

발간등록번호

11-1543000-001479-01

가축질병대응사업 R&D Report

고효율 미생물 발현시스템을 이용한 가축점막면역백신의 개발 최종보고서

2016. 12. 14.

주관연구기관 / 서울대학교
세부연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 축산검역본부
(주)우진비앤지

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고효율 미생물 발현시스템을 이용한 효과적인 가축점막면역백신의 개발”(개발기간 : 2013. 8. 26~ 2016. 8. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 1.

주관연구기관명 : 서울대학교

세부연구기관명 : 서울대학교 그린바이오과학기술원

협동연구기관명 : 농림축산검역본부

(주) 우진 B&G

주관연구책임자 : 최윤재 교수

세부연구책임자 : 강상기 교수

협동연구책임자 : 안동준 연구관

강석진 회장

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

요약문

가. 제목

고효율 미생물 발현시스템을 이용한 효과적인 가축점막면역백신의 개발

나. 연구의 목적 및 내용

본 연구의 최종목표는 효율적인 M 세포 표적형 단백질 항원 생산 시스템과 이를 이용한 효과적인 경구 및 호흡기 전달 점막면역 백신의 개발으로서 현재 전국적으로 유행중인 PED와 FMD 바이러스를 예방하기 위한 점막면역백신을 개발하는 것이다. 세부 연구 목표로는 1) 경구 및 호흡기 전달방식의 점막면역백신 생산 시스템의 개발, 2) M 세포 표적기술을 활용하여 효과적인 점막면역 백신 구현, 3) cytokine을 면역보강제로 활용하는 새로운 전략 수립, 4) 고효율 유산균 및 대장균 발현 벡터 시스템 구축, 5) 효과적인 PED (porcine epidemic diarrhea: 돼지 유행성 설사) 및 FMD (foot-and-mouth disease: 구제역)백신 개발 체계 확립이다.

본 과제는 2개의 세부과제와 2개의 협동과제로 이루어져 있다. 제1세부과제 (서울대학교 농생명공학부)에서는 점막면역백신의 핵심자원인 M 세포 표적형 항원 및 면역보강 단백질 개발 및 생산을, 제2세부과제 (서울대학교 그린바이오과학기술연구원)에서는 점막면역백신의 체내 전달 효율 증진을 위한 가축 백신 담지 고분자 전달체 개발 및 생산을, 제1협동과제 (농림축산검역본부)에서는 병원체 공격접종을 통한 표적형 점막면역 백신 효과 실증 연구를, 마지막으로 제2협동과제 (우진비엔지)에서는 표적형 점막면역 백신 산업적 대량생산체계 확립 및 산업화 추진을 목표로 하였다. 각 연구개발 수행기관은 유기적 역할분담 및 협력 체계를 구축하여 과제를 통해 발생한 연구 성과가 산업화로 이어지도록 구성되었다.

각 세부협동과제별 연구내용은 다음과 같다. 제1세부과제에서는 M 세포 표적형 단백질 항원 및 면역보강제를 유산균과 대장균 발현시스템을 개발하고 이에 따른 PED와 FMD 바이러스 유래의 항원의 생산체계를 개발하는 것이다. 또한 cytokine 면역보강 단백질을 유산균에서 생산하여 그 특성을 규명하였다. 제2세부과제는 경구용 백신 담지 고분자 전달체를 개발하고 특성을 규명하며, 호흡기 전달용 백신담지 고분자 전달체를 개발하였다. 제1협동과제는 제1,2세부에서 개발된 자원을 활용하여 목적동물 대상 실증 시험을 진행하고 이 자원의 백신 인증 및 허가를 추진하였다. 제2협동과제는 제1,2세부에서 개발된 자원의 대량생산 및 고농도 배양 체계를 확립하고 백신의 산업화를 추진하였다.

다. 연구개발성과

본 과제의 연구를 통해 특허출원 7건 (목표 3건), SCI급 논문 13편 (목표 9건), 비SCI급 논문 1편, 학술발표실적 20건과 언론홍보 3건, 인력양성 10명으로 기존 목표에 비교하여 우수한 성과를 보였다.

제1세부과제에서는 목적 병원체인 PED와 FMD 바이러스에 대한 아단위 항원 생산을 완료하였다. PED바이러스의 주요 당단백질인 spike protein의 일부분인 SID와 COE 부분을 수용성단

백질과 inclusion body의 재수용화 방법을 통해서 생산해냈다. FMD 바이러스는 multi-epitope 라는 독창적인 기술을 통해 수용성 단백질을 개발하였다. 또한 cytokine 면역보강제를 개발하였다. RANKL은 유산균과 대장균에서 모두 생산이 가능하며 특히, RANKL 생산 유산균은 그 자체로 면역보강제로 같이 사용 가능한 결과를 보였다. 그리고 IL-2 생산 유산균을 개발하였다. 그 외에도 고효율 유산균 발현 벡터시스템을 개발하고 대장균 고농도 배양을 위한 최적화 기술 및 배양 배지를 개발하였다.

제2세부과제에서는 경구용 백신 담지체로 HPMCP와 CAP에 cysteine 아미노산을 이용하여 thiol 기를 도입하였다. Thiol기는 점막의 황이온과 이황화결합을 통해 점막에 결합하여 점막에서 백신담지체의 유지시간을 증가시켜주는 결과를 보였다. 이렇게 개발된 T-HPMCP와 T-CAP는 점막면역백신 보조제로 그 활용성을 입증하였다. 또한 비강용 백신 담지체로 T-HPMCP와 T-Eudragit에 mannan을 수식하여 점막점착성과 면역보강효과를 모두 증가시킨 결과를 도출하였다. mannan은 면역세포를 직접 활성화 시키는 면역보강기능효과를 보였다.

제1협동과제에서는 1,2세부에서 개발된 자원에 대해 목적동물에 실증실험을 하였고 그 결과 PED 백신은 GST-S1D 항원을 HPMCP에 담지하여 RANKL 생산 유산균과 조합하였을 때 공격접종에서 자돈의 생존률을 향상시켰으며, FMD 백신은 M5BT 항원과 돼지용 면역보강제인 IMS1313과 조합하여 주사하였을 때 상용백신에 준하는 중화항체 생성량을 확인하여 백신으로서 가능성을 확인하였다.

제2협동과제에서는 제1,2세부에서 개발된 자원의 대량생산을 위한 연구를 진행하였고 대장균에서 생산되는 항원의 대량생산을 위해 고농도 배양 기술 등과 최적화 작업을 진행하였다. 향후 돼지 등 대상가축에 대한 공격접종에 대한 후속데이터 축적이 완료되면 'FMD 항원단백질 생산' 특허를 기술이전 받아 'FMD 예방 경구백신' 제품과 'FMD 치료 주사백신' 제품을 개발하여 출시할 예정이다.

라. 연구개발성과의 활용계획 (기대효과)

본 과제를 통해 아단위 백신으로 활용할 PED와 FMD 표면항원 생산 관련된 기술, 아단위 백신의 면역원성 증진을 위한 cytokine 면역보강제 생산 관련 기술, 아단위 백신 및 cytokine의 점막전달 효율 증진 고분자 전달체 생산 관련 기술 그리고 아단위 백신 및 cytokine을 생산하는 경구용 백신생산 유산균 제조에 활용될 유산균 발현벡터 시스템 기술 등이 개발되었다. 본 과제를 통해 개발된 항원단백질 및 면역보강제 그리고 이를 전달할 수 있는 전달체는 다른 백신의 개발에 활용 가능할 전망이다. 특히, 본 과제에서 출원된 특허인 "FMD 아단위 백신 제조방법 및 이의 용도"를 활용하여 대상가축인 돼지 등에 활용할 수 있는 FMD 백신 상용화를 적극 검토하고 있다. 이를 통해 FMD 항원 단백질을 활용한 경구 예방 백신 및 주사 백신을 제품화하여 출시할 예정이며 이를 위해 후속데이터의 축적을 필요로 한다.

본 과제를 통해 출원된 '돼지 유행성 설사병을 유발하는 국내 야외주 (PED)바이러스 spike 당단백질 유래 아단위 백신 항원 단백질'과 '회장 표적화 점막 점착성 티올화 HPMCP 백신 단백질 전달제제' 그리고 'RANKL를 생산하는 재조합 유산균 및 이의 용도'의 특허 기술의 조합은 본 과제의 실험에서도 상용백신보다 공격접종에서 자돈의 생존률을 높이는 것으로 확인되었다. 이 결과를 통해 PED 항원의 모돈백신 상용화도 가능할 것으로 기대된다.

서울대학교와 기업의 후속연구와 농림축산검역본부의 가축백신 인허가 절차에 따라 다음과

같은 백신 제품 단계별 사업화 진행을 예정이다. 첫 단계로, PED 및 FMD 바이러스 유래 수용성 항원 단백질을 이용한 1세대 아단위 백신을 제품화하고, 두 번째 단계로, 항원단백질과 cytokine 면역보강제 조합을 통해 면역원성을 증진시킨 2세대 아단위 백신을 제품화하며, 마지막 단계로, 고분자 전달체 및 GRAS 유산균을 적용하여 경구투여시 백신 전달 효율과 면역보강 효과를 증진시킨 3세대 아단위 백신을 제품화한다.

마. 중심어 (5개 이내)

돼지유행성설사병, 구제역, 아단위백신, 경구백신, 호흡기 백신

SUMMARY

A. Title

Development of effective mucosal vaccine for domestic animals using high efficient microorganism expression system

B. Purpose & Contents

The final goal of this research study is to develop a mucosal PED and FMD vaccine by producing M cell targeting antigen proteins and constructing an oral and nasal vaccine delivery system.

The detailed research goals are: 1) Development of a mucosal vaccine through the oral and nasal route, 2) Development of an effective mucosal vaccine through M cell targeting technology, 3) Establishment of a new strategy using cytokines as vaccine adjuvants, 4) Construction of an expression vector system through high-efficient lactic acid bacteria and *E.coli*, and 5) Development of an effective PED and FMD vaccine.

This project consists of two sub-projects and two cooperative projects. (1) Sub-project 1: Development and production of the M cell targeting antigen and adjuvant protein, (2) Sub-project 2: Development and production of the vaccine-encapsulated delivery carrier to improve in vivo delivery efficiency of the mucosal vaccine, (3) Cooperative project 1: Validation of the mucosal vaccine effects through challenge experiments, and (4) Cooperative project 2: Mass production and industrialization of the mucosal vaccine. This project was organized to facilitate the industrialization of the research performance through cooperation between university and involved companies.

The followings are contents of each project. Sub-project I: Development of the lactic acid bacteria and *E.coli* expression system into producing M cell targeting FMD and PED antigens and cytokine adjuvants, Sub-project II: Development and characterization of an oral and nasal vaccine delivery carrier, Cooperative project I: Proceeding target animal experiments using resources developed in Sub-project I and Sub-project II, Cooperative project II: Mass production and industrialization of the resources developed in Sub-project I and Sub-project II.

C. Results

The quantitative R&D product outcomes in this project were three patent applications and nine SCI research papers. In this project, we applied for seven patents and published thirteen SCI-level papers and one non-SCI paper. In addition, ten graduate students were educated on the research subject and twenty presentations meetings were held.

In Project I, the Subunit antigen of PED and FMD was successfully produced. The PED

antigen was produced through expressing SID and COE, the part of spike protein of PED virus, as a soluble protein and re-solubilizing the inclusion body. The FMD antigen was produced by constructing a multi-epitope antigen. In addition, this team developed a cytokine adjuvant. RANKL can be produced in both lactic acid bacteria and *E.coli*. In particular, RANKL producing lactic acid bacteria in and of itself showed the adjuvant effect. This research team also developed an IL-2 producing lactic acid bacteria and constructed a high-efficient lactic acid bacteria expression system.

In Project II, thiolated HPMCP and CAP were developed as an oral vaccine delivery carrier. Thiol residues can increase the holding time of an encapsulated vaccine through making a disulfide bond between the sulfide ions of intestinal mucosa. Developed T-HPMCP and T-CAP showed vaccine adjuvant effects. Also, mannan decorated T-HPMCP and T-Eudragit were developed as a nasal vaccine delivery carrier. Mannan showed adjuvant features by directly activating immune cells.

In Cooperative project I, target animal experiments were performed using resources developed in Project I and Project II. As a result, the PED antigen enhanced survival rates of piglets in challenge experiments when GST-S1D antigen was encapsulated in HPMCP with RANKL producing lactic acid bacteria. The FMD antigen induced neutralizing antibody production comparable to commercial vaccines when the M5BT antigen and IMS1313 adjuvant were injected.

In Cooperative project II, mass production of developed resources were proceeded and the culture condition of PED and FMD antigen was optimized.

Commercial production for FMD preventing oral vaccine and FMD treating injection vaccine is scheduled for after completing challenge experiments against the target animal.

D. Expected contribution

The antigen protein, adjuvants and vaccine delivery carrier developed in this study will be used as a vaccine combination. In particular, the applied patent, “Production and usage of efficient FMD subunit vaccine consists of multi-epitope in *E.coli*” will be used in industrialization of a FMD vaccine. Commercial production of oral and injection vaccines using a FMD antigen is planned and follow-up data is needed.

Additionally, applied patents, “Subunit vaccine antigen originated from the spike glycoprotein of PED virus” and “Ileum targeting mucoadhesive T-HPMCP as a vaccine delivery carrier” will be used for commercialization of a PED vaccine.

Industrialization of vaccine product will be followed by a phase depending on the approval procedure of domestic animal vaccines. The first phase is to commercialize first-generation subunit vaccines using PED and FMD antigen proteins. The second phase is to commercialize second-generation subunit vaccines through the combination of antigen protein and cytokine adjuvants. The third phase is to commercialize third-generation subunit vaccines, which enhance the efficiency of vaccine delivery and adjuvant effects

using vaccine delivery carriers and GRAS lactic acid bacteria.

E. Keywords

Porcine Epidemic Diarrhea (PED), foot-and-mouth disease (FMD), subunit vaccine, oral vaccine, nasal vaccine

< CONTENTS >

1. Summary of Research	9
1) Aim of the research	9
2) Significance of the research	10
3) Range of the research	20
2. Present State of Technologies at Home and Abroad	25
1) Present state of technologies at home	25
2) Present state of technologies at abroad	28
3. Research Contents and Results	31
1) General strategy for the projects	31
2) Sub-project I	33
3) Sub-project II	62
4) Cooperative Project I	85
5) Joint research between S·P I, II and C·P I	113
6) Cooperative Project II	121
7) Joint research between S·P I and C·P II	147
8) Research Performance	158
4. Degree of Accomplishment in Research and Contribution to Related Fields	168
1) Degree of accomplishment	168
2) Degree of contribution to related fields	169
5. Achievements of Research and Further Prospects	171
6. Information of Related Technologies Abroad	173
7. Representative Research Performance of the Project	184
8. Reference	185

〈 목 차 〉

제1장 연구개발과제의개요	9
제1절 연구개발의 목표	9
제2절 연구개발의 필요성	10
제3절 연구개발 범위	20
제2장 국내외 기술개발 현황	25
제1절 국내 기술개발 현황	25
제2절 국외 기술개발 현황	28
제3장 연구수행 내용 및 결과	31
제1절 총괄 연구개발 추진전략	31
제2절 제1세부과제	33
제3절 제2세부과제	62
제4절 제1협동과제	85
제5절 1,2세부 및 1협동 공동연구	113
제6절 제2협동과제	121
제7절 1세부 및 2협동 공동연구	147
제8절 연구개발 성과	158
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	168
제1절 연도별 목표달성도	168
제2절 관련분야 기여도	169
제5장 연구결과의 활용계획 등	171
제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	173
제7장 연구개발과제의 대표적 연구실적	184
제8장 참고문헌	185

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목표

1. 연구 최종 목표

효율적인 M 세포 표적형 단백질 항원 생산 시스템과 이를 이용한 효과적인 경구 및 호흡기 전달 점막 면역 백신의 개발 (PED와 FMD를 효과적으로 방어하는 아단위 백신 system의 개발)

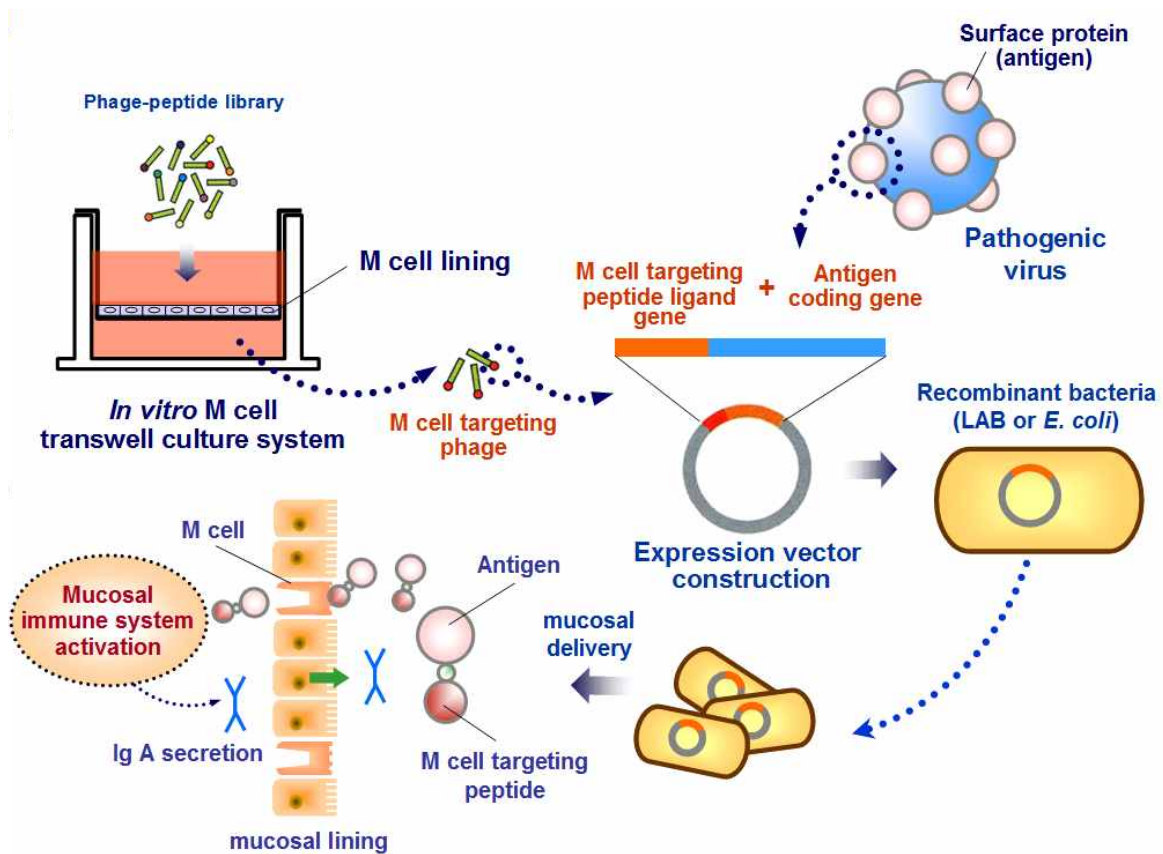


그림 1. M 세포 표적형 단백질 항원을 이용한 아단위 (subunit) 점막면역백신 개념도

2. 세부 연구 목표

- 경구 및 호흡기 전달방식의 점막면역백신 생산 시스템의 개발
- M 세포 표적기술을 활용하여 효과적인 점막면역 백신 구현
- Cytokine을 면역보강제 (adjuvant)로 활용하는 새로운 전략 수립
- 고효율 유산균 및 대장균 발현 벡터 시스템 구축
- 효과적인 PED (Porcine Epidemic Diarrhea: 돼지 유행성 설사) 및 FMD (Foot and Mouth Disease: 구제역) 백신 개발 체계 확립

제2절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 가축 질병 바이러스 백신분야 연구현황과 문제점

(1) 돼지유행성설사 (PED)

돼지유행성설사 (PED)는 현재 국내 양돈농장에서 경제적인 피해가 가장 큰 소화기성질병으로 특히 포유자돈에서 피해가 심각하다. PED의 예방을 위하여 주사 방식의 상용화 백신이 제작되어 판매되고 있지만 큰 효과를 보지 못하고 있다. 그 이유는 PED와 같은 소화기성 질병의 경우 체면역반응을 통한 방어보다는 점막면역을 통하여 분비된 IgA를 이용한 방어가 더 효과적인데 주사 방식의 백신은 점막면역반응의 부재로 효율이 떨어질 수밖에 없다. 경구 백신은 점막면역반응과 체면역반응을 모두 효율적으로 유도할 수 있는 장점이 있기에 소화기성 질병의 예방에 있어서 가장 적합한 백신으로 생각된다. 현재 한국은 물론 세계적으로 경구 백신의 개발이 활발하게 진행되고 있으나 안정성 문제로 허가에 성공한 품목은 적다. 그렇더라도 미국의 경우 몇 년 사이 허가받은 경구 백신의 품목이 점차 증가하고 있는 추세이다. 때문에 현재 소화기성 질병의 예방과 근절은 물론 세계적인 경쟁 속에서 기술적인 우위를 차지하기 위해서는 효율이 뛰어나고 안정성이 확보된 경구 백신 개발이 절실히 필요한 상황이다.

(2) 구제역 (FMD)

FMD는 소와 돼지 등 가축에 대한 전염성이 높은 급성 바이러스성 전염병으로서 대한민국에서는 제 1 종가축전염병으로 지정되어있다. FMD는 picorona virus라고 하는 RNA바이러스로 인해 감염되며 호흡기를 통해 감염되어 성체 가축의 경우 치사율이 약 1% 가량으로 낮지만, 어린 가축의 경우 심근염 등이 발생하여 폐사하고, 특히 포유중인 돼지의 경우 폐사율이 거의 100%에 달한다. 성장기 가축의 경우에도 한번 앓게 되면 발굽이 떨어져 나가고 완전히 회복되지 않으며, 성장효율이 낮아져 상품가치가 떨어지게 된다. 한 마리의 FMD 감염돼지가 1억 TCID (Tissue culture infective dose)의 바이러스를 체외로 배출하는 데 소 한 마리당 10 TCID의 바이러스로도 감염될 수 있다. 산술적으로 돼지 한 마리가 소 1000마리를 하루에 감염시킬 수 있을 정도로 전파율이 매우 높다. 2011년에 한국에서 발생한 FMD를 놓고 봤을 때, 가축 전염병 방제에 있어서 가장 중요한 것은 사전에 발병원인을 차단하여 전염병의 발생을 예방하는 것이라고 볼 수 있다.

(3) 바이러스 백신 분야 연구 현황과 문제점

(가) 현재 사용되는 백신

세계 대부분 국가에서 사용되는 FMD 백신은 불활화백신 (inactivated whole virus)으로써 면역보강제 (adjuvant)와 함께 사용하고 있다. 백신의 효과는 불화화백신이 가장 좋지만 이를 사

용할 경우 몇 가지 제한점이 있다. 첫째로 불활화 백신 제조과정에서 대량의 살아있는 바이러스를 배양하는 과정을 거치기 때문에 바이러스의 유출 우려가 있으며, 생산시설 역시 높은 수준의 생물학적 안전성이 요구되어 연구개발의 한계로 작용한다 (Marvin J. Grubman et al., 2004). 미국 아이오와 주립대학 내 식품안전 및 공중보건 센터의 보고에 따르면 현재 시판되고 있는 FMD 백신은 총 69가지가 있으며 모두 사독 백신의 형태를 띠고 있다. FMD 백신의 생산에는 상당한 위험성이 따르며 이는 영국에서 FMD 바이러스의 누출에 의한 바이러스 확산의 전례에서도 살펴볼 수 있다. 둘째로 불활화 된 바이러스를 생산하는 과정은 세포배양을 통한 세포 감염 후 배양 상층액을 취해 불활화백신으로 사용하기 때문에 상층액에 있던 바이러스의 비 구조 단백질에 의한 항체 생성으로 인해 실제로 감염바이러스와 백신접종 바이러스의 구분이 명확하지 못 할 수도 있다는 단점이 있다. 셋째로, 불활화백신은 일반적으로 FMD가 발생한 이후 접종하게 되는데 접종을 하더라도 빠른 시간 내에 효과적인 면역 반응을 일으키지 못 하고 또 후천면역이 일어나기까지는 시간이 많이 걸리기 때문에 FMD를 통제하는 시점이 늦어지고 막대한 경제적인 손실이 있을 수 있다는 단점이 있다. 또한 불활화백신은 보통 침습적인 주사형태를 취하고 있기 때문에 가축에게 스트레스를 줄 뿐 아니라 FMD 청정지역의 이미지를 갖지 못하고, 백신을 접종한 가축을 수출할 수 없기 때문에 여러 가지 면에서 경제적인 손실이 크다.

(나) 대안으로 진행 되고 있는 가축 질병 바이러스 백신 연구

① 단백질 기반의 아단위 백신

지난 25~30년간 대체 FMD 백신에 대한 연구가 많이 되어 왔다. 그 중 특히 FMD 바이러스의 표면 단백질인 VP1과 VP1 유래의 펩타이드를 기반으로 아단위 백신을 개발하는 연구가 많이 행해졌는데 예를 들어 VP1을 경구적으로 전달하기 위해 VP1을 발현할 수 있도록 형질 전환된 식물을 생산하여 가축에게 먹이는 등의 연구가 행해졌다. 하지만 현재까지 진행된 아단위 (subunit) 기반의 연구들은 백신의 전달 효율을 높일 수 있는 면역보강제나 표적형 리간드, 점막점착성물질, 전달체 (delivery vehicle) 등을 이용한 종합적인 체계를 갖추고 있지 못하여 생산 및 효과 면에서 효율적이지 못하며 실제로 상당수의 아단위 백신이 *in vivo*에서 공격접종 (challenge) 실험 결과 제대로 된 항체를 생산하지 못하였다. 그러나 아단위 백신은 생산적 측면에서 안전할 뿐만 아니라 경구로 전달할 경우 비침습적인 투약이 가능하므로 백신 전달 효율 면을 보강한다면 현실적인 측면에서 가장 가능성이 있는 백신이므로 위에서 언급한 종합적인 체계를 갖추는 필요가 있다.

② 약독화백신 (Live attenuated vaccine)

약독화백신의 경우 비감염성 숙주나 세포 주에 바이러스를 감염시켜 바이러스의 돌연변이를 유도하여 더 이상 원래의 숙주에서 virulent 하지 않은 상태로 만든 백신을 말한다. 그러나 바이러스가 약독화 되었더라도 감염성 숙주 내부에서 다시 virulent 한 성질을 회복할 가능성이 있어 안전성의 측면에서 위험부담이 따른다. 또한 virulent하지 않으면서 동시에 immunogenic 한 성질을 모두 갖춰야 하므로 자연적인 돌연변이에 의해 이러한 조건을 완전히 충족시키는

변형된 바이러스를 만들기는 현실적으로 어렵다.

따라서 다양한 방법으로 백신 개발 연구를 진행하고 있으나 이러한 제한 때문에 실제적인 안전한 백신은 아직 개발 되어 있지 않다. 우리나라는 FMD 청정구역을 선포하기 위해 FMD 백신의 자체 생산을 하지 않고 있다. 최근에 고려비엔피, 녹십자수의약품, 대성미생물연구소, 중앙백신연구소 그리고 고미당 등의 회사에서 백신을 만들겠다는 발표를 하였으나 아직 실행되지는 않고 있다. 현재 우리나라에 있는 FMD 백신은 2종류인데 그 중 하나는 항체의 생성이 25%이하의 수준이라 그 효능이 의심된다. 따라서 안전하고 효과적인 백신의 개발을 위해 면역보강제로 백신 효율이 증강된 아단위 백신을 만들고 이를 고분자 화합물을 이용하여 효율적으로 전달하는 종합적인 백신체계를 구축하는 것이 필요하다고 생각된다.

나. 감염경로 (소화기, 호흡기)에 따른 FMD 백신 개발의 필요성

(1) 수인성 바이러스의 감염 경로

PED 및 FMD 바이러스는 소화기 또는 호흡기 감염성 질병으로서 공기를 통한 전파 외에 물과 사료를 통해 감염이 되는 수인성 질병이기도 하다. 호흡기 또는 소화기를 통해 들어온 바이러스는 급속도로 온 몸에 퍼지면서 병을 야기하므로 이 때 처음으로 바이러스와 접촉하는 호흡기 점막, 소화기 점막에서의 준비된 면역반응을 유도함으로써 감염 초도의 방어를 유도할 수 있도록 백신의 개발이 필요하다. 아래 그림1에서와 같이 호흡기, 소화기의 점막 면역 반응은 사람의 경우 각각 비강, 경구투여를 통하여 유도하게 되며 가축의 경우도 이와 마찬가지로 면역을 유도할 수 있다. 비강, 경구 투여 시 기존의 침습적인 주사방식과는 달리 비침습적이기 때문에 가축 스트레스를 예방하여 생산량 저감을 막을 수 있다. 또한 주사방식의 불활화백신과 달리 예방 접종된 가축의 수출에도 문제가 없으므로 경제적 손실을 막을 수 있고 감염 초도의 면역반응을 유도할 수 있어서 더욱 효율적이다.

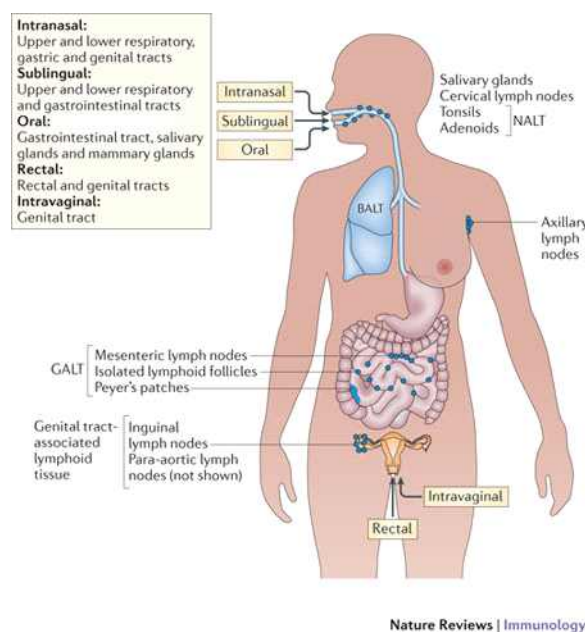


그림 2. 점막 면역 체계

(2) 소화기성 점막면역반응 유도

소화 장관은 가축이 물과 사료를 섭취하였을 때 바이러스에 노출되는 직접적인 부위이므로 소화 장관에서의 점막 면역반응을 효과적으로 유도하여 IgA 항체를 많이 생산하는 것이 중요하다. 소장 점막에는 Peyer's patch와 같은 점막면역기구 (GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue)가 존재하고 Peyer's patch의 상부에 위치한 M 세포가 소장 내 항원을 흡수하고 하부의 면역기구에 전달하여 점막면역반응을 유도 한다 (Marvin J. Grubman et al., 2004). 만약 M 세포를 표적하여 항원을 전달할 수 있는 경구백신 시스템이 개발된다면 이러한 점막면역반응 효율을 크게 증진시킬 수 있다. 본 연구실에서는 파지디스플레이를 이용한 M-cell homing 펩타이드를 탐색하고 다양한 항원이나 고분자에 conjugation하여 그 특성을 확인하였다 (M. Yoo et al., 2010).

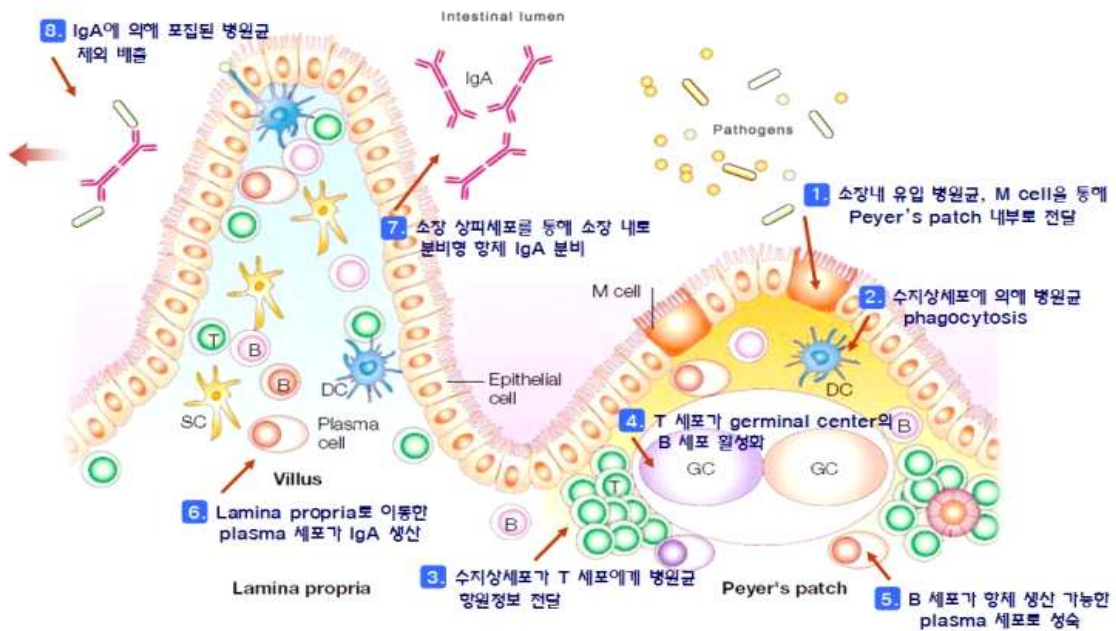


그림 3. 점막면역반응에 의한 소화장관 내 유입 병원균 방어 모식도 (S. Fagarasan et al., 2003)

(3) 호흡기성 점막면역반응 유도

호흡기에는 NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue)라는 점막면역기구가 존재한다. FMD 바이러스는 호흡기를 통한 감염이 가장 쉽고 빈번하게 일어나는데 비강 투여기법을 통하여 NALT에서의 면역반응을 유도하면 호흡기성 점막면역반응을 가장 효과적으로 유도할 수 있다. 비강 투여를 통한 백신접종 방법으로는 아단위 백신 또는 DNA 백신을 고분자물질로 코팅하여 주입하거나 스프레이 방식으로 주입하는 방법이 있다. 이 경우 주사형태의 침습성을 띠지 않아 가축의 스트레스를 덜 수 있으며 호흡기부분에서 국소적으로 점막면역반응을 유도하여 IgA를 생성할 수 있어 호흡기로 들어오는 바이러스를 중화시킬 수 있어 효과적이다.

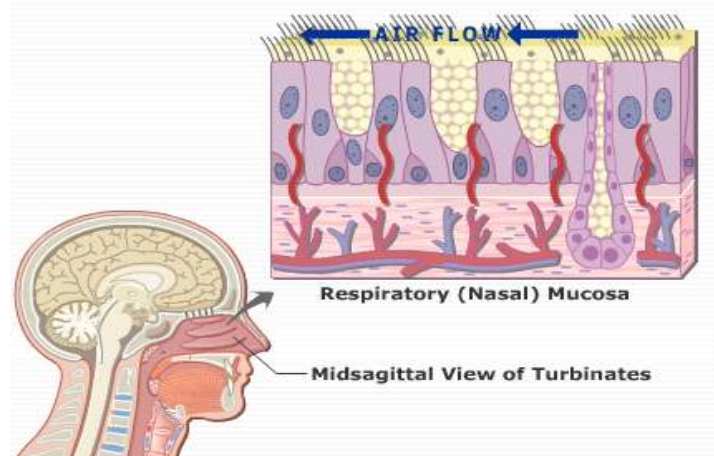


그림 4. 호흡기 점막면역체계

(4) 점막면역반응의 중요성

그림 1에서 표시한 바와 같이 호흡기, 소화장관, 생식기관 등 체내의 광범위한 면적이 점막으로 보호되어 있으며 이런 조직에서 일어나는 면역반응은 주로 점막면역반응이다. 점막면역반응에서 침입한 항원에 대해 효과적으로 방어할 수 있는 항체의 대부분이 IgA이며 이는 체내에서 생성되는 전체의 항체 중 80%를 차지하는 주요한 항체이다 (N. Lyche et al., 2012). IgA는 점막면역반응을 통해서만 생성되기 때문에 주사투여방식을 이용한 백신전략은 체면역반응을 효율적으로 유도할 수 있으나, 감염 초기 점막에서 실제로 방어역할을 하는 IgA를 생성하는 능력이 미미하다는 한계점이 있다. 특히 사료나 물의 섭취 등으로 인한 소화기 감염 바이러스나 호흡기 감염 바이러스의 경우 점막면역반응을 유도함으로써 바이러스와 최초 접촉하는 장소인 소화기, 호흡기 점막에서 즉각적인 방어면역으로 바이러스의 전신 확산을 초도에 방어할 수 있다. 점막을 통한 면역반응은 점막에서의 면역반응뿐만 아니라 체면역반응을 같이 유도할 수 있다. 따라서 점막면역반응을 유도하는 백신은 소화기와 호흡기에서의 IgA의 유도뿐만 아니라 혈중에서의 IgG의 형성도 유도한다는 점에서 기존의 주사백신의 단점을 극복할 수 있다.

다. 백신의 효율을 증가시키기 위한 면역보강제개발의 필요성

백신 설계 시 면역보강제 (adjuvant)를 사용하면 면역반응을 더욱 효과적으로 유도할 수 있다. 면역보강제는 아래 그림에서와 같이 백신 전달체계와 면역 활성 증진물질의 두 가지 범주로 나눌 수 있다. 백신 전달체계의 경우 해당 점막기관까지 백신을 효율적으로 전달할 수 있는 운반체를 사용하므로 동량의 백신 투여 시 이를 이용하지 않는 경우에 더 많은 면역반응을 유도할 수 있으며 면역 활성 증진물질을 활용할 경우에도 역시 면역 boosting의 효과를 더욱 극명하게 유도할 수 있다. 특히 아단위 백신의 경우 빈번한 연구에도 불구하고 실제 바이러스를 방어 시 효율이 저조하므로 위와 같은 두 가지의 기본적인 전략을 포함하여 안전하고 효과적인 PED 및 FMD 백신 시스템을 개발할 수 있다.

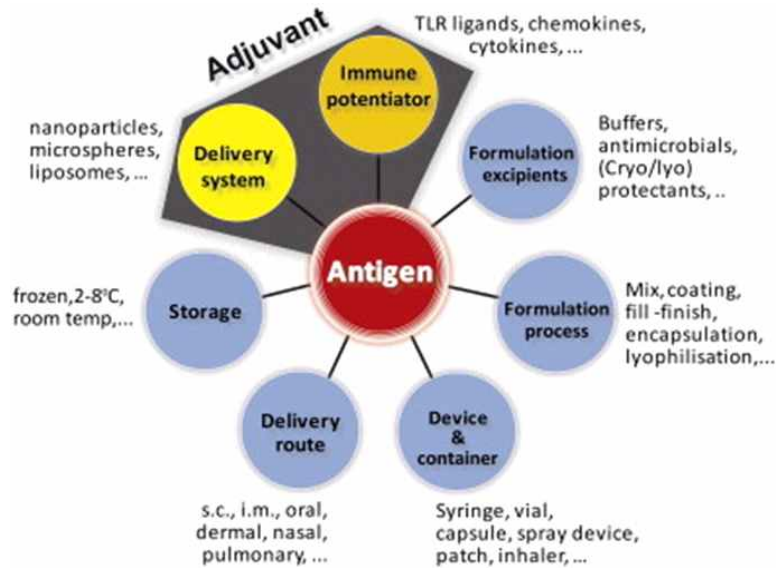


그림 5. 백신 design에 있어서 고려해야 할 점들 (J.-P. Amorij et al., 2012)

(1) Delivery system 번역보강제

(가) 유산균 (LAB: Lactic acid bacteria)

백신의 주요 구성 요소인 단백질은 위산에 의한 낮은 pH, 소화 장관의 각종 분해효소 등에 의해 변성되어 그 고유 기능을 잃기 쉽고 (운송과정 중의 문제점), 안전하게 소화 장관까지 전달되더라도 소장 점막층에서의 흡수율 (체내 흡수의 문제점)이 저조하므로 현재까지 경구백신의 활용은 매우 제한적이다 (그림5) (S. Pavla et al., 2009).

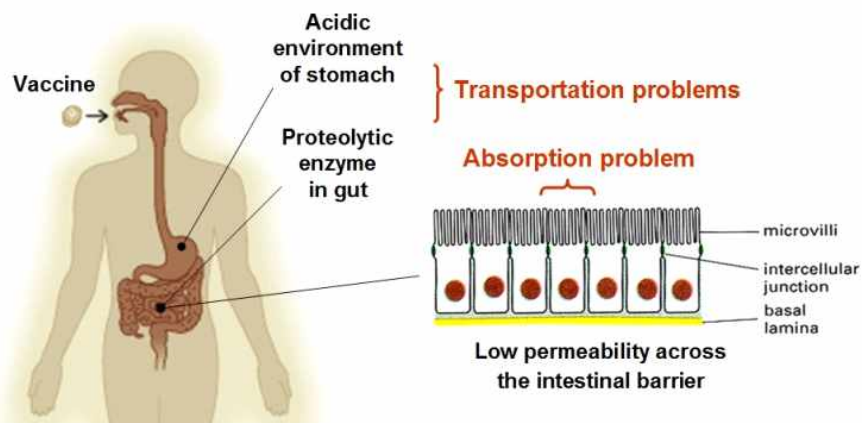


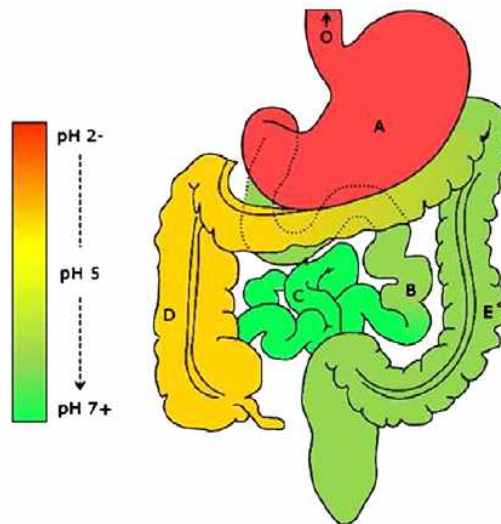
그림 6. 경구백신 개발에 있어서 극복해야 할 두 가지 문제점 (S. Pavla et al., 2009)

유산균은 인간이 발효식품을 제조할 때 이용해 온 대표적인 안전한 식품미생물 (GRAS: generally recognized as safety)로 이미 많은 연구를 통해 그 이용성이나 영양적 가치가 밝혀져 있고, 최근 생명공학 기술의 발달로 인하여 유산균의 대사 작용과 특성이 밝혀지면서 다양한 활용 가능성이 제시되고 있다. 유산균은 경구로 섭취할 경우 소장까지 살아서 이동이 가능

하고, 균에 따라서는 지속적 섭취를 통해 소장에서 군집 (colony)을 형성할 수 있으며, 이러한 유산균 군집이 장내 우점하게 되면 병원성미생물의 장내서식을 억제하여 동물체의 면역능을 증진시키는 것으로 알려져 있어 항생제를 대체할 수 있는 생균제 (probiotics)로 각광받고 있다 (H. Link-Amster et al., 1999). 최근 유산균의 경구 투여 시 장 내 전달 효율이 높다는 점에 착안하여, 특정 병원성균 유래의 단백질 항원이나, 면역 활성을 유도하는 cytokine 유전자가 도입된 재조합 유산균을 개발하여 이들 약물을 안전하게 소장까지 전달 할 수 있는 운반체 (vehicle)로 활용하는 전략이 널리 연구되고 있으나, 유산균의 저조한 단백질 발현율과 분비효율, 생산된 항원 및 cytokine 단백질의 소장 점막층에서의 낮은 흡수 효율 등은 아직 해결해야 할 문제로 남아있다 (S. Klayrang et al., 2009). 또 한 이런 유산균을 아단위 백신의 전달체로 사용을 함으로써 주사방식에 비해 가축에 스트레스를 덜 주고 투약의 편이성을 높일 수 있을 뿐 더러 systemic한 면역반응보다는 소화 장관에서의 면역반응을 잘 유도할 수 있다는 장점이 있다.

(나) 고분자 전달체

유산균이 소장에 전달되어 항원단백질을 생산하려면 소화기관을 거쳐 전달되는 과정에서 생존률이 높아야 백신 효율을 높이고 백신의 투여량을 줄일 수 있다. 또한, 항원 단백질만 백신의 용도로 전달하는 경우에도 단백질이 소화 장관을 거치면서 최종적으로는 아미노산 형태로 분해되어 그 기능을 잃어버리기 때문에 단백질을 보호하는 전략이 필요하다. 약물 전달시 소화 장관의 환경은 아래 모식도와 같이 매우 다양한데 구체적으로는 pH의 변화, 각 부위별 약물의 체류시간, 분비되는 효소 및 물질, 소화관의 운동 등이 모두 다르기 때문에 약물이 효과를 나타내려면 이처럼 변이가 큰 소화 장관의 화학적, 물리적 환경의 제약을 극복해야 한다.



Letter	Region	pH	Transit Time
O	Oesophagus	~7.0	10-14 seconds
A	Stomach	1-2.5 (up to 5 fed)	Half emptying: ~80.5 mins
B	Proximal Small Intestine	6.15-7.35	3.2 ± 1.6 hrs (combined)
C	Distal Small Intestine	6.80-7.88	
D	Ascending Colon	5.26-6.72	Highly variable, dependent on bowel evacuations
E	Descending Colon	5.20-7.02	

그림 7. 약물 전달시 소화 장관 내 환경 모식도 (W. Frank et al., 2012)

이러한 점을 고려했을 때 대안으로 고분자 전달체를 이용할 수 있으며, 유산균과 같은 생균제나 단백질 약물의 경우 고분자 기질에 고정되어 쉽게 방출되지 않고 소화관을 지나면서 각종 분해효소나 담즙산, pH 등의 외적 요소로부터 보호될 수 있다. 또한 pH에 따른 방출 효과가 다른 고분자화합물을 이용할 경우 특정 부위에서 약물의 방출을 통제할 수 있고 점막 점착성 고분자화합물을 이용할 경우 소장 장 상피의 점막에 부착하여 약물의 지속시간을 증가시키며 장 상피세포의 transcytosis 기전을 통한 흡수율을 증가시킬 수 있다. 약물의 전달 용도로서 pH에 따른 방출효과가 다른 고분자화합물로는 HPMCP, eudragit이 널리 사용되어 왔으며 점막점착성 고분자 화합물로는 eudragit, chitosan이 빈번히 사용되어 왔다.

① HPMCP (Hydroxypropyl methylcellulose phthalate)

HPMCP는 hydroxypropyl methylcellulose phthalate의 약자로 약물을 위산으로부터 보호하거나 위에서 부작용을 일으키지 않도록 코팅하는 enteric coating제이다. 1971년에 cellulose의 유도체로서 시판된 이후 의약 산업분야에서 enteric coating제로 널리 사용되어왔으며 U.S. National Formulary (US/NF), European Pharmacopoeia (EP), Japanese Pharmacopoeia (JP)으로부터 인증되었다.

HPMCP의 화학 구조는 아래 구조식 (그림 7)에서 보듯이 hydroxypropyl methylcellulose의 phthalic half ester이며 HPMCP가 분해되는 pH값은 phthalyl 함량을 변화시킴으로서 조절할 수 있다.

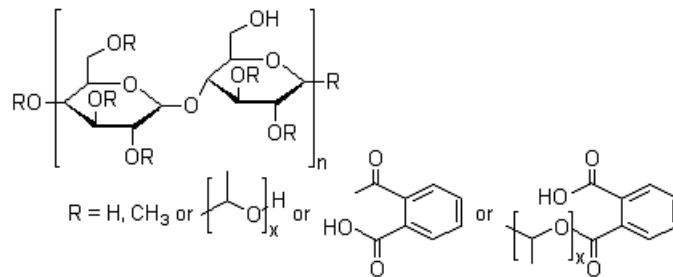


그림 8. HPMCP의 구조

HPMCP는 크게 HP50, HP55의 2가지 등급으로 구분될 수 있으며 이들은 서로 다른 pH 용해도와 phthalyl 함량, 점성을 갖고 있다. HPMCP는 위산 (pH 1.5)에서는 녹지 않지만 소장으로 진입하면서 pH가 5.5 정도에서 급속히 방출하기 때문에 경구백신의 안전한 소화기 전달이 가능하다. 그러나 아직까지 동물산업에서 백신 전달을 위한 사료첨가용 tablet을 만들기 위한 용도로 사용된 적이 없다. 건조된 유산균을 HPMCP와 함께 혼합하여 tablet의 형태로 만들면 HPMCP와 유산균 분말의 비율 및 tablet 제조시의 압력에 따라 유산균의 생존률과 장 내에서의 방출속도를 조절하여 지속적이고 효율이 높은 백신 효과를 기대할 수 있다 (S. Klayraung et al., 2009). 또한 tablet형태로 급여할 경우 가축이 pellet 형태의 사료로 섭취할 정도의 큰 입자를 만들 수 있기 때문에 쉽게 급여가 가능하고 가루 형태의 잔여 사료의 손실을 막을 수 있다.

② 점막 점착성 고분자

기존에 알려진 점막 점착성 고분자화합물인 Eudragit L-100과 키토산의 경우에는 소장에서 경구백신의 전달 관문인 M 세포와 특이적으로 결합하는 능력이 없다. 따라서 이를 개선하고 백신 전달 효율을 높이기 위해서 M 세포 특이적인 작용기를 도입하여 백신 전달 효율을 극대화할 수 있다. 또한 Eudragit L-100의 경우 점막 점착성 효율을 더 높이기 위해서는 점막 점착성 작용기인 thiol기를 도입하는 전략이 이용 된다 (J. Quan et al., 2007).

③ Antigen presenting cell (APC) 표적형 담지체

점막 점착성 고분자의 경우 점막 면역이 일어나는 표적 부위에 머무르는 시간이 길지만, 점막이 renewal 되면서 함께 휩쓸려 내려가게 되는 단점이 있다. 이 경우 만노오즈와 같은 APC 표적 단백질을 수식함으로써 항원 표적 세포에 보다 빠르게 접근할 수 있고 효율적으로 면역 반응을 유도할 수 있다. 백신의 주요 목적이 획득 면역을 유도하여 기억세포를 생산하기 위함이며 이 과정에서 가장 선행되는 과정이 APC의 항원 제시이다. 따라서 특이적으로 APC에 접근하는 고분자에 항원을 담지하면 점막 부위에서 문제가 되는 항원 전달 효율을 높일 수 있다. 본 연구실에서 수행한 연구에 따르면 만노오즈로 수식된 키토산의 경우 수지상 세포 표적 능력이 유의적으로 증가하였으며 항원 전달 및 면역 반응 또한 상승하였다.

(2) 면역증진 면역보강제

백신의 효율을 증진시키기 위해서는 면역 활성 물질의 역할이 매우 중요하며 현재까지 점막 면역 반응을 유도하기 위한 면역보강제로는 아래와 같이 3개의 범주로 나눌 수 있다.

(가) Bacterial enterotoxins (LT, CT)

실험적으로 가장 빈번히 사용된 면역 보조제로 비브리오균의 cholera toxin (CT) 을 약독화 시킨 것과 대장균의 enterotoxin 인 heat-labile enterotoxin (LT) 을 약독화 시킨 것이 있으며 이들의 면역증진 효율 또한 높지만 독성으로 인한 문제가 해결이 되지 않아 아직까지 임상에서 승인을 받지 못하였다.

(나) TLR ligands (CpG, MPL 등)

CpG 는 TLR9와 결합하고 MPL은 TLR4와 결합함으로써 이들 TLR를 발현하고 있는 면역세포들을 활성화시켜 면역 증진 작용을 한다. Monophosphoryl Lipid A (MPL)은 이미 humann papiloma virus vaccine의 면역보강제로써 미국 FDA 승인을 받은 면역보강제이다.

(다) Small molecule / non-TLR immunostimulants

Cytokine (IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ , BAFF) 계 molecule을 이용하여 cytokine이 일으

키는 작용을 모방함으로써 면역반응이 더 활발히 일어나게끔 유도할 수 있다. 또한 RANKL는 M 세포의 분화를 유도함으로써 면역반응의 증진을 유도할 수 있어 이 범주에 속할 수 있다. 곰팡이 유래의 small molecule (Dectin-1, mast cell activators) 또한 면역반응 활성물질로 이 범주에 속한다. M 세포 표적형 단백질의 경우 항원 포집 세포인 M 세포에 항원을 직접 표적하여 면역 반응을 개시하는데 중요한 역할을 하므로 small molecule의 범주에 속하는 면역보강제로 볼 수 있다 (그림9). Small molecule/ non-TLR immunostimulants를 분비하기 위해 미생물 숙주를 이용하는 경우, 미생물이 소장등의 점막부위에 colonization함으로써 지속적으로 cytokine 등을 분비하므로 투여량을 줄일 수 있어 비용절감 효과를 기대할 수 있다. 하지만 유산균 및 대장균등은 물론 인체에 영향이 크지 않으나 미생물로서 성장이 빠르며 변이가 잦아 pathogen으로써 기능을 할 가능성도 배제할 수 없다. 더불어 아단위의 안전성 문제 역시 간과할 수 없다. RANKL 역시 M 세포의 분화를 안정적으로 유도할 수 있는지에 대한 의문이 남아있으며 분화된 M 세포가 면역증진에 기여하는지의 여부 역시 여전히 미지수이다. 따라서 이들의 가축 적용을 우선함으로써 안전성 및 실용성 측면을 검정하고 이들의 효과를 파악할 것이다.

본 연구에서는 면역반응의 면역보강제인 cytokine을 생산하는 유산균 균주를 확립한다. 유산균은 배양조건이 까다롭지 않아 대량으로 배양이 가능하며 균주 자체를 숙주로 직접 소화 장관 내로 투입할 경우 균주가 생산하는 단백질 정제비용이 절감된다. 또한 가축에 대한 안정성을 확보하면서 이를 실용화하는데 문제가 없을 것으로 사료된다. 이를 고분자화합물로 담지한 아단위 백신과 함께 투여할 뿐만 아니라 항원단백질 (subunit) 자체에 M 세포 표적능을 부여하여 기존의 아단위 백신의 낮은 효율을 개선하고 고효율의 백신 시스템을 구축하고자 한다.

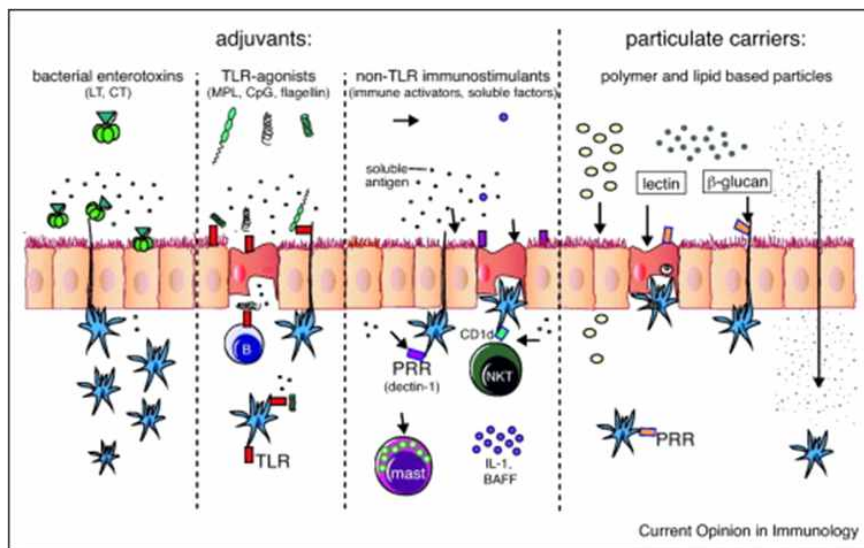


그림 9. Mucosal immunity 에서의 mucosal 면역보강제의 분류

2. 연구개발에 따른 기대효과

가. 경제 가축 질병의 대다수를 차지하는 수인성 전염병 및 호흡기 감염 질병을 감염경로인 소화기 및 호흡기 점막수준에서 초도에 방어하는 효율적인 백신 전략으로 FMD 등 국가재난 수준의 사회적 파장을 야기하는 가축질병의 효과적인 방제 체계 마련

나. 주사에 의존하는 기존 백신투여 방식을 일반 농가에서도 적용 가능하도록 경구 및 호흡기 (비강) 투여 방식으로 대체함으로써 가축 스트레스, 비용 및 노동력 절감으로 축산 생산성 향상 기대

다. 질병 원인체 (세균 및 바이러스) 자체를 약독화/사독화 시켜 사용하던 기존 백신과 비교하여 방어능이 있는 항원 (병원체 표면 단백질 등)만을 미생물 숙주를 이용하여 경제적으로 생산하여 활용하는 아단위 백신 (아단위 백신)개념으로 기존 백신체계에 비해 안전성 및 가격경쟁력에서 우위를 점할 것으로 기대

라. 돼지 유행성 설사병 (PED)와 구제역 (FMD) 등 가축 전염병이 만연해 있는 동남아시아, 중국 등에 수출 가능성 모색

제3절 연구개발 범위

1. 주요연구내용

- **기존 가축백신의 한계점 극복:** 체면역반응 (systemic immunity)을 주로 유도하는 주사방식에 대응하여 가축 수인성 전염병에 대응하여 점막면역반응 (mucosal immunity)을 활성화 시킬 수 있는 경구 및 호흡기 전달방식의 점막면역백신 생산 시스템의 개발.
- **면역력이 우수한 차세대 백신의 개발:** 선행연구로 확보된 M 세포 표적기술을 활용하여 효과적인 점막면역 백신 구현, 면역시스템을 특이적으로 조절하는 cytokine을 면역보강제 (adjuvant)로 활용하는 새로운 전략 구축.
- **대량생산 가능 한국형 발현 시스템 개발:** M 세포 표적형 단백질 항원 생산 가능 고효율 유산균 및 대장균 발현 벡터 시스템 구축.
- **주요 적용 가축 질병:** 기 확보된 PED (Porcine Epidemic Diarrhea: 돼지 유행성 설사) 바이러스의 SP1 단백질을 이용한 모델 백신 생산 시스템의 효용성을 검정한 후 이를 FMD (Foot and Mouth Disease: 구제역) 백신 개발에 적용.
- **백신의 안정성 확보:** 본 과제에서는 병원체 자체 백신으로 이용하는 약독화/사독화 백신과는 달리 병원체의 항원단백질을 미생물 숙주를 통해 대량생산하여 백신으로 활용하는 전략을 통해 안전성 확보.

2. 세부과제별 연구내용

가. 제 1세부과제: 서울대학교 농생명공학부

■ 연구 목표

점막면역백신의 핵심자원인 M 세포 표적형 항원 (2종) 및 면역보강 단백질 (2종) 개발 및 생산.

■ 연구 내용

- M 세포 표적형 단백질 항원/cytokine 생산 유산균 및 대장균 발현백터 시스템 개발.
- 돼지 유행성 설사 (PED) 및 구제역 (FMD) 바이러스 유래 항원 단백질 생산 체계 확립.
- 면역보강 단백질 (cytokine adjuvants)의 생산 및 특성 규명.

나. 제 2세부과제: 서울대학교 그린바이오과학기술연구원

■ 연구 목표

점막면역백신의 체내 전달 효율 증진을 위한 가축 백신 담지 고분자 전달체 (3종) 개발 및 생산.

■ 연구 내용

- 경구용 백신 담지 고분자 전달체 개발 및 특성 규명.
- 호흡기 전달용 백신 담지 고분자 전달체 개발 및 특성 규명.
- 백신 생산 유산균 경구전달 고분자 전달체 개발 및 특성 규명.

다. 제 1협동과제: 농림축산검역본부 (연구소)

■ 연구 목표

병원체 공격접종을 통한 표적형 점막면역 백신 효과 실증 연구 (PED, FMD).

■ 연구 내용

- 표적형 점막면역 백신 경구 및 호흡기 투여 목적동물 대상 실증 시험.
- M 세포 표적형 가축 점막면역 백신 인증 및 허가 추진.

라. 제 2협동과제: (주) 우진 B&G (산업체)

■ 연구 목표

표적형 점막면역 백신 산업적 대량생산체계 확립 및 산업화 추진 (기술이전 1, 제품화 2).

■ 주요연구내용

- 대장균 이용 가축질병원 항원 및 면역보강 단백질 (cytokine) 대량생산 체계 확립.
- 백신 생산 유전자 재조합 유산균 고농도 대량생산 체계 확립.
- M 세포 표적형 가축 점막면역 백신 산업화 추진.

3. 과제별(세부·협동) 기존 기술 대비 차별화 전략

구분	기존 국내외 기술 문제점	본 과제 개발 내용
제 1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ● 백신 접막전달시 낮은 항원 전달 효율 ● 수인성/호흡기질병 방어율 낮은 주사백신 ● 비특이적 면역보강제 (adjuvant) 	<ul style="list-style-type: none"> ● M 세포 표적 기술 도입 접막면역반응 효율 증진 ● 수인성/호흡기질병 방어율 높은 접막면역백신 ● Cytokine 면역보강제를 이용한 직접적인 면역유도
제 2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ● 백신 접막전달시 낮은 항원전달 효율 ● 백신 경구투여시 소화장관 내 분해 	<ul style="list-style-type: none"> ● 접막점착성 고분자물질 도입 항원전달 효율 증진 ● pH조절 코팅 및 tablet 전략으로 보호효과 증진
제 1협동과제	<ul style="list-style-type: none"> ● 목적 가축에 대한 백신효과 규명 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> ● 공인 분석기관에서 백신효과 검증 (PED/FMD)
제 2협동과제	<ul style="list-style-type: none"> ● 박테리아/바이러스 생균/약독화 백신 위주 ● 국내 아단위 백신 기술 취약 	<ul style="list-style-type: none"> ● 독자적인 M 세포 표적형 아단위 백신 산업화 및 제품화 연구 진행

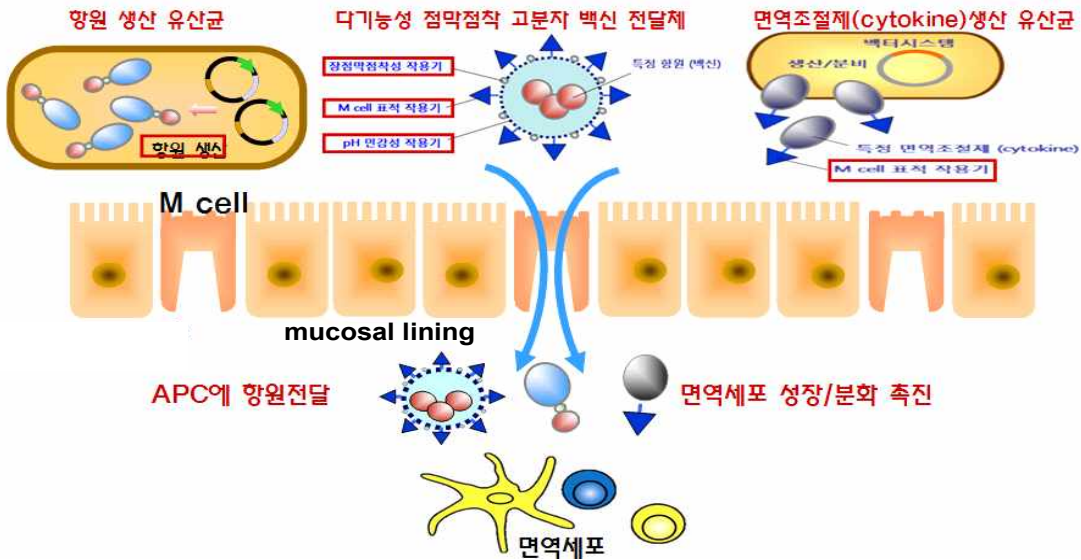


그림 10. 본 과제를 통해 구현하고자 하는 M 세포 표적형 점막면역백신 및 면역조절제 개념도

4. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

가. 제 1세부과제: M 세포 표적형 항원 및 면역보강 단백질 개발 및 생산

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2013	점막면역 백신 후보 항원 및 면역보강 단백질 생산	-FMD 바이러스 항원 유전자 클로닝 및 발현 확인 -면역보강 단백질 유전자 클로닝 및 발현 확인 (유산균/대장균 시스템)
2차년도	2014	고효율 유산균 및 대장균 단백질 발현백터 구축	-고효율 유산균 발현백터 개발 -고효율 대장균 단백질 생산체계 개발 (유산균/대장균 시스템)
3차년도	2015	항원 및 면역보강 단백질 특성 규명 및 점막면역 백신 체계 구축	-항원 및 면역보강 단백질 기능 및 특성 규명 -항원 및 면역보강 단백질 최적 조합 결정 -백신 및 면역보강 단백질 효과 개선

나. 제 2세부과제: 효율적인 가축 백신 담지 고분자 전달체 개발 및 생산

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2013	백신 담지 고분자 전달체 개발	-경구용 백신 담지 고분자 전달체 개발 -호흡기용 백신 담지 고분자 전달체 개발
2차년도	2014	백신 담지 고분자 전달체 특성 규명	-경구용 백신 담지 고분자 전달체 특성 규명 -호흡기용 백신 담지 고분자 전달체 특성 규명
3차년도	2015	백신 담지 고분자 전달체 제형 개선	-경구용 백신 담지 고분자 전달체 제형 개선 -호흡기용 백신 담지 고분자 전달체 제형 개선

다. 제 1협동과제: 표적형 점막면역 백신 효과 실증 연구

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2013	M 세포 표적형 모델 점막면역 아단위 백신 (아단위 백신) 효과 실증 시험	-M 세포 표적형 모델 항원 (PED 바이러스 표면단백질) 경구 및 호흡기 투여 백신 효과 검정 (challenge 시험)
2차년도	2014	M 세포 표적형 모델 유산균 경구백신 효과 실증 시험	-M 세포 표적형 유산균 경구백신 및 cytokine 면역보강제 효과 검정 (challenge 시험) -가축 백신 인증 및 허가 프로세싱
3차년도	2015	M 세포 표적형 FMD 점막면역 백신 효과 실증 시험	-M 세포 표적형 경구백신 및 호흡기 투여 백신 challenge 시험 (FMD 백신, cytokines) -가축 백신 인증 및 허가 프로세싱

라. 제 2협동과제: 표적형 점막면역 백신 산업적 대량생산 체계 확립

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2013	항원 및 면역보강 단백질 대량생산 체계 확립	-항원 및 면역보강 단백질 대량생산 체계 확립 -고분자 담지체 제조 산업적 기술체계 연구
2차년도	2014	백신 생산 유산균 대량생산 체계 확립	-항원 및 면역보강 단백질 생산 모델 유산균 이용 재조합 유산균 고농도 배양조건 및 대량생산 체계 확립
3차년도	2015	M 세포 표적형 점막면역 백신 제형 확립 및 제품화	-유산균 백신 제형 확립 -고분자 담지 단백질 백신 제형 확립 -가축 백신 제품화 및 산업화 프로세싱

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

- 국내의 동물용 백신산업 역사는 반세기를 지나, 이제 선진국과 어깨를 나란히 할 만큼 국내의 수의미생물학 분야도 급속히 발전하여 국내 동물자원사업의 발전에 기여하고 있다. 1911년 농무성 산하의 우역 혈청 제조소를 기점으로, 1942년 가축위생연구소가 설립되어 미생물 연구소로서의 면모를 갖추기 시작하였고, 그동안 우역, 사독 백신, 뉴캐슬 백신 등 다양한 동물용 백신들을 개발해 왔다. 현재는 국립연구소, 대학, 산업체 등의 다양한 기관에서 가축 전염병의 원인체인 바이러스, 세균, 원충 등에 대한 백신의 개발이 이루어지고 있다 (박영호, 2016).
- 동물용 백신 관련 산업은 가축 질병의 예방뿐만 아니라, 전세계적으로 이슈화되고 있는 생물무기 (천연두, 탄저균), SARS (중증 급성 호흡기 증후군), AI (조류 인플루엔자) 등 인수 공통 전염병에 대한 대응기술 개발에 많은 공헌을 하고 있으며, 국가적으로도 큰 전략산업으로 인식되고 있다.
- 농림수산물식품기술기획평가원의 보고서와 한국동물약품협회 자료에 따르면 국내 동물약품의 시장규모는 2009년 5,663억원에서 연평균 9.5%씩 성장하여, 2015년에 9,663억원 규모로 성장할 것으로 전망되고 있다. 그 중에서도, 동물백신 시장의 성장세가 매해 20%이상으로 가장 괄목할만한 성장을 보이고 있는데, 그 이유는 항생제에 대한 규제 강화와 치료 대신 예방이라는 인식의 변화로 인해 최근 동물백신에 대한 수요가 급증했기 때문이다 (한국보건산업진흥원, 2014).
- 동물 약품시장에서 동물백신이 새로운 성장 동력으로 작용하면서, 기존의 백신 제조사 외에도 다른 동물의약품 업체들이 빠르게 시장으로 진입중이다. 향후 시장 전망이 매우 밝고 성장가능성이 클 것임에도 불구하고, 현재 대부분의 동물 백신 제품이 해외 수입에 의존하고 있는 실정이기에 국외와의 기술 격차를 극복할 수 있는 국내 기술 개발이 시급한 실정이다 (한국보건산업진흥원, 2014).

1. 단백질 백신

- 재조합 단백질 백신은 항원 생산 유전자나 면역 조절물질 생산 유전자를 주입한 유전한 재조합 백신으로서, 다양한 항원을 동시에 발현할 수 있는 백신이다. 현재 multivalent vaccine, 점막면역 유발 백신, cytokine (IFN- γ , IL-2 등)과 같은 면역조절 유전자 재조합 백신이 개발 중이다. 국내 산업에 벡터로 주로 이용되는 바이러스로는 Fowl pox, Adeno, Herpes 바이러스 등이 있다.

- 경구용 단백질 백신의 경우, 우리나라에서 돼지 유행성 설사 (PED) 경구용 백신이 이미 개발되어 판매중이며, 형질전환 식물을 이용한 경구 백신은 동물 질병 백신에 집중하는 경향이 있다. 특히 돼지 설사병 및 흉막폐렴에 대한 연구에서는 실험동물 및 목적 동물에서 효능이 검정 (농촌진흥청, 전북대학교)되었음을 보고하였다 (양문식, 2010).

가. 돼지유행성설사병

- 국내 양돈장의 고질적인 숙제로 부각되고 있는 돼지 설사성 바이러스 질병인 PED (Porcine Epidemic Diarrhea) 바이러스의 경우, 국내에서 생독·사독·경구용 백신모두가 개발되어 사용되고 있으나, 야외 바이러스가 환경에 적응하면서 계속 변이를 하기 때문에 쉽게 근절되기가 어려운 실정이다. 야외 질병 원인체와 백신 항원의 동질성을 시차를 줄여서 확보하는 것이 기술개발의 관건이라 할 수 있다.
- 동물 경구용 백신의 경우, 현재 녹십자수의약품주식회사가 개발한 경구용 PED 백신이 있다. 돼지유행설사병이라는 질병에 대한 세계 최초의 경구용 백신 기술로써 그 의의가 있다. 1997년부터 지난 6년간에 걸친 연구로 효능, 안전성, 안정성에 대한 검증을 마친 상태이며, 특허 등록을 마치고 현재 시중에서 시판되고 있음. 장관면역과 점막면역 활성화에 탁월한 효과를 내고 높은 안전성과 접종 스트레스를 줄여주는 등의 장점을 가지고 있다 (축산경제, 2015).

나. FMD 바이러스

- FMD 백신의 경우 국내에서 시판되었던 제품 중 효과를 발휘했던 사례가 거의 없었기 때문에, 해외로부터 전량 수입에 의존하고 이로 인해 거대한 외화 손실이 발생하고 있는 실정이다. 또한 이 수입백신 자체도 항체 생성률이 낮은 문제점이 있어 이를 극복할 수 있는 증강용 면역보강제 및 고분자 전달체의 조합 등을 고려해볼 필요성이 있다.
- 연구 예시로, Sf9 세포에서 생산하는 재조합 단백질로 Virus-like particle (VLP)을 생산해 FMD 바이러스 아형 O 타입에 대해 방어하고자 하는 시도의 연구 사례가 있었다. 중화항체가의 측면에서 충분한 백신 능력을 보여주었으나, 실제 아형 O 타입에 대한 예방 및 방어 효과로써의 백신의 효과 여부까지는 결과로 제시하지 못했다 (건국대학교, 2016).
- 우리나라에서 발발했던 FMD 바이러스는 아형 O타입 외에도 아시아1 타입이 존재하는데, 이에 대해서도 방어하기 위해 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 일례로 FMD 아시아1 혈청형의 표준백신 바이러스의 방어항원을 발현하는 재조합 FMD 바이러스 및 이의 제조 방법에 대해 밝혀놓은 기술이 있다. 이 재조합 FMD 바이러스는 As1/Shamir/89의 VP1 단백질 또는 VP1 단백질의 에피토프를 발현하는 효과가 우수하여, FMD 아시아1형을 포함하는 FMD의 예방에 유용하게 사용될 수 있다고 한다 (등록번호 1015663710000, 2015, 농림축산검역본부).

2. 면역보강제 생산 유산균

- 백신 항원 전달체계를 위해 현재 사용 중인 동물용 면역보강제에는 수산화 알루미늄 겔, 동물 또는 식물 유래의 오일, 미네랄 오일 등이 주로 사용되고 있으나 세포성 면역 유발효과가 떨어진다는 단점을 보여주었다. 이를 보완하기 위해, 세포성 면역 증강효과가 있는 다당체인 사포닌, 베타글루칸, 락틴 등을 첨가함으로써 백신의 효과를 높이는 기술들이 개발되고 있다.
- 상기 언급된 다당류들은 과민 반응을 일으킨다는 단점이 남아있어, 이를 극복하고자 최근에는 Fc 수용체에 특이적으로 항원을 결합시킬 수 있는 liposome 혹은 virosome이 개발되고 있다. 또한, 분자량이 작고 면역원성이 낮아 사용되지 못했던 펩타이드 역시 cytokine과 결합해 면역 보강제로써의 기능성이 확인되면서 새로운 전기를 맞이하고 있다.
- 현재 동물용 백신 면역보강제로 많은 특허 및 기술 개발이 이루어졌고, 녹십자수의약품(주)와 (주)바이오리더스와 같은 기업체를 중심으로 다양한 종류의 동물 백신 면역보강제 제품의 개발 및 판매가 이루어지고 있는 실정이다. 일례로, 녹십자수의약품의 한 면역보강제 기술은 미생물로부터 분비되는 독소 단백질과 미생물 자체를 유효성분으로 이용하는 기술을 개발하고, 제품 생산에 이용하였다 (특허등록 1013049830000, 2013, 녹십자수의약품(주)).

3. 고분자전달체

- 점막 백신은 전신 면역계에 항원특이적인 면역 반응을 유도하고, 주사바늘에 의해 매개되는 감염이나 통증에 대한 공포가 없다는 장점이 있다. 그럼에도 불구하고, 효과적인 고분자 전달체의 부족으로 현재 사용 중인 점막 백신의 수가 극히 적으며, 백신 효율도 높지 않은 실정이다. 따라서, 안전하고 효과적인 점막 고분자 전달체 개발을 통한 점막 면역 효과 증진 및 시스템 면역반응 유도가 절실하게 필요한 실정이다.
- 구체적인 연구 예시로, 면역글로불린 Y (IgY)와 티올화 메타크릴레이트계 고분자 복합체가 있다. 이는 계란 난황에서 추출한 면역글로불린 Y와 반응시켜 만든 티올화시킨 메타크릴레이트를 폴리비닐알코올 용액 하에서 반응시켜 생성한다. 이 합성된 물질은 위장 내 환경에서 더 안정화된 모습을 보이며, IgY를 통해 유발된 간접 면역 유발 등으로 동물의 설사병을 예방에 효과적일 것으로 기대되는 고분자 백신 전달체이다 (출원 번호 1020140079599, 2014, (주)크로엔리서치).
- 또 다른 연구 예시로, γ -PGA(Poly- γ -glutamic Acid)의 카르복실산 그룹과 친유성 물질인 콜레스테롤을 self-assembly로 결합하여 γ -PGA 나노마이셀을 제조하였다. 이에 인플루엔자 바이러스를 고분자 전달체에 담지해 기존 점막면역 반응과 비교했을 때, 고분자 전달체를 활용한 그룹에서 중화항체 역가가 27-28배증가하고, 세포성 면역 반응에서 3배 이상 증가하는 등의 효과적인 점막 면역 능력 향상을 확인하였다 (임용택, 2013).

■ 폐길화된 키토산 미립자를 활용해 *Bordetella bronchiseptica* Dermonecrotxin (BBD)를 담지해, 이것이 돼지의 위축성 비염의 예방용 백신으로써의 기능을 평가한 내용도 있다. 폐길화된 키토산 미립자는 BBD 단백질을 보호하는 한편, 장내 점착성을 증가시켜 상대적으로 긴 시간동안 점막 면역을 일으킬 수 있도록 돕는 효과적인 보조 역할을 수행함으로써 고분자 전달체의 또 다른 가능성을 보여주었다 (등록번호 1011169400000, 2012. 조종수 외).

제2절 해외 기술개발 현황

■ 최근 동물건강과 관련된 이슈는 축산업 관련 사업에 새로운 수익 성장의 기회를 제공하고 있다. 또한 개발도상국가의 육류 및 유제품에 대한 수요 증가는 지속적으로 성장할 것으로 예측되고, 농축산을 포함한 전체 동물용의약품 시장은 향후 급속도로 확대될 잠재가치가 높은 시장이다 (장희원, 2016).

■ 현재 세계 동물용의약품은 약 250억 달러 규모이며, 향후 연간 4~5%의 매출액 성장률이 예상된다. 특히 식용동물용의약품은 언제나 수의학 분야에서 가장 매출 비중이 높은 제품군으로 알려져 있으며, 2014년 세계 식용동물용의약품 매출은 전체 시장의 약 59% (141억 달러)를 차지하고 있다 (장희원, 2016).

■ 수의 동물 약품은 2014년 기준 매출로, 미주 대륙에서 전 세계의 약 47% (약 112억 달러)의 매출이 발생하고, 유럽연합 (EU)가 약 31% (약 74억 달러) 차지하고 있고, 나머지 국가들이 22% (약 53억 달러)의 매출 비중을 차지하고 있다 (장희원, 2016)

■ 또, 동물용의약품 시장이 주요 선진국을 중심으로 활성화되어 있음에도 불구하고 이머징 마켓의 신흥개발도상국들이 적극적으로 현대농업을 받아들임에 따라, 동물용의약품 산업에서 핵심적인 성장분야인 백신과 제약품에 대한 요구가 커져가고 있는 상황이다. 특히, 중국의 동물용의약품 매출은 그 어느 나라보다 빠르게 성장하고 있는데, 중국 동물용의약품 협회 (China Veterinary Drug Association, CVDA)에 따르면 2014년까지 지난 6년간 중국의 동물용의약품 매출의 연평균 성장률은 13.64%로 매우 높은 수준을 유지하고 있다 (장희원, 2016).

■ 그 중에서도, 중국 동물용의약품 매출의 95% 이상은 가축부문에서, 또 그 절반 이상은 양돈산업에 기인하고 있다. 이는 중국이 세계적인 돼지고기 생산 선도국가인 것과 연관이 깊기 때문인데, 최근 생산규모의 증가와 함께 돼지관련 질병 또한 급격하게 증가하고 있는 실정이기 때문에, 앞으로 돼지 백신 분야에 대한 성장가능성은 매우 무궁무진하고 국제적으로 중요한 상태이다.

1. 단백질 백신

가. 돼지유행성설사병

- 돼지유행성설사병 바이러스는 그 병원성을 지니는 단백질을 Spike protein이라 부르는데, 이는 아미노산의 배열에 따라 1번에서 789번까지로 구성된 S1과 790번에서 1383번까지로 구성된 S2로 구성된다고 알려져 있다 (D. Sun *et al.*, 2006). 그 중에서 S1 도메인은 돼지 아미노펩티다아제 N에 결합하는 역할을 하면서 세포 내로 침입하는 역할을 한다 (C. Liu *et al.*, 2015). 때문에 아단위 백신 등의 단백질 백신에서는 주로 S1 도메인을 발현시켜 이를 백신으로 이용하고자 하는 시도들이 많았다.
- 최근에는, S1 domain의 병원성을 높이기 위해 효모, 곤충, 포유류 세포주를 이용하여 이를 발현하는 시도가 있었고, 돼지설사병바이러스가 속한 코로나 바이러스는 당질화가 되어있기 때문에 이를 통해서 기존 박테리아 등에서 발현한 S1 도메인 단백질에 비해 뛰어난 백신의 효과를 개발할 수 있던 사례가 있다 (Makadiya *et al.*, 2016).

나. FMD 바이러스

- FMD 바이러스를 치료 및 예방하기 위한 단백질 백신들은 대개 항원결정부 (epitope)만을 인위적으로 대장균 등에서 생성이 되도록 하는 방법이 대부분이다. 그러나, 이들은 inclusion body의 형태로 생산이 되면서 본래의 기능을 제대로 수행하지 못하거나, 간혹 수용성의 단백질이 생산되었어도 경구 투여 시 기능 상실 등 면역반응을 유발시키지 못하는 것이 대부분이었다.
- 이를 극복하기 위해, 최근 대장균에서 FMD 바이러스의 외피단백질들(VP0, VP1, VP3)을 함께 발현 (co-expression)시킴으로써 자연스럽게 단백질들끼리 바이러스 유사입자 (virus-like particle)의 구조를 띠게 만드는 연구가 있었다. 그 결과 한 번의 주입만으로 6개월 이상의 백신 지속 효과를 나타내면서, 동시에 대량 생산에도 용이하여 실제 산업에 적용할 수 있는 효과적인 백신 생성 기술이 생겼다 (Xiao Y *et al.*, 2016).

2. 면역보강제 생산 유산균

- 박테리아 중에서도 유산균의 경우 비병원성이며 안정된 상태와 유전자 조작의 간편성 때문에 점막 백신접종에 있어 효과적인 수단으로 기대되고 있다 (Wells JM *et al.*, 2008). 그 이유는 락토바실러스 속 (*Lactobacillus spp.*)에 속하는 많은 종들은 상피세포의 형태인지 수용체에 결합하기도 하고 (Wells JM, 2011), 수지상세포와 상호작용을 하면서 T 세포 반응을 조절하기도 한다고 알려져 있기 때문이다 (Mohamadzadeh M *et al.*, 2005). 때문에 최근 점막 백신이나 치료용 생리물질의 전달체로서의 유산균이나 균 그 자체로서의 면역보강제 기능 강화 유산균을 개발한 연구들이 있다.

■ 한 연구에서는 락토코커스 락티스의 한 균주 (*Lactococcus lactis* IBB477)가 점막점착성을 띠는 성질이 있어 인플루엔자 바이러스에 대한 경구 백신 접종의 전달체로써 가능성을 제시하였다 (Radziwill-Bienkowska JM et al., 2014).

■ 또 다른 연구에서는 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)에 CCL3Gag라는 케모카인 (chemokine)의 종류 중 하나인 CCL3와 HIV-1의 항원 단백질인 Gag가 같이 그 표면에 발현이 되도록 조절함으로써, 결과적으로 항원단백질에 대한 면역세포들의 인지능을 높인 연구가 있다 (Katarzyna Kuczkowska, 2015).

3. 고분자 전달체

■ 아단위 백신과 같은 단백질 백신이 가지는 낮은 면역원성을 극복하기 위한 방법 중 하나로 고분자 등을 이용한 백신 전달체의 개발이 최근 많이 이루어지고 있다. 특히 적합한 항원 표지 (antigen presentation), 엔도솜 탈출 (endosomal escape), 세포 내 추적 (cellular trafficking) 등 그 목적에 따라 물리화학적 성질에 변화를 준 다양한 전달체들이 개발되고 있다.

■ 특히 고분자 나노파티클의 경우, 리포솜 형태의 전달체가 가지는 생체적합성, 안전성 등의 장점을 가짐과 동시에 생분해가 가능한 다양한 소재들이 개발되고 있다. 이들은 다시 크게 자연에 존재하는 소재들과 인공합성 소재들로 나뉘는데, 자연적인 소재로는 단백질 기반의 알부민 (albumin), 젤라틴 (gelatin) 혹은 탄수화물 기반의 덱스트란 (dextran), 키토산 (chitosan), 사이클로덱스트린 (cyclodextrin) 등이 있고, 인공적 소재로는 폴리에스터 복합체, 폴리아민 복합체, 폴리무수물 등이 있다.

■ 한편, 만노오스로 당화시킨 키토산을 나노입자화하여 FMD 바이러스에 대한 DNA 백신의 전달체로써 사용한 예가 있는데, 전달체를 이용함으로써 근육주사와 비강 내 주사 시 모두 면역 반응에 긍정적인 효과를 일으켰다 (Nanda RK et al., 2014).

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제1절 총괄 연구개발 추진전략

1. 연구개발개요

본 과제에서는 가축질병에 대응하기 위해 고효율 미생물 발현시스템을 이용하여 백신후보단백질과 면역보강 후보 단백질을 생산기술을 확립하고 가축의 점막면역반응을 효율적으로 유도하기 위하여 고분자코팅기술을 접목하는 백신을 개발하고자 하였다. 본 연구과제에서 개발하고자 하는 질병은 돼지유행성 설사병 (PED)와 구제역 (FMD) 이다. 현재 이 두 질병을 예방하기 위한 백신은 다음과 같은 문제점이 있다. 첫째, 주사백신은 농가에서 사용이 불편하며 호흡기 및 경구를 통한 감염바이러스에 비적합한 백신접종 경로를 가지고 있다. 둘째, 현재의 경구 및 호흡기용 아단위 백신은 소화장관을 거치며 분해되기 쉽고, 아단위 백신 자체의 낮은 면역원성 때문에 백신의 효율이 낮다. 셋째, 국내의 아단위 백신의 독자적 생산 기술의 취약하다. 마지막으로, FMD의 경우 원인이 되는 바이러스의 strain이 다양하여 하나의 백신으로 모든 FMD를 예방할 수 없는 문제가 있다. 이 문제를 해결하기 위해 다양한 epitope와 M 세포 표적형 펩타이드를 포함하는 항원단백질을 디자인하고, 그 생산 시스템을 구축하였으며, 면역원성을 높이기 위한 면역보강제를 탐색하고, 효율적인 전달을 위해 고분자 시스템을 도입하였다.

이 과제를 추진하기 위한 전략 첫 번째 전략은 대장균과 유산균을 이용한 효율적인 발현시스템을 구축하는 것이다. 대장균의 경우 고농도 배양 프로세스를 개발하고, 유산균의 경우 발현율을 높여주는 벡터시스템을 개발하였다. 둘째, 개발된 아단위 백신과 면역보강제에 M 세포 표적형 기술을 도입하여 더욱 효과적으로 장점막에서 흡수되어 면역반응을 유도하였다. 세 번째, 고분자 및 유산균을 이용하여 각종분해효소로부터 백신을 보호할 수 있는 안정적인 전달 시스템을 개발하였다. 마지막으로, 산업적 이용을 위해 종합적인 대량생산 시스템을 구축하였다.

본 과제에서 개발된 기술은 해당 가축질병에 대한 간편하고 효과적인 방제 체계를 확립과 가축의 생산성 향상에 크게 기여하는 경제적인 백신체계가 될 것으로 예상하며, 더 나아가 국외로 수출이 가능할 것으로 기대된다 (그림 11).

2. 연구개발전략

본 과제에서 PED 및 FMD 백신을 개발하기 위하여 1세부과제에서는 “M 세포 표적형 항원 및 면역보강 단백질 개발 및 생산”을 목표로 PED 및 FMD 항원을 단백질 생산 시스템을 대장균에서 확립하고 cytokine 면역보강제를 생산 유산균을 개발하였다. 2세부과제에서는 “점막면역백신의 체내 전달 효율 증진을 위한 가축백신 담지 고분자 전달체 개발 및 생산”을 목표로 Hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP), cellulose phthalate acetate (CAP) 및 Eudragit 등의 고분자를 이용한 개선된 백신 전달체를 개발하였다. 1협동과제에서는 “병원체 공격접종을 통한 표적형 점막면역 백신 효과 실증 연구”를 목표로 제1세부 및 2세부에서 개발한 백신제형 및 고분자 제제를 활용한 목적동물 효율 평가 실험을 통해서 그 효과를 검증하였

다. 2협동과제에서는 “표적형 점막면역 백신 산업적 대량생산체계 확립 및 산업화 추진”을 목표로 1세부 및 2세부에서 개발된 자원들을 대장생산 체계를 확립하고 가축 점막면역 백신의 산업화를 추진하였다 (그림 12).

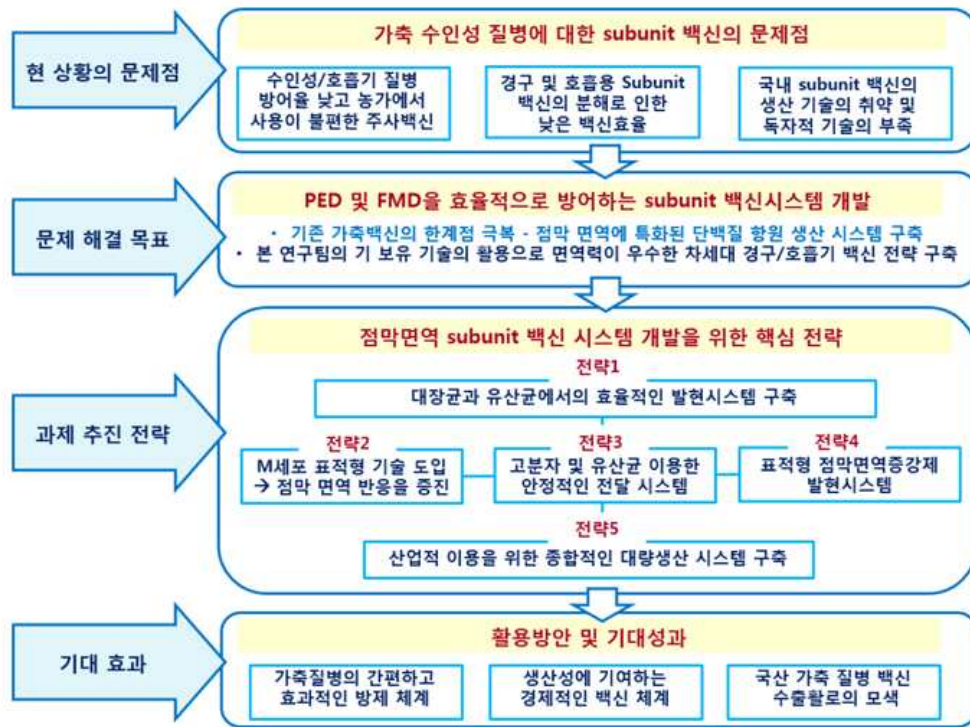


그림 11. 연구 개발 개요

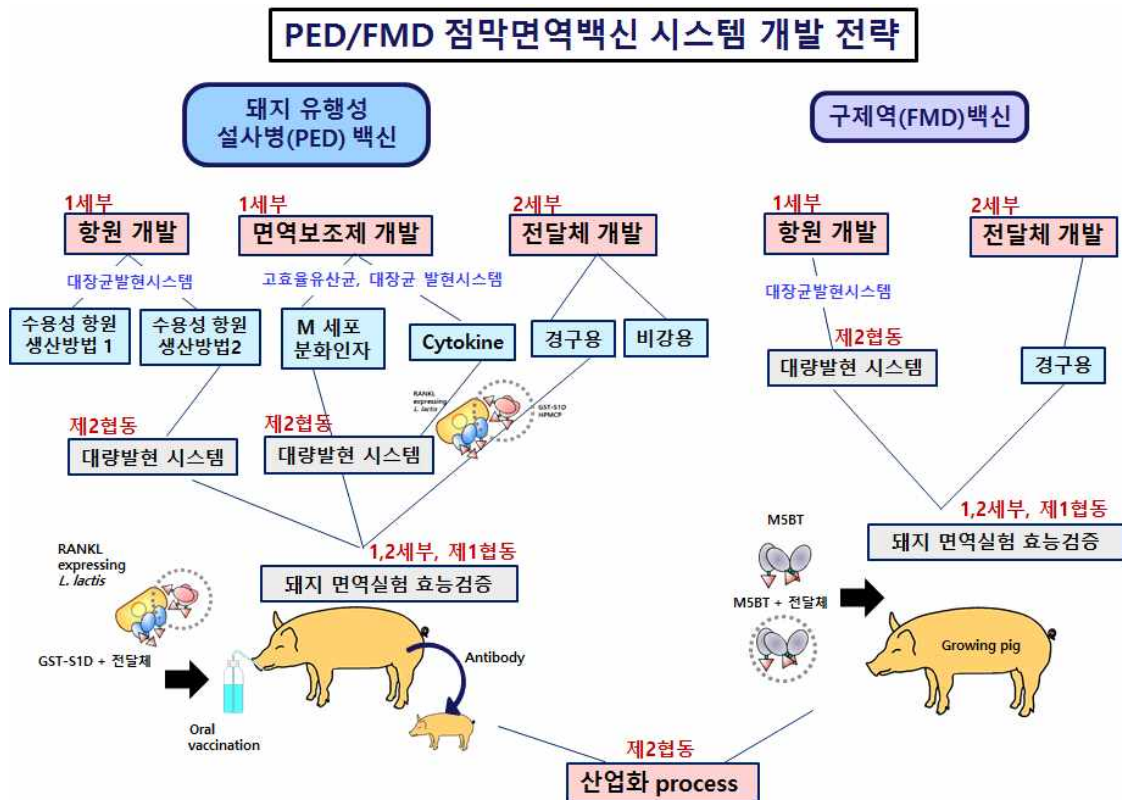


그림 12. 연구개발전략

제2절 1세부과제 : M 세포 표적형 항원 및 면역보강 단백질 개발 및 생산

1. PED 바이러스 항원 단백질 생산 및 검정

가. PED 바이러스 유래 항원 단백질 생산 전략

(1) PED 바이러스 spike protein 유전자 클로닝

본 세부과제에서는 PED 바이러스 Spike protein 항원 단백질 유전자를 클로닝하기 위하여 서울대학교 수의대 바이러스학 연구실로부터 국내 농장에서 분리한 PED 바이러스 PPIV756 strain을 분양 받았다. PED 바이러스 Spike protein의 경우 아래 그림1에서 나타낸 바와 같이 총 1383개 아미노산으로 구성되어 있으며 S1과 S2 domain으로 나눌 수 있다. Spike protein의 경우 S1 domain의 499-734 a.a. (또는 789) 영역에 주요 중화항체 epitope가 분포되어 있다고 알려져 있기에 이 영역을 클로닝 영역으로 선정하였다. 그리하여 야생 바이러스주의 클로닝 영역 서열을 확보하고자 1-734 a.a. 영역에 대한 서열 분석 (sequencing)을 진행하였다 (그림13).

PEDV Spike protein

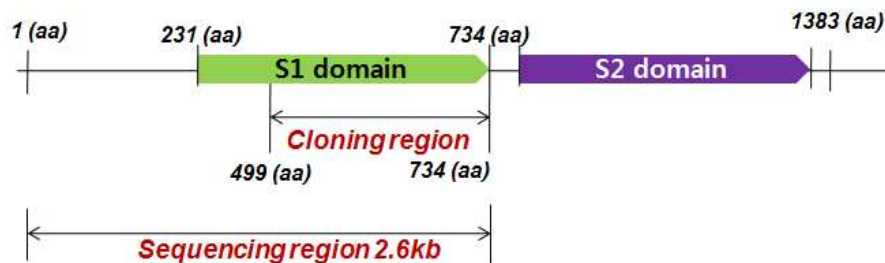


그림 13. PED 바이러스 Spike protein 클로닝 영역

(2) PED 바이러스 항원 생산 결정

다수의 해외저널을 검색하여 연구한 결과 PED 바이러스의 S1 domain에 더 효과적인 중화항체 영역이 존재하는 것으로 밝혀졌다. 그리하여 137개 아미노산으로 이루어진 COE (co-equivalent 26 kDa) 와 152개 아미노산으로 이루어진 S1D (D region of S1 domain)을 발현 영역으로 선정하였다. 현재까지 S1 domain 영역을 수용성 항원 형태로 효과적으로 생산한 예가 전무하여 추가 수용성 항원 단백질 생산 전략이 필요하였다 (그림 14).

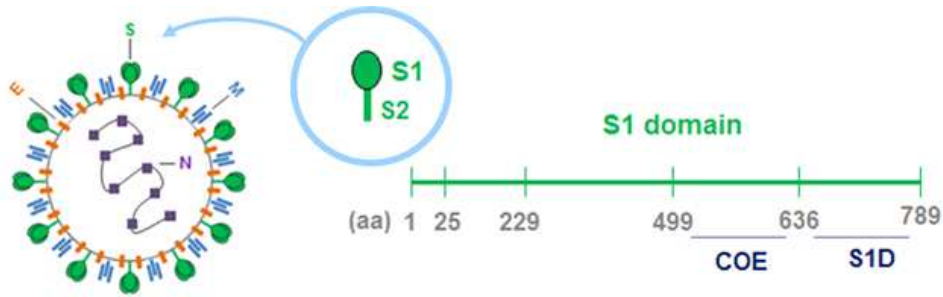


그림 14. PED 바이러스 구조단백질과 S1 도메인의 클로닝

나. 수용성 PED 항원 단백질 생산법

(1) Chaperone co-expression system

(가) 항원단백질 생산

본 연구에서는 2년차에 대장균에서 수용성 항원 단백질을 발현하고자 chaperone co-expression system을 이용하였다. 이 시스템은 단백질의 folding에 관여하는 여러 종류의 chaperone 단백질과 목적 단백질을 대장균 세포질에서 공동 발현을 함으로써 목적 단백질의 적절한 folding이 이뤄질 수 있게 하는 것이다. 본 실험에서는 BL21에 각각 pTF16, pGro7, pG-KEJ8 등과 같은 chaperone 단백질 발현 벡터가 들어있는 competent cell에 pGEX 5x-1::GST-C1, pGEX 5x-1::GST-C3 벡터를 각각 삽입한 재조합 균주를 이용하였다. 목적 단백질 발현을 위한 실험은 먼저 5 ml LB 배지에 ampicillin (100ug/ml), chloramphenicol (20 ug/ml) 항생제를 첨가한 후 37 °C에서 O/N 배양을 하였다. 이튿날 25 ml 같은 배지에 균을 1/1000로 접종 후 L-arabinose를 첨가하여 chaperone 단백질을 목적 단백질 발현 전에 미리 37 °C에서 발현 유도 하였다. OD₆₀₀ 값이 0.6이 될 때까지 균을 배양하고 나서 flask를 4 °C 냉장고에서 30 분 보관하여 온도를 낮춘 후 IPTG 0.1 mM을 첨가하여 목적 단백질을 15 °C에서 24 시간 발현유도 하였다. 결과적으로 chaperone 단백질을 공동으로 발현하였을 때 목적 단백질이 수용성으로 발현되는 것을 확인 할 수 있었으며, 그중에서 trigger factor (TF)의 효과가 가장 좋았다 (그림 15).

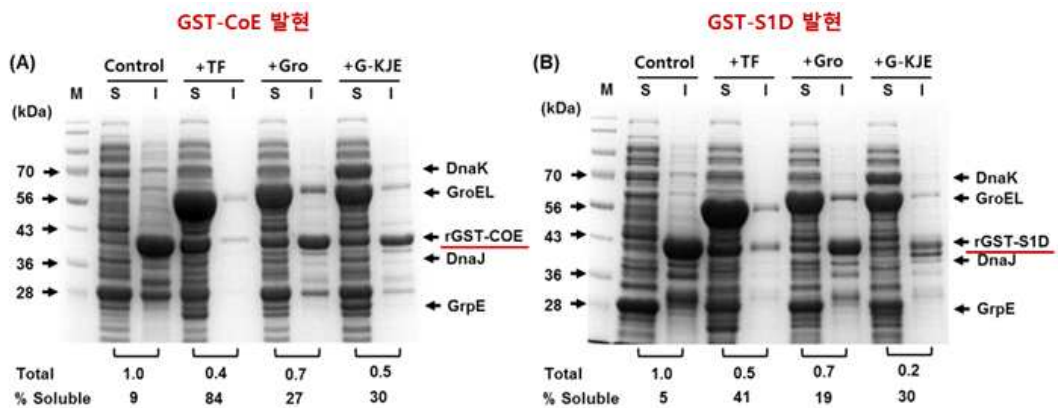


그림 15. Chaperone 단백질 동시발현을 통한 soluble PED 바이러스 아단위 단백질 생산

(나) 항원단백질 특성 규명

그 다음으로 GST resin 친화크로마토그래피 정제기법을 통하여 순도가 비교적 높은 목적 단백질을 정제하였으며 정제된 단백질은 anti-GST 항체와 PED 바이러스 백신을 접종한 동물의 혈청을 이용하여 western blot 분석기법을 통하여 정제된 단백질이 목적 단백질임을 확인하였다. 또한 정제된 단백질이 실제 PED 바이러스를 면역한 돼지의 혈청과 반응성을 가지는지 알아보았다. 실험은 96 well immunoplate (SPL)에 각각의 정제된 단백질 (0.1 ug/ml)을 carbonate buffer (pH 9.6)을 이용하여 코팅한 다음 PED 바이러스 약독화 생백신을 접종하였던 돼지 항혈청을 1:1000으로 희석하여 1차 항체로 사용하였으며, swine anti-IgG HRP를 1:2000으로 희석하여 2차 항체로 사용하였다. 결과적으로 GST-C1과 GST-C2 항원 단백질 모두 PED 바이러스 돼지 항혈청과 반응한 반면 대조구인 GST 단백질은 반응이 약한 것을 확인하였으며, GST-C2의 경우 GST-C1 보다 더 강하게 항혈청과 반응하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 현재 대장균에서 chaperone co-expression 시스템을 적용하여 발현한 수용성 항원 단백질의 표면에 실제 PED virus의 spike protein의 표면에 존재하는 epitope와 구조적으로 동일하거나 유사한 epitope가 존재한다는 것을 의미하며 또한 반대로 항원 단백질을 백신으로 사용하였을 때 실제 PED virus를 인식할 수 있는 항체의 생성이 가능하다는 것을 짐작할 수 있다 (그림 16)

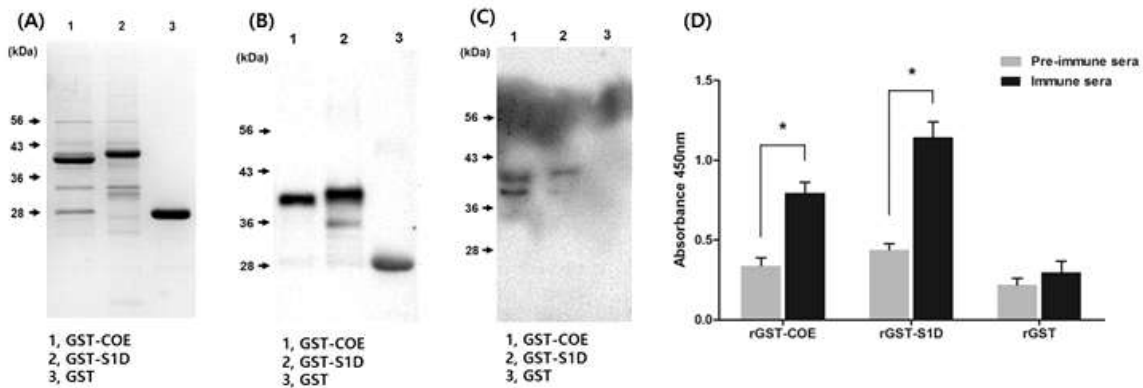


그림 16. (A) 항원단백질 생산 후 정제, (B) 정제단백질 Anti-GST antibody를 이용한 western blot, (C) 정제단백질 PED 바이러스 vaccine pre-immunized 동물의 sera를 이용한 western blot assay, (D) pre-immunized 동물의 sera를 이용한 ELISA

(2) Alkaline pH에 의한 inclusion body 용해

(가) 항원단백질 생산

본 연구팀에서는 수용성 항원 단백질 생산의 대안으로 inclusion body로부터 solubilization 및 refolding 방법을 통하여 수용성 항원 단백질을 대량으로 생산하는 방법을 확립 하고자 하였다. Inclusion body를 원료로 수용성 항원을 생산하는 과정에 있어서의 가장 큰 문제점은 수용성 항원 단백질이 refolding 과정에서 다시 aggregation 되어 생산 효율이 낮거나 생산 공정이 다소 복잡하며 많은 시간이 소요된다는 것이다. 본 연구팀에서는 생산 효율이 높으며 보다 간편

한 방법으로 수용성 항원 단백질을 생산하기 위하여 Conventional (Method 1), Mild detergent (Method 2), Alkaline NaHCO₃ (Method 3), alkaline pH & acetone PPT (Method 4) 등 4가지 방법을 비교 시험하였다. 시험결과 Method 1, 2, 3의 경우 생산성이 낮은 문제점이 (<5mg/1L culture) 있었고 Method 4의 경우 수용성 항원 단백질을 100mg/1L culture 수준으로 대량 생산 가능하다는 것을 확인하였다. 간략하게 설명하면 Method 4는 alkaline pH solubilization (10mM Tris-HCl, pH12.5) 방법으로 inclusion body를 용해한 후 acetone precipitation 방법으로 단백질을 침전 후 다시 원하는 buffer에 침전된 단백질 pellet을 용해하여 수용성 단백질을 생산하는 과정으로 구성되었다. Alkaline pH & acetone PPT 방법으로 생산한 4가지 수용성 항원 단백질을 SDS-PAGE 상에서 보여주고 있다. 이렇게 생산한 단백질의 순도는 대략 50%~80% 도달하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 17).

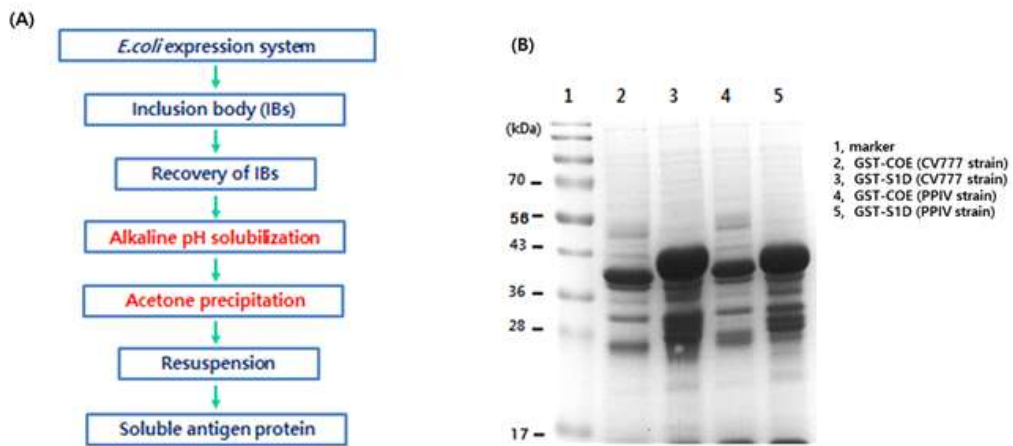


그림 17. (A) Alkaline pH & acetone PPT 방법 모식도, (B) re-solubilization된 항원 단백질 (SDS-PAGE)

다. 항원 단백질 마우스 면역 실험

Chaperone 방법과 alkaline pH & acetone 방법을 이용하여 생산한 GST-S1D GST-COE 등 수용성 항원 단백질들의 항원성 및 중화항체 생성 여부를 검증하고자 Balb/C 마우스에서 면역 시험을 하였다. 그룹 편성은 5개 그룹을 두었으며 항원은 10 ug/dose로 CFA/FA 면역보강제와 함께 피하로 주사하였다 (표 1). 시료는 6주에 걸쳐 2주에 한번씩 총 4번의 혈액을 채취했으며 2주 간격으로 항원은 총 3번 접종하였다.

면역시험 후 마우스 혈중 항원 특이적 IgG의 수준을 ELISA 기법으로 측정한 결과를 나타내었다. 결과적으로 PBS를 제외한 모든 그룹에서 항원 투여 후 2 주 간격으로 혈청에서의 항원 특이적 IgG 수치가 증가하는 것을 확인하였으며, chaperone 방법으로 생산한 항원 단백질에서 acetone 방법으로 생산한 항원 단백질 보다 높은 IgG 수준을 보였다. 이는 chaperone으로 생산한 항원 단백질의 경우 구조적으로 folding이 보다 적절하게 이루어졌을 가능성 때문일 수 있다. 또한 S1D (499 - 636 aa) 영역에서 COE (637 - 789 aa) 영역 보다 높은 IgG 레벨을 보였다. 그리고 6 주차 혈청 중화항체를 측정한 결과를 나타내었다. 결과적으로 chaperone 방법으로 생산한 항원에서 acetone 방법으로 생산한 항원 보다 2 배 높은 중화항체가 생성되는 것을 확인하였으며, 영역 간의 큰 차이는 보이지 않았다 (그림 18).

이 연구를 통해 생산된 항원 단백질의 PED 바이러스에 대한 아단위 백신으로써의 높은 활용 가능성을 확인하였으며 APP를 통해 생산된 단백질이 생산량이 높고 편리하여 높은 사용화 가능성을 확인하였다.

표 1. 마우스 면역 실험 그룹 배치

No.	시료	마우스	마리	방식	투여량	Adjuvant.	비고
1	NC	Balb/C	5	-	-	-	Non-immunized control
2	GST-COE	Balb/C	5	피하주사	10ug	CFA/FA	Chaperone 방법 생산
3	GST-S1D	Balb/C	5	피하주사	10ug	CFA/FA	"
4	GST-COE	Balb/C	5	피하주사	10ug	CFA/FA	Acetone PPT 방법 생산
5	GST-S1D	Balb/C	5	피하주사	10ug	CFA/FA	"

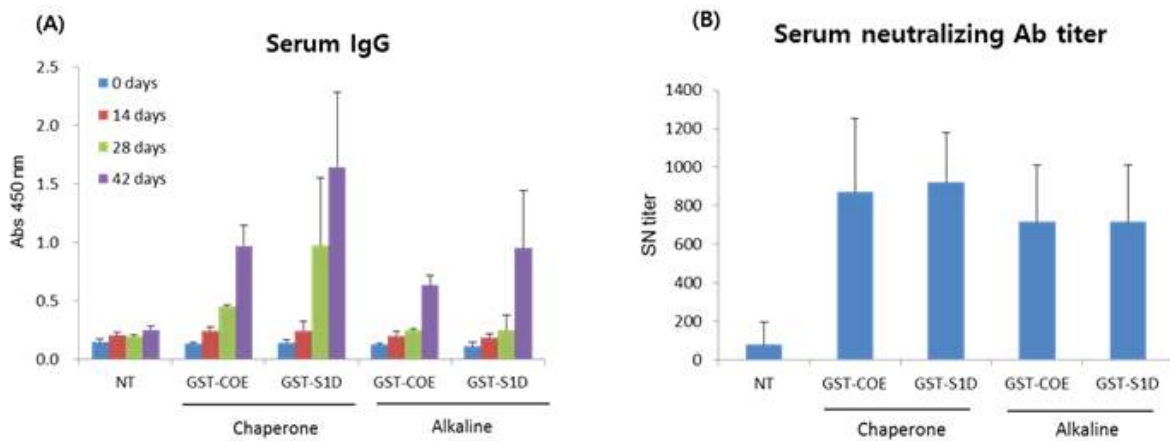


그림 18. 혈중 항원단백질 특이적 IgG 측정 및 중화항체 반응 확인

2. FMD 바이러스 항원 단백질 생산 및 검정

가. 백신 활용 위한 FMD 바이러스 유래 항원 단백질 생산 전략

FMD 바이러스 항원으로서 아단위 백신의 경우에는 바이러스의 변이에 민감하게 백신의 효과가 줄어드는 단점이 있다. 다양한 FMD 바이러스 변종에 대응하기 위해서 multi-epitope 전략을 도입하였다. 여러 학술논문을 검색해 본 결과, FMD 바이러스의 VP1 단백질에는 GH loop라고 하는 외부에 노출된 단백질 서열을 가지고 있다. 이 GH loop에는 RGD 모티프를 가지고 있어 우제류 동물의 integrin과 결합하여 감염되는 기작을 가지고 있다. 이를 예방하기 위해 이 GH loop에 대한 항체가 생성되는 것을 유도할 필요가 있다. GH loop 부분을 활용한 multi-epitope 전략을 도입하여 바이러스의 변종에도 유연하게 반응할 수 있도록 아단위 백신을 디자인하였다. 수용성 단백질을 생산하기 위해 FMD 바이러스 VP1 단백질의 구조를 분석한 결과 RGD 모티프 이후 8 개 아미노산은 펩타이드 특유의 나선구조 (α -helix)를 형성한다는 것을 알게 되었다. 그래서 단백질이 안정적으로 생성을 위해 내부적으로 2차 구조를 가지는 펩타이드를 선택하기 위해 클로닝 위치를 VP1 단백질의 136 - 162 aa 부분으로 선정하였다. 그리고 기존에 조사되었던 중화 아미노산 서열을 분석하여 대표적인 5 가지의 서열을 선택하게

되었다. 또한 아단위 백신의 낮은 면역성을 극복하기 위해 면역반응의 중간단계인 T 세포를 쉽게 활성화 시키는 것으로 알려진 FMD 비구조 단백질인 3A의 T cell epitope 아미노산 서열 (AAIEFFEGMVHPSIK)을 추가하였다 (그림 19).

No	Year	Accession number	GI number	country
A	2000	adv53920	157400640	China
B	1963	acc63126	183579030	Belgium
C	2000	cac51271	15212003	Korea
D	2010	afd50726	380294880	Korea
E	2010	aaq92301	37519568	Kenya

→ 국내에서 빈번하게 발생하는 FMDV Type O의 다양한 변이종에 대한 핵심 항원영역 (GH loop)에 대한 유전정보 취합, 병렬형 재조합 항원 단백질 생산

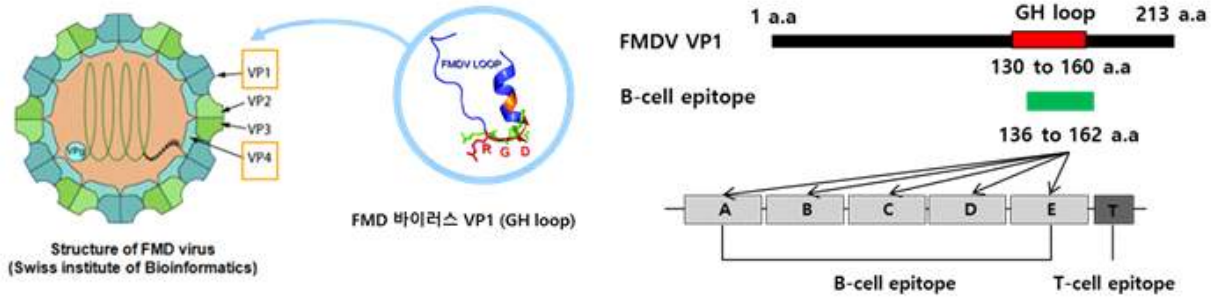


그림 19. FMD 바이러스의 B-cell epitope 선정과 단백질 디자인

나. FMD 바이러스 항원 단백질 유전자 클로닝 및 단백질 발현

(1) 항원 단백질 클로닝

앞서 추려낸 아미노산 서열을 이용하여 하나의 연속적으로 연결되는 항원을 구성하였다. 구성된 항원은 총 4개로 M 세포 표적형 펩타이드가 도입된 연속 서열 FMD 항원 단백질과 도입되지 않은 항원 단백질, 그리고 기존에 실험실 자원으로 가지고 있던 모델 항원 BmpB와 M 세포 표적형 BmpB가 도입된 항원과 연결시킨 항원 단백질을 구축하였다. 그리하여 FMD 바이러스 항원인 5BT와 M 세포 표적형 펩타이드가 도입된 M5BT, BmpB가 도입된 B5BT, MBmpB가 도입된 MB5BT로 총 4개의 단백질을 발현할 수 있는 각각의 대장균 벡터로 구축하였다. 위에서 구성한 항원 생산 유전자를 합성하여 대장균 발현 벡터로 널리 사용되는 pET21a 벡터에 Nde I과 Xho I 제한효소를 이용하여 유전자를 자른 후 ligation 되어 삽입되었다. 5BT의 경우에는 504 bp, M5BT 552 bp, B5BT 1281 bp, MB5BT 1332 bp 크기이다. 이 클로닝 된 벡터를 heat shock transformation 방법을 통해 발현균주에 삽입하여 단백질 발현을 확인하였다 (그림 20).

(2) 대장균 배양과 단백질 발현 유도

발현 균주로 사용된 대장균은 Novagen의 BL21 (DE3) 균주를 이용하였다. LB 배지에서 배양하여 OD₆₀₀의 과장에서 0.6 일 때 lactose 유사체인 IPTG 1 mM로 단백질 발현을 유도하고

4 시간을 배양하였다.

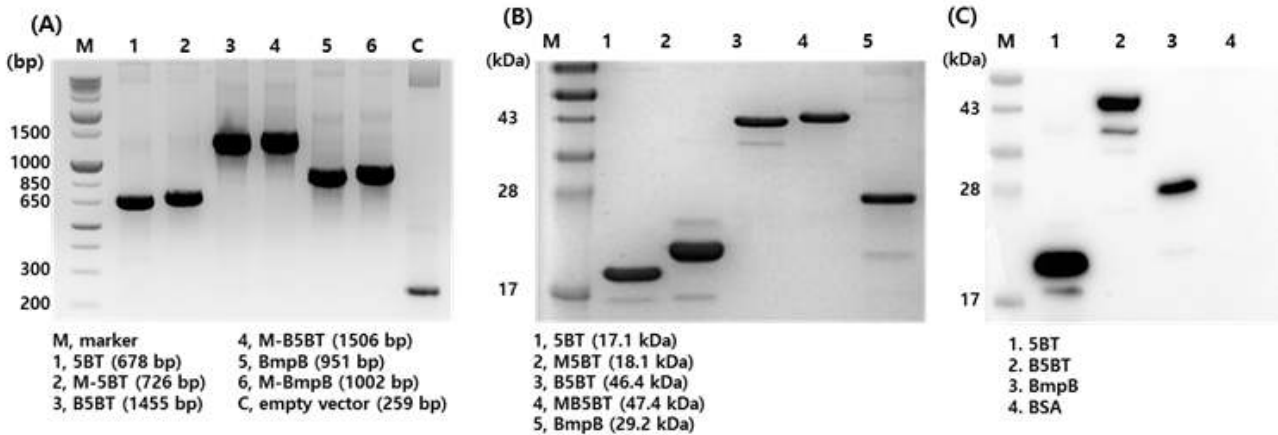


그림 20. (A) 대장균 발현용 plasmid에 삽입된 유전자 증폭 후 전기영동을 통해 확인, (B) 각 plasmid가 transformation이 된 대장균을 통해 단백질의 생산 후 정제한 것을 SDS-PAGE를 통해 확인, (C) Anti-Histag antibody를 이용하여 표적단백질의 여부를 western blot을 통해 확인.

(3) 단백질 발현 확인 및 정제

단백질 발현을 유도하고 4 시간의 배양시간 이후에 대장균을 모아서 sonication 방법을 통해 대장균의 세포벽 안에 있는 단백질을 회수하였다. 먼저 이 단백질이 백신으로 효과가 있는지 검증하기 위해 M 세포 표적형 펩타이드가 도입되지 않은 두 가지 단백질 (5BT, B5BT)를 먼저 발현해보았다. 회수한 단백질을 SDS-PAGE에서 분석해 본 결과 유의적으로 과발현 되는 양상을 보였다. 5BT의 경우에는 soluble한 단백질이 나온 만큼 inclusion body도 일부 발현 되었으며 기존에 실험실에서 모델항원으로 사용하던 BmpB의 경우에는 inclusion body가 발현되지 않은 만큼 B5BT에서 BmpB를 도입하였을 때 inclusion body이 생성되지 않은 결과를 보였다. 단백질의 정제는 벡터에 도입된 his-tag 펩타이드를 이용하여 정제되었다. his-tag는 히스티딘 아미노산 6개가 이어진 펩타이드 서열이며 이 펩타이드를 이용하여 친화 크로마토그래피로 정제하기 위해 NTA (Nitrilotriacetic acid) 레진을 이용하였다. 이 NTA 레진은 금속이온을 킬레이트하여 히스티딘의 음전하와 배위공유결합을 통해 결합되어 정제되는 형태의 친화크로마토그래피 (affinity chromatography)이다. 정제된 단백질은 각각 SDS-PAGE를 통해 분석되었고 western blot은 현재 FMD 단백질을 인식하기 위한 항체가 상용으로 판매되지 않기 때문에 his-tag를 인식할 수 있는 항체를 이용하여 탐지하여 해당 단백질이 목적 단백질임을 검증하였다. Flask 수준에서 1L 배양 당 단백질의 발현량은 5BT의 경우 42mg이고 B5BT의 경우 11.6mg 이다 (표 2).

표 2. Flask 수준에서 단백질 발현 양

Protein	mg/1L culture
5BT	42
B-5BT	11.6

다. 항원단백질 마우스 면역실험

(1) 마우스 면역실험 계획

생산과 정제 및 농도 측정이 완료된 FMD 바이러스 항원을 검증하기 위해 돼지 등 목적동물에서 검증하기 이전에 실험실 차원에서 mouse를 통해 검증하기로 하였다. 마우스는 흰색 쥐 Balb/c mouse 6 주령 암컷을 사용하였다. 단백질은 근육주사를 통해 주입이 되었고 20 ug/40 ul/doses로 주입되었으며 그 중 절반은 첫 주입에서는 CFA (complete freund's adjuvant) boosting 2번은 IFA (incomplete freund's adjuvant)가 면역보강제로서 사용되었다. 계획은 0 주차, 2 주차, 4 주차에 각각 하지대퇴근에 주사되었고 양성대조군으로 현재 사용 중인 불활화 백신 (iFMDV)이 사용되었으며 음성대조군으로 PBS가 사용되었다. 그리고 접종 하루 전에 mouse의 혈액을 채취하였다 (표 3).

표 3. 마우스 면역 실험 그룹 배치

No.	시료	마우스	마리	방식	투여량	Adjuvant.	비고
1	NC	Balb/C	5	-	-	-	Non-immunized control
2	5BT	Balb/C	5	근육주사	20ug	CFA/FA	
3	B5BT	Balb/C	5	근육주사	20ug	CFA/FA	
4	iFMDV	Balb/C	5	근육주사	20ug	CFA/FA	

(2) 혈청분석 결과

마우스면역 실험에서 그룹별로 2주마다 채취한 혈액을 통해 시간이 갈수록 면역반응이 유도되는 양상을 알아보았다. 5BT가 코팅된 플레이트에 각 주차별로 채취한 혈청을 5 배로 serial dilution을 하여 주차별 5BT 특이적 항체의 titer 값을 도출해 냈다. 실험 결과는 5BT는 4 주차에 최고치에 다다르고 더 큰 면역반응을 유도하지 않는 것을 확인할 수 있었다. B5BT는 지속적으로 증가하는 양상을 보였다. 하지만 5BT 보다는 낮는데, 그 이유는 단백질의 양에 있는 것으로 생각된다. B5BT는 5BT보다 BmpB의 영향으로 단백질 크기가 크므로 같은 양을 주입했다면 B5BT의 양이 상대적으로 적게 주입되었기 때문에 면역반응 유도가 감소했을 수 있다. 이를 감안하여 주입을 한다면 더 효율 좋은 면역반응을 유도할 수 있을 것이다. 불활화 백신의 경우에는 아단위 단백질보다 적지만 음성대조군에 비하여 항체가 유의적으로 생성된다는 것을 알 수 있었다. 이는 iFMDV가 방어할 수 있는 바이러스를 본 연구팀이 개발한 항원도 방어할 수 있는 능력을 가지고 있음을 시사한다. 또한 마우스 면역실험을 통해 얻은 혈청을 Median diagnostic 회사의 VDpro FMDV type O ELISA를 이용하여 분석하였다. 이 kit는 동물이 FMD에 대한 감염여부를 진단하기 위해 사용되는 것으로 백신을 접종하였을 경우 생성되는 중화항체를 통해서 백신접종의 효율을 측정할 수 있다. sample의 결과를 키트에 제공되는 음성대조군의 결과로 나눠서 (SN value) 0.5 이하일 경우 양성으로 판정되며 0.5 이상일 경우 음성으로 판정된다. 5BT 단백질을 주입한 그룹은 그 값이 PBS를 주입한 그룹에 비해 $P < 0.001$ 인 유의적인 결과를 보였다. 또한 B5BT는 음성대조군 보다 $P < 0.01$ 인 유의적인 결과를 보

였으며 개발된 새로운 두 단백질 (5BT, B5BT)는 불활화 백신과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러므로 이 두 단백질은 백신으로서 사용될 수 있는 잠재성을 보였다. 또한 iFMDV에 사용된 바이러스와 키트에 사용된 바이러스는 같은 종이지만 새롭게 개발된 단백질 백신은 그렇지 않음에도 효과를 보인다는 의의를 가지고 있다 (그림 21).

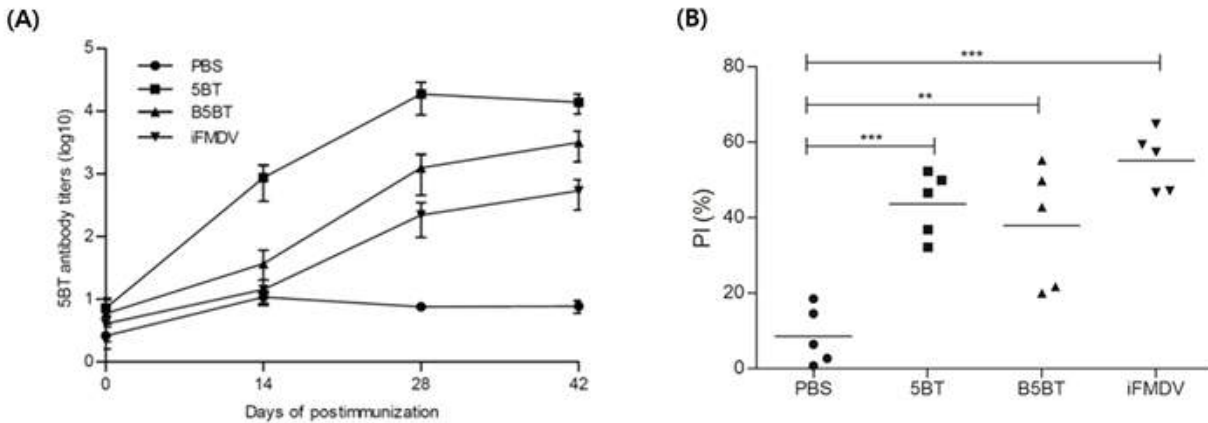


그림 21. (A) 접종 이후 시간에 따른 항체 증가 titer 측정, (B) FMD 바이러스 특이적 항체 생성 확인 (중화항체 시험 대체)

3. 고효율 유산균 단백질 발현 시스템 개발

가. 고효율 유산균 발현벡터 개발

(1) Reporter 유전자 도입

본 세부과제에서는 유산균용의 발현벡터로 pIL252유래의 *tuf* 프로모터, *BmpB* 항원 단백질 코딩 유전자, chloramphenicol에 대한 저항성을 지닌 *cat* 유전자, *pep N* 유전자 유래의 전사 터미네이터 *TpepN*, replication 단백질 E와 D, erythromycin에 대한 저항성 유전자 *ermAM*를 지닌 pIL.Ptuf.Mb 벡터 (그림 22) 를 사용하였다.

(가) Luciferase 유전자의 증폭

점막면역 백신 후보 항원 및 면역보강 단백질 대량생산을 위한 유산균용의 효율 좋은 발현 프로모터를 구축하기 위해, 전사효율을 쉽고 빠르게 측정하기 위한 reporter 유전자로 luciferase 유전자를 도입하고자 하였다. Luciferase 유전자 (165 bp) 는 Promega Corporation 에서 제공하는 pGL3 벡터에서 forward primer (GGAATTCCATATGGAAGACGCCAAAAC AT, 30bp) 와 reverse primer (TCCCC CGGGTTACACGGCGATCTTTCC, 28 bp) 를 이용하여 touch down PCR 기법으로 증폭 하였다. 또한 agarose gel 전기영동을 통해 luciferase 유전자가 증폭되어 1000bp와 2000bp 사이에 DNA band가 관찰되는 것을 간이적으로 확인하였다 (그림 23).

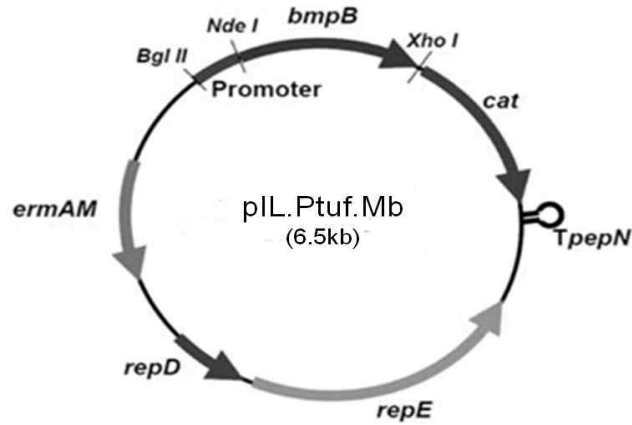


그림 22. 본 연구에서 사용한 유산균용의 벡터

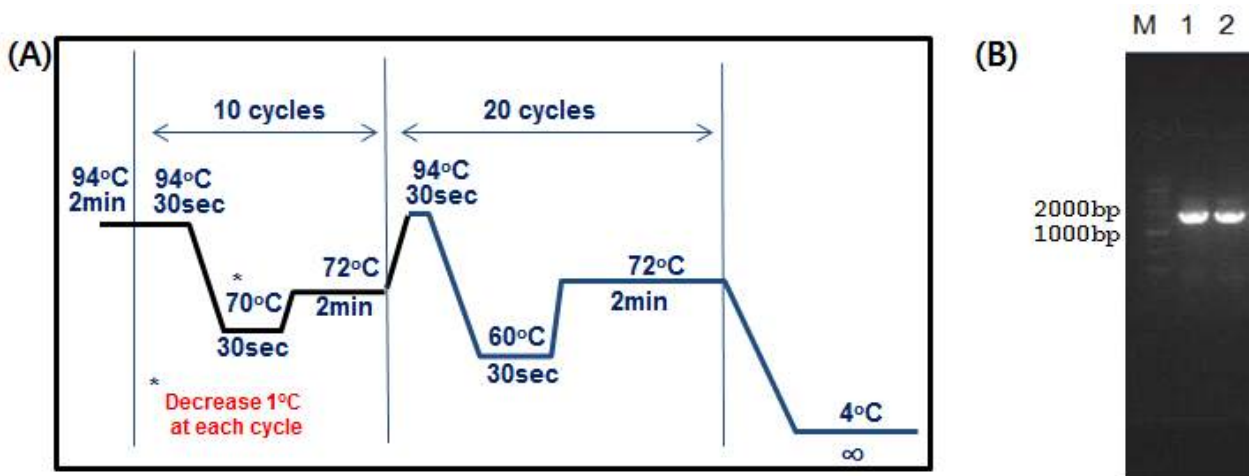


그림 23. Touch down PCR 조건 (A) 과 증폭된 luciferase 유전자 (B)

(나) Luciferase 유전자 도입

Luciferase 유전자 도입을 위해 *Nde* I 과 *Xma* I 제한효소를 이용하여 pIL.Ptuf.Mb의 BmpB-cat 부분을 제거하고, 같은 두 효소를 처리하여 sticky end 형태로 존재하는 luciferase 유전자와 ligation을 진행하였다. 이후 유산균 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 (*L. lactis* subsp. IL1403) competent cell에 electroporation 기법으로 재조합 벡터를 전달 후, erythromycin이 첨가된 선택배지에 도말하였다. 배지 내에 자란 colony는 replica plate를 제작하여 colony PCR과 sequencing 기법으로 luciferase 유전자가 도입된 유산균을 선별하였다.

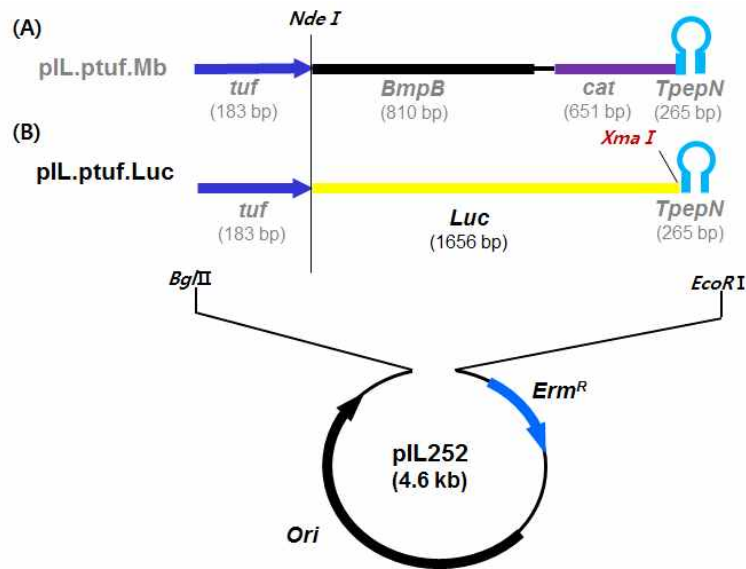


그림 24. 유산균용의 luciferase 유전자 발현벡터 모식도

Sequencing 결과, 원하는 부분인 *tuf* 프로모터와 *TpepN* 사이에 luciferase gene이 삽입되어 있는 것을 확인하였다. 또한 그 cloning한 서열이 pGL3 벡터내의 luciferase 서열과 100 %로 일치하는 것을 확인하였다 (그림 24). 아래 그림은 구축한 luciferase 발현벡터의 모식도이다 (그림 25).

Luciferase gene from candidate colony
 Sequence ID: IC||Query_60127 Length: 1653 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1653 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3053 bits(1653)	0.0	1653/1653(100%)	0/1653(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGA	60		
Sbjct 1	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGA	60		
Query 61	ACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATT	120		
Sbjct 61	ACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATT	120		
Query 121	GCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCC	180		
Sbjct 121	GCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCC	180		
Query 181	GTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTA	240		
Sbjct 181	GTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTA	240		

⋮

그림 25. 선별한 유산균내에 도입된 luciferase 유전자 sequencing 결과 중 일부

(다) 선별된 유산균의 physiological characteristics 확인

유산균이 luciferase 단백질 발현에 있어 growth와 metabolism의 저해 여부를 확인하기 위하여 physiological test를 진행하였다. pIL.Ptuf.Luc 그룹이 wild type의 IL1403과 비교하였을 때, growth 속도나 lactic acid를 생성하여 pH를 떨어뜨리는 유산균의 고유 성질에 차이를 보이는

지 확인하기 위하여 신선한 50 ml의 배지에 1 % (w/w) 으로 유산균을 접종 후 2 시간 간격으로 optical density (OD₆₀₀)와 pH를 측정하였다 (그림 26).

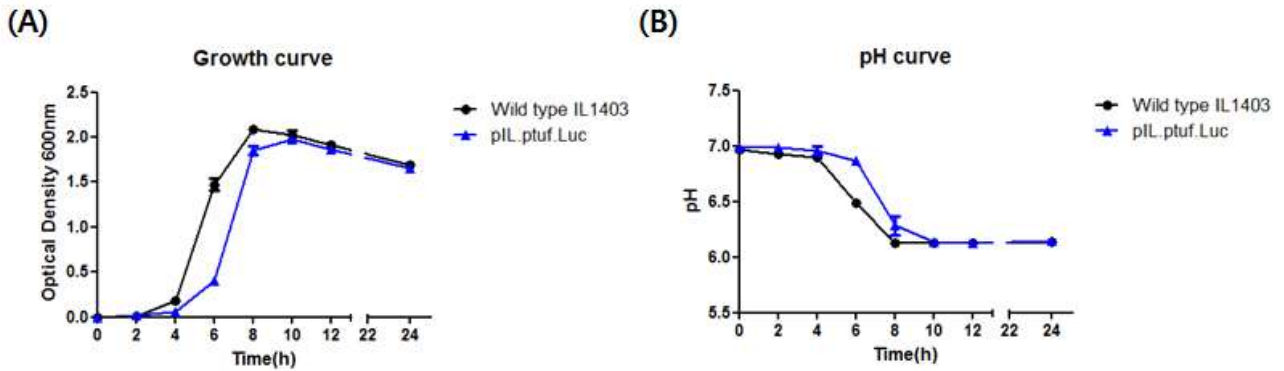


그림 26. (A) Wild type과 pIL.ptuf.Luc 그룹의 growth, (B) pH drop pattern 확인

실험 결과, 접종 후 4 시간부터 8 시간까지인 log phase에서 growth나 pH drop pattern이 지연되는 현상이 관찰되나 stationary phase에 같은 시간 내에 도달하는 것을 확인 할 수 있다. 또한 최종 growth되는 양이나 lactic acid 생성으로 인한 pH가 wild type과 동일한 수치를 보여, 이후 luciferase 발현 여부와 activity를 측정하기 위한 실험에 pIL.Ptuf.Luc 그룹을 사용 할 수 있음을 확인 하였다.

(라) Luciferase 유전자 발현 확인

유산균 내에 도입한 luciferase 유전자의 발현 및 activity를 확인하기 위해, luciferase assay를 수행하였다. 유산균을 도달한 agar plate에서 colony를 10 ml의 신선한 배지에 접종하여 over-night (O/N)으로 culture 후 1 % (w/w) 수준으로 새로운 50 ml의 신선한 배지에 재접종 하였다. 24 시간 배양하는 2 시간 interval로 sampling 하여, Promega Corporation의 Luciferase assay system을 처리하여 microplatereader기로 relative light unit (RLU) 을 측정 하였다. 측정된 RLU는 각 해당 시간의 OD₆₀₀ 값으로 보정하여 수치화 하였다 (그림 27).

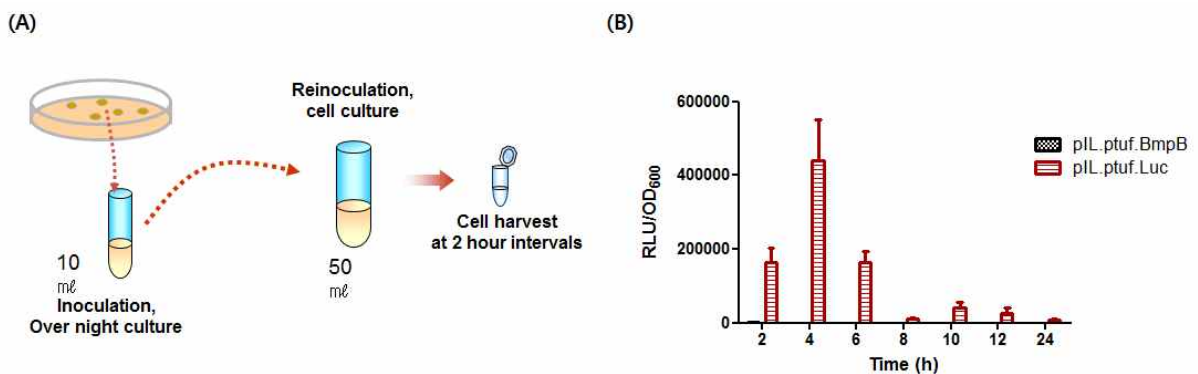


그림 27. Luciferase assay를 위한 sampling 방법 (A) 과 측정 결과 (B)

그 결과, negative control인 pIL.Ptuf.BmpB 그룹에서는 RLU값이 매우 낮게 측정되었으며 pIL.Ptuf.Luc 그룹에서는 8449에서 440858까지 측정되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히,

growth나 단백질 발현 및 대사 활동이 가장 활발한 log phase에서 가장 높은 RLU/OD₆₀₀ 값이 측정되었고, stationary phase에 갈수록 그 값이 떨어지는 양상을 확인 할 수 있었다. 결론적으로, pIL.Ptuf.Luc 그룹은 physiological characteristic인 측면과 luciferase의 기능적인 측면에서 유산균용의 프로모터 screening에 사용 가능함을 증명하였다.

(2) 프로모터 modification

본 연구에서 사용할 프로모터는 유산균 IL1403 genome 상에 존재하는 house keeping 유전자로 잘 알려진 *tuf* 유전자의 프로모터로 본 연구실의 선행 연구자가 탐색한 유산균용의 새로운 프로모터이다 (그림 28).

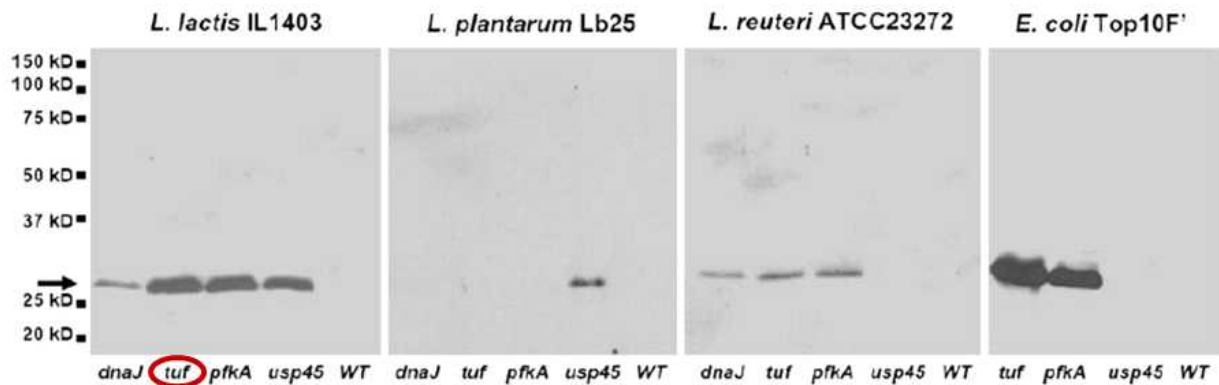


그림 28. 선행 연구를 통해 선별된 *tuf* 프로모터의 단백질 발현 양상 (Eun Bae Kim *et al.*, 2009)

하지만 유산균용의 벡터의 copy number가 작고, 대장균에 비해 재조합 단백질에 대한 발현율이 많이 떨어지는 한계점이 있다. 이를 극복하기 위한 여러 가지 전략들 중 강력한 프로모터를 개발하는 전략을 도입하고자 한다. 하지만 새로운 프로모터를 찾는 것은 시간과 비용이 많이 들어가는 문제점이 있어 이미 선행 연구를 통해 유산균에서 잘 작동한다고 알려진 *tuf* 프로모터의 전사 효율을 더 높일 수 있는 전략으로 프로모터의 *cis*-acting elements를 repeating하여 전사 개시에 필요한 factor들이 많이 결합하여 전사과정이 많이 일어날 수 있도록 modification하고자 하였다.

그래서, 다음 세 가지 과정을 거쳐 실험을 수행하였다. 첫 번째, PCR 기법을 기반으로 우선, *tuf* 프로모터에서 *cis*-acting elements (빨간색)가 포함된 부분 (노란색)을 증폭하고, 두 번째 PCR step에서 partial complimentary reverse primer를 이용하여 다양한 repeated fragment를 얻고, 세 번째 PCR step에서 제한효소 서열 (초록색)과 ribosome binding site (RBS, 보라색)를 extension시켰다. (그림 29).

(가) *tuf* 프로모터의 core region 선별과 증폭

Softberry 사에서 웹상으로 제공하는 prokaryote 프로모터 예측 tool인 BPROM을 이용하여 프로모터에 존재하는 -35와 -10 서열을 확인하였다. RBS의 upstream에서 -35 region과 -10 region이 포함되게 임의로 선별한 core region (119 bp) 을 forward primer

(CCGGCTTCTTGAAAAAATGCGATTAAAAGCTG, 32 bp) 와 reverse primer (GGGGAA TTTGTTTTATTATAGGTAGTCTGC, 36 bp)를 이용하여 증폭하였다 (그림 30). 이때 임의로 선정한 core region은 primer를 디자인 하였을 때 적정온도의 melting temperature 값을 갖는지의 여부로 선정하였다.

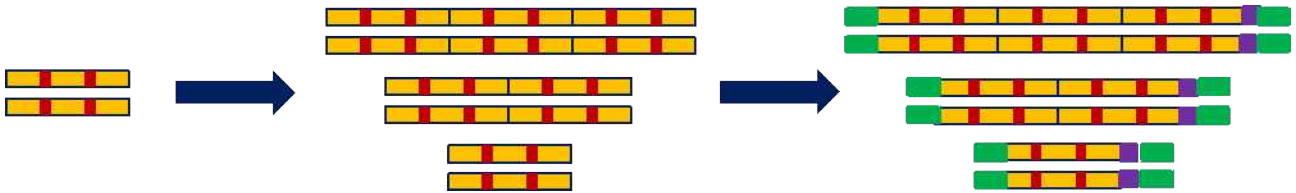


그림 29. *tuf* 프로모터 modification 과정 모식도

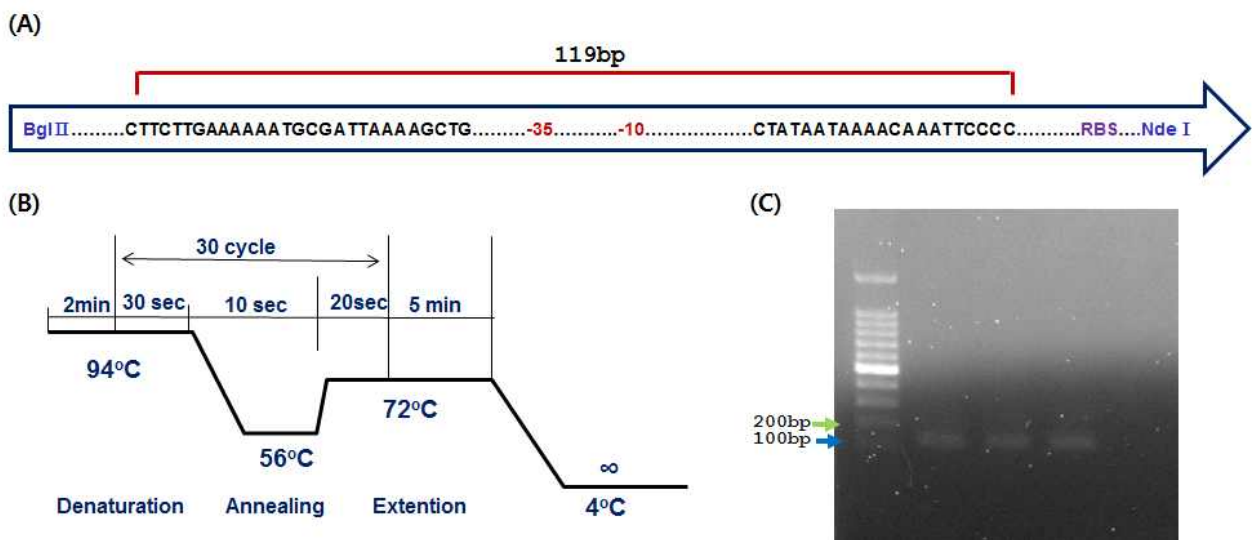


그림 30. *tuf* 프로모터 모식도 (A) 와 core region PCR 조건 (B) 및 전기영동 결과 (C)

PCR 결과물을 agarose gel 전기영동으로 확인한 결과, 119 bp인 core region이 100 bp와 200 bp 사이에서 관찰되는 것을 확인 하였다. 이후 실험은 모두 PCR 결과물에서 PCR purification kit을 통해 얻은 순수한 DNA 만을 이용하여 수행하였다.

(나) Core region repeating을 통한 프로모터 modification

PCR 기법으로 core region을 repeating 시키기 위해 core region의 5' 부분과 상보적으로 결합 할 수 있는 서열을 reverse primer에 추가하여 디자인 하였다. 이 reverse primer (TTTTAATCGCATTTTTTCAAGAAGCCGGGGGAATTTGTTTTATTATAG, 49 bp) 와 그림 8 (B) 에서 사용한 forward primer를 이용하여 core region과 함께 proofreading 기능이 있는 *pfu* polymerase 존재 하에서 PCR을 수행하였다 (그림 31).

위 그림을 통해 core region의 repeating으로 인해 각 각 119 bp, 238 bp와 357 bp로 예측되는 DNA band가 agarose gel 상에서 laddering 되는 것을 확인 할 수 있다. 이렇게 증폭된 PCR product에 RBS와 벡터 내로 재조합 할 때 필요한 제한효소 서열이 존재하지 않아, 이들

서열을 extension 시켜주기 위해 추가 PCR 과정을 수행하였다. 이때 *Bgl* II 제한효소 서열이 추가된 forward primer (AAATGGAAGATCTCCGGCTTCTTGAAAAAAT, 31 bp) 와 RBS 및 *Nde* I 제한효소 서열이 추가된 reverse primer (CGGGAATTCCATATGTTTAAAAA TTTCTCC, 30 bp) 를 사용 하였다 (그림 32).

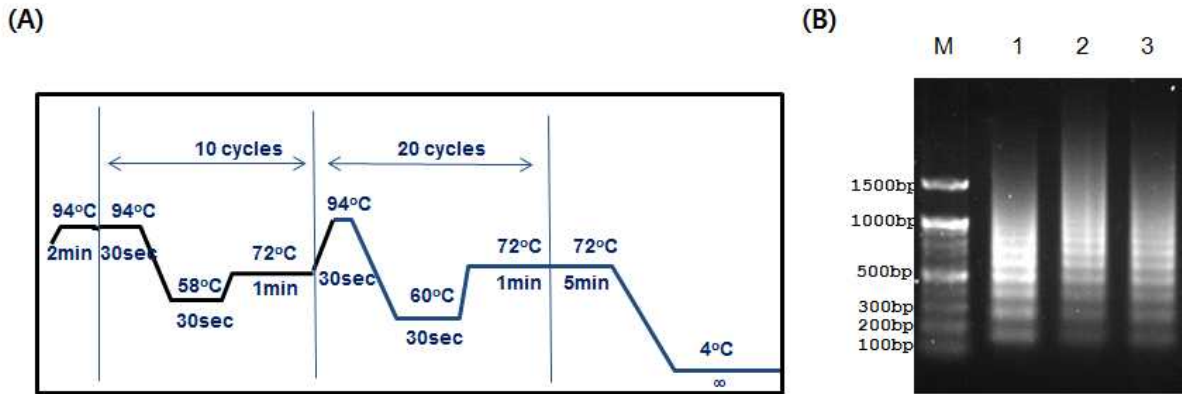


그림 31. Core region repeating을 위한 PCR 조건 (A) 과 전기영동 결과 (B)

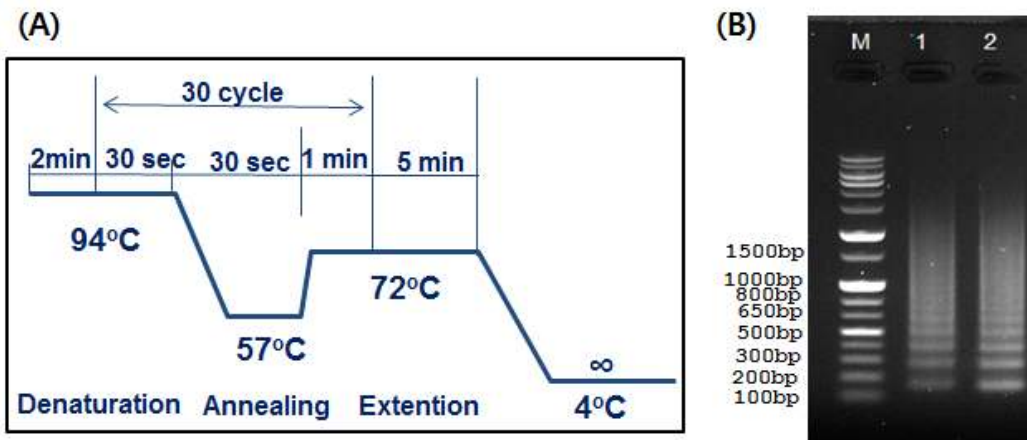


그림 32. 제한효소와 RBS 서열을 extension 시키기 위한 PCR 조건 (A) 과 그 전기영동 결과 (B)

PCR product의 agarose gel 전기영동 결과, extension되는 서열의 길이가 길지 않아 gel 상에서 크기 비교가 어렵지만 DNA ladder 모양이 유지되어 증폭된 것을 확인 할 수 있었다. 이렇게 획득한 modified *tuf* 프로모터를 core region의 repeating 개수에 따라 각각 *mtuf1*, *mtuf2*, *mtuf3*로 명명 하였다.

(다) ‘C’ 서열의 ‘A’ 서열로의 교체 및 복구

본 연구에서 사용한 유산균 IL1403은 genome상에 GC contents가 35 %인 AT-rich bacteria 로, 프로모터 상에 존재하는 ‘G’, ‘C’ 서열이 전사 개시에 있어 negative한 영향을 끼칠 수 있을 것을 가능성을 고려하였다. 이에 Clustal W를 이용하여 pIL.Ptuf.Luc과 IL1403 genome에 존재하는 *tuf* 프로모터를 alignment를 수행하였다 (그림 33). 세 개의 box는 순서대로 -35, -10

region과 RBS 서열을 표시하였다.

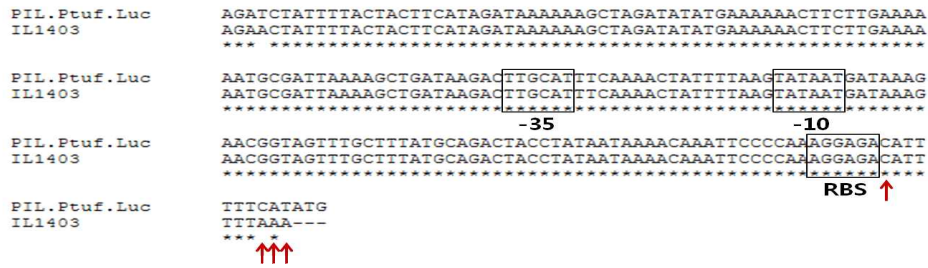


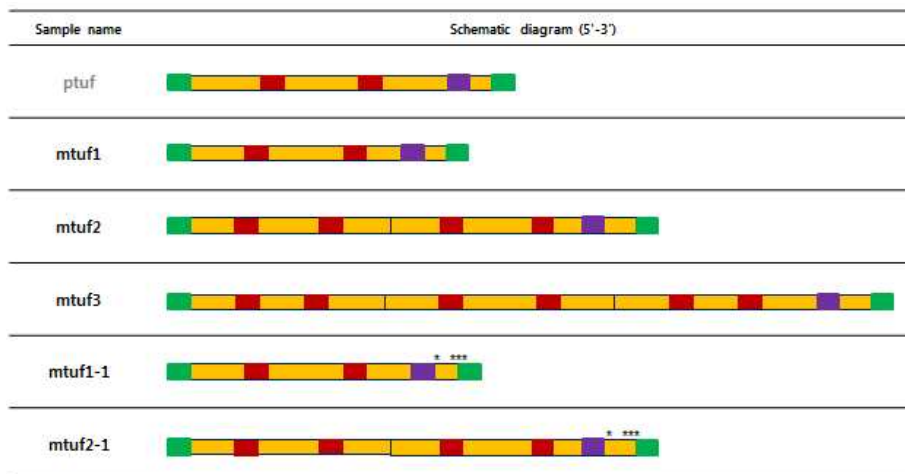
그림 33. pIL.Ptuf.Luc 벡터에 존재하는 *tuf* 프로모터와 IL1403 genome상에 존재하는 *tuf* 프로모터의 alignment 결과

선행 연구자가 유산균용의 벡터로 *tuf* 프로모터를 cloning시 deletion시킨 개시코돈 상위 서열 'AAA' 복구와 primer를 이용해 쉽게 접근 가능한 RBS 하위 서열 'C'를 'A'로 교체를 하고자 하였다. 위 그림에서 빨간색 화살표는 'A' 서열로 교체 및 복구 시켜주고자 하는 서열을 가르킨다. 그림 9 에서 얻은 core region repeating strand에 양 말단에 결합 할 수 있는 forward primer (그림 10) 와 새 reverse primer (GGAATTCCATATGTTTAAAAATTCTCCTTTGGGGAATTTGTTTTATTA, 49 bp) 를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과로 얻은 프로모터를 mtuf1-1, mtuf2-1이라고 명명하였다.

(라) pIL.ptuf.Luc 벡터로의 도입 및 electroporation

(2) ~ (3) 과정을 통해 획득한 modified *tuf* 프로모터인 mtuf1, mtuf2, mtuf3, mtuf1-1, mtuf2-1을 pIL.ptuf.Luc 벡터에 재조합 시키기 위해 *Bgl* II와 *Nde* I 제한효소를 각각 처리 후 digested 벡터에 ligation을 수행하였다. 이후 IL1403 competent cell에 electroporation 후 선택배지에 도말하여 colony PCR과 sequencing을 통해 colony를 선별하였다 (표 4). 노란색 box는 core region을, 초록색은 제한효소를, 보라색은 RBS를 표시한 것이다. mtuf1-1과 mtuf2-1은 RBS와 제한효소 사이에 'A' 서열로 변환된 부분을 '*'로 표시하였다.

표 4. *tuf* 프로모터와 구축한 modified *tuf* 프로모터



(3) Luciferase 단백질 발현양 비교

(가) 선별된 유산균의 physiological characteristics 확인

Sequencing을 통해 선별 및 확인 된 유산균들의 physiological characteristics를 먼저 확인해 보았다 (그림 34). 미리 O/N으로 culture한 유산균을 50 ml의 신선한 배지에 1 % (w/w)으로 접종 후, OD₆₀₀ 값과 pH 값을 3 시간 interval로 측정하였다. 그 결과, pH drop pattern은 거의 유사했으며 growth pattern은 *tuf* 프로모터를 가진 유산균이 6 시간 때에 가장 낮았지만 큰 차이 없이 비슷한 양상으로 증가되는 것을 확인 할 수 있었다.

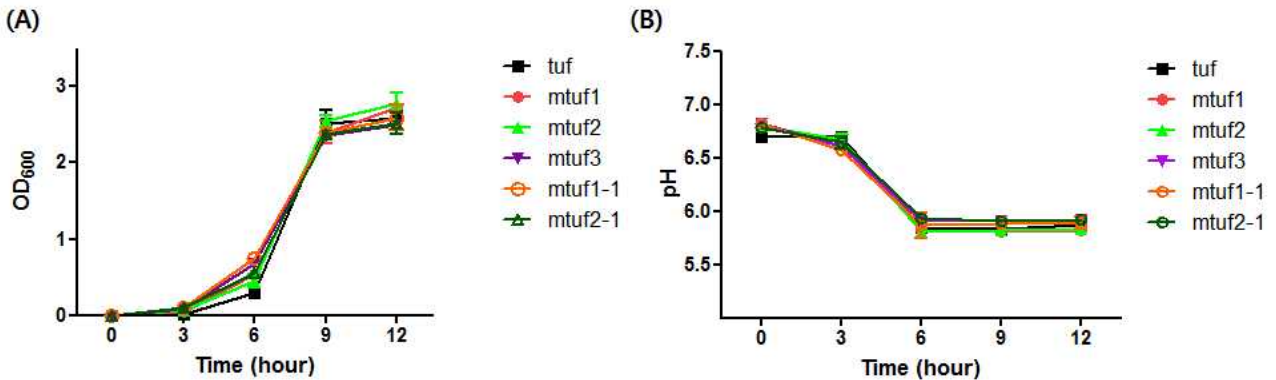


그림 34. *tuf* 프로모터와 modified *tuf* 프로모터를 가진 유산균의 physiological characteristics 확인

(나) Luciferase activity 확인

Physiological characteristics를 확인 후, 각 각의 프로모터가 *tuf* 프로모터와 비교했을 때 얼마나 발현율이 증가 되었는지를 간이적으로 luciferase assay를 통해 측정해 보았다. 50 ml의 신선한 배지에 1 % (w/w)으로 접종 후 3 시간 interval로 sampling하여 그들의 RLU값을 OD₆₀₀값으로 보정한 값을 *tuf* 그룹의 값을 1로 계산하여 ratio로 표기하였다 (그림 35).

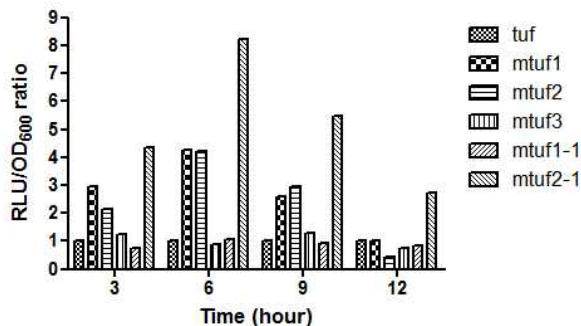


그림 35. Modified *tuf* 프로모터 그룹의 luciferase activity 비교 결과

실험 결과, *mtuf2-1*이 가장 높은 activity를 각 시간대 별로 보이고 있는 것을 확인 할 수 있

었다. 특히, log phase인 6 시간대에 *tuf* 그룹에 비해 8배 이상으로 높은 activity를 보이고 있으며, *mtuf1*과 *mtuf2*는 시간대별로 우위가 뒤바뀌지만 *mtuf2-1* 다음으로 높은 activity ratio를 보이고 있다. 하지만 이 결과들은 luciferase activity를 통한 간이적인 luciferase 발현양 비교 실험이기 때문에 추가적인 실험이 필요하다.

(다) RNA 수준에서의 luciferase 전사율 비교

우선 프로모터의 *cis*-acting elements를 repeating하여 구축한 modified *tuf* 프로모터들의 전사율이 증진되었는지, RNA 수준에서 확인하고자 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 수행하였다. 이때 luciferase assay를 통해 발현양이 많다고 추측되는 *mtuf1*, *mtuf2*, *mtuf2-1*을 이용하여 *tuf* 프로모터를 control로 그 전사율을 비교하였다 (그림 36).

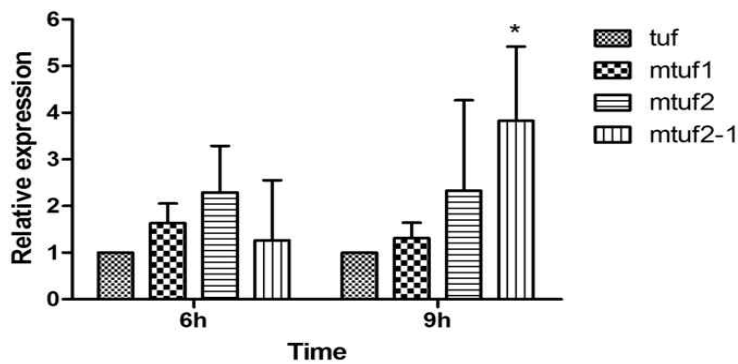


그림 36. Modified *tuf* 프로모터 그룹의 qRT-PCR 결과

측정한 시간은 접종 후 6 시간과 9 시간으로 각 각 증식과 단백질 합성이 가장 많이 일어날 거라 예상되는 log phase의 중간과 cell 수가 최대 수치로 도달하는 stationary phase의 초기 부분이다. 측정된 RNA는 luciferase로, 유산균의 genome상에 있는 *tuf* 유전자의 발현율로 보정한 값을 *tuf* 그룹을 1로 두어 각 각의 relative expression ratio를 비교하였다. *mtuf1*, *mtuf2*, *mtuf2-1* 모두 동일 시간대에서 *tuf* 그룹보다 높은 luciferase의 전사율을 보인 것은 물론, 6 시간대에서 *tuf* 그룹보다 *mtuf2*가 2 배이상, 9 시간대에는 *mtuf2-1*이 약 4배 이상의 수치를 보이는 것을 확인 할 수 있다.

(라) Western blot기법을 이용한 단백질 수준에서의 luciferase 발현양 비교

Luciferase와 luciferin의 효소 반응을 이용한 luciferase assay는 단백질양이 많고 적음을 간이적으로 확인 할 수 있는 방법이고, 그 반응 시간이 짧아 단백질이 축적되고 있는지 확인하기 어려운 단점이 있다. 이를 보완하기 위해 luciferase에 특이적인 antibody를 이용하여 단백질의 발현양 비교는 물론, 축적이 되고 있는지 확인 하고자 한다. Sampling은 접종 후 각 각 6 시간, 8 시간, 10 시간으로 log phase의 중간 시점에서 stationary phase 중간 시점으로 SDS-PAGE를 수행하였다 (그림 37 (A)).

이때 loading한 cytoplasmic protein의 양은 25 ug으로, luciferase 단백질의 size는 61kDa이다. 그림 16 (A) 에서와 같이 SDS-PAGE 상에서 눈으로 발현양 비교가 어려운 것을 확인 할 수 있었다. 이후 cell 수가 최대치로 일정한 stationary phase 초기와 중간인 8 시간과 10 시간 대의 sample을 이용하여 western blot을 수행하였다 (그림 37 (B)). 그 결과 시간이 지남에 따라 각 그룹의 luciferase양이 증가되는 것을 band intensity로 확인하여, 단백질 양이 cytoplasmic에 축적되고 있음을 알 수 있었다. 또한 각 각의 동일 시간대 sample 중 mtuf2-1과 mtuf1에서 단백질 발현양이 많은 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 10 시간 이후 sampling한 mtuf2-1과 mtuf1은 *tuf* 그룹에 비해 Imaging J 프로그램을 이용한 intensity 정량화 결과, relative quantitative intensity (Rel. Quant)가 약 9배 이상 높아, 기존 *tuf* 프로모터에 비해 높은 단백질 발현율을 보이는 것을 증명하였다.

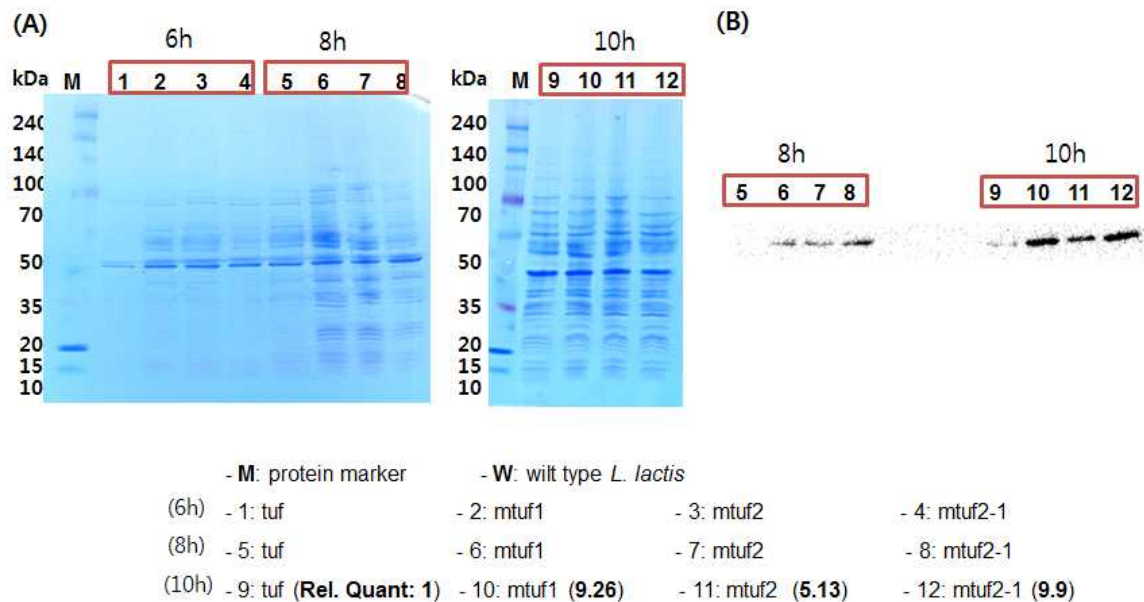


그림 37. SDS-PAGE (A) 와 luciferase 특이적 antibody를 이용한 western blot (B) 결과

(마) *In vivo* imaging system을 이용한 장내에서의 프로모터 strength 검증

위 연구를 통해 mtuf2-1이 가장 프로모터 strength가 강한 것을 확인할 수 있었다. 이에 재조합 유산균이 숙주의 장내에 도달하였을 때, mtuf2-1 프로모터가 잘 작동하는지를 검증하기 위해 *in vivo* imaging을 시도하였다 (그림 38).

대조군인 *tuf* 프로모터에 의해 luciferase가 발현되는 재조합 유산균과, mtuf2-1 프로모터에 의해 luciferase가 발현되는 재조합 유산균을 각각 1×10^9 CFU를 배양액에 re-suspension 후 경구 투여하였다. 경구 투여 0 분과 90 분 후에 각각 luciferin을 100ul 씩 복강으로 주사하여 *in vivo* image를 수행하였다. 그 결과, *tuf* 그룹과 mtuf2-1 그룹에서 시간이 지남에 따라 luciferase, luciferin 발광 반응으로 인해 측정된 intensity가 높아 지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 경구 투여 90 분 후에 mtuf2-1 그룹에서 측정된 intensity가 *tuf* 그룹에 비해 유의적으로 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 결론적으로, 본 연구에서 구축된 mtuf2-1 프로모터는 기존의 *tuf* 프로모터보다 western blot을 통하여 약 9배 이상 luciferase를 발현하는 것을 확인

하였고, *in vivo*를 통하여 장내에서도 *mtuf2-1* 프로모터가 효과적으로 작동하는 것을 확인 할 수 있었다.

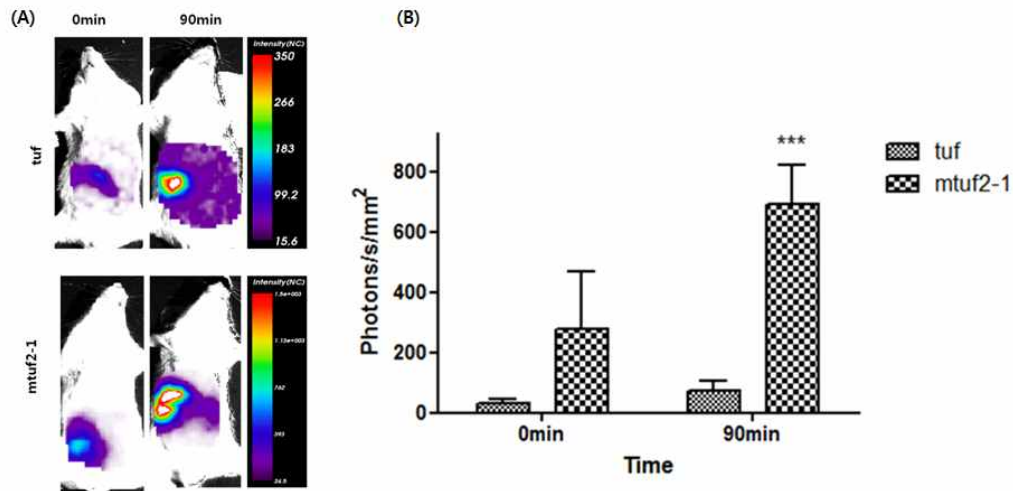


그림 38. *In vivo* imaging 결과

4. 면역보강 단백질 생산 및 특성 규명

가. 면역보강 단백질 RANKL의 *E. coli*에서의 클로닝 및 발현 확인

RANKL (Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)은 종양괴사인자 (TNF superfamily)의 한 종류로서, 조골세포 (osteoblasts)와 기질 계열 세포 (stromal lineage cells) 표면에서 주로 발현되며 그 수용체 RANK는 파골세포 (osteoclasts)에서 주로 발현된다. RANKL과 RANK의 신호전달은 뼈와 관련된 생리적 기작뿐만 아니라 면역체계의 성숙과 활성화에 있어서도 필수적인 역할을 수행한다. 또한 RANKL-RANK 시스템은 림프절의 기관형성이나 흉선의 수질 세포의 발달, 몸의 체온조절, 임신 중의 유선발달, 수지상세포의 활성화 촉진 그리고 Peyer's patch의 발달에도 기능적으로 관여한다. 최근에는 Knoop 연구팀이 RANKL가 RANK를 발현하는 소장 상피 전구세포로부터 M 세포로의 분화를 조절하는 주요인자임을 밝혔고, 또한 뒤이어 RANKL 유전자가 없는 쥐에서 M 세포의 발달이 이루어지지 않는다는 사실도 밝혀졌다. 이러한 관점에 착안하여, 경구로 항원을 전달 할 때, 항원이 면역체계로 노출되는 통로인 M 세포의 수를 RANKL를 통해 증진시켜준다면 결과적으로 백신의 효과가 증진될 수 있을 것이라는 전략을 세우게 되었고, 이 연구에서는 특히 *E. coli*에서 transmembrane RANKL (mRANKL)을 발현하여 면역보강 단백질로서의 이용가능성을 검증해보고자 한다.

(1) RANKL 생산의 최적 균주와 plasmid 선발 및 최적 induction 조건 잡기

(가) RANKL 유전자 클로닝과 벡터 구축

발현하고자 하는 단백질을 coding하는 유전자의 구성을 codon optimization이 완료된

transmembrane RANKL (mRANKL) 서열과 함께 Maltose Binding Protein (MBP)을 coding 하는 malE 유전자 서열로 구성하였다. 이를 PCR을 통해 증폭시킨 이후에, T4 DNA ligase를 통해서 후보군 vector들에 삽입하였다. ‘Response surface methodology’를 기반으로 하여 *E. coli* BL21, Top 10F’ *E. coli*, Shuffle Express *E. coli* 등 여러 대장균 균주 후보들의 발현 효율을 비교 검토해 본 결과 (표 6), Shuffle Express *E. coli*가 발현 효율이 가장 좋은 것으로 나타났고, vector의 경우에는 pMAL-c5x vector를 선정하였다. 최종적으로 재조합 plasmid를 *E. coli*에 넣은 발현 시스템을 ‘Shuffle Express *E. coli*-pOmR-c5X’로 명명하였으며, 이를 transformation 시킨 이후에 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 배양하여 transformation이 된 *E. coli*만을 선택적으로 증식시켰다.

표 5. 후보 균주 및 plasmid 종류

E. coli host	Vector system	Recombinant plasmid	Expression system	Induction	Expression of mRANKL
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pMAL-c5X	pOmR-c5X	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pOmR-c5X	IPTG/Lactose	Too low
<i>E. coli</i> BL21	pMAL-c5X	pOmR-c5X	<i>E. coli</i> BL21-pOmR-c5X	IPTG/Lactose	Too low
TOP10F’ <i>E. coli</i>	pMAL-c5X	pOmR-c5X	TOP10F’ <i>E. coli</i> -pOmR-c5X	IPTG/Lactose	Too low
Shuffle® Express <i>E. coli</i>	pMAL-c5X	pOmR-c5X	Shuffle® <i>E. coli</i> -pOmR-c5X	IPTG	Too low
Shuffle® Express <i>E. coli</i>	pMAL-c5X	pOmR-c5X	Shuffle® <i>E. coli</i> -pOmR-c5X	Lactose	Significant
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET32a(+)	pOmR-32	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pOmR-32	IPTG/Lactose	ND
<i>E. coli</i> BL21	pET32a(+)	pOmR-32	<i>E. coli</i> BL21-pOmR-32	IPTG/Lactose	ND
TOP10F’ <i>E. coli</i>	pET32a(+)	pOmR-32	TOP10F’ <i>E. coli</i> -pOmR-32	IPTG/Lactose	ND
Shuffle® Express <i>E. coli</i>	pET32a(+)	pOmR-32	Shuffle® <i>E. coli</i> -pOmR-32	IPTG/Lactose	ND
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pGEX-5X-1	pOmR-G5X	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pOmR-G5X	IPTG/Lactose	ND
<i>E. coli</i> BL21	pGEX-5X-1	pOmR-G5X	<i>E. coli</i> BL21-pOmR-G5X	IPTG	Negligible
<i>E. coli</i> BL21	pGEX-5X-1	pOmR-G5X	<i>E. coli</i> BL21-pOmR-G5X	Lactose	ND
TOP10F’ <i>E. coli</i>	pGEX-5X-1	pOmR-G5X	TOP10F’ <i>E. coli</i> -pOmR-G5X	IPTG/Lactose	ND
Shuffle® Express <i>E. coli</i>	pGEX-5X-1	pOmR-G5X	Shuffle® <i>E. coli</i> -pOmR-G5X	IPTG/Lactose	ND
Shuffle® Express <i>E. coli</i>	pMAL-c5X	pOsREx-c5X	Shuffle® <i>E. coli</i> -pOsREx-c5X	Lactose	Significant

(나) mRANKL-fusion protein의 induction 조건 최적화

Central composite design (CCD)와 response surface methodology (RSM)에 기반 하여 mRANKL fusion protein의 최적 배양 induction 조건을 찾아낸다. OD (Optical density)값 0.5-0.7, lactose 농도 5-10mM, induction 후 온도 22-30°C, induction 후 시간 4-6시간으로 다양하게 조건을 설정한 후 (표 5), 통계적 분석과 RSM에 입력되어 있는 수식 알고리즘에 기반 하여 다섯 단계 (-α, -1, 0, +1, +α)로 나누어 CCD값을 구하면서 최적 조건을 잡았다. 그 결과 OD₆₀₀ 0.6, Lactose 7.5mM, 온도 26°C, induction time 5시간에서 가장 많은 mRANKL를 생산할 수 있다는 결론에 도달하였다 (표 7).

(2) mRANKL fusion protein과 mRANKL protein의 균주 내 발현 양상 확인

37°C incubation을 통해 OD₆₀₀ 0.5~0.7수준까지 숫자를 늘린 후, *E. coli*의 재조합 단백질 생산을 위해 0.4mM 수준의 IPTG 혹은 20mM 수준의 lactose를 넣어주고 충분한 induction time을 주어 단백질 발현을 유도하였다. 이 후에 세포를 배양하기 위하여 원심분리로 세포를 가라앉힌

뒤, His-tag 및 GST-tag를 활용하여 resuspension 시킨다. 이렇게 모은 cell들을 sonication을 통해서 세포벽을 깨트리고 이 중에서 단백질만을 추출해내기 위해 더 높은 수준의 원심분리를 통해 단백질 pellet을 회수하였다. 이 단백질 중 원하는 mRANKL fusion protein만을 살펴보기 위해 MBP를 활용한 amylose 친화크로마토그래피를 통하여 단백질을 정제 한 후, SDS-PAGE (그림 39. A와 B)와 western blot (그림 39. C)을 통해 단백질의 발현 여부와 발현량을 살펴보았다. 그 결과 mRANKL fusion protein의 크기에 해당하는 약 75 kDa 수준의 단백질이 높은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

표 6. 독립 변수 및 단계 별 최적 조건

Independent variables	Units	Levels				
		-α	-1	0	1	α
Cell density (OD ₆₀₀)	-	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Lactose	mM	2.5	5	7.5	10	12.5
Temperature	°C	18	22	26	30	34
Induction time	h	3	4	5	6	7

표 7. 최적화된 mRANKL 생산 조건

	Expression condition				mRANKL (mg/L)
	OD ₆₀₀	Lactose (mM)	Temperature (°C)	Induction time (h)	
Predicted value	0.6	7.5	26	5	49.5
Experimental value	0.6	7.5	26	5	52.4

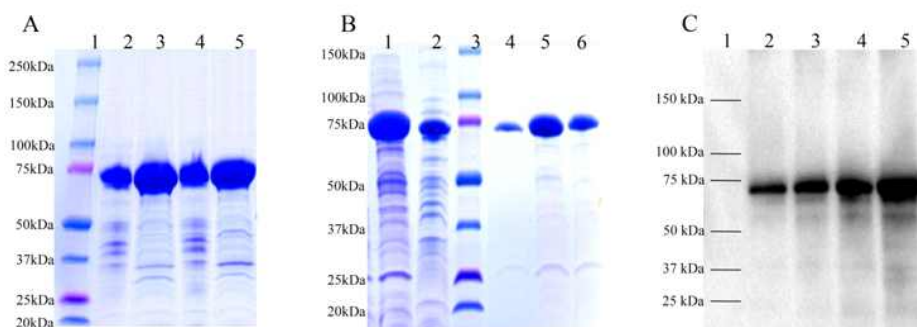


그림 39. mRANKL fusion protein의 SDS-PAGE와 wetern blot 분석 결과

또한, mRANKL만을 확인해보기 위해서 fusion protein을 분리해내고, amylose 친화 크로마토그래피와 gel filtration chromatography를 연속적으로 진행하여 단백질을 정제하고, SDS PAGE와 native PAGE를 수행하였다. SDS PAGE에서 mRANKL 단백질 (~35 kDa)의 단량체

의 (monomeric) 발현을 확인할 수 있었고 (그림 40. A), native PAGE 분석에서는 RANKL가 self-assemble된 104 kDa 크기 수준의 삼량체 (trimeric) 단백질을 수용성 형태로 생산하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 40. B). 또한 gel filtration chromatography profile을 통해 삼량체와 단량체 단백질 크기에 해당하는 각각의 peak를 확인할 수 있었다 (그림 40. C).

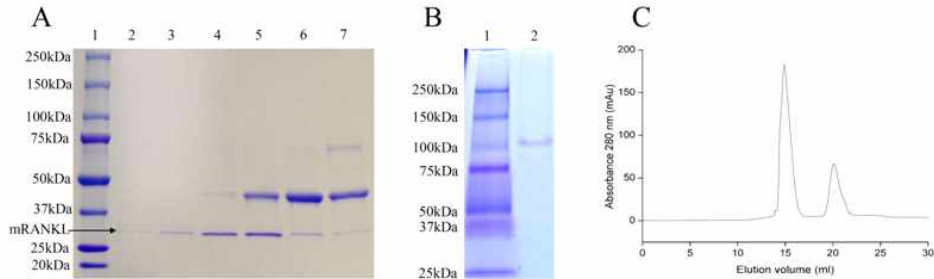


그림 40. Affinity chromatography와 gel filtration chromatography를 통한 mRANKL의 정제

(3) RANKL 단백질의 특성 실증 실험

대장균에서 생산된 RANKL 단백질이 실제 RANKL과 같은 특성을 보이는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. RANKL은 osteoclastogenesis의 효과를 가지고 있다. 이 효과를 알아보기 위하여 macrophage의 유래인 RAW264.7 세포에 처리하여 TRAP의 활성화를 통해 그 특성을 알아보았다. 그 결과 생산된 RANKL의 농도에 따라 TRAP의 활성도가 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 RANKL의 길이에 따른 TRAP의 활성도를 측정하였을 때 온전한 RANKL의 경우에 활성도가 더 높게 나타나는 것을 확인하였다 (그림 41).

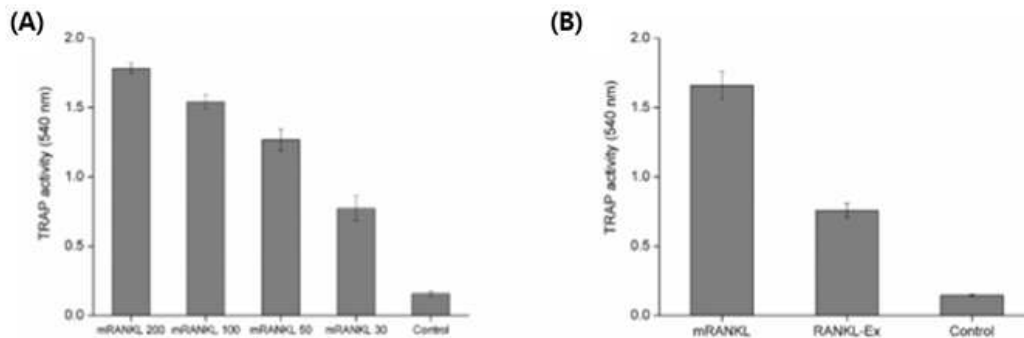


그림 41. (A) RANKL 처리농도에 따른 RAW264.7 세포의 활성화 측정, (B) RANKL 길이에 따른 RAW264.7 세포의 활성화 측정

나. 면역보강 단백질 RANKL의 *L. lactis*에서의 클로닝 및 발현 확인

(1) 유산균에서의 면역보강 단백질 유전자 클로닝

(가) 유전자 클로닝 및 단백질 발현 벡터 구축

Murine soluble RANKL (sRANKL)을 유산균 내에서 발현시키기 위해 Usp45 secretion signal과 sRANKL의 유전자 서열을 유산균 숙주에 적합하도록 codon optimization 후 Usp45 secretion signal과 sRANKL을 연결한 서열, sRANKL 서열을 pIL252 vector에 삽입하여 단백질 발현 벡터를 구축하였다. pIL252 벡터 시스템에서 Usp45 secretion signal 도입 유무에 따라 sRANKL을 분비하는 형태의 재조합유산균 (u.LAB)과 sRANKL을 발현하는 형태의 재조합유산균 (s.LAB), 두 종류의 형질 전환 유산균 균주를 구축하였다 (그림 42).

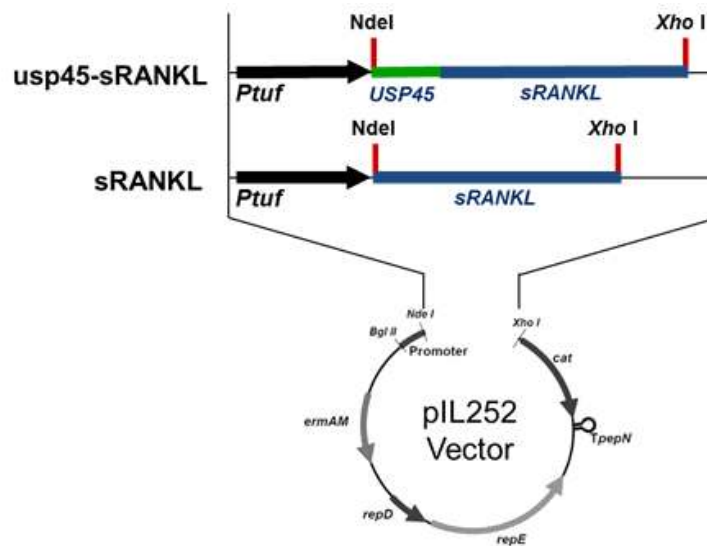


그림 42. 단백질 발현 벡터 모식도

(나) 선발 된 재조합 유산균의 면역활성 물질 발현 및 분비 검정

두 종류의 형질전환 *L. lactis* IL1403 유산균에서 sRANKL의 발현과 분비를 western blot을 이용하여 검증 후 선발하였다. 형질 전환된 *L. lactis* IL1403를 M17G (M17, 5% Glucose) 배지에서 배양하여 sRANKL의 발현여부를 검정하였다. 37 °C, 16시간 배양한 형질전환 *L. lactis* IL1403 10ml을 원심분리기 (4,500 rpm)에서 배양상층액과 균체로 분리한다. 배양 상층액을 버리고 균체는 증류수로 2번 washing을 진행 한 후, cell pellet에 500ul의 증류수와 glass bead를 첨가하고 bead beater를 이용하여 30min 동안 균체를 파쇄한다. 다시 원심분리기 (1,300rpm)를 이용해 세포질 단백질이 용해된 상층액만 취하여 SDS-PAGE와 western blot을 진행하여 단백질 발현을 검정하였다. 배양 상층액은 TCA (trichloroacetic acid)로 단백질을 농축시켜서 검정하였다. 농축방법은 1.6 ml의 배양 상층액에 80% TCA (trichloroacetic acid) (v/v) 0.4ml을 첨가하여 얼음에서 30분 동안 incubation을 진행한 다음 원심분리기 (13,000 rpm)로 분리하여 단백질 침전을 회수한다. 여기에 cold acetone 0.3ml를 첨가하여 vortexing으로 washing 하고 다시 원심분리기 (13,000 rpm)로 상층액을 제거한다. 단백질 침전물은 Tris-Hcl (pH=8.0) 0.5ml 에 녹여 SDS-PAGE 및 western blot을 진행하여 단백질 발현을 검정하였다 (그림 43).

결과, 세포내 단백질에서 sRANKL 특이적인 밴드를 감지할 수 있었고 Usp45-sRANKL 단백질의 경우 세포 내에서 Usp45 secretion signal이 연결되어 있기 때문에 sRANKL보다 조금 위에서 감지되는 양상을 보이고 있었고 상층액으로 분비되는 단백질의 경우 u.LAB에서만

sRANKL 밴드가 감지되었다. 밴드 양상은 세포 내 단백질 보다 secretion signal이 떨어져 나왔기에 낮은 밴드 패턴을 보였다.

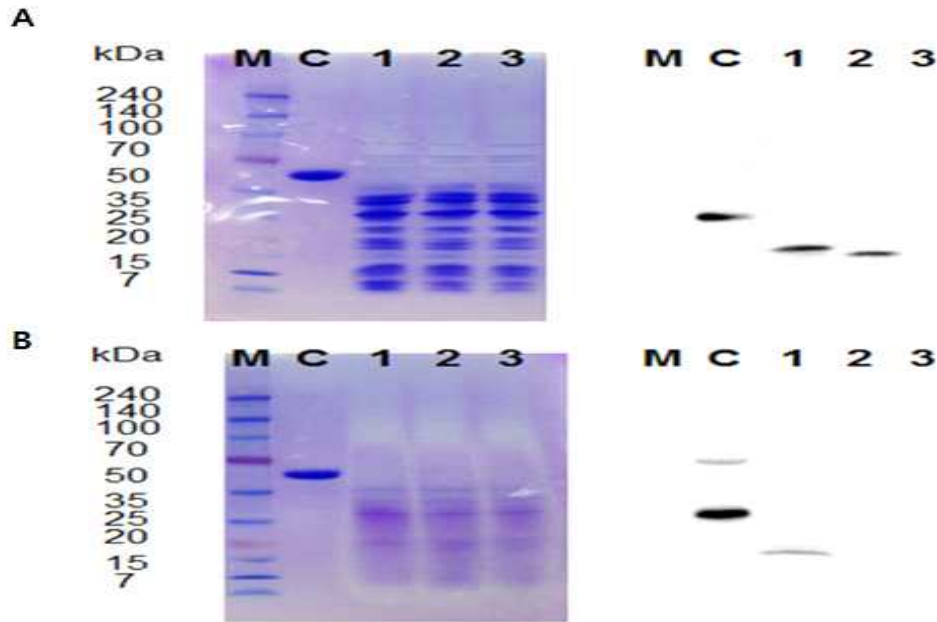


그림 43. 형질전환 유산균 균주에서 Usp45-sRANKL (A), sRANKL (B) 발현과 분비 M, marker; C, commercial sRANKL; lane 1, u.LAB; lane 2, s.LAB; lane 3, wild-type (66 kDa의 band는 BSA로 carrier protein으로 사용)

(다) 선발된 유산균의 생리활성 특징과 단백질 분비효율 검정

sRANKL을 생산할 수 있는 형질전환 *L. lactis* IL1403 유산균을 선발한 후 배양하여 wild type 대비 균체 성장능력 및 산 생성 능력 차이를 검정하였고, signal 펩타이드 종류에 다른 배양 상층액 상의 단백질 분비 효율을 ELISA 기법을 통해 비교 분석 하였다.

① 형질전환 유산균의 생리적 특성 검정

sRANKL을 생성하는 능력이 있는 형질전환체가 wild type 유산균과 비교하여 생리적 특성이 달라졌는지 알아보기 위해 시간에 따른 균주의 성장률과 산 생산능력 (pH 변화)를 살펴보았다. 그 결과, 형질전환체가 wild type에 비해 log phase로 들어가는 시점이 다소 지연되는 것을 관찰할 수 있었고, 산 생산능력 또한 wild type에 비해 형질 전환체에서 다소 지연되는 것을 볼 수 있었다. 그러나 성장률과 산 생산능력에 있어서 wild type과 두 가지 형질 전환체는 전체적으로 두드러진 큰 차이를 보이지는 않았다. 이로서 본 연구에서 구축된 *L. lactis* IL1403 형질 전환체들은 정상적인 유산균의 생리적 특징을 잃지 않고 유지하고 있다고 판단할 수 있었고 향후 소장 상피세포로 sRANKL을 전달 할 수 있는 면역보강제로 활용할 수 있는 잠재력이 있는 것으로 평가되었다 (그림 44).

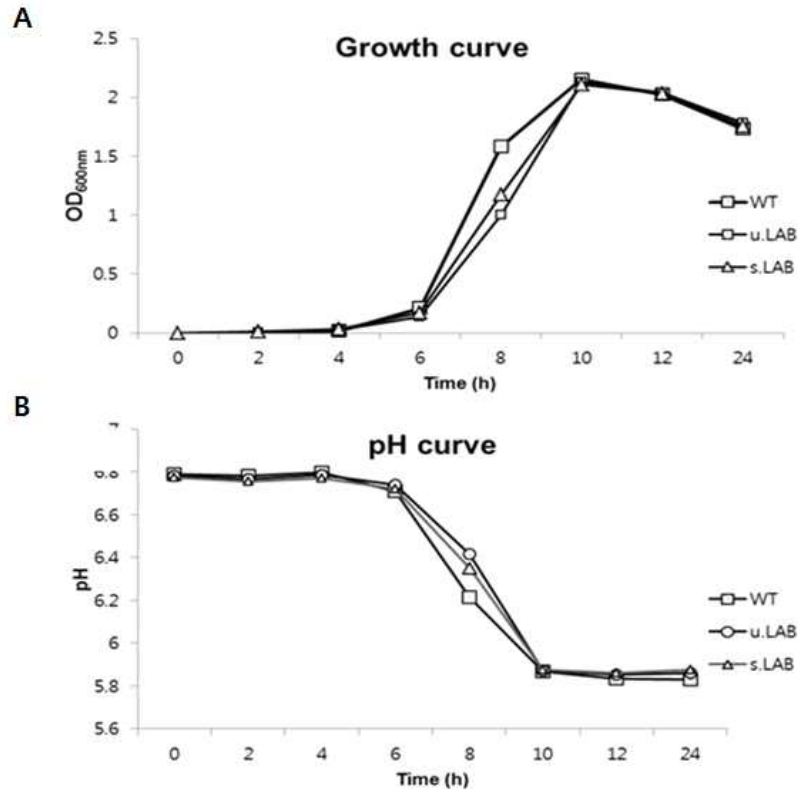


그림 44. 형질전환 유산균 균주와 wild type의 성장률 및 산 생산능력

② 단백질 분비 효율 검정

앞서 선발된 두 가지 균주 u.LAB과 s.LAB 형질전환체의 sRANKL 생산효율을 검증하기 위해 sRANKL 특이적인 항체를 이용한 고감도 ELISA 기법을 이용하여 세포내 단백질의 함량을 측정하였다. 형질전환균주 및 wild type을 16시간 동안 배양 후, 위에서 설명된 방법을 통해 sRANKL의 생산량을 측정한 결과, u.LAB이 ml당 200 ng수준으로 s.LAB보다 생산량이 좀 더 높았다 (그림 45).

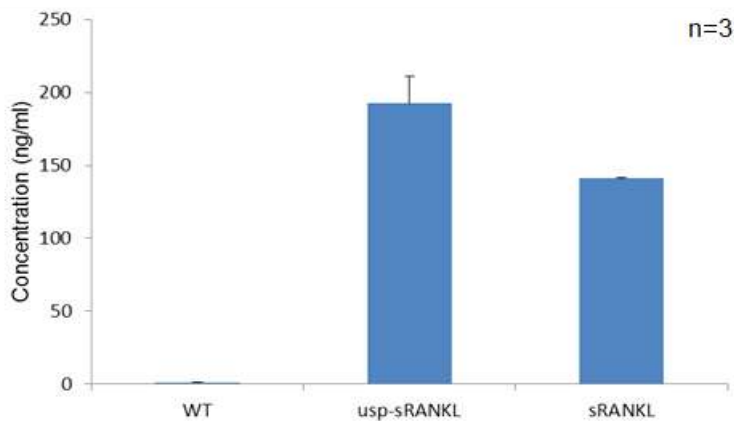


그림 45. 형질전환 유산균 균주와 wild type의 sRANKL 생산량

(2) RANKL 생산 유산균 효율 비교

(가) M 세포 분화 활성화

유산균에서 생산되는 RANKL이 실제로 마우스의 면역체계에 영향이 될수 있는지 확인하기 위해 유산균을 직접 처리 후 M 세포 분화양상을 확인하였다. 마우스 경구를 통해 배양한 유산균을 위내에 직접 먹인 후 소장의 peyer's patch를 적출하였다. 세포의 핵을 DAPI로 염색하고 M 세포를 GP2로 염색하여 이미지를 촬영하였다. 유산균을 먹인 후 7일 이내에 M 세포가 분화가 활성화 됨을 확인하였다 (그림 46 A).

(나) 면역보강효과 확인

유산균에서 생산되는 RANKL의 면역보강효과를 확인하기 위해 마우스면역실험을 진행하였다. 사용한 항원은 모델 항원인 BmpB를 이용하였고 모델항원을 접종하기 일주일 전부터 RANKL 생산 유산균을 경구를 통해 투여하였다. 그 결과 RANKL 생산 유산균을 먹인 그룹에서 대조군에 비교하여 혈중 IgG와 장내 IgA의 양이 증가함을 확인하였다. 특히 IgA의 경우에는 유의적으로 차이가 남을 확인하였다. 또한 RANKL에 M 세포 표적형 펩타이드를 도입하였을 경우 도입하지 않은 경우에 비하여 유의적으로 항체 생성량이 증가함을 확인하였다 (그림 46 B,C).

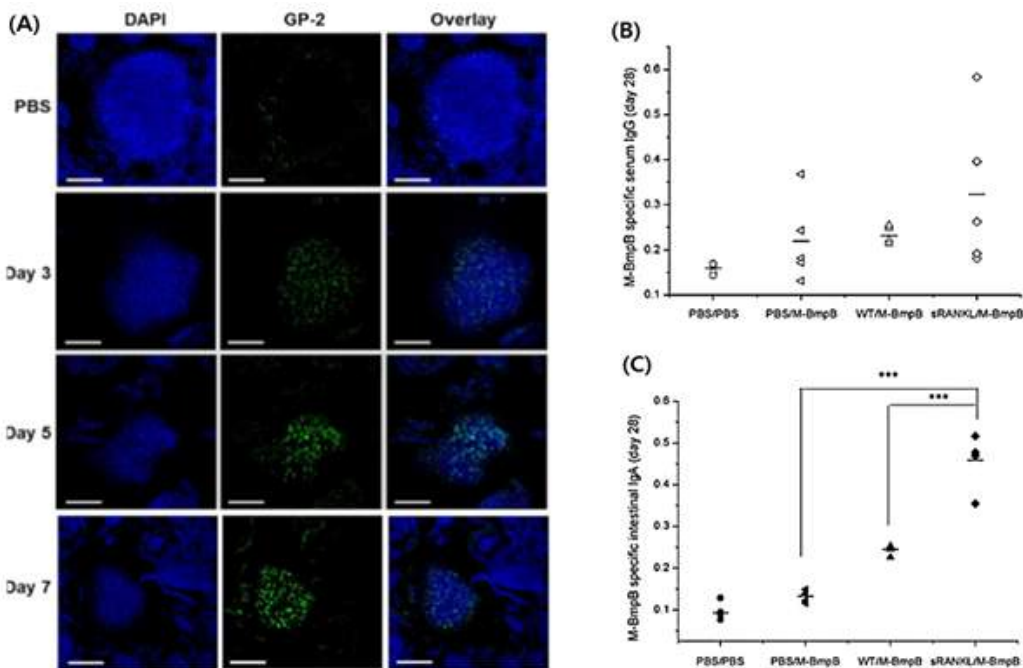


그림 46. (A) RANKL 처리에 따른 M 세포 분화 양상 확인 (B) 마우스 실험 시 혈중 IgG 역가 확인 (C) 장내 IgA 생성 역가 확인

다. 면역보강 단백질 IL-2 발현 재조합 유산균 개발

(1) IL-2 유전자 구축 및 발현

IL-2 단백질은 T cell proliferating factor로 T 세포의 증식에 도움을 주어 면역반응 활성화에 도움을 줄 수 있다. murine의 IL2를 클로닝하여 C 말단에 M 세포 표적형 단백질을 도입하였다. N 말단에 도입할 경우 단백질의 구조가 어긋나 제대로 된 특성을 보이지 않을 수 있다. 클로닝된 유전자는 pIL.ptuf plasmid에 도입하였고 signal 펩타이드인 USP45를 도입하여 단백질이 유산균 외부로 분비될 수 있도록 하였다. transformation 된 유산균을 배양하여 배양 상층액과 유산균 내부의 단백질을 western blot 기법을 통해서 단백질 발현 유무를 확인하였다. 확인 결과 유산균 내부와 배양상층액 모두에서 단백질이 발현됨을 확인하였다 (그림 47).

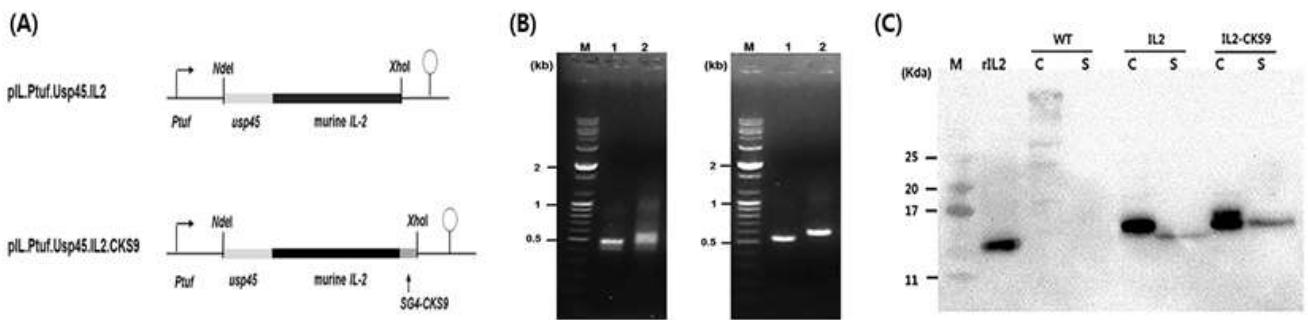


그림 47. (A) IL-2 유전자 클로닝 모식도, (B) IL-2 유전자 클로닝, (C) IL-2 생산 western blot 확인

(2) IL-2 생산량 측정 및 활성 검사

유산균의 IL-2 생산량을 확인하기 위하여 유산균의 배양시간대 별로 sampling을 하여 배양상층액에 존재하는 IL-2의 양을 측정하였다. IL-2는 M 세포 표적형 단백질이 도입되었을 때 근소하게 생성량이 줄어들었고 배양상층액 ml 당 약 200 ~ 300 ng 정도가 분비됨을 확인하였다. IL-2의 고유기능인 T 세포 증식능력을 가지고 있는지 확인하기 위해 in vitro에서 생산된 IL-2를 첨가하여 MTT assay를 통해 확인하였다. 결과는 처리 농도가 높아질수록 T 세포가 증식이 증가하였고 상용 IL-2 보다 유산균에서 생산된 IL-2가 더 높은 T 세포 증가를 보였다 (그림 48).

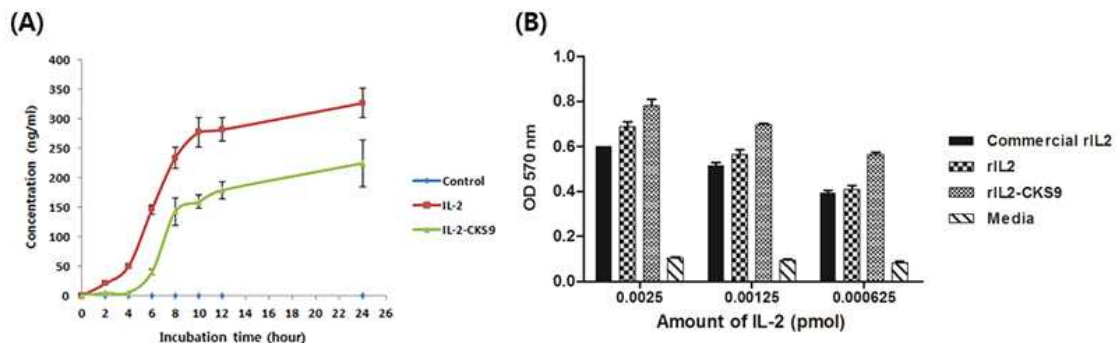


그림 48. (A) IL-2 생산량 측정 (B) MTT assay를 통한 IL-2 활성 검사

(3) 마우스 면역실험을 통한 IL-2 효과 실증 실험

IL-2의 실제 *in vivo*에서 효과를 검정하기 위해 마우스 실험을 진행하였다. 이 때 사용한 모델 항원은 ovalbumin을 이용하였고 상용 IL-2와 IL-2 및 M 세포 표적형 IL-2를 생산하는 유산균과 같이 처리한 그룹을 추가하였고 음성대조군으로 ovalbumin 단독그룹과 PBS 처리 그룹을 이용하였고 양성대조군으로 강력한 면역보강제인 cholera toxin을 사용하였다. 그 결과 혈청의 IgG는 양성대조군에서 가장 높게 나타났지만 양성대조군을 제외하면 M 세포 표적형 IL-2를 생산하는 유산균의 경우에서 가장 높은 경향을 보였다. 분변내 IgA를 측정하였을 때도 동일한 경향을 보였다. 이처럼 유산균에서 생산하는 IL-2 단백질은 온전한 T 세포 증식능력을 가지고 있으며 cytokine으로서 점막면역반응의 면역보강제로의 가능성을 제시하였다 (그림 48).

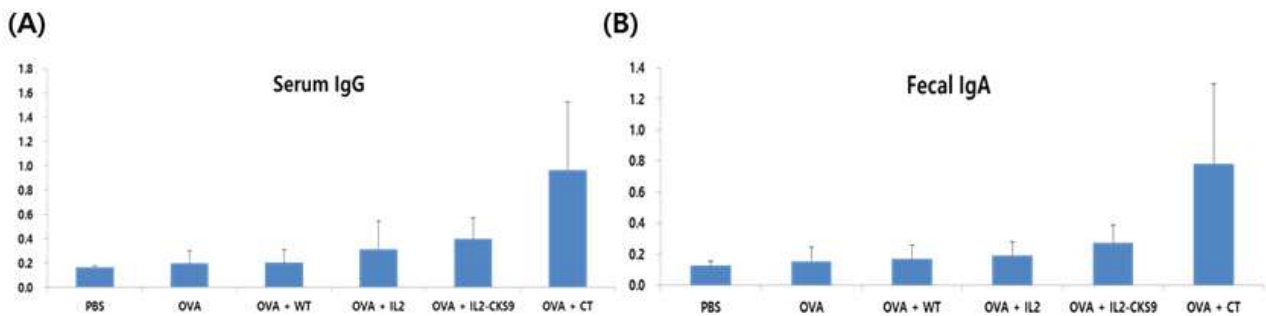


그림 48. (A) 혈중 IgG 생산량 측정 (B) 분변 중 IgA 항체 생산량 측정

제3절 2세부과제 : 점막면역백신의 체내 전달 효율 증진을 위한 가축 백신 담지 고분자 전달체 개발 및 생산.

1. 경구백신 전달 고분자 개발

가. Thiolated HPMCP 고분자 백신 전달체 개발

(1) Thiolated HPMCP 고분자 전달체의 개발

(가) HPMCP 고분자에 점막점착성 티올기 도입

Thiolated HPMCP는 그림 49의 반응식에서 나타내는 바와 같이 4g (0.0118 mol)의 HPMCP의 카르복실기와 0.41g (0.00236 mol)의 L-cysteine의 아미노기를 DMSO에 녹인 활성화제인 DCC/NHS를 사용하여 N₂가스를 공급하면서 실온에서 24시간 반응을 시켜 아마이드결합으로 티올기를 도입하였다. DMSO를 사용하여 반응에 참가하지 않은 L-cysteine을 48시간 투석하여 제거한 후, 다시 D·W로 72시간 투석하여 DMSO를 제거하고 동결건조하여 티올기가 도입된 CAP을 얻었다. 도입된 티올기의 양은 그림 38의 NMR측정에 의하여 10.37 mol%가 도입된 것을 확인하였다 (그림 50).

(나) Thiolated HPMCP 미립자의 제조

Thiolated HPMCP 미립자는 전형적인 W/O/W 이중 에멀전 방법을 이용하여 형성한다. 자세한 방법으로는 oil 상은 dichloromethane (DCM)을, 안정제는 Pluronic F-127을, external 수용상은 1% (w/v) PVA를 사용하고 Ultra Turrax homogenizer로 11000 rpm으로 미립자를 제조한다. 미립자 제조시에 internal 수용액상에 BmpB (모델단백질)을 혼합하여 백신을 담지하였고 제조된 미립자의 형태는 Field-emission SEM으로 관찰하였는데 그림 51에 나타내는 바와 같이 크기는 대부분 1~10 μm 정도의 크기를 나타냈다.

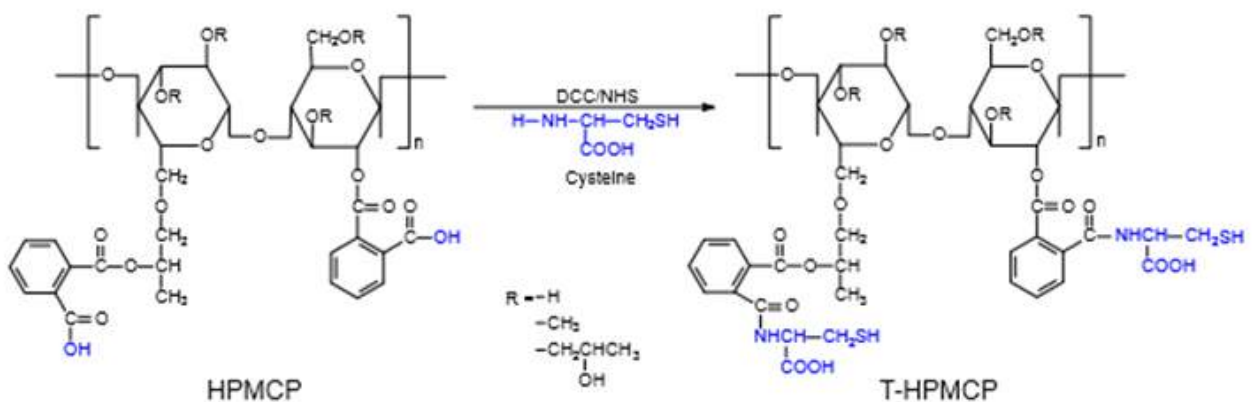


그림 49. T-HPMCP 합성 모식도

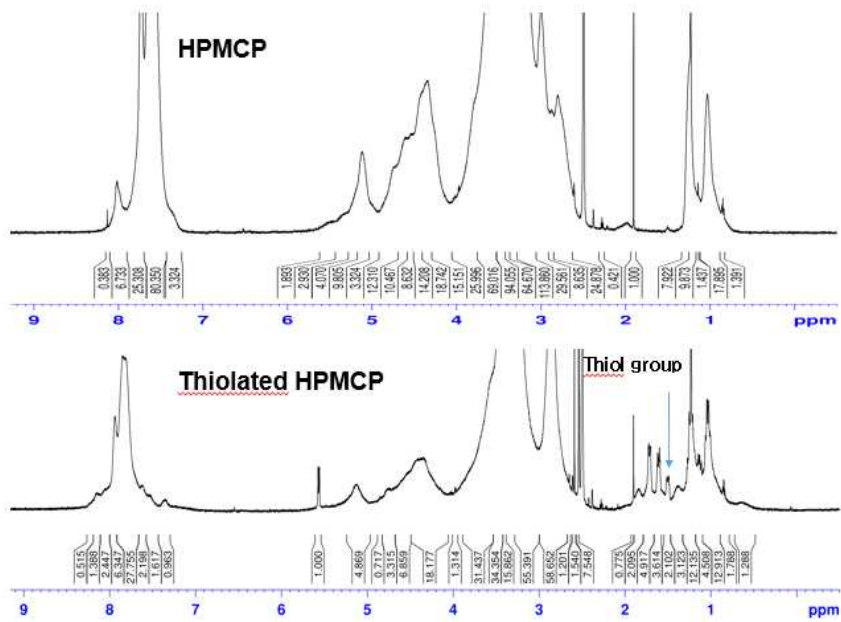


그림 50. H^1 NMR 측정을 통한 티올기 도입 확인

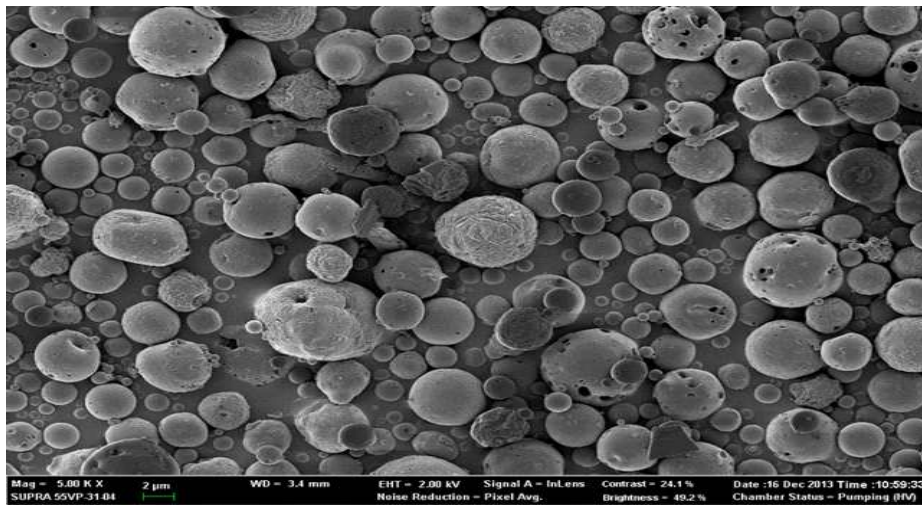


그림51. BmpB를 loading한 Thiolated HPMCP 미립자

(2) 소화기 점막면역 증진을 위한 티올화 고분자 담지체의 합성

(가) Thiolated HPMCP 고분자 전달체의 개발

① *In vitro*에서 티올화된 미립자의 점막 점착성 평가(*ex vivo*)

Thiolated HPMCP의 점막점착성을 평가하기 위하여, FITC로 라벨링한 T-HPMCP와 HPMCP 미립자 10mg을 1ml의 sodium phosphate buffer (pH 7.0)와 sodium acetate buffer (pH 5.0)에 분산시킨 뒤, 슬라이드 글라스에 고정된 돼지 소장 점막에 분산시켰다. 슬라이드 글

라스는 각각의 버퍼 40 ml가 담긴 falcon tube에 수직으로 놓은 채 37 °C에서 100 rpm으로 교반하며 2시간동안 incubation하였다. 점막에 붙은 미립자를 긁어 모아 1 M NaOH에서 37 °C에서 30 분간 두어 가수분해하였다. 그 뒤 10,000 x g에서 5분간 원심분리 후 200 ul의 상층액을 취하고 microplate reader로 495nm에서 FITC의 흡광도를 측정 한 뒤 standard curve로부터 농도를 계산하였다.

그 결과 2 시간 경과 후, HPMCP 미립자는 처음 로딩량의 40 %만 점막 표면에 남아있는 반면, T-HPMCP 미립자는 평균 69 %가 점막에 남아있는 것으로 나타났다. 이에 따라 T-HPMCP 미립자는 HPMCP 미립자보다 1.72 배 높은 점막점착능을 보였다 (그림52).

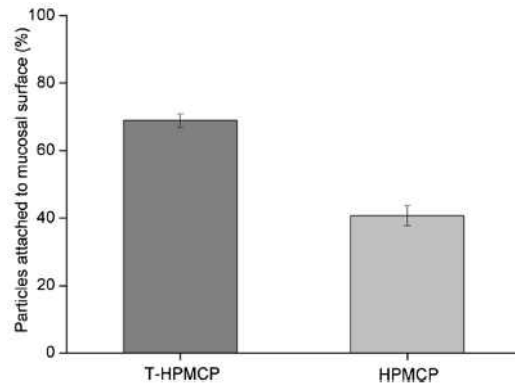


그림 52. Thiolated HPMCP의 점막점착성 비교실험

② 미립자에 백신담지 특성 조사

미립자에 담지된 단백질 담지량 (Loading content)을 구하기 위하여 건조된 미립자 5mg을 His-binding buffer (pH 7.9) 250ul에 분산시킨 후 1.5ml의 dichloromethane을 더하여 실온에서 2시간 동안 rotating shaker를 이용하여 일정한 교반을 시키며 유기용액으로부터 버퍼로 단백질을 추출하였다. 6000g에서 10분간 원심분리 후, 수용액 200ul을 거두어내어 BCA protein assay로 M-BmpB content를 계산하였다. Loading content는 아래에 표기된 식에 의해 계산되었으며, HPMCP 미립자는 loading content가 2.86 ± 1.32%이었으며, T-HPMCP 미립자는 7.54 ± 1.71% 였다.

T-HPMCP의 단백질 경구전달 효능을 평가하기 위하여 M-BmpB를 담지하였으며, 단백질 담지 효율 (Encapsulation efficiency)은 미립자 제조시 사용된 총 항원 단백질량에 대한 실제 담지된 항원 단백질의 양의 비율로 나타내어진다 (그림 53). Double-emulsion 방법으로 제조된 HPMCP 미립자의 담지효율은 80.97 ± 1.55%였고, T-HPMCP 미립자는 83.20 ± 1.43%의 담지효율을 나타내었다.

$$\text{Encapsulation efficiency (wt.-%)} = \frac{\text{Total protein} - \text{Free protein}}{\text{Total protein}} \times 100$$

$$\text{Loading contents (wt.-%)} = \frac{\text{Weight of loaded protein}}{\text{Total weight}} \times 100$$

그림 53. 고분자 미립자의 단백질 담지효율 지표 계산식

수용액 상에서 미립자의 직경 및 입자사이즈 분포는 DLS (Dynamic light scattering)를 이용하여 측정하였다. 미립자의 평균 직경은 T-HPMCP는 $3.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ 이고, HPMCP의 경우 $3.771 \pm 0.4 \mu\text{m}$ 로 나타났으며, 각각 사이즈 분포가 좁게 나타남을 관찰할 수 있었다 (그림 54).

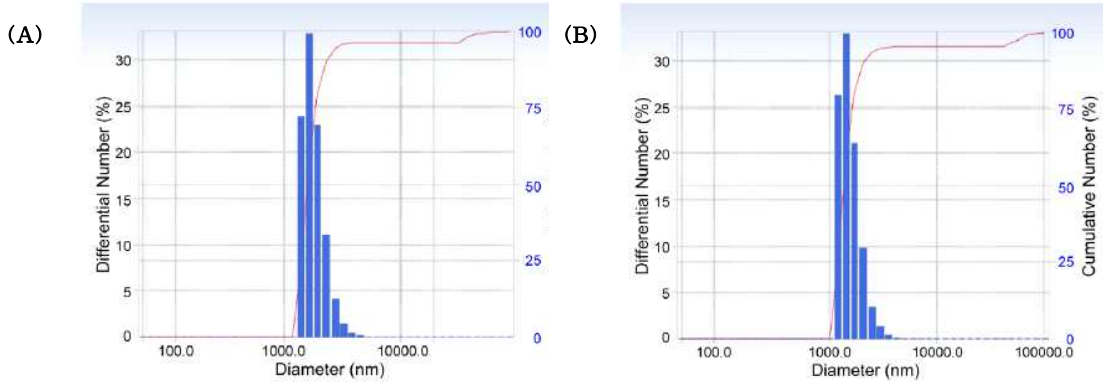


그림 54. T-HPMCP (A)와 HPMCP (B) 미립자의 평균 직경 및 사이즈 분포

③ *In vitro* 에서 미립자에 담지된 백신의 보호 효과와 방출실험

T-HPMCP와 HPMCP의 *in vitro* release 양상을 살펴보기 위해 각 위, 소장, 회장의 생리적 조건을 모방한 pH 2.0, pH 6.0, pH 7.4에서 37°C를 유지하며 시간에 따른 백신 누적방출량을 미립자에 담지된 백신의 양에 대한 비율로 나타내었다. 예상대로, T-HPMCP와 HPMCP 미립자는 pH 의존적으로 백신을 방출하였다. 용해 pH가 5.5인 HPMCP 미립자는 pH 2에선 소량의 백신을 방출하고 pH 6.0과 7.4에서는 대부분의 백신을 즉각적으로 방출하였다. 이와 대조적으로 T-HPMCP 미립자는 pH 2.0에서 백신의 방출량이 낮지만, pH 7.4에서 2시간 후부터 서서히 조절형 방출이 일어나며, 10시간 내에 미립자 내의 약 85 %의 백신이 방출되었다. 이는 높은 pH에서 고분자의 용해에 의해 생성된 많은 구멍으로부터 많은 양의 단백질이 방출되는 것으로 보인다 (그림 55).

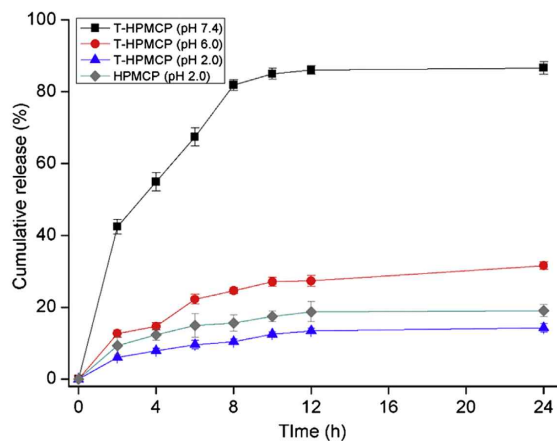


그림 55. T-HPMCP 미립자의 *in vitro* release behavior

CD (Circular Dichroism)를 이용하여 미립자에 로딩하기 전 후 M-BmpB의 고차구조의 변화를 확인하고자 하였다. Naive M-*BmpB*와 미립자로부터 방출된 M-*BmpB*의 CD spectra는 그림 53에 나타내었다. UV-CD spectra에서 naive M-*BmpB*와 미립자로부터 방출된 M-*BmpB*의 molar ellipticity minima가 모두 210nm와 230nm에서 동일하게 나타남에 따라 담지된 단백질의 α -helical 2차구조가 그대로 유지됨을 확인하였다 (그림 56).

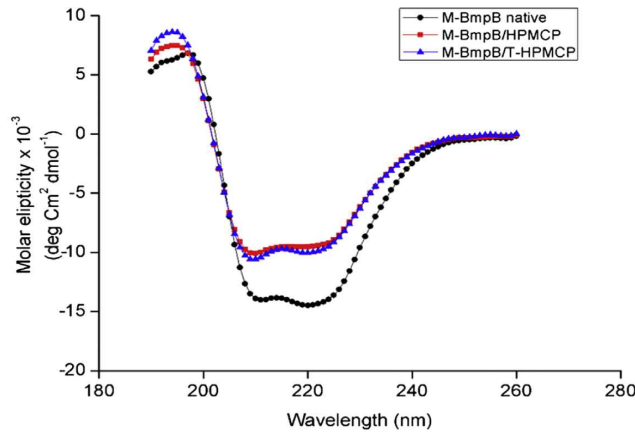


그림 56. 미립자 담지 전 후 M-BmpB의 Secondary structure

④ *In vitro* 에서 회장 특이적 백신 전달 효과 규명

T-HPMCP의 회장 선택적 전달의 증명을 위하여 FITC-labeled M-BmpB를 쥐에 경구투여하고 8시간 뒤 회장의 Peyer's patch를 적출하여 CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)으로 관찰하였다. 실험 결과, FAE (Follicle-associated epithelium) 하부에 항원이 cluster 형태로 관찰됨을 통해 M 세포를 통한 효과적인 항원의 uptake가 이루어짐을 확인하였다. 또한 GALT (gut associated lymphoid tissue) 영역으로 들어간 항원의 양은 HPMCP 미립자에선 적게 나타났지만, T-HPMCP 미립자의 경우 GALT 영역에 분산될 뿐만 아니라 Image J로 분석한 결과 HPMCP보다 평균 2.7배 높은 항원이 전달되었다 (그림 57).

⑤ *In vitro* 에서 수지상세포에 의한 미립자 방출 항원의 cellular uptake

면역세포로부터의 면역반응 개시와 더불어 단백질 항원의 효율적 전달을 위하여, 미립자로부터 방출된 항원의 cellular internalization을 확인하는 *in vitro* 실험을 수지상 세포를 이용하여 진행하였다. FITC로 labeling된 M-*BmpB*/HPMCP 또는 M-*BmpB*/T-HPMCP 미립자를 JAWS II 세포에 처리하여 4시간 동안 incubation하여 CLSM로 관찰한 결과, 두 미립자에서 방출된 FITC-labeled M-*BmpB* 모두 세포 내에 효과적으로 들어가는 것을 확인하였다. 세포로 흡수된 항원의 양은 서로 비슷하였다 (그림 58).

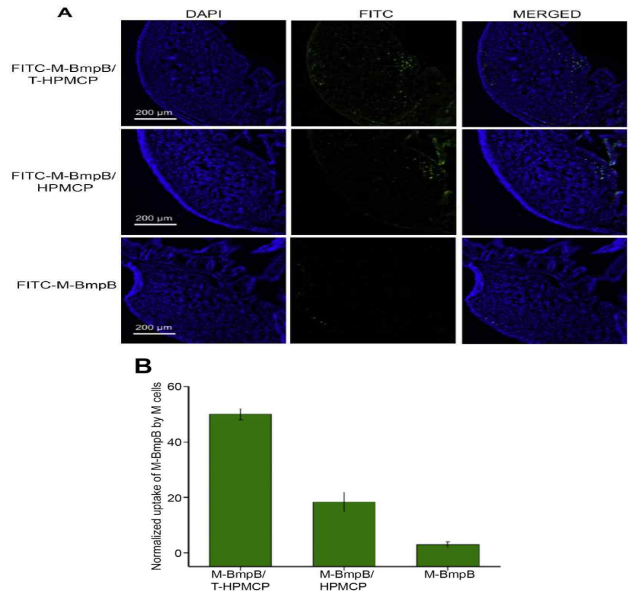


그림 57. 쥐의 소장 Peyer's patch내 FITC-labeled M-*BmpB*의 Localization

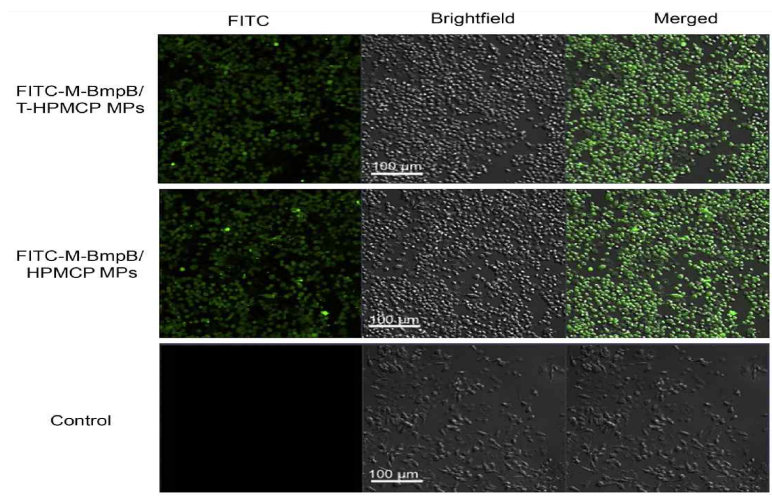


그림 58. 수지상세포에 uptake된 FITC-labeled 항원의 공초점형광현미경 이미지

⑥ *In vivo* 미립자 경구 투여에 따른 항원 특이적 면역반응 유도효과 규명

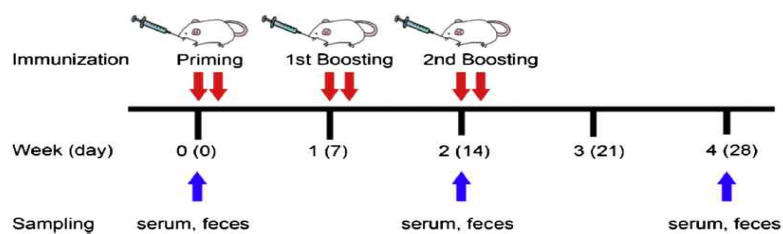


그림 59. *In vivo* oral immunization 실험 스케줄

T-HPMCP 미립자를 통한 단백질 전달이 담지된 항원에 대한 면역 반응을 유도하는지 알아

보기 위하여 쥐를 대상으로 항원 담지 미립자 (T-HPMCP, HPMCP), M-*BmpB*, PBS를 경구 투여하여 실험스케줄에 따라 0, 2, 4주차에 혈청 및 분변 샘플을 채취하여 ELISA를 실시하였다 (그림 59). T-HPMCP 미립자 담지 항원은 HPMCP 미립자에 비해 전기간 동안 항원 특이적 항체수준이 상당히 증진되었다. M-*BmpB* 혹은 PBS 단독 투여군에서는 면역반응이 거의 유도되지 않았다. T-HPMCP 미립자를 통한 면역반응 유도시 HPMCP 미립자군에 비해 약 1.56 ± 0.20 배 높은 분변 항체수준 (그림 60 (A))과 약 1.63 ± 0.21 배 높은 혈청 항체 수준 (그림 60 (B))이 유도되었으며, M-*BmpB* 단독 투여군에 비해 약 4.66 ± 0.18 배 높은 분변 항체 수준과 4.78 ± 0.12 배 높은 혈청 항체 수준이 유도되었다. 생성된 항체의 isotype을 분석한 결과, 미립자 종류에 관계없이 IgG 1 (그림 60 (C))보다 IgG2a (그림 60 (D)) 수준이 더 높은 것으로 나타나 Th1 type 항체가 우세한 반응이 나타남을 알 수 있었다.

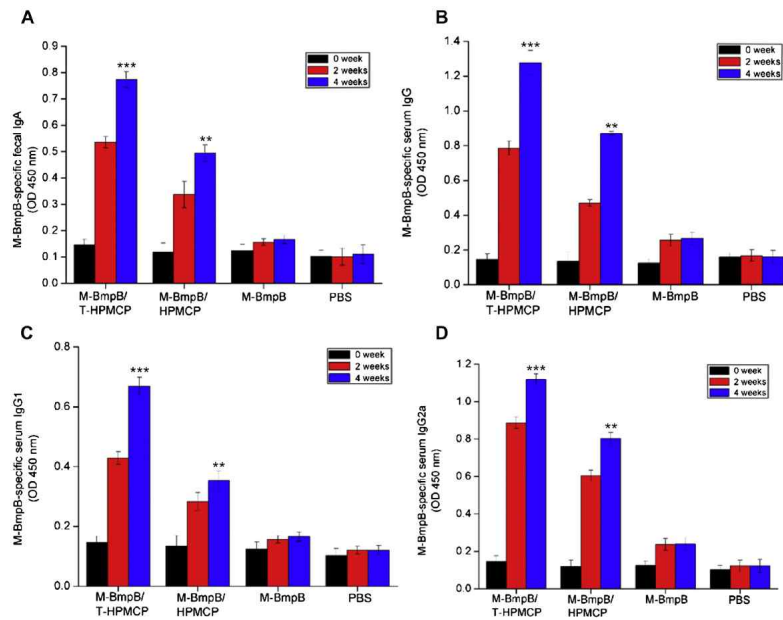


그림 60. 미립자 경구투여에 따른 항원 특이적 면역반응 (분변, 혈청)

⑦ 회장 Peyer's patch 내 면역세포 군집 변화 분석

장내 lamina propria 영역, 특히 Peyer's patch 내의 수지상세포는 장 내장의 항원의 sampling 및 processing을 통해 T세포에 제시하는 중요한 역할을 한다. 따라서 회장의 Peyer's patch로부터 수지상세포를 분리하여 *in vivo*상에서 항원과 반응하는 특정 면역세포를 알아보하고자 CD11c와 MHCII 마커를 이용한 multicolor flow cytometry로 수지상세포 군집을 분석하였다. 실험 결과, M-*BmpB*/HPMCP 미립자를 경구투여한 쥐에서 CD11c 양성, MHC-II 양성 수지상세포가 각 33.8%, 25.6%인데 반해 M-*BmpB*/T-HPMCP 미립자 투여군은 각각 36.0%, 27.7%로 증가된 군집을 보여주었다 (그림 61).

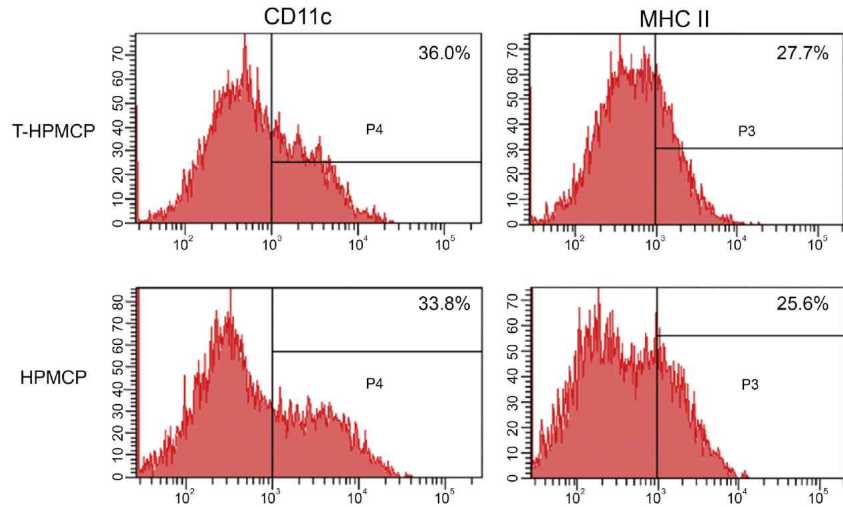


그림 61. 경구투여 후 Peyer's patch 내 특정 면역세포의 Flow cytometry 분석 결과

⑧ *in vivo*에서 비장 내 CD4⁺ T세포의 up-regulation 분석

효과적인 항원 전달의 최종 결과, 향후 후천성 면역을 담당하는 memory cell처럼 면역세포를 비장에 축적시키게 된다. 단백질 항원의 특정 T세포 반응 유도능을 알아보기 위하여, 항원을 투여한 쥐에서 분리한 splenocyte를 *in vitro* 상에서 cell stimulation cocktail로 자극한 뒤 CD4⁺, IFN- γ 및 IL-4에 대한 세포내 cytokine staining을 실시 후 flow cytometry로 분석하였다. 실험 결과, M-BmpB/T-HPMCP 미립자군은 HPMCP 미립자 혹은 대조군에 비해 IFN- γ 생성 항원특이적 CD4⁺ T세포가 현저히 증가하였다. 특히, IL-4 분비 CD4⁺ T세포의 비율에 대해선 면역화된 군과 대조군간의 유의적 차이가 발견되지 않았다 (그림 62).

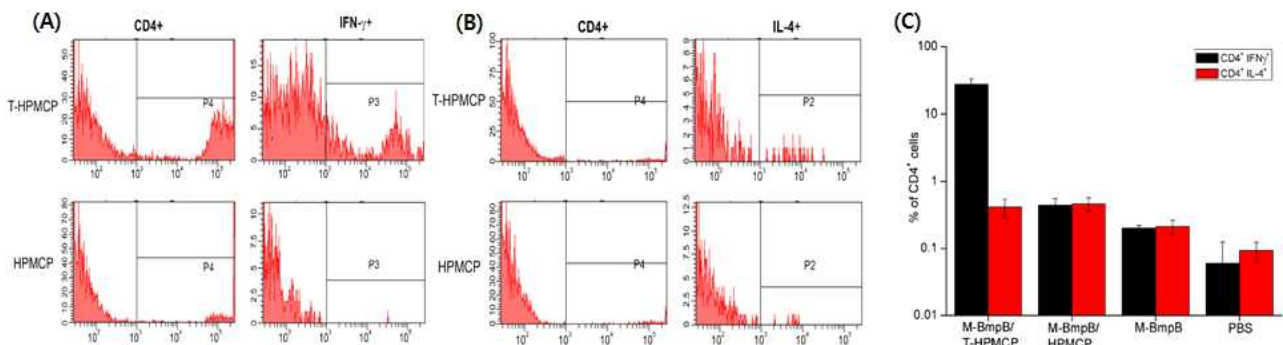


그림 62. CD4⁺IFN- γ ⁺ T세포에 대한 Flow cytometry 분석 결과 (A), CD4⁺IL-4⁺ T세포에 대한 Flow cytometry 분석 결과 (B), IFN- γ 및 IL-4 분비 CD4⁺ 세포의 비교 분석 (C)

나. Thiolated CAP 고분자 백신 전달체 개발

(1) CAP (cellulose acetate phahalate) 고분자의 특성

Cellulose acetate phthalate (다른 명칭: Cellacefate)는 pH-sensitive cellulose derivative로서 약물을 위산으로부터 보호하거나 위에서 부작용을 일으키지 않도록 코팅하거나 타블렛 제조에 이용되는 enteric coating제로 널리 이용되고 있다. CAP의 기본구조는 셀룰로오스 (cellulose)이며 수산화기의 29.7 mol%가 phthalyl group, 70.3 mol%가 acetyl group으로 이루어져있다. CAP는 pH 2의 강한 위산으로부터 용해되지 않지만, 소장의 중성 pH부터 약한 산성의 환경에서는 용해되는 특징을 지니기 때문에 단백질 또는 유산균 형태 vaccine의 bioavailability를 증진시킬 수 있다.

(2) CAP (cellulose acetate phthalate) 고분자에 티올기 도입

Thiolated CAP는 그림 63의 반응식에서 나타내는 바와 같이 4g (0.01051 mol)의 CAP의 카복실기와 0.37g (0.002102 mol)의 L-cysteine의 아미노기를 DMSO에 녹인 활성화제인 DCC/NHS를 사용하여 N₂가스를 공급하면서 실온에서 24시간 반응을 시켜 아마이드결합으로 티올기를 도입하였다. 반응 후 DMSO를 사용하여 반응에 참가하지 않은 L-cysteine을 48시간 투석하여 제거한 후, 다시 DW로 72시간 투석하여 DMSO를 제거 하고 동결 건조하여 티올기가 도입된 CAP을 얻었다. 도입 된 티올기의 양은 그림 36의 NMR측정에 의하여 phthalyl group의 34.9 mol%가 도입되었으며, 전체 고분자에 티올기는 10.37 mol%가 도입된 것을 확인하였다 (그림 64).

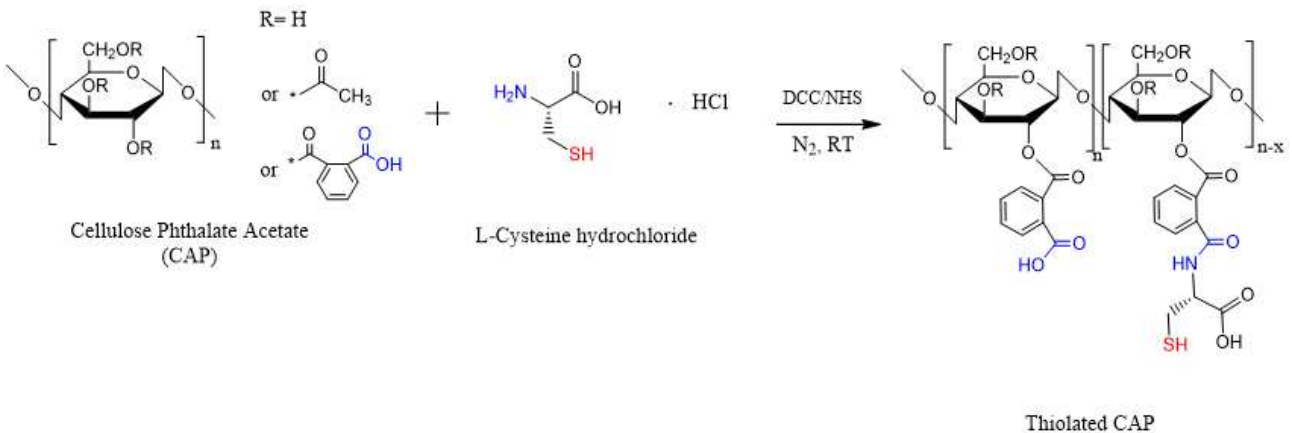


그림 63. T-CAP 개발 합성 모식도

(3) Thiolated CAP 미립자의 제조

Thiolated CAP 미립자는 전형적인 W/O/W 이중 에멀전 방법을 이용하여 형성한다. 자세한 방법으로는 oil 상은 dichloromethane (DCM)을, 안정제는 Pluronic F-127을, external 수용상은 1% (w/v) PVA를 사용하고 Ultra Turrax homogenizer로 11000 rpm으로 미립자를 제조한다. 미립자 제조시에 internal 수용액상에 PED 바이러스 항원 단백질 혹은 bovine serum albumin (모델단백질)을 혼합하여 백신을 담지하였고 제조된 미립자의 형태는 FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope)으로 관찰하였다 (그림 65). 크기는 대부분 1 - 10µm 정도의 크기를 나타냈다.

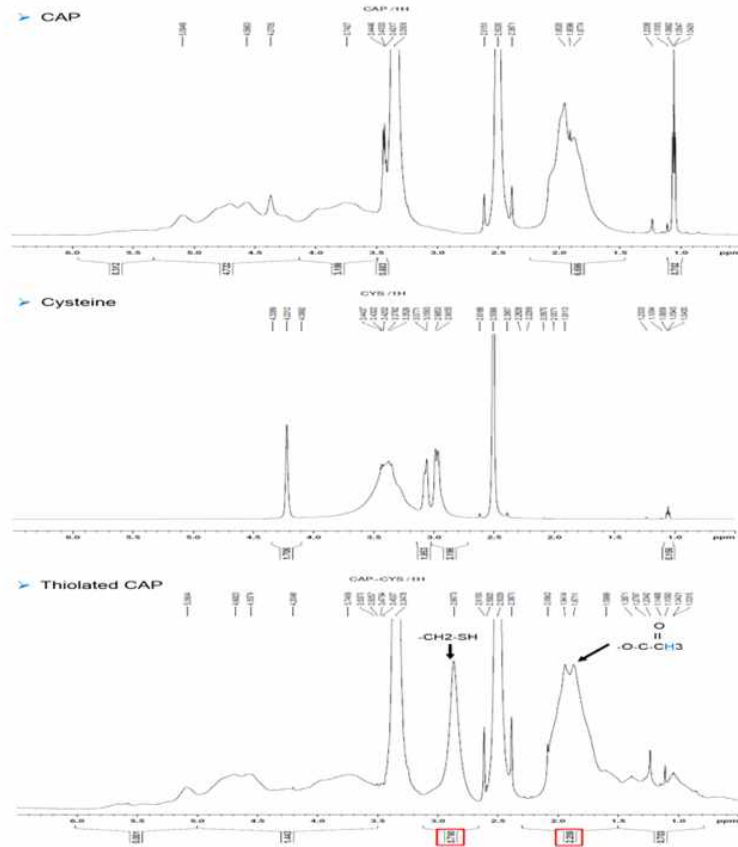


그림 64. H^1 NMR 측정을 통한 티올기 도입 확인

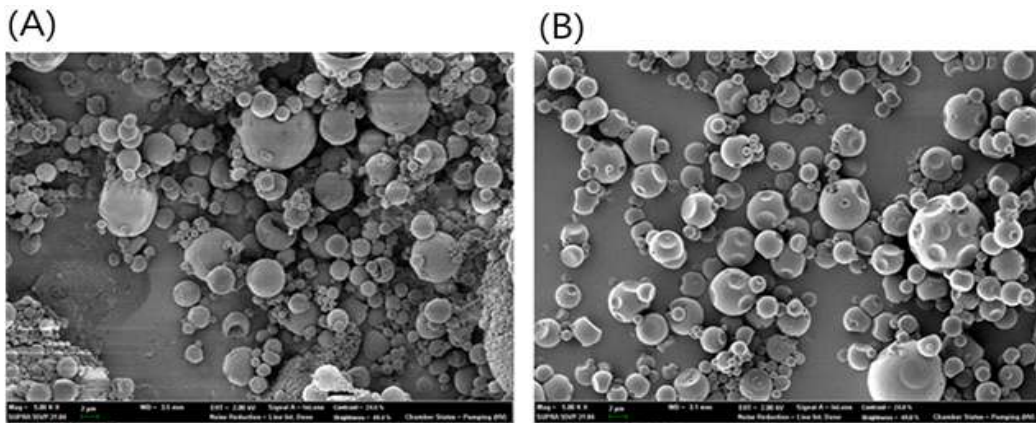


그림 65. CAP (A)와 Thiolated CAP (B) microsphere의 FE-SEM 사진

(4) T-CAP 특성 분석

T-CAP 미립자의 특성을 분석하기 위하여 1세부에서 개발한 M5BT 단백질을 혼합하여 미립자를 만들고 pH 2의 위장환경을 모방한 용액과 pH 7의 소장내 환경을 모방한 용액에 넣어 단백질 방출특성을 확인하였다. CAP는 pH2에서 단백질 방출이 적고 pH7에서 단백질 방출이 100% 가까이 발생하는 것을 확인하였다. T-CAP의 경우에는 pH 2에서는 CAP와 비슷한 양상을 보이며 pH 7에서는 조금 늘어나 24시간이 되면 50% 정도의 방출을 보였다. 이는 T-CAP

의 점막점착성을 높이기 위한 Thiol 기가 미립자 내부에서 이황화결합을 이루면서 훨씬 더 정교한 구형의 미립자가 만들어지는 대신에 용액에 용해되는 양상이 줄어든 것으로 생각된다. 또 돼지의 소장 점막층에 결합하는 점막점착능력을 확인하였을 때 T-CAP가 CAP 보다 약 50% 증가된 점막점착능력을 보였다. 이는 단백질 방출량은 줄었지만 장내에 점막에 점착하여 유지 시간이 증가함에 따라 충분히 보완할수 있는 특성이라 여겨진다 (그림 66).

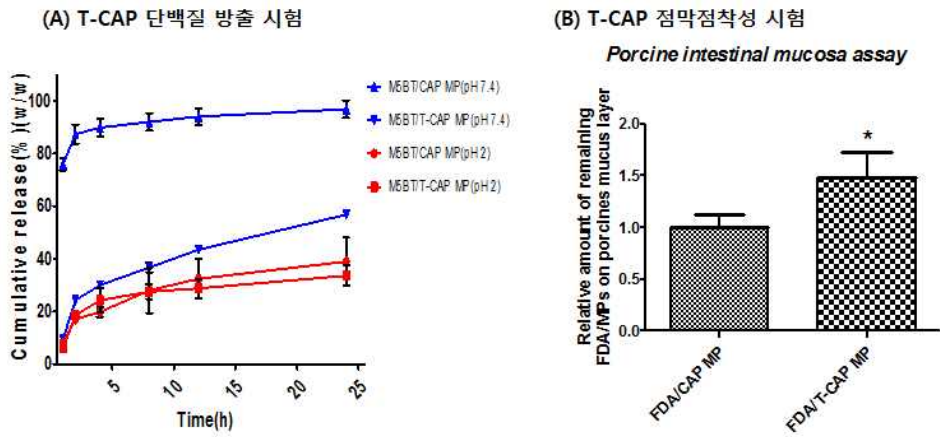


그림 66. T-CAP 특성 규명

(5) T-CAP 마우스 면역 실험

(가) 마우스 면역실험 계획

1세부에서 개발한 M5BT 단백질을 활용하여 마우스 면역실험을 계획하였다. M5BT 단백질을 T-CAP 고분자에 담지하였고 경구 및 주사를 통해 면역실험을 비교하고자 하였다. 먼저 M5BT 단백질을 CFA 면역보강제와 함께 처리하여 근육주사를 준 것과 불활화 백신을 접종한 것은 양성대조군으로 두고 M5BT 단독 경구투여 그룹, CAP 담지 그룹 그리고 T-CAP 담지 그룹을 두었다. 주사그룹은 20ug의 양을 접종하였고 경구투여 그룹은 200ug을 접종하였다. 경구투여 그룹은 주 2회로 투여하였고 주사그룹은 2주에 1회 접종하였다 (그림 67).

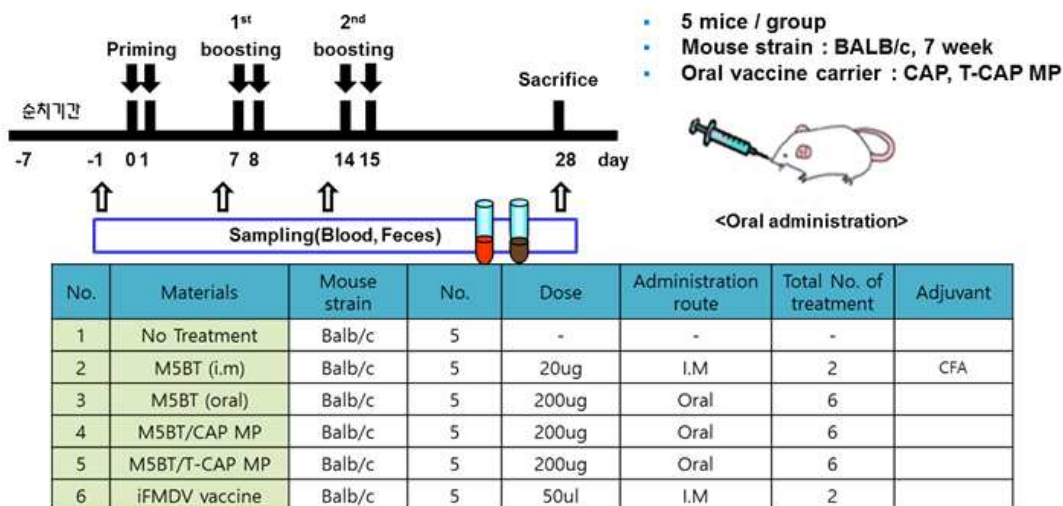


그림 67. T-CAP 코팅 FMD 항원 경구면역 실험 계획

(나) 면역지표 분석

먼저 분변 내 IgA를 분석하였다. 경구투여한 그룹이 주사그룹에 비해 높은 IgA 생산경향을 보였으며 경구투여 그룹 내에서도 T-CAP에 담지한 M5BT의 경우 가장 높은 경향성을 보였다. 반대로 혈청 내 IgG를 분석하였을 때는 경구그룹은 음성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 주사그룹에서는 높은 경향성을 보이는 것을 확인하였다 (그림 68).

(다) FMD 특이적 항체 측정

단백질에 의해 생산된 항체가 실제 FMD 바이러스를 인식할수 있는지 확인하기 위해 VDpro FMDV type O ELISA를 이용하여 분석하였다. 주사그룹에서는 50이상의 효과를 보였지만 경구그룹에서는 음성대조군과의 유의적인 결과를 보이지 않았다. 경구투여의 경우에 혈청에서 항체생성능력이 주사에 비해 떨어지는 경향은 이미 보고된 바 있으며 IgA를 이용한 정확한 분석법이 필요한 것으로 생각된다 (그림 69).

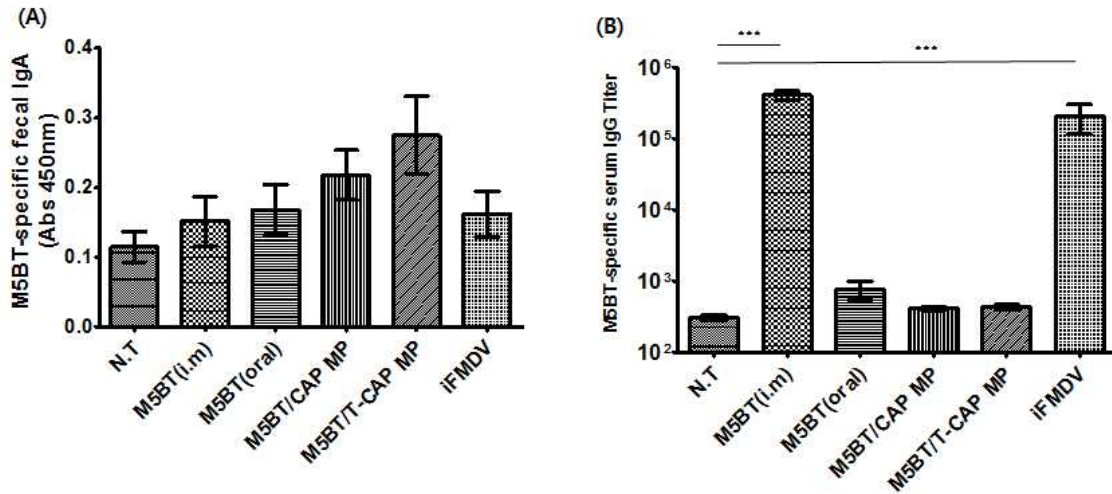


그림 68. (A) M5BT 특이적 장내 IgA 역가 분석, (B) 혈중 M5BT 특이적 IgG 역가 분석

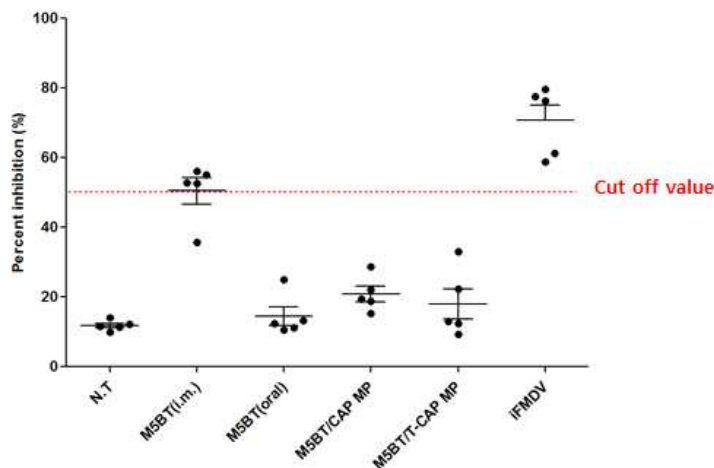


그림 69. FMD 바이러스 특이적 항체 측정

2. 비강투여백신 전달 고분자 개발

가. Mannan이 수식 된 thiolated Eudragit L-100 고분자 전달체 (Man-TEM)의 개발

(1) *In vitro*에서 TEM (OVA)와 Man-TEM (OVA)의 방출거동 분석

pH 7.4의 조건에서 OVA (Ovalbumin, 모델단백질)를 담지 한 TEM (OVA)와 Man-TEM (OVA)의 시간대별 단백질의 방출거동을 관찰하였다. Thiolated Eudragit은 pH민감성 고분자인 Eudragit L-100에 thiol그룹을 도입하여 modification하여 합성한 것으로서 modification이후에도 그 pH민감성을 지니고 있는 것을 확인 할 수 있었다. TEM (OVA)와 Man-TEM (OVA)에 담지 된 OVA는 2 시간 이내에 약 50 %정도의 담지 되어 있던 단백질을 빠르게 방출시켰고, 24 시간 이내에는 약 60 %정도의 단백질을 방출하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 70). 또한, Man-TEM (OVA)와 TEM (OVA)의 단백질 방출거동에 있어서는 큰 차이가 없는 것을 확인 하였다.

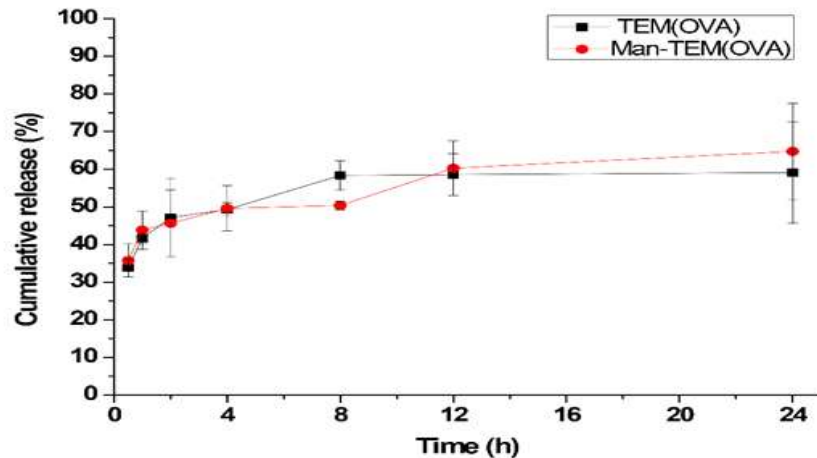


그림 70. pH7.4에서 TEM (OVA), Man-TEM (OVA)에 담지 된 OVA 단백질의 방출효과 검증

(2) Man-TEM의 항원제시세포의 receptor 표적능력 및 항원제시세포에 의한 microparticle의 uptaking 양상 확인

TEM 표면에 mannan을 수식함으로써 항원제시세포에 있는 Mannose receptor (MR)를 타겟팅을 할 수 있는지를 검증하기 위하여 mouse의 대식세포 cell line인 Raw264.7을 이용하여 uptaking assay와 receptor competition assay를 진행하였다. FITC로 라벨링이 되어있는 OVA-FITC를 담지 한 TEM (OVA-FITC)와 Man-TEM (OVA-FITC)를 Raw264.7 cell에 처리 후 1시간과 2시간이 지난 시점에 FACS를 이용하여 microparticle을 uptaking한 cell을 정량하였다. 또한 receptor competition assay를 진행하기 위하여 3mg/ml의 mannan을 전처리하여 MR을 블로킹을 하였다. Uptaking assay 결과, Man-TEM (OVA-FITC)이 TEM (OVA-FITC)에 비해 Raw264.7 cell에 의해 1시간과 2시간에서 더 많이 uptaking이 되는 것을

확인 하였다. Receptor competition assay 결과, MR를 블로킹할 경우 Man-TEM (OVA-FITC)는 1시간대에 uptaking양상이 inhibition이 되는 것을 확인함으로써 Raw264.7 cell에서의 Man-TEM (OVA) uptaking 증가는 receptor mediated phagocytosis를 통해 일어나는 것을 검증하였다 (그림 71).

(3) 항원제시세포에 의한 microparticle의 phagocytosis확인

Man-TEM (OVA-FITC)와 TEM (OVA-FITC)를 confocal dish에 배양한 Raw264.7 cell에 동일한 양으로 처리한 후 2시간 뒤 uptaking되지 않은 microparticle은 washing을 통하여 제거하고 세포의 핵은 DAPI로 염색 후 confocal microscopy를 이용하여 관찰하였다. 그 결과, Man-TEM (OVA-FITC)와 TEM (OVA-FITC) microparticle이 Raw264.7 cell에 의해 phagocytosis되는 양상을 확인하였고 uptaking된 세포의 수는 FACS로 측정하였을때와 마찬가지로 Man-TEM (OVA)그룹에서 더 많이 uptaking되는 것을 확인하였다 (그림 72).

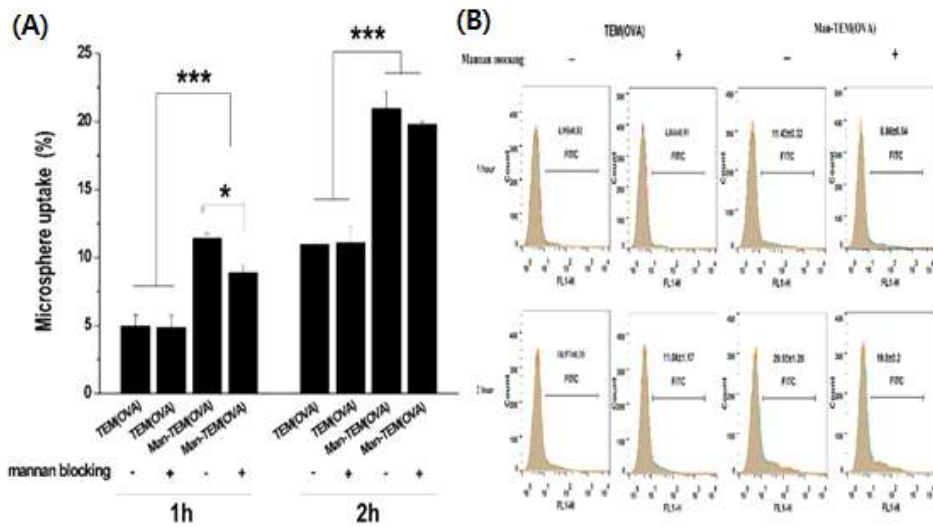


그림 71. Man-TEM (OVA-FITC)의 Raw264.7 cell line에 의한 uptaking assay 결과

(4) Mouse *in vivo* immunization 실험

In vivo immunization 실험을 통하여 mannan이 수식된 Man-TEM (OVA)이 항원제시세포를 타겟팅하여 효과적으로 비강면역효과를 높일 수 있는지를 검증하고자 하였다. 실험 그룹은 PBS그룹, soluble OVA그룹, OVA 담지 TEM (OVA)과 OVA 담지 Man-TEM (OVA)그룹으로 구성된 비강점막면역 실험그룹과 soluble한 OVA를 근육주사를 통해 주입한 그룹으로 구성된 전 신면역유도 실험그룹으로 정하여 진행하였다. 면역실험에 사용한 단백질 및 microparticle의 양은 soluble OVA를 기준으로 20 ug을 투여하였다. 비강점막면역 실험그룹은 0 주차, 1 주차, 2 주차, 3 주차 간격으로 비강을 통하여 immunization하였고 근육주사그룹은 0 주차, 1 주차, 2 주차 3 번에 걸쳐서 immunization을 시켰다. 실험 종료 시점인 6 주차에 각각

serum, BAL (brochealveolar lavage), nasal wash, vaginal wash, intestinal wash를 sampling 하여 IgG와 sIgA level을 ELISA를 통하여 측정하였다 (그림 73).

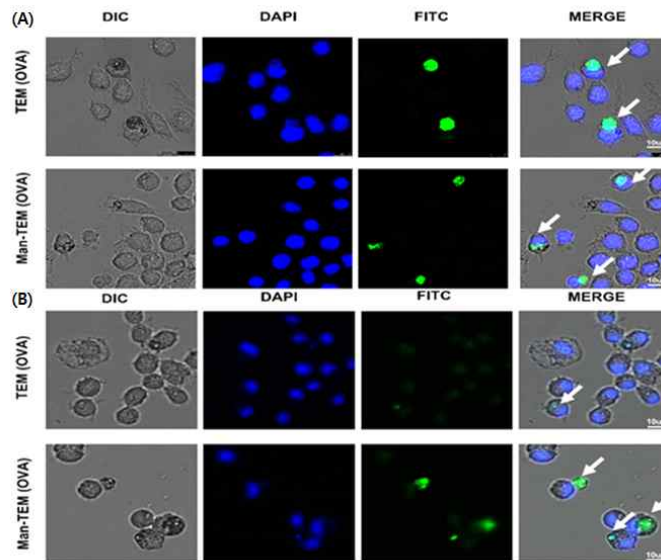


그림 72. Raw 264.7 cell에 의한 microparticle의 phagocytosis 양상 확인

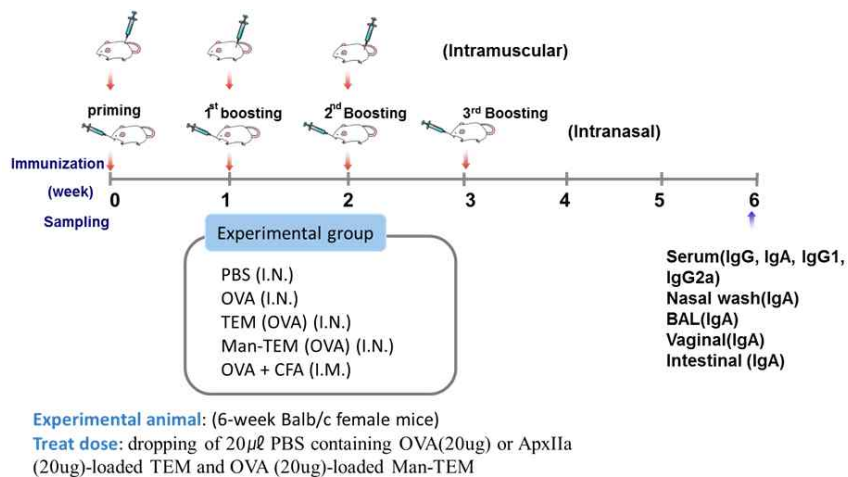


그림 73. Mouse *in vivo* immunization 스케줄 및 그룹 분배

(5) 점막면역에서의 OVA 특이적 sIgA 항체 분석

비강 혹은 근육주사를 통해 면역반응을 유도 후 BAL과 nasal wash에서 sIgA를 측정된 결과 Man-TEM (OVA) 그룹이 TEM (OVA) 그룹과 soluble한 OVA 그룹에 비해 더 높은 sIgA titer 값을 나타내는 것을 확인하였다. 그 뿐만 아니라 호흡기와 같은 local한 immune response 뿐만 아니라 vagina, intestine에서도 sIgA를 검출할 수가 있어서 distal한 mucosal immune response도 일으킬 수 있는 것을 확인하였다. sIgA titer 값은 호흡기에서 일어난 면역반응과 비

슷한 양상으로 Man-TEM (OVA)그룹에서 가장 높게 나왔다. 반면, 근육주사를 통해 면역을 시킨 그룹에서는 점막면역의 지표인 sIgA가 굉장히 낮게 나타나 점막면역반응을 유도하지 못하고 있다는 것을 확인하였다 (그림 74).

(6) Serum에서 OVA특이적 IgG, IgA 항체 분석

6주차 serum을 분석해본 결과, Man-TEM (OVA)그룹에서 TEM (OVA)그룹과 soluble한 OVA그룹에 비해 높은 항체가가 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 근육주사를 통해 주사한 그룹에서 Man-TEM (OVA)그룹에 비해 항체가가 낮게 나타나는 것은 아마도 투여횟수가 다른 이유에서 비롯된 것임을 예측할 수가 있다. 그 밖에 Th1 면역반응과 Th2 면역반응 지표인 혈청 IgG2a와 IgG1 subtype을 분석해 본 결과 Man-TEM (OVA)를 비강을 통해 면역을 시킨 그룹에서 전부 IgG2a와 IgG1값이 높게 나타난 것으로 보아 Th1과 Th2 타입의 면역반응이 함께 증진이 된 것임을 알 수 있었다 (그림 75).

나. Mannan이 수식 된 thiolated HPMCP 고분자 전달체 (Man-THM)의 개발

(1) HPMCP에 티올 그룹 도입

Thiolated HPMCP는 4g (0.0118 mol)의 HPMCP의 카르복실기와 0.41g (0.00236 mol)의 L-cysteine의 아미노기를 DMSO에 녹인 활성화제인 DCC/NHS를 사용하여 N₂가스를 공급하면서 실온에서 24 시간 반응을 시켜 아마이드결합으로 티올기를 도입하였다 (그림 76). 반응에 참가하지 않은 L-cysteine은 DMSO에서 48 시간 투석하여 제거한 후, D.W로 72 시간 투석하여 잔존 DMSO를 제거하고 동결건조하여 티올기가 도입된 thiolated HPMCP를 얻었다. 도입된 티올기의 양은 NMR측정에 의하여 10.37 mol%가 도입된 것을 확인하였다 (그림 77).

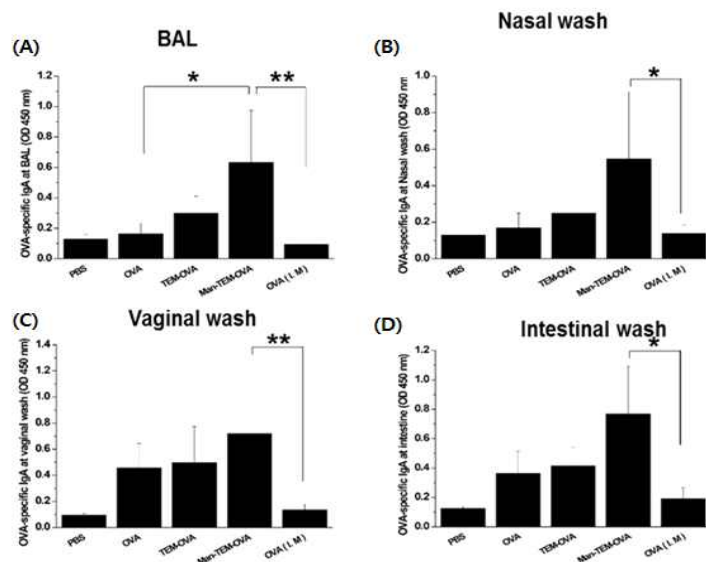


그림 74. 점막에서의 OVA 특이적 sIgA 측정 결과 * P < 0.1, ** P < 0.05 유의성

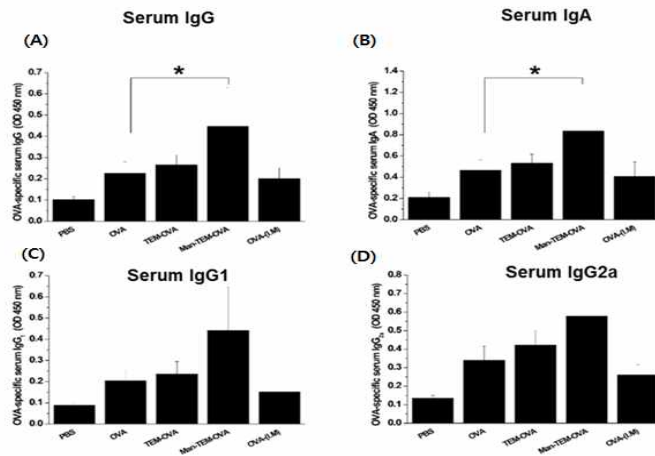


그림 75. 혈청 OVA 특이적 IgG, IgG1, IgG2a와 IgA 측정 결과 * P < 0.1, ** P < 0.05 유의성

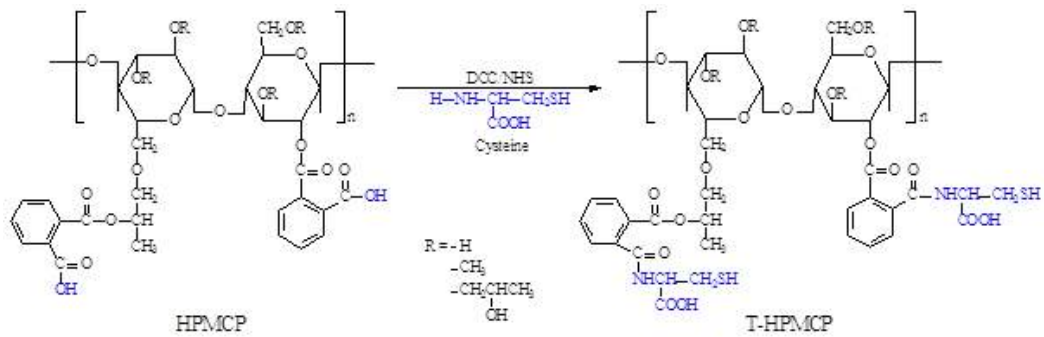


그림 76. HPMCP 화학구조와 티올기 도입 모식도

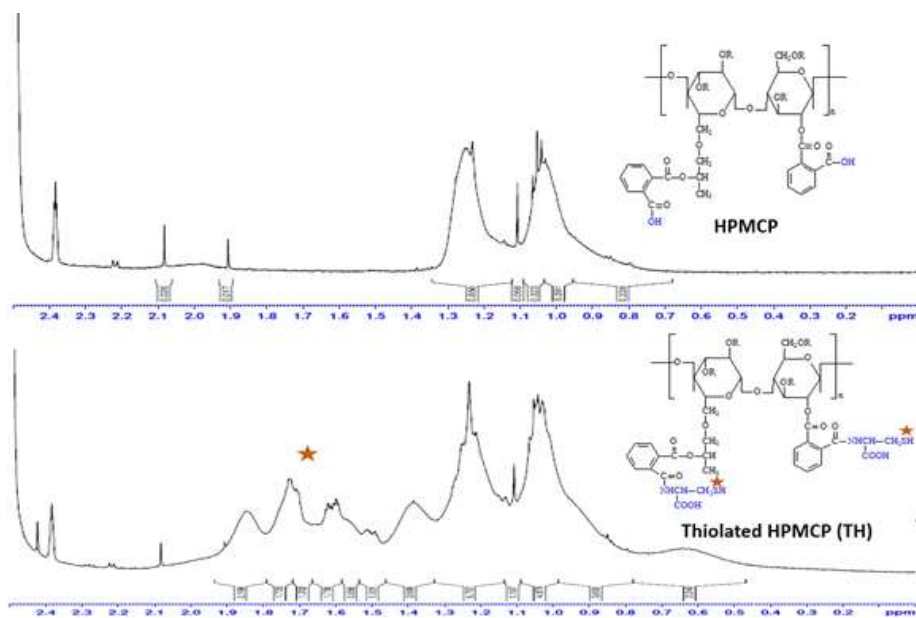


그림 77. H^1 NMR 측정을 통한 티올기 도입 확인

(2) Mannan이 수식 된 thiolated HPMCP 고분자 담지체 (Man-THM)의 형성

Thiolated HPMCP 미립자는 전형적인 W/O/W 이중 에멀전 방법을 이용하여 형성하였다. 자세한 방법으로는 oil 상은 dichloromethane (DCM)을, 안정제는 Pluronic F-127을, external 수용상은 1% (w/v) PVA를 사용하고 Ultra Turrax homogenizer로 11000 rpm으로 미립자를 제조하였다. 미립자 제조시에 internal 수용액상에 ApxIIA 항원단백질 (Actinobacillus pleuroneumonia exotoxin fragment) 혹은 OVA-FITC (형광이 연결된 단백질)을 혼합하여 백신을 담지하였다. Man-THM (mannan decorated thiolated HPMCP microsphere)은 기타방법은 동일하지만 external 수용상으로 0.25% (w/v) PVA와 0.5% (w/v) mannan를 혼합하여 사용하였고 Ultra Turrax homogenizer로 11000 rpm으로 미립자를 제조하였다. 제조된 미립자의 형태는 FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope)으로 관찰하였는데 DLS (Dynamic light scatter)로 크기를 측정하였는데 대부분 1-5 μ m 정도의 크기를 나타내고 있었다 (그림 78).

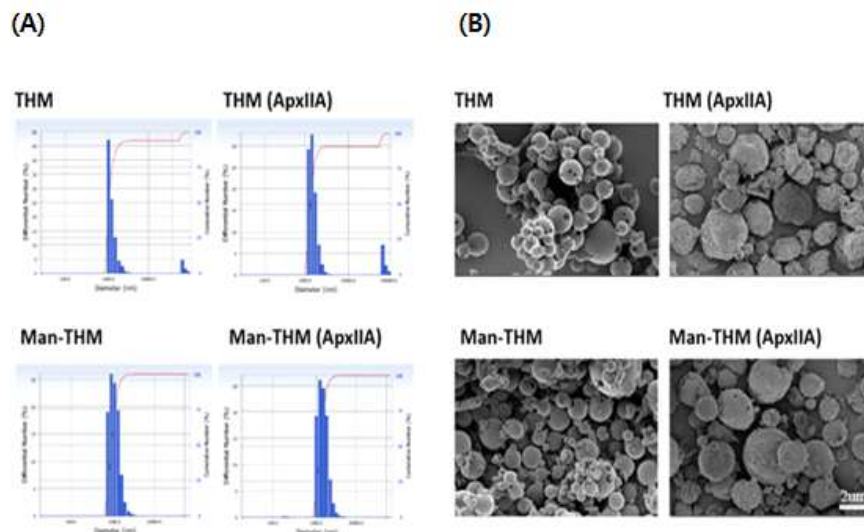


그림 78. 항원단백질을 담지 혹은 담지하지 않은 THM과 Man-THM의 size분포도와 FE-SEM사진.

(3) THM고분자 담지체에 mannan molecule의 수식여부 검증

External 수용액상에 mannan을 용해시켜 이중 에멀전 방법을 통하여 미립자를 형성할 때, mannan molecule이 미립자의 표면에 coating이 되었는지를 정성적으로 판단하기 위해, mannan에 FITC를 결합시킨 molecule을 이용하여 형광현미경을 통하여서 검증하였다. Mannan-FITC molecule이 Man-THM미립자의 표면에 coating이 되어 있는 것을 확인하였다 (그림 79).

(4) *In vitro*에서 THM (ApxIIA)와 Man-TEM (ApxIIA)의 방출거동 분석

pH 7.4의 조건에서 ApxIIA (항원단백질)를 담지 한 THM (ApxIIA)와 Man-TEM (ApxIIA)

의 시간대별 단백질의 방출거동을 관찰하였다. THM (ApxIIA)와 Man-TEM (ApxIIA)에 담지된 ApxIIA는 10시간 이내에 약 50 %정도 방출이 되는 것을 확인하였고 또한, THM (ApxIIA)와 Man-TEM (ApxIIA)의 단백질 방출거동에 있어서는 큰 차이가 없는 것을 확인 하였다 (그림 80 (A)). 또한, 항원단백질을 담지체에 담지시킬때에 구조적으로 변성이 생기지는 않았는지 확인하기 위하여 THM (ApxIIA)과 Man-TEM (ApxIIA)에 담지되어 있던 단백질을 방출시킨 후 SDS-PAGE를 통하여 확인해본 결과 담지 전의 단백질과 동일한 위치에서 밴드가 확인이 되는 것으로 보아 단백질의 구조적인 변성이 일어나지 않은 것으로 판단되었다 (그림 80 (B)).

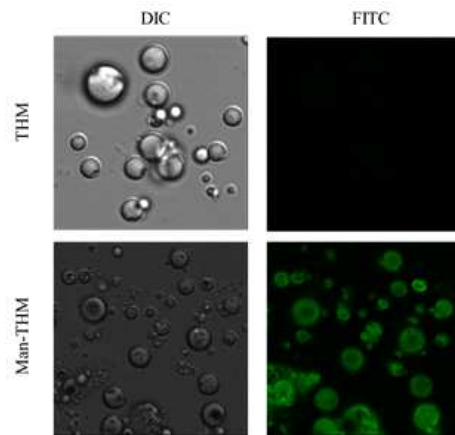


그림 79. Man-THM 미립자 표면에 mannans의 코팅 검증

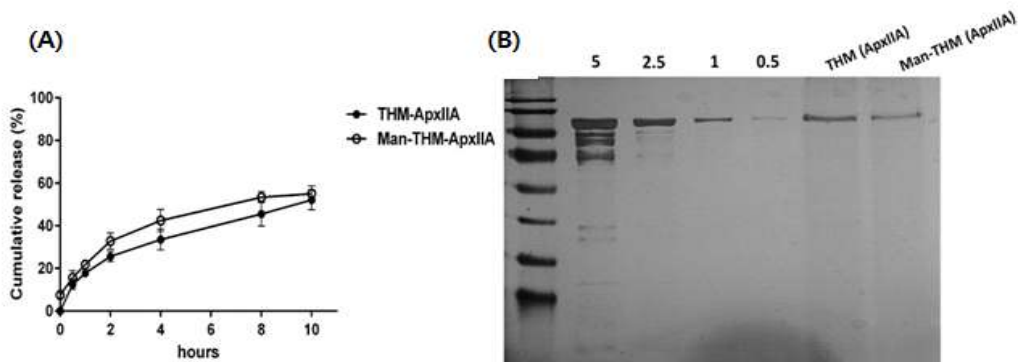


그림 80. *In vitro* pH7.4 조건에서 방출거동 분석 (A). SDS-PAGE를 통한 단백질 담지 전, 후의 단백질 구조적 변화 검증 (B) (1:5ug ApxIIA, 2: 2.5ug ApxIIA, 3: 1ug ApxIIA, 4: 0.5ug ApxIIA, 5: 100ug THM (ApxIIA)에서 방출 된 ApxIIA, 6:100ug Man

(5) Man-THM의 항원제시세포의 mannose receptor 표적능력 및 항원제시세포에 의한 microparticle의 uptaking양상 확인

THM표면에 mannans을 수식함으로써 항원제시세포에 있는 mannose receptor (MR)를 타겟팅을 할 수 있는지를 검증하기 위하여 mouse의 대식세포 cell line인 Raw264.7을 이용하여 uptaking assay와 receptor competition assay를 진행하였다. FITC로 라벨링이 되어있는

OVA-FITC를 담지한 THM (OVA-FITC)와 Man-THM (OVA-FITC)를 Raw264.7 cell에 처리 후 1 시간과 2 시간이 지난 시점에 FACS를 이용하여 microparticle을 uptaking한 cell을 정량하였다. 또한 receptor competition assay를 진행하기 위하여 3 mg/ml의 mannan을 전처리하여 MR을 블로킹하였다. Uptaking assay 결과, Man-THM (OVA-FITC)이 THM (OVA-FITC)에 비해 Raw264.7 cell에 의해 1시간에서 더 많이 uptaking이 되는 것을 확인하였지만 2 시간에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 2시간대에 Raw264.7 cell이 거의 대부분의 microparticle을 uptaking하여 나타나는 양상으로 추측된다. Receptor competition assay 결과, MR를 블로킹할 경우, 1 시간대와 2 시간대에 모두 uptaking 양상이 inhibition이 되는 것을 확인함으로써 Raw264.7 cell의 Man-THM (OVA-FITC)의 uptaking 증가는 receptor mediated phagocytosis를 통해 일어나는 것을 검증하였다. Man-THM (OVA-FITC)와 THM (OVA-FITC)를 confocal dish에 배양한 Raw264.7 cell에 동일한 양으로 처리한 후 2 시간 뒤 uptaking되지 않은 microparticle은 washing을 통하여 제거하고 세포의 핵은 DAPI로 염색 후 confocal microscopy를 이용하여 관찰하였다. 그 결과, Man-THM (OVA-FITC)와 THM (OVA-FITC) microparticle이 Raw264.7 cell에 의해 phagocytosis되는 양상을 확인하였고 uptaking된 세포의 수는 FACS로 측정하였을때와 마찬가지로 Man-THM (OVA)그룹에서 더 많이 uptaking되는 것을 확인하였다 (그림 81).

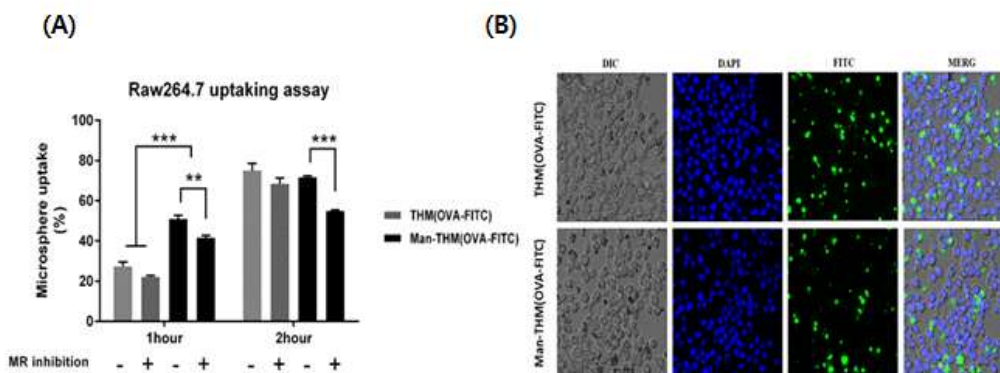


그림 81. Man-THM (OVA-FITC)의 raw264.7 cell line에 의한 uptaking assay 결과 (A), Raw 264.7 cell에 의한 microparticle의 phagocytosis양상 확인 (B)

(6) Mouse *in vivo* immunization 실험

In vivo immunization 실험을 통하여 mannan이 수식된 Man-THM (ApxIIA)이 항원제시세포를 타게팅하여 효과적으로 비강면역효과를 높일 수 있는지를 검증하고자 하였다. 실험 그룹은 비강점막면역 실험그룹으로 PBS그룹, soluble ApxIIA그룹, ApxIIA를 담지한 THM (ApxIIA)과 ApxIIA를 담지한 Man-THM (ApxIIA)그룹으로, soluble한 ApxIIA를 FA (Freud adjuvant)와 함께 피하주사를 통해 주입한 그룹을 전신면역유도 실험그룹으로 정하여 진행하였다. 면역실험에 사용한 단백질 및 microparticle의 양은 soluble ApxIIA를 기준으로 5ug을 투여하였다. 0 주차, 1 주차, 2 주차, 3주 차 간격으로 비강과 피하주사를 통하여 immunization을 시켰다. Sampling은 6 주차에 각각 serum, BAL, nasal wash, vaginal wash를 얻어 그 중의 항원 특이적인 IgG와 sIgA를 ELISA를 통하여 측정하였다 (그림 82).

(7) 점막면역에서의 ApxIIA 특이적 sIgA 항체 분석

비강 혹은 근육주사를 통해 면역반응을 유도 후 BAL과 nasal wash에서 sIgA를 측정된 결과 Man-THM (ApxIIA)그룹이 THM (ApxIIA)그룹과 soluble한 ApxIIA그룹에 비해 더 높은 sIgA titer값을 나타내는 것을 확인하였다. 그 뿐만 아니라 호흡기와 같은 local한 immune response뿐만 아니라 vagina에서도 sIgA를 검출할 수가 있어서 distal 한 mucosal immune response도 일으킬 수 있는 것을 확인하였다. sIgA titer값은 호흡기에서 일어난 면역반응과 비슷한 양상으로 Man-THM (ApxIIA)그룹에서 가장 높게 나왔다. 반면, 피하주사를 통해 면역을 시킨 그룹에서는 점막면역의 지표인 sIgA가 굉장히 낮게 나타나 점막면역반응을 유도하지 못하고 있다는 것을 확인하였다 (그림 83).

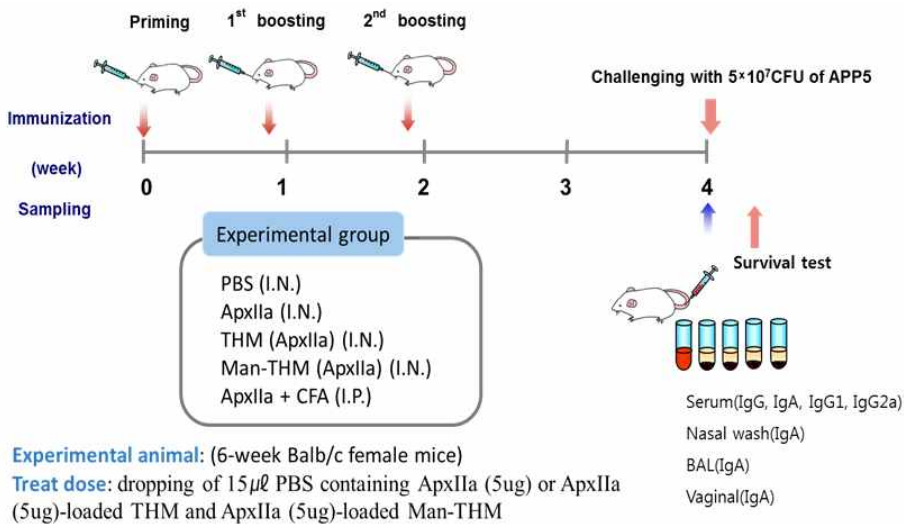


그림 82. Mouse *in vivo* immunization 스케줄 및 그룹 분배

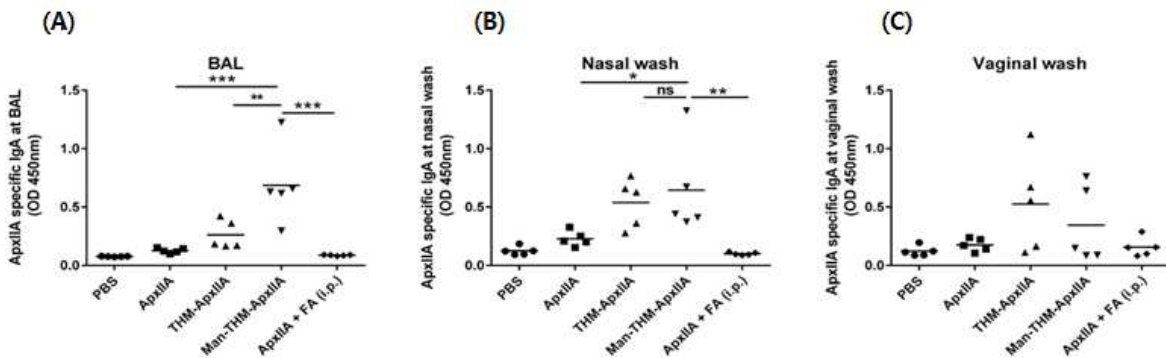


그림 83. 점막에서의 ApxIIA 특이적 sIgA 측정 결과 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 유의성

(8) Serum에서의 ApxIIA 특이적 IgG, IgA 항체 분석

6 주차 serum의 분석 결과, Man-THM (ApxIIA)그룹에서 THM (ApxIIA)그룹과 soluble한 ApxIIA그룹에 비해 높은 항체가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그 밖에 Th1 면역반응과

Th2 면역반응 지표인 혈청 IgG2a와 IgG1 subtype을 분석해 본 결과 Man-THM (ApxIIA)를 비강을 통해 면역을 시킨 그룹에서 전부 IgG2a와 IgG1값이 높게 나타난 것으로 보아 Th1과 Th2 타입의 면역반응이 함께 증진이 된 것임을 알 수 있었다. 특히, IgG2a와 IgG1 ratio를 비교해 보았을 때 microparticle형태로 면역을 시킨 그룹에서 Th1/Th2 ratio가 증가하는 양상을 확인하였고, 또한 Man-THM (ApxIIA)그룹에서 Th1/Th2 ratio가 더 많이 증가하는 것을 확인함으로써 Th1-biased immune response를 유도하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 84).

(9) 공격접종 실험

면역실험 시작 4주차에 5×10^7 CFU 수준의 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5를 비강을 통하여 공격접종을 실시하였다. 공격접종 후 4일에 거쳐 mouse의 상태를 관찰하여 survival test를 진행하였다. 실험결과, 면역을 시키지 않은 (non-treat)그룹과 피하주사로 면역을 시킨 그룹에서는 20%의 생존율을 보이는 반면 비강을 통하여 면역을 시킨 그룹에서는 100%의 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 실험종료 후 lung 조직을 적출하여 관찰한 결과, 폐사한 개체의 lung에서 hemolysis가 일어남이 관찰되었다. 또한 lung에 내존하고 있는 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 counting해본 결과 Man-THM (ApxIIA)그룹에서 bacteria가 기타 그룹에 비해 가장 적게 존재하고 있는 것으로 나타나, 높게 생성된 항체가 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 공격접종으로부터 효과적으로 방어를 하고 있다는 것을 검증할 수 있었다 (그림 85).

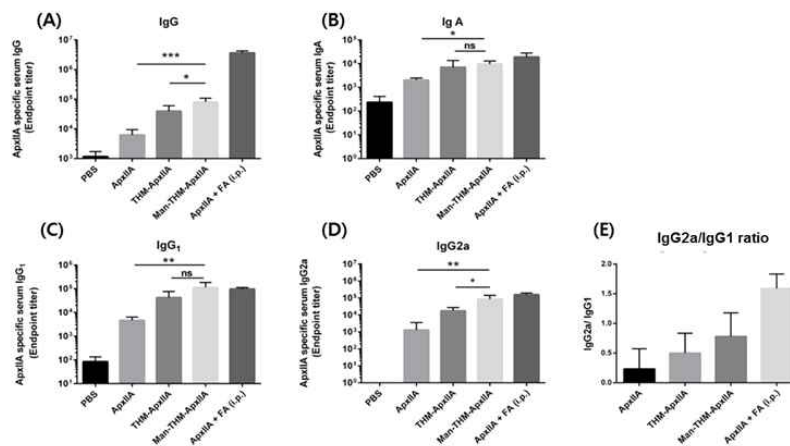


그림 84. 혈청 ApxIIA 특이적 IgG, IgG1, IgG2a와 IgA 측정 결과 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 유의성

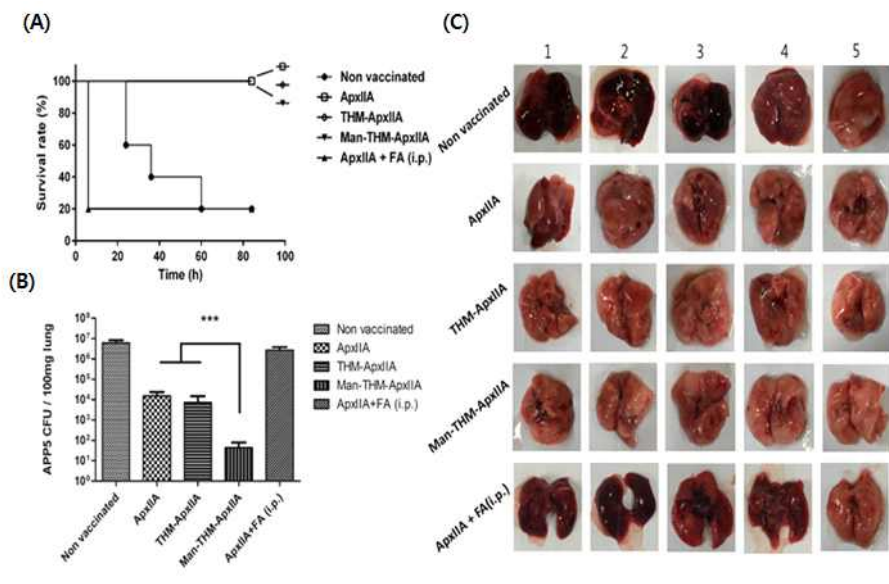


그림 85. 공격접종 및 survival test 결과

제4절 1협동과제 : 병원체 공격접종을 통한 표적형 점막면역 백신 효과 실증 연구 (PED, FMD).

1. 표적형 점막면역백신을 이용한 돼지유행성설사병 효과 실증연구

가. Maltose binding protein (MBP)를 이용한 PED immunization 시험

(1) 1차 *in vivo* 자돈 PED immunization 시험

본 연구에서는 대장균에서 발현한 inclusion body 형태의 MBP-SP1 및 MBP-SP1-CKS9의 항원으로써의 유효성을 검증하기 위하여 *in vivo* PED 음성자돈을 이용하였다. 항원은 10 mg/dose 및 1 mg/dose로 3일 연속 경구 투여하고 2주 후 1회 경구 투여한 그룹과 1 mg/dose로 피하주사 1회하고 2주 후 1회 피하주사한 그룹으로 4주 동안 시험을 진행 하였다 (표 8). 측정 항목은 중화항체 실험으로 혈중 IgG를 확인하였고 ELISA를 통해 혈중 IgA 및 분변 내 IgA 양을 측정하였다.

표 8. 1차 *in vivo* 자돈 PED immunization 실험군

Group	Inoculation	Heads	Inoculation method
1	MBP-SP1, 10 mg	3	실험 시작 후 연속 3일 3회, 2주 후 1회 경구투여
2	MBP-SP1-CKS9, 10 mg	3	실험 시작 후 연속 3일 3회, 2주 후 1회 경구투여
3	MBP-SP1, 1 mg	3	실험 시작 후 연속 3일 3회, 2주 후 1회 경구투여
4	MBP-SP1-CKS9, 1 mg	3	실험 시작 후 연속 3일 3회, 2주 후 1회 경구투여
5	MBP-SP1, 1 mg	3	실험 시작 후 1회, 2주 후 1회 피하주사
6	MBP-SP1-CKS9, 1 mg	3	실험 시작 후 1회, 2주 후 1회 피하주사
7	상용 PED 경구백신	2	실험 시작 당일 및 2주 후 1회 경구투여

*MBP-SP1 : N-terminal 말단에 maltose binding protein (MBP) fusion된 재조합 단백질

*MBP-SP1-CKS9 : N-terminal 말단에 maltose binding protein (MBP) fusion 및 C-terminal 말단에 CKS9 (M cell targeting peptide) fusion된 재조합 단백질



그림 86. *In vivo* 자돈 PED 재조합 단백질 경구투여

표 9. 혈중 IgG 중화항체 실험결과 (Japan strain, 1차 *in vivo*)

Group	0주차 채혈	2주차 채혈	4주차 채혈
1	<2	<2	2X
	<2	2X	2X
	<2	<2	4X
2	2X	<2	2X
	2X	2X	4X
	2X	4X	4X
3	2X	2X	2X
	<2	2X	4X
	<2	2X	2X
4	<2	<2	2X
	<2	<2	2X
	<2	2X	2X
5	<2	<2	4X
	2X	2X	2X
	<2	<2	2X
6	<2	2X	4X
	<2	2X	4X
	<2	2X	2X
7	<2	4X	8X
	2X	8X	16X

표 10. 혈중 IgG 중화항체 실험결과 (SM-98 strain, 1차 *in vivo*)

Group	0주차 채혈	2주차 채혈	4주차 채혈
1	2X	2X	4X
	<2	2X	2X
	<2	4X	4X
2	2X	<2	4X
	2X	2X	8X
	<2	4X	4X
3	2X	2X	2X
	<2	2X	4X
	<2	2X	4X
4	<2	<2	2X
	2X	<2	2X
	<2	2X	4X
5	<2	<2	4X
	2X	2X	2X
	<2	<2	2X
6	<2	2X	4X
	2X	2X	4X
	<2	2X	2X
7	<2	4X	8X
	2X	4X	8X

경구투여는 그림 86처럼 직접 경구를 통해 재조합 단백질을 투여 하였다. 중화항체 실험 결과 접종 2주차, 4주차에 걸쳐 모든 그룹에서 중화항체 실험을 통해 항원 특이적 IgG 수치가 증가하는 경향을 미미하게 나타내었다 (표 9과 표 10). 하지만 이러한 결과는 중화항체 실험 시 사용하는 바이러스 strain에 따라 차이를 보일 것으로 생각되는데, 표 8과 표 9을 비교해보면 SM-98 strain으로 중화항체 실험을 하였을 경우 Japan-PED strain으로 실험 했을 때 보다 나은 중화항체 실험결과를 얻을 수 있었다. 이러한 사실은 중화항체 실험을 함에 있어서 어떤 strain으로 실험을 하느냐가 중요한 요인이라고 사료된다. 실험결과 상용화된 PED 경구용 백신보다는 낮은 효과를 보이지만, 1차 접종 전 채혈과 비교하여 중화항체가 높아지는 경향을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 향후 실험에서는 면역증강제와 더불어 재조합 단백질의 함량을 높이는 것이 중화항체를 높이는데 관여할 것으로 사료된다.

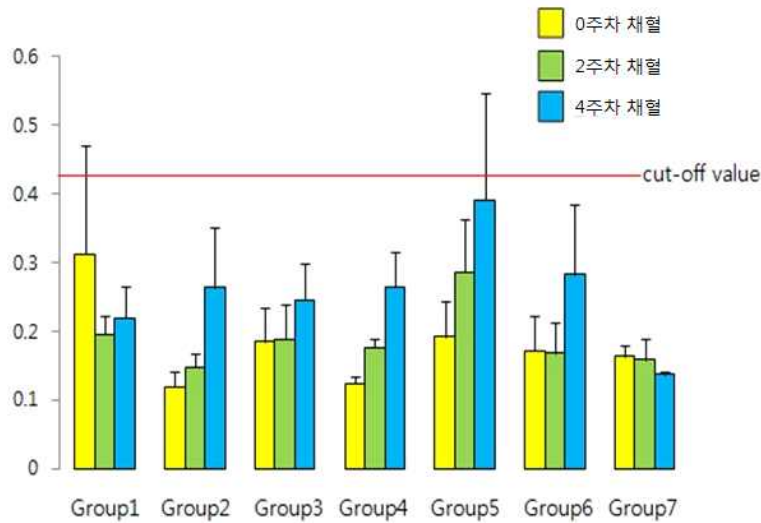


그림 87. 혈청 내 IgA 측정 결과

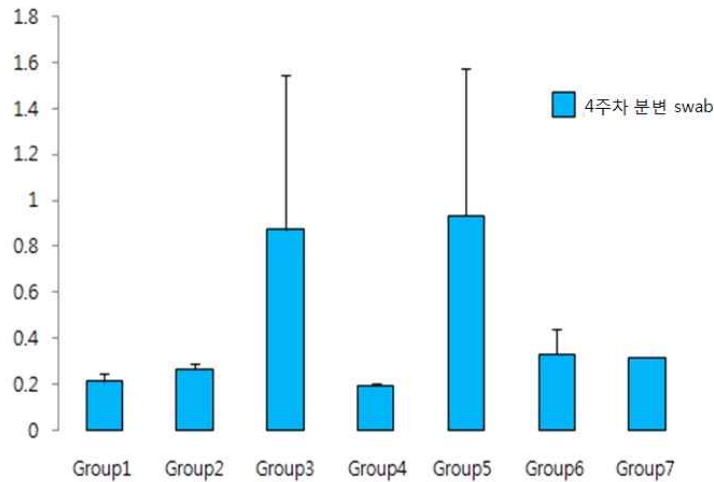


그림 88. 분변 내 IgA 측정 결과

혈중 내 IgA 의 경우 모든 실험군에서 상대적으로 수치가 높아지는 것을 확인하였지만 모든 실험군에서 cut-off 치를 넘어설 만큼의 IgA 항체가의 변화를 보이지 못하였다 (그림 87). 반대로 상용 경구백신을 투여한 경우에는 혈중 IgA 변화가 전혀 보이지 않았다. 분변 내 IgA의 양을 측정한 결과 Group 3과 Group 5에서 다른 실험군과 비교해서 상대적으로 분변 내 IgA의 함량이 높게 측정되었다 (그림 88). 이런 결과가 도출된 이유는 개체별로 항문 swab시에 묻어나오는 분변의 양이 다르기 때문이라고 생각된다. 분변의 양과 ELISA시 사용되는 희석액의 비율을 동등하게 맞추어서 실험을 수행해야 믿을 수 있는 결과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

(2) 2차 *In vivo* 자돈 PED immunization 시험

1차 자돈 PED immunization 시험에서 중화항체 실험결과가 높게 나오지 않은 이유로 재조합

단백질의 투여량이 적었던 것으로 사료되어, 2차 PED immunization 실험에서는 고농도의 PED 재조합 단백질을 접종하였다. 일반적으로 spike protein의 경우 S1 domain의 499-734 a.a. (또는 789) 영역에 주요 중화항체 epitope가 분포되어 있다고 알려져 있지만, 이외 spike protein의 다른 부위가 중화항체 epitope로 작용할 수 있기 때문에 499-789 a.a. (GST-SP1), 499-734 a.a. (MBP-SP1) 및 37-591 a.a. (S1) 를 사용하여 immunization 시험을 수행하였다 (그림 89). 이번 실험에서는 면역증강제로서 면역보강제를 접종 시 사용하였는데 경구투여의 경우 20%의 AIOH를, 근육주사의 경우 50%의 IMS1313을 면역보강제를 사용하여 접종하였다. 실험군의 그룹은 다음과 같다 (표 11).

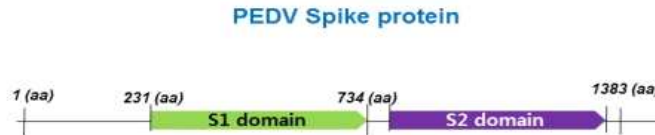


그림 89. PED 바이러스 spike protein

표 11. 2차 *In vivo* 자돈 PED immunization 실험군

Group	Inoculation	Heads	Inoculation method
1	S1 (IBs), 10 mg	3	2주 간격으로 총 4회 근육투여
2	S1 (IBs), 50 mg	3	2주 간격으로 총 4회 근육투여
3	GST-SP1 (IBs), 10 mg	3	2주 간격으로 총 4회 근육투여
4	GST-SP1 (IBs), 50 mg	3	2주 간격으로 총 4회 근육투여
5	MBP-SP1 (IBs), 100 mg	3	2주 간격으로 총 4회 경구투여
6	MBP-SP1-CKS9 (IBs), 100 mg	3	2주 간격으로 총 4회 경구투여
7	상용 PED 경구백신	2	2주 간격으로 총 4회 근육투여
8	상용 PED 경구백신	3	2주 간격으로 총 4회 경구투여
9	음성대조군	2	

*S1: spike protein region의 33-591 amino acid를 재조합한 단백질

*GST-SP1: spike protein region의 499-789 amino acid를 재조합한 단백질

*MBP-SP1: spike protein region의 499-734 amino acid를 재조합한 단백질

표 12에서는 1차 접종 전 자돈 혈중 IgG 중화항체 실험결과 2배 이하 및 2~4배의 중화항체가 보였다. 1차 접종 2주 후 채혈 중화항체가의 경우 6번 그룹 한 마리 자돈과 7번 그룹 2마리 자돈에서 각각 32배와 64배 나온 것을 제외하곤 중화항체가의 변화를 보이지 않았으며, 2차 접종 2주 후 채혈 중화항체가의 경우에도 6번 그룹 한 마리 자돈 및 7번 그룹 2마리 자돈에서 32배와 64배가 나온 것을 제외하고는 유의한 결과를 나타내지 못했다.

표 12. 혈중 IgG 중화항체 실험결과 (SM-98 strain, 2차 *in vivo*)

Group	접종 전	2주차	4주차	Group	접종 전	2주차	4주차
1	4X	4X	2X	6	2X	<2	<2
	4X	<2	2X		4X	<2	<2
	2X	<2	<2		<2	32X	32X
2	<2	<2	<2	7	2X	32X	32X
	<2	<2	2X		<2	64X	64X
	2X	<2	2X		<2	<2	4X
3	<2	<2	<2	8	2X	<2	<2
	<2	<2	<2		4X	<2	<2
	<2	<2	<2		<2	<2	<2
4	<2	<2	<2	9	<2	<2	<2
	<2	<2	<2		2X	<2	<2
	<2	<2	<2		<2	<2	<2
5	<2	<2	<2				
	<2	<2	<2				
	<2	<2	<2				

나. 고분자 및 경구용 PED 바이러스 항원 자돈 접종

(1) PED 바이러스 pig *in vivo* immunization

30 kg의 자돈 (7~8 주령)을 이용하였고 먼저 혈액을 채취하여 PED 중화항체 실험을 통하여 PED 감염 여부와 모체이항 항체의 여부를 측정하였다 (그림 90). 그룹은 총 9개로 Non-treat 그룹, P1그룹 (IM), P2 그룹 (IM), aP1 그룹 (IM), aP2 그룹 (IM), aP2 그룹 (Oral), HPMCP 그룹 (Oral), T-HPMCP 그룹 (Oral), T-HPMCP+RANKL 그룹 (Oral)이 있으며 그룹당 3마리를 배정하였다. 배정된 돼지는 축사 내 5개의 방에 배치하였다 (그림 91). 주사는 각 항원을 근육주사 하였으며 돼지용 IMS1313 면역보강제에 섞었다.

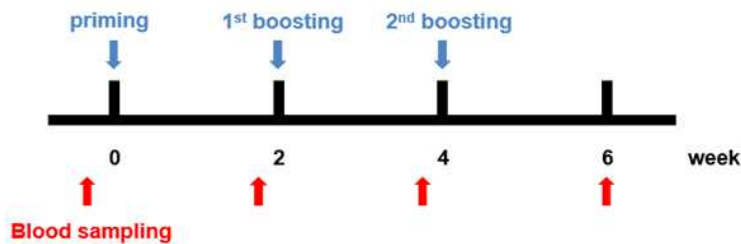


그림 90. 자돈 PED 바이러스 아단위 백신 투여 계획

Group 1	P1: 4, 280, 282 P2: 248, 319, 320	Group 3	aP2 : 301, 318, 322 HPMCP: 287, 315, 323
Group 2	aP1: 256, 258, 275 aP2: 260, 269, 300	Group 4	T-HPMCP: 305, 316, 321 LL-RANKL: 246, 257, 286
Exit			
		Group 5 NC: 247, 273, 285, 299	

그림 91. 축사 내 돼지 배치 모식도

(2) PED 중화항체 test

PED 아단위 백신 접종 전 PED 감염 여부와 모체이항 항체의 여부를 측정하였다. 중화항체 가는 세포가 CPE가 나는 혈청희석배수를 체크하여 측정하였으며 정상세포 및 CPE 세포의 사진은 그림 92와 같다. 접종 전 채혈에서 SM98 strain 및 P-5V strain으로 중화항체 실험을 실시한 결과 2배~4배 사이의 중화항체 titer를 보여 모든 자돈에서 PED 항체 음성으로 확인하였다 (표 13, 표 14).

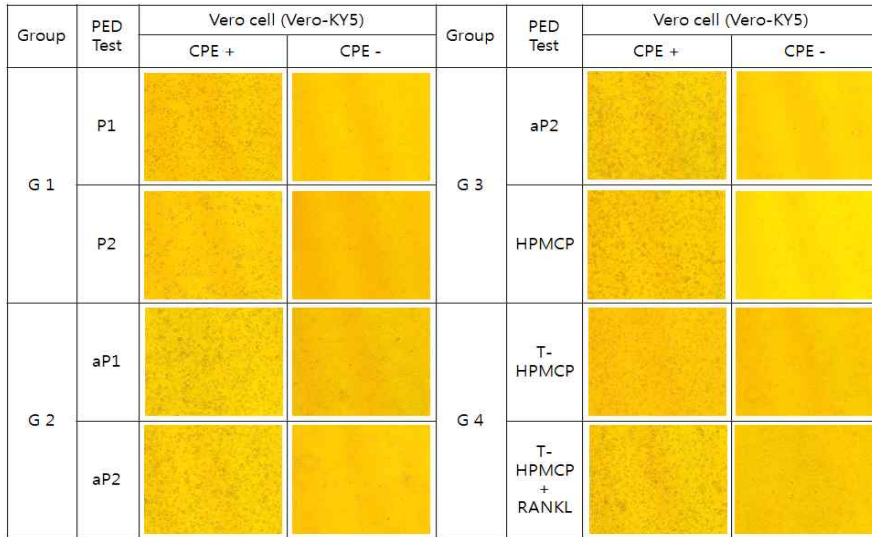


그림 92. 자돈 실험 그룹별 정상세포와 CPE 발생 세포

표 13. 접종 전 SM98 중화항체 titer

PED Experiment	Number	접종 전 중화항체 Titers	PED Experiment	Number	접종 전 중화항체 Titers
P1 근육주사 (Group 1)	4	4x	aP2 경구투여 (Group 3)	301	<2
	280	2x		318	2x
	282	4x		322	2x
P2 근육주사 (Group 1)	248	<2	HPMCP 경구투여 (Group 3)	287	<2
	319	2x		315	2x
	320	2x		323	2x
aP1 근육주사 (Group 2)	256	<2	T-HPMCP 경구투여 (Group 4)	305	<2
	258	<2		316	4x
	275	2x		321	4x
aP2 근육주사 (Group 2)	260	<2	T-HPMCP+ RANKL 경구투여 (Group 4)	246	<2
	269	<2		257	<2
	300	<2		286	<2
			Negative	247	<2
			Control	273	2x
			(Group 5)	285	<2
				299	<2

표 14. 접종 전 P-5V 중화항체 titer

PED Experiment	Number	접종 전 중화항체 Titers	PED Experiment	Number	접종 전 중화항체 Titers
P1 근육주사 (Group 1)	4	2x	aP2 경구투여 (Group 3)	301	4x
	280	4x		318	2x
	282	2x		322	2x
P2 근육주사 (Group 1)	248	2x	HPMCP 경구투여 (Group 3)	287	<2
	319	2x		315	<2
	320	<2		323	2x
aP1 근육주사 (Group 2)	256	4x	T-HPMCP 경구투여 (Group 4)	305	2x
	258	<2		316	2x
	275	<2		321	<2
aP2 근육주사 (Group 2)	260	2x	T-HPMCP+ RANKL 경구투여 (Group 4)	246	<2
	269	<2		257	2x
	300	2x		286	4x
Negative Control (Group 5)				247	2x
				273	2x
				285	2x
				299	<2

(3) PED 항원 검출

PED 아단위 백신 접종 전 분변을 통해 PED 항원의 유무를 PED immunochrom- atography antigen kit으로 검사하였다. 실험결과 분변에서 PED 항원이 전혀 검출되지 않아 PED 음성돼 지임을 재확인하였다 (그림 93, 표 14).







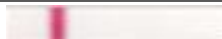
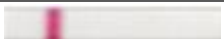
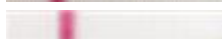

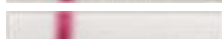
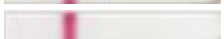

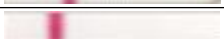

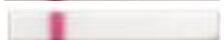




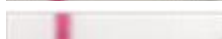
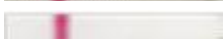
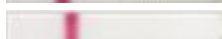

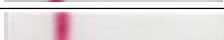
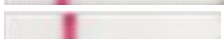


PED Experiment	Number	PEDV antigen kit	PED Experiment	Number	PEDV antigen kit
P1 근육주사 (Group 1)	4		aP2 경구투여 (Group 3)	301	
	280			318	
	282			322	
P2 근육주사 (Group 1)	248		HPMCP 경구투여 (Group 3)	287	
	319			315	
	320			323	
aP1 근육주사 (Group 2)	256		T-HPMCP 경구투여 (Group 4)	305	
	258			316	
	275			321	
aP2 근육주사 (Group 2)	260		T-HPMCP+ RANKL 경구투여 (Group 4)	246	
	269			257	
	300			286	
Negative Control (Group 5)				247	
				273	
				285	
				299	

그림 93. 각 자돈 실험군의 PED 바이러스 접종 전 분변 내 PED 바이러스 항원 검사 결과

(4) 백신 3차 접종 완료 후 국내 유행 PED 바이러스 야외주 공격 접종

국내에서 현재 유행하고 있는 PED 야외주 (K14JB01 strain : GenBank accession no. KJ623926)를 자돈에 공격 접종하여 임상증상을 관찰하고 immunochromatography antigen kit 을 이용하여 분변으로의 PED 바이러스의 배출기간 확인 및 Real time PCR을 이용하여 바이러스 배출량을 조사할 예정이다. 국내 유행 PED 바이러스 야외주를 실험자돈에 공격접종하기 위해서 공격접종량 측정을 위해 포유 자돈을 이용하여 LD₅₀을 측정하였다. 포유자돈을 이용하여 국내 유행 PED 바이러스의 LD₅₀을 측정하였다 (표 15). 실험결과 10³ copies/ml (10^{2.7} TCID₅₀/ml) 농도의 PED 야외주를 포유자돈에 접종 시 50%의 폐사율을 보이는 것으로 나타났다. 이 실험결과를 토대로 자돈에서 PED 공격접종 농도를 10³ copies/ml로 정했으며 실험 종료 후 공격접종을 수행할 예정이다. PED 바이러스 경구 투여한 무포유자돈의 부검소견상 소장 용모상피 길이나 소장의 변화들이 대조에 비하여 심각하게 조사되었다 (표 16). PED 바이러스 경구 투여한 무포유자돈을 부검한 후 소장의 현미경적 소견상 날자별로 1, 2, 3번의 소장상피 세포가 탈락되는 현상이 보였으며, 반면에 4번은 정상상태의 대조군 소장상피세포이다 (그림 94).

표 15. 포유자돈에서의 LD₅₀ 측정

Day post inoculation (dpi)	10 ⁵ copies/ml	10 ⁴ copies/ml	10 ³ copies/ml	10 ² copies/ml
1 dpi	0	0	0	0
2 dpi	0	0	0	0
3 dpi	1	2	0	0
4 dpi	2	0	0	0
5 dpi	1	1	2	1
폐사포유자돈/실험자돈	4/4.	3/4.	2/4.	1/4.
폐사율	100%	75%	50%	25%

표 16. PED 바이러스 경구 투여한 결과 모식도

Titer	Villi atroph (VH:CD)			Villi fusion			Epithelial expoliation				Cytoplasmic vacuolation				Irregualr nuclear polarity		
	D	J	I	D	J	I	D	J	I	C	D	J	I	C	D	J	I
10 ⁵ copies	2.5	2	2		mi			mi	mi	mi		mi	se	mi		mi	mi
10 ⁴ copies	3	3	3.5		mi							se	mi				
10 ³ copies	3	2.5	2			mi						mi					mi
10 ² copies	2.5	3	3.5									mi					
con	4	5	3.5			mi						mi		mi			mi
con	4	5	2.5			mi											
	비율			No Mild Severe			No Mild Severe				No Mild Severe				No Mild Severe		

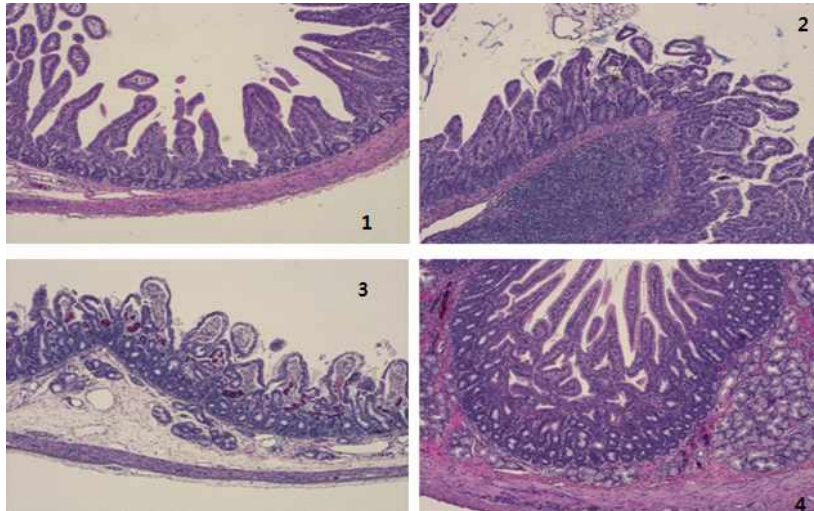


그림 94. PED 바이러스 경구 투여 후 포유자돈 부검 결과

(다) 백신 3차 접종 완료 후 국내 유행 PED 바이러스 야외주 공격 접종

자돈에 10^3 copies/ml($10^{2.7}$ TCID₅₀/ml)의 PED 공격접종은 HPMCP, T-HPMCP, LL-RANKL에 접종하였다. 공격접종후 개체별 설사는 일부 항체가 낮은 개체에서 2-3일 설사를 한후 멈추었으며, 항체가가 높은 개체들에서는 하루나 아니면 설사를 하지 않는 개체도 보였다. 중화항체가는 2차 백신접종과 3차 백신 접종에는 큰 유의차 없으므로 2차 백신접종 만으로도 될 것으로 사료되며, HPMCP와 LL-RANKL 백신접종 그룹에서 백신으로서 유의성이 보여 모든 추가실험 후보군으로 선정하였다. 이렇게 정한 이유는 백신접종 그룹내에서 돼지 개체들이 고르게 백신항체 형성이 이루어지고 있지 않는 점도 고려하여 결정하였다 (표 17).

표 17. PED 야외주 공격접종 후 항체가 변화추이 조사

		접종 전 채혈 (2차)	1차 백신접종 2주후 1차 채혈	2차 백신접종 2주후 2차 채혈	3차 백신접종 2주후 3차 채혈	각 백신접종 후 5일차 채혈	각 백신접종 후 10일차 채혈	각 백신접종 후 17일차 채혈	각 백신접종 후 23일차 채혈	각 백신접종 후 30일차 채혈	각 백신접종 후 37일차 채혈	각 백신접종 후 43일차 채혈	각 백신접종 후 50일차 채혈	각 백신접종 후 57일차 채혈	
PED chaperone IM	P1	4	<2	4	16	4	4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		280	<2	4	4	4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		282	<2	16	4	8	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	P2	248	<2	8	<2	4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		319	<2	16	<2	16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		320	<2	32	64	32	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
PED acetone IM	aP1	256	<2	8	4	8	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		258	<2	8	8	16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		275	<2	4	4	4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	aP2	260	<2	8	8	16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		269	<2	16	4	8	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		300	<2	8	16	8	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
PED HPMCP coating oral	aP2	301	<2	<2	4	8	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		318	<2	16	16	16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		322	<2	<2	<2	<2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	HPMCP	287	<2	16	64	64	128	256	>256	256	>256	128	256	128	128
		315	<2	64	256	256	>256	>256	>256	>256	256	256	128	256	
		323	<2	4	<2	16	8	32	128	256	>256	128	128	128	64
PED M cell activator oral	T-HPMCP	305	<2	4	4	4	4	16	64	256	>256	128	256	128	
		316	<2	4	4	4	4	64	256	>256	128	256	128	256	
		321	<2	32	4	16	4	64	256	>256	>256	128	128	256	
	LL-RANKL	246	<2	4	4	<2	8	128	128	256	>256	>256	256	128	128
		257	<2	64	128	256	256	>256	>256	>256	256	>256	256	128	128
		286	<2	128	256	256	256	>256	>256	>256	256	256	128	128	

다. 선별된 표적형 점막면역 백신을 이용한 PED 바이러스 모돈접종

(1) PED 항원 백신과 면역보강제를 이용한 목적동물에서의 효능 실증 실험

자돈에서 주사백신 (P1, P2, aP1, aP2) 시험 결과를 토대로 효율 좋은 aP2 항원에 M 세포 표적 펩타이드 도입 및 수용성 항원 단백질 생산하여 점막점착성 고분자 생산 및 면역보강 단백질의 조합 (소장 점막면역 반응이 가장 잘 유도되는 조합 선정)을 통해 임신 모돈에서의 효과를 검증하였다.

(가) 임신모돈의 초유를 통한 중화항체 검사 수행

① 실험 그룹 별 백신 및 백신 후보군 접종 후 채혈 및 초유 채취

임신모돈은 10두를 사용하였고 접종하는 백신의 종류에 따라 G사 PED 경구백신 (Oral), J사 PED 사독백신 (IM), HPMCP (aP2)(IM), HPMCP (aP2)(IM), HPMCP (aP2)+LL RANKL (Oral), 음성대조군, 양성대조군으로 그룹을 구성하였다 (표 18). 분만 5주전 임신모돈에서 채혈은 백신 접종전과 1차 백신접종 후 2주, 2차 백신접종 후 분만시 채혈하였고 분만시에 초유를 채취하여 중화시험과 IgA 항체가를 측정하는데 공시하였다.

표 18. 백신 접종 및 채혈·초유 채취 일정

그룹	시료	마리수	투여 방법	투여량	백신 접종 및 채혈, 초유 채취		
					백신접종전 채혈/ 1차백신접종	1차백신접종 2주후 채혈/2차백신접종	분만 시 채혈 및 초유 채취
1	PED경구(G사)	1	경구투여	5ml			
2	PED사독(J사)	1	이근부주사	2ml			
3	HPMCP(aP2)	2	이근부주사	2ml			
4	HPMCP(aP2)	2	경구투여	20ml			
5	HPMCP(aP2)+ LL RANKL	2	경구투여	20ml			
6	양성대조	1	-				
7	음성대조	1	-				

② 백신 접종 전후 혈청 및 초유의 중화항체역가변화

그룹 2 및 3과 그룹 5의 5-2를 제외하고는 백신 접종 전에 비하여 1차 백신 접종 후에 모든 그룹에서 항체가가 올라갔음을 확인하였다. 특히 4-2, 5-1 그룹에서는 그 증가 폭이 다른 그룹에 비하여 유의성있게 보였다 (각각 $2^4 \rightarrow 2^7$, $2^1 \rightarrow 2^4$). 2차 백신 접종 후에는 그룹 4에 4-2를 제외한 모든 그룹에서 항체가가 증가하였다. 접종 전에 비하여 2차 백신 후 혈청가가 가장 큰 폭으로 댄 그룹은 5그룹에 5-2로 2^1 에서 2^6 으로 증가하였다 (표 18). 중화항체가가 가장 높은 그룹은 4그룹에 4-1로 다른 군에 비하여 2배 정도 높은 항체가를 보였다. 또한 모든 군에서 PED 방어능을 가질 수 있는 $2^5 \sim 2^6$ 이상의 항체가를 보였다. 초유에는 혈청보다 2배 정도 높은

항체가를 보였고 유청에서는 혈청과 비슷한 항체가를 보였다. 초유에서는 그룹 5에서 가장 높은 항체가를 보였다.

표 19. 백신 접종 및 채혈 · 초유에서 백신항체

그룹	백신종류	돼지번호	백신 접종 전 채혈 /1차 백신 접종		2차 백신 접종 후/ 분만 시 채혈 및 초유 채취		
			접종 전	1차	혈청	초유	유청
1	PED경구(G사)	1-1	8	16	64	128	64
2	PED사독(J사)	2-1	4	4	32	128	64
3	HPMCP(aP2)_IM	3-1	8	8	64	128	128
		3-2	8	4	64	64	128
4	HPMCP(aP2)_Oral	4-1	16	16	128	256	128
		4-2	16	128	64	256	128
5	HPMCP(aP2)+ LL-RANKL	5-1	2	16	64	128	64
		5-2	2	2	64	128	64

(나) PED 항원의 안전성 평가를 위해 백신투여 후 임상증상 및 유사산 여부 관찰

시험백신 접종에 따라 그룹별로 태어난 태아 생존율에서 차이를 보였는데 상업용 백신은 각각 71.4%와 80%의 산자 생존율을 보인 반면 4그룹 4-2 돼지를 제외한 모든 백신 후보군에서는 모두 그 이상의 생존율을 보였다. HPMCP (aP2)+LL RANKL을 투여받은 그룹 5의 돼지들이 100%로 가장 높은 생존율을 보였다 (표 20).

표 20. 임신모든 백신투여 후 분만시 살아 있는 생존율

번호	시료	투여방법	산자 수	유·사 산	압살 (모든에 의한)	최종 산자 수	생존율	비고 (실험 두수)
1-1	PED경구(G사)	경구 투여	14	4	1	9	71.4%	8
2-1	PED사독(J사)	근육 주사	10	2	1	7	80%	6
3-1	HPMCP(aP2)	근육 주사	13	2	0	11	84.6%	8
3-2	HPMCP(aP2)	근육 주사	15	1	0	14	93.3%	8
4-1	HPMCP(aP2)	경구 투여	11	0	0	11	100%	8
4-2	HPMCP(aP2)	경구 투여	11	3	0	8	72.7%	6
5-1	HPMCP(aP2) +LL RANKL	경구 투여	12	0	0	12	100%	8
5-2	HPMCP(aP2) +LL RANKL	경구 투여	12	0	0	12	100%	8
6	음성대조군	-	10	1	0	9	90%	8

(다) 임신모든에서 선정된 항원의 주사/경구백신으로 효능을 검증하기 위한 포유자돈에 PED 야외주 공격접종을 통한 방어 효능 평가

① 포유자돈 공격 접종 후 유행율과 폐사율

출생 자돈에서 백신 후보군의 방어능을 알아보기 위해 PED 야외주로 공격접종 후 유병율과 폐사율을 조사할 결과 대부분의 그룹에서 100%의 설사율을 보였으며 그룹 2와 그룹 3 그리고 그룹 4에 4-1돼지에서 태어난 포유자돈들은 공격접종에서 모두 폐사하였다. 상업용 백신을 맞은 모돈의 자돈 그룹인 1번 그룹에서 50% 폐사율을 보였다. 이에 비하여 5번 그룹의 5-1 돼지에서 태어난 포유자돈은 25%의 폐사율을 보여 가장 낮은 폐사율을 기록하였다 (표 21).

표 21. 출생 자돈의 PED 공격 접종에 따른 방어 효능 평가

그룹	공격접종시기	Inoculum; Dose; Route	접종 시 평균 몸무게(kg)	포유자돈	
				유병율(%)	폐사율(%)
1	5 일령	HS strain; 10 ^{2.5} TCID ₅₀ ; Oral	1.83	100(8/8)	50(3/6)
2			2.63	100(6/6)	100(8/8)
3-1			1.91	100(8/8)	100(8/8)
3-2			1.87	100(8/8)	100(8/8)
4-1			1.81	100(8/8)	100(8/8)
4-2			1.19	100(6/6)	83(5/6)
5-1			1.88	100(8/8)	25(2/8)
5-2			1.99	100(8/8)	75(6/8)
6			2.25	100(8/8)	100(8/8)
7			Mock	2.70	0(0/3)

② 출생자돈 공격 접종 후 설사 지속일 및 체중 변화변화

포유자돈에서 백신 후보군의 방어능을 알아보기 위하여 공격접종후 설사 지속일 및 체중 변화를 측정된 결과 상업용 백신인 그룹 1와 2에서는 각각 315g, 521g의 체중 감소를 보였다. 그룹 2는 실험 군 중 가장 적은 체중 감소를 보였으며 후보군 중에는 4-2그룹이 345g, 5-1이 330g으로 가장 적은 체중 감소를 보였다. 설사 지속일은 그룹 5-1과 5-2에서 Rating score (RS) 3 이상의 설사를 3일, 3.88일을 보였으며 이는 RS 3의 설사를 가장 오래 버텼고 RS 3의 설사를 보이면 그룹 내 개체가 거의 모두 폐사한 다른 그룹과는 달리 5-1모돈의 포유자돈은 대다수(75%)가 5-2 모돈의 포유자돈은 일부 (25%)가 살아남았다 (표 22).

표 22. 자돈의 설사 지속일 및 체중 변화

그룹	설사 시작(일)	일주일 간 체중 변화			△1733.33
		설사 지속일	RS=3	RS≥2	
1	2	1.00	1.17	1.00	▽315.00
2	4	1.83	1.33	1.00	▽521.67
3-1	2	1.40	1.00	1.00	▽438.75
3-2	2	1.62	1.00	1.00	▽417.50
4-1	2	2.13	1.00	1.00	▽419.38
4-2	2	2.00	1.60	-	▽345.00
5-1	3	3.00	1.20	1.00	▽330.00
5-2	1	3.88	1.00	1.00	▽550.00
6	1	1.50	1.63	-	▽512.88
7	-	-	-	-	△1733.33

(라) 공격접종 후 포유자돈 부검에 따른 육안적 병리소견

공격 접종 후 10일간 관찰 후 11일째에 부검하는 것으로 계획을 잡았다. 부검일 전에 폐사한 개체에 대해서는 폐사 당일 바로 부검을 진행하였다. 관찰 포인트는 장용모 탈락에 따른 장의 투명화 여부, 설사분변 유무 및 장의 팽창 등이다. 대부분의 그룹에서 평균적으로 공격접종 후 6일 이내에 폐사하여 부검을 진행하였지만 Group 5-1의 (HPMCP(aP2)+LL RANKL (oral)은 약 공격접종 후 8일 정도 후에 폐사하여 그룹 중 가장 오랜 기간 생존하였다.

① 양성대조군

그룹 6의 모돈에서 태어난 포유자돈인 Positive control의 경우 장용모 탈락으로 인한 장의 투명화와 장의 팽창도가 심했고 설사분변이 가득 찬 개체도 보였다 (그림 95).

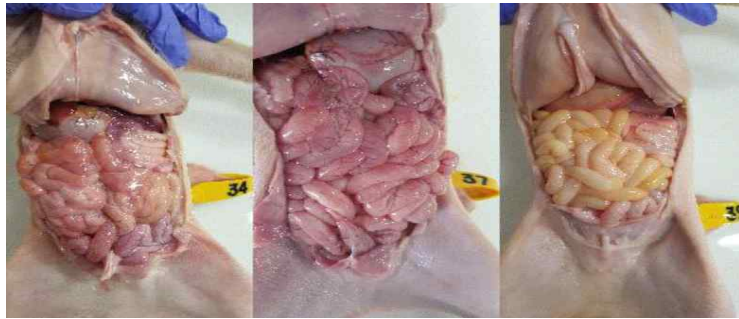


그림 95. 공격접종후 양성대조군 소장장기 부검소견

② PED경구(G사)

그룹 1는 기존에 상업용으로 사용하는 경구용 PED 백신을 맞춘 그룹으로 일부 자돈에서는 장용모 탈락에 따른 장의 투명화가 약간 보였다. 설사가 가득찬 장도 보였으며 맹장에 가스가 차 부풀어 있는게 특징적이었다 (그림 96).

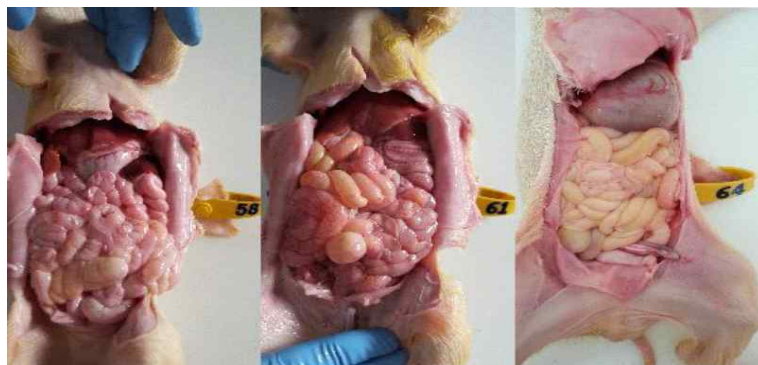


그림 96. PED 경구 녹십자 경구접종후 공격접종시 소장장기 부검소견

③ PED백신 (J사)

그룹 2도 기존에 사용하는 PED 백신 주사용을 맞춘 그룹으로 장상피 탈락에 따른 장의 투명도 증가를 보이는 개체가 보이긴 하였지만 그렇지 않은 개체도 많았다. 장의 팽창도 일부 개체에서 보였고 설사 분변도 존재하였지만 양성대조군에 비해서는 그 정도가 적었다 (그림 97).

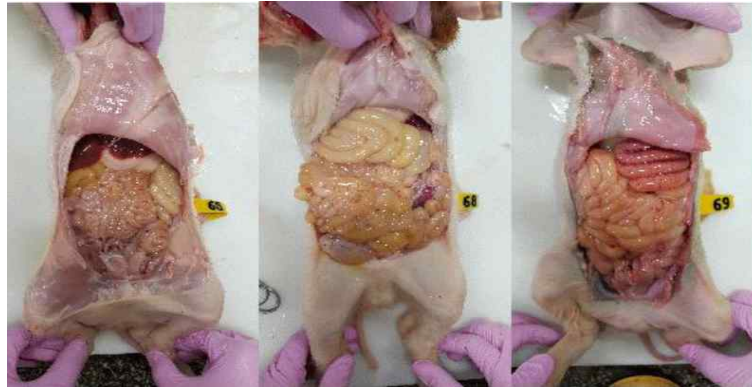


그림 97. PED 백신 (J사) 근육접종후 공격접종시 소장장기 부검소견

④ HPMCP(aP2) IM

그룹 3의 3-1모돈에 시험백신을 접종하여 HPMCP(aP2)항체를 갖고 태어난 포유자돈 5일령에 공격접종하였을 시 소장 용모 탈락에 따른 소장의 투명도는 낮았지만 다른 군들에 비해 충출혈 소견이 많았다 (그림 98).

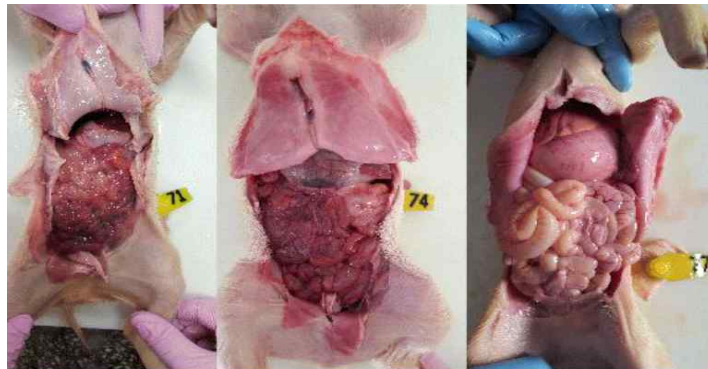


그림 98. HPMCP(aP2) 근육접종후 공격접종시 소장장기 부검소견

⑤ HPMCP(aP2) IM

그룹 3의 3-2모돈에 시험백신을 접종하여 HPMCP (aP2)항체를 갖고 태어난 포유자돈 5일령에 공격접종하였을 시 부검상에서 설사 분변이 가득 차 있었고 장의 팽창이 관찰되었다. 일부 개체에서는 충출혈 소견이 관찰되었다 (그림 99).



그림 99. HPMCP (aP2) 근육접종후 공격접종시 소장장기 부검소견

⑥ HPMCP (aP2) (oral)

그룹 4의 4-1모돈에 시험백신을 경구접종하여 HPMCP (aP2)항체를 갖고 태어난 포유자돈 5 일령에 공격접종하였을 시 설사 분변이 가득하였고 소장 용모 탈락에 따라 장의 투명도가 높아있다. 약간의 충출현 소견을 보였고 일부 자돈의 장이 팽창되어 있었다. 일부개체에서는 충출혈이 관찰되었고 한 개체에서는 담낭 파열 소견이 보였다 (그림 100).

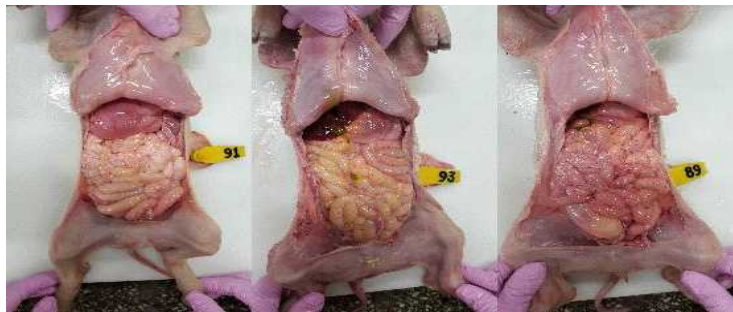


그림 100. HPMCP(aP2) 경구투여후 공격접종시 소장장기 부검소견

⑦ HPMCP(aP2) (oral)

그룹 4의 4-2모돈에 시험백신을 경구접종하여 HPMCP (aP2)항체를 갖고 태어난 포유자돈 5 일령에 공격접종후 장팽창이 진행되었고 설사 분변이 가득하였다. 장용모 탈락에 따른 장 투명도가 관찰되었으며 일부 개체에서 복수도 관찰되었다 (그림 101).

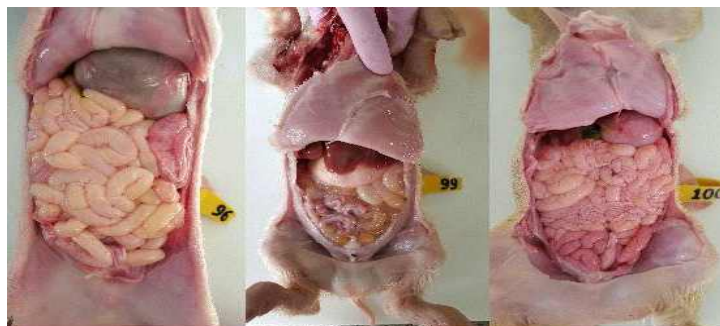


그림 101. HPMCP(aP2) 경구투여후 공격접종시 소장장기 부검소견

⑧ HPMCP(aP2)+LL RANKL (oral)

그룹 5의 5-1모돈에 시험백신을 경구접종하여 HPMCP (aP2)+LL RANKL항체를 갖고 태어난 포유자돈 5일령에 공격접종후 장 용모 탈락 유무에 따른 장 투명도가 다른 군에 비하여 매우 적었고 설사 분변 또한 일부 개체에서만 관찰되었다. 장의 팽창 또한 많이 보이지 않았다 (그림 102).

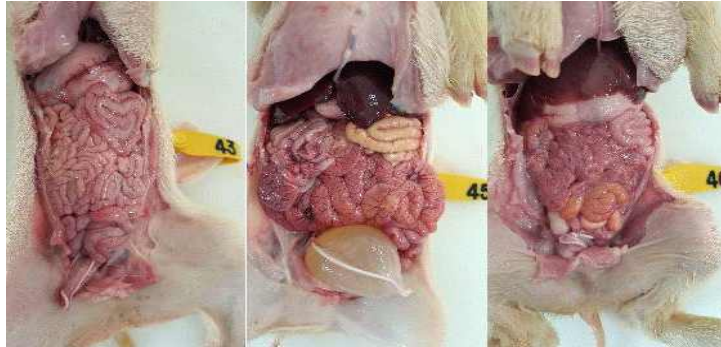


그림 102. HPMCP(aP2)+LL RANKL 경구투여후 공격접종시 소장장기 부검소견

⑨ HPMCP(aP2)+LL RANKL (oral)

그룹 5의 5-2모돈에 시험백신을 경구접종하여 HPMCP (aP2)+LL RANKL항체를 갖고 태어난 포유자돈 5일령에 공격접종 후 일부 개체에서 충출혈 소견이 보였으며 장의 팽창도 일부 보였다. 그러나 그룹 5-1과 비슷하게 장투명도가 다른 군에 비해 낮았고 설사 분변은 설사 분변 또한 대부분 관찰 되지 않았다 (그림 103).

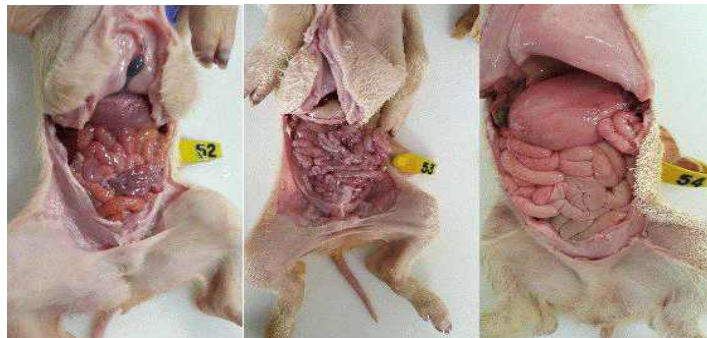


그림 103. HPMCP(aP2)+LL RANKL 경구투여후 공격접종시 소장장기 부검소견

(마) 공격접종 후 포유자돈의 소장상피세포 변화 추이 조직소견분석

① 음성대조군

점막주름이 잘 발달되어 용모가 장의 내강을 거의 덮고 있으며, 점막밑조직에 무리림프소절(Peyer's patches)이 잘 발달되어 있다 (그림 104).

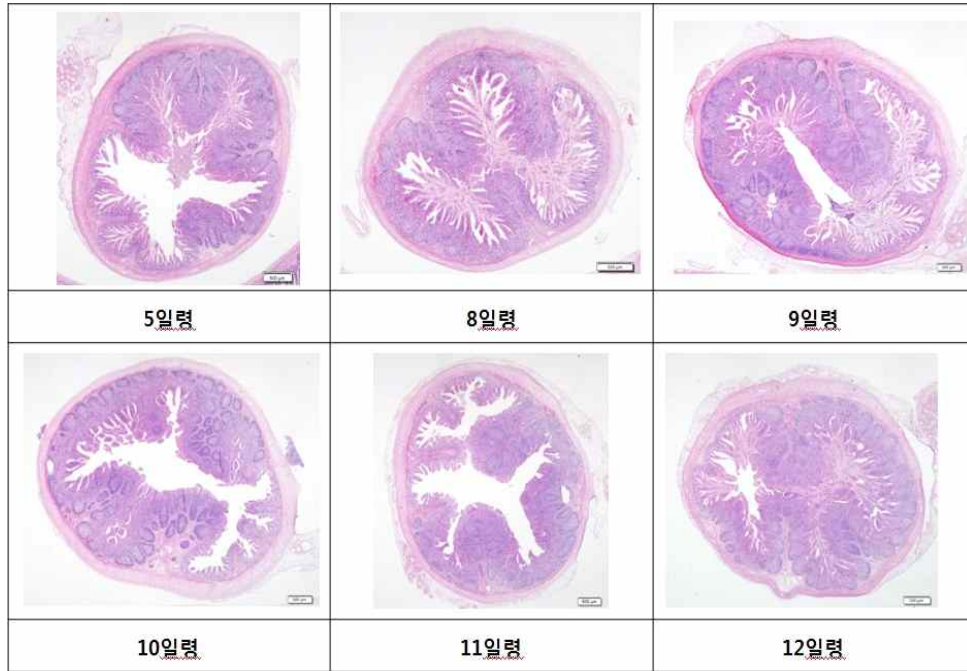


그림 104. 음성대조군 포유자돈 소장 조직 소견

② 양성대조군

장융모의 길이가 NC보다 짧아졌고, HV/DC가 NC의 1/3으로 줄어 점막고유판의 두께가 얇아지는 경향을 보이고 있으나 상피의 탈락율에서는 큰 차이는 보이지 않고 있다 (그림 105).

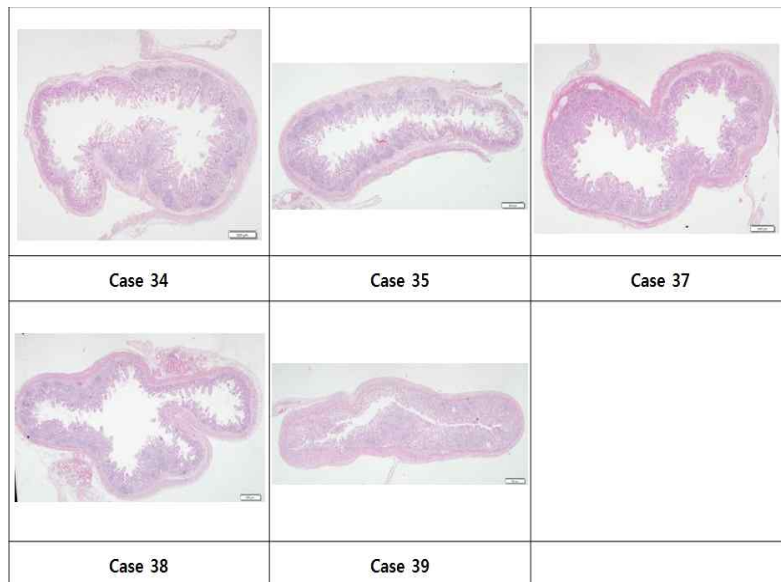


그림 105. 양성대조군 조직 소견

③ PED경구(G사)

상피 탈락 정도가 실험군 큰 편이었으며 용모의 길이는 매우 짧아서 내강이 넓어졌다. 크립트의 깊이는 Negative control에 비하여 2배 정도 두꺼워졌고 V/C ratio 또한 Negative control의 1/4.5 수준으로 줄었다 (그림 106).

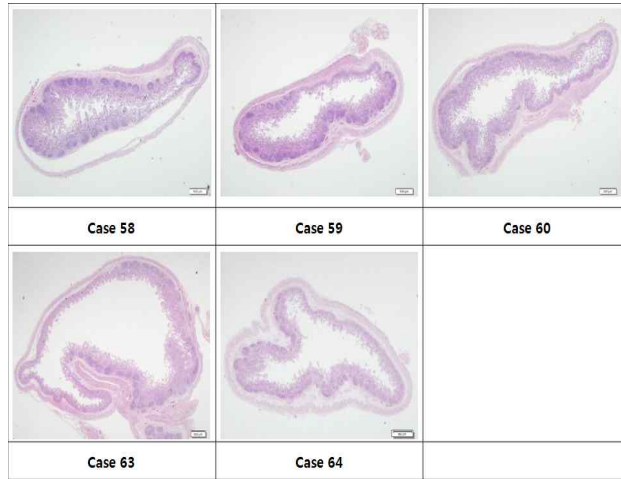


그림 106. PED경구(G사) 조직 소견

④ PED백신 (J사)

상피의 탈락 정도는 G2에 비해 낮았으며 용모의 길이나 크립트 깊이는 차이를 보이지 않았다. 다만 V/C ratio는 G2보다 낮은 수치를 보였다 (그림 107).

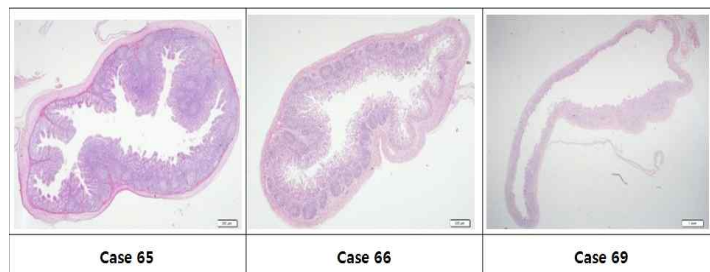


그림 107. PED백신(G사) 조직 소견

⑤ HPMCP(aP2) (IM)

다른 실험군과 유사하게 상피가 탈락하였고 용모 길이는 상업용 백신과 비슷하였다. 장근육층 경계면에 충출혈 소견이 보이게 특징적이다 (그림 108A). 또한 용모의 길이는 실험군 중 가장 길었지만 상피 탈락 정도가 컸고 내강 또한 매우 크게 보였다 (그림 108 B).

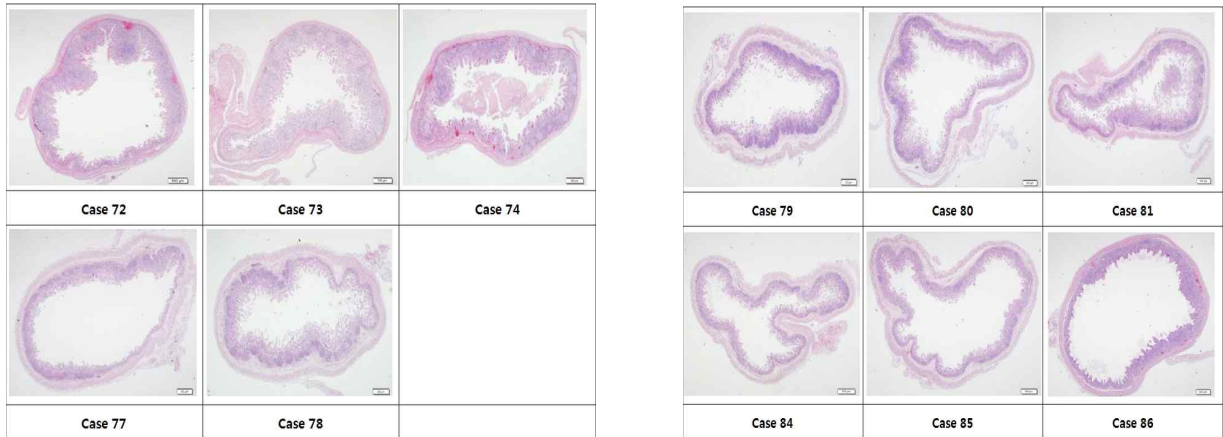


그림 108. HPMCP(aP2) (IM) 조직 소견 (A) HPMCP(aP2) (IM) 조직 소견 (B)

⑥ HPMCP(aP2)_Oral

상피탈락 정도가 가장 심한 그룹이다. 크립트는 깊은 편이었지만 V/C ratio는 NC의 1/3 수준으로 다른 실험군에 비해 높은 편이었다 (그림 109 A). 상피탈락정도가 심했으며 용모 길이 또한 많이 줄어들었다. 근육층이 매우 두꺼운 것이 특징이었다 (그림 109 B).

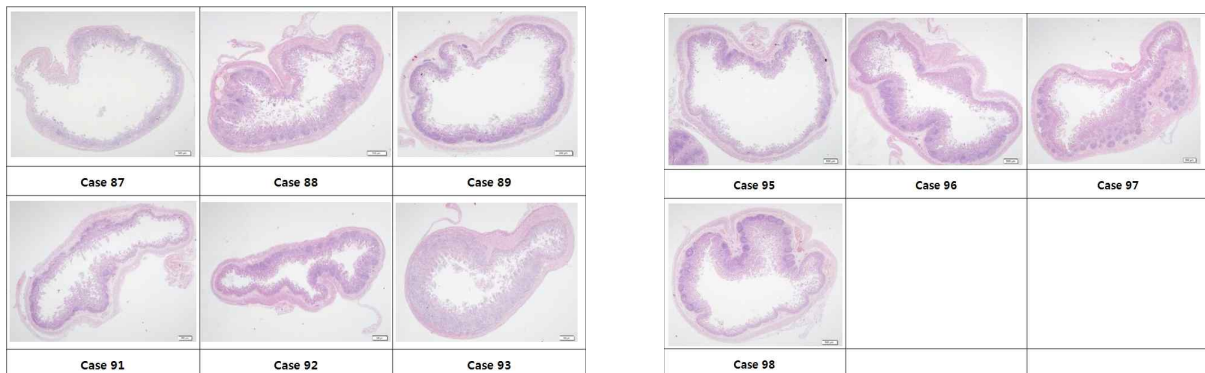


그림 109. HPMCP(aP2)_Oral 조직 소견 (A) HPMCP(aP2)_Oral 조직 소견 (B)

⑦ HPMCP(aP2)+LL RANKL_(Oral)

상피 탈락 정도가 매우 낮았고 내강이 크게 드러나지 않았던 것이 특징이다 (그림 110 A). 상피 탈락정도가 심하고 내강이 많이 노출된 그룹이 많았다. V/C ratio는 Negative control에 비하여 1/3 수준이었다 (그림 110 B).

⑧ 소장 상피 탈락율, 용모 길이와 크립트 깊이의 비율, 근육층 두께

상피의 탈락율은 G4-1에서 가장 높게 나타나고, G7(NC)에서 현저히 감소했다. HV/DC는 각 그룹에서 PC와 유사한 비를 보였다. 근육층의 두께는 음성대조군과 양성대조군에서 보다 각 그룹이 더 두껍게 나타나는 경향을 보였다 (표 23).

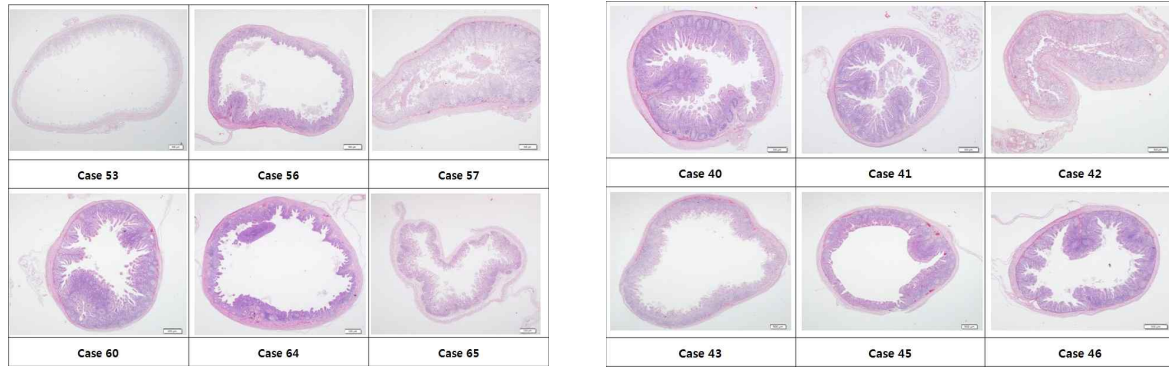


그림 110 HPMCP(aP2)+LL RANKL_(Oral) 조직 소견

표 23. 소장 상피 탈락율, HV/DC, 근육층 두께

Group(N)	% of Epithelial exfoliation	Height of Villus(μ m)	Depth of Crypt (μ m)	HV / DC	Thickness of Tunica Muscularis (μ m)
G1 (8)	69	114	143	0.8	176
G2 (6)	33	113	158	0.7	208
G3-1 (8)	45	115	116	1.0	211
G3-2 (8)	58	137	132	1.0	194
G4-1 (8)	78	137	131	1.1	174
G4-2 (6)	65	117	126	0.9	213
G5-1 (8)	33	128	165	0.8	159
G5-2 (8)	51	128	124	1.0	145
G6 (5)	38	102	90	1.1	112
G7 (3)	3	133	140	1.0	202

(바) 공격접종후 포유자돈 설사에 대한 PED바이러스 배출정량 조사

G4-2를 제외한 모든 그룹에서 공격접종후 day post-infection (DPI) 4 또는 5에서 최고치를 기록하고 감소하는 경향을 보였다. G5-1과 G5-2의 포유자돈들은 높은 copy number를 보였지만 차차 감소 하는 추세를 보였다 (표 24, 그림 111).

표 24. 포유자돈 설사샘플내 바이러스 정량측정 (log10 Copies number)

	DPI 1	DPI 2	DPI 3	DPI 4	DPI 5	DPI 6	DPI 7
G1	2.33	6.167	5.871	5.857	5.935	5.296	3.238
G2	1.589	2.796	3.072	5.657	6.304	3.969	-
G3-1	3.408	6.643	5.959	5.812	7.796	6.43	-
G3-2	-	3.705	3.831	5.239	6.353	4.111	-
G4-1	1.659	2.855	5.553	6.541	5.775	4.236	-
G4-2	-	5.486	6.589	5.724	5.915	5.107	5.764
G5-1	0.682	3.123	6.3	7.051	6.904	6.44	5.299
G5-2	0.867	6.236	5.725	6.49	5.881	6.395	5.153
G6 PC	2.155	5.651	5.486	6.805	5.919	5.723	-
G7 NC	-	-	-	-	-	-	-

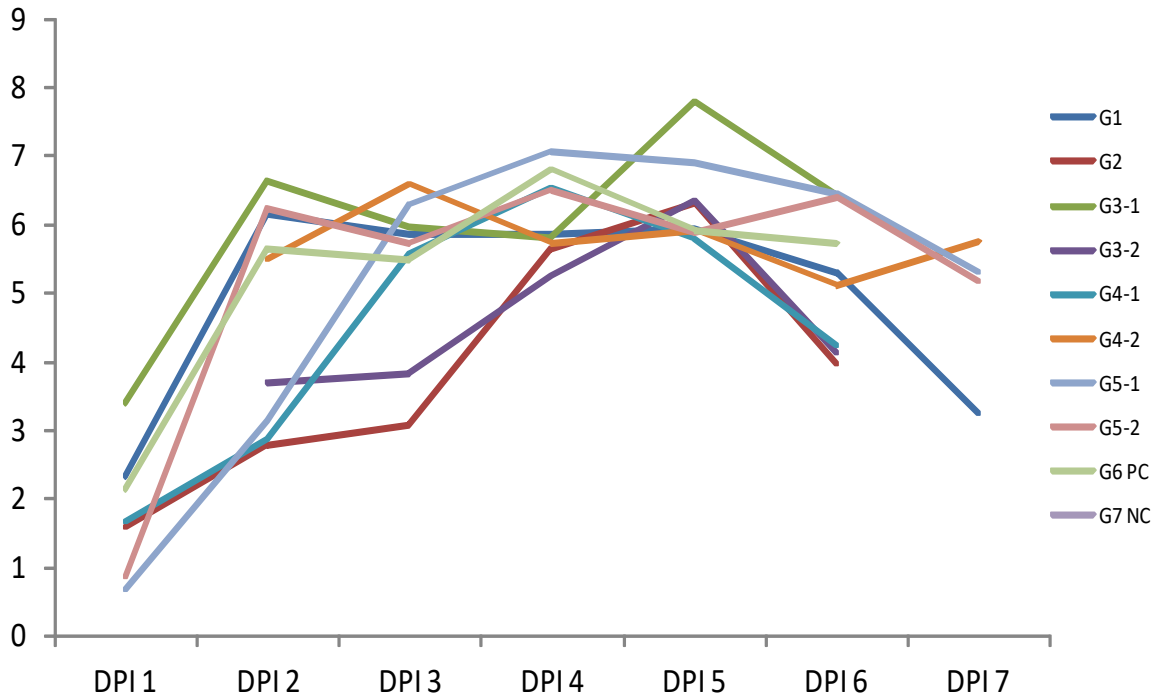


그림 111. 포유자돈 설사샘플내 바이러스 정량확인 (log10 Copies number)

2. 표적형 점막면역백신을 이용한 FMD 효과 실증연구

가. FMD pig *in vivo* immunization

30 kg의 자돈 (7~8 주령)을 이용하였고 먼저 혈액을 채취하여 VDpro FMDV O type ELISA kit를 이용하여 FMD 감염 여부와 모체이항 항체의 여부를 측정하였다 (그림 114). 그룹은 총 5개로 Non-treat 그룹, 5BT그룹, B5BT 그룹, BmpB 그룹, iFMDV 그룹이 있으며 그룹당 3마리를 배정하였다. 주사는 각 항원 500 ug/2 ml/dose를 이근부 (귀 근처 목근육)에 근육주사를 하였으며 그 중 절반은 IMS1313 돼지용 면역보강제에 섞었다 (그림 112).

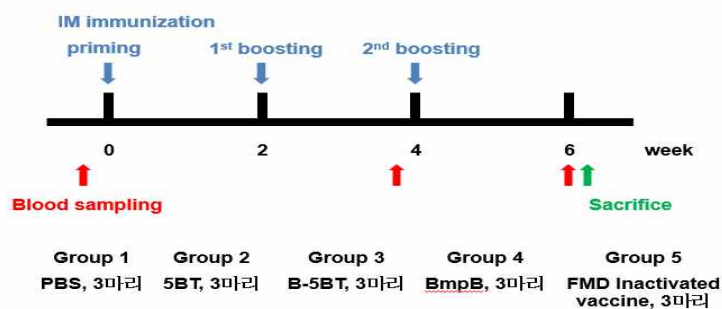


그림 112. 돼지 FMD 면역실험 계획 및 그룹 분배

현재 시판되고 있는 iFMDV 백신은 접종 후 이근부에 화농과 괴사를 일으키는 단점을 가지고 있는데 (그림 113) FMD 아단위 백신 실험 종료 및 sacrifice 이후에는 목 근육 화농 및 괴사 여부를 알아 볼 예정이다.

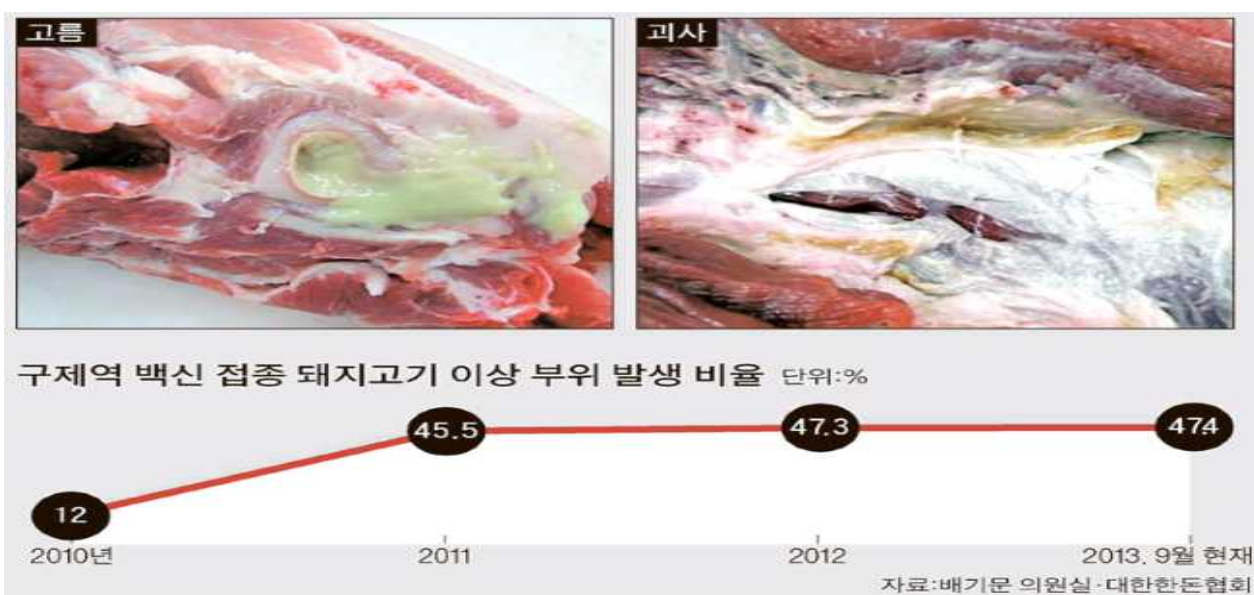


그림 113. 현재 시판되고 있는 iFMDV 상용 백신의 문제인 이근부 주사부위 화농

(1) FMD 접종 실험 전 자돈 항체가 측정

FMD 백신 접종 전 혈액을 채취하여 VDpro FMDV O type ELISA kit를 이용하여 FMD 감염 여부와 모체이항 항체의 여부를 측정하였다. VDpro FMDV O type ELISA kit을 이용한 혈청 내 항체가 측정결과 (그림 114 A)를 나타내었으며 ELISA kit 결과를 토대로 항체가 실험 결과를 그래프로 (그림 114 B) 나타내었다. 모든 FMD 바이러스 실험 자돈에서 Percentage inhibition (PI) 값이 50 미만으로 나와 접종 실험 전 자돈의 FMD 바이러스 항체가는 모두 음성으로 확인되었다 (그림 114).

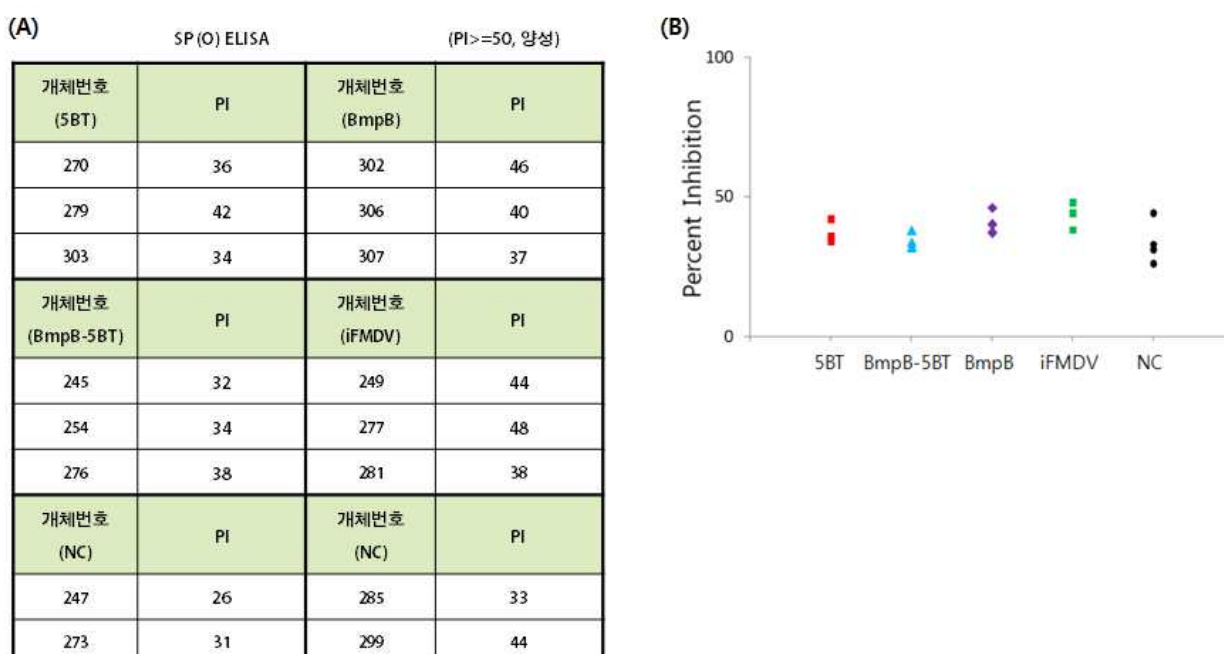


그림 114. 각 자돈 실험군의 FMD 바이러스 접종 전 중화항체 titier 값

(2) FMD 접종 실험 전 자돈 항체가 측정에 따른 축사 내 자돈 배치

VDpro FMDV O type ELISA kit 실험결과를 통해 Percentage inhibition (PI) 값이 50 미만인 음성 돼지를 축사 내 배치하였으며 (그림 115) 후보 백신 접종은 이근부에 주사하였다 (그림 116).

사위실	사료 창고	5번 방 5BT: 270, 279, 303 BmpB-5BT: 245, 254, 276
통로		
창고		6번 방 NC: 247, 273, 285, 299 iFMDV: 249, 277, 281 BmpB: 302, 306, 307

그림 115. 축사 내 FMD 바이러스 자돈 배치 모식도



그림 116. 이근부 주사 부위

나. 대장균 생산 단백질 및 유산균 생산 FMD 항원과 면역보강제를 이용한 목적동물에서의 효능 실증 실험

자돈에서 대장균생산 단백질 및 유산균 생산 FMD항원에 대한 면역 실험을 위하여 M5BT를 합성하였고 이것을 단독 주사 또는 경구 투여를 하였으며 M5BT에 HPMCP 또는 T-HPMCP를 붙여 백신으로서의 가능성을 보기 위해 항체가를 조사하였다.

(1) 대장균 생산 단백질 및 유산균생산 FMD항원과 면역보강제를 이용한 자돈에서의 효능 실증 실험

(가) 대장균 생산 단백질 및 유산균생산 FMD항원접종 후 자돈에서의 면역형성 실험

실험 자돈은 20두를 사용하였고 접종하는 백신의 종류에 따라 FMD 항원을 합성하여 제작한 M5BT를 이근부와 경구 투여 그룹으로 나뉘었고 M5BT에 HPMCP 또는 T-HPMCP와 혼합하여 백신을 제작한 그룹으로 경구용으로 투여하였다. 양성대조군으로는 상업용 백신인 iFMDV 백신을 사용하여 실험에 공시하였다 (표 25).

표 25. 대장균 생산 단백질 및 유산균생산 FMD항원접종 후 자돈에서의 면역형성 실험계획

그룹	백신	축종	두수	돼지 번호	투여 용량	투여 경로	투여 회수	채혈 및 분변채취			비고	
								백신접 종전	1차백 신2주 후	2차백 신2주 후		3차백 신 2주후
1	무처치	자돈	3	12	2ml	이근부	3	0	0	0	0	음성대조군
				2	2ml	이근부	3	0	0	0	0	음성대조군
				3	2ml	이근부	3	0	0	0	0	음성대조군
2	M5BT	자돈	3	4	2ml	이근부	3	0	0	0	0	시험백신(IMS1313)
				5	2ml	이근부	3	0	0	0	0	시험백신(IMS1313)
				7	2ml	이근부	3	0	0	0	0	시험백신(IMS1313)
3	M5BT	자돈	3	8	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
				9	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
				10	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
4	HPMCP (M5BT)	자돈	3	11	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
				14	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
				15	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
5	T-HPMCP(M 5BT)	자돈	3	16	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
				17	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
				18	2ml	경구	3	0	0	0	0	시험백신
6	iFMDV vaccine	자돈	3	19	2ml	이근부	3	0	0	0	0	양성대조군(상업용백신)
				20	2ml	이근부	3	0	0	0	0	양성대조군(상업용백신)
				1	2ml	이근부	3	0	0	0	0	양성대조군(상업용백신)
7	M5BT	자돈	2	6	2ml	비강	3	0	0	0	0	시험백신
				13	2ml	비강	3	0	0	0	0	시험백신

(나) 백신 접종 전후 임상관찰

모든 그룹의 돼지들에서는 접종전과 백신접종후에 매일 임상관찰에서 이상증후 및 사료섭취 이상, 침울, 활동성결여, 주사부위 경결, 경구투여시 이상증상 등은 관찰되지 않았다. 또한 무처치 자돈과 같이 체중 증가도 유사하게 진행되었다. 일부 개체 (12, 9, 14, 20번 돼지)에서 간혹 설사를 보였으나 질병에 의한 것이 아니라 식이성설사로 일시적으로 1-2차례 약한 설사를 보였다가 회복되었다. 하지만 M5BT 경구투여 9번 자돈은 6차 채혈전에 원인 불명으로 자연 폐사되어 6차 채혈하지 못했다.

(다) FMD ELISA IgG 항체가 측정

Prionic사에 FMD ELISA 키트를 사용하였으며 양성음성기준은 PI(>=50, posi) 이상시 양성으로 판독하였다. 모체이행항체가 음성으로 떨어질때까지 2번 채혈하였으며 12번 돼지를 제외한 19두가 음성으로 확인되었을시 백신후보 물질과 대조군으로 상업용 백신을 각각 접종하였다. 채혈은 매주 채혈하였으며 음성대조군 중 12번 돼지는 모체이행항체가 실험상 6번째 채혈하였을 때 음성으로 떨어졌다. 상업용 백신그룹 6과 M5BT시험백신 이근부 접종 그룹 2에서만 2차 접종 2주째 모두 양성을 보여 백신으로서 가능성을 보였다. 하지만 경구용으로 백신한 물질 후보군들은 양성값을 보이지 못하였다 (표 26).

표 26. 대장균 생산 단백질 및 유산균생산 FMD항원접종 후 자돈에서의 면역형성 ELISA 검사결과

백신종류	개체번호	1차FMD접종						2차FMD접종					
		1차채혈		2차채혈		3차채혈		4차채혈		5차채혈		6차채혈	
		PI	판정	PI	판정	PI	판정	PI	판정	PI	판정	PI	판정
음성대조군	12	87	양성	84	양성	84	양성	69	양성	61	양성	35	음성
	2	54	양성	39	양성	35	음성	19	음성	27	음성	19	음성
	3	19	음성	7	음성	6	음성	5	음성	14	음성	15	음성
M5BT (IM)	4	53	양성	35	음성	33	음성	34	음성	63	양성	83	양성
	5	28	음성	15	음성	12	음성	29	음성	54	양성	72	양성
	7	54	양성	35	음성	22	음성	17	음성	20	음성	83	양성
M5BT (oral)	8	18	음성	5	음성	10	음성	11	음성	14	음성	9	음성
	9	24	음성	20	음성	28	음성	10	음성	16	음성	폐사	-
	10	14	음성	6	음성	9	음성	8	음성	17	음성	8	음성
M5BT (oral)+ HPMCP	11	14	음성	2	음성	17	음성	11	음성	17	음성	5	음성
	14	11	음성	-4	음성	11	음성	9	음성	14	음성	8	음성
	15	13	음성	5	음성	13	음성	7	음성	14	음성	2	음성
M5BT (oral)+ T-HPMCP	16	8	음성	4	음성	9	음성	9	음성	9	음성	-1	음성
	17	42	음성	25	음성	18	음성	15	음성	21	음성	13	음성
	18	50	양성	31	음성	29	음성	20	음성	23	음성	16	음성
iFMDV	19	16	음성	2	음성	11	음성	50	양성	64	양성	74	양성
	20	59	양성	32	음성	20	음성	37	음성	57	양성	55	양성
	1	25	음성	9	음성	10	음성	25	음성	57	양성	86	양성
M5BT (nasal)+ T-HPMCP	6	88	양성	NT	NT	77	양성	NT	NT	25	음성	21	음성
	13	91	양성	NT	NT	80	양성	NT	NT	57	양성	18	음성

(라) 중화항체 serum neutralization test (SNT) 결과

상업용 백신그룹 6에 19, 29, 1번 돼지에서는 평균 181배 항체가를 기록하였고 M5BT시험백신 이근부 접종 그룹 2에 4, 5, 7번 돼지에서는 각각 64, 90, 90배의 양성 중화항체가를 보였다. 이는 중화시험 항체시험결과가 ELISA성적과 같은 결과를 보여 주었으며 나머지 그룹에서는 모두 음성으로 성적을 보여 FMD항체 형성에 경구접종이 비강접종으로는 항체가 형성이 안되는 것을 확인하였다. 또한 유산균생산으로 코팅하여 경구투여 및 비강접종도 같은 결과를 보였다.

(마) 접종 부위 이근부의 이상육 측정

Prionic사에 FMD ELISA 키트를 사용하였으며 양성음성기준은 PI (>=50, posi) 이상시 양성으로 판정하였고 이상육을 보기 위하여 돼지에 백신접종부위인 이근부를 절개하여 관찰하여 본 결과 이상육은 관찰되지 않아 표적형점막면역 백신은 면역보강제와 반응하여 문제가 없는 것으로 확인되었다.

3. 가축 백신 인증 및 허가 프로세스

가. 동물 의약품 생물학적 제제 백신 인허가 관련 시스템 조사

민원인으로부터 동물용의약품 등 품목허가 신청이 들어오면 농림축산 검역본부 자체평가를 통해 안전성 및 유효성 심사대상인지 검토 후 심사대상 목록에 들어가면 안전성 및 유효성 심사를 통해 기술검토를 수행한다. 보완이 필요한 백신인 경우 신청업체가 보완서류를 제출하고 이에 대한 기술검토를 통해 백신을 허가 혹은 반려한다 (그림 117).

표 27. 대장균 생산단백질 및 유산균생산 FMD항원접종 후 자돈에서의 중화시험결과

백신종류	개체번호	0 week (1차 접종)	2 week (2차 접종)	4 week
NT	12	16	<16	<16
	2	<16	<16	<16
	3	<16	<16	<16
M5BT (IM)	4	22	64	64
	5	16	90	90
	7	<16	16	90
M5BT (oral)	8	<16	<16	<16
	9	nt	nt	nt
	10	<16	<16	<16
M5BT (oral) + HPMCP	11	<16	<16	<16
	14	<16	<16	<16
	15	<16	<16	<16
M5BT (oral) + T-HPMCP	16	<16	<16	<16
	17	<16	22	<16
	18	<16	<16	<16
iFMDV	19	32	90	181
	20	64	90	181
	1	32	64	181
M5BT (nasal) + T-HPMCP	6	22	<16	<16
	13	<16	<16	<16



그림 117. 동물 의약품 생물학적 제제 백신 인허가 시스템

나. 동물 의약품 등 안전성 유효성심사에 관한 규정절차

동물용 의약품 등 취급규칙내 동물용 의약품 등 안전성 유효성 심사에 관한 규정은 농림축산검역본부 고시 제 2015-10호에 2015년 4월 27일 개정하여 명시되어 있으며, 별표 3에 생물학적제제, 유전자재조합의약품, 세포배양의약품 등의 제출자료가 제5조 1항과 관련하여 자세히 표시되어 있다 (표 28).

다. 백신 인허가를 위해서는 기본적인 품목허가 필수 조건

(1) 백신 시제품 제작

- 재조합 항원의 장기 보존성 실험 (4℃ 1개월 이상, -40℃ 6개월 이상, 보관 전 후 항원 함량 비교)
- 백신 항원에 적합한 최적의 면역증강제 선정 (상용화된 면역증강제 3종 이상 사용 (gel 및 oli 포함), 기니픽 중화항체 형성능 비교)
- 백신 1 dose 당 최소 항원 함량 확인 (항원 농도별 시제품 3종 이상 제조, 기니픽 중화항체 형성능 및 목적동물 방어력 확인)
- 연속 3 Lot의 시제품 제작 (제조단위 : 10두 분, 제조량 : 100 vial 이상)

(2) 백신의 실험실 내 검증실험 및 야외 임상시험계획서 제출

- 시제품 3 Lot에 대한 자돈 안전성 실험 (항체음성 자돈 사용, 2두분 근육 접종 후 21일간 임상증상 관찰)
- 시제품 3 Lot에 대한 자돈 면역원성 실험 (항체음성 자돈 사용, 1두분 근육 접종, 3주 간격 2회 접종 후 중화항체가 확인)
- 백신의 야외임상시험 승인을 위한 임상시험 계획서 제출 (기술검토기한 : working day 기준 30일, 보완 시 30일 추가)

(3) 백신의 야외 임상시험 및 품목허가서류 제출

- 시제품 3 Lot의 3개 농장 야외 임상시험 (임신 모돈에서의 안전성 및 면역원성 확인실험 포함, 모돈의 안전성 확인 항목에는 태아의 안전성도 포함)
- 임신모돈 및 자돈에 대한 공격접종에 따른 방어능 조사
 - 돼지유행성설사병 불활화백신 : 포유자돈의 설사율 및 폐사율 측정
- 백신의 유효기간 설정을 위한 장기보존성 시험
 - 실험방법 : 생물학적제제 국가검정 기준 “돼지유행성설사병 불활화 백신” 및 “FMD불활화 백신” 검정기준(안)에 따라 실시 (백신의 특성에 맞게 수정 필요)
 - 실험항목 : 특성시험, 수소이온농도시험, 무균시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인시험, 안전시험, 마커에 대한 항체음성 시험, 혈청역가시험
 - 시험 일정 : 제조직후~12개월 : 매 3개월, 12개월 이후 : 매 6개월
- 백신의 제조 및 판매 승인을 위한 품목허가서류 신청 (기술검토기한 : working day 기준 90일, 보완 시 60일 추가)

※ 상기 조건들은 과제수행후 산물에 대해 특허출원을 하고 백신제조업체에서 특허실시권을 획득후 향후 백신인허가를 위한 절차이므로 본 사업에서는 전임상실험의 단계로 백신에 대한 안전성과 효능의 가능성을 검토한 결과 **PED 점막면역백신**으로서는 **HPMCP(aP2)+LL-RANKL 경구백신** 이 가능성이 보였고, **FMD는 M5BT가 백신으로** 가능성을 보였다.

표 28. 생물학적제제, 유전자재조합의약품, 세포배양의약품 등의 제출자료 (제5조 1항 관련)

구 분	1	2	3		4										5			6			7			8	9	
			①	②	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	①	②	③	①	②	③						
I. 신약																										
1. 별표 1 제1호 및 제2호 해당 의약품 중 유전자재조합의약품 및 세포배양의약품		○	○	○	○	○	△	△	△	△	△	△	△	△	△	○	△	△	○	×	×	△	○	○		
2. 별표 1 제호 및 제호 해당 의약품 중 생물학적제제																										
가. 백신·항독소		○	○	○	○	○	△	△	△	△	△	×	△	△	△	○	△	×	○	×	×	△	○	○		
나. 혈액제제																										
1) 진혈장제제 및 성분제제		○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△	△	△	△	△	○	×	×	×	○	○		
2) 분획제제		○	○	○	○	△	×	△	△	△	×	△	△	△	○	○	○	○	×	×	×	○	○			
다. 가목 내지 나목 이외의 생물학적제제 (치료용 항원류, 인터페론제제 등)		○	○	○	○	○	×	○	△	△	×	△	△	△	○	○	○	○	×	×	×	○	○			
라 가목의 백신중 유전자변형생물체를 이용하는 경우		○	○	○	○	△	△	△	△	△	×	△	△	△	○	△	×	○	×	×	△	○	○			
3. 별표1 제1호 및 제2호에 해당 의약품 중 체외진단용 동물용의약품		○	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	○	×	×	×	○	○			
II. 자료제출의약품																										
1. 새로운 효능군		○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△	×	○	×	×	○	×	×	×	○	○		
2. 유효성분의 새로운 조성 및 함량만의 증감		새로운 조성		○	○	○	×	○	△	×	×	×	×	×	△	△	△	○	△	△	○	×	×	×	○	○
		함량의 증감		○	○	○	×	△	×	×	×	×	×	×	△	×	△	△	×	×	○	×	×	×	○	○
3. 새로운 투여경로		별표 2중 새로운 투여경로의 범위에 따른다																								
4. 동일투여경로의 새로운 제형		별표 2중 새로운 제형의 범위에 따른다.																								
5. 새로운 용법·용량		○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	×	△	△	×	×	×	○	○		
6. 제조방법 변경		△	△	△	×	△	△	△	△	△	△	△	△	×	△	△	×	×	△	×	×	×	△	△		
7. 제조소 소재지의 추가 및 이전		△	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	×	×	△	×	×	×	△	×		
III. 공정서에 수재된 품목·기준 및 시험방법이 고시된 품목·기준 허가 품목과 동일한 품목																										
1. 이미 허가된 의약품과 균주 및 제조방법 등이 같은 제제를 제외한 생물학적제제																										
2. 다음 각 목의 1에 해당하는 유전자재조합의약품																										
가. 이미 허가된 동물용의약품과 제조에 사용되는 숙주 또는 벡터계가 다르거나 DNA 입수방법이 다른 재조합의약품																										
나. 이미 허가된 의약품과 숙주 및 벡터계가 같음에도 불구하고 배치의 조성 또는 정제방법이 다른 재조합의약품		○	○	○	×	○	△	×	×	×	×	×	△	△	△	△	○	×	×	○	×	×	△	○	○	
3. 이미 허가된 의약품과 종세포주가 같음에도 불구하고 배양방법 또는 정제방법이 다른 세포배양의약품																										
4. 이미 허가된 의약품과 종세포주가 다른 세포배양의약품		○	○	○	○	○	△	×	×	×	×	×	△	△	△	○	△	△	○	×	×	×	○	○		
5. 이미 허가된 의약품과 균주 및 제조방법 등이 같은 제제를 제외한 생물학적제제중에서 유전자변형생물체를 이용하는 경우		○	○	○	×	○	△	×	×	×	×	△	△	△	△	○	×	×	○	×	×	△	○	○		

○ : 자료를 제출하여야 하는 것 × : 자료가 면제되는 것 △ : 개개의 의약품에 따라 판단되어야 하는 것

제5절 1, 2세부 및 1협동 공동연구

1. PED 항원 효율 평가

가. 생산방식에 따른 항원 효율 평가

(1) 자돈 면역실험 계획

표 29. 자돈 면역 실험 그룹 배치

No.	시료	마리	방식	투여량	Adjuvant.	비고
1	NC	3	-	-	-	Non-immunized control
2	GST-COE	3	근육주사	500ug	IMS1313	Chaperone co-expression
3	GST-COE	3	근육주사	500ug	IMS1313	APP
4	GST-S1D	3	근육주사	500ug	IMS1313	Chaperone co-expression
5	GST-S1D	3	근육주사	500ug	IMS1313	APP

최종 PED 아단위 백신을 선정하기에 앞서 1세부에서 개발된 자원들 중 가장 효율이 높은 단백질을 목적동물에서 선정하기 위한 실험을 진행하였다. 수의과학검역본부와 함께 자돈 8~12주령을 이용하였고 자돈의 혈청에서 항 PED 바이러스 항체가 기준치 이하로 떨어질 때 까지 순차기간을 거쳤다. 그룹 당 3마리씩 배치를 하였으며 음성대조군으로 미투여군과 GST-COE 항원과 GST-S1D 항원을 chaperone co-expression 방법을 통해 생산해낸 단백질과 acetone precipitation 방법을 이용하여 생산해낸 단백질 그룹을 각각 배치하였다. 근육주사를 통해 2주마다 1회씩 총 3번 500ug을 IMS1313 돼지용 면역보강제와 함께 섞어서 접종하였다. 혈청 sample은 백신을 접종하기 직전에 채혈을 통해 수집했으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 다시 수집하였다 (표 29).

(2) 자돈 면역실험 혈청분석

항원 효율평가 결과는 먼저 ELISA 기법을 통해 각각 GST-COE 항원과 GST-S1D 항원에 대한 항체를 분석하였다. 이 분석에서는 Chaperone co-expression 방법과 acetone PPT 방법간에 유의적인 차이를 보이지 않았다 (그림 118).

다음 혈청을 이용한 중화항체 시험을 진행하였다. 중화항체 시험에서는 GST-S1D가 GST-COE 항원 보다 전체적으로 높은 titer를 나타내었다. 그리고 chaperone co-expressison 방법이 acetone PPT 방법보다 높은 중화항체 titer 경향을 나타내었다. 결론적으로 가장 높은 방어효율을 보였던 조합은 chaperone co-expression 방법을 통해 생산된 GST-S1D 항원이다 (그림 119).

최종 PED 항원 선정에 있어 한 가지 더 고려할 사항을 추가하였다. 산업화를 위한 단백질 생산의 난이도를 고려하여 최종적으로 Acetone PPT를 이용하여 생산된 GST-S1D를 선정하였

다. Acetone PPT 방법을 통한 단백질 생산은 Chaperone co-expression 방법보다 10배 이상으로 높은 발현율을 보인다는 장점이 있다. 비교적 간편한 공정을 통해 생산이 가능하며 그 양 또한 월등하게 많다. 또한 중화항체 생산효과 기준치 이상의 효과를 보이는 것으로 확인하였다. 앞으로의 연구는 GST-S1D를 활용한 실험을 진행하였다.

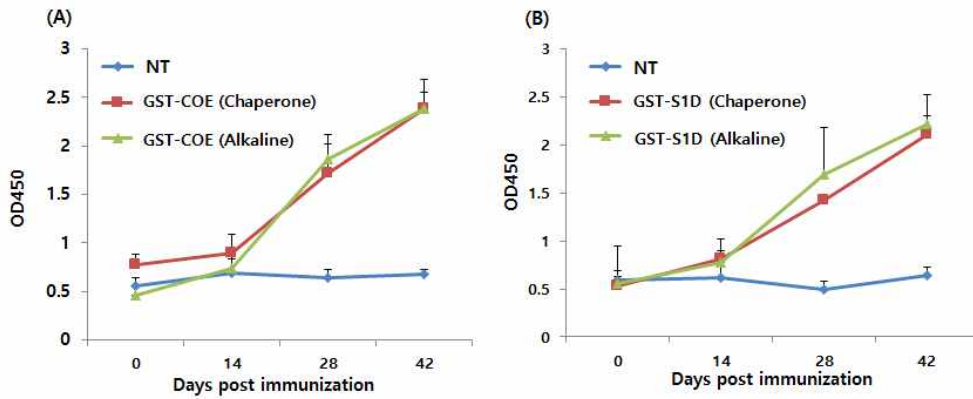


그림 118. (A) GST-COE 항원 특이적 항체 시간에 따른 생산 역가, (B) GST-S1D 항원 특이적 항체 시간에 따른 생산 역가

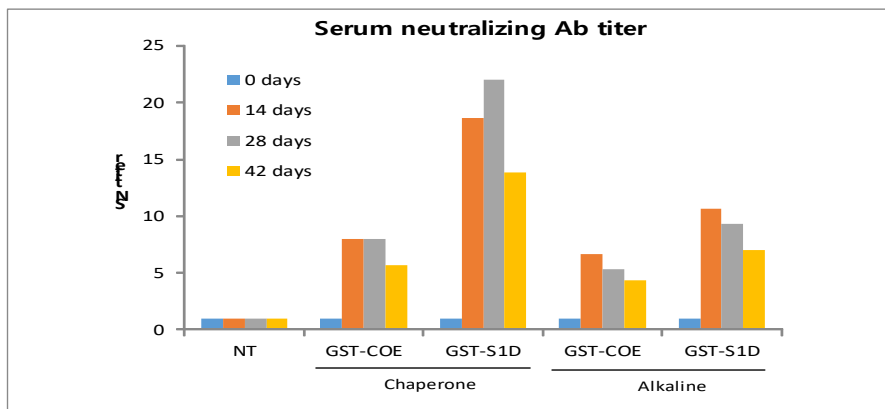


그림 119. 돼지 혈청을 이용한 중화항체 실험 결과

나. 완성형 PED 백신 개발을 위한 연구

(1) HPMCP 고분자를 이용한 항원 담지

경구용 PED 백신을 생산하기 위해 위장을 통과할 때 pH 2와 pepsin의 효소로부터 단백질을 보호하기 위하여 HPMCP 고분자를 이용하여 코팅하였다. 코팅결과 고분자 담지체는 1~10 um 크기의 마이크로파티클이 형성되었음을 확인하였고 SDS-PAGE를 통해 고분자에 담지된 GST-S1D (aP2) 단백질이 담지되어 있는 것을 확인하였다. 고분자는 pH 2에서는 단백질을 방출하지 않고 pH 7의 소장환경에서 방출하는 특성 시험도 유지하고 있는 것을 확인하였다 (그림 120).

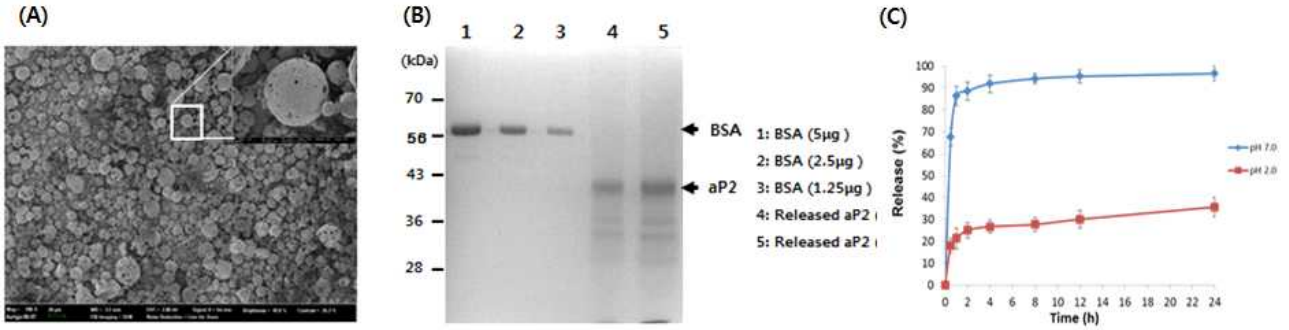


그림 120. (A) HPMCP를 이용한 항원 단백질 담지, (B) 담지된 단백질 양 측정, (C) 단백질 방출실험

HPMCP 고분자에 담지된 항원의 양을 확인하기 위해 pH 12의 buffer에 고분자를 녹인 후 원심분리에 의해 상층액을 분리해냈다. 분리된 상층액에서의 단백질 양을 microphotometer를 이용하여 측정한 결과 100mg의 HPMCP 당 6.3 mg의 단백질이 담지되어 있는 것을 확인하였다. 단백질 담지 효율은 42.5%이고 담지함량은 6.3%이다 (표 30).

표 30. aP2 (S1D) 단백질을 담지한 HPMCP의 제원

MPs	Size (um)	Loading content (%)	Loading efficiency (%)
HPMCP (aP2)	1~10	6.3	42.5

(2) 모든면역실험 계획

PED 바이러스는 성체의 돼지에게는 큰 경제적인 피해를 주지 못하지만 포유자돈과 이유자돈에게 높은 치사율을 보여 농가에 막대한 경제적인 피해를 주게 된다. 그래서 PED 바이러스의 올바른 방어를 위하여 자돈에게 PED에 대한 면역력을 전달하는 것이 중요하다. 갓 태어난 자돈은 면역체계가 자리잡히지 않아 백신을 접종하더라도 질병을 예방하는 항체를 생성하지 못한다. 그래서 모돈의 젖을 통해서 이항되는 항체가 중요하다. 이번 실험의 디자인은 모돈에 본 연구진이 개발한 항원을 접종하고 생성된 항체가 자돈에게 이항되어 자돈을 바이러스로부터 얼마나 보호가 가능한지를 알아보려고 하였다.

실험에 사용한 동물은 분만예정일로부터 한달전의 모돈을 이용하였다. 음성 대조군으로 무처리군 모돈 2마리를 배치하였고 상용백신은 경구투여와 주사접종 각 1마리씩 배치하였다. HPMCP에 담지된 GST-S1D (aP2) 단백질을 각 2마리씩 주사접종 그룹과 경구투여 그룹으로 배치하였고 마지막으로 HPMCP (aP2) 에 RANKL을 생산하는 유산균 10^{12} CFU와 함께 경구투여 한 그룹을 배치하였다 (표 31). RANKL 생산 유산균은 이전 BmpB를 이용한 마우스 면역실험 결과를 기초로 하여 10^{12} CFU를 선정하였다.

모돈 출산 한달전 혈액이 수집되었고 2주간격으로 백신이 접종되었다. 분만 당일 혈액과 초유가 수집되었고 5일 동안 자돈은 모돈의 초유와 돈유를 섭취하고 5일 후 옮겨져 공격접종 실험이 진행되었다 (그림 121).

표 31. PED 바이러스 임신모돈을 이용한 면역실험 그룹배치

No.	Group	Sows	Dose	Route	Note
G1	NT	2	-	-	Negative control
G2	Commercial PED vaccine	1	10 ^{4.5} TCID ₅₀	Oral	Positive control
		1	10 ^{4.5} TCID ₅₀	I.M	
G3	HPMCP (aP2)	2	10 mg	I.M	IM
G4	HPMCP (aP2)	2	10 mg	Oral	Oral
G5	HPMCP (aP2) + LL RANKL	2	10 mg + 10 ¹² CFU	Oral	RANKL secreting <i>L. lactis</i> as adjuvant

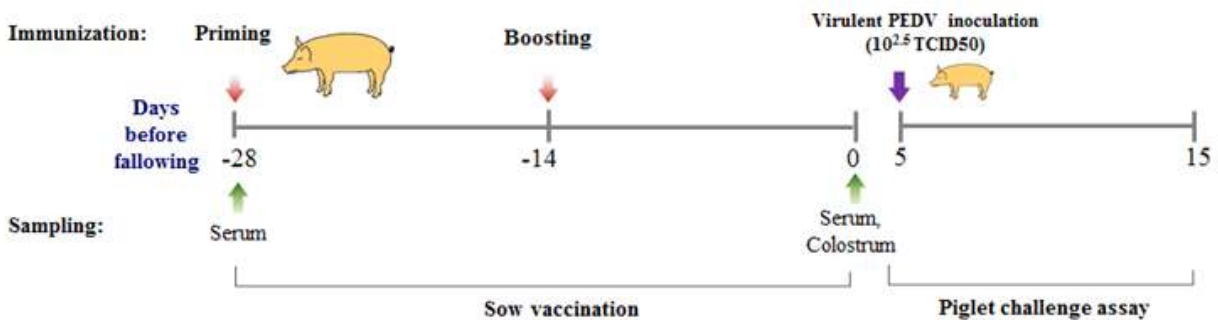


그림 121. PED 바이러스 임신모돈 및 포유자돈을 이용한 면역실험 스케줄

(3) 모돈 PED 항원에 대한 면역지표

모돈에서 수집된 혈청, 초유 그리고 돈유를 이용한 중화항체 실험을 진행하였다. 혈청 내 중화항체는 음성대조군을 제외하고 모두 기준치 이상의 중화항체가 생성된 것을 확인하였고 특히 G4인 HPMCP에 항원을 담지하여 경구투여한 그룹에서 가장 높은 중화항체가 보였다. 초유에서의 중화항체도 혈청에서의 중화항체와 비슷한 결과를 보였으며 돈유에 포함되는 중화항체역시 비슷한 경향을 보였다. 전체적인 그룹에서 본 연구진에서 개발한 백신은 상용백신보다 높은 효율을 보였다 (그림 122).

(4) 포유자돈 공격접종 실험

모돈의 젖을 5일간 섭취하고 옮겨져 공격접종이 된 자돈들의 방어 성적을 분석하였다. 양성대조군으로 배치한 상용백신 그룹에서 경구투여 한 그룹에서는 8마리 중 1마리만 살아남았고 주사그룹에서는 50%가 살아남았다. HPMCP (aP2) 그룹은 주사그룹에서는 100% 치사율을 보였고 경구투여 그룹은 14마리 중 1마리만이 살아남았다. 하지만 RANKL을 생산하는 유산균을 함께 넣은 그룹에서는 두 모돈의 자돈을 합쳐 50%의 방어율을 보인 것을 확인하였다 (표 32).

먼저 이 분석을 해석하기에 앞서 실험상에서 자돈이 꾸준히 모돈의 모유를 먹으면서 공격접종이 진행되었다면 좀 더 치사율이 낮아졌을 것이라 생각된다. 5일째 이후부터 모체로부터 오는 이항항체가 끊긴 후 공격접종이 시작이 되어 오히려 치사율이 높아졌다는 해석을 나타낼 수 있다. 그럼에도 불구하고 RANKL 생산 유산균을 접종한 그룹에서 50%의 생존율을 보였다

는 것은 의미가 깊다. 이 연구를 통해 Acetone PPT 방법을 통해 생산한 GST-S1D 항원을 HPMCP에 담지하여 RANKL 생산 유산균과 함께 섞은 형태를 PED 바이러스의 최종 백신 제형으로 제안한다. GST-S1D 항원 10mg을 HPMCP 고분자에 담지한 제형과 RANKL 생산 유산균의 함량은 10^{12} CFU를 10ml의 PBS에 섞은 제형이 최종적으로 제안한다.

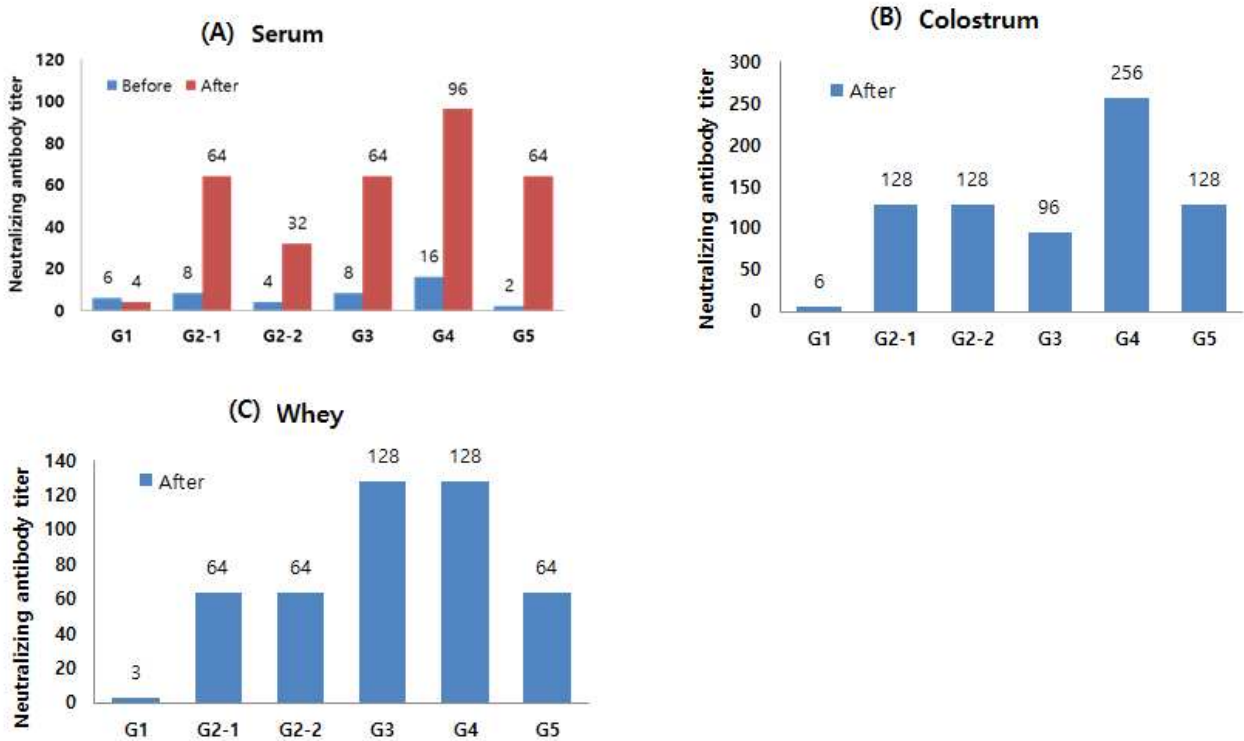


그림 122. 모돈 혈청 및 초유, 유청 등에 존재하는 중화항체 역가 측정

2. FMD 항원 돼지면역평가

가. 완성형 FMD 백신 개발을 위한 연구

(1) FMD 항원 고분자 담지

FMD 항원으로 경구를 통한 면역실험을 자돈에서 하기 위해서 앞서 마우스 면역실험을 통해 BmpB 단백질이 연결된 항원의 경우보다 생산량이 많고 면역반응 효과에서 뒤지지 않는 5BT 항원을 이용하기로 하였다. 여기에 점막면역반응을 활성을 위해서 M 세포 표적형 기술이 도입된 M5BT 항원을 사용하기로 하였다. M5BT 항원은 각각 HPMCP와 T-HPMCP에 담지되었고 담지체의 크기는 1~10um의 크기를 형성하는 것을 확인하였다. SDS-PAGE를 통해서 단백질 담지가 잘된 것을 확인할 수 있었다. 단백질 방출 시험에서 T-HPMCP는 24시간 이내에는 HPMCP 보다 방출량인 50% 정도로 감소하지만 시간이 지나면 완전히 방출 하는 것으로 확인이 되었다 (그림 123).

HPMCP 고분자와 T-HPMCP에 담지된 항원의 양을 확인하기 위해 pH 12의 buffer에 고분자를 녹인 후 원심분리를 이용해 상층액을 분리해냈다. 분리된 상층액에서의 단백질 양을

microphotometer를 이용하여 측정한 결과 100mg의 HPMCP 당 4.3 mg의 단백질이 담지되어 있는 것을 확인하였다. 단백질 담지 효율은 52%이고 담지함량은 4.3%이다. THPMCP에는 100mg 당 4.19 mg의 단백질이 담지되었고 담지 효율은 50% 이다 (표 33).

표 32. 포유자돈의 모돈 이항항체를 통한 공격접종에 대한 저항성 자료

Litter no.	Litter size; Still born; Lost to injury	Age(day); body weight (kg) at inoculation	Inoculum; Dose(TCID ₅₀); Route	piglet Condition								
				Morbidity (%)	Mortality ^b (%)	Highest fecal PEDV RNA shedding titer(log ₁₀ GE/mL)	Onset of diarrhea(dpi) ^c	Duration of diarrhea(days) ^d			First week mean body weight gain (g)	
G1-1 NC	10;1;0*	5; 2.70	Mock	0(0/3)	0(0/3)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-Δ1733.33
G2-1 PC Oral	14;4;1*	5; 1.83	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(8/8)	88(7/8)	7.941	2	1.00(3)	1.17(7)	1.00(1)	1.00(1)	-Δ315.00
G2-2 PC IM	10;2;1*	5; 2.63	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(6/6)	50(3/6)	7.387	4	1.83(6)	1.33(3)	1.00(2)	1.00(2)	-Δ521.67
G3-1 HPMCP(aP2) IM	13;2;0*	5; 1.91	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(8/8)	100(8/8)	7.796	2	1.40(5)	1.00(3)	1.00(2)	1.00(2)	-Δ438.75
G3-2 HPMCP(aP2) IM	15;1;0*	5; 1.87	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(8/8)	100(8/8)	7.610	2	1.62(8)	1.00(1)	1.00(2)	1.00(2)	-Δ417.50
G4-1 HPMCP(aP2) oral	11;0;0*	5; 1.81	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(8/8)	100(8/8)	7.278	2	2.13(8)	1.00(2)	1.00(1)	1.00(1)	-Δ419.38
G4-2 HPMCP(aP2) oral	11;3;0*	5; 1.19	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(6/6)	83(5/6)	6.889	2	2.00(4)	1.60(5)	NA	NA	-Δ345.00
G5-1 HPMCP(aP2) +LL RANKL Oral	12;0;0*	5; 1.88	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(8/8)	25(2/8)	7.648	3	3.00(8)	1.20(5)	1.00(3)	1.00(3)	-Δ330.00
G5-2 HPMCP(aP2) +LL RANKL Oral	12;0;0*	5; 1.99	HS; 10 ^{2.5} ; Oral	100(8/8)	75(6/8)	7.894	1	3.88(8)	1.00(6)	1.00(2)	1.00(2)	-Δ550.00

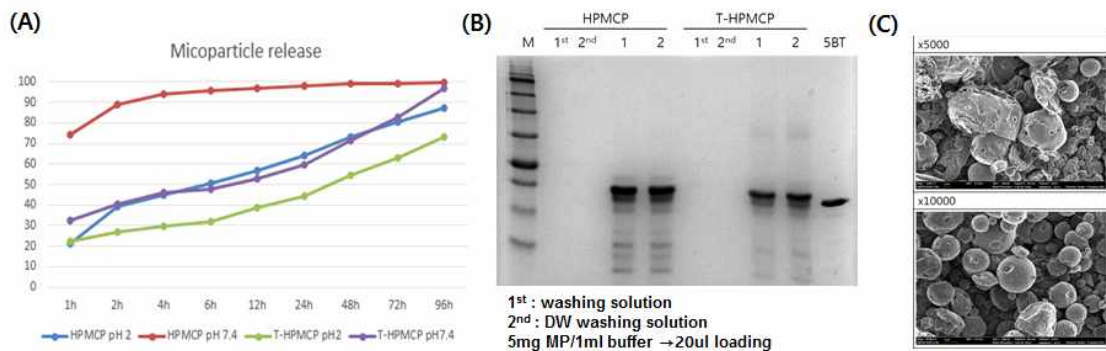


그림 123. (A) 고분자 항원 방출 실험, (B) 항원의 담지 과정 중 안정성 확인, (C) SEM 사진을 통한 고분자 형태 관찰

표 33. M5BT 항원 담지 효율

	Proteins(g)/polymer(g) X 100
HPMCP(M5BT)	4.3% (3.4%)
T-HPMCP(M5BT)	4.19% (3.2%)

(2) FMD 항원 면역실험 계획

FMD 바이러스는 강력한 전염병으로 우제류 동물의 발굽이나 입 주변에 수포를 발생시키고 사료섭취가 감소하여 돼지 본연의 상품성을 저하시켜 농가에 경제적인 피해를 준다. PED 바이러스와는 다르게 자돈을 위한 백신이 필요한 것이 아니라 성체 돼지에게도 발병을 예방하는 것이 중요하다. 그래서 FMD 아단위 백신 면역실험을 위해 8~12주령의 자돈을 이용해 접종실험을 진행하였다. 8~12주령의 자돈은 일반적으로 상용백신이 접종하는 주령이다. 자돈은 모체로부터 이항받은 항 FMD 바이러스 항체가 줄어들 때 까지 순치기간을 두었고 그룹당 3마씩 배치하였다. 음성대조군으로 무처리군을 두었고 양성대조군으로 현재 농가에서 사용중인 상용백신 (iFMDV)을 접종하였다. M5BT 10mg을 근육주사로 접종한 그룹과 경구투여한 그룹을 두었고 HPMCP와 T-HPMCP에 코팅한 그룹을 각각 그룹으로 배치하였다 (표 34).

표 34. 자돈 경구 면역실험을 위한 그룹 배치

No.	Group	Pigs	Dose	Route	Note
1	NT	3	-	-	Negative control
2	M5BT	3	10 mg	I.M	IMS1313
3	M5BT	3	10 mg	Oral	
4	M5BT (HPMCP)	3	10 mg	Oral	
5	M5BT (T-HPMCP)	3	10 mg	Oral	
6	iFMDV vaccine	3	2 ml	I.M	Positive control

백신 접종은 2주간격으로 3번 접종되었고 접종 직전 혈액이 수집되었고 마지막 6주차에도 혈액을 수집하였다.

(3) FMD 항원 면역시험 결과

4주차까지 수집된 혈청을 ELISA 기법을 이용하여 항원 특이적 항체를 조사한 결과 M5BT 단독 주사그룹과 불활화 백신의 경우 시간이 지남에 따라 항원 특이적 항체가 증가한 양상을 확인할 수 있었으나 경구투여 그룹의 경우에는 음성대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 돼지의 혈청을 이용한 western blot 기법의 항원 특이적 항체를 조사한 결과 M5BT 주사그룹과 상용백신의 혈청에서 M5BT 항원을 인식하는 항체가 존재함을 확인하였고 그 크기는 상용 histag 항체와 동일한 결과가 나왔다 (그림 124).

수집된 혈청을 이용하여 항 FMD 바이러스 항체를 분석하였다. 결과는 M5BT를 주사한 그룹과 iFMDV를 접종한 그룹에서 50이상의 유의적인 중화항체 생성량을 확인하였으나 경구백신의 경우에는 음성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이 실험은 서울대학교와 수의과학 검역본부에서 동시에 진행하였고 같은 결과를 보였으므로 신뢰성이 높은 결과이다. 그리고 마지막으로 중화항체 test를 진행하였다. 중화항체 test는 16배 희석 배수를 기준으로 그 이상일 경우 방어효율이 나타나는 중화항체 생성량을 인정한다. 앞서 항 FMD 바이러스 항체 검사와 동일하게 M5BT 주사그룹과 상용백신 그룹에서 기준 이상의 중화항체가 생성된 것을 확인하였고 경구투여 그룹은 음성대조군과 유의적 차이가 나타나지 않았다 (그림 125).

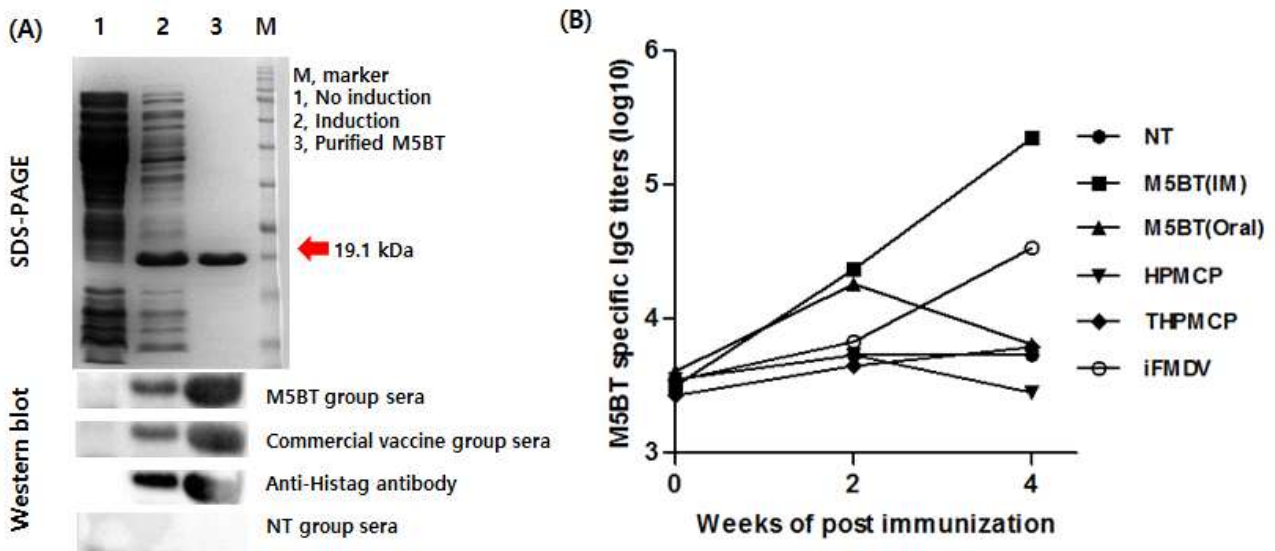


그림 124. (A) 정제된 단백질 SDS-PAGE 및 western blot 분석, (B) 돼지 면역실험 후 혈청 IgG 생성 결과

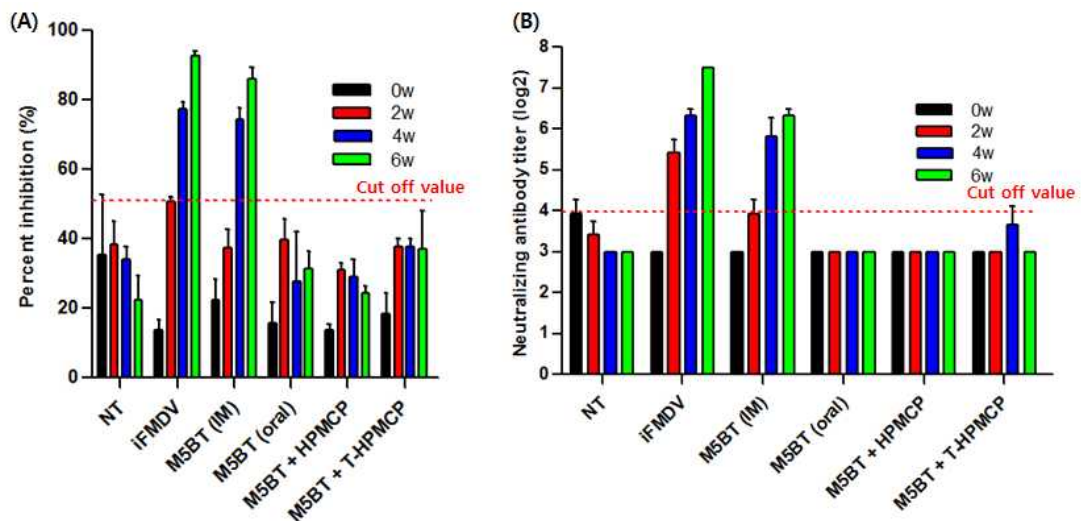


그림 125. (A) FMD 바이러스 특이적 항체 생성 확인 (B) 중화항체 생성 역가 측정

FMD 아단위 백신인 M5BT는 10mg의 항원단백질이 포함된 1ml의 용액과 돼지용 면역보강제 IMS1313 1ml을 섞은 주사제로써 그 효과를 보이는 것으로 확인이 되었지만 경구투여에서는 추후실험이 더 필요할 것으로 보인다. 단백질 자체의 안정성이 점막면역유도 효과에 영향을 미치는 것으로 보인다. M5BT항원과 다른 단백질이 연결된 형태의 conjugated vaccine 형태로 다시 실험해 볼 필요가 있다. 또한 FMD 공격접종은 국내에서 여건상 FMD 바이러스를 다루는 것이 어렵기 때문에 실험을 하지 못하였다. 이 부분에서도 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

제6절 2협동과제 : 표적형 접막면역 백신 산업적 대량생산체계 확립 및 산업화 추진

1. 항원 및 면역보강 단백질 생산 유산균 고농도 배양조건 확립

가. 종 배지와 intermediate culture의 조건 확립 후 최종 대량 배양 배지에서의 유산균 농도 최적화 조건 확립

(1) 선정 유산균의 균체 생육 확인

항원 및 면역보강 단백질을 생산하는 유산균의 배양 시간별 성장 변화를 관찰하기 위해 실험을 진행하였다. MRS broth에 overnight으로 키운 *L.lactis*-IL6, *L.lactis*-IL6-CKS9을 400ml의 MRS broth에 2% 접종하고 일정 간격으로 배양액의 O.D. value를 측정하였다 (표 35, 그림 126). 면역보강 단백질을 생산하는 두 유산균 모두 비슷한 growth curve를 그리며 자라는 것을 확인할 수 있었다. 이는 M 세포 표적형 펩타이드가 도입되어도 유산균 성장에는 큰 영향을 주지 않음을 시사한다.

표 35. *L.lactis*-IL6, *L.lactis*-IL6-CKS9 배양시간 별 O.D. 값

배양시간	IL6	IL6-CKS9
1	0.164	0.175
2	0.193	0.196
3	0.366	0.348
4	0.636	0.518
5	1.085	1.083
6	1.211	1.21
7	1.297	1.291
8	1.32	1.29

(2) 선정 유산균의 배지 내 탄소원 선별 및 적정 농도 최적화

(가) 선정 유산균의 배지 내 탄소원 선별

앞선 실험에서 두 개의 항원 및 면역보강 단백질을 생산하는 유산균의 생육이 비슷한 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었다. IL6를 생산하는 유산균의 최적 배양 조건을 찾기 위해 실험을 진행하였다. 탄소원을 제거한 MRS broth에 glucose, galactose, sucrose, fructose, lactose를 2%의 농도로 첨가하여 시간별 O.D. value를 측정하였다. *L.lactis*-IL6를 이용해서 점 배양한 뒤 2%의 배양액을 각각의 탄소원이 첨가되어 있는 MRS broth에 접종하였다. 시간별 배양을 했을 때, 더 좋은 성장을 보이는 탄소원을 관찰하였다. Control로 사용한 MRS broth와 비교해 봤을

때, 5개의 탄소원 (glucose, galactose, sucrose, fructose, lactose) 모두 비슷한 양상의 성장을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (표 36, 37, 그림 127, 128).

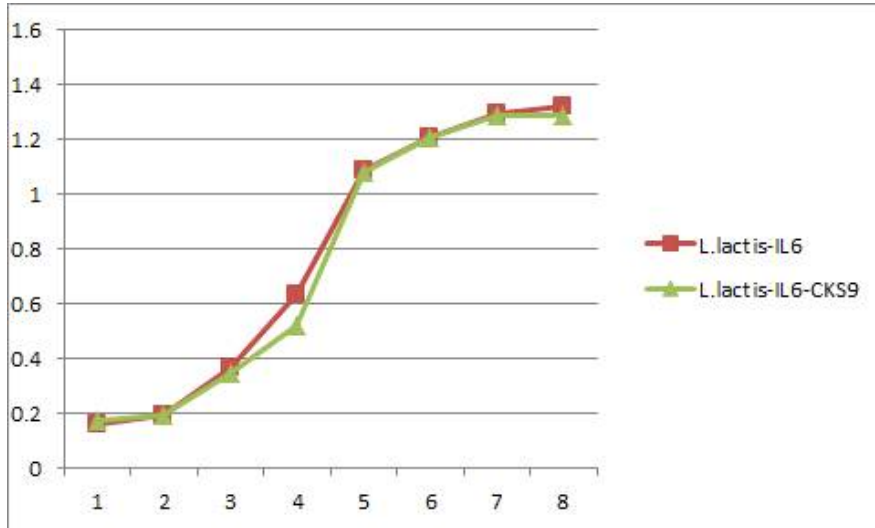


그림 126. L.lactis-IL6, L.lactis-IL6-CKS9의 growth curve

표 36. Control (MRS broth), 2% glucose, 2% galactose

배양시간	control	2% glucose	2% galactose
1	0.249	0.164	0.184
2	0.397	0.297	0.342
3	0.739	0.599	0.628
4	0.972	0.827	0.845
5	1.078	0.979	0.981
6	1.143	1.07	1.069
7	1.211	1.114	1.111
8	1.235	1.168	1.156

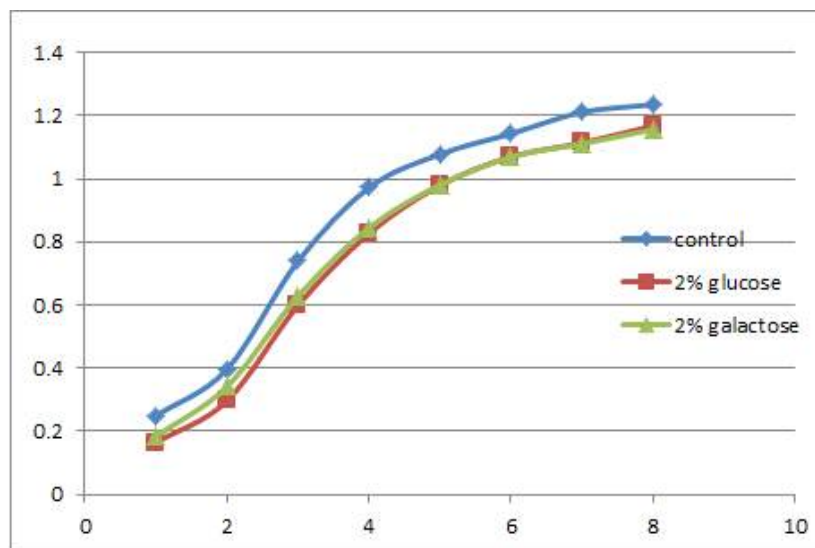


그림 127. 2 % glucose, galactose를 첨가했을 때 L.lactis-IL6의 O.D. 값의 변화

표 37. Control (MRS broth), 2 % lactose, 2 % fructose, 2 % sucrose

배양시간	Control	2 % lactose	2 % fructose	2 % sucrose
0	0.173	0.147	0.175	0.151
1	0.228	0.153	0.193	0.196
2	0.415	0.391	0.348	0.366
3	0.702	0.604	0.518	0.636
4	1.095	1.082	1.085	1.18
5	1.274	1.219	1.211	1.214
6	1.316	1.256	1.291	1.27
7	1.352	1.311	1.29	1.297
8	1.3	1.356	1.28	1.32

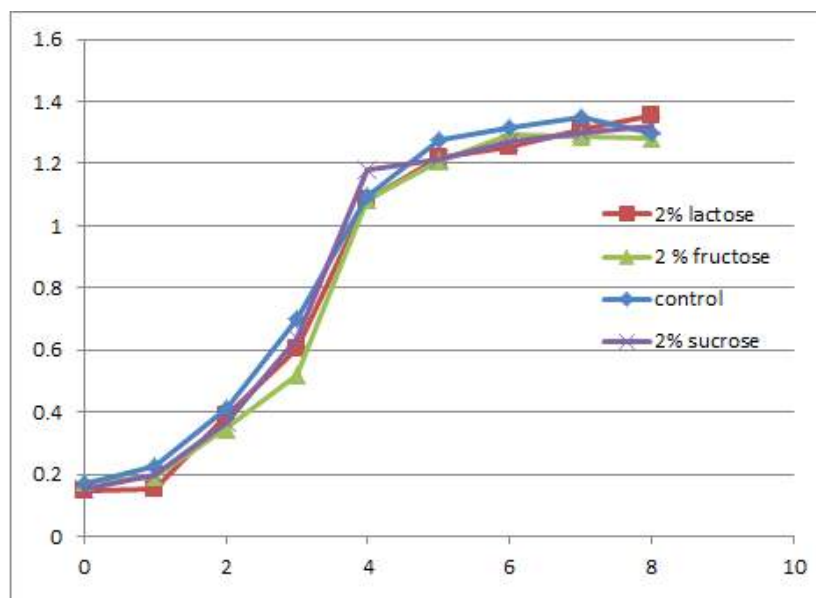


그림 128. 2 % lactose, fructose, sucrose를 첨가했을 때 L.lactos-IL6의 O.D. 값의 변화

(나) 선정 유산균의 적정 탄소원 농도 선정

앞선 실험에서 탄소원의 변화를 봤을 때, 선정 유산균의 성장에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. 2 %의 탄소원의 농도가 선정 유산균의 성장에 큰 영향을 주지 않았을 경우를 대비해 농도별 실험을 진행하였다. 5 시간 pre-culture한 L.lactis-IL6, L.lactis-IL6-CKS9을 탄소원 glucose, sucrose를 농도별 (0, 2, 5, 10 %)로 첨가한 MRS broth에 2%의 양을 접종하였다. 8 시간 후 최종 O.D.값을 측정하였다 (표 38). 탄소원인 glucose와 sucrose를 농도별로 접종했을 때, 농도가 높아질수록 O.D. value가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 같은 균주, 같은 양을 접종했을 때, 탄소원 (glucose, sucrose)의 농도가 높아질수록 성장이 느려진다는 것을 확인했다.

표 38. 탄소원 (glucose, sucrose) 농도별 samples의 O.D. 값

1. L. lactis-IL6 0 % glucose 1.089	2. L. lactis-IL6 2 % glucose 1.068	3. L. lactis-IL6 5 % glucose 0.984	4. L. lactis-IL6 10 % glucose 0.805
5. L. lactis-IL6 0% sucrose 1.146	6. L. lactis-IL6 2% sucrose 1.015	7. L. lactis-IL6 5% sucrose 0.911	8.L. lactis-IL6 10% sucrose 0.629
9. L. lactis IL6-CKS9 0% glucose 1.138	10. L. lactis IL6-CKS9 2% glucose 1.074	11. L. lactis IL6-CKS9 5% glucose 0.961	12. L. lactis IL6-CKS9 10% glucose 0.741
13.L. lactis IL6-CKS9 0% sucrose 1.164	14.L. lactis IL6-CKS9 2% sucrose 0.991	15.L. lactis IL6-CKS9 5% sucrose 0.956	16.L. lactis IL6-CKS9 10% sucrose 0.818

(3) 선정 유산균의 탄소원 변화에 따른 IL-6의 발현 변화 확인

항원 및 면역보강 단백질을 생산하는 유산균, L. lactis-IL6, L.lactis-IL6-CKS9을 이용해서 탄소원의 변화 및 농도의 변화를 주었을 때 성장에는 큰 영향이 없는 것을 확인할 수 있었다. 오히려 탄소원의 농도가 높아질수록 성장속도가 느려지는 것을 확인할 수 있었다. 선정 유산균의 성장속도가 면역보강 단백질의 발현에 의해 느려질 수 있다고 생각되어 IL-6의 발현을 확인해보았다.

MRS broth에 탄소원 (glucose, sucrose)을 농도별로 첨가해서 키운 뒤, 상층액과 pellet을 centrifuge하여 나누었다. 상층액은 TCA precipitation 법을 이용해 sampling하였고, pellet은 lysozyme 처리 후, sonication해 세포를 파쇄하였다. Bradford법으로 protein 정량을 한 뒤, 12 % acrylamide gel에 sample을 loading했다. 이어서 PVDF membrane에 transfer한 뒤 anti-IL6 (Santa Cruz) antibody로 Western blot을 진행하였다. 또한 같은 방법으로 loading하여 SDS-PAGE 후, coomassie blue staining하였다.

IL6, IL6-CKS9을 생산하는 전체 단백질의 농도를 확인하기 위해서 같은 양을 취해 Bradford 법을 이용해 정량했다 (표 39). 탄소원 농도가 높아질수록 O.D값이 작아지고, 같은 양을 취했을 때 생기는 pellet의 양도 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 그래서 같은 양의 배양액을 취해 정량했을 때, 전체 단백질량 또한 줄어들 것이라 예상되었다. 그러나, 표 13을 봤을 때 대체적으로 비슷한 단백질량이 있는 것을 확인할 수 있었다. 탄소원 첨가로 성장속도는 느려졌지만 생산하는 총 단백질량은 더 많이 생산하고 있다고 생각되어진다.

(가) glucose 농도 변화에 따른 IL6 발현 변화 확인 (L.lactis-IL6)

L.lactis-USP45-IL6를 glucose 2, 5, 10 %의 농도로 MRS broth에 첨가한 다음 30 °C에서 overnight 배양하였다. lysozyme, sonication한 samples을 SDS-PAGE 후 Coomassie blue staining했다 (그림 129). USP45-IL6 (216 amino acid)가 약 23 kDa이므로 25 kDa marker size 아래에 나온 band가 USP45-IL6일 것이라 예상된다 (그림 129 (A)). glucose 농도 변화에도 이 band의 굵기는 일정한 것을 볼 수 있다. 15kDa이하의 band가 glucose를 넣은 samples

에서 굵어지는 것을 확인 할 수 있으나, IL6의 size가 아니므로 다른 protein이 glucose 첨가에 의해 많이 생산되는 것으로 생각된다. anti-IL6 (Abcam) antibody를 처리해서 수행한 실험 (그림 129 (B))에서는 band를 관찰 할 수 없었다. IL6가 없거나 약하게 발현되어 membrane 상에서 보이지 않는 것으로 생각된다.

표 39. *L.lactis* 탄소원 (glucose, sucrose) 농도별 단백질 정량 값 (1 ug/ul)

No	Samples	단백질농도 (1 ug/ul)
1	<i>L. lactis</i> -IL6 0 % glucose	1.89281642
2	<i>L. lactis</i> -IL6 2 % glucose	1.858608894
3	<i>L. lactis</i> -IL6 5 % glucose	2.006841505
4	<i>L. lactis</i> -IL6 10 % glucose	1.698973774
5	<i>L. lactis</i> -IL6 0 % sucrose	1.915621437
6	<i>L. lactis</i> -IL6 2 % sucrose	1.915621437
7	<i>L. lactis</i> -IL6 5 % sucrose	1.904218928
8	<i>L. lactis</i> -IL6 10 % sucrose	1.767388826
9	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 0 % glucose	1.938426454
10	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 2 % glucose	1.961231471
11	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 5 % glucose	1.835803877
12	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 10 % glucose	1.767388826
13	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 0 % sucrose	1.870011403
14	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 2 % sucrose	1.938426454
15	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 5 % sucrose	1.927023945
16	<i>L. lactis</i> -IL6-CKS9 10 % sucrose	1.81299886

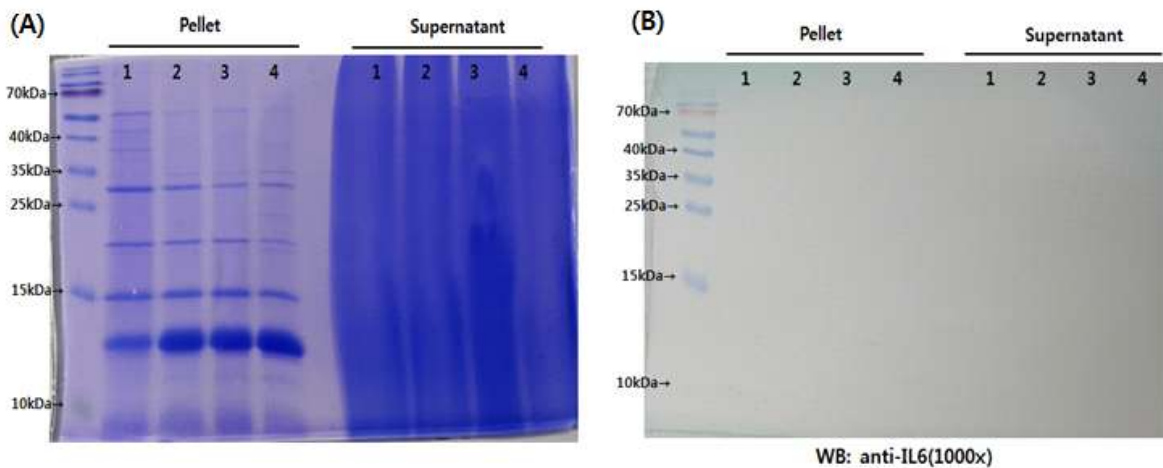


그림 129. (A) Coomassie blue staining; *L.lactis*-IL6 (glucose 농도 변화에 따른 IL-6 발현 확인, 0~10%), (B) Western blot membrane; *L.lactis*-IL6 (glucose 농도 변화에 따른 IL-6 발현 확인, 0-10%) TMB substrate로 반응시 band가 나타나지 않음

(나) sucrose 농도 변화에 따른 IL6 발현 변화 확인 (*L.lactis*-IL6)

L.lactis-USP45-IL6를 sucrose 농도 (0, 2, 5, 10%)를 다르게 해서 키워 lysozyme, sonication 한 samples을 SDS-PAGE후 Coomassie blue staining하였다 (그림 130 (A)). USP45-IL6 (216 amino acid)가 약 23kDa이므로 25kDa이하에서 나온 band를 봤을 때, sucrose를 첨가해준

samples에서 희미한 band가 하나 더 생긴 것을 확인할 수 있다. glucose 첨가 실험에서처럼 15kDa 이하에 진해지는 band가 나타난다. IL6 size band는 끊어지지 않았지만 glucose 실험에서와 다르게 많은 band가 생겨나는 것을 볼 수 있다. 탄소원의 변화로 인해 다른 proteins이 생성된 것으로 보인다.

anti-IL6 (Abcam) antibody를 이용한 Western blot 실험에서 약하게 15kDa 이하에서 band가 나타나는 것을 볼 수 있다 (그림 130 (B)). Coomassie blue로 staining한 실험 결과에서, 15kDa 이하에서 끊어지는 band의 위치와 같다. IL6가 degradation 되어 antibody가 인식할 수 있는 epitope 부분만 남아서 band가 나타난 것인지에 대한 추가 연구와 IL6 안정성 실험이 필요해 보인다.

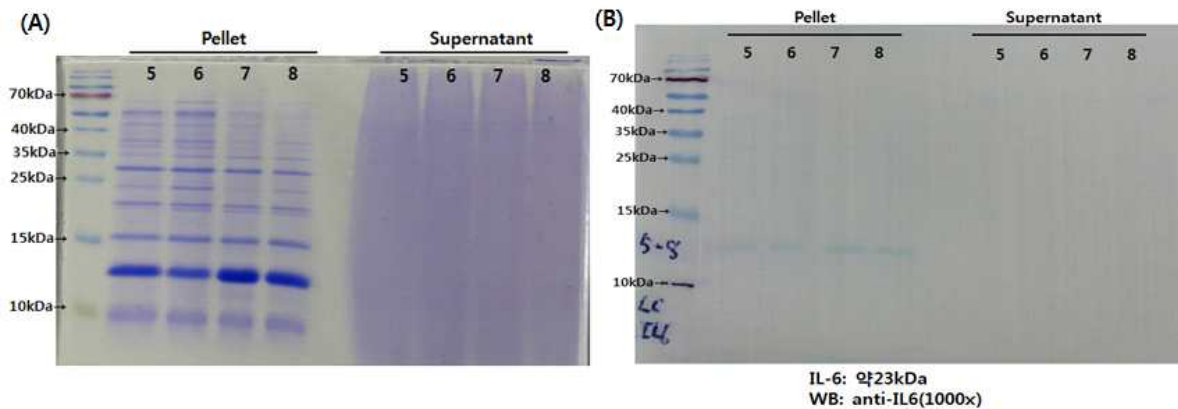


그림 130. (A) Coomassie blue staining; L.lactis-IL6 (sucrose 농도 변화에 따른 IL-6 발현 확인, 0~10%), (B) Western blot membrane; L.lactis-IL6 (sucrose 농도 변화에 따른 IL-6 발현 확인, 0~10%)

(다) glucose 농도 변화에 따른 IL6 발현 변화 확인 (L.lactis-IL6-CKS9)

L.lactis-USP45-IL6-CKS9을 glucose 농도 (0, 2, 5, 10 %)를 다르게 해서 키워 lysozyme, sonication한 samples을 SDS-PAGE후 Coomassie blue staining하였다 (그림 131 (A)). L.lactis-USP45-IL6-CKS9의 크기가 약 25 kDa이지만 25kDa marker band 위치에는 뚜렷한 band를 볼 수 없다. 앞선 실험에서 나온 결과처럼 15 kDa 이하에서 glucose 농도가 높아짐에 따라 band가 끊어지는 것을 확인할 수 있다. anti-IL6 antibody (Abcam)을 이용한 Western blot 결과 (그림 131 (B))에서는 band를 찾아볼 수 없었다. 앞선 실험에서 나온 연한 band의 위치를 볼 때 15 kDa이하에서 나온 굵은 band가 IL6 라면 IL6 protein이 *L.lactis* 내에서 안정적으로 expression되는 지 확인하는 실험이 필요해 보인다.

(라) glucose 농도 변화에 따른 IL6 발현 변화 확인 (L.lactis-IL6-CKS9)

L.lactis-USP45-IL6-CKS9을 sucrose 농도 (0, 2, 5, 10 %)를 다르게 해서 키워 lysozyme, sonication한 samples을 SDS-PAGE후 Coomassie blue staining하였다 (그림 132 (A)). 앞선 실험 결과에서처럼 15 kDa이하에서 가장 굵은 band를 볼 수 있다. 또한 sucrose 농도가 높아짐에 따라 끊어지는 것도 확인할 수 있다. glucose 농도를 다르게 한 실험에서와는 다르게 (그

림 94) 더 많은 band가 생겨난 것을 확인 할 수 있다 (그림 132 (A)). L.lactis-USP45-IL6-CKS9의 예상 크기인 25 kDa 주위에 glucose를 이용한 실험과는 다르게 band가 나타난 것도 확인할 수 있다. 그러나 anti-IL6 antibody (Abcam)을 이용한 Western blot 실험 결과 (그림 132 (B))에서 뚜렷한 band를 확인 할 수 없었다. 15 kDa이하에서 아주 연하게 band가 나타나긴 했으나 예상 size의 band가 아니다. USP45-IL6, USP45-IL6-CKS9 둘 모두 L.lactis 내에서 안정적으로 발현되는지 여부에 대해 추가 실험이 필요해 보인다.

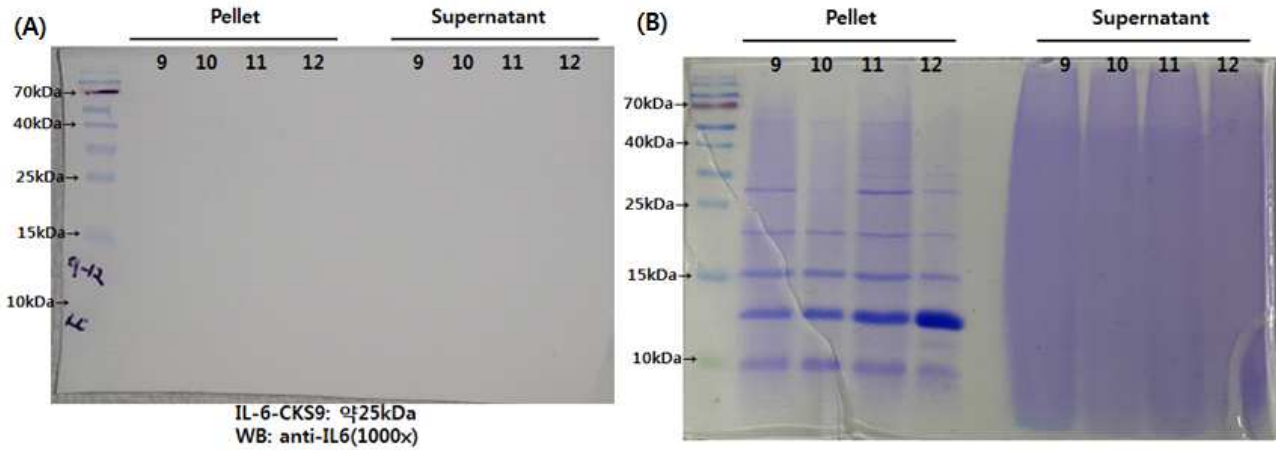


그림 131. (A) Western blot membrane ; L.lactis-IL6-CKS9 (glucose 농도 변화에 따른 IL-6-CKS9 발현 확인, 0-10 %) (B), coomassie blue staining; L.lactis-IL6-CKS9 (glucose 농도 변화에 따른 IL-6-CKS9 발현 확인, 0-10 %)

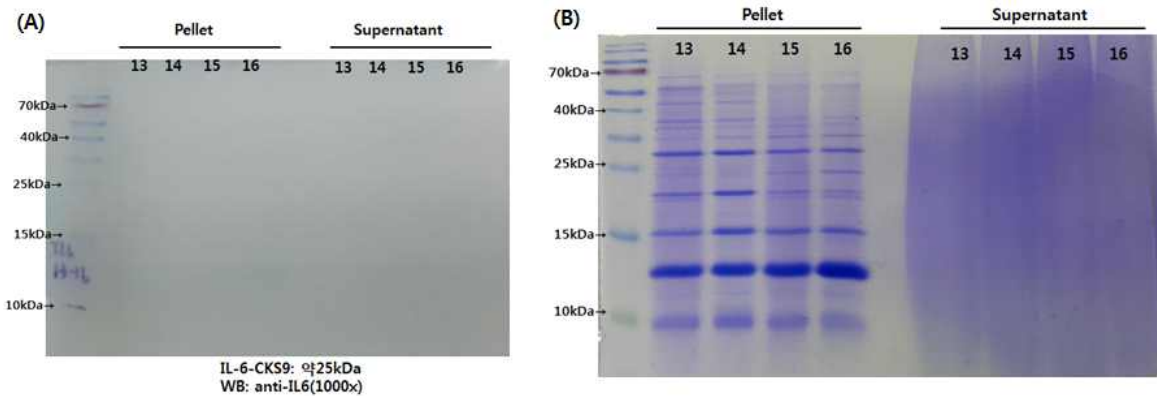


그림 132. (A) Western blot membrane ; L.lactis-IL6-CKS9 (sucrose 농도 변화에 따른 IL-6-CKS9 발현 확인, 0-10 %), (B) Coomassie blue staining; L.lactis-IL6-CKS9 (sucrose 농도 변화에 따른 IL-6-CKS9 발현 확인, 0-10 %)

4가지 종류의 균주에 대한 최적의 배양 조건 확립을 위한 배지 조성 연구를 수행한 결과 SDS-PAGE 분석과 Western blotting 실험을 통해 확인한 결과 어떠한 단백질 발현도 확인되지 않아 당초 2차년도 연구 계획에 따라 200 L scale 까지의 배양 최적화 실험이 의미가 없을 것으로 판단되어 추가적인 실험은 하지 않았다. 특히 일부 단백질의 경우 목적단백질에 대한 항체를 이용한 western blotting 실험에서도 target 단백질의 band 가 검출되지 않아 추가적인 단백질 발현 실험이 정확히 이루어져야 할 것으로 판단된다.

2. 대장균 발현 PED 바이러스 수용성 항원의 대량 배양

(가) 대장균 발현 PED 바이러스 수용성 백신의 PED 바이러스 항원 발현 확인

표 40. 항원 및 사이토카인 단백질 생산 재조합미생물

Species	Stock Name	Host/vector	Description
<i>E. coli</i> (PEDV1 &PEDV2)	BL21 pTF16 pGEX 6p-1 PEDV1	host: BL21 pTF16 vector: pGEX 6p-1	PED virus의 spike protein 499-636aa 영역을 GST와 fusion 형태로 Trigger factor 균주에서 soluble 형태로 발현
	BL21 pTF16 pGEX 6p-1 PEDV2	host: BL21 pTF16 vector: pGEX 6p-1	PED virus의 spike protein 636-637-789aa 영역을 GST와 fusion 형태로 Trigger factor 균주에서 soluble 형태로 발현
<i>E. coli</i> (M5BT)	E.coli BL21(DE3) pET21a-M5BT	host: E.coli BL21(DE3) vector: pET21a (Novagen)	FMD 바이러스의 epitope으로 구성된 5BT단백질이 M 세포 표적형 단백질과 fusion되어 수용성 단백질로 발현되는 형 태

PED 바이러스 spike protein이 inclusion epitope 영역(499-734 aa)을 둘로 나눠 발현하는 PEDV1, PEDV2으로 발현시스템을 구축하였고, 2차년도 과제 진행 중 발생했던 문제중에 inclusion body로 발현되는 문제점을 보완하기 위해 chapeone expression이 가능한 BL21 pTF16을 이용하여 발현을 진행하였다 (표 40).

표 41. PED 바이러스 단백질 발현 정보

stain	Vector	Insert	Tag
BL21 pTF16	pGEX 6p-1	PEDV1(499-636a.a.)	N terminal GST tag
BL21 pTF16	pGEX 6p-1	PEDV2(637-789a.a.)	N terminal GST tag

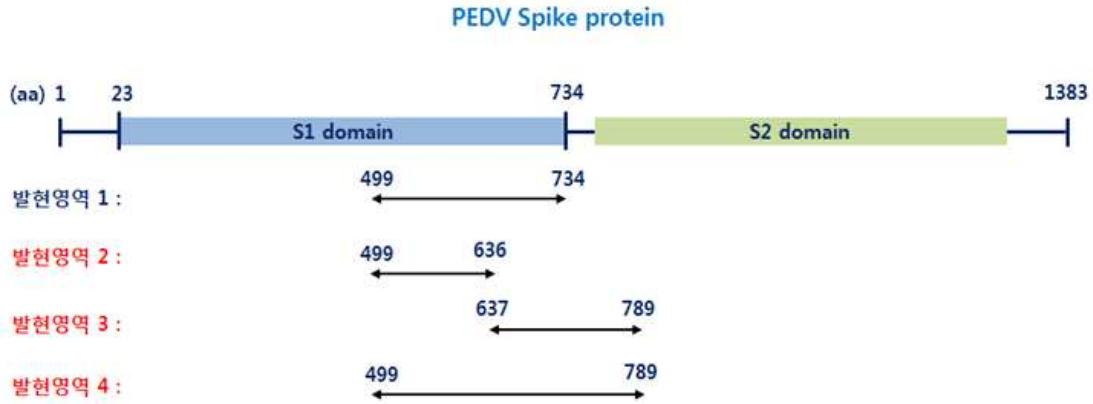


그림 133. PED 바이러스 아단위 백신 발현 영역 표시

① BL21 pTF16 pGEX 6p-1 PEDV1 ②BL21 pTF16 pGEX 6p-1 PEDV2의 단백질 발현 여부를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다 (표 41). 배지는 LB broth(BD) + Ampicillin(100ug/ml) + Chloramphenicol(20ug/ml)로 진행하였고, 배양조건은 37℃, 240rpm에서 pre culture 진행하였고, GST-PEDV1, GST-PEDV2 균을 200ml LB(flask)에 접종해서 L-arabinose(1.5mg/ml, Goldbio) 첨가 후 O.D. 0.6에 이를 때 16℃로 낮춰서 IPTG(0.1mM)로 induction하였다. 발현여부는 Western blot으로 확인하였다 (그림 134).

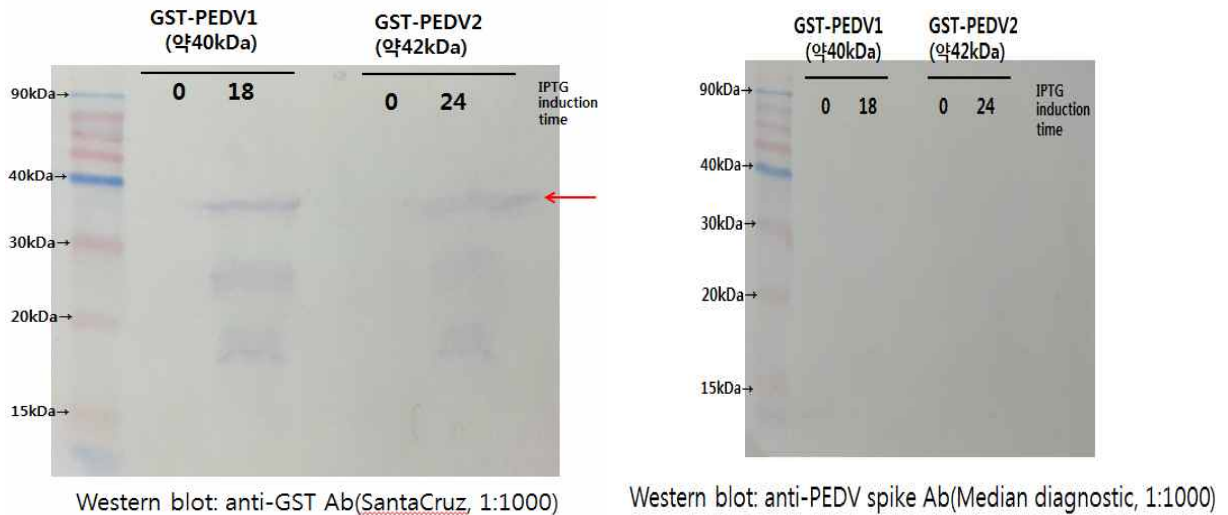


그림 134. Western blot 결과 (anti-PEDV, anti-GST antibody)

위의 배양 조건으로 실험하여 같은 sample을 둘로 나누어 Western blot을 통해 발현을 확인했을 때, anti-GST Ab(SantaCruz)로 반응 시 PEDV1, PEDV2 band 및 여러 잡 band가 나타난다. 그러나 target 단백질에 대한 Antibody인 anti-PEDV spike protein Antibody(Median Diagnostic)로 확인시 band를 확인할 수 없었다.

3. 경구용 FMD 바이러스 M5BT 항원 생산 유산균 백신의 대량배양

(가) 경구용 FMD 바이러스 M5BT 바이러스 항원 생산 대장균을 이용한 항원 발현 확인

FMD 바이러스 M5BT 발현시스템은 FMD 바이러스 항원인 5BT와 M 세포 표적형 펩타이드가 도입된 M5BT가 pET21a 벡터에 연결되어 있고, C-terminal에 6x histidine 이 fusion 되어 확인할 수 있도록 구축되었다. 2차년도에서 진행했던 발현시스템과 비교하여 epitope 부위를 변경하여 구축한 벡터시스템으로 실험을 진행하였다 (표 42)).

표 42. FMD 아단위 백신 항원 정보

stain	Vector	Insert	Tag
BL21(DE3)	pET21a	M5BT	C terminal 6xHis

FMD 바이러스 M5BT protein의 단백질 발현 여부를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. 배지는 LB broth(BD) + Ampicillin(100ug/ml) 로 진행하였고, 배양조건은 37°C, 240rpm에서 pre-culture 진행하였고, M5BT-6xHis 균을 200ml LB(flask)에 접종해서 O.D. 0.5에 이를 때 16°C로 낮춰서 IPTG(0.1mM)로 induction하였다. 발현여부는 Western blot으로 확인하였다 (그림 135).

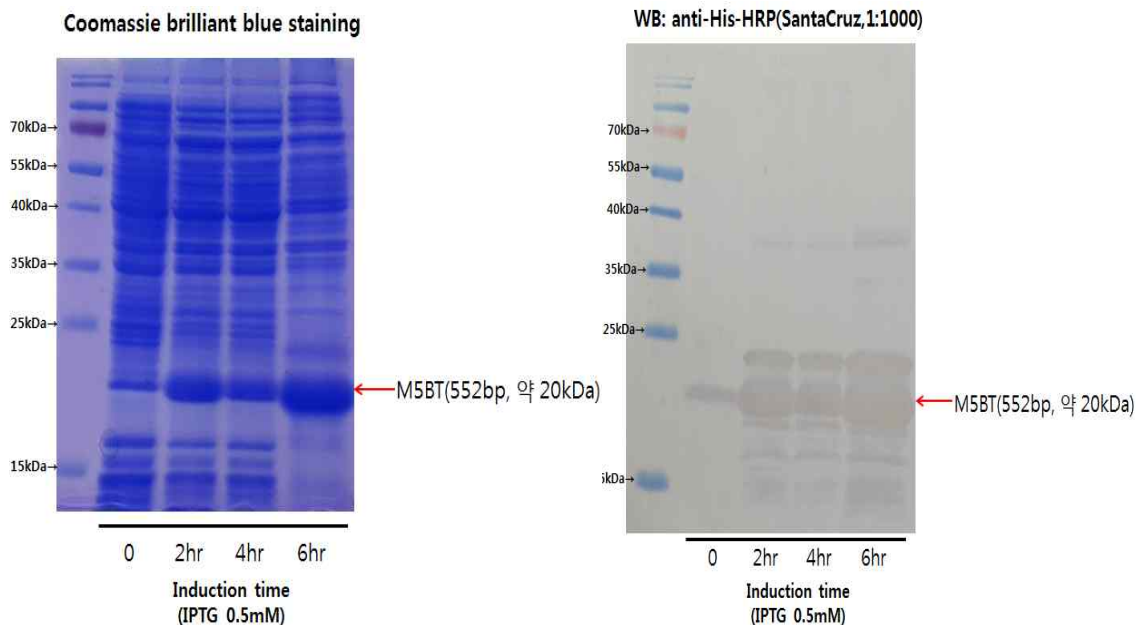


그림 135. M5BT 단백질 발현 SDS-PAGE & western blot assay

FMD 바이러스 M5BT의 예상 size인 약 20kDa 부근에서 IPTG induction한 뒤 band가 진해지는 것을 확인할 수 있었고(coomassie blue staining), Western blot 실험 시에도 target band 뿐만 아니라 여러 band가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 6xHis tag이 달린 M5BT를 Ni-NTA resin(Thermo fisher)을 이용해 정제하여 위와 같은 결과를 얻었다. 5번 lane에서 target band가 가장 진하게 나왔으나 다른 band 또한 나타났다. 이는 Anti-His Antibody를 이용한 Western blot 실험 시에도 여러 band가 나왔기 때문에 단순히 non-specific binding 때문에 나타난 band라 생각되지 않는다 (그림 136).

서울대 FMDV M5BT his protein(552bp, 약 20kDa) purification

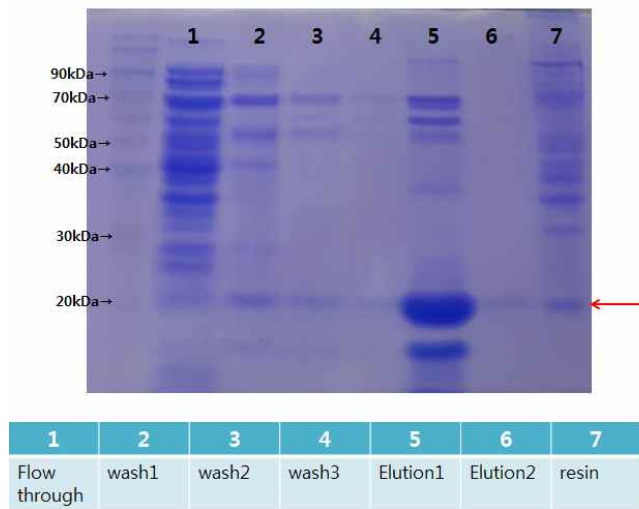


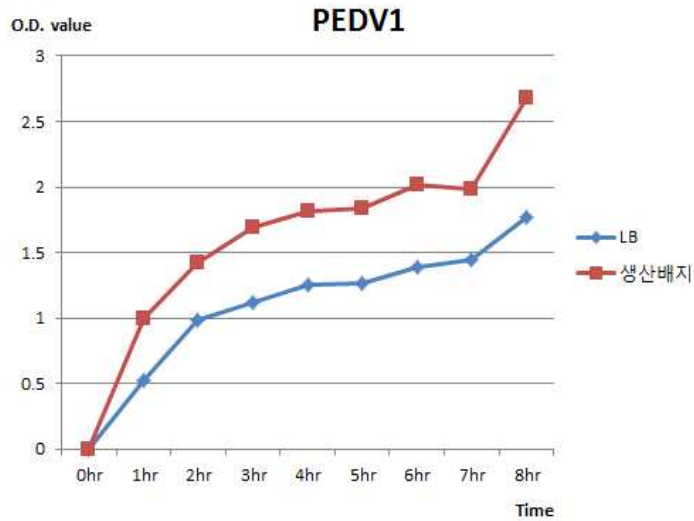
그림 136. FMD 바이러스 M5BT 단백질 His tag 정제 결과

4. 대장균, 유산균 백신의 대량 생산 조건 확립

가. 배지별 발현 비교(flask level)에서 최적 발현배지 선정 실험

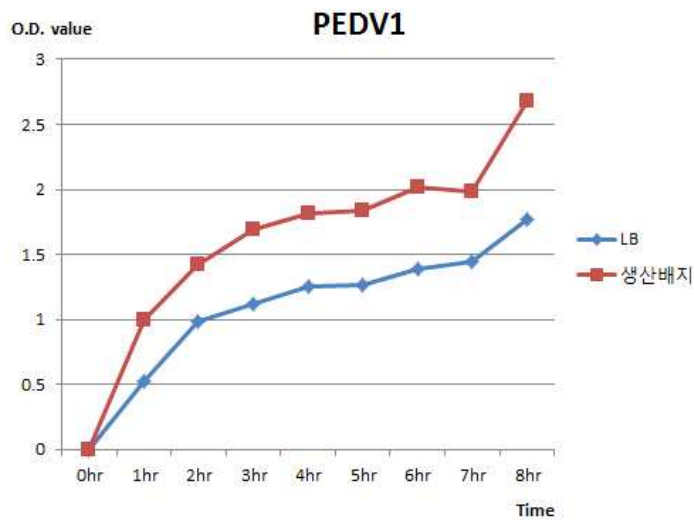
(1) 일반배지(LB) 와 생산배지에서 백신 생산 대장균의 성장 및 발현 비교

일반 LB broth(BD) 와 우진비엔지에서 직접 제조한 생산배지를 사용하여 배지비교 하였다. 생산배지는 1% glucose, 1% yeast extract, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.0) 으로 제조하였다. 균주는 PEDV1, PEDV2, M5BT 3개의 발현 대장균을 사용하였다 (그림 137, 138, 139). seed 배양은 LB(BD)에 배양조건 37°C, 240rpm 으로 pre-culture 진행하였고, 익일 각각 배지 100ml 에 seed 10%를 접종하여 성장변화를 관찰하였고, 이전 발현 확인 시험과 같은 조건에서 induction을 진행하여 단백질 생산 여부를 확인하였다 (그림 140, 141).



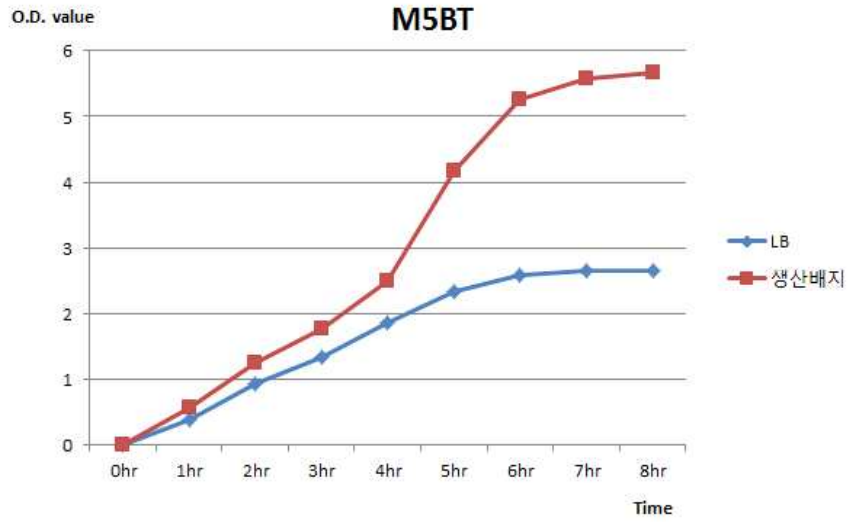
PEDV1		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB		0	0.53	0.98	1.12	1.26	1.27	1.39	1.45	1.77
생산배지		0	1	1.42	1.69	1.82	1.84	2.02	1.98	2.68

그림 137. PEDV1 생산 대장균 고농도 배양 최적화



PEDV1		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB		0	0.53	0.98	1.12	1.26	1.27	1.39	1.45	1.77
생산배지		0	1	1.42	1.69	1.82	1.84	2.02	1.98	2.68

그림 138. PEDV2 생산 대장균 고농도 배양 최적화



M5BT		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB		0	0.39	0.92	1.34	1.86	2.34	2.58	2.65	2.64
생산배지		0	0.57	1.24	1.76	2.49	4.18	5.27	5.57	5.66

그림 139. M5BT 생산 대장균 고농도 배양 최적화

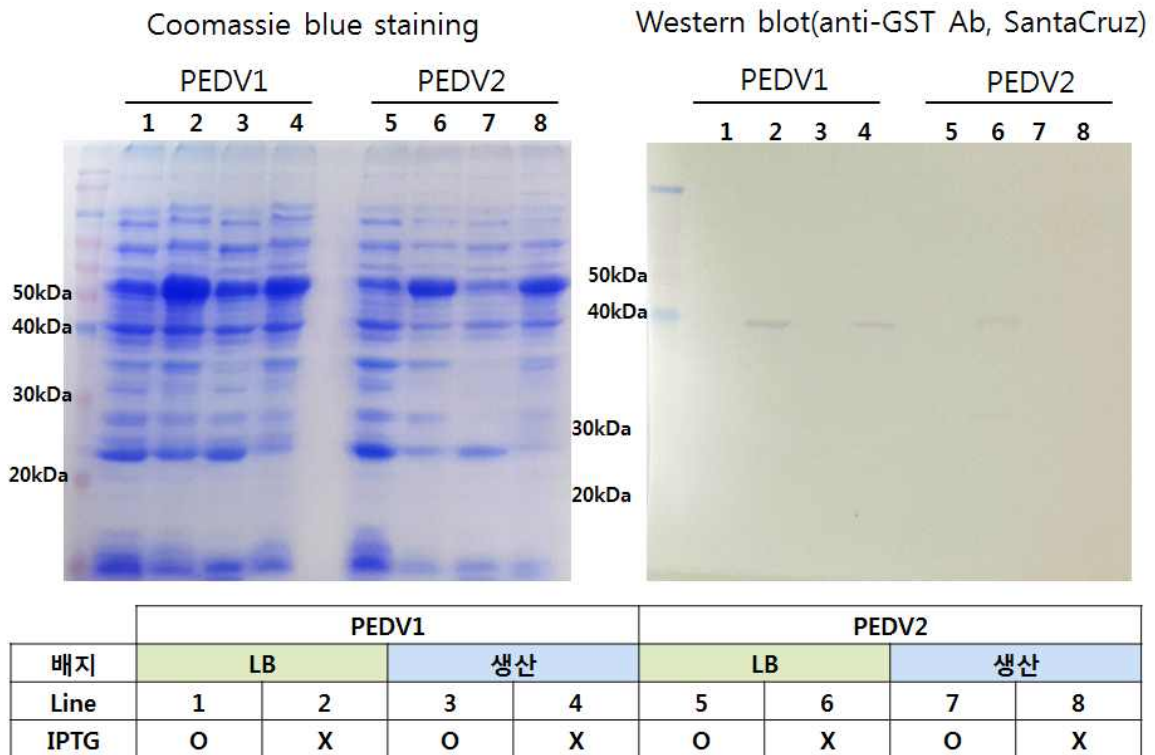


그림 140. PEDV1, 2 단백질 생산 확인

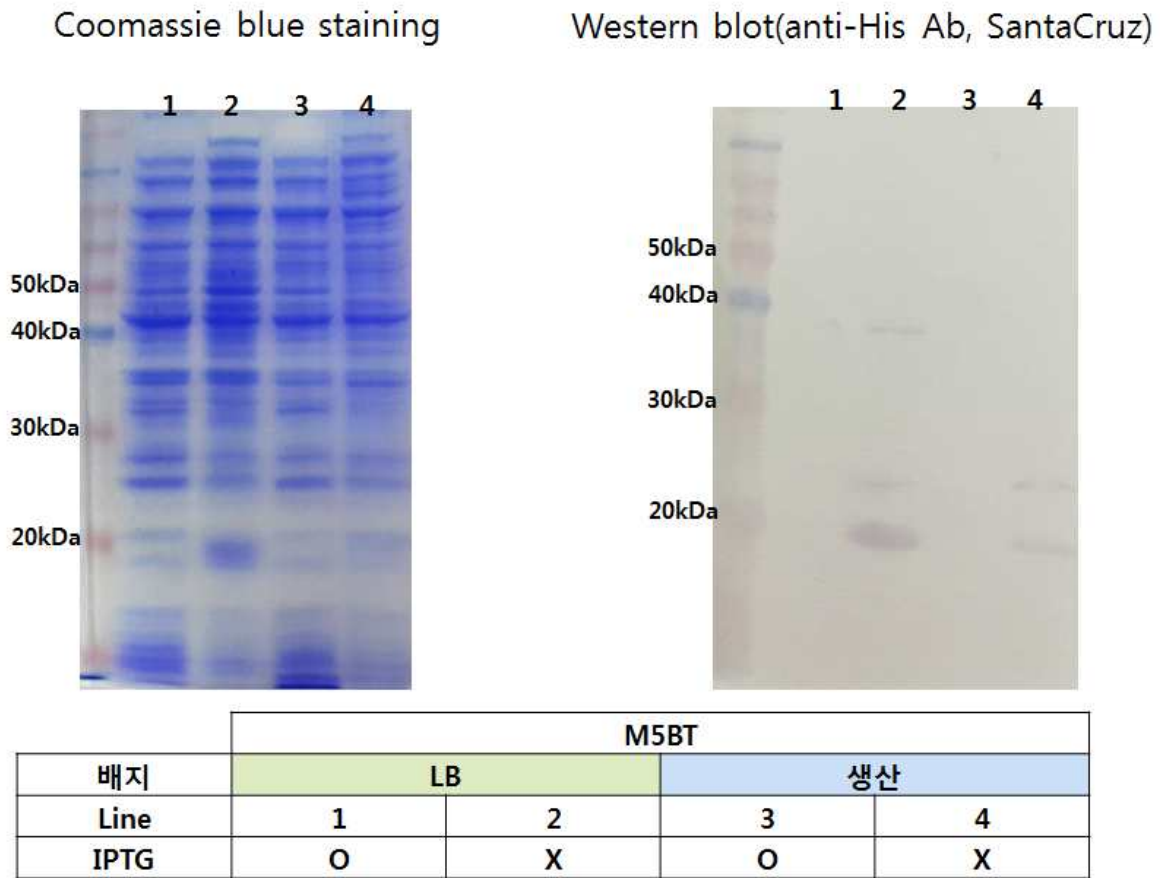
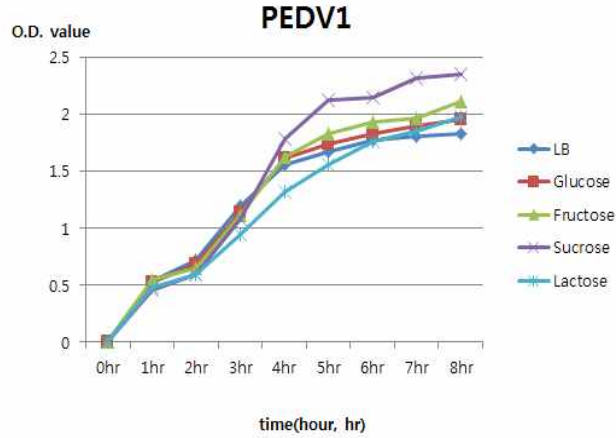


그림 141. M5BT 단백질 생산 확인

나. 일반배지(LB)에 탄소원 및 질소원 조건별 백신 생산 대장균의 성장 및 발현 비교

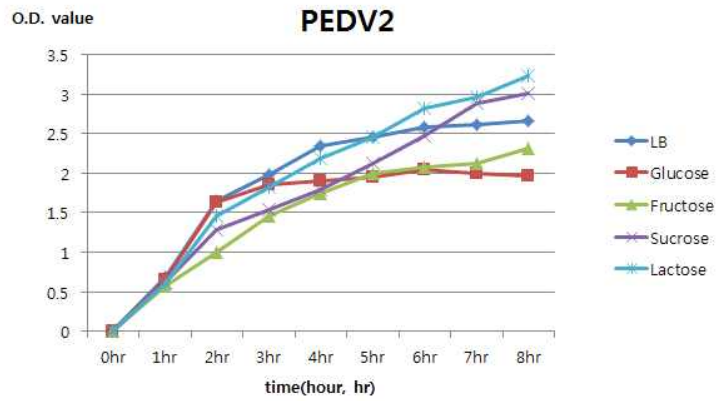
(1) 일반배지 LB broth(BD)에 탄소원 첨가 후 백신 생산 대장균의 성장과 발현량 비교

탄소원은 glucose, sucrose, fructose, lactose로 설정하였다. 균주는 PEDV1, PEDV2, M5BT 3개의 발현 대장균을 사용하였다 (그림 142, 143, 144). seed 배양은 LB(BD)에 배양조건 37°C, 240rpm 으로 pre-culture 진행하였고, 익일 각각 배지 100ml 에 seed 10%를 접종하여 성장변화를 관찰하였고, 이전 발현 확인 시험과 같은 조건에서 induction을 진행하여 단백질 생산 여부를 확인하였다 (그림 145, 146, 147).



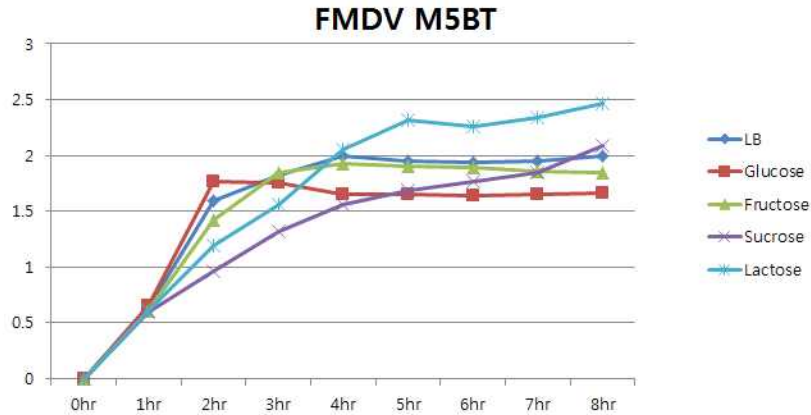
PEDV1		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB	0	0.54	0.72	1.2	1.56	1.67	1.78	1.81	1.83	
Glucose	0	0.53	0.69	1.14	1.62	1.74	1.83	1.9	1.96	
Fructose	0	0.55	0.65	1.12	1.63	1.83	1.93	1.97	2.12	
Sucrose	0	0.46	0.59	1.08	1.79	2.13	2.15	2.32	2.35	
Lactose	0	0.48	0.6	0.95	1.32	1.56	1.76	1.85	1.98	

그림 142. PEDV1 생산 대장균의 탄소원에 따른 생장률 변화



PEDV2		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB	0	0.68	1.65	1.99	2.35	2.46	2.58	2.62	2.66	
Glucose	0	0.65	1.63	1.85	1.9	1.95	2.04	2	1.96	
Fructose	0	0.58	1	1.46	1.75	2	2.07	2.13	2.32	
Sucrose	0	0.62	1.29	1.54	1.79	2.13	2.47	2.88	3.01	
Lactose	0	0.61	1.46	1.82	2.18	2.45	2.82	2.97	3.23	

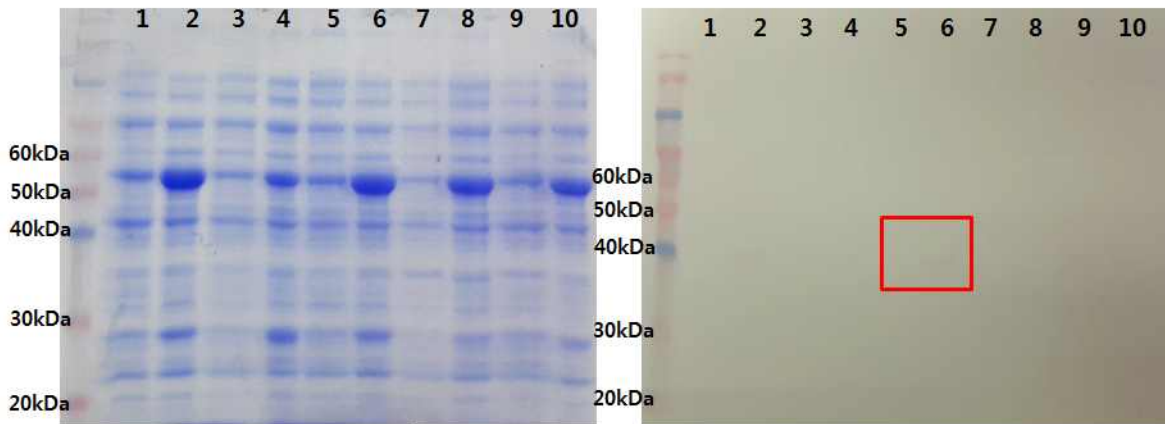
그림 143. PEDV2 생산 대장균의 탄소원에 따른 생장률 변화



M5BT	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB	0	0.63	1.59	1.82	1.99	1.95	1.94	1.95	1.99
Glucose	0	0.65	1.77	1.75	1.65	1.65	1.64	1.65	1.66
Fructose	0	0.61	1.42	1.84	1.93	1.9	1.89	1.86	1.84
Sucrose	0	0.59	0.96	1.32	1.56	1.68	1.77	1.84	2.09
Lactose	0	0.61	1.19	1.56	2.05	2.32	2.26	2.34	2.46

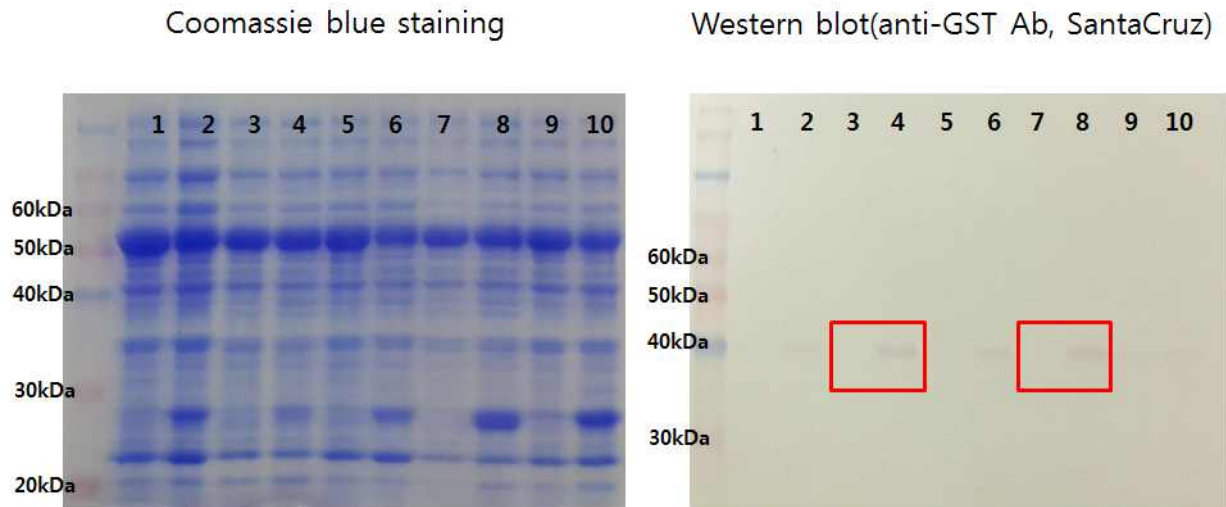
그림 144. M5BT 생산 대장균의 탄소원에 따른 성장률 변화

Coomassie blue staining



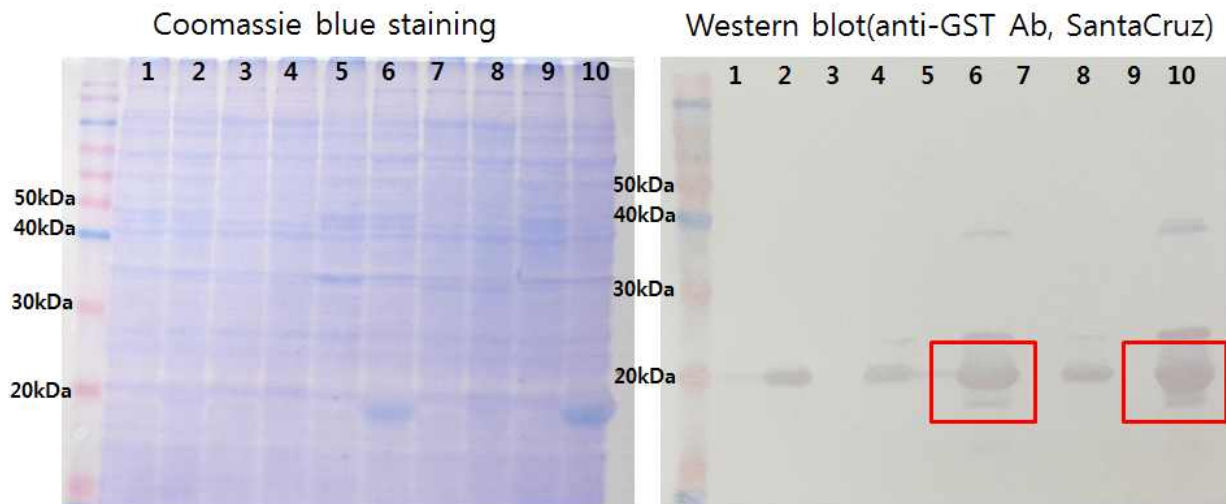
배지	LB		Glucose		Sucrose		Fructose		Lactose	
Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IPTG induction	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X

그림 141. PEDV1 생산 대장균의 탄소원에 따른 단백질 생산량 (40 kDa)



배지	LB		Glucose		Sucrose		Fructose		Lactose	
Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IPTG induction	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X

그림 142. PEDV2 생산 대장균의 탄소원에 따른 단백질 생산량 (40 kDa)



배지	LB		Glucose		Sucrose		Fructose		Lactose	
Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IPTG induction	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X

그림 143. M5BT 생산 대장균의 탄소원에 따른 단백질 생산량 (19 kDa)

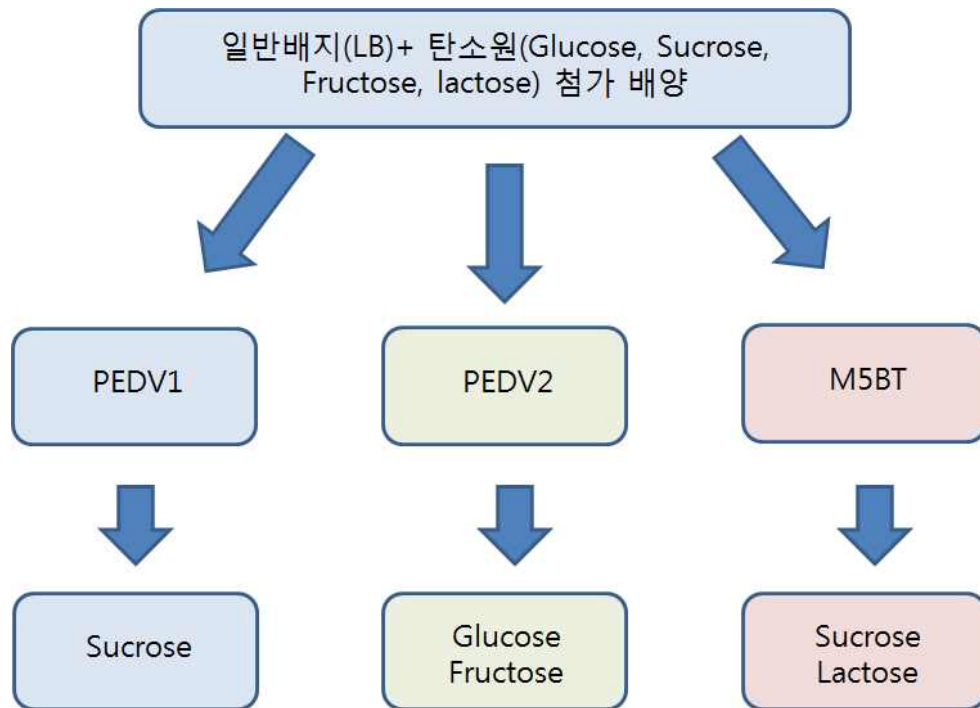
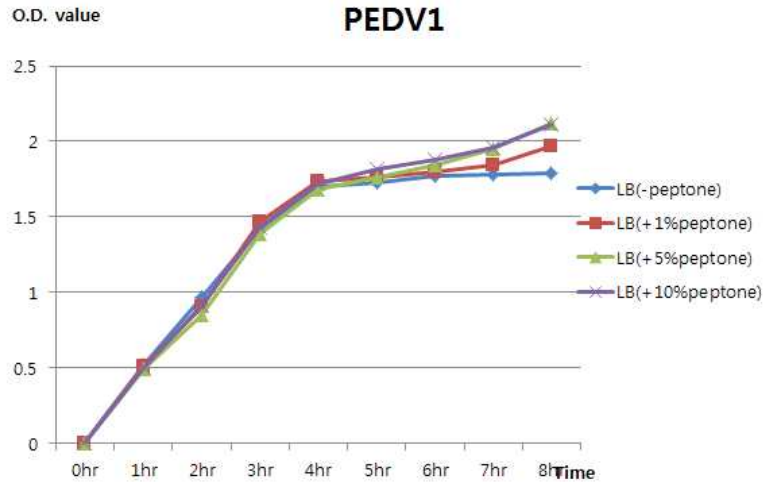


그림 144. 각 항원의 효율적인 생산의 최종 결과

일반배지에 탄소원별로 첨가하여 배양하였을 경우, 성장 곡선을 비교하였을 때, 생산배지처럼 뛰어난 성장을 나타내는 배지는 없었다. 하지만 백신 생산 능력에 있어서는 차이를 뚜렷하게 확인할 수 있었다. western blot의 결과를 보면 PEDV1의 경우 sucrose 배지에서, PEDV2의 경우는 glucose, fructose에서, M5BT의 경우에는 sucrose, lactose에서 일반배지(LB+무첨가)보다 두꺼운 밴드를 확인함으로써 더 나은 백신 생산 능력을 확인하였다(그림 144).

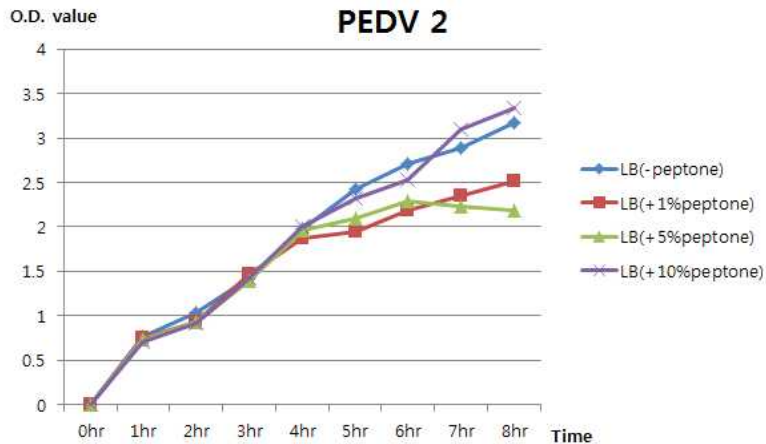
(2) 일반배지 LB broth(BD)에 질소원 농도별 첨가 후 백신 생산 대장균의 성장과 발현량 비교

질소원은 peptone으로 설정하였고, LB배지에 peptone을 제외시켜 제조한 후 peptone 농도를 0%, 1%, 5%, 10%로 첨가하여 배지제조하였다. 균주는 PEDV1, PEDV2, M5BT 3개의 발현 대장균을 사용하였다(그림 145, 146, 147). seed 배양은 LB(BD)에 배양조건 37°C, 240rpm으로 pre-culture 진행하였고, 익일 각각 배지 100ml에 seed 10%를 접종하여 성장변화를 관찰하였고, 이전 발현 확인 시험과 같은 조건에서 induction을 진행하여 단백질 생산 여부를 확인하였다(그림 148, 149, 150).



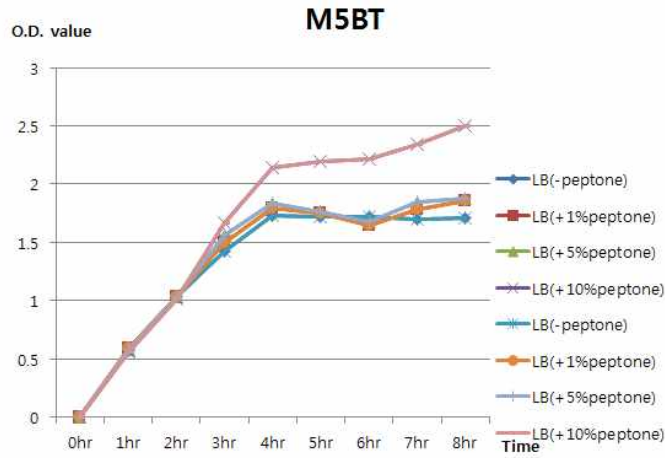
PEDV1									
	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB(-peptone)	0	0.52	0.97	1.42	1.7	1.73	1.77	1.78	1.79
LB(+1%peptone)	0	0.51	0.9	1.47	1.74	1.76	1.8	1.84	1.97
LB(+5%peptone)	0	0.49	0.85	1.39	1.68	1.76	1.84	1.95	2.12
LB(+10%peptone)	0	0.5	0.91	1.43	1.72	1.82	1.88	1.96	2.11

그림 145. 질소원에 따른 PEDV1 단백질 생산 대장균 성장효과



PEDV2									
	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB(-peptone)	0	0.76	1.04	1.42	1.98	2.42	2.71	2.89	3.17
LB(+1%peptone)	0	0.75	0.93	1.47	1.88	1.95	2.19	2.35	2.52
LB(+5%peptone)	0	0.74	0.93	1.39	1.96	2.1	2.29	2.23	2.19
LB(+10%peptone)	0	0.71	0.91	1.43	2.01	2.32	2.53	3.1	3.34

그림 146. 질소원에 따른 PEDV2 단백질 생산 대장균 성장효과

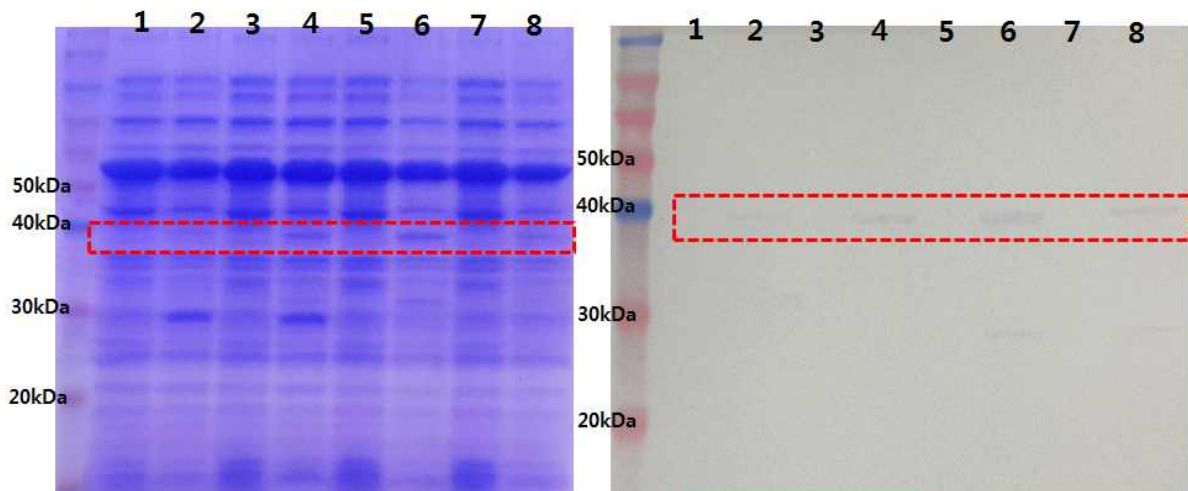


M5BT		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr
LB(-peptone)		0	0.57	1.04	1.43	1.73	1.72	1.72	1.7	1.71
LB(+1%peptone)		0	0.59	1.04	1.5	1.79	1.75	1.65	1.78	1.86
LB(+5%peptone)		0	0.58	1.04	1.56	1.84	1.76	1.68	1.85	1.88
LB(+10%peptone)		0	0.56	1.01	1.67	2.14	2.19	2.21	2.34	2.5

그림 147. 질소원에 따른 M5BT 단백질 생산 대장균 성장효과

Coomassie blue staining

Western blot(anti-GST Ab, SantaCruz)

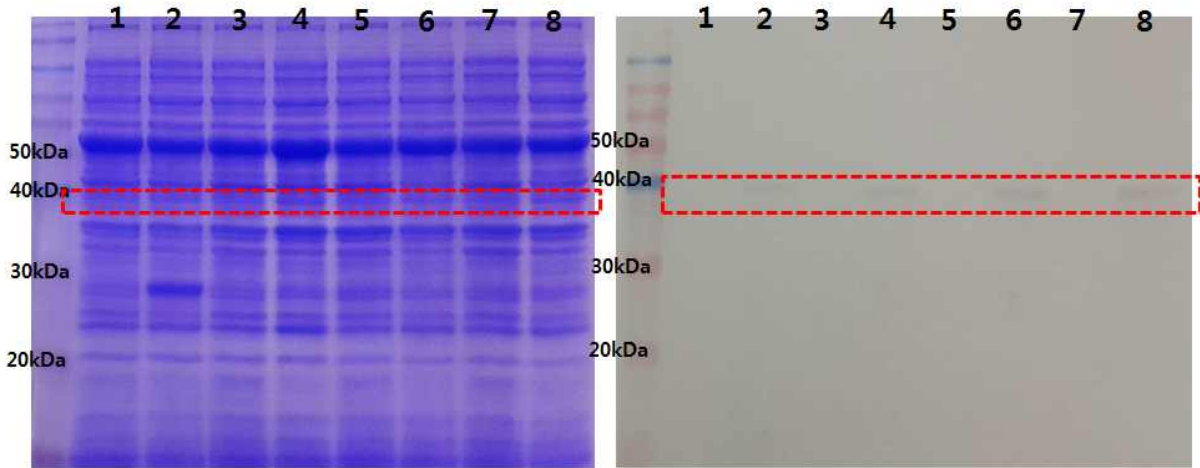


	질소원 0%		질소원 1%		질소원 5%		질소원10%	
Line	1	2	3	4	5	6	7	8
IPTG	O	X	O	X	O	X	O	X

그림 148. PEDV1 생산 대장균의 질소원에 따른 단백질 생산량 (40 kDa)

Coomassie blue staining

Western blot(anti-GST Ab, SantaCruz)

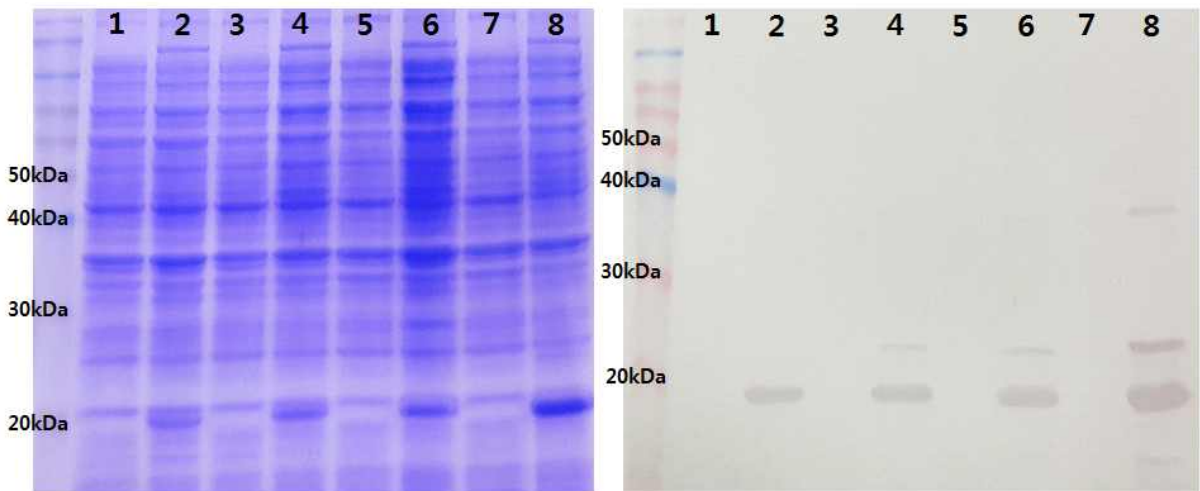


	질소원 0%		질소원 1%		질소원 5%		질소원 10%	
Line	1	2	3	4	5	6	7	8
IPTG	O	X	O	X	O	X	O	X

그림 149. PEDV2 생산 대장균의 질소원에 따른 단백질 생산량 (40 kDa)

Coomassie blue staining

Western blot(anti-His Ab, SantaCruz)



	질소원 0%		질소원 1%		질소원 5%		질소원 10%	
Line	1	2	3	4	5	6	7	8
IPTG	O	X	O	X	O	X	O	X

그림 150. M5BT 생산 대장균의 질소원에 따른 단백질 생산량 (19.1 kDa)

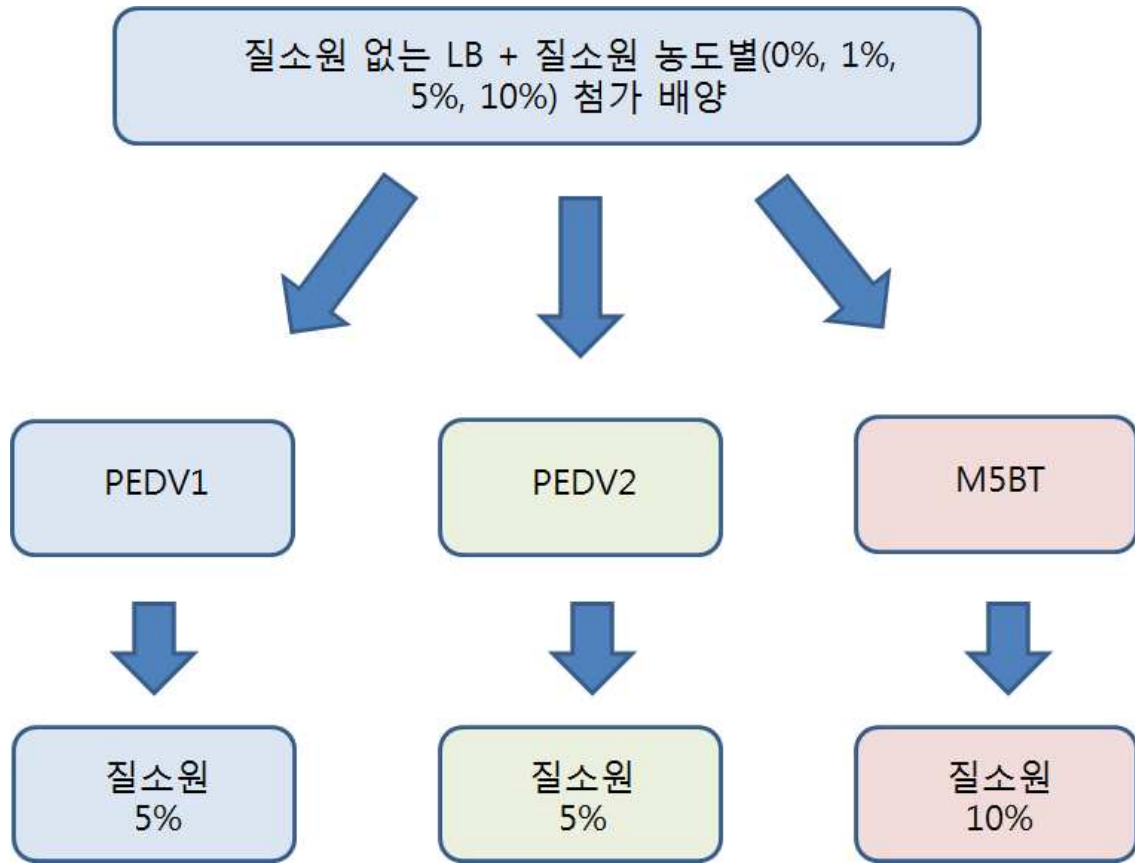


그림 151. 각 항원의 효율적인 생산의 최종 결과

PEDV1, PEDV2 는 peptone 5% 첨가 배지에서 생산량이 다른 배지에 비해 증가함을 확인하였고, M5BT는 peptone 10% 첨가 배지에서 생산량이 제일 높은 것으로 확인하였다. 이로써 각 균주별로 최적의 배지가 설정되었다 (그림 151, 표 43).

표 43. 백신별 최적의 발현 배지 조성

질병	항원 단백질	최적 탄소원	최적 질소원 농도	균주
PEDV	PEDV1	Sucrose	peptone 5%	E.coli BL21pTF16
	PEDV2	Glucose	peptone 5%	E.coli BL21 pTF16
FMDV	M5BT	Sucrose	peptone 10%	E.coli BL21(DE3)

5. 항원별 백신의 대량 생산 배양

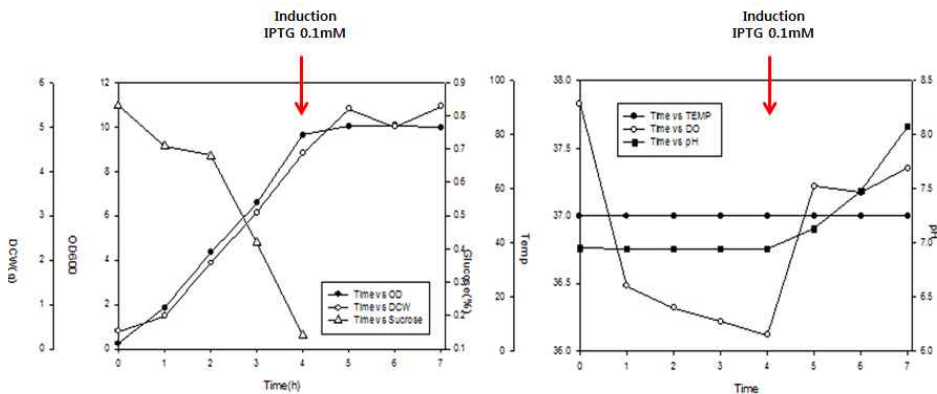
가. 대장균 발현 PEDV1 수용성 백신의 대량 배양

[Experimental conditions]

- ◆ Strain : E.coli BL21 pTF16
- ◆ Vector+insert : pGEX 6p-1 + PEDV1
- ◆ Seed culture : : LB broth + Ampicillin 100 ug/ml
+ Chloramphenicol(20ug/ml) , Over-night culture
- ◆ 1차 sub-culture : 400ml, 2H culture (OD : 1.113)
- ◆ Inoculum volume : 10%
- ◆ Production culture : 일반배지(LB) 4L + 0.5 mg/ml arabinose
- ◆ Carbon source: Sucrose
- ◆ Nitrogen Concentration: Peptone 5%

그림 152. PEDV1 단백질 대량 생산을 위한 배양 조건

seed 배양은 LB(BD)에 배양조건 37°C, 240rpm 으로 pre-culture 진행하였고, 익일 LB 배지 400ml 에 seed 10%를 접종하여 2시간동안 sub-culture 진행하였고, OD 1.0 이상임을 확인한 후 fermentor 4L jar 에 10% 접종하여 배양 진행하였다 (그림 152). 배양은 산소포화도를 기준으로 진행하여, 산소포화도가 급격히 상승한 상태를 2시간 이상 유지했을 때 배양을 종료하였다 (그림 153).



Time(hr)	OD600nm	RPM	pH	DO	air(vvm)	DCW(g/L)	Sucrose (g/L)
0	0.235	200	6.95	91.5	1	0.4	0.83
1	1.84	400	6.94	24	1	0.733	0.71
2	4.33	600	6.94	16	1	1.933	0.68
3	6.58	663	6.94	11	1	3.067	0.42
4	9.63	663	6.94	6	1	4.4	0.14
5	10.03	663	7.13	60.9	1	5.4	-
6	10.06	663	7.48	58.5	1	5	-
7	9.98	663	8.08	67.6	1	5.467	-

그림 153. PEDV1 대장균 대량 배양 결과

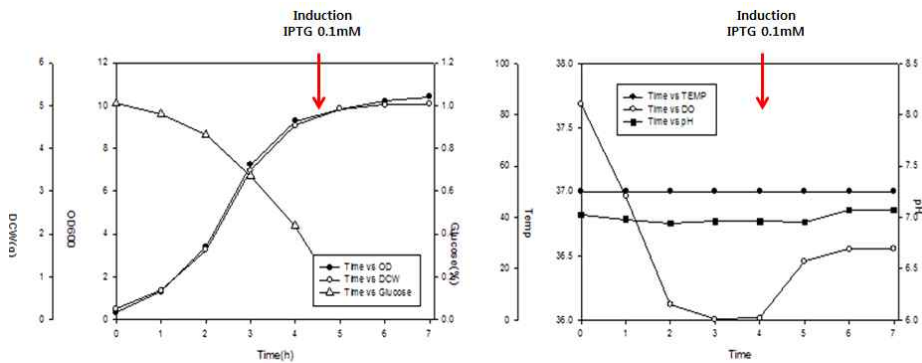
나. 대장균 발현 PEDV2 수용성 백신의 대량 배양

[Experimental conditions]

- ◆ Strain : E.coli pTF16
- ◆ Vector+insert : pGEX 6p-1 + PEDV2
- ◆ Seed culture : : LB broth + Ampicillin 100 ug/ml
+ Chloramphenicol(20ug/ml) , Over-night culture
- ◆ 1차 sub-culture : 400ml, 2H culture (OD : 1.214)
- ◆ Inoculum volume : 10%
- ◆ Production culture : 일반배지(LB) 4L + 0.5 mg/ml arabinose
- ◆ Carbon source: Glucose
- ◆ Nitrogen Concentration: Peptone 5%

그림 154. PEDV2 단백질 대량 생산을 위한 배양 조건

seed 배양은 LB(BD)에 배양조건 37°C, 240rpm 으로 pre-culture 진행하였고, 익일 LB 배지 400ml 에 seed 10%를 접종하여 2시간동안 sub-culture 진행하였고, OD 1.0 이상임을 확인한 후 fermentor 4L jar 에 10% 접종하여 배양 진행하였다 (그림 154). 배양은 산소포화도를 기준으로 진행하여, 산소포화도가 급격히 상승한 상태를 2시간 이상 유지했을 때 배양을 종료하였다 (그림 155).



Time(hr)	OD600nm	DCW(g/L)	Temperature	pH	DO	RPM	glucose (g/L)
0	0.347	0.251	37	7.02	84	300	1.01
1	1.31	0.684	37	6.98	48	500	0.96
2	3.41	1.622	37	6.94	6	600	0.86
3	7.23	3.49	37	6.96	0.2	650	0.67
4	9.25	4.524	37	6.96	0.6	650	0.44
5	9.82	4.91	37	6.95	22.8	650	0.1
6	10.21	5.011	37	7.07	27.5	650	
7	10.41	5.023	37	7.07	27.7	650	

그림 155. PEDV2 대장균 대량 배양 결과

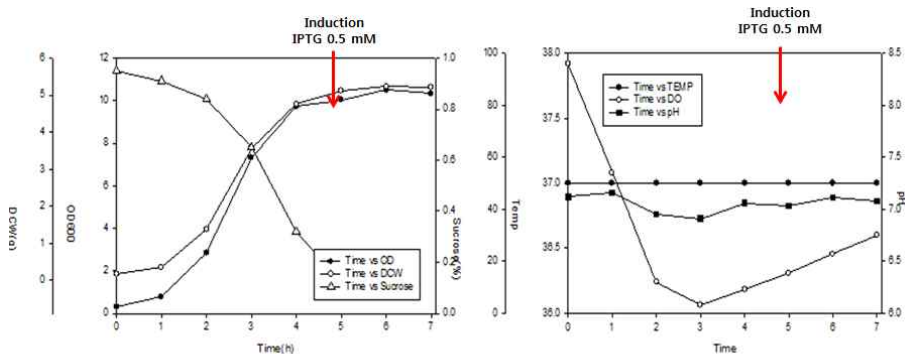
3) 대장균 발현 M5BT 경구용 백신의 대량 배양

[Experimental conditions]

- ◆ Strain : E.coli pTF16
- ◆ Vector+insert : pGEX 6p-1 + PEDV2
- ◆ Seed culture : : LB broth + Ampicillin 100 ug/ml
+ Chloramphenicol(20ug/ml) , Over-night culture
- ◆ 1차 sub-culture : 400ml, 2H culture (OD : 1.214)
- ◆ Inoculum volume : 10%
- ◆ Production culture : 일반배지(LB) 4L + 0.5 mg/ml arabinose
- ◆ Carbon source: Glucose
- ◆ Nitrogen Concentration: Peptone 5%

그림 156. M5BT 단백질 대량 생산을 위한 배양 조건

seed 배양은 LB(BD)에 배양조건 37°C, 240rpm 으로 pre-culture 진행하였고, 익일 LB 배지 400ml 에 seed 10%를 접종하여 2시간동안 sub-culture 진행하였고, OD 1.0 이상임을 확인한 후 fermentor 4L jar 에 10% 접종하여 배양 진행하였다 (그림 156). 배양은 산소포화도를 기준으로 진행하여, 산소포화도가 급격히 상승한 상태를 2시간 이상 유지했을 때 배양을 종료하였다 (그림 157).



Time(hr)	OD600nm	DCW(g/L)	Temperature	pH	DO	RPM	Sucrose (g/L)
0	0.304	0.16	37	7.12	96	200	0.95
1	0.781	0.348	37	7.16	54	300	0.91
2	2.84	1.37	37	6.95	12	550	0.84
3	7.31	3.568	37	6.91	3	700	0.65
4	9.72	4.755	37	7.06	9	700	0.32
5	10.03	5.11	37	7.03	15.4	714	0.12
6	10.49	5.23	37	7.11	22.8	715	
7	10.33	5.21	37	7.08	29.9	715	

그림 157. M5BT 대장균 대량 배양 결과

표 44. 대량배양 항원 단백질 정제 후 정량 결과

Target protein	Total protein concentration	Purified protein concentration
PEDV1	932mg/4L	56.3mg
PEDV2	953mg/4L	59.4mg
M5BT	968mg/4L	89.3mg

제7절 1세부 및 2협동 공동연구

1. 고효율 대장균 발현 시스템

가. Fermenter를 이용한 고농도 배양기술

본 연구팀에서는 또한 재조합 항원 단백질 생산량을 최대화하기 위하여 fermentor 시스템을 이용하여 고농도 대장균 배양을 구현하고자 하였다. 본 실험에서 외래 항원 대량생산공정 시스템을 구축하기 위하여 우선 2차년도에 개발한 PED 항원을 생산하는 여러 가지 대장균 균주에서 chaperone co-expression 균주를 모델로 선택하여 대장균 고농도 배양 최적화 조건을 잡고자 하였는데, 그 이유는 위의 마우스 면역시험 결과에서 chaperone co-expression을 통하여 생산한 수용성 항원이 inclusion body를 이용하여 생산한 수용성 항원 보다 좋은 결과를 보였으므로 현재 PED 백신개발에 있어서 유력한 후보이기 때문에 향후 백신개발 과정에서 항원 대량 생산 공정이 필요시 되어 선택하였다.

(1) Flask culture condition에서 외래 항원 생산 최적화

(가) Chaperone co-expression을 이용한 soluble form expression의 검증

① Chaperone co-expression의 효과

고농도 대장균 배양을 통한 외래 항원 대량생산공정 시스템 구축의 목표는 *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 가장 적은 비용으로 가장 많은 양의 외래 항원을 생산하는 것으로써 가장 경제적인 외래 항원 대량생산공정 시스템을 구축하는 것이다. 실험 진행은 먼저 small scale flask 수준에서 chaperone co-expression effect, expression temperature, inducer concentration, induction time, harvest time등을 조절하는 실험을 진행하여 기본적인 조건을 잡았다. 그 조건을 기반으로 scale up하여 high cell density을 얻기 위하여 growth temperature, induction time, L-arabinose concentration등을 조절하는 실험을 진행하여 large scale fermenter수준에서 대량생산공정 시스템을 구축한 후 정제공정 개발을 진행하였다. 앞서 chaperone screening을 통하여 선택된 pTf16 chaperone system (21page)에서 수용성으로 발현되는 것이 실질적으로 chaperone co-expression을 통한 효과인지 검증하기 위하여 chaperone을 발현시키는 inducer인 L-arabinose의 유무를 통하여 chaperone effect 검증실험을 실시하였다. SDS-PAGE결과 GST-C1과 GST-C2에서 모두 L-arabinose를 첨가해주어 chaperone을 발현시켰을 때 insoluble form에서 soluble form으로 변환되는 것을 확인함으로써 chaperone이 단백질 folding을 도와주어 수용성으로 단백질을 합성하는 것을 검증하였다 (그림 158).

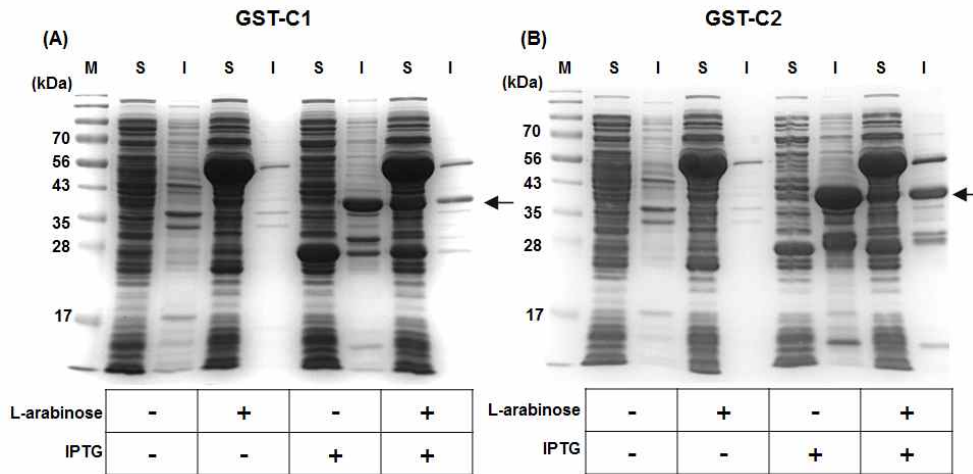


그림 158. Chaperone co-expression system의 효과를 검증하기 위한 수용성 PED 바이러스 항원 단백질 발현 SDS-PAGE 확인. (A), pTF16 (TF) chaperone co-expression system을 이용한 GST-C1 발현, (B), GST-C2 발현. (-): 미첨가, (+): 첨가, 화살표: 목적 단백질 위치, S: soluble fraction, I: insoluble fraction

(나) Expression temperature의 screening을 통한 항원 단백질 생산 최적화

37 °C에서 cell을 동일하게 OD600이 0.6 으로 성장 시킨 후 induction 할 때의 온도를 37, 28, 21, 15 °C 으로 4가지에서 screening해보았다. 37, 28, 21, 15 °C의 순으로 온도가 낮아질수록 발현된 protein 형태가 inclusion body에서 수용성으로 점점 변환되는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 159). inclusion body의 생산되는 원인 중 하나는 지나치게 빠른 전사와 단백질 번역으로 인하여 단백질이 적절하게 folding이 되지 못하고 주변의 단백질과 aggregation을 이루는 것이다. 즉, 온도를 낮춰줌으로써 cell의 전체적인 대사속도와 transcription 및 translation rate를 낮춰 단백질 folding rate에 과부하를 주지 않는 방법을 통해 적절한 folding 효과를 누릴 수 있다.

(다) Inducer concentration의 screening을 통한 항원 단백질 생산 최적화

37 °C에서 cell을 성장 시킨 후 앞서 selected expression temperature 15 °C에서 inducer인 IPTG concentration을 0.1, 0.4, 0.7, 1.0 mM IPTG로 4가지를 screening하였다. GST-C1과 GST-C2에서 동일하게 0.1 mM IPTG로 Induction 할 때 가장 많은 수용성을 발현시키고 그와 동시에 가장 적은 inclusion body를 발현시킨 것을 확인하였다 (그림 160). IPTG concentration가 낮아질수록 단백질을 발현 시키는 속도를 늦춤으로써 적절하게 folding 되도록 한다.

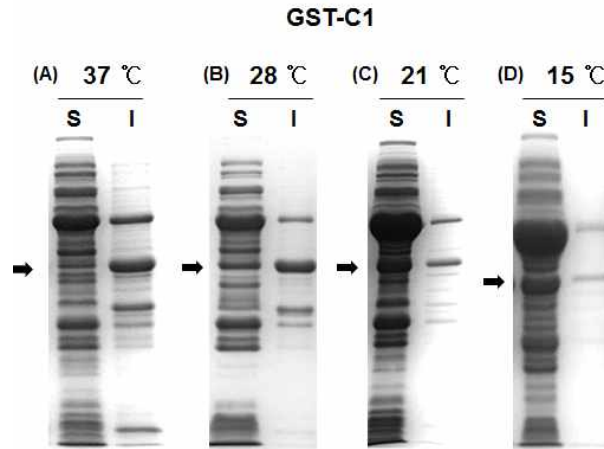


그림 159. GST-C1 온도별 발현효율.
Expression temperature를 37 °C (A), 28 °C (B), 21 °C (C), 15 °C (D)

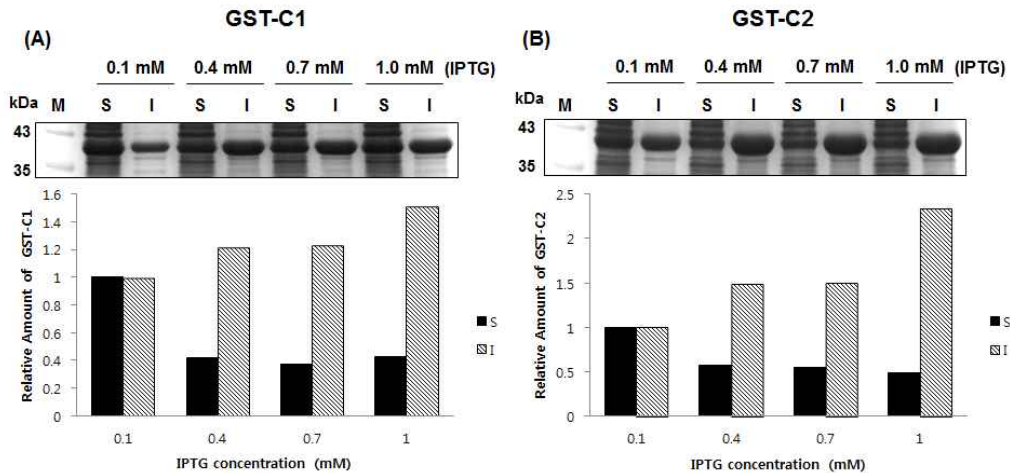


그림 160. IPTG 농도 별 GST-C1 (A)과 GST-C2 (B) 발현. 0.1 mM IPTG induction 시 soluble protein과 inclusion body의 양을 기준으로 상대적인 양을 표기

(라) Induction time의 screening을 통한 항원 단백질 생산 최적화

앞서 잡은 조건인 expression temperature 15 °C, 0.1 mM IPTG에서 induction time을 OD₆₀₀이 0.6, 0.9, 1.2, 1.5으로 4가지를 screening하였다. GST-C1과 GST-C2에서 모두 동일하게 OD₆₀₀이 0.6에서 가장 많은 수용성을 발현시키고 가장 적은 inclusion body를 발현시킨 것을 확인하였다 (그림 161). 이것은 가장 활성이 높은 시기인 OD₆₀₀이 0.6에서 induction time이 가장 적절하다는 것을 확인 할 수 있다.

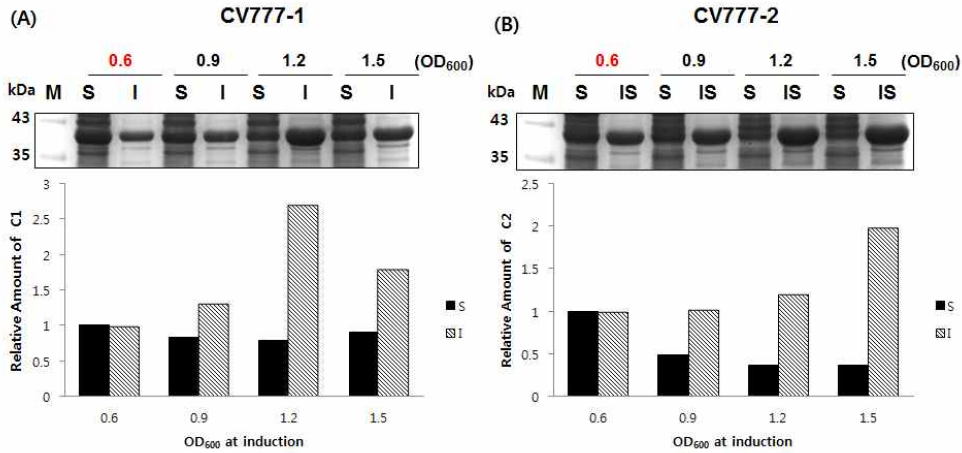


그림 161. Induction 시기에 따른 CV777-1 (A)과 CV777-2 (B) 발현 효율. Induction 시기, OD₆₀₀ = 0.6 일 때 두가지 형태의 단백질 발현양을 기준으로 상대적인 양 표기

(마) Harvest time의 screening을 통한 항원 단백질 생산 최적화

이전에 획득된 조건인 expression temperature 15 °C, 0.1 mM IPTG, induction time OD₆₀₀ 값 0.6 에서 harvest time 12, 24, 36, 48 시간을 screening하였다. 각 amino-acid의 서열에 따라 발현되는 양상이 다르므로 발현되는 속도 또한 다르다는 것을 확인 할 수 있었다. CV777-1 (그림 162 (A))에서는 24 시간에서 가장 많은 수용성 발현양을 확인 할 수 있었고, CV777-2 (그림 162 (B))에서는 12 시간에서 가장 많은 수용성 발현양을 확인 할 수 있었다.

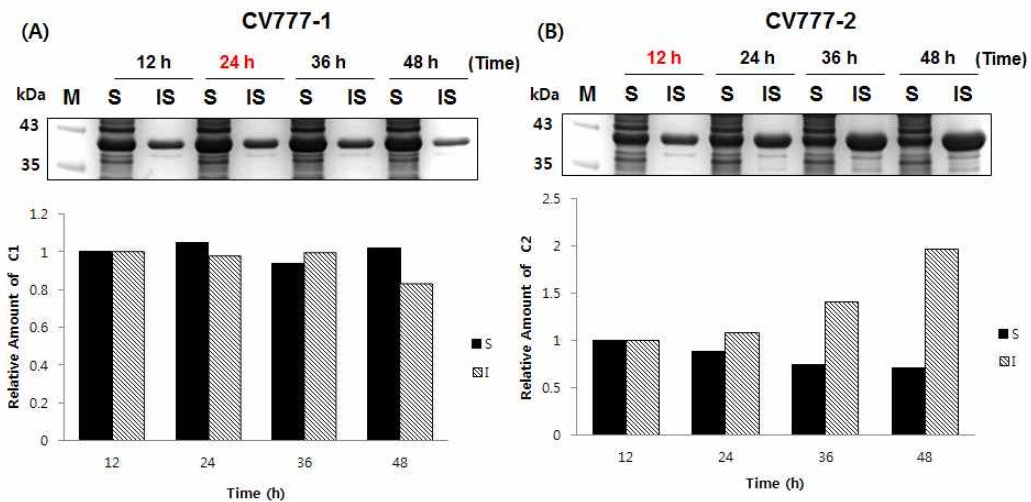


그림 162. Harvest time 별 CV777-1 (A)과 CV777-2 (B) 발현 효율. Harvest time을 12, 시간 째를 기준으로 상대적인 양 표기

(바) 최적화된 inducer concentration인 0.1 mM IPTG 와 다양한 lactose concentration의 induction에 따른 단백질 생산량 비교

앞서 잡은 조건인 expression temperature 15 °C, 0.1 mM IPTG, Induction time OD₆₀₀ 0.6,

harvest time 24 시간 (CV777-1), 12 시간 (CV777-2)에서 0.1 mM IPTG와 1, 5, 10 mM lactose의 두 가지 inducer를 이용하여 단백질 생산량을 비교하였다. CV777-1과 CV777-2에서 모두 동일하게 0.1 mM IPTG를 사용하였을 때가 가장 soluble form의 발현양이 많은 것을 확인할 수 있었다 (그림 163). 결과적으로 IPTG가 lactose에 비해 100 배 보다 높은 효율을 보이므로 가격적인 측면을 고려했을 때 IPTG를 이용하기로 하였다.

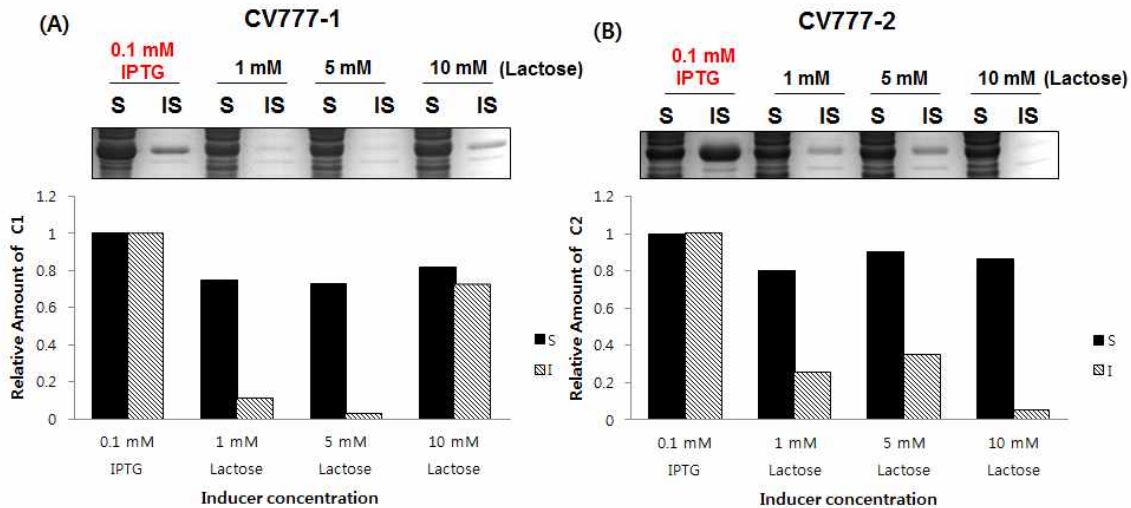


그림 163. Inducer 별 CV777-1 (A)과 CV777-2 (B) 발현 효율. 0.1 mM IPTG에서 두가지 형태의 단백질 발현양을 기준으로 비교

(2) Fermenter condition에서 외래 항원 대량 생산 시스템 구축

(가) Monitoring growth curve

① Growth temperature를 30, 37 °C로 할 때 성장곡선

Fermenter 수준에서는 CV777-1만을 최적화 조건을 확립하였다. 1.5 L vessel의 fermenter에 1 L 합성배지를 넣고 OD600이 0.9~1.0에 도달한 2nd seed를 5% 접종하여 배양하였다. 균 접종 시 L-arabinose를 함께 첨가하여 chaperone을 미리 생산되게 유도하였다. Cell growth를 induction없이 growth temperature를 30, 37 °C에서 monitoring 함으로써 growth curve를 획득하였다 (그림 164). Monitoring 결과 30 °C에서는 13.5 시간에 최대 OD₆₀₀값이 14.6으로 도달하였고, 37 °C에서는 7 시간에 최대 OD₆₀₀값이 15.6으로 도달하였다. 최대 OD₆₀₀값을 14~15로 확인하였고 mid-log phase 7~8 과 early-log phase 3~4 에서 induction OD₆₀₀값을 달리하여 단백질 발현양을 screening하였다.

(나) Batch type expression에서의 최적화

① OD₆₀₀ = 7~8에서 0.1 mM IPTG induction할 때 growth temperature 30 °C와 37 °C에서의 발현 양상 비교

Cell을 30 °C와 37 °C에서 키운 뒤 OD₆₀₀ 값이 6 일 때 온도를 1 시간동안 15 °C로 낮췄다. 1 시간 후 0.1 mM IPTG를 이용하여 induction하였다. 30 °C에서 induction했을 시에는 발현 양상이 발견되었지만 37 °C에서 induction했을 시에는 발현 양상을 확인하기 어려웠다 (그림 165). 즉, 30 °C에서 induction하는 것이 더욱 효과적인 것을 확인하였다.

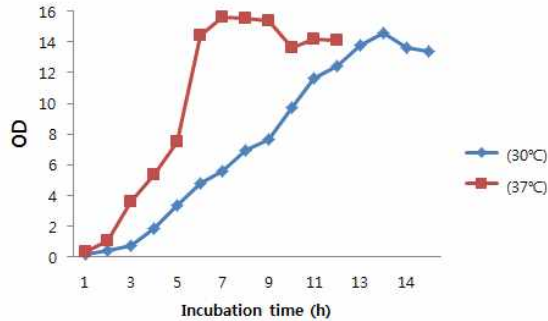


그림. 164 30 °C, 37 °C에서 성장 시 GST-C1 growth curve

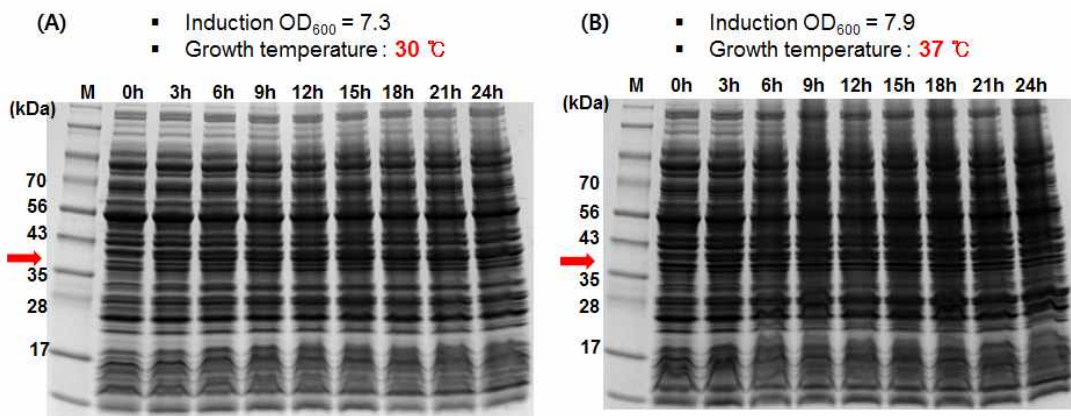


그림 165. GST-C1 발현. Induction OD₆₀₀ = 7~8, growth temperature가 30 °C (A), 37 °C (B) 일 때 0.1 mM IPTG로 induction한 후 soluble form의 발현양을 SDS-PAGE상에서 시간에 따라 비교한 결과. 0 h 이 induction 직전의 시간을 의미.

② OD₆₀₀ = 3~4에서 0.1 mM IPTG induction할 때 growth temperature 30 °C와 37 °C에서의 발현 양상 비교

Cell을 30 °C와 37 °C에서 키운 뒤 OD₆₀₀ 값이 3 정도가 되면 온도를 1 시간동안 15 °C로 낮추고, 1 시간 후 0.1 mM IPTG를 이용하여 induction하였다. 30 °C에서 induction했을 시에는 발현 양상이 발견되었지만 37 °C에서 induction했을 시에는 30 °C에서 induction할 때 보다 발현양이 적은 것을 확인하였다 (그림 166). 30 °C에서 induction하는 것이 더욱 효과적인 것을 확인하였다.

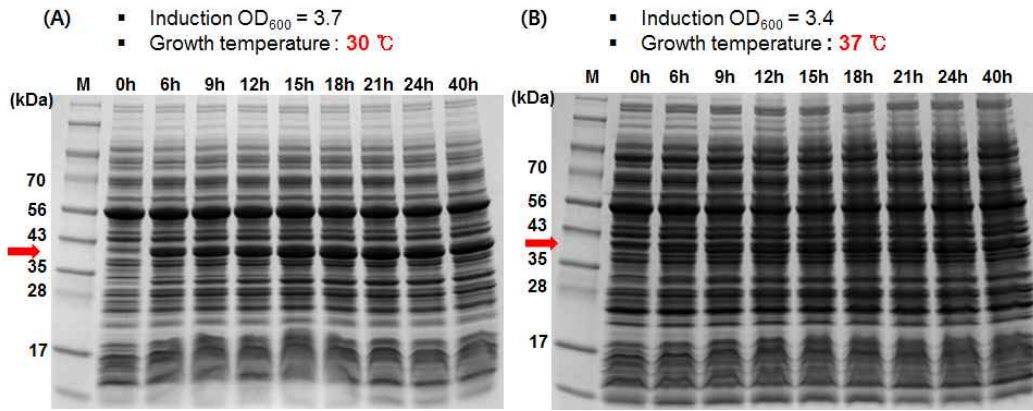


그림 166. GST-C1 발현. Induction $OD_{600} = 3\sim 4$, growth temperature가 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B)일 때 0.1 mM IPTG로 induction한 후 soluble form의 발현양을 SDS-PAGE상에서 시간에 따라 비교한 결과. 0 시간이 induction 직전의 시간을 의미.

③ Growth temperature $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 OD_{600} 값 $7\sim 8$ 과 $3\sim 4$ 되었을 때 induction하여 발현 양상 비교

앞서 OD_{600} 값 $7\sim 8$ 과 $3\sim 4$ 에서 induction 할 시 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 와 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 모두 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 발현이 더 잘 되는 것을 확인하였다. 최종적으로 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 OD_{600} 값 $7\sim 8$ 과 $3\sim 4$ 에서 induction하여 SDS-PAGE를 비교 한 결과 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 OD_{600} 값 $3\sim 4$ 에서 induction할 때 발현이 더 많이 되는 것을 확인하였다 (그림 167). 이것은 가장 cell의 활성이 좋은 초기의 OD_{600} 값에서 induction것이 최대 발현양을 얻을 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

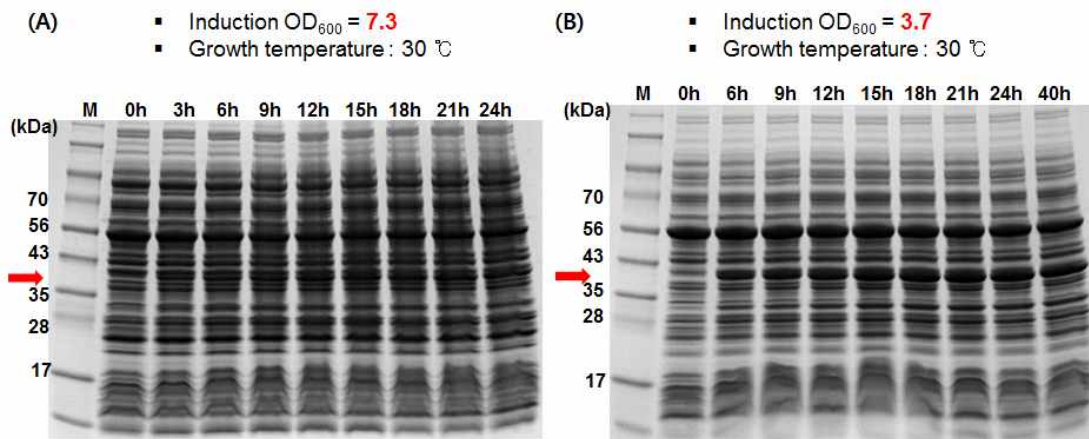


그림 167. GST-C1 발현. Growth temperature $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, OD_{600} 값 $7\sim 8$ (A)와 $3\sim 4$ (B)되었을 때 0.1 mM IPTG로 induction한 후 soluble form의 발현양을 시간에 따라 비교한 SDS-PAGE 결과. 0 시간이 induction 직전의 시간을 의미.

④ L-arabinose 농도의 최적화

앞서 정해진 growth temperature $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 OD_{600} 값 $3\sim 4$ 되었을 때 0.1 mM IPGE로

induction하는 조건에서 chaperone을 발현시키는 L-arabinose 농도에 따른 발현 양상을 비교해 보았다. L-arabinose 0.5 mg/ml과 1.0 mg/ml에서 induction한 결과 0.5 mg/ml에서의 발현양이 많은 것을 확인해 볼 수 있었다 (그림 168). 이것은 많은 양의 L-arabinose를 넣어줌으로써 목적 단백질이 생성되는 energy가 chaperone을 생성하는 에너지로 변환된다는 것을 알 수 있다. 이로써 fermenter에서의 단백질 발현 최적의 조건을 30 °C, OD₆₀₀값 3~4, 0.5 mg/ml L-arabinose으로 정하였다.

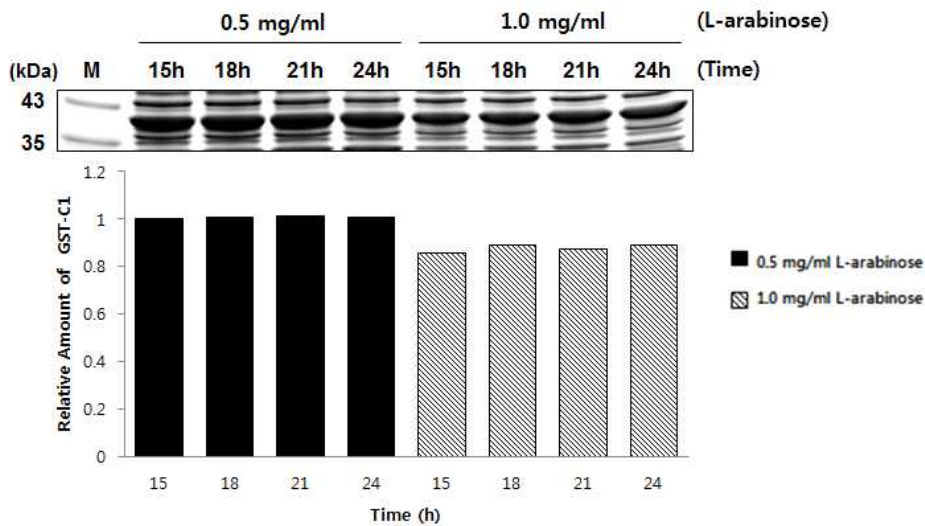


그림 168. GST-C1 발현. L-arabinose 농도를 각각 0.5 mg/ml과 1.0 mg/ml을 접종. 0.1 mM IPTG로 induction한 후 soluble form의 발현양을 시간에 따라 비교한 SDS-PAGE 결과.

(다) PED antigen의 정제 확립

① GSTrap column method를 이용한 purification

앞서 fermenter에서 최적화하여 생산된 PED antigen을 GSTrap column method (친화크로마토그래피)를 이용하여 purification을 하였다. Sample은 6.25 ml volume을 사용하였고 Flow speed는 1 ml/min을 사용하였다. Equilibrium/binding/wash buffer는 PBS (pH7.3)을 사용하였고 elution buffer는 50 mM Tris-HCl + 10 mg/ml Glutathione (pH 8.0)을 사용하였다. Purification 결과를 보면 SFT 1, 2와 W 1, 2에서 목적 단백질이 unbound된 것을 확인할 수 있었고 Elution 1, 2, 3에서 정제된 것을 확인하였다 (그림 169).

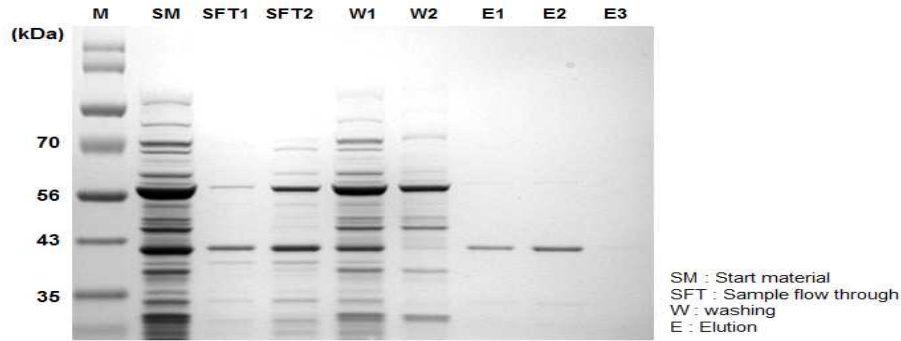


그림 169. 최적화하여 생산 된 GST-C1을 GSTrap column method을 이용하여 purification한 SDS-PAGE결과. SM: start material, SFT: unbounded sample flow through, W: bounded washing, E: elution fraction (목적 단백질).

Fermenter level에서 측정된 cell density (OD_{600})와 총 단백질 (g)은 flask level에서 측정된 수치보다 대략 3 배 조금 넘는 비율로 나타났고 정제된 단백질 (mg)의 양은 10 배 정도 fermenter에서 높은 수율을 얻는 것으로 확인되었다 (표 45).

표 45. Flask level과 fermenter level에서 측정된 cell density, total protein, purified protein, purity의 비교

Culture type	Final cell density (OD)	Total protein (g/l)	Purified protein (mg/l)	Purity (%)
Flask	3	1.5	5	50
Fermenter	10	5	53.8	95

2. 배지 조성 변형을 통한 고농도 배양 조건 확립

가. 배지 조성과 배양 특성

대장균을 배양함에 있어 가장 많이 쓰이는 상용 배지는 LB broth이다. LB broth 보다 더 고농도로 대장균을 배양할 수 있는 것이 Terrific broth (TB)이다. TB는 LB보다 고농도로 배양이 되고 더 많은 생산물을 획득할 수 있는 장점이 있지만 LB 보다 배양하는 시간에 있어 더 많은 시간이 필요하다. 본 연구팀에서는 TB에서 대장균 증식력을 더 높이고 생산량을 더 많이 할 수 있는 배지 조성을 새롭게 개발하고자 하였다 (그림 170). 그래서 본연구팀은 표에서 보다시피 LB와 TB 의 배지 조성에서 일부 염을 추가하여 배지조성을 변경하였다. T1B는 대장균의 성장에 도움을 주는 NaCl과 $MgSO_4$, lactose를 추가하였고 T2B는 TB에 비하여 K_2HPO_4 의 양을 증가시키고 $MgSO_4$ 를 추가하였다 (표 46).

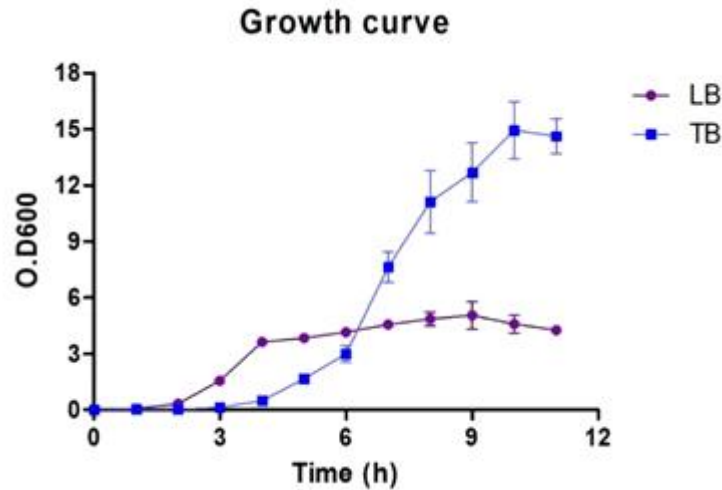


그림 170. 대장균 배양 시간에 따른 성장곡선 (LB, TB)

표 46. 개발된 배지 조성파 기존 배지 조성

	LB	TB	T1B	T2B
pH	7.41	7.34	6.8	7.43
Component (1L)				
Yeast extract (g)	5	24	24	24
Tryptone (g)	10	12	12	12
Glycerol (ml)		8	4	4
K ₂ HPO ₄ (g)		9.4	12	12.5
KH ₂ PO ₄ (g)		2.2	3	2.3
NaCl (g)	10		5	
MgSO ₄ (Fin. mM)			2	10
Lactose (g)			5	

대장균 성장곡선을 비교한 결과 T1B 보다 T2B가 log phase에 더 빨리 들어가서 빠른 시간 내에 성장 최대치에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 TB보다 T2B가 공정시간을 줄일 수 있음을 시사한다 (그림 171).

나. FMD항원 생산 대장균 배양 및 항원 생산 결과

FMD 항원을 생산하는 대장균을 앞서 개발한 배지에 배양하고 그 단백질을 추출하여 그 양을 측정하였다. LB 배지에서 배양한 대장균은 기존의 공정에 따라 OD600 0.5에서 0.5mM의 IPTG를 접종하여 항원 단백질 생산을 유도하고 4시간을 더 배양한 후 대장균을 수득했다. 반면 TB계열의 배지에서 배양한 대장균은 OD600의 4에서 1mM의 IPTG를 접종하여 대장균 생산을 유도하고 4시간을 배양한 후 대장균을 수득했다. 정제 결과는 LB는 1L 배양시 18mg의 단백질을 얻을 수 있었고 TB는 52mg을 얻었다. T2B는 67.3mg으로 가장 많이 얻을 수 있었다.

밀의 SDS-PAGE 그림에서 보이는 것은 TB와 T2B는 4배로 희석되어 분석된 것으로 실제의 양은 LB에서 생산한 양의 4배 이상이 됨을 알 수 있다. 즉, 기존의 LB 배지에서 4배이상의 단백질을 얻는 대신 가격차이는 1.5배로 경쟁력있는 배지를 개발하였다 (그림 172).

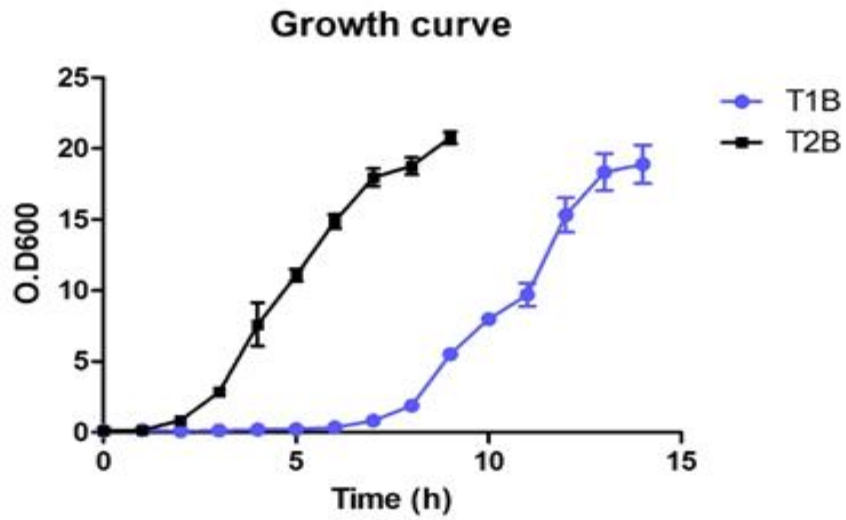


그림 171. 변형 배지의 향상된 성장 곡선

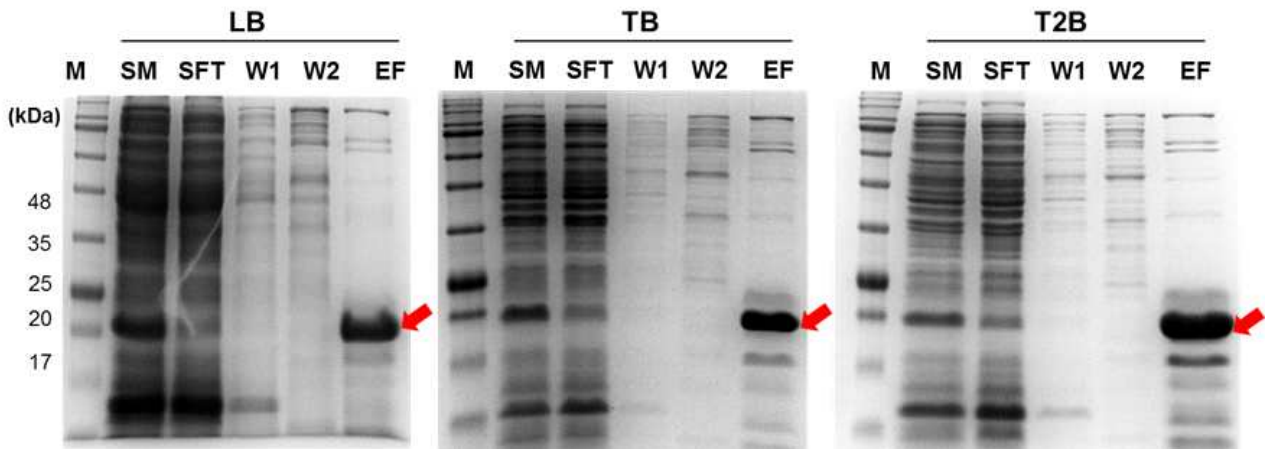


그림 172. 단백질 생산 및 정제의 양 (TB 및 T2B는 4배로 희석되어 측정)

제8절 연구개발성과

1. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Exploring Codon Optimization and Response Surface Methodology to Express Biologically Active Transmembrane RANKL in <i>E. coli</i>	Sushila Maharjan, Bijay Singh	강상기, 최윤재	복진덕, 김정인, Tao Jiang, 조중수	Plos one	9(5)	국외	SCIE (IF 3.73)
2014	Complete Genome Sequence of K14JB01, a virulent strain of Porcine Epidemic Diarrhea Virus isolated from a South Korean Pig	조윤영	안동준	임성인, 김용관, 송재영, 이중복	Genome Annals of the International Society for Human Genetics	2014 May 29;2(3). pii: e00505-14.	국외	-
2014	Mucosal Delivery of Vaccine by M Cell Targeting Strategies	박태은	최윤재, 조중수	Bijay Singh, Sushila Maharjan, 장도, 윤소연, 강상기, 복진덕	Current Drug Therapy	9(1)	국외	-

2014	Targeted Delivery of Vaccine to Dendritic Cells by Chitosan Nanoparticles Conjugated with a Targeting Peptide Ligand Selected by Phage Display Technique	정수나, 강상기	최윤재, 조종수	여근혜, 이혜영, 장도나, 재원, 박진덕	Macromolecular bioscience	15(3)	국외	SCI (IF 3.85)
2015	Attuning Mucoadhesive Thiolated Hydroxypropyl Methylcellulose Phthalate as Oral Delivery Vehicle for Effective and Selective Delivery of Vaccine in Ileum	Bijay Singh	최윤재, 조종수	Suhila Maharjan, Tao Jiang, 강상기	Biomaterials	59	국외	SCI (IF 8.55)
2015	Mucoadhesive Chitosan Derivatives as Novel Drug Carriers	Mohammad Ariful Islam, 박태은	박인규, 조종수	Emma Reesor, Kondaredy Cherukula, Anwarul Hasan, Jannatul Ferdous, 강상기, 최윤재	Current Pharmaceutical design	21(29)	국외	SCI (IF 3.45)
2015	Soluble RANKL Expression in <i>Lactococcus Lactis</i> and Investigation for Its Potential as An Oral Vaccine Adjuvant	김정인, 박태은	강상기, 최윤재	Sushila Maharjan, 이혜선, 이호빈, 김인선, 박대천, 이준영, 조종수, 박진덕, 홍중산	BMC Immunology	16(71)	국외	SCI (IF 2.48)

2015	Mannan-decorated Thiolated Eudragit Microspheres for Targeting Antigen Presenting Cells via Nasal Vaccination	이혜선	최윤재, 조종수	Bijay Singh, 박태은, 홍중산, 강상기	European Journal of Pharmaceutical Sciences	80(1)	국외	SCI (IF 3.35)
2015	A novel strain of porcine epidemic diarrhea virus in vietnamese pigs	김용관	안동준	임성인, 임지애, 조인수, Phan, 박은혜	Archives of Virology	160(6):1573-7160	국외	SCI (IF 2.39)
2016	Molecular characterization of the spike and ORF3 genes of porcine epidemic diarrhea virus in the Philippines.	김용관	안동준	조윤영, 안병현, 임성인, 임지애, 조인수, Phan	Archives of Virology	161(5):1323-8	국외	SCI (IF 2.39)
2016	Systemic Administration of RANKL Overcomes the Bottleneck of Oral Vaccine Delivery through Microfold Cells in Ileum	Suhila Maharjan, Bijay Singh	최윤재, 조종수	Tao Jiang, 윤소연, 이혜선, 김기락, 구민정, 김수지, 박옥진, 한성현, 윤철희	Biomaterials	84	국외	SCI (IF 8.55)

2016	Trigger Factor Assisted Soluble Expression of Recombinant Spike Protein of Pig Epidemic Diarrhea Virus in <i>E. coli</i>	Da-Chuan Piao	강상기, 최윤재	김인선, 이혜선, 오서호, Bijay Singh, Sushila Maharjan, 복진덕, 조종수, 홍중산	BMC Biotechnology	16(39)	국외	SCI (2.03)
2016	Nasal Immunization with Mannan-decorated Mucoadhesive HPMCP Microspheres Containing APXIIA Toxin Induces Protective Immunity Against Challenge Infection with <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> in Mice	Hui-Shan Li	최윤재, 조종수	신민정, Bijay Singh, Sushila Maharjan, 박태은, 강상기, 유한상, 홍중산	Journal of Controlled Release	10(233)	국외	SCI (7.70)
2016	Production of Soluble Truncated Spike Protein of Pig Epidemic Diarrhea Virus from Inclusion Bodies of <i>E. coli</i> through Refolding	Da-Chuan Piao	최윤재, 강상기	이윤석, 복진덕, 조종수, 홍중산	Protein expression and purification	126	국외	SCI (1.69)

2. 특허성과

구분	지식재산권 명칭	국명	출원인	년도	출원번호
특허출원	RANKL를 생산하는 재조합 유산균 및 이의 용도	대한민국	서울대학교 산학협력단	2014	10-2014-0078168
특허등록	점막점착성 고분자 및 그의 용도	대한민국	서울대학교 산학협력단	2016	10-1662898

특허출원	유산균 락토코커스락티스 용의 효율적인 벡터 발현 시스템	대한민국	서울대학교 산학협력단	2015	10-2015-0087502
특허출원	회장 표적화 점막 점착성 티올화 HPMCP 백신 단백질 전달체	대한민국	서울대학교 산학협력단	2015	10-2015-0097285
특허출원	돼지 유행성 설사병을 유발하는 국내 야외주(PED)바 이러스 spike 당단백질 유래 아단위 백신 항원 단백질	대한민국	서울대학교 산학협력단	2016	10-2016-0072308
특허출원	코돈 최적화된 막관통 RANKL의 대장균 내 수용성 발현 방법 및 상기 RANKL 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물	대한민국	서울대학교 산학협력단	2016	10-2016-0056471
특허출원	FMD 아단위 백신 제조방법 및 이의 용도	대한민국	서울대학교 산학협력단	2016	10-2016-0128433

3. 기술요약정보

항목	세부 항목	기술 세부 내용
PED & FMD 항원	PED 항원	GST-S1D, GST-COE chaperone co-expression 대장균주
		GST-S1D, GST-COE inclusion body 재수용화 기술
	FMD 항원	5BT, M5BT 단백질 발현 대장균주
		B5BT, MB5BT 단백질 발현 대장균주
면역보강제	유산균 발현	RANKL 및 mRANKL 발현·분비 유산균주
	면역보강제	IL-2 분비 유산균주
	대장균 발현 면역보강제	GST-RANKL 생산 대장균주
미생물 고효율 발현 시스템	유산균용	tuf promoter를 개량한 유산균용 고효율 발현 plasmid
	대장균용	fermenter를 이용한 고농도 배양 최적화 기술
		Terrific broth를 개량한 고농도 배양 배지 개발
경구용 항원 전달체	T-HPMCP	점막점착성 능력 향상 및 위산보호효과를 가지는 고분자
	T-CAP	향상된 점막점착성 능력 및 위산보호효과를 가지는 고분자

비강용 항원 전달체	Mannan coated T-HPMCP	점막점착성능력이 향상되고 면역세포에 면역보강기능을 가진 고분자
	Mannan coated E-Eudragit	점막점착성능력이 향상되고 면역세포에 면역보강기능을 가진 고분자

4. 학술발표 및 수상 실적

가. 학술발표

- (1) In-Seon Kim et al., 2013. Construction of efficient recombinant protein expression vector by introduction of cis-elements for *Lactococcus lactis* IL-1403. 분자세포생물학회, 서울, 한국
- (2) In-Seon Kim et al., 2014. Construction of efficient Recombinant Protein Expression Vector System by Development of Strong Promoter for *Lactococcus lactis* IL1403. 분자세포생물학회, 서울, 한국.
- (3) Hui-Shan Li et al., 2014. Construction of mannan decorated thiolated eudragit microsphere to target APC mannan receptor in an adjuvant system for intranasal immunization. 한국동물자원과학회 학술발표회, 강원, 한국.
- (4) Su-Na Jung et al., 2014. Development of dendritic cell targeting peptide ligands conjugated chitosan nanoparticles for efficient vaccine delivery systems. 한국동물자원과학회 학술발표회, 강원, 한국.
- (5) In-Seon Kim et al., 2014. Construction of efficient expression vector system by introduction of modified tuf promoter for *lactococcus lactis* IL1403. 한국동물자원과학회 학술발표회, 강원, 한국.
- (6) Ho-Bin Lee et al., 2014. Production of recombinant protein vaccine with M cell targeting ligand for foot-and-mouth disease in *Escherichia coli*. 한국동물자원과학회 학술발표회, 강원, 한국.
- (7) Da-Chuan Piao et al., 2014. Oral administration of MBP-SP1 inclusion bodies as vaccine antigen elicited both systemic and mucosal immune responses in the Balb/c mouse. 한국동물자원과학회 학술발표회, 강원, 한국.
- (8) Do-Woon Shin et al., 2014. Optimization of flask culture conditions for foot-and-mouth

disease and porcine epidemic diarrhea in *Escherichia coli*. 한국동물자원과학회 학술발표회, 강원, 한국.

- (9) Jiang-Tao et al., 2014. Oral delivery of probiotics in poultry using pH-sensitive tablets. 한국동물자원과학회, 강원, 한국
- (10) Dong-Suk Park et al., 2014, Construction and characterization of C-C motif Chemokine Ligand 20(CCL20) secreting recombinant *Lactococcus Lactis* IL1403, 한국동물자원과학회 학술발표회, 강원, 한국
- (11) Na-Young Kim et al., 2015. Expression of soluble PEDV spike protein and FMDV viral protein in pichia pastoris for subunit vaccine development. 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대, 서울.
- (12) Do-Woon Shin et al., 2015. Process development for the fermentation and purification of a soluble recombinant PED vaccine. 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대, 서울.
- (13) Ho-Bin Lee et al., 2015. Production of recombinant protein for FMDV vaccine consisted of multi-epitope and enhanced solubility with BmpB as fusion partner in *Escherichia coli*. 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대, 서울.
- (14) So-yeon Yoon et al., 2015. Development of pH-sensitive and mucoadhesive carrier for increasing the oral bioavailability and mucosal immunity of mucosal vaccines. 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대, 서울.
- (15) In-Seon Kim et al., 2015. Validation of the modified tuf promoter to develop the efficient expression vector system for *lactococcus lactis* IL1403. 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대, 서울.
- (16) Da-Chuan Piao et al., 2015. A method for the efficient production of soluble recombinant protein form bacterial inclusion body using alkaline pH mild solubilization and acetone precipitation. 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대, 서울.
- (17) Ho-Bin Lee et al., 2016. Production of recombinant multi-epitope proteins for FMDV vaccine consisted of multi-epitope and enhanced solubility with fusion partner in *E. coli*. 한국동물자원과학회 학술발표회, 서울대, 서울.
- (18) So-yeon Yoon et al., 2016. Development of pH-sensitive and mucoadhesive polymeric carrier to increase the oral bioavailability and mucosal immunity of mucosal vaccines. 한국동물자원과학회 학술발표회, 서울대, 서울.

- (19) Hui-Shan Li et al., 2016. Development of manna decorated mucoadhesive HPMCP microspheres for an efficient nasal vaccine delivery. 한국동물자원과학회 학술발표회, 서울대, 서울.
- (20) Na-Young Kim et al., 2016. Optimization of solubilization and refolding process of PEDV spike protein from *E.coli* as inclusion bodies. 한국동물자원과학회 학술발표회, 서울대, 서울.
- (21) Da-Chuan Piao et al., 2016. Trigger factor assisted soluble expression of recombinant spike protein of porcine epidemic diarrhea virus in *Escherichia coli*. 한국동물자원과학회 학술발표회, 서울대, 서울.
- (22) Dong-Jun An et al., 2014. Novel Variant of the porcine epidemic diarrhea virus in south Korea. 미국바이러스 학회, 콜로라도
- (23) Dong-Jun An et al., 2015. A novel diagnostic approach to detecting porcine epidemic diarrhea virus: The lateral immunochromatography assay, 유럽임상미생물 및 전염성질환학회, 덴마크

나. 수상실적

- (1) 2014 한국동물자원과학회 발표 최우수상 수상
Su-Na Jung et al., 2014. Development of dendritic cell targeting peptide ligands conjugated chitosan nanoparticles for efficient vaccine delivery systems.
- (2) 2015 한국동물자원과학회 발표 최우수상 수상
Do-Woon Shin et al., 2015. Process development for the fermentation and purification of a soluble recombinant PED vaccine. PC15008.
- (3) 2016 한국동물자원과학회 포스터 최우수상 수상
Na-Young Kim et al., 2016. Optimization of solubilization and refolding process of PEDV spike protein from *E.coli* as inclusion bodies. OC16007.

5. 인력양성 실적

가. 1세부과제 6명

- (1) 2014년 2월 : 석사 김정인 박동석 김인선
(2) 2014년 8월 : 석사 신도운

(3) 2016년 8월 : 박사 Da-Chuan Piao, 석사 김나영

나. 2세부과제 4명

(1) 2015년 2월 : 박사 Tao Jiang, 박태은

(2) 2016년 2월 : 박사 Hui-Shan Li

(3) 2016년 8월 : 석사 윤소연

6. 언론 홍보

(1) “주사보다 효과 좋은 먹는 백신 나온다” 최영준, 동아사이언스, 2015

(2) “단백질 주사 후 백신 먹으면 효과 up” 권예슬, 동아사이언스, 2016

(3) “서울대 연구팀, 경구백신 면역 효율 높이는 방법 개발” 채새롬, 연합뉴스, 2016

서울대, 전염병 예방 효율 높이는 경구백신 전달물질 개발
주사보다 효과 좋은 먹는 백신 나온다

동아사이언스 | 입력 2015년 06월 16일 15:57 | 최종편집 2015년 06월 16일 18:00

국내 연구진이 가족과 인간에서 공통으로 전염병 예방 효율을 높일 수 있는 경구백신 제조 기술을 개발했다.

최윤재 서울대 교수팀은 경구백신을 목적 부위까지 안전하게 전달하는 백신 전달체를 새로 개발하고 국제학술지 '바이오테리얼스(Biomaterials)' 5월 15일자에 발표했다.



최윤재(왼쪽) 조종수 서울대 교수. 서울대 제공

서울대, 경구백신 흡수효율 증진시키는 신개념 치료법 개발
단백질 주사 후 백신 먹으면 효과 ↑

동아사이언스 | 입력 2016년 03월 16일 11:58 | 최종편집 2016년 03월 16일 18:00

국내 연구진이 경구백신의 흡수 효율을 개선할 수 있는 새로운 치료법을 개발했다.

최윤재, 조종수 서울대 농생명공학부 교수팀은 소화장관에서 체내 효소에 의해 분해되는 기존 경구백신의 문제점을 해결한 새로운 치료 시스템을 개발했다고 16일 밝혔다.



최윤재(왼쪽) 교수와 조종수 교수. 서울대 제공

서울대 연구팀, 경구백신 면역 효율 높이는 방법 개발

송고시간 | 2016/03/16 12:00

f t G+ BAND blog

(서울=연합뉴스) 채새롬 기자 = 주사백신보다 면역 효율이 떨어지는 경구백신의 효율을 증진시키는 방법이 개발됐다.

그림 173. 언론홍보 기사 캡처

7. 경제적 성과

가. 사업화성과 및 매출실적

(1) 사업화 성과

(가) 기술이전(1건) : FMD 아단위 백신 제조방법 및 이의 용도 (FMD 항원 단백질 생산), 기술이전 예정

(나) 산업화(2건) : FMD 예방 경구백신과 FMD 치료 주사백신, 산업화 예정

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	100 억원
		관련제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	100 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 17% 국외 : 0%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 17% 국외 : 0%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		- 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		4 위

(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)	300 백만원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0 억원	100 억원	350 억원	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0 %	17 %	25 %
		국외	0 %	0 %	3.3 %
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0 억원	100억원 (17%)	150억원 (25%)	
	수 출	0 억원	0 억원	200억원	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 연도별 목표달성도

1. 1차년도 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	제1세부과제	점막면역 백신 후보 항원 및 면역보강 단백질 생산	100%	○ FMD 바이러스 항원 유전자 클로닝 및 발현 확인
			100%	○ 면역보강 단백질 유전자 클 로닝 및 발현 확인
	제2세부과제	백신 담지 고분자 전달체 개발	100%	○ 경구용 및 호흡기용 백신 담 지 고분자 전달체 개발
			100%	○ 유산균 경구전달 고분자 담 지체 개발
	제1협동과제	M 세포 표적형 모델 점막면역 아단위 백신 (아단위 백신) 효과 실증 시험	100%	○ M 세포 표적형 모델 항원 (PED 바이러스 표면단백질) 경 구 및 호흡기 투여 백신 효과 검정 (challenge 시험)
	제2협동과제	백신 생산 유산균 대량생산 체계 확립	100%	○ 항원 및 면역보강 단백질 생 산 모델 유산균 이용 재조합 유 산균 고농도 배양조건 및 대량 생산 체계 확립

2. 2차년도 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2014)	제1세부과제	고효율 유산균 및 대장균 단백질 발현백터 구축	100%	○ 고효율 유산균 발현백터 개 발
			100%	○ 고효율 대장균 단백질 생산 체계 개발
	제2세부과제	백신 담지 고분자 전달체 특성 규명	100%	○ 경구용 및 호흡기용 백신 담 지 고분자 전달체 특성 규명
			100%	○ 유산균 경구전달 고분자 담 지체 특성 규명
	제1협동과제	M 세포 표적형 모델 유산균 경구백신 효과 실증 시험	100%	○ M 세포 표적형 유산균 경구 백신 및 cytokine 면역보강제 효과 검정 (challenge 시험)
	제2협동과제	가축 백신 인증 및 허가 프 로세싱	100%	○ 항원 및 면역보강 단백질 생 산 모델 유산균 이용 재조합 유 산균 고농도 배양조건 및 대량 생산 체계 확립

3. 3차년도 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2015)	제1세부과제	항원 및 면역보강 단백질 특성 규명 및 점막면역 백신 체계 구축	100	○ 항원 및 면역보강 단백질 기 능 및 특성 규명
			100	○ 항원 및 면역보강 단백질 최 적 조합 결정
			100	○ 백신 및 면역보강 단백질 효 과 개선
	제2세부과제	백신 담지 고분자 전달체 제형 개선	100	○ 경구용 및 호흡기용 백신 담 지 고분자 전달체 제형 개선
			100	○ 유산균 경구전달 고분자 담 지체 제형 개선
	제1협동과제	M 세포 표적형 FMD 점막면역 백신 효과 실증 시험	100	○ M 세포 표적형 경구백신 및 호흡기 투여 백신 challenge 시 험 (FMD 백신, cytokines)
			100	○ 가축 백신 인증 및 허가 프 로세싱
	제2협동과제	M 세포 표적형 점막면역 백신 제형 확립 및 제품화	100	○ 유산균 백신 제형 확립
			100	○ 고분자 담지 단백질 백신 제 형 확립
100			○ 가축 백신 제품화 및 산업화 프로세싱	

제2절 관련분야 기여도

■ 본 연구에서 개발한 PED 바이러스의 아단위 백신은 spike protein의 중화항체 영역이 있는 것으로 알려진 부분을 GST tag와 대장균에서 함께 발현이 된다. 이 발현된 단백질은 재수용화를 통해서 저렴하고 비교적 간단한 공정을 거쳐서 대량으로 생산이 가능하다. 이렇게 생산된 단백질을 직접 동물에 주사하였을 때 상업적으로 사용가능한 수준의 중화항체 생산이 이루어진 것으로 아단위 백신과 관련된 분야에 기여도가 높다 하겠다.

■ PED 바이러스와 함께 점막면역반응을 유도하기 위해 HPMCP 고분자와 RANKL 생산 유산균을 조합한 백신제형의 연구결과는 긍정적이다. PED 바이러스의 주요 피해 대상은 포유자돈으로 면역력이 활성화되지 않아 모돈에 의해 이항받는 항체가 아니면 치사율이 굉장히 높다. 이러한 PED 바이러스의 감염기작과 주요 피해를 예방하기 위한 실험디자인은 그 자체로 의미가 깊다. 모돈에 본 연구진이 개발한 백신제형을 경구 투여를 통해 접종하고 공격접종을 통해 자돈의 생존율에서 긍정적인 결과를 얻었기 때문에 관련된 분야의 기여도가 높다.

■ FMDV는 현재까지 불활화 백신이 주를 이루고 있으며 아단위 백신의 경우에는 산업화가 된 예가 없다. 세계의 다양한 연구진이 아단위 백신에 대해서 연구를 진행하고 있지만 본

연구진이 개발한 multi-epitope 아단위 백신은 세계 어느 연구진에 비교하여도 독창적인 아단위 백신이라 할 수 있다. 이 백신을 이용하여 실제 자돈에 면역실험을 진행하였을 때 상용백신 수준의 중화항체 생성이 되었다.

■ 본 연구진은 아단위 백신의 약한 면역반응 유도 효과를 보완하기 위해 유산균에서 생산되는 cytokine을 여러종 개발을 하였다. 기 보유중인 IL-6를 비롯하여 새롭게 IL-2와 RANKL을 생산하였다. 특히, RANKL의 경우에는 장 내 M 세포의 분화를 촉진하여 점막면역반응을 더 강하게 유도할 수 있는 것으로 생각되고 실제 모든 실험에서 자돈 공격접종을 하였을 때 치사율이 가장 낮은 것으로 나타났다. 이 연구는 유산균에서 생산되는 cytokine 류가 면역보조제로 충분히 사용할 수 있음을 시사한다.

■ 본 연구진이 개발한 경구용 혹은 비강용 고분자는 아단위 백신을 위산으로부터 보호하고 점막점착성 능력이 향상되었다. 이 고분자를 통해 경구접종된 항원에 대해서 장내 및 혈청에 항원 특이적 항체가 생성되는 것으로 확인되었다. 또한 비강용 고분자의 경우에는 mannan을 코팅하여 면역세포에 인식이 잘되어 면역반응을 활성화 하는 효과를 보였으며, 특히 비강을 통해 접종된 항원은 장, 생식기, 기관지 등 광범위하게 면역반응이 활성화 되는 효과를 보였다. 고분자를 활용한 실험들은 세계적인 학술지에 게재됨에 따라 관련분야에 기여가 크다.

제 5 장 연구결과의 활용계획

- 사업화는 연구개발 기간인 3년과 추가적으로 본 과제가 종료 된 후의 2년을 포함하여 2013년부터 2018년 까지 총 5년간 단계별로 진행될 예정이다. 1차 년도에서 유산균 발현 면역보강제를 이용하여, 2차 년도에서 개발된 PED 및 FMD 아단위 백신조합 및 고분자 전달체를 활용하여, 3차 년도에서 수의축산검역본부와 함께 진행한 목적동물 실증 실험으로 백신으로서 가능성을 확인하였다. 이후 4차 년도에는 항원단백질 특허 기술이전을 실시하고 후속데이터 축적과 함께 제품화 계획을 진행하고, 5차 년도에는 가축백신 인허가 절차에 따라 단계별 사업화를 진행할 예정이다.
- 단계별 사업화 전략을 통해 산업화를 체계적으로 진행하며, 완성된 제품은 즉시 사업화하여 경제성을 증대시킬 예정이다. 국내에서의 제품은 안전성, 효율성이라는 키워드를 중심으로 하여 마케팅을 실시하며 제품의 공신력을 확보하기 위해 수의축산검역본부의 인증 및 허가를 확보하는 것이 중요하다. 국내에서의 제품 공신력과 참여 기업의 마케팅 능력을 이용하여 해외로의 수출을 추진할 수 있을 것으로 예상된다. 현재 구축된 해외 기반의 수요국을 중심으로 추진 후 점진적으로 국가를 확대해나갈 예정이다.
- 본 과제를 통해 출원된 ‘FMD 아단위 백신 제조방법 및 이의 용도’를 활용하여 대상가축인 돼지 등에 활용할 수 있는 FMD 백신 상용화를 적극 검토하고 있다. 이 특허는 기존의 불활화 백신의 안전성에 대한 이슈를 극복하고 안전한 아단위 백신으로서 창의적인 기술이다. 또한, 이 특허의 아단위 백신은 연구결과 상용백신에 준하는 중화항체 생산역가를 확인하였다. 추후 공격접종에 대한 후속데이터를 축적하면 산업화 프로세스를 통해 FMD 경구용 예방 백신 및 주사 백신 등을 제품화 할 예정이다.
- 본 과제를 통해 출원된 특허인 ‘돼지 유행성 설사병을 유발하는 국내 야외주 (PED)바이러스 spike 당단백질 유래 아단위 백신 항원 단백질’과 ‘회장 표적화 점막 점착성 티올화 HPMCP 백신 단백질 전달체제’ 그리고 ‘RANKL를 생산하는 재조합 유산균 및 이의 용도’의 기술의 조합은 본 과제의 3차 년도에서 모돈을 통한 자돈에 초유 및 돈유를 통한 이항항체가 안정적으로 공급이 되는 것을 확인하였고 이를 통해 공격접종에서 포유자돈의 생존률이 상용백신과 준하는 혹은 그 이상의 효과를 보이는 것을 확인하였다. 이 결과를 토대로 개선된 백신조합과 재현성 실험을 통한 후속데이터 확보에 주력하고 이를 토대로 모돈용 PED 예방백신등의 상용화 가능성이 기대된다.
- 서울대학교와 기업의 후속연구와 농림축산검역본부의 가축백신 인허가 절차에 따라 다음과 같은 백신 제품 단계별 사업화 진행을 예정이다. 1단계는 PED 및 FMD 유래 수용성 항원단백질을 이용한 1세대 아단위 백신을 제품화한다. 2단계는 항원단백질과 cytokine 면역보강제 조합을 통해 면역원성을 증진시킨 2세대 아단위 백신을 제품화한다. 3단계는 고분자 전달체 및 GRAS 유산균을 적용하여 경구투여시 백신 전달 효율과 면역보강 효과를 증진시킨 3세대 아단위 백신을 제품화한다.

■ 본 과제를 통해 개발된 각종 고분자 항원 전달체 및 면역보강 cytokine 생산 유산균등을 활용하여 가축질병대응을 위한 백신을 통해 경제가축을 위협하는 각종 질병을 예방하기 위한 아단위 백신의 개발에 영감을 줄 수 있을 것으로 기대되며 현재까지 행해지던 침습적인 주사백신을 벗어나 경구 및 비강을 통해 가축에 스트레스를 주지 않는 백신 접종으로 가축 생산성을 증대시키며 질병을 예방할 수 있는 도구로서 추가적인 상품화가 기대된다.

■ 백신을 최종적으로 상용화하기 위해서는 두 가지 보장을 해야한다. 첫째는 최소의 dose를 사용해 최대의 효과를 낼 수 있는 dose 최적화 실험을 진행해야 한다. PED나 FMD 백신의 경우 10mg의 고용량을 사용한 결과이며 용량을 단계적으로 낮춰 최대의 효과를 낼 수 있는 양을 확보해야한다. 또한 PED 백신의 경우 고분자 담지 공정과 RANKL 생산 유산균이 같이 담지되기 때문에 백신 제조 공정 최적화도 진행될 예정이다. 또한 경구용 백신의 유효성을 산업 내에서 정확한 간이 진단을 위한 점막면역 측정 방법과 기준에 대한 추후 연구 역시 필요하다.

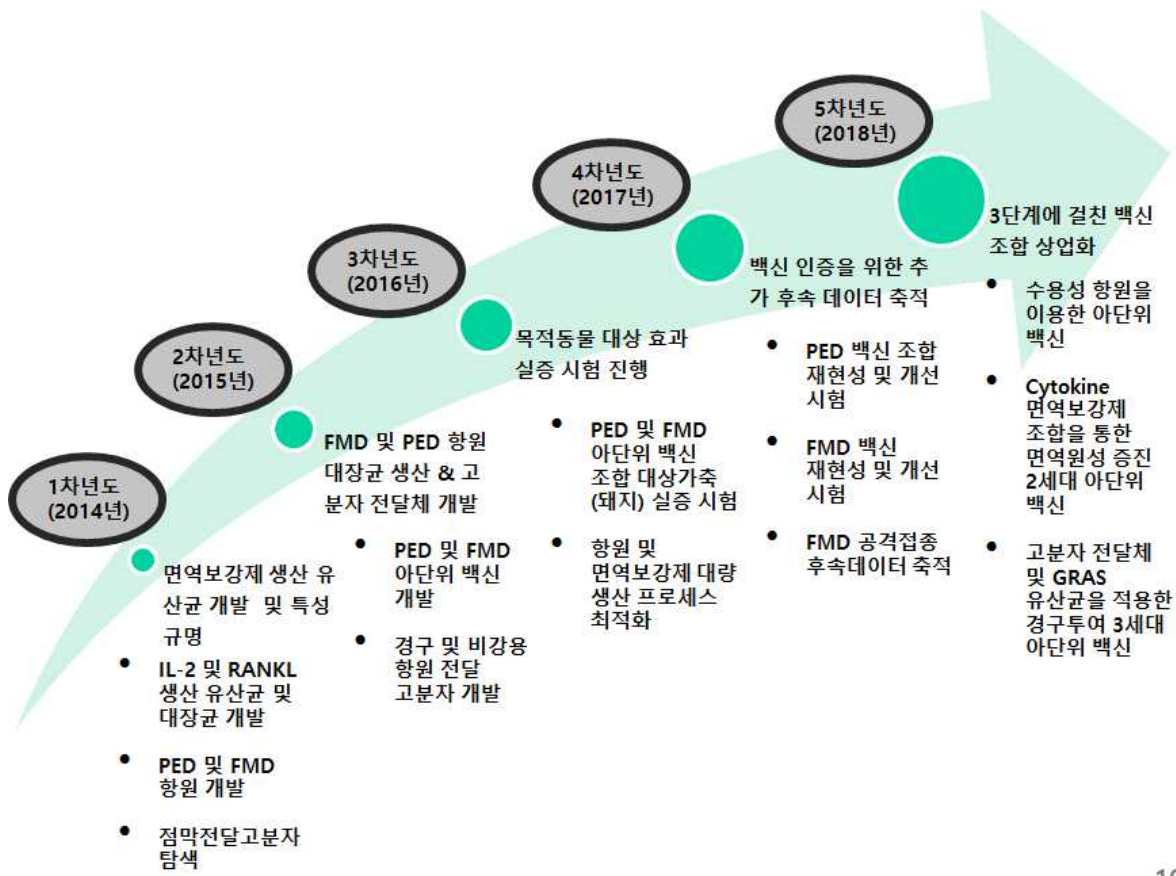


그림 174. 단계별 사업화 추진 계획

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 아단위 백신 관련 해외과학기술 정보

아단위 백신은 면역반응을 가장 잘 유도할 수 있는 항원부분만을 포함하는 백신으로 바이러스나 병원균 전체를 포함하지 않는 형태의 백신으로 기존 백신의 부작용이나 효력을 높이기 위한 백신 생산 기술로 지속적으로 연구되고 있는 분야이다. 항원 분자가 너무 커서 항원제시 세포가 항원을 특이적으로 인식하지 못하는 Gram 음성세균 백신 (한국미생물생명공학회, 2007)의 경우 항원성이 높은 항원후보를 DNA 재조합 기술을 이용하여 재조합 항원을 생산하기도 한다. 1945년 처음 개발된 인플루엔자 백신은 바이러스를 불활화 시켜서 쓰는 형태에서 보다 안전성이 높아진 split 백신으로 발전하였고, 이후에는 항원성이 높은 HA, NA만 정제된 형태로 만든 아단위 백신이 개발되었다. 현재 전세계적으로 불활화 백신에 비해 안전성이 높은 split 백신이나 subunit 백신이 인플루엔자 백신으로 사용되고 있다 (한국보건산업진흥원, 2013)

가. PED 바이러스 (Porcine epidemic diarrhea virus)백신

2013년 돼지 유행성 설사 바이러스 (PEDV)가 미국, 캐나다 및 동남아시아 지역을 중심으로 발생하여 세계 양돈산업을 위협하고 있다. 돼지 유행성 설사 바이러스는 형질전환 식물을 이용하여 생산한 아단위 경구 백신이 개발되어 판매중이다. 이는 2006년에 미국 농무부에 의해서 허가된 식물의 성장에 따라 생성된 항원을 정제하여 백신 제조용으로 사용하는 기술이다 (한국미생물생명공학회, 2007).

돼지 유행성 설사 바이러스는 형질전환 식물을 이용하여 생산한 아단위 경구 백신이 개발되어 판매중이다. 이는 2006년에 미국 농무부에 의해서 허가된 식물의 성장에 따라 생성된 항원을 정제하여 백신 제조용으로 사용하는 기술이다 (한국미생물생명공학회, 2007). 돼지 유행성 설사 바이러스는 야외 바이러스가 환경에 적응함에 따라 지속적인 변이가 일어나기 때문에 쉽게 근절되기 어렵다. 지속적인 변이가 진행됨에 따라 새로운 유전형과 항원형이 보고되고 있기 때문에 새로운 변이에 빨리 대항할 수 있는 아단위 백신의 개발이 요구되고 있다.

돼지 유행성 설사 바이러스의 spike protein 중 숙주 세포의 receptor와 결합을 하는데 관여하는 S1 domain을 발현하여 아단위 백신으로써의 효능을 본 연구가 지속적으로 수행되고 있다.

2016년에 *Virology journal*에서는 발표된 논문에서는 돼지 유행성 설사 바이러스의 S1 domain을 효모 (*PichiaPink Pichia pastoris*), recombinant baculovirus, 동물세포 (HEK-293 T cells)에서 모두 발현시켰다. 이 중 HEK-293 T cells에서 발현시켰을 때 당화가 가장 야생 균주와 비슷하며 발현양이 가장 높았다. HEK-293 T cells에서 발현시킨 아단위 백신을 모두에 면역실험한 결과, 모돈에서 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 항체가 검출되었다. 또한 이 유자돈도 수동 면역으로 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 항체가 생성됨을 보았다. 이유자

돈에서 돼지 유행성 설사 바이러스 challenge 실험을 한 결과 한 결과 사망률이 낮아졌지만, 여전히 설사 반응은 보였으며, 증체는 보이지 않았다. 이에 따라 아단위 백신의 낮은 항원성을 더 발전시킬 연구의 필요성이 대두되었다 (Makadiya 등, 2016).

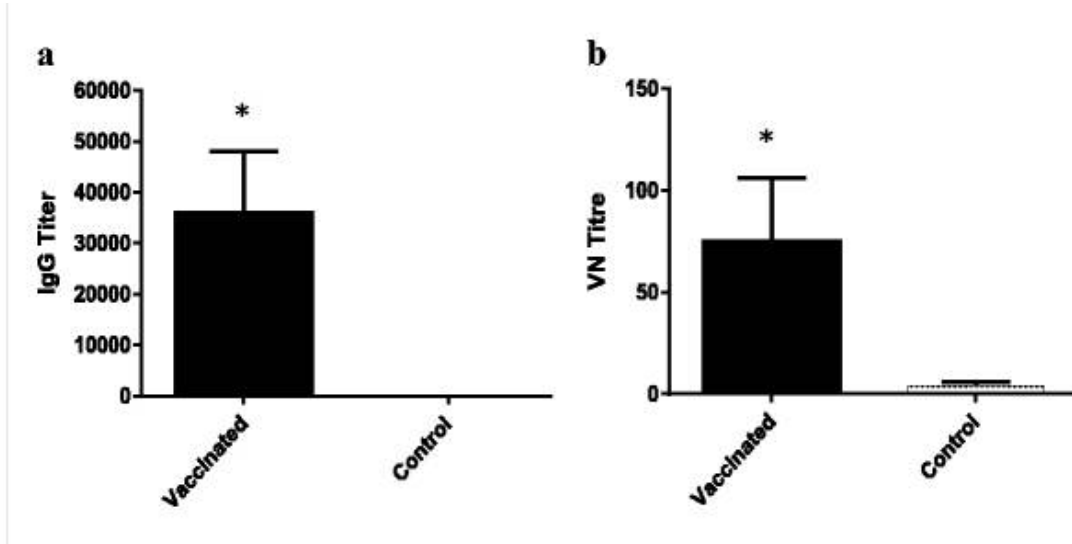


그림 175. 자돈에서의 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 IgG 값과 증화항체 값 (Makaduya 등, 2016)

또한 형질 전환 식물에서 돼지 유행성 설사 바이러스 아단위 백신을 생산하는 연구도 있다. 2016년 *Tissue and Organ Culture*에 발표된 논문에서 돼지 유행성 설사 바이러스의 SID domain 부분 (a.a. 636 ~ 789)과 cholera toxin B subunit을 fusion 시켜서 형질 전환 식물에서 발현시켰다. 형질 전환 식물에 infiltration 시키고 2일 뒤에 발현양이 가장 높았다. 돼지에 경구 투여한 결과 6주 후에 cholera toxin과 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 IgG와 IgA 항체가 가장 높게 나타났다 (Huy 등, 2016).

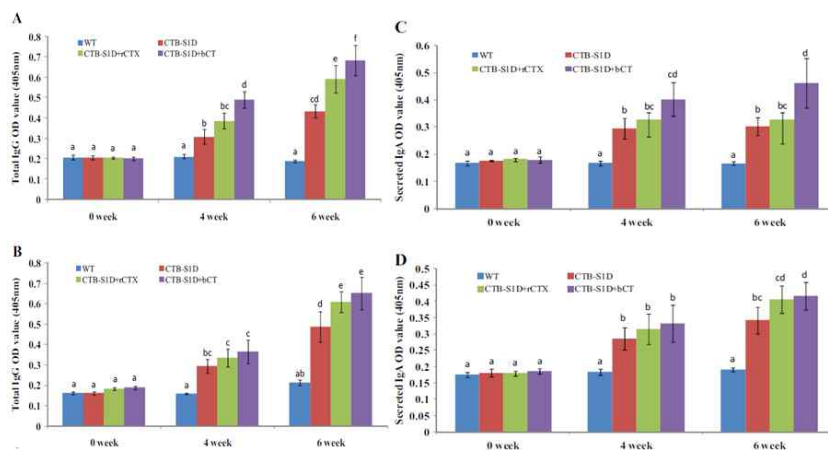


그림 176. (A) 혈액 내 IgG 값, (B) 분변 내 IgG 값, (C) 혈액 내 IgA 값, (D) 분변 내 IgA 값 (Huy 등, 2016)

나. FMD 바이러스 (Foot and mouth disease vaccine)백신

FMD는 전염성이 강한 수포성 질환 7가지의 혈청형으로 구성되어 있다. 혈청형간 항원 다양성이 커서 현재 사용되고 있는 불활화 백신은 모든 혈청형을 방어하지 못한다는 단점이 있다 (Doel, 2003). 이러한 항원 다양성을 극복하기 위한 방안으로 아단위 백신이 있으며, 아단위 백신은 백신을 맞은 개체와 질병에 걸린 개체가 구분이 가능 (DIVA ; differentiation infected from vaccinated animals)하여 무역 장벽을 극복할 수 있다는 장점이 있다 (Ludi 등, 2014).

2013년 *Veterinary research*에 발표된 논문에서는 FMD 바이러스의 3가지 외피 단백질을 SUMO 단백질과 fusion 하여 발현시킴으로써 virus like particle (VLP) 형태의 아단위 백신을 생산하였다. 이렇게 생산된 VLP는 크기나 모양이 FMD 바이러스와 굉장히 유사하였다. 기니피그와 돼지, 소에 근육 주사하고, FMD에 특이적인 항체 생성 반응, 중화 항체 반응, T 세포 증식, cytokine (IFN-gamma) 분비를 확인한 결과 VLP를 주사한 그룹에서 불활화 백신만큼의 FMD 특이적 항체가 생성되고, 중화 항체 반응이 확인되며, T 세포 증식 및 cytokine이 분비되었다 (Guo 등, 2013).

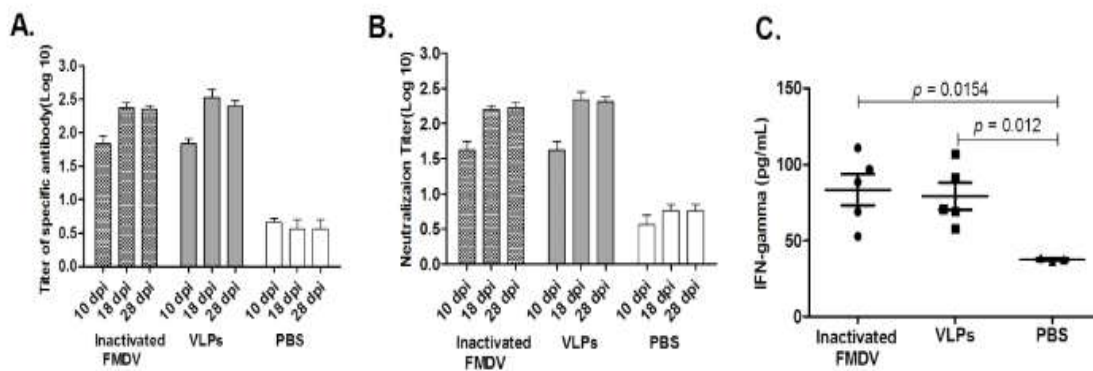


그림 177. FMD 특이적인 면역 반응 (A) FMD 특이적 항체 생성, (B) 중화 항체 반응, (C) cytokine 생성 (Guo 등, 2013)

2015년 *Applied microbiology and biotechnology*에 발표된 논문에서는 3가지의 재조합 단백질 백신을 디자인한 후, FMD 바이러스에 대한 항원성을 비교하였다. 3가지 재조합 단백질 중 FMD 바이러스 VP1의 129 ~ 169 a.a,와 3D의 346 ~ 370 a.a로 구성된 PB 단백질이 가장 높은 항원성을 나타내었다. 기니피그에 50 μ g의 재조합 단백질을 두 번 주사하였을 때는 100%의 방어율을 보였으며, 100 μ g의 재조합 단백질을 한 번 주사하였을 때는 60%의 방어율을 보였다 (Zhang, 2015).

2. 점막면역활성화를 위한 백신에 관한 해외과학기술 정보

가. 경구용 면역 백신

경구 백신의 경우 소화 장관에서 IgA를 생산함으로써 소화기성 질병에 대한 점막면역 반응을 유도할 수 있으며 기존의 주사백신에 비해 투여가 편리하고 가축에게 스트레스를 유발하지 않

는다는 장점이 있다. 이에 점막면역 활성화를 위한 경구 백신이 많이 개발되어 왔다. 경구용 면역 백신으로 대표적으로 경구용 소아마비 백신, 경구용 로타 바이러스 백신, 경구용 콜레라 백신 등이 있다 (Holmgren 등, 2005).

소화기성 질병을 일으키는 FMD, PED 바이러스에 대한 경구 백신을 개발하기 위한 시도도 많이 이루어지고 있다. 2015년 중국에서 진행된 연구에 따르면 유산균 (*Lactobacillus plantarum*)에 FMD 바이러스의 VP1 단백질을 발현시킨 후 유전자 재조합 유산균을 기니피그에 경구 투여한 결과 혈중 항원 특이적 IgG, IgA, IgM 수준이 증가하였고 점막 조직에서도 분비형 IgA의 생산이 증가하였다. 또한 FMD 바이러스에 대한 중화항체가 생산되었으며 챌린지 실험에서 강력한 세포성 면역반응 및 FMD 방어 효과를 나타냈다.

Peptide name and amino acid positions	Amino acid sequence
PA: 59mer 3A(21-35)-PPS-VP1(129-134(T→C) ^a -156(Q→C) ^b -169)	acetyl-AAIEF FEGMV HDSIK PPS VYNGT CKYSA PATRR GDLGS LAARL AACLP ASFNY GAIRA T-amide
PB: 69mer 3D(346-370)-PPS-VP1(129-134(T→C) ^a -156(Q→C) ^b -169)	acetyl-YDLDF EALKP HFKSL QQTIT PADKS PPS VYNGT CKYSA PATRR GDLGS LAARL AACLP ASFNY GAIRA T-amide
PC: 87mer 3A(21-35)-PPS-VP1(129-134(T→C) ^a -156(Q→C) ^b -169) ~PPS-3D(346-370)	acetyl-AAIEF FEGMV HDSIK PPS VYNGT CKYSA PATRR GDLGS LAARL AACLP ASFNY GAIRA T PPS YDLDF EALKP HFKSL QQTIT PADKS-amide

그림 178. 3가지 재조합 단백질 백신 아미노산 서열 (Zhang, 2015)

Group	Vaccine and peptide dose	Neutralizing antibody titer ^a (average value)			Primary vesicles ^b	Secondary vesicles ^b	Protection rate (%)
		Day 0	Day 21	Day 42			
1	PBS	<0.3	<0.3	<0.3	5/5	5/5	0
2	Killed virus vaccine	<0.3	1.389±0.15	1.58±0.14	5/5	0/5	100
3	PB/250 µg/0.5 mL/dose	<0.3	1.73±0.25	1.8±0.29	3/5	0/5	100
4	PB/100 µg/0.5 mL/dose	<0.3	1.5±0.35	2.4±0.33	3/5	0/5	100
5	PB/50 µg/0.5 mL/dose	<0.3	0.6±0.22	1.73±0.31	5/5	0/5	100
6	PB/25 µg/0.5 mL/dose	<0.3	0.381±0.12	1.27±0.45	5/5	2/5	60

그림 179. 기니피그 challenge 실험 결과 (Zhang, 2015)

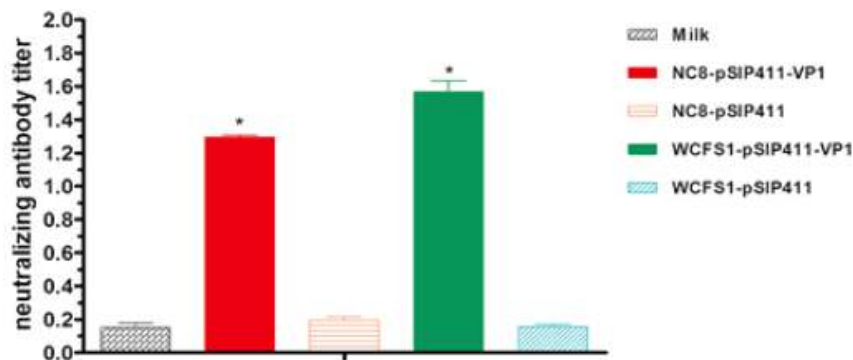


그림 180. 기니피그 면역실험 후 중화 항체 값 (Wang 등, 2015)

Table 4. Protection of guinea pigs (n = 5) against FMDV challenge.

Group ^a	Vaccines	Protection
A	NC8 (pSIP411-VP1)	4/5
B	NC8 (pSIP411)	2/5
C	WCFS1 (pSIP411-VP1)	5/5
D	WCFS1 (pSIP411)	3/5
E	Only milk	1/5

그림 181. 챌린지 실험 결과
(Wang 등, 2015)

PED 또한 경구 백신 개발이 활발히 이루어지고 있다. 2016년 최근 중국에서 개제된 연구에 따르면 *Salmonella typhimurium*에 PED 바이러스의 Spike protein을 발현시켜 자돈에 경구로 투여하였을 때 중화 항체 생산, 항원 특이적 IgG, sIgA 증가, IFN- γ , IL-4 증가 등을 통해 PED 바이러스에 대한 점막 면역반응 및 세포성 면역반응이 유도되는 것을 확인하였다.

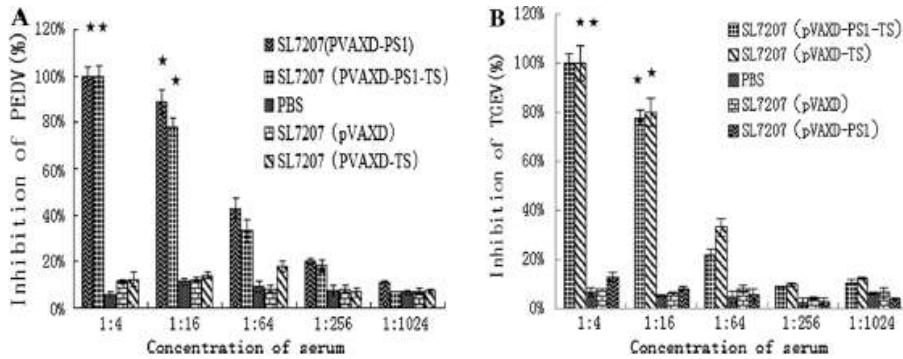


그림 182. 자돈 면역 실험 후 중화 항체 값 측정
(Zhang 등, 2016)

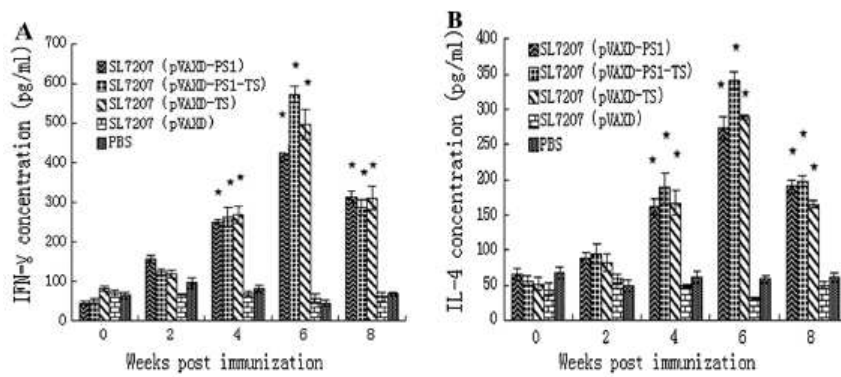


그림 183. 자돈 면역 실험 후 사이토카인 IFN- γ , IL-4 생산
(Zhang 등, 2016)

나. 비강용 면역 백신

호흡기에는 NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue)라는 점막면역기구가 존재하는데 비강 백신은 NALT에서의 면역반응을 유도하여 호흡기성 점막면역반응을 가장 효과적으로 유도

할 수 있다. 대표적인 비강 백신으로는 인플루엔자 백신이 있다 (Holmgren 등, 2005). 비강 투여를 통한 vaccination 방법으로는 백신을 고분자물질로 코팅하여 injection하거나 스프레이 방식으로 주입하는 방법이 있는데 이 중에서도 점막에 의해 백신의 clearance가 일어나지 않도록 나노 파티클을 도입하는 연구가 많이 진행되고 있다.

2014년 중국에서 개제된 논문에 따르면 불활성 FMD 바이러스 또는 FMD 바이러스 DNA를 키토산 나노입자에 담지한 후 비강 경로를 통해 소에 투여 및 챌린징 실험을 진행한 결과 FMD DNA를 키토산 입자에 담지한 그룹에서 혈중 및 nasal wash의 FMD 바이러스 특이적 분비형 IgA가 가장 높은 수준으로 발견되었고 비강세포의 증식 수준 또한 매우 높았다. 챌린징 실험에서도 대조군에 비해 FMD DNA를 키토산 입자에 담지한 그룹에서 방어율이 가장 높게 관찰되었고 FMD 바이러스

RNA 카피 수를 측정하였을 때 대조군에 비해 vaccination한 그룹에서 카피 수가 더 적게 관찰되었다.

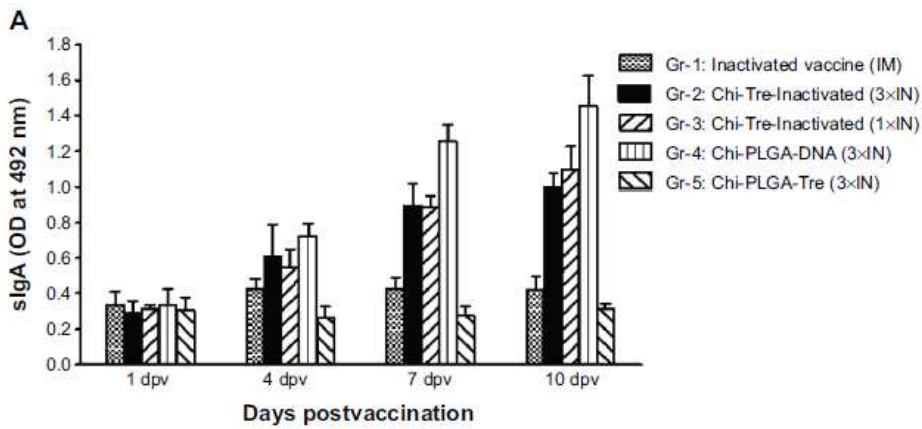


그림 184. 자돈 백신 투여 후 nasal wash에서 분비형 IgA 수준 (Pan 등, 2014)

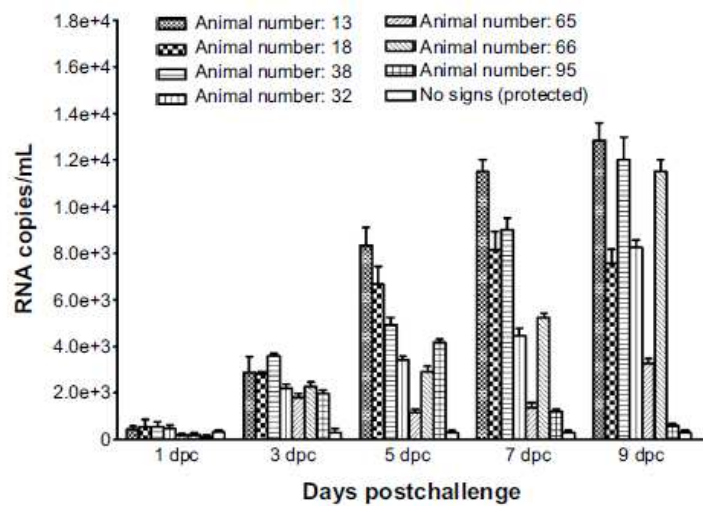


그림 185. 챌린징 실험 후 비강 점액에서의 FMD 바이러스 RNA 카피 수 (Pan 등, 2014)

3. 면역보강제에 관련 해외과학기술 정보

면역보강제 (Adjuvant)는 크게 3가지 역할을 통해 백신의 효율을 증진시킨다. 첫째, 백신의 면역반응을 극대화시키거나, 두 번째, 특정 병원체에 대한 면역반응이 형성되도록 유도하거나, 세 번째, 초기 면역 반응의 속도를 변화시킴으로써 가능하다.

가. cytokine 류 면역보강제

Cytokine은 세포로부터 분비되어 선천성 면역반응 및 획득성 면역반응에 관여하는 다양한 세포에게 영향을 미치는 물질이다. 다양한 면역 보강제가 면역세포의 Cytokine분비를 유도하여 면역증강 효과를 나타내는 반면, Cytokine 단독의 경우 짧은 반감기로 인하여 Liposome을 이용하거나, vector system을 이용해 전달하기 위한 시도가 이루어지고 있다.

2014년 *Acta Biochimica Polonica* 에 발표된 연구에서는 *Lactococcus lactis* 에서 조류 인플루엔자 항원 단백질인 H5를 단독으로 또는 면역보강제인 chIL-2 (ChickenIL-2)와 함께 발현시켰다.

L.lactis 10⁹ CFU를 i.g.로 투여한 결과 항원 단백질과 면역보강제를 함께 발현하고 있는 유산균을 투여한 그룹에서 항원 특이적인 serum IgG와 IgA가 항원을 단독으로 발현하는 유산균 투여 그룹보다 높게 나타났다.

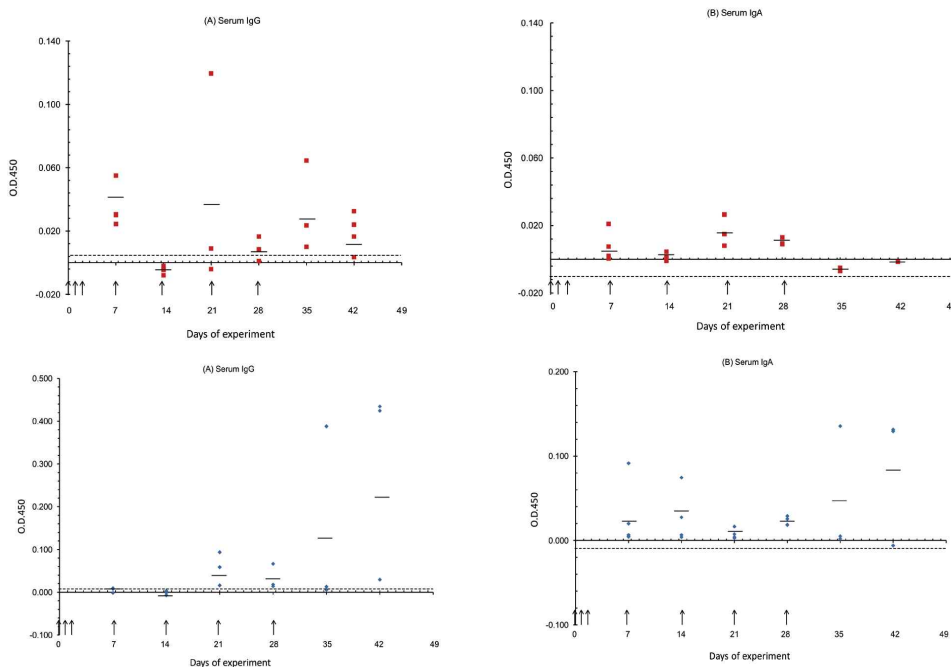


그림 186. 항원 특이 serum IgG 와 IgA (상부), 항원 특이 serum IgG와 IgA (하부) (Szatraj 등, 2014)

결과를 바탕으로 유산균을 생물학적 항원 또는 면역보강제의 전달체로 이용할 수 있는 가능성에 대해 확인하였다.

나. TLR agonist

TLR agonist는 병원체에서 발견되는 특이적 분자 패턴으로 작용하여 TLR에 결합함으로써 초기 선천성 면역반응에 관여한다. TLR agonist는 대식세포 및 수지상세포를 활성화시켜 Cytokine분비를 유도하여 백신의 면역 효과를 증강하는데 기여하는 것으로 알려져 있다. 2014년 발표된 *Veterinary Microbiology*에서는 TLR3 agonist인 poly(I:C)를 O 혈청형 FMD multi-epitope vaccine의 면역보강제로 이용하여 백신 단독보다 높은 항원 특이적 항체를 확인한 이전의 연구 결과를 바탕으로 면역보강제로서 poly(I:C)와 FMD multi-epitope vaccine을 근육 주사한 결과 다양한 topotype의 바이러스주에 대한 방어율을 향상시켰다.

Animal no.	Vaccination status	LPB-ELISA titres* (28 dpv)	Virus challenge	Day of onset ^b	Protection	3ABC antibody (15 dpc)
1863	Vaccinated	1.8	Contact	/	Yes	Neg
1872	Vaccinated	0.6	Contact	/	Yes	Neg
1858	Vaccinated	1.8	Contact	/	Yes	Neg
1869	Vaccinated	1.8	Contact	/	Yes	Neg
1882	Vaccinated	1.5	Contact	/	Yes	Neg
1854	Unvaccinated	<0.6	Contact	4	No	Pos
1859	Unvaccinated	<0.6	Contact	4	No	Pos
1860	Unvaccinated	<0.6	Contact	6	No	Pos
1861	Unvaccinated	<0.6	Inoculation	2	No	Pos
1865	Unvaccinated	<0.6	Inoculation	3	No	Pos

* Antibody titres were expressed as the reciprocal log10 of the serum dilutions giving 50% of the absorbance recorded in the control wells (wells with virus but without serum).

^b Day of onset of lesion in feet.

그림 187. FMD 바이러스 접촉 감염 실험 결과 (Cao 등, 2014)

실험 결과 3가지 topotype 바이러스에 대한 LPBE 값이 백신접종 그룹에서 높게 나타났으며, 접촉 감염 실험 결과 백신 접종 그룹에서는 모든 개체에서 바이러스를 방어할 수 있었으며, 바이러스 감염여부를 판단할 수 있는 지표인 3ABC antibody 또한 음성으로 판단되어 poly(I:C)를 면역증강제로 이용한 경우 FMD 백신으로서 이용가능성을 확인한 연구 결과였다. 이어 2015년 발표된 *Human Vaccines & Immunotherapeutics*에서는 poly(I:C)와 더불어 TLR9 agonist인 CpG를 이용하여 조류인플루엔자 백신에 대한 면역보강제로서의 효과를 비교하였다. 후보 백신 단백질은 면역보강제와 함께 비강으로 투여하여 점막면역을 유도하였고, 그 결과 그림 14에서처럼 poly(I:C)나 CpG를 면역보강제 사용한 경우 항원 특이적인 IgG 와 IgA가 증가했다.

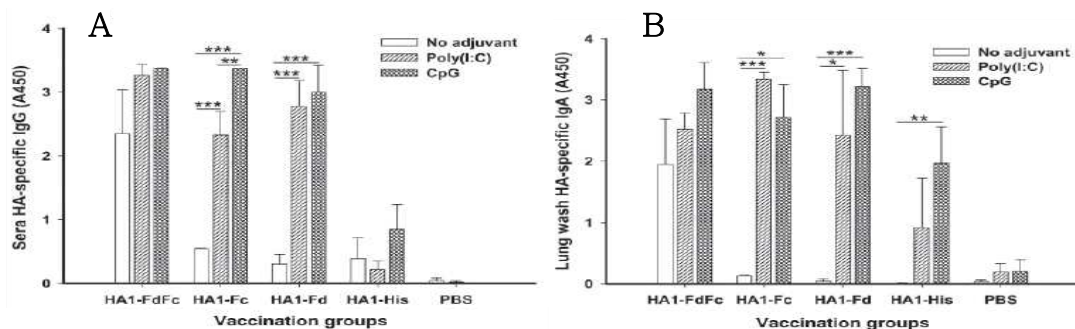


그림 188. 그룹별 항원 특이 Sera IgG, Lung wash IgA (Yu 등, 2015)

이러한 결과를 바탕으로 점막면역 반응을 유도하는데 있어서 TLR agonist의 이용 가능성을 확인하였으며, 특징적으로 Virus 유사 분자 패턴을 갖는 TLR agonist의 경우 효과적인 면역보강제로서 역할 할 수 있을 것으로 보인다.

4. 점막면역반응을 위한 고분자 전달체 관련 해외과학기술 정보

가. HPMCP (Hydroxypropyl methylcellulose phthalate)

HPMCP는 pH 민감성을 특징으로 하는 고분자이다. 위산에서는 녹지 않는 반면 소장 내부에서 swelling이 일어나 약물을 방출하는 특징이 있어 경구 백신의 생체 전달률을 개선할 수 있는 전달체 후보물질이라고 할 수 있다. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* (2015) 에서는 HPMCP와 TMC (Trimethyl chitosan)을 ionic gelation을 하여 B형 간염 항원을 담지하여 입자화하였다.

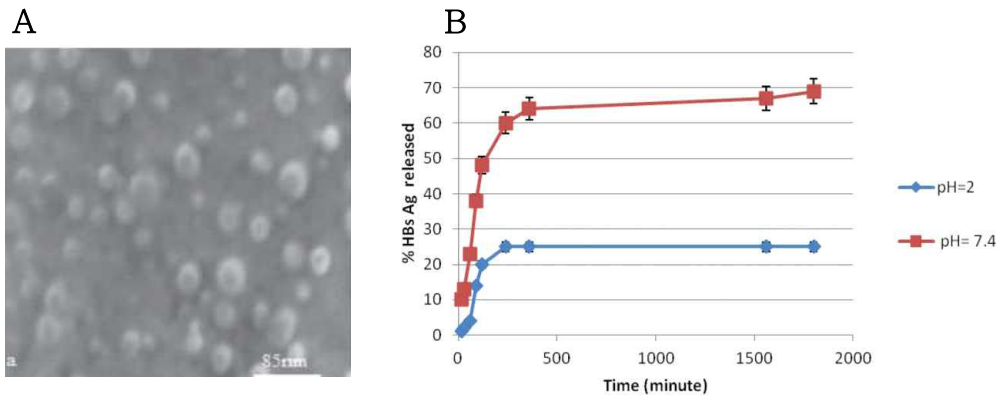


그림 189. 항원 담지 TMC/HPMCP 나노입자(A), pH-민감성 항원 방출 (B) (Farhadian 등, 2015)

이로써 점막점착성을 갖는 TMC의 단점인 낮은 용해도를 극복하고, 소장 pH 7.4에서 항원 단백질이 서방형으로 방출되는 나노입자를 형성하여 경구 백신 전달체로서 HPMCP의 이용 가능성을 제시한 연구 결과였다.

나. CAP

Cellulose Acetate Phthalate (CAP)는 셀룰로오스 유도체로서 구조적 특징상 낮은 pH에서도 안정하기 때문에 위산에 견딜 수 있어 약물을 소장까지 전달되어 흡수되도록 하는 장용제로 이용되는 고분자이다. CAP는 HPMCP에 비해 독성이 낮으며 낮은 pH에서는 불용성이며 약한 산성 또는 중성 pH에서 분해되기 때문에 위액으로부터 약물을 보호하고 소장의 중간 부분에서 담지한 약물을 방출하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 CAP는 소화기를 거쳐 백신을 전달하는 경구 백신 전달용 고분자로서 사용할 수 있으며 이와 관련한 연구 또한 진행되고 있다.

2014년 스페인에서 진행된 한 연구에서는 CAP를 경구 콜레라 백신의 전달체로 이용하여 그 효과를 검증하였다. 열을 가해 불활성화 시킨 비브리오 콜레라 균을 스프레이 분무법을 이용하여 CAP 안에 담지하였다. 형성된 마이크로파티클은 약 6 μm 사이즈로 백신 loading content는 8.16~8.64%였다. 담지한 백신의 항원성은 85%이하로 떨어지지 않았고 in vivo에서 면역 실험을 한 결과 30mg을 투여한 그룹에서 비브리오 콜레라 배양액을 투여한 그룹과 유사한 면역 반응을 유도하였다.

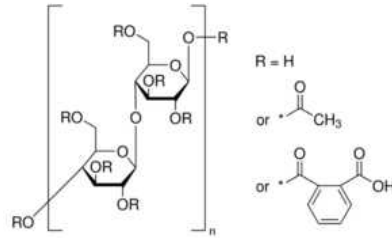


그림 190. CAP 구조

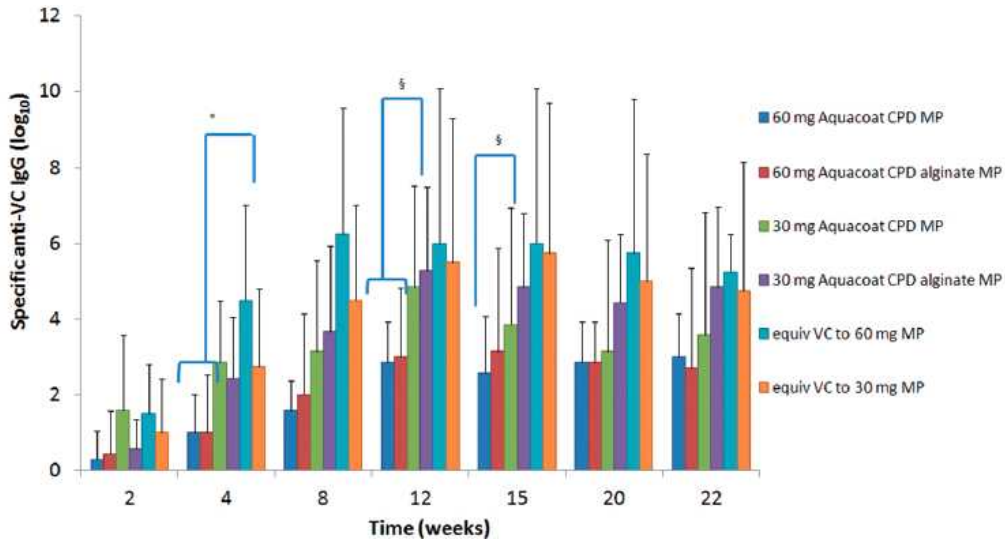


그림 191. CAP 담지 비브리오 콜레라 백신 투여 후 비브리오 콜레라 균 특이 혈중 IgG (Pastol 등, 2016)

다. inulin

이눌린은 치커리, 돼지감자 등 덩이줄기 식물에 특이적으로 많이 존재하는 천연물질로써 경험적으로 췌장 당뇨, 항비만 등에 대한 효능과 다량의 과당함유에 따른 천연 감미제로서의 기능이 있어 오늘날 추출물들이 제품화되어 있는 농생명자원이다. 이눌린은 베타 2-1 결합을 하고 있어 전달체로서의 이용 가능성이 높으며, 전달체로 사용 시 약물을 천천히 방출시키고, 항암제 및 면역 보조제의 효능을 보인다는 장점이 있다.

2015년 European journal of pharmaceutical sciences에 발간된 논문에서는 델타 형태의 이눌린을 인플루엔자 폐 백신과 함께 처리하였을 때, 면역 반응을 향상시켜주는 것으로 나타났다. 폐 백신을 사용함으로써 점막 면역 반응은 잘 유도할 수 있지만, 체면역 반응의 유도는 근육 주사보다 덜 유도된다. 이눌린과 인플루엔자 폐 백신을 함께 사용함으로써 인플루엔자에 대한 IgG 값은 높이고, 체면역 반응의 높게 유도되는 것을 볼 수 있었다. 또한 이눌린이 Th1/Th2 반응을 좀 더 균형잡힌 쪽으로 유도하였으며, 폐 백신을 단독으로 사용했을 때보다 비강의 IgA 값을 더 높여주는 것을 볼 수 있었다 (Murugappan 등, 2015)

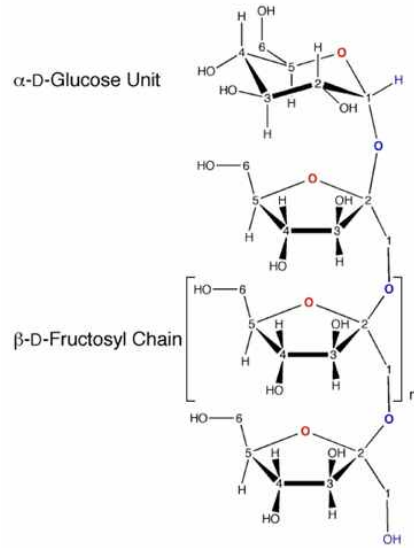


그림 192. 이눌린의 구조

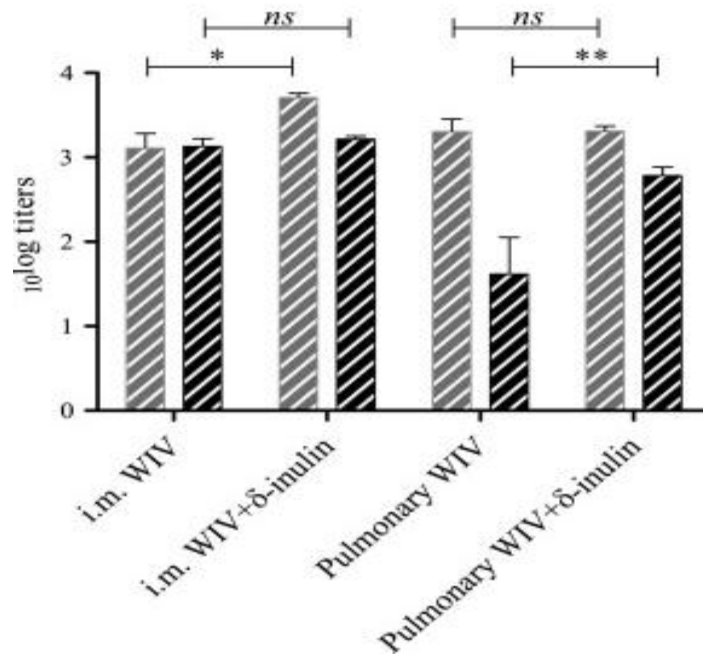


그림 193. 혈청 내 IgG1 값 (회색)와 IgG2a 값 (검은색) (WIV : Whole inactivated influenza vaccine) (Murugappan 등, 2015)

제7장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사시여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	FMD 아단위 백신 제조방법 및 이의 용도	서울대학 교	1세부, 2세부	대한민국		2016.10.5		
2	특허	돼지 유행성 설자병을 유발하는 국내 야외주 (PED) 바이러스 spike 당단백질 유래 아단위 백신 항원 단백질	서울대학 교	1세부, 2세부	대한민국		2015.6.18		
3	논문	Soluble RANKL Expression in <i>Lactococcus</i> <i>Lactis</i> and Investigation for Its Potential as An Oral Vaccine Adjuvant	서울대학 교	1세부, 2세부	미국	2.246	2015.11.5	중복	SCI
4	논문	Nasal Immunization with Mannan-decorated Mucoadhesive HPMCP Microspheres Containing APXIIA Toxin Induces Protective Immunity Against Challenge Infection with <i>Actinobacillus</i> <i>Pleuripneumoniae</i> in Mice	서울대학 교	2세부	미국	7.705	2016.5.14	중복	SCI
5	논문	Production of Soluble Truncated Spike Protein of Pig Epidemic Diarrhea Virus from Inclusion Bodies of <i>E. coli</i> through Refolding	서울대학 교	1세부	미국	1.695	2016.5.31	단독	SCI

제8장 참고문헌

- Alander M., Satokari R., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T. and von Wright A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1):351-354.
- Cao Y., Lu Z., Li D., Fan P., Sun P., Bao H., Fu Y., Li P., Bai X., Chen Y., Xie B and Liu Z. 2014. Evaluation of cross-protection against three topotypes of serotype O foot-and-mouth disease virus in pigs vaccinated with multi-epitope protein vaccine incorporated with poly(I:C). *Veterinary Microbiology* 168(2-4):294-301.
- C. Liu, J. Tang, Y. Ma, X. Liang, Y. Yang, G. Peng, Q. Qi, S. Jiang, J. Li, L. Du, F. Li, Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus, *J. Virol.*, 2015, 89, 6121e6125.
- Doel, T. R. 2003. FMD vaccines. *Virus research*, 91(1), 81-99.
- D. Sun, L. Feng, H. Shi, J. Chen, S. Liu, H. Chen, Y. Wang, Spike protein region(aa 636-789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies, *Acta Virol.*, 2006, 51, 149e156.
- Erin L. Giudice, James D. Campbell. 2006. Needle-free vaccine delivery. *Advance Drug Delivery Reviews*. 58:68-89
- Farhadian A., Dounighi N.M and Avadi M. 2015. Enteric trimethyl chitosan nanoparticles containing hepatitis B surface antigen for oral delivery. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11(12):2811-2818.
- Guo, H. C., Sun, S. Q., Jin, Y., Yang, S. L., Wei, Y. Q., Sun, D. H., ... & Luo, J. X. 2013. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. *Veterinary research*, 44(1), 1.
- Hiroshi Kiyono, Satoshi Fukuyana. 2004. NALT-versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity. *Nature reviews immunology*.4:699-710
- Holmgren J., Czerkinsky C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* 11(4): 45-53.
- Huy, N. X., Kim, M. Y., Kim, T. G., Jang, Y. S., & Yang, M. S. 2016. Immunogenicity of an S1D epitope from porcine epidemic diarrhea virus and cholera toxin B subunit fusion protein transiently expressed in infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 1-12.
- Jan Holmgren, Cecil Czerkinsky. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*. 11:S45-S53
- Jean-Pierre Amorij, Gideon F.A. Kersten, Vinay Saluja, Wouter F. Tonnis, Wouter L.J. Hinrichs, Bram Slutte, Suzanne M. Bal, Joke A. Bouwstra, Anke Huckride, Wim Jiskoot. 2012. Towards tailored vaccine delivery: Need, challenges and perspectives. *Journal of*

Controlled Release. 161(2)363–37

- Katarzyna Kuczkowska, Geir Mathiesen, Vincent G. H. Eijsink and Inger Øynebraten, *Lactobacillus plantarum* displaying CCL3 chemokine in fusion with HIV-1 Gag derived antigen causes increased recruitment of T cells, *Microb Cell Fact*, 2015, 14:169 DOI 10.1186/s12934-015-0360-z
- Kim EB., Piao DC., Son JS., Cho YJ. 2009. Cloning and Characterization of a Novel *tuf* Promoter from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Current Microbiology*. 59(4):425–431
- Kim TH., Jin H., Kim HW., Cho MH. and Cho CS. 2006. Mannosylated chitosan nanoparticle -based cytokine gene therapy suppressed cancer growth in BALB/c mice bearing CT-26 carcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics* 5(7):1723–1732.
- Klayraung S., Viernstein H. and Okonogi S. 2009. Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics* 370(1):54–60.
- Lawson LB., Norton EB. and Clements JD. 2011. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Current opinion in immunology* 23(3):414–420.
- Link-Amster H., Rochat F., Saudan KY., Mignot O. and Aeschlimann J M. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 10(1):55–63.
- Ludi, A. B., Horton, D. L., Li, Y., Mahapatra, M., King, D. P., Knowles, N. J., Russell, C. A., Paton, D. J., Wood, J. L. N., Smith, D. J., Hammond, J. M. 2014. Antigenic variation of foot-and-mouth disease virus serotype A. *Journal of General Virology*, 95(2), 384–392.
- Marvin J. Grubman, Barry Baxt. 2004. Foot-and-Mouth Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(2):465–493
- Makadiya, N., Brownlie, R., van den Hurk, J., Berube, N., Allan, B., Gerdts, V., & Zakhartchouk, A. 2016. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virology journal* 13(1), 1.
- Murugappan, S., Frijlink, H. W., Petrovsky, N., & Hinrichs, W. L. 2015. Enhanced pulmonary immunization with aerosolized inactivated influenza vaccine containing delta inulin adjuvant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66, 118–122.
- Mohana Subramanian B., Madhanmohan M., Sriraman R., Chandrasekhar Reddy R.V., Yuvaraj S., Manikumar K., Rajalakshmi S., Nagendrakumar S.B., Rana S.K., Srinivasan V.A. 2012. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. *Antiviral Research*. 96(3):288–295.
- Nanda RK, Hajam IA, Edao BM, Ramya K, Rajangam M, Chandra Sekar S, Ganesh K, Bhanuprakash V, Kishore S, Immunological evaluation of mannosylated chitosan nanoparticles based foot and mouth disease virus DNA vaccine, pVAC FMDV VP1-OmpA in guinea pigs, *Biologicals*, 2014, 42(3):153–9.

- Nils Lycke. 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature reviews immunology*. 12:592–605
- Niraj Makadiya, Robert Brownlie, Jan van den Hurk, Nathalie Berube, Brenda Allan, Volker Gerdts and Alexander Zakhartchouk, S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen, *Virology Journal*, 2016, 13:57, DOI: 10.1186/s12985-016-0512-8
- Pan L., Zhang Z., Lv J., Zhou P., Hu W., Fang Y., Chen H., Liu X., Shao J., Zhao F., Ding Y., Lin T., Chang H., Zhang J., Zhang Y., Wang Y. 2014. Induction of mucosal immune responses and protection of cattle against direct-contact challenge by intranasal delivery with foot-and-mouth disease virus antigen mediated by nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 9: 5603 - 5618.
- Pastor M., Esquisabel A., Marquínez I., Talavera A., Pedraz J. 2017. Cellulose acetate phthalate microparticles containing *Vibrio cholerae*: steps toward an oral cholera vaccine. *Journal of Drug Targeting* 22(6):478–487.
- Quan JS., Jiang HL., Choi YJ., Yoo MK. and Cho CS. 2007. Thiolated Eudragit-coated chitosan microspheres as an oral drug delivery system. In *Key Engineering Materials* 342:445–448
- Radziwill-Bienkowska JM, Zochowska D, Bardowski J, Mercier-Bonin M, Kowalczyk M, *Lactococcus lactis* IBB477 presenting adhesive and muco-adhesive properties as a candidate carrier strain for oral vaccination against influenza virus. *Acta Biochim Pol*, 2014, 61(3):603 - 607
- Simerska P., Moyle PM., Olive C. and Toth I. 2009. Oral vaccine delivery—new strategies and technologies. *Current drug delivery* 6(4): 347–358.
- Sidonia Fagarasan., Tasuku Honjo. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature reviews immunology*. 3:63–72
- Szatraj K., Szczepankowska A.K., Sączyńska V., Florys K., Gromadzka. B., Łeppek K., Płucienniczak G., Szewczyk B., Zagórski-Ostojka W and Bardowski J. 2014. Expression of avian influenza haemagglutinin (H5) and chicken interleukin 2 (chIL-2) under control of the *ptcB* promoter in *Lactococcus lactis*. *Acta Biochimica Polonica* 61(3):609–614.
- Wang M., Pan L., Zhou P., Lv J., Zhang A., Wang Y., Zhang Y. 2015. Protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in Guinea Pigs via Oral Administration of Recombinant *Lactobacillus plantarum* Expressing VP1. *PLOS ONE* 10(12):e0143750.
- Wegmann F., Gartlan KH., Harandi AM., Brinckmann SA., Coccia M., Hillson WR. and Puthia M. 2012. Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens. *Nature biotechnology* 30(9):883–888.
- Xiao Y, Chen HY, Wang Y, Yin B, Lv C, Mo X, Yan H, Xuan Y, Huang Y, Pang W, Li X, Yuan YA, Tian K, Large-scale production of foot-and-mouth disease virus (serotype Asia1) VLP vaccine in *Escherichia coli* and protection potency evaluation in cattle, *BMC Biotechnology*, 2016, 2:16(1):56
- Yoo MK., Kang SK., Choi JH., Park IK., Na HS., Lee HC., Kim EB., Lee NK., Nah

- JW., Choi YJ., Cho cs. Targeted delivery of chitosan nanoparticles to Peyer's patch using M cell-homing peptide selected by phage display technique. *Biomaterials*. 31(30):7738-7747
- Young-Woock Noh., Ji Hyun Hong., Sang-Mu Shim., Hye Sun Park., Hee Ho Bae., Eun Kyoung Ryu., Jung Hwan Hwang., Chul-Ho Lee., Seong Hun Cho., Moon-Hee Sung., Haryoung Poo., Yong Taik Lim. 2013. Polymer Nanomicelles for Efficient Mucus Delivery and Antigen-Specific High Mucosal Immunity. *Angewandte chemie*. 125(30):7838-7843.
 - Yu F., Li Y., Wang L., Yang J., Zhao G., Zhou Y., Du L and Jiang S. 2015. Intranasal vaccination of recombinant H5N1 HA1 proteins fused with foldon and Fc induces strong mucosal immune responses with neutralizing activity: Implication for developing novel mucosal influenza vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11(12):2831-2838.
 - Zhang Y. Zhang X., Liao X., Huang X., Cao S., Wen X., Wen Y., Wu R., Liu M. 2016. Construction of a bivalent DNA vaccine co-expressing S genes of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Virus Genes* 52:354 - 364.
 - Zhang, Z., Pan, L., Ding, Y., Zhou, P., Lv, J., Chen, H., ... & Shao, J. (2015). Efficacy of synthetic peptide candidate vaccines against serotype-A foot-and-mouth disease virus in cattle. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1389-1398.
 - [Http://www.lookchem.com/Hydroxypropyl-methylcellulose-phthalate/](http://www.lookchem.com/Hydroxypropyl-methylcellulose-phthalate/)
 - 건국대학교 수의과대학. 2004. 유산균백터를 이용한 돼지로타바이러스 감염증 및 돼지증식성회장염 예방 백신개발. 농림부
 - 녹십자수의약품(주) 「경구용PED백신」 세계 최초 ‘먹이는’ 백신...접종 스트레스 해소. 2015. 축산경제신문 (2015.05.29. 기사).
 - 동물용 백신의 연구개발 동향. 2007. 한국미생물생명공학회.
 - 미국 NIH의 백신연구 및 개발 동향, 2015, 한국산업기술평가관리원.
 - 박영호. 2016. 동물용 백신의 연구개발 동향. (주)고려비엔피.
 - 양문식. 2010. 형질전환 식물을 이용한 경구백신 개발 및 현황. 전북대학교.
 - 유한상. 2011. 구제역:원인체의 특성, 국내, 외 발생 상황 및 예방대책
 - 이성규, 이새라. 동물 약품 시장 동향. 2014. 한국보건산업진흥원 보건산업기술이전센터.
 - 장희원, *Global Agribusiness Annual 2016:동물용의약품산업, 세계농업 제 188호*, 2016.
 - 1945년 첫 개발 이래 ‘인류 생명 지킴이’역할, 2013, 한국보건산업진흥원.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.