

11-1543
000-002
244-01

발간등록번호

11-1543000-002244-01

구제역
아데노바
이러스와
인터페론
의
공동접종
을 통한
백신
접종
초기
돼지구제
역 예방
연구

최
종
보
고
서

2018

농림축산식품부

기술사업화지원사업
R&D Report

구제역 아데노바이러스와 인터페론의
공동접종을 통한 백신 접종 초기
돼지구제역 예방 연구
최종보고서

2018 . 4 . 17 .

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 농림축산검역본부

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “구제역 아데노바이러스와 인터페론의 공동접종을 통한 백신 접종 초기 돼지구제역 예방 연구”(개발기간 : 2015.12.18 ~ 2017.12.17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 1. 31.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향
협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박봉균
참여기관명 : (주)대성미생물연구소 (대표자) 조항원



주관연구책임자 : 이중복
협동연구책임자 : 고영준
참여기관책임자 : 이병형

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	115077-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.12.18 ~ 2017.12.17	단 계 구 분	24개월 / 24개월
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	구제역 아데노바이러스와 인터페론의 공동접종을 통한 백신 접종 초기 돼지구제역 예방 연구			
연구책임자	이중복	해당단계 참 여 연구원 수	총: 37 명 내부: 14 명 외부: 23 명	해당단계 연구 개발 비	정부:200,000천원 민간:68,000천원 계:268,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 37 명 내부: 14 명 외부: 23 명	총 연구개발비	정부:200,000천원 민간:68,000천원 계:268,000천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 산학협력단, 농림축산검역본부			참여기업명 (주)대성미생물연구소	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약				보고서 면수	
<p>본 연구에서는 1)번째로는 인터페론을 생성하는 나노젤을 제작하였고 2)번째로는 대장균에서 인터페론을 생산하는 시스템을 구축하였으며, 3)번째로는 IL2 유전자가 탑재된 아데노바이러스를 제작하였다. 4)번째로는 면역 및 진단 항원을 구제역아데노바이러스가 감염된 세포로부터 생산하고 정제하는 기술을 습득하였다. 따라서 1) Nanogel 담체 기술 특허 1건, 2) 대장균 인터페론 생산 기술 특허 1건 및 3) 논문 게재 4) 구제역 진단 항원 생산 기술에 대한 및 기술이전 1건, 5) 학술발표 4건, 6) 정책활용 1건, 7) 인력개발 3건의 성과를 거두었다.</p>				75	

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 나노기술을 이용한 돼지 인터페론의 방출 지연 기술 개발과 면역력 분석 및 실험 효성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 세포에 독성이 없고 면역 증진 효과가 있는 Nanogel 탐색 및 제작 - RD-NG의 합성 및 마우스 모델 시험 - RD-NG에 반응성이 있는 돼지 연구 모델 탐색 ○ 돼지 인터페론의 공동접종에 의한 돼지 구제역 아데노바이러스 백신의 방어력 및 면역력 증진 <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 인터페론 알파8 유전자의 클로닝 - 재조합 돼지 인터페론 알파8의 발현 및 정제 - 재조합 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과 검증 ○ 돼지 구제역 아데노바이러스의 공장스케일 대량생산 기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 바이오리액터를 이용한 구제역 아데노바이러스의 공장스케일 생산기술 확립 - 습득한 기술을 이용하여 구제역 아데노바이러스를 대량 생산하고 면역원성 시험 ○ 돼지 인터페론 유전자가 삽입 된 아데노바이러스의 공장스케일 대량생산 기술 확보 및 기술 전수 <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 인터페론, IL2, CD40L 등의 유전자 클로닝 및 아데노바이러스에 삽입 - 상기의 아데노바이러스의 공장스케일 대량생산 기술 확보 및 전수 - 구제역 아데노바이러스와 공동접종 효과 확인 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지 인터페론 알파8 연구 결과 논문 게재 (Immune Network, 2017) ○ 돼지 인터페론 알파8 특허출원 및 기술이전 (출원 번호 : 10-2016-0131075) ○ poly IC 담지 Nanogel 담체 특허출원 (출원 번호 : 10-2018-0007280) ○ 학술발표 4건, 정책 활용 1건, 인력 개발 3건 ○ 구제역 아데노바이러스를 이용한 구제역 항원 생산 기술에 대한 기술이전 및 산업화 진행 중 (메디안디노스틱) 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지 구제역 아데노바이러스 대량생산 기법에 대한 기술이전 및 산업화 ○ 돼지 인터페론 알파8의 약리학적 특성 연구 및 제품화 ○ Nanogel 담체를 이용한 구제역 백신 개발 및 산업화 ○ 구제역 항원을 이용한 구제역 항체 진단 기법 개발 및 제품화 					
중심어 (5개 이내)	구제역	아데노바이러스	대량생산	인터페론	나노겔 (Nanogel)	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of swine interferon release delay technology using nanotechnology and analysis of immunity and effectiveness <ul style="list-style-type: none"> - Production and efficacy evaluation of Nanogel carrying poly IC ○ Establishment and technology transfer of industrial scale mass production technology of adenovirus with insertion of swine interferon gene <ul style="list-style-type: none"> - Gene cloning and adenovirus insertion of swine interferon, IL2 and CD40L - Establishment and technology transfer of industrial scale mass production technology of adenovirus with insertion of swine interferon, IL2 and CD40L - Validation of effects of simultaneous inoculation with FMD adenovirus ○ Establishment of industrial scale mass production technology of swine FMD adenovirus <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of industrial scale production technology of FMD adenovirus using bioreactor - Mass production of FMD adenovirus through the acquired technology and performance of immunogenicity experiment ○ Enhancement of protectivity and immunity of swine FMD adenovirus vaccine by simultaneous inoculation with swine interferon <ul style="list-style-type: none"> - Cloning of swine interferon alpha8 gene - Expression and purification of recombinant swine interferon alpha8 - Validation of antiviral effect of recombinant swine interferon alpha8 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Publication of research paper on swine interferon alpha8 (Immune Network, 2017) ○ Patent application and technology transfer of swine interferon alpha8 (Application number : 10-2016-0131075) ○ Patent application of Nanogel carrying poly IC (Application number : 10-2018-0007280) ○ 4 academic publications, 1 policy application, 3 human resources development results ○ On the progress of technology transfer and industrialization of FMD antigen production technology using FMD adenovirus (Mediandiagnosics) 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Technology transfer and industrialization of mass production technology of swine FMD adenovirus ○ Pharmacological characteristics analysis and commercialization of swine interferon alpha8 ○ Development and industrialization of FMD vaccine using Nanogel carrier ○ Development and commercialization of FMD antibody diagnosis technique using FMD antigen 					
Keywords	FMD	Adenovirus	Mass production	Interferon	Nanogel	

< **Table of Contents** >

1. Introduction	1
2. Status of domestic and foreign technology development	2
3. Contents and results of research	16
4. Research aim achievement level and contribution	56
5. Application plan	57
6. Foreign science technology information collected during research	61
7. Security level of research results	66
8. Research facilities and equipments registered at National Science and Technology Information System	67
9. Safety measures implementation results	68
10. Representative research results	70
11. Supplemental information	71
12. Reference	72

<Annex> Self-evaluation report

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	2
3. 연구수행 내용 및 결과	16
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	56
5. 연구결과의 활용계획 등	59
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	61
7. 연구개발성과의 보안등급	66
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	67
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	68
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	70
11. 기타사항	71
12. 참고문헌	72

<별첨> 자체평가의견서

1장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1절. 연구개발 목적

- 돼지 구제역 아데노바이러스의 공장스케일 대량생산 기술 확립
- 돼지 인터페론의 공동접종에 의한 돼지 구제역 아데노바이러스 백신의 방어력 및 면역력 증진
- 돼지 인터페론 유전자가 삽입 된 아데노바이러스의 공장스케일 대량생산 기술 확보 및 기술 전수
- 나노기술을 이용한 돼지 인터페론의 방출 지연 기술 개발과 면역력 분석 및 실효성 분석

1-2절. 연구개발의 필요성

- 2010/2011년에는 전국적으로 구제역이 발생하여 약 3조원의 경제적 피해를 입혔다. 2014/2015년에는 전국적으로 백신을 접종하고 있는 상황에서도 구제역이 발생하여 피해액이 600억 원 이나 발생하였다. 2011년부터는 축산차량에 장착한 GPS와 구제역백신에 의해서 피해가 경감 되었다.
- 구제역백신에 의해서 피해가 경감되기는 했으나 이상육 발생이라는 또 다른 구제역백신의 간접 피해가 발생하여 양돈 산업에 1년에 1천 억 원 이상의 피해를 보게 하는 것으로 보고되어 있다. 구제역을 종식 시켜야 하는 것은 현실인데 백신을 접종하니 이상육의 발생과 백신비용이 부담 되는 것도 현실이다.
- 백신접종이 정착단계에 올랐지만 이상육 발생으로 접종을 기피하는 분위기가 형성되면서 출하직전 돼지에서 구제역이 발생하는 현상이 발생하게 되었다. 이러한 피해를 막기 위해서는 이상육이 생기지 않고 출하직전 돼지한테 접종했을 때 구제역이 발생하지 않아야 한다.
- 본 연구진은 이러한 현장애로를 풀어주기 위한 바람직한 백신을 개발하고자 하여서 지난 3년 동안 연구를 수행하였던바 아데노바이러스를 이용한 벡터 백신을 개발하였다. 그러나 이 백신만으로는 출하직전에 구제역바이러스를 신속하게 막아주고 방어면역력을 출하 때까지 충분히 유지하지 못할 것으로 판단되었다.
- 이에 기존 백신 대비 다소 미진한 면역력을 보충하고 구제역이 발생하고 있는 지역에서도 구제역 발생을 막아 줄 수 있는 백신을 개발하여 차폐 혹은 현장에 적용해 보고자 한다.

1-3절. 연구개발 범위

- 구제역 아데노바이러스 백신의 대량 생산 기술을 확립
- 아데노바이러스를 이용한 각종 분자 면역 보조제 생산 및 공동접종
- 돼지 인터페론 알파8의 클로닝
- 재조합 돼지 인터페론 알파8의 발현 및 정제
- 재조합 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과 검증
- poly IC 담지 Nanogel 담체 제작

2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호 D-04

2-1절. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
아데노바이러스 벡터를 이용한 돼지 구제역O형 방어 벡터백신 개발	대한민국	30%	70%	100%	
아데노바이러스의 공장스케일 대량생산 기술 확립	미국	30%	50%	90%	
돼지 인터페론의 면역력 증진	대한민국/미국	80%	80%	90%	
poly IC 및 Nanogel	프랑스/미국	30%	30%	70%	

- 1) 개발 기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표 기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표 수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2-2절. 특허분석

1. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외
특허 DB	특허정보원(www.kipris.or.k), 국제특허청(www.wipo.int), 미국특허청(www.uspto.gov)등
검색기간	최근 20년간
검색범위	1. 구제역 (Foot and Mouth disease, FMD) 2. 소(bovine), 돼지(porcine), 인간(human)을 포함한 구제역 3. 소(bovine), 돼지(porcine), 인간(human), 아데노바이러스(Adenovirus)를 포함한 구제역

2. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		Adenovirus를 이용한 구제역 백신의 생산기술 개발	
Keyword		Adenovirus, Porcine, Bovine, Human, Foot-and-Mouth disease, Vaccine	
검색건수		432	
유효특허건수		143	
핵심특허 및 관련성	특허명	구제역에 대한 합성 펩티드 백신 (synthetic peptide vaccines for foot-and-mouth disease)	구제역 SAT 2형 VII 지역형의 방어항원 단백질을 발현하는 재조합 바이러스 (Recombinant virus expressing protective antigen protein of foot-and-mouth disease AST 2-VII topotype)
	보유국	미국	대한민국
	등록년도	2006	2016
	관련성(%)	50%	50%
	유사점	본 발명은 구제역 바이러스의 VP1 캡시드 단백질 유래의 표적항원 부위를 포함하는 면역원으로서의 펩티드 조성물의 용도에 관한.	본 발명은 구제역 SAT 2형 VII 지역형의 방어항원 단백질을 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드, 상기 재조합 플라스미드를 이용하여 제조한 재조합 구제역 바이러스 및 상기 재조합 바이러스를 유효성분으로 함유하는 구제역 예방용 백신 조성물에 관한 것.
	차이점	본 연구에서는 구제역 바이러스의 캡시드 단백질을 목표로 한 재조합 아데노바이러스를 제작하는 것을 목표로 하여 특허기술과는 최종산물에서 차이 있음	본 연구에서는 chaperon 일부를 조작한 아데노 바이러스를 이용한 구제역 백신을 만드는 것을 목표로 하고 있어, 상기 특허기술과는 백터의 조작방법 및 발명의 최종산물 부분에서 차이 있음

개발기술명		돼지 인터페론의 면역력 증진
Keyword		FMDV vaccine, Adenovirus, interferon
검색건수		631
유효특허건수		15
핵심특허 및 관련성	특허명	돼지 인터페론 알파-돼지 인터페론 감마를 동시발현하는 재조합 아데노 바이러스 (Recombinant adenovirus simultaneously expressing porcine interferon alpha and porcine interferon gamma)
	보유국	대한민국
	등록년도	2013
	관련성(%)	60%
	유사점	본 발명은 돼지 인터페론 알파와 인터페론 감마를 동시에 발현시켜 돼지 인터페론 알파와 감마를 한번에 처리할 수 있게 하여 구제역 바이러스에 대한 억제 효과를 증강시킬 수 있는 재조합 아데노바이러스에 관한 것.
차이점	본 연구에서는 NF-beta, IL2, CD40L를 클로닝한 아데노 바이러스를 목표로 하고 있어, 상기 특허기술과는 아데노바이러스의 조작방법 및 발명의 최종산물 부분에서 차이 있음	

개발기술명		공장스케일 대량생산 기술 확립	poly IC 및 Nanogel
Keyword		Adenovirus, bioreactor	interferon nanoparticle
검색건수		175	385
유효특허건수		31	7
핵심특허 및 관련성	특허명	아데노바이러스 벡터의 생산과 정제를 위한 신규한 방법 (Method for the production and purification of adenoviral vectors)	항체의 FC 영역에 특이적 결합능을 가지는 리포펩타이드 및 그를 포함하는 항원 인지형 지질 나노입자 (Lipopeptides with specific affinity to Fc region of antibodies and antigen-recognizing lipid nanoparticles comprising the same)
	보유국	미국	대한민국
	등록년도	2007	2010
	관련성(%)	70%	28%
	유사점	바이옱렉터를 이용한 대량 배양과 TFF를 이용한 농축방법	nanoparticle bound system을 이용한 투여
차이점	본 연구에서는 구체역을 클로닝한 아데노 바이러스를 목표로 하고 있어, 상기 특허기술과는 클로닝 된 아데노바이러스 및 발명의 최종산물 부분에서 차이 있음	Lipopeptides 아닌 나노젤을 이용하여 인터페론알파 방출을 조절함	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

2-3절. 논문분석

1. 논문분석 범위

대상국가	미국
논문 DB	PubMed
검색기간	최근 20년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

2. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		Adenoviral vectored FMDV	immunoadjuvant가 포함된 FMDV 백신
Keyword		FMDV, adenoviral vector	FMDV, adjuvant, immunoadjuvant
검색건수		44	5
유효논문건수		37	2
핵심논문 및 관련성	논문명	Adenovirus-vectored type Asia1 foot-and-mouth disease virus (FMDV) capsid proteins as a vehicle to display a conserved, neutralising epitope of type O FMDV	Poly ICLC increases the potency of a replication-defective human adenovirus vectored foot-and-mouth disease vaccine
	학술지명	Journal of virological methods	virology
	저자	Chai Z 등	Fayna Diaz-San segundo 등
	게재년도	2012	2014
	관련성(%)	70%	50%
	유사점	adenoviral vector를 기반으로 하는 FMDV 백신을 사용하였으며 여러 혈청형을 방어하기 위해 혈청형 2종 (Asia, O)에 대한 유전자를 이용한 백신 개발	adenoviral vector를 기반으로 하는 FMDV 백신을 Poly ICLC로 면역반응을 증가시켜 이용하는 백신 개발
	차이점	개발된 백신은 면역원성이 효과적이지 못한 subunit 백신인 반면 본 연구에서는 생독백신의 장점인 높은 면역원성과 사독백신의 장점인 안전성이 확립된 백신 개발임	adenoviral vector를 기반으로 하는 FMDV 백신을 기반으로 하였으나 본 연구는 immunoadjuvant를 porcine interferon등을 사용하여 목적동물에서의 면역원성을 향상시킬 백신 개발임.

개발기술명		FMDV 백신	poly IC 및 Nanogel
Keyword		FMDV, vaccine	interferon nanoparticle
검색건수		249	17,100
유효논문건수		137	8
핵심논문 및 관련성	논문명	Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency	Hyaluronic Acid-Gold Nanoparticle/Interferon α Complex for Targeted Treatment of Hepatitis C Virus Infection
	학술지명	Antiviral Research	American Chemical Society
	저자	B. Mohana Subramanian 등	Min-Young Lee
	게재년도	2012	2012
	관련성(%)	70%	47%
	유사점	FMDV serotype O의 VP1-2A-3C coding sequences 를 VLP 형태를 이용하여 FMDV 백신 개발	nano particle을 이용한 interferon의 전달
	차이점	생체 전달 시스템으로 VLP 기반 구제역 백신인 반면 본 연구는 아데노바이러스 기반 유전자 전달 백신 개발임	virus infection의 치료목적이 아닌 vaccine과 함께 사용하여 보다 강력한 면역력 획득.

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

2-4절. 제품 및 시장 분석

1. 생산 및 시장현황

가. 국내 관련(유사) 제품의 생산 및 시장 현황

- 국내 관련(유사) 제품의 생산
 - 현지 생산시설의 부재로 인하여 국내에서는 구제역 백신을 생산하지 못한다.

국내		국외	
경쟁 기업명	제품명	경쟁 기업명(국명)	제품명
-	-	메리알(프랑스, 영국)	Aftopor 백신
-	-	인터베트(네덜란드)	Decivac 백신
-	-	아르헨티나	Aftogen 백신
-	-	러시아	CNHKO 백신

▪ 시장현황:

- 2014년 국내 동물약품 내수시장 규모는 5,839억 원이었으면, 그중 양돈용 동물약품 시장규모가 2,347억 원(40%)으로 가장 큰 것으로 나타났다. 한국 동물약품협회에 따르면, 국내 동물약품 내수시장은 2008년(4,208억 원)부터 2012년(5,837억 원)까지 지속적으로 상승하다가 2013년 5,469억 원으로 마이너스 성장을 기록했다. 하지만 2014년에는 구제역발생 등으로 백신, 소독제 판매량이 증가하며 5,840억 원으로 다시 성장세로 돌아섬(출처 :DailyVET: 2015년07월09일자)
- 경쟁 제조사별 비중으로는 국내외 통틀어 10개 업체가 전체 시장의 80% 이상을 차지한 형태임(출처: 이코노미스트: 2010년 5월호).
- 2012년부터 시행되는 국내 항생제 금지에 따라 치료 및 예방제 시장의 급격한 성장이 예상된다.
- 국내의 한 해 구제역 백신 수요량은 약 3천 500만 - 4천만 두분(1회 접종량), 780,000병/50두분 정도로 추정된다.(한국동물약품협회, 구제역 백신 시장 규모 예측, 2011년).
- 국내 구제역 시장 규모는 최소 350억원, 최대 600억원이 이를 전망이다.(연합뉴스, 2011년 7월 26일자).
- 다국적 기업인 인터베트사와 메리알사가 국내 백신 수요량의 100% 공급하고 있다.

구 분	사육규모(두)	접종	소요물량(Dose)	비 고
소	3,000,000	년2회(2)	13,000,000	
돼지	13,000,000	년1회(2)	26,000,000	
계	16,000,000	-	39,000,000	

수요처	국명	수요량 ¹⁾	관련제품 ²⁾
농림부	대한민국	39,000,000	Aftopor, Merial Decivac FMD DOE, Intervet/SPAH
팜스월드	대한민국, 충남	540,000	Aftopor, Merial
대전충남양돈조합	대한민국, 충남	65,000	Decivac FMD DOE, Intervet/SPAH
삼화육종	대한민국, 충남	22,000	Aftopor, Merial
선진한마을	대한민국	540,000	Aftopor, Merial
돈마루	대한민국	43,000	Aftopor, Merial
태흥축산	대한민국	108,000	Decivac FMD DOE, Intervet/SPAH
Promeritage Vietnam	베트남 ³⁾	58,000,000	Aftopor, Merial
Transcend Phils. Inc.	필리핀 ³⁾	28,000,000	Aftopor, Merial
PVG Thailand	태국 ³⁾	17,000,000	Aftopor, Merial

* ¹⁾연간 사용 추정량(돼지 마리수=모돈 두수x월간 분만회수x10두 자돈x12개월)

* ²⁾국내 긴급 수입된 FMD 백신,

* ³⁾출처; 국가통계포털(www.kosis.kr)

- 우리나라의 한 해 구제역 백신 소요량은 3천500만~4천만두 분으로, 구제역 백신 가격은 바이러스 타입이 하나인 경우 1달러, 3가지 바이러스 혼합형인 경우 1.5달러에 달해 시장 규모는 최소 350억원, 최대 600억원 시장에 이릅니다.
- 구제역 백신의 경우 전량 수입에 의존하고 있어 막대한 외화 손실이 되고 있으며, 또한 항체 생성률도 낮은 문제점이 있어 이를 극복할 수 있는 변역원성 증강용 분자 어쥬번트의 시장 규모는 점차 확대 될 것으로 예상되며, 이를 통한 백신의 소요량 감소로 인한 외화절감 효과도 있을 것으로 사료된다.
- 면역관련 치료제의 국내 시장규모는 매년 13%이상 성장하고 있으며 2010년에 1000억달러 이상의 시장규모가 예상됨. 각종 난치성질환의 증가로 면역증강제의 수요증가가 예상된다.
- 국내의 면역질환 치료를 위한 연구개발 수준과 수행 능력은 최근 크게 향상되었으며, 산업체에서의 백신의 개발 능력 향상으로 면역질환 치료제 시장규모가 확대되고 있다.

나. 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 국외 관련(유사)제품의 생산
 - 구제역 사독백신은 다국적 기업인 인터베트사와 메리알사가 주로 제조 판매하고 있으며, 아르헨티나와 러시아의 경우는 자체적으로 구제역 백신을 제조 판매한다.

- 국외 FMD Vaccine의 경우 러시아의 agrovets사 10종, 브라질 Bayer Saude animal사 1종, 아르헨티나 Biogenesis-bago S.A사 2종, 인도 Biovet private limited사 1종, 보츠와나 Bostswana Vaccine Institute사 1종, 인도 Brilliant Bio Pharma Ltd사 1종 등 많은 백신이 나와 있음. 특히 우리나라와 근접한 중국의 경우 Tiankang Biopharmaceutical사 6종의 백신이 나와 있으며, 우리나라는 현재 merial사의 백신을 사용하고 있음 국외의 모든 제품은 사독백신을 생산하고 있음.

(The Center for Food Security & Public Health - Vaccines: Foot and Mouth Disease, http://www.cfsph.iastate.edu/Vaccines/disease_list.php/disease_list.php?disease=foot-and-mouth-disease&lang=en)

■ 세계의 구제역 백신 시장 (국가통계포털 추정치, 2008년)

- 전 세계 동물백신 시장은 2008년도 현재 약 40억 달러이며 연평균 5.9%의 성장세를 지속하여 오는 2013년에는 이르면 50억 달러대를 기록할 것으로 예상된다.(출처: 약업닷컴 2008년 2월 19일자, ImmunoBiosciences, Inc).
- 소 사육두수: 1,347,473,112두, 양돈사육두수: 941,281,626두(국가통계포털 2008년).
- 총 2,288,754,738두 x 30%(back-yard제외) x 600원/두/비용 = 약 4,120억원
- 전 세계 중 구제역 호발지역은 중국, 동남아시아, 인도, 남미 및 러시아 등이 있다.(OIE 보고서).
- 남미의 경우, 아르헨티나에 OIE reference lab.이 위치하고 Homologous serotype인 O-campos를 사용
- 인도의 경우, 다국적기업(메리알, 인터벳/쉐링푸라우 등) 제조시설이 위치하고 있어, 수출을 통한 접근이 어려운 상태이다.
- 2010년 중국시장에서의 구제역백신 시장은 약 3억달러 정도 형성되었으며, 전 세계적으로는 이보다 큰 시장을 형성한다. (출처: Reuters; 2011년 1월 31일자).
- 따라서 수출목표시장을 동남아시아(베트남, 태국) 및 러시아 등으로 예측되고 있다.
- 어쥬번트와 면역관련 치료제의 전체 시장규모는 매년 13%이상 성장하고 있으며 2010년에 1000억달러 이상의 시장규모가 예상되고 있다(국가기술지도 2002).
- 동물 백신의 사용량 증가에 따른 어쥬번트의 사용량도 점차 증가 하고 있는 실정으로 효과적인 분자 어쥬번트의 시장도 확대될 전망이다.
- 최근의 시장 보고에 따르면 전 세계적인 구제역 백신 시장의 꾸준한 성장이 기대됨. 'Foot and Mouth Disease (FMD) Vaccines Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2014 - 2020'에서는 2014년에서 2020년간의 백신시장의 연평균 성장률이 8.8%일 것으로 예측함. 2013년도의 FMD 백신 시장은 5억 1천만 US달러에 근접하였고 이에 따라 2020년도에는 9억 5천만 달러에 이를 것으로 예상됨.

<2011년도의 FMD vaccine의 국제적 수요 산정>

지역	투약량 / 년
중국	16억
남미	5억
아시아	2억
중동	2천만
유럽지역	1천 5백만
아프리카	1천 5백만

(‘Albany, NY, April 24, 2015 (GLOBE NEWSWIRE)’)/(표-Institute for American Health)(<http://globenewswire.com/news-release/2015/04/24/728138/10130637/en/Foot-and-Mouth-Disease-Vaccines-Market-to-Earn-Highest-Revenues-from-APAC-to-Hit-US-0-95-billion-by-2020-Transparency-Market-Research.html>)

2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화, 제품화 계획

○ 제품의 특징

- 인터페론알파를 아데노바이러스화 및 담체화를 통하여 백신접종 후 단기간 (최소 0-14일에서 최대 4주)의 구제역 차단에 연이은 면역 증강을 위한 인터페론 구제역 백신을 개발하고자 함

- 이상육을 발생시키지 않는 백신의 개발로 높은 제품 경쟁력을 확보함

- 국내 분리주를 이용한 맞춤형 구제역 백신의 생산

- 국내 분리주를 이용한 맞춤형 백신으로 해외 수입 백신을 대체할 수 있음

○ 개발 제품의 국내 시장 및 해외시장 산업화 방안

- 국내 분리주를 이용한 맞춤형 돼지 구제역 백신의 생산

- 해외 수입 돼지용 구제역백신을 대체하여 연간 600억원의 수입대체효과

- 매년 구제역 발생으로 인한 축산업의 연간 경제적 손실액을 최소화 함

- 이상육 발생이 없는 구제역 백신의 개발로 이상육 발생으로 인한 연간 1,324억원을 경제적 손실을 막음

● 구제역 백신의 해외시장 진출

- 구제역 백신은 국내분리주로 생산되었으나, 대부분이 중국 분리주와 유사성이 있으므로, 중국시장 및 극동아시아 지역을 목표로 우선적으로 수출을 진행함

- 제품화 첫해인 3차년도에는 세계 전체 구제역 백신 시장의 5%(280억원), 그 다음해에는 10%(561억)을 수출함

- 최종적으로 지속적인 새로운 구제역 분리주에 대한 백신 개발로 세계 구제역 백신시장의

30%(1683억원)의 점유율을 달성

- 2000년 이전에는 구제역의 발생이 없었고 국가정책이 빠른 전파를 차단하기 위한 살처분정책을 고수하여, 농림축산검역본부 해외전염병과를 제외하고는 연구활동이 전무한 상황이었다. 농림축산검역본부 해외전염병과에서도 국내 구제역 발병 시 예방을 위한 백신 연구가 한 두 건 시도되었으나, 차폐시설(BSL3 이상)이 없는 관계로 인해 성공적인 수행이 없는 상황이었다. 더하여 국내 구제역 전문가들은 백신 연구에 대해 많은 거부감이 있어서 국내백신업체 및 사설 연구기관에서 이에 대한 연구가 활발하지 않았던 상황이었다.
- 1962년 Vallee 등이 포름알데하이드로 생 바이러스를 불활화하여 백신을 만드는 연구를 시작하였으며, Waldmann등은 (1937) 포름알데하이드로 불활화하여 알루미늄하이드록사이드 겔과 혼합한 백신을 사용한 경험이 있음. 1960년대 초 소 초대신장세포(Bovine primary kidney cell)를 이용하여 구제역 바이러스를 대량으로 배양할 수 있는 백신생산 라인이 개발되었으며 이 백신은 1960년대 유럽에서 구제역 청정화를 이루는 계기가 되었음. 이후 햄스터 신장 유래세포(BHK-21)와 같은 세포가 개발되면서 구제역 바이러스가 성공적으로 대량 배양이 이루어지고 포름알데하이드에서 BEI(binary ethylenimine)에 의한 불활화 체계로 바뀌면서 백신의 안정성을 확보할 수 있게 되었다.
- 세계식량기구(FAO) 및 국제수역기구(OIE) 등은 구제역에 대한 심각성과 통상 관계 정립을 위해 전 세계 중앙연구소 및 지역 연구소를 운영하고 있으며 몇몇 나라들은 별도의 국가 정책에 따라 FMD바이러스에 대한 연구소를 운영하고 있음. 국내의 경우, 현재 FMD 백신 제조와는 별도로 농림축산검역본부에 구제역진단과를 신설하였고, FMD를 전문적으로 연구할 수 있는 시설을 보유하고 있다.
- 메리알의 Aftopor 제품은 O1 type(Manisa or Taiwan), A22(Iraq), Asia1 (Shamir)의 바이러스 strain 을 사용하여 불활화 바이러스 백신으로 판매되고 있음. 인터베트의 Decivac 제품은 Type O : O1-BFS, O1-Manisa, Type A : A10-Holl, A-Iran, A22-Iraq, A24-Cruzeiro, Type C : C1-Detm., C3, Type ASIA : ASIA1 의 strain을 사용하여 불활화 바이러스 백신으로 판매되고 있다.
- FMDV 국내 야외분리주의 유전자중 면역원성이 뛰어난 유전자(VP1, 3D)를 재조합 단백질로 발현하여 효과적인 백신개발이 필요함. 구제역 바이러스는 지속적으로 변이가 진행됨으로써 유전형과 항원형이 새로운 subtype이 보고되고 있는 가운데, 야외 질병 원인체와 백신 항원이 동질한 유전자 백신을 개발 가능한 기술력을 확보가 필요하다.
- 본 연구 결과 도출되는 방어항원 발현 시스템은 원인 병원체가 확인되면, 유전자의 분석과 합성에서 백신의 제작까지는 2개월 정도 소요됨. 이렇게 신속하게 백신을 제작할 있는 플랫폼을 구축하면 국가 재난형 질병 또는 긴급을 요하는 신종 바이러스성 질병에 효과적으로 대처가 가능하다.
- 본 연구에서 확립될 벡터 시스템은 동물 체내에서 방어항원을 발현시키기 때문에 체액성 면역뿐만 아니라 세포성 면역을 증가시키기 때문에 방어능이 우수하다.
- 이 시스템은 병원체 유전자의 일부만을 이용하기 때문에 백신을 안전하게 생산할 수 있

을 뿐만 아니라, 백신주의 병원성 복귀나 환경으로 배출 등이 없는 차세대 백신 플랫폼임. 따라서 특수한 차폐시설을 요하는 고위험성 바이러스에 대한 백신을 일반백신제조업체에서도 안전하게 생산할 수 차세대 백신제작 시스템으로 그 활용도의 제한이 없다.

- 동물 의약품 및 유전자 백신의 효용성을 확인하고, 유전자 백신의 제제화 연구를 통하여 산업화 및 제품화를 용이하게 한다.
- 고위험성 병원체를 일반백신생산라인에서 대량생산 공정으로 확립할 수 있고, 생산된 백신제형이 불활화 과정을 필요로 하지 않기 때문에 백신의 원가 경쟁력과 안정화된 제품을 개발할 수 있어 즉시 산업화가 용이하다.
- 이 백신제작 플랫폼은 특별한 기술적인 어려움이 없이 다양한 병원체의 방어항원을 발현시킬 수 있기 때문에, 다양한 가축질병 퇴치에 사용할 수 있음. 이를 통하여 농가의 소득증대 및 국가 경제에 이바지 할 수 있다.
- 계속적으로 바이러스의 변이가 진행됨으로써 유전형과 항원형이 새로운 subtype이 보고되고 있는 가운데, 야외 질병 원인체와 백신 항원이 동질한 유전자 백신을 개발 가능한 기술력을 확보한다.
- 연구 결과 도출되는 유전자 백신의 제작 기간은 2개월 정도 밖에 안되기 때문에 신종 바이러스에 대하여 신속하게 대처가 가능하다.
- 본 유전자 백신은 동물 체내에서 항원 발현 면역반응을 유발하는 백신으로서, 세포성 면역 및 체액성 면역을 증가시키고, 안정하며, 병원성 복귀 문제가 없는 제 3세대 백신이다.
- In vivo 상에서 활성 발현을 극대화하기 위해 항원 유전자 전달체계 최적화 기술을 개발한다.
- 동물 의약품 및 유전자 백신의 효용성을 확인하고, 유전자 백신의 제제화 연구를 통하여 산업화 및 제품화를 용이하게 한다.
- 대량생산 공정 확립 및 안정화 제형개발을 통한 원가경쟁력 및 안정화된 제품을 개발하여 산업화가 가능하다.
- 가축 질병 퇴치를 통하여 농가의 소득 증대 및 국가 경제에 이바지 할 수 있다.

나. 산업화를 통한 기대효과

- 본 연구의 최종 결과는 유전자 재조합 구제역 백신을 제작하는 기법을 확립하는 것으로, 연구과제가 종료되는 2015년에 구제역 백신의 예방정책의 변경여부에 따라 본 기술의 산업화 여부가 결정될 것으로 예상된다. 즉, 현재 사용되고 있는 구제역 사독백신에 더하여 유전자 재조합 구제역 백신의 사용을 승인하면 다음과 같은 경제적인 효과를 기대할 수 있을 것이다.

• (단위: 원)

산업화 기준 항 목	1년 후	2년 후	3년 후	계
직접 경제효과	60,000,000	60,000,000	60,000,000	180,000,000
경제적 파급효과	4,132,400,000	4,132,400,000	4,132,400,000	12,397,200,000
부가가치 창출액	28,000,000	56,100,000	168,300,000	252,450,000
합 계	4,220,400,000	4,248,500,000	4,360,700,000	

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드 가치 등 추정치

(1) 시장잠재력

- 국내 소요량: 39,000,000두분(1회 접종분), 780,000병/50두분

구 분	사육규모(두)	접종	소요물량(Dose)	비 고
소	3,000,000	년2회(2)	13,000,000	
돼지	13,000,000	년1회(2)	26,000,000	
계	16,000,000	-	39,000,000	

- 생산금액은: 230억원/년 (1회분 600원)

(2) 경제적인 효과

- 수입대체효과: 국내·외 경쟁업체 현황에서 언급되었듯이, 현재 국내에서 수입된 구제역 예방용 백신은 아래 표와 같이 약 600억원 정도임('10년 10월~'11년 3월, 사단법인 한국동물약품협회 자료). 본 기술제품 개발이 성공적으로 수행되어 상품화 시, 약 300억원의 수입대체효과가 있을 것으로 예측된다.

2010 ~ 2011년 구제역 발생 시 수입된 구제역 백신 현황(단위: 백만원)

공급 기업명	매출(국내점유율, %)
메리알 코리아	17,011(58%)
인터베트/쉐링푸라우 코리아	12,300(42%)
계	29,311(100%)

(3) 수출증대효과

- 동남아시아 지역의 구제역 상재국에 공급되고 있는 다국적기업 제품을 대체할 경우, 국내 동물약품 수출에 크게 기여할 전망이다.
- 축산규모가 우리나라보다 큰 베트남(총 3천만두), 태국(약 2.5천만두) 및 러시아(약 2천만두) 등지에 대한 수출을 목표로 당사의 해외 수출 파트너와 연계한 판촉으로 개발 종료 3년 후에는 최대 약 \$18,700,000 (75백만두x2회전x25%점유율x\$0.5/도즈)이상의 수출이 증대될 것으로 예측된다.

(4) 수입단가 인하 효과

- 구제역 제품의 국내 생산으로 인하여 외국에서 수입되는 완제품도 경쟁력을 확보하기 위해서는 현재의 가격보다 낮은 단위 가격으로 시장에 공급될 것으로 예상된다.

3. 제품화의 특성

강점 (Strength)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 구제역이 발병하는 지역에서 분리한 바이러스를 이용하기 때문에 방어능이 우수함 ▪ 특허 출원
약점 (Weakness)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 사독백신과 비교되는 중화항체가 수준
기회요인 (Opportunities)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 구제역 연 중 발생 가능성 높음 ▪ 구제역 백신 사용 후 발생을 감소에 따른 백신접종 인식 높음 ▪ 경쟁품 거의 없음 ▪ 국내 발생 균주를 이용한 백신제조로 항원 상동성 확보를 통한 시장 접근성 용이
위협요인 (Threat)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자재조합 구제역백신에 대한 인지도 저하(vs. Whole FMD virus백신)

3장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

3-1절. poly IC 담지 Nanogel 담체 제작

1. 이론적 접근방법

가. 인터페론 혹은 인터페론 유도체의 지연 방출 담체 개발

상기한 바와 같이 구제역바이러스에 저항하는 인터페론을 돼지에게 주입하여 구제역발생을 막고 구제역 아데노바이러스의 면역력을 향상시키기 위해서는 인터페론이 필수적이거나 인터페론은 최대 5일의 짧은 시간 동안만 구제역에 대한 방어력이 형성되고 그 이후는 구제역에 대한 방어가 어렵다. 인터페론을 대량생산하는 방법 중의 하나는 poly (I:C)를 구제역 아데노바이러스백신과 함께 접종하여 면역력을 높이는 방법이다. 본 연구진에서 돼지에게 Kg당 500 μ g의 poly (I:C)를 접종하여 실험해 본 결과 접종 6시간 후부터 9 ng/100 μ l씩 생성된 후에 48시간 이상 지속 되는 것을 확인할 수 있었다. 인터페론을 직접 이용한 구제역백신의 면역능을 증강시킬 수 있다는 연구결과가 알려져 있으므로 본 연구 과제를 수행하는 과정에서 용량과 유효성을 확인하는 실험이 동반되어야 한다. 그러나 실효성 면에서 산업화하는 데에는 어려움이 따를 것으로 생각된다. 체내에서 인터페론의 지속시간을 인위적으로 증가시키는 방법 중의 하나는 nanoparticle과 같은 담체를 이용하는 것이다. 본 연구진은 방출 지연 담체 작제 능력을 보유하고 있다.

2. 실험적 접근방법

가. 인터페론 혹은 인터페론 유도체를 탑재하기 위한 담체 개발

나노젤은 분자량과 고분자 구조 제어가 가능한 Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)를 기반한 inverse miniemulsion 중합으로 합성한다. 수용성의 개시제와 단량체 및 가교제를 물 상에 녹인 후, 계면활성제와 유기용매를 투입함으로써 inverse emulsion을 형성하여 중합을 진행한다. 이 때, emulsion이 형성되기 전에 단량체 수용액에 혼합함으로써 Poly I:C가 담지되어 있는 나노젤을 합성할 수 있다.

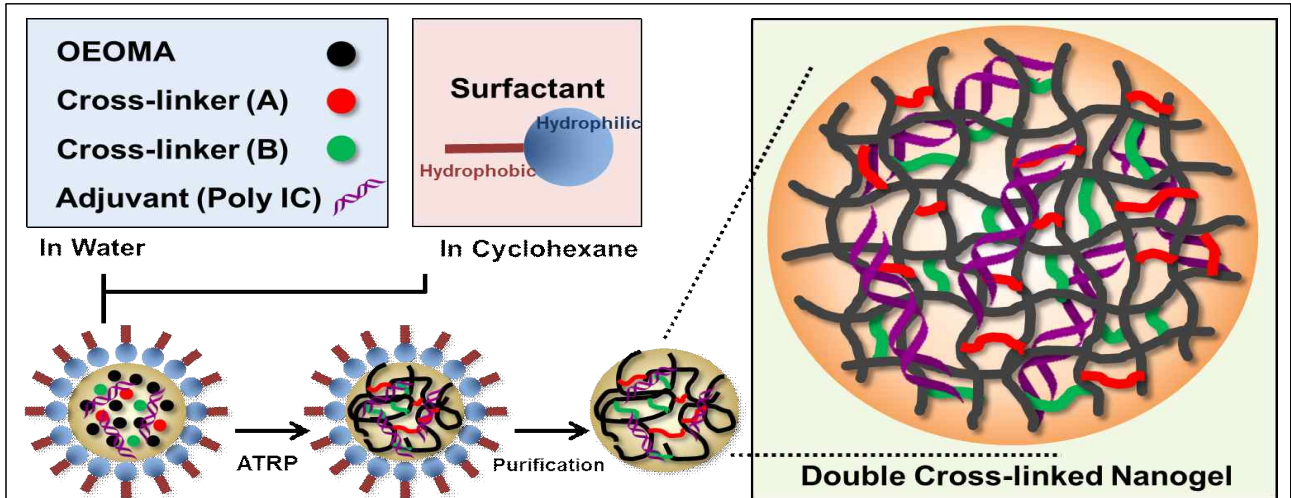


그림 1. Nanogel 합성 개념도

나. 제작된 담체와 아데노구제역바이러스 백신의 돼지 혼합접종 실험

각 그룹의 돼지에 인터페론알파와 아데노바이러스 및 인터페론알파와 담체와 1×10^9 PFU/ml 농도의 구제역 아데노바이러스 백신을 접종한 후에 혈중 인터페론의 양을 측정한다. 인터페론의 지속적인 방출을 측정하기 위해서 백신에 의한 면역이 형성되는 시점인 최소 2주에서 3-4주까지 담체에 담긴 인터페론 혹은 그의 유도체에 의한 인터페론의 형성을 혈액을 통해서 측정 분석한다. 인터페론과 동시에 투여한 아데노구제역백터백신에 의한 중화항체가를 측정하기 위해서 검역원 차폐 연구실에 혈액을 송부하여 중화항체가가 16배 이상 생성되었는지 확인한다.

3. 연구결과

가. Nanogels 제작

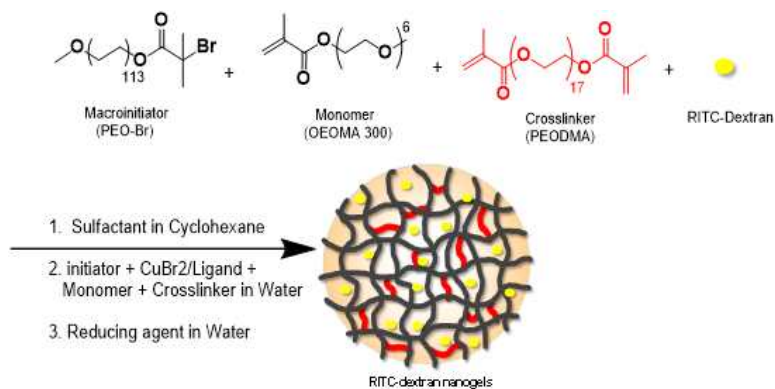


그림 2. RITC-Dextran-Nanogel 합성 개념도

Nanogel 종류로 Basic-Nanogel(B-NG), RITC-Dextran-Nanogel(RD-NG), Poly IC-Nanogel, Poly IC-RITC-Dextran-Nanogel로 제작하여 이 Nanogel들과 세포와의 독성

실험을 하기 위해 MTT 실험을 진행하였다. Mouse Raw264.7 세포에 Nanogels을 처리한 결과 poly (I:C)가 합성된 poly IC-Nanogel 과 poly IC-RITC-Dextran-Nanogel은 독성이 나타나 실험 24시간 이내에 사멸하였으며 basic-Nanogel과 RITC-Dextran-Nanogel은 poly (I:C)가 합성된 Nanogel에 비해 독성이 낮게 나타났다(그림 3).

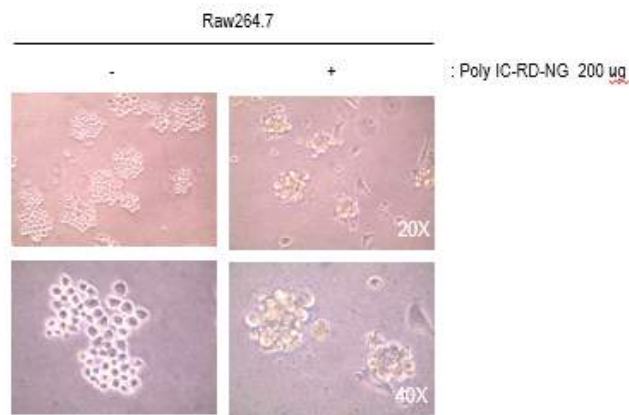


그림 3. poly (I:C)-RITC-Dextran-Nanogel의 세포 독성 확인

농도에 따른 nanogel의 독성을 확인하기 위하여 Raw264.7 세포에 0ug에서 200ug까지 Basic-Nanogel, RITC-Dextran-Nanogel을 처리하고 MTT한 결과 200ug까지 처리하여도 Raw264.7 세포에 독성이 없음을 확인 할 수 있었다. 또한 RITC-Dextran은 형광물질이기 때문에 세포 탐식 및 생체 내 Nanogel의 분포를 관찰하기 위해 유리한 점을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다(그림 4).

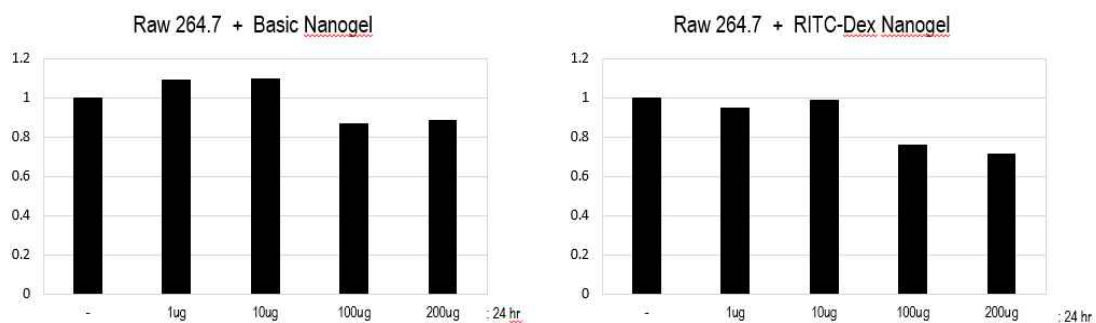


그림 4. Raw264.7 에 B-NG와 RD-NG와의 독성 검사

나. Mouse Raw264.7 + RITC-Dextran-Nanogel in vitro

(1) Mouse Raw264.7 에 주입한 RD-NG와의 uptake

이 실험은 Mouse macrophage 인 Raw264.7에 RITC-Dextran-Nanogel 을 처리해 줌으로써 Raw264.7이 RITC-Dextran-Nanogel을 uptake를 하는지 보기 위한 실험으로 이때 형광현미경을 이용하는 실험 이므로 Nanogel에 TRITC-Dextran을 합성하여 제작된 Nanogel 을 사용하였다. 먼저 60Φ dish에 cover glass를 깔고 Raw cell을 2.5×10^5 로 seeding후

RITC-Dextran-Nanogel 200ug 더한 후, 0hr, 24hr, 48hr, 72hr 으로 time dependent하게 조건을 두었다. Raw264.7이 자라있는 cover glass를 24 well plate로 옮겨 DPBS washing을 해준 후 Raw264.7을 cover glass 에 고정시키기 위해 acetone을 이용하여 fix를 해준 후 DAPI를 염색하여 slide glass 에 붙여주고 형광현미경으로 관찰하였다.

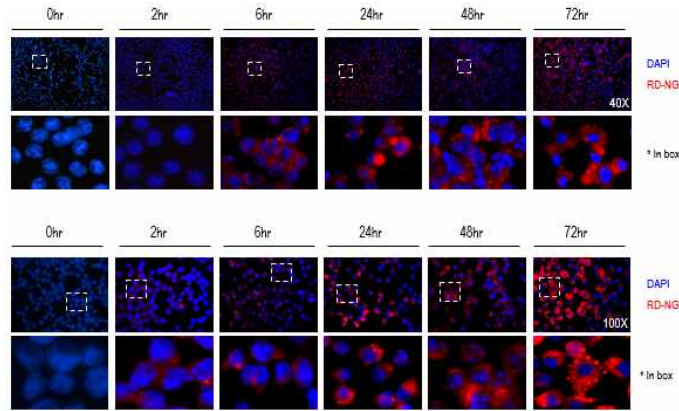


그림 5. Raw264.7세포에 의한 RD-NG의 uptake 확인

그 결과, (그림 5) control 0hr보다 24hr에서 확연하게 Raw264.7이 RITC-Dextran-Nanogel을 uptake 하였음을 Red signal로 확인할 수 있었으며, 점점 시간이 지나갈수록 Raw264.7이 더 많은 RITC-Dextran-Nanogel을 uptake한다는 것을 확인할 수 있었다.

(2) Mouse Raw264.7 에 주입한 RD-NG와의 RIG-1, IFN- α 의 증가

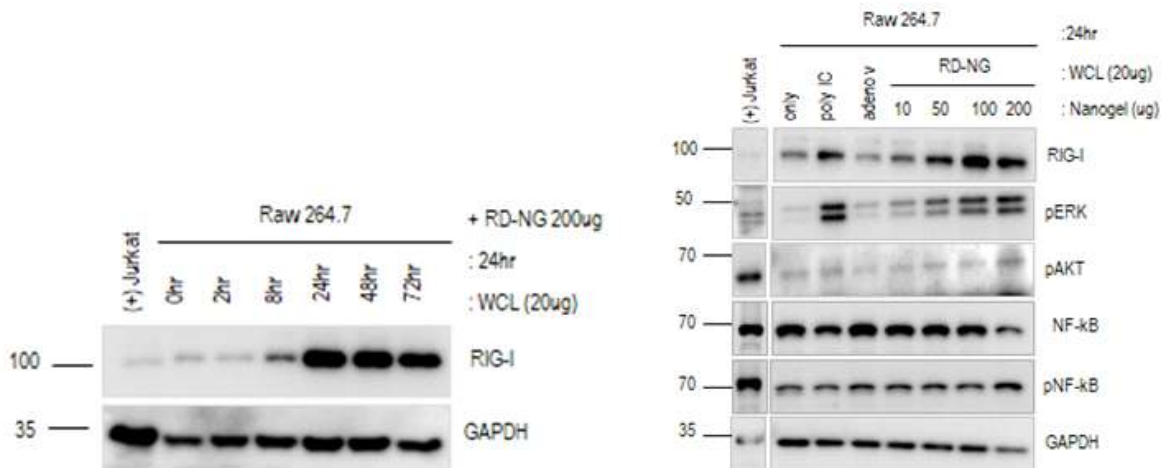


그림 6. RD-NG의 처리 시간과 농도에 따른 RIG-1에 대한 영향 확인.

이 실험은 Raw 264.7에 RITC-Dextran-Nanogel 을 처리해 줌으로써 Raw264.7이 RITC-Dextran-Nanogel을 uptake를 하여 RIG-1이 증가 하는지 확인하는 실험으로 western blot을 진행 하였다. Raw264.7 에 RD-NG 200ug처리해주고 0, 2, 8, 24, 48, 72hr 시간 별로 확인한 결과 0hr 보다 24hr 에서 RIG-1의 증가를 확인할 수 있었다(그림 6).

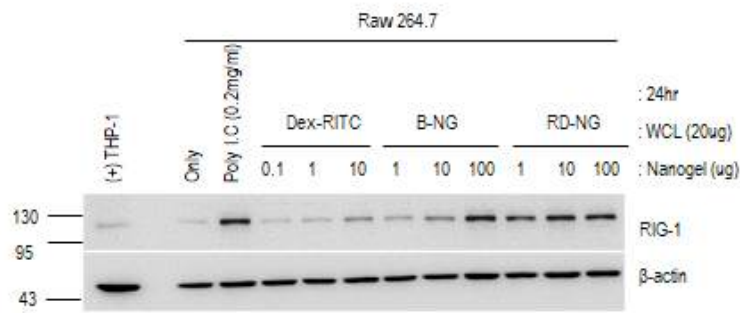


그림 7. 각 나노겔의 농도에 따른 Raw264.7의 반응

이는 Raw264.7 과 RD-NG가 면역 반응이 일어나 그 중 RLR signal 에서도 RIG-1이 증가됨을 확인 할 수 있었다. Raw264.7에 RD-NG 10, 50, 100, 200ug 농도 별로 처리하고 24hr 후 western blot 으로 확인한 결과 100ug, 200ug 에서 RIG-1이 증가하였음을 알 수 있었다. 더 낮은 농도의 Nanogel에서도 RITC-Dextran-Nanogel이 Basic-Nanogel 보다 반응이 좋았다(그림 7). 위의 결과와 같이 B-NG 보다 RD-NG와 RIG-1이 증가되었음을 확인할 수 있었고 또한 RITC-Dextran 보다 Nanogel에 합성이 된 RITC-Dextran-Nanogel 이 더 Raw264.7과 반응을 보였다. 더 나아가 이 과제의 목적인 돼지 구제역을 예방하는 백신의 제작을 목표로 최종적으로 Interferon- α 의 생성을 확인하기 위해 RLR(RIG-I-like receptor) signal에서 RIG-1을 시작으로 최종단계인 Interferon- α 의 생성을 확인하기 위해 Raw264.7에 RITC- Dextran-Nanogel을 처리 후 ELISA를 하였다.

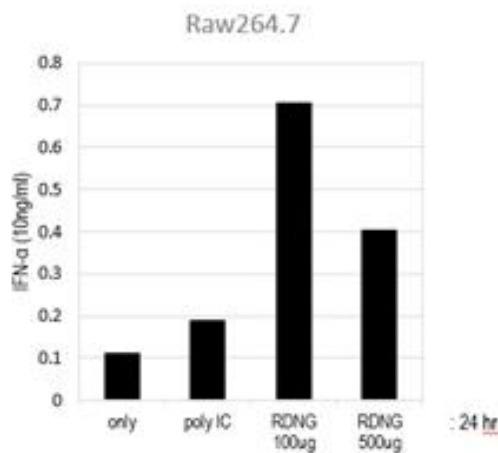


그림 8. INF- α ELISA 결과

RITC-Dextran-Nanogel 100ug에서 IFN- α 의 생성이 증가하였으며 오히려 더 많은 양을 처리하였을 경우에는 IFN- α 의 양이 줄어들었다(그림 8). Raw264.7은 RITC-Dextran-Nanogel와 반응하여 RIG-1을 활성화 시키고 IFN- α 를 분비한다.

(3) Mouse Raw264.7 에 주입한 RD-NG과의 직접적인 결합 증명.

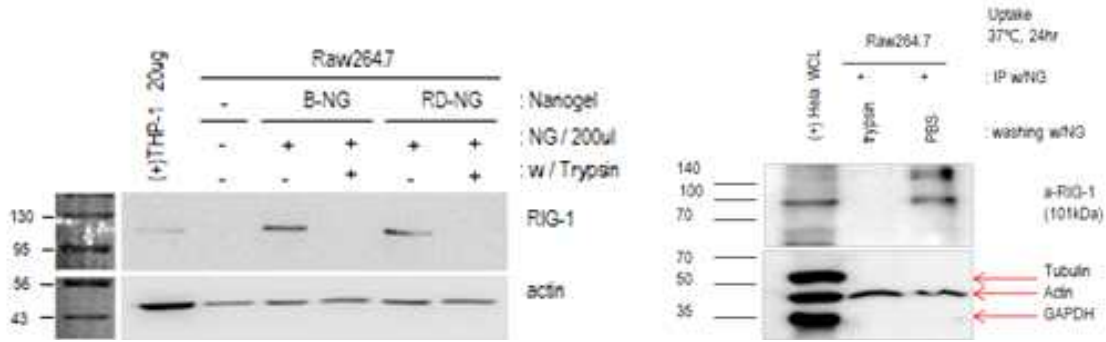


그림 9. B-NG와 RN-NG의 Raw264.7 세포에 대한 결합 확인

이 실험은 Raw264.7에 RITC-Dextran-Nanogel처리해 줌으로써 pattern recognition receptor 인 RIG-1이 RITC-Dextran-Nanogel의 구조를 인식하여 직접적으로 결합하였는지 확인하는 실험으로 Immunoprecipitation을 진행 하였다(그림 9). Raw264.7에 RITC-Dextran-Nanogel 200ug 처리하고 24 hr 후 하나는 washing을 trypsin 으로 해주 고 하나는 PBS로 해주어 RIG-1을 찍은 결과 PBS로 washing 해준 sample에서 RIG-1 band가 나왔으며 이는 RIG-1이 RITC-Dextran-Nanogel의 패턴을 인식하여 binding하였음을 알 수 있다. 동일한 방법으로 control과 Basic-Nanogel을 포함하여 진행한 결과, RIG-1이 Basic-Nanogel과도 직접적인 결합을 한다는 것을 알 수 있다. B-NG보다는 RD-NG와 Raw264.7 과 상호작용하였고 MTT assay에서도 세포에 독성이 없었으며, uptake결과에서도 시간이 갈수록 더 많이 uptake하는 것을 확인하였다. 또한 RD-NG를 처리함으로써 RIG-1이 증가하면서 IFN- α 도 증가 하였고 이것은 IP 결과에서 패턴인식수용체 RIG-1이 Nanogel 을 인식하여 결합하는 것을 알 수 있었다. 확인을 위해 B-NG와 RD-NG, Dextran-Nanogel을 가지고 IP반복실험 중이며 더 나아가 RD-NG의 농도를 더 높게 제작 하여 적은 양으로도 RIG-1과의 상호작용을 확인 할 것이다.

다. Mouse C57BL/6 + RITC-Dextran-Nanogel in vivo

(1) 연구재료 및 방법

in vitro상에서 Mouse Raw264.7이 RIRC-Dextran-Nanogel에 의해 RIG-1이 증가되는 현상을 확인하였으므로 in vivo상으로 확인 하고자 하였다. 동물은 Mouse C57BL/6 5주령 female 총23마리 사용하였으면 각 intravenous injection, intraperitoneal injection 하였고 PBS, poly IC, RITC-Dextran, Basic-Nanogel, RITC-Dextran-Nanogel 를 사용하였으며 injection하고 3day후에 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) 1set

Interferon- α 을 촉진하는 poly IC 보다 RITC-Dextran-Nanogel 100ug 에서 IFN- α 생성을 확인 하였으며 이 결과를 바탕으로 Mouse in vivo 에 접목시켜 진행하였다. C57BL/6에 RITC-Dextran-Nanogel을 injection 하여 주요 장기 (Spleen, Liver, Lung, Thymus, Lymph node)를 가지고 Immunofluorescence를 확인하였다.

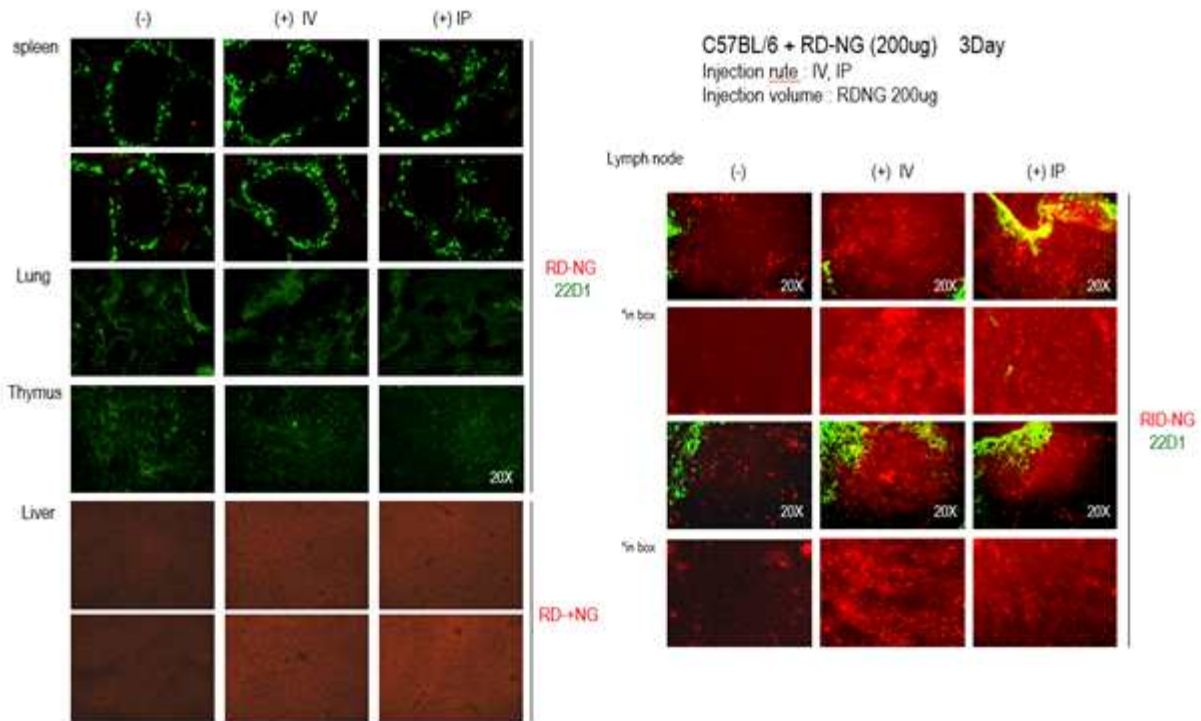


그림 10. Lymph node에서 면역 반응을 일으키는 RD-NG확인

위의 (그림 10) 에서 보이듯이 주요 면역반응을 일으키는 장기인 Spleen, Thymus, Lymph node 중에서도 Lymph node 에서 RITC-Dextran-Nanogel의 signal을 보였으면 22D1(SIGN-R1) 과도 merge가 되는 결과를 확인할 수 있었다. 이는 RITC-Dextran-Nanogel을 injection 해주면 Lymph node에 영향을 미치며 그로 인해 SIGN-R1이 분비 되는 것을 알 수 있다. 또한 주요장기 에서 RIG-1의 분비를 확인하기 위해 Western blot을 하였다.

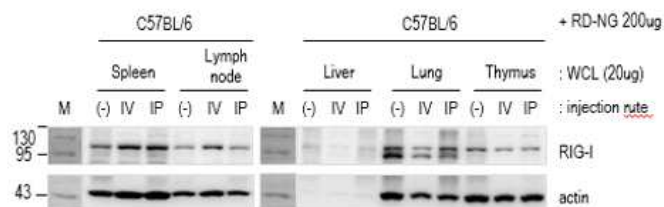


그림 11. RD-NG에 의한 RIG-1 유전자 활성화

Immunofluorescence결과와 비슷하게 Lymph node 에서 약하지만 RIG-1의증가를 확인 할 수 있었었다(그림 11). 이 결과들을 토대로 porcine 구제역 바이러스 제거를 위해 Interferon- α 을 생성할 수 있는 RITC-Dextran-Nanogel을 이용하고자 porcine primary cell 에서도 macropage만 isolation하여 RITC-Dextran-Nanogel 과 uptake를 확인하였다.

(나) 2set

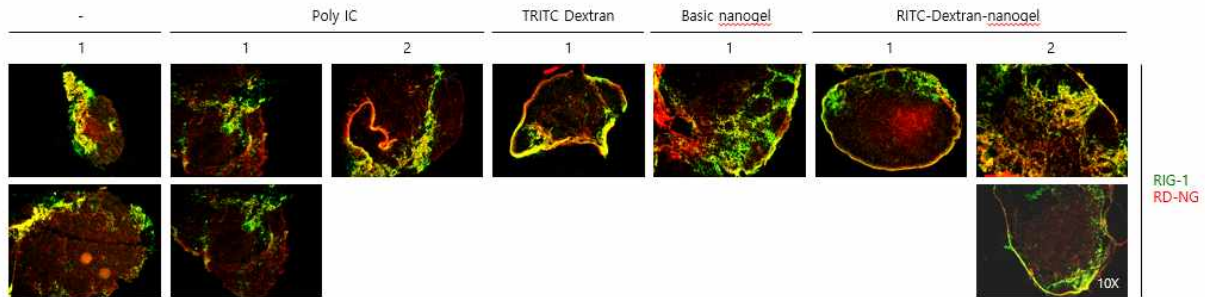
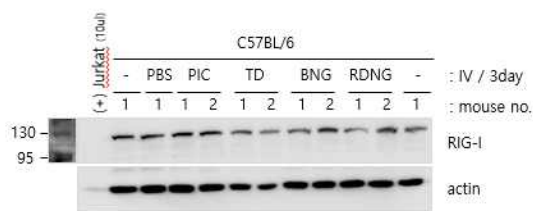


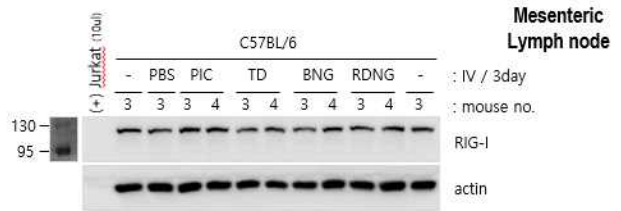
그림 12. Mouse lymph node에서 RD-ND의 uptake 확인.

확인을 위해 반복 실험을 하였다. 위의 결과(그림 12)는 C57BL/6에 control, PBS (200ul/20g), poly IC (0.2mg/20g), RITC-Dextran (1ug/20g), Basic-Nanogel (200ug/20g), RITC-Dextran-Nanogel(200ug/20g)으로 intravenus injection 하여 3day 분석한 결과, 1set와는 다르게 림프절에서 RITC-Dextran-Nanogel (red signal)이 보이지 않았고 control과 비슷하게 보여져 분석이 어려웠으며, 수차례 in vivo를 반복 하였지만 같은 결과를 확인하지 못하였다.

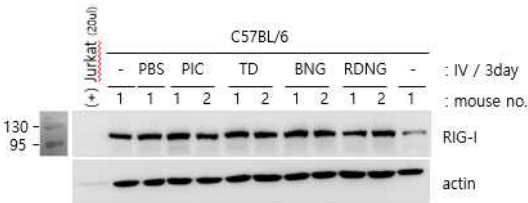
A



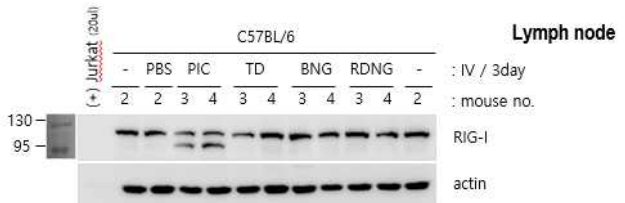
B



C



D



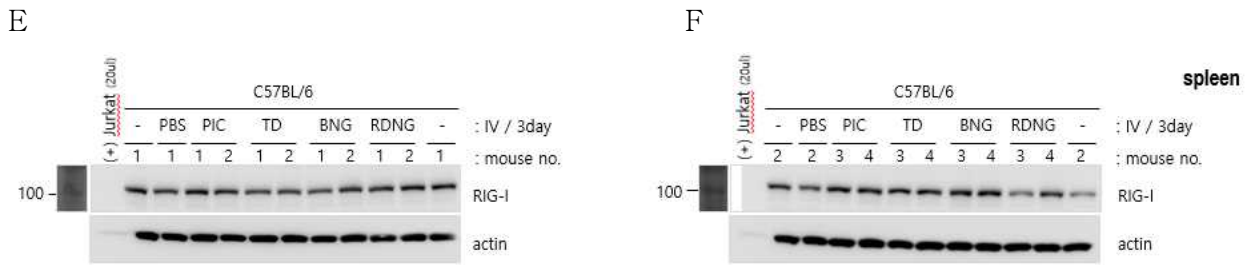


그림 13. RD-NG에 대한 Lymph node 와 spleen의 RIG-1의 반응.

RIG-1을 양적으로 확인하기 위해 western blot을 진행 하였다. 정확한 분석을 위해 1set에서 반응을 보였던 lymph node를 부위를 나누어 분석하였다. 분석을 control (-, 2마리), PBS (PBS, 2마리), poly IC (PIC, 4마리), RITC-Dextran (RD, 4마리), Basic-Nanogel (B-NG, 4마리), RITC-Dextran-Nanogel (RDNG, 4마리)를 두 그룹으로 나누었고 (그림 34 A, B) 는 Lymph node 중에서도 Mesenteric부분만 사용하였고 (그림 13 C, D) 는 popliteal lymph node, axillary lymph node등 나머지 부분의 Lymph node를 사용하여 분석하였으며 (그림 13 E, F)은 spleen만을 사용 하였다. 그 결과 control 그룹과 비교 하여 poly IC, RITC-Dextran, Basic-Nanogel과 RITC-Dextran-Nanogel 을 처리한 그룹과 차이를 보이지 않았으며 1set와 다른 결과를 보였다.

1set에서는 Mouse의 Lymph node와 RITC-Dextran-Nanogel과 선천성 면역시스템 작동을 확인 하였지만 2set에서는 확인하지 못하였다. 그래서 현재 다른 injection 경로로 확인 하는 중이며 반복실험 중이다. 1set에서는 intravenous injection (IV) 와 intraperitoneal injection (IP) 경로로 injection 하여 intravenous injection (IV)에서 면역반응을 보였고 2set에서 intravenous injection (IV)로 injection 하여 진행 하였으나 면역 반응을 확인하지 못하였다. 이를 보완하기 위해 다른 injection 경로로 footpad injection을 진행 중이며 현재 Nanogel이 오래되어 구조가 변하거나 형광이 약해질 가능성이 있으므로 새로 제작된 Nanogel을 사용할 것이다.

본 연구진은 상기의 마우스 모델로 이용한 in vitro 및 in vivo 실험 내용을 바탕으로 특허를 출원하였으며 발명의 명칭은 “RIG-1 유사 수용체와 결합하는 텍스트란 중합 나노입자”이며 출원번호는 “10-2018-0007280”이다.

라. 돼지 세포 + RD-NG in vitro 실험

Mouse in vitro, in vivo에서 RITC-Dextran-Nanogel 과 선천 면역시스템을 확인하였으므로 과제 최종 목표인 돼지 구제역을 예방하는 백신제작에 맞추어 돼지 cell line을 이용하여 실험을 하였다. 돼지 cell line으로 PAM, PAM-CD163, IBRS2, BAL, splenocytes를 이용하였고 primary cell로는 spleen, tonsil, blood PBMC를 이용하였다. 그리고 돼지 RIG-1을 인식하는 항체가 없어 주로 porcine IFN- α ELISA로 분석을 하였다.

(1) 돼지 cell line을 이용한 실험결과

먼저 돼지 PAM, PAM-CD163을 시도 하였지만 현미경 상 uptake을 확인 할 수 없었으며 (그림 14) Western blot을 통해서 phospho-NF-kB, phospho-AKT, phospho-ERK 를 찍은 결과 control에 비해 RITC-Dextran-Nanogel 500ug에서 phospho-NF-kB, phospho-ERK가 증가하는 듯 보였다.

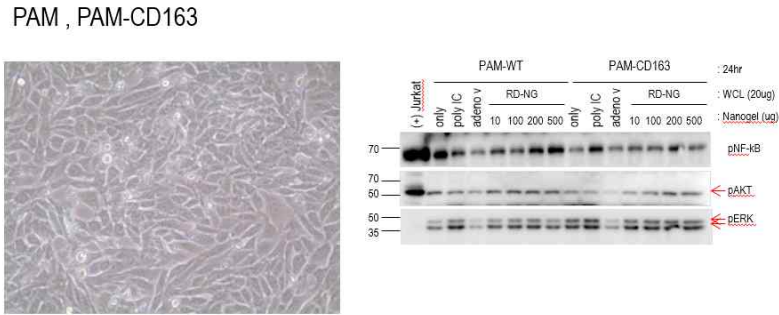


그림 14. RD-NG에 대한 돼지 PAM, PAM-CD163세포의 반응

그래서 IFN- α (그림 15.)ELISA결과에서는 PAM cell에서 RITC-Dextran-Nanogel 500ug에서 IFN- α 가 조금 증가하였지만 PAM-CD163은 전혀 반응을 보이지 않았다.

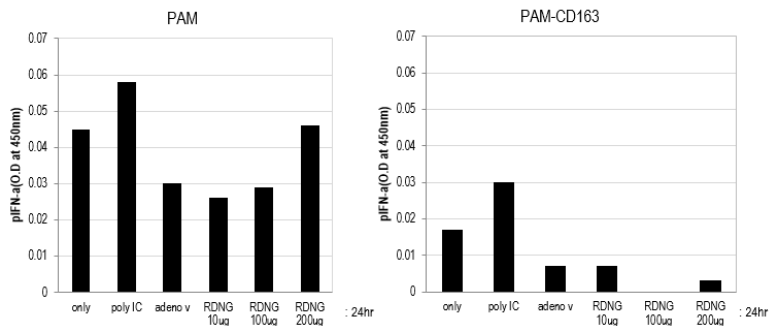


그림 15. RD-NG처리 후 IFN- α ELISA 결과.

IBRS2

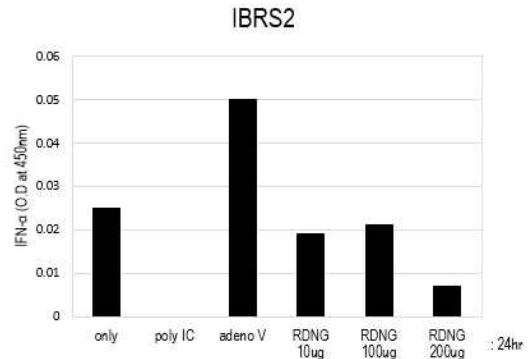
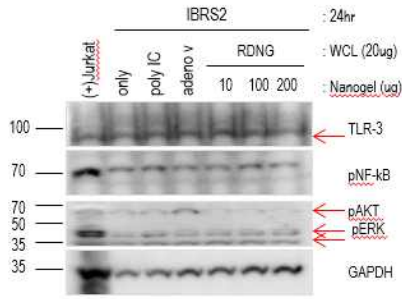


그림 16. 돼지 IBRS 2 에서의 pIFN- α 의 변화.

두 번째로 분석한 세포는 IBRS 2이며 돼지 kidney 유래의 cell line으로 RITC-Dextran-Nanogel 과 반응을 하지 않았다(그림 16).

세 번째로 분석한 세포는 BAL cell로 돼지 폐에서 분리한 세포로서 무균 적으로 부검하여 얻은 돼지의 폐에 PBS를 넣고 마사지 해준 후 PBS를 다시 회수하여 BAL cell만 분리하였다. 3-4일 계대 후 분석하였다.

BAL

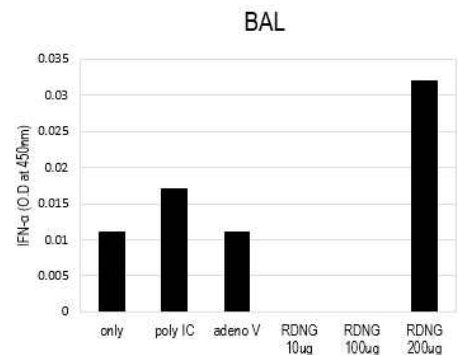
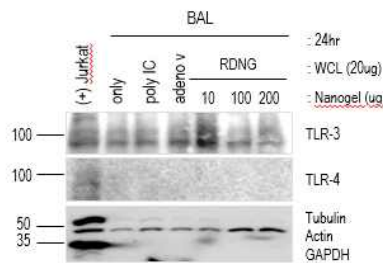


그림 17. 돼지 BAL 에서의 pIFN- α 의 변화.

pIFN- α ELISA 결과에서는 RITC-Dextran-Nanogel 200ug에서 pIFN- α 가 증가하는 결과를 확인 할 수 있었으나 western blot 에서는 확인 할 수 없었다(그림 17).

(2) 돼지 비장 유래 유사 탐식 세포를 이용한 실험결과

위의 여러 종류의 cell들로 시도 한 결과 긍정적인 결과를 얻지 못하여 돼지 조직들로 primary culture를 하였다. 첫 번째로 면역세포가 많이 존재하는 비장과 편도를 이용하여 시도 하였다.

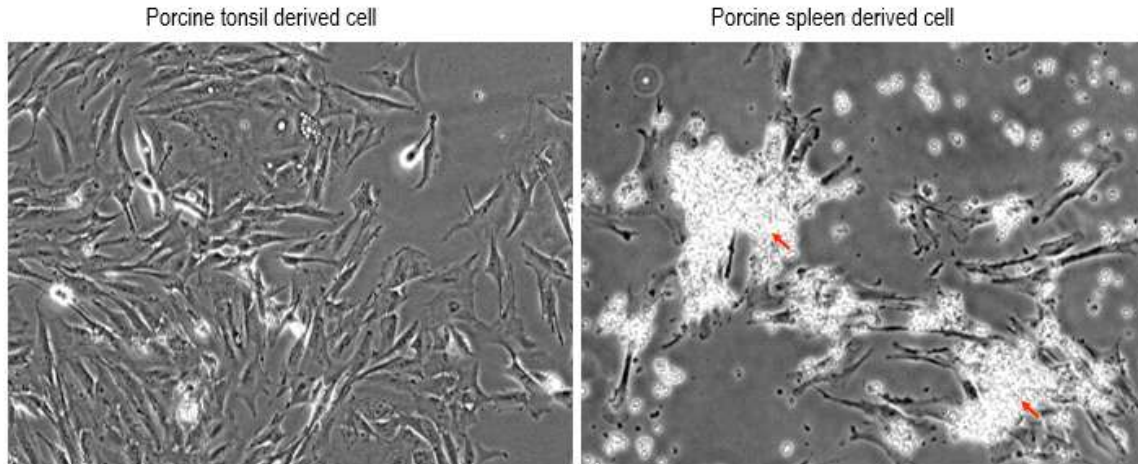


그림 18. 돼지 편도와 비장의 primary culture

조직샘플을 일반적인 Primary culture (Enzyme digestion) 하였을 때 편도의 경우 Target (면역계통) 하고자 하는 세포를 찾기가 힘들다고 판단이 되었고 비장의 경우 가능성이 있음을 확인하여 비장을 이용하여 시도 하였다(그림 18). 다만 이와 같은 방법의 경우 일정 배양 시간이 지나면 기질을 이루고 있던 세포가 우세하게 배양됨을 파악하였다.

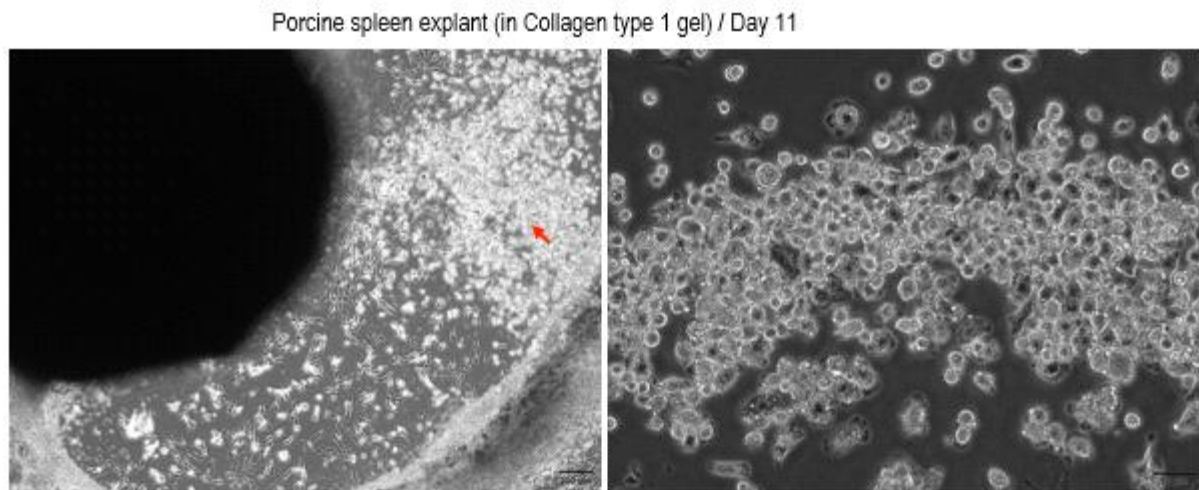


그림 19. 돼지 비장 primary culture

이후에 가능성이 높은 조직으로 비장을 선정하고 Target하고자 하는 세포의 수율을 높이기 위해 방법을 모색하였고 비장조직을 Collagen gel에 Explant 하여 배양을 해본 결과(그림 19) 면역세포로 여겨지는 세포를 확보할 수 있었다. 확인을 위해 해당세포를 회수하여 재 배양 시킨 후 RITC-Dextran -Nanogel을 처리하여 관찰하였다.

Porcine spleen explant derived cell → Re-seed (Day 3) / 48hrs Uptake (100 μ L/mL)

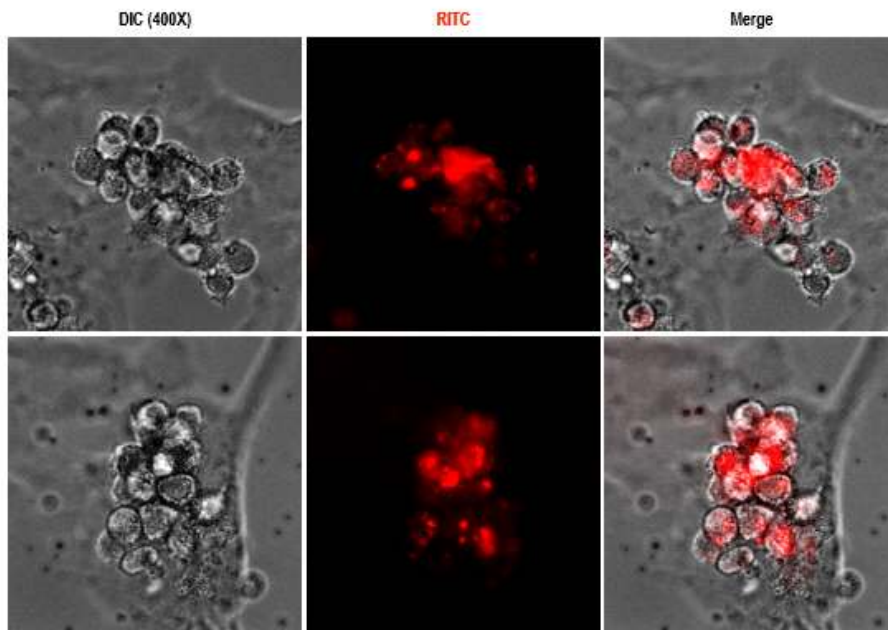


그림 20. Porcine spleen primary cell과 RD-NG의 uptake확인

돼지 비장 explant derived cell에 RITC-Dextran-Nanogel을 100ug을 처리하고 48hr후 현미경 관찰 결과(그림 20) 면역세포처럼 보이는 세포에 red signal을 확인하였으며 이 결과를 통해 uptake를 확인 할 수 있었다.

Porcine spleen explant derived cell → Re-seed (Day 3) / 48hrs Uptake (100 μ L/mL)

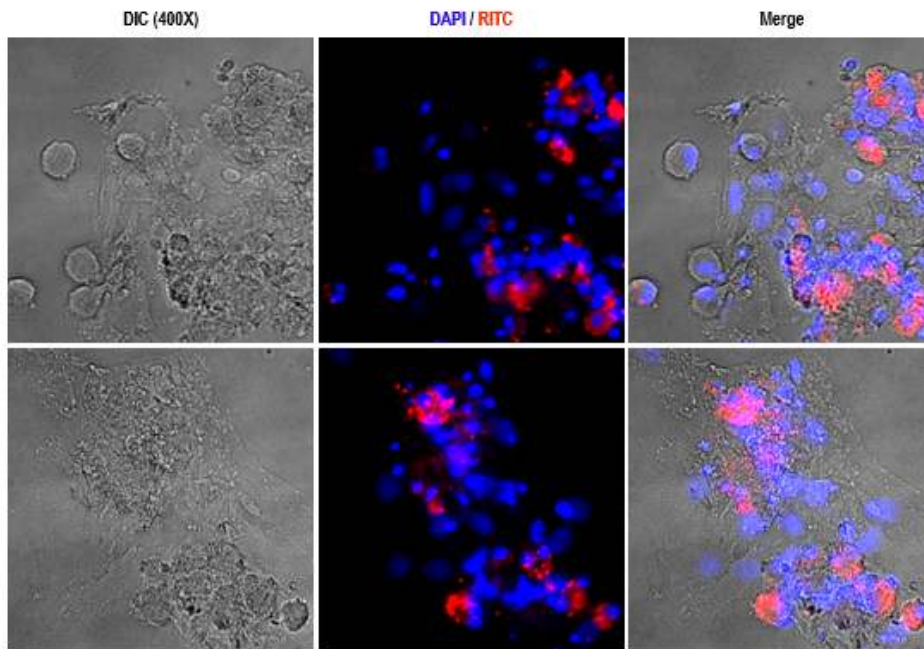


그림 21. Porcine spleen primary cell과 RD-NG의 uptake확인

또한 DAPI와 merge한 결과(그림 21) 핵 내부에서 red signal을 관찰할 수 있었다. 한편 면역세포의 수율을 높이기 위해 비장조직을 Collagen gel에 Explant 하여 배양하였지만 여전히 세포의 양이 너무 적어 다른 실험을 진행하기에 어려움이 있었다.

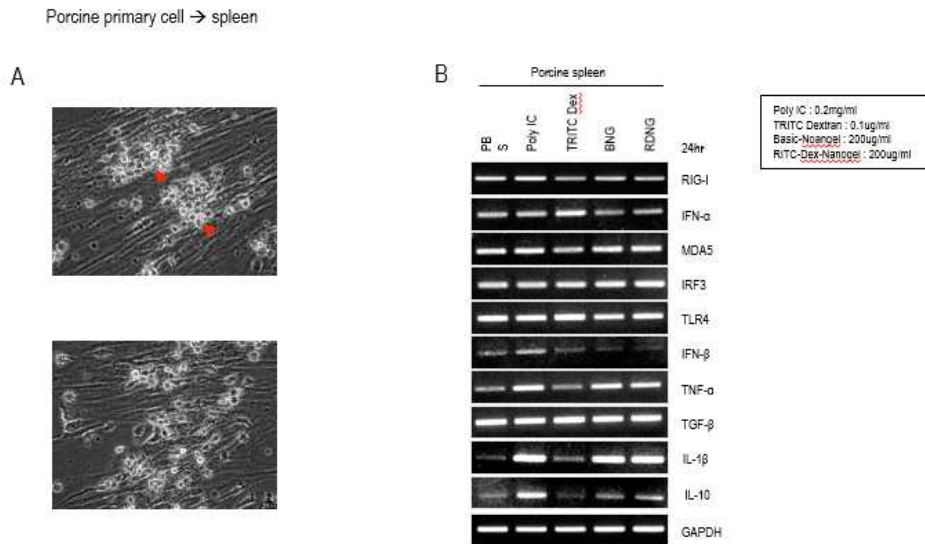


그림 22. Nanogel에 의한 세포 독성

상기 돼지 비장의 primary culture를 이용한 실험에서 RT-PCR을 진행한 결과(그림 22) control과 비교하여 RIG-1, IFN- α 와 MDA5, IRF3의 증가는 보이지 않았다. 하지만 IL-1 β 이 poly IC와 Nanogels에서 증가한 것을 확인하였고, TNF- α 가 증가된다는 것은 Nanogel이 세포에 약간의 독성으로 판단 될 수 있기 때문에 IL-10과 IL-1 β 을 추가하여 해석해본 결과, 독성이 있다는 것을 확인하였다.

(3) 돼지 PBMC 유래 유사 탐식 세포를 이용한 실험결과

primary culture 에서 두 번째로 시도한 돼지 혈액에서 PBMC 분리하여 진행 하였다. EDTA 채혈한 전혈을 PBS 와 1:1 희석하여 준다. 그리고 15ml 튜브에 3ml Ficoll을 넣은 후 1:1로 희석한 전혈을 9ml위에 조심스럽게 올려준다. 원심분리 하여 Ficoll층 위에 걸려있는 PBMC 회수해준다. 이 후 wash해주고 seeding한다.

2hr 후 상등액은 다른 dish로 옮겨 주고 부착한 세포들은 media change만 해주는데 M1 Macropage만 얻기 위해 Porcine GM-CSF를 Growth media에 넣어주어 change 해준다(그림 23A). 12hr 후 부착세포 현미경 결과이다(그림 23B). A에서 상등액을 계대해준 세포이며 12hr후 현미경 결과이다(그림 23C). 이때는 약간 세포가 죽은듯하게 검은 세포들이 관찰 되었으며 이(그림 23D)는 부착세포에 Porcine GM-CSF가 함유되지 않은 media를 사용한 결과로 세포가 죽은 것 같은 검은 부분들이 보였다. 결론적으로 우리가 원하는 유사탐식세포로 (그림 23B)의 세포를 실험에 이용하였다. 하지만이 경우에서도 macropage와 유사한 세포의 양이 적어 실험 하는데 어려움이 있었다.

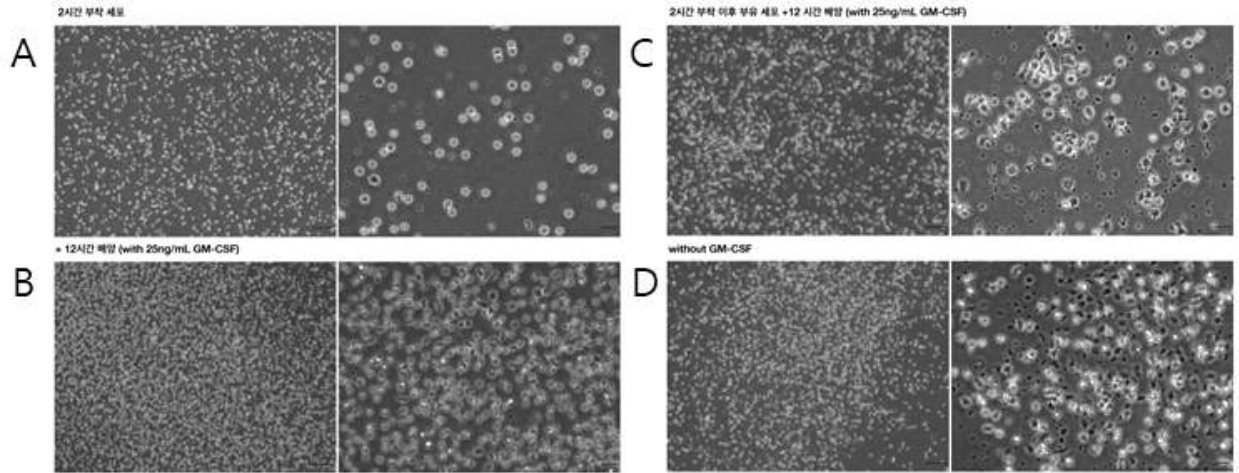


그림 23. 돼지 PBMC의 분화 과정.

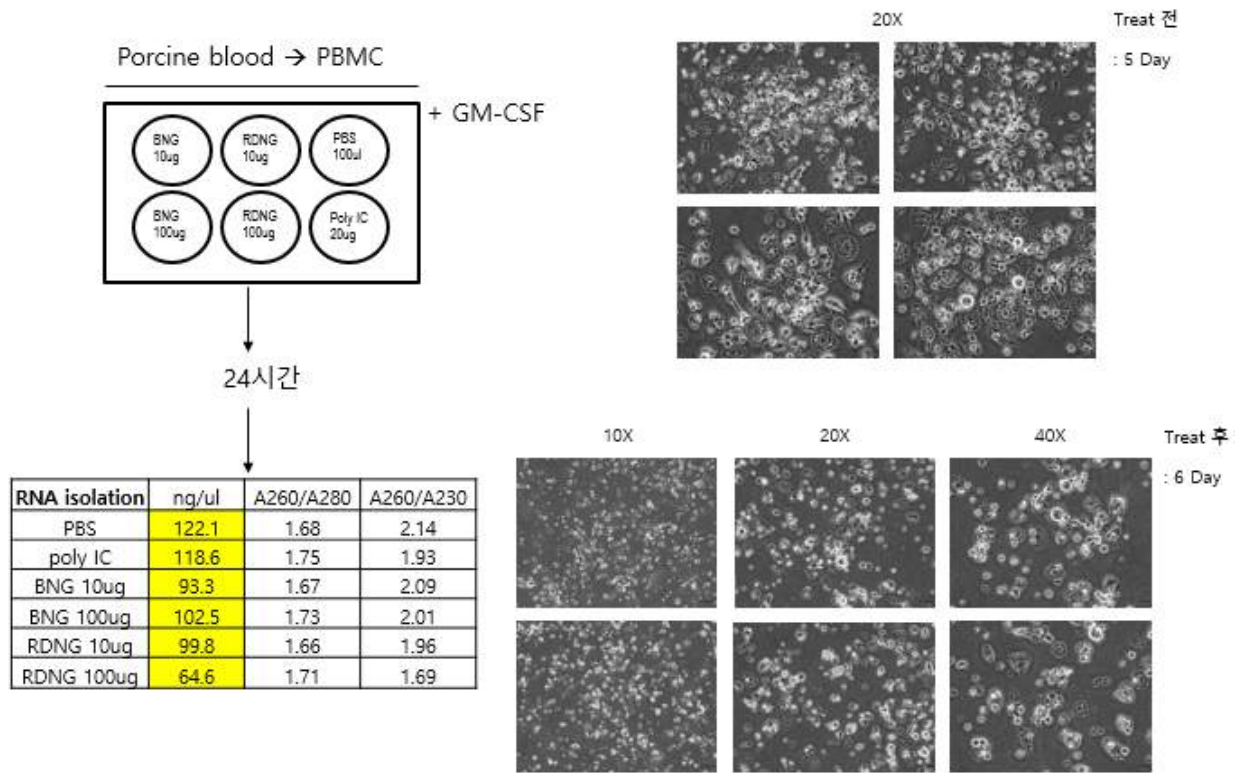


그림 24. 돼지 PBMC를 이용한 RNA isolation.

Macropage와 가장 유사한 (그림 23B)세포 분석을 위해 위의 조건(그림 24)으로 물질을 처리하여 24hr후 RT-PCR을 하였으나 sample을 수득하기 전 떠있는 세포들이 많았으며 RNA isolation하여 nano drop을 찍은 결과 농도가 낮아 더 이상 진행 할 수 없었다. 이를 보완하기 위해 다음 시도 에서는 세포의 양을 더 많게 하여 seeding 하여 Western blot을 하였다.

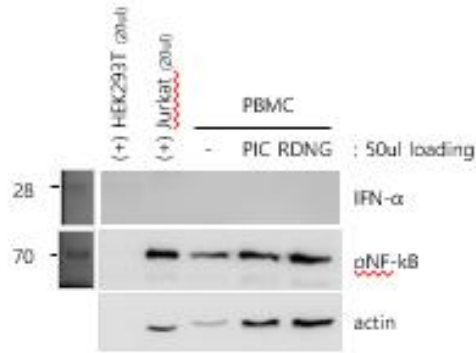


그림 25. 돼지 PBMC를 이용한 Western blot.

상기의 내용으로 보완하여 실험해 보았지만 세포의 양이 매우 적었으며 phosph-NF-kB가 actin과 비례하는 양상으로 나타났다(그림 25). 지금 까지 결과로는 부족한 부분이 많으며 유사 탐식 세포를 수율을 높이는 실험을 진행하고 있다. 돼지의 여러 가지 cell line과 돼지에서 다양한 1차 배양 세포들로 시도하였고 RIG-1 선천성 면역 system의 확인을 못하였다. 그 원인으로는 필요한 유사탐식세포의 수가 부족하여 분석하기 어려웠으며 상대적으로 다른 기질 세포가 많았기 때문에 RIG-1 선천성 면역체계의 활성이 낮아 결과를 보기 어려웠다. 그래서 현재 유사 탐식 세포를 더 늘릴 수 있는 분화 조건 확립 하기위해 실험을 진행 중이다.

3-2절. 돼지 인터페론 알파8의 클로닝

1. 돼지 말초혈액세포에서 인터페론알파8 (IFN α 8)의 자발적 발현

본 연구진은 한국 돼지 (*Sus scrofa domestica*)의 신선한 말초혈액세포로 돼지 IFN α 8 발현 조절을 분석하기 위해서 돼지의 전체 혈액 세포에 LPS, Poly I:C, VSV 자극제를 처리하였다. 흥미롭게도, 돼지 IFN α 8의 자발적인 발현이 자극받지 않은 대조군에서 검출되었고, 면역 자극제를 처리한 것에는 IFN α 8 전사체의 의미 있는 유도는 없었다(그림 26). β -actin은 전사량의 변화에 기인한 것이 아니라는 것을 보여주기 위해 분석했다.

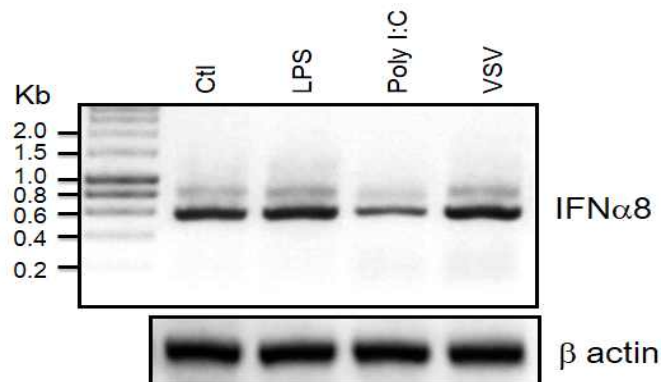


그림 26. 각종 면역 자극에 대한 인터페론 알파8의 발현

본연구진은 면역 자극제를 처리하지 않은 대조군 전사체의 RT-PCR 산물을 사용하여 TA 클로닝을 하였고, DNA 서열을 검증했다(그림 27). 돼지 IFN의 오픈리딩프레임은 "Met"잔기에 대한 개시코돈 및 종결코돈 "TGA"를 포함하는 570 염기쌍으로 이루어 졌다는 것을 알 수 있었다. 23개의 소수성 신호 펩티드 아미노산 서열은 녹색으로 강조하여 표시했다(그림 27).

```

1 ATGGCCCCAACCTCAGCCTTCTTCACAGCCCTGGTGCTACTCAGCTGCAATGCCATCTGC
1 M A P T S A F F T A L V L L S C N A I C

61 TCTCTGGGCTGTGACCTGCCTCAGACCCATAGCCTGGCGCACACCAGGGCCCTGAGGCTC
21 S L G C D L P Q T H S L A H T R A L R L

121 CTGGCACAAATGAGGAGAATCTCCCCCTTCTCCTGCCTGGACCACAGAAGGGACTTTGGA
41 L A Q M R R I S P F S C L D H R R D F G

181 TTCCCCAAGAGGCCTTGGGGGGCAACCAGGTCCAGAAGGCTCAAGCCATGGCTCTGGTG
61 F P Q E A L G G N Q V Q K A Q A M A L V

241 CATGAGATGCTCCAGCAGACCTTCCAGCTCTTCAGCACAGAGGGCTCGGCTGCTGCCTGG
81 H E M L Q Q T F Q L F S T E G S A A A W

301 GATGAGAGCCTCCTGCACCAGTTCTGCACTGGACTGGATCAGCAGCTCAGGGACCTGGAA
101 D E S L L H Q F C T G L D Q Q L R D L E

361 GCCTGTGTCATGCAGGAGGTGGGGCTGGAAGGGACGCCCTGCTGGAGGAGGACTCCATC
121 A C V M Q E V G L E G T P L L E E D S I

421 CTGGCTGTGAGGAAATACTTCCACAGACTCACCCCTCTATCTGCAAGAGAAGAGCTACAGC
141 L A V R K Y F H R L T L Y L Q E K S Y S

481 CCCTGTGCCTGGGAGATCATCAGGGCAGAAGTCATGAGAGCCTTCTCTTCTCCACAAAC
161 P C A W E I I R A E V M R A F S S S T N

541 CTGCAAGACAGACTCAGGAGGAAGGAGTGA
181 L Q D R L R R K E *

```

그림 27. 돼지 인터페론 알파8의 유전자 염기 서열 및 아미노산 서열

2. 국내 돼지의 IFN α 8의 아미노산 서열 규명

TA클로닝으로 확보한 DNA 서열로부터 분석된 한국 돼지 IFN α 8의 아미노산 서열을 공개된 돼지 IFN α 8 아미노산 서열과 비교하기 위해서 정렬한 결과 다음과 같다(그림 28). 한국 돼지로부터 얻은 IFN α 8은 공개되어 있는 IFN α 8 아미노산 서열 (Accession No: ACV42397) 과 98.4 % 동일한 것으로 나타났다(그림 28). 3개의 아미노산 잔기가 공개된 돼지 IFN α 8과 비교해서 차이가 났고 상이한 잔기는 노란색으로 강조하여 표시했다. 이번 연구로 획득한 한

국 돼지 IFN α 8은 GenBank에 등록 번호 KX275310로 등록하였다. 시그널 서열이 없는 성숙 단백질 영역 (Met/1-Gly/23)을 대장균에서 발현을 위해 pProEx/HTa 벡터에 서브 클로닝하였다. 한국 돼지의 성숙 IFN α 8의 2 개의 아미노산 잔기는 GenBank에 공개된 IFN α 8의 아미노산 잔기와 상이하다(그림 28).

```

98.4% identity (100.0% similar) in 189 aa overlap (1-189:1-189)

      10      20      30      40      50      60
IFN $\alpha$ 8  MAPTSAFFTALVLLSQNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMFRI SPFSCLDHRDFG
      .....
ref     MAPTSAFFTALVLLSQNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMFRI SPFSCLDHRDFG
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
IFN $\alpha$ 8  FPQEALGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLFSTEGSAAAWDESLLHQFCTGLDQQLRDLE
      .....
ref     FPQEALGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLFSTEGSAAAWDESLLHQFCTGLDQQLRDLE
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
IFN $\alpha$ 8  ACVMQEVGLEGTPLLEEDSILAVRKYFHRILTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRAFSSSTN
      .....
Ref     ACVMQEVGLEGTPLLEEDSILAVRKYFHRILTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRAFSSSTN
      130     140     150     160     170     180

IFN $\alpha$ 8  LQDRLFRKE
      .....
Ref     LQDRLFRKE
  
```

그림 28. GenBank 등재 돼지 인터페론 알파8 아미노산 서열과 비교.

3-3절. 돼지 인터페론 알파8의 발현 및 정제

1. 재조합 한국 돼지 IFN α 8 발현

대장균에서 재조합 IFN α 8 단백질의 발현 효율을 비교하기 위하여, 발현 벡터를 대장균 BL-21 / Codon 및 Rosetta 균주로 형질 전환(transformation)시켰다. 재조합 단백질의 생성은 IPTG를 첨가함으로써 유도되었고, anti-6xhis-tag 항체를 사용한 Western blot으로 확인했다(그림 20A). anti-6xhis-tag 항체는 IPTG로 유도된 25 kDa 밴드를 인식한 것을 확인할 수 있다(화살표). 단백질 발현은 BL-21 / Codon plus 균주로 진행하였고 재조합 돼지 IFN α 8 단백질의 생산은 불용성 분획에 존재한다.

2. 재조합 한국 돼지 IFN α 8 정제

첫 번째 정제 단계는 mini-Talon affinity column을 사용하여 수행했고, 용출된 분획을 coomassie blue 염색으로 분석하였다(그림 29B). 한국 돼지 IFN α 8의 분자량은 대략 25 kDa로 나타났다(그림 29B의 화살표). 탈론 친화성 컬럼으로 정제된 재조합 IFN α 8 단백질은 Tris-HCl (20 mM, pH 9.0)에 투석 후 음이온교환크로마토그래피로 2차 정제하였다. 재조합 돼지 IFN α 8 단백질의 용출 최대 점은 결합된 분획에서 관찰되었다(그림 30A). 음이온교환크로마토그래피로 분획된 단백질은 Silver 염색으로 시각화하였고 재조합 돼지 IFN α 8 단백질의 순도를 확인하였다(그림 30B). 음이온교환크로마토그래피로 정제된 재조합 돼지 IFN α 8 단백질은 Silver 염색에서 약 25 kDa 및 희미한 38 kDa 밴드로 나타났다. 본연 구조는 Western blot으로 38 kDa 밴드도 돼지 IFN α 8임을 확인하였다. 정제된 재조합 돼지 IFN α 8 단백질은 소혈청알부민(BSA)과 비교하여 정량하였다(그림 30C).

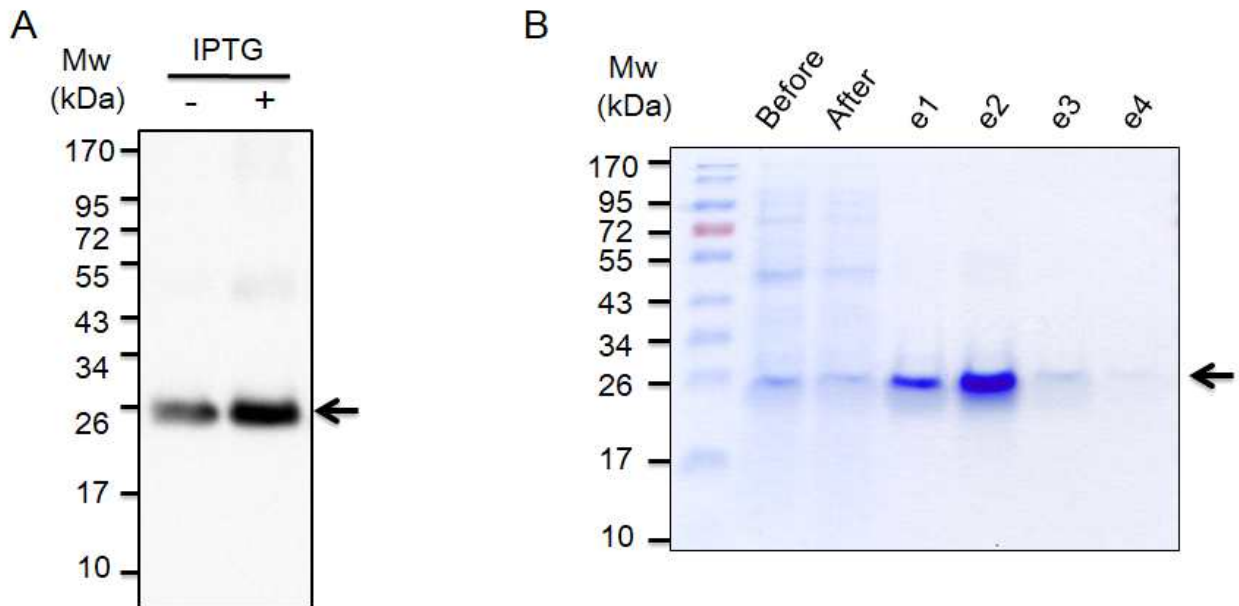


그림 29. Talon 컬럼을 이용한 재조합 돼지 인터페론 알파8의 발현 및 정제.

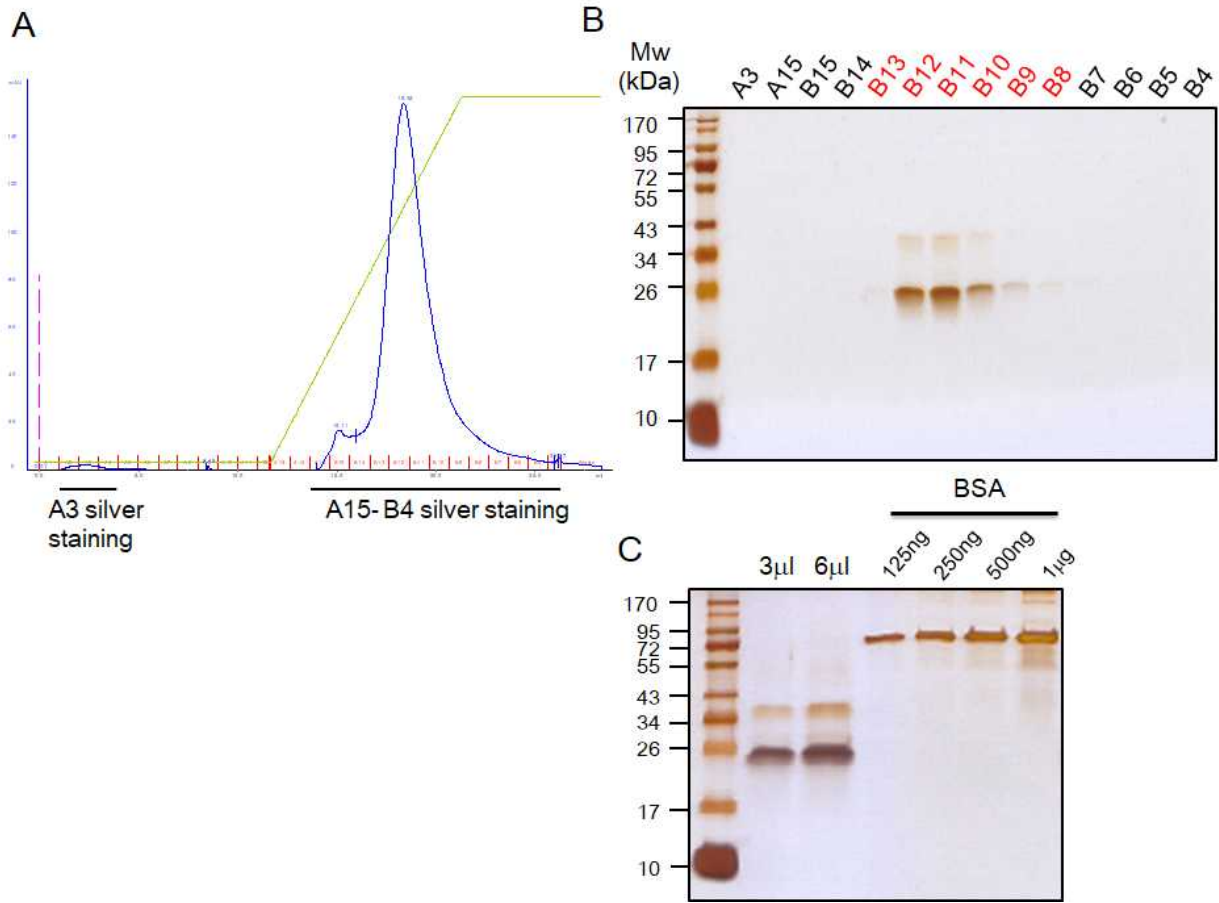


그림 30. 양이온 교환 크로마토그래피를 이용한 돼지 인터페론 알파8의 정제

3-4절. 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과 검증

1. VSV에 대한 한국 돼지 IFNa8의 항바이러스 활성 분석

항바이러스 분석은 한국 돼지 IFNa8와 대조군인 사람 IFNa2를 사용했고 먼저 사람 WISH 세포주에서 수행했다. 사람 IFNa2는 VSV(Vesicular Stomatitis Virus) 감염으로부터 세포를 보호하는 반면, 돼지 IFNa8은 세포를 보호하지 못했다(그림 31A). 다음으로 소 MDBK 세포주에 돼지 IFNa8와 사람 IFNa2를 처리한 결과는 모두 항바이러스 효과를 나타냈고(그림 31B) 개 MDCK 세포주에서는 사람 IFNa2와 돼지 IFNa8가 VSV 감염으로부터 보호하지 못했다(그림 31C).

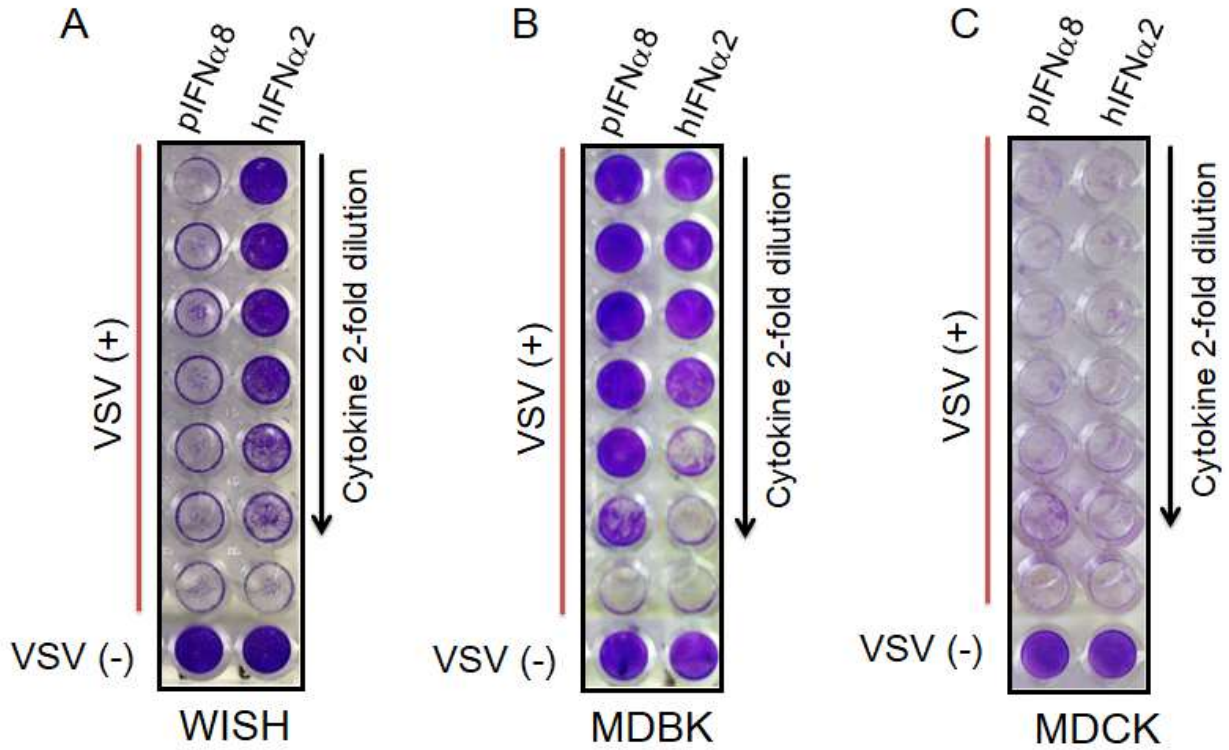


그림 31. VSV억제 효과를 이용한 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과 확인

2. Mx-1과 OAS-1을 통한 한국 돼지 IFN α 8의 항바이러스 활성 분석

한국 돼지 IFN α 8의 항바이러스 기전을 연구하기 위해서 IFN 자극으로 유도된 유전자를 RT-PCR로 분석하였다. 소 MDBK세포주에 돼지 IFN α 8을 처리하고 3, 6 시간 후 분석한 결과에서 Mx-1과 2', 5'-OAS-1의 발현이 증가했고(그림 32A), 사람 WISH 세포에서의 항바이러스 유전자의 발현은 사람 IFN α 2 처리군에서만 증가했다(그림 32B). 흥미롭게도, 개 MCBK 세포에서 Mx-1과 2', 5'-OAS-1의 발현이 IFN 자극없이 관찰되었다(그림 32C). β -actin의 결과는 IFN 자극으로 유도된 유전자에서 실험적 오류가 없다는 것을 나타내고 있다.

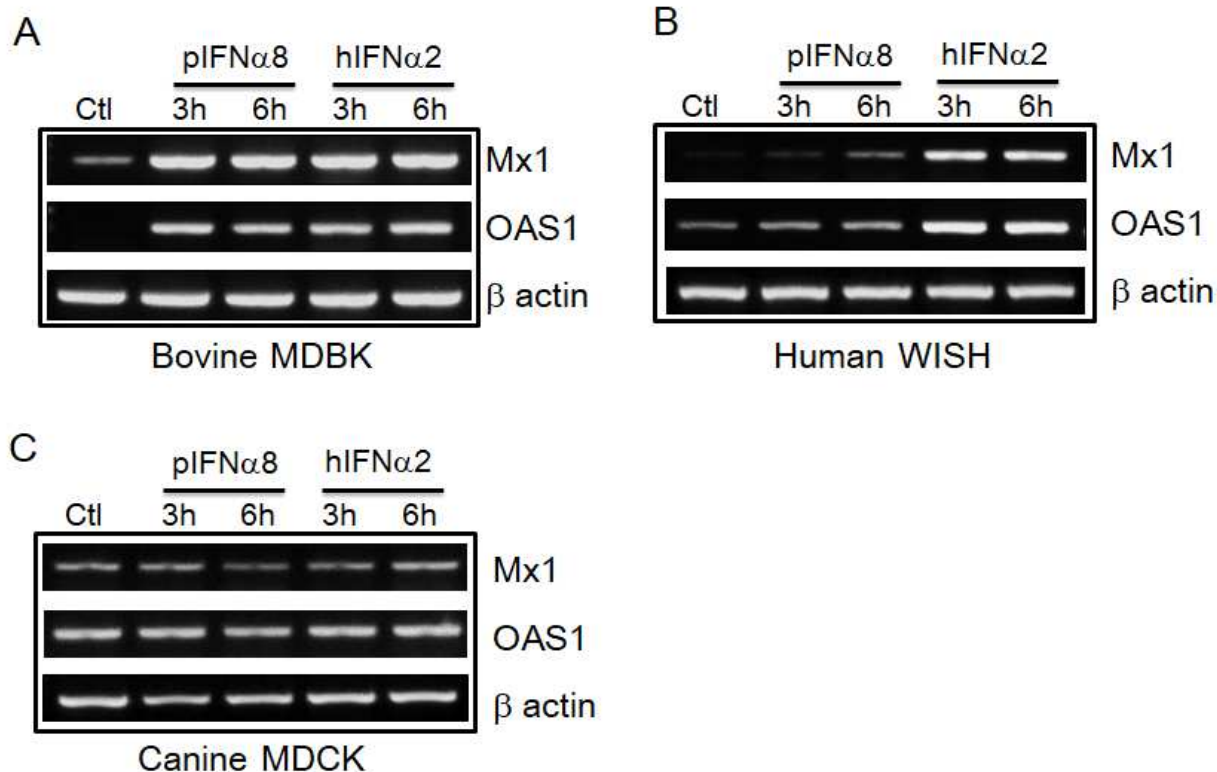


그림 32. 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과 확인

3. 논문게재

본 연구진은 상기 연구 결과를 정리하여 Immune Network지에 논문을 게재하였다.

Title. : Species Specific Antiviral Activity of Porcine Interferon- α 8 (IFN α 8)

Authors : Eunhye Kim, Hyunjhong Jhun, Joohee Kim, Unjoo Park, Seunghyun Jo, Areum Kwak, Sinae Kim, Tam T. Nguyen, Yongsun Kang, Insoo Choi, Joongbok Lee, Heijun Kim, Younghyun Kim, Siyoung Lee, Soohyun Kim

Journal. : Immune Network

Volume : 17(6):424-436

Published online 2017 Dec 19

3-5절. 구제역 아데노바이러스 백신의 대량 생산 기술을 확립

1. 구제역 O형 진천주의 P12A3C 유전자를 이용한 구제역 아데노바이러스(Ad.JC) 작제

가. 구제역 진천주 P12A3C의 합성 및 아데노바이러스에 삽입

본 연구진은 지난 3년간의 연구 결과 및 역학조사 결과를 고려했을 때 2014년 국내 발생 O형 구제역 바이러스인 진천주를 기준으로 하여 연구를 진행하는 것이 옳다는 판단을 하였다. 이에 따라 구제역 O형 진천주(O/SKR/JC/2014, KX162590)의 구조단백질유전자인 P1과 비구조 단백질 유전자인 2A와 3C를 연결하는 3.417Kb의 nucleotide를 디자인하고 adeno-vector에 ligation하여 구제역 아데노바이러스 진천주(Ad.JC)를 제작하였다.

나. 진천주구제역 아데노바이러스의 발현

구제역 진천주의 구조단백질 유전자(P12A3C)를 포함하는 아데노바이러스(Ad.JC)의 구제역 구조단백질 발현은 6 cell culture plate에 각 well당 2×10^5 cell/ml의 Adeno-X 293 cell을 3ml을 분주하여 단층세포를 충분히 단층을 형성할 때까지 3일 동안 배양 한 후 각 well(1.8×10^6 cells) 당 구제역 진천주의 방어항원 유전자가 함유된 아데노바이러스 0.001TCID₅₀/cell을 접종한 후 24시간과 48시간 IFA를 진행하였다. 1차 항체로는 VP1에 대하여 특이한 IgG anti-VP1 antibody를 사용했고 2차 항체로는 anti-mouse IgG-FITC antibody를 사용했다. 그 결과(그림 33) 접종 24시간, 28시간 후에서 형광신호를 발견할 수 있었으며 시간이 지남에 따라 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러므로 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)는 진천주의 구제역 항원을 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

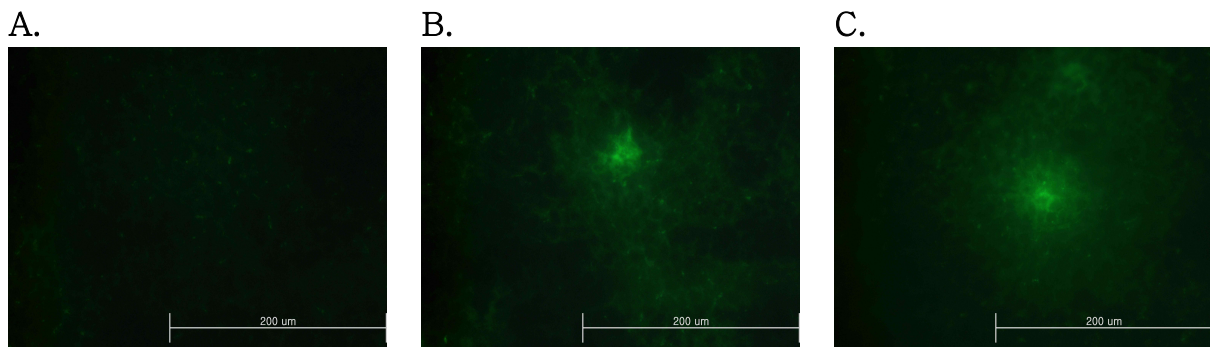


그림 33. 구제역 진천 아데노바이러스를 접종한 Adeno-X 293세포. (A=0시간, B=24시간, C=48시간)

다. 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)의 면역원성 확인

구제역 진천 아데노바이러스를 작제한 후 정치 배양을 통해 생산한 후 8주령의 돼지에 10^8 TCID₅₀/ml의 농도로 1ml씩 접종 하였다. 접종 3주 후 채혈하여 분리한 혈청으로부터 항체 형성 유무를 SP ELISA(PrioCHECK FMDV Type O antibody ELISA)와 구제역 LPB

ELISA로 검사한 결과 다음(표 1)과 같다. 8번 개체가 31.69, 7번 돼지는 26.24의 PI 값을 나타낸 것으로 보아 낮은 정도의 면역반응이지만 면역이 형성되는 것을 알 수 있었다. 그러나 LPB ELISA를 이용한 결과는 아래 표와 같이 모두 4배 이하를 나타내었다. 본 연구진은 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)가 면역원성은 있으나 충분한 양을 접종하지 않았기 때문에 구제역 감염을 방어할 수 있는 면역을 확보지 못했다고 원인을 분석하고 바이오리액터(Bioreactor)를 이용하여 대량 생산 후 재접종하기로 계획하였다.

개체 번호	1	2	3	4	5	6	7	8
SP ELISA(PI)	11.66	15.89	6.93	10.93	9.07	1.48	26.24	31.69
LPB-ELISA	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4

표 1. 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)의 면역원성 검사 결과.

2. 구제역 및 인터페론아데노바이러스의 대량 생산기술 개발

가. 구제역아데노바이러스를 위한 세포 대량배양 기술 개발

정지 배양(stationary culture)을 통한 바이러스 배양에서 증식된 바이러스의 역가는 최대 10^8 TCID₅₀/ml으로 나타나고 있다. 이 경우 유효 백신 접종 농도인 10^{10} TCID₅₀/ml를 달성하기 위해서 100배 농축이 필요하다. 과도한 농축을 통한 백신 생산 방법은 대량 생산단계에서 백신의 단가를 높이는 원인이 될 수 있다. 그러므로 부유 배양(suspension culture)과 같은 방법을 도입하여 구제역 아데노바이러스의 역가를 향상시킬 필요가 있다.

나. Bioreactor (부유배양 세포 배양기) 이용을 위한 세포 준비

문헌에 의하면 아데노바이러스의 접종을 위한 부유 배양 세포는 HEK293.2sus(ATCC)를 사용하고, 부유 배양에 사용된 배지는 Hyclone SFM4HEK293 media(FBS free)를 사용하는 것으로 보고되고 있다(GE Healthcare, Sweden). 본 연구진은 무혈청 배지에 세포를 적응시키기 위해서 HEK293.2sus 세포의 배양을 25T-Flask부터 시작하여 75T-Flask, 175T-Flask 단계별로 진행한 후 250ml Shaking-Flask 단계까지 적응시키는 단계별 훈련을 진행하고 마지막으로 Bioreactor에 증진하고자 하였다.

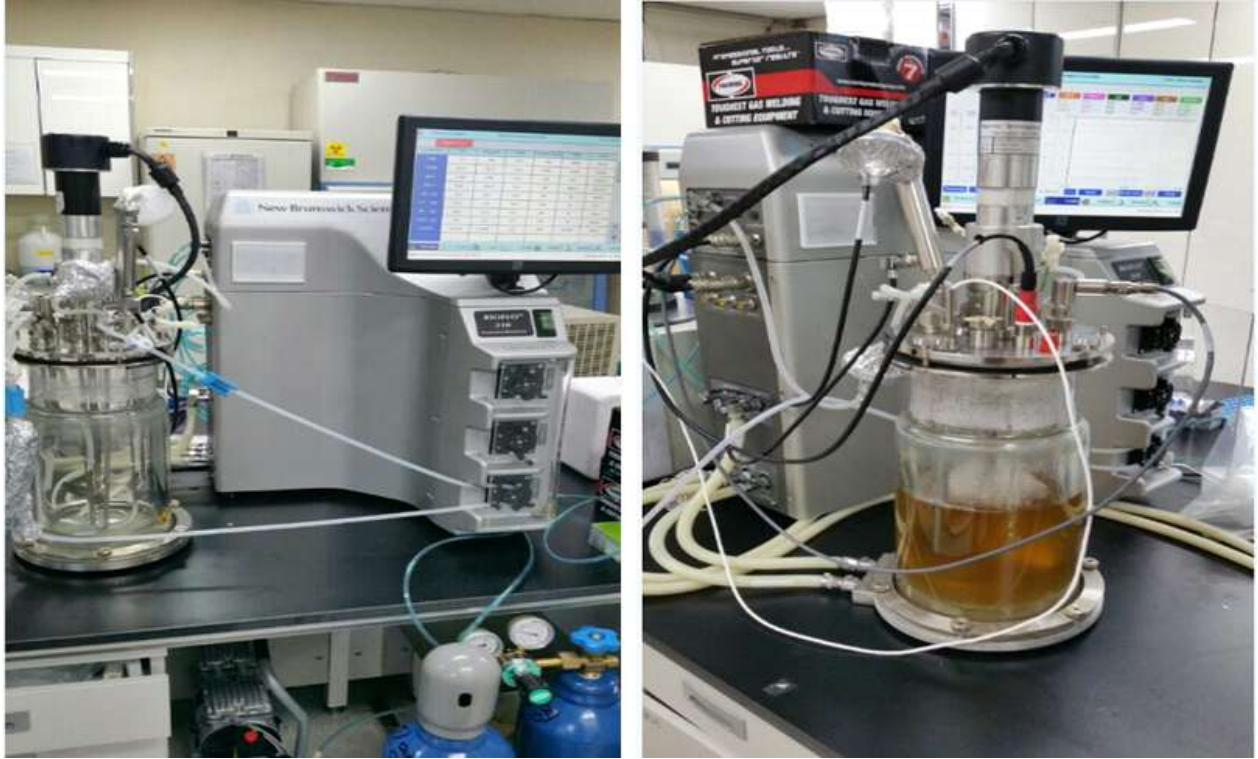


그림 34. 가동 중인 바이오리액터(Bioreactor)

바이오리액터의 배양 조건은 리액터 제작사의 매뉴얼과 제작사 기술진의 조언을 바탕으로 아래 표(표 2)에서 보는 바와 같이 8% 이산화탄소, 40% 산소, 52% 공기와 분당 75회 회전 조건으로 실험하였다.

Component	CO ₂	O ₂	Air	N ₂	rpm
Concentration	8%	40%	52%	0%	75rpm

표 2. 바이오리액터(Bioreactor) 가동 조건

다. 바이오리액터 배양 전 단계 세포배양

관계자 의견 수렴결과 바이오리액터에서 직접 세포를 배양하는 프로토콜은 적절하지 않은 것으로 판단하여 소형 플라스크에서 HEK293.2sus 세포를 적응시키고 일정 숫자의 세포가 되었을 때 바이오리액터로 옮기는 절차가 필요했다. 따라서 25T(6ml의 배양액을 채움), 75T(15ml), 175T 30ml), 그리고 250 플라스크(90ml)에 10⁶/ml 세포를 접종하고 시간대 별로 세포를 채취하여 그 숫자를 측정하였다. 그 결과(그림 35) 세포 접종 후 48시간에서 72시간 사이에서 최대치를 보이고 있으며 반복실험에 의해서 검증한바 세포가 안정적으로 적응했다고 볼 수 있다.

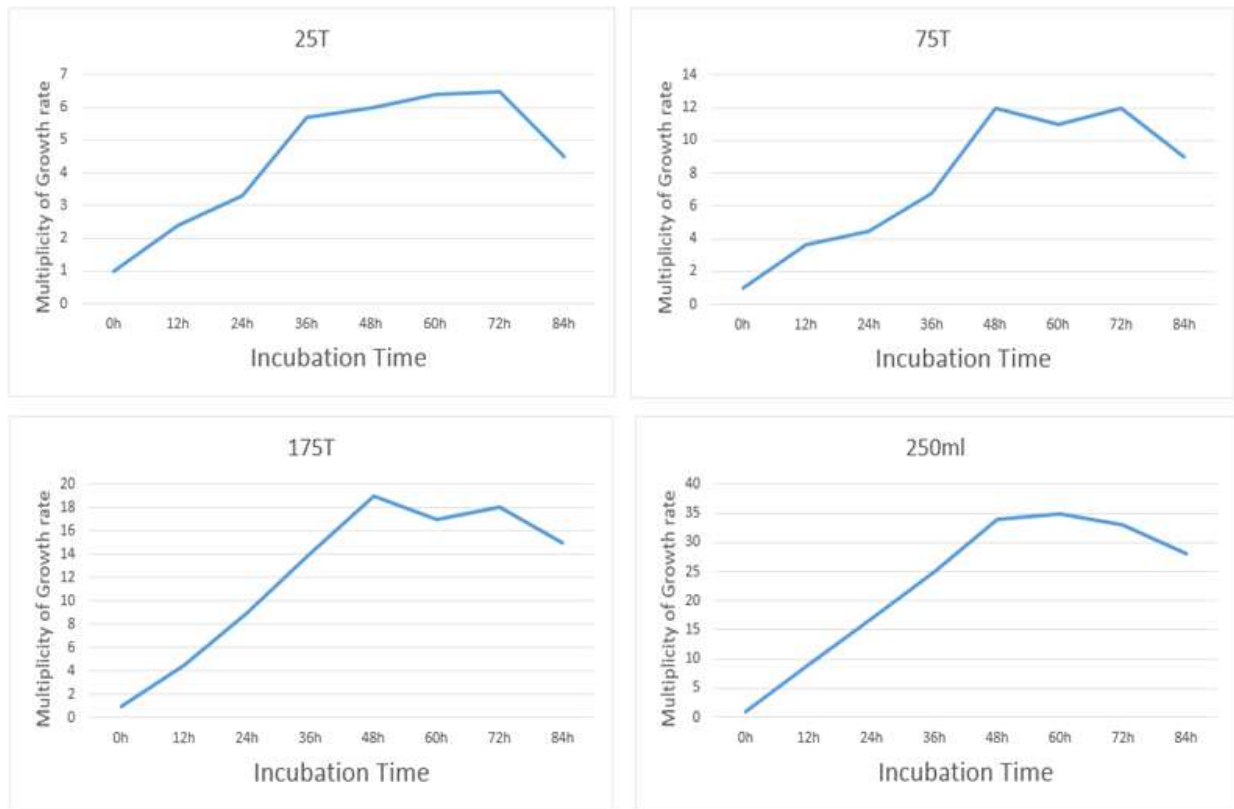


그림 35. HEK293.2sus 세포의 무혈청 배지 성장 곡선.

처음 접종한 세포의 양을 1로 보았을 때 시간대별 세포의 증가량으로 환산해 본 결과(표 3) 25T-Flask에서는 72시간 후 6.5배 증가를 보였고, 75T-Flask에서는 48시간 후 12배, 175T-Flask에서는 48시간 후 19배, 250ml-Shaking Flask에서는 60시간 후 35배의 증가 되는 것을 알 수 있었다.

Group	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h
25T-Flask	1	2.4	3.3	5.7	6	6.4	6.5	4.5
75T-Flask	1	3.6	4.5	6.8	12	11	12	9
175T-Flask	1	4.5	9	14	19	17	18	15
200ml-Flask	1	9	17	25	34	35	33	28

표 3. HEK293.2sus 세포의 무혈청 배지 성장 수치.

라. 바이옱액터를 이용한 대량 배양

이전 연구에 의하면 shaking flask에서 배양하여 10^9 개의 부유배양세포를 얻은 후 Ad5FMD 바이러스 10^5 TCID₅₀/ml을 접종한 후 1시간 후에 1L의 부유배양 배지를 채우고 바이옱액

터에 충전 한 후 3일 후에 채득하는 것이 가장 많은 바이러스 역가를 얻을 수 있다고 보고 하였다(Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells, Hans-Peter Meyer, Diego Schmidhalter, 2014). 본 연구진은 세포 숫자와 바이러스 접종량은 이전 연구를 참고하여 바이오리액터의 생산성을 평가하기 위한 실험을 진행하였다.

상기의 조건으로 세포를 준비하고 바이러스를 접종 하고 1L의 배지를 충전 하여 접종 0, 24, 48, 72시간의 세포 접종액 10ml을 채취하여 real-time 기법을 통해 아데노바이러스 유전체의 양을 비교하고 바이러스의 역가를 측정하였다. 그 결과(그림 36) 접종 3~4일 후에 구체역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)의 역가가 최대치에 도달하는 것으로 나타났으며 약 5×10^7 TCID₅₀/ml인 것으로 밝혀졌다. 이러한 수치는 정치 배양법에 비해서 개선된 수치라고 할 수는 없지만 1회 접종에 1L 가량의 세포 접종액을 수득할 수 있으므로 이점이 있다고 판단하여 농축을 진행하였다.

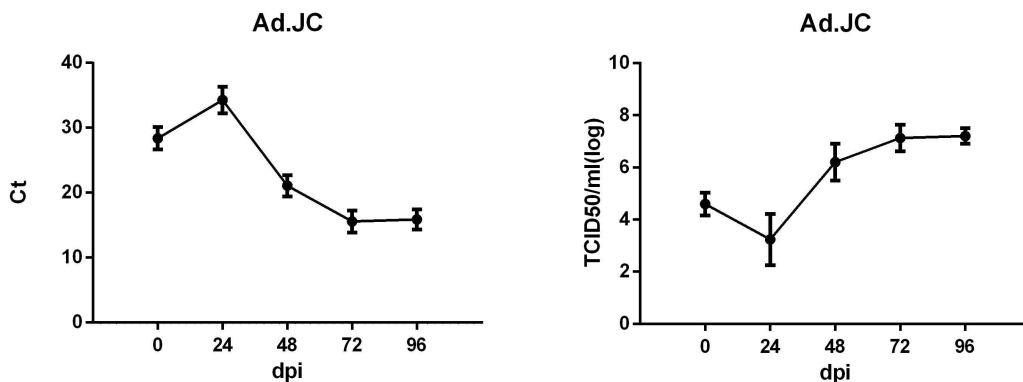


그림 36. 바이오리액터(Bioreactor)를 이용한 구체역 진천 아데노바이러스 시험 생산 결과

마. Labscale TFF system을 이용한 구체역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)

Labscale TFF system(그림 37)은 액체를 필터에 통과시키는 방법으로 액체 내부에 들어 있는 단백질을 필터에 다량으로 포집할 수 있으며 후반 작업을 통해 다시 용출시킬 수 있다. 본 연구팀의 경험에 의하면 이러한 특성을 이용하면 세포배양액을 TFF system에 통과시킨 후 소량의 배지에 용출시키는 것으로 바이러스를 농축할 수 있다. 또한 TFF system은 다양한 용량의 장비 구성이 있기 때문에 향후 대량 정제에 들어가더라도 labscale에서 실험한 것과 동일한 조건으로 scale-up이 가능하다. 그러므로 향후 대량생산을 고려했을 때 적합한 시스템이라 할 수 있으므로 본 연구에 사용하였다.



그림 37. Labscale TFF system.

그러므로 상기의 바이오리액터(Bioreactor) 기술로 대량 생산한 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC) 3L를 Labscale TFF system을 이용하여 제조사의 표준 프로토콜에 따라 100배 이상 농축을 진행하였다. 그 결과 약 20두 분량(1ml/두)의 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)를 생산할 수 있었으며 최종적으로 측정된 역가는 8×10^9 TCID₅₀/ml이었다.

바. 농축된 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)의 면역원성 실험

상기에 기술된 바와 같이 본 연구진은 8마리의 8주령 돼지에 10^8 TCID₅₀/ml의 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)를 1ml접종한 결과 면역원성을 보이기는 하지만 충분한 면역을 형성하지는 못했다. 한편 바이오리액터(Bioreactor)를 이용한 대량생산 결과 8×10^9 TCID₅₀/ml의 구제역 진천 아데노바이러스를 20두 분량 생산할 수 있었으며 관련 문헌을 통해 충분한 면역력을 발휘할 수 있을 것이라 판단하고 접종 실험 하였다.

이를 위해 S농장에서 8주령 돼지 10마리를 선발하고 이 중 5마리에는 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)를 1ml씩 접종하고 5마리에는 M사의 상용 백신을 2ml씩 접종하였다.

	구제역 진천 아데노바이러스 (Ad.JC, 1ml)	상용 백신 (1ml)
동물의 수	5	5

표 4. 농축된 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)의 면역원성 동물실험 편성

그 후 12주령에 채혈하여 혈청을 분리하고 FMDV type O SP ELISA(Prionics AG, Switzerland)을 이용하여 구제역 특이항체를 검사하였다. 그 결과(그림 38) 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC) 접종군에서는 5마리 중 3마리가 양성으로 나타났으며(60%) 상용백신 접종군에서는 5마리 중 5마리가 양성으로 나타났다(100%). PI값의 분포를 t-test로 비교해 본 결과 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)접종군과 상용백신 접종군간의 PI값에 의미가 있는 차이는 없는 것으로($P=0.074$) 나타났다.

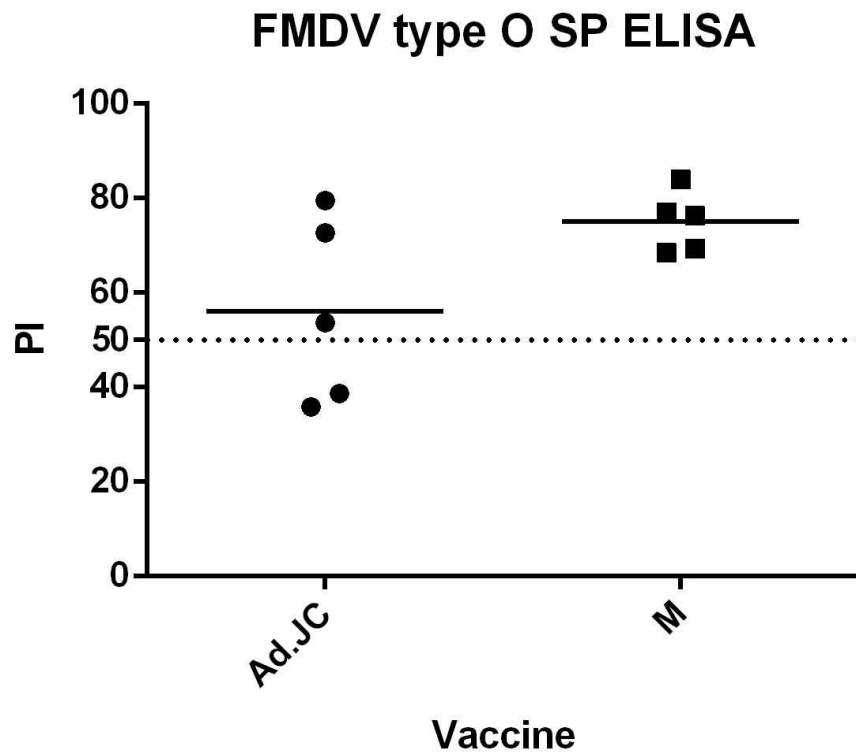


그림 38. 구제역 진천 아데노바이러스(Ad.JC)와 상용백신의 면역원성 비교

2. 구제역 홍콩 아데노바이러스 작제 및 구제역 면역 항원의 생산

가. 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK)의 작제 및 대량 생산

1차 년도 연구에서 사용한 구제역 아데노바이러스 진천주의 경우 면역능이 다소 떨어지는 것으로 밝혀졌다. 이에 따라 구제역 type O 홍콩 주를 이용한 새로운 구제역 아데노바이러스(Ad.HK)를 제작하였다.

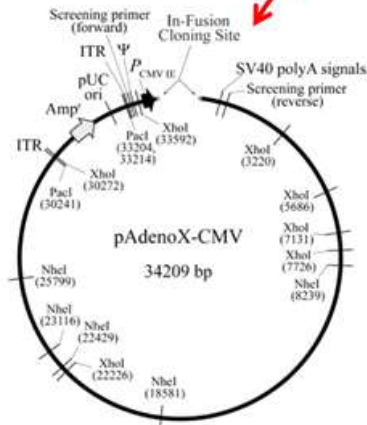


Figure 1. pAdenoX-CMV (Linear) vector map.

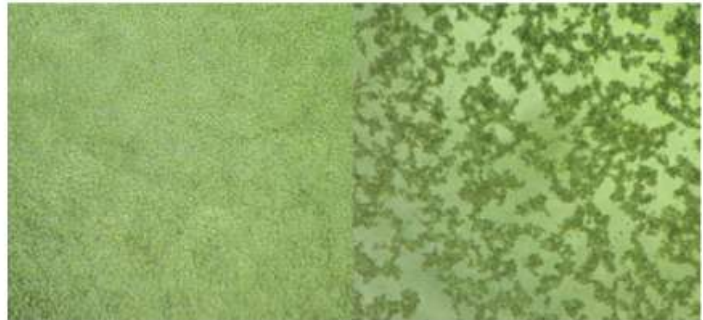
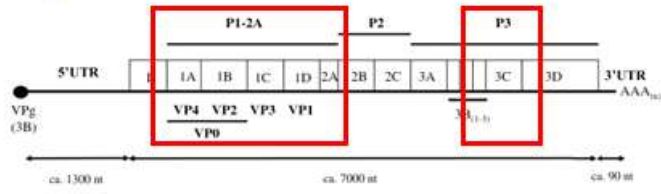


그림 39. 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK)의 제작 개념 및 CPE확인

제작한 새로운 구제역 아데노바이러스(Ad.HK)를 이전 연구 결과에서 습득한 바이오리액터 기술을 이용하여 대량생산 하였다. 그 후 Adeno-X Mega purification kit(Clontech, USA) 와 Vivaspin 20(Sartorius, Germany)를 이용해서 정제하고 농축했다. Adeno-X Mega purification kit은 size exclusive filtration system의 일종으로 실험실 수준에서 사용할 수 있도록 소형화 하여 제작되었다. 지난 연구에서 사용한 TFF system은 다양한 장점이 있음에도 불구하고 소량 시험에서는 적합하지 않고 아데노바이러스 이외의 단백질 또한 농축된다는 문제점이 발견되어 변경하게 되었다. Vivaspin 20의 경우 단백질 농축 필터로서 원심분리에 의한 단백질 농축이 가능하다. Adeno-X Mega purification kit을 사용하여 1차 정제 및 농축 후 용출액은 바이러스의 농도가 목표치인 $10^{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 에는 도달하지 못할 것으로 예측하고 Vivaspin 20을 사용하여 2차 농축하는 것으로 계획하였다.

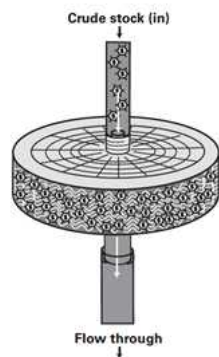


Figure 1. Principle of Adeno-X virus purification. The Adeno-X Purification Filter consists of several layers that selectively bind adenoviral particles as they pass through. The filter is enclosed in a small cylindrical cartridge that resembles a radial flow column, complete with entrance and exit ports. The Maxi purification cartridge is 3.5 cm wide and 1 cm thick.

그림 40. Adeno-X Mega purification kit의 개념도 및 사용 예시

상기 서술한 방법으로 2차 농축 까지 마친 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK)의 역가를 측정하기 위해서 면역 염색법을 이용하여 역가를 측정한 결과 1.012×10^{10} ifu/ml임을 알 수 있었다. 학계 보고에 따르면 ifu는 pfu와 동가인 것으로 밝혀져 있다(Bewig, B. & Schmidt, W. E., BioTechniques, 2000).

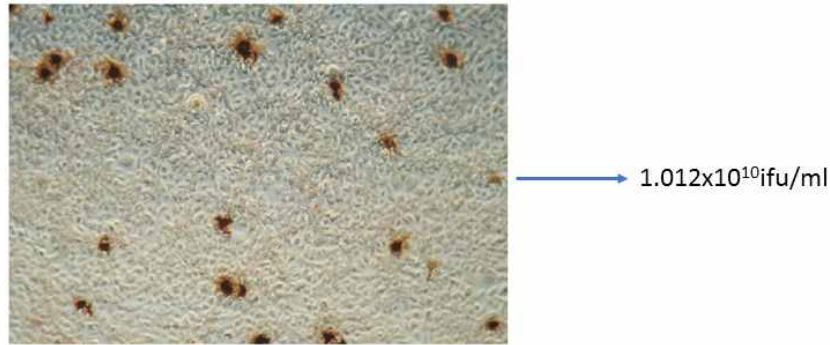


그림 41. 면역염색법을 이용한 역가 측정 예시 및 실험 결과

나. 대량생산된 구제역 아데노바이러스의 면역원성 시험

최종적으로 생산된 구제역 아데노바이러스(Ad.HK)의 효능을 평가하기 위해서 8주령 돼지를 이용하여 다음과 같이 군을 설정하고 동물 실험을 진행하였다. 먼저 실험 돼지 7마리를 선발하고 실험군 4마리와 대조군 3마리로 설정하였다. 실험군에는 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK)를 10^{10} ifu/dose로 접종하고 대조군에는 PBS를 1ml 접종하였다.

	실험군	대조군
구성	4마리	3마리
접종	1.0×10^{10} ifu/dose	PBS
채혈	접종 후 0,1,2,3,4 주간 채혈	

표 5. 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK) 면역원성 실험

접종 0, 1, 2, 3, 4, 5주 후에 채혈한 혈액에서 혈청을 분리하고 혈청으로부터 Priocheck FMDV type O ELISA kit(Pirbright, UK)와 FMDV type O LPB ELISA를 이용하여 구제역 특이 항체를 분석한 결과 다음(그림 42)과 같다. SP ELISA결과에서는 접종 후 4주 까지 모두 구제역 항체 음성(PI값을 기준으로 50 이상일 때 양성 판정)을 나타내었다. 그러나 항체가 증가하는 경향성은 확인할 수 있었다. LPB ELISA결과에서는 접종 3주 후부터 구제역 항체가 1:16 이상을 나타내고 있으며 한 마리에 한해서는 1:45을 나타내어 일정 수준 이상의 구제역 방어능을 갖춘 것으로 확인되었다.

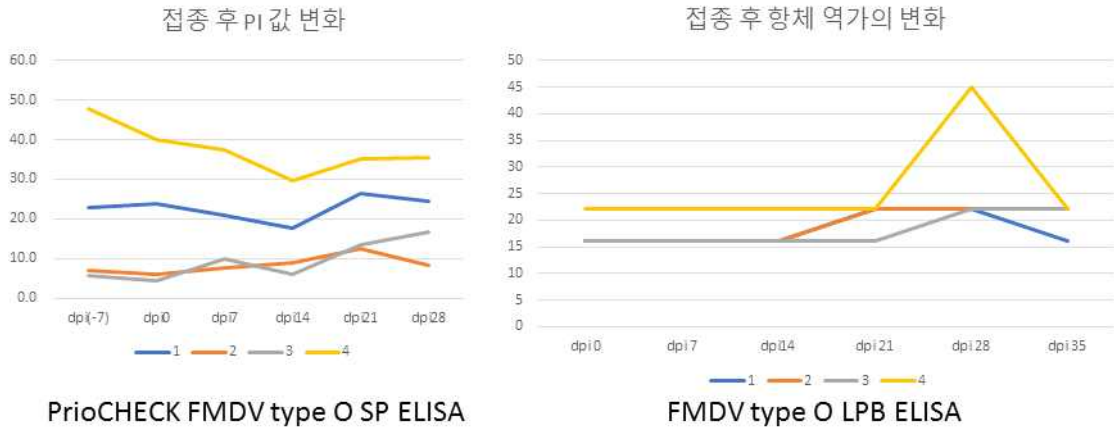


그림 42. 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK) 면역원성 실험 결과.

결과적으로 1.0×10^{10} ifu/dose의 용량으로 1회 접종할 백신 접종 사실을 확인할 수 있는 수준인 1:16 이상의 항체를 형성할 수 있지만 구제역의 감염을 방어할 수 있는 수준인 1:45 이상의 항체를 형성하지 못하는 것으로 확인되었다.

다. 구제역 홍콩 아데노바이러스를 이용한 구제역 O형 항원의 생산

아데노바이러스 벡터는 DNA 전달 체계의 일종으로 세포에 감염하여 벡터에 삽입되어 있는 유전자를 전달하여 특정 단백질을 발현하도록 하는 수단 중의 하나이다. 본 연구팀은 지난 연구 기간 동안 인간 아데노바이러스 타입 5가 돼지에도 감염한다는 사실에 착안하여 구제역 유전자 중 P12A3C를 아데노바이러스 벡터에 삽입하고 돼지의 체내(in vivo)에서 구제역 구조(SP)단백질이 발현되도록 하여 백신을 연구해왔다.

한편 같은 원리로 구제역 아데노바이러스는 in vitro상에서 구제역 SP항원을 생산할 수 있다. 그러므로 본 연구진은 문헌 조사(Jia-Qi Chu et al., Journal of Bacteriology and Virology, 2012)를 통해 돼지의 신장 유래 세포의 하나인 IB-RS2 세포에 아데노바이러스가 감염할 수 있다는 사실을 확인하고 구제역 항원의 발현을 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

먼저 정치배양을 통해 monolayer로 준비된 IB-RS2 세포에 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK)를 1MOI로 접종하고 0, 1, 2, 3일 후에 세포를 수득하였다. 수득한 세포는 3000rpm, 4°C, 30분 조건으로 원심분리하여 세포 pallet과 상층액으로 분리하고 pallet만을 실험에 사용하였다. pallet은 lysis buffer(M-PER, Thermo Scientific)를 이용하여 용해시키고 세포의 debris를 제거하기 위해서 3000rpm, 4°C, 30분 조건으로 원심분리하여 상층액만을 취하였다. 구제역 O형 구조(SP) 단백질의 발현 사실을 확인하기 위해서 각각의 용해액을 Western blot하여 분석하였다. 1차 항체로 mouse anti-FMDV type O VP1 IgG를 사용하였으며 2차 항체로 goat anti-mouse IgG IgG-HRP를 사용하였다.

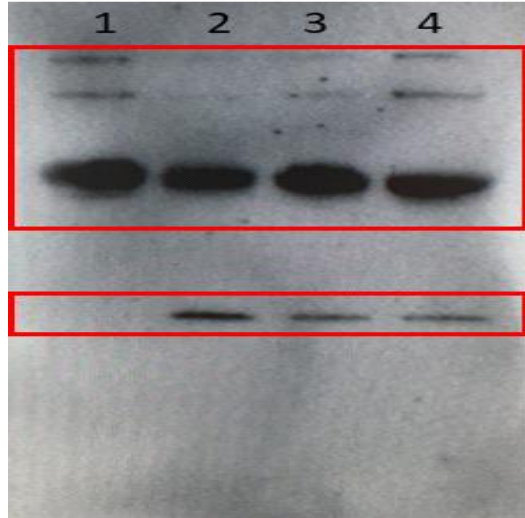


그림 43. IBRS2 세포를 이용한 구제역 항원 발현 확인.

그 결과(그림 43) 접종 후 1일부터 구제역 VP1에 반응하는 밴드를 얻어낼 수 있었으며 그림에는 누락되었지만 마커를 이용해 밴드의 크기를 볼 때 약 23Kda임을 확인할 수 있었다. 사용한 항체와 단백질의 크기를 고려했을 때 구제역 O형 구조 단백질 중 VP1의 발현을 확인할 수 있었다.

다. 구제역 O형 구조 항원의 정제

문헌 정보(Jae-Ku Oem et al., Vaccine, 2007)에 따르면 5%~40% CsCl gradient에 구제역 구조(SP)단백질 발현액을 로딩하여 35000rpm, 4℃, 16시간 조건으로 초원심분리 하면 구제역 구조(SP)단백질만을 순수 분리할 수 있다는 내용을 참고 하여 상기의 구제역 O형 구조(SP)단백질을 정제하였다.

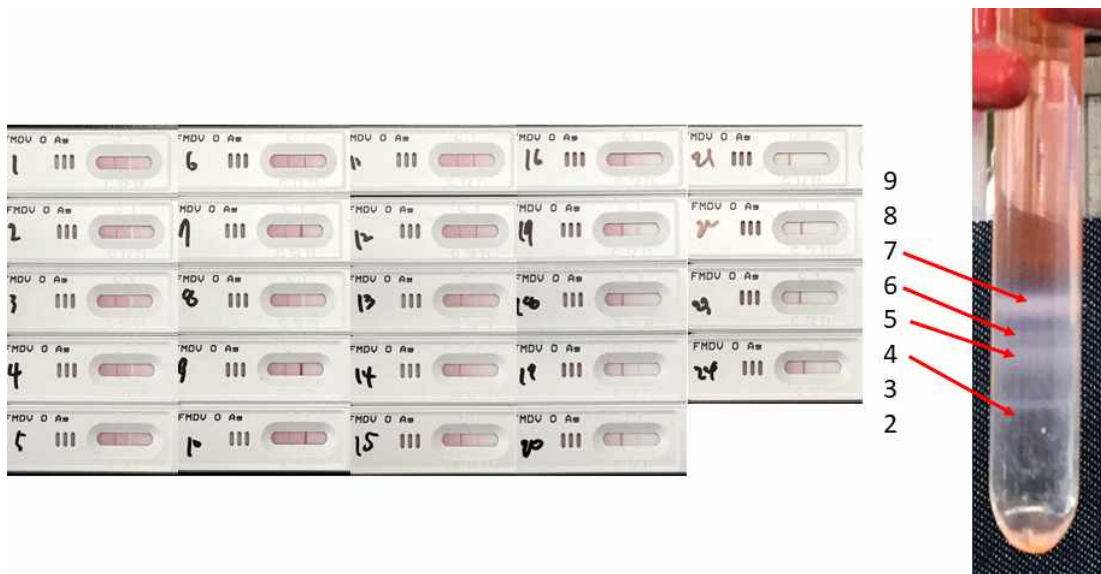


그림 44. 초원심분리를 이용한 구제역 O형 구조(SP)단백질의 정제.

그 결과(그림 44) 우측과 같이 4개의 밴드가 형성되었다. 이 중 어느 밴드에 구제역 구조 항원이 있는지 알아보기 위해 초원심분리 결과를 밑에서부터 500ul씩 분리하여 10ul를 구제역 항원 진단 RAPID 키트에 로딩하였다. 그 결과 왼쪽의 사진과 같이 6번, 7번, 9번, 10번, 11번, 12번 분획에서 상당히 강한 양성 신호가 나타났다. 상기한 문헌에 따르면 6번 분획이 온전한 구제역 구조(SP)단백질을 의미하는 것으로 명기되어 있어 6번 분획에 대한 SDS-PAGE 실험을 진행하였다.



그림 45. 구제역 O형 항원 정제 결과.

SDS-PAGE결과를 NC paper에 transfer한 후 Ponceau S 염색하여 그 결과(그림 45)를 확인하였다. 그림과 같이 단백질의 순도가 높았으며 하단에 VP1, VP2, VP3에 해당하는 단백질을 확인할 수 있었으며 상단에 P1에 해당하는 단백질을 확인할 수 있었다. 그러므로 IBRS2세포주에 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK)를 접종하여 생산해낸 구제역 O형 구조(SP)단백질은 주요 구제역 구조(SP)단백질을 모두 함유 하고 있으며 그 순도가 매우 높다는 점을 알 수 있었다.

라. 구제역 O형 면역 항원 특허출원 및 산업화

상기 기술한 바와 같이 본 연구진은 구제역 O형 면역항원을 성공적으로 발현했으며 이를 이용하여 출원번호 10-2017-0183431, 발명의 명칭 “구제역 바이러스에 대한 항체 검출용 조성물”로서 특허를 출원하였다.

또한 구제역 항원, 항체 진단 키트 개발 업체인 (주)메디안디노스틱과 협업하여 구제역 O형 항체 진단 물질로서 산업화 가능성을 연구 중에 있다. 이를 위해서 (주)메디안디노스틱 연구소에 구제역 홍콩 아데노바이러스(Ad.HK)와 Adeno-X 293세포주, 그리고 IBRS-2세포주를 분양했으며 연구소 내부 시설에 세포와 바이러스가 정착할 수 있도록 기술적 지원을 하고 있다.

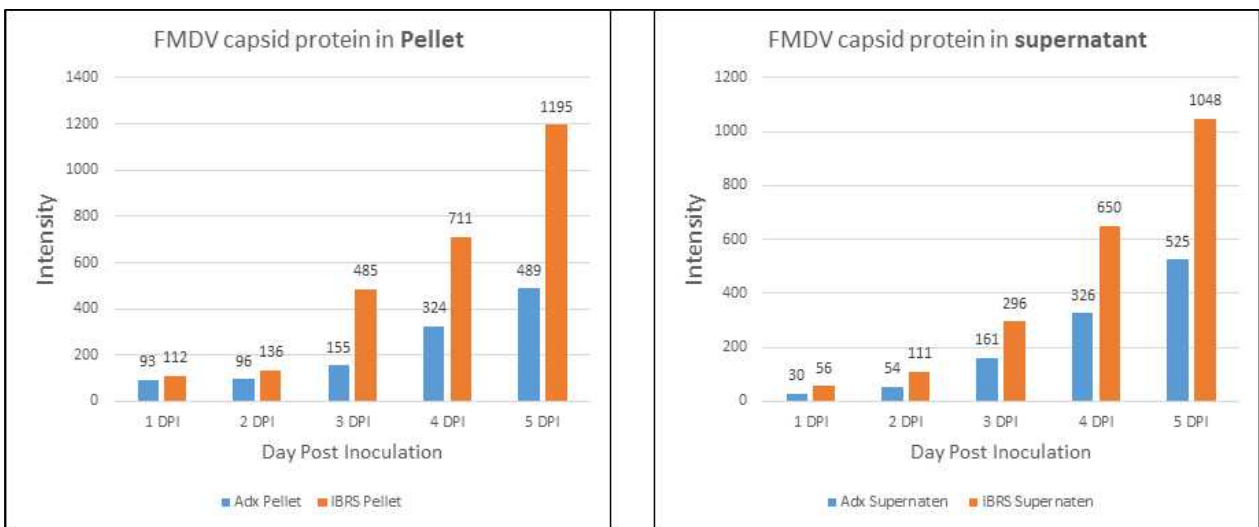


그림 46. ㈜메디안디노스틱 연구소 자료.

또한 ㈜메디안디노스틱은 내부적으로 구제역 아데노바이러스를 이용하여 생산한 구제역 면역 항원을 이용하여 구제역 항체 진단 ELISA 키트의 시제품(그림 47)을 생산하고 제품에 대한 검증 작업을 진행 중이다.



그림 47. 구제역 항체 ELISA 시제품

구제역 항체 진단 ELISA 키트 시제품에 대해서 27개의 혈청을 이용하여 시험해본 결과(그림 48) 다음과 경쟁제품과 경향성은 비슷하지만 정확도와 민감도가 미진한 것으로 나타났다. 이에 대해서 추가 실험을 통해 보완하고 제품화 할 예정이다.

(주)메디안디노스틱 연구소 내부 실험 자료에 따르면 각 세포주와 바이러스가 안정적으로 정착되었으며 항원을 생산할 준비가 완료되었다. 이에 따라 기술이전에 대한 협의가 마무리 되었으며 보고서를 작성하는 2018년 현재 행정적인 절차만을 남겨둔 상태이다.

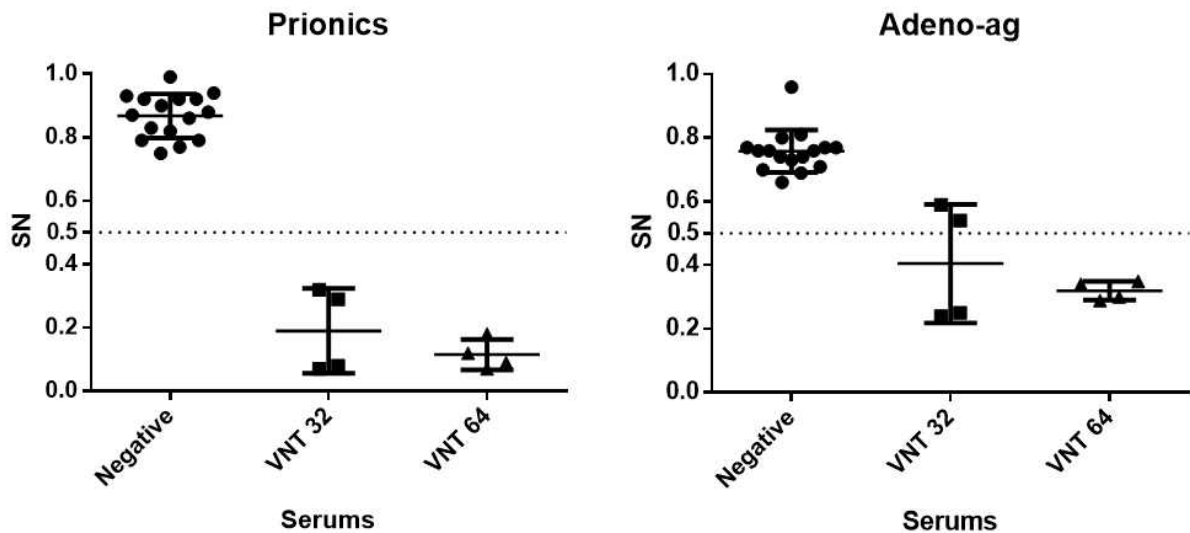


그림 48. 구제역 항체 ELISA 키트 시제품 평가 결과.

4. 아데노바이러스를 이용한 각종 분자 면역 보조제 생산 및 공동접종

가. 구제역 백신 효능 증가와 분자 면역 보조제

보고에 따르면 구제역 백신의 면역 증강 효과를 위해 INF-alpha/beta/gamma 등을 분자 면역 보조제로 사용이 가능하다는 연구 결과가 있다(Moraes MP et al., J Virol, 2007). 본 연구진은 이를 참고하여 각종 돼지 면역 사이토카인을 클로닝하고자 시도 했으며 그 중 INF-alpha/beta, IL2, CD40L의 유전자를 클로닝 하고 아데노바이러스 벡터에 삽입하는데 성공했다. 이 중 INF-alpha/beta는 type 1 interferon으로 세포의 초기면역에 관여한다. 그러므로 본 연구진은 인터페론 알파 아데노바이러스를 우선 실험하였다.

나. 인터페론 알파 작용 저해제를 이용한 인터페론아데노바이러스의 생산 시험

본 연구진이 인터페론 알파 아데노바이러스를 제작한 후 평판 배양으로 인터페론 알파 아데노바이러스를 생산하고 역가를 측정 한 결과 최고 10^4 TCID₅₀/ml을 넘지 못했다. 문헌조사(Terawaki S et al., J Immunol., 2011)를 통해 배양 세포에 인터페론 알파 아데노바이러스를 접종한 결과 고농도의 인터페론 알파의 면역 작용으로 세포의 자가 사멸이 촉진되었고 그 결과 아데노바이러스가 충분히 생산되지 않는다는 결론을 얻었다.

이를 해결하기 위해 본 연구진은 다양한 인터페론 알파 저해제를 탐색하였고 기존의 인터페론 알파 저해제는 항암 효과가 있는 제제로 알려졌으나 고가의 제품이라서 실험실이나 축산 현장에서 사용하기 곤란한 것을 지난 2013-2015년 연구 결과에서 알 수 있었다.

본 연구에서는 새로운 제제를 탐색했고, 여러 약제 중 Fludarabine phosphate라는 제품은 주로 사람 B세포성 백혈병에 사용되는 약제이며 가격이 저렴하다. 이 제제는 STAT1 inhibitor의 일종으로 Type I interferon pathway를 억제하는 작용을 하는 것으로 분자생물학적으로 규명이 되어 있다. 따라서 Fludarabine phosphate를 세포배양액에 첨가하는 것으로 인터페론 알파 아데노바이러스의 역가를 높일 수 있을 것으로 예상하고 실험을 진행하였다.

군	음성대조	양성대조	1	2	3	4	5
인터페론 알파 아데노바이러스	0 TCID ₅₀ /ml	1.8x10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	1.8x10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	1.8x10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	1.8x10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	1.8x10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	1.8x10 ⁴ TCID ₅₀ /ml
Fludarabine phosphate	0mM	0mM	0mM	0mM	0mM	0mM	0mM

표 6. Fludarabine phosphate를 이용한 인터페론아데노바이러스의 감염력 증가 확인 실험군

Adeno-X 293세포를 monolayer로 준비하고 실험군(표 4)을 편성하여 바이러스 접종 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72시간 후에 아데노바이러스 real-time PCR기법을 이용하여 분석하였다.

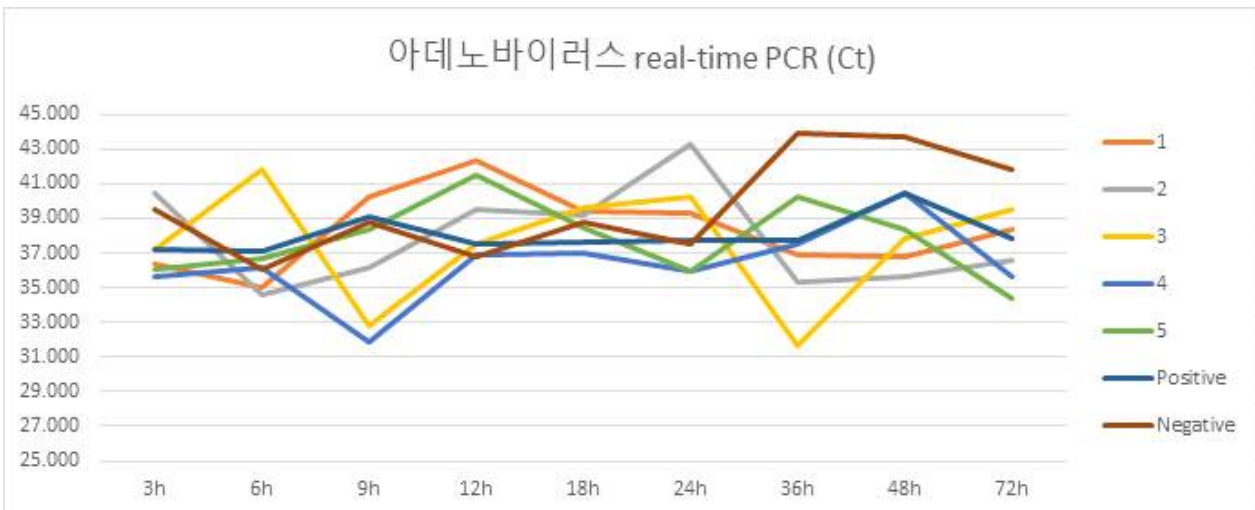


그림 49. Fludarabine phosphate의 인터페론 알파 억제 효과 확인.

그 결과(그림 49) Fludarabine phosphate의 용량과 처리 후 시간에 따른 경향성을 전혀 확인하지 못했다. 결과적으로 Fludarabine phosphate는 in vivo에서는 효과가 있지만 in vitro

에서는 효과가 없다고 할 수 있다. 해당 실험의 결과에 따라 INF-alpha/beta는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 대량으로 생산하는데 어려움이 있을 것으로 예측하고 본 연구진은 IL2 아데노바이러스(Ad.IL2)를 대량 생산하여 동물 실험하는 것이 옳다고 판단하였다.

다. IL2 아데노바이러스의 생산 및 동물실험

본 연구진은 IL2 아데노바이러스(Ad.IL2)를 대량 생산하기 위하여 평판 배양을 통해 실험한 결과 최고 3.1×10^{10} TCID₅₀/ml의 바이러스를 수득할 수 있었다. 이에 따라 추가적인 대량 생산 연구 없이 동물 실험을 진행할 수 있었다. SPF 3주령의 BALB/c 마우스 50마리를 아래의 표(표 5)와 같이 4개의 실험군으로 준비하였다. A군(15마리)은 commercial vaccine과 IL2 아데노바이러스(Ad.IL2)를 접종하였고, B군(15마리)은 commercial vaccine만 접종하였다. 그리고 C군(10마리)은 Ad.IL-2만 접종하였고, 마지막으로 D군(10마리) PBS를 접종했다. 접종 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 후에 채혈하여 얻은 혈액으로부터 혈청을 분리하였다.

그룹	동물의 수	치치	접종방법	채혈방법
A. 시험군	15	Commercial vaccine 200ul + AdIL2 10 ¹⁰ TCID ₅₀ /dose 접종	IM	Facial vein
B. 시험군	15	Commercial vaccine 200ul 접종		
C. 시험군	10	AdIL2 10 ¹⁰ TCID ₅₀ /dose 접종		
D. 대조군	10	PBS 접종		

표 7. IL2 아데노바이러스와 구제역 백신의 공동접종 동물시험(마우스) 실험군 편성

라. SP ELISA 실험결과

PrioCHECK FMDV Type O antibody ELISA를 사용하여 접종 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 일 후 혈청을 검사한 결과 다음 그림(그림 50)과 같다.

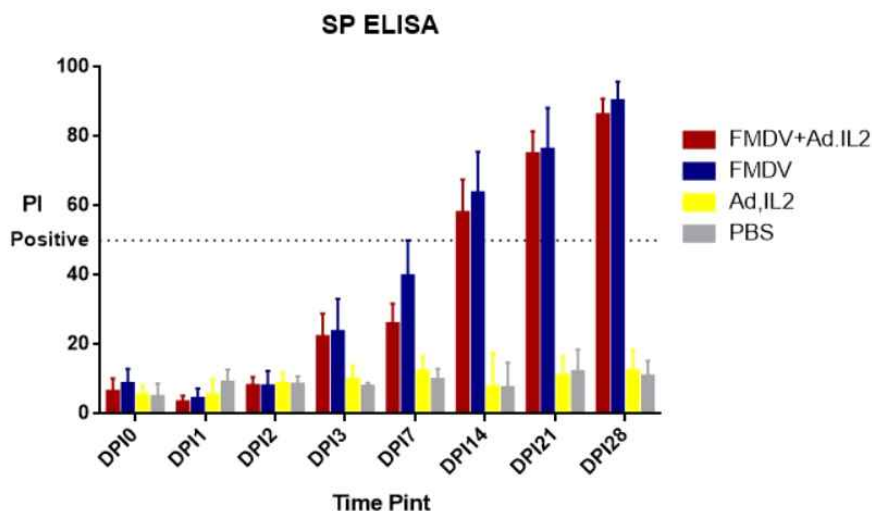


그림 50. 구제역 O형 SP ELISA 검사 결과

접종 후 2일까지는 모두 구제역 항체 음성을 나타내었다. 그러나 3일 후 부터 항체가 증가하는 경향성을 확인할 수 있었다. 결과적으로 구제역 백신 접종군과 비교하였을 때, 구제역 백신과 아데노 IL2(Ad.IL2) 공동접종 군의 항체 형성이 낮음을 확인할 수 있다.

마. LPB ELISA Screening test

LPB ELISA(액상차단효소면역법)을 사용하여 구제역백신 접종군과 구제역백신과 IL-2 아데노바이러스(Ad.IL2)공동 접종군의 구제역 특이 항체 형성 정도를 확인하였다.

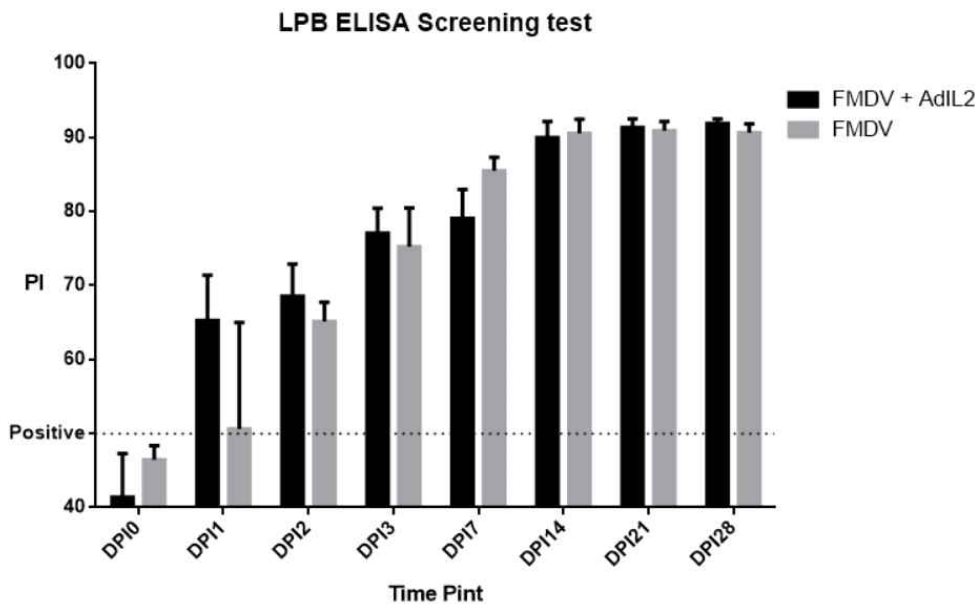


그림 51. IL2 아데노바이러스(Ad.IL2)와 구제역 백신 공동접종 시험 LPB-ELISA결과.

구제역백신 접종군과 구제역백신과 IL-2 아데노바이러스(Ad.IL2)를 동시접종군의 접종 후 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28일의 혈청으로 LPB ELISA Screening test를 진행한 결과(그림 51) 구제역 특이 항체의 증가 추세를 확인할 수 있었다. SP ELISA 검사 결과와는 다르게 LPB-ELISA 검사 결과에서는 구제역 백신과 IL2 아데노바이러스(Ad.IL2)공동접종군의 항체 생성이 구제역 백신 접종군에 비해 빠르게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 접종 후 21일과 28일에는 항체의 양이 더 높게 측정되는 것으로 나타났다.

바. 돼지를 이용한 IL-2 아데노바이러스의 목적 동물 적용 실험

상기의 마우스 실험 결과 구제역 백신과 IL-2 아데노바이러스의 공동접종에 의한 효능 증대 효과가 확인되어 목적동물인 돼지에 실험을 진행하였다. 9마리의 돼지를 3개의 군으로 나누고 각각 구제역 백신, 구제역 백신 + IL-2 아데노바이러스, IL-2 아데노바이러스를 접종하였다(표 8). 그리고 접종 후 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21일에 채혈하여 구제역 바이러스를 이용한

바이러스 중화 시험(VNT)을 진행하였다.

그룹	동물의 수	처리	접종방법	채혈방법
A. 시험군	15	Commercial vaccine 2ml + AdIL2 10 ¹⁰ TCID ₅₀ /dose 접종	IM	external jugular vein
B. 시험군	15	Commercial vaccine 2ml 접종		
C. 시험군	10	AdIL2 10 ¹⁰ TCID ₅₀ /dose 접종		

표 8. IL2 아데노바이러스와 구제역 백신의 공동접종 동물시험(돼지) 실험군 편성

협동-농림축산검역본부의 BL3 시설에서 진행한 구제역 바이러스 중화시험(VNT)결과 다음 그림(그림 52)과 같이 접종 후 7일차에서 구제역 백신 단독 접종군에 비해 공동 접종군의 VNT역가가 높게 나타났다.

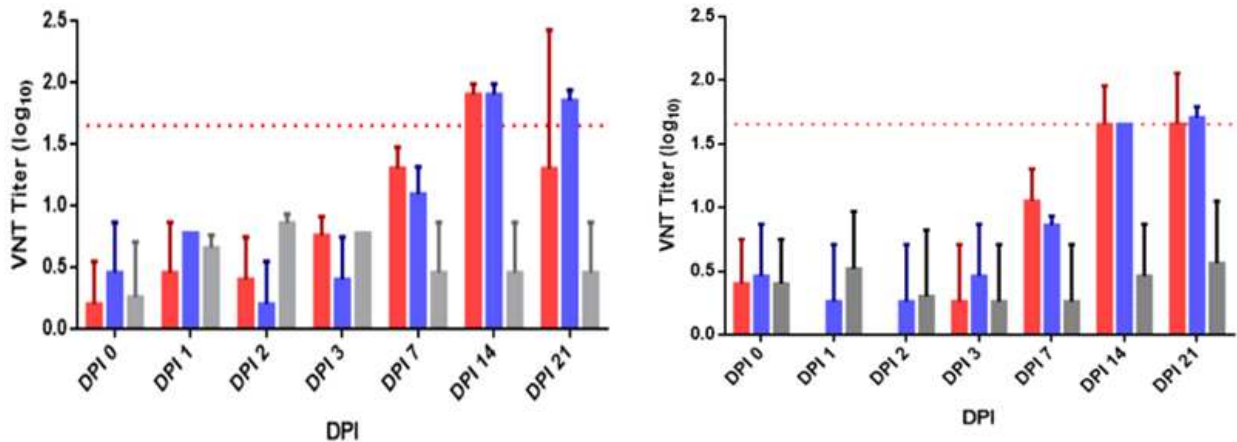


그림 52. IL2 아데노바이러스(Ad.IL2)와 구제역 백신 공동접종 시험 VNT 결과 (좌)마니사주, (우) 진천주.

사. 향후 연구 계획

바이러스 중화시험(VNT)결과에서 마니사주의 경우 3일과 7일, 진천주의 경우 7일에서 구제역 백신 단독접종군 보다 높은 중화항체가를 나타내었다. 그러나 그 수치가 유의성을 보일만큼 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 추가적인 연구를 통해 IL-2 아데노바이러스의 효능을 보강할 필요가 있다. 그러므로 본 연구팀은 Poly I:C, CpG, dsRNA 등 IL-2의 기능을 보강할 수 있는 물질을 탐색하고 아데노바이러스와 혼합을 통해 구제역 백신의 효능 증대 효과를 보강하고자 한다.

4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
<p>4-1절. 목표달성도</p> <p>1. poly IC 담지 Nanogel 담체 제작 : 80%</p> <p>가. 본 연구진은 Basic-Nanogel(B-NG), RITC-Dextran-Nanogel(RD-NG), Poly IC-Nanogel, Poly IC-RITC-Dextran-Nanogel(Poly IC-NG) 등 다양한 nanogel을 마우스 유래 세포에서 스크리닝 하여 RD-NG가 담체로서 적당하다는 사실을 확인하였다.</p> <p>나. RD-NG를 이용하여 마우스 in vitro, in vivo 실험을 진행한 결과 nanogel의 면역 증진 및 인터페론 알파 분비 유도 효과를 유전자 단계에서 확인했으며 RD-NG는 면역 반응을 유도 하여 구제역 초기 면역에 기여할 수 있는 우수한 담체임을 확인하였다. 이 결과는 출원번호 “10-2018-0007280”으로 특허 출원하였다.</p> <p>다. RD-NG를 목적동물인 돼지에 실험하기에 앞서 in vitro상에서 검증하고자 RN-NG에 반응 하는 돼지 유래 모델을 탐색했다. 이를 위해서 돼지 유래 세포주(PAM, PAM-CD164, BAL, IBRS2), primary cell culture(tonsil, spleen), PBMC 등에 대한 RD-NG의 반응을 관찰 하 였고 그 결과 돼지 spleen primary cell culture와 PBMC에서 반응성을 확인 하였다.</p> <p>라. 그러나 상기의 세포는 살아있는 돼지에서만 얻을 수 있는 실험 재료로서 수급에 어려움이 있어 최종적으로 연구를 완성하지 못하였다. 지금 까지 습득한 기술을 이용하면 추가 연구를 통해 쉽게 성과를 낼 수 있을 것이라 판단하여 목표달성도를 80%로 측정하였다.</p> <p>2. 돼지 인터페론 알파8 클로닝 : 100%</p> <p>가. 우리나라 돼지의 인터페론 알파8의 유전자를 성공적으로 클로닝 했으며 GenBank에 등재 되어 있는 돼지 인터페론 알파8의 유전자와는 차이점이 있었다는 사실을 밝혀냈다.</p> <p>나. 우리나라 돼지의 인터페론 알파8 유전자 염기 서열은 GenBank에 등재되었다(ACV42397).</p> <p>3. 재조합 돼지 인터페론 알파8의 발현 및 정제 : 100%</p> <p>가. 본 연구진은 상기에서 클로닝한 돼지 인터페론 알파8의 유전자를 대장균에서 성공적으로 발현하고 이를 높은 순도로 정제했다.</p> <p>나. 형질전환된 대장균은 유전자원 은행에 기탁했다(KX275310).</p> <p>4. 재조합 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과 검증 : 100%</p> <p>가. 상기 연구를 통해 획득한 재조합 돼지 인터페론 알파8의 바이러스 억제 효과를 다양한 세 포에서 확인하였고, 면역 신호 전달 수준에서 확인했다.</p> <p>나. 그 결과 논문으로 Immune network지에 출간하였다.</p>	

5. 구제역 아데노바이러스의 공장스케일 대량 생산 기술 확립 : 90%

- 가. 지난 2년간의 연구 결과와 문헌자료를 고려하였을 때 아데노바이러스 벡터를 이용한 구제역 백신이 1회 단독접종으로 충분한 방어능을 지니기 위해서는 10^{10} TCID₅₀/dose의 용량은 부족하고 10^{11} TCID₅₀/dose의 용량으로 접종해야 하는 것으로 예측된다.
- 나. 본 연구진은 바이오리액터(Bioreactor)와 다양한 정제 및 농축 방법을 복합적으로 연구하여 10^{10} TCID₅₀/dose 수준의 생산 능력을 갖췄지만 10^{11} TCID₅₀/dose에는 도달하지 못하였다.
- 다. 연구 초기 10^8 TCID₅₀/dose 수준의 기술이었지만 연구 과정에서 대량 생산 및 정제 및 농축 기술을 습득했고 시간이 충분히 주어지면 10^{11} TCID₅₀/dose에 도달 할 수 있을 것으로 예측되기 때문에 목표달성도를 90%로 측정하였다.

6. 아데노바이러스를 이용한 각종 분자 면역 보조제 생산 및 공동접종 : 90%

- 가. 본 연구진은 INF- α / β / γ , IL2, CD40L 등 분자 면역 보조제로 사용될 수 있는 유전자들을 돼지의 혈액에서 스크리닝 하고 클로닝 하여 아데노바이러스 벡터에 삽입하는데 성공했다.
- 나. 연구 초기에는 해외 연구 사례를 참고하여(Moraes MP et al., Vaccine, 2003) 인터페론 알파와 아데노바이러스가 가장 유용할 것이라고 판단하고 연구를 진행하였으나 인터페론 알파의 세포 성장 억제효과로 인해 유효 아데노바이러스 농도에 도달하지 못했다. 또한 적절한 인터페론 알파 억제제를 스크리닝 하는 연구 또한 좋은 결과를 얻지 못했다.
- 다. 이에 따라 IL2 아데노바이러스를 구제역 백신과 공동접종하는 것을 목표로 연구를 진행하였으며 보고서를 작성하는 현재 시점에 마우스 실험 모델에서 구제역 백신과 공동접종 효과를 확인하고 있다.
- 라. 현재 까지 분석 결과 IL2 아데노바이러스의 면역 증진 효과가 있는 것으로 나타나고 있다. 보고서 종료시점에 완성된 결과를 제시하지는 못했지만 긍정적인 결과가 도출될 것이라 예측되기 때문에 목표 달성도를 90%로 측정했다.

4-2절. 관련분야 기여도

1. poly IC 담지 Nanogel 담체

- 가. 지금 까지 연구 결과를 고려했을 때 RD-ND는 면역 작용을 증강 시키고 INF α 의 분비를 촉진하는 것으로 보인다. 이와 같은 특성은 면역 보조제(adjuvant)와 매우 비슷하다고 할 수 있다.
- 나. 그러므로 RD-ND에 항원을 로딩하는 것으로 면역을 증강시키는 면역 보조제로 사용할 수 있으면 향후 백신 시장에서 새로운 보조제로 주목받을 것이라고 기대된다.

2. 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과

- 가. 본 연구진은 이번 연구를 통해 한국 돼지의 인터페론 알파8의 염기서열이 해외 돼지와는 다르다는 점을 밝혀내었다. 또한 이를 통해 재조합 돼지 인터페론 알파8을 발현하고 정제하는데 성공했다.
- 나. 연구 결과를 통해 재조합 돼지 인터페론 알파8은 기존의 다른 치료법보다 낮은 세포 독성으로 바이러스 감염을 예방할 것으로 기대된다. 그러므로 재조합 IFN α 8 단백질은 단축접종으로 어린 자돈에서 초기 면역 증진을 통해 로타바이러스, TGEV, PEDV 감염을 예방하는 제제로 개발이 가능할 것으로 보인다.
- 다. 더불어 다른 백신과 공동 접종하는 것으로 백신의 효능은 증가시키고 백신의 독성은 감소시킬 수 있다. 이러한 특성은 백신의 성능 향상 없이 백신의 효능을 증진시킬 수 있는 방법이므로 동물약품 시장에서 각광받는 기술이 될 것이다.

3. 구제역 아데노바이러스 백신의 대량 생산 기술 확립 및 분자 면역 보조제

- 가. 현재 사용하고 있는 구제역 백신은 세포 배양을 통해 생산 후 정제 하여 판매된다. 구제역 바이러스는 그 위험성을 고려하여 BL3 등급 이상의 연구 및 생산 시설에서만 취급할 수 있으며 이에 따라 연구 및 생산에 큰 제약이 있다. 아데노바이러스 벡터는 BL2 등급의 물질로서 아데노바이러스의 증식을 돕는 세포에서만 자랄 수 있으며 체내에서는 증식능력이 없어 매우 안전하다. 그러므로 안전한 구제역 바이러스 백신을 빠르게 국산화 하여 한국형 구제역을 방어하는 것으로 축산업에 기여할 수 있다.
- 나. 또한 상기한 바와 같이 구제역 백신 연구와 생산에는 제약이 있어 현재로서는 국내 백신 업체에 구제역 백신 생산 능력이 없다. 하지만 구제역 아데노바이러스 백신은 제약이 낮으므로 빠른 시일 내에 구제역 아데노바이러스 백신의 생산 능력을 습득할 수 있을 것으로 보인다. 그러므로 국내 구제역 백신 시장에 기여할 수 있다.
- 다. 한편 축산업에서 널리 사용하고 있는 면역 보조제(Adjuvant)는 mineral oil을 근간으로 하여 제작한 것으로 조직독성이 나타나는 문제점이 있다. 우리나라는 구제역 상시 백신 정책에 따라서 법적인 구속을 통해 가축에게 백신을 하도록 정하고 있으나 돼지의 경우 접종 부위가 상품가치가 높은 이근부이고 전국적으로 한해 추산 1조원 가량 발생하고 있는 것으로 집계되고 있다. 아데노바이러스를 이용한 분자 면역 보조제는 조직독성이 없으므로 농가 소득에 기여할 수 있다.

5장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

5-1절. poly IC 담지 Nanogel 담체 제작

1. 이번 연구 기간 동안 마우스 모델을 이용한 in vitro, in vivo 실험을 통해 RD-ND에 의한 면역 활성화 및 INF α 분비 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 특성을 이용하면 구제역 면역 항원을 nanogel에 load하는 것으로 백신의 효능을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.
2. 이를 확인하기 위해서는 목적동물인 돼지 모델을 이용한 실험이 필수적이나 적합한 연구 모델을 선별하기에는 시간이 부족했다. 그러므로 돼지 실험 모델을 통한 RN-ND의 면역 증강 실험이 필요하다.
3. Nanogel 담체는 구제역뿐만 아니라 백신에 의한 면역이 잘 성립되지 않는 다양한 바이러스에 대해서 백신의 효능을 증가시키는 첨가제 혹은 면역 보조제(adjuvant)로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 그러므로 이번 연구를 통해 출원한 특허를 이용하여 기술이전 및 산업화를 진행할 예정이다.

5-2절. 돼지 인터페론 알파8의 항바이러스 효과

1. IFN α , IFN β , IFN ω 및 IFN τ 는 공통 1형 수용체인 IFN α R1 및 IFN α R2에 결합하지만, 이들의 결합과 생물학적 활성화는 아마도 1형 IFN 리간드 사이의 3차원 입체 구조 차이로 인해 종, 조직 및 세포 특이적 차이를 보인다. 따라서 종에 따라 돼지 IFN α 8의 활성화 변화는 돼지 IFN α 8과 인간 IFN α 2 사이의 아미노산 서열의 차이로 인한 것일 수 있지만 돼지 IFN α 8의 종 특이적 항바이러스 활성화에 기여하는 추가적인 알려지지 않은 수용체 성분이 있다는 것을 배제할 수는 없다. 돼지 IFN α 8의 생물학적 활성화는 돼지에서 고친화성 수용체를 지니므로 돼지세포에서 최적 활성을 갖는다. IL-1 관련 사이토카인 리간드는 결합수용체이외에 보조수용체가 필요하므로 이미 알려진 4종류의 IFN 리간드에 대한 수용체는 단 2종류만 알려졌으므로 밝혀지지 않은 보조수용체에 대한 연구가 필요하다.
2. 또한 이번 연구 결과는 세포를 이용한 in vitro 실험에 국한되어 있다. 돼지 인터페론 알파8의 단독 접종 혹은 백신과 공동 접종을 통한 면역능 증강을 확인하기 위해서는 돼지를 이용한 in vivo 실험이 필수적이다.

5-3절. 구제역 아데노바이러스 백신의 대량 생산 기술 및 분자 면역 보조제

1. 구제역 아데노바이러스 대량생산 기술은 현재까지 연구 결과로는 1회 접종으로 충분한 면역을 형성할 수 있는 10^{11} TCID₅₀/dose 까지 도달하지 못했다. 그러나 충분한 시간이 주어진다 면 현재 까지 습득한 기술을 이용하여 유효 면역 용량까지 도달할 수 있을 것으로 기대 된다. 구제역 아데노바이러스의 면역원성은 이전 연구를 통해 입증된 바 있으므로 생산성 개선을 통해 기술이전 및 사업화 계획이다.
2. 아데노바이러스를 이용한 분자 면역 보조제 중 IL2 아데노바이러스의 면역 증진 능력에 대한 실험을 보고서를 작성하는 현 시점에서 아직 진행 중이다. 지금 까지 도출한 결과로는 IL2 아데노바이러스의 면역 증진 능력이 긍정적인 것으로 보이고 있다. IL2 아데노바이러스와 구제역 백신 공동 접종에 의한 면역 증진 효과가 확인된다면 상기 구제역 아데노바이러스 백신이 1회 단축접종 유효 면역 농도에 도달하지 못하더라도 분자 면역 보조제와 공동 접종으로 구제역에 대한 면역을 확보할 수 있을 것이다. 이에 대한 추가적인 연구가 필요하며 기술이 완성된다면 기술이전을 통해 사업화 할 계획이다.

6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

6-1절. Nanogel 담체의 면역 유도 작용

1. RIG-1 유사 수용체 (RIG-1 liker receptor, RLR) 연구동향

- 바이러스에 존재하는 DNA 또는 RNA를 인식하는 중요한 패턴인식수용체 (Pattern recognition receptor)의 하나이다.
- RLR는 바이러스에 의해 감염된 세포 내에서 바이러스 RNA를 인식하여 MAVS(Mitochondrial antiviral signaling protein)와 IRF3(Interferon regulatory transcription factor 3) 등에 신호를 전달하고 최종적으로 1형 인터페론 IFN- α 또는 IFN- α 를 생성하는 경로를 활성화시킨다.
- 생성된 1형 인터페론은 세포 밖으로 분비되어 모든 세포 들이 갖고 있는 인터페론 수용체에 결합하여 새로운 신호를 전달하여 바이러스가 증식하는 것을 억제하는 항 바이러스 유전자들의 생성을 유도한다.
- 결과적으로 RLR 신호경로에 의한 1형 인터페론 생성은 항 바이러스 기능에 핵심적인 역할을 수행한다.

2. Dextran 중합체 나노물질 연구 및 응용연구 동향

- 텍스트란 설페이트를 포함하는 블록공중합체로 도포된 산화철 복합 나노 입자 (동맥경화 진단용 조영제)
- PEG와 텍스트란 (dextran)을 섞어서 메타크릴레이트(methacrylate)기와 락티드(lactide)기를 도입한 텍스트란의 하이드로젤 (약물방출이 조절되는 약물전달체 개발)
- 텍스트란과 리포익산으로 구성된 나노 입자에 DTT(dithiothreitol)를 첨가하여 가교된 다기능성 나노 입자 (약물전달체로 이용)
- 다당류 유도체, 폴리알데히드 텍스트란(polyaldehyde dextran)을 이용한 Au-나노입자 중합체 (차세대 광학 나노장치의 선구물질 제조와 생물학적 적용)
- 나노 섬유를 이용한 약물전달시스템의 발전 방향 (나노 섬유를 이용한 약물 전달시스템)
- 텍스트란과 젤라틴을 고정화한 생의학용 산화철 나노입자의 제조 (생 의학용 나노입자 제조)
- 텍스트란과 락타이드-글리콜라이드 공중합체를 이용한 이중층 나노미립구 제조 (나노미립구 제조)

3. 나노 입자를 이용한 백신개발 연구동향

- 지카 바이러스용 백신을 위한 맞춤형 RNA 나노 입자 (지카바이러스를 이용한 백신제작)
- 면역 활성화 유도 DNA스마트 나노입자 개발 (각종 질병에 대한 면역치료제 및 백신 개발)
- 키토산 나노 입자를 이용한 약물전달시스템 (키토산 나노 입자를 이용한 암 치료, 유전자 치료)
- 질병의 면역 치료 돕는 나노입자 개발 (다양한 질병의 항원을 나노 입자에 결합한 백신·면역치료제를 개발)
- H1N1 항체 생성을 유도하는 자가 조립형 나노 입자 독감 백신 (독감 백신 개발)
- 바이러스 나노입자 기반의 진단 분석 (나노 입자 진단분석)
- 암세포 보호막 뚫는 항암 나노물질 개발 (항암제 나노물질 개발)
- 나노 입자를 이용한 백신의 합성 (감염 예방, 자가면역질환 치료)
- 나노 패치: 주구나 직접 부착가능한 새로운 백신 (나노 패치를 이용한 감염 예방)
- 나노 입자를 이용한 약물전달체계의 개선 및 암 치료 (나노 튜브를 이용한 단백을 감별하는 진단기구)

6-2절. 아데노바이러스 벡터를 이용한 백신과 면역 증강 연구

1. A Recombinant Adenovirus Expressing P12A and 3C Protein of the Type O Foot-and-Mouth Disease Virus Stimulates Systemic and Mucosal Immune Responses in Mice, Yinli Xie, Peng Gao and Zhiyong Li, BioMed Research International Volume 2016 (2016), 9 pages

- 본 논문은 구제역 재조합 아데노 바이러스의 근육 및 복강, 구강과 안구 접종에서의 항체가 형성에 대해 비교하였다. rAdv-P12A3C를 이용한 T세포 특이적 항 바이러스 반응이 백신 접종 후 지속적으로 나타난다는 것을 입증하였다. 불활화된 FMD 백신과 rAdv-P12A3C 구제역 재조합 아데노바이러스 벡터 백신을 각각 마우스의 근육과 복강, 구강과 안구에 3회 접종하고 각각의 구제역 특이적 IgA 항체를 비교 검출하였다. 또한, rAdv-P12A3C에 의해 자극된 IL-4와 IFN- γ 의 수준도 기준에 사용되는 불활화 FMD 백신보다 유의하게 높았다. 이를 통한 안전성과 면역반응 유도 측면에서 충분히 백신으로서 가능성을 나타내었다. 이를 통해 일부 면역 시스템이 재조합 된 아데노바이러스를 증성화시키는 단점을 보완했다고 예상되며 이러한 결과는 재조합된 아데노 바이러스 벡터 백신 접종 후 보다 광범위한 항체 생산능력 향상에 새로운 옵션을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

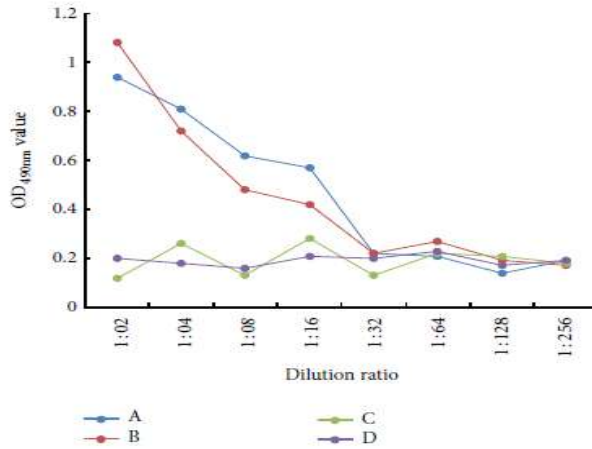


FIGURE 10: Anti-FMDV IgA antibodies detection by indirect ELISA. (A) rAdv-P12A3C given by oral immunization; (B) rAdv-P12A3C given by intraocular-nasal immunization; (C) WtAdv given by oral immunization; (D) WtAdv given by intraocular-nasal immunization.

그림 1. 구제역 아데노바이러스 접종 방법에 따른 항체 형성

2. Foot-and-Mouth Disease (FMD) Virus 3C Protease Mutant L127P: Implications for FMD Vaccine Development, Michael Puckette, Benjamin A. Clark, Justin D. Smith, Traci Turecek, Erica Martel, Lindsay Gabbert, Melia Pisano, William Hurtle, Juan M. Pacheco, José Barrera, John G. Neilan, Max Rasmussen, J. Virol. November 2017 vol. 91 no. 22 e00924-17

- 본 연구는 구제역 아데노바이러스 벡터 백신의 구성 중, P1 polyprotein을 캡시드 단백질로 절단하기 위해 적용되는 C3 protease로 인한 숙주 세포의 독성을 낮추기 위해 wild-type 3C로 치환하여 도입 유전자의 생산량 증가를 확인하였다. 이 새로운 wild-type C3 (L127P)는 P1-C3 형질 전환 유전자를 발현하는 포유류 및 박테리아 세포에서 구제역 아데노바이러스 벡터 백신의 서브 유닛 단백질의 수율을 증가시키고, 다중 구제역-혈청형에서 P1 polyprotein을 생성하는 능력을 유지하였다. 이러한 C3 돌연변이 구제역 아데노바이러스 벡터 백신을 이용한 구제역 백신 생산의 수율을 증가시킬 수 있는 가능성을 제공하였다.

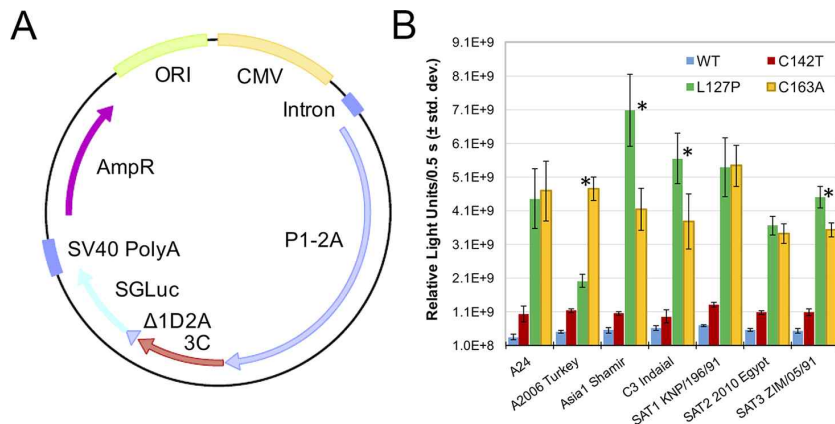


그림 2. 치환된 wild-type 3C(L127P) 클로닝 및 wild-type 3C(C163A, C142T)의 Luciferase reading 결과

3. Increased humoral antibody response of foot-and-mouth disease virus vaccine in growing pigs pre-treated with poly- γ -glutamic acid, Lee JH, Kang IJ, Kim AR, Noh YS, Chung HC, Park BK, J Vet Sci. 2016 Jun 30;17(2):253-6.

- 본 연구는 γ -PGA의 조기 접종으로 인한 FMDV O형 항원에 대한 항체 증가율을 확인하였다.
- 한국에서 사용되는 FMD 백신은 이중 오일 에멀전 (double oil-based emulsion, DOE)로 불활성화된 (O1 Manisa + A Malaysia + Asia 1 Shamir)가 혼합된 백신을 사용한다. 하지만 이러한 3가 구제역 백신을 접종한 돼지에서 단일 구제역 백신을 접종한 돼지에 비해 면역유도가 약하고 면역 기간이 짧은 몇가지 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 γ -PGA와 이중 오일 에멀전과의 비교 분석을 통해 FMD의 어주번트로서 사용될 수 있다는 가능성을 설명할 필요가 있다.
- 8주령 돼지를 12마리씩 2그룹으로 나누고 한쪽 그룹에만 FMD백신 접종 3일 전에 γ -PGA를 근육 주사하였다. ≥ 50 PI 값에 기초하여, 백신 접종 3일 전 γ -PGA가 접종된 TS군과 HB군의 양성 반응은 대조군보다 높았다.
- 이를 통해 백신 접종 3일 전 γ -PGA의 사전 접종을 인해 구제역 백신의 항체 반응이 유의하게 증가했다고 볼 수 있으며, 구제역 백신 어주번트의 다각적인 접근을 통해 돼지의 면역개선에 매우 효과적이라고 볼 수 있어 효과적이지만, 실제 구제역 백신 접종 3일 전이라는 변수가 존재하고 있어 현장에서 사용되기 어려운 문제가 발생할 수 있다. 이러한 단점을 보완한 합리적인 백신 어주번트의 개발이 필요할 것으로 보여진다.

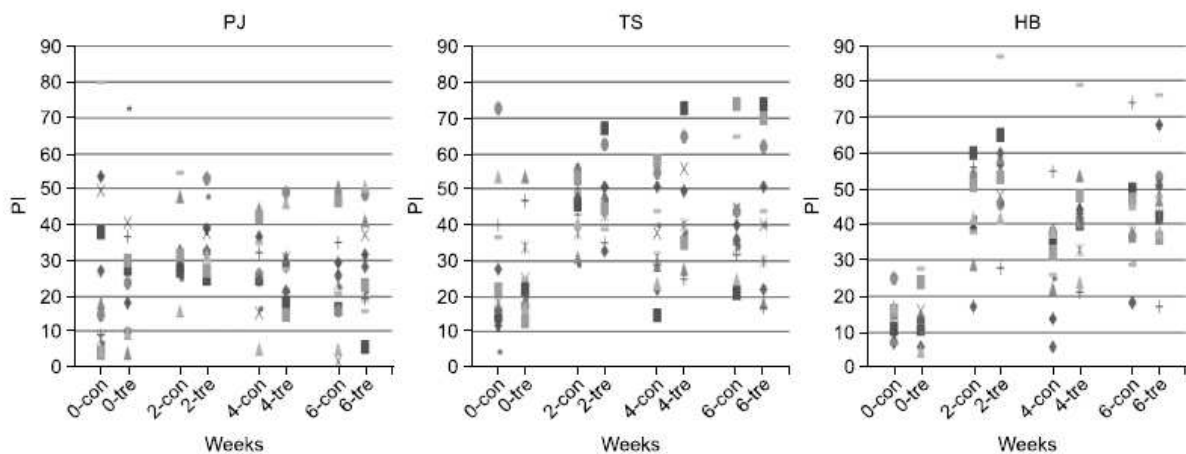


Fig. 1. Comparative distribution of percentage inhibition (PI) values at 0, 2, 4 and 6 weeks after foot-and-mouth disease vaccination in 8-week-old pigs pre-injected with γ -PGA at 3 days before vaccination. con, control; tre, treatment.

그림 3. 백신 접종 전 γ -PGA 투여에 따른 항체의 변화

4. 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), Yimei Cao, Zengjun Lu, Dong Li, Pengju Fan, Pu Sun, Huifang Bao, Yuanfang Fu, Pinghua Li, Xingwen Bai, Yingli Chen, Baoxia Xie, Zaixin Liu, Veterinary Microbiology, Volume 168, Issues 2-4, 31 January 2014, Pages 294-301

- 본 연구는 구제역 O형의 3가지 topotype에 대해 poly(I:C)로 통합된 multi-epitope 백신의 교차방어 효과를 입증하였다. 총 45마리에게 poly(I:C)로 통합된 multi-epitope 백신을 각각 다른 용량으로 접종하고, 접종 후 28일째에 O/Mya/98 (동남아시아형), O/HN/CHA/93 (Cathay topotype) and O/Tibet/CHA/99 (PanAsia topotype)을 접종하여 방어능을 확인하였다.
- 결과는 모든 돼지 (n = 15)가 O / Mya / 98 및 O / HN / CHA / 93 FMDV에 대해 완전한 방어를 제공했으며 그 중 11 개는 O / Tibet / CHA / 99 FMDV로부터 보호되었다. 이러한 결과를 통해 poly(I:C)가 포함된 multi-epitope 단백질 백신의 접종이 돼지에서 구제역을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여주었다.
- 낮은 면역원성과 교차 방어의 약점은 펩타이드 또는 에피토프 기반 단백질 백신의 주요한 단점이다. 따라서 다중 multi-epitope 단백질을 강력한 세포 면역 자극제와 결합시키는 것으로 높은 수준의 T세포 면역을 이끌어내고, 에피토프 기반 백신의 면역원성을 개선시키는 효과적인 전략일 수 있다.
- 이전의 연구에서는 다중 multi-epitope 단백질과 오일 어주번트를 혼합한 백신에서는 FMD에 대한 완벽한 예방을 볼 수 없었다. 이를 통해 poly(I:C)와 다중 multi-epitope 단백질을 혼합한 백신에서는 면역효과를 향상시키는데 사용 될 수 있는 매우 강력한 보조제이며 응급 백신으로 사용 될 수 있다고 밝히고 있다.

Table 2
Results of contact infection.

Animal no.	Vaccination status	LPB-ELISA titres ^a (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

^a 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.

표 1. poly I:C와 구제역 항원의 공중 접종 후 항체 변화 및 공격접종 후 방어능 변화

7장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당 없음	

8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설 · 장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS 장비 등록번호
-	-	-	-	-	-	-	-	-

9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

9-1절. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

1) 실험실 안전 점검

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 실험실 정밀안전진단 실시

실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전문기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

9-2절. 교육 훈련

- 1) 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행규칙 제 9조, 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)
- 2) 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (연구책임자, 참여연구원 및 업체직원 등)
- 3) 안전교육 시간 및 수료인정기간 - 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8시간 이상 교육이수 필수 - 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)

4) 안전교육 과정

- 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
- A코스 : 생물·방사선 취급
- B코스 : 화학·가스 취급
- C코스 : 전기·기계 취급

5) 안전교육절차



9-3절. 안전관리추진내용

- 2016년~2017년 실험실 출입자에 대한 생물안전관리교육 이수
- 2016년~2017년 각 분기별 사이버 안전 교육 훈련 이수
- 2016년~2017년 일일점검 및 정기점검 실시
- 2016년~2017년 연구실 일상점검 실시 및 지적사항에 따른 보안 조치

10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/기타)	논문명/ 특허명/기타	소속 기관명	역 할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Species Specific Antiviral Activity of Porcine Interferon- α 8 (IFN α 8)	건국대학교 산학협력단	교 신 저 자	Immune Network	0	2017.12.04	중복사사	SCI(E)
2	특허	신규한 돼지 인터페론 알파 8 및 그용도	건국대학교 산학협력단		대한민국		2016.10.11	단독사사	
3	특허	RIG-1 유사 수용체과 결합하는 텍스트란 중합 나노입자	건국대학교 산학협력단		대한민국		2018.01.19	단독사사	
4	기타 (기술이전)	신규한 돼지 인터페론 알파 8 및 그의 용도	건국대학교 산학협력단				2016.10.11		
5	기타 (정책활용)	AI와 구제역의 방역에 대한 보완점을 인터뷰형식으로 제안	건국대학교 산학협력단				2017.04.06		

11장. 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 해당 없음	

12장. 참고문헌

코드번호	D-14
<ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of HEK293 cell growth and adenovirus productivity in HyClone™ CDM4HEK293 medium (GE Healthcare, Swenden, 2017) - Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells(Hans-Peter Meyer, Diego Schmidhalter, John Wiley & Sons, 2014, 242p) - Enhanced antiviral activity against foot-and-mouth disease virus by a combination of type I and II porcine interferons (Moraes MP et al., J Virol, 2007) - Accelerated Titering of Adenoviruses (Bewig, B. & Schmidt, W. E., BioTechniques, 2000) - Adenovirus Expressing Human Interferon Inhibits Replication of Foot and Mouth Disease Virus and Reduces Fatal Rate in Mice (Jia-Qi Chu et al., Journal of Bacteriology and Virology, 2012) - Characterization of recombinant foot-and-mouth disease virus pentamer-like structures expressed by baculovirus and their use as diagnostic antigens in a blocking ELISA (Jae-Ku Oem et al., Vaccine, 2007) - IFN-α directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity (Terawaki S et al., J Immunol., 2011) - Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine (Moraes MP et al., Vaccine, 2003) - Nanogel based antigen delivery system for nasal vaccines (Yoshikazu Yuki, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2013) - Nanogel Based Immunologically Stealth Vaccine Targets Macrophages in the Medulla of Lymph Node and Induces Potent Antitumor Immunity (Daisuke Muraoka, Acsnano, 2014) - Nanogel vaccines targeting dendritic cells Contributions of the surface decoration and vaccine cargo on cell targeting and activation (L.J Thomann-Harwood, Journal of controlled release, 2013) - Temperature-sensitive polypeptide nanogels for intracellular delivery of a biomacromolecular drug (Du Young Ko, Materials Chemistry B, 2015) - IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction (Taro Kawai, Nature Immunology, 2005) - Current advances in self-assembled nanogel delivery systems for immunotherapy (Yoshiro Tahara, Advanced Drug Delivery, 2015) - Mechanisms that determine nanocarrier targeting to healthy versus inflamed lung regions (Jacob S. Brenner, Nanomedicine, 2017) - Classical swine fever virus triggers RIG-I and MDA5-dependent signaling pathway to IRF-3 and NF-κB activation to promote secretion of interferon and 	

inflammatory cytokines in porcine alveolar macrophages (Xiao-Ying Dong, Virology, 2013)

- Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA (Eva Kowalinski, Cell, 2011)
- Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFN α R1 and IFN α R2(Kim SH et al., Gene, 1997)
- The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning(Novick D et al., Cell, 1994)
- The neutralization of type I IFN biologic actions by anti-IFNAR-2 monoclonal antibodies is not entirely due to inhibition of Jak-Stat tyrosine phosphorylation(Novick D et al., J Interferon Cytokine Res, 2000)
- IL-32-induced Inflammatory Cytokines Are Selectively Suppressed by alpha1-antitrypsin in Mouse Bone Marrow Cells(Lee S et al., Immune Netw, 2017)
- Intracellular interleukin (IL)-1 family cytokine processing enzyme(Kwak A et al., Arch Pharm Res, 2016)
- Interleukin-32 in inflammatory autoimmune diseases(Kim S, 2014, Immune Netw, 2014)
- The Interleukin-1alpha Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines(Kim B et al., Front Immunol. 2014)
- The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling(Bach EA et al., Annu Rev Immunol,1997)
- Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells(Carneau C et al., J Immunol, 1999)
- Regulation of interferon-gamma gene expression(Young HA, J Interferon Cytokine Res, 1996)
- IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge(Frucht DM et al., Trends Immunol, 2001)
- IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance(Gessani S et al., Cytokine Growth Factor Rev, 1998)
- Viruses and interferons(Sen GC, Annu Rev Microbiol, 2001)
- Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo(Ank N et al., J Virol, 2006)
- Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus(Gray CA et al., Biol Reprod, 2006)
- Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells(Binelli M et al., Biol Reprod, 2001)
- Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of

pregnancy(Roberts RM, Cytokine Growth Factor Rev, 2007)

- New and atypical families of type I interferons in mammals: comparative functions, structures, and evolutionary relationships(Roberts RM et al., Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1997)
- Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA(Uze G et al., Cell, 1990)
- Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal(Bazer FW et al., Am J Reprod Immunol, 1997)
- Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes(Chen Y et al., Endocrinology, 2006)
- Interferons as hormones of pregnancy(Roberts RM et al., Endocr Rev, 1992)
- Ovine interferon-tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone(Spencer TE et al., Biol Reprod, 1995)
- The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development(Wolfsdorf KE et al., Theriogenology, 1997)
- The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow(Robinson RS et al., J Endocrinol, 1999)
- Antiproliferative activity of a pregnancy recognition hormone, ovine trophoblast protein-1(Pontzer CH et al., Cancer Res, 1991)
- Antiviral activity of the pregnancy recognition hormone ovine trophoblast protein-1(Pontzer CH et al., Biochem Biophys Res Commun, 1988)
- Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (type I trophoblast interferon) and bovine interferon-alpha I1(Skopets B et al., Vet Immunol Immunopathol, 1992)
- The IFN pregnancy recognition hormone IFN-tau blocks both development and superantigen reactivation of experimental allergic encephalomyelitis without associated toxicity(Soos JM et al., J Immunol, 1995)
- Cytokine-like Activity of Liver Type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) Inducing Inflammatory Cytokine Interleukin-6(Kim H et al., Immune Netw, 2016)
- Proinsulin Shares a Motif with Interleukin-1alpha (IL-1alpha) and Induces Inflammatory Cytokine via Interleukin-1 Receptor 1(Lee S et al., J Biol Chem, 2016)
- Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114(Aida Y et al., J Immunol Methods, 1990)
- Amino acid differences in interferon-tau (IFN-tau) of Bos taurus Coreanae and Holstein(Kang D et al., Cytokine, 2012)
- The receptor of the type I interferon family(Uze G et al., Curr Top Microbiol Immunol, 2007)

- pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells(Kerr IM et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1978)
- The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties(Rebouillat D et al., J Interferon Cytokine Res, 1999)
- The 100-kDa 2',5'-oligoadenylate synthetase catalyzing preferentially the synthesis of dimeric pppA2'p5'A molecules is composed of three homologous domains(Rebouillat D et al., J Biol Chem, 1999)
- Effects of mutating specific residues present near the amino terminus of 2'-5'-oligoadenylate synthetase(Ghosh A et al., J Biol Chem, 1997)
- Enzymatic activity of 2'-5'-oligoadenylate synthetase is impaired by specific mutations that affect oligomerization of the protein(Ghosh A et al., J Biol Chem, 1997)
- Enzymatic characteristics of recombinant medium isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase(Sarkar SN et al., J Biol Chem, 1999)
- The nature of the catalytic domain of 2'-5'-oligoadenylate synthetases(Sarkar SN et al., J Biol Chem, 1999)

주 의

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