

보안과제( ), 일반과제( )

과제번호 :

조류인플루엔자 바이러스 H9에 대한 효율적  
감염억제물질로서의 DNA aptamer 개발  
(Development of DNA aptamer as anti viral drug  
against avian influenza virus H9)

Aptamer의 작용기작 연구 및 AIV에 대한 aptamer의  
생체내 효능평가 (세부과제)  
(Action mechanism and in vivo efficacy test  
of aptamer for AIV)

H9 단백질 작용억제 aptamer 발굴 (협동과제)  
(Selection of aptamer which can inhibit H9 protein)

충북대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “조류인플루엔자 바이러스 H9에 대한 효율적 감염억제물질로서의 DNA aptamer 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 20 일

주관연구기관명 : 충북대학교

주관연구책임자 : 최 수 영

세부연구책임자 : 최수영,모인필

연 구 원 : 박 민 아

연 구 원 : 따 와

연 구 원 : 성 하 창

연 구 원 : 표 정 식

연 구 원 : 문 인 회

연 구 원 : 이 매 우

연 구 원 : 김 세 나

연 구 원 : 강 석 휘

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구책임자 : 전 성 호

연 구 원 : 이 광 수

연 구 원 : 최 승 관

연 구 원 : 우 성 지

연 구 원 : 박 지 훈

연 구 원 : 이 연 실

# 요 약 문

## I. 제 목

조류인플루엔자 바이러스 H9에 대한 효율적 감염억제물질로서의  
DNA aptamer 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

조류는 일반적으로 influenza A virus의 자연숙주로 인정되고 있으며, 이중 일부 바이러스는 닭, 칠면조 등의 가금류에 감염되어 심각한 질병을 야기시키는 것으로 보고되고 있다. 조류인플루엔자 바이러스(AIV: Avian Influenza Virus)는 1990년대 이후 중동을 포함한 아시아지역에서 지속적으로 발생되고 있다. 특히 국내에서는 1996년 3월 처음 보고된 이후 현재는 전국적으로 만연되어 있는 실정이다.

이상의 사실로 보아 널리 퍼져있는 H9 type의 조류인플루엔자 바이러스는 공공 보건에 심각한 위협을 주고 있다고 보아야 할 것으로, 이에 대한 감염억제제를 개발하는 것은 매우 중요하다고 본다. 특히, 국가가축방역의 관점에서 볼 때 백신접종과 더불어 감염억제제의 개발은 매우 중요한 방역수단으로 판단된다. 본 연구는 AIV 중 H9 type 바이러스의 조류감염을 선택적으로 억제하는 신규 감염억제효능을 가진 DNA aptamer를 개발하고자 한다

## III. 연구개발 내용 및 범위

기존에 발굴한 A22 압타머의 HA 단백질과의 상호작용 특성을 조사하기 위하여, 조류인플루엔자 바이러스의 H9 단백질과 A22의 반응성 및 H9 단백질과 직접적으로 결합하는 A22의 기능적 부위 결정, 그리고 A22의 구조 변경을 통한 H9 결합력의 증감을 분석하였다.

조류인플루엔자바이러스(AIV)에 대한 aptamer의 생체내 효능평가연구는 첫째, 현재 국내에 유행하는 H9N2 약병원성 조류인플루엔자에 대하여 목적동물인

SPF닭과 일반 실용계인 산란계를 대상으로 안전성과 효능을 평가하였고, 안전성시험에 있어서는 A22의 농도별, 투여방법별, 투여부위에서의 조직반응 등을 집중적으로 확인하였으며, 효능시험에 있어서는 간접적인 평가인 체중의 변화, 임상증상, 폐사 등을 관찰하며 직접적인 평가는 A22 투여 후 공격접종을 통하여 실제 바이러스의 감소 혹은 사멸되는 정도를 조직내 바이러스의 재분리로 확인하였다.

조류인플루엔자 바이러스 H9 단백질의 수용체 결합부위와 특이적 반응을 하는 신규 Aptamer 발굴은 SELEX 법을 이용하여 H5 단백질과 결합하는 Aptamer 라이브러리를 스크린하여 선별된 Aptamer를 클로닝 한 후, klenow 효소를 이용하여 바이오틴과 결합된 Aptamer를 제조하였다.

또한 신규 분리한 H9 binding aptamer에 대한 안전성과 효능을 앞에서 기술한 A22 평가방법과 동일하게 진행하였으며, 새로운 aptamer에 대하여 실제 농가를 대상으로 야외시험을 실시하였다. 야외시험 시 접종 후 일정기간이 경과한 다음 산란계에서의 효능평가를 위하여, 1) 산란율, 폐사율 등의 변화 비교, 2) 주요 난질 및 난각질의 변화 비교, 야외 감염 시 바이러스 배출 함량을 비교, 분석하였다.

#### IV. 연구개발결과 및 성과활용 계획

H9 단백질에 선별적으로 결합하는 aptamer 염기서열의 특징을 규명할 수 있었으며, C7 mix의 경우 SPF 계란에서 바이러스 중화능을 확인하였고, 산란계에서 바이러스의 배출효과를 검증할 수 있었다. 또한 야외산란계 농장에서 안전성을 조사한 결과, 특별한 임상증상이 관찰되지 않아 본 시험물질의 임상증상 측면에서의 안전성을 확인하였고, 시험물질 접종 후에도 산란율에 대한 영향은 없는 것으로 판단되었다.

본 과제에서 도출된 중간결과를 바탕으로 특허를 이미 출원하였으며, 현재 논문을 준비중에 있다. 효능 및 안전성에 있어서는 제품화를 위해 참여기업과의 협의를 진행중에 있다.

## SUMMARY

### I. Research title

Development of DNA aptamer as anti viral drug against avian influenza virus H9

### II. Abstract

The globular region of hemagglutinin (HA) protein of avian influenza virus attaches to cell surface sialic acid receptors, thereby facilitating entry of the virus into host cell. In this study, we have identified specific DNA aptamers with high affinity to the HA of H9N2 type influenza virus (A/ck/Korea/ms96/96). We have cloned and purified HA101-257 peptide containing the globular region (101-257 residues) of HA protein and then immunized into BALB/c mice to obtain the anti-H9 anti-serum. By SELEX method, 28 aptamers were isolated that bind to the HA101-257 peptide. Sequence alignment analysis of these aptamers revealed that 6 selected have highly conserved consensus sequences. Among them, aptamer C7 showed the highest similarity to the consensus sequences. Based on C7 aptamer, we have synthesized two aptamers with 35 nucleotides, C7 and C7[M]. Newly synthesized aptamers showed strong binding capability to the H9 peptide as well as viral particle, and thus prevented MDCK cells from viral infection. From these results, we have concluded that our aptamers can recognize HA protein of influenza virus and block the binding of virus to target receptors that is required for the penetration into the host cells.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
Section 1. Purpose of the research	1
Section 2. Importance of the research	1
1. Economic and industrial side	1
2. Social and cultural side	2
3. Technological side	4
Section 3. Scope of the research & development	5
Chapter 2. Current status of the technology	6
Section 1. Foreign	6
Section 2. Domestic	7
Section 3. Our team	8
Chapter 3. Results of the research	13
Section 1. Isolation of H3 and H9 hemagglutinin protein	13
1. Cloning of globular region of H3 type AIV hemagglutinin protein	13
2. Cloning of globular region of H9 type AIV hemagglutinin protein	15
3. Isolation of globular region of H3 and H9 type AIV hemagglutinin protein	16
(1) Expression of H3 and H9 protein in E. coli using pQE vector	16
(2) Expression of H3 protein in E. coli using pGEX4T-1 vector	18
(3) Isolation of H3 hemagglutinin protein	19
(4) Isolation of H9 hemagglutinin protein	20

Section 2. Characterization of A22 aptamer -----	22
1. Sequence analysis of A22 -----	22
2. Inhibitory effects of A22 for AIV infection -----	23
3. Anti-AIV effects of A22 -----	25
(1) A22 effects on SPF eggs -----	25
(2) A22 effects on SPF chickens -----	27
Section 3. Isolation of new aptamers binding to H9 protein -----	32
1. First screening of new aptamers -----	32
2. Anti-AIV effects of newly isolated aptamers -----	35
3. Second screening of new aptamers -----	38
4. Characterization of newly isolated aptamers -----	42
Section 4. Anti-influenza effects of newly isolated aptamers -----	46
1. Effects on SPF eggs -----	32
2. Effects on general chicken system -----	50
3. Safety and efficacy at field farm -----	57
Chapter 4. Achievement and contribution of the research -----	64
1. Analysis of achievement and contribution to related research field -----	64
2. Annual research goal and accomplishment upon evaluation points -----	65
3. Patent -----	67
4. Research paper -----	70
Chapter 5. Plan for using the results -----	92

# 목 차

제 출 문	-----	i
요 약 문	-----	ii
Summary	-----	iv
Contents	-----	v
제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	1
제 1 절	연구개발의 목적 -----	1
제 2 절	연구개발의 필요성 -----	1
1.	경제·산업적 측면 -----	1
2.	사회·문화적 측면 -----	2
3.	기술적 측면 -----	4
제 3 절	연구개발의 범위 -----	5
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	6
제 1 절	국외현황 -----	6
제 2 절	국내현황 -----	7
제 3 절	본 연구진의 관련기술 개발현황 -----	8
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	13
제 1 절	H3 및 H9 헤마글루티닌 단백질의 분리 -----	13
1.	H3 type 조류인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 단백질의 globular region 클로닝 -----	13
2.	H9N2 type 조류인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 단백질의 globular region 클로닝 -----	15
3.	H3 및 H9 헤마글루티닌 단백질의 globular region 분리 -----	16
가.	pQE vector를 이용한 H3 및 H9 단백질의 대장균내 발현 -----	16



나. pGEX4T-1 vector를 이용한 H3 단백질의 대장균내	
발현 -----	18
다. H3 헤마글루티닌 단백질의 분리 -----	19
라. H9 헤마글루티닌 단백질의 분리 -----	20
제 2 절 A22 aptamer의 특성분석 -----	22
1. A22 염기서열 분석 -----	22
2. A22의 조류인플루엔자 바이러스 감염억제 효과 -----	23
3. A22의 항 AIV 효과 -----	25
가. A22의 SPF 계란에서의 효과 -----	25
나. A22의 SPF 닭에서의 효과 -----	27
제 3 절 H9 단백질과 결합하는 신규 aptamer 발굴 -----	32
1. 1차 신규 aptamer의 screening -----	32
2. 1차 신규 분리된 aptamer의 항 AIV 효과 -----	35
3. 2차 신규 aptamer의 screening -----	38
4. 2차 신규 분리된 aptamer의 특징 분석 -----	42
제 4 절 2차 신규 분리된 Aptamer의 항인플루엔자 효능 -----	46
1. SPF 계란에서의 효과 -----	32
2. 일반 산란계에서의 효과 -----	50
3. 야외 산란계농장에서의 안전성 및 효능 -----	57
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	64
1. 전반적인 목표 달성도 분석 및 관련분야에의 기여도 -----	64
2. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 달성도 -----	65
3. 특허출원 -----	67
4. 논문원고 -----	70
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	92

## 그림 목차

그림 1. 조류 인플루엔자 발생농장의 산란율 및 폐사율 변화 -----	2
그림 2. 조류독감의 인체감염 과정 -----	3
그림 3. A형 인플루엔자 바이러스는 표면 단백질 -----	8
그림 4. 헤마글루티닌 분자 모델 -----	9
그림 5. 바이러스 챌린지에 대한 A22의 감염억제 효과 -----	10
그림 6. 다른 타입의 인플루엔자바이러스 감염에 대한 A22의 억제효과 -----	11
그림 7. H3 단백질의 아미노산서열 및 H3 유전자의 염기서열 -----	13
그림 8. H3의 91~261 aa 부위가 클로닝된 pQE30과 pGEX 4T-1 vector에서의 염기 및 아미노산 서열 -----	14
그림 9. H9 단백질의 아미노산 서열 및 H9 유전자의 염기서열 -----	15
그림 10. H9의 102~262 aa 부위가 클로닝된 pQE30 vector에서의 아미노산 서열 -----	16
그림 11. pQE vector에서 IPTG 농도에 따른 H3 및 H9 단백질발현 양 측정 -----	17
그림 12. pQE vector에서 IPTG 처리시간에 따른 H3 단백질의 발현 -----	17
그림 13. pGEX4T-1 vector를 사용한 H3 단백질의 발현 -----	18
그림 14. pGEX4T-1 vector에서 IPTG 처리시간에 따른 H3 단백질의 발현 -----	18
그림 15. 과발현시킨 H3 발현단백질의 fractionation -----	19
그림 16. anti-GST antibody를 이용한 Western blot -----	19
그림 17. Purification of H9 -----	20
그림 18. Confirmation of H9(101-257) protein expression by immunoblotting with anti-H9 serum -----	21

그림 19.	Immunogenicity of H9	-----	21
그림 20.	A22 aptamer의 변이서열	-----	22
그림 21.	변이시킨 A22 aptamer와 H3 단백질과의 결합력 측정	-----	23
그림 22.	Aptamer A22에 의한 세포의 바이러스 감염 억제	-----	24
그림 23.	H9 단백질과 결합하는 1차 분리한 Aptamer의 결합능	-----	33
그림 24.	1차 분리한 aptamer의 바이러스에 대한 결합력 분석	-----	34
그림 25.	H9-A3(왼쪽) 및 H3-A22(오른쪽)의 2차원 구조(모델)	-----	34
그림 26.	A Group 압타머의 결합력 [ELISA result]	-----	39
그림 27.	B Group 압타머의 결합력 [ELISA result]	-----	40
그림 28.	C Group 압타머의 결합력 [ELISA result]	-----	40
그림 29.	신규 압타머의 H9 단백질에 대한 결합력	-----	41
그림 30.	신규 압타머 혼합물의 바이러스 결합력	-----	42
그림 31.	신규 분리 압타머의 consensus sequence	-----	43
그림 32.	신규 압타머와 H9 단백질의 Gel retardation 측정	-----	43
그림 33.	H9 단백질 및 바이러스에 대한 신규 압타머의 결합력	-----	44
그림 34.	The effect of consensus on the viability of MDCK cells infected by H9N2 influenza virus in tissue culture	-----	45
그림 35.	C7[M]-35mer 혼합체의 개별 압타머의 항-바이러스 효과	-----	45
그림 36.	C7mix 투여 일반 산란계의 LPAI 바이러스 접종 후 산란율 변화 비교	-----	55
그림 37.	C7mix 투여 일반 산란계의 LPAI 바이러스 접종 후 사료섭취량 변화	-----	56

## 표 목차

표 1. 기존 조류인플루엔자 치료제 -----	7
표 2. A22와 타미플루(Oseltamivir)의 인플루엔자 감염억제 효과-----	11
표 3. A22의 AI 바이러스에 대한 중화능 비교 -----	26
표 4. SPF 닭에서의 A22 투여에 따른 약병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과비교 -----	28
표 5. Comparison of gene titer among groups after challenge with MS96 -----	29
표 6. Comparison of clinical chemistry among groups after challenge with MS96 -----	30
표 7. Comparison of HI titer (Log2) among groups after challenge -----	31
표 8. Comparison of B/B and S/B ratio among groups after challenge with MS96 -----	31
표 9. A3의 AI 바이러스에 대한 중화능 비교 -----	36
표 10. A4의 AI 바이러스에 대한 중화능 비교 -----	37
표 11. H9 단백질과 결합하는 신규 Aptamer의 염기서열-----	38
표 12. 항-H9 항체와 비교한 Aptamer의 H9 단백질에 대한 상대적 결합력 -----	41
표 13. The neutralization effect of C8mix and CPCR mix against MS96 LPAI virus using SPF eggs -----	47
표 14. The neutralization effect of Cm35 against 01310 LPAI virus using SPF eggs -----	48
표 15. The neutralization effect of Cm35 against 01310 LPAI virus using SPF eggs -----	48
표 16. The neutralization effect of C7 against 01310 LPAI	

	virus using SPF eggs -----	49
표 17.	The neutralization effect of C7 mix against A/CK/01310 LPAI virus using SPF eggs -----	49
표 18.	Comparison of serological response among groups after challenge in commercial layer -----	53
표 19.	Comparison on amount of viral gene in the samples of chickens with C7 mix treatment after challenge -----	54
표 20.	AP 야외시험을 위하여 선정된 농장 개요 -----	57
표 21.	실험계군의 백신접종내역 -----	58
표 22.	시험계군에서의 C7 mix 투여 내역 -----	59
표 23.	주요전염병에 대한 접종군과 대조군의 시험기간 중 혈청역가 변화비교 -----	61
표 24.	야외 산란계농장의 C7 mix 투여 후 처리군과 대조군의 산란율변화비교 -----	62
표 25.	RT-PCR를 이용한 시험농장에서의 AI 바이러스 감염여부 검사 -----	63

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

조류는 일반적으로 influenza A virus의 자연숙주로 인정되고 있으며, 이중 일부 바이러스는 닭, 칠면조 등의 가금류에 감염되어 심각한 질병을 야기시키는 것으로 보고되고 있다. 조류인플루엔자 바이러스(AIV: Avian Influenza Virus)는 1900년대 초부터 발병이 된 것으로 추정되나 1966년에 터키에서 확인된 H9N2 type의 AIV는 양계산업에 있어 세계적으로 가장 광범위하게 분포하고 있으며 1990년대 이후 중동을 포함한 아시아지역에서 지속적으로 발생되고 있다. 특히 국내에서는 1996년 3월 처음 보고된 이후 현재는 전국적으로 만연되어 있는 실정이다.

이상의 사실로 보아 널리 퍼져있는 H9 type의 조류인플루엔자 바이러스는 공공보건에 심각한 위협을 주고 있다고 보아야 할 것으로, 이에 대한 감염억제제를 개발하는 것은 매우 중요하다고 본다. 특히, 국가가축방역의 관점에서 볼 때 백신접종과 더불어 감염억제제의 개발은 매우 중요한 방역수단으로 판단된다. 본 연구는 AIV 중 H9 type 바이러스의 조류감염을 선택적으로 억제하는 신규 감염억제효능을 가진 DNA aptamer를 개발하고자 한다

## 제 2 절 연구개발의 필요성

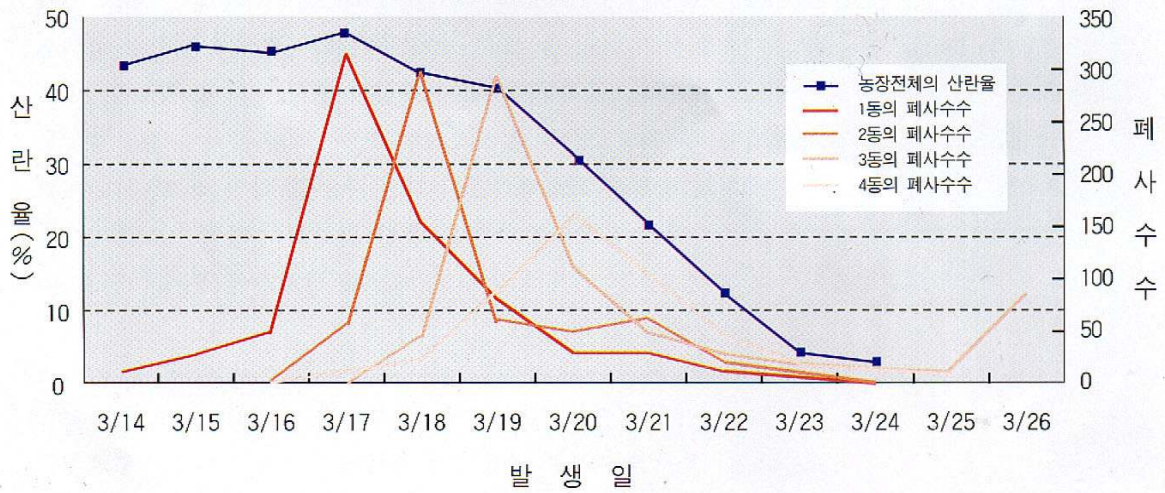
### 1. 경제·산업적 측면

조류인플루엔자(Avian influenza 또는 Bird flu)는 닭·오리 및 야생조류 등에 감염되는 급성 바이러스성 질병으로, 100여년 전에는 국지적으로 발생이 되는 등의 소강상태가 되었으나 1990년 이후 다시 전 세계적으로 퍼지고 있다. 닭, 칠면조 등 가금류뿐 아니라 야생오리와 같은 야생조류에도 감염되며 전파속도도 매우 빠를 뿐만 아니라, 고병원성은 치사율이 100%에 이를 만큼 전염성과 폐사율이 높기 때문에 국

내에서는 제1종 법정전염병, 국제수역사무국(OIE)은 A급으로 분류하고 있다

최근 수년간 유행하여 심각한 피해를 입히고 있는 고병원성 조류인플루엔자 (Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI)는 가금류에 치명적으로 작용하여 농가에 엄청난 경제적 손실을 초래한다. 또한, 현재 국내에 만연되어 있는 약병원성 AIV (H9N2)의 경우에도 산란율의 하락과 함께 폐사율증가를 야기한다 (그림 1).

〈그림 1〉 조류인플루엔자 발생농장의 산란율 및 폐사율 변화

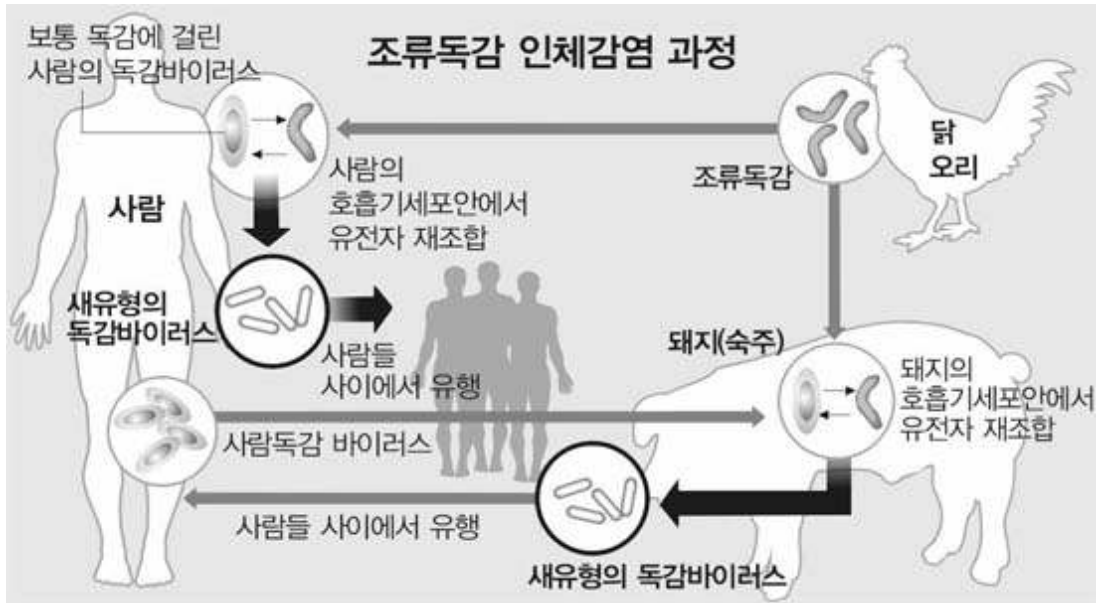


## 2. 사회·문화적 측면

그동안 조류독감은 조류와 돼지 사이에서만 전염된다고 생각했으나 1997년 홍콩에서 조류독감에 감염된 조류와 접촉한 사람들 중 18명이 감염되고 그중 6명이 사망하는 사건이 발생해 사람도 감염되는 것으로 알려졌다. 2003년에는 홍콩에서 감염자 2명중 1명이, 네덜란드에서는 83명중 의사 1명이 숨졌는데, 홍콩은 H5N1, 네덜란드는 H7N7 바이러스가 원인이었다. 지난 1999년 홍콩에서 발생한 조류독감에선 H9N2 바이러스가 검출되었다

조류독감의 바이러스는 감염된 조류가 다른 닭, 사육 오리와 접촉하거나 배설물을 통해 조류독감을 전파하므로 방역이 쉽지 않다. 특히 문제가 되는 것은 감염된 조류를 통해 인간에게 전염될 수 있다는 사실이다. 인간이 조류독감에 감염되면 변종

바이러스가 발생할 가능성이 더욱 커지고, 돌연변이를 일으킨 변종 바이러스는 인간끼리의 전염을 일으킬 수 있다. 사람 간에 전염되는 변종 바이러스가 나타날 가능성 때문에 전문가들은 조류독감이 잘못하면 세계적인 유행병이 되지 않을까 우려하고 있다.



(그림 2) 조류독감의 인체감염 과정(출처 : 동아일보)

조류인플루엔자를 예방하는 가장 좋은 방법은 정기적인 혈청검사를 통하여 평소에 계군을 감시하는 것이다. 조류인플루엔자 바이러스는 혈청형이 다양하고 또한 매번 쉽게 변이가 일어나기 때문에 효과적인 예방약을 만들 수 없다. 따라서 예방약이 없는 이유는 예방약을 만들 수 있는 기술이 부족한 것이 아니라 각각의 혈청형에 대한 다양한 예방약을 제조하는 것이 현실적으로 무모하기 때문이다. 더군다나 1997년 이후 보고된 H5N1 타입의 조류인플루엔자는 종간의 장벽 (species barrier) 을 뛰어넘어 사람에게 감염되는 경우 70%의 높은 치사율을 보이는 등 매우 치명적으로 작용하기 때문에 전 세계의 보건 및 의료 전문가들이 이에 대한 대책을 마련하기 위해 분주히 노력하고 있다.

연구자들은 만일 이번 조류인플루엔자가 사람에서 사람으로 전염되는 형태로의 이차변이가 일어난다면 1918년 스페인 독감의 유행으로 전 세계적으로 4천만 명 이상



의 희생자를 낸 것 이상의 피해를 감수해야할 정도로 심각한 결과를 초래할 것으로 우려하고 있다. 따라서 가금류에서 조류인플루엔자 바이러스의 유행을 효과적으로 억제하고 바이러스의 이차적 변이를 통한 인체 감염 및 전파를 막기 위해서는, 보다 근본적이고 새로운 개념의 조류인플루엔자 바이러스 감염 억제 및 치료제의 개발이 시급하다.

### 3. 기술적 측면

바이러스와 숙주세포는 생존을 위한 끈임 없는 상호작용을 통해 진화해 왔다.

숙주세포는 면역 시스템을 이용하여, 바이러스의 증식을 막거나, 감염된 세포를 죽이는 등의 방어기작을 발전시켰다. 즉, 바이러스 표면에 발현되는 단백질에 대한 항체를 만들거나 (체액성 면역), 인터페론같은 사이토카인의 분비를 촉진하여, 감염된 세포를 죽이는 세포성 면역 시스템을 유도한다.

바이러스 또한 숙주세포의 면역 시스템을 피하기 위하여 다양한 생존방법을 개발해 내었다. 최근에는 HIV나 인플루엔자 바이러스의 표면 단백질의 항원부위가 계속 변화되거나, 숙주세포의 인터페론(IFN) 신호전달의 억제, 아포토시스(apoptosis)를 막거나 유도하는 조절기능이 밝혀지고 있다.

이렇게 끊임없이 변이를 일으키는 바이러스 단백질에 대한 기존의 면역학적 접근방법엔 분명 한계가 있다. 특히, HPAI의 예에서 보듯이 면역 시스템에 노출된 적이 없는 새로운 종류의 감염성 바이러스의 출현에 대하여 우리가 대처할 수 있는 방법은 거의 전무한 실정이다.

따라서, 보다 효율적인 백신 또는 바이러스 억제제의 개발을 위해서는 바이러스의 숙주 세포내 감염과정의 각 단계에서 바이러스와 숙주세포 분자간의 상호작용 기작을 정확히 이해하는 것이 필수적이다.

이러한 근본적인 접근법을 통해 조류인플루엔자 바이러스가 숙주세포에 감염되는

정확한 기작을 규명하고, 바이러스의 감염 과정에서 가장 직접적으로 작용할 것이라 여겨지는 바이러스의 기능적 부위를 연구의 타겟으로 결정하는 것이 중요하다. 본 연구는 이러한 타겟을 이용하여 백신 후보 또는 바이러스 감염억제 물질을 발굴하고, 이들 물질의 생체 내 효능 및 안전성을 평가함으로써 보다 효율적인 조류인플루엔자 바이러스에 대한 감염억제 방법을 개발하고자 한다.

### 제 3 절 연구개발의 범위

Aptamer란 비교적 적은 분자의 ssDNA 또는 RNA를 말하는 것으로서, 3차원 구조를 이루어 특정 단백질에 높은 친화능력을 가지는 물질을 말한다. 본 연구에서는 조류인플루엔자 바이러스의 감염 과정에서 가장 직접적으로 작용하는 것으로 알려진 HA 단백질을 대상으로, 이 단백질의 숙주 수용체 결합부위에 결합하여 숙주 감염을 억제하는 DNA aptamer를 발굴하고, 이 aptamer의 생체 내 효능 및 안전성을 평가함으로써 보다 효율적인 조류인플루엔자 바이러스에 대한 감염억제 물질을 개발하고자 한다.

이를 위하여, 앞서의 연구를 통해 개발한 인체 인플루엔자 바이러스 (H3 type) 감염억제 aptamer인 A22에 대한 생화학 및 분자생물학적 분석을 통해 조류인플루엔자 H5, H7 및 H9 단백질과의 상호작용을 조사할 것이며, SPF 닭 및 일반 실용계를 대상으로 A22의 안전성 및 효능을 실험실적 실험과 야외실험을 통하여 평가하고, 새로운 생체내 전달경로 및 전달물질을 개발할 것이다.

또한, 조류에 광범위하게 감염되어 있는 H9 type 조류인플루엔자 바이러스에 선택적으로 작용하는 신규 감염억제 aptamer를 발굴하여, 이 aptamer의 숙주 생체내에서의 효능 및 안전성을 SPF 닭 및 실용닭을 이용해 평가할 것이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외현황

조류인플루엔자 바이러스의 유행에 대한 면역학적 대응 방법으로 이에 대한 백신을 만들거나 항바이러스 제제를 개발하는 연구가 전 세계적으로 활발히 진행 중이나 아직까지 바이러스의 유행 및 인체 감염에 대한 대책은 충분히 마련되어 있지 못한 실정이다.

현재 사용되는 조류인플루엔자 바이러스 백신은 주로 바이러스 표면에 발현되는 헤마글루티닌 (Hemagglutinin, HA)과 뉴라미니데이즈 (NA) 단백질에 대한 항체 형성을 유도한다. 이러한 백신은 항체 형성이 충분히 유도되고 임상증상을 감소시키지만, 생독백신이 아닌 경우엔 바이러스의 배출을 완전히 막지 못하기 때문에 전파를 효율적으로 차단할 수 없다는 문제점이 있다. 또한, 계속해서 변이를 일으키는 주항원에 대해서는 기존의 항체가 효과적으로 결합하지 못하기 때문에, 사람의 경우보다 훨씬 다양한 종류의 HA 단백질을 가진 조류인플루엔자 바이러스에 대해 효과적으로 대처하는 백신을 개발하는 데 많은 한계가 있다.

이러한 이유로 새로운 타입의 바이러스가 출현할 때마다 이에 맞는 새로운 백신을 접종해야 하는 불편함이 상존하며, 그 해 유행할 바이러스를 제대로 예측 못했을 경우엔 매우 치명적인 결과를 초래할 가능성을 배제할 수 없다.

한편, 기존의 연구자들은 항바이러스 제제 또는 인플루엔자 바이러스에 대한 직접적인 치료제로 이온채널 (M2 단백질)의 억제제나, NA의 효소작용 저해제를 개발하였다 (표 1).

(표 1) 기존 조류인플루엔자 치료제

적용 방법	제 품
Ion channel (M2) blocker	Amantadine, Rimantadine
Neuraminidase (NA) inhibitor	Zanamivir (Relanza), Oseltamivir phosphate (Tamiflu)

그러나 이러한 일반적인 항바이러스 제제는 부작용이 매우 심하여 상용화되어 있지 않으며, NA작용 저해제의 경우는 근본적인 바이러스 감염에 대한 억제작용을 못하므로 그저 통증의 완화와 회복을 1-2일 정도 앞당기는 정도의 간접적인 효과가 있을 뿐이다. 또한, NA작용 저해제를 복용한 일부 환자에서 환각 증세 등의 심각한 부작용 사례가 보고되고 있다.

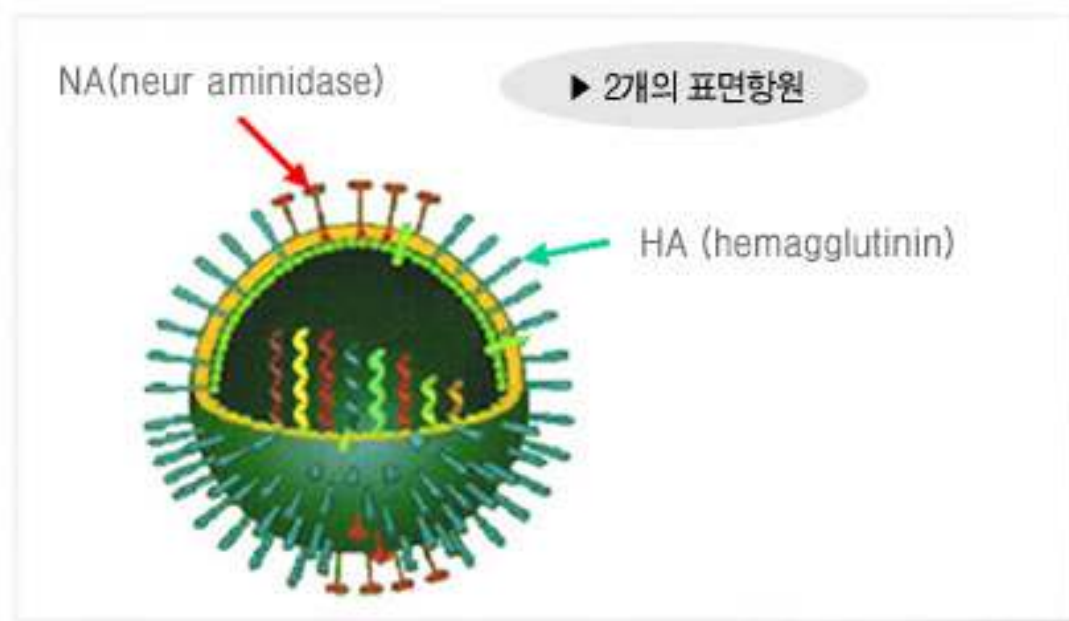
## 제 2 절 국내현황

국내에서의 백신 및 치료제의 개발은 거의 외국의 연구방법인 항체를 이용하는 연구를 따라서 하고 있다. 하지만 이러한 방법의 결정적인 단점은 바이러스 변이형이 출현되었을 때 즉각적인 대처가 되지 않는다는 점이다. 하지만 아직도 제품으로 출시되는 것은 사람의 경우 전량 외국에서 수입된 제제를 사용하고 있는 실정이며 가축의 경우 국내백신이 개발되어 곧 출시될 예정이다.

본 연구팀의 연구원은 바이러스에 감염된 세포의 면역시스템 작동과, 이를 억제하는 바이러스 단백질의 기능에 관한 연구에 초점을 맞추어서, 바이러스의 증식을 억제하는 효과적인 물질을 개발하는 연구를 수행해 왔다. 이러한 연구시스템을 기반으로 생물학적 제제에 대한 안전성 및 효능에 대한 평가를 수행한 경험이 있으며, 특히 조류전염병의 병인 및 병성기전 규명에 대한 수십 년간의 연구 경험을 바탕으로 현재 조류인플루엔자 백신 및 야외감염과 백신감염 항체를 구별할 수 있는 진단 키트 개발에 대한 프로젝트를 수행하고 있다. 또한 다른 연구원은 DNA aptamer의 효용성에 맞추어 AIV의 H3 hemagglutinin 특정부위에 결합하는 aptamer 개발에 관한 연구성과를 낸 경험을 가지고 있다.

### 제 3 절 본 연구진의 관련기술 개발현황

인플루엔자 바이러스의 주 항원 표면 단백질인 HA는 계속적으로 변이를 일으킴으로써 숙주의 면역시스템에 의해 유도되는 항체의 결합을 피해나간다. 하지만, 숙주 세포의 수용체 (sialic acid)를 인식하는 HA 분자의 특정 영역(HA91-261)은 변하지 않고 비교적 잘 보존된 아미노산 서열을 유지하고 있다.

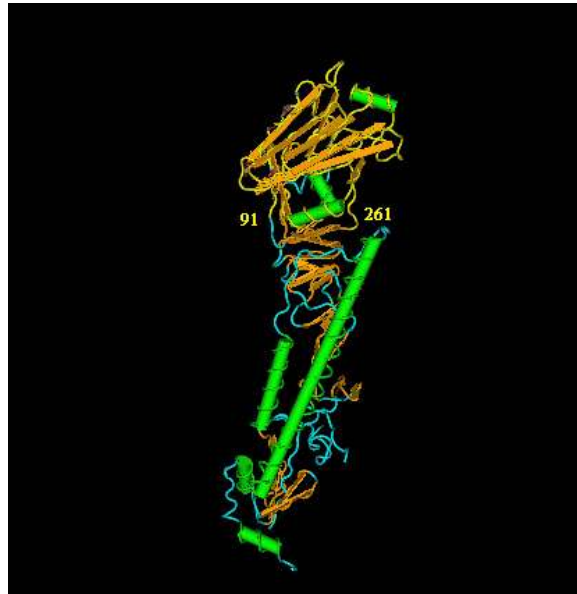


(그림 3) A형 인플루엔자 바이러스는 표면 단백질 (hemagglutinin(HA), neuraminidase(NA))에 의해 몇 가지 종류로 나눌 수 있다

이러한 수용체 결합영역 (receptor-binding pocket)은 바이러스가 숙주세포에 결합하고 이를 통해 숙주세포로 감염하기 위해서 필수적인 부위로서, 자연 상태에선 삼량체 (trimer) 구조의 안쪽에 묻혀서 숙주세포의 면역 시스템에 노출되지 않기에 HA 단백질에 대한 효과적인 백신이나 치료제의 개발에 어려움을 겪고 있다.

우리는 이렇게 잘 보존된 HA 단백질의 수용체 결합영역(HA91-261 펩타이드)을 대장균에서 과발현시켜 생쥐에 주사한 결과, 현존하는 모든 타입의 사람에 대한 인플루엔자 바이러스(H1N1, H2N2, 및 H3N2)와 작용하는 항체를 얻을 수 있었다. 이는,

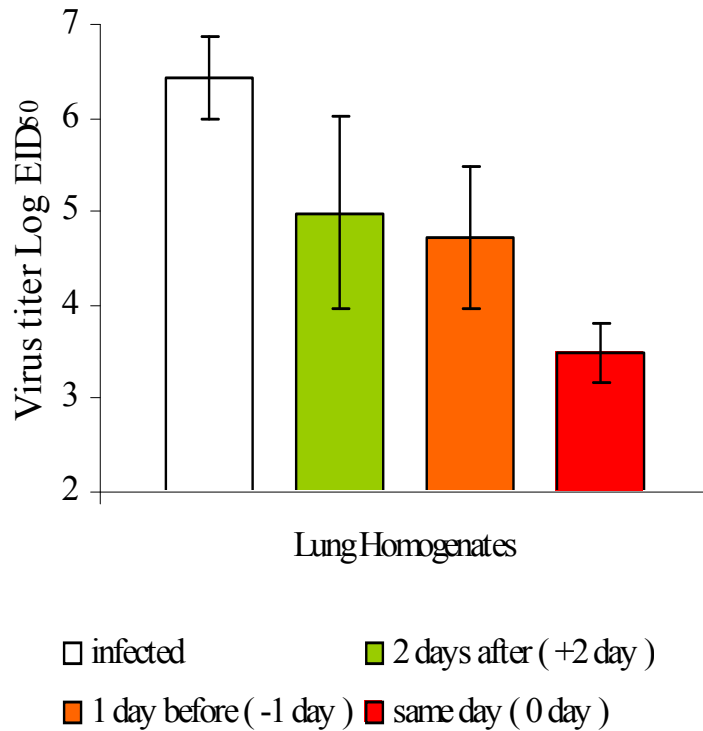
매년 새로운 인플루엔자 백신을 맞는 불편함을 제거할 수 있는, 획기적인 백신을 만들 수 있는 기초를 제공한다.



(그림 4) 헤마글루티닌 분자 모델

본 연구진은 이러한 결과에서 더 나아가, HA 펩타이드와 매우 특이적으로 결합하는 뉴클레오타이드인 Aptamer (A22)를 스크린하였다. 이 물질은 예상대로 사람의 인플루엔자 바이러스 감염을 효과적으로 억제함을 생쥐 실험을 통해 밝혀내었으며 (그림 5), 그 결과를 저명한 학술지(Jeon et al., J. Biological Chemistry 2004)에 투고하고 국제특허를 출원(PCT/IL04/00182)하였다.

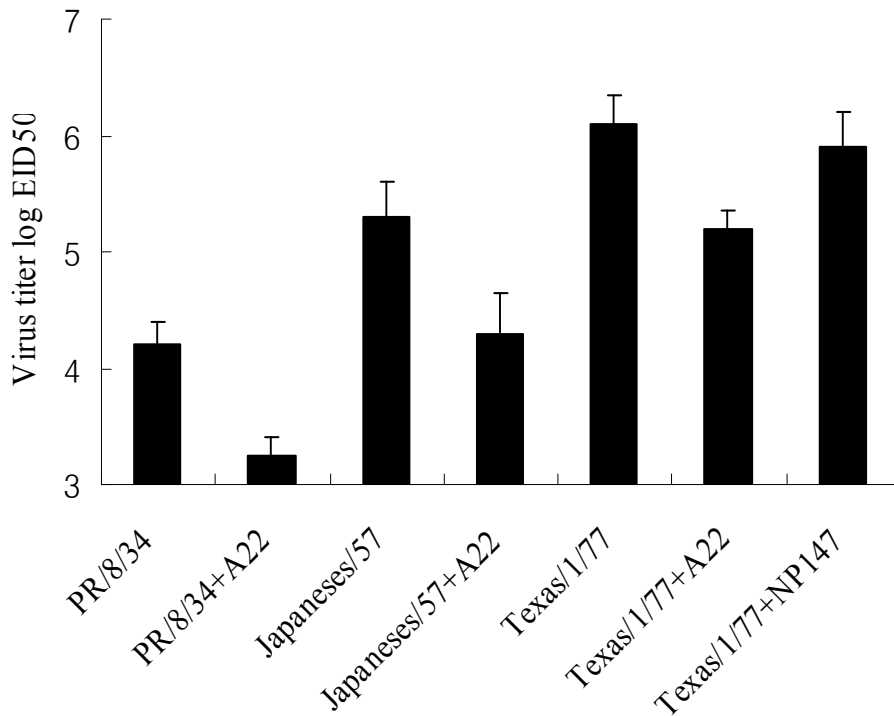
Aptamer는 RNA 또는 단사 DNA가 단백질처럼 고유한 3차원적 구조를 유지해 마치 리간드-수용체 또는 항원-항체 반응에서와 같이 특정 타겟 단백질의 활성부위와 특이적 결합을 할 수 있는 원리를 이용한다. 이는 상대적으로 작은 크기(8-15kDa)로 인해 커다란 항체단백질 (150kDa)이 작용할 수 없는 부위도 선택적이고 매우 결합력이 강한 상호작용이 가능하다 .



(그림 5) 바이러스 챌린지에 대한 A22의 감염억제 효과. A22 처리시 허파에 감염된 바이러스의 양이 0.1% 이하로 감소하였다. 이러한 감염억제 효과는 챌린지 하루 전 또는 2일 후에도 나타났다 (그림의 세로축은 로그 스케일임. 따라서 숫자 1 감소는 1/10 감소를 의미함)

이러한 Aptamer는 순수하게 합성할 수 있고 안정적이며, 과민 면역반응을 일으키지 않는 등 인체에 거의 무해한 특징이 있어 이를 이용한 항바이러스 (HIV, HCV, HBV), 및 항암 (glioblastoma, hepatocarcinoma) 물질의 개발과 여러 질병에 대한 진단시약 개발 등 많은 분야에서 응용이 가능하다.

우리가 분리한 A22는 기존의 사람 인플루엔자 바이러스 세 타입 (H1, H2 및 H3) 모두에 대해 감염 억제 효과를 보이고 있으며 (그림 6), 이는 같은 숙주세포의 수용체와 결합할 H5 및 H9타입의 조류인플루엔자 바이러스에도 작용할 개연성이 높다.



(그림 6) 다른 타입의 인플루엔자바이러스 감염에 대한 A22의 억제효과.  
(PR/8/34: H1N1, Japaneses/57: H2N2, Texas/1/77: H3N2)

특히, 최근에 우리가 얻은 데이터는 A22에 의한 인플루엔자 바이러스에 대한 감염 억제 효과가 현재 사용되고 있는 인플루엔자 치료제(타미플루)의 효능을 15%이상 증가하고 있음을 보여준다 (표 2).

(표 2) A22와 타미플루(Oseltamivir)의 인플루엔자 감염억제 효과  
(% protection=100%-100%/Dlog EID50)

Treatment	$\Delta \log \text{EID50}$	Fold reduction	Protection (%)
<b>A22</b>	1.11	12.88	<b>92.30</b>
<b>Oseltamivir</b>	0.62	4.17	<b>76.03</b>



본 연구팀은 수년간 인플루엔자 바이러스와 이에 감염된 숙주세포 단백질간의 상호 작용에 대한 연구 및, 바이러스 표면 단백질의 항원결정부위를 이용한 보다 효과적이고 새로운 백신 및 감염 억제 물질의 개발에 대한 연구를 수행해 왔으며, 이렇게 축적된 연구기반을 바탕으로 우리가 이미 발굴한 신규 항-인플루엔자 바이러스 물질에 대한 전 임상 단계에서의 실험동물의 생체 내 연구를 통한 안전성 및 효능 검사를 수행 할 것이며, 이와 유사한 방법으로 조류인플루엔자 바이러스 특이 신규 물질을 발굴하고자 한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 H3 및 H9 헤마글루티닌 단백질의 분리

#### 1. H3 type 조류인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 단백질의 globular region 클로닝

H3 hemagglutinin 부위의 염기서열 및 발현단백질의 서열은 아래와 같다(그림 7). coding region의 크기는 1,701 bp로서 본 연구에 사용한 수용체 부위는 cDNA의 310~831 base 부위인, 생체내 기능단백질의 (그림의 붉은색 부위는 발현 후 소실되는 부위임) 91~261 aa를 사용하였다(주황색부위).

##### (A) H3 protein

10            20            30            40            50            60            70            80            90            100

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKWEWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLFNNESFNWTGVAQNGTSSSCKRRSIKSFFSRLNWLHOLKYRYPALNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPTSDSDOTSLYTQASGRVTVSTKRSQOTVIPNIGSRPWVIRGISSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRIITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIEENGWEGMMDGWYGFRRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFERTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVVLLGFIWACQKGNIRCNICI

##### (B) H3 gene

1 atgaagacta tcaatgcttt gagctacatt ttagtctctg ttttctctca aaaacttccc ggaatgaca acagcacggc aacgctgtgc ctgggacacc  
 101 atgcagtgcc aaacggaacg ctagtgaaaa caatcacgaa tgaccaaatt gaagtgacta atgctactga gctggttcag agttctctca caggtagaat  
 201 atgcgacagt cctcaccaaa tccitgatgg agaaaactgc acactgatag atgctctatt gggagacca cattgtgatg gcttccaaaa taaggaatgg  
 301 gacctttttg ttgaacgcag caaagcctac agcaactggt acccttatga tgtgccgat fatgcctccc ttaggtcact agttgcctca tccggcacc  
401 tggagttaa caatgaaagc tcaatfaga ctggagtcgc tcagaatgga acaagctctt ctgcaaaaag gagatctatt aaaagtittt ttagtagatt  
501 gaattgggtg caccaattaa aatacagata tccagcactg aactgacta tgccaacaa fgacaaattt gacaaattgt acattgggg ggttcaccac  
601 cggagtacgg acagtgacca aaccagccta tatacccaag catcaggag agtcacagtc tctacaaaa gaagccaaca aactgtaate cgaatatcg  
701 gatccagacc ctgggtaagg ggtatctcca gcagaataag catctatfag acaatagtaa aaccgggaga catactittg attaacagca cagggaatct  
801 aattgctcct cggggttact tcaaaatagc aagtgggaaa agctcaataa tgaggtcaga tgcaccatt ggcaaatgca atctggaat catcactcca  
 901 aatggaagca ttccaatga caaacattt caaaatgtaa acaggatcac atagggggcc tgtcccagat atgttaagca aaactctg aaattggcaa  
 1001 cagggatgcg gaatgacca gagaacaaa ctagaggcat attcggcgca atcgcgggtt tcatagaaaa tggttgggag ggaatgatgg acggttggt  
 1101 cggtttcagg catcaaaat ctgagggcac aggacaagca gcagatctta aaagcactca agcagcaatc aaccaaatca acgggaaact gaataggtta  
 1201 atcgagaaaa cgaacgagaa attccatcaa attgaaaaag aattctcaga agtagaaggg agaattcagg acctcgagaa atatgttgag gacactaaaa  
 1301 tagatctctg gtcgtacaac gcgagcttc ttgttgcct ggagaaccaa catacaattg atctaactga ctcagaatg aacaactgt ttgaaagaac  
 1401 aaggaagcaa ctgagagaaa atgctgagga tatgggcaat ggttgttca aaatatacca caaatgtgac aatgctgca tagggtcaat cagaatgga  
 1501 acttatgacc atgatgata cagagacgaa gcattaaaca accggttcca gatcaaggt gttgagctga agtcaggata caagattgg atcctatgga  
 1601 tttcctttgc catatcatgt tttttgcttt gtgtgtttt gctggggttc attatgtggg cctgcaaaa aggcaacatt aggtgcaaca ttgcatfag  
 1701 a

(그림 7) H3 단백질의 아미노산서열 및 H3 유전자의 염기서열

상기의 부위를 PCR을 이용하여 증폭시킨 뒤, BamHI/SalI 제한효소를 이용하여 절단한 후, pQE30과 pGEX 4T-1 vector에 각각 클로닝하였다

(A) pQE30/H3(91-261)

From 115 to 690. (H3) Translation 191 a.a. MW=21602.84

```

ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC gga tcc agc aaa gcc tac agc aac tgt tac cct tat gat gtg ccg gat tat gcc tcc ctt
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu

agg tca cta gtt gcc tca tcc ggc acc ctg gag ttt aac aat gaa agc ttc aat tgg act gga gtc gct cag aat gga aca agc tct tct
Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ser

tgc aaa agg aga tct att aac agt ttc ttt agt aga ttg aat tgg ttg cac caa tta aaa tac aga tat cca gca ctg aac gtg act atg
Cys Lys Arg Arg Ser Ile Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Gln Leu Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met

cca aac aat gac aaa ttt gac aaa ttg tac att tgg ggg gtt cac cac ccg agt acg gac agt gac caa acc agc cta tat acc caa gca
Pro Asn Asn Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Thr Gln Ala

tca ggg aga gtc aca gtc tct acc aaa aga agc caa caa act gta atc ccg aat atc gga tcc aga ccc tgg gta agg ggt atc tcc agc
Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Ile Ser Ser

aga ata agc atc tat tgg aca ata gta aaa ccg gga gac ata ctt ttg att aaa agc aca ggg aat cta att gct cct ccg ggt tac ttc
Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Lys Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe

aaa ata cga gtc gac CCT GCA GCC AAG CTT AAT TAG
Lys Ile Arg Val Asp Pro Ala Ala Lys Leu Asn End

```

(B) pGEX4T-1/H3(91-261)

H3N2\_107-277\_pGEX4T-1.seq From 258 to 1478. Translation 406 a.a. MW=46806.66

```

atg tcc cct ata cta ggt tat tgg aaa att aag gcc ctt gtg caa ccc act cga ctt ctt ttg gaa tat ctt gaa gaa aaa tat gaa gag
Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu

cat ttg tat gag cgc gat gaa ggt gat aaa tgg cga aac aaa aag ttt gaa ttg ggt ttg gag ttt ccc aat ctt cct tat tat att gat
His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp

ggt gat gtt aaa tta aca cag tct atg gcc atc ata cgt tat ata gct gac aag cac aac atg ttg ggt ggt tgt cca aaa gag cgt gca
Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala

gag att tca atg ctt gaa gga cgc gtt ttg gat att aga tac ggt gtt tgc aga att gca tat agt aaa gac ttt gaa act ctc aaa gtt
Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val

gat ttt ctt agc aag cta cct gaa atg ctg aaa atg ttc gaa gat cgt tta tgt cat aaa aca tat tta aat ggt gat cat gta acc cat
Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His

cct gac ttc atg ttg tat gac gct ctt gat gtt gtt tta tac atg gac cca atg tgc ctg gat cgc ttc cca aaa tta gtt tgt ttt aaa
Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys

aaa cgt att gaa gct atc cca caa att gat aag tac ttg aaa tcc agc aag tat ata gca tgg cct ttg cag gcc tgg caa gcc agc ttt
Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe

ggt ggt ggc gac cat cct cca aaa tgc gat ctg gtt ccg cgt gga tcc agc aaa gcc tac agc aac tgt tac cct tat gat gtg ccg gat
Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp

tat gcc tcc ctt agg tca cta gtt gcc tca tcc ggc acc ctg gag ttt aac aat gaa agc ttc aat tgg act gga gtc gct cag aat gga
Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asn Gly

aca agc tct tct tgc aaa agg aga tct att aac agt ttc ttt agt aga ttg aat tgg ttg cac caa tta aaa tac aga tat cca gca ctg
Thr Ser Ser Ser Cys Lys Arg Arg Ser Ile Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Gln Leu Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu

aac gtg act atg cca aac aat gac aaa ttt gac aaa ttg tac att tgg ggg gtt cac cac ccg agt acg gac agt gac caa acc agc cta
Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu

tat acc caa gca tca ggg aga gtc aca gtc tct acc aaa aga agc caa caa act gta atc ccg aat atc gga tcc aga ccc tgg gta agg
Tyr Thr Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg

ggt atc tcc agc aga ata agc atc tgg aca ata gta aaa ccg gga gac ata ctt ttg att aaa agc aca ggg aat cta att gct cct
Gly Ile Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Lys Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro

cgg ggt tac ttc aaa ata cga gtc gac ctc gag cgg ccg cat cgt gac tga
Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Val Asp Leu Glu Arg Pro His Arg Asp End

```

(그림 8) H3의 91 ~ 261 aa 부위가 클로닝된 pQE30과 pGEX 4T-1 vector에서의 염기 및 아미노산 서열

## 2. H9N2 type 조류인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 단백질의 globular region 클로닝

Influenza A virus (A/ck/Korea/ms96/96)의 헤마글루티닌 (hemagglutinin, HA) 타입9(H9) 유전자(ACCESSION AF203008)를 이용하였다. 헤마글루티닌 단백질의 globular region (HA 101-257)을 증폭하기 위해서 BamHI 5' primer 와 HindIII 3' primer를 제작한 후 이 프라이머를 이용해서 PCR을 하였다. PCR 조건은 95°C 5분 / 95°C 1분, 50°C 30초, 72°C 1분, 30 cycles / 72°C 10분 및 프라이머 농도는 100pmole로 하였다. PCR product 는 T vector 에 클로닝 한 후 DH5α competent cell 에 transformation 하였다. colony를 배양하여 mini prep 한 후 BamHI, HindIII enzyme을 이용해서 확인하고 다시 염기서열을 확인하였다(그림 9).

### (A) H9N2 protein

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

```

MEIIALIAILVVTKTSNADKICIGYQSTNSTETVDTLVENNVPTVTHAKELLHTEHNGMLCATNLGHPLILDCTIEGLVYGNPSCDLLGGKWEYSIVER
SSAVNGMCYPGKVENLEELQSFSSARSYKRLLLFPDRITWVNTYGTGSKACNSFYRSMRWLTHKNGSYPIQDAQYTNWGNILFMWGIHHPPTDTEQI
NLYKKADTTTSTITTEDINRTFKPVIQPRPLVNGPTGRIDYYWVSLKPGQTLRVRNGLIAPWYGHILSGESHGRILKTDLSSGNCVVQCQTEKGLNTT
LPFHNVSKYAFGNCPKYVGVKSLKLAVGLRNVPAASYRGLFGAIAAGFIEGGWVPLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRESTQEAVDKITSKVNNIIDKMNKQ
YEIIDHEFSEIEARLNMNNKIDDIQDIWAYNAELLVLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAIEDGKGFELYHKDDQCMETIRNGTYDRLKY
EESKLERQKIEGVKLESEETYKILTIYSTVASSLVAVGFAAFMFWAMNSGSCRNICI
  
```

### (B) H9N2 gene

```

1 atggaataa tagcactaat agctatactg gtagtgacaa aaacaagcaa tgcagataaa atttgcatg gctaccagtc aacaaactcc acagaactg
101 ttgatacct agtagaaaac aatgtccctg tgacacatgc caaagaatg ctccacacag agcacaatgg aatgctatg gcaacaaacc tggggcacc
201 tctcactcta gacacctgca ccatcgaagg gttggtgtac ggcaaccctt cctgtgatit gctactggga gggaaagaat ggtcttacat tgtcgaaga
301 tcatcagctg tcaatgggat gtgtaccct ggaaggttag agaactcaga agaactccag tcattttca gctccgctcg ctctcaaaa agactcctgc
401 tctttcaga cagaacttgg aatgtgactt acactgggac aagcaagca tgttcaaact cattctacag aagatgaga tggctgacac acaagaacgg
501 ttcttaccct attcaagcgc ccaatatac caacgattgg gggaagaata ttcttctcat gtgggcata caccaccac ctaccgatac agagcaata
601 aatctataca aaaaagccga tacaacaaca agtatacaaa cggaagatat caatogaact ttcaaaccag tgatagggcc aagcctctt gtcaatggtc
701 caacaggag aatgattat tattggtcag tactaaagcc aggccagaca ctgagagtga gatccaatgg gaatctaatt gcccctagg atggacacat
801 tcttcagga gaaagccatg gaagaactct gaagaccgat ttgagtagtg gcaactgcgt agtacaatgc caaactgaga aaggtggttt gaacacgacc
901 ttgccattcc acaatgtcag caagtatgca ttgggaact gcccacaata tgtggagtg aagagtctca aactggcagt tggctaggg aatgttctg
1001 ctgcatcata tagagggtc ttcggtgcca tagctggatt catagaagge ggttggccag gactagtgc aggctggtac gggtttcage attcaatga
1101 tcaaggggtt ggaatggcgg cagataggga atcaactcaa gaagcagt g acaagataac atccaaagta aataacataa tgcacaaaat gaacaagcag
1201 tatgaaatca ttgatcatga gttcagtgaa attgaagcca gactcaatat gatcaacaat aagattgatg accaaatata ggacatctgg gcgtacaatg
1301 cagaattact ggtactgctt gaaaatcaga aaacactcga tgagcatgat gcaaatgtga ataactgtga taataaggtg aagagagcat tgggttcaaa
1401 tgcaatagag gatggaaagg gatgcttcca gttgtatcac aaatgtgat atcaatgcat ggaacaatt agaaacggga cttatgacag gctaaagtat
1501 gaagaagaat caaaactaga aaggcagaaa atagaagggg tgaactgga gctcgaagaa acttacaaga tccttaccat ttattgact gtcgctcat
1601 ctcttctgct tgcagtgggg ttgctgct tcatgtctg ggccatgtcc aatggattct gcagatgcaa cattgtata taa
  
```

(그림 9) H9 단백질의 아미노산서열 및 H9 유전자의 염기서열  
(The A/ck/Korea/ms96/96 Hemagglutinin sequence)

From 115 to 645. Translation 169 a.a. MW=19485.4 ???(7 extra codons after stop)

```
ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC TCA GCT GTC AAT GGG ATG TGC TAC CCT GGA AGG GTA GAG AAT CTG GAA GTA CTC
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ser Ala Val Asn Gly Met Cys Tyr Pro Gly Arg Val Glu Asn Leu Glu Val Leu

AGA TCT TTT TTC AGT TTT GCT CGC TCC TAC AAA AGA CTC CTG CTC TTT CCA GAC CGC ACT TGG AAT GTG ACT TAC ACT GGA ACA AGC AAA
Arg Ser Phe Phe Ser Phe Ala Arg Ser Tyr Lys Arg Leu Leu Leu Phe Pro Asp Arg Thr Trp Asn Val Thr Tyr Thr Gly Thr Ser Lys

GCA TGC TCA GAT TCA TTC TAC AGA AGT ATG AGA TGG CTG ACA CAC AAG AGC AAT TCT TAC CCT ATT CAA GAC GCT CAA TAT ACC AAC GAT
Ala Cys Ser Asp Ser Phe Tyr Arg Ser Met Arg Trp Leu Thr His Lys Ser Asn Ser Tyr Pro Ile Gln Asp Ala Gln Tyr Thr Asn Asp

TGG GGA AAG AAT ATT CTC TTC ATG TGG GGC ATA CAC CAT CCA CCT ACT GAT ACT GAG CAA ATG AAT CTA TAC AAA AAA GCT GAT ACA ACA
Trp Gly Lys Asn Ile Leu Phe Met Trp Gly Ile His His Pro Pro Thr Asp Thr Glu Gln Met Asn Leu Tyr Lys Lys Ala Asp Thr Thr

ACG AGT ATA ACA ACG GAA GAT ATC AAT CGG ACT TTC AAA CCA GTG ATA GGA CCA AGG CCC CTT GTC AAT GGT CAA CAA GGG AGG ATT GAT
Thr Ser Ile Thr Thr Glu Asp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Pro Val Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Gln Gln Gly Arg Ile Asp

TAT TAT TGG TCA GTA CTA AAG CCA GGC CAG ACA TTG CGA ATA ANA TCC AAT GGA ATC TAA TTG CCC CAA GCT TAA TTA GCT
Tyr Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Ile Xxx Ser Asn Gly Ile * Leu Pro Gln Ala * Leu Ala
```

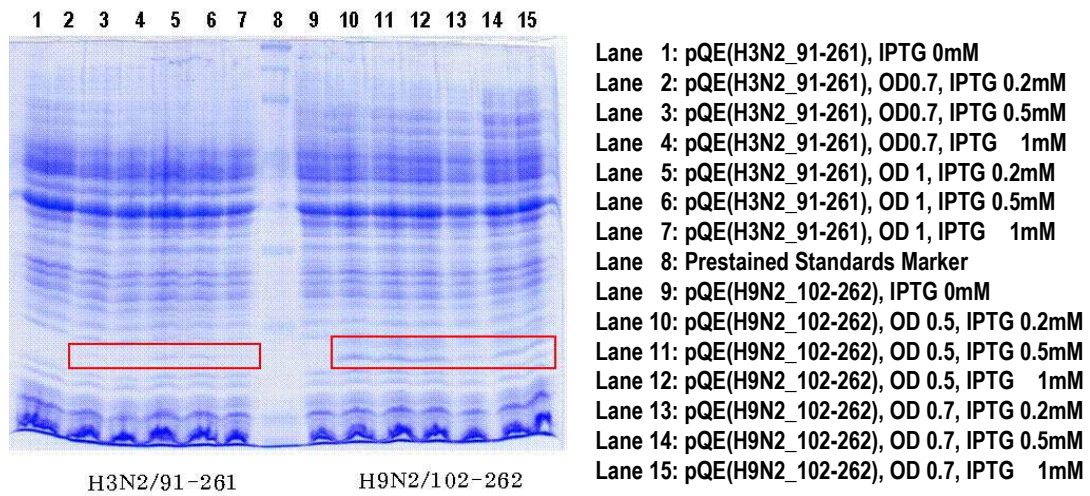
(그림 10) H9의 102 ~ 262 aa 부위가 클로닝된 pQE30 vector에서의 아미노산 서열

### 3. H3 및 H9 헤마글루티닌 단백질의 globular region 분리

#### 가. pQE vector를 이용한 H3 및 H9 단백질의 대장균내 발현

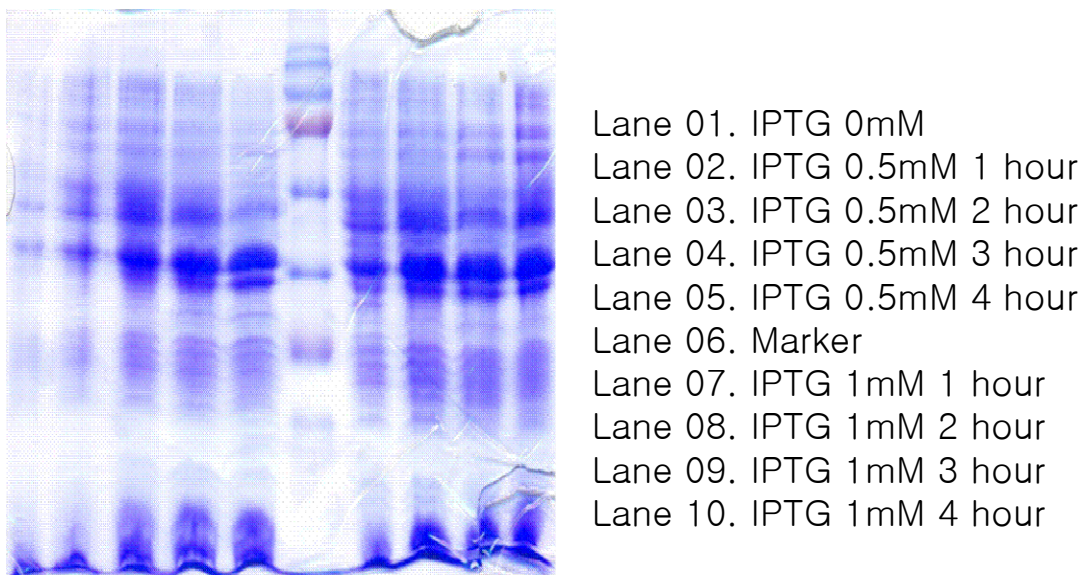
상기의 과정을 통해 클로닝한 H3 및 H9 수용체 단백질이 발현 vector에서 정상적으로 발현되는지를 확인하였음. 이 발현벡터에서 발현되는 단백질에는 앞부위에 Histidine hexamer가 존재하여, 추후 column으로 분리가능케 되어 있음.

promoter inducer인 IPTG의 농도 최적조건을 조사하기 위하여, 여러 농도의 IPTG 처리시 발현되는 단백질을 측정 측정하였음. lane 1~7은 H3, lane 9~15는 H9 수용체를 나타내고 있음(그림 11). 세포를 OD 0.5, OD 0.7 또는 OD 1.0으로 키운 후, 0.2~1.0 mM의 IPTG를 배양액에 첨가한 뒤, 추가 배양 후 세포를 lysis 시켜 세포내 발현된 과발현 단백질을 확인하였다.



(그림 11) pQE vector에서 IPTG 농도에 따른 H3 및 H9 단백질발현 양 측정

Promoter inducer인 IPTG 처리시간에 변화를 주어 발현되는 단백질의 양을 측정한 결과, induction time이 3시간에 달했을때 가장 많은 단백질이 발현되고 있음.

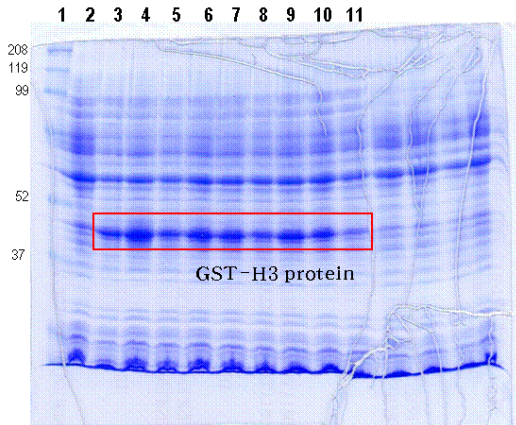


(그림 12) pQE vector에서 IPTG 처리시간에 따른 H3 단백질의 발현



### 나. pGEX4T-1 vector를 이용한 H3 단백질의 대장균내 발현

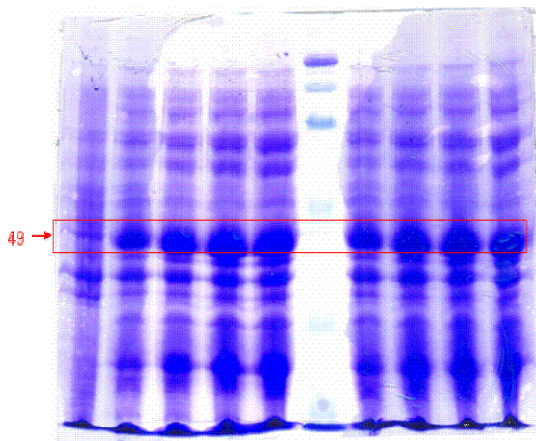
pGEX4T-1 vector 이용 시, IPTG 농도에 따라 발현되는 단백질의 양을 측정하였다 (그림 13).



Lane 1: Prestained Standards Marker  
 Lane 2: pGEX(H3N2\_91-261), IPTG 0mM  
 Lane 3: pGEX(H3N2\_91-261), OD0.5, IPTG 0.2mM  
 Lane 4: pGEX(H3N2\_91-261), OD0.5, IPTG 0.5mM  
 Lane 5: pGEX(H3N2\_91-261), OD0.5, IPTG 1mM  
 Lane 6: pGEX(H3N2\_91-261), OD0.7, IPTG 0.2mM  
 Lane 7: pGEX(H3N2\_91-261), OD0.7, IPTG 0.5mM  
 Lane 8: pGEX(H3N2\_91-261), OD0.7, IPTG 1mM  
 Lane 9: pGEX(H3N2\_91-261), OD 1, IPTG 0.2mM  
 Lane 10: pGEX(H3N2\_91-261), OD 1, IPTG 0.5mM  
 Lane 11: pGEX(H3N2\_91-261), OD 1, IPTG 1mM

(그림 13) pGEX4T-1 vector를 사용한 H3단백질의 발현

IPTG를 이용한 induction 시간에 변화를 주어 발현되는 GST-H3 단백질의 양을 측정하였으며, induction time이 3시간에 달했을 때 가장 많은 단백질이 발현되고 있음 (그림 14).

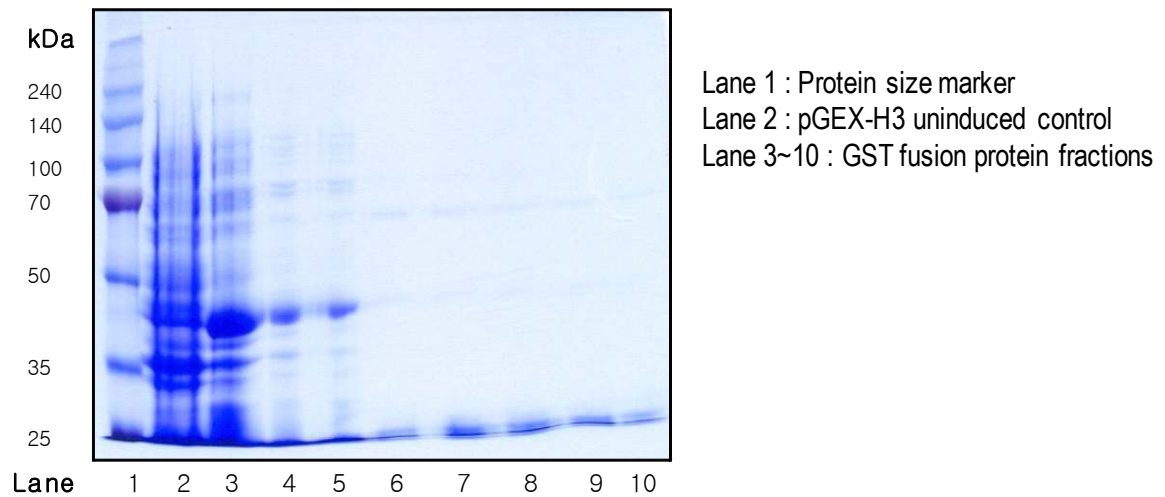


Lane 1 IPTG 0mM  
 Lane 2 IPTG 0.5mM 1hour  
 Lane 3 IPTG 0.5mM 2hour  
 Lane 4 IPTG 0.5mM 3hour  
 Lane 5 IPTG 0.5mM 4hour  
 Lane 6 Size Marker  
 Lane 7 IPTG 1.0mM 1hour  
 Lane 8 IPTG 1.0mM 2hour  
 Lane 8 IPTG 1.0mM 3hour  
 Lane 10 IPTG 1.0mM 4hour

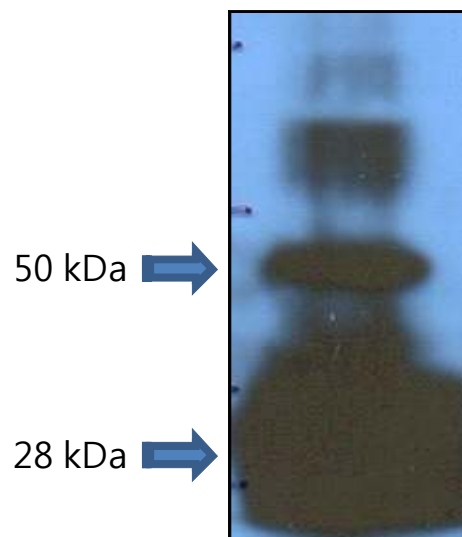
(그림 14) pGEX4T-1 vector에서 IPTG 처리시간에 따른 H3 단백질의 발현

#### 다. H3 헤마글루티닌 단백질의 분리

앞의 결과를 바탕으로 H3를 pGEX 벡터를 사용하여 분리하였다. pGEX에서 과발현시킨 H3 단백질을 GST-affinity column을 사용하여 분리, 정제하였다(그림 15). 이후 GST 항체를 이용하여 확인하였다(그림 16).



(그림 15) 과발현시킨 H3 발현단백질의 fractionation



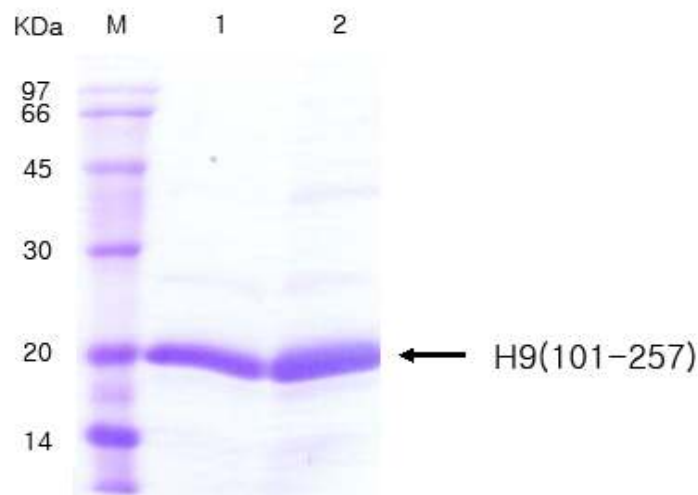
(그림 16) anti-GST antibody를 이용한 Western blot



## 라. H9 헤마글루티닌 단백질의 분리

### (1) H9 단백질의 정제

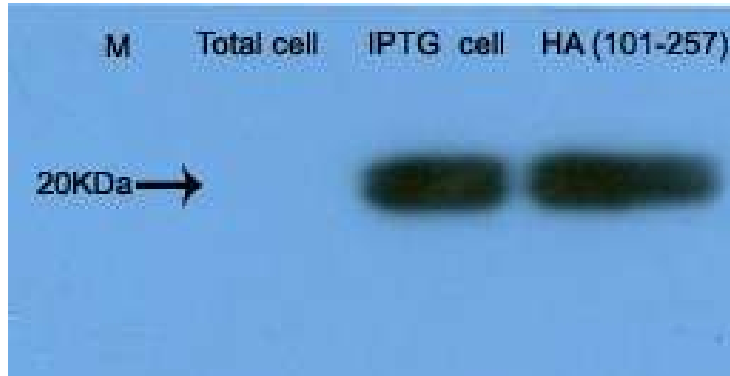
확인된 insert 는 발현벡터인 pQE30 vector 에 클로닝한 후 BL26 competent cell 에 transformation 하였다. 형성된 콜로니를 subculture해서 mini prep 한 후 다시 enzyme으로 확인 하였다. HA(101-257) protein을 정제하기 위해서 확인된 H9 cell(BL26)을 LB medium 200ml culture 한 후 1mM IPTG induction을 하였다. 단백질 정제에 사용한 버퍼는 denaturation 방법으로 8M Urea를 이용하였고 Ni-NTA column으로 정제하였다. 정제한 단백질은 15% SDS PAGE gel을 이용하여 20KDa size를 확인 하였다(그림 17).



(그림 17) Purification of H9

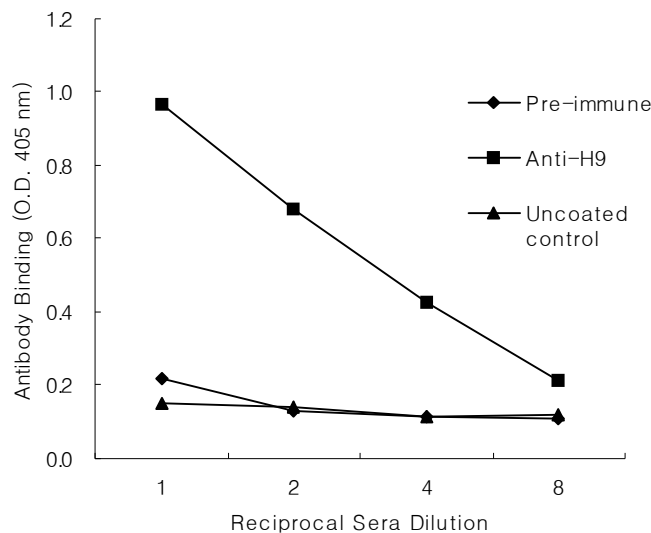
### (2) 효소면역측정법과 면역블롯을 통한 항-H9 펩티드 항체 효과 분석

H9(101-257) 펩티드 단백질에 대한 항체를 제작하기 위해서 순수 정제된 단백질을 6주령 BALB/c 생쥐에 주사한 후 면역반응을 유도하여 항체를 제작하였다. 이렇게 얻은 항체의 H9 펩티드에 대한 결합력을 알아보기 위해서 면역블롯과 효소면역측정법으로 확인하였다. 면역블롯을 통해서 H9 펩티드에 대한 항-H9 펩티드 항체의 결합력이 높음을 확인 하였다(그림 18).



(그림 18) Confirmation of H9(101-257) protein expression by immunoblotting with anti-H9 serum

또한, 96well 플레이트에 HA(101-257) 펩티드를 코팅하고 항-H9펩티드 항체를 첨가한 후, 항 마우스 항체에 결합된 HRP의 효소 활성도를 효소면역측정법으로 확인하였다(그림 19). 측정 결과 면역반응을 하지 않은 항체를 네거티브로 사용하였는데 이보다 훨씬 높은 반응을 확인 할 수 있었다. 항체를 제작하는 과정에서 H9 펩티드 단백질에 어주번트를 넣어준 것과 넣어주지 않은 생쥐로부터 항체를 각각 얻었다. 이때, 어주번트를 넣어 준 생쥐에서 얻은 항체가 훨씬 높은 결합력을 나타내었다.



(그림 19) Immunogenicity of H9

## 제 2 절 A22 aptamer의 특성분석

### 1. A22 염기서열 분석

이전 연구결과로 얻은 H3에 affinity가 있는 A22 aptamer의 경우, 30 base의 염기 중 특정 염기서열의 참여도를 확인하기 위하여 임의로 염기서열을 변화시킨 oligo를 합성하여 H3와의 affinity를 조사하였다. 그림 20은 A22의 염기서열을 바꾼 염기서열을 나타내었다.

5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-(N)30-TATGGTCGAATAAGTTAA-3'

A22: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGCTGAGTCTCAAACCGCAATACACTGGTTGTATGGTCGAATAAGTTAA-3'

A22-1: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGTTGAGTTTAAAATGTAAATATATGGTTGTATGGTCGAATAAGTTAA-3'

A22-2: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGCCGAGCCCAAACCGCAACACACCGCCGTATGGTCGAATAAGTTAA-3'

A22-3: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGCTAAATCTCAAACCAATACACTAATATATGGTCGAATAAGTTAA-3'

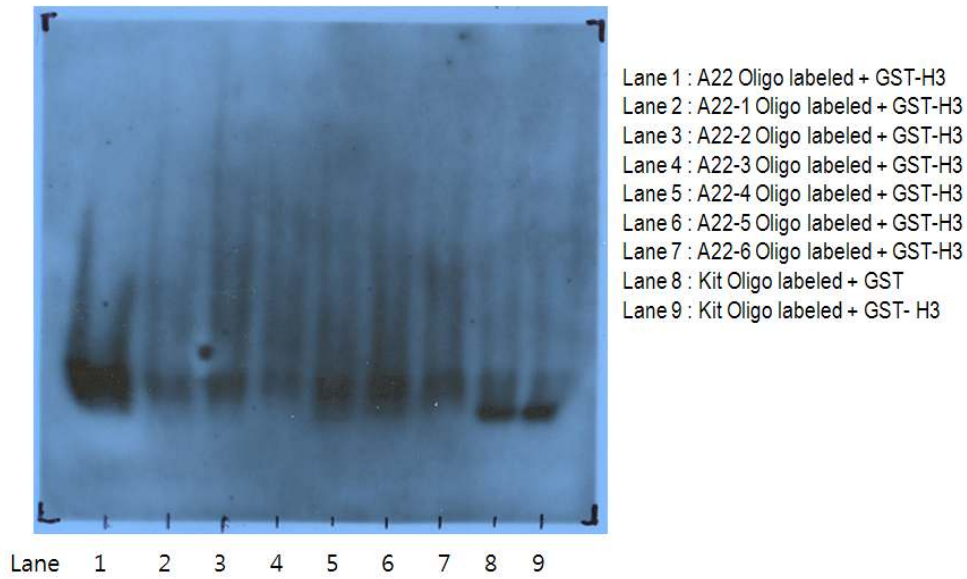
A22-4: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGCTGGGTCTCGGGCCGCGGTGCGCTGGTTGTATGGTCGAATAAGTTAA-3'

A22-5: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGCTGAGTCTCAAACCGCAATACACTGGGGGTATGGTCGAATAAGTTAA-3'

A22-6: 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGGGGAGGGGGAAAACCGCAATACACTGGTTGTATGGTCGAATAAGTTAA-3'

(그림 20) A22 aptamer의 변이서열

앞에서 분리한 H3단백질과 염기서열을 변화시킨 aptamer와의 결합정도를 측정하였는데, 전반적으로 볼때 H3단백질과 A22 aptamer는 결합력이 미미하였다(그림 21). 변이시킨 A22 aptamer의 염기서열 또한 H3와의 결합력은 염기서열에 따라 약간 증가하는 것을 관찰하였다 (Lane 3와 Lane 7).



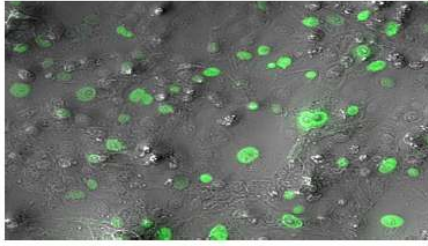
(그림 21) 변이시킨 A22 aptamer와 H3 단백질과의 결합력 측정

## 2. A22의 조류인플루엔자 바이러스 감염억제 효과

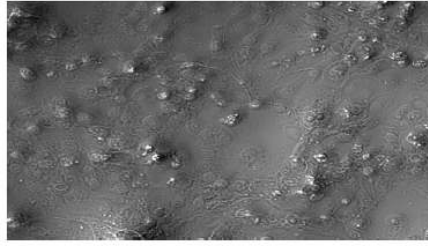
A22 Aptamer의 세포내 바이러스 감염 억제능을 조사하기 위하여 MDCK 세포에 사람의바이러스인 H3N2 타입의 인플루엔자 바이러스 (Port Chalmers strain)를 감염시키고, MTT 법으로 세포의 생존률을 측정한 결과 매우 효과적으로 바이러스의 감염을 억제시켰다.

A22는 조류인플루엔자 바이러스의 감염도 효과적으로 억제하였다. 바이러스에 대한 항체에 형광물질을 부착하고 형광현미경으로 관찰한 결과 바이러스가 현저히 감소하는 것을 관찰하였다(그림 22). 하지만, 1차년도에서 신규 발굴한 Aptamer인 A3의 경우엔 바이러스 감염 억제능에서 만족할 만한 효과를 얻지 못했다.

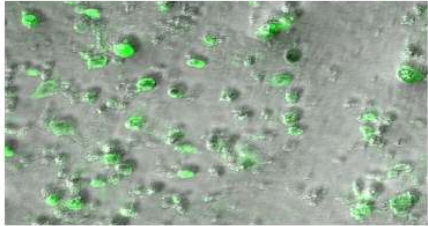
Cells infected with H3N2



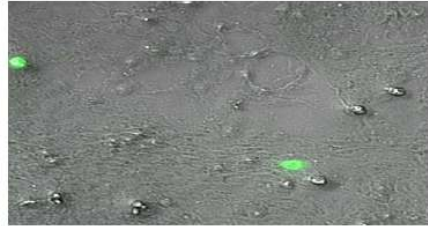
Cells infected with H3N2 + A22



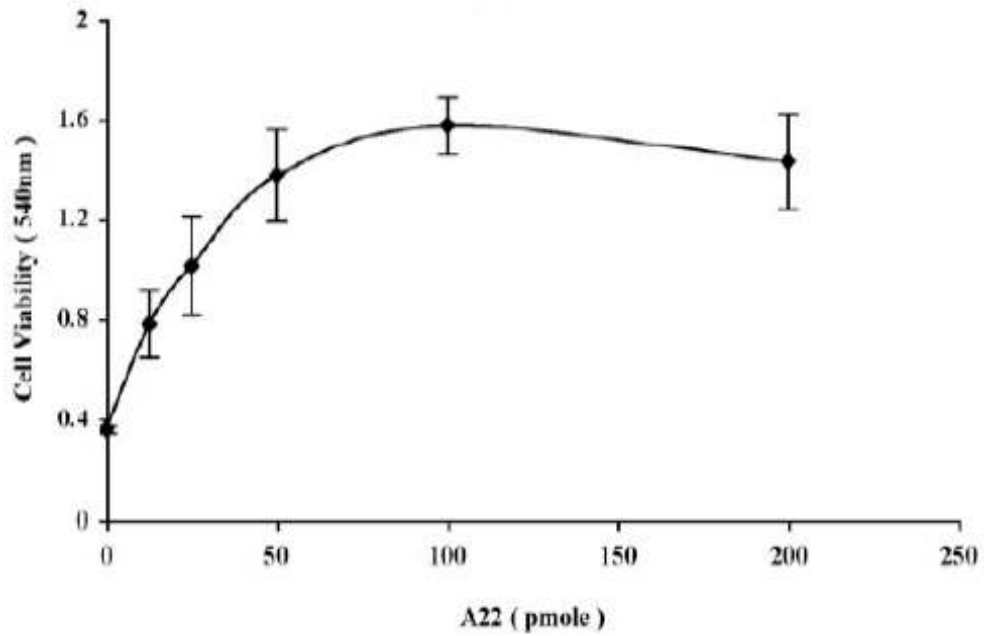
Cells infected with Avian flu



Cells infected with Avian flu + A22



Green spots: virus (fluorescent microscope, DFA)  
Gray spots: Cells



(그림 22) Aptamer A22에 의한 세포의 바이러스 감염 억제

### 3. A22의 항 AIV 효과

#### 가. A22의 SPF 계란에서의 효과

##### (1) 목적

A22의 조류 인플루엔자(Avian Influenza: AI) 바이러스에 대한 항 바이러스 작용을 발육란을 이용하여 검증하는 것을 목적으로 한다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 공시동물

미국의 SPAFAS 회사로부터 수입된 SPF(Specific Pathogen Free)계란을 국내 수입업체를 통하여 구입한 후 충북대학교 수의과대학 조류질병학교실의 부화기(윤선부화기, 수원)에서 발육시켜 11일령이 되었을 때 시료를 접종하였다.

###### (나) 바이러스 및 배양

국내에서 분리되어 특성이 규명된 A/CK/ANYANG/MS96(H9N2) AI 바이러스를 SPF 계란에서 증식시킨 후 Speaman-Karber 방법을 이용하여 농도(107.5EID50/ml)를 측정 후 본 실험에 사용하였다.

###### (다) 공시시료 및 희석

공시시료는 시험의뢰자가 제공한 A22와 관련된 물질이며 실제 실험농도는 원액을 단계별 희석하여 시험에 공시하였다. 실험에 대한 대조시료로서 Oseltamivir phosphate (Tamiflu, Roche)를 사용하였다. Tamiflu는 1mg/ml의 농도를 원액으로 하여 단계별 희석을 하였다.

### (3) 실험결과 및 고찰

표 3. A22의 AI 바이러스에 대한 중화능 비교

구분	음성대조	양성대조	Tamiflu (mg/ml)			A22(pmol)		
			3	0.3	0.03	1000	500	250
시료	-	-						
바이러스	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
HA 양성율	0/3	3/3	1/3	0/3	3/3	3/3	2/3	2/3
HA 역가 범위	0	2-5	0-4	0	3-7	4-7	0-6	0-7

바이러스를 투여한 양성대조군의 경우 접종한 SPF 계란은 혈구응집검사에서 100% 양성으로 판정되어 바이러스의 감염에는 문제가 없는 것으로 판단이 되었다. 음성대조군의 경우에도 혈구응집검사에서 음성으로 판정되어 시험상 문제점은 발견되지 않았다.

대조물질인 Tamiflu 접종군의 경우 0.3 - 3mg/ml 농도에서 대부분 혈구응집능력이 나타나지 않아 접종한 바이러스를 중화한 것으로 판단이 되었다. 그러나 0.03mg/ml의 경우에는 혈구응집능력이 검출되어 바이러스를 중화하지 못한 것으로 판단이 되었다.

시험물질인 A22는 500 pmol과 250 pmol 농도에서 일부 계란이 혈구응집능력이 나타나지 않았지만 이것은 바이러스에 대한 중화능력보다는 시험계란에 대한 처리에서의 문제점으로 나타나 실질적으로 A22는 시험바이러스에 대한 중화능력이 거의 없는 것으로 판단이 되었다. 즉, 대조 시험물질인 Tamiflu에 비하여 바이러스 중화능력이 떨어진 것으로 판단된다.

## 나. A22의 SPF 닭에서의 효과

### (1) 목적

닭에 대한 A22의 효능을 확인하기 위하여 6주령의 무균닭(SPF: Specific Pathogen Free) 54수를 선정하여 시험군과 대조군(음성, 양성)으로 나누어 실시한다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 공시동물

6주령 SPF 닭은 미국에서 수입된 SPF 계란을 본 대학의 조류질병학 교실에서 부화시켜 양압으로 유지되는 Isolater (Three shine, Seoul Korea)에서 6주령까지 무균상태로 사육한 후 본 실험에 공시하였다.

#### (나) 바이러스 및 배양

국내에서 분리되어 특성이 규명된 A/CK/ANYANG/MS96(H9N2) 인플루엔자 바이러스를 계태아 이용하여 증식시킨 후 107.5EID<sub>50</sub>/ml의 농도로 본 실험에 공격균주로서 사용하였다.

#### (다) 공시시료 및 회석

공시시료는 여러 시험물질 중 시험여건상 A22만 선정하였다. 음수로 투여를 하여야 하며 실험기간동안 외부와 격리를 하여야 하기 때문에 1회 접종방법을 사용하였다. 공격접종 전에 계란접종에서 사용한 A22를 1회 투여를 하여 항바이러스에 대한 효과를 평가하였다.



(라) 검사항목

① 임상증상 및 폐사율

접종 후 설사 등의 임상증상을 매일 오전 오후로 나누어 2회 관찰하였다.

② 증체량

시험 전과 접종 후 5일, 14일에 체중을 측정하여 투여군간 증체량을 비교하였다.

③ 혈청검사

접종전에 대조군에서 채혈을 하여 검사를 하였으며 시험종료 시 남아있는 모든 개체에 대하여 채혈후 H9에 대한 혈구응집억제 반응을 실시하였다.

④ 공격 바이러스의 재분리 및 역가검사

공격접종 5일째에 공격접종바이러스를 재분리하기 위하여 기관과 맹장편도를 채취한 후 qRT-PCR로 Ct값을 측정하여 바이러스역가로 환산하였다.

(마) 실험개요

표 4. SPF 닭에서의 A22 투여에 따른 약병원성 조류인플루엔 바이러스에 대한 항바이러스 효과비교

구분	접종	마리수	접종 방법	평가항목				
				임상증상	증체량	폐사율	혈청검사	RT-PCR
A22-A	A22	10수	공격전					
A22-B	A22	10수	공격후					
Cont	무접종	10수	-					
Chal	MS96	10수	-					
TA	Tamiflu	3수	공격후					

\* LPAI 공격접종은 수당 0.1ml( 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub>/수)를 투여

### (3) 실험결과

(가) A22의 MS96에 대한 방어능 비교

#### ① 조직 내 바이러스 함량 비교

표 5. Comparison of gene titer among groups after challenge with MS96

Group	Days post inoculation (gene titer*)							
	0		3		5		10	
	Trachea	Cloaca	Trachea	Cloaca	Trachea	Cloaca	Trachea	Cloaca
A22-A	nt*	0	2.3	4.7	2.2	4.9	0.0	1.7
A22-B	nt	0	2.1	2.6	0.6	4.3	0.0	2.1
Cont	nt	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Chal	nt	0	2.8	4.2	1.4	3.8	0.0	1.4
TA	nt	nt	nt	nt	3.1	3.9	nt	nt

\* gene titer: 50% egg infectious dose converted from Ct value of quantitative real-time PCR

\*\* nt: not tested

AI virus 무접종 계군(Cont)은 시험기간내 공격바이러스인 MS96 AIV가 기관, 총배설강에서 분리되지 않아 본 실험의 계군간 오염이 없었다는 것을 알 수 있다. 치료 무처리 공격접종군은 시험기간내 바이러스가 대부분 분리되어 본 실험에 사용한 AIV의 공격이 성공적으로 이루어진 것을 알 수 있다.

치료대조군으로 사용한 Tamiflu는 실험동물의 충분하지 않아 공격후 가장 AIV가 가장 많이 배출되는 5 DPI에 만 치료를 채취하였다. 공격접종전 각 그룹에서 바이러스를 총배설강으로부터 분리한 결과 모두 음성임으로 공격접종전에 감염된 것은 없었던 것으로 판단된다. 공격접종 후 바이러스의 재분리는 시간이 지나갈수록 기관보다는 총배설강에서 주로 분리가 되며 접종 10일에는 총배설강에서도 바이러스

의 분리가 제한적이어서 전체적인 실험은 저병원성 AI의 전형적인 감염경과를 거친 것으로 판단되었다. 공격접종전 혹은 공격접종 후 시료 투여 계군 모두 실험기간내 바이러스가 계속 분리되어 실제 시료의 바이러스 중화 혹은 면역증강효능은 인정되지 않았다.

② 혈액내 임상병리수치의 비교

표 6. Comparison of clinical chemistry among groups after challenge with MS96

Group	AST(GOT)				ALT(GPT)				ALP			
	0	3	5	10	0	3	5	10	0	3	5	10
A22-A	340	184	194	233	5.7	2.0	3.4	2.5	2904	2100	2182	4157
A22-B	194	150	211	187	3.3	2.7	2.6	2.3	2783	2044	1741	4446
Cont	190	304	170	229	2.3	2.7	3.0	3.0	3039	2396	2035	3035
Chal	221	180	200	176	3.0	2.0	3.7	2.0	2637	1977	2004	4272
TA	nt	nt	146	nt	nt	nt	3.3	nt	nt	nt	2317	nt

본 실험은 A22의 바이러스에 대한 직접적인 중화능력보다도 간접적인 감염에 대한 피해 최소화 효능을 보기 위하여 간기능과 관련된 혈액내 화학치를 비교하였다. 일반적으로 닭에서의 정상혈액화학치는 품종, 일령 등에 따라 매우 다양하여 정상범위가 넓다.

AST의 정상평균과 표준편차는  $179 \pm 103$ , ALT는  $8 \pm 4$ 이며 ALP는  $2500 \pm 2600$ 이다. 대부분의 임상병리수치는 ALT를 제외하고는 대부분 정상범위 내에 위치하고 있다. 특히, 공격접종을 하지 않은 계군과 공격접종을 한 계군사이에 특별한 차이가 나타나지 않아 A22, 타미플루의 효능은 인정이 되지 않았다. ALT의 경우 정상범위의 범위 내에서 벗어나 있지만 모든 그룹들이 비슷한 수준을 나타내고 있어 A22에 의한 효능은 인정되지 않고 있다.

③ MS96 접종 후 항체양성을 및 역가 비교

표 7. Comparison of HI titer (Log2) among groups after challenge

Group	Days post inoculation			
	0	3	5	10
A22-A	0 (0/3)*	0.7 (2/3)	3 (5/5)	5.3 (3/3)
A22-B	0 (0/3)	0.7 (2/3)	2 (5/5)	5 (2/2)
Cont	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)
Chal	0 (0/3)	0 (0/3)	4.3 (3/3)	5.7 (2/2)
TA	nt	nt	1 (2/3)	nt

\* Log 2 HI titer (# of positive / # of tested)

공격접종 후 바이러스의 감염을 확인하기 위해서는 항체를 확인하여야 한다. 본 실험에서는 공격접종 전에 바이러스의 항체가 검출되지 않아 감염이 되지 않은 것을 확인할 수 있었으며 공격접종 후에 채취한 시료에서는 대부분 항체가 형성되어 감염이 성공적으로 이루어진 것을 알 수 있었다. 또한, 실험기간동안 무접종대조군은 항체가 검출되지 않아 계군 간 교차오염이 없었다는 것을 확인할 수 있었다. 실험군 간의 HI역가의 차이는 인정이 되지 않았다.

④ MS96 접종 후 항체양성을 및 역가 비교

표 8. Comparison of B/B and S/B ratio among groups after challenge with MS96

Group	Days post inoculation							
	0		3		5		10	
	B/B*	S/B**	B/B	S/B	B/B	S/B	B/B	S/B
A22-A	nt	nt	5.2	2.7	5.0	2.8	6.9	2.6
A22-B	nt	nt	5.0	2.4	4.4	2.6	5.8	3.2
Cont	nt	nt	6.5	2.2	6.4	1.8	5.7	2.6
Chal	nt	nt	5.6	3.0	5.2	2.8	5.8	2.2
TA	nt	nt	nt	nt	6.3	3.7	nt	nt

\* BB ratio: bursal weight / body weight x 1000

\*\* SP ratio: spleen weight / body weight x 1000

저병원성 AI 바이러스의 면역억제에 대한 방어효능을 보기 위하여 면역기관인 F낭과 비장의 index를 비교하였다. 전체적으로 비교할 때 무접종군과 접종군간에 차이가 없어 A22의 효능보다는 공격접종주인 저병원성 AI MS96의 면역기관에 대한 병원성이 크지 않은 것을 알 수 있다.

### 제 3 절 H9 단백질과 결합하는 신규 aptamer 발굴

#### 1. 1차 신규 aptamer의 screening

왼쪽의 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3' 그리고 오른쪽의 5'-CGTATGGTCGAATAAGTTAA-3' 염기서열 사이에 위치하는 30개의 뉴클레오티드 무작위 서열을 포함하는 aptamer 라이브러리를 바이오니아 및 Operon에서 구입하였다. 라이브러리는 총 분자수 1018개 이상의 30개의 뉴클레오티드 무작위 분절을 포함하며 aptamer 라이브러리의 염기서열은 다음과 같다.

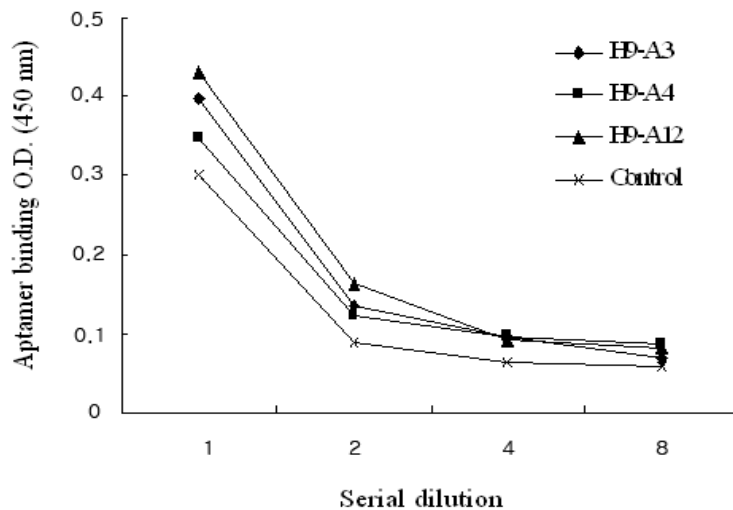
5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA - N30 - CGTATGGTCGAATAAGTTAA-3'

(N30은 무작위적 삽입 염기서열에 해당하는 30개의 뉴클레오티드)

정제된 H9 protein과 친화력을 갖는 aptamer를 선별하기 위하여 SELEX 방법을 사용하였다. 200ug H9 protein을 선별완충용액(w/o Urea) 500ul에 넣고 pH8.0에 맞추고 후 같은 볼륨으로 선별완충용액을 넣어주었다. Ni-NTA agarose 200ul를 넣어주고 4°C에서 30분 동안 rotor로 반응시켜주었다. ssDNA를 80°C에서 10분 denaturation한 후 ice에서 10분간 반응시켜준 후 50ul Ni-NTA agarose를 넣어주고 4°C에서 같은 방법으로 반응시켜주었다. 아가로즈와 반응시킨 단백질은 원심분리 후 아가로즈와 결합한 단백질만 회수해서 선별완충용액으로 워싱을 2회 해준 후 마지막으로 200ul 선별완충용액으로 서스펜션하였다. 아가로즈와 반응시킨 aptamer는 원심분리 후 아가로즈와 반응하지 않은 상층액을 회수하였다. aptamer 상층액과 선별완충용액으로 서스펜션한 200ul 중 50ul를 섞어준 후 37°C에서 30분간 반응시켜주었다.

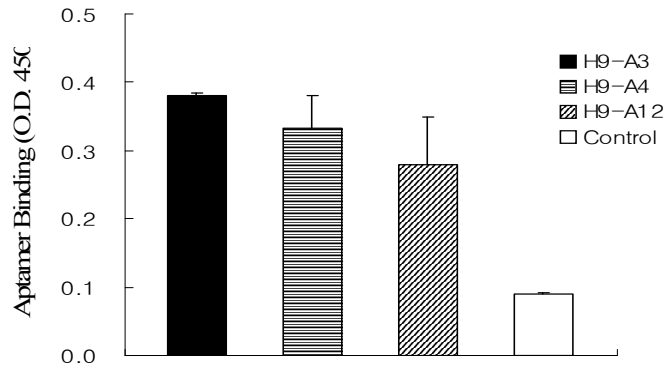
단백질과 결합한 ssDNA를 증폭하기 위해서 제작된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95℃ 5분 / 95℃ 1분, 40℃ 1분, 72℃ 1분, 30cycles / 72℃ 10분 및 100 pmole의 각 프라이머를 포함한다. 이 과정을 3차례 반복 한 후에 T-벡터에 클로닝을 하고 대장균 DH5α 균주에 형질전환을 시켰다. 형성된 콜로니는 subculture 한 후 mini prep 하였다.

4번의 결합과 PCR 증폭을 통하여 대조군에 비해 높은 결합력을 보이는 세 개의 Aptamer를 분리하고, 이에 대한 염기서열을 분석하였다(그림 23).



(그림 23) H9 단백질과 결합하는 1차 분리한 Aptamer의 결합능

세 종류의 Aptamer가 H9 타입의 조류인플루엔자 바이러스와 결합하는 지 여부를 조사하였다. 이를 위하여 조류인플루엔자 바이러스를 96 well 플레이트에 코팅하고 바이오틴에 결합된 Aptamer를 첨가한 후, 스트렙타비딘에 결합된 HRP 의 효소 활성도를 ELISA로 분석하였다(그림 24). 세 종류의 Aptamer 모두 바이러스에 대한 의미있는 결합력을 보였으며, 그 중 가장 높은 결합력을 보인 H9-A3를 분리하였다.

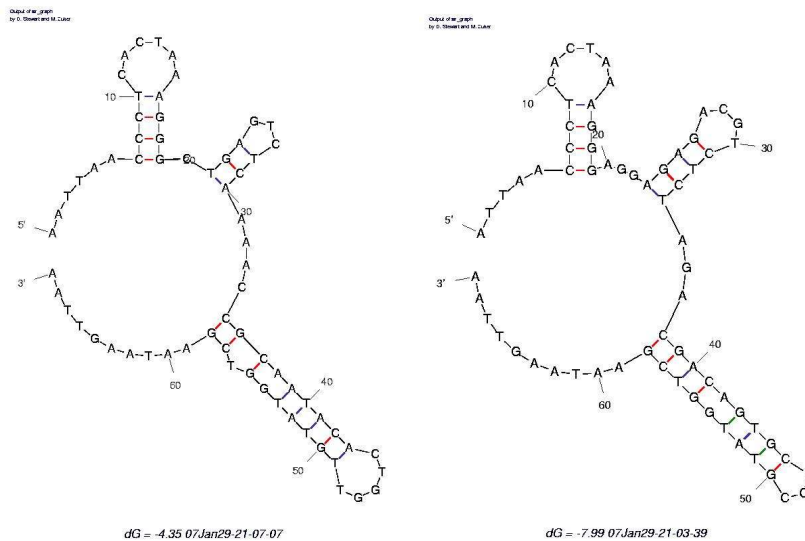


(그림 24) 1차 분리한 aptamer의 바이러스에 대한 결합력 분석

이렇게 얻은 H9-A3의 염기서열 및 2차원 구조를 결정하였다. H9-A3의 염기서열은 아래와 같으며,

5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGAGGAGAGACGTCTCTAGACGACAGTGCCCCGT  
ATGGTCGAATAAGTTAA-3'

흥미롭게도, H9-A3는 기존에 본 연구진이 분리한 사람의 H3 타입의 인플루엔자 바이러스에 결합하는 Aptamer (A22)와 2차구조가 유사함을 발견하였다.



(그림 25) H9-A3(왼쪽) 및 H3-A22(오른쪽)의 2차원 구조(모델)

이러한 결과는 상대적으로 잘 보존된 인플루엔자 바이러스의 숙주세포 인식부위에 작용하는 공통된 구조를 갖는 Aptamer가 존재함을 암시하며, 이러한 물질은 H5 타입 같은 고병원성 조류 인플루엔자를 포함하는 다양한 종류의 바이러스에 작용할 가능성을 제시한다.

## 2. 1차 신규 분리된 aptamer의 항 AIV 효과

### 가. A3 및 A4의 SPF 계란에서의 효과

#### (1) 목적

A22의 조류 인플루엔자(Avian Influenza: AI) 바이러스에 대한 항 바이러스 작용을 발육란을 이용하여 검증하는 것을 목적으로 한다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 공시동물

미국의 SPAFAS 회사로부터 수입된 SPF(Specific Pathogen Free)계란을 국내 수입업체를 통하여 구입한 후 충북대학교 수의과대학 조류질병학교실의 부화기(윤선부화기, 수원)에서 발육시켜 11일령이 되었을 때 시료를 접종하였다.

##### (나) 바이러스 및 배양

국내에서 분리되어 특성이 규명된 A/CK/ANYANG/MS96(H9N2) AI 바이러스를 SPF 계란에서 증식시킨 후 Speaman-Karber 방법을 이용하여 농도(107.5EID<sub>50</sub>/ml)를 측정 후 본 실험에 사용하였다.

##### (다) 공시시료 및 회석



공시시료는 시험의뢰자가 제공한 A3 및 A4와 관련된 물질이며 실제 실험농도는 원액을 단계별 희석하여 시험에 공시하였다. 실험에 대한 대조시료로서 Oseltamivir phosphate (Tamiflu, Roche)를 사용하였다. Tamiflu는 1mg/ml의 농도를 원액으로 하여 단계별 희석을 하였다.

### (3) 실험결과 및 고찰

표 9. A3의 AI 바이러스에 대한 중화능 비교

구분	음성대조	양성대조	Tamiflu (mg/ml)			A3 (p mol)		
			3	0.3	0.03	300	150	100
시료	-	-						
바이러스	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
HA 양성율	0/3	3/3	0/3	1/3	3/3	2/2	3/3	3/3
HA 역가 범위	0	2-5	0	0-4	3-7	5-6	5-8	5-6

바이러스를 투여한 양성대조군의 경우 접종한 SPF 계란은 혈구응집검사에서 100% 양성으로 판정되어 바이러스의 감염에는 문제가 없는 것으로 판단이 되었다. 음성대조군의 경우에도 혈구응집검사에서 음성으로 판정되어 시험상 문제점은 발견되지 않았다.

대조물질인 Tamiflu 접종군의 경우 3mg/ml 농도에서 100%, 0.3mg/ml에서 일부 시료에서 혈구응집능력이 나타나지 않아 접종한 바이러스를 중화한 것으로 판단이 되었다. 그러나 0.03mg/ml의 경우에는 혈구응집능력이 검출되어 바이러스를 중화하지 못한 것으로 판단이 되었다.

시험물질인 A3는 300 pmol - 100 pmol 농도에서 모두 혈구응집능력이 나타나 실질적으로 A3는 시험바이러스에 대한 중화능력이 거의 없는 것으로 판단이 되었다.

즉, 대조 시험물질인 Tamiflu에 비하여 바이러스 중화능력이 떨어진 것으로 판단된다.

표 10. A4의 AI 바이러스에 대한 중화능 비교

구분	음성대조	양성대조	Tamiflu (mg/ml)			A4 (p mol)		
			3	0.3	0.03	300	150	100
시료	-	-						
바이러스	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
HA 양성율	0/3	3/3	0/3	1/3	3/3	3/3	2/2	2/3
HA 역가 범위	0	2-5	0	0-4	3-7	4-9	1-5	0-9

바이러스를 투여한 양성대조군의 경우 접종한 SPF 계란은 혈구응집검사에서 100% 양성으로 판정되어 바이러스의 감염에는 문제가 없는 것으로 판단이 되었다. 음성대조군의 경우에도 혈구응집검사에서 음성으로 판정되어 시험상 문제점은 발견되지 않았다.

대조물질인 Tamiflu 접종군의 경우 3mg/ml 농도에서 100%, 0.3mg/ml에서 일부 시료에서 혈구응집능력이 나타나지 않아 접종한 바이러스를 중화한 것으로 판단이 되었다. 그러나 0.03mg/ml의 경우에는 혈구응집능력이 검출되어 바이러스를 중화하지 못한 것으로 판단이 되었다.

시험물질인 T4는 300 pmol, 150 pmol 농도에서 모두 혈구응집능력이 검색되었으며 100pmol에서는 일부 개체에서 혈구응집능력이 발견되지 않았으나 실질적으로 T3는 시험바이러스에 대한 중화능력이 거의 없는 것으로 판단이 되었다. 즉, 대조 시험물질인 Tamiflu에 비하여 바이러스 중화능력이 떨어진 것으로 판단된다.

### 3. 2차 신규 aptamer의 screening

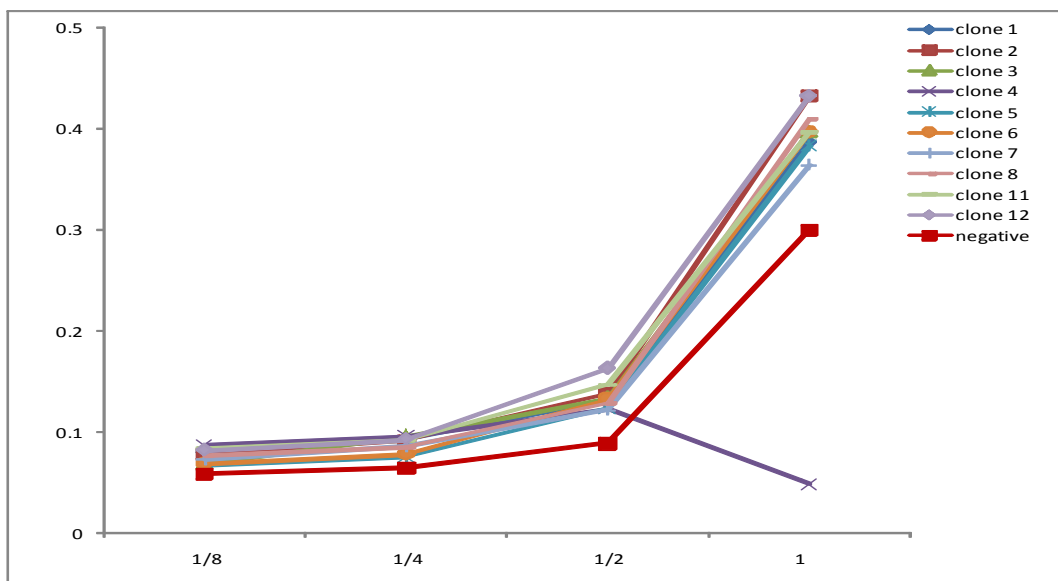
H9 단백질에 대해 보다 결합력이 높은 Aptamer pool을 확보하기 위하여 역 스크리닝을 하였으며, 이를 위해서 5' primer 와 동일 염기서열에 biotin을 합성시킨 프라이머를 제작하였다. 각각의 클론으로부터 얻은 DNA를 biotin 5' primer와 3' primer를 이용하여 PCR을 하고 정제를 하였다. H9 단백질과 결합력이 높은 aptamer를 선별하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 1ug per well 단백질을 코팅하고 각각의 aptamer를 이용하여 결합력이 높은 aptamer를 선별하였다(표 3).

(표 11) H9 단백질과 결합하는 신규 Aptamer의 염기서열

Clone	Specific sequence (N <sub>30</sub> )
A1	GTCGAGTTGGGCGCTTCTCATCTTTGCG
A2	G TTCATCACCGCTCGCCCTTTTGTAGA
A3	GGAGAGACGTCTCTAGACGACAGTGCCC
A4	TGCCAACTCCCCATGATTGGGCCGAAAG
A5	TCTAGGACTGCTATATGGTCTCCTGATG
A6	NGTCCCCCCCACAGTTATTGCTTAGACG
A7	GCAAGGTCCATTGTATAGCTTAACCCAT
A8	CCATAGCTAGATAATATTGATACACGGT
A11	ACCTGTATGGCAATAGCATCTAACTGTC
A12	TNTAACGAGGCCGTTGCCCTGCTGAGT
B1	TCGAGACTTGCTAGTGTGCGAATTGG
B2	GAACGTCGGTGAGCGGGTTGTGTGC
B3	GGTGGGTCAGACGGAGTGTGGAGGTG
B5	GGGCTGCCAGTGCTTGGATTGGCGT
B6	CGCCTAGGGATACTGGTTACGGGC
B7	TGGACGGGCAGGAGTGT TTTGTGTGT
B8	ATCCATCCAGGAGTTGCGGGCAGTGG
B9	TTGCAGACTGATTCTGTGGTGTGAC
C1	GGGGGGGCGGGGAGGCCTACGCCTGCGC
C5	CGGTTTGGCGCTCTGGTATTCTTCGGTA
C7	GGTAGTTATAGTATATGGAAGGGGGTGT
C12	TTGGGTGGTGGAGGTAGGCAGCACTTGG
C13	GTGGGGGCGTCCAGTCGCACGGGATAGG
C14	CGCGGGCAAAGGGACGGAGAGCATCGA
C15	TAGCAAGATCTGCAGGGGGACTCGTGTA
C16	GGAGAGGGGACGCGGCTAACTACTAGGA
C17	ACTTCAGTCCCTACTACCCTCCCGCCTC
C18	TGGGCGCGATAATCAGTGCCATGATGCA
C19	ATGTGCCGCTAGATCAACCAGGGGTAGA

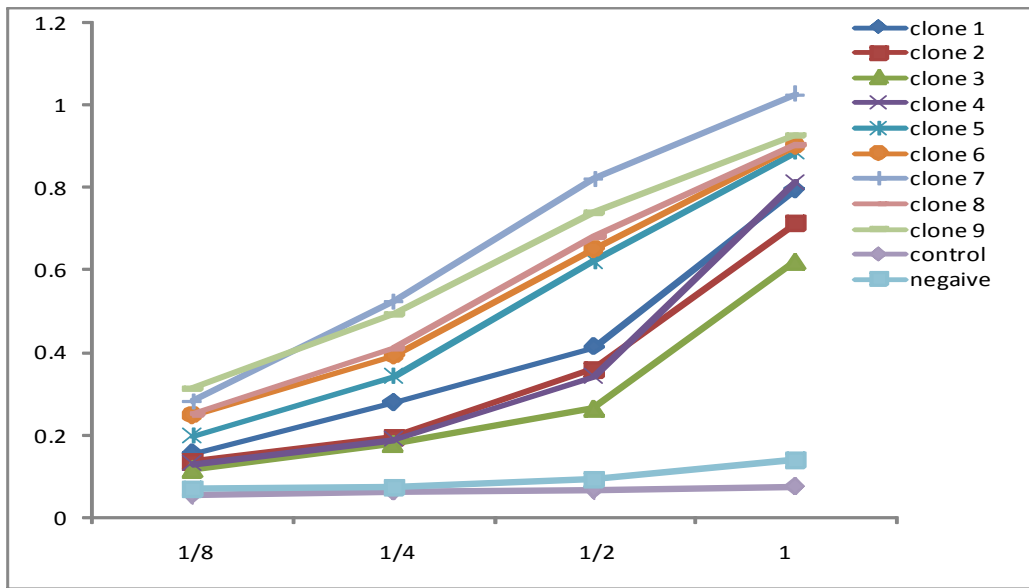
선별한 압타머는 A, B, C group으로 나누었고 처음 선별한 A group의 압타머는 H9 peptide 에 대해서는 높은 결합력은 나타냈지만 바이러스에 대해서는 결합력이 없는 것으로 나타났다. 두 번째 그룹인 B 그룹은 mouse anti-H9 antibody 보다는 높게 나타나지만 chicken anti-H9 antibody 보다는 낮은 수치가 나왔다. 또 바이러스에 대한 결합력이 없었다. 마지막 C group의 압타머는 마우스와 닭에서 얻은 항체와 비슷하거나 보다 높은 결합력을 나타내었다 (그림 26 - 28).

A 그룹 압타머들의 H9 peptide에 대한 결합력을 ELISA로 확인한 결과 대조군인 biotin labeled 5' primer와 비교하였을 때 이보다 높게 나타났다. 이 중 clone 3, 4, 12 를 2차 구조로 변화시켰을 때 H3 타입의 헤마글루티닌 결합 압타머인 A22 와 비슷한 결합력을 나타내었다. 하지만 이들은 virus로 coating을 하고 ELISA 확인을 한 결과 어느 정도 결합력은 보였지만 대조군인 BSA를 코팅한 것과 비슷한 수치가 나왔다(그림 26).



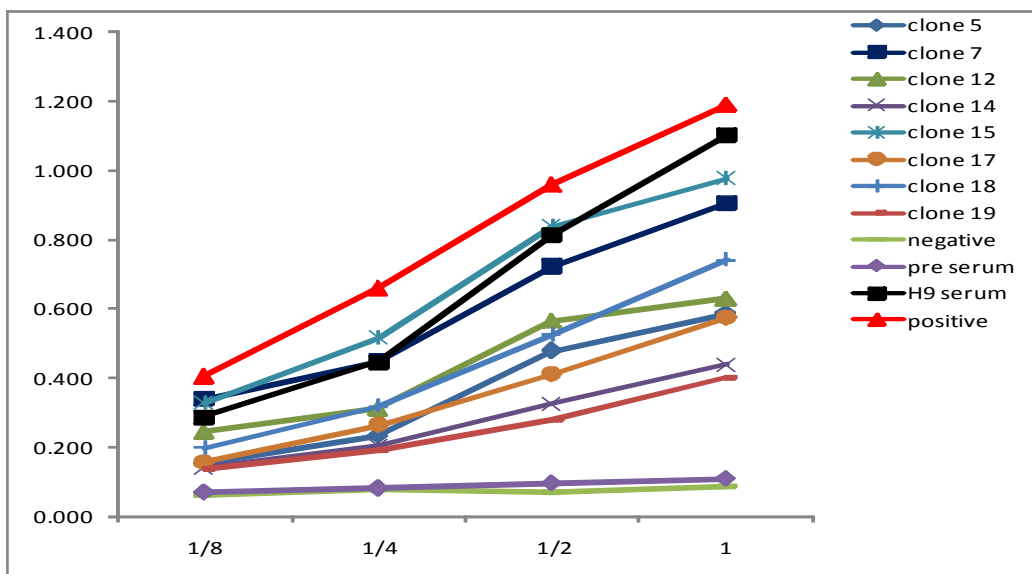
(그림 26) A Group 압타머의 결합력 [ELISA result]

B group aptamer의 H9 peptide에 대한 결합력을 조사하였을 때 negative 대조군 (biotin labeled 5' primer) 보다 높게 나왔지만 mouse anti-H9 serum과 비교 하였을 때는 비슷하게 나왔다. 8개 클론의 염기서열을 분석해본 결과 random sequence 부분이 26~28개이고 primer 부분이 일치하지 않는 클론이 있었다(그림 27).



(그림 27) B Group aptamer의 결합력 [ELISA result]

C group aptamer 는 mouse anti-H9 antibody(serum) 과 비교했을 때 비슷한 수치로 나타났고 clone 7 aptamer가 항체보다 높게 나타났다. C group 의 각각의 aptamer들은 여러번 ELISA 방법으로 확인한 결과 대체적으로 높은 결합력을 보였지만 실험 컨디션에 따라 결합정도가 다르게 나타났다(그림 28).



(그림 28) C Group aptamer의 결합력 [ELISA result]

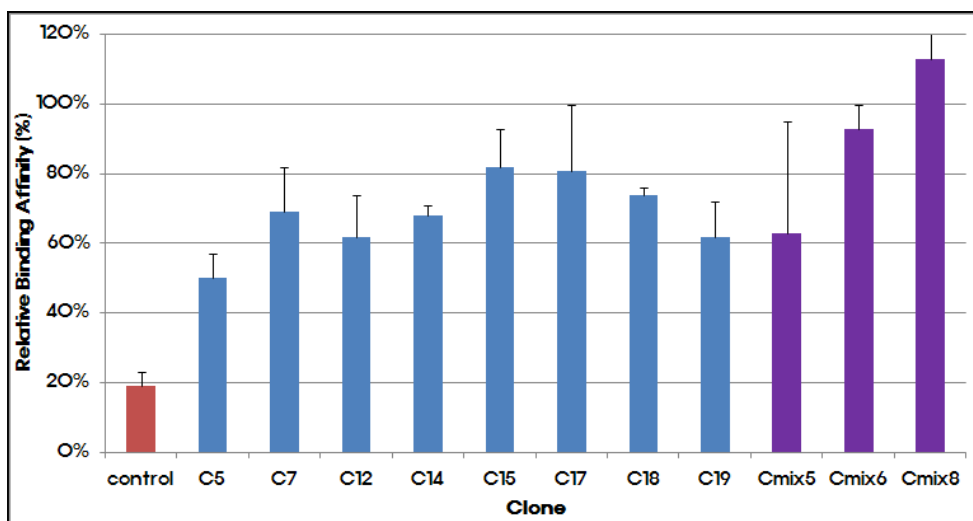
앞의 결과는 실험 조건에 따라 결합정도가 약간 다르게 나타나는 경향이 있어, 각각의 압타머를 5~8개 조합으로 혼합물을 만들어서 처리하였다(표 4). 그 결과 개별 압타머를 처리한 것 보다 더 높은 결합 수치를 나타내었고 이는 항체의 결합력 보다도 높았다(그림 29).

(표 12) 항-H9 항체와 비교한 Aptamer의 H9 단백질에 대한 상대적 결합력

### Group C

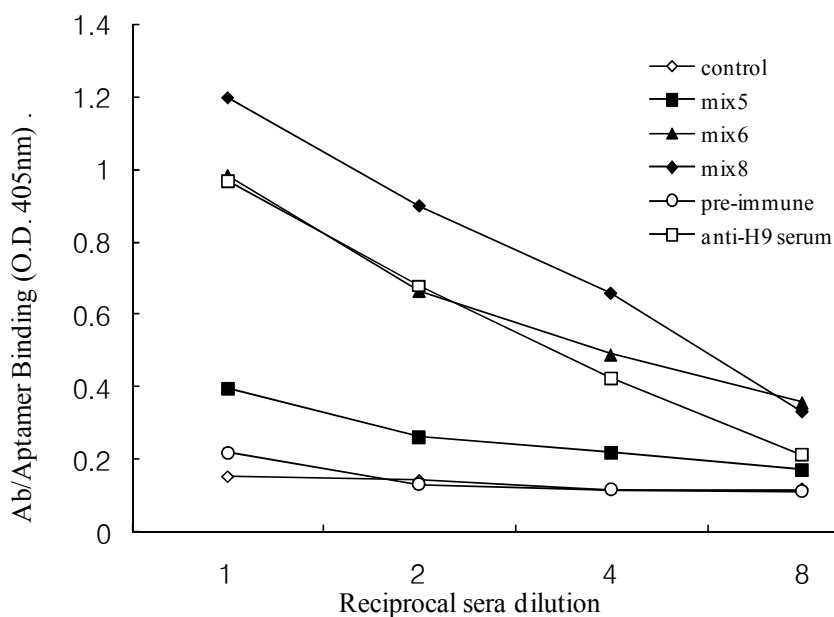
Clone	Specific sequence	Relative Binding affinity
C5	CGGTTTGGCGCTCTGGTATTCTTCGGTA	0.50 ± 0.07
C7	GGTAGTTATAGTATATGGAAGGGGGTGT	0.69 ± 0.13
C12	TTGGGTGGTGGAGGTAGGCAGCACTTGG	0.62 ± 0.12
C14	CGCGGGCAAAGGGACGGAGAGCATCGA	0.68 ± 0.03
C15	TAGCAAGATCTGCAGGGGGACTCGTGTA	0.82 ± 0.11
C17	ACTTCAGTCCCTACTACCCTCCCGCCTC	0.81 ± 0.19
C18	TGGGCGCGATAATCAGTGCCATGATGCA	0.74 ± 0.02
C19	ATGTGCCGCTAGATCAACCAGGGGTAGA	0.62 ± 0.10
Cmix5	C7, C14, C17, C18, C19	0.63 ± 0.32
Cmix6	C7, C14, C15, C17, C18, C19	0.93 ± 0.07
Cmix8	C5, C7, C12, C14, C15, C17, C18, C19	1.13 ± 0.10
Cmix14	Cmix8 + 6 other clones	0.96

### Binding affinity



(그림 29) 신규 압타머의 H9 단백질에 대한 결합력

각 클론들을 5~8개 조합으로 mixture 해서 확인한 결과 단일클론 보다는 높게 나왔고 mouse anti-H9 antibody(serum) 보다는 높게 나타났다. 5개의 클론으로 조합된 혼합물은 구성성분에 따라서 결합력이 다르게 나타났고 여러 번 ELISA로 확인한 결과 실험마다 오차가 생겼다. 6개 이상의 조합에서는 항체보다 높게 나타나는 결과를 보였고 오차도 적게 나타났다.



(그림 30) 신규 aptamer 혼합물의 바이러스 결합력

#### 4. 2차 선별 분리된 aptamer의 특징 분석

H9 단백질에 결합하는 aptamer들의 염기서열을 분석하여 공통된 염기서열을 도출하기 위하여, 개별 aptamer들을 정렬하고 공통된 염기서열을 분석하였다. 그 결과 28개의 aptamer들 중 공통적으로 발견되는 부분 염기서열이 C 그룹에 가장 많이 포함되어 있었으며, 이 중 C7 aptamer가 가장 높은 consensus 염기서열을 포함하였다. 그 외에 5개의 aptamer가 공통서열을 많이 포함하였다(그림 31). 이 C7 aptamer를 바탕으로 C7의 무작위적 염기서열 부분과 삽입서열을 포함하는 35개의 뉴클레오타이드로 된 올리고머(C7-35mer)와 6개 aptamer에서 일치하는 부분을 포함한 35개의 뉴클레오타이드로 된 올리고머(C7[M]-35mer)를 합성하였다. C7[M]-35mer는 8개의 시퀀스 조합으로 되어있는 개별 조합으로 각각을 합성하였다.

Consensus      . . . . . **AANATCTGNNAGGGGNGTCGTGT** . . .

C19:            ATGTGCCGCT**AGATCAACCAGGGGTAGAcgtat**

C7:             **GGTAGTTATAGTATATGGAAGGGGTGTcgtatggt**

C15:            TAGCA**AGATCTG**-**CAGGGGACTCGTGTA**

B2:             ga**GAACGTCGGTGAGCGGGTTGTGTGC**

B1:             ga**TCGAGACT**-**TGCTAGTGTCGAATTGGc**

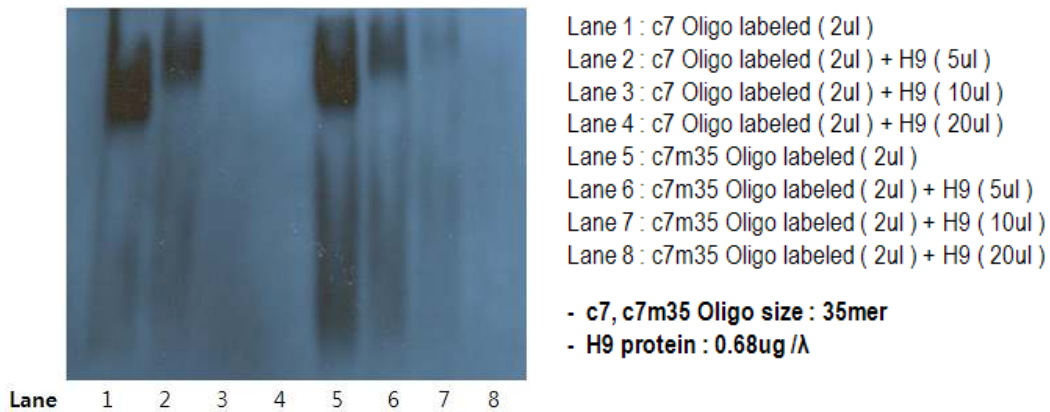
B6:             CGCCTAGGG**ATACT**-**GTTACGGGCcgtatggt**

**Cm35**           **GGTAGTTATAAKATCTGSMAGGGGGWGTCGTGTGG**

K; G or T, S; G or C, M; A or C, W; A or T

(그림 31) 신규 분리 압타머의 consensus sequence

새로 합성한 C7-35mer 와 C7[M]-35mer oligomer의 분리한 H9 단백질과의 affinity를 측정해보았다. 두 oligomer 모두 H9 단백질과의 affinity가 강력하여, label된 올리고 DNA와 결합하여 전기영동 시 이동에 상당한 제약을 받고 있다(그림 32)

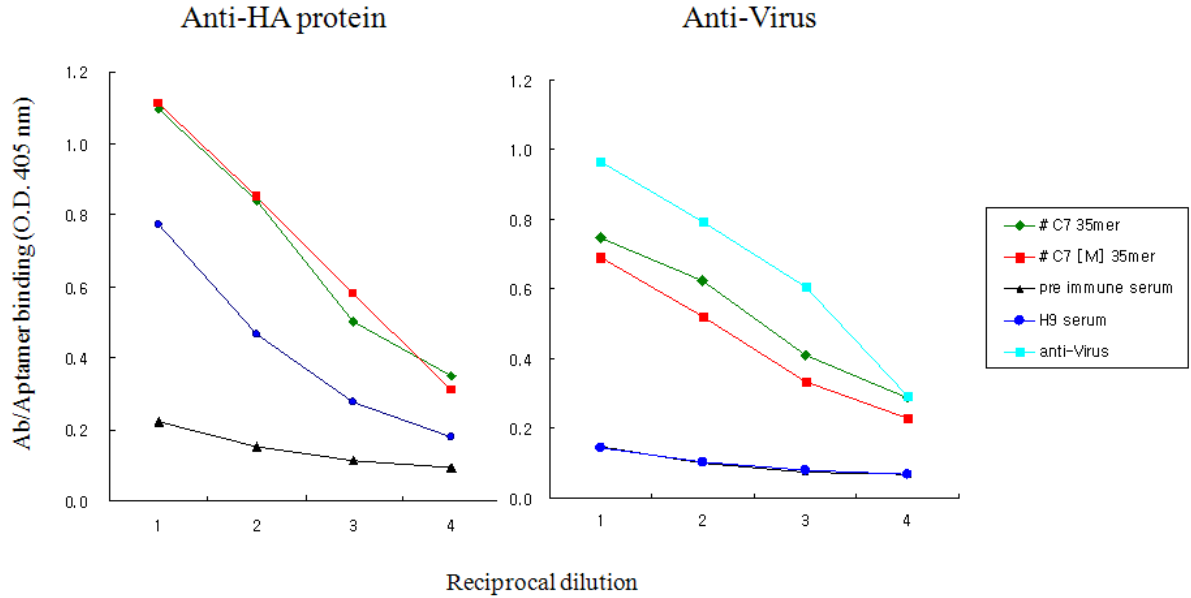


(그림 32) 신규 압타머와 H9 단백질의 Gel retardation 측정

새로 합성한 C7-35mer 와 C7[M]-35mer oligomer와 C group의 압타머의 결합력을 ELISA를 통해서 비교해보면, 압타머가 mice anti-H9 antibody 보다 더 높은 결합력을 나타내었다. 한편, H9 타입의 virus에 대한 결합력을 확인하기 위해서 virus를 코팅해서 ELISA로 측정을 하였다. 바이러스에 대해 mouse anti-H9 serum은 결합력이 없는 것으로 나타났다. 하지만 압타머의 바이러스 입자에 대한 결합력은 대조

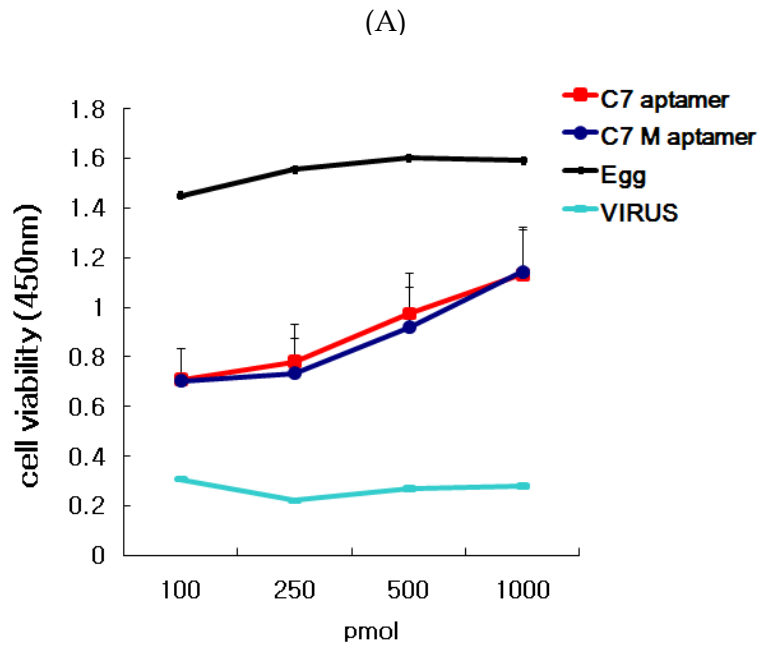


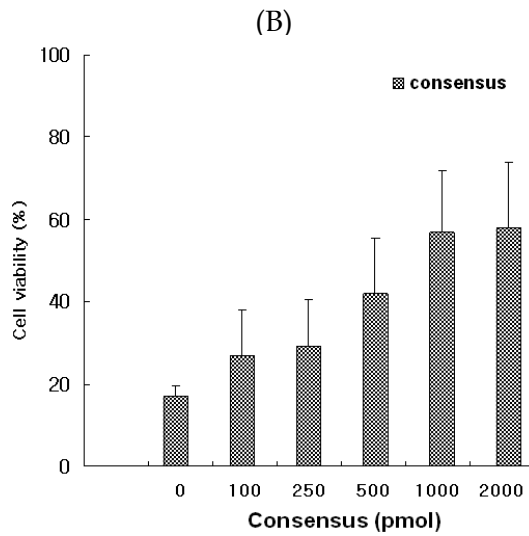
균인 chicken anti-virus antibody와 비슷하거나 근접하게 나타났다(그림 33).



(그림 33) H9 단백질 및 바이러스에 대한 신규 압타머의 결합력

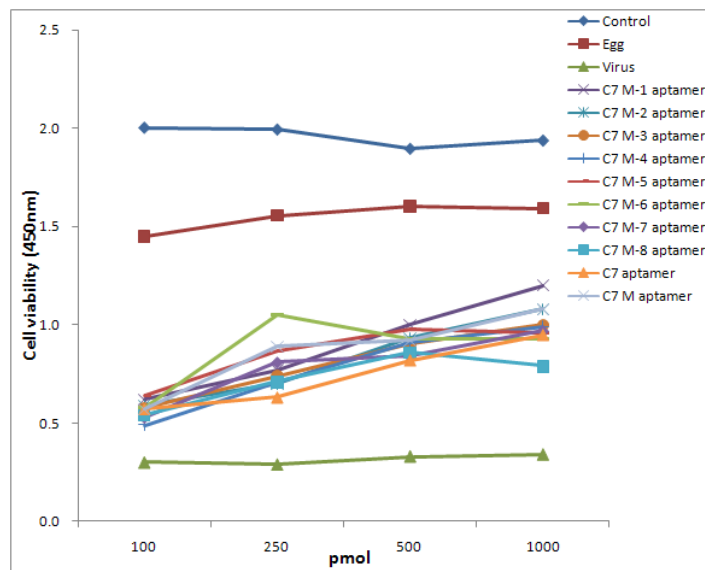
MDCK 세포주를 이용해서 virus 감염에 의한 세포의 viability를 MTT assay 로 확인하였다. 그 결과 살아 있는 세포의 수가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 34).





(그림 34) The effect of consensus on the viability of MDCK cells infected by H9N2 influenza virus in tissue culture

C7[M]-35mer는 8종류의 aptamer 서열 혼합체로, 이들을 구성하는 개별 aptamer의 항-바이러스능을 조사하였다. 이를 위하여 8종류의 개별 aptamer를 합성하고 바이러스 감염에 대한 억제능을 MTT assay로 측정하였다. 실험마다 오차가 있었지만 전체적으로 생존하는 세포의 수가 증가되었다. 8종류의 aptamer들 중에서 C7[M]-1, 2 및 5가 높은 수치를 나타냈으나 큰 차이점은 발견되지 않았다(그림 35).



(그림 35) C7[M]-35mer 혼합체의 개별 aptamer의 항-바이러스 효과

## 제 4 절 2차 신규 분리된 Aptamer의 항인플루엔자 효능

### 1. SPF 계란에서의 효과

#### 가. 목적

새롭게 분리, 제조한 C8 mix, CPCR mix, Cm35, C7, C7mix (C7+Lac 85)의 조류 인플루엔자(Avian Influenza: AI) 바이러스에 대한 항 바이러스 작용을 발육란을 이용하여 검증하는 것을 목적으로 한다.

#### 나. 재료 및 방법

##### (1) 공시계란

미국의 SPAFAS 회사로부터 수입된 SPF(Specific Pathogen Free)계란을 국내 수입업체를 통하여 구입한 후 충북대학교 수의과대학 조류질병학교실의 부화기(윤선부화기, 수원)에서 발육시켜 9-11일령이 되었을 때 시료를 접종하였다.

##### (2) 바이러스 및 배양

본 실험을 처음 수행당시에 사용하였던 MS96 LPAI 바이러스는 현재 국내에서 유행하는 AI 바이러스와 유전자형이 달라 최근 국내에서 분리되어 특성이 국립수의과학검역원에 의해 규명된 A/CK/01310(H9N2) AI 바이러스로 교체하였다. 새로운 바이러스(01310)를 SPF 계란에서 증식시킨 후 Speaman-Karber 방법을 이용하여 농도(107.0-107.5 EID50/ml)를 측정 후 본 실험에 사용하였다.

##### (3) 공시시료 및 회석

공시시료는 본사업의 협동과제에서 개발된 C8 mix, CPCR mix, Cm35, C7, C7mix

(C7+Lac 85)이며 실제 실험농도는 각각의 원액을 단계별 희석하여 시험에 공시하였다.

## 다. 결과 및 고찰

### (1) 계란에서의 중화능

표 13. The neutralization effect of C8mix and CPCR mix against MS96 LPAI virus using SPF eggs

Group	-ve control	+ve control	Dilution of aptamer								
			C8 mix				CPCR mix				
			0	10	100	1000	0	10	100	1000	
HA Positive	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3
mean HA titer	0	4.0	6.0	5.3	6.0	4.7	3.0	4.7	4.7	2.3	

바이러스를 투여한 양성대조군의 경우 접종한 SPF 계란은 혈구응집검사에서 100% 양성으로 판정되어 바이러스의 감염에는 문제가 없는 것으로 판단이 되었다. 음성대조군의 경우에도 혈구응집검사에서 음성으로 판정되어 시험상 문제점은 발견되지 않았다.

시험물질인 C8mix의 경우 모든 농도에서 혈구응집능력이 확인되어 바이러스에 대한 직접적인 중화능력은 없는 것으로 판단된다. CPCR mix 는 원액과 1000배희석농도에서 혈구응집능력이 없는 경우가 있었지만 이는 바이러스에 대한 중화능력보다는 시험계란의 문제에 의한 것으로 판단되어 실질적으로 CPCR mix는 시험바이러스에 대한 중화능력이 거의 없는 것으로 판단이 되었다.

따라서, C8mix와 CPCR mix의 AI 바이러스에 대한 중화능력은 다른 방법으로 측정을 해야할 것으로 판단된다. 접종 후 면역기관 혹은 면역에 관련된 항목을 측정함

으로서 간접적인 항바이러스 효과를 확인해야 할 것으로 판단된다.

표 14. The neutralization effect of Cm35 against 01310 LPAI virus using SPF eggs

Group	-ve control	+ve control	Dilution of Cm35		
			1:10	1:50	1:100
HA Positive	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Mean HA titer	0	5.0	5.3	5.3	4.3

표 15. The neutralization effect of Cm35 against 01310 LPAI virus using SPF eggs

Group	-ve control	+ve control	Concentration of 01310 LPAI virus (EID <sub>50</sub> )			
			10 <sup>4.8</sup>	10 <sup>3.8</sup>	10 <sup>2.8</sup>	c
HA Positive	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Mean HA titer	0	6.3	5.3	6.0	5.0	5.7

바이러스를 투여한 양성대조군의 경우 접종한 SPF 계란은 혈구응집검사에서 100% 양성으로 판정되어 바이러스의 감염에는 문제가 없는 것으로 판단이 되었다. 음성 대조군의 경우에도 혈구응집검사에서 음성으로 판정되어 시험상 문제점은 발견되지 않았다.

시험물질인 Cm35의 경우 모든 농도에서 혈구응집능력이 확인되어 바이러스에 대한 직접적인 중화능력은 없는 것으로 판단된다. 또한, 바이러스 농도를 달리하여 104.8EID<sub>50</sub>에서 104.8EID<sub>50</sub>에서의 효능도 측정하였으나 모두 혈구응집이 나타나 바이러스에 대한 직접적인 효능이 인정되지 않았다.

표 16. The neutralization effect of C7 against 01310 LPAI virus using SPF eggs

Group	-ve control	+ve control	Concentration of 01310 LPAI virus (EID <sub>50</sub> )			
			10 <sup>4.83</sup>	10 <sup>3.83</sup>	10 <sup>2.83</sup>	10 <sup>1.83</sup>
HA Positive	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Mean HA titer	0	6.3	5.3	6.0	5.0	5.7

바이러스를 투여한 양성대조군의 경우 접종한 SPF 계란은 혈구응집검사에서 100% 양성으로 판정되어 바이러스의 감염에는 문제가 없는 것으로 판단이 되었다. 음성대조군의 경우에도 혈구응집검사에서 음성으로 판정되어 시험상 문제점은 발견되지 않았다.

시험물질인 C7의 경우 모든 농도에서 혈구응집능력이 확인되어 바이러스에 대한 직접적인 중화능력은 없는 것으로 판단된다.

표 17. The neutralization effect of C7 mix against A/CK/01310 LPAI virus using SPF eggs

Group	-ve control	+ve control	Dilution of C7 mix				
			2	8	32	128	256
HA Positive	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3
Mean HA titer	0	6.3	0	0	0	6.3	6

바이러스를 투여한 양성대조군의 경우 접종한 SPF 계란은 혈구응집검사에서 100% 양성으로 판정되어 바이러스의 감염에는 문제가 없는 것으로 판단이 되었다. 음성대조군의 경우에도 혈구응집검사에서 음성으로 판정되어 시험상 문제점은 발견되지 않았다.

시험물질인 C7 mix의 경우 시험물질을 2배 희석하여 LPAI 바이러스인 01310에 대

한 직접적인 중화능력을 확인한바 32배까지 중화능력이 인정이 되었다. 이러한 결과는 그동안 실험하였던 여러종류의 압타머 중 가장 좋은 중화능력을 보여주는 것이었다. 32배희석까지의 중화능력은 기대한 성적에는 미치지 못하지만 in vivo에서 압타머의 직접적인 효력을 확인할 수 있는 중요한 결과로 판단이 되었다. 또한 C7 mix는 Lac 85와 혼합제조된 것으로 서로간의 시너지 효과에 대해서도 추후 확인할 필요가 있을 것이다.

## 2. 일반 산란계에서의 효과

### 가. 목적

A22의 AI 바이러스에 대한 직접적인 중화능력이 낮아 새롭게 제조한 C8 mix, CPCR mix, Cm35, C7, C7mix (C7+Lac 85) 중 AI 바이러스에 대한 항 바이러스 작용이 가장 높은 C7mix의 일반산란계에서의 효과를 검증하는 것을 목적으로 한다.

### 나. 재료 및 방법

#### (1) 공격접종 바이러스

국내에서 분리되어 특성이 규명된 A/CK/01310(H9N2) AI 바이러스를 SPF 계란에서 증식시킨 후 Speaman-Karber 방법을 이용하여 농도(107.0-107.5 EID50/ml)를 측정 후 본 실험에서 공격 AI 바이러스로 사용하였다.

#### (2) 공시동물 및 시험계사

본 실험은 야외 산란계 농장에서 일반 백신접종이 완료된 47주령의 산란계 계군에서 대조군과 처리군으로 각각 50수를 무작위로 선정 하여 수행하였다. 실험은 농장에서 격리된 독립된 계사에서 수행하였으며 처리군과 대조군의 산란을 변화를 비교하기 위하여 일정기간 안정화시기를 거쳐 정상적인 산란회복이 된 시점부터 실시하였다.

### (3) 시료채취 및 처리

처리군과 대조군에 AI바이러스 공격접종 후 바이러스의 재분리를 위한 시료처리는 다음과 같이 수행하였다. 계획된 시료채취일에 총 배설강, 구강에서 swab 시료를 채취한 후 항생제가 첨가된 Phosphate Buffed Saline(PBS)를 15ml conical tube에 넣고 잘 섞어주었다. 항생제는 Streptomycin(2mg/ml), Penicillin(2000IU), Kanamycin(0.25mg)를 즉 SPK를 혼합하여 사용하였다. 조직시료의 경우에는 시료의 무게 측정 후 멸균된 막자사발에 소량의 silica sand와 함께 넣어 갈아준 다음 시료의 1.5배에 해당하는 항생제가 첨가된 PBS를 넣어주었다. 항생제는 SPK를 250배 희석하여 사용하였다. 이와 같이 전 처리된 swab시료 및 조직들을 3,000rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층 액을 취해 11일령의 SPF 부화란의 요막강(Allantoic Sac) 내에 0.2ml를 접종하였다.

### (4) 혈청검사

혈구응집억제(Hemagglutination inhibition: HI)시험은 일반적인  $\beta$ -Proce dure micromethod를 기본적으로 하여 실시하였다. 요약하면 아래와 같다.

V-자형 96 well microplate 전체에 PBS 25 $\mu$ l를 분주하였다. A~F의 첫 번째 well에 혈청시료를 25 $\mu$ l 넣어 분주하고 G well에는 음성혈청을 H well에는 양성혈청을 넣고 각각 2진단계 희석하였다. 4HA Unit로 조정된 항원 동량을 각 well에 넣고 실온에서 30분간 감작시켰다. 1% 닭 적혈구 부유 액을 25 $\mu$ l 분주하여 실온에서 40분간 정지시킨 후 45° 각도로 세워 흘러내리는 최대희석배수를 End Point로 판독하였다.

### (5) qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase chain reaction)

채취된 구강과 총배설강 swab 시료의 바이러스 농도를 측정하기 위하여 qRT-PCR 검사법을 도입하였으며 바이러스의 농도와 측정값 간의 상관성을 아래와 같이 산출하였다. 즉 107.9 EID<sub>50</sub>/ml(Chicken embryo infective dose 50%) 역가의 LPAI바이



러스에서 유전자를 추출한 후 10진법으로 회석을 하였다. 각 회석배수의 시료를 qRT-PCR 방법으로 정량하여 각각의 Ct(Threshold cycle value)값을 구하였다. 바이러스 RNA는 Viral Gene-Spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON biotechnology, Bundang, Korea)의 지침에 따라 추출하였으며 추출한 바이러스 RNA는 I-AIV(H9) Detection Kit(iNtRON biotechnology Bundang, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 요약하면 enzyme mix 8µl에 RNA template 2µl를 첨가하여 진단용액을 넣은 후 최종부피를 20µl로 맞춘 후 잘 섞어주고 Reverse transcription (45°C/30min), Pre-PCR(94°C/5min), PCR(denaturation 94°C/30sec, annealing 50°C/30sec, extension 72°C/40sec, 40cycles) 및 post-PCR(72°C/5min)을 핵산증폭기(Thermo Hybaid U.K)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1.2% agarose gel(Invitrogen California, USA) 상에서 전기영동한 뒤 5X loading dye로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 H9 유전자 크기는 1 kb plus DNA Ladder(Invitrogen California, USA)를 같이 전기영동 함으로써 확인하였다.

## (6) 실험설계

### (가) 효능시험

야외 일반 산란계 농장에서 처리군 및 대조군으로 사용할 산란계 각각 50수를 선정하여 공격접종 실험농장으로 이동한 후 C7 mix의 효능 평가를 실시하였다. C7 mix의 효능 시험을 위하여 공격접종 후 일정한 시간에 계란을 수거하였으며 사료 공급량은 1일 2회 일정한 양으로 급여하였고 사료섭취 후 잔류량은 매일 저울로 무게를 측정하였으며 물은 자유 급수하였다. 그리고 정해진 일정에 따라 혈액 등의 시료를 채취하였으며 산란율, 비정상란 발생률, 사료섭취량, 난각 색의 변화, 난황색의 변화 등을 주기별로 조사하여 기록하였다.

### (나) 통계 분석

본 실험의 통계학적 유의성 검정방법은 SPSS (Windows Release 10.07; SPSS, 한글판)방법을 이용한 독립 t-test(두집단 간의 유의성 검정방법)와 GLM(General Liner

Model)방법인 일원 분산분석(one way ANOVA)과 2원 분산분석(two way ANOVA) 및 3원 분산분석(three way ANOVA)으로 그룹 간의 유의수준을 검정하였다(P<0.05)

## 나. 실험결과 및 고찰

### (1) 효능 시험

#### (가) 혈구응집억제(HI) 역가의 변화

표 18. Comparison of serological response among groups after challenge in commercial layer

Groups	Weeks of challenge	No	HI titer <sup>A</sup>	
			47-0	47-14 <sup>B</sup>
Treatment	47	50	0	7.0±0.0 <sup>a</sup>
Control	47	50	0	6.3±1.2 <sup>a</sup>

A: Mean HI titer ± Standard Deviation expressed as log<sub>2</sub>.

B: 47-14 means 5day after challenge which was done at 47week old.

a: Mean with different superscripts within a column differ Significantly(P<0.05).

본 시험은 C7mix를 접종한 처리군과 미접종 대조군에 공격접종을 한 후 HI 역가의 변화를 비교하였다. 공격접종 전 접종군과 대조군의 HI 역가는 모두 음성이었으나 공격 접종 후 14일 뒤에 측정하였을 때는 HI 역가가 각각 7.0±0.0, 6.3±1.2 로 상승되어 다소의 차이가 있었으나 통계학적으로는 유의한 차이가 인정되지 않았다. 그러나 두 계군 모두 혈청학적 반전이 이루어져 공격접종이 정확하게 이루어진 것을 확인할 수 있었다.

(나) 공격접종 후 바이러스의 배출비교

표 19. Comparison on amount of viral gene in the samples of chickens with C7 mix treatment after challenge

Group	Number of bird	5 DPC <sup>B</sup>			14 DPC		
		O	K	C	O	K	C
Treatment	50	2.3±2.6	0	0	0	NT <sup>E</sup>	0
Control	50	2.9±3.3	0	3.1±3.3	0	NT	0

<sup>A</sup> The birds were challenged with 106.9EID50 per bird of AI virus (01310) using intraocular route.

<sup>B</sup> Days post inoculation.

<sup>C</sup> O: Oral, K: Kidney, C: Cloaca.

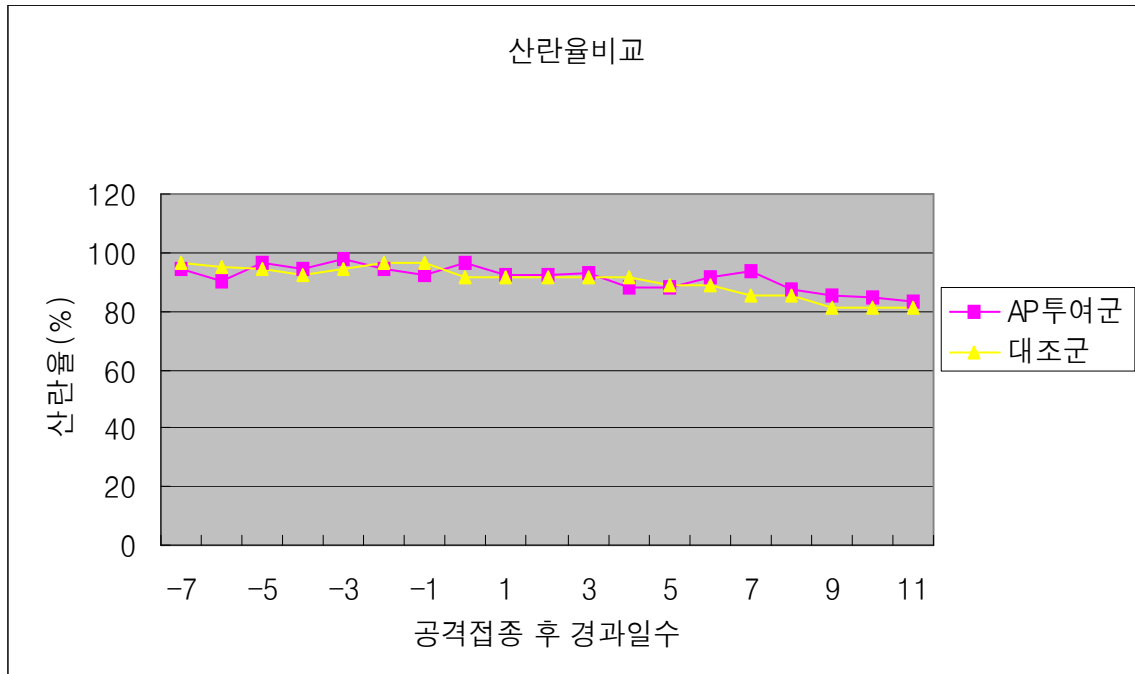
<sup>D</sup> Viral titer (EID50) transformed from the Ct value obtained by qRT-PCR (mean ± SD) expressed as EID50.

<sup>E</sup> NT: Not tested.

본 시험은 야외 농장에서 처리군과 대조군을 임의로 선정하여 공격접종 후 qRT-PCR 방법으로 조직 내 혹은 총배설강으로 배출되는 바이러스 함량을 정량 분석하였다. 처리군과 대조군 모두 구강시료에서 AIV가 공격접종 후 5일째 검출되어 감염이 된 것을 확인하였다. 처리군은 공격접종 후 5일째에는 구강에서만 2.3±2.6(EID50)의 농도로 바이러스가 검출 되었으며, 신장과 총배설강에서는 검출되지 않았다.

대조군에서는 공격접종 후 5일째에는 2.9±3.3(EID50)로 처리군과 비슷한 수준이었으며 두 계군 모두 접종 후 14일에는 바이러스가 검출되지 않았다. 그러나 총배설강의 경우 대조군에서는 바이러스가 공격접종 5일에 3.1±3.3의 농도로 검출이 되었으나 처리군에서는 검출이 되지 않아 바이러스 배출에 있어서 차이가 인정되었다. 즉, C7 mix의 바이러스 배출 감소효과가 인정이 되었다.

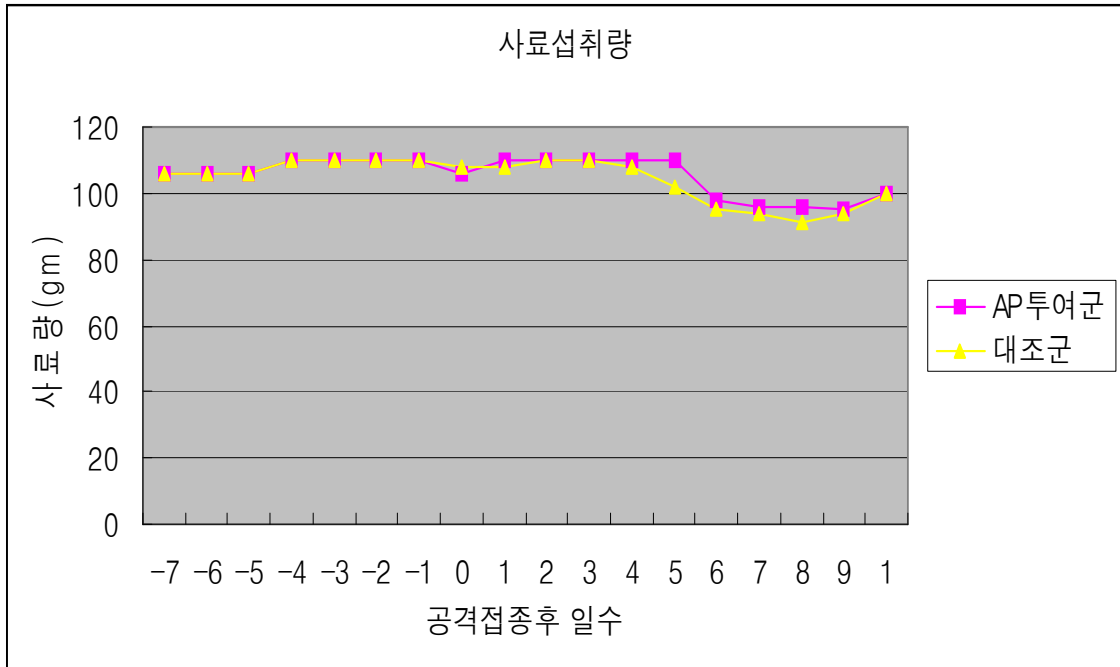
(다) 공격접종 후 산란율의 비교



(그림 36) C7mix 투여 일반 산란계의 LPAI 바이러스 접종 후 산란율 변화

본 시험은 C7 mix를 투여한 처리군과 대조군에 공격접종 후 산란율의 변화를 비교하였다(그림 36). 공격접종 전에 두 계군 모두 정상적인 산란으로 회복할 때 까지 안정화시기를 가졌다. 처리군은 공격접종 전 96%에서 공격접종 후 2일부터 감소하기 시작하였으나 접종 6일째에 일시 회복하는 경향을 보였다. 그러나 그 후 다시 감소가 이루어져서 전반적으로 AI바이러스 공격접종 후 산란율 감소현상이 나타났다. 대조군의 경우에도 AI 바이러스 공격접종 후 지속적인 감소가 이루어졌으며 전반적인 감소현상은 처리군에 비하여 다소 높은 것으로 판단이 되었다. 그러나 통계학적으로는 공격접종 후 6일 이후 처리군과 대조군에서 산란율차이가 인정이 되었으나 처리군의 경우 공격접종 전 산란율에는 미치지 못하여 대조군에 비하여 산란율감소정도만 다소 나은 정도로 인정이 되었다. 즉, AI 바이러스 공격접종에 C7 mix는 부분적인 방어는 가능하지만 충분하지는 않은 것으로 판단이 되었다.

(라) 공격접종 후 사료섭취량의 변화



(그림 37) C7mix 투여 일반 산란계의 LPAI 바이러스 접종 후 사료섭취량 변화

본 시험은 C7 mix를 투여한 처리군과 대조군에 공격접종 후 사료섭취량의 변화를 비교하였다(그림 37). 본 실험계사로 이동 후 공격접종 전에 두 계군 모두 정상적인 사료섭취량으로 회복할 때 까지 안정화시기를 가졌다. 처리군과 대조군은 공격접종전에 정상적인 사료섭취수준까지 회복되었으며 두 계군 간 차이는 거의 없었다. 공격접종 후 두 계군 모두 사료섭취량이 감소하였으며 접종 후 10일에는 접종전의 수준은 아니지만 회복하는 현상을 나타내었다. 공격접종 후 처리군은 접종 6일부터 감소가 시작이 되었으나 대조군은 접종 5일부터 감소가 시작되었다. 공격접종 후 대부분 대조군이 처리군에 비하여 사료섭취량이 낮은 수준이었으나 접종 10일에는 동일한 수준으로 회복되었다. 처리군은 대조군에 비하여 사료섭취량의 감소가 다소 적었지만 감소하는 현상은 동일하여 AI 바이러스 공격접종에 다소의 방어가 되지만 충분하지 않은 것으로 판단이 되었다.

### 3. 야외 산란계농장에서의 안전성 및 효능

#### 가. 시험목적

A22의 AI 바이러스에 대한 직접적인 중화능력이 낮아 새롭게 제조한 C8 mix, CPCPCR mix, Cm35, C7, C7mix (C7+Lac 85) 중 AI 바이러스에 대한 항 바이러스 작용이 가장 높은 C7mix의 일반산란계 농장에서의 안전성 및 효능을 검증하는 것을 목적으로 한다.

#### 나. 재료 및 방법

##### (1) 공시동물 및 시험계사

표 20. AP 야외시험을 위하여 선정된 농장 개요

농장	지역	계종	품종	입추일	사육수수	시험수수	계사형태
YL	충남천안	산란계	HLB	'08.04.10	20,000	5,600	무창
				'08.04.10	20,000	15,000	무창

본 실험은 야외 산란계 농장에서 일반 백신접종이 완료된 산란계를 대상으로 실시하였다. 본 YL 농장은 2개의 계사로 구분되어 있어 한 계군을 처리군, 다른 계사를 대조군으로 편성하였다. 처리군의 경우 20,000수 중 5,600수를 대상으로 시험물질을 투여하였으며 나머지 15,000수를 대조군으로 편성하였다.

## (2) 시험계군의 백신접종내역

표 21. 시험계군의 백신접종내역

접종시기	백신명
10일령	뉴캐슬 음숫접종
14일령	전염성 F낭병 음수접종
20일령	뉴캐슬 음수접종
24일령	전염성 F낭병 음수접종
28일령	계두 쌍침접종
35일령	전염성후두기관염 및 마이코프라스마 혼합 접종
46일령	가금티푸스 생균백신접종
96일령	콕시듐백신접종
98일령	가금티푸스 생균백신접종

시험농장의 일반 백신접종프로그램은 뉴캐슬병, 전염성F낭병, 계두, 가금티푸스를 대상으로 작성되었으며 콕시듐백신접종이외에 특이사항은 없었다.

## (3) 시험물질 및 접종

시험물질은 산란중인 산란계에 대하여 음수로 접종을 한 후 산란율, 폐사율 등을 대조군과 비교를 하였다. 음수접종 시 시험 물질을 2시간 내 닭이 먹을 음수량에 0.1%로 투여를 하였다. 매주 2-3회 추가 접종을 원칙으로 하였으나 투여횟수는 시험 중에 다소간의 조절을 하여 가능한 효능이 지소될 수 있도록 하였다. 근거는 이 물질이 1주일 이상 호흡기 혹은 소화기에 잔존할 수 있기 때문이었다. 접종일령과 시기는 아래 (표 22)과 같다.

표 22. 시험계군에서의 C7 mix 투여 내역

접종일령	접종시간	접종량	비고
48주령	14:00	200ml	
49주령	14:00	200ml	
50주령	14:00	200ml	
51주령	14:00	200ml	
52주령	14:00	200ml	

#### (4) 시료채취 및 검사

시험 일정에 맞추어 혈청시료와 swab 시료, 조직시료를 채취하였다. 혈청시료에 대해서는 혈청검사를 실시하였으나 조직과 swab시료에 대해서는 AI 야외감염 등에 대비하여 채취하였으므로 바로 검사를 실시하지 않았다. 혈청검사는 계란검사 등에서 실시한 방법과 동일하게 실시하였으며 조직과 swab시료도 앞에서 기술한 것과 동일하게 처리하였다. 단, 혈청검사의 경우 전여성기관지염에 대한 항체를 검출하기 위하여 ELISA방법을 추가로 실시하였다. 시험도중 폐사한 모든 닭은 폐사원인분석을 위한 검사를 실시하였다. 필요시 기본적인 조직학적 검사를 위하여 조직검체도 채취하였으며 처리는 일반적인 조직처리방법과 동일하게 수행하였다.

#### (5) 안전성 및 효능평가

##### (가) 시험물질의 안전성평가

시험물질의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 시험물질 접종 후 임상증상을 매일 지속적으로 관찰 하였다. 시험 중에 폐사된 닭에 대하여서는 본 시험물질과의 관련여부를 파악하기 위하여 부검을 실시하였으며 필요시 원인체의 확인 차 조직검사 등 실험실적 실험을 함께 수행하였다.

시험물질 접종 후 산란율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시험물질 접종 후 산란율, 주간폐사율, 비정산란 발생 등을 조사하여 시험물질에 의한 부작용 여부를 처



리군과 대조군간 비교하였다. 시험기간 중에는 각각의 실험계군에서 생산된 계란은 따로 수거하여 평가 하였다.

#### (나) 시험물질의 효능평가

시험물질 접종 후 2주 간격으로 채혈을 하여 시험기간 중 야외 ND, IB, AI 등의 바이러스 감염의 실태를 파악하기 위하여 혈청검사를 실시하였다. 또한, 기관지, 총배설강 및 분변을 멸균 면봉으로 Swab하여 계란접종과 필요시 qRT-PCR 검사를 병행하였다.

### (6) 통계 분석

본 실험의 통계학적 유의성 검정방법은 SPSS (Windows Release 10.07; SPSS, 한글판)방법을 이용한 독립 t-test(두집단 간의 유의성 검정방법)와 GLM(General Liner Model)방법인 일원 분산분석(one way ANOVA)과 2원 분산분석(two way ANOVA) 및 3원 분산분석(three way ANOVA)으로 그룹 간의 유의수준을 검정하였다( $P < 0.05$ ).

## 다. 결과 및 고찰

### (1) 야외 산란계 농장에서의 안전성

#### (가) 임상증상

시험물질의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 시험물질 접종 후 임상증상을 매일 지속적으로 관찰 하였다. 시험기간 중 호흡기, 설사 등 특별한 임상증상이 관찰되지 않았지만 접종군과 대조군간 주간폐사에 있어서는 차이가 관찰되었다. 즉 접종군에서는 주간 평균일일 폐사가 2수에서 5수인 반면 대조군에서는 7수에서 10수였다. 하지만 이들 개체에 대한 부검결과 특정한 질병이 아닌 개체질병으로 판정되어 뚜렷한 외부의 야외감염은 없었던 것으로 확인되었다. 따라서 시험물질이 접종

된 접종군에서 특별한 임상증상이 관찰되지 않아 본 시험물질의 임상증상 측면에서의 안전성은 확인되었다.

(나) 혈청학적 변화

표 23. 주요전염병에 대한 접종군과 대조군의 시험기간 중 혈청역가 변화비교

접종 후 주령	실제 주령	접종군			대조군		
		AI	ND	IB	AI	ND	IB
0	48	4.6±0.84	6.3±0.88	4879±2918	4.7±0.59	7.9±0.83	6170±1847
2	50	6.1±0.73	7.6±0.97	7026±1939	5.6±1.26	7.5±0.92	6437±1993
4	52						

대조군과 처리군간의 시험기간 중 혈청역가의 변화를 관찰하였다(표 23). 이 농장의 경우 AI등에 대한 백신을 이미 접종한 상태여서 모든 개체가 항체형성이 되어 있었다. 시험기간 중 주요 질병에 대한 혈청역가 변화를 보면 다음과 같다. ND의 경우 접종군과 대조군, 또는 접종당시와 접종 2주 후의 혈청변화가 크게 다르지 않아 야외감염은 없었던 것으로 판단이 되었다. AI의 경우 백신을 실시하지않은 농장이 있으면 야외감염 시의 효능평가를 할 T수 있지만 국내여건상 대부분의 농장이 백신접종을 하며 또한 시험기간 중 야외감염이 된다는 보장이 없기 때문에 AI백신을 접종한 농장을 상대로 본 시험을 실시하였다. AI에 대한 혈청역가는 접종군과 대조군 모두 접종전 보다 접종 후 2주때 역가가 상승이 되었다. 이러한 상승은 야외감염보다는 실험실적 오차, 시료오차 등에 기인한 것으로 판단이 된다. 따라서, 시험기간 중에 AI야외감염은 없었던 것으로 판단이 된다. IB의 경우에도 시험기간 중에 접종군과 대조군간의 뚜렷한 차이는 인정이 되지 않았다. 즉, 시험기간 중 IB감염은 없었던 것으로 판단이 되었다.

(다) 산란율의 변화

표 24. 야외 산란계농장의 C7 mix 투여 후 처리군과 대조군의 산란율변화비교

접종 후 주령	실제 주령	접종군			대조군		
		주간폐사	정상계란수 (%)	비정상란수 (%)	주간폐사	정상계란수 (%)	비정상란수 (%)
1	49	2	4,500 (80.0)	92 (1.6)	10	12,210 (81.4)	90 (0.6)
2	50	5	4,476 (79.9)	88 (1.6)	7	12,133 (80.1)	92 (0.6)
3	51	2	4,437 (79.2)	71 (1.3)	7	12,049 (80.3)	101 (0.7)
4	52	2	4,552 (81.2)	40 (0.7)	8	12,158 (81.0)	63 (0.4)
5	53						

야외산란계농장에서의 시험물질 투여 후 산란율 등에 대한 항목을 서로 비교하였다 (표 24). 접종군의 경우 평균산란율은 접종 후 1주때 80%에서 접종 후 4주 때 81.2%로 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서, 시험물질 접종 후 산란율에 대한 영향은 없었던 것으로 판단되었다. 대조군의 산란율도 접종군과 크게 다르지 않은 80.1%에서 81.4%로 시험기간동안 외부로부터 영향을 받지 않은 것으로 판단되었다. 비정상란은 난각 혹은 난질에 이상이 있는 상태를 의미하는 것으로 일반적으로 난각이 얇아지거나 색깔이 변하여 탈색이 되는 상태 등을 예로 들 수 있다. 비정상란 수의 경우는 오히려 대조군에서의 발생이 적어 접종군에서의 영향이 있는 것처럼 판단이 될 수 있지만 모두 일반 농장에서의 비정상란수 오차범위내 이기 때문에 본 시험물질에 의한 비정상란 수의 변환은 없는 것으로 판단이 된다. 주간폐사에 대한 해석은 앞의 임상증상에서 이미 기술한 바 있다.

(라) 시험 대상농장에서의 AI 바이러스 감염 여부 확인 시험

표 25. RT-PCR를 이용한 시험농장에서의 AI 바이러스 감염여부 검사

접종후 주령	실제 주령	구분	바이러스 시료		
			기관	분변	기타
2		접종구	음성	음성	-
		대조구	음성	음성	-
4		접종구	음성	음성	-
		대조구	음성	음성	-

시험물질인 C7 mix 접종 후 주기적으로 기관 swqb, 분변을 대상으로 AI 바이러스 여부를 RT-PCR를 이용하여 검사하였다(표 25). 분변은 1 tube 당 10개의 시료, 기관 swab은 1 tube 당 5개의 시료를 pooling 하여 시험을 수행하였다. 2주간격으로 2회 시험한 결과 모두 음성으로 판정이 되어 시험기간동안 AI 바이러스의 야외감염은 없었던 것으로 판단이 되었다. 이러한 결과는 앞에서 언급한 혈청성적과 일치하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 전반적인 목표 달성도 분석 및 관련분야에의 기여도

- ◆ 본 과제를 수행하면서 처음 예상과는 달리 분리한 aptamer의 동물에의 효과가 기대만큼 나오지 않아, 당초 예상대로 연구를 수행하기가 힘들었다
- ◆ 하지만 1차 및 2차에 걸친 aptamer 분리 및 헤마글루티닌 단백질과의 specific한 결합능 측정을 통해 결합능이 우수한 aptamer를 분리해내게 되었고, 궁극적으로는 결합능이 우수한 aptamer 염기서열을 분석하여 공통적인 구조 및 염기서열을 확인한 후, 35-mer의 작은 길이의 mix를 제조할 수 있게 되었다.
- ◆ 최종적으로 AIV 감염억제 효능을 가진 aptamer mix를 선별해낼 수 있게 되어, 차후 제품으로의 개발가능성을 타진할 수 있다고 본다
- ◆ 연구과정 중, 분리한 aptamer의 특허를 출원하게 되었고, field에서의 결과를 추가하여 학술지에 논문투고를 준비하고 있다.
- ◆ 논문 투고가 늦어진 이유는 field에서의 효과를 검증하는데 시간이 오래 걸렸고, 투여 aptamer 양 결정에 시간이 상당기간 소요되어 예상보다 늦어지게 되었다.
- ◆ 향후, aptamer를 이용한 AIV 억제물질 이외에도 여타 단백질관련 연구에도 기술활용 가치가 클 것으로 예상되며, 본 연구진에서도 역가가 더 높은 물질 개발 가능성이 있다고 보아 지속적인 연구를 할 예정이다

## 2. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 달성도

구분	연구개발의 내용	평가의 착안점 및 달성도		
		착안사항	척도	수행도
1차년도 (2006)	A22와 HA 단백질의 상호작용에 대한 생화학 및 분자생물학적 분석	HA 단백질과 A22의 결합능 조사	15	100
		조류인플루엔자 바이러스의 H9 단백질과 A22의 반응성 분석	15	100
	H9N2 조류인플루엔자 바이러스에 대한 A22의 감염 억제 효능 조사	조류인플루엔자 바이러스 공격접종에 대한 A22 Aptamer의 감염억제 효능 조사	10	100
		SPF 닭에서의 효능평가를 위하여, 공격접종 후 임상증상 비교와 폐사율, 증체율 등의 변화 관찰 및 비교 분석	10	100
		주요 조직의 병리조직학적 병변 및 조직 내 바이러스 함량 비교 분석하고, 바이러스 배출 함량 비교를 위해 EID <sub>50</sub> 및 Realtime PCR에 의한 정량분석을 수행	10	100
	신규 조류인플루엔자 바이러스 감염억제 물질의 발굴	H9 단백질의 수용체 결합부위의 클로닝 및 대장균 내 과발현	20	100
		SELEX 법을 이용하여 H9 단백질과 결합하는 Aptamer 라이브러리 스크린	20	100
2차년도 (2007)	A22와 HA 단백질의 상호작용에 대한 생화학 및 분자생물학적 분석	electromobility shift assay를 통한 A22의 기능적 부위 결정 및 높은 결합력을 보이는 A22 돌연변이체 발굴	15	100
		A22의 구조 변경을 통한 H9 단백질과의 결합력의 증감 분석	20	100
	신규 개발된 AIV 억제물질의 안전성 및 효능 평가(H9N2)	SPF 닭에서의 안전성평가	15	100
		SPF 닭에서의 효능평가	15	100
	신규 감염억제 물질의 세포내 효능 분석	HA 단백질과 A22의 직접적인 결합능을 조사하기 위하여, 숙주세포 표면에 발현시킨HA와 Aptamer의 결합여부를 FACS 또는 형광현미경을 이용하여 관찰	15	100
		lethal dose 또는 sublethal dose의 조류인플루엔자 바이러스 챌린지에 대한 세포사 억제 효능 조사	20	100

3차년도 (2008)	A22의 생체내 전달경로 및 전달물질 개발	생체 내 주입방법 및 전달 경로에 따른 A22의 안정성 및 효율성을 분석	15	100
		효과적인 생체 전달 물질을 발굴하기 위하여 용매에 따른 A22의 생체 내 안정성 (stability)을 시간 및 주입 양에 따라 평가	15	100
	AIV 감염억제 물질의 야외농장에서의 효능 및 안전성 평가(A22 및 신규 물질)	산란계 농장에서의 안전성 평가 - 투여방법 및 농도별	20	100
		산란계 농장에서의 효능평가 - 산란율, 폐사율 등의 변화 비교 - 주요 난질 및 난각질의 변화 비교 - 야외 감염 시 바이러스 배출 함량을 비교, 분석	20	100
	신규 감염억제 물질의 분자생물학적, 생화학적 분석	조류인플루엔자 바이러스에 대한 결합력 분석	15	100
		HA 단백질과 직접적으로 결합하는 기능적 부위 결정 및 돌연변이에 의한 구조 변형을 통한 결합력의 증감을 분석	15	100
최종평가	A22의 조류인플루엔자 감염억제능 평가	A22가 조류인플루엔자 바이러스의 감염을 효과적으로 억제하는 지를 분석하였는가?	25	100
	A22에 대한 생체 안전성 평가를 통한 감염억제로서의 가능성 분석	생체내 안전성 및 전달 물질의 개발을 통해 조류인플루엔자 감염억제제로서의 가능성을 제시하였는가?	25	100
	신규 조류인플루엔자 바이러스 감염억제 물질의 발굴 및 바이러스 감염억제 효능 분석	적절한 조류인플루엔자 억제물질을 발굴하고 이에 대한 효능을 분석하였는가?	50	100

### 3. 특허출원

## 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2008.04.28  
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(0001)  
출원번호 10-2008-0039199 (접수번호 1-1-2008-0302343-29)  
출원인명칭 충북대학교 산학협력단(2-2004-016822-6)  
대리인성명 윤의상(9-1998-000359-2)  
발명자성명 최수영 모인필 전성호 홍승통 윤인중

## 특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가, 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.  
2-나, 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)  
2-다, 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 메일 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공에 드립니다.  
후 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.  
2-라, 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 뵈은 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.  
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지([www.kipo.go.kr](http://www.kipo.go.kr))를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동  
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터  
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454





특허출원서

【참조번호】 0001

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 충북대학교 산학협력단

【출원인코드】 2-2004-016822-6

【대리인】

【성명】 윤의상

【대리인코드】 9-1998-000359-2

【포괄위임등록번호】 2005-010414-2

【발명의 국문명칭】 조류인플루엔자 바이러스 H9N2 감염예방 및 검출에  
유용한 DNA aptamer 및 그 혼합물

【발명의 영문명칭】 DNA aptamers and their mixture for using protection and  
detection of avian influenza virus H9N2

【발명자】

【성명】 최수영

【출원인코드】 4-2000-050778-1

【발명자】

【성명의 국문표기】 모인필

【성명의 영문표기】 MO, IN-PIL

【주민등록번호】 550602-1024625

【우편번호】 361-730

【주소】 충청북도 청주시 흥덕구 가경동 762 벽산아파트 106-901

【국적】 KR

【발명자】

3-1



**【성명의 국문표기】** 전성호  
**【성명의 영문표기】** JEON, SUNG-HO  
**【주민등록번호】** 670621-1235019  
**【우편번호】** 200-760  
**【주소】** 강원도 춘천시 퇴계동 주공2차아파트 212-702  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 홍승룡  
**【성명의 영문표기】** HONG, SEUNG-TONG  
**【주민등록번호】** 410511-1010813  
**【우편번호】** 135-230  
**【주소】** 서울특별시 강남구 일원동 718 샘터마을아파트 110-1301  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명】** 윤인중  
**【출원인코드】** 4-2000-037049-5

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인

윤의상 (인)

**【수수료】**

<b>【기본출원료】</b>	0	면	38,000	원
<b>【가산출원료】</b>	25	면	0	원
<b>【우선권주장료】</b>	0	건	0	원
<b>【심사청구료】</b>	0	항	0	원
<b>【합계】</b>			38,000	원

**【감면사유】** 전담조직

**【감면후 수수료】** 19,000 원

**【첨부서류】** 1. 전담조직임을 증명하는 서류[제출서류생략정보:법인  
 등기부등본(성명:윤의상, 주민등록번호:590901-1380916,

#### 4. 논문원고

## **A DNA Aptamer against Receptor Binding Region of the Hemagglutinin Prevents Avian Influenza Viral Infection**

Seung Kwan Choi, Seong Ji Woo, Soo-Young Choe<sup>1</sup>, In Pil Mo<sup>2</sup> and Sung Ho Jeon\*

Department of Life Science and the Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University, Chuncheon 200-702, <sup>1</sup> School of Life Science, <sup>2</sup> College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 361-764, Republic of Korea.

\*To whom correspondence should be addressed:

Sung H. Jeon, Ph. D.  
Department of Life Science  
Hallym University, Chuncheon 200-702,  
Republic of Korea  
Tel: 82-33-248-2096  
Fax: 82-33-256-3420  
E. mail : [sjeon@hallym.ac.kr](mailto:sjeon@hallym.ac.kr)

## **Abstract**

The globular region of hemagglutinin (HA) protein of avian influenza virus attaches to cell surface sialic acid receptors, thereby facilitating entry of the virus into host cell. In this study, we have identified specific DNA aptamers with high affinity to the HA of H9N2 type influenza virus (A/ck/Korea/ms96/96). We have cloned and purified HA101-257 peptide containing the globular region (101-257 residues) of HA protein and then immunized into BALB/c mice to obtain the anti-H9 anti-serum. By SELEX method, 28 aptamers were isolated that bind to the HA101-257 peptide. Sequence alignment analysis of these aptamers revealed that 6 selected have highly conserved consensus sequences. Among them, aptamer C7 showed the highest similarity to the consensus sequences. Based on C7 aptamer, we have synthesized two aptamers with 35 nucleotides, C7 and C7[M]. Newly synthesized aptamers showed strong binding capability to the H9 peptide as well as viral particle, and thus prevented MDCK cells from viral infection. From these results, we have concluded that our aptamers can recognize HA protein of influenza virus and block the binding of virus to target receptors that is required for the penetration into the host cells.

*Keywords:* H9N2 Avian Influenza virus, Hemagglutinin (HA), DNA aptamer, antiviral effect

## Introduction

The influenza A virus is in the family *Orthomyxoviridae*, a group of single stranded minus-sense RNA viruses with a segmented genome and a serious infectious disease [1]. Avian influenza viruses have appeared a hundred years ago, since then developed regionally, since the 1990, it has spread again worldwide. Avian influenza viruses are capable of infecting a wide range of chickens, wild birds and animal species including human beings. The natural reservoir of influenza A viruses are wild birds such as ducks, geese and shore birds (gull) and rapidly spread to become a prevalent diseases in domestic poultry worldwide [2, 17]. They have caused serious economic losses in the poultry industry and constituted an important threat to human health [3]. Global outbreaks of highly pathogenic avian influenza (HPAI) in domestic poultry are reported since the last decade and caused a still increasing. At the same time, H9N2 low pathogenic avian influenza (LPAI) have become endemic and have continued to spread through Asia, Middle Eastern countries and South Africa [4]. Avian influenza A viruses of the H9N2 subtype were first detected in Turkey and United States in 1966 [5] and then were first documented in 1966 in Korea [6, 18, 19].

An influenza virus (H5N1) known to infect only birds previously was found to infect human causing disease and death in Hong Kong in 1997 and the outbreak involved 18 patients with six deaths [7, 15, 16]. The 2003 Dutch outbreak of highly pathogenic avian influenza virus A/H7N7 is notable, since 89 manifested symptoms as conjunctivitis, and the remaining patients presented with influenza-like illness. Among them, one veterinarian had an influenza-like illness and then died of pneumonia [8]. An H9N2 avian influenza was isolated from a child with a flu-like illness in Hong Kong In November 2003. Although highly

pathogenic avian influenza H5N1 has been a major health threat to humans in Southeast Asia since 2003, this event demonstrated that H9N2 virus also has the potential to infect humans [9]. H9N2 AIV were isolated from pig, human cases of H9N2 virus infection have been reported in Hong Kong and China [10].

The use of antiviral drugs has been recognized as the primary public health strategy for mitigating the severity of a new influenza pandemic strain. However, the success of this strategy requires the prompt onset of therapy within 48 hours of the appearance of clinical symptoms [11]. A development of effective vaccine depends on understanding of protective immune responses against natural infection, particularly those directed against specific virus constituents. The influenza virus major surface glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are the principal targets of the protective immune response. HA specific antibodies neutralise the infectivity of the virus and prevent infection by antigenically related influenza viruses. In contrast, NA specific antibodies do not prevent influenza virus infection but prevent the release of viruses from infected cells, and NA immunity is referred to as infection permissive. Antibodies to the matrix M2 protein, which is conserved within the A-type influenza viruses, are cross-protective between different subtype-virus infections, although the level of protection is low. Antibodies to the conserved nucleoprotein (NP) and matrix M1 protein can be induced, although they fail to contribute to protection. This was demonstrated by failure of passive transfer of M1 or NP monoclonal antibodies in mice to protect from challenge by a wild-type influenza virus [12, 20].

Hemagglutinin mediates attachment to and entry of the virus into host cells by binding to sialic acid receptors at the cell surface. It exists in the viral membrane as homotrimeric spikes, each monomer containing a globular domain with a conserved sialic acid-binding pocket surrounded by antigenically variable

antibody-binding sites. The receptor-binding site within the HA is probably not exposed to the immune system because of the conformational restriction of the trimeric form of HA in native conditions. Using the above mentioned conserved region of the HA molecule as a template, we designed a novel molecule aptamer, which would bind directly to the virus HA receptor-binding region and eventually prevent its interaction with the host cells [13, 21, 22].

Aptamers are non-naturally occurring structured oligonucleotides that bind their targets with high affinity and have the capacity to inhibit protein–protein interactions with potencies similar to that observed with antibodies. Aptamers are discovered using a process termed SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment), in which ligands are isolated from highly diverse ( $10^{15}$ - $10^{18}$ ) starting pools via rounds of affinity capture and amplification [14, 23, 24]. Using this SELEX procedure, an aptamer was selected for its binding to the globular region of influenza HA, HA-(91–261). We demonstrated that this aptamer was capable of blocking the binding of the virus to host cells and consequently preventing viral infection [13].

## **Materials and method**

### **Cloning of recombinant H9 (101-257) peptide and expression**

It was cloned by PCR method that residues 101-257 of HA protein of influenza strains A/ck/korea/ms96/96 virus. It was the overexpressed of its gene product in *Escherichia coli*. The expressed peptide was purified and produced antibody against the anti-H9 peptide with BALB/c. Plasmid DNA encoding the H9N2 full gene was used to clone the globular region of HA and used for PCR using the two primers ; 5'-CCGGATCCTCAGCTGTCA ATGGGAT-3' and, 5'-GGAAGCTTGGGGCAATTAGATTCC-3', respectively. After amplified HA(101-257) by PCR and cloned by inserting the PCR product into T-vector (Real-biotech). PCR condition was initiated by denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C 1min, 50°C 30 s and 72°C 1 min. The amplified products were further elongated at 72°C for 10 min. The HA gene was cloned as a BamHI-HindIII DNA fragment into BamHI-HindIII digested pQE30 plasmid (Qiagen) and transformed into *E.coli* strain BL26 competent cell for HA(101-257) expression. Transformed *E.coli* BL26 cells were grown at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5-0.6 in LB medium containing ampicillin (100µg/ml) and HA(101-257) expression induced by the addition of 1mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) for 4hr with shaking.

### **Immunization of H9 peptide**

Harvested the cells by centrifugation at 7000 rpm for 15 min at 4°C was resuspended in Buffer B (8M Urea; 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris-Cl; pH8.0) and shaken cells at 4°C for 40 min. The supernatant was collected from lysate by centrifugation at 7000 rpm for 15 min at 4°C to pellet the cellular debris. It was loaded up to the cleared lysate supernatant containing the 6XHis-tagged



protein onto a pre-equilibrated Ni-NTA spin column and centrifuged 2 min at 2000 rpm. And the washed the Ni-NTA spin column with 500µl Buffer C (8M urea: 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris-Cl; pH6.3). The sample was centrifuged for 2 min at 2000 rpm. After washing 3 times, the supernatant was eluted the protein twice with 500µl Buffer E (8M urea: 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris-Cl; pH4.5). Centrifuge for 2 min at 2000 rpm, and collected the eluate. BALB/c two mice at the age of 5 weeks were immunized intramuscularly (foot pad) with a droplet of 50ul of recombinant peptide solution containing 1ug / 50µl HA(101-257) in PBS with Complete Freund's adjuvant(CFA). The mice were boosted twice at 2-week intervals, using the same amount of antigen in Incomplete Freund's adjuvant(IFC) used for the initial immunization. The mice were bled after the last immunization and incubated 1hr at 37°C as well as at 4°C overnight. After incubated, the serum was centrifuged and collected the supernatant. Mouse anti-HA(101-257) antibody was confirmed ELISA and immunoblot assay.

### **Identification and design of specific aptamer**

The aptamer library containing a central, randomized sequence of 28 nucleotides flanked by common primers 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-(n)<sub>28</sub>-TATGGTCTGAAT AAGTTAACG-3' was synthesized. The ssDNA aptamer library was denatured at 80°C for 10 min and the cooled ice for 10 min. For the selection process, 30nmol of this product were mixed with 25µl Ni-NTA superflow(Qiagen) in 500µl of selection buffer(50mM Tris-HCl; pH 7.4, 5mM KCl, 100mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, tRNA, 0.2% BSA) by rotor at 4°C for 30 min. Nonspecific Ni-NTA agarose binding aptamer was removed by centrifugation and then collected the supernatant. It was mixed with 200ug of the recombinant His-tagged HA(101-257) peptide in 500µl

of selection buffer at 37°C for 30 min. The bound aptamer-HA(101-257) complex was purified by adding 25µl of Ni-NTA superflow (Qiagen). After washing three times with 1ml of selection buffer, the complex was resuspended in 50µl of 10mM Tris-buffer and amplified by PCR using the above 5' primer 5'-ATTAACCCTCACT AAAGGGA-3' and the 3' primer 5'-CGTAACTTATTCGACCATA-3' under the conditions of 100pmol/primer, in a final volume 50µl at 40°C, for 30 cycles. After three repeats of this SELEX procedure, amplified nucleotides were cloned by inserting the PCR product into T-vector and transformed into *E. coli*.

#### **Reverse screening of aptamer**

Biotinylated ssDNA of each plasmid from individual clones was synthesized using the B-5' primer 20mer, which has the same sequence as the 5' primer in the aptamer. The solid phase ELISA plate was prepared by coating with 100µl well of 100µg/ml streptavidin diluted in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> and incubated overnight at 37°C. After washing four times with PBS, the wells were blocked with 200µl of PBS containing 5% bovine serum albumin by incubating at room temperature for 2 h followed by washing three times with PBS-T. After washing, 100µl of 2.5 pmol/100µl of the individual biotinylated ssDNA and, as negative control, B-5' primer were added to the wells and incubated at 37°C for 2 h followed by washing four times with PBS-T. After this step, 100µl/well of 10 HAU/well virus or 2µg/well histidine-labeled HA101-257 peptide were added and incubated at 37 °C for 2 h. After washing the wells four times with PBS-T, anti-His antibody or anti-virus serum were added to the corresponding wells. Reverse screening assay was completed by following the procedures of ELISA after this step.

### **Immunoblot analysis**

Recombinant HA101-257 peptide was subjected to 15% SDS-PAGE. The separated protein was electrotransferred and immobilized onto nitrocellulose membrane (Milipore). The membrane was blocked with 5% nonfat milk in TBS containing 0.1% Tween-20 (TBST) at room temperature for 2 hr and incubated with Anti-HA(101-257) antibody at 4°C for 15hr. The membrane was rinsed ten times with TBST and blocking with 5% nonfat milk in TBST at room temperature for 2 hr. The membrane was rinsed ten times with TBST and further incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG. Bound antibody was detected by the addition of Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP substrate (Milipore). The membrane was stripped with stripping solution (25mM glycine-HCL, pH 2, 1% (w/v) SDS in PBS) for 30 min and then washed with PBS. The membrane was blocked with 5% nonfat milk in TBS containing 0.1% Tween-20 (TBST) at room temperature for 2 hr and incubated with biotinylated C7 aptamer of 200pmole /10ml at 4°C for 15hr and followed previous protocols.

### **Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA)**

Ninety-six-well round-bottom microtiter plates were coated with HA101-257 peptide in 1µg/100µl 0.1M bicarbonate buffer (60mM sodium bicarbonate and 40mM sodium carbonate) and incubated at 37°C for 2 h or at 4°C overnight. Between all subsequent incubation steps, the plate was washed four times with PBST, and all dilutions were made in PBST containing 1% BSA. The plates were blocked by incubation with 200µl of blocking solution (5% BSA in PBS) at RT for 2 h, rinsed, and incubated with twofold serial dilutions of anti-HA peptide in 5µl/50µl dilution buffer at RT for 2 hr. After the plate was rinsed, 50µl of HRP-conjugated goat anti-mouse (1:5000 dilution) was added; and the mixture was incubated for 2 hr at 37°C, washed. Color

development was performed by the addition of 50µl freshly prepared substrate solution (ABTS, Roche) for 10 min at room temperature. After stopping the reaction with 50ul of 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the plate was read a multichannel, ELISA reader (Thermo ELECTRON CORPORATION Multiskan Ascent) at 405nm. For the selection of aptamer with high affinity binding to H9 peptide, ELISA plate was coated with 100ul of HA(101-257) peptide diluted in PBS by incubating at 4°C overnight. After washing four times with PBST, the wells were blocked by incubation with 200µl of blocking solution (5% BSA in PBS) at RT for 2 h. After several washing, the screened aptamer 200pmole was mixed in 200µl of selection buffer and denatured at 80°C for 10 min and then cooled on ice for 10 min. 50µl of serial-diluted aptamer was added to each well, and the plate was incubated at 37°C for 2h. Anti-HA antibody from mice immunized the recombinant HA101-257 peptide was used positive control. After washing four times, streptavidin conjugated to HRP was used as secondary antibody. ABTS was added as substrate. After the addition of the substrate the plate was incubated at 37°C until color was produced and subsequently determined at 405nm by ELISA reader.

### **Viability of MDCK cell**

MDCK cells were used to measure of cells infectivity of H9N2 virus. MDCK cells were laid on 96-well plate (0.5 X 10<sup>4</sup>/well) 1 day before the experiment. The plate was incubated in maintaining medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum) at 37°C for 18 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was aspirated and infected with influenza virus 10ul, 20ul and then incubated further at 37°C for 1 h. After 1 h, virus infected wells were added DMEM of 100ul for 24 h. And then the plate was added MTT solution of 10ul to each well, which contained 100ul medium

and incubated at 37°C for 1 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The optical density values were quantitated using an ELISA reader at 405 nm. DMSO was used positive control. C7 35mer and C7 [M] aptamers were used to confirm the inhibition of viral infectivity of the MDCK. The MDCK cells were laid on 96-well plate (0.5 X 10<sup>4</sup>/well) 1 day before the experiment. The plate was incubated in maintaining medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum) at 37°C for 18 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After the medium was removed except control well, and added 10µl of Egg supernatant, 10µl, 20µl of virus, virus with C7 35mer aptamer, virus with C7 [M] aptamer (aptamers were treated with 100, 250, 500, 1000pmol). After 1 h, virus infected wells were added DMEM of 100µl for 24 h. And then the plate was added MTT solution of 10ul to each well, which contained 100ul medium and incubated at 37°C for 1 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The optical density values were quantitated using an ELISA reader at 405 nm. DMSO was used positive control.

## **Results and Discussion**

### ***Cloning of receptor binding pocket of type 9 HA peptide***

Avian influenza virus has expressed surface glycoprotein, the hemagglutinin. HA attaches to cell surface sialic acid receptors, facilitating entry of the virus into host cell. If novel molecules that can bind directly to the virus HA interfere the HA to bind to the receptor of host cells, it will prevent to infection of avian influenza virus. The globular region of type 9 HA (residues 101-257) membrane glycoprotein of avian influenza virus (A/ck/Korea/ms96/96) has been amplified by RT-PCR and cloned into T vector. This gene, designated HA101-257, was digested with BamHI-HindIII and cloned into expression vector, pQE30 and then transformed into *E.coli* BL-26 competent cells. HA101-257 gene was confirmed by electrophoresis and DNA sequencing analysis (Fig. 1). The HA101-257 peptide was overexpressed by IPTG induction, purified with Ni-NTA column and confirmed by SDS-PAGE (Fig. 2A). The antigenicity of HA101-257 peptide to the chicken anti-virus antibody was confirmed by immunoblot analysis (Fig. 2B). Purified HA101-257 peptide was then used to immunize mice for the purpose of production of anti-HA101-257 peptide antiserum. As shown in Fig. 2C, anti-HA101-257 serum showed higher binding affinity to the HA101-257 peptide than pre-immune serum as control.

### ***Selection and construction of the aptamers***

Using the HA101-257 peptide, we have screened aptamer library, a nucleotide library obtained from a pool of  $10^{18}$  ssDNA molecules containing a random segment of 30 nucleotides flanked by 5' and 3' common primers as conserved linkers to amplify the selection process. This random library was hybridized with the HA101-257 peptide using a process termed Systematic

Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) as described in materials and methods for the identification of aptamer binding to the HA101-257. DNA library was mixed with HA101-257 peptide and then purified by Ni-NTA column. Aptamers are isolated from highly diverse  $10^{15}$  starting and bound HA101-257 peptide and then amplified by PCR. After four rounds amplification, ssDNA aptamers with high affinity to the HA101-257 peptide were screened by ELISA for binding to the HA101-257 peptide. The process of reverse screening was selected 28 aptamers in 3 groups. Selected aptamers were then cloned into T-vector and analyzed their DNA sequences.

Among the 3 groups, aptamers of group C were showed continuous high affinity to the HA101-257 (Table 1); relative binding affinities of individual aptamers were about 0.5 to 0.82 times compared to mouse anti- HA101-257 antibody. The combination of four aptamers in group C which showed relatively higher affinity to the HA101-257 peptide, and the other 1 to 3 aptamers were treated to the HA101-257 peptide and then measured their binding affinity by ELISA. As a result, aptamer mixtures significantly showed higher binding affinity to the HA101-257 peptide than individual aptamer. Random five aptamer mixture of group C did not show significant increase of binding affinity according to its components and individual mixture was represented high error in each experiment. But, more than 5 components (6 to 8) of aptamers showed higher level of binding affinity to the peptide than mouse anti-HA101-257 antibody, respectively (Table 1). The highest binding affinity was achieved by Cmix8 (Fig. 3).

#### ***Consensus sequence of aptamers to HA101-257 peptide***

Aptamers in each group were analyzed the random sequences of aptamers to binding to the HA101-257 peptide. Among analyzed random sequence was confirmed consensus of aptamers to binding HA101-257 peptide (Fig. 4). C7

aptamer was the most including consensus among of these aptamers. Nucleotides were synthesized 35mer nucleotide including with random and insert sequences in C7 aptamer and six aptamers. The synthesized two aptamers were confirmed binding affinity against HA101-257 peptide and virus by ELISA. These aptamers were shown high affinity than aptamers mixture of group C to HA101-257 peptide and similar combination to type H9 virus. These results showed that two aptamers were high affinity binding to HA101-257 peptide and virus. C7 35mer and C7 modified 35mer aptamer as anti-viral agent against H9N2 type avian influenza virus was measured using MDCK cells by MTT assay. First we confirmed that MDCK cells were infected with 10ul of H9N2 influenza virus. Concentration classification of aptamers were confirmed to inhibition viral infectivity against H9N2 type avian influenza virus. When aptamers was treated each concentration with 10 $\mu$ l of virus, at a 100pmol concentration, it represented inhibition, at a 500pmol concentration with 20 of virus, it shown inhibition. In result, Aptamer was able to confirm the prevention and suppression viral infection to cell.

C7 aptamer was the most including consensus among of twenty-eight aptamers. Nucleotides were synthesized 35mer nucleotide including with random and insert sequences in C7 aptamer and six aptamers. C7 35mer and C7 modified 35mer aptamer as anti-viral agent against H9N2 type avian influenza virus was measured using MTT assay. The Aptamers efficacy was measured by comparing cell survival in non-treated and aptamer-treated, after virus infected MDCK cells. Egg supernatant was treated in MDCK cells for using control experiment. Then plates were incubated for 24 h. Aptamers was treated with 100-1000pmol. Control experiment was shown four times the cell survival than virus-treated. When aptamers was treated each concentration, at a 100pmol



concentration, it survived fifty percent, and at a 500pmol concentration, it confirmed the cell viability up to fifty percent.

### ***Confirmation to inhibition viral infectivity of aptamer***

The result was investigated that aptamer mixture bind to AVI H9N2 whether or not to. After the microtiter plate was coated with AVI H9N2, biotinylated aptamers was added in plate and then confirmed by ELISA. Aptamer mixture showed meaningful to AVI H9N2 (Fig. 4). Meanwhile, sequences were analyzed consensus of aptamers to binding to the HA101-257 peptide (Fig. 5). The synthesized 35mer aptamers were confirmed binding affinity against HA101-257 peptide and virus by ELISA. These aptamers were shown high affinity than anti- HA101-257 antibody to HA101-257 peptide and similar combination to H9 virus. These results showed that aptamer mixture and 35mer aptamers were high affinity binding to HA101-257 peptide and virus.

In view of these results, we know that aptamers of C group were high affinity to HA101-257 peptide and some degree affinity to H9N2 virus. However, two of C7 35mer aptamers were appeared high affinity both HA101-257 peptide and H9N2 virus that were confirmed inhibition of viral infection on MDCK cells. All things considered, it means that identification of aptamer specific binding to hemagglutinin which concerned about H9 type AVI virus infection. We thought that aptamer could prevent and inhibit the viral infection.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry for Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea ( ).

## References

1. [Thomas JK](#), [Noppenberger J](#). (2007). Avian influenza: a review. [Am J Health Syst Pharm](#). Jan 15;64(2):149-65.
2. [Choi JG](#), [Lee YJ](#), [Kim YJ](#), [Lee EK](#), [Jeong OM](#), [Sung HW](#), [Kim JH](#), [Kwon JH](#). (2008). An inactivated vaccine to control the current H9N2 low pathogenic avian influenza in Korea. [J Vet Sci](#). Mar;9(1):67-74.
3. [Du N](#), [Li W](#), [Li Y](#), [Liu S](#), [Sui Y](#), [Qu Z](#), [Wang Y](#), [Du Y](#), [Xu B](#). (2008). Generation and evaluation of the trivalent inactivated reassortant vaccine using human, avian, and swine influenza A viruses. [Vaccine](#). Jun 2;26(23):2912-8.
4. Sorrell EM, Ramirez-Nieto GC, Gomez-Osorio IG, Perez DR. (2007). Genesis of pandemic influenza. [Cytogenet Genome Res](#). 117(1-4):394-402.
5. [Ping J](#), [Li C](#), [Deng G](#), [Jiang Y](#), [Tian G](#), [Zhang S](#), [Bu Z](#), [Chen H](#). (2008). Single-amino-acid mutation in the HA alters the recognition of H9N2 influenza virus by a monoclonal antibody. [Biochem Biophys Res Commun](#). Jun 20;371(1):168-71.
6. [Wan H](#), [Perez DR](#). (2007). Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. [J Virol](#). May;81(10):5181-91.
7. [He Q](#), [Velumani S](#), [Du Q](#), [Lim CW](#), [Ng FK](#), [Donis R](#), [Kwang J](#). (2007). Detection of H5 avian influenza viruses by antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5-specific monoclonal antibody. [Clin Vaccine Immunol](#). May;14(5):617-23.
8. Munster VJ, de Wit E, van Riel D, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Kuiken T, Fouchier RA. (2007). The molecular basis of the pathogenicity of the Dutch highly pathogenic human influenza A H7N7 viruses. [J Infect Dis](#).196(2):258-65.

9. [Wu R](#), [Sui ZW](#), [Zhang HB](#), [Chen QJ](#), [Liang WW](#), [Yang KL](#), [Xiong ZL](#), [Liu ZW](#), [Chen Z](#), [Xu DP](#). (2008). Characterization of a pathogenic H9N2 influenza A virus isolated from central China in 2007. [Arch Virol](#). 153(8):1549-55.
10. [Lu X](#), [Renshaw M](#), [Tumpey TM](#), [Kelly GD](#), [Hu-Primmer J](#), [Katz JM](#). (2001). Immunity to influenza A H9N2 viruses induced by infection and vaccination. [J Virol](#). May;75(10):4896-901.
11. Alexander ME, Moghadas SM, Röst G, Wu J. (2008). A delay differential model for pandemic influenza with antiviral treatment. *Bull Math Biol*. 70(2):382-97.
12. Cinatl J Jr, Michaelis M, Doerr HW. (2007). The threat of avian influenza A (H5N1). Part IV: Development of vaccines. *Med Microbiol Immunol*. 196(4):213-25.
13. [Jeon SH](#), [Kayhan B](#), [Ben-Yedidia T](#), [Arnon R](#). (2004). A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. [J Biol Chem](#). Nov 12;279(46):48410-9.
14. [Shamah SM](#), [Healy JM](#), [Cload ST](#). (2008). Complex target SELEX. [Acc Chem Res](#). Jan;41(1):130-8.
15. [Wong SS](#), [Yuen KY](#). (2006). Avian influenza virus infections in humans. [Chest](#). Jan;129(1):156-68.
16. Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, Toapanta FR, Steckbeck JD, Cole KS, Kumar NM, Pushko P, Smith G, Tumpey TM, Ross TM. (2008). Cross-Clade Protective Immune Responses to Influenza Viruses with H5N1 HA and NA Elicited by an Influenza Virus-Like Particle. *PLoS ONE*. 3(1):e1501.

**Table 1. Relative binding affinity of individual and mixtures of aptamers .group C to the HA101-257 peptide.**

Clone	Specific sequence	Relative
		Binding affinity
C5	CGGTTTGGCGCTCTGGTATTCTTCGGTA	0.50 ± 0.07
C7	GGTAGTTATAGTATATGGAAGGGGGTGT	0.69 ± 0.13
C12	TTGGGTGGTGGAGGTAGGCAGCACTTGG	0.62 ± 0.12
C14	CGCGGGCAAAGGGACGGAGAGCATCGA	0.68 ± 0.03
C15	TAGCAAGATCTGCAGGGGGACTCGTGTA	0.82 ± 0.11
C17	GAGGCGGGAGGGTAGTAGGGACTGAAGT	0.81 ± 0.19
C18	TGGGCGCGATAATCAGTGCCATGATGCA	0.74 ± 0.02
C19	ATGTGCCGCTAGATCAACCAGGGGTAGA	0.62 ± 0.10
Cmix5	C7, C14, C17, C18, C19	0.63 ± 0.32
Cmix6	C7, C14, C15, C17, C18, C19	0.93 ± 0.07
Cmix8	C5, C7, C12, C14, C15, C17, C18, C19	1.13 ± 0.10
Cmix14	Cmix8 + 6 other clones	0.96

Relative binding affinity of aptamers in group C to the HA101-257 peptide as measured by ELSIA. The highest binding affinity was achieved by Cmix8.

## Figure legends

**Fig. 1. The sequence of hemagglutinin of A/ck/Korea/ms96/96 avian influenza virus.** Underline indicates globular region of hemagglutinin.

**Fig. 2. Purification of HA101-257 and its immunogenicity.** (A) The recombinant HA101-257 peptide was expressed in *E. coli*. and analyzed by 15% SDS-PAGE. Lane M, Size marker; lane 2, 10µg protein; lane 3, 20µg protein. (B) Confirmation of HA101-257 peptide expression by immunoblotting with chicken anti-H9 serum. (C) Anti-H9 antibody production in mice infected with H9101-257 peptide. Anti-H9 serum for binding to HA101-257 peptide coated on the

microtitre plated for the ELISA assay. HA101-257 peptide protein boosting (■), nonimmunized control mice (▲) and uncoated peptide (\*).

**Fig. 3. Analysis the binding affinity of selected DNA aptamers against HA101-257 peptide and A/ck/Korea/ms96/96 virus.** (A) Binding reactions were performed at group C aptamers. Among the group C aptamers, Cmix5 are C7, 14, 17, 18, X and Cmix6 are #C 7, 14, 17, 18, 19, X and Cmix8 are C 5, 7, 12, 14, 15, 17, 18, 19. Control is biotylated primer. ( X = 5 or 12 or 13 or 15 or 16). (B) Effects of Cmix and anti- HA101-257 antibody on binding to the A/ck/Korea/ms96/96 virus. The binding was tested by ELISA. Cmix are combinations of C7, 14, 15, 17, 18 aptamers.

**Fig. 4. Analysis of consensus nucleotide sequences with specific binding aptamers to HA101-257 peptide.** The sequences shown represent consensus sequences. Sequences highlighted are the conserved sequences. Common consensus sequence among six aptamers is indicated. Bold letters are consensus sequence more than five, dashed letters are more than three, and N meanse non-consensus sequence.

**Fig. 5. Anti-viral effects of C7 35mer and C7 [M] 35mer.** The C7 35mer and C7 [M] 35mer showed protective effect on the viability of MDCK cells infected with H9N2 influenza virus.

Fig 1

1 - GGATCCTCAGCTGTCAATGGGATGTGCTACCCTGGAAGGGTAGAGAATCTGGAAGTACTC - 60  
 (G) S S A V N G M C Y P G R V E N L E V L

61 - AGATCTTTTTTTCAGTTCTGCTCGCTCCTACAAAAGACTCCTGCTCTTTCCAGACCGCACT - 120  
 R S F F S S A R S Y K R L L L F P D R T

121 - TGGAAATGTGACTTACACTGGAACAAGCAAAGCATGCTCAGATTCATTCTACAGAAGTATG - 180  
 W N V T Y T G T S K A C S D S F Y R S M

181 - AGATGGCTGACACACAAGAGCAATTCTTACCCTATTCAAGACGCTCAATATACCAACGAT - 240  
 R W L T H K S N S Y P I Q D A Q Y T N D

241 - TGGGGAAAGAATATTCTTTCATGTGGGGCATAACCATCCACCTACTGATACTGAGCAA - 300  
 W G K N I L F M W G I H H P P T D T E Q

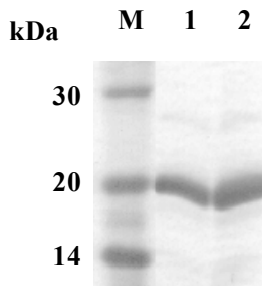
301 - ATGAATCTATACAAAAAAGCTGATACAACAACGAGTATAACAACGGAAGATATCAATCGG - 360  
 M N L Y K K A D T T T S I T T E D I N R

361 - ACTTTCAAACAGTGATAGGACCAAGGCCCTTGTC AATGGTCAACAAGGGAGGATTGAT - 420  
 T F K P V I G P R P L V N G Q Q G R I D

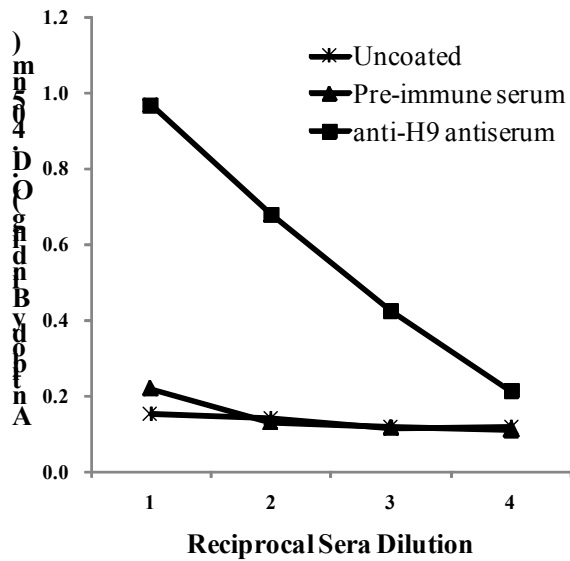
421 - TATTATTGGTCAGTACTAAAGCCAGGCCAGACATTGCGAATAANATCCAATGGAATCTAA - 480  
 Y Y W S V L K P G Q T L R I R S N G (I) Ter

Fig 2

A



B



C

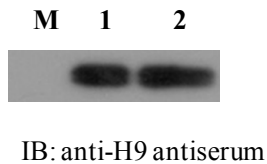
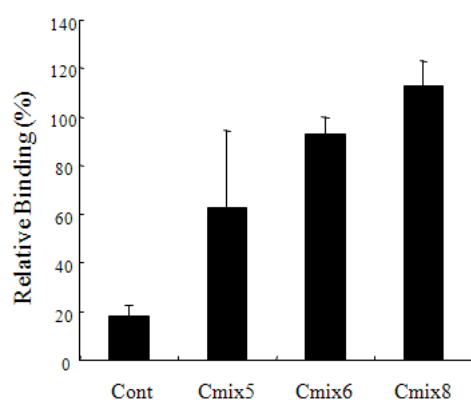


Fig 3

Consensus : **AANATCTGNNAGGGGNGTCGTGT**  
 C7 : GGTAGTTAT**AGTATATGGAAGGGGTGTCGTATGG**  
 C19 : ATGTGCCGCTAGAT**TCAACCAGGGTAGACGTATGG**  
 C15 : TAGCA**AGATCTG-CAGGGGACTCGTGTA**  
 B1 : GATCG**AGACT-TGCTAGTGTCGAATTGGC**  
 B2 : GAGA**ACGTAGGTGAGCGGGTTGTGTGC**  
 B6 : CGCCTAGGG**ATACT-GGTTACGGCCGTATGGT**

Fig 4

A



B

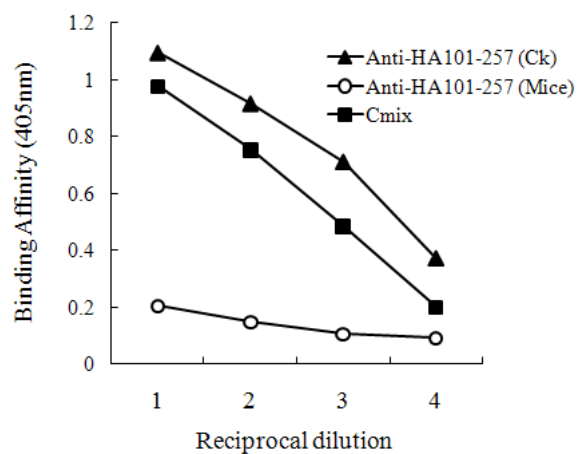
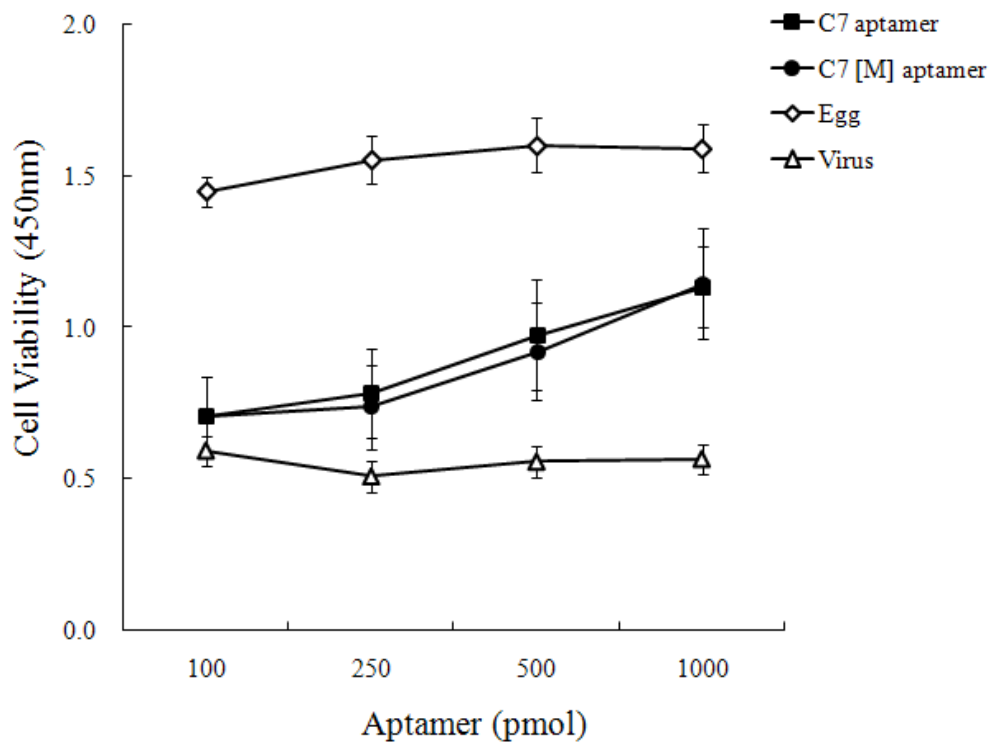


Fig 5





## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

H9 단백질에 선별적으로 결합하는 aptamer 염기서열의 특징을 규명할 수 있었으며, C7 mix의 경우 SPF 계란에서 바이러스 중화능을 확인하였고, 산란계에서 바이러스의 배출효과를 검증할 수 있었다. 또한 야외산란계 농장에서 안전성을 조사한 결과, 특별한 임상증상이 관찰되지 않아 본 시험물질의 임상증상 측면에서의 안전성을 확인하였고, 시험물질 접종 후에도 산란율에 대한 영향은 없는 것으로 판단되었다.

본 과제에서 도출된 중간결과를 바탕으로 특허를 이미 출원하였으며, 현재 논문을 준비중에 있다. 효능 및 안전성에 있어서는 제품화를 위해 참여기업과의 협의를 진행중에 있다.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.