

발간등록번호

11-1543000-000274-01

포유류 유래 인플루엔자 바이러스에 대한
M2e 서브유닛 백신 산업화

(Commercialization of M2e subunit vaccine of
mammalian origin influenza viruses)

녹십자수의약품 주식회사

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “**포유류 유래 인플루엔자 바이러스에 대한 M2e 서브유닛 백신 산업화에 관한 연구**”
과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 10월 일

주관연구기관명 : 녹십자수의약품 주식회사

주관연구책임자 : 강 보 규

세부연구책임자 : 강 보 규

연 구 원 : 김 종 만

연 구 원 : 문 형 준

연 구 원 : 황 정 민

연 구 원 : 손 동 현

연 구 원 : 한 상 윤

연 구 원 : 선 보 현

연 구 원 : 김 용 환

협동연구기관명 : 농림축산검역본부

협동연구책임자 : 안 동 준

요 약 문

I. 제 목

포유류 유래 인플루엔자 바이러스에 대한 M2e 서브유닛 백신 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

돼지 인플루엔자 바이러스 (SIV) 및 개 인플루엔자 바이러스 (CIV)의 효과적인 예방을 위한 우수한 백신의 개발, 생산, 및 보급

III. 연구개발 내용 및 범위

- 국내 유행하는 돼지 인플루엔자 바이러스 (SIV) 및 개 인플루엔자(CIV) 바이러스에 대한 원인체 확보 및 역학과 유형 조사
 - 다양한 분리주들의 유전자 분석을 통한 분자역학조사
 - 바이러스 분리를 통한 향후 비교 분석 시험 및 교차 방어 시험 활용을 위한 바이러스 확보
- 돼지인플루엔자 바이러스 (SIV) 및 개 인플루엔자(CIV) 바이러스에 대한 우수한 백신의 개발, 생산, 및 보급
 - 포유류 인플루엔자에 Universal한 항원성을 부여하는 M2e 단백질 발현 기술 확립
 - 동물용 백신 생산을 위한 경제적이고 효율 높은 발현 시스템을 이용한 백신 생산 공정의 표준화
 - M2e 단백질을 이용한 Subunit 백신 개발 및 효과적이고 안전한 adjuvant 기술 접목 및 선발
 - 개발되어진 M2e 재조합 단백질 백신의 비침습적이고 효과적인 백신 접종 루트 개발

IV. 연구개발결과

- 국내 분리 인플루엔자 유전자원 확보
- 3M2e subunit단백질의 백신 후보주로서의 효능 확인

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 3M2e을 이용하여 현재 상용화된 돼지 및 개 인플루엔자 불활화 백신의 예방 효과 향상
- 추후 기존 인플루엔자의 유전적 변이 발생시 활용할 수 있도록 기존백신의 품질 향상

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Commercialization of M2e subunit vaccine of mammalian origin influenza viruses

II. Objective and necessity of the research

Development of vaccines for prevent swinf influenza virus (SIV) and canine influenza virus (CIV) infection

III. Contents and scope

- Epidemiological study of the SIV and CIV in Korea.
 - Molecular-epidemiological study for different isolates
 - Virus isolation for characterization and cross protection study
- Development, producion and marketing of the effective influenza vaccine against SIV and CIV
 - Establishment of the expression process for M2e subunit protein presenting universal antigenicity
 - Standardization of the veterinary vaccine manufacturing procedure using effective and economic protein expression system for animal vaccine
 - Application and selection of the safe and effective adjuvant for M2e protein containing subunit vaccine
 - Development of noninvasive and effective administration route with the M2e recombinant protein vaccine

IV. Results

- Isolation of canine influenza and equine influenza virus
- Confirmation of the 3M2e subunit protein as vaccine candidates

V. Outcome of the research and its application plan

- Improvement of the vaccine efficacy using 3M2e subunit protein
- Improvement of the influenza vaccine prepare for genetic variation in influenza virus

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research	7
Section 1. Necessity of the research	7
Section 2. Scope of the research	9
Chapter 2. Information of the related research	10
Chapter 3. Contents and results of the research	11
Section 1. Isolation and characterization of the Korean influenza virus	11
Section 2. Manufacture and validation of the Influenza vaccine containing M2e subunit protein	19
Section 3. Assessment of the cell mediated immunity against influenza virus	32
Chapter 4. Achievement and contribution of the research	38
Section 1. Annual goals and achievement	38
Section 2. Contribution to the related field	40
Chapter 5. Outcome of the research and its application plan	41
Section 1. Outcome of the research	41
Section 2. Application plan of the research outcome	43
Chapter 6. The acquired scientific information during the study	44
Chapter 7. References	46

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 1 절 연구개발의 필요성	7
제 2 절 연구 개발의 목표 및 범위	9
제 2 장 국내외 개발 현황	10
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	11
제 1 절 국내 분리 인플루엔자 바이러스의 특성 연구	11
제 2 절 M2e protein포함백신의 제작 및 평가	19
제 3 절 인플루엔자 백신에 대한 세포성 면역 확인	32
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	38
제 1 절 연차별 목표 및 달성도	38
제 2 절. 관련분야 기여도	40
제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용 계획	41
제 1 절 연구개발 성과	41
제 2 절 성과활용계획	43
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	44
제 7 장 참고 문헌	46

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

전 세계적으로 신종플루라고 불리는 인플루엔자 바이러스 감염이 크게 유행이 있었고 이후 지속적으로 인플루엔자 감염에 대한 관심과 경계심이 증가하고 있다. 인플루엔자 바이러스 감염은 발열, 기침을 동반하는 호흡기 질환을 동반하며 심할 경우 사망에 까지 이르게 할 만큼 병원성을 지니고 있으며, 폭발적인 감염력을 지니고 있어 빠른 시간에 많은 감염을 유발할 수 있는 특징 때문에 많은 관심을 받고 있다. 돼지의 경우에도 돼지인플루엔자 바이러스 (Swine influenza virus; SIV)가 유행하고 있으며, 최근에 문제가 되고 있는 신종플루의 유전자 분석결과 유전자의 대부분이 SIV의 유전자와 매우 유사한 것으로 알려져 있어 관심을 더하고 있다. 특히 돼지의 경우 조류인플루엔자의 수용체인 2,3 수용체와 사람인플루엔자의 수용체인 2,6 수용체를 모두 보유하고 있기 때문에 mixing vessel이라 불리며 (그림1), 여러 종 유래의 인플루엔자 바이러스가 재조합되는 공장으로서 알려져 있다. 과거에도 돼지인플루엔자가 인체에 감염되는 사례나, 사람 인플루엔자바이러스가 돼지에 감염되는 사례는 종종 보고되어 왔으나, 이런 사례들은 모두 사람 대 사람, 돼지 대 돼지와 같은 확장된 감염양상이 아니라, 감염개체에서만 국한되는 양상을 보였고, 특히 돼지인플루엔자바이러스의 사람감염의 예에서는, 주로 돼지와 접촉하는 양돈전문수의사, 양돈장의 노동자등에서만 국한적으로 발생해왔다. 본 연구팀이 돼지인플루엔자 바이러스를 연구한 결과, 국내에서도 활발히 감염이 이루어지고 있고, 또한 최근에는 사람 인플루엔자 바이러스가 돼지에 감염된 사례도 보고가 되고 있어, 추가적인 연구가 더욱 요구되는 상황이다 (표1, Lee et al., 2009, Song et al., 2007). 또한 돼지에서는 인플루엔자 바이러스가 호흡기 질환의 주요한 원인으로 알려져 있으며, 돼지호흡기복합질환 (PRDC)와 같은 호흡기 질환의 원인으로 소모성 질환등을 유발하여, 양돈농가에 큰 경제적인 피해를 유발하고 있다. 따라서 국내 양돈농가의 경제적인 피해의 유발을 예방하고, 중간전파의 매개체가 되는 돼지에서 인플루엔자 바이러스의 감염을 효과적으로 예방하기 위한 대책이 필요하다.



그림 1. 인플루엔자바이러스에 대한 숙주별 수용체 모식도

또한 최근에, 2006년 하반기와 2007년도에 걸쳐, 수도권외 동물병원을 중심으로 조류유래의 인플루엔자 바이러스 H3N2에 의한 개 인플루엔자 바이러스가 급성의 호흡기 증상을 나타내는 CASE가 보고되었다(Song et al 2008; Song et al., 2009). 애완견에서 발생한 개 인플루엔자 바이러스는 비병원성 조류인플루엔자가 애완견에 감염되어 심각한 호흡기 질환을 일으킨 것으로 지금까지 알려진 개 인플루엔자 바이러스 H3N8과는 다른 아형으로, 종간의 벽을 극복하여 감염된 것으로 주목을 받고 있다. 따라서 개에서의 인플루엔자에 의한 급성의 호흡기 질환을 예방하기 위해서 뿐만이 아니라, 인플루엔자 전염에 있어서 중간전파의 매개체가 되는 것을 예방하고, 재조합의 가능성이 큰 Carrier가 되는 것을 방지하기 위해서 효과적인 백신이 필요한 실정이다.

이상에서 언급한 개와 돼지 이외에 국내에서는 말에서 인플루엔자 백신을 사용하고 있다. 말에서 사용하는 인플루엔자 백신의 경우 그 목적이 말 산업, 특히 경마 산업에 있어서 인플루엔자의 발병이 미치는 영향이 매우 크기 때문에 백신을 적용하고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 이상에서 언급한 세 가지 종류의 포유동물에서 사용되는 백신중 돼지와 개에 사용되는 백신은 국산화가 성공적으로 이루어 졌으나 말 백신의 경우 아직 국산화가 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 말 인플루엔자 백신의 경우에도 기존의 외국백신을 대체할 수 있는 국산 백신의 개발이 필요한 실정이다.

경제적인 측면에서의 본 기술의 필요성은 백신제조에서 생산단가를 획기적으로 절감할 수 있는 부분과 국내 축산업에 미치는 경제적인 피해를 줄일 수 있다는 측면으로 나눌 수 있다. 예를 들어 현재의 불활화 백신을 만드는 생산 단가가 순수 발육란의 재료비가 600원/dose이지만, 국제백신연구소에서 확립한 벡터에 발현할 경우, 50원/dose정도로 획기적인 원가절감을 통한 상업화에 우위를 점할 것으로 기대되고 있습니다. 또한 돼지 인플루엔자, 조류 인플루엔자나 개 인플루엔자 등의 창궐로 양돈업, 양계산업 및 육견산업에 큰 경제적인 피해를 유발하고 있는데, 본 기술이 개발되어 상용화 될 경우, 부가가치를 크게 창출할 것으로 예상된다. 예를 들어, 금년에 전세계적으로 창궐했던 신종플루 발생의 경우 신종플루 바이러스가 돼지 인플루엔자 바이러스와 유전적 근연관계만 확인 되었을 뿐 돼지에서 사람으로 전파되었다는 구체적인 정황이 없음에도 불구하고 돼지를 둘러싼 우려를 증폭시켰다. 일례로 아래 그래프(그림 2)에서 보는 바와 같이 최근 3년간 지육가격 월간 변동 자료를 보면 예년의 경우에는 3월에서 6월 중순까지 지육가격이 일반적으로 상승하는 추세를 보여주는 것을 확인할 수 있으나 2009년 4월 말 미국, 멕시코에서 시작된 신종플루의 여파로 국내 지육가격이 4월에서 6월까지 급격하게 하락하는 것을 볼 수 있다. 물론 신종플루 이외의 다른 영향도 완전히 배제할 수 없는 상황이었지만, 신종플루도 일정부분 영향을 미쳤음을 간과할 수 없다고 볼 수 있다.

그러나 중요한 것은 공중 보건학적 필요성이다. 상술한 신종플루의 경제적 파급효과 외에 인수공통 전염병의 측면에서 바라본다면 돼지에는 사람에 존재하는 인플루엔자 바이러스의 수용체인 SA a2,6-gal이 존재하기 때문에 돼지에 존재하는 인플루엔자가 사람으로 전파될 가능성이 항상 조명되어왔다. 그래서 양돈용 백신의 개발 및 산업화를 통하여 돈군내 인플루엔자 바이러스 전파 방지 및 잠재적으로 존재할 가능성이 있는 돼지에서 사람으로의 전파 방지를 통한 새로운 유입경로 차단을 위해 필요하다.

제 2 절 연구 개발의 목표 및 범위

돼지인플루엔자 바이러스 (SIV) 및 개 인플루엔자 바이러스 (CIV)의 효과적인 예방을 위한 우수한 백신의 개발, 생산, 및 보급

가. 국내 유행하는 돼지 인플루엔자 바이러스 (SIV) 및 개인플루엔자(CIV) 바이러스에 대한 원인체 확보 및 역학과 유형 조사

- 다양한 분리주들의 유전자 분석을 통한 분자역학조사
- 바이러스 분리를 통한 향후 비교 분석 시험 및 교차 방어 시험 활용을 위한 바이러스 확보

나. 돼지인플루엔자 바이러스 (SIV) 및 개인플루엔자(CIV) 바이러스에 대한 Universal한 방어 효과를 갖는 M2e protein 기반의 subunit 백신의 개발, 생산, 및 보급

- 포유류 인플루엔자에 Universal한 항원성을 부여하는 M2e 단백질 발현 기술 확립
- 동물용 백신 생산을 위한 경제적이고 효율 높은 발현 시스템을 이용한 백신 생산 공정의 표준화
- M2e 단백질을 이용한 Subunit 백신 개발 및 효과적이고 안전한 adjuvant 기술 접목 및 선발

다. 개발되어진 M2e 재조합 단백질 백신의 효과적인 백신 접종 루트 (Per oral, Intranasal, Sublingual route 등)의 확보

- 제조된 시험백신을 이용하여 면역원성과 방어효능을 극대화 시킬 수 있는 접종 경로에 대한 연구

제 2 장 국내외 개발 현황

국내외 많은 연구자들이 인플루엔자에 대한 범용 백신 개발을 위해 본 연구와 같은 M2e 부위를 타겟으로 하여 연구들을 진행하였다. 그중 일부는 M2 부위가 아닌 HA부위에서 여러 아형간 공통적인 항원인식 부위를 단백질 구조분석을 통해 도출해 내어 그 부위에 대한 백신을 실시하여 방어효과를 분석했을 뿐만 아니라 해당 구조를 이용하여 인플루엔자 감염에 대한 항 바이러스제 개발에 대한 새로운 실마리를 제시한 바 있다.

본 연구와 동일한 타겟 부위인 M2e를 사용하지만 다른 연구에서는 subunit백신이 아닌 DNA백신에 대한 연구를 진행하여 M2e부위를 coding하는 DNA를 접종했을 때 다른 아형에 대한 교차 방어가 일부 일어나는 것을 확인하기도 하였다.

VLP (Virus-like particle)에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있는 분야중 하나로 인플루엔자 바이러스, 특히 고병원성 H5N1에 대한 VLP를 제작, 특히 H5, N1 부위 이외에 M2e 이렇게 세가지 단백질을 이용하여 VLP 백신을 제작하여 신종플루 H1N1과 신종플루 이전 계절독감 H1N1에 대해서도 hetero subtypic 한 방어효과를 보이는 것을 확인하였다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 국내 분리 인플루엔자 바이러스의 특성 연구

1. 최근 분리·검출되는 개 인플루엔자바이러스의 유전학적 특성분석

2007년 이후 국내에서 분리 검출된 개 인플루엔자 바이러스에 대하여 HA부위에 대하여 염기서열 분석을 실시한 결과 2007년이 검출된 개인플루엔자 바이러스는 유전학적으로 이전에 분리검출되었던 개 인플루엔자 바이러스와 구별되는 특징을 나타내는 것으로 판단된다. 최초 검출된 바이러스로부터 시간이 지남에 따라 유전학적 변이가 축적되는 양상을 보이므로 본 과제 이후로도 관계당국이나 연구소 역학조사 사업으로 지속적인 모니터링이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

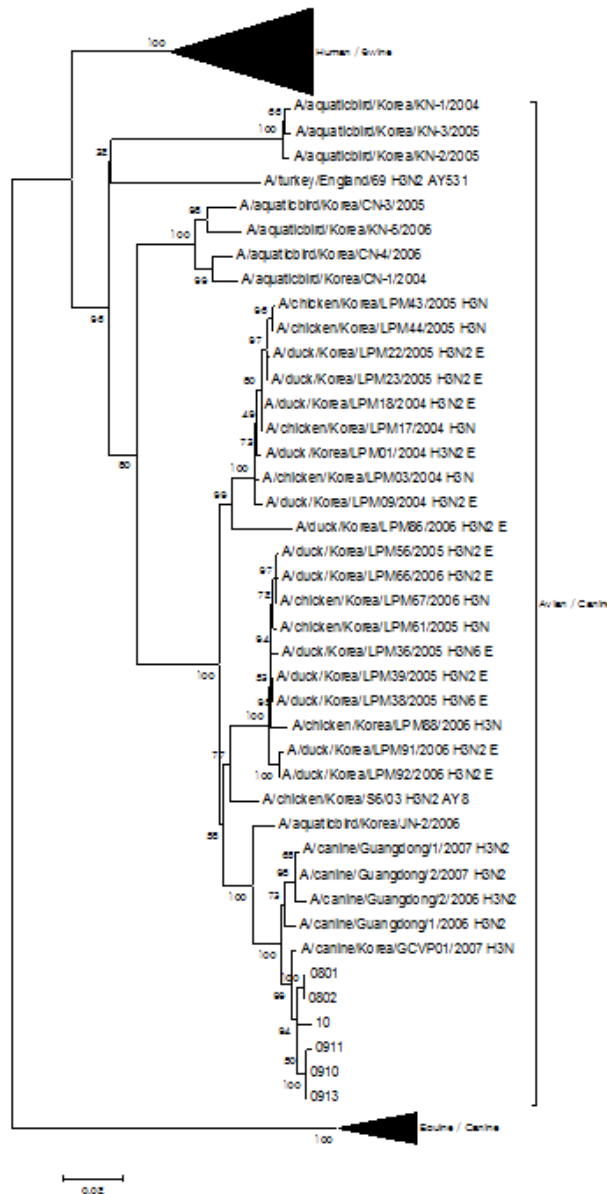


그림 2. 2007년 이후 분리된 개 인플루엔자 바이러스의 유전학적 특징 (HA유전자)

2. 재조합 개 인플루엔자 바이러스 H3N1의 특성조사

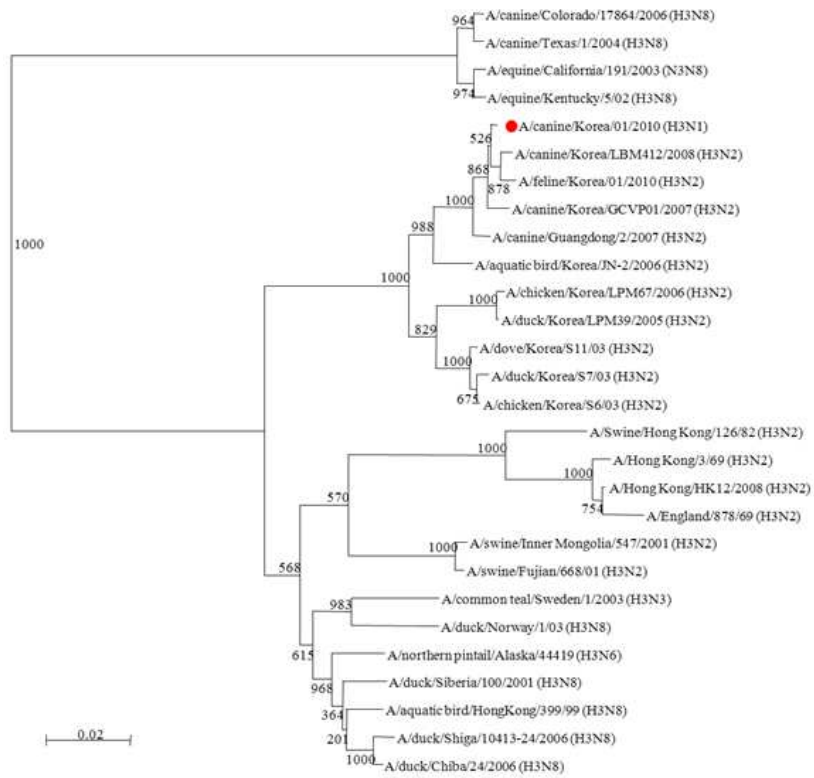
농림축산검역본부, 녹십자수의약품, (주) 바이오노트와 협동으로 실시중인 국내 반려동물에서의 인플루엔자 바이러스 surveillance 프로그램에서 2009년도에 전국에 유행했던 pandemic H1N1 바이러스와 기존의 H3N2 개 인플루엔자의 재조합 바이러스 H3N1이 검출되어 아래와 같이 특성이 규명되었다. 또한 새로 발견된 H3N1과 기존 신종플루 pH1N1이 동시 감염된 mixed infection 사례도 확인하여, 폐렴에서 병원성 비교를 실시하였다. 특이적으로 신종플루 바이러스와 혼합 감염된 바이러스에서 접촉감염을 유발하는 것으로 확인하였다.

표1. 새로 분리된 개 인플루엔자 H3N1주와 다른 바이러스 (pH1N1, 개 인플루엔자 바이러스)와의 각 유전자의 상동성 비교

Homology of the genes of A/canine/Korea/01/2010 influenza virus (H3N1) isolated in South Korea with related sequences in the Genbank				
Gene†	Virus with highest identity	Origin	Identity, %	Accession no.
HA	A/canine/Korea/GCVP01/2007 (H3N2)	Canine (H3N2)	99	EU127500
NA	A/Finland/631/2009 (H1N1)	Pandemic (H1N1)	99	HQ247664
PB1	A/Russia/171/2009 (H1N1)	Pandemic (H1N1)	99	CY054669
PB2	A/Madrid/IN8130/2009 (H1N1)	Pandemic (H1N1)	99	CY083744
PA	A/Malaysia/12617/2009 (H1N1)	Pandemic (H1N1)	99	CY055278
NP	A/swine/Korea/SCJ41/2010 (H1N1)	Pandemic (H1N1)	99	HM189646
M	A/California/VRDL4/2010 (H1N1)	Pandemic (H1N1)	99	CY086983
NS	A/Zhejiang/DJID-ZJU03/2009 (H1N1)	Pandemic (H1N1)	99	GU189653

†HA, hemagglutinin; NA, neuraminidase; PB, polymerase basic protein; PA, polymerase acidic protein; NP, nucleocapsid protein; M, matrix protein; NS, nonstructural protein.

(A)



(B)

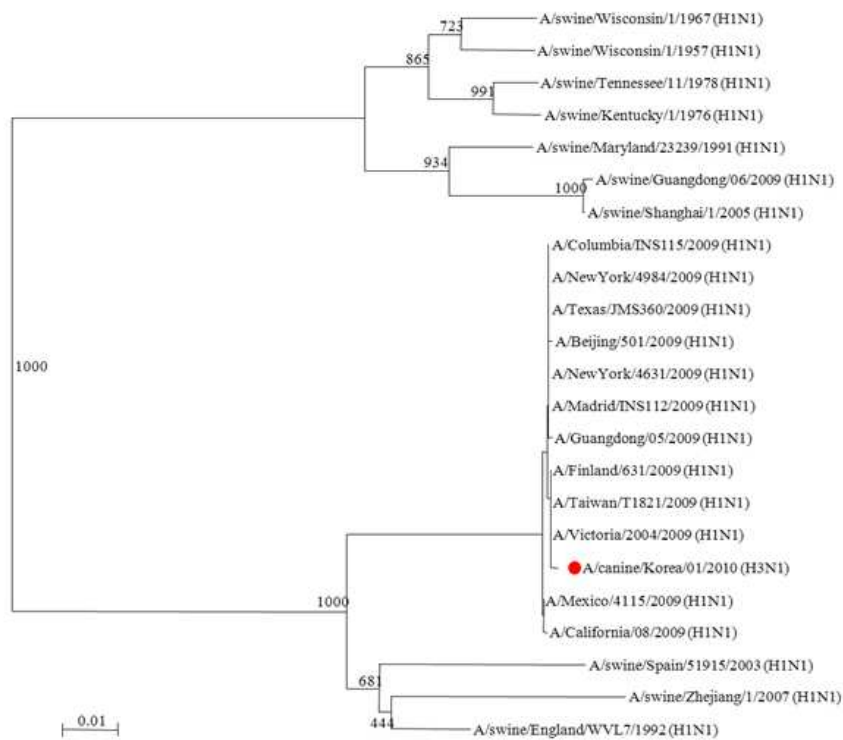


그림3. 새로분리된 개 인플루엔자 H3N1바이러스의 HA부위(A)와 NA부위 (B)의 유전학적 비교

3. 국내 스타드 팜에서 말인플루엔자 H3N8바이러스 분리 및 특성 규명

가. 바이러스 분리 및 염기서열 분석

국내 경기도 소재의 스타드팜에서 호흡기 비강 샘플을 채취하여 바이러스 분리를 시도하였다. 바이러스 양성 샘플에서 1주의 말 인플루엔자 H3N8바이러스를 분리했으며, 염기서열 분석을 통해 근연관계를 확인했다. 분석결과 분리바이러스는 몽고나 일본에서 기 분리된 바이러스와 유전학적으로 매우 유사 했다. 또한 NS 유전자 부위에 자연적인 염기서열의 결손부위가 확인되어, 추후 본 결손부위와 바이러스의 기능과의 상관관계에 대한 연구가 필요하다. 그리고, 분리된 바이러스의 국내 유행도를 파악하기 위한 혈청학적 역학조사 추가 연구가 수행되어야 한다.



그림4. 국내 경기도 소재 스타드팜에서의 비강샘플링

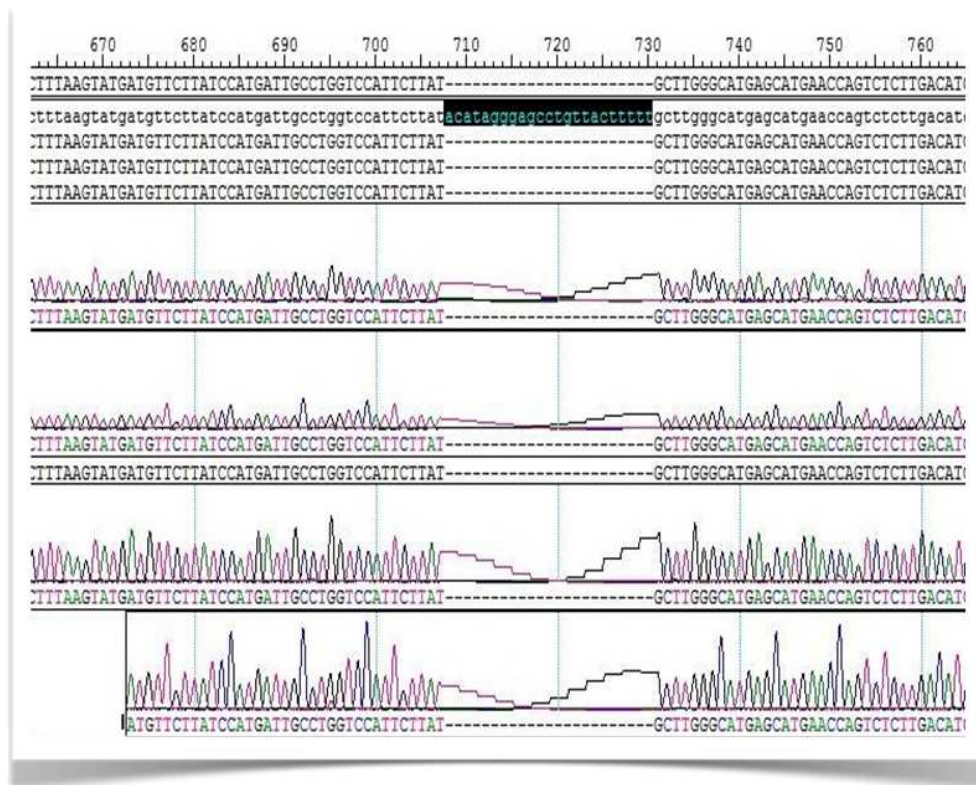
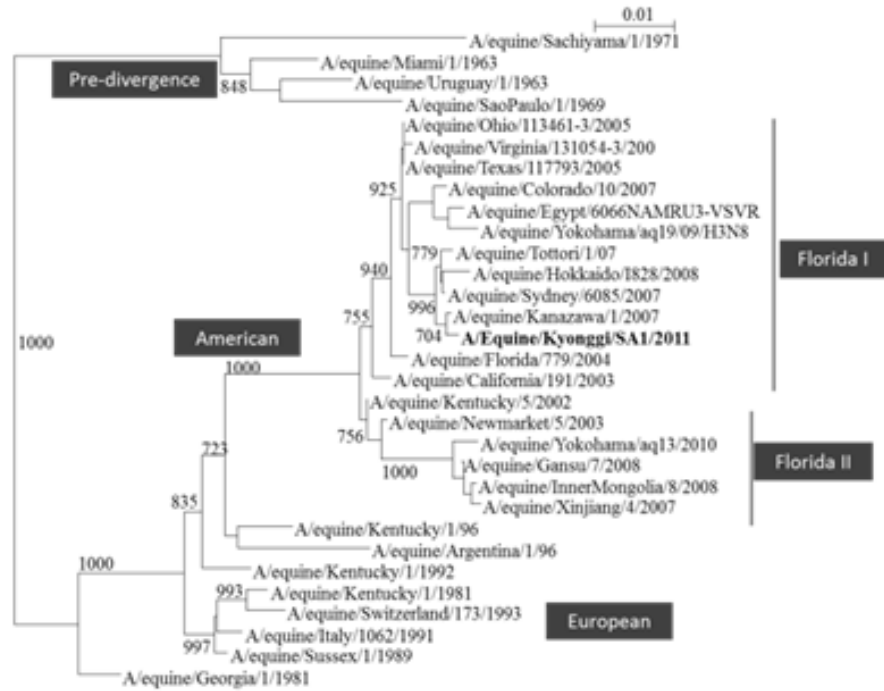


그림5. 분리된 H3N8바이러스의 NS 유전자의 결손부위

(A)



(B)

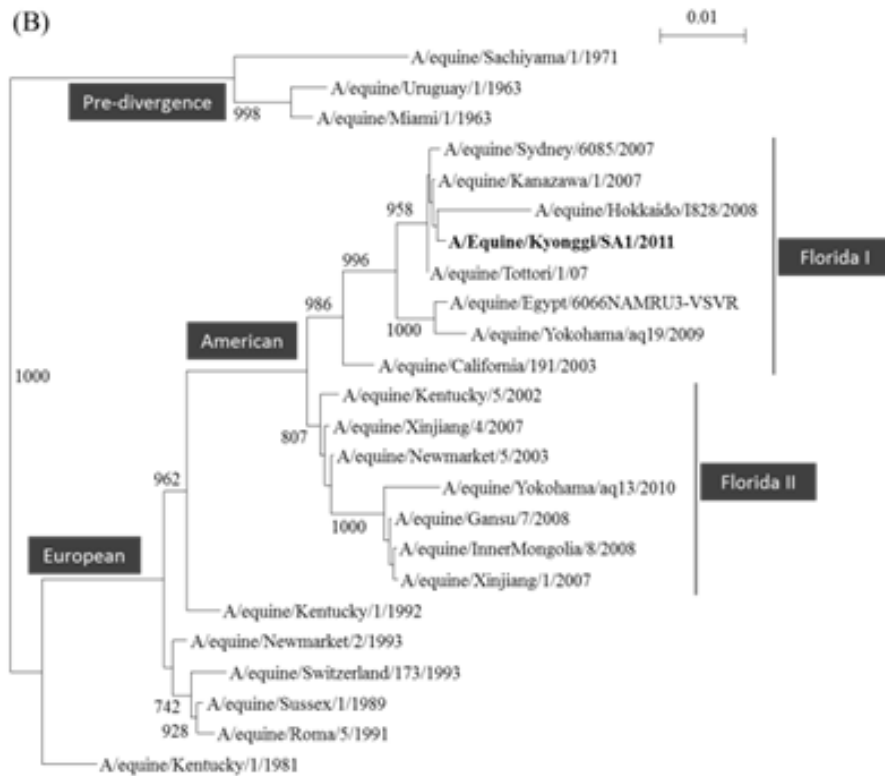


그림6. 염기서열 분석을 통한 유전학적 근연관계 분석(HA, NA 유전자)

나. 분리된 바이러스의 마우스 병원성 시험

분리된 말 인플루엔자 바이러스 (H3N8)을 마우스에 접종하여 체중 변화등 병원성을 확인한 결과 유의적인 체중감소등의 병원성이 확인 되지 않았다.

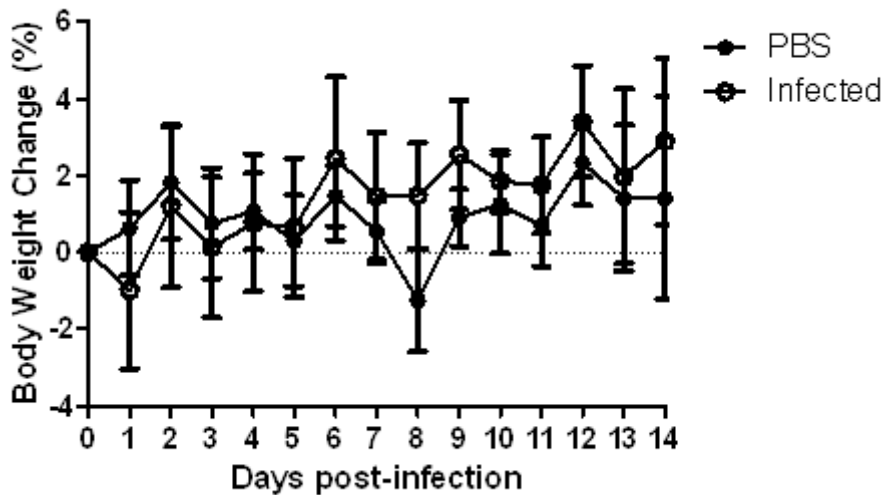


그림7. C57/B 마우스 모델에서의 말 인플루엔자 바이러스 분리주의 병원성 분석

4. 재조합 개 인플루엔자 바이러스 H3N2 분리 및 특성조사

개 인플루엔자 바이러스의 모니터링 결과 2012년 재조합된 H3N2 개 인플루엔자 바이러스 (CIV H3N2)를 분리하였다.

본 바이러스는 기존 연구에서 분리된 H3N1 CIV 재조합 바이러스와는 달리 8개의 유전자중 7개는 기존의 개 인플루엔자 H3N2 유래 였으나 Matrix (M) gene만 신종플루바이러스 (pH1N1) 유래의 새로운 유형의 재조합 바이러스였다. 이미 미국에서는 기존의 H3N2바이러스와 pH1N1인플루엔자 바이러스의 M gene간의 재조합이 보고되었으나 개 인플루엔자 바이러스에서 위와 같은 재조합은 처음 보고된 것이다. 따라서 본 바이러스의 유전정보를 Gene bank에 등록하였으며 분리바이러스를 이용하여 병원성 및 바이러스학적인 특성에 대한 조사를 하여 현재 논문 투고중이다.

가. H3N2 CIV M variant의 유전학적 특징

해당 바이러스의 8개 유전자 분절중 PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, NS유전자는 기존의 H3N2 CIV와 99%이상 일치했으나 오직 M 유전자만 2009년이후 유행한 pH1N1바이러스의 유전자와 99.7%의 상동성을 보였다 (표2).

나. H3N2 CIV M variant 병원성 및 전파

분리된 바이러스를 실험동물인 페렛과 원숙주인 개에 인공감염 시켜 병원성과 바이러스 전파 향상을 확인하였다. 그 결과 체온상승등 인플루엔자 감염의 병원성을 보였으며 접촉감염도 원활하게 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

표2. H3N2 CIV M variant 유전자의 상동성 비교

Gene	Nucleotide similarity	Origin/subtype	%	Accession no.
PB2	A/Canine/Korea/01/2007(H3N2)	Canine/H3N2	99.9	JX163253
PB1	A/Canine/Korea/GCVP01/2007(H3N2)	Canine/H3N2	100	FJ560889
PA	A/Canine/Korea/GCVP01/2007(H3N2)	Canine/H3N2	100	FJ560888
HA	A/Canine/Korea/01/2007(H3N2)	Canine/H3N2	99.5	JX163256
NP	A/Canine/Korea/GCVP01/2007(H3N2)	Canine/H3N2	99.9	FJ560887
NA	A/Canine/Guangdong/02/2007(H3N2)	Canine/H3N2	99.8	GU433363
M	A/Korea/S1/2009(H1N1)	Pandemic/H1N1	99.7	CY069622
NS	A/Canine/Korea/GCVP01/2007(H3N2)	Canine/H3N2	100	FJ560886

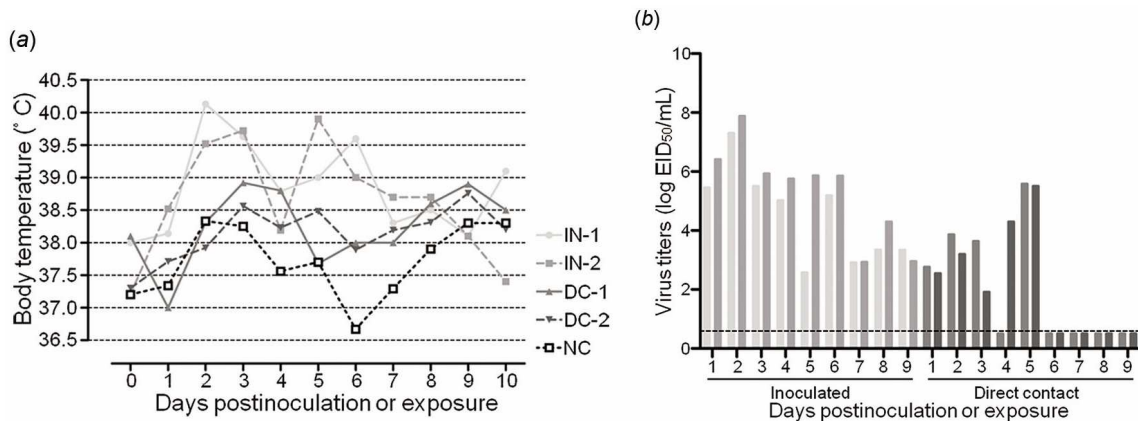


그림8. H3N2 CIV M variant의 개에서의 병원성 및 접촉감염 양상

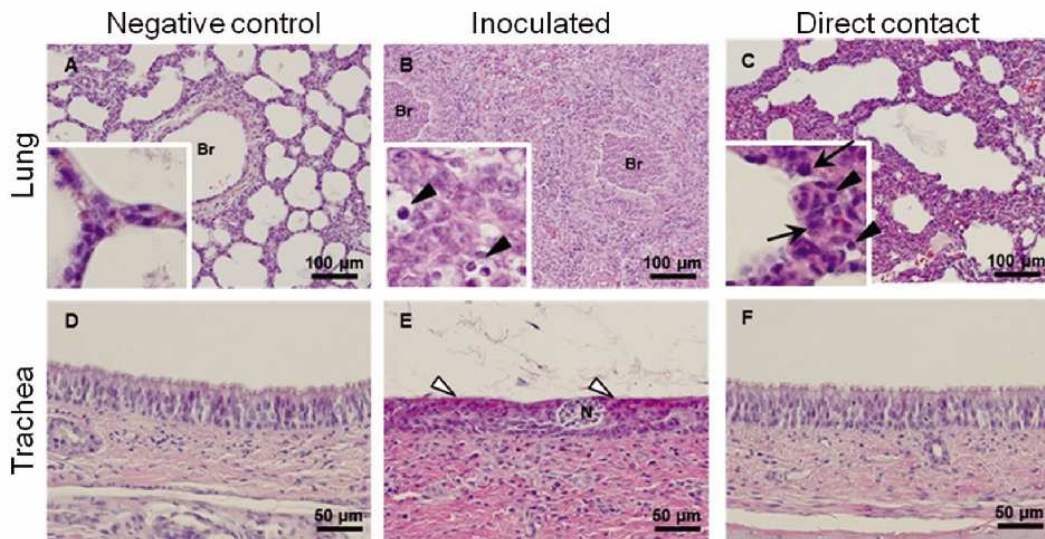


그림9. H3N2 CIV M variant이 감염된 개에서의 병리조직학적 병변. 감염된 개체에서 인플루엔자 감염에서 나타나는 괴사성 폐렴 (necrotizing pneumonia)병소가 확인되었다.

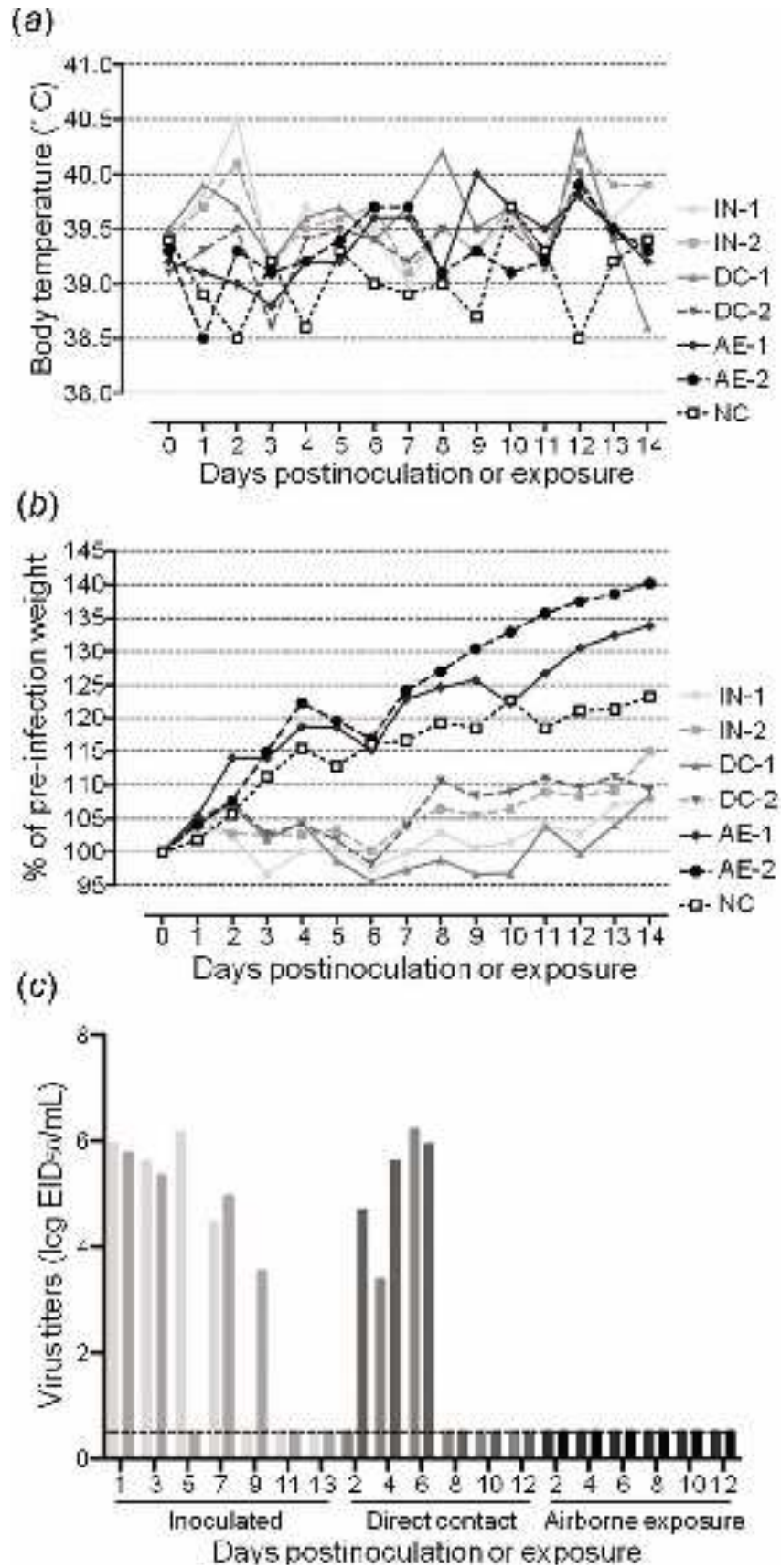


그림10. H3N2 CIV M variant의 페렛에서의 병원성 및 접촉감염 양상

제 2 절 M2e protein포함백신의 제작 및 평가

1.포유류 인플루엔자 바이러스에 대한 Universal한 방어가 가능한 M2e 재조합 단백질 발현

가. 개와 돼지 인플루엔자 바이러스의 아형에 따른 면역원성의 차이를 극복하며, 넓은 범위의 교차 방어를 가능케 하는 Matrix protein 2 의 Ectodomain (M2e)의 대량 발현 기술 정립

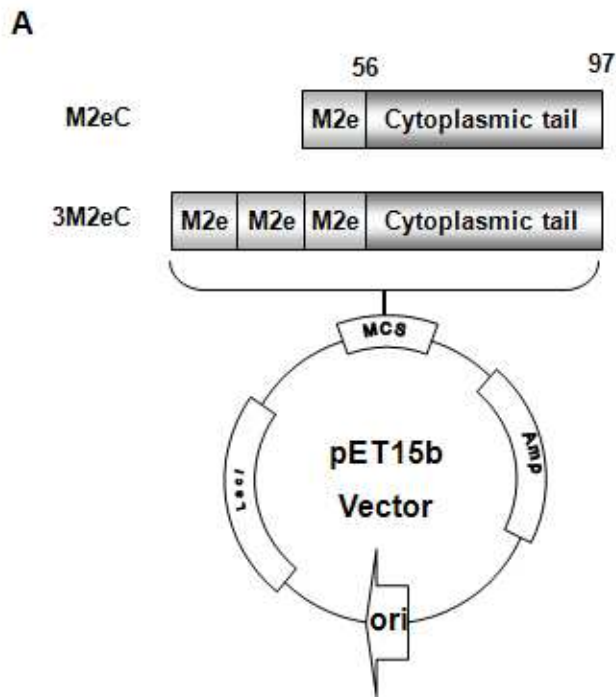


그림11. M2e 단백질 제작 scheme

나. 재조합 M2eC, 3M2eC 단백질 함유 백신에 대한 마우스 면역원성 및 효능평가 실시 (그림12)

- M2eC, 3M2eC, 3M2eC+Cholera-Toxin (CT)를 이용하여 마우스에 백신을 실시했을 때 마우스에서 유의적인 면역원성 측정
- 공격접종 후 체중변화와 생존율을 확인하여 백신의 방어효능을 확인

다. 3M2e를 이용하여 시험백신 제조 후 마우스에 백신 후 PR8 (A/H1N1) 과 H5N2바이러스를 접종 후 생존율과 체중변화를 측정하여 시험백신의 실험동물에서의 효능 평가 (그림13)

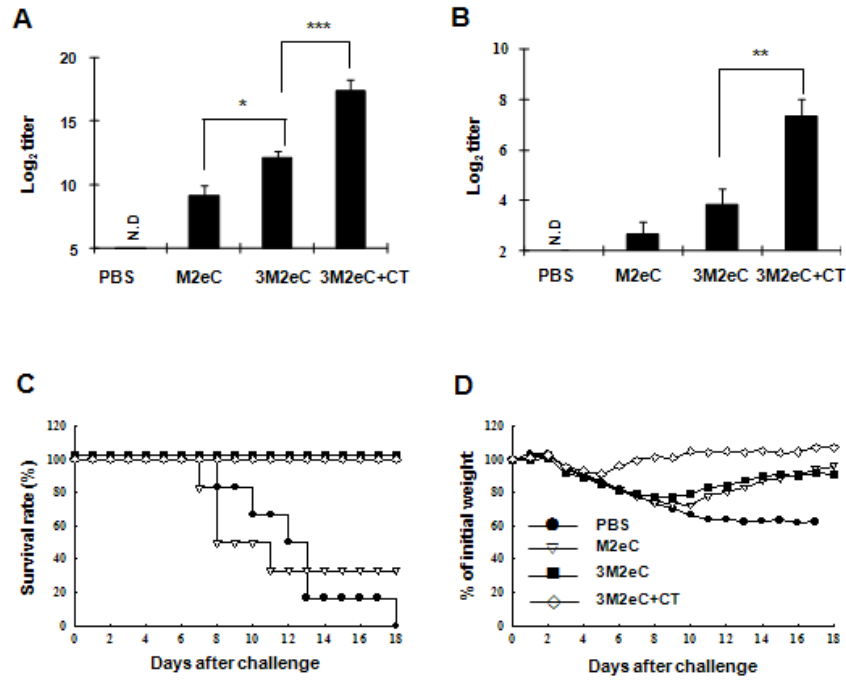


그림12. 마우스 모델에서의 M2e백신 후보 적용 후 평가결과

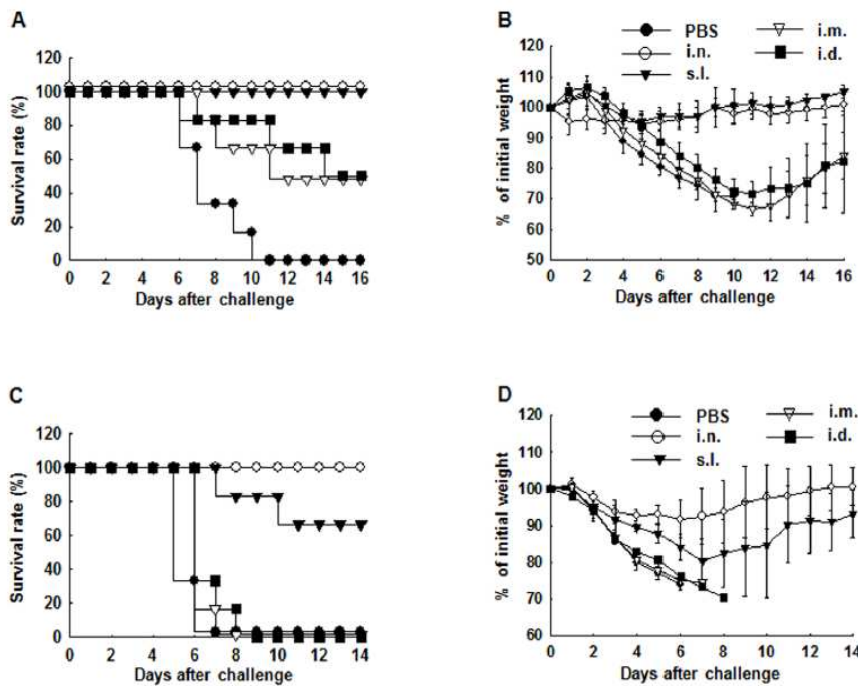


그림13 . 3M2e적용 후 PR8(H1N1)(A,B) 및 H5N2 (C,D)에 대한 방어능

라. 실험동물에 M2e단백질을 이용하여 백신을 실시한 결과 마우스에서 M2e함유 백신의 면역원성이 확인되었다. 백신을 한 동물에 인플루엔자 바이러스를 공격접종하여 생존율과 체중변화로 효능을 평가한 결과 유의적으로 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 실험동물에서의 결과를 바탕으로 M2e단백질의 면역원성과 효능에 대한 기초 정보를 확보할 수 있었다.

2. M2e 함유 시험백신의 개 및 말에서의 면역원성 및 방어효능 평가

가. 말인플루엔자 시험백신에서의 효능평가

말인플루엔자 virus 백신 후보주의 실험동물에서의 효능 및 3M2e의 영향을 확인하기 위해서 각 그룹당 기니픽 3두씩을 공시하여, 백신을 접종하였다. 백신 후보주는 split백신으로 제조하였고, 2주간격으로 2회 백신 후, 2차 접종 2주후에 채혈하여 혈청역가를 측정하였다. 3M2e의 용량은 100ug/dose를 접종하였고, 아래의 그래프와 같이 HI역가가 확인되었다.

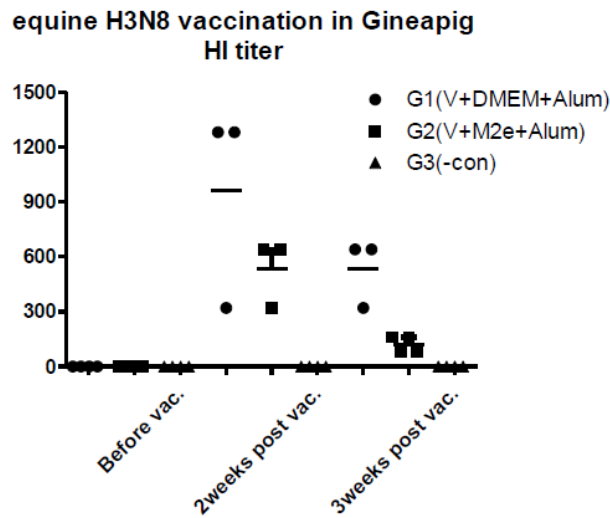


그림 14. 말인플루엔자 백신후보주의 실험동물 (기니픽)에서의 면역원성

나. 개 인플루엔자 모델을 이용한 M2e백신의 면역원성 및 효능 평가

- 3M2e단백질을 200ug/ml의 농도로 준비
- 2주 간격으로 2회 1ml 근육접종 또는 비강접종
- 공격접종 : 2차 접종 2주 후 불활화 하지 않은 개 인플루엔자 바이러스 (H3N2)를 각각의 비공으로 1ml씩 공격 접종
- 공격 접종후 7일간 체온, 바이러스 배출량 확인

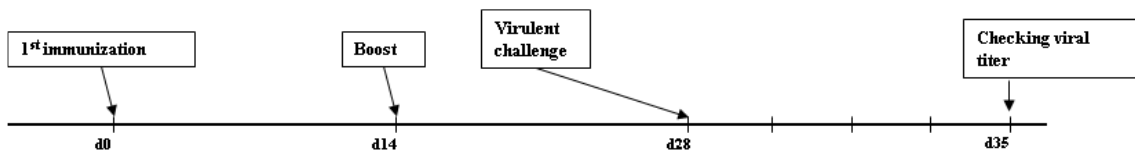


그림 15. 개에서의 인플루엔자 백신의 면역원성 비교 및 3M2e (200ug/ml)의 효과 확인

- 기존의 백신과 비슷한 수준의 방어효과를 나타냈고, 음성대조군에 비해서 유의적으로 바이러스 배출을 방어하는 것으로 확인되어, 3M2e 단독 투여군도 방어능력이 인정됨

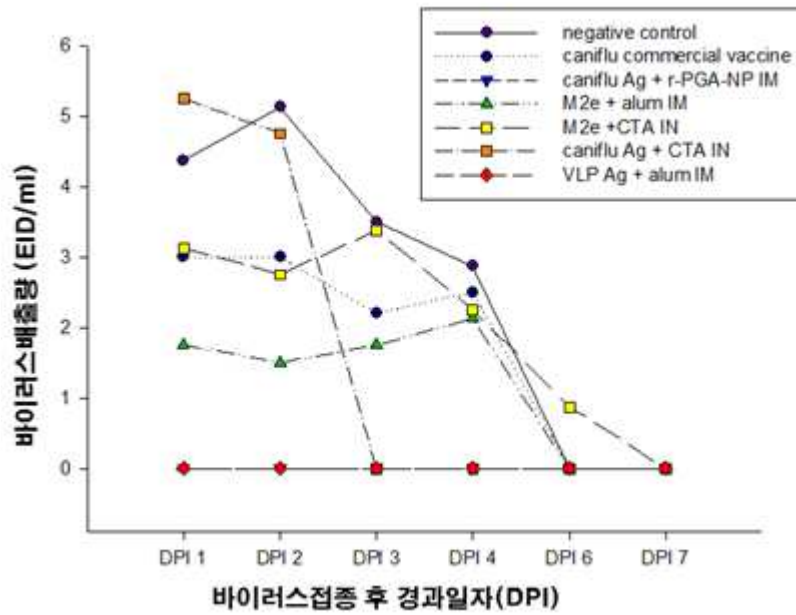


그림16. 비글견 모델에서의 개인플루엔자 백신 후보주에 대한 백신별 공격접종 후 바이러스 배출 비교 및 3M2e의 효능 비교

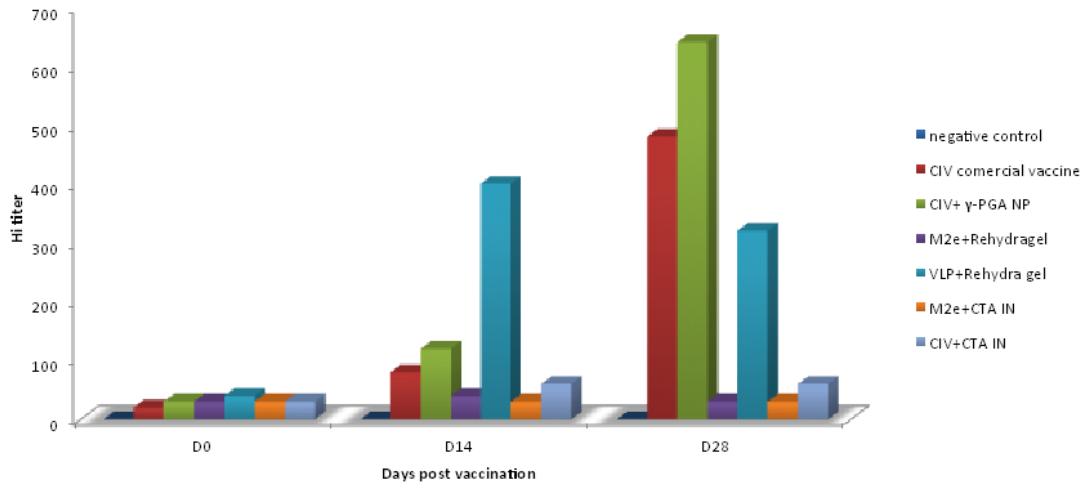


그림17. 개인플루엔자 백신 후보군별 백신 접종 후 HI 항체가 확인

3. 인플루엔자 백신 평가를 위한 기니픽 모델 확립

인플루엔자 바이러스의 병원성을 확인하는 동물모델로 기니픽 모델은 sneezing이 잘 일어나서 실제 감염모델을 반영하는데 매우 적합한 모델로 알려져 있음. 실험동물로 가장 많이 사용되는 마우스 모델은 바이러스 배출에 대한 적합한 모델이 아니기 때문에, 시험백신의 효능을 평가하기위해서 sneezing이 원활하게 일어나는 기니픽 모델을 이용하여 평가하였음. 기니픽 모델에서의 개인플루엔자 바이러스에 대한 병원성 평가 및 감염성 검정은 기 확립됨.

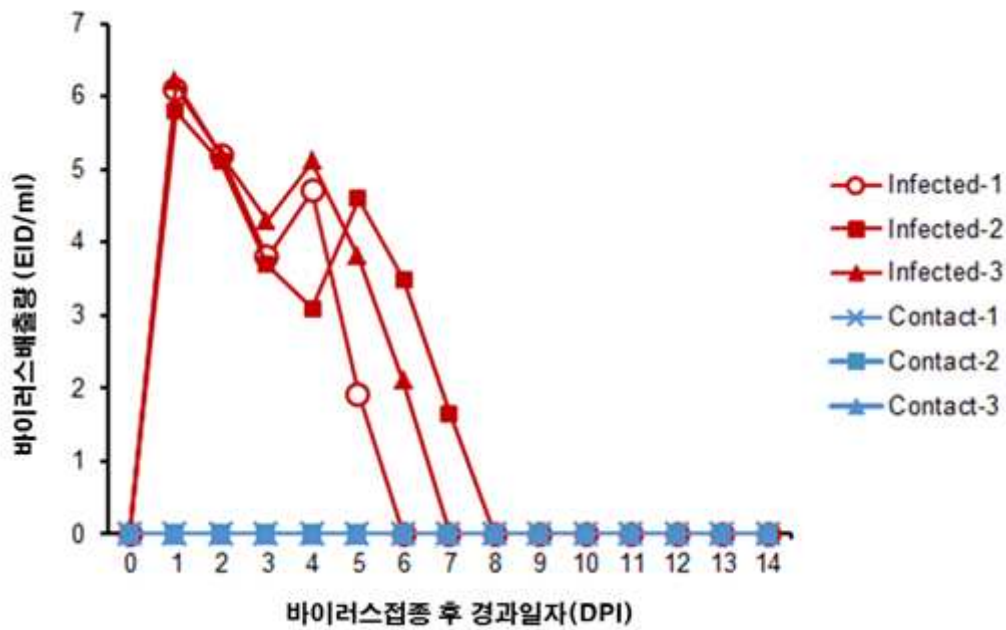


그림18. 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 기니픽에서 바이러스 배출 양상.

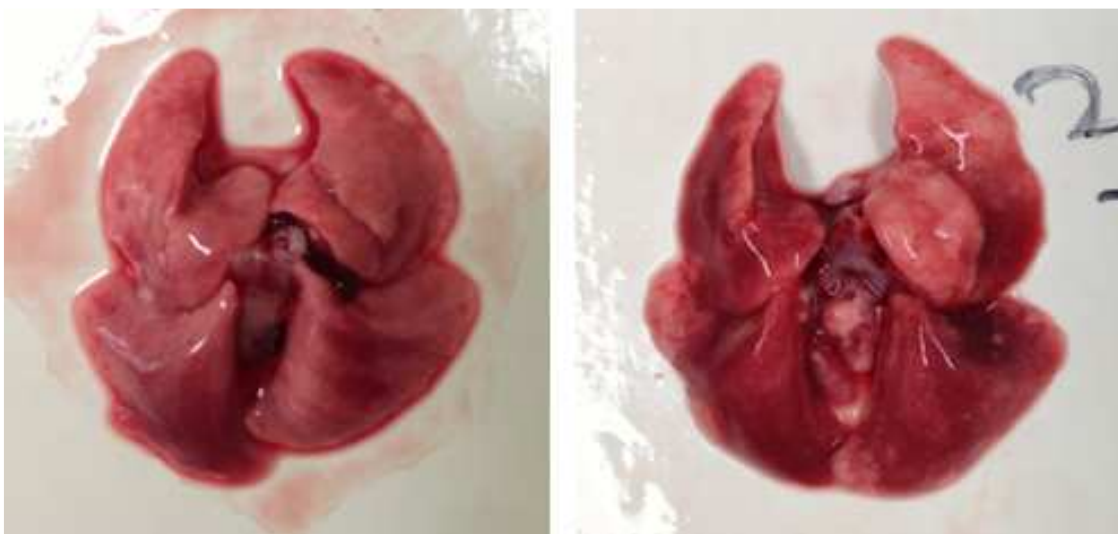


그림19. 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 기니픽에서 폐렴의 육안 병변 확인

4. 개인플루엔자 H3N2 백신에서의 3M2e 효능평가

개 인플루엔자 바이러스 H3N2과 3M2e 및 M2e를 함유한 시험백신을 제조하여 마우스와 기니픽에 접종후 homologous challenge와 heterologous challenge를 실시하여 병원성을 근거로 방어 효능을 평가 하였다.

가. 마우스를 이용한 3M2e, M2e 함유 백신의 효능평가

개 인플루엔자 바이러스 H3N2와 3M2e, M2e를 각각 함유한 시험백신을 제조하여 CIV H3N2바이러스로 homologous challenge를 한 후 M2e단백질이 함유되지 않은 시판 백신과 체중변화를 통해 병원성을 확인하였다.

그 결과 M2e가 첨가된 개인플루엔자 백신은 homologous challenge했을 경우에, M2e첨가 그룹에 비교하여 유의적으로 mice의 체중변화가 적게 변하는 것을 확인함. 또한 M2e group 및 3M2e group간에도 유의적인 체중변화의 차이를 확인함으로써, 3M2e가 M2e 대비 기존상용화 백신에 첨가되었을 경우에 백신효능을 증가시킬 수 있음을 확인함.

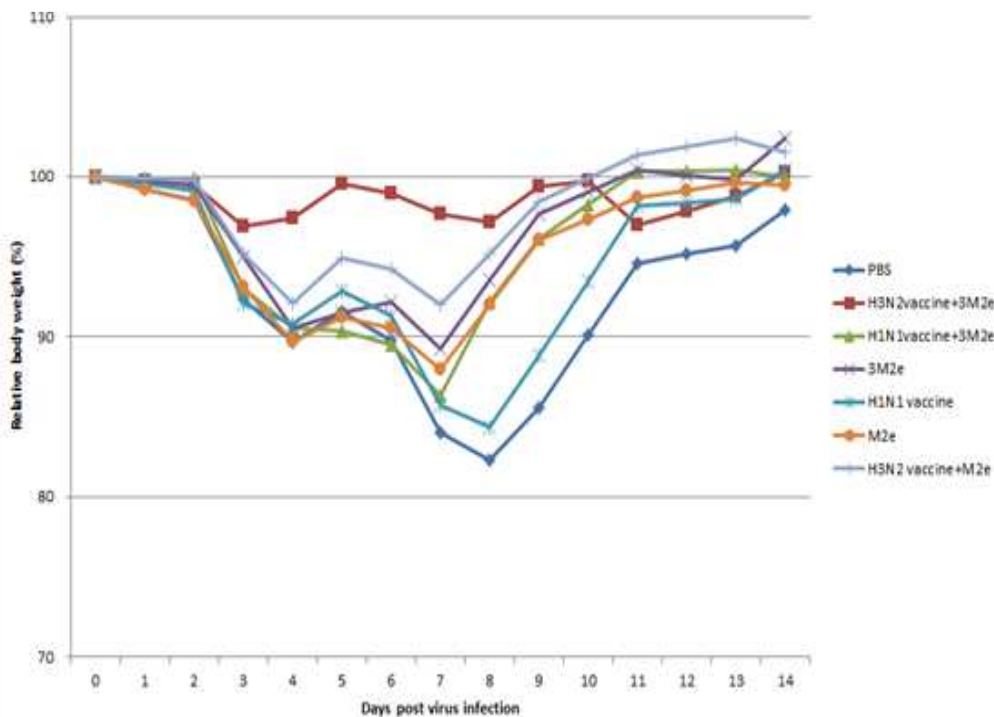


그림20. BL/6 mice 모델에서의 canine influenza virus vaccine에 대한 M2e의 효과검정

나. 개 인플루엔자 불활화 바이러스와 3M2e, M2e를 혼합한 시험백신을 제조하여 기니픽에 접종한 후 CIV H3N2를 이용한 homologous challenge뿐만 아니라 신종플루 pH1N1바이러스를 이용한 heterologous challenge를 실시하여 백신의 방어효능을 평가 하였다.

그 결과 Homologous challenge에서 3M2e와 불활화된 CIV H3N2를 함유한 백신이

바이러스의 배출을 효과적으로 감소시키는 것이 확인되었다. 뿐만 아니라 불활화 백신에 사용된 바이러스와 상이한 pH1N1을 감염시킨 Heterologous challenge시험에서는 불활화 바이러스 만으로는 바이러스의 배출을 감소시킬 수 없었으나 3M2e와 불활화 바이러스가 혼합된 바이러스에서는 바이러스의 배출을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 본 시험 결과 3M2e subunit단백질을 백신에 첨가 했을 때 첨가하지 않았을 때 보다 효과적으로 이형 바이러스에 대한 방어를 나타내는 것을 확인하여 Universal 백신의 효과적인 후보임을 확인하였다.

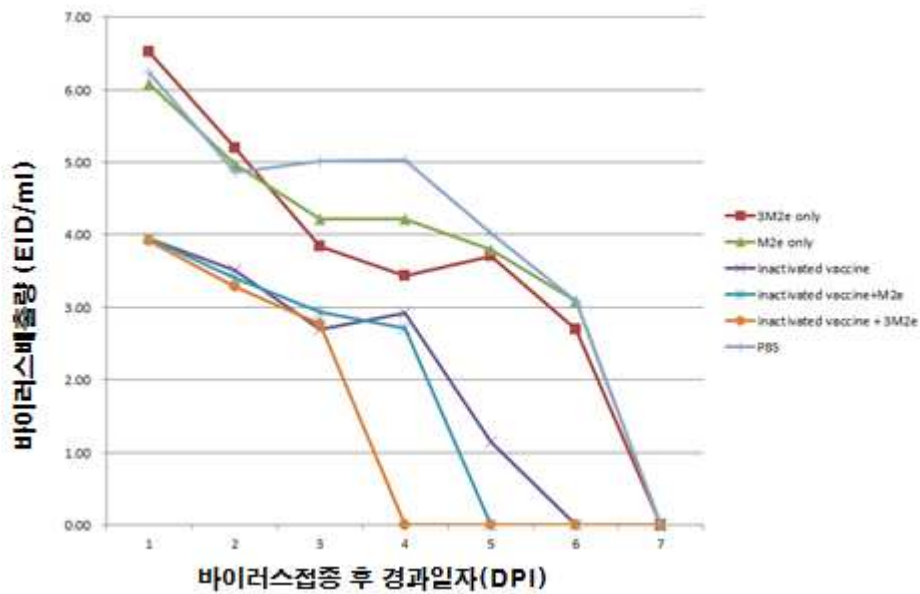


그림21. 기니픽모델에서 개인플루엔자 바이러스 불활화 백신에 대한 3M2e의 영향 (homologous challenge :canine H3N2 virus 공격접종)

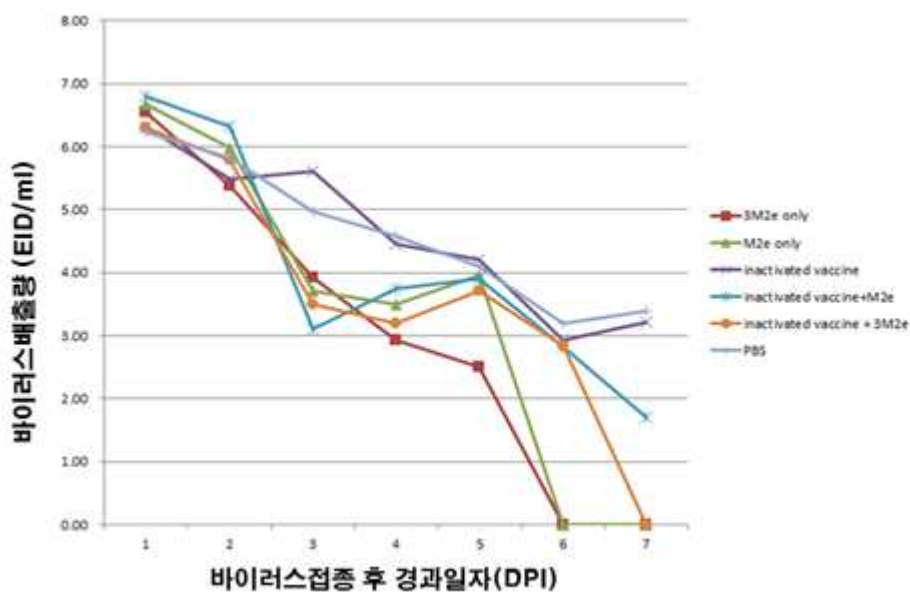
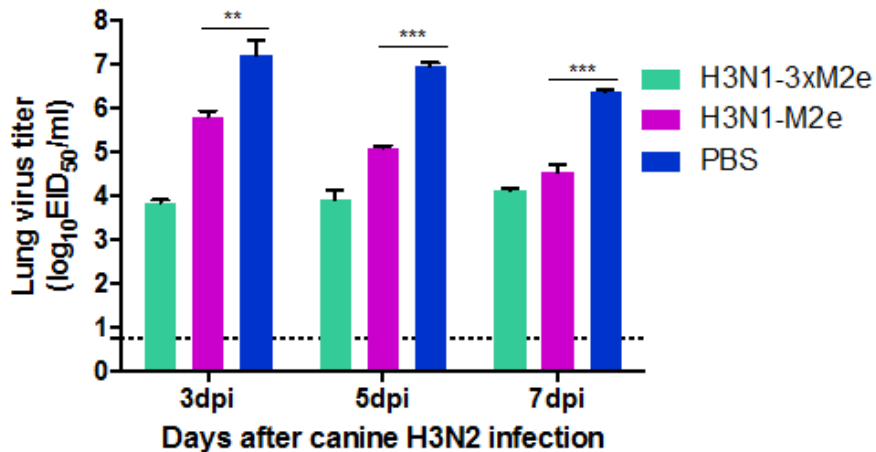


그림22. 기니픽모델에서 개인플루엔자 바이러스 불활화 백신에 대한 3M2e의 영향 (heterologous challenge :pandemic H1N1 virus 공격접종)

5. 개인플루엔자 H3N1백신 후보주에 대한 3M2e와 M2e의 효능 평가

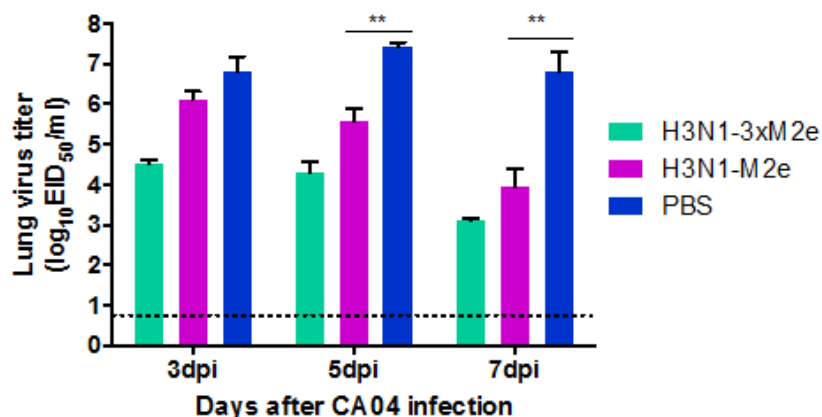
본 과제를 통해 확보된 CIV H3N1바이러스에 대한 시험백신을 제작하여 이 시험백신에 3M2e와 M2e를 함유하여 마우스에서 homologous challenge와 heterologous challenge를 통해 백신의 효능을 평가 하였다.

그 결과 M2e보다는 3M2e를 포함한 시험백신에서 바이러스 배출량 감소를 확인할 수 있었으며 체중변화도 적은 것이 확인되었다.



C57/BL mice were infected with canine H3N2 influenza virus at LD50 ($10^{8.75}$ EID₅₀/mL) per mouse. Two-tailed Student's t-tests were used; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

그림23. C57/BL마우스에 시험백신을 접종한 후 $10^{8.75}$ EID₅₀/ml의 CIV H3N2바이러스 공격접종 후 바이러스 배출 양상



C57/BL mice were infected with pH1N1 influenza virus at LD50 ($10^{4.25}$ EID₅₀/mL) per mouse. Two-tailed Student's t-tests were used; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

그림24. C57/BL마우스에 시험백신을 접종한 후 $10^{4.25}$ EID₅₀/ml의 pH1N1바이러스 (CA04) 공격접종 후 바이러스 배출 양상

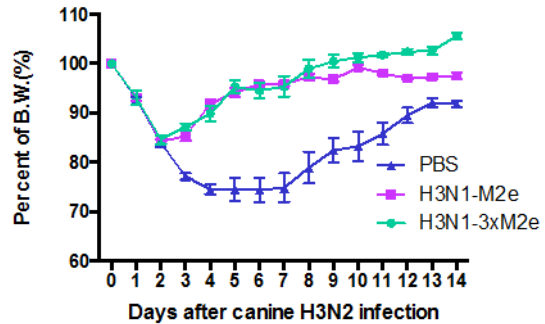
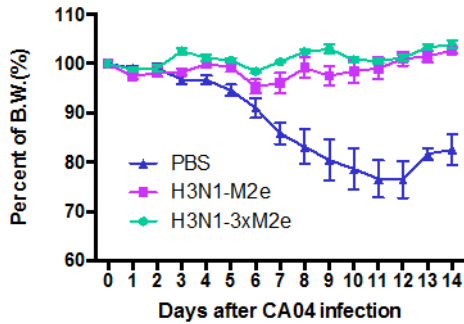


그림25. C57/BL마우스에 시험백신을 접종한 후 pH1N1 CA04주와 CIV H3N2주 공격접종 후 체중변화

6. 돼지에서 3M2e subunit단백질의 적용

녹십자수의약품 주식회사에서 제조한 돼지 인플루엔자 시험백신 플루셀드에 3M2e단백질을 200ug/dose첨가하여 목적동물인 돼지에서 안전성과 면역원성을 시험하였다.

가. 시험백신의 제조

- 시험백신 : 플루셀드, 플루셀드+ 3M2e, 대조군
- * 플루셀드 : 돼지 인플루엔자 3종 (H1N1, H1N2, H3N2)혼합백신, 부형제: 알미늄겔

나. 안전성 시험 및 면역원성 시험

• 안전성시험

백신 2두분을 군당 10마리의 3주령 자돈에 접종한 후 3시간 동안 즉시형 과민 반응을 관찰하였으며 21일동안 주사부위 화농, 괴사 발열, 설사등의 부작용 발생여부를 관찰하였다.

그 결과 백신 접종후 즉시형 접종반응을 확인한 결과 표3과 같이 일부 개체에서 침울한 증상을 보였지만 쇼크 증상이 관찰되지 않아 3M2e를 함유한 백신의 안전성에 문제가 없었다. 21일간 관찰한 결과 역시 안전성에 문제없었다.

표3. 1차 접종 및 2차 접종 후 3시간 동안 과민반응 관찰

	침울	식욕저하	설사	쇼크
플루셀드	2/10	0/10	0/10	0/10
플루셀드+ 3M2e	3/10	0/10	0/10	0/10
대조군	2/10	0/10	0/10	0/10

• 면역원성 시험

각 군별 백신 1두분을 3주령에 1차 접종하였으며 2주후 2차 접종을 실시하고 2차접종후 6주후 까지 HI를 이용하여 항체검사를 실시하여 면역원성을 확인하였다. 그 결과 돼지 인플루엔자 불활화 백신과 불활화 백신과 3M2e subunit단백질을 혼합한 그룹 모두 면역원성이 인정되었다.

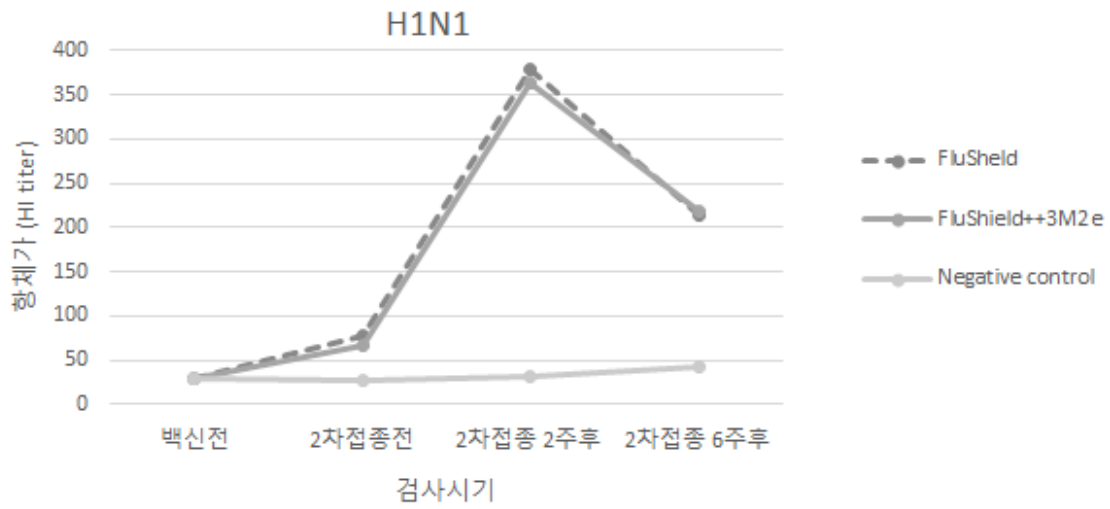


그림26. 돼지 인플루엔자 백신 접종후 SIV H1N1에 대한 항체검사 결과

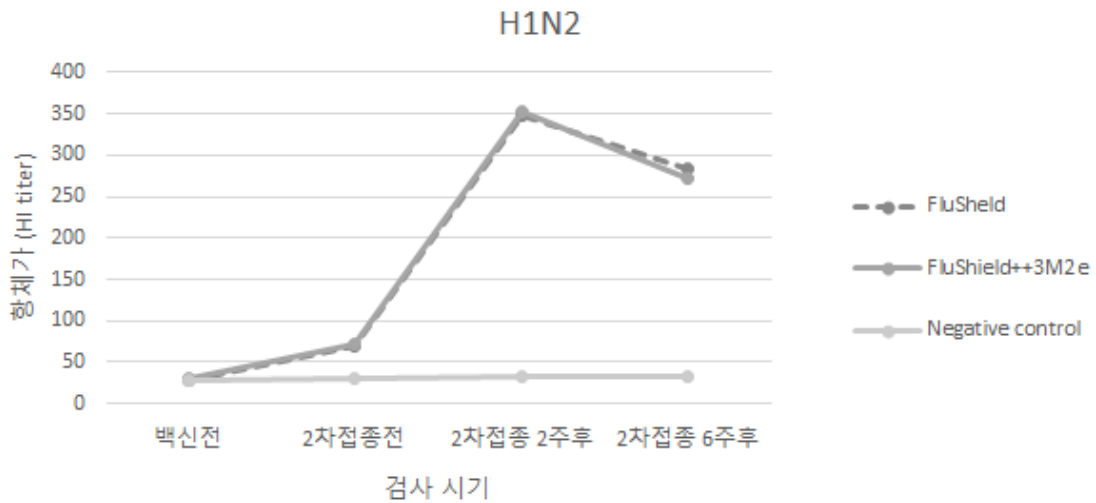


그림27. 돼지 인플루엔자 백신 접종후 SIV H1N2에 대한 항체검사 결과

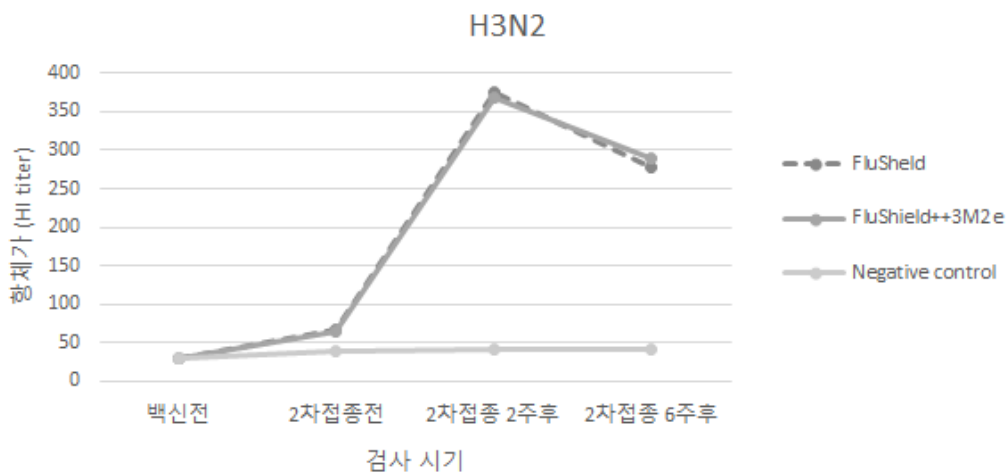


그림28. 돼지 인플루엔자 백신 접종후 SIV H3N2에 대한 항체검사 결과

7. 개 인플루엔자 불활화 백신과 3M2e subunit 단백질 혼합백신 시험

녹십자수의약품 주식회사에서 제조한 개 인플루엔자 불활화 백신백신 캐니플루에 3M2e단백질을 200ug/dose첨가하여 목적동물인 개에서 야외 시험을 실시하였다.

가. 시험백신의 제조

- 시험백신 : 캐니플루+ 3M2e
- * 캐니플루 : 개 인플루엔자 (H3N2)혼합백신, 부형제: 알미늄겔

나. 시험농장

농장명	주소	사육규모
명진 농장	경상북도 영양군 석보면 지경리 331-8	400두
정읍 농장	전라북도 정읍시 신내면 두월리 1486번지	350두

다. 시험방법

상기 농장에서는 사육 중에 육견에 권장용법에 따라 마리당 1ml씩 근육접종하였고, 2주후에 같은 방법으로 2차 접종하였다. 최종 백신 접종일로부터 12개월이상 경과한 개체의 경우 채혈 후 추가 접종을 실시하여 1년 후 추가접종을 실시하였을 때 항체가 상승을 확인하였다.

라. 면역원성 시험

HI를 이용하여 항체검사를 실시하여 면역원성을 확인하였다. 그 결과 개 인플루엔자 불활화 백신과 불활화 백신과 3M2e subunit단백질을 혼합한 백신의 면역원성이 인정되었다.

표4. 개인플루엔자백신 접종 후 경과기간별 항체가 변화 (명진농장, 33두)

개체번호	최종 백신 접종일	채혈일	경과기간	항체가
M-U-1	2012.11.8	13.9.9	10개월	64
M-U-2	2012.4.8	13.8.7	15개월	16
M-U-3	2012.4.8	13.8.7	15개월	8
M-U-4	2012.4.8	13.8.7	16개월	8
M-U-5	2012.12.12	13.8.7	8개월	128
M-U-6	2013.5.7	13.8.7	3개월	128
M-U-7	2012.4.8	13.8.7	15개월	16
M-U-8	2013.5.7	13.8.7	3개월	128
M-U-9	2012.4.8	13.8.7	15개월	16
M-U-10	2012.4.8	13.8.7	16개월	8

M-U-11	2013.6.8	13.8.7	2개월	128
M-U-12	2012.5.10	13.9.9	16개월	<4
M-U-13	2013.1.7	13.9.9	8개월	64
M-U-14	2013.1.7	13.9.9	8개월	64
M-U-15	2012.9.28	13.9.9	12개월	16
M-U-16	2012.9.28	13.9.9	12개월	8
M-U-17	2012.5.10	13.9.9	15개월	8
M-U-18	2012.11.8	13.9.9	10개월	64
M-U-19	2012.11.8	13.9.9	10개월	64
M-U-20	2012.4.8	13.8.7	15개월	16
M-U-21	2013.1.17	13.9.9	8개월	64
M-U-22	2013.1.7	13.9.9	8개월	64
M-U-23	2012.9.28	13.9.9	12개월	16
M-U-24	2012.9.28	13.9.9	12개월	16
M-U-25	2012.11.8	13.9.9	10개월	32
M-U-26	2012.11.8	13.9.9	10개월	<4
M-U-27	2013.6.8	13.9.9	3개월	128
M-U-28	2013.6.8	13.9.9	3개월	128
M-U-29	2013.6.8	13.9.9	3개월	64
M-U-30	2013.6.8	13.9.9	3개월	128
M-U-31	2013.6.8	13.9.9	3개월	128
M-U-32	2013.6.8	13.9.9	3개월	64
M-U-33	2013.6.8	13.9.9	3개월	128

표5. 개인플루엔자백신 접종 후 경과기간별 항체가 변화 (정읍농장, 24두)

개체번호	최종 백신 접종일	채혈일	경과기간	항체가
J-U-1	2012.12.23	13.9.25	9개월	64
J-U-2	2012.12.23	13.9.25	9개월	64
J-U-3	2012.12.23	13.9.25	9개월	32
J-U-4	2012.8.12	13.9.25	13개월	8
J-U-5	2013.2.19	13.9.25	7개월	64
J-U-6	2013.7.20	13.9.25	2개월	128
J-U-7	2013.2.19	13.9.25	7개월	64
J-U-8	2013.2.19	13.9.25	7개월	128
J-U-9	2012.8.12	13.9.25	13개월	16
J-U-10	2012.8.12	13.9.25	13개월	<4
J-U-11	2012.5.13	13.9.25	16개월	16

J-U-12	2013.6.21	13.9.25	3개월	128
J-U-13	2012.8.12	13.9.25	13개월	8
J-U-14	2012.8.12	13.9.25	13개월	8
J-U-15	2013.8.20	13.9.25	2개월	128
J-U-16	2013.8.20	13.9.25	2개월	128
J-U-17	2013.6.21	13.9.25	3개월	64
J-U-18	2013.8.20	13.9.25	2개월	128
J-U-19	2013.6.21	13.9.25	3개월	64
J-U-20	2013.6.21	13.9.25	3개월	64
J-U-21	2013.8.20	13.9.25	2개월	128
J-U-22	2013.6.21	13.9.25	3개월	128
J-U-23	2013.6.21	13.9.25	3개월	128
J-U-24	2013.6.21	13.9.25	3개월	128

표6. 캐니플루 맥스 접종 후 1년이 경과한 개체에 대한 추가 접종 후 항체가 검사 결과

개체번호	추가접종일	채혈일	항체가
M-U-2	13.8.7	13. 9. 10	64
M-U-3	13.8.7	13. 9. 10	128
M-U-4	13.9.9	13. 10. 15	128
M-U-7	13.8.7	13. 9. 10	64
M-U-9	13.8.7	13. 9. 10	64
M-U-10	13.8.7	13. 9. 10	64
M-U-12	13.9.9	13. 10. 15	64
M-U-15	13.8.7	13. 9. 10	128
M-U-16	13.8.7	13. 9. 10	64
M-U-17	13.9.9	13. 10. 15	128
M-U-20	13.9.9	13. 10. 15	64
M-U-23	13.9.9	13. 10. 15	128
M-U-24	13.9.9	13. 10. 15	128
J-U-4	13.9.25	13. 10. 21	64
J-U-9	13.9.25	13. 10. 21	64
J-U-10	13.9.25	13. 10. 21	128
J-U-11	13.9.25	13. 10. 21	128
J-U-13	13.9.25	13. 10. 21	64
J-U-14	13.9.25	13. 10. 21	64

제 3 절 인플루엔자 백신에 대한 세포성 면역 확인

1. 돼지의 폐조직에서 Influenza 감염에 의한 TLRs 및 Nod1, Nod2의 발현 변화

Influenza의 감염이 돼지의 폐조직에서 패턴인식수용체의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 실험적으로 influenza를 감염시킨 돼지와 대조군 동물의 폐조직으로부터 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 아래의 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

표7. 수용체 분석에 사용된 프라이머

Gene specificity	Primer sequences (5'-3')	Size (bps)
TLR2	F5'-GTGCTTTCCGAGAAGCTTTGT-3' R5'-GCAGAATGAGGATGGCG-3'	106
TLR3	F5'-TCCAATAACAAACCAGGC-3' R5'-ACATCCTTCCACCATCT-3'	186
TLR4	F5'-AAGGTTATTGTCGTGGTGT-3' R5'-CTGCTGAGAAGGCGATAC-3'	179
TLR7	F5'-GTGGACTGCACAGACAAC-3' R5'-GGGCATTATAACAACGAGGG-3'	655
TLR8	F5'-CCGCACTTCGCTATCTAAAC-3' R5'-GAAAGCAGCGTCATCATCAA-3'	792
TLR9	F5'-AGATGTTTGCTCGCCT-3' R5'-GGACACTCGGCTATGGA-3'	308
NOD1	F5'-TGCTGAAAGTCAACCAGACG-3' R5'-CAACGGCTCAGAAACAGACA-3'	198
NOD2	F5'-GGCACCTCAAGCTGACTTTC-3' R5'-AGAGCATGTTCCACGAGCTT-3'	226
β -actin	F5'-ACCACTGGCATTGTCA-3' R5'-CTCCTGCTCGAAGTCC-3'	237

실험 결과, TLR3와 TLR9은 influenza 감염과 관계없이 모든 개체의 폐 조직에서 발현되는 것을 확인하였다 (그림26). 이와는 대조적으로, TLR7은 어떠한 개체에서도 발현이 확인되지 않았다. 그러나 TLR2, TLR4, TLR8 및 Nod1, Nod2는 대조군에 비해서 influenza의 감염에 의해 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (그림29).

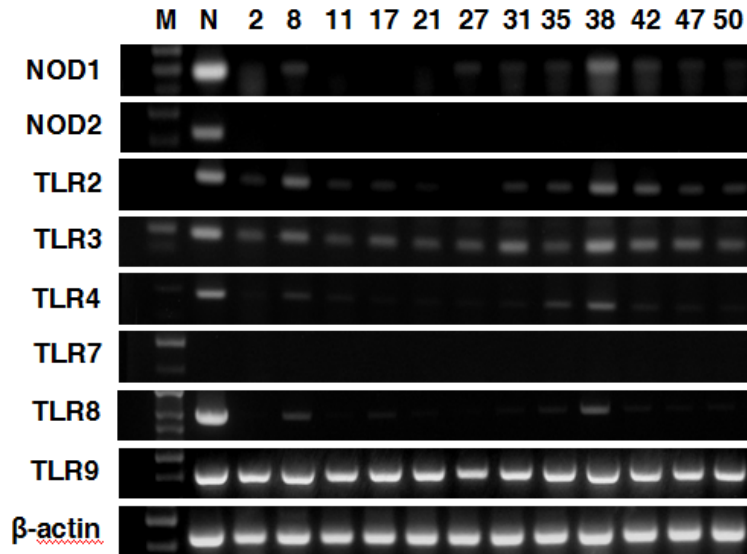


그림29. TRL, NOD1, NOD2에 대한 RT-PCR결과

2. Influenza virus PR8의 마우스 감염 실험

위 실험결과 유의적인 변화가 관찰된 다양한 패턴인식수용체 중에서 Nod2와 TLR4에 대한 influenza 숙주면역반응에서의 역할 규명을 위해 동물실험을 수행하였다. 먼저 influenza PR8 바이러스는 1:5000으로 PBS에 희석하여 비강내 접종하고 체중 변화를 관찰하였다. 실험결과, WT, TLR4 KO, Nod2 KO 마우스 모두 감염 2일째부터 체중 감소가 관찰되었고, 특히 TLR4 KO 마우스에서 체중 감소가 더욱 많이 일어났다 (그림 30). 감염 14일 쯤까지 관찰한 결과, 사망한 개체는 없었다.

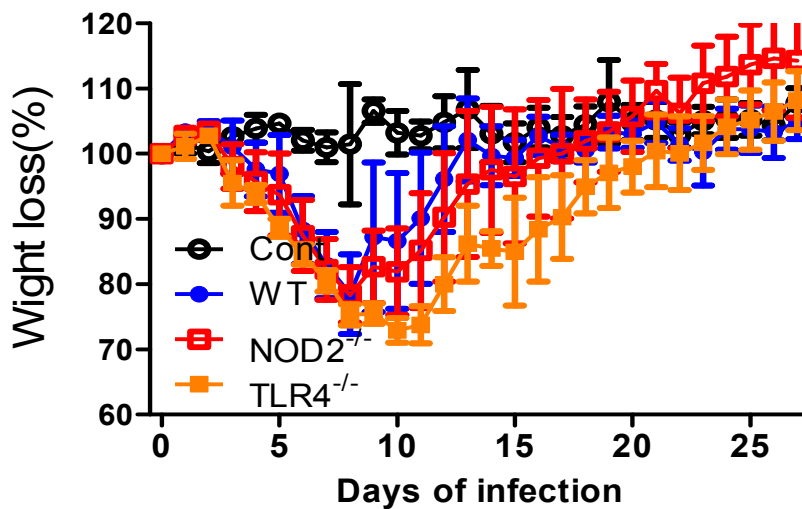


그림30. 인플루엔자 바이러스 감염후 대조군, TLR4, Nod2 녹아웃 마우스의 체중 변화 (1:5000희석)

Survival에 대한 영향을 관찰하기 위해, infection dose를 희석배수 1:3,000으로 증가시켜서 감염 시킨 후 체중변화와 mortality를 관찰하였다. 실험결과, 체중변화는 위의 실험과 유사한 경향으로 관찰되었다 (그림31). TLR4 KO 마우스에서는 감염 9일 째 처음으로 사망한 개체가 관찰되었으며,

감염 11일 째 모든 개체가 사망하였다 (그림31). 그러나 WT과 Nod2 KO 마우스에서는 사망한 개체가 확인되지 않았다.

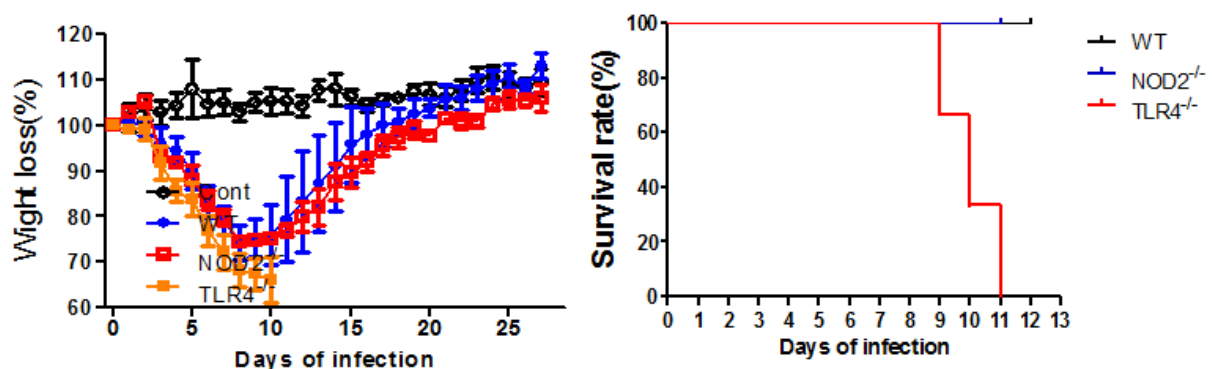


그림31. 인플루엔자 바이러스 감염후 대조군, TLR4, Nod2 녹아웃 마우스의 체중 변화 (1:3000희석)

3. Influenza 감염에 있어서 세포질 내 수용체 Nod2 및 어댑터 분자 Rip2의 역할

기존 연구에 의하면, ssRNA 바이러스 감염에 있어서 Nod2가 중요한 역할을 한다고 알려져 있었으나 1차년도 연구에서 WT과 Nod2 KO 마우스 사이에 survival rate의 차이를 확인할 수 없었다. 1차년도의 연구에서는 감염 농도가 다소 약했다고 판단하여 추가적으로 감염 농도를 변화시켜 실험을 수행하였다. 실험결과 Nod2 KO 마우스는 WT 마우스에 비해 유의적으로 사망률이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 (그림 32A, B), 또한 Nod2의 adaptor 분자도 influenza에 대한 마우스 저항성에 중요하다는 것을 확인하였다 (그림 32C, D).

4. Influenza 감염에 있어서 세포 표면 수용체 TLR4의 역할

본 실험 또한 1차년도에 확인된 TLR4의 역할에 대한 추가실험 결과이다. 마우스 수를 더욱 확대하여 반복 실험에 의한 체중 변화 및 사망률 결과로써, 1차년도에서 확인한 바와 같이 TLR4가 사망률에 있어서 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다 (그림 33A, B). 감염 후 3일 째 부검시, 폐 병변이 TLR4 KO 마우스에서 보다 심하였는데, 염증성 회색 병소가

TLR4 KO 마우스에서 보다 뚜렷이 그리고 넓게 육안적으로 확인되었다 (그림 34).

한편 감염 후 3일 째 폐 조직액으로부터 생성되는 cytokines 및 chemokines을 분석한 결과, MCP-1, IL-6의 생성은 TLR4 KO 마우스에서 유의적으로 높았으나 (그림 35A, B), KC는 유의적 차이가 관찰되지 않았다 (그림 35C).

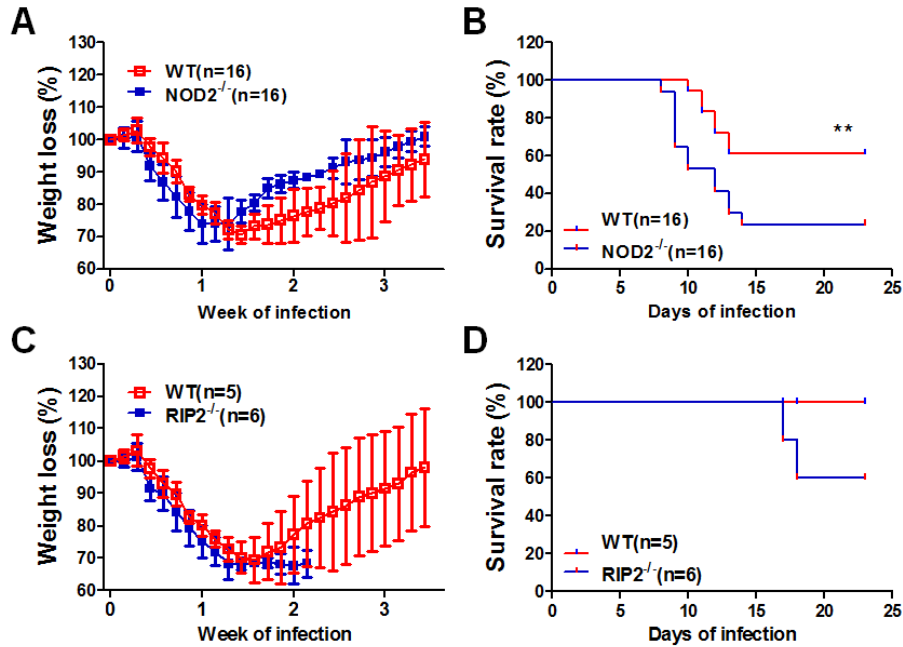


그림32. Body weight and survival rate of WT, Nod2 (A and B) or Rip2 (C and D) deficient mice infected with influenza virus strain PR8.

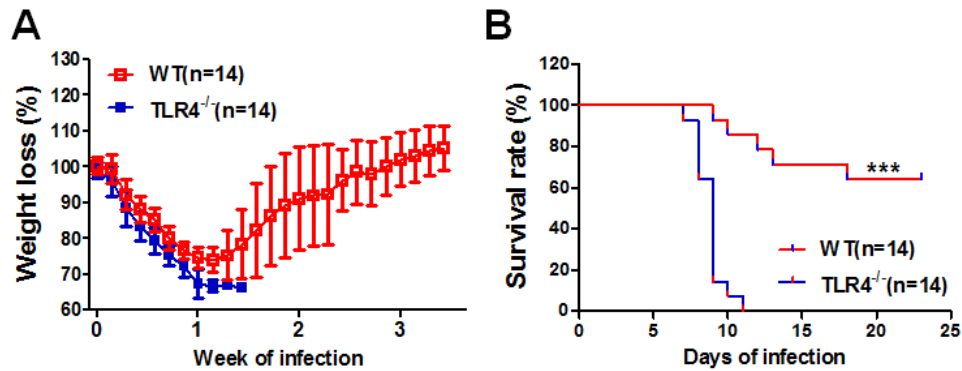


그림33. Body weight (A) and survival rate (B) of WT and TLR4-deficient mice infected with influenza virus strain PR8.

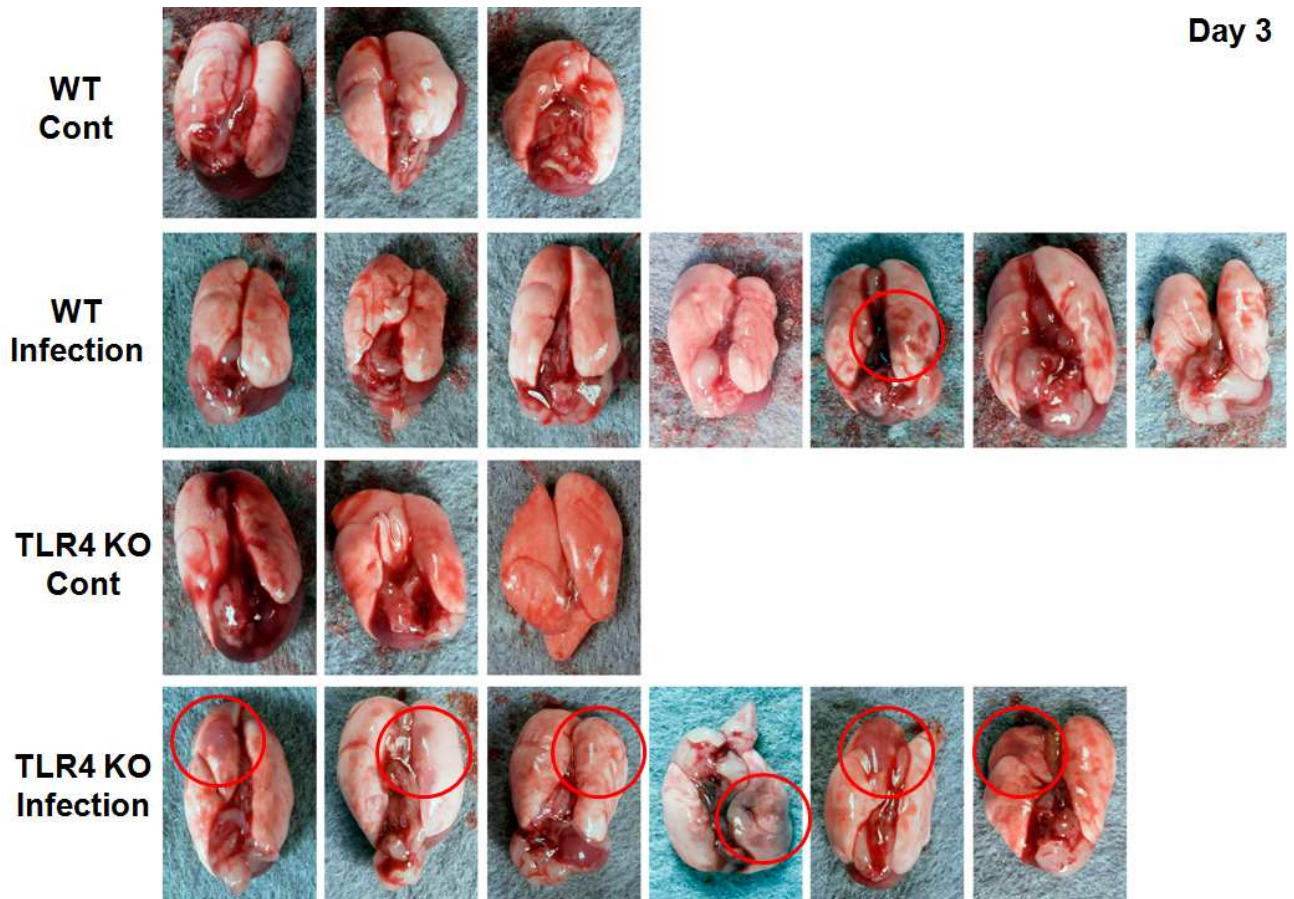


그림34. Gross lesion of WT and TLR4-deficient mice infected with influenza virus strain PR8 at day 3 after infection.

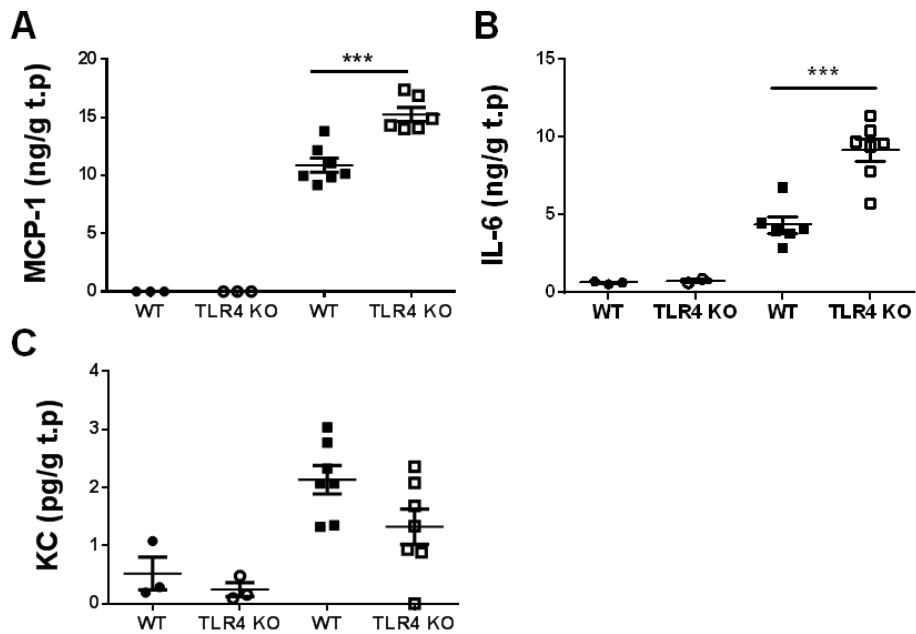


그림35. The production of MCP-1, IL-6, and KC in lung homogenates from WT and TLR4-deficient mice infected with influenza virus strain PR8 at day 3 after infection.

5. DCs에서 influenza virus 감염에 의한 cytokines/chemokines 생성 kinetics 분석

마우스 골수에서 DCs를 분리하여 cytokines 및 chemokines 생성에 대한 kinetics 분석을 하였다. 실험 결과 KC와 MCP-1은 감염 후 48시간에 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내었다 (그림 36A, B). TNF- α 는 24 시간 (data not shown) 및 48 시간 (그림 36C)에 고농도군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, IL-12는 24시간에 고농도에서 증가하는 현상을 확인하였다 (그림 36D).

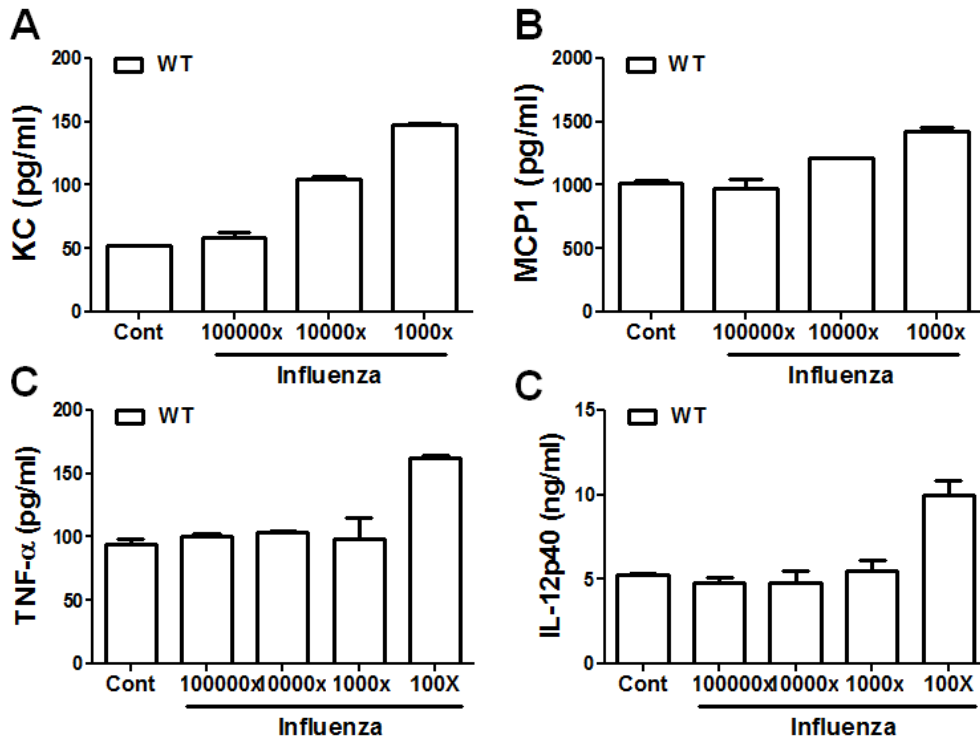


그림36. 인플루엔자 감염후 DC에서 분비하는 cytokine 및 chemokine의 변화

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 목표 및 달성도

1. 1차년도의 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011- 2012)	효과적인 M2e 재조합 단백질 기반 백신 개발, 효능 평가, 동물실험 및 야외 임상실험	포유류 인플루엔자 바이러스에 대한 Universal한 방어가 가능 한 M2e 재조합 단백질 발현	100	포유류 인플루엔자 바이러스에 대한 Universal한 방어가 가능한 M2e 재조합 단백질 발현
		최적의 M2e 재조합 단백질 백 신 조합 기본 확립	100	3M2e의 대동물 적용, 효과적인 백신주 작출 및 효능평가
	국내 분리 유전자원 데이터 베이스를 통한 새로운 포유류 유래 인플루엔자 바이러스 분자역학 분석 및 신규 데이터 제공	국내 양돈장 및 양견장 유행 인 플루엔자 바이러스에 대한 분자 역학 조사	100	신종 개 인플루엔자 H3N1바이러스의 특성 규명 국내 스타드팜에서의 말인플루엔자 H3N8바이러스 분리 및 특성규명
	인플루엔자 백신에 대한 세포성 면역 반응 규명 및 이를 이용한 효과적인 adjuvant 개발	돼지 폐조직에서 influenza 감염 에 의한 패턴인식수용체 변화	100	RT-PCR법을 이용하여 influenza 감염이 돼지 폐조직에서 TLR2, 4, 8, 및 Nod1, 2의 발현을 감소시키 는 것을 확인함
		Influenza 감염에 대한 Nod2, TLR4 유전자의 체중 및 사망률 에 미치는 영향	100	Nod2는 influenza 감염에 대한 체 중 변화 및 사망률에 영향을 미치 지 못하였으나, TLR4는 마우스 mortality에 매우 중요하였음

2. 2차년도의 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012- 2013)	효과적인 M2e 재조합 단백질 기반 백신 개발, 효능평가, 동물실험 및 야외 임상실험	M2e함유 백신의 교차방어 효능 평가	100	백신의 효능평가를 위한 기니픽 모델 확립 개 인플루엔자 H3N2주를 이용한 불활화 백신과 3M2e혼합 백신에 대한 Heterologous 및 Homologous challenge에 대한 효능평가 개 인플루엔자 H3N1주를 이용한 불활화 백신과 3M2e혼합 백신에 대한 Heterologous 및 Homologous challenge에 대한 효능평가
		돼지에서의 3M2e함유 돼지 인 플루엔자 백신 평가	90	돼지 인플루엔자 불활화백신과 3M2e를 혼합하여 3주령 자돈을 이용하여 안전성, 면역원성 시험 실시 * 목적동물에서 Heterologous 및 Homologous challenge를 통한 효능평가 필요
		개에서의 3M2e함유 개 인플루 엔자 백신 평가	95	개 인플루엔자 불활화백신과 3M2e를 혼합하여 안전성, 면역원성 확인
	국내 분리 유전자원 데이터 베이스를 통한 새로운 포유류 유래 인플루엔자 바이러스 분자역학 분석 및 신규 데이터 제공	국내 분리 인플루엔자 유전자원 확보 및 특성분석	100	CIV H3N2 M variant 바이러스의 분리 및 이에 대한 바이러스학적, 병리학적 특성분석
인플루엔자 백신에 대한 세포성 면역 반응 규명 및 이를 이용한 효과적인 adjuvant 개발	Influenza 감염에 있어서 세포 수용체 Nod2, TLR4 및 어댑터 분자 Rip2의 역할	100	각 수용체에 대한 Knock out 마우스를 이용하여 인플루엔자 바이러스 감염 후 임상증상, 폐사율, 병리조직학적 평가 실시	
	DCs에서 influenza virus 감염에 의한 cytokines/ chemokines 생성 kinetics 분석	100	인플루엔자 바이러스 감염된 마우스 골수에서 Dendritic cell을 분리하여 cytokine/ chemokine분석 실시	

제 2 절. 관련분야 기여도

포유류 유래 인플루엔자 바이러스의 병원성 및 유전학적 변이에 대한 연구자료의 축적이 기대됨. 특히 중간감염의 위험성을 항상 내포하고 있는 인플루엔자 바이러스 감염증을 각 특이 감염종(돼지, 개, 말)에서 효과적인 예방을 함으로써 인플루엔자에 의한 해당 축산업의 경제적인 이익 뿐 아니라 사람에게 전파될 새로운 인플루엔자 바이러스 출현을 억제한다는 측면에서 큰 의미가 있음. 그리고, 최근 인플루엔자 바이러스 유니버설 백신(universal vaccine) 연구가 활발히 진행되고 있는 추세에서 본 과제를 통한 universal vaccine의 효용성 및 활용 가능성을 확인할 수 있을 것으로 기대함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구성과 목표 대비 성과

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1	0	0	0	0	0	10	2	0	
	달성	3	0	0	0	0	0	9	1	0	
2차 년도	목표	1	1	0	0	0	0	5	2	0	
	달성	0	(2)	0	0	0	0	8	1 (2)	0	
계	목표	2	1	0	0	0	0	15	4	0	
	달성	3	1(2)	0	0	0	0	17	2 (2)	0	

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010	송대섭, 안동준	강보규, 정권일	문형준, 염민주, 정혜영, 정우석, 박성준, 김혜권, 한상윤, 오진식, 박봉균, 김정기, 부하령, R.G. Webster	Journal of General Virology	92	국외	SCI
2013	Isolation and genetic characterization of naturally NS-truncated H3N8 equine influenza virus in South Korea	나운성, 강보규, 김현일	김정기, 송대섭	홍민기, 박성준, 정혜영, 안동준, 문형준	Epidemiology and Infection	Epub	국외	SCI
	H3N2 Canine Influenza Virus with the Matrix Gene from the Pandemic A/H1N1 Virus: Infection Dynamics in Dogs and Ferrets	문형준, 홍민기, 김정기	송대섭, 강보규	선보현, 나운성, 박성준, 안동준, 정혜영, 김두진, 김종만, 김상현, R.J. Webby, R.G. Webster	Epidemiology and Infection	under review	국외	SCI
	Comparative Analysis of Virulence of a Novel Avian-Origin H3N2 Canine Influenza Virus in Various Host	류광수	송대섭	김정기, 강보규, 문형준, 김종만, 송만기, 박봉균, 김상현, R.G. Webster	Journal of Virology		국외	SCI

3. 특허 출원 및 등록

출원된 특허				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012	신규한 H3N8 말 인플루엔자 바이러스	한국생명공학연구원/옵티팜솔루션	대한민국	10-2012-0039328

등록된 특허				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	돼지 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료방법	녹십자수의약품(주)	대한민국	10-2011-0103045 (2013. 등록결정)
2011	신규한 돼지 인플루엔자 바이러스 A H1N1 및 그의 용도	녹십자수의약품(주)	대한민국	10-2011-0103046 (2013. 등록결정)

4. 학회발표 (포스터)

제 목	학 회	저 자
First Isolation and Characterization of Equine Influenza H3N8 virus from stud farm in South Korea	ASM2012 (2012.6.28., 미국)	나운성 외

제 2 절 성과활용계획

본 과제를 통하여 인플루엔자 바이러스 Matrix 단백질 기반의 Universal vaccine의 후보주의 효능을 평가 하였다.

M2e단백질이 단량체로 사용되는 것보다는 3M2e형태의 삼량체의 형태가 백신의 효능을 증진시키는 것으로 확인되었다.

따라서, 현재 사용되고 있는 개 인플루엔자 백신, 돼지 인플루엔자 백신에 M2e단백질의 삼량체인 3M2e 단백질을 포함시켜 광범위한 방어 효과를 갖도록 백신을 개량할 수 있다.

또한 장차 발생할 동물인플루엔자 백신에 효과적으로 대처하기 위해 본 과제에서 평가된 3M2e를 이용할 계획이다.

대장균에 발현되는 3M3e의 대량생산체계확립을 위하여 녹십자수의약품주식회사에 설비된 자체 시설을 활용한 생산기법 연구는 본 과제 이후 자체 재원을 활용하여 지속 수행할 계획이다. 또한 대량 생산기법 연구를 수행하면서 동시에 생산단가를 산출하여 기존 백신생산단가와 비교 경제성 여부를 평가할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

- Influenza virus 의 M2 protein 의 ectodomain (M2e)은 다양한 생물의 세포 내부 혹은 외부에서 다양한 protein 과 결합된 여러 가지 형태로 발견되고 정제되어 단독으로 vaccine 으로 활용되거나 inactivated virus 와 혼합하여 vaccine 으로 적용되어 효과적인 universal vaccine 으로서의 가능성을 제시하고 있음.
- Influenza A virus 의 M2e protein 세 개의 copy 와 flagellin 또는 hepatitis B 의 core antigen(HBc)을 결합시켜 두 종류의 recombinant protein 을 vaccine candidate 로서 효능을 확인함. Flagellin 과 결합된 M2e protein 은 HBc 와 결합된 M2e protein 보다 현저히 높은 항원성을 보이며 두 recombinant virus 모두 mouse 에서 H1N1 virus 에 대한 면역 및 방어가 이루어짐.
- Influenza virus M2e protein 을 Lactococcus lactis 의 표면에서 발견시키거나 keyhole-limpet-memocyanin 을 M2e protein 에 conjugation 하여 vaccine 으로 활용하는 방법도 제시됨. Lactococcal vaccine 과 keyhole-limpet-hemocyanin conjugated M2e (KLH-M2e) 모두 공격접종시 실험군의 생존 시간을 증가시켰으며 KLM-M2e 의 경우는 높은 M2e-specific IgG 를 유도하여 더 낮은 viral load 를 보임. 이는 가격경쟁력 있는 효과적인 동물용 universal Influenza vaccine 으로 활용 가능함.
- M2e protein trimer 와 nucleoprotein (NP), Hepatitis B virus core protein (HBc) 를 함께 발견하여 universal influenza VLP vaccine 으로 활용함. 이는 mouse 에서 pandemic 2009 H1N1 및 highly pathogenic avian influenza H5N1 virus 의 공격접종에 대한 방어능력을 가지며 특히 Nucleoprotein 에 대한 세포면역반응이 방어를 증진시키는 데 중요한 역할을 했을 것으로 예상됨.
- Influenza A virus 의 M2e protein 을 rotavirus fragment NSP4 와 연결하여 aqueous solution 상태에서 tetramer 를 이루는 M2e 의 자연형태를 모방한 vaccine 을 개발함. 이 백신은 Murine influenza challenge model 에서 넓은 항체 반응을 유도하며 낮은 dose 의 백신으로도 공격접종에 대한 방어를 가능하게 하여 universal vaccine 후보로서 장점을 가짐.
- Immune-stimulant molecule peptide 인 Tuftsin 과 M2e polypeptide 를 연결하거나 Toll-like receptor ligand 를 M2e polypeptide 를 연결하여 influenza A vaccine 으로 활용함.
- 그리고 Human, swine, avian origin 의 각각의 Influenza A virus 에서 얻어진 M2e sequence 를 활용하여 각각의 M2e protein 이 membrane 으로 연결된 형태로 발견시킨 virus-like particle 은 넓은 범위의 강력한 면역을 유도함. Heterologous VLPs 로 면역된 mouse 는 live influenza virus A 나 homologous M2e VLPs, M2e monoclonal antibody

14C 보다 더 넓은 범위의 cross reactivity 를 보이고, 더 높은 항체를 유도함으로써 효과적인 universal vaccine 으로서의 개발 가능성을 제시함.

- 또한 E.coli 에서 H5N1의 M2e protein monomer 혹은 tetramer를 발현하여 inactivated H9N2 virus와 혼합하여 vaccine으로 적용함. 이는 혼합백신의 접종군 mouse에서 H9N2 뿐만 아니라 H5N2에 대해서 충분한 방어가 가능함. Human H3N2에서는 vaccine alone, M2e alone 그룹에 비해서는 우수하지만 부분적인 교차방어능을 가짐.
- 이외에도 M2e polymer 를 base 로 T lymphocyte epitope 와 H3 hemagglutinin 등의 protein 을 conjugation 한 fusion protein 을 vaccine 으로 활용한 다수의 연구 논문이 보고되고 있음.

제 7 장 참고 문헌

Stepanova LA et al. 2013, Immunogenicity of recombinant proteins including ectodomain of M2 influenza virus A. *Vopr Virusol.* May-Jun;58(3):21-5.

Reese KA et al. A Novel Lactococcal Vaccine Expressing a Peptide from the M2 Antigen of H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus Prolongs Survival of Vaccinated Chickens. 2013. *Vet Med Int.* 2013:316926

Gao X et al. Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge. 2013. *Antiviral Res.* Apr;98(1):4-11

Andersson AM et al. Increased immunogenicity and protective efficacy of influenza M2e fused to a tetramerizing protein. 2012. *PLoS One.* 7(10):e46395

Liu X et al. Enhanced immune response induced by a potential influenza A vaccine based on branched M2e polypeptides linked to tuftsin. 2012. *Vaccine.* Oct 12;30(46):6527-33

Wang BZ et al. Enhanced influenza virus-like particle vaccines containing the extracellular domain of matrix protein 2 and a Toll-like receptor ligand. 2012. *Clin Vaccine Immunol.* Aug;19(8):1119-25

Kim MC et al. Multiple heterologous M2 extracellular domains presented on virus-like particles confer broader and stronger M2 immunity than live influenza A virus infection. 2013. *Antiviral Res.* Sep;99(3):328-35

Kim EH et al. Prokaryote-expressed M2e protein improves H9N2 influenza vaccine efficacy and protection against lethal influenza A virus in mice. 2013. *Virol J.* Apr 3;10:104

Ebrahimi SM et al. In contrast to conventional inactivated influenza vaccines, 4xM2e.HSP70c fusion protein fully protected mice against lethal dose of H1, H3 and H9 influenza A isolates circulating in Iran. 2012. *Virology.* Aug 15;430(1):63-72

Wang B et al. Protective efficacy of a broadly cross-reactive swine influenza DNA vaccine encoding M2e, cytotoxic T lymphocyte epitope and consensus H3 hemagglutinin. 2012. *Virology*. Jun 27;9:127.

Wolf AI et al. Vaccination with M2e-based multiple antigenic peptides: characterization of the B cell response and protection efficacy in inbred and outbred mice. 2011. *PLoS One*. 6(12):e28445

Li R et al. Development of live attenuated *Bordetella pertussis* strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e. 2011. *Vaccine*. Jul 26;29(33):5502-11