호	바이러스 함량 (TCID <sub>50</sub> /ml)	배양세포
1	10 <sup>3.75</sup>	Marc145
2	10 <sup>4.25</sup>	"
3	10 <sup>4.5</sup>	"
4	10 <sup>5.0</sup>	"
5	10 <sup>5.5</sup>	"
6	10 <sup>6.0</sup>	"
7	10 <sup>6.25</sup>	"
8	10 <sup>6.0</sup>	"
9	10 <sup>6.5</sup>	"
10	10 <sup>6.5</sup>	"
11	10 <sup>6.5</sup>	"
12	10 <sup>6.5</sup>	"
13	10 <sup>6.5</sup>	"
14	10 <sup>6.5</sup>	"
15	10 <sup>6.5</sup>	"

(3) 분리주 유전자 서열 확인

Marc 145에서 감염이 확인 된 균주 Komi-NA263, KomiI-NA316 각각 RNA를 추출해서 ORF5 를 target으로 제작 된 primer를 이용하여 PCR 한다.

PCR product를 TA cloning해서 ORF5 전체 염기 서열을 확인하고 prototype인 VR-2332 및 다른 국내 분리주와 상동성을 비교한다.

#### (4) 코미팜 분리주와 국내 분리주와의 염기서열 비교

ORF5 유전자 서열을 바로로 야외분리주를 검사한 결과 PRRSV Komi-NA263는 VR2322와 유사한 Korea segment 1에 속하는 바이러스로 밝혀졌으며 PRRSV Komi-NA316주는 Korea segment 2형에 속하는 균주로 밝혀졌다.

PRRSV Komi-NA263주의 ORF5 염기서열

Nucleotide=603 bp

Amino Acid=301 aa

ATGTTGGAGAAATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCGATTGCTTTCTTTGTGG  
TGTATCGTGCCGTTCTGTTTTGCTGCGCTCGCCAACGCCAGCGGCAACAGCAGCT  
CCCATCTACAGCTGATTTACAACCTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATT  
GGCTAGCTAACAAATTTGATTGGGCAGTGGAGAGTTTTGTCATCTTTCCTGTTT  
TGA CTCACATTGTCTCCTACGGTGCCCTCACCACCAGTCATTTTCCTTGACACGGT  
TG CCTTGACCACCGTGTCTACCGCCGGATTTGTTACGGGCGGTATGTCCTAAGC  
AGCATCTACGCGGTCTGTGCCCTGGCTGCGTTGCTTTGCTTCATCATCAGGTTTG  
CAAAGAATTGCATGTCCTGGCGCTATGCGTGCACCAGATACACCAATTTTCTTC  
TGGATACCAAGGGTAGACTCTATCGCTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGAAAA  
GGGGCAAAGTTGAGGTCGAAGGTCATCTAATCGACCTAAAAAAGTTGTGCTTG  
ATGGTTCCGTGGCAACCCCTATAACCAGAGTTTCAGCGGAACAATGGGGTCGTCC  
TTAG

PRRSV Komi-NA316주의 ORF5 염기서열

Nucleotide=603 bp

Amino Acid=301 aa

ATGTTGGAGAAATGCTTGACCGCGGGTTGTTGCTCGCAATTGCTTTTTTTTGTGG  
TGTATCGTGCCGTCCTGTTTTGTTGCGCTCGTCAGCGCCAACAACAACAGCAGCT  
CCAAATTTTCAGTTGATTTATAACTTGACGCTATGCGAGCTGAACGGCACAGAAT  
GGCTAGCCGATAAGTTTAATTGGGCAGTTGAGACCTTCGTCATTTTTCCCGTGT  
TGA CTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTTACTACTAGCCATTTTCCTTGACACAGT  
TGGTCTGGCCACTGTGTCTACCGCCGGTTATTATCATGGGCGGTATATTTTGAG  
TAGCATCTACGCGGTCTGTGCCCTGGCTGCGTTGATTTGTTTCATCATCAGGTTT  
GTGAAAAATTGCATGTCTTGGCGCTACTCATGTACCAGGTACACCAATTTTCTT  
CTGGATACCAAGGGCAGACTCTATCGTTGGCGTTCACCTGTCATCATAGAGAAA  
GGGGGTAAAGTTGAGGTCGAAGGGCATCTAATCGATCTCAAAGAGTTGTGCTT  
GATGGTTCCGCGGCAACCCCTGTAACCAAAAATTTCTGCGGAANCAATGGGGTCGT  
CCTTA

## 2. PRRSV 야외 분리주 병원성 시험

### 가. 개요

야외에서 분리한 PRRSV Komi-NA263 주와 Komi-NA316 주의 사백신 으로서 의 가치를 평가하기위한 방법으로 병원성을 확인하였다. PRRS 음성 돼지를 실험실에서 사육하며 야외분리주를 공격 접종하여 임상 증상을 관찰하였다.

### 나. 실험방법

- (1) PRRS 바이러스 strain: Komi-NA263, Komi-NA316
- (2) 공격접종 함량 및 접종 경로 : 두 균주 모두 각각  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스액을 2.0 ml 씩 돼지 기관을 통해 접종하였다.
- (3) 실험용 돼지: 체중 8~10 kg 정도의 PRRS 음성 돼지를 사용하였으며 총 6마리를 세 그룹으로 나누어 2 마리는 Komi-NA263 주를 접종하고 2 마리는 Komi-NA316주를 접종하였다. 2 마리는 비 접종 대조군으로 관찰하였다. 공격 접종 후 돼지간의 바이러스 감염을 방지하기 위하여 각각의 독립된 공조 시설을 갖춘 실험실에 2 마리씩 사육하면서 관찰하였다.

### 다. 결과

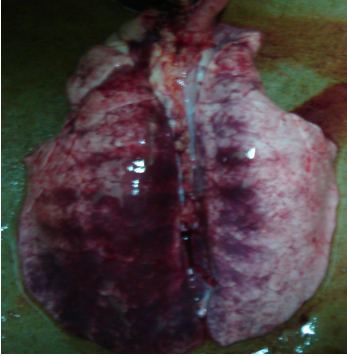
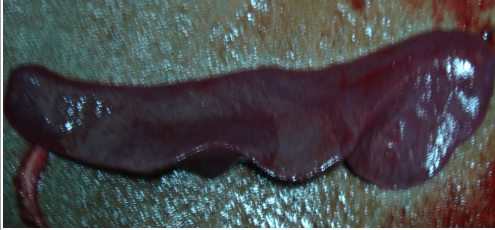
- (1) PRRSV 배출 확인 및 혈중 바이러스 확인

DPI	Komi-NA263(1)			Komi-NA263(2)			Komi-NA316(1)			Komi-NA316(2)		
	비강	항문	혈중	비강	항문	혈중	비강	항문	혈중	비강	항문	혈중
1	-	-		-	-		-	-		-	-	
2	-	-		-	-		-	-		-	-	
3	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
4	+	-		+	+		-	+			+	-
5	+	-		+	-		+	-		+	-	
6	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
7	-	-		-	-		-	-		-	-	
8	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
9	-	-		-	-		-	-		-	-	
10	-	-		-	-		-	-		-	-	
11	-	-		-	-		-	-		-	-	

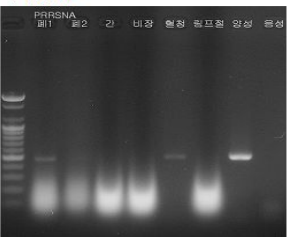
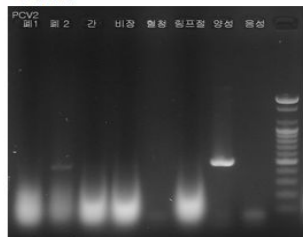
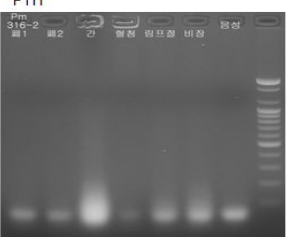
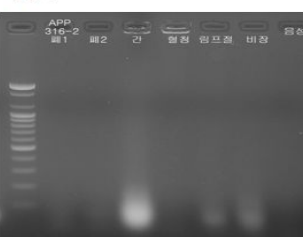


(2) 부검 및 조직 내 바이러스 검출

(가) Komi-NA316(2) 집중돈 부검

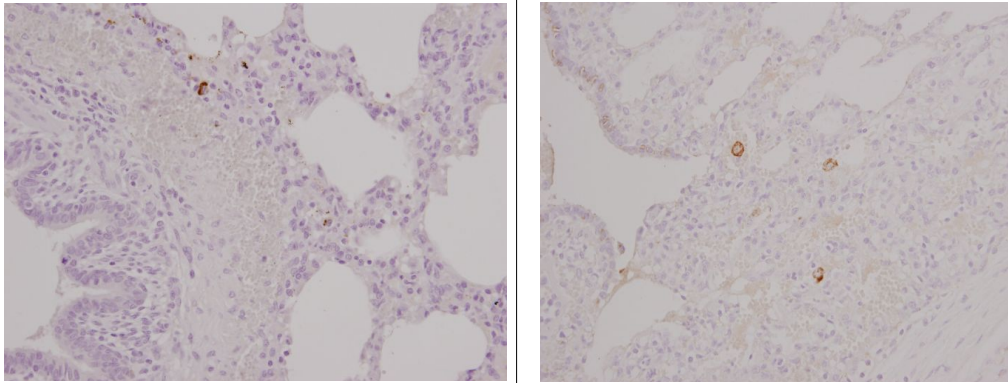
폐	비장
	
<p>공격집중 이후 체온이 40 ℃를 넘는 개체를 선택하여 부검하였으며, 부검결과 폐조직의 심각한 충혈 및 점상출혈이 나타났다. 폐조직 전반에 걸쳐 염증이 진행되고 있었으나, 편측으로 충혈이 더 심하게 나타났다. (두개 타격 후 바로 방혈과 부검을 실시하였기 때문에 사반으로 인한 영향이 적었을 것으로 판단.) 또한, 비장의 종대가 심하게 나타났으며, 간과 신장의 창백한 증상이 나타난 것으로 보아 많은 량의 적혈구 파괴가 나타났을 거라 추측된다. 기관지내 삼출물이 관찰되었으며, 폐조직에 대한 세균 검사결과 폐렴과 관계된 병원균 분리는 되지 않았다.</p>	

(나) Komi-NA316(2) 집중돈 조직의 폐렴관련 병원균에 대한 PCR 결과

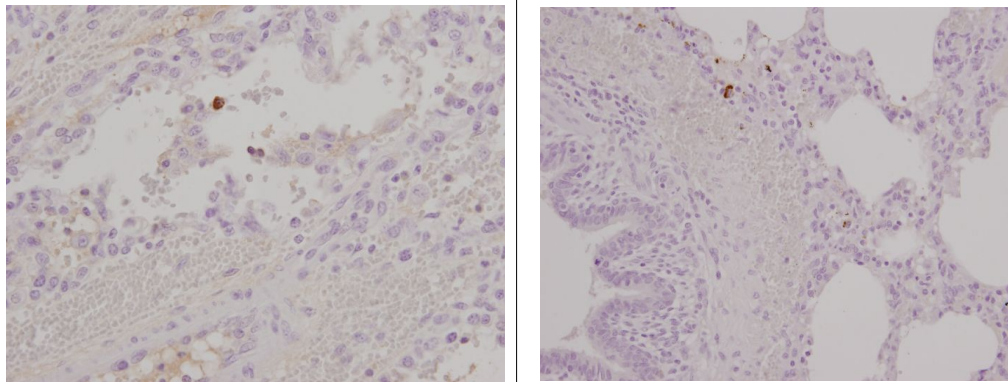
<div style="display: flex; flex-wrap: wrap;"> <div style="width: 50%;"> <p><b>PRRSV</b></p>  </div> <div style="width: 50%;"> <p><b>PCV2</b></p>  </div> <div style="width: 50%;"> <p><b>Pm</b></p>  </div> <div style="width: 50%;"> <p><b>APP</b></p>  </div> </div>	<p>부검 결과 폐에서 전형적인 PRRSV 증상을 확인 하였고 각 조직에서 채취한 샘플로 PCR 결과 및 면역 조직 화학 염색 결과 폐에서 PRRSV 양성을 확인 하였다 PCV2 또한 폐에서 발견 되었으며 APP, Pm 기회감염이 예상되어 PCR로 확인 하였으나 음성으로 확인되었다.</p>
--	--

(3) 조직검사 결과

(가) Komi-NA316(2) 접종돈 면역 조직 화학 염색 : 폐조직



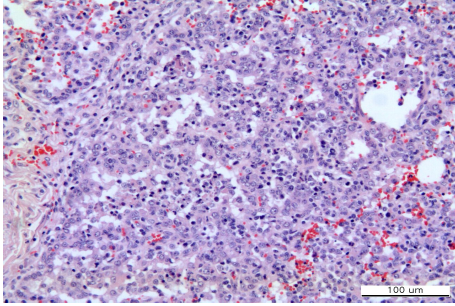
(나) Komi-NA263(2) 접종돈 면역 조직 화학 염색 : 폐조직



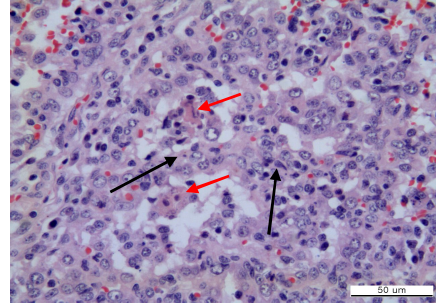
공격 접종 후 2주 후에 폐지를 부검하여 폐조직에 대한 면역염색을 실시한 결과 폐조직에서 바이러스가 검출되었다

(4) 조직 병변 검사

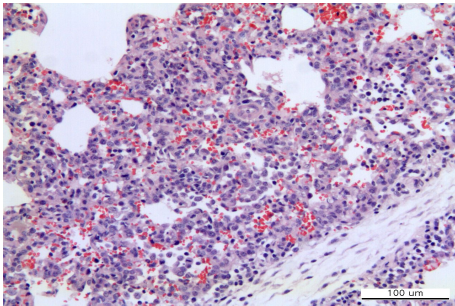
공격접종 2주 후 폐지를 부검하여 장기에 대한 조직 병변검사를 실시하였다.



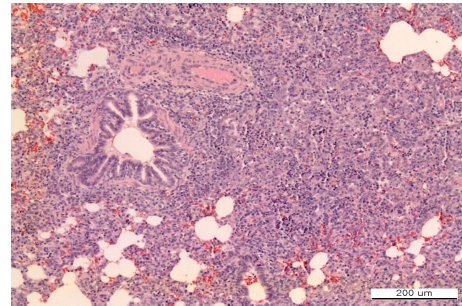
Komi-NA263(1) 접종돈 폐 조직 :폐포벽은 비후 되고, 폐포강내 염증세포가 들어 있다.



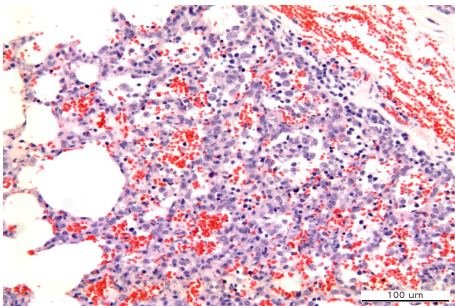
Komi-NA263(1\_ 접종돈 폐 조직 :폐포벽(화살표)은 비후 되고, 폐포강내 염증세포(변성된 세포 및 큰포식세포: 붉은 화살표)가 들어 있다.



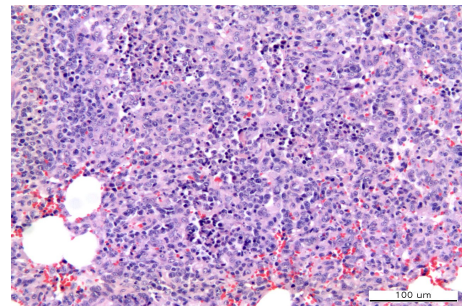
Komi-NA263(2) 접종돈 폐 조직 :폐포벽의 비후와 폐포강 내 염증세포 침윤



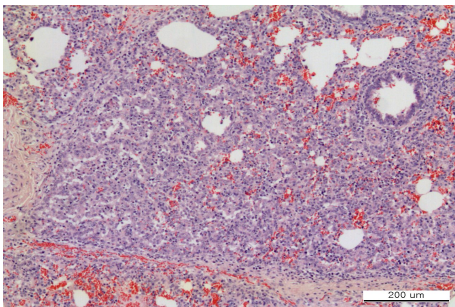
Komi-NA263(2) 접종돈 폐 조직 :세기관지 주위에 림프구가 침윤되어 있고, 간질성 폐렴이 관찰된다.



Komi-NA316(1) 접종돈 폐 조직: 폐포강 내 염증세포는 큰포식세포로 구성되어 있다.



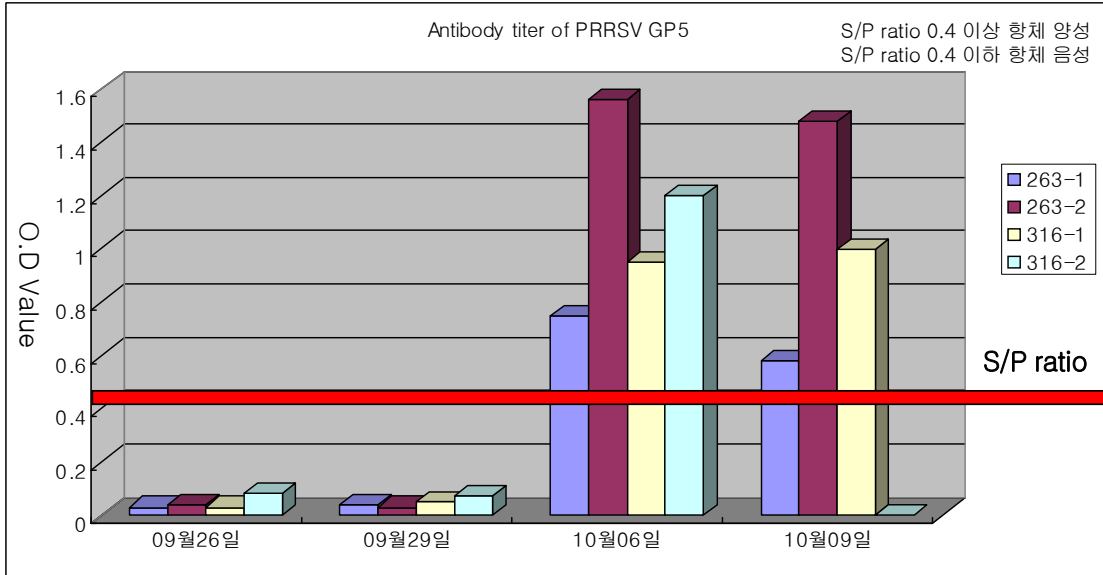
Komi-NA316(2) 접종돈 폐 조직 : 폐포벽은 비후 되고, 폐포강내 염증세포가 들어 있다.



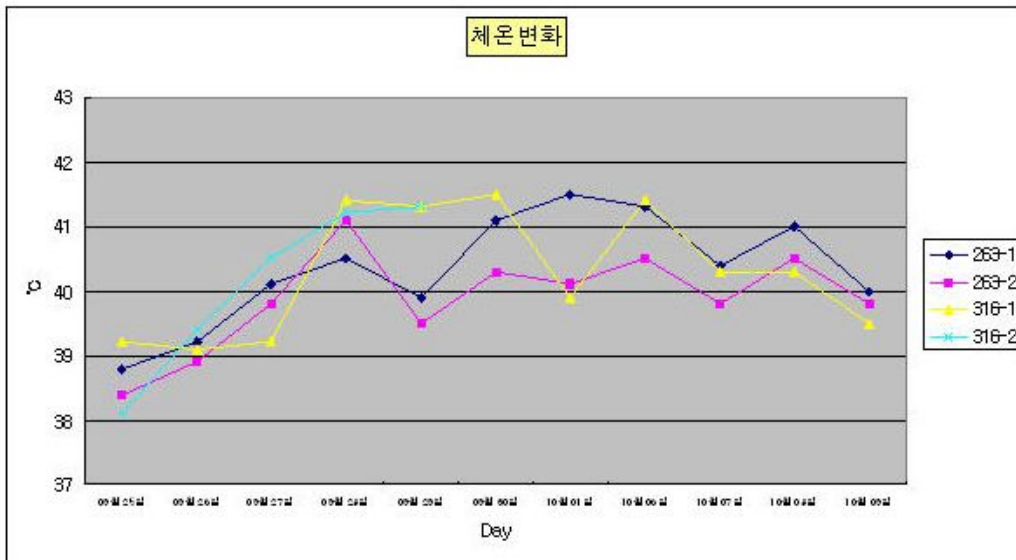
Komi-NA316(2) 접종돈 폐 조직 : 간질성 폐렴 소견이 관찰되고 있다

(5) PRRSV 항체가 확인

항체 생성 기간은 각 개체들마다 약간의 차이를 보였지만 일반적으로 접종후 일주일 이후에 항체 (nucleocapsid specific antibody) 생성이 확인 되었다.



(6) 공격 접종 시험 기간 주 체온 변화를 관찰 하였다.



라. 고찰

No.	Histopathology	Immunohistochemistry
Komi-NA 263(1) 접종돈	간 : 정상적인 간세포와 간 실질이 관찰된다 폐 : 간질성 폐렴 증상 (폐포의 비후와 염증세포의 침윤)이 관찰된다 비장 : 정상적인 비장이 관찰된다 임파절 : 정상이다 신장 : 정상이다	간: - 폐: + 비장: - 임파절: - 신장: -
Komi-NA 263(2) 접종돈	간 : 정상적인 간세포와 간 실질이 관찰된다 폐 : 간질성 폐렴이 보인다. 비장 : 정상적인 비장이 관찰된다 임파절 : 정상이다 신장 : 정상이다	간 : - 폐 : + 비장 : - 임파절 : - 신장 : -
Komi-NA 316(1) 접종돈	간 : 정상적인 간세포와 간 실질이 관찰된다 폐 : 간질성 폐렴이 관찰된다 임파절 : 정상이다 신장 : 정상이다	간 : - 폐 : + 임파절 : - 신장 : -
Komi-NA 316(2) 접종돈	간 : 정상적인 간세포와 간 실질이 관찰된다 폐 : 간질성 폐렴이 관찰된다 임파절 : 정상이다 신장 : 정상이다	간 : - 폐 : + 임파절 : - 신장 : -

Komi-NA263와 Komi-NA316 균주를 이용한 돼지에서의 병원성 실험 결과 감염된 돼지로부터 감염 후 2~3일 후부터 바이러스가 비강과 항문을 통해 배출되었으며 배출은 감염 후 10일이 지나면서 감소하였다. 공격 접종 후 2~3일 후부터 감염된 돼지의 체온이 상승하여 41℃ 이상의 고열을 보였으며 이후 1~2℃ 정도 체온이 감소하였으나 시험기간 중 정상적인 체온보다 높게 형성되었다. 조직 검사를 통한 결과를 볼 때 공격접종으로 인해 폐 조직에서 바이러스 감염이 관찰되었으며 바이러스 감염으로 인한 간질성 폐렴 증세를 보여주었다.

### 3. Fc 표면발현 백신주 제작

본 연구의 일차적인 목표로 기존의 PRRSV 백신보다 향상된 효능을 지니는 PRRS 백신을 개발하기 위해서 Fc 분자를 세포 표면에 안정적으로 발현하는 Marc145-Fc cell line을 우선적으로 확립하여, PRRS 바이러스를 접종한 후, PRRS-Fc 바이러스를 생산하여 Fc 분자로 인한 면역 증강효과를 백신의 효능 향상에 적용시키고자 하였다.

#### 가. Plasmid vector를 이용한 Fc 발현 세포주 생성

Mammalian 세포에 단백질 발현이 가능한 vector를 사용하여 돼지 Fc 분자를 발현하도록 하는 plasmid vector를 미리 제작하였다.

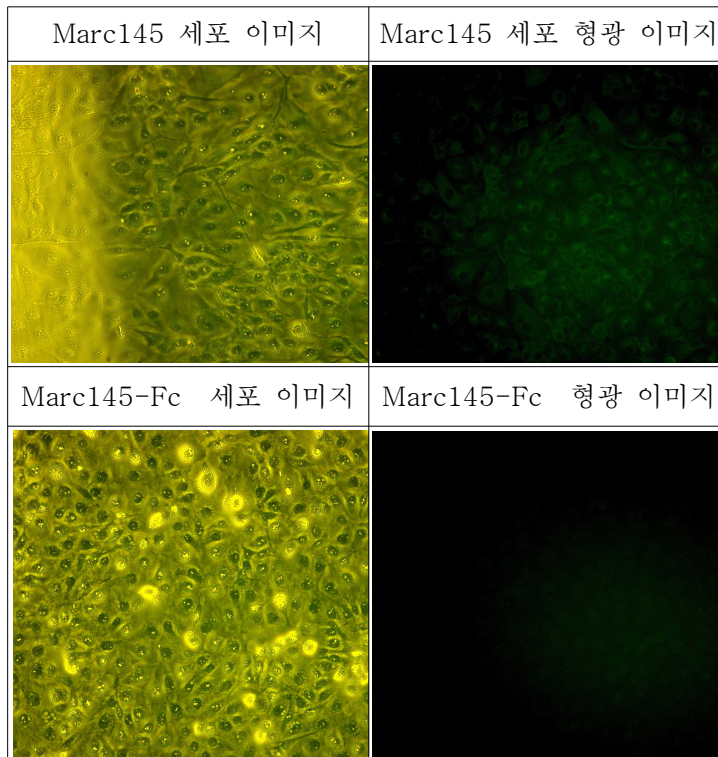
##### (1) Transfection 방법

- ① Marc145 세포를 기존의 media를 aspirator로 제거하고, Opti-MEM 1 ml로 한 번 washing한 후, 800  $\mu$ l의 Opti-MEM을 채워준다.
- ② Transfection 당일, 100  $\mu$ l의 Opti-MEM media를 멸균 ET에 넣은 후, 적당량의 DNA를 넣고 가볍게 섞어준다. (DNA의 농도는 6well 기준으로 well 당 4  $\mu$ g이 적당하다)
- ③ Lipofectamine 2000 reagent를 역시 100  $\mu$ l의 Opti-MEM media에 희석시키고 가볍게 섞어 준다. 그리고 상온에서 20분간 incubation 시킨다. (DNA 4  $\mu$ g당 lipofectamine 2000 reagent는 10  $\mu$ l가 적당하며, 최적의 transfection 조건을 찾기 위해서, DNA( $\mu$ g) : lipofectamine( $\mu$ l)의 농도비를 1:0.5~1:5 까지 다양화 해볼 수 있다)
- ④ 2와 3을 잘 섞은 후, 상온에서 20분간 incubation 시킨다.
- ⑤ 위의 혼합액 200  $\mu$ l를 세포에 잘 점적한 후, 골고루 섞어준다.
- ⑥ 37  $^{\circ}$ C에서 incubation시키고, 5시간 후에 aspirator로 transfection 용액을 제거하고, washing 없이, Vero 세포 배양용 media로 바꿔준다.
- ⑦ 48시간이 경과한 후에 transfection 된 세포를 계대 배양을 통해서 100 mm dish로 옮겨주고, 8 ml의 선택용 배지를 넣어준다. (선택용 배지의 조성은 일반 Vero 세포 배양용 배지에 Zeocin을 500  $\mu$ g/ml 함유하도록 한 것이다. 500  $\mu$ g/ml의 Zeocin 농도 설정 근거는 일반 세포에 Zeocin을 농도별로 첨가하여 세포가 자라지 않고 죽는 농도를 설정한 것이다)
- ⑧ 3일 간격으로 죽은 세포를 제거하고, 선택용 배지를 바꿔준다. 한 번의 계대로 세포가 잘 죽지 않고 colony가 형성되지 않는 경우에 2번, 3번 정도까지 계속 반복해서 계대를 해준다. 어느 정도 안정화되면 5일 간격으로 해도 좋다.
- ⑨ 더 이상 죽는 세포가 나오지 않으면, colony를 selection하여 배양 한다. 처음에는

zeocin 농도를 동일하게 사용하다가 어느 정도 colony가 expansion 되면, 선택용 배지의 zeocin의 농도를 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 줄이고, FBS의 농도를 10 %까지 올린다.

## (2) Cell line 생성 확인

- ① 실험 전 날, 6well plate에  $5 \times 10^5$ 개의 세포를 미리 seeding 한다. Fc를 발현하는 cell line과 그리고 대조군으로 일반 세포가 필요하다.
- ② Marc145-Fc cell line에서의 Fc 발현을 확인하기 위해서는 대조군으로 일반 Marc145 세포를 함께 준비하고, 마찬가지로 Marc145-Fc cell line에서의 Fc 발현을 확인하기 위해서는 일반 Marc145 세포를 함께 준비한다.
- ③ 세포 배양액을 aspirator로 제거하고, well 당 PBS 1 ml로 2회 세척해준다.
- ④  $-20^\circ\text{C}$ 에서 미리 차갑게 해둔 90 % 아세톤 1 ml을 plate 벽면을 통해서 조심스럽게 넣고,  $-20^\circ\text{C}$ 에서 20분간 incubation 시킨다.
- ⑤ 20분이 경과하면 냉장고에서 plate를 빼내서, 90% 아세톤을 pipet으로 빼내고, 실온에서 20분 정도 말려, plate에 남아있는 아세톤을 제거한다.
- ⑥ Well 당 PBS 1 ml로 2회 세척해주고, FITC 가 conjugation 되어 있는 Porcine IgG Fc antibody를 PBS에 1:1000으로 희석하여 well 당 1 ml씩 넣고, Plate를 은박지로 잘 싸 후,  $37^\circ\text{C}$  incubator에서 1시간 동안 배양시킨다.
- ⑦ 1시간 동안 antibody를 붙이고 나면, incubator에서 plate를 꺼내어 pipet으로 항체 희석액을 제거하고, 1 ml의 PBS로 5회 세척해준다.
- ⑧ Plate를 암실로 가져가 형광 현미경으로 형광을 관찰한다.

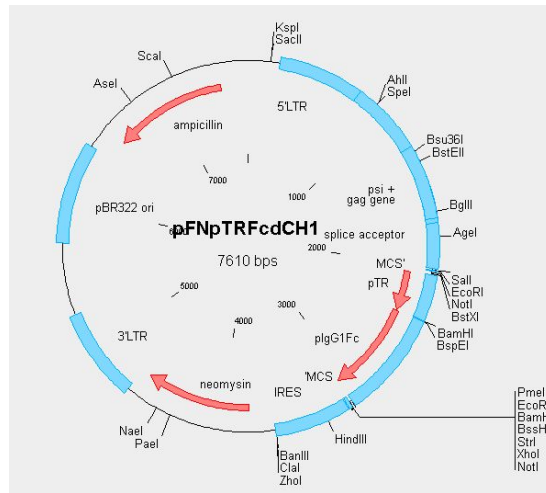


나. Fc 표면발현 세포주 (Marc 145) 작성용 전이벡터를 Retrovirus를 이용하여 세포주 작성

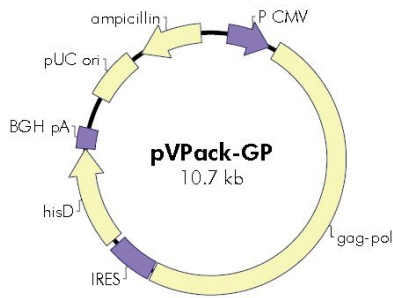
(1) 실험 목적

앞서, Plasmid vector system을 이용하여 Marc145 cell 표면에 Fc 표면 발현 세포주를 작성하였지만 이 세포주에서는 PRRS 바이러스가 증식 되지 않아 Marc 145 세포에 Retrovirus system을 이용하여 Fc 분자를 표면 발현하는 세포주를 작성하였다. pFB-Neo라는 MoMLV based vector에 Pig IgG Fc 유전자르 삽입하여 최종적으로 pFNpTRFcCH1라고 명명된 재조합 레트로바이러스 벡터를 디자인하였고 <그림 1> 레트로바이러스 벡터와 gag-pol <그림 2> 그리고 envelope 발현 plasmid <그림 3>를 한꺼번에 세포에 transfection 하여 바이러스를 얻는 방법을 사용하였다.

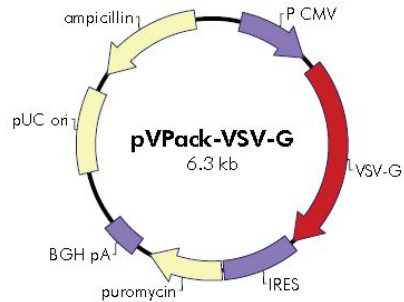




(그림1)



(그림2)



(그림3)

## (2) 레트로바이러스의 생산

- ① 전 날, 100 mm dish에  $6 \times 10^6$ 개의 293 FT cell 을 seeding 한다.
- ② 당일, 5 ml tube에 1.5 ml의 Opti-MEM media를 넣고, 각각 3  $\mu$ g씩의 MMLV based retroviral plasmid (containing gene of interest), pVPack-GP (gag-pol expression vector), Env-expression vector를 넣은 후, 잘 섞어준다.
- ③ 다른 5 ml tube에 1.5 ml의 Opti-MEM media를 넣고, 36  $\mu$ l의 Lipofectamine 2000을 넣고 잘 섞어준 후, 실온에서 5분간 incubation 시킨다. (Lipofectamine 2000은 사용 전에 미리 vortexing 한다.)
- ④ 5분경과 후, 2와 3을 섞고 20분간 실온에서 incubation 한다.
- ⑤ 293FT 세포를 미리 seeding 한 100 mm dish의 media를 제거하고 5 ml의 Opti-MEM media로 1번 washing 해준 후, 5 ml의 Opti-MEM media를 채워둔다.
- ⑥ DNA와 Lipofectamine의 혼합액 3 ml을 잘 집적한다.
- ⑦ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 5시간 동안 incubation 한다.
- ⑧ 세포 상등액을 제거하고, 25 uM의 chloroquine이 함유된 complete media 10 ml로 갈

아준다.

⑨ 6~7시간 동안 37°C incubator에서 추가로 배양한 후, chloroquine이 함유된 complete media를 제거하고, chloroquine을 포함하지 않은 complete media 10 ml로 갈아준다. 다음날 10 ml의 새로운 media로 갈아주고, transfection 후, 48시간이 경과하면 (6의 과정 이후), viral supernatant를 harvest 한다. 3000 rpm, 4°C에서 15분간 centrifuge하여, cell debris를 제거하고, 0.45 µm filter를 한 후, -80°C에서 보관한다.

### (3) Marc 145 세포주의 Fc 유전자 형질 도입 및 cell line 확립

① 전날, Marc145 세포를 6well에  $1 \times 10^5$ 개 seeding 한다. (Density는 20~30%가 적당)

② 실험 당일, 위에서 harvest 한 viral supernatant에 10 µg/ml의 최종 농도가 되도록 DAEA-dextran을 넣는다. (10 mg/ml stock 만들어 1000배 희석)

③ 6well에 seeding 된 Marc145 세포의 media를 제거하고, PBS로 1회 washing 후, 2의 viral stock을 1 ml을 첨가한다.

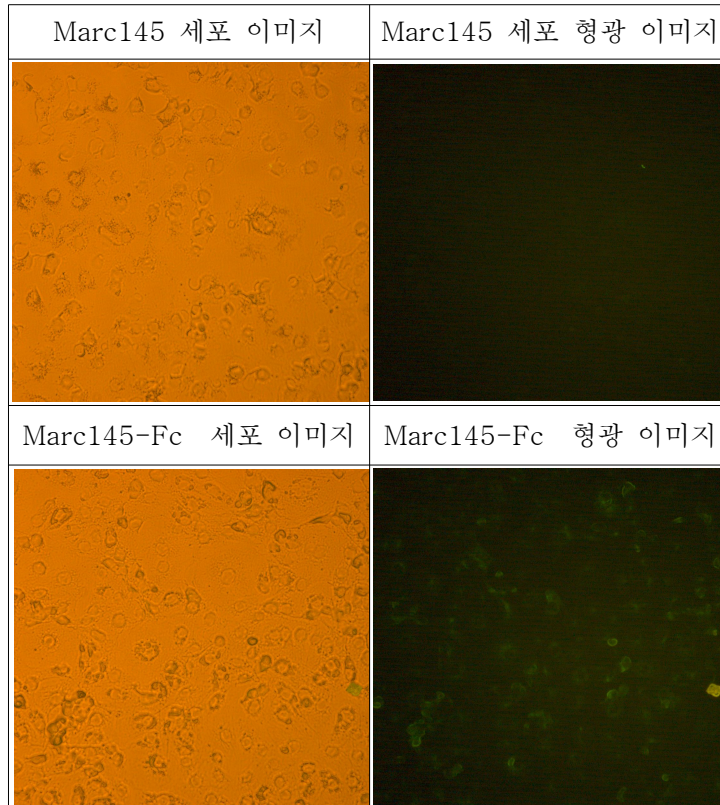
④ 37°C incubator에서 3시간 동안 배양한다.

⑤ 3시간 경과 후, 1 ml의 growth media를 첨가해준다.

⑥ 48시간 동안 배양한 후, 500 µg/ml의 G418이 함유된 RPMI (10% FBS, 1X antibiotics)선택 배지를 사용하여 100 mm dish로 세포를 계대한다. G418이 37°C에서 불안정하기 때문에 3일에 한 번씩 신선한 배지로 갈아준다.

⑦ 5일 정도 경과하면 colony가 형성되는 것을 확인할 수 있으며, 10일 정도 지나면 colony silynder로 selection이 가능할 정도로 colony가 충분히 자란다. 먼저, 24well로 옮겨서 배양한 다음 6well로 옮기고, 다시 75T flask로 옮겨서 점점 양을 늘린다.

⑧ 세포의 양이 충분히 확보되면, FITC conjugated Pig IgG Fc specific antibody를 사용하여 Marc145 세포 표면에 Fc 분자의 발현 유무를 FA 법으로 확인한다. 발현이 확인되면 3~5 번의 반복 계대 과정을 거치면서 Fc 분자가 안정적으로 발현되는지를 최종적으로 확인하고, PRRS 바이러스를 접종시켜 CPE 유무를 관찰한다.



Marc 145 cell 표면에 Fc 분자 발현을 위해 Retroviral system을 이용해 형질변화 결과를 FA method로 확인 한 결과 Comtral cell 에서는 형광이 확인 되지 않았고 Marc 145-Fc 세포에서는 확연한 형광을 확인할 수 있었다.

#### 다. 고찰

Fc 표면발현 Marc145 세포를 사용하여 PRRS 야외 분리주를 배양하려 했으나, 어떠한 이유에서인지 바이러스 접종 후, CPE가 관찰되지 않는 것으로 미루어 Fc 분자가 표면 발현됨으로써 PRRS 바이러스가 정상적으로 세포에 감염되는 것을 방해하거나 혹은, Fc 발현 세포주를 만드는 과정에서 사용된 plasmid vector transfection system이 알 수 없는 영향을 미쳐 PRRS 바이러스의 접종을 방해하는 것으로 생각된다. 이를 확인하기 위해서 아무것도 발현하지 않는 Empty vector를 Marc145 세포에 일시적으로 transfection 시킨 후, PRRS 바이러스를 접종시켜 본 결과, 여전히 PRRS 바이러스가 감염되지 않는 것으로 확인되어 Fc 발현 세포주를 만드는 방법에 변화를 주기로 하고, Retrovirus vector를 이용한 방법을 도입하여 현재 발현을 확인 하였으며 PRRS 야외 분리주를 배양 실험을 진행하고 있다.

#### 4. 단백질 발현 기술을 이용한 백신 개발

Baculovirus system을 이용하여 Recombinant로 돼지의 Fc 분자만을 단독으로 발현시켜 Fc 분자를 얻는 방법과 이미 확립해놓은 Vero-Fc cell line에서 Fc 분자를 lysis 시켜서 Fc 분자를 얻는 두 가지 방법을 사용하여 Fc 만을 따로 수확한 후, 이것을 PRRS 바이러스와 formalin을 이용하여 cross linking 시켜 PRRS-Fc 바이러스를 임의적으로 만들어 백신으로써의 가능성을 평가하였다. Fc 분자의 정량에는 Sandwich ELISA를 사용하였다.

##### 가. 정량 system의 확립

Bethyl Lab에서 구입한 Pig IgG ELISA Quantitation Set를 사용하였다.

##### (1) Plate coating 및 Blocking

- ① 샘플 수에 맞추어 샘플 하나 당 1  $\mu\text{l}$ 의 affinity purified antibody를 100  $\mu\text{l}$ 의 Coating buffer에 희석한 후, microplate에 넣고, 실온에서 60분간 배양하여 coating 한다.
- ② Aspirator를 이용하여 plate에서 antibody를 제거하고, well 당 washing buffer 200  $\mu\text{l}$ 로 5회 세척한다.
- ③ Well 당 200  $\mu\text{l}$ 의 Blocking buffer를 넣고, 실온에서 30분 동안 배양한다.
- ④ 30분 후, blocking buffer를 제거하고, washing buffer로 5회 washing 한다.

##### (2) Standard 와 Sample

- ① Standard curve를 작성하기 위해서 Pig reference serum을 각각 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62.5 ng/ml, 31.25 ng/ml, 15.6 ng/ml, 7.8 ng/ml 그리고 0 ng/ml (blank)로 준비한다. 샘플 및 serum의 희석은 conjugate diluent를 사용한다.
- ② 정량하고자 하는 샘플 또한 standard curve의 범위에 들도록 적당히 희석한다.
- ③ 100  $\mu\text{l}$ 의 standard와 샘플을 이미 coating 되어 있는 well에 넣고, 실온에서 60분간 배양한다.
- ④ 60분 후, standard와 샘플을 well에서 제거하고, washing buffer로 5회 washing 한다.

##### (3) HRP detection antibody

- ① HRP detection antibody를 conjugate diluent에 희석한다. 처음 시작은 1:75,000으로 하고, 500 ng/ml의 standard sample의 OD 값이 1.8~2.2 사이가 나오지 않으면, 희석배

수를 다시 조정한다.

② 100  $\mu\text{l}$ 를 각각의 well에 넣고, 실온에서 60분간 배양한다.

③ 60분 후, HRP detection antibody를 제거하고, washing buffer로 5회 washing 한다.

(4) TMB substrate incubation and reaction stop

① Well 당 100  $\mu\text{l}$ 의 TMB solution을 넣는다.

② Plate를 실온의 어두운 곳에 두고 15분 정도 incubation 하면서 색의 변화를 관찰한다. (점점 파란색으로 변함)

③ 발색이 충분히 되면 100  $\mu\text{l}$ 의 stop solution을 넣고, 반응을 중지시킨다.

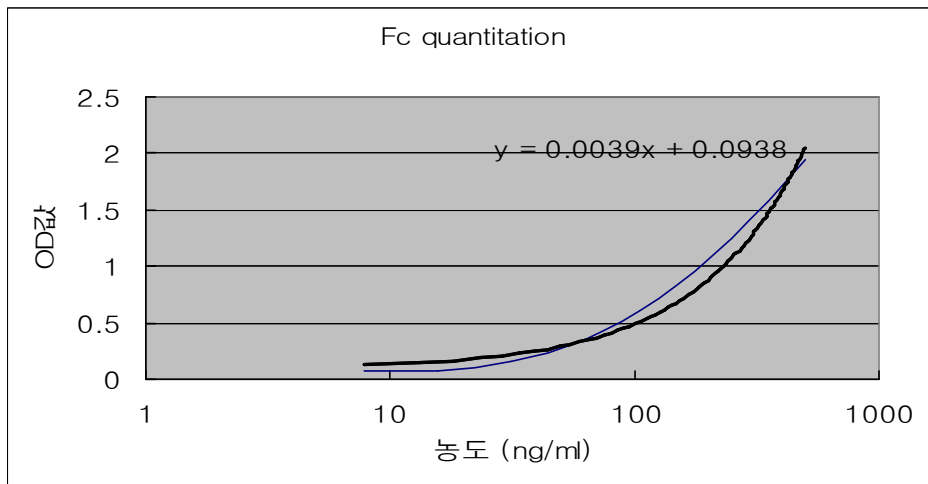
(5) 흡광도 측정 및 결과 분석>

① 반응 중지 후 30분 이내에 450nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

② Standard 결과를 이용하여 standard curve를 작성하고, 거기에 샘플의 OD 값을 대입하여 최종 농도를 도출해낸다.

③ 각 정량때마다 새로운 standard curve를 그려서 사용한다.

예시)



#### 나. Fc cell line 내 Fc 분자 확보 및 정량

175T flask 1개에 monolayer 된 양을 기준으로 세포를 lysis 하였고, 거기에 포함된 Fc 분자의 양을 정량하였다.

##### (1) Fc cell line 내 Fc 분자 lysis

- ① Cell counting을 통해서  $10^7$ 개의 Vero-Fc cell을 준비한다.
- ② 1 ml의 PBS로 잘 suspension 한 후, 액체 질소에서 freeze and thaw 과정을 3번 걸쳐 세포를 충분히 lysis시킨 후, 13000 rpm에서 원심분리하여 cell lysate와 PPT를 분리하고, PPT는 다시 1 ml의 PBS로 잘 suspension 한다.
- ③  $10^7$ 개 Vero-Fc 세포의 cell lysate는 다시  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ 개로 단계 희석하여 각각을 Fc 정량에 사용하였다. (세포수에 따른 Fc 분자량의 경향성을 확인해보기 위해서)

##### (2) 정량 결과

Sample	$10^7$ PPT	$10^7$ cell lysate	$10^6$ cell lysate	$10^5$ cell lysate	$10^4$ cell lysate
총 함량 (ng)	205	165	124	29	25

모든 Fc 분자가 cell lysate로 lysis 되지 않았으며, PPT에 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 실제로 western blot을 해보면, cell lysate에서는 확인되지 않으나, PPT에서 확인이 가능하다. PPT에 좀 더 많은 Fc 분자가 있는 것 같으나 그 양은  $10^7$  (175T flask 1개) 개를 기준으로 205 ng이며, cell lysate와 합친 총 양은 370 ng 정도이다.

#### 다. Baculovirus system을 사용한 recombinant Fc 분자의 확보 및 정량

코미팜 중앙 연구소에 setting 되어 있는 baculovirus system을 사용하여 돼지 Fc 분자만을 recombinant로 단독 발현시켰으며, viral sup으로 soluble하게 Fc 분자가 유리되었다. 부가적으로 농축하는 과정을 거쳐 높은 농도의 Fc가 함유된 viral sup을 얻을 수 있었다.

(1) 정량 결과

Sample	농축전	농축 후 (12X)	flow
농도 (ng/ml)	231	2460	99

라. PRRS 바이러스와 Fc 분자간의 cross linking 및 효능 평가

'나' 와 '다'에서 준비된 각각의 Fc 분자를 formalin을 사용하여 PRRS 바이러스와 cross linking을 시도하였다. PRRS 바이러스와 Fc 분자를 섞은 후 0.1% formalin을 넣고, 4 °C에서 하루 동안 배양하여 시험 백신을 준비하였다.

(1) 실험 그룹

(가) PRRSV NA263 농축 (4마리)

(나) PRRSV NA263 농축 + Recombinant Fc (4마리)

(다) PRRSV NA263 농축 + Fc cell line origin Fc (4마리)

백신을 접종하지 않은 negative control은 각 그룹 당 1마리씩을 전 채혈하여 확보하였다.

(2) 백신의 조성

1 dose 당 1 ml을 기준으로 PRRSV 항원 400  $\mu$ l + Fc 단백질 (혹은 PBS) 400  $\mu$ l + 부형제 200  $\mu$ l (IMS1313) + (포르말린 0.1%) 을 각각 함유하고, 먼저, PRRSV와 Fc 단백질을 포르말린을 이용해 불활화 시킨 후에 부형제를 섞어주었다.

1	Group	PRRSV NA263
	최종 함량 (백신 1 ml 당)	$10^{6.6}$ TCID PRRSV
2	Group	PRRSV NA263 + Recombinant Fc
	최종 함량 (백신 1 ml 당)	$10^{6.6}$ TCID PRRSV + 984 ng Fc
3	Group	PRRSV NA263 + cell line origin Fc
	최종 함량 (백신 1 ml 당)	$10^{6.6}$ TCID PRRSV + 37.4 ng Fc

### (3) 백신 접종 및 샘플 확보

기니픽의 뒷다리 근육에 1차로 백신을 접종하고, 2주 후 2차 추가 접종을 실시하였으며 그로부터 2주 후 최종 채혈하여 혈청을 분리 후, 혈청 내 중화항체와 ELISA 항체를 비교, 평가하였다. 2차 접종하는 과정에서 그룹 2에서 1차 접종과정에서 생겼을 것이라 예상되는 접종 부위의 부종이 발견되었으며, 나머지 그룹에서는 접종 부위에 특이한 이상이 발견되지 않았다. 최종 채혈하는 과정에서 기니픽의 상태를 살펴보니 1차 접종하고 나서 28일이나 경과하였는데도, 처음과 체중의 변화가 거의 없을 정도로 야위어 있었으며 채혈하는 과정에서도 맥이 잘 잡히지 않을 정도로 심장 박동이 약한 기니픽도 있었다. (주로 그룹 2번) 백신의 부작용이라기보다 기니픽의 관리가 원활히 이루어지지 않은 이유로 판단된다.

### (4) 중화항체 측정 및 결과

- ① 혈청 희석 : 96 well microplate에 60  $\mu$ l의 RPMI(-) media를 각각 넣고, 첫줄에 60  $\mu$ l씩의 비동화시킨 혈청을 넣은 후, 2배씩 26까지 serial dilution 시켰다.
- ② Virus 준비 :  $10^6$ TCID<sub>50</sub>/ml의 NA263 stock을 사용하였고, 300배 희석하여 (300 ml의 RPMI(-) media에 100  $\mu$ l의 virus stock을 희석) 333TCID<sub>50</sub>/0.1 ml의 농도가 되게 희석하였다.
- ③ 중화반응 : 희석시킨 virus 60  $\mu$ l 를 (최종 200TCID) 희석된 각각의 혈청과 1:1로 동량 반응시키고, 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시켰다.
- ④ 세포에 접종 : 1시간 중화반응이 끝나기 전, 세포를 well 당 150  $\mu$ l의 RPMI media로 한 번 washing 하고, 중화반응이 끝난 혈청과 바이러스 혼합액을 100  $\mu$ l 취하여 각각의 well에 접종하고, 37°C incubator에서 1시간 30분 동안 감작시켰다.
- ⑤ 세포 관찰 : Media를 갈아주기 전에 세포의 상태를 관찰하였다. 혈청을 분리하는 과정에서 혈구가 깨지는 경우, 세포의 응집이 종종 일어나기 때문에, 나중에 결과를 도출하는데 있어서 문제가 생길수도 있기 때문이다. 관찰 결과, 1-1, 1-2, 1-3 번 샘플에서 2배, 4배, 8배 혈청 희석액에 의해서 세포의 응집이 일어났으며, 1-4 번 샘플의 경우 2배 혈청 희석액에서 세포 응집이 생겼다. 3-2, 3-3, 3-4 번 샘플의 경우에는 2배 혈청 희석액에서 세포의 응집이 생겼다. 이들 샘플의 경우는 중화항체를 도출하기에 어려움이 있을 것 같다.
- ⑥ 중화항체가 결정 : 실험 4일 후에 세포의 CPE를 관찰하였다.



		2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	N.C	P.C	중화 항체
1. PRRSV	1-1	*	*	*	+	+	+	-	+	≤ 8배
	1-2	*	*	*	+	+	+	-	+	≤ 8배
	1-3	*	*	*	+	+	+	-	+	≤ 8배
	1-4	*	+	+	+	+	+	-	+	≤ 2배
2. PRRSV + Recombinant Fc	2-1	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배
	2-2	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배
	2-3	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배
	2-4	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배
3. PRRSV + cell line origin Fc	3-1	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배
	3-2	*	+	+	+	+	+	-	+	≤ 2배
	3-3	*	+	+	+	+	+	-	+	≤ 2배
	3-4	*	+	+	+	+	+	-	+	≤ 2배
Control	N.C1	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배
	N.C2	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배
	N.C3	+	+	+	+	+	+	-	+	0 배

\* : 세포 응집으로 인해 CPE 관찰 못함

+ : CPE 관찰됨

- : CPE 관찰안됨

몇몇 그룹에서 혈청 분리과정에서 혈구가 깨어져 그로 인해 세포의 응집이 일어나 중화항체를 결정할 수 없었지만, 경향 상 모든 그룹에서 중화항체는 0으로 판단해야 할 것 같다. 모든 그룹에서 CPE가 발생하지 않을 정도로 바이러스를 중화시키진 못하였고, 다만, 그룹간에 세포의 차이는 좀 있었다. CPE가 모두 나오긴 하였으나, Control 그룹에서 세포가 가장 많이 손상을 입었고, Recombinant Fc 와 함께 접종한 그룹 또한 세포에 손상을 많이 입었습니다. PRRS 단독 접종군은 세포 응집이 많이 일어나서 비교가 좀 힘들었고, 그나마, cell line에서 분리한 Fc와 함께 접종한 그룹이 CPE는 보였지만, 전체적으로 건강한 세포의 비율이 좀 더 많았다. 결론적으로, 기니픽 중화항체 실험결과로는 Recombinant Fc 나, 세포에서 유래한 Fc 분자가 PRRSV에 대한 중화항체를 높이는 데 기여를 하지 못한 것으로 판단된다.

(5) ELISA 항체 측정 및 결과

IDEXX PRRS virus antibody kit를 사용

① Antibody coating 된 plate는 그대로 사용하였고, HRP conjugation 되어있는 2차 antibody는 kit에 포함되어 있는 Porcine이 아닌, 기니픽에 대한 antibody로 대체하여 (1:500 희석) 사용하였다.

② 혈청 희석 : 혈청은 10배, 20배, 40배로 희석하여 각각에 대해서 실험을 진행하였다.

혈청희석	10배	10배	20배	20배	40배	40배
Coating Ab	PRRS	NHC	PRRS	NHC	PRRS	NHC
1.PRRS	0.104	0.042	0.097	0.042	0.092	0.042
	0.129	0.046	0.127	0.046	0.122	0.044
	0.136	0.041	0.146	0.042	0.148	0.042
	0.096	0.043	0.091	0.043	0.088	0.043
2. PRRS + Recombinant Fc	0.054	0.042	0.047	0.041	0.045	0.042
	0.091	0.042	0.073	0.041	0.06	0.04
	0.119	0.041	0.104	0.042	0.086	0.041
	0.135	0.044	0.127	0.044	0.038	0.04
3. PRRS + Cell origin Fc	0.09	0.043	0.086	0.043	0.084	0.042
	0.138	0.045	0.123	0.04	0.111	0.045
	0.077	0.043	0.067	0.041	0.058	0.042
	0.133	0.045	0.125	0.044	0.127	0.042
4. N.C	0.043	0.045	0.042	0.042	0.044	0.045
	0.043	0.044	0.041	0.043	0.044	0.044
	0.042	0.044	0.04	0.066	0.045	0.045

전 채혈을 통해서 확보한 negative control은 보정값 (NHC)과 비슷한 수준으로 가장 낮은 OD값을 보였으며, PRRS 만을 접종한 그룹에서 2.6배 정도 항체가가 증가하였고, Recombinant Fc를 함께 접종한 그룹은 2.3배, 세포에서 분리한 Fc를 함께 접종한 그룹은 2.5배 정도 항체가가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로, 그냥 PRRS만을 접종한 그룹들보다 Fc 분자를 함께 접종한 그룹에서 항체가가 더 낮게 나왔으며, 그중에서도 Recombinant Fc를 함께 넣어준 그룹이 가장 낮은 항체가를 보였습니다. 이 결과는 중화항체 실험에서 세포의 손상 정도와도 패턴이 동일하였다.

## (6) 최종 결론

이번 기니픽 실험을 통해서 결과적으로는 PRRSV에 대한 항체 혹은 중화항체 형성에 있어서 Fc 분자가 긍정적인 영향을 미치지 못하였지만, 실험 내적으로 몇 가지 문제점이 발견되어 Fc 분자의 효능을 결정짓기에는 충분치 못한 결과이다.

첫 번째로, 포르말린을 통한 PRRS 바이러스와 Fc 분자간의 cross linking이 정확히 확인되지 않았으며, 둘째로, 최종 채혈할 당시에 기니픽 무게가 처음 들어왔을때와 비슷하였는데, 대조군에서도 그런 것을 보니 접종한 백신에 문제가 있었던것 같진 않고, 사육 환경상에서 좀 문제가 있어서 기니픽의 상태가 많이 안 좋았던 것 같다. 그래서 평소에 나오던 항체가보다도 3배 정도 낮게 ELISA 항체가가 측정되었다.

또한 발현된 Fc 분자가 얼마나 바이러스 분자 표면에 cross-linking 되었는지 정량적인 확인이 되지 않아 실험 결과의 판단이 어려운 상황이었다.

따라서 Fc 분자 발현을 통한 바이러스 표면에 cross-linking 실험은 보다 정확한 실험 디자인을 통해 다시 시도해 볼 필요가 있을 것으로 예상된다.

### 3절 Fc 분자발현 양돈용 백신의 경제성 분석

#### 1. 국내외 PED 바이러스의 분포 동향 및 PED 백신 시장 규모 변화 파악

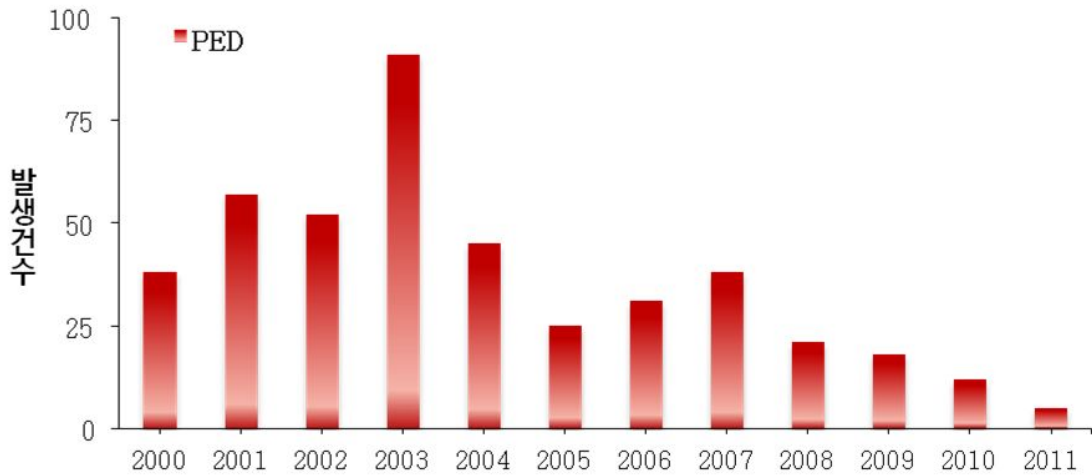
양돈업은 국내 축산업 중 다른 축종에 비해 국제 경쟁력이 높은 것으로 조사된 바 있다. 그러나 최근 이들 양돈 농가의 고충을 들여보면, 생산성을 저하시키는 질병을 가장 큰 걸림돌로 제기하였다. 생산성을 저하시키는 질병 중, PED는 코로나 바이러스가 원인체로서 주로 어린자돈에서 설사병을 유발하고 모든 유즙항체를 부여받지 못한 자돈은 대부분이 폐사하게 되는 등 평균 산자수 대비 평균 이유두수의 감소로 양돈 농가에 큰 피해를 끼치고 있다. TGE와 발병증상이 아주 유사하나 전파속도, 폐사율에서 약간 낮은 경향을 가지고 있다. PED는 전 세계적으로 발생하고 있으며, 추운겨울에 다발하지만 요즘 들어서는 연중 발생하고 있다. 전파는 PED에 오염된 사료, 물, 분변 등에 의해 경구적으로 감염되며 감염된 돼지의 이동, 오염된 차량, 장화, 작업기구 등에 의해 급속히 전파되는 것으로 알려져 있다. 과거에는 대개 2주 정도면 농장에서 자연적으로 소멸되었으나 최근에는 1달 이상 지속되는 양상을 보인다. 최근 6년간 돼지 설사병의 발생동향을 살펴보면 다음과 같다.

돼지의 주요 전염병 발생 동향

단위: 발생두수(발생건수), %

연도 병명	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
돼지열병 (콜레라)	406 (13)	5,866 (72)	781 (9)	811 (5)	1,074 (2)	58 (5)	99 (7)	316 (2)	0
오제스키병	1,792 (50)	355 (30)	2,826 (37)	2,912 (19)	2,343 (7)	82 (2)	287 (-)	23 (-)	0
일본뇌염	1 (1)	10 (2)	1 (1)	27 (4)	7 (1)	1 (1)	0	0	0
돼지유행성설사	22,068 (52)	40,377 (91)	9,195 (45)	3,652 (25)	10,258 (31)	13,724 (38)	12,531 (21)	6,850 (18)	3,092 (12)
인플루엔자	-	-	-	-	-	-	-	187 (11)	144 (8)
구제역	398 (16)	0	0	0	0	0	0	0	477 (84)

자료: 국립수의과학검역원 AIMS 가축전염병 발생통계



돼지 유행성 설사병 발생현황

1999년부터 2000년까지 2년간 검역원 병리진단과에 설사병으로 의뢰된 가검물에 대한 원인진단 결과에 의하면 대장균증에 의한 설사를 제외하면 유행성설사병(PED)이 가장 많은 비율을 차지하고 있음을 알 수 있다. 10여년 가까이 문제가 돼온 PED는 이를 막기 위해 백신접종과 차단방역 등 다양한 해결책이 제시됨에도 불구하고 수년째 가장 높은 발생률을 보이고 있다. 10여 년간 매년 비슷한 수준으로 발생하고 있어 2000년을 시작으로 매년 작게는 20여건에서 많게는 90여건까지 그 건수가 줄어들지 않고 있는 상황이다. 실제로 국립수의과학검역원 가축전염병 발생자료 관리시스템(AIMS)에 따르면 돼지 질병 중 가장 높은 발병 양상을 보인 질병은 PED로 2006년 1만 258마리, 2007년 1만 3,724마리에 이어 지난해에는 1만 2,531마리에서 발생했고 올해도 상반기에 이미 6000마리 이상을 넘긴 상태다. 그러나 이마저도 정확한 발생건수라고는 볼 수 없다. 업계에 따르면 2종 법정전염병이던 PED의 경우 농가가 신고를 기피하는 현상이 만연, 3종 법정전염병으로 바뀌었음에도 불구하고 농가들이 신고를 꺼리고 있어 실제로는 발생률이 더 높을 것으로 보고 있다.

PED의 경우 생후 1주령 미만의 신생자돈에서는 탈수가 심하고 3~4일정도 설사를 하다가 폐사되며, 폐사율은 50%이지만 심할 경우에는 90%에 이르기도 한다. 문제는 PED가 바이러스성 설사로 세균성 설사병에 비해 폐사율이 높다는 데 있다. 생후 10일 이하의 포유자돈에서 전염성위장염이나 PED가 발생하면 최소 20~30%, 심한 경우에는 80~90%의 폐사를 초래, 농장을 초토화시킨다고 해도 과언이 아니다. 특히 PED는 포유기 후기를 시작으로 이유기 전반에 걸쳐 감수성이 미약하며 폭발적이고 산발적으로 질병이 발생한다. 가장 큰 문제는 연중 발생한다는 것이다. 바이러스가 분변 등을 통해 농장에 상존, 계속적으로 문제를 일으킨다.

돼지 질병의 주요 변수 요약

변수	질병			
	PRRS	PED	PMWS	CSF
발병률 (%)	100	육성 이전: 100 이후: 15~90	5~50	100 (5주령까지는 비발생)
호발연령	모든 연령	모든 연령	이유~육성초기	모든 연령
발생시기	봄, 여름 다발	동절기 다발	봄처 다발	연중 발생
발생률 <sup>1)</sup>	15~34.2두	41.6~445.2두	0.7~3.0두	8.6~64.8두
혈청 항체양성률 (%)	양돈장: 59.1~94.9 돼지: 21.0~59.3 항원검출: 24.0~40.7	돼지: 45.0~50.4 양돈장: 47.6 (대한양돈협회 자료: 98.3)	돼지: 50.3~60.8 양돈장: 100.0	돼지: 95 이상 (백신) 항원검출: 0.12 (농장기준)
폐사율 (%)	신생자돈: 100	신생자돈: 50~100 10일령이상 자돈: 10 비육돈: 1~3	자돈: 40~100	100
백신접종	접종	접종	비접종	접종

1) 100,000두 기준으로 국립수의과학검역원 AIMS 자료 이용(2003~2005년)

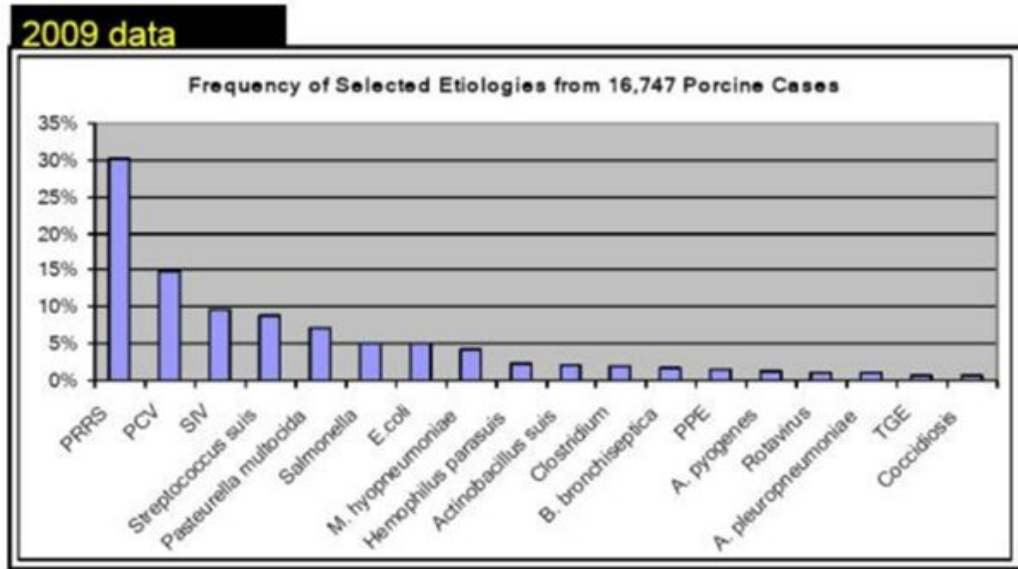
PED로 인한 양돈 산업의 피해액은 연간 500~670억원 정도이며, 그 중 경제적 손실은 직접피해와 간접피해 효과로 구분될 수 있다.

가축질병별 농가 직접손실액 추정

		단위: 억원	
구분	구분	피해 금액	총 피해액
소	부르셀라병	673.9	1,117.9
	소결핵병	5.2	
	요네병	438.8	
돼지	돼지열병(콜레라)	16.6	79.4
	호흡기생식기증후군	9.5	
	유행성설사병	53.3	
닭	뉴캐슬병	8.6	8.77
	추백리	0.17	

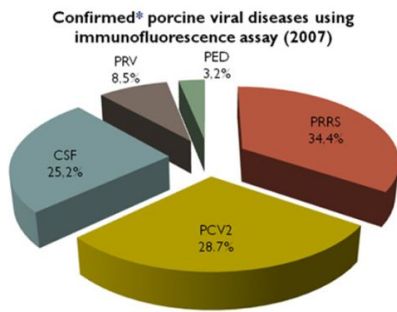
자료: 송주호외 (2006), 가축질병의 경제적 영향분석

PED는 유럽에서 최초로 보고되었고, 미국에서는 발생보고가 없다. 현재는 한국, 중국, 일본, 필리핀, 대만 등 아시아 지역에서 지속적으로 발생이 보고되고 있다. 대만은 2007~2008년까지 8개 지방을 분석하여 33개의 바이러스를 분리하였으며 (Emerg Infect Dis. 2009, 15: 1112~1115), 중국에서는 PED에 면역된 돼지에서 재감염되는 사례도 보고되었다 (Arch Vriol. 2010, 9: 1471~1476).

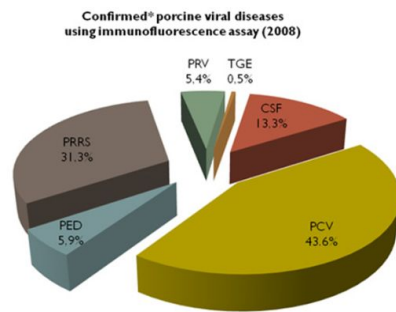


미국의 돼지 질병 발생 빈도

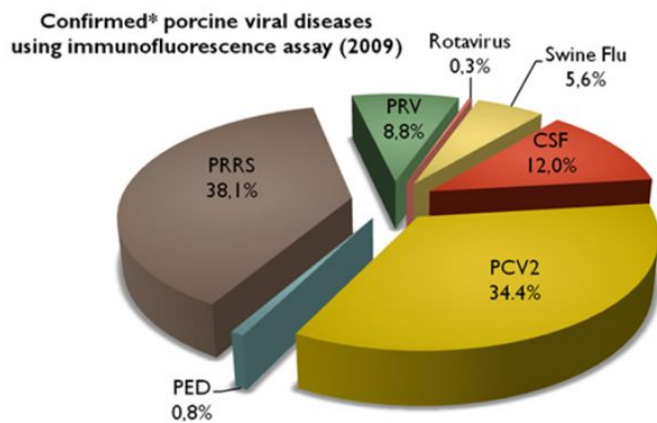
PED 백신 시장 규모를 파악해보면 국내 축산산업 중 돼지가 차지하는 비율이 가장 크며 육류소비량에서도 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 수입개방으로 인한 사육두수의 정체에도 불구하고 소비자의 국산 선호도 증가로 국내 양돈 산업은 향후 발전 가능성이 크다고 본다. 사육규모면에서 볼 때에도 1977년 148만두에 비해서 2002년 12월 약 6배 이상 증가한 897만두이며, 1,000두 이상 키우는 전업농가는 2000년 12월 2,340호에서 2002년 12월 2,950호로 예전의 소규모 영세사육형태가 최근의 통계자료만 보더라도 매년 대단위 집약사육형태로 변화되고 있는 추세로 파악되고 있다. 하지만 대단위 집약사육에 있어서 문제점은 질병이 발생하면 농장 전체 또는 전국적으로 확산되어 추정이 불가능할 정도의 막대한 경제적 피해가 발생된다는 점이다. 특히 우리나라는 일본으로의 돼지고기 수출량이 꾸준히 증가됨에 따라 양돈산업의 규모도 점진적으로 증대되고 있지만, 돼지콜레라, 구제역 등과 같은 질병 발생으로 인하여 돼지고기 수출에 심각한 타격을 안겨주고 있다. 하지만 대단위 집약사육에 있어서 문제점은 질병이 발생하면 농장 전체 또는 전국적으로 확산되어 추정이 불가능할 정도의 막대한 경제적 피해가 발생된다는 점이다.



Source: Philippine Animal Health Center

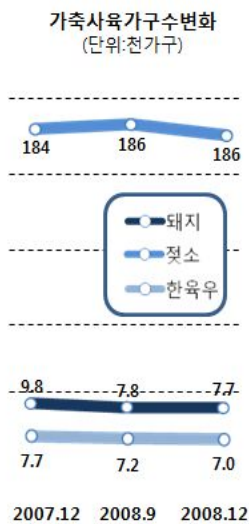
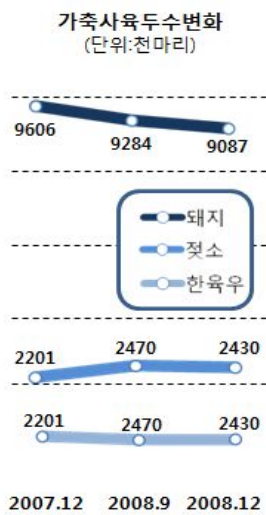


Source: Philippine Animal Health Center

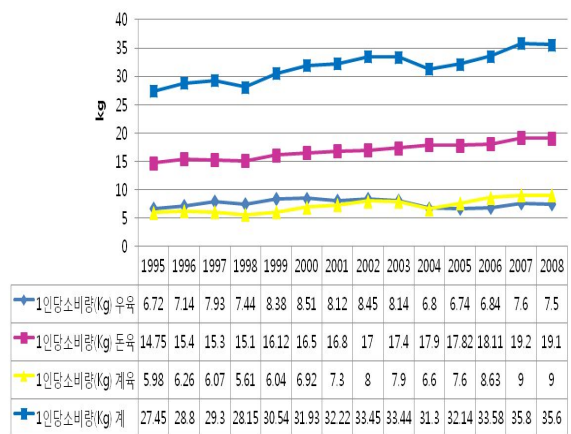


Source: Philippine Animal Health Center

### 필리핀의 돼지 발생 현황



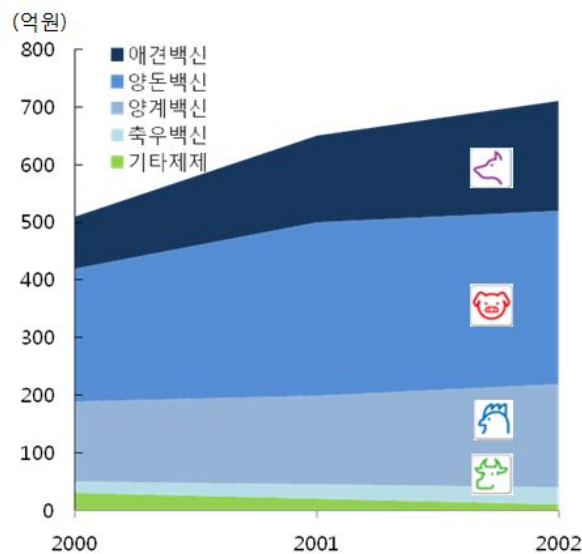
가축 사육두수 변화  
(2008년도 통계청자료)



육류 소비량 (월간 PIG 8월호)



축종별 생물학적 제제의 시장규모를 살펴보면, 국내 백신시장의 규모는 약 1,180 억원으로써 지속적인 성장률을 보였으며, 연평균 성장률(2000~2002)이 애견백신은 56.5%, 양돈백신 2.2%, 양계백신 33.6%, 축우백신 39.6%을 기록하였다. 이는 양돈백신이 차지하는 비율이 컸으며, 안정적인 백신 수요를 형성했다고 볼 수 있다. 치료중심에서 예방중심이라는 인식의 변화를 통해 백신수요는 점진적으로 증가하고 있으며, 외식산업의 성장으로 육류소비가 지속적으로 늘어날 전망이다 가운데 새로운 전염병들이 출현하고 있어서 동물백신의 수요는 계속해서 증가할 전망이다.



축종별 시장규모

PED 백신의 한국내 시장상황은 PED 생백신과 PED를 비롯 TGE, ROTA 등 돼지 설사병의 원인이 되는 다른 바이러스성 질병과 같이 혼합백신으로 만들어져 사용되고 있다. PED의 국내업체의 각 점유율은 전체 동물백신 시장에서 약 6.7~7.5%의 점유율을 나타내고 있다. 국내업체에서 생산하는 PED 백신은 크게 경구용과 주사용으로 나뉘지며 대부분이 모돈접종을 실시하며, 분만 5주전에 1차 접종을 할 것과 분만 2~3주전에 2차 접종을 할 것, 매 분만마다 2회 접종을 할 것을 권하고 있다. 또한 생독과 사독을 교차백신할 것을 권하고 있다. 국내에서는 5개 백신업체에서 생산을 하고 있는데, 녹십자수의약품의 경구용 PED 백신은 국내유일 경구용 백신으로 점막면역을 자극하여 IgA를 효과적으로 유도해 PED를 예방하는 백신이다. 대성 미생물연구소의 TP혼합 오일백신은 국립수의과학검역원과 공동개발한 혼합 오일사백신으로 강력한 면역증강제를 사용해 모돈에 접종하면 자돈에 높은 수준의 모체이행항체를 제공, 돼지의 TGE(전염성위장염)와 PED를 예방하는 백신이다. 오일백신으로 항체 형성능력이 우수하고 안전성과 면역증가 효과가 우수한 특수 보존제를 사용해 제조한 것이다. 이것은 혼합백신으로 접종 스트레스를 줄이고 안전성을 높이는 것이 특징이다.

국내 시판 제품 및 매출액

구분	제제 정상	2008년 매출액	백신명	백신 정상
국내	생단일백신	2억5천 7백9십만원 (5개사 6제품)	녹십자수의약품 경구용 PED	
			중앙백신연구소 수이샷 PED	
	생혼합백신	1억3천만원 (5개사 5제품)	코미팜 돼지유행성설사 예방백신	
			고려비엔피돈사방 -TPR	
			대성 미생물연구소 PED	
	국외	생단일백신	1천6백만원	니찌세이젠, 바이엘코리아 바이오백

고려비엔피의 돈사방-TPR 생백신과 돈사방-PT를 생산하고 있다. 돈사방-TPR 생백신은 국내에서 최신 분리된 PED 바이러스로 제조하여 최근 유행하는 PED를 방어하는데 효과적으로 보이며, TGE와 로타 A형을 동시에 예방할 수 있는 장점이 있다. 돈사방-PT는 사독백신으로 높은 IgA 모체이행항체를 유발시키며 고농도 면역증강제 함유로 높은 항체가를 형성하는 것으로 알려져 있다. 중앙백신연구소의 수이샷 PED 백신 시리즈가 있다. 이중 수이샷 PED는 단일 PED 생독백신으로 모돈에 접종해 모체이행항체를 통해 자돈의 설사를 예방하는 것이다. 수이샷 PTR 2는 최초의 PED, TGE, 로타바이러스의 혼합 생백신으로 모돈 접종용이다. 수이샷 PT-100은 국내 최초 PED, TGE 혼합사독백신으로 세포성면역과 체액성면역을 동시에 유도한다고 알려져 있다. 코미팜은 독자 개발한 동결건조방식을 채택한 생건조백신 PED-VAC으로 면역시스템이 불완전한 신생자돈의 설사병을 예방할 수 있도록 하고 있다. 효과적인 PED 바이러스를 선별해 조직배양 세포에서 순화한 생백신이기 때문에 현장적용력이 높다고 알려져 있다. TP-VAC은 TGE와 PED를 동시에 예방할 수 있는 혼합백신으로 특수 면역 증강제 사용으로 면역이 활성화

화된데다 임신모든에 충분한 항체를 형성, 자돈에서 효과적인 방어력을 형성한다고 알려져 있다.

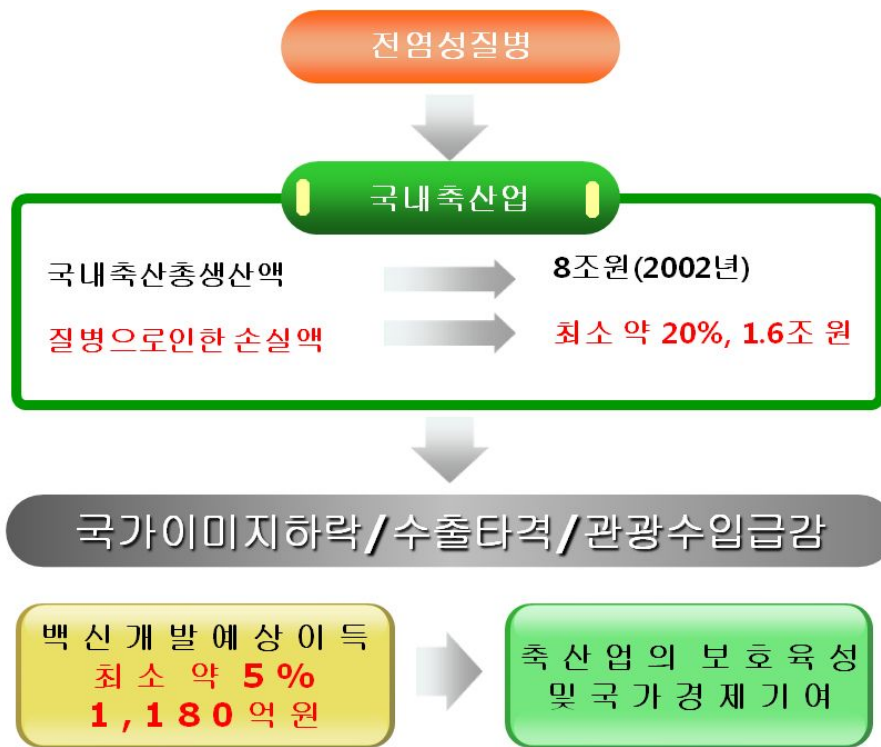
최근 PED 바이러스의 국내 변이주가 존재하는 것으로 알려져 있어 농가에서 백신의 효능에 의문점을 제기하는 상황이고 현행 유통되는 백신이 유효성이 없거나 역가가 부족하다기 보다는 정확한 접종횟수를 지키지 않아 백신의 효과가 없다고 생각하는 경향이 있으며, 이를 개선하기 위한 방법을 모색하고 있다.

## 2. Fc 분자 발현 PED 백신의 경제성 분석

기존의 불활화 백신(Killed vaccine) 및 약독화 순화 백신 (Live attenuated vaccine)으로는 가축 질병 퇴치 과정에 있어서 여러 가지 문제점과 한계점이 있기 때문에, 다양한 기술을 이용한 백신의 개발에 더욱 박차를 가할 필요가 있다. 백신접종의 문제점으로는 백신 자체의 함유 미생물 성분 또는 백신의 어쥬번트(Adjuvant : 면역보조제, 백신의 면역 자극을 돕기 위해 첨가하는 물질로 수산화알루미늄염, 미네랄 오일 등이 사용됨) 등에 기인하는 것으로 보이는 국소적인 접종반응(부종, 염증, 괴사 등)과 전신적인 접종반응(발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 식욕불량) 및 심한 경우 임신 모돈에서 유·사산 등의 부작용도 나타날 수 있다. 어떤 주사용 백신이든 주사를 위한 보정과정, 접종 시 통증, 접종 후 면역반응 및 백신 투여 후 백신 약제의 통증 유발 등으로 미약하거나 심하거나 백신을 접종받는 개체는 스트레스를 받게 된다. 국가 간의 교류가 급속히 확대되고 가축전염병의 국경 개념이 더욱 희박해지는 상황에서, 국가 간의 기술개발 경쟁은 더욱 치열해지고 있고 기술 선점을 위한 지적 소유권도 더욱 강화되고 있는 것이 세계적인 추세이다. 따라서, 우리도 기존의 전통적인 백신 제조방법과 첨단 분자생물학적 방법을 잘 조화시킴으로써 부작용을 최소화하고 효능을 극대화한 백신의 개발에 총력을 기울이고 있다.

현행 PED 백신은 생백신과 불활화 백신을 적절히 안배를 하여 경산돈에서는 LKK(생독 접종 후 사독백신 두 번 접종), 후보돈에서는 LLKK(생독백신 두 번 접종 후 사독백신 두 번 접종)의 방식을 취할 것을 권하고 있다. 이러한 백신 시스템은 번거롭고, 농장에서 정확한 접종횟수를 지키는 것은 수월하지 않았다. PED 질병이 지속되는 농장의 경우에 예상할 수 있는 직접적인 자돈폐사 손실을 등을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다. 예를 들면, 모돈 100두 규모 농장의 경우에서 자돈폐사에 의한 직접손실 예상액만 해도 연간 PED에 의해 300두가 폐사한다면  $6\text{만원} \times 300\text{두} = 1,800\text{만원}$ (04년 3월 자돈가 기준)에 이르는 높은 수준이다.

종전에 백신개발에 많이 사용해 오던 유전자 재조합기술을 이용해 항원단백질의 대량생산이나 또는 바이러스 자체의 유전자를 이용하는 형태의 제품으로 안정성에 문제가 있을 수 있다.



국내 축산업의 질병으로 인한 손실 및 예방백신 개발의 중요성

그러한 모색 방법의 하나로 백신의 효율을 증강시키며, 경제성 있는 백신을 개발하기 위해 본 과제를 수행하였다. 백신 항원 전달체계를 위해 현재 사용 중인 동물용 Adjuvant(면역보조제)로는 수산화 알루미늄 겔, 동물 또는 식물 유래의 오일, 미네랄 오일 등이 주로 사용되고 있으나 세포성 면역유발 효과가 떨어지는 단점이 있다. 최근에는 세포성 면역 증강의 효과가 있는 다당체인 Quilaza saponin,  $\beta$ -glucan, lectin 등을 첨가함으로써 불활화 백신의 효과를 높이는 기술이 개발되고 있다. 하지만 면역증강제가 첨가된 백신은 주사 후에 과민반응을 일으킬 수 있음이 알려져 그 사용범위가 넓지는 않다. 이런 단점을 해결할 수 있는 방법으로, 새롭게 생체내 기능이 밝혀진 항원제시 세포인 수지상세포(Dendritic cell)의 Fc 수용체에 특이적으로 항원을 결합시킬수 있는 liposome, virosome 등이 연구되고 있다. 수지상 세포의 Fc에 특이적으로 결합된 항원은 Phagocytosis를 거쳐 체액성 면역과 세포성 면역을 동시에 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이번 연구팀이 개발한 백신의 특징은 면역력을 증가시키기 위하여 Fc분자를 바이러스 배양에 사용되는 동물세포 표면에 발현시키고, 이 세포에 바이러스가 감염된 새로운 바이러스가 생산되어, 자연스럽게 동물세포막을 바이러스표면에 전달하면서 발현된 Fc분자가 바이러스 표면에 발현됨으로서 바이러스에 직접적인 조작을 가하지 않고서 분자조작 바이러스를 생산해 낼 수 있는 특징이 있다. 국내 및 국외시장 분석결과 현재 PED 모두 병원성이 제거된 바이러스를 이용한 생백신 또는 병원성 균주를 이용한 사백신이 전체 제품군을 이루고 있어 종래에 사용해 오던 백신과 큰 차이가 없는 백신의 형

태로 효능과 안전성에 문제가 있는 것으로 나타났다. 따라서 이번 연구를 통해 개발될 백신은 항체 Fc분자의 특이한 면역자극 능력을 이용한 새로운 차세대 백신으로 국내 및 국제적으로 차별화된 기술력을 가진 제품으로 기대되고 있다. 2002년 수입백신 시장점유율은 63.3%이고, 국내백신 연평균 20.1% (2000~2002년), 수입백신 연평균 23.9% 증가 (2000~2002년)하고 있다. 국내 백신시장은 국내/다국적기업 포함 27개에 달하는 완전 경쟁시장을 형성하고 있다. 1위 업체외 상위 10개 기업이 5~12%의 시장점유하고 있으며, 국내기업 중 5개 선두기업으로 시장구조가 안정화된 상태이다. 수입백신 시장 지배력이 상승 추세인 현시점에서 새로이 개발된 Fc 분자 발현 PED백신의 장점으로 국내에서 다국적 기업과 해외기업의 경쟁력이 증대될 것이고, 향후 수출 또한 증대할 것으로 예상된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

구분	연도	세부과제명	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
1 차 년도	2009	(제1 세부과제)  Fc 분자발현 PRRS와 PED 백신의 산업적 생산 및 야외 임상 시험을 통한 상품화	Fc 표면발현 Vero 세포주 확립	세포주 확립	100%
			Lab scale Fc 표면발현 PED 바이러스 생산	바이러스 증식 확인	100%
			Fc 분자발현 PED 바이러스 불활화제 시험	불활화제 시험	100%
			PED 표면발현된 Fc 분자의 정량화 및 실험동물을 이용한 면역원성 시험	Fc 분자 정량 및 항체 형성능 확인	100%
			Fc 발현 PED 바이러스의 안전성 시험	안전성 확인	100%
			Fc 발현 PED 바이러스를 이용한 시험백신의 효능 검정을 위한 시험법 연구	효능검정법 확립	100%
		(제1 협동과제)  Fc 함유 PED 및 PRRS 바이러스를 이용한 백신 생산법 확립	Fc 표면발현 세포주 작성용 전이벡터 점검 및 확인	발현 벡터 제작	100%
			PED 증식용 Fc 표면발현 Vero 세포주 작성 및 특성 분석	세포주의 특성 분석	100%
			PRRS 증식용 Fc 표면발현 Marc145 세포주 작성	세포주 작성	100%
			표면발현 Vero 세포주에서의 PEDV 증식 효율 조사	바이러스 증식 확인	100%
			표면발현 Marc145 세포주에서의 PRRSV 증식 효율 조사	바이러스 증식 확인	100%
		(제2 협동과제)  Fc 분자발현 양돈용 백신의 평가기술 확립 및 효능 평가	Fc 분자 발현 백신의 면역유도능 및 면역 세포 활성화 평가	면역유도능 확인	100%
			PED/Fc harboring 여부의 확인	바이러스 내 Fc harboring 확인	100%
			바이러스 중화능 검증 시험	중화항체 형성 확인	100%
			마우스를 모델로 한 Fc/PED 면역원성 실험	마우스 면역원성 확인	100%

구분	연도	세부과제명	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
2 차 년도	2010	(제1 세부과제) Fc 분자발현 PRRS와 PED 백신의 산업적 생산 및 야외 임상 시험을 통한 상품화	3 Lot의 Fc 분자 표면발현 PED 바이러스 생산	시험 백신 생산	100%
			PED-Fc 바이러스의 seed bank 확립과 안정성 순수도 시험	seed bank 확립	100%
			임상 시험을 위한 3 Lot의 시험백신 생산 및 국가검정기준에 준하는 백신의 기초 시험 완료	시험백신의 기본 특성 확인	100%
			시험 생산된 백신을 이용한 목적 동물 전임상 실험 완료	전임상 시험 실시	100%
			시험백신의 효능검증을 위한 공격 접종 실험	공격접종 시험 실시	100%
			상용화된 백신과의 비교 실험	PED 백신과의 효능 비교	100%
			농장 야외 실험을 위한 수의과학 검역원에서 PED-fc 야외 임상 실험신청서 제출 및 승인 완료	야외 임상시험 계획서 승인	100%
			야외 임상시험 통한 안전성 및 효능 평가	야외 임상시험 실시	100%
		(제1 협동과제) Fc 함유 PED 및 PRRS 바이러스를 이용한 백신 생산법 확립	IFA 및 FACS 분석을 통한 Fc 표면발현의 확인	Fc 분자의 표면 발현 확인	100%
			Fc 발현 세포주 증식 PEDV 및 PRRSV 정상 세포주 재감염 후 각 세포막 uncoated Fc 단백질 IFA 확인	바이러스 내 Fc 분자의 harboring 확인	50%
			세포막에 Fc 분자 함유 여부 확인	세포표면의 Fc 분자 확인	100%
			다양한 oil adjuvant, carbopol, aviridin 등에 대한 백신과의 물리적 적합 여부 검토	Adjuvant 와의 적합성 확인	100%
			Adjuvant 별 기본 면역 유도능 조사	Adjuvant 별 효능 비교 실험	100%
		(제2 협동과제) Fc 분자발현 양돈용 백신의 평가기술 확립 및 효능 평가	PEDV-Fc harboring 검증	Fc harboring 검증	100%
			목적동물의 면역학적 분석	목적동물 효능 평가	100%
			마우스 모델을 이용한 PEDV, PEDV-Fc의 생백신 및 사백신 효능 검증	마우스 모델 이용한 효능 평가	100%

구분	연도	세부과제명	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
3 차 년도	2011	(제1 세부과제) Fc 분자발현 PRRS와 PED 백신의 산업적 생산 및 야외 임상 시험을 통한 상품화	선정된 농장에서 시험백신의 안전성과 효능 시험	야외 임상시험 실시 및 데이터 확보	100%
			현재 실험중인 농장 외에 추가 농장 선별 후 백신 효능 재검증	추가적인 농장 실험 실시	100%
			야외 임상시험 결과 바탕으로 Fc 분자발현 PED 백신 품목허가를 위해 허가서류 작성 및 제출	품목허가서류 작성 및 제출	100%
			PED-Fc 백신 대량 생산 위한 생산부서로의 기술 이전	생산부서로의 기술 이전	100%
			PED-Fc 백신 대량 생산 요건 및 비용을 바탕으로 백신 생산량 측정 및 단가 결정	백신 생산량 및 단가 결정	100%
			제품명 결정 및 마케팅 전략 구상	마케팅 전략에 기반한 제품명	100%
			Retroviral system을 이용한 Marc145-Fc cell line에서 배양 가능한 PRRSV 선별	Fc cell line에서 배양가능한 PRRSV 선별	100%
			PRRS 및 PRRS-Fc 바이러스를 이용한 시험 백신 제조	PRRS 및 PRRS-Fc 시험 백신 제조	100%
			임상시험 위한 3 Lot의 PRRS-Fc 시험 백신 생산	3 Lot의 PRRS-Fc 시험 백신 제조	100%
			시험 생산된 백신을 이용한 전임상 시험	전임상 시험 실시	50%
			시험 백신 효능 검증을 위한 공격접종 실험	공격 접종 실험 실시	0%
			상용화된 백신과의 비교 실험	기존 백신과의 비교 실험	70%
			PED-Fc 백신의 돼지 접종 후 면역학적 효능 평가	돼지에서의 면역학적 효능 평가	100%
		PED-Fc 백신 및 PRRS-Fc 백신의 돼지 접종 후 공격접종 시험을 통한 백신의 효능 평가	PED-Fc 및 PRRS-Fc 백신의 공격접종 실험	50%	
		(제1 협동과제)	Fc 발현 PED 백신의 임상 시험 평가	PED-Fc 백신 임상시험 평가	100%
		Fc 함유 PED 및 PRRS 바이러스를 이용한 백신 생산법 확립	Fc 발현 PRRS 백신의 전임상 시험 평가 임상 시험 계획	PRRS-Fc 백신 전임상 시험 계획	100%
			Fc 분자발현 PED 백신의 검정체계 구축	PED-Fc 백신의 검정	100%
			Fc 발현 세포주의 안정성 확인	세포주 안정성 확인	100%
			(제2 협동과제) Fc 분자발현 양돈용 백신의 평가기술 확립 및 효능 평가	국내 외 PED 바이러스의 분포 동향 및 PED 백신 시장 규모의 변화 파악	PED 백신의 시장 규모 파악
			기존의 PED 백신과의 경쟁력 비교 및 경제성 분석	PED-Fc 백신의 경쟁력 확인	100%



## 제 5 장 연구개발의 성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구 성과

- 돼지 Fc 분자 표면발현 Vero-Fc, Marc145-Fc 세포주의 제작 및 배양 기술 확립
- Fc 발현 세포를 이용한 PEDV, PRRSV 바이러스의 배양기술 확립 및 바이러스 표면 anchoring Fc 분자의 확인
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스의 면역학적 효능 입증
- Fc 분자 표면 anchoring PED 바이러스를 이용한 PED 불활화백신 개발
- PRRSV 국내 유행 바이러스의 유전적 특성 분석
- PRRSV 백신 후보주 선발

### 2. 연구 성과 활용 계획

- PED-Fc 바이러스를 이용한 PED 예방 백신 제조기술 특허 출원
- PED-Fc 바이러스를 이용한 예방 백신 상품화 및 판매
- PRRSV-Fc 백신의 효능 평가를 통해 PRRSV 불활화 백신 제조기술개발 및 특허 출원
- 엔벨로프를 가지고 있는 바이러스에 대한 예방 백신 제조에 Fc 발현 기술을 이용한 기반 기술화
- 최근 동남아시아 PRRS 및 PED 질병의 만연으로 인해 새롭게 개발된 Fc 기술 이용 백신의 수출 상품화

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 해외 PED발생 현황

최근 중국을 비롯한 동남아시아 전역에 걸쳐 PED 바이러스 감염으로 인한 피해가 속출하고 있다. 2009년부터 시작된 PED 감염으로 인한 피해는 베트남, 필리핀, 태국 등지에서 자돈의 폐사를 일으켜 100 % 가까운 폐사를 일으키고 있다. 2009년부터 2010년까지 베트남에서 8건의 PED 바이러스에 대한 조사결과를 발표하였다. 유전적 특성에 관한 연구는 PED 바이러스의 spike protein S 단백질 유전자를 비교하여 조사되었다. S protein은 PED 바이러스 표면의 glycoprotein으로 혈청형과 병원성에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 베트남에서 최근 조사된바에 의하면 베트남에서 PED 질병을 일으킨 바이러스는 최근 중국(JS-2004, DX), 태국(07NP01, 08NP02, 08CB01) 그리고 한국(KNU-0802, CPF299)에서 분리된 것과 같은 바이러스로 분석되었다. 따라서 최근 동남아시아에서 유행하고 있는 PED 바이러스는 한국, 중국 등에서 유래된 바이러스로 볼 수 있다.(Do Tien Duy et al. / Thai J Vet Med. 2011. 41(1): 55-64)

### 2. PRRSV 불활화 백신 연구

2011년 39 종류의 PRRSV 분리주와 30 종류의 monospecific 한 항체를 이용한 바이러스 중화 반응에 따른 교차 방어에 관한 연구에 따르면 GP3, GP4 그리고 GP5 유전자와 교차 반응과의 상관성은 없으며 다양한 변이주에 대한 통합적인 분석에 따라 새로운 백신주 선발이 이루어져야 한다고 발표하였다. (Vaccine 29 (2011) 6928 - . 6940)

PRRS 불활화 백신개발에 있어 불활화 방법에 따른 항원의 중화항체 형성에 관한 연구에 의하면 BEI(Binary ethylenimine)을 이용한 PRRSV 불활화 항원은 백신으로 제조 되었을때 중화항체를 형성하는 것으로 밝혀졌다. 백신의 형태는 BEI로 불활화된 항원에 oil in water adjuvant를 사용한 백신을 제조하였으며 돼지에 2회 근육접종을 통해 3.2 Log<sub>2</sub> 이상의 바이러스 중화항체를 형성하는 것으로 보고되었다.

특히 불활화 백신을 접종 받은 돼지에 공격 접종을 실시한 경우 공격 접종 후 빠르게 중화항체가 다시 상승하는 결과를 보여주었으며 바이러스 감소 효과가 있는 것으로 보고되었다. 그러나 여전히 hetero type의 변이주에 대한 방어력은 떨어지는 것으로 보고되었다. (Vet. Res. (2009) 40:63).

## 제 7 장 참고문헌

- [1] Meulenbergg JJ. PRRSV, the virus. *Vet Res* 2000;31:11 - .21.
- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, etal. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 1991;13:121 - .30.
- [3] Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 2000;74:309 - .29.
- [4] Park SJ, Kim HK, Song DS, Moon HJ, Park BK.. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch Virol*. 2011 Apr;156(4):577-85. Epub 2011 Jan 6.
- [5] Chae C, Kim O, Choi C, Min K, Cho WS, Kim J, Tai JH. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet Rec*. 2000 Nov 18;147(21):606-8.
- [6] Kim O, Chae C. Application of reverse transcription polymerase chain reaction to detect porcine epidemic diarrhea virus in Vero cell culture. *J Vet Diagn Invest*. 1999 Nov;11(6):537-8.
- [7] Kweon CH, Kwon BJ, Lee JG, Kwon GO, Kang YB. Vaccine. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Jun* 4;17(20-21):2546-53. Erratum in: *Vaccine* 1999 Aug 20;18(1-2):201.
- [8] Snijder EJ, Van Tol A, Pedersen KW, Raamsman MJB, De Vries AAF. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* 1999;73:6335 - .45.
- [9] Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS ONE* 2007;13(2):e526.
- [10] Holliger P, Hudson PJ.. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep;23(9):1126-36. Review.

- [11] Stabila, P.F., S.C. Wong, F.A. Kaplan, and W. Tao. Cell surface expression of human IgG Fc chimera activates macrophages through Fc receptors. *Nat. Biotechnol.* 1998. 16:1357-1360
- [12] Yasuhiro Takashima, Mikuru Tsukamoto, Haruko Ota, Yasunobu Matsumoto, Yoshihiro Hayashi, Haruki Otsuka. Immunization with pseudorabies virus harboring Fc domain of IgG : 2005. *vaccine* 3775 - 782
- [13] Olanratmanee EO, Kunavongkrit A, Tummaruk P. Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim Reprod Sci.* 2010 Oct;122(1-2):42-51. Epub 2010 Jul 27
- [14] Sueyoshi M, Tsuda T, Yamazaki K, Yoshida K, Nakazawa M, Sato K, Minami T, Iwashita K, Watanabe M, Suzuki Y. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea.. *J Comp Pathol.* 1995 Jul;113(1):59-67.
- [15] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes.* 2001;23(2):137-44.
- [16] Ren X, Suo S, Jang YS. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol Lett.* 2011 Feb;33(2):215-20.
- [17] Yoo D, Welch SK, Lee C, Calvert JG. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:143 - .54.
- [18] Fang Y, Christopher-Hennings J, Brown E, Liu H, Chen Z, Lawson SR, et al. Development of genetic markers in the non-structural protein 2 region of aUS type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for future recombinant marker vaccine development. *J Gen Virol* 2008;89:3086 - .96.