

발간 등록 번호

11-1543000-003167-01

식물 발현 시스템을 이용한 반려동물 고품질 정제 백신 개발 최종보고서

2020. 07. 10.

주관연구기관 / (주)우진바이오

협동연구기관 / (주)바이오애플

협동연구기관 / 농림축산검역본부

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

“식물 발현 시스템을 이용한 반려 동물 고품질 정제 백신 개발”(연구개발 기간 : 2017. 04. 21 ~ 2019. 12. 31) 과제의 최종보고서 10부를 제출합니다.

2020. 07. 10

주관연구기관명 : (주)우진바이오 (대표자)
협동연구기관명 : (주)바이오맵 (대표자)
협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자)

주관연구책임자 : 강 재 구
협동연구책임자 : 이 상 민
협동연구책임자 : 우 인 옥



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	317023-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	식물 발현 시스템을 이용한 반려 동물 고품질 정제 백신 개발			
연구책임자	강 재 구	해당단계 참여연구원 수	총: 26 명 내부: 15 명 외부: 11 명	해당단계 연구개발비	정부: 400,000천원 민간: 172,000천원 계: 572,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 32 명 내부: 16 명 외부: 16 명	총 연구개발비	정부: 1,100,000천원 민간: 473,000천원 계: 1,573,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)우진바이오			참여기업명 (주)바이오엠플 농림축산검역본부	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다.)

보고서 면수 127면

- 국내 시장의 80% 이상을 점유하고 있는 다국적 기업의 백신과 품질 차이를 줄여 나가고 새롭게 성장하고 있는 애완견 백신시장에서 국내 백신의 점유율을 높이기 위한 고품질의 백신 공급은 매우 시급한 일임.
- 친환경적인 식물단백질 발현시스템을 이용하여 광견병 및 애완견 5종 질병에 대한 고품질의 백신개발 및 상용화를 촉진하고자 함.
- 식물 단백질 발현시스템을 이용하여 광견병 및 개 파보바이러스, 디스토펜바이러스, 파라인플루엔자, 개 간염 그리고 렙토스피라의 최적 항원 생산기술을 개발하였음.
- 광견병 및 애완견 5종 질병에 대한 혈청학적 유전학적 평가를 통해 최적의 항원을 선발하였음.
- 선발된 항원 유전자를 바탕으로 식물체 고발현 백터를 제작하였고 발현된 단백질의 특성을 분석하였음.
- 대량생산 가능성 및 효능이 입증된 항원 단백질의 대량 생산용 형질전환체 개발을 완료하였고, large scale로 분리/정제공정을 최적화하여 제조공정을 확립하였음.
- 전임상 시험을 통해 애완견 5종 혼합백신의 임상시험 신청을 완료하였음.
- 식물발현 시스템을 이용한 항원 백신 제조 기술 개발을 통해 친환경적인 백신 제조기술을 확립할 계획임.
- 외국 백신의 국내 애완견 백신시장 점유율이 80%를 넘고 있는 현실에서 고품질의 백신생산으로 수입 대체는 물론 수출 제품으로 개발할 계획임.
- 친환경적인 식물 발현시스템을 이용한 백신 개발을 통해 고부가 가치를 창출할 수 있는 다양한 반려동물 백신 분야로 기술을 확대해 나갈 수 있을 것이며, 식물 발현 단백질을 이용한 단백질 제품(항체진단 및 항원진단키트) 개발에도 활용할 계획임.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 친환경적인 식물단백질 발현시스템을 이용하여 광견병 및 애완견 5종 질병의 고품질 백신개발 및 상용화를 촉진하고자 함. ○ 식물 단백질 발현시스템을 이용하여 광견병 및 개 파보바이러스, 디스토펜바이러스, 파라인플루엔자, 개 간염 그리고 렙토스피라의 최적 항원 생산 기술을 개발하고자 함. ○ 기존의 백신주와 현재 유행하는 야외 감염주의 유전적 특성 및 다양한 국가의 야외 바이러스 특성을 조사하여 국내는 물론 다양한 국가에 수출이 가능한 백신을 개발하고자 함. ○ 애완견 백신의 안전성과 효능을 높이기 위한 불활화 정제백신의 개발을 위한 공정을 개발하고자 함. ○ 광견병 및 애완견 5종 혼합 백신의 국내외 유전형 및 혈청형 조사를 통해 백신 개발의 기초자료를 제공하고자 함. 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존 바이러스에 대한 혈청학적 유전학적 평가를 통해 최적의 항원을 선발하였음. ○ 외국 애완견 질병원에 대한 유전학적 조사를 통해 수출 대비 항원을 선발하였음. ○ 고품질의 애완견 5종 혼합백신의 개발 및 식물 발현시스템을 이용한 백신 항원에 대한 제조기술을 확보함. ○ 선발된 항원 유전자 6종에 대한 고발현 벡터를 제작하였고 항원성 및 면역원성을 분석함. ○ 식물 발현 항원의 대량 생산용 형질전환 담배 제작 및 분리/정제공정 개발을 통해 대량생산 공정을 개발하였음. ○ 전임상 시험을 통해 애완견 5종 혼합백신의 임상시험 신청을 완료함. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물발현 시스템을 이용한 항원 백신 제조 기술 개발을 통해 친환경적인 백신 제조 기술을 확립할 계획임. ○ 외국 백신의 국내 애완견 백신시장 점유율이 80%를 넘고 있는 현실에서 고품질의 백신생산으로 수입 대체는 물론 수출 제품으로 개발할 계획임. ○ 식물 발현 항원 단백질의 특성 연구를 통해 다양한 백신 개발 연구에 활용할 계획임. ○ 고품질 광견병 불활화 백신 및 애완견 5종 혼합백신의 전임상 시험 완료 및 안전성과 효능을 개선하여 상업화를 추진할 계획임. ○ 친환경적인 식물 발현 시스템을 이용한 백신 개발을 통해 고부가 가치를 창출할 수 있는 다양한 반려동물 백신 분야로 기술을 확대해 나갈 계획이며, 향후 식물 발현 단백질을 이용한 단백질 제품(항체진단 및 항원진단키트) 개발에도 활용할 계획임. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>애완견 백신</p>	<p>식물 발현 시스템</p>	<p>불활화 백신</p>	<p>제조 공정개선</p>	<p>adjuvant</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	12
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	121
제 5 장 연구결과의 활용계획	127
붙임. 참고문헌	128

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적

1. 식물 발현 시스템을 이용한 새로운 백신 항원 생산 기술 연구
2. 항원의 분리정제 공정을 확립하고 안전성과 효능이 우수한 formulation 연구
3. 현재 사용되고 있는 애완용 생백신주의 다양한 문제점을 해결하기 위하여 백신주의 유전적 조사 및 적정한 항원 발굴
4. 식물 발현 재조합 단백질 항원의 안정성 및 안전성 등 전임상 연구
5. 식물발현 시스템을 이용한 항원 대량 생산 시스템 도입을 통하여 광견병 백신 및 반려견 5종 혼합백신 2종을 상용화

제2절 연구개발의 필요성

1. 항생제 사용 규제와 국민 소득 증가 1인가구 증가 등 다양한 사회적 용인에 의해 반려 동물에 대한 소비자가 증가하고 있으면 십년 이상의 반려 동물이 사람과 같이 하면서 사람과 같은 수준의 의료 혜택을 소비자가 원하고 있는 실정이다. 이러한 상황에서 질병 예방을 위한 애완 동물의 백신 시장은 급격히 성장하고 또한 안전성에 초점을 둔 새로운 백신들이 개발되고 있는 실정이다.
2. 따라서 국내 시장의 80% 이상 점유하고 있는 다국적 기업과의 백신 품질 차이를 줄여 나가면서 새롭게 성장하고 있는 애완견 백신 시장에 새로운 기술 개발을 통해 고품질의 백신 공급은 매우 시급한 일이다.
3. 최근 새로운 질병에 대한 백신 제조에 여러 가지 새로운 기술들이 접목되고 있으나 바이러스 항원의 경우 glycosylation 등 박테리아 시스템을 이용할 수 없는 경우가 많고 특히 애완견 같이 민감한 동물에 대한 endotoxin control 등이 매우 어려운 단점이 있다.
4. 따라서 이번 과제를 통해 새롭게 개발된 식물발현 시스템을 이용한 광견병 및 기본 5종 혼합백신 제조 방법에 대한 확립은 안전성이 우수한 불활화 백신을 개발하는데 경쟁력 있는 제품의 기술화 측면에서 매우 중요하다.

5. 또한 최근 국내사에서 사용되고 있는 생백신주는 이미 개발된지 매우 오래된 균주로 현재 유행하는 야외 감염주와의 비교 분석을 통해 정확한 항원을 발굴할 필요성이 있으며 외국의 야외 감염주에 대한 유전적 조사를 통해 최적의 항원 단백질 생산이 수출에 매우 중요하다.

제3절 연구개발 범위

1. 선발된 항원 유전자 6종에 대한 고발현 벡터 제작 및 발현 평가
2. 식물 발현 항원 대량 생산용 형질전환 담배 제작 및 분리정제 공정 개발
3. 항원 대량 생산용 형질전환체 개발 및 대량 생산 공정 개발 완료
4. 식물 발현 항원과 바이러스항원 및 안전한 adjuvant formulation 개발
5. 기존 바이러스에 대한 혈청학적 유전학적 평가를 통해 최적의 항원 선발
6. 외국 애완견 질병원에 대한 유전학적 조사를 통해 수출 대비 항원 선발
7. 안전성과 효능 평가
8. 전임상 시험을 통해 연구 과정 중 2종 이상의 백신 임상 진입

제2장 국내외 기술개발 현황

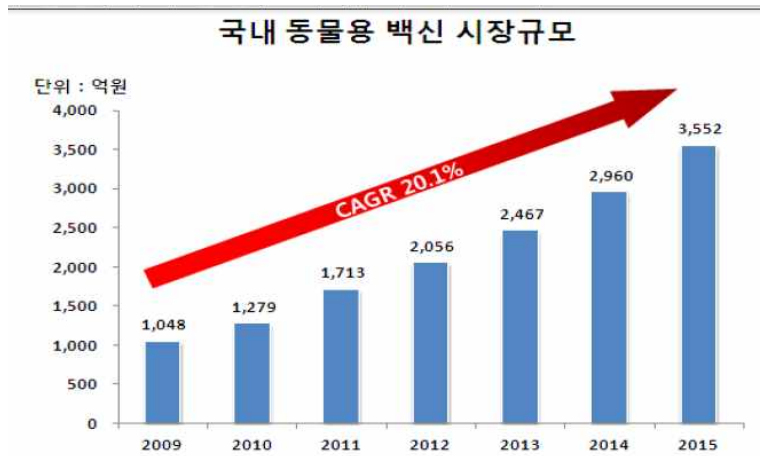
제1절 국내 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

가. 새로운 질병의 발생 및 기존 질병원의 유전적 변이 등 지속적인 질병의 예방 백신 기술 연구가 이루어지고 있으나 대부분의 기술이 기존의 박테리아 발현 시스템을 이용하는 경우가 많아 바이러스 질병의 재조합 항원 발현에 적합하지 않은 기술적 한계가 있음.

2. 시장현황

가. 국내 동물 백신 시장은 2009년부터 2015년까지 매년 20% 이상 고 성장을 지속하고 있으며 기존 인체 의약품의 0.7 % 성장률에 비해 9% 이상의 성장세를 지속하고 있어 이미 국내 동물약품 시장은 1조 4천억원에 달하고 있음.



<그림 4> 국내 동물용 백신 시장 규모

나. 특히 국민 소득 수준 향상과 1인가구 증가 등 사람에게 반려 동물의 수요가 증가하여 애완견에 대한 동물용 의약품 시장의 성장세는 그림에서 보는 바와 같이 빠른 성장세를 지속하고 있으면 특히 생물학적 제제 즉 백신의 수요 증가가 2000년대 들어오면서 지속적으로 성장하고 있음.



3. 경쟁기관현황

가. 국내 백신 시장은 다국적 제약사의 제품을 수입 판매하거나 원액을 수입하여 판매하는 업체가 대부분이며, 이는 백신의 기술 개발 기간이 길고, 제조 설비 구축 및 상업화까지 투자비가 많이 소요되며, 고도의 생산 기술적 노하우가 필요하기 때문에 신규 업체의 초기 시장 진입이 쉽지 않은 원인에 기인함. 특히 현재 애완견 백신을 생산하고 있는 국내 5개 백신 업체는 연구 능력의 미비로 검역본부의 연구 과정을 통한 기술이전으로 신제품 개발을 해오고 있으며, 열악한 GMP 시설은 물론 백신 제조에 있어 분리 정제에 대한 노하우나 기술이 없어 외국 경쟁사에 국내 애완견 백신 시장을 모두 내주고 있는 실정으로, 다만 육견용 백신 판매에 의존하고 있는 상황임. 현재 국내 제조사의 애완용 백신 균주는 개발된지 이미 수십년이 지난 균주로 현재 야외 감염주와의 혈청학적 유전적 비교를 통해 새로운 백신주 개발이 필요한 상황이나 이에 대한 기술 개발이 이루어지고 있지 않은 상황임.

4. 지식재산권현황

가. 국내 애완견 백신에 대한 지적 재산권 수준은 세계 수준과 많은 격차를 보이고 있으며 특허의 수준 및 양적 수준에서도 내우 부족한 상황으로, 백신 관련 특허는 16건 정도로 파악됨.

5. 표준화현황

가. 애완견 백신에 대한 표준화(국가 출하승인)는 농림축산검역본부의 검정 기준에 의해 표준화 되어 있음.

6. 기타현황

가. 국내 생산 애완견 백신의 가장 큰 문제점은 백신 접종으로 인한 부작용이 많아 동물병원에서 소비자나 임상수의사의 사용 기피로 외국계 백신이 주로 사용되고 있음. 이러한 상황의 주된 원인으로서는 아직까지 새로운 백신 개발이 없는 상황과 이미 개발된 국내 백신들도 분리정제를 하지 않은 백신으로 국제적인 품질 기준에 미치지 못하기 때문임.

7. 식물 발현 시스템을 이용한 재조합 백신 개발 현황

가. 가축 질병 백신을 식물 발현 시스템을 이용하여 안전하게 대량 생산하려는 연구개발 투자가 있었음.

나. 최근 본 과제에 참여하는 농림축산검역본부와 (주)바이오엠플이 공동으로 개발한 돼지열병 그린 마커백신 생산 기술로 식물 발현 시스템의 적용가능성이 높아진 상태임.

다. 식물발현 시스템을 이용한 재조합 백신 개발에는 식물 고발현 기술과 경제적이고 효과적인 분리정제 기술 확보가 핵심 기술로 바이오엠플에서는 두 가지 핵심 기술을 보유하고 있음.

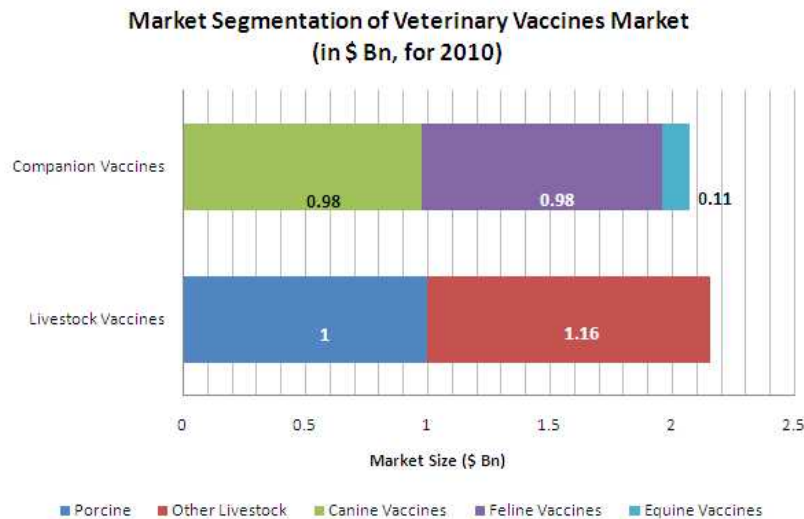
제2절 국외 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

가. 반려 동물 백신 시장을 장악하고 있는 주요 다국적 기업의 기술 현황은 불활화 백신, 재조합 백신 그리고 Whole virus를 이용한 백신 제조 기술을 바탕으로 주로 반려견의 부작용을 줄이기 위한 분리정제 기술과 안전성에 중점을 둔 기술이 개발되고 있음.

2. 시장현황

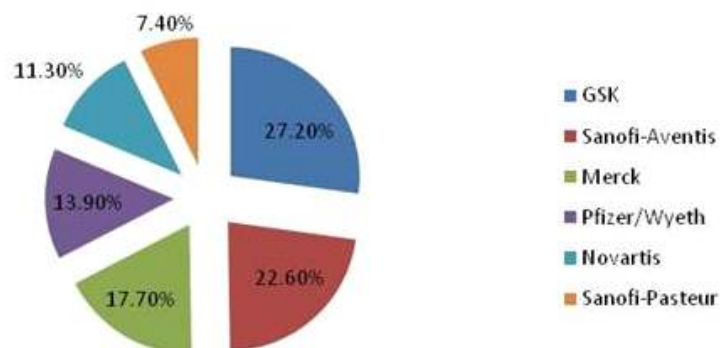
가. 세계 동물백신 시장은 2021년 7조 8천억 달러에 이를 것으로 예상되고 있으면 2015년부터 2021년까지 매년 5.8% 성장을 지속할 것으로 예상됨. 이 중 가장 성장률이 빠른 백신 분야는 애완동물로 구분되는 개, 고양이, 그리고 말 백신이 전체 백신 시장의 반 정도를 차지하고 있으며 산업동물에서는 돼지 백신이 가장 큰 시장으로 발전하고 있음.



3. 경쟁기관현황

가. 세계 동물백신 시장은 상위 10개 회사가 전체 시장의 90% 이상을 장악하고 있으며 잘 알려진 제약사들이 동물 백신 분야에서도 거의 같은 순위로 시장을 지배하고 있으며 특히 애완동물 시장은 중국 등 신흥 국가 중심으로 심한 경쟁을 하고 있음.

%Share In Vaccines Market Worldwide



4. 지식재산권현황

가. 반려 동물에 관련된 총 306건 정도의 특허가 한국 특허 정보 검색원에 등록되어 있으며 이중 일본에서 출원된 특허가 140여건으로 가장 많은 부분을 차지하고 있음. 나머지 국가들의 특허도 다수 있으며 개별적인 항원에 대한 특허를 면밀히 조사해야할 필요성이 있음.

5. 표준화현황

가. 미국을 비롯한 유럽의 경우 동물백신의 경우 모두 인체 백신 제조 기준에 따라 규정을 정하고 있음.

6. 기타현황

가. 다국적 기업은 지속적인 마케팅과 자사 제품의 안전성을 광고하는 형식으로 국내 시장을 공략하고 있음.

7. 식물 발현 시스템을 이용한 단백질의약품 개발 현황

가. 2014년에 아프리카를 중심으로 발생한 에볼라사태에서 미국인 의사 2명에게 긴급 투여되어 생명을 구한 것으로 알려진 지땀(에볼라 항체 치료제)이 *Nicotiana benthamiana*에서 생산이 되면서 의약품 생산 플랫폼으로써의 식물 시스템에 관심이 모아짐.

나. 2012년 5월 당근세포배양 기술을 이용한 고셔병(효소 결핍으로 인한 유전 희귀병) 치료제(엘레리소)가 미국 FDA 정식 허가를 받아 시장에 출시되면서 식물 발현 시스템을 이용한 의약품 생산에 기대가 높아짐.

다. 2006년 미국 농무부에서 닭 뉴캐슬병 바이러스의 항원 단백질을 BY-2 세포 배양방식으로 생산하여 허가를 득하였지만 시장에 출시되지는 못하였지만 안전성, 생산성, 효능은 입증되었다고 할 수 있음.

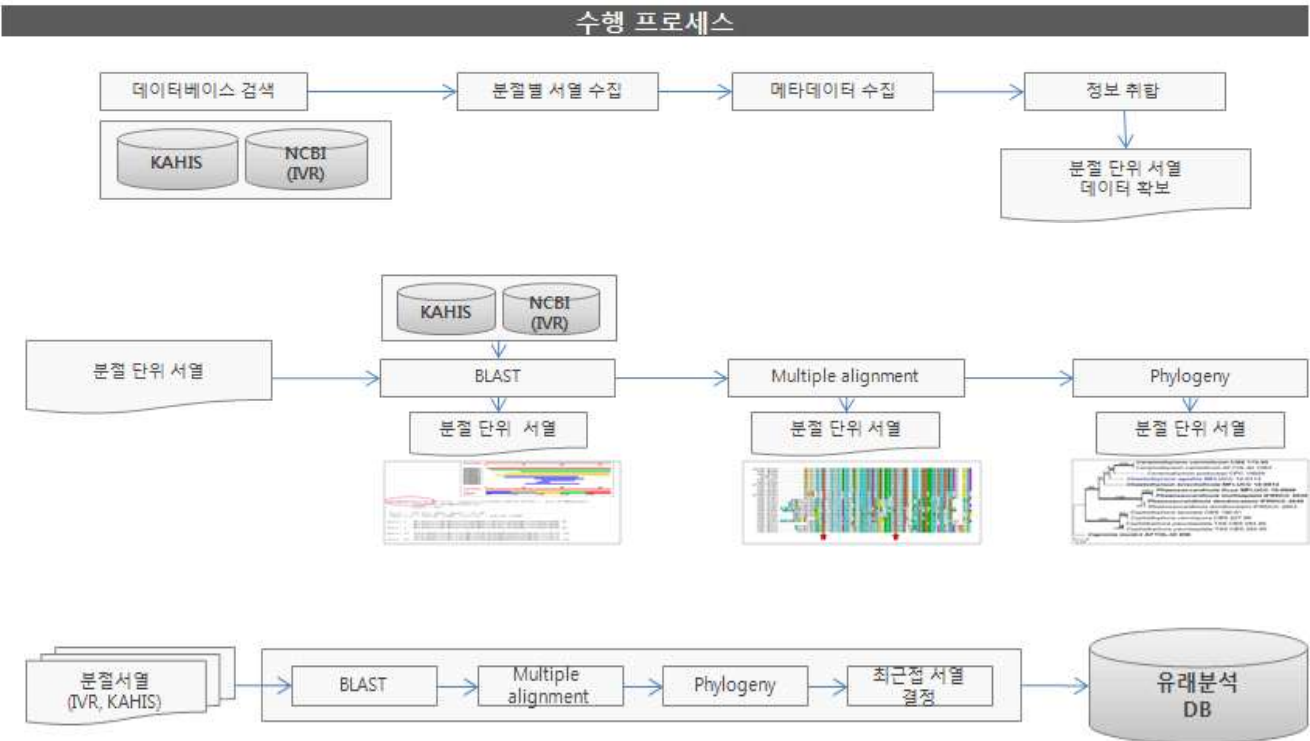
라. 일본 다나베제약 소유인 캐나다 퀘백주에 위치한 메디카고라는 회사에서 식물 발현 시스템을 이용한 독감백신을 2019년 출시 예정이라고 언론으로 보도된바 있음.

마. 그 외 다수의 식물 의약품이 임상을 진행 중으로 더 많은 제품이 시장에 출시될 것으로 예상됨.

제3장 연구수행 내용 및 결과

제1절 1차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 6종 바이러스에 대한 재조합 백신 생산용 단백질의 유전자 변이조사 가. 조사방법



(1) 유전자 정보수집

- (가) NCBI, 국가가축방역통합시스템(KAHIS)에서 광견병 바이러스의 유전자 정보검색
- (나) 정보 수집 : 각각 항원성이 알려진 G-protein(Glycoprotein), N-protein(Nucleoprotein), M-protein(Matrix protein)의 분절 서열별 정렬, 메타데이터 수집

(2) 유전자형 분석

- (가) 획득된 유전정보별 Multiple alignment 실시
- (나) 유전자 정보로 Phylogenetic tree 작성
 - 분절 서열의 유래 경로 분석
 - 각 분절서열의 유전자형 분석 결과로부터 유전적으로 가장 가까운 서열 정보와 해당 서열의 유래 정보를 연결
 - 국가, 유전형, 숙주 정보 등의 유래 경로 정보유래 경로 정보를 2차원으로 가시화 하여 출력
 - 입력 서열의 유행 정보 중 연도를 기준으로 직전 연도의 서열들을 대상으로 계통 분석 최근 접 서열에서 유래된 것으로 판정

나. 광견병 바이러스(Rabies virus)에 대한 유전자 및 단백질의 변이조사

(1) 광견병 바이러스 유전자 분석(G-protein, M-protein, N-protein)

- 광견병 바이러스를 분석하기 위해서 항원성을 나타내는 glycoprotein(G-protein), matrix protein(M-protein), nucleoprotein(N-protein)의 유전자 정보를 가지고 유전정보별 Phylogenetic tree 및 Multiple alignment를 가지고 유전자형 분석 완료

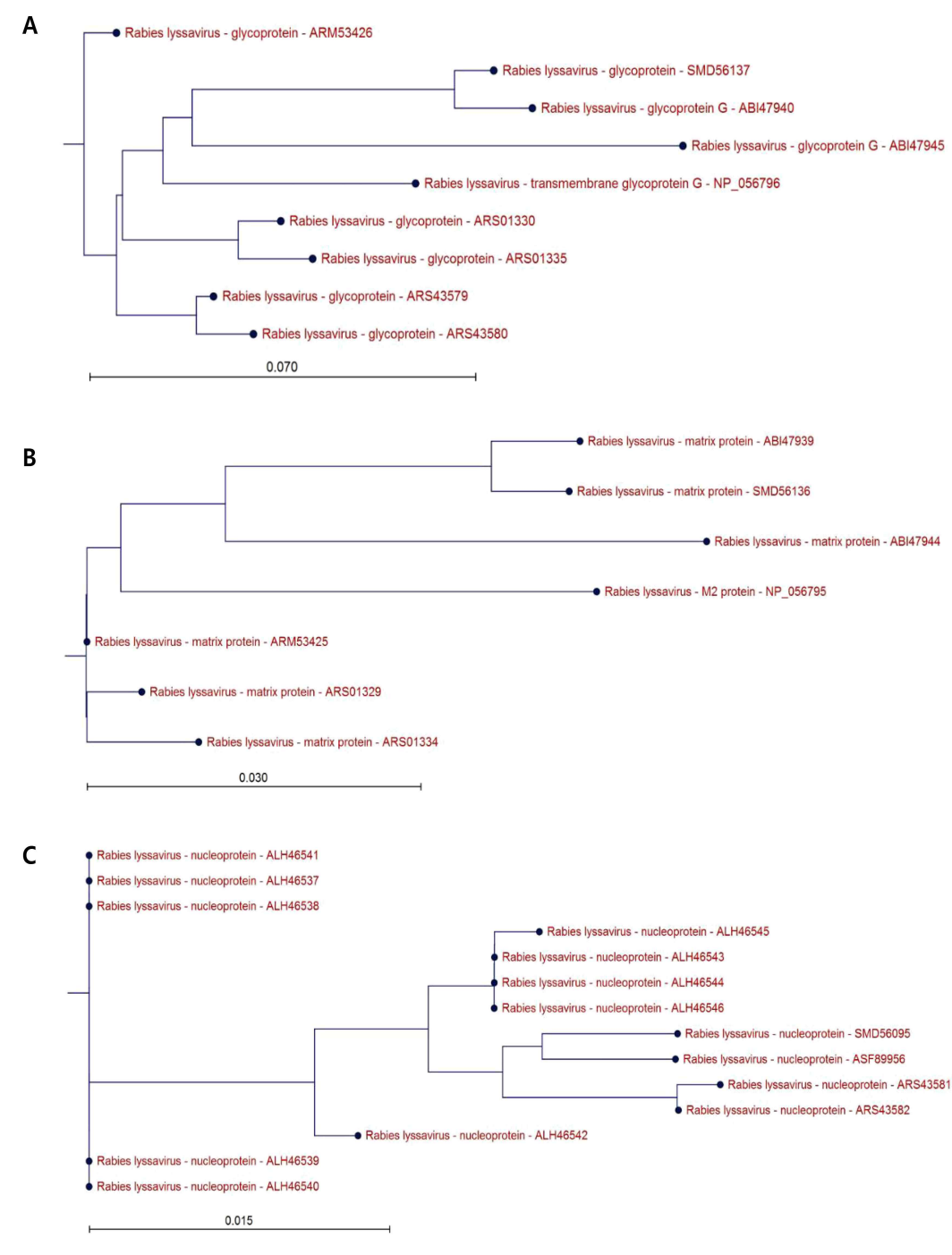


그림 1. Phylogenetic tree of Rabies proteins (A: G-protein B: M-protein C: N-protein)

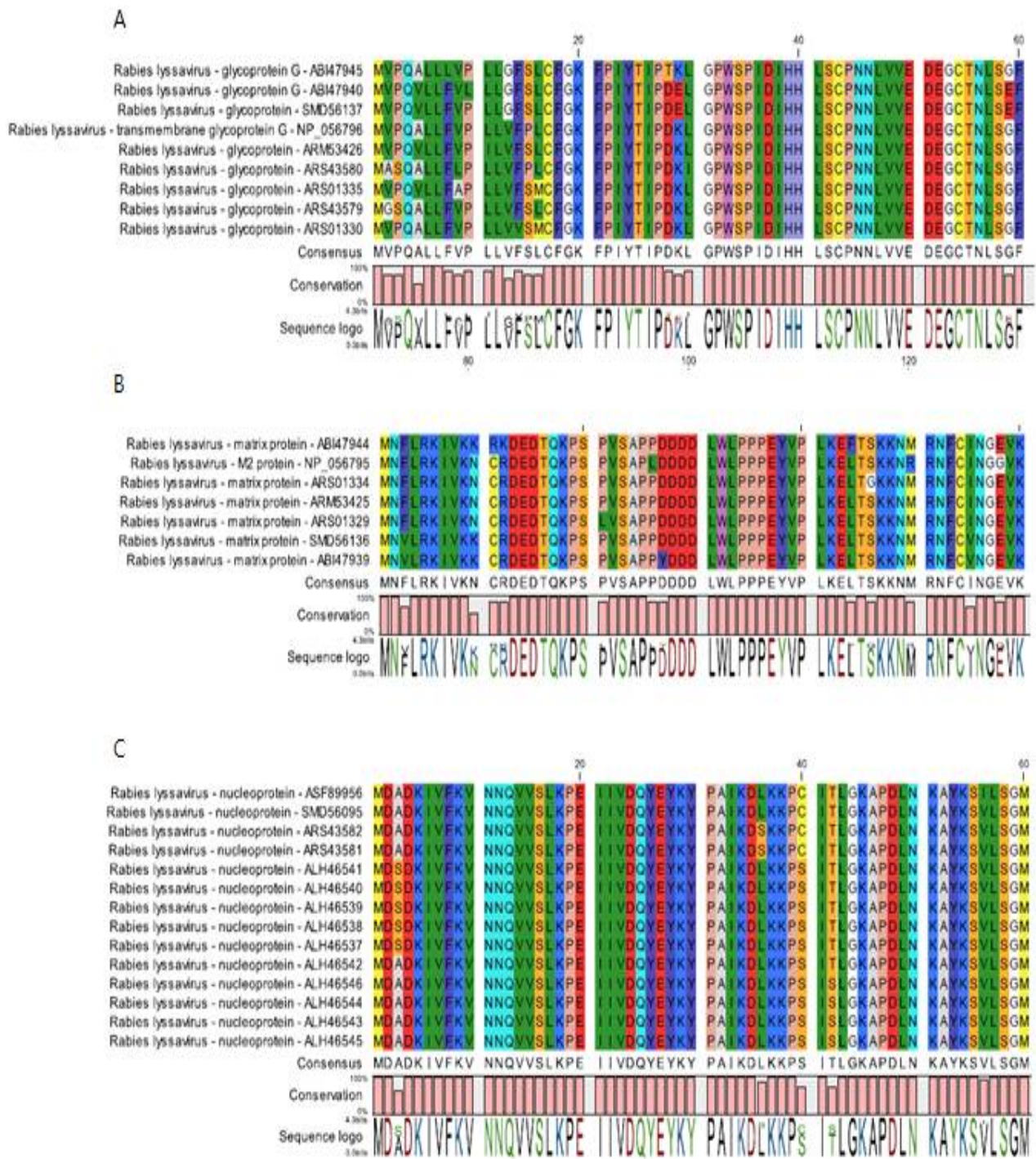


그림 2. Alignment of Rabies proteins (A: G-protein B: M-protein C: N-protein 1-60 residues)

다. 개 파보바이러스(Canine parvovirus, CPV)에 대한 유전자 및 단백질의 변이조사

(1) 개 파보바이러스 유전자 정보의 확보

- CPV-2는 분류가 CPV2a, CPV2b, CPV2C 나뉘지며, CPV-2는 4개의 segments는 NS1, NS2, VP1 그리고 VP2로 이고 특히 VP2 캡시드 단백질(capsid protein)는 항원성을 나타내는 부위로 유전학적 조사가 필요

(가) 유전자 정보수집

- NCBI, KAHIS에서 개 파보바이러스의 유전자 정보검색
- 정보 수집 : 항원성이 알려진 각각의 CPV-2의 변이체(2, 2a, 2b, 2c)의 VP2의 분절 서열별 정렬, 메타데이터를 수집

(나) 유전자형 분석

- 획득된 유전정보별 Multiple alignment 실시
- 유전자 정보로 Phylogenetic tree 작성

(다) 분절 서열의 유래 경로 분석

- 각 분절서열의 유전자형 분석 결과로부터 유전적으로 가장 가까운 서열 정보와 해당 서열의 유래 정보를 연결
- 국가, 유전형, 숙주 정보 등의 유래 경로 정보유래 경로 정보를 2차원으로 가시화 하여 출력
- 입력 서열의 유행 정보 중 연도를 기준으로 직전 연도의 서열들을 대상으로 계통 분석 최근 집 서열에서 유래된 것으로 판정

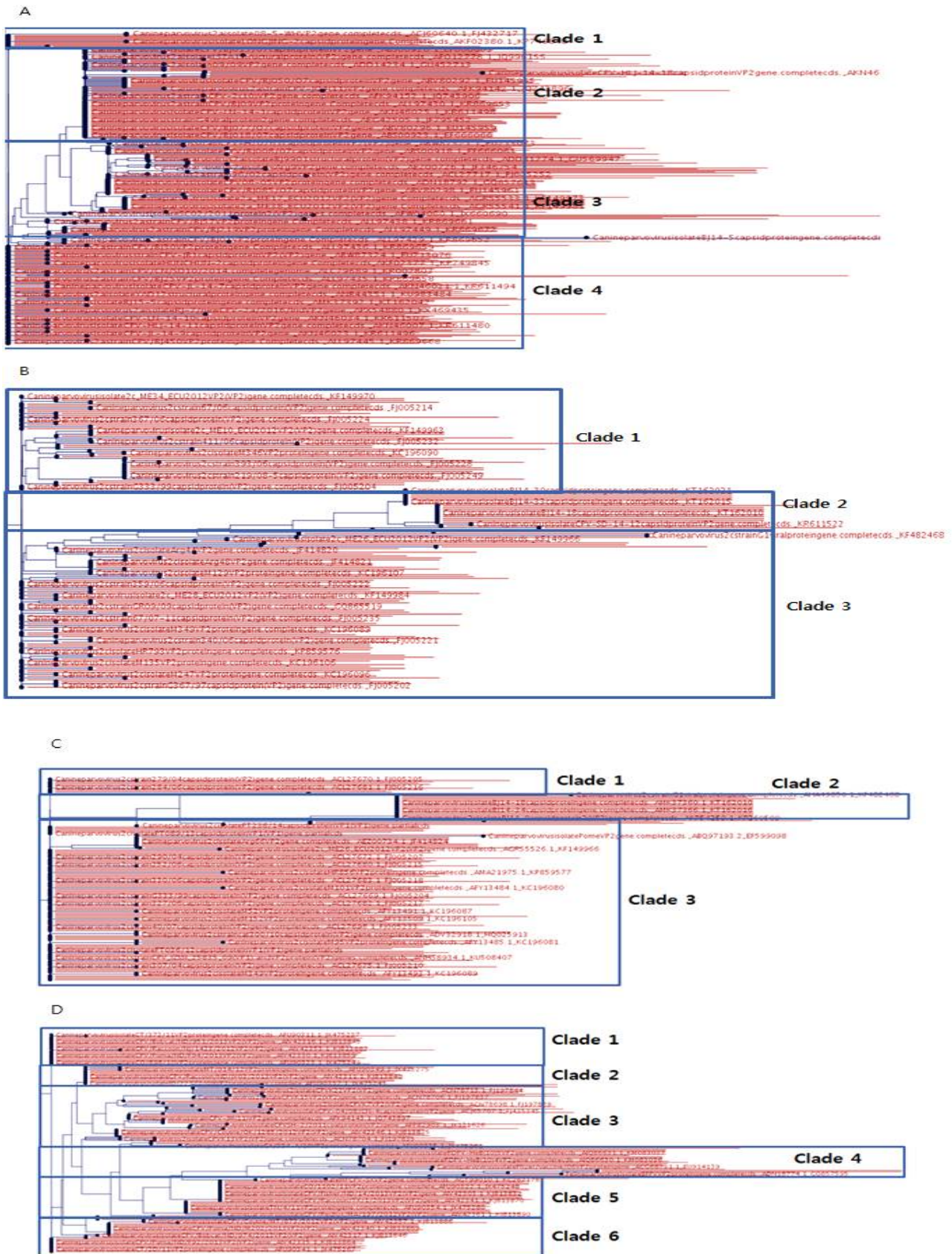


그림 3. Phylogenetic tree of CPV VP2 Capsid proteins(A: CPV-2a B: CPV-2b C: CPV-2c D:CPV non evolute)

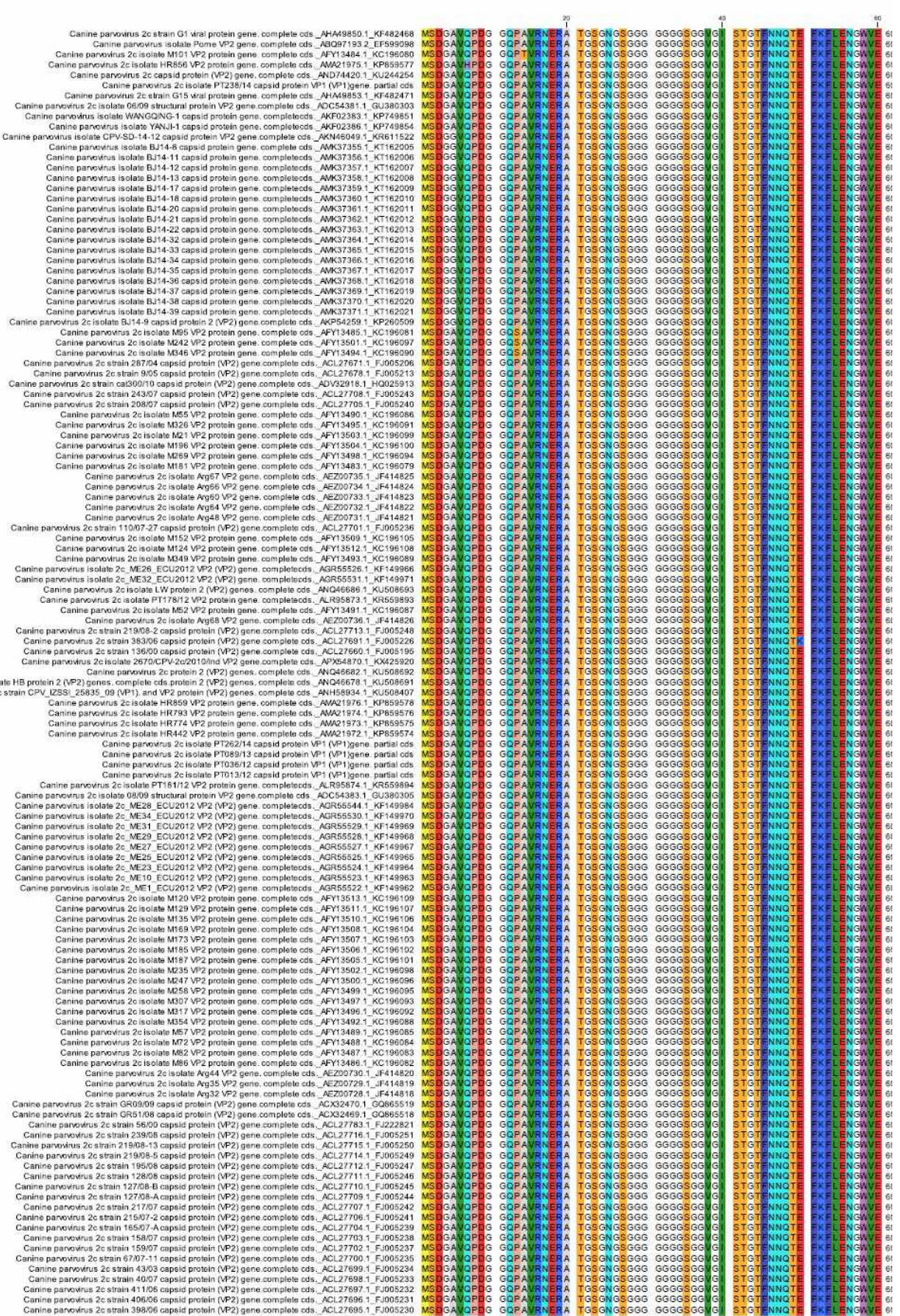


그림 5. Alignment of CPV-2c VP2 capsid proteins (1-60 residues)

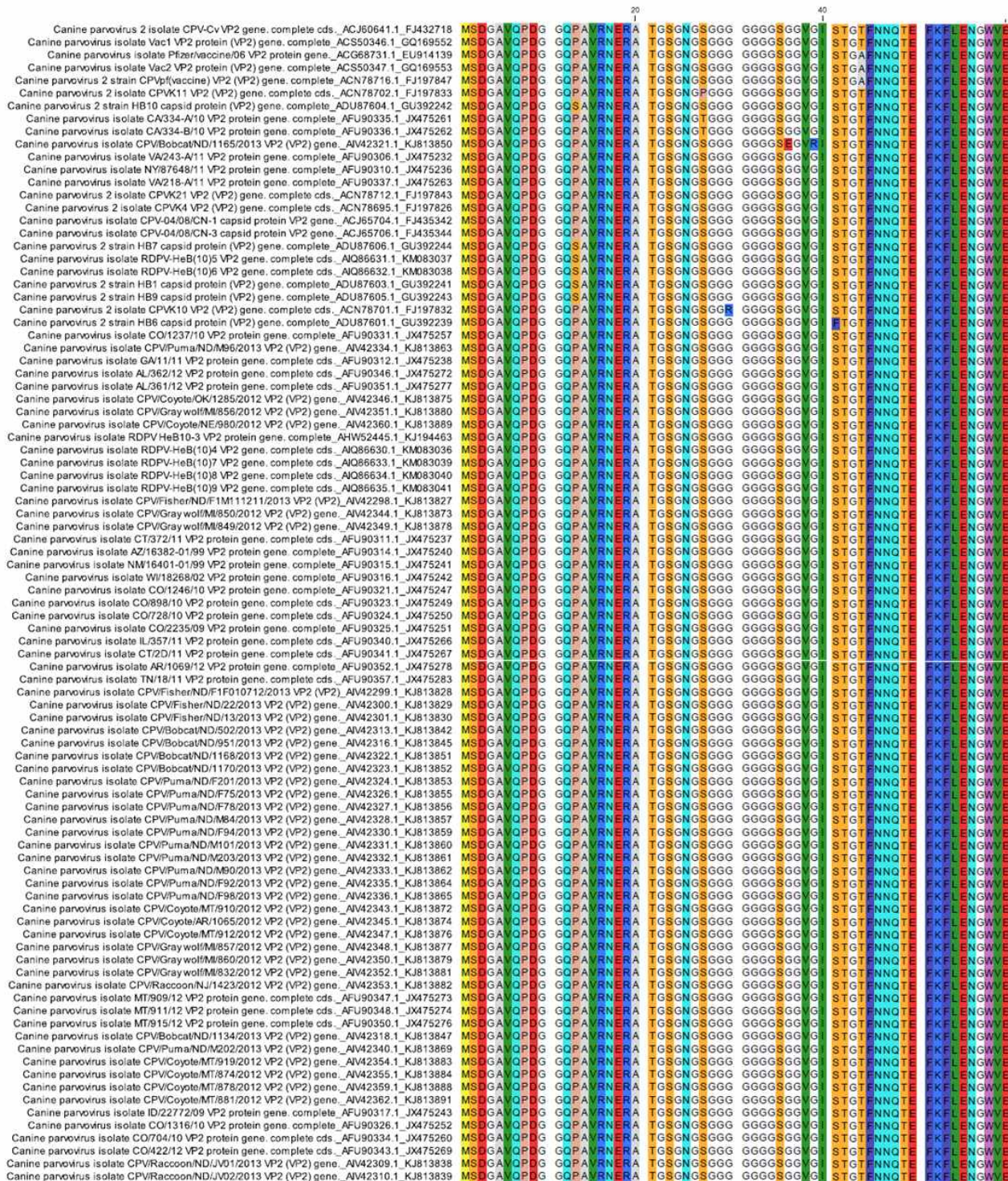


그림 6. Alignment of CPV-2 non evolute VP2 capsid proteins (1-60 residues)

(라) 설사 증상이 있는 애완견 분변 시료에서 CPV-2a 및 CPV-2C 검출

- 설사증상이 있는 개 분변 가검물 시료에서 DNA를 추출(시중에 판매되고 있는 DNA 추출 키트 사용)
- CPV-2 primer(표 1)를 이용하여 PCR 확인 및 CPV 전체 DNA sequence를 확보(그림 7)
- 시퀀스 분석 결과 CPV-2a와 2c를 확인
- 증폭된 유전자를 주형으로 식물용 Plasmid vector에 맞게 Primer를 디자인하여 PCR 한 후 각각 TA-cloning 실시(그림 8)

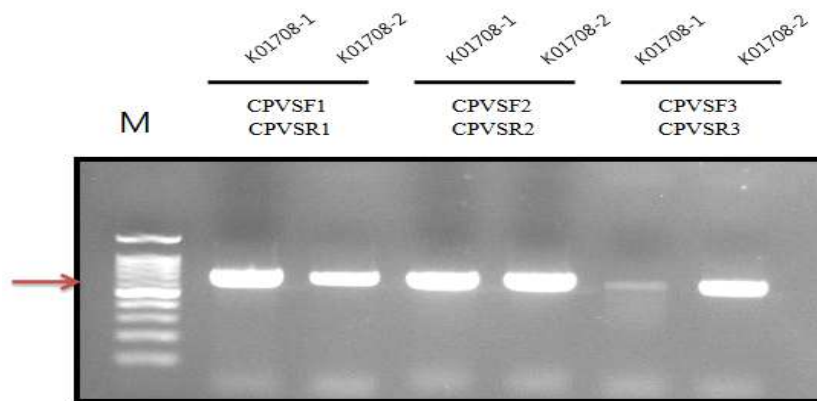


그림 7. PCR for identification of CPV 2 VP2 gene in faeces of dogs

(마) 설사 증상이 있는 애완견 분변 시료에서 CPV-2a 및 CPV-2C 바이러스 분리

- 가검물 유제액을 PBS 및 DMEM 배지에 희석해서 10% 유제액을 필터 접종액 준비
- A72 세포를 하루 전에 플레이트에 깔아서 배양 후에 유제액을 감염하여 세포와 바이러스를 접촉시켜서 60~90분 정도 감작을 시킨 후에 5% FBS 함유 배지를 첨가하여 바이러스를 분리 시도
- 3~4일 정도 배양을 한 후에 세포변성효과 관찰 후에 바이러스 분리를 시도하여 배양 후 바이러스 분리(그림 9)
- 세포 감염 후 계대 배양을 2~3번 진행하여 배양 된 plate를 얼렸다 녹이는 것을 3번 반복하여 원심 분리하여 세포를 가라앉혀서 배양액에서 DNA 추출한 후에 PCR을 진행

표 1. List of PCR primers used for PCR and nucleotide sequence assay

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
CPVSF1	CCA ACT AAA AGA AGT AAA CC	VP2	708
CPVSR1	TGG TTG GTT TCC ATG GAT AAA AAC C		
CPVSF2	AGA TAG TAA TAA TAC GCC ATT T		719
CPVSR2	TTT TGA ATC CAA TCT CCT TCT GGA T		
CPVSF3	ACA GGA GAA ACA CCT GAG AGA TTT A		736
CPVSR3	CCT ATA TCA AAT ACA AGT ACA ATA		

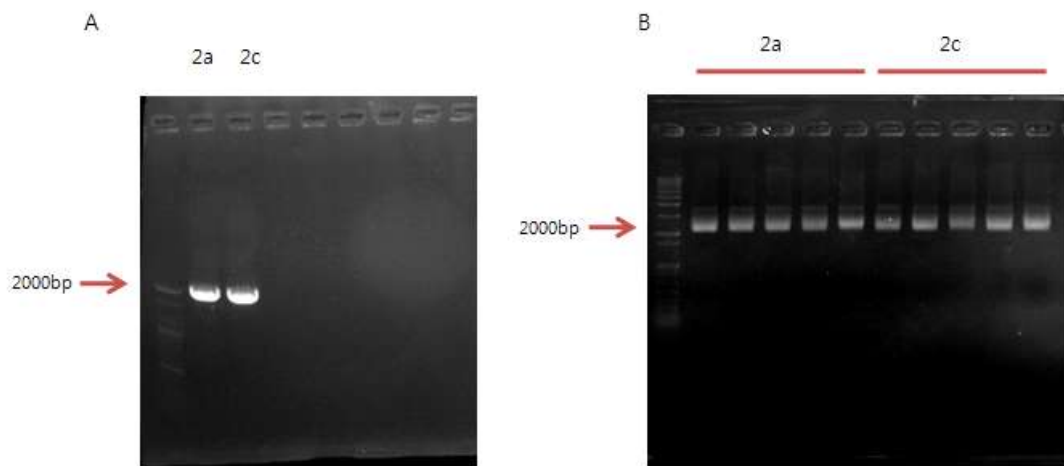


그림 8. Colony PCR of pGEM T-easy-CPV-2a and CPV -2c (A). Restriction Enzyme digestion of T-easy-CPV-2a and -2 with BamH1 and XmaI (B).

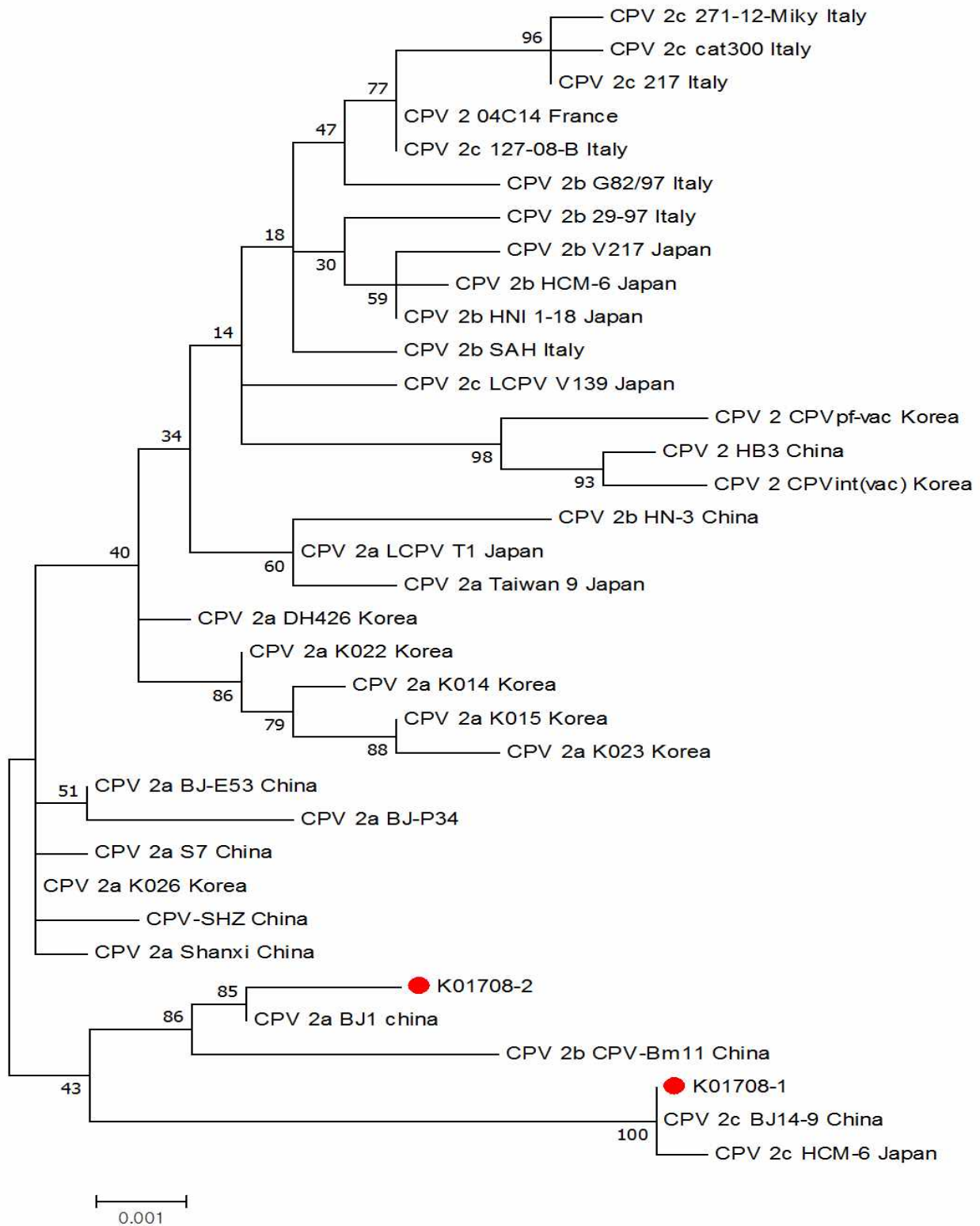


그림 9. Molecular phylogenetic tree by Maximum Likelihood method with CPV2 of the world

㉞ 2. Amino acid mutations of the VP2 gene sequences analyzed with South Korea and China

Genotype name	Amino acid at position					
	263	267	324	418	435	440
K01708-2 *	T	Y	I	I	P	A
CPV 2a BJ1 China*	T	Y	I	I	P	A
CPV 2a BJ-E53 China	T	F	I	I	P	T
CPV 2a K026 Korea	T	F	I	I	P	T
CPV 2a K014 Korea	T	F	Y	T	P	A
CPV 2a K015 Korea	T	F	Y	T	S	A
CPV 2a K023 Korea	S	F	Y	T	S	A
CPV 2a DH426 Korea	T	F	Y	I	P	T
CPV 2a K022 Korea	T	F	Y	I	P	A

㉞ 3. Amino acid mutations of the VP2 gene sequences analyzed with CPV-2c of world

Genotype name	Amino acid at position							
	5	231	267	274	300	324	370	426
K01708-1*	G	N	Y	R	G	I	R	E
CPV 2c BJ14-9 China*	G	N	Y	R	G	I	R	E
CPV 2c HCM-6 Japan*	G	N	Y	R	G	I	R	E
CPV 2c cat300 Italy	A	N	F	K	G	Y	Q	E
CPV 2c 217 Italy	A	N	F	R	G	Y	Q	E
CPV 2c LCPV V139 Japan	A	N	F	R	D	Y	Q	N
CPV 2c 271-12-Miky Italy	A	K	F	R	G	Y	Q	E
CPV 2c 127-08-B Italy	A	N	F	R	G	Y	Q	E

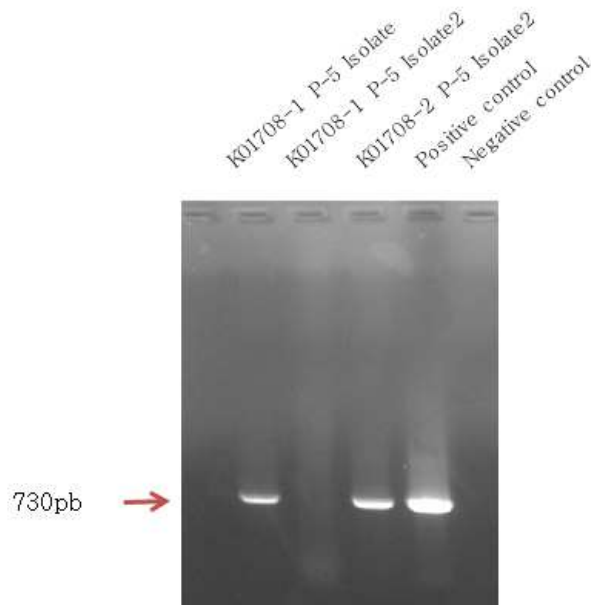


그림 10. PCR for identification of CPV 2 *VP2* gene in CPV-2 virus infected A72 cell

다. *Leptospira Canicola*에 대한 유전자 및 단백질의 변이조사

(1). *Leptospira Canicola* 유전자 정보의 확보

- *Leptospira Caicola*에 항원성을 나타내는 부위인 leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins Lig A 및 Lig B에서 90개 단백질이 병원성과 관련이 있으며, Outer membrane protein (OMP) 유전자도 항원성에 중요한 유전자 부위임

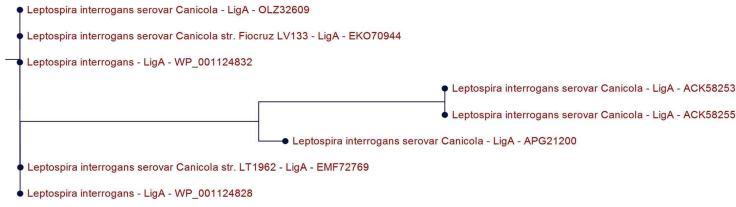
(가) 유전자 정보수집

- NCBI, KAHIS에서 *Leptospira Canicola*의 유전자 정보검색
- 정보 수집 : 항원성이 알려진 *Leptospira Canicola* protein LigA, LigB, LipL32, LipL41, OmpL1의 분절 서열 정렬, 메타데이터 수집

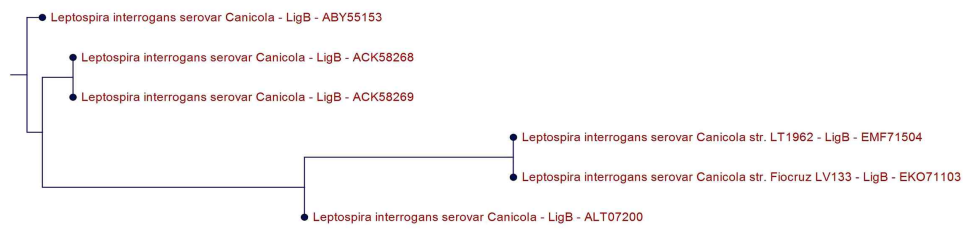
(나) 유전자형 분석 및 유전적 거리 분석

- 획득된 유전정보별 Multiple alignment 실시
- 유전자 정보로 Phylogenetic tree 작성

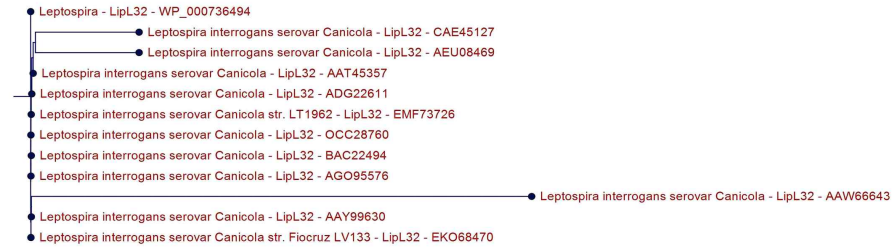
A



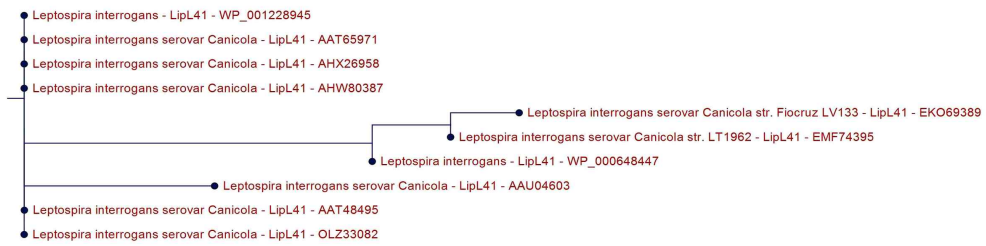
B



C



D



E

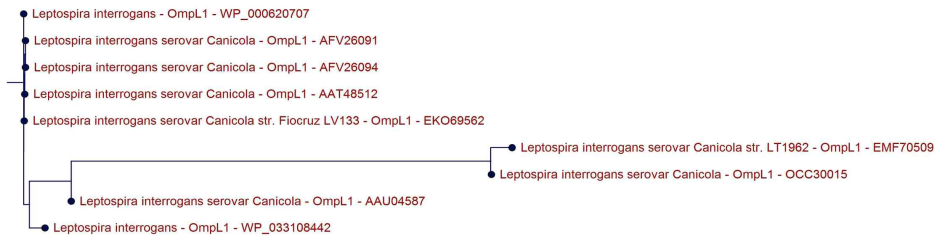


그림 11. Phylogenetic tree of *Leptospira Canicola* proteins (A : LigA, B : LigB, C : LipL32, D : LipL41, E : OmpL1)

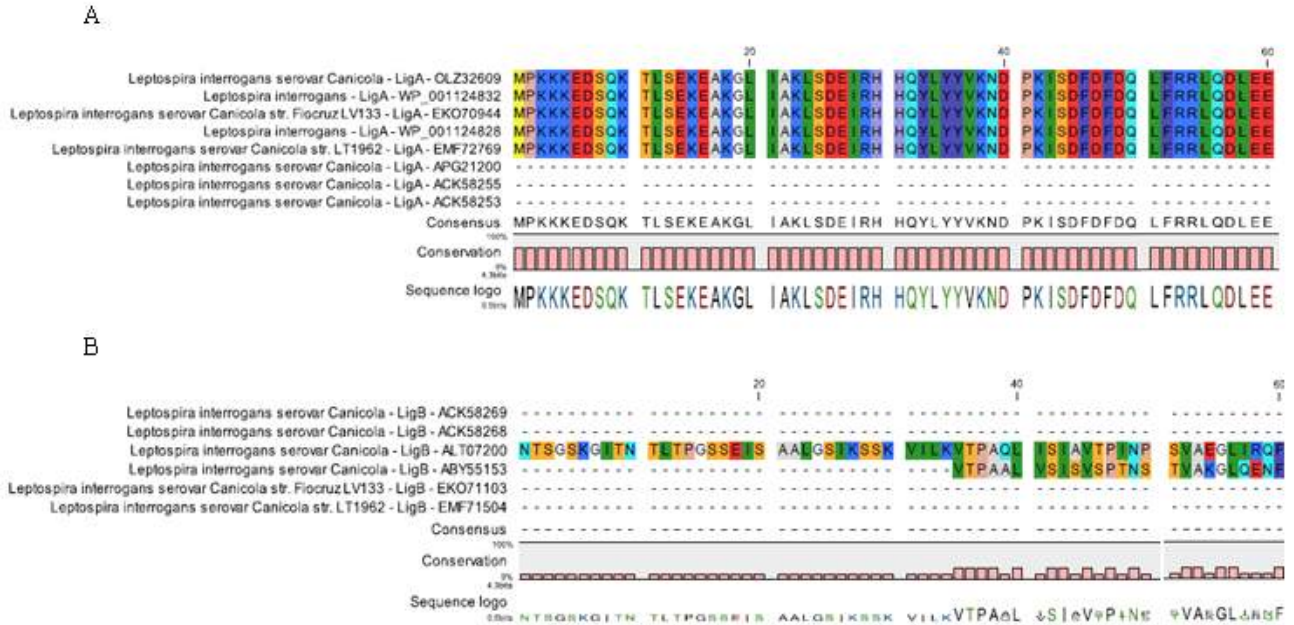


그림 12-1. Alignment of *Leptospira Canicola* Antigen proteins (A : LigA, B : LigB proteins)

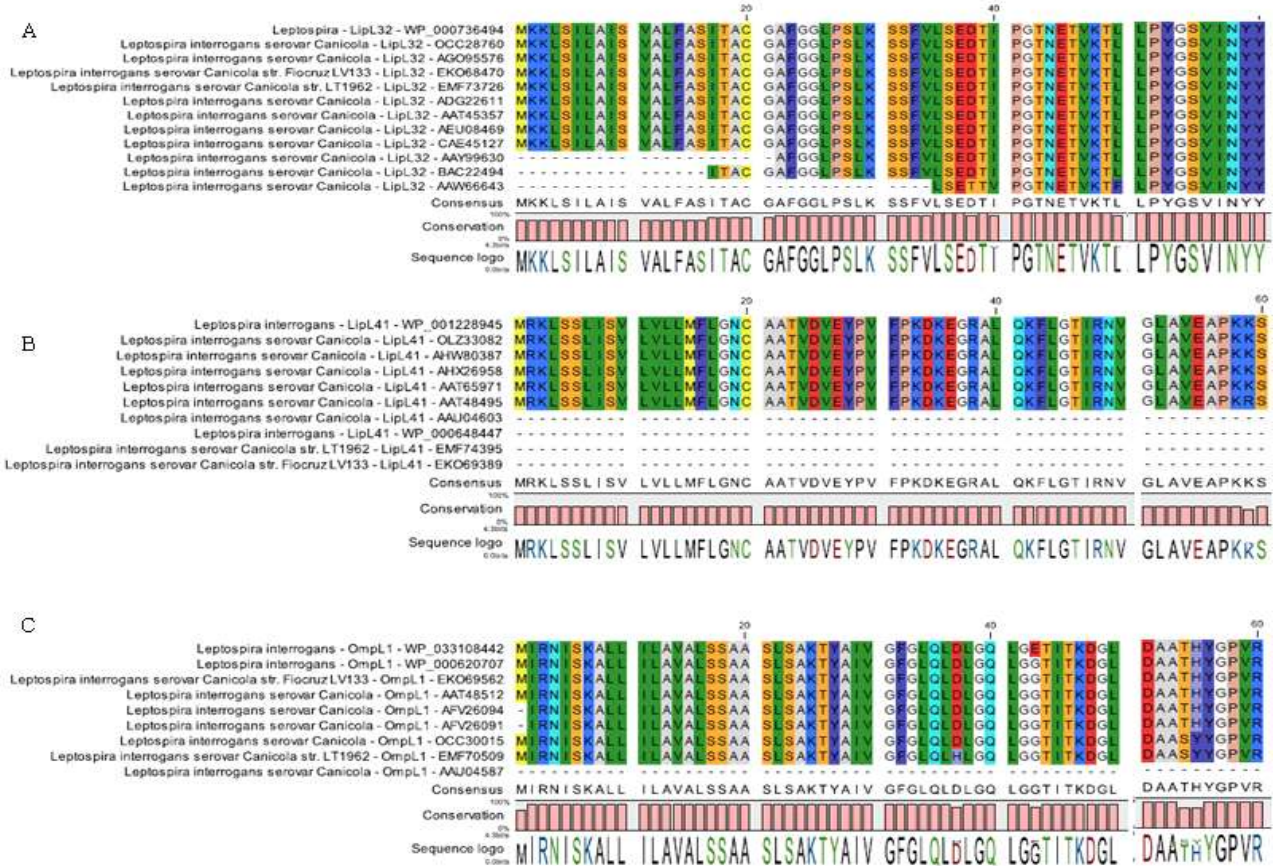
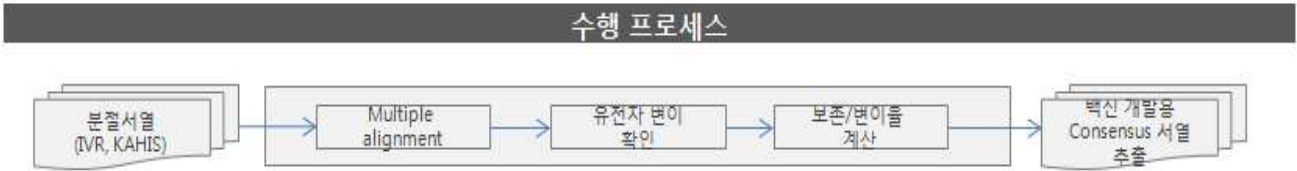


그림 12-2. Alignment of *Leptospira Canicola* Antigen proteins (A : LigA, B : LigB proteins)

2. 6종 바이러스 유전자 변이형 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발
 가. Consensus 서열 추출과정



나. 광견병 바이러스에 대한 유전자 변이형 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발

(1) 백신 개발용 Consensus 서열 추출

- (가) 취합정보를 통해 백신 개발용 표준 유전자 서열 추출
- (나) 각 추출된 유전자서열을 사용할 식물에 맞게 Optimization 실시
- (다) 조사된 유전자 정보를 이용하여 Nucleotide 합성

(2) Rabies G-protein plant OPT consensus sequence 확보

```

ATGGTTCCCAAGCCCTCTTTTCGTTCCGCTGCTTGTTTTTCTCTGTGCTTTGGCAAATTCC
CCATCTACACAATCCCTGACAACTTGGTCCCTGGAGCCCTATTGATATTCATCATTTGAGC
TGCCCGAACAATCTCGTAGTTGAGGACGAAGGTTGTACCAATCTCTCCGGCTTTTCTATAT
GGAATTAAGGTGGGATATATTTCCGCCATTAAGGTTAACGGGTTCACTTGTACGGGTGTA
GTTACTGAAGCAGAGACATACCAATTTTGTAGGCTATGTCACCACAACATTCAAGCGTA
AGCATTTCAGACCGACGCCGATGCCTGCCGTGCAGCATATAATTGGAAAATGGCCGGGG
ATCCAAGGTACGAAGAAAGCTTGCATAATCCCTATCCAGACTACCATTGGCTTCGTACGGT
CAAGACCACCAAGAATCACTGGTCATAATATCCCCTAGTGTGTCAGACTTGGACCCCTAC
GATAAGTCCCTGCATTCACGAGTCTTTCCCGCGGTAAATGTTTCAGGGATAACGGTATCTT
CTACCTACTGCTCTACAAACCACGATTATACGATTTGGATGCCTGAAAACCCAGGCTTGG
AACATCATGTGATATCTTTACTAACTCCCGAGGAAAAAGGGCCTCCAAAGGTAGCAAAAC
ATGTGGATTCGTCGATGAAAGAGGACTTTACAAGAGTCTGAAAGGCGCTTGTAAAGTTAAA
GCTGTGCGGAGTCTTAGGATTACGATTGATGGACGGGACCTGGGTTGCCATGCAAACGTCA
GACGAGACCAAATGGTGCCCGCCGATCAATTGGTAAATCTCCATGACTTTAGATCAGAC
GAGATTGAGCACCTTGTGTAGAAGAGCTCGTCAAAAAGAGGGAAGAATGCTTAGACGCA
TTAGAATCCATAATGACTACAAAAGTGTGTCTTTAGACGATTATCCCACCTGCGAAAAC
TTGTCCCCGGCTTCGGAAAGGCTTATACTATATTCAATAAAACACTCATGGAGGCCGACGC
CCATTACAAAAGCGTGCGTACATGGAACGAAATAATACCTTCAAAGGATGTTTTCGTGT
AGGAGGCAGGTGTCATCCTCATGTCAACGGTGTATTTTCAACGGGATAATTTTAGGACCC
GACGGACACGTCCTGATACCAGAGATGCAAAGTTCCTTGCTTCAGCAGCATATGGAGTTGT
TAGAGTCTCCGTCATACCGTTGATGCACCCTTTAGCCGACCCGAGCACGGTATTCAAGGA
CGGCGACGAGGCAGAAGACTTCGTTGAAGTCCATCTGCCTGATGTACACAAGCAGGTATC
TGGGGTTGACCTTGGTCTCCCAAATTGGGGCAAGTATGTCTTACTCTCTGCTGGTGCCTGA
TTGCTCTTATGCTGATAATATTCCTGATGACGTGCTGCAGACGAGTCAATCGTCCAGAAAG
TACACAACGATCACTGGGAGGCACAGGGCGTAAAGTGTCTGTTACCAGCCAGTCTGGAAA
GGTAATCAGTTCCTGGGAGAGTTACAAGAGCGGCGGCGAGACACGTCTCTGA
    
```


(3) Rabies M-protein plant OPT consensus sequence 확보

ATGAACTTTTTACGAAAGATAGTGAAAAANTGTCGAGATGAGGACACTCAGAAGCCGTCA
CCCGTCTCCGCCCCACCCGACGACGATGACCTGTGGCTCCCCCACCAGAGTATGTACCGC
TGAAAGAGTTGACTTCCAAAAAGAACATGAGGAACTTTTGCATCAACGGTGAAGTGAAGG
TTTGTAGCCCGAATGGGTATTCCTTCAGAATTTTAAGGCACATCCTGCGAAGTTTCGACGA
GATATACAGCGGAAACCACCGAATGATCGGACTCGTTAAAGTAGTCATTGGGCTTGCTTTA
TCTGGCGCACCAGTACCCGAAGGAATGAACTGGGTGTACAAGTTAAGGCGAACCCTTATA
TTTCAATGGGCCGACTCACGTGGTCCGCTCGAAGGAGAGGAACTCGAGTATAGTCAGGAA
ATAACCTGGGACGACGATACAGAATTTGTGGGTTTGCAGATTAGAGTATCCGCCCGACAG
TGCCACATCCAGGGCAGAATATGGTGCATCAATATGAACTCCAGAGCCTGCCAACTGTGG
AGCGATATGAGTCTCCAGACCCAGAGAAGCGAAGAAGACAAGGACTCCAGCCTTCTTCTC
GAATAA

(4) Rabies N-protein plant OPT consensus sequence 확보

ATGGATGCAGACAAGATAGTGTTCAAAGTGAATAATCAGGTAGTCAGCCTCAAGCCCGAA
ATCATAGTAGACCAGTACGAATACAAGTATCCGNCATAANGGATTTGAAAAACCTCC
ATTACGCTCGGCAAAGCTCCCGATTTAAACAAAGNCTATAAGTCAGTATTGTCTGGCATGA
ACGCCGCAAATTTGGATCCAGACGACGTGTGCTCTTACCTGGCTGCAGCTATGCAGTTCTT
TGAAGGGACCTGTCTGAAGACTGGACATCTTACGGTATTCTTATCGCTAGAAAGGGTGAC
AAAATCACTCCCGACAGTTTAGTAGAGATAAAAAGAACGGACGTGGAGGGGAATTGGGC
TCTCACGGGAGGAATGGAATTGACGCGTGATCCGACTGTATCTGAACACGCCTCTCTCGTC
GGGCTCCTTTTATCTCTGTATAGGCTGTCCAAGATAAGCGGTCAGAATACTGGGAACTACA
AGACCAATANCGCCGACAGAATAGAGCAAATTTTCGAGACCGCTCCTTTCGTAAAGATTG
TAGAGCACCACACTCTTATGACCACTCATAAAATGTGTGCTAATTGGTCAANCATCCCAA
CTTTCGTTTTTTAGCAGGAACATATGACATGTTTTTCTCCCGTATTGAGCATTTATACTCCGC
AATCAGGGTCGGAACCGTGGTGACCGCATATGAAGACTGTAGTGGATTGGTGTCTTCACG
GGATTTATCAAACAGATCAATTTGACCGCCAGAGAGGCCATTCTGTNATTCTTTCACAAA
ATTTTGAAGAAGAGATTAGGAGAATGTTTGAACCGGGGCAGGAACTGCCGTACCACACA
GCTATTTTATACATTTCCGATNACTCGGTTTATCTGGGAAGAGCCCTTACTCAAGCAACGCT
GTGGGACATGTATTTAATCTGATACACTTTGTAGGCTGCTATATGGGTCAGGTGAGATCAC
TTAATGCCACGGTAATTGCCGCTTGTGCTCCCCACGAGATGAGTGTCTTGGGGGGTATCT
GGGAGAAGAGTTCTTTGGGAAGGGGACGTTTGAACGACGTTTTTCCGTGATGAGAAGGA
ACTGCAGGAATACGAGGCTGCTGAGTTGACTAAAACAGACGTTGCCTTGGCTGATGATGG
TACCGTTAATAGCGATGATGAAGATTACTTTCCGGGGAGACTAGATCCCCGGAGGCAGT
GTACACACGTATAATGATGAATGGAGGCCGTTTAAAGCGTTCTCACATAAGGAGGTATGT
AAGCGTAAGCTCTAATCACCAGGCAAGACCTAATTTCTTTCGCTGAATTTCTCAACAAGACG
TACAGCAGCGACTCCTAA

다. 개 파보바이러스에 대한 유전자 변이별 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발

(1) 백신 개발용 Consensus 서열 추출

(가) 취합정보를 통해 백신 개발용 표준 유전자 서열 추출

(나) 각 추출된 유전자서열을 사용할 식물에 맞게 Optimization

(다) 유전자 정보를 이용하여 Nucleotide 합성

(2) CPV-2a plant OPT consensus sequence 확보

GCAACTGGGGCTGGGACTGGCGCTACTGGCGGGGCAGGATGCGCCGGA ACTACATGTGCA
GCCTGCTGTGCCGGAGCTTGC GGTGGGACCGGCGGTACATGCGCCGGTTGCTGCACCGGGT
GTACCGGTACTTGTGCCGGAGCTGCCGCAACTGGCGCTGCTGCAGGGGCAGGGTGCACCG
CATGCGCTGGCGGTGCCACATGTACCGGCGGGGGTGCCGCATGTGGTGGAGGAACCTGCA
CGGGCGGAGCAGGAGGTTGCGGAGGAGGTGGAGGGACTGGGGGAACGGGAGGCACGGG
AGGCACGACCTGTACCGGGGGGGGGCGGGGAACCGGA ACTGGTGGGGGGGGTGCCACTA
CTACGTGTACTGCATGTGGGGGTGGCACTGCTTGCAACCACA ACTTGTGCTGCTACTGCCGC
AACTTGTGCAGGTGCATGCGGGGGGGCTGCAACGACAACCGCCGCAGCAACCACTACGA
CCACGGGTGGCGCAGCAGCCGCTTGC GGTGGCGCCACGGGTGGCGGGACGGGCGGTGCCG
CTGCTACTTGCGCCTGCGCAGGTTGTGCCGCAGCATGTACATGCGCCGCTGGCTGCGCAGG
GGCCTGCACCACAGGCACGGCTTGTGCTACCACGACCGCTGCAGCAACCGCAACGGGTTG
CTGCGCCGGTGCCGCAGCCGGCACTGGGGCCGCTGCAGCAACTACAGCTACCGCTGGGGC
CGCTGGTGTGCTGGGACCGGCGGTACGACAGGTACCGCCGCCACTGCTGCCACGACTAC
TGGTGGTGTACAGCAGCTGCTGCCTGTACAGGTTGTGCCGGAACCAACCGCAGCTTGTGGC
GGCGCCGCCCTGTGCAACGGGCGGTTGTACAACCACTGCCGGCGCTACGGGCGCAACA
GCATGTTGCTGTGCCACTGGTTGCGCTTGC GCAGCAGCCACAACAGGAACAGCAGCTTGTG
CATGCTGCACGACGGGCGGAACGTGCGCAACCAACGGGCGGGACTACCGGTGCAACGGGT
TGTGCTGCAGCAACGGGGTGCACCACCGGTGGCGGCGGAGCAGGGACTACAACGGGAGG
AACC ACTACGGCCGCCACCTGCTGTGCTGGCGGTGCCGGAGCTACCACAGGTGGATGTGC
CGCCTGCACTGCCGCCACTACAGGAACGACTGCTGCAACAGCATGTACTGCAACCGGCGC
TGGTACCGGAGCCGGGACGACTGGTTGCGCAACGACGACGGCAGGAACTACGGCTGGTAC
CACAACCACTGGTGCAGCCTGTGCCGCCGGCGCCGCAGCCACGACGACAACAACAGCCG
CCACTGGTACCACAGGTACAACCACTACTGCTGCTGCTGGAGCCTGCACAGGAACTACAA
CTTGCGCTGGTGTGCTGCAACTTGTACGGGATGTACCGCATGTACATGCGCTGGGTGCTGTGC
TTGTGTGCCGCTGTACCGCTGCTGCTGGAACGACTACGGCCACTGCCGCCACAGCCGCC
ACAGGGGCAACGACCACCGCTGCCTGTACCGGATGCGCTACATGCGCTACCACAGGGGCT
ACGGGGGGCACTACAGGCTGCGCAACAACCGCTGGCGCTACTGCCGGCACGGCCGCTACC
GCAGCAACGGCATGCACTGCTACAGGTTGCTGTGCAACCACCACTGCATGTACATGCTGTG
CCGGATGCGCAGGCTGCACAGCTACCGGTGCAGGGGCTACTTGCACCGGTGCTGGTGCTTG
TGCTACCACAGGAGGCGGGACCACTACAACAACAGCTACTTGTGCTGTGCCACAGGGGGGGC
CGCCGCCTGCTGCGCAGCTTGTGTGCAACAGCTTGTGTGTCAGCATGCACATGTTGCGCT
ACGGGTGGAGCCGGTGC AACTGCTACAACGGCAACTACTACAACATGCGCAGCCACGGG
AGGAGGCGCAACGGCTGGGGCCGCATGTGCTACAACAGCCGCCACGGCCTGTTGTGCAAC
TTGTACATGCGCAACCGCCTGTACTGGTGGGGCTGCATGTACCGCAGGAACAGGAGGCTG
TGCCTGTGCCTGTTGTGCTGCTTGTGTCAGCAGCTACCGCTACGGCTACTGCCTGTTGTGCAA

CGGGGGGCACCGCCTGCGCTGGAGCTACATGCTGTGCAGGAGCTACCGGCGCTACTGGCA
CCACGTGCGCAGCCACCACTACAACACTGCAACAGCTTGTACTGCTACGACGGGTGCAGCAG
CCGCCACGACTTGCCTGGTACGGGATGCTGCGCCGGTACGGCCTGCGCTTGCACCACTGC
ATGCACTGCCGCTGGAGCCGCATGTGCAGGCGGAACCGGAGCAACCGGTGCAGCCACCA
CCACTGGGTGCACGGCCTGTGCAGGTGGAGCAGCCTGTGCAACGACTACCACTACTACCA
CTACCACGGGTGCCACAACGGGCACTGCTGCCGCTGTTGCGCAACAGGGACCGCCGGTG
CTTGACAGCAGCCTGCGCCTGTGCAACAGCCTGCGCAACTGGCGGGTGTGCCGCAGCAT
GCGCAGCTGCCACCGCCGGCGCAGGGTGCGCAACTACTGGGGGAGGCTGTACAACACTGCTT
GCTGCGCTTGTGTGCCACAACACTACATGCACTGCCGCCGCAACAACCTGTACGACGACGG
GTTGTTGTACGTGCGCCGCCGGCTGCACGGGGGCCCGCGGTGCTGGAGGTACAGCAT
GCACCGCTGCTTGTACCACAACCGGAGGGACTACAGCAACAGCTACTGCAGGAGGTGCCG
GTACCACATGTGCCGCTTGTGCAGCAGGAGCTACAGCAGCTGCAGCAGGTGCTTGTGGTA
CAGGTGGTACGGGGACAGCAGCATGCACGTGCGCTGCTGCAACAGGGGGAGGCGCAGCT
GCAACGGCATGTGCCGCCGCTGTGCCACCACTGCAACGACGGCTTGTACAGGAGCAGCA
GGGTGCACGGCATGCACGGCTACGACGGCAACTGGAGCAGGTGCATGCTGCGCTGGTTGC
ACCGGAGCAGGTGGGACAACAGGTGGAACAACAGCTACTGCTGGAACGGGTGCGCATG
CTGCGCTACAGCTACAACCGCCACCACATGCACAACACTACTACCGGGGCAGGGGGGTGCGG
AACCTGTACAGCATGTGCTTGTGCAGCCGGCGGAGGGTGTGTGCTACCACTACAGCAGCT
GCAGCATGCGCCTGCTGTACGGCTACTACGGGTGTGCTGGGTGTGCAGGCGGGGCTTGTG
GTGGAGGGGGCGGTGGCGGAGCCGGATGTGGATGCGCTGCAGCCTGTGCAGGCGCCACGG
GAGCTGCTGCCGCAACTTGCGCCGCTGGGTGCGCTGGTTGTGCTGGTGCCACTGGCGGTAC
GGGGGCCACGTGTTGCGCTGCAGGGGCTACGGCCACTGGATGTGCCACGACGACTGGTGG
GACCGCCGGAGCATGTGCTGCTTGTGCCACTGGCGGTACATGTGCAGCTGCAGCAGCTGCT
TGTACGGCTTGTGTGCTTGTGCGCTGCTTGTGCCGGGGAGCAGGTGCTGCAGCATGTGCTT
TTGTACTGGGGCTGGCGCAGGAGCAACCACAACAGCCTGCGCCACCGCCACAGCAACTGC
AGGGTGTGCATGTGCAACCTGTGCCGAGGGGCTACTGCCTGTGCCGGCGGTGCCGCTGG
AGCAACCGCAACGTGTTGCGCAGGCGCAGCTGGTGGTGTGTTGGGCTACTACCGGCGGGCG
TACCACATGTGCCGAGCAGCTACGGCCACGACCGCAGCTTGCACGACAACAGCCGCCTG
CTGTACAACATGTTGCACGGGGACTGCCGCTGTGCAGCTGCTACGGGTGCTACGGCAGCT
ACGGGCACGGCAACCACGGGTGTCACGGCCTGCTGCGCCGCTGCGCTGGGGCTACATGC
TGCCTGCCACTACGGGTGGTGCCGGCGGCACTGCAGCAGCAGCCTGCGCAGGTGGAGCC
GCCACTACTGCTGCCTGTACAGCTACAGCCTGTACTGCAGCCACCGCAACCGCCACCACC
ACCGCAGCCACTGCCTGTACAACAGCTACTGGCGGGACCTGCTGCACAACACTACGGCTGCA
TGCACGGGATGCGCAACGACTGCAGCCGCTACGGCCGCAACGGGTACAGCTTGTGTGCC
TGCTGTGCTGGTACAACACTACAGCTACTTGTGCGCCGAGCCACGGGGGGTACTTGTGCGCC
CCGCCACAACGACTGGCGGAGGGGCAACTGCTGCTGCTGGAGCCGCAACCACTACAGGA
GCAACTGCATGCACCGGTGCTTGCACGACAGCAGCTGCTGCATGCTGCGCCGAGGGGCA
TGCACCACCTGCGCTACAGGCACAGCTGCTGCTACGGGGTGTGCATGCTGCGCCACTACTA
CCGGGACGACTACGGGGACTTGTGCGAGCCGCCGCAACTGCCGCCACGACCGGAACATGTT
GCACGGGAGGCACATGCGCTGCCACTACTGCTACGACAACGGGTACCGCCGAGCTGCAG
GTACGACGGGTGTGGCTGCTGCACAGCAGCTACTACAACCGCAGCATGTGCTGCCGCTAC
CGGTGCAGCAACCGCCACTGGAGCCACGTGTTGTACTGGGGCTACGGGTGTGCAACCTG
CACAGGATGCACGGCTGCAACCGCAACAGGTACATGCGCTGCAGGTGCTGCTACAACAGG
CACAGCTGCATGCACTACTGCATGCACCTGCGCTGGGGCTACAACAACCACTACCGGCGG

AACAGGGGGTGCCGCAGCAGGTGGAAGTGCAGCCGCCACTACGGCAGGGACGGCTACCA
CTACTGCTGCAGCCGGTTGCACAGCAGCTGCATGTACCGCCGCCGGTGCAGGTTGCTGCAC
CTGCACTTGTGCTACGGCATGCACAACGGGAGGCGCTGCTACATGTTGTGCAGCTACCACG
TGTGCAGCTTGCAGCTGCCACTGGGGCTGGGACTGCTACGACTGCTGCAACAGGTACC
GCTGGTGCCACGGCAGCTTGGCTGCGCAGCCACTACGACTGCCGCATGTACGGCAACGGGC
ACCGCATGTTGCGCAGCAGGGACTGCTGCTACGGCCACTACTGGGGGGGGCCGGAGGTACT
GCAACAGGCGCTGCCGCCGCTACTACAGGGACTGCCACCGCAACTGGCGCAGCCGCTGCT
GCTACATGTACATGCGCTGCCTGCACTGCAGGCTGCGCATGCTGTACAGCCGGAGCCGCA
GCTGCAACCACAGCCACGGCTACAAGTGTGCA

(3) CPV-2b plant OPT consensus sequence 확보

ATGTCCGATGGAGCAGTTCAACCGGACGGAGGACAACCCGCTGTTTCGTAATGAACGAGCA
ACAGGTTCTGGAAATGGTAGTGGTGGCGGGGGTGGAGGTGGTTCAGGTGGGGTAGGAATA
TCTACTGGCACTTTTAAACAACCAGACTGAATTCAAATTCCTGGAAAATGGATGGGTTGAGA
TCACAGCTAATTCATCTAGACTCGTACACCTCAACATGCCAGAATCAGAGAACTATAGGA
GAGTAGTTGTCAACAATTTAGACAAAACGGCAGTTAACGGGAATATGGCCCTCGACGACA
CCCATGCCCAAATCGTGACGCCATGGTCTCTGGTGGACGCCAATGCCTGGGGCGTTTGGTT
TAATCCGGGTGATTGGCAGCTGATTGTCAATACGATGTCAGAGCTTCATCTGGTTAGTTTTG
AACAGGAGATATTTAATGTAGTGTGAAGACAGTCTCTGAGTCTGCTACCCAGCCGCCAC
GAAGGTGTACAATAATGATCTGACAGCATCATTGATGGTGGCTCTCGATTCAAATAATACG
ATGCCGTTTACGCCTGCCGCCATGCGATCCGAAACACTGGGATTTTATCCGTGGAAACCTA
CTATCCCCTCCGTGGCGTTATTATTTCCAATGGGACCGAACCTTGATTCCGAGCCACACC
GGAACCAGCGGTACGCCACGAATATTTATCATGGCACTGACCCAGATGATGTACAATTTT
ATACTATAGAAAACAGCGTTCGGTACATCTGCTGCGAACAGGCGACGAGTTTGCTACAG
GGACTTTTTACTTCGACTGTAAGCCTTGCCGACTGACCCACACTTGGCAGACCAATAGAGC
ACTTGGACTCCCCCATTCTCAATTCCTTACCGCAGGCCGAAGGAGGTACAAATTTTGGGA
TATATAGGGGTGCAGCAAGATAAGCGTCGAGGTGTAAGTGGGTTACAGTGCTCCCTATTACTCTT
TTGAAGCAAGCACACAAGGGCCGTTCAAACCCCAATAGCTGCCGGTAGGGGAGGAGCC
CAGACTGACGAGAATCAGGCCGAGATGGCGACCCTAGATACGCCTTTGGACGTCAACAT
GGACAGAAAACGACAACACTACCGGGGAGACACCGGAACGATTCACATATATAGCCCATCA
GGATACAGGCAGATACCCCGAAGGTGATTGGATCCAGAATATCAATTTCAACTTACCTGT
GACGGACGACAACGTCCTCCTTCCAAGTACCCCATCGGAGGAAAAACGGGAATAAATTA
CACGAACATCTTCAACACATATGGCCCACTGACCGCTCTCAACAACGTGCCGCCCGTGTAT
CCAAACGGGCAGATATGGGATAAAGAGTTCGATACGGATTTAAAGCCAAGGCTTCATGTT
AATGCACCGTTTGTGTTGTCAGAATAATTGCCCTGGGCAACTGTTTGTAAAGTCGCCCCGA
ATCTTACTAACGAGTACGACCCAGACGCATCCGCCAACATGTCGCCGAATAGTCACCTATTC
TGATTTCTGGTGGAAAGGGCAAGCTTGTGTTCAAAGCTAAGCTTAGGGCATCTCACACATGG
AATCCCATACAGCAAATGAGCATTAAATGTTGATAACCAATTCAACTACGTTCCATCTAACA
TCGGTGGTATGAAAATCGTGTATGAAAAGAGCCAGTTGGCTCCCAGGAAATTGTACTAA

(4) CPV-2c plant OPT consensus sequence

ATGTCTGACGGGGCCGTACAACCCGACGGTGGGCAGCCGGCTGTCAGGAACGAGCGAGC
AACAGGATCTGGGAATGGCAGTGGAGGGGGCGGAGGAGGAGGGTCCGGTGGAGTAGGTA
TTTCCACTGGCACCTTTAATAATCAGACCGAATTTAAATTTCTCGAGAATGGGTGGGTCTGA
AATCACGGCCAATAGCTCACGTCTGGTCCATCTTAACATGCCGGAGAGTGAGAATTACAG
AAGGGTCGTCGTCAATAACTTGGACAAGACTGCTGTCAATGGGAACATGGCTTTAGACGA
CACCCATGCTCAAATTGTCACTCCATGGTCACTCGTGGACGAAACGCATGGGGTGTATGG
TTTAACCCGGGAGATTGGCAACTCATTGTAATACTATGTCTGAACTGCATTTAGTGAGTTT
CGAGCAGGAGATCTTCAACGTTGTACTTAAAAGTGTCTCCGAGAGCGCAACTCAACCGCC
AACAAAGGTTTATAACAACGACCTTACTGCTTCCCTCATGGTGGCTCTTGATAGCAATAAC
ACAATGCCGTTTACGCCAGCCGCAATGAGGAGTGAAACCTTGGGATTCTACCCCTGGAAA
CCCACGATACCGACGCCCTGGAGGTAATACTTTCAATGGGATCGAACATTGATACCATCTC
ACACAGGCACCAGCGGAACCTCCGACTAATATCTACCACGGAACTGATCCTGATGACGTGC
AGTTCTACACAATAGAAAACAGTGTGCCGGTGCACCTTGCTGCGAACAGGAGATGAGTTG
CAACAGGAACATTCTTCTTTGATTGCAAACCTTGTAGACTGACTCATACTGGCAGACCAA
CAGGGCCCTTGGGTTACCACCTTTCCTCAATTCTTCCACAGGCAGAAGGAGGGGACGAAT
TTTGGCTACATAGGTGTCCAACAGGACAAAAGAAGAGGAGTGAAGTACTCAGATGGGAAATAC
CAATTACATTACAGAAGCTACGATTATGAGACCTGCTGAGGTCGGATACAGCGCACCGTA
CTATAGTTTTGAAGCTTCTACGCAGGGCCCCTTTAAGACGCCAATAGCCGCAGGACGTGGT
GGGGCTCAAACAGACGAGAATCAGGCTGCTGACGGCGATCCACGTTACGCATTTGGACGA
CAACATGGCCAGAAAACGACAACAACCGGGGAAACACCGGAGCGATTACATACATCGC
TCACCAGGACACAGGGCGTTACCCCGAGGGAGATTGGATTGAGAACATAAATTTTAACTT
ACCAGTAACAGAAGACAACGTAATCTTACCCACTGATCCCATTGGTGGAAAGACTGGTAT
CAATTACACCAATATATTCAATACTTACGGTCCCTTGACTGCCCTGAACAACGTGCCCCCT
GTATATCCTAATGGTCAGATATGGGATAAGGAATTTGACACTGATTTAAAGCCTCGTCTGC
ATGTCAACGCTCCTTTTCGTATGCCAAAATAACTGCCCCGGGCAGCTTTTCGTTAAAGTCGCT
CCTAACTTAACGAATGAATACGACCCTGACGCAAGCGCAAACATGTCACGTATCGTTACG
TATAGCGATTTCTGGTGGAAAGGGCAAGCTCGTTTTTAAAGCCAAGCTGAGAGCAAGCCAC
ACTTGGAACCCCATCCAGCAAATGTCAATAAATGTAGACAACCAGTTTAATTACGTGCCCT
CTAATATCGGCGGCATGAAGATAGTCTATGAAAAGAGTCAGCTGGCACCGCGTAAGTTAT
ACTAA

(5) CPV-2 non evoluted plant OPT consensus sequence

ATGTCAGACGGAGCAGTACAACCAGATGGGGGGCAACCGGCAGTGCCTAACGAGAGGGC
TACTGGAAGCGGGAACGGATCAGGAGGTGGTGGGGGGCGGGGGTTCCGGAGGAGTTGGTA
TTTCTACCGGAACCTTTAATAATCAAAGTGAATTCAAGTTCTTAGAGAATGGATGGGTAGA
AATCACGGCAAATAGCTCAAGACTCGTCCATTTGAATATGCCAGAAAGTGAGAACTACAG
AAGGGTTGTTGTAATAACCTCGATAAGACCGCCGTGAATGGGAACATGGCATTGGATGA

CACTCATGCCAGATAGTGACACCCTGGTCTTTGGTAGATGCAAACGCATGGGGCGTCTGG
TTCAACCCAGGTGATTGGCAGCTTATCGTAAATACCATGAGCGAGCTTCATTTGGTATCTTT
TGAACAGGAAATTTTAAATGTAGTATTGAAAACGGTCTCTGAATCAGCCACCCAACCGCCA
ACTAAGGTCTATAACAATGATCTCACGGCTTCACTCATGGTAGCACTGGATAGCAATAACA
CTATGCCTTTTACTCCGGCTGCAATGAGATCCGAGACGTTAGGTTTTTATCCTTGGAAACCG
ACGATTCCAACACCTTGGAGGTAATTTCCAGTGGGATAGGACTCTGATTCCGAGCCATA
CCGGAACCTCAGGAACGCCTACCAATATCTATCATGGCACTGATCCGGACGATGTTTCAGTT
TTACACTATTGAAAACCTCCGTTCTGTTTCATCTTTTAAAGGACTGGCGATGAATTCGCTACGG
GCACCTTCTTCTTTGACTGCAAGCCTTGTAGACTGACTCATACTTGGCAAATAACAGAGC
CTTAGGGTTGCCGCCGTTTCTTAATAGTCTCCCTCAGGCCGAAGGTGGAACAACTTTGGG
TACATAGGTGTTCAACAAGATAAACGTCGAGGGGTGACGCAGATGGGCAATACGAATTAT
ATAACGGAGGCAACTATAATGCGACCTGCCGAAGTGGGATATTCTGCACCGTATTACTCCT
TCGAAGCCAGTACGCAGGGGCCTTTTAAAGACGCCAATCGCCGCCGGTAGGGGCGGTGCTC
AAACCGACGAGAACCAGGCCGACGACGGCGACCCAAGGTACGCATTCGGGAGACAGCAT
GGGCAAAAACCACGACCACCGGCGAGACGCCAGAACGATTTACATATATTGCTCACCA
AGACACAGGTCGTTACCCCGAAGGTGATTGGATTCAAATATAAATTTTAAATTTGCCGGTG
ACTAATGACAACGTTCTCTTGGCCGACTGATCCCATAGGAGGAAAAACAGGGATAAATTAT
ACAAACATTTTCAACACTTACGGTCCTTTAACAGCCTTGAATAATGTCCCCCAGTGTACC
CTAATGGGCAAATCTGGGACAAAGAATTGATACTGATTTGAAGCCCCGATTGCATGTTAA
CGCTCCGTTTCGTATGCCAAAATAATTGCCCGGGCCAATTGTTTGTAAAGTTGCTCCTAATC
TTACGAATGAATATGACCCTGATGCATCCGCTAATATGTCTCGAATCGTGACATACTCTGA
CTTCTGGTGGAAAGGAACTTGTTTTTAAAGCTAAGCTGCGTGCAAGTCATACCTGGAAT
CCTATCCAACAGATGTCTATTAATGTGGATAACCAGTTCAACTATGTGCCTTCCAATATTGG
GGGTATGAAAATTGTATATGAAAAGTCTCAACTCGCACCGAGGAAGCTTTATTA

라. *Leptospira Canicola*에 대한 유전자 변이별 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발

(1) 백신 개발용 Consensus 서열 추출

- (가) 취합정보를 통해 백신 개발용 표준 유전자 서열 추출
- (나) 각 추출된 유전자서열을 사용할 식물에 맞게 Optimization
- (다) 유전자 정보를 이용하여 Nucleotide 합성

(2) LigA plant OPT consensus sequence 확보

ATGCCGAAGAAGAAAGAAGATTCTCAAAAACGTTGAGCGAAAAGGAGGCAAAGGGAC
TTATCGCAAAGTTATCTGACGAGATTAGACACCACCAGTACTTATATTATGTTAAAAATGA
TCCGAAGATCTCAGATTTTCGACTTTGATCAATTGTTTAGGAGGTTACAAGACCTCGAAGAA
GAATTCCCTCAGTTCAAGGATTTGGCTAGCCCCACGCTCGTTGTGGGCTCCGACCTTGATA
AGGATTTTCGAGAAGTTCCAACATAAGCTTCCAGTGTGTCACTGATAAACACGTACAATGA
TAACGAATTATTAGAATGGGTTAATAAAAACAGACCCCGAAGGTCTTTACTCAGTGGAGTG
GAAAATTGATGGAGCTTCCATCGTTTTATACTACGAAAACGGCATCCTTAAAAATGGGGTG
ACTAGGGGTTCCGGGGGGACTGGTGACGACGTCACCGACAACATCAGGACTATTAGGAAC
ATACCTCTCAGGTTACCAGAGCCAATCACTGTGTACTTGGCGTGGAGAGGTATTTATGACTTT

CAAGGATTTCTGAAGAATTCAATGCTCTTTCTAGTGGGAAGTATGCTAACCCGAGAAACCTT
AGTGCCGGCAGTATAAAGCAAAGAATAGTTCCGATACTGCCAAACGACCTTTGAGGATC
TTTACATATGATGCCACGTTCCCTAATATGGAAAAGAAGTTTAAGACACACCAAGAAATA
TTCTCTAAGCTCGAAAAGCTCACATTCCTGTCCCCCGAACACCGCTTTTGTCTCCGGGTC
AAAAATAGCTAAGACAATTCAAGAGTTTAAGAAGCAGAAAGACAGTCTTGGCTTCCCCAC
TGACGGCTTGGTTATTAACCTTAATGACATTAGCAAGCGTGATGCCTTGGGGTATACTAGC
CACAGTCTCGATGGGCCAGAGCTTATAAGTTCGACGCCATCATGAAGGAGTCAAAGATA
GTTGACATTACATATGCAGTGGGTGCGAACTGGAAAAATCACGCCAGAGCAGAAATCGAA
CCAATATCACTCGCAGGTACAACGGTCACCTTCGCAACTTTGCACAACCAGGACTACATTG
ATGAATTAGGTGTAGGTATCGGTGCTATAGTAAGAGTAGCCAAAAGGGGAGAAATAATTC
CTGCAGTGGAGAAGTCGTCACACCAGGCAAAGAAGTATTTAAGATTCCAGATCGTTGTC
CCAGTTGCAATACCCAGACCATTAAAAAGGAGTCTCTTGTGGACCTTTTCTGTCCCAATCC
CGATTGCCAGATAGGGTGAAAAACGGAATAATCTTCTATTGCCAGAGGAAGCAAATGGA
TATTGAGGGTCTTGGAGATAAACAATTGAGTTTTTATACGACCACGACTACATAAAGTCT
ATTGCAGATTTGTATGACCTCAAAGATCAGAAGGAGAAATTGATGGAAGAGGAAGGCTTT
GGGAAAAATCCGTAAACATTATCCTGAAAGGGATCGAACAGAGCAAACAAAAAGACTT
CCGTTTCTTTTACCATCATTAGGATTATCTGAATTGGGTGATAAGGTTACGGAGTTATTGA
TCGAACACGGAATCGACTCCATTGATGAGATCCTCTCAATAGCAAAAAGACCAAAAAGAAA
ATCGAGAGCCTCCTCGAGATTCGGGAATAGGCCCATCAACCATCCAAGCTTTCCAGGAG
AATTTTAGCGACAAAAGGATATTAATAATTGATTGAGAGGCTGAAAAAAGCTGGGCTCAA
ATGAAAGCCGACCCTATTCAAGTCGCTGACCAGCAACCATTGCTGGGCAGTCTTGGTGTG
TAACGGGATCTTTCGAGA ACTTTCAGCCTAGAGATAAGGCTATGGACCTCATCGTATACTA
CGGAGGTCGTAAGGTAAGTGCCGTAAGCAGTAAGACGACACATTTGTTAGCAGGCCCTGG
AGCCGGCTCAAACCTCGAAAAGGCTAATGAATTAGGAGTGTGAGTCTACGACGAGAAAC
AGTTCCTCGACTTACTGAAGTCCCTTAAGATTGATTTCAAAAATCTTATCTAG

(3) LigB plant OPT consensus sequence 확보

GTCACTCCCGCACTCAGCATTGTTCCCAACGTAGCCGGGCTGTTCAAGGCCACGGGGACA
GACAGTGACACTACTTGGTCTTCAAACAACGGGACGGGTAATGCAATCATCGGTTTCAGTTA
CTGCTTTAACAAGTATTGAGCCGAGTATAGGACTCACCTTTGCAGGTATTTTCGATTCTACG
ACGTGGAGCTCTAACAAAGGAGCTGGTATAGCAAGTACCGTGTTGAGCATCATACTTCC
GCTAAAGGGTTAACTCAATTCGCCGGAGATAGCATAGTTACATGGTCCAGTTCTGCAATTA
ATGCCGGAGCTGGGGATATAGCTTCATCAGTCGCCGATTGATCATAACCCGCAAAGGGCCT
TACCGCCGGCACGGACGATATCGTGACCTGGAGTTCTAACATCAATAAAGGCCTCGGCAG
TATCATGACTAACCCGGTGCTGTTCTTGGTCATGGTAGCCCTATGAACCTCATTACGACTA
GTGACTTCACGCAAAACCTCGAACTTTTGGTTCCACACTTAGTGAAATAAAAAACATCTT
GGTCATTAGTGCTCATTGGAAAACCCGTGGGACCTACGTCAGTGTAGCCGATCCCCCAGAG
CAGATCTACGATTTTTACGGGTTTCCGCAAGAGTTGTATGAGGTCAAATATCGTCCGAGTG
GGAGTACCGAATTAGCCAGCAGATACAAAAGTTGGTCAAACCGTTGATGTGTGGGCAA
CAAAGGACTGGGGTTTGGATCACGGATCATGGGGGGTACTCTACTTTCTGTTTCGTAAAGC
TAATTTCCCGTAATCCAGTTATCTATCGATGCCAACTGTAATCCCAGAGAAGCAATATGAG
ATAGGAAAGGAATTAAGGCCGCTTAGAGAAGAGGGCACATTAATTTTAGGTAGTGGGAAC
ATAGTCCATAACCTGCATAAAGCAGATTTCTACAATTTGAACGCTACCCAACATGGGCTA

TCGAATTCGATGAGTATATGCGACAGGCTTTAGAGTCAAGGAACGATAAGACCATCTTAG
ACTTTCAGAATAAAGGAGAAATTGCTAAACTTGCCGCTCCCTCTACCGAGCACTTGGAGCC
CATATTCTATGTTCTGGGGGCCATGAAGCCTGAGGAGAAAGTGAAGTTCATCCACCATTCC
TTTCAGAATCGAACGGTCTCCATGAGAAGTTTCACATCCGTT

(4) LipL32 plant OPT consensus sequence 확보

ATGAAGAAGCTGAGTATATTAGCAATTAGTGTAGCCCTCTTTGCTTCAATTACCGCATGTG
GAGCATTTCGGAGGTTTGCCGAGCCTGAAGAGCTCCTTTGTACTGTCCGAGGATAACAATCCC
TGGAACGAACGAAACCGTAAAAACGTTACTGCCGTATGGGTCTGTTATCAATTACTATGGT
TACGTAAAACCAGGTCAAGCCCCTGACGGACTTGTGTGATGGAAATAAAAAGGCCTATTAT
CTTTATGTGTGGATTCCCAGTCATAGCAGAGATGGGTGTGAGGATGATTTCTCCTACTG
GTGAAATTGGTGAGCCCGGGACGGGGACCTTGTTCAGACGCCTTCAAGGCAGCAACCC
CGGAAGAAAAGAGTATGCCTCACTGGTTCGACACTTGGATCAGAGTAGAGAGAATGTCAG
CCATAATGCCTGATCAGATTGCTAAAGCCGCTAAGGCCAAACCTGTTTCAGAAGCTCGATG
ACGATGACGATGGGGATGATACGTACAAGGAGGAAAGGCATAACAAGTATAATTCTCTTA
CCAGAATTAAGATCCCTAATCCTCAAAGAGCTTCGACGATCTCAAGAACATCGATACTA
AGAAGTTGTTAGTACGAGGTTTATACCGAATAAGTTTTACCACCTACAAGCCGGGCGAGGT
CAAGGGCAGTTTTGTTGCATCAGTGGGACTTCTCTTTCCGCCGGGAATCCCCGGTGTCTCTC
CGTTAATCCATTCAAACCCTGAAGAACTTCAAAAACAAGCAATAGCAGCCGAAGAGTCAC
TGAAGAAGGCCGCTTCAGATGCCACAAAATAA

(5) LipL41 plant OPT consensus sequence 확보

ATGCGAAAGTTAAGTAGTTTTGATTAGTGTACTTGTCTTACTGATGTTTTTGGGAAACTGCGC
TGCTACAGTAGATGTAGAATATCCAGTTTTCCCGAAGGACAAGGAAGGACGTGCTTTGCA
AAAATTCCTCGGTACAATCAGGAATGTCGGCTTGGCTGTAGAAGCCCCAAAGAAGTCCCT
TTGGGAGGCTATATTTGGAGAGGGCAGCAGCTTCATTGATCAGATGCCCTCAAAGTATTT
GAGGCATTCGACAAAGAGTCATACTATAAATTGACAGACTTGAGTAAGAGGGCCGATGCT
ATAAACGAAGCCAGCTTGAGCTTAACGGGAATCACAAAGAATAGAGCAAAGATAGGTAA
TCTGATAGGTGCTGAGGCTATCCTGTATATTGGTTACCAGAAACCATATACAGAATGCAGT
ACGGAGAACAAGATTGACGCTGTTGCTGCCGGTCTCAAAGTAGCTGGTTTTGCTGCTTCCA
TGGCCACAGGGAAGGATGTAAACACGGGGAATGAACCTGTCAGTAAGCCTACTGGGGTC
AGAATGATGTTGATTCCCTTGGACGCAACATTGATTAAAGTTGAGACGGGCGAGGTAAAA
AAGGCCGTGGTGTCTCTCCAGCCAAGATTTTCAACTCAGTCGGCAACTTGAATGCCCT
CTATACTTGACAGTTTTCGGTCAAGGTCTCGACGAAGCTGCCGCATATATAAAGGGACGACT
TAGTCCCATTGTGAAAACCTGAAAGGATTAAGTGTGTTGTGAAAGATGAAGACGAGGAGGT
AAAGGAGTTACTCCAGGAAGGATACGAAGAGATAGTCGGGGAAACCCCAAGCTTTAAAA
AAGCTAAAGAAGCTTGGGAAAAAGCTGACAAAAAGGCAAAAGGGCAGTCCTGGGGCGCC
AAGGCCAATCTTGCAACCTACTATTTTTCTACGGGCGATTTTCGAGAAATCCATAAAGTTAT
ATGAGGAAGCAATGAAGTTGAAAGACGCCGACAAGTCATACTTAAGAGAGTTACGTAAA
AGAGTTGAGGCTACGTTTGCTGTCGACGAATCTAATGCAAAGTAA

(6) OmpL1 plant OPT consensus sequence

ATGATCCGTAACATTAGTAAAGCCCTTTTAATCCTGGCTGTAGCCCTGAGCTCTGCTGCATC
CCTGTCCGCTAAGACTTACGCCATTGTTGGTTTCGGCCTGCAGCTTGACTTGGGACAGCTGG
GGGTACAATCACCAAAGACGGCTTGGATGCTGCAACACATTACGGCCCAGTACGAAGCT
CTAACACTTGTACTGTTGGTCCTAGTGATCCCGCATGCTTTCAGAACCCTGCCAAGCCCAC
GGGTGAGGGGAATTATATCGGGGTTGCACCACGTAAGCCATACCTGCTGAAAATCGTTT
AATCACGTTGGACCGTACGACGGGAGGCGCAATCAATGCTAGATCCACGAAGGGAGCTAT
GGTGGGTGGTAACCTTATGGTAGGCTATGAGAGCGACTTCGGTAAGTATTTCTTTTGGAGA
GTGGCAGCTGAGTACACTCAAAAAATTTACGGGGGGGTGACCAAGGCAGACATCGCAGG
CTATAATATTGTTGACATGACATGGGGGTTTCAGTAGCATAGTAATCCCGGCCACTGTCCGT
ATAAAGTTGAATGTAAGTGAAGATGCTGCCATCTACATGGGGGCTGGGTGAATTATTTCA
ACGGTGGGTGGAGCCTGAACGGATCAAATAATATCAAAGGAGGGTATGATATATTGACAG
CCGCTGGGGCTGGTGCAGTTGCTAACTTATTATCCGACGGGACAGATCCTGTCCTACTCGAG
AGAGCACGTAAGGTTGAGAACCAGCGGTATAGCACCGAACTTTTTGATTGGGACACAAGC
CCGAGTCACGGACAAAGGGCACGTATTTATAGAACTCGAAACAATAATGTCTGCAGCATA
TGCAGTGGGAAGACTCAGAGCGTAGGTGGTGCAACAAACCTTTCACCTTTTCCTGCCTAC
CCTATCGTGGTTGGCGGGCAAATCTATAGATTTGGATATAAGCATGAGCTGTAA

3. 식물발현 광견병 항원에 대한 효력 시험 및 기존 바이러스 항원과의 비교시험

가. 식물에서 발현된 재조합 광견병 G-protein 항원을 이용한 면역원성 확인

(1) 마우스에서 면역원성 확인

- (가) 바이오엠프로부터 받은 식물 발현 재조합 G-protein을 5 μ g 접종시킨 후 마우스에서 채혈하여 원심분리한 혈청 수령
- (나) BHK-21 세포를 Plate에서 배양하여 Rabies virus (백신주, Evelyn-Rokitnicki-Abelseth, ERA strain)를 감염시켜 세포변성효과가 확인
- (다) 메탄올 : 아세톤 용액(1 : 1)으로 세포 고정
- (라) 마우스 혈청을 1/50 농도로 PBS에 희석하여, 대조군으로 G-protein의 monoclonal 항체와 비교하기 위해 단클론항체(monoclonal antibody)를 1 : 1,000의 농도로 희석시켜 처리
- (마) PBS로 Washing 한 후 biotinyleted Anti-mouse항체(1/1,000)를 처리하고 PBS로 Washing 후 DAB으로 염색을 해서 비교
- (바) 식물 재조합 G-protein을 접종한 마우스 혈청과 판매되고 있는 mAB와 동일하게 마우스에 면역원성을 증명

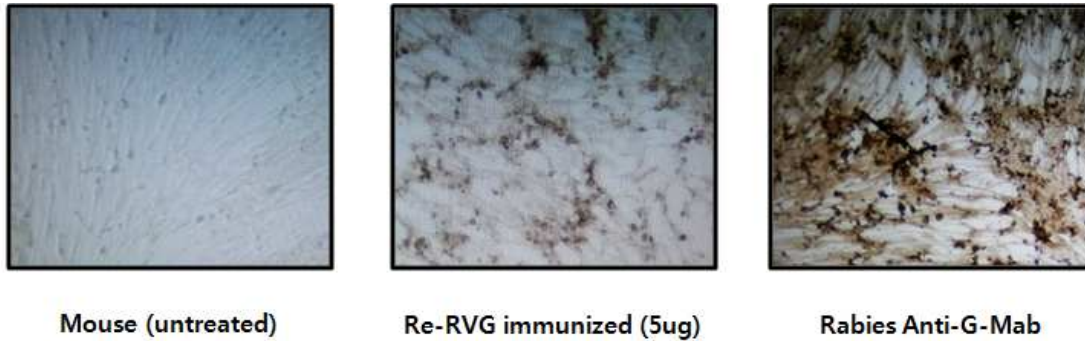


그림 13. Antibody detection from Mouse immunized with recombinant G-protein expressed on *Nicotiana Benthamiana*

4. 선발된 항원 유전자에 대한 식물체 고발현 벡터 제작

가. 광견병, canine parvovirus 및 leptospira canicola 항원 선발 및 단백질 서열 분석

- (1) 광견병 항원 단백질로 RVGe (Rabies Virus G protein, era strain)를 선정하였다. RVGe 단백질의 N 말단 signal peptide와 transmembrane domain을 포함한 C 말단 부분을 제외한 부분을 항원 단백질로 사용하였다.
- (2) Canine parvovirus의 항원 단백질로는 외피 단백질 VP2와 VP2의 주요 항원부위로 알려진 19개의 아미노산으로 구성된 2L21 epitope을 선정하였다.
- (3) *Leptospira canicola*의 항원 단백질로는 외막 단백질 LipL32를 선정하였다. 항원 단백질의 solubility를 향상시키기 위해, transmembrane domain을 포함하고 있는 N 말단을 제외한 부분을 항원 단백질로 사용하였다.

나. 항원 유전자 codon optimization 및 식물 발현 벡터 제작

- (1) 3종의 선발된 항원 유전자를 식물에서의 발현을 최적화하기 위해 codon optimization을 적용한 후 유전자 합성을 진행하였으며, 합성된 유전자는 식물 발현 벡터인 pCAMBIA1300에 클로닝 하였다.
- (2) 광견병 항원으로 선발된 RVGe의 소포체에서의 glycosylation을 유도하기 위해 RVGe의 N 말단과 C 말단에 각각 BiP signal sequence와 HDEL sequence를 fusion 하였다. 또한 식물에서 발현된 RVGe 분리를 위해 C 말단에 His tag를 fusion 했으며, 최종적인 식물 발현 벡터의 형태는 그림 1과 같다.
- (3) Canine parvovirus의 항원 2L21 epitope의 경우, 항원성을 향상시키기 위해 VLP (virus like particle)를 형성하는 것으로 알려진 BaMV (Bamboo mosaic virus)의 외피 단백질의 N 말단에 2L21 epitope을, 그리고 C 말단에는 His tag를 fusion 시킨 형태의 식물 발현 벡터를 제작하였다. (그림 14)
- (4) *Leptospira canicola*의 항원인 LipL32의 경우, 항원성을 향상시키기 위해 LipL32의 N 말단에는 CTB (Cholera Toxin Subunit B)를 fusion 시켰고, C 말단에는 His tag를 fusion 시킨 형태의 식물 발현 벡터를 제작하였다. (그림 14)



광견병 항원 식물 발현 벡터



Canine parvovirus 항원 식물 발현 벡터



Leptospira canicola 항원 식물 발현 벡터

그림 14. 재조합 항원 단백질 식물 발현 벡터

5. 재조합 항원 단백질의 식물에서의 발현평가 및 형질전환체 제작

가. Transient expression을 통한 3종 재조합 항원 단백질 식물 발현 평가 및 특성 분석

- (1) 3종의 항원 발현 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 Vacuum infiltration을 통해 각각 담배잎에 도입하는 방식으로 transient expression을 수행하고, His antibody를 사용한 western blotting을 통해 재조합 항원 단백질의 발현과 특성을 분석하였다.
- (2) 광견병 항원인 RVGe는 48 kDa의 크기로, 약 90 % 가 soluble한 상태로 식물에서 발현되었다. (그림15. A)
- (3) Canine parvovirus의 재조합 항원 단백질인 2L21-BaMV는 28 kDa의 크기로 발현 확인 되었으며, soluble한 상태로 존재하였다. (그림 15. B)

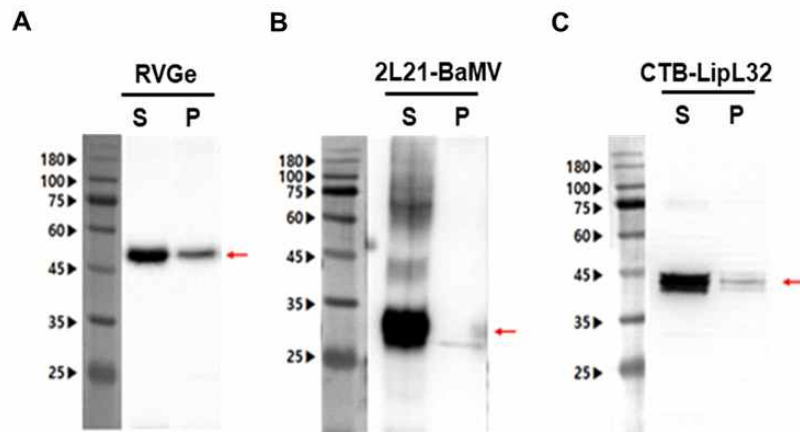


그림 15. 3종 재조합 항원 단백질의 식물에서의 발현 양상

- (4) Leptospira canicola의 재조합 항원 단백질인 CTB-LipL32는 45 kDa의 크기로 식물에서 발현됨을 확인하였고, soluble한 상태로 존재하였다. (그림 2. C)
- (5) 식물에서 발현된 RVGe의 glycosylation 여부를 확인하기 위해 RVGe에 Endo H (Endoglycosidase H) 효소를 처리한 결과, Endo H 처리 시 RVGe가 상대적으로 작은 크기에서 확인되었고, 이는 식물에서 발현된 RVGe가 glycosylation 되어 있음을 의미한다. 또한, RVGe의 아미노산 서열을 이용한 glycosylation prediction을 통해 2개의 가능성 있는 glycosylation site (N₃₈, N₃₂₁)를 확인했다. (그림 16)

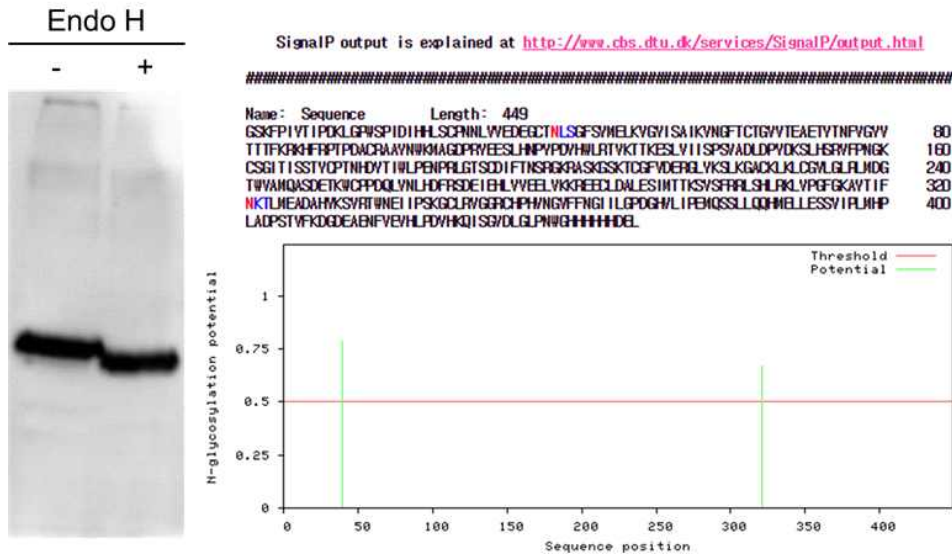


그림 16. 식물에서 발현된 RVGe의 glycosylation 여부 확인

나. 광견병 항원이 발현되는 형질전환체 제작

(1) 광견병 항원인 RVGe가 발현되는 형질전환 담배 (*Nicotiana benthamiana*)를 식물 조직배양법으로 제작하였다. 하이그로마이신 (Hygromycin) 항생제에 내성을 갖는 독립된 식물 라인들의 앞에서 총 단백질을 추출하고, Histidine antibody로 western blotting을 실시한 결과, 각 라인마다 RVGe의 발현 정도가 다를 수 있었다. 여러 세대를 걸쳐 selection을 하면서 RVGe가 안정적으로 고발현되는 엘리트 (elite) 라인 선발 진행 실험 (T0)을 진행하였다 (그림. 17).

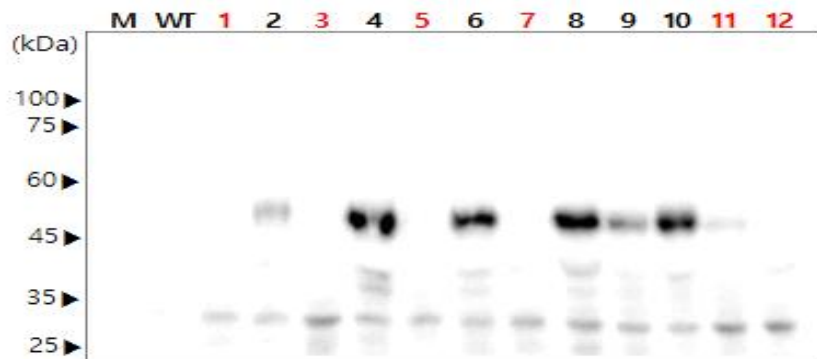


그림 17. 각 형질전환 담배 라인에서 RVGe 발현 양상

6. 유효 항원 단백질 분리정제 방법 개발 및 유효성 평가

가. 3중 재조합 항원 단백질의 식물 발현 및 분리정제

(1) 3중 재조합 항원 단백질을 식물에서 Transient expression으로 발현시킨 후, Ni-NTA resin을 사용하는 친화 크로마토그래피로 분리정제를 하였다. 분리 정제된 재조합 항원 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electroporesis)후, coomassie staining으로 재조합 항원 단백질의 상태와 purity를 확인하였다. 3종의 재조합 항원 단백질 중 RVGe와 LipL32는 90 % 이상의 purity를 나타내었고, 2L21-BaMV는 약 70% 정도의 purity를 나타냈다. (그림 18)

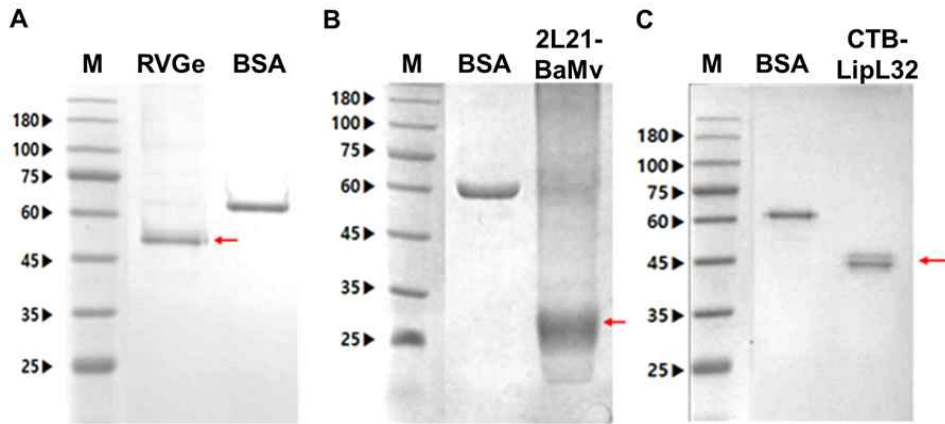


그림 18. 식물에서 발현된 3종 재조합 항원 단백질의 분리 정제

나. 식물에서 분리정제된 광견병 항원 단백질의 항원 유효성 분석

(1) 분리 정제된 RVGe의 항원 유효성을 농립축산검역본부에서 분양받은 광견병 표준항체를 이용하여 indirect ELISA로 평가하였다. 그림 6. A와 같이 분리 정제된 RVGe는 25 ng에서도 반응성을 보인 반면, 음성 대조군으로 사용한 BSA (bovine serum albumin)는 전혀 반응성을 나타내지 않았다. 또한 광견병 바이러스를 항원으로 만들어진 단일 클론 항체로 western blotting을 실시한 결과, 식물에서 분리 정제된 RVGe가 반응성을 보이는 것을 확인하였다. (그림 19)

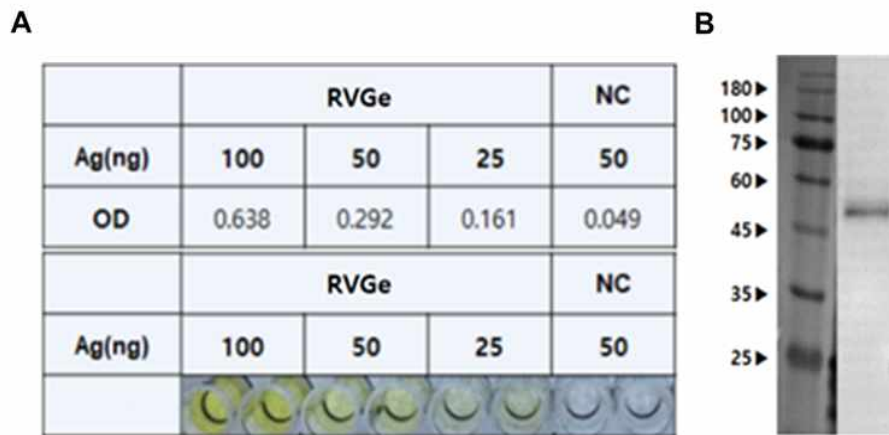


그림 19. Indirect ELISA와 western blotting으로 RVGe의 반응성 분석

다. 식물에서 분리정제된 광견병 항원 단백질의 항원성 분석

(1) 식물에서 발현된 RVGe 단백질의 항원성을 조사하기 위해, 1, 5, 10 μ g의 분리 정제된 RVGe 단백질을 마우스에 2주 간격으로 2번 주사한 후, 혈청을 분리하여 주사한 RVGe에 대한 항체 형성 여부를 indirect ELISA 방법으로 확인하였다. 비록 전체적인 RVGe에 대한 항체 형성 정도는 낮게 보이지만, 주사한 RVGe의 양과 이에 대한 항체 생성이 높은 정량적인 상관성을 보이고 있다. (그림 20)

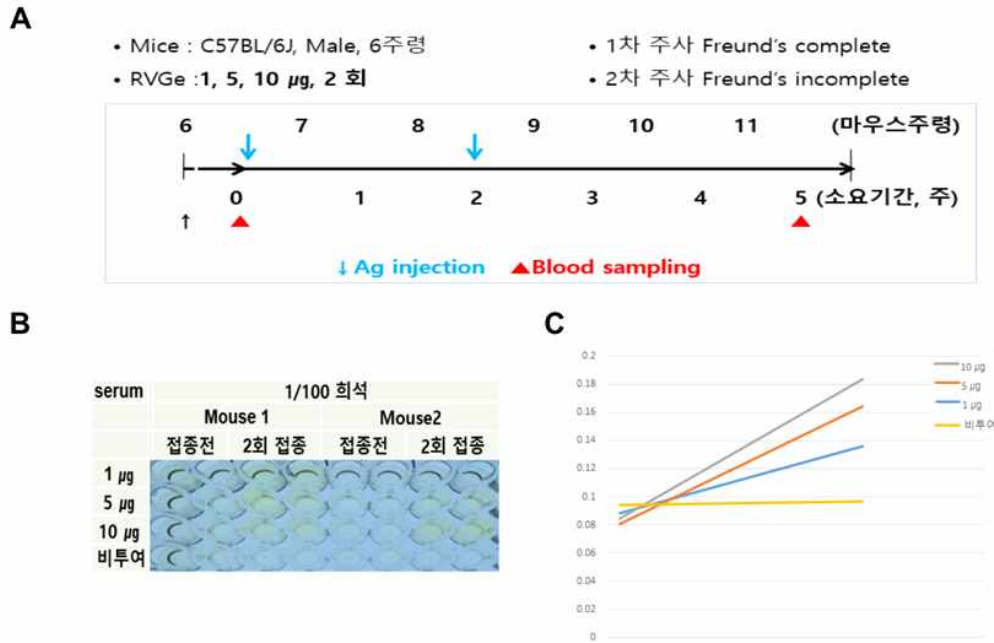


그림 20. 식물발현 RVGe의 항원성 분석

7. 5종 바이러스 균주 strain 선정 및 항원 확보

- 우진비엔지(주)에서는 5종 균주에 대하여 해외에서 일반적으로 사용되어지고 있는 strain을 확인하여 균주 확보를 위해 분양신청을 진행하였다. 특히 CDV(Canine distemper virus)의 Rockborn strain의 경우 외국에서는 1990년 중반에 효능 및 안전성의 문제로 시장에서 공식적으로 철수했지만, 국내 애견백신의 경우 여전히 Rockborn stain으로 백신을 제조하여 판매중이다. 이렇듯 바이러스 strain의 안전성 및 외국에서의 상용화를 목적으로 균주를 선택하였으며, “버박”사 제품과 동일strain으로 CDV(Canine distemper virus)의 경우 KVCC (한국세포주은행)에서 VR1100010 (Lederle strain)을 구매하여 확보하였고, ATCC(세계유전자은행)에서는 “메리알”사와 동일 strain인 CAV-2(Canine adenovirus type-2) VR-800TM(Tronto A/26/61 strain), CPI(Canine parainfluenza) VR-399TM(D008), CPV(Canine parvovirus) VR-953TM(780916 strain)를 구매하여 애견백신 4종에 대하여 항원 확보를 완료하였다.

표 4. 애견 백신 해외 제조사와의 균주 strain 비교

CDV(Canine distemper virus)			CPI(Canine parainfluenza)		
분양 strain	Lederle	KVCC 분양	분양 strain	D008	ATCC 분양
버박 사 strain	Lederle		메리알 사 strain	D008	
CAV-2(Canine adenovirus type-2)			CPV(Canine parvovirus)		
분양 strain	Tronto A/26/61	ATCC 분양	분양 strain	780916	ATCC 분양
메리알 사 strain	Tronto A/26/61		메리알 사 strain	780916	

8. 세포주 선발

- 바이러스 균주 확보 후 감염력이 있는 세포주를 선발하여 바이러스 배양조건을 확립하는 실험을 진행하였다. CDV의 경우 기존 SPF란의 접종하는 대신 감염력이 있는 VERO 세포주에 infection 후 세포병변을 확인하기 위하여 cell adaptation을 진행하였으며, CAV-2 균주의 경우 감염력이 있는 MDCK cell (Canis familiaris, dog kidney) 을 이용하여 항원배양을 진행하고, CPI, CPV 균주는 ATCC에서 A-72(CRL-1542TM)를 분양받아 바이러스 배양 세포주로 사용하였다.

9. 균주 및 세포주 명명

- 우진비앤지(주)의 애견백신목적으로 확보된 균주 및 세포주에 대하여 명명법으로 명시하였으며, 균주 및 세포주 명명은 다음과 같다.

○ 반려견 백신 균주	- CDV [WGV-CDV0714]
	- CAV-2[WGV-CAV0803]
	- CPV[WGV-CPV0803]
	- CPI[WGV-CPI0803]

○ 세포주	- VERO [WGC-VERO0923]
	- MDCK[WGC-MDCK1222], A/72[WGC-A72 0810]

10. 반려견 백신(4종)의 유전자분석 및 항원성검사 결과

- 애견백신의 항원으로 제조된 각 각의 바이러스 항원(CDV, CAV-2, CPI, CPV)에 대하여 유전자분석을 진행하였으며, 항원성 검사를 수행하였다.(그림 21 ~ 24)

Canine distemper virus, complete genome

Sequence ID: [AF014953.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 892 to 1211 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
580 bits(314)	6e-162	318/320(99%)	0/320(0%)	Plus/Minus
Query 1	CATTTCTTGCCCGAGTCTGAAGTAAGCTGGGTCAAAGTAAGATCGACCGAAATTTAACCC	60		
Sbjct 1211	CATTTCTTGCCCGAGTCTGAAGTAAGCTGGGTCAAAGTAAGATCGACCGAAATTTAACCC	1152		
Query 61	TCCCATGGAGTTTTCAAGTTCAACACCAACCCCATAGCATAACTCCAGAGCAATGGGTA	120		
Sbjct 1151	TCCCATGGAGTTTTCAAGTTCAACACCAACCCCATAGCATAACTCCAGAGCAATGGGTA	1092		
Query 121	GGACCTGCACTAAATTTGTTTGAACAGAGTTTTCCAAGATAACCATGTACGGTCTGT	180		
Sbjct 1091	GGACCTGCACTAAATTTGTTTGAACAGAGTTTTCCAAGATAACCATGTACGGTCTGT	1032		
Query 181	TTCACCCATCTGTTGATATAGCATCATGAGGGATTCAATAGTTGTTAATTCCTCCGAAAA	240		
Sbjct 1031	TTCACCCATCTGTTGATATAGCATCATGAGGGATTCAATAGTTGTTAATTCCTCCGAAAA	972		
Query 241	CTCATGCAACCCCAAGAGCCGGATACATAGTTTCAATGCCAAACTTGATAGTTAGGATGAA	300		
Sbjct 971	CTCATGCAACCCCAAGAGCCGGATACATAGTTTCAATGCCAAACTTGATAGTTAGGATGAA	912		
Query 301	CTTAGCTAACCCAGCTTCCA	320		
Sbjct 911	ACTAGCTAACCCAGCTTCCA	892		

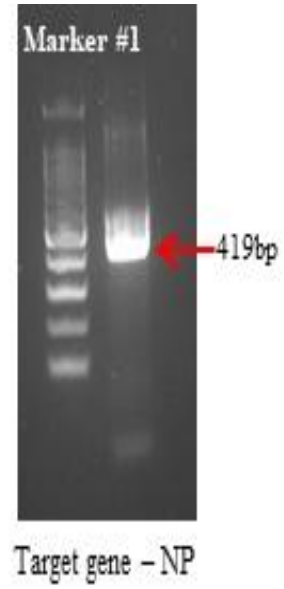


그림 21. CDV(Canine distemper virus)의 유전자 분석 및 항원성 검사

Canine adenovirus type 2 strain Toronto A28/61 complete genome

Sequence ID: [U77082.1](#) Length: 31323 Number of Matches: 1

Range 1: 25044 to 26234 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1092 bits(591)	0.0	591/591(100%)	0/591(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAGTCTGCCACGGGCTATTTCCAGGCCCTCAACGAGATGCCTCTTCCAGCGTAACC	60		
Sbjct 25644	GAGTCTGCCACGGGCTATTTCCAGGCCCTCAACGAGATGCCTCTTCCAGCGTAACC	25703		
Query 61	ATAAATGCTTCCCTTCTATCCCGCTTTCGGAGCTGCCCCACAGTACAGCAATGAC	120		
Sbjct 25704	ATAAATGCTTCCCTTCTATCCCGCTTTCGGAGCTGCCCCACAGTACAGCAATGAC	25763		
Query 121	CTTAGCAATGTGGCTGGTATAAAGTAGACCCAGCGGCTTCCAAGCCCAAAAAATCTCT	180		
Sbjct 25764	CTTAGCAATGTGGCTGGTATAAAGTAGACCCAGCGGCTTCCAAGCCCAAAAAATCTCT	25823		
Query 181	AAAGTCAGAAGCGGAGGCAGAAAAGAGAACC TGCAATCCCAACTGGGCCCTGGTTACCTAT	240		
Sbjct 25824	AAAGTCAGAAGCGGAGGCAGAAAAGAGAACC TGCAATCCCAACTGGGCCCTGGTTACCTAT	25883		
Query 241	ACTGGAGACCTTCTTGCTTGCAATGTTGGCCAAACACCTTGGACTGTGGCTGGCAGCC	300		
Sbjct 25884	ACTGGAGACCTTCTTGCTTGCAATGTTGGCCAAACACCTTGGACTGTGGCTGGCAGCC	25943		
Query 301	GTGCAGCATCGGGGGGGCACTAATTTTCAATACCTTCAACATAACTGTACCCAACTGG	360		
Sbjct 25944	GTGCAGCATCGGGGGGGCACTAATTTTCAATACCTTCAACATAACTGTACCCAACTGG	26003		
Query 361	CAACAAAATCTAGTAACCATATTTAATCAACAGAGCCCCAAAAAGGGCGATAAATAT	420		
Sbjct 26004	CAACAAAATCTAGTAACCATATTTAATCAACAGAGCCCCAAAAAGGGCGATAAATAT	26063		
Query 421	GAGGACAGTTTTATGGAAATGGACTCTGTTTAAAAAGCTCAAAAAGGCTTATTTAGAGTA	480		
Sbjct 26064	GAGGACAGTTTTATGGAAATGGACTCTGTTTAAAAAGCTCAAAAAGGCTTATTTAGAGTA	26123		
Query 481	ACTTGCAGAGCCAAGTCAATATTTCCAGAGTGGCTCTCAACATCACCCGCGAGGAACT	540		
Sbjct 26124	ACTTGCAGAGCCAAGTCAATATTTCCAGAGTGGCTCTCAACATCACCCGCGAGGAACT	26183		
Query 541	TTCTGCTTATTGGGGATAGCAAAAAGACCCCTATGTATCTCTGCTGCC	591		
Sbjct 26184	TTCTGCTTATTGGGGATAGCAAAAAGACCCCTATGTATCTCTGCTGCC	26234		

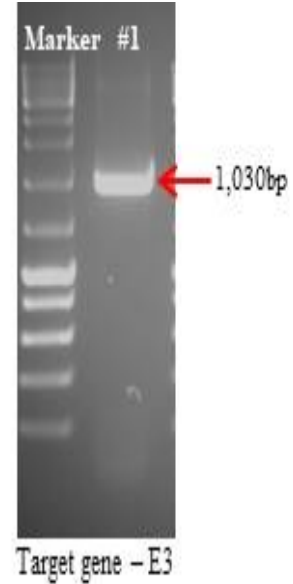


그림 22. CAV-2(Canine adeno virus type2)의 유전자 분석 및 항원성 검사

Canine parvovirus strain CPV-436 nonstructural protein 1 (NS1) gene, complete cds
 Sequence ID: [AY742956.1](#) Length: 2007 Number of Matches: 1

Range 1: 1142 to 1471 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
610 bits(330)	8e-171	330/330(100%)	0/330(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CTATAGCATGTGTTTTAAATAGACAAGGTGGTAAAAGAAATACAGTTCCTTTTCATGGAC 60
Sbjct 1142 CTATAGCATGTGTTTTAAATAGACAAGGTGGTAAAAGAAATACAGTTCCTTTTCATGGAC 1201
Query 61  CAGCAAGTACAGGAAAACTATCATTGCTCAAGCCATAGCACAAGCTGTGGGTAATGTTG 120
Sbjct 1202 CAGCAAGTACAGGAAAACTATCATTGCTCAAGCCATAGCACAAGCTGTGGGTAATGTTG 1261
Query 121  GTTGTATAATGCAGCAAAATGTAATTTCCATTTAATGACTGTACCAATAAAAAATTAA 180
Sbjct 1262 GTTGTATAATGCAGCAAAATGTAATTTCCATTTAATGACTGTACCAATAAAAAATTAA 1321
Query 181  TTTGGATTGAAGAAGCTGGTAACTTTGGTCAACAAGTTAATCAATTTAAAGCAATCTGTT 240
Sbjct 1322 TTTGGATTGAAGAAGCTGGTAACTTTGGTCAACAAGTTAATCAATTTAAAGCAATCTGTT 1381
Query 241  CTGGACAGACAATTAGAATTGATCAAAAAGGTAAGGAAGTAAGCAAAATTGAACCAACTC 300
Sbjct 1382 CTGGACAGACAATTAGAATTGATCAAAAAGGTAAGGAAGTAAGCAAAATTGAACCAACTC 1441
Query 301  CAGTAATTATGCAACTAATGAAATATAA 330
Sbjct 1442 CAGTAATTATGCAACTAATGAAATATAA 1471
    
```

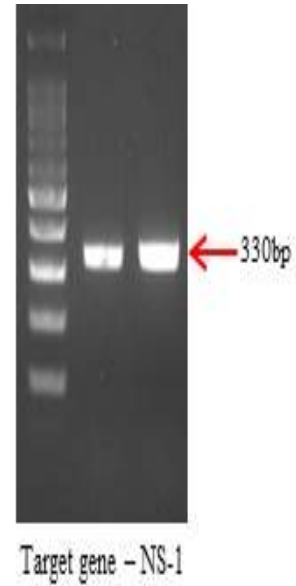


그림 23. CPV(Canine parvovirus)의 유전자 분석 및 항원성 검사

Canine parainfluenza virus clone T65 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds
 Sequence ID: [AY581307.1](#) Length: 667 Number of Matches: 1

Range 1: 400 to 585 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
344 bits(186)	5e-91	186/186(100%)	0/186(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  GDCBGTGBAGATCAATGCCATGCTGCACTTGCAGAGATCTACCTGACACACTAAATC 60
Sbjct 400  GDCBGTGBAGATCAATGCCATGCTGCACTTGCAGAGATCTACCTGACACACTAAATC 459
Query 61  ATGAAACACCTTTTGTGATTCGAAAGTCGAGGGAAGTGCATGGGATGAGATTGAGACTT 120
Sbjct 480  ATGAAACACCTTTTGTGATTCGAAAGTCGAGGGAAGTGCATGGGATGAGATTGAGACTT 519
Query 121  TCTTAGATATGTTACAGTGTCTTAATGCAGGCATGGATAGTGAATGCAAGTGCATGA 180
Sbjct 520  TCTTAGATATGTTACAGTGTCTTAATGCAGGCATGGATAGTGAATGCAAGTGCATGA 579
Query 181  CTGCGC 186
Sbjct 580  CTGCGC 585
    
```

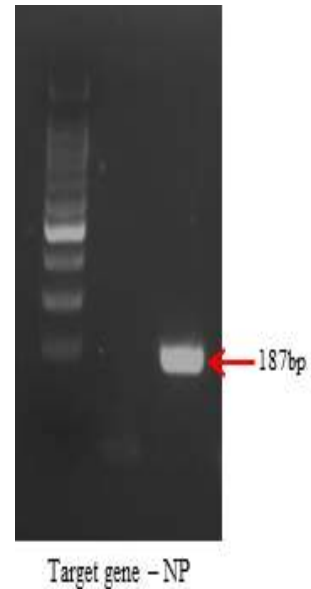


그림 24. CPI(Canine parainfluenza)의 유전자 분석 및 항원성 검사

11. 반려견 백신(4종) 항원의 대량배양을 위한 배양조건 확립
 가. CPV(Canine parvovirus)

Attenuated canine parvovirus				
Strain	780916	명명 : WGV-CPV0803	P1 Titer	10 ^{5.5} HAD ₅₀ /ml
Cell	A/72	명명 : WGC-A/72 0810	목표 Titer	10 ^{7.0} HAD ₅₀ /ml

- 최초 인수받은 CPV로 동시접종 방식으로 계대배양을 진행하였다.

(1) CPV 계대배양 상황

Virus 계대수	접종일	Cell	FBS (%)	Seed (%)	접종 방법	채독일	IPC			
							역가 (HA ₅₀ /ml)	미입부정시험		
								Myco	CPIV	BVD
P2	170915	A72 P5	10%	10%	동시	170919	6.3	-	-	+
P3	170918	A72 P6	5 %	10%	동시	170922	6.7	-	-	+
P4	171014	A72 P10	10%	10%	동시	171018	5.3	-	-	+
P5	배양 중									

- 현재까지 배양된 CPV IPC 결과에서 BVDV PCR에서 양성반응이 나왔다.
- 재시험을 의뢰한 상태이다.

나. CPIV(Canine parainfluenzavirus)

Attenuated canine parainfluenzavirus				
Strain	D008	명명 : WGV-CPIV0803	P1 Titer	10 ^{5.5} HAD ₅₀ /ml
Cell	A/72	명명 : WGC-A/72 0810	목표 Titer	10 ^{6.0} HAD ₅₀ /ml

- 최초 인수받은 CPIV로 동시접종 방식으로 계대배양을 진행하였다.

(1) CPIV 계대배양 상황

Virus 계대수	접종일	Cell	FBS (%)	Seed (%)	접종 방법	채독일	IPC			
							역가 (HA ₅₀ /ml)	미입부정시험		
								Myco	CPIV	BVD
P2	171014	A72 P9	10%	10%	동시	171018	6.1	-	NT	+
P3	171020	A72 P8	10%	10%	동시	171024	2.5	-	NT	+
P4	171024	A72 P9	5%	10%	동시	171027	진행예정			
P5	171027	A72 P10	5%	10%	동시	171031	진행예정			

- BVD PCR 결과 양성반응이 나왔으며 P3의 경우 예상보다 함량이 너무 낮게 나와서 재 시험을 의뢰한 상태이다.

다. CDV(Canine distemper virus)

Attenuated canine distemper virus				
Strain	Lederle	명명 : WGV-CDV0714	P1 Titer	10 ^{2.5} TCID ₅₀ /ml
Cell	Vero	명명 : WGC-Vero 0923	목표 Titer	10 ^{6.0} TCID ₅₀ /ml

- 최초 보유하고있는 CDV 항원에 마이코플라즈마 PCR 검사에서 양성반응이 나타났다.

- CDV 항원의 경우 마이코플라즈마 제거 실험을 먼저 진행하고 고역가 항원 배양 실험을 진행하기로 결정하였다.

(1) CDV 계대배양 상황

Virus 계대수	접종일	Cell	FBS (%)	Seed (%)	접종 방법	채독일	IPC			
							역가 (TCID ₅₀ /ml)	미입부정시험		
								Myco	CPIV	BVD
P2	171020	Vero	0%	10%	mono	171020	진행예정			
P3	171027	Vero	0%	10%	mono	171031				
P4	171114	Vero	0%	10%	mono					

- CDV 항원의 경우 계대배양을 진행하는 과정에서 마이코플라즈마 치료 시약을 첨가하고 있다.
- 마이코플라즈마 치료를 위해 CDV 배양 과정에서 접종 후 1일 후에 배지를 교환하여 배양하였다.

라. CAV-2(Canine adenovirus-2)

Attenuated canine adenovirus-2				
Strain	Tronto A/26/61	명명 : WGV-CAV0803	P1 Titer	10 ^{3.5} TCID ₅₀ /ml
Cell	MDCK	명명 : WGC-MDCK1222	목표 Titer	10 ^{6.0} TCID ₅₀ /ml

- 최초 보유하고 있는 CAV-2 항원에 마이코플라즈마 PCR 검사에서 양성반응이 나타났다.
- CAV-2 항원의 경우 마이코플라즈마 제거 실험을 먼저 진행하고 고역가 항원 배양 실험을 진행하기로 결정하였다.

(1) CAV-2 계대배양 상황

Virus 계대수	접종일	Cell	FBS (%)	Seed (%)	접종 방법	채독일	IPC			
							역가 (TCID ₅₀ /ml)	미입부정시험		
								Myco	CPIV	BVD
P2	171016	MDCK P16	10%	10%	mono	171020	4.75	-	-	-
P3	171020	MDCK P17	0%	10%	mono	171024	4.5	-	-	+
P4	171024	MDCK P18	0%	10%	mono	171027	진행예정			
P5	171027	MDCK P19	0%	10%	mono	171031				

- 마이코플라즈마 제거 시약을 사용하여 계대배양을 실시하였고 그 결과 배양된 CAV-2 P2, P3에서 IPC 결과 마이코플라즈마 음성 결과를 확인하였다.

(2) 항원의 역가 추이

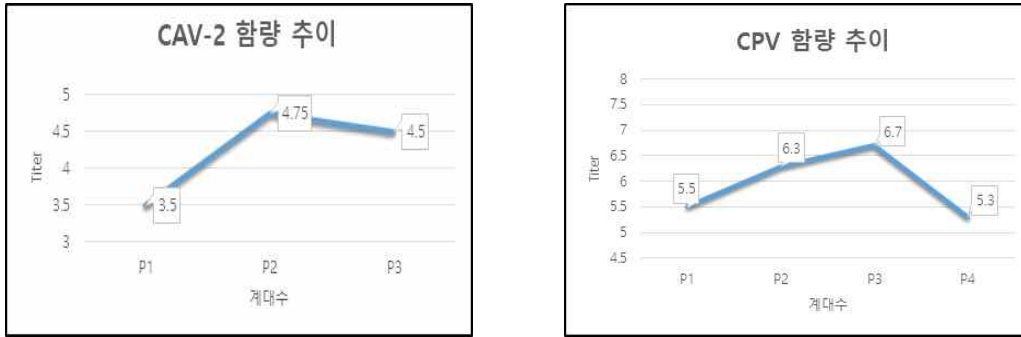


그림 25. CAV-2(Canine adenovirus-2) 항원역가의 변화 추이

12. 반려견 백신 항원의 품질시험 성적

- 배양조건 확립 후 반려견 같이 민감한 동물의 백신을 제조함에 있어서 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 하며, 품질시험 항목으로는 endotoxin 조건을 포함한 품질시험을 확립함으로써 제품의 안전성을 더욱 향상시키는 데 목적을 두고 있다. 각 항원의 품질시험 항목으로는 무균시험, Mycoplasma 부정시험, 미입바이러스 확인시험, Endotoxin 측정시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 우진비엔지(주) 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 5. 반려견 백신 바이러스 각각의 항원에 따른 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine distemper virus		
시험 항목	SOP	결과
무균시험	WGD-QC-SOP202	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Mycoplasma 부정시험(PCR법)	WGD-QC-SOP209	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입바이러스 부정시험 (CPI)	WGD-QC-SOP304	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Endotoxin 측정 시험	WGD-QC-SOP310	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Attenuated canine adenovirus-2		
시험 항목	SOP	결과
무균시험	WGD-QC-SOP202	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Mycoplasma 부정시험(PCR법)	WGD-QC-SOP209	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입바이러스 부정시험 (CPI)	WGD-QC-SOP304	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Endotoxin 측정 시험	WGD-QC-SOP310	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Attenuated canine parvovirus		
시험 항목	SOP	결과
무균시험	WGD-QC-SOP202	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Mycoplasma 부정시험(PCR법)	WGD-QC-SOP209	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입바이러스 부정시험 (CPI)	WGD-QC-SOP304	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Endotoxin 측정 시험	WGD-QC-SOP310	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Attenuated canine parainfluenza virus		
시험 항목	SOP	결과
무균시험	WGD-QC-SOP202	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Mycoplasma 부정시험(PCR법)	WGD-QC-SOP209	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
Endotoxin 측정 시험	WGD-QC-SOP310	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

13. 대량배양 항원 정제기술 확립 (undesirable contaminants 제거기술)

- DHPP 바이러스 항원에 대하여 대량배양공정을 확립 후 대량 배양된 항원에 대한 정제공정을 진행하였다.

가. 1차 원심분리(Cell debris 제거)

- 배양 Flask를 초저온 냉동고에 18hr 이상 보관하여 냉동하고 실온(20°C~25°C)에서 2±1hr 정치하여 해동하는 과정을 3회 진행 한 후 확보된 각 각의 바이러스 항원을 Centrifuge bottle에 회수하여 원심분리를 진행하였다.
- 원심분리 방법은 우진비앤지 (주) WGD-PC-SOP207에 준하여 작업을 진행하였으며, Centrifuge 기기의 경우 Thermo fisher 제품으로 작동 및 유지관리방법서 WGD-PC-SOP502에 따라 작동을 진행하였다. 원심분리는 2,500rpm으로 10min분간 작동하여 세포부유물을 제거하였으며, 원심분리된 상층액을 준비된 1L 메스실린더를 이용하여 Bulk수량을 확인하고 Roller bottle에 회수하였다.

나. 정제(Purification) 작업 방법

- 원심분리 후 확보된 상층액을 0.2µm Capsule filter 양측 nozzle에 멸균된 실리콘 튜브를 연결하여 Peristaltic pump에 연결 후 작동하여 Bulk를 0.2µm Capsule filter로 이송하여 Filtration공정을 진행하였다.
- 위 방법은 우진비앤지(주) Peristaltic pump 작동 및 유지관리방법서 - WGD-PC-SOP521에 따라 작동을 진행하였으며, WGE-2138-15 기기를 사용하여 작업을 진행하였다. 정제공정을 구축하기 위하여 초기 속도 및 최종 속도에 대하여 validation을 진행하였으며, 최종적으로 구축된 공정 조건은 초기속도 500ml/min으로 설정되었으며 최종 속도는 1700ml/min으로 선정되어 정제작업을 진행하였다.

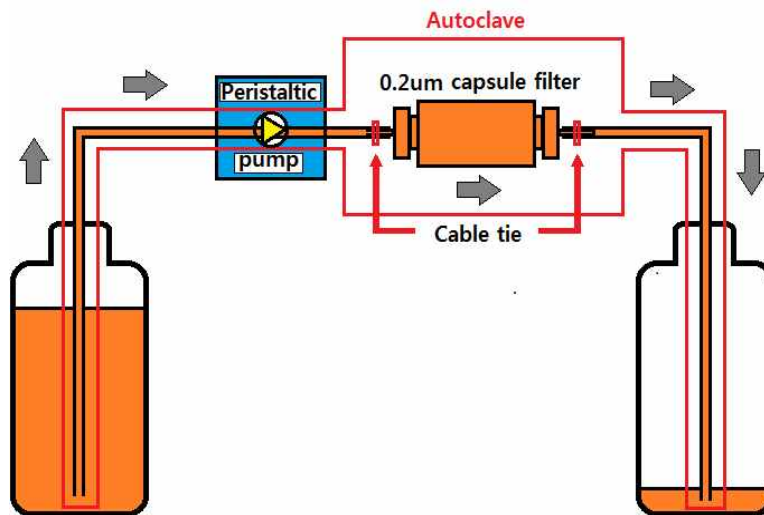


그림 26. 대량배양된 항원의 정제공정(undesirable contaminants 제거기술) 모식도

제2절 2차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 6종 바이러스에 대한 재조합 백신 생산용 단백질의 유전자 변이조사

가. 개 디스토펙퍼 바이러스 (Canine distemper virus, CDV)의 방어항원 단백질의 유전자 변이조사

(1) CDV Hemagglutinin (H), Fusion (F) 유전자 정보수집 및 분석

- CDV 방어항원 단백질 문헌조사(*Journal of Virology*, Aug. 1991, TAYLOR *et al.*)를 통해 H protein과 F protein 선택

- CDV의 H, F 유전자 정보검색 및 염기서열 정보 수집

(2) CDV 유전자형 분석

- 수집한 유전자 염기서열을 이용하여 Multiple alignment 분석을 통해 염기서열 변이 및 단백질 변이 부분 확인

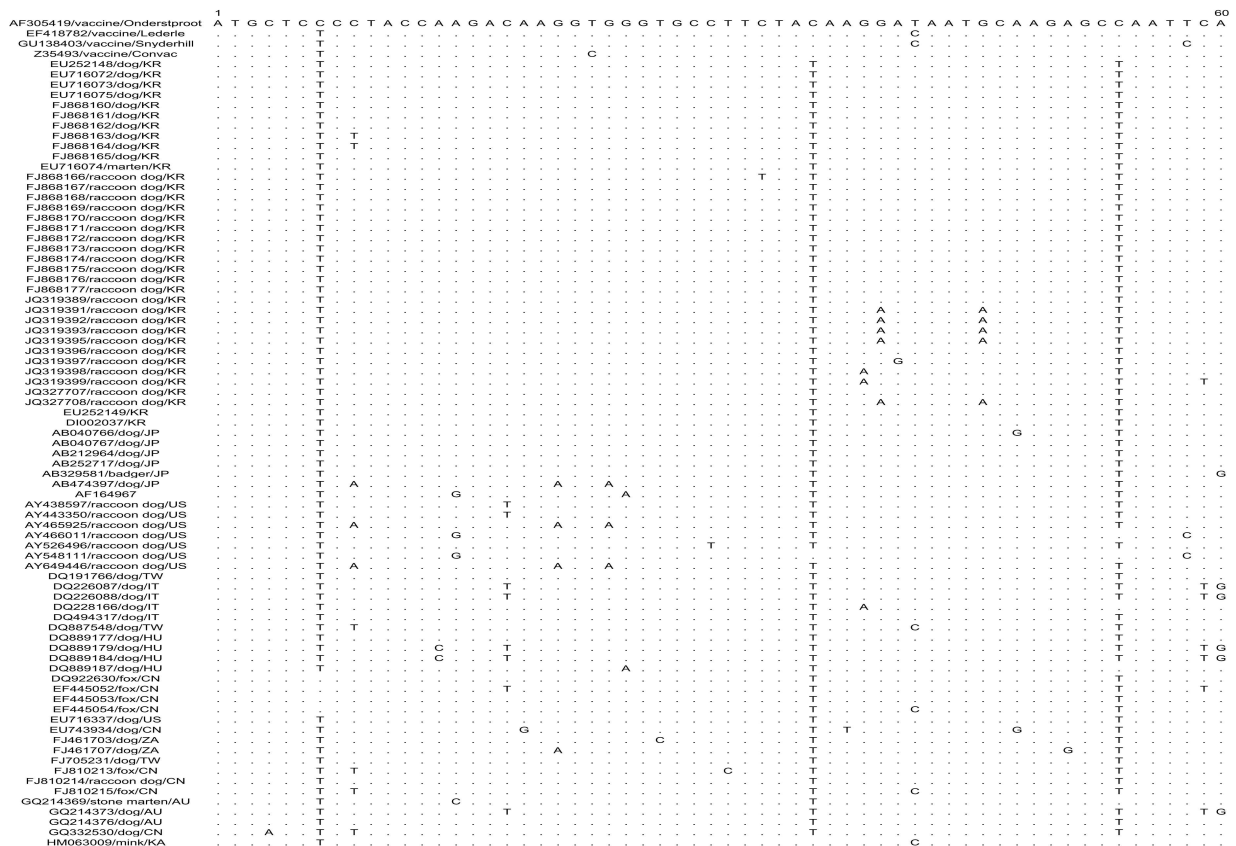


그림 1. CDV H 유전자 Multiple alignment 분석 (1-60 bp).

	1	60
DNA vaccine	MVAEDAPVRGTCRVLFRRTTLIFLCTLLALSISILYESLITQKQIMSHAGSTGSNSRLGS	
08-1990 (Canine KR KC237063)		
1168-1 (Canine KR KC237064)		
D277 (Canine KR KC237065)		
KNU-11 (Porcine KR KC852177)		
78524 (Canine UK JQ743319)		
CC-14 (Canine CN KP893891)		
CPI+ (Canine USA JQ743321)		
CPIV-HeN0718 (Canine CN KY114804)		
FA (Canine CN EF543647)		
FC (Canine CN EF543633)		
H221 (Canine UK JQ743323)		
PV5-BC14 (Calf CN KM067467)		
RQ (Human UK JQ743327)		
SER (Human UK JQ743328)		
W3A (Human USA NC 006430)		
ZJQ-221 (Lesser panda CN KX100034)		

그림 6. CPIV HN 단백질 Multiple alignment 분석 (1-60 residues).

다. 개 파보바이러스 (Canine parvovirus, CPV)의 방어항원 단백질의 유전자 변이조사

(1) 국내 CPV 분리 및 VP2 유전자 정보의 확보

(가) 국내 CPV-2의 VP2 유전자 확보

- 설사증상의 개 분변 시료에서 DNA 추출
- CPV-2 VP2 primer sets를 이용하여 PCR 확인 및 DNA 염기서열 확보

표 1. CPV-2 확인 및 염기서열 확보 PCR을 위한 primer sets.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
CPVSF1	CCAACTAAAAGAAGTAAACC	VP2	708
CPVSR1	TGGTTGGTTTCCATGGATAAAAACC		
CPVSF2	AGATAGTAATAATACGCCATTT		719
CPVSR2	TTTTGAATCCAATCTCCTTCTGGAT		
CPVSF3	ACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTA		736
CPVSR3	CCTATATCAAATACAAGTACAATA		

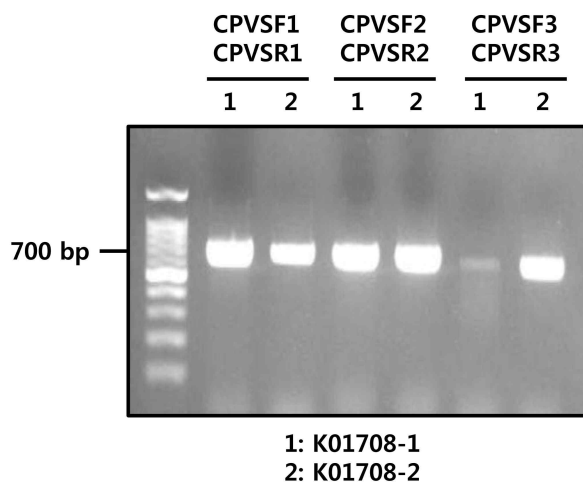


그림 7. 개 분변시료의 CPV-2 PCR 결과. (CPVSF1-CPVSR1: 708 bp, CPVSF2-CPVSR2: 719 bp, CPVSF3-CPVSR3: 736 bp).

- 국내 CPV-2(K01708-1) VP2 유전자 염기서열

ATGAGTGATGGAGGAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCT
ACAGGATCTGGGAACGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGTGGGGATT
TCTACGGGTACTIONTTAATAATCAGACGGAATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAAA
TCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTGCATTTAAATATGCCAGAAAGTGAAAATTATAGAA
GAGTGGTTGTAAATAATTTGGATAAAAACCTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGATGATA
CTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTT
AATCCAGGAGATTGGCAACTAATGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGA
ACAAGAAATTTTTAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTA
AAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATG
CCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTATCCATGGAAACCAACCA
TACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGG
AACTAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTAC
ACTATTGAAAATTCTGTGCCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAA
CATTTTATTTGATTGTAAACCATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATT
GGGCTTACCACCATTTCTAAATTTCTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATA
TAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAACACAAACATTATTA
CTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAG
GCGTCTACACAAGGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAAC
AGATGAAAATCGAGCAGCAGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCA
AAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATA
CAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAACAG
AAGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACACAGGAATTAACATACTA
ATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAAT
GGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCA
CCATTTGTTTGTCAAATAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCACCTAATTTAAC
AAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTT
GGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGAATCCAA
TTCAACAAATGAGTATCAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGG
TATGAAAATTGTATATGAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTA

- 국내 CPV-2 (K01708-2) VP2 유전자 염기서열

ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCT
ACAGGATCTGGGAACGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGTGGGGATT
TCTACGGGTACTIONTTAATAATCAGACGGAATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAAA
TCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAGAAAGTGAAAATTATAGAA
GAGTGGTTGTAAATAATTTGGATAAAAACCTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGATGATA
CCCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTT
AATCCAGGAGATTGGCAACTAATGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGA
ACAAGAGATTTTTAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTA
AAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTAAATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATG
CCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTATCCATGGAAACCAACCA
TACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGG

AACTAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTAC
 ACTATTGAAAATTCTGTGCCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAA
 CATTTTATTTTGATTGTAAACCATGTAGACTAACACACACATGGCAAACAAACAGAGCATT
 GGGCTTACCACCATTCTAAATTCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATA
 TAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACATTATTA
 CTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAG
 GCGTCTACACAAGGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAAC
 AGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTGTCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCA
 AAAAATACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATA
 CAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAACAA
 ATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAGCAGGAATTAACTATACTA
 ATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAAT
 GGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCA
 CCATTTGTTTGTCAAATAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAAC
 AAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTT
 GGTGGAAAGGTAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGAATCCAA
 TTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGG
 TATGAAAATTGTATATGAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATACTAA

(나) 국내 CPV-2 VP2 유전자 분석

- NCBI에서 확보한 타 CPV-2 strain들과 국내 CPV-2 VP2 유전자 간 multiple alignment 분석
- NCBI에서 확보한 타 CPV-2 strain들과 국내 CPV-2 VP2 유전자의 phylogenetic tree 분석 결과, CPV-2a (K01708-2)와 CPV-2c (K01708-1)를 확인하였고, 국내 CPV-2a와 CPV-2c가 각각 중국 strain에서 유래된 것으로 확인

(다) 국내 CPV-2 분리

- A72 세포를 이용하여 CPV-2a, CPV-2c 바이러스를 분리, P-5에서 PCR로 바이러스를 각각 확인

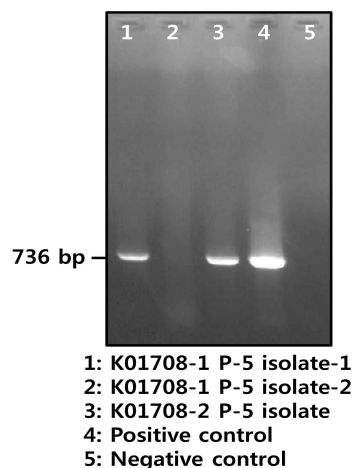


그림 11. A72 CPV-2c (K01708-1) P-5, A72 CPV-2a (K01708-2) P-5의 CPV-2 PCR 결과. (CPVSF3-CPVSR3: 736 bp).

- A72 CPV-2c (K01708-1) P-11, A72 CPV-2a (K01708-2) P-11을 Hemagglutination(HA) test 해 본 결과, 각 2⁹ HA unit의 HA활성도를 보임

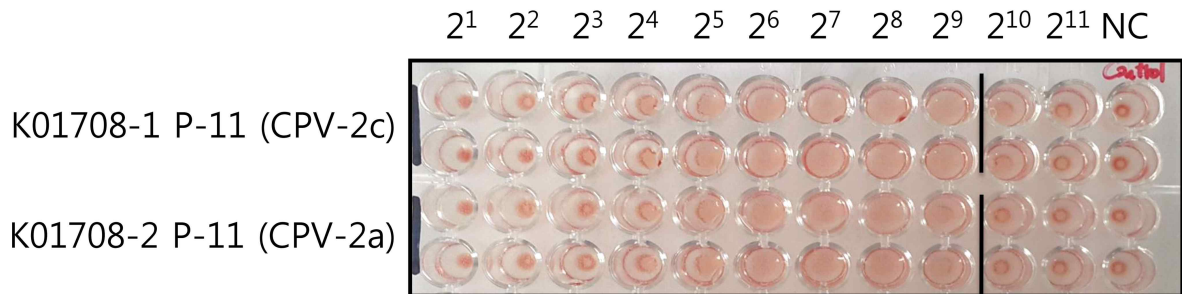


그림 12. A72 CPV-2a P-11, A72 CPV-2c P-11의 HA test결과.

- A72 CPV-2a P-11, A72 CPV-2c P-11을 CPV monoclonal antibody를 이용하여 Immunohistochemistry assay를 해 본 결과, 핵에서 염색이 되는 것을 확인

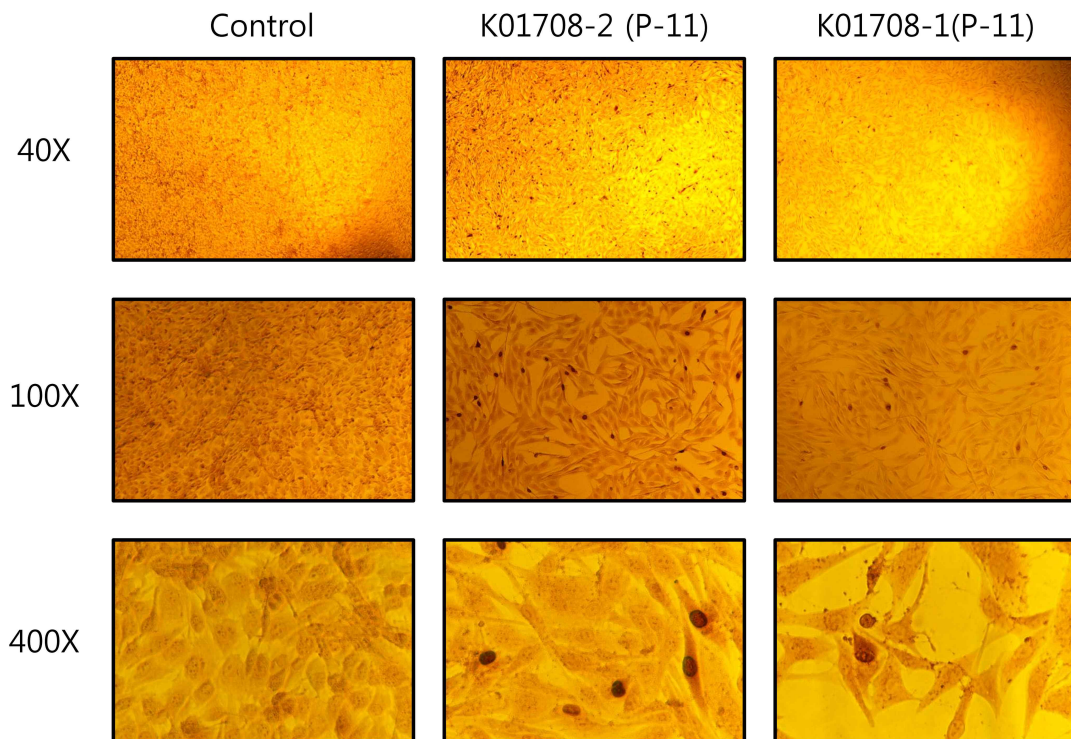


그림 13. A72 CPV-2a (K01708-2) P-11, A72 CPV-2c (K01708-1) P-11 immunohistochemistry assay 결과.

(라) 국내 CPV 2a, 2c VP2 유전자 클로닝

- 확보한 국내 CPV 2a, 2c VP2 유전자 염기서열을 주형으로 식물용 Plasmid vector에 맞게 Primer 디자인

표 2. CPV-2 클로닝 PCR을 위한 primer set.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
CPV-2c F	GGATCCGCATGAGTGATGGAGGAGTTC	VP2	1,752
CPV-2c R His	CCCGGGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGCC ACCGTATAATTTTCTAGGT		

- 디자인 한 primer를 이용하여 VP2 유전자 PCR 증폭 및 pGEM-T-easy vector 클로닝

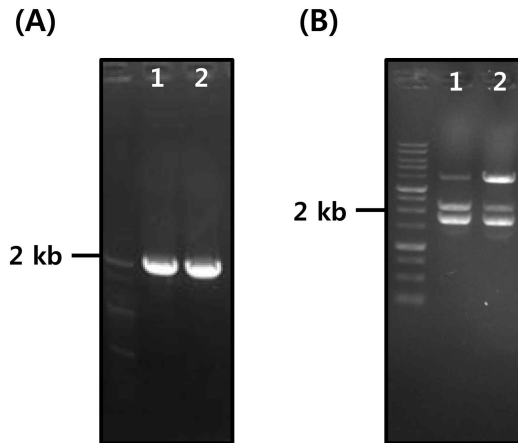


그림 14. CPV 2a, 2c VP2 유전자의 pGEM-T-easy vector 클로닝 확인. (A) 콜로니 PCR. (B) BamHI/XmaI 제한효소 처리 확인. 1: CPV 2a VP2 / pGEM-T-easy, 2: CPV 2c VP2 / pGEM-T-easy (1752 bp).

- pGEM-T-easy vector에 클로닝 된 CPV 2a, 2c VP2 유전자를 이용하여 식물 CLC vector에 클로닝

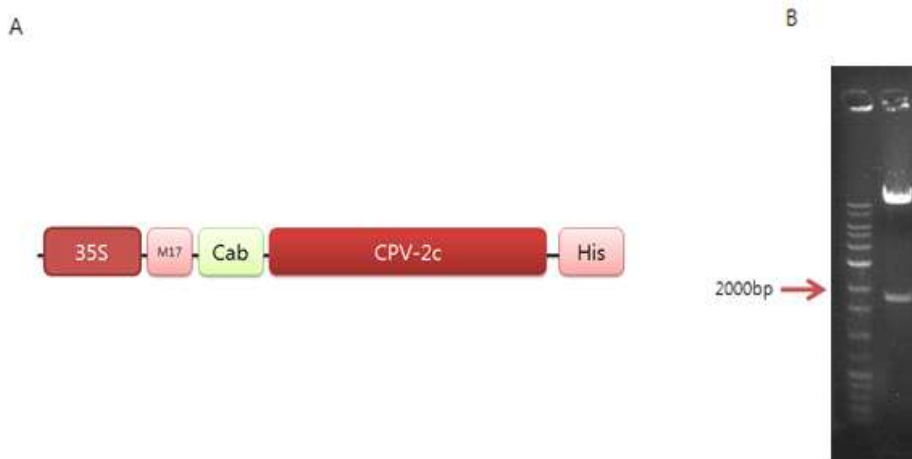


그림 15. CPV 2c VP2 유전자의 CLC vector 클로닝. (A) CPV-2c-VP2 / CLC vector 모델. (B) BamHI/XmaI 제한효소 처리를 통한 CPV-2c-VP2 / CLC construct의 확인 (1752 bp).

- 확인된 Plasmid를 전기 천공법으로 *Agrobacterium* (GB3101)으로 형질전환 도입한 후, *Nicotiana benthamiana*에 infiltration하여 CPV-2c-VP2 단백질 식물 임시발현을 진행
- 4일 후 식물을 수확하고 단백질을 추출하여 Western Blot analysis로 확인결과 CPV-2c VP2 단백질을 확인 할 수 있었으나, 그 양이 매우 적어 Antigen으로 활용하기에 부적합하다고 판단(그림18) primary antibody: anti-His, secondary antibody: anti-mouse-HRP

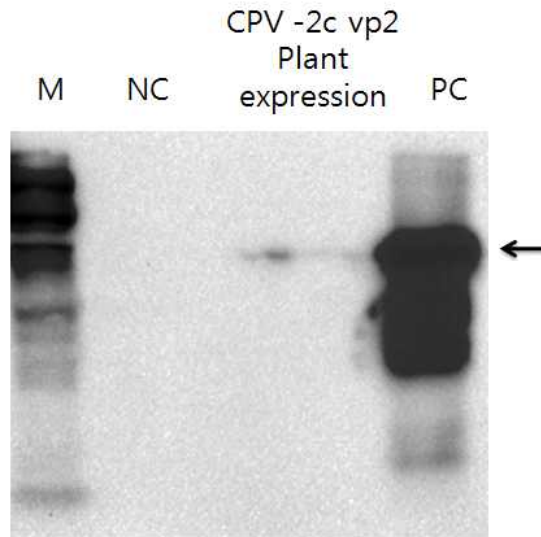


그림 16. Western blot을 이용한 CPV-2c-VP2 단백질 식물발현 확인.

- 단백질 발현을 늘리기 위해 Native CPV-2c를 *Nicotiana benthamiana*에 맞게 codon optimization을 하여 합성

- 국내 CPV-2c VP2 *Nicotiana benthamiana* codon optimized 염기서열

```

ATGTCAGACGGAGGGGTTTCAGCCAGACGGCGGGCAGCCGGCCGTTTCGTAACGAAAGGGC
CACTGGCTCCGGCAACGGGAGTGGTGGCGGGGGGGCGGCGGATCTGGTGGAGTCGGCAT
TAGCACTGGAACCTTTTAATAACCAAACCGAGTTCAAATTTCTTGAGAACGGCTGGGTTCGAG
ATCACCGCCAACTCCTCAAGATTGGTCCATCTTAATATGCCTGAGTCTGAAAACCTATAGAA
GAGTCGTCGTAAATAACTTGGATAAAACTGCAGTTAACGGCAACATGGCTTTAGATGACA
CACATGCACAGATCGTCACACCTTGGTCCTTAGTTGATGCAAACGCTTGGGGGGTCTGGTT
TAACCCCGGAGACTGGCAACTGATCGTCAACACGATGTCAGAGCTCCATCTTGTGAGTTTC
GAACAAGAAATATTTAACGTGGTCCTCAAGACAGTATCCGAGTCCGCAACTCAGCCACCT
ACAAAAGTCTACAACAATGACCTGACTGCCAGCTTAATGGTTGCCTTAGACAGTAATAAT
ACTATGCCGTTTACACCGGCAGCAATGAGATCTGAAACTTTGGGTTTTTATCCTTGAAGC
CTACAATCCCCACACCGTGGAGGTATTATTTCCAATGGGATAGAACTCTGATTCCATCCCA
CACAGGCACGAGCGGCACACCGACTAATATTTATCATGGTACGGACCCCGATGATGTCCA
ATTTTATACGATTGAGAACAGCGTTCGGTCCATCTGTTGCGTACGGGCGACGAGTTTCGCA
ACTGGAACCTTCTACTTCGATTGTAAACCATGCAGACTGACCCACACTTGGCAGACAAAC
AGGGCACTTGGGCTTCCCCCTTTTCTTAACAGCTTGCCCCAGGCCGAGGGGGGTACCAACT

```

TTGGCTACATCGGCGTTCAACAGGATAAAAAGACGAGGAGTCACACAAATGGGCAACACG
AACATAATTACCGAAGCAACCATAATGCGACCAGCCGAAGTAGGATACTCTGCACCATAC
TACAGTTTTGAAGCCTCTACGCAGGGCCCTTCAAGACTCCCATAGCAGCAGGGAGAGGT
GGCGCTCAGACAGATGAAAACCGTGCTGCCGATGGAGATCCGAGGTATGCCTTCGGGAGG
CAGCACGGACAAAAGACTACCACAACCTGGGGAGACTCCCGAAAGGTTTACCTACATTGCA
CATCAAGACACCGGTAGATACCCTGAAGGAGACTGGATTCAGAACATAAACTTCAATTTG
CCCGTGACCGAAGACAATGTATTGTTACCTACGGACCCCATCGGAGGAAAGACCGGTATT
AATTATACTAACATTTTCAATACTTATGGACCCCTGACCCGCACTCAACAACGTGCCGCCCG
TGTACCCCAATGGACAAATCTGGGATAAGGAGTTCGATACTGATTTGAAGCCGAGACTGC
ATGTCAACGCTCCATTCGTTTGCCAGAACAACCTGCCAGGCCAGTTATTCGTTAAGGTTGC
ACCAAACCTTGACCAACGAGTACGATCCAGACGCCTCTGCCAATATGTCCAGGATAGTCAC
GTACTCTGACTTTTGGTGGAAGGAAAATTAGTTTTTAAGGCAAAAACCTGCGTGCATCCCAT
ACATGGAATCCTATACAGCAGATGTCTATAAATGTGGACAATCAGTTTAATTACGTACCCT
CCAATATAGGTGGAATGAAAATCGTGTACGAAAAGTCTCAACTCGCCCCTCGTAAGCTTTA
TTAA

라. 개 간염 바이러스 (Canine Adenovirus, CAV)의 방어항원 단백질의 유전자 변이조사

(1) CAV 유전자 정보의 확보

(가) 유전자 정보수집

- 정보 수집 : Canine Adenovirus의 경우 항원성을 가진 단백질 부분이 아직 알려지지 않고 있으며 Subunit 백신도 개발되지 않았음.
- 개 간염 바이러스와 유사한 인간 간염 바이러스의 Capsid protein인 hexon과 fiber가 항원성을 가지고 있다는 것을 확인하였음. (Shuai Lang 2016. and Susan L. Phichla-Gollon 2007.)
- 국내 보고된 분리주가 없어서 가장 보편적인 변형 생균 백신주 Canine Adenovirus type 2 TORONTO A26/61을 선택 하여 *Nicotiana benthamiana*에 맞게 codon optimization을 하여 합성을 하였음
- Canine Adenovirus type 2 TORONTO A26/61의 Hexon 유전자 *Nicotiana benthamiana* codon optimized 염기서열

ATGGCAACCCCGTCGATGCTGCCACAATGGTCTTACATGCACATTGCTGGCCAGGACGCCG
CCGAATACTTGTCTCCCGCCCTGGTTCAGTTTGCCCAAGCAACCAGTTCTTACTTTAAGTTG
GACAACAAGTTCAGAAACCCCACTGTGGCCCCACCCACGATGTGACCACTGAGAGGTCCG
CAGCGCTTGCAGCTGCGCTTTGTGCCAGTCATGCAAGAGGATGGCCAGTACACTTACAAA
ACCCGCTTCCAGCTTGCGGTGGGAGACAACAGGGTGCTGGACATGGCCAGTACTTACTTCG
ATATCAGGGGTACCCTAGACAGAGGCCCTCCTTCAAGCCTTACAGCGGCACCGCCTACA
ATGCCCTCGCCCCAAGGCCGGGGCTAACAACTGTCTTTTTAATGGACAGGGTGCCAATAT

TAACACTTTAGCCCAGGTGCCCTCTGCAGGTGCCATAACTGTGAATGGCCAAGCTGCTGTC
ACAAACAATACCTACCAGCCAGAGCCCCAGCTGGGCCCTGAAAGCTGGGTTCGATGGCAGC
CTAGCAGAGCTGGGGGATGCGTCTGGCCGTGCCCTTAAGGCTTCAACCCCGCGCATGCCTT
GCTATGGTTCCTATGCTCCCCCACCAACGAAAATGGAGGTCAAGCAACTGGTCCAGTGG
AATCCAGATTTTATAAGGTGACCACCAACAATAACAATGAAGCAGATGCCATGCTATACA
CTGAAGATGTAAACCTGCAGGCCCCAGACACCCACCTGGTGCACCAAGTGCCAGAGGGTC
AGGTTACAGGGGTGCAAGGGCTGGGCCAGCAGGCTGCGCCAACAGGCCGAACACTACATA
GGCTTCAGGGACAACCTTCATAGGCCTCATGTACTACAATAGTAATGGAAACCTAGGGGTG
CTGGCGGGTCAGTCATCTCAGCTCAATGCCGTGGTGGACTTGCAAGACAGAAACACAGAG
CTCTCTTACCAGCTGCTGCTGGATGCCCTCACAGACAGGTCCCGCTACTTTTCCATGTGGAA
CCAGGCTGTAGATAGCTATGACCAGGATGTTAGGATTATTGACAACCATGGCGTGGAAGA
TGATATGCCCAACTATTGCTACCCACTGAGCGGCATGGGGCCCCTAACAAACATGACCAC
CATGAAGGTTAACAACCAAAAACCTTTCAGGCAGAAAATACCAATGTGGGGCCATTCAAAA
GATTGGTTTTGGAAATGTTGAGGCCATGGAAATCAACCTCAATGCCAACCTCTTCAAAAAGC
TTCCTTTACTCCAATGTGGCCTTATACTTGCCTGATGCCTTTAAATACACACCTGAAAACAT
TGTGGCCCCTGCCAATGTGAATACCTATGCTTACATGAATGTTAGATTACCCGCCGCCAAC
CTTATAGATACCTTTGTAAATATTGGCGCCAGATGGTACCAGATGTAATGGACACTGTTA
ATCCTTTCAACCACCACAGGAATGCAGGACTCCGCTACCGTTCACAACCTGCTTGGCAATGG
CCGCTATTGCTCGTTCATATTCAGGTCCCTCAAAAATTTTTTGGCAATCAAAAATCTCCTCC
TACTGCCTGGAACGTACACGTACGAGTGGTCTTTCAGAAAGGATGTAAACATGATCCTTCA
AAGCAGCTTGGGCAATGACCTCCGAGTGGATGGGGCCACCATCAACATTCAGAGCATCAA
CCTATATGCAAGCTTTTTCCCAATGGCACACAACACTGCCTCCACTCTGGAAGCCATGCTG
CGCAACGATGTAAATGACCAGTCCCTTTCAGACTACCTGTCTTCTGCCAACATGCTTTATCC
CATCCCTGCCAACACTACTAACCTGCCAATCTCCATTCCCGCCAGAACTGGGCGGGATTT
AGAGGGTGGAGCTTTACCAGAATTAAGCAACGAGAACTCCTGCCCTGGGCTCGCCTTAT
GATCCCTACTTCACTTATTCGGGCAGTATTCATATCTGGATGCAACTTTTTTACCTCAGCCA
CACCTTTAGAAGAGTTTCCATCATGTTTACTCTTCCGTGTCTTGGCCTGGCAATGACAGGC
TGCTTACCCCAATGAGTTTGGAGATTAAGGATATGTAGACGGTGAAGGTTACAATGTGGC
CCAGTCCAACATGACAAAAGACTGGTTCATGGTTCAAATGCTAGCCCACTACAACATCGG
CTACCAAGGCTACCACCTGCCAGAAAGCTACAAGGACAGAATGTACTCCTTCCTAAGAAA
CTTTGAGCCCATGTGCAGACAGTTGGTGGACGTGGCCAACACTATGCTGCCTACCAGCCGGTT
ACCGTGGGCCACCAGCATAACAATTCTGGTTATGCTAGCGCCCTTTCGGCCTTTAACCCGC
GTGAGGGGCACCCATACCCAGCAAACCTGGCCTTACCCACTCATTGGAGCCAATGCAGTAC
CCACTGTCACCCAGAAAAGTTCCTCTGCGACAGGTCCCTGTGGCGCATCCCATCTCCTC
CAACTTTATGTCTATGGGAACCCTCACTGACCTGGGCCAAAACCTGCTGTACTCTAACTCC
GCCACGCCCTTGACATGACTTTTGGAGGTTGATGCCATGAATGAGCCCACTCTGTTGTACGT
TTTGTGTTGAAGTGTTCGACGTGGCACGCGTCCATCAGCCCCACCGGGGGTTATTGAGGTA
GGGTACCTCAGAACTCCCTTCTCCGCCGGCAACGCCACCACCTAA

- Canine Adenovirus type 2 TORONTO A26/61의 Fiber 유전자 *Nicotiana benthamiana* codon optimized 염기서열

ATGAAGAGGACTAGGCGTGCCTTACCTGCCAACTATGATCCTGTTTACCCTTACGATGCTC
CCGGAAGCTCAACGCAGCCGCCGTTTTTCAATAACAAACAGGGTCTGACCGAGTCTCCCC
CCGGAACGCTGGCCGTAAATGTCAGTCCCCCTTAACGTTTCAGCACATTGGGGGCAATAA
AACTCAGTACAGGACCCGGCTTGACTCTTAATGAAGGCAAGTTACAAGCATCTTTAGGGC
CAGGTTTGATCACGAACACTGAGGGGCAGATCACGGTGGAAAACGTAAACAAGGTCCTTT
CATTACCTCACCCCTTACAAGAATGAGAACACAGTGTTCATTAGCATTGGGTGACGGATT
AGAGGATGAAAACGGAACCTTTGAAGGTCACATTTCCAACACCCCCACCCCTCTCCAGTTT
TCCCCACCACTGACAAAACTGGCGGAACAGTATCCTTGCCCTTACAAGATTCCATGCAA
GTCACTAACGGTAACTCGGGGTCAAGCCGACAACATACGCTCCGCCACTTAAAAGACG
GACCAGCAGGTGAGTTTACAAGTAGGATCTGGATTGACAGTCATCAACGAGCAACTTCAA
GCCGTGCAGCCACCTGCAACGACTTACAACGAACCCTTGAGTAAGACGGATAATAGTGTT
AGTCTGCAAGTTGGAGCTGGTTTGGCCGTGCAGAGCGGAGCCCTTGTCTGCTACACCTCCTC
CCCCTCTTACATTCACGAGCCCGTTAGAGAAAAATGAGAATACGGTATCTTTACAAGTAGG
AGCCGGTTTTATCTGTGCAAAATAATGCACTCGTCTGCTACACCACCACCGCCTCTTACCTTTG
CTTACCCTCTCGTGAAGAATGATAATCACGTCGCATTGTCCGCCGGGTCCGGTTTAAGGAT
CTCAGGGGGGAGCTTGACAGTCGCAACTGGGCCAGGACTGTCACACCAAAACGGGACGA
TTGGAGCTGTAGTTGGTGCCGGCTTAAAGTTTGAGAACAAATGCAATACTGGCTAAACTTGG
TAACGGCTTGACCATTAGAGATGGCGCTATAGAGGCAACCCAACCTCCTGCCGCCCGGATT
ACCCTTTGGACGGGTCCGGGTCCTTCAATTAACGGTTTCATAAACGACACGCCAGTAATTC
GTTGTTTTATCTGTTTAAACGCGAGACTCCAACCTCGTAACGGTGAATGCATCATTTGTGGGG
GAAGGTGGGTATCGAATAGTCTCCCCTACACAGTCCCAGTTCTCCCTCATCATGGAGTTCG
ATCAGTTCGGTCAACTTATGTCCACTGGCAACATAAATTCAACAACGACATGGGGTGAGA
AGCCATGGGGAAATAAACACTGTTTCAGCCCCGACCATCCCACACCTGGAAGCTCTGTATGC
CTAATAGGGAGGTCTACTCAACCCCCGCCGCTACAATCTCTCGTTGCGGATTGGATTCAAT
AGCCGTAGACGGCGCTCCTAGCCGTAGCATCGACTGTATGCTCATTATAAACAAACCAAA
GGGCGTCGCCACATACACGCTCACGTTTCAGATTTCTCAACTTCAATAGACTGAGCGGCGGC
ACACTTTTCAAGACCGATGTGTTAACATTTACCTACGTCGGGGAAAATCAATAA

2. 6종 바이러스 유전자 변이별 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발

가. 개 디스토펙 바이러스에 대한 유전자 변이별 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발

(1) 개 디스토펙 바이러스 H, F 유전자 변이별 항원그룹 분류

(가) 수집한 유전자 염기서열의 Multiple alignment 분석결과를 이용해 phylogenetic tree 분석을 하여 유전자 변이별 항원그룹 분류

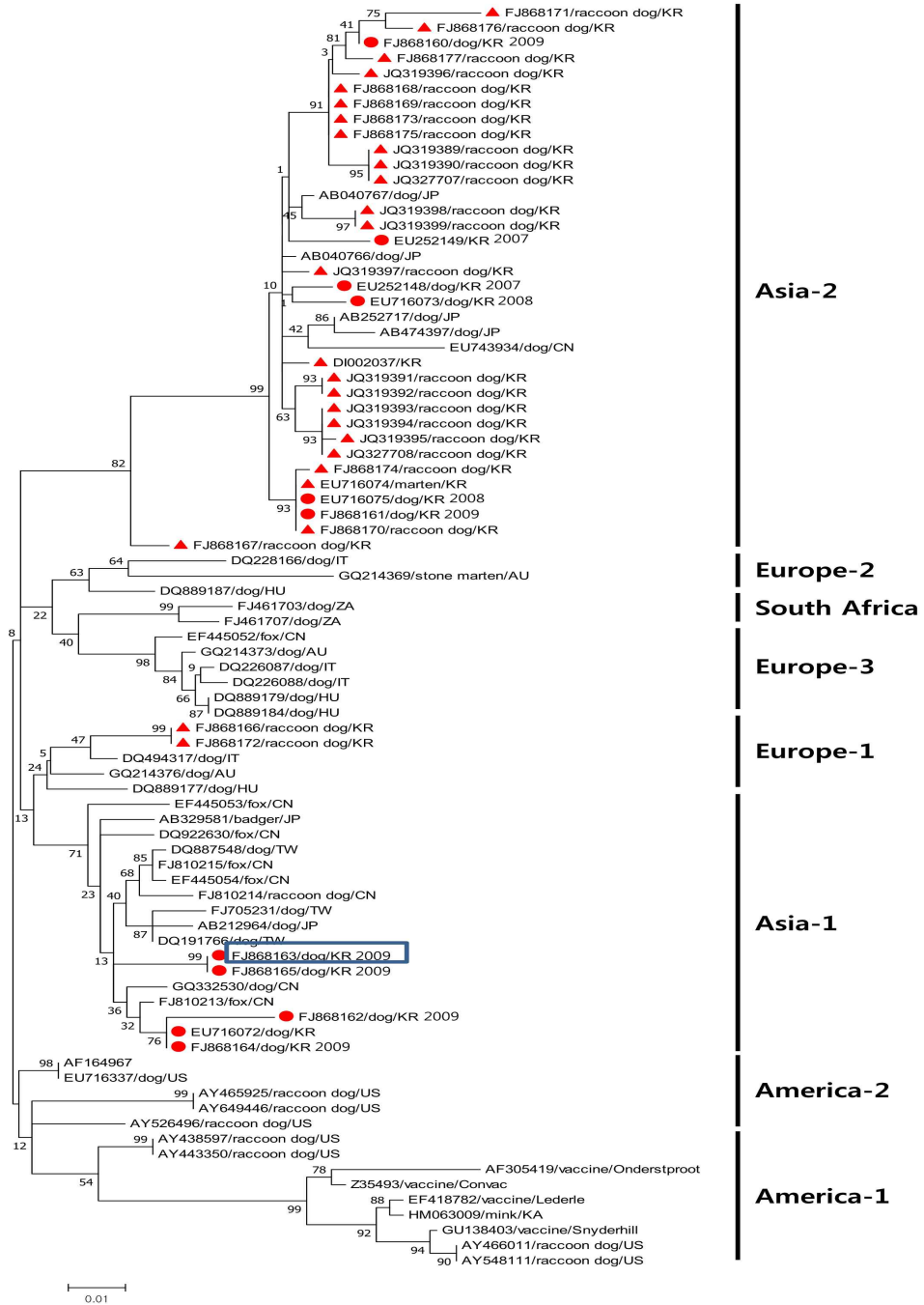


그림 17. 개 디스토펜퍼 바이러스 H 유전자 Phylogenetic tree 분석.
 ●: 국내 개, ▲: 국내 너구리 및 담비. □: 선발된 발현용 유전자.

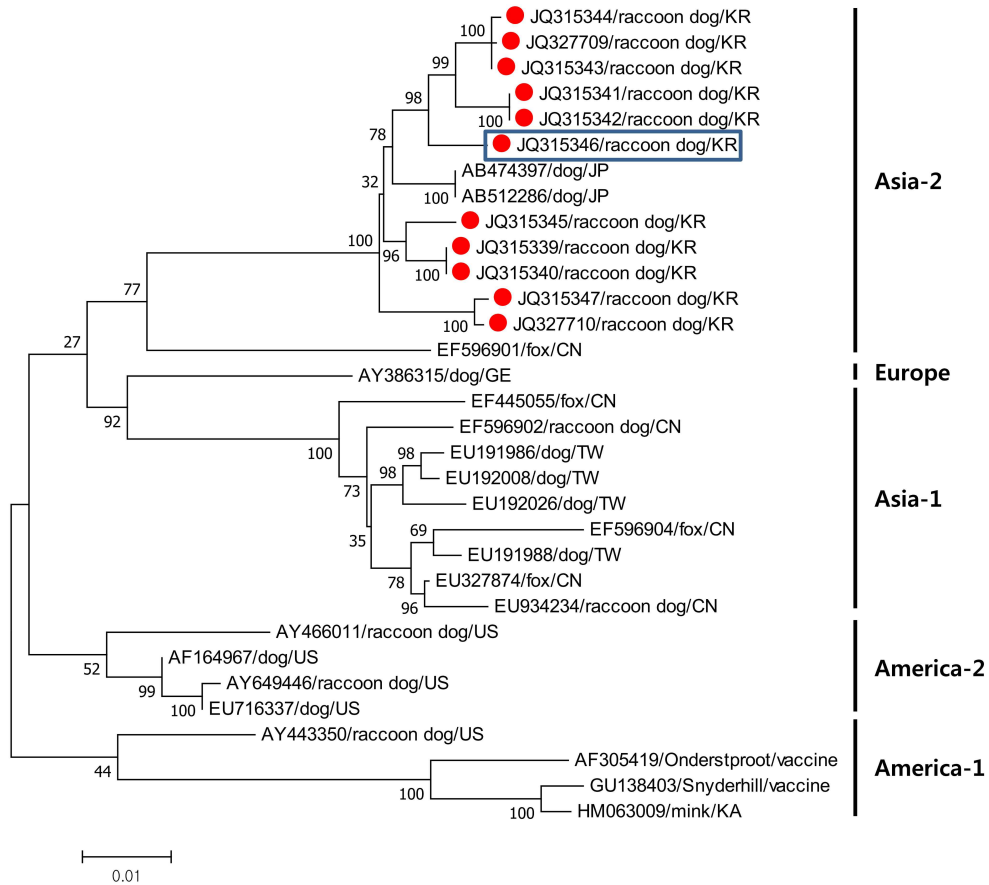


그림 18. 개 디스토펜퍼 바이러스 F 유전자 Phylogenetic tree 분석.

●: 국내 너구리. □: 선발된 발현용 유전자.

(나) Phylogenetic tree 분석 결과, 개 디스토펜퍼 바이러스 국내 분리주의 H 유전자는 대부분 Asia-1과 Asia-2에 속하는 것을 확인. F 유전자는 모두 Asia-2에 속하는 것을 확인

(2) 개 디스토펜퍼 바이러스 H, F 유전자 단백질 발현용 유전자 선발

(가) 개 디스토펜퍼 바이러스의 단백질 발현용 H 유전자는 가장 최근 분리 주 (FJ868163, 2009년)를 선발하여 *Nicotiana benthamiana*에서의 발현에 최적화 되도록 DNA 염기서열을 제작하여 합성

(나) 최적화 개 디스토펜퍼 바이러스 H 유전자 염기서열

ATGCTCTCCTACCAAGATAAGGTCGGGGCTTTTTACAAAGATAATGCTAGGGCAAATTCTT
CTAAACTGAGCCTGGTTACGGAAGACAAGGCGGCCGACGACCGCCGTACCTGTTGTTTG
TTCTTCTTATCTTACTCATTGGGATTTTGGCCTTACTGGCAATAACGGGCGTACGTTTTTCATC
AAGTCAGCACATCAAACATGGAATTCTCACGTCTTCTGAAAGAAGACATGGAAAAGTCTG
AAGCCGTACATCATCAGGTGATTGATGTTTTGACTCCTCTGTTTAAGATTATTGGTGACGAA
ATAGGGCTGAGGTTACCGCAGAAATTGAATGAAATCAAGCAATTTATACTCCAAAAAACC
AACTTCTTTAATCCAAACCGAGAGTTCGATTTTAGAGACCTGCATTGGTGCATAAACCCCC

CCAGTAAAATAAAAAGTAAATTTCACTAACTACTGCGATACTGTCCGGGGTGAAAAAAGTA
 TTGCTAGCGCCGCTAATCCGATTATACTGAGCGCCCTCAGCGGTGCTAGAGGCGATATCTT
 CCTCCCTATCGATGTTCCGGAGCAACAACGAGCGTAGGTCGTGTCTTCCCGTTAAGTGTA
 AGCCTGTCTATGTCCCTTATCAGCAGGACGTCCGAGATTATAAACATGCTGACTGCCATCT
 CAGACGGCGTTTATGGGAAAACATACCTCTTGGTTCCCGACTACATTGAGGGAGAATTTGA
 TAGTCAAAAAGATTAGGGTCTTCGAGATTGGCTTCATAAAGCGTTGGCTTAATGACATGCCC
 TTGTTGCAGACAACCAACTACATGGTCCTCCCCGAAACATCAAAGCAAAGGTTTGCCT
 ATAGCAGTGGGTGAGTTGACCCTTGATCTTTATGCGTGGACGAATCAACAGTTTTGTTGTA
 TCACGATAGTAATGGCCACACGACAGTGTACTGGTCGTGACCCTCGGGATCTTCGGAGCT
 ACCCCTATGAATCAGGTCGAAGAAGTCATTCCTGTAGCACATCCATCAGTAGAAAAGATA
 CACATTACTAATCACAGAGGGTTTATTAAGGACTCAGTAGCTACCTGGATGGTTCCAGCTC
 TGGTGTCTGAACAGCAAGAAGGACAAAAGAAGTGTAGAGTCAGCTTGTCAACGTAAAA
 GTTATCCGATGTGTAACCAGACATCATGGGAACCCTTCGGTGGGGTGCAACTCCCCTCATA
 CGGAAGACTGACATTACACCTTGACGCAAGTATCGACCTCCAACCTCAATATATCTTTCACA
 TACGGTCCCGTAATTCTCAATGGCGACGGTATGGACTATTACGAAAATCCTCTTCTGGACT
 CCGGCTGGCTTACGATTCCTCCCAAGAACGGAACCATCCTTGGGTTGATCAACAAGGCCTC
 AAGGGGTGATCAATTTACTGTAACACCCCATGTACTTACGTTTGCACCTAGGGAATCTAGT
 GGGAACTGCTACTTACCTATCCAGACGTCCCAAATAATGGACAAGGATGTACTGACGGAA
 TCAAATTTAGTCGTGCTCCCCACCCAGAATTTCCGATATGTTATCGCCACATATGACATAA
 GCAGAGGCGACCATGCCATAGTGTATTACGTGTATGATCCTATTCGTACTATTAGTTACAC
 CTACCCTTTCGTTTTGACGACTAAGGGAAGACCCGATTTCTTGAGAATCGAATGTTTCGTCT
 GGGATGACGACTTATGGTGTACCAAGTTCATCGTTTCGAAGCTAACATTACAACTCTAC
 GACTTCCGTCGAGAATTTGGTAAGAATGCGTTTCTCTTGTAATAGGAGTAAACCT

(다) 개 디스토펙퍼 바이러스의 단백질 발현용 F 유전자는 가장 최근 분리 주 중에서 같은 그
 룩의 개 분리 주(일본)와 가장 가까운 국내 분리 주 (JQ315346, 2011년)을 선발하여 *Nicotiana
 benthamiana*에서의 발현에 최적화 되도록 DNA 염기서열을 제작하여 합성함

(라) 최적화 개 디스토펙퍼 바이러스 F 유전자 염기서열

ATGCACAAAAAGGTACCGAAACGACCAAAAACACAGATTCATACGCAACAAGATCTTCC
 ACAACAGCATTCAACAAAGAGTGCTGAAACAAAGACCTCCAGGGCACGTCATAGCATT
 CCTCTGCACAGAGAAGCACCCATTACGATCCGCGAACCGCCGACCGACCGGATTATTACA
 TCATGAAGCGAACTCGACCCTGCAAACAGGCTTCTTACCGAAGTGATAACATTCCTGCTCA
 CGGGGACCGTGATGGCATCATAACCCATACGCCAGAGTCAGTATCTCGTGGGGCAAAGTC
 ACGTCTCAAATGGGGCAAAGCAACGCCATTAATCAGGTTCCAGTGCACCTGGTTAGT
 GCTGTGGTGTATAGGGATTGCTAGCTTGTTCCTGTGTTCCAAGGCTCAAATACATTGGAATA
 ACTTGTCTACAATTGGTATAATCGGTACAGACTCTGTTCACTATAAAATCATGACACGTCC
 GAGCCATCAATATCTTGTCAATTAATGCCTAACGTGAGCCTCATTGATAACTGCACC
 AAAGCCGAGTTAGACGAATACGAGAAGCTCCTGAATTCGTTAGAACCGATTAACCAA
 GCCCTGACCCTCATGACCAAAAACGTAAAACCATTGCAAAGCGTTGGTTCAGGCAGACGT
 CAGAGGAGATTCGCCGGTGTAGTATTGGCAGGTGCCGCCTTAGGGGTAGCTACTGCCGCTC
 AGATAACGGCCGGAATCGCACTCCATCAAAGCAATCTGAATGCACAAGCCATACAGAGTC
 TCCGAACCTCATTGGAACAAAGCAACAAGGCTATAGAGGAGATTCGAGAAGCTACACAA

GAGACTGTCATAGCCGTTACAGGGCGTACAGGATTATGTGAATAACGAGTTGGTCCCAGCC
 ATGCAGCACATGTCATGCGAACTTGTGGCCAGCGTCTCGGCCTTAAATTGCTCCGTTATTA
 CACGGAATTGTTGAGCATCTTTGGACCATCCCTCCGAGATCCTATATCAGCCGAGATAAGC
 ATACAGGCTCTCAGTTACGCCTTGGGTGGCGAGATTCATAAGATTTTAGAAAAATTAGGTT
 ACTCCGGGAACGATATGATTGCAATTCTTGAATCTCGTGGAAATAAAGACGAAAATAACAC
 ACGTTGATCTCCCTGGAAAATTTATAATTCTGTCAGTTTCTATCCTACGTTGAGTGAGGTG
 AAGGGTGAATTGTGCACCGATTAGAAGCAGTAAGCTATAATATAGGATCTCAGGAGTGG
 TATACCACGGTTCCTAGATATGTTGCCACAAACGGTTACCTTATAAGCAATTTTCGACGAGA
 GTAGTTGCGTCTTTGTGAGCGAAAGTGCAATATGCTCCCAGAATTCCTTGTACCCTATGAGT
 CCCCTCCTCCAACAGTGTATTCGTGGGGATACATCTAGCTGCGCCCGAACTCTTGTCTCTGG
 CACGATGGGAAATAAATTTATTCTTAGTAAAGGCAATATCGTAGCCAACCTGCGCATCAAT
 ACTCTGCAAGTGTATAGCACGTCAACGATTATCAATCAAGGCCCGGATAAGCTGCTTACG
 TTTATCGCTTCAGACACGTGTCCGCTTGTAGAGATAGATGGAGTTACTATACAAGTCGGCG
 GACGACAATATCCAGATATGGTATACGAATCCAAAGTTGCATTAGGTCCAGCTATCAGTTT
 AGAAAGACTGGACGTCGGTACGAACCTGGGCAATGCTTTAAAAAAGTTGGACGATGCCAA
 GGTCTTATAGATAGCTCCAACCAGATACTCGAGACAGTTAGGAGATCCTCAAGTAACTTT
 GGGTCTCTTCAGTGTGCCATTTTGTCTGTACTGCCTTAGCCCTTTTACTGCTGATATGT
 TGTGCAAGCGACGTTATCAACAAACCCTTAAGCAAAACACTAAAGTTGATCCCACATTC
 AAACCCGATTTGACCGGCACGAGTAAGTCTTATGTCCGTTCCCTG

나. 개 파라인플루엔자 바이러스에 대한 유전자 변이별 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발

(1) 개 파라인플루엔자 바이러스 HN 유전자 변이별 항원그룹 분류

(가) 수집한 유전자 염기서열의 Multiple alignment 분석결과를 이용해 phylogenetic tree 분석을 하여 유전자 변이별 항원그룹 분류

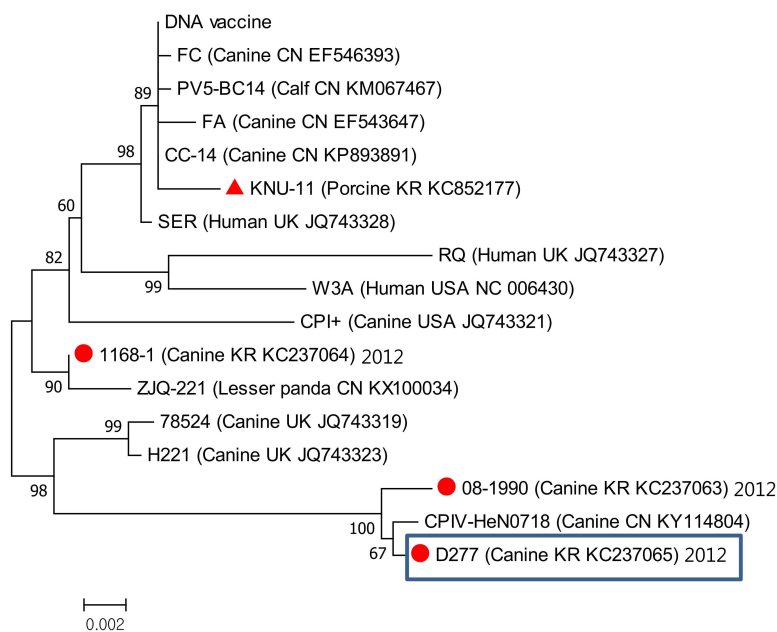


그림 19. 개 파라인플루엔자 바이러스 HN 유전자 Phylogenetic tree 분석.

●: 국내 개, ▲: 국내 돼지. □: 선발된 발현용 유전자.

(나) Phylogenetic tree 분석 결과, 국내 개 분리 주 1168-1은 중국 Lesser panda 분리 주와, 국내 개 분리 주 08-1990, D277은 중국 개 분리 주와 가장 가까운 것을 확인

(2) 개 파라인플루엔자 바이러스 HN 유전자 단백질 발현용 유전자 선발

(가) 개 파라인플루엔자 바이러스의 단백질 발현용 HN 유전자는 국내 개 분리 주 두 개가 같이 있는 그룹에서 중국 개 분리 주와 가까운 D277(KC237065)을 선발하여 *Nicotiana benthamiana*에서의 발현에 최적화 되도록 DNA 염기서열을 제작하여 합성

(나) 최적화 개 파라인플루엔자 바이러스 HN 유전자 염기서열

```
ATGGTTGCAGAAGACGCCCCCGTAAGGGGAACGTGTTCGAGTACTGTTTAGAACGATTACT
CTGATTTTTCTGTGCACGCTGCTGGCTTTGAGTATTTCCATACTTTACGAGAGCCTTATCACG
CAAGAGCAGATTATGTCCCATGCTGGATCTACTGGGAGTAATAGTCGTTTAGGCAGTATAA
TCGACCTTCTGAACAATATACTCTCAGTCGCTAACCAGATTATATACAACTCCGCAGTGGC
CCTCCCCCTTCAACTTGATACGCTCGAATCAACATTACTCACAGCTATCAAATCACTGCAG
ACATCTGACAAATTAGAACAAAATTGCTCCTGGGGTGCTGCCCTGATTAACGACAACAGA
TACATTAATGGAATAAATCAATTCTATTTTTCAATCGCAGAGGGCCGTAACCTTGCCCTCG
GGCCACTGTTGAACATCCCATCCTTTATACCCACTGCAACGACGCCAGAGGGATGTACAA
GGATTCCTTCCTTTTCTTTAACCAAGACACATTGGTGCTATACTCACAATGTAATATTGAAC
GGTTGCCAAGATCATGTATCCAGCAATCAGTTCGTAAGTATGGGCATCATTGAGCCAACGA
GCGCAGGTTTCCCGTCATTCCGTA CTCTTAAGACCCTGTACCTTTCCGACGGTGTTAATCGT
AAATCTTGTTCCATATCTACCGTCCCTGGGGGGTGTATGATGTACTGCTTCGTCAGCACACA
ACCCGAACGAGATGATTATTTAAGCACGGCTCCGCCTGAACAAAGAATCATTATTATGTAT
TACAATGATACTATTGTCGAGAGAATTATAAACCCCTCCGGGAGTTCTTGACGTGTGGGCTA
CTCTCAATCCGGGTACTGGTAGCGGCGTATACTATCTCGGATGGGTCTGTTCCCGATCTAC
GGTGGGGTAATCAAAAAGACGAGCCTTTGGAACAATCAAGCCAATAAATATTTTATTCCC
CAGATGGTGGCTGCTTTATGCTCTCAGAATCAAGCAACACAGGTAAAAAACGCAAAAAGC
TCTTACTACAGCAGCTGGTTAGGAAATCGAATGATCCAGTCCGGGATCTTAGCATGTCCTC
TCCAGCAAGACCTCACTAATGAGTGTTTAGTTCTCCCATTTAGTAACGATCAAGTGTTGAT
GGGTGCTGAGGGACGTCTCTACATGTATGGAGACAGTGTCTATTATTACCAGAGAAGCAA
CTCCTGGTGGCCCATGACTATGTTGTATAAAGTTACAATAACGTTACCAACGGACAACCA
TCAGCTATAAGCGCTCAAACGTTCTACTCAACAAGTGCCAAGACCGGGA ACTAGGAAT
TGTT CAGCAACCAATCGTTGCCCGGATTCTGTTTGAAAGGAGTCTACGCTGACGCATGGC
TTTTGACAAATCCTTCTAGCACATCCACCTTTGGCTCTGAGGCTACTTTCACAGGCTCCTAT
TTGAACGCAGCCACTCAAAGAATAAACCCGACGATGTATATTGCCAATAATACACAAATA
ATCAGCAGCCAACAATTTGGATCTAGTGGGCAGGAGGCCGCATACGGCCACACTACGTGC
TTCAGGGATACGGGAAGCGTCATGGTGTACTGCATATATAAATAGAGCTGAGCAGTAGC
CTGCTGGGACAGTTCCAGATAGTACCATTTATTCGACAGGTGACTCTTTCC
```

다. *Leptospira Canicola*에 대한 항원 발현용 유전자 합성

(1) *Leptospira Canicola* LigB 유전자 합성

(가) 1차년도 LigB plant OPT consensus sequence의 제한효소 부위 변경을 위해 다시 DNA 염기서열을 최적화 함

(나) 최적화 *Leptospira Canicola* LigB 유전자 염기서열

GTCACTCCTGCACTGTCTATAGTTCCTAACGTTGCTGGCTTATTCAAAGCAACTGGCACAG
ACTCAGACACCACATGGTCAAGCAACAATGGAACAGGGAATGCCATTATAGGCAGTGTA
ACAGCATTAAACGTCCATCGAACCGAGTATCGGACTTACTTTTCGCAGGAATCTTTGATTCAA
CGACGTGGAGCAGTAACAAGGGCGCAGGAATAGCTAGTACCGTATTATCCATTATACCGT
CTGCAAAGGGACTGACTCAATTTGCCGGAGACTCAATTGTTACTTGGTCTAGTTCAGCTAT
CAACGCTGGTGCAGGAGACATCGCCTCTTCCGTGGCAGCACTTATCATCCCGGCCAAGGG
ACTGACGGCTGGCACCGACGATATCGTGACATGGTCCAGCAATATTAATAAGGGGCTCGG
CTCCATCATGACGAATCCGGTACTGTTCTGGGTACGGTTCCTTCCCAATGAACTTGATAACC
ACAAGCGATTTACACAGAACCTTGAGACTTTTGGTTCAACCCTCAGTGAAATCAAGAAC
ATATTGGTTATCTCTGCACATTGGAAGACAAGGGGGACGTATGTGACGGTTGCTGATCCGC
CTGAGCAAATCTATGATTTTTACGGTTTCCCGCAGGAATTGTACGAGGTAATAACCGACC
TAGTGGGAGTACGGAGTTGGCTCAACAGATTCAAAGTTAGTGAAAAGTGTGATGTTTGG
GGCCACTAAGGATTGGGGCTTAGATCATGGGTTCATGGGGCGTCCTGTACTTCTTATTCCGT
AAGGCTAATTTCCCGGTCATCCAGCTGTCCATTGACGCAAATTGTAATCCGGAAAAGCAGT
ACGAGATAGGGAAAGAGTTACGACCCCTTCGTGAAGAAGGAAGTAAATATTAGGCTCAG
GTAACATCGTACACAACCTTCATAAGGCAGATTTTTATAATCTGAATGCAACACCGACTTG
GGCCATCGAGTTCGATGAGTATATGCGACAAGCACTCGAGTCCAGGAATGACAAGACAAT
ATTGGACTTTTACAATAAAGGGGAGATAGCTAAACTCGCAGCTCCATCAACGGAGCATCT
GGAGCCGATCTTTTACGTCCTCGGAGCAATGAAACCTGAAGAAAAAGTTAAGTTCATCCA
CCACAGTTTTTACAACCGAAGTGTGAGGTCTTTTACATCCGTT

라. 광견병 바이러스에 대한 항원 발현용 유전자 합성

(1) 광견병 바이러스 glycoprotein(G protein) transmembrane domain (TM) 유전자 합성

(가) 1차년도 G protein plant OPT consensus sequence의 제한효소 부위 변경을 위해 다시 DNA 염기서열을 최적화 함

(나) 최적화 광견병 바이러스 G protein 유전자 염기서열

ATGGTCCCCAAGCACTTCTGTTTCGTCCTTACTCGTCTTCAGTCTGTGCTTCGGCAAATTT
CCGATCTACACCATACTGACAAGTTGGGACCATGGTCTCCTATTGACATAACCACTTGT
CATGCCCAATAATTTGGTTGTTGAAGATGAGGGATGTACGAATTTGTCCGGATTTAGCTA
TATGGAAGTCAAGGTCGGATACATCTCTGCCATTAAAGTCAACGGTTTCACCTGTACCGGT
GTCGTTACGGAAGCTGAAACATATACGAATTTTGTGGCTATGTAACAAGTACTTTCAAAC
GTAAACATTTCCGACCAACACCGGACGCATGCAGGGCCGCCTACAATTGGAAGATGGCAG
GTGACCCAGATATGAAGAAAGTCTTCAATCCCTATCCGGACTACCACTGGCTCCGTAC
CGTCAAGACAAGTAAAGGAATCCTTGGTGATTATATCTCCATCCGTAGCTGACTTAGACCCT

TATGACAAGTCTTTGCACAGCAGGGTATTTCCGGGCGGAAAATGCAGTGGAATTACTGTCA
 GTTCTACCTACTGCAGTACTAATCACGACTACACGATATGGATGCCCCGAGAATCCCAGATT
 AGGAACAAGCTGTGATATATTTACAAATTCCCAGGAAAACGTGCCTCTAAGGGAGGGAA
 AACGTGCGGGTTTGTGACGAGAGAGGGTTATATAAGAGCTTGAAGGGCGCCTGTAAGTT
 AAAACTGTGTGGTGTTTTAGGGCTGCGACTCATGGACGGGACATGGGTGGCAATGCAAAC
 ATCTGATGAAACGAAATGGTGCCCCCAGATCAACTTGTAATTTACACGACTTCAGGTCC
 GACGAGATCGAACATTTGGTCGTCGAGGAGCTTGTGAAGAAGAGGGAAGAATGTTTAGAC
 GCCTTGAGAGTATCATGACGACCAAATCCGTCAGCTTTCGTCGTTTATCCCATCTCAGGA
 AACTTGTACCCGGTTTCGGTAAAGCCTATACCATCTTTAACAAAACATTGATGGAGGCCGA
 CGCTCACTACAAGTCAGTGAGGACATGGAATGAAATCATTCCCTCCAAGGGGTGCTTAAG
 AGTAGGCGGCAGATGTCACCCTCACGTTAATGGGGTCTTCTTCAACGGAATTATCCTCGGC
 CCCGACGGGCACGTGCTGATACCTGAAATGCAATCATCACTCCTCCAACAGCACATGGAG
 CTTCTCGAAAGCAGTGTCATACTCATGCATCCACTGGCCGACCCTTCCACTGTATTTAA
 AGACGGCGATGAGGCAGAAGATTTTGTGCGAGGTGCATCTTCCCGACGTGCATAAGCAGGT
 TAGTGGCGTAGACCTGGGATTACCTAACTGGGGGAAATACGTAATTCTGTCAGCCGGGGC
 ATTAATCGCTCTCATGCTGATAATTTTCTGATGACGTGCTGTAGGAGGGTAAATCGACCT
 GAGTCTACACAGCGTTCCTCGGAGGAACTGGTAGAAAGGTCTCCGTAACATCTCAGAGC
 GGCAAGGTCATAAGCAGCTGGGAGAGTTACAAGAGCGGTGGCGAGACACGATTG

3. 식물 발현 재조합단백질 클로닝

가. 광견병 G-protein TM(+) 항원 발현 위한 벡터 제작

(1) Cloning PCR을 위한 primer 제작

표 3. G-protein 클로닝 PCR을 위한 primer set.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
G protein-His-F	GGATCCTTATGCACCACCATCATCATCACGGCG GTATGGTCCCCCAAGCACTT	<i>G</i> <i>protein</i>	1,613
G protein-stop-R	GAGCTCTCACAAATCGTGTCTCGCCACC		
G protein-F	GGATCCTTATGGTCCCCCAAGCACTT	<i>G</i> <i>protein</i>	1,613
G protein-His-R	GAGCTCTCAGTGATGATGATGGTGGTGACCGC CCAATCGTGTCTCGCCACC		

(2) 디자인 한 primer를 이용하여 G protein 유전자 PCR 증폭 및 pGEM-T-easy vector 클로닝 진행

(3) pGEM-T-easy vector에 클로닝 된 G protein 유전자를 이용하여 식물 ELCH vector에 클로닝

나. 광견병 G protein 항원 식물 단백질 발현

(가) 확인된 Plasmid를 전기 천공법으로 *Agrobacterium* (GB3101)으로 형질전환 도입한 후, *Nicotiana benthamiana*에 infiltration하여 G protein 단백질 식물 임시발현을 진행

(나) 3일 후 식물을 수확하고 단백질을 추출하여 Western Blot analysis로 확인결과, Gprotein 단백질이 발현되지 않는 것을 확인 (그림29) primary antibody: anti-His, secondary antibody: anti-mouse-HRP

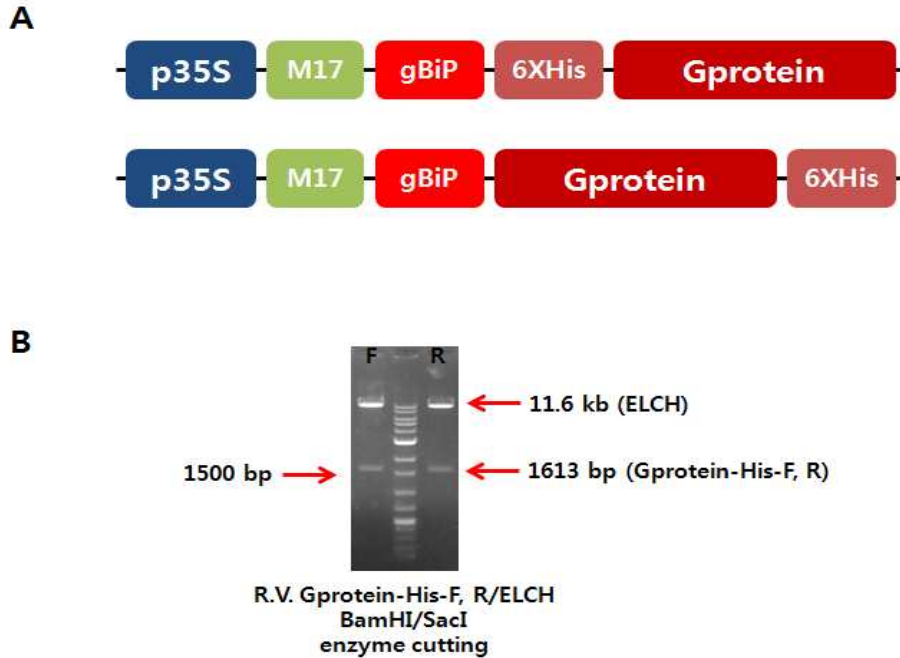


그림 28. G protein 유전자의 ELCH vector 클로닝. (A) G protein / ELCH vector 모델. (B) BamHI/SacI 제한효소 처리를 통한 G protein / ELCH construct의 확인 (1,613 bp).

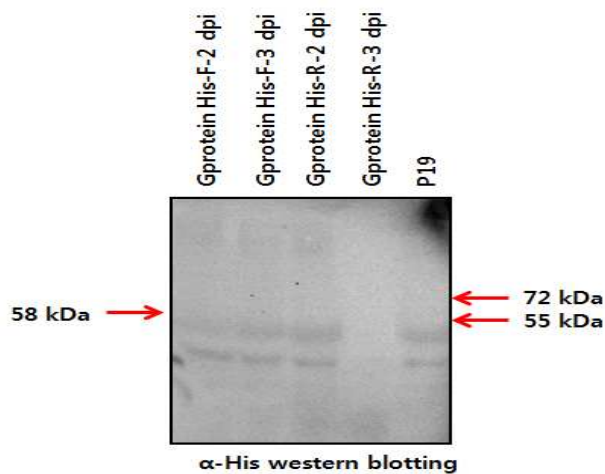


그림 29. Western blot을 이용한 G protein (58 kDa) 식물발현 확인. dpi: Day post infiltration

다. 최적화 된 CPV 2c VP2 유전자 클로닝

(1) CPV 2c VP2 유전자의 CLC vector 클로닝 벡터 제작

(가) *Nicotiana benthamiana*에 맞게 optimization된 CPV 2c VP2 유전자 염기서열을 주형으로 식물용 Plasmid vector에 맞게 Primer를 디자인

표 2. CPV-2 클로닝 PCR을 위한 primer set.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
CPV-2c-His F	GGATCCCGCATCATCATCATCATATG ATGTCAGACGGAGGGGTTTCAGC	VP2	1,752
CPV-2c R	CCCGGGTTATATAAAGCTTACGAGGGG		

(나) 디자인 한 primer를 이용하여 VP2 유전자 PCR 증폭 및 pGEM-T-easy vector 클로닝

(다) pDrive vector에 클로닝 된 CPV 2c VP2 유전자를 이용하여 식물 CLC vector에 클로닝 확인된 Plasmid를 전기 천공법으로 *Agrobacterium* (GB3101)으로 형질전환 도입한 후, *Nicotiana benthamiana*에 infiltration하여 CPV-2c-VP2 단백질 식물 임시발현을 진행

(라) 4일 후 식물을 수확하고 단백질을 추출하여 Western Blot analysis로 확인결과 CPV-2c VP2 단백질을 확인 할 수 있었음(primary antibody: anti-His, secondary antibody: anti-mouse-HRP)

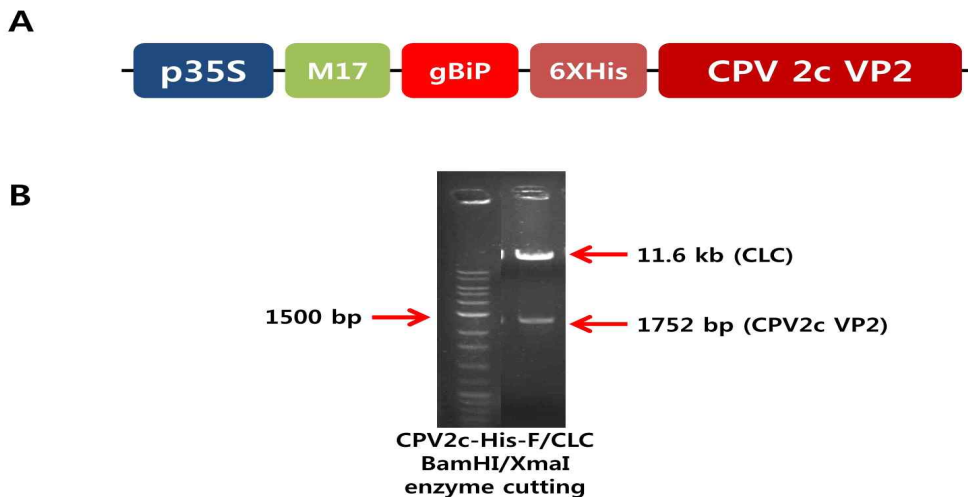


그림 30. CPV 2c VP2 유전자의 CLC vector 클로닝. (A) CPV 2c VP2 / CLC vector 모델. (B) BamHI/XmaI 제한효소 처리를 통한 CPV 2c VP2 / CLC construct의 확인 (1,752 bp).

(2) HA activity 측정을 통한 발현 양 조사

(가) 0.6% 돼지 적혈구와 Sorensen 버퍼(pH 6.8)로 2배 계단 희석(serial two-fold dilution)하여 준비한 재조합 개파보바이러스 VP2 단백질을 이용하여 수행

(나) 실험 결과 HA 역가는 2^3 HAunit으로 나타남

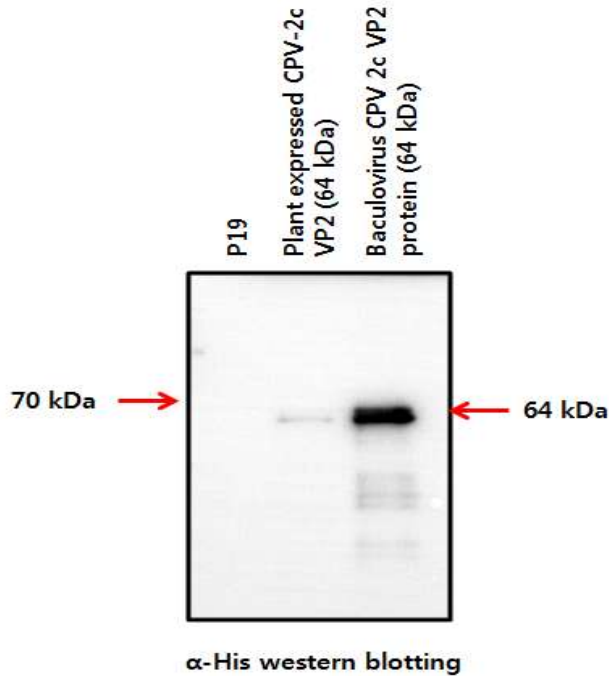


그림31. Western blot을 이용한 CPV VP2 단백질 (64 kDa) 식물발현

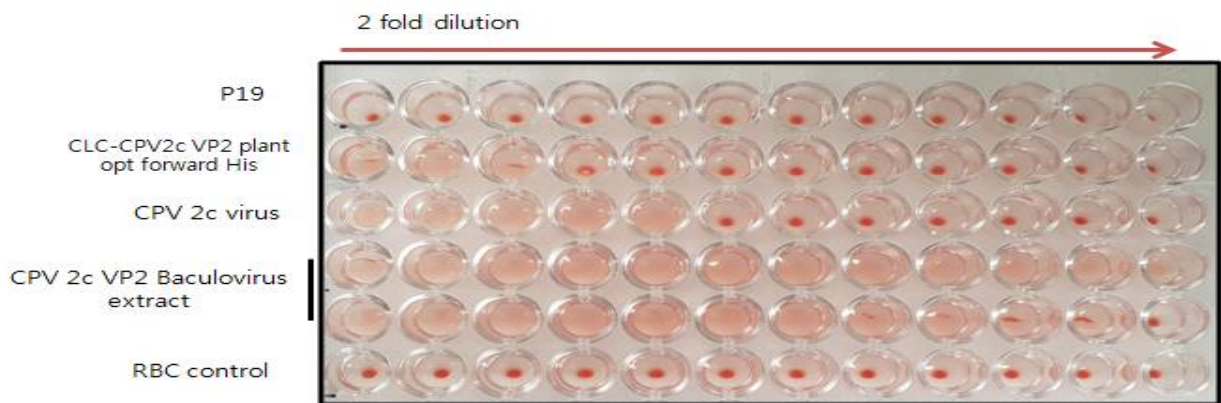


그림 32 혈구 응집 반응을 통한 단백질의 활성도 측정

라. *Leptospira Canicola* (Lig B)에 대한 항원단백질 식물발현 클로닝

(1) *Leptospira Canicola* LigB 항원 발현 위한 벡터 제작

(가) Cloning PCR을 위한 primer 제작

표 3. LigB 클로닝 PCR을 위한 primer set.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
L.C. LigB-His-F	GGATCCTTATGCACCACCATCATCATCACG GCGGTGTCACCTCCTGCACTGTCT	<i>LigB</i>	1,238
L.C. LigB-stop-R	GAGCTCTCAAACGGATGTGAAAGACCT		

- (나) 디자인 한 primer를 이용하여 *LigB* 유전자 PCR 증폭 및 pGEM-T-easy vector 클로닝 진행
- (다) pGEM-T-easy vector에 클로닝 된 *LigB* 유전자를 이용하여 식물 ELCH vector에 클로닝

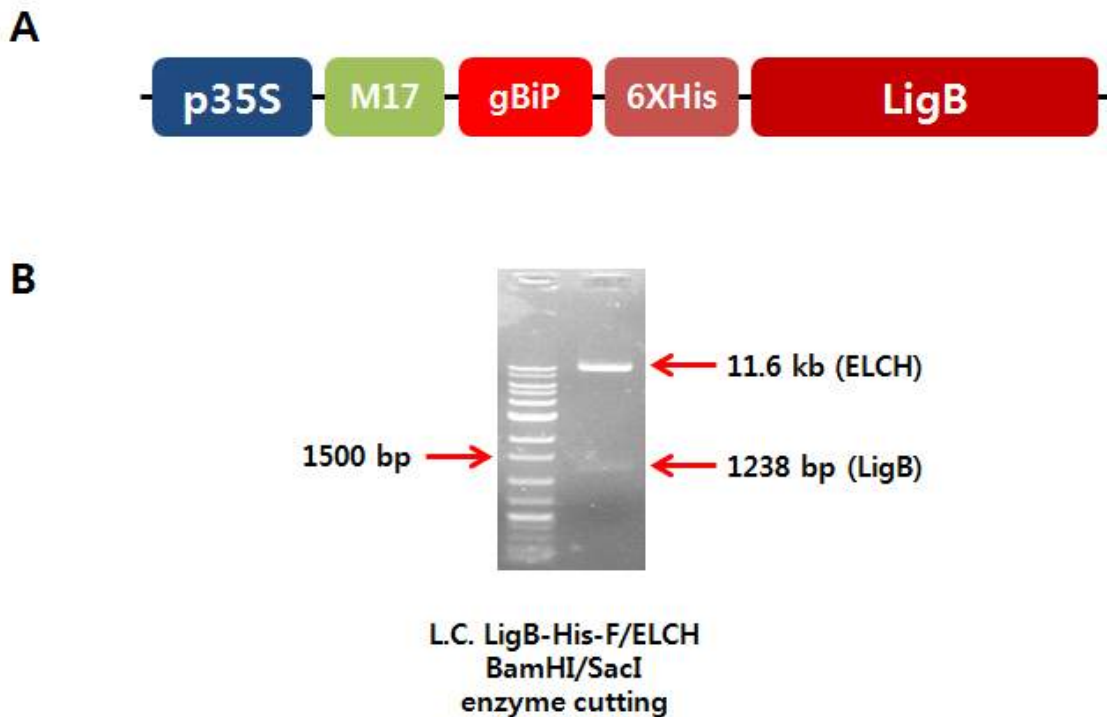


그림 33. *Lig B* 유전자의 ELCH vector 클로닝. (A) LigB / ELCH vector 모델. (B) BamHI/SacI 제한효소 처리를 통한 Lig B / ELCH construct의 확인 (1,238 bp).

(2) *Leptospira Canicola* Lig B 항원 식물 단백질 발현

- (가) 확인된 Plasmid를 전기 천공법으로 *Agrobacterium*(GB3101)으로 형질전환 도입한 후, *Nicotiana benthamiana*에 infiltration하여 LigB 단백질 식물 임시발현을 진행
- (나) 3일 후 식물을 수확하고 단백질을 추출하여 Western Blot analysis로 확인결과, Lig B 단백질이 발현되는 것을 확인(그림 34) primary antibody: anti-His, secondary antibody: anti-mouse-HRP
- (다) 같은 단백질을 anti-*Leptospira* primary antibody를 이용하여 western blot analysis를 수행하였지만, anti-*Leptospira*에 binding 되지 않는 것을 확인 (그림 34) primary antibody:

anti-Leptospira, secondary antibody: anti-rabbit-HRP

(라) Lig B 단백질이 맞는 지 확인하기 위해 다른 anti-Leptospira antibody를 이용한 western blot analysis가 필요

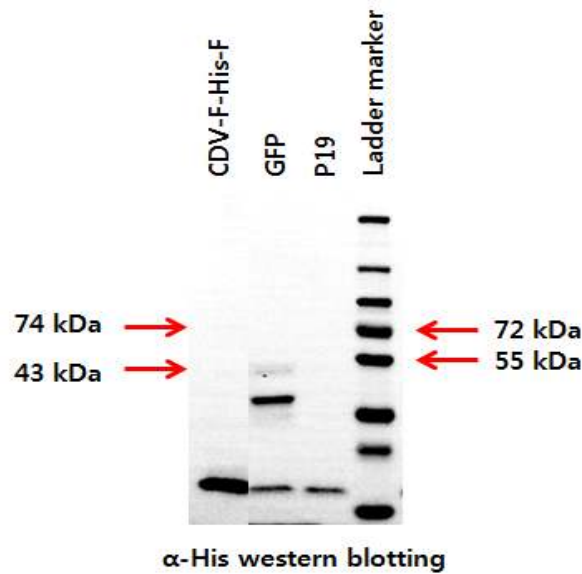


그림 34. Western blot을 이용한 CDV-F 단백질 (74 kDa) 식물발현 확인.

마. 개 디스토펜 바이러스에 대한 항원단백질 클로닝

(1) 개 디스토펜 바이러스 H 항원 (CDV-H) 발현 위한 벡터 제작

(가) Cloning PCR을 위한 primer 제작

표 4. CDV-H 클로닝 PCR을 위한 primer set.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
CDV-H-His-F	GGATCCTTATGCACCACCATCATCATCACG GCGGTATGCTCTCCTACCAAGAT	<i>H gene</i>	1,865
CDV-H-stop-R	GAGCTCTCAAGGTTTACTCCTATTACA		

(나) 디자인 한 primer를 이용하여 *CDV-H* 유전자 PCR 증폭 및 pGEM-T-easy vector 클로닝

(다) pGEM-T-easy vector에 클로닝 된 *CDV-H* 유전자를 이용하여 식물 ELCH vector에 클로닝

(2) 개 디스토펜 바이러스 H 항원 (CDV-H) 식물 단백질 발현

(가) 확인된 Plasmid를 전기 천공법으로 *Agrobacterium*(GB3101)으로 형질전환 도입한 후, *Nicotiana benthamiana*에 infiltration하여 CDV-H 단백질 식물 임시발현을 진행

(나) 3일 후 식물을 수확하고 단백질을 추출하여 Western Blot analysis로 확인결과, CDV-H 단백질이 발현되지 않는 것을 확인(그림36) primary antibody: anti-His, secondary antibody: anti-mouse-HRP

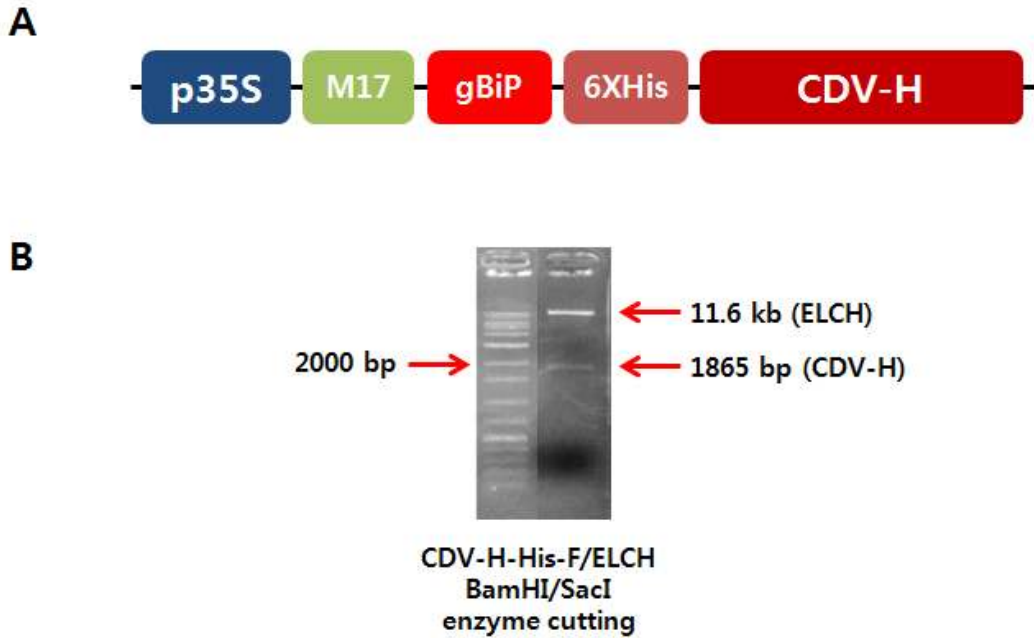


그림 35. *CDV-H* 유전자의 ELCH vector 클로닝. (A) *CDV-H* / ELCH vector 모델. (B) BamHI/SacI 제한효소 처리를 통한 *CDV-H* / ELCH construct의 확인 (1,865 bp).

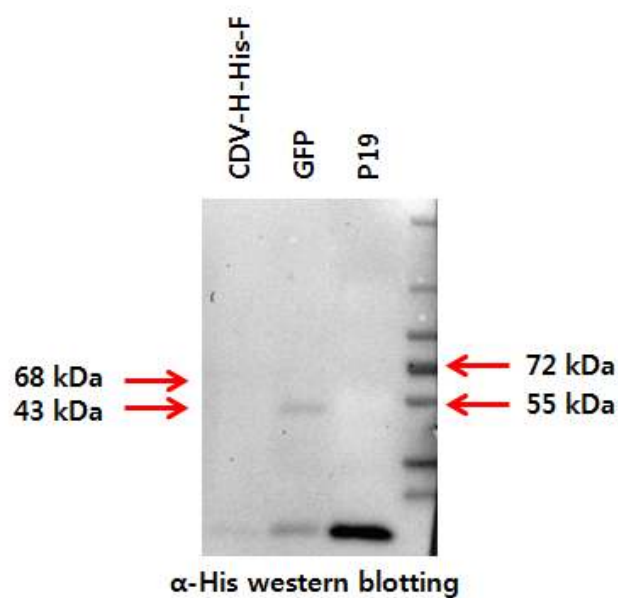


그림 36. Western blot을 이용한 *CDV-H* 단백질 (68 kDa) 식물발현 확인

(3) 개 디스토펙퍼 바이러스 F 항원 (CDV-F) 발현 위한 벡터 제작

(가) Cloning PCR을 위한 primer 제작

표 5. CDV-F 클로닝 PCR을 위한 primer set.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
CDV-F-His-F	GGATCCTTATGCACCACCATCATCATCAC GGCGGTATGCACAAAAAGGTACCG	<i>F gene</i>	2,027
CDV-F-stop-R	GAGCTCTCACAGGGAACGGACATAAGA		

(나) 디자인 한 primer를 이용하여 *CDV-F* 유전자 PCR 증폭 및 pGEM-T-easy vector 클로닝 진행

(다) pGEM-T-easy vector에 클로닝 된 *CDV-F* 유전자를 이용하여 식물 ELCH vector에 클로닝

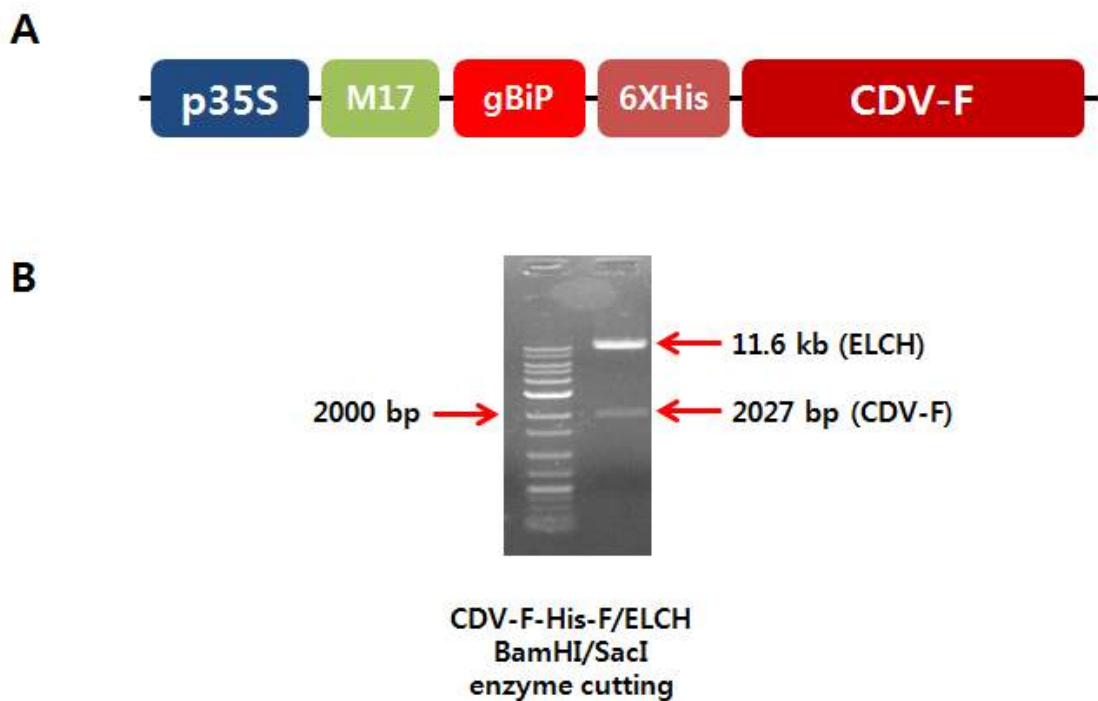


그림 37. *CDV-F* 유전자의 ELCH vector 클로닝. (A) *CDV-F* / ELCH vector 모델.

(B) BamHI/SacI 제한효소 처리를 통한 *CDV-F* / ELCH construct의 확인 (2,027 bp).

(4) 개 디스토펙퍼 바이러스 F 항원 (CDV-F) 식물 단백질 발현

(가) 확인된 Plasmid를 전기 천공법으로 *Agrobacterium*(GB3101)으로 형질전환 도입한 후, *Nicotiana benthamiana*에 infiltration하여 *CDV-F* 단백질 식물 임시발현을 진행 함

(나) 3일 후 식물을 수확하고 단백질을 추출하여 Western Blot analysis로 확인결과, *CDV-F* 단

백질이 발현되지 않는 것을 확인(Primary antibody: anti-His, secondary antibody: anti-mouse-HRP)(그림34)

바. 개 파라인플루엔자 바이러스에 대한 항원단백질 식물발현 검정

(1) 개 파라인플루엔자 바이러스 HN 항원 (CPIV-HN) 항원 발현 위한 벡터 제작

(가) Cloning PCR을 위한 primer 제작

표 6. CPIV-HN 클로닝 PCR을 위한 primer set.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Target	Product size (bp)
CPIV-HN-His -F	GGATCCTTATGCACCACCATCATCAC GGCGGTATGGTTGCAGAAGACGCC	CPIV- HN	1,739
CPIV-HN-sto p-R	GAGCTCTCAGGAAAGAGTCACCTGTCG		

(나) 디자인 한 primer를 이용하여 CPIV-HN 유전자 PCR 증폭 및 pGEM-T-easy vector 클로닝 진행 하였으나, 성공하지 못 함

4. 바이오앰에서 받은 식물 발현 재조합단백질 면역원성 및 항원성 확인

가. 식물에서 발현된 광견병 바이러스 G-protein TM(-)의 항원성 확인

(1) 동물실험을 이용한 광견병 바이러스 G protein TM(-)의 항원성 검정 시험

(가) 광견병 바이러스 G-protein을 Balb/C 마우스에 총 단백질 50 μ g을 첫 번째 접종 2 주 후 두 번째 접종하여 4주차에 채혈 후 혈청 획득

(나) 혈청으로 바이러스 중화능 시험을 진행

(2) 형광항체중화시험법 (FAVN, fluorescent antibody virus neutralisation test) 실험방법

(가) 표준양성혈청은 0.5 IU(International units)/mL로 희석한 OIE 표준 개혈청을 이용하고, 항체음성혈청을 음성대조군으로 이용. 그 외의 샘플혈청은 비동화하여 준비

(나) 96 well plate에서 각 샘플당 4줄의 well에 배지를 100 μ l씩 넣은 후 희석할 혈청을 첫 번째 줄에 각각 50 μ l 넣고 3배 계단희석을 실시

(다) 혈청희석이 끝난 well에 100 TCID₅₀/50 μ l로 희석한 표준고정주바이러스(CVS11)를 각각 50 μ l씩 넣고 37도에서 1시간동안 정치

(라) 1시간후 10% FBS가 들어간 DMEM배지에 4 \times 10⁵cells/mL인 세포를 각 well에 50 μ l씩 추가

(마) 37도에서 48시간 배양후 배양액을 제거하고 80% 아세톤에 30분동안 세포를 고정

(바) 광견병특이항체를 이용하여 형광염색을 실시한 후 형광현미경을 이용하여 감염된 세포가 있는 well를 각각 관찰

(사) 0.5 IU/mL로 희석한 OIE 표준 개혈청 결과를 이용하여 아래 공식을 통해 각 샘플의 항체가를 계산

(아) 판정기준 : 0.5IU/ml 이상 양성, 0.5IU/ml 미만 : 음성(중화항체가 9가 0.5IU로 환산)

$$\text{Serum titre (IU/ml)} = \frac{[(10^{\text{(serum log D}_{50}\text{ value)})} \times \text{theoretical titre of positive standard serum 0.5 IU/ml}]}{(10^{\text{(log D}_{50}\text{ of positive standard serum 0.5 IU/ml)})}$$

Example of conversion:

- log D₅₀ of the serum = 2.27
- theoretical titre of positive standard serum 0.5 IU/ml = 0.5 IU/ml
- log D₅₀ of positive standard serum = 1.43
(for the log D₅₀ of positive standard, the value of the day or the mean value can be considered)

$$\text{Serum titre (IU/ml)} = \frac{10^{2.27} \times 0.5}{(10^{1.43})} = 3.46 \text{ IU/ml}$$

※ 참고문헌 : OIE Terrestrial Manual

(3) 동물실험결과

(가) 항체가 검사 : FAVN 검사법으로 검사한 결과 5마리 시험군 마우스에서 각각의 항체는 4.56 IU/ml, 1.51 IU/ml, 13.77 IU/ml, 0.87 IU/ml, 23.93 IU/ml로 모두 양성판정기준 0.5 IU/ml 이상으로 확인되었으며 (주) 우진 비엔지와 농림축산검역본부에서 실험한 샘플은 중화능이 확인 되지 않았다.

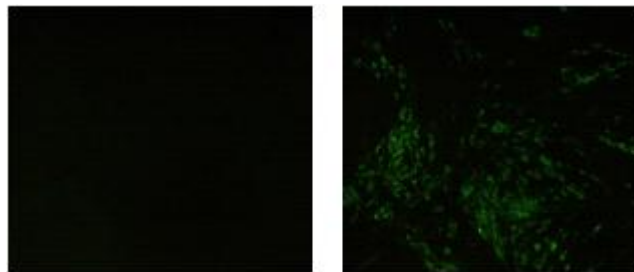


그림 38. FAVN 검사법으로 항체가 확인

나. 식물에서 발현 된 CPV 2c VP2 protein의 항원성 확인

(1) 개 파보바이러스 혈구응집반응 및 혈구응집억제반응

※ 혈구응집반응(HA, Hemagglutination test)

(가) 검사재료

- HA test용 시료 : 의심되는 분변을 채취하여 유제한 다음, 원심하여 상층액에 대하여 검사를 실시한다.
- HI test용 시료
- 혈청 : 채취한 혈청을 kaoline 처리를 실시하고 돼지 적혈구로 비특이응집소를 제거한 다음, 검사를 실시한다.

(나) 시약 및 기구

- VP2 recombinant antigen : 수의연 제조
- Sorensen buffer (pH 6.8)

① Solution A (M/15 KH₂PO₄) : KH₂PO₄ (9.078g) + NaCl (9.0g) + D.W. 1L

- ② Solution B (M/15 Na₂HPO₄) : Na₂HPO₄ (9.47g) + NaCl (9.0g) + D.W. 1L
 ③ Solution buffer (pG 6.8) → solution A : B (508 : 492)
 → solution A : B (25.4 : 24.6) / 50ml

표 7 Sorensen buffer의 제조방법

pH	Solution A (ml/l)	Solution B (ml/l)	pH	Solution A (ml/l)	Solution B (ml/l)
5.2	980	20	6.8	508	492
5.4	967	33	7.0	392	608
5.6	948	52	7.2	285	715
5.8	919	81	7.4	196	804
6.0	877	123	7.6	132	868
6.2	815	185	7.8	86	914
6.4	732	268	8.0	55	945
6.6	627	373	8.2	33	967

- Alsercer's solution (pH 6.1)

Dextrose, anhydrous	2.05g
Sodium citrate	0.80g
Citric acid	0.55g
Nacl	0.42g
H ₂ O q.s	100ml

- Kaoline 현탁액의 제조

- ① 90ml의 PBS에 시판되는 acid-washed kaoline 25g을 첨가하고 혼합한다.
- ② pH를 7.2로 조정한다.
- ③ 24시간 동안 정치하여 침전시킨 다음, 상층액을 버리고, 다시 PBS를 첨가하여 100ml가 되게 한다.
- ④ 1N NaOH로 pH를 7.2로 조정한다.

- 적혈구 : 돼지 RBC

- ① Alsever solution과 채혈한 혈액을 4:1로 혼합한다.
- ② 1000xg에서 15분간 원심하여 적혈구를 가라앉힌 다음, 상층액과 백혈구층(buffy coat)을 버린다.
- ③ 최초용량 만큼의 Sorensen buffer를 첨가하여 현탁시킨다.
- ④ (2), (3) 의 순서를 2회 더 반복한다.

- ⑤ 마지막으로 원심한 RBCs를 0.7% 농도로 현탁시킨 다음, bovine serum albumin을 0.175% 농도로 첨가한다.

(다) 검사방법

- Sorensen buffer를 모든 well(1-12번)에 50 μ l 씩을 가한다.
- (주) 튜브응집반응으로 실시할 경우에는 용량을 모두 0.2ml로 증가시킨다.
- 96well plate 1번 well에 검사재료 50 μ l를 가한다.
- 1번 well에서부터 11번 well 까지 희석한다. (주) 12번 well은 RBC 대조군
- 동량의 돼지 적혈구 현탁액(0.7%)을 가하고 혼합한다.
- 밀봉하여, 실온에 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 다음 판독한다.

(라) 실험결과 판독

- 판독방법 : 혈구응집이 일어난 마지막 희석배율을 가검재료의 혈구응집역가 (HA titer)로 계산한다.
- * 돼지 파보바이러스 혈구응집반응 참조.

※ 혈구응집억제 반응(HI, Hemagglutination Inhibition test)

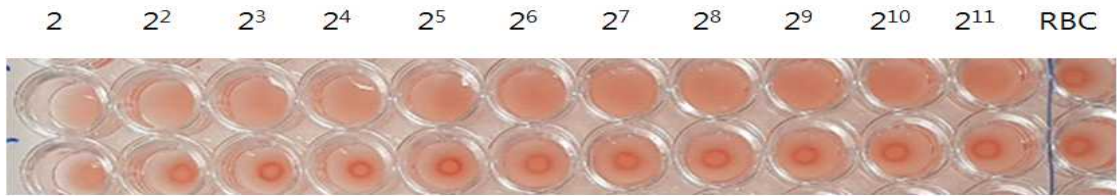
(가) 검사방법

- Kaoline 처리
- ① 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화한 혈청을 Sorensen buffer로 1:5로 희석한다.
- ② 희석한 가검혈청 0.1~0.4ml를 튜브에 첨가하고, 동량의 Kaoline 현탁액을 첨가한 다음, 혼합한다.
- ③ 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한다. (배양중 3~4회 혼합한다)
- ④ 원심(1,000 \times g, 15분, 4 $^{\circ}$ C)한 다음, 상층액을 실험에 사용한다.
- (주) 이 상태의 혈청은 1:10으로 희석된 상태이다.

- 적혈구를 이용한 비특이 응집소 흡착

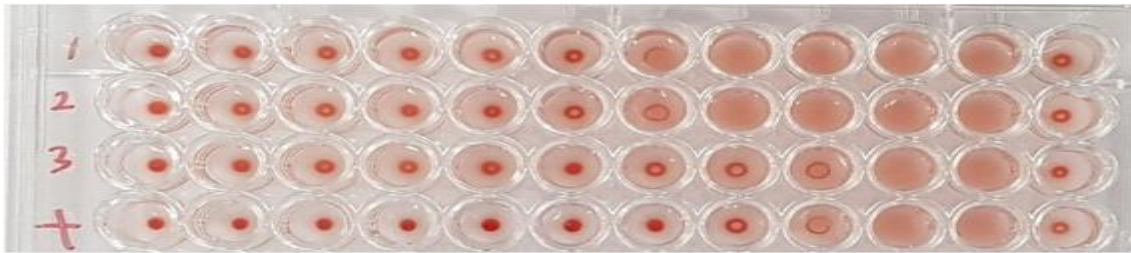
- ① 50% 돼지 적혈구 현탁액을 준비한다.
- ② Kaoline을 처리한 혈청 1ml에 대해 50% 적혈구현탁액 0.1ml를 첨가한다.
- ③ 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 흡착한다.
- ④ 원심(1,000 \times g, 10분)한 다음, 상층액을 실험에 사용한다.
- 혈청을 Sorensen buffer로 2배수 단계희석 한다.
- VP2 recombinant antigen이나 CPV (8 HA unit/50 μ l)을 50 μ l첨가한다.
- 항원의 back titration을 실시한 다음, plate를 부드럽게 혼합한 후, 실온에 1시간 배양한다.
- 적혈구 현탁액 50 μ l를 첨가한 다음, 부드럽게 혼합한다.
- 4 $^{\circ}$ C에서 1~2시간 배양한 다음, 판독한다.

(2) 개 파보바이러스 재조합 단백질 HA 실험결과



- 식물발현 단백질을 가지고 돼지 혈구에서 HA능을 평가한 결과 2¹¹ HA 결과 확인

(3) 실험동물 접종 후 개 파보바이러스 항체확인(HI)



- 기니피그 3마리에 식물발현단백질(2¹⁰ HA) 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 HI 항체가 를 평가한 결과 2⁶~2⁷ HI 항체가 확인

다. *Leptospira Canicola* L32 항원 식물 단백질 발현 동물접종 실험 후 항체가 확인

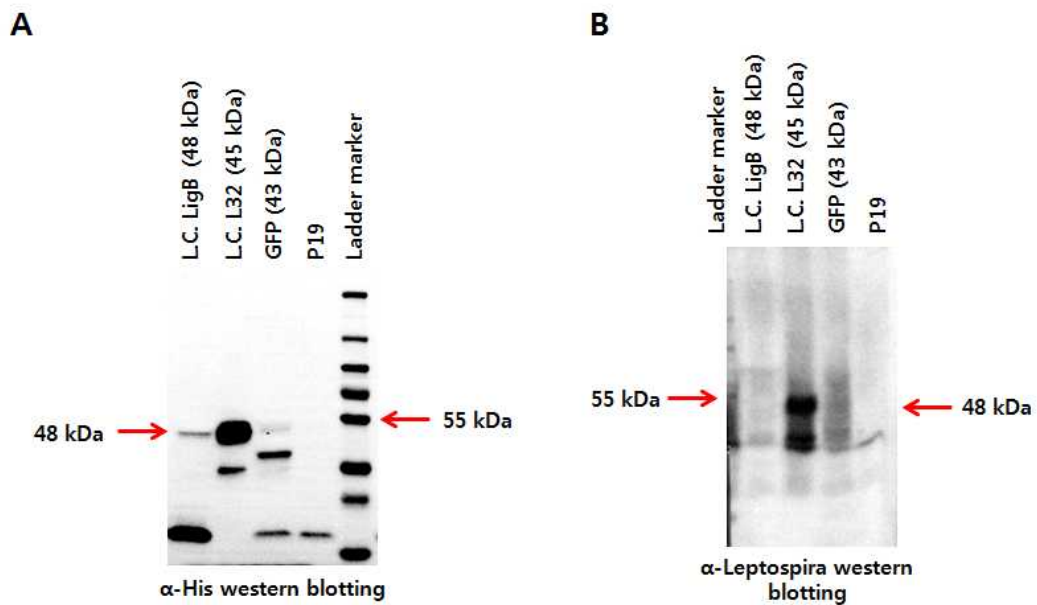


그림 39. Western blot을 이용한 LigB 단백질 (48 kDa) 식물발현 확인. (A) anti-His를 이용한 western blot. (B) anti-Leptospira를 이용한 western blot.

5. 3종 바이러스 항원 식물 발현 평가

가. 항원유전자의 codon optimization 및 합성

(1) 농림축산검역본부에서 발굴한 항원 유전자에 대한 식물체 고발현 벡터 시스템을 이용하여 식물체에서 발현시킬 경우, 사용하는 codon usage에 의해 발현효율이 낮아질 수 있다. 따라서 농림축산검역본부에서 발굴한 6종 바이러스 항원의 식물체 발현을 최적화하기 위해, 바이오니아에서 제공하는 codon optimizing program을 사용하여 *Nicotiana benthamiana* 식물에 최적화된 codon으로 변환 후, 유전자를 합성하였다. 합성된 항원 유전자의 식물체 고발현을 위해, 애기장대 식물 유래 UCP031279의 5' UTR을 부착했으며, 소포체 targeting signal인 BiP signal peptide, 또는 엽록체 targeting signal인 Rubisco transit peptide를 부착하여, 발현되는 단백질이 소포체 또는 엽록체에서 안정적으로 축적되도록 설계하였다. 최종적으로 재조합 항원 단백질의 발현 확인 및 분리정제를 위해 Histidine 또는 canine IgG의 Fc domain을 부착하여 식물체 고발현 벡터를 제작하였다. (그림 40)

바이러스	Rabies	Leptospira canicola	Canine parvovirus	Canine Distemper	Canine parainfluenza	Canine Adenovirus Type 2
항원 단백질	G protein M protein	L32 LigA LigB	2L21- BMV:His VP2	H protein	HN protein	Fiber protein

5' UTR	BiP-SP	항원유전자	6XHis
5' UTR	Rbc-TP	6XHis	항원유전자
5' UTR	BiP-SP	항원유전자	Fc domain

그림 40. 6종 바이러스 항원 및 항원 발현을 위한 식물 발현벡터 제작

나. 6종 바이러스 항원의 식물 발현 평가

(1) 식물체 transient expression 및 발현 검증

- 각 항원 단백질의 식물체에서의 발현 및 특성을 확인하기 위해, transient expression 방법으로 *Nicotiana benthamiana* 잎에서 발현시킨 후, 단백질 분석을 수행하였다. 제작된 식물 발현 벡터를 electroporation 기법으로 아그로박테리아 (*Agrobacteria*) 균주 LBA4404에 도입하였다. 형질 전환된 아그로박테리아를 5ml YEP 액체 배지 (Yeast extract 10 g, Peptone 10 g, NaCl 5 g, Kanamycin 50 mg/L, Rifampicin 25 mg/L)에 접종하여 28 °C의 조건에서 16시간 동안 배양 한 후, 1차 배양액을 새 YEP 배지에 접종하여 28 °C의 조건에서 6시간 더 배양하였다. 배양된 아그로박테리아를 원심분리 (7,000 rpm, 4 °C, 5분)하여 수집한 후, infiltration buffer (10 mM MES (pH 5.7), 10 mM MgCl₂, 200 μM Acetosyringone)에 600 nm의 파장에서 O.D. 1.0의 농도가 되도록 현탁하였다. 아그로박테리아 현탁액은 주사 바늘을 제거한 주사기 또는 진공펌프를 이용하여 *N. benthamiana* 잎에 주입하는 방법으로 Agro-infiltration을 수행하였다. Agro-infiltration된 식물체는 22 °C, 18시간 명 상태, 6시간 암 상태로 재배실에서 배양되었고, 4일 후, 잎을 수확하여, 항원 단백질 발현 분석에 사용하였다. 식물체에서 각 항원 단백질의 발현을 확인하기 위해, western blotting을 수행하였다. 단백질

extraction buffer로 앞에서 총 단백질을 추출하고, 원심분리를 통해 soluble fraction (S) 과 pellet fraction (P)으로 분리하였다. SDS-PAGE로 각 fraction의 단백질을 전개 후, Histidine monoclonal antibody 또는 anti-canine secondary antibody를 사용한 western blotting으로 각 항원 단백질의 발현 및 특성을 분석하였다.

(2) 6종 바이러스 항원의 식물체 발현 및 특성 분석

- Western blotting을 통해 6종 바이러스 항원 모두 식물체에서 soluble한 형태로 발현됨을 확인할 수 있었으나, 발현수준은 많은 차이를 보였다. 식물체에서 발현된 광견병 바이러스 glycoprotein (RVGe)의 약 90 % 가량이 soluble한 형태로 존재하며, 10 % 미만 이 pellet으로 존재함을 확인할 수 있었다. 또 다른 항원 M protein의 경우, RVGe와 비교하여 상대적으로 향상된 solubility를 보였지만, 발현량이 상대적으로 적은 것을 확인할 수 있었다. (그림 41)

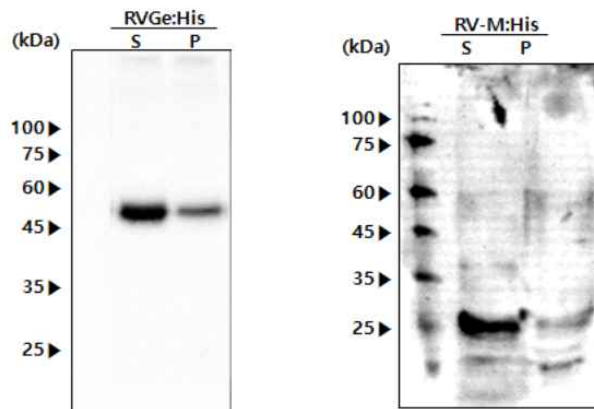


그림 41. 광견병 항원 RVGe, M protein 식물체 발현 확인

- CTB (Cholera Toxin Subunit B)가 fusion된 *Leptospira* 항원 단백질인 CTB-LipL32는 45 kDa의 크기로, 약 80% 이상이 soluble한 상태로 확인되었다. (그림 42)

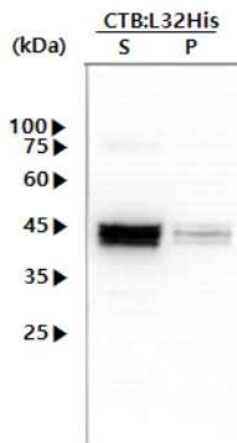


그림 42. 식물발현 시스템에서 *Leptospira* 항원 CTB-LipL32의 발현확인

- Canine parvovirus의 항원 단백질인 VP2는 60 kDa의 크기로 식물에서 발현됨을 확인하였고, 약 90% 이상 soluble한 상태로 존재하였다. (그림 43)

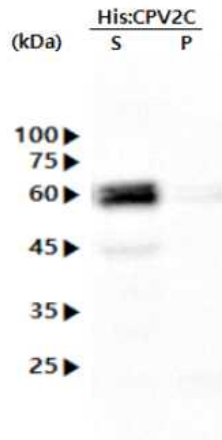


그림 43. Canine parvovirus의 항원 VP2 식물체 발현 확인

- Histidine이 tagging된 CAV-2 (canine adenovirus type 2)의 항원 F (fiber) protein 및 CPIV (canine parainfluenza virus) 항원 HN (hemagglutinin-neuraminidase) 단백질을 식물체에서 발현시켰을 경우, 예상 크기보다 작은 크기의 여러 밴드로 관찰되었고, 이는 식물체 내에서 이들 단백질의 안정성이 낮음을 의미한다. 이들 항원 단백질에 IgG Fc domain을 fusion 하면, His tagging과 비교하여 CAV-2 F, CPIV HN 단백질의 안정성이 향상된 것을 확인할 수 있었다 (그림 12, 그림 13). CDV (canine distemper virus) 항원 H (Hemagglutinin) 단백질의 경우, 식물체에서 낮은 발현량으로 인해 His tag 또는 Fc domain fusion 단백질의 발현을 western blotting으로 확인할 수 없었으며, 향후 식물에서 CDV 항원 단백질을 발현시키기 위해서는 유효한 epitope 또는 truncated form의 재조합 단백질을 발현시키는 전략을 시도해 볼 필요성이 있다.

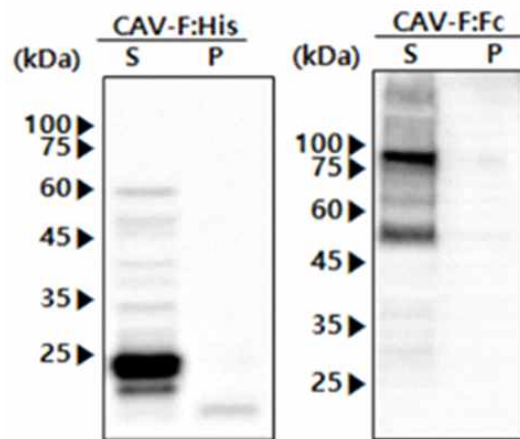


그림 44. 식물발현 시스템으로 Canine adenovirus type 2 항원 F protein 발현 확인

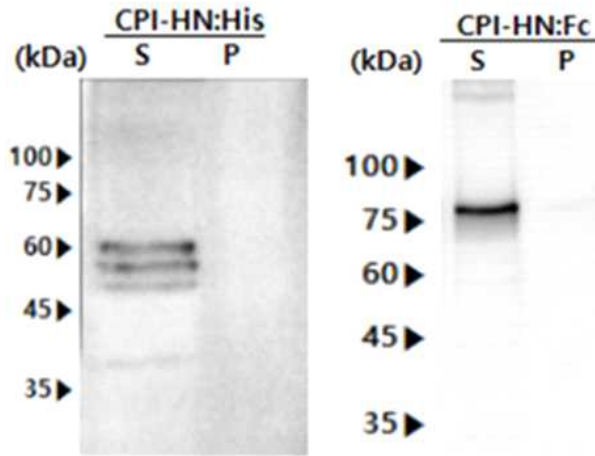


그림 45. 식물발현 시스템으로 Canine parainfluenza virus 항원 HN protein 발현확인

6. 식물발현 항원 단백질 분리정제 조건 확립 및 효능 검증을 위한 시료 제공

가. 식물발현 항원 단백질 분리정제 및 항원성 검증을 위한 시료 제공

- Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)를 이용한 재조합 항원 단백질 분리 정제; 항원 단백질을 발현하는 *N. benthamiana* 잎 50 g에 extraction buffer 100 mL을 첨가하고, 블랜더로 조직을 파쇄하였다. 식물 파쇄액을 4 °C, 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상등액을 획득한 후, 0.45 um filter를 통과시켜 식물 단백질 추출액을 확보하였다. 확보한 단백질 추출액은 Ni-NTA agarose resin이 부착된 단백질 자동정제 시스템을 이용하여 분리정제 하였으며, 분리정제 조건은 아래 table 3과 같다.

표 8. 식물발현 항원 단백질의 분리정제 조건

Purification step	Resin	Sample loading	Flow rate
Affinity	Ni-NTA agarose	100 ml	5 mL/min
Extraction buffer	20 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4		
Wash buffer	20 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, 40 mM imidazole, pH 7.4		
Elution buffer	20 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4		

- 상기 조건으로 분리정제 후, 각 fraction을 His antibody를 이용한 western blotting과 coomassie blue staining을 통해 재조합 항원 단백질의 존재 여부와 순도를 확인하였으며, 대부분의 His tagging된 RVGe 단백질이 Ni-NTA resin에 결합한 후, 선택적으로 elution 되는 것을 확인할 수 있었으며, *N. benthamiana* 잎 1 g 당 약 30 µg의 분리정제된 재조합 RVGe 단백질을 획득하였다 (그림 46).

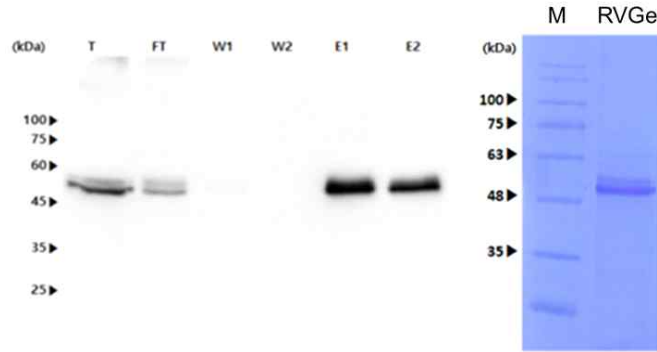


그림 46. 식물발현 시스템을 이용한 광견병 항원 RVGe 분리정제 결과

- Histidine이 tagging된 *Leptospira* 항원 CTB-LipL32 역시 Ni-NTA resin을 이용한 affinity purification으로 성공적으로 분리정제가 가능함을 확인하였고, 식물 잎 1 g 당 약 45 µg의 재조합 CTB-LipL32 단백질을 획득할 수 있었다. (그림 47)

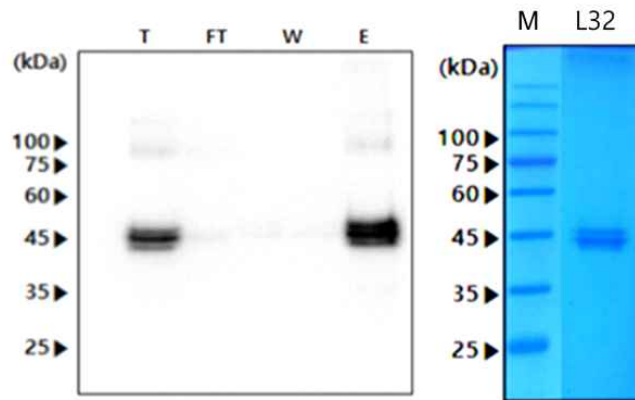


그림 47. 식물발현 시스템을 이용한 *Leptospira* CTB-LipL32 항원 분리정제 결과

(1) Capto Core 700 chromatography를 이용한 CPV2 항원 단백질의 분리정제

- His tagging된 CPV2 항원 VP2 단백질의 경우, Ni resin에 전혀 결합하지 않아 IMAC을 이용한 affinity purification으로는 분리 정제할 수 없었다. CPV2 항원 VP2 단백질은 self assembly를 통해 VLP를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 식물에서 발현된 VP2 단백질도 세포 내에서 VLP를 형성했기 때문에 Ni resin에 결합하지 않았던 것으로 생각된다. VLP 형태의 VP2 단백질을 분리정제하기 위해, cut off size가 700 kDa인 Capto Core 700 resin을 사용하여 chromatography를 수행했으며, 분리정제 조건은 아래와 같다.

Purification step	Resin	Sample loading	Flow rate
Affinity	HiTrap Capto Core 700	20 ml	1 mL/min
Binding buffer	50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4		

- 상기 조건으로 분리정제를 실시하고, 각각의 fraction을 획득한 후, coomassie blue

staining을 통해 VP2 단백질의 존재 여부를 확인해 본 결과, 11번부터 14번 fraction에서 VP2 단백질을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 VLP 형태의 VP2 단백질이 resin에 capture 되지 않고, resin을 통과한다는 것을 알 수 있었다 (그림 48).

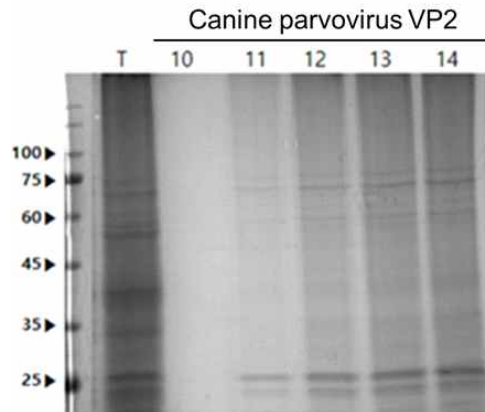


그림 48. 식물발현 시스템을 이용한 Canine parvovirus VP2 항원 분리정제 결과

나. 마우스에서 식물 발현 광견병 항원 RVGe 항원성 검증

- 식물 발현 광견병 항원 RVGe 단백질이 생체 내에서 항체를 유도하여 면역원성을 가지는지 확인하기 위하여, 6주령의 수컷 C57BL/6J 마우스를 이용하였다. 실험군 마우스에 RVGe 단백질 10 µg을 6주령 및 8주령 시점에 각각 투여하였고, 음성 대조군 마우스에는 PBS를 투여하였다. 항원 투여 시, 동량의 Freund's adjuvant를 혼합 투여하였는데, 1차에는 complete adjuvant를, 2 차에는 incomplete adjuvant를 투여하였다. 실험을 시작하는 시점과 2차로 항원을 투여하고 2주일 이후에 채혈하여 RVGe 단백질이 코팅된 ELISA 플레이트를 이용하여 RVGe 단백질에 대한 특이항체의 생성 여부를 확인하였다. 항원 비투여군 4마리와 항원 투여군 5마리의 마우스에서 RVGe 항원성 검증 실험을 진행하였으며, 그 결과, 비투여군의 혈청에서는 RVGe 단백질에 대한 반응성이 전혀 관찰되지 않았으나, 항원을 2회 투여한 군의 혈청에서는 RVGe 단백질에 대해 높은 반응성을 나타내는 것을 확인하였다. (그림 49)

serum		pre	post	pre	post
음성 대조 군	1	0.049	0.053		
	2	0.053	0.062		
	3	0.047	0.051		
	4	0.050	0.064		
RVGe 투여	1	0.047	4.310		
	2	0.053	3.421		
	3	0.048	4.325		
	4	0.047	4.541		
	5	0.045	4.310		

그림 49. 식물발현 시스템을 이용한 광견병 항원 RVGe (glycosylated form)의 항원성 검증

7. 항원 단백질 발현 형질전환체 제작

가. *Nicotiana benthamiana* 조직 배양 및 식물 형질전환체 제작

(1) 담배 형질전환체 제작

- *N. benthamiana* 종자를 callus 유도 배지 (MS 배지)에서 발아시킨 후, 무균상태의 잎을 형질전환에 사용하였다. 생장실에서 배양한 담배의 어린 잎을 약 0.5 x 0.5 cm 로 잘라서 MS 배지 (NAA 2.0 mg/L, BA 0.5 2.0 mg/L)에 넣고 배양한 *Agrobacterium*과 함께 배양실에서 2일간 암배양 하였다. 배양 후, 담배 잎 절편을 멸균수로 여러번 세척하고, 항생제 (20 mg/L Hygromycin, 200 mg/L Kanamycin)가 포함된 선발 배지에서 배양 하였다. Callus에서 자란 Hygromycin 저항성을 가진 shoot는 호르몬이 들어있지 않은 배지로 옮겨 뿌리 생성을 유도하였다. 순화 후, 선발된 형질전환 식물체는 식물재배 블럭으로 옮겨 생장실에서 재배하였다.

(2) 형질전환 식물체에서 광견병 항원 단백질 발현 검증

- 선발된 개체에서 광견병 항원 단백질의 발현을 확인하기 위해 western blotting을 수행 하였다. 단백질 extraction buffer로 잎에서 총 단백질을 추출하고 SDS-PAGE를 수행하여 크기별로 단백질을 전개하였다. 전개된 단백질을 PVDF membrane에 transfer 한 후, Histidine monoclonal antibody를 사용한 western blotting으로 각 개체에서 단백질 발현 수준을 분석하였다. 그 결과, 그림 50과 같이 선발된 형질전환체에서 광견병 항원 단백질의 발현을 확인하였다.

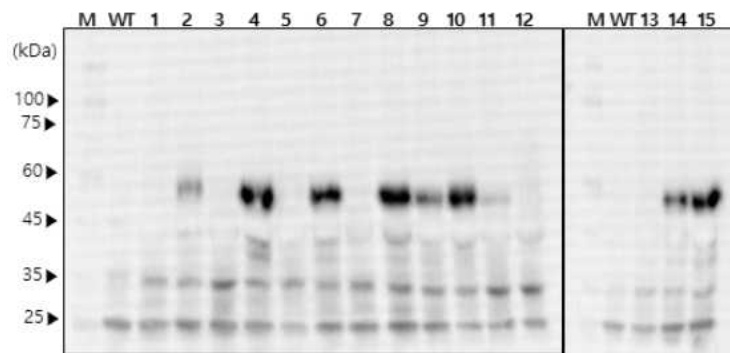


그림 50. 형질전환체에서 RVGe 발현 확인

8. 광견병 식물 발현 항원의 안전성 유효성 시험

가. 임상시험계획서신청에 따른 안전시험

(1) 안전시험

- 마우스, 기니픽, 개를 실험동물로 선정하여 안전시험을 진행한다.

(가) 마우스 안전시험

- 체중 15~20g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의마우스 복강에 0.5ml를 접종하고 7 일간 관찰하여 이상 없이 생존여부를 확인한다.

(나) 기니픽 안전시험

- 체중 300~350g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2ml를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2ml를 접종하고 7일간 관찰한다음 이상 없이 생존 여부를 확인한다.

(다) 개 안전시험

- 체중 4~5kg(3~4개월령)의 건강한 개 2마리를 준비하여, 백신의 2두분을 피하로 접종하고 28일간 관찰하여 이이상 없는 것을 확인하여 한다.

나. 임상시험계획서신청에 따른 효력시험

(1) 기니픽을 이용한 광견병 항원 효력시험

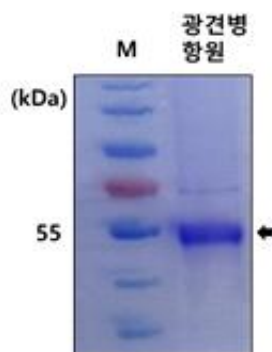
- 체중 300~350g의 건강한 기니픽 20두를 선정하여 10마리는 접종군, 10마리는 대조군으로 하여 접종군은 백신 2% 말 혈청을 가한 생리식염수로 10배 희석하여 0.5ml(1/20두분)을 복부 피하에 각각 주사하고 21일간 관찰한 후 채혈하여 중화항체를 측정한다.

(2) 마우스를 이용한 광견병 항원 항체가 확인 시험

(가) 항원 단백질 확인

- 마우스를 이용한 광견병 바이러스 항원의 항체를 확인하기 전에 먼저, 바이오애플에서 제공된 광견병 바이러스 항원에 대한 항체형성 여부를 마우스 혈청으로 Western blotting을 통해 확인하였다. 그 결과 그림 51에서 보이듯이 광견병 바이러스 항원에 대해 정확하게 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다.

❖ SDS-PAGE 결과



❖ Western Blot 결과

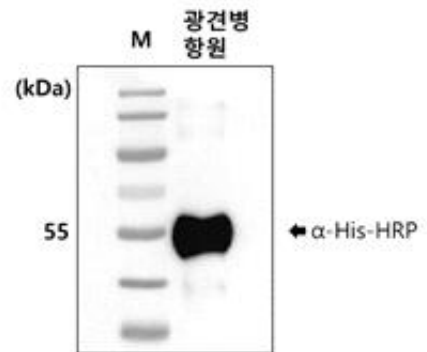


그림 51. 마우스 혈청에서 광견병 항원 형성 확인

(나) 1차 항체가 확인

- 마우스 혈청을 이용하여 광견병 항원에 대한 항체를 ELISA로 확인한 결과 항원 접종 농도(1ug, 5ug, 10ug)에 따라 마우스 개체간의 항체에 차이가 있었다. 그러나

항체가 전반적으로 낮아 마우스 개체간의 유의적인 차이를 확인하기는 어려움이 있었다. (그림 52)

- 보다 높은 항원농도(50ug, 100ug)를 사용하여 재접종 후 항체를 측정할 계획이다.

❖ 광견병 항원 단백질(바이오엠)

효능 검증 (Mouse 실험) 1 차

serum	1/100				serum	1/100			
	Mouse 1		Mouse 2			Mouse 1		Mouse 2	
	Pre	Post2-3w	Pre	Post2-3w		Pre	Post2-3w	Pre	Post2-3w
1 µg	0.102	0.083	0.075	0.089					
5 µg	0.088	0.192	0.074	0.117					
10 µg	0.086	0.187	0.082	0.204					
비투여	0.102	0.515	0.006	0.079					

개체간의 항체가 차이가 있음.
→ 10µg 2번 mouse OD 0.204 (가장 높음)

효능 검증 (Mouse 실험) 2 차

serum	1/100				serum	1/100			
	Mouse 1		Mouse 2			Mouse 1		Mouse 2	
	Pre	Post2-3w	Pre	Post2-3w		Pre	Post2-3w	Pre	Post2-3w
1 µg	0.061	0.092	0.063	0.289					
5 µg	0.054	0.112	0.056	0.072					
비투여	0.054	0.067	0.053	0.075					

개체간의 항체가 차이가 있음.
→ 1µg 2번 마우스가 가장 높음

❖ 광견병 항원 단백질(우진비엔저(주))

효능 검증 (Mouse 실험) 2 차 접종 결과

효능 검증 (Mouse 실험 - 2차 접종 결과)					
접종	Mice 1	Mice 2	Mice 3	Mice 4	Mice 5
비접종	0.082	0.09			
1µg	0.164	0.173			
5µg	0.098	0.135	0.134	0.092	0.180
10µg	0.140	0.137	0.097	0.107	
CONTROL TEST					
Mouse serum X - OD값	0.036				
Ag(ERA virus) coating X - OD값	0.054				

※ 결론

- 1µg 접종 군에서 가장 높은 항체가 확인됨.
- 5µg / 10µg 접종군에서의 개체간 항체가 차이를 보임
- (단, 대체적으로 개체간의 차이가 있으며, 항체가 수준 또한 낮아 유의적 차이를 확인하기 다소 어려움이 있음)

RVGe 접종량에 따른 항체가 비교



RVGe 단백질 접종량에 따른 평균 항체가 비교

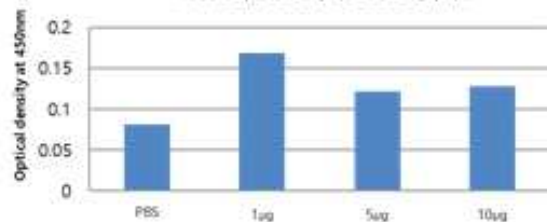


그림 52. 마우스 혈청에서 광견병 항원에 대한 1차 항체가 확인

(다) 2차 항체가 확인

- 마우스 혈청을 이용하여 광견병 항원에 대한 항체를 ELISA로 확인한 결과 항원 접종 농도(50ug)의 접종군에서 가장 높은 항체를 확인하였다. 따라서 광견병 항원 접종 농도를 50ug 기준으로 마우스 체중에 비례하여 목적동물에 적용할 계획이다. (그림 53)

※ 계획

농도	10ug	50ug	100ug	CONTROL
마리수	5 마리	5 마리	5 마리	5 마리

※ 결과

농도	10ug	50ug	100ug	CONTROL	
2차항체	1	0.148	0.274	0.125	0.042
	2	0.151	0.212	0.131	0.043
	3	0.129	0.182	0.141	0.041
	4	0.125	0.145	0.117	0.04
	5	0.119	0.149	0.138	0.039

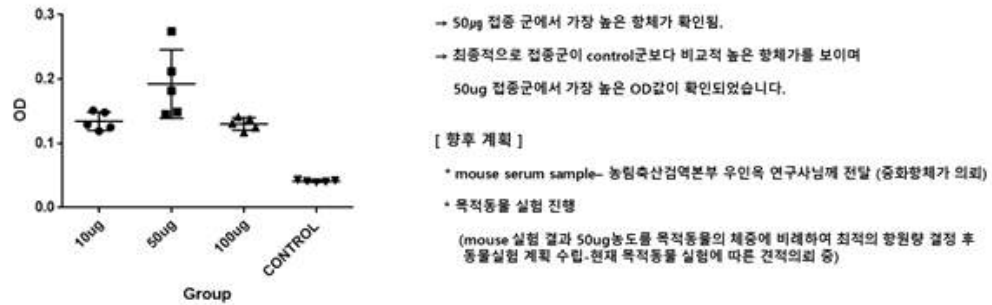


그림 53. 마우스 혈청에서 광견병 항원에 대한 2차 항체가 확인

8. 렙토스피라(Leptospira) 세균주의 유래 및 특성

가. 렙토스피라 균주(렙토스피라 캐니콜라 및 렙토스피라 익테로헤모레지)

(1) 기원 및 특성

- 렙토스피라 균주(캐니콜라, ATCC 23470 및 익테로헤모레지, ATCC23581)는 ATCC에서 2017년 08월에 구매하여 확보하였다.

(2) 계대 및 보존

- 렙토스피라 캐니콜라와 익테로헤모레지는 소 혈청 알부민과 Tween 80이 포함된 Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris(EMJH) 배지에 30℃에서 7일간 배양하면서 각각 접종하여 렙토스피라균 활성을 확인 후 각각 채균하여 28℃ 항온기에 4주 간격으로 계대하고 보존하였다.

(3) Master Bacteria Bank 확립

(가) 원종균(Master seed bacteria)의 배양

- ATCC에서 분양받은 렙토스피라 균주(캐니콜라, 및 익테로헤모레지)를 소 혈청 알부민과 Tween 80이 포함된 Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris(EMJH) 배지에 접종하여 28℃에서 7일간 진탕배양하여 원종균을 확보하였다.

(나) 원종균의 명칭 및 Master Bacteria Bank 구축

- 원종균의 명칭은 WGB-leptospira canicola (WGB-M-Lc0803)과 WGB-leptospira icterohaemorrhagiae (WGB-M-Li0803)로 명명하였으며, 배양하여 채득된 원종균은 5 ml EMJH 반유동배지가 포함된 screw cap 시험관에 각각 소분하여 #1~#50까지 Number를 부여하였고 28℃에서 7일간 배양 후 4℃에 보존하였다.

(다) 원종균의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 불활화 확인시험, 안전시험과 혈청 역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 9. 렙토스피라 캐니콜라 원종균에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Inactivated leptospira canicola			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
불활화 확인시험	Leptospira 불활화 확인시험	균 발육 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청 역가 시험	기니피 혈청 역가시험	80%	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

표 10. 렙토스피라 익테로헤모레지 원종균에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Inactivated leptospira icterohaemorrhagiae			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
불활화 확인시험	Leptospira 불활화 확인시험	균 발육 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청 역가 시험	기니피 혈청 역가시험	100%	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(라) 원종균의 생균수시험

- 배양된 렙토스피라 균주(WGB-Lc0803 및WGB-Li0803)를 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 까지 PBS로 각각 10진 희석한 후 렙토스피라균수측정기(Petroff-Hausser Chamber)를 이용하여 배양된 콜로니 개수를 개수하였다. 그 결과, 균수가 1.41×10^8 cfu/ml로 확인되었다.

(3) 생산용 세균주 (Working Bacteria Bank)의 확립

(가) 생산용 세균주 (Working seed bacterial)의 배양

- Master seed bacteria에서 1 ml을 취해 EMJH 배지 30 ml에 접종하여 28°C 7일간 진탕배양하여 균액을 확보하였다.

(나) 생산용 세균주의 명칭 및 Working Bacteria Bank 구축

- 생산용 세균주의 명칭은 WGB-leptospira canicola (WGB-W-Lc0803)과 WGB-leptospira icterohaemorrhagiae (WGB-W-Lc0803)로 명명하였으며, 배양하여 채득된 생산용 세균주는 5 ml EMJH 반유동배지가 포함된 나사마개가 달린 시험관에 각각 0.5 ml씩 접종하여 #1~#50까지 Number를 부여하였고 28°C 에서 7일간 배양 후 4°C 에 보존하였다. 단, 생산용 세균주의 계대는 5회 이내로 제한하였다.

(다) 생산용 세균주 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 불활화 확인시험, 안전시험과 혈청 역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 11. 렙토스피라 캐니콜라 생산용 세균수에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Inactivated leptospira canicola			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
불활화 확인시험	Leptospira 불활화 확인시험	균 발육 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청 역가 시험	기니픽 혈청 역가시험	90%	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

표 12. 렙토스피라 익테로헤모레지 생산용 생균수에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Inactivated leptospira icterohaemorrhagiae			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
불활화 확인시험	Leptospira 불활화 확인시험	균 발육 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청 역가 시험	기니픽 혈청 역가시험	90%	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(라) 생산용 세균주의 생균수시험

- 양된 렙토스피라 균주(WGB-0830-1 및 WGB-0830-2)를 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 까지 각각 PBS로 10진 희석한 후 렙토스피라균수측정기(Petroff-Hausser Chamber)를 이용하여 배양된 콜로니 개수를 개수하였다. 그 결과, 균수가 1.38×10^8 cfu/ml 이상이였다.

제3절 3차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 광견병 단백질 면역원성 확인

가. 형광항체중화시험법 (FAVN, fluorescent antibody virus neutralisation test)

(1) 식물에서 발현된 광견병 바이러스 G-protein TM(-)의 항원성 확인에 시험방법 기술 (Page 79)

나. 실험동물에서 광견병 재조합 단백질 접종 중화능 실험 결과

(1) 마우스 4마리에서 식물발현재조합단백질(광견병 G 단백질) 접종 후 중화능 확인 결과 미흡한 0.5IU 확인

(2) 기니피그 4마리에서 식물발현재조합단백질(광견병 G 단백질) 접종 후 중화능 확인 결과 0.5IU 확인

(3) 바이오앵 마우스 11마리에서 식물발현재조합단백질 접종 후 중화능 실험 의뢰 결과 중화능 확인

실험동물 혈청	광견병 중화능 결과
CT-1	0
CT-2	3
CT-3	9
A-1	9
A-2	27
A-3	27
A-4	27
C-1	9
C-2	9
C-3	9
C-4	81
D-1	3
D-2	9
D-3	3
E-1	9
E-2	9
E-3	3

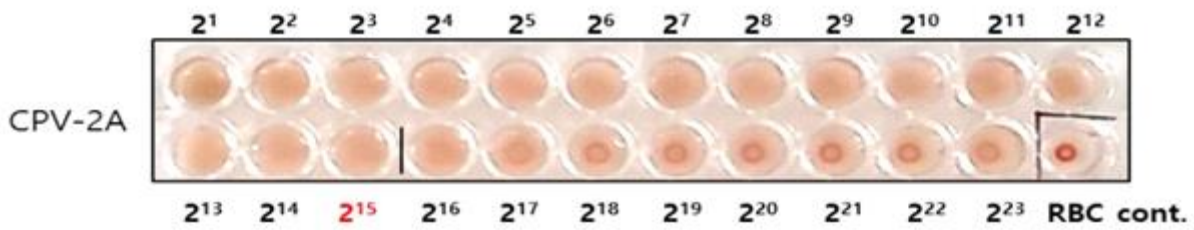
2 . 개파보바이러스 단백질 면역원성 확인

가. 개 파보바이러스(2a, 2b) 돼지 적혈구 응집능으로 항원성 평가

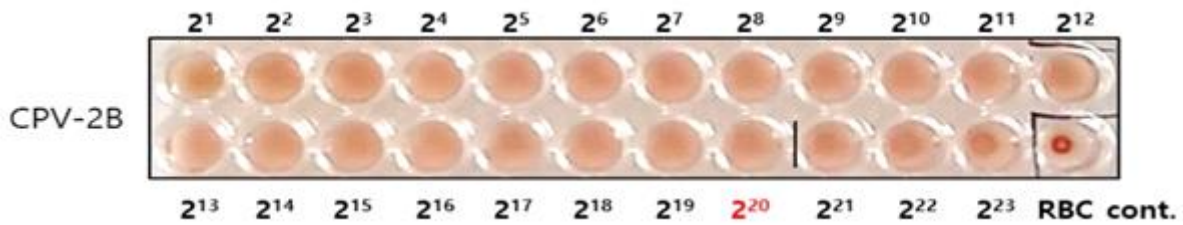
- 개 파보바이러스 혈구응집반응 및 혈구응집억제반응에 대한 시험방법 동일 (Page 80 ~ 82)

나. 개 파보바이러스 재조합 단백질 HA 실험결과

- 식물발현 단백질 추출물을 가지고 돼지 혈구에서 HA능을 평가



재조합 단백질	HA titer
CPV 2a VP2 재조합 단백질	2^{15}



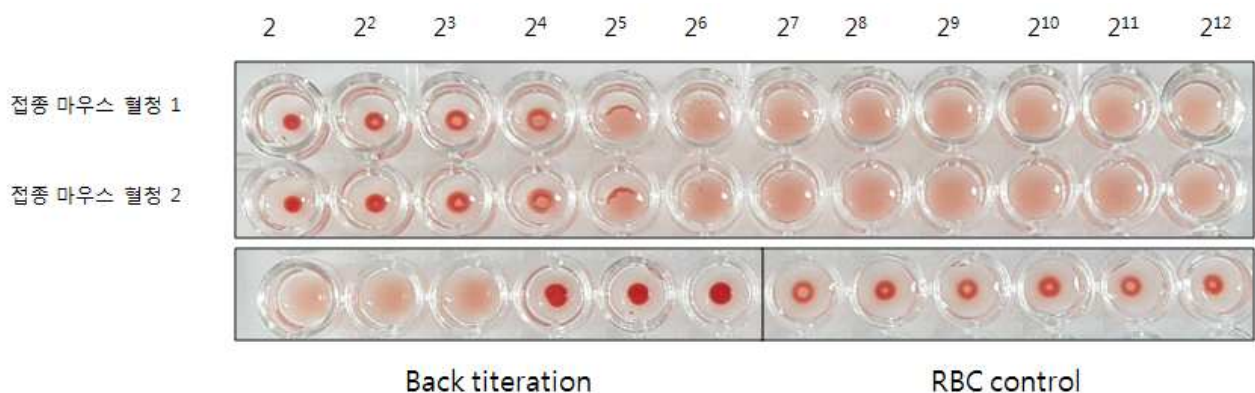
재조합 단백질	HA titer
CPV 2b VP2 재조합 단백질	2^{20}

다. 실험동물 접종 후 개 파보바이러스 항체확인(HI)

재조합 단백질	HI titer
CPV 2a VP2 재조합 단백질	2^6



- 기니피그 3마리에 식물발현단백질(2^{10} HA) 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 HI 항체가 를 평가한 결과 $2^6 \sim 2^7$ HI 항체가 확인



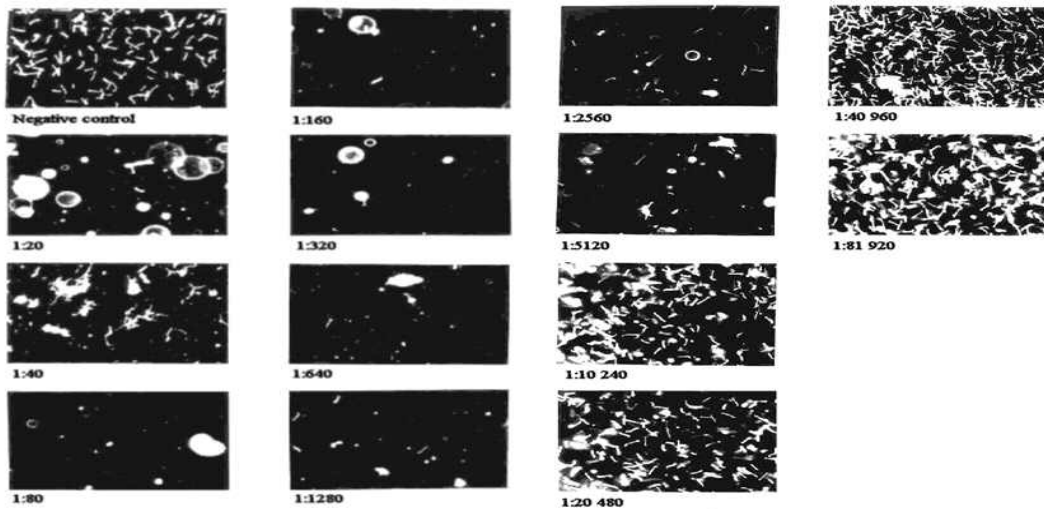
- 마우스 2마리에 식물발현단백질 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 HI 항체를 평가한 결과 2⁴ HI 항체가 확인

3. 렙토스피라(Leptospira) 면역원성 확인

가. 렙토스피라 혈청 검사 방법 : Microscopic agglutination test(MAT, 현미경 응집반응)

Microscopic Agglutination Test [MAT; 현미경응집(용균)반응]

- OIE reference method
- Advantage; apply to all kinds of animals
- Disadvantage; use the live culture of leptospira



판정 : 음성대조군의 균수와 비교하여 50% 이상 균수가 감소한 희석배수가 100배 이상이면 양성 (OIE)

(1) 렙토스피라 단백질(Lig B-F)

- 기니피그 4마리에 식물발현단백질 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체를 평가한 결과 음성 확인
- 마우스 4마리에 식물발현단백질 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체를 평가한 결과 음성 확인

(2) 렙토스피라 단백질(Lig B-bio)

- 기니피그 4마리에 식물발현단백질 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체를 평가한 결과 음성 확인
- 마우스 4마리에 식물발현단백질 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체를 평가한 결과 음성 확인

(3) 렙토스피라 단백질(Lig 32)

- 기니피그 4마리에 식물발현단백질 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체를 평가한 결과 음성 확인

- 마우스 4마리에 식물발현단백질 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체가를 평가한 결과 음성 확인

4. 개 디스토펜퍼 바이러스(Canine distemper virus) 면역원성 확인

- 기니피그 4마리에 식물발현단백질(H 단백질) 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체가를 평가한 결과 중화능 확인
- 기니피그 4마리에 식물발현단백질(F 단백질) 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체가를 평가한 결과 음성 확인

※ 개 디스토펜퍼 바이러스 중화능 실험 방법

. Materials : 배지(DMEM, 1% anti), virus, cell, 비동화 된 시료(혈청)

. Virus Cell : Lederle(CDV) - Slam vero

- (1) 배지 50ul를 모든 well에 분주한다. (control well에는 100ul, back titration well에는 비워둠)
- (2) 미리 비동화 된 시료 (56도, 30분 in water bath)를 이진 희석을 위해 첫번째 칸에 50ul 분주한다. 이진 희석한 뒤, 마지막 50ul는 버린다.
 - * 이진 희석시 pipetting은 15~20번으로 최대한 거품이 안생기도록 하며 tip이 이상하다면 tip교체
- (3) Virus를 준비한다.
 - (가) Virus는 사용할 만큼 배지에 희석한다. (CAV-2는 1000배, Lederle는 200배 희석)
 - * 예를 들어 CAV-2 (1000배 희석)을 사용한다면, 96well에 1판에 필요한 virus양은 4.8ml (96well x 50ul) 이므로 넉넉하게 total 6ml을 만든다. 그러면 배지 6ml + virus 원액 6ul을 최대한 섞어준다.
 - (나) Back titration virus를 ep-tube에 만든다. (각각 4well씩)
 - 10^{-0} : (1)에 희석한 virus 사용
 - 10^{-1} : 배지 900ul + 10^0 virus 100ul
 - 10^{-2} : 배지 900ul + 10^1 virus 100ul
 - 10^{-3} : 배지 900ul + 10^2 virus 100ul
 - * 희석배수는 virus titration을 통해 역가를 확인한 후 결정
 - * 희석한 virus가 이제 전체 분주할 virus이며, back titration에서 10^0 으로 사용할 virus임
- (4) (2번에 이어) 시료를 이진 희석한 다음, virus를 50ul씩 분주한다. (control well에는 분주하지 않음)
- (5) Back titration virus 역시 각 well에 100ul씩 분주한다.
- (6) 37도씨 배양기에서 1시간동안 중화반응 시킨다.
- (7) 1시간동안 세포를 준비한다. 계대배양하여 5ml~20ml로 현탁한 뒤, cell counting한다.
 - * 1well 당 2×10^4 (2만개) 분주해야함. 96well 1판 기준 거의 200×10^4 (2백만개) 필요
- (8) 1시간 배양 후, 준비된 세포를 모든 well (control, back titration)에 100ul씩 분주한다
- (9) 37도씨 배양기에서 3~4일 배양한다. 매일 관찰하고, back titration에서 나는 CPE가

10⁻²에서 2 well까지(4 well중 반) 나면 정확하게 virus가 들어갔다고 봄

- Virus에 대한 항체의 중화력이 높다고 예상되면 96well plate를 가로로 하여 이진 희석함
- Back titration은 10⁻⁰ 4 well, 10⁻¹ 4 well, 10⁻² 4 well, 10⁻³ 4well로 총 16well 필요.
- Control은 최소 1well이상 필요.

5. 개 파라인플루엔자 바이러스(Canine parainfluenza virus) 면역원성 확인

가. 기니피그 4마리에 식물발현단백질(HN 단백질) 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체를 평가한 결과 음성 확인

※ 개 파라인플루엔자 바이러스 혈구응집반응 실험 방법

. HA (hemagglutination, 혈구응집반응)

. Materials : PBS, 세척된 기니피그 혈구, virus (sample)

* 세척 혈구는 PBS에 0.006%가 되도록 사용 할 만큼 만든다.

예) 분주할 total 혈구가 5ml이라면 5ml X 0.006% = 30ul, PBS 5ml + 세척 혈구 30ul

(1) PBS 50ul를 사용할 모든 well에 분주한다. (96well plate 사용, control well 포함)

(2) 이진희석을 위해 Virus (sample)를 첫번째 칸에 50ul씩 분주한다.

(3) 이진희석한 뒤, 마지막 50ul는 버린다.

* pipetting은 8회 이상, 거품이 안생기도록

(4) 미리 만들어둔 혈구 (0.06% in PBS) 50ul를 모든 well에 분주한다. (control well 포함)

(5) 4도씨에 보관하여 1시간 이상 반응시키며, 1시간 이후 확인한다.

6. 개 아데노바이러스(Canine adenovirus) 면역원성 확인

가. 기니피그 4마리에 식물발현단백질(Hexon 단백질) 발현확인 결과 음성

나. 기니피그 4마리에 식물발현단백질(Fiber 단백질) 1차 접종 후, 2주 후에 2차 접종 후 항체를 평가한 결과 음성 확인

※ 개 아데노바이러스 중화능 실험 방법

. Materials : 배지(DMEM, 1% anti), virus, cell, 비동화 된 시료(혈청)

. Virus Cell : CAV2 - MDCK

(1) 배지 50ul를 모든 well에 분주한다. (control well에는 100ul, back titration well에는 비워둠)

(2) 미리 비동화 된 시료 (56도, 30분 in water bath)를 이진 희석을 위해 첫번째 칸에 50ul 분주한다. 이진 희석한 뒤, 마지막 50ul는 버린다.

* 이진 희석시 pipetting은 15~20번으로 최대한 거품이 안생기도록 하며 tip이 이상하다면 tip교체

(3) Virus를 준비한다.

(가) Virus는 사용할 만큼 배지에 희석한다. (CAV-2는 1000배, Lederle는 200배 희석)

* 예를 들어 CAV-2 (1000배 희석)을 사용한다면, 96well에 1판에 필요한 virus양은 4.8ml (96well x 50ul) 이므로 넉넉하게 total 6ml을 만든다. 그러면 배지 6ml + virus 원액 6ul을 최대한 섞어준다.

(나) Back titration virus를 ep-tube에 만든다. (각각 4well씩)

- 10^{-0} : (1)에 희석한 virus 사용
- 10^{-1} : 배지 900ul + 10^0 virus 100ul
- 10^{-2} : 배지 900ul + 10^1 virus 100ul
- 10^{-3} : 배지 900ul + 10^2 virus 100ul

* 희석배수는 virus titration을 통해 역가를 확인한 후 결정

* 희석한 virus가 이제 전체 분주할 virus이며, back titration에서 10의 0으로 사용할 virus임

(4) (3번에 이어) 시료를 이진희석한 다음, virus를 50ul씩 분주한다. (control well에는 분주하지 않음)

(5) Back titration virus 역시 각 well에 100ul씩 분주한다.

(6) 37도씨 배양기에서 1시간동안 중화반응 시킨다.

(7) 1시간동안 세포를 준비한다. 계대배양하여 5ml~20ml로 현탁한 뒤, cell counting한다.

* 1well 당 2×10^4 (2만개) 분주해야함. 96well 1판 기준 거의 200×10^4 (2백만개) 필요

(8) 1시간 배양 후, 준비된 세포를 모든 well (control, back titration)에 100ul씩 분주한다

(9) 37도씨 배양기에서 3~4일 배양한다. 매일 관찰하고, back titration에서 나는 CPE가 10^{-2} 에서 2 well까지(4 well중 반) 나면 정확하게 virus가 들어갔다고 봄

- Virus에 대한 항체의 중화력이 높다고 예상되면 96well plate를 가로로하여 이진희석함
- Back titration은 10^{-0} 4 well, 10^{-1} 4 well, 10^{-2} 4 well, 10^{-3} 4well로 총 16well 필요.
- Control은 최소 1well이상 필요

7. 재조합 단백질 발현 및 면역원성 확인 정리표

Target virus or bacteria	Target antigen	사용 Vector	Tag type	antigenicity 확인						immunogenicity (동물접종시험)			비고	
				MW (kd)	His Ab	mon o AB	poly AB	HA (unit)	mou se	GP	목적 동물			
Rabies	G-protein-TM (-)	ELCH	ELCH	75	○	○	-	-	○	○	-	-	-	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오애플에서 실험한 마우스에서 중화항체가 양성 확인 - 기니피그 접종완료4마리, 중화능 확인 - 바이오애플 요청된 마우스

												(5그룹) 혈청 중화실험 결과 중화능 확인, 결과 전달
	G-proteinTM (+)	ELCH			-	-	-	-	-	-	-	- 검역본부에서 합성했고, 발현했으나 확인 안됨 - 유전자합성 바이오앱에 전달
	M-protein	ELCH	C-His	24	-	-	-	-	-	-	-	- 바이오앱에서 단백질 보내주기로 했음
Canine parvovirus	2a VP2	CLC	F His	65	○	-	-	○	○	○	-	- 검역본부에서 단백질 합성 후 바이오앱에 합성 유전자 보냄 - 항원성, 항체가 확인
	2b VP2	CLC	F His	65	○	-	-	○	○	○	-	- 검역본부에서 단백질 합성 후 바이오앱에 합성 유전자 보냄 - 항원성 항체가 확인
	2c VP2	CLC	F His	65	○	-	-	○	○	○	-	-검역본부에서 발현확인 후 HA항원 확인(4~16HAU) 확인 -바이오앱에서 재발현 후 항원 확인(2048HAU) -기니피그에서 HI항체가 (64~128HI)
<i>Laptospira Canicola</i>	Lig B	ELCH	F His	45	○	-	△	-	-	-	-	- 검역본부에서 합성 후 발현 확인(His 확인됨) - 기니피 동물실험 결과 항체 음성 확인 - 추가 마우스 실험으로 항체가 확인 음성
	Lig B	ELCH	F His									- 바이오앱에서 합성 후 발현 확인 - 추가 마우스 실험으로 항체가 확인 음성
	L32	ELCH (바이오 앱)	R His	30	○	-	○	-	○			- 바이오앱에서 재조합단백질 받아서, 기니피그 접종 실험 완료, 혈청 확보 - 웨스턴 결과 토끼 항혈청에 반응 확인 - 기니피 동물실험 결과 얻은 항체 음성 확인 - 추가 마우스 실험으로 항체가 음성 확인
Canine Parainfluenza	HN protein	ELCH	c+Fc	85	○	-	-	-	○	-	-	- 바이오앱에서 받아서 기니피그 접종 완료, 항원성 확인 음성

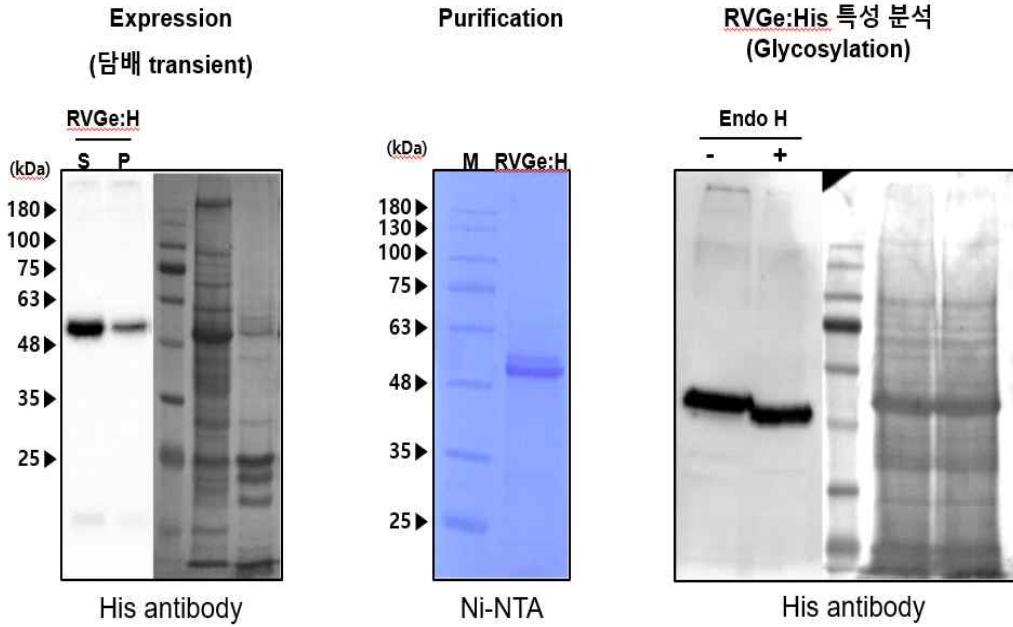


그림 1. 임시발현 시스템을 이용한 RVGe 항원의 발현 분리정제 및 특성분석

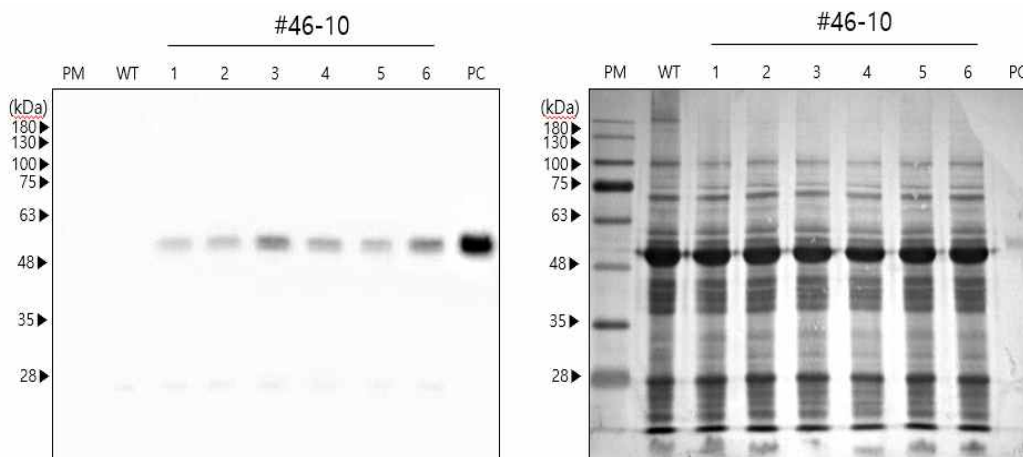


그림 2. 형질전환 식물체 (T2) 호모라인 제작 및 선발 완료

나. Canine parvovirus 항원 CPV2a, CPV2b, CPV2c, CPV VP2

- Canine parvovirus (CPV)의 VP2 epitope (2L21)을 Bamboo mosaic virus (BMV) capsid에 부착하여 식물에서 발현할 경우, soluble form으로 발현됨을 확인하였고, 발현이 확인된 항원 단백질 분리정제는 Ni-NTA column으로 진행하였다. 분리된 항원의 순도 (Purity) 및 올리고머 형성 유무를 확인하기 위해 size-exclusion chromatography를 진행하였다. 그림 3에 나타난 것처럼 발현 및 분리정제 공정을 확립할 수 있었으며, BMV에 의해 두 가지 형태의 올리고머 (P1, P2)를 형성할 수 있음을 확인했고, 대량생산을 위한 분리정제 공정을 확립할 수 있었다.

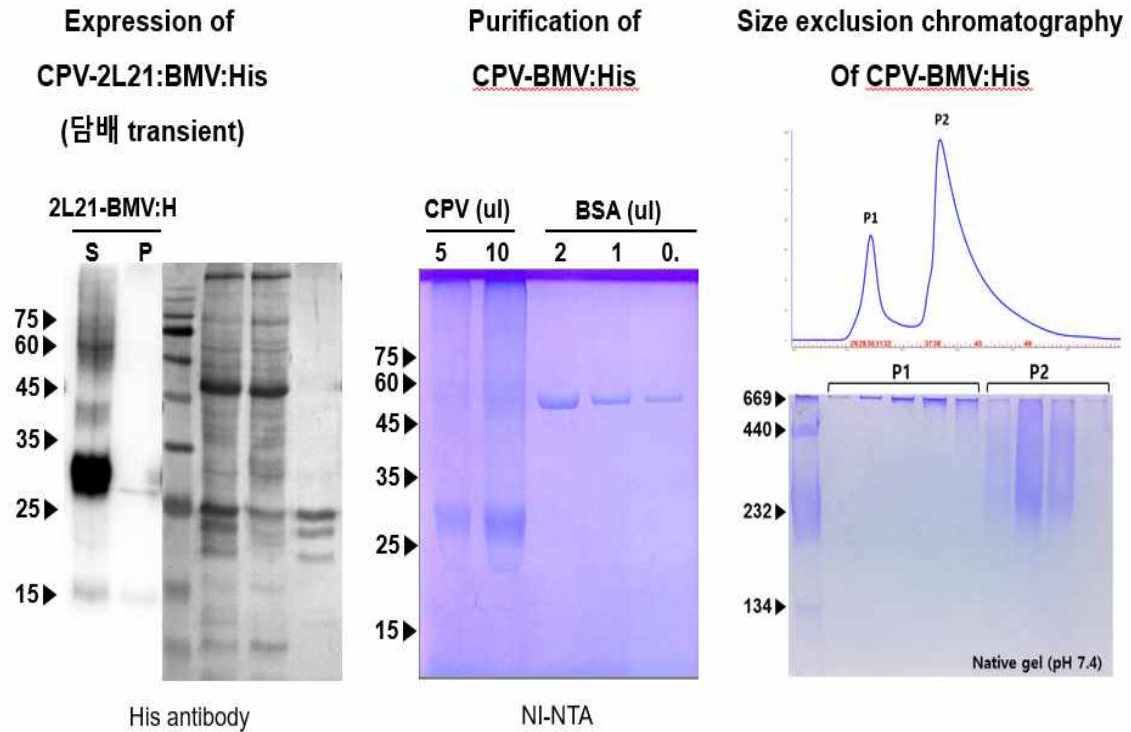


그림 3. Canine parvovirus VP2의 분리정제 공정

- CPV2a, CPV2b, CPV2c를 식물시스템을 이용하여 발현 시, soluble form으로 발현됨이 확인되었다. 세 종류의 항원 모두 친화크로마토그래피 (affinity chromatography)와 ion-exchange chromatography를 이용한 분리정제 방법으로 분리정제가 불가능하여, 열처리 및 pH 변경을 진행하였다. CPV2a와 CPV2b는 50 °C의 온도에서 10분간 열처리를 하면, 단백질들이 응집되어 분리정제를 진행할 수 없었지만, CPV2c의 경우, 열처리 또는 pH 변경으로 항원 손실없이 분리정제를 진행할 수 있었다. 그 결과는 그림 4에서 확인할 수 있다.

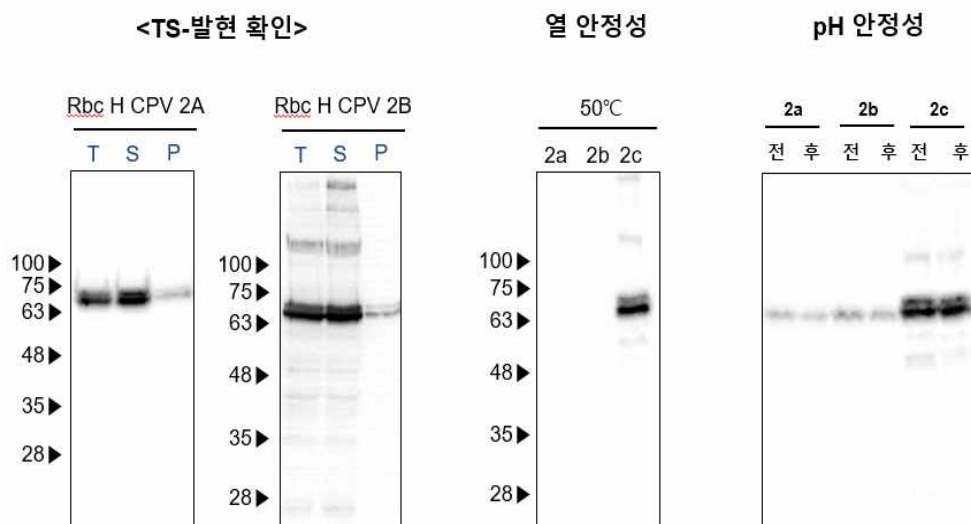


그림 4. CPV 2a, 2b, 2c의 열안정성 및 pH안정성 확인

- 분리정제가 가능한 CPV2c의 DNA construct를 이용하여 영구발현 식물체 제작을 진행했으며, 최종적으로 4개의 호모 라인 (#21-4, #21-5, #21-6, #21-10)을 선발할 수 있었다. CPV2c 호모 라인 선발 결과는 그림 5에서 확인할 수 있다.

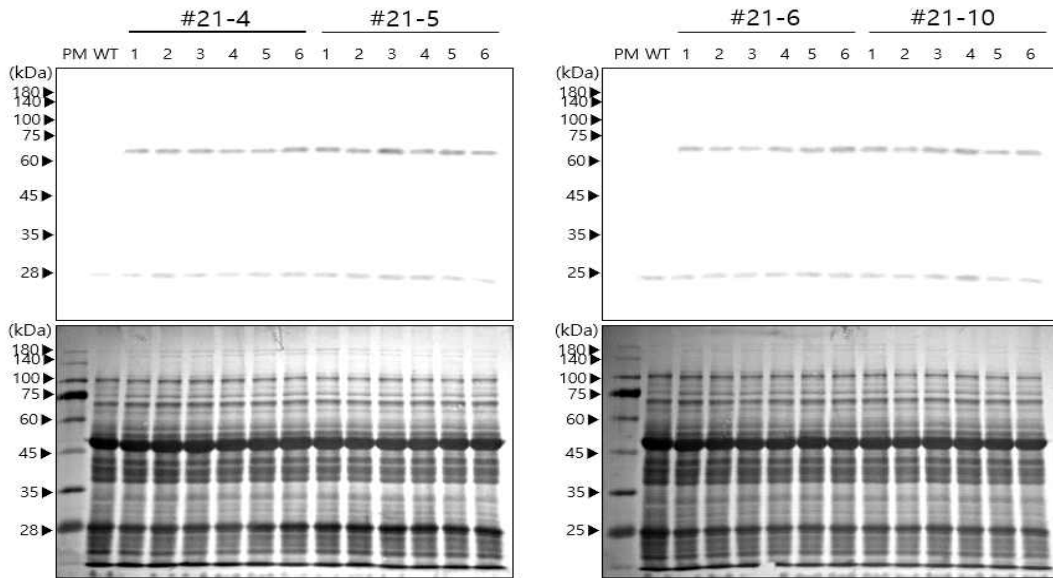


그림 5. CPV2c homo line 선발 및 발현 확인

다. Leptospira 항원 단백질 L32

- Leptospira 항원 단백질 L32는 ER (소포체)를 targeting되는 NB 벡터에 fusion 하여 제작하였으며, 식물에서 항원 단백질의 발현량 및 solubility를 측정하였다. 95 % 이상이 soluble form으로 존재했으며, Ni-NTA column을 이용하여 대량으로 (100 mg/kg 이상)으로 분리정제 가능한 공정을 확립했다. 그 결과는 그림 6에서 확인할 수 있다.

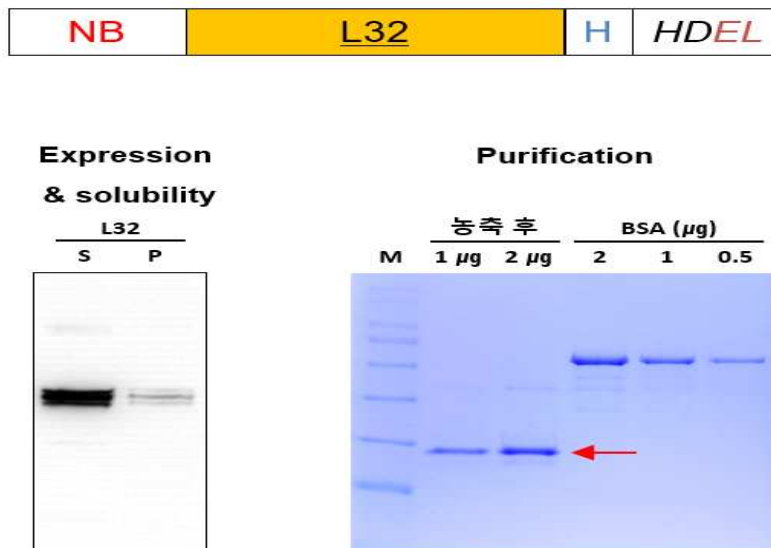


그림 6. L32 분리/정제 및 대량생산 공정 확립

라. *Leptospira* 항원 단백질 LigB

- *Leptospira* 항원 단백질 LigB는 Ni-NTA column으로 분리정제를 진행했으며, kg당 200 mg 이상의 항원이 생산 가능함을 확인했다. SDS-PAGE 분석에서 하나의 band가 아닌 여러 개의 band로 나타나, 재조합 항원 단백질이 proteolysis 및 glycosylation 될 수 있다는 가능성을 염두에 두고 분석 실험을 진행했다. 그 결과 glycosylation에 의한 protein band smearing (다양한 glycosylation pattern이 나타남)을 확인할 수 있었다 (그림 7).

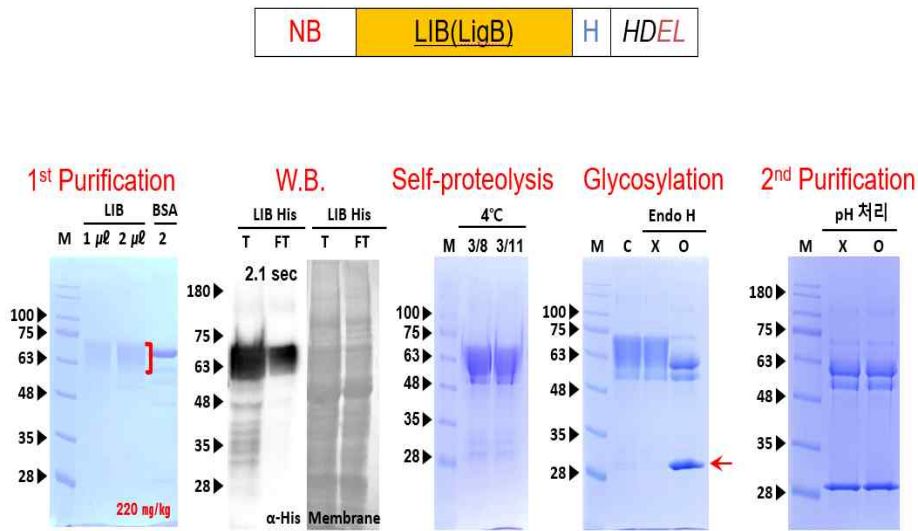


그림 7. LigB 분리정제 공정 확립 및 glycosylation 분석

마. Canine parainfluenza virus 항원 단백질

- Canine parainfluenza virus 항원 단백질의 분리정제공정을 확립하기 위하여, 4종류의 DNA constructs (ELCH CIV HA, ELCH CIV M1, NB CIV DG1 HA, CIV His HA)를 제작하고, 식물에서 단백질의 발현 및 solubility를 확인하였다. ELCH CIV HA 와 ELCH CIV M1의 경우, 항원 단백질의 발현이 굉장히 낮았으며, NB CIV DG1 HA 와 CIV His HA의 경우, 항원 단백질의 발현은 높게 확인이 되었으나, 대부분 pellet (P) 형태로 존재함을 확인했다. Pellet 에서 항원 단백질을 회수하기 위해 초음파를 이용한 단백질의 분리정제를 추가 진행했으며, 발현된 항원 단백질의 약 50% 가량을 회수할 수 있었다. (그림 8)

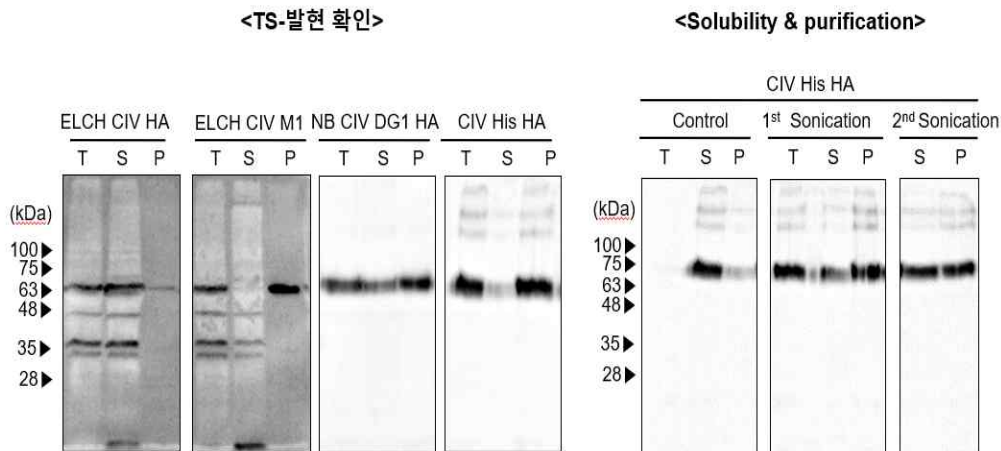


그림 8. CIV 항원 단백질의 발현확인 및 분리정제

바. Canine Distemper virus (CDV) 항원 단백질

- Canine Distemper virus (CDV) 항원 단백질의 분리정제를 위해, 두 종류의 tag (His and pFc2)을 단백질의 C-terminal에 부착 후, 식물체에서 발현 및 solubility 여부를 확인하였다. 그림 9에서 나타난 것처럼 항원 단백질이 식물에서는 만들어지지 않음을 확인할 수 있었다.

<TS-발현 확인>

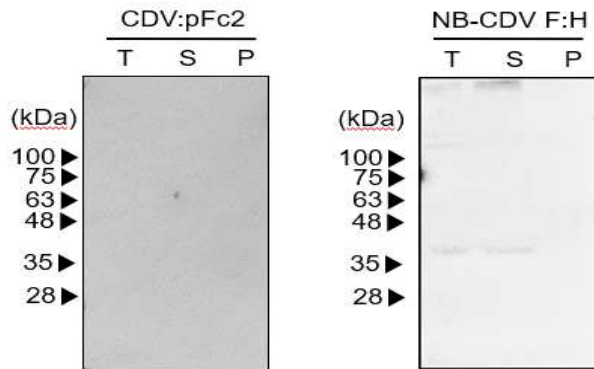


그림 9. LigB 분리정제 공정 확립 및 glycosylation 분석

사. Canine Adenovirus 항원 단백질

- Canine Adenovirus 항원 단백질의 분리정제를 위해 총 8종류의 DNA construct를 제작하였다. 3종류의 construct (RCAV:H, RCDV:H, R CIP:H)는 굉장히 낮은 발현 패턴을 나타냈으며, 또 다른 construct 3종 (NR-CAV hexon:H, NRH-CAV hexon:H, NB8H-CAV hexon:H)도 낮은 발현을 보였다. R CIP:H의 경우, 거의 발현이 확인되지 않았으며, CAV:pFc2 한 종류만 분리정제 가능한 수준으로 발현됨을 확인하였다. CAV:pFc2의 분리정제는 Protein A agarose를 이용하여 진행했으나, 분리정제 과정 중, 대부분의 단백질이 잘라지는 현상이 발생하여, 온전한 형태의 항원 생산은 현 상태에서 불가능하다. (그림 10)

<TS-발현 확인>

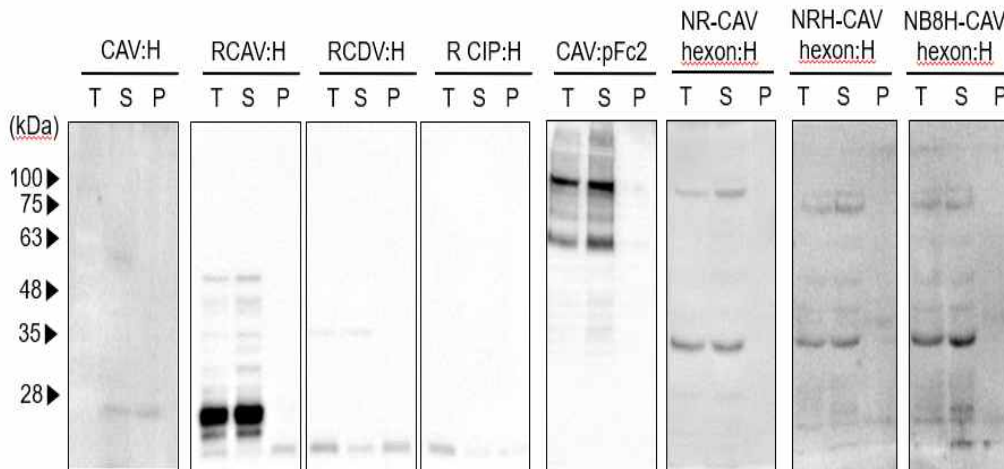


그림 10. Canine adenovirus 항원 단백질의 발현확인

10. 연구 진행상황 요약

바이러스	항원 단백질	발현	Solubility	분리정제 (mg/kg)	분리정제	TG (Homo line)
Rabies	NB RVGe:H	양호	90%	20 mg/kg	O	1 개
	RVM:H	매우 낮음	80%	-	X	
Leptospira canicola	NB LIB:H	중음	80%	220 mg/kg	O	
	CTB L32:H	양호	80%	80 mg/kg	O	
	NB L32:H	양호	80%	126 mg/kg	O	
Canine parvovirus	Rbc H CPV 2a	양호	90%	pH Or 열처리	△	6개
	Rbc H CPV 2b	양호	90%		△	
	pTEX Rbc H CPV 2c	양호	-		X	
Canine parainfluenza	ELCH CIV HA ELCH CIV M1 (검역본부)	안됨	-	-	X	
	NB CIV His HA	양호	40%	-	X	
	CIV His HA	양호	나쁨	Total extract	X	
Canine Distemper virus	CDV-pFc2	안됨	-	-	X	
	NB-CDV F:H	안됨	-	-	X	
	CAV:H	안됨	-	-	X	
Canine Adenovirus	RCAV:H, RCDV:H, R CIP:H	매우 낮음	-	-	X	
	CAV:pFc2	매우 낮음	-	-	X	
	NR CAV hexon:H	안됨	-	-	X	
	NRH:CAV hexon	안됨	-	-	X	
	NR8H:CAV hexon	안됨	-	-	X	

11. 반려견 5종 혼합백신에 대한 전임상시험 내용 및 결과

가. 사용 바이러주의 유래 및 특성

(1) 개 디스토펜퍼 바이러스(Lederle주)

(가) 기원 및 특성

- 개 디스토펜퍼 바이러스는 KVCC에서 2017년 07월에 분양받아 확보하였다.

(나) 계대방법

- 개 디스토펜퍼 바이러스, Lederle주(VR1100010)는 초대 배양한 CEF세포(Chicken embryo fibroblast, WGC-CEF001)에서 계대하여 시험에 사용하였다.

(다) Master Virus Bank 확립

① 원종독(Master virus bank)의 배양

- KVCC(Korea Veterinary Culture Collection)로부터 확보한 개 디스토펜퍼 바이러스는 10일령의 SPF(specific pathogen free) egg를 primary culture하여 배양된 CEF(Chicken embryo fibroblast) 세포를 사용하여 배양되었다. CEF세포가 1×10^6

cells/ml이 되도록 T-flask에 분주하였고, 이후, CDV 바이러스를 배양 용기 내에 최종 바이러스 농도가 MOI 0.001이 되도록 접종용 배지에 희석하여 분주하였고, 4~5일간 배양 후 바이러스 배양액을 무균적으로 채독하였다. 채독된 바이러스 상등액은 5,000 rpm에 10분간 원심 분리하여 최종 바이러스 상등액을 원중독으로 하였다.

② 원중독의 명명 및 Master Virus Bank 구축

- 원중독의 명칭은 WGV-M-CDV0714로 명명하였으며, 채독된 원중독은 1 ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, -80° C의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 원중독의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 1. 개 디스토펜퍼의 원중독에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine distemper virus			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CDV 함량 시험 (EID50)	10 ^{3.9} EID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니픽 접종	254	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(라) 생산용 바이러스주(Working Virus Bank)의 확립

① 생산용 바이러스 주(Working virus bank)의 배양

- Master virus bank로 구축된 개 디스토펜퍼 바이러스는 CEF세포에서 배양하여 생산

용 바이러스 주를 제작하였다. CEF세포가 1×10^6 cells/ml이 되도록 T-flask에 분주하였고, 이후, CDV 바이러스를 배양 용기 내에 최종 농도가 MOI 0.001이 되도록 접종용 배지에 희석하여 분주하였다. 그리고 4~5일간 배양 후 바이러스 배양액을 무균적으로 채독하였다. 채독된 바이러스 상등액은 5,000 rpm에 10분간 원심분리하여 최종 바이러스 상등액을 생산용 바이러스 주로 하였다.

② 생산용 바이러스주의 명명 및 Working virus bank 구축

- 생산용 바이러스주의 명칭은 WGV-W-CDV0714로 명명하였으며, 배양 채독된 원종독은 1 ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, -80° C의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 생산용 바이러스주의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 2. 개 디스토펜퍼의 생산용 바이러스주에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine distemper virus			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CDV 함량 시험 (EID50)	$10^{3.8}$ EID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니픽 접종	254	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(마) 개 디스토펜퍼 바이러스의 원종독 안전성 자료

① 과용량 접종시 안전성 확인

- 1) 바이러스: WGV-W-CDV0714

- 바이러스함량; $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml (10두분, 1ml 접종)
- 2) 실험동물: 개 디스템퍼 항체음성인 7주령 비글견 2마리
- 3) 실험방법
- 2마리의 비글견에 피하로 과용량 (10두분)의 원종독을 접종하였다. 접종 후 21일간 국소 및 전신반응을 관찰하여 대조군 개체와 비교하였다.
 - 직장체온을 접종 전, 접종 후 21일간 매일 측정하며, 과민반응, 식욕 부진, 구토 및 설사 그리고 화농 및 괴사 등의 개체에 대한 안전성 항목을 측정하였다.
- 4) 실험결과
- 국소반응: 공시동물 전 두수에서 접종 후, 이상반응이 관찰되지 않았음.
 - 전신반응: 공시동물 전 두수에서 특이 사항 없음.
 - 체온: 직장체온은 표01에 기록된 바와 같다.

표 3. 개 디스템퍼 백신 과용량(10두분) 접종 후 개체에 대한 안전성 실험 결과표

구분	개체	임상 증상	관찰 기간																					
			00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
접종군	#1	체온	38.1	38.7	38.5	38.9	38.7	38.3	37.8	38.3	38.4	37.9	38.2	38.0	37.9	38.3	38.3	38.0	38.4	38.2	37.9	38.2	37.8	38.1
		과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#2	체온	37.6	38.7	38.8	39.0	38.5	38.4	38.0	38.3	38.1	38.2	38.3	37.9	38.2	38.0	37.7	38.4	38.0	38.3	37.6	37.9	38.2	38.6
		과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
대조군	#1	체온	38.1	38.3	37.8	38.3	37.9	38.4	38.6	37.6	37.6	38.5	37.8	37.7	38.4	37.7	37.9	37.6	38.1	37.8	38.6	37.6	38.6	
		과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5) 결론: 디스템퍼 바이러스에 대하여 감수성 있는 최저일령의 강아지에 대하여 백신 접종 이후 표 3에서와 마찬가지로 특이한 체온 변화를 보이지 않았고, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 그리고 화농 및 괴사 등의 어떠한 증상도 확인되지 않았기 때문에 10두 분 농도의 바이러스 접종에도 안전성뿐만 아니라 약독화 또한 검증되었다.

(2) 개 전염성 간염 바이러스(아데노바이러스2형) (Tronto A 26/61주)

(가) 기원 및 특성

- 개 전염성 간염 바이러스(infectious canine hepatitis, ICH, ATCC VR-800™)는 ATCC에서 2017년 8월에 구입하여 확보하였다.

(나) 계대방법

- 개 전염성 간염 바이러스 (Tronto A 26/61주)는 WGC-A-72(ATCC CRL-1542)-0810[08] 세포주에서 계대하여 시험에 사용하였다.

(다) Master Virus Bank 확립

① 원종독(Master virus bank)의 배양

- ATCC로부터 확보한 개 전염성 간염 바이러스는 A-72 세포를 3×10^5 cells/ml가 되도록 세포를 주입한 이후 100% monolayer가 형성된 것을 사용하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 이후, 접종용 배지에 ICH 바이러스를 적정량 희석하여 최종 바이러스 농도가 MOI 0.01이 되도록 접종하였다. 37° C에서 3일간 배양하여 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 5,000 RPM에 10분간 원심분리 이후 최종의 바이러스 상등액을 원종독으로 하였다.

② 원종독의 명명 및 Master Virus Bank 구축

- 원종독의 명칭은 WGV-M-ICH0803로 명명하였으며, 배양 채득된 원종독은 1 ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, -80° C의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 원종독의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 4. 개 전염성 간염의 원종독에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine adenovirus-2			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응 집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CAV 함량 시험 (TCID50)	$10^{3.8}$ TCID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니픽 접종	254	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(라) 생산용 바이러스주(Working Virus Bank)의 확립

① 생산용 바이러스 주(Working virus bank)의 배양

- Master virus bank로 구축된 개 점염성 간염 바이러스는 A-72 세포를 3×10^5 cells/ml가 되도록 세포를 주입한 이후 100% monolayer가 형성된 것을 사용하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 이후, 접종용 배지에 ICH 바이러스를 적정량 희석하여 최종 바이러스 농도가 MOI 0.01이 되도록 접종하였다. 37° C에서 3일간 배양하여 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 5,000 RPM에 10분간 원심분리 이후 최종의 바이러스 상등액을 생산용 바이러스주로 하였다.

② 생산용 바이러스주의 명명 및 Working virus bank 구축

- 생산용 바이러스주의 명칭은 WGV-W-ICH0803로 명명하였으며, 배양 채득된 원종독은 1 ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, -80° C의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 생산용 바이러스주의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 5. 개 전염성 간염의 생산용 바이러스주에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine adenovirus-2			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CAV 함량 시험 (TCID50)	$10^{3.7}$ TCID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니픽 접종	320	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(마) 개 전염성간염 바이러스의 원종독 안전성 자료

① 과용량 접종시 안전성 확인

1) 바이러스: WGV-W-ICH0803

바이러스함량: $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml(10 두분, 1ml 접종)

2) 실험동물: 개 전염성 간염 바이러스 항체 음성인 7주령 비글견 2마리

3) 실험방법

- 개 디스토펜 바이러스 원종독의 안전성자료의 실험방법과 동일

4) 실험결과

- 국소반응: 공시동물 전 두수에서 접종 후, 이상반응이 관찰되지 않았음.

- 전신반응: 공시동물 전 두수에서 특이 사항 없음.

- 체온: 직장체온은 표 4에 기록된 바와 같다.

표 6. 개 전염성간염 백신 과용량(10두분) 접종 후 개체에 대한 안전성 실험 결과표

구분	개체	임상 증상	관찰 기간																						
			00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
접종군	#1	체온	38.2	38.7	38.6	38.8	38.0	38.1	37.9	38.1	38.0	38.1	38.4	38.2	38.3	38.2	37.8	37.8	38.2	38.0	37.9	38.2	38.1	38.1	
		과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		체온	38.3	38.7	38.4	38.3	38.1	38.2	37.9	37.9	38.1	38.4	38.0	38.4	38.0	37.9	38.2	38.5	37.9	37.8	38.3	38.2	38.3	38.0	
	과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	대조군	#1	체온	37.6	37.6	38.5	38.6	38.6	37.8	38.4	37.6	37.8	38.0	38.0	38.5	37.8	38.4	37.7	38.0	38.4	38.3	37.6	38.6	38.2	37.8
			과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
식욕 부진			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
구토 및 설사			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
화농 및 괴사			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

5) 결론: 최소 권장 접종 일령의 감수성 강아지에 대한 안전성이 확인되었다. 21일까지 관찰 결과, 표 6에서와 마찬가지로 특이한 체온 변화를 보이지 않았고, 백신 접종 이후 21일간 과민반응, 식욕 부진, 구토 및 설사 그리고 화농 및 괴사 등의 어떠한 증상도 확인되지 않아 백신주로서 안전성 및 약독화가 되었음을 확인할 수 있었다.

(3) 개 파보바이러스(C-780916주)

(가) 기원 및 특성

- 개 파보바이러스(ATCC VR-953™)는 ATCC에서 2017년 8월에 구입하여 확보하였다.

(나) 계대방법

- 개 파보바이러스 (C-780916주)는 WGC-W-A-72-0810[23]에서 계대하여 시험에 사용하였다.

(다) Master Virus Bank 확립

① 원종독(Master virus bank)의 배양

- ATCC로부터 확보한 개 파보바이러스를 A-72 세포가 플라스크 내에 3×10^5 cells/ml 이 되도록 계수하여 주입하고, monolayer가 100%가 되는 시점에서 MOI 0.01이 되도록 바이러스를 접종한다. 3일간 배양 후 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 원종독으로 하였다.

② 원종독의 명명 및 Master Virus Bank 구축

- 원종독의 명칭은 WGV-M-CPV0803로 명명하였으며, 배양 채득된 원종독은 1 ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, $-80^{\circ}C$ 의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 원종독의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.

- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 7. 개 파보바이러스의 원종독에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine parvovirus			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응 집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CPV 함량 시험 (TCID50)	$10^{5.8}$ TCID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니피 접종	201	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(라) 생산용 바이러스주(Working Virus Bank)의 확립

① 생산용 바이러스 주(Working virus bank)의 배양

- Master virus bank로 구축된 개 파보바이러스를 WGC-A-72-0810[08] 세포가 플라스크 내에 3×10^5 cells/ml이 되도록 계수하여 주입하고, monolayer가 100%가 되는 시점에서 MOI 0.01이 되도록 바이러스를 접종한다. 3일간 배양 후 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 생산용 바이러스주로 하였다.

② 생산용 바이러스주의 명명 및 Working virus bank 구축

- 생산용 바이러스주의 명칭은 WGV-W-CPV0803로 명명하였으며, 배양 채득된 원종독은 1 ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, -80° C의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 생산용 바이러스주의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 8. 개 파보바이러스의 생산용 바이러스주에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine parvovirus			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CPV 함량 시험 (TCID50)	$10^{5.9}$ TCID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니픽 접종	320	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(마) 개 파보 바이러스의 원종독 안전성 자료

① 과용량 접종시 안전성 확인

1) 바이러스: WGV-CPV0803

바이러스함량: $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml(10 두분, 1ml 접종)

2) 실험동물: 개 전염성 간염 바이러스 항체 음성인 9주령 비글견 2마리

3) 실험방법

- 2마리의 강아지에 과용량 (10 두분)의 원종독 바이러스를 피하로 주사하였다. 접종 후 21일 동안 강아지의 국소 및 전신반응을 관찰하였다.

4) 실험결과

- 국소반응: 공시동물 전 두수에서 접종 후, 이상반응이 관찰되지 않았음.
- 전신반응: 공시동물 전 두수에서 특이 사항 없음.
- 체온: 직장체온은 표 9에 기록된 바와 같다.

표 9. 개 파보바이러스 백신 과용량(10두분) 접종 후 개체에 대한 안전성 실험 결과표

구분	개체	임상 증상	관찰 기간																						
			00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
접종군	#1	체온	38.2	38.7	38.6	38.8	38.0	38.1	37.9	38.1	38.0	38.1	38.4	38.2	38.3	38.2	37.8	37.8	38.2	38.0	37.9	38.2	38.1	38.1	
		과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		체온	38.3	38.7	38.4	38.3	38.1	38.2	37.9	37.9	38.1	38.4	38.0	38.4	38.0	37.9	38.2	38.5	37.9	37.8	38.3	38.2	38.3	38.0	38.0
	#2	과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		체온	38.0	38.5	37.8	38.6	38.5	38.4	38.6	38.6	38.5	38.3	38.5	38.4	37.8	37.8	37.8	38.3	38.2	38.1	38.5	37.9	38.3	38.3	
		대조군	#1	과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
식욕 부진	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
구토 및 설사	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
화농 및 괴사	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
체온	38.0			38.5	37.8	38.6	38.5	38.4	38.6	38.6	38.5	38.3	38.5	38.4	37.8	37.8	37.8	38.3	38.2	38.1	38.5	37.9	38.3	38.3	
과민 반응	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5) 결론: 백신 접종 이후 21일까지 관찰결과, 표 9에서와 마찬가지로 특이한 체온변화를 보이지 않았고, 과민반응, 식욕부진 구토 및 설사 그리고 화농 및 괴사 등의 어떠한 증상도 확인되지 않아 백신주로서 안전성 및 약독화가 되었음을 확인할 수 있었다.

(3) 개 파라인플루엔자 바이러스 (D008주)

(가) 기원 및 특성

- 개 파라인플루엔자 바이러스(ATCC VR-399™)는 ATCC에서 2017년 8월에 구입하여 확보하였다.

(나) 계대방법

- 개 파라인플루엔자 바이러스, D008주(WGV-CPIV0803)는 WGC-A-72(ATCC CRL-1542)-0810[23], 세포에서 계대하여 시험에 사용하였다

(다) Master Virus Bank 확립

① 원종독(Master virus bank)의 배양

- ATCC로부터 확보한 개 파라인플루엔자 바이러스를 A-72 세포 (1×10^5 cells/ml)를 T-flask로 seeding과 동시에 접종하였다. 3일간 배양 후 바이러스 배양액을 무균적으로 채독하여 원종독으로 하였다.

② 원종독의 명명 및 Master Virus Bank 구축

- 원종독의 명칭은 WGV-M-CPIV0803로 명명하였으며, 배양 채독된 원종독은 1 ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, -80°C 의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 원종독의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 10. 개 파라인플루엔자의 원종독에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine parainfluenza virus			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응 집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CPIV 함량 시험 (TCID50)	$10^{4.8}$ TCID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니피 접종	403	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(라) 생산용 바이러스주(Working Virus Bank)의 확립

① 생산용 바이러스 주(Working virus bank)의 배양

- Master virus bank로 구축된 개 파라인플루엔자 바이러스를 WGC-A-72-0810[23] 세포 (1×10^5 cells/ml)를 T-flask로 seeding과 동시에 접종하였다. 3일간 배양 후 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 원종독으로 하였다.

② 생산용 바이러스주의 명명 및 Working virus bank 구축

- 생산용 바이러스주의 명칭은 WGV-W-CPIV0803로 명명하였으며, 배양 채득된 원종독은 1ml/vial로 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100까지의 숫자를 부여하였고, -80° C의 deep freezer에 동결 보존하였다.

③ 생산용 바이러스주의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 특성시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 안전시험, 미입 바이러스 부정시험, 바이러스 함량 및 혈청역가시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 11. 개 파라인플루엔자의 생산용 바이러스주에 대한 품질시험 적합 유무 확인

Attenuated canine parvovirus			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
특성시험	WGD-QC-SOP200 특성시험	연한 주황색, 이물,이취 없음. 내용물 균일	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
안전성 시험	DHPPL 안전시험	이상 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	DHPP 미입 바이러스 부정시험	특이적 CPE가 없고, 응 집이 없음.	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
바이러스 함량	DHPP-CPV 함량 시험 (EID50)	$10^{5.1}$ TCID ₅₀ /ml	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
혈청역가 시험	기니픽 접종	640	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(마) 개 파라인플루엔자 바이러스의 원종독 안전성 자료

① 과용량 접종시 안전성 확인

- 1) 바이러스: WGV-CPIV0803

- 바이러스함량: $10^{5.0}$ HAD₅₀/ml(10 두분, 1ml 접종)
- 2) 실험동물: 개 전염성 간염 바이러스 항체 음성인 7주령 비글견 2마리
 - 3) 실험방법
 - 개 디스토펜 바이러스 원종독의 안전성자료의 실험방법과 동일
 - 4) 실험결과
 - 국소반응: 공시동물 전 두수에서 접종 후, 이상반응이 관찰되지 않았음.
 - 전신반응: 공시동물 전 두수에서 특이 사항 없음.
 - 체온: 직장체온은 표 12에 기록된 바와 같다.

표 12. 개 파라인플루엔자 백신 과용량(10두분) 접종 후 개체에 대한 안전성 실험 결과표

구분	개체	임상 증상	관찰 기간																					
			00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
접 종 군	#1	체온	37.8	37.6	37.7	37.6	37.8	37.7	38.3	37.9	38.5	38	37.9	37.6	38.5	38.3	38.4	37.7	37.6	37.9	38.2	37.9	38.3	38.2
		과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		체온	37.6	37.6	37.6	37.9	38.3	38.6	38.1	38.3	37.7	38.3	38.1	37.8	37.7	37.9	38.1	38.6	38.2	37.9	38.6	37.8	38.6	37.7
	#2	과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		식욕 부진	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		구토 및 설사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		화농 및 괴사	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		체온	37.9	38.6	38	37.8	38.5	38.4	38	38.5	37.8	37.9	37.6	38.6	38.1	38.5	37.8	38.2	38.2	38.5	38.2	38.2	38.5	38.6
		대 조 군	#1	과민 반응	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
식욕 부진	-			-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
구토 및 설사	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
화농 및 괴사	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
체온	37.9			38.6	38	37.8	38.5	38.4	38	38.5	37.8	37.9	37.6	38.6	38.1	38.5	37.8	38.2	38.2	38.5	38.2	38.2	38.5	38.6
과민 반응	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5) 결론: 백신 21일까지 관찰결과, 표 12에서와 마찬가지로 특이한 체온변화를 보이지 않았고, 과민반응, 식욕부진, 구토 및 설사 그리고 화농 및 괴사 등의 어떠한 증상도 확인되지 않아 백신주로서 안전성 및 약독화가 되었음을 확인할 수 있었다.

나. 사용 세포주의 유래 및 특성

(1) A-72 cell line

(가) 기원 및 특성

- ATCC로부터 분양받은 A-72(ATCC CRL-1542) 세포주를 배양용 배지에 배양하여 T-flask에서 100%의 monolayer를 확인하고 이후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 모두 떼어낸다. 그리고 trypsin 용액을 제거하기 위하여 원심분리이후 상등액을 제거

하고 10% FBS가 첨가된 배양용 배지로 배양하였다.

(나) 원세포주(Master Cell Bank)의 확립

① 명칭 및 Master Cell Bank 구축

- 원세포주의 명칭은 WGC-M-A-72-0810으로 명명하였으며, 배양된 세포를 DMSO(Dimethyl sulfoxide)7%, FBS 20%가 포함된 배지에 5×10^5 cells/ml가 되도록 희석하여 1ml 씩 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100 까지 숫자를 부여하여, -196℃ 액체 질소에 동결 보존하였다.

② 원세포주의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는 데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험 및 미입 바이러스 부정시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 13. 원세포주에 대한 품질시험 적합 유무 확인

A-72 cell line			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	BVD, CPI 미입 바이러스 부정시험	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

(다) 생산용 세포주(Working Cell)의 확립

① 생산용 세포주 제작

- WGC-M-A-72 1 vial을 2~8 °C 냉장에서 해동한 후 배양용 배지로 희석하여 원심분리하여 순수한 Cell을 분리한 후 배양용 배지에 배양하여 T-flask에서 100% Monolayer가 형성된 Cell을 EDTA-trypsin 용액을 처리하여 T-flask로부터 탈락시키고 배양용 5 % FBS가 첨가된 배지로 중화하여 원심분리한 후 순수한 Cell만을 수거하여 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 7 %, FBS 20 %가 첨가된 배지에 3×10^5 cells/ml 이상으로 되게 희석하여 소분 후 생산용 세포주로 하였다.

② 명칭 및 Working cell bank 구축

- 생산용 세포주 명칭은 WGC-W-A-72-0810으로 명명하였으며, 배양된 세포를 DMSO(Dimethyl sulfoxide)7%, FBS 20%가 포함된 배지에 5×10^5 cells/ml가 되도록 희석하여 1ml 씩 cryogenic tube에 소분하여 #1~#100 까지 숫자를 부여하여, -

196℃ 액체 질소에 동결 보존하였다.

③ 생산용 세포주의 검증

- 배양조건 확립 후 반려견 동물 백신을 제조함에 있어 품질시험은 최종적으로 적합이 확인되어야 한다. 품질시험을 확립함으로써 제품의 안정성을 더욱 향상시키는데 목적을 두고 있다.
- 항원의 품질시험항목으로는 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험 및 미입 바이러스 부정시험으로 분류하였으며 각 항목의 시험은 (주)우진바이오의 품질시험 SOP에 따라 실험을 진행하였다.

표 14. 생산용 세포주에 대한 품질시험 적합 유무 확인

A-72 cell line			
시험항목	시험방법	시험결과	판정
무균시험	WGD-QC-SOP202 무균시험	미생물 증식 없음	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
마이코플라즈마 부정시험	WGD-QC-SOP209 마이코플라즈마 PCR법	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합
미입 바이러스 부정시험	BVD, CPI 미입 바이러스 부정시험	특이 밴드 확인 안됨	<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 연구목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2017)	식물 발현 시스템을 이용한 반려 동물 고품질 정제 백신 개발	광견병 식물 발현 항원 및 바이러스 항원에 대한 정제기술 개발 및 formulation 개발	100	- 5종 바이러스 균주 및 세포주 선정 및 확보 - 유전자 분석 및 항원성 검사
		식물 발현 항원을 이용한 광견병 subunit(불활화) 백신 전임상 시험 및 임상 신청	100	- 백신 항원 품질시험 진행 - 안전성 유효성 시험방법 확인
		5종 바이러스에 대한 배양 및 정제 기술 확립(undesirable contaminants 제거 기술)	100	- 바이러스 고역가 배양 조건 확립 - 정제기술 확립
		선발된 항원 유전자에 대한 식물체 고발현 벡터 제작	100	- 광견병, canine parvovirus 및 leptospira canicola 항원 선발 및 단백질 서열 분석 - 항원 유전자 codon optimization 및 식물발현벡터 제작
		재조합 항원 단백질의 식물에서의 발현 평가 및 형질전환체 제작	100	- Transient expression을 통한 3종 재조합 항원 단백질 식물 발현 평가 및 특성 분석 - 광견병 항원이 발현되는 형질전환체 제작
		유효 항원 단백질 분리정제 방법개발 및 유효성 평가	100	- 식물 발현 3종 재조합 항원의 단백질 분리정제 - 광견병 항원 단백질의 항원 유효성 및 항원성 평가
		6종 바이러스에 대한 재조합 백신 생산용 단백질의 유전자 변이조사	100	- 광견병 바이러스에 대한 유전자 분석
		6종 바이러스 유전자 변이별 항원그룹 분류 및 발현용 유전자 선발	100	- 광견병 바이러스에 대한 유전자 선발 - Leptospira 항원유전자 분석
식물발현 광견병 항원에 대한 효력 시험 및 기존 바이러스 항원과의 비교시험	100	- 식물발현 광견병 항원을 이용하여 면역원성 확인		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2018)	식물 발현 시스템을 이용한 반려 동물 고품질 정제 백신 개발	식물발현 광견병항원을 이용한 전임상 및 안전성 및 유효성 시험을 통한 임상 신청, 고품질 5종 백신의 허가 신청	100	- 식물발현 광견병 백신의 전임상 시험 비교시험 및 안 전성 유효성 시험
			50	- 광견병 백신 임상시험 신 청
			100	- 제2협동 기관의 바이러스 항원 조사에 따라 5종 바이 러스 중 교체가 필요한 항원 에 대한 대량 생산 및 정제 공정 확립
			50	- 5종 백신에 대한 임상시험 수 행 및 허가 신청
			50	- 5종 바이러스 항원 중 추 가 식물 발현항원을 이용한 5종 백신 formulation 개발 및 안전성 유효성 시험
		식물발현 항원단백질 분리/정제공 정 확립	100	- Canine distemper virus, canine hepatitis virus 및 canine parainfluenzavirus 유효 항원의 식물 발현 평가
			100	- 선발된 유효 항원 단백질의 lab scale 분리정제 공정 최적화
			100	- 식물발현 항원 단백질 분리정 제 평가 및 효능 검증을 위한 시료 제공(주관 및 협동기관)
			100	- 선발된 항원에 대한 Nicotiana benthamiana 조직 배양 및 식 물 형질전환체 제작 시작
		6종 바이러스에 대한 백신용 식물발현 단백질의 항원성 평가	100	- canine parvovirus 및 <i>leptospira canicola</i> 유효 항원 의 효능 평가 및 기존 항원 과의 비교시험
			100	- Canine distemper virus, canine hepatitis virus 및 canine parainfluenzavirus 의 효능 평가 및 기존 항원 과의 비교시험

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2019)	식물 발현 시스템을 이용한 반려 동물 고품질 정제 백신 개발	식물발현 광견병 백신의 허가 신청 및 고품질 5종 백신의 허가 신청	50	- 식물 발현 광견병 백신의 임상 및 허가 신청
			100	- 식물 발현 바이러스 항원 함유 및 신규 바이러스 항원 을 이용한 5종 혼합 백신의 전임상시험, 비교시험 및 안 전성 유효성 시험
			100	- 임상시험계획서 신청
		식물발현 항원단백질 대량생산 공 정 확립	100	- 대량 생산 가능성 및 효능이 입증된 항원 단백질 대량 생산 용 형질전환체 개발 완료
			100	- 식물발현 항원 단백질 large scale 분리/정제 공정 확립
			100	- 제품화를 위한 제조 공정 확 립 및 심사서 작성
		식물발현 항원을 이용한 백신의 면 역학적 특성 분석	100	- 식물 발현 항원의 물리화 학적 특성 분석
			100	- 면역원성에 미치는 항원의 특성 조사
			100	- 식물발현 항원을 이용한 백신의 면역학적 특성 분석 및 항체 발현 양상 확인

제2절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 식물 발현 시스템을 이용한 백신 제조용 항원 개발 기술을 확립할 수 있음.
- 나. 기존의 바이러스 항원과 식물 발현 항원의 비교 연구를 통해 식물 발현 단백질의 유용성을 확인할 수 있음.
- 다. 광견병 및 애완견 5종 혼합 백신의 국내외 유전형 및 혈청형 조사를 통해 백신 개발의 기초 자료를 제공.
- 라. 식물 단백질의 대량 생산 및 정제기술의 확립을 통해 백신 및 기타 단백질의약품의 생산 효율을 높일 수 있을 것으로 사료됨.
- 마. 기존의 바이러스 및 식물 발현 단백질의 혼합 백신 기술 개발을 통해 다양한 형태의 백신 개발이 가능함.

2. 경제적 · 산업적 측면

- 가. 최근 급성장하고 있는 반려동물 시장에서 국내 제조 백신의 공급 확대에 의한 시장 확대 및 수입대체 효과를 가져올 것으로 기대함.
- 나. 안전하고 효능이 우수한 애완견 백신 개발로 아시아 신흥국으로의 백신 수출이 가능할 것으로 사료됨.
- 다. 1인 가구가 증가하고 있는 요즘에는 특히 반려동물들의 역할이 중요하게 대두되고 있음. 외로움을 달래주는 친구의 역할뿐만 아니라 시각장애인의 눈이 되어주는 맹인견들과 같은 반려동물들은 동시에 많은 도움을 주는 서포터로 활약하기도 함. 따라서 반려동물의 건강을 지켜주는 백신의 개발은 인간의 행복에 매우 중요한 요소로 작용할 것으로 사료됨.

제3절 목표 미달성 시 사유 및 차후대책

1. 식물발현 광견병 항원을 이용한 광견병 백신의 상용화 미달성에 대한 사유와 차후대책

가. 목표 미달성 원인

- 실험동물에서의 효능은 확인하였으나 목적 동물인 개에서의 효능 검증을 위한 실험 진행이 필요함.

나. 차후 대책

- 국내에서는 아직까지 식물발현 단백질 항원을 이용하여 제작된 백신이 없기 때문에 국가 검정기준이 없으며 이를 확립하기 위해서는 추가적인 시험들이 필요한 상황임.
 - 항원량 결정: 1회 투여 안에 항원 단백질의 양을 결정하기 위한 실험이 수행되어야

하며 이를 위한 항원량 결정시험을 진행할 예정임.

- 면역증강제 선정: 면역 효과를 높이기 위해 백신과 함께 투여하는 면역증강제에 대한 상승효과 실험을 진행하였고 이를 통해 면역증강제를 선별하였으나, 실제로 목적동물에 적용해서 확인하지 못했음. 목적동물에 적용해서 확인할 예정임.
- 투여횟수 결정: 1회 투여로 충분한 방어능이 있는지 아니면 2, 3회 투여를 통해 효과를 증가시켜야 하는지에 대한 실험을 통해 투여횟수를 결정할 예정임. 우선 목적동물에 대한 최소항원함량 확인시험 결과를 확보한 후 투여횟수 결정시험을 진행할 것임.

2. 식물발현 항원이 혼합된 반려견 5종 백신의 상용화 미달성에 대한 사유와 차후 대책

가. 목표 미달성 원인

- 5종 백신을 제작하기 위해서는 각각의 항원 단백질들에 대한 높은 순도와 농도가 확보되어야 하지만 다음과 같은 이유에서 항원 단백질의 확보에 제약이 있었음.
 - 이상적인 항원 단백질의 확보를 위해서는 우선 식물에서 발현을 시켰을 때 강하게 발현이 되어야하고 식물 추출 버퍼를 이용해 추출물에 녹여낼 때에도 항원의 수용성이 좋아야 함.
 - 이후, 항원 단백질의 분리정제를 위해서는 resin에 결합 효율이 좋아야 하고 용출 버퍼에 잘 녹아 나와야 함.
 - 이런 과정을 통해서 확보된 항원 단백질은 최종적으로 비정상적으로 엉기지 않고 고농도로 농축이 잘 되어야 함.
 - 최종 정제과정까지 완료한 항원 단백질을 이용하여 실험동물에서의 면역원성 확인을 위한 실험을 수행하였으나 확인 결과 음성으로 판정되었음.

나. 차후 대책

- 발현을 높이기 위해서 다른 세포 소기관으로 타겟팅을 하거나 tag의 종류를 바꿔서 항원 단백질의 안정성을 높이는 방법을 적용할 계획임.
- 분리정제 과정에서 resin에 결합이 안 좋거나 용출이 안 되는 경우, 친화력 크로마토그래피를 수행하지 않고 필터나 이온 친화력 크로마토그래피를 이용하여 높은 순도의 항원 단백질을 확보할 수 있는 방법을 적용할 것임.
- 항원 단백질로 실험동물 시험 시 음성으로 나온 경우, 항원 단백질의 종류를 바꿔서 재시험을 진행할 예정임.

3. 식물발현 항원이 혼합된 반려견 5종 백신의 상용화를 위한 추진일정 및 추후 계획

가. 식물 발현 광견병 백신의 사업화 추진 계획

- 백신의 사업화 추진일정은 다음과 같음.
 - 2021년 1분기: 임상시험계획서 제출
 - 2021년 3분기: 임상시험 승인
 - 2022년 2분기: 임상시험완료 및 허가자료 준비
 - 2022년 3, 4분기: 품목허가 서류 제출 및 승인완료
 - 2023년: 제품생산 및 판매

나. DHPPL 5종 혼합 백신의 사업화 추진 계획

- 백신의 사업화 추진일정은 다음과 같음.
 - 2020년 1분기: 임상시험계획서 제출
 - 2020년 3분기: 임상시험 승인
 - 2021년 2분기: 임상시험완료 및 허가자료 준비
 - 2021년 4분기: 품목허가 서류 제출 및 승인완료
 - 2022년: 제품생산 및 판매

다. 현재 해외에서 사용되고 있는 애완견 백신주를 활용한 백신개발의 문제점 및 개선을 위한 백신개발 계획

- 국내에서 사용되고 있는 백신주는 이미 오래전에 유행되었던 병원체에 대한 백신주로 방어효능이 매우 약함.
- 이를 극복하고자 해외에서 널리 사용되고 있는 백신주를 확보하여 백신을 개발하고자 하였음. 그러나 최근 병원체의 변이가 빠르게 나타나고 있기 때문에 백신이 개발되었을 때, 현장 적용에 한계가 있을 수 있음.
- 식물발현 항원이 혼합된 반려견 5종 백신은 최근 유행하고 있는 병원체를 분석하여 이에 대한 항원 선별을 통해 백신을 제작하고자 하였음. 그러나 5종 병원체를 모두 포함하는 항원의 생산에는 문제가 있고 이를 해결하기 위해서는 추가적으로 수행해야 될 실험이 많음.
- 이런 문제점을 해결하고자 5종 병원체 모두를 포함하는 항원이 아닌 각각의 항원에 대한 생산효율 및 방어효능을 확인하여 우선 사용가능한 병원체의 항원을 기존 백신주와 치환하여 백신을 개발할 계획임.
- 이를 통해 현재 유행하고 있는 병원체에 대한 방어효능을 높일 수 있는 백신을 개발할 수 있음. 또한 항원치환방식의 백신개발 시스템을 활용하여 변이된 병원체에 대해 신속히 대처할 수 있는 백신의 생산이 가능할 것임.

제 5 장 연구결과의 활용 계획

1. 식물 발현 항원 단백질의 특성 연구를 통해 다양한 백신 개발 연구에 활용할 계획임.
2. 고품질 애완견 광견병 불활화 백신 및 5종 혼합백신의 전임상 시험 완료 및 안전성과 효능을 개선하여 상업화 추진할 계획임.
3. 광견병 및 5종 혼합 백신의 제제화를 통해 1회 주사로 6종의 질병 예방이 가능한 백신을 개발에 활용할 계획임.
4. 친화경적인 식물 발현 시스템으로 성공적인 백신 개발이 성공할 경우, 고양이 및 말 백신 등 고부가 가치를 창출할 수 있는 반려 동물 백신 개발 분야로 기술을 확대해 나갈 예정임.
5. 안전하고 효능이 우수한 광견병 불활화 백신은 국내뿐만 아니라 광견병이 문제가 되는 아시아 여러 국가들에 필수적인 백신으로 본 연구를 통해 다양한 국가의 바이러스주에 방어가 가능한 백신을 개발하여 수출할 계획임.
6. 광견병 바이러스 항원 G 단백질은 당화(Glycosylation)과정이 필수적인 단백질임에도 불구하고 당화과정이 일어나지 않는 대장균 시스템에서 생산한 단백질이 1mg당 200만원을 호가하는 고가에 판매되고 있어, 향후 식물 발현 시스템을 이용한 단백질 수요를 창출하여 단백질 제품으로의 판매를 시도할 계획임.
7. 광견병 바이러스 항체 검사 ELISA 키트(192 tests)는 현재 동물용으로 약 200만원에 판매되고 있음. 향후 식물발현 광견병 항원 단백질을 이용한 항체 진단 키트 개발에 활용할 계획임.

붙임. 참고문헌

1. 유전자재조합 돼지열병 백신바이러스 F1c-LOM-BE rns virus 및 이의 제조방법, 특허공개번호 제10-2009-0040368, 2010.
2. 반려동물 보유가구 및 시장규모 추이, 농림축산식품부 보도자료, 2016.
3. 국내 동물용 의약품 통계자료, 한국동물약품협회, 2012.
4. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.8.3, 2014.
5. 1-4-12-02 개 디스토펙사, 전염성간염, 파보바이러스, 파라인플루엔자(생), 렙토스피라 불활화 복합백신 검정기준.