

11-15430
00-00236
9-01

발간등록번호

11-1543000-002369-01

조류인플루엔자
바이러스 특이
방어항체 생산 및
산업화 기술
최종보고서

가축질병대응기술개발사업 R&D Report

2018

농림축산식품부

조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술 최종보고서

2018. 11. 14.

주관연구기관 / 경상대학교

협동연구기관 / 충북대학교

서울대학교

참여기관명 / (주) 메덱스

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술”(개발기간 : 2015. 08. 14. ~ 2018. 08. 13.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 14.

주관연구기관명 : 경상대학교 산학협력단	(대표자) 정태성 (인)
협동연구기관명 : 충북대학교	(대표자) 모인필 (인)
서울대학교	(대표자) 박영호 (인)
참여기관명 : (주) 메텍스	(대표자) 김경동 (인)

주관연구책임자 : 정태성
협동연구책임자 : 모인필, 박용호
참여기관책임자 : 김경동

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	315045-3	해 당 단 계 연 구 기 간	3 년	단 계 구 분	(3단계)/(3단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술			
연구책임자	정태성	해당단계 참여연구원 수	총: 20명 내부: 7명 외부: 13명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:50,200천원 계:352,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 57명 내부: 19명 외부: 38명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:150,600천원 계:1,050,600천원
연구기관명 및 소속부서명	경상대학교, 충북대학교, 서울대학교			참여기업명 (주) 메텍스	
국제공동연구	상대국명: 해당사항 없음			상대국 연구기관명 :해당사항 없음	
위탁연구	연구기관명: 해당사항 없음			연구책임자: 해당사항 없음	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당 없음				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>본 과제에서는 현재 빈발하고 있는 주요 국가 재난형 질병, 특히 조류인플루엔자의 예방 및 저감화를 위하여 특이 항체 생산이 가능한 시스템을 확립하고, 이를 통해 생산된 국가 재난형 질병 원인체에 대한 항체를 수동면역 백신으로 개발하여 AIV 질병 발생 저감화를 시키고자 함</p>	<p>보고서 면수</p>
---	---------------

요 약 문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 과제에서는 현재 빈발하고 있는 주요 국가 재난형 질병, 특히 조류인플루엔자의 예방 및 저감화를 위하여 특이 항체 생산이 가능한 시스템을 확립하고, 이를 통해 생산된 국가 재난형 질병 원인체에 대한 항체를 수동면역 백신으로 개발하여 AIV 질병 발생 저감화를 시키고자 함</p> <p>AIV에 대한 무악척추동물 (턱없는 동물)의 획득면역 산물인 VLRs (variable lymphocyte receptors)를 이용한 다양한 항체(먹장어 항체) 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - AIV에 대한 먹장어항체 생산을 위한 platform 구축 - AIV에 대한 먹장어항체의 안전성 및 효능평가연구 - AIV에 대한 먹장어항체의 항원성 부위 (Epitope)의 발굴 및 작용성 검증 - 개발된 먹장어 항체의 다양한 적용을 통한 제품의 산업화 연구 				
<p>연구개발성과</p>	<p>항체의 중요성 및 효용성은 이미 잘 알려져 있으나, 생산단가 및 제조공정의 복잡성로 인하여 다양한 활용이 저해되었음. 따라서 본 연구개발에서는 저비용으로 생산 가능한 효모의 분비 시스템을 통하여 대량생산을 할 것이며, 이렇게 생산된 항체는 조류 인플루엔자가 발생하고 있는 곳, 혹은 발생할 가능성이 있는 곳에 사료, 음용수 및 스프레이 방식으로 적용가능하며, 또한 오리농장에서도 적용가능하고, 나아가서는 철새의 먹이에 코팅 혹은 섞어서 줌으로서 바이러스 감염의 저감화에 큰 역할을 할 수 있음. 뿐만 아니라 항체 생산방법의 확립은 다른 주요 가축질병 적용 가능함. 예) 소: FMD, BVD 등, 닭: AI, ND등, 돼지: PED, Rota, TGE등</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 먹장어를 통한 특이방어 항체의 대량생산체계 구축 및 산업화 진행 - 먹장어 항체를 이용한 백신개발은 수동면역백신 개발에 중점을 두고 있고, 이것은 항체가 AIV와 결합하여 감염력을 떨어뜨리는 것으로서, 대량항체생산을 통하여 외부환경 및 점막면역부분에 작용토록 하는 것임. - 먹장어를 이용한 수동면역 백신을 이용한 효율적인 생산 기술 확립 및 대량생산의 편의성에 의한 산업적 응용확대 - 본 연구를 통해 개발한 먹장어항체 발현 시스템을 통해 동물백신 시장의 확대 및 경제적 상품 가치의 증진 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	조류인플루엔 자	항체	고발현 시스템	단백질 분리	립프구변이수 용체
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	AI	Antibody	high-expressi on system	protein purification	variable lymphocyte receptor

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 -----	6
가. 연구개발목적 -----	6
나. 연구개발의 필요성 -----	6
다. 연구개발 범위 -----	11
라. 연구 개발의 추진전략, 방법 및 추진체계 -----	12
2. 연구수행 내용 및 결과 -----	14
가. 과제별 (세부, 협동) 연구개발을 위한 이론적, 실험적 연구내용 -----	14
나. 특허 성과 -----	77
다. 논문 성과 -----	86
라. 학술대회발표 -----	96
마. 인력양성 -----	100
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 -----	107
가. 목표 달성도 -----	107
나. 목표 달성여부 -----	108
다. 목표 미달성 원인 및 차후대책 -----	111
4. 연구결과의 활용 계획 등 -----	112
가. 활용방안 -----	112
나. 기대성과 -----	112
붙임. 참고 문헌 -----	114
<별첨 1> 연구개발보고서 초록 -----	119
<별첨 2> 자체평가의견서 -----	120
I. 연구개발실적 -----	121
II. 연구목표 달성도 -----	123
III. 종합의견 -----	124
IV. 보안성 검토 -----	125
<별첨 3> 연구성과 활용계획 -----	126

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

주요 국가재난형 질병의 예방 및 저감화를 위해 AIV 특이 항체개발을 통한 수동면역 백신 개발 및 사업화 실현

나. 연구개발의 필요성

(1) 고병원성 조류인플루엔자의 위험성

조류인플루엔자는 전 세계적으로 발생하고, 바이러스의 종류, 항원성 및 병원성이 다양할 뿐만 아니라, 단일 숙주뿐 아니라 숙주 간 전파가 가능해 중심숙주인 야생조류를 기반으로 사람에게까지 대유행할 가능성이 있음.

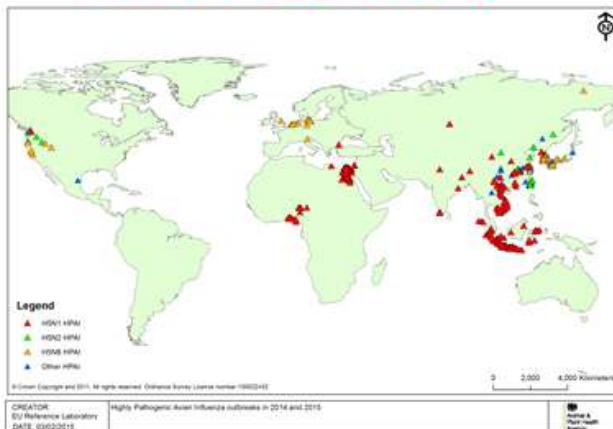
AI 구조

AI 전파 가능성

Disease outbreak map

2014/2015년에 유행한 고병원성 조류인플루엔자가 다양한 형태로 나타나고 있어, 이에 대한 다양한 특이항체의 개발이 AIV를 유행을 방지하기엔 시간적 경제적으로 어려움 있음.

HPAI 발생국 (2014 및 2015)



국내 HPAI의 발생 및 피해 요약

년도	'03/04	'06/07	'08	'10/11	'14/'15
최초신고 발생기간(일)	03.12.10	06.11.22-	08.4.1-	'10.12.29	'14.1.16-
발생시군	102	104	42	139	>431
신고건수	10	5	19	25	>53
양성건수	49	24	68	103	>43
양성건수	19	7	33	53	>37
전체양성건수	26	12	106	91	>415
양성가금					
닭	10	4	21	18	>15
오리	9	2	6	33	>21
기타	0	1	6	1	-
살처분					
농가수	392	460	1,500	286	>707
가금수(천수)	5,285	2,800	10,200	6,473	>17,923

이로 인해, 2003년 이후 조류인플루엔자의 발생 및 피해액이 기하급수적으로 증가하고 있어, 이에 대한 대비책이 필요함.

(2) 고병원성 조류인플루엔자 방제 방법 및 문제점

철새의 이동, 초기대응의 실패로 인해 국내 가금류 농가 및 시장에서의 고병원성 조류인플루엔자의 발생이 빈번해지고, 이로 인해 상재화의 가능성이 제기되고 있음. 이로 인해 지속적 발생 인해 축산산업 및 식품산업의 위축 뿐 아니라, 국가의 부담으로 국내 경제성장의 저해적 요소로 작용할 가능성이 있음. 가장 큰 문제는 지속적인 변이를 통해 숙주간 교차감염이 우려되고 이로 인해 사람으로의 감염성까지 위협받는 수준임.

현재까지의 고병원성 조류인플루엔자 방제 방법은 차단방역 및 살처분이 대부분이었음. 차단방역의 경우 현실적인 어려움이 있고, 살처분의 경우 방법은 효율적이거나, 경제적 부담이 높고, 동물 복지 측면에서 제한점이 있음. 보편적으로 백신접종을 통해 조류인플루엔자 방제를 실시하고 있으나, 다양한 형태의 조류인플루엔자로 백신 개발에 제한성이 있고, 개발 및 생산비용이 높을 뿐만 아니라, 접종률이 낮아 현재까지 조류인플루엔자에 대한 백신접종이 제한적인 측면이 있음.

미국 HPAI 발생에 따른 반응

Update on Avian Influenza Findings
Poultry Findings Confirmed by USDA's National Veterinary Services Laboratories

147 Detections Reported	30,731,873 Birds Affected
14. 12. 19. First Detection Reported	15. 5. 10. Last Detection Reported

State	County	Flyway	Flock type	Species	Avian influenza subtype*	Confirmation date	Flock size
Indiana	Whitley	Mississippi	Backyard	Mixed Poultry	EA-H5N5	2015. 5. 10	pending
Iowa	Sioux	Mississippi	Commercial	Chickens	EA/AM-H5N2	2015. 5. 8.	581,300
Iowa	Sioux	Mississippi	Commercial	Chickens	EA/AM-H5N2	2015. 5. 8.	100,000
Iowa	Pocahontas	Mississippi	Commercial	Turkeys	EA/AM-H5N2	2015. 5. 8.	32,900



Analysis: Biosecurity the answer for avian influenza
The current strain of avian influenza may be found in wild bird populations around the globe for years, so primary breeders call for heightened biosecurity, recognition of compartmentalization, and geographic dispersion of genetic stock.

Release Date: 2015-05-07
By Terrence O'Keefe

NICK STOCKTON 05-07-15 5:28 PM

VACCINES MIGHT NOT STOP THE MIDWEST BIRD APOCALYPSE

따라서 새로운 형태의 고병원성 조류인플루엔자 방제 수단이 필요함.

본 연구에서는 이미 알려진 항체의 중요성 및 효용성을 기초로, 저비용으로 생산 가능한 항체생산 시스템 개발을 통해 대량생산 시스템을 구축하고, 개체수가 많아 백신접종의 한계성이 있는 가금류에 대해 접종 방법의 다양성 (음용, 식용 등)을 통해 병원성의 저감화가 필요함.

(3) 왜 딱장어 항체 인가?

무척추동물에서는 일반적으로 자연면역 시스템만 존재한다고 알려져 왔으나, 유악류, 즉 계통분류학적으로 현존하는 초기의 유악류인 상어나 가오리를 포함하여 연골어류, 경골어류, 양서류, 파충류, 조류 및 포유류에서는 획득면역 시스템의 구성은 기본적으로 매우 유사함. 하지만 놀랍게도 무악류는 이러한 획득면역 시스템이 없다고 알려짐. 유악류에서 recombination-activation gene (RAG)의 출현과 더불어 획득면역 시스템이 존재하게 되는데, 이것은 광범위한 유악류에 나타나서 **면역학적인 빅뱅(Immunological Big Bang)**이라는 매우 중요한 사건으로 인식됨(Kasahara et al., 2004). 따라서 상어나 경골어류는 획득면역 반응과정을 연구는 결국 사람같이 진화론적으로 상위의 다른 척추동물의 면역반응을 이해하는데 중요한 역할을 수행함. 최근에 무악 척추동물에서 독특하고 다른 형태의 면역리셉터를 지니고 있는 것이 밝혀졌고, 변형된 리셉터는 기능적으로는 병원체를 인식하고 제거한다는 측면에서 획득면역시스템을 반영하고 있는 것으로 밝혀졌음(Pancer et al., 2004). 유악척추동물의 항체도 정확하게는 B cell receptor로서, variable lymphocyte receptor로서의 VLR과 유사함.

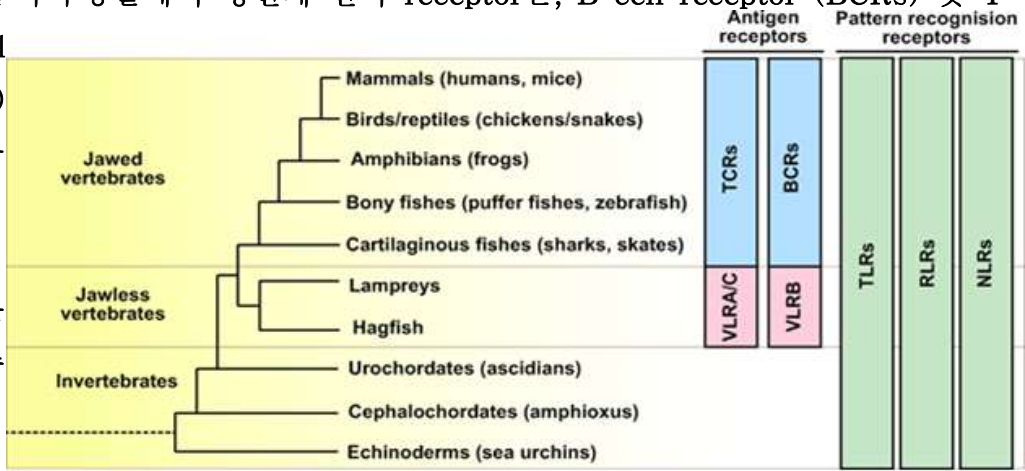
Finstad (1964) 등은 무악류(無類類, 턱이 없는 척추동물)에서 형태학적으로 포유류의 T 및 B 세포와 유사한 lymphocyte-like cells (LLCs)세포를 발견하였고(Finstad et al., 1964), 무악류에서도 항원 특이적인 agglutinin과 면역기억이 있음을 보여주는 피부 동종이식 거부 반응 능을 확인하였음(Perey et al., 1968). 이러한 발견은 무악류도 유악류(有類類, 턱이 있는 척추동물)와 동일하게 획득면역을 지니고 있다고 간주되었고, 칠성장어와 딱장어 (*Eptatretus burger*) (아래 그림 참조)는 현존하는 척추동물 중 가장 초보적인 동물로서, 턱이없고, 척색류의 조상이 무척추 동물(예: 멍게)과 유사하여 무악류라고 일컬음. 무악류는 혈액학적으로 heterogenous leukocytes를 갖고 있으며, 옵소닌과 agglutinin을 생성하며, 동종이식반응을 보여주나, MHC, Ig, TcR or RAG-1/RAG-2 gene와 같은 **획득면역 지표 유전자는 없었고**(Pancer et al., 2004), 최근 LLCs에 대한 transcriptome 분석에서 유악류의 획득면역에서 중심이 되는 역할을 하는 분자, 즉 T cell receptors (TCRs), B cell receptors (BCRs), major histocompatibility complex (MHCs) and recombination

-activating Genes (RAGs)이 발견되지 않아서, 무악류는 상기 분자들에 의존하지 않는 독특한 면역 시스템을 지니고 있음을 보여주었음(Suzuki et al., 2004).



먹장어 및 칠성장어는 무악 척추동물(agnathans)로서 현존하는 유일한 원구류(cyclostomes)로서 계통발생학적으로 유악류로 갈라지기 전의 고대의 조상이라고 여겨져서 척추동물의 획득면역의 원천을 찾기 위하여 상기 동물의 면역체계가 광범위하게 연구되었음(Pancer and Cooper, 2006). 무악 척추동물에 대한 획득면역의 유전적 기초의 동정은 typhlosole of lamprey larva로 분리한 lymphocyte-like cells (LLCs)의 transcriptome 분석에서 시작되는데, 비록 무악류가 유악류와 비교하여 기본적인 획득면역요소(T cell receptor (TCRs), B cell receptor (BCRs or Ig) 및 MHC molecules이 결여되어 있는 것으로 조사되었지만, 무악류는 유악류의 T 및 B 세포와 유사한 lymphocyte을 갖고 있고, 이들 세포는 variable lymphocyte receptors (VLRs)를 갖고 있었음(Pancer et al., 2004). 구조 분자학적으로 VLRs은 leucine-rich repeats (LRRs)의 단백질로서 이뤄져 있고, 이것은 유악류의 germ-line VLR (gVLR) gene/s의 체세포적인 변형에 의하여 기능을 발휘하는 리셉터로서 조합되는 것과 유사함을 보여주었음(Pancer et al., 2005). 다음 그림에서 제시한 것처럼 후구동물에서 병원체 인식 receptor는, B cell receptor (BCRs) 및 T

cell receptor(TCRs)는 유악 척추동물에서만 보존되어있고 무악 척추동물에서는 VLRs만 보존되어있음.

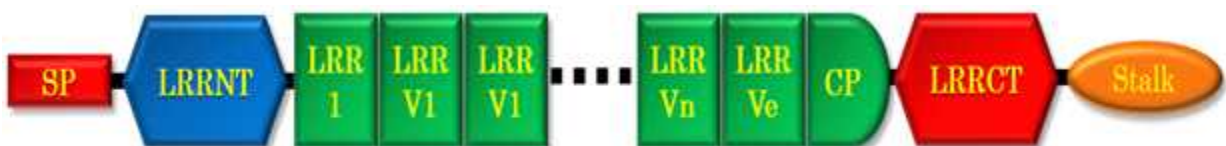


후구동물에서 병원체 인식 리셉터 (Kasamatsu, 2013 Microbiology and Immunology)

철성장어나 먹장어는 두개의 VLR-A와 C, VLR-B로 불리는 VLRs을 갖고 있는데, 세포표면 리셉터의 다양한 레퍼트와(repertoire)는 포유류 항체에 보존되어 있는 레퍼트와의 예상되는 다양성과 견줄 정도로 다양하기에, **VLRs은 유악류의 항원 리셉터와 비슷함으로 광범위한 항원성 결정부위를 인식하는데 충분함**(Alder et al., 2005, Pancer et al., 2005, Rogozin et al., 2007). 또한 무악류의 Lymphocyte가 독특하게 VLR gene을 조합하는 것으로 알려졌고, 이 VLR gene 조합과정의 중간산물에 대한 연구에서 germ-line gene 속으로 flanking cassettes로부터 유래한 다양한 Leucine Rich Repeats (LRR) 모듈이 삽입하는 여러 과정을 거치는 것으로 밝혀졌음 (Alder et al., 2005).

무악류의 여러 기관이 Lymphocyte의 발달과 성숙에 관여함. (1) 원구류에서 관찰되는 초기 면역 기관 중 하나인 superneural body는 척추의 뒤쪽에 위치하며, 조직학적으로 고등 척추동물의 골수와 닮았는데, 이 안에 혈액세포와 성숙중인 모든 단계의 임파구를 관찰 가능, (2) 경골어류의 신장에서 관찰되는 것처럼 무악류의 신장에도 상당히 많은 수의 lymphocyte가 신관 사이에 섞여 있는데, 이것은 신장이 Lymphocyte의 발달과정에 중요한 역할을 수행함을 보여줌, (3) 상당히 넓은 범위의 lympho-hematopoietic cells이 소화관 고유층의 함몰부에 위치한 Typhlosole의 기질 비슷한 조직과 혈액 등에서 관찰되어 이 기관 역시 분화 및 발달에 관여함(Saha et al., 2010). 그 외, VLR-A와 C, VLR-B lymphocytes들이 초기 임파기관, lamprey larvae, 혈액, 신장, typhlosole 및 아가미 부위에서 발견되며, 분비형태인 VLR-B lymphocyte가 아가미부위를 제외한 상기의 면역기관에서 훨씬 더 발견되었음(Guo et al., 2009). **VLR-B lymphocyte는 혈액과 신장에서 상당히 많이 발견되었고, VLR-A와 C는 lymphocyte는 아가미에서 많이 발견되었다는 사실은, 상기 조직이 이들 세포의 발달기관으로서 추정되며 이차적인 저장소로도 간주됨.**

아래 그림과 같이, 구조적으로 먹장어 (*Eptatretus burgeri*)의 VLR-A, C 및 -B로서 2개의 VLRs 타입이 있는데, 이들은 철성장어 및 다른 먹장어 종류 (*E. stoutii*)의 VLR과 비슷한 구조적 도메인을 갖고 있음. 구조는 A signal peptide, N-terminal LRR (LRRNT); 18-residue LRR1 followed by a variable number of 24-residue LRRs; a 13-residue connecting peptide (CP); a C-terminal LRR (LRRCT); a threonine/proline rich stalk; and a hydrophobic tail region that is required for modification of the protein to add a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) cell surface membrane anchor로 되어있음 (Kim et al., 2007, Pancer et al., 2005).

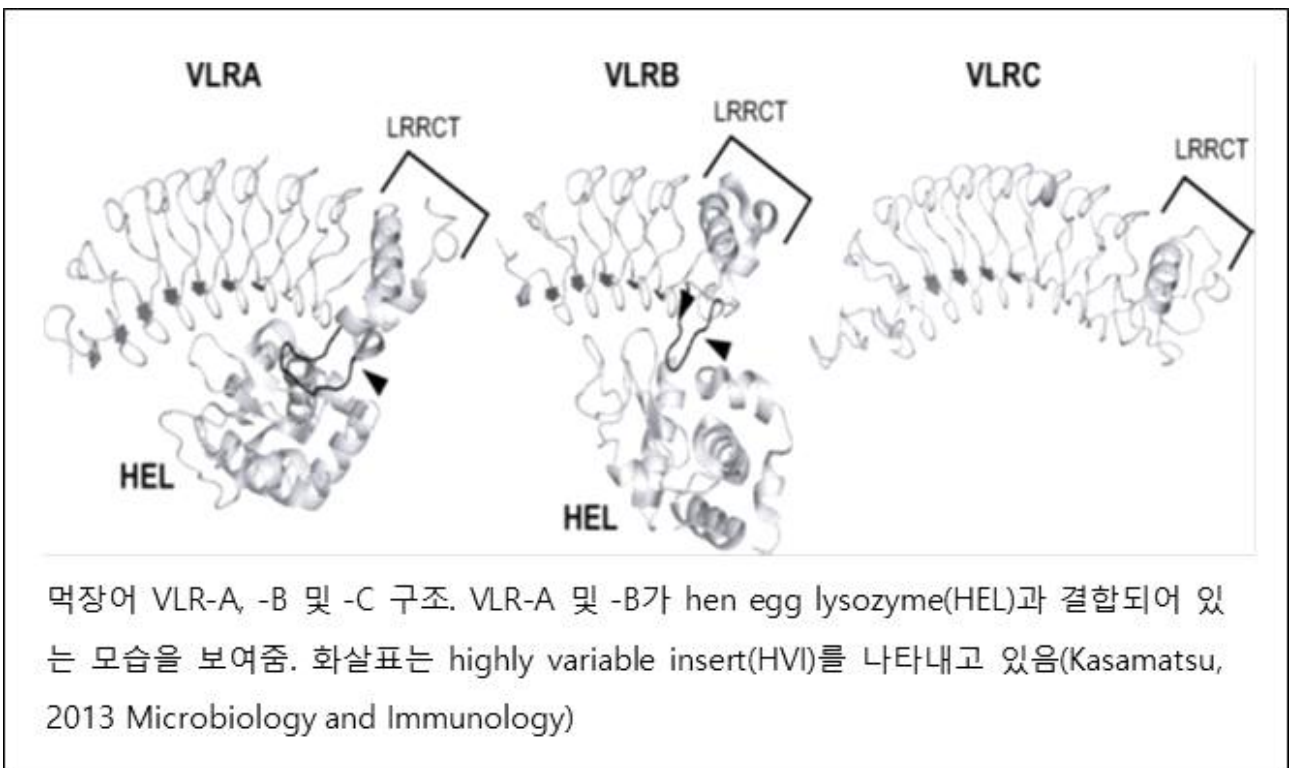


성숙먹장어 VLR의 전형적인 구조도메인 배열

다음 그림과 같이, **VLR-A 와 C**의 크리스탈 구조는 말뚝같은 솔레노이드 구조로서, 이것은 LRR family 단백질의 특이 구조를 택하고 있고, LRR 반복되어 8개 모듈을 갖고 있으며, 이 LRR 시퀀스는 삼입이나 결핍이 없이 거의 정확한 길이를 유지하는 것을 나타내는 것으로 알려져 있음.

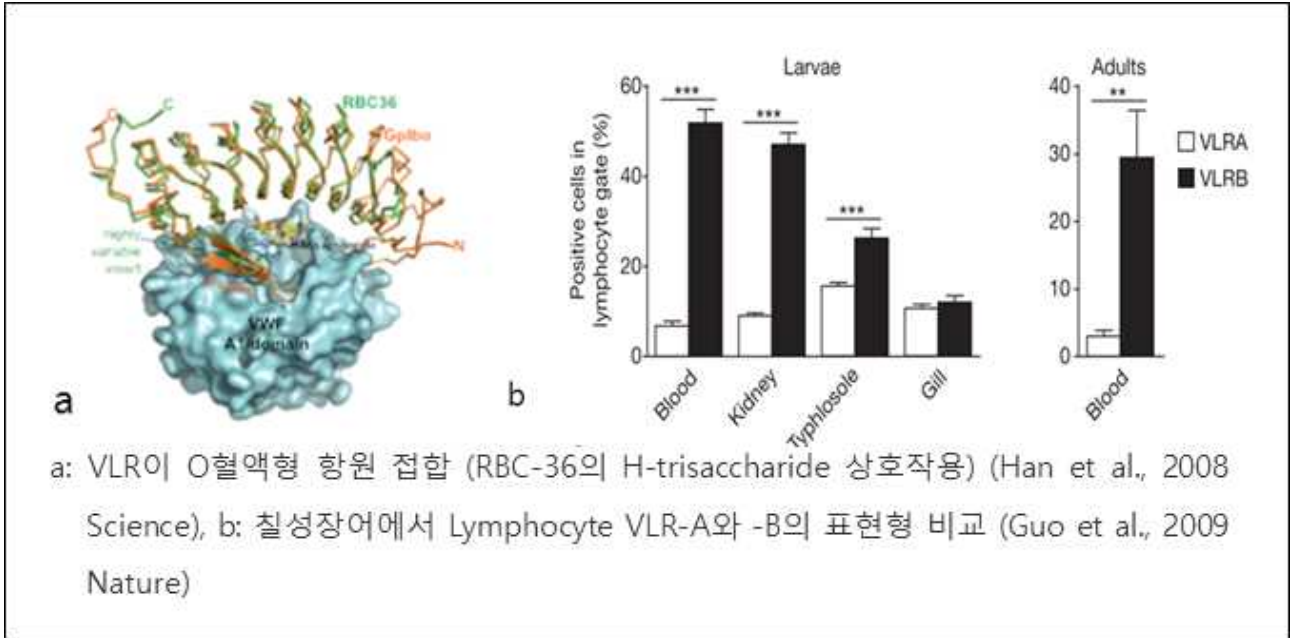
VLR-B는 5-6 LRR 모듈이 있는데, 이것은 잘 보존된 leucines, asparagines 및 phenylalanines 있고, 이들은 각각 hydrophobic core, asparagine ladder, 및 phenylalanine spine를 구성하고, VLR-B도 VLR-A와 똑같이 말뚝같은 구조를 가지고 있는데, VLR-B가 훨씬 짧지만, 두 개다 거의 같은 근간 구조를 갖고 있고, 단지 **시퀀스 변이**는 항원과 작용하는 부위인 **오목한 면의 표면단백질에 집중되어 있음**(Kim et al., 2007).

그러나 항원자극 후에 VLR-B 리셉터를 표현하는 lymphocyte만이 VLR-B를 분비하는 세포로 분화함 (Guo et al., 2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) 분석에서 나타난 바와 같이 VLR-A 와 C, B는 같은 염색체상에 위치하고 있으나 서로 멀리 떨어져 있어, 두 VLRs 유전자가 분리되어 기능하고 있음을 보여줌. VLR-C는 계통발생학적으로는 VLR-A와 가까우나 signal peptide 와 단백질의 3' terminus은 다른 VLRs과 유사성이 낮아서 특이한 멤버로 간주하고 있음(Kasamatsu et al., 2010).



VLRs은 구조적으로 포유동물의 toll-like receptors (TLRs) 유사하고, 기능적으로는 Antibody와 유사한 (VLR-B) 및 T cell receptor와 유사한 VLR-A 및 VLR-C가 있음. VLR에서 항원 인식 및 접합부위는 leucine-rich repeat (LRR) 부분으로서, 예를 들면,

O 혈액형의 적혈구 인식은 말발굽처럼 생긴 VLR의 오목한 부분에서 RBC36과 결합함 (Han et al., 2008). Egg lysozyme과 β -galactosidase (β -gal)도 single VLR에 인식됨을 보였고, 특히, VLR-B가 secret form 입을 규명하였음(Guo et al., 2009) (아래 그림).



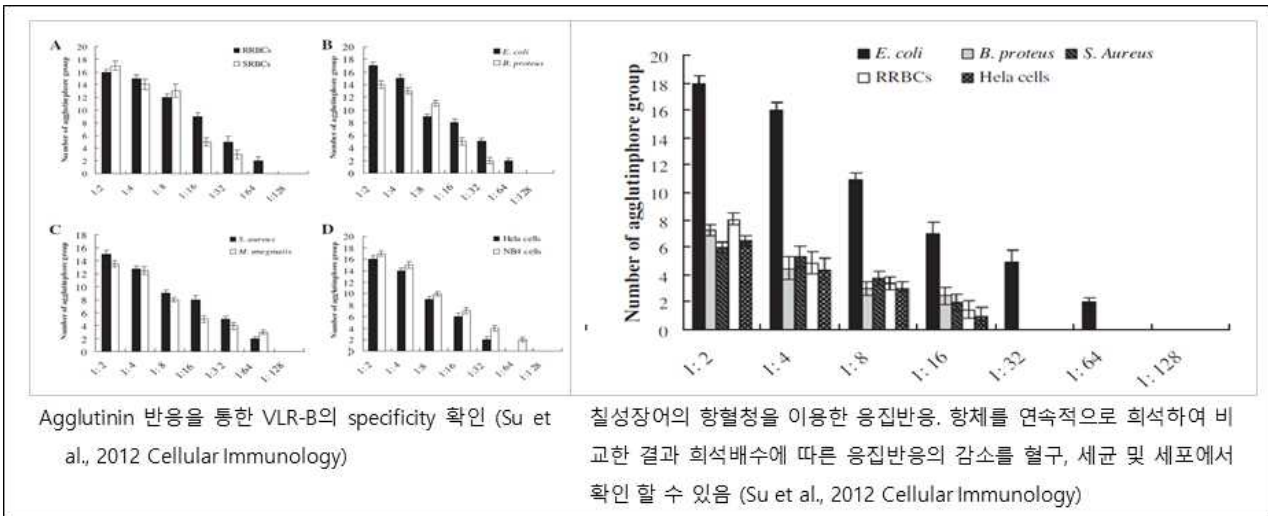
Anti-hen egg white lysozyme (HEL)를 이용한 VLRs의 항원 결합능 연구에서 VLR-A는 어떤 전 처리과정 혹은 특별히 항원을 제시하는 분자의 도움 없이 직접 적으로 항원에 결합할 수 있음을 보였고, 이러한 것은 VLR-A가 유악 척추동물의 $\gamma\delta$ TCRs과 기능적으로 동일한 것으로 추정할 수 있었으며(Deng et al., 2010), VLR-B와 HEL 결합능 분석에서, 오목한 면의 VLR-B가 HEL 단백질 표면에 매우 잘 결합하여 높은 affinity를 보였고, VLRB-HEL구조 분석 및 시퀀싱 분석을 통하여 리간드와 접촉하는 위치와 높은 시퀀스

다양성의 위치 사이에 거의 완전한 매치를 이뤄짐을 보였음. 또한 HEL을 면역한 칠성장어의 VLR은 affinity가 성숙한 IgG 항체와 비교될 정도의 binding affinities 또는 avidities가 micro (10^{-6})에서 picomolar(10^{-12})정도를 보였고(Tasumi et al., 2009), VLR-B의 multivalent 구조는 강력한 agglutinin으로 작용함을 보였음. 즉, *Escherichia coli*, *Bacillus proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, RRBCs, SRBCs, NB4 cells and HeLa cells을 면역하여 VLR-B의 생산 가능함을 보였고, Agglutination assay 통한 면역기간 및 방법, 그리고 VLRs간의 **Antigen specificity**도 있음 밝혔음(아래 그림, Agglutinin 반응을 통한 VLR-B의 specificity 확인과 칠성장어의 항혈청을 이용한 응집반응).

Anthrax spore coat(exosporium)를 칠성장어에 면역한 다음, VLR 특이 항체를 이용한

flow cytometry 분석에서 VLR-positive 세포 중에서 사이즈가 큰 lymphocyte가 유의적으로 증가함을 나타내어 면역 기간 동안 항원에 대한 인식이 점진적인 증가함을 알 수 있었음(Alder et al., 2005).

*Bacillus anthracis*의 spore에 대한 Immunodominant Glycoprotein의 인식 및 결합에 대한 연구를 통하여 VLRs의 진단 tool로서 가능성이 있음을 증명하였고(Robert et al., 2012), 나아가서 VLRs의 유용한 가치는 biomarker개발에 있음을 밝힌 다음 적용한 경우는, human T cells을 면역 후 다양한 VLR을 생산한 다음 이들의 세포 마커 인식능도 증명하였음(표 1). VLR의 binding site를 immunoprecipitating으로 얻은 다음 mass spectrometry로서 동정하였다 (Yu et al., 2012).



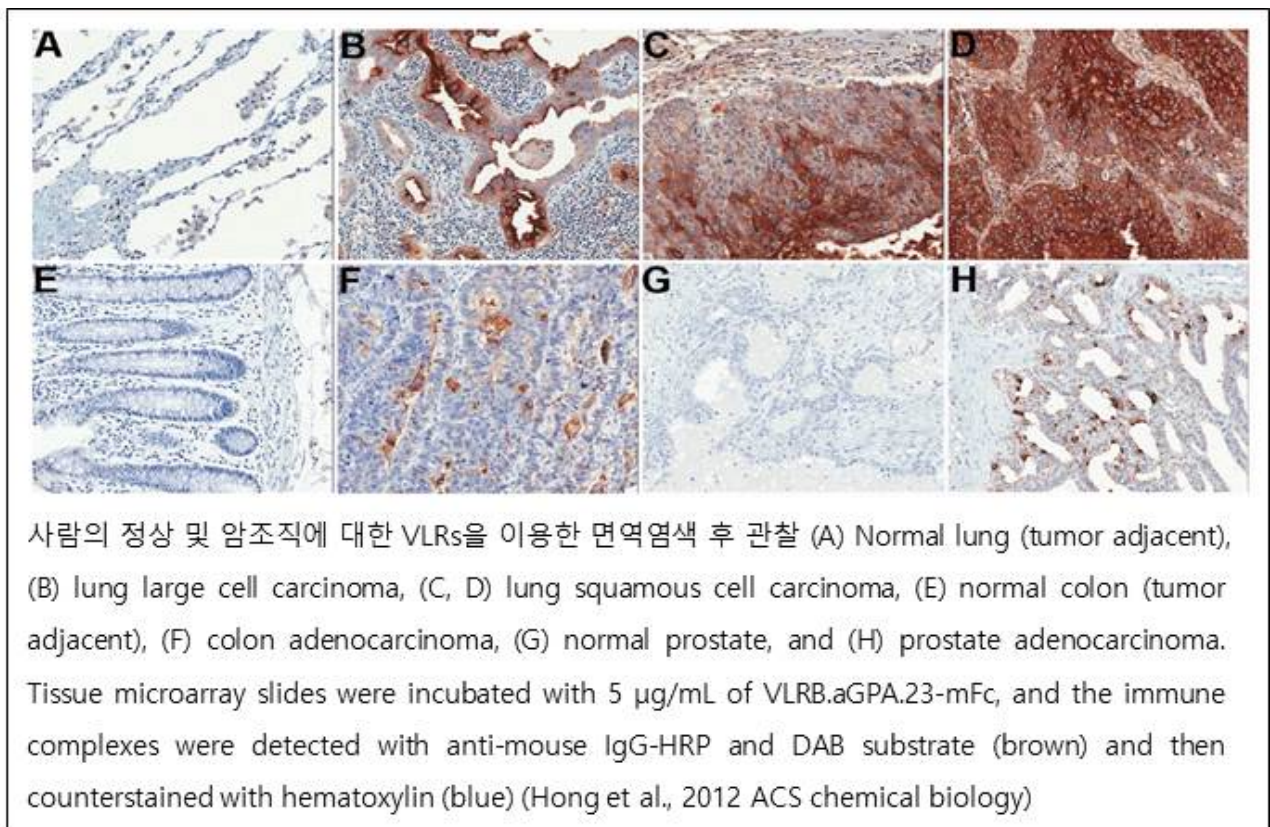
VLR clone	T cells	B cells	Non B/T cells	Monocytes
VLR6	+	—	—	—
VLR18	+	+	+	—
VLR25	+	+	+	—
VLR32	+	—	—	—
VLR33	+	—	+ ^a	—
VLR37	+	—	+ ^a	—
VLR73	+	—	+ ^a	—
VLR87	+	+	+	—
VLR97	+	—	—	—
VLR99	—	—	—	+
VLR109	+	—	+ ^a	—
VLR139	+	+	+	—

T cells: CD3⁺, B cells: CD19⁺, non B/T cells: CD3⁻/Cd19⁻, monocytes identified by FSC/SSC profile.

^a Indicates partial staining of the cell population.

표1. 단클론 VLR을 이용하여 사람의 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)을 스크린 결과 (Yu et al., 2012 [Journal of Immunological Methods](#))

현재 VLRs을 임상적으로 적용하려는 가장 대표적인 연구는, 칠성장어의 VLRs library를 만든 다음, 이것을 yeast surface-displayed (YSD)시스템을 이용하여서 발현 후 **glycan array**를 실시하여 VLRs의 **sugar-binding proteins**에 대한 연구로서, 그 중 tumor-associated carbohydrate antigens (Tn and TFa), Lewis antigens (LeA and LeX), N-glycolylneuraminic acid, targets of broadly neutralizing HIV antibodies (poly-Man9 and the HIV gp120), 와 glycoproteins asialo-ovine submaxillary mucin (aOSM) and asialohuman에서 **높은 특이성을 확인**하였음(Hong et al., 2012). 특히, 이들 중 특이성이 높은 monoclonal VLR을 이용한 면역조직학적 조사 결과, **암 진단에 상당히 유용함**을 보여 주어서(아래 그림), **VLRs이 갖고 있는 sugar에 대한 높은 친화성은 충분히 진단용 Tool로서 적용 가능함을 보였음.**



(4) 떡장어 항체의 산업 적용가능성 및 기존 항체와의 비교

본 연구과제에서는 떡장어 항체의 유전자 library를 이용하려는 것이 아니라, 떡장어 자체의 면역시스템, 즉 떡장어가 항원에 대하여 반응하는 결과로 나타는 VLRB의 항체 유전자를 클로닝 후 효모를 통하여 대량생산하는 시스템을 구축하여, 이를 통하여 AIV에 대한 항체를 저가로 대량생산하는데 주안점이 있음.

다른 실험동물과 비교하여, 떡장어의 항체를 선택한 이유는; 유악척추동물간에는 항원 인

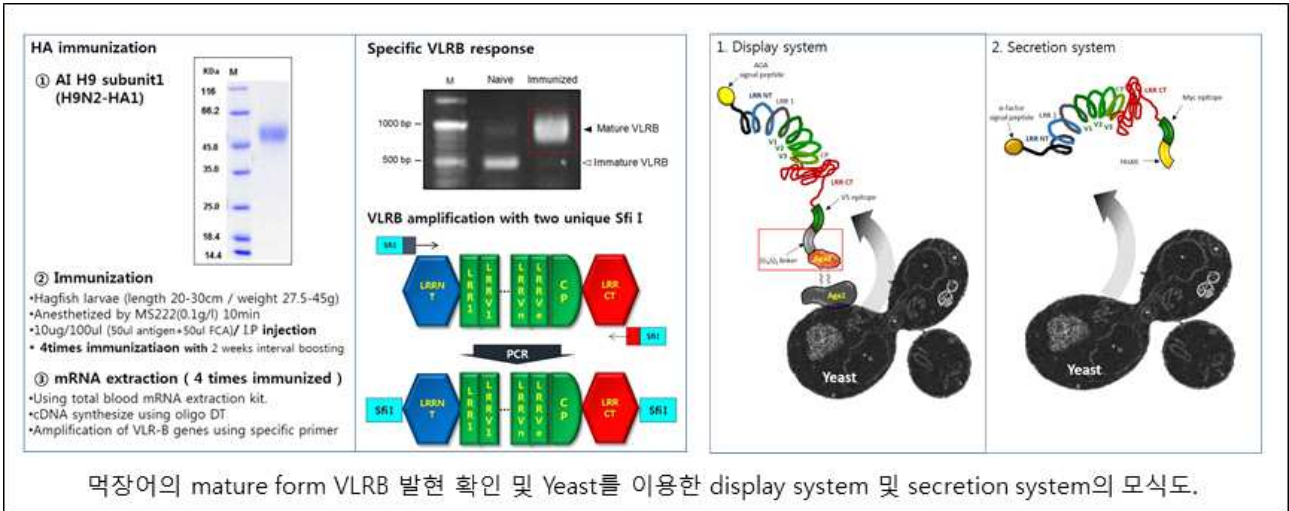
식성이 비슷함으로 인하여 유악척추동물을 실험동물로 사용하였을 경우 항원에 대한 항체 특이성을 그다지 발견하기 어렵고, 또한 유악척추동물 항체는 VLR에 비교하여 복잡한 구조를 띄고 있음으로 인하여 저가로 대량생산하는 것이 어려움이 있으며, 이에 비교하여 VLR은 항원에 대한 친화력, 구조, 크기 및 안정성에서 유악척추동물의 항체와 비견될 정도로 탁월하며, 특히 항체를 효모에서 대량생산하는 장점이 있음, VLR에 대해서는 과학적으로 증명되었고, 산업적 응용성이 충분함. 구조적으로도 무악척추동물의 항체는 복잡하지 않고 분자량이 적어서 조작이 용이한 점이 있고, 라이브러리의 다양성도 풍부하다는 장점이 있음. 이러한 이유로 무악척추동물을 실험동물로서 선택하였음.

표 2. 먹장어 항체와 전통적인 항체인 마우스 단클론 항체와 비교

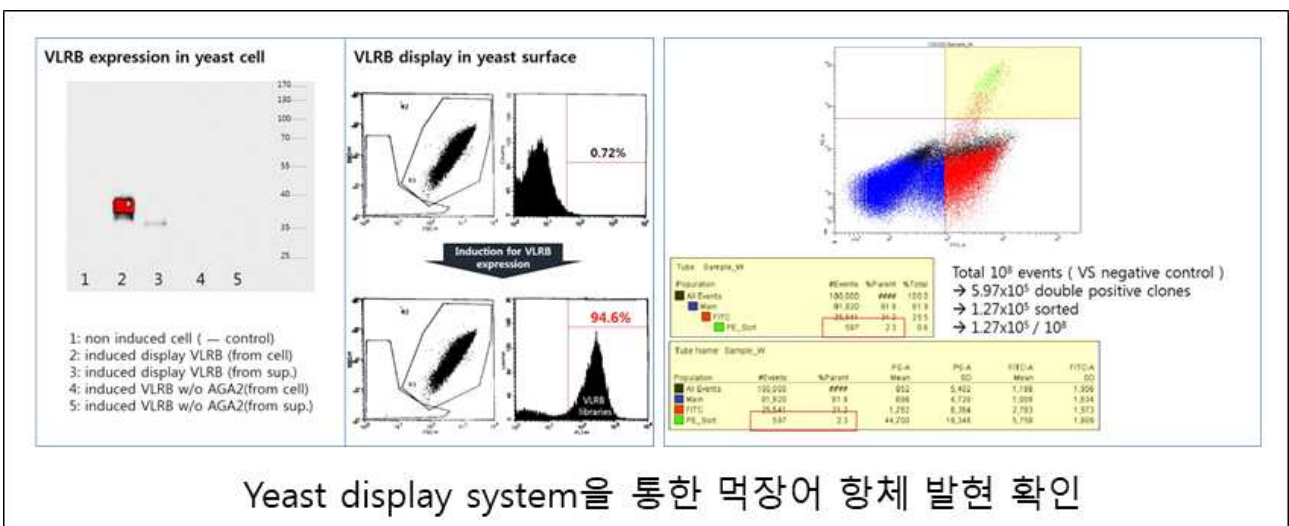
특성	먹장어항체	일반 항체 (mouse monoclonal Ab, IgG)	
유사점	항원가변부위 친화력	있음 (산술적으로 10 ¹⁴ 정도의 다양성)	있음 (10 ¹⁰ 정도의 다양성)
	생산형태	분비됨	분비됨
차이점	항원 종류	단백질, 탄수화물, 지질 (특히, 탄수화물에 대한 면역원성이 우수함)	단백질, 탄수화물, 지질
	생산세포	Yeast 혹은 293F	융합세포 (hybridoma cell)
이점	크기 (kDa)	32 ~ 38	150 ~ 180
	구조	U 모양	Y 모양
이점	항원인식면적	~ 1500 Ao	~ 800 Ao
	항원인식부위	Concave 부위의 β -sheet (보통 LRRV라 불리며 1 개 ~ 3 개가 다수를 이룸)	Fab 부위 (400 여 개 이상의 연결된 아미노산)
	안정성	pH 4, 온도 (80 C) 등에 훨씬 안정적	보통

(5) 선행연구결과

현재 본 연구 개발팀에서는 조류독감바이러스(avian influenza virus H9N2)의 항원성 분자(hemagglutinin)인 특정항원 (H9N2-HA1)을 먹장어에 면역하여 먹장어의 면역반응을 유도하였음. 어린 먹장어에 항원을 면역시킨 후 전혈 채취하여 mRNA 분리하여 cDNA를 합성후 본 실험에 사용하였고, 이때 면역전에 비해 면역 후 mature form VLRB 발현이 확연히 증가하는 것을 확인하였음. 이는 조류독감바이러스의 항원성 분자에 대한 먹장어의 면역반응이 유도되어 항원 특이적 먹장어항체 (VLRB)가 형성됨을 의미하고 이를 이용하여 조류독감바이러스에 대한 특이 방어항체를 대량생산하기 위하여 Yeast를 이용한 display system 및 secretion system을 구축 중임 (다음 그림).



아래 그림과 같이, Yeast display system에서는 yeast의 세포 표면의 Aga linker 단백질을 통한 목적 단백질의 표면발현을 위한 system으로 AI항원을 통해 유도된 면역반응의 결과물인 mature VLRB gene library를 Yeast display system을 통한 high-throughput screening으로 항원 특이적 VLRB 클론의 선별을 목적으로 이용되며, Yeast secretion system은 yeast를 통해 발현된 목적단백질을 secretion signal을 이용하여 yeast 배양액 속으로의 분비, 축적을 목적으로 사용. Yeast display system을 통하여 AI항원에 특이적 먹장어항체를 선별하기 위해 AI항원 면역반응으로 얻은 mature form VLRB gene library를 Aga linker 단백질에 재조합하였고, Yeast에 표면발현이 되는지를 western blot (expect size: 34.5~39.5 kDa) 및 FACS를 통해 확인하였음. 또한, AI 항원을 통해 유도된 면역반응의 결과로 형성된 mature VLRB library 중 항원 특이적 VLRB 클론의 선별을 위하여 2 round의 FACS sorting을 통해 목적 클론 (AI항원 특이 방어항체)을 선별 및 분리하였음.



항원 특이적으로 결합하는 먹장어 항체를 선별한 후에는, 다음의 yeast secretion system을 통해 대량생산할 예정이다. 또한 본 연구실에서는 이 시스템을 통해 선별된 AI항원에 대한

특이 먹장어 항체 이용의 용이성을 위해 Yeast secretion system을 구축 필요.

다. 연구개발 범위

(1) 주요 내용

- 가) AIV에 대한 먹장어항체 생산을 위한 flat form 구축: 대표적 무악척추동물인 먹장어를 이용하여 항체생산 플랫폼 확립 및 AIV 항원에 대한 다양한 monoclonal antibody 생산, antibody 기본성상 조사
- 나) AIV에 대한 먹장어항체의 안전성 및 효능평가연구: 먹장어항체의 실험실내 효능평가와 SPF 닭 및 일반 실용계를 대상으로 사육환경에서의 안전성 및 효능을 실험실적 실험과 야외실험을 통하여 평가함.
- 다) 개발된 먹장어항체의 항원성 부위 (Epitope) 동정 및 수동면역백신으로서 교차감염 방어 가능성 제시: 1세부에서 개발된 먹장어항체의 항원인식 Epitope 부위를 확인하고, 다양한 AIV strain의 특정된 항원 부위에 대한 amino-acid sequence를 비교하여, 개발된 먹장어항체가 항체개발에 사용되어진 AIV strain 뿐만 아니라 항원 부위에 대하여 동일한 amino-acid sequence를 가지는 다양한 strain에 대하여 수동면역백신으로서 사용 가능성 제시.
- 라) 개발한 먹장어항체를 이용한 제품의 산업화 연구: Fermenter를 이용한 anti-AIV Ab의 대량발현 시스템 구축, 제품화를 위한 특이 항체의 안정화 및 Pilot 생산을 통한 제품생산 flowchart 작성

(2) 단계별 연구개발 범위

본 과제에서는 현재 빈발하고 있는 주요 국가 재난형 질병 중 조류인플루엔자 (AIV: avian influenza virus)의 국가적 차원의 예방 및 저감화를 위해 AIV 특이 항체를 개발하고 이를 통한 수동면역 백신 개발 및 사업화 실현을 본 연구의 최종목표로 함. 이에 따른 단계별 연구개발 범위는 크게 4가지로 분류하였으며, 구체적으로 무악척추동물 (턱없는 동물)의 획득면역 산물인 VLR (variable lymphocyte receptors)을 기반으로 AIV에 대한 먹장어 항체 생산 platform 구축하고, 각 항체의 안전성 및 효능평가연구, 항원-항체 결합에 관여하는 항원성 부위 (epitope)의 발굴 및 작용성 검증 및 개발된 먹장어 항체의 다양한 적용을 통한 제품의 산업화를 연구하고자 함. 또한, 조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술을 위한 1, 2, 3차 년도에 따른 구체적인 연구목표는 다음과 같으며, 각 세부 및 협동 연구개발을 위한 연구 개발범위는 먹장어를 이용한 항체 생산 시스템 확립 및 항체 생산을 경상대학교 주관으로 하여 적절한 스크리닝 벡터시스템 구축, 다양한 항원에 대한 먹장어 항체 생산, 동물 병원체에 대한 수동면역 백신 개발을 진행하였으며, 충북대에서는 조류인플루엔자 바이러스에 대한 먹장어 항체의 안전성 및 효능평가를 연구하였으며, 서울대에서는 선별된 먹장어 항체의 에피토프 동정 및 다양한 AIV 종들에 대한 교차감염 방어 가능성을 탐색하였으며, 참여기업인 (주) 메텍스에서는 개발한 먹장어 항체를

이용한 제품의 산업화 연구를 위해 추진해 왔음.



각 세부과제에 따른 1, 2, 3차 년도의 구체적인 연구목표

라. 연구 개발의 추진 전략, 방법 및 추진체계

아래는 본 연구 개발을 위한 각 주관, 세부과제 별 추진 전략, 방법을 순차적으로 보여주며, 년차 별에 따른 추진 전략을 그림으로 간략히 보여줌.



산업화 추진일정 로드맵

'2019

'2020

조류독감바이러스 저감화 항체 개발



산업화

현재 선별된 GKP94, GKP261, GKP343
중화항체 외 다른 후보군 선별

최종 선별된 후보 항체들의
효모 발현으로 대량 생산

제품화 및 산업화 추진

LRRCT 도메인 스와핑 과정을
통해 바이러스 결합능 증진

SPF 닭에서의 효능 연구 및
실제 농가에 배포 → 효능 평가

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 과제별 (세부, 협동) 연구개발을 위한 이론적, 실험적 연구내용

(1) 연차별 연구개발의 목표 및 내용



(2) 실험적 연구내용

(가) 제1세부: 주관 - 먹장어를 이용한 항체생산 시스템 확립 및 항체생산

- **연구목표:** 먹장어를 이용한 항체생산 시스템 확립 및 항체생산

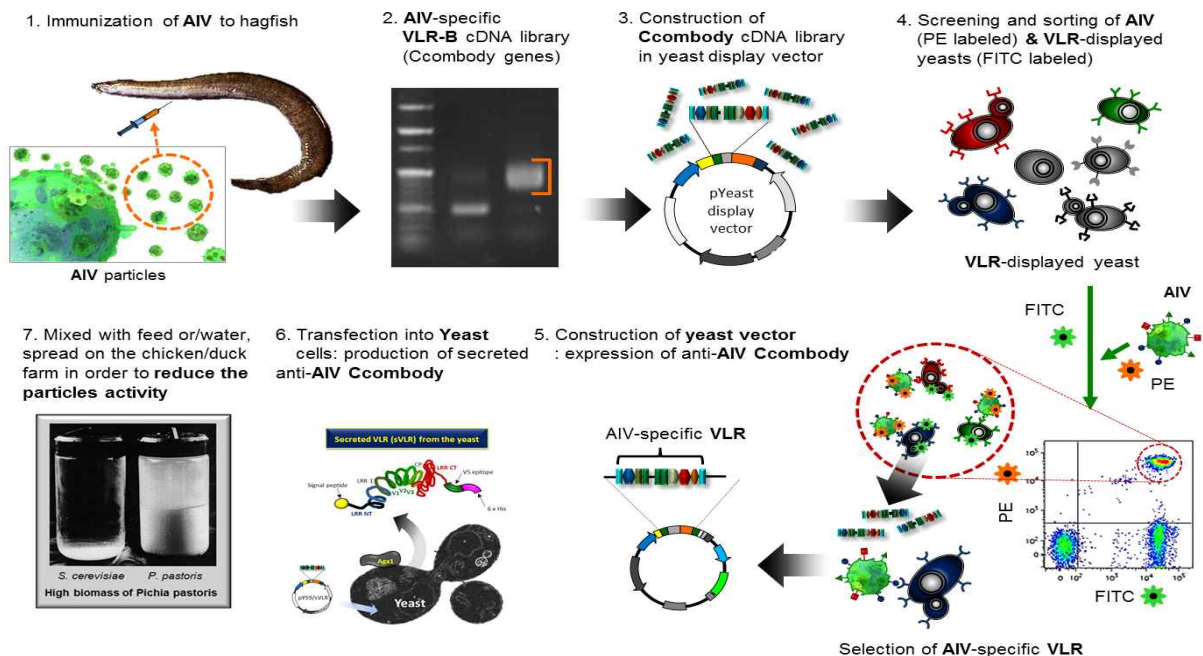
① 적절한 스크리닝 벡터시스템

본 연구목표를 성공적으로 구현해 내기 위해 본 연구팀에서 독자적으로 개발한 새로운 벡터시스템을 이용하고자 함. 먼저특정항원으로 면역한 먹장어로부터 VLR-B, 즉 먹장어항체 유전자들을 획득하고 yeast display 벡터나 mammalian 벡터시스템에 cDNA library 형태로 제작한 다음 FACS-sorting이나 ELISA assay를 통해 항원 특이적 먹장어항체 유전자를 선별하고자 함. 각각의 질병 유발 항원에 대해, 기존 항체와 비교해 보다 높은 친화력을 보이는 먹장어항체들을 선택하고 순수 분리한 다음 각각의 특성들을 분석함.

② 다양한 항원에 대한 먹장어항체 생산

본 연구에서는 항원에 대한 기존항체와의 경쟁력검토 및 먹장어의 면역시스템을 활용한 새로운 AIV항체를 발굴하여 보다 높은 항원-친화력을 보이며 저예산, 고효율로생산가능한 먹장어항체 개발시스템을 완성코자하며, 보다 다양한 AIV항원을 획득하여 많은 종류의 먹장어항체를 개발 및 생산코자 함.

먹장어 항체의 생산 플랫폼



③ 동물 병원체에 대한 수동면역 백신 개발

현재 수동면역백신을 개발 및 판매하는 곳은 매우 드물며, 가끔 있어도 닭의 IgY를 적용하는 정도임. IgY의 경우 면역 후 계란을 수거하여 난황으로부터 IgY를 추출해야하며 정기적으로 면역을 해야만 하나, 먹장어항체의 경우 검증을 통하여 일단 효모에서 분비시스

템을 통하면 추가적인 추출 및 면역의 필요성이 없고, 빠른 속도로 저렴하게 생산 가능함.

(나) 제2세부 : 조류인플루엔자바이러스(AIV)에 대한 먹장어항체의 안전성 및 효능평가연구

- 연구목표: 먹장어항체의 실험실내 효능평가와 SPF 닭 및 일반 실용계를 대상으로 사육환경에서의 안전성 및 효능을 실험실적 실험과 야외실험을 통하여 평가함.

① 개발된 먹장어항체의 실험실적 효능스크리닝을 통한 유효 먹장어항체의 선정(2-3개)

개발된 먹장어항체의 효능을 평가하여 2-3개의 유효한 먹장어항체를 선정함. 기본적인 먹장어항체의 효능은 기본 AIV 실험실적 효능평가방법(MDT, ICPI, VN 등)을 준용함.

② 선정된 실험실적 항 바이러스 유효농도 설정 및 효능 평가

먹장어항체의 항바이러스 효과를 실험실내 실험을 통하여 유효농도를 설정함. 먹장어항체를 처리하지 않은 대조군의 AIV 함량과 먹장어항체 처리군의 AIV 함량을 비교하여 기준치 이상의 차이가 인정되는 희석배수를 유효농도로 판정함.

③ 선정된 먹장어항체의 개발보조제 및 투여방법, 투여농도 및 시설환경(격리시설)에 따른 SPF 닭과 일반 산란계에서의 안전성 평가

먹장어항체의 환경 내 투여방법, 실험개체의 섭식방법(음수, 사료투여 등) 및 전달 경로에 따른 먹장어항체의 안정성 및 효율성을 분석함. 닭에 대한 먹장어항체의 효능평가는 기본적으로 격리된 ISOLATER에서 실시하며 가능한 기본적인 환경을 제어할 수 있는 장치를 이용함. 단, 야외실험의 경우에는 소규모로 진행될 수 있는 농장을 중복하여 선정하여 실시함.

④ 선정된 먹장어항체의 개발보조제 및 투여방법 및 시설환경(격리시설)에 따른 SPF 닭에서의 효능평가

먹장어항체의 안정성은 대상숙주(SPF 닭과 일반 산란계)를 대상으로 하여 폐사를 포함한 임상증상, 병리학적 소견, 조직병리학적 소견 및 임상병리학적 소견을 대조군과 비교하고, 먹장어항체의 대상숙주에서의 효능은 일정 실험공간 혹은 야외농장에서 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 전후에 먹장어항체를 투여한 후 SPF 닭과 일반 실용계를 대상으로 조사함. SPF 닭에서의 효능평가를 위하여, 환경에 대한 공격접종 후 임상증상 비교와 폐사율, 증체율 등의 변화를 관찰하고 비교 분석함. 조류인플루엔자 바이러스의 특성을 감안하여 주요 조직의 병리조직학적 병변 및 조직 내 바이러스 함량 비교 분석하고, 바이러스 배출 함량 비교를 위해 EID₅₀ 및 Realtime PCR에 의한 정량분석을 수행함.

⑤ 개발된 먹장어항체의 개발보조제 및 투여방법 및 시설환경(야외현장)에 따른 일반 산란계에서의 효능평가

야외실험 시 환경 접촉 후 일정기간이 경과한 다음 산란계에서의 효능평가를 위하여, 1) 산란율, 폐사율 등의 변화 비교, 2) 주요 난질 및 난각질의 변화 비교, 야외 감염 시 바이러스

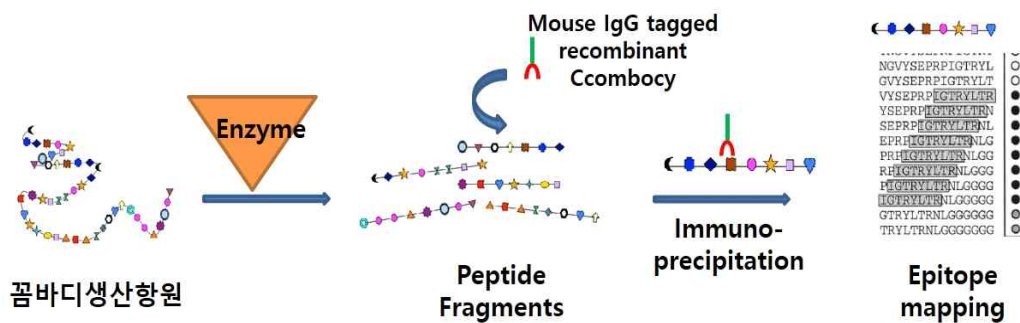
스 배출 함량을 비교, 분석함.

(다) 제3세부 : **떡장어 항체의 Epitope 동정 및 다양한 AIV strain에 대한 교차감염 방어 가능성 탐색**

- **연구목표:** 개발된 떡장어 항체의 AIV 항원 인식 Epitope 확인을 위한 실험기법을 개발 정립하여, 1, 2세부과제에서 선정된 다양한 떡장어 항체의 epitope 규명과 target antigen에 대한 binding affinity를 비교, 규명된 epitope peptide의 sequence 정보를 이용하여 다양한 AIV strain에 대한 떡장어항체의 교차감염 방어 가능성 확인 및 제시.

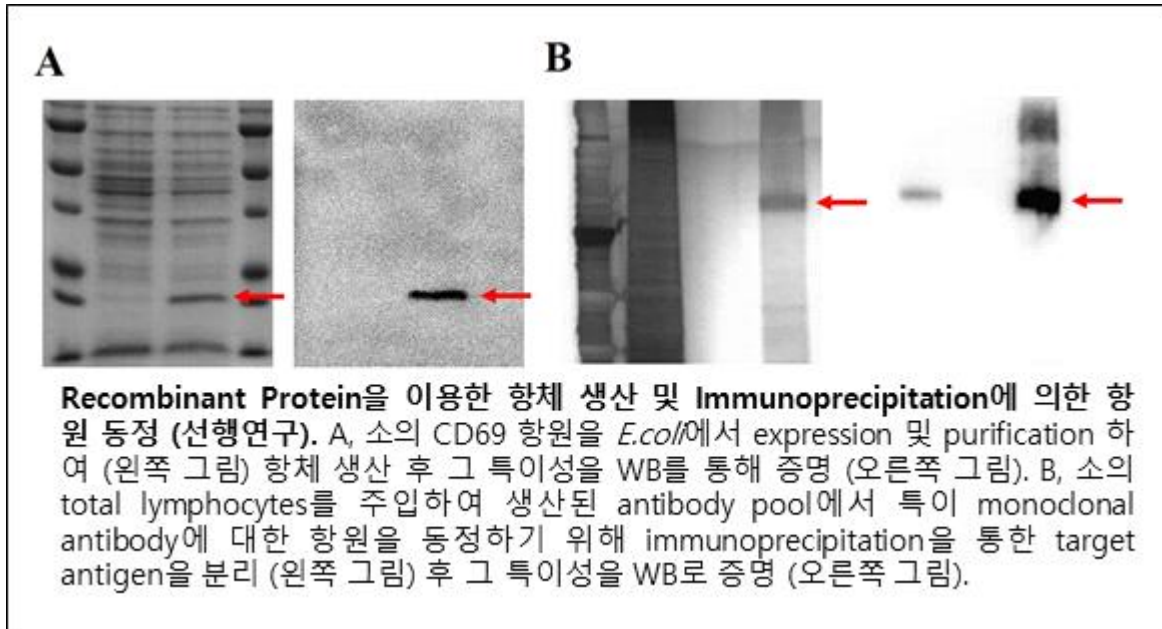
① **떡장어 항체의 epitope 확인 방법 개발 및 정립**

개발되는 여러 가지 떡장어 항체들에 대한 지속적인 epitope 확인 및 비교를 위해 떡장어 항체 epitope 확인 기술을 개발 정립할 필요가 있음. 이를 위해 실험 초기 개발 되는 떡장어 항체를 이용하여 그 방법을 정립하고자 함. 전략으로는 떡장어 항체 생산에 사용된 AIV 항원 중 떡장어 항체가 인식하는 Peptides 부위를 좁혀나가 최종 epitope를 확인하고자 함. 그림 1에서 보는 바와 같이, 먼저, Genbank의 AIV amino acid (aa) 정보와 On-line website (MS-Digest, <http://prospector.ucsf.edu>) 프로그램을 이용하여 protein cleavage enzyme에 따른 theoretical cleavage profile을 비교하여 적절한 enzyme 선택. 전체 항원을 enzyme으로 처리하여 짧은 peptide fragments 형태로 만듦. Mouse IgG와 fusion된 떡장어 항체를 이용하여 Immunoprecipitation 방법으로 epitope을 포함한 fragment를 분리 후 mass-spectrometer를 이용하여 peptide fragment의 aa sequence정보를 확인 함. Fine epitope mapping을 위하여, 확인된 aa sequence에 대한 overlapping peptide library를 제작하여 아래 그림과 같이 epitope mapping 하여 정확한 떡장어 항체의 binding 부위를 확인 함.



Peptide fragmentation에 따른 immunoprecipitation 방법이 성공하지 못 할 경우, 위와 유사한 전략으로 AIV 항원을 recombinant protein expression 방법을 이용하여 확인 하고자 함. AIV는 8개의 RNA segments로 구성되어 있고, 이로부터 오직 11 개의 protein만을 만듦. 그러므로 소수의 recombinant protein 만을 발현하여 확인할 수 있음. 먼저 11 개의 프로테인 발현 후 Western blot (WB)으로 떡장어 항체가 인식하는 프로테인 확인. 해당 프로테인을 overlapping하는 몇 개의 프로테인으로 쪼개어 발현 후 WB로 재확인. 이렇게

하여 예상 aa 수를 줄인 후 epitope mapping 방법에 의해 최종적으로 epitope을 동정할 수 있음. 본 연구진은 아래 그림과 같이 이전 수행한 실험을 통하여, 본 계획서에서 제안하는 실험들을 성공적으로 수행하기 위해 필요한 recombinant protein 과 antibody 생산, unknown antibody의 target antigen 확인을 위한 immunoprecipitation에 대해 확립된 연구 기법과 다년간의 경험을 보유하고 있어 이 실험을 수행하는 데 있어 문제가 없을 것으로 생각됨.



② 먹장어 항체별 binding epitope sites 규명 및 affinity 차이 비교

1세부과제에서 선정된 먹장어 항체들과 선정되지 않은 항체들의 epitope sites를 위 연구 내용 1에서 정립된 실험방법을 이용하여 규명함. 규명된 이러한 항체들의 AIV에 대한 affinity의 차이를 비교함. 이를 위하여 각각의 항체에 결합하는 short aa sequence를 합성 후, 반투과성막 (semi permeable membrane)을 이용하여 antigen-antibody binding의 affinity constant (k_a , affinity 상수)를 구하여 비교함. 실험 결과는 1세부과제 결과와 취합 분석하여 효과적인 수동면역백신 먹장어 항체의 특성을 확인함으로써 먹장어 항체를 이용하여 다른 virus성 질병의 수동면역 백신 개발 및 선정을 위한 자료로 쓰고자 함.

③ 규명된 epitope sequence 정보를 이용하여 다양한 AIV strain에 대한 교차감염 방어 효과 가능성 제시

Blasting (또는 Alignment)을 이용하여 규명된 먹장어항체들의 Epitope 부위에 대하여 먹장어항체 생산에 사용되어진 AIV strain 과 다른 strain들 간의 amino-acid sequence를 비교함. 이는 동일 또는 유사한 amino-acid sequence를 가지는 AIV strain들에 대해서 개발된 먹장어항체가 target strain에 대한 방어효과와 유사한 효과를 기대할 수 있기 때문임. 이를 증명하기 위하여 각각의 AIV strain을 epitope 부위 sequence에 따라 먹장어항체 생산에 사용되어진 AIV strain에 대하여 일치, 유사, 불일치의 3가지 그룹으로 나눔. 각각의

AIV strain에 대하여 먹장어항체를 이용하여 virus neutralization assay를 시행하여 먹장어 항체 개발에 사용되어진 AIV strain 결과와 비교함. 이러한 실험을 통하여 Epitope 부위의 유사성에 따른 먹장어항체의 항바이러스 효과를 증명함으로써 개발된 먹장어항체의 수동면역백신으로서 사용 가능한 대상 AIV strain들을 확장 및 특정할 수 있을 것임.

④ 규명된 epitope의 항원성 (antigenicity) 확인과 새로운 AIV 백신 개발 가능성 테스트

선정된 먹장어 항체가 수동면역 백신으로 탁월한 효과를 보인다면, 이는 먹장어 항체가 인식하는 epitope 부위에 대해 기존의 AIV 백신이 닭에서 항체 생산을 잘 유도하지 못했다는 것을 뜻함. 그러므로 이러한 먹장어 항체가 인식하는 항원부위에 대해 predominant antibody response를 유도할 수 있다면 좋은 백신이 될 것임. 먼저 이러한 epitope이 닭에서 항원성을 띄는지 확인하기 위해 hapten-carrier 방식을 이용하여 면역원성을 증가시키는 carrier protein에 규명된 epitope aa sequence를 conjugation 또는 재조합 기술을 이용하여 chimeric protein인을 만듦. 이를 닭에 접종하여 주어진 epitope에 대한 항체 형성 유무를 확인하고, 이러한 항체 반응을 증가시킬 수 있는 백신 delivery방법을 연구하고자 함.

(라) 협동기관 (참여기업 (주) 메덱스) - 개발한 먹장어항체를 이용한 제품의 산업화 연구

① Anti-AIV 먹장어항체 pilot 생산을 위한 배양조건 최적화

Yeast를 ferment를 이용하여 생산 후, 상층액을 수거한 다음 필터링 하여 사용하고, 중화 시험 혹은 HI를 통하여 품질 평가하여 일정한 품질을 유지함.

② 제품화를 위한 발현시킨 먹장어항체의 안정화 및 실용화 방안 (액상 혹은 분말)

먹장어 항체는 조류 혹은 다른 동물의 체내에 들어가서 면역작용을 유발하는 능동 면역이 아니라, 체외에서 병원체에 붙어서 병원체의 체내 침입을 막는다든지 혹은 독소의 역할을 없앤다든지 하는 것으로서, 이러한 관점에서 아래의 안정화 조건과 적용방법이 제시됨

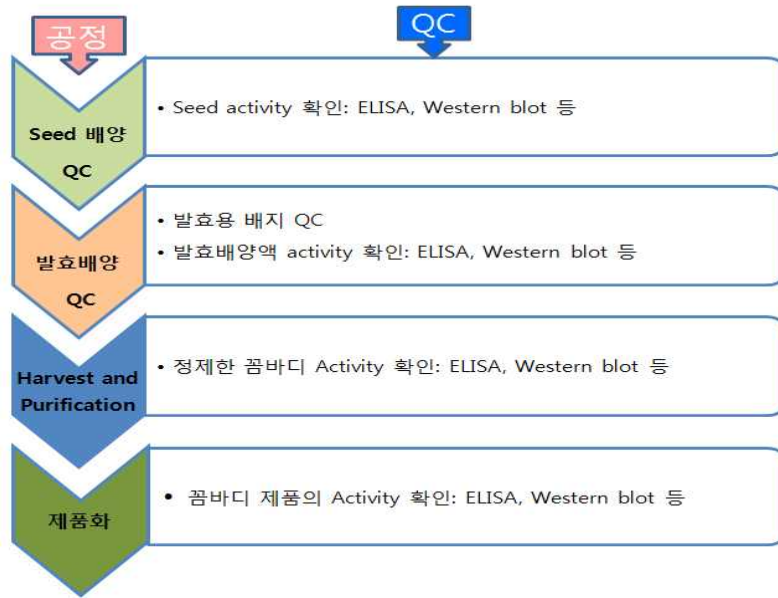
- 먹장어 항체의 안정화 pH, 온도 등에 따른 최적 안정화 조건 확립
- 사료공장에서 사료 첨가용, 스프레이용 혹은 식수가 사용이 가능한 액상제제 개발 및 야생조류 먹이 코팅용, 다양한 분자를 태깅하여 적용 및 분말 살포가 가능한 분말제제 개발.

③ 개발제품의 산업화를 위한 준비

- 제조업 허가를 위한 시설 준비
- 제품 생산을 위한 제조업 허가 준비
- 품목허가를 위한 허가자료 준비

④ 제품생산 및 QC(quality control) flowchart 작성

Flowchart for ccombody Production



⑤ 대량생산 시스템 기반 구축

- 1) 제품생산위한 제품공정 시스템 구축
- 2) 대량생산을 위한 Fermenter
- 3) 발효 상층액의 농축 시스템 구축

(3) 추진전략

고위험성 조류인플루엔자에 대한 높은 수준의 차단방역시스템을 유지할 수 있는 새로운 패러다임의 방역수단 구축



(4) 연구결과

(가) 떡장어항체의 스크리닝 벡터시스템 구축 - AI 항원 면역 후, 특히 방어항체 유전자 획득 (떡장어항체)

① 실험재료로 사용된 떡장어의 개체 선별 및 생리학적 특성에 적합한 사육조건

본 연구과제에서 사용된 생체재료로는 꼼장어, 즉 떡장어 (hagfish, 학명: *Eptatretus burgeri*)를 사용하였으며 우리나라에서는 비교적 쉽게 구입 가능하며 식재료 및 가죽제품에 사용되는 무악 척추동물이다. 일반적으로 항원에 대한 항체를 유도하는 면역 유발체계는 성장이 완성된 성체보다는 비교적 어린 개체를 사용하는 편이 훨씬 유리하므로, 본 연구에서는 20 ~ 30 cm 의 길이



본 연구에 사용되는 떡장어
(Hagfish, 학명: *Eptatretus burgeri*)

와 28 ~ 45 그램의 중량을 보이는 비교적 어린 떡장어들을 선별하여 사용하였다. 또한 실험실 시설에 도입 후 일주일 이상의 적응기간을 거쳐서 실험에 사용하였다. 사육시설의 지하설계를 통하여 빛에 대한 노출을 최소화 하였으며 (사진 촬영을 위해 밝은 조도에서 촬영) 항온 독립수조를 채용하여 저온의 적정 수온 유지 및 개별급여, 개별 면역 등을 통한 개체 간 스트레스를 최소화하였다. 떡장어의 면역 및 혈액 채취 시 어류전용 마취제(MS222)를 사용하여 실험을 수행하였다. 또한, 떡장어를 다루는 모든 실험에서는 동물이 받을 수 있는 스트레스를 최소화하였으며 미정맥을 통한 멸균 채혈과정을 통하여 조직손상 및 감염위험성을 최소화하였고, 떡장어에 항원을 주사하여 면역 부스팅 실험을 시행 시에는 마취 후 항원을 복강내 접종하였으며 모든 과정은 신속하고 재현성 있게 진행되었다.



장기간 떡장어 사육 및 유지를 위한 실험실 내 해수정화 및 자외선 살균 시스템

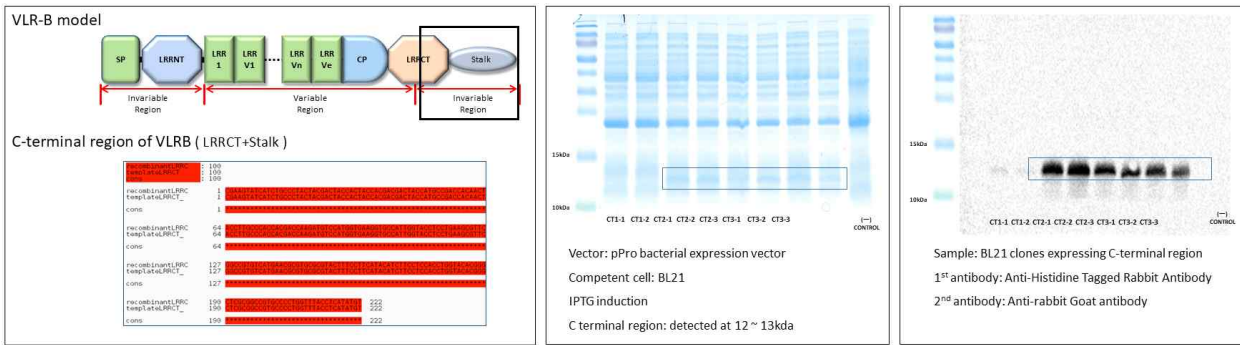


떡장어의 생리학적 특성에 적합한 생육을 위한 항온 독립수조.

② 떡장어항체에 대한 마우스유래 VLR-인식 항체 개발

떡장어의 특이항체인 VLR-B의 전체 아미노산 서열 중 conserve한 부분의 아미노산 서열을 탐색하여 단백질의 선택적 합성을 위한 모델링을 진행하였다. VLRB C-말단의 conserve한 부분을 획득하기 위하여 떡장어 혈액에서 추출한 mRNA로부터 목적부위 양말단의 primer를 이용하여 PCR 증폭 하였으며 박테리아에서 expression 하기위해 클로닝 한 결과 100%의 DNA 염기서열 동일성을 확인하였다. 클로닝된 VLRB C-말단의 invariable 부위 중 222 bp

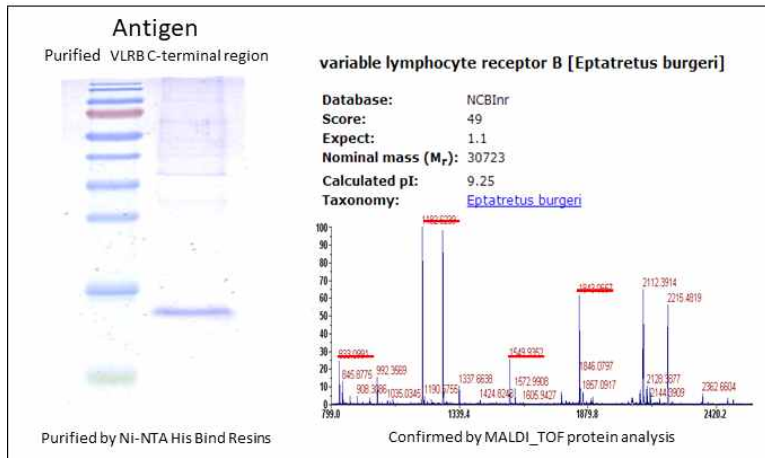
DNA (74 아미노산)를 E.coli에서 단백질 발현을 유도하였다. 목적단백질의 말단에는 Histidine epitope을 부착시켜 발현 후, SDS-PAGE를 통한 Western blotting으로 확인하였으며 Probond (Invitrogen)와 같은 metal-chelating resin을 통해 순수분리 및 정제하였다(그림 8). Metal-chelating resin과 His tag epitope 부분의 친화력을 이용해 순수 분리 및 정제된 목표단백질은 MALDI_TOF 단백질 분석을 통해 먹장어 VLR-B임을 확인하였다.



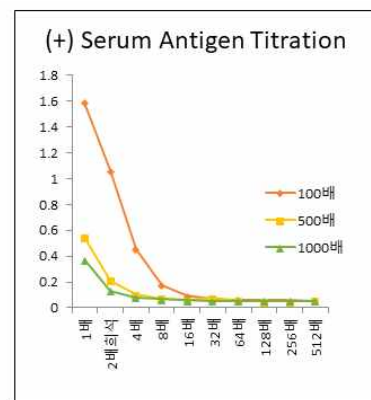
다클론 항체 생산을 위한 항원 모델링.

발현된 VLRB C-terminal의 invariable region을 SDS-PAGE 및 western blotting 으로 확인.

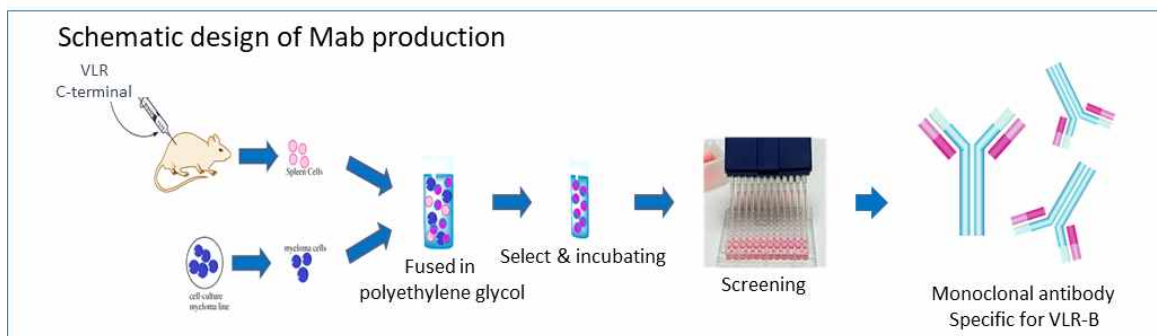
정제된 단백질은 2 주 간격으로 총 6 주간, 마우스의 복강 내 주사하여 면역 부스팅을 유도하였다. 면역 부스팅된 개체에서 항원 특이적 반응을 관찰하였고 항원/항체 titration을 통해 항체가 제대로 생성되어졌는지 검증하였다. 또한 mouse 비장세포와 mouse myeloma SP2/0를 이용하여 항체를 생산하는 hybridoma 세포주를 제작하였다. 마우스로부터 유래된 hybridoma 세포주를 이용하여 VLR-B 특이적 단일 항체를 생산할 수 있는 제작과정을 모식도로 나타낸 그림이다. 총 1296 hybridoma중 항원과 반응성까지는 93 clones 선별하였고, 그중 가장 높은 반응성과 특이성을 가지는 11G5를 선정하여 2 번의 한계 희석법을 진행하여 monoclonal antibody를 생산하였다.



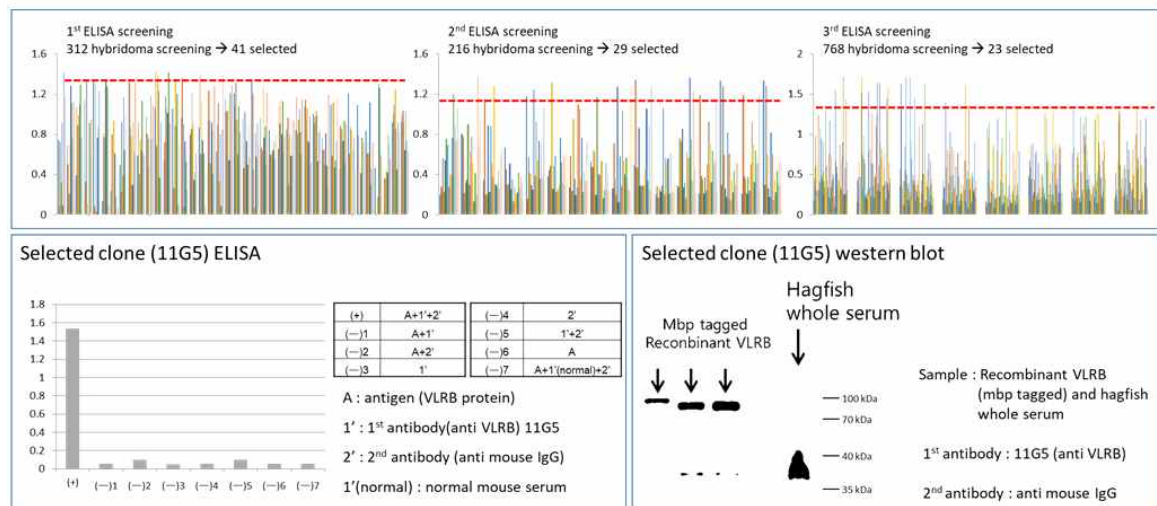
VLR-B 특이적 단일 항체 정제 및 MALDI_TOF분석.



mouse로부터 생성된 항체의 진위여부를 판별하기 위한 항원/항체 titration assay



VLR-B 특이적 단일 항체 생산을 위한 제작과정 모식도

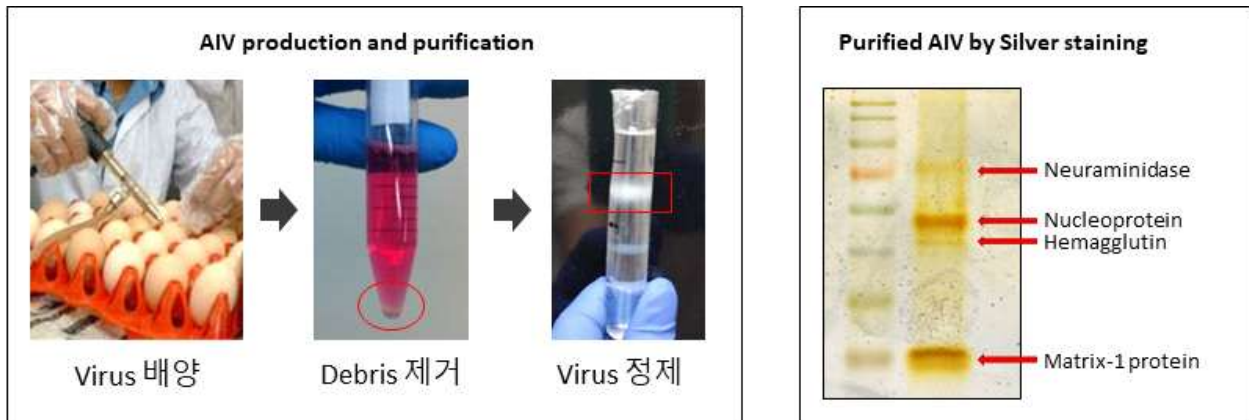


Hybridoma 스크리닝 결과. 선택된 monoclonal antibody(11G5)의 항원에 대한 특이적 반응성을 ELISA 및 Western blotting으로 검증. Recombinant VLR-B 와 혈장 내의 natural VLR-B 모두에 강한 반응을 나타냄.

생산된 단일항체를 이용하여 ELISA(Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) 및 Western blotting으로 먹장어의 VLR-B에 높은 반응성과 특이성을 가진다는 사실을 검증하였다. 이 VLR-B 단일 항체는 본 연구에서 순차적으로 진행될 차후 실험에 있어서 아주 유용한 tool로 사용될 예정이다.

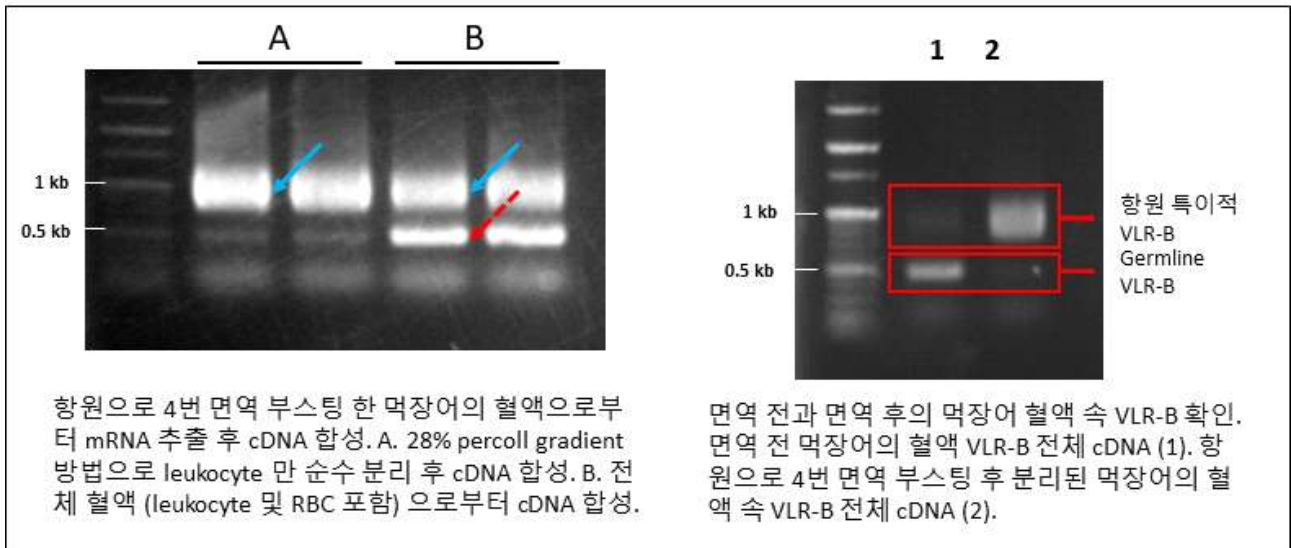
③ 먹장어 Lymphocyte-like cell 분리 후 VLR cDNA library 구축

본 연구에 사용된 항원은 저병원성 조류독감바이러스 (avian influenza virus subtype H9N2) 의 외피단백질 중 hemagglutinin-1 단백질을 선택적으로 재조합한 재조합 HA1 단백질과 순수 분리된 AI virus 입자를 사용하였다. 재조합 HA1 단백질은 인플루엔자 관련 전문 업체인 Sino Biological Inc에서 구입하였으며 (cat:40036-V08H1, Sino Biological Inc), 순수 분리된 H9N2 바이러스는 먼저 달걀에서 배양하고 세포찌꺼기 및 다른 부유물질들을 제거한 후 continuous sucrose gradient 초고속원심분리법을 이용하여 온전한 형태의 바이러스들만을 순수 분리하였다.



AIV 순수정제과정 및 확인. 바이러스의 외피단백질은 실버 염색법을 통하여 바이러스가 순수 분리되었음을 검증함.

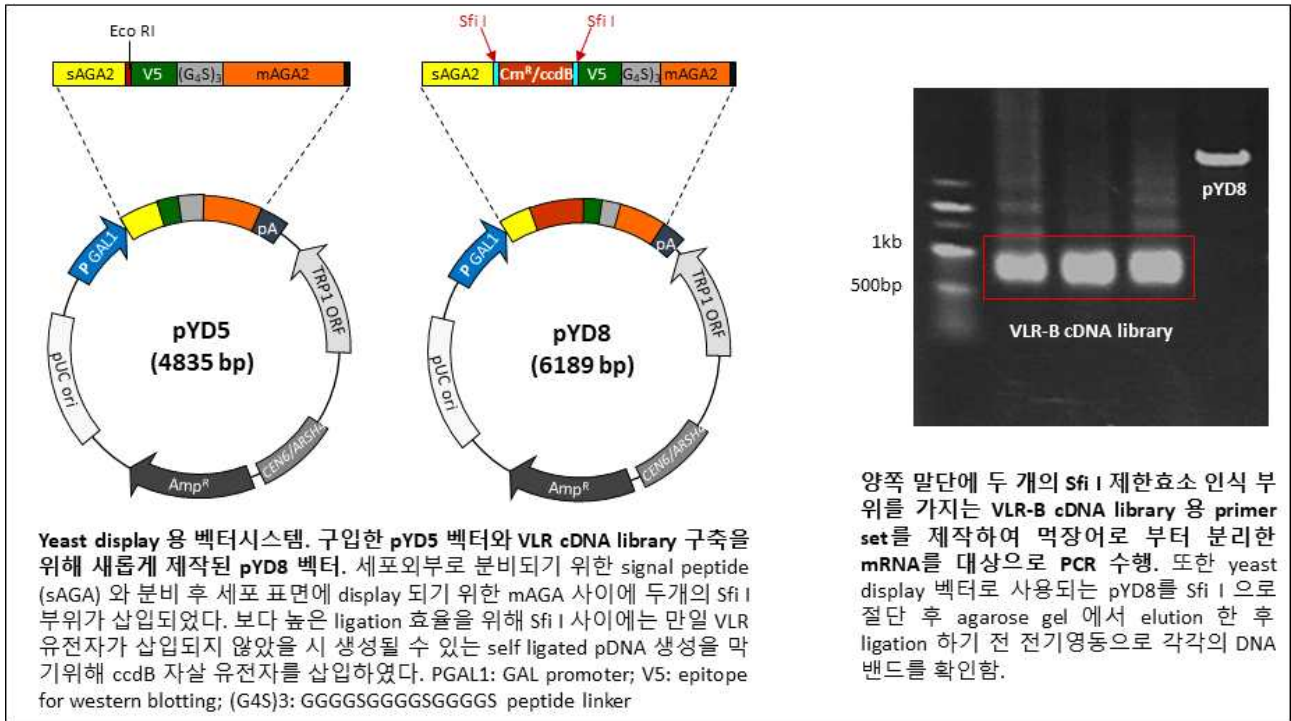
면역 전 MS222 (0.1 g/L)를 이용하여 침지법으로 마취한 후 10 µg의 항원을 2 주 간격으로 4 회, 복강에 주사하여 면역 부스팅을 유발하였다. 면역 부스팅된 먹장어의 혈액으로부터 전체 mRNA를 회수하는 방법으로는, 28% percoll gradient를 통하여 leukocyte만 순수 분리하는 방법 과 leukocyte 및 RBC가 모두 포함된 형태의 혈액 분리 방법을 통하여 각각의 mRNA를 분리하여 cDNA를 합성해 본 결과, percoll을 통해 leukocyte만 순수 분리된 실험군에서 보다 순수한 형태의 항원특이적 VLR-B cDNA library (yellow solid arrows)가 획득되어졌다. 반면, 전체혈액으로부터 얻어진 cDNA 산물에서는 항원특이적 VLR-B cDNA (yellow solid arrow) 뿐만 아니라 상당량의 germline 형태의 VLR-B cDNA (red broken arrow) 도 함께 합성되어졌다. 따라서 본 연구에서는 percoll로 순수 분리된 leukocyte만을 이용하여 cDNA library를 합성하는 방법을 채택하였다. 다시 요약하면, 면역 부스팅된 먹장어의 혈액으로부터 percoll로 순수 분리된 leukocyte를 이용하여 “Total blood mRNA extraction kit” 로 전체 mRNA를 분리한 다음, 역전사효소를 이용해 cDNA library를 PCR로 합성하였다. VLR-B 유전자 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 VLR cDNA library를 다시 합성하여 전기영동 상으로 항원으로 면역하기 전과 면역 후의 VLR cDNA 양상 변화를 아가로스 전기영동 상으로 관찰하였다.



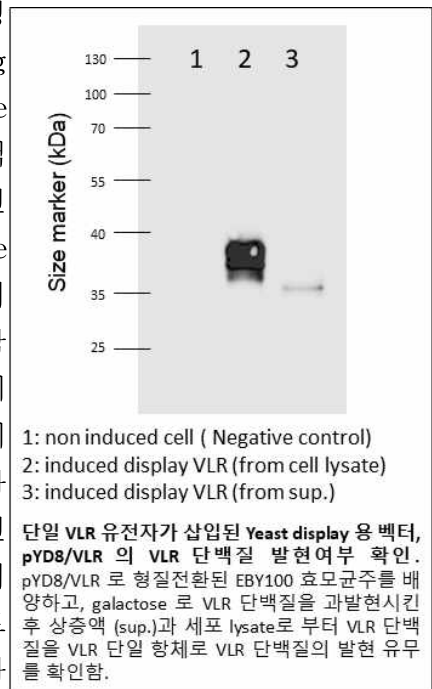
나) 먹장어 항체의 스크리닝 및 발현에 관한 독자적 벡터시스템 구축

① EBY100 효모균주를 이용한 AGA Yeast display 벡터 제작

VLR-B 단백질을 효모의 표면에 발현시키는 display 용 Yeast 벡터 시스템 제작을 위해 Yeast display 벡터로 이미 판매되고 있는 pYD5 벡터를 구입하여 본 연구 목적에 맞게 DNA 조작을 통해 새로운 형태의 yeast display 용 벡터, pYD8을 제작하였다. 구입한 pYD5 벡터는 AGA display 시스템이라 불리며 GAL 프로모터에 의해 발현되는 재조합 단백질은 N 말단의 AGA SP (signal peptide) 에 의해 yeast 세포 외부로 분비되며 분비된 단백질은 C 말단에 위치한 mAGA (mature 형태의 AGA)에 의해 yeast 외부표면에 display 된다. VLR cDNA library를 pYD5의 sAGA 와 mAGA 사이에 클로닝 하기 위해 두 개의 Sfi I 부위를 삽입하였다. 결국 이러한 DNA 재조합으로 발현되는 단백질은 sAGA-VLR-mAGA 형태로 yeast에서 분비되며 yeast 세포외부 표면에는 AGA 단백질과 연결된 형태의 VLR peptide library가 display 되게 된다. 클로닝 방법을 다시 자세히 설명하면, pYD8을 제작하기 위한 실험방법은 다음과 같다. 구입한 pYD5의 AGA SP 부위와 mAGA 부위 중간위치의 Eco RI 부위를 절단한 후 Eco RI과 Sfi I 제한효소 부위가 각각 말단에 위치하게 디자인한 프라이머 세트를 이용하여 chloramphenicol과 자살유전자인 ccdB 유전자를 PCR 증폭하였다. PCR 증폭을 위한 주형 플라스미드 DNA로 Invitrogen회사로부터 구입한 pEF-DEST Gateway vector (Cat: 12285-011, Invitrogen)을 사용하였다. 두 개의 Sfi I 제한효소자리를 가지는 새로운 yeast display 용 플라스미드, pYD8은 제작 후 DNA sequencing으로 확인하였다. 본 연구에서 새롭게 제작된 pYD8, yeast display 용 벡터에 면역화된 먹장어의 VLR cDNA library를 구축하기 위하여 앞에서 언급한 방법으로 혈액 분리 후 cDNA library pool 를 합성하고 양쪽말단에 Sfi I 부위를 각각 가지는 VLR 특이적 primer set을 이용하여 PCR 산물을 대량으로 획득하고 전기영동 상에서 확인하였다(그림 17). 마찬가지로 Sfi I으로 가수분해된 pYD8 벡터 또한 아가로스 젤 전기영동 상에서 깨끗한 DNA 밴드들을 확인하였다.

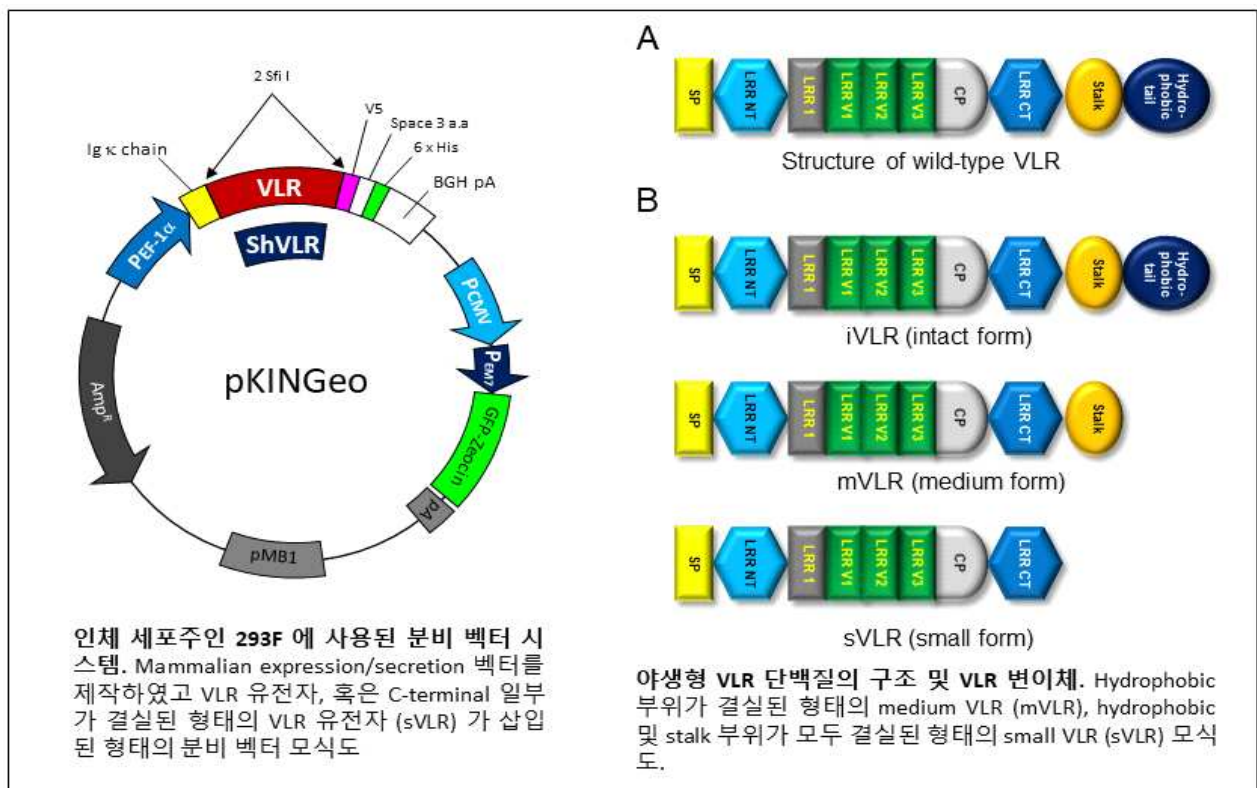


Sfi I로 가수분해된 VLR-B cDNA 와 pYD8을 각각 아가로스 젤 상에서 gel elution 하였으며 ligation 한 후 electroporation 방법을 통하여 DH5a competent cell에 transformation 하였다. 생성된 총 콜로니 개수는 대략 2.5×10^6 이상의 높은 다양성을 나타내었다. Colony PCR 과정을 통해 얻어진 각각의 VLR PCR 산물들을 DNA sequencing 해 본 결과 모든 클론에서 각각의 VLR의 invariant region 및 variable region이 모두 존재함을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 VLR-B cDNA library가 yeast display 벡터 시스템에 높은 효율로 구축되어 있음을 확인하였다. 제작된 yeast display 벡터, pYD8에 무작위로 선택된 단일 VLR 유전자를 클로닝하여 EBY100 yeast에 일반적인 electroporation 방법으로 형질전환 시키고 VLR 단백질의 발현 여부를 Western blotting으로 확인하였다. pYD8/VLR로 형질 전환된 yeast는 raffinose가 함유된 YNB-broth에서 3일 동안 배양시킨 후 재조합 단백질을 과발현 시키기 위해 2% galactose가 함유된 YNB-broth에서 다시 4일 간 배양 (매일 새로운 2% galactose 함유된 YNB 배지로 교환했음) 하였다. 발현된 VLR 단백질이 세포배양액에 존재하는지 세포에 부착된 형태로 존재하는지 확인하기 위하여 galactose로 induction 한 후 상층액 (sup.)과 세포를 각각 회수하여 SDS-PAGE 하고 VLR 특이적 단일 항체로 immunoblotting을 수행하였다. Galactose로 induction을 하지 않은 세포에서는 VLR 단백질이 발현되지 않았으며 분비된 상층액에서는 극소량의 VLR 단백질이 VLR 항체에 대해 감지되었다. 반면, 세포내에서 발현된 VLR 단백질은 높은 농도로 검출되었으며, 이는 세포내 뿐 아니라 세포 외부로 분비됨과 동시에 외부 표면에 직접적으로 결합됨 보여준다.



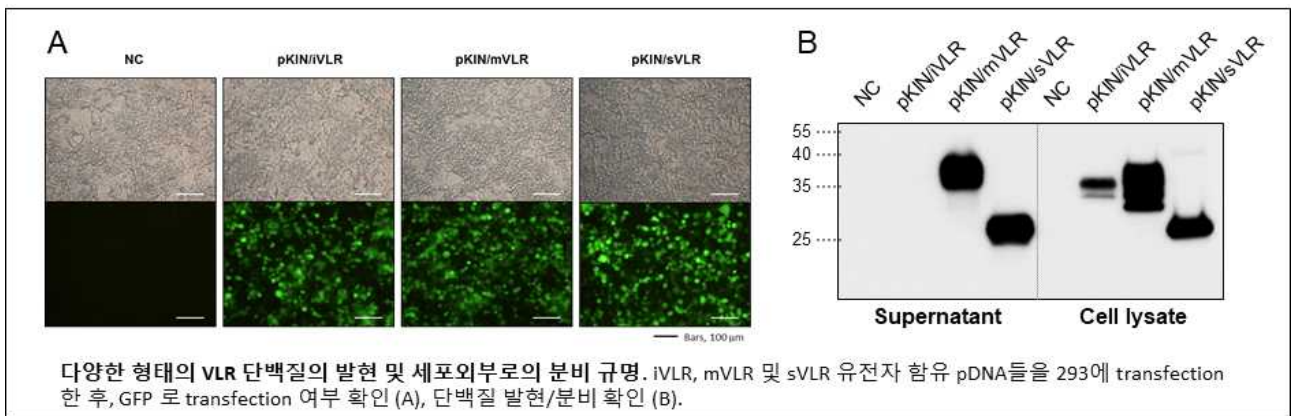
② HEK 293F 인체세포에서 VLR 항체 분비 벡터 시스템 제작

현재 일반적으로 사용되어지는 mammalian 세포주 중 외래 유전자 발현율이 상대적으로 높은 HEK 293 세포주를 선택하였다. 특히, 최근에 Invitrogen에서 판매되는 293F 세포주는 suspension 형태로도 성장 및 번식이 가능하며 외래 단백질의 발현양 또한 보다 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 제작된 꿈바디의 인체세포 내 발현 및 정제를 위해 293F를 선택, 사용하였다. 인체 세포주에서 발현 가능한 벡터 시스템 개발을 위해 본 연구팀은 일반적으로 사용되는 mammalian expression vector 플라스미드 DNA의 변형을 유도하였다. 먼저, 293F 세포주에 transfection 후 만들어지는 단백질은 세포 외부로 분비되어야 하므로 분비 신호 펩타이드가 링크된 형태로 만들어져야 한다. 분비 신호 펩타이드 도입을 위하여 pSecTag2A 플라스미드 DNA (Invitrogen, cat# V900-20)로부터 murine Ig κ -chain leader sequence 를 PCR로 증폭시키고 VLR 유전자 도입을 용이하게 하기 위한 Sfi I 두 개 부위가 말단에 위치한 Cm/ccdB 유전자를 pYD8로부터 분리해내어 연결시켜 pKINGeo/ccdB를 제작하였다. 이 플라스미드 DNA는 Ig κ 유전자 다음으로 VLR 유전자 도입을 위한 두 개의 Sfi I 부위가 존재하며, Western blotting 및 순수 분리/정제를 위해 V5 epitope과 His epitope이 링크되어 있으며 CMV promoter 보다 강력한 프로모터로 알려진 elongation factor 1a (EF-1a) promoter에 의해 발현이 조절되도록 디자인하였다. 또한, 293F에 transfection 후 도입 여부 및 selection을 위해 pKINGeo/ccdB DNA에는 CMV promoter에 의해 발현되는 GFP-zeocin 퓨전 유전자가 삽입되어 있다. 꿈바디 유전자가 도입된 pKINGeo/ccdB를 Sfi I로 절단하고, 앞서 제작했던 꿈바디 유전자 중 랜덤으로 하나를 골라, 전체 VLR를 가지는 유전자와 C-말단의 유전자를 일부 제거한 짧은 형태의 VLR 유전자 (ShVLR)를 각각 PCR로 증폭하고 양쪽 말단을 Sfi I로 절단하여 pKINGeo 벡터의 Sfi I 위치에 클로닝하였다(pKINGeo/VLR 및 pKINGeo/ShVLR).

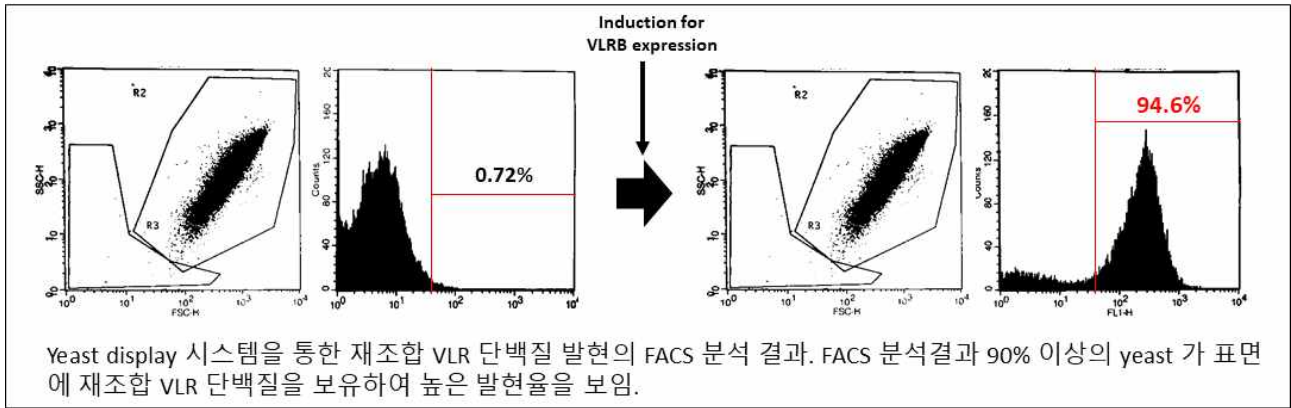


야생형 VLR 단백질 구조의 모식도를 보면 다음 그림과 같으며 이는 세포 외부로 분비를 조절하는 signal peptide (SP), LRRNT, LRRV, connecting peptide (CP), LRRCT, stalk, 그리고 hydrophobic 한 C-terminal 부위로 나뉜다. 주로 연구가 많이 된 lamprey에서는 항원 특이성과는 무관한 stalk 부위는 제거할 수 있으며, 먹장어의 C-terminal 부위는 상당히 hydrophobic 한 아미노산들이 연결되어 있어 세포 외부로 분비되지 않는 특성을 지닌다. 그래서 본격적인 screening 실험에 앞서 C-terminal 부위의 유무, stalk 부위의 유무에 따른 VLR 단백질의 발현 양상 및 분비 양상을 확인하였다. 다음 그림에는 각각의 truncated 된 형태의 세 종류 다른 VLR 구조 (intact VLR: iVLR; medium VLR: mVLR; small VLR: sVLR)를 나타낸다.

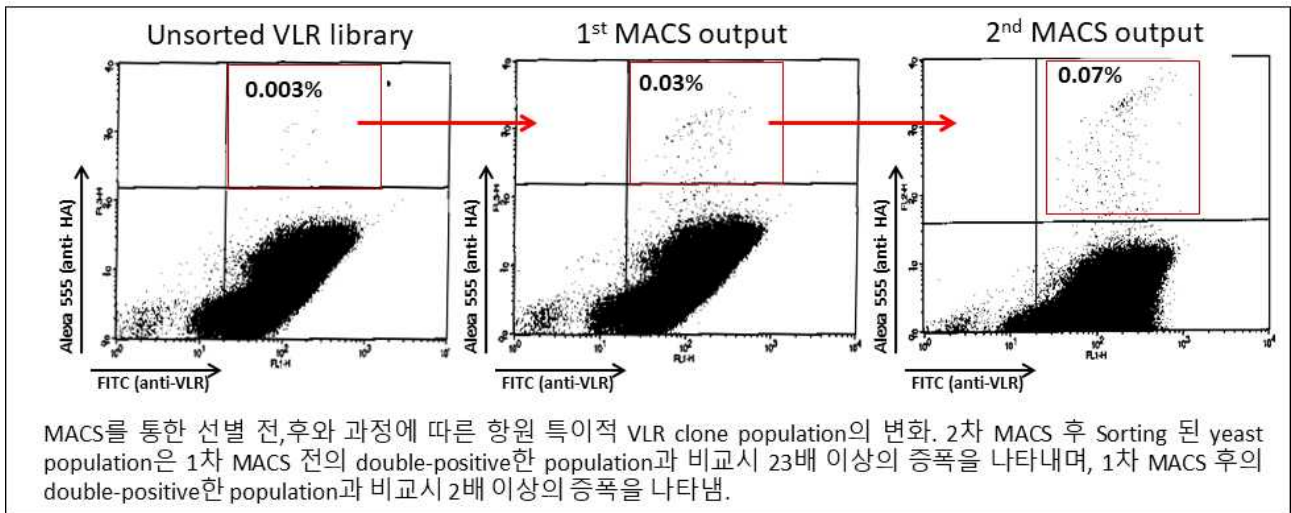
무작위로 선별된 세 종류 다른 형태를 가지는 VLR 유전자가 클로닝된 pDNA들을 293 세포주에 transfection 시키고 48 시간 경과 후 GFP 단백질의 발현으로 transfection이 높은 효율로 이루어졌음을 확인하였다. 각각의 상층액 및 cell lysate로부터 각 단백질들을 SDS-PAGE 하고 tagging 된 V5 특이적 Ab로 Western blotting을 수행하였다. 다음 그림에서 보는 바와 같이 mVLR, sVLR 단백질들은 모두 293 세포주 내부에서 제대로 발현되고 세포 외부로 제대로 분비되어졌으나, iVLR 단백질은 세포내에서 발현은 되어졌으나, C-말단의 강한 소수성 부분 때문에 세포 외부로 전혀 분비되지 못하는 현상을 관찰하였다. 따라서 항원 특이적 VLR들을 선별하기 위해, 이후 제작될 VLR cDNA library는 세포 외부로 제대로 발현되는 mVLR 및 sVLR 형태로 제작되었다.



목적 단백질인 VLR의 표면 발현 여부를 검증하기 위하여 western blot과 FACS 분석을 실시하였다. Western blot 결과 induction되지 않은 negative control 군에서는 단백질이 검출되지 않았으며, induction시에 배양 배지 상으로 분비되지 않고 yeast가 함유하고 있는 재조합 VLR단백질을 검출하였다. 재조합 단백질의 표면 존재여부를 검증하기 위한 FACS 실험 결과, induction되지 않은 negative control 군에 대비하여 90% 이상의 yeast가 표면에 VLR 단백질을 발현하여 보유하고 있었으며 높은 발현율을 보였다.

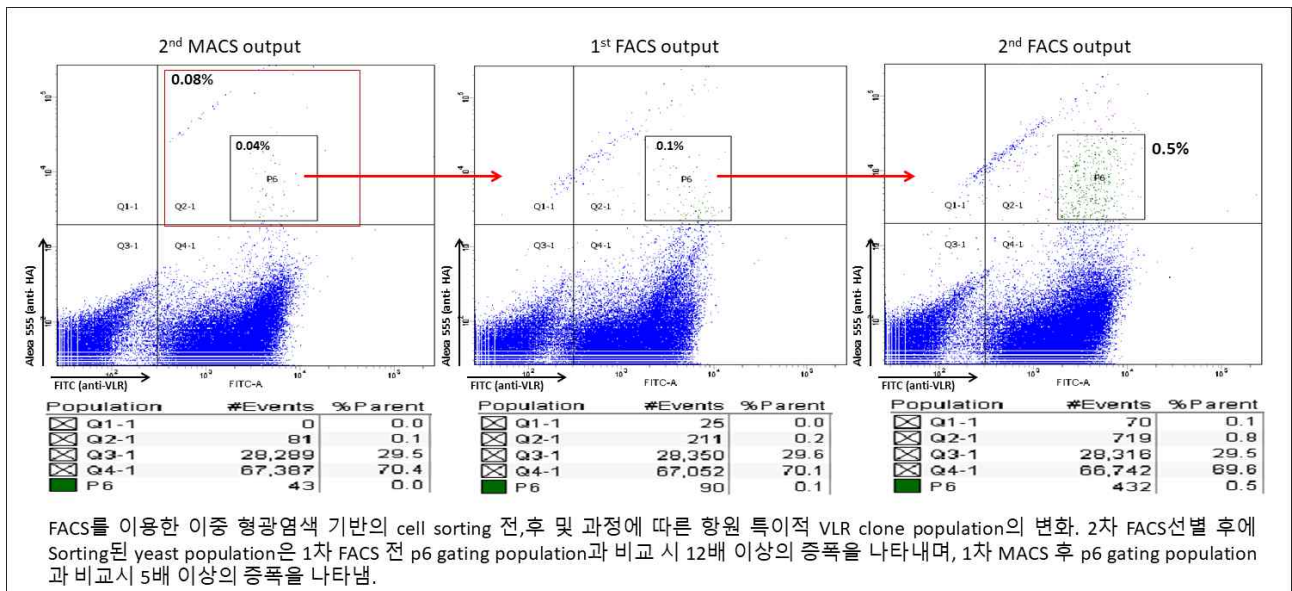


Yeast display 벡터 시스템 상에서 구축된 VLR library를 항원 특이적 screening 하기 위하여 FACS를 기반으로 한 cell sorting 기술을 적용 하였다. 그러나 이전의 보고에 따르면 FACS를 이용한 cell sorting 전 처리 단계로 MACS를 이용한 target clone의 증폭 과정을 통해 보다 높은 효율의 screening 및 낮은 background 수준을 가능케 한다고 보고되었다. 따라서 구축된 VLR library를 이용하여 총 2회의 MACS 과정이 실시하였다. MACS를 이용한 전자기적 cell sorting 전후의 항원 특이적 VLR clone의 증폭을 확인을 위하여 FACS기반의 이중형광 염색을 이용하였다.



재조합 VLR 단백질의 yeast 표면 발현을 확인하기 위한 형광항체인 FITC와 항원과의 특이적 반응을 확인하기 위한 형광항체인 Alexa 555의 반응을 모두 나타내는 double-positive한 군집 (우측 상위 사분할)의 형성을 통하여 0.07%의 항원 특이적 VLR clone의 population을 관찰하였다. 2차 MACS후 sorting 된 yeast clone 들은 회복 과정과 증폭과정을 통해 충분한 population 확보 후 FACS를 이용하여 분석하였다. MACS sorting과정에 비하여 보다 선택적 구역인 p6구역을 gating 하여 분석 한 결과 0.04%의 항원 특이성을 보이는 population을 확인할 수 있었으며 p6 gating 구역을 이용하여 1차 FACS sorting 후에 선별된 yeast clone 들은 회복 과정과 증폭과정을 통해 충분한 population 확보 후 FACS를 이용하여 분석하였다. 1차 FACS sorting 후에 sorting 된 yeast clone 중 1.0×10^5 개의 yeast clone을 FACS 분석한 결

과 0.1%의 p6 gating구역의 population을 확인할 수 있었으며 이는 1차 FACS 선별 전에 p6 population과 비교 시 2배 이상의 증폭을 나타내는 수치이다. 1차 FACS를 통해 증폭된 p6 population을 이용하여 2차 FACS를 통한 sorting을 진행하였다. 2차 FACS 후에 sorting 된 yeast clone 들은 회복 과정과 증폭과정을 통해 충분한 population 확보 후에 FACS 분석하였다. 2차 FACS 선별 후에 Sorting 된 library 중 1.0×10^5 개의 yeast clone을 FACS를 이용하여 분석한 결과 0.5%의 p6 gating구역의 population을 확인할 수 있었다. 이는 1차 FACS 전에 p6 population과 비교 시 12배 이상의 증폭을 나타내며, 1차 FACS 후에 p6 population과 비교 시 5배 이상의 증폭을 나타낸다.

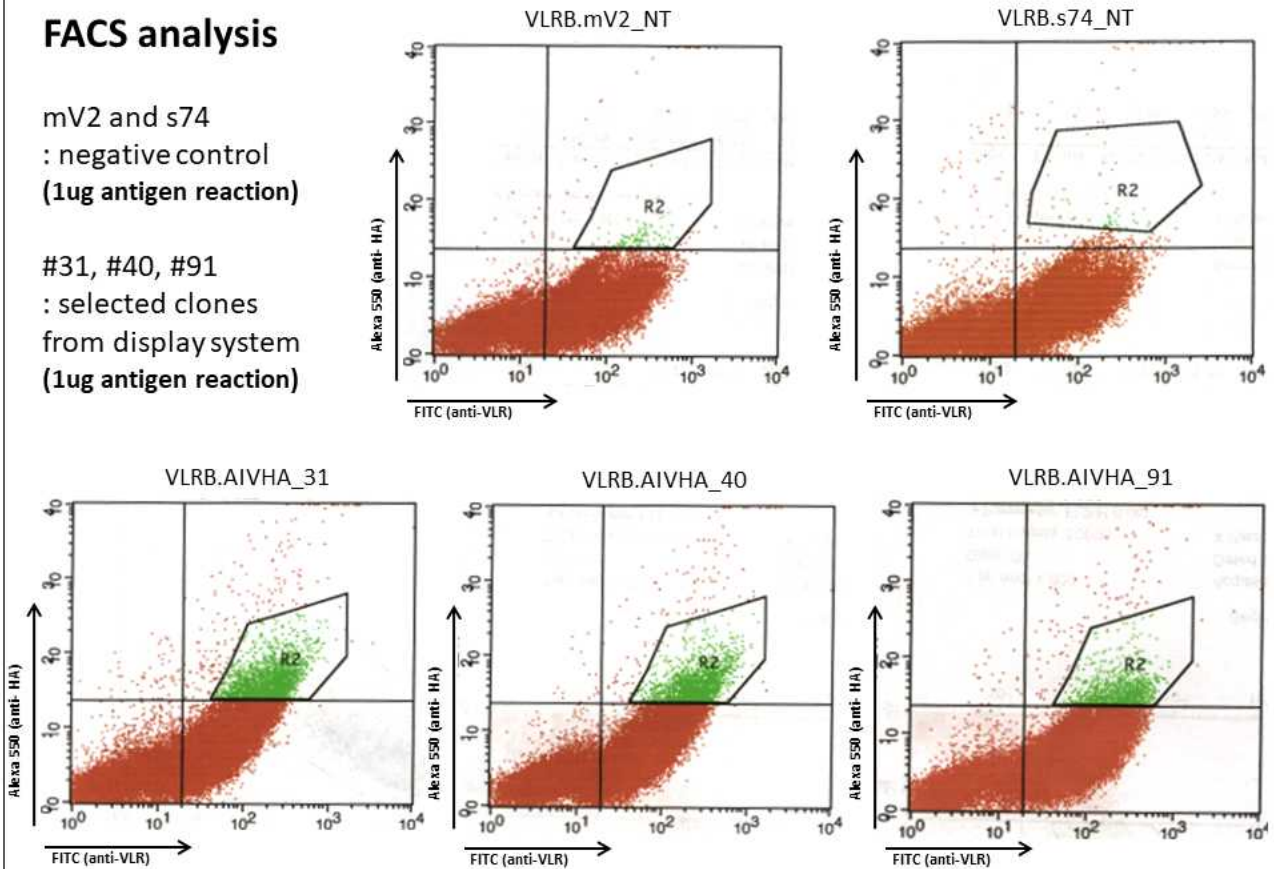


총 2차에 걸친 FACS를 이용한 항원 특이적 VLR clone의 선별을 완료 했으며 sorting 된 yeast를 이용하여 single isolation 후 개별적인 screening을 진행하였다. 무작위로 선별된 50여 개의 single clone을 PCR 증폭 후 VLR-B DNA 서열을 분석한 결과, 중복된 clone을 제외하고 총 3개의 clone이 선별되었다. 선별된 clone은 각각 VLRB.AIVHA_31, VLRB.AIVHA_40, VLRB.AIVHA_91 이다. 선별된 clone을 이용하여 FACS를 기반으로 한 이중형광 염색을 진행 하였다. 재조합 VLR 단백질의 yeast 표면 발현을 확인하기 위한 형광항체인 FITC와 항원과의 특이적 반응을 확인하기 위한 형광항체인 Alexa 555의 반응을 모두 나타내는 double-positive 한 군집 (우측 상위 사분할)의 형성을 통하여 선별된 single clone의 항원에 대한 선택적 반응성을 나타내었다. negative control로 사용된 VLR clone인 VLRB.mV2_NT과 VLRB.s74_NT에 대비하여, 선별된 3종의 clone은 double-positive한 군집의 확연한 증가를 나타내었으며, 이는 Yeast 의 표면에 발현된 각각의 단일종류의 VLR 단백질이 표적항원을 인식하여 결합하였고, 이중형광 염색의 확연한 양성 결과를 나타낸다.

FACS analysis

mV2 and s74
: negative control
(1ug antigen reaction)

#31, #40, #91
: selected clones
from display system
(1ug antigen reaction)

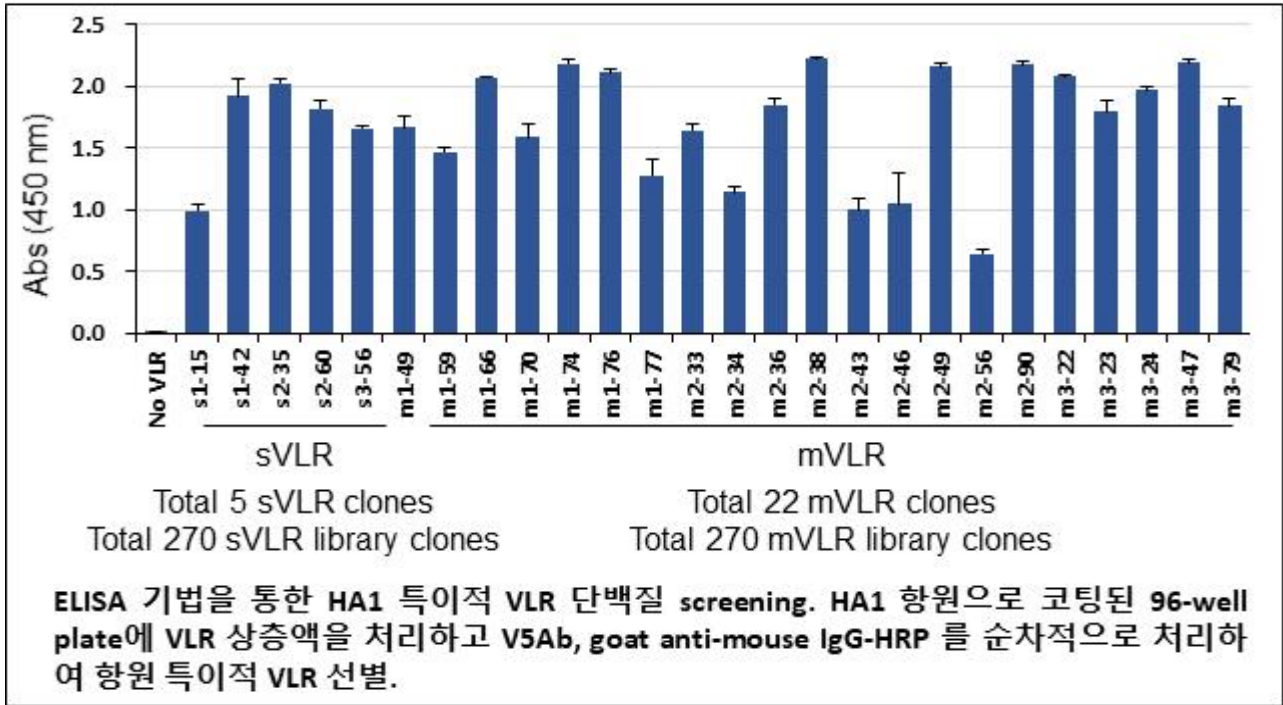


총 2회의 FACS sorting 과정 후 선별된 AIV 특이적 VLR clone의 이중형광 염색 결과. 선별된 VLR clone 들은 (31, 40, 91) 음성 대조군(mv2, s74)과 비교하여 Alexa 550 으로 염색된 AIV와 결합능을 보여 double positive 양상을 나타냄.

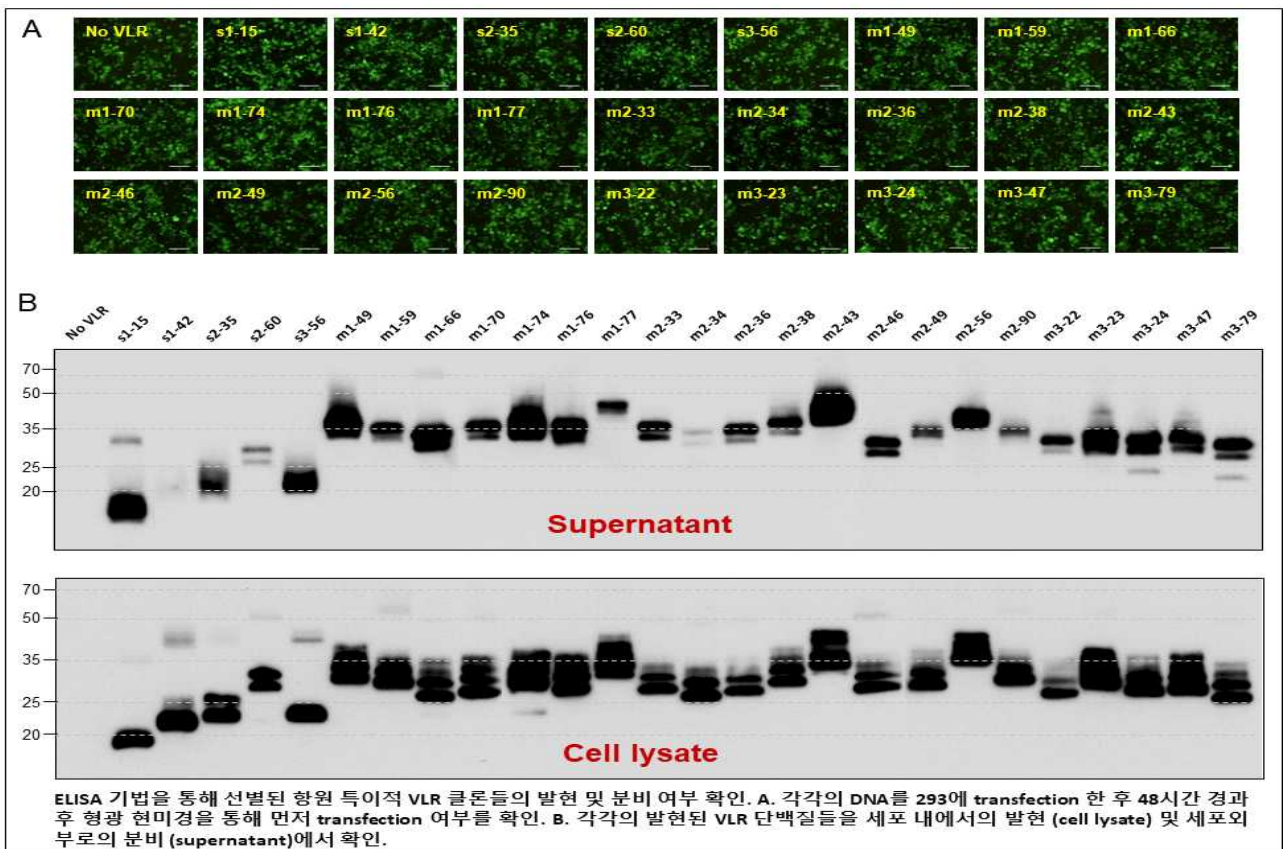
③ 293 세포주에서 분비된 VLR을 이용한 AI 특이적 항체 스크리닝

i) 293 세포주로 스크리닝한 AI 특이적 먹장어 항체의 비특이적 결합능

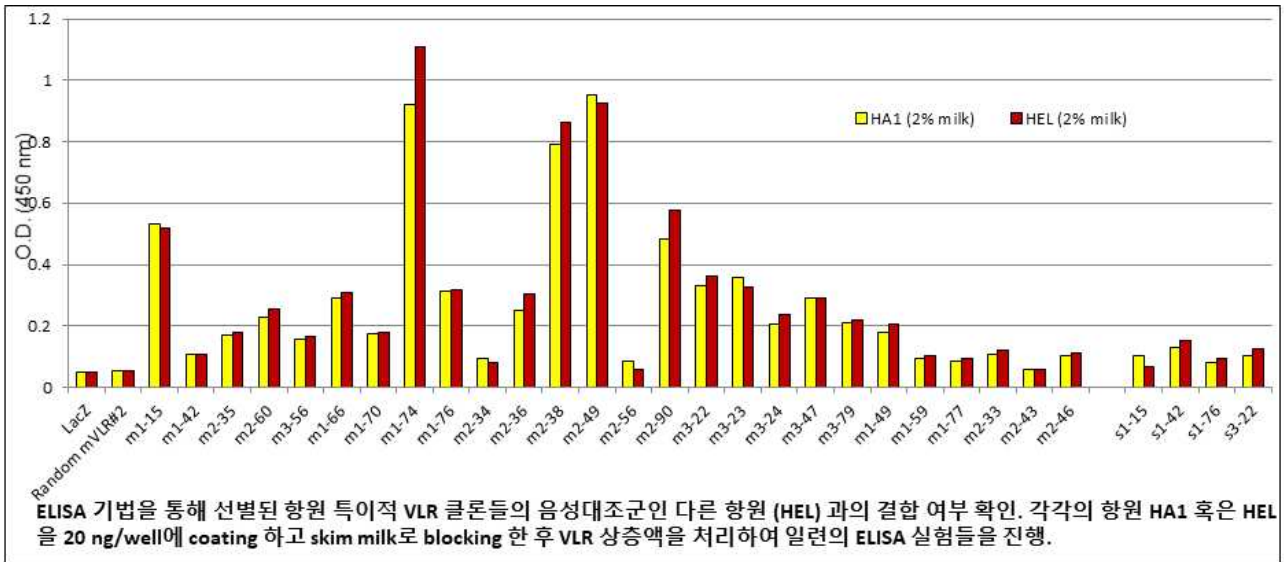
특정항원에 대하여 앞서 제작된 VLR cDNA library를 pKINGeo vector 에 클로닝하고 무작위로 clone 들을 선별하고 colony PCR 방법으로 클로닝 여부를 확인하였다. 이후 각각의 clone 들로부터 pDNA를 획득하고 96-well plate의 293 세포주에 transfection한 후 48~72 시간 후 상층액을 회수하였다. 총 540 개의 library (270 개의 sVLR library 와 270 개의 mVLR library) 의 상층액을 이용하여 HA1 항원으로 coating 된 96-well plate에서 ELISA를 시행하였다. HA1 항원에 반응성을 보이는 것으로 추정되는 VLR 클론들은 sVLR에서 5개, mVLR에서 22개, 총 27개의 클론들을 선별하였다.



ELISA를 통해 선별된 27개의 클론들을 다시 24-well plate에 transfection 한 후, transfection 여부를 조사하기 위해 먼저 형광 현미경을 통해 GFP 발현 여부를 관찰하였다. 또한 각각의 상층액과 cell lysate로부터 단백질들을 각각 분리한 후 VLR 특이적 항체로 발현 및 분비여부를 확인하였다.



선별된 27개의 VLR 항체들을 대상으로 다른 항원과의 결합여부를 조사하기 위해 항원으로 주입한 HA1 단백질 이외에 음성대조군으로 사용된 HEL 단백질로 96-well을 코팅하여 ELISA를 시행하였다. HA1에 특이적으로 결합한 것으로 추정되는 VLR 단백질들은 HA1 뿐만 아니라 HEL에도 결합한 것으로 보였다. 또한, 항원을 코팅하지 않은 96-well plate에도 선별된 VLR 단백질들이 96 well ELISA plate 표면에 결합하는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 VLR 단백질이 기존의 단백질과 완전 다른 특성을 가지는 것으로 보여지며, 일반적인 ELISA 방법으로는 항원과의 결합여부를 조사할 수 없다는 사실을 나타낸다.



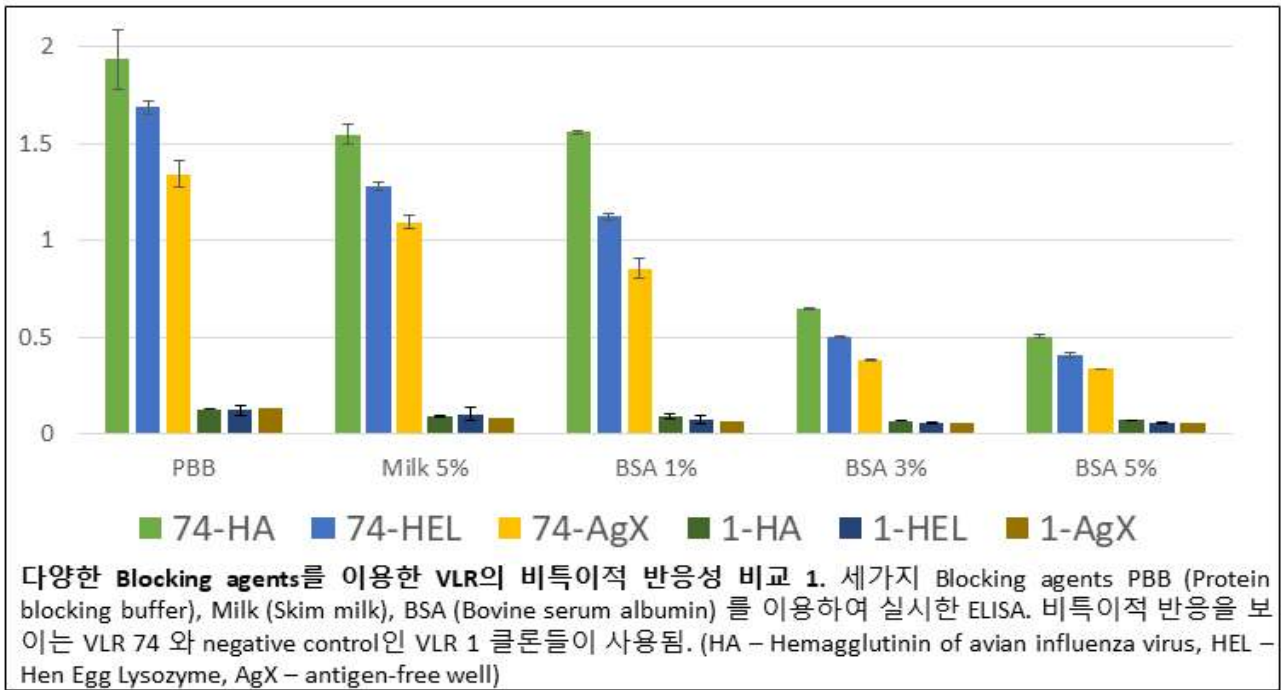
ii) 각종 실험 기법을 통해 기존 ELISA 방법을 통한 항원 특이적-VLR screening의 한계점과 극복 방안 모색

293 세포주에서 분비된 VLR을 이용한 ELISA 선별 방식에서 항원특이적 VLR들은 AI 항원과의 결합이 아닌 96-well plate 표면과의 결합능, 즉 polystyrene으로 표면 처리된 96-well plate에 결합하는 것으로 밝혀지면서 기존의 ELISA 방법을 통한 screening 방법으로는 한계가 있는 것으로 결론 짓고, 다음과 같은 실험 기법들을 통해 항원 특이적 VLR들을 발굴하고자 하였다.

a) 다양한 Blocking 용액에 따른 선별된 VLR들의 비특이적 결합능 비교

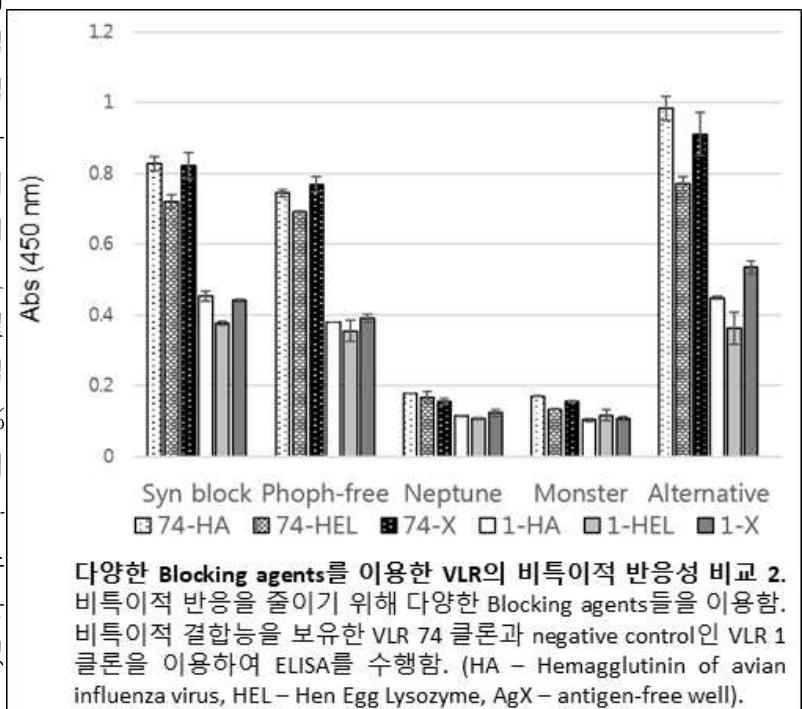
ELISA 기법에서 항원-항체간의 non-specific binding과 background reactivity를 감소시키는 Blocking 과정의 변화를 통해 VLR 들의 비특이적 결합능을 낮출 수 있는 방법을 모색하였다. 기존의 방법에서는 항원 부착 후 Low salt buffer (TBS with 0.1% Tween 20) 로 3회 세척 후 한 시간 동안 5% Skim milk (nonfat dry milk) 로 Blocking 과정을 수행하였다. 항원이 미처 부착되지 않은 plate면에 skim milk 단백질들이 부착되어 항체들이 plate에 붙어 나타날 수 있는 실험적 오류를 미리 예방하였지만 비특이적 VLR clone들이 blocking buffer가 처리되었으나 항원이 부착되어 있지 않은 조건에서도 강한 발색을 보였기에 skim milk로 충분한 blocking이 되지 않았다고 유추하였다. 따라서 본 연구팀은 다양한 Blocking buffer 용액을 이용하여 VLR 단백질의 비특이적 결합능을 감소시킬 수 있는 실험조건을 비교해 보았다. 먼저, Blocking buffer로 빈번하게 사용되는 bovine serum albumin (BSA)와 Skim milk, 그리고 단백질을 함유하고 있지 않으면서도 blocking 효과가 뛰어난 Pierce Protein-Free Blocking

Buffer (PBB)를 적용해보았다. 비특이적 결합능을 가지는 m74 VLR 클론은 위 세 종류의 Blocking agents들에도 여전히 비특이적인 반응성을 보였다. BSA 5%를 사용했을 때 가장 낮은 발색량을 보였지만 여전히 비특이적인 양상을 보였다.



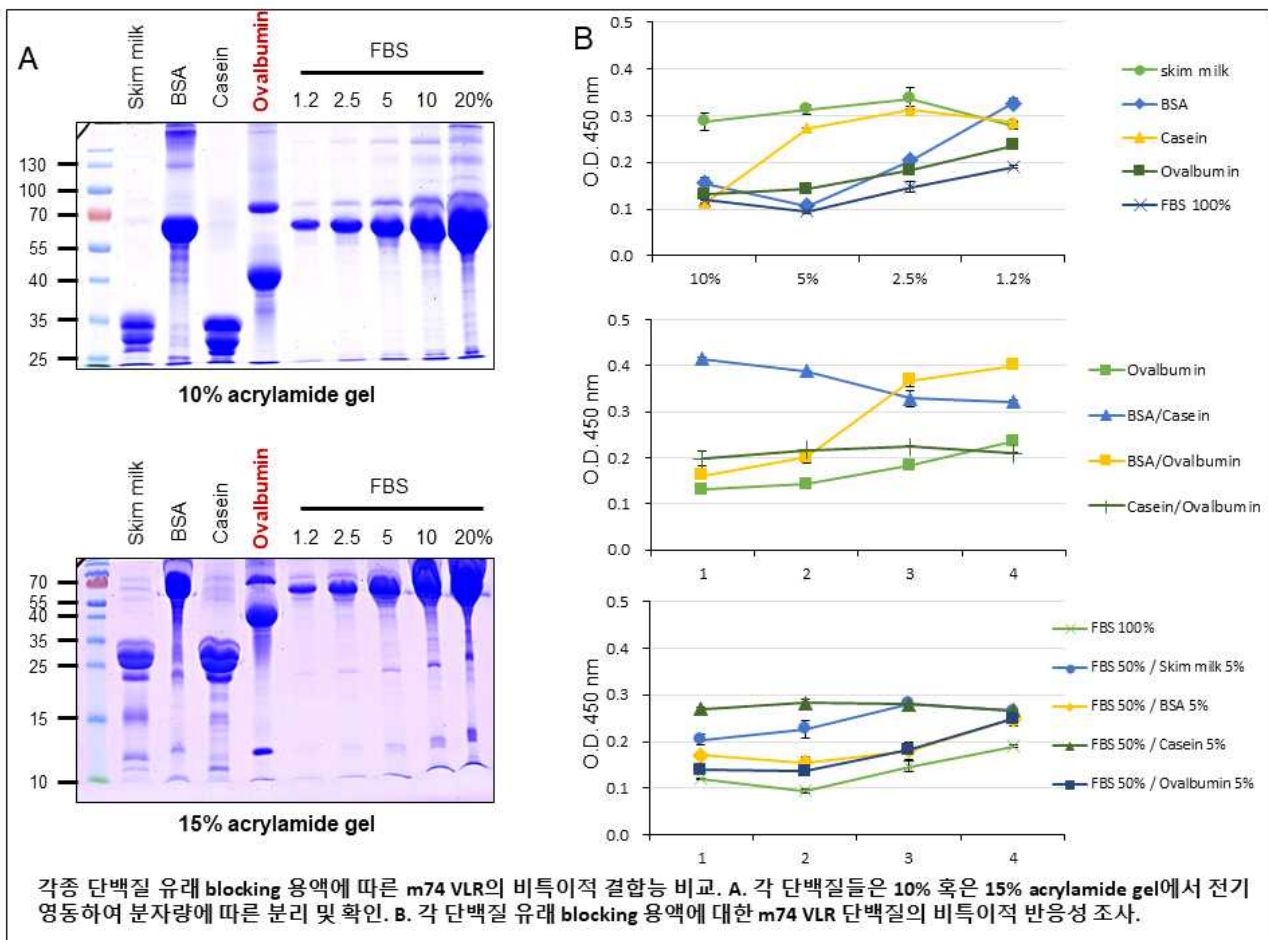
본 연구팀은 또한 위의 Blocking agents 외에도 ELISA 기법에서 Blocking 효율을 향상시키는 것으로 알려진 다양한 Blocking buffer를 사용해보았다. 다섯 가지의 Blocking buffer 들은 각각 다른 조성으로 이루어져 있으며 (Syn Block, phospho-free ; protein free buffer, Alternative ; protein free, detergent free, Neptune ; small molecules protein, Monster ; non-mammalian protein) VLR 클론들을 처리하기 전에 blocking 과정으로 한시간 처리되었다.

Neptune과 Monster buffer는 상대적으로 m74 VLR 클론의 비특이적 결합을 감소시키는데 비교적 효과적인 것으로 보였다. 나머지 세 종류의 Blocking agents들은 오히려 더 높은 비특이적 반응성을 보였으며 심지어 negative control 인 VLR 1 클론에서도 반응성을 보였다. 이 결과로부터, VLR 클론들의 비특이적 결합능을 감소시키기 위하여 5% BSA, Neptune blocking buffer 그리고 Monster blocking buffer가 효과적인 것으로 결론지었다. 하지만, 스크리닝 되었던 항원 특이적 VLR들은 모두 항원과의 반응성이 전혀 없는 것으로 관찰되었다.



b) 각종 단백질 유래 blocking 용액에 따른 VLR 들의 비특이적 결합능 비교

다양한 종류의 commercial한 blocking 용액을 이용하여 VLR 단백질의 비특이적 결합능을 비교했을 때, 다소 차이를 보였으나 완벽히 polystyrene 표면과의 비특이적 결합을 억제하지는 못하였다. 따라서 각종 단백질 유래 blocking 용액을 이용하여 그 노이즈현상을 제거해 보고자 하였다. 먼저, 가장 보편적으로 사용되는 skim milk를 비롯하여, bovine serum albumin (BSA), casein, ovalbumin (albumin from chicken egg white), 혹은 fetal bovine serum (FBS) 등과 같은 단백질들을 이용하여 m74 VLR 과 같이 높은 비특이적 결합능을 보이는 VLR clone의 노이즈를 제거해 보고자 하였다. 먼저 각 단백질들의 분자량을 미리 측정해 보기 위하여 SDS-PAGE로 전기영동 한 후, Coomassie blue 염색약으로 각 단백질들의 존재 및 분자량을 확인하였다. 각 단백질들은 각각의 고유 분자량을 가지므로 10% 와 15% acrylamide gel에서 사이즈를 관찰하였다. 하지만, 다음 그림에서 보는 바와 같이 높은 비특이적 결합능을 보이는 m74 VLR 단백질의 반응성은 미미한 정도의 차이를 나타낼 뿐, 특이할만하게 높은 blocking 효과를 나타내지는 못하였다. 또한, 각각의 단백질 유래 blocking 용액들을 합쳐서 사용한 경우에도 큰 차이를 나타내지는 못하였다. 따라서, 각종 단백질 유래 blocking 용액으로 VLR 단백질의 polystyrene 표면과의 비특이적 결합능을 완벽히 제거하기에는 다소 무리인 것으로 보였다.



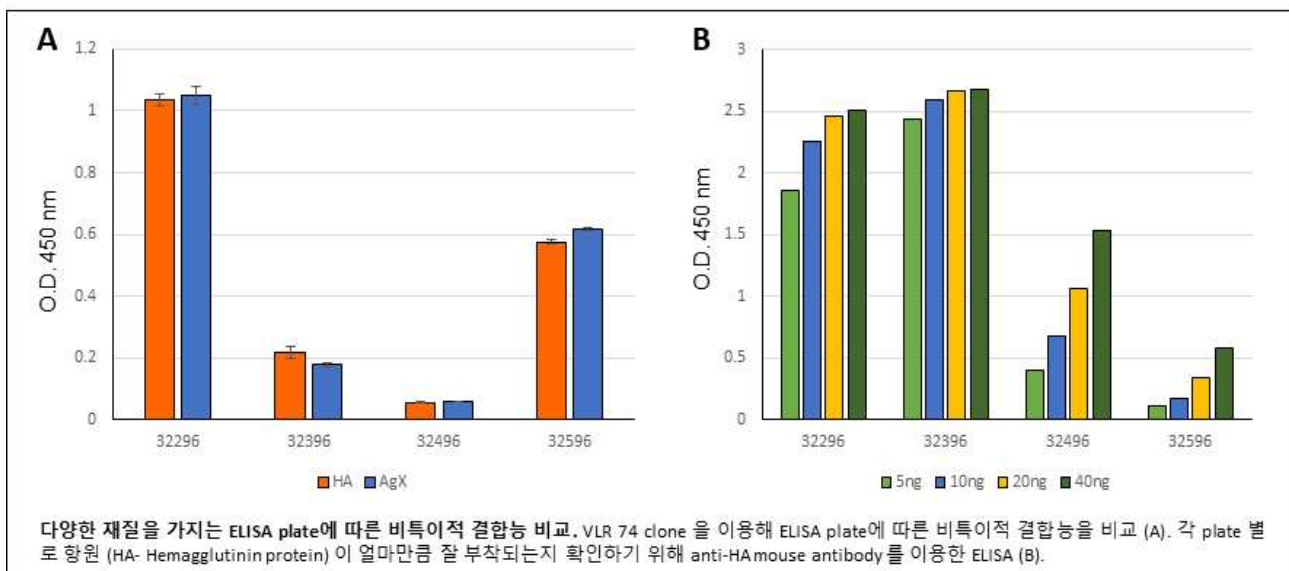
c) 다양한 재질을 가지는 ELISA plate에 따른 비특이적 결합능 비교

본 연구팀은 VLR 클론의 비특이적 반응성이 blocking의 문제가 아닌 VLR 단백질 자체의 성질 때문인지를 확인해보기 위해 다양한 재질의 ELISA plate 이용해 ELISA를 실시하였다. 이 실험은 또한 VLR 클론 자체가 항원이 아닌 plate well에 부착이 되는 것을 방지하는 것을 목표로 하였다. 다음은 이 실험에서 사용된 plate들에 대한 간략한 설명이다.

Plate. No	Surfacetype	Description
32296	Maxibinding	Modified polystyrene surface for a higher binding capacity for proteins and other molecules with <u>both hydrophilic and hydrophobic regions</u>
32396	Medibinding	Surface adsorbs proteins and molecules that consist of <u>intermediate hydrophobic and hydrophilic properties</u>
32496	Unibinding	Suitable for adsorption of <u>hydrophobic molecules</u>
32596	Multibinding	Suitable specifically for adsorbing <u>hydrophilic molecules</u>

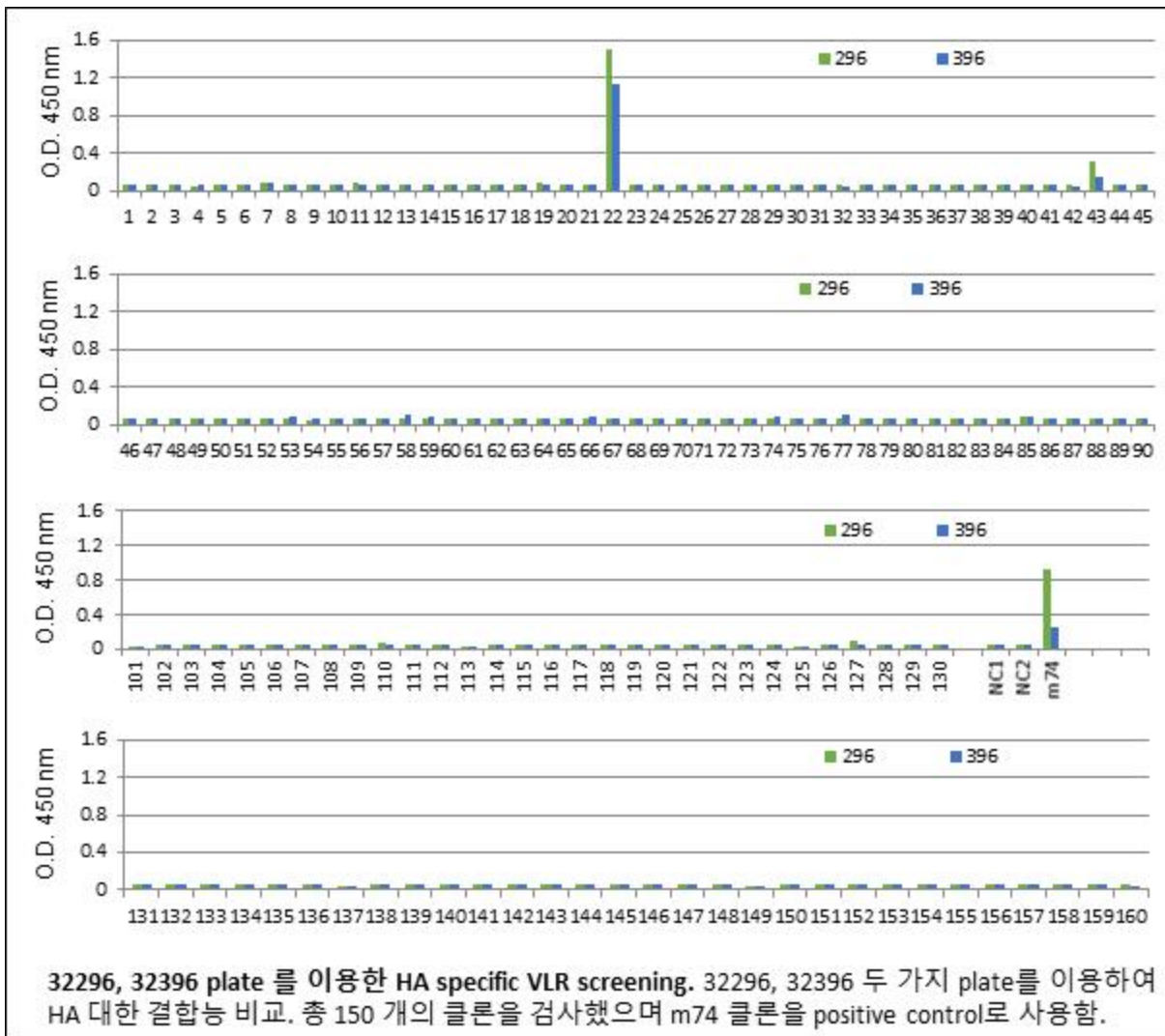
Plate의 표면 형식에 따른 분류. Plate의 표면 처리 형태에 따른 분류 및 특징.

일반적으로 사용되는 ELISA plate는 친수성과 소수성을 모두 가지는 단백질 (예를 들어 면역글로불린)을 부착하는데 용이한 maxi-binding plate이다. 하지만 이 외에도 소수성 또는 친수성 단백질들을 부착하는데 용이하도록 만들어진 ELISA plate들이 있다. 이 실험에서 사용한 네 가지 plate들은 각각 친수성 또는 소수성 단백질 또는 분자를 부착하기 용이하도록 표면이 처리되어있다. Plate 별로 비특이적 결합능을 얼마나 감소시키는지 보기 위해 m74 VLR 클론을 이용하여 ELISA를 수행하였다. 기존 결과와 유사하게 Maxibinding type인 32296 에서는 OD 값이 항원에 상관없이 약 1.0까지 나왔다. 32296 보다 친수성 단백질을 부착하는데 용이한 32596 에서는 약 OD 값이 약 0.6이 나와 32296보다는 감소한 패턴을 보인다.



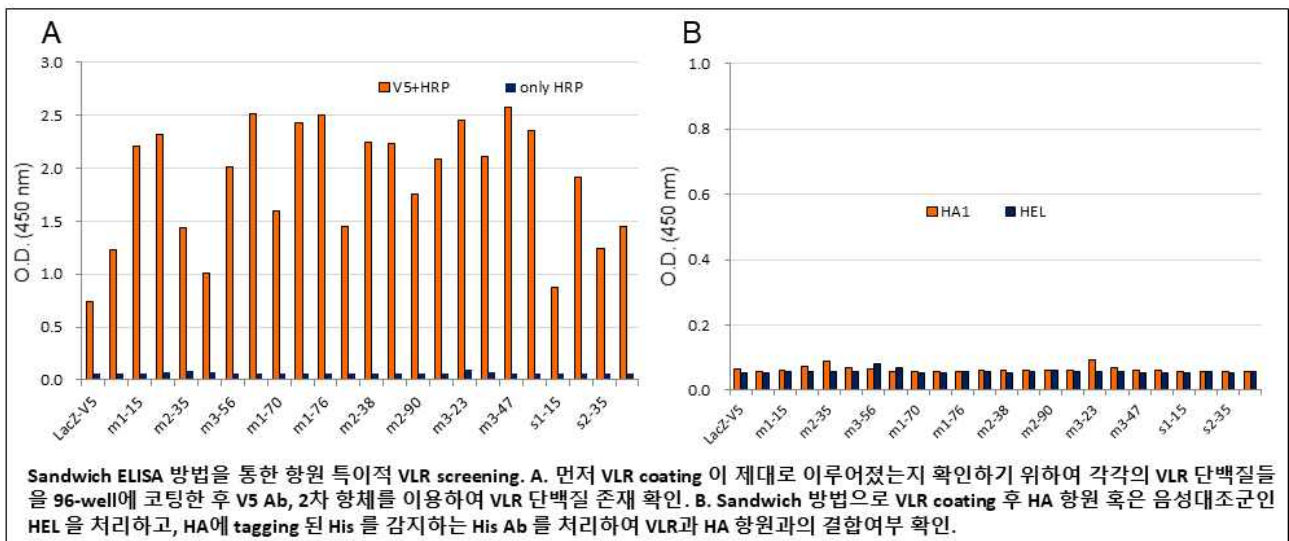
이 두 plate 보다 소수성 단백질을 부착하는데 용이한 32396, 32496 에서는 OD 값이 0.2 이하로 나왔다. 결과적으로 소수성 분자를 부착하는데 적합한 32396과 32496 plate에서 m74 VLR 클론의 비특이적 결합능이 감소되는 것으로 나타났다. 하지만 이러한 표면 형식이 Target 항원인 HA를 부착시키는 데에도 영향을 미치는 것으로 보였다.

HA 항원이 부착된 정도를 알아보기 위해 anti-HA mouse antibody를 이용해 ELISA를 진행하였다. 모든 plate에서 항원의 농도가 늘어남에 따라 OD값이 증가하는 것으로 보였다. 하지만 32496과 32596에서는 32296과 32396에 비해 항원의 부착정도가 2배에서 10배까지 감소하는 것으로 보여졌다. 이러한 결과로부터 본 연구팀은 항원 부착이 용이하면서도 VLR clone의 성질까지 고려할 수 있도록 32296과 32396을 함께 사용하여 VLR Screening을 진행하도록 하였다. HA 항원에 대해 32296, 32396 두가지 plate 모두에서 높은 반응성을 보인 클론을 찾기 위해 VLR library부터 150개의 클론을 선별하여 ELISA를 진행하였다. 하지만, AIV 항원 특이적 VLR 클론은 발견되지 않았다.



d) Sandwich ELISA 방법을 통한 항원 특이적 VLR screening

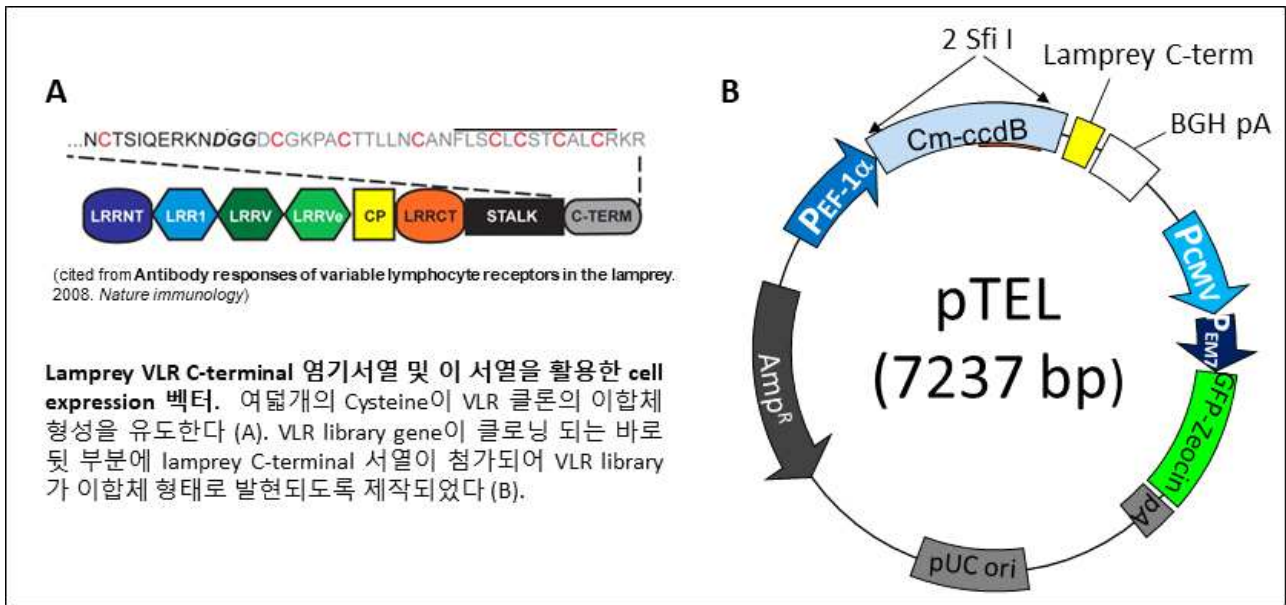
기존의 일반적인 ELISA 방법으로 본 연구과제의 특이 단백질, VLR을 screening 하는 방법은 한계적이라는 사실을 확인한 후, indirect ELISA 방법이 아닌 direct ELISA 방법, 즉 sandwich ELISA 방법을 통해 항원 특이적 VLR을 screening 하는 방법을 시도해 보았다. 대략적인 실험 방법을 기술한다면, 먼저 앞서 VLR 상층액을 96-well plate에 먼저 코팅한 다음, HA1 항원, 혹은 AIV 바이러스를 처리하고, 이에 따른 항체를 순차적으로 처리하여 VLR 단백질과 항원과의 결합력을 보이는 클론들을 스크리닝 하였다. 다음 그림에서 보는 바와 같이 앞선 실험에서 선별된 VLR 단백질들은 96-well plate에 제대로 코팅되어졌음을 확인했다. 하지만, 같이 코팅된 VLR 단백질에 HA1 항원 혹은 음성대조군인 HEL 단백질을 처리하고 HA1 단백질에 tagging 된 His epitope을 감지할 수 있는 His Ab 및 2차 항체를 처리해본 결과, 선별된 VLR clone들은 모두 Sandwich 방법으로는 항원과의 결합능이 감지되지 않았다. 대략 300 여개의 다른 VLR 클론들을 이 방법으로 다시 스크리닝해보았으나, AI 항원 특이적 VLR 들은 발굴되지 못 하였다. 따라서, Sandwich ELISA 방법을 통해 항원 특이적 VLR 단백질을 screening 하는 방법도 본 과제의 특이적 단백질인 VLR 과는 적합하지 않는 것으로 보여진다.



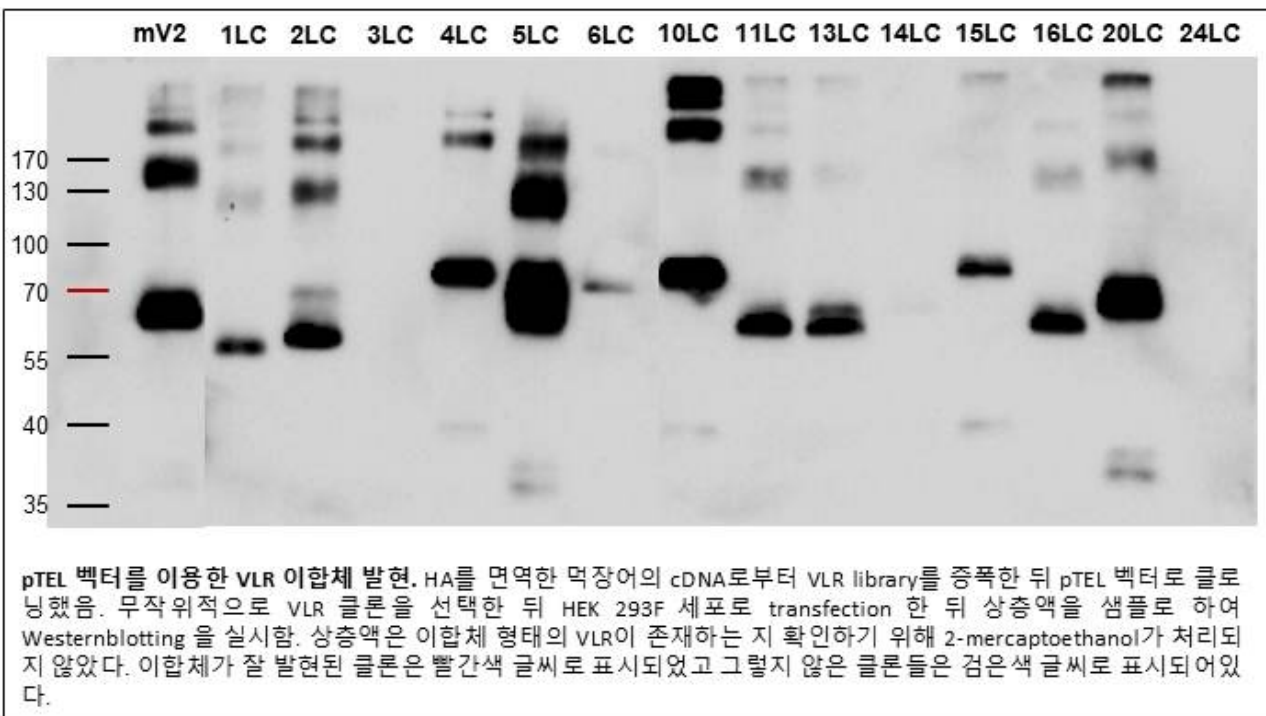
iii) Lamprey C 말단부위가 연결된 VLR 복합체를 이용한 항원특이적 항체 발굴

a) Lamprey C 말단이 연결된 VLR 복합체 발현 벡터시스템 개발

본 연구팀은 다양한 방법으로 VLR screening을 시도했지만 항원 특이적인 VLR 클론을 찾기에는 어려움이 있었다. Lamprey의 VLR을 이용한 Max D Cooper 연구팀의 결과에 의하면, 이 황화결합을 형성하는 Cysteine기들이 풍부한 lamprey VLR C 말단부가 VLR의 복합체를 형성하는데 역할을 한다고 밝혀졌었다. 하지만, 본 연구에서 사용된 먹장어의 VLR에서 복합체를 이룰 만한 어떠한 도메인도 발견되지 않았다. 따라서 먹장어 VLR의 결합력을 향상시켜 VLR screening하기 위해 lamprey C 말단 서열을 연결시켜 VLR 복합체 형성을 유도하고자 새로운 mammalian 발현/분비 벡터 pTEL을 제작하였다.

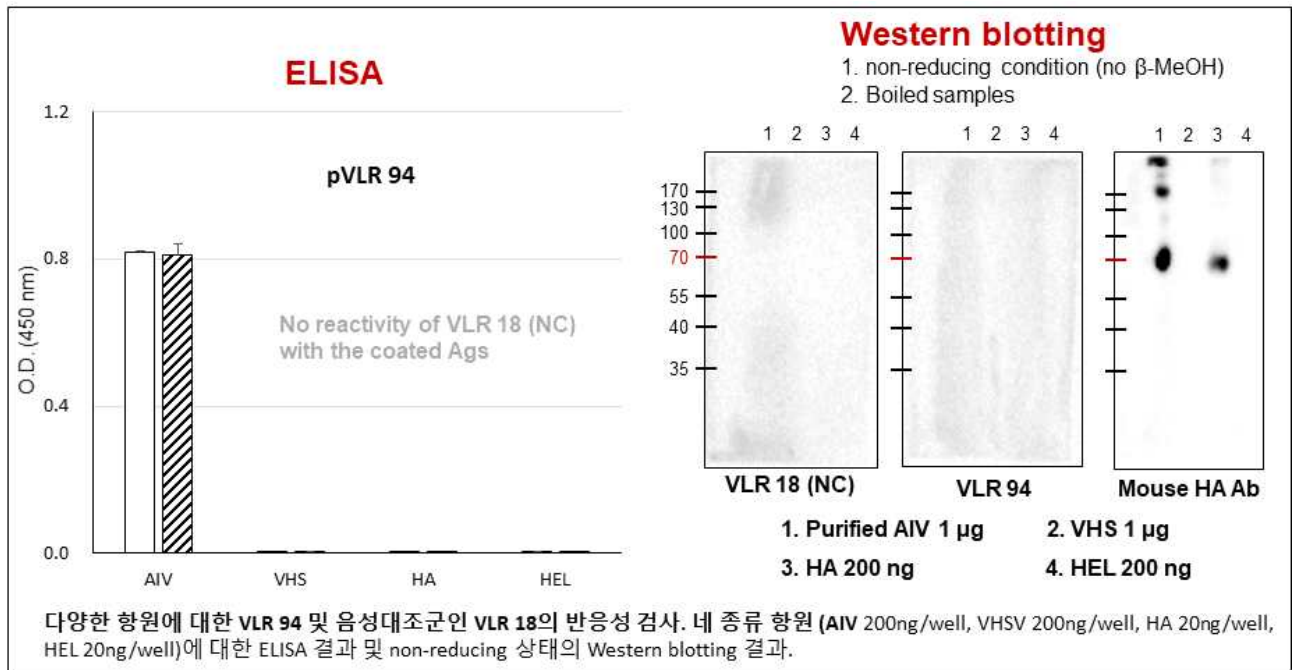


앞서 언급한 먹장어의 VLR cDNA library를 다시 pTEL 벡터에 클로닝하고, 무작위로 VLR clone들을 선별한 뒤 293 세포주에 transfection 하였다. 상층액으로 분리된 VLR 단백질들의 유무 및 복합체 여부를 조사하기 위해 VLR 감지 항체, 11G5를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 클론 별로 다소 발현정도의 차이를 보였으나, 전반적으로 기존의 단일체형태가 아닌 복합체, 즉 이합체나 사합체의 복합체 형태로 분비되는 양상을 관찰할 수 있었다.

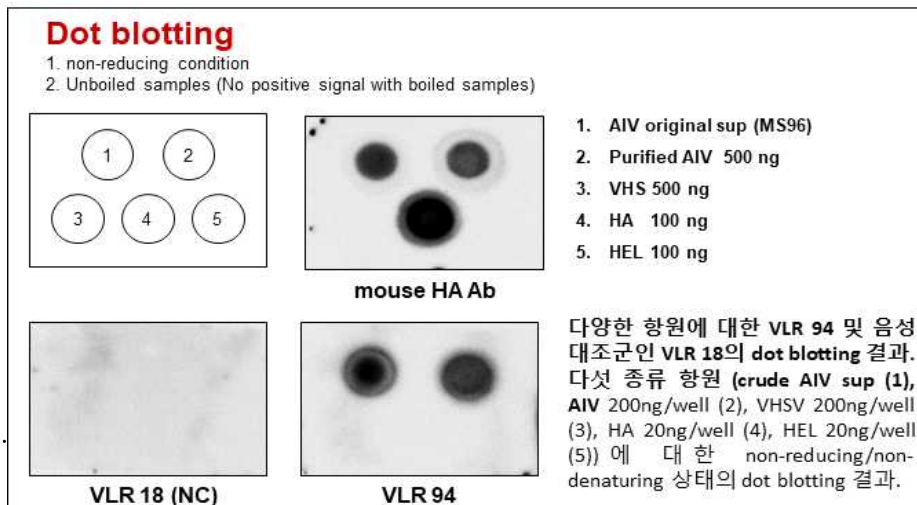


b) VLR 복합체를 이용한 AIV 특이적 먹장어 항체 발굴

앞서 언급했던 일반적인 ELISA 방법을 통해 대략 300 개 정도의 VLR 클론들을 AIV에 대해 screening 해본 결과, ELISA에서 강하게 양성을 보이는 VLR 94를 발견하였다. 음성대조군 VLR18과 비료해 볼 때 AIV에만 단독적으로 높은 반응성을 나타내었다.



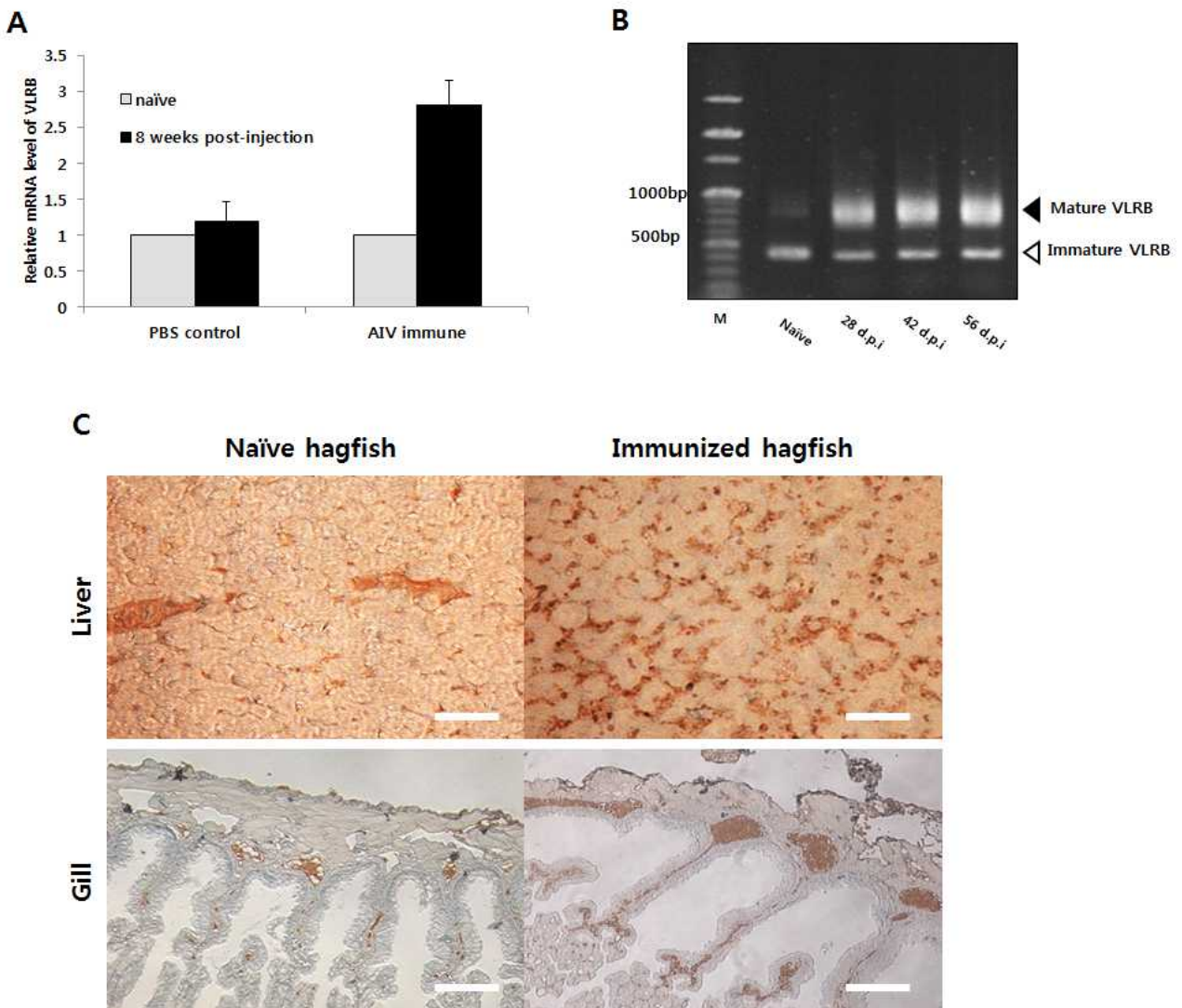
하지만, Western blotting 결과에서는 어떠한 반응성도 관찰할 수 없었다. 따라서, 발굴된 VLR94가 AIV 의 삼차구조만을 인식함으로 인함인지 확인해 보기 위해, 각각의 바이러스 (AIV, VHSV)를 boiling 하지 않은 샘플과 boiling으로 denaturation 한 샘플을 각각 PVDF membrane에 dotting 하고 immunoblotting을 시행하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 ELISA로 선별된 VLR 94는 denaturation 시키지 않은 AIV에만 선택적으로 강하게 결합되어 signal을 형성하며, AIV 대표적인 표면 단백질인 HA에는 결합하지 않는 것을 관찰 할 수 있었다. 따라서, VLR 복합체를 통한 screening 방법을 통해 AIV 특이적 먹장어 항체 발굴에 성공하였다.



다) 조류 독감 바이러스 특이 먹장어 항체 발굴

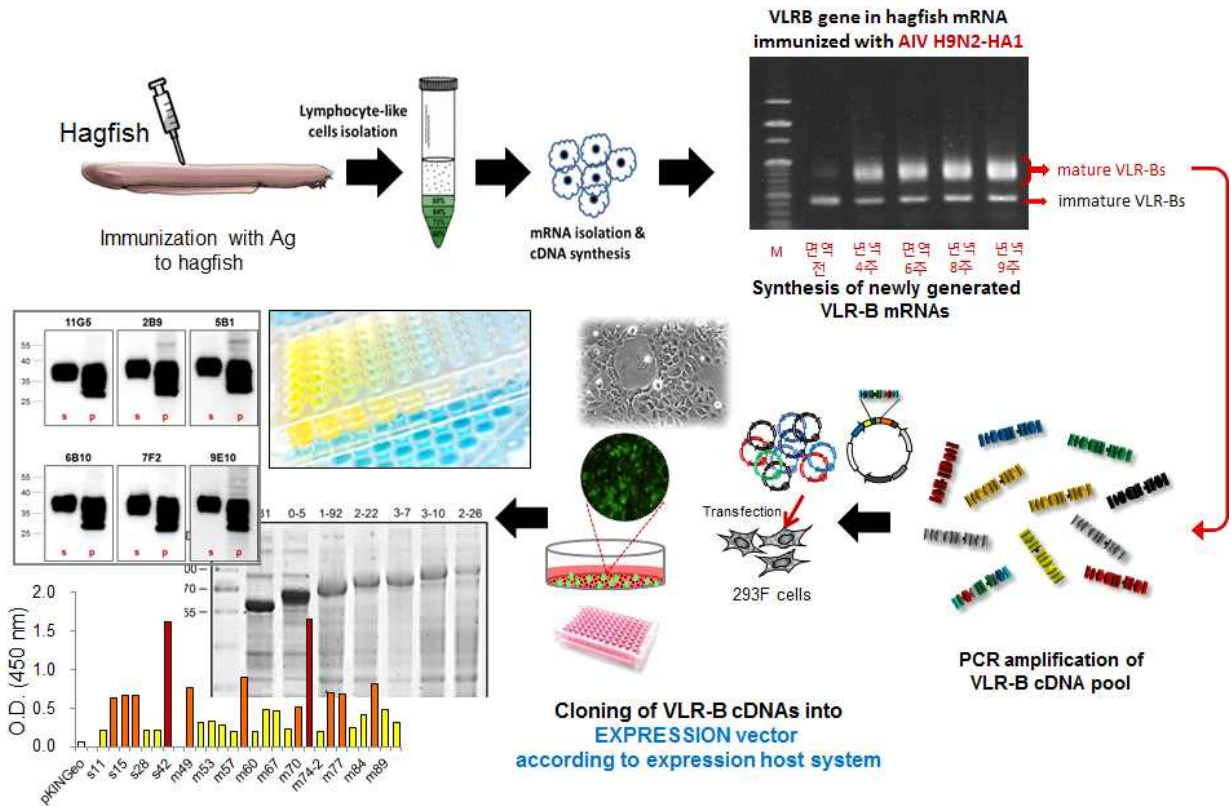
① 조류독감 바이러스의 면역 후 먹장어의 후천 면역 반응 평가

다음 그림은 조류독감 바이러스의 면역 과정에서 먹장어의 후천 면역 반응을 확인하기 위하여 진행한 면역학적 분석 결과임. 정량적 실시간 PCR 실험을 통하여 AIV 면역에 따른 먹장어항체인 VLRB의 mRNA상에서의 변화를 관찰한 실험에서 면역 전과 먹장어의 등장성 PBS를 주입한 음성대조군에 비하여 면역 8주 후 유의적으로 증가된 VLRB의 mRNA수치를 확인 할 수 있었음. 또한 면역 전에는 성숙 VLRB 유전자에 비해 미성숙 VLRB 유전자가 우세한 것에 반해 면역 후 28일, 42일, 56일에 현저히 증가된 성숙 VLRB 유전자를 확인함. 조직학적인 측면에서도 면역전에 비하여 면역 후 liver의 간세포 사이 모세혈관에서 확연히 증가된 VLRB 양성 림포구를 확인할 수 있으며 Gill에서는 Gill filaments와 Gill basement에서 육안상 현저히 증가된 VLRB 양성 림포구를 확인함.

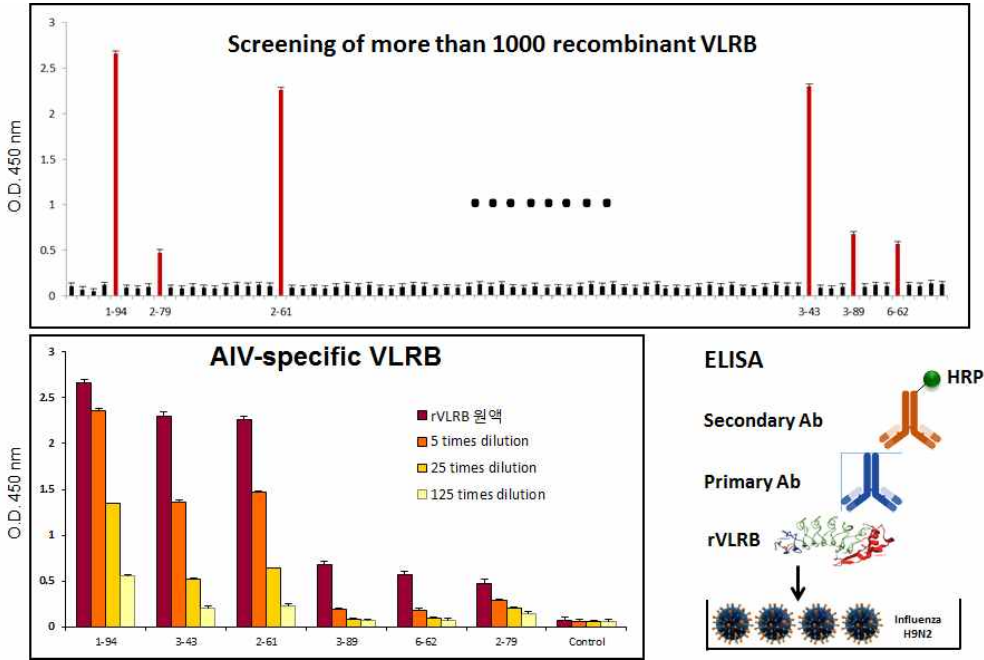


② 면역된 먹장어로부터 AIV 특이적 VLRB 항체 스크리닝

개발된 pTEL 벡터 시스템을 이용하여 각종 항원으로 면역한 먹장어 VLRB cDNA library를 pTEL 벡터에 클로닝하고, 각각의 클론들을 293 세포주에 transfection 하고 3일 경과 후 상층액을 회수하여 AIV 항원이 코팅된 96well ELISA plate에 처리하여 AIV 특이적 먹장어 항체를 스크리닝함. 전체적인 실험 전략은 다음과 같음.



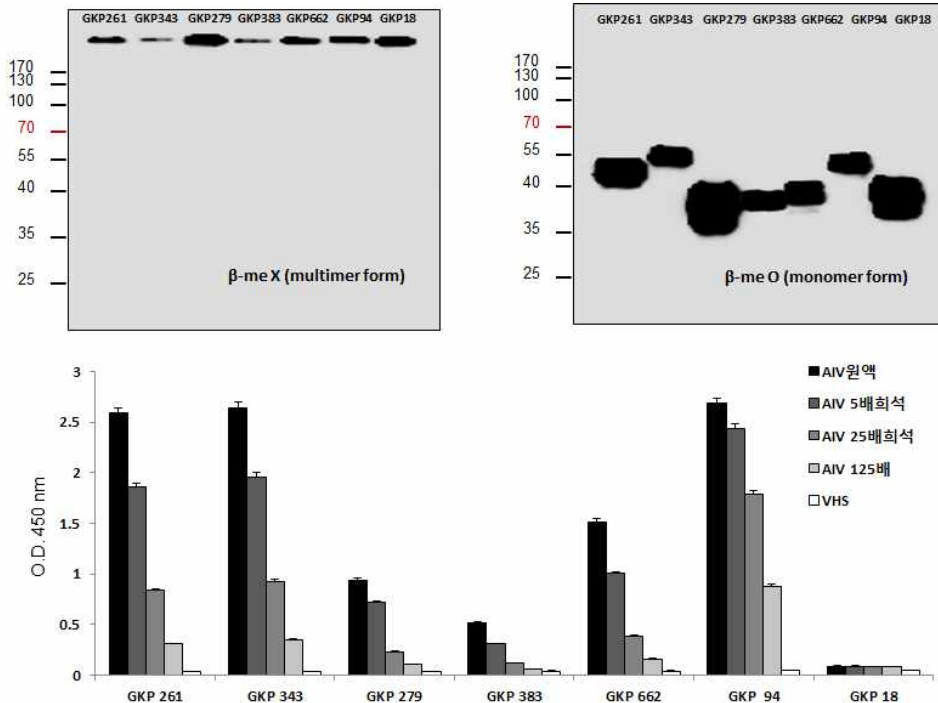
AIV 특이적 먹장어 항체 발굴을 위해 약 1,000 여개 이상의 재조합 항체 단백질들을 ELISA를 통해 스크리닝 하였고, 특이적으로 반응성이 높은 3개의 클론들과 비교적 낮은 3개의 클론들, 그리고 음성대조군 하나를 선별함. 대략적인 실험방법은 아래 그림 오른쪽에 명시됨. 간략히, 먼저 AIV 바이러스를 ELISA 플레이트에 코팅하고, 5% skim milk로 blocking 하고, 각각의 96 well 상층액을 회수하여 5% skim milk와 1:1로 mix 한 후 각각을 처리함. PBST 용액으로 3회 린스한 후, 먹장어 항체를 선택적으로 인식하는 11G5 (2차년도에서 개발됨)를 처리하고, 다시 린스 후 마지막 HRP가 결합된 2차 항체를 처리함. TMB로 발색하고 stop 용액으로 고정 시킨 후 450 nm에서 분석함.



③ 선별된 AIV-특이적 먹장어 항체들의 성질 분석

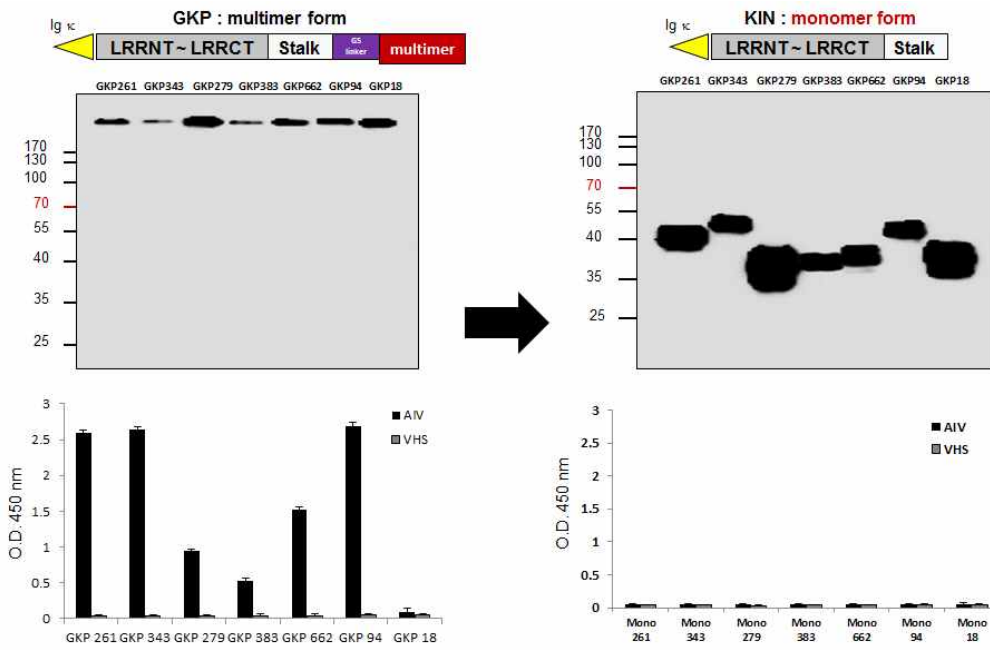
i) 선별된 먹장어 항체들의 중합체 형태 및 크기 분석

선별된 AIV-특이적 먹장어 항체들의 성질을 분석하기 위해 비환원적 조건과 환원적 조건에서 중합체 형성 여부를 SDS-PAGE와 Western blotting 분석을 통해 규명함. B-Mercaptoethanol 이 처리되지 않은 상태에서는 중합체를 형성하지만, 환원적 조건에서는 완벽하게 단일체 형태로 분리되어 전기영동 뒀을 확인함. 이 먹장어 항체의 AIV 반응성을 농도별로 확인하기 위해서 각각의 먹장어 항체들을 5배, 25배, 125배 각각 희석하여 AIV에 처리하여 그 반응성을 확인한 결과 높은 반응성은 먹장어 항체 농도 의존적으로 감소함을 확인함. 음성대조군으로 사용한 VHV 바이러스에는 전혀 반응성을 나타내지 않았음.



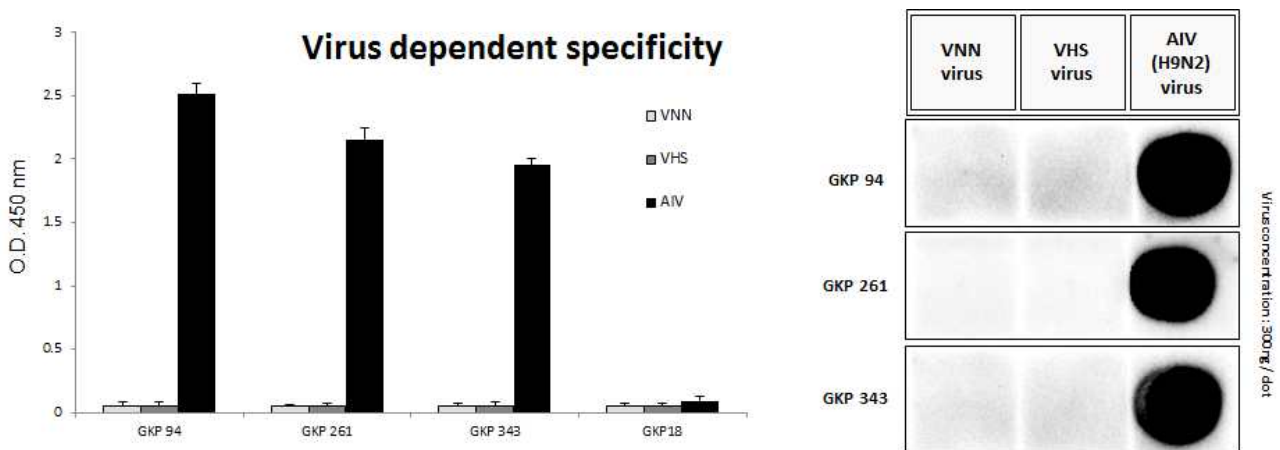
ii) 중합체 및 단량체 VLRB 항체의 항원 결합력 비교

중합체를 형성할 수 있는 중합체 도메인을 결실하여 단일체 형태로 만들어 항원 특이적 결합 능력이 상실 되는지 확인하기 위하여 각각의 도메인들이 결실된 먹장어 단일체를 제작하고 AIV 항원과의 반응성을 살펴봄. 아래 그림과 같이 중합체 도메인을 결실하였을 때, 항원 결합능이 완전히 소멸됨을 확인함.



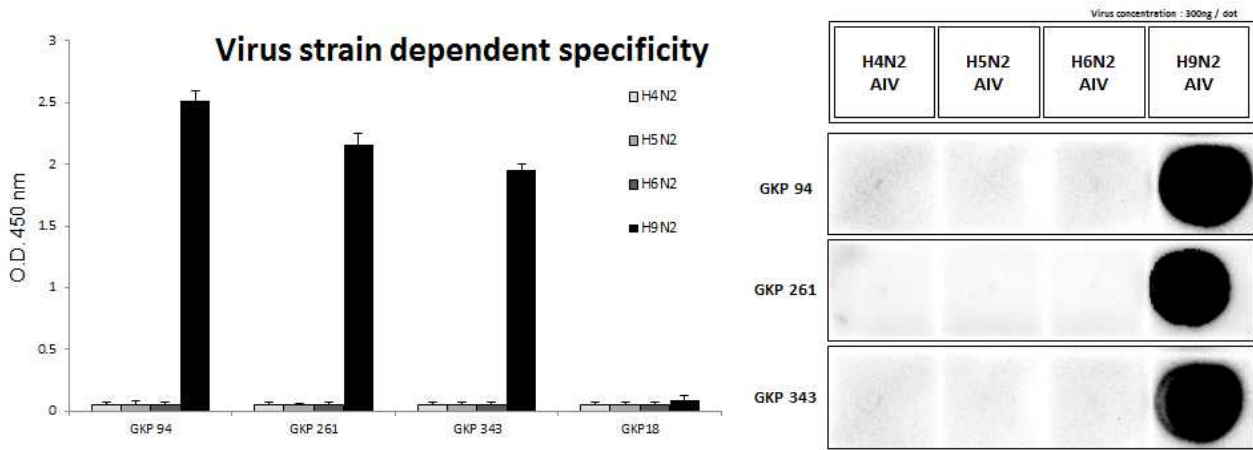
iii) 선별된 먹장어 항체의 항원 특이적 결합능 검사

AIV 바이러스 특이적 반응성을 보이는지 확인하기 위해 VNN 바이러스, VHS 바이러스들을 각각 코팅하여 ELISA를 시행하였을 때, 선별된 94, 261, 343 먹장어 항체들은 AIV항원에만 선택적으로 결합함을 immunoblotting (dot blotting)을 통해 확인하였음.



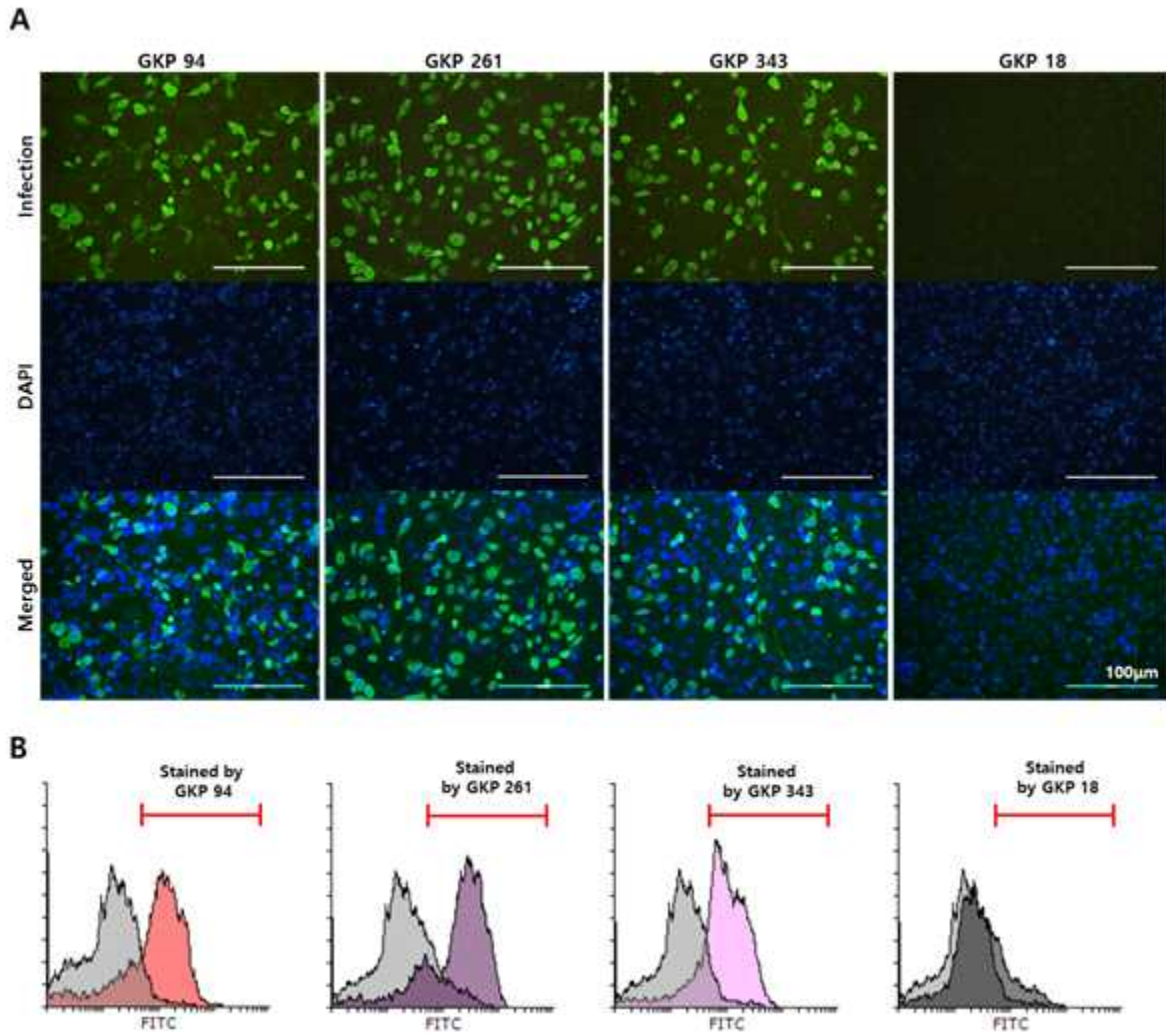
또한, AIV 바이러스 중에서도 스크리닝에 사용된 H9N2 strain에만 특이적으로 결합하는 지 확인해 보기 위해, H4N2, H5N2, H6N2 및 H9N2를 PVDF membrane에 dotting 하고 선별된 3

중류의 먹장어 항체를 처리한 결과, H9N2 strain에만 특이적인 반응성을 보임. 이는 스크리닝으로 발굴된 먹장어 항체들이 AIV 바이러스를 선택적으로 결합하는 것 뿐만 아니라, H9N2 strain에도 선별력을 보이는 것을 확인함. 이는 먹장어 항체의 특이적인 결합능을 한 번 더 확인해 볼 수 있는 중요한 결과임.

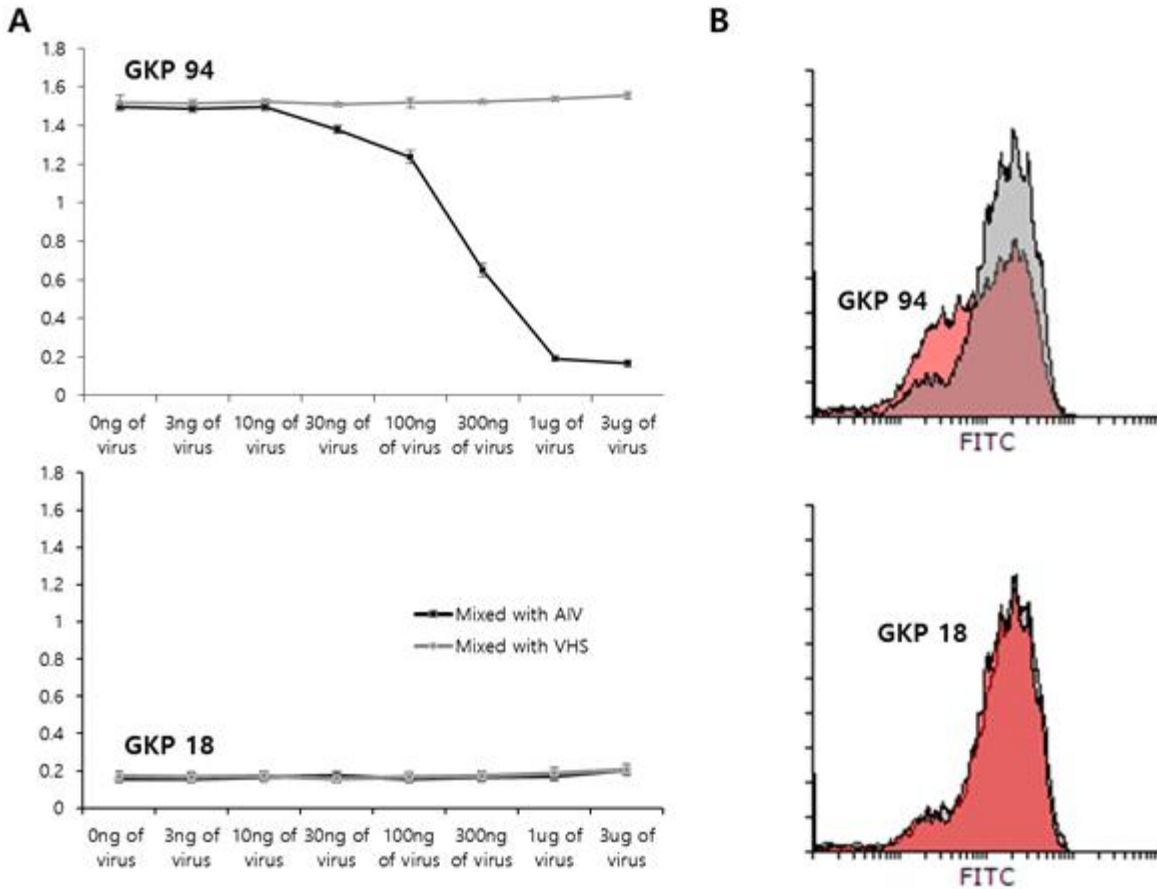


iv) 선별된 먹장어 항체의 다양한 활용 가능성 검사

이러한 먹장어 항체가 진단용으로 사용되어 질 수 있는지 확인해 보고자 함. 선별된 먹장어 항체들은 순수 분리된 H9N2 AIV 만을 감지하고 강한결합을 보였으나, 실제 세포에 감염되고, 새롭게 생성된 자바이러스(progeny virus) 또한 감지하는 지 확인하였음. 먼저 AIV H9N2 바이러스를 MDCK 세포주에 감염시키고 바이러스 복제를 유도시킴. 48 시간 경과 후, 바이러스를 고정하고, blocking 한 후 선별된 3종류의 먹장어 항체(261, 343, 94)들을 각각 처리하여 새롭게 생성된 자바이러스를 감지하는 지 확인함. 음성대조군인 먹장어 항체 18에서는 전혀 반응성을 보이지 않은 반면, AIV-특이적 먹장어 항체들은 높은 인식능을 보였음. 이로써, 개발된 먹장어 항체는 순수 분리 정제된 AIV 뿐만 아니라, 감염된 세포들을 강하게 인식할 수 있는 이용성도 가지고 있음을 확인하였음. 또한, 감염된 MDCK 세포를 이용한 flow cytometry 결과에서 먹장어 특이항체 GKP94, 261, 343은 비감염 MDCK 세포에 대해서는 반응하지 않았지만, 감염된 MDCK 세포에 대해서 높은 반응성 및 특이성을 보임.



특히, 조류독감 바이러스에 특이적으로 반응하는 먹장어항체의 소모성 및 바이러스 중화능력을 검사함. 3 종류의 항원특이적 먹장어 항체 중 가장 강력한 반응성을 나타내는 GKP 94와 음성대조군인 GKP18을 이용하여 실험을 진행함. 일정 농도의 조류독감 특이적 먹장어항체 GKP94를 다양한 농도의 조류독감 바이러스와 충분히 반응시킨 후 다시 고정된 조류독감 항원에 반응시켜 진행한 경쟁적 ELISA 실험에서 특정농도 이상의 바이러스와 결합한 먹장어 항체는 AIV와 모두 결합하여 고정된 바이러스 항원과 반응할 수 없어 경쟁적 ELISA 실험상에서 음성의 결과를 보임. 대조군으로 진행된 VHS 바이러스와의 반응에서는 반응시키는 바이러스의 농도와 상관없이 GKP94는 조류독감 바이러스에 대하여 동일한 반응성을 보였으며 마찬가지로 대조군으로 진행된 GKP18을 이용한 실험에서는 바이러스의 종류와 농도에 상관없이 ELISA 실험에서 음성의 결과를 나타냄. **In vitro**상에서 MDCK 세포를 감염시키는 조류독감 바이러스에 대하여 GKP 94의 중화능력을 검사한 flow cytometry 분석 결과에서 GKP 94는 음성 대조군인 GKP 18에 비하여 약 25% 정도 MDCK 세포의 감염 저하 능력을 보였음. 조류독감 특이적 먹장어항체 GKP94를 이용한 바이러스 감염의 중화능력 분석은 현재 flow cytometry 분석뿐만 아니라 MDCK 세포의 바이러스 감염시 GKP 94 항체의 처리 유무에 따른 변화를 수치상으로 나타내기 위해 MTT assay와 plaque assay를 진행 중에 있으며 GKP94실험 진행상황에 따라 GKP 261과 GKP343도 동일한 실험과정을 거쳐 중화능력을 검증할 예정임.



라) 조류 독감 바이러스 외막 단백질인 hemagglutin-1 (HA1) 특이 먹장어 항체 발굴

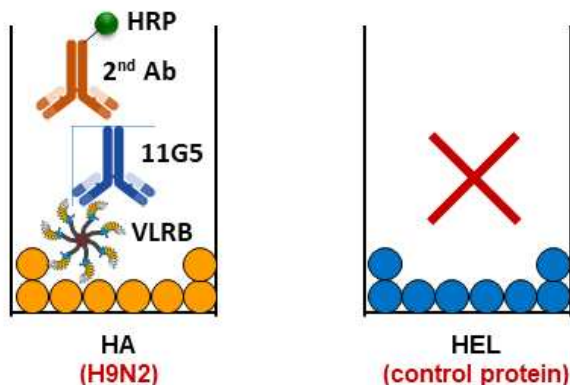
① HA1 단백질을 활용한 먹장어 면역

본 연구에 사용된 항원은 저병원성 조류독감바이러스 (avian influenza virus subtype H9N2)의 외피단백질 중 hemagglutin-1 단백질을 선택적으로 재조합한 재조합 HA1 단백질을 사용함. 재조합 HA1 단백질은 인플루엔자 관련 전문 업체인 Sino Biological Inc에서 구입하였음 (cat:40036-V08H1, Sino Biological Inc). 면역 전 MS222 (0.1 g/L)를 이용하여 침지법으로 먹장어를 마취한 후 10 µg의 항원을 2 주 간격으로 4 회, 복강에 주사하여 면역 부스팅을 유발하였음. 면역 부스팅된 먹장어의 혈액으로부터 전체 mRNA를 회수하는 방법으로, 28% percoll gradient를 통하여 leukocyte만 순수 분리하는 한 후, RNA extraction Kit를 이용하여 mRNA를 분리하고 이를 cDNA로 합성 하였음. 실험 결과, 면역 후 먹장어 혈액에서 얻어진 mRNA를 통한 실험군에서 보다 순수한 형태의 항원특이적 VLR-B cDNA library (mature VLR-Bs)가 획득되어짐. 반면, 면역전 혈액으로부터 얻어진 cDNA 산물에서는 항원특이적 VLR-B cDNA 뿐만 아니라 상당량의 germline 형태의 VLR-B cDNA (germline VLR-Bs) 도 함께 합성되어 졌음. 다시 요약하면, 면역 부스팅된 먹장어의 혈액으로부터 percoll로 순수 분리된 leukocyte를 이용하여 “Total blood mRNA extraction kit” 로 전체 mRNA를 분리한 다음, 역전사효소를 이용해 cDNA library를 PCR로 합성함. VLR-B 유전자 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 VLR cDNA library를 다시 합성하여 전기영동 상으로 항원으로 면역하기 전과 면역 후의

VLR cDNA 양상 변화를 아가로스 전기영동 상으로 관찰하였음. 2차년도 벡터시스템에서 개발된 pGkepta 벡터 시스템을 이용하여 항원으로 면역한 먹장어 VLRB cDNA library를 pGkepta 벡터에 클로닝하고, pGkepta에 클로닝된 VLRB cDNA library 를 HEK-293F 세포주에 transfection 하였음. 형질 도입된 세포주들을 항생제 puromycin (2µg/ml)을 이용하여 선별하고 선별된 세포주들을 96 well plate에 분리 배양하여 각 well 당 50개 정도의 세포로 분주하고 90%의 confluency로 세포를 배양 하였음. 3일 경과 후 상층액을 회수하여 HA1 항원이 코팅된 96 well ELISA plate에 처리하여 항원 특이적 먹장어 항체를 생산하는 세포군을 스크리닝함.

ELISA procedure

1. 항원으로 사용될 단백질 (HA)을 94 well plate에 코팅.
2. 5% skim milk가 함유된 PBS를 통하여 블로킹과정 진행.
3. 검증해야할 각각의 세포배양액 (VLRBs) 을 직접적으로 94 well plate 에 코팅된 항원에 반응시킴.
4. VLRB에 특이적 반응하는 자체 생산 마우스항체(11G5)를 반응시켜 VLRB의 반응을 검출.
5. 마우스 항체에 특이적인 HRP 부착 항체 반응시킴.
6. TMB/H₂O₂ 반응 후 반응성 측정 (OD 450 nm)



② 면역된 먹장어로부터 HA1 특이적 먹장어 항체 스크리닝

항원 특이적 먹장어 항체를 생산하는 세포군을 스크리닝하는 과정을 통해 선별된 세포군 (poly-clonal)를 한계희석 (limited dilution)을 이용하여 단일 세포(mono-clonal)로 선별하는 1차, 2차 ELISA 선별과정을 아래와 같이 진행하였음. 대조군으로 사용된 hen egg lysozyme(HEL)단백질에 특이적으로 반응하는 먹장어 항체를 생산하는 세포도 추가적으로 선별 하였음.

1st ELISA screening (Ag: 800 ng/well)

HA1-specific hagfish Abs													HEL-specific hagfish Abs												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#1-25	0.111	0.088	0.083	0.095	0.125	0.091	0.134	0.141	0.089	0.077	0.087	0.123	0.127	0.132	0.088	0.099	0.157	0.099	0.132	0.154	0.098	0.088	0.094	0.144	
	0.11	0.105	0.094	0.098	0.096	0.066	0.256	0.071	0.078	0.103	0.092	0.088	0.106	0.132	0.106	0.099	0.093	0.071	0.126	0.088	0.085	0.112	0.108	0.102	
	0.212	0.075	0.077	0.099	0.08	0.074	0.076	0.091	0.075	0.079	0.079	0.08	0.125	0.096	0.083	0.119	0.098	0.091	0.082	0.103	0.078	0.079	0.091	0.092	
	0.08	0.072	0.075	0.093	0.075	0.067	0.293	0.101	0.113	0.069	0.104	0.1	0.084	0.089	0.08	0.118	0.087	0.088	0.462	0.115	0.076	0.081	0.09	0.122	
	0.108	0.068	0.092	0.064	0.076	0.067	0.091	0.084	0.072	0.087	0.079	0.204	0.15	0.064	0.1	0.088	0.088	0.07	0.089	0.086	0.073	0.089	0.079	0.207	
	0.084	0.072	0.554	0.077	0.072	0.07	0.067	0.134	0.112	0.079	0.1	0.097	0.124	0.086	0.101	0.09	0.079	0.076	0.082	0.152	0.11	0.097	0.152	0.084	
0.072	0.064	0.072	0.07	0.124	0.109	0.082	0.078	0.09	0.074	0.077	0.092	0.096	0.096	0.085	0.083	0.074	0.111	0.085	0.073	0.103	0.078	0.075	0.11		
0.128	0.076	0.215	0.094	0.106	0.103	0.075	0.076	0.235	0.113	0.118	0.137	0.163	0.085	0.189	0.134	0.121	0.099	0.066	0.08	0.216	0.129	0.127	0.143		
#2-3	0.243	0.143	0.298	0.131	0.442	0.111	0.093	0.149	0.223	0.502	0.1	0.273	0.276	0.112	0.133	0.382	0.104	0.094	0.08	0.175	0.152	0.395	0.08	0.179	
	0.333	0.111	0.091	0.096	0.188	0.106	0.094	0.129	0.099	0.082	0.15	0.225	0.276	0.107	0.08	0.103	0.162	0.099	0.08	0.106	0.087	0.083	0.114	0.135	
	0.107	0.109	0.088	0.079	0.082	0.092	0.103	0.105	0.074	0.086	0.18	0.144	0.091	0.095	0.09	0.096	0.097	0.095	0.1	0.105	0.077	0.083	0.166	0.129	
	0.141	0.096	0.114	0.099	0.088	0.087	0.08	0.127	0.078	0.102	0.074	0.122	0.124	0.12	0.09	0.104	0.087	0.078	0.076	0.107	0.073	0.093	0.075	0.098	
	0.176	0.106	0.094	0.073	0.07	0.078	0.082	0.08	0.082	0.09	0.08	0.138	0.194	0.106	0.091	0.079	0.072	0.077	0.084	0.086	0.084	0.084	0.07	0.094	
	0.123	0.083	0.076	0.083	0.081	0.091	0.077	0.309	0.08	0.086	0.112	0.441	0.101	0.073	0.072	0.073	0.082	0.095	0.073	0.09	0.074	0.078	0.087	0.108	
0.209	0.107	0.103	0.099	0.097	0.083	0.072	0.083	0.085	0.083	0.115	0.197	0.104	0.097	0.101	0.096	0.096	0.078	0.124	0.097	0.082	0.178	0.083	0.136		
0.372	0.173	0.276	0.135	0.118	0.158	0.321	0.109	0.154	0.114	0.144	0.328	0.142	0.112	0.235	0.105	0.096	0.117	0.277	0.089	0.082	0.118	0.093	0.108	0.128	
#9-12	0.226	0.114	0.09	0.107	0.089	0.12	0.147	0.123	0.091	0.17	0.099	0.282	0.459	0.102	0.104	0.097	0.09	0.088	0.165	0.097	0.087	0.15	0.1	0.182	
	0.168	0.069	0.098	0.071	0.122	0.072	0.068	0.117	0.078	0.07	0.1	0.263	0.096	0.068	0.093	0.073	0.155	0.066	0.067	0.123	0.068	0.207	0.106	0.085	
	0.196	0.07	0.075	0.111	0.093	0.076	0.732	0.09	0.101	0.07	0.066	0.103	0.182	0.079	0.07	0.101	0.088	0.074	0.08	0.096	0.126	0.078	0.098	0.084	
	0.228	0.107	0.166	0.146	0.071	0.101	0.065	0.083	0.069	0.069	0.089	0.075	0.263	0.094	0.072	0.113	0.075	0.083	0.071	0.079	0.067	0.072	0.098	0.075	
	0.086	0.083	0.074	0.099	0.078	0.077	0.078	0.085	0.07	0.076	0.117	0.088	0.115	0.088	0.079	0.12	0.077	0.096	0.074	0.094	0.07	0.085	0.079	0.086	
	0.093	0.086	0.076	0.079	0.093	0.082	0.073	0.091	0.083	0.082	0.078	0.184	0.128	0.077	0.106	0.073	0.075	0.081	0.084	0.089	0.087	0.089	0.078	0.179	
0.106	0.063	0.074	0.166	0.076	0.07	0.18	0.072	0.07	0.079	0.078	0.1	0.101	0.063	0.082	0.128	0.081	0.072	0.082	0.129	0.07	0.075	0.107	0.091		
0.108	0.099	0.085	0.536	0.078	0.078	0.536	0.098	0.229	0.085	0.084	0.087	0.107	0.102	0.091	0.113	0.076	0.08	0.08	0.103	0.087	0.087	0.086	0.121		
#3-31	0.137	0.096	0.099	0.108	0.098	0.138	0.094	0.11	0.117	0.165	0.148	0.295	0.112	0.081	0.094	0.098	0.086	0.13	0.072	0.085	0.09	0.108	0.096	0.135	
	0.087	0.077	0.073	0.064	0.066	0.079	0.071	0.078	0.075	0.077	0.075	0.147	0.082	0.069	0.065	0.069	0.069	0.079	0.069	0.078	0.071	0.076	0.062	0.097	
	0.077	0.065	0.073	0.074	0.085	0.081	0.093	0.085	0.083	0.09	0.081	0.119	0.07	0.069	0.066	0.063	0.077	0.081	0.083	0.077	0.076	0.065	0.068	0.091	
	0.092	0.076	0.087	0.083	0.08	0.295	0.086	0.079	0.079	0.078	0.073	0.167	0.073	0.096	0.089	0.078	0.066	0.376	0.07	0.071	0.072	0.077	0.062	0.121	
	0.128	0.072	0.081	0.075	0.082	0.099	0.079	0.107	0.515	0.079	0.083	0.099	0.108	0.086	0.085	0.072	0.07	0.096	0.067	0.095	0.074	0.073	0.071	0.074	
	0.19	0.076	0.09	0.074	0.068	0.122	0.185	0.074	0.288	0.071	0.085	0.113	0.316	0.069	0.082	0.078	0.067	0.1	0.092	0.067	0.071	0.068	0.081	0.105	
0.116	0.077	0.076	0.093	0.07	0.093	0.081	0.1	0.084	0.084	0.088	0.125	0.082	0.072	0.076	0.059	0.082	0.095	0.075	0.092	0.099	0.07	0.072	0.104		
0.14	0.129	0.1	0.081	0.098	0.132	0.1	0.091	0.13	0.085	0.088	0.211	0.097	0.122	0.08	0.066	0.086	0.125	0.085	0.078	0.149	0.079	0.066	0.101		
#5-22	0.108	0.077	0.081	0.081	0.093	0.077	0.076	0.08	0.1	0.116	0.097	0.157	0.363	0.224	0.179	0.174	0.212	0.145	0.252	0.132	0.195	0.142	0.122	0.281	
	0.077	0.072	0.103	0.066	0.097	0.084	0.069	0.08	0.217	0.025	0.069	0.088	0.121	0.084	0.097	0.08	0.112	0.1	0.063	0.095	0.084	0.092	0.089	0.194	
	0.08	0.07	0.077	0.068	0.073	0.078	0.092	0.09	0.087	0.087	0.066	0.077	0.115	0.082	0.087	0.083	0.087	0.11	0.121	0.078	0.081	0.083	0.077	0.19	
	0.095	0.083	0.069	0.081	0.075	0.083	0.074	0.083	0.074	0.064	0.083	0.106	0.122	0.086	0.079	0.08	0.107	0.076	0.097	0.106	0.087	0.082	0.112	0.266	
	0.094	0.1	0.073	0.079	0.07	0.074	0.149	0.067	0.074	0.113	0.077	0.086	0.253	0.17	0.093	0.103	0.079	0.085	0.177	0.077	0.089	0.111	0.091	0.123	
	0.086	0.074	0.078	0.116	0.087	0.082	0.064	0.069	0.07	0.07	0.073	0.078	0.086	0.082	0.086	0.11	0.116	0.08	0.073	0.081	0.073	0.083	0.123		
0.097	0.103	0.081	0.067	0.074	0.072	0.076	0.073	0.079	0.069	0.084	0.087	0.117	0.113	0.091	0.074	0.088	0.08	0.089	0.082	0.087	0.078	0.09	0.119		
0.077	0.598	0.103	0.075	0.091	0.08	0.082	0.127	0.193	0.074	0.077	0.187	0.098	0.107	0.114	0.092	0.166	0.085	0.101	0.172	0.091	0.112	0.105	0.188		

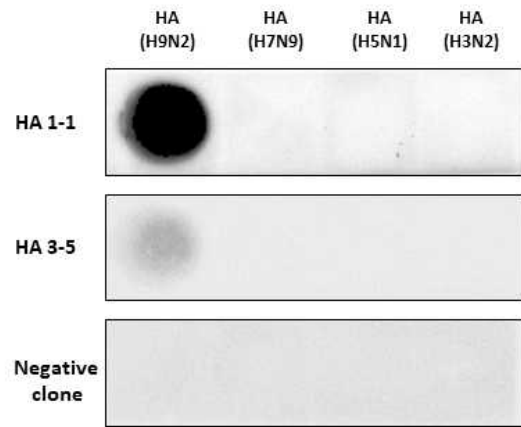
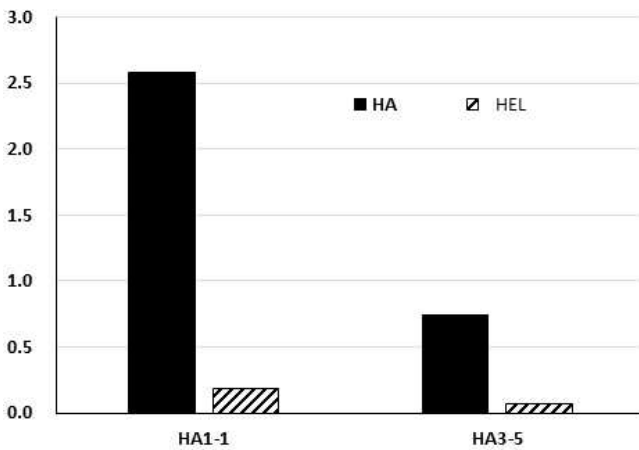
2st ELISA screening (Ag: 800 ng/well)

HA1-specific hagfish Abs												HEL-specific hagfish Abs																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		0.01	0.092	0.076	0.089	0.11	0.092	0.102	0.096	0.166	0.114	0.134	0.112	#6-14		0.124	0.085	0.069	0.112	0.102	0.099	0.103	0.094	0.219	0.217	0.199	0.162	
		0.081	0.39	0.281	0.08	0.076	0.082	0.082	0.078	0.078	0.066	0.065	0.098			0.095	0.133	0.067	0.131	0.081	0.078	0.087	0.089	0.075	0.066	0.07	0.137	
		0.088	0.074	0.07	0.075	0.067	0.085	0.071	0.072	0.081	0.071	0.131	0.112			0.089	0.074	0.069	0.074	0.064	0.091	0.072	0.1	0.078	0.065	0.092	0.108	
		0.087	0.073	0.068	0.088	0.068	0.082	0.072	0.083	0.073	0.07	0.074	0.095			0.092	0.071	0.062	0.082	0.064	0.121	0.078	0.096	0.07	0.067	0.086	0.101	
		0.087	0.069	0.082	0.083	0.088	0.069	0.078	0.083	0.078	0.079	0.07	0.09			0.093	0.071	0.079	0.064	0.082	0.068	0.396	0.092	0.075	0.076	0.087	0.096	
		0.114	0.063	0.07	0.064	0.071	0.07	0.079	0.074	0.073	0.062	0.063	0.085			0.099	0.07	0.083	0.062	0.072	0.074	0.082	0.07	0.075	0.078	0.062	0.089	
		0.097	0.068	0.069	0.067	0.065	0.076	0.075	0.069	0.069	0.067	0.065	0.079			0.088	0.073	0.072	0.069	0.066	0.079	0.072	0.068	0.067	0.078	0.067	0.09	
		0.166	0.069	0.129	0.08	0.118	0.13	0.076	0.091	0.061	0.106	0.074	0.09			0.077	0.075	0.175	0.082	0.113	0.075	0.079	0.096	0.238	0.199	0.094	0.115	
#7-14		0.098	0.088	0.084	0.09	0.079	0.09	0.082	0.091	0.1	0.117	0.113	0.127			0.102	0.106	0.093	0.106	0.084	0.089	0.096	0.084	0.135	0.13	0.115	0.13	
		0.071	0.697	0.074	0.083	0.095	0.069	0.066	0.091	0.073	0.075	0.068	0.079			0.084	0.156	0.081	0.09	0.1	0.081	0.068	0.105	0.079	0.081	0.07	0.086	
		0.1	0.071	0.069	0.066	0.072	0.07	0.077	0.069	0.067	0.062	0.073	0.1			0.109	0.072	0.075	0.071	0.076	0.076	0.089	0.123	0.076	0.075	0.082	0.096	
		0.079	0.068	0.072	0.063	0.071	0.07	0.067	0.071	0.082	0.491	0.075	0.077			0.092	0.132	0.075	0.065	0.07	0.073	0.068	0.077	0.077	0.071	0.086	0.076	
		0.071	0.075	0.068	0.08	0.073	0.067	0.08	0.066	0.078	0.075	0.338	0.096	#7-59		0.081	0.081	0.069	0.087	0.076	0.077	0.165	0.066	0.081	0.08	0.075	0.118	
		0.495	0.062	0.094	0.062	0.081	0.079	0.071	0.145	0.068	0.07	0.065	0.072			0.082	0.078	0.202	0.063	0.075	0.093	0.078	0.191	0.072	0.071	0.07	0.111	
		0.066	0.07	0.071	0.062	0.072	0.067	0.143	0.103	0.079	0.085	0.067	0.087			0.062	0.073	0.081	0.071	0.072	0.123	0.144	0.116	0.083	0.086	0.069	0.09	
		0.084	0.078	0.083	0.126	0.142	0.073	0.097	0.073	0.072	0.078	0.078	0.107	#7-88		0.086	0.071	0.082	0.335	0.148	0.07	0.09	0.074	0.073	0.085	0.082	0.085	
		0.138	0.079	0.079	0.092	0.099	0.088	0.068	0.085	0.075	0.072	0.091	0.1			0.167	0.099	0.093	0.104	0.132	0.102	0.101	0.119	0.094	0.338	0.158	0.235	
		0.07	0.063	0.069	0.064	0.066	0.068	0.066	0.068	0.074	0.062	0.07	0.096			0.155	0.074	0.094	0.076	0.078	0.083	0.117	0.161	0.103	0.078	0.085	0.216	
		0.179	0.435	0.085	0.068	0.067	0.069	0.069	0.062	0.066	0.061	0.073	0.09			0.38	0.081	0.077	0.079	0.088	0.075	0.077	0.071	0.085	0.073	0.085	0.19	
		0.242	0.069	0.064	0.188	0.076	0.068	0.072	0.065	0.061	0.071	0.07	0.202			0.138	0.084	0.08	0.096	0.105	0.095	0.091	0.085	0.082	0.092	0.219		
		0.07	0.066	0.07	0.159	0.084	0.062	0.068	0.064	0.067	0.073	0.068	0.092			0.097	0.204	0.077	0.399	0.078	0.067	0.063	0.078	0.095	0.085	0.092	0.176	
		0.071	0.079	0.07	0.062	0.069	0.063	0.096	0.069	0.063	0.062	0.065	0.085			0.11	0.099	0.084	0.072	0.08	0.073	0.109	0.087	0.073	0.076	0.074	0.16	
		0.068	0.069	0.067	0.074	0.071	0.124	0.068	0.065	0.069	0.073	0.064	0.07			0.122	0.17	0.096	0.084	0.083	0.076	0.078	0.091	0.078	0.083	0.075	0.146	
		0.152	0.069	0.084	0.075	0.084	0.076	0.069	0.077	0.076	0.086	0.078	0.078	#8-89		0.271	0.129	0.146	0.116	0.37	0.117	0.115	0.114	0.125	0.154	0.114	0.166	
		0.109	0.075	0.082	0.076	0.085	0.072	0.09	0.086	0.071	0.347	0.078	0.109			0.117	0.079	0.094	0.08	0.086	0.077	0.097	0.087	0.079	0.074	0.137	0.109	
		0.088	0.078	0.067	0.064	0.064	0.066	0.064	0.07	0.066	0.065	0.063	0.072			0.091	0.081	0.069	0.069	0.067	0.067	0.068	0.07	0.063	0.078	0.083	0.081	
		0.081	0.062	0.065	0.059	0.063	0.071	0.064	0.067	0.073	0.062	0.067	0.073			0.084	0.064	0.071	0.061	0.082	0.072	0.067	0.069	0.078	0.065	0.067	0.076	
		0.071	0.061	0.062	0.061	0.06	0.067	0.062	0.1	0.065	0.081	0.068	0.074			0.068	0.065	0.063	0.063	0.064	0.068	0.065	0.094	0.071	0.086	0.071	0.108	
		0.095	0.059	0.065	0.066	0.066	0.058	0.066	0.225	0.071	0.075	0.066	0.069			0.111	0.065	0.072	0.075	0.062	0.061	0.07	0.341	0.071	0.073	0.07	0.07	
		0.072	0.066	0.088	0.073	0.065	0.069	0.068	0.063	0.06	0.065	0.071	0.089			0.067	0.064	0.103	0.074	0.066	0.07	0.071	0.107	0.066	0.064	0.073	0.077	
		0.092	0.075	0.071	0.067	0.061	0.083	0.071	0.066	0.07	0.063	0.071	0.078			0.265	0.072	0.073	0.066	0.062	0.062	0.074	0.077	0.067	0.065	0.075	0.077	
#9-90		0.12	0.069	0.064	0.068	0.072	0.648	0.084	0.069	0.08	0.078	0.078	0.115			0.108	0.087	0.07	0.075	0.07	0.076	0.235	0.072	0.08	0.08	0.074	0.109	
		0.073	0.08	0.063	0.071	0.069	0.065	0.077	0.071	0.069	0.081	0.067	0.091			0.23	0.166	0.144	0.184	0.149	0.171	0.194	0.202	0.204	0.179	0.234	0.313	
		0.069	0.065	0.068	0.067	0.077	0.058	0.052	0.067	0.059	0.069	0.065	0.084			0.337	0.085	0.085	0.084	0.095	0.083	0.086	0.092	0.098	0.095	0.092	0.217	
		0.067	0.069	0.066	0.091	0.061	0.063	0.086	0.07	0.062	0.069	0.072	0.068			0.143	0.092	0.085	0.075	0.08	0.078	0.092	0.085	0.079	0.088	0.084	0.155	
		0.073	0.065	0.064	0.065	0.065	0.064	0.062	0.066	0.068	0.067	0.067	0.117			0.104	0.089	0.078	0.091	0.081	0.097	0.084	0.075	0.084	0.078	0.08	0.188	
		0.075	0.068	0.061	0.059	0.074	0.063	0.07	0.067	0.059	0.067	0.543	0.072			0.106	0.087	0.084	0.083	0.1	0.086	0.077	0.087	0.087	0.078	0.078	0.084	0.126
		0.072	0.067	0.064	0.061	0.072	0.075	0.063	0.063	0.07	0.063	0.092	0.078			0.106	0.081	0.09	0.13	0.078	0.082	0.078	0.071	0.091	0.084	0.126	0.194	
		0.066	0.068	0.062	0.059	0.064	0.061	0.067	0.064	0.065	0.066	0.073	0.082			0.095	0.076	0.08	0.082	0.081	0.075	0.08	0.076	0.092	0.078	0.083	0.143	
		0.101	0.078	0.064	0.068	0.075	0.072	0.065	0.068	0.065	0.068	0.076	0.114			0.229	0.09	0.097	0.084	0.103	0.096	0.088	0.094	0.082	0.125	0.091	0.212	

1차, 2차 ELISA 선별과정을 거친 결과 HA1 특이적 먹장어 항체를 생산하는 세포주 9개의 clone 과 HEL 특이적 먹장어 항체를 생산하는 세포주 8개의 clone을 선별하였음. 각각의 항원에 특이적으로 반응하는 항체생산 세포주들 중 강력한 반응성을 보이는 4개의 세포주를 각각 다시 선별하여 반응성 및 특이성을 검증하였고 추가 실험을 진행하기 위하여 시퀀스 분석 및 모듈 분석을 통한 비교분석을 진행하였음. 시퀀스 분석 결과 4개의 세포주 중 3개의 세포주에서 동일한 VLRB 염기서열을 가지는 것으로 확인 되었으며 최종적으로 2개의 HA1 특이적 먹장어 항체를 생산하는 세포주를 선별하였음. 각각의 단백질서열 비교분석을 진행하였고, ELISA 반응성분석, dot blotting 분석을 통한 높은 항원 특이적 반응성을 확인 하였으며 이에 대한 결과를 아래에 나타냄. HA1(H9N2)에 특이적 반응성을 비교하기 위한 대조군 단백질로는 H3N2 (H3N2-HA1, A/reassortant/TVR-155; Sinobiological), H5N1 (H5N1-HA1, A/common magpie/HongKong/5052/2007; Sinobiological), H7N9 (H7N9-HA1, A/Pigeon/Shanghai/S1069/2013; Sinobiological)이 사용됨.

Characterization of the positive VLR clones (1-1, 3-5) specific to HA protein of AIV

	VLR HA1-1 (high affinity)	VLR HA3-5 (low affinity)
LRRNT	CPSRCSCSGTEVGGCCSSLTSVPTGIPARTT	CPSRCSCSGTTVSCQSKSFTSVPSGFPSSTT
LRR1	YLNLCCKNLQSLPHGVFD	I LYLHTNQLQSI PDGVFD
LRRV	KLTKLTTLVLYNNQLKSVPDGIFD	KLTQLTKLDLGINQLQSLPNEVFD
LRRV	-	KLTKLTKLWLNNNQLQSLPNGVFE
LRRV	-	KLTLTTLTYLHTNQLKSVPDGVFD
CP	RLTSLQRIYLYSN	RLTSLQTIYLYSN
LRRCT	PWDCTCPGIHYFSEWINKHSGVLIGTSGNVNPDSAKCSG SGKPVRSIICP	PWDCTRPGVDYLSRWLHTNSKKETSTSAKCSGSGKPVRSIICP

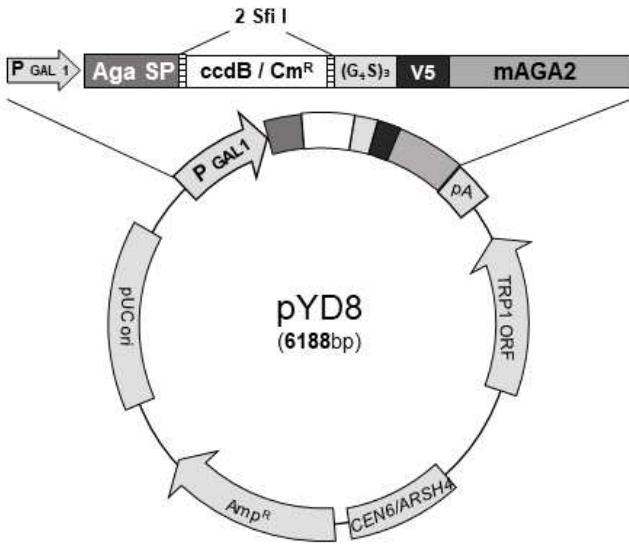


마) Yeast display 시스템을 이용한 항원 특이적 먹장어 항체 발굴

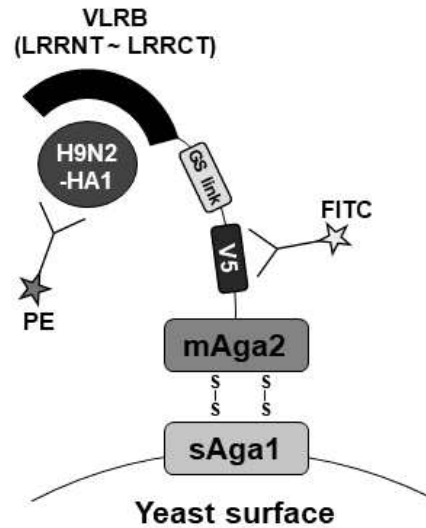
① Yeast display 시스템 구축

본 연구에서는 기존의 pYD8 yeast display 용 벡터에 면역화된 먹장어의 VLR cDNA library를 cloning 하여 pDNA library를 구축하였음. pYD8 yeast display 용 벡터는 AGA display 시스템을 이용하며 GAL 프로모터에 의해 발현되는 재조합 단백질은 N 말단의 AGA SP (signal peptide)에 의해 yeast 세포 외부로 분비되며 분비된 단백질은 C 말단에 위치한 mAGA (mature 형태의 AGA)에 의해 yeast 외부표면에 display 됨. VLR cDNA library를 pYD8의 sAGA와 mAGA 사이에 클로닝 하기 위해 두 개의 Sfi I에 클로닝 하였음. 이러한 DNA 재조합으로 발현되는 단백질은 sAGA-VLR-mAGA 형태로 yeast에서 분비되며 yeast 세포외부 표면에는 AGA 단백질과 연결된 형태의 VLR peptide library가 display 되게 됨. 생산된 library는 대략 2.5×10^6 이상의 높은 다양성을 나타내었음. Colony PCR 과정을 통해 얻어진 각각의 VLR PCR 산물들을 DNA sequencing 해 본 결과 모든 클론에서 각각의 VLR의 invariant region 및 variable region이 모두 존재함을 확인할 수 있었음. 이 결과를 통해 VLR-B cDNA library가 yeast display 벡터 시스템에 높은 효율로 구축되어 졌음을 확인하였음.

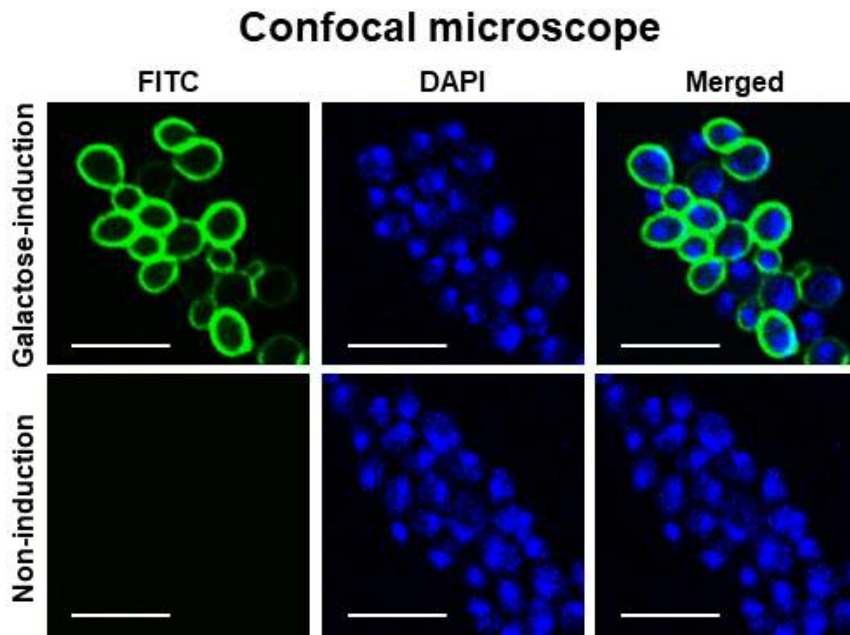
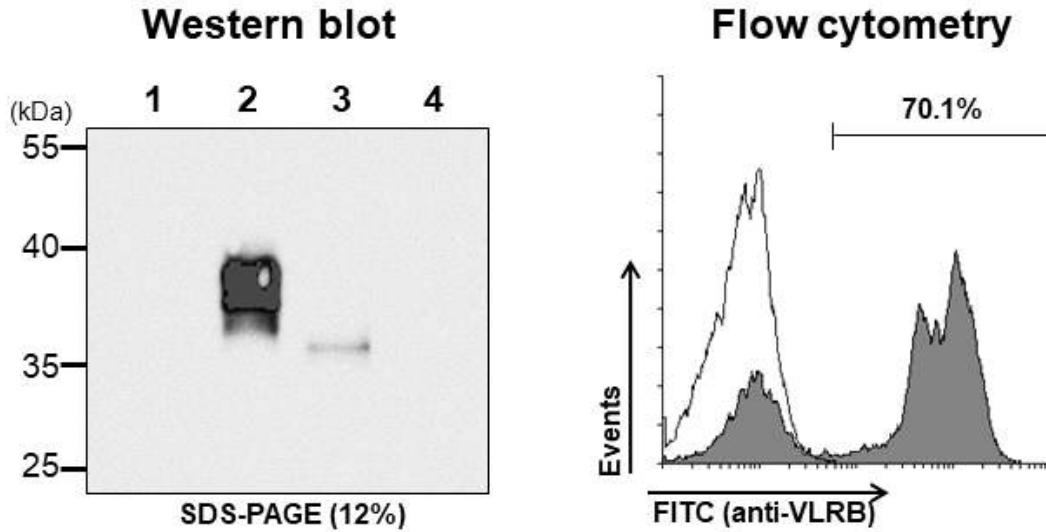
Vector map of pYD8



Schematic expression pattern



제작된 yeast display 벡터, pYD8에 무작위로 선택된 단일 VLR 유전자를 클로닝하여 EBY100 yeast에 일반적인 electroporation 방법으로 형질전환 시키고 VLR 단백질의 발현 여부를 확인 하였음. 목적 단백질인 VLRB의 yeast 표면 발현 여부를 검증하기 위하여 western blot과 형광염색을 통한 localization을 위한 FACS 분석, confocal microscope 분석을 실시하였으며 아래에 나타내었음. Western blot 결과 induction되지 않은 negative control 군에서는 단백질이 검출되지 않았으며, induction시에 배양 배지 상으로 분리되지 않고 yeast가 함유 하고 있는 재조합 VLR단백질을 검출하였음 (1: non-induction군의 yeast 분해물, 2: galactose induction군의 yeast 분해물, 3: non-induction군의 yeast 배양액, 4: galactose induction군의 yeast 배양액). 재조합 단백질의 표면 존재여부를 검증하기 위한 FACS 실험 결과, induction되지 않은 negative control 군에 대비하여 70% 이상의 yeast 가 표면에 VLRB 단백질을 발현하여 보유하고 있었으며 높은 발현율을 보였음. Confocal microscope 분석을 통하여 induction 되지 않은 negative control 군에 대비하여 yeast 세포표면의 명확한 FITC 형광염색을 확인하였으며 DAPI 형광염색을 통하여 yeast세포의 군집을 확인 할 수 있었음.

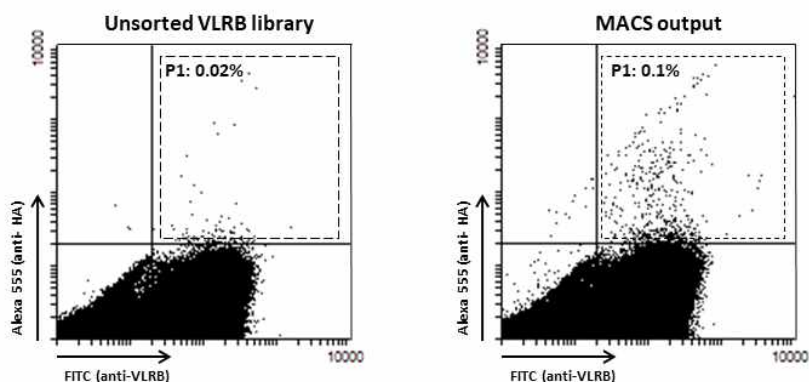


② Yeast display 시스템을 이용하여 HA1 특이 먹장어 항체 발굴

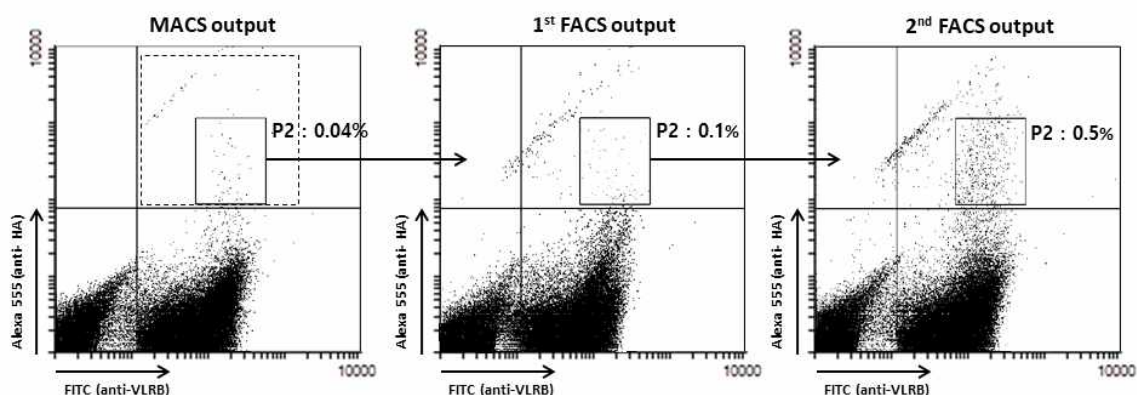
Yeast display 벡터 시스템 상에서 구축된 VLR library를 항원 특이적 screening 하기 위하여 FACS를 기반으로 한 cell sorting 기술을 적용 하였고 아래에 나타냄. FACS를 이용한 cell sorting 전 처리 단계로 MACS를 이용한 target clone의 증폭 과정을 통해 보다 높은 효율의 screening 및 낮은 background 수준을 가능케 하기 위하여 구축된 VLR library를 이용하여 1 회의 MACS 과정이 실시하였음. MACS를 이용한 전자기적 cell sorting 전후의 항원 특이적 VLR clone의 증폭을 확인을 위하여 FACS기반의 이중형광 염색을 이용하였음. 재조합 VLR 단백질의 yeast 표면 발현을 확인하기 위한 형광항체인 FITC와 항원과의 특이적 반응을 확인 하기 위한 형광항체인 Alexa 555의 반응을 모두 나타내는 double-positive한 군집 (우측 상위 사분할)의 형성을 통하여 0.1%의 항원 특이적 VLR clone의 population을 관찰하였고 MACS를

통해 5배의 증폭을 확인하였음. MACS후 sorting 된 yeast clone 들은 회복 과정과 증폭과정을 통해 충분한 population 확보 후 FACS를 이용하여 분석하였음. MACS sorting과정에 비하여 보다 선택적 구역인 p2구역을 gating 하여 분석 한 결과 0.04%의 항원 특이성을 보이는 population을 확인 할 수 있었으며 p2 gating 구역을 이용하여 1차 FACS sorting 후에 선별된 yeast clone 들은 회복 과정과 증폭과정을 통해 충분한 population 확보 후 FACS를 이용하여 분석하였음. 1차 FACS sorting 후에 sorting 된 yeast clone 중 1.0×10^5 개의 yeast clone을 FACS 분석한 결과 0.1%의 p2 gating구역의 population을 확인할 수 있었으며 이는 1차 FACS 선별 전에 p6 population과 비교 시 2.5배의 증폭을 나타내는 수치임. 1차 FACS를 통해 증폭된 p2 population을 이용하여 2차 FACS를 통한 sorting을 진행하였음. 2차 FACS 후에 sorting 된 yeast clone 들은 회복 과정과 증폭과정을 통해 충분한 population 확보 후에 FACS 분석하였음. 2차 FACS 선별 후에 Sorting 된 library 중 1.0×10^5 개의 yeast clone을 FACS를 이용하여 분석한 결과 0.5%의 p2 gating구역의 population을 확인할 수 있었음. 이는 1차 FACS 전에 p2 population과 비교 시 12배 이상의 증폭을 나타내며, 1차 FACS 후에 p2 population과 비교 시 5배 이상의 증폭을 나타냈음. 총 2차에 걸친 FACS를 이용한 항원 특이적 VLR clone의 선별을 완료 했으며 sorting 된 yeast를 이용하여 single isolation 후 개별적인 screening을 진행하였음. 무작위로 선별된 50여개의 single clone을 PCR 증폭 후 VLR-B DNA 서열을 분석한 결과, 중복된 clone을 제외하고 총 2개의 clone이 선별되었음. 선별된 clone은 각각 VLRB.AIVHA_31, VLRB.AIVHA_91 이며 아래에 나타내었음. 선별된 clone을 이용하여 FACS를 기반으로 한 이중형광 염색을 진행하였음. 재조합 VLR 단백질의 yeast 표면 발현을 확인하기 위한 형광항체인 FITC와 항원과의 특이적 반응을 확인하기 위한 형광항체인 Alexa 555의 반응을 모두 나타내는 double-positive한 군집 (우측 상위 사분할)의 형성을 통하여 선별된 single clone의 항원에 대한 선택적 반응성을 나타내었음. negative control로 사용된 VLR clone인 VLRB.mV2_NT에 대비하여, 선별된 2종의 clone은 double-positive한 군집의 확연한 증가를 나타내었으며, 이는 Yeast 의 표면에 발현된 각각의 단일종류의 VLR 단백질이 표적항원을 인식하여 결합하였고, 이중형광 염색의 확연한 양성 결과를 나타냄.

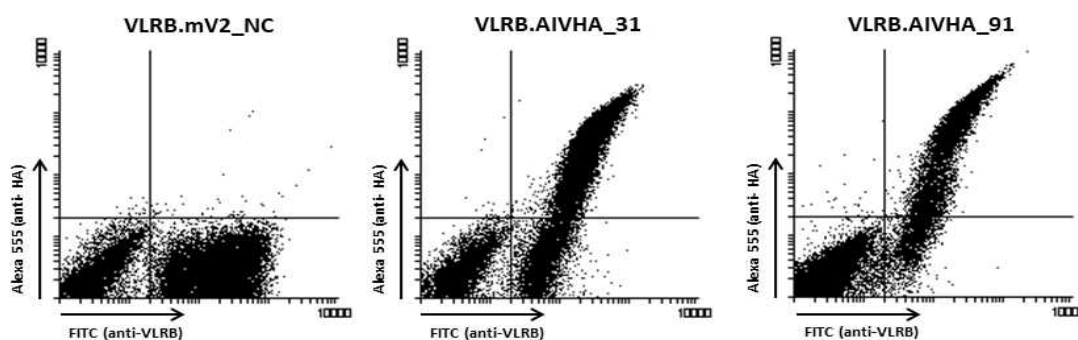
MACS sorting



FACS sorting



VLRB single isolation



VLRB sequence alignment

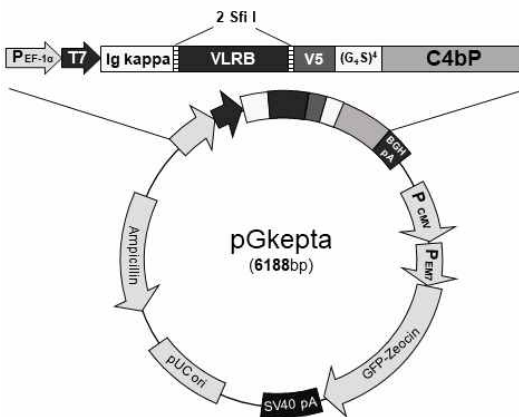
```

< LRRNT >      < LRR 1 >      < LRR V1 >      < LRR V2 >
>VLRB.AIVHA_31  CPSRCS CSGTELCRCYGKGLTSVPTGIPASTT YLDLGANKFQSIHPGVFD KLTQLTYLRLDYNQLQSLPSGVFD KLTSLTFLLDLDGNKQSLPHGVFD
>VLRB.AIVHA_91  CPSRCS CSGTTVNCAVEGLTSVPSGIPASTT  YLTLYENKLQSLPSGVFD KLTSLTQLYLGGNKLQSLPSGVFD KLTQLKELHLYNNQLQSLPSEVFD
>VLRB.mV2_NC    CPSRCS CSGTINVYCNSKGLTAVPTGISASTT  YLSFEDNKQLQSLPRGVFD KLSKLTHELEQRNQLQSLPHGVFD KLTQLTKLELDNNKQLQSLPHGVFD
***** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

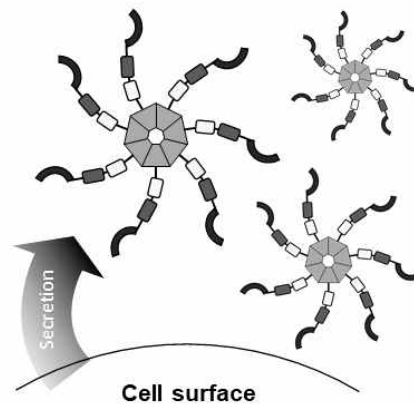
< LRR V3 >      < CP >          < LRRCT >
>VLRB.AIVHA_31  KLTKLTALSLDNNQLKSIIPQGMFD NLKLNVIYLFNPN WDCTCPGIHYLSEWIRKNSGIVYYTGTSSSVVQPDSAKCSGSGKPVRSIICP
>VLRB.AIVHA_91  RLTSLQYIYLYNNPLKSVDPDGIFD RLTSLQYIYLYSNP WDCTCPGIHYFSEWINKHSG-VLIGTSGVNV--PDSAKCSGSGKPVRSIICP
>VLRB.mV2_NC    KLTKLTLLLYNNQLKSVDPDGIFD RLTSLQYIYLYNNP WDCTCPGIRYLSWINKHSG-VVNVAYGRAT--PDSAKCSGSGKPVRSIICP
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

선별된 2종의 항원 특이적 VLRB clone의 생산에 있어서 생산숙주의 호환성 및 확장성 검증을 위하여 HEK-293F 세포주를 사용하였음. 각각의 항원 특이적 VLRB 유전자를 yeast 표면 발현용 벡터인 pYD8 vector로부터 HEK-293F 세포 분비 발현 벡터인 pGkepta vector로 이동시켰음. 두 벡터간 공유된 Sfi I 부위를 cloning 위치로 이용하여 유전자의 손실 및 변이의 위험 없이 직접적인 유전자 이동을 진행하였음. 이 벡터는 아래에 보여진 바와 같이 Ig κ 유전자 다음으로 VLR 유전자 도입을 위한 두 개의 Sfi I 부위가 존재하며, Western blotting 및 순수 분리/정제를 위해 V5 epitope이 링크되어 있으며 CMV promoter 보다 강력한 프로모터로 알려진 elongation factor 1a (EF-1a) promoter 에 의해 발현이 조절되도록 디자인하였음. 각각의 VLR 유전자가 클로닝된 pDNA들을 293 세포주에 transfection 시키고 48 시간 경과 후 GFP 단백질의 발현으로 transfection이 높은 효율로 이루어 졌음을 확인하였음. 각각의 상층액을 수확하여 항원 특이적 ELISA 분석과 항원 특이적 immunoblot 분석을 진행 하였으며 아래에 나타내었음. ELSIA분석과 immunoblot 분석 모두에서 control로 사용된 다른 항원(H6N2; A/Chicken/Korea/ KBU0084, H4N2; A/Chicken/Korea/VI1410583)에 대비하여 H9N2 (A/Chicken/Korea/MS96/96)에 높은 항원 특이성을 보였으며 이는 선별된 2종의 항원 특이적 VLRB clone이 HEK-293F 세포주에서 생산될 시에도 VLRB 단백질의 항원 특이적 특성이 그대로 보존되며 생산숙주의 호환성 및 확장성 검증을 뒷받침해주는 결과로 사용될 수 있음.

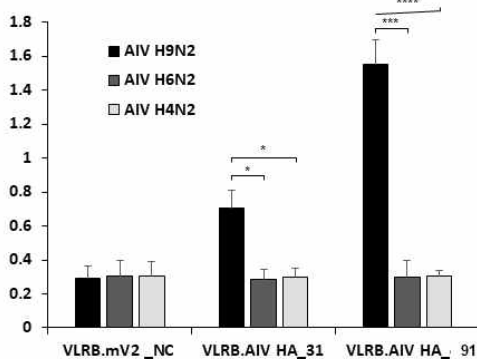
Vector map of pGkepta



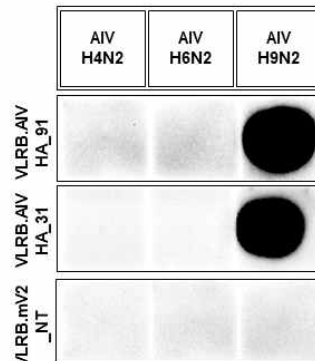
Schematic expression pattern



ELISA



Immunoblotting



(나) 유효먹장어항체 및 유효농도 선정 후 안전성 평가 (SPF 닭 및 일반 산란계)

① 개발된 먹장어항체 중 유효 먹장어항체를 선정하고 환경에서의 유효농도 선정

앞선 실험에서 선정된 AIV 특이적 먹장어항체를 이용하여 chicken egg를 감염 시킬 수 있는 AIV를 얼마나 중화시키는지 테스트해보기 위해 Egg inoculation method를 실시하였다. 총 3번의 in vitro 실험을 실시하였으며 국내 분리 H9N2 AIV에 대한 총 13 종류의 먹장어 항체 효능평가를 테스트하였다.

- 먹장어 항체 13 종류: m38, 1-1, 1-31, 2-41, 3-14, 3-29, 3-71, m74, m76, v125, 166, h2-18, h2-94
- HA역가는 2⁴ - 2⁸의 범위를 나타냄

AIV를 단계별로 희석하여 집중한 농도별 9 개의 SPF 계란에서 7 - 9개의 계란에서 HA농도 검출하였다. 하지만, 발굴된 먹장어 항체 13종류에 대한 중화능을 평가한 결과 3 종류에 대해서는 현재도 계속 실험이 진행 중이나 현재까지 진행된 10종류에서는 아직은 국내 저병원성 AIV(H9N2)에 대한 충분한 중화능을 보이지 않고 있음. 가장 가능성이 보이는 것으로 사료되는 VLR 94는 보다 높은 농도에서 중화반응을 테스트해 보려고 준비 중.

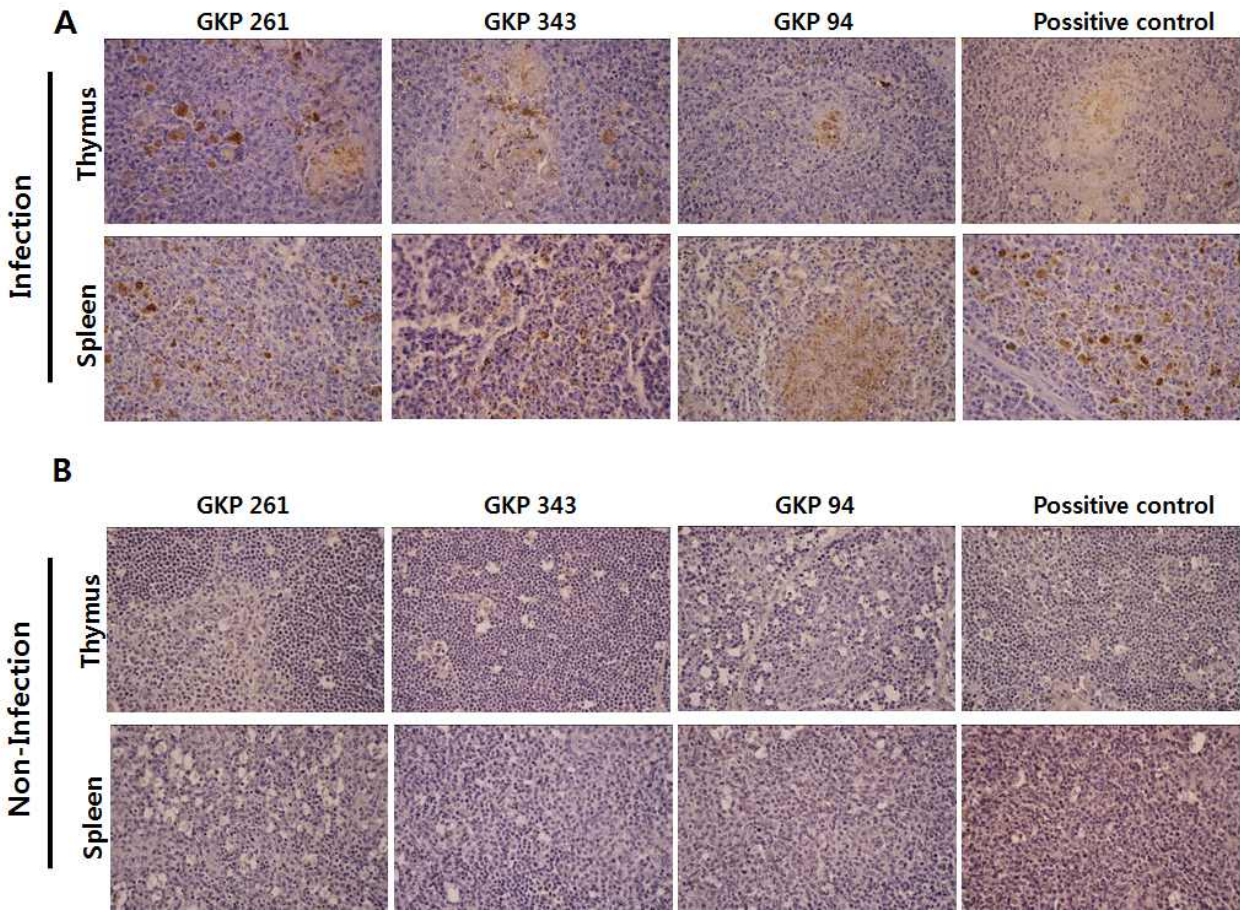
VLR clones	HA 30 minutes incubation	Egg 1	(2 [^])	Egg 2	Egg 3		
		Dead day	HA	Dead day	HA	Dead day	HA
VLR 125	5	>5	5	>5	4	>5	5
VLR 166	5	4	4	>5	4	5	5
VLR 18	5	>5	5	>5	4	>5	5
VLR 94	5	4	4	>5	5	>5	4
Negative control	0	>5	0	>5	0	>5	0
Positive control	7	>5	5	5	5	>5	5

AIV 특이적 먹장어 항체의 바이러스 중화반응

② 조류 독감 바이러스 특이적 먹장어 항체를 이용한 조류 조직의 면역조직화학염색

조류독감 바이러스에 반응하는 먹장어 특이항체들의 반응성 및 특이성을 검증하기 위하여 조류독감 바이러스를 감염시킨 조류의 조직을 이용하여 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry)을 진행하고 조류독감바이러스의 감염여부를 진단 할 수 있는지 실험을 진행함. 인위적으로 감염시킨 개체와 감염되지 않은 개체로부터 흉선(Thymus)과 비장(Spleen) 조직을 이용하여 파라핀 슬라이드를 제작하여 먹장어 특이항체 GKP94, GKP261, GKP343, 그리고 양성대조군으로 사용될 조류독감바이러스 양성혈청을 1차 antibody로 사용함. 먹장어 항체를 사용한 실험군에서는 먹장어항체에 특이적인 단클론항체 (11G5)를 반응시켰으며 그 후 2차 antibody (HRP)처리 한 후 DAP으로 발색하여 현미경으로 확인하였음. 각각의 반응성을 양성 대조군 및 음성대조군과 비교함으로써 조직에서의 조류독감바이러스에 대한 먹장어 항체의 반응성을 확인하였음. 조류독감바이러스를 감염시킨 개체에서 흉선과 비장조직에서 GKP94, GKP261, GKP343 모두 양성 대조군과 비교하였을 때 갈색으로 발색된 부분을 확연히 관찰되었으며, 조직에서의 조류독감바이러스와도 반응성이 있는 것으로 나타남(A). 반면 음성 대조군으로 사용된 감염되지 않은 개체에서 분리된 흉선과 비장조직은 GKP94, GKP261,

GKP343, 양성혈청 모두에서 반응성을 나타내지 않았음(B).



(다) 떡장어항체 Epitope 확인 방법 개발 및 정립

① 떡장어 항체 생산에 사용된 HA antigen expression을 위한 gene synthesis

㉞ Source of recombinant HA antigens

- Influenza A H9N2 (Hong Kong/G9/97)의 HA1 subunit으로 N terminal 331 amino acid 부분을 recombinant protein 형태로 제작되어짐 (Cat No: 40036-V08H1, Sino Biological Inc., China).

● Whole DNA sequence for HA antigen expression:

```
ATGAAGGCTGTACCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGACAAAATC
TGCATCGGCTACCAATCAACAACTCCACAGAAACCGTAGACACGCTAACAGAAAACAATGTT
CCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCACAATGGGATGCTGTGTGCAACAAAT
CTGGGACGTCCTTATTCTAGACACTTGCACCATTGAAGGACTGATCTATGGCAACCCTTCT
TGTGATCTACTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGTCGAAAGACCATCGGCTGTTAA
TGGAATGTGTTACCCCGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTAAGGTCATTTTTTTAGTTCTG
CTAGTTCCTACCAAGAATCCAGATCTTCCAGACACAATCTGGAATGTGTCTTACAGTGGAA
CAAGCAAAGCATGTTTCAGATTCATTCTACAGGAGCATGAGATGGTTGACTCAAAGAACAACG
CTTACCCTATTCAAGACGCCCAATACACAAATAATAGAGGAAAGAGCATTCTTTTCATGTGGG
```


GCATAAATCACCCACCTACCGATACTGCACAGACAAATCTGTACACAAGGACTGACACAACAA
CAAGTGTGGCAACAGAAGATATAAATAGGACCTTCAAACCAGTGATAGGGCCAAGGCCCTTG
TCAATGGTCTGCAGGAAGAATTGATTATTATTGGTCGGTATTGAAACCAGGTCAGACATTG
CGAGTAAGATCCAATGGGAATCTAATCGCTCCATGGTATGGGCACATTCTTTTCAGGAGAGAGC
CACGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAACAGTGGTAGCTGTGTAGTGCAATGTCAAACAGAA
AGAGGTGGCTTAAATACTACTTTGCCATTCCACAATGTCAGTAAATATGCATTTGGAAACTGC
CCAAAATATGTTGGAGTAAAGAGTCTCAAACCTGGCAGTTGGTCTGAGGAATGTGCCTGCTAG
ATCAAGTAGA

● **Amino acid sequence of recombinant HA antigen:**

MKAVPLITILLVVTASNADKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPTVTHAKELLHTEHNGMLCATNLGR
PLILDTCIEGLIYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPSAVNGMCPGNVENLEELRSFFSASSYQRIQIF
PDTIWNVSYSGTSKACSDSFYRSMRWLTQKNNAYPEIQDAQYTNNRGKSILFMWGINHPPTDTAQT
NLYTRTDTTTSVATEDINRTFKPVIGPRPLVNLQGRIDYYWSVLKPGQTLRVRNNGNLIAPWYGHI
LSGESHGRILKTDLNSGSCVVQCQTERGGLNTTLPFHNVSKYAFGNCPKYVGVKSLKLAVGLRNVP
ARSSR

Molecular weight: 37 KDa.

② **Recombinant protein 생산을 위한 국내 AIV H9N2 분리 균주 이용**

㉞ **국내 분리 균주 확보 및 cloning**

- 제 2 세부 충북대로부터 국내 AIV H9N2 분리 균주 (AIV 01310)를 확보하여 HA1 subunit을 PCR2.1 cloning vector를 이용하여 성공적으로 cloning 하였음.

㉟ **AIV 01310 HA1 sequencing 및 Hong Kong G9/97과 시퀀스 비교**

- PCR 2.1 plasmid에 insertion 된 AIV 01310 HA1 sequence를 cloning site 양쪽에 존재하는 M13 F/R primer를 이용하여 DNA sequencing을 수행.

- Sequence Alignment 결과 일치하지 않는 부분이 많으므로 epitope typing을 위한 fragmented peptide 생산에 부적합한 것으로 결론 지음.



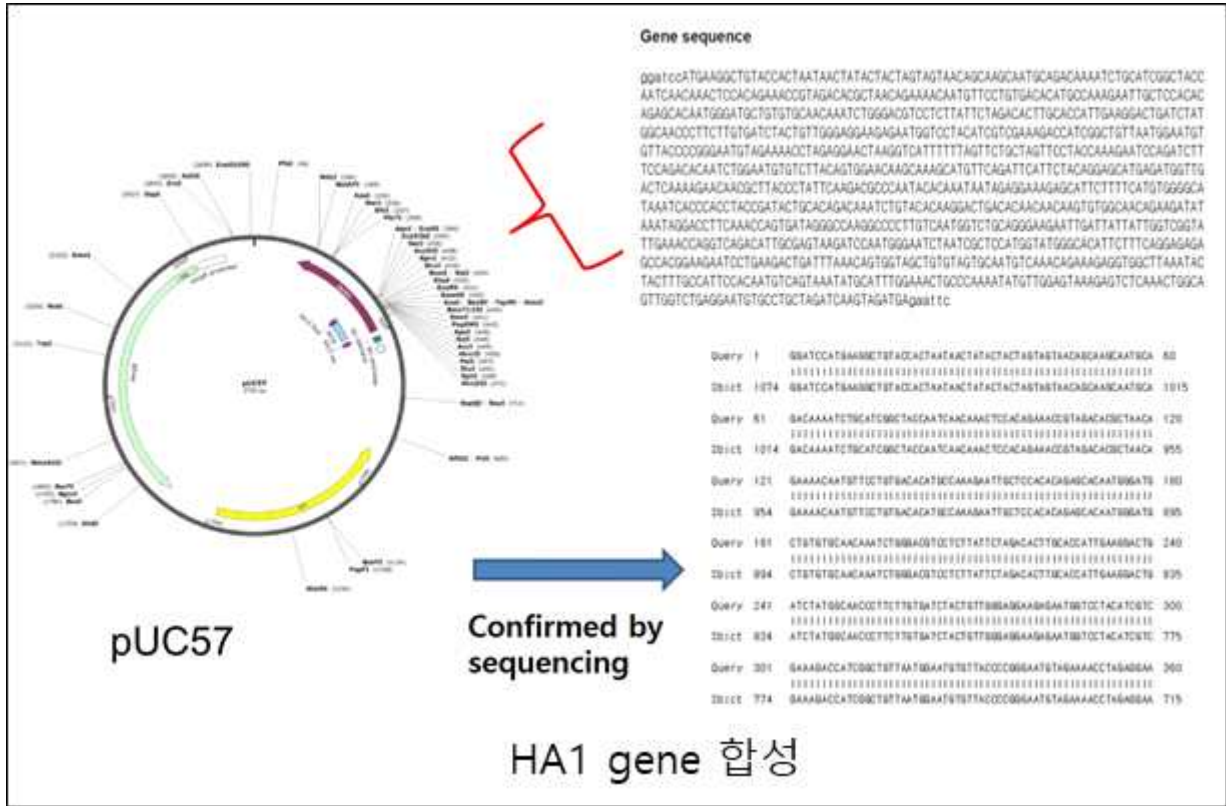
③ Influenza A H9N2 (Hong Kong/G9/97)의 HA1 gene synthesis

㉞ 해외로부터 gene construct 수입

- HA 생산 업체인 Sino Biological Inc.로부터 cDNA 또는 expression plasmid 수입을 추진하였으나, Sino Biological Inc. 측에서 plasmid 제작에 실패함.

㉟ 국내에서 gene 자체 합성

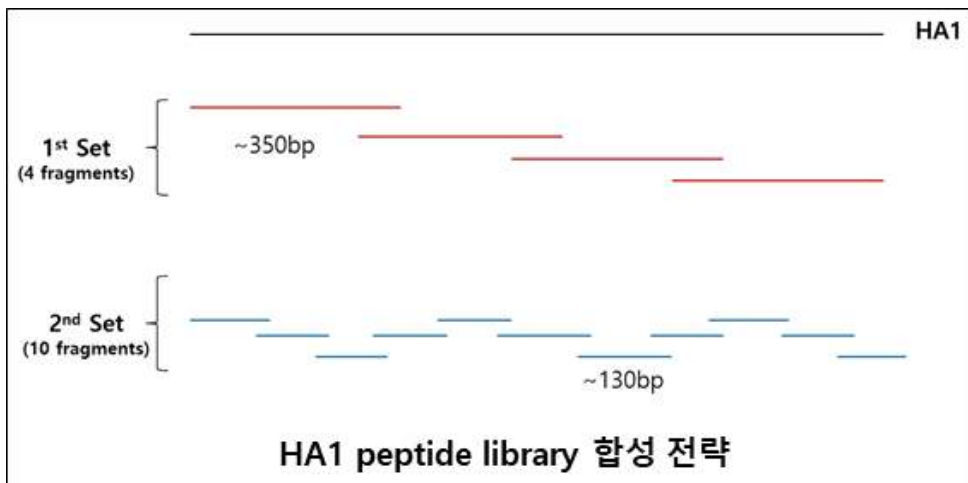
- 확보한 시퀀스 정보를 이용하여 자체 합성
 - 확보한 시퀀스를 바탕으로 gene을 합성하여 pUC57 cloning vector에 insertion 시킴. MUC13 F/R primer를 이용하여 insertion 된 시퀀스 정보를 시퀀싱 기술로 확인하여 기존의 알려진 시퀀스와 비교하여 확인 함.



④ 합성된 HA1 gene을 이용하여 fragmented peptide library 구축

㉞ 전략

- HA1 recombinant protein 합성에 사용되어진 시퀀스를 mid size 및 short size 두 그룹으로 나누어 아래 그림과 같이 overlapping하는 연속된 peptide로 발현 시켜 epitope site가 존재 하는 부위를 특정할 수 있도록 디자인 함. 먹장어 항체가 준비 되었을 시, 먼저 mid size fragments와 반응시켜 binding site를 확인 후, 해당하는 mid size fragment를 더욱 짧게 나누는 short size fragment와 반응시켜 최종 epitope 부위를 100 - 130 DNA bp (30 - 40 amino acids)의 짧은 구간으로 한정시킴.



Ⓢ Cloning 및 protein expression

- Cloning

- Expression Vector : pET30a의 multi-cloning site에 partial cloning 된 HA1 cDNA를 삽입시켜 C-terminal His-tag이 달린 linked protein 형태로 발현되도록 디자인.
- 1st Set (각각의 fragment가 약 300 bp DNA 를 포함하도록 디자인)
 - HA300-1 (plasmid 내 linked protein expression region. 굵은 글씨 부분 (대문자)은 HA partial sequence)

```
Atgcaccatcatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca  
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccATGAAGGCTGTACCACTAAT  
AACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGACAAAATCTGCATCGGCTACCAATCAAC  
AAACTCCACAGAAACCGTAGACACGCTAACAGAAAACAATGTTCTGTGACACATGCCAAAGA  
ATTGCTCCACACAGAGCACAATGGGATGCTGTGTGCAACAAATCTGGGACGTCCTCTTATTC  
TAGACACTTGCACCATTGAAGGACTGATCTATGGCAACCCTTCTTGTGATCTACTGTTGGGA  
GGAAGAGAATGGTCCTACATCGTCGAAAGACCATCGGCTGTTAaagcttgcggccgactcgagcaccac  
caccaccactgagatccggtgctaa
```

- HA300-2

```
Atgcaccatcatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca  
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccTACATCGTCGAAAGACCATC  
GGCTGTTAATGGAATGTGTTACCCCGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTAAGGTCATTTT  
TTAGTTCTGCTAGTTCTACCAAGAATCCAGATCTTCCAGACACAATCTGGAATGTGTCT  
TACAGTGAACAAGCAAAGCATGTTTACAGATTCTACAGGAGCATGAGATGGTTGACTCA  
AAAGAACAACGCTTACCCTATTCAAGACGCCAATACACAAATAATAGAGGAAAGAGCATTCT  
TTTCATGTGGGGCATAAATCACCCACCTACCGATACTGCACAGAAaagcttgcggccgactcgagcaccac  
ccaccaccactgagatccggtgctaa
```

- HA300-3

```
Atgcaccatcatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca  
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccGGCATAAATCACCCACCTAC  
CGATACTGCACAGACAAATCTGTACACAAGGACTGACACAACAACAAGTGTGGCAACAGAAGA  
TATAAATAGGACCTTCAAACCAGTGATAGGGCCAAGGCCCTTGTCAATGGTCTGCAGGGAA  
GAATTGATTATTATTGGTCGGTATTGAAACCAGGTCAGACATTGCGAGTAAGATCCAATGGG  
AATCTAATCGCTCCATGGTATGGGCACATTCTTTCAGGAGAGAGCCACGGAAGAATCCaagcttg  
cggccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggtgctaa
```

- HA300-4

```
Atgcaccatcatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca  
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccATTCTTTCAGGAGAGAGCCA
```

CGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAACAGTGGTAGCTGTGTAGTGCAATGTCAAACAGAAA
GAGGTGGCTTAAATACTACTTTGCCATTCCACAATGTCAGTAAATATGCATTTGGAAACTGC
CCAAAATATGTTGGAGTAAAGAGTCTCAAACCTGGCAGTTGGTCTGAGGAATGTGCCTGCTAG
ATCAAGTAGAaagcttgcgccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaa

● 2nd Set (각각의 fragment가 약 100 bp DNA 를 포함하도록 디자인)

- HA100-1

Atgcaccatcatcatcatcattcttctggctctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccATGAAGGCTGTACCACTAAT
AACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGACAAAATCTGCATCGGCTACCAATCAAC
AACTCCACAGAAACCGTAGACACGCaagcttgcgccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggct
gctaa

- HA100-2

Atgcaccatcatcatcatcattcttctggctctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccGTAGACACGCTAACAGAAAA
CAATGTTCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCACAATGGGATGCTGTGTG
CAACAAATCTGGGACGTCaagcttgcgccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaa

- HA100-3

Atgcaccatcatcatcatcattcttctggctctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccCTGGGACGTCCTCTTATTCT
AGACACTTGCACCATTGAAGGACTGATCTATGGCAACCCTTCTTGTGATCTACTGTTGGGAG
GAAGAGAATGGTCTACATCGTCGAAAGACCACaagcttgcgccgactcgagcaccaccaccaccactg
agatccggctgctaa

- HA100-4

Atgcaccatcatcatcatcattcttctggctctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccGAAAGACCATCGGCTGTTAA
TGGAATGTGTTACCCCGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTAAGGTCATTTTTTAGTTCTG
CTAGTTCCTACCAAAGAATCCaagcttgcgccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaa

- HA100-5

Atgcaccatcatcatcatcattcttctggctctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagccc
agatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccCAAAGAATCCAGATCTTTCCAGACACAATCT
GGAATGTGTCTTACAGTGGAACAAGCAAAGCATGTTTACAGATTCTTACAGGAGCATGAGATG
GTTGACTCAAaagcttgcgccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaa

- HA100-6

Atgcaccatcatcatcatcattcttctggctctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccTTGACTCAAAGAACAACGC

TTACCCTATTCAAGACGCCCAATACACAAATAATAGAGGAAAGAGCATTCTTTTCATGTGGG
GCATAAATCACCCACCTACCGaagcttgcgccgcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaa

- HA100-7

Atgcaccatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccCCACCTACCGATACTGCACA
GACAAATCTGTACACAAGGACTGACACAACAACAAGTGTGGCAACAGAAGATATAAATAGGA
CCTTCAAACCAGTGATAGGGCaagcttgcgccgcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaa

- HA100-8

Atgcaccatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccGTGATAGGGCCAAGGCCCT
TGTC AATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTTCGGTATTGAAACCAGGTCAGACAT
TGCGAGTAAGATCCAATGGGAATCaagcttgcgccgcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgct
aa

- HA100-9

Atgcaccatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccAATGGGAATCTAATCGCTCC
ATGGTATGGGCACATTCTTTTCAGGAGAGAGCCACGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAACA
GTGGTAGCTGTGTAGTGCAATGTCAAACAGAAAGAGGTGGCTTAAaagcttgcgccgcactcgagcac
caccaccaccactgagatccggctgctaa

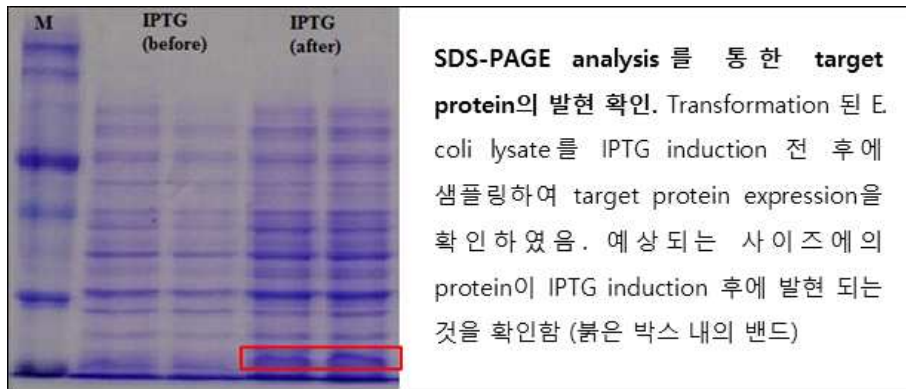
- HA100-10

Atgcaccatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctggtatgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcaca
tggacagcccagatctgggtaccgacgacgacgacaaggccatggctgatatcggatccGGTGGCTTAAATACTACTTT
GCCATTCCACAATGTCAGTAAATATGCATTTGGAACTGCCAAAATATGTTGGAGTAAAGA
GTCTCAAACCTGGCAGTTGGTCTGAGGAATGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGaagcttgcgccgcac
tcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaa

- Sequencing을 통하여 모든 cloning이 정확히 수행되었음을 확인하였음.

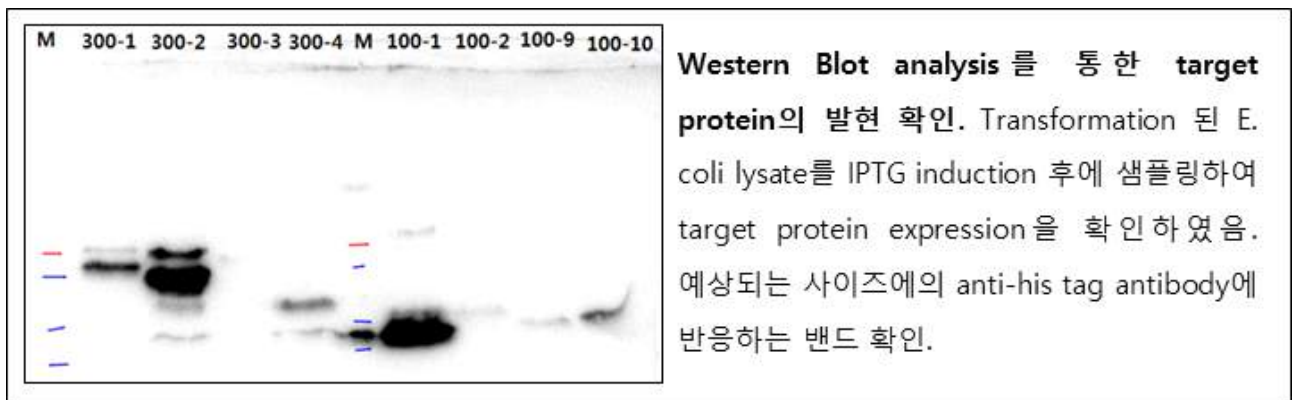
㉞ **Recombinant protein expression**

- 방법: Cloning된 plasmid를 expression host (E. coli BL21DE3)에 Transformation 시킨 후 IPTG를 이용한 conventional recombinant protein expression protocol에 따라 연구 수행
- Protein expression 확인: SDS-PAGE 후 Staining을 통하여 expected size protein의 발현을 확인 함.



㉔ Confirmation of the expressed proteins as designed by Western blot analysis

- Sequence analysis: 모든 cloned plasmid를 DNA sequencing 후 확인 함.
- Anti-his tag antibody를 이용한 Western blot analysis: 모든 recombinant protein은 C-terminal end에 his-tag과 link 되어 expression 되게 디자인 됨. 만일 reading frame에 오차가 없을 경우 원하는 사이즈에 his-tag이 달린 프로테인이 존재 하게 됨. 이를 antibody를 이용하여 Western Blot으로 확인 함.



㉕ 먹장어 항체 특이성 확인을 위한 Western blot 실험 방법 개발 및 정립

㉔ 전략: 제 1, 2 세부에서 효과적인 AIV 먹장어 항체 개발 전 항체 특이성을 확인 할 수 있는 실험 방법 개발. 현재 먹장어 항체를 Direct로 확인 할 수 있는 western blot 시스템이 없으므로, 먼저 먹장어 항체를 인식할 수 있는 mouse antibody를 이용하여 indirect 방법으로 개발. 또한 AIV 특이 먹장어 항체 개발 이전이므로 이미 개발된 anti-VHS virus 먹장어 항체를 이용하여 실험 방법 개발.

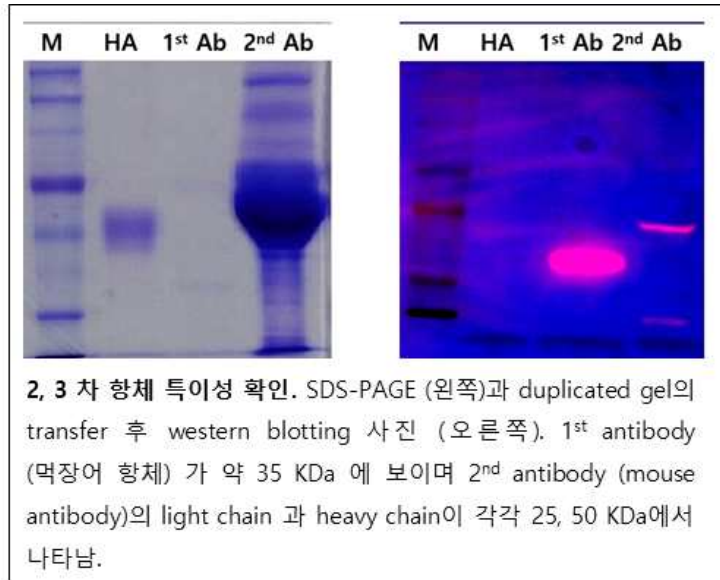
㉔ 먹장어 항체 항원 특이성 확인을 위한 western blot analysis system 개발

- 항원 및 항체
 - 항원: purified VHS virus
 - 1st antibody: 먹장어 anti-VHS virus antibody
 - 2nd antibody: Mouse anti-먹장어항체 antibody

- 3rd antibody: Goat anti-mouse IgG antibody (HRP-conjugated)

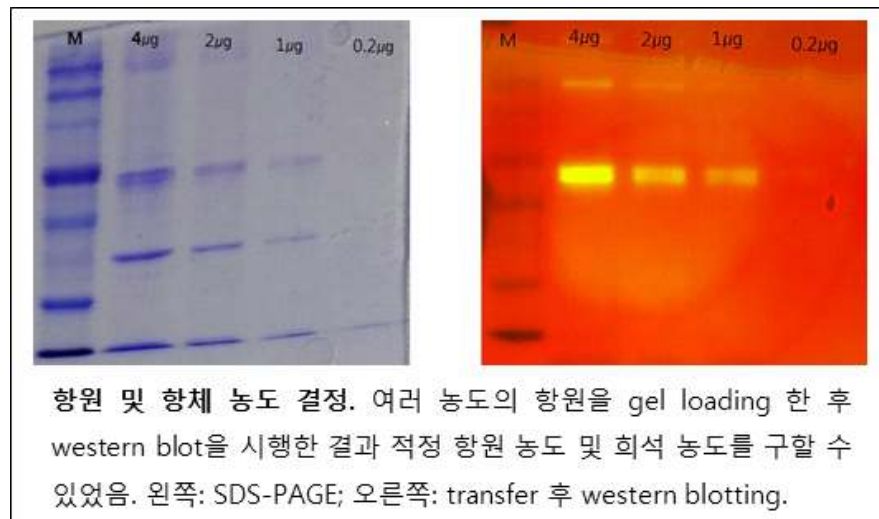
3-2-2. 항체 특이성 확인

- 1 차 항체 및 2 차 항체와 - control (HA)를 gel에 running 한 후 nitrocellulose membrane에 transfer 한 후 2, 3 차 항체를 차례로 binding 시킨 후 developing. 이 실험은 2, 3 차 항체가 차례대로 1, 2 차 항체에 반응하는지를 확인하기 위한 실험임.
- 실험 결과 아래 그림과 같이 정상적으로 반응함을 확인할 수 있었음.



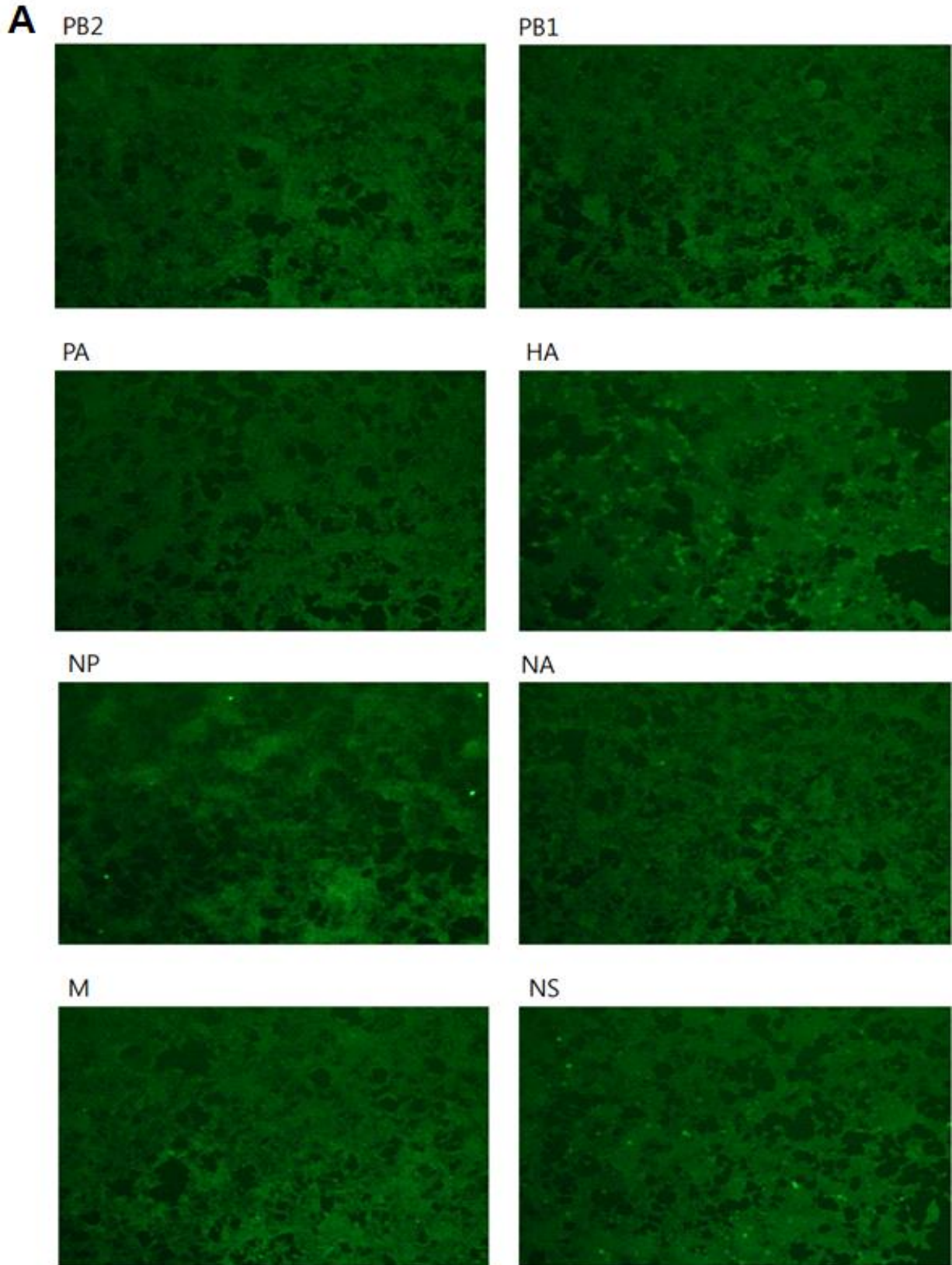
- 항원 항체 적정 농도 확인

- 다음 그림과 같이 여러 농도의 항원과, 여러 희석 농도의 항체로 실험한 결과 항원의 경우 2ug, 항체의 경우 각각 5-10 배수 희석하여 사용하였을 때 좋은 결과를 나타냄.

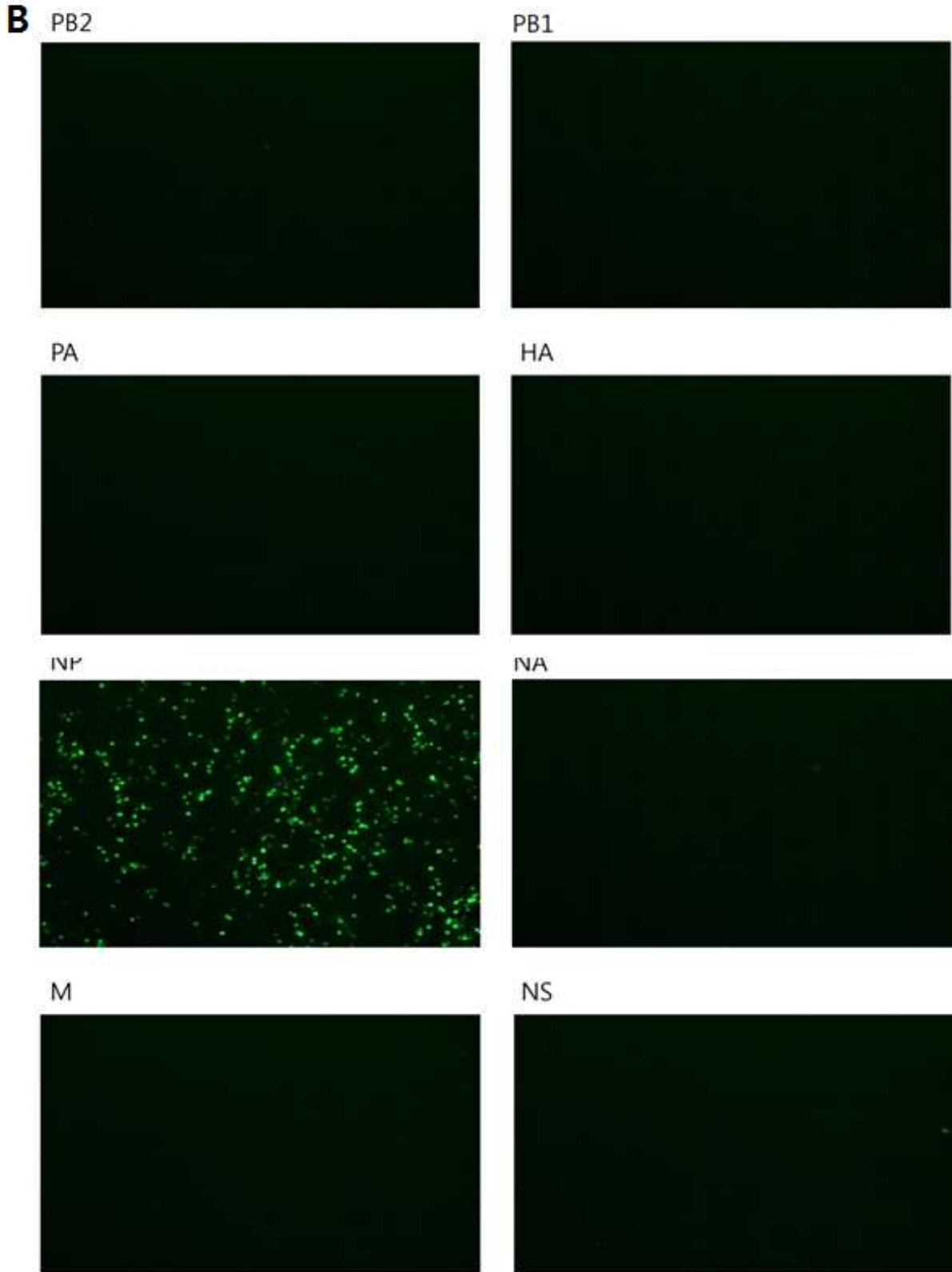


⑥ 먹장어 항체별 binding epitope sites 규명 및 affinity 차이 비교

조류독감 바이러스에 특이적으로 결합하는 먹장어 항체 발굴 과정을 통해 선별된 특이항체들의 조류독감바이러스에 대한 특정 결합 부위 및 정확한 epitope을 탐색하기 위한 목적으로 Epitope mapping을 진행하였음. AI virus의 PR8 plasmid 유전자 (8 segment; PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS)를 293T 세포에 개별적으로 재조합 단백질로 발현시켜 immunofluorescence assay를 진행하였음. 24 well의 각 well에 PR8 plasmid 각각의 유전자를 293T cell에 transfection한 후 단백질을 발현시킨 세포를 고정하여 먹장어 항체 4종 (#94, #261, #343, #18)과 PR8 control Mouse serum을 1차 antibody로 사용하였음. 먹장어 항체를 사용한 실험군에서는 먹장어항체에 특이적인 단클론항체 (11G5)를 반응 시켰으며 그 후 2차 antibody (mouse IgG-FITC)처리 한 후 형광현미경으로 확인하였음. 각각의 반응성을 양성대조군과 비교함으로써 조류독감 바이러스와 각 항체의 정확한 결합부위를 찾아내기 위해 진행함.



위 그림은 양성대조군으로 사용한 PR8 mouse 혈청으로 각각의 PR8 단백질들을 발현한 모든 293T 세포에 전반적으로 밝은 형광으로 염색되는 결과를 확인할 수 있었음.



먹장어 항체 GKP 18을 사용한 실험군에서 각각의 PR8 gene을 발현한 293T세포중 NP(Nucleoprotein)을 발현한 세포에만 특이적으로 반응하여 staining 되는 결과를 확인하였으며 3번의 독립적 실험을 통해 GKP 18 항체는 인플루엔자 NP단백질과 특이적으로 binding하는 것으로 확인됨.

C PB2



PB1



PA



HA



NP



NA



M



NS



먹장어 항체 GKP 94을 사용한 실험군에서 각각의 PR8 gene을 발현한 293T세포중 어떠한 유전자를 발현한 세포에도 반응성을 보이지 않으며 독립적인 3번의 실험을 통해 GKP 94은 본 실험에서 음성의 결과를 보임.

D PB2



PB1



PA



HA



NP



NA



M



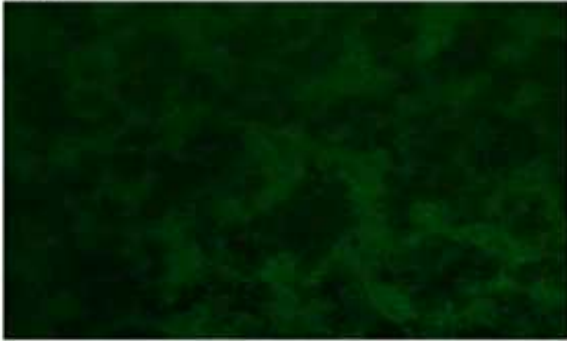
NS



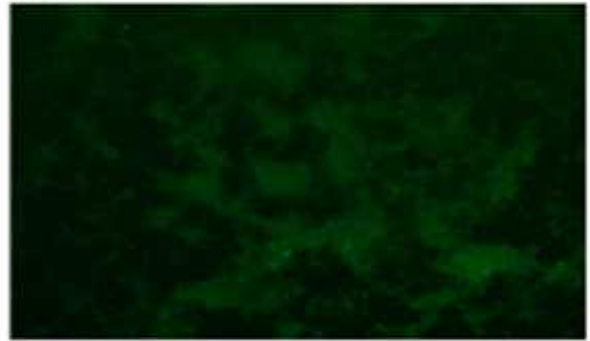
먹장어 항체 GKP 261을 사용한 실험군에서 각각의 PR8 gene을 발현한 293T세포중 어떠한 유전자를 발현한 세포에도 반응성을 보이지 않으며 독립적인 3번의 실험을 통해 GKP 261은 본 실험에서 음성의 결과를 보임.

E

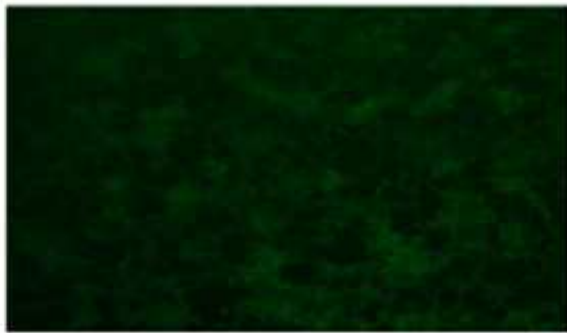
PB2



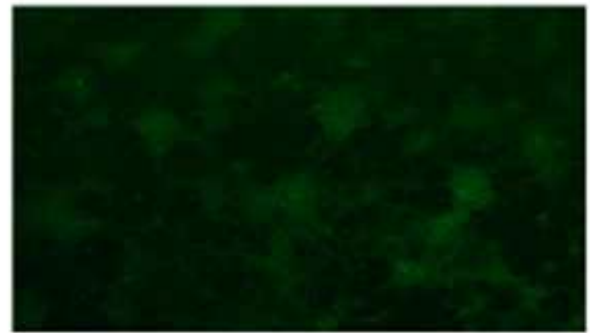
PB1



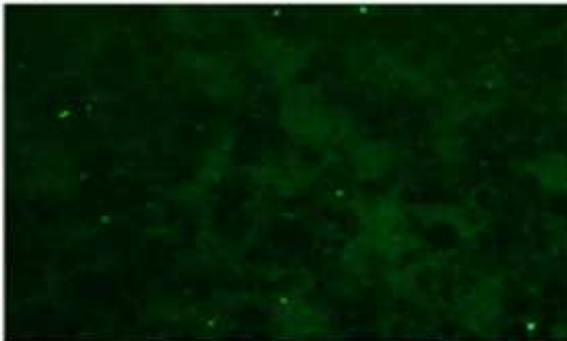
PA



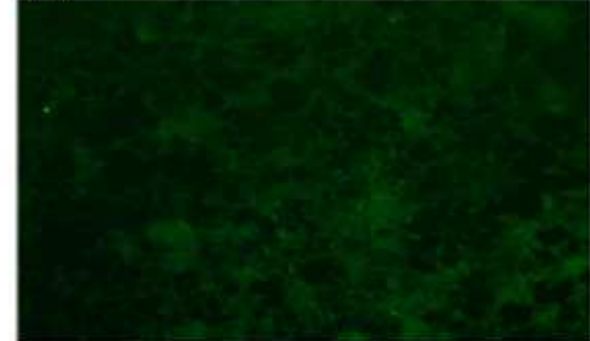
HA



NP



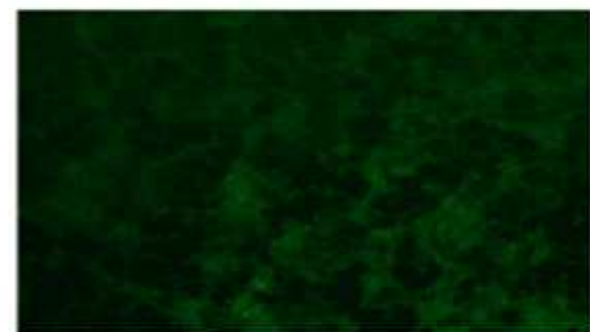
NA



M



NS



먹장어 항체 GKP 343을 사용한 실험군에서 각각의 PR8 gene을 발현한 293T세포중 모든 세포에서 반응성을 보였으며 독립적인 3번의 실험을 통해 #343은 본 실험에서 non-specific, 즉 비특이적 반응성을 보이는것으로 확인됨.

(라) AIV에 특이항체 (떡장어항체) pilot 생산을 위한 배양조건 최적화

① 다양한 yeast에 따른 발현량 조사

먼저, *Pichia pastoris*와 *H. polymorpha*에서의 발현을 확인하기에 앞서 다음과 같은 연구수행방법으로 접근해보고자 함.

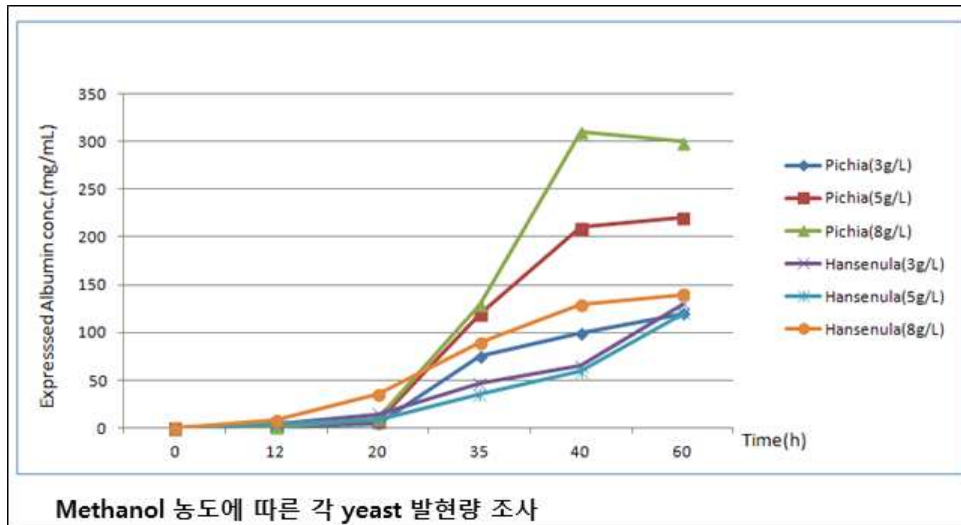
Methanol 농도에 따른 발현량 조사

methanol inducer의 induction 시기가 발현에 미치는 영향 확인

*Pichia pastoris*에서 pH에 따른 albumin 발현양상 확인

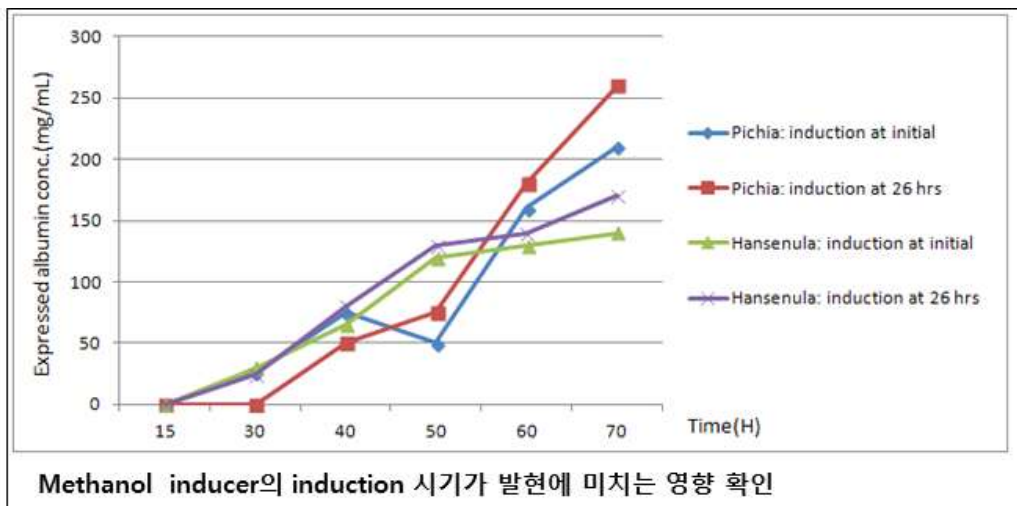
㉞ Methanol 농도에 따른 발현량 조사

각 yeast 들을 메탄올 농도별로 알부민 발현량을 비교함. *Pichia*가 *Hansenula*보다 전체적으로 발현량이 높았으며 *Pichia* 경우 8g/L가 3g/L에 비해 60시간에서 3배 가량 많이 발현되는 것으로 파악됨.



㉞ methanol inducer의 induction 시기가 발현에 미치는 영향 확인

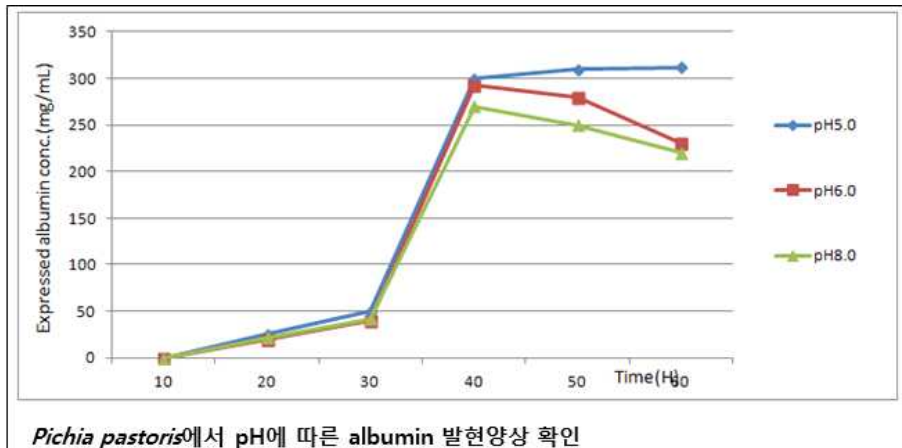
Exponential growth stage 후 O.D. 약 0.4 정도에서 induction 시켰을 때 albumin 발현량이 높은 것을 확인 할 수 있음.



② 물리적 환경 (pH, 온도, 교반속도 등)의 최적화

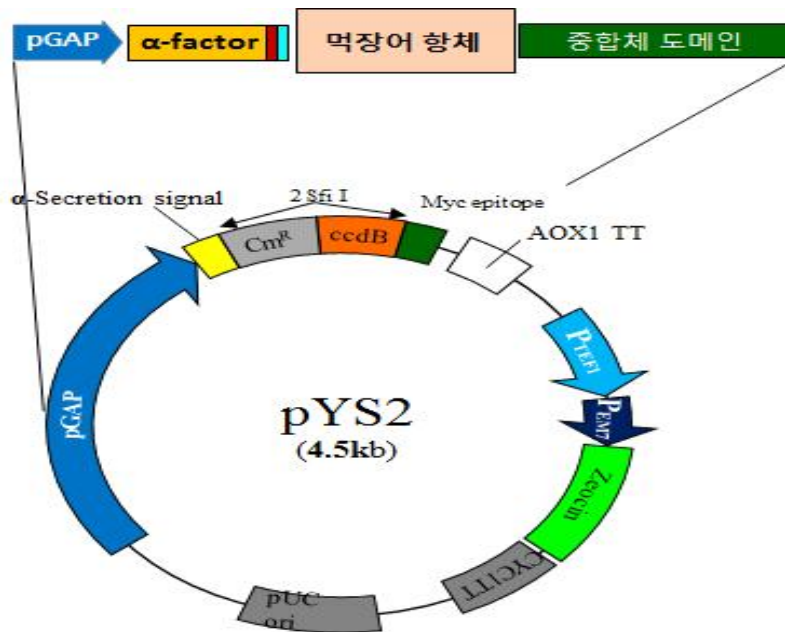
- *Pichia pastoris*에서 pH에 따른 albumin 발현양상 확인
pH 5, 6, 8에서 albumin 발현량은 큰 차이는 없었지만 pH 5.0에서 약간 높은 발현 양상을 보임.
- 온도 및 교반속도와 같은 다른 물리적 환경 최적화 실험은 현재 진행 중임.

③ 생물학적 환경 (배지조성, 균체제어 등) 조건들의 분석을 통한 발현량 최적화



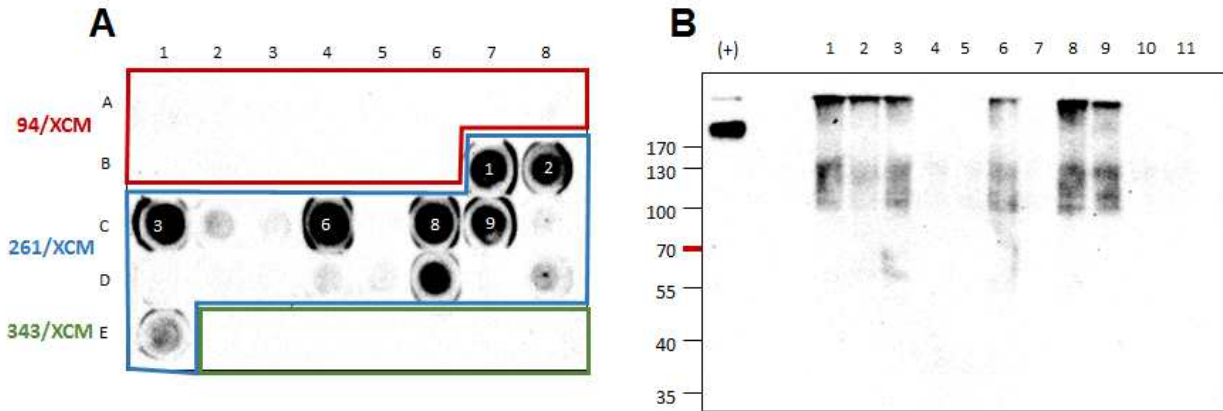
④ 제품화를 위해 발현시킨 먹장어 항체의 안정화

선별된 먹장어 중합체 항체의 대량생산을 위해 효모균주, *Pichia pastoris*를 이용하여 먹장어 항체 발현 벡터 시스템 구축하였음. 다량체 형성이 가능한 Yeast expression 벡터 시스템에 클로닝하고 형질전환 한 후 Zeocine으로 selection 하고, 그 발현 및 분비 여부를 dot blotting 및 Western blotting을 통해 확인하였음.



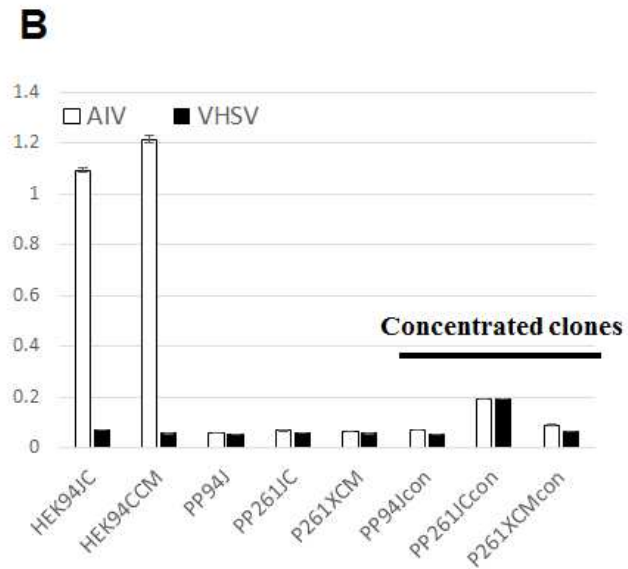
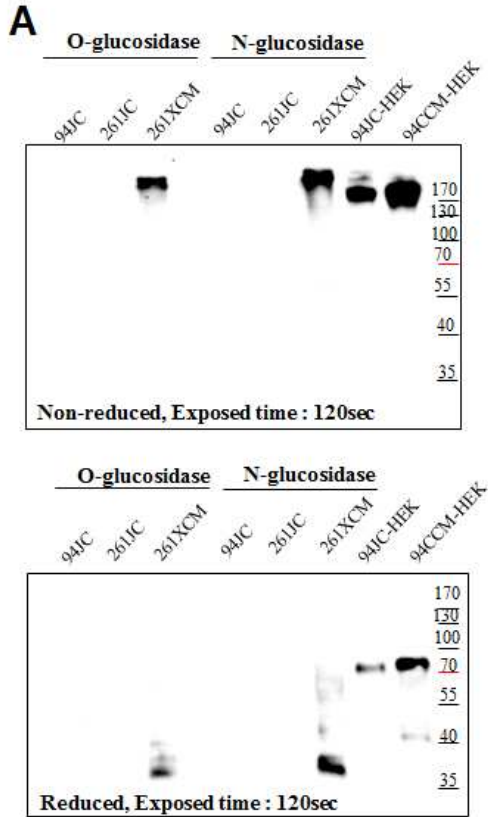
Pichia pastoris 균주에서 다량체 VLR을 발현 시키기 위한 Yeast expression vector 제작. 뼈대 역할을 하는 pYS2 (Yeast secretion vector) 에 대한 모식도

아래 그림과 같이 각 클론 별로 그 발현율을 보이는 경우도 있으나, 실험 조건에 따라 293에서는 그 발현율이 높으나 *Pichia*에서는 그 발현율이 현저히 감소하여 감지되지 않는 사실을 확인할 수 있었음. 또한 효모 균주 특이적으로 발생하는 O-mannosylation의 영향으로 기대되는 분자량보다 훨씬 높은 분자량으로 분비된다는 사실을 확인하였음.



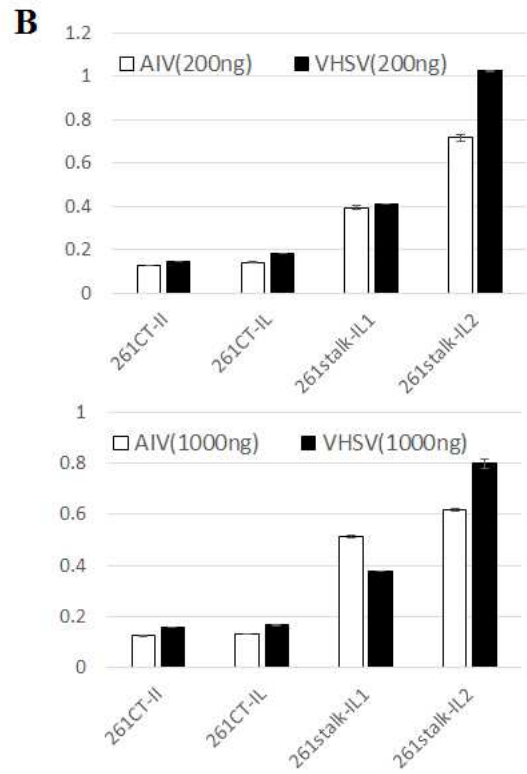
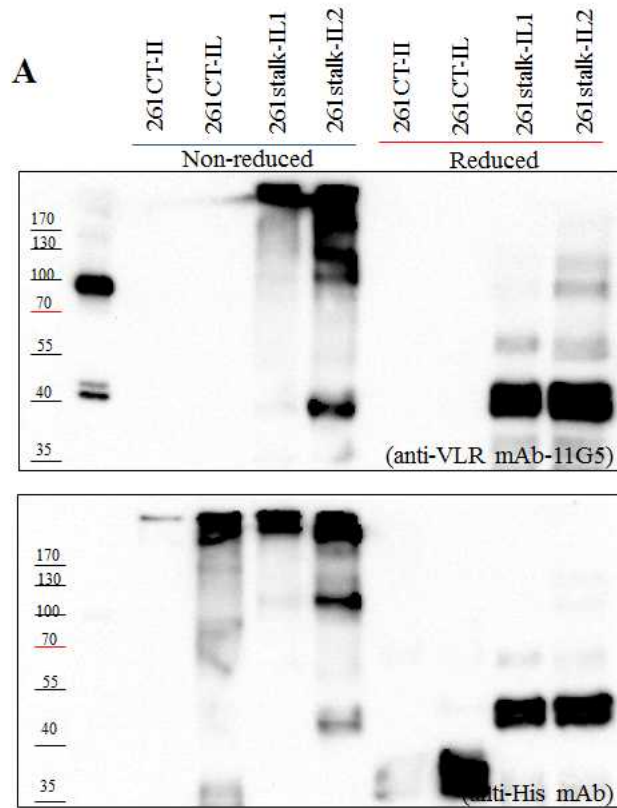
pYS 벡터를 이용하여 세 종류의 AIV-specific VLR (94, 261, 343) 들의 발현 테스트.
Pichia pastoris strain SMD 균주에서 각각의 다량체 VLR 단백질들 발현시킨 3일 후 Dot blot을 통해 발현율을 확인함 (A).
 A에서 발현이 관찰된 261 클론 중 일부 (1 ~ 11)의 다량체 형태를 Western blot으로 확인함 (B).

또한, HEK293F 세포주로부터 발현량 및 분비량이 높은 AIV 특이 VLRB의 세가지 클론, 94, 261, 그리고 343 들은 먼저 Yeast 발현 시스템에서 발현여부 조사를 위해 변형된 yeast vector에 클로닝하여 *Pichia pastoris* strain SMD 균주에 형질전환 시켰음. 형질전환 후 3일간의 배양 후 상층액들로부터 재조합 VLRB 단백질들을 검출하였음. 각 클론 별로 다양한 개수의 콜로니들을 선별하여 Dot blot을 통해 발현 여부를 조사하였음. 세 가지 클론 중 오직 261번만 발현이 되는 것을 확인하였음. 또한, 이 결과에서 높은 효율로 단백질을 발현하는 클론들을 선별하여 Non-reducing 상태로 Western blot을 진행하여 이들의 다량체 여부를 확인하였음. Dot blot에서 강한 반응성을 보인 샘플들이 Western blot에서도 강한 반응성으로 확인 되었으며, 약간의 백그라운드 시그널과 함께 매우 높은 (>170 kDa) 크기의 단백질이 확인이 됨. 먹장어 항체 261번 단백질의 정확한 크기를 측정하기 위해 yeast에서 분비된 재조합 단백질에는 O-glycosidase 와 N-glycosidase를 각각 처리함. 다음 그림과 같이 261번 단백질은 단일 밴드의 형태가 관찰됨. 하지만, 293에서 발현되었을 때 261 번 먹장어 항체의 높은 항원 특이성과는 달리 yeast에서 발현된 261 번 먹장어 항체는 AIV 항원과의 결합능을 전혀 보이지 않았음. 농축을 통해 보다 많은 량의 먹장어 항체를 처리하였을 때에도 비 특이적인 반응성이 소량 증가할 뿐, AIV-항원 특이적 결합능은 관찰되지 않았음.



pYSJC, pYSXCM 벡터를 사용하여 발현된 AIV specific VLR 단백질의 발현 및 반응성 테스트. JC와 XCM으로 부터 발현된 다량체 VLR 단백질의 크기를 확인하기 위해 O-glycosidase 및 N-glycosidase를 처리한 뒤 실시한 western blot (A). *Pichia pastoris* strain SMD 및 HEK293F 로부터 발현된 다량체 VLR 단백질들의 반응성 테스트 (B).

일반적인 효모균주의 경우, 이미 많은 보고가 되어왔듯이, 외래 단백질 발현 시 과도한 당쇄화 반응이 일어남이 밝혀짐. 특히, 인체 항체를 효모에서 발현하고자 할 때 원치않는 당쇄화의 영향으로 그 항체의 항원 결합능이 당쇄화로 인해 현저히 감소함은 이미 기정화된 사실임. 이에 착안하여, 본 연구에서는 *Pichia pastoris*의 변이체인 GlycoSwitch 효모균주를 도입함. 이 GlycoSwitch는 일반적으로 일어나는 yeast의 당쇄화가 최소화된 효모균주로 원치않는 당사슬의 유입이 상당히 감소된 strain임. 다음 그림과 같이 완성된 yeast 발현 벡터들을 GlycoSwitch에 형질전환하여 그 발현량 및 발현형태를 Western으로 조사해 보았을 때, 일반적인 *Pichia pastoris*에 비해 현저하게 당쇄화과정이 감소하는 것을 확인하였으나, 항원과의 결합능을 확인하는 ELISA 결과에서는 여전히 비특이적 반응성을 보여, 항원 특이성이 있던 293 세포주에서의 먹장어 항체와는 다른 양상으로 일어남을 관찰함. 또한, 먹장어 항체의 conserved 부위로 알려진 stalk 부위에서 주로 mannosylation이 일어나는 Threonine rich 부위가 있으므로 이가 결실되거나, glutamine으로 치환된 형태의 Q-form을 제작하여 이의 발현을 및 항원 결합능을 확인하였음. 그 발현을 및 분비율은 증가하였으나, 여전히 항원 특이성 대비 비 특이적 반응성을 보여 보다 면밀한 최적화 과정이 필요할 것으로 보임. 따라서, 본 연구의 최종목표인 대량생산 체제 시스템 도입과 최적화를 이루기 위한, yeast 대량생산 시스템 구축에는 성공하였으나, 항원과의 결합능이 다소 부족한 형태로 최적화 과정이 필요할 것으로 사료됨



Yeast 변이체 벡터를 이용한 복합체 형태의 AIV specific VLR 단백질의 발현 및 반응성 테스트. 두 가지의 벡터 (II와 IL) 에 융합된 복합체 형태의 VLR 서열을 *Pichia pastoris* strain Glycoswitch 발현시켜 그 크기를 Western blot 에서 확인 (A). 각기 다른 양의 항원 (200ng or 1000ng/well) 에 대한 VLR 복합체들의 반응성 검사 (B).

나. 특허성과

출원된 국내 특허 1: 2017, 떡장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함하는 다량체 다가 중합체, 출원인: 경상대학교 산학협력단, 10-2016-0183813

출원된 국내 특허 2: 2017, 떡장어 유래 야생형 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 제거하고 중합체(7합체) 도메인을 연결시킨 7합체 융합 단백질, 출원인: 경상대학교 산학협력단, 10-2017-0052501

출원된 국내 특허 3: 2017, 소수성 테일 도메인이 제거된 떡장어 유래 VLRB 단백질에 칠성장어 유래 VLRB 단백질의 C 말단 서열이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도, 출원인: 경상대학교 산학협력단, 10-2017-0061576

출원된 국내 특허 4: 2017, 소수성 테일 도메인이 제거된 떡장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도, 출원인: 경상대학교 산학협력단, 10-2017-0061578

출원된 국제 특허 1: 2017, 떡장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함하는 다량체 다가 중합체, 출원인: 경상대학교 산학협력단, PCT/KR2017/003937

출원된 국내 특허 2: 2018, 소수성 테일 도메인이 제거된 떡장어 유래 VLRB 단백질과 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도, 출원인: 경상대학교 산학협력단, PCT/KR2018/004463

출원된 국내 특허 3: 2018, 소수성 테일 도메인이 제거된 떡장어 유래 VLRB 단백질에 칠성장어 유래 VLRB 단백질의 C 말단 서열이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도, 출원인: 경상대학교 산학협력단, PCT/KR2018/004464

출원된 국내 특허 4: 2018, 소수성 테일 도메인이 제거된 떡장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도, 출원인: 경상대학교 산학협력단, PCT/KR2018/004465

위 항목의 국내 특허 중, “소수성 테일 도메인이 제거된 떡장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도”는 특허 등록됨.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2016.12.30
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2016-0183813 (접수번호 1-1-2016-1296728-17)
출원인명칭 경상대학교산학협력단(2-2004-010719-4)
대리인명칭 최규환(9-2005-001504-0)
발명자명칭 정태성 이종석 임세원 김재성 김명원
발명의명칭 역삼어 유래 VLBB 단백질의 소수성 태양 도메인을 포함하는 다량체 디거 중합체

관리번호	2017-1-055-KR	구분	특허
발명자 소속	수의학과	발명자 성명	정태성 발명자 정보
발명의 명칭(국문)	역장애 유래 아생형 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 제거하고 마우스의 Fc 도메인을 연결시킨 2합체 및 4합체 융합 단백질		
발명의 명칭(영문)	Dimerized and tetramerized hagfish VLRB protein by conjugating with mouse heavy chain Fc region		
출원번호	10-2017-0061578	출원일자	2017-05-18
등록번호		등록일자	
특허사무소	그린국제특허법률사무소	진행 특허사무소	
진행상태	중간사건 완료보고 확인(산학협력단)		

발명서 명세서 출원/중간사건 등록 기타보고



TOP

[명세서 정보]

[특허사무소]

명 칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 역장애 유래 VLRB 단백질에 마우스 합체 유래 Fc 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
명 칭(영문)	Fusion protein comprising Fc domain from mouse antibody linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
초안검토요청일	2017-04-26	초안발송일자	2017-04-24
최종 명세서	[2017-1-055-KR]경상대정태성_FC(초안).HWP		
선행자료첨부			
특허사무소	그린국제특허법률사무소	담당자 이름	그린국제특허사무소
연락처	042-489-8897	Email	biopatent@naver.com
Comments	명세서 초안을 송부드리오니 검토하여 주시기 바랍니다. 		
[최종 명세서]			
명세서구성			
독립항	6항	종속항	3항

관리번호	2017-1-053-KR	구분	특허
발명자 소속	수의학과	발명자 성명	정태성
발명의 명칭(국문)	먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 칠성장어 VLRB의 C-말단 서열로 치환시켜 다량체의 융합 항체		
발명의 명칭(영문)			
출원번호	10-2017-0061576	출원일자	2017-05-18
등록번호		등록일자	
특허사무소	그린국제특허법률사무소	진행 특허사무소	
진행상태	중간사건 완료보고 확인(산학협력단)		

발명서 명세서 출원/중간사건 등록 기타보고



[명세서 정보]

[특허사무소]

명 칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질에 칠성장어 유래 VLRB 단백질의 C 말단 서열이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
명 칭(영문)	Fusion protein comprising C-terminus from lamprey VLRB protein linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
초안검토요청일	2017-04-26	초안발송일자	2017-04-24
최종 명세서	[2017-1-053-KR]경상대정태성_LC(초안).HWP		
신청자료첨부			
특허사무소	그린국제특허법률사무소	담당자 이름	그린국제특허사무소
연락처	042-499-8887	Email	biopatent@naver.com
Comments	명세서 초안을 송부드리오니 검토하여 주시기 바랍니다.		

[최종 명세서]

명세서구성			
독립항	8항	종속항	2항
도면 Page수	5장	명세서 면수	18면
명세서 최종본	[2017-1-053-KR]경상대정태성_LC(초안).HWP	검토일자	2017-04-24
Comments	명세서 초안을 송부드리오니 검토하여 주시기 바랍니다.		

관리번호	2017-1-054-KR	구분	특허
발명자 소속	수의학과	발명자 성명	정태성 발명자 정보
발명의 명칭(국문)	먹장어 유래 아생형 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 제거하고 중합체(7합체) 도메인을 연결시킨 7합체 융합 단백질		
발명의 명칭(영문)			
출원번호	10-2017-0052501	출원일자	2017-04-24
등록번호		등록일자	
특허사무소	그린국제특허법률사무소	진행 특허사무소	
진행상태	출원완료보고 확인		

발명서 명세서 출원/중간사건 등록 기타보고



[명세서 정보]

[특허사무소]

명 칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
명 칭(영문)	Fusion protein comprising human C4bp oligomerization domain linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
초안검토요청일	2017-04-26	초안발송일자	2017-04-24
최종 명세서	[2017-1-054-KR]명세서(최종).HWP		
선행자료첨부			
특허사무소	그린국제특허법률사무소	담당자 이름	그린국제특허사무소
연락처	042-489-8887	Email	biopatent@naver.com
Comments	발명자 확인이 완료된 명세서 최종본을 송부드리오니 검토하여 주시기 바랍니다. (독립항: 8항, 종속항: 1항, 명세서: 18면, 도면 7장) 검토 완료 후, 출원진행에 대한 지시를 보내주시기 바랍니다. 감사합니다.		

[최종 명세서]

명세서구성

독립항	8항	종속항	1항
도면 Page수	7장	명세서 면수	18면
명세서 최종본	[2017-1-054-KR]명세서(최종).HWP	검토일자	2017-04-24
발명자 확인이 완료된 명세서 최종본을 송부드리오니 검토하여 주시기 바랍니다.			

특허협력조약
(PATENT COOPERATION TREATY)

발명수탁자명

주소
 서울특별시
 서울특별시 20208 영등포구 서문동 14가길 74B, 12층
 그린국제특허법률사무소

PCT

국제출원번호 및 국제출원일 통지서

(PCT 규정 26.2(a))

국제출원일 (PCT 규정)
 2017년 04월 21일 (21.04.2017)

출원인 또는 출원인의 국외소재주소 ACTITU		출원통제사상	
국제출원번호 PCT/KR2017/003937	국제출원일 (PCT 규정) 2017년 04월 21일 (21.04.2017)	수신일 (PCT 규정) 2018년 12월 30일 (30.12.2018)	
출원인 서울국제특허법률사무소			
발명의 명칭 화합물 용해 인자 관련 신규 고수성 화합물 조성물을 포함하는 다양한 자가 중합체			

관리번호	2018-5-019-PC	구분	해외특허
발명자 소속	수의학과	발명자 성명	정태성 발명자 정보
발명의 명칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
발명의 명칭(영문)	Fusion protein comprising human C4bp oligomerization domain linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
출원번호	PCT/KR2018/004463	출원일자	2018-04-18
등록번호		등록일자	
특허사무소	그린국제특허법률사무소	진행 특허사무소	
진행상태	PCT 출원완료확인		

발명서 명세서 출원/중간사건 등록 기타보고



[명세서 정보]

[특허사무소]

명 칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
명 칭(영문)	Fusion protein comprising human C4bp oligomerization domain linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
초안검토요청일	2018-04-20	초안발송일자	2018-04-16
최종 명세서	PCT1807.docx		
선행자료첨부	2018.04.16 발명자의 출원진행 요청 메일.pdf		
특허사무소	그린국제특허법률사무소	담당자 이름	그린국제특허사무소
연락처	042-489-8887	Email	biopatent@naver.com
Comments	당소에 의뢰해주신 PCT출원 진행과 관련하여, 명세서최종본 및 발명자의 출원진행 요청 메일을 송부드립니다. 확인 후, PCT출원 진행에 대한 지시를 보내주시기 바랍니다. 감사합니다. (업로드 담당자: 김수연, 명세서 담당자: 김미경)		

[최종 명세서]

명세서구성			
독립항	8항	종속항	1항
도면 Page수	12장	명세서 면수	21면
명세서 최종본	PCT1807.docx	검토일자	2018-04-16

당소에 의뢰해주신 PCT출원 진행과 관련하여

관리번호	2018-5-020-PC	구분	해외특허
발명자 소속	수의학과	발명자 성명	정태성 발명자 정보
발명의 명칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 역장어 유래 VLRB 단백질에 칠성장어 유래 VLRB 단백질의 C 말단 서열이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
발명의 명칭(영문)	Fusion protein comprising C-terminus from lamprey VLRB protein linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
출원번호	PCT/KR2018/004464	출원일자	2018-04-18
등록번호		등록일자	
특허사무소	그린국제특허법률사무소	진행 특허사무소	
진행상태	PCT 출원완료확인		

발명서 **명세서** **출원/중간사건** **등록** **기타보고**



[명세서 정보]

[특허사무소]

명 칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 역장어 유래 VLRB 단백질에 칠성장어 유래 VLRB 단백질의 C 말단 서열이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
명 칭(영문)	Fusion protein comprising C-terminus from lamprey VLRB protein linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
초안검토요청일	2018-04-20	초안발송일자	2018-04-16
최종 명세서	PCT1808.docx		
선행자료첨부	2018_1.04.16 발명자의 출원진행 요청 메일.pdf		
특허사무소	그린국제특허법률사무소	담당자 이름	그린국제특허사무소
연락처	042-489-8887	Email	biopatent@naver.com
Comments	당소에 의뢰해주신 PCT출원 진행과 관련하여, 명세서최종본 및 발명자의 출원진행 요청 메일을 송부드립니다. 확인 후, PCT출원 진행에 대한 지시를 보내주시기 바랍니다. 감사합니다. (업로드 담당자: 김수연, 명세서 담당자: 김미경)		

[최종 명세서]

명세서구성			
독립항	8항	종속항	2항
도면 Page수	6장	명세서 면수	23면
명세서 최종본	PCT1808.docx	검토일자	2018-04-16
당소에 의뢰해주신 PCT출원 진행과 관련하여,			

관리번호	2018-5-021-PC	구분	해외특허
발명자 소속	수의학과	발명자 성명	정태성
발명의 명칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
발명의 명칭(영문)	Fusion protein comprising Fc domain from mouse antibody linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
출원번호	PCT/KR2018/004465	출원일자	2018-04-18
등록번호		등록일자	
특허사무소	그린국제특허법률사무소	진행 특허사무소	
진행상태	PCT 출원완료확인		

발명서	명세서	출원/중간사건	등록	기타보고
---------------------	---------------------	-------------------------	--------------------	----------------------



TOP

[명세서 정보]

[특허사무소]

명 칭(국문)	소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도		
명 칭(영문)	Fusion protein comprising Fc domain from mouse antibody linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof		
초안검토요청일	2018-04-20	초안발송일자	2018-04-16
최종 명세서	PCT1809.docx		
선행자료첨부	2018_2.04.16 발명자의 출원진행 요청 메일.pdf		
특허사무소	그린국제특허법률사무소	담당자 이름	그린국제특허사무소
연락처	042-489-8887	Email	biopatent@naver.com
Comments	당소에 의뢰해주신 PCT출원 진행과 관련하여, 명세서최종본 및 발명자의 출원진행 요청 메일을 송부드립니다. 확인 후, PCT출원 진행에 대한 지시를 보내주시기 바랍니다. 감사합니다. (업로드 담당자: 김수연, 명세서 담당자: 김미경)		

[최종 명세서]

명세서구성			
독립항	8항	종속항	3항
도면 Page수	5장	명세서 면수	20면
명세서 최종본	PCT1809.docx	검토일자	2018-04-16

다. 논문 성과

년도	논문명	저자명	논문지명	vol/ page	Sci
2017	Prevalence and Mechanism of Fluoroquinolone Resistance in <i>Escherichia coli</i> Isolated from Swine Feces in Korea	Yoon Sung Hu, Sook Shin, Yong Ho Park, Kun Taek Park	Journal of Food Protection,	80/1 145- 1151	SCI
2017	Enhancement of glycoprotein-based DNA vaccine for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) via addition of the molecular adjuvant, DDX41	Jassy Mary S. Lazarte, Young Rim Kim, Jung Seok Lee, Se Pyeong Im, Si Won Kim, Jae Wook Jung, Jaesung Kim, Woo Jai Lee, Tae Sung Jung	Fish & Shellfish Immunology	62, 356 -365	SCI
2017	Development of a monoclonal antibody against the CD3 ϵ of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) and its application in evaluating immune response related to CD3 ϵ	Jae Wook Jung, Jung Seok Lee, Young Rim Kim, Se Pyeong Im, Si Won Kim, Jassy Mary S. Lazarte, Jaesung Kim, Kim D. Thompson, Jong Pyo Suh, Tae Sung Jung	Fish & Shellfish Immunology	65, 179 -185	SCI
2017	Immunostimulatory effect of DDX41 of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Jassy Mary S. Lazarte, Young Rim Kim, Jung Seok Lee, Se Pyeong Im, Si Won Kim, Jae Wook Jung, Jaesung Kim, Jeong-Ho Lee, Tae Sung Jung	Food and Agricultural Immunology	0954 0105 2017 1318 836	SCI
2017	Phenotypic and genotypic analysis of <i>Edwardsiella tarda</i> isolated from olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) and Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Seong Bin Park, Seong Won Nho, Ho Bin Jang, In Seok Cha, Jeong-Ho Lee, Takashi Aoki, Tae Sung Jung	Aquaculture	473: 449- 455	SCI
2018	Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant <i>Escherichia coli</i> enable the survival of β -lactam-susceptible <i>E. coli</i> in the presence of β -lactam antibiotics	Si Won Kim, Seong Bin Park, Jung Seok Lee, Se Pyeong Im, Jae Wook Jung, Tae Won Gong, Jassy Mary S. Lazarte, Jaesung Kim, Jong-Su Seo, Jong Hwan Kim, Jong-Wook Song, Hyun Suk Jung, Gwang Joong Kim, Young Ju Lee, Suk-Kyung Lim, Tae Sung Jung	Scientific Reports	8, 5402	SCI
2018	Expression and	Jung Seok Lee, Jaesung	Journal	SCI	SCI

	characterization of monomeric variable lymphocyte receptor B specific to the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)	Kim, Se Pyeong Im, Si Won Kim, Jae Wook Jung, Jassy Mary S. Lazarte, Jeong-Ho Lee, Kim D. Thompson, Tae Sung Jung	of Immunological Methods		
2017	Bacterial diversity and its relationship to growth performance of broilers	Yeonji Bae, Bonsang Koo, Seungbaek Lee, Jongsuk Mo, Kwanghyun Oh, In Pil Mo	Korean J Vet Res	57(3) : 1~9	대한수의학회 CI

Research Paper

Prevalence and Mechanism of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Swine Feces in Korea

YOON SUNG HU, SOOK SHIN, YONG HO PARK,* AND KUN TAEK PARK*

Department of Veterinary Microbiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

MS 16-502; Received 15 November 2016/Accepted 31 January 2017/Published Online 9 June 2017

ABSTRACT

In this study, we investigated the prevalence and fluoroquinolone (FQ) resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from swine fecal samples. *E. coli* isolates were collected from 171 (72.2%) of 237 swine fecal samples. Of these, 59 isolates (34.5%) were confirmed as FQ-resistant *E. coli* by the disk diffusion method. Of the FQ-resistant isolates, three major FQ resistance mechanisms were investigated. Of the 59 isolates, plasmid-mediated quinolone resistance genes were detected in 9 isolates (15.3%). Efflux pump activity was found in 56 isolates (94.9%); however, this was not correlated with the increased FQ resistance measured by determining the MIC. Point mutations in quinolone resistance-determining regions were the main cause of FQ resistance. All 59 ciprofloxacin-resistant isolates had mutations in quinolone resistance-determining regions; of these 59 isolates, all (100%) had mutations in *gyrA*, 58 (98.3%) had mutations in *parC*, 22 (37.3%) had mutations in *parE*, and none had mutations in *gyrB*. The predominant mutation type was double mutation in *gyrA* (Ser83Leu plus mutation in aspartic acid 87), and all FQ-resistant isolates (except one) that had mutations in *parC* or *parE* also had double mutations in *gyrA*. Importantly, the frequencies of multidrug-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* were significantly higher in the high ciprofloxacin MIC group in this study. Compared with previous studies in Korea, the prevalence of FQ resistance and plasmid-mediated quinolone resistance genes had increased considerably in swine. Although the use of FQ as a feed additive is prohibited in Korea, use for self-treatment and therapeutic purposes has been increasing, which may be responsible for the higher FQ resistance rate observed in this study. Therefore, prudent use of FQ on animal farms is warranted to reduce the evolution of FQ-resistant bacteria in the animal industry.

Key words: Antimicrobial resistance; *Escherichia coli*; Fluoroquinolone; Pig; Plasmid-mediated quinolone resistance gene; Quinolone resistance-determining region

Fluoroquinolones (FQs) are some of the most frequently used antimicrobials worldwide for the treatment of both gram-negative and gram-positive bacterial infections (2). The World Health Organization (WHO) has classified quinolones and FQs as “critically important antimicrobials” because of their broad-spectrum effects and clinical importance in both human and animal medicine (40). Because the importance of FQs in humans and animals is increasing, FQ-resistant bacteria are a major concern in the treatment of infectious diseases.

Antimicrobials are widely used in the food-producing animal industry; they are used as feed additives to promote growth and prevent disease and also for therapeutic purposes (20). On average, antimicrobial use is higher in the animal industry than in human medicine (39). The swine industry is the most important livestock industry in South Korea, and the consumption of antimicrobials in the swine industry has been estimated to represent approximately 60% of all antimicrobial consumption in the animal industry in Korea (23). Consequently, the antimicrobial-resistant rate in swine

is relatively higher than that in other food-producing animals in Korea (4, 22).

In an effort to reduce antimicrobial resistance in food-producing animals, many antimicrobial agents, including FQs, have been prohibited for use in feed additives since 2009 in Korea (4). Consequently, FQ-resistant bacteria were expected to decrease in the animal industry in Korea. Accordingly, in this study, we investigated the prevalence of FQ-resistant *Escherichia coli* isolated from swine feces. In addition, we characterized three major FQ resistance mechanisms in FQ-resistant *E. coli*: (i) target-enzyme modification (mutations in quinolone resistance-determining regions [QRDRs]), (ii) plasmid-mediated quinolone resistance gene (PMQR) activity, and (iii) extrusion of drug agents by efflux pump activity (43).

MATERIALS AND METHODS

Isolation of *E. coli*. A total of 237 swine fecal samples were collected from 24 swine farms in Korea (Jeju province, $n = 86$; Jeolla province, $n = 82$; Gyeongsang province, $n = 35$; Chungcheong province, $n = 24$; Gyeonggi province, $n = 6$; Gangwon province, $n = 4$) from March to June 2015. Of the 237 samples, 53 (22.4%) were from swine with diarrhea. The other 184

* Authors for correspondence. Tel: +82-2-880-4175; Fax: +82-2-871-7524; E-mail: yhp@smu.ac.kr (Y.H.P.), magic007@smu.ac.kr (K.T.P.).



Full length article

Enhancement of glycoprotein-based DNA vaccine for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) via addition of the molecular adjuvant, DDX41



Jassy Mary S. Lazarte^a, Young Rim Kim^a, Jung Seok Lee^a, Se Pyeong Im^a, Si Won Kim^a,
Jae Wook Jung^a, Jaesung Kim^a, Woo Jai Lee^b, Tae Sung Jung^{a,*}

^a Laboratory of Aquatic Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, South Korea

^b BluGem Korea, Busan, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2016

Received in revised form

19 January 2017

Accepted 20 January 2017

Available online 23 January 2017

Keywords:

DDX41

Glycoprotein

VHSV

Interferon

Innate immune system

ABSTRACT

The use of molecular adjuvants to improve the immunogenicity of DNA vaccines has been thoroughly studied in recent years. Glycoprotein (G)-based DNA vaccines had been proven to be effective in combating infection against Rhabdovirus (especially infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) in salmonids. DDX41 is a helicase known to induce antiviral and inflammatory responses by inducing a type I IFN innate immune response. To gain more information regarding G-based DNA vaccines in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), we tried to develop a more efficient G-based DNA vaccine by adding a molecular adjuvant, DDX41. We designed a DNA vaccine in which the VHSV glycoprotein (G-protein) and DDX41 were driven by the EF-1 α and CMV promoters, respectively. Olive flounders were intramuscularly immunized with 1 μ g of plasmids encoding the G-based DNA vaccine alone (pEF-G), the molecular adjuvant alone (pEF-D), or the vaccine-adjuvant construct (pEF-GD). At two different time points, 15 and 30 days later, the fish were intraperitoneally infected with VHSV (100 μ l; 1×10^5 TCID₅₀/ml). Our assays revealed that the plasmid constructs showed up-regulated expression of IFN-1 and its associated genes at day 3 post-vaccination in both kidney and spleen samples. Specifically, pEF-GD showed statistically higher expression of immune response genes than pEF-G and pEF-D treated group ($p < 0.05$ ($p < 0.001$)). After VHSV challenge, the fish group treated with pEF-GD showed higher survival rate than the pEF-G treated group, though difference was not statistically significant in the 15 dpv challenged group however in the 30 dpv challenged group, the difference was statistically significant ($p < 0.05$). Together, these results clearly demonstrate that DDX41 is an effective adjuvant for the G-based DNA vaccine in olive flounder. Our novel findings could facilitate the development of more effective DNA vaccines for the aquaculture industry.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of effective fish vaccines had been the subject of many recent studies aimed at helping the virus-plagued aquaculture industries of Asia, especially those in South Korea and Japan. Many of the in-development fish vaccines are DNA-based systems whereby fish are inoculated with plasmid DNA encoding a specific portion of a virus gene under the control of a eukaryotic promoter. This kind of vaccine resembles a virus in that it requires

the same cellular machinery for replication and initiates an immune response normally observed after viral infection [1]. DNA vaccines offer numerous advantages over conventional fish vaccines (e.g., live-attenuated vaccines, subunit vaccines, killed vaccines, etc.). For example DNA vaccines: can induce both humoral and cellular immune responses [2]; are easier and safer to handle as they will never revert to an infectious state; and are characterized by fast and cost-effective production, as well as a high degree of stability during the preparation process (unlike other vaccine types) [3]. In contrast to other vaccines (e.g. attenuated vaccines) that were rampantly used in the past, the antigenic gene within the DNA vaccine is conserved the same way as its antigenicity therefore giving a more advanced initiation of immune response after its

* Corresponding author. Tel.: +82 55 772 2350; fax: +82 55 762 6733.
E-mail address: jungts@gnu.ac.kr (T.S. Jung).



Full length article

Development of a monoclonal antibody against the CD3 ϵ of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its application in evaluating immune response related to CD3 ϵ



Jae Wook Jung ^a, Jung Seok Lee ^a, Young Rim Kim ^a, Se Pyeong Im ^a, Si Won Kim ^a,
Jassy Mary S. Lazarte ^a, Jaesung Kim ^a, Kim D. Thompson ^b, Jong Pyo Suh ^c,
Tae Sung Jung ^{a,*}

^a Laboratory of Aquatic Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 900 Gajwa-dong, Jinju, Gyeongnam, 660-701, South Korea

^b Moradun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik EH26 0PZ, UK

^c Haeyon Fish Farm Research Center, Jeju, 685-976, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2016

Received in revised form

12 April 2017

Accepted 18 April 2017

Available online 20 April 2017

Keywords:

CD3 ϵ lymphocyte

Monoclonal antibody

Immune response

Viral hemorrhagic septicaemia virus

ABSTRACT

The T cell receptor (TCR) is the binding site of antigen and is responsible for specifically activating the adaptive immune response. CD3, an essential component of the CD3-TCR complex, is known to be composed of $\gamma\delta$ and ϵ chains in teleost. However, there are few monoclonal antibodies (mAb) available to identify these molecules on T cells, so we aimed to produce a mAb against CD3 ϵ to improve our understanding of T cell immune response in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). CD3 ϵ recombinant protein was expressed in yeast, the expression of which was confirmed by SDS-PAGE, MALDI-TOF/TOF MS and Western blot analysis. A CD3 ϵ -specific mAb 4B2 was selected, the specificity of which was examined by confocal microscopy, flow cytometry and RT-PCR, and the mAb was subsequently used to examine the CD3 ϵ lymphocyte population in several different immune organs, with relatively high percentages of these cells seen in trunk-kidney and spleen, while lower percentages were seen in the liver and peripheral blood of olive flounder. During a viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection in olive flounder, the number of CD3 ϵ lymphocytes was seen to gradually increase in the liver, spleen and trunk-kidney of infected fish until 7 days post infection (dpi). In peripheral blood, on the other hand, the increase in CD3 ϵ lymphocyte numbers peaked by 3 dpi. These results suggest that CD3 ϵ lymphocytes might be involved in the immune response against VHSV.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The adaptive immune system in vertebrates is mediated by two major types of lymphocytes, B lymphocytes and T lymphocytes [1–5]. The recognition of antigen by B-lymphocytes results in the production of antibodies, also known as immunoglobulins (Ig). These are able to neutralize pathogens during infection in a process referred to as humoral immunity. T lymphocytes, on the other hand, are responsible for cell-mediated immunity, either by

modulating the host's immune response through the action of T-helper cells, or by directly destroying cells infected with an intracellular pathogen through the action of cytotoxic T-cells. Notable cell surface markers associated with the adaptive immune response include CD (cluster of differentiation) molecules CD4, CD8, and CD3, together with the T cell receptor (TCR) [1,4,6–8]. The TCR and CD3 molecule form the T cell receptor complex, which in humans is composed of TCR α , TCR β , one chain of CD3 γ , one chain of CD3 δ and two chains of CD3 ϵ [4]. The structure of the TCR/CD3 complex in teleosts is similar to that found in mammals, however, only three kinds of chains are present in teleosts i.e. CD3 $\gamma\delta$ and CD3 ϵ chains [9–13].

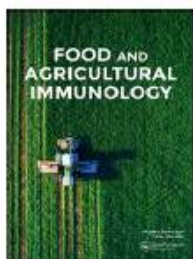
The TCR/CD3 complex plays a significant role in adaptive immunity. T cells are able to bind antigen through an interaction between the TCR and the antigen, thus triggering the immune

* Corresponding author: Laboratory of Aquatic Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 900 Gajwa-dong, Jinju, Gyeongnam 660-701, South Korea. Tel.: +82 55 772 2350; fax: +82 762 6733.

E-mail address: jungts@gnu.ac.kr (T.S. Jung).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.016>

1050-4648/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Immunostimulatory effect of DDX41 of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Jassy Mary S. Lazarte, Young Rim Kim, Jung Seok Lee, Se Pyeong Im, Si Won Kim, Jae Wook Jung, Jaesung Kim, Jeong-Ho Lee & Tae Sung Jung

To cite this article: Jassy Mary S. Lazarte, Young Rim Kim, Jung Seok Lee, Se Pyeong Im, Si Won Kim, Jae Wook Jung, Jaesung Kim, Jeong-Ho Lee & Tae Sung Jung (2017) Immunostimulatory effect of DDX41 of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Food and Agricultural Immunology, 28:5, 876-887, DOI: [10.1080/09540105.2017.1318836](https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1318836)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1318836>



Published online: 08 May 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 205



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at



Phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella tarda* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Japanese eel (*Anguilla japonica*)



Seong Bin Park^a, Seong Woon Nho^b, Ho Bin Jang^c, In Seok Cha^b, Jeong-Ho Lee^c, Takashi Aoki^d, Tae Song Jung^{b,*}

^a Department of Aquaculture, Jeju National University, Jeju, South Korea

^b Laboratory of Aquaculture Biotechnology, Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Jeonju National University, Jeonju, South Korea

^c School of Aquaculture, Jeonju National University, Jeonju, South Korea

^d Institute of Biotechnology, College of Bioscience and Biotechnology, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 January 2017
Received in revised form 7 March 2017
Accepted 8 March 2017
Available online 9 March 2017

Keywords:
Olive flounder
Japanese eel
Edwardsiella tarda
Phenotyping and genotyping

ABSTRACT

Edwardsiella tarda is an important bacterial pathogen of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Japanese eel (*Anguilla japonica*). Here, a total of 16 strains of *E. tarda* isolated from olive flounder and Japanese eel were compared using biochemical tests, whole cell protein analysis, lipopolysaccharide (LPS) profiling, and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis to determine the host related homogeneity of these pathogens. The *E. tarda* strains isolated from olive flounder were highly homogeneous in the analyzed parameters, whereas the isolates from Japanese eel were highly heterogeneous. *E. tarda* isolated from Japanese eel did not demonstrate any pathogenic effect against olive flounder in challenge experiments. The phenotypic and genotypic homogeneity observed in the isolates from olive flounder may be helpful in deriving an effective vaccine for edwardsielliosis in olive flounder.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Edwardsiella tarda, a Gram-negative intracellular bacterium, is a causative agent of edwardsiellosis in various fish species, such as olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), and sea bream (*Pagrus major*), turbot (*Scophthalmus maximus*), Japanese eel (*Anguilla japonica*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Park et al., 2012). After the onset of infection, affected fish show fatal pathologic changes, including exophthalmia, renal failure, haemorrhage, ascites, and swelling of the internal organs (Yu and Chung, 2011). *E. tarda* is of great economic importance, as there have been numerous reports of natural mortality in various fish species, and the pathogen has been responsible for mass mortalities in aquaculture (Park et al., 2012; Yu and Chung, 2011).

Several epidemiologic studies have evaluated the phenotypic and genotypic associated with the host origin of *E. tarda*, which has been isolated from fishes, amphibians, reptiles, birds, and mammals (including humans) (Park et al., 2012; Yu and Chung, 2011). Conventional biochemical analysis and serological tests have proven useful for

phenotypic characterization of this pathogen, but were unable to discriminate the strains according to their host origins (Saitoh et al., 1994; Lee et al., 2011; Watanabe et al., 1994, 1998). However, other strategies proved more useful. For example, *E. tarda* strains isolated from human were successfully distinguished from fish-infecting strains using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis (Piao et al., 2002). *E. tarda* isolates from freshwater fish could be differentiated from those isolated from pond culture using genotyping methods, such as interdigital repetitive sequence expansion (IDRE) PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR (Phongsakul et al., 2010; Wei and Mao, 2000; Mao et al., 2000; Acharya et al., 2007). Moreover, protein and rDNA profiling using SDS-PAGE was found to enable host-origin discrimination of *E. tarda* (Canto et al., 2008; Phongsakul et al., 2008; Maiti et al., 2000; Kang et al., 1992).

Various studies have sought to develop the specific and preventive agents against edwardsiellosis in fish. Specific antigenic elements have been found to mediate the attachment, penetration, and internalization of pathogen into host cells, and antigens have exhibited significant immunostimulating effects, and thus may have potential as effective vaccine candidates (Cha and Kim, 2011; Sun et al., 2013b; Sun et al., 2013). Several experimental vaccines developed using outer membrane proteins (OMP), Takano et al., 2010), outer membrane vesicles (OMVs, Park et al., 2012), and DNA have yielded prolonged immune responses in hosts (Lee et al., 2011c), which have established a significant high

* Corresponding author at: Laboratory of Aquaculture Biotechnology, Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Jeonju National University, 100 Gyeon-1-dong, Jeonju, Jeonbuk-province 550-709, South Korea.

E-mail address: seongw@jnu.ac.kr (T.S. Jung).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics

Received: 20 September 2017
Accepted: 7 March 2018
Published online: 29 March 2018

Si Won Kim¹, Seong Bin Park², Se Pyeong Im³, Jung Seok Lee¹, Jae Wook Jung¹, Tae Won Gong¹, Jassy Mary S. Lazarte¹, Jaesung Kim¹, Jong-Su Seo³, Jong-Hwan Kim³, Jong-Wook Song³, Hyun Suk Jung⁴, Gwang Joong Kim⁴, Young Ju Lee⁵, Suk-Kyung Lim⁶ & Tae Sung Jung¹

Outer membrane vesicles (OMVs) containing various bacterial compounds are released from mainly gram-negative bacteria. Secreted OMVs play important roles in the ability of a bacterium to defend itself, and thus contribute to the survival of bacteria in a community. In this study, we collected OMVs from β -lactam antibiotic-resistant *Escherichia coli* established by conjugation assay and the parental β -lactam antibiotic-susceptible strain, and performed comparative proteomic analysis to examine whether these OMVs carried β -lactam-resistant compounds. We also investigated whether both types of OMVs could protect susceptible cells from β -lactam-induced death and/or directly degrade β -lactam antibiotics. Several proteins that can be involved in degrading β -lactam antibiotics were more abundant in OMVs from β -lactam-resistant *E. coli*, and thus OMVs from β -lactam resistant *E. coli* could directly and dose-dependently degrade β -lactam antibiotics and fully rescue β -lactam-susceptible *E. coli* and other bacterial species from β -lactam antibiotic-induced growth inhibition. Taken together, present study demonstrate that OMVs from β -lactam-resistant *E. coli* play important roles in survival of antibiotic susceptible bacteria against β -lactam antibiotics. This finding may pave the way for new efforts to combat the current global spread of antibiotic resistances, which is considered to be a significant public health threat.

The discovery of antibiotics has prolonged the human lifespan and aided in the development of various health-related technologies. The efficacies of many antibiotics have been established and improved since the initial identification of penicillin, but the overuse of antibiotics has led to the appearance of "superbugs" as bacteria evolve the means to resist traditional antibiotics. The increased emergence of superbug strains has come to be considered the biggest problem facing public health worldwide. For example, carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*¹ and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*² are currently important clinical problems. In addition, *Staphylococci* strains that are highly resistant to β -lactams (e.g., methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)^{2,3} and *Escherichia coli* and *Klebsiella* species capable of producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), which confer resistance against β -lactams⁴, are becoming severe problems in antibacterial chemotherapy. The damage caused by antimicrobial resistance has been predicted to reach a total gross domestic

¹Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 52020, Republic of Korea. ²Department of Animal and Dairy Sciences, Mississippi State University, MS, 39762, USA. ³Environmental Chemistry Research Center, Korea Institute of Toxicology Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry, Jinju, 52034, Republic of Korea. ⁴Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 24341, Republic of Korea. ⁵College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Republic of Korea. ⁶Bacterial Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon-si, 39660, Republic of Korea. Si Won Kim and Seong Bin Park contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.S.J. (email: jungts@gnu.ac.kr)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Research paper

Expression and characterization of monomeric variable lymphocyte receptor B specific to the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)

Jung Seok Lee^a, Jaesung Kim^a, Se Pyeong Im^a, Si Won Kim^a, Jae Wook Jung^a,
Jassy Mary S. Lazarte^a, Jeong-Ho Lee^c, Kim D. Thompson^b, Tae Sung Jung^{a,*}

^a Laboratory of Aquatic Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 900 Gajwadong, Jinju 660-701, South Korea

^b Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Pentlands EH26 0PF, UK

^c NIFS, Inland Aquaculture Research Center, Changwon 645-806, South Korea

ARTICLE INFO

Keywords

Variable lymphocyte receptor B (VLRB)
Hagfish
Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)
Heterogeneous expression
Pichia pastoris

ABSTRACT

Monomeric variable lymphocyte receptor B (VLRB) is one of the smallest binding scaffold (20–25 kDa) from jawless vertebrates, hagfish and lamprey. This relatively new class of binding scaffold has various advantages: i) it has a single peptide composition, amenable to molecular engineering for enhancing its stability and affinity; ii) it has a small size, contributing better tissue penetration and easier production using microorganism expression system. Monomeric arVLRB142, which can specifically bind to the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), was expressed in *Pichia pastoris*. High quantity recombinant monomeric arVLRB142 (rVLR142^{mon}) was purified from 100 ml of culture with a resulting yield of 2.6 ± 1.3 mg of target protein. Functional studies revealed that the purified rVLR142^{mon} can specifically recognize low levels of the target antigen (recombinant glycoprotein) (i.e. as low as 0.1 nM), but also the native glycoprotein of VHSV. The expressed rVLR142^{mon} exhibited high levels of stability and it retained its binding capacity over broad temperature (4 °C – 60 °C) and pH ranges (pH 1.5–12.5). We developed an effective expression system for mass production of monomeric VLRB based on *P. pastoris*. The recombinant protein that was obtained offers promising binding avidity and biophysical stability and its potential use in various biotechnological applications.

1. Introduction

Variable lymphocyte receptor B (VLRB) plays an important role in the humoral immunity of jawless vertebrates, including hagfish and lamprey. VLRB is comprised of an N-terminal LRR domain (LRRNT), the first LRR (LRR1), a diverse number of variable LRRs (LRRV), a connecting peptide (CP), a C-terminal LRR domain (LRRCT), an invariant threonine/proline-rich region (Stalk) and a multimerizing C-terminus domain (Pancer et al., 2004). The variable domain of LRRV can interact with the target antigen, with a potential repertoire of $> 10^{14}$ unique VLRBs (Han et al., 2008). Lamprey VLRB antibodies naturally form a multivalent complex conferred by several monomeric functional units through their multimerizing C-terminal domain (Herrin et al., 2008). Although the multivalent antibodies allow high binding affinity and structural stability, the large size of the multimeric structure limits their applicability due to poor tissue penetration, and laborious, expensive production (Kolkman and Law, 2010; Nuñez-Prado et al., 2015).

Monomeric VLRB, which spans from LRRNT to LRRCT, is a functional unit that is able to bind to the foreign antigen and has a single

peptide composition, amenable to molecular engineering to enhance its stability and affinity (Lee et al., 2012; Tasumi et al., 2009). Monomeric VLRB is one of the smallest antigen binding molecules (20–25 kDa) and because of its small size gives it several advantages over larger binding molecules, including better tissue penetration and easier production using a microorganism expression system (Khosroshahi et al., 2016). These characteristics make monomeric VLRBs an interesting tool for a variety of biotechnological applications, including cancer therapy and targeting viral and bacterial pathogens.

Pichia pastoris has been widely used as a heterologous protein expression host in both academic research and in industry. As a microorganism, *P. pastoris* is easier to genetically manipulate and is more cost-effective to culture than mammalian cells that require higher cell densities. Also, *P. pastoris* contains sub-cellular organelles allowing post-translational modification, which enables soluble and functional recombinant proteins to be expressed (Gregg et al., 2000). In addition, the α -factor signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* can efficiently mediate the secretion of heterologous proteins through endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and the plasma membrane. Using a strong

* Corresponding author.

E-mail address: jungts@gim.ac.kr (T.S. Jung).<https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.08.006>Received 3 July 2018; Received in revised form 8 August 2018; Accepted 10 August 2018
0022-1759/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Bacterial diversity and its relationship to growth performance of broilers

Yeonji Bae, Bonsang Koo, Seungbaek Lee, Jongsuk Mo, Kwanghyun Oh, In Pil Mo*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

(Received: June 7, 2017; Revised: August 18, 2017; Accepted: August 22, 2017)

Abstract: The microbial community is known to have a key role during the rearing period of broilers. In this study, gut microbial composition and diversity were examined to evaluate the relationships between these factors and broiler growth performance. By applying 454-pyrosequencing of the V1-V3 regions of bacterial 16S rRNA genes, six fecal samples from four- and 28-day-old chickens from three broiler farms and 24 intestinal samples of broilers with heavy and light body weights were analyzed. Microbial composition assessment revealed Firmicutes to be the most prevalent phylum at farm A, while Proteobacteria were predominant at farms B and C. Fecal microbial richness and diversity indices gradually increased from four to 28 days at all three farms. Microbial diversity assessment revealed that small intestine microbial diversity was lower in heavy birds than in light birds. In light birds, the Firmicutes proportion was lower than that in heavy birds. In conclusion, each broiler farm revealed a specific microbial profile which varied with the age of the birds. The microbial communities appeared to affect growth performance; therefore, gut microbial profiles can be utilized to monitor growth performance at broiler farms.

Keywords: broiler, growth performance, microbial community, pyrosequencing, 16S rRNA gene

Introduction

The gut microbiota in chickens consists of diverse prokaryotic and eukaryotic microbes, which live synergistically in their host [38]. The gut microflora plays a key role in maintaining a conditioned status by the competitive exclusion of pathogens. It is also related with a number of reactions, such as the metabolization of nutrients, the development of immune responses, and the regulation of both health and diseases [25, 34]. In poultry, several studies have suggested that there is significant diversity in bacterial populations among different parts of the gastrointestinal tract (GIT) [2, 22], and that the microbial profiles of the GIT are connected to the growth and health of flocks [26, 29].

Gut health can be affected by various factors, such as the host, feed, litter, farm facilities, and environment [12]. Disturbances in the balance of the gut microbiota subsequently impair feed efficiency and growth performance [39]. The growth performance of broilers is one of the most critical concerns for producers. Several parameters such as the feed conversion ratio (FCR), body weight at market age, and livability were included in the elements of performance indices and used to determine the body performance of broiler flocks. Antibiotic growth promoters in food animal production have been used to enhance the growth performance and the health status of animals since the mid-1940s [18]. However, antibiotics-free

programs have been established worldwide and these have induced a negative impact on body weight gain and frequent occurrences of bacterial enteritis in broiler farms [9].

Bacterial enteritis can cause economic losses, increased mortality, the disturbance of animal welfare, and risks the contamination of products for human consumption [32]. The presence of specific bacterial species and a variety of environmental factors were involved in outbreaks of enteritis among broilers. These extrinsic and intrinsic factors also include medication exposure, diet, litter management, housing type, biosecurity, flock age, genetic elements mediating drug resistance, and the gut microbial community [1, 10]. Until recently, a number of previous studies on poultry bacterial populations have relied on conventional culture methods to identify infectious agents and enumerate bacterial species [14]. However, such labor-intensive and time-consuming cultivation based-methods have limitations in their ability to provide comprehensive observations of chicken's gut microbiota.

The metagenomic approach, enhanced by high-throughput sequencing technologies, has begun to fulfill expectations and revolutionize our understanding of microbial communities by encompassing both the host and environmental aspects [21]. The metagenomic analysis of fecal microbiomes by Singh *et al.* [26] indicated that fecal microbiota may be related to broiler performance and suggested the potential use of these tools for improving feed efficiency and weight gain

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-3356, Fax: +82-43-261-3224

E-mail: moip@cnu.ac.kr


라. 학술대회발표

발표일자	발표학회	발표제목	발표장소
2016. 12. 10. ~ 2016, 12. 18	Antibody engineering and therapeutics	Multimerized variable lymphocyte receptors B of hagfish induced by superhydrophobic tails	Sandiego Hilton Hotel
2016.10.27.~28.	추계수의학회	Multimerized variable lymphocyte receptors B of hagfish induced by hydrophobic clustering	진주 컨벤션 홀
2016.6.26.~30.	Fish & shellfish immunology	Development of biomarkers utilizing variable lymphocyte receptors (VLRS) of hagfish (Eptatretus burgeri) against avian influenza virus H9N2	포틀랜드, 메인

EVENT GUIDE

Antibody Engineering & Therapeutics

December 11-15, 2016
Marriott Grand Hyatt
San Diego, CA



What's Inside

Registration	4
Poster Session	4
Workshop	4
Networking	4
Antibody Engineering	4
Antibody Therapeutics	4
Antibody Diagnostics	4
Antibody Manufacturing	4
Antibody Delivery	4
Antibody Evaluation	4
Antibody Application	4
Antibody Innovation	4
Antibody Future	4

www.aantibody.com/sand2016 @antibody2016

POSTER PRESENTATIONS CONTINUED

DEVELOPMENT OF ANTIBODIES AND ANTIBODY THERAPEUTICS			
201	Development of the Binding of Novel Antibodies to Cytokines	Michael Sander	University of California, San Diego
202	Highly Specific Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
203	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
204	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
205	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
206	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
207	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
208	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
209	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
210	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
211	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
212	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
213	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
214	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
215	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
216	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
217	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
218	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
219	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
220	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
221	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
222	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
223	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
224	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
225	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
226	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
227	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
228	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
229	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
230	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
231	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
232	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
233	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
234	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
235	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
236	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
237	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
238	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
239	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
240	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
241	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
242	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
243	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
244	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
245	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
246	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
247	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
248	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
249	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego
250	Development of Novel Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma	Michael Sander	University of California, San Diego

Abstract for conference 'Antibody engineering & therapeutics', San Diego, Dec. 2016.

Title: Multimerized variable lymphocyte receptors B of hagfish induced by superhydrophobic tails

It has been well known that variable lymphocyte receptors (VLRs) of jawless vertebrates directly mediate adaptive immune response (AIS) by antigen-specific binding and memory function. Hagfish and lamprey are the only surviving members of jawless vertebrates, which utilize their VLRs grouped as VLRA, VLRC and VLRB in response to antigen stimulation. Like immunoglobulin of B cell in mammals, VLRB antibodies can be secreted from plasma cell after differentiation. Although the structure and the function of VLRB in both hagfish and lamprey are quite similar, the characteristic of each C-terminal tail is totally different. While lamprey's VLRB has Cys-rich tail, the VLRB of hagfish has superhydrophobic tail located at the C-terminal region. The presence of VLRB proteins in the serum of hagfish were detected as multimers (1,000 ~ 2,000 kDa; approximately 25 ~ 50 monomers) by Fast protein liquid chromatography (FPLC) and immunoblotting. When randomly selected VLRB clones were expressed in mammalian 293 cells, the VLRB proteins were expressed and secreted as the multimerized forms. We assume that the superhydrophobic tail of VLRB in hagfish could induce the multimerization to make a sort of globular protein complex. Furthermore, when the superhydrophobic tail was genetically conjugated onto mCherry gene, the chimeric protein, mCherry-superhydrophobic tail was not only secreted to the medium, but was also localized on the surface of the transfected 293 cells as the multimerized proteins. Therefore, the binding avidity of VLRB proteins of hagfish with the corresponding antigens could be much more increased by the multimerization.



2nd International Conference of
**Fish & Shellfish
 Immunology**

CONFERENCE PROGRAM
 AND ADDITIONAL
 ABSTRACTS

Holiday Inn by the Bay, Portland, Maine • June 26-30, 2016



P-025	Ming Chen Mingmei Ding Yuhong Wang Kaizhen Yu Zheng Guo Anli Wang Jianwei Ye	Complement C3c has a novel tetrameric structure in teleosts (<i>Oreochromis niloticus</i>)
P-026	Shah Sattar Hassan Akbar Hassan Akbar Hassan Akbar	Construction and validation of an <i>Edwardsiella ictaluri</i> vaccine protein P-Actin
P-027	Chen Sheng Wu Ding Yu Wang Dong Hui Chen	ORF13-ORF14 signaling pathways of orange-spotted grouper (<i>Lateolabrax niloticus</i>) contribute to red-spotted infection
P-028	Aysegül Kılıcı Fuat Yıldırım	Development and efficacy of a trivalent vaccine against bacterial pathogens in rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>
P-029	Denizli Hacıoğlu Ayhan Özkan Ayhan Özkan Ayhan Özkan Ayhan Özkan	Development of a mucosal adjuvant for fish vaccination
P-030	Imyeong Im Jung Seok Lee Si Won Kim Jae Wook Jung Jenny Mary Lazarte Jae Sung Kim Tae Sung Jung	Development of biomarkers utilizing variable lymphocyte receptors (VLRs) of hagfish (<i>Eptatretus burgeri</i>) against avian influenza virus H9N2
P-031	Hong Jun Liang Ren Hong Peng Fengsen P. Chen	Development of infectious salmon anaemia against grouper <i>Micropterus dolomieu</i>
P-032	Huaying Zhang Tingting Lu	Differential molecular responses of a novel TOLL gene to virus pathogenesis LPS and Poly I:C in Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) with different resistance contents
P-033	Shi H. Liu Shi H. Hansen James C. Woodson	IL2 impacts innate immune pathways in teleost fish
P-034	A. Fernández-Alonso M.J. Calvo S. Torres M. S. Izquierdo D. Montero	Effect of temperature on growth performance and immunological parameters of brown Amberjack <i>Seriola lalandi</i> juveniles
P-035	Paula Santana Fátima Ramos Fátima Ramos Luís Menezes	Effects of a peptide derived from the extreme carboxyl terminal of L4 on immune response genes in the Nile L tilapia
P-036	Jamal Alfarraj Hassan Alfarraj Sung-Min Lee	Effects of dietary inclusion of chitosan oligomers on growth, blood biochemical parameters and antioxidant enzyme activity in Olive Flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>
P-037	Guohua Zhang Lili Baba S. Venes Braghini	Effects of dietary essential vitamins on liver and gut histology of rainbow trout

**Development of biomarkers utilizing variable lymphocyte receptors (VLRs)
 of hagfish (*Eptatretus burgeri*) against avian influenza virus H9N2**

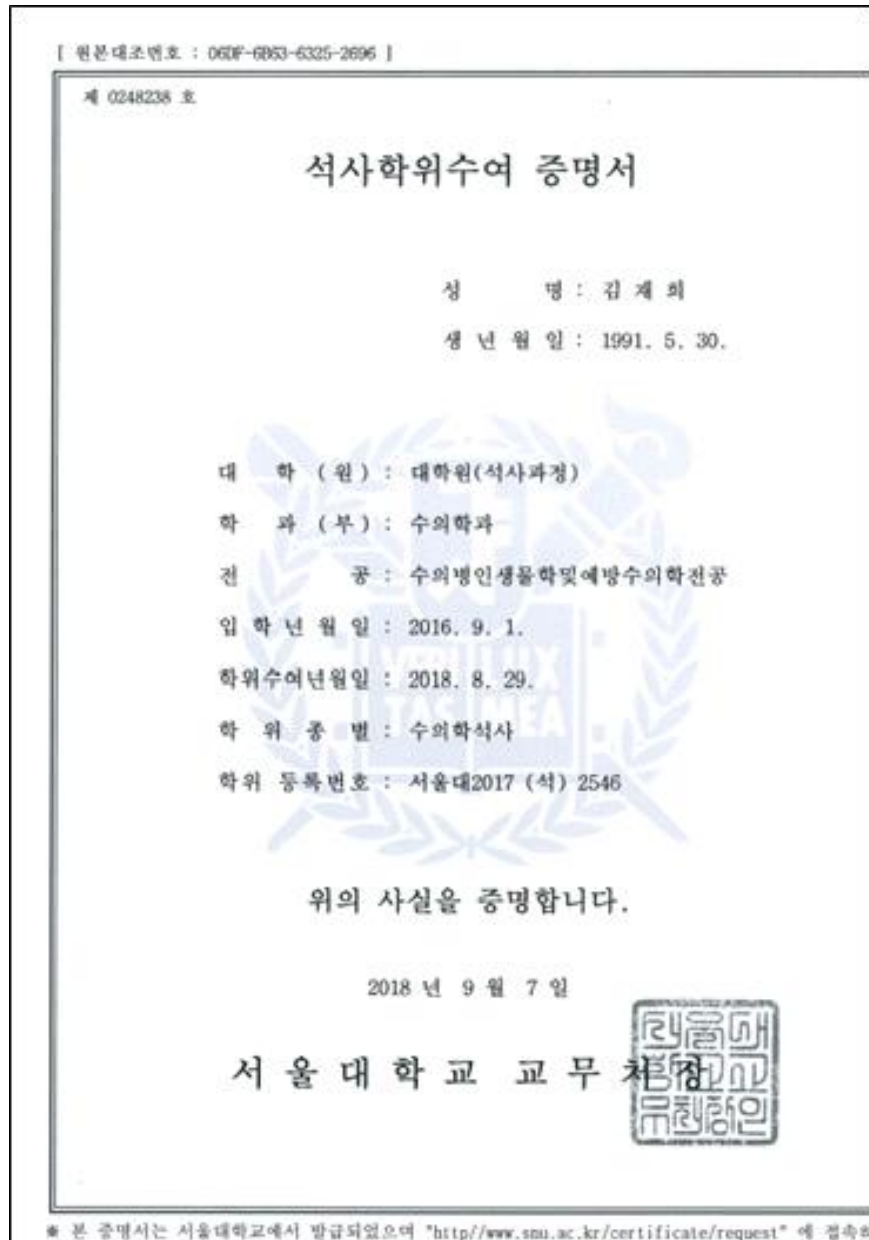
Se Pyeong Im⁺, Jung Seok Lee, Si Won Kim, Jae Wook Jung, Jenny Mary Lazarte, Jae Sung Kim, Tae Sung Jung*

Lab. of Aquatic Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 900 Gajwadong, Jinju, Gyeongsang, Korea

Hagfish, along with lampreys, are jawless vertebrates (*agnathans*) which do not have essential adaptive components, such as T (TCRs) and B (BCRs or Ig) cell receptors and MHC molecules, which are possessed by their jawed (*gnathostomes*) counterparts. They have lymphocytes similar to T and B cells that are referred to as variable lymphocyte receptors (VLRs). VLRs are proteins made up of leucine-rich repeats (LRRs) that are assembled into functional receptors through somatic diversification of germ-line VLR (gVLR) gene/s in *agnathans*. Hagfish have two VLRs, VLR-A and VLR-B, which are known to be equivalent to TCRs and BCRs in vertebrates, respectively. The VLR gene can generate a diverse repertoire of these cell surface receptors comparable to the predicted diversity of mammalian antibody repertoire. The unique phylogenetic position of VLRs in the evolution of adaptive immunity provides many potential advantages in VLR research. In particular, VLR-B function as the immunoglobulin (Ig)-based system of jawed vertebrates, which, together with their relatively small size and high stability, enhances the potential of VLRs for biomarkers beyond the higher vertebrates-derived antibodies. In this study, we tried to isolate and express monoclonal VLR-B proteins specific for low-pathogenic avian influenza virus (LPAIV) subtype H9N2 hemagglutinin (H9) protein by using a monoclonal antibody against VLR-B. The high-throughput screening system enables us to isolate monoclonal VLRs and explore the role of VLR in hagfish immunity by screening large libraries for specific antigen-binding VLR clones. The ability of hagfish immunity to produce a repertoire of mature VLRs that can rearrange to respond to specific antigens or antigenic determinants make it a good candidate for antibody therapies and may be beneficial in treating significant diseases.

마. 인력양성

	이름	학위	학교
1	김재희	석사	서울대학교
2	이찬희	석사	서울대학교
3	정연수	박사	서울대학교
4	제시메리라자르트	박사	경상대학교
5	이정석	박사	경상대학교
6	담반라이	석사	충북대학교
7	오광현	석사	충북대학교



[AUTHENTICATION NO : 0924-0020-0875-0723]

Seoul National University
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, Rep. of Korea

Date Issued : August 3, 2018

Serial No : 0219729

Subject : Degree Certificate

Name in Full : Lee Chan Hee(이찬희)

Date of Birth : September 27, 1986

Date of Admission : March 1, 2015

Date of Degree Conferment : February 26, 2018

College : Graduate School(Master Course)

Department : Dept. of Veterinary Medicine

Major : Veterinary Pathology and Preventive Medicine

Degree Conferred : Master of Science in Veterinary Medicine

This is to certify that the above mentioned received the Master of Science in Veterinary Medicine Degree from the Graduate School(Master Course), Seoul National University.



KIHYEON KIM Ph.D.
Dean of Academic Affairs
Seoul National University

* This Certificate was issued by e-issuing system. (in <http://www.snou.ac.kr>)

제 0247601 호

박사학위수여 증명서

성 명 : 정 언 수

생 년 월 일 : 1986. 10. 24.

대 학 (원) : 대학원(박사과정)

학 과 (부) : 수의학과

전 공 : 수의학인생물학및예방수의학전공

입 학 년 월 일 : 2014. 3. 1.

학위수여년월일 : 2017. 8. 29.

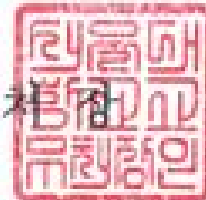
학 위 종 별 : 수의학박사

학위 등록번호 : 서울대2016 (박) 1150

위의 사실을 증명합니다.

2018 년 9 월 7 일

서울대학교 교무처



* 본 증명서는 서울대학교에서 발급되었으며 "<http://www.snu.ac.kr/certificate/request>" 에 접속하여 상단의 증명서 "원본대조번호"를 입력하면 증명서 원본대조 및 중요성을 검증할 수 있습니다.

제 III1972 호

학 위 증 명 서

성 명 : 제시메리라자르트

생년월일 : 1987년 8월 20일

소 속 : 대학원 박사과정 수의학과

입학일자 : 2013년 3월 4일

전 공 : 수의어류질병학전공

학 위 명 : 수의학박사

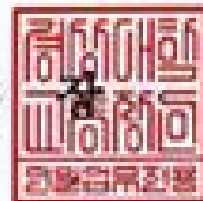
학위등록번호 : 경상대2016(박)135

학위수여일자 : 2017년 8월 25일

위의 사실을 증명합니다.

2018년 9월 18일

경 상 대 학 교 총



제 H11973 호

학 위 증 명 서

성 명 : 이정석

생년월일 : 1988년 5월 3일

소 속 : 대학원 석박사통합과정 수의학과

입학일자 : 2014년 9월 1일

전 공 : 수의어류질병학전공

학 위 명 : 수의학박사

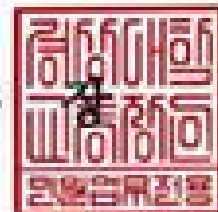
학위등록번호 : 경상대2017(박)322

학위수여일자 : 2018년 8월 24일

위의 사실을 증명합니다.

2018년 9월 18일

경 상 대 학 교 총



석사제 11956 호



학 위 기

성명 DAM VAN LAI
1989년 4월 26일생

위 사람은 대학원 석사과정을
이수하고 소정의 시험과 논문심사에 합격하여
수의학석사의 자격을 갖추었으므로
대학원위원회의 심의를 거쳐 이를 인정함.

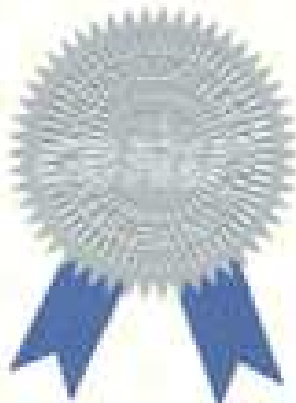
2017년 8월 23일

충북대학교 대학원장 약학박사 오 기 완

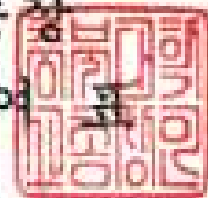


위의 인정에 의하여 수의학석사 학위를 수여함.

2017년 8월 23일



충북대학교 총장
약학박사 윤 여 표



학위번호 : 충북대2018[석]769

제 2018-14771 호

학위 수여 증명서

성명 : 오광현
 생년월일 : 1978년 5월 10일
 입학년월일 : 2015년 3월 15일
 졸업년월일 : 2018년 2월 28일
 대학명 : 충북대학교
 학과명 : 수의학부
 학위명 : 수의학사
 학위번호 : 2018-14771호
 학위변환수준 : 2018년 2월 28일
 위의 사실은 증명합니다.

2018년 9월 18일

충북대학교 총장



충북대학교 총장 : 오광현, 직인 : 오광현, 충청북도 충주, 충주대학교 39101-282-2800-4

본 증명서는 학위 수여 증명서입니다. 학위 수여는 본 대학의 학위 수여 규정에 따라 이루어지며, 학위 수여 후 10년 이내에 학위 수여 증명서를 발급받아야 합니다. 학위 수여 증명서의 발급은 학위 수여 후 10년 이내에 이루어지며, 학위 수여 증명서의 발급은 학위 수여 후 10년 이내에 이루어집니다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

가. 목표달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1 차 년 도	2015년	먹장어항체의 스크리닝 벡터시스템 구축	1. AI항원 면역 후, 특히 방어항체 유전자획득(먹장어항체) 2. 먹장어 항체의 스크리닝 및 발현에 관한 독자적 벡터시스템 구축
		유효먹장어항체 및 유효농도 선정 후 안전성 평가 (SPF 닭 및 일반 산란계)	1. 개발된 먹장어항체 중 유효 먹장어항체를 선정하고 환경에서의 유효농도 선정 (1~2 차년도) 2. 보조제 및 투여방법별 SPF 닭에서의 임상 및 해부병리학적 소견 평가 3. 보조제 및 투여방법별 일반산란계(야외농장)에서의 임상 및 해부병리학적 소견 평가
		먹장어항체 Epitope 확인 방법 개발 및 정립	먹장어항체의 AIV 항원에 대한 epitope 확인 방법 개발 및 정립
		AIV에 특이항체 (먹장어항체) pilot 생산을 위한 배양조건 최적화	1. 다양한 yeast에 따른 발현량 조사 2. 물리적환경(pH, 온도, 교반속도 등)의 최적화 3. 생물학적 환경(배지조성, 균체제어 등) 조건들의 분석을 통한 발현량 최적화
2 차 년 도	2016년	다양한 항원에 대한 먹장어항체 생산	AIV에 대해 친화력인 높고, 생산효율을 높일수 있는 시스템개발 및 AIV에 대한 항체 생산
		SPF 닭에서의 효능 평가(제어된 환경장치)	조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 SPF 닭에서의 바이러스 재분리 및 임상 및 해부병리학적 소견 평가
		먹장어항체별 binding epitope sites 규명 및 affinity차이비교	먹장어 항체별 binding epitope site 규명 및 affinity 차이비교
		제품화를 위해 발현시킨 먹장어항체의 안정화	1. 발현 및 정제한 먹장어항체 활성유지를 위한 첨가제 최적화
3 차 년 도	2017년	동물 병원체에 대한 수동면역 백신 개발	다양한 AIV에 대한 먹장어 항체 개발 및 다른 병원체에 대한 먹장어 항체 개발 시도
		일반 산란계에서의 효능 평가(야외산란계 농장)	조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 일반 산란계(실험실 및 야외농장)에서의 바이러스 재분리 및 임상 및 해부병리학적 소견 평가
		epitope 항원성 확인	규명된 epitope sequence 정보를 이용하여 다양한 AIV strain에 대한 교차감염 방어효과 가능성 제 시 및 항원성 확인과 새로운 AIV백신개발 가능성 테스트
		제품생산 및 QC Flowchart 작성	1. 생산 Flowchart 작성 2. Seed culture QC 스펙 설정 및 작성 3. 발효배양 QC 스펙 설정 및 작성 4. Harvest 및 Purification QC 스펙 설정 및 작성 5. 대량생산 기반구축

나. 목표 달성여부

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	
1 차 년 도	먹장어항체의 스크리닝 벡터시스템 구축	AI항원 면역 후, 특이 방어항체 유전자획득(먹장어항체) 먹장어 항체의 스크리닝 및 발현에 관한 독자적 벡터시스템 구축	목표달성완료
	유효먹장어항체 및 유효농도 선정 후 안전성 평가 (SPF 닭 및 일반 산란계)	1. 개발된 먹장어항체 중 유효 먹장어항체를 선정하고 환경에서의 유효농도 선정 (1~2 차년도) 2. 보조제 및 투여방법별 SPF 닭에서의 임상 및 해부병리학적 소견 평가 3. 보조제 및 투여방법별 일반산란계(야외농장)에서의 임상 및 해부병리학적 소견 평가	목표달성완료
	먹장어항체 Epitope 확인 방법 개발 및 정립	먹장어항체의 AIV 항원에 대한 epitope 확인 방법 개발 및 정립	목표달성완료
	AIV에 특이항체 (먹장어항체) pilot 생산을 위한 배양조건 최적화	1. 다양한 yeast에 따른 발현량 조사 2. 물리적환경(pH, 온도, 교반속도 등)의 최적화 3. 생물학적 환경(배지조성, 균체제어 등) 조건들의 분석을 통한 발현량 최적화	목표달성완료
2 차 년 도	다양한 항원에 대한 먹장어항체 생산	AIV에 대해 친화력인 높고, 생산효율을 높일수 있는 시스템개발 및 AIV에 대한 항체 생산	목표달성완료
	SPF 닭에서의 효능 평가(제어된 환경장치)	조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 SPF 닭에서의 바이러스 재분리 및 임상 및 해부병리학적 소견 평가	목표달성완료
	먹 장 어 항 체 별 binding epitope sites 규명 및 affinity차이비교	먹장어 항체별 binding epitope site 규명 및 affinity 차이비교	목표달성완료
	제품화를 위해 발현시킨 먹장어항체의 안정화	1. 발현 및 정제한 먹장어항체 활성유지를 위한 첨가제 최적화	목표달성완료
3 차	동물 병원체에 대한 수동면역 백신 개발	다양한 AIV에 대한 먹장어 항체 개발 및 다른 병원체에 대한 먹장어 항체 개발 시도	목표달성완료
	일반 산란계에서의	조류인플루엔자 바이러스	목표달성완료

년 도	효능 평가(야외산란계 농장)	공격집중 후 일반 산란계(실험실 및 야외농장)에서의 바이러스 재분리 및 임상 및 해부병리학적 소견 평가	
	epitope 항원성 확인	규명된 epitope sequence 정보를 이용하여 다양한 AIV strain에 대한 교차감염 방어효과 가능성 제시 및 항원성 확인과 새로운 AIV백신개발 가능성 테스트	목표달성완료
	제품생산 및 QC Flowchart 작성	1. 생산 Flowchart 작성 2. Seed culture QC 스펙 설정 및 작성 3. 발효배양 QC 스펙 설정 및 작성 4. Harvest 및 Purification QC 스펙 설정 및 작성 5. 대량생산 기반구축	목표달성완료

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
먹장어 항체의 스크리닝 및 발현에 관한 독자적 벡터시스템 구축	10	10	VLR cDNA library를 정상적으로 발현시키며 스크리닝에 구형하기 위해 크게 두 종류의 벡터 시스템 (yeast display vector 및 mammalian secretion vector)을 개발하고 정상적이고 높은 효율의 발현양상을 규명화하였음.
AI 항원 면역 후, 특이 방어항체 유전자 획득	10	10	먹장어에 AIV 면역은 성공적으로 수행되었으며 또한, VLR cDNA library도 높은 효율로 합성되어졌음.
개발된 먹장어항체 중 유효 먹장어항체를 선정	20	20	ELISA 방법 및 FACS sorting 방법을 통해 AIV에 특이적으로 반응성을 보이는 VLR clone들을 선정하였으며, 이는 immunoblotting과 FACS 분석결과를 통해 다시 한번 검증하였음.
AIV 구성단백질 중 어떤 단백질과 결합 반응성을 보이는지 확인	10	10	AIV 특이적으로 결합능을 보이는 먹장어 항체들이 실제적으로 AIV와 결합할 때 구체적으로 어떤 단백질과 반응성을 보이는 지를 확인하기 위해 AIV 구성단백질들을 각각 발현하는 세포주들을 이용하여 그 결합능을 규명코자 함.
선정된 AIV 특이적 먹장어 항체의 중화반응 테스트	10	7	ELISA, FACS 결과 및 immunoblotting을 통해 실제적으로 AIV 와 결합하는 VLR 클론을 발굴하였으나, 중화반응 테스트에서는 아직 promising한 결과도출이 안됐음. 이는 선정된 VLR 단백질들의 농축 등과 같은 일련의 과정들을 통해 해결될 것으로 사료됨
개발된 먹장어항체의 효능 스크리닝	10	8	개발된 먹장어 항체 13종류에 대한 중화능을 평가한 결과 3종류에 대해서는 현재도 계속 실험이 진행중이나 현재까지 진행된 10종류에서는 아직은 국내 저병원성 AIV(H9N2)에 대한 충분한 중화능을 보이지 않고 있음
AIV 감염된 조류 조직절편 이용 먹장어 항체들의 감지능력 확인	10	10	AIV 특이적 결합능을 보이는 먹장어 항체들을 대상으로 야생에서, 혹은 실험실에서 인위적으로 AIV로 감염된 조류들의 조직절편을 이용하여 먹장어 항체들의 감지 능력 확인
먹장어항체 Epitope 확인 방법 개발 및 정립	10	8	1. HA 항원 제작에 사용된 Influenza A H9N2 (Hong Kong/G9/97)의 HA1 subunit genomic DNA 정보 확보 및 자체 합성. 2. 합성된 genome sequence를 이용하여 epitope site 확인을 위한 fragmented HA recombinant protein library 제작 및 발현 확인. 3. 먹장어항체 항원 특이성 확인을 위한 western blot 실험 방법 개발 및 확립. [자체평가 지표: 90%, AIV 먹장어 항체 선정 시 epitope mapping 완성으로 100% 완료 예정]
조류인플루엔자 특이항체 발현위한 yeast host 및 배양조건 결정	10	10	- 발현량, 배양조건 등을 고려했을 때 <i>Pichia pastoris</i> 가 적합한 것으로 결정함. - pH 5~6에서 발현이 가장 적합할 것으로 판단되어 조류인플루엔자 특이항체 발현을 위해 기본 pH로 시작하여 최적화 할 생각임.
합계	100점	93	

다. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

해당없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 활용방안

- 본 연구를 통한 연구결과는 SCI급 국제저널에 투고 및 특허를 출원함으로써, 연구결과의 법적 산업재산권 확보
- 먹장어를 통한 특이방어 항체의 대량생산체계 구축 및 산업화 진행
- 본 연구를 통해 기능이 확인된 먹장어항체는 참여기업인 (주)메텍스를 통하여 생산관리하고, 안정적 보급을 위한 생산시스템을 확보함으로써 축산 농가에 도움을 줄 뿐만 아니라, 시장경쟁력 확보가 가능할 것임.
- 저비용, 고효율로 농가 보급 방법: 현재 Yeast 배양에 사용되고 있는 YNB (Yeast Nitrogen Base + Amino acid)은 고가이나 YPD (yeast extract, peptone, dextrose)로 전환하여서, 먼저 배양에 드는 비용의 경감과, 포장 및 물류에 드는 비용절감을 고려하여 볼 것임 (예를 들면, 먹장어 항체가 고온에 안정성이 있다면 포장 및 저장에 많은 비용을 절감할 수 있으리라고 예상됨)
- 먹장어 항체를 이용한 백신개발은 수동면역백신 개발에 중점을 두고 있고, 이것은 항체가 AIV와 결합하여 감염력을 떨어뜨리는 것으로서, 대량항체생산을 통하여 외부환경 및 점막면역부분에 작용토록 하는 것임.
- 본 과제를 통해 선별된 조류독감바이러스 특이항체로 우선적으로 선별된 GKP94, GKP261, GKP343 먹장어 항체들은 친화력을 높이기 위해 LRRCT 도메인 스와핑 과정을 추후 진행하여 보다 높은 친화력과 저감화 능력을 가지는 항체로 보다 진보될 예정. 먹장어 항체는 일반적인 마우스 항체와는 달리, LRRCT 도메인 스와핑 과정을 통해 100배, 많게는 천배까지 항원 결합력을 높일 수 있음. 이후 효모 발현 시스템을 통해 저비용으로 대량생산할 계획이며 실제 산업화를 추진할 예정임.

나. 기대성과

- 기술적 측면: 먹장어를 이용한 수동면역 백신을 이용한 효율적인 생산 기술 확립 및 대량생산의 편의성에 의한 산업적 응용확대
- 경제·산업적 측면: 현재 수동면역을 통한 백신개발은 고비용으로 개발이 제한적일 뿐만 아니라 매번 변화하는 AIV에 대한 다변화적 백신개발 또한 어려움이 있어 AIV로 인한 경제적 손실이 발생함. 이에 본 연구를 통해 개발한 먹장어항체 발현 시스템을 통해 동물백신 시장의 확대 및 경제적 상품 가치의 증진
- 관련 후속연구개발의 전망: Passive immune vaccine으로서 다른 가축 적용 가능성: 환경 중 다양한 감염성 질병의 원인체 저감화 및 생체의 외부 접촉 부위 (예: 장)등에 적용 가능
 - 소: FMD, BVD 등
 - 닭: AI, ND등
 - 돼지: PED, Rota, TGE등
- 본 “조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술” 연구과제의 수행을

통하여 축적된 기술, 즉 항체 생산기술을 PED 및 FMD virus에 대한 항체를 생산하는데 적용하는데 있음. 본 연구개발을 통한 기술로서 다양한 국가재난형 병원체에 대한 항체를 생산에 있어서 어려움보다는, 각각의 항원에 대한 적용방법의 개발이 요구되고 있음, 예를 들면 PED virus 항체는 자돈에 음수, 사료첨가 혹은 위산의 영향을 받지 않고 장내로 전달되도록 하는 방법 개발, FMD virus에 대하여는 가슴기와 같은 기기의 개발을 통하여 일정하게 항체가 살포되도록 하는 방법 등을 고려하여 볼 수 있음.

- 이후, 최종 선발된 조류독감바이러스 특이적 먹장어 항체 3종류의 효모 분비 벡터 시스템을 통해 저렴한 가격에 대량생산할 계획이며, 살포제 등과 비교해 보다 효과적인 음용 첨가제, 사료 첨가제, 독성이 없이 장내까지 전달 될 수 있도록 하는 제품들을 개발하여 산업화를 추진하고자 함.

붙임. 참고문헌

1. Guo, P., M. Hirano, B. R. Herrin, J. Li, C. Yu, A. Sadlonova, and M. D. Cooper. 2009. Dual Nature of the Adaptive Immune System in Lampreys. *Nature* 459: 796-801.
2. Cooper, M. D., and M. N. Alder. 2006. The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* 124: 815-822.
3. Alder, M. N., I. B. Rogozin, L. M. Iyer, G. V. Glazko, M. D. Cooper, and Z. Pancer. 2005. Diversity and Function of Adaptive Immune Receptors in a Jawless Vertebrate. *Science* 310: 1970.
4. Rogozin, I. B., L. M. Iyer, L. Liang, G. V. Glazko, V. G. Liston, Y. I. Pavlov, L. Aravind, and Z. Pancer. 2007. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nature Immunology* 8: 647.
5. Pancer, Z., C. T. Amemiya, G. R. A. Ehrhardt, J. Ceitlin, G. Larry Gartland, and M. D. Cooper. 2004. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* 430: 174-180.
6. Herrin, B. R., and M. D. Cooper. 2010. Alternative Adaptive Immunity in Jawless Vertebrates. *The Journal of Immunology* 185: 1367.
7. Kasamatsu, J., Y. Sutoh, K. Fugo, N. Otsuka, K. Iwabuchi, and M. Kasahara. 2010. Identification of a third variable lymphocyte receptor in the lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 14304-14308.
8. Li, J., S. Das, B. R. Herrin, M. Hirano, and M. D. Cooper. 2013. Definition of a third VLR gene in hagfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 15013-15018.
9. Pancer, Z., N. R. Saha, J. Kasamatsu, T. Suzuki, C. T. Amemiya, M. Kasahara, and M. D. Cooper. 2005. Variable lymphocyte receptors in hagfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9224-9229.
10. Finstad, J., and R. A. Good. 1964. THE EVOLUTION OF THE IMMUNE RESPONSE : III. IMMUNOLOGIC RESPONSES IN THE LAMPREY. *The Journal of Experimental*

Medicine 120: 1151-1168.

11. Papermaster, B. W., R. M. Condie, J. Finstad, and R. A. Good. 1964. EVOLUTION OF THE IMMUNE RESPONSE : I. THE PHYLOGENETIC DEVELOPMENT OF ADAPTIVE IMMUNOLOGIC RESPONSIVENESS IN VERTEBRATES. *The Journal of Experimental Medicine* 119: 105-130.
12. Marchalonis, J. J., and G. M. Edelman. 1968. PHYLOGENETIC ORIGINS OF ANTI-BODY STRUCTURE : III. ANTIBODIES IN THE PRIMARY IMMUNE RESPONSE OF THE SEA LAMPREY, *PETROMYZON MARINUS*. *The Journal of Experimental Medicine* 127: 891-914.
13. Linthicum, D. S., and W. H. Hildemann. 1970. Immunologic Responses of Pacific Hagfish. *The Journal of Immunology* 105: 912.
14. Fujii, T., H. Nakagawa, and S. Murakawa. 1979. Immunity in lamprey I. Production of haemolytic and haemagglutinating antibody to sheep red blood cells in Japanese lampreys. *Developmental & Comparative Immunology* 3: 441-451.
15. Alder, M. N., B. R. Herrin, A. Sadlonova, C. R. Stockard, W. E. Grizzle, L. A. Gartland, G. L. Gartland, J. A. Boydston, C. L. Turnbough, and M. D. Cooper. 2008. Antibody responses of variable lymphocyte receptors in the lamprey. *Nat Immunol* 9: 319-327.
16. Herrin, B. R., M. N. Alder, K. H. Roux, C. Sina, G. R. A. Ehrhardt, J. A. Boydston, C. L. Turnbough, and M. D. Cooper. 2008. Structure and specificity of lamprey monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2040-2045.
17. Lee, S.-C., K. Park, J. Han, J.-j. Lee, H. J. Kim, S. Hong, W. Heu, Y. J. Kim, J.-S. Ha, S.-G. Lee, H.-K. Cheong, Y. H. Jeon, D. Kim, and H.-S. Kim. 2012. Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 3299-3304.
18. Tasumi, S., C. A. Velikovsky, G. Xu, S. A. Gai, K. D. Wittrup, M. F. Flajnik, R. A. Mariuzza, and Z. Pancer. 2009. High-affinity lamprey VLRA and VLRB monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12891.
19. Moot, R., S. S. Raikar, L. Fleischer, M. Querrey, D. E. Tylawsky, H. Nakahara, C. B. Doering, and H. T. Spencer. 2016. Genetic engineering of chimeric antigen receptors

using lamprey derived variable lymphocyte receptors. *Molecular Therapy Oncolytics* 3: 1602-1606.

20. Yun, M., D.-Y. Kim, J.-j. Lee, H.-S. Kim, H.-S. Kim, A. Pyo, Y. Ryu, T.-Y. Kim, J. H. Zheng, S. W. Yoo, H. Hyun, G. Oh, J. Jeong, M. Moon, J.-H. Min, S. Y. Kwon, J. Y. Kim, E. Chung, Y. Hong, W. Lee, H.-S. Kim, and J.-J. Min. 2017. A High-Affinity Repertoire for Molecular Imaging of EGFR-Expressing Malignant Tumors. *Theranostics* 7: 2620-2633.

21. Velásquez, A. C., K. Nomura, M. D. Cooper, B. R. Herrin, and S. Y. He. 2017. Leucine-rich-repeat-containing variable lymphocyte receptors as modules to target plant-expressed proteins. *Plant Methods* 13: 29.

22. Takaba, H., T. Imai, S. Miki, Y. Morishita, A. Miyashita, N. Ishikawa, H. Nishizumi, and H. Sakano. 2013. A major allogenic leukocyte antigen in the agnathan hagfish. *Scientific Reports* 3: 1716.

23. Im, S. P., J. S. Lee, S. W. Kim, J. E. Yu, Y. R. Kim, J. Kim, J.-H. Lee, and T. S. Jung. 2016. Investigation of variable lymphocyte receptors in the alternative adaptive immune response of hagfish. *Developmental & Comparative Immunology* 55: 203-210.

24. Guo, Y., J. Li, and X. Cheng. 1999. [Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus]. *Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology* 13: 105-108.

25. Bano, S., K. Naeem, and S. A. Malik. 2003. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. *Avian diseases* 47: 817-822.

26. Sun, Y., and J. Liu. 2015. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. *Protein & Cell* 6: 18-25.

27. Iqbal, M., T. Yaqub, N. Mukhtar, M. Z. Shabbir, and J. W. McCauley. 2013. Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds. *Veterinary Research* 44: 100.

28. Altman, M. O., J. R. Bennink, J. W. Yewdell, and B. R. Herrin. 2015. Lamprey VLRB response to influenza virus supports universal rules of immunogenicity and antigenicity. *eLife* 4: e07467.

29. Lazarte, J. M. S., Y. R. Kim, J. S. Lee, S. P. Im, S. W. Kim, J. W. Jung, J. Kim, J.-H. Lee, and T. S. Jung. 2017. Immunostimulatory effect of DDX41 of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Food and Agricultural Immunology* 28: 876-887.
30. Brusle, J., and G. Anadon. 1996. The structure and function of fish liver. In *Fish morphology*. Science Publishers Inc. New York. 545-551.
31. Crispe, I. N., M. Giannandrea, I. Klein, B. John, B. Sampson, and S. Wuensch. 2006. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunological Reviews* 213: 101-118.
32. Kotak, B. G., S. Semalulu, D. L. Fritz, E. E. Prepas, S. E. Hruday, and R. W. Coppock. 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 34: 517-525.
33. Kim, H. M., S. C. Oh, K. J. Lim, J. Kasamatsu, J. Y. Heo, B. S. Park, H. Lee, O. J. Yoo, M. Kasahara, and J.-O. Lee. 2007. Structural Diversity of the Hagfish Variable Lymphocyte Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 282: 6726-6732.
34. Velikovskiy, C. A., L. Deng, S. Tasumi, L. M. Iyer, M. C. Kerzic, L. Aravind, Z. Pancer, and R. A. Mariuzza. 2009. Structure of a lamprey variable lymphocyte receptor in complex with a protein antigen. *Nature structural & molecular biology* 16: 725-730.
35. Collins, B. C., R. J. Gunn, T. R. McKittrick, R. D. Cummings, M. D. Cooper, B. R. Herrin, and I. A. Wilson. 2017. Structural Insights into VLR Fine Specificity for Blood Group Carbohydrates. *Structure (London, England : 1993)* 25: 1667-1678.e1664.
36. Kirchdoerfer, R. N., B. R. Herrin, B. W. Han, C. L. Turnbough, M. D. Cooper, and I. A. Wilson. 2012. Variable Lymphocyte Receptor Recognition of the Immunodominant Glycoprotein of *Bacillus anthracis* Spores. *Structure(London, England:1993)* 20: 479-486.
37. Huang, X., J. J. Barchi, Jr., F. D. Lung, P. P. Roller, P. L. Nara, J. Muschik, and R. R. Garrity. 1997. Glycosylation affects both the three-dimensional structure and antibody binding properties of the HIV-1IIIB GP120 peptide RP135. *Biochemistry* 36: 10846-10856.
38. Bazin, R., A. Darveau, F. Martel, A. Pelletier, L. Piche, M. St-Laurent, L. Thibault, A. Demers, L. Boyer, G. Lemieux, and et al. 1992. Increased avidity of mutant IgM antibodies caused by the absence of COOH-terminal glycosylation of the mu H chain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 149: 3889-3893.

39. Zheng, K., C. Bantog, and R. Bayer. 2011. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs* 3: 568–576.
40. Dalton, A. C., and W. A. Barton. 2014. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 23: 517–525.
41. Yan, B. X., and Y. Q. Sun. 1997. Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *The Journal of biological chemistry* 272: 3190–3194.
42. Trevino, S. R., J. M. Scholtz, and C. N. Pace. 2007. Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa. *Journal of molecular biology* 366: 449–460.
43. Saupe, F., M. Reichel, E. J. M. Huijbers, J. Femel, P.-O. Markgren, C. E. Anderson, S. Deindl, U. H. Danielson, L. T. Hellman, and A.-K. Olsson. 2017. Development of a novel therapeutic vaccine carrier that sustains high antibody titers against several targets simultaneously. *The FASEB Journal* 31: 1204–1214.
44. Hofmeyer, T., S. Schmelz, M. T. Degiacomi, M. Dal Peraro, M. Daneschdar, A. Scrima, J. van den Heuvel, D. W. Heinz, and H. Kolmar. 2013. Arranged sevenfold: structural insights into the C-terminal oligomerization domain of human C4b-binding protein. *Journal of molecular biology* 425: 1302–1317.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술				
	(영문) Production and industrialization of specific antibody for AIV				
주관연구기관	경상대, 충북대, 서울대	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 수의대학		
참 여 기 업	(주) 메덱스		(성명) 정태성		
총연구개발비 (1,056,000천원)	계	1,056,000	총 연구 기간	2015.8월.~ 2018.8월	
	정부출연 연구개발비	900,000	총 참여 연구 원 수	총 인 원	57
	기업부담금	50,200		내부인원	19
	연구기관부담금			외부인원	38
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>본 과제에서는 현재 빈발하고 있는 주요 국가 재난형 질병, 특히 조류인플루엔자의 예방 및 저감화를 위하여 특이 항체 생산이 가능한 시스템을 확립하고, 이를 통해 생산된 국가 재난형 질병 원인체에 대한 항체를 수동면역 백신으로 개발하여 AIV 질병 발생 저감화를 시키고자 함</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>AIV에 대한 무악척추동물 (턱없는 동물)의 획득면역 산물인 VLRs (variable lymphocyte receptors)를 이용한 다양한 항체(먹장어 항체) 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - AIV에 대한 먹장어항체 생산을 위한 platform 구축 - AIV에 대한 먹장어항체의 안전성 및 효능평가연구 - AIV에 대한 먹장어항체의 항원성 부위 (Epitope)의 발굴 및 작용성 검증 - 개발된 먹장어 항체의 다양한 적용을 통한 제품의 산업화 연구 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>항체의 중요성 및 효용성은 이미 잘 알려져 있으나, 생산단가 및 제조공정의 복잡성로 인하여 다양한 활용이 저해되었음. 따라서 본 연구개발에서는 저비용으로 생산 가능한 효모의 분비 시스템을 통하여 대량생산을 할 것이며, 이렇게 생산된 항체는 조류 인플루엔자가 발생하고 있는 곳, 혹은 발생할 가능성이 있는 곳에 사료, 음용수 및 스프레이 방식으로 적용 가능하며, 또한 오리농장에서도 적용가능하고, 나아가서는 철새의 먹이에 코팅 혹은 섞어서 줌으로서 바이러스 감염의 저감화에 큰 역할을 할 수 있음. 뿐만 아니라 항체 생산방법의 확립은 다른 주요 가축질병 적용 가능함. 예) 소: FMD, BVD 등, 닭: AI, ND등, 돼지: PED, Rota, TGE등</p>					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		315045032SB010	
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야	가축질병대응		과제구분	단위	
사업명	가축질병대응기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	경상대학교		연구책임자	정태성	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2015.8-2016.8	300,000	50,200	350,200
	2차연도	2016.8-2017.8	300,000	50,200	350,200
	3차연도	2017.8-2018.8	300,000	50,200	350,200
	4차연도				
	5차연도				
	계		900,000	150,600	1,050,600
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경상대학교 수의대학	교수	정태성

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구에서는 기존의 보편적인 마우스 항체와는 달리, 완전 새로운 형태의 먹장어 항체를 이용해 조류인플루엔자 바이러스를 중화시키는 개발을 시도함. 먹장어 항체는 독창적이고, 창의적이며, 기존의 항체들의 단점들을 보완할 수 있는 다음과 같은 우수성이 있음. 1) 항원 특이적 먹장어 항체를 선별한 후 그 항체의 유전자를 바로 확보할 수 있음. 2) 기존의 항체들은 항원 결합부위가 2곳이지만, 먹장어 항체는 단일체, 이합체, 삼합체, 사합체, 칠합체, 십합체 등 다양한 형태의 구조를 유전자 조작을 통해 가능함. 3) 먹장어 구조 변환을 통해, 항원과의 결합력과 항체 분자량 크기를 자유자재로 조절 가능. 4) 기존의 항체에는 존재하지 않는 항원 결합능 강화부위(LRRCT)가 존재하여 도메인 스와핑과 같은 간단한 작업을 통해, 항원 결합력을 100배에서 1,000배까지 증진 가능.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구를 통한 바이러스 중화항체 개발은 조류 인플루엔자 바이러스 중화 뿐만 아니라, 관련 후속 연구개발이 전망됨. 이는 passive immune vaccine으로서 다른 가축으로의 적용 가능성, 환경 중 다양한 감염성 질병의 원인체 저감화 및 생체의 외부 접촉 부위 등에 적용가능하여, 소 (FMD, BVD), 닭(AI, ND), 돼지(PED, Rota, TGE) 등 다양한 동물의 질병 유발 바이러스 및 다양한 국가재난형 병원체(예, 메르스바이러스)에 대한 중화항체 개발로의 파급효과가 예상됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구를 통해 특이 방어 항체의 대량생산 체계 구축 및 산업화 진행을 통한 활용가능성이 예상됨. 저비용, 고효율로 농가 보급을 할 수 있으며, 배양에 드는 비용의 경감과 포장 및 물류에 드는 비용절감을 기대할 수 있으며, 다른 여러 바이러스들에 대한 백신개발로도 활용도를 넓힐 수 있음. 또한, 가축 사육장에 음수, 사료 첨가 혹은 위산의 영향을 받지 않고 장내로 전달되도록 하는 방법 개발, 가슴기와 같은 기기의 개발을 통하여 일정하게 항체가 살포되도록 하는 방법으로 활용가능.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구계획서에 미리 보고했던 바와 같이 년차별 계획에 따른 연구수행은 성공적으로 수행되었음. 보다 구체적으로는 먹장어 항체의 항원 특이적 스크리닝, 벡터시스템 구축, 항원 결합능 증진, SPF 닭에서의 효능평가, 산란계에서의 효능평가, 항원 결합 에피토프 규명, 새로운 AIV 백신개발 가능성 테스트, 대량생산을 위한 배양조건 최적화 등, 모든 측면에서 연구개발수행은 성실하게 시행되었다고 사료됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (~~아주우수~~, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제의 연구개발결과 성과는 당초 계획의 3편 지식 재산권 확보와 3편의 SCI 논문 발표를 목표로 하였음. 특히 출원은 국내 3건과 국제 3건으로 보다 많은 지적 재산권을 보유하였으며 SCI 논문도 당초계획 대비 200%에 해당하는 6편의 우수한 논문을 발표하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
먹장어 항체의 스크리닝 및 발현에 관한 독자적 벡터시스템 구축	10	10	VLR cDNA library를 정상적으로 발현시키며 스크리닝에 구형하기 위해 크게 두 종류의 벡터 시스템 (yeast display vector 및 mammalian secretion vector)을 개발하고 정상적이고 높은 효율의 발현양상을 규명화하였음.
AI 항원 면역 후, 특이 방어항체 유전자 획득	10	10	먹장어에 AIV 면역은 성공적으로 수행되었으며 또한, VLR cDNA library도 높은 효율로 합성되어졌음.
개발된 먹장어항체 중 유효 먹장어항체를 선정	20	20	ELISA 방법 및 FACS sorting 방법을 통해 AIV에 특이적으로 반응성을 보이는 VLR clone들을 선정하였으며, 이는 immunoblotting과 FACS 분석결과를 통해 다시 한번 검증하였음.
AIV 구성단백질 중 어떤 단백질과 결합 반응성을 보이는지 확인	10	10	AIV 특이적으로 결합능을 보이는 먹장어 항체들이 실제로 AIV와 결합할 때 구체적으로 어떤 단백질과 반응성을 보이는 지를 확인하기 위해 AIV 구성단백질들을 각각 발현하는 세포주들을 이용하여 그 결합능을 규명코자 함.
선정된 AIV 특이적 먹장어 항체의 중화반응 테스트	10	7	ELISA, FACS 결과 및 immunoblotting을 통해 실제로 AIV 와 결합하는 VLR 클론을 발굴하였으나, 중화반응 테스트에서는 아직 promising한 결과도출이 안됐음. 이는 선정된 VLR 단백질들의 농축 등과 같은 일련의 과정들을 통해 해결될 것으로 사료됨
개발된 먹장어항체의 효능 스크리닝	10	8	개발된 먹장어 항체 13종류에 대한 중화능을 평가한 결과 3종류에 대해서는 현재도 계속 실험이 진행중이나 현재까지 진행된 10종류에서는 아직은 국내 저병원성 AIV(H9N2)에 대한 충분한 중화능을 보이지 않고 있음
AIV 감염된 조류 조직절편 이용 먹장어 항체들의 감지능력 확인	10	10	AIV 특이적 결합능을 보이는 먹장어 항체들을 대상으로 야생에서, 혹은 실험실에서 인위적으로 AIV로 감염된 조류들의 조직절편을 이용하여 먹장어 항체들의 감지 능력 확인
먹장어항체 Epitope 확인 방법 개발 및 정립	10	8	4. HA 항원 제작에 사용된 Influenza A H9N2 (Hong Kong/G9/97)의 HA1 subunit genomic DNA 정보 확보 및 자체 합성. 5. 합성된 genome sequence를 이용하여 epitope site 확인을 위한 fragmented HA recombinant protein library 제작 및 발현 확인. 6. 먹장어항체 항원 특이성 확인을 위한 western blot 실험 방법 개발 및 확립. [자체평가 지표: 90%, AIV 먹장어 항체 선정 시 epitope mapping 완성으로 100% 완료 예정]
조류인플루엔자 특이항체 발현위한 yeast host 및 배양조건 결정	10	10	- 발현량, 배양조건 등을 고려했을 때 <i>Pichia pastoris</i> 가 적합한 것으로 결정함. - pH 5~6에서 발현이 가장 적합할 것으로 판단되어 조류인플루엔자 특이항체 발현을 위해 기본 pH로 시작하여 최적화 할 생각임.
합계	100점	83	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서는 보다 혁신적이며 미래지향적인 형태의 먹장어 항체를 이용하여 조류인플루엔자 바이러스에 대한 특이 방어항체를 생산하였고, 산업화 기술 개발을 시도하였음. 또한, 기존의 항체들의 단점들을 완벽히 보완할 수 있는 새로운 백터개발들이 이루어 졌으며 이를 통해 다양한 항원들에 대한 맞춤형 항체들을 개발할 수 있는 플랫폼 기술의 개발이 보다 잠재력 있는 기술 개발로 평가될 수 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

당초 계획했던 바와 같이, 새로운 형태의 먹장어 항체 발현 백터시스템 개발, 특정 항원에 대한 맞춤형 항체를 선별할 수 있는 시스템의 개발, 기존의 보편적 항체로서는 거의 불가능했던, 유전자 조작을 통한 항원 결합능 증진, 효모를 이용한 대량 생산 등과 같은 혁신적인 시스템 개발 등이 완벽하게 진행되어졌음. 따라서, 이 모든 시스템들이 유기적으로 연결된 먹장어 항체 플랫폼 기술은 각종 다양한 항원에 대한 먹장어 항체 개발에 사용될 수 있다는 사실이 평가 시 필수적으로 고려되어야 할 사항임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

유전자 조작을 통한 다양한 구조 변환 및 항원 결합 부위 증진, 항원 결합능 증진, 다양한 에피토프 연결을 통한 보다 간편한 정제 과정, 다른 개체를 통한 대량 생산 등, 현재까지 사용되는 기존의 항체들의 단점들을 보완할 수 있는 먹장어 항체는 본 과제의 AIV 뿐만 아니라 다른 바이러스들의 방어 항체에도 그 파급효과를 나타낼 수 있는 잠재력이 충분하여 그 스펙트럼을 보다 폭넓게 응용하여 사용할 수 있는 기술 개발임.

IV. 보안성 검토

해당없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

해당없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	가축질병대응기술개발사업	
연구과제명	조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술			
주관연구기관	경상대학교		주관연구책임자	정태성
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	900,000	156,000		1,056,000
연구개발기간	2015.8-2018.8			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 먹장어 항체의 스크리닝 및 발현에 관한 독자적 벡터시스템 구축	기존에 존재하지 않던 새로운 형태의 먹장어 항체 발현 벡터시스템을 독자적으로 구축하였으며 항원 특이적 스크리닝을 시행하였음
② AI 항원 면역 후, 특이 방어항체 유전자 획득	먹장어 복강에 AI 바이러스를 면역하는데 성공하였으며, 먹장어 내에서 획득면역형질로 형성된 바이러스 특이 방어 항체 유전자를 성공적으로 획득하였음
③ 개발된 먹장어항체 중 유효 먹장어항체를 선정	항원 특이적 먹장어 항체 스크리닝을 통해 유효한 먹장어 항체들을 우선적으로 대량 선정하였음
④ AIV 구성단백질 중 어떤 단백질과 결합 반응성을 보이는지 확인	항원 특이적 결합능을 보이는 먹장어 항체 중 AIV 구성 단백질 중 외피 단백질 및 내피 단백질에 결합 반응성을 보이는지 확인하였음
⑤ 선정된 AIV 특이적 먹장어 항체의 중화반응 테스트	최종적으로 선정된 AIV 특이적 먹장어 항체가 실제적으로 AI 바이러스를 중화하는지 FACS 분석을 통해 그 결과를 도출하였음
⑥ 개발된 먹장어항체의 효능 스크리닝	개발된 먹장어 항체의 실제적인 효능을 알아보기 위한 스크리닝을 시행하였음
⑦ AIV 감염된 조류 조직절편 이용 먹장어 항체들의 감지능력 확인	실제적으로 실험실내 및 야생 농가에서 AIV로 감염된 조류의 조직 절편을 이용하여 먹장어 항체들이 감염된 조직내에서 분포되어 있음을 다양한 먹장어 항체들로 감지하는 데 성공하였음
⑧ 먹장어항체 Epitope 확인 방법 개발 및 정립	실제적으로 결합하는 부위를 알아보기 위한 epitope 확인 방법을 개발하였음
⑨ 조류인플루엔자 특이항체 발현위한 yeast host 및 배양조건 결정	항원 특이적 먹장어 항체의 대량생산을 위해 본 연구에서는 효모세포 주를 선정하였고, 다양한 배양조건을 통해 가장 최적화된 먹장어 발현 효모 배양조건을 결정하였음

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	1		1	1						2	2		0	3	1				
연구기간내 달성실적	8	1		3	0						7	1	3.0	3	7	0				
달성율(%)	40 0	10 0		30 0	0						35 0	50		30 0	22 5	0				

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	독창적인 먹장어 발현 벡터시스템 개발
②	AI 항원 면역 후 특이 방어 항체 유전자 획득
③	유전자 조작을 통한 2합체 먹장어 항체 개발
④	유전자 조작을 통한 4합체 먹장어 항체 개발
⑤	유전자 조작을 통한 7합체 먹장어 항체 개발
⑥	유전자 조작을 통한 10합체 먹장어 항체 개발
⑦	먹장어 항체의 LRRCT 부분 도메인 스와핑 과정을 통한 항원 결합능 증진
⑧	ELISA 과정을 통한 항원 특이적 먹장어 항체 스크리닝
⑨	효모 세포주를 통한 먹장어 항체 대량 생산시스템 구축

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)						
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해	정책 결	정책 자료	기타
①의 기술	V											V
②의 기술	V											V
③의 기술	V						V					
④의 기술	V						V					
⑤의 기술	V						V					
⑥의 기술	V						V					
⑦의 기술	V											V
⑧의 기술	V											V
⑨의 기술	V							V				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	다양한 항원에 대한 먹장어 항체 발현 시스템 활용가능
②의 기술	다양한 동물 병원성 바이러스에 대한 특이 방어 항체 유전자 획득 가능
③의 기술	특정 항원에 대한 이합체 먹장어 항체로의 응용 가능
④의 기술	특정 항원에 대한 사합체 먹장어 항체로의 응용 가능
⑤의 기술	특정 항원에 대한 칠합체 먹장어 항체로의 응용 가능
⑥의 기술	특정 항원에 대한 합체 먹장어 항체로의 응용 가능
⑦의 기술	특정 항원에 대한 먹장어 항체 발굴 후 항원 결합능을 100배에서 1000배까지 증진 가능
⑧의 기술	다양한 병원성 바이러스 및 단백질 등에 대한 항원 특이적 먹장어 항체 발굴을 위한 기본적 실험방법으로 활용가능
⑨의 기술	최종 선별된 항원 특이적 먹장어 항체의 대량생산을 통한 상품화 시스템 구축가능

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	2	1		1		1						2	2						
연구기간내 달성실적	8	1		3								7	1	3.0					
연구종료 후 성과창출 계획		7		3		1													

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	특정 항원에 대한 이합체, 사합체 및 칠합체로서 떡장어 항체로의 응용 가능		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	5년	실용화예상시기 ³⁾	10년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	기술을 전수 받기위한 인력, 설비 및 장비 요함		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

<뒷면지>

주 의

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