

발간등록번호
11-1543000
-002368-01

발간등록번호
11-1543000-002368-01

구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증 최종보고서

가축질병대응기술개발 R&D Report

2018

농림축산식품부

구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증 최종보고서

2018. 11. 12.

주관연구기관 / 충남대학교
협동연구기관 / 성신여자대학교
협동연구기관 / (주)코미팜
협동연구기관 / 농림축산검역본부

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "구제역 예방 재조합백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능검증" (개발기간 : 2015.8.14 ~ 2018.8.13.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 12.

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단	(대표자)	이영석 (인)
협동연구기관명 : 성신여자대학교 산학협력단	(대표자)	채정현 (인)
협동연구기관명 : ㈜코미팜	(대표자)	문성철 (인)
협동연구기관명 : 농림축산검역본부	(대표자)	박봉근 (인)

주관연구책임자 : 이 종 수
협동연구책임자 : 송 제 민
협동연구책임자 : 이 오 수
협동연구책임자 : 김 제 조

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 재조합 항원 발현시스템 확보 ● 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 항원 발현시스템 확보 ● 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물에서의 구제역바이러스 방어 효능 검증 ● 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 항원 발현을 달성 ● 안전하고 효과적인 재조합백신의 분리정제 기술 확립 및 대량 생산시스템 구축 ● 재조합 구제역 백신의 백신 품목허가 제출 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 대장균 가용단백질 발현시스템을 이용한 구제역 다가항원 발현 및 생산 연구 ○ 대장균 가용단백질 발현시스템을 구축하여 다양한 FMDV serotype (O, A, Asia1 type) 유래 항원단백질들 (3가 serotype용, O serotype용, A serotype용, Asia serotype용, 5가 serotype용 Multi-VP1 epitope)의 가용성 고발현 시스템 확립 및 원천기술 확보와 경제적 정제법 연구 ● 곤충세포 발현시스템을 이용한 내산성 구제역 VLP 생산 연구 ○ FMDV의 VP1 구조단백질의 안정성에 영향을 주는 4종류 (N17D, S93F, C142T, H145Y) 돌연변이의 작용을 실험적으로 입증 ● 하이브리드 VLP 기술의 proof of concept 구현 및 원천기술 확보 ○ Baculovirus 시스템을 이용하여 FMDV의 주요 항원 (VP1 epitopes)부분을 막표면에 발현하는 Hybrid-VLP 제작 시스템의 원천기술 (등록특허)을 확보 ● 상기 개발된 재조합 항원들을 이용한 백신 효능 검증 ○ 상기의 재조합 항원들의 면역원성 및 FMD virus에 대한 방어 효능을 실험동물 (마우스) 및 목적동물 (돼지)에서 백신의 효능을 검증하여 백신으로서의 활용 가능성을 확보 ● 재조합 구제역 단백질 항원의 보존성 및 조성 확인 ● 재조합 항원의 시제품 제조 및 안전성 검증 ● 재조합 항원의 임상시험 계획서 제출 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 안전하게 생산이 가능한 재조합 구제역 백신 생산기술 확보 및 발전 ● 단기간내 방어항원 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 확보 및 발전 ● 구제역에 대한 신속 방어가 가능한 백신 후보물질 발굴 ● 국내 동물 백신 산업 시장 확대 및 수출가능성 증대 기대 ● 구제역 국가적 대유행 상황에 대한 억제력 및 백신 자주권 확보 기대 ● 본 과제에 의해 구축된 안전하고 효과적인 재조합 항원발현 시스템을 이용한 다른 동물용 혹은 사람용 백신 제품 개발에 활용 기대 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	재조합 단백질	고발현 시스템	구제역백신	바이러스 유사입자	방어능
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Recombinant protein	High-expression system	Foot-and-mouth disease virus vaccine	Virus-Like Particles	Protective efficacy

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제1장. 연구개발과제의 개요	1
제2장. 연구수행 내용 및 결과	16
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	121
제4장. 연구결과의 활용 계획 등	125
붙임. 참고 문헌	127

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 현재의 불활화 구제역백신은 구제역 바이러스를 직접 이용해서 만든다는 점에서 제조공정에 있어 높은 방역수준을 갖춘 시설이 필요하고, 위험성 검증을 위해 차폐된 시설에서의 동물실험이 항상 필요하며, 각각 제조된 백신마다 그 성능을 일정하게 유지하기 어려운 단점이 있음.
- 또한, 구제역바이러스에 감염된 동물과 백신접종되어 면역성을 가진 동물을 구별하는 NSP-antibody test가 어려울 수 있고, 보다 중요한 문제점은 백신종인 혈청형과 다른 바이러스가 유행할 경우 높은 감염율을 보일 수 있다는 점으로 우리나라에서는 우리나라에서 유행하는 구제역바이러스에 대한 백신의 생산을 할 수 없어 새로운 혈청형에 대한 신속한 대응이 어렵다는 점이 있음.
- 또한, 전량 수입에 의존하여 전세계 대유행 시 수급부족의 문제가 발생할 수 있음.
- 따라서 기존의 불활화백신의 문제점을 보완하고, 장점은 부각시킬 수 있는 다른 형태의 백신 개발의 지속적 연구가 필요함.
- 새로운 구제역백신의 개발 및 연구는 돼지를 비롯한 반추류동물 모두에서 면역원성이나 방어능이 좋으며, 방어가 가능한 항체지속 기간이 긴 백신의 연구가 필요하고, 짧은 시간내에 혈청형 및 아형이 다른 구제역바이러스에 대해서도 방어항원의 교제가 가능한 구제역 항원의 발현 및 전달시스템이 요구되고 있음.
- 또한, 구제역바이러스에 대한 차세대 백신의 개발은 구제역바이러스 전체를 이용해 만들지 않으며, 균일한 성능의 백신 제조가 가능하고, 백신 접종된 동물과 자연감염 동물을 구별할 수 있는 방향으로 진행되어야 함.
- 본 “구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 실험동물 효능 검증” 연구에서는 본 연구팀이 수년간 연구한 항원발현 시스템들을 이용하여 효율이 보다 좋은 구제역 항원발현 및 전달시스템을 개발하고자 하며, 이를 바탕으로 재조합 구제역 백신을 개발하고자 함.

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 배경

(1) 구제역 (Foot and Mouth disease; FMD)

- 구제역 (Foot and Mouth Disease)이란 우제류 (Cloven hoofed animal) 즉, 굽이 두 개로 갈라진 동물에 감염되는 질병으로 특히 소, 돼지, 양, 염소, 사슴등에 잘 감염하는 것으로 알

려져 있음.

- 구제역은 수포성 질환으로서 잘 알려져 있으며 입술, 혀, 잇몸, 코, 발굽 사이 등에 물집 (수포)이 생기는 것이며, 체온이 급격히 상승하거나 식욕이 저하됨으로 인해 심하게 앓거나 죽게 되는 질병으로 국제수역사무국 (OIE)에서 A급 질병 (전파력이 빠르고 국제교역상 경제피해가 매우 큰 질병)으로 분류하며 우리나라 제1종 가축전염병으로 지정되어 있음. 발병한 환축에서는 24시간 이내에 증상들이 나타나 유연, 수포발생이 관찰되며 발생한 수포는 곧 터져서 짓무르면서 환축의 보행장애를 유발하게됨. 6개월 미만의 송아지에서는 구제역 감염시 심근염에 의해 죽는 경우가 있음.
- 구제역의 원인체는 Picornaviridae Aphthovirus속의 양성 단일가닥 RNA 바이러스로서 막 (Envelope)이 없이 구조단백질로 이루어진 캡시드 (capsid)에 쌓인체로 존재하는 바이러스 이며, 7개의 혈청형 즉 A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3형으로 분류되며 이 주요 혈청형은 다시 80 여러 가지의 아형으로 나뉘며, 혈청형은 혈청아형내에서 변이가 잘 일어나며, 혈청형간의 교차 면역은 이루어지지 않는 것으로 알려져 있음.
- 구제역 바이러스는 유기용매, 낮은 온도, 습기 있는 중성 pH의 환경에서 일반적으로 저항성을 나타내나, 열, 산 및 알칼리에 약하며, 특히 pH에 의한 감수성이 매우 높아 pH가 6.5 이하나 11이상일 때 빠르게 감염력이 소실됨.
- 구제역의 중요한 특징 중 하나는 빠른 전파력으로서 폐사율 자체가 높지는 않으나 높은 이환율 때문에 가축산업에 막대한 경제적 피해를 유발하며 또한, 혈청형 또는 혈청아형 내에서 변이가 잘 일어나지만, 혈청형간의 교차 면역은 이루어지지 않기 때문에 그 예방 및 질병 발생의 조절이 매우 어려운 질병임.
- 실례로, 국내에서 사용하는 구제역 백신은 Merial사에서 제조한 3가백신으로 O1 Manisa, A May97, Asia 1 Shamir의 3가지 혈청형에 대한 백신이며, 국내 및 EU의 기준도 통과한 제품으로 국내 발생중인 O형 구제역에 대한 충분한 방어가 기대되는 제품이나 방역당국의 조사결과를 보면 항체생성률이 0 ~ 80%로 다양하며 백신사용에도 불구하고 구제역은 계속 발생하고 있는 실정임.
- 따라서 구제역 예방 및 질병컨트롤을 위한 연구 및 개발은 계속적으로 이루어져야 하며, 그 필요성이 강조되고 있음.

(2) 구제역의 발생 및 확산

- 구제역은 1514년 이탈리아 북부지역에서 최초 발생된 이후 19세기에는 전 세계적으로 발생하여 왔음. 구제역이 발생하였던 많은 나라에서 다양한 근절 및 박멸정책으로 인해 현재 많은 나라에서 발생하지 않고 있으나, 아직까지 아프리카, 중동, 아시아 및 남미에서 만연하고 있음.

- 최근 우리나라 주변 발생 현황은 중국에서 2010년 1월초부터 중국의 북경시, 광둥성, 강서성, 귀주성, 티벳 등 여러지역에서 산발적으로 발생하였고, 몽골, 대만, 홍콩 등에서도 발생하였으며, 일본 미야자키현에서 O형 (Mya-98 lineage) 구제역 바이러스가 2010년 4월 9일 최초발생 이후 6월 19일까지 292회에 걸쳐 발생한 것으로 보고됨.
- 한국은 1917년 소규모로 발생하기 시작하여 1934년까지는 전국적으로 발생하였으나, 그 이후 발생이 없다가 2000년 3월에 경기도, 충북 및 충남지역의 소에서 구제역 발생이 보고되었음.
- 2002년 5월에는 경기도와 충북지역의 돼지에서 구제역이 발생 보고되었고, 2010년 1월에는 경기도 포천의 소에서 8년 만에 6농가 29두에서 다시 발생하였으며, 또한 2010년 4월, 5월에 인천광역시 강화군, 경기도 김포시, 충청북도 충주시 및 충청남도 청양군지역에서 11농가에서 총 26두가 발생한 것으로 보고됨. 2010년 11월에도 구제역이 발생하여 전국적으로 확산됨에 따라서 전국의 소350여만두와 돼지 820여만두에 대하여 구제역 백신을 2차까지 접종함.
- 2014년 12월에는 충북 진천에서 구제역이 발생하여 2015년 1월경까지 경기도 안성, 이천 그리고 2월에는 경기도 이천과 충북 제천으로 확산되었으며 2015년 5월 13일까지의 집계 결과 7개도의 33개 시,군에서 총 185건의 구제역이 발생한 것으로 보고됨.
- 최근 국내 발생 구제역 바이러스는 O type의 경우 2000년 3월, 2002년 5월, 2010년 4월 및 11월, 그리고 가장 최근인 2014년 12월에 발생한 것으로 보고되어 있으며, A type의 경우 2010년 1월에 발생한 것으로 보고되어있음.

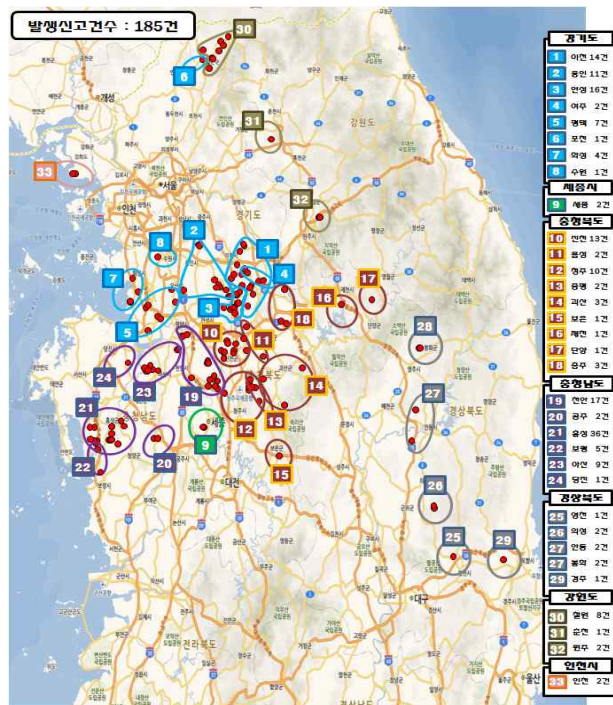


그림 1. 구제역 발생현황 (2015.5.14.일 보도자료 기준)

(3) 구제역 발생으로 인한 피해

- 2000년에는 3월 24일부터 4월 15일까지 경기도 파주, 충남 홍성등을 포함하는 3개도 6개 시군에서 발생하여 2216마리의 소가 살처분되어 약 3006억원의 경제적 손실을 입었음.
- 2002년도에는 5월 2일부터 6월 23일까지 경기도 안성을 포함하는 2개도 4개시에서 발생을 하여 돼지와 소를 포함한 16만 155마리가 살처분되어 1434억원의 경제적 손실을 입었음.
- 2010년 발생한 구제역은 2009년 11월29일 경북 안동에서 처음 양성판정이 나온 뒤 현재까지 11개 시.도의 75개 군에서 150건이 발생하여 소의 경우 15만871마리, 돼지는 331만7천864마리, 염소 7천535마리, 사슴 3천243마리 등 6천250개 농가에서 총 347만9천513마리의 가축이 살처분되어 매몰이 되었음.
- 구제역의 발생으로 인하여 가축의 손실뿐 아니라 전국에서 85개소의 가축시장이 폐쇄되었고, 매몰처리 및 구제역 확산을 막기 위해서 막대한 인원과 장비도 투입되었음. 공무원 48만9천 140명을 비롯해 군인 33만8천862명, 경찰 14만6천158명, 소방공무원 30만6천157명, 민간인 69만3천738명 등 총 197만4천55명이 투입이 되었고, 이 과정에 방역작업에 참여했던 공무원 8명이 목숨을 잃기도 했음. 구제역으로 인한 경제적인 손실액은 매몰보상비 1조8천억 원을 비롯해 3조원 가까이 되었음.
- 2014년 12월 3일 충북 진천에서 발생한 구제역은 2015년 1월에 경기도 안성, 이천 그리고 2월에는 경기도 이천과 충북 제천으로 확산되어 9만두 이상의 살처분 두수를 기록였고, 2015년 5월 13일 기준으로 총 195개 농장에서 172,734마리의 살처분 두수를 기록하고 있음.

(4) 현 구제역의 예방방법

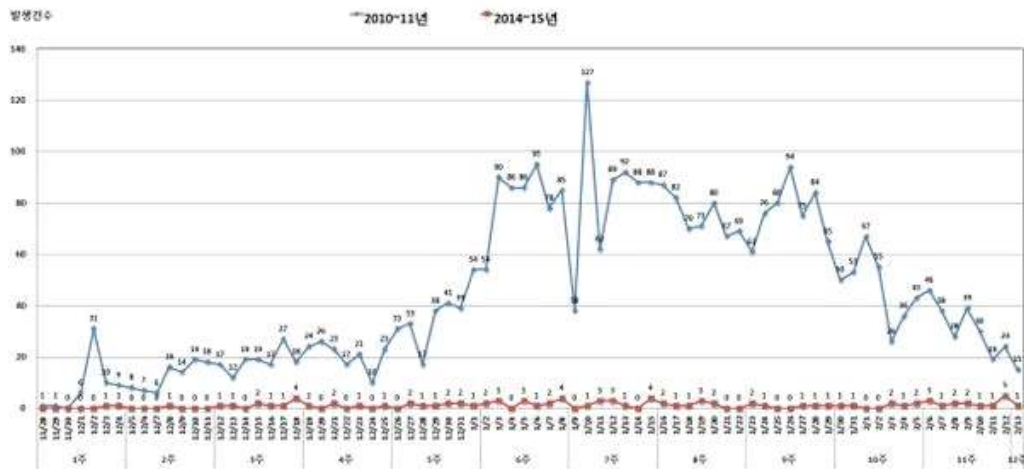
- 현재 구제역 발생에 대한 특별한 치료방법이 없기 때문에 구제역에 대한 대책은 질병의 발생 예방과 확산 방지에 중점을 두고 있음.
- 구제역 확산에 대한 대책으로는 감염동물의 살처분, 감수성동물의 이동통제, 축사와 차량의 철저한 소독 및 방역 등이 실시되고 있음. 더불어 질병의 발생 예방을 위한 백신 접종이 현재 실시되고 있음.
- 백신 접종은 구제역 예방에 필수적인 방책으로 전 세계적으로 백신청정국 (FMD-free with vaccination) 또는 상재발생국 (endemic)은 백신접종을 통해 구제역을 예방하고 있으며, 구제역이 발생하지 않는 구제역 청정국 (FMD-free)에서도 긴급한 경우에 백신을 실시할 수 있도록 백신생산용 항원을 비축하고 있음. 구제역 백신생산은 국제적으로 세계동물보건기구 (OIE)에서 명확하게 규정하고 있음.

- 구제역 백신은 구제역 바이러스를 특수 시설 (BSL3)에서 증식시킨 후 이를 순수하게 정제 후 농축 하여 화학제품 (Binary Etheleneimine)을 사용하여 불활화 시켜 제조함. 이렇게 정제된 불활화 바이러스 (항원)를 mineral oil에 섞어 미세한 입자로 만든 것이 구제역 불활화 백신 임.
- 우리나라에서 사용하는 백신은 프랑스의 메리알 (Merial)사의 제품으로 세 가지 혈청형 (O, A, Asia1)을 막을 수 있는 3가백신 (O1 Manisa A May97, Asia1 Shamir)임. 구제역은 여러 혈청형과 지역형이 존재하기 때문에 백신주를 선정하기 상당히 까다로운 질병 중 하나로, 매년 유행하는 인플루엔자의 백신주 선정이 어려운 문제와도 유사함.
- 구제역 예방백신의 완제품 생산은 보통 4개월이 걸려야 완성이 되지만 항원에서 완제품을 만드는 데는 6일 정도가 소요됨. 우리나라는 시행중인 3가백신 이외의 혈청형에 대한 항원을 Merial사에 보관해 놓고 있으며, 국내에서 필요시 요청만 하면 신속히 백신으로 제조하여 단계적으로 도입토록 되어 있음.
- 현재 구제역의 방역을 위하여 대한수의사회와 국내 5개 백신 생산회사가 협력하여 메리알 (Merial)사에서 생산한 벌크백신을 수입해 국내 생산하고 있는 상황임
- 국내에서 발생하고 있는 진천의 구제역 바이러스와 메리알사의 구제역 백신주 (O1 manisa)의 면역학적 연관성 확인결과 최고 일치율을 1로 보았을 때 0.29-0.59의 일치율을 보임을 보고받았으며, 최근 긴급 백신주의 경우에는 0.47-0.57의 면역학적 상관성을 보임을 메리알사로 부터 보고받음.

국내분리주	백신혈청			
	단독		혼합(O1 Manisa + O 3039)	
	O1 Manisa	O 3039	O1 Manisa	O 3039
O SKR 11/2014	0.42	0.49	1.00	0.81
O SKR 13/2014	0.29	0.47	0.46	0.36
O SKR 15/2014	0.59	0.57	0.95	0.75

- 백신은 송아지의 경우 2개월령에 1차, 1개월 후 2차 접종이 권장되며, 모든 소는 4-7개월 간격으로 접종함. 돼지는 모돈의 경우 분만 약 1개월 (3-4)주 이전에 접종하며, 웅돈은 4-7개월 간격으로 접종, 자돈은 2-3개월령에 1차 접종함. 종돈장의 자돈중 암컷은 2개월령의 1차, 1개월 후 2차 접종이 권장됨.
- 국내에서는 지난 2010년 11월부터 2011년 4월까지 전국적인 구제역이 발생하였으며, 질병 확산 방지 조치와 함께 전국적으로 백신을 접종함으로써 구제역을 종식시킨 바 있음. 2014년 5월에는 세계동물보건기구 (OIE)로부터 구제역 백신접종 청정국 지위를 인정받은 바 있음.

- 하지만 이후 재발하여 2014년 12월 3일부터 2015년 4월 1일까지 7개 시·도의 33개 시·군에서 총 174건(돼지 170, 소 4)의 구제역이 발생하고 있는 상황임. 현재까지 181개 농장, 165,694마리의 살처분이 진행되었으며 기존 발생 지역을 중심으로 산발적인 발생이 있고 일부 새로운 지역에서 단발성으로 발생하고 있는 상황임. 하지만 지속적인 노력과 백신 접종으로 인해 2010년-2011년의 발생 상황에 비해 낮은 발생건수를 유지하고 있음.
- 발생상황에서 최근 발생 혈청형은 O형으로 밝혀짐. 이에 따라 백신접종은 현재 수입중인 O3039가 추가된 O형 단가백신 (O1 Manisa + O 3039)을 추가로 공급하고, 현재 보유하고 있는 기존 3가 백신은 항체생성률이 비교적 높은 소 위주로 접종하기로 추진되고 있음.
- 농장에서는 구제역 백신접종을 반드시 실시하도록 지도하며, 가축의 판매, 분양이나 도축장 출하 시 백신접종을 의무화하여 구매 시에도 구제역 예방접종증명서 등을 확인하도록 권장. 구제역 백신접종 미실시 농가는 500만원 이하의 과태료가 부과되며 백신접종을 하지 않은 구제역 감염농장은 살처분 보상금이 60%이하로 지급되는 등 정책적으로 백신접종을 의무화 하고 있음.



기간 (동일시점 비교)	발생건수	
	2010~11년 구제역	2014~15년 구제역
11/28~2/15	3,503	96

그림 2. 구제역 발생 건수(11/28~2/15)

(5) 현 구제역 예방방법의 한계점

- 구제역은 혈청형 사이에 여러 변종이 있을 뿐 아니라 한 혈청형 내에서도 많은 변종이 존재하기 때문에 백신 생산에 어려움이 있음. 한 혈청형에 대한 백신은 다른 혈청형에 대하여 면역 작용을 하지 않으며, 같은 혈청형에 속하는 두 주(strain)가 가진 유전자 서열에서 전체 유전자의 30%까지 차이가 있는 경우도 있음. 따라서 구제역 백신은 혈청형 마다 적용되어야 한다는 것이 중론임.

- 그렇기 때문에 구제역 백신은 유행지역의 혈청형에 따라 선별되어 만들어져야 하며 발병중인 혈청형의 파악과 그에 따른 백신 제조까지 빠른 대처가 요구됨.
- 현재 구제역 발생농장의 항체양성률은 0-80%까지 매우 다양하게 나타나고 있는데, 항체양성률이 낮은 농가는 물론이고 80% 이상의 높은 항체양성률을 나타내고 있는 농장에서도 구제역이 발생하고 있는 상황임.
- 구제역과 관련된 세계동물보건기구 (OIE)의 기술보고서에 따르면 6PD50 이상의 고역가백신을 접종받은 돼지라 할지라도 구제역 바이러스에 감염되어 임상증상을 나타내는 돼지와 접촉했을 경우 일반적으로 임상증상이 나타남. 이러한 현상은 백신의 질적 문제가 아니라 구제역에 감염된 돼지의 경우, 소에 비해 많은 양의 바이러스를 배출하거나 돼지를 감염시킨 구제역 바이러스의 병원성과 관련이 있다고 밝혀짐.
- 즉 백신접종에 의해 전반적인 구제역 항체수준이 높은 농가라 할지라도 일단 구제역 바이러스가 농가내로 유입되어 항체수준이 낮거나 허약하여 면역수준이 낮은 감수성 개체가 구제역에 감염될 경우, 폭발적인 바이러스 배출을 통해 동거축을 감염시킬 수 있음. 그렇기 때문에 항체형성률이 전반적으로 높은 농장이라 할지라도 구제역이 발생할 가능성을 완전히 배제할 수는 없는 상황임.
- 따라서 기존의 불활화백신의 문제점을 보완하고, 장점은 부각시킬 수 있는 다른 형태의 백신 개발이 필요함. 즉 기존의 불활화백신이 임상적 감염을 막을 수 있음에도 불구하고 문제점과 불편함이 분명히 존재하기 때문에 차세대 백신 개발의 필요성은 끊임없이 제기되어 왔으며, 실제로 전 세계적으로 그에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 추세임.
- 대표적으로, 기존의 백신은 구제역 병원체를 이용해 만들어진다는 점에서 그 위험성이 남아 있다는 문제점이 있음. 백신접종으로 인해 상피세포에서 바이러스의 증식이 조금이나마 일어날 수 있는 가능성이 있고, 그로 인해 백신을 접종한 가축이 추후 실제 구제역 바이러스 감염에 대해 캐리어 상태로 남아있을 수 있는 가능성 역시 존재함.
- 그리고 구제역 바이러스를 직접 이용해서 만드는 문제점의 연장선상에서, 기존의 백신은 제조 공정에 있어 높은 방역수준을 갖춘 시설이 필요하다는 단점이 있음. 실험실이나 백신 제조 공장에서 이용되는 바이러스가 밖으로 퍼져나가 감염원으로 작용할 수 있기 때문에 그 자체로 문제가 될 수 있으며 구제역이 발생하지 않는 청정국에서는 쉽게 백신제조를 결정하기 힘들.
- 다음으로 백신의 효능이나 위험성을 검증하기 힘들다는 단점이 있음. 위험성 검증을 위해 차폐된 시설에서의 동물실험이 항상 필요하고 각각 제조된 백신마다 그 성능을 일정하게 유지하기 어려움.
- 마지막으로, 대부분의 백신은 구제역바이러스를 감염시킨 세포의 상층액을 농축시켜 만들기

때문에 많은 양의 non-structural protein을 함유하기 때문에 실제로 구제역바이러스에 감염된 동물과 백신접종되어 면역성을 가진 동물을 구별하는 NSP-antibody test가 어려울 수 있음.

- ◎ 따라서 구제역바이러스에 대한 차세대 백신의 개발은 구제역바이러스 전체를 이용해 만들지 않으며, 혈청형에 따른 빠른 재생산이 가능하고, 균일한 성능의 백신 제조가 가능하며, 백신 접종된 동물과 자연감염 동물을 구별할 수 있는 방향으로 진행되어야 함.

기존 백신의 특징	문제점
◎ 다양한 혈청형을 가지며 혈청형간의 다양성이 높아 각각의 혈청형에 대한 개별 백신이 필요함	◎ 백신중인 혈청형과 다른 바이러스가 유행할 경우 높은 감염율을 보일 수 있음
◎ 전염성이 높고 감염축의 바이러스 배출량이 많아 항체가 생성됨에도 불구하고 감염이 발생할 수 있음	◎ 지역이나 농장 내 구제역바이러스의 유행이 많이 진행된 경우 백신 효율이 떨어질 수 있음
◎ 구제역바이러스가 백신제조에 이용됨	◎ 높은 수준의 차폐시설이 필요하고 바이러스가 유출되어 자연감염을 유발할 가능성이 있음
	◎ 구제역 청정국에서 백신제조가 어렵다
	◎ 백신접종된 바이러스의 증식으로 인해 동물이 구제역바이러스 보균 상태로 남을 수 있음
	◎ NSP-antibody test가 어려울 수 있음

(6) 해외 관련연구의 현황

- ◎ 앞선 서술과 같이, 기존 백신의 단점들을 극복하기 위해 국제적으로 차세대 백신을 위한 다양한 연구가 수행되고 있음. 즉 첨단 백신의 조건은 불활화 백신의 한계를 뛰어 넘는 백신이어야 함.
- ◎ 여러 혈청형 또는 유전형의 발생에도 면역 후 방어에 문제가 없어야 하는 것이 중요함. 또한, 일반적으로 구제역 백신이 6개월 이내로 면역지속 기간이 한정되어 있으므로 평생 한번 또는 2회 접종하는 백신으로 개발이 되는 것이 바람직함. 또한 불활화 백신의 생산과정처럼 고도의 차폐시설을 갖추지 않고 일반 백신시설에서도 생산이 가능해야 함.
- ◎ 구제역백신 연구의 새로운 시도는 크게 cDNA 재조합 바이러스를 이용한 백신, 펩타이드 백신, 재조합 단백질을 이용한 백신, live vector를 이용한 백신, DNA 백신, 식물을 이용한 백신으로 분류할 수 있음.

① cDNA 재조합 바이러스를 이용한 백신

- 감염성 cDNA 기술의 출현과 구제역 바이러스 기능 유전학에 대한 연구결과의 축적으로 인해 세포배양뿐만 아니라 동물에서 특이적 변화에 대한 미세한 차이의 분석이 가능해짐에 따라, 부분적으로 감염성을 없애거나 결손시킨 재조합 바이러스를 이용한 백신이 가능해졌음.

② 펩타이드 백신

- 불활화된 백신은 바이러스 항원을 주기적으로 접종하는 것이 필요하며, 그렇기 때문에 바이러스가 방출될 위험이 있음. 이러한 단점을 보완하기 위해서 재조합 단백질을 이용한 안전한 백신의 생산이 요구됨. 재조합 백신은 생성과정에서 전염성이 있는 바이러스를 필요로 하지 않기 때문에 바이러스가 방출될 위험이 없으며 재조합 단백질이나 펩타이드는 생산과정이 쉽고, 보관에 용이한 장점이 있음.

③ 재조합 단백질을 이용한 백신

- 재조합 단백질 백신은 B cell이나 T cell epitope로 구성된 단일 폴리펩타이드 체인이나 B cell과 T cell 모두에 대한 에피토프로 구성된 멀티펩타이드를 이용해 병원체에 대한 면역을 매개하는 백신법으로 FMD의 경우 지금까지의 연구에서 실험동물에서의 효과가 보고되어 있음.

④ Live vector를 이용한 백신

- 구제역 바이러스의 면역원성을 포함하지만 자체의 감염력과 독성이 제거된 벡터 바이러스를 이용한 백신 방법으로 다양한 벡터 바이러스가 백신제조에 이용되고 있음.
- 실험적으로 아데노바이러스(Adenovirus)를 이용해 P1, 2A, 2B, 3B, 3C를 발현시킨 백신이 개발되어 있으며, 인터페론과 구제역 바이러스의 protease를 함께 발현시킨 백신을 이용해 돼지와 소에서 면역효과가 확인된 바 있음. 하지만 많은 양의 바이러스 (5×10^9)가 필요하고, 아데노바이러스 감염이 널리 존재하기 때문에 필드에서의 효과는 더 확인이 필요함.

⑤ DNA 백신

- DNA 백신은 숙주동물의 면역반응을 일으킬 수 있는 항원을 암호하는 부위를 이용하여 구제역 바이러스 감염에 대한 방어를 유도하는 방식으로서, DNA 자체가 숙주동물에 전달되면 숙주동물에서 합성된 항원 단백질이 내부의 경로를 따라 분해되어 결국 바이러스 방어에 효과적으로 알려진 CTL 활성화를 일으킬 수 있음.

⑥ 식물을 이용한 백신

- 형질전환을 통해 구제역 바이러스의 단백질을 발현하도록 한 식물을 통한 백신으로, 현재까지

VP1의 구조단백질을 이용해 *Arabidopsis thaliana*, alfalfa, potato plant 등에서 발현에 성공하였음.

- 그리고 이렇게 발현된 VP1 단백질이 실험용 마우스에서 성공적으로 구제역 바이러스에 대한 면역을 자극하는 것이 중국과 아르헨티나에서 보고되었음.

(7) 국내 관련연구의 현황

- 국내 구제역 백신 관련연구는 농림축산검역본부 주도로 이뤄지고 있음. 안동에서 분리된 바이러스를 이용해 구제역 O형 불활화 백신주가 개발되었으며, 백신의 효능 평가 및 현장 적용 실험 등을 남겨둔 상태임. 구제역 O형 안동주 불활화 백신주는 특허 출원되었음 (2013).
- 기존 Marial사에서 수입하던 백신은 현재 대한수의사회와 국내 5개 백신 생산회사가 협력하여 국내에서도 생산하고 있는 상황임.
- 현재 불활화 백신 연구로는 각 혈청형에 대한 종독주 개발에 대한 연구와 백신 보조제의 개발 개선, 접종방법의 개선, 모체이행항체의 극복 등에 대한 연구와, 항원뱅크 시스템 구축, 백신 효력 평가기술 개발 등의 연구가 진행되고 있음.
- 불활화 백신에 관한 연구 이외에 재조합 백신 연구가 구제역 백신용 벡터개발, 재조합단백질을 이용한 구제역 백신연구로 나뉘어 진행되고 있는 상황임.
- 그러나 국내 구제역백신 개발 연구는 해외에 비해 많이 뒤쳐져 있으며, 특히 재조합 항원을 이용하여 혈청형에 따른 빠른 재생산이 가능하고, 균일한 성능의 백신 제조가 가능하며, 백신 접종된 동물과 자연감염 동물을 구별할 수 있는 구제역 백신 개발연구가 요구됨.

나. 기술도입의 타당성

(1) 신규 예방기술의 특징 및 차별성

1) 대장균시스템에 의한 가용단백질 (soluble form)의 발현 및 정제를 이용한 재조합 구제역 백신의 개발

- 구제역 바이러스에서 가장 항원성이 높은 VP1을 이용한 백신연구가 진행되어 있음 (Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: Evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites, *Virology*, Volume 179, Issue 1, November 1990, Pages 26-34)

- 그중에서 VP1에서 가장 항원성이 높은 부위를 분석하여 펩타이드의 형태로 제작하여 백신에 이용한 연구들이 있음 (Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine, Vaccine 20 (2002) 2603-2610).
- VP1 부분에서도 항원성의 중요한 역할을 가지고 있는 G-H loop와 C-terminus 부분을 단백질로 발현 시켜 백신으로 사용한 연구가 있음 (Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs Antiviral Research 97 (2013) 145-153).
- 그러나 펩타이드의 한계성과 대장균내 발현시 불용성단백질 (Insoluble form)로의 발현에 따른 정제 및 대량생산의 어려움등에 의해 현재까지 대장균 발현 항원의 재조합 구제역백신으로서의 개발에 한계가 있었음.
- 본 연구에서는 코돈 최적화 대장균 발현시스템을 이용하여 FMDV 3 serotype (O, A, Asia1)의 주요 항원부분 RGD motif가 포함된 G-H loop (132-162 a.a)와 C-terminus (192-212 a.a) epitope 부분을 모두 융합 (Multi-VP1e) 혹은 각각의 serotype별 항원을 반복하는 구조 (Serotype-VP1e)의 가용단백질 (Soluble protein) 형태로 다량발현을 유도하고, 이를 정제하여 실험동물 및 목적동물에서의 백신효능을 검증하는 연구로, 경제적이고 안전한 재조합항원의 생산과 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 예방용 재조합 항원 발현시스템의 구축 및 생산하고자 함.
- 또한, 본 연구에서는 항원 단독 사용시 부족한 면역원성을 보완하기 위해 구제역 바이러스 백신에서 효과가 좋다고 알려진 SEPPIC사의 Montanide ISA201보조제와 혼합하여 백신에 이용하려함. (Montanide ISA™201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle Vaccine 31 (2013) 3327-3332)
- Montanide ISA201 adjuvant의 경우 보관 방법이 쉽고, 항원과 혼합하는 방법도 다른 보조제에 비해 간편하여 상용화하는데 유리함이 있으며, 항원과 혼합 후 주사제의 점성이 다른 보조제보다 낮아 주사하는데도 간편하여 농장에 쉽게 적용할 수 있는 장점이 있음.

2) Baculovirus 시스템을 이용한 내산성의 구제역 VLP 정제 및 백신 연구

- 구제역은 혈청형 사이에 여러 변종이 있을 뿐 아니라 한 혈청형 내에서도 많은 변종이 존재하기 때문에 백신 생산이 어려움. 한 혈청형에 대한 백신은 다른 혈청형에 대하여 면역 작용을 하지 않아 구제역 백신은 혈청형 마다 적용되어야 함. 따라서 발병중인 혈청형의 파악과 그에 따른 백신 제조까지 빠른 대처가 요구됨.
- Baculovirus expression vector를 이용할 경우 단백질 생산력이 우수하고, VLP 생성 속도가 매우 빨라 원하는 혈청형에 대한 백신 제조가 수월하여 빠른 대처가 가능함.

- 또한 Baculovirus는 자체적으로 2개 이상의 프로모터가 존재하여 여러 가지 단백질을 동시에 생산하는데 있어 그 효율성이 탁월함.
- VLP 자체만으로도 백신으로서의 효율성이 극대화될 수 있고, 척추동물에서는 병원성을 나타내지 않기 때문에 특별한 장치 없이 안전하게 상용화할 수 있는 특징을 갖고 있음.
- 산(acid)에 민감한 구제역 바이러스의 구조단백질 항원부위를 Baculovirus system에 적용시킬 경우, 대량의 VLP 단백질이 발현될지라도 낮은 pH로 인해 그 단백질이 변성될 가능성이 있지만, 이것에 대한 보완책을 내세운 논문 및 연구 아직 없었음.
- 이러한 한계성을 극복하기 위해 본 연구에서는 FMDV의 구조단백질 중 내산성과 관련 있는 VP1의 N17과 VP2의 H145 유전자를 mutation시킨 P1 유전자와 2A 및 3C 유전자를 융합 제작하고 이를 곤충세포에서 고발현 유도를 위해 코돈 최적화 작업을 수행, 구제역 VLP 백신 생산 중에 배양액의 산성화에 따른 VLP 생산성 저감 및 면역원성 저감을 극복하려함.

3) Hybrid-VLP 시스템을 이용한 구제역 항원발현 VLP 정제 및 백신 연구

- 기존의 VLP 기반 백신 생산은 바이러스 캡시드단백질의 자가조립 능력에 의존하고 있음. 대표적인 성공사례로는 인체의 HPV VLP 백신인 가닥실, 서바릭스를 들 수 있음. 하지만 HPV의 경우 아래 그림과 같이 한 종류의 캡시드단백질(L1)이 자가조립을 통해 VLP를 형성할 수 있는 구조임.

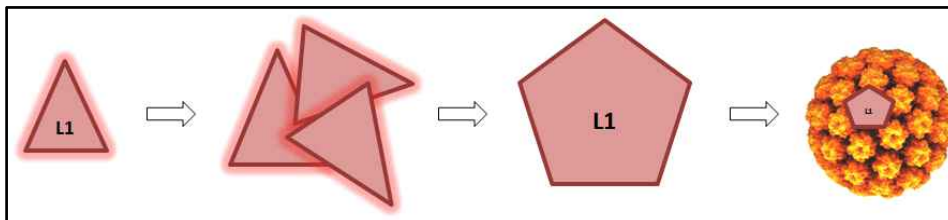


그림 3. 단순 캡시드단백질의 자가조립을 통한 VLP 형성 과정 (HPV의 예)

- 하지만 한 종류 이상의 캡시드단백질의 조립이 필요하거나 외막(envelope) 단백질을 갖는 바이러스의 경우 적용이 어려운 한계점을 갖고 있음. 대표적인 예로 구제역 바이러스(FMDV) VLP는 VP0, VP1, VP3 3개의 캡시드단백질이 정교하고 정확하게 조립되어야 VLP구조를 형성함.
- 이러한 복잡하고 다양한 형태의 항원을 효능이 높은 VLP 백신으로 제작하기 위해서는 별도의 단백질 발현기술과 벡터시스템이 필요함.
- 본 연구에 의한 하이브리드 VLP 기술은 항원단백질에 외래 단백질 유래의 특이적인 막투과 영역을 융합하여 baculovirus 발현시스템에서 발현시키고, 이렇게 발현된 항원단백질이 표면으로 노출된 VLP 형태를 갖도록 고안된 백신 플랫폼 기술임.

- 본 기술을 이용하여 FMDV의 주요 항원(VP1 epitopes)부위가 막 단백질 형태로 발현된 하이브리드 구제역 VLP를 제작, 정제법을 확립하고 백신의 효능을 검증하여 새로운 재조합 구제역 백신을 개발하고자 함.

(2) 기존 기술과의 차별성

	기존 기술	본 연구 기술
<p>대장균 유래 재조합 항원단백질</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 불용성 단백질로 항원단백질이 발현되는 경우가 많음. ● 불용성 단백질 형태로 발현할 경우 정제 이전 refolding 과정이 필요. ● 불용성 단백질의 refolding 후 정제를 할 경우 대체로 수용성 단백질의 농도보다 낮아 비효율적임. 	<ul style="list-style-type: none"> ● FMDV 3 serotype (O, A, Asia1)의 주요 항원부분을 모두 포함하는 Multi-VP1e 항원의 발현 및 정제 ● 코돈 최적화 대장균 발현시스템을 이용한 항원의 가용단백질 (Soluble protein) 다량발현 유도 ● refolding 과정이 불필요하여 정제효율이 보다 좋으므로 높은 농도의 항원 단백질을 얻어 백신 효율을 높일 수 있음
<p>Baculovirus 시스템을 이용한 내산성의 구제역 VLP 정제 및 백신 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Baculovirus system을 이용하여 FMDV의 VLP를 생산하여 백신으로 이용하려는 시도는 많았음. ● 그러나 산성조건하에서 FMDV의 VLP의 안정성 문제로 대량의 정제가 어려우 실정임. 	<ul style="list-style-type: none"> ● 본 연구에서는 이러한 한계점을 극복하기 위해 FMDV의 구조단백질 중 내산성과 관련 있는 VP1과 VP2의 유전자를 mutation시킨 P1 유전자와 2A 및 3C 유전자를 융합하고, 곤충 세포에서 고발현 유도를 위해 코돈 최적화 작업을 수행하여 구제역 VLP 백신 생산 중에 배양액의 산성화에 따른 VLP 생산성 저감 및 면역원성 저감을 극복하려함.
<p>Hybrid-VLP 시스템을 이용한 구제역 항원발현 VLP 정제 및 백신 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 기존의 VLP 기반 백신 생산은 바이러스 캡시드단백질의 자가조립 능력에 의존 ● 또한, 한 종류 이상의 캡시드단백질 조립이 필요하거나 외막(envelope) 단백질을 갖는 바이러스의 경우 적용이 어려운 기본적인 한계점을 갖고 있음. 	<ul style="list-style-type: none"> ● 본 연구에 의한 하이브리드 VLP 기술은 항원단백질에 외래 단백질 유래의 특이적인 막투과영역을 융합하여 baculovirus 발현시스템에서 발현시키고, 이렇게 발현된 항원단백질이 표면으로 노출된 VLP 형태를 갖도록 고안된 백신 플랫폼 기술임.

3. 연구개발 범위

연구개발의 최종목표	
<p>■ 구제역 예방용 재조합 백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능 검증 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 주요 항원을 발현할 수 있는 발현시스템 확보 ● 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 항원 발현시스템의 구축 ● 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물에서의 구제역바이러스 방어 효능 검증 ● 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 항원 발현율 달성 ● 구제역 예방을 위한 안전하고 효과적인 재조합백신 대량 생산시스템 구축 ● 재조합 구제역 백신의 백신 품목허가 제출 	
연구개발 주요내용 및 범위	
세부 연구목표	세부 연구내용 및 범위
<ul style="list-style-type: none"> ● 대장균 가용단백질 발현시스템을 이용한 구제역 다가항원 생산 및 백신 연구 (주관기관, 제2협동기관) 	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 대장균시스템에서의 다가 FMDV 항원단백질 정제 및 백신 연구 <ul style="list-style-type: none"> ○ FMDV serotype (O, A, Asia1 type) virus의 주요 항원부분을 모두 융합 (Multi-VP1e) 혹은 각각의 serotype별 항원을 반복하는 구조 (Serotype-VP1e)의 가용단백질(soluble protein)을 대장균에서 발현 검증 및 small scale 정제 ○ 정제된 Multi-VP1e 및 Serotype-VP1e 항원단백질과 adjuvant (ISA201)의 혼합후 근육투여에 의한 mouse 면역원성 (항체생성률) 검증 ○ FMDV mouse challenge 실험을 통한 Multi-VP1e/adjuvant (ISA201) 혹은 Serotype-VP1e/adjuvant (ISA201)의 백신 효능 1차 검증 ○ FMDV mini-pig challenge 실험을 통한 Multi-VP1e/adjuvant (ISA201) 혹은 Serotype-VP1e/adjuvant (ISA201)의 백신 효능 2차 검증 및 중화항체 검증
<ul style="list-style-type: none"> ● 곤충세포 발현시스템을 이용한 내산성 구제역 VLP 생산 및 백신 연구 (제1협동기관, 제2협동기관) 	<ul style="list-style-type: none"> ◎ Baculovirus 시스템을 이용한 내산성 구제역 VLP 정제 및 백신 연구 <ul style="list-style-type: none"> ○ FMDV의 구조단백질 VP1, VP2에 특정 돌연변이(N17D, H145Y)를 도입하여 산성조건에서도 안정하게 VLP를 형성할 수 있는 내산성 구제역 VLP 제작용 유전자 확보 (mutP1-2A-3C) ○ 곤충세포에서 내산성 구제역 VLP의 발현을 높이기 위한 코돈 최적화 작업 및 재조합 Baculovirus 제작 ○ 내산성 FMD-VLP 발현 검증 및 small scale 정제법 확립 ○ 정제된 내산성 FMD-VLP와 adjuvant (ISA201) 혼합 근육투여에 의한 mouse 면역원성 (항체생성률) 검증 ○ FMDV mouse challenge 실험을 통한 FMD-VLP/adjuvant (ISA201)의 백신 효능 1차 검증 ○ FMDV mini-pig challenge 실험을 통한 FMD-VLP/adjuvant (ISA201)의 백신 효능 2차 검증 및 중화항체 검증

연구개발 주요내용	
세부 연구목표	세부 연구내용 및 범위
<ul style="list-style-type: none"> ● 하이브리드 VLP 기술을 이용한 구제역 백신 연구 (제1협동기관, 제2협동기관) 	<ul style="list-style-type: none"> ◎ Hybrid VLP 시스템을 이용한 구제역 항원발현 VLP 정제 및 백신 연구 <ul style="list-style-type: none"> ○ 임의의 항원 단백질을 막 표면 발현 형태의 VLP로 제작할 수 있는 하이브리드 VLP 기술 활용 ○ FMDV의 주요 항원(VP1 epitopes)부위가 막 단백질 형태로 발현되어 VLP를 만들 수 있는 baculovirus 시스템 구축 및 제작 ○ FMDV의 주요 항원부위를 발현하는 하이브리드 구제역 VLP 제작 및 정제법 확립 ○ 정제된 Hybrid-VLP와 adjuvant (ISA201) 혼합 근육투여에 의한 mouse 면역원성 (항체생성률) 검증 ○ FMDV mouse challenge 실험을 통한 Hybrid-VLP/adjuvant (ISA201)의 백신 효능 1차 검증 ○ FMDV mini-pig challenge 실험을 통한 Hybrid-VLP/adjuvant (ISA201)의 백신 효능 2차 검증 및 중화항체 검증
<ul style="list-style-type: none"> ● 재조합 구제역백신의 대량생산 체계 구축 및 시제품 제조 (주관기관, 제1협동기관, 제2협동기관, 제3협동기관) 	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 재조합 구제역 백신 제품화를 위한 시제품 생산 <ul style="list-style-type: none"> ○ 주관기관 및 제2세부과제로부터 개발된 재조합 구제역 항원 생산법 및 정제법에 대한 기술 이전 ○ 백신 조성 최적화 및 시제품 생산 ○ 주관기관 및 제2세부과제와 연계하여 선택된 재조합 항원의 대량 정제 공정 확립 ○ 백신 제조공정 및 대량 생산시스템 확립 ○ 시제품의 동물 안전성 실험 ○ 시제품 Lot별 목적동물 면역원성 실험 ○ 재조합 구제역 백신의 야외임상시험 승인을 위한 임상시험 계획서 제출
<ul style="list-style-type: none"> ● 재조합 구제역백신의 야외 임상검사 및 품목허가 서류 준비 (제2협동기관, 제3협동기관) 	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 개발된 재조합 구제역백신의 품목허가서류 준비 <ul style="list-style-type: none"> ○ 재조합 구제역 백신 시제품의 야외 농장임상시험 및 효능 검증 ○ 재조합 구제역 백신 장기 보존성 시험 ○ 재조합 구제역 백신의 제조 및 판매승인을 위한 품목허가서류

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계

1. 연구개발의 추진전략.방법

- ◎ 본 과제인 “구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 실험동물 효능 검증”의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같이 주관기관인 충남대학교 수의과대학 이종수교수 연구팀의 “미생물을 이용한 구제역 재조합백신 생산시스템 개발 및 효능연구”와 제1협동과제인 성신여자대학교의 송재민교수 연구팀의 “곤충발현시스템을 이용한 구제역 재조합백신 생산 시스템개발 및 효능검증연구” 그리고 제2협동과제인 농림축산검역본부 김재조연구관 연구팀의 “구제역 재조합백신의 효능검증 연구” 및 제3협동연구기관인 (주)코미팜 기술연구소의 이오수 연구팀의 “구제역 재조합 백신생산 및 제품화 연구”로 구성하여 연구를 수행하였음.



그림 1. 구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 실험동물 효능 검증 연구를 위한 과제구성

- 본 과제인 “구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 실험동물 효능 검증”의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같은 세부 및 협동기관들간의 기본 연구와 상호협력 체계를 구축하여 성공적인 연구를 수행하였음.
- 본 과제인 “구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 실험동물 효능 검증”의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같은 세부 및 협동기관들간의 기본 연구와 상호협력 체계를 구축하여 성공적인 연구를 수행하였음.

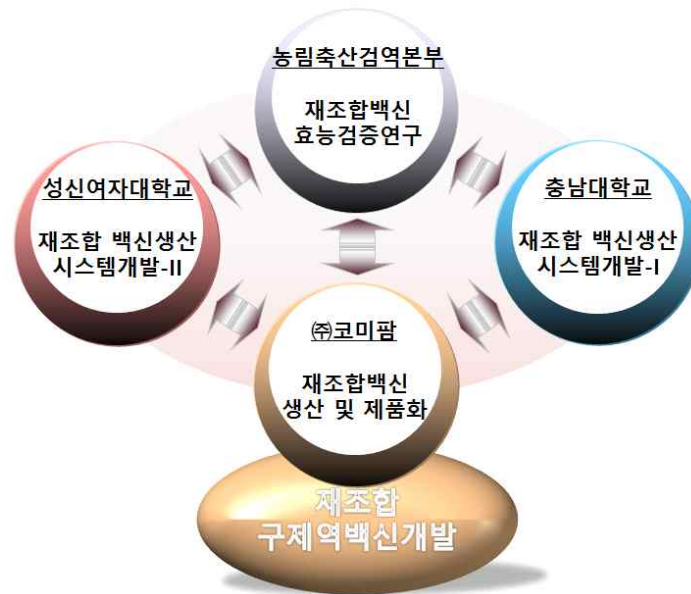


그림 2. 구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 효능 검증 연구를 위한 상호협력 체계구성



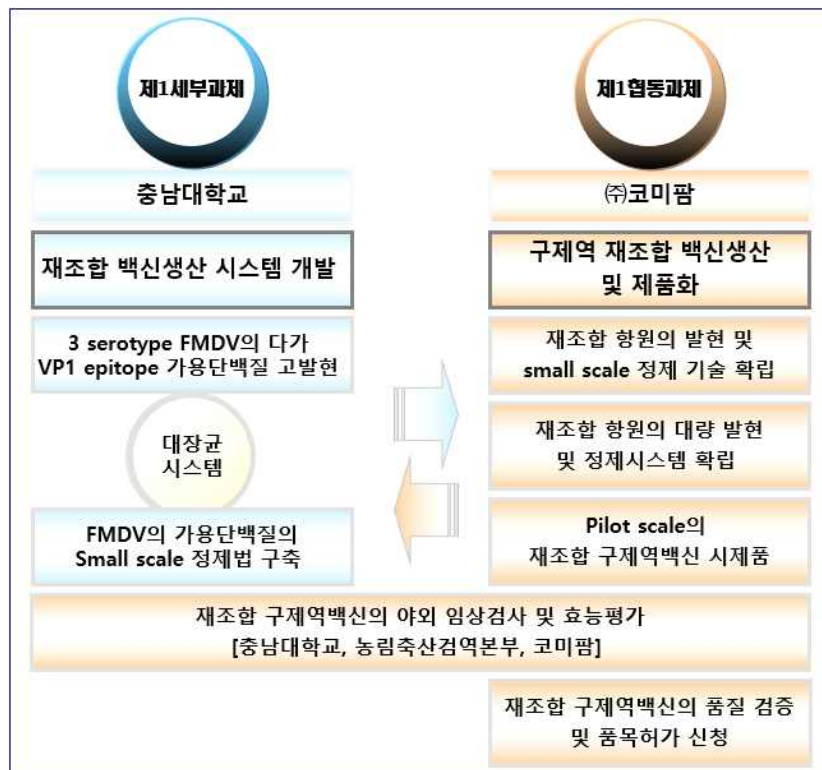
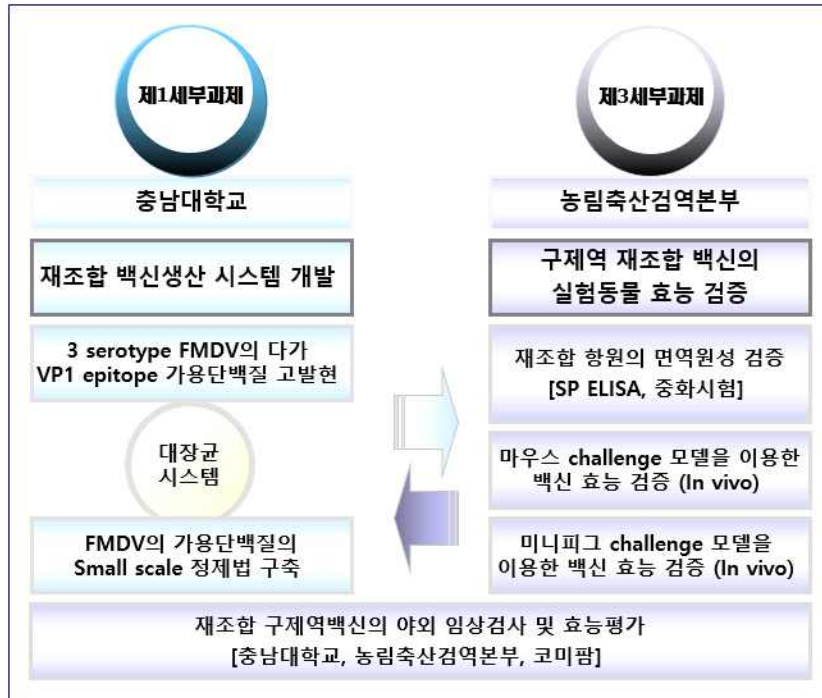


그림 3. 주관기관을 대상으로 한 구제역 예방 재조합 백신 생산 연구의 상호협력 모식도

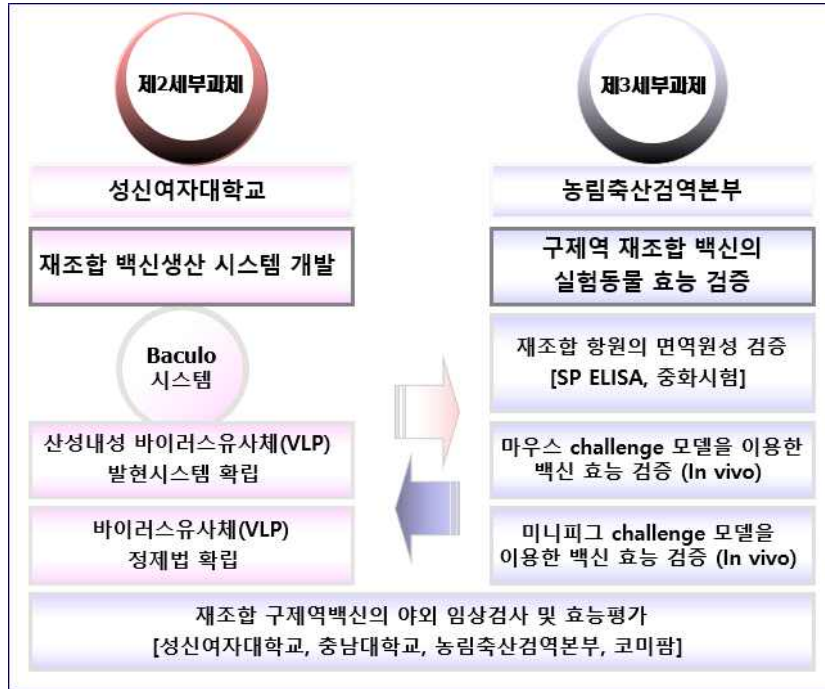


그림 4. 제1협동기관을 대상으로 한 구제역 예방 재조합 백신 생산 연구의 상호협력 모식도

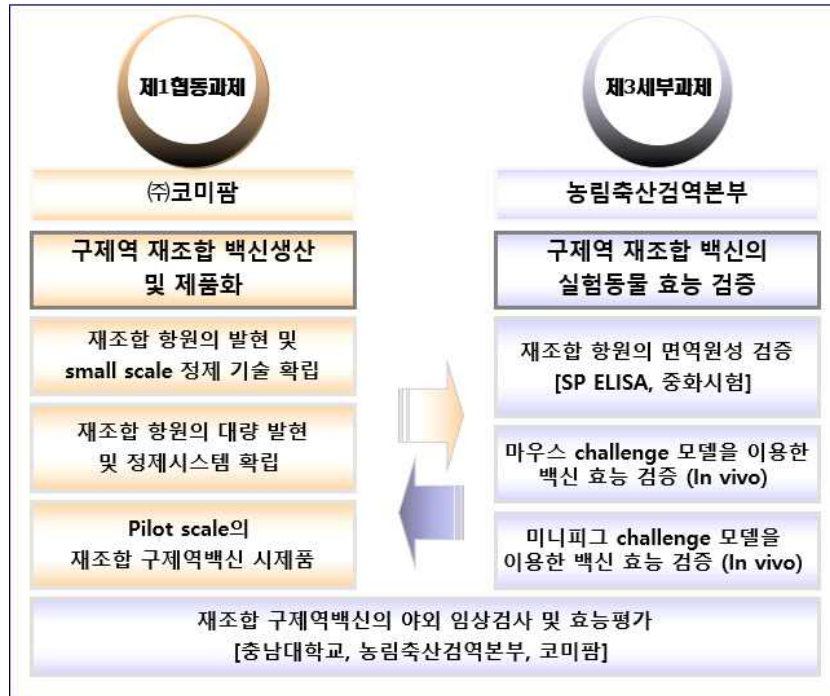


그림 5. 제2협동기관을 대상으로 한 구제역 예방 재조합 백신 생산 연구의 상호협력 모식도

2. 연구개발의 추진체계

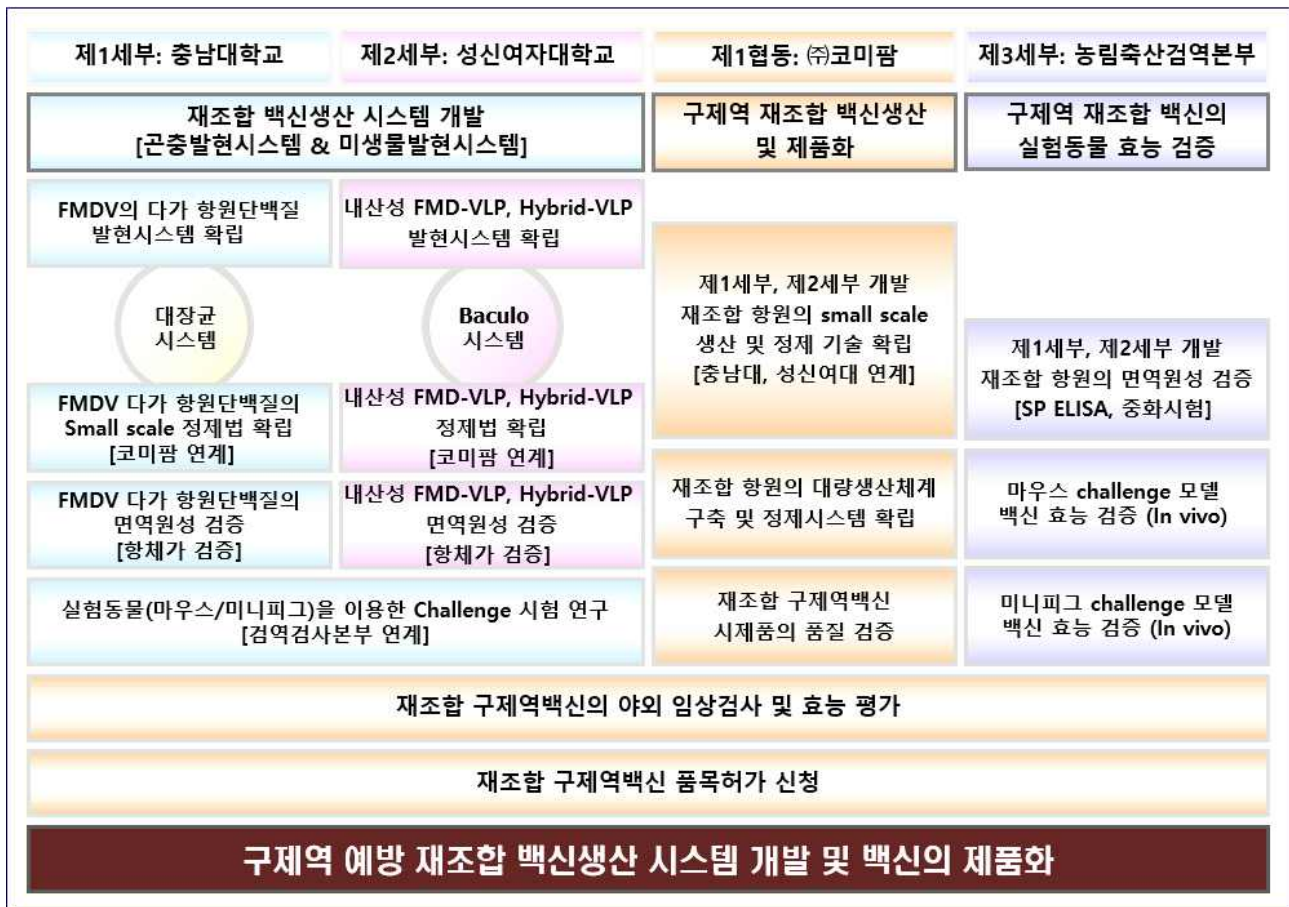


그림 6. 구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 효능 검증 연구를 위한 추진체계

- ◎ 본 과제인 “구제역 예방 재조합 백신 생산 시스템 개발 및 실험동물 효능 검증”의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 상기와 같은 방법으로 연구를 수행하였음.

제 2 절 연구수행 내용 및 결과

1. 미생물을 이용한 구제역 재조합백신 생산시스템 개발 및 효능연구

가. 대장균 가용단백질 발현시스템을 이용한 구제역 다가항원의 발현/정제 및 면역원성 검증

(1) 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/man-A/Poch-Asia/Shamir; Multi-VP1e) 단백질의 발현/정제 및 면역원성과 방어 효능 검증연구

- ◎ 본 연구결과는 2015년 11월 30일 종료된 농림축산검역본부 용역과제 “바이러스 벡터 및 재조합 기술 이용 구제역 백신 개발”의 연구내용을 약간 포함하고 있음.
- ◎ 즉, 농림축산검역본부의 용역과제 종료후 연구의 발전적 수행을 위하여 본 연구를 통해 지속적으로 수행하여 결과를 도출하였음.

1) 대장균시스템을 이용한 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/man-A/Poch-Asia/Shamir; Multi-VP1e) 단백질의 발현/정제 연구

- ◎ 본 연구진은 FMDV의 재조합단백질 백신 개발 연구를 위해 참고 문헌들을 통해서 FMDV의 구조 단백질들중 가장 neutralizing activity가 강한 VP1 단백질을 우선적으로 선택하였고, 그 중에서도 RGD motif가 포함된 G-H loop (132-162 a.a)와 C-terminus (192-212 a.a) epitope 부분을 항원으로 선택하였음 (표 1). 또한, 현재 우리나라에서 백신으로 사용하고 있는 FMDV serotype인 O1 manisa과 A 포천 그리고 Asia1 shamir virus의 epitope 부분을 각각 항원으로 선택하고 linker protein (GPGPG)을 이용하여 안정적으로 연결하여 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (Multi-VP1e) 항원단백질을 유전자기법으로 합성하였음.

표1. 3가 serotype용 Multi-VP1e 항원의 epitope sequences

Type	Epitope	Amino acid
O	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	GNCKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARALPTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LAIHPDQARHKQKIVAPVEQL
A	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	VTNGTSRYSAPATARGDLGSLAARLAAQLPA
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LLAVEVTSQDRHKQKIIAPAK
Asia	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	YNGKTAYGETTSRRGDMAALQRLSARLPTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LALDTTQDRRKQEIIAPEKQV

- ◎ Multi-VP1e의 합성 유전자를 Histidine이 tag된 대장균 발현벡터에 삽입하여 Multi-VP1e를 발현하는 plasmid를 구축하였음 (그림 1). 구축된 Multi-VP1e 발현 plasmid를 특징적으로 선발한 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 Multi-VP1e

단백질 발현을 확인하였음.

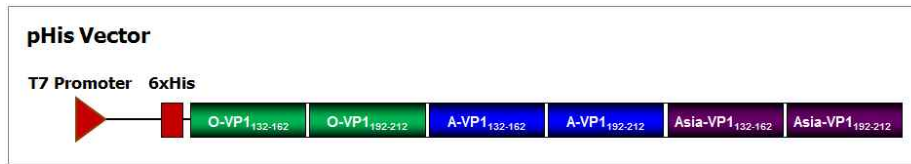


그림 1. 대장균으로부터 3가 serotype용 Multi-VP1e 정제를 위한 plasmid 구축

◎ Soluble form의 Multi-VP1e 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography를 이용하여 Multi-VP1e 단백질 fraction을 대장균 단백질들로부터 정제하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 3가 serotype용 Multi-VP1e 단백질을 정제하였음 (그림 2).

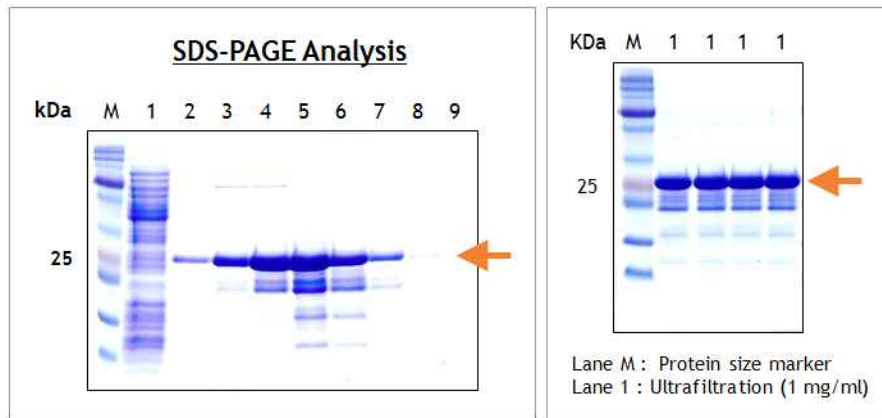


그림 2. 대장균으로부터 3가 serotype용 Multi-VP1e 정제

◎ 결론적으로 고전적인 방법이지만 현재까지 insoluble form의 항원발현으로 백신으로서의 개발에 어려움을 갖고 있었던 대장균에서의 FMDV 항원 정제를 본 연구팀의 대장균 발현시스템을 이용하여 5 liter 대장균 배양으로부터 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 70mg (1mg/ml)을 순수 정제할 수 있었음.

2) 정제된 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/man-A/Poch-Asia/Sha; Multi-VP1e) 단백질의 면역원성 연구 (검역원 공동연구)

◎ Multi-VP1e에 대한 면역원성 확인을 위한 ELISA system 구축

◎ Soluble form으로 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 우선적으로 Multi-VP1e에 대한 항체측정용 자체 ELISA system을 구축하였음.

◎ 그림 3에서 보는 바와 같이 O1 manisa, A 포천 그리고 Asia1 shamir virus의 epitope 부분에 대한 펩타이드를 합성하여 각각에 대한 항체측정 조건을 구축한 후 ELISA 조건을 확립하였고, 또한, 정제 Multi-VP1e 단백질을 이용하여 ELISA 조건을 확립하였음.

◎ 더불어 각각의 펩타이드와 Multi-VP1e 단백질을 토끼에 접종하여 각각의 항원에 대한 항체를 확보하여 정제된 Multi-VP1e 단백질과의 반응을 확인하였음 (그림 4).

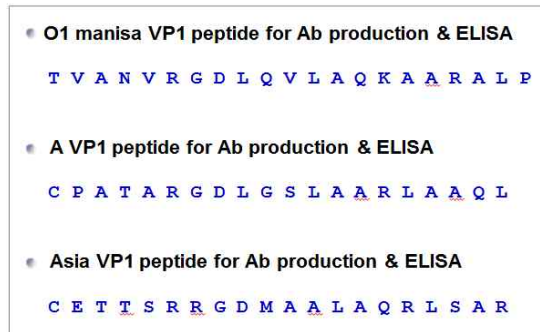


그림 3. ELISA system 구축을 위한 펩타이드 합성

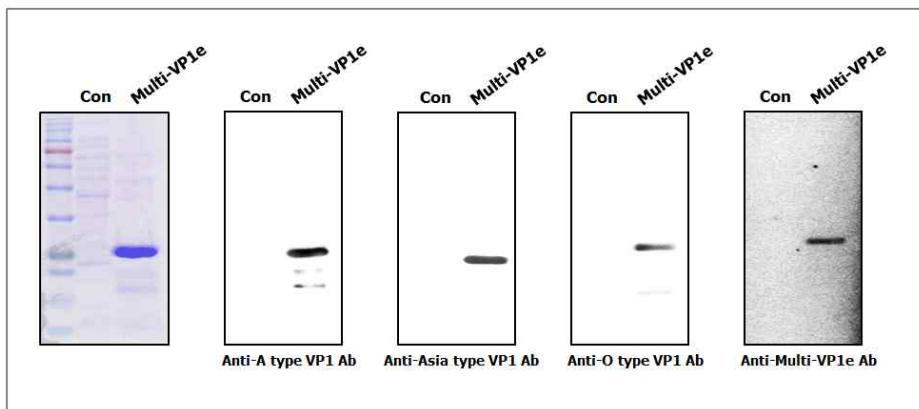


그림 4. 펩타이드 및 Multi-VP1e에 대한 토끼 항체의 Multi-VP1e 반응 검증

● 3가 serotype용 Multi-VP1e에 대한 면역원성 확인 및 마우스 challenge 시험

◎ 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 그림 5에서 보는 바와 같이 5주령의 female C57BL/6N crl jori 마우스에 SEPPIC사의 ISA201 adjuvant를 Multi-VP1e 단백질 (40ug)과 혼합한 group을 근육으로 그림 5에서 보는 바와 같은 스케줄로 2번 접종을 수행하였음.

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crl/jori mice				
Route of administration : Intramuscular Injection				
Days of inoculation : 1, 14days				
Asia 1 Shamir virus – 10LD50 infection				
Groups	Inoculum	Route	No. of Mice	
1	Control (ISA201)	100ul	I.M	11
2	Multi-VP1e + ISA201	40ug/40ul	I.M	11
3	Commercial Vaccine	100ul	I.M	7

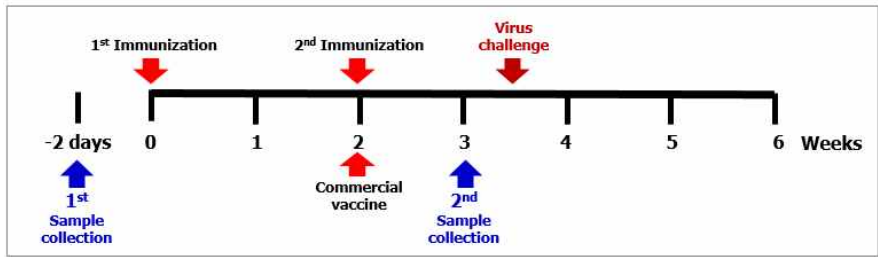


그림 5. 정제 Multi-VP1e 단백질의 마우스 면역원성 실험 schedule

◎ 그 결과 아래 그림에서 보는 바와 같이 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 O1 manisa, A, Asia1 shamir에 대한 항원 펩타이드 혹은 Multi-VP1e 단백질로 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체생성율을 분석한 결과, 정제 Multi-VP1e 단백질에 대하여 높은 항체가의 유도를 확인할 수 있었음.

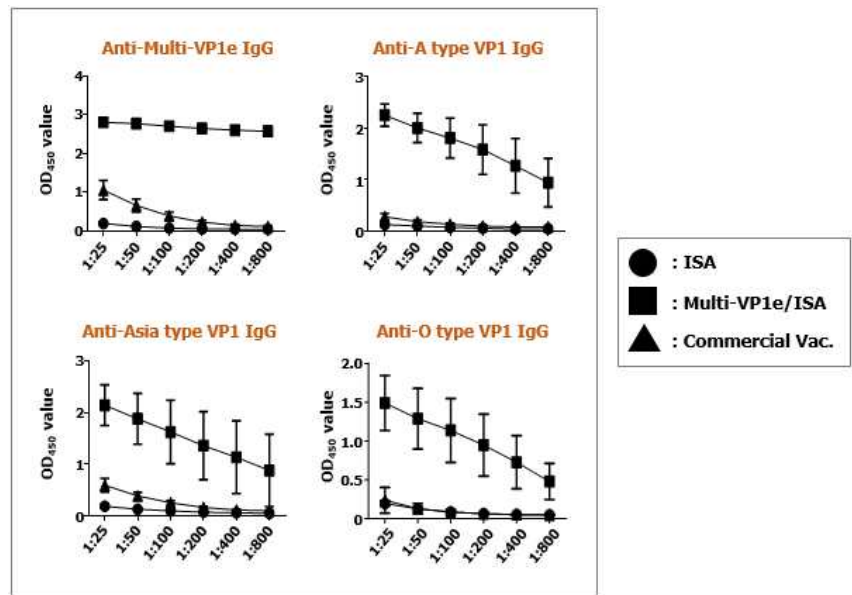


그림 6. 3가 serotype용 Multi-VP1e의 항체가 검증

◎ 또한, Multi-VP1e 항원단백질에 의해 T 면역세포가 반응하여 면역작용에 관여하였는지를 알아보기 위해 Multi-VP1e 항원단백질로 접종된 마우스의 비장내 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질, O1/Manisa/Turkey/69, A/Pocheon/001/KOR/2010 그리고 Asia1/Shamir/89 유래의 각 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 T-면역세포 반응 실험

험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.

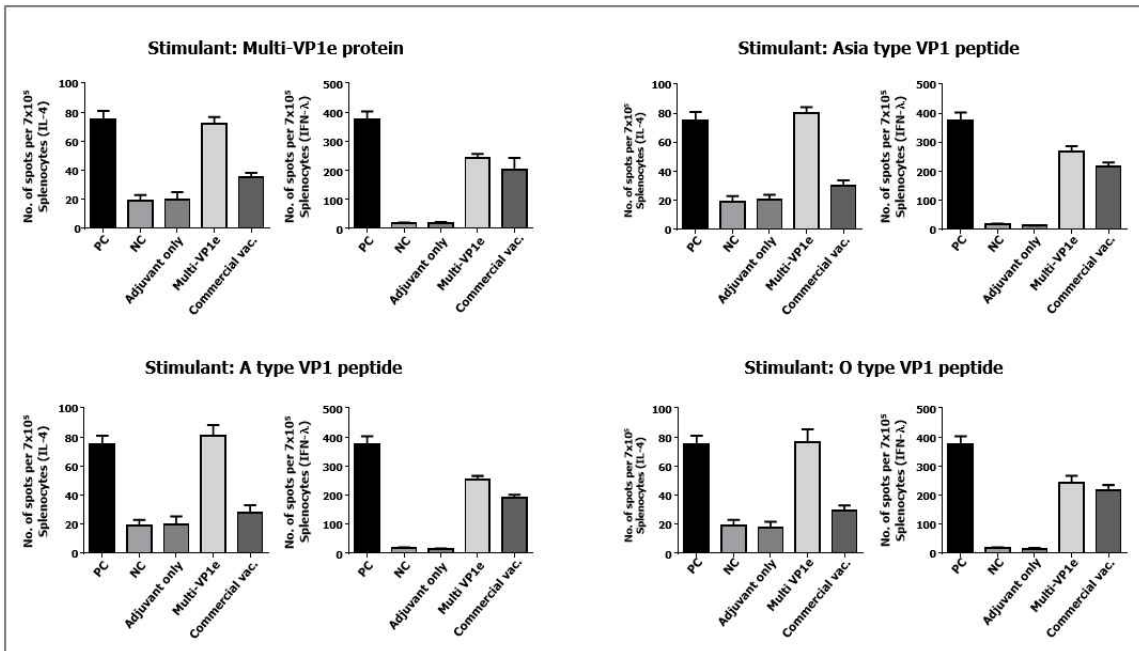


그림 7. 3가 serotype용 Multi-VP1e 단백질에 의한 특이 T 세포 면역반응 유도 검증

◎ 그 결과 그림 7서 보는 바와 같이, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN-γ와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성이 확인되었음을 확인하였음. 이 실험을 통해 Multi-VP1e 항원단백질에 의해 Multi-VP1e 항원단백질에 대한 T 면역세포의 활성화 면역작용에 기여하였음을 확인하였음.

◎ 다음으로 본 실험에서 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 각 혈청형 별로 수행하였음 (그림 8). PrioCHECK® FMDV Type Antibody ELISA 분석 결과 Multi-VP1e와 ISA 201 혼합제가 상용화 백신과 유사한 높은 항체 생성 유도도를 확인하였음.

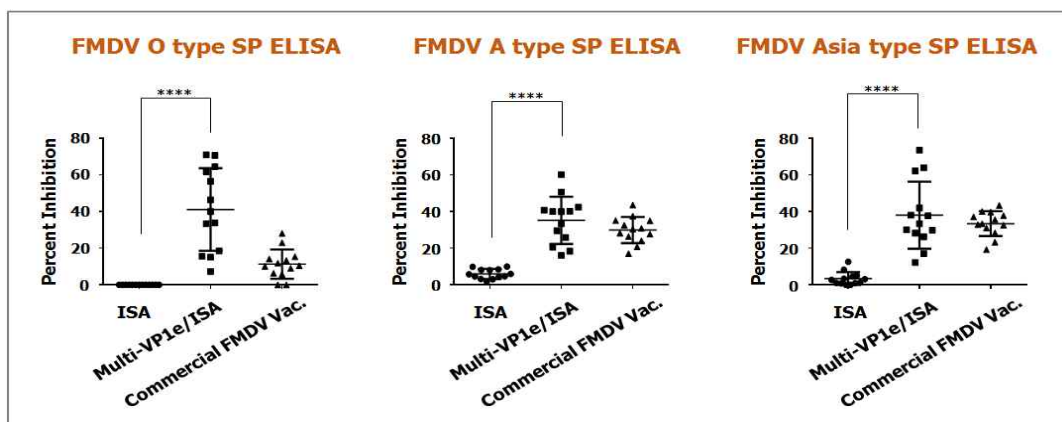


그림 8. 3가 serotype용 Multi-VP1e 단백질의 SP ELISA에 의한 마우스 면역원성 검증

◎ 마지막으로, 이들 마우스 그룹에 Asia sharmir FMDV를 공격접종하여 3가 serotype용 Multi-VP1e 항원단백질에 의해 FMDV에 대한 방어능을 확인하였음.

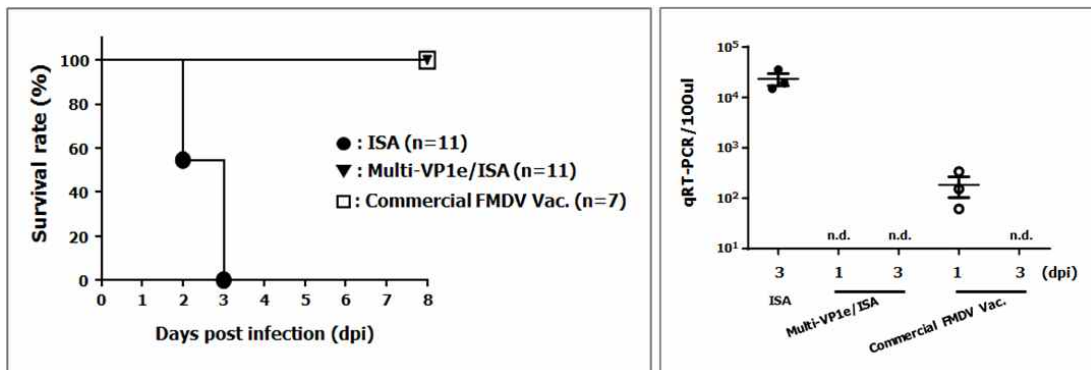


그림 9. Asia1 Shamir Challenge Model을 이용한 Multi-VP1e 항원단백질의 방어 효능 검증

◎ 상기의 그림에서 보는바와 같이, 감염 후 8일동안 생존율을 분석한 결과 대조군 마우스는 3일 이내에 모두 사망하였고, Multi-VP1e와 ISA 201 혼합제 투여군과 상용화 백신 투여군은 모두 생존하였음 (그림 9).

◎ FMDV Asia1 shamir 바이러스 감염후 1일과 3일째 얻어낸 마우스 혈청 샘플을 통해 qRT-PCR을 진행하여 바이러스 양 측정 결과 상용화 백신 투여군에서는 3일째부터 바이러스의 완전한 제거가 일어난 반면, Multi-VP1e 다가항원 단백질 투여군은 1일째부터 완전한 제거가 일어난 것으로 확인되었음. 이를 통해 Multi-VP1e 항원단백질의 백신 효능이 우수함을 확인하였음.

● 3가 serotype용 Multi-VP1e에 대한 돼지 면역원성 및 challenge 시험

◎ 돼지에서의 면역원성 검증 실험을 수행하기 전, 돼지에서의 정제 Multi-VP1e 단백질 용량 결정 실험을 우선 수행하였음.

◎ 먼저, 농장에서 사육되고 있는 8주령 돼지 20마리의 혈청을 대상으로 PrioCHECK® FMDV Type O SP Antibody ELISA Kit를 이용하여 선별검사를 수행하여 SP ELISA 값이 낮은 돼지를 선별한 후 Multi-VP1e 항원단백질을 100ug, 200ug, 300ug으로 세 가지 용량을 설정하여 3가지 실험군을 설정하여 면역실험을 수행한 결과, Multi-VP1e 항원단백질 300ug을 ISA201 VG와 혼합하여 접종한 그룹의 돼지에서 항원 ELISA 및 SP ELISA의 결과 높은 수준의 면역이 형성됨을 확인할 수 있었음.

◎ 이를 기초로 Asia1 Shamir Challenge 돼지 모델을 이용한 Multi-VP1e 항원단백질의 바이러스방어 효능 검증 실험을 수행하였음.

◎ 우선, Asia1 Shamir Challenge 돼지 모델을 이용한 3가 serotype용 Multi-VP1e 항원단백질의 바이러스방어 효능 검증 실험을 수행하기 전, 농장에서 사육되고 있는 8주령 돼지 50마리의 혈청을 대상으로 PrioCHECK® FMDV Type O SP Antibody ELISA Kit를 이용하여 선

별검사를 수행하였음.

개체번호	PI	결과	비고
1	58	2	
2	60	2	
3	34	0	
4	59	2	
5	62	2	
6	-1	0	
7	60	2	
8	-3	0	
9	-5	0	
10	4	0	
11	75	2	
12	40	0	
13	60	2	
14	61	2	
15	4	0	
16	37	0	
17	-9	0	
18	37	0	
19	58	2	
20	56	2	
21	56	2	
22	56	2	
23	55	2	
24	62	2	
25	26	0	
26	37	0	
27	66	2	
28	76	2	
29	59	2	
30	71	2	
31	58	2	
32	-3	0	
33	8	0	
34	60	2	
35	50	2	
36	-14	0	
37	31	0	
38	34	0	
39	71	2	
40	-4	0	
41	90	2	
42	27	0	
43	24	0	
44	84	2	
45	9	0	
46	52	2	
47	45	0	
48	68	2	
49	10	0	
50	51	2	

그림 10. 3가 serotype용 Multi-VP1e 항원단백질 효능 검증을 위한 돼지 선별

◎ 선별검사 결과 높은 PI 값이 나온 돼지를 제외하여 11마리를 선별하고, 다음의 그림과 같이 실험계획을 수립하였음 (그림 11).

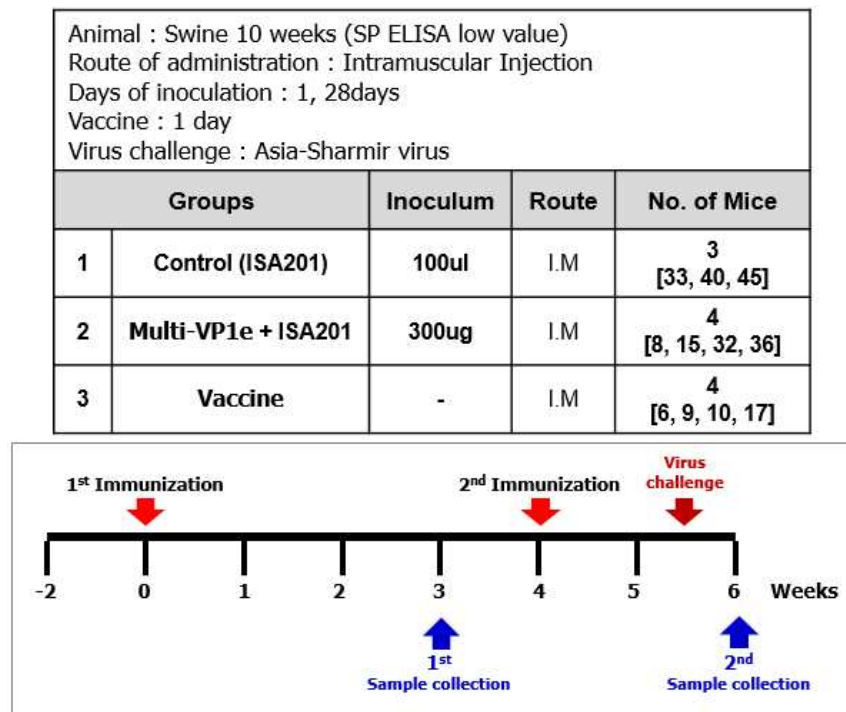


그림 11. 3가 serotype용 Multi-VP1e 항원단백질의 돼지 면역원성 실험 schedule

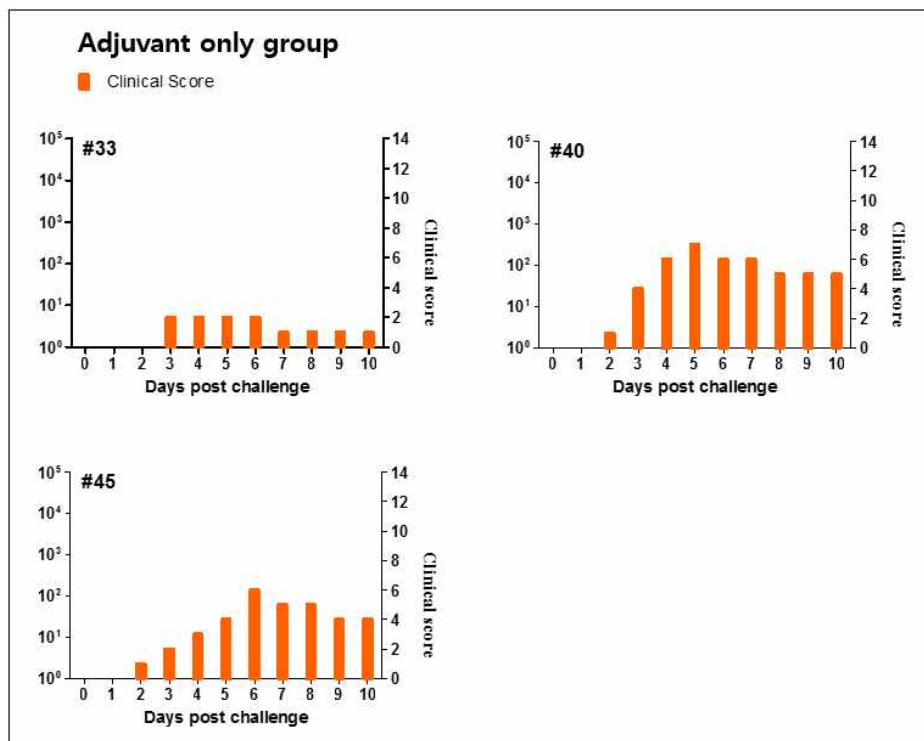
◎ 상기의 표에서 보는 바와 같이, Multi-VP1e 항원단백질의 접종은 0주차와 4주차에 실시하였고, 5주차를 지난 시점에서 Asia 1 type Shamir strain을 이용한 방어능 검증 실험을 수행하였음.

◎ 그 결과, 아래의 그림에서와 같이, 접종 후 9일 동안의 체온변화를 지켜 본 결과 상용화백신 그룹과 Multi-VP1e 항원단백질 접종 그룹의 체온상승이 확인되지 않았음.

Pig No.	0dpc 01/12	1dpc 01/13	2dpc 01/14	3dpc 01/15	4dpc 01/16	5dpc 01/17	6dpc 01/18	7dpc 01/19	8dpc 01/20	9dpc 01/21	10dpc 01/22
Vaccine	6	38.8	39	39.2	38.7	38.8	38.9	39.0	38.7	38.8	38.8
	9	38.6	38.7	39.5	38.9	38.8	38.8	39.6	39.3	39.1	38.6
	10	39.0	38.5	39.3	38.8	38.3	38.8	39.6	39.0	39.2	39.1
	17	38.6	39.2	39.6	39.5	39.5	39.0	39.6	39.2	38.8	38.8
Multi-VP1e	8	38.4	39.2	38.9	38.5	38.5	38.6	38.9	38.5	39.0	38.9
	15	39.0	39.0	39.4	39.0	39.2	38.7	38.8	39.0	39.2	38.9
	32	39.4	39.3	39.0	38.0	38.0	38.8	38.4	38.6	39.2	38.2
	36	38.7	39.5	39.4	39.5	39.3	39.4	38.6	39.1	39.5	38.8
Adjuvant only	33	40.1	39.4	39.0	39.3	39.5	39.2	39.1	39.2	38.8	38.6
	40	38.7	39.3	38.7	39.6	40.4	40.0	39.4	38.7	38.8	38.4
	45	39.3	39.2	38.8	39.0	39.5	39.2	39.3	38.5	38.6	38.2

그림 12. Asia1 Shamir virus에 의한 체온변화

◎ 그리고 접종후 10일 동안의 수포형성등 임상증상을 확인한 결과, 아래의 그림에서와 같이, Adjuvant only 그룹에서 보이는 임상증상이 상용화백신 그룹과 Multi-VP1e 항원단백질 접종 그룹에서는 보이지 않았음.



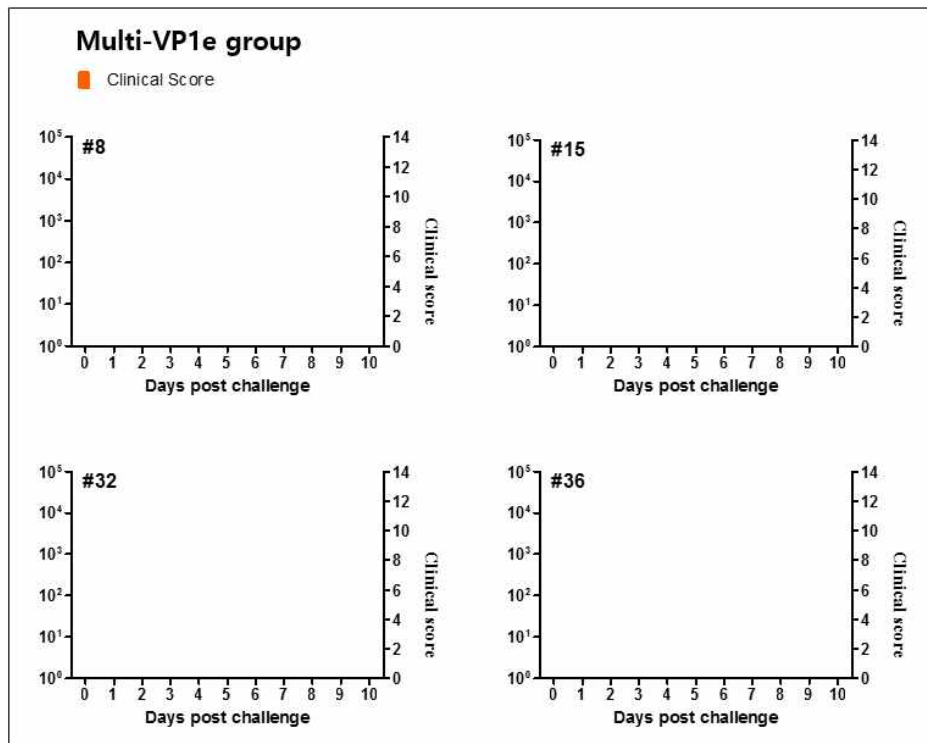
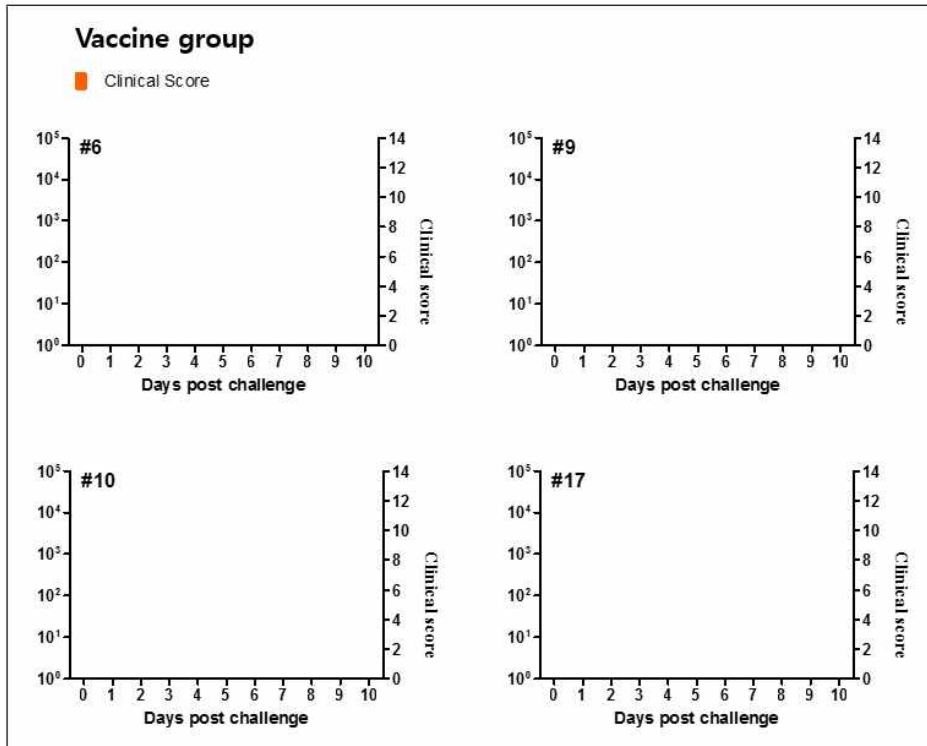


그림 13. Asia1 Shamir virus에 의한 임상증상 변화

◎ 결과적으로 본 실험결과에 의해 Multi-VP1e 항원단백질 300ug을 ISA201 VG와 혼합하여 준비한 vaccine candidate는 마우스 모델에서 뿐만 아니라 목적동물인 돼지에서도 FMDV 공격접종에 방어할 수 있음을 확인하였음.

◎ 더불어, Asia 1 type Shamir strain의 공격접종 후 10일 동안 이틀 간격으로 돼지의 혈청을 준비하여 각각의 그룹 혈청을 이용한 중화항체 시험을 수행하였음.

Vaccinated groups	Pig ID	Serum neutralizing antibody titers (days post challenge, log10)						Clinical score
		0	2	4	6	8	10	
Aftopor vaccine	6	2.11	2.41	1.65	2.41	1.65	2.26	0
	9	2.41	2.86	2.41	2.71	2.11	2.26	0
	10	2.26	2.56	2.11	1.95	2.26	2.26	0
	17	1.95	1.65	1.95	1.65	1.81	1.51	0
Multi-VP1e	8	1.20	<1.20	<1.20	<1.20	1.95	1.95	0
	15	1.20	<1.20	1.34	1.20	1.81	2.11	0
	32	2.11	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	0
	36	2.56	2.26	2.56	2.11	2.11	2.11	0
Adjuvant only	33	<1.20	<1.20	<1.20	1.65	1.65	1.95	2
	40	<1.20	<1.20	<1.20	1.95	1.65	2.26	7
	45	<1.20	<1.20	<1.20	1.95	1.95	2.11	6

그림 14. 3가 serotype용 Multi-VP1e 항원단백질에 의한 중화항체 형성 시험

◎ 결론적으로, Multi-VP1e 항원단백질을 접종한 돼지에서는 FMDV 공격접종에 방어할 수 있는 수준의 중화항체가 유도되었음을 확인하였음.

(2) 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-A/Poch-Asia/Sha) 단백질의 발현/정제 및 면역원성 검증연구

◎ 상기의 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope을 이용한 실험결과들은 현재 우리나라에서 백신으로 사용하고 있는 FMDV serotype인 O1 manisa, A 포천 그리고 Asia1 shamir virus의 epitope 부분을 각각 항원으로 선택하여 수행한 실험결과임.

◎ 최근에 대한민국에서 발생되었던 FMDV O serotype에 대한 재조합백신의 개발을 위해서 2011년 대한민국에서 발생되었던 FMDV인 O serotype Jincheon strain을 대상으로 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope 단백질을 발현/정제하여 실험을 수행하였음.

1) 대장균시스템을 이용한 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-A/Poch-Asia/Sha: Multi-VP1e) 단백질의 발현/정제 연구

◎ 본 연구진은 앞서 설계되었던 3가 serotype용 Multi-VP1e에서 O1 manisa VP1 epitope 부분을 최근 우리나라에서 발생한 진천 발생주 (Jincheon strain)로 교체하여 3가지 혈청형의 O/Jincheon, A/Pocheon, Asia1/Shamir의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위를 포함하는 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (Multi-VP1e) 항원단백질을 유전자 재조합기법으로 합성하였음.

표2. 3가 serotype용 Multi-VP1e 항원의 epitope sequences

Type	Epitope	Amino acid
O (Jincheon)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	GNCKYTGGSLPNVRGDLQVLAPKAARPLTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LAVHPSAARHKQKIVAPVKQ
A (Pocheon)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	VTNGTSRYSAPATARGDLGSLAARLAAQLPA
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LLAVEVTSQDRHKQKIIPAK
Asia (Shamir)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	YNGKTAYGETTSRRGDMAALAQRLSARLPTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LALDTTQDRRKQEIHAPEKQV

◎ Multi-VP1e의 합성 유전자를 Histidine이 tag된 대장균 발현벡터에 삽입하여 Multi-VP1e를 발현하는 plasmid를 구축하였음 (그림 15). 구축된 Multi-VP1e 발현 plasmid를 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 발현을 확인하였음.

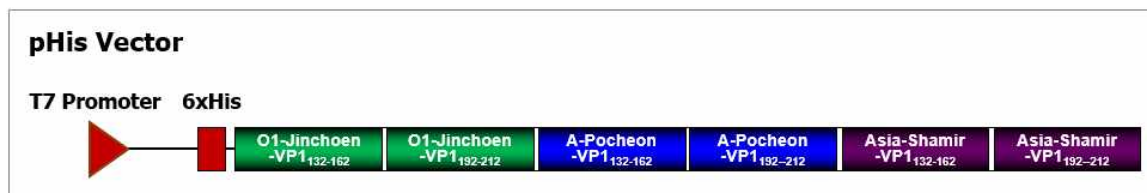


그림 15. 대장균으로부터 3가 serotype용 Multi-VP1e 정제를 위한 plasmid 구축

◎ Soluble form의 Multi-VP1e 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography를 이용하여 Multi-VP1e 단백질 fraction을 대장균 단백질들로부터 정제하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 3가 serotype용 Multi-VP1e 단백질을 정제하였음 (그림 16).

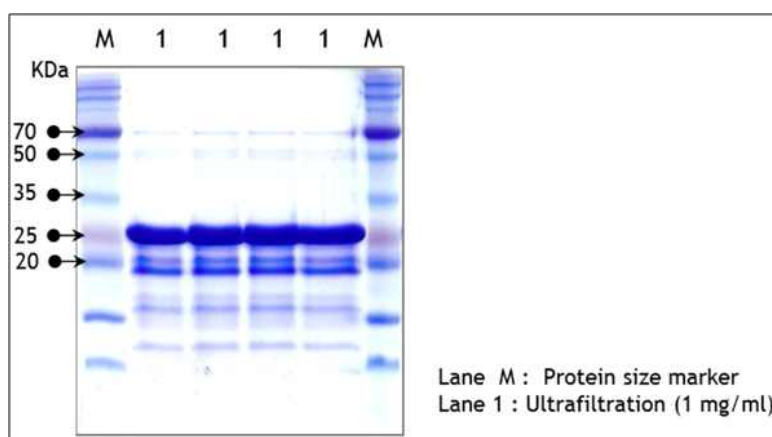


그림 16. 대장균으로부터 3가 serotype용 Multi-VP1e 정제

◎ 결론적으로 FMDV O/Jincheon VP1 epitopes을 포함하는 Multi-VP1e 단백질을 대장균 발

현시스템을 이용하여 5 liter 대장균 배양으로부터 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 70mg (1mg/ml)을 순수 정제할 수 있었음.

2) 정제된 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-A/Poch-Asia/Sh; Multi-VP1e) 단백질의 면역원성 검증연구 (검역원 공동연구)

- Multi-VP1e (O/Jin-A/Poch-Asia/Sh)에 대한 면역원성 확인을 위한 ELISA system 구축
- 역시, Soluble form으로 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 우선적으로 Multi-VP1e에 대한 항체측정용 자체 ELISA system을 구축하였음.
- FMDV O/Jincheon VP1 epitope 부분에 대한 펩타이드를 합성하여 항체측정 조건을 구축한 후 ELISA 조건을 확립하였고, 또한, 정제 Multi-VP1e 단백질을 이용하여 ELISA 조건을 확립하였음.
- 더불어 각각의 펩타이드 항체를 확보하여 정제된 Multi-VP1e 단백질과의 반응을 확인하였음 (그림 17).

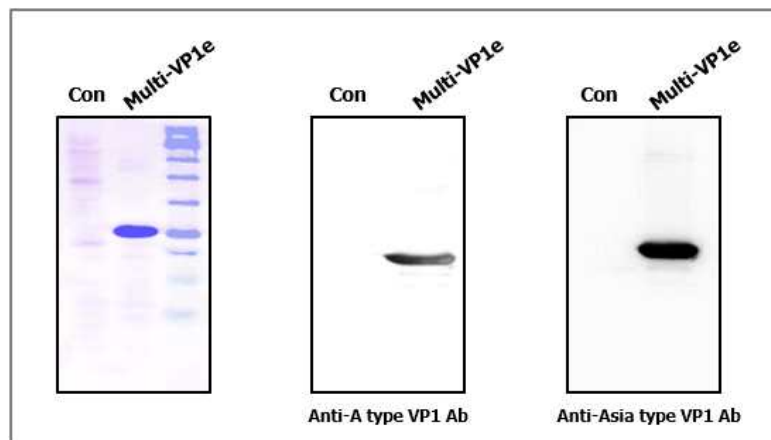


그림 17. 펩타이드에 대한 토끼 항체의 Multi-VP1e 반응 검증

- 3가 serotype용 Multi-VP1e (O/Jin-A/Poch-Asia/Sh)에 대한 면역원성 확인 및 마우스 challenge 시험
- 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 그림 18에서 보는 바와 같이 5주령의 female C57BL/6N crl jori 마우스에 SEPPIC사의 ISA201 adjuvant를 Multi-VP1e 단백질 (40ug)과 혼합한 group을 나누어 근육으로 2번 접종을 수행하였음.

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crl jori mice				
Route of administration : Intramuscular Injection				
Days of inoculation : 1, 14days				
Asia 1 Shamir virus – 10LD50 infection				
O Jincheon virus – 100LD50 infection				
Groups		Inoculum	Route	No. of Mice
1	Control (ISA201)	100ul	I.M	16
2	Multi-VP1e + ISA201	40ug/40ul	I.M	16
3	Commercial vaccine	100ul	I.M	16

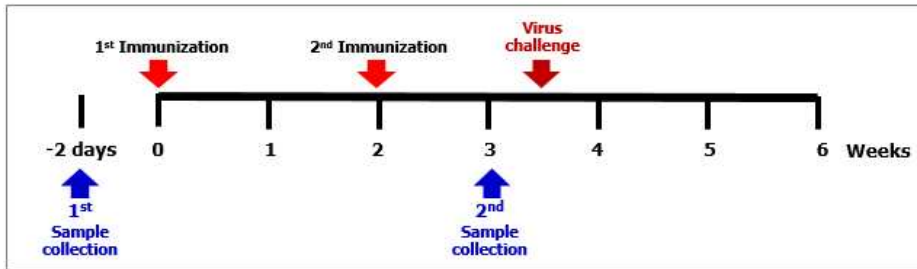


그림 18. 정제 Multi-VP1e 단백질의 마우스 면역원성 실험 schedule

◎ 그 결과 아래 그림에서 보는 바와 같이 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 O Jincheon, A, Asia1 Shamir에 대한 항원 펩타이드 혹은 Multi-VP1e 단백질로 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체생성율을 분석한 결과, 정제 Multi-VP1e 단백질에 대하여 높은 항체가의 유도를 확인할 수 있었음.

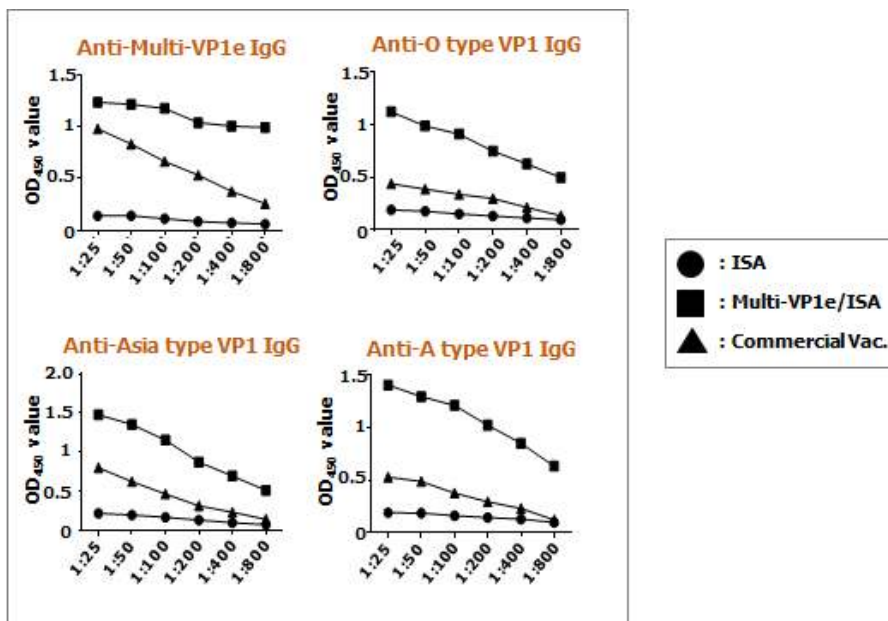


그림 19. 3가 serotype용 Multi-VP1e의 항체가 검증

◎ 또한, Multi-VP1e (O/Jin-A/Poch-Asia/Sha) 항원단백질에 의해 T 면역세포가 반응하여 면역작용에 관여하였는지를 알아보기 위해 Multi-VP1e 항원단백질으로 접종된 마우스의 비장내

비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질, O jincheon, A pocheon 그리고 Asia1 shamir 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 T-면역세포 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.

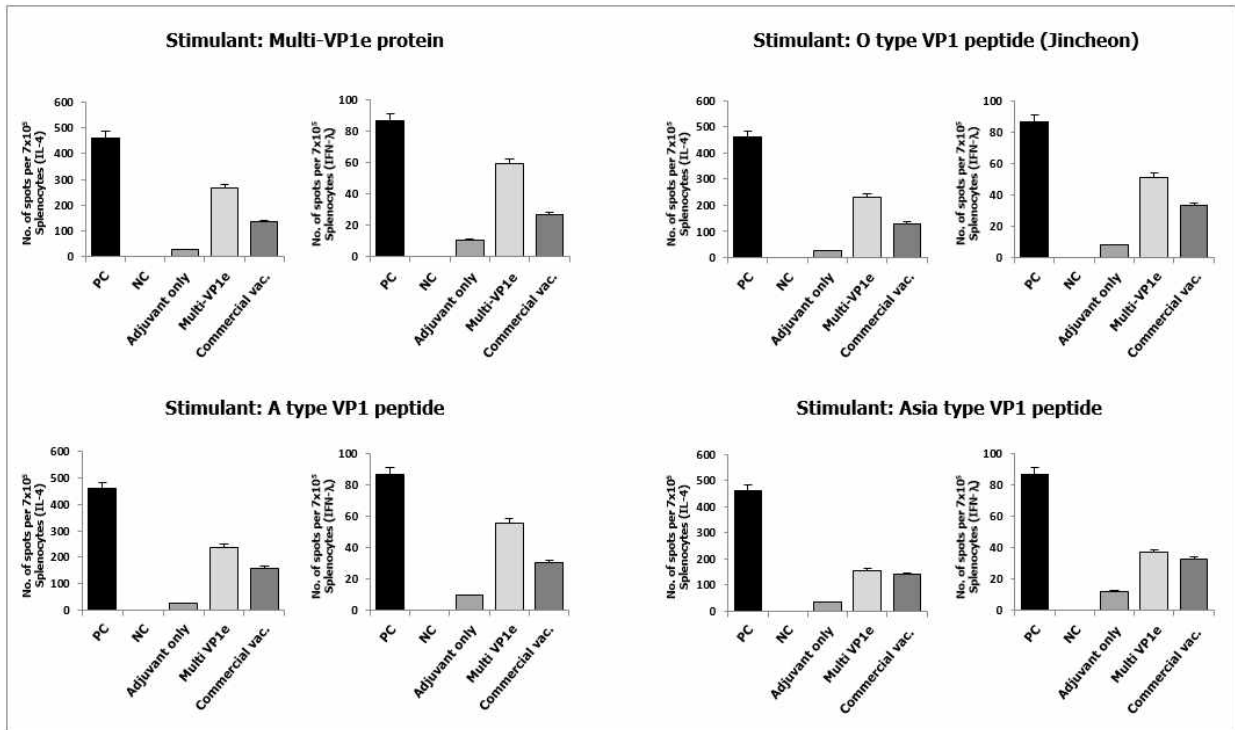


그림 20. 3가 serotype용 Multi-VP1e 단백질에 의한 특이 T 세포 면역반응 유도 검증

◎ 그 결과 그림 20에서 보는 바와 같이, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN-r와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성이 확인되었음을 확인하였음. 이 실험을 통해 Multi-VP1e (O/Jin-A/Poch-Asia/Sh) 항원단백질에 의해서도 역시 Multi-VP1e 항원 단백질에 대한 T 면역세포의 활성화 면역작용에 기여하였음을 확인하였음.

◎ 다음으로 본 실험에서 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 각 혈청형 별로 수행하였음 (그림 21). PrioCHECK® FMDV Type Antibody ELISA 분석 결과 Multi-VP1e와 ISA 201 혼합제가 상용화 백신과 유사한 높은 항체 생성 유도를 확인하였음.

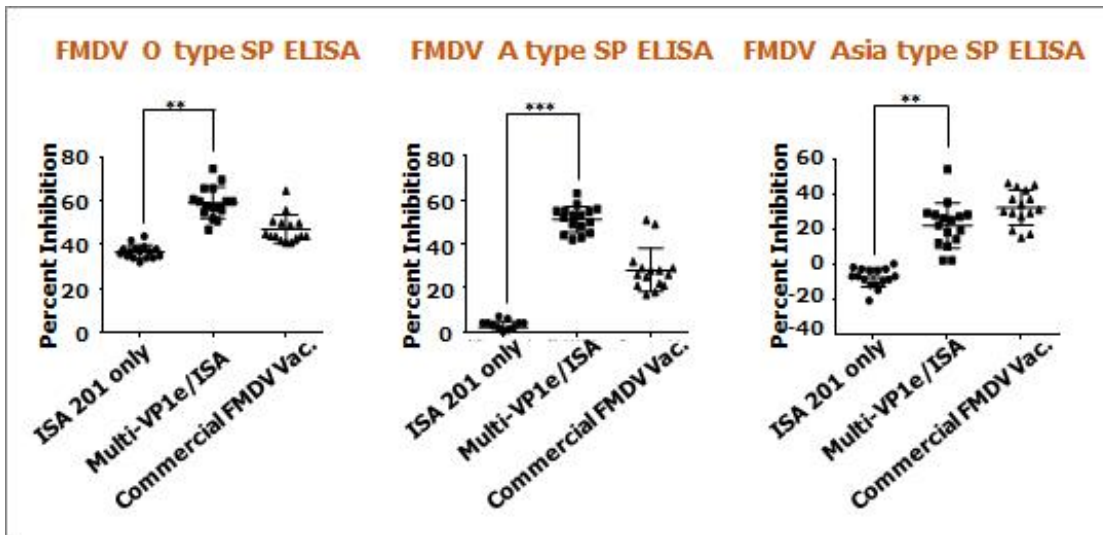


그림 21. 3가 serotype용 Multi-VP1e 단백질의 SP ELISA에 의한 마우스 면역원성 검증

◎ 다음으로, 이들 마우스 그룹에 Asia Sharmir FMDV 및 O Jincheon FMDV를 공격접종하여 3가 serotype용 Multi-VP1e (O/Jin-A/Poch-Asia/Sha) 항원단백질에 의해 FMDV에 대한 방어능을 확인하였음.

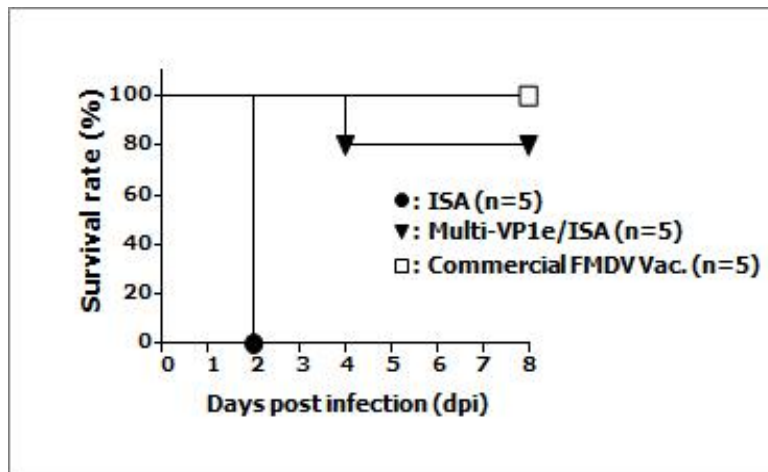
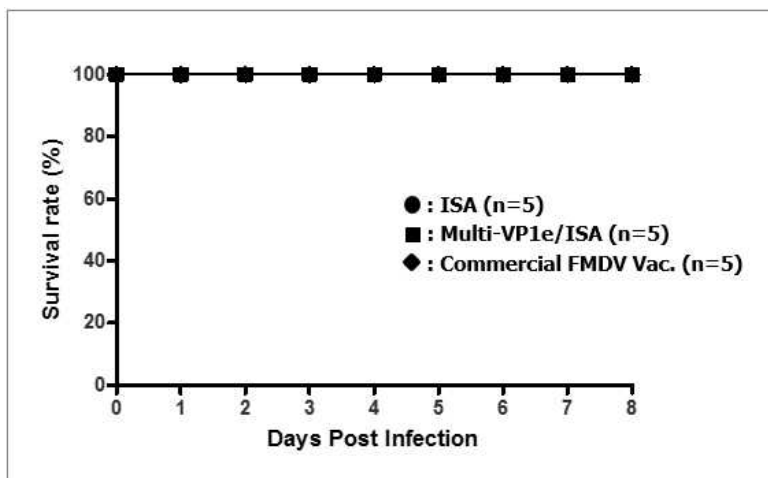


그림 22. Asia1 Shamir Challenge Model을 이용한 Multi-VP1e 항원단백질의 방어 효능 검증



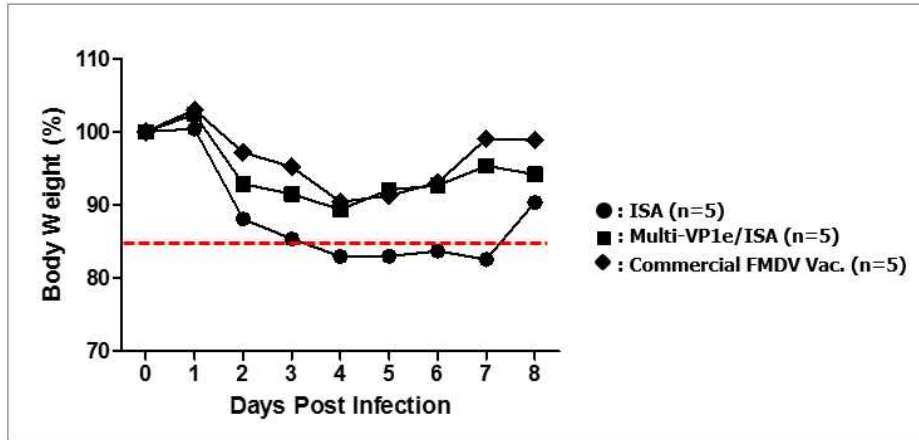


그림 23. O jincheon Challenge Model을 이용한 Multi-VP1e 항원단백질의 방어 효능 검증

- ◎ 감염 후 8일동안 생존률 및 체중변화를 분석한 결과, 그림에서 보는바와 같이 Asia sharmir FMDV 공격접종의 경우 대조군 마우스는 2일 이내에 모두 사망하였으나, Multi-VP1e (O/Jincheon-A/Pocheon-Asia/Shamir) 투여군과 상용화 백신 투여군은 높은 생존률을 보였다.
- ◎ 그러나 현재까지 O Jincheon FMDV 공격접종 model의 경우에는 공격접종후 마우스가 죽지 않았기 때문에 마우스의 체중변화를 통하여 백신의 효능을 검증하고 있음. 상기의 그림에서 보는바와 같이 Multi-VP1e (O/Jincheon-A/Pocheon-Asia/Shamir) 투여군과 상용화 백신 투여군의 마우스 체중변화는 거의 없는 반면 대조군 마우스의 경우에는 체중의 감소가 확인이 되었음. 이를 통해 Multi-VP1e (O/Jincheon-A/Pocheon-Asia/Shamir) 항원단백질의 백신 효능이 우수함을 확인하였음.

(3) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man) 단백질의 발현/정제 및 면역원성과 방어효능 검증연구

- ◎ 상기의 실험들은 3가 즉 FMDV의 O, A, Asia1 serotype을 동시에 방어하기 위한 항원단백질의 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope 항원단백질의 연구였음.
- ◎ 본 연구진은 최근 우리나라에서 유행하는 FMDV의 serotype이 O type임을 감안하여 FMDV O serotype을 위한 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질 연구를 수행하였음.

1) 대장균시스템을 이용한 O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질의 발현/정제 연구

- ◎ 본 연구진은 앞서 설계되었던 3가 serotype용 Multi-VP1e 대신 O serotype에 대한 specific 재조합 백신용 항원단백질을 제작하기 위해 O/Jincheon, O/Andong/SKR/201, O1/Manisa/Turkey/69의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위를 포함하는 O serotype용 Multi-VP1 epitope

(Multi-VP1e) 항원단백질을 유전자 재조합기법으로 합성하였음.

표3. O serotype용 Multi-VP1e 항원의 epitope sequences

Type	Epitope	Amino acid
O (Jincheon)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	GNCKYTGGSLPNV RGDLQVLAPKAAR PLPTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LAVHPSAARHKQKIVAPVKQ
O (Andong)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	GNCKYAGGSLPNV RGDLQVLAQKAAR PLPTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LLAVEVTSQDRHKQKIIAPAK
O (Manisa)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	GNCKYGDGTVANV RGDLQVLAQKAAR ALPTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LAIHPDQARHKQKIVAPVEQL

◎ Multi-VP1e의 합성 유전자를 Histidine이 tag된 대장균 발현벡터에 삽입하여 Multi-VP1e를 발현하는 plasmid를 구축하였음 (그림 24). 구축된 Multi-VP1e 발현 plasmid를 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 발현을 확인하였음.



그림 24. 대장균으로부터 O serotype용 Multi-VP1e 정제를 위한 plasmid 구축

◎ Soluble form의 Multi-VP1e 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography를 이용하여 Multi-VP1e 단백질 fraction을 대장균 단백질들로부터 정제하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 O serotype용 Multi-VP1e 단백질을 정제하였음 (그림 25).

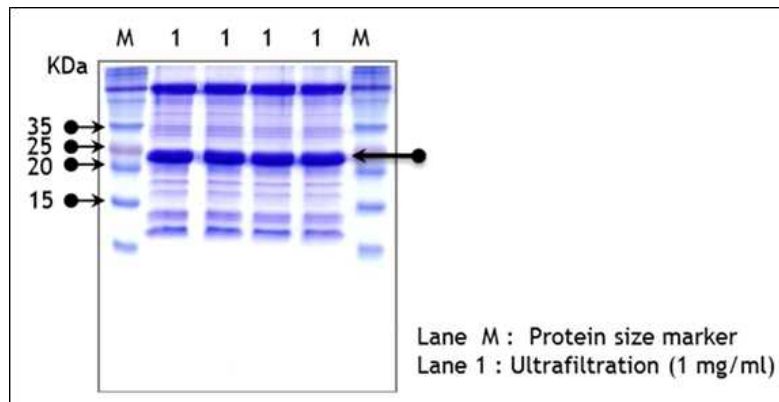


그림 25. 대장균으로부터 O serotype용 Multi-VP1e 정제

◎ 결론적으로 FMDV O serotype용 Multi-VP1e 단백질을 대장균 발현시스템을 이용하여 5 liter 대장균 배양으로부터 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 70mg (1mg/ml)을 순수 정제할 수 있었음.

2) 정제된 O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질의 실험동물 (마우스)에서의 면역원성 연구 (검역원 공동연구)

◎ Multi-VP1e (O/Jin-O/An-O/Man)에 대한 면역원성 확인을 위한 ELISA system 구축

◎ 역시, Soluble form으로 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 우선적으로 Multi-VP1e에 대한 항체측정용 자체 ELISA system을 구축하였음.

◎ FMDV O/Jincheon, O/Andong, O1/Manisa VP1 epitope 부분에 대한 펩타이드를 합성하여 항체측정 조건을 구축후 ELISA 조건을 확립하였고, 또한, 정제 Multi-VP1e 단백질을 이용하여 ELISA 조건을 확립하였음.

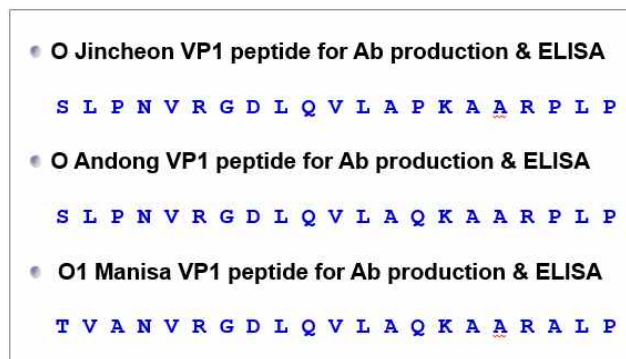


그림 26. ELISA system 구축을 위한 펩타이드 합성

◎ 더불어 각각의 펩타이드 항체를 확보하여 정제된 Multi-VP1e 단백질과의 반응을 확인하였음 (그림 27).

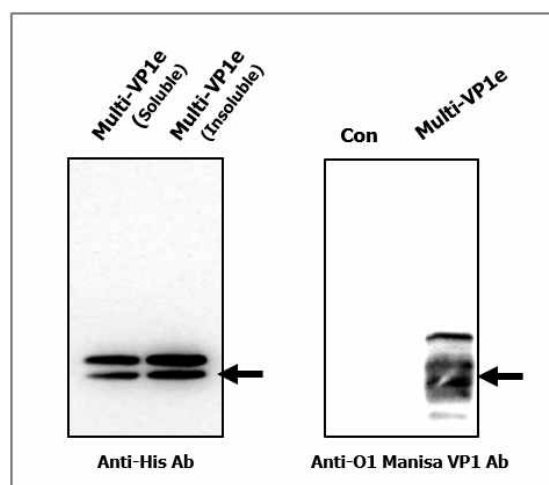


그림 27. 펩타이드 및 Multi-VP1e에 대한 토끼 항체의 Multi-VP1e 반응 검증

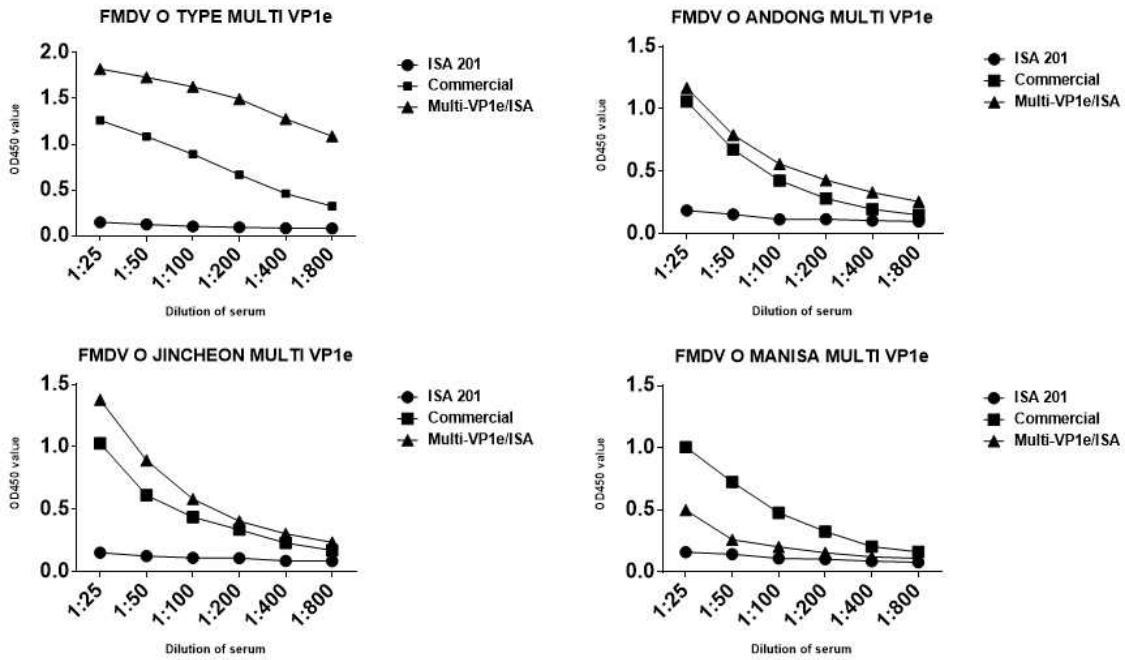


그림 29. O serotype용 Multi-VP1e의 항체가 검증

◎ 또한, Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질에 의해 T 면역세포가 반응하여 면역작용에 관여하였는지를 알아보기 위해 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질로 접종된 마우스의 비장내 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 T-면역세포 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.

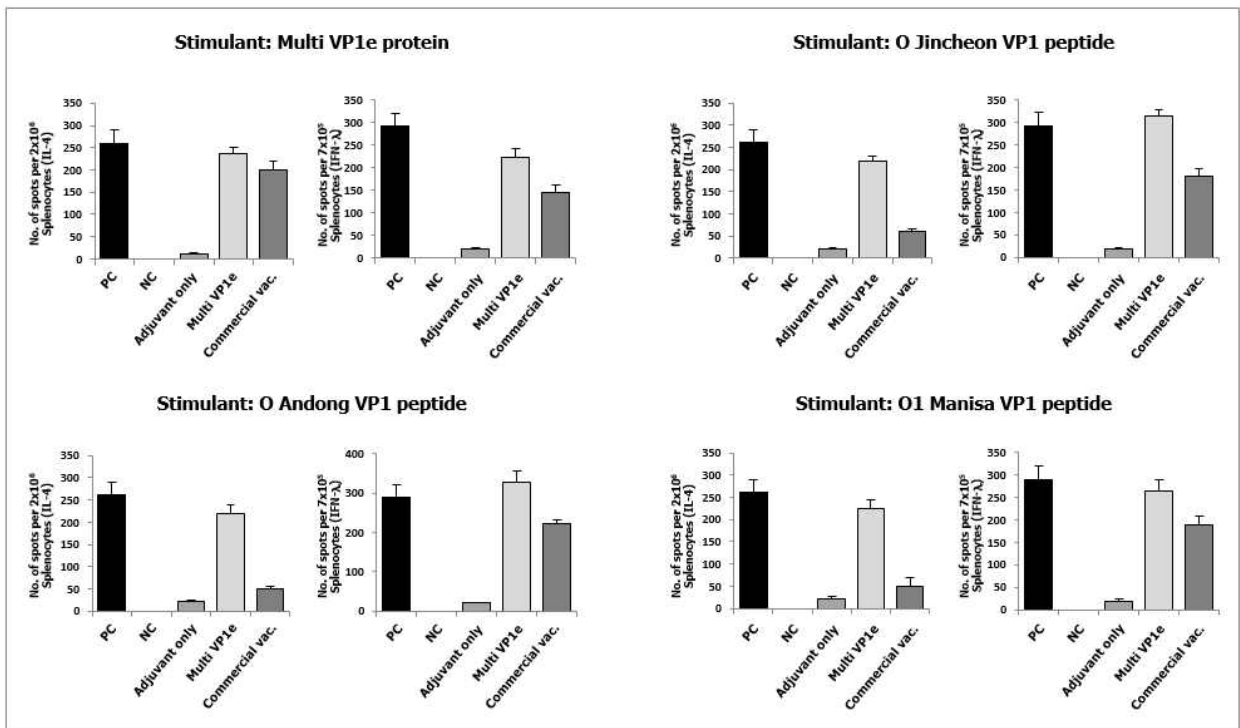


그림 30. O serotype용 Multi-VP1e 단백질에 의한 특이 T 세포 면역반응 유도 검증

- ◎ 그 결과 그림 30에서 보는 바와 같이, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN-r와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성이 확인되었음을 확인하였음. 이 실험을 통해 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질에 의해 Multi-VP1e (OVM) 항원단백질에 대한 T 면역세포의 활성화 면역작용에 기여하였음을 확인하였음.
- ◎ 결론적으로 FMDV O serotype specific Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa: OVM) 항원단백질은 체액성면역과 세포성면역을 효과적으로 유도할 수 있음.
- ◎ 다음으로 본 실험에서 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV O Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 혈청을 이용하여 수행하였음 (그림 31). PrioCHECK® FMDV O Type Antibody ELISA 분석 결과 Multi-VP1e와 ISA 201 혼합제가 상용화 백신과 유사한 높은 항체 생성 유도를 확인하였음.

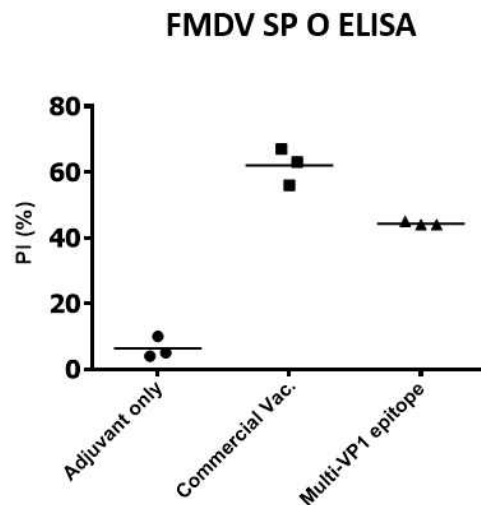


그림 31. O serotype용 Multi-VP1e 단백질의 SP ELISA에 의한 마우스 면역원성 검증

- ◎ 다음으로, 이들 마우스 그룹에 O Jincheon FMDV를 공격접종하여 O serotype용 Multi-VP1e (O/Jin-A/Poch-Asia/Shu) 항원단백질에 의해 FMDV에 대한 방어능을 확인하였음.

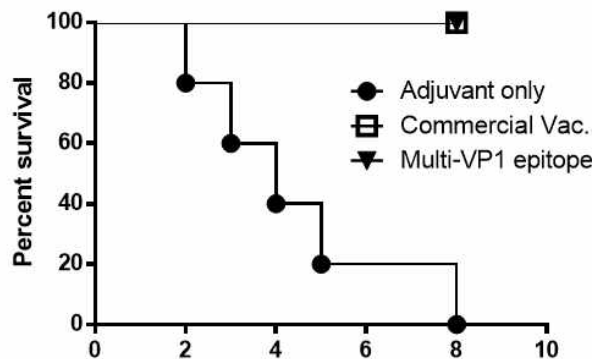


그림 32. O Jincheon Challenge Model을 이용한 Multi-VP1e 항원단백질의 방어 효능 검증

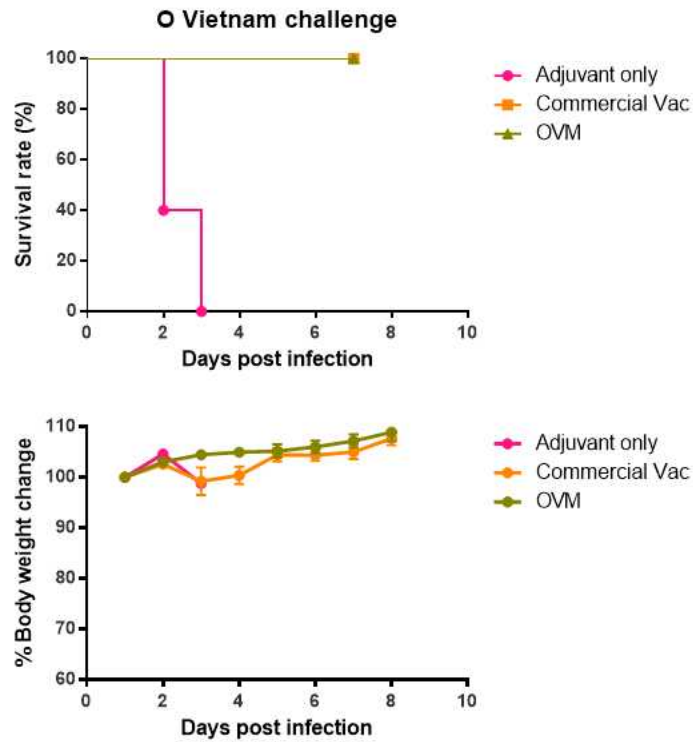


그림 34. O Vietnam Challenge Model을 이용한 Multi-VP1e 항원단백질의 방어 효능 검증

◎ 또한, 아래의 그림에서 보는 바와 같이 O Andong FMDV를 challenge한 뒤, 각각 3일과 7일째 혈액에 있는 바이러스의 양을 측정하였음. O Andong FMDV challenge model의 경우에는 마우스를 치사시키지 못함으로 생존율을 대신하여 혈액에 있는 바이러스의 양을 측정하였음. 그 결과 대조군에 비해 상용화 백신과 Multi-VP1e 항원단백질을 접종한 그룹에서는 바이러스가 검출되지 않았음. 따라서 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질이 다양한 O serotype 바이러스들에 대해 방어 효능이 뛰어나다는 것을 마우스 모델에서 검증하였음.

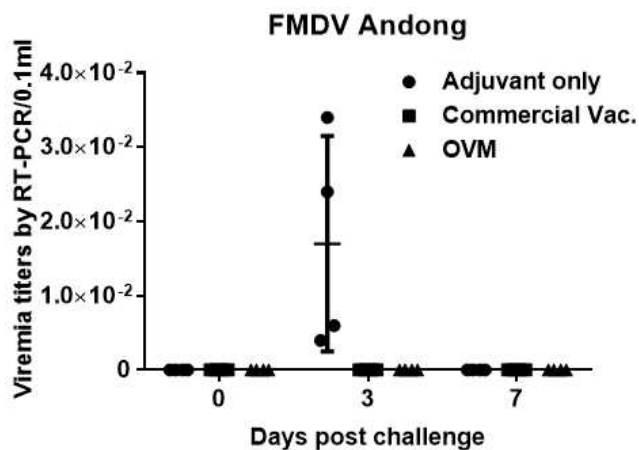
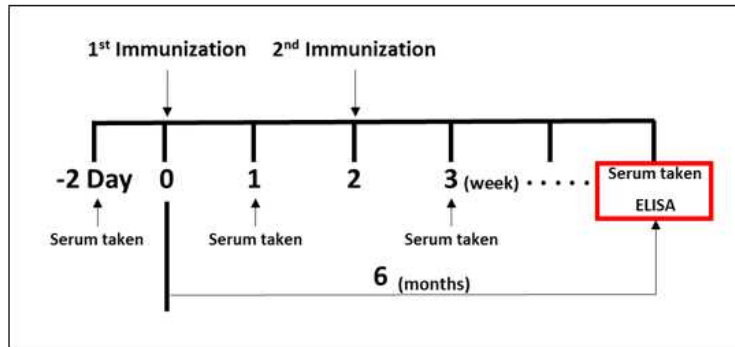


그림 35. O Andong Challenge Model을 이용한 Multi-VP1e 항원단백질의 방어 효능 검증

◎ 다음으로 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질에 의한 면역원성의

지속력을 확인하기 위해 long lasting 면역원성 실험을 수행하였음. 아래의 그림과 같은 schedule로 실험을 수행하였음.

◎ 즉, 5주령의 female C57BL/6N crl jori 마우스에 SEPPIC사의 ISA201 adjuvant를 Multi-VP1e단백질 (40ug)과 혼합한 group을 나누어 근육으로 2회 접종 (단, 상용화 백신은 1회) 한 후, 6개월 뒤에 혈청을 분리하여 항체가를 측정하였음.



C57BL/6N crl jori mice: Female, 5 weeks old (IM)

Group	Group	Adjuvant	Antigen volume	Inoculation time	Long lasting
1	Adjuvant only	ISA201	-	2	6 heads
2	Commercial vac.	-	-	1	6 heads
3	VP1 multi epitope	ISA201	40ug	2	6 heads

그림 36. Long lasting 면역원성 검증을 위한 schedule

◎ 그 결과, 그림과 같이 접종 6개월 뒤에도 항체가가 높은 수준으로 지속되는 것을 확인하였음.

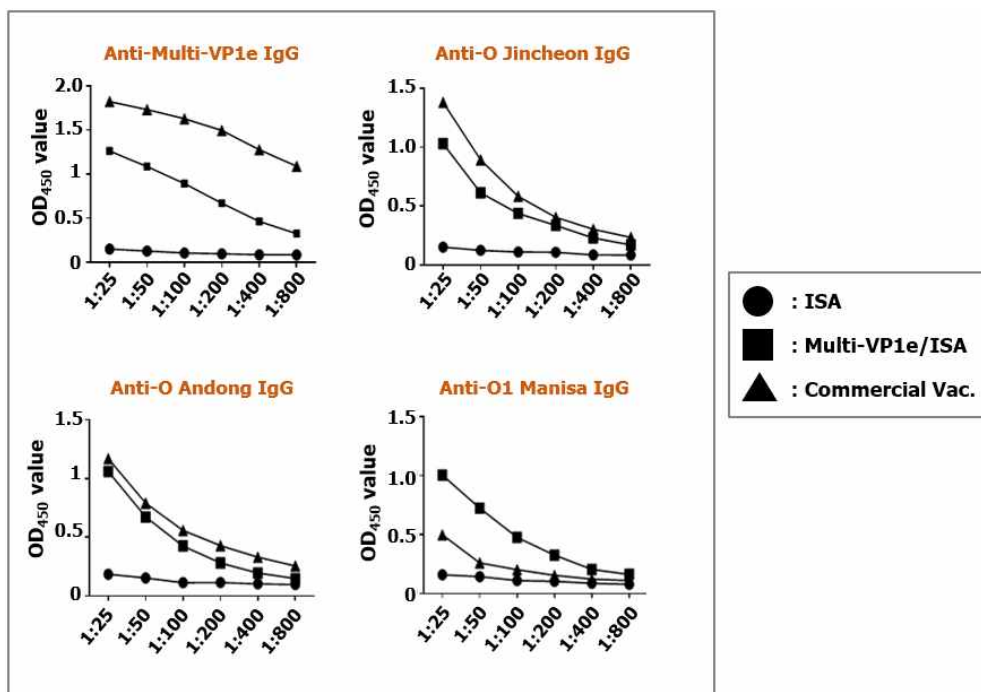
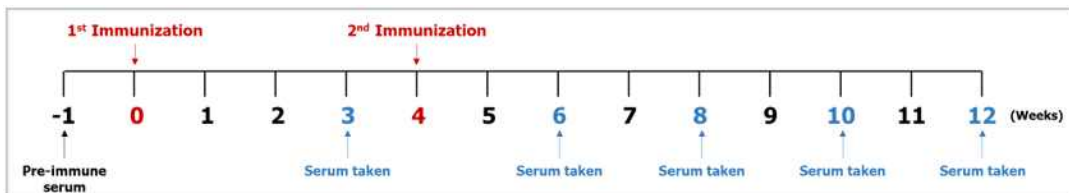


그림 37. O serotype용 Multi-VP1e의 지속면역 항체가 검증

3) 정제된 O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질의 목적동물 (돼지)에서의 면역원성 연구 (코미팜, 검역원과 공동연구)

◎ 정제된 O serotype Multi-Vp1 epitope 항원에 대한 면역원성을 목적동물인 미니피그에서 확인하기 위해 다음의 schedule로 실험을 수행하였음. 각각의 준비된 시료를 그림 38과 같은 스케줄로 미니피그에 접종 (2회)하여 표시된 주령별로 혈청을 채취하였음. Negative control 로 Adjuvant 만 접종하였고, positive control로 상용화백신을 접종하였음.



Group	시험백신의 조성		개체 수 (SPF 미니피그)
	재조합 항원양	면역증강제	
1		ISA201	2 heads
2	상용화백신		3 heads
3	O type mVP1e (O jincheon-O andong-O1 manisa) 400ug	ISA201	4 heads

그림 38. 미니피그에서의 O serotype Multi-VP1e 항원 접종 스케줄

◎ 실험수행 결과로 우선 각 그룹의 미니피그로부터 기간별로 혈청을 준비하고, 혈청에서의 각 항체가 (IgG)를 ELISA를 통해서 측정하였음. 그 결과, 그림에서 보는 바와 같이, 각각의 코팅 항원에 대해 높은 항체가를 확인하였음.

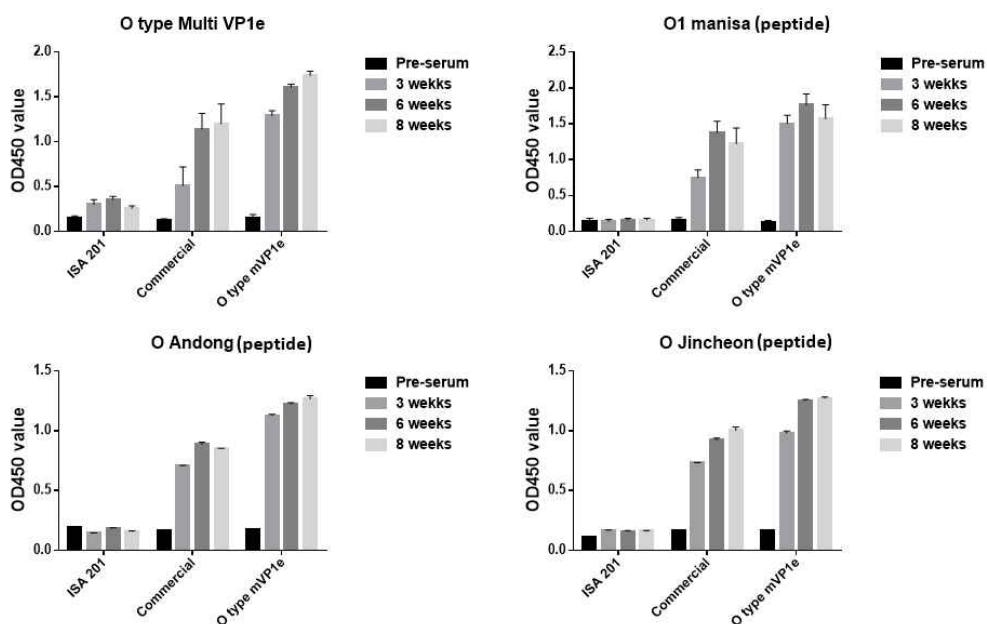


그림 39. 미니피그 혈청에서의 항체가 (IgG) 측정

◎ 다음으로 주별 혈청에서 O serotype에 대한 SP항체를 확인하였음. 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV O Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 이용하여 측정하였음.

Type O SP ELISA

개체별	0주			3주			6주			8주			10주			12주		
	OD(450)	PI(%)	결과	OD(450)	PI(%)	결과	OD(450)	PI(%)	결과	OD(450)	PI(%)	결과	OD(450)	PI(%)	결과	OD(450)	PI(%)	결과
음성 1	1.88	5.16	-	1.85	16.07	-	1.81	18.16	-	1.97	0.98	-	1.584	11.730	-	1.774	1.14	-
음성 2	1.84	7.37	-	1.93	12.36	-	2.02	8.55	-	1.87	6.02	-	1.705	4.987	-	2.082	-16.02	-
평균	1.86	6.27		1.89	14.21		1.91	13.35		1.92	3.50		1.645	8.359		1.928	-7.44	
양성 1	1.90	4.30	-	1.49	32.53	-	0.89	59.78	양성	0.74	62.60	양성	0.594	66.899	양성	0.841	53.13	양성
양성 2	1.96	1.54	-	1.42	35.43	-	0.87	60.73	양성	0.65	67.08	양성	0.492	72.583	양성	0.465	74.09	양성
양성 3	1.94	2.19	-	1.33	39.51	-	0.61	72.39	양성	0.40	79.86	양성	0.374	79.159	양성	0.338	81.16	양성
평균	1.93	2.68		1.42	35.83		0.79	64.30		0.60	69.85		0.487	72.880		0.548	69.46	
O400-1	1.82	8.38	-	1.26	42.92	-	0.56	74.47	양성	0.50	74.98	양성	0.405	77.43	양성	0.522	70.91	양성
O400-1	1.83	7.78	-	0.61	72.30	양성	0.25	88.85	양성	0.47	90.10	양성	0.180	89.97	양성	0.189	89.47	양성
O400-1	1.97	0.88	-	1.02	53.57	양성	0.53	75.92	양성	0.58	76.30	양성	0.472	73.70	양성	0.656	63.44	양성
O400-1	1.83	7.83	-	0.53	75.88	양성	0.63	71.30	양성	0.86	76.30	양성	0.524	70.80	양성	0.560	68.79	양성
평균	1.86	6.22		0.86	61.17		0.49	77.64		0.60	79.42		0.395	77.97		0.482	73.15	

그림 40. 미니피그 혈청에서의 O serotype에 대한 SP항체가 측정

◎ 그 결과, 그림에서 보는바와 같이 O serotype에 대해 정제된 O serotype Multi-VP1e (+ISA201) 항원이 상용화백신과 주령별로 비슷하거나 보다 더 높은 구제역 바이러스 구조단백질 (SP)에 대한 항체를 형성하였음.

◎ 또한, 처음 면역후 12주까지도 항체가의 지속성을 보여주어 면역원성의 우수성을 확인하였음.

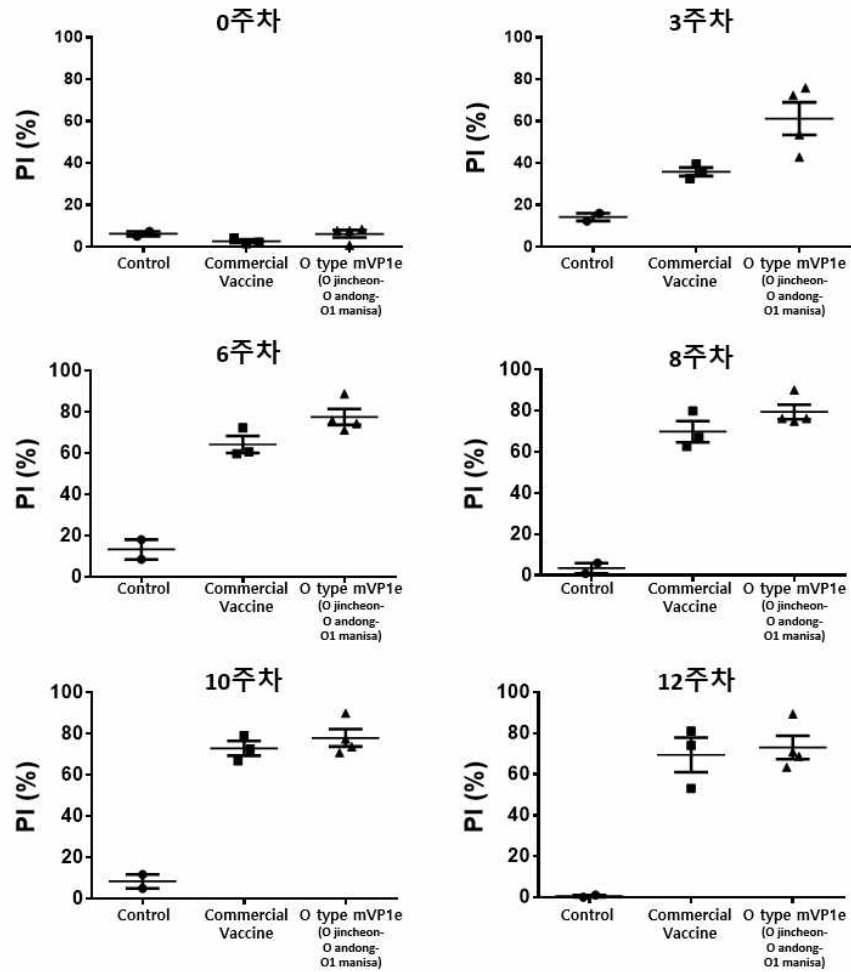


그림 41. 미니피그 혈청에서의 O serotype에 대한 SP항체가 측정

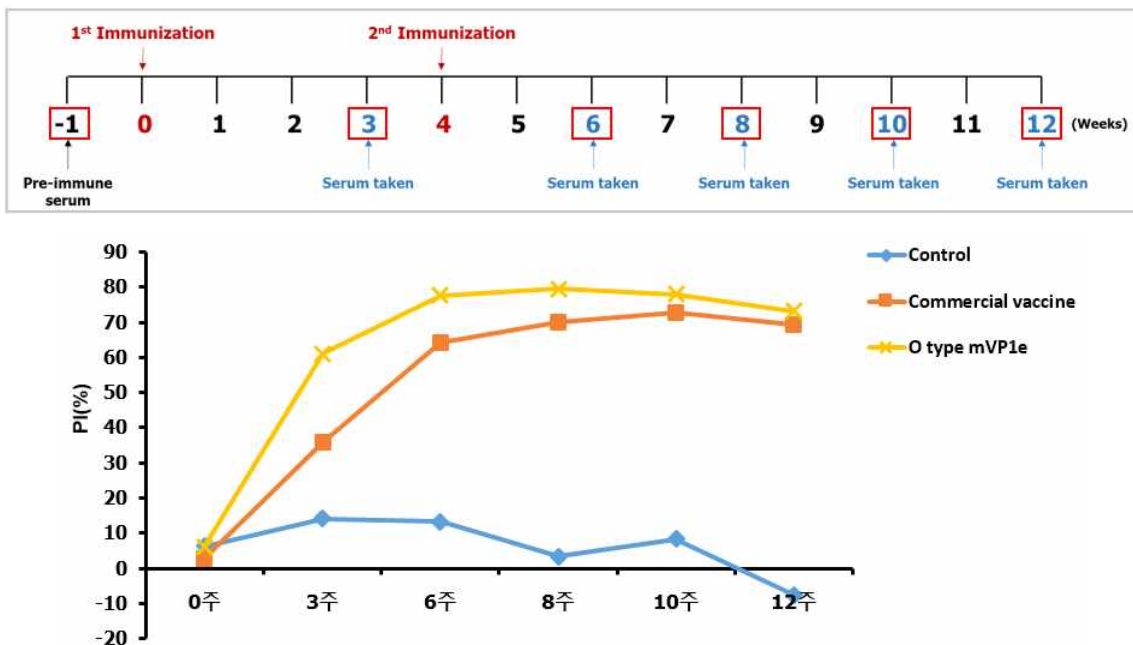


그림 42. 미니피그 혈청에서의 O serotype에 대한 SP항체가 측정

◎ 다음으로 주별 혈청에 대해 각각의 3가지 FMD 바이러스로 중화항체 검사를 농림축산검역본부에서 수행하였음.

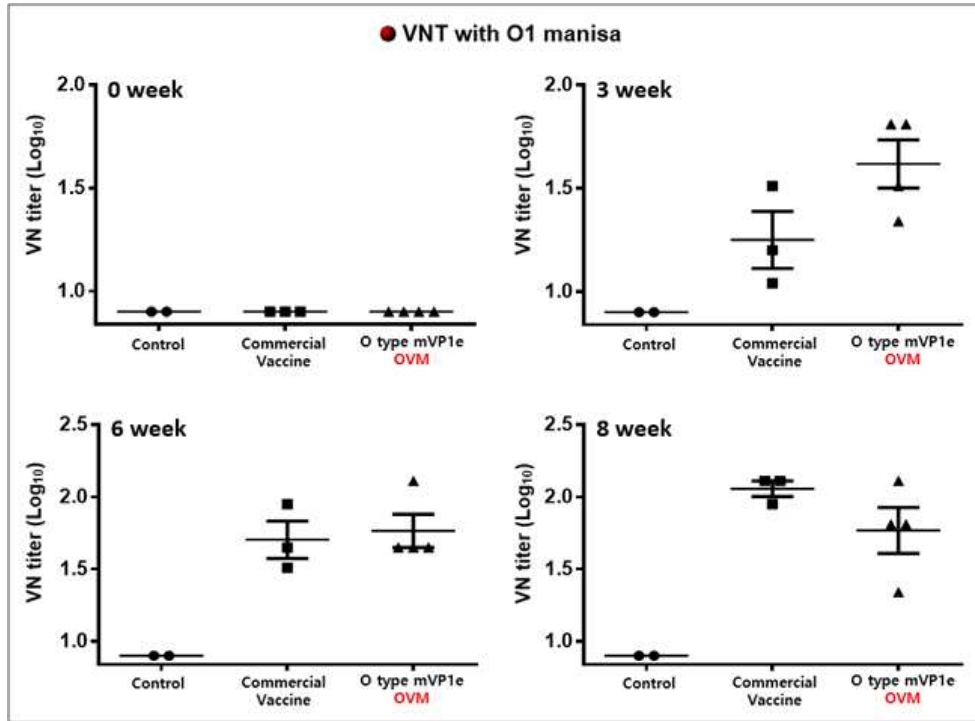


그림 43. 미니피그 혈청에서의 O1 manisa 바이러스에 대한 VNT 결과

◎ 그 결과로, O1 manisa 바이러스에 대해서는 상용화 백신과 더불어 O serotype Multi-VP1e 항원으로 면역시킨 미니피그의 혈청내 중화항체 값이 높게 유도되었음을 확인하였음. 그러나 8주차의 혈청에서는 O serotype Multi-VP1e 항원의 경우 상용화백신 보다 약간 낮게 유지됨을 확인하였음.

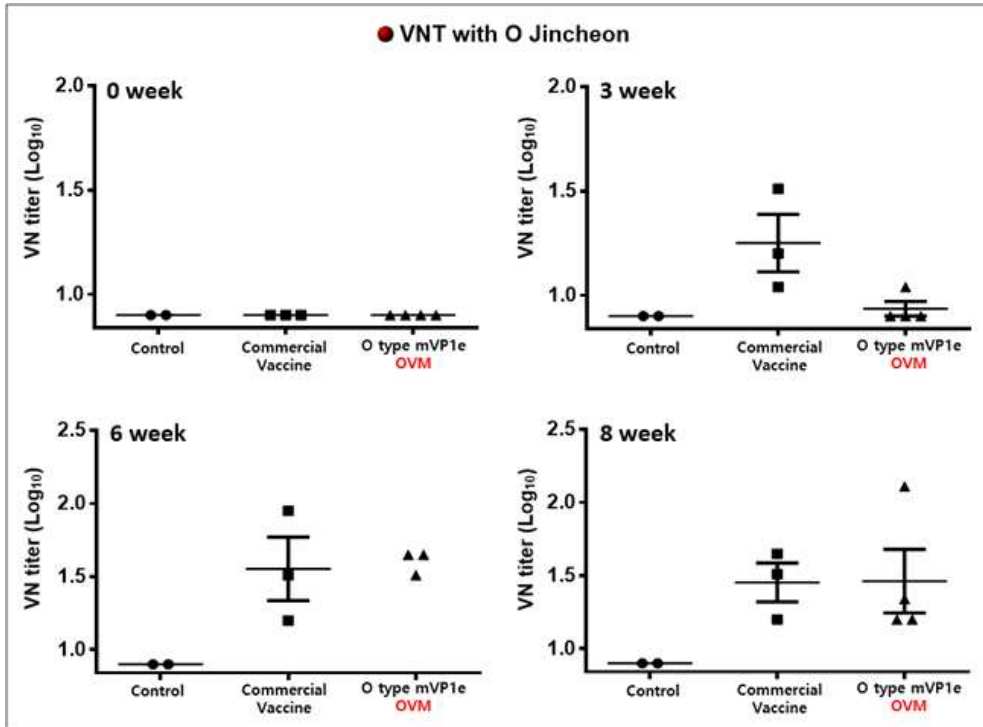


그림 44. 미니피그 혈청에서의 O Jincheon 바이러스에 대한 VNT 결과

© O Jincheon 바이러스에 대해서는 상용화 백신과 더불어 O serotype Multi-VP1e 항원으로 면역시킨 미니피그의 혈청내 중화항체 값이 역시 유도되었음을 확인하였음. 그러나 다른 바이러스들에 비해 Jincheon 바이러스에 대해서는 보다 낮은 중화항체의 유도능을 보였음.

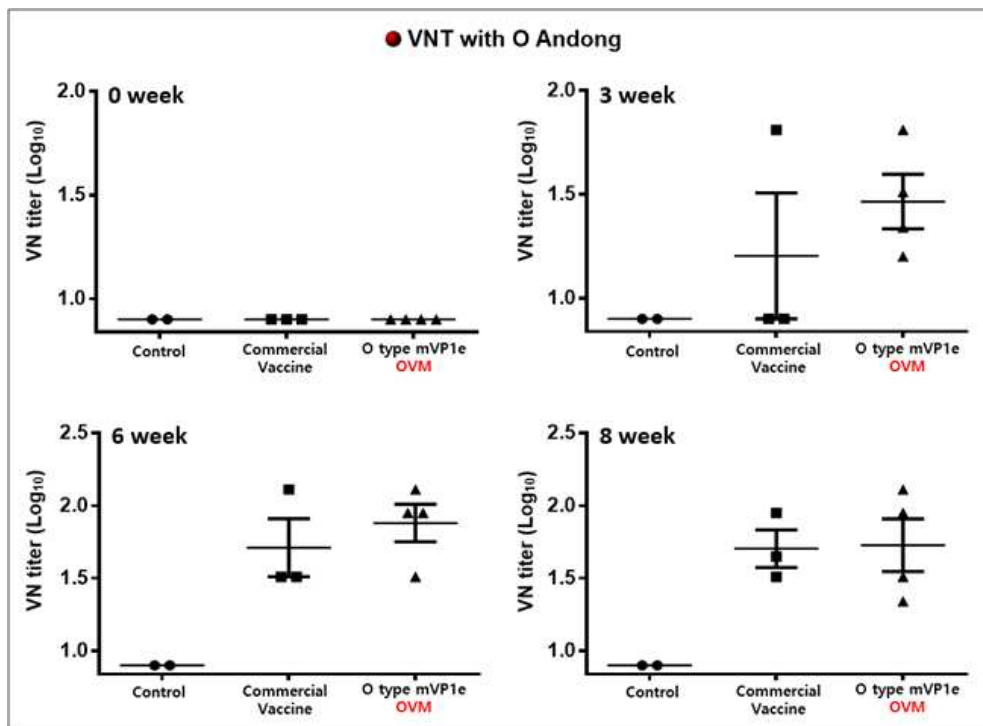


그림 45. 미니피그 혈청에서의 O Andong 바이러스에 대한 VNT 결과

- ◎ O Andong 바이러스에 대해서는 상용화 백신과 더불어 O serotype Multi-VP1e 항원으로 면역시킨 미니피그의 혈청내 중화항체 값이 역시 높게 유도되었음을 확인하였음.
- ◎ 결론적으로 마우스에서와 마찬가지로 목적동물인 돼지(미니피그)에서도 정제된 O serotype Multi-VP1e 항원이 효과적으로 중화항체를 유도함을 확인함으로써, 상용화백신과 비슷한 면역원성을 지니고 있음을 확인함. 그러나 O Jincheon 바이러스 방어를 위해서는 중화항체능을 향상시킬 수 있는 방법이 요구됨.

(4) Asia serotype용 Multi-VP1 epitope (Asia/sha-Asia/Mong-Asia/LC) 단백질 발현/정제 및 면역원성 검증연구

- ◎ 본 연구진은 최근 우리나라 주변국에서 유행하는 FMDV의 serotype이 Asia type임을 감안하여 FMDV Asia serotype을 위한 Multi-VP1e (Asia/Shamir, Asia/Mongolia05, Asia/LC04) 항원단백질 연구를 수행하였음.

1) 대장균시스템을 이용한 Asia serotype용 Multi-VP1 epitope (Asia/sha-Asia/Mong-Asia/LC; AsiaVM) 단백질의 발현/정제 연구

- ◎ 본 연구진은 Asia serotype에 대한 specific 재조합 백신용 항원단백질을 제작하기 위해 Asia/Shamir, Asia/Mongolia05, Asia/LC04의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus (VP1 amino acid 192~212) 항원 부위를 포함하는 Asia serotype용 Multi-VP1 epitope (Multi-VP1e) 항원단백질을 유전자 재조합기법으로 합성하였음.

표4. Asia serotype용 Multi-VP1e 항원의 epitope sequences

Type	Epitope	Amino acid
Asia (Shamir)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	YNGKTAYGETTSRRGDMAALAQRLSARLPTS
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LALDTTQDRRKQEIIAPQKQV
Asia (Mongolia05)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	KTTYGESSRRGDLAALARRVNNRLPTSFN
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	DTTQDRRKQEIIAPEKQ
Asia (LC04)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	KTAYGETTTRRGDLAALAQRVSRQLPTSFN
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	DTVQDRRKQEIIAPEKQ

- ◎ Multi-VP1e의 합성 유전자를 Histidine이 tag된 대장균 발현벡터에 삽입하여 Multi-VP1e를 발현하는 plasmid를 구축하였음 (그림 46). 구축된 Multi-VP1e 발현 plasmid를 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 발현을 확인하였음.

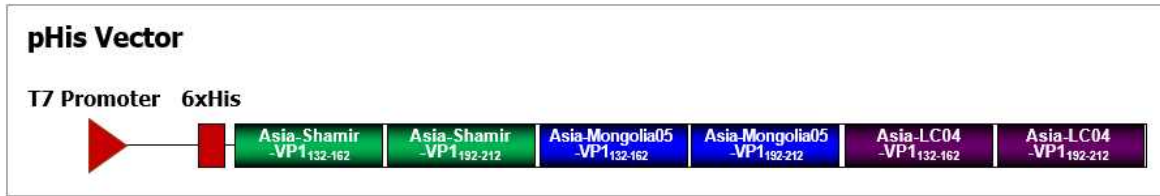


그림 46. 대장균으로부터 Asia serotype용 Multi-VP1e 정제를 위한 plasmid 구축

- ◎ Soluble form의 Multi-VP1e 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography를 이용하여 Multi-VP1e 단백질 fraction을 대장균 단백질들로부터 정제하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 Asia serotype용 Multi-VP1e 단백질을 정제하였음 (그림 47).

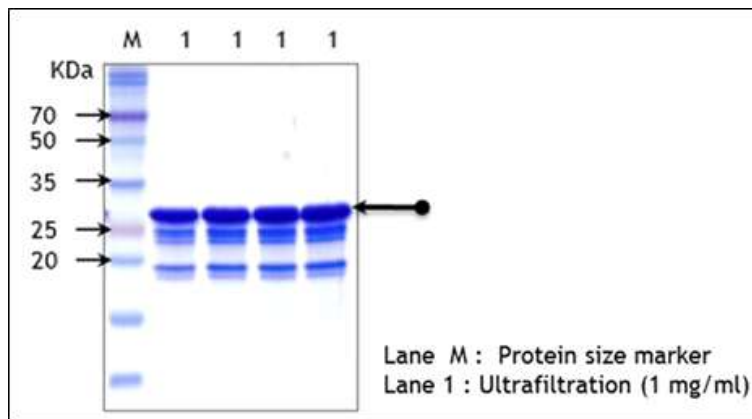


그림 47. 대장균으로부터 Asia serotype용 Multi-VP1e 정제

- ◎ 결론적으로 FMDV Asia serotype용 Multi-VP1e 단백질을 대장균 발현시스템을 이용하여 5 liter 대장균 배양으로부터 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 60mg (1mg/ml)을 순수 정제할 수 있었음.
- 2) 정제된 Asia serotype용 Multi-VP1 epitope (Asia/sha-Asia/Mong-Asia/LC; AsiaVM) 단백질의 면역원성 연구
- Multi-VP1e (Asia/sha-Asia/Mong-Asia/LC)에 대한 면역원성 확인을 위한 ELISA system 구축
 - ◎ 역시, Soluble form으로 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 우선적으로 Multi-VP1e에 대한 항체측정용 자체 ELISA system을 구축하였음.
 - ◎ FMDV Asia/Shamir, Asia/Mongolia05, Asia/LC04 VP1 epitope 부분에 대한 펩타이드를 합성하여 항체측정 조건을 구축한 후 ELISA 조건을 확립하였고, 또한, 정제 Multi-VP1e 단백질을 이용하여 ELISA 조건을 확립하였음.

- Asia shamir VP1 peptide for Ab production & ELISA
E T T S R R G D M A A L A Q R L S A R
- Asia mongolia05 VP1 peptide for Ab production & ELISA
G E E S S R R G D L A A L A R R V N N R
- Asia LC04 Iraq VP1 peptide for Ab production & ELISA
G E T T T R R G D L A A L A Q R V S R Q

그림 48. ELISA system 구축을 위한 펩타이드 합성

◎ 더불어 각각의 펩타이드 항체를 확보하여 정제된 Multi-VP1e 단백질과의 반응을 확인하였음 (그림 49).

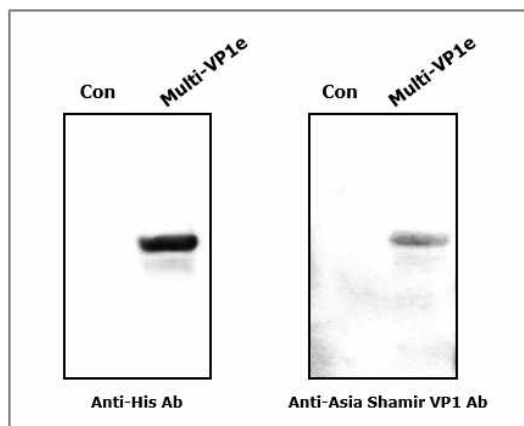


그림 49. 펩타이드 및 Multi-VP1e에 대한 토끼 항체의 Multi-VP1e 반응 검증

◎ Multi-VP1e (Asia/sha-Asia/Mong-Asia/LC)에 대한 면역원성 확인

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crl/jori mice				
Route of administration : Intramuscular Injection				
Days of inoculation : 1, 14days				
Groups		Inoculum	Route	No. of Mice
1	Control (ISA201)	100ul	I.M	5
2	Multi-VP1e + ISA201	40ug/40ul	I.M	5
3	Commercial vaccine	100ul	I.M	5

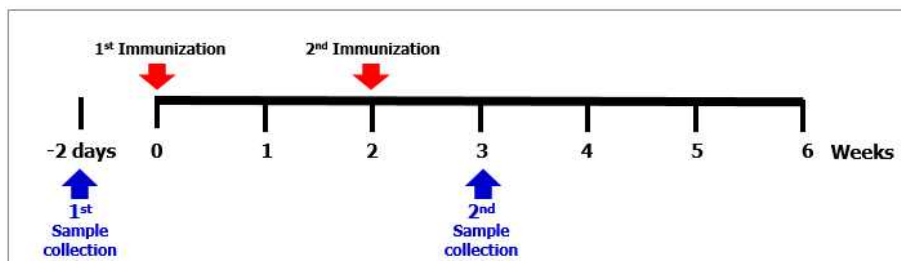


그림 50. 정제 Multi-VP1e 단백질의 마우스 면역원성 실험 schedule

◎ 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 그림에서 보는 바와 같이 5주령의 female C57BL/6N crl jori 마우스에 SEPPIC사의 ISA201 adjuvant를 Multi-VP1e 단백질 (40ug)과 혼합한 group을 나누어 근육으로 2번 접종을 수행하였음.

◎ 그 결과 아래 그림에서 보는 바와 같이 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 Asia/Shamir, Asia/Mongolia05, Asia/LC04에 대한 항원 펩타이드 혹은 Multi-VP1e 단백질로 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체생성율을 분석한 결과, 정제 Multi-VP1e 단백질에 대하여 높은 항체의 유도도를 확인할 수 있었음.

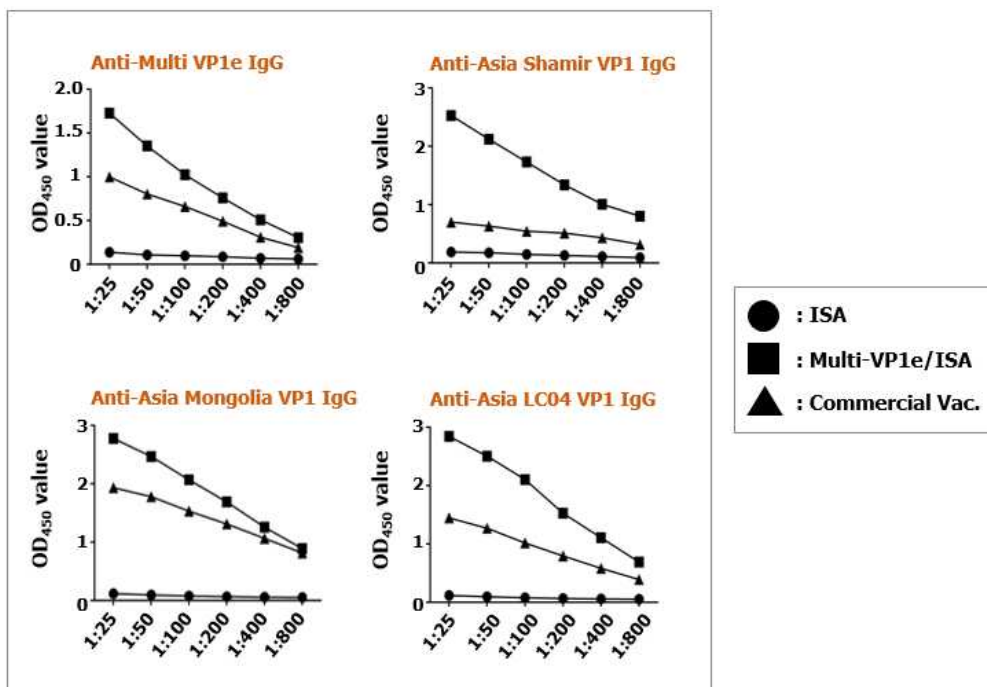


그림 51. Asia serotype용 Multi-VP1e의 항체가 검증

◎ 또한, Multi-VP1e (Asia/Shamir-Asia/Mong05-Asia/LC04) 항원단백질에 의해 T 면역세포가 반응하여 면역작용에 관여하였는지를 알아보기 위해 Multi-VP1e (Asia/Shamir-Asia/Mong05-Asia/LC04) 항원단백질로 접종된 마우스의 비장내 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 및 Asia/Shamir, Asia/Mongolia05, Asia/LC04 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 T-면역세포 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.

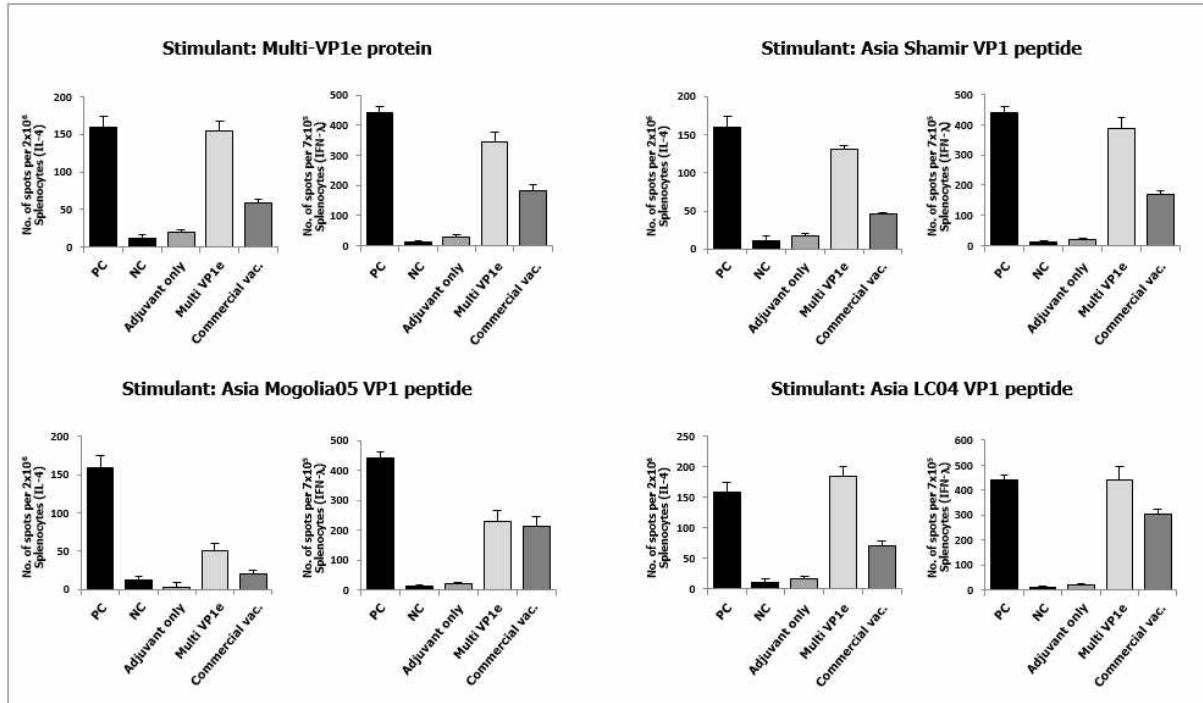


그림 52. Asia serotype용 Multi-VP1e 단백질에 의한 특이 T 세포 면역반응 유도 검증

◎ 그 결과 그림 52에서 보는 바와 같이, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN-r와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성이 확인되었음을 확인하였음. 이 실험을 통해 Multi-VP1e (Asia/Shamir-Asia/Mong05-Asia/LC04) 항원단백질에 의해 Multi-VP1e 항원단백질에 대한 T 면역세포의 활성화 면역작용에 기여하였음을 확인하였음.

◎ 결론적으로 FMDV Asia serotype specific Multi-VP1e (Asia/Shamir-Asia/Mong05-Asia/LC04) 항원단백질은 체액성면역과 세포성면역을 효과적으로 유도할 수 있음.

(5) A serotype용 Multi-VP1 epitope (A/Poch-A/Mal-A/Iraq) 단백질 발현/정제 및 면역원성 검증연구

◎ 본 연구진은 최근 우리나라 주변국에서 유행하는 FMDV의 serotype이 A serotype임을 감안하여 FMDV A serotype을 위한 Multi-VP1e (A/Pocheon-A/Malay97-A/Iraq) 항원단백질 연구를 수행하였음.

1) 대장균시스템을 이용한 A serotype용 Multi-VP1 epitope (A/Poch-A/Mal-A/Iraq; AVM) 단백질의 발현/정제 연구

◎ 본 연구진은 A serotype에 대한 specific 재조합 백신용 항원단백질을 제작하기 위해 A/Pocheon, A/Malay97, A/Iraq의 G-H loop (VP1 amino acid 132~162)와 C-terminus

(VP1 amino acid 192~212) 항원 부위를 포함하는 A serotype용 Multi-VP1 epitope (AVM) 항원단백질을 유전자 재조합기법으로 합성하였음.

표5. A serotype용 Multi-VP1e 항원의 epitope sequences

Type	Epitope	Amino acid
A (Pocheon)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	VYNGTSRY SAPATRRGDLGSLAARLAAQLPA
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	LLAVEVTSQDRHKQKIIAPAK
A (Malay97)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	GTSKYSTPGARRGDLGSLAARDA AQLPASFN
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	VEVLSQDRHKQR I IAPAKQ
A (Iraq)	VP1 ₁₃₂₋₁₆₂	GTSKYSAGGTGRRGDLGPLAARVAAQLPAS F
	VP1 ₁₉₂₋₂₁₂	AVEVSSQDRHKQK I IAPAKQ

◎ Multi-VP1e의 합성 유전자를 Histidine이 tag된 대장균 발현벡터에 삽입하여 Multi-VP1e를 발현하는 plasmid를 구축하였음 (그림 53). 구축된 Multi-VP1e 발현 plasmid를 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 발현을 확인하였음.

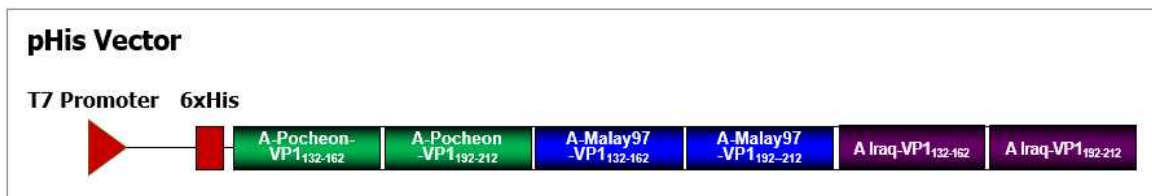


그림 53. 대장균으로부터 A serotype용 Multi-VP1e 정제를 위한 plasmid 구축

◎ Soluble form의 Multi-VP1e 단백질을 정제하기 위해서 Bio-Rad FPLC system과 Immobilized metal affinity chromatography를 이용하여 Multi-VP1e 단백질 fraction을 대장균 단백질들로부터 정제하였고, ultrafiltration을 통하여 그림에서 보는 바와 같은 고농도의 A serotype용 Multi-VP1e 단백질을 정제하였음 (그림 54).

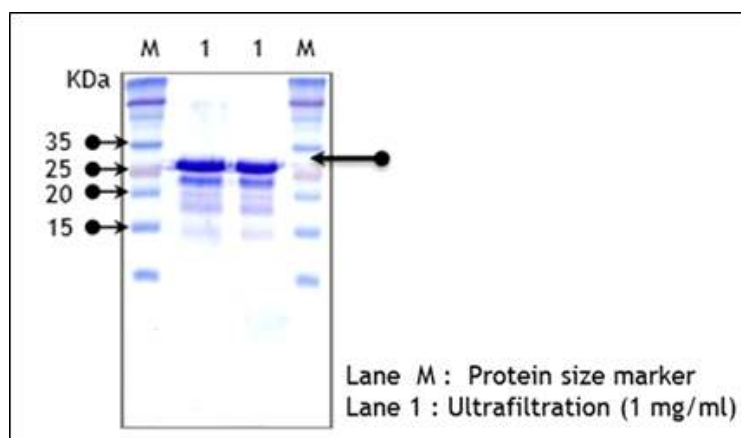


그림 54. 대장균으로부터 A serotype용 Multi-VP1e 정제

◎ 결론적으로 FMDV A serotype용 Multi-VP1e 단백질을 대장균 발현시스템을 이용하여 5 liter 대장균 배양으로부터 soluble form의 Multi-VP1e 단백질 60mg (1mg/ml)을 순수 정제할 수 있었음.

2) 정제된 A serotype용 Multi-VP1 epitope (A/Poch-A/Mal-A/Iraq; AVM) 단백질의 면역원성 연구

◎ Multi-VP1e (A/Poch-A/Mal-A/Iraq)에 대한 면역원성 확인을 위한 ELISA system 구축

◎ 역시, Soluble form으로 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 우선적으로 Multi-VP1e에 대한 항체측정용 자체 ELISA system을 구축하였음.

◎ FMDV A/Pocheon, A/Malay97, A/Iraq VP1 epitope 부분에 대한 펩타이드를 합성하여 항체측정 조건을 구축후 ELISA 조건을 확립하였고, 또한, 정제 Multi-VP1e 단백질을 이용하여 ELISA 조건을 확립하였음.

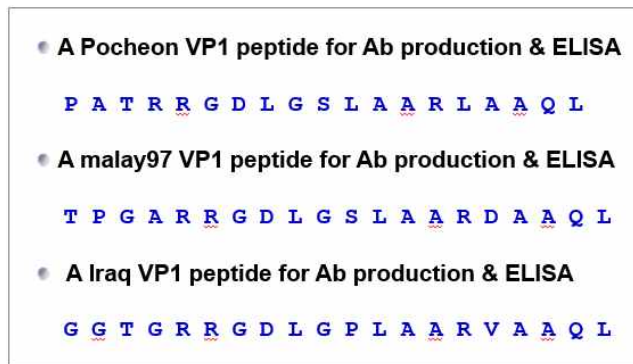


그림 55. ELISA system 구축을 위한 펩타이드 합성

◎ 더불어 각각의 펩타이드 항체를 확보하여 정제된 Multi-VP1e 단백질과의 반응을 확인하였음 (그림 56).

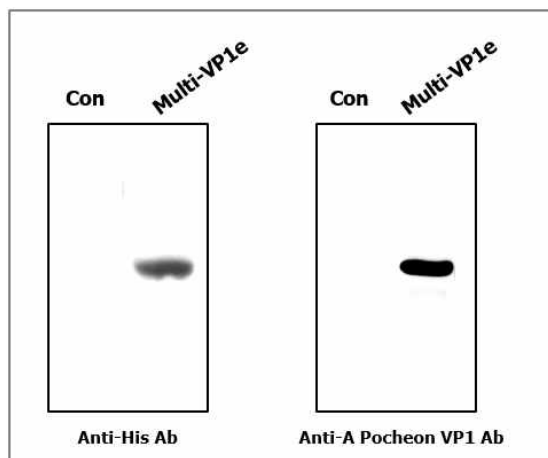


그림 56. 펩타이드 및 Multi-VP1e에 대한 토끼 항체의 Multi-VP1e 반응 검증

● Multi-VP1e (A/Poch-A/Mal-A/Iraq; AVM)에 대한 면역원성 확인

◎ 정제된 Multi-VP1e 단백질의 면역원성을 확인하기 위해서 그림 57에서 보는 바와 같이 5주령의 female C57BL/6N crl jori 마우스에 SEPPIC사의 ISA201 adjuvant를 Multi-VP1e 단백질 (40ug)과 혼합한 group을 나누어 근육으로 2번 접종을 수행하였음.

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crl jori mice				
Route of administration : Intramuscular Injection				
Days of inoculation : 1, 14days				
Groups		Inoculum	Route	No. of Mice
1	Control (ISA201)	100ul	I.M	5
2	Multi-VP1e + ISA201	40ug/40ul	I.M	5
3	Commercial vaccine	100ul	I.M	5

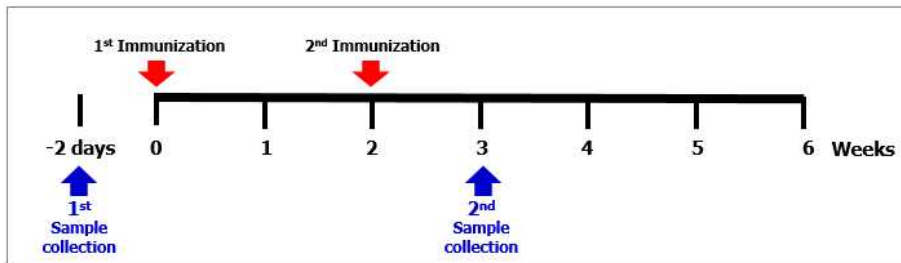


그림 57. 정제 Multi-VP1e 단백질의 마우스 면역원성 실험 schedule

◎ 그 결과 아래 그림에서 보는 바와 같이 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 A/Pocheon, A/Malay97, A/Iraq에 대한 항원 펩타이드 혹은 Multi-VP1e 단백질로 코팅하여 수행한 ELISA를 통해 OD450nm에서 항체생성율을 분석한 결과, 정제 Multi-VP1e 단백질에 대하여 높은 항체의 유도를 확인할 수 있었음.

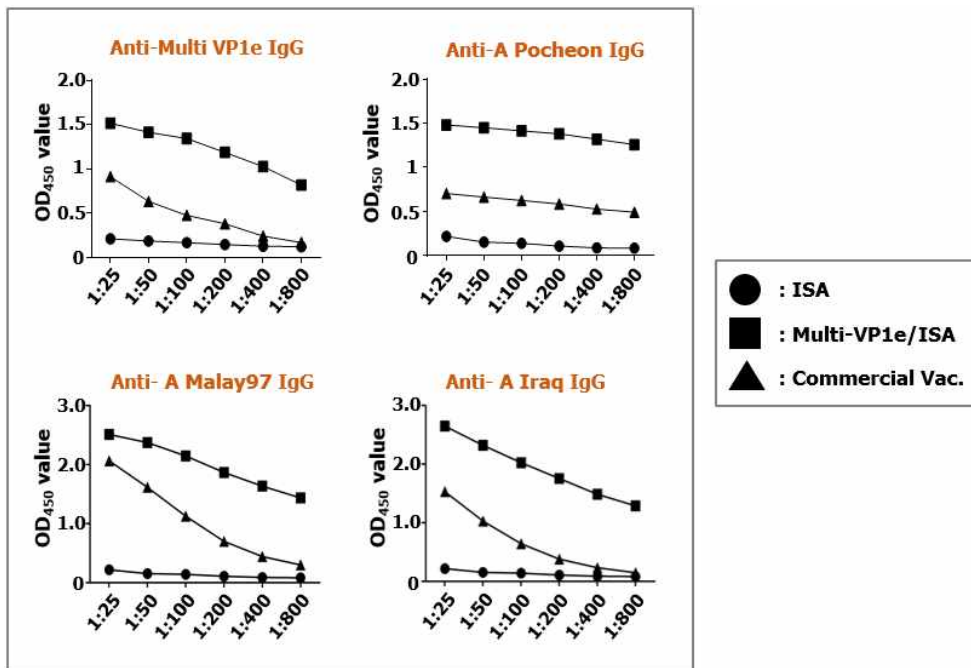


그림 58. A serotype용 Multi-VP1e의 항체가 검증

◎ 또한, Multi-VP1e (A/Poch-A/Mal-A/Iraq) 항원단백질에 의해 T 면역세포가 반응하여 면역 작용에 관여하였는지를 알아보기 위해 Multi-VP1e (A/Poch-A/Mal-A/Iraq) 항원단백질로 접종된 마우스의 비장내 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 및 A/Pocheon의 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 T-면역세포 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.

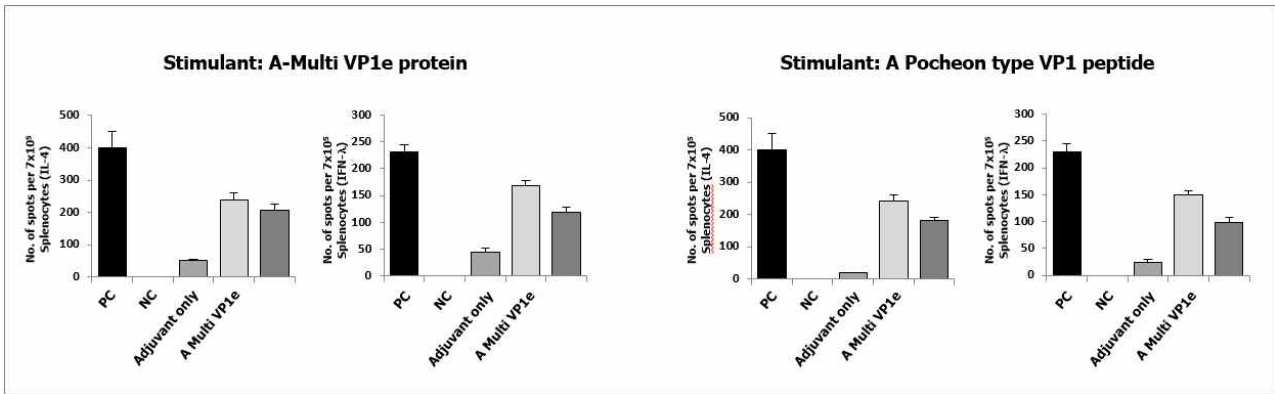


그림 59. A serotype용 Multi-VP1e 단백질에 의한 특이 T 세포 면역반응 유도 검증

◎ 그 결과 그림 59에서 보는 바와 같이, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN-r와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성이 확인되었음을 확인하였음. 이 실험을 통해 Multi-VP1e (A/Poch-A/Mal-A/Iraq) 항원단백질에 의해 Multi-VP1e 항원단백질에 대한 T 면역세포의 활성화 면역작용에 기여하였음을 확인하였음.

◎ 결론적으로 FMDV A serotype specific Multi-VP1e (A/Poch-A/Mal-A/Iraq) 항원단백질은 체액성면역과 세포성면역을 효과적으로 유도할 수 있음.

(6) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man) 단백질과 hWRS 면역증강제 혼합제제의 면역증강 효능 검증연구

◎ 본 연구진은 개발한 FMDV의 Multi-VP1e 항원단백질의 면역원성을 보다 더 높일 수 있는 단백질 면역증강제 (Immunostimulant) 연구를 동시에 수행하였음.

1) O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질의 면역원성 증진을 위한 단백질 면역증강제 hWRS (Immunostimulant)의 최적 용량 검증

◎ 본 연구진에 의한 개발된 단백질 면역증강제 (Immunostimulant)인 hWRS가 대장균에서 soluble form으로 발현 정제되어 준비가 되어졌고, hWRS의 면역증강 효능을 검증하기 위하여 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질을 이용하였음.

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crl jori mice Route of administration : Intramuscular Injection Days of inoculation : 1, 14days					
Groups		Inoculum	Route	No. of Mice	
1	PBS	PBS	0ug+0ug	I.M	4
2	Multi-VP1e 10ug	Adjuvant 0ug	10ug+0ug	I.M	4
3		Adjuvant 10ug	10ug+10ug	I.M	4
4		Adjuvant 20ug	10ug+20ug	I.M	4
5		Adjuvant 30ug	10ug+30ug	I.M	4
6	Multi-VP1e 20ug	Adjuvant 0ug	20ug+0ug	I.M	4
7		Adjuvant 10ug	20ug+10ug	I.M	4
8		Adjuvant 20ug	20ug+20ug	I.M	4
9		Adjuvant 30ug	20ug+30ug	I.M	4
10	Multi-VP1e 30ug	Adjuvant 0ug	30ug+0ug	I.M	4
11		Adjuvant 10ug	30ug+10ug	I.M	4
12		Adjuvant 20ug	30ug+20ug	I.M	4
13		Adjuvant 30ug	30ug+30ug	I.M	4

그림 60. 정제 hWRS 단백질의 마우스 면역원성 실험 schedule

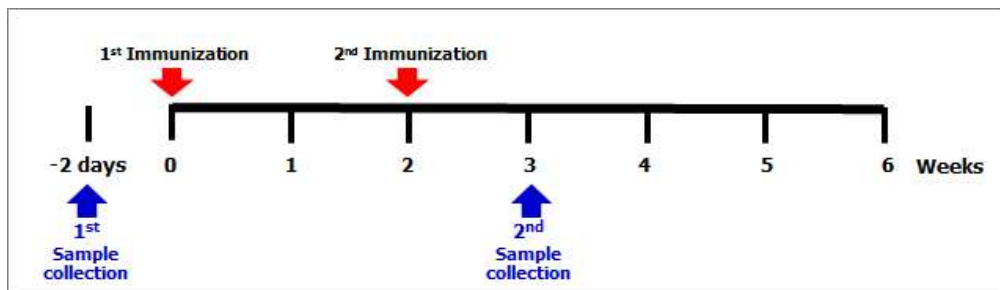


그림 61. 정제 hWRS 단백질의 마우스 면역원성 실험 schedule

© 상기의 그림과 같이 10ug, 20ug, 30ug 3개의 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질 접종그룹으로 나누고 hWRS 0ug, 10ug, 20ug, 30ug을 혼합하여 다른 면역증강제 없이 그림 61의 일정으로 마우스에 접종하고 항체생성률을 확인하였음.

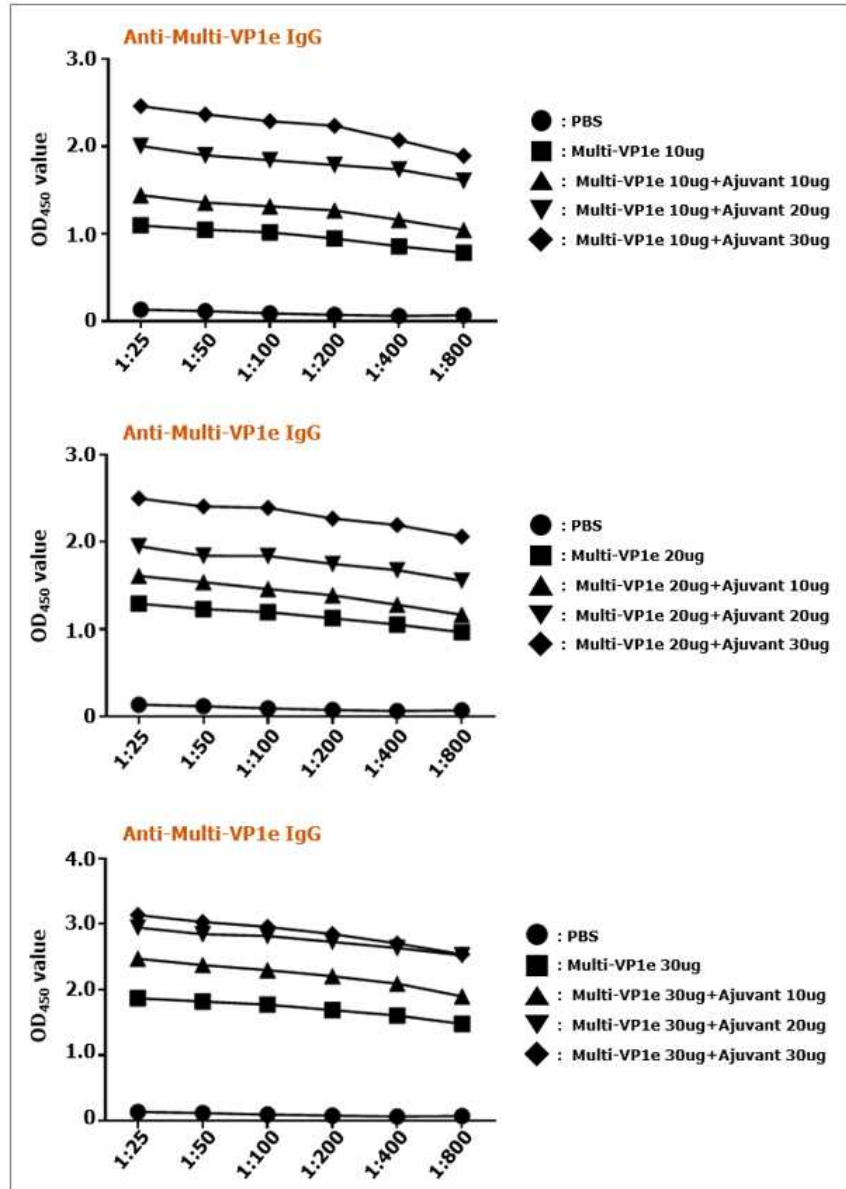
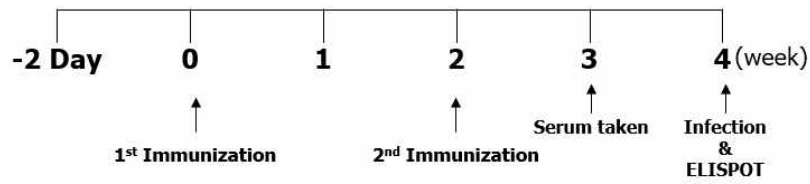


그림 62. Multi-VP1e의 항체가 증강 검증

- ◎ 상기의 그림과 같이 항체생성률을 분석한 결과 그림과 같이 면역증강제 hWRS의 투여량이 증가함에 따라 Multi-VP1e (O/Jincheon-A/Pocheon-Asia/Shamir) 항원 단백질에 대한 항체 생성률도 증가한 것을 3개의 Multi-VP1e(O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 10ug, 20ug, 30ug 접종그룹에서 모두 확인 할 수 있었음.
- ◎ 이 실험을 통해 면역증강제 hWRS의 면역증강 효능을 확인할 수 있었음. 또한 이 물질을 앞서 실험한 항원을 이용한 구제역 백신과 함께 이용하면 더욱 효과적인 구제역 예방이 가능 할 것으로 보임.
- ◎ 또한, O serotype용 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질에 면역증강제 hWRS를 첨가하여 투여하였을 때, T면역세포 반응이 더 증가하는지 확인하기 위해 그림 63과 같은 스케줄로 실험을 수행하였고, 접종 후 각 그룹의 마우스의 비장세포를 분리하고,

이에 Multi-VP1e 단백질 및 O type의 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 T-면역세포 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.



-Mouse type: 5weeks old Female C57BL/6N crl/jori mice
 -Inoculum: O type VP1e (O jincheon - O andong - O1 manisa) w or w/o WRS
 -Route of administration: Subcutaneous or Intramuscular
 -Days of inoculation: 0, 14 dpi
 -Challenge : 28 dpi

	ISA201	Antigen	WRS	PBS	Total amount	Inoculation Time	for SP ELISA & ELISPOT	for Challenge
Adjuvant only		-	-		100ul	2	3 heads	5 heads
Commercial vac.		100ul	-		100ul	2	3 heads	5 heads
mVP1e	50ul	40ug		10ul	100ul	2	3 heads	5 heads
WRS+ mVP1e	50ul	40ug	40ug	80ul	200ul	2	3 heads	5 heads

그림 63. 정제된 WRS의 면역원성 증강 효능 실험 schedule

◎ 그 결과, 그림과 같이 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 상용화백신과 항원 접종 그룹에서만 IFN- γ 와 IL-4가 유도됨을 확인하였음. 이 실험을 통해 O serotype용 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질과 정제된 hWRS를 같이 접종할 경우 Multi-VP1e 항원단백질에 대한 T 면역세포의 면역작용이 증강됨을 확인하였음.

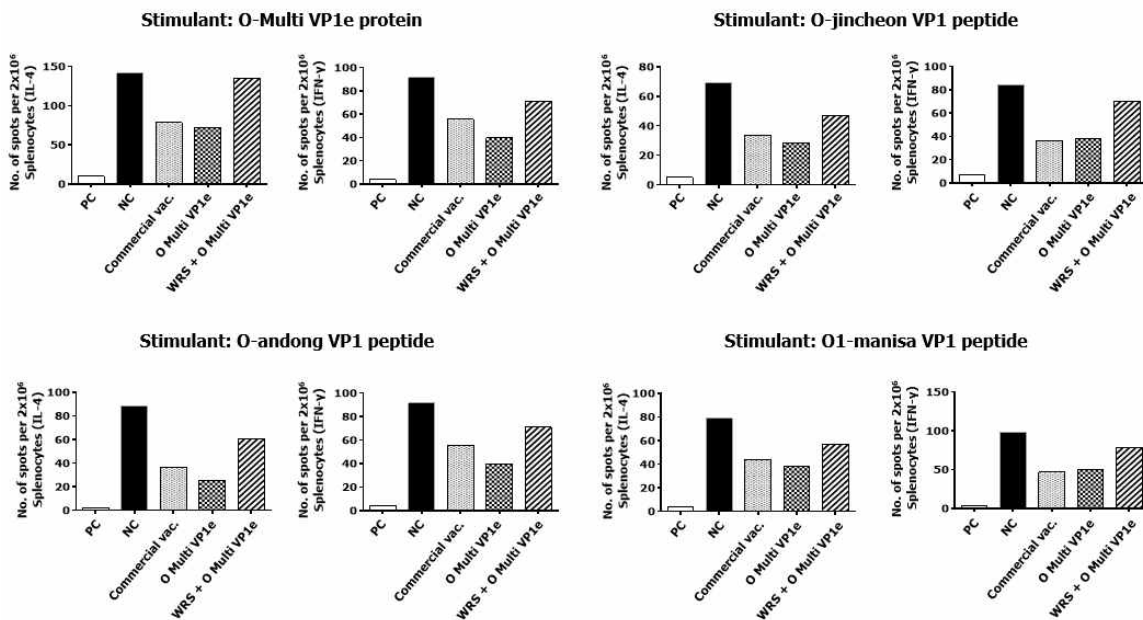


그림 64. 정제된 hWRS에 의한 특이 T 세포 면역반응 증강 효능 검증

◎ 다음으로 본 실험에서 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV O Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 혈청형을 이용하여 수행하였음. PrioCHECK® FMDV Type Antibody ELISA 분석 결과 O serotype용 Multi-VP1e 항원단백질에 정제된 hWRS를 첨가할 경우 보다 높은 수준의 항체가 형성됨을 확인함.

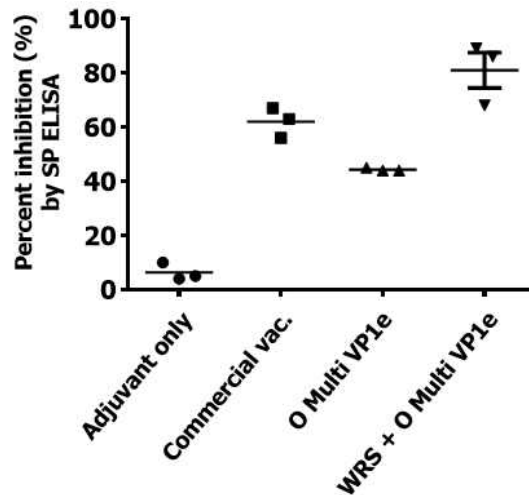


그림 65. O type SP ELISA에 의한 마우스 면역원성 검증

◎ 마지막으로, 그림과 같이 O Jincheon FMDV challenge model을 이용하여 O serotype용 Multi-VP1e 항원단백질의 구제역바이러스 방어 효능을 검사한 결과 백신그룹 모두 100% 방어 효능을 보여주어 hWRS를 첨가한 경우와는 그 효능을 구별할 수 없었음.

◎ 그러나 앞서 보인바와 같이 hWRS의 첨가는 Multi-VP1e 항원단백질의 면역원성을 증가시킬 수 있음.

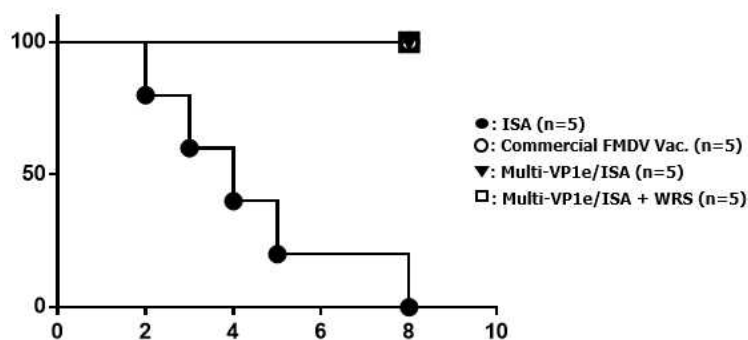


그림 66. O Jincheon challenge model을 이용한 hWRS의 방어효능 증가 검증

◎ 다음은 그림과 같이 hWRS의 첨가에 의해서 면역원성이 오랫동안 지속 가능한지를 검증하기 위한 실험을 수행하였음.

5주령의 female C57BL/6N crljori 마우스에 O serotype용 Multi-VP1e 항원단백질과 hWRS를 각각 용량별(10ug, 20ug, 30ug)로 근육으로 2회 접종을 수행하였음. 그리고 3개월

혹은 6개월 뒤에 혈청을 분리하여 그룹별 항체가를 측정하여 항체의 지속적 유도를 확인하였
 음.

Group	Inoculum (100ul)		No. of mice	Route	Experiments	Mouse type (C57BL/6N)
	O type mVP1e	WRS				
1	PBS	PBS	4	Intramuscular	1 st serum ELISA 2 nd serum ELISA Long-lasting (3,6months)	Female (6weeks)
2	OVM 10ug	WRS 0ug	4	Intramuscular		
3	OVM 10ug	WRS 10ug	4	Intramuscular		
4	OVM 10ug	WRS 20ug	4	Intramuscular		
5	OVM 10ug	WRS 30ug	4	Intramuscular		
6	OVM 30ug	WRS 0ug	4	Intramuscular	1 st serum ELISA 2 nd serum ELISA 3 rd serum ELISA Long-lasting (3,6months)	
7	OVM 30ug	WRS 10ug	4	Intramuscular		
8	OVM 30ug	WRS 20ug	4	Intramuscular		
9	OVM 30ug	WRS 30ug	4	Intramuscular		
Dose selection		Total	36			

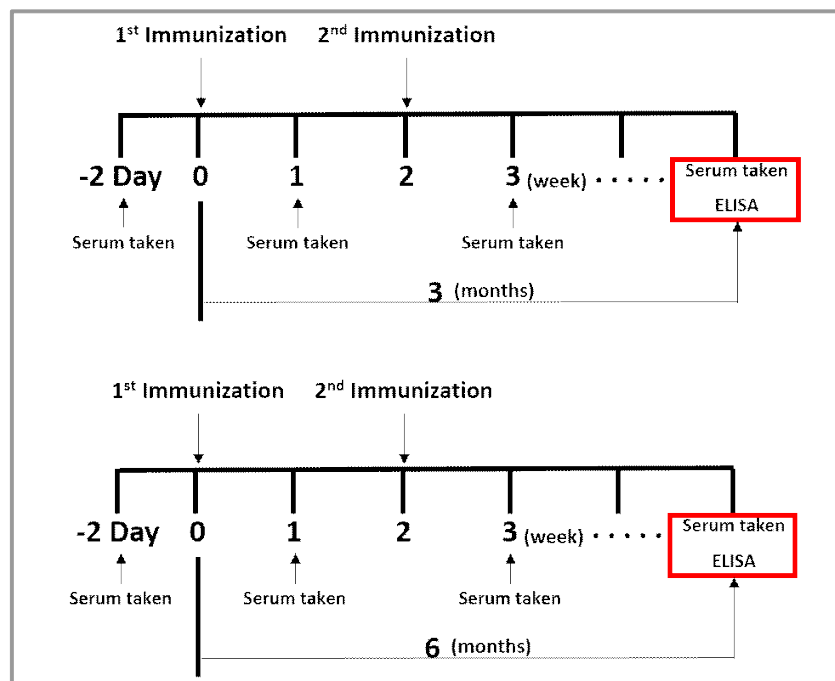


그림 67. hWRS의 장기 지속성 면역원성에 대한 검증 실험 스케줄

◎ 그 결과, 그림과 같이 hWRS 용량이 증가함에 따라 Multi-VP1e 정제 단백질에 대한 항체가
 가 증가할 뿐만 아니라 오래 지속되었음.

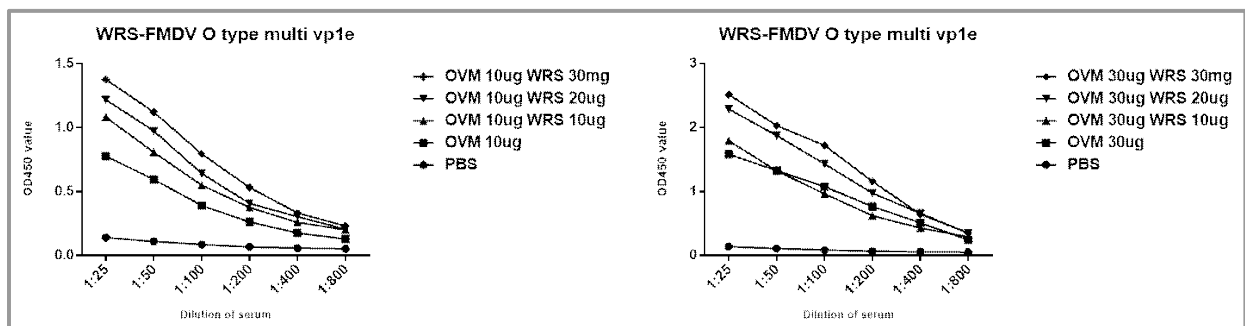


그림 68. 접종 3개월째 혈청에 대한 항체가 측정

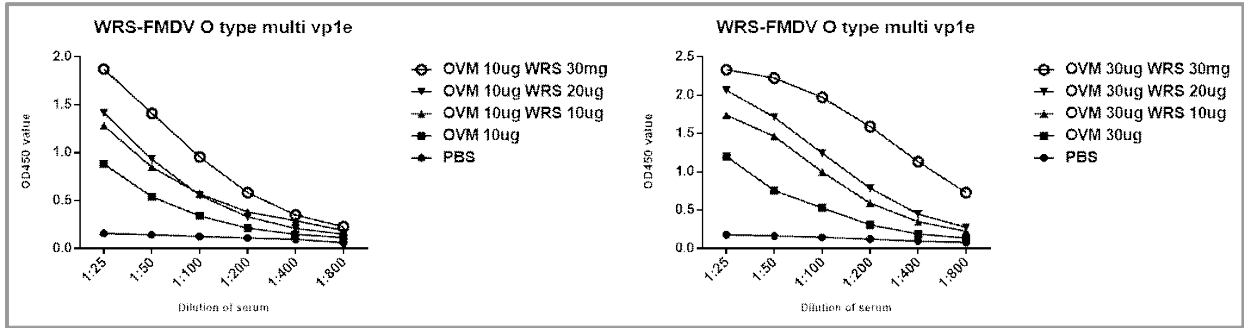
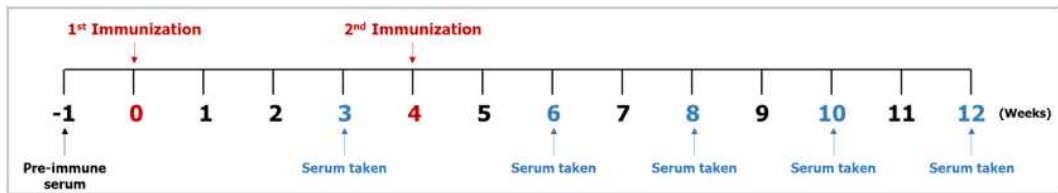


그림 69. 접종 6개월째 혈청에 대한 항체가 측정

◎ 결론적으로, 정제된 hWRS가 세포성 면역 및 체액성 면역 모두 증가시키고, 항원단백질에 대한 면역원성을 오래 지속시킴으로써, Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질의 면역원성을 증강시켜주는 면역증강제로서의 효능을 검증하였음.

2) 정제된 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/manisa-A/Poch-Asia/Sha) 단백질과 hWRS 혼합제제의 목적동물(돼지) 면역원성 연구 (코미팜, 검역원과 공동연구)

◎ 정제된 3가 serotype Multi-Vp1 epitope 항원에 대한 면역원성과 hWRS (면역증강제) 혼합제제의 면역원성 확인을 목적동물인 미니피그에서 확인하기 위해 다음의 schedule로 실험을 수행하였음. 각각의 준비된 시료를 그림 70과 같은 스케줄로 미니피그에 접종 (2회)하여 표시된 주령별로 혈청을 채취하였음. Negative control로 Adjuvant 만 접종하였고, positive control로 상용화백신을 접종하였음.



Group	시험백신의 조성		개체 수 (SPF 미니피그)
	재조합 항원양	면역증강제	
1		ISA201	2 heads
2	상용화백신		3 heads
3	O-A-Asia (O manisa-A pocheon-Asia shamir) 400ug	ISA201	4 heads
4	O-A-Asia (O manisa-A pocheon-Asia shamir) 400ug + WRS 200ug	ISA201	4 heads

그림 70. 미니피그에서의 3 serotype Multi-VP1e 항원 접종 스케줄

◎ 실험수행 결과로 우선 각 그룹의 미니피그로부터 기간별로 혈청을 준비하고 혈청중 10주와

12주의 혈청에서 각 항체가 (IgG)를 ELISA를 통해서 측정하였음. 그 결과, 그림에서 보는 바와 같이, 각각의 코팅 항원에 대해 높은 항체가를 유지하고 있음을 확인하였음.

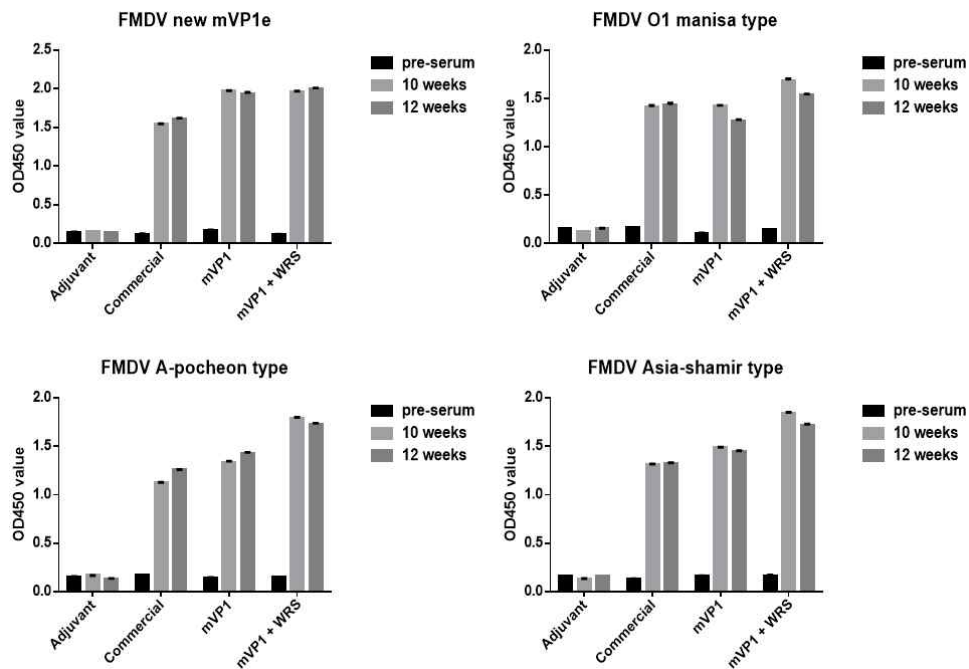


그림 71. 미니피그 혈청에서의 각 serotype에 대한 항체가 (IgG) 측정

◎ 결과적으로 hWRS를 포함하여 접종한 그룹의 항체가가 좀 더 높은 값을 유지하고 있었음.

◎ 다음으로 본 실험에서 각 주령별로 얻은 혈청을 이용하여 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 O type과 A type 혈청형을 이용하여 수행하였음.

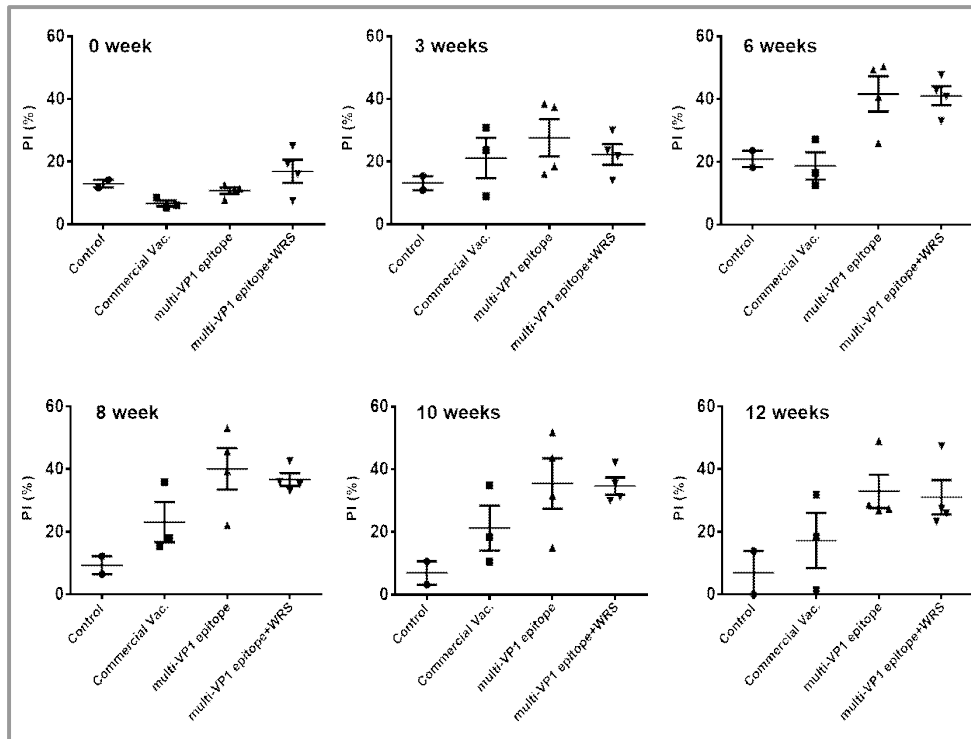


그림 72. 미니피그 혈청에서의 FMDV O type SP ELISA

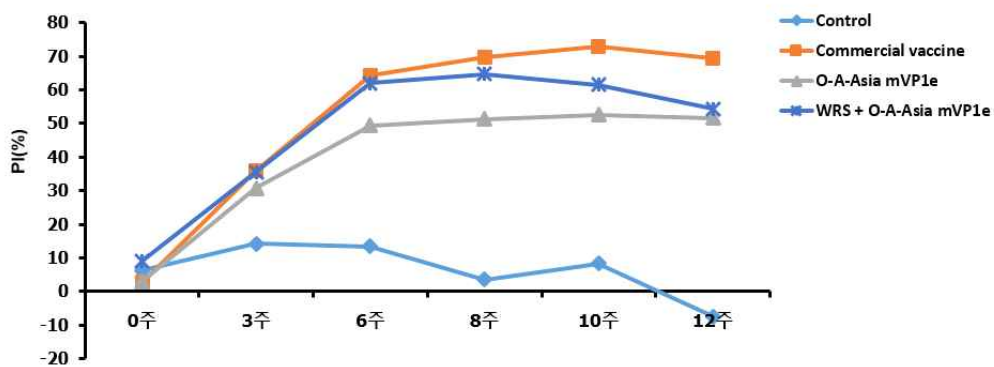
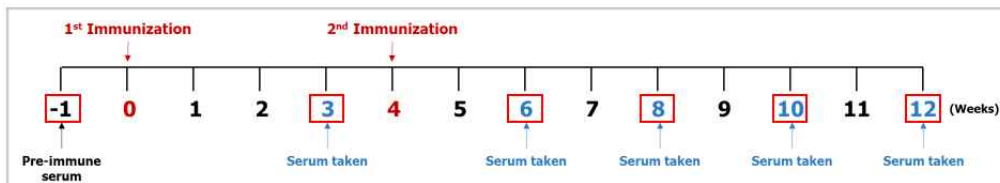


그림 73. 미니피그 혈청에서의 FMDV O type SP ELISA

© PrioCHECK® FMDV O Type SP ELISA 분석 결과 Multi-VP1e항원 단백질에 hWRS를 첨가할 경우 Multi-VP1e항원 단백질 단독으로 접종한 그룹에 비해 처음 6, 8, 10주에는 더 높은 수준의 SP항체가 형성됨을 확인함.

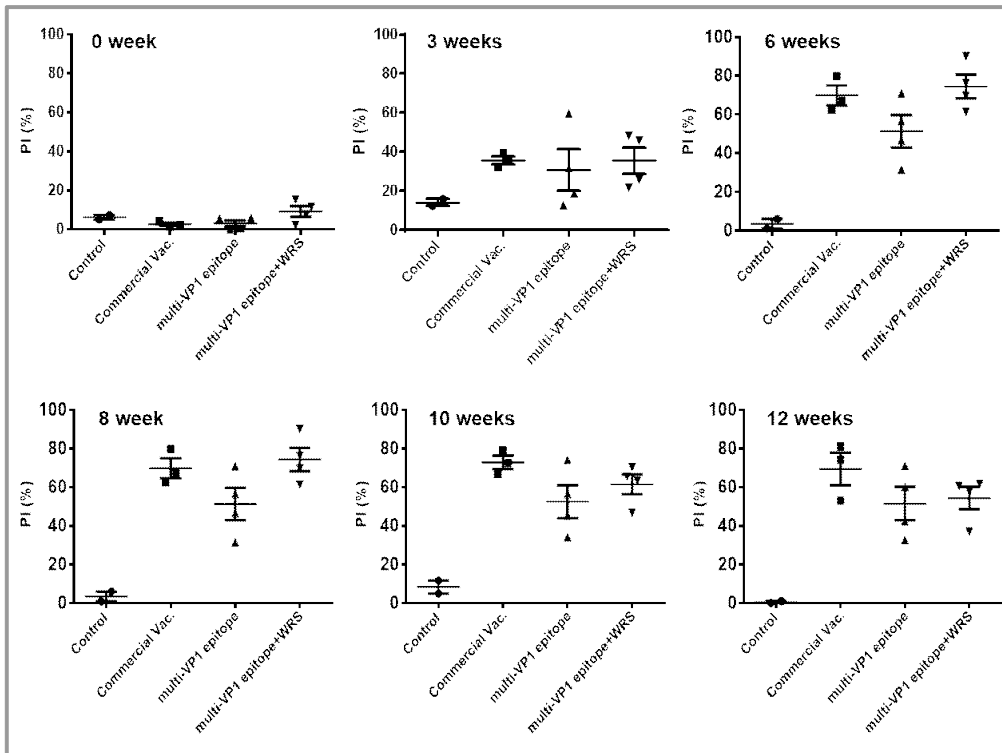


그림 74. 미니피그 혈청에서의 FMDV A type SP ELISA

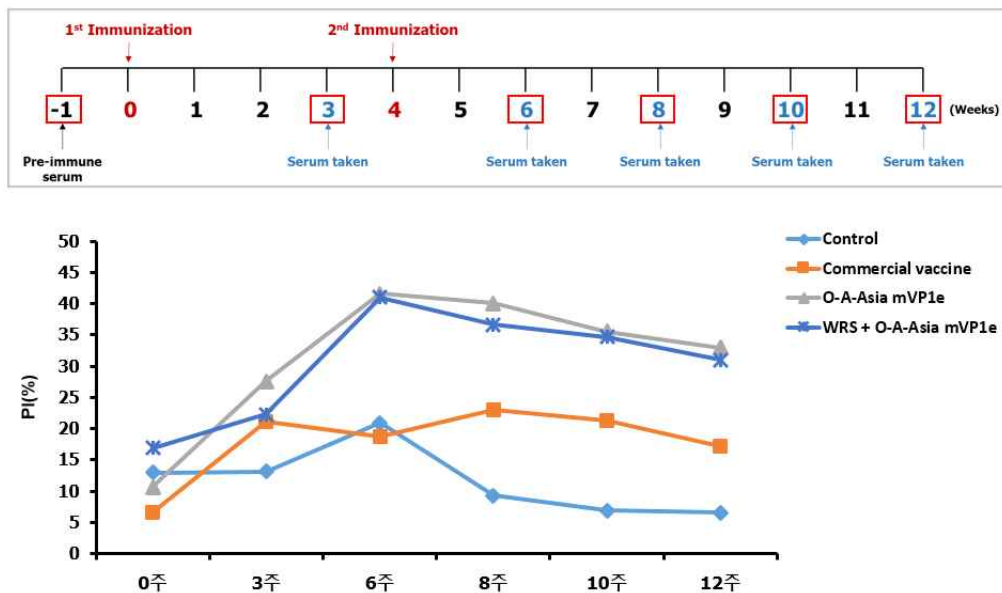


그림 75. 미니피그 혈청에서의 FMDV A type SP ELISA

◎ PrioCHECK® FMDV A Type SP ELISA 분석 결과의 경우 O Type SP ELISA 값보다는 낮은 값을 나타냈으며, Multi-VP1e항원 단백질에 hWRS를 첨가할 경우와 Multi-VP1e항원 단백질 단독으로 접종한 그룹의 SP항체가 비슷하게 형성됨을 확인함.

◎ 다음으로 그림과 같이, 각 주령별로 얻은 혈청을 이용하여 FMDV O1 manisa 바이러스에 대한 virus Neutralizing test를 수행하였음.

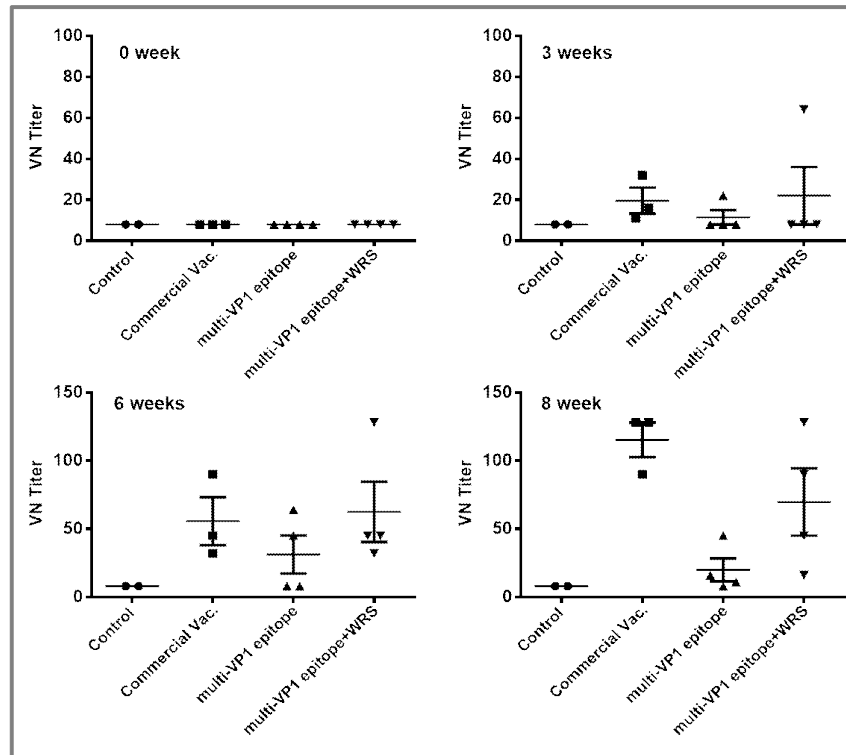


그림 76. 미니피그 혈청에서의 VNT 측정 결과

◎ 그 결과 Multi-VP1e을 단독으로 접종한 그룹보다 hWRS를 혼합하여 접종한 그룹에서 중화항체가 더 높게 나타났음을 확인할 수 있었음.

◎ 결론적으로 마우스와 미니피그에서 모두 Multi-VP1e 항원단백질과 hWRS를 혼합하여 접종한 경우, Multi-VP1e 항원단백질 단독으로 접종한 경우보다 더 높은 면역원성을 보여주었음. 따라서 hWRS는 면역증강제로서 Multi-VP1e 항원단백질과 같이 사용할 경우 효과적으로 구제역을 예방할 수 있을 것이라 사료됨.

(7) Crude O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질의 발현/정제 및 면역원성 검증연구

◎ 앞선 모든 실험들은 대장균에서 구제역의 Multi-VP1 epitope 항원단백질을 발현시키고 단백질 정제과정을 통해 얻은 정제단백질을 이용하여 그 효능을 검증하였음.

◎ 그러나 정제된 Multi-VP1 epitope 항원단백질의 경우 정제과정의 복잡함에 의한 경제적인 문제를 갖고 있어 산업화에 시간이 필요한 장애를 갖고 있음.

◎ 따라서, 정제 항원단백질이 아닌 산업화에 최적화된 항원단백질을 개발하기 위해 다음의 실험들을 진행하였음.

◎ 본 과제에서 이용한 대장균 항원발현시스템은 가용성 항원단백질을 발현하는 시스템임. 따라

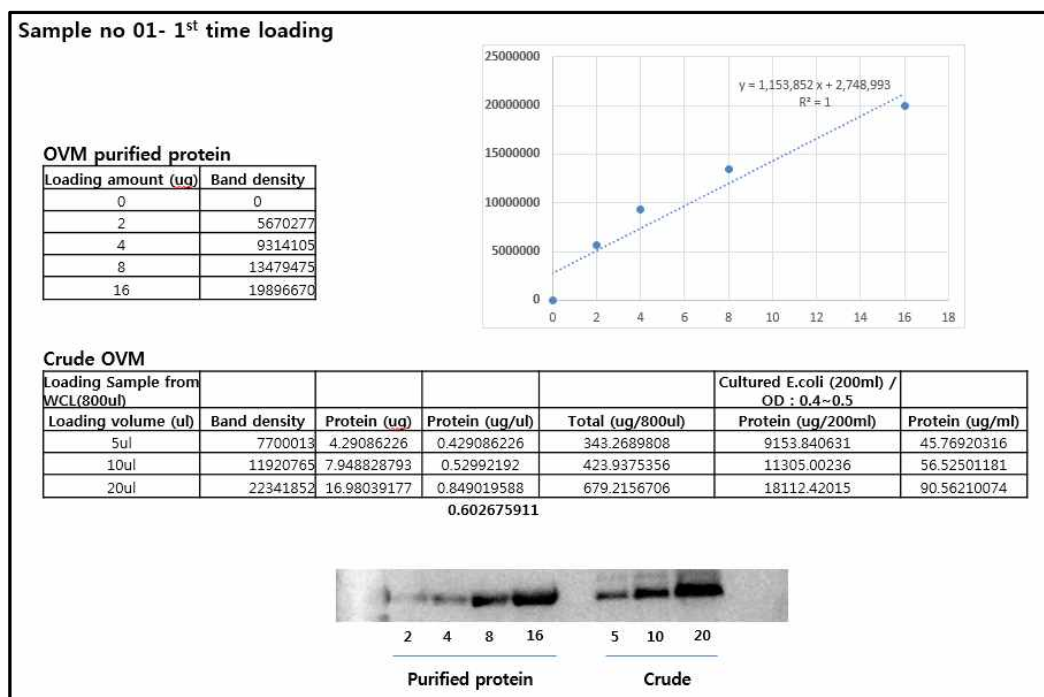
서 모든 구제역의 Multi-VP1 epitope 항원단백질들은 대장균의 세포질에서 가용성으로 발현이 됨. 이 특성을 이용하여 정제를 하지 않고 가용성의 Multi-VP1 epitope 항원단백질을 포함하는 대장균 세포질 성분들을 이용하여 Multi-VP1 epitope 항원단백질의 면역원성을 검증하였음.

1) Crude O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질의 발현/정량 및 실험동물(마우스)에서의 면역원성 검증 연구

◎ 면역원성의 실험에 앞서, 대장균의 세포질내 가용성의 Multi-VP1 epitope 항원단백질 양을 측정하였음.

◎ 우선, 대장균에서 가용성의 Multi-VP1 epitope 항원단백질을 발현시킨 후 대장균의 lysis 과정을 거쳐 soluble fraction내 단백질들 중 가용성의 Multi-VP1 epitope 항원단백질 양을 측정하였음. 먼저 정제된 항원단백질을 2-fold dilution한 뒤 SDS-PAGE와 western blot을 통해 band intensity 값을 구하고 standard curve를 나타내었음. 그 후 soluble fraction을 용량별로 loading 한 뒤 western blot을 통해 band intensity를 구하고 standard curve에 대입하여 농도를 구하였음.

◎ 결과적으로 soluble fraction 단백질 1ul에 약 0.5-0.6ug의 O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man) 항원단백질이 포함되어 있음을 확인하였음.



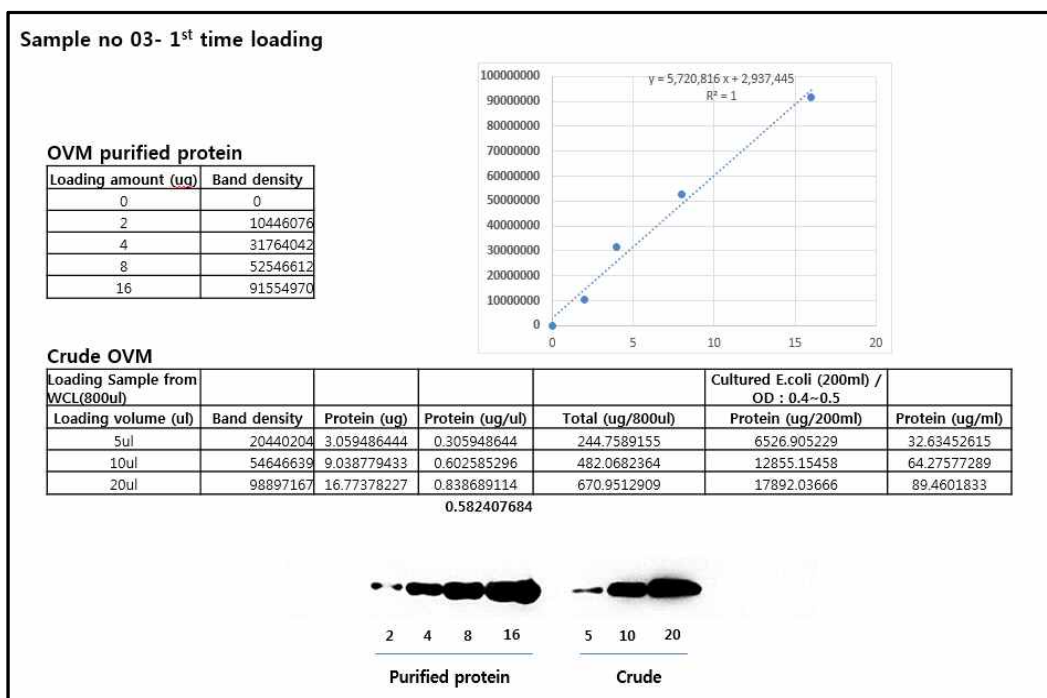
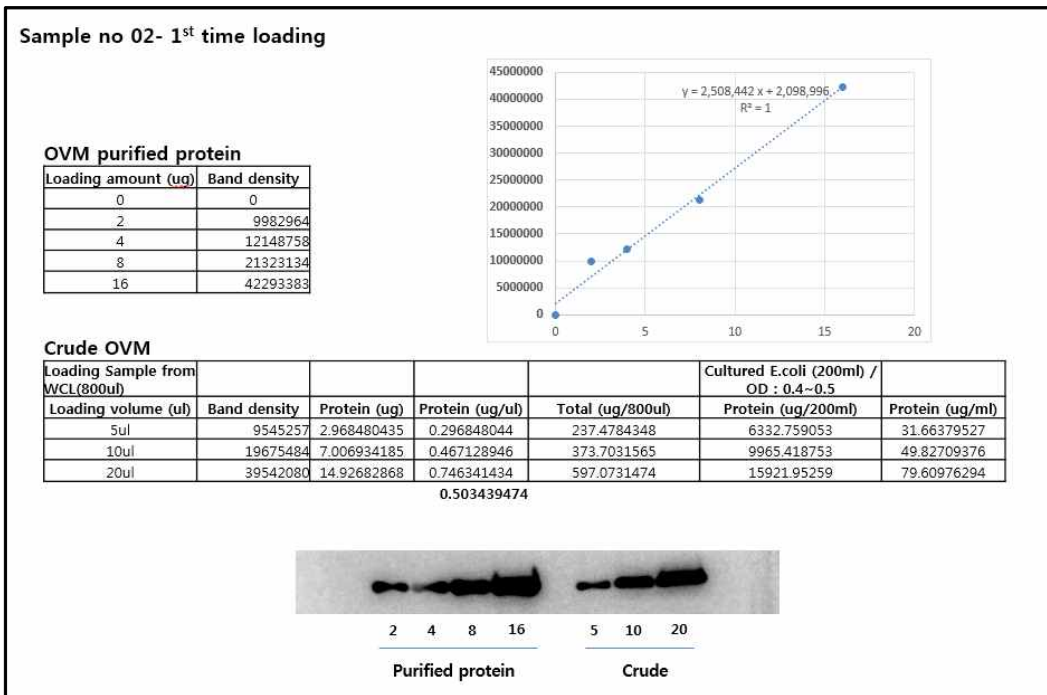
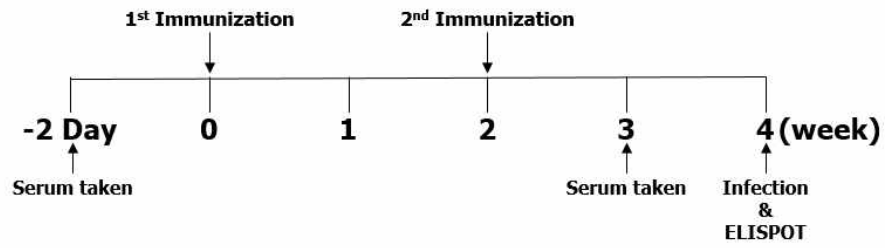


그림 77. soluble fraction 단백질에 포함된 multi-VP1e 단백질의 양 측정

◎ 대장균의 soluble fraction 단백질내 가용성의 Multi-VP1 epitope 항원단백질의 양을 상기의 방법으로 측정하여 준비한 후, 마우스에서의 면역원성 실험을 아래와 같이 수행하였음.



-Mouse type: 5weeks old Female C57BL/6N crl/jori mice
 -Inoculum: OVM (O jincheon-O andong-O mainisa)
 -Route of administration: Intramuscular
 -Days of inoculation: 0, 14 dpi
 -Challenge : 28 dpi

Target protein (OVM) : 0.7ug/ul

	ISA201	Antigen	Total amount	Inoculation time	ELISA & ELISPOT	Challenge
Adjuvant only	50ul	-	100ul	2	5 heads	5 heads
Commercial vac.	-		100ul	2	5 heads	5 heads
Multi VP1e -OVM	50ul	40ug	100ul	2	5 heads	5 heads
Crude OVM (40ug)	50ul	40ug	100ul	2	5 heads	5 heads
Crude OVM (50ug)	50ul	50ug	100ul	2	5 heads	5 heads

그림 78. O type multi-VP1e를 포함한 crude 단백질 접종 스케줄

- ◎ 위의 그림과 같이 5주령 C57BL/6N에 Crude 단백질을 그룹별로 각각 40ug, 50ug을 2회 접종하였음. negative control은 adjuvant만 접종하였고, positive control로 상용화 백신과 정제된 multi-VP1e 단백질을 접종하였음.
- ◎ 우선 3주째 마우스로부터 분리한 혈청으로부터 각 O serotype에 대한 IgG 항체가를 측정하였음.

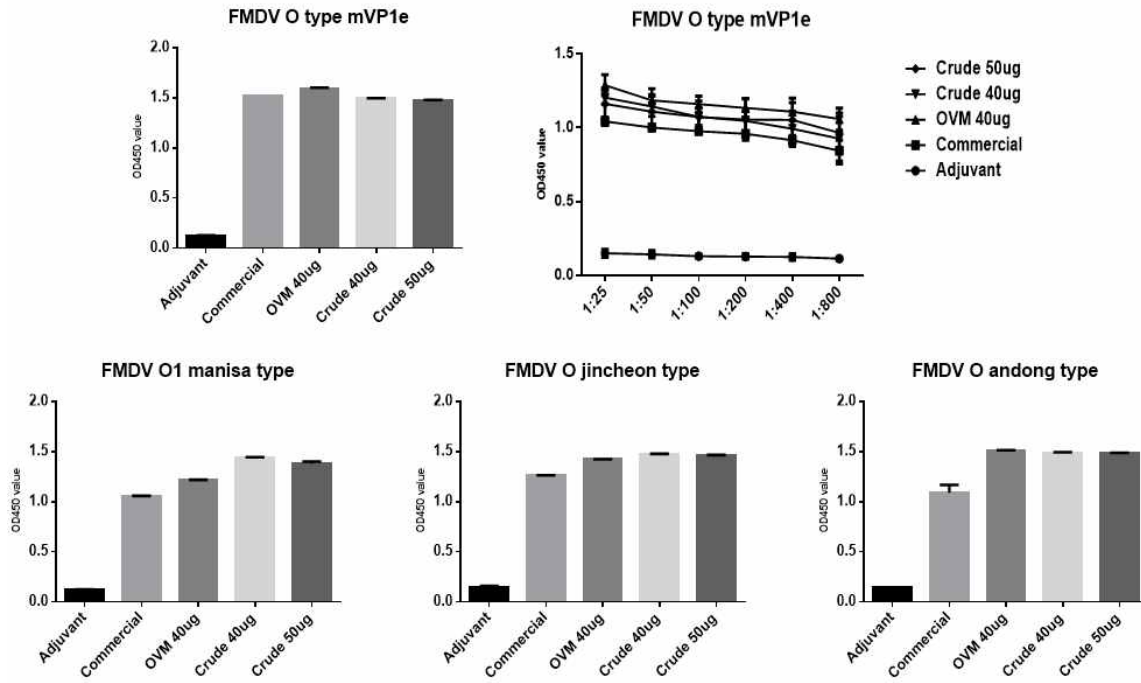
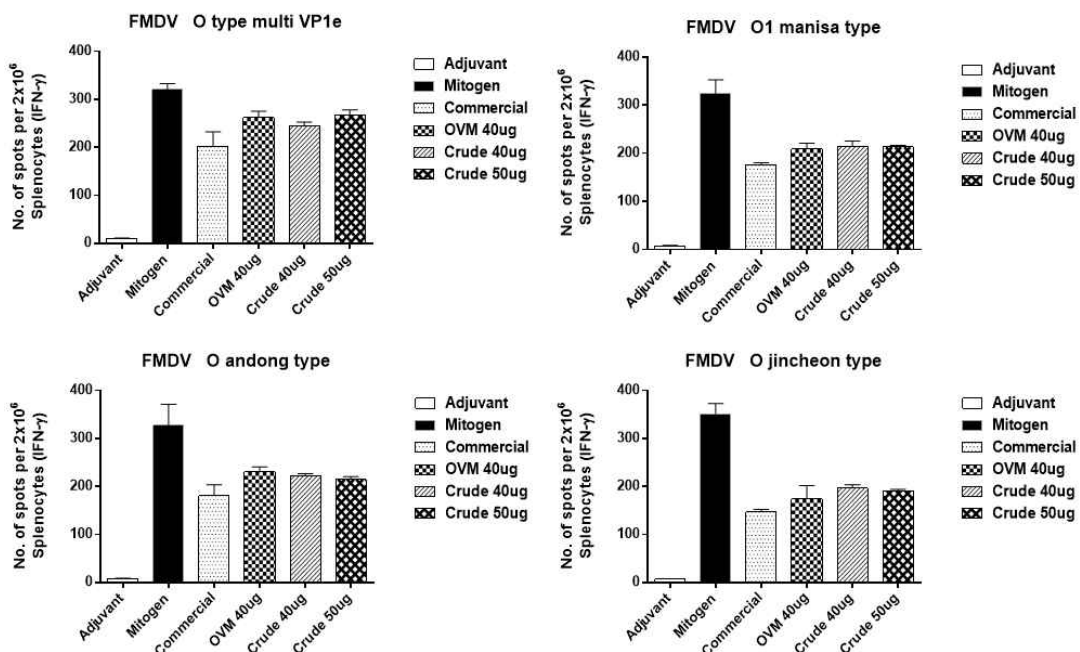


그림 79. O serotype들에 대한 IgG 항체가 측정

◎ 그 결과 정제된 Multi-VP1 epitope에 의해 유도되는 항체와 비슷하게 crude 단백질을 접종한 그룹에서도 높은 항체가의 형성을 확인할 수 있었음.

◎ 또한, crude Multi-VP1e 항원단백질에 의해 CTL 반응이 유도되는지를 확인하기 위해 각 그룹의 마우스 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 CTL 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.



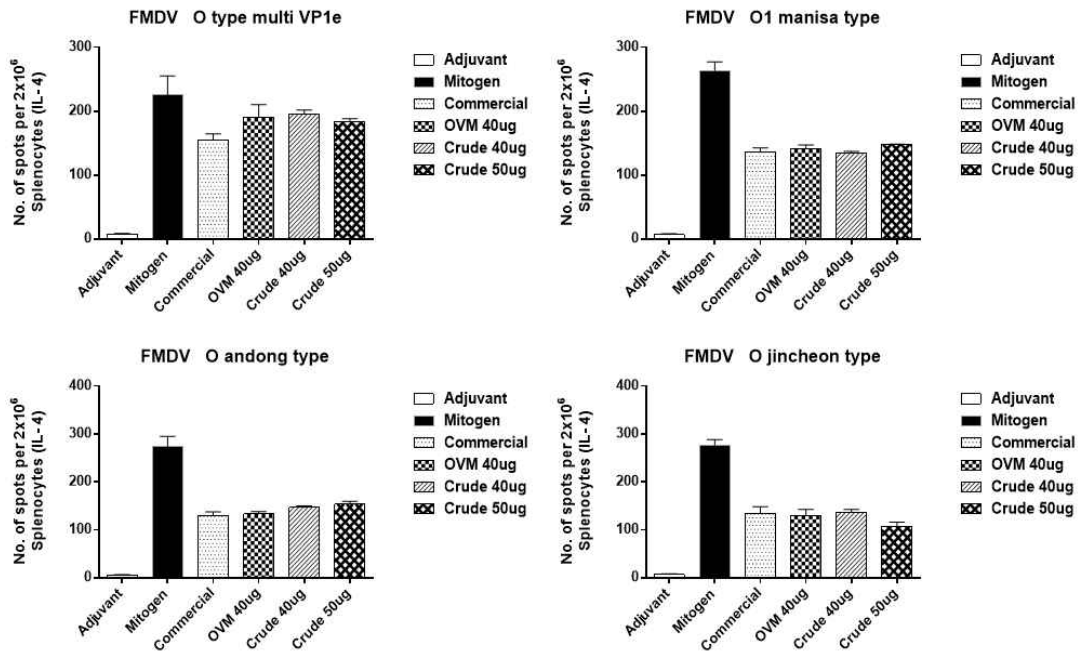


그림 80. CTL 면역 반응 유도 시험 (ELISPOT)

- ◎ 그 결과 그림에서 보는 바와 같이, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN- γ 와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성이 확인되었음을 확인하였음.
- ◎ 이러한 실험결과를 통해 정제된 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa; OVM) 항원단백질과 마찬가지로 crude 단백질에 의해서도 T 면역세포의 활성화가 일어남을 확인하였음.
- ◎ 결론적으로 Multi-VP1e 항원단백질을 포함한 대장균의 세포질 단백질 역시 체액성면역과 세포성면역을 효과적으로 유도할 수 있음.
- ◎ 다음으로 crude 단백질의 방어효능을 평가하기 위하여 접종 4주째 FMDV O Jincheon challenge (100LD₅₀) model을 이용하여 마우스의 생존율과 체중 변화를 측정하였음.

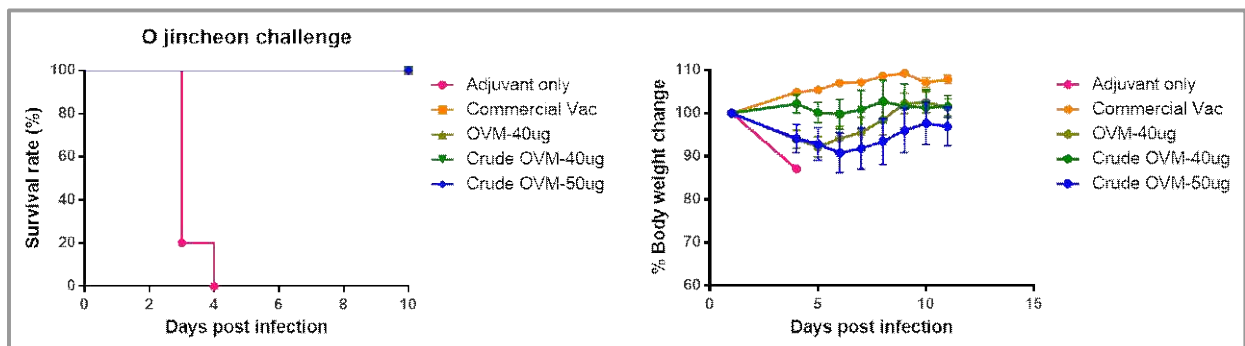


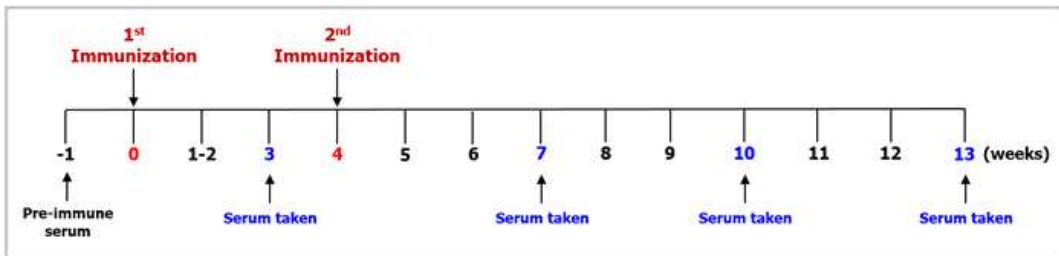
그림 81. FMDV O Jincheon challenge (100LD₅₀) model을 이용한 생존율 및 체중변화 측정

◎ 상기의 그림과 같이 FMDV Jincheon 바이러스에 의해 adjuvant만 접종한 음성 대조군에서는 4일만에 모두 폐사하였으나, 상용화백신과 더불어 정제된 항원단백질 및 crude 단백질 접종 그룹 모두 100% 방어효능을 나타내었음.

◎ 결론적으로 O type multi-VP1e 항원단백질을 포함한 대장균의 crude 단백질 역시 정제된 항원과 같은 면역원성으로 구제역 바이러스를 방어할 수 있을 것이라 사료됨.

2) Crude O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질의 목적동물 (돼지)에서의 면역원성 연구 (코미팜, 검역원과 공동연구)

◎ Crude 단백질 (O serotype Multi-Vp1 epitope) 항원에 대한 면역원성을 마우스에서 검증하였고, 이후 목적동물(돼지)에서 효능을 확인하기 위해 그림 82와 같은 스케줄로 일반돼지에 접종 (2회)하여 표시된 주령별로 혈청을 채취하였다. Negative control로 Adjuvant 만 접종하였고, positive control로 상용화백신을 접종하였음.



Group		시험백신의 조성 (2ml/회)		개체 수 (일반돼지) 8-10주령
		재조합 항원양	면역증강제	
1	Control	-	ISA201	3 heads
2	P.C	상용화백신	ISA201	3 heads
3	pOVM	pOVM (400ug)	ISA201 (1ml)	3 heads
4	C-OVM	C-OVM (400ug)	ISA201 (1ml)	3 heads

그림 82. 돼지에서의 3가 Serotype Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa)의 crude 단백질 접종 실험 스케줄

◎ 먼저 스케줄과 같이 각각의 주령에서 분리한 혈청으로부터 각 O serotype에 대한 IgG 항체가를 측정하였음 (그림 83). 그 결과 Crude 단백질을 접종한 그룹에서도 정제된 항원단백질과 높거나 비슷한 수준으로 항체가를 형성하는 것을 확인할 수 있었음.

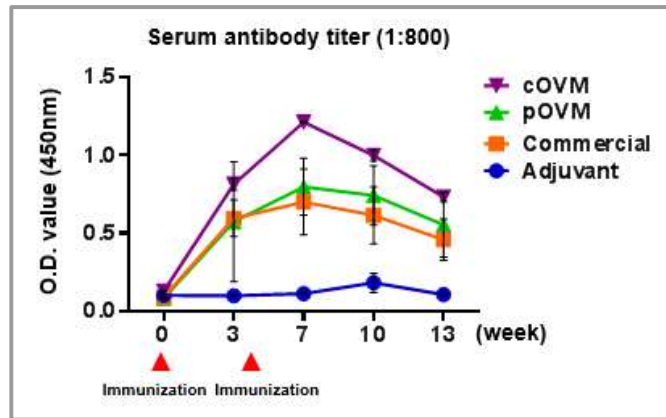


그림 83. 혈청으로부터 각 O serotype에 대한 IgG 항체가 측정 결과

◎ 본 실험에서 각 주령별로 얻은 혈청을 이용하여 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 O type (그림 84) 혈청형을 이용하여 수행하였음. PrioCHECK® FMDV Type Antibody ELISA 분석 결과 crude 항원 단백질도 정제된 항원 단백질과 비슷한 수준의 항체가 형성됨을 확인함.

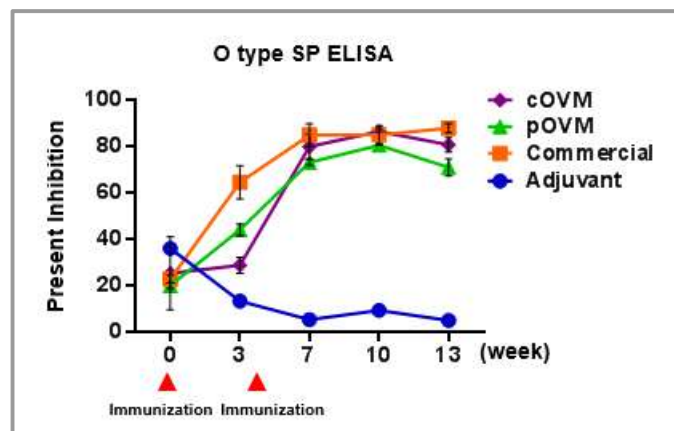


그림 84. 돼지 혈청에서의 FMDV O type SP ELISA

◎ 다음으로 그림 85과 같이, 각 주령별로 얻은 혈청을 이용하여 Viral Neutralizing test를 수행하였다. 그 결과 정제된 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa)를 접종한 그룹과 마찬가지로 crude 항원 단백질을 접종한 그룹에서도 비슷한 수준으로 중화항체가 높게 나타났다.

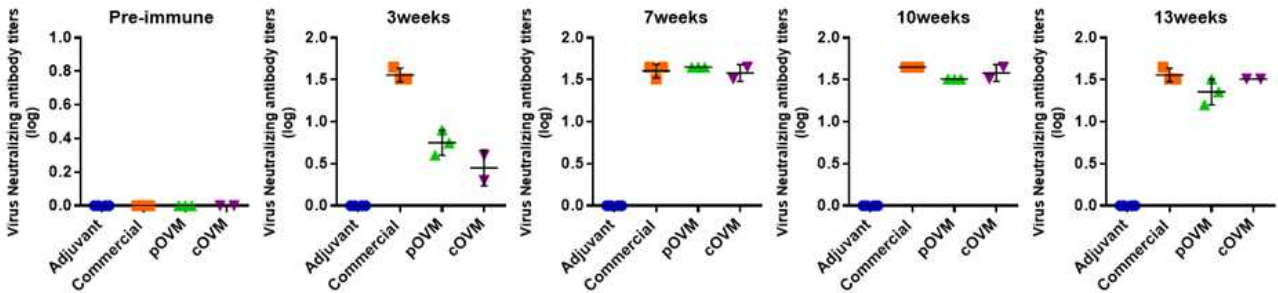
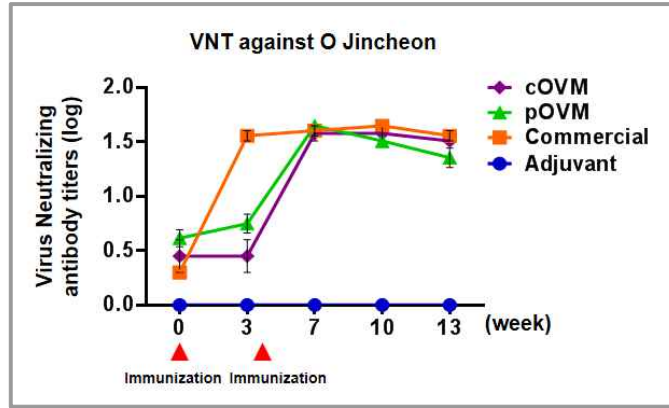


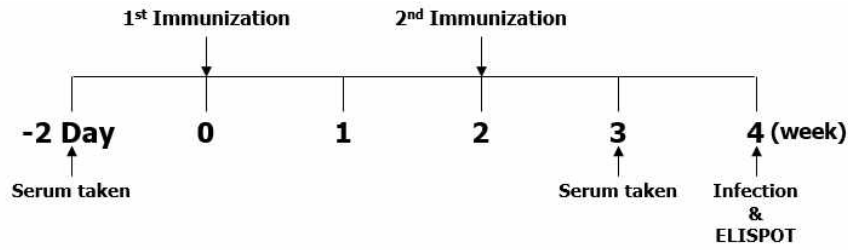
그림 85. 돼지 혈청에서의 FMDV VNT 시험 결과

◎ 결론적으로 O type multi-VP1e 항원단백질을 포함한 crude 단백질 역시 백신으로서 구제역 예방에 효과적일 것으로 예상됨.

(8) Crude O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man; OVM) 단백질과 crude hWRS 단백질 혼합제제의 면역원성 검증 및 구제역바이러스 방어능 연구

◎ 대장균의 soluble fraction 단백질 즉, 가용성의 crude O serotype용 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질의 면역원성을 높이기 위해, 앞서 효능을 확인한 crude O serotype용 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질과 같은 방법으로 얻은 crude hWRS를 혼합하여 마우스에 접종함으로써 그 면역원성을 증강시킬 수 있는지 확인해보고자 실험을 수행하였음.

◎ 아래와 같은 실험방법으로, 음성 대조군으로 Adjuvant만 접종하였고, 양성대조군으로 상용화 백신 또는 정제된 O type 항원단백질 및 정제된 hWRS와의 혼합제제를 접종하였음. 본 실험에서는 multi-VP1e를 대장균에 발현시켜 얻은 crude 단백질에 포함된 항원단백질의 양은 0.85ug/ul, hWRS를 발현시켜 얻은 crude 단백질에 포함된 항원의 양은 0.5ug/ul로 확인되었다. 모든 그룹은 2주 간격으로 총 2회 접종되었음.



	Total protein concentration	Target protein concentration
Crude OVM	36.40ug/ul	0.85ug/ul
Crude pWRS	22.40ug/ul	0.50ug/ul

-Mouse type: 5weeks old Female C57BL/6N crl jori mice
 -Inoculum: OVM (O jincheon-O andong-O mainisa)
 -Route of administration: Intramuscular
 -Days of inoculation: 0, 14 dpi
 -Challenge : 28 dpi

	ISA201	Porcine WRS	Antigen	Inoculation time	ELISA & ELISPOT	Challenge
Adjuvant only	50ul	-	-	2	5 heads	5 heads
Commercial vac.	-	-	-	2	5 heads	5 heads
OVM	50ul	-	40ug (40ul)	2	5 heads	5 heads
pWRS + OVM	100ul	40ug (40ul)	40ug (40ul)	2	5 heads	5 heads
Crude OVM	100ul	-	40ug (50ul)	2	5 heads	5 heads
Crude pWRS + Crude OVM	150ul	40ug (80ul)	40ug (50ul)	2	5 heads	5 heads

그림 86. Crude hWRS의 Adjuvant로서의 효능 평가를 위한 실험 스케줄

◎ 우선적으로, 스케줄과 같이 각각의 주령에서 분리한 혈청으로부터 각 O serotype에 대한 IgG 항체를 측정하였음 (그림 87). 그 결과 Crude 단백질을 접종한 그룹에서도 정제된 항원단백질과 높거나 비슷한 수준으로 항체를 형성하는 것을 확인할 수 있었음.

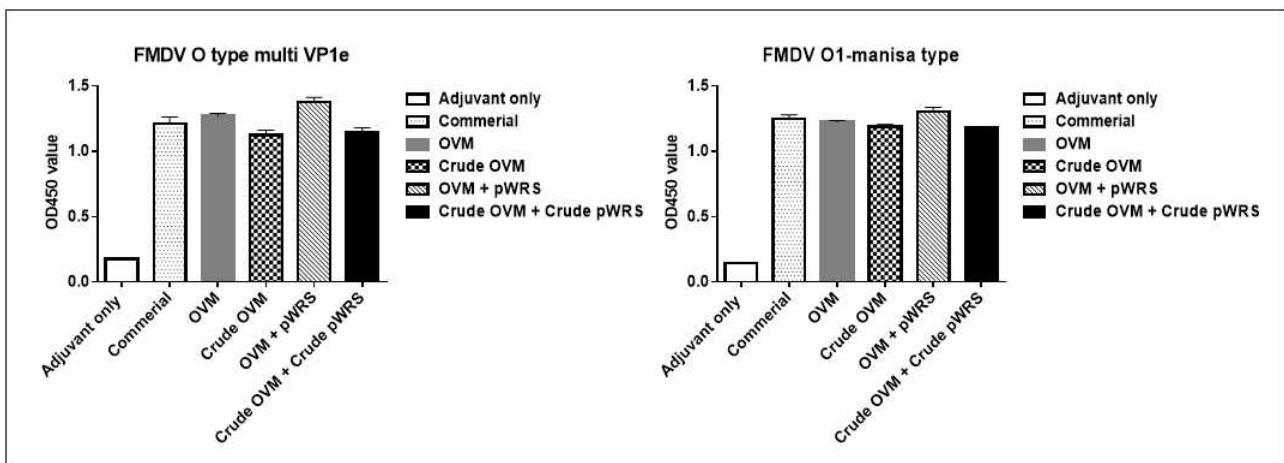


그림 87. 혈청으로부터의 O serotype에 대한 항체가 (IgG) 측정

◎ 또한, crude hWRS에 의해 T 세포 면역작용이 증강되는지 알아보기 위해 각 그룹의 마우스의 비장세포를 분리하고, 이에 Multi-VP1e 단백질 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 각각의 VP1 peptide로 자극하는 방법을 이용하여 T-면역세포 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시하였음.

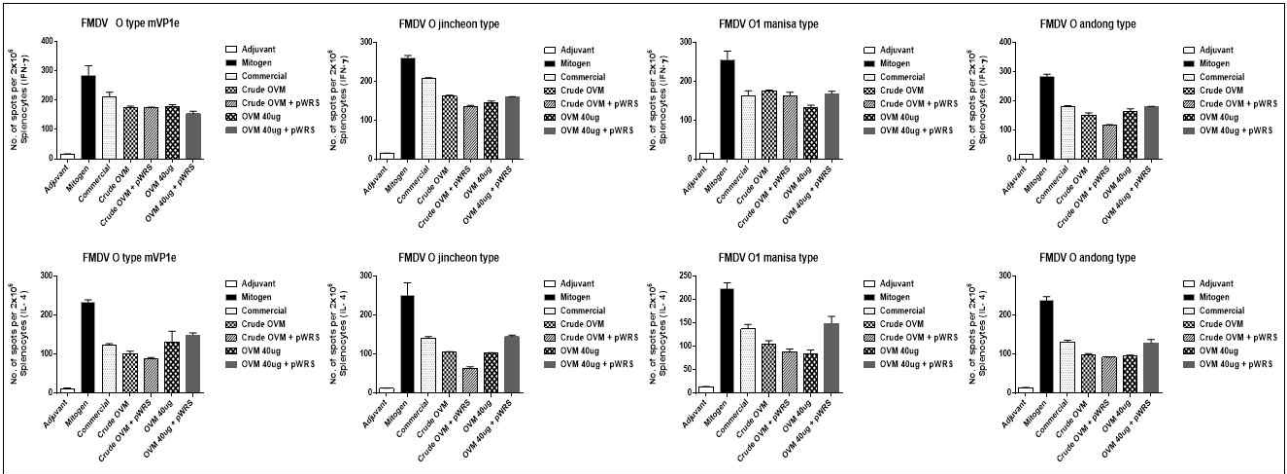


그림 88. Crude hWRS의 특이 T 세포 면역반응 증강 효능 검증 (ELISPOT)

◎ 그 결과, 양성 대조군인 Mitogen 자극제 (1ug/well)과 음성 대조군인 media only를 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였으며, 백신 그룹에서만 IFN-r와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성이 확인되었음을 확인하였음. 이 실험을 통해 crude multi-VP1e 항원단백질에 crude hWRS를 혼합하여 접종할 경우 T 면역세포의 활성화에 더욱 기여하였음을 확인하였음.

◎ 다음으로 본 실험에서 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 불활화된 FMDV를 코팅하여 수행하는 PrioCHECK® FMDV Type SP Antibody ELISA Kit (Life technology)를 O type 혈청형을 이용하여 수행하였음. PrioCHECK® FMDV Type Antibody ELISA 분석 결과 crude Multi-VP1e항원 단백질에 crude hWRS를 첨가할 경우 훨씬 더 높은 수준의 항체가 형성됨을 확인함. Crude OVM을 접종한 그룹은 정제된 OVM을 접종한 그룹보다 항체가 높았지만, crude hWRS를 혼합해서 접종한 그룹과는 비슷한 수준의 항체를 나타내었음.

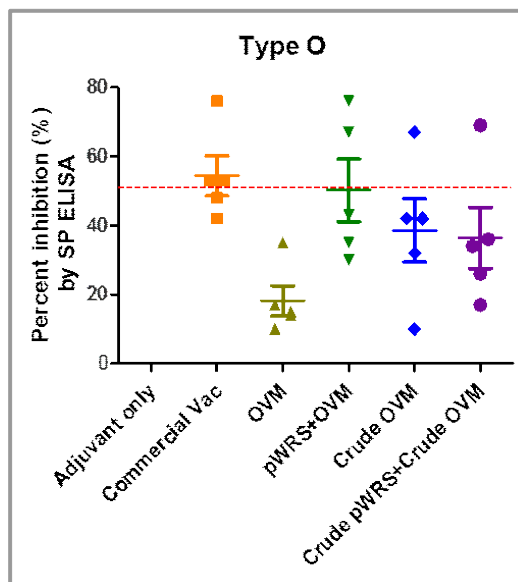


그림 89. O type SP ELISA에 의한 마우스의 면역원성 검증

◎ 최종적으로, hWRS의 방어효능을 평가하기 위하여 접종 4주째 FMDV O Jincheon challenge (100LD₅₀) model을 이용하여 마우스의 생존율과 체중 변화를 측정하였음.

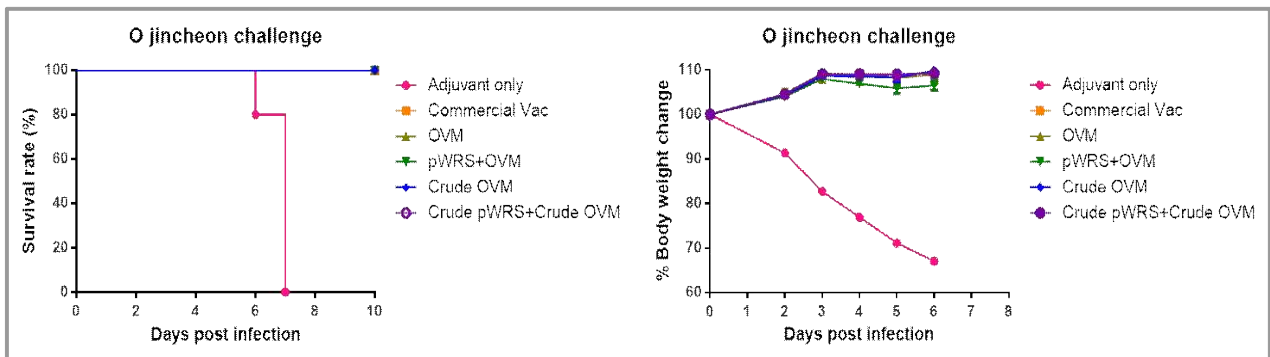


그림 90. FMDV O Jincheon challenge (100LD₅₀) model을 이용한 생존율 및 체중변화 측정

◎ 그 결과 Adjuvant만 접종한 음성 대조군에서는 7일만에 모두 폐사하였으며, 상용화백신과 더불어 정제된 항원단백질 및 crude 단백질 접종 그룹(w/ or w/o hWRS) 모두 100% 방어효능을 나타내었음. 양성대조군과 마찬가지로 체중감소는 발생하지 않았음.

◎ 결론적으로 crude 항원단백질과 crude hWRS의 혼합제제는 정제된 Multi-VP1e 항원단백질보다 구제역 예방에 더욱 효과적일 것으로 사료됨.

(9) Jincheon VP1 epitope 3개를 포함하는 O serotype용 2J-OVM (O/3Jin-O/An-O/Man) 단백질의 발현/정제 및 면역원성 검증 연구

1) O serotype용 Multi-VP1 epitope (2J-OVM) 항원 단백질의 발현 및 정제

◎ 상기의 O serotype용 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질의 면역원성을 높이기 위해 즉, O/Jincheon에 대한 면역원성을 증강시키기 위해 기존의 항원 유전자 부분에 O-Jincheon strain의 VP1 epitope 서열을 2회 반복하여 유전자서열을 합성하고, 기존의 O type Multi-VP1e 유전자를 갖는 발현벡터의 NcoI-EcoRI 제한효소를 이용하여 삽입하였음.

◎ 결과적으로 대장균에서 O-Jincheon VP1 서열이 3번 반복되는 O type 3J-Multi-VP1e를 발현하는 plasmid가 제작되었음.

◎ 구축된 O serotype용 3J-Multi-VP1e (O/3Jin-O/An-O/Man; 2J-OVM) 발현 벡터를 RG와 RIPL 대장균 균주에 transformation시키고, 30°C에서 1M IPTG로 발현을 유도하여 Coomassie Blue staining과 Western Blot을 통해 soluble form의 3J-Multi-VP1e 단백질 발현을 그림과 같이 확인하였음.

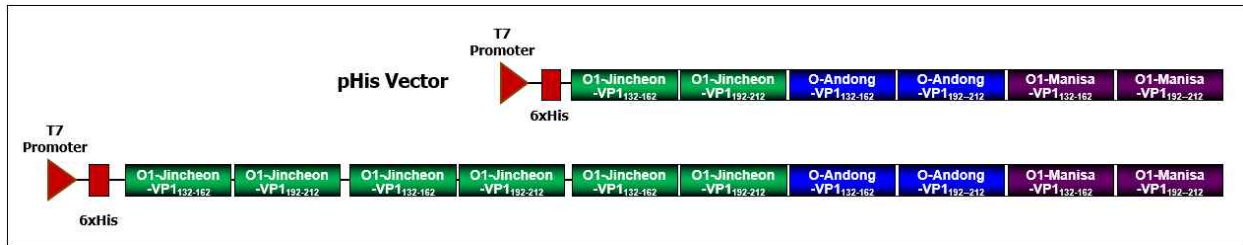


그림 91. O serotype용 3J-Multi-VP1 epitope (O/3Jin-O/An-O/Man) 발현 벡터 구축

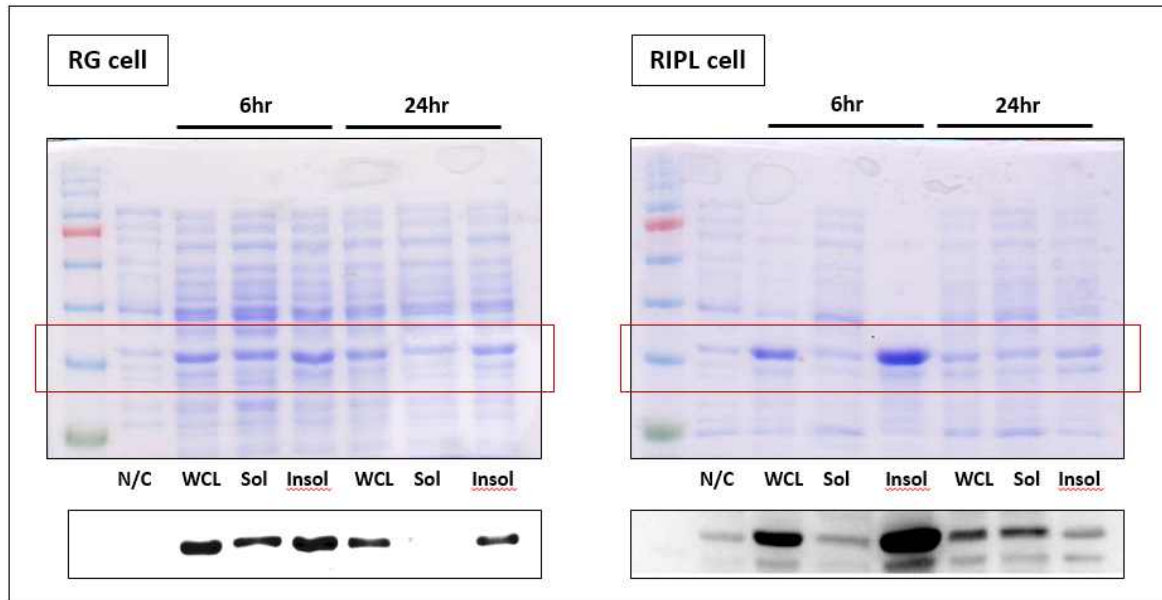


그림 92. O serotype용 3J-Multi-VP1 epitope (O/3Jin-O/An-O/Man) 가용성 발현 검증

◎ 구축된 2J-OVM 발현 plasmid를 본 연구실에서 선별한 대장균 균주에 transformation시킨 후 발현을 유도하여 soluble form의 2J-OVM 항원 단백질 발현을 확인하였고, 정제를 하여 5 liter 대장균 배양으로부터 soluble form의 2J-OVM 항원 단백질 40mg (1mg/ml)을 순수 정제할 수 있었음 (그림 93).

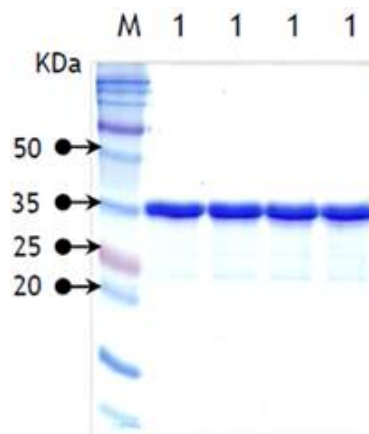
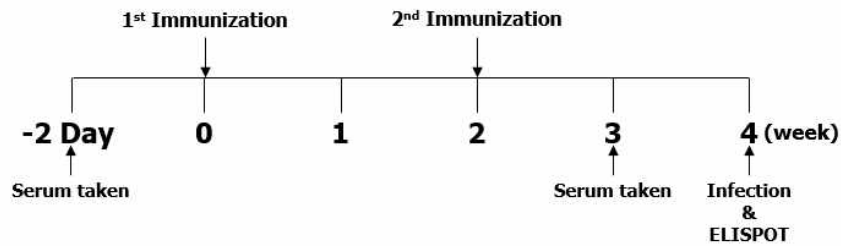


그림 93. O serotype용 2J-OVM 정제

2) O serotype용 Multi-VP1 epitope (2J-OVM) 항원 단백질의 면역원성 및 FMDV 방어능 검증

◎ 정제된 2J-OVM 항원 단백질의 마우스에서의 면역원성을 확인하기 위해서, 그림에서 보는 바와 같이 5주령의 female C57BL/6N crljori 마우스에 SEPPIC사의 ISA201 adjuvant를 2J-OVM 항원 단백질 (40ug)과 혼합한 group을 나누어 근육으로 2번 접종을 수행하였음.



-Mouse type: 5weeks old Female C57BL/6N crljori mice
 -Inoculum: OVM, 2J-OVM (O 3Jincheon-O Andong-O manisa)
 -Route of administration: Intramuscular
 -Days of inoculation: 0, 14 dpi
 -Challenge : 28 dpi

	ISA201	Antigen	Inoculation time	ELISA & ELISPOT	Challenge
Adjuvant only	50ul	-	2	5 heads	5 heads
Commercial vac.	-		2	4 heads	4 heads
Multi VP1e-OVM	50ul	30ug	2	4 heads	4 heads
Multi VP1e-OVM	50ul	40ug	2	4 heads	4 heads
2J-OVM	50ul	30ug	2	4 heads	4 heads
2J-OVM	50ul	40ug	2	4 heads	4 heads

그림 94. 정제 2J-OVM 항원 단백질의 마우스 면역원성 실험 스케줄

◎ 그 결과, 21일째에서 얻은 혈청을 이용하여 자체적으로 2J-OVM 항원 단백질 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 각각의 VP1 peptide로 개발한 ELISA를 수행한 결과, 정제 2J-OVM 항원 단백질에 대하여 높은 항체가의 유도를 확인할 수 있었고 (그림 95), 또한, 2J-OVM 항원 단백질 및 O Jincheon, O Andong, O1 Manisa 각각의 VP1 peptide로 자극한 후 T-면역세포 반응 실험을 BD™ ELISPOT set을 이용하여 실시한 결과 높은 수준의 CTL 반응성을 확인하였음 (그림 96).

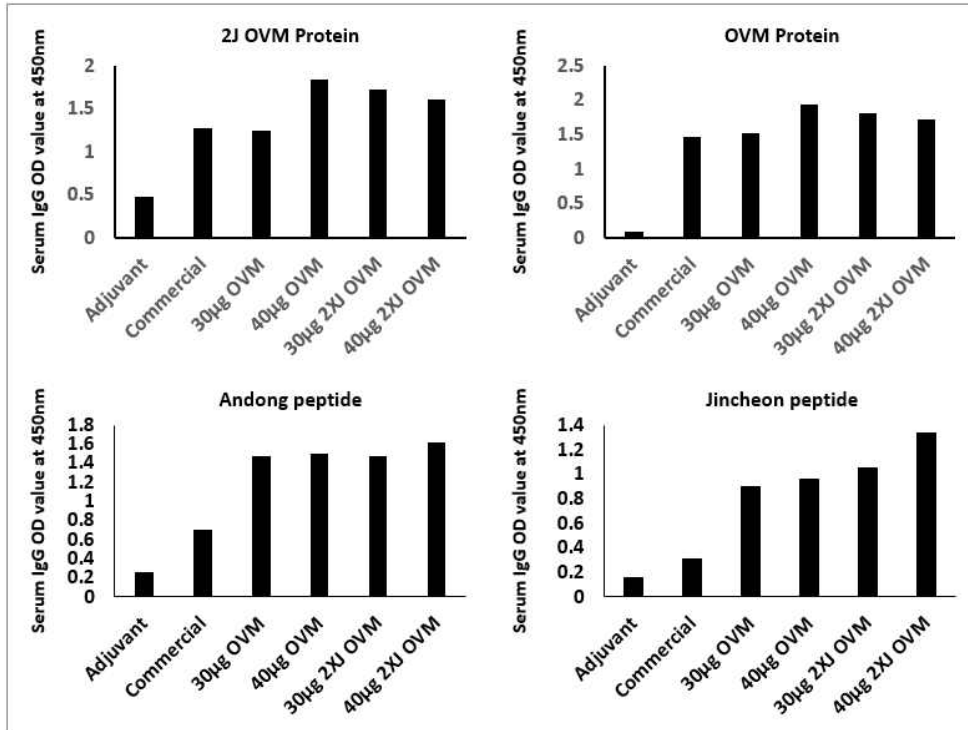


그림 95. 2J-OVM 항원단백질에 대한 혈청 내 IgG 항체가 형성 시험

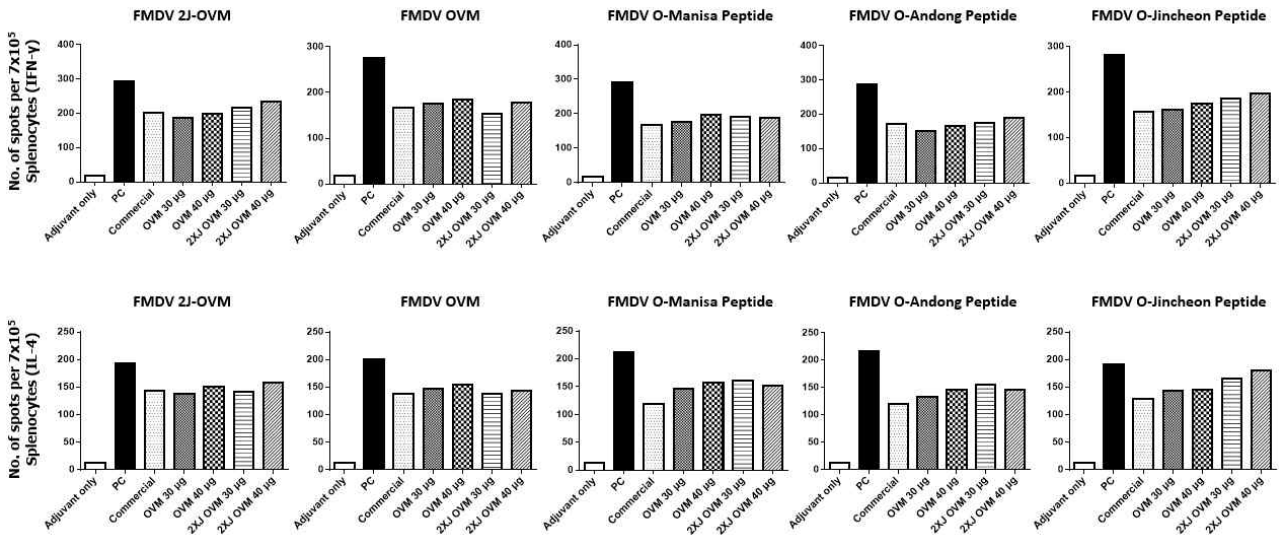


그림 96. 2J-OVM에 의한 특이 T 세포 면역반응 증강 효능 검증 (ELISPOT)

◎ 다음으로, 이들 마우스 그룹에 O Jincheon FMD 바이러스를 공격접종하여 O serotype용 2J-OVM 항원 단백질에 의한 FMD 바이러스에 대한 방어능을 확인하였음. 그 결과, 그림과 같이 2J-OVM 항원 단백질과 ISA201 혼합제가 상용화 백신과 더불어 100% 방어 효능을 보여주었음 (그림 97).

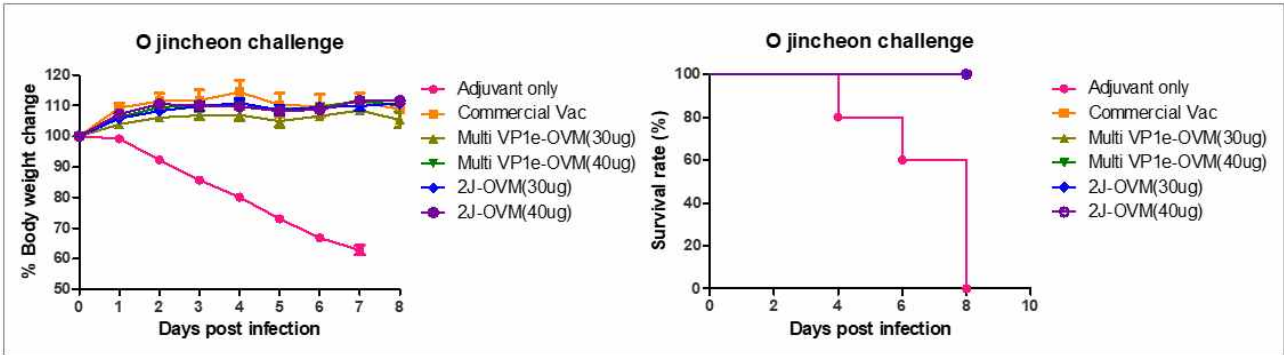


그림 97. O Jincheon Challenge Model을 이용한 2J-OVM 항원단백질의 방어 효능 검증

◎ 결론적으로 O serotype용 2J-OVM 항원 단백질은 FMDV Jincheon strain에 대해 보다 우수한 방어능을 갖는 구제역 재조합 백신 항원이 될 수 있을 것이라 사료되며, 향후 목적동물에 이용한 방어능 실험이 요구됨.

(10) FMDV T-cell epitope을 포함하는 O serotype용 T-Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man-T) 단백질의 제작 및 발현

◎ 상기의 O serotype용 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원단백질의 면역원성을 높이기 위해, 특히 T 세포 면역반응의 활성화를 위해 FMDV의 항원단백질들중 CTL 반응을 높일 수 있는 epitope을 문헌으로부터 발체하여 유전자를 확인한 후 유전자 합성을 수행함.

◎ CTL과 관련이 깊다고 알려진 항원부위는 VP1의 16~44 a.a., VP4의 20~35 a.a., 3A의 11~40 a.a 부위가 T cell 면역반응에 중요하다고 알려져 있음.

◎ 합성한 T-epitope 유전자를 기존의 O serotype용 Multi-VP1e (O/Jincheon-O/Andong-O/Manisa) 항원 유전자가 삽입되어 있는 발현벡터의 C-말단에 삽입하여 B-cell epitope과 T-cell epitope을 모두 발현하는 항원단백질 발현용 벡터를 구축하였음.

● T-cell epitopes

Type	Epitope s	Amino acid
O1/Manisa	VP1 ₁₆₋₄₄ (29)	ENYGGETQ V QRR Q HTDVSFILDRE FV T V T P
O/Jincheon	VP1 ₁₆₋₄₄ (29)	ENYGGETQ I QRR H HTDVSFILDRE FV K V T P
O/Andong	VP1 ₁₆₋₄₄ (29)	ENYGGETQ V QRR H HTDVSFILDRE FV K V T P
O1/Manisa	VP4 ₂₀₋₃₅ (15)	SIINNYMQQYQNSMD
O/Jincheon	VP4 ₂₀₋₃₅ (15)	SIINNYMQQYQNSMD
O/Andong	VP4 ₂₀₋₃₅ (15)	SIINNYMQQYQNSMD
O1/Manisa	3A ₁₁₋₄₀ (30)	YFLIEKGQHEAA I EF F EGMVHDSI K EEL R P
O/Jincheon	3A ₁₁₋₄₀ (30)	YFLIEKGQHEAA I EF F EGMVHDSI K EEL R P
O/Andong	3A ₁₁₋₄₀ (30)	YFLIEKGQHEAA I D F EGMVHDSI K EEL R P

그림 98. FMDV에서 알려진 T cell 면역 유도 epitope 서열



그림 99. O serotype용 T-Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man-T) 발현 벡터 구축

◎ 구축된 O serotype용 T-Multi-VP1e (3O/Jin-O/An-O/Man-T) 발현 벡터를 RG와 RIPL 대장균 균주에 transformation시키고, 30°C에서 1M IPTG로 발현을 유도하여 Coomassie Blue staining과 Western Blot을 통해 soluble form의 T-Multi-VP1e 단백질 발현을 그림과 같이 확인하였음.

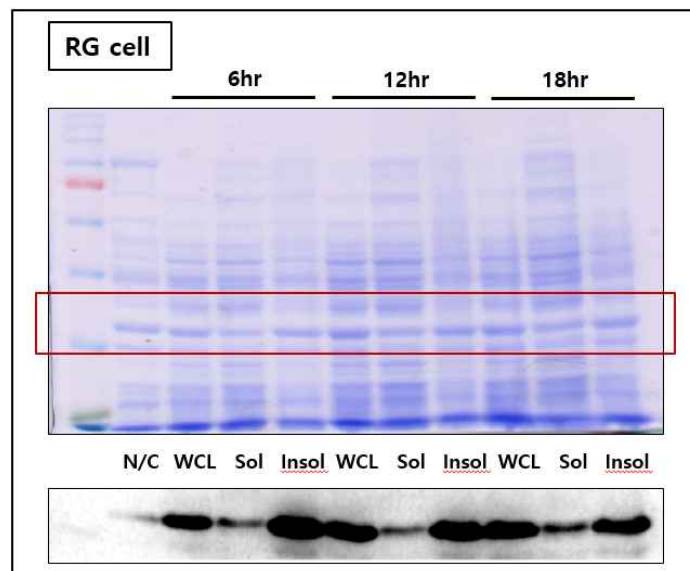


그림 100. O serotype용 T-Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man-T) 가용성 발현 검증

◎ 향후 T-Multi-VP1e 항원단백질의 발현이 확인된 대장균에서 항원단백질의 정제 과정을 진행할 예정이며, 정제단백질과 crude 단백질을 이용한 면역원성 실험이 진행될 예정임.

2. 곤충발현시스템을 이용한 구제역 재조합백신 생산시스템 개발 및 효능 연구

가. Baculovirus 시스템을 이용한 내산성 구제역 VLP 정제 및 백신 연구

(1) 내산성 구제역 VLP 유전자 확보

◎ 국내분리 진천주의 유전자 활용(O/Jinchon/KOR/2014) 하였음

◎ 최초 2 곳의 내산성 관련 유전자 돌연변이(H145Y, N17D)가 도입된 돌연변이 형태로 고안하

고, 추가 문헌조사를 통해 2곳의 내산성 관련 유전자 돌연변이가 추가로 도입된(S93F, C142T) 유전자를 확보하였음. 유전자 돌연변이는 PCR기반의 site direct mutagenesis를 사용하였음

- ◎ 최초 야생형 유전자는 곤충발현시스템에 적용하기 위해 곤충세포(sf9) 코돈최적화 과정을 수행하였으며, 전체 합성 유전자의 크기가 3000bp가 넘어 유전자 합성 기간이 매우 오래 걸리고, 합성 중에 돌연변이가 반복적으로 발생하는 문제점이 발견되어, 유전자 합성의 정확도를 높이기 위해 아래 그림과 같이 P1-2A, 3C 2개의 분절된 유전자로 합성 한 후 클로닝 과정 중에 합치는 형태로 진행하여 최종 완성하였음.

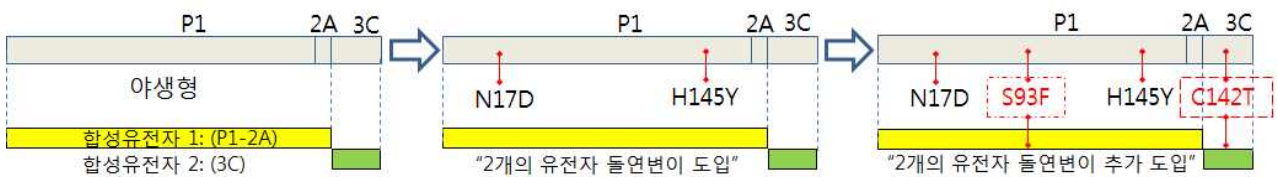


그림 1. FMDV VP1 유전자에 도입된 내산성 돌연변이 위치 및 아미노산 변이

(2) 내산성 VLP 생산을 위한 곤충세포 및 베쿨로바이러스 발현시스템 구축

- ◎ 내산성 VLP 제작을 위한 Bac-to-Bac baculovirus expression system(Invitrogen)을 구입하여 활용하였으며, 전체 합성 유전자 크기가 3000 bp인 P1-2A, 3C 2개의 분절된 유전자로 합성 한 후 제한효소 등을 이용하여 클로닝 과정 중에 결합하여 최종 유전자 클로닝을 완성하였으며 전체 유전자 서열 시퀀싱을 통해 적절히 제작되었음을 확인하였음.

P1-2A-C3 construction

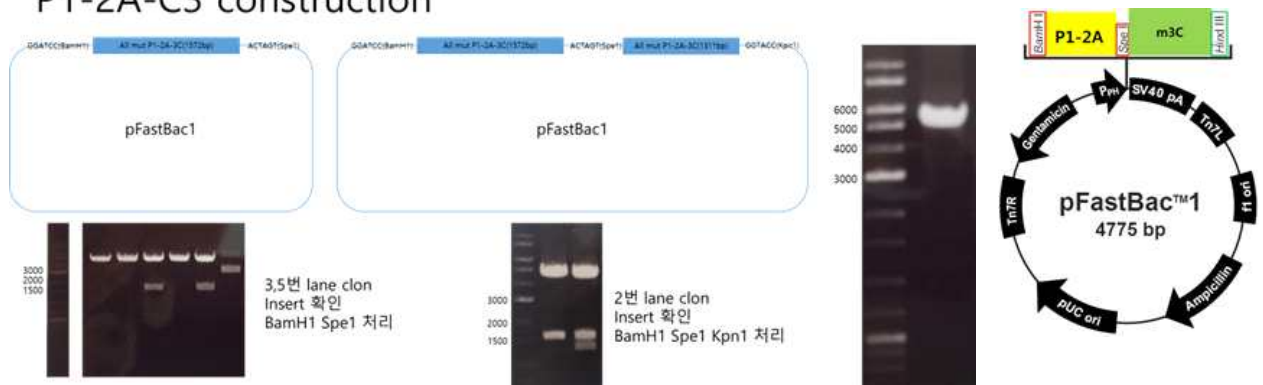


그림 2. 내산성 구제역 VLP 제작용 유전자 클로닝

- ◎ 내산성 VLP 제작을 위한 전반적인 제작과정은 내산성 구제역 VLP용 유전자를 pFastBac1 transfer vector에 삽입한 후 이를 다시 Bacmid vector에 transfer하고, 이를 다시 곤충세포에 transfection하여 내산성 구제역 VLP 제작을 위한 P1-2A-3C 단백질을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스(recombinant baculovirus: rBV)를 제작하였음.

◎ 내산성 FMDV-rBV는 정량과 순화과정을 거친 후 곤충세포에 감염하여 단백질 발현여부를 웨스턴블롯을 통해 검증하였음. 단백질 검출 시 항체는 구제역 백신 접종 레빗 항체를 활용함.

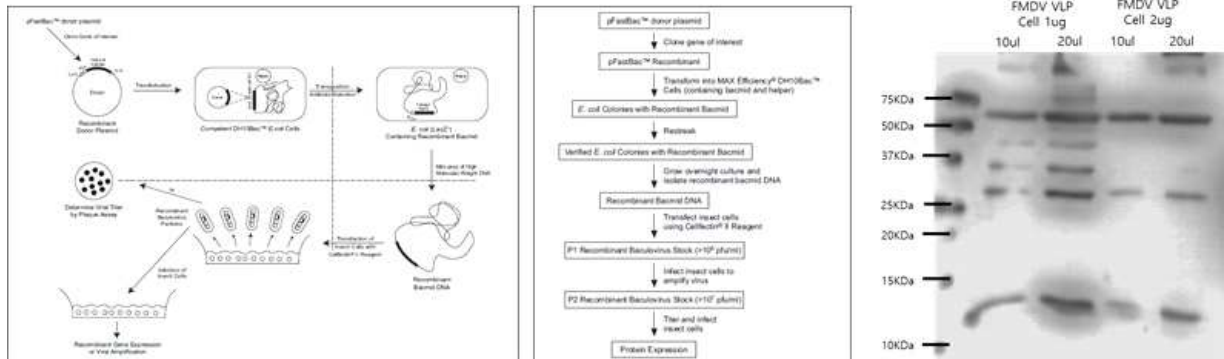


그림 3. 내산성 구제역 VLP 제작용 재조합 베클로바이러스 제작과정 및 단백질 발현 검증

(3) 내산성 및 야생형 FMDV-VLP 생산 및 확인

◎ 내산성 VLP의 백신 효능을 검증하기 위해 목적동물 실험 시 중규모의 백신이 필요할 수 있음. 따라서 중규모 스케일의 배양 시 내산성 VLP의 정제 효율을 높이기 위하여 size-exclusion ultra-filtration system을 추가로 도입함(Amicon Stirred cell concentration). 본 시스템을 통해 시료의 농축은 약 2-10배까지 가능하며, membrane MWCO에 따라 적절한 크기의 단백질 분리정제가 가능함.

◎ 내산성 및 야생형 FMDV-VLP 생산을 위해 성장기에 있는 곤충세포에 내산성 또는 야생형 FMDV-VLP를 발현하는 rBV를 감염한 후 배양과 정제조건에 따라 VLP를 생산함. 대략적으로 1~3moi로 rBV를 감염한 후 27C에서 60시간 배양, 상층액을 원심분리를 통해 수득하였음. 이를 상기에 기록한 ultra-filtration을 통해 1차 정제, 농축하고 이를 다시 sucrose gradient ultracentrifugation법을 통해 2차 정제 및 농축함.

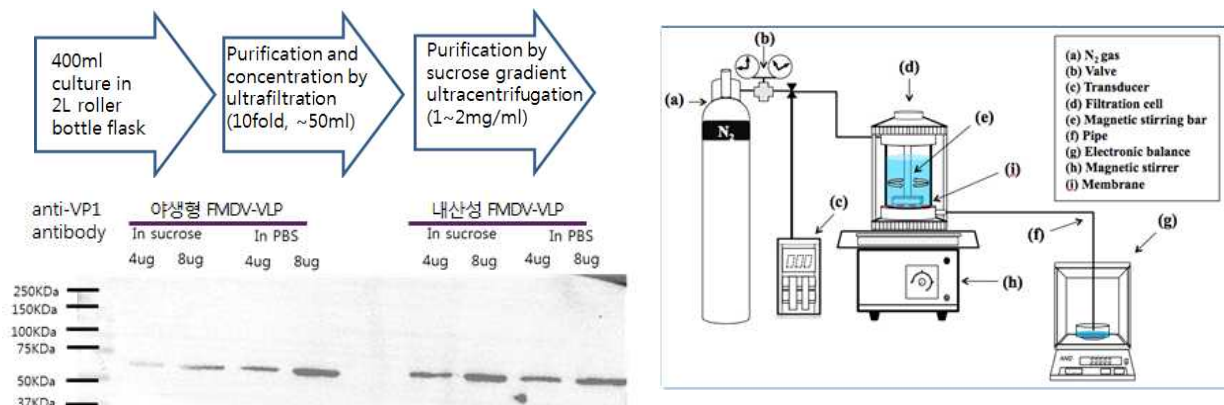


그림 4. 내산성 VLP 백신의 생산 스케일을 높이기 위해 도입된 ultra-filtration system의 모식도

◎ 최종 생산된 VLP는 웨스턴블롯을 통해 적절하게 생산이 되었는지 확인하였음. 두 시료 모두

FMDV-VP1 단백질의 예상되는 크기의 밴드가 확인되었으며, 동량의 내산성 및 야생형 FMDV-VLP를 시료를 비교하였을 때, 야생형에 비해 내산성 VLP에 VP1 단백질의 함량이 다소 높은 것으로 확인되나 크게 차이나 나지는 않았음. 본 실험을 통해 내산성을 부여하는 아미노산 돌연변이가 단백질 발현 자체에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.

(4) 내산성 FMDV-VLP의 백신 효능평가

◎ 구제역 백신 후보물질로서 내산성 FMDV-VLP와 야생형 FMDV-VLP의 백신효능을 평가하기 위해 동물실험을 수행하였음. 6주령 C57BL/6 마우스에 제작한 야생형, 내산성 FMDV-VLP를 2가지 농도로 각각 근육주사 방법으로 접종하였음. 백신은 3주 간격으로 총 2회 접종하였으며, 양성대조군으로 상업용 백신을 사용하였음.

Group	Antigen	Amount(ug)	Adjuvant	Route
1	야생형(WT) FMDV-VLP	0.8	ISA201	IM
2	야생형(WT) FMDV-VLP	8	ISA201	IM
3	내산성(Mut) FMDV-VLP	0.8	ISA201	IM
4	내산성(Mut) FMDV-VLP	8	ISA201	IM
5	Commercial Vaccine	8	ISA계열	IM
6	Negative control	-	-	IM

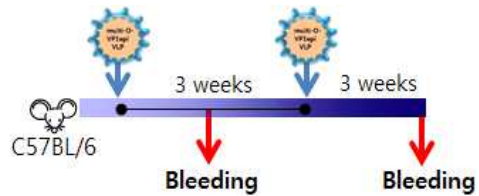


그림 5. 내산성/야생형 FMDV-VLP 백신의 동물실험

◎ 백신 및 VLP 백신 후보물질을 접종하고, 3주가 지난 후 채혈하여 혈액에 존재하는 FMDV-VP1 특이적인 항체를 ELISA를 이용하여 측정하였음. FMDV-VP1 특이적인 항체는 O1 type VP1 epitope 부위(132~162, 192~212)의 서열이 일부 중첩되도록 고안한 총 8종의 peptide를 합성, 이를 동일한 비율로 혼합하여 coating antigen으로 활용하여 ELISA를 통해 VP1 특이적인 항체를 측정함.



그림 6. FMDV VLP 백신의 면역원성 측정을 위한 peptide ELISA용 아미노산 서열

◎ 야생형 또는 내산성 VLP 백신 후보물질을 접종하고 3주가 지난 후 혈액에 존재하는 VP1 특이적인 항체를 측정한 결과, 야생형 VLP의 경우 접종한 양에 상관없이 면역 반응을 거의 일으키지 못한 반면, 내산성 VLP의 경우 유의미한 수준의 항체 형성이 확인되었음. 하지만 상업용 백신에 비해서는 그 효능이 현저히 낮았음.

◎ 야생형 또는 내산성 VLP 백신 후보물질을 2회 접종하고 3주가 지난 후 혈액에 존재하는 VP1 특이적인 항체를 측정한 결과, 야생형 VLP의 경우 접종한 양과 횟수에 상관없이 VP1

항원 특이적인 면역 반응을 거의 일으키지 못한 반면, 내산성 VLP의 경우 2차 접종 후 항체가 소폭 상승함을 확인하였음. 반면에 상업용 백신의 경우 항체가 큰 폭으로 상승하였음.

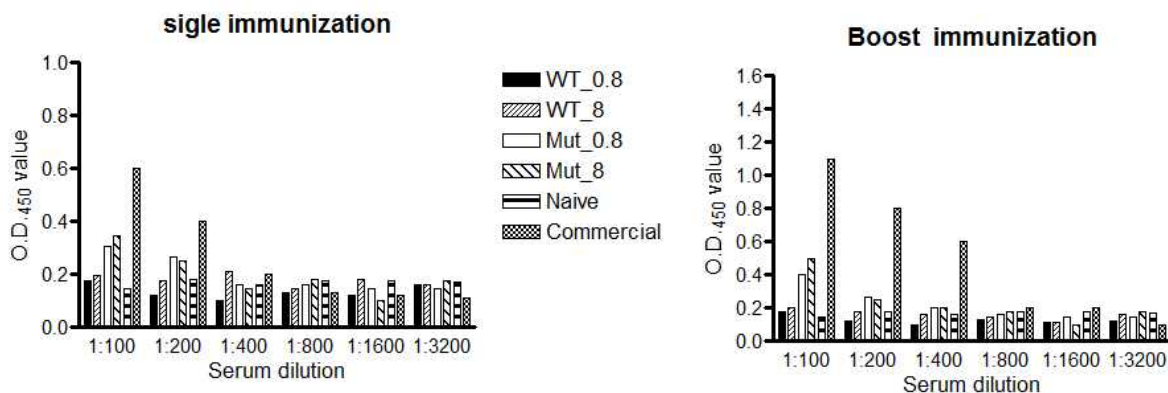


그림 7. 내산성 FMDV-VLP와 야생형 FMDV-VLP의 VP1 특이적 항체 형성 비교

◎ 내산성 FMDV-VLP와 야생형 FMDV-VLP의 안정성을 비교하기 위해 일반적인 재조합 단백질 백신의 보존온도인 4°C에 약 2주간 보관한 후 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 파티클의 존재여부를 확인하였음.

◎ 간략한 실험과정은 각각의 VLP 시료를 4% paraformaldehyde 와 0.1%gluta-aldehyde로 고정하고 carbon grid에 시료 흡착한 후 1% uranyl acetate로 염색 및 건조하여 현미경 관찰하였음. 관찰한 결과, 아래 그림과 같이 내산성 돌연변이가 도입된 FMDV-VLP의 경우 다수의 파티클이 확인되고, 크기가 약 50nm 전후를 유지하고 있는 반면, 야생형 FMDV-VLP는 대부분 파티클 외형을 잃은 상태로 존재하여 안정성이 매우 떨어지는 것을 확인하였음.

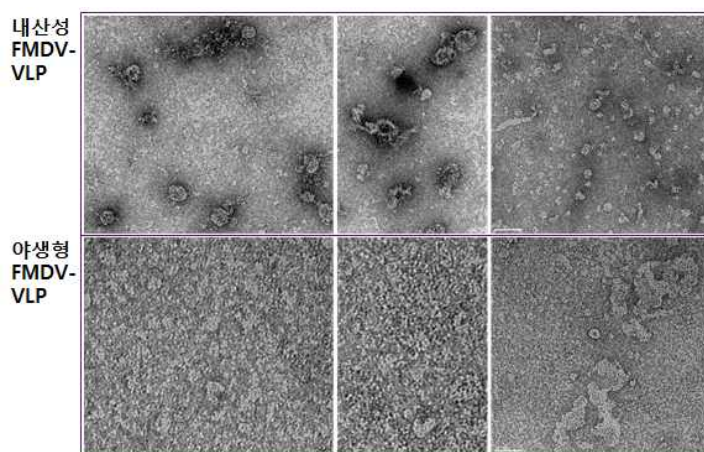


그림 8. 내산성 FMDV-VLP(상)와 야생형 FMDV-VLP(하)의 전자현미경 사진

◎ 본 실험을 통해 내산성을 부여하는 돌연변이의 도입은 단백질의 발현 자체에는 큰 영향을 미치지 않으나, VLP 파티클 구조의 안정화에는 기여하는 것으로 확인이 됨. 이러한 안정화 된 파티클 구조에 기인하여 동물실험을 통해 야생형에 비해 내산성 VLP의 면역원성이 개선되는 효과를 보였으나 상업용 백신에 비해서는 백신 효능이 현저히 낮았음.

◎ 이러한 원인으로 파티클에 존재하는 VP1 항원 단백질 incorporation ratio가 naive virus에 비해 낮은 비율로 존재하여 충분한 백신효능을 일으키지 못하는 것으로 판단됨.

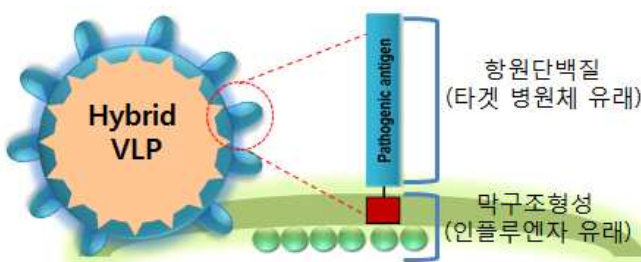
◎ 웨스턴 블랏 결과를 바탕으로 간접적으로 VP1 항원 단백질의 파티클 내 비율을 측정할 경우 그 비율이 1% 미만인 것으로 판단되며, 따라서 결과적으로 내산성 돌연변이가 도입된 FMDV-VLP는 안정성에서 개선된 효과를 보이나, 불활화 FMDV 백신에 비해 절대 항원량이 부족하여 충분한 백신의 효과가 나타나지 않으므로 향후 개선이 필요하다고 판단됨.

나. 하이브리드 VLP 시스템을 이용한 구제역 항원발현 VLP 정제 및 백신 연구

(1) 하이브리드 VLP 시스템을 활용한 백신 플랫폼 구축

◎ VLP백신은 병원체 항원을 파티클형태로 발현시켜 면역반응을 증진시키는 기술로 HPV, influenza, HBV 등 다양한 바이러스 백신에 활용되고 있음. 그러나 native VLP 형성이 용이한 병원체에만 활용이 가능하다는 근본적인 한계를 갖고 있음.

◎ 따라서 본 과제에서는 다양한 바이러스 항원을 VLP형태의 재조합 단백질로 발현할 수 있는 플랫폼기술 Hybrid VLP를 개발하고자 인플루엔자 바이러스 유래 VLP 구조를 형성할 수 있는 막구조 단백질(M1)과 타겟 병원체의 항원단백질에 인플루엔자 TM/CT 부위를 fusion 하여 2종의 단백질을 곤충세포에서 동시 발현한 후 VLP 형태를 구성하도록 고안된 벡터시스템을 최종 완성하였으며, 본 과제 1차년도에 특허 출원 후 3차년도에 최종 등록되었음.



특허등록원부			
특허번호	제 1861578 호		
[권 리 란]			
표시번호	등 록 사 항		
1번 출원연월일	2016년 07월 05일	출원번호	2016-0084828
공고연월일	2016년 05월 28일	공고번호	-
특허공정(심결)연월일	2018년 03월 28일	청구범위의 횡수	10
분류기호	C07K 14/235, C07K 14/005, A61K 39/12		
발명의 명칭	병원체 유래 항원을 포함하는 융합단백질 및 이를 포함하는 바이러스 유사 입자		
등록기간(예정)연월일	2036년 07월 05일		
2018년 05월 21일 등록			
[특허요란]			
제 1 - 69 년분 (2018.05.21 ~ 2021.05.21) 공 액 217,500 원(전담조직) 2018년 05월 21일 납입			
[특허권자란]			
[최종권리자]			
성신여자대학교 산학협력단 (114471-*****)			
서울특별시 성북구 보문로34길 2 (동선동3가, 성신여자대학교)			
순위번호	등 록 사 항		
1번 (등록권리자)	성신여자대학교 산학협력단 (114471-*****)		
서울특별시 성북구 보문로34길 2 (동선동3가, 성신여자대학교)			
2018년 05월 21일 등록			

그림 9. 하이브리드 VLP 시스템의 구조도와 특허등록

(2) FMDV-multi-VP1epi VLP 제작 및 백신 효능 검증 (O serotype 방어용)

◎ FMDV multi-O-VP1epi VLP 유전자 제작

- ◎ 하이브리드 VLP 시스템을 이용한 O serotype 방어용 multi-O-VP1epi VLP 백신 제작 및 검증을 수행함. 국내분리 진천주의 유전자(O/Jinchon/KOR/2014)를 기반으로 아래 그림과 같이 epitope 부위로 알려진 VP1 epitope 2부분(VP₁₃₂₋₁₆₂, VP₁₉₂₋₂₁₂)을 3회 반복(tandem repeat)한 형태로 유전자를 합성하였음. 해당 유전자는 하이브리드 VLP 구조 형성에 필수적인 막투과영역을 포함하고 있으며, 그 외 단백질 발현을 높이기 위한 signal peptide 서열을 포함하고 있음.

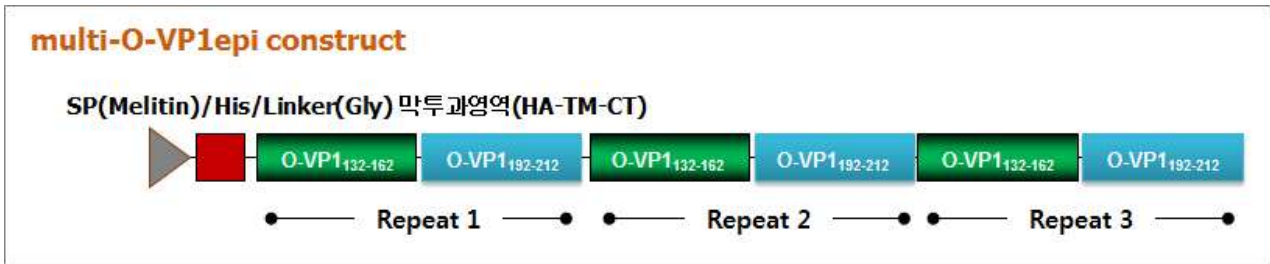


그림 10. Multi-O-VP1 epitopes 유전자 구조

- ◎ FMDV multi-O-VP1epi VLP 생산을 위한 곤충세포 및 베쿨로바이러스 발현시스템 구축
- ◎ 최종 완성한 유전자는 하이브리드 벡터시스템에 클로닝 및 rBV 제작을 완료하였으며, 곤충세포 bac-to-bac expression 시스템을 통해 단백질 발현을 확인함. 에피토프는 일반적으로 사이즈가 작아 단독으로는 충분한 면역원성을 유발하지 못하므로 multiple 형태로 제작할 경우 높은 수준의 항체를 형성할 수 있을 것으로 기대됨.
- ◎ 곤충세포 발현 최적화 된 multi-VP1e 유전자는 최종 합성이 완료되어 베쿨로바이러스를 생산하기 위한 클로닝 작업을 수행하였으며, 곤충세포 transfection을 통해 최종 multi-VP1e 단백질을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스 P1 stock을 완성하였음.
- ◎ 재조합 베쿨로바이러스의 multi-VP1e 단백질 발현을 확인하기 위해, 해당 바이러스가 감염된 세포 추출액으로부터 웨스턴 블롯을 수행한 결과 아래 그림과 같이 적절한 크기의 multi-VP1e 단백질을 발현을 확인하였음. 웨스턴 블롯 수행에 사용된 항체는 1세부 과제 총남대에서 제작, 제공하여 활용하였음.

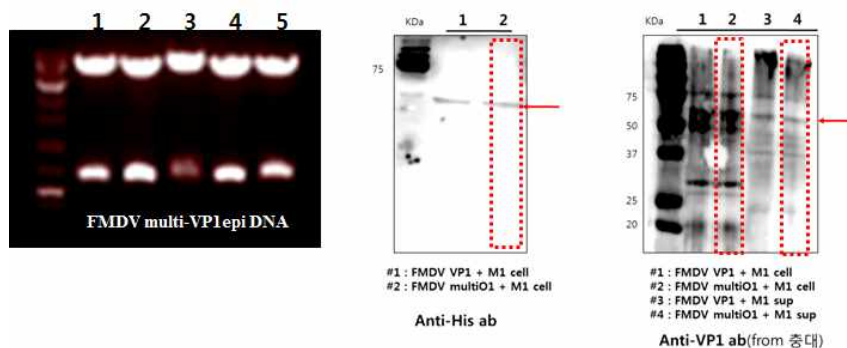


그림 11. FMDV-multi-O-VP1epi VLP 유전자 구조 및 단백질 발현 검증

● FMDV multi-O-VP1epi VLP 생산 및 확인

◎ FMDV-multi-VP1e VLP제작을 위해 rBV 및 막구조 형성을 위한 M1-rBV와 multi-VP1e rBV를 곤충세포에 동시감염한 후 일정시간 배양을 유지하여 배양액으로 조립된 하이브리드 FMDV-multi-O-VP1e VLP를 분리, 정제하였음. 간략한 제작과정으로, 성장기에 있는 곤충세포에 M1-rBV와 multi-VP1e rBV를 1~3moi로 감염한 후 27C에서 60시간 배양, 상층액을 원심분리를 통해 수득한다. 이를 상기에 기록한 ultra-filtration을 통해 1차 정제, 농축하고 이를 다시 sucrose gradient ultracentrifugation법을 통해 2차 정제 및 농축함.

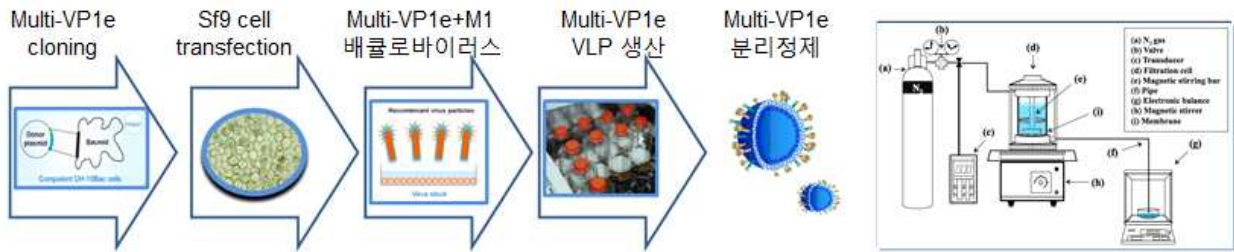


그림 12. FMDV-multi-VP1e VLP 제작과정

◎ 최종 제작되어 분리, 정제된 하이브리드 FMDV-multi-VP1e VLP의 항원발현을 확인하기 위해 VP1 항체를 이용하여 웨스턴블롯을 수행하였으며 전자현미경을 통해 VLP 형태의 파티클 형성을 확인하였음.

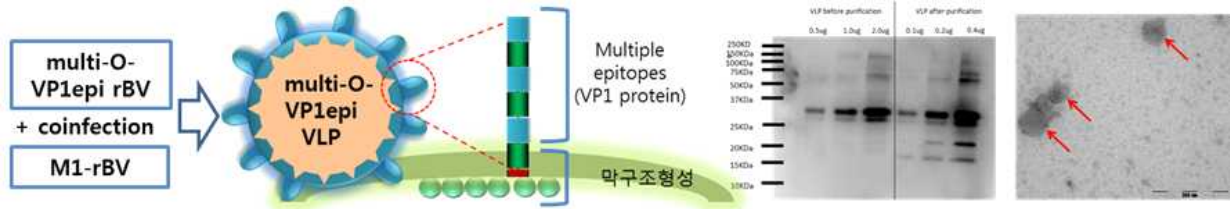


그림 13. FMDV-multi-VP1e VLP 구조 및 전자현미경 검증

● FMDV multi-O-VP1epi 백신 효능평가

◎ 구제역 백신 후보물질로서 FMDV-multi-VP1e VLP의 백신효능을 평가하기 위해 동물실험을 수행하였음. 6주령 C57BL/6 마우스에 제작한 FMDV-multi-VP1e VLP를 ISA201 면역보조제와 혼합한 후 50ug농도로 각각 근육주사 방법으로 접종하였음. 백신은 3주 간격으로 총 2회 접종하였음.

Group	Antigen	amount	Adjuvant	route
1	negative control	-	-	IM
2	FMDV-multi-O-VP1epi VLP	50ug	ISA201	IM
3	FMDV-multi-O-VP1epi VLP	50ug	-	IM

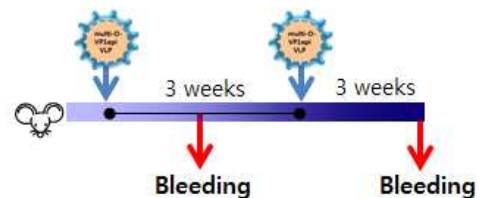


그림 14. FMDV-multi-O-VP1epi VLP 백신의 동물실험

● 항체가는 다음 2가지 방법으로 측정하였음.

● Peptide ELISA

◎ O1 type VP1 epitope 부위(132~162, 192~212)의 서열이 일부 중첩되도록 고안한 총 8종의 peptide를 합성, 이를 coating antigen으로 활용하여 ELISA를 통해 VP1 특이적인 IgG 항체가를 측정함



그림 15. FMDV VLP 백신의 면역원성 측정을 위한 peptide ELISA용 아미노산 서열

● SP(structural protein) ELISA

◎ PriorCHECK FMDV type O ELISA kit(Prionics Lelystad B.V., Netherlands)를 사용하여 VP1 특이적인 IgG 항체가를 측정하며, PI 값 50 이상일 경우 양성으로 판정함.

◎ 각각의 방법으로 ELISA를 수행한 결과, 아래 그림에서 보는 바와 같이 FMDV multi-O-VP1epi VLP 백신 접종에 따른 VP1 특이적인 IgG 항체가가 검출되었음.

◎ peptide ELISA와 SP ELISA 모두 양성반응으로 나타났으며, 면역보조제 ISA201을 처리한 그룹에서만 양성반응을 확인함.

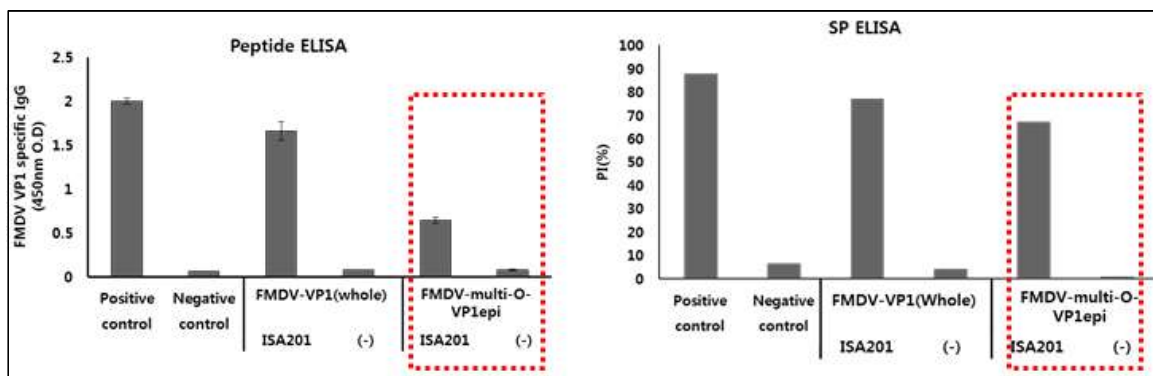


그림 16. FMDV-multi-VP1e VLP의 항체 형성 검증

◎ FMDV-multi-O-VP1epi VLP에 의해 형성된 항체의 지속력을 확인하기 위해 최종 백신 접종 후 3주 간격으로 15주까지 채혈한 후 혈액에 존재하는 VP1 특이적인 항체가와 isotype을 peptide ELISA를 통해 측정하였음.

◎ 그 결과, FMDV-multi-O-VP1epi VLP에 의해 형성된 IgG는 최종 백신 접종 후 최소 15주까지 지속되었으나, 9주를 기점으로 감소하기 시작하였음.

◎ Isoptype 분석 결과에 따르면, FMDV-multi-O-VP1epi VLP에 의해 형성된 IgG는 IgG1형이 IgG2a 형에 비해 현저히 높게 나타남을 확인하였음.

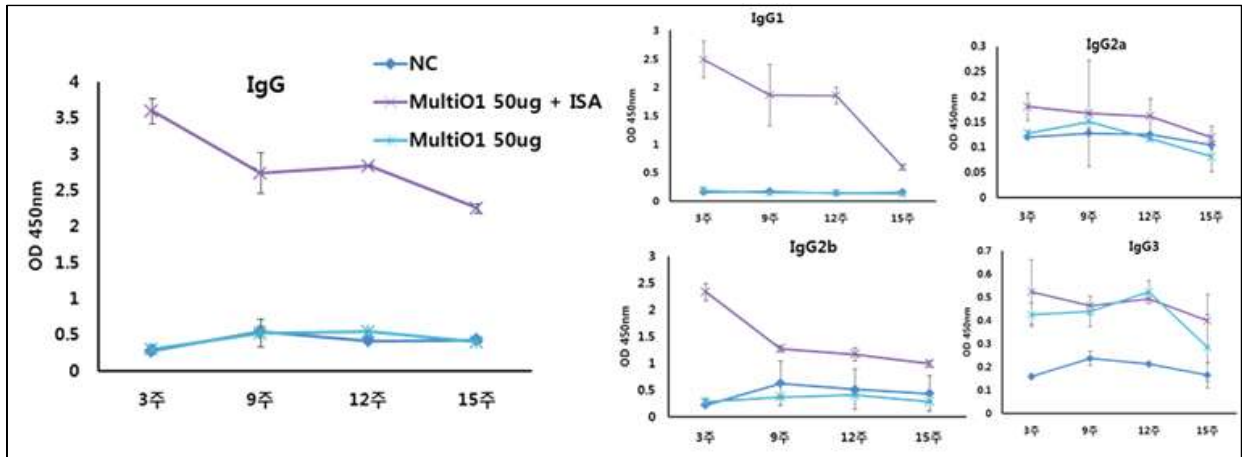


그림 17. FMDV-multi-VP1e VLP의 항체 지속력 및 Isotype 확인

◎ 본 실험을 통해 하이브리드 VLP 백신 플랫폼의 개념을 구현하였음. 즉 기존 self-assembly 를 통해 형성되는 VLP 가 아닌, 다양한 외부 항원을 막표면에 인위적으로 발현시킬 수 있는 인플루엔자 바이러스의 매트릭스 단백질과 HA 단백질의 TM/CT(막투과부위/세포질부위)를 활용한 하이브리드 VLP 플랫폼을 개발하였으며, 여기에 외부 항원으로 FMDV의 주요 항원단백질인 VP1 단백질의 특정 에피토프를 반복구조 형태로 제작하여 발현함으로써 FMDV-multi-VP1e VLP를 제작하였음.

◎ 이러한 하이브리드 VLP의 제작 가능성이 확인되었으며 뿐만 아니라 동물실험을 통해 FMDV-multi-VP1e VLP에 의한 항체 형성 가능성이 검증되었음.

◎ 현재 개선점으로 FMDV-multi-VP1e VLP에 존재하는 VP1 epitope 항원부위의 비율이 높지 않아 상대적으로 다량의 항원을 접종해야하는 문제점이 있으므로 이 부분에 대해서는 향후 개선이 요함. 현재 해당 FMDV-multi-VP1e VLP 은 농림축산검역본부 구제역 백신연구센터의 공동연구를 통해 공격접종실험이 진행중에 있음.

(3) FMDV-VP1 VLP 제작 및 백신 효능 검증 (O serotype 방어용)

● FMDV-VP1(Whole) VLP 유전자 확보

◎ 하이브리드 VLP 시스템을 이용한 O serotype 방어용 FMDV-VP1(Whole) VLP 백신 제작 및 면역원성 검증을 수행함. 국내분리 진천주의 유전자(O/Jinchon/ KOR/2014)를 기반으로 아래와 같이 VP1 단백질을 암호화 하는 전체 유전자를 합성하였음.

- ◎ 해당 유전자는 하이브리드 VLP 구조 형성에 필수적인 막투과 영역과 세포질 영역을 포함하고 있으며 이 부위는 인플루엔자 바이러스 HA 단백질에서 유래하였음. 그 외 단백질 발현을 높이기 위한 signal peptide 서열을 포함하고 있음.

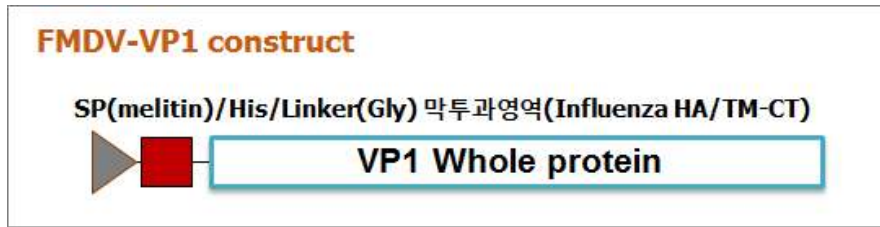


그림 18. FMD-VP1(whole) VLP의 유전자 구조

- ◎ 이를 하이브리드 벡터시스템에 클로닝 및 rBV 제작을 완료하였으며, 곤충세포 bac-to-bac expression 시스템을 통해 단백질 발현을 확인함.
- ◎ FMDV의 VP1 단백질구제역 바이러스의 가장 강력한 항원으로 알려져 있으나 단백질 발현 과정 중에 pH 등 외부조건에 의해 그 단백질의 구조가 매우 불안정하여 재조합 단백질 백신으로 개발이 어려움.
- ◎ 본 연구는 VP1이 발현된 VLP 형태로 재조합 단백질을 제작하여 높은 수준의 항체를 형성할 수 있을 것으로 기대됨.
- ◎ FMDV-VP1(Whole) VLP 생산을 위한 곤충세포 및 베쿨로바이러스 발현시스템 구축
- ◎ 곤충세포 발현 최적화 된 whole VP1-Influenza TM/CT 결합 유전자는 최종 합성이 완료되어 베쿨로바이러스를 생산하기 위한 클로닝 작업을 수행하였으며, 곤충세포 transfection을 통해 최종 whole VP1-Influenza TM/CT 결합 단백질을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스 P1 stock을 완성하였음.
- ◎ 재조합 베쿨로바이러스의 VP1 단백질 발현을 확인하기 위해, 해당 바이러스가 감염된 세포 추출액으로부터 웨스턴 블롯을 수행한 결과 아래 그림과 같이 적정한 크기의 VP1 단백질 발현을 확인하였음.

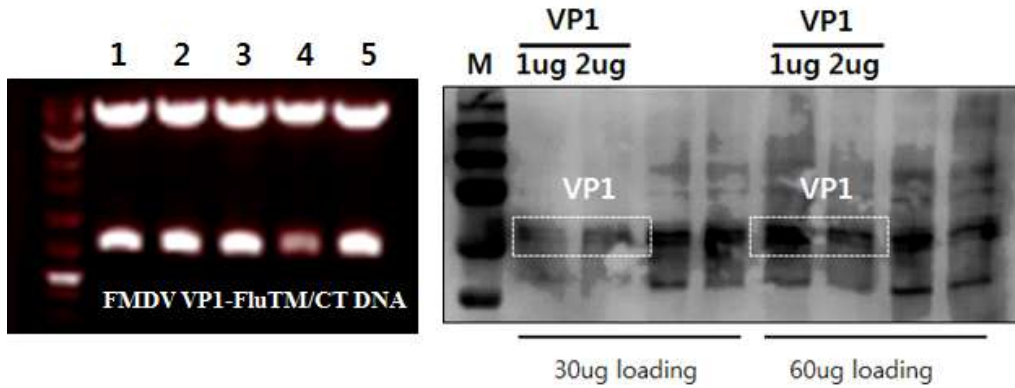


그림 19. FMDV-VP1 VLP 유전자 클로닝 및 단백질 발현 검증

● FMDV-VP1(Whole) VLP 생산 및 확인

◎ FMDV-VP1(Whole) VLP 제작을 위한 rBV 및 막구조 형성을 위한 M1-rBV를 곤충세포에 동시감염한 후 일정시간 배양조건을 유지하여 배양액으로 조립된 하이브리드 FMDV-VP1 (Whole) VLP를 분리, 정제하였으며, 전자현미경을 통해 VLP 형태로의 파티클 형성을 확인하였음.

◎ 간략한 제작과정으로, 성장기에 있는 곤충세포에 M1-rBV와 FMDV-VP1(Whole) rBV를 1~3moi로 감염한 후 27C에서 60시간 배양, 상층액을 원심분리를 통해 수득함. 이를 상기에 기록한 ultra-filtration을 통해 1차 정제, 농축하고 이를 다시 sucrose gradient ultracentrifugation법을 통해 2차 정제 및 농축함.

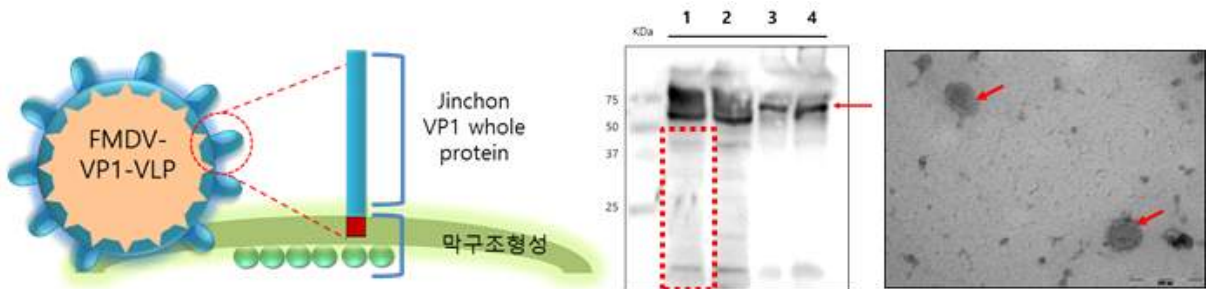


그림 20. FMDV-VP1 VLP 구조 모식도 및 전자현미경 발현 검증

● FMDV-VP1(Whole) VLP 백신 효능평가

◎ 구제역 백신 후보물질로서 FMDV-VP1(Whole) VLP의 백신효능을 평가하기 위해 동물실험을 수행하였음. 6주령 C57BL/6 마우스에 제작한 FMDV-VP1(Whole) VLP를 2가지 농도로 각각 근육주사 방법으로 접종하였음.

◎ 백신은 3주 간격으로 총 2회 접종하였으며, 양성대조군으로 상업용 백신을 사용하였음.

Group	Antigen	amount	Adjuvant	route
1	negative control	-	-	IM
2	FMDV-VP1(whole) VLP	50ug	ISA201	IM
3	FMDV-VP1(whole) VLP	50ug	-	IM

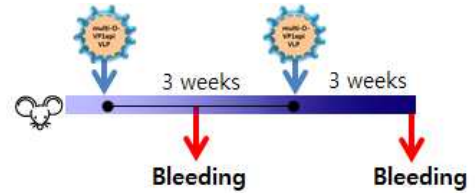


그림 21. FMDV-VP1(whole) VLP 백신의 면역원성 검증을 위한 동물실험 스케줄

◎ 백신 및 VLP 백신 후보물질을 접종하고 3주가 지난 후 채혈하여 혈액에 존재하는 FMDV-VP1 특이적인 IgG 항체를 ELISA를 이용하여 측정하였음. FMDV-VP1 특이적인 IgG 항체는 이전 동물실험과 동일한 방법으로 peptide 와 SP ELISA를 각각 수행하였으며, 아래 그림에서 보는 바와 같이 FMDV-O-VP1(Whole) VLP 백신 접종에 따른 VP1 특이적인 항체가 peptide ELISA와 SP ELISA 모두 양성반응으로 나타났으며, 면역보조제 ISA201을 처리한 그룹에서만 양성반응을 확인할 수 있었음.

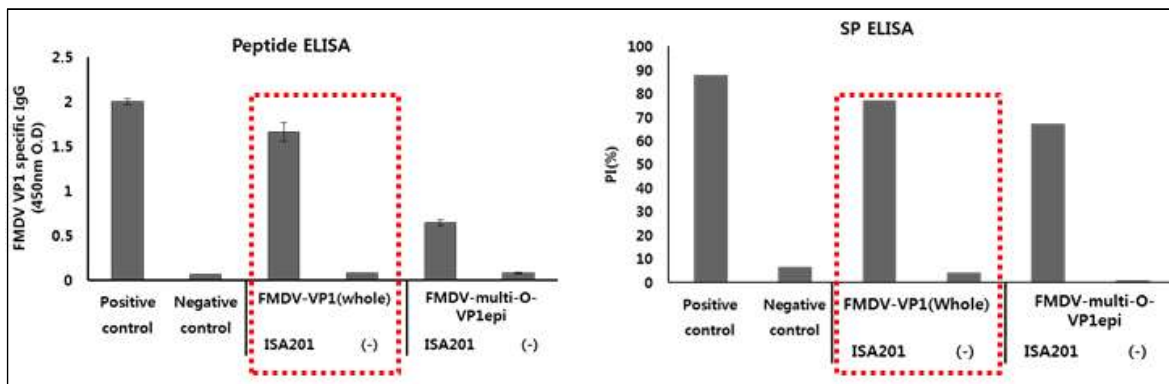


그림 22. FMDV-VP1(whole) VLP의 항체 형성 검증

◎ FMDV-VP1(whole) VLP에 의해 형성된 항체의 지속력을 확인하기 위해 최종 백신 접종 후 3주 간격으로 15주까지 채혈한 후 혈액에 존재하는 VP1 특이적인 항체와 isotype을 peptide ELISA를 통해 측정하였음.

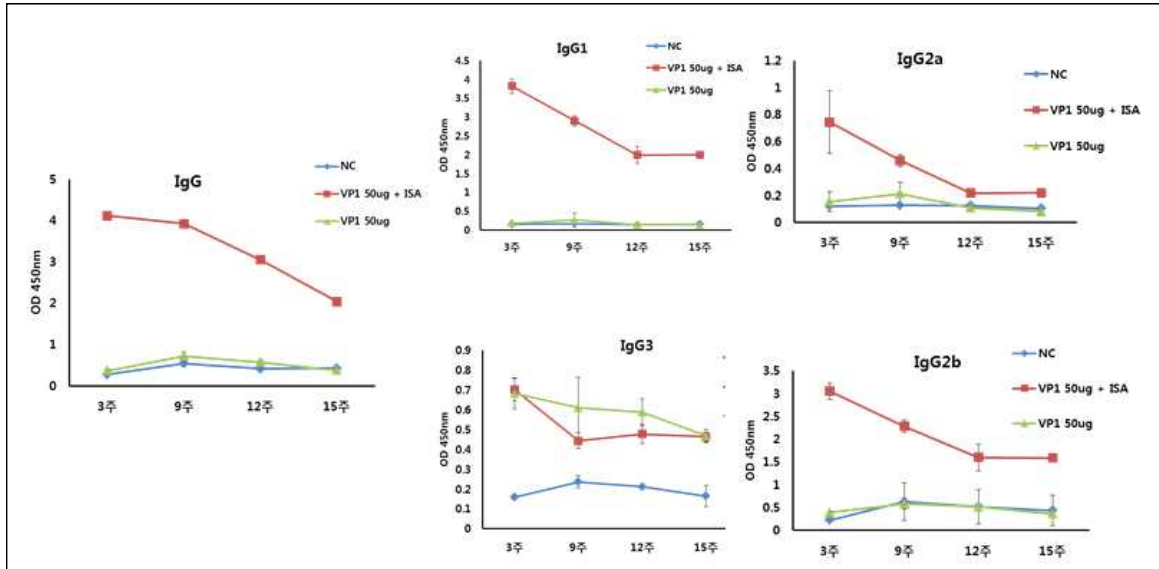


그림 23. FMDV-VP1(whole) VLP의 항체 지속력 및 Isotype 확인

- ◎ 그 결과, FMDV-VP1(whole) VLP에 의해 형성된 IgG는 최종 백신 접종 후 최소 15주까지 지속되었으나, 9주를 기점으로 감소하기 시작하였으며, Isootype 분석 결과에 따르면, FMDV-VP1(whole) VLP에 의해 형성된 IgG는 IgG1형이 IgG2a 형에 비해 현저히 높게 나타남을 확인하였음.
- ◎ 본 실험을 통해 하이브리드 VLP 백신 플랫폼의 개념을 구현하였음. 즉 기존 self-assembly를 통해 형성되는 VLP가 아닌, 다양한 외부 항원을 막표면에 인위적으로 발현시킬 수 인플루엔자 바이러스의 매트릭스 단백질과 HA 단백질의 TM/CT(막투과부위/세포질부위)를 활용한 하이브리드 VLP 플랫폼을 개발하였으며, 여기에 외부 항원으로 FMDV의 주요 항원단백질인 VP1 전체 단백질을 발현시켜 FMDV-VP1(Whole) VLP를 제작하였음.
- ◎ 이러한 하이브리드 VLP의 제작 가능성이 확인되었으며 뿐만 아니라 동물실험을 통해 FMDV-multi-VP1e VLP에 의한 항체 형성 가능성이 검증되었음. 현재 개선점으로 VP1 단백질의 발현을 자체가 낮고, 농림축산검역본부 구제역 백신연구센터의 공동연구를 통해 백신에 의한 중화항체를 측정할 결과 상업용 백신에 비해 낮은 값이 확인되었음.
- ◎ 따라서 향후 백신의 VP1 항원함량 증대 뿐만 아니라 3회 접종, 피하접종 등 접종 스케줄과 방법에 관한 최적화가 필요할 것으로 판단됨.

(4) FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP 제작 및 검증 (3가 serotype 방어용)

- FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP 유전자 확보
- ◎ 하이브리드 VLP 시스템을 이용한 FMDV 3 serotype 공통 방어용 FMDV-multi-3sero

-VP1epi VLP 백신 제작 및 면역원성 검증을 수행함.

- ◎ 국내분리 진천주의 유전자(O/Jincheon/ KOR/2014)와 A/Pocheon, Asia/Shamir 3종의 혈청형(serotype)에 존재하는 VP1 단백질 epitope 부위를 유래한 기반으로 아래와 같이 VP1 단백질을 암호화 하는 전체 유전자를 합성하였음.
- ◎ 해당 유전자는 하이브리드 VLP 구조 형성에 필수적인 막투과 영역과 세포질 영역을 포함하고 있으며 이부위는 인플루엔자 바이러스 HA 단백질에서 유래하였음. 그 외 단백질 발현을 높이기 위한 signal peptide 서열을 포함하고 있음.

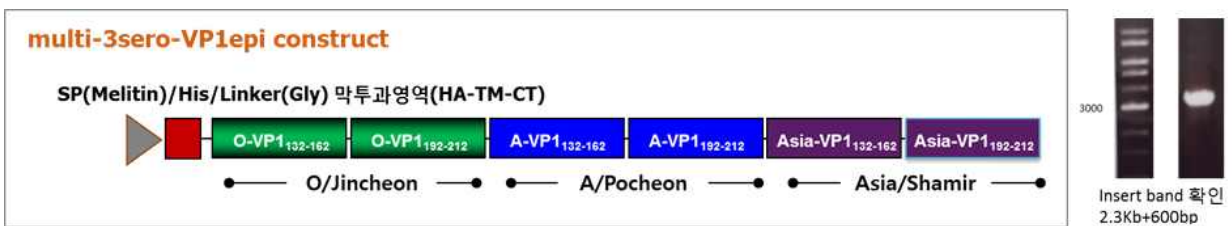


그림 24. FMDV-multi-3sero-VP1 epitopes VLP의 유전자 구조 및 확인

- ◎ 국내 구제역 발생은 O형, A형, Asia형 3가지 혈청형의 유행에 대한 대비가 가장 필요하기 때문에 이들 3가지 serotype에 대해 공통적으로 사용할 수 있는 백신이 개발될 경우 그 효용성이 매우 높음. 이를 위해 3가지 혈청형의 VP1 항원 유래 epitope 부분이 동시에 발현된 FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP를 고안하게 되었음.
- ◎ FMDV-multi-3sero-VP1epi 생산을 위한 곤충세포 및 베쿨로바이러스 발현시스템 구축
- ◎ 합성된 해당 유전자는 앞서 사용한 하이브리드 벡터시스템에 클로닝 및 rBV 제작을 완료하였으며, 곤충세포 bac-to-bac expression 시스템을 통해 단백질 발현을 확인하였음.
- ◎ 간략히 설명하면, 곤충세포 발현 최적화 된 multi-3sero-VP1epi 유전자는 최종 합성이 완료되어 베쿨로바이러스를 생산하기 위한 클로닝 작업을 수행하였으며, 곤충세포 transfection을 통해 최종 multi-3sero-VP1epitope 단백질을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스 P1 stock을 완성하였음.
- ◎ 재조합 베쿨로바이러스의 VP1 단백질 발현을 확인하기 위해, 해당 바이러스가 감염된 세포 추출액으로부터 웨스턴 블롯을 수행한 결과 아래 그림과 같이 적절한 크기의 multi-3sero-VP1epitope 단백질 발현을 확인하였음.
- ◎ FMDV-multi-3sero-VP1e 생산 및 확인
- ◎ FMDV-multi-3sero-VP1e VLP 제작을 위한 rBV 및 막구조 형성을 위한 M1-rBV를 곤충세

포에 동시감염한 후 일정시간 배양조건을 유지하여 배양액으로 조립된 하이브리드 FMDV-VP1(Whole) VLP를 분리, 정제하였으며, 전자현미경을 통해 VLP 형태로의 파티클 형성을 확인하였음.

◎ 간략한 제작과정으로, 성장기에 있는 곤충세포에 M1-rBV와 FMDV-multi-3sero-VP1e rBV를 1~3moi로 감염한 후 27C에서 60시간 배양, 상층액을 원심분리를 통해 수득함.

◎ 이를 상기에 기록한 ultra-filtration을 통해 1차 정제, 농축하고 이를 다시 sucrose gradient ultracentrifugation법과 Ni-NTA(anti-HIs)를 이용하여 2차 정제 및 농축함.

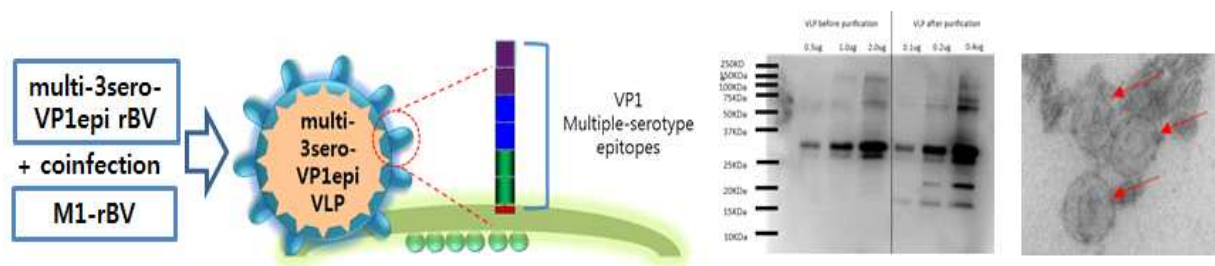


그림 25. FMDV-multi-3sero-VP1 epitopes VLP의 구조 모식도 및 전자현미경 사진

◎ 전자현미경을 통해 확인한 FMDV-multi-3sero-VP1e VLP는 기존 FMDV가 50nm 전후의 크기를 갖는 반면, 100~120nm의 크기를 보여 전형적인 하이브리드 VLP의 크기와 형태를 갖고 있음. 이러한 크기와 구조는 실제 면역세포에 인식되기 좋은 형태와 크기에 해당함.

◎ FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP 백신 효능평가

◎ 구제역 백신 후보물질로서 FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP의 백신효능을 평가하기 위해 동물실험을 수행하였음. 6주령 C57BL/6 마우스에 제작한 FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP를 2가지 농도로 각각 근육주사 방법으로 접종하였음.

◎ 면역보조제로서 ISA201을 사용한 그룹과 사용하지 않은 그룹으로 나눠 진행하였으며, 백신은 3주 간격으로 총 2회 접종하였음.

Group	Antigen	amount	Adjuvant	route
1	negative control	-	-	IM
2	FMDV-multi-3sero-VP1 VLP	50ug	ISA201	IM
3	FMDV-multi-3sero-VP1 VLP	50ug	-	IM
4	FMDV-multi-3sero-VP1 VLP	0.5ug	ISA201	IM

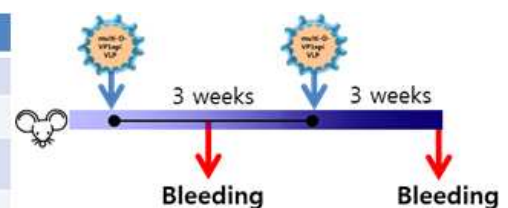


그림 26. FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP백신의 면역원성 검증

- ◎ 백신 및 VLP 백신 후보물질을 접종하고 3주가 지난 후 채혈하여 혈액에 존재하는 FMDV-VP1 특이적인 항체를 ELISA를 이용하여 측정하였음.
- ◎ 본 실험에서는 3가지 형태의 혈청형 백신이 동시에 포함되어 있으므로 3가지 혈청형의 VP1 epitope 부위 각각의 peptide를 활용하여 VP1 특이적인 항체를 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같음.

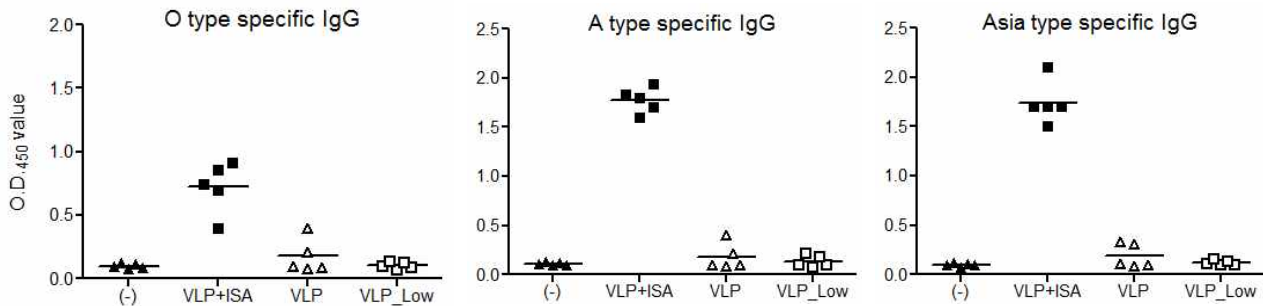


그림 27. FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP 의 항체 형성 검증

- ◎ 위 그림에서 보는 바와 같이 FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP 백신 접종에 따른 VP1 특이적이 확인되었으며, VP1 특이적인 항체가 면역보조제 ISA201을 처리한 그룹에서만 유도되는 것으로 보아 면역보조제의 활용이 필수임을 알 수 있음.
- ◎ 목적인 3가지 혈청형(O, A, Asia) 각각에 대해 VP1 특이적인 항체가 형성되는 것으로 확인되었으나, 혈청형 간에 반응성에는 다소간에 차이가 있었음. A, Asia type에 대한 항체반응이 O type에 비해 크게 나타남.
- ◎ 추가 동물실험을 통해 Multi-3sero-VPe VLP의 면역원성 시험을 수행하였음. poly I:C 면역보조제의 효과를 보기위한 그룹이 추가되었으며, prime-boost strategy의 효과를 확인하기 위해 prime-VLP 백신, boost-상업용 백신(commercial vaccine; formalin inactivated) 그룹(그룹3)을 추가하였음.
- ◎ 이전 실험과 동일한 접종 경로와 횟수, 기간 등으로 Multi-3sero-VPe VLP 또는 상업용 백신을 접종한 후 3주 후 채혈하여 혈액에 존재하는 FMDV-VP1 특이적인 IgG 항체를 peptide ELISA 로 측정하였음. 이때 사용한 peptide 는 3가지 serotype 의 peptide를 혼합하여 사용하였음.

Group	Antigen (1차 접종)	Antigen (2차 접종)	Amount (ug)	Adjuvant	Route
1	multi-3sero VLP	multi-3sero VLP	25	Poly I:C	IM
2	multi-3sero VLP	multi-3sero VLP	25	ISA201	IM
3	multi-3sero VLP	Commercial	25	ISA201	IM
4	Commercial	Commercial	50ul	ISA계열	IM
5	negative control	negative control	-	-	IM

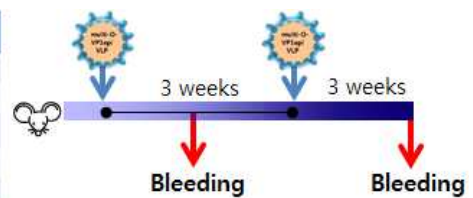


그림 28. FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP백신의 면역원성 검증을 위한 동물 실험 스케줄

- ◎ 아래 결과와 같이 첫번째 백신 접종 후 측정된 ELISA 반응에서 poly I:C를 사용한 그룹은 ISA201을 사용한 그룹에 비해 면역반응 효과가 미미했으며, VLP 그룹보다는 상업백신의 효과가 더 높았음. 하지만 Multi-3sero-VPe VLP 백신 접종 그룹에서도 유의미한 수준의 VP1 특이적 IgG 항체가 검출되었음.
- ◎ 백신 2회 접종 후 VLP-ISA201 그룹과 상업용 백신 그룹에서 1회 접종 후 보다 더 높은 boost immunization 효과를 나타내었으나, Poly I:C 그룹에서는 효과가 미미하였음.
- ◎ VLP 백신과 상업용 백신의 효과를 비교하였을 경우 그 효과는 상업용 백신에서 더 크게 나타나고 있음. 따라서 VLP 백신에 있어 면역보조제는 PolyI:C에 비해 ISA계열이 더 효율적인 것으로 확인됨.

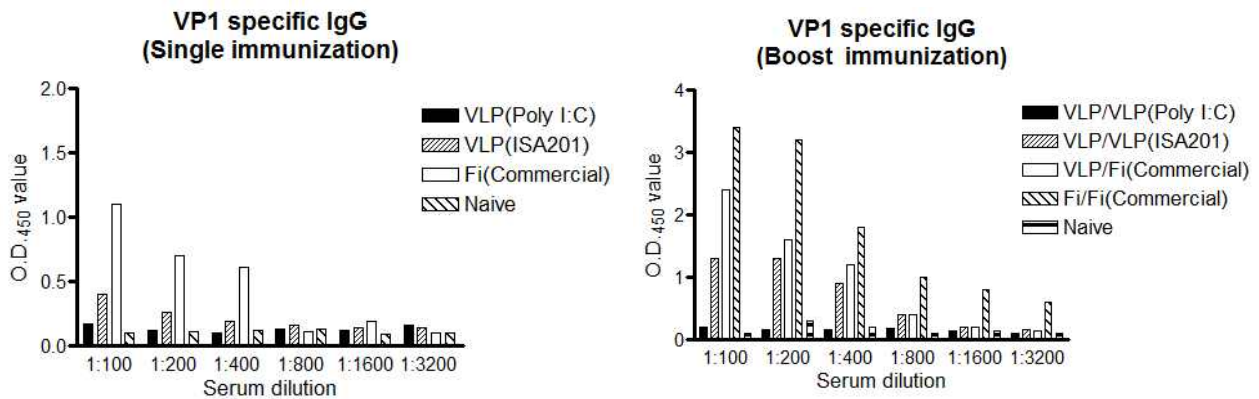


그림 29. FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP 의 항체 형성 검증

- ◎ 또한 VLP-VLP 백신 그룹보다 VLP-상업용 백신 그룹에서 전반적인 VP1 특이적 항체는 더 잘 유도되는 것으로 확인되나, 여전히 상업용 백신 2번 접종한 그룹이 가장 높은 항체 유도능력을 나타냄.
- ◎ 반면 O type과 A type peptide 각각에 대해 ELISA를 수행한 결과, VLP-상업용 백신 접종 그룹은 O type과 A type에 비교적 고르게 반응성이 나타나는 반면(좌), 상업용-상업용 백신 그룹은 A type 의 반응성이 현저히 높게 나타남을 알 수 있음(우).
- ◎ 이러한 결과는 Multi-3sero-VPe VLP 백신과 기존 백신을 함께 사용하는, prime-boost 전략으로 활용할 경우 기존 백신에서 얻지 못한 이상적인 면역반응을 유도할 수 있을 것이라 생각됨.

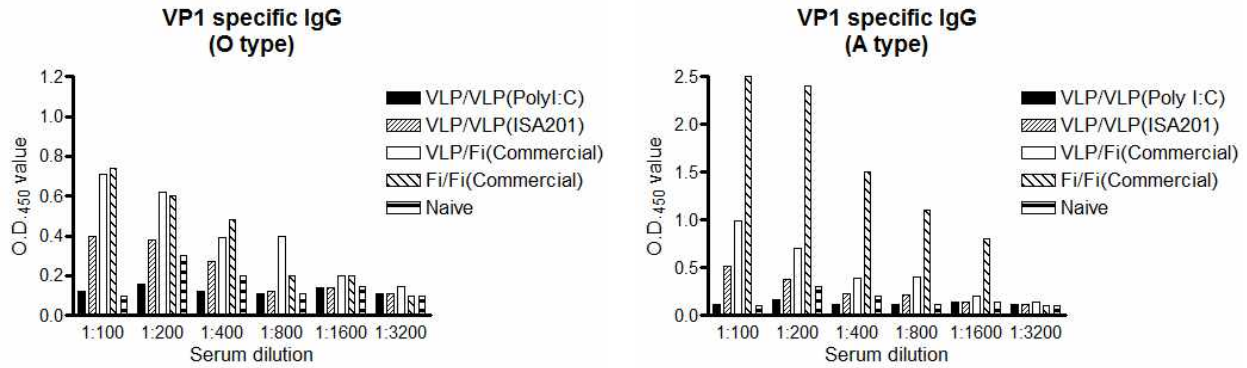


그림 30. FMDV-multi-3sero-VP1epi VLP 의 혈청형 특이적 항체 형성 검증

- ◎ 본 실험을 통해 하이브리드 VLP 백신 플랫폼을 통해 다양한 구제역 예방 백신의 proof of concept를 구현하였으며, 그 활용가치를 확인하였음.
- ◎ VLP 백신은 고병원성 구제역바이러스 자체를 다룰 필요가 없이, 재조합 단백질 기술을 통해 생산이 가능하며, 필요에 따라 항원의 종류와 구성을 다양하게 고안할 수 있어 유행하는 균주와 패턴에 따라 다양한 백신개발이 가능하다는 장점이 있는 반면, 아직 목적하는 항원의 함량을 극대화 시켜 생산단가를 낮추기 위한 노력이 더 필요할 것으로 판단됨.
- ◎ 본 과제를 통해 하이브리드 VLP 백신 플랫폼에 대한 원천기술과 특허권을 확보하였고, 그 활용가능성을 확인 하였으므로, 향후 구제역 및 타 가축질병을 유발하는 병원체에 대한 백신개발에 널리 활용될 것으로 기대됨.

3. 재조합 구제역 백신 생산 및 제품화

가. 재조합 구제역 단백질 항원의 보존성 확인

- ◎ 대장균 시스템을 이용한 FMDV VP1 가용단백질 생산 및 백신 제조에 있어서 정제 공정도 중요하지만 정제된 항원 단백질의 보존성이 매우 중요함.
- ◎ 백신 제조 과정에서 단백질 항원을 생산 직후에 바로 사용하는 것 보다는 미리 생산해놓은 단백질을 필요에 따라 사용하는 것이 일반적이며, 제조 관리에 이점이 있기 때문임.
- ◎ 이러한 관점에서 시제품 제조에 사용될 재조합 구제역 항원에 대한 안정성 평가를 수행하였으며, 시험에 사용된 재조합 구제역 항원은 chromatography purification, ultrafiltration 과정을 통해서 얻어진 것임.

1) 실험방법

- ◎ -70°C 동결 보존과 4°C 냉장 보존 조건을 따로 설정하였으며, -70°C 동결 보존 조건의 경우 1개월 단위로 5개월 경과시점까지, 4°C 냉장 보존 조건의 경우 7일 단위로 28일 경과시점까지 안정성을 확인하였음.
- ◎ 아래 그림에서와 같이 chromatography purification, ultrafiltration 과정을 통해서 얻어진 재조합 항원의 제조직후 함량은 1 mg/ml 이며, 각 경과시점마다 이와 동일한 방법으로 재조합 항원의 함량을 측정하였음.

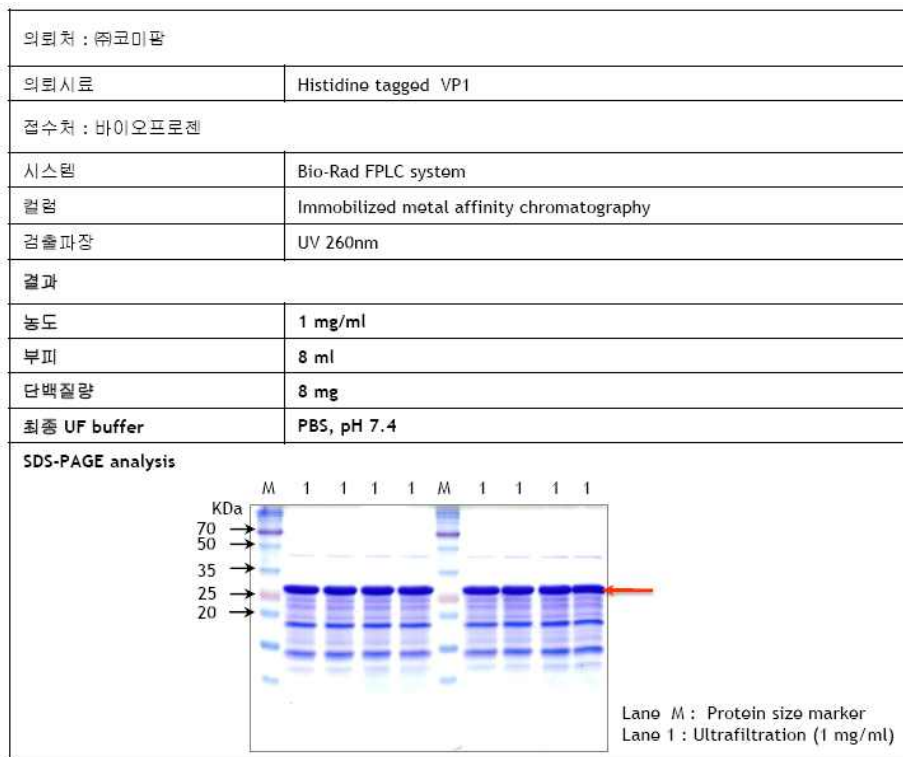


그림 1. 제조직후 항원 함량

2) 실험결과

◎ 4°C 보관 조건

- ◎ 아래 그림에서 확인할 수 있듯이 4°C 보관 조건에서 1주일 경과 후 재조합 항원의 역가가 20% 감소하였으며, 최대 4주 동안 30%의 역가 감소가 일어날 수 있음을 확인하였음.

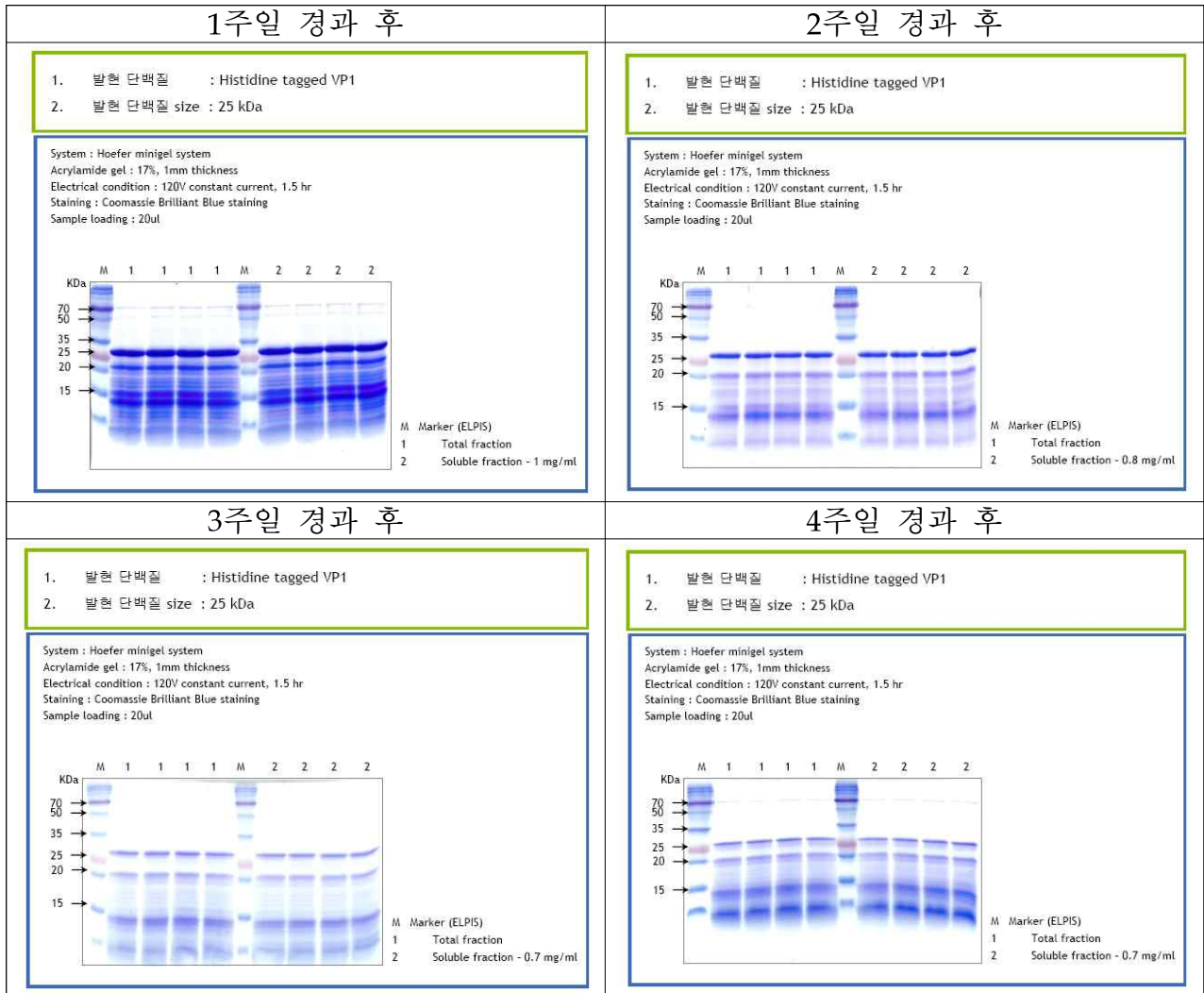


그림 2. 4°C 보존기간에 따른 항원 함량 변화

● -70°C 보관 조건

◎ 아래 그림에서 확인할 수 있듯이 -70°C 보관 조건에서는 최소 5개월 이상 재조합 항원이 역가 감소 없이 안정적으로 보존되는 것을 확인하음.



그림 3. -70°C 보존기간에 따른 항원 함량 변화

나. 재조합 단백질의 정제과정 연구

- ◎ 대장균 시스템을 이용한 재조합 항원의 정제과정 연구에 있어서 재조합 항원의 효능, 재조합 항원의 안전성 그리고 생산 공정의 효율성을 가장 먼저 고려하음.
- ◎ 일반적으로 정제 과정이 진행될수록 재조합 항원의 순도 및 농도가 높아지지만, 그에 비례하여 생산 효율은 떨어짐. 이러한 측면에서 극단적으로 높은 수준의 항원 정제보다는 생산 공정의 효율성을 고려한 전략이 필요함.
- ◎ 따라서 목적 단백질 함량이 백신 제조에 사용할 만큼 충분하면서 공존하는 비 특이 단백질들로 인한 부작용을 최소화 할 수 있는 효율적인 정제가 필요하다고 사료됨.

(1) 재조합 항원 생산 및 정제

- ◎ 하기 모식도에서와 같이 대장균 시스템을 이용한 재조합 항원의 정제 과정은 크게 3단계로 나눌 수 있음.
- ◎ 1단계가 균 파쇄 후 수용성 단백질이 포함된 상등액을 분리하는 공정이며, 2단계는 tag를 이용하여 affinity chromatography를 진행하는 단계, 3단계는 ultrafiltration을 통해 buffer를 교환하는 단계로 실질적인 정제 및 농축은 2단계에서 끝난다고 볼 수 있음.
- ◎ 시제품 제조를 위한 재조합 구제역 항원을 생산하는 과정에서 상기 3단계에서의 샘플을 각각 채취하였으며, 해당 샘플을 이용하여 실험을 진행하였음.

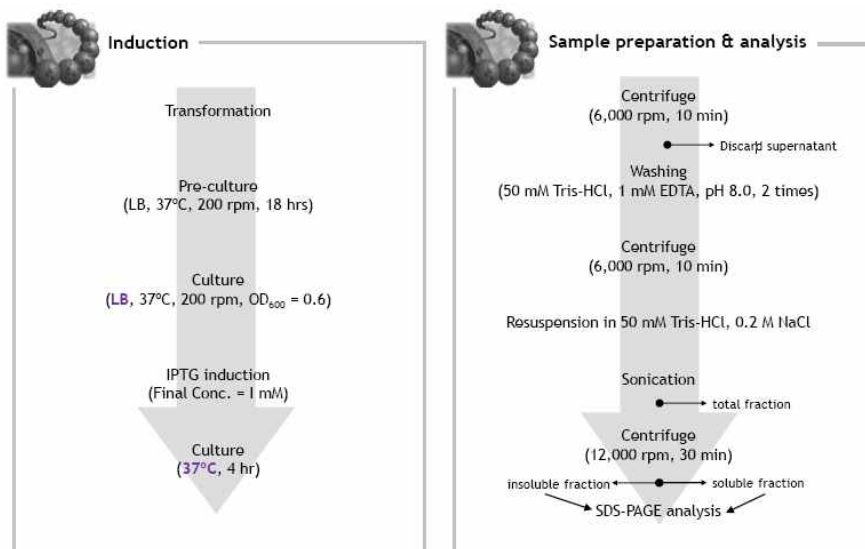


그림 4. 재조합 항원의 생산 모식도

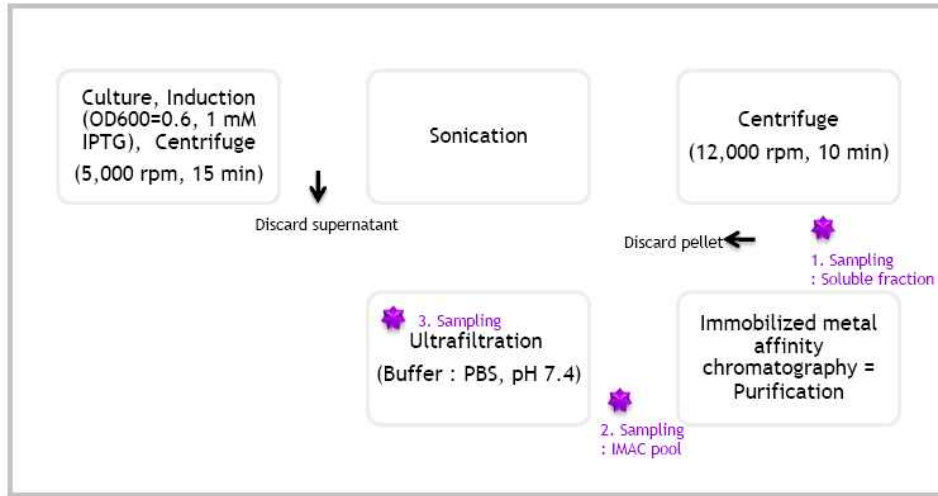


그림 5. 재조합 항원의 정제 모식도

(2) 정제 공정에 따른 재조합 항원의 농도

◎ 하기 그림에서 확인할 수 있듯이 정제 공정이 1단계 -> 2단계로 넘어가는 과정에서 재조합 항원의 농도가 11 mg/ml에서 0.6 mg/ml로 확연히 줄어드는 것을 확인할 수 있음 (3단계의 경우 농축 과정이므로 2단계보다 항원 농도는 늘어났지만, 전체적인 항원량은 2단계보다 줄어든다고 볼 수 있음).

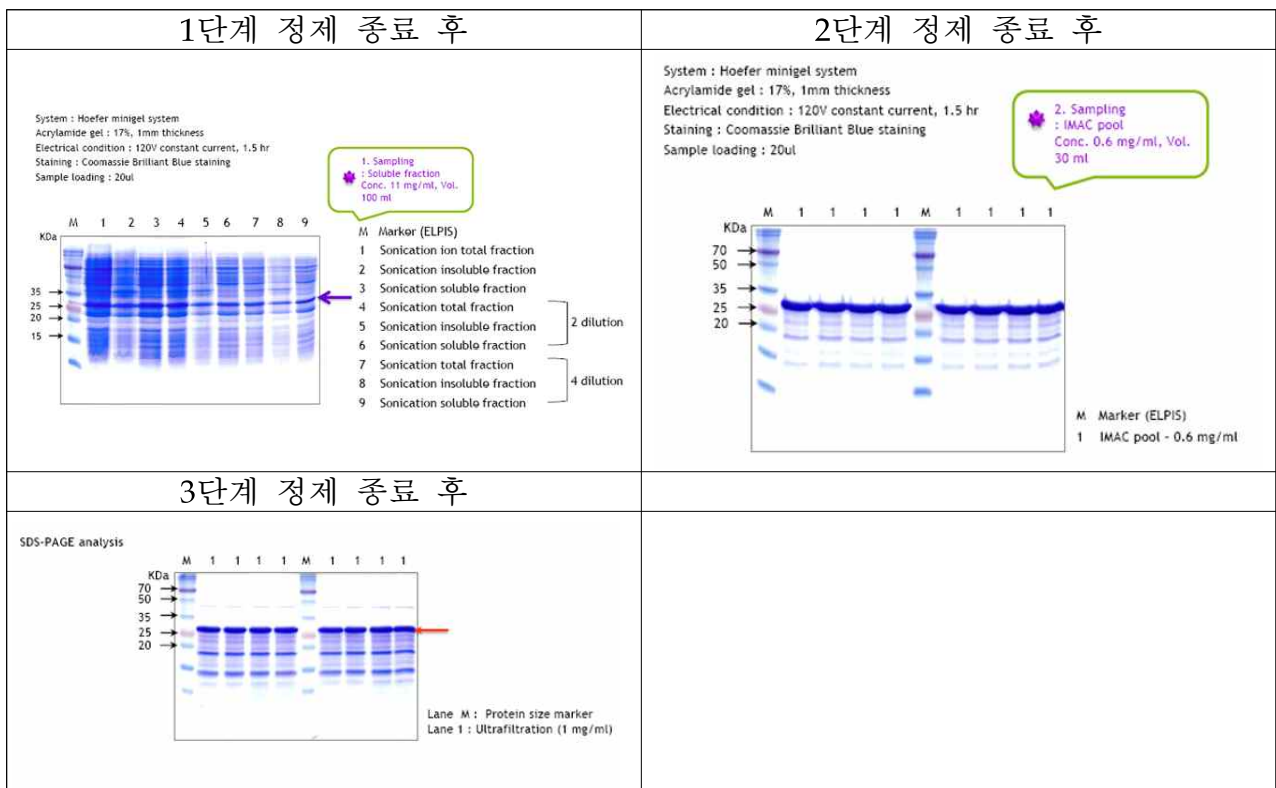


그림 6. 정제 단계별 재조합 항원의 농도

(3) 정제 공정에 따른 재조합 항원의 독성 평가

1) 실험방법

- ◎ 대장균 시스템을 이용하여 재조합 단백질 생산 시에 백신의 안전성에 영향을 줄 수 있는 비특이 단백질 중 대표적인 것은 대장균 유래 LPS 이며, 이 LPS로 인한 실험동물 독성을 확인하기 위해 마우스 실험을 실시하였음.
- ◎ 해당 실험 결과에 따라서 각각의 정제 단계의 재조합 항원에 대한 포르말린 불활화 유무를 결정할 것이며 각 정제 단계별로 총 단백질 함량이 상이하고, 정제 단계가 높아질수록 총 단백질 함량 중 재조합 구제역 항원이 차지하는 비중이 큰 것으로 생각됨.
- ◎ 3단계 정제항원의 마우스에서의 유효 단백질 항원 농도 (40 µg/dose)를 감안하여 각 정제 단계별 샘플에 대한 마우스 접종량을 결정하였으며, 희석한 항원 0.2 mL씩을 마우스 복강을 통해서 1회 접종 후 10일 동안 부작용이나 폐사 유무를 관찰하였음.

표 1. 정제 단계별 재조합 항원의 마우스 독성 실험 계획

그룹	실험 조건						
	정제 단계	항원 함량	실험 동물	접종 수	접종량	접종 경로	관찰 기간
A	1단계	11 mg/mL	ICR 마우스	10 마리	0.2 mL	복강	10일
B	2단계	0.6 mg/mL		10 마리	0.2 mL		10일
C	3단계	1 mg/mL		10 마리	0.2 mL		10일

2) 실험결과

표 2. 정제 단계별 재조합 항원의 마우스 독성 실험 결과

정제 항원	개체 수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 (생존 수/ 공시 수)									
				1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
1단계	10 마리	복강접종 0.2 mL	10일	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
2단계	10 마리	복강접종 0.2 mL	10일	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
3단계	10 마리	복강접종 0.2 mL	10일	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

◎ 상기 결과와 같이 대장균을 파쇄하여 얻어진 재조합 항원을 포르말린 불활화 없이 바로 사용하더라도 항원의 정제 수준과 상관없이 마우스에서 독성이 없음을 확인하였음.

다. 재조합 단백질의 대량 생산 연구

(1) 3L pilot batch 생산 결과

1) 실험방법

◎ 1차 배양 : 3L × 2 bottle, O.D 1.3에서 IPTG induction (1 mM, overnight)

◎ 2차 배양 : 3L × 2 bottle, O.D 0.5에서 IPTG induction (1 mM, overnight)



그림 7. 1차 및 2차 pilot batch 배양 결과

2) 실험결과

표 3. 3L pilot batch의 정량 결과

구분	정량 값 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	Flask -1	Flask -2
1차 배양	241	216
2차 배양	533	682

◎ Target 단백질의 정량 실험 결과, IPTG induction 조건에 따라서 발현되는 단백질 양에 차이가 있었으며, O.D 0.5~0.6에서 induction 시, 보다 높은 수율의 단백질 발현이 확인되었음.

(2) 200L 퍼멘터 생산 결과

1) 실험방법

표 4. 200L 퍼멘터 배양 순서

Seed 배양	Plate 배양 (24 hr) ⇨ 1 st Flask 배양 (15 hr) ⇨ 2 nd Flask 배양 (5 hr)
Main 배양	전 배양 (2.8 hr) ⇨ IPTG 첨가 ⇨ 본 배양 종료 (16 hr) ⇨ Harvest (5 hr) ⇨ 원심 세척 ⇨ 파쇄 ⇨ 원심 상등액 분리

표 5. 200L 퍼멘터 배양 조건

작업명	용량	작업 환경	작업시간
Main Seed 배양	1,500 mℓ Amp (100 µg/mℓ)	37°C, 150rpm	5 hr
전 배양	150,000 mℓ Amp (100 µg/mℓ)	37°C, 100rpm, 80FL, 0.3Kg/cm ²	2 hr 50 min
IPTG 첨가	IPTG (1.0 mM)	OD (600nm) = 0.522, pH 7.07	-
본 배양	150,000 mℓ	37°C, 100 rpm, 80FL, 0.3Kg/cm ² , OD (600nm) = 2.04 pH 8.02	16 hr
농축 회수	≒ 16,000 mℓ	Membrane Filter (0.2 µm) 2 ea	6 hr
원심 세척	≒ 8,000 mℓ	4,500 rpm, 30 min	3 hr
보관	≒ 8,000 mℓ	1.500 mℓ 소분, -40°C 냉실 보관	-

◎ 상기 표와 같이 Plate 배양을 거쳐서 flask에서 2회 전 배양을 실시하였음

◎ 본 배양을 200L 퍼멘터에서 수행하였음. IPTG induction은 O.D 0.5에서 실시하였고, 총 16 시간 추가 배양 후 채독하여 단백질 발현양을 확인하였음.

2) 실험결과

표 6. 샘플링 단계별 단백질 발현양

샘플명	샘플 제조법 (volume)	정량 시 농축 배수	정량 값 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	환산 값 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)*	총량 (g)**
전 배양	퍼멘터 배양 후 IPTG induction 전 (150 l)	약 6.6배	-	ND***	ND
본 배양	퍼멘터 배양 후 IPTG induction 후 (150 l)	약 5배	451	90.2	13,530
원심 세척	채균 및 원심세척 후 (약 8 l)	없음	428	428	3,424

* 환산 값 : 정량 시 농축 배수 반영하여 샘플링 당시 배양액의 1 mL 당 농도로 환산

** 총량 : 최종 확보된 단백질 총량 (환산 값 \times bulk 양)

*** ND : Not detection

◎ 200L 퍼멘터 배양 결과, mL 당 451 μg 의 FMDV O serotype multi-VP1e protein이 생산되는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 배양액 1 mL 당으로 환산한 결과 약 90 μg 의 항원양으로 확인되었음.

◎ 또한, 채균 및 원심세척 과정에서 단백질 총량이 약 4배 정도 감소한 결과가 있었기 때문에 단백질 발현 효율을 높이고, 회수 과정에서의 손실을 줄이기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 판단됨.

라. 연속 3 Lot 시험백신의 제조 (이하 임상시험 계획서 제출본 내의 내용 발췌)

◎ 이전 실험 결과들을 통해 대장균 시스템에서 생산 후 정제한 Multi-VP1e (O Jincheon-O Andong-O Manisa) 항원단백질을 이용하여 구제역 백신 제조 시, 돼지에서 O serotype에 대한 면역반응을 상용화 구제역 백신과 동등한 수준 이상으로 형성시킬 수 있다는 것을 확인하였고, 이를 위해 필요한 항원 함량은 1 dose 당 400 μg 임을 확인하였다. 이를 통해 야외 임상시험 및 백신의 장기 보존성 확인을 위한 연속 3 Lot 시험백신을 아래와 같이 제조하였음.

표 7. 연속 3 Lot의 시험 백신의 조성

제조 번호	항원 함량	제조 일자	제조 수량
KM-FMDVAC-O-1	400 μg	2018.04.09	5두 분 \times 50 vial
KM-FMDVAC-O-2	400 μg	2018.04.10	5두 분 \times 50 vial
KM-FMDVAC-O-3	400 μg	2018.04.11	5두 분 \times 50 vial

마. 연속 3 Lot 시험백신에 대한 실험실 내 평가

(1) 시험백신의 안전성

1) 실험방법

◎ 각 Lot 별로 8주령 이상의 구제역 음성 돼지 10마리씩을 공시하여 백신의 2두 분을 근육 접종 후, 접종 후 1~2시간 내에 과민반응 및 14일간의 관찰기간 내 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 설사 등의 부작용과 구제역 임상증상 유무를 확인하였음.

2) 실험결과

◎ 실험 결과, 3 Lot의 시험 백신 접종군 모두 관찰 기간 내내 아무런 임상증상 (발적, 동통, 부종, 침울 등) 없이 정상적으로 생존하여 안전성에 문제가 없는 것으로 확인하였음.

Table 8. 시험백신 3 Lot의 자돈 안전성 실험 결과 요약

제조번호	자돈 접종수	접종부위 및 접종량	관찰 일수	결과 (정상 개체 수 / 공시 수)					
				접종 직후	접종 1시간	접종 2시간	3일 이내	7일 이내	14일 이내
KM-FMDVAC-O -1	10마리	근육 4.0 ml	14일	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
KM-FMDVAC-O -2	10마리	근육 4.0 ml		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
KM-FMDVAC-O -3	10마리	근육 4.0 ml		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

(2) 시험백신의 면역원성

1) 실험방법

◎ 각 Lot 별로 8주령 이상의 구제역 음성 돼지 5마리씩을 공시하여 백신 1두 분을 근육접종하고 4주 후에 추가 접종함.

◎ 2차 접종 2주 후에 채혈하여 혈중 ELISA 항체가 및 중화 항체를 측정. (대조군 2두 별도 설정) * ELISA 항체가는 제조사의 매뉴얼에 따라 수행 (PrioCHECK® FMDV Type O Antibody ELISA)

● 중화항체가 측정법

◎ 가검 혈청을 56°C 30분간 비동화한 후 0.05 ml의 혈청을 96 well microplate에 넣고 세포

유지용 배양액 0.05 ml로 2진 희석함.

- ◎ 중화용 구제역 바이러스 (200TCID₅₀/0.1 ml)액을 0.05 ml씩 동량 혼합하여 37°C에서 60분간 감작시킨 후 5.0×10⁵cells/ml로 조정된 BHK-21 세포 또는 이와 동등한 감수성이 있는 세포 0.05 ml를 넣어 37°C에서 3~4일간 배양하여 관찰함.
- ◎ 매일 현미경으로 관찰하여 CPE에 의한 양성과 음성을 판정한다. 혈청역가는 CPE를 저지한 최고 혈청 희석배수의 역수를 역가로 나타냄.

2) 실험결과

- ◎ 백신 접종 개체에 대하여 commercial ELISA kit로 [PrioCHECK® FMDV Type O Antibody ELISA] 항체를 측정된 결과, 모든 개체가 PI 값 50% 이상으로 항체 양성으로 확인되었음. (중화항체가 결과 추후 보완)

표 9. 시험백신 3 Lot의 면역원성 측정 결과

구분		중화항체가	항체 양성율(%)*
KM-FMDVAC-O-1	1	추후 제출	100 %
	2	"	
	3	"	
	4	"	
	5	"	
KM-FMDVAC-O-2	1	"	100 %
	2	"	
	3	"	
	4	"	
	5	"	
KM-FMDVAC-O-3	1	"	100 %
	2	"	
	3	"	
	4	"	
	5	"	
대조군	1	< 2	0 %
	2	< 2	

(3) 시험백신의 물리화학적 성상

1) 특성시험

◎ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물과 이물의 유무를 1000룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사하였음. 그 결과, 유백색의 액제로 특별한 성상의 변화 없이 자체 기준에 적합한 것으로 확인되었음.

표 10. 시험백신 3 Lot의 특성시험 결과

제조번호	제조직후
KM-FMDVAC-O-1	적 합
KM-FMDVAC-O-2	적 합
KM-FMDVAC-O-3	적 합

2) 무균시험

◎ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 각각의 Lot에 대하여 무균검사법에 따라 Lot별로 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22 °C 및 37 °C에서 각각 배양 관찰하였음. 그 결과, 무균상태가 확인되었음.

표 11. 시험백신 3 Lot의 무균시험 결과

제조번호	온도	배지	제조직후
KM-FMDVAC-O-1	22 °C	NA	-*
		NB	-
		Thio	-
	37 °C	NA	-
		NB	-
		Thio	-
KM-FMDVAC-O-2	22 °C	NA	-
		NB	-
		Thio	-
	37 °C	NA	-
		NB	-
		Thio	-
KM-FMDVAC-O-3	22 °C	NA	-
		NB	-
		Thio	-
	37 °C	NA	-
		NB	-
		Thio	-

3) 수소이온농도시험

◎ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 각 Lot에 대한 수소이온농도를 측정한 결과, pH 6.0~8.0으로 정상 범위내로 측정되었다.

표 12. 시험백신 3 Lot의 수소이온농도시험 결과

제조번호	제조직후
KM-FMDVAC-O-1	7.25
KM-FMDVAC-O-2	7.31
KM-FMDVAC-O-3	7.28

4. 연구성과(해당되는 성과만 기재)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
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	15	20		25		10							15		15					
최종목표	3	3		1		1					5	2		6		3	1			
1 차 년 도	목 표	1									1			1	1					
	실 적	3									3			1	3					
2 차 년 도	목 표	1	1								2	1		2	1	1				
	실 적	2	1								5	1		19	2					
3 차 년 도	목 표	1	1		1						1	1		2	1					
	실 적		3		1						1			9	4					
소 계	목 표	3	2		1						4	2		5	3	1				
	실 적	5	4								9	1		29	9					
종료 1차년도		1				1					1			1						
종료 2차년도																				
종료 3차년도																				
소 계		1				1					1			1						
합 계	3	3		1		1					5	2		6	3	1				

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Infection-specific phosphorylation of glutamyl-prolyl tRNA synthetase induces antiviral immunity	Nature Immunology (IF: 21.8)	이현철 (주저자) 이종수 (교신)	17			SCI	2016.09.05	
2	Inhibitory Effects of an Aqueous Extract from Cortex Phellodendri on the Growth and Replication of Broad-Spectrum of Viruses <i>In vitro and In vivo</i>	BMC Complementary and Alternative Medicine (IF: 2.11)	김재훈 (주저자) 이종수 (교신)	16			SCIE	2016.08.02	
3	Mucosal vaccination of conserved sM2, HA2 and cholera toxin subunit A1 (CTA1) fusion protein with poly gamma-glutamate/chitosan nanoparticles (PC NPs) induces protection against divergent influenza subtypes.	Veterinary Microbiology (IF: 2.62)	이현철 (주저자) 이종수 (교신)	201			SCI	2017.01.21	
4	Coptidis Rhizoma extract inhibits replication of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by inducing antiviral state.	Journal of Microbiology (IF: 1.92)	김재훈 (주저자) 이종수 (교신)	55			SCIE	2017.05.28	
5	FAS-associated factor-1 positively regulates Type I interferon response to RNA virus infection by targeting NLRX1.	PLOS pathogens (IF: 6.6)	이종수	13			SCI	2017.05.22	
6	Rubicon modulates antiviral type I IFN signaling by targeting IRF3 dimerization.	Journal of Virology (IF: 4.66)	이종수	91			SCI	2017.05.03	
7	Inhibition of HPAI virus infection by a small peptide derived from vFLIP of KSHV through its direct destabilization of viruses	Scientific Reports (IF: 4.25)	이종수	7			SCI	2017.05.03	
8	Inhibitory effects of Bee Venom and its components against viruses <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i>	Journal of Microbiology (IF: 1.92)	이종수	54			SCIE	2016.11.26	
9	Dense Granule Protein-7 (GRA-7) of <i>Toxoplasma gondii</i> inhibits viral replication <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Journal of Microbiology (IF: 1.92)	이종수	55			SCIE	2017.10.16	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2015 International Meeting of the Federation of Korea Microbiological Societies	이종수외	2015년 11월 6일	고양시 일산 Kintex	대한민국
2건	2016 International Conference of the Korea Society for Molecular and Cellular Biology	이종수외	2016년 10월 12일-14일	서울 COEX	대한민국
6건	2016 International Conference of the Korea Society for Microbiology and Biotechnology	이종수외	2016년 6월 28일-30일	부산 BEXCO	대한민국
1건	대한백신학회	송재민외	2016년 9월 29일	서울 가톨릭대학교	대한민국
1건	International Conference on Vaccines	송재민외	2017년 2월 21일	미국 볼티모어	미국
6건	KMB 2017 국제학술대회 및 정기학술대회	이종수외	2017년 6월 28-30일	부산 BEXCO	대한민국
3건	IUMS 2017	이종수외	2017년 7월 17-21일	Sands Expo & Convention Center	싱가포르
3건	2017 International Conference of the Korea Society for Molecular and Cellular Biology	이종수외	2017년 9월 12일-14일	서울 COEX	대한민국
3건	11 th Vaccine Congress	이종수외	2017년 9월 17일-20일	Paradise Point, 샌디에고	미국
1건	Cytokine 2017	이종수외	2017년 10월 29일-11월 2일	Kanazawa	일본
7건	KMB 2018 국제학술대회 및 정기학술대회	이종수외	2018년 6월 27-29일	여수 EXPO	대한민국
1건	2018년 제13차 대한백신학회	이종수	2018년 9월 28일	가톨릭대학교 성의교정	대한민국

다. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
	트립토판- <i>tRNA</i> 합성효소 단백질을 함유하는 조성물의 백신보조제로서의 활용	대한민국	충남대학교	2016.07.05	10-2016-0084656	충남대학교	2017.04.18	제1729547호	50%
	구제역의 가용 다가항원 제조 및 이를 이용한 구제역 백신	대한민국	농림축산검역본부, 충남대학교	2016.12.05	10-2016-0164441				50%
	병원체 유래 항원을 포함하는 융합단백질 및 이를 포함하는 바이러스 유사입자	대한민국	성신여자대학교	2016.10	10-2016-0084826	성신여자대학교	2018.05	제10-1861578호	30%
	EPRS 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 항RNA-바이러스용 조성물	대한민국	한국생명공학연구원	2017.08.23	10-2017-0106914	한국생명공학연구원	2018.04.24	제10-1853403호	25%
	트립토판- <i>tRNA</i> 합성효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이의 용도	대한민국	충남대학교	2017.09.15	10-2017-0118709	충남대학교	2018.08.01	제10-1886415호	50%

라. 전문연구 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
	수의예방학 인력양성	2016		3			0			0				
	수의예방학 인력양성	2017		1			0			0				
	수의예방학 인력양성	2017	3	1			0	0		0				

마. 기술거래(이전) 등

8	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
		구제역 바이러스의 가용성 다가 항원단백질 및 이의 용도	(주)코미팜	2018.10.15	선급 기술료: 금일천만원정 경상 기술료: 해당기술이 적용된 제품 총매출액의 1.35%	

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

연구개발의 최종목표
<ul style="list-style-type: none">■ 구제역 예방용 재조합 백신 생산시스템 개발 및 실험동물 효능 검증 연구● 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 주요 항원을 발현할 수 있는 발현시스템 확보● 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 항원 발현시스템의 구축● 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물에서의 구제역바이러스 방어 효능 검증● 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 항원 발현율 달성● 구제역 예방을 위한 안전하고 효과적인 재조합백신 대량 생산시스템 구축● 재조합 구제역 백신의 백신 품목허가 제출

3-2. 목표 달성여부

연구목표	달성도	달성한 연구내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 주요 항원을 발현할 수 있는 발현시스템 확보 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 주요 항원(O, A, Asia type 항원 에피토프들)을 가용성으로 발현할 수 있는 대장균 발현시스템 확보 ◎ 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 주요 항원 에피토프를 막표면에 발현하는 Hybrid-VLP 발현 Baculovirus 발현시스템 확보
<ul style="list-style-type: none"> ● 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역 바이러스 재조합 항원 발현시스템의 구축 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 다양한 혈청형의 구제역 바이러스 VP1 단백질내 주요 항원 에피토프의 정보를 이용하여 이를 합성하고 재조합 항원으로 발현하는 데 1-2달 정도의 단기간내 교체가 가능한 발현시스템 확보
<ul style="list-style-type: none"> ● 재조합 백신의 실험동물 및 목적동물에서의 구제역바이러스 방어 효능 검증 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 3가 serotype용 Multi-VP1 epitope (O/man-A/Poch-Asia/Sha, O/Jin-A/Poch-Asia/Sha) 항원단백질과 O serotype용 Multi-VP1 epitope (O/Jin-O/An-O/Man) 항원단백질의 실험동물 및 목적동물에서의 구제역바이러스 방어 효능(중화항체 형성능) 검증
<ul style="list-style-type: none"> ● 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 항원 발현을 달성 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 구제역 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있는 주요 항원들(O, A, Asia type 항원 에피토프들)을 가용성으로 대장균의 세포질에서 발현할 수 있는 발현시스템을 이용하여 항원생산에 대한 경제성을 확보
<ul style="list-style-type: none"> ● 구제역 예방을 위한 안전하고 효과적인 재조합백신 대량 생산시스템 구축 	80%	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 대장균의 세포질에서 가용성으로 발현할 수 있는 발현시스템을 이용하여 대장균의 대량배양을 통한 대량 생산시스템을 확보하였음. 그러나 정제공정 확립의 완전한 확립은 구축하지 못하였음.
<ul style="list-style-type: none"> ● 재조합 구제역 백신의 백신 품목허가 제출 	70%	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 재조합 구제역 백신의 임상시험 계획서 제출

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

(1) 재조합 항원의 대량 생산 및 정제 공정 확립

① 목표 미달성 사유

- 재조합 항원의 대량 생산 공정을 연구하는 초기 과정에서 FPLC 등을 활용한 고순도 항원 정제를 고려하였으나, 항원 발현 시스템의 특성상 고농도의 구제역 바이러스 다가 항원이 (O1 manisa, O jincheon, O andong의 multi-VP1e protein) 수용성으로 발현된다는 점, 그리고, 이를 정제 하는 과정에서 항원 단백질의 손실이 크고, 새로운 생산 설비를 구축하는 과정에서 막대한 투자 비용이 발생한다는 점 (이는 곧 생산 단가 상승으로 이어져 제품의 경쟁력

을 저하시킴), 마지막으로 고순도 정제 항원이 아니더라도 백신을 제조하였을 때 안전성이나 면역원성에 문제가 되지 않는다는 점 등을 종합적으로 고려하여 생산 공정에 대한 연구 방향을 수정하였음.

② 차후 대책

- 궁극적으로 재조합 항원의 정제 수준을 낮춰 항원 발현 시스템의 특성을 최대한 살리고, 항원 제조 단가를 낮춰 백신의 생산 효율을 높이고자 함.
- 이를 위해 주관연구기관과 후속 연구를 수행 중에 있으며, 백신의 효력과 항원 정제 수준 및 함량과의 상관관계를 정확히 규명하여, 추후 제품화될 백신에 적용코자 함.
- 향후 상업화를 위한 재조합 항원의 효율 및 안정성 위해 심층적인 연구(재조합 항원 대량생산 공정 및 재조합 항원의 안정성연구)를 수행하여 상품화 목표를 위해 노력할 예정임.
- 즉, 재조합 항원의 대량생산을 위한 정제시스템 구축에 있어 대장균의 원심, 세척, 파쇄 및 다양한 membrane을 이용한 filtration, ultrafiltration 등의 단계들에 대해 향후 고도화 연구를 수행하여 대장균의 LPS를 제거함과 동시에 경제적인 수준의 재조합 항원 수율을 높이는 노력을 할 예정임.

(2) 재조합 구제역 백신의 야외 임상시험 실시

① 목표 미달성 사유

- 재조합 항원의 대량 생산 공정을 연구하는 과정에서 방향 수정이 불가피 하였고, 이로 인해 재조합 구제역 백신의 제품화 단계가 지연된 측면이 있으며, 최근 들어 A 혈청형의 구제역이 새롭게 발생하는 등 국내 농장 환경이 여전히 구제역 바이러스로부터 자유롭지 못하기 때문에 야외 임상시험을 실시하기 위한 농장 섭외에 많은 시간과 노력이 필요하였음.

② 차후 대책

- 재조합 구제역 백신에 대한 임상시험 계획서 제출이 다소 지연되었으나, 3개 임상시험 농장에 대한 섭외가 완료되었고, 임상시험을 위한 임상시험 계획서가 검역본부에 정상적으로 제출되었기 때문에 재조합 구제역 백신은 정상적으로 제품화 단계에 진입하였다고 볼 수 있으며, 임상 시험이 승인되는 즉시, 야외 임상시험을 수행하는데 있어서 아무런 문제가 없을 것으로 사료됨.

(3) 재조합 구제역 백신의 제조 및 판매 승인을 위한 품목허가서류 신청

① 목표 미달성 사유

- 품목허가서류를 제출하기 위해서는 임상시험 계획서 승인, 야외 임상시험 결과, 시험백신의 장기보존성 평가 결과 등이 필요하기 때문에 이전 절차들의 지연으로 인해 품목허가서류 제출 또한 함께 지연된 측면이 있음.

② 차후 대책

- 임상시험 계획서가 검역본부에 제출됨으로써 재조합 구제역 백신이 본격적인 제품화 단계에

돌입하였고, 시험백신의 장기보존성 평가를 코미팜에서 수행할 능력이 있고, 연속적으로 수행해나가고 있기 때문에, 시간의 문제일 뿐, 제품화 절차상에는 문제가 없을 것으로 판단하고 있음.

(4) 구제역 재조합 백신 개발을 위한 보좌제 연구

- 본 연구에서는 구제역 재조합 항원에 WOW type의 ISA201을 사용하여 실험을 수행하였음. 향후 OW 혹은 WO type 보좌제와의 혼합백신 비교 연구를 통한 재조합 백신 효율 연구를 수행할 예정임.

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

가. 연구개발결과의 활용방안

- 기존의 불활화 형태 구제역 백신을 생백신과 사백신의 장점을 모두 가지고 있는 새로운 형태의 차세대 재조합 백신으로 대체가 가능한 기술력 제공.
- 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 개발로 우리나라 실정에 맞는 구제역 백신 제품화에 활용
- 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 항원 발현을 달성 기술의 다른 질병으로의 활용
- 다양한 시스템 유래의 항원 단백질 분리 정제 기술 구축에 의한 기술의 활용
- 구제역 재조합 백신 개발 기술의 동물백신회사를 통한 재조합 구제역 백신의 제조 및 판매 승인을 통한 제품화
- 국내 동물 백신 산업 시장 확대 및 수출로의 활용
- 특허등록을 통한 지적재산권 확보
- 국제저명학술지 논문발표를 통한 개발 원천기술의 우수성 활용

나. 연구개발결과의 기대성과

● 기술적 측면

- 본 연구에 의해 제작된 항원 혹은 재조합백신의 개발은 현재 불활화백신이 갖고 있는 기술적 단점을 보완할 수 있을 것으로 기대
- 구제역의 국가적 대유행 상황에 대한 긴급 억제력 및 백신주권의 확보
- 효과적인 동물 질병 억제를 위한 백신 면역력을 향상시키는 기반기술의 확보
- 구제역 예방을 위한 안전하고 효과적인 재조합백신 생산시스템 확보
- 사업화 가능한 수준의 경제성이 확보되는 항원 발현을 달성 기술 구축
- 백신 제품 개발을 위한 다양한 유래의 항원 단백질 분리 정제 기술 구축
- 목적동물에 병원성이 없고, 안전하게 생산이 가능한 항원발현 시스템 구축
- 기존 백신항원 발현 시스템과 차별화된 차세대 구제역 백신 생산을 위한 원천기술 확보
- 구제역에 대한 신속 방어 및 지속면역 유도 가능 백신 후보물질 확보
- 단기간내 방어항원의 교체가 가능한 구제역바이러스 재조합 백신 기술 개발
- 신 변종 바이러스 출현에 따른 백신 개발에 신속하게 적용 가능한 기술적 확보
- 본 기술들은 구제역을 비롯한 축산에의 적용이외에 궁극적으로 인간의 다양한 질병을 예방하기 위해 활용될 수 있는 기술임.

● 경제적·산업적 측면

- 자체 구제역 백신 생산 및 제품화에 따른 수입 대체효과 및 그에 따른 제반 비용을 감소시켜 기업의 이윤 창출
- 이러한 구제역백신 개발을 위한 연구개발은 구제역의 발생을 예방하고 구제역의 확산을 신속하게 차단하게 함으로서 가축의 손실뿐 아니라 구제역 확산을 막기 위한 막대한 인원과 장비

의 소요를 줄이고, 매몰보상비를 포함한 경제적 산업적 손실을 줄여 줄 수 있을 것으로 기대됨.

- 본 연구의 발현시스템 개발은 구제역뿐만 아니라 다른 수의학적 질병원인체에 대해서 그 범위를 확대 적용이 가능하여 그 활용가치가 높을 것으로 기대됨.
- 본 연구개발로 새로운 구제역백신의 개발은 백신의 수입대체 효과 및 국내 고유의 기술 적용을 통하여 국제 시장에 기술 이전 및 해외수출을 통한 국부창출이라는 이중 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대됨.
- 비숙련자가 직접 실시간으로 바이오 리스크를 모니터링하고 관제기관과의 정보를 공유함으로써 감염성 질환이 발생 시 빠른 대처와 처방이 가능함으로서 이에 따른 경제적인 손실을 최소화할 수 있을 것임.

붙임. 참고문헌

1. Yimei Cao, Zengjun Lu, Yanli Li, Pu Sun, Dong Li, Pinghua Li, Xingwen Bai, Yuanfang Fu, Huifang Bao, Chunxue Zhou, Baoxia Xie, Yingli Chen, Zaixin Liu. Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs. *Antiviral Research* (2013) 97.
2. Dandan Zhang, Hongmei Li, Zhongsheng Zhang, Shuhong Sun, Ziqiang Cheng, Jianzhu Liu, Peng Zhao, Qingya Ren, Huijun Guo. Antibody responses induced by recombinant ALV-A gp85 protein vaccine combining with CpG-ODN adjuvant in breeder hens and the protection for their offspring against early infection. *Antiviral Research* (2015) 116.
3. Yan-mei Dong, Guo-guang Zhang, Xiao-jun Huang, Liang Chen, Hao-tai Chen. Promising MS2 mediated virus-like particle vaccine against foot-and-mouth disease. *Antiviral Research*. (2015) 117 11:43.
4. Yu-Ching Sua, Kiew-Lian Wana, Rahmah Mohameda, Sheila Nathana. Immunization with the recombinant Burkholderia pseudomallei outer membrane protein Omp85 induces protective immunity in mice. *Vaccine* (2010) 28 11:5011.
5. Meng-Shiou Lee, You-Cheng Hseu, Guan-Hua Lai, Wen-Te Chang, Hsi-Jien Chen, Chi-Hung Huang, Meng-Shiunn Lee, Min-Ying Wang, Jung-Yie Kao, Bang-Jau You, Wen- Hsin Lin, Yi-Yang Lien and Ming-Kuem Lin. High yield expression in a recombinant E. coli of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development. *Microbial Cell Factories*. (2011) 10:56.
6. Kyoung Ok Jang, Jong-Hwa Park, Hyun Ho Lee, Dae Kyun Chung, Wonyong Kim, In Sik Chung. Expression and immunogenic analysis of recombinant polypeptides derived from capsid protein VP1 for developing subunit vaccine material against hepatitis A virus. *Protein Expression and Purification*. 100 (2014).
7. Verdaguer N, Mateu MG, Andreu D, Giralt E, Domingo E, Fita I. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J* (1995) 14:1690-6.
8. B. Mohana Subramanian, M. Madhanmohan, Rajan Sriraman, R.V. Chandrasekhar

- Reddy, S.Yuvaraj, Kankipati Manikumar, S. Rajalakshmi, S.B. Nagendrakumar, Samir Kumar Rana, V.A.Srinivasan. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. *Antiviral Research*. 96 (2012) 288-295.
9. Yimei Cao, Zengjun Lu, Pu Sun, Yuanfang Fu, Feipeng Tian, Xiaofang Hao, Huifang Bao, Xiangtao Liu, Zaixin Liu. Pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of foot-and-mouth disease virus and a T-cell immunogen shows enhanced immunogenicity in mice. *Virology Journal* (2011) 8:77.
 10. S.A. Bhat, P. Saravanan, M. Hosamani, S.H. Basagoudanavar, B.P. Sreenivasa, R.P. Tamilselvan, R. Venkataramanan. Novel immunogenic baculovirus expressed virus-like particles of foot-and-mouth disease (FMD) virus protect guinea pigs against challenge. *Research in Veterinary Science* 95 (2013) 1217-1223.
 11. Kumar R, Hosamani M, Sreenivasa BP, Kotyal A, Venkataramanan R. Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural Protein, 3D in Insect Cells and its Application in Detection of Anti-FMDV Antibodies. *Indian J Virol*. (2012) 23(3):326-32.
 12. Takeuchi, O. Akira, S. Pattern Recognition Receptor and Inflammation and Inflammation. (2010) *Cell*. 140(6):805-820.
 13. Lee, T. H. Song, H. J. Park, C. S. Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma. (2014) *Asia Pac Allergy*. 4(4): 187-196.
 14. Denis Gerlier, Douglas S. Lyles. Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: toward a rational model. (2011) *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 75(3): 468-490.
 15. Lei, X. Xiao, X. Wang, J. Innate immunity evasion by Enteroviruses: insight into virus-host interaction. (2016) *Viruses*. 8(1): 10.3390/v8010022
 16. Grubman, M. J. Moraes, M. P. Diaz-San Segundo, F. Pena, L. de los Santos, T. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. (2008) *FEMS Immunol Med Microbiol*. 53(1): 8-17.
 17. Whitton, J. L. Cornell, C. T. Feuer, R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. (2005) *Nat Rev Microbiol*. 3(10): 765-776.

18. Gao, Y. Sun, S. Q. Guo, H. C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. (2016) *Virol J.* 13:107.
19. V. Quattrocchi, P. Molinari, C. Langellotti, V. Gnazzo, O. Taboga, P. Zamorano. Co-inoculation of baculovirus and FMDV vaccine in mice, elicits very early protection against foot and mouth disease virus without interfering with long lasting immunity. *Vaccine* 31 (2013).
20. 농림축산검역본부 용역연구사업 “바이러스 벡터 및 재조합 기술 이용 구제역 백신 개발” 2015년 보고서.

주 의

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