

발간등록번호

11-1543000-000802-01

AI-DIVA 프로그램 적용 방역 시스템 개발
Development of a DIVA-based AI control system

서울대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “AI-DIVA 프로그램 적용 방역 시스템 개발” 과제 (제 1세부과제 “AI-DIVA 시스템용 백신 개발”, 제 1협동과제 “AI-DIVA 시스템용 진단 키트 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2014 년 12 월 15 일

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 권 혁 준

세부연구책임자 : 권 혁 준

협동연구기관명 : (유) 바이오노트

협동연구책임자 : 김 정 호

요 약 문

I. 제 목

AI-DIVA 프로그램 적용 방역 시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

고병원성 조류 인플루엔자 (HPAI)는 1차 (2003년 12월 ~ 2004년 3월), 2차 (2006년 11월 ~ 2007년 3월), 3차 (2008년 4월 ~ 5월), 4차 (2010년 12월 ~ 2011년 5월), 5차 (2014년 1월 ~)까지 총 다섯 차례 발생하여 막대한 경제피해를 초래하였음. 2010년 ~ 2011년에 발생한 HPAI의 경우 살처분 보상금 669억 원, 생계안정자금 18억 원, 경영안전자금 1,221억 원, 수매도태자금 733억 원을 포함한 직접 피해액은 2,641억 원이었고, 가공·유통업체, 외식업체, 소매업체 등을 포함하는 경우 총 피해규모 6,324억 원에 이르는 것으로 보고 (한국농촌경제연구원)되어 막대한 경제피해를 초래하고 있음.

현재까지는 관련 공무원, 방역요원, 그리고 정부의 노력으로 성공적인 방역이 이루어졌으나, 우리나라가 철새 이동경로 상 중요한 위치를 차지하고 있어 철새에 의한 바이러스 유입 차단은 불가능하며 바이러스의 농장유입 경로나 매개체 또한 명확히 밝혀지지 않아 과거처럼 1년 걸러 발생하거나 앞으로 매년 발생하는 최악의 상황도 배제할 수 없음. 구제역 사례처럼 차단 방역에 실패하고 백신에 대한 준비도 이루어지지 않아 도입 시점을 놓치는 경우 경제적인 피해는 물론 인체 감염 위험성으로 인한 사회 불안을 초래할 수 있으므로 최악의 상황을 가정한 대책 마련이 시급함.

차단방역에 실패하여 전국적으로 질병이 발생하는 경우 택할 수 있는 방안으로 HPAI에 대한 백신접종이 있음. 이를 위해서는 안전 (Safe)하고, 면역원성 (immunogenic)이 높으며 교차방어 (generic Antigenicity)가 가능하고 생산성 (pRoductive)이 높으며 야외바이러스 감염과 백신 접종에 의해 생성된 항체를 감별 (Trouble-shooting) 할 수 있는 똑똑한 (SMART) 백신이 필요하며, 국내 상황에 맞는 DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals) 진단키트도 확보해야 함.

동물용 인플루엔자 백신은 야외 분리주를 계태아에 계대하여 증식성을 개선시킨 후 불활화 오일백신으로 사용하고 있음. 인체용 백신의 경우 계태어나 세포주에서 증식성이 좋은 바이러스들의 8개 유전자 중 방어항원으로 중요한 HA와 NA 유전자를 최근 유행하는 바이러스의 HA와 NA 유전자로 교체하여 역유전학 기법을 사용하여 백신주를 제작하고 있음. 원하는 특성을 갖는 바이러스를 자연에서 골라내기 어려우므로 SMART 백신을 확보하기 위해서는 역유전학 기술을 적용해야 함. 계태아에서의 증식성이 좋고, 생물학적 특성이 많이 규명된 PR8 바이러스는 전 세계적으로 역유전학 기법을 이용한 백신 제작에 가장 흔하게 사용되고 있으나, 생쥐 반수 치사농도 (50% mouse lethal dose, MLD₅₀)가 10^{5.5}EID₅₀/ml 정도로 10⁶EID₅₀/ml 바이러스를 마우스에 접종하는 경우 7일 이내에 100% 폐사를 초래하므로 PR8 바이러스의 고증식성은 유지하면서도 포유류에 대한 병원성이 전혀 없는 안전한 역유전학 시스템이 필요함.

인플루엔자 바이러스는 HA와 NA의 항원형에 따라 HA1-HA16과 NA1-NA9의 아형으로 분류되며 서로 다른 아형 간에는 교차방어가 충분하지 않은 것으로 알려졌다. 최근 HA 단백질에서 대부분의 A형 인플루엔자 바이러스에서 보존된 에피토프가 발견되어 범용성 인플루엔자 백신 개발 가능성이 높아졌으나, HA 단백질의 안쪽에 위치하여 다른 에피토프에 비해 면역원성이 높지 않을 것으로 판단됨. 이 에피토프의 면역원성을 높이는 기술이 개발되는 경우 교차방어가 가능한 범용성 (generic) 백신 개발이 가능할 것으로 기대됨.

H5N1 조류 인플루엔자 바이러스의 계태아 증식성은 분리주마다 달라 많게는 1,000배 이상 바이러스 역가의 차이를 보이고 있음. 계태아 고증식성과 관련된 HA 및 NA 유전자의 다양한 돌연변이가 보고된 바 있고, 특정 바이러스의 특정 유전자가 계태아 증식성을 높여준다는 사실이 보고된 바 있음. 본 연구자들은 국내 저병원성 H5N1 바이러스의 계태아 고증식성과 관련된 아미노산 변이를 동정하였고, 특정 바이러스의 PB2와 NS 유전자가 재조합 바이러스의 계태아 증식성을 높여준다는 사실을 확인하여 관련 특허를 출원하였음. 따라서 H5N1 바이러스의 HA와 NA 단백질의 아미노산 서열을 최적화하고, 계태아 고증식성과 관련된 유전자들로 기존 PR8 기반 역유전자 시스템을 개선한다면 유사시 짧은 시간 내에 적은 수의 발육란으로 필요한 양만큼의 백신을 생산할 수 있어 위기대응 능력을 향상시킬 수 있으므로 이에 대한 연구가 시급함.

H5N1 HPAI 바이러스는 HA 유전자의 계통발생학적 분석 결과 0-9 clade로 분류되며, 국내에서 발생한 HPAI의 원인 바이러스는 2.5 clade (1차 발생), 2.2 clade (2차 발생), 2.3.2 clade (3차 발생), 2.3.2 clade (4차 발생)로 분류되며 이들 바이러스 간에는 95% 이상의 상동성을 보였음 (고병원성조류인플루엔자 백신 - 농림수산식품부; 2008.11/2012.2). 2008년 ~ 2011년 발생한 3차 및 4차 HPAI는 2.3.2 clade에 의한 것으로 몽고지역에서 우점 하는 것으로 알려져 겨울철새를 통해 다시 유입될 가능성이 높음. 따라서 당면한 위험성, 방역의 용이성, 항원적 관련성을 근거로 2.3.2 clade 바이러스를 주요 방어 목표로 설정하여 백신 및 DIVA 시스템 구축이 필요함.

백신항체와 감염항체를 구별하기 위한 DIVA 시스템은 크게 4가지 전략으로 분류할 수 있음. 첫째, 백신 하지 않은 닭을 보초계 (sentinel)로 계사에서 합사하면서 항체검사를 하거나 둘째, HA 서브유닛 백신 (또는 HA 발현 벡터백신)을 접종하고 HA 이외의 내부단백질에 대한 항체유무를 조사하거나 셋째, HA 아형은 같으나 NA 아형은 야외주와 다른 아형을 갖는 백신을 접종하여 야외주 NA 아형 항체를 검출하거나 넷째, 백신 바이러스에는 포함되지 않아 항원성이 없으면서도 감염 세포에서 다량으로 발현되는 NS1 단백질에 대한 항체를 검출하는 방법임. 이러한 전략들 중 최근에 가장 활발하게 연구되고 있는 것은 세 번째 전략으로 국가마다 백신주와 야외 바이러스의 NA 아형에 따라 적합한 조합을 선정하여 DIVA 시스템을 구축하고 있음. 그러나 tamiflu의 치료 효능에서 알 수 있듯이 NA의 방어효능은 무시할 수 없으며 보다 나은 백신효능을 기대한다면 야외주와 동일한 조합의 HA와 NA 단백질을 백신으로 사용하는 것이 상책임. 따라서 야외주와 동일한 HA 및 NA 단백질을 사용하여 백신주를 개발하되 야외주와 항원성이 크게 다르지만 백신주 증식성에 영향을 주지 않는 NP 단백질을 사용하고, 백신주와 야외주 간 차이를 보이는 NP 단백질의 선형항원 펩티드를 사용하여 특이적인 항체를 ELISA로 검출하는, DIVA 시스템에 대한 평가가 필요함.

국내에서는 H9N2 저병원성 조류인플루엔자에 대한 사독오일백신을 광범위하게 접종하고 있는데 H5N1 HPAI 바이러스의 야외 감염을 검출하기 위한 DIVA 시스템을 적용하는 경우 백신주의 NA 아형은 NA1 이외의 것으로 바꾸어야 함. 농림수산검역검사본부 조류질병과 인플루엔자 연구실에서 개발한 국내 H9N2 사독백신주인 01310의 NA2는 바이러스의 증식성과 면역원성 향상과 관련된 중요 돌연변이가 밝혀져 H5N2 DIVA 백신 개발 시 유용하게 활용할 수 있음. 만약 01310 NA2로 제작한 H5N2 백신주의 증식성과 면역원성이 다른 NA 아형보다 높은 경우 활용성이 높으므로 이에 대한 연구가 필요함. 그러나 유사시 H9N2 백신을 접종한 가금에 H5N2 백신을 접종하는 경우 이미 존재하는 NA2에 대한 항체에 의해 H5N2 백신의 면역원성이 저하될 수 있는 가능성이 있어 이에 대한 평가가 필요하며 상당한 면역원성 저하가 인정되는 경우 NA1과 NA2가 아닌 제 3의 NA 아형을 결정하여 백신주를 제작해야 함.

따라서 본 연구팀은 기존의 PR8 기반 역유전학 벡터 시스템이 갖는 포유류 병원성을 제거하여 안전하고, 발육란에서의 생산성이 높은 개선된 역유전학 벡터 시스템을 기초로, 국내 H5N1 HPAI 바이러스 HA의 항원성은 유지하나 병원성은 제거하고, 01310 바이러스의 NA2와 조합하여 증식성, 면역원성, 교차방어 능력을 개선시킨 HA5와 NA2 인공 유전자를 제작하여 NA1-기반 DIVA 시스템용 H5N2 백신주와 NA1-DIVA ELISA 키트를 개발하고자 본 과제를 수행하였음. 또한, H9N2 백신에 의해 형성된 NA2 항체의 간섭을 회피할 수 있는 H5N3 백신주 제작을 위해 최적의 NA3을 합성하여 H5N3 백신주를 개발하고자 하였음. 또한, NP-기반 DIVA 시스템용 H5N1 백신주 개발을 위해 상기 개선된 역유전학 벡터 시스템의 NP 유전자를 추가로 개선하여 DIVA 능력을 극대화한 H5N1 백신주와 NP-DIVA ELISA 키트를 개발하고자 하였음.

III. 연구개발 내용 및 범위

1) H5N2 DIVA 백신 개발

- SMART H5N2 vaccine (교차방어 능력 강화/NA1 DIVA 용 백신) 개발 및 평가

2) H5N3 DIVA 백신 개발

- SMART H5N3 vaccine (교차방어 능력 강화/H9N2 백신 항체 교란 회피/NA1 DIVA 용 백신) 개발 및 평가

3) NA1-DIVA ELISA 키트 개발

- NA1-DIVA ELISA 진단 키트 개발 및 평가

4) H5N1 DIVA 백신 개발

- SMART H5N1 Vaccine (NP 에피통 감별 가능 백신주) 개발 및 평가

5) NP-DIVA ELISA 키트 개발

- NP B-세포 에피통을 이용한 DIVA 용 펩티드 ELISA 키트 개발 및 평가

6) 최적의 AI-DIVA 방역 시스템 선정

- 최적의 DIVA 진단법과 백신 선정

IV. 연구개발결과

1) HA 및 NA 유전자 확보 및 약독화

- 고병원성 H5N1 바이러스 K10-483의 HA5와 NA1 유전자 클로닝을 위해 건국대학교 조류질병학 연구실로부터 RNA 형태로 분양 받고, NA3 유전자 클로닝을 위해 서울대에서 분리된 저병원성 H5N3 유전자를 이용함.
- 고병원성 HA5 유전자 약독화를 위해 cleavage site의 RERRRKR 아미노산 서열을 저병원성 H9N2 바이러스인 0028의 HA9 cleavage site의 ASGR 아미노산 서열로 치환함. ASGR의 alanine 코돈은 single point mutation에 의해 R이나 K로 전환될 수 없어 안전함.

2) 포유류 저병원성/발육란 고증식성 백신주 개발 (SMART RG 벡터 시스템)

- 본 연구자들은 PR8 기반 역유전학 벡터 시스템의 NS 유전자를 0028 바이러스의 NS 유전자로 교체함으로써 포유류 병원성을 제거하는데 성공하여 특허출원을 진행 중임.
- 본 연구자들은 PR8 기반 역유전학 벡터 시스템의 PB2 유전자를 01310 바이러스의 PB2 유전자로 교체함으로써 포유류 병원성을 제거하였고, PR8 바이러스 대비 발육란 증식성을 10배 정도 증가시키는데 성공하여 특허출원 진행 중임.
- 현재 이들 유전자들과 PR8 바이러스의 나머지 유전자들로 구성된 SMART RG 벡터 시스템을 확립하여 저병원성 H5N1 백신주 개발을 성공적으로 수행하였고, 국내 고병원성 H5N1 바이러스의 H5를 갖는 H5N2, H5N3 백신주 개발을 완료함.

3) 발육란 고증식성 백신주 개발

- 저병원성 H5N1 바이러스인 50-5E20에서 발견된 발육란 고증식성 관련 HA와 NA의 아미노산 돌연변이를 고병원성 H5N1 바이러스의 HA와 NA에 이식하여 증식성 개선 여부를 확인함.
- 발육란에서의 증식성이 높기 위해서는 HA의 수용기 결합력과 NA의 수용기 제거 기능 간에 균형을 이루어야 함. HA의 수용기 결합력은 수용기 결합부분 인근의 아미노산 변화에 의해 영향을 받지만 이외에도 그 주변부위의 N-glycan 유무와 개수에 영향을 받는 것으로 알려져 있음. NA 활성의 경우 stalk 길이에 영향을 받으므로 H9N2 바이러스와 H5N1 바이러스 등 기존에 알려진 사례들을 참고하여 HA N-glycan 돌연변이 유전자와 NA stalk 길이 다른 돌연변이 유전자 수종을 제작하고 HA-NA 쌍을 다양하게 조합하여 재조합 바이러스 제작하여 최적의 바이러스 선발함.

4) 면역원성 및 교차방어능력 개선

- H5 단백질의 HA2 절편에 존재하는 공통항원 부분의 면역원성을 증대시키기 위해 공통항원에 결합하는 항체의 친화도를 떨어뜨릴 것으로 예상되는 154-156 N-glucon 제거함 (NGT를 NGE로 돌연변이 시켜 154N-glycan 제거).

- NA stalk에 존재하는 N-glycan은 HA2 공통항원을 가려 면역원성을 감소시키는 것으로 의심되므로 바이러스 증식성과 병원성에 영향을 주지 않는 범위에서 제거함.

5) NP-DIVA 시스템용 백신주 최적화

- NP-DIVA 가능성이 높은 경우 백신주와 야외주 간의 차이를 극대화하기 위해 에피통 부분에 바이러스 증식성과 병원성에 영향을 주지 않는 범위에서 인공적인 돌연변이 유발시킨 바이러스 제작.

6) 백신주 평가

- 공동 연구에 참여하는 건국대학교 연구진들은 ABSL3 실험 전문가들로 동 대학에서 운영 중인 ABSL3 실험 시설을 활용하여 백신주 평가 예정이며 원활한 연구 진행을 위해 (주) 바이오리더스, 국립농림수산물검역검사본부 (QIA) 등의 ABSL3 실험 시설도 활용함.
- QIA와의 공동연구를 통해 비상용 예비 백신 제품으로 산업화 추진

7) NA1-DIVA ELISA 키트 개발

- 지금까지 NA 유전자를 baculovirus 벡터에 클로닝하여 Sf9 세포에서 발현시킨 후 ELISA 키트로 개발한 성공 사례들이 많으므로 그 방법에 따라 키트 제작함.
- 국내 발생 H5N1 바이러스의 NA1에 대한 특이성이 높은 단클론항체를 개발하여 지적재산권 획득.

8) NP-DIVA ELISA 키트 개발

- 최신의 B-세포 선형항원 예측 프로그램인 Antibody Epitope Prediction (IEDB analysis resources) 프로그램을 사용하여 PR8 NP와 국내 AIV NP 에피통 후보 선별하여 가장 차이가 많이 나는 부분을 선정하되 T-세포 항원 예측 프로그램인 T cell epitope prediction tool (IEDB analysis resources) 사용하여 산출된 T-세포 에피통과 겹치지 않는 부분을 선정.
- NP 단백질 3D 구조에서 에피통 부분의 구조 확인하여 beta-sheet나 alpha helix 부분 보다는 loop 구조를 이루며 단백질의 표면에 노출된 에피통에 우선순위를 두어 펩티드 (12-mer) 합성.
- NP 펩티드 ELISA 키트 제작 시 펩티드의 96-well plate 코팅을 촉진하고, 항체의 결합을 원활하게 하기 위해 펩티드 N-말단에 aminocaproic acid (C6) 결합시킴.
- 가능성이 있으나 펩티드 항원의 한계로 NP 펩티드 ELISA 개발이 용이하지 않은 경우 해당 에피통에 대한 단클론항체를 작출하고 AIV NP 유전자를 Baculovirus 벡터에 클로닝하여 Sf9 세포에서 발현시켜 항원으로 96-well plate에 코팅하여 competitive ELISA 키트 개발함.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

SMART H5N1/H5N2/H5N3 백신주

- 지적재산권 획득(국제특허)
- 정부 정책 반영하여 국내 비상용 예비 백신으로 상용화(비축)
- 비상 시 인체용 전환

SMART 백신 제작 기술

- H5N1 상재지역 바이러스에 적용하여 백신주 제작에 활용
- H5N8 백신 제작에 활용
- H9N2 백신 개량에 활용
- 인체 백신 제작에 활용

NA1 기반 DIVA 용 ELISA 키트

- 유사 시 H5N1 야외 감염 모니터링 용 진단 키트로 사업화

NP 기반 DIVA 용 펩티드 ELISA 키트

- 신규 발굴된 에피토프의 경우 바이러스 간 차이가 인정되며 바이러스 감염이나 백신 접종 시 면역계에 의해 인식된다는 사실을 확인하였으므로 에피토프 부분을 다른 에피토프로 치환하는 경우 감별에 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

SUMMARY

(영문요약문)

In the present research, we aimed at developing H5N1 SMART vaccine strains which possessed high safety to mammalian, strong immunogenicity, generic antigenicity, high-yield productivity, and other troubleshooting property (DIVA: differentiation of infected from vaccinated animals). In addition, we tried to develop DIVA ELISA kits targeting neuraminidase (NA) and nucleocapsid proteins (NP) of avian influenza virus (AIV).

The six internal genes of PR8 virus has been used to generate highly productive influenza A virus (IAV) vaccine strains in humans and animals by reverse genetics, and they have been applied successfully to commercial vaccines. However, the PR8-derived recombinant vaccine strains have residual mammalian pathogenicity. To generate safer vaccine strains we replaced PB2 and/or NS genes of PR8 with PB2 and NS of H9N2 low pathogenic AIVs (LPAIVs), 01310 and 0028, respectively. We generated several recombinant viruses that possessed HA and NA of mouse-pathogenic H5N1 LPAIVs or those of highly pathogenic AIV (K10-483 strain, clade 2.3.2.1), and we found those recombinant viruses are non-pathogenic in mice. The 01310 PB2 gene-possessing recombinant viruses replicated efficiently and non-pathogenic in embryonated chicken eggs (ECEs), and they were highly productive in ECEs. A 0028 NS gene-possessing recombinant virus was immunogenic as well as non-pathogenic in mice, and it protected H5N1 HPAIV challenge completely. For this reason, 01310 PB2 gene may be useful for developing inactivated vaccine and 0028 NS gene for immunogenicity and protective efficacy study of live recombinant viruses in mice.

An HA2 common epitope that is conserved among IAVs had been reported, and we hypothesized that a neighboring 154N-glycan may decrease the immunogenicity of the epitope. For this reason, we removed the 154N-glycan by mutation of N-glucon (N-X-S/T) of K10-483 HA, and we compared the replication efficiency of parent and 154N-glycan deleted mutant viruses. The replication efficiency of 154N-glycan deleted mutant virus was similar to the parent virus. The 154N-glycan deleted HA may be useful for generation of various subtype vaccine strains and shuttle vector expressing the mutated HA.

For DIVA vaccine development, we generated H5N2 that possessed 154N-glycan-deleted HA, 01310 NA2 and PB2 genes (rH5N2-CP), and H5N3 that possessed 154N-glycan-deleted HA and 01310 PB2 genes. rH5N2-CP was non-pathogenic in mice and ECEs, and showed highly productive in ECEs. We are

going to test cross protectivity of rH5N2-CP against different subtypes such as H1N1, H9N2, etc. However, rH5N3 recombinant viruses showed relatively low virus titers in ECEs.

The NA1-based DIVA ELISA kit was tested with various mouse and chicken antisera, and it was successful. Although the NP-based DIVA ELISA kit has to some extent of possibility, it is not applicable without improvement in specificity.

In conclusion, we established mammalian non-pathogenic, highly productive, possibly cross-protective DIVA vaccine strain, rH5N2-CP and NA1-based DIVA ELISA kit. They may be useful to establish AI-DIVA-based prevention and monitoring system.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter I. Outline of Research Project	-----	11
Chapter II. Present Situation of Research	-----	14
Chapter III. Methods and Results	-----	16
Chapter IV. Achievement and Contribution in Relevant Research Field	-----	60
Chapter V. Plan of Practical Use	-----	62
Chapter VI. Data Collection during Project	-----	64
Chapter VII. The present condition of research facility and machines	-----	65
Chapter VIII. References	-----	66

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	-----	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	-----	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	-----	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	-----	60
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	-----	62
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	-----	64
제 7 장	연구시설·장비 현황	-----	65
제 8 장	참고문헌	-----	66

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 과제는 안전 (Safe)하고, 면역원성 (iMmunogenic)이 높으며, 교차방어 (generic Antigenicity)가 가능하고, 생산성 (pRoductive)이 높으며 야외바이러스 감염과 백신 접종에 의해 생성된 항체를 감별 (Trouble-shooting) 할 수 있는 똑똑한 (SMART) 백신을 개발하고, 국내 상황에 맞는 DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals) 진단키트도 확보를 목적으로 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

고병원성 조류 인플루엔자 (HPAI)는 1차 (2003년 12월-2004년 3월), 2차 (2006년 11월-2007년 3월), 3차 (2008년 4월-5월), 4차 (2010년 12월-2011년 5월), 5차 (2014년 1월-)까지 총 다섯 차례 발생하여 막대한 경제피해를 초래하였다. 2011년 발생한 고병원성 조류 인플루엔자의 경우 살처분 보상금 669억 원, 생계안정자금 18억 원, 경영안전자금 1,221억 원, 수매도태자금 733억 원을 포함한 직접 피해액은 2,641억 원이었고, 가공유통업체, 외식업체, 소매업체 등을 포함하는 경우 총 피해규모 6,324억 원에 이르는 것으로 보고 (한국농촌경제연구원)되어 막대한 경제피해를 초래하고 있다.

현재까지는 관련 공무원, 방역요원, 그리고 정부의 노력으로 성공적인 방역이 이루어졌으나 우리나라가 철새이동경로 상 중요한 위치를 차지하고 있어 철새에 의한 바이러스 유입 차단은 불가능하며 바이러스의 농장유입 경로나 매개체 또한 명확히 밝혀지지 않아 과거처럼 1년 걸러 발생하거나 앞으로 매년 발생하는 최악의 상황도 배제할 수 없다. 구제역 사례처럼 차단 방역에 실패하고 백신에 대한 준비도 이루어지지 않아 도입 시점을 놓치는 경우 경제적인 피해는 물론 인체 감염 위험성으로 인한 사회 불안을 초래할 수 있으므로 최악의 상황을 가정한 대책 마련이 시급하다.

차단방역에 실패하여 전국적으로 질병이 발생하는 경우 택할 수 있는 방안은 백신접종이며 이를 위해서는 안전 (Safe)하고, 면역원성 (iMmunogenic)이 높으며 교차방어 (generic Antigenicity)가 가능하고 생산성 (pRoductive)이 높으며 야외바이러스 감염과 백신 접종에 의해 생성된 항체를 감별 (Trouble-shooting) 할 수 있는 똑똑한 (SMART) 백신이 필요하며 국내 상황에 맞는 DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals) 진단키트도 확보해야 한다.

A형 인플루엔자 바이러스 (이하 인플루엔자 바이러스)는 오소믹소바이러스에 속하며, 음성의 단일가닥 RNA 절편 8개를 유전자로 갖는 바이러스로서, 상기 8개의 RNA 절편으로부터 혈구응집 단백질 (HA), 뉴라미니다제 (NA), 뉴클레오캡시드 단백질 (NP), 매트릭스 단백질 1 및 2 (M1 & M2), 중합효소 단위체 A, B1 및 B2 (PA, PB1, PB2), 및 비구조 단백질 1 및 2 (NS1 & NS2)가 만들어진다.

동물용 인플루엔자 백신은 야외 분리주를 계태아에 계대하여 증식성을 개선시킨 후 불활화 오일백신으로 사용하고 있는데, 인체용 백신의 경우 계태아나 세포주에서 증식성이 좋은 바이러스들의 8개 유전자 중 방어항원으로 중요한 HA와 NA 유전자를 최근 유행하는 바이러스의 HA와 NA 유전자로 교체하여 역유전학 기법을 사용하여 백신주를 제작하고 있다. 원하는 특성을 갖는 바이러스를 자연에서 골라내기 어려우므로 SMART 백신을 확보하기 위해서는 역유전학 기술을 적용해야 한다. 계태아에서의 증식성이 좋고, 생물학적 특성이 많이 규명된 PR8 바이러스는 전 세계적으로 역유전학 기법을 이용한 백신 제작에 가장 흔하게 사용되고 있으나 생쥐 반수 치사농도 (50% mouse lethal dose, MLD₅₀)가 10^{5.5}EID₅₀/ml 정도로 10⁶EID₅₀/ml 바이러스를 마우스에 접종하는 경우 7일 이내에 100% 폐사를 초래하므로 PR8 바이러스의 고증식성은 유지하면서도 포유류에 대한 병원성이 전혀 없어 안전한 역유전학 시스템이 필요하다.

A형 인플루엔자 바이러스는 HA와 NA의 항원형에 따라 HA1-HA16과 NA1-NA9의 아형으로 분류되며 서로 다른 아형 간에는 교차방어가 충분하지 않은 것으로 알려졌으나 최근 HA 단백질에서 대부분의 A형 인플루엔자 바이러스에서 보존된 에피토프가 발견되어 범용성 인플루엔자 백신 개발 가능성이 높아졌으나 HA 단백질의 안쪽에 위치하여 다른 에피토프에 비해 면역원성이 높지 않을 것으로 판단되므로 이 에피토프의 면역원성을 높이는 기술이 개발되는 경우 교차방어가 가능한 범용성 (generic) 백신 개발이 가능할 것으로 기대된다.

H5N1 조류 인플루엔자 바이러스의 계태아 증식성은 분리주마다 달라 많게는 1,000배 이상 바이러스 역가의 차이를 보이고 있는데 계태아 고증식성과 관련된 HA 및 NA 유전자의 다양한 돌연변이가 보고된 바 있고, 특정 바이러스의 특정 유전자가 계태아 증식성을 높여준다는 사실이 보고된 바 있다. 본 연구자들은 국내 저병원성 H5N1 바이러스의 계태아 고증식성과 관련된 아미노산 변이를 동정하였고, 특정 바이러스의 PB2와 NS 유전자가 재조합 바이러스의 계태아 증식성을 높여준다는 사실을 확인하여 관련 특허를 출원하였다. 따라서 H5N1 바이러스의 HA와 NA 단백질의 아미노산 서열을 최적화하고, 계태아 고증식성과 관련된 유전자들로 기존 PR8 기반 역유전학 시스템을 개선한다면 유사시 짧은 시간 내에 적은 수의 발육란으로 필요한 양 만큼의 백신을 생산할 수 있어 위기대응 능력을 향상시킬 수 있으므로 이에 대한 연구가 시급하다.

H5N1 HPAI 바이러스는 HA 유전자의 계통발생학적 분석 결과 0-9 clade로 분류되며 국내에서 발생한 HPAI의 원인 바이러스는 2.5 clade (1차 발생), 2.2 clade (2차 발생), 2.3.2 clade (3차 발생), 2.3.2 clade (4차 발생)로 분류되며 이들 바이러스 간에는 95% 이상의 상동성을 보였음 (고병원성조류인플루엔자 백신-농림수산식품부; 2008.11/2012.2). 2008년 - 2011년 발생한 3차 및 4차 HPAI는 2.3.2 clade에 의한 것으로 몽고지역에서 우점 하는 것으로 알려져 겨울철새를 통해 다시 유입될 가능성이 높다. 따라서 당면한 위험성, 방역의 용이성, 항원적 관련성을 근거로 2.3.2 clade 바이러스를 주요 방어 목표로 설정하여 백신 및 DIVA 시스템 구축이 필요하다.

백신항체와 감염항체를 구별하기 위한 DIVA 시스템은 크게 4가지 전략으로 분류할 수 있는데 첫째, 백신 하지 않은 닭을 보초계 (sentinel)로 계사에서 합사하면서 항체검사를 하거나 둘째, HA 서브유닛 백신 (또는 HA 발현 벡터백신)을 접종하고 HA 이외의 내부단백질에 대한 항

체유무를 조사하거나 셋째, HA 아형은 같으나 NA 아형은 야외주와 다른 아형을 갖는 백신을 접종하여 야외주 NA 아형 항체를 검출하거나 넷째, 백신 바이러스에는 포함되지 않아 항원성이 없으면서도 감염 세포에서 다량으로 발현되는 NS1 단백질에 대한 항체를 검출하는 방법이다. 이러한 전략들 중 최근에 가장 활발하게 연구되고 있는 것은 세 번째 전략으로 국가마다 백신주와 야외 바이러스의 NA 아형에 따라 적합한 조합을 선정하여 DIVA 시스템을 구축하고 있다. 그러나 tamiflu의 치료 효능에서 알 수 있듯이 NA의 방어효능은 무시할 수 없으며 보다 나은 백신효능을 기대한다면 야외주와 동일한 조합의 HA와 NA 단백질을 백신으로 사용하는 것이 상책이다. 따라서 야외주와 동일한 HA 및 NA 단백질을 사용하여 백신주를 개발하되 야외주와 항원성이 크게 다르지만 백신주 증식성에 영향을 주지 않는 NP 단백질을 사용하고, 백신주와 야외주 간 차이를 보이는 NP 단백질의 선형항원 펩티드를 사용하여 특이적인 항체를 ELISA로 검출하는, DIVA 시스템에 대한 평가가 필요하다.

국내에서는 H9N2 저병원성 조류인플루엔자에 대한 사독오일백신을 광범위하게 접종하고 있는데 H5N1 HPAI 바이러스의 야외 감염을 검출하기 위한 DIVA 시스템을 적용하는 경우 백신주의 NA 아형은 NA1 이외의 것으로 바꾸어야 한다. 농림수산검역검사본부 조류질병과 인플루엔자연구실에서 개발한 국내 H9N2 사독백신주인 01310의 NA2는 바이러스의 증식성과 면역원성 향상과 관련된 중요 돌연변이가 밝혀져 H5N2 DIVA 백신 개발 시 유용하게 활용할 수 있다. 만약 01310 NA2로 제작한 H5N2 백신주의 증식성과 면역원성이 다른 NA 아형보다 높은 경우 활용성이 높으므로 이에 대한 연구가 필요하다. 그러나 유사시 H9N2 백신을 접종한 가금에 H5N2 백신을 접종하는 경우 이미 존재하는 NA2에 대한 항체에 의해 H5N2 백신의 면역원성이 저하될 수 있는 가능성이 있어 이에 대한 평가가 필요하며 상당한 면역원성 저하가 인정되는 경우 NA1과 NA2가 아닌 제 3의 NA 아형을 결정하여 백신주를 제작해야 한다.

따라서 본 연구팀은 기존의 PR8 기반 역유전학 벡터 시스템이 갖는 포유류 병원성을 제거하여 안전하고, 발육란에서의 생산성이 높은 개선된 역유전학 벡터 시스템을 기초로, 국내 H5N1 HPAI 바이러스 HA의 항원성은 유지하나 병원성은 제거하고, 01310 바이러스의 NA2와 조합하여 증식성, 면역원성, 교차방어 능력을 개선시킨 HA5와 NA2 인공 유전자를 제작하여 NA1-기반 DIVA 시스템용 H5N2 백신주와 NA1-DIVA ELISA 키트를 개발할 계획이다. 이후 H9N2 백신에 의해 형성된 NA2 항체의 간섭을 회피할 수 있는 H5N3 백신주 제작을 위해 최적의 NA3를 합성하여 H5N3 백신주를 개발한다. 또한, NP-기반 DIVA 시스템용 H5N1 백신주 개발을 위해 상기 개선된 역유전학 벡터 시스템의 NP 유전자를 추가로 개선하여 DIVA 능력을 극대화한 H5N1 백신주와 NP-DIVA ELISA 키트를 개발할 계획이다. NP-기반 DIVA 시스템은 세계 최초로 시도되는 것으로 성공하는 경우 원천 기술 확보가 가능하며 제작된 재조합 바이러스들은 안전성, 생산성, 교차방어능력 면에서 세계 최고 수준으로 향후 백신 개발 연구의 모범사례가 될 것으로 평가되므로 본 연구에 대한 지원이 절실하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련분야에 대한 기술개발 현황

1. 국외 현황

가. 1997년부터 2014년 5월까지 63개국의 가금 및 야생조류에서 7,526건 이상의 HPAI 발생 사례가 보고되었으며 H5N1 HPAI 연중 발생(endemic) 국가로는 베트남, 방글라데시, 인도네시아, 인도, 이집트, 중국이 있다 (OIE). 이들 국가 중 베트남, 인도네시아, 중국, 이집트에서는 백신접종 정책을 채택하였고, 멕시코에서는 저병원성 및 고병원성 H5N2 예방을 위해 백신 정책을 채택하였다 (OIE).

나. 중국의 경우 2004년 3km 살처분 구역 바깥 5km 지역에 처음으로 백신을 허가한 이후로 2005년부터 무상으로 백신을 공급하고 있으며, 유행하는 바이러스와 일치하는 항원성을 갖는 백신을 지속적으로 개발하여 보급하고 있다. 2008년에는 150억 회 접종 분량이 넘는 백신이 사용되었다 (FAO, 2011).

다. 백신을 채택한 국가에서 백신접종 전후의 H5 HPAI 발생율과 백신 접종군 분리주의 유전자 변이 연구를 통해 백신 후 HPAI 발생 및 바이러스 load 감소 등 긍정적인 결과들이 보고되고 있으나, 변이주 발생 위험성이 증가하고 있는 것으로 보고되어 유행 바이러스에 대한 지속적인 모니터링과 현재 유행하는 바이러스를 이용한 백신 접종을 주문하고 있다.

2. 국내 현황

가. 국내 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI)는 1차 (2003년 12월-2004년 3월), 2차 (2006년 11월-2007년 3월), 3차 (2008년 4월-5월), 4차 (2010년 12월-2011년 5월), 5차 (2014년 1월-현재)까지 총 다섯 차례 발생하여 막대한 경제피해를 초래하였다. 4차 고병원성 조류 인플루엔자의 경우 살처분 보상금 669억 원, 생계 안정자금 18억 원, 경영 안정자금 1,221억 원, 수매도태자금 733억 원을 포함한 직접 피해액은 2,641억 원 수준임. 가공유통업체, 외식업체, 소매업체 등을 포함하는 경우 총 피해규모 6,324억 원에 이르는 것으로 보고 (한국농촌경제연구원) 되어 막대한 경제피해를 초래하고 있다.

나. 특히 5차 발생의 경우 겨울 철새 도래 이전에 재발한 후 현재까지 발생하고 있어 엔데믹에 대한 우려가 커지고 있다. 구제역 사례처럼 차단 방역에 실패하고 백신에 대한 준비도 이루어지지 않아 도입 시점을 놓치는 경우 산업기반 붕괴는 물론 국민 안전을 위협할 수 있는 상황이다.

3. 기술개발 현황

- 가. 중국은 PR8 바이러스의 6개 내부 유전자(internal gene: PB2, PB1, PA, NP, M, NS)와 유행하는 바이러스로부터 약독화시킨 HA (cleavage site의 RRRKKR-을 RETR-로 치환하여 약독화한 HA)와 NA 유전자를 갖는 재조합 바이러스를 역 유전학(reverse genetics) 기술로 제작하여 사독백신을 사용하고 있다.
- 나. HA5와 NA1 공여 바이러스들의 발육란 증식성이 낮았으나, 재조합 바이러스들의 증식성은 상당히 개선된 것으로 알려져 있다. 이들 사독백신을 접종하는 경우 오랜 기간 혈구응집 억제 항체가 지속되며 오리나 거위에 대한 효과도 좋은 것으로 알려져 있다.
- 다. 생독백신으로는 재조합 계두 벡터 백신과 뉴캐슬병 바이러스 벡터 백신이 개발되었으나 상기의 PR8 재조합 바이러스를 이용한 사독백신들이 지속적으로 많이 사용되고 있다.
- 라. 국내에서는 저병원성 H5 바이러스 사독백신이 개발된 바 있고, PR8 6개 유전자와 국내에서 발생한 HA5, NA1을 갖는 재조합 바이러스들이 백신주로 개발된 바 있다.
- 마. 최근 국내 연구결과에 의하면 오리에 대한 H5N1 백신의 효과가 매우 낮아 일회 접종으로 질병 방어는 물론 바이러스 배출을 완벽하게 예방하기 어렵기 때문에 2회 접종이 필요하나 육용오리의 경우 7주령 출하시기와 맞지 않는 문제가 해결되지 않고 있다.
- 바. 대부분의 국가에서 백신주와 야외 바이러스의 NA 아형에 따라 적합한 조합을 선정하여 DIVA 시스템을 구출하고 있기 때문에 DIVA 진단 키트의 경우 주로 NA 단백질에 집중되어 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구범위 및 연구수행 방법

1. 세부과제: AI-DIVA 시스템 용 백신 개발

가. HA5 유전자 mutagenesis

(1) Cleavage site mutagenesis

(가) A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (H5N1) (이하 K10-483) RT-PCR/클로닝

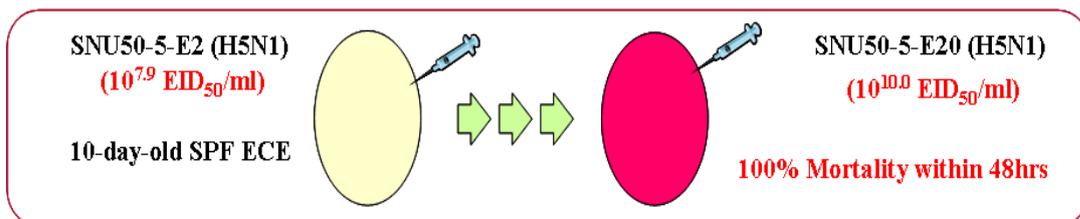
(나) Cleavage site multi-basic 아미노산 서열 (RERRRK)을 ASG [계태아와 마우스에 병원성이 전혀 없는 KBNP-0028 (특허 제 10-0708593호)의 cleavage site 아미노산 서열]로 치환하기 위해 SOE-PCR 이용한 mutagenesis 실시 및 역유전학용 모벡터인 pHW2000 (Hoffmann et al., 2002)에 클로닝함 (벡터 1종, pHWH5/ASGR).

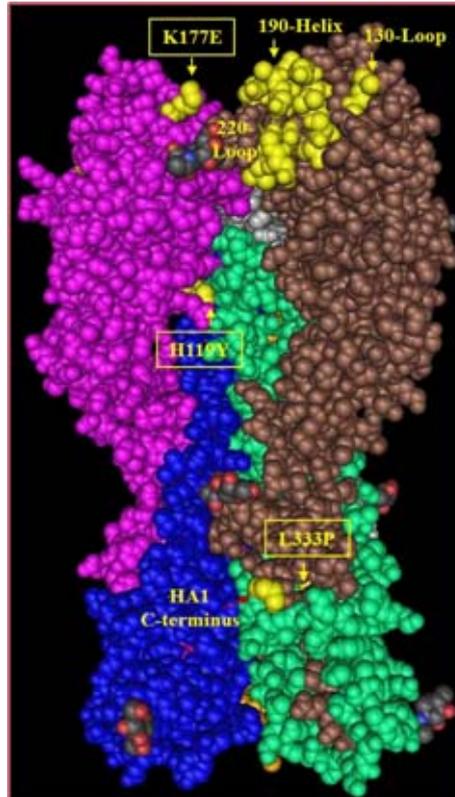


(2) 발육란 고증식성을 위한 119, 177, 333 (저병원성 H5N1 바이러스 SNU50-5 numbering; 393K 같음) 돌연변이 이식

(가) 저병원성 H5N1 바이러스 SNU50-5-E2를 발육란에서 20대 계대한 SNU50-5-E20의 경우 증식성이 100배 정도 증가하였는데 HA와 NA에서 아미노산 변이가 관찰되었고, 역유전학 기법으로 각 바이러스의 HA5와 NA1 유전자를 shuffling 하여 재조합 바이러스를 제작하여 증식성을 비교한 결과 SNU50-5-E20 바이러스의 HA5와 NA1 조합이 가장 좋은 증식성을 보임.

(나) 발육란 고증식성과 관련된 HA5 단백질 돌연변이인 H119Y, K177E, L333P를 pHWH5/ASGR plasmid 사용하여 site-directed mutagenesis 이용해 K10-483 HA5 유전자에 이식 함 (벡터 1종, pHWH5/ASGR/HG).

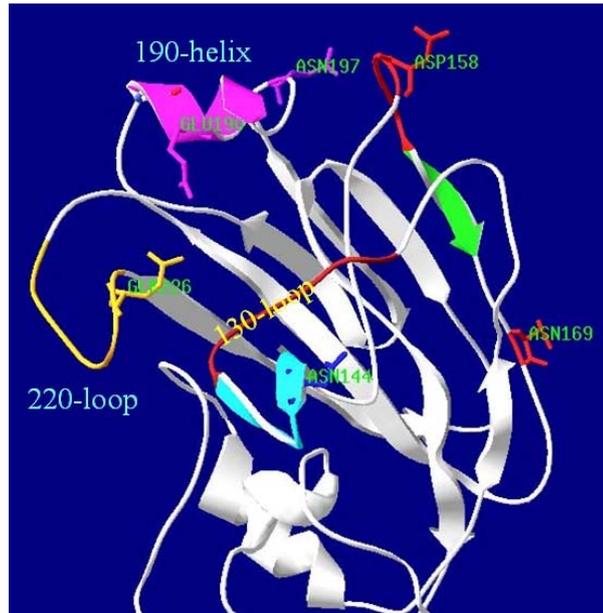




(3) N-glycan 위치 및 개수 조절

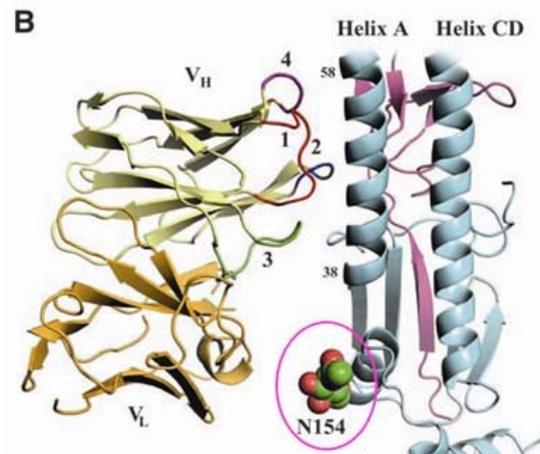
(가) 4차 발생 HPAI 바이러스는 NA stalk에서 20개 아미노산이 결손되어 있으며 이로 인해 감소한 뉴라미니다아제 효능과 균형을 맞추기 위해 HA 단백질의 수용기 친화력이 조절되었을 수 있는데 이러한 조절은 수용기 결합 부분 주위의 N-glycan의 위치와 개수에 의해 조절됨. 현재 최적화된 상태인지 알 수 없으므로 N-glycan의 위치와 개수를 조절하여 증식성이 가장 좋은 바이러스를 선발해야 함.

① 2fk0Q pdb 파일의 3차 구조 상 수용기에 가깝게 존재하는 N-glucon은 144-146번과 197-199번이고 trimer 형성되는 연결부에 169-171번이 존재함. 일반적으로 수용기 결합력에 영향을 주는 N-glucon은 158-160번이므로 이들에 대한 영향 평가가 필요함. 따라서 wild type과 144N-glycan 및 158N-glycan 유무 조합한 돌연변이 HA5를 pHWH5/ASGR과 pHWH5/ASGR/HG 플라스미드 사용하여 site-directed mutagenesis로 제작 함 (벡터 4종, pHWH5/ASGR/144N-/158N+, pHWH5/ASGR/158N+, pHWH5/ASGR/HG/144N-/158N+, pHWH5/ASGR/HG/158N+).



(나) K10-483 HA5의 HA2 절편 common epitope 면역원성 증대

① pHWH5/ASGR, pHWH5/ASGR/HG, pHWH5/ASGR/144N-/158N+, pHWH5/ASGR/158N+, pHWH5/ASGR/HG/144N-/158N+, pHWH5/ASGR/HG/158N+ 플라스미드 사용하여 site-directed mutagenesis로 154N-glucon 제거 (NGT > NGE) 함 (벡터 6종, pHWH5/ASGR/154N-, pHWH5/ASGR/HG/154N-, pHWH5/ASGR/144N-/158N+/154N-, pHWH5/ASGR/158N+/154N-, pHWH5/ASGR/HG/144N-/158N+/154N-, pHWH5/ASGR/HG/158N+/154N-).



나. NA2 유전자 mutagenesis

(1) NA2 유전자 선발

(가) 현재 H9N2 저병원성 인플루엔자 백신주로 사용되고 있는 01310의 NA2 선발 함. 이유는 지금까지 바이러스의 생물학적 특성과 유전자 특성에 대해 많은 연구가 이루어졌고, K10-483계열 H5N1 바이러스의 NA1 stalk에 20개 아미노산 결손이 있어 구조상 유사하므로 조금만 변형시키면 최적화 가능할 것으로 판단됨.

(2) 01310 NA2 stalk 아미노산 길이 조절

(가) 01310 NA2 stalk은 발육란에서 계대하는 과정에서 HA9 단백질의 수용기 친화력이 약 해지면서 (수용기 결합부위 N-glycan 2개 존재) 뉴라미니다아제 활성 조절을 위해 18개 아미노산이 결손됨 (N2/18). HA5의 경우 HA9 대비 수용기 결합력을 예측할 수 없으므로 stalk 길이 신장시킨 돌연변이 유전자 제작 [3개 아미노산(GGS) 삽입한 유전자, N2/15] 하여 N-glycan 위치와 개수 조절한 HA 유전자와 조합하여 발육란 증식성이 좋은 조합을 찾아냄. 역 유전학 모벡터 pHW2000에 두 유전자 클로닝 완료 (벡터 2종, pHWN2/18, pHWN2/15). 상황에 따라 stalk 아미노산 서열 종류 및 길이 조정 예정.

다. NA3 유전자 mutagenesis

(1) NA3 유전자 선발

(가) 자연계에 존재하는 H5N3 바이러스 중 NA3 stalk에 결손이 있는 바이러스를 BLAST 검색한 결과 A/mallard/Miyagi/53/1976 (H5N3) (accession no. BAH69245) 바이러스 (Miyagi) NA는 국내에서 분리 보고된 A/spot-billed duck/Korea/KNU SYG06/2006(H5N3) (이하 KNU-SYG06) 바이러스 (KNU)의 NA와 비교 시 stalk에서 24개 아미노산이 결손되어 있었 음. 따라서 KNU NA3 유전자를 사용하되 Miyagi NA에서 N-glucon 3개 (N1, N2, N3) 부분 만 결손된 KNU-m 제작.

```

>Query: KNU SYG06 NA (no del.) JF800146
Sbjct: Miyagi (H5N3) NA (24aa del.) BAH69245
Length=445

Score = 882 bits (2280), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 428/469 (91%), Positives = 438/469 (93%), Gaps = 24/469 (5%)

Query 1  MNPNQKIIITIGVNTTLSTIALLIGVGNLIFNTVIHEKIGDHQIVVYPTTAPVWPNCS 60
          MNPNQKIIITIGVNTTLSTIALLIGVGNLIFNTVIHEKIGDHQ VVYPT TA  N1
Sbjct 1  MNPNQKIIITIGVNTTLSTIALLIGVGNLIFNTVIHEKIGDHQTVVYPTITA----- 52
                                     <- 24aa del.

Query 61  TIITYNNTVWNNITTTIITKEETHFKSSLPLCPFRGFFPFHKDNAIRLGENKDIVTREP 120
          N2  N3  +ITK E HFK SLPLCPF+GFFPFHKDNAIRLGENKD IVTREP
Sbjct 53  -----LITKAEKHFKPSLPLCPFKGFPPFKDNAIRLGENKDAIVTREP 96
          <----->

```

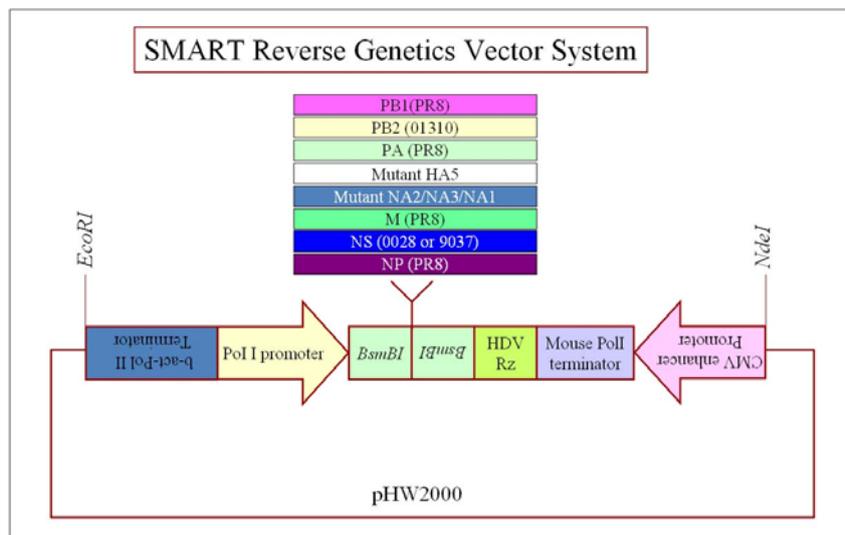
(2) NA3 유전자 stalk 길이 조절

(가) 18aa del. 된 NA3 (KNU-m) 제작; Miyagi 바이러스의 경우 24개 아미노산이 결손된 NA3와 HA5가 최적의 조화를 이루고 있는지 확실하지 않으나 K10-483 HA5와 다른 N-glucon을 가지고 있음 (K10-483 HA5의 144-146번 대신 158-160번 N-glucon 보유). 따라서 필요한 경우 K10-483 HA5와의 조화를 맞추기 위해 GGS (glycine-serine) 삽입하여 추가 mutant 유전자 제작 (SOE-PCR mutagenesis) 하며 K10-483 HA5 N-glucon mutant 유전자와 조합하여 재조합 바이러스 제작. 역 유전학 모벡터 pHW2000에 두 유전자 클로닝 완료 (벡터 2종, pHWN3/18, pHWN3/15). 상황에 따라 stalk 아미노산 서열 종류 및 길이 조정 예정.

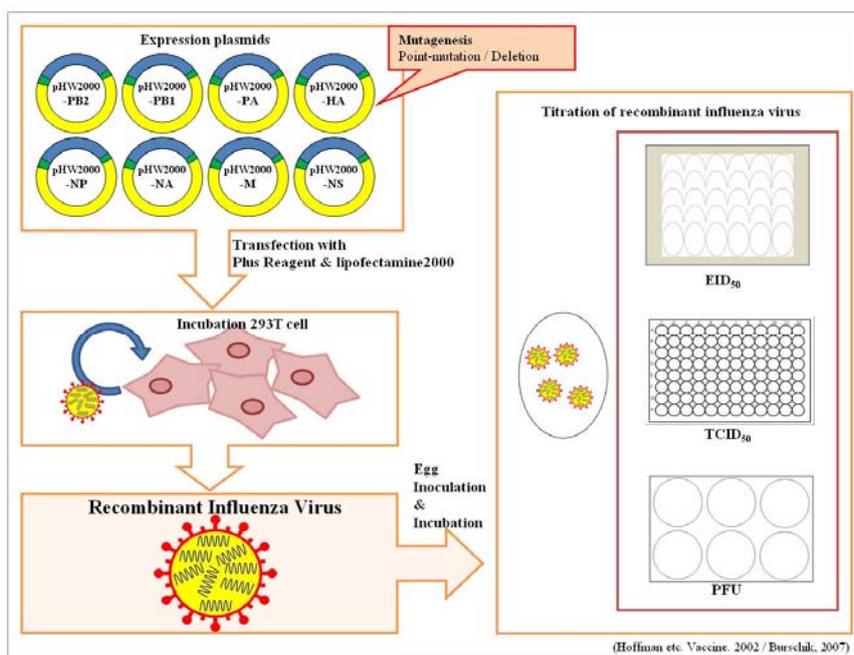
마. 재조합 바이러스 제작

(1) 발육란 고증식성, 포유류 무병원성 역유전학 벡터 시스템

(가) H5, N1, N2, N3 돌연변이 시킨 유전자를 제외한 나머지 6개 유전자들은 발육란에서 증식성이 좋고, 포유류에 대한 병원성이 없도록 최적화한 것으로 국내 특허출원 완료/준비 중임. PB2 유전자는 H9N2 백신주인 01310 유래로 발육란에서 증식성을 높여주며 또 다른 H9N2 백신주인 0028 유래의 NS 유전자는 포유류 병원성이 전혀 없으며 H9N2 야외주 9037 유래인 NS 유전자는 포유류에 대한 병원성은 PR8 NS 유전자 수준이나 발육란에서의 증식성을 높여 줌. PR8 바이러스 유래의 PB1, PA, M, NP 유전자는 이러한 H9N2 바이러스 유래의 PB2 및 NS 유전자들과 조화를 이루며 특히 PR8 바이러스의 NP는 국내에서 분리된 다양한 조류 인플루엔자 바이러스들의 NP와 B-세포 선형항원에서 비교적 큰 차이를 보여 DIVA에 활용할 수 있을 것으로 기대됨.



(2) SMART 재조합 바이러스 제작



바. 재조합 바이러스 특성 분석

(1) 바이러스 증식성

(가) 재조합 바이러스들의 계태아에서의 증식역가 (50% embryo infection dose, EID₅₀/ml)를 측정하기 위하여, 각각의 재조합 바이러스들을 인산완충용액으로 10⁻¹내지 10⁻⁹까지 10진 희석하여 각 희석 배수 별로 10-11일령의 SPF 발육란 5개에 요막강 경로로 100μl 씩 접종하여 3일간 배양한 후, 요막액을 수확하여 닭의 적혈구로 혈구응집여부를 확인하여 Reed-Muench 계산식에 따라 바이러스 역가 (EID₅₀/ml)를 측정 함.

(2) BALB/c 마우스 병원성

(가) 각 재조합 바이러스를 PBS로 각각 10진 희석하여 졸레틸 (Virbac S.A., France) 15mg/kg 로 마취한 BALB/c 마우스 (6주령 암컷, 주식회사 코아텍) 5수에 비강으로 각각 10⁶ EID₅₀를 접종한 후, 매일 폐사 유무와 체중을 조사하며 실험 초 체중의 30% 감소 시 안락사 시키고 폐사로 처리 하여 생취반수치사농도 (50% mouse lethal dose, MLD₅₀)를 측정 함. 양성 대조군으로 PR8 바이러스 음성대조군으로 PBS를 사용함.

(3) 계태아 병원성 평가

(가) 재조합 바이러스를 인산완충용액으로 각각 10진 희석하여 10⁻¹내지 10⁻⁸희석하여 200μl 의 양으로 10 내지 11일령 SPF 종란 (Sunrise Co., NY)에 요막강 경로로 접종하여 3일 간 37°C 에 배양하며 폐사한 종란과 3일까지 생존한 종란을 4°C 에서 12 내지 24시간 보관한 후 계태아에서의 폐사와 출혈이나 충혈 등의 병변을 관찰함.

(4) 면역원성/항원성/교차방어능력 평가

(가) 면역원성 평가

① 선발된 재조합 바이러스 (154N+ & 154N-) 1×10⁸⁻⁹ EID₅₀/ml 를 포르말린 0.1%-0.3%로 불활화 한 후 ISA70 미네랄 오일과 3:7의 부피비 로 혼합하여 에멀전을 만들어 사독오일 백신을 제조하고, 6주령의 SPF 닭에 500μl 씩 근육접종 한 후 1주 (optional), 2주, 3주, 4 주 (optional) 채혈하여 혈청을 수확하여 접종한 바이러스를 사용하여 혈구응집억제법으로 항체를 측정함.

(나) 최소 면역원성 평가

① 선발된 재조합 바이러스 1×10⁶/ml, 1×10⁷/ml, 1×10⁸ EID₅₀/ml 를 포르말린 0.1%-0.3%로 불활화 한 후 ISA70 미네랄 오일과 3:7의 부피비 로 혼합하여 에멀전을 만들어 사독오일 백신을 제조하고, 6주령의 SPF 닭에 500μl 씩 근육접종 한 후 3주 후 10⁶EID₅₀ 고병원성 H5N1을 비강으로 공격하여 폐사율을 측정함.

(다) 항원성 평가

① 상기의 혈청을 사용하여 국내에서 분리된 다양한 고병원성 및 저병원성 H5N1 바이러스들과 교차 혈구응집억제법으로 항체 역가를 비교하고, 교차바이러스 중화시험을 계태아신장세포를 사용하여 실시함.

(라) 교차방어능력 평가

① 상기의 혈청을 사용하여 국내에서 분리된 H1, H3, H7, H9 아형의 AIV에 대해 교차바이러스 중화시험을 계태아신장세포를 사용하여 실시함.

② 각 재조합 바이러스에 대해 6주령의 SPF 닭 10수를 5수씩 2개군으로 한 개 군에는 백신을 500 μ l 씩 근육접종하고, 나머지 군은 음성대조군으로 3주간 사육한 후 동일한 고병원성 H5N1 바이러스나 1차 또는 2차 발생 고병원성 H5N1 바이러스 (택 1)로 공격하여 방어율을 측정함.

(5) DIVA 가능성 평가

(가) 6주령의 SPF 닭에 rH5N2 또는 rH5N3 사독오일백신 접종 3주 후 10⁶ EID₅₀ 고병원성 H5N1을 비강으로 공격하여 2일 후 구강/인두 및 총배설장 swab 시료 채취하고, 백신 전, 공격 전, 공격 후 2주에 혈청 수확하여 혈구응집억제법과 NA1-기반 DIVA ELISA 키트로 항체 조사하여 평가함.

(나) 6주령의 SPF 닭에 rH5N1 사독오일백신 접종 3주 후 10⁶ EID₅₀ 고병원성 H5N1을 비강으로 공격하여 2일 후 구강/인두 및 총배설장 swab 시료 채취하고, 백신 전, 공격 전, 공격 후 2주에 혈청 수확하여 혈구응집억제법과 NP-DIVA ELISA 키트로 항체 조사하여 평가함.

2. 협동과제(바이오노트): AI-DIVA 시스템 용 진단 키트 개발

가. NA1-DIVA ELISA 키트 개발

(1) 수용성 및 활성형의 AIV NA1 재조합 단백질의 생산: AIV의 NA1 단백질의 cDNA를 확보하고 본 연구단의 고유기술인 수용성 및 활성형 단백질 생산기술을 이용하여 재조합 단백질을 개발하고 이를 ELISA 키트 제작에 활용함.

(2) ELISA 키트의 제작

(가) 고민감도의 ELISA 키트를 제작하기 위하여 Sandwich ELISA법을 이용한다. 그 원리는 다음과 같다 먼저 재조합 NA1 단백질을 마이크로 플레이트웰에 흡착한 뒤 검체와 반응시킨 후 NA1 단백질-HRP 접합체와 반응시켜 검체 내 항 NA1 항체를 검출함. 이를 위해 capture 항원농도, 검체 희석액 조성, HRP 접합체 및 각종 용액의 최적화 단계를 거쳐 ELISA 키트를 제작함.

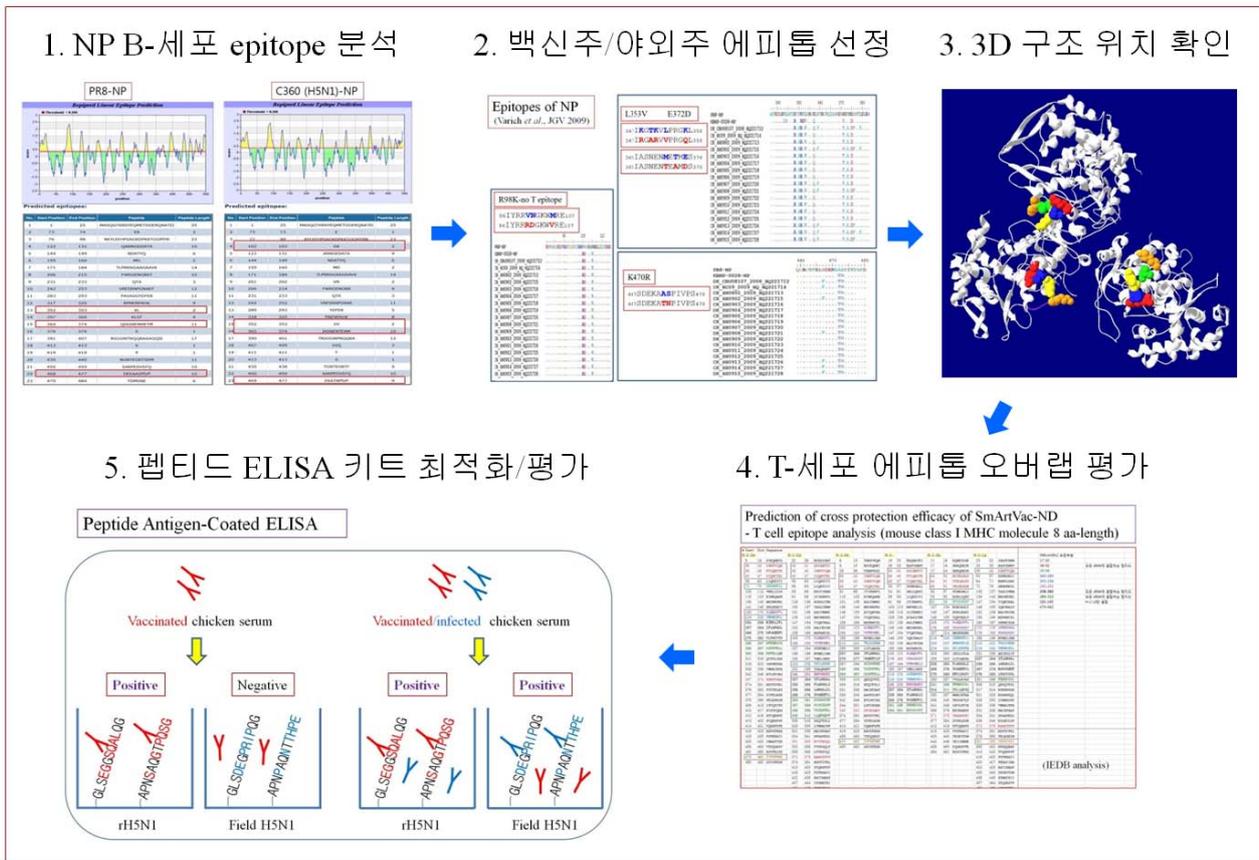
(3) NA1-DIVA ELISA 키트 평가

(가) 국내 임상 시험: 개발된 AIV NA1 Ab ELISA 키트에 대하여 효능을 평가하기 위하여 주관기관/국립농림수산물검역검사본부에서 민감도와 특이도, 교차반응성 등의 성능을 평가한다.

(나) 해외 임상 시험: 개발된 AIV NA1 Ab ELISA 키트 수출 대상국과의 국제공동연구를 통해 대상국의 검체를 이용해 키트의 해외 임상 시험을 수행함.

나. NP-DIVA ELISA 키트 개발

(1) NP-DIVA ELISA 키트 개발 개념도



(가) 재조합 바이러스에 사용할 PR8 바이러스의 NP와 국내 발생 H5N1 바이러스의 NP 단백질의 linear epitope를 분석하여 공통된 에피토프로 두 NP 간에 아미노산 차이가 비교적 많은 세부분을 선발하였음. NP 3차 구조상에 위치를 확인한 후 보고된 NP 에피토프의 위치와 비교한 결과 이들 모두 기존 확인된 에피토프 부분과 오버랩 되는 것으로 확인 됨. 따라서 이 에피토프들이 실제로 면역계에 의해 인식됨을 알 수 있고, 두 NP 간의 아미노산 차이에 의해 구분될 가능성이 높음. 따라서 하기와 같이 펩티드를 합성하여 ELISA 키트를 제작하여 항원성 유무와 차이를 비교할 계획임.

(2) NP-DIVA ELISA 키트 평가

(가) 국내 임상 시험: 개발된 NP-DIVA ELISA 키트에 대하여 효능을 평가하기 위하여 주관 기관/국립농림수산물검역검사본부에서 민감도와 특이도, 교차반응성 등의 성능을 평가한다.

(나) 해외 임상 시험: 개발된 NP-DIVA ELISA 키트 수출 대상국과의 국제공동연구를 통해 대상국의 검체를 이용해 키트의 해외 임상 시험을 수행함.

제 2 절 연구결과

[세부과제(서울대): AI-DIVA 시스템 용 백신 개발]

1. 유전자 선별

가. HA5 유전자 선별

(1) 2010-2011년 발생한 4차 HPAI는 clade 2.3.2에 의한 것으로 몽고지역에서 우점하는 것으로 알려져 겨울철새를 통해 다시 유입될 가능성이 높음. 따라서 국내 발생한 clade 2.3.2 H5N1 HPAI 중에서 gene bank에 등록되어 있는 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (H5N1) (이하 K10-483)의 HA 유전자 정보 (JF699673.1)를 이용함.

나. NA2 유전자 선별

(1) 현재 H9N2 저병원성 인플루엔자 백신주로 사용되고 있는 A/chicken/Korea/01310/2001 (H9N2) (이하 01310)의 NA2 선별 함. 이유는 지금까지 바이러스의 생물학적 특성과 유전자 특성에 대해 많은 연구가 이루어졌고, K10-483 계열 H5N1 바이러스의 NA1 stalk에 20개 아미노산 결손이 있는데 비해 01310 NA2는 18개 아미노산 결손이 있고, 대부분의 바이러스의 stalk에 2개내지 5개의 많은 N-glycan이 존재하는데 반해 01310의 경우 N-glycan이 전혀 없음. 이러한 특징은 이웃한 HA 단백질의 HA2-common epitope의 면역원성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대하고 있음.

다. NA1 유전자 선별

(1) 2010-2011년 발생한 4차 HPAI는 clade 2.3.2에 의한 것으로 몽고지역에서 우점하는 것으로 알려져 겨울철새를 통해 다시 유입될 가능성이 높음. 따라서 국내 발생한 clade 2.3.2 H5N1 HPAI 중에서 gene bank에 등록되어 있는 K10-483의 NA 유전자 정보 (JF699677.1)를 이용함.

라. NA3 유전자 선별

(1) 2013년 12월 국내 야생조류에서 분리된 저병원성 A/wild bird/Korea/SW190/2013 (H5N3) (이하 SW190)의 NA3를 선별 함. 자연계에 존재하는 H5N3 바이러스로 NA3 stalk에 결손이 없는 바이러스임.

2. 유전자 mutagenesis

가. HA5 유전자 mutagenesis

(1) Cleavage site mutagenesis

(가) Cleavage site multi-basic 아미노산 서열 (RERRRK)을 ASGR [계태아와 마우스에 병원성이 전혀 없는 KBNP-0028 (특허 제 10-0708593호)의 cleavage site 아미노산 서열]로 치환한 유전자를 PTDS 기법을 이용하여 합성함. Cleavage site의 아미노산 서열이 RXXR인 경우 잠재적인 병원성을 가질 수 있는데 ASGR 중 A (alanine) 코돈인 GCA는 single point mutation에 의해 R (arginine)이나 K (lysine)로 치환될 수 없어 제작된 재조합 바이러스의

표 1. NA3 인공합성을 위한 PTDS 프라이머

PTDS primer (5' to 3')	PTDS primer (5' to 3')
P1: ATGAATCCAAATCAGAAGATAATCACAATTGGTGTAGTGAATACTA	P2: ATAAGAAGGGCTATTGTTGATAGAGTAGTATTCACTACACCAATTGT
P3: CAACAATAGCCCTTCTTATCGGAGTTGGGAATCTGATTTTCAACAC	P4: GTCCCCTATTTTCTCATGTATAACAGTGTGAAAATCAGATCCCA
P5: ACATGAGAAAATAGGGACCACCAATGTGGTGTATCCAACAACA	P6: TTTCTCTTTAGTTATTATGGCTGTTGTTGGATACACCACAAT
P7: ATAATAACTAAAGAGGAAACGCACTTCAAGTCTCACTGCCACTGT	P8: AAGGGGAAGAAACCTCGGAAGGGGCACAGTGGCAGTGAGGACTTGA
P9: TCCGAGGTTTCTCCCTTTCCACAAGGACAATGCAATACGATTGGG	P10: TGTGACTATTACGCTTTGTTCTCACCAATCGTATTGCATTGTCC
P11: CAAAGACGTAATAGTCAAGGGAGCCTTATGTCAGTTGTGACAAT	P12: CGAGAGCAAAGGACCAGCAATCATCATTGTCACAACGACATAAGG
P13: TGCTGGTCTTTGCTCTGCCCAAGGGGCTCTACTGGGACTAAAC	P14: CTGTCTTTGATGGTCCATTGCTGTGTTTAGTCCCAGTAGAGCCC
P15: ATGGAACCATCAAAGACAGGACACCGTACAGATCATTAAATCCGGTT	P16: CAGTACAGGAGCAGTCCCTAGTGGGAACCGGATTAAATGATCTGTAC
P17 AGGGACTGCTCCTGTACTGGGTAATTACAAGGAGATATGTGTTGCT	P18: CATCGAAGCAACTGCTACTTGACCAAGCAACACATATCTCCTTGTA
P19 AGTAGCAGTTGCTTCGATGGAAGGAGTGGATGCATGTTTGCATGA	P20: CCACCTGCGATCATTGTGTTCCAGTCATGCAACATGCATCCACT
P21 ACGACAATGATGCGAGTGGCCAAATAATGTATGCAGGGAAAATGAC	P22: CTTTCTCCATGATTAATGGAGTCTGTCATTTTCCCTGCATACATT
P23 CATTAAATCATGGAGAAAGGATATACTAAGAACTCAAGAGTCTGAA	P24: TACAGGTCCCATCAATGCATTGACATTCAGACTCTTGAGTTCTTAG
P25: TGCATTGATGGGACCTGTATTGCTGCTGTACAGATGGTCTGCGG	P26: TAAATTCGGTGGTCTGCACTATTAGCCGCAGGACCATCTGTGACAG
P27: GTGCAGACCACCGAATTTACTGGATACGAAAAGGGGAGATAATAAA	P28: CTTTGTCTTGGGAATGTTCTCATACTTTATTATCTTCCCTTTTTCGT
P29: GAACATTCCCAAGACAAAGATACAACATTTGGAGGAGTGTCTTGT	P30: CGCAGTACACATCGATGTCCACATAAACAAGAACACTCCTCCAAATG
P31: GACATCGATGTACTGCGTATGTAGGGACAATTGGAAAAGTTCCA	P32: TTGTTGATCTTCATCCAAGGCCTGTTGGAACCTTTCCAATTGTCCC
P33: CTTGGATGAAGATCAACAATGAGACCATATTAGAAACAGGGTATGT	P34: GGTATCTGAATGAAATTTACTACATACATACCCTGTTTCTAATATG
P35: TAAATTTCAATTCAGATACCCCGAGCCAGCCGATCCTTCAACAGTA	P36: TGACGTTACTTGGAGAATCACATGATACTGTTGAAGGATCGGCTGG
P37: GATTCTCCAAGTAACGTCAATGGAGGACCTGGAGTCAAAGTTTTTG	P38: CATACATCATTACCCGTTTTGAAGCCAAAACCTTTGACTCCAGGTC
P39: AAACGGGTAATGATGTATGGTTGGGAAGGACTGTATCAACTAGTGG	P40: TTTGATAATTTCAAAGCCTGATCTTCCACTAGTTGATACAGTCTTT
P41: AGGCTTTGAAATATCAAAGTACGGAGGGGTGGATTAACCTCCCC	P42: TTTGTGTAACGATTTGGCATGATTGGGGGAGTTAATCCACCCCTC
P43: GCCAAATCAGTTACACAAACATTAGTGTCAAACAATGATTGGTCAG	P44: TCAACAATGAAACTCCCTGAGTAACCTGACCAATCATTGTTGACA
P45: CAGGGAGTTTCATTGTTGAGAACAATGGCTGTTTTAGCCCTGCTT	P46: CCTCCCCGTATAAGTTCAATATAGAAGCAGGGCTGAAAACAGCCA
P47: TGAACCTATACGGGGAGGCCCAATAAGAATGATGACGTTTCTTGG	P48: AGAAAGTAACTATACTATTGCTTGTCCAAGAAACGTCATCATTCTT
P49: AATAGTATAGTTACTTTCTGTGGACTAGACAATGAACCTGGATCGG	P50: ATGTTGGAACCATCAGGCCAATTTCCCGATCCAGGTTCAATTGTCTA
P51: GGCCTGATGGTTCCAACATTGGGTTTATGCCCAAGTAA	P52: TTAAGTTGGGCATAAACCCA

(2) SW190 NA3 stalk 아미노산 길이 조절

(가) SW190 NA3 stalk은 아미노산이 결손이 없음 (N3). HA5의 경우 수용기 결합력을 예측할 수 없으므로 stalk의 아미노산 30개를 결손시킨 돌연변이 유전자 제작하여 역 유전학 모벡터 pHW2000에 두 유전자 클로닝 완료함 (벡터 2종, pHWN3, pHWN3/30).

3. 재조합 바이러스 제작

가. 본 과제는 3년으로 설계되었고, 최종 목표 달성을 위한 핵심 재조합 바이러스 제작 이외에 H5N1 바이러스의 병원성, 증식성 및 면역원성에 대한 기초 연구를 진행하고자 하였으나 평가과정에서 2년으로 축소 된 바 최종 목표 달성을 위해 핵심적인 재조합 바이러스 제작에 집중하였음.

나. 발육란 고증식성, 포유류 무병원성 역유전자 벡터 시스템

(1) 기존 국내외의 연구에서는 PR8의 backbone을 사용하여 H5N1 재조합 바이러스를 제작 하였으나 본 연구팀은 PR8의 PB2 유전자를 01310 PB2나 0028 PB2로 대체하는 경우 포유류 병원성이 없고, 발육란 증식성이 탁월하다는 사실을 확인하여 K10-483의 HA5와 NA1 또는 K10-483의 HA5와 01310의 NA2를 가지며 01310 PB2 또는 0028 PB2를 갖는 재조합 바이러스를 제작 함.

표 2. H5N1 재조합 바이러스 제작 목록

재조합 바이러스	HA	NA	PB1	PB2	PA	NP	M	NS	제작
rH5N1-0	pHWH5/ASGR	pHWN1/20	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N1-1	pHWH5/ASGR	pHWN1/20	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N1-2	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN1/20	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N1-7	pHWH5/ASGR	pHWN1/20	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	O
rH5N1-8	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN1/20	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	-
rH5N1-13	pHWH5/ASGR	pHWN1/20	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N1-14	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN1/20	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	-
rH5N1-19	pHWH5/ASGR	pHWN1/20	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	0028	-
rH5N1-20	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN1/20	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	0028	O

표 3. H5N2 재조합 바이러스 제작 목록

재조합 바이러스	HA	NA	PB1	PB2	PA	NP	M	NS	제작
rH5N2-1	pHWH5/ASGR	pHWN2/18	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N2-2	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN2/18	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N2-7	pHWH5/ASGR	pHWN2/18	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	-
rH5N2-8	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN2/18	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	-
rH5N2-13	pHWH5/ASGR	pHWN2/18	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N2-14	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN2/18	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N2-19	pHWH5/ASGR	pHWN2/18	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	0028	-
rH5N2-20	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN2/18	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	0028	-

표 4. H5N3 재조합 바이러스 제작 목록

재조합 바이러스	HA	NA	PB1	PB2	PA	NP	M	NS	제작
rH5N3-1	pHWH5/ASGR	pHWN3	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	-
rH5N3-2	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN3	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	-
rH5N3-7	pHWH5/ASGR	pHWN3	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	O
rH5N3-8	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN3	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	-
rH5N3-13	pHWH5/ASGR	pHWN3/30	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	-
rH5N3-14	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN3/30	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	O
rH5N3-19	pHWH5/ASGR	pHWN3/30	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	-
rH5N3-20	pHWH5/ASGR/154N-	pHWN3/30	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	0028	-

4. 재조합 바이러스 평가

가. 재조합 바이러스의 증식성 평가

(1) 제작된 재조합 바이러스들의 계태아에서의 증식역가 (50% embryo infection dose, EID₅₀/ml)를 측정하기 위하여, 각각의 재조합 바이러스들을 인산완충용액으로 10⁻¹내지 10⁻⁹까지 10진 희석하여 각 희석 배수 별로 10-11일령의 SPF 발육란 5개에 요막강 경로로 100μl 씩 접종하여 3일간 배양한 후, 요막액을 수확하여 닭의 적혈구로 혈구응집여부를 확인하여 Reed-Muench 계산식에 따라 바이러스 역가 (EID₅₀/ml)를 측정 함.

표 5. 재조합 바이러스의 계태아에서의 바이러스 역가

Recombinant virus	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	NS	M	HAU	EID ₅₀ /ml
rH5N1-0	H5/ASGR	N1/20	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	32	10 ^{7.7}
rH5N1-1	H5/ASGR	N1/20	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	512	10 ^{9.1}
rH5N1-2	H5/ASGR	N1/20	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	512	10 ^{8.9}
rH5N1-13	H5/ASGR	N1/20	01310	PR8	PR8	PR8	0028	PR8	256	10 ^{8.1}
rH5N2-0	H5/ASGR	N2/18	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	512	10 ^{9.3}
rH5N2-1	H5/ASGR	N2/18	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	1024	10 ^{9.1}
rH5N2-13	H5/ASGR/154N-	N2/18	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	2048	10 ^{9.4}
rH5N2-2	H5/ASGR	N2/18	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	1024	10 ^{8.5}
rH5N2-14	H5/ASGR/154N-	N2/18	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	1024	10 ^{8.2}
rH5N3-1	H5/ASGR	N3	01310	PR8	PR8	PR8	0028	PR8	512	10 ^{8.7}
rH5N3-13	H5/ASGR/154N-	N3/30	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	512	10 ^{8.4}

(2) PR8의 모든 backbone을 갖는 rH5N1-0의 경우 증식성이 매우 낮았고 ($10^{7.8}$ EID₅₀/ml), rH5N2-0의 경우 증식성은 낮지 않으나 마우스 병원성이 있을 것으로 예상되므로 본 과제에서 목표로 하는 재조합 바이러스 대비 경쟁력이 매우 낮음. 이외 제작된 재조합 바이러스 모두 발육란에서 높은 증식성 ($10^{8.9-9.5}$ EID₅₀/ml)을 나타내었으며, N1 유전자가 포함된 재조합 바이러스보다 N2 유전자가 포함된 재조합 바이러스가 더 높은 증식성을 보임. HA5 유전자가 NA 유전자에 20개 아미노산이 결손 되었을 경우보다 18개 아미노산이 결손 된 경우-또한 NA1 대비 NA2의 효소 활성도의 영향으로-더 높은 증식성을 보이는 것으로 판단됨. 본 연구팀은 01310 PB2 또는 0028 PB2를 갖는 H1N1 및 H5N1 재조합 바이러스가 PR8 PB2를 갖는 재조합 바이러스 대비 마우스 병원성이 없다는 사실을 확인 (연구실적에 제시한 투고논문) 하여 고증식성 마우스 무병원성 재조합 바이러스 제작을 완료하였음. 현재 기존 진단기술 (NA1 ELISA)을 사용하는 경우 rH5N2-1과 rH5N2-2는 계태아 고증식성, 마우스 무병원성, DIVA 가능 백신주로 국내외 개발된 백신주 대비 최고 사양을 보유함. rH5N2-1과 rH5N2-2를 추가적으로 개선한 rH5N2-13과 rH5N2-14는 HA2 common epitope의 면역원성을 극대화 (교차방어: 다른 subtype 바이러스 감염 예방 효과) 하기 위해 제작한 바이러스이므로 이에 대한 효능 실험을 우선적으로 수행할 계획임.

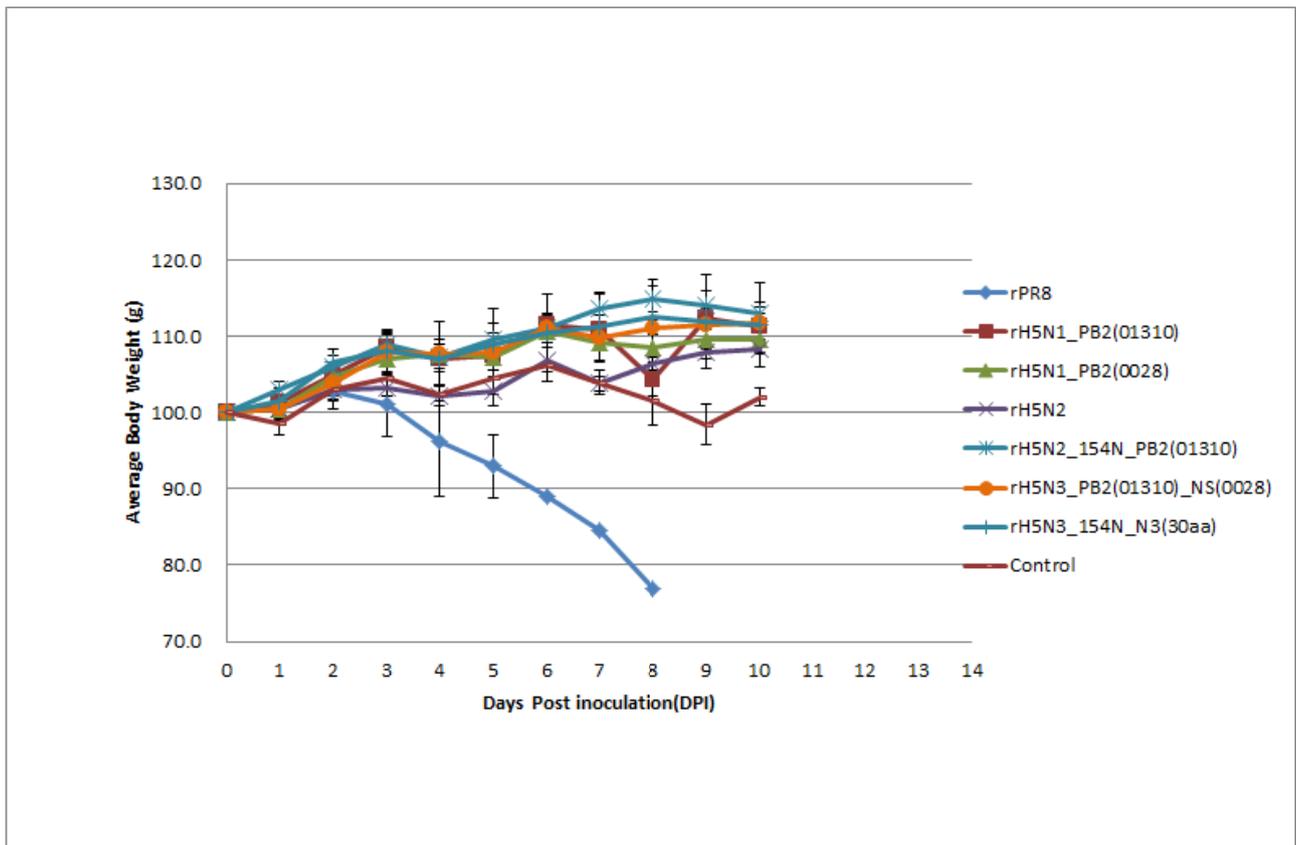
(3) 재조합 바이러스의 세포에서의 증식역가 (50% tissue culture infection dose, TCID₅₀/ml)를 측정하기 위하여, 각각의 재조합 바이러스들을 인산완충용액으로 10^{-1} 내지 10^{-9} 까지 10진 희석하여 각 희석 배수 별로 MDCK cell에 100 μ l씩 접종하여 3일간 배양한 후 수확하여 닭의 적혈구로 혈구응집여부를 확인하여 Reed-Muench 계산식에 따라 바이러스 역가 (TCID₅₀/ml)를 측정 함.

표 6. H5 재조합 바이러스의 MDCK에서의 증식성 비교

Recombinant virus	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	NS	M	TCID ₅₀ /ml
rH5N1-0	H5/ASGR	N1/20	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{5.3}$
rH5N1-1	H5/ASGR	N1/20	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{4.6}$
rH5N1-2	H5/ASGR	N1/20	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{5.4}$
rH5N1-13	H5/ASGR	N1/20	01310	PR8	PR8	PR8	0028	PR8	$10^{2.5}$
rH5N2-0	H5/ASGR	N2/18	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{8.2}$
rH5N2-1	H5/ASGR	N2/18	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{4.7}$
rH5N2-13	H5/ASGR/154N-	N2/18	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{5.0}$
rH5N2-2	H5/ASGR	N2/18	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{5.1}$
rH5N2-14	H5/ASGR/154N-	N2/18	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{4.8}$
rH5N3-1	H5/ASGR	N3	01310	PR8	PR8	PR8	0028	PR8	$10^{5.1}$
rH5N3-13	H5/ASGR/154N-	N3/30	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	$10^{7.2}$

나. BALB/c 마우스 병원성

(1) 각 재조합 바이러스를 PBS로 각각 10진 희석하여 졸레틸 (Virbac S.A., France) 15mg/kg 로 마취한 BALB/c 마우스 (6주령 암컷, 주식회사 코아텍) 5수에 비강으로 각각 10^6 EID₅₀를 접종한 후, 매일 폐사 유무와 체중을 조사하며 실험 초 체중의 30% 감소 시 안락사 시키고 폐사로 처리 하여 생취반수치사농도 (50% mouse lethal dose, MLD₅₀)를 측정 함. 양성 대조군으로 rPR8 바이러스, 음성대조군으로 PBS를 사용함.



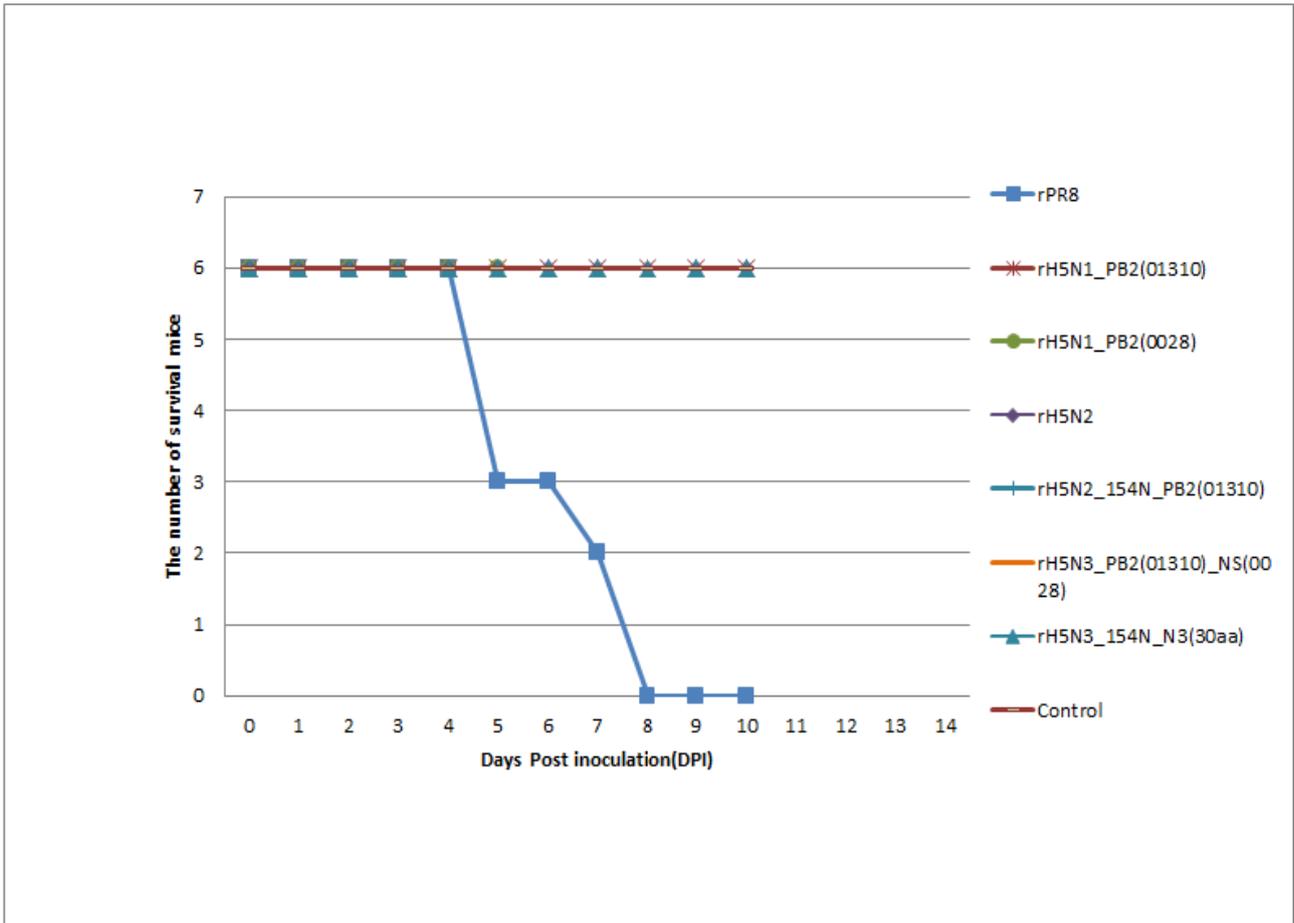


그림 1. H5 재조합 바이러스의 마우스 병원성 측정. 위: 체중 변화 측정, 아래: 폐사율.

(2) 방어능을 평가하기 위하여 공격접종 3일, 6일 째에 각 3마리씩의 마우스를 안락사하며 폐를 채취하여 조직 내 공격접종 바이러스의 역가를 측정함. 폐에서의 공격접종 바이러스 재분리 역가를 평가하기 위하여 적출된 조직의 무게를 측정하여 무게의 10배에 해당하는 PBS (1% gentamicin) 를 15ml conical tube 에 분주함. 적출된 조직을 주사기 (18G needle) 를 이용하여 PBS 가 분주된 15ml conical tube 안에서 유제를 실시함. 유제 후 이를 원심분리하여 유제상층액을 10^{-1} 부터 10^{-9} 까지 각 희석 배수 별로 10-11일령의 SPF 발육란 5개에 요막강 경로로 $100\mu\text{l}$ 씩 접종하여 3일간 배양한 후, 요막액을 수확하여 닭의 적혈구로 혈구응집여부를 확인하여 Reed-Muench 계산식에 따라 바이러스 역가 ($\text{EID}_{50}/\text{ml}$)를 측정 함.

표 7. H5 재조합 바이러스의 마우스 폐장 증식성 비교

Virus ^a	Virus reisolation in mouse lung ^b	
	3 DPI	6 DPI
rH5N1-PB2(01310)	0/3 (<0.5)	0/3 (<0.5)
rH5N1-PB2(0028)	0/3 (<0.5)	0/3 (<0.5)
rH5N2	3/3 (4.1)	3/3 (2.9)
rH5N2-154N-PB2(01310)	0/3 (<0.5)	0/3 (<0.5)
rH5N3-PB2(01310)-NS(0028)	0/3 (<0.5)	0/3 (<0.5)
rH5N3-154N-N3(30aa)	0/3 (<0.5)	0/3 (<0.5)
rPR8	3/3 (5.3)	3/3 (5.1)
Mock (PBS)	0/3 (<0.5)	0/3 (<0.5)

(3) NT test는 96-well plate에 불활화된 혈청을 PBS로 이진 희석하고, 동량의 200 TCID₅₀의 바이러스를 첨가하여 37°C 에 1시간 incubation함. 이 혼합액을 MDCK cell이 준비된 96 well plate에 흡착시킨 후, 배지를 첨가하여 4일간 배양함. 그 후, CPE 관찰을 통해 control 대비 50% 이하로 CPE가 감소하는 희석배수를 Neutralization antibody titer로 평가함.

표 8. H5 재조합 바이러스의 중화항체 역가

Virus ^a	Neutralization antibody titer
rH5N1-PB2(01310)	<10
rH5N1-PB2(0028)	<10
rH5N2	160
rH5N2-154N-PB2(01310)	<10
rH5N3-PB2(01310)-NS(0028)	<10
rH5N3-154N-N3(30aa)	<10
rPR8	640
Mock (PBS)	<10

5. 포유류 병원성 H5N1 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 약독화 및 생산성 증대 기술 실증 연구

가. A/wild duck/SNU50-5/2011 (H5N1) E2와 E20의 마우스 병원성

(1) 50-5-E2를 SPF 발육란에서 18회 계대하여 증식성이 증대된 50-5-E20을 선발하였고, 이 바이러스들의 병원성을 BALB/c 마우스에서 평가 (10^6 EID₅₀/수 비강 접종)함. 그 결과 6일 이내에 모두 25% 이상의 급격한 체중 저하를 보여 안락사 시킴. 50-5 바이러스는 최근 사람에게 감염되어 문제를 일으킨 저병원성 H7N9 AIV처럼 마우스 적응과정 없이도 병원성을 보이며 HA의 수용기 결합부위의 아미노산도 조류 수용기 친화성을 보이므로 유전자 분석만으로는 잠재적인 위험성을 예측하기 어려움. 이러한 포유류 병원성은 내부 유전자에서 기인하는 것으로 판단 됨 (Kim et al., 2014; Kim et al., 2015).

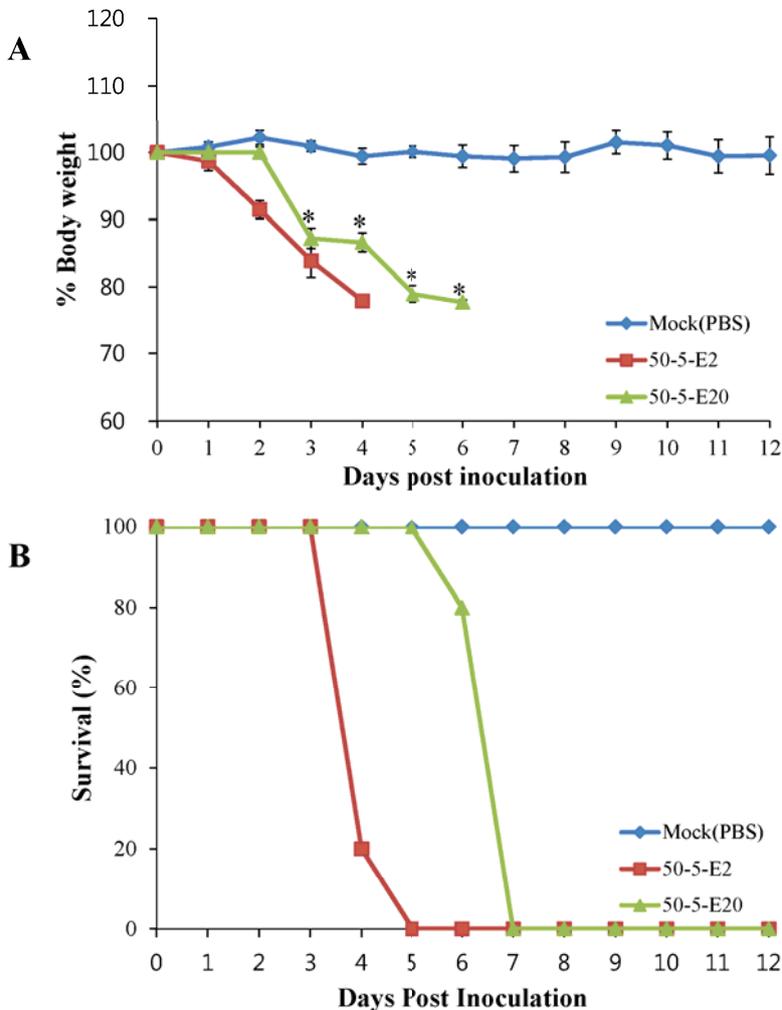


그림 2. 50-5-E2와 50-5-E20 바이러스의 마우스 병원성. A: 체중 변화, B: 폐사율.

(2) 50-5-E2와 50-5-E20 바이러스를 6주령 BALB/c 마우스 비강에 10^6 EID₅₀/수 접종한 후 5 일째에 안락사 시킨 후 폐장에서 바이러스 역가를 측정한 결과 50-5-E2와 50-5-E20 모두 바이러스 양성이었고, 4.3 내지 4.7 EID₅₀/그램의 비교적 높은 바이러스 역가를 보여 폐장에서의 증식에 의한 체중의 감소가 일어난 것으로 사료됨.

표 9. BALB/c 마우스 폐장에서 50-5-E2와 50-5-E20 바이러스의 재분리

Virus ^a	Virus reisolation in mouse lung	
	Virus isolation / No. of mice	Virus titer (log ₁₀ EID ₅₀ /0.1ml) ^b
50-5-E2	4/4	4.3
50-5-E20	4/4	4.7
Mock(PBS)	0/2	≤0.5

^a 6-week-old BALB/c mice were infected intranasally with 106.0EID₅₀ of 50-5-E2 and 50-5-E20.

^b Chicken embryo 50% infectious dose, EID₅₀/0.1ml. Lung tissues were sampled at 5 days post-inoculation and pooled for virus titration.

(3) 발육란 증식성이 탁월한 50-5-E20의 HA 및 NA를 가지면서 나머지 6개 유전자는 PR8 유래인 HN(E20), PR8 NS 대신 0028의 NS를 갖는 HN(E20)-NS(0028), 0028 NS의 PL-motif로 GSEV 대신 ESEV를 갖는 HN(E20)-NS(0028)EPEV, PR8 PB2대신 01310의 PB2를 갖는 HN(E20)-PB2(01310), PR8의 NS, PB2 대신 0028의 NS, 01310의 PB2를 갖는 HN(E20)-PB2(01310)-NS(0028)을 역유전학 기법을 사용하여 제작하였으며 SPF 발육란을 사용하여 역가를 측정하였다. 그 결과 표 10과 같이 HN(E20)-PB2(01310)은 HN(E20) 보다 유의적으로 높은 역가를 보임 (P < 0.05) (Kim et al., 2015).

표 10. 50-5-E20 재조합 바이러스의 발육란 역가 비교

Virus ^a	Virus titer (log ₁₀ EID ₅₀ /ml) ^b
HN(E20)	9.2 ±0.2 *
HN(E20)-NS(0028)	8.4 ±0.2
HN(E20)-NS(0028)EPEV	8.4 ±0.2
HN(E20)-PB2(01310)	9.8 ±0.3 *
HN(E20)-PB2(01310)-NS(0028)	9.2 ±0.1

^a Each virus was inoculated at $10^{4.0}$ EID₅₀/0.1ml each.

^b 50% of chicken embryo infection dose, EID₅₀/ml, geometric mean log₁₀ titer with standard deviation.

* Significantly different (P < 0.05).

(4) 50-5-E20 재조합 바이러스의 마우스 병원성 측정 결과 (그림 3) PR8의 6개 유전자를 갖는 HN(E20) 바이러스는 6일 이내에 체중이 급격하게 감소하여 병원성이 있었으나 HN(E20)-NS(0028), HN(E20)-NS(0028)EPEV, HN(E20)-PB2(01310), HN(E20)-PB2(01310)-NS(0028)은 병원성이 전혀 없었음.

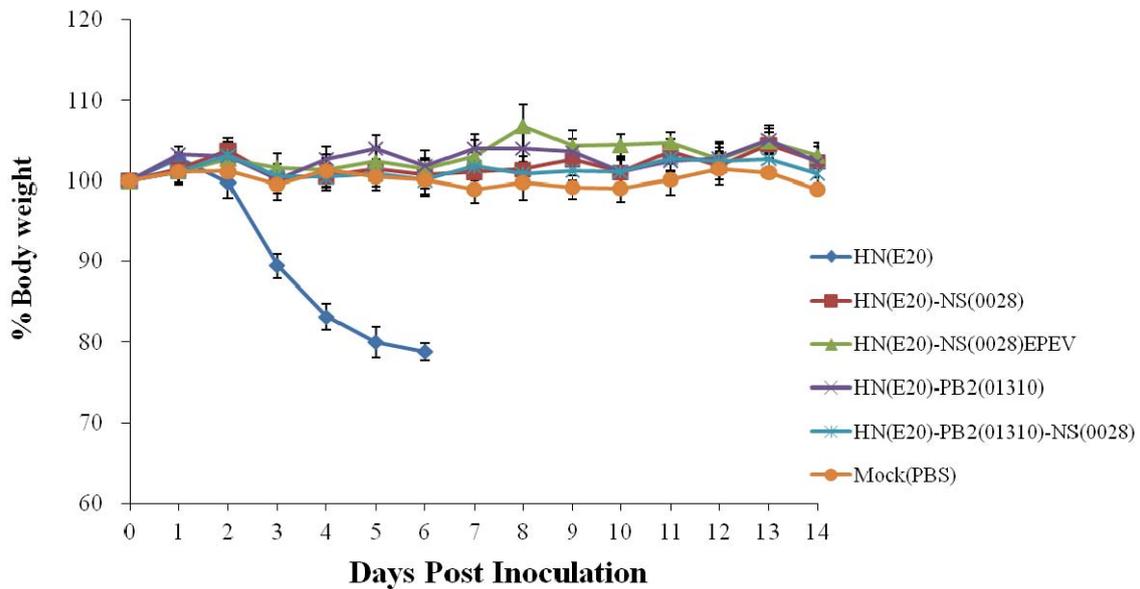


그림 3. 50-5-E20 재조합 바이러스의 마우스 병원성

(5) 50-5-E20 재조합 바이러스의 BALB/c 마우스 폐장에서의 증식성을 비교한 결과 HN(E20)은 접종 3일과 6일에 비교적 높은 바이러스 역가가 검출되었고, HN(E20)-NS(0028), HN(E20)-NS(0028)EPEV는 HN(E20) 대비 낮은 역가를 보이긴 하였으나 HN(E20)-PB2(01310), HN(E20)-PB2(01310)-NS(0028)은 거의 증식하지 못하였음. 이는 01310의 PB2 때문인 것으로 생각됨 (Kim et al., 2014).

표 11. 50-5-E20 재조합 바이러스의 마우스 폐장 증식성 비교

Virus ^a	Virus reisolation in mouse lung ^b	
	3 DPI	6 DPI
HN(E20)	3/3 (5.5)	3/3 (3.5)
HN(E20)-NS(0028)	3/3 (4.3)	2/3 (≤1.1)
HN(E20)-NS(0028)EPEV	3/3 (3.3)	3/3 (1.7)
HN(E20)-PB2(01310)	1/3 (≤0.7)	0/3 (≤0.5)
HN(E20)-PB2(01310)-NS(0028)	0/3 (≤0.5)	0/3 (≤0.5)
Mock(PBS)	0/3 (≤0.5)	0/3 (≤0.5)

^a 6-week-old BALB/c mice were infected intranasally with 10^{6.0}EID₅₀ recombinant H5N1 LPAIVs.

^b Lung tissues were sampled at 3 days post inoculation (DPI) and 6 DPI.

No. of virus isolation/no. of mice (virus titers of the pooled lung tissues, Log₁₀EID₅₀/0.1ml).

(6) 50-5-E20 재조합 바이러스를 6주령 BALB/c 마우스에 10^6 및 10^4 EID₅₀/수를 각각 접종한 후 2주후에 채혈하여 혈구응집억제 및 중화항체를 측정한 결과 거의 대부분의 바이러스에서 검출한계 이하의 혈구응집억제항체가 검출되었으나 모든 바이러스에서 중화항체가 검출됨.

표 12. 50-5-E20 재조합 바이러스 감염 후 혈구응집억제 및 중화항체 역가

Virus	Inoculum (EID ₅₀ /0.1ml)	HI titer						VN titer					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
HN(E20)-NS(0028)	10^4	<10 ^a	<10	<10	<10	20	<10	160	40	160	160	640	640
	10^6	20	10	10	<10	20	10	640	160	80	320	640	160
HN(E20)-NS(0028)EP EV	10^4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	320	320	320	640	40
	10^6	20	<10	10	<10	40	NT ^b	320	160	160	160	1280	NT
HN(E20)-PB2(01310)	10^4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	40	160	40	40	40
	10^6	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80	160	80	40	80
HN(E20)-PB2(01310) -NS(0028)	10^4	<10	<10	<10	<10	<10	NT	80	40	20	160	80	NT
	10^6	<10	<10	<10	<10	<10	NT	40	160	80	80	320	NT
Mock(PBS)	-	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

6-week-old BALB/c mice were infected intranasally with 10^4 or 10^6 EID₅₀ of recombinant H5N1 LPAIVs, and blood samples were collected at 2 weeks post inoculation. HI and VN titers against homologous virus HN(E20) were determined.

^a The detection limit of the HI and VN titers was < 10.

^b NT, not tested.

(7) 50-5-E20 재조합 바이러스를 6주령 BALB/c 마우스에 10^6 및 10^4 EID₅₀/수를 각각 접종한 후 2주후에 50-5-E20 바이러스로 공격접종을 실시한 결과 HN(E20)-NS(0028), HN(E20)-NS(0028)EPEV, HN(E20)-PB2(01310)-NS(0028)은 10^6 EID₅₀/수를 백신한 경우 (그림 4A, B) 체중의 변화가 없어 완벽한 방어가 이루어졌으나 HN(E20)-PB2(01310)은 10% 정도의 체중 감소가 관찰되었음. HN(E20)-NS(0028), HN(E20)-NS(0028)EPEV를 10^4 EID₅₀/수를 백신한 경우 (그림 4C, D) HN(E20)-NS(0028), HN(E20)-NS(0028)EPEV는 10% 정도의 체중 감소 후 모두 회복되었으나 HN(E20)-PB2(01310), HN(E20)-PB2(01310)-NS(0028)은 대부분에서 25% 이상의 급격한 체중 감소가 관찰되어 효능이 없었음.

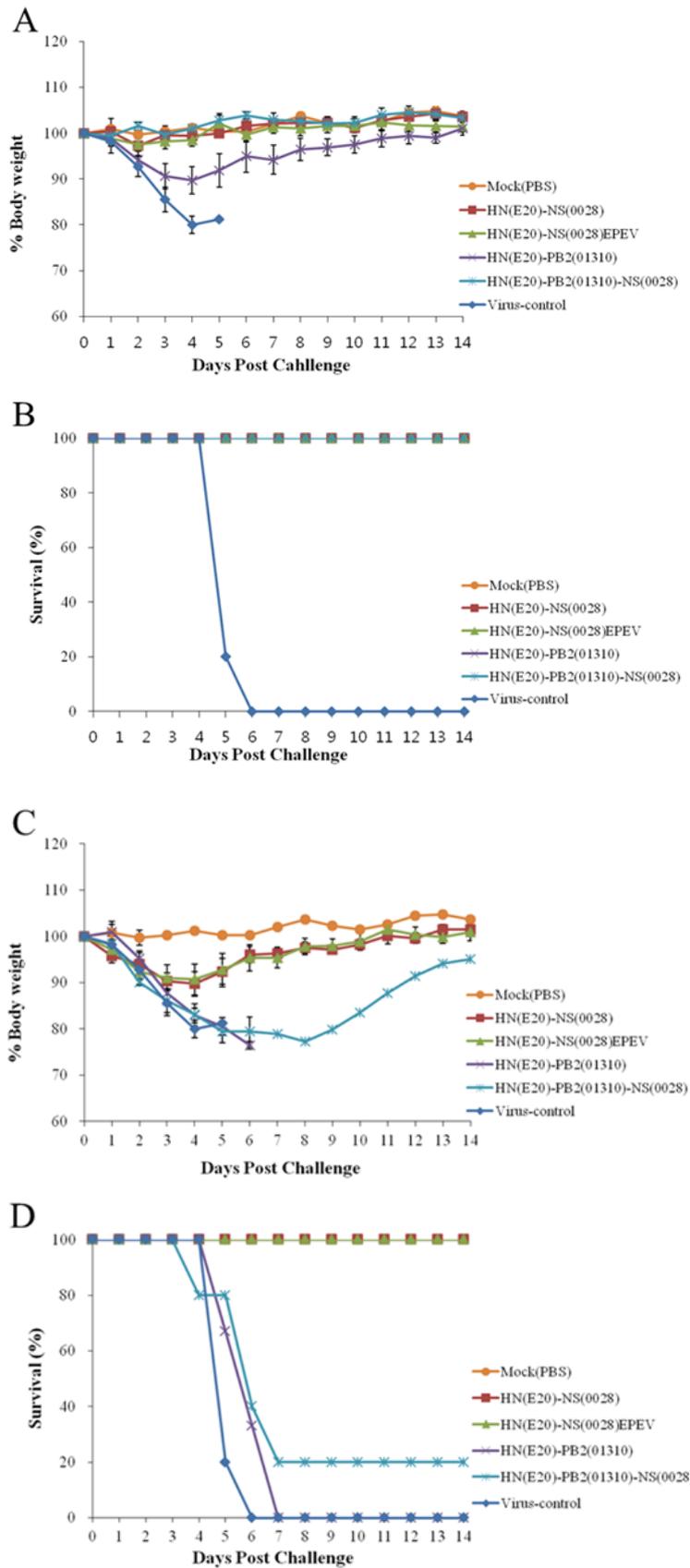


그림 4. 50-5-E20 재조합 바이러스의 50-5-E2에 대한 백신 효능 평가. A: 10⁶ EID₅₀/수 백신 접종 후 체중의 변화, B: 10⁶ EID₅₀/수 백신 접종 후 폐사율, C: 10⁴ EID₅₀/수 백신 접종 후 체중의 변화, D: 10⁴ EID₅₀/수 백신 접종 후 폐사율.

(8) 50-5-E20 재조합 바이러스들의 고병원성 H5N1 바이러스에 대한 방어효능을 알아보기 위해 6주령 BALB/c 마우스에 10^6 및 10^4 EID₅₀/수를 각각 접종한 후 3주후에 K10-483 바이러스 (2010년 야생조류 분리 H5N1 AIV, clade 2.3.2.1)로 공격접종을 실시한 결과 HN(E20)-NS(0028)은 모든 역가에서 완벽한 방어효능을 보였음. HN(E20)-PB2(01310)은 10^6 EID₅₀/수에서는 완벽한 방어효능을 보였으나 10^4 EID₅₀/수에서는 67%의 폐사율을 보였음. 50-5-E20과 K10-483의 HA와 NA 아미노산 상동성은 89%와 88%로 매우 낮았으나 HN(E20)-NS(0028)에서 완벽한 방어효능을 보인 것은 살아 있는 바이러스를 백신하였기 때문인 것으로 판단됨.

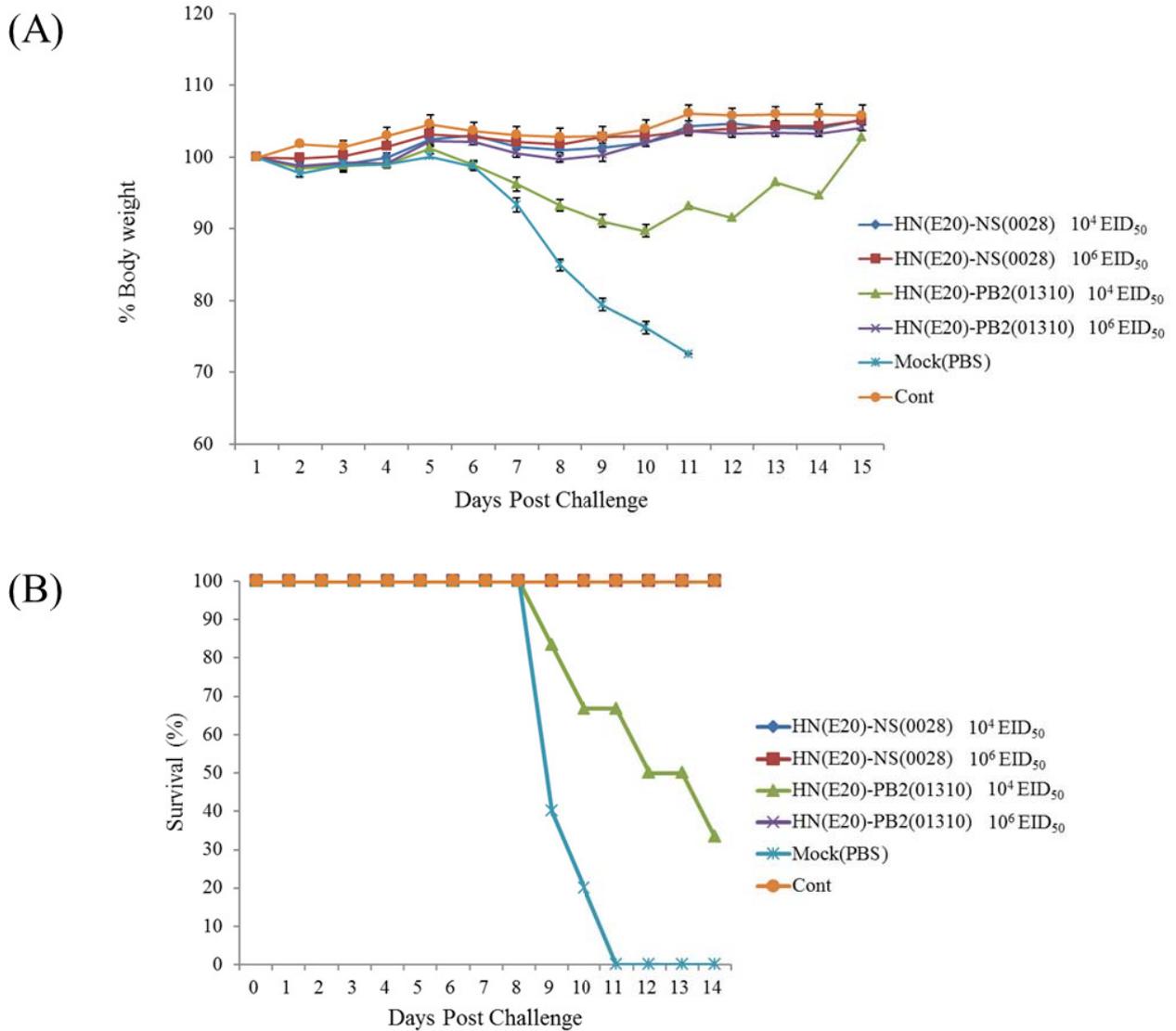


그림 5. 50-5-E20 재조합 바이러스의 고병원성 H5N1 바이러스 K10-483에 대한 백신 효능 평가. A: 체중의 변화, B: 폐사율.

6. 50-5-E20 재조합 바이러스 사독 오일백신의 면역원성 및 면역 지속성 평가

(1) 50-5-E20 재조합 바이러스를 BEI로 불활화 하여 ISA70과 3:7의 비율로 혼합하여 오일에멸 전 백신을 제조한 후 SPF 닭에 접종하여 2주후부터 매주 채혈하여 혈구응집억제 항체를 측정함. 그 결과 HN(E20)-PB2(0028)과 HN(E20)-PB2(0028)-NS(0028)의 경우 2주부터 HN(E20)과 HN(E20)-PB2(0028) 대비 높은 항체역가를 유지하였음.

표 13. 백신용 바이러스 역가

Virus	HAU ^a	EID ₅₀ /ml
HN(E20)	128	10 ^{8.1}
HN(E20)-PB2(0028)	256	10 ^{9.1}
HN(E20)-PB2(310)	512	10 ^{8.9}
HN(E20)-PB2(0028)-NS(0028)	128	10 ^{8.5}

^a BEI 처리 한 후 HA 역가

표 14. 50-5-E20 재조합 바이러스 백신 접종 후 혈구응집억제 항체 추이

Anti-serum	Mean hemagglutination inhibition titer (log2) at week-post-vaccination									
	0	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN(E20)	0	4.3	8.3	9.7	10	10.7	9	9	8	7
HN(E20)-PB2(0028)	0	7.7	9.7	10.3	11	11	10	10	9.3	9
HN(E20)-PB2(01310)	0	4	7.7	10.3	11	10.7	9.3	8.3	7.7	7
HN(E20)-PB2(0028)-NS(0028)	0	7.7	9.7	11	11	11.3	10.7	10.7	10	9

표 15. 50-5-E20 재조합 바이러스 백신 접종 후 교차 혈구응집억제 항체 측정

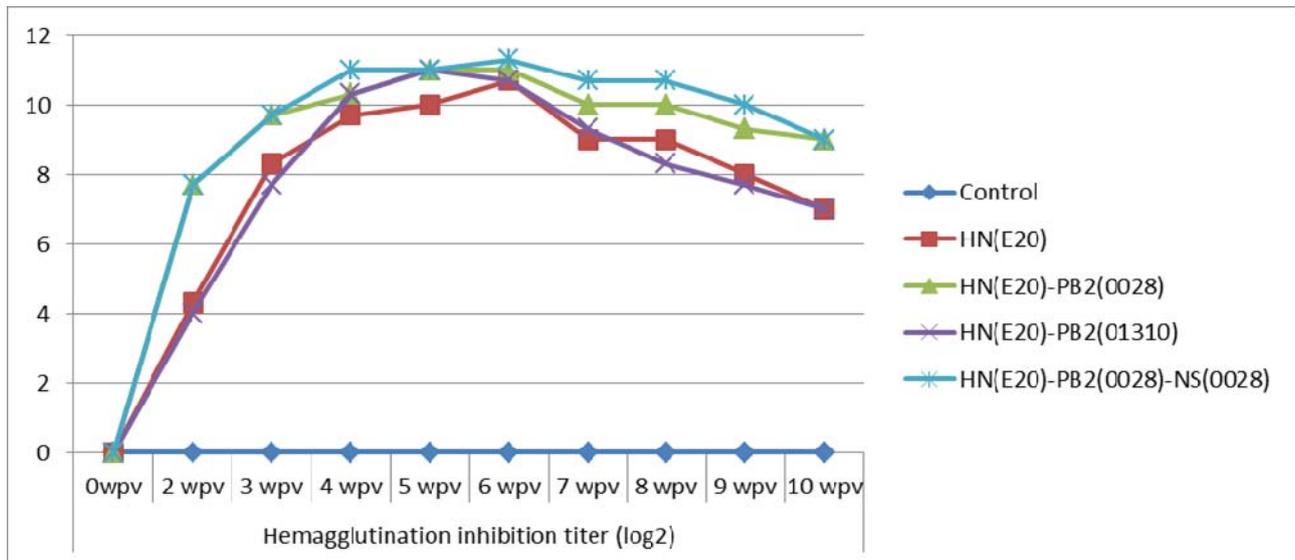
Anti-serum	AI (HN50-5 E20) ^b			AI (HPAI H5N1) ^b		
	0dpv ^c	14dpv	21dpv	0dpv ^c	14dpv	21dpv
Control ^d	0.0	0.0	0.0	1.7	2.0	1.3
PR8 ^d	0.0	4.3	8.3	2.0	2.3	4.0
PB2(0028) ^d	0.0	7.7	9.7	1.7	4.3	5.7
PB2(310) ^d	0.0	4.0	7.7	2.0	3.7	3.3
PB2(0028) -NS(0028) ^d	0.0	7.7	9.7	3.0	5.3	5.3

^a BEI로 불활화 후 ISA70와 3:7로 희석하여 IM으로 0.5ml 씩 접종

^b HI test 검사 항원

^c 백신 접종 전 채혈

^d 항혈청



[협동과제 (바이오노트): AI-DIVA 시스템 용 진단 키트 개발]

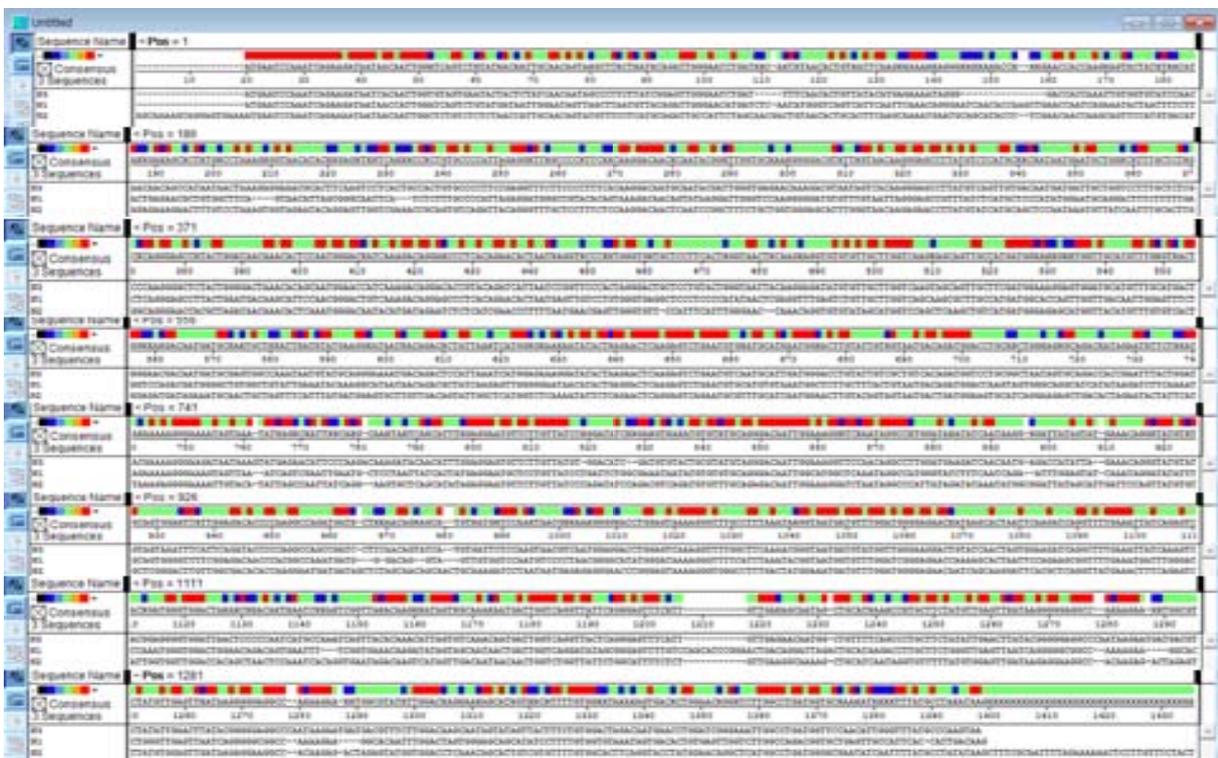
1. NA1-DIVA ELISA 키트 개발

가. NA1단백질과 NA2, NA3 단백질의 sequence 비교 분석

(1) NA1 단백질과 백신의 target 부위인 NA2, NA3 단백질의 sequence를 비교하여, NA2와 NA3를 타겟으로 한 백신을 사용 시에 검체 중의 항 NA1 항체를 검출함으로써 DIVA kit 로써의 적용이 가능한지 검토하였다.

(2) Sequence의 비교는 H5N2와 H5N3, H5N1의 NA단백질 sequence를 Megalign 프로그램을 이용하여 다음과 같이 비교하였다.

<NA1, NA2, NA3 단백질의 sequence 비교>



(3) 각 단백질의 sequence homology를 비교한 결과 다음과 같이 sequence간 차이가 있음을 확인하였고, 이에 대해 NA2, NA3 백신에 대한 DIVA kit의 개발 시에 NA1 단백질을 적용할 수 있음을 검증하였다.

<sequence homology 비교>

		Percent Identity				
		1	2	3		
Divergence	1		56.5	58.6	1	N3
	2	70.0		58.1	2	N1
	3	67.7	73.6		3	N2
		1	2	3		

나. 항원 원료의 개발

(1) 마이크로 웰 흡착용 항원 제조

- 마이크로 웰에 흡착할 항원으로 유전자 재조합 NA1 TC1(truncated form)을 사용하였으며 제조과정은 다음과 같다.

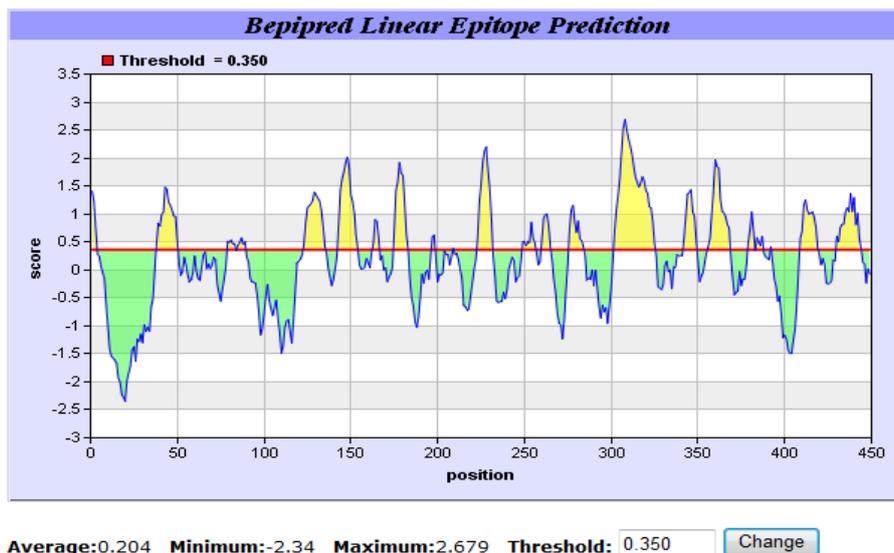
(가) Template

① 서울대학교 수의과대학에서 받은 NA1 plasmid를 입수하였다.

(2) PCR 및 발현벡터 제조

(가) NA1 TC1(123a.a~368a.a)을 encoding 하는 유전자는 NA1 plasmid를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 획득하였다.

(나) NA1 gene을 truncation(NA1 TC1:123a.a~368a.a)을 한 이유는 항원 항체 반응에 핵심적인 역할을 하는 epitope 가 많이 존재 하는 region을 중심으로 항원을 발현시키기 위해서이다.

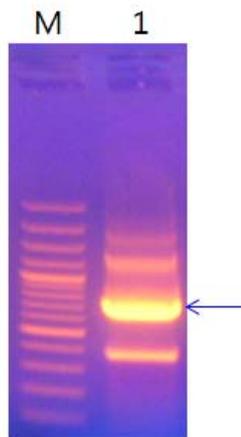


(다) PCR을 수행하기위해 다음의 Oligonucleotide primer는 유전자은행 (Accession No. JF699677.1)에서 정보를 얻어 작성하였다 (표1).

표 1. Oligonucleotide primers used in this study

AGA TCT AAG CAT TCC AAC GGG ACT	NA1 TC1 F
GTC GAC TTA CGA AAA TTC ACT GTC TGT	NA1 TC1 R

(라) NA1 TC1 항원의 증폭은 thermocycle (mycycler ; BioRad)을 이용하여 (94°C, 5분) x 1 cycle, (94°C, 1분, 45°C, 1분, 72°C, 1분 30초) x 28 cycles, (94°C, 1분, 60°C, 1분, 72°C, 5분) x 1 cycle 으로 사용하였다. PCR반응이 완전히 끝난 후, 1.5%의 agarose gel을 만들어 PCR product 1ul를 전기 영동하여 항원의 size를 확인하고 Gene clean Kit (MP biochemical, #1101-400, France) 를 사용하여 증폭된 DNA를 추출하였다(그림1).



LaneM: DNA 100bp ladder
Lane1: AIV H5N1 NA1 TC1 738bp

그림 1. PCR products of NA1 TC1 gene
Lane M, O' GeneRuler 100bp DNA Ladder (Thermo, Cat. No.: #SM1153)
Lane 1, NA1 TC1 738bp

(마) DNA의 확인은 작업의 효율과 정확성을 기하기 위하여 전문업체(Genotech, Korea)에 DNA sequencing을 의뢰하였고, 추출한 DNA가 NA1 TC1 유전자임을 확인하였다 (그림2).

NA1 TC1 Translation map

```

1 K H S N G T V K D R S P H R T L M S C P
1 AAGCATTCCAACGGGACTGTCAAAGACAGGAGCCCTCACAGAACACTAATGAGTTGTCTT
21 V G E A P S P Y N S R F E S V A W S A S
61 GTGGGTGAGGCTCCCTCCCCATATAACTCGAGGTTTGTAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGC
41 A C H D G T S W L T I G V S G P D D G A
121 GCTTGCCATGATGGCACCAGTTGGTTGACAATTGGAGTTTCTGGTCCAGACGATGGGGCT
61 V A V L K Y K G I I T D T I K S W G N N
181 GTGGCTGTATTGAAATACAAAGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGGGGAATAAC
81 I L R T Q E S E C A C V N G S C F T V M
241 ATACTGAGGACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGCTCTTGCTTTACTGTAATG
101 T D G P S N G Q A S Y K I F K I E K G K
301 ACAGATGGACCAAGTAATGGGCAGGCATCATATAAAATCTTCAAAATAGAAAAAGGAAA
121 V V K S V E L N A P N Y H Y E E C S C Y
361 GTAGTTAAATCAGTCGAATTGAATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTAT
141 P D S G E I I C V C R D N W H G S N R P
421 CCTGATTCTGGCGAAATAATATGTGTGTGCAGGGACAATTGGCATGGCTCAAATAGGCCA
161 W V S F N Q N L E Y Q I G Y I C S G V F
481 TGGGTATCTTTCAATCAGAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATTTGCAGTGGGGTTTTTC
181 G D N P R P N D G T G S C G P M S P N G
541 GGAGACAACCCACGGCCAAATGATGGGACAGGTAGTTGTGGTCCAATGTCCCCTAACGGG
201 A Y G I K G F S F K Y G N G V W I G R T
601 GCATATGGGATAAAAAGGGTTTTTCATTTAAATACGGTAATGGTGTGGATCGGGAGAACC
221 K S T N S R S G F E M I W D P N G W T G
661 AAAAGCACTAATTCAGAAGCGGTTTTGAAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGGACTGGA
241 T D S E F S
721 ACAGACAGTGAATTTTCG

```

그림 2. Nucleotide/amino acid sequence of cloned NA1 TC1

(바) NA1 TC1 recombinant gene 제조를 위하여 Baculo 발현 벡터인 Bachis9 vector를 primer의 linker site인 BamH I(NEB, #R0136S, USA), XhoI(NEB, #R0146S, USA)으로 restriction하고, PCR product NA1 TC1은 Bgl II(NEB, #R0144S, USA), SalI(NEB, #R0138S, USA)으로 각각 Restriction 하였다. agarose gel에 전기 영동하여 Gene Clean Kit (MP biochemical, #1101-400, France)를 이용해 추출해 놓았다.

(사) Elution한 insert와 Vector를 T4 DNAligase(Roche,10481220001,Germany)를 이용해 16°C 4시간이상 ligation 시키고 competent cell (Top10F')에 형질전환 시켰다. 형질전환은 heat-shock법을 이용하였으며, -70°C에 보관된 competent cell을 꺼내 ice 위에서 해동 시킨 후 ligate 8ul를 넣고 약 3초간 조심스럽게 혼합한 후 얼음에서 20분간 정치시켰다. 반응물이 혼합된 competent cell의 tube를 42°C의 항온수조에 90초간 정치시켜 heat shock을 하고 즉시 얼음에 넣어 주었다. LB 액체 배지를 1 ml 넣어주어 37°C, 1시간 incubation을 시킨 후 selection marker로 항생제 Ampicilin이 포함된 LB agar plate에 100ul의 균액을 도말하고 16-18시간 37°C 조건으로 배양하였다.

(아) LB agar plate에 자란 colony를 Ampicilin이 포함된 액체 LB 배지에 접종하여 cell이 충분히 자랐을 때 Wizard Plus SV Minipreps Kit (Promega, #A1460, USA)를 이용해서 DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA를 BacPAK6TM DNA(Clontech, Cat. No.:631401)를 이용하여 sf9 cell 에 Transfection 한 후 72시간 후에 배양액을 회수 하였다.

다. ELISA 키트의 제작

(1) 교정용 기준 물질 (표준 검체)의 설정 근거

(가) 키트의 제제화 시 용법, 용량 설정 시험에 사용 될 음성, 양성 표준 검체를 선별하였다. SMART백신 접종 혈청은 확보되지 않았기 때문에, 자연감염혈청 및 AIV 음성혈청을 다음과 같이 선정하였다.

(나) 표준 양성 검체 (RP01, RP02)

① 3주령 SPF닭에 AIV(K040110)을 공격접종한 후 48주에 채혈한 혈청을 바이오노트 AIV Ab ELISA 검사 결과 PI value가 80이상으로 양성임이 확인된 혈청을 사용하였다.

(다) 표준 음성 검체 (RN01, RN02)

① SPF닭 혈청으로, 바이오노트 AIV Ab ELISA 검사 결과 PI value가 10미만으로 음성임이 확인된 혈청을 사용하였다.

② BioNote AIV Ab ELISA의 검사방법 및 결과판정기준

㉠ 플레이트의 각 well에 음성대조액, 양성대조액, 검사하고자 하느 시료의 원액을 50uL씩 각각 분주하고, 접합체액을 50uL씩 첨가하여, 플레이트를 잘 흔들어 섞어준다. 37°C에서 30분 동안 반응시키고, 세척액으로 6회 세척한다. 기질액 100uL를 주입한 후, 빛을 차단하여 상온에서 10분간 반응시킨다. 반응정지액 100uL를 첨가한 후, ELISA리더기로 흡광도를 측정한다.(측정파장 : 450nm, 참조파장 : 620nm)

㉡ 결과 판정식 (PI value계산) : $[1-(\text{검체흡광도}/\text{음성대조액 평균 흡광도})] \times 100$

㉢ 결과 판정식에 대입하여 산출된 PI value가 50이상이면 양성, 50미만이면 음성으로 판정한다.

(2) 용법, 용량 설정 근거

(가) 항원 coating 농도 조건 시험

① 시험방법 및 조건선정 기준

㉠ 표준음성혈청의 각각의 흡광도 값이 0.1을 넘지 않고, 표준양성혈청과 표준음성혈청의 흡광도 차이(P/N value)가 가장 큰 조건을 선정하였다.

항원 코팅 조건	유전자 재조합 항원을 4 μ g/ml 2 μ g/ml 1 μ g/ml 0.5 μ g/ml 의 농도로 희석하여 준비된 플레이트에 코팅 : 37°C, 1시간 coating
검체 반응	100배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 60분
세척	5회, 350 μ l/well
접합체액 반응	접합체액(0.5 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분
세척	5회, 350 μ l/well
기질액 첨가	TMB 100 μ l/well첨가, 실온(15~25°C),15분후 stop
판정 (450nm, 620nm Ref.)	
양성 혈청	표준양성혈청01(RP01), 표준양성혈청02 (RP02)
음성 혈청	표준음성혈청01(RN01), 표준음성혈청02 (RN02)

② 결과

㉠ 항원 코팅 농도 설정 시험 결과 항원의 코팅농도가 2 μ g/mL이었을 때, 조건선정 기준에 가장 부합하였다.

	항원코팅농도(μ g/ml)			
검 체	4	2	1	0.5
표준양성혈청01	2.9500	2.6340	1.6640	1.1970
표준양성혈청02	1.5500	1.4440	1.3930	1.0160
표준음성혈청01	0.1070	0.0920	0.0690	0.0450
표준음성혈청02	0.2170	0.0710	0.0620	0.0670
양성혈청 평균	2.2500	2.0390	1.5285	1.1065
음성혈청 평균	0.1620	0.0815	0.0655	0.0560
P/N Value	13.89	25.02	23.34	19.76

(나) 검체 희석배수 설정 시험

① 시험방법 및 조건선정 기준

㉠ 표준양성혈청의 각각의 흡광도 값이 0.1을 넘지 않고, 표준양성혈청과 표준음성혈청의 흡광도 차이(P/N value)가 가장 큰 조건을 선정하였다.

검체 반응	검체 희석액으로 50배 희석 100배 희석 200배 희석 400배 희석 를 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 60분
세척	5회, 350 μ l/well
접합체액 반응	접합체 용액(0.5 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분
세척	5회, 350 μ l/well
기질액 반응	TMB 100 μ l/well첨가, 실온(15~25 $^{\circ}$ C),15분후 stop
측정 파장(450nm, 620nm Ref.)	
양성 혈청	표준양성혈청01(RP01), 표준양성혈청02 (RP02)
음성 혈청	표준음성혈청01(RN01), 표준음성혈청02 (RN02)

② 결과

㉠ 검체 희석배수 설정 시험 결과 검체를 100배 희석하였을 때, 조건선정 기준에 가장 부합하였다.

검 체	검체 희석 배수			
	1/50	1/100	1/200	1/400
표준양성혈청01	2.880	2.6340	1.537	1.005
표준양성혈청02	1.751	1.4440	1.225	0.871
표준음성혈청01	0.150	0.0920	0.07	0.034
표준음성혈청02	0.300	0.0710	0.068	0.045
양성혈청 평균	2.3155	2.0390	1.3810	0.9380
음성혈청 평균	0.2250	0.0815	0.0690	0.0395
P/N Value	10.29	25.02	20.01	23.75

(다) 검체 반응시간 설정

① 시험방법 및 조건선정 기준

㉞ 표준양성혈청의 각각의 흡광도 값이 0.1을 넘지 않고, 표준양성혈청과 표준음성혈청의 흡광도 차이(P/N value)가 가장 큰 조건을 선정하였다.

검체 반응	검체를 검체 희석액으로 100배 희석하여 100 μ l/well로 각 well에 첨가 한 후 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 15분 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 60분 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 90분 반응 시켰다.
세척	5회, 350 μ l/well
접합체액 반응	접합체 용액(0.5 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분
세척	5회, 350 μ l/well
기질액 반응	TMB 100 μ l/well첨가, 실온(15~25 $^{\circ}$ C),15분후 stop
측정 파장 (450nm, 620nm Ref.)	
양성 혈청	표준양성혈청01(RP01), 표준양성혈청02 (RP02)
음성 혈청	표준음성혈청01(RN01), 표준음성혈청02 (RN02)

② 결과

㉞ 검체 반응시간은 30분으로 사용하였을 때 조건선정 기준에 부합하여 본 제제의 검체 반응 시간은 30분으로 설정 하였다.

검 체	검체반응시간 (분)			
	15	30	60	90
표준양성혈청01	1.242	2.6340	3.335	3.521
표준양성혈청02	0.905	1.4440	1.749	1.908
표준음성혈청01	0.054	0.0920	0.121	0.155
표준음성혈청02	0.04	0.0710	0.092	0.111
양성혈청 평균	1.0735	2.0390	2.5420	2.7145
음성혈청 평균	0.0470	0.0815	0.1065	0.1330
P/N Value	22.84	25.02	23.87	20.41

(라) Conjugate(접합체) 농도 설정

① 시험방법 및 조건선정 기준

- ㉠ 표준양성혈청의 각각의 흡광도 값이 0.1을 넘지 않고, 표준양성혈청과 표준음성혈청의 흡광도 차이(P/N value)가 가장 큰 조건을 선정하였다.

검체 반응	100배 희석검체 100 μ l/well로 각 well에 첨가, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분 반응
세척	5회, 350 μ l/well
접합체액 반응	접합체액(0.13 μ g/ml) 접합체액(0.25 μ g/ml) 접합체액(0.5 μ g/ml) 접합체액(1.0 μ g/ml) 100 μ l/well로 각 well에 첨가, 실온(15~25 $^{\circ}$ C)에서 30분 반응
세척	5회, 350 μ l/well
기질액 반응	TMB 기질액 100 μ l/well첨가, 실온(15~25 $^{\circ}$ C)에서 15분후 반응 정지
측정 파장 (450nm, 620nm Ref.)	
양성 혈청	표준양성혈청01(RP01), 표준양성혈청02 (RP02)
음성 혈청	표준음성혈청01(RN01), 표준음성혈청02 (RN02)

② 결과

- ㉠ 접합체 농도를 0.5 μ g/ml로 사용하였을 때 조건선정 기준에 부합하여 본 제제의 접합체액의 농도는 0.5 μ g/ml로 설정 하였다.

	접합체 농도(μ g/ml)			
검 체	0.13	0.25	0.5	1
표준양성혈청01	0.844	1.512	2.6340	3.1000
표준양성혈청02	0.61	0.951	1.4440	1.851
표준음성혈청01	0.055	0.072	0.0920	0.157
표준음성혈청02	0.034	0.051	0.0710	0.092
양성혈청 평균	0.7270	1.2315	2.0390	2.4755
음성혈청 평균	0.0445	0.0615	0.0815	0.1245
P/N Value	16.34	20.02	25.02	19.88

(마) 시험단계 및 단계별 시험 최종 조건

① 상기의 시험결과로 용법 용량을 다음과 같이 설정하여 키트를 제작하였다.

단 계		최 종 조 건
1	항원 coating	Rec.Antigen을 2ug/mL로 코팅 하여 37 °C 에서 1시간 동안 coating하는 것이 최적의 상태임
2	검체 반응	검체를 검체희석액으로 100배 희석하여 각 well에 100μl씩 분주 한 후 실온(15~25°C)에서 30분 반응 시킨다.
3	세척	5회, 350μl/well (특별한 시험은 하지 않음)
4	접합체액 반응	최종 농도가 0.5μg/ml인 접합체액을 각 well에 100μl씩 분주 한 후 실온(15~25°C)에서 30분 반응 시킨다.
5	기질액 반응	TMB 기질액을 100μl씩 각 well에 분주하고 실온(15~25°C)에서 15분간 반응 시킨다. (특별한 시험은 하지 않음)
6	반응정지	0.1N 황산을 100μl/well 씩 기질액이 반응 한 well에 분주한다. (특별한 시험은 하지 않음)
7	측정과장	620nm를 reference로 하여 450nm에서 측정(이중 파장 측정이 어려운 경우 450nm 단일 파장에서 측정한다.)

라. NA1-DIVA ELISA 키트의 실험실 내의 효능 시험

(1) NA1-DIVA ELISA 키트의 효능 시험

(가) 음, 양성 검체 변별력 효능 시험

① 본 제제는 해당 과제의 시작 시기에 국내에서 H5N1의 발병만 확인되었기 때문에, NA2 와 NA3를 타겟으로 한 백신 개발에의 적용을 위한 DIVA 키트로, NA1을 이용한 DIVA 키 트를 개발하여, 자연감염을 구별하고자 하였다. 따라서, 본 제제의 적용 시 AIV Ab에 대 한 검사가 동반 적용되어야 하며, 도출되는 결과에 따라 다음의 5가지 Case로 구분되어 해석될 수 있다.

	백신	검사 판정 결과		생성된 항체의 종류
		AIV Ab ELISA	NA1-DIVA ELISA	
Case 1	접종	양성	양성	야외감염 및 백신에 의한 항체
Case 2	접종	양성	음성	백신에 의한 항체
Case 3	비접종	양성	양성	야외감염에 의한 항체
Case 4	비접종	양성	음성	H5N1을 제외한 다른 형의 야외감염
Case 5	비접종	음성	음성	음성검체

② 음성검체에 대한 특이도 평가 시험 (Case 5에 해당)

㉠ 30종의 SPF 닭혈청을 AIV Ab ELISA 키트로 음성임을 확인하고, 본 제제에 적용하여 다 음과 같은 결과를 확인하였다.

㉔ SMART 백신 접종 혈청에 대한 적용을 통한 판정기준값 설정이 되지 않았기 때문에, 앞선 조건 설정에 사용된 표준음성혈청과 표준양성혈청을 대조군으로 하여, 검사의 재현성을 확인하였다. 표준양성혈청에 대해 앞선 결과와 동일한 흡광도를 가지면서, 30종의 SPF 닭혈청에 대해 본 제제는 모두 표준음성혈청의 흡광도와 유사하거나 그 이하의 흡광도를 확인하여, 음성검체에 대해 음성으로 인식함을 확인할 수 있다.

개체구분	AIV Ab ELISA			NAI-DIVA ELISA
	OD	PI value	판정	OD
표준음성혈청 01	2.4240	8.6	-	0.081
표준음성혈청 02	2.5810	1.1	-	0.059
표준양성혈청 01	0.0160	99.4	+	2.655
표준양성혈청 02	0.3150	87.9	+	1.521
1-1	2.576	1.3	-	0.046
1-2	2.898	-11.0	-	0.045
1-3	2.576	1.3	-	0.043
1-4	1.932	26.0	-	0.041
1-5	3.864	-48.0	-	0.052
1-6	1.932	26.0	-	0.046
1-7	2.576	1.3	-	0.044
1-9	1.932	26.0	-	0.045
2-1	3.542	-35.7	-	0.049
2-3	3.864	-48.0	-	0.045
2-4	2.576	1.3	-	0.046
2-5	3.22	-23.4	-	0.043
2-7	2.576	1.3	-	0.047
2-9	2.576	1.3	-	0.045
3-1	2.898	-11.0	-	0.043
3-3	2.576	1.3	-	0.046
3-4	2.898	-11.0	-	0.048
3-7	2.254	13.6	-	0.042
3-8	3.864	-48.0	-	0.05
3-9	2.576	1.3	-	0.045
4-1	3.542	-35.7	-	0.052
4-2	2.576	1.3	-	0.045
4-3	2.898	-11.0	-	0.044
4-4	1.932	26.0	-	0.045
4-5	3.542	-35.7	-	0.044
4-6	2.898	-11.0	-	0.044
4-7	3.542	-35.7	-	0.043
4-8	5.152	-97.4	-	0.048
4-9	2.254	13.6	-	0.044
5-1	2.898	-11.0	-	0.049

③ H5N1 공격접종(야외감염혈청)에 대한 민감도 평가 시험 (Case 3에 해당)

㉞ SPF 닭에 H5N1바이러스를 공격접종하여 8주 후 채혈한 양성혈청 23종에 대해 AIV Ab ELISA 키트로 검사하여, 양성임을 확인하고, 본 제제에 적용하였다. 아래의 결과와 같이, 본 제제에서 해당 양성검체에 대하여 반응성이 있음을 확인하였다.

개체구분	AIV Ab ELISA			NA1-DIVA ELISA
	OD	PI value	판정	OD
표준음성혈청 01	2.4240	8.6	-	0.081
표준음성혈청 02	2.5810	1.1	-	0.059
표준양성혈청 01	0.0160	99.4	+	2.655
표준양성혈청 02	0.3150	87.9	+	1.521
1	0.0250	99.03	+	0.6230
2	0.0660	97.45	+	0.5800
3	0.0200	99.23	+	1.5220
4	0.4170	83.86	+	1.2340
5	0.2550	90.13	+	0.9520
6	0.0340	98.68	+	0.8354
7	0.1100	95.74	+	0.7750
8	0.6120	76.32	+	0.4990
9	0.2110	91.83	+	1.1200
10	0.1350	94.78	+	0.8860
11	0.0850	96.71	+	0.9820
12	0.3320	87.15	+	0.7600
13	0.2500	90.33	+	0.8990
14	0.0350	98.65	+	0.7600
15	0.0420	98.37	+	1.8720
16	0.4210	83.71	+	1.2810
17	0.6510	74.81	+	0.6900
18	0.0320	98.76	+	0.7020
19	0.0600	97.68	+	0.5880
20	0.0410	98.41	+	0.5600
21	0.0150	99.42	+	1.4600
22	0.0310	98.80	+	1.7110
23	0.0130	99.50	+	0.7260

④ H5N2, H5N3 공격접종(야외감염) 혈청의 적용 평가 (Case 4에 해당)

㉞ H5N2와 H5N3형 바이러스를 각각 공격접종하여 획득한 혈청을 AIV Ab ELISA 및 본 제제에 적용하였다. 앞서 언급된 것과 같이 본 제제는 NA1을 타겟으로 하여 개발된 키트이기 때문에, 이론적으로 H5N1이외의 야외감염에 대해 양성으로 검출할 수 없고, 실제 적용 결과에서도 다음과 같은 결과가 확인되었다.

	개체구분	AIV Ab ELISA			NA1-DIVA ELISA
		OD	PI value	판정	OD
대조군	표준음성혈청 01	2.4240	8.6	-	0.081
	표준음성혈청 02	2.5810	1.1	-	0.059
	표준양성혈청 01	0.0160	99.4	+	2.655
	표준양성혈청 02	0.3150	87.9	+	1.521
H9N2 공격접종혈청	9/5	0.0440	98.3	+	0.0540
	9/12	0.0290	98.9	+	0.0360
	9/19	0.0160	99.4	+	0.0920
	9/26	0.0310	98.8	+	0.0710
	10/03	0.0210	99.2	+	0.0810
	10/10	0.0100	99.6	+	0.0860
	10/17	0.0360	98.6	+	0.0750
	10/24	0.0160	99.4	+	0.0850
	10/31	0.3150	87.9	+	0.0350
	11/07	0.3620	86.1	+	0.0950
H5N3 공격접종혈청	28DPI	0.9860	62.2	+	0.0510
	21DPI	1.1170	57.2	+	0.0770

⑤ 백신접종 후 야외감염 혈청 및 백신접종 음성혈청에 대한 평가 (Case 1, 2에 해당)

㉓ 올 해 국내 대규모 H5N8의 발병으로 인하여, 해당 백신의 닭에 대한 적용 시험이 진행되지 못하여, 해당 항혈청이 확보되지 못한 상황이다.

㉔ 이에 Case 1과 Case 2에 해당하는 검체의 본 제제 적용 평가는 수행되지 못하였다.

㉕ 추후 본 과제의 개발 백신의 닭 적용 시험이 수행되어, 획득되는 혈청에 의한 적용평가가 진행 될 계획이다.

2. NP-DIVA ELISA 키트 개발

가. 항원 원료의 개발 (서울대학교 수행부분)

(1) 재조합 백신 개발에 사용할 PR8바이러스의 NP와 국내 발생 H5N1바이러스의 NP 단백질의 linear epitope를 분석하여 공통된 에피토프로 두 NP 간에 아미노산 차이가 비교적 많은 부위를 선발하였다. 이에 PR8 바이러스의 펩티드와, H5N1바이러스의 펩티드를 총 6종 (3pair)제작하였고, ELISA 키트 개발 시 플레이트의 코팅 시 코팅 효과를 위하여, 펩타이드에 6-aminohezanoic acid (이하 Ahx)를 접합하였다. 제작된 펩티드의 sequence는 다음과 같으며, 합성은 펩트론(Peptron)에 의뢰하여 수행하였다.

rH5N1(PR8바이러스) 펩타이드	Field H5N1 펩타이드
Ahx-IKGTKVLPRGKL (이하 PR8NP-2)	Ahx-IRGARVVPRGQL (이하 9FVNP-2)
Ahx-IASNENMETMES(이하 PRNP-3)	Ahx-IASNENTEAMDS (이하 FVNP-3)
Ahx-SDEKAASPIVPS (이하 PRNP-4)	Ahx-SDEKATNPIVPS (이하 9FVNP-4)

나. NP-DIVA ELISA 키트의 제작

- (1) 플레이트의 종류와 재조합항원의 코팅농도 및 용액들의 반응 온도 및 반응시간이 최적화 실험을 위해 아래와 같이 채택되었다.
- (2) 플레이트에 합성 펩타이드를 각각 2 μg/mL로 코팅시킨 후, 검사하고자 하는 혈청(검체)을 희석액으로 1/100배로 희석하여 well에 100 μL씩 주입하여 37°C에서 1시간동안 반응시킨다. well 안의 용액을 모두 제거한 후 세척액으로 세척과정을 거쳐 well에 흡착된 항원과 반응하지 않은 희석된 혈청의 잔여를 제거한다. Horseradish-peroxidase가 접합된 이차항체인 goat anti-Chicken IgY-HRP conjugate를 0.5 μg/mL의 농도로 100 μL씩 주입하고 37°C에서 1시간동안 반응시킨다. 앞의 세척과정을 반복하여 well 표면의 반응하지 않고 남아있는 goat anti-Chicken IgY-HRP conjugate를 제거시킨다. 기질액(substrate; TMB)를 주입하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 2M의 황산용액을 주입하여 효소반응을 정지한다.

다. NP-DIVA ELISA 키트의 평가

- (1) 본 제제에 H9N2 바이러스를 공격접종 한 닭혈청과 PR8유래의 재조합바이러스를 접종한 닭혈청을 희석하여 반응시켜 적용하여 평가하였다. 평가 방법은 위에서 기술한 방법에 따라 ELISA 검사를 수행하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

검체		코팅 펩티드					
		PR8NP- 2	9FVNP- 2	PR8NP- 3	9FVNP- 3	PR8NP- 4	9FVNP- 4
H9N2 바이러스 고도면역 닭혈청	0028 3차 7/10	0.280	0.650	0.253	0.298	0.196	0.182
	01310 3차 7/10	0.624	0.852	0.459	0.201	0.421	0.216
	8011-1 3차 7/10	0.395	0.713	1.129	0.300	0.215	0.233
재조합 바이러스 면역 닭혈 청	rg310E20HA(T156 Q) 25dpi	0.151	0.142	0.166	0.078	0.121	0.045

- (2) 본 과제의 성공 시에는 야외감염 혈청에서 PR8NP펩티드 코팅 플레이트에서는 양성이며, FVNP펩티드 코팅 플레이트에서도 양성 판정이며, 백신감염혈청(위 결과의 재조합바이러스 면역 닭혈청)에서 PR8NP펩티드 코팅 플레이트에서는 양성, FVNP펩티드 코팅 플레이트에서는 음성판정의 결과를 보여야 한다.
- (3) 하지만, 본 실험의 결과에서는 재조합 바이러스 면역 닭혈청에서 두 펩티드간의 변별력을 크게 확인하기는 어려웠다. 다만, 야외감염 혈청과 재조합 바이러스 면역 혈청에서 차이를 보인다는 것은 에피통 부위의 설정이 올바르게 되었음을 확인할 수 있는 결과이다.

(4) 이에 PR8 펩티드에 추가적인 돌연변이를 만들어 아래와 같이 차이가 나도록 추가 실험을 수행하였다.

mPR8	6	IYKKVNSRWMKE	107
mPR8	347	IKSTKLLPKSKL	358
mPR8	365	ITTNDNMDTTES	376
mPR8	467	SEDRTASPLMPS	478

(5) 그러나, 해당 변이를 주었음에도, 펩타이드별로 야외감염 혈청과 재조합 바이러스 면역혈청 간의 변별력을 보이는 조건은 확인되지 않았다.

(6) 해당 과제 부분에 있어서의 연구 성과는, 설정한 타겟 부위가 야외감염 혈청과 재조합 바이러스 면역 혈청 간의 차이가 확인될 가능성이 있는 에피토프 부위임을 찾았음에 의의를 둘 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절. 연구개발목표의 달성도

[세부과제: AI-DIVA 시스템 용 백신 개발]

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
○ rH5N2 재조합 바이러스 제작	- HA5/NA2 유전자 클로닝 - HA5/NA2 mutagenesis (약독화/증식성) - 역 유전학 기술 이용한 재조합 바이러스 제작	100
○ rH5N2 재조합 바이러스 평가	- 재조합 바이러스 증식성 평가 ($10^{9-9.5}$ EID ₅₀ /ml 도달)	100
○ rH5N1 재조합 바이러스 제작	- NA1 유전자 클로닝 - NA1 mutagenesis (증식성) - 역 유전학 기술 이용한 재조합 바이러스 제작	100
○ rH5N1 재조합 바이러스 평가	- 재조합 바이러스 증식성 평가 - 재조합 바이러스 병원성 평가 - 면역원성/항원성/교차방어능력 평가 - DIVA 평가	70
○ rH5N3 재조합 바이러스 제작	- NA3 mutagenesis (증식성) - 역 유전학 기술 이용한 재조합 바이러스 제작	100
○ rH5N3 재조합 바이러스 평가	- 재조합 바이러스 증식성 평가 ($10^{9-9.5}$ EID ₅₀ /ml 도달) - 재조합 바이러스 병원성 (계태아, BALB/c) 평가 - 면역원성/항원성/교차방어능력 평가 - DIVA 평가	70

[협동과제:]

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
NA1-DIVA ELISA 키트 개발	- 진단키트의 개발 및 제제 완료 - 음성 시료 및 야외감염 시료의 적용 및 평가 완료 - 백신 접종 시료에의 평가 계획 중 (본 과제의 백신 접종 시험이 수행되지 못하여, 대기 중에 있으므로, 추후에 수행 계획임)	75
NP-DIVA ELISA 키트 개발	- ELISA 제제 완료 - 시료의 평가 진행 : 야외감염 혈청과 재조합 바이러스 면역 혈청의 변별력 확인 안됨.	100

제2절. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

[세부과제: AI-DIVA 시스템 용 백신 개발]

평가의 착안점	자 체 평 가
○ rH5N2 재조합 바이러스 제작 및 평가	- 계획한대로 고증식성, 포유류 무병원성, 교차방어 가능 rH5N2 바이러스 제작 및 평가가 성공적으로 완료되었으나 고병원성 H5N1 바이러스에 대한 방어 효능 시험은 부득이한 사정으로 지체되었지만 조속히 실시할 계획임.
○ rH5N1 재조합 바이러스 제작 및 평가	- 계획한 rH5N1 바이러스 제작 및 평가가 완료 되었으며 기존 PR8 backbone을 갖는 바이러스 대비 10배 이상의 증식성 향상을 확인함.
○ rH5N3 재조합 바이러스 제작 및 평가	- 계획한 rH5N3 바이러스 제작 및 대부분의 평가가 완료 되었으나 증식성이 기대에 미치지 못함.

[협동과제: AI-DIVA 시스템 용 진단 키트 개발]

평가의 착안점	자 체 평 가
AIV-DIVA 프로그램 적용 방역 시스템 개발	- NA1-DIVA ELISA 제작하여, 비백신 야외감염혈청 및 음성혈청에 대한 시험을 완료함. 백신접종 혈청에 대한 평가 시험은 혈청 확보 후 수행 예정임. - NP-DIVA ELISA 제작하여, 야외감염혈청 및 재조합바이러스 면역혈청에 대한 평가시험 수행하였으나, 펩타이드간 변별력을 확인하지 못함. 단, 해당 타겟 부위가 야외감염과 백신접종을 구분할 수 있는 중요한 에피토프 부위가 될 수 있는 가능성을 확인함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 발육란 고증식성, 포유류 무병원성, 교차방어 가능 백신제작 기술

가. 발육란 고증식성, 포유류 무병원성 01310 PB2 유전자

- 동물 및 인체용 백신 제작에 공통적으로 활용될 수 있도록 다양한 백신주 제작하여 기존 기술 대비 차별성을 홍보하여 기술 이전 추진
- 동물백신제조사(녹십자수의약품, 고려비엔피, 코미팜, 중앙백신, 대성미생물)와 인체백신제조사(녹십자, 일양약품)에 기술 홍보

나. 교차방어 가능 HA5 제작 기술: 154N-glycan 제거 기술

- 동물 및 인체용 백신 제작에 공통적으로 활용될 수 있도록 다양한 백신주 제작하여 기존 기술 대비 차별성을 홍보하여 기술 이전 추진
- 동물백신제조사(녹십자수의약품, 고려비엔피, 코미팜, 중앙백신, 대성미생물)와 인체백신제조사(녹십자, 일양약품)에 기술 홍보

다. Stalk에 N-glycan 결손된 01310 NA(HA2-common epitope immunogenicity 향상)

- 동물 및 인체용 백신 제작에 공통적으로 활용될 수 있도록 다양한 백신주 제작하여 기존 기술 대비 차별성을 홍보하여 기술 이전 추진
- 01310 NA stalk 부분과 다양한 subtype의 NA를 연결하는 기술을 개발하여 다양한 subtype 바이러스 백신 개발에 활용

2. 발육란 고증식성, 포유류 무병원성, 교차방어 가능 H5N2-CP-PB2(01310) 백신주

- 국내 DIVA 백신으로 활용
- 중국, 인도네시아, 베트남, 한국 등 동아시아 지역에서 유행하는 clade 2.3.2.1 H5N1 바이러스 예방용 백신주로 시장 진입(국내 기업 또는 다국적 기업에 실시권 이전 고려)
- 현재 H5N2-CP의 M 유전자는 PR8 유래로 최근 공통항원으로 알려진 M2e의 에피토프 구조가 우리나라에서 유행하는 H5 바이러스와 차이를 보이고 있으므로 추가적인 돌연변이를 갖는 재조합 바이러스를 제작하여 교차방어 효능을 평가하여 특허출원 및 상업화

3. NA1-DIVA ELISA 키트

- 국내 백신 타당성 조사 결과 백신 접종이 결정되는 경우 진단용 키트로 상업화
- 해외 수출 추진

4. 발육란 고증식성, 포유류 무병원성 H5N1 백신주/진단항원

- 완벽한 방어를 위해서는 NA도 중요하므로 DIVA보다 방어 효능에 의해 백신주를 선정하는 경우 백신주로 활용
- 교차방어 능력이 증명되는 경우 중국, 인도네시아, 베트남, 한국 등 동아시아 지역에서 유행

행하는 clade 2.3.2.1 H5N1 바이러스 예방용 백신주로 시장 진입(국내 기업 또는 다국적 기업에 실시권 이전 고려)

5. 포유류 무병원성, 교차방어 가능 H5N3 백신주

- 향후 추가적인 연구를 통해 증식성 개선이 이루어지는 경우 DIVA 백신 후보주로 stock-piling

6. 인플루엔자 바이러스 NP 에피통

- 마우스 및 닭의 항혈청이 인식하는 NP 에피통 대신 AIV protective antigen의 다른 에피통을 삽입하여 감별 시도

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

중국은 PR8 바이러스의 6개 내부 유전자(internal gene: PB2, PB1, PA, NP, M, NS)와 유행하는 바이러스로부터 약독화시킨 HA (cleavage site의 RRRKKR-을 RETR-로 치환하여 약독화한 HA)와 NA 유전자를 갖는 재조합 바이러스를 역 유전학(reverse genetics) 기술로 제작하여 사독백신을 사용하고 있다. HA5와 NA1 공여 바이러스들의 발육란 증식성이 낮았으나, 재조합 바이러스들의 증식성은 상당히 개선된 것으로 알려져 있다. 이들 사독백신을 접종하는 경우 오랜 기간 혈구응집억제 항체가 지속되며 오리나 거위에 대한 효과도 좋은 것으로 알려져 있다. 생독백신으로는 재조합 계두 벡터 백신과 뉴캐슬병 바이러스 벡터 백신이 개발되었으나 상기의 PR8 재조합 바이러스를 이용한 사독백신들이 지속적으로 많이 사용되고 있다. 대부분의 국가에서 백신주와 야외 바이러스의 NA 아형에 따라 적합한 조합을 선정하여 DIVA 시스템을 구축하고 있기 때문에 DIVA 진단 키트의 경우 주로 NA 단백질에 집중되어 있다.

제 7 장 연구시설·장비 현황 (해당사항 없음)

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 참고문헌

- Basler, C.F., Reid, A.H., Dybing, J.K., Janczewski, T.A., Fanning, T.G., Zheng, H., Salvatore, M., Perdue, M.L., Swayne, D.E., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Taubenberger, J.K., 2001. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2746-2751.
- Choi, J.G., Lee, Y.J., Kim, Y.J., Lee, E.K., Jeong, O.M., Sung, H.W., Kim, J.H., Kwon, J.H., 2008. An inactivated vaccine to control the current H9N2 low pathogenic avian influenza in Korea. *Journal of Veterinary Science* 9, 67-74.
- Fan, S., Macken, C.A., Li, C., Ozawa, M., Goto, H., Iswahyudi, N.F., Nidom, C.A., Chen, H., Neumann, G., Kawaoka, Y., 2013. Synergistic Effect of the PDZ and p85beta-Binding Domains of the NS1 Protein on Virulence of an Avian H5N1 Influenza A Virus. *J. Virol.* 87, 4861-4871.
- Graef, K.M., Vreede, F.T., Lau, Y.F., McCall, A.W., Carr, S.M., Subbarao, K., Fodor, E., 2010. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *Journal of Virology* 84, 8433-8445.
- Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R.W., Ortin, J., Hart, D.J., Cusack, S., 2008. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 500-506.
- Hale, B.G., Steel, J., Manicassamy, B., Medina, R.A., Ye, J., Hickman, D., Lowen, A.C., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A., 2010a. Mutations in the NS1 C-terminal tail do not enhance replication or virulence of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 91, 1737-1742.
- Hale, B.G., Steel, J., Medina, R.A., Manicassamy, B., Ye, J., Hickman, D., Hai, R., Schmolke, M., Lowen, A.C., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A., 2010b. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 84, 6909-6922.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology* 11, 714-719.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y., 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293, 1840-1842.

- Hoffmann, E., Krauss, S., Perez, D., Webby, R., Webster, R.G., 2002. Eight plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 20, 3165-3170.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology* 146, 2275-2289.
- Jackson, D., Hossain, M.J., Hickman, D., Perez, D.R., Lamb, R.A., 2008. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4381-4386.
- Jones, I.M., Reay, P.A., Philpott, K.L., 1986. Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *The EMBO Journal* 5, 2371-2376.
- Kim, B.S., Kang, H.M., Choi, J.G., Kim, M.C., Kim, H.R., Paek, M.R., Kwon, J.H., Lee, Y.J., 2011. Characterization of the low-pathogenic H5N1 avian influenza virus in South Korea. *Poult. Sci.* 90, 1449-1461.
- Kim, I.H., 2013. Characterization of Recombinants with Low Pathogenic and Highly Productive Gene Segments of Avian Influenza Viruses. Seoul National University, Seoul (PhD Thesis).
- Kim, I.H., Kwon, H.J., Choi, J.G., Kang, H.M., Lee, Y.J., Kim, J.H., 2013a. Characterization of mutations associated with the adaptation of a low-pathogenic H5N1 avian influenza virus to chicken embryos. *Veterinary Microbiology* 162, 471-478.
- Kim, I.H., Kwon, H.J., Kim, J.H., 2013b. H9N2 avian influenza virus-induced conjunctivitis model for vaccine efficacy testing. *Avian Diseases* 57, 83-87.
- Kim, I.H., Choi, J.G., Lee, Y.J., Kwon, H.J., Kim, J.H., 2014. Effects of different polymerases of avian influenza viruses on the growth and pathogenicity of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)-derived reassorted viruses. *Veterinary microbiology* 168, 41-49.
- Kim, I.H., Kwon, H.J., Lee, S.H., Kim, D.Y., Kim, J.H., 2015. Effects of different NS genes of avian influenza viruses and amino acid changes on pathogenicity of recombinant A/Puerto Rico/8/34 viruses. *Veterinary microbiology* 175, 17-25
- Kwon, H.J., Cho, S.H., Ahn, Y.J., Kim, J.H., Yoo, H.S., Kim, S.J., 2009. Characterization of a chicken embryo-adapted H9N2 subtype avian influenza virus. *The Open Veterinary Science Journal* 3, 9-16.

Lee, H.J., Kwon, J.S., Lee, D.H., Lee, Y.N., Youn, H.N., Lee, Y.J., Kim, M.C., Jeong, O.M., Kang, H.M., Kwon, J.H., Lee, J.B., Park, S.Y., Choi, I.S., Song, C.S., 2010. Continuing evolution and interspecies transmission of influenza viruses in live bird markets in Korea. *Avian Diseases* 54, 738-748.

Liu, H., Golebiewski, L., Dow, E.C., Krug, R.M., Javier, R.T., Rice, A.P., 2010. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J. Virol.* 84, 11164-11174.

Liu, M., Wood, J.M., Ellis, T., Krauss, S., Seiler, P., Johnson, C., Hoffmann, E., Humberd, J., Hulse, D., Zhang, Y., Webster, R.G., Perez, D.R., 2003. Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology* 314, 580-590.

Ma, W., Brenner, D., Wang, Z., Dauber, B., Ehrhardt, C., Hogner, K., Herold, S., Ludwig, S., Wolff, T., Yu, K., Richt, J.A., Planz, O., Pleschka, S., 2010. The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. *J. Virol.* 84, 2122-2133.

Maines, T.R., Jayaraman, A., Belser, J.A., Wadford, D.A., Pappas, C., Zeng, H., Gustin, K.M., Pearce, M.B., Viswanathan, K., Shriver, Z.H., Raman, R., Cox, N.J., Sasisekharan, R., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2009. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 325, 484-487.

Maines, T.R., Lu, X.H., Erb, S.M., Edwards, L., Guarner, J., Greer, P.W., Nguyen, D.C., Szretter, K.J., Chen, L.M., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Nguyen, D.T., Nguyen, T., Nguyen, H.H., Kim, J.H., Hoang, L.T., Kang, C., Phuong, L.S., Lim, W., Zaki, S., Donis, R.O., Cox, N.J., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2005. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *Journal of Virology* 79, 11788-11800.

Matsuoka, Y., Lamirande, E.W., Subbarao, K., 2009. The mouse model for influenza. *Curr. Protoc. Microbiol.*, Chapter 15, Unit 15G 13.

Obenauer, J.C., Denson, J., Mehta, P.K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D.B., Xu, X., Wang, J., Ma, J., Fan, Y., Rakestraw, K.M., Webster, R.G., Hoffmann, E., Krauss, S., Zheng, J., Zhang, Z., Naeve, C.W., 2006. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311, 1576-1580.

Park, K.J., Kwon, H.I., Song, M.S., Pascua, P.N., Baek, Y.H., Lee, J.H., Jang, H.L., Lim, J.Y., Mo, I.P., Moon, H.J., Kim, C.J., Choi, Y.K., 2011. Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programmes. *The Journal of General Virology* 92, 36-50.

Subbarao, K., Chen, H., Swayne, D., Mingay, L., Fodor, E., Brownlee, G., Xu, X., Lu, X., Katz, J., Cox, N., Matsuoka, Y., 2003. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology* 305, 192-200.

Twu, K.Y., Kuo, R.L., Marklund, J., Krug, R.M., 2007. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J. Virol.* 81, 8112-8121.

Yuen, K.Y., Wong, S.S., 2005. Human infection by avian influenza A H5N1. *Hong Kong Med. J.* 11, 189-199.

Zhang, Z., Hu, S., Li, Z., Wang, X., Liu, M., Guo, Z., Li, S., Xiao, Y., Bi, D., Jin, H., 2011. Multiple amino acid substitutions involved in enhanced pathogenicity of LPAI H9N2 in mice. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1790-1797.

Zielecki, F., Semmler, I., Kalthoff, D., Voss, D., Mael, S., Gruber, A.D., Beer, M., Wolff, T., 2010. Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. *J. Virol.* 84, 10708-10718.

본문 작성 요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.