

316043-3

가
금
질
병
방
제
를
위
한
조
류
백
신
용
백
신
보
조
제
개
발
및
상
용
화

2019

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개(○)발간등록번호()

발간등록번호

11-1543000-002673-01

가금 질병 방제를 위한 조류백신용 백신보조제 개발 및 상용화

최종보고서

2019.04.01.

주관연구기관 / (주)중앙백신연구소
협동연구기관 / 한국생명공학연구원
협동연구기관 / 충남대학교
협동연구기관 / 충북대학교

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가축질병대응기술개발사업 가금 질병 방제를 위한 조류백신용 백신보조제 개발 및 상용화”(개발기간 : 2016. 05. 19 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 04. 01.

주관연구기관명 : (주)중앙백신연구소 (대표자) 윤 인 중
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김 장 성
협동연구기관명 : 충남대학교 (대표자) 이 영 석
협동연구기관명 : 충북대학교 (대표자) 최 상 훈



주관연구책임자 : 유 성 식
협동연구책임자 : 최 의 성
협동연구책임자 : 이 중 수
협동연구책임자 : 모 인 필

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라
보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316043-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.05.19.~ 2018.12.31.	단 계 구 분	3단계/ 총 3단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	가금 질병 방제를 위한 조류백신용 백신보조제 개발 및 상용화			
연구책임자	유 성 식	해당단계 참여연구원 수	총: 25명 내부: 25명 외부: 0명	해당단계 연구개발비 (천원)	정부: 500,000 민간: 170,000 계: 670,000
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비 (천원)	정부: 1,330,000 민간: 450,000 계: 1,780,000
연구기관명 및 소속부서명	(주)중앙백신연구소			협동기관 : 한국생명공학연구원 협동기관 : 충남대학교 협동기관 : 충북대학교	
국제공동연구	상대국명:	상대국 연구기관명:			
위탁연구	연구기관명:	연구책임자:			

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	회합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	SCI급 11건 비SCI급1건	특허출원 (6건) 10-2016-0084656 10-2017-0118709 10-2018-0095792 10-2018-0159687 10-2018-0141588 10-2019-0012317 특허등록 (2건) 10-1729547 10-1886415									

국가과학기술중합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

1. 특허(출원 6건, 등록 2건)

- 1) 특허출원 (10-2016-0084656)
 - 트립토판-tRNA 합성효소 단백질을 함유하는 조성물의 백신보조제로서의 활용
- 2) 특허출원 (10-2017-0118709)
 - 트립토판-tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이의 용도
- 3) 특허출원 (10-2018-0159687)
 - 클루이베로마이세스 막시아누스 균주에서 유도 발현이 가능한 프로모터 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템
- 4) 특허출원 (10-2018-0095792)
 - 프럭탄을 함유하는 바이오 매스로부터 바이오 에탄올과 면역증강 프로바이오틱 효모 균체를 동시 생산하는 방법
- 5) 특허출원 (10-2018-0141588)
 - 안정성과 면역원성이 증대된 동물용 백신보조제 조성물
- 6) 특허출원 (10-2019-0012317)
 - 동물용 백신보조제 조성물
- 7) 특허등록 (10-1729547)
 - 트립토판-tRNA 합성효소 단백질을 함유하는 조성물의 백신보조제로서의 활용
- 8) 특허등록 (10-1886415)
 - 트립토판-tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이의 용도

2. 기술이전 (2건)

- 1) ‘분자 면역증강제 생산 노하우 기술’ 한국생명공학연구원과 기술이전
- 2) ‘자원 조성물의 백신보조제로서의 활용’ 충남대학교와 기술이전

3. 사업화(제품화 6건)

- 1) 개발된 조류용 백신보조제의 상품화: 제품명 CAvant WO-A1
- 2) 개발된 조류용 백신보조제가 적용된 조류 백신의 상품화: 제품명 포울샷 NEO-6
- 3) 개발된 조류용 백신보조제가 적용된 조류 백신의 상품화: 제품명 포울샷 QX-Flu4
- 4) 개발된 조류용 백신보조제가 적용된 조류 백신의 상품화: 제품명 포울샷 QX-Flu5

-
- 5) 개발된 면역증강제를 포함하는 조류용 사료첨가제 상품화: 제품명 포올가드
 - 6) 면역증강제가 포함된 조류용 백신보조제 상품화: 제품명 CAWIO-A

4. 고용창출 (정규직 채용 3명)

- 1) 박상찬(중앙백신연구소)
- 2) 김민호(중앙백신연구소)
- 3) 강현정(중앙백신연구소)

5. 기술인증 (1건)

- 1) 농림축산식품부 인증 NET 신기술 인증
기술명 ‘안정성이 증대된 W/O type 백신보조제 유화기술’

6. 논문 (SCI 11건, 비SCI 1건)

- 1) J Microbiol. 2017 Jun;55(6):488-498
- Coptidis Rhizoma extract inhibits replication of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by inducing antiviral state.
 - 2) J Microbiol. 2017 Nov;55(11):909-917
- Dense Granule Protein-7 (GRA-7) of Toxoplasma gondii inhibits viral replication in vitro and in vivo.
 - 3) PLoS Pathog. 2018 Sep 21;14(9):e1007302.
- FAS-associated factor-1 positively regulates type I interferon response to RNA virus infection by targeting NLRX1
 - 4) Scientific Reports volume 7, Article number: 4875 (2017)
- Inhibition of highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus by a peptide derived from vFLIP through its direct destabilization of viruses
 - 5) BMC Complementary and Alternative Medicine (2016) 16:265
- Inhibitory effects of an aqueous extract from Cortex Phellodendri on the growth and replication of broad-spectrum of viruses in vitro and in vivo
 - 6) J Microbiol. 2016 Dec;54(12):853-866
- Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo.
 - 7) Vet Microbiol. 2017 Mar;201:240-251
- 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
 - 8) J Virology. 2017 Jul;91(14)
- Rubicon Modulates Antiviral Type I Interferon (IFN) Signaling by Targeting IFN Regulatory Factor 3 Dimerization
 - 9) J Biomed Transl Res 2018;19(1):021-025 (비SCI급)
- The anti-Influenza effect of a water soluble herbal extract from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) *in vivo*
 - 10) Biotechnol. Bioeng. 115:694-704 (2018)
- Ty1-fused Protein-body Formation for Spatial Organization of Metabolic Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*.
 - 11) J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 45:239-251 (2018)
- High-level recombinant production of squalene using selected strains of *Saccharomyces cerevisiae*.
-

7. 학술대회 발표 (해외 11건, 국내 12건)

1) 해외 (포스터 11 건 발표)

- Coptidis Rhizoma extract inhibits replication of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by inducing antiviral state
- Mucosal Immunization with Lactobacillus-displayed CTA1-conjugated sM2HA2 of Influenza Virus induces Broad Protective Immune Responses in Balb/c Mice
- Mucosal immunization of conserved sM2, HA2 of Influenza virus and cholera toxin subunit A1 (CTA1) fusion protein with PC nanoparticles induces protection against divergent influenza subtypes
- Inactivated Enterovirus 71 (EV71) Adjuvanted with PC Nanoparticles Induces High Cellular and Humoral Immune Responses in BALB/c Mice
- Mucosal Immunization with Lactobacillus-displayed CTA1-conjugated influenza sM2HA2 induces Broad Protective Immune Responses against Divergent Influenza Subtypes
- Mucosal administration with recombinant Lactobacillus-displayed CTA1-conjugated PEDSe induces neutralizing immune responses against porcine epidemic diarrhea (PED) virus
- Production of porcine circovirus nucleocapsid protein in Saccharomyces cerevisiae
- Recombinant production of SpaA, a subunit vaccine for swine erysipelas, in Saccharomyces cerevisiae
- Surveillance of amino acid substitutions in avian influenza viruses isolated from wild birds from south korea, 2014-2016
- Evaluation of safety of multivalent oil based vaccines containing different adjuvant and immunostimulant materials
- Prevalence of salmonella spp. isolated from commercial duck farms in south korea

2) 국내 (포스터 12건 발표)

- KMB 2017 국제학술대회 및 정기학술대회 (6건)
- KMB 2018 국제학술대회 및 정기학술대회 (6건)

8. 인력양성 (2건)

- 수의학 관련 석사 인력양성 2명

9. 정책활용 (1건)

- 농림축산식품부 조류인플루엔자 방역과에 정책건의 건의내용 ‘고병원성 AI 항원뱅크 구축 사업의 조류용 백신보조제 사용 제안’

10. 홍보전시 (3건)

- 1) IPET 농림식품기술기획평가원 소식지 창(2018 vol73)
 - 신기술인증업체 ‘안정성 및 효능성 뛰어난 백신보조제 개발’
- 2) 2018 EuroTier CAVant WO 소개 및 홍보전시
- 3) 파키스탄 CAVAC 양계제품 런칭 세미나. 2018.04

11. 기타 (1건)

- 한국연구재단 2018 원천기술개발사업 신규 연구과제 선정
과제명 ‘안전성과 효능성이 최적화된 구제역 백신보조제 개발 및 적용’
-

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>< 최종목표 > 가금 질병 방제를 위한 조류백신용 백신보조제 개발 및 상용화</p> <p>< 세부목표 ></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 가금용 백신에 적합한 백신보조제 개발을 위한 에멀전 기술 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) 가금용 백신에 적합한 오일 백신보조제의 개발 및 에멀전 제제화 및 평가 2) 가금용 백신에 적합한 재조합 분자면역증강제 발굴 및 선발 3) 가금용 백신에 적합한 신규의 분자면역증강 물질 발굴 및 개발 4) 개발된 백신보조제 및 항원을 함유한 백신의 안전성 및 효능 평가 2. 개발된 백신보조제를 포함한 조류 핵심 질병 혼합백신의 평가 <ol style="list-style-type: none"> 1) 개발된 백신보조제를 포함하는 조류 핵심질병 혼합백신의 개발 및 평가 2) 분자면역증강제의 재조합 발현 시스템 확립 및 효능 평가 3) 신규 분자면역증강 물질들의 면역증강 효능 검증 및 기작규명 4) 개발된 면역증강제, 백신보조제 및 혼합백신의 평가 3. 개발된 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 상용화 <ol style="list-style-type: none"> 1) 조류 핵심질병 혼합백신의 허가 신청 및 백신보조제의 대량생산 방안연구 2) 분자면역증강제의 대량생산 시스템 구축 및 경제성 생산기술 개발 3) 신규 면역증강 물질의 조류용 백신 적용 및 효능 검증 4) 개발된 백신보조제 종류별 시험백신의 효능 평가 <p>< 연구개발 내용 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ◎ 가금용 오일 백신보조제의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 후보군 유화제들의 조성별 유화제조 조건 확립 및 특성분석 - 후보군 유화제로 조성된 유화액의 안정성 평가 - 유화액의 항원 방출 시험 - 수상액의 부피에 따라 적합한 백신보조제 개발 - 이화학분석 ◎ 가금용 오일 백신보조제가 포함된 혼합백신의 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 혼합백신 제제화 평가 - 개발된 가금용 오일 백신보조제의 SPF 닭에서의 항체가 지속성 평
------------------------	---

가

- ◎ 가금용 오일 백신보조제가 포함된 혼합백신의 임상시험
 - 시험백신 제조내역
 - 시제품의 3개월 마다 안전시험 및 효능시험 반복
 - 야외임상평가 결과
- ◎ 가금용 오일 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 상용화
 - 제조시설 구축 (논산 사진 및 설명)
 - 개발 제품명 및 상품의 상표등록
 - 신기술 인증
- ◎ 면역증강제가 포함된 가금용 오일 백신보조제의 개발
 - 분자면역증강제가 함유된 백신보조제의 효능평가
 - 분자면역증강제 함유 백신보조제 평가
 - 분자면역증강제 함유 백신 효능 평가
- ◎ 신규의 TLR agonist 기반 분자면역증강 물질 개발
 - 병원체 (세균 및 바이러스) 감염시 사람 혹은 마우스 WRS 단백질의 분비 검증
 - 대장균 발현시스템을 이용한 수용성의 WRS 단백질 발현 및 실험실적 정제
 - WRS 단백질에 의한 면역세포의 선천면역 자극 효능 검증
 - 마우스 WRS 단백질에 의한 면역세포의 자극 효과는 TLR4를 필요로 함
 - WRS 단백질에 의한 항원의 체액성면역 증진 효능 검증
 - WRS 단백질에 의한 항원의 세포성면역 증진 효능 검증
 - WRS 단백질에 의한 항원의 지속적 면역 증진 효능 검증
 - Influenza A virus의 M2HA2 항원을 이용한 Influenza in vivo challenge 모델에서의 hWRS의 효능검증
 - Chicken bone marrow derived macrophages (cBMDMs)를 이용한 WRS의 면역증강능 확인
 - FMDV-VP3와 IFN-lambda 재조합 단백질의 정제 및 *in vivo* 효능 검증
- ◎ 천연물 기반 신규의 면역증강 물질 개발
 - 천연물 기반 단일물질 Q의 효능시험
 - Chicken bone marrow derived macrophages를 이용한 면역증강 후보물질 탐색
 - 천연물 W314에 의한 면역증강 효능 검증
 - Chitosan, Squalene의 면역증강 효능 검증
- ◎ 인플루엔자 재조합항원을 이용한 백신보조제 면역원성 검증 및 백신 효능 검증 시스템 구축
 - M2HA2-Influenza A virus infection in vivo challenge 모델을 이용

	<p>한 CAVant WO-A1과 ISA70의 면역보조제 효능비교평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - H5N2 감염에 대한 CAVant WO-A1과 ISA70의 효능비교평가 - H9N2 감염에 대한 CAVant WO-A1과 ISA70의 효능비교평가 <p>◎ 닭에서 면역증강제의 세포성면역검증</p> <ul style="list-style-type: none"> - Chicken splenocytes에서의 CTL response 평가 시험 - 혈청에서의 CTL response 확인 - Splenocyte에서의 사이토카인 측정을 통한 CTL response 확인 - Splenocyte에서의 FACS 분석을 통한 CTL response 확인 <p>◎ 다양한 재조합 분자면역증강제 후보의 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - Heat shock protein, Flagellin, Hydrophobin, 스쿠알렌 <p>◎ 재조합 발현 시스템 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 효모발현 시스템 적용 - 대장균 발현 시스템 적용 <p>◎ 재조합 분자면역증강제 시료 생산</p> <p>◎ 분자면역증강제의 재조합 발현</p> <ul style="list-style-type: none"> - 분자면역증강제의 재조합 발현 - 분자면역증강제 후보의 항원-증강제 융합발현 형태의 시도 - 면역증강효과를 가지는 <i>Kluyveromyces marxianus</i> 효모 균주의 신규 재조합 발현 시스템 구축 - <i>Kluyveromyces marxianus</i> 균주를 활용한 분자면역증강제의 재조합 발현 <p>◎ 재조합 분자면역증강제 시료 생산 및 주관연구기관으로의 공급</p> <p>◎ 면역증강 프로바이오틱 효모 균주를 이용한 분자면역증강제 및 백신 항원 단백질 재조합 생산 기술개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>S. boulardii</i> 효모 균체의 발효 생산 - 분자면역증강제 squalene을 함유하는 <i>S. boulardii</i> 효모 균체 생산 기술개발 - <i>S. boulardii</i> 균주를 숙주세포로 사용한 백신 항원 단백질의 발현 <p>◎ <i>S. cerevisiae</i> 균주에서 분자면역증강제 squalene의 과생산 최적화 및 스케일-업</p> <ul style="list-style-type: none"> - 효모 <i>S. cerevisiae</i> 균주에서 squalene 과생산을 위한 발현 최적화 및 배양 최적화 - Squalene 생산 스케일-업을 위한 재조합 <i>S. cerevisiae</i> 균주의 30-L 발효배양 - Squalene의 non-GMO 생산을 위한 self-cloning 효모균주의 제조 <p>◎ 개발된 백신보조제(CAVant WO-A1) 함유 조류핵심질병(조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 전염성 기관지염, 산란저하증 등) 다가혼합백신의 실험실적 시험 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 백신보조제와 면역증강제에 따른 안전성 평가
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> - 백신보조제와 면역증강제에 따른 효능성 평가 - 시험 백신 접종 후 공격 접종 시 생존율 비교 ◎ 개발된 백신보조제(CAvant WO-A1) 함유 조류핵심질병(조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 전염성 기관지염, 산란저하증 등) 다가혼합백신의 야외실증시험 평가 - 다가혼합백신의 야외 실증 시험 농장 선정 및 백신 조성 - 다가혼합백신의 안전성 평가 - 다가혼합 시험백신의 효능성 평가 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 가금용 오일 백신보조제의 이화학분석, 항원방출속도 등의 다양한 분석 연구로 기술력 확보 ◎ 분자면역증강제 및 천연물 기반의 면역증강제의 발굴 및 메카니즘 연구로 기술력 확보 ◎ 국내 독자적, 창의적 에멀전 기술 창출로 가금류에 적합한 오일 백신보조제 개발 완료 ◎ 백신보조제의 생산 시스템 구축 및 상용화를 위한 사업화 방안마련 ◎ 가금 핵심질병 불활화 백신에 적용한 신제품 출시 ◎ 국내 독자적, 창의적 에멀전 기술 창출로 백신보조제 및 면역증강제의 국산화 ◎ 신규 개발된 면역증강제 관련 기술이전 2건 ◎ 특허출원 6건, 특허등록 2건 ◎ 제품화 6건 (백신보조제 2건, 백신보조제 적용 조류 백신 3건, 닭 사료첨가제 1건) ◎ SCI급 11건 게재, 학술발표 20건 이상 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 독자적인 국내 기술로 백신보조제 개발로 기존 수입 백신보조제 ISA70을 CAvant WO-A1으로 대체하여 자사에서 생산중인 백신에 적용/ 수입대체 효과 ◎ 백신 보조제 및 면역증강제의 자체상품화로 국내 및 해외(중국 및 중동) 백신보조제 시장 진출 ◎ 원가 절감 및 고품질 조류 백신 개발로 국내 백신의 수출 경쟁력 강화 ◎ 원천 기술로 관련된 백신 및 백신보조제 연구개발에 플랫폼 기술로 활용 ◎ 기술력 확보로 구제역 백신보조제 개발과 같은 타 과제에의 활용 				
국문핵심어 (5개 이내)	백신보조제	면역증강제	가축질병	실증시험	에멀전
영문핵심어 (5개 이내)	Adjuvant	Immune stimulator	Livestock's Disease	Verification test	Emulsion

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	2
2. 연구수행 내용 및 결과	7
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	190
4. 연구결과의 활용 계획 등	197
5. 실적 자료	199
붙임. 참고문헌	239

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 동물용 백신보조제(Adjuvant)는 동물백신의 효능과 지속력을 증대시켜 주고 적절한 면역 반응을 유도하기 위해 사용되는 제품으로, 항원에 대한 면역반응을 신속하고 강력하게, 그리고 장기간 유지시켜주는 역할을 하는 동물용 백신 제조에 필수적인 물질임.
- 이상적인 백신보조제(Adjuvant)는 면역증진효과 외에도 안전성(safety), 안정성(stability) 및 실용성(utility) 측면에서 몇 가지 조건을 갖추어야 하며, 가격이 저렴하고 물리화학적으로 안정해야 함.
- 현재 사용되는 백신보조제(Adjuvant)로서 알루미늄염의 경우는 지속력이 약해 빈번하게 백신을 투여해야 하고 세포성면역 유도에 제한적인 단점이 있으며, O/W (Oil-in-water) 백신보조제의 경우에는 초기 면역반응이 강하나 장기간 지속되지 않고, W/O (Water-in-oil) 백신보조제의 경우, 국소적인 부작용을 일으킬 수 있는 여지가 있지만 오일에 기반을 둔 에멀전 백신보조제(Adjuvant)가 경우에 따라서 알루미늄 염보다 더 효과가 좋음.
- 동물용 백신보조제 (Adjuvant)는 전통적으로 사용되어 온 알루미늄 염, Freund's adjuvant(FA), 에멀전 등을 비롯하여 ISCOMs, microsphere 등 백신의 면역효과를 보다 증강시킬 수 있는 새로운 Adjuvant들이 전 세계적으로 경쟁적으로 그 연구가 진행되고 있음.
- 많은 종류의 백신보조제(Adjuvant)의 연구개발 결과가 보고되고 있으나 독성, 안정성, 생체이용가능성, 비용 등의 문제로 인체용 백신의 백신보조제(Adjuvant)로서 사용될 수 있는 것은 알루미늄 화합물 정도로 한정되어 있으며, 이는 지금까지 개발된 보조제 후보물질들의 안전성이 확보되지 않았기 때문임.
- 기술현황
 - 국내에서 유중수형(Water-in-oil) 에멀전은 주로 화장품에 적용되고 있는 기술로 아직까지 동물용 백신제조를 위한 유중수형(Water-in-oil) 에멀전을 백신 제조에 있어서 백신과 상분리를 유발시키지 않는 안정한 에멀전 제조의 어려움과 제조된 에멀전 백신이 주사하기 어려운 정도로 높은 점도를 나타내는 단점이 있어 에멀전 개발에 어려움이 있음.
 - 국내의 동물백신에 이용되는 백신보조제(Adjuvant)중 항원제시세포(APC)들을 자극시켜 선천면역 및 적응면역 특히 세포성면역을 유도하여 백신의 효능을 증강시킬 수 있는 면역증강제(Immune stimulator)를 포함하는 백신보조제(Adjuvant)를 생산, 판매하고 있는 회사는 없음.
 - 특히, 세균의 성분과 같은 외래물질을 이용하여 백신보조제(Adjuvant)를 개발하려는 시

도가 있으나 숙주세포 유래 즉, 병원체의 침입에 대응하여 숙주의 면역세포에서 자체적으로 분비되어 dendritic cell과 같은 항원제시세포(APC)들을 자극시켜 선천면역 및 적응 면역을 촉진시킴으로 인해 숙주의 방어면역을 유도할 수 있는 숙주 자체의 단백질(Endogeneous adjuvant)를 재조합단백질로 생산하여 백신보조제(adjuvant)로 이용하려는 연구는 전 세계적으로도 거의 없음

- 주관기관과 협동기관의 동물백신용 에멀전 후보물질 및 면역증강제(Immune stimulator)를 연구 결과를 토대로 제품개발을 목표로 실용화 기술을 개발하고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

1) 동물용 백신보조제 (adjuvant) 개발의 중요성

- 백신보조제(adjuvant)용 에멀전 기술은 국내 개발되어 있지 않음. 에멀전 원료물질을 예를 들어 보면, 양계용 불활화 백신 성분 중 약 70% 정도를 차지하는 미네랄오일을 수입하거나 제조된 백신보조제(SEPPIC사 ISA 70)을 수입하여 사용하고 있는 실정으로 국내 자체의 기술개발이 절실이 필요함.
- 실제적으로 백신 제조에 있어서 높은 항원함량, 백신의 높은 면역원성 유지, 높은 에멀전 입자 균일성, 저점도, 주사능(syringeability), 제조공정의 용이성, 에멀전 원료의 무독성, 장기간의 보관안정성 등의 조건을 충족시키는 동물백신용 에멀전의 국내 기술 부재는 브랜드화된 제품의 수출과 수익성 증대에 장애요인이 될 뿐만 아니라 다국적 기업에의 기술종속을 심화하고 있음.
- 주관기관인 동물용백신 전문 기업인 중앙백신연구소는 동물 백신용 에멀전 보조제 개발에 필요한 다양한 유화제 후보물질, 이중 및 다중 에멀전 제조기술, 백신 항원의 제제화 기술, 에멀전 분석기술 및 장비, GMP 백신 제조 시설, 안전성 및 효력성 평가 시설, 동물용 백신보조제 개발 관련 핵심 기술과 인프라를 보유하고 있음.
- 주관기관인 중앙백신연구소는 에멀전, 자가미세유화, 리포솜 기술 등 유화기술 관련 기 보유한 선행 연구결과를 토대로 새로운 면역증강제 (Immune stimulator)의 개발 기술을 갖고 있는 협력기관(충북대, 한국생명공학연구원, 충남대)과 공동으로 동물 백신용 에멀전 보조제를 개발하고자 함.
- 주관기관인 중앙백신연구소는 동물용 백신 제조, 대량 생산, 인허가 및 국내외 판매 네트워크 등에서 국내 최고의 기술력과 시설을 구축하고 있으며 동물용 백신보조제 개발을 통한 자체 브랜드화 제품 개발과 다국적 기업 종속 탈피의 강력한 의지와 연구개발의 경험을 보유하고 있어 공동연구를 통한 기술 실용화의 가능성이 높음.



그림1. 백신보조제의 개발 모식도

2) W/O 형태 불활화 조류 백신의 emulsion 안정성 및 역가 비교시험

- 국내에서 유통되고 있는 조류 오일 백신을 대상으로 각 회사별 제품을 비교 분석한 결과, 모두 동일한 W/O 형태의 불활화 백신임에도 불구하고 각 백신이 갖는 물리화학적 특성은 조금씩 다르게 나타남.
- 특히 다국적기업인 인터벳 제품의 경우, 제조일로부터 15개월이 경과하였으나 유효기간 내의 유효한 백신임에도 불구하고 그림과 같이 W/O 에멀전 상태가 깨져 항원과 백신 보조제가 서로 층분리가 발생함.

제조사	Viscosity (cP)
국내 A사	34.3
국내 B사	21.7
국내 C사	31.3
국내 D사	47.6
국내 E사	32.8
인터벳	82.2
메리알	24.3



그림2. 인터벳 Nobilis REO+IB+G+ND 제품의 정상

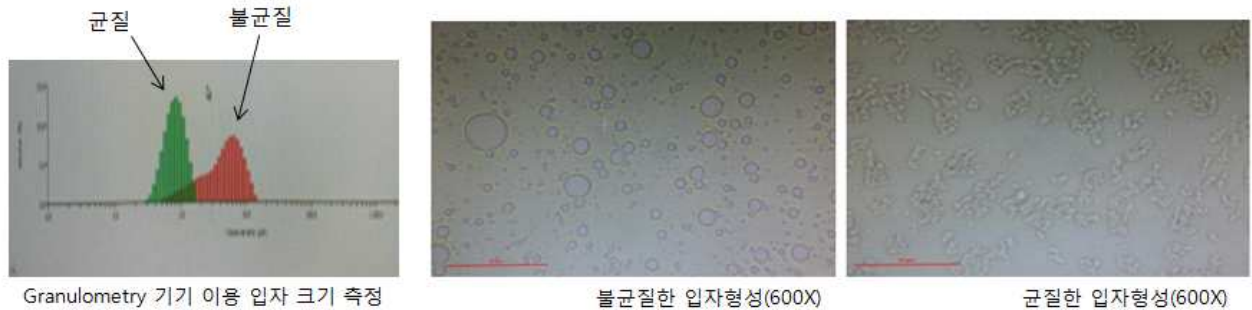


그림3. 백신 에멀전의 현미경 관찰

- 각 업체별 NDV가 포함된 백신의 성상관찰 후, 6~8주령 닭에 백신 1수분을 근육접종하고 접종 2주 후 및 접종 3주 후에 채혈하여 NDV 항체가를 측정한 결과임. 국내 5개 업체의 조류 오일 백신보조제는 ISA 70을 사용한다고 알려져 있으나, 아래 결과와 같이 업체별 항체의 형성 정도가 다른 것을 확인함.
- 각 업체별 항원의 종류 및 함량 차이, 백신보조제와의 에멀전 정도, 백신의 제조 후 시간 경과, 백신의 보관 상태 등의 차이에 따라 백신의 안정성 및 항체 편차가 발생하는 것으로 판단됨.

3) 협력기관 소개

- 한국생명공학연구원 최의성 박사 연구실 소개
 - 전통효모 *Saccharomyces cerevisiae* 균주와 희귀효모 *Hansenula polymorpha* 및 *Pichia pastoris* 등의 균주를 활용한 재조합 단백질의 발현 기술 보유
 - 세포내 발현 분비 및 표면 발현 기술의 기반 기술을 보유
 - 효모에서 면역증강물질인 squalene과 이소프레노이드 동시발현 생산 기술 보유
 - 효모를 이용한 재조합 분자면역증강제(예: heat shock protein, flagellin, cytokine 등)을 생산함으로써 분자면역증강제 자체의 면역증강 효과에 더하여 닭의 TLR (toll-like receptor)15 리간드로서 효모 세포벽 베타글루칸의 분자면역증강 효과를 동시에 얻을 수 있는 가능성을 조사함.
- 충남대학교 이종수 교수 연구실 소개
 - 가용성(soluble)단백질을 발현, 정제할 수 있는 대장균 재조합 단백질의 발현 기술 보유
 - 가용성 아미노아실 tRNA 합성효소 (aminoacyl tRNA synthetase, ARS) 단백질 발현 및 정제기술 보유
 - 재조합 단백질의 유산균 표면발현 기반 기술을 보유
 - 면역세포 및 세포주를 이용한 선천면역 활성화 검증 In vitro 시스템 보유
 - 백신보조제 (adjuvant)의 효능검증을 위한 인플루엔자 challenge mouse model 보유
 - 백신항원의 체액성, 세포성 면역을 분석할 수 있는 mouse model 시스템 보유

○ 충북대학교 모인필 교수 연구실 소개

- 백신면역증강제 후보군의 생체 내에서의 안전성 및 효능 스크린
- 백신보조제 후보군의 생체 내에서의 안전성 및 효능 스크린
- 조류 핵심질병 oil 백신의 실험실적 안전성 및 효능 평가
- 조류 핵심질병 oil 백신의 야외농장에서의 실증실험 (안전성 및 효능평가)

1-3. 연구개발 범위

- 1) 가금용 백신에 적합한 백신보조제 개발을 위한 에멀전 기술 개발
 - (1) 가금용 백신에 적합한 오일 백신보조제의 개발 및 에멀전 제제화 및 평가
 - (2) 가금용 백신에 적합한 재조합 분자면역증강제 발굴 및 선별
 - (3) 가금용 백신에 적합한 신규의 분자면역증강 물질 발굴 및 개발
 - (4) 개발된 백신보조제 및 동물질 함유한 백신의 안전성 및 효능 평가

- 2) 개발된 백신보조제를 포함한 조류 핵심 질병 혼합백신의 평가
 - (1) 개발된 백신보조제를 포함하는 조류 핵심질병 혼합백신의 개발 및 평가
 - (2) 분자면역증강제의 재조합 발현 시스템 확립 및 효능 평가
 - (3) 신규 분자면역증강 물질들의 면역증강 효능 검증 및 기작규명
 - (4) 개발된 면역증강제, 백신 보조제 및 혼합백신의 평가

- 3) 개발된 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 상용화
 - (1) 조류 핵심질병 혼합백신의 허가 신청 및 백신보조제의 대량생산 방안 연구
 - (2) 분자 면역증강제의 대량 생산 시스템 구축 및 경제성 생산 기술 개발
 - (3) 신규 면역증강 물질의 조류용 백신 적용 및 효능 검증
 - (4) 개발된 백신보조제 종류별 시험백신의 효능 평가

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 백신보조제 개발

2-1-1. 가금용 오일 백신보조제의 개발

1) 후보군 유화제들의 조성별 유화제조조건 확립 및 특성분석

(1) 주원료인 미네랄 오일 선발

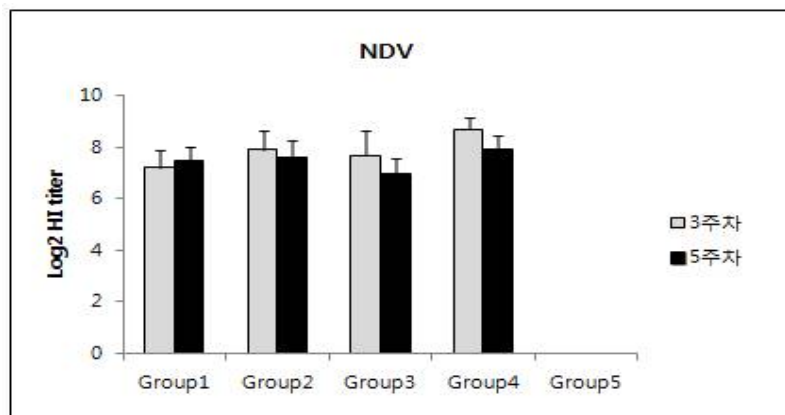
- 동물용 오일 백신보조제에 적합한 오일을 선정하고자 다양한 오일을 이용하여 백신보조제를 제조한 다음, 조류 인플루엔자 바이러스(AIV, H9N2주)와 뉴캐슬병 바이러스(NDV, LaSota주) 불활화 항원으로 시험백신을 제조함

표 1. 오일 종류에 따른 조류 시험백신 4종

	뉴캐슬병 항원량 (EID ₅₀ /dose)	조류인플루엔자 항원량 (EID ₅₀ /dose)	Adjuvant	비고
Group 1	10 ^{8.0} , 10%	10 ^{8.0} , 10%	Mineral oil A	
Group 2	10 ^{8.0} , 10%	10 ^{8.0} , 10%	Mineral oil B	
Group 3	10 ^{8.0} , 10%	10 ^{8.0} , 10%	Mineral oil C	
Group 4	10 ^{8.0} , 10%	10 ^{8.0} , 10%	ISA70	양성대조군
Group 5	-	-	-	음성대조군

- 6~8주령 SPF 닭을 그룹당 10수씩 배정하고, 시험군에 시험백신의 1수분(0.5ml)을 근육으로 접종함. 백신 접종 3주 후, 5주 후에 채혈하여 혈구응집억제시험(Hemagglutinin inhibition assay)을 실시함.

- 수행결과 그림1와 같이 백신 접종 3주차에 NDV, AIV HI 항체가 128배 이상인 것으로 확인되었으며, 5주차에 AIV 의 항체가는 양성대조군 그룹을 제외하고 모두 상승하였음. 저병원성 조류인플루엔자의 혈청역가시험 검정기준은 시험군의 평균 닭 적혈구 응집억제 항체가가 64배 이상이어야하며 본 시험군에서 모든 그룹에서 검정기준 이상의 결과를 보였고, 미네랄 오일에 따른 유의적 차이는 없었음.



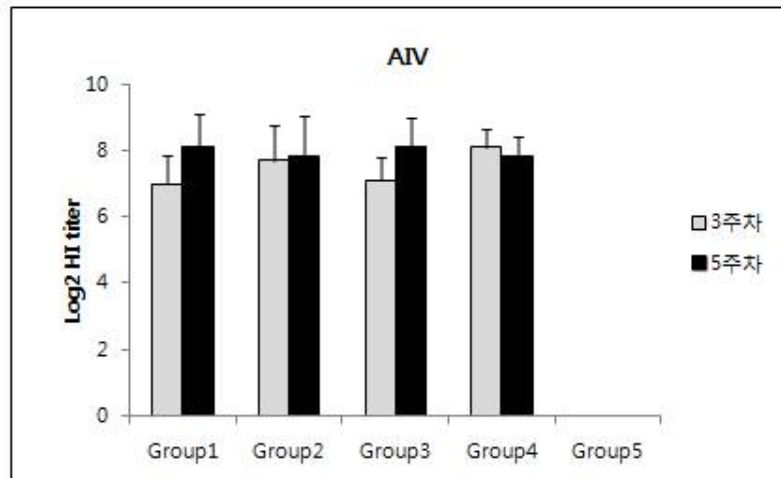


그림 4. 미네랄 오일에 따른 NDV, AIV 항체가 측정 결과

(2) W/O 형성에 적합한 유화제의 선발 시험

- 주성분인 미네랄 오일의 선정 후, Water-in-Oil emulsion 형성에 적합한 유화제를 선발하기 위하여 뉴겟슬병 바이러스(NDV, LaSota주) 불활화 항원을 이용하여 유제하고, 그 유화액의 성상을 관찰함
- 백신 유화액은 오일상과 백신 수용액의 수성상을 각각 제조하고 이들을 일정한 비율로 혼합하고 기계식 교반에 의해 유화하여 제조함(그림 5).

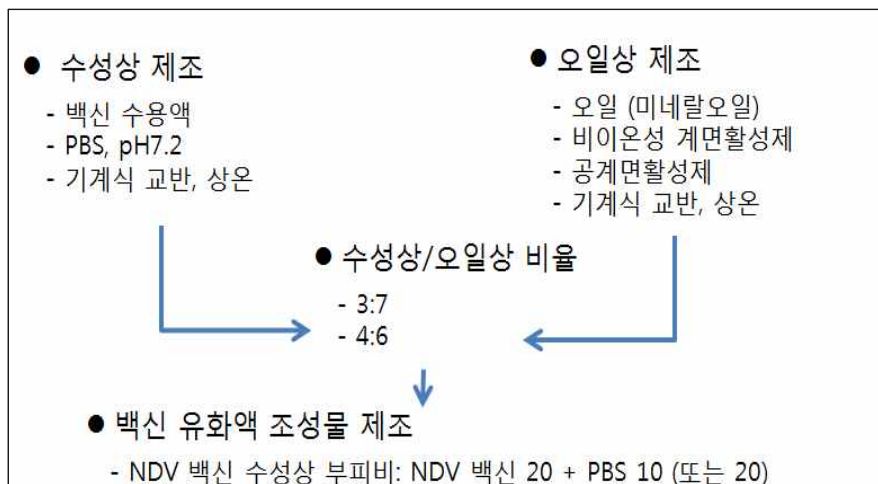


그림 5. NDV 단일백신 유화액 제조

- 양성대조군으로 상용 유화제 (ISA70, Seppic사)를 기준으로 계면활성제의 종류, 오일상과 수성상의 비율 등을 변화시킨 백신 유화액을 6종 제조 후, 12시간 경과시점에서 상용 유화제를 사용하여 제조한 백신 유화액과의 성상을 비교한 결과임. 그림 6과 같이 일부 조건(3MP1P2 그룹)에서는 유화액 제조 후 수상과 유상이 분리되었으며, 3MG, 3MP와 같은 조건에서는 제조한 유화액의 성상이 안정한 것을 확인할 수 있었음. 안정한 유화액 조성액을 기준으로 액적크기와 점도를 측정함.

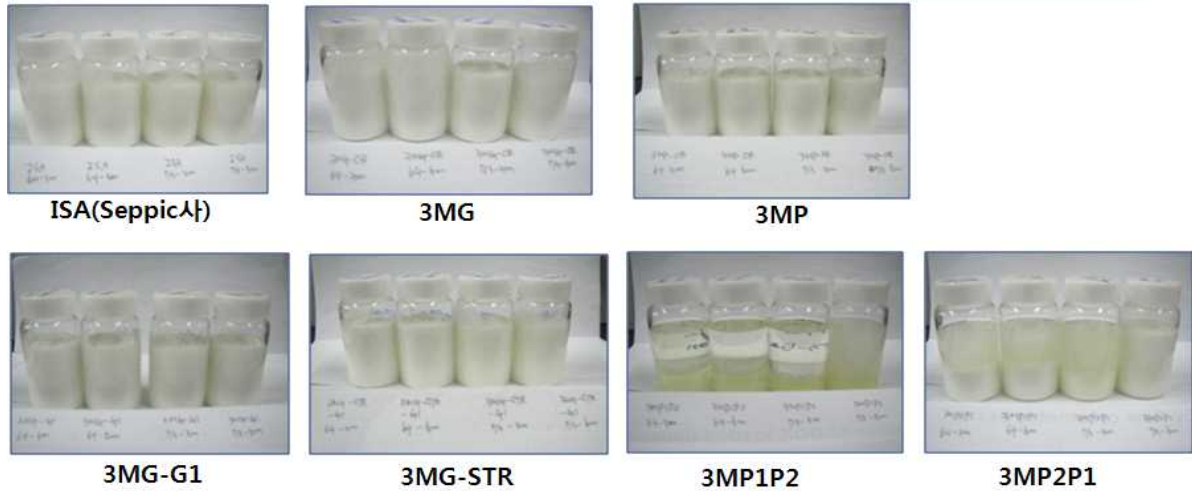


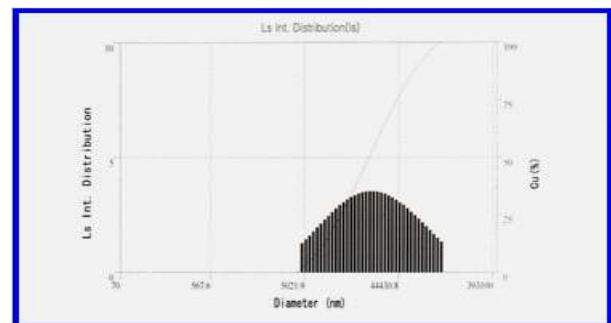
그림 6. 유화액 성상 비교 관찰

(3) NDV 단일백신용 유화액의 액적크기 및 분포, 그리고 점도

- 제조된 백신 유화액의 액적크기와 분포를 조사하기 위해 균일한 백신 유화액 3ml를 취하여 일회용 cell에 담아 전기영동광산란기(ELS-Z, OTUSKA Electronics Co., Japan)를 사용하여 측정하였고, 액적크기는 광산란장치(ELS-Z)로 50회 스캔한 평균값으로 나타냄. NDV 단일백신 유화액의 액적크기 분포는 계면활성제의 종류와 양, 오일상/수성상의 비율 등에 거의 영향을 받지 않았으며 정규분포를 나타내어 유화액내에서 액적의 크기가 고르게 분포하는 유화액인 것을 확인함.

표 2. NDV단일백신 유화액의 유화액 조성에 따른 평균 액적크기

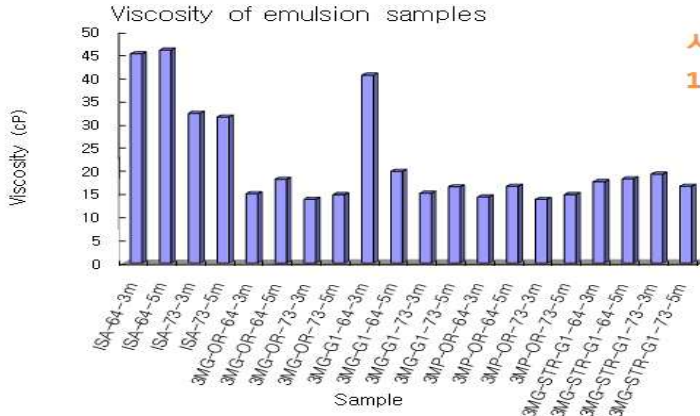
Sample	Size (micrometer)	Mean (micrometer)
ISA-64-3m	6.7	6.45
ISA-64-5m	6.2	
ISA-73-3m	8.5	7.85
ISA-73-5m	7.2	
3MG-OR-64-3m	12.9	12.40
3MG-OR-64-5m	11.9	
3MG-OR-73-3m	13.9	12.55
3MG-OR-73-5m	11.2	
3MG-G1-64-3m	5.2	5.00
3MG-G1-64-5m	4.8	
3MG-G1-73-3m	8.5	8.45
3MG-G1-73-5m	8.4	
3MG-STR-64-3m	3.4	3.20
3MG-STR-64-5m	3.0	
3MG-STR-73-3m	4.8	5.45
3MG-STR-73-5m	6.1	
3MP-OR-64-3m	4.8	4.60
3MP-OR-64-5m	4.4	
3MP-OR-73-3m	5.4	5.05
3MP-OR-73-5m	4.7	



- 대조군인 상용 유화제 ISA 70으로 제조한 유화액의 점도는 약 30~50 cP의 점도를 나타내었으며, 3MG 및 3MP조성의 백신 유화액이 ISA 70으로 제조한 백신 유화액에 비해 낮

은 점도를 나타내어 주사투여 가능성에 있어서 ISA 70으로 제조한 대조군에 비해 우수함을 확인함.

ISA 유화액:
32 ~ 46 cP



시험유화액:
14 ~ 20 cP

그림 7. 시험 백신 유화액의 액적 크기분포

(4) NDV/AIV 혼합백신용 시험 유화액 선정, 동물 효력시험

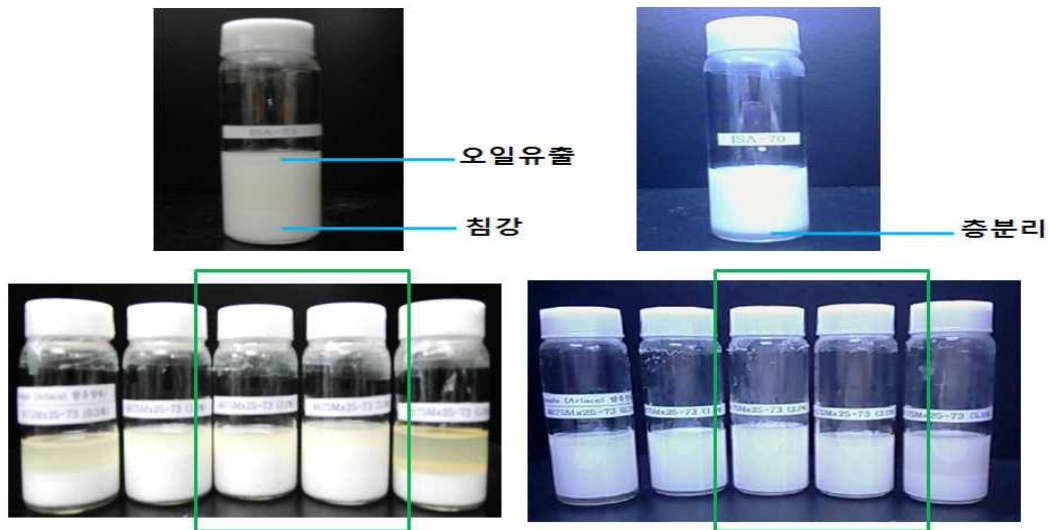
- 조류 인플루엔자 바이러스(AIV, H9N2주)와 뉴캐슬병 바이러스(NDV, LaSota주) 불활화 항원으로 제조한 시험백신의 효능을 조사하고 상용 보조제인 ISA 70으로 제조된 백신과 효력을 비교, 평가하기 위하여 뉴캐슬병 바이러스는 반수방어용량측정법으로, 조류인플루엔자 바이러스는 항체가 평가를 통하여 역가시험을 실시함. 역가시험법에 의한 혈구응집 억제시험을 실시하였으며, 반수방어용량 측정법에 따라 생존율을 측정하고 그 결과를 아래 표에 나타냄(표 3).

표 3. 시험백신의 동물 효력 시험

접종량	시험품	3MG			MG8020			3MP			ISA70			Ctrl		
		AI	ND	CH	AI	ND	CH	AI	ND	CH	AI	ND	CH	AI	ND	CH
1/5 접종 (PD50)	1	6	6	-	1	4	D	3	4	-	7	9	-	<1	<1	
	2	5	7	-	NT	NT	NT	2	6	-	3	6	-	<1	<1	
	3	4	6	-	2	5	-	NT	NT	NT	5	6	-	<1	<1	
	4	3	6	-	4	6	-	4	6	-	NT	NT	NT	<1	<1	
	Mean	4.5	6.3	100%	2.3	5	67%	3	5.3	100%	4	6	100%			
1/25 접종 (PD50)	5	4	5	-	5	6	-	4	6	-	4	5	-			
	6	4	5	-	5	7	-	NT	NT	NT	4	5	-			
	7	5	7	-	5	6	-	<1	3	D	4	5	-			
	8	4	6	D	5	6	-	3	5	-	2	6	-			
	Mean	4.3	5.8	75%	5	6.3	100%	3.5	4.7	67%	3.5	5.3	100%			
1/50 접종 (PD50)	9	5	5	-	NT	NT	NT	<1	2	D	3	5	D			
	10	3	7	-	8	9	-	5	6	-	4	5	-			
	11	4	5	-	6	7	D	4	5	D	4	6	-			
	12	5	7	-	NT	NT	NT	6	6	-	4	5	D			
	Mean	4.5	6	100%			50%	3.8	4.8	50%	3.8	5.3	50%			
항체가(생존율)		4.5	6	92%	3.7	5.7	78%	3.5	5	78%	3.8	5.5	82%			

(5) NDV/AIV 혼합백신의 유화액의 가속안정성 평가

- 조류 백신의 특성상 오일 유화액 백신은 최소 2년 정도의 에멀전 안정성(Stability)를 확보해야 함. 조류 인플루엔자 바이러스(AIV, H9N2주)와 뉴캐슬병 바이러스(NDV, LaSota주) 불활화 항원으로 시험백신을 제조하고 백신의 안정성을 평가하기 위하여 가속안정성 (accelerated stability) 시험방법을 실시함. 가속 안정성 시험은 37°C 조건 또는 24시간 주기로 4°C ~ 37°C로 순환하는 조건에서 6주 동안 오일유출, 침전, 물 유출 및 층분리 발생 여부를 관찰하여 평가하는 방법으로 진행함.
- 그림 8와 같이 양성대조군 ISA 70과 비교, 평가하여 안정성이 인정되는 조성을 선발함.



	37°C				온도변화(4↔37°C)			
	오일유출	침전	물유출	층분리	오일유출	침전	물유출	층분리
ISA70: Ag 70:30	○	○	-	-	○	○	-	○
ISA70: Ag 60: 40	○	○	○	-	○	○	-	○

	37°C				온도 변화 (4↔37°C)			
	오일유출	침전	물유출	층분리	오일유출	침전	물유출	층분리
	-	○	○	○	-	-	-	○
	-	○	○	○	-	-	-	○
	-	○	○	○	-	-	-	○
	-	○	○	-	-	○	○	-
	-	○	○	-	-	○	○	-
	○	-	-	○	-	-	-	○
	-	-	○	○	-	-	-	○
	-	-	○	○	-	-	-	○
	-	-	○	○	-	-	-	○
	○	○	-	-	-	○	-	-

그림 8. 시험 백신 유화액 가속안정성 평가결과

(6) 항원 및 백신보조제 함량별 백신의 점도 평가

- 조류 불활화 오일백신은 오일성분을 포함하고 있어 일반적으로 점도가 높아 접종이 어려울 수 있음. 또한 백신제조시 수상과 유상의 혼합 비율에 따라 점도가 달라지므로 백신보조제 종류 및 함량별 점도를 동시에 비교하고자 Brookfield 점도계를 이용하여 각각의 온도조건 4℃, 25℃, 37℃ 30rpm 조건에서 점도를 측정함.
- 측정결과 백신보조제 종류가 다른 group 4의 nanoparticle은 희석액 수준의 낮은 점도를 보였고, 오일이 포함된 백신보조제 그룹은 40~80cP 정도의 점도를 보였음. 특히 수상 함량이 높아질수록 점도도 증가하는 양상을 보임.

표 4. 백신보조제 종류 및 함량별 점도 비교

	수상(항원 포함), %	유상(백신보조제), %	비고
Group 1	30	70	CAvant WO-A1
Group 2	35	65	CAvant WO-A1
Group 3	40	60	CAvant WO-A1
Group 4	30	70	Nanoparticle
Group 5	30	70	ISA70 양성대조군

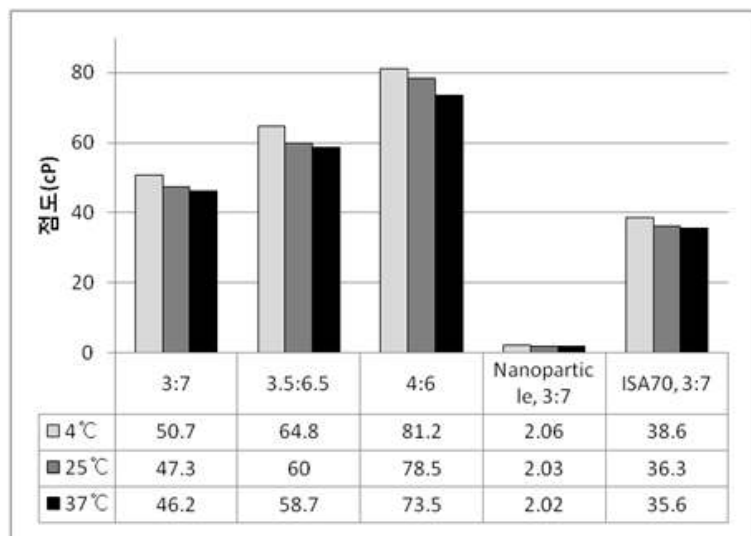


그림 9. 시험 백신 점도 분포

2) 후보군 유화제로 조성된 유화액의 안정성 평가

(1) 항원 함유량에 따른 유화액의 안정성 측정

- 개발된 백신보조제 및 양성대조군 ISA70의 시험백신을 제조하여 가속 안정성 시험을 6주간 실시함. 가속 안정성 시험은 37℃ 조건 또는 24시간 주기로 4℃ ~ 37℃로 순환하는 조건에서 오일유출, 침전, 물 유출 및 층분리 발생 여부를 관찰하여 평가하는 방법으로 진행함. 관찰결과 ISA70은 가속 시험 1주차부터 물 유출과 층분리가 발생했으나, CAWIO(CAvant

WO-A1)는 시험기간 6주 동안 안정하였음.

시험백신명	37°C				4↔37°C			
	오일	침전	물유출	충분리	오일	침전	물유출	충분리
CAWIO	-	-	-	-	-	-	○	○
ISA 70	-	-	○	○	-	-	○	○

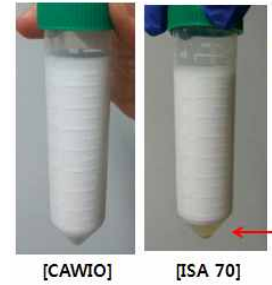


그림 10. 백신보조제를 포함하는 유화액의 가속 안정성 관찰 결과

(2) 유화액의 장기보존 안정성 평가

- 조류 오일 사독 백신의 유효기간은 24개월인 경우가 대부분으로 백신보조제 자체의 안정성 뿐만이 아니라 백신 유화액 상태에서도 안정해야하며, 효능성이 유지되어야 함. 유화액의 장기보관에 따른 효능확인을 위하여 제조 직후 및 유화액 제조 9개월이 경과한 시점에서 SPF 닭에 접종하여, 뉴캐슬병 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항체가 변화를 측정함.

- 측정결과, 제조 당시와 9개월이 경과한 시험백신의 항체가 변화는 유의적 수준의 큰 변화 없이 유지되는 것을 확인함. 본 연구팀이 개발한 백신보조제는 유화액 상태의 물리적 안정성 및 백신 효능 측면의 장기보존 안정성이 뛰어난 것을 확인함.

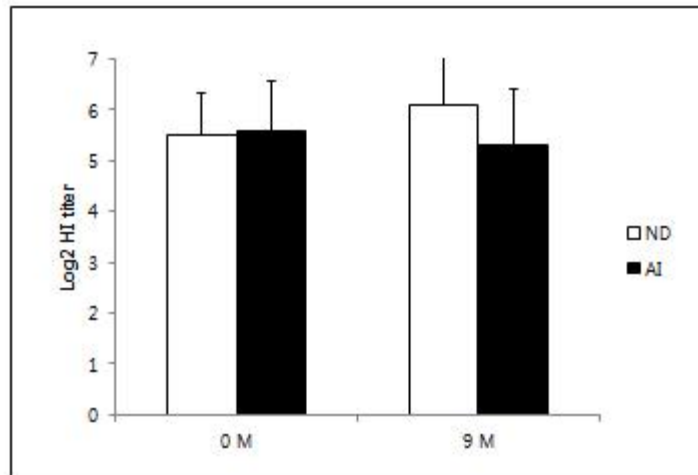


그림 11. 유화액의 장기보존 안정성 평가

3) 유화액의 항원 방출 시험

(1) 유화액의 항원 방출 시험

- Water-in-Oil emulsion으로 제조된 뉴캐슬병 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 불활화 혼합백신 조성물로부터 항원과 단백질의 *in vitro* 방출시험을 실시하여 ISA 70으로 제조된 조성물로부터의 *in vitro* 항원 및 단백질 방출 경향을 비교함.

- 백신 조성물로부터 항원 및 단백질의 방출경향을 조사함으로써 동물시험에서의 항원방출 및 항체생성 경향을 예측하기 위한 시험. 각 방출시험 시료로부터 방출시험액을 상층과 하층에서 각각 1ml씩 2ml을 채취하여 Bradford assay로 단백질을 정량하여 평균값을 산출함.
- Surfactant 종류와 함량에 의해 항원 방출 지연, 투여부위에서의 지연방출(sustained release)를 조절할 수 있어 본 시험 모델로 적절한 항원 방출 속도를 결정하고자 시험을 실시함.

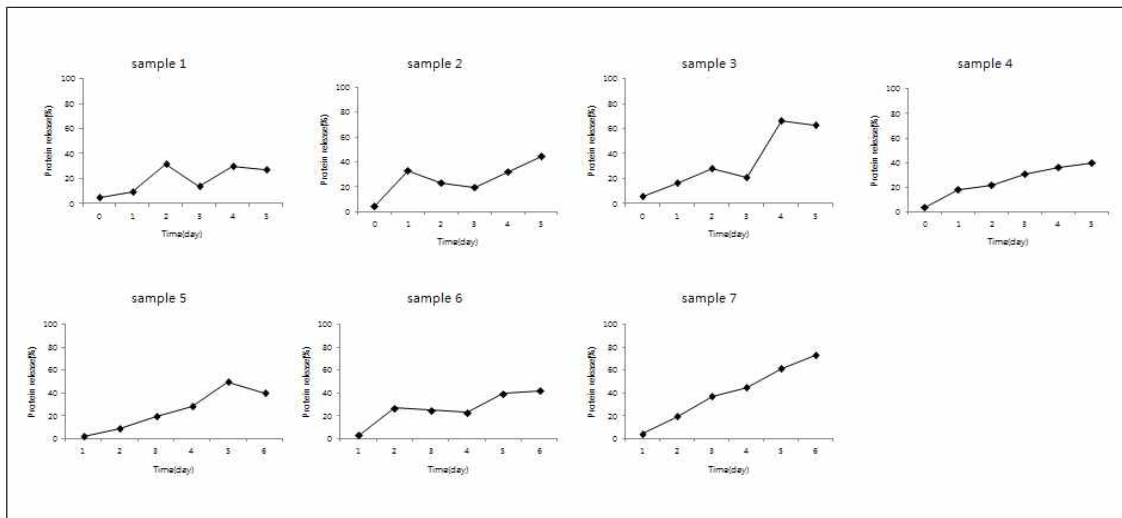


그림 12. 유화액의 항원 방출 시험

4) 수상액의 부피에 따라 적합한 CAvant WO-A1 백신보조제 개발

(1) 수상액의 부피에 따라 적합한 CAvant WO-A1 백신보조제 개발

- 수상액(항원) 비율에 따라 적합한 CAvant WO-A1 백신보조제를 개발하기 위하여 기존에 시험한 수상액(30%)에서 수상액을 최대 40%까지 증가시켜 시험을 실시함. 조류 백신에서의 수상액 증대는 궁극적으로 항원량의 증대를 의미하며, 다가 혼합 백신 개발에 중요한 요인이 됨.
- 본 시험백신은 조류 핵심 질병인 뉴캐슬병 바이러스, 닭 전염성 기관지염 바이러스, 산란 저하증 바이러스, 조류인플루엔자 바이러스 불활화 항원을 포함하고 있음.

표 5. 백신보조제 구성에 따른 항체가 비교시험

Group	Antigen	Adjuvant % contant	Note
Group 1	NDV(LaSota)		
	IBV(KM91, ADL05258)	ISA70	양성대조군
	AIV(H9N2)	65.8%	
EDSV(K11)			
Group 2	NDV(LaSota)	CAvant	
	IBV(KM91, ADL05258)	WO-A1	시험군
	AIV(H9N2)	65.8%	

	EDSV(K11)		
	NDV(LaSota)		
Group 3	IBV(KM91, ADL05258)	CAvant	시험군
	AIV(H9N2)	WO-A1	
	EDSV(K11)	60%	

- 6~8주령 SPF 닭을 그룹당 10수씩 배정하고, 시험군에 백신의 1수분인 0.5ml을 근육으로 접종하고, 2회 접종 그룹은 1차 접종 2주후에 1수분을 추가 접종함. 최종 백신 접종 3주, 5주, 7주 후에 채혈하여 혈구응집억제 시험(ND, AI, EDS)을 실시하였으며, 시험백신 1회 접종한 시험군은 뉴캐슬병 바이러스 강독주(Kr005주)를 공격접종하여 14일간 임상증상을 관찰함.



그림 13. 조류 핵심질병 다가 혼합백신의 목적동물 실험 스케줄

- 뉴캐슬병의 효력시험은 90% 방어율 측정법으로 공격용 뉴캐슬병 바이러스를 공격접종하고 14일간 증상과 폐사를 관찰하는 방법으로 검정기준에 의거하여 공격접종을 수행한 결과, 대조군은 100% 폐사하였고 시험군은 90% 이상 생존하는 것을 확인함.

표 6. 뉴캐슬병 바이러스 공격접종결과

그룹	No. of chickens	Observation period(Day)	Protection rate (No. of the alive/ No. of the tested)
Group 1	10	14	90% (9/10)
Group 2	10	14	90% (9/10)
Group 3	10	14	100% (10/10)
무접종 대조군	10	14	0% (10/10)

- One-Way ANOVA 분석법으로 분석한 결과, 1회 접종 3주 후 결과에서 ISA70이 유의적 차이가 있는 것으로 분석되었고, 5주 후 및 7주 후 결과에서는 유의적 차이가 없는 것으로 분석됨. 항체가 지속 측면에서 ISA70 그룹은 1차 접종 3주와 5주차까지는 항체가 상승한 다음 7주차에 감소하는 경향을 보이나, CAvant WO-A1 그룹은 접종 3주, 5주, 7주차까지 항체가 상승 유지되는 양상임. 접종 횟수 측면에서 CAvant WO-A1 그룹은 1회 접종 보다는 2회 접종시 항체가 상승 효과가 큰 것으로 나타남. 효력 시험 및 항체가 측정 결과, 항원량

증대에 따른 항체가 변화가 크지 않고, 백신 유효액의 안정성이 유지(본 보고서에 첨부하지 않음)되어 CAWIO(CAvant WO-A1)의 수상액 조절이 가능한 것으로 판단되며, 조류 핵심 질병을 포함하는 다가 혼합백신 제조가 가능함.

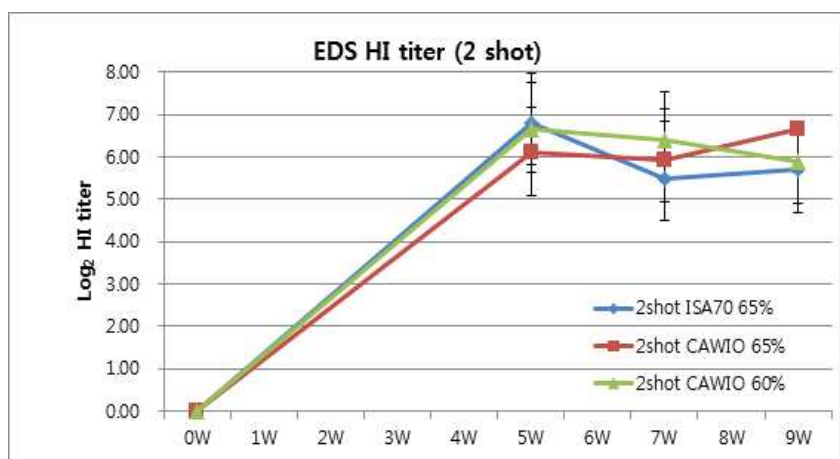
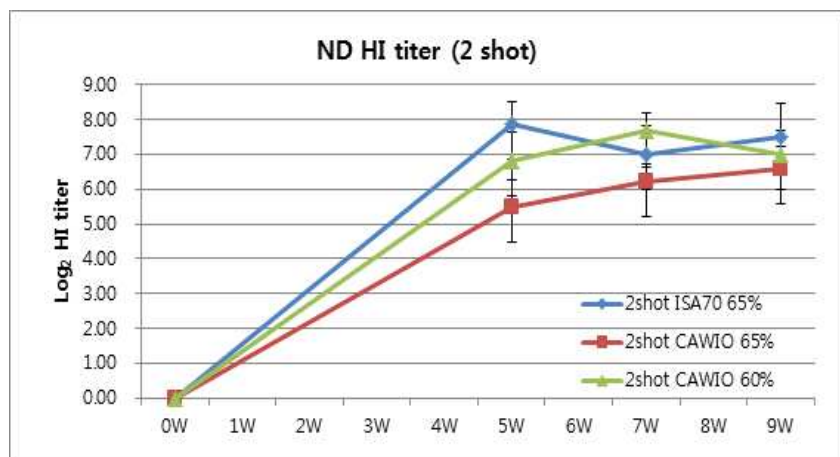


그림 14. 백신보조제 함량에 따른 바이러스 주차별 비교

5) 이화학 분석

(1) 이화학 분석의 목적

- 백신보조제의 품질을 평가하는 물리화학적 특성시험방법을 조사하고, 실제로 유지(Oil, 油脂; 동물 또는 식물에서 채취한 기름을 통틀어 이르는 말)에 대한 분석시험을 수행하는 충남대학교 식품공학과 이기택 교수 연구실에 자문을 요청하여 시험을 수행한 내역을 담고있다. 궁극적으로 실험실에서 수행할 수 있는 특성분석 시험법을 도입 및 조건을 확립하고 제조한 백신보조제(CAWIO;CAvant WO-A1)에 대한 Certification of analysis를 작성하고자 한다. 유지(oil, 油脂)의 이화학 분석은 W/O emulsion type의 백신보조제의 주성분인 오일을 분석하여 동물백신보조제에 적합한 오일 선정에 활용될 수 있다. 또한 오일 및 백신보조제의 산패진행에 따른 유효기간 설정에도 중요한 척도로 활용할 수 있다.

- 의뢰인: 중앙백신 연구소
- 실험수행: 충남대학교 식품공학과 식품화학실 이기택교수님.
- 의뢰일자: 2016.09.22.~ 2016.09.26.
- 내용: 의뢰 시료에 대한 산가, 과산화물가, 요오드가, 비누화가 분석법 Setting 및 전수, 의뢰 시료에 대한 결과값 확인.

- 의뢰시료는 일반 식용유지(triacylglycerol)과 그 조성 및 특성이 다르기 때문에 산가, 과산화물가, 요오드가, 비누화가를 측정할 때 분석 시료량을 따로 설정해야함. 이를 위하여 네 가지 분석법에 대하여 시료량을 설정하고 분석법을 전수하였음.
- 의뢰시료에 대하여 분석값을 보고함.

(2) 시험법

① 산가(Acid value, AV)

- 정의: 유지 1 g 중에 존재하는 유리지방산을 중화하는데 필요한 KOH의 mg수 유지 중에 존재하는 유리지방산의 함량을 나타내는 척도

○ 시험법

- i) 시료(약 5 g)를 100mL 삼각플라스크에 취함
 - ii) n-hexane : EtOH(1:1, v/v) 용액 30 ml 가함
 - iii) 0.5% 페놀프탈레인 용액 1 mL
 - iv) 0.1N KOH(100 ml, 에탄올 : 물 = 95 : 5)로 적정
 - v) 시료의 End Point(종말점)(T1) : 적색을 나타내어 30초간 사라지지 않는 순간
- * Blank(No sample)도 전 과정 그대로 수행하여 적정값(T0)을 구할 것!

○ 계산식

$$\text{산가} = \frac{(T_1 - T_0) \times F \times 5.611}{S}$$

T_1 : 적정에 사용된 0.1N KOH 소비량(ml)

T_0 : Blank에 사용된 0.1N KOH 소비량(ml)

F : 0.1 N KOH 용액의 농도계수(Factor) ≈ 1

S : 유지 시료의 채취량(g)

5.611 : 0.1N KOH 용액 1ml 중에 존재하는 KOH mg 수

② 과산화물가(Peroxide value, POV)

- 정의: 유지 1 kg 에 함유된 과산화물의 mg 당량수(meq/kg)

유지 산패의 초기단계에 있어서 유지의 산패정도를 나타내는 척도

○ 시험법

i) 시료(약 5 g)를 250mL 삼각플라스크에 취함(S)

ii) Chloroform : acetic acid 용액(2:3, v/v) 35 ml 가해 녹임

iii) 포화 KI용액 1 ml 첨가(실험때마다 새로 만들것)

iv) 1분동안 진탕한 후 암소에서 5분 방치(상온)

v) 증류수 75 ml 첨가, 혼합 (색:노란색)

vi) 1% 전분용액(지시약) 1 ml 첨가 (색:보라색)

vii) 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (100 ml)로 적정(T_1) (endpoint : 무색)

* Blank(No sample)도 전 과정 그대로 수행하여 적정값(T_0)을 구할 것!

○ 계산식

$$\text{POV(meq/kg oil)} = \frac{(T_1 - T_0) \times F \times N}{S} \times 1000$$

T_1 : 본 실험의 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액 소비량(ml)

T_0 : Blank에서의 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액 소비량(ml)

F : 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 농도계수 Factor(≈ 1)

S : 시료무게(g)

N : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 의 노르말 농도(= 0.01)

1000 : 과산화물가는 시료 **1 kg** 중의 과산화물 양임.

③ 요오드 가(Iodine value, IV)

- 정의: 유지 100 g 에 흡수되는 요오드의 g 수(단위, g iodine/100g)

유지의 불포화도(이중결합 수)를 측정하는 방법

○ 시험법

i) 삼각플라스크(500mL)에 시료(약 1 g)를 취함

- ii) Chloroform 10 ml 첨가 & 용해
- iii) Wijs reagent 15 ml 첨가하고 잘 흔들
- iv) 밀봉 후 암소에서 방치(60 min, 수시로 흔들)
- v) 10% KI solution 20 ml & 증류수 100 ml 첨가
- vi) 0.1 N Na₂S₂O₃ solution 으로 적정(노란빛이 사라질때까지)
- vii) 이어서 무색에 1% 전분용액 2 mL(지시약) 넣고 이어서 적정
- viii) End Point : 보라색이 무색(완전히)으로 될 때 전분용액 2 mL넣고 확인!

○ 계산식

$$I.V = \frac{(V_0 - V_1) \times 0.01269 \times F \times 100}{S}$$

- I.V. : 유지 100g에 흡수되는 요오드의 g수
- V₀ : 공시험(Blank)에서 0.1 N Na₂S₂O₃ 용액의 소비량(mL)
- V₁ : 본시험(시료)에서 0.1 N Na₂S₂O₃ 용액의 소비량(mL)
- F : 0.1 N Na₂S₂O₃ 용액의 Factor값
- 0.01269 : 0.1 N Na₂S₂O₃ 용액 1mL에 상응하는 요오드의 g수
- 100 : 요오드가는 시료 100g에 부가되는 요오드의 g 수임
- S : 채취한 시료량(g)

④ 비누화가(Saponification value, SV)

- 정의: 유지 1 g을 비누화시키는 데 필요한 KOH의 mg 수
유지의 구성지방산의 분자량 대소를 개략적으로 측정

○ 시험법

- i) 삼각플라스크(250mL)에 시료(약 2 g)를 취함
- ii) 0.5 N KOH in EtOH 용액 25ml 첨가 & 밀봉
- iii) Water bath 에서 15 min 가열(무색→노란색)
- iv) 1% 페놀프탈레인 1 mL(노란색→보라색)
- v) 0.5 N HCl로 적정(보라색→무색)

○ 계산식

$$\text{Saponification value} = \frac{(V_0 - V_1) \times F}{S} \times 28.05$$

V_0 : Blank test(공시험)에서 0.5 N HCl 용액의 소비량(mL)

V_1 : 본시험에서 0.5 N HCl 용액의 소비량(mL)

F : 0.5 N HCl 용액의 Factor값

28.05 : 0.5 N HCl 용액 1 mL에 상당하는 KOH의 mg수

S : 채취한 시료 중량(g)

(3) 시료 분석 결과

① ISA 70 (Certified value 참조 결과비교 후 시험법 설정)

AV	시료무게 (g)	0.1N KOH mL	AV	Certified value	비 고
Blank		0.1			
AV-1 g	1.1002	0.1	0		
AV-5 g	5.0008	0.2	0.11	0.1	산가 시료무게결정
POV	시료무게 (g)	0.01N Na ₂ S ₂ O ₃ mL	POV	Certified value	비 고
Blank		0.3			
POV-1 g	1.0305	0.3	0		
POV-5 g	5.0718	0.5	0.39	0.40	과산화물가 시료무게결정
IV	시료무게 (g)	0.1N Na ₂ S ₂ O ₃ mL	IV	Certified value	비 고
Blank		53.7			
IV-1 g	1.3501	46.8	6.49	6.3	요오드가 시료무게결정
IV-5 g	5.0596	27.8	6.50		
SV	시료무게 (g)	0.5N HCl mL	SV	Certified value	비 고
Blank		20.8			
SV-1 g	1.1706	19.9	21.57		
SV-2 g	2.1255	19.6	15.84	14	비누화가 시료무게결정

② 시험법에 의한 시료 분석(A oil, C 조제)

	AV	POV	IV	SV
A oil	0.11	0.20	0.50	0.00
C 조제	1.12	0.59	5.79	12.56
ISA 70	0.11	0.39	6.50	15.84

2-1-2. 가금용 오일 백신보조제가 포함된 백신 평가

1) 혼합백신 제제화 평가

(1) 선정된 백신보조제로 시험백신 제조

조류백신은 백신접종에 따른 스트레스로 인하여 산란율이 저하될 수 있어, 백신접종을 최소화하고 1회 접종만으로 효과가 오래 지속되는 백신을 선호함. 또한 단일항원보다는 여러 가지 항원이 포함된 다가백신 형태의 백신이 백신접종을 최소화하며 효과를 극대화 할 수 있어 다가백신이 주를 이룸. 본 과제에서 개발된 백신보조제 역시 조류 핵심질병인 뉴캐슬병 바이러스, 조류인플루엔자 바이러스, 산란 저하증 바이러스, 닭 전염성 기관지염 바이러스 항원을 포함하는 다가백신(제품명 가칭 NEO-6)적용하고자 시험백신을 아래 표와 같이 제조함.

표7. 시험백신 제조내역

Contents (per 1 dose)	Mixcure ratio
NDV (rNDV-mF strain) ^A10 ^{8.4} EID ₅₀	Bulk : 75,000 ml Adjuvant : 175,000 ml
IBV (KM91 strain) ^B10 ^{6.4} EID ₅₀	
IBV (ADL05258 strain) ^B10 ^{6.1} EID ₅₀	
EDSV (K11 strain) ^C10 ^{5.8} EID ₅₀	
AIV (A/Chicken/Korea/01310/2001(H9N2) CE20 strain) ^A10 ^{8.4} EID ₅₀	
Adjuvant(CAvant WO-A1)70%	
Formalin0.2% 이하	

(2) 시험백신의 안전성 시험

백신보조제 및 시험백신의 안전성 확인을 위하여 2수분 접종 시험, 단일용량 반복 접종 시험 그리고 2수분 반복 접종 시험을 실시함.

① 2수분 접종 시험

뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염, 산란저하증 및 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형)에 노출된 적이 없는 건강한 6~8주령의 닭 5마리를 사용하여 백신 2수분을 1회 근육접종하고 대조군과 함께 14일간 관찰함. 모든 백신의 접종 후 시험기간 동안 폐사한 개체 없이 모두 건강하였음.

Group	Clinical signs (No. of birds positive/No. of birds examined)
Test group	0/5
Control	0/5

② 단일용량 반복 접종 시험

뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염, 산란저하증 및 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형)에 노출된 적이 없는 건강한 6~8주령의 닭 5마리를 사용하여 백신 1수분을 근육접종하고 2주 후 동일방법으로 접종하여 대조군과 함께 14일간 관찰함. 모든 백신의 접종 후 시험기간 동안 폐사한 개체 없이 모두 건강하였음.

Group	Clinical signs (No. of birds positive/No. of birds examined)
Test group	0/5
Control	0/5

③ 2수분 반복 접종 시험

뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염, 산란저하증 및 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형)에 노출된 적이 없는 건강한 6~8주령의 닭 5마리를 사용하여 백신 2수분을 근육접종하고 2주 후 동일방법으로 접종하여 대조군과 함께 14일간 관찰함. 모든 백신의 접종 후 시험기간 동안 폐사한 개체 없이 모두 건강하였음.

Group	Clinical signs (No. of birds positive/No. of birds examined)
Test group	0/5
Control	0/5

④ 증체율

시험백신이 증체율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 백신 접종 그룹과 백신을 접종하지 않은 그룹에 각각 10수씩 배정하고 백신 접종 전부터 주령별로 체중을 측정하여 증체율을 확인함.

시험결과 시험백신 1차 접종 1주차에 백신을 접종한 그룹이 백신을 접종하지 않은 대조군에 비하여 체중이 약 100g 정도 적었으나, 1차 접종 2주후부터는 오차범위 내의 차이를 보였고, 2차 접종 2주후에는 백신 비접종 그룹과 동일한 체중을 나타내었음. 백신접종에 따른 스트레스 및 증체율에는 큰 차이가 없는 것을 확인함.

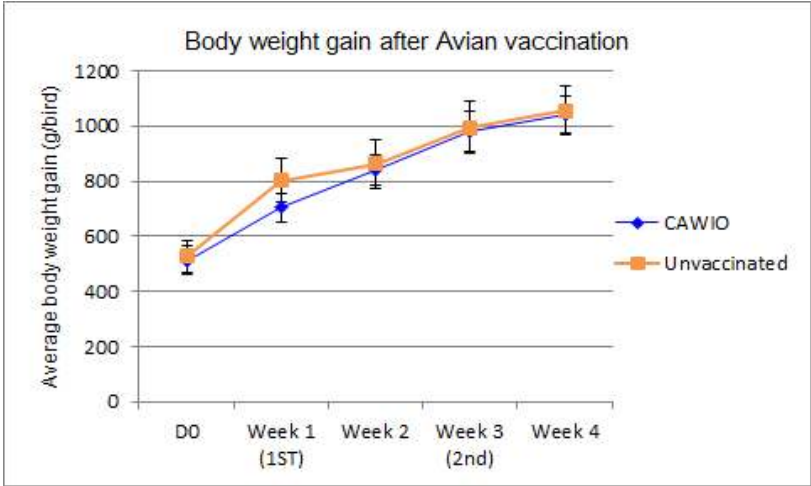


그림15. 백신접종에 따른 증체율 확인

(3) 시험백신의 면역원성 시험

임상시험에 앞서 일반 접종 프로그램에 따라 백신을 접종한 일반 닭 20수에 대하여 NEO-6 시험백신을 접종하고 그에 따른 항체가 변화추이를 확인하고자 시험을 수행함.

시험결과 NDV는 접종전 평균 2^7 의 항체가를 보이고 있으며, 접종 후 2^{10} 까지 항체가가 상승하고 대조군은 시간 경과에 따라 감소하는 추세를 보임. AIV는 백신접종 전 AI에 대한 항체가를 보유하고 있지 않았으며, 백신접종 후 검정기준인 2^6 이상의 항체가를 보여 검정기준을 만족하는 수준으로 나타남. 마지막으로 EDSV의 경우 개체간 항체가 차이가 뚜렷이 나타나 경향성을 확인하기 어려웠으며, 백신 접종 후에는 검정기준인 2^4 이상의 항체가를 보여 검정기준을 만족하는 수준으로 나타남.

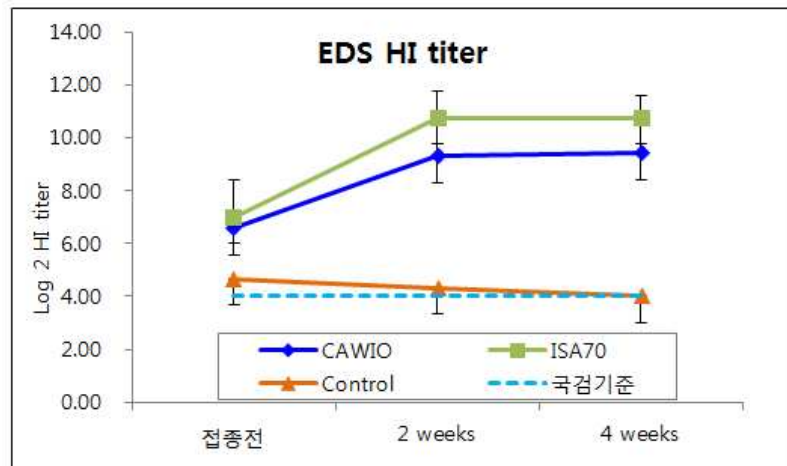
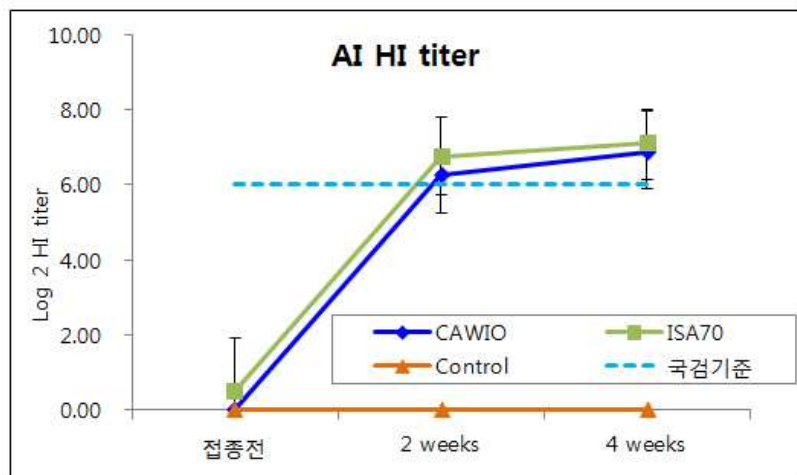
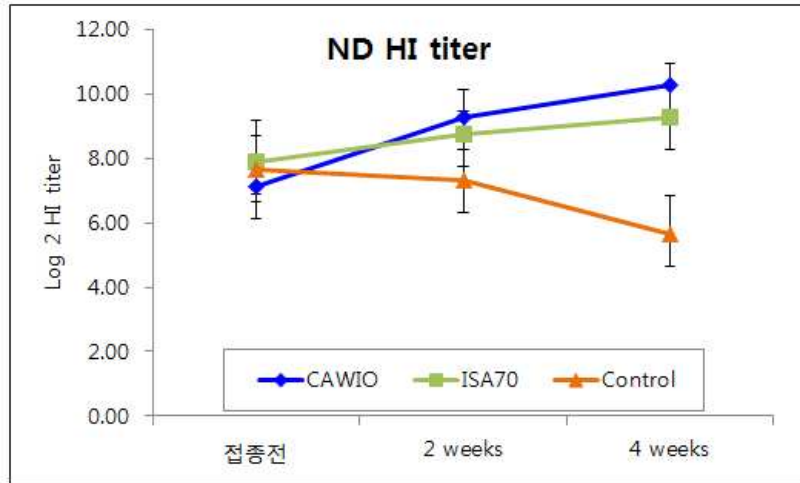


그림16. 일반 닭의 백신 접종 후 ND, AI, EDS HI 항체가 측정결과

3) 뉴캐슬병 바이러스에 대한 반수방어용량(PD₅₀) 평가

6주령의 SPF 시험계를 대상으로 백신의 dose를 달리하여 접종한다. 백신 접종 3주 후 모든 시험군에 대해 공격용 뉴캐슬병 바이러스 (Kr005 strain, 10^{5.5} ELD₅₀/bird)를 근육 내 공격접종한다. 공격접종 후 14일간 생존율을 확인한다.

Group	Vaccine	Injection dose	Exp. animal	No. of animals	Remark
1	CAvant WO-A1	1 dose	6 weeks old SPF chicken	5	Kr005 strain, 10 ^{5.5} ELD ₅₀ /bird
2		1/25 dose		10	
3		1/50 dose		10	
4		1/100 dose		8	
5	Challenge control			5	

시험결과, CAvant WO-A1를 사용한 시험군은 82.4 PD₅₀ 결과를 보여 국제기준인 50 PD₅₀ 이상으로 높은 수준임을 확인하였다.

Group	Vaccine	Injection dose	No. of animals	Survival rate	PD ₅₀
1	CAvant WO-A1	1 dose	5	100%	82.4
2		1/25 dose	10	70%	
3		1/50 dose	10	70%	
4		1/100 dose	8	75%	
5	Challenge control		5	0%	

4) 개발된 가금용 오일 백신보조제의 SPF 닭에서의 항체가 지속성 평가

특정 병원체에 노출되지 않은 SPF(Specific pathogen free) 닭을 사용하여 백신 접종 프로그램에 따라 백신을 접종하였다. 2개의 시험군과 1개의 무접종 대조군으로 그룹을 분류하였다. 시험군에는 NDV, AIV, EDSV, IBV 항원 조성에 백신보조제만 CAvant WO-A1와 ISA 70로 달리하여 백신을 제조하였다. 백신 제조 후 접종 프로그램에 따라 총 37주 (2차 접종 후 35주) 간의 시험결과를 토대로 시험백신의 지속성을 관찰하였다. 백신 접종 후 총 37주 간 항체가를 측정함으로써 백신보조제 종류에 따른 지속 여부를 확인하고자 하였다.

Group	Antigen	Adjuvant	Note
Group1	NDV-K(rND-mF) EDSV-K(K11)	CAvant WO-A1	시험군
Group2	AIV-K(01310) IBV-K(KM91, ADL05258)	ISA70	시험군
Group3			무접종 대조군

SPF 닭 25마리를 준비하여, 시험군 각각 10마리, 무접종 대조군 5마리를 배정하여 백신 1수분인 0.5ml을 근육 내로 접종한다. 그리고 일정에 따라 시험백신 접종 및 채혈을 실시한다. 1차 접종 이후 2주 후 2차 접종 한다. 채혈은 4주차 까지 1주 간격으로 진행하고, 이후 8주차까지는 2주 간격으로 진행하고, 37주 까지 4주 간격으로 진행하였다.

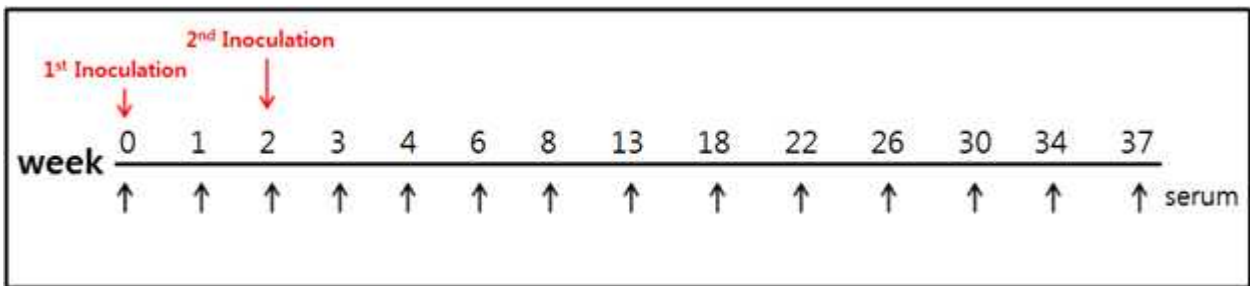


그림17. 시험백신 접종 및 채혈 일정

뉴캐슬병에 대한 효력 검정기준은 90% 방어율 측정법으로 공격접종 후 시험군의 90% 이상이 생존하여야 한다. SFP닭의 경우 CAvantWO-A1과 ISA 70 을 사용한 백신 접종군 둘 다 1차 접종 이후 2주차 까지 HI titer가4배 이상 올랐다. 그리고 2차 접종 2주차에 HI titer 가 32배 이상 올랐고, 37주에 8배까지 낮아졌다.

CAvant WO-A1의 경우 접종 1차 1주 까지 ISA 70 접종군과 비슷한 수준으로 HI titer가 4배를 나타냈다. 2차 접종 후 2주 (4주)에 HI titer가 32배를 나타냈다. 전체적으로 CAvant WO-A1를 사용한 그룹에서 ISA 70 접종군 보다 HI titer가 조금 더 높거나 비슷한 수준으로 유지됨을 나

타냈다.

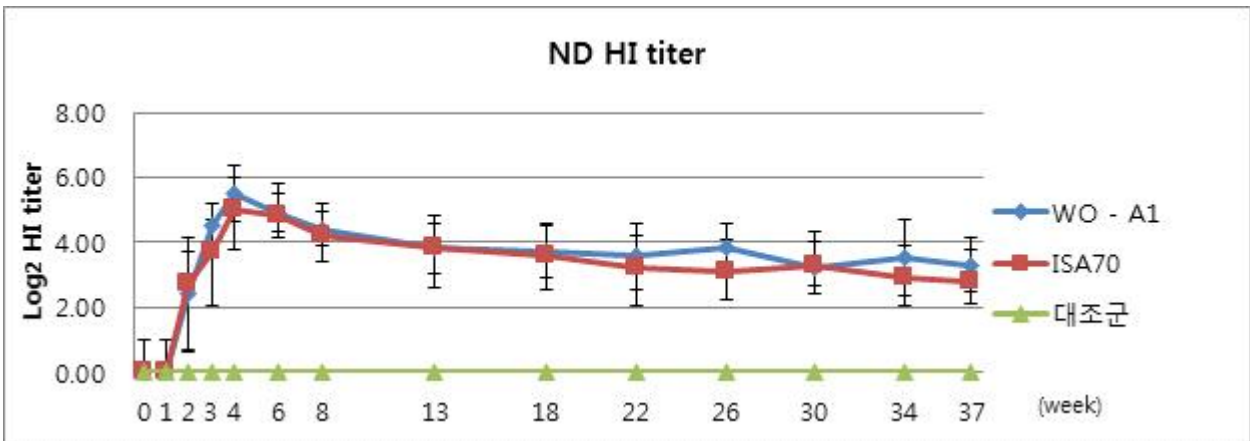


그림18. SPF 닭에서 CAvant WO-A1와 ISA 70 의 ND HI test 비교 결과

저병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 효력 검정기준은 닭 적혈구 응집억제 항체가 64 배 이상 이어야한다. SFP닭의 경우 CAvant WO-A1과 ISA 70 을 사용한 백신 접종군 둘 다 1 차 접종 이후 2차 접종 2주차 까지 HI titer가 256배 이상으로 올랐다가 이후 부터는 가파르게 떨어지며 국검 기준 이하 (64배) 로 떨어졌다.

ISA 70 이 2차 접종 2주차 (4주)에 HI titer가 512배로 가장 높았다. 그리고 2차 접종 이후 4주 차 (6주) 에는 32배가 되었다. CAvant WO-A1경우2차 접종 2주차 (4주)에 HI titer가 256배 되었고, 2차 4주 (6주)에 32배가 되었다.

CAvant WO-A1와 ISA 70 을 사용한 백신 접종군 둘 다 비슷한 양상으로 HI titer가 형성되었다. AI의경우 ISA 70보다 CAvant WO-A1가 HI titer가 조금 더 낮거나 비슷하게 유지되었다.

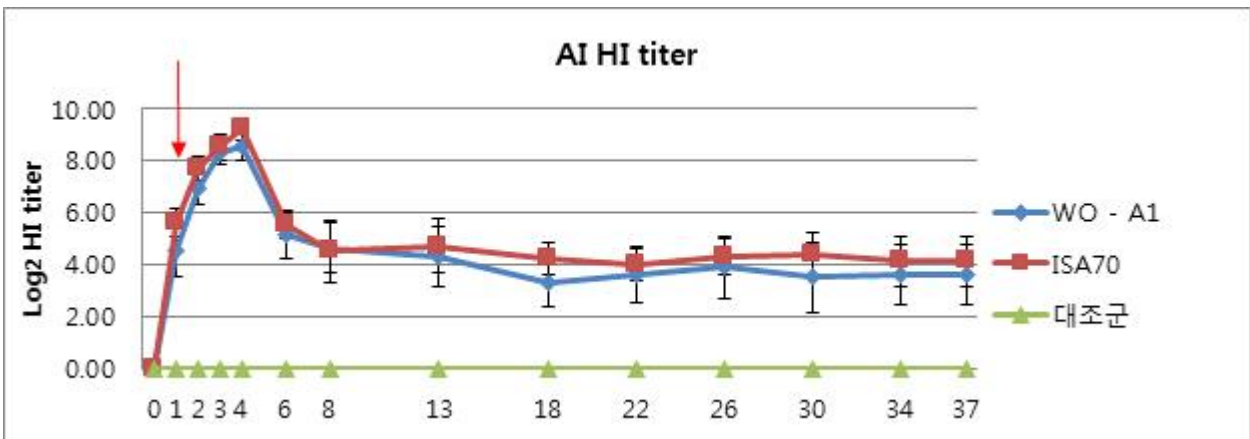


그림19. SPF 닭에서 CAvant WO-A1와 ISA 70 의 AI HI test 비교 결과

백신 및 백신보조제의 임상시험 전 효능평가를 위해서는 특정 병원체에 노출된적이 없는 개체에 해당 백신을 접종하여 항체가 시험을 진행 하였다. 2차 접종 35주후까지 항체가 유지에 대한 지속시험을 함께 확인해본 시험이다.

· 뉴캐슬병 바이러스의 항체가는 NEO- 6 백신에서 CAvant WO-A1가 ISA 70에 비해 높거나

같은 수준의 HI titer를 보여주었으며 CAVant WO-A1를 adjuvant로 사용했을 경우 2차 2주차에 항체가가 64배 수준으로 올랐으며 시간이 경과함에 따라 낮아졌다. 35주 후에는 8배 수준으로 떨어졌다.

· 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항체가는 ISA 70이 CAVant WO-A1보다 높거나 비슷한 수준을 항체가가 유지되었다. CAVant WO-A1와 ISA 70 둘 다 접종 2차 2주까지는 256배 까지 항체가를 유지했으나, 2차 4주 이후에는 국검 기준 (64배) 이하로 떨어졌다. 이 후 35주차 까지 지속적으로 감소하였다.

NEO-6 지속성 시험을 통해서 확인한 결과 뉴캐슬병과 조류인플루엔자 바이러스에서 CAVant WO-A1와 ISA 70 은 그룹간 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었다. 산란저하증의 경우 항체가에서 약간의 차이가 있었지만 CAVant WO-A1와 ISA 70그룹 둘 다 검정 기준 이상의 항체가를 보였다. 또한 뉴캐슬병과 산란저하증의 경우 백신접종 후 37주 (약 6개월)간 검정기준 이상의 항체가를 기록하며 지속되는 것을 확인할 수 있었다. 다만, AI의 경우 2차 접종 2주후까지는 높게 형성되나 이후 항체가가 감소하여 이는 백신 프로그램 등의 조정이 필요해 보이나, ISA70과 CAVant WO-A1의 양상이 동일하여 백신보조제간의 차이는 아닌 것으로 판단된다.

2-1-3. 가금용 오일 백신보조제가 포함된 백신의 임상시험

개발된 가금용 오일 백신보조제(CAVant WO-A1)가 포함된 백신의 신규 허가를 위하여 임상시험계획서를 농림축산검역본부에 제출하였으며 임상시험계획서에 작성된 내용과 같이 제조방법에 따라 3 lot의 시험백신을 아래와 같이 제조함.

1) 시험백신 제조내역

Lot No.	Contents(per 1 dose, 0.5ml)	Production quantity (1,000dose)
T316N601	NDV (rNDV-mF strain) ^A10 ^{8.4} EID ₅₀ IBV (KM91 strain) ^B10 ^{6.4} EID ₅₀ IBV (ADL05258 strain) ^B10 ^{6.1} EID ₅₀ EDSV (K11 strain) ^C10 ^{5.8} EID ₅₀ AIV (A/Chicken/Korea/01310/2001(H9N2) CE20 strain) ^A10 ^{8.4} EID ₅₀ Adjuvant (CAvant WO-A1)70% Formalin0.2% 이하	102
T316N602	NDV (rNDV-mF strain) ^A10 ^{8.8} EID ₅₀ IBV (KM91 strain) ^B10 ^{6.2} EID ₅₀ IBV (ADL05258 strain) ^B10 ^{6.1} EID ₅₀ EDSV (K11 strain) ^C10 ^{6.0} EID ₅₀	100

	AIV (A/Chicken/Korea/01310/2001(H9N2) CE20 strain) ^A10 ^{8.4} EID ₅₀ Adjuvant (CAvant WO-A1)70% Formalin0.2% 이하	
T316N603	NDV (rNDV-mF strain) ^A10 ^{8.4} EID ₅₀ IBV (KM91 strain) ^B10 ^{6.4} EID ₅₀ IBV (ADL05258 strain) ^B10 ^{6.2} EID ₅₀ EDSV (K11 strain) ^C10 ^{5.8} EID ₅₀ AIV (A/Chicken/Korea/01310/2001(H9N2) CE20 strain) ^A10 ^{8.2} EID ₅₀ Adjuvant (CAvant WO-A1)70% Formalin0.2% 이하	98

(1) 시험백신의 일반시험

시험백신 3 Lot.에 대하여 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준에 따라 일반시험(특성시험, 수소이온농도시험, 무균시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인 시험)을 실시함. 일반시험 실험 결과 3 Lot 모두 특별한 이상을 발견할 수 없었음.

① 특성시험

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 2개 이상의 백신에 대하여 색조, 혼탁도, 이물, 이취, 내용물의 균일성에 대하여 검사함. 시험 결과 모든 백신이 백색의 유탁주사액으로서 정치하면 약간의 침전층이 생기나 진탕하면 균일한 액체가 되며, 색조나 혼탁도에 이상이 없고, 이물 및 이취가 없이 성상이 균일하였음.

Group	Tests				
	Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T316N601	-*	-	-	-	-
T316N602	-	-	-	-	-
T316N603	-	-	-	-	-

*: Normal or negative

② 수소이온농도시험

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03에 따라 pH 측정기를 이용하여 백신의 pH를 측정하였으며, 실험 결과 모든 백신이 pH는 6.0~8.0 범위 이내임을 확인함.

Group	pH
-------	----

Group	pH
T316N601	7.54
T316N602	7.61
T316N603	7.48

③ 무균시험

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-06에 따라 3개 이상의 백신에 대하여 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), fluid thioglycollate medium(Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22°C와 37°C에서 7일간 배양하면서 잡균의 혼입여부를 관찰하였고, 시험 결과 모든 백신에서 어떠한 세균의 발육도 나타나지 않음.

Group	22°C			37°C		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T316N601	-*	-	-	-	-	-
T316N602	-	-	-	-	-	-
T316N603	-	-	-	-	-	-

*: No growth of any bacteria

④ 방부제 정량시험

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-09에 따라 포르말린 함량을 측정하기 위하여 Schiff 시약 2.0mL를 가하고 동일하게 포르말린 표준액에도 가하여 실온에서 30분간 방치하여 1시간 이내에 520nm spectrophotometer를 이용하여 측정함. 시험 결과 모든 백신에서 포르말린 함량이 0.2% 이하임을 확인함.

Group	Formalin content
T316N601	0.12%
T316N602	0.09%
T316N603	0.11%

⑤ 불활화 확인 시험

각 백신 별로 산란저하증 바이러스에 감수성이 있는 9~11일령 발육오리란 10개를 사용하여 검정대상 제품을 장노막강내에 0.2 mL씩 접종하여 37°C에서 배양하고, 접종 7일 후 장노막강액을 채취하여 2차로 10개의 9~11일령 발육오리란의 장노막강 내에 0.2 mL씩 계대 접종

한 후 37°C 에서 7일간 배양하였다. 각각의 접종란은 접종 7일 후에 장노막강액의 닭 적혈구 응집성을 시험하였음.

시험 결과 모든 백신에서 1차 접종한 오리란과 1차 접종하여 얻은 장노막강액을 2차 접종한 오리란은 이상이 없었으며, 장노막강액의 적혈구 응집성은 관찰되지 않았음.

Group	Hemagglutination	
	1차	2차
T316N601	-*	-
T316N602	-	-
T316N603	-	-

*: Hemagglutination was not detected.

⑥ 안전시험

각 백신 별로 뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염, 산란저하증 및 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형)에 노출된 적이 없는 건강한 6~8주령의 닭 5마리를 사용하여 백신 2수분을 1회 근육접종하고 대조군과 함께 14일간 관찰함. 시험 결과 제조 직후 3 Lot의 백신의 접종 후 시험기간 동안 폐사한 개체 없이 모두 건강한 것으로 관찰됨.

Group	Clinical signs
	(No. of birds positive/No. of birds examined)
T316N601	0/5
T316N602	0/5
T316N603	0/5
Control	0/5

⑦ 뉴캐슬병의 효력시험

뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염, 산란저하증 및 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형)에 노출된 적이 없는 건강한 6~8주령의 닭 20마리를 15마리(12개월까지는 10마리)는 시험군으로, 5마리(12개월까지는 10마리)는 대조군으로 사용하고, 각 백신 별로 시험군에 백신의 1수분을 1회 근육접종하고 3주 후에 공격용 뉴캐슬병 바이러스(Kr005주, $10^{5.5}$ ELD₅₀/bird)를 근육 내에 공격접종하고 14일간 임상증상을 관찰함. 시험결과 제조 직후 3 Lot의 백신 효력시험 결과 대조군은 모두 폐사하고 백신을 접종한 시험군은 100% 생존함.

Group	No. of birds alive /	Survival rate
-------	----------------------	---------------

No. of birds examined		
T316N601	10/10	100%
T316N602	10/10	100%
T316N603	10/10	100%
Control	0/10	0%

신규 3 Lot의 신규 시험백신에 대하여 일반시험, 안전시험 그리고 효력시험을 진행한 결과 이전 Lot의 시험백신과 비교하였을 때, 차이가 없이 동등함을 확인함. 따라서 야외 임상 시험에 적용하기로 결정함.

2) 시제품의 3개월 마다 안전시험 및 효능시험 반복

시험백신을 2~8℃에 보존하면서, 제조일로부터 3개월 단위로 특성시험, 수소이온농도시험, 무균시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인 시험, 안전시험, 효력시험 및 혈청 역가 시험을 실시하여 백신의 안정성을 확인하고자 함.

백신 제조일로부터 9개월이 경과되어 각 항목별 아래와 같은 시험결과를 얻음.

① 특성시험

제조 후 9개월까지 모든 백신이 백색의 유탁주사액으로서 정치하면 약간의 침전층이 생기나 진탕하면 균일한 액체가 되며, 색조나 혼탁도에 이상이 없고, 이물 및 이취가 없이 성상이 균일하였음.

Group	MPM	Tests				
		Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T314N601	0 MPM	-*	-	-	-	-
	3 MPM	-	-	-	-	-
	6 MPM	-	-	-	-	-
	9 MPM	-	-	-	-	-

MPM: months post manufacture

*: Normal or negative

② 수소이온농도시험

제조 후 9개월까지 모든 백신이 pH는 6.0~8.0 범위 이내임을 확인함.

Group	pH			
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM
T314N601	7.57	7.61	7.59	7.62

③ 무균시험

제조 후 9개월까지 모든 백신에서 어떠한 세균의 발육도 관찰되지 않음.

Group	MPM	22°C			37°C		
		NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T314N601	0 MPM	*	-	-	-	-	-
	3 MPM	-	-	-	-	-	-
	6 MPM	-	-	-	-	-	-
	9 MPM	-	-	-	-	-	-

*: No growth of any bacteria

④ 방부제 정량시험

제조 후 9개월까지 모든 백신에서 포르말린 함량이 0.2% 이하로 측정됨.

Group	Formalin content			
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM
T314N601	0.10%	0.12%	0.11%	0.10%

⑤ 불활화 확인 시험

제조 후 9개월까지 모든 백신에서 1차 접종한 오리란과 1차 접종하여 얻은 장노막강액을 2차 접종한 오리란은 이상이 없었으며, 장노막강액의 적혈구 응집성은 관찰되지 않음.

Group	MPM	Hemagglutination	
		1차	2차
T314N601	0 MPM	*	-
	3 MPM	-	-
	6 MPM	-	-
	9 MPM	-	-

*: Hemagglutination was not detected.

⑥ 안전시험

제조 후 9개월까지 모든 백신의 접종 후 시험기간 동안 폐사한 개체 없이 모두 건강하였음.

Group	Clinical signs (No. of birds positive/No. of birds examined)			
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM
T314N601	0/5	0/5	0/5	0/5
Control	0/5	0/5	0/5	0/5

⑦ 뉴캐슬병의 효력시험

제조 후 9개월까지 모든 백신의 효력시험 결과 대조군은 모두 폐사하고 백신을 접종한 시험군은 100% 생존하였음.

Group	MPM	No. of birds alive / No. of birds examined	Survival rate
T314N601	0 MPM	10/10	100%
Control		0/10	0%
T314N601	3 MPM	10/10	100%
Control		0/10	0%
T314N601	6 MPM	10/10	100%
Control		0/10	0%
T314N601	9 MPM	10/10	100%
Control		0/10	0%

⑧ 혈청 역가시험

○ 닭 전염성 기관지염

건강한 SPF 6~8주령의 닭 15마리를 10마리는 시험군으로, 5마리는 대조군으로 사용하여 각 백신 별로 시험군에 백신의 1수분을 2주 간격으로 2회 근육접종하고 3주 후에 채혈하여 중화시험을 실시함.

KM91주에 대한 시험 결과, 제조 후 9개월까지 모든 백신의 중화시험 결과 대조군의 혈청은 바이러스 역가에 대한 중화지수가 1.0 이하이며, 시험군의 중화지수는 2.0 이상임을 확인함.

Group	MPM	IBV KM91 strain		비고
		Virus titer (logEID ₅₀ /mL)	Neutralization index	
T314N601	0 MPM	4.2 ^A	2.3 ¹⁾	
Control		6.5 ^B	0.7 ²⁾	
Virus		7.2 ^C	-	
T314N601	3 MPM	4.4 ^A	2.0 ¹⁾	
Control		6.4 ^B	0.4 ²⁾	
Virus		6.8 ^C	-	
T314N601	6 MPM	4.2 ^A	2.0 ¹⁾	
Control		6.2 ^B	0.6 ²⁾	
Virus		6.8 ^C	-	
T314N601	9 MPM	4.0 ^A	2.4 ¹⁾	
Control		6.4 ^B	0.8 ²⁾	
Virus		7.2 ^C	-	

^A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

^B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

^C중화시 사용한 바이러스 역가

¹⁾대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

²⁾중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

ADL05258주에 대한 시험 결과 제조 후 9개월까지 모든 백신의 중화시험 결과 대조군의 혈청은 바이러스 역가에 대한 중화지수가 1.0 이하이며, 시험군의 중화지수는 2.0 이상임을 확인함.

Group	MPM	IBV ADL05258 strain		비고
		Virus titer (logEID ₅₀ /mL)	Neutralization index	
T314N601	0 MPM	4.4 ^A	2.2 ¹⁾	
Control		6.6 ^B	0.6 ²⁾	
Virus		7.2 ^C	-	
T314N601	3 MPM	4.5 ^A	2.3 ¹⁾	
Control		6.8 ^B	0.4 ²⁾	
Virus		7.2 ^C	-	
T314N601	6 MPM	4.5 ^A	2.1 ¹⁾	
Control		6.6 ^B	0.4 ²⁾	
Virus		7.0 ^C	-	
T314N601	9 MPM	4.0 ^A	2.4 ¹⁾	
Control		6.4 ^B	0.8 ²⁾	
Virus		7.2 ^C	-	

^A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가,

^B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

^C중화시 사용한 바이러스 역가

¹⁾대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

2) 중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

○ 산란저하증

건강한 SPF 6~8주령의 15마리를 10마리는 시험군으로, 5마리는 대조군으로 사용하였다. 각 백신 별로 시험군에 백신의 1수분을 2주 간격으로 2회 근육접종하고 3주 후에 채혈하여 산란저하증 바이러스에 대한 혈구응집억제시험을 실시함. 제조 후 9개월까지 모든 백신의 혈구응집억제시험 결과 모든 접종군은 512배 이상 대조군은 모두 2배 이하를 나타냄.

Group	MPM	EDS HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T314N601	0 MPM	10	11	10	10	9	10	10	11	9	11	10.1 ± 0.74
	3 MPM	11	10	9	10	9	10	9	11	9	9	9.7 ± 0.82
	6 MPM	9	9	10	10	11	11	11	11	10	11	10.3 ± 0.82
	9 MPM	10	11	10	11	10	10	9	10	11	11	10.3 ± 0.67
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1

○ 저병원성 조류인플루엔자(H9N2형)

건강한 SPF 6~8주령의 닭 15마리를 10마리는 시험군으로, 5마리는 대조군으로 사용하여 각 백신 별로 시험군에 백신의 1수분을 2주 간격으로 2회 근육접종하고 3주 후에 채혈하여 저병원성 조류 인플루엔자에 대한 혈구응집억제시험을 실시함. 제조 후 9개월까지 모든 백신의 혈구응집억제시험 결과 모든 접종군은 평균 128배 이상 대조군은 모두 2배 이하를 나타냄.

Group	MPM	AIV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T314N601	0 MPM	7	7	7	8	6	7	7	9	8	8	7.4 ± 0.84
	3 MPM	8	8	8	7	6	6	6	8	7	8	7.2 ± 0.92
	6 MPM	7	8	7	8	8	7	8	7	8	7	7.5 ± 0.53
	9 MPM	8	7	7	7	8	7	8	8	8	7	7.5 ± 0.53
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1

3) 야외임상평가 결과

(1) 제1농장

① 시험백신의 안전성 시험

농장 내에서 시험 백신의 안전성을 확인하기 위하여 60일령(9주령)의 시험계군(T316N601: 약40,000수)에 근육접종 후 110일령(16주령)에 추가 근육접종하고, 접종 시마다 무접종 대조군(37수)과 함께 21일간 임상관찰을 실시함. 시험결과시험기간 동안 시험백신의 접종에 의한 임상 증상은 없었으며 폐사도 주간폐사 0.1% 이하의 정상 수준의 폐사율을 보임.

관찰일시 (1차 접종)	구분	임상 증상				
		설사	식욕부진	과민증	폐사	접종반응
1 DPI	T316N601	-	-	-	4	-
	Control	-	-	-	-	-
7 DPI	T316N601	-	-	-	5	-
	Control	-	-	-	-	-
14 DPI	T316N601	-	-	-	5	-
	Control	-	-	-	-	-
21 DPI	T316N601	-	-	-	6	-
	Control	-	-	-	-	-

관찰일시 (2차 접종)	구분	임상 증상				
		설사	식욕부진	과민증	폐사	접종반응
1 DPI	T316N601	-	-	-	5	-
	Control	-	-	-	-	-
7 DPI	T316N601	-	-	-	4	-
	Control	-	-	-	-	-
14 DPI	T316N601	-	-	-	6	-
	Control	-	-	-	-	-
21 DPI	T316N601	-	-	-	4	-
	Control	-	-	-	-	-

② 시험계군의 혈청역가 시험

시험백신이 각 질병에 대한 시험계의 항체 형성 정도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 백신을 접종하고, 백신접종군과 대조군의 NDV, EDSV, 그리고 AIV에 대한 혈구응집억제 항체가와 IBV에 대한 중화지수를 주령별로 확인함.

NDV에 대한 시험 결과, 대조군과 동일한 수준의 HI 역가에서 시험백신 접종 후 상승하여 시험기간 동안 512배 이상의 HI 역가를 유지함. 대조군 역시 시험백신 외 ND 백신(생독: 1일령, 12일령, 22일령, 8주령; 사독: 7일령, 19주령)이 접종되어 높아진 항체역가를 보임.

구분	채혈시기	NDV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T316N601	0 WPI	8	7	8	8	8	7	6	7	7	8	7.4 ± 0.7
Control	9 weeks	7	8	6	8	7	8	7	8	6	8	7.3 ± 0.82
T316N601	4 WPI	10	9	10	9	10	10	9	10	9	9	9.5 ± 0.53
Control	13 weeks	7	8	8	7	6	8	7	8	8	6	7.3 ± 0.82
T316N601	8 WPI	10	9	10	11	10	11	10	11	9	10	10.1 ± 0.74
Control	17 weeks	7	8	7	7	8	7	6	8	6	8	7.2 ± 0.79
T316N601	12 WPI	10	10	11	10	9	10	11	11	11	10	10.3 ± 0.67
Control	21 weeks	8	9	8	9	9	8	10	7	8	8	8.4 ± 0.84
T316N601	16 WPI	10	8	9	10	9	10	9	10	10	10	9.5 ± 0.71
Control	25 weeks	8	7	8	7	7	8	9	8	9	8	7.9 ± 0.74
T316N601	20 WPI	10	9	9	10	9	10	7	10	10	9	9.3 ± 0.95
Control	29 weeks	7	8	7	6	8	9	8	8	6	8	7.5 ± 0.97

IBV KM91주에 대한 시험 결과, IBV KM91주에 대한 중화지수는 기존 접종된 백신으로 인해 시험백신의 접종 전부터 시험군과 대조군 혈청의 시험 역가지수와 바이러스 역가지수의 차이가 1.5 이상으로 나타남. 바이러스 역가와 시험군 역가를 비교하였을 때, 백신 접종 후 지수 차이가 모두 3.0 이상으로 해당 바이러스에 대한 충분한 면역력이 있음이 확인됨.

구분	채혈시기	IBV KM91 strain		비고 (Virus와 차이)
		바이러스 역가 (logEID ₅₀ /mL)	중화지수	
T316N601	0 WPI 9 weeks	4.5 ^A	0.0 ¹⁾	1.9
Control		4.5 ^B	1.9 ²⁾	
Virus		6.4 ^C	-	
T316N601	4 WPI 13 weeks	3.3 ^A	1.3 ¹⁾	3.2
Control		4.6 ^B	1.9 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N601	8 WPI 17 weeks	2.8 ^A	1.8 ¹⁾	3.7
Control		4.6 ^B	1.9 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N601	12 WPI 21 weeks	2.5 ^A	1.3 ¹⁾	3.9
Control		3.8 ^B	2.6 ²⁾	

Virus		6.4 ^C	-	
T316N601	16 WPI	2.6 ^A	1.1 ¹⁾	3.9
Control		3.7 ^B	2.8 ²⁾	
Virus	25 weeks	6.5 ^C	-	
T316N601	20 WPI	2.7 ^A	1.1 ¹⁾	3.8
Control		3.8 ^B	2.7 ²⁾	
Virus	29 weeks	6.5 ^C	-	

WPI: Weeks Post 1st Inoculation

A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

C중화시 사용한 바이러스 역가

1) 대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

2) 중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

IBV ADL05258주에 대한 시험 결과, IBV ADL05258주에 대한 중화지수는 기존 접종된 백신으로 인해 시험백신의 접종 전부터 시험군과 대조군 혈청의 시험역가지수와 바이러스 역가지수의 차이가 1.3으로 확인됨. 바이러스 역가와 시험군 역가를 비교하였을 때, 백신 접종 후 지수 차이가 3.0이상으로 해당 바이러스에 대한 충분한 면역력이 있음을 확인함.

구분	채혈시기	IBV ADL05258 strain		비고
		바이러스 역가 (logEID ₅₀ /mL)	중화지수	
T316N601	0 WPI	5.2 ^A	0.0 ¹⁾	
Control		5.2 ^B	1.3 ²⁾	
Virus	9 weeks	6.5 ^C	-	
T316N601	4 WPI	3.5 ^A	1.7 ¹⁾	
Control		5.2 ^B	4.0 ²⁾	
Virus	13 weeks	6.6 ^C	-	
T316N601	8 WPI	3.2 ^A	2.2 ¹⁾	
Control		5.4 ^B	1.2 ²⁾	
Virus	17 weeks	6.6 ^C	-	
T316N601	12 WPI	2.6 ^A	1.2 ¹⁾	
Control		3.8 ^B	2.7 ²⁾	
Virus	21 weeks	6.5 ^C	-	
T316N601	16 WPI	2.8 ^A	1.0 ¹⁾	
Control		3.8 ^B	2.9 ²⁾	
Virus	25 weeks	6.5 ^C	-	

Virus		6.7 ^C	-
T316N601		3.2 ^A	1.0 ^D
Control	20 WPI	4.2 ^B	2.4 ²⁾
Virus	29 weeks	6.6 ^C	-

WPI: Weeks Post 1st Inoculation

A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

C중화시 사용한 바이러스 역가

¹⁾대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

²⁾중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

EDSV에 대한 시험 결과, EDSV에 대한 HI 역가는 백신 접종 후 64배 이상으로 상승하여 시험 기간동안 유지되었으며, 2회 접종 후 검사(8 WPI)에서는 256배 이상의 역가를 확인할 수 있었음. 대조군의 경우 시험 기간동안 EDSV에 대한 역가는 확인되지 않음.

구분	채혈시기	EDSV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
T316N601	0 WPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
Control	9 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N601	4 WPI	8	8	6	7	6	7	8	6	8	7	7.1 ± 0.88	
Control	13 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	
T316N601	8 WPI	9	9	7	9	9	7	8	8	8	7	8.1 ± 0.88	
Control	17 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	
T316N601	12 WPI	8	9	10	9	8	9	9	8	8	8	8.6 ± 0.7	
Control	21 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	
T316N601	16 WPI	8	8	7	8	7	8	9	7	7	8	7.7 ± 0.67	
Control	25 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	
T316N601	20 WPI	7	7	9	6	6	7	5	5	8	8	6.8 ± 1.32	
Control	29 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	

AIV에 대한 시험 결과, AIV에 대한 HI 역가는 백신 접종 후 64배 이상으로 상승하여 시험 기간동안 유지되었으며, 2회 접종 후 검사(8 WPI)에서는 128배 이상의 역가를 확인할 수 있었음. 대조군의 경우 시험 기간동안 AIV에 대한 역가는 확인되지 않음.

구분	채혈시기	AIV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

T316N601	0 WPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
Control	9 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N601	4 WPI	7	7	5	7	6	5	6	5	7	6	6.1 ± 0.88
Control	13 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N601	8 WPI	7	8	7	8	8	6	8	8	7	8	7.5 ± 0.71
Control	17 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N601	12 WPI	7	9	8	9	7	8	7	9	9	8	8.1 ± 0.88
Control	21 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N601	16 WPI	7	8	8	6	8	8	6	8	7	8	7.4 ± 0.84
Control	25 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N601	20 WPI	7	6	7	8	7	5	7	5	6	7	6.5 ± 0.97
Control	29 weeks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1

(2) 제2농장

① 시험백신의 안전성 시험

농장 내에서 시험 백신의 안전성을 확인하기 위하여 8~12주령의 시험계군에 근육접종 후 14~18주령에 추가 근육접종하고, 접종 시마다 무접종 대조군(37수)과 함께 21일간 임상관찰을 실시함. 시험결과시험기간 동안 시험백신의 접종에 의한 임상 증상은 없었으며 폐사도 주간폐사 0.1% 이하의 정상 수준의 폐사율을 보임.

관찰일시 (1차 접종)	구분	임상 증상				
		설사	식욕부진	과민증	폐사	접종반응
1 DPI	T316N602	-	-	-	6	-
	Control	-	-	-	-	-
7 DPI	T316N602	-	-	-	7	-
	Control	-	-	-	-	-
14 DPI	T316N602	-	-	-	7	-
	Control	-	-	-	-	-
21 DPI	T316N602	-	-	-	8	-
	Control	-	-	-	-	-

관찰일시 (2차 접종)	구분	임상 증상				
		설사	식욕부진	과민증	폐사	접종반응

1 DPI	T316N602	-	-	-	7	-
	Control	-	-	-	-	-
7 DPI	T316N602	-	-	-	8	-
	Control	-	-	-	-	-
14 DPI	T316N602	-	-	-	9	-
	Control	-	-	-	-	-
21 DPI	T316N602	-	-	-	9	-
	Control	-	-	-	-	-

DPI: Days Post Inoculation

② 시험계군의 혈청역가 시험

NDV에 대한 시험 결과, 대조군과 동일한 수준의 HI 역가에서 시험백신 접종 후 상승하여 시험기간 동안 512배 이상의 HI 역가를 유지하는 것으로 측정됨. 대조군 역시 시험백신 외 ND 백신(생독: 1일령, 10일령, 20일령, 30일령; 사독: 7일령, 17주령)이 접종되어 높아진 항체

구분	채혈시기	NDV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T316N602	0 WPI	6	8	7	8	7	8	6	6	8	8	7.2 ± 0.92
Control		7	8	8	7	6	8	6	7	6	8	
T316N602	4 WPI	9	8	9	9	8	9	8	10	9	8	8.7 ± 0.67
Control		8	7	8	7	6	6	7	8	7	8	
T316N602	8 WPI	9	9	10	9	10	10	10	11	9	10	9.7 ± 0.67
Control		7	6	7	7	6	7	6	8	6	8	
T316N602	12 WPI	9	10	9	10	9	9	11	9	10	10	9.6 ± 0.7
Control		8	7	9	9	8	7	8	9	8	8	
T316N602	16 WPI	10	9	10	10	11	10	11	10	11	10	10.2 ± 0.63
Control		7	8	7	8	7	8	7	9	8	6	
T316N602	20 WPI	10	11	10	9	10	10	11	11	11	9	10.2 ± 0.79
Control		9	7	9	9	10	8	9	10	8	10	

역가를 보임.

IBV KM91주에 대한 시험 결과, IBV KM91주에 대한 중화지수는 기존 접종된 백신으로 인해 시험백신의 접종 전부터 시험군과 대조군 혈청의 시험 역가지수와 바이러스 역가지수의 차이가 1.4로 확인됨. 바이러스 역가와 시험군 역가를 비교하였을 때, 백신 접종 후 지수 차이

가 모두 3.0 이상으로 해당 바이러스에 대한 충분한 면역력이 있음이 확인됨.

구분	채혈시기	IBV KM91 strain		비고 (Virus와 차이)
		바이러스 역가 (logEID ₅₀ /mL)	중화지수	
T316N602	0 WPI	5.2 ^A	0.0 ¹⁾	1.4
Control		5.2 ^B	1.4 ²⁾	
Virus		6.6 ^C	-	
T316N602	4 WPI	3.2 ^A	2.0 ¹⁾	3.3
Control		5.2 ^B	1.3 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N602	8 WPI	2.4 ^A	2.8 ¹⁾	4.1
Control		5.2 ^B	1.3 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N602	12 WPI	2.5 ^A	1.3 ¹⁾	4.1
Control		3.8 ^B	2.8 ²⁾	
Virus		6.6 ^C	-	
T316N602	16 WPI	2.8 ^A	1.0 ¹⁾	3.7
Control		3.8 ^B	2.7 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N602	20 WPI	3.2 ^A	1.0 ¹⁾	3.2
Control		4.2 ^B	2.2 ²⁾	
Virus		6.4 ^C	-	

WPI: Weeks Post 1st Inoculation

A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

C중화시 사용한 바이러스 역가

¹⁾대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

²⁾중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

IBV ADL05258주에 대한 시험 결과, IBV ADL05258주에 대한 중화지수는 기존 접종된 백신으로 인해 시험백신의 접종 전부터 시험군과 대조군 혈청의 시험역가지수와 바이러스 역가지수의 차이가 1.7로 확인됨. 백신 접종 후 지수 차이가 모두 3.0이상으로 해당 바이러스에 대한 충분한 면역력이 있음을 확인함.

구분	채혈시기	IBV ADL05258 strain		비고
		바이러스 역가 (logEID ₅₀ /mL)	중화지수	
T316N602	0 WPI	4.8 ^A	0.0 ¹⁾	
Control		4.8 ^B	1.7 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N602	4 WPI	3.2 ^A	1.6 ¹⁾	
Control		4.8 ^B	1.7 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N602	8 WPI	2.4 ^A	2.4 ¹⁾	
Control		4.8 ^B	1.8 ²⁾	
Virus		6.6 ^C	-	
T316N602	12 WPI	2.4 ^A	1.2 ¹⁾	
Control		3.6 ^B	2.9 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N602	16 WPI	2.4 ^A	1.2 ¹⁾	
Control		3.6 ^B	3.0 ²⁾	
Virus		6.6 ^C	-	
T316N602	20 WPI	2.6 ^A	1.2 ¹⁾	
Control		3.8 ^B	2.7 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	

WPI: Weeks Post 1st Inoculation

A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

C중화시 사용한 바이러스 역가

¹⁾대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

²⁾중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

EDSV에 대한 시험 결과, EDSV에 대한 HI 역가는 백신 접종 후 64배 이상으로 상승하여 시험 기간동안 유지되었으며, 2회 접종 후 검사(8 WPI)에서는 256배 이상의 역가를 확인할 수 있었음.

구분	채혈시기	EDSV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

구분	채혈시기	EDSV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T316N602	0 WPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	4 WPI	6	7	6	5	8	7	8	6	5	6	6.4 ± 1.07
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	8 WPI	9	9	7	8	9	9	9	8	9	7	8.4 ± 0.84
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	12 WPI	8	9	9	8	7	8	7	8	9	8	8.1 ± 0.74
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	16 WPI	8	7	9	8	6	7	8	9	7	8	7.7 ± 0.95
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	20 WPI	8	7	6	8	7	8	6	6	7	9	7.2 ± 1.03
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

AIV에 대한 시험 결과, AIV에 대한 HI 역가는 백신 접종 후 64배 이상으로 상승하여 시험 기간동안 유지되었으며, 2회 접종 후 검사(8 WPI)에서는 128배 이상의 역가를 확인할 수 있었음.

구분	채혈시기	AIV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T316N602	0 WPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	4 WPI	7	8	6	6	7	6	6	8	7	6	6.7 ± 0.82
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	8 WPI	9	8	7	8	8	9	8	9	9	8	8.3 ± 0.67
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	12 WPI	7	9	9	8	7	6	7	8	8	8	7.7 ± 0.95
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	16 WPI	6	7	8	6	6	8	6	7	6	8	6.8 ± 0.92
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T316N602	20 WPI	6	7	7	7	6	6	7	6	5	7	6.4 ± 0.7
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

(3) 제3농장

① 시험백신의 안전성 시험

농장 내에서 시험 백신의 안전성을 확인하기 위하여 60일령(9주령)의 시험계군에 근육접종 후 100일령(15주령)에 추가 근육접종하고, 접종 시마다 무접종 대조군과 함께 21일간 임상관찰을 실시한 결과, 시험기간 동안 시험백신의 접종에 의한 임상 증상은 없었으며 폐사도 주간폐사 0.1% 이하의 정상 수준의 폐사율을 보임.

관찰일시 (1차 접종)	구분	임상 증상				
		설사	식욕부진	과민증	폐사	접종반응
1 DPI	T316N603	-	-	-	8	-
	Control	-	-	-	-	-
7 DPI	T316N603	-	-	-	9	-
	Control	-	-	-	-	-
14 DPI	T316N603	-	-	-	8	-
	Control	-	-	-	-	-
21 DPI	T316N603	-	-	-	8	-
	Control	-	-	-	-	-

관찰일시 (2차 접종)	구분	임상 증상				
		설사	식욕부진	과민증	폐사	접종반응
1 DPI	T316N603	-	-	-	11	-
	Control	-	-	-	-	-
7 DPI	T316N603	-	-	-	9	-
	Control	-	-	-	-	-
14 DPI	T316N603	-	-	-	9	-
	Control	-	-	-	-	-
21 DPI	T316N603	-	-	-	7	-
	Control	-	-	-	-	-

DPI: Days Post Inoculation

② 시험계군의 혈청역가 시험

NDV에 대한 시험 결과, 대조군과 동일한 수준의 HI 역가에서 시험백신 접종 후 상승하여 시험기간 동안 512배 이상의 HI 역가를 유지함. 대조군 역시 시험백신 외 ND 백신(생독: 1일령, 12일령, 22일령, 50일령; 사독: 7일령, 18주령)이 접종되어 높아진 항체역가를 보임.

구분	채혈시기	NDV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T316N603	0 WPI	7	6	8	7	6	8	8	6	7	8	7.1 ± 0.88
Control		8	6	7	7	6	7	8	7	8	8	
T316N603	4 WPI	8	9	9	10	9	10	10	10	9	9	9.3 ± 0.67
Control		7	8	8	7	6	8	7	8	8	6	
T316N603	8 WPI	11	10	9	11	9	11	10	11	10	10	10.2 ± 0.79
Control		7	7	8	7	8	7	6	8	6	8	
T316N603	12 WPI	9	10	9	10	10	10	9	9	10	10	9.6 ± 0.52
Control		8	9	8	7	9	8	10	8	8	8	
T316N603	16 WPI	10	8	9	10	9	10	9	10	8	8	9.1 ± 0.88
Control		8	7	8	7	7	8	9	8	9	8	
T316N603	20 WPI	9	10	8	8	9	8	7	10	8	9	8.6 ± 0.97
Control		8	7	8	6	7	9	7	9	6	8	

IBV KM91주에 대한 시험 결과, IBV KM91주에 대한 중화지수는 기존 접종된 백신으로 인해 시험백신의 접종 전부터 시험군과 대조군 혈청의 시험 역가지수와 바이러스 역가지수의 차이가 1.8로 확인됨. 바이러스 역가와 시험군 역가를 비교하였을 때, 백신 접종 후 지수 차이가 모두 3.0 이상으로 해당 바이러스에 대한 충분한 면역력이 있음이 확인됨.

구분	채혈시기	IBV KM91 strain		비교 (Virus와 차이)
		바이러스 역가 (logEID ₅₀ /mL)	중화지수	
T316N603	0 WPI	4.8 ^A	0.0 ^D	1.8
Control		4.8 ^B	1.8 ²⁾	-
Virus		6.6 ^C	-	-
T316N603	4 WPI	3.4 ^A	1.4 ^D	3.1
Control		4.8 ^B	1.7 ²⁾	-
Virus		6.5 ^C	-	-
T316N603	8 WPI	2.8 ^A	1.8 ^D	3.8
Control		4.6 ^B	2.0 ²⁾	-
Virus		6.6 ^C	-	-
T316N603	12 WPI	2.4 ^A	1.2 ^D	4.1
Control		3.6 ^B	2.9 ²⁾	-
Virus		6.5 ^C	-	-
T316N603	16 WPI	2.6 ^A	1.2 ^D	4.0

Control		3.8 ^B	2.8 ²⁾	-
Virus		6.6 ^C	-	-
T316N603		2.8 ^A	1.4 ¹⁾	3.8
Control	20 WPI	4.2 ^B	2.4 ²⁾	-
Virus		6.6 ^C	-	-

WPI: Weeks Post 1st Inoculation

A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

C중화시 사용한 바이러스 역가

¹⁾대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

²⁾중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

IBV ADL05258주에 대한 시험 결과, IBV ADL05258주에 대한 중화지수는 기존 접종된 백신으로 인해 시험백신의 접종 전부터 시험군과 대조군 혈청의 시험역가지수와 바이러스 역가지수의 차이가 1.4로 확인됨. 바이러스 역가와 시험군 역가를 비교하였을 때, 백신 접종 후 지수 차이가 모두 3.0 이상으로 해당 바이러스에 대한 충분한 면역력이 있음이 확인됨.

구분	채혈시기	IBV ADL05258 strain		비고
		바이러스 역가 (logEID ₅₀ /mL)	중화지수	
T316N603	0 WPI	5.2 ^A	0.0 ¹⁾	
Control		5.2 ^B	1.4 ²⁾	
Virus		6.6 ^C	-	
T316N603	4 WPI	3.4 ^A	1.8 ¹⁾	
Control		5.2 ^B	1.3 ²⁾	
Virus		6.5 ^C	-	
T316N603	8 WPI	3.2 ^A	2.2 ¹⁾	
Control		5.4 ^B	1.2 ²⁾	
Virus		6.6 ^C	-	
T316N603	12 WPI	2.8 ^A	1.0 ¹⁾	
Control		3.8 ^B	2.8 ²⁾	
Virus		6.6 ^C	-	
T316N603	16 WPI	2.8 ^A	1.0 ¹⁾	
Control		3.8 ^B	3.0 ²⁾	
Virus		6.8 ^C	-	

T316N603		3.4 ^A	1.2 ¹⁾
Control	20 WPI	4.6 ^B	2.0 ²⁾
Virus		6.6 ^C	-

WPI: Weeks Post 1st Inoculation

A시험군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

B대조군 혈청의 중화 후 바이러스 역가

C중화시 사용한 바이러스 역가

1)대조군 혈청의 바이러스 역가와 시험군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(B-A)

2)중화시 사용한 바이러스 역가와 대조군 혈청의 바이러스 역가와의 차이(C-B)

EDSV에 대한 시험 결과, EDSV에 대한 HI 역가는 백신 접종 후 64배 이상으로 상승하여 시험 기간동안 유지되었으며, 2회 접종 후 검사(8 WPI)에서는 256배 이상의 역가를 확인할 수 있었음. 대조군의 경우 시험 기간동안 EDSV에 대한 역가는 확인되지 않음.

구분	채혈시기	EDSV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T316N603	0 WPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	4 WPI	7	8	6	7	6	7	6	6	8	7	6.8 ± 0.79
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	8 WPI	9	7	9	9	7	8	8	9	8	7	8.1 ± 0.88
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	12 WPI	10	9	8	9	8	9	9	8	8	8	8.6 ± 0.7
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	16 WPI	8	9	7	6	8	9	8	8	7	8	7.8 ± 0.92
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	20 WPI	6	7	9	6	7	7	8	5	6	8	6.9 ± 1.2
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1

AIV에 대한 시험 결과, AIV에 대한 HI 역가는 백신 접종 후 64배 이상으로 상승하여 시험 기간동안 유지되었으며, 2회 접종 후 검사(8 WPI)에서는 128배 이상의 역가를 확인할 수 있었음. 대조군의 경우 시험 기간동안 AIV에 대한 역가는 확인되지 않음.

구분	채혈시기	AIV HI titer (log ₂)										Avg. ± SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T316N603	0 WPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	4 WPI	7	6	7	8	7	7	6	6	7	6	6.7 ± 0.67
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	8 WPI	8	7	7	7	7	8	7	8	7	8	7.4 ± 0.52
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	12 WPI	8	8	7	8	9	8	7	7	9	8	7.9 ± 0.74
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	16 WPI	7	8	7	7	8	8	7	7	7	8	7.4 ± 0.52
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1
T316N603	20 WPI	6	7	7	6	7	6	6	7	6	7	6.5 ± 0.53
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1

(4) 백신 접종 후 목적동물의 생산성 조사 (산란율, 증체율 등)

시험백신이 산란율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 산란개시이후 주령별로 산란율을 측정하여 표준산란율과 해당 농장의 최근 3년 평균 산란율과 비교하고, 객관적인 성적처리를 위해 t-test를 실시하여 표준산란율과 유의적인 수준에서 차이가 있는지 확인함.

① 산란율

시험군의 농장 산란율은 산란개시부터 대부분의 기간 동안 표준 산란율에 비해 조금 낮으나 큰 차이는 없었으며 통계학적 분석(t-test)으로도 유의적인 차이를 발견할 수 없었음. 따라서 시험백신이 산란율에 영향을 미치지 않음을 확인함.

농장 (Lot No.)	산란개시 후 경과시간(주)	주령	표준 산란율(%)	농장 최근 3년 평균 산란율(%)	농장 산란율(%)
제 1농장 (T316N601)	0	19	24-38	19.8	20.4
	4	23	92-94	92.5	92.9
	8	27	95-96	93.9	94.2
	12	31	94-96	94.5	94.4
	16	35	94-95	94.3	94.0
	20	38	93-94	92.7	93.1
제 2농장 (T316N602)	0	19	24-38	17.5	18.4
	4	23	92-94	91.1	90.8%
	8	27	95-96	95.4	95.6%

	12	31	94-96	94.0	93.3%
	16	35	94-95	94.8	94.7%
	20	38	93-94	92.5	92.8%
제 3농장 (T316N603)	0	19	24-38	26.4	27.1
	4	23	92-94	92.7	93.3
	8	27	95-96	94.2	94.2
	12	31	94-96	95.1	94.9
	16	35	94-95	94.3	94.4
	20	38	93-94	93.2	93.6

② 폐사율

시험백신이 농장의 폐사율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시험계군에 백신 1수분을 근육 접종하고, 주령별로 폐사율을 확인함. 2차 접종(14주령) 이후 20주동안 주간폐사율은 0.1% 내외로 시험백신의 안전성을 확인할 수 있었음.

Lot No.	백신접종 후 경과시간	주령	폐사수	폐사율 (%)
제 1농장 (T316N601)	0 WP2I	16주령	30	0.07
	4 WP2I	20주령	24	0.06
	8 WP2I	24주령	33	0.08
	12 WP2I	28주령	25	0.06
	16 WP2I	32주령	31	0.08
	20 WP2I	36주령	36	0.09
제 2농장 (T316N602)	0 WP2I	14주령	50	0.08
	4 WP2I	18주령	47	0.08
	8 WP2I	22주령	42	0.07
	12 WP2I	26주령	50	0.08
	16 WP2I	30주령	32	0.05
	20 WP2I	34주령	35	0.06
제 3농장 (T316N603)	0 WP2I	16주령	62	0.09
	4 WP2I	20주령	54	0.08
	8 WP2I	24주령	60	0.08
	12 WP2I	28주령	61	0.09
	16 WP2I	32주령	62	0.09
	20 WP2I	36주령	64	0.09

WP2I: Weeks Post 2nd Inoculation

2-1-4. 가금용 오일 백신보조제의 상용화 관련 내역

1) 제조시설 구축 (논산 사진 및 설명)

(주)중앙백신연구소에서는 개발된 백신보조제의 대량 생산 및 상용화를 위하여 백신보조제 전용 생산시설을 구축(2018년 3월 제조업 허가, 7월 KVGMP인증)하였다. 백신보조제 생산을 위한 GMP 생산시설 내에 전용 톤 단위의 제조탱크를 제작하였으며, down stream에 filling line 까지 연결하여 최종품을 무균적으로 생산할 수 있도록 하였다. 현재 톤 단위의 백신보조제를 생산하고 있으며, 해당 전용 생산 시설 및 제조 탱크는 국가연구과제 연구비가 아닌 회사의 투자비용으로 구입하였다.



그림20. 백신보조제 생산 시설

2) 개발 제품명 및 상품의 상표등록 사진 추가

본 과제착수 시점에서는 연구개발 단계의 백신보조제 시제품을 CAWIO(CAVAC Water in Oil adjuvant)로 가칭하여 시험을 수행하였다. 연구개발이 완료된 이후에는 중앙백신연구소의 백신보조제 라인업을 위한 백신보조제 브랜드명을 CAvant로 명명하였으며, 개발된 조류백신용 백신보조제의 이름은 사용자 편의 및 축종을 강조하여 WO-A1으로 명명하였다. 또한 해당 내용은 상표명 등록을 진행하였다.

표8. 백신보조제 명명

구분	연구단계	상용화단계	
백신보조제 라인	브랜드명 없음	CAvant®	상표등록
W/O type 보조제	CAWIO	WO-A1	



그림21. CAvant 상표 등록 로고

3) 신기술 인증

본 과제를 통해 개발된 가금용 오일 백신보조제의 기술개발을 내용으로 하여 농림축산식품부에서 시행하는 「농림식품 신기술(NET) 인증제」의 2018년 상반기 인증 신기술로 인정되었다.

기관명	(주)중앙백신연구소	유효기간	2년
기술분야	축산·수의기술 / 동물질병·수의약품		
기술명	안정성이 증대된 W/O type 백신보조제 유화기술		
<p>○ 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 국내 자체 기술개발을 통해 안정성(Stability)이 증대된 W/O(Water-in-Oil) type의 백신보조제를 개발 - 다양한 오일과 계면활성제 가운데 최적의 구성성분과 최적의 조성비를 발굴하고, 수상인 항원과 에멀전 조건을 확립 <p>○ 특징</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개발기술은 국내 독자 기술로 개발완료 되었으며, 낮은 점성과 수상(항원) 비율을 증가한 조건에서도 안정성이 증대된 제품 CAWIO-A를 개발하였으며, 유제공정이 1 단계로 사용이 용이하고 수입대체효과는 물론 가격 경쟁력을 확보함 - 기존 제품의 경우, 수상인 항원과 백신보조제의 유제 비율이 3 : 7로 고정되어있으며, 해당 비율이 변경될 경우, 안정성이 유지되지 않는 반면 개발제품은 이러한 점을 극복하여 항원과 백신보조제의 비율을 3 : 7 ~ 5 : 5로 항원의 비율을 높여도 안정성이 유지되며, 점도는 낮아 사용에 용이한 것이 특징임. <p>○ 적용제품의 개요</p> <ul style="list-style-type: none"> - 적용제품명(시제품): 가금용 백신보조제 CAWIO-A - 적용 효능·효과: 시제품(가금용 백신 CAWIO-A) 제작을 통해 최종 안정성(stability) 및 효능성(efficacy), 안전성(safety)을 모두 확인, 동물용 백신 산업에 유화기술로써 적용할 수 있으며, 특히 가금 불활화 혼합백신에 적용 가능 <ul style="list-style-type: none"> · 백신보조제 CAWIO-A는 오일 백신보조제로서 수상인 항원과 오일상인 백신보조제를 유화하여 최종 백신의 W/O(Water-in-Oil) 에멀전을 형성하는 물질로 본 물질을 사용한 백신은 1회 투여만으로도 지속적인 유제상태를 유지 			

제 23-056호



신 기술 인증서

기술명 : 안정성이 증대된 W/O type 백신보조제 유화기술

기관명 : (주)중앙백신연구소

대표자 : 윤인중

소재지 : 대전광역시 유성구 유성대로 1476-37

인증번호 : 23-056

유효기간 : 2018년 7월 5일부터 2020년 7월 4일까지

위 기술을 「농림식품과학기술 육성법」 제12조의2에 따른
신기술로 인증합니다.

2018년 7월 5일

농림축산식품부장관



그림22. 신기술인증서

5. 면역증강제가 포함된 가금용 오일 백신보조제의 개발

1) 분자면역증강제가 함유된 백신보조제의 효능평가

(1) 일반적인 면역증강제가 포함된 백신보조제의 효능 평가

- 사포닌은 식물에서 유래한 triterpenoid 배당체로 세포막의 콜레스테롤과 작용하여 막을 변형시킴으로서 항원수송을 증가시키고 면역세포로부터 사이토카인을 분비시키는 것으로 알려져 있음. 본 연구팀은 선행연구로써 협동연구기관의 분자면역증강제, 천연물 유래 면역증강물질을 확보하기 전에 사포닌을 이용한 적절한 함량 시험을 실시함.

- 동일한 면역증강제에 대하여 농도가 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g으로 증가함에 따라 접종 5주차에 항체가 증가하는 것을 확인함. 서로 다른 면역증강제의 경우, 종류별 적절한 용량이 다른 것으로 판단됨.

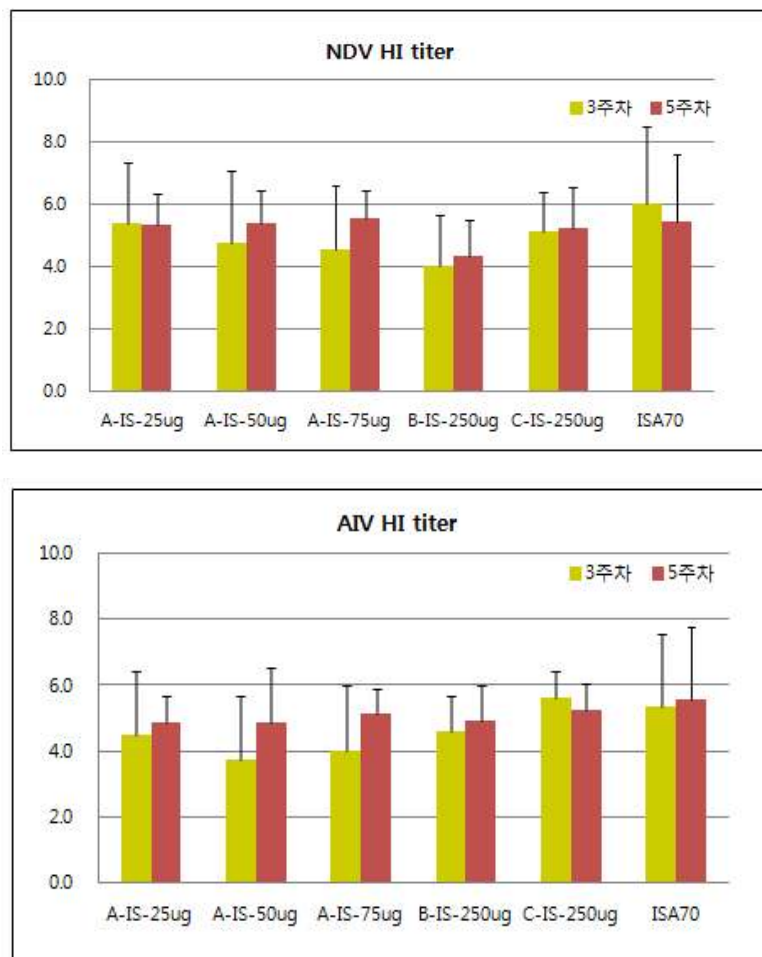


그림 23. 면역증강제의 함량별 SPF 닭에서의 NDV 및 AIV 항체가

(2) 선발된 분자면역증강제가 포함된 백신보조제 제제화

- 제1협동연구기관에서 발현한 재조합 분자면역증강제와 제2협동연구기관에서 발굴한 신규 분자면역증강제를 포함하여 면역증강제 스크리닝을 위한 시험을 진행함.
- 면역증강제 스크리닝을 위하여 조류 핵심질병인 뉴캐슬바이러스(NDV, rLaSota주), 조류 인플루엔자 바이러스(AIV, H9N2주)와 닭 산란저하증 바이러스(EDSV, K11주) 불활화 항원으로 시험백신을 아래 표와 같이 제조함.

표 9. 면역증강제 스크리닝 시험

Group	Antigen	Adjuvant (%)	면역증강제	Note	No. of chickens
Group 1	NDV AIV EDSV	CAvant WO-A1(65)	Saponin	제1세부	5
Group 2		CAvant WO-A1(65)	Squalene	제1세부	5
Group 3		CAvant WO-A1(65)	hWRS	제2협동	5
Group 4		CAvant WO-A1(65)	<i>Yeast squalene</i>	제1협동	5
Group 5		CAvant WO-A1(65)	<i>Yeast Hsp70,</i> <i>Yeast gp96</i>	제1협동	5
Group 6		CAvant WO-A1(65)	Stimular 조절	제1세부	5
Group 7		CAvant WO-A1(65)	-	면역증강대조군	4
Group 8		ISA70(65)	-	양성대조군	4
Group 9		-	-	무접종군	3

(3) 분자면역증강제가 포함된 백신보조제의 효능성 평가

- 6~8주령 SPF 닭을 그룹당 5수씩 배정하고, 시험군에 시험백신의 1수분(0.5ml)을 근육으로 접종함. 백신 접종 3주차에 채혈한 다음, 1수분을 추가 접종한다. 1차 접종 3주 후와 2차 접종 2주 후에 채혈하여 혈구응집억제시험(Hemagglutinin inhibition assay)을 실시함.
- NDV HI 항체가 측정결과, 1차 접종 3주후 시험결과에서는 모든 접종군 사이의 유의적 차이가 없는 것으로 평가되었고 2차 접종 2주 후 결과에서는 면역증강제가 포함된 그룹(Group 1, 3, 4)에서 기존 CAvant WO-A1(65) 그룹보다 다소 높은 항체가를 확인하는 것으로 확인됨.
- AIV HI 항체가 측정결과, 1차 접종 3주후, 2차 접종 2주후 모든 접종군 사이의 유의적 차이는 없는 것으로 확인됨(AIV 검정기준은 64배 이상).
- EDSV HI 항체가 측정결과, NDV 결과와 유사하게 1차 접종 3주후 시험결과에서는 모든 접종군 사이의 유의적 차이가 없는 것으로 평가되었고, 2차 접종 2주후 결과에서는 면역증강제가 포함된 그룹에서 기존 CAWIO 그룹보다 다소 높은 항체가를 형성하는 것으로 확인됨((EDSV 검정기준은 시험군의 80% 이상이 16배 이상).

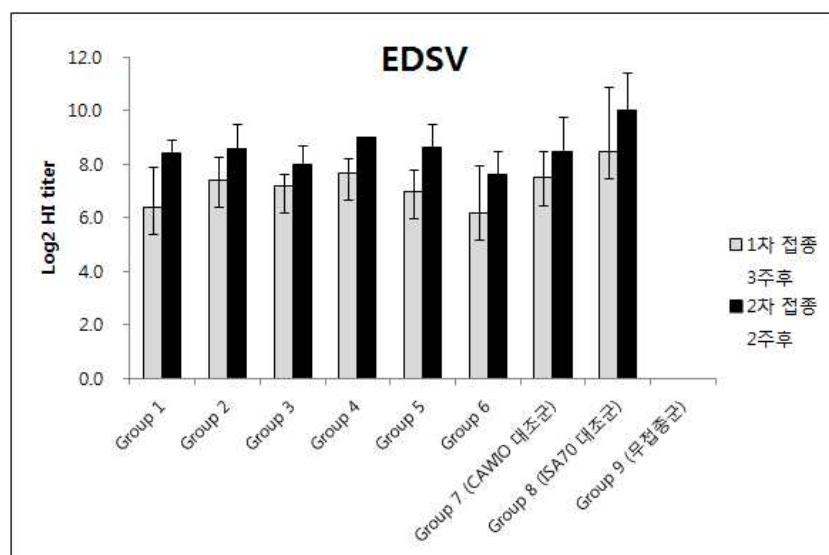
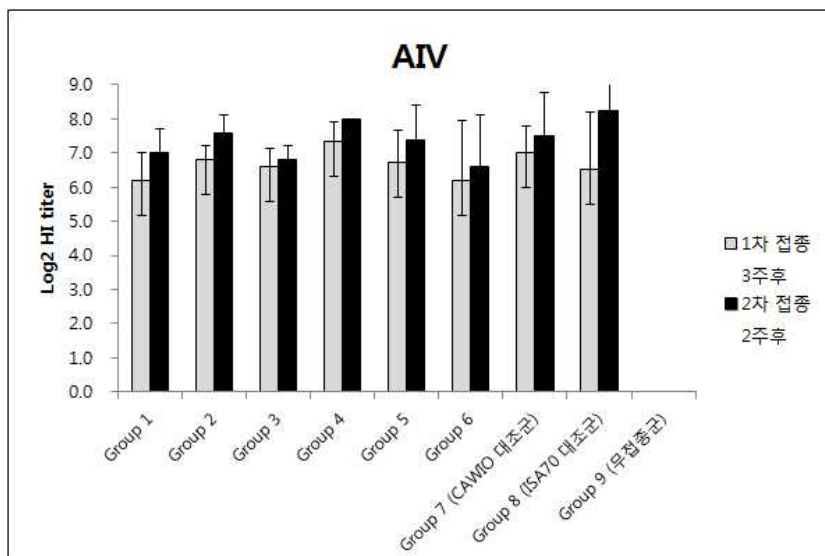
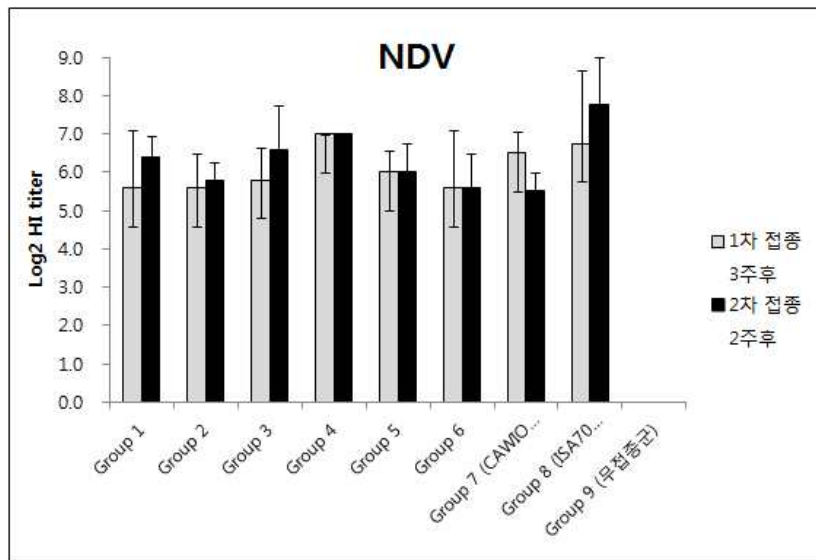


그림 24. 면역증강제 스크리닝 시험결과

(4) 분자면역증강제가 포함된 백신보조제의 안전성 평가

- 백신별로 뉴캐슬병, 산란저하증 및 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 노출된 적이 없는 건강한 6~8주령의 닭 5마리를 사용하여 백신 2수분을 1회 근육접종하고 대조군과 함께 14일간 관찰함.
- 시험결과 모든 시험백신 그룹에서 접종 후 시험기간 동안 폐사한 개체 없이 모두 건강함.

Group	Clinical signs (No. of birds positive/No. of birds examined)
Group 1	0/5
Group 2	0/5
Group 3	0/5
Group 4	0/5
Group 5	0/5
Group 6	0/5
Group 7	0/5
Group 8	0/5
Group 9	0/5

2) 분자면역증강제 함유 백신보조제 평가

(1) 분자면역증강제의 효능평가

백신보조제의 면역원성 증진을 위하여 세부협동기관에서 발현한 분자면역증강제에 대한 효력시험을 실시함. 정확한 면역원성 비교를 위하여 백신보조제를 제외하고, SE bacterin 항원과 면역증강물질만 혼합하여 마우스 challenge 모델을 이용하여 생존율을 관찰함.

표10. 분자면역증강제 스크리닝을 위한 시험백신 제조 조성

Group	Antigen	Immunostimulant	Route	No. of Mice
1	SET2 bacterin	Chicken gp96	S.C	5
2		Hydrophobin hfb1	S.C	5
3		S.typhimurium flagelin	S.C	5
4		M.tuberculosis HSP70	S.C	5
5		Squalene	S.C	5
6		MBP-flagelin protein	S.C	5
7		CA-1	S.C	5
8		CA-2	S.C	5
9		hWRS	S.C	5
10		Al(OH)3	S.C	5
11		-	S.C	5
12	음성대조군		S.C	5

돼지단독 백신의 효력시험 검정기준에 따라 마우스 체중 15~20g의 마우스를 준비하여 그룹별 5마리씩 접종군으로 하고 나머지 5마리는 대조군으로 사용함. 1/10두분을 피하에 접종하고 1차 접종 2주후에 접종군과 대조군에 *E.rhusiopathiae* 100LD₅₀/0.2ml을 접종하고 10일간 관찰함.



그림25. SE mice challenge 시험일정

시험결과 아래 표와 같이 대조군에서는 100% 폐사가 일어났으며 group 8, 9, 11을 제외한 모든 그룹에서 100% 폐사가 발생하여 면역효과가 크지 않은 것으로 나타남. 반면 중앙백신과 충납대에서 보유하고 있는 면역증강물질(group 8 및 group 9)에서는 각각 2마리와 3마리가 폐사하여 일부 개체가 생존하였으며, 면역증강 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었음.

시험군	공격접종 후 폐사수										생존수/전 체수	생존율	판정기준
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Group 1				1	2	1	1				0/5	0%	80% 이상 생존
Group 2				1	2				2		0/5	0%	
Group 3				2		1	1		1		0/5	0%	
Group 4				3	1		1		1		0/5	0%	
Group 5					2	1		1	1		0/5	0%	
Group 6					2	1		1	1		0/5	0%	
Group 7					2	1	2				0/5	0%	
Group 8			1	1							3/5	60%	
Group 9			1	1			1				2/5	40%	
Group 10				2		2	1				0/5	0%	
Group 11				1		1	1				2/5	40%	
대조군			1	1	1	2					0/5	0%	100% 폐사

(2) 분자면역증강제가 포함된 백신보조제 효능평가

선행되었던 면역증강제의 스크리닝 시험결과를 토대로 백신보조제(CAWIO)와 면역증강제를 혼합하여 시험백신을 제조하고 닭에서의 효능시험을 실시함. 항원은 조류 핵심 질병인 뉴캐슬병 바이러스와 조류인플루엔자 바이러스로 하고 그룹별로 면역증강제가 포함되어 있지 않은 그룹과 선행시험에서 가장 높은 생존율을 보인 CA-2, 그리고 신규 면역증강제 2종을 각각 제조함.

표 11. 면역증강제가 포함된 백신보조제의 목적동물에서의 항체가 평가 시험조성

Group	Antigen	Adjuvant	Immunostimulator	Route	No. of Chickens
1	ND 10% AI 10%	CAWIO 70%		I.M	4
2		CAWIO 70%	CA-1	I.M	8
3		CAWIO 70%	CA-2	I.M	8
4		CAWIO 70%	CA-PM-01	I.M	8
5		ISA70 70%		I.M	4
6	대조군			I.M	4

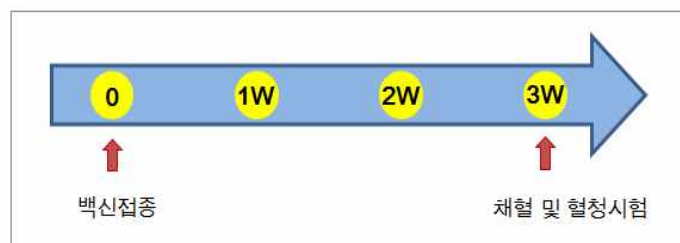


그림26. 면역증강제가 포함된 백신보조제의 목적동물에서의 항체가 평가 시험일정

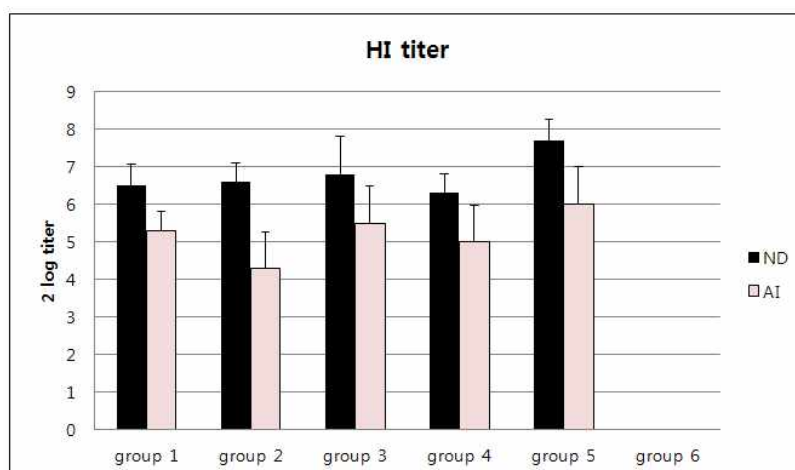


그림27. 면역증강제가 포함된 백신보조제의 목적동물에서의 항체가 결과

시험결과 모든그룹에서 뉴캐슬병 바이러스와 조류인플루엔자 바이러스 검정기준 이상의 수준을 나타냈으며, 양성대조군이 가장 높은 항체가를 보였고, 그 다음으로는 마우스 challenge 시험에서 60%의 생존율을 보인 CA-2 면역증강제가 포함된 그룹에서 ND와 AI 모두 높은 HI titer를 보임.

(3) 종합결론

백신보조제 함량에 따른 시험결과 점도가 낮고 안정한 7:3(백신보조제:항원) 비율로 백신보조제를 적용하기로 결정함. 또한 수차례 수행한 신규 면역증강물질에 대한 스크리닝 결과에서 기존 백신보조제의 효능으로 인해 적절한 물질 선정의 어려움이 존재하여, 조류 핵심 질병이 포함된 시험백신 제조 및 안전 및 효능시험은 개발된 백신보조제(CAvant WO-A1)로 진행하였음. 신규 면역증강물질 스크리닝은 적절한 실험모델의 선정 및 협동기관과 협의하여 효능 검증할 수 있는 방안을 마련하기로 함.

3) 분자면역증강제 함유 백신 효능 평가

1차년도와 2차년도에 협동연구기관에서 제공한 면역증강제를 이용해 스크리닝 시험, 안전시험 및 면역원성 시험을 통해 면역증강제를 최종 선별함. 선별된 면역증강제와 개발된 백신보조제를 적용하여 목적동물인 닭에서의 면역원성 시험을 실시함.

(1) 시험조성 및 시험방법

표12 . 면역증강제가 포함된 백신보조제의 목적동물에서의 항체가 평가 시험조성

Group	Antigen	Adjuvant	Immunostimulator	Route	No. of Chickens
1	NDV AIV	CAvant WO-A1 70%	CAVAC I.S	I.M	8

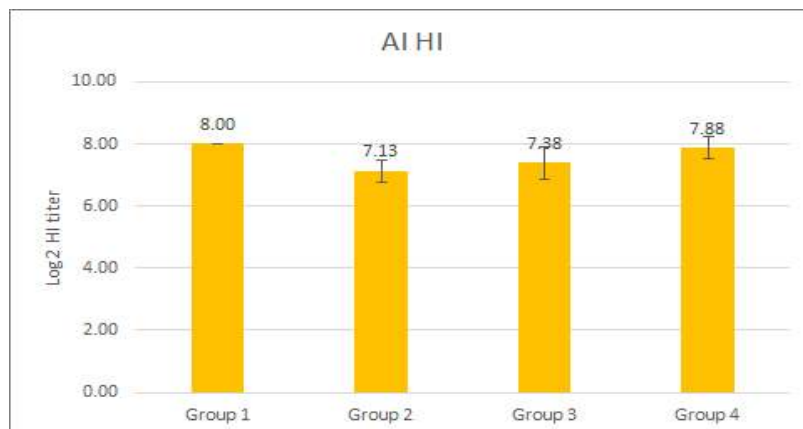
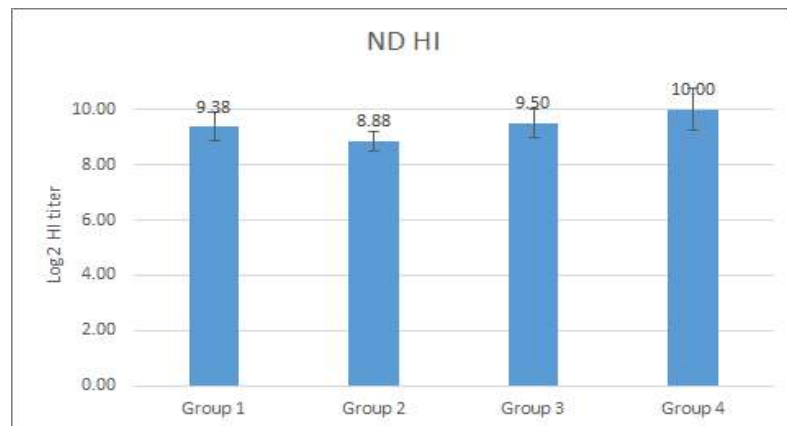
2	EDSV IBV	CAvant WO-A1 70%	CNU I.S	I.M	8
3		CAvant WO-A1 70%	KRIBB I.S	I.M	8
4		ISA70 70%	-	I.M	8
5	대조군			I.M	5

그룹별로 뉴캐슬병, 산란저하증 및 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 노출된 적이 없는 건강한 6~8주령의 닭 8리를 사용하여 백신 1수분을 접종한 다음, 2주후에 백신 1수분을 2차 접종한다. 2차 접종 3주후에 채혈하여 항체를 측정한다.

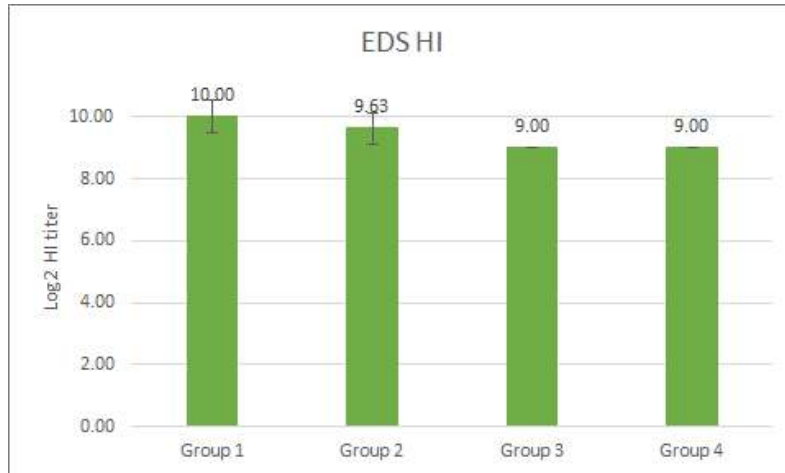


그림28. 면역증강제가 포함된 백신보조제의 목적동물에서의 항체가 평가 시험일정

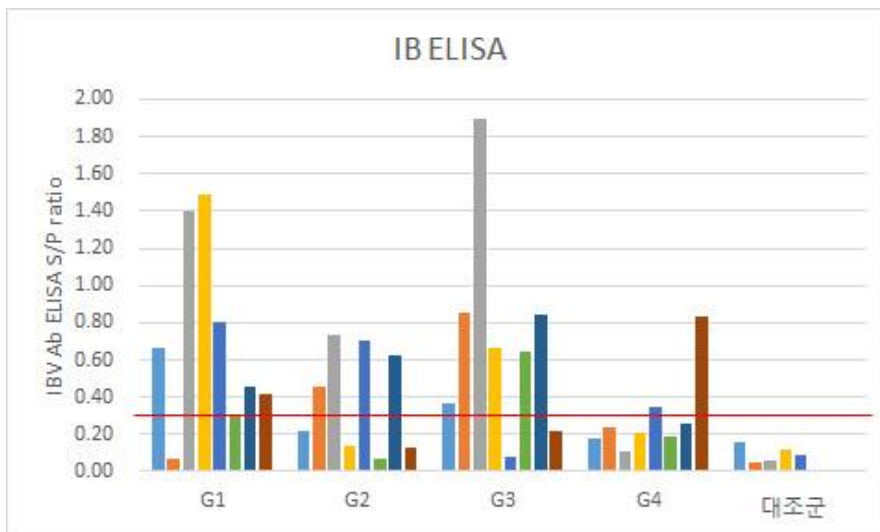
(2) 시험결과



* 저병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 효력 검정기준은 시험군 평균에서 닭 적혈구 응집억제 항체가 64배 이상 이어야한다.



* 닭 산란저하증에 대한 효력 검정기준은 시험군의 80% 이상이 적혈구 응집억제 항체가 16배 이상이어야 한다.



* 판정기준: IBV Ab ELISA S/P ratio 0.3 이상 양성

그림29. 면역증강제가 포함된 백신보조제의 목적동물에서의 항체가 결과

대체적으로 면역증강제가 포함된 그룹에서 백신대조군에 비해 상대적으로 높은 항체가를 형성하였다. 각 그룹별 면역증강제 비교결과 중앙백신의 IS를 사용한 그룹에서 ND, AI, EDS의 항체가 형성 및 IB에서의 ELISA 양성 전환 그룹을 확인함.

2-2. 분자면역증강제 연구

2-2-1. 다양한 면역증강제 (molecular adjuvant) 후보의 확보

○ Heat shock protein (HSP70 과 gp96)

단백질의 접힘과 이동 그리고 스트레스 상황에서 유도되는 단백질인 heat shock protein (HSP) 중 몇몇은 면역반응을 일으키거나 이를 증강시키는 역할을 한다. 병원체유래의 HSP는 면역원으로 작용하거나 면역반응을 증강시키며 숙주 유래의 것은 면역반응을 증강시키는 것으로 알려져 있다.

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*), 진균 병원체인 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 마이코플라스마 하이오뉴모니에 (*Mycoplasma hyopneumoniae*), 그리고 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis* 등의 Mycobacteria) 등에서 HSP70 family인 HSP60, HSP65 그리고 HSP70이 숙주의 면역반응을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

특히 결핵균 유래의 경우, HBV DNA 백신, 말라리아 백신 및 구제역 백신과 함께 사용 시 면역 증강의 효과를 보인다고 알려져 있어 결핵균 유래의 HSP70을 후보로 선정하여 면역증강의 효과를 확인하고자 하였다 (NP_214864.1).

HSP70은 peptide binding 도메인을 포함하는 약 27 kDa 의 C-말단 도메인 부분과 약 39 kDa 인 N-말단 부분으로 구성되어지며, C-말단 부분이 항원성을 가지거나 면역반응을 증가시키는 것으로 알려져 있어 C-말단 (356-600 아미노산, 약 27 kDa)과 N-말단(1-355 아미노산, 약 39 kDa) 도메인으로 나누어 발현하였다.

이 외에도 glycoprotein 96 (gp96)은 HSP90 family의 중요한 단백질로 ER에 위치하며 T cell의 peptide presentation을 증가시켜주는 것으로 알려져 있기 때문에 숙주에 대한 면역 증강제로 사용하기 위해 닭의 gp96을 후보로 선정하였다(GenBank: AAK69350.1).

○ Flagellin

그람양성, 그람 음성 세균의 flagella를 구성하는 주요한 구조 단백질인 flagellin은 N-말단과 C-말단에 보존된 도메인을 가지며 중간은 매우 높은 가변성을 가지는 부분으로 구성되어있다.

Flagellin은 원숭이, 쥐 등의 여러 면역 시스템에서 면역증강의 효과를 가지는 것으로 알려져 있으며 특히 N-말단과 C-말단에 보존된 부분이 Toll like receptor(TLR)5에 리간드로 작용하여 면역반응을 일으키는 역할을 한다.

따라서, *Salmonella enterica subsp.* 유래의 fliC (GenBank: HF937208.1)를 후보로 선정하였으며, fliC의 높은 가변성을 가지는 부분을 제거 한 fliC $_{\Delta 180-400}$ 과 fliC 전체를 각각 사용하였을 때

에 면역증강의 효과가 비슷하다는 문헌을 참고하여, 높은 가변성을 가지는 부분을 제거한 fliC $\Delta_{180-400}$ 를 면역증강제 후보로 사용하기로 하였다 (서열 1 참조).

[서열 1]

>FliC

```
MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDLSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNT
LTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDTLNVQQKYKvsdtaatvtgyadttialdnstfkasatglggtgdkidgdlkfddttg
kyyakvtvtggtgkdgyeysvdktnqkvtlaggatspltgglpatatedvknvqvanadlteakaaltaagvtgtasvvkmsytdnngkti
dgglavkvgddyysatqnkdgsgisinttkytaddgtsktalnlggadgktevvsiggktyaaskaeghnfkaqpdlaeaAATTTTENPL
QKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTSARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVL
AQANQVPQNVLSLLR*
```

Flagellin에서 높은 가변성 부분을 제거한 후 높은 보존성을 지닌 N-말단과 C-말단 부분은 (GGGG)₂-linker를 이용하여 연결하여 발현되도록 계획하였다.

○ Hydrophobin

곰팡이가 생산하는 Hydrophobin은 양친매성의 작은 단백질로 자가조립(self-assembly)을 통하여 탄탄한 층을 형성하게 된다. 따라서 이 양친매성의 작은 단백질을 표면발현하게 하여 친수성의 표면을 소수성의 것으로, 혹은 소수성의 표면을 친수성의 성질을 가지도록 변화 시키는 것이 가능 할 것으로 생각되며 현재 시중에 판매되고 있는 ISA70 혹은 현 과제에서 사용하고 자 하는 CAWIO (water in oil)와 같은 백신보조제에 효모의 전세포가 거부감 없이 섞이는 것을 가능하게 하여 효모세포벽의 베타글루칸이 면역증강의 효과를 가질 수 있도록 효모의 표면에 hydrophobin을 표면발현 하도록 계획 하였다.

또한 *Schizophyllum commune* 유래의 Sc3은 항암의 효과 및 면역 증강의 기능을 가지는 것으로 알려져 있어 주요한 분자면역증강제 후보라 생각되어진다.

따라서 *Schizophyllum commune* 유래의 Sc3(Genbank KU173824)과 *Trichoderma reesei* 유래의 Hfb1(GenBank KU173825)를 재조합 분자면역증강제 후보로 선정하였다.

○ 스쿠알렌

스쿠알렌은 식물에서 추출되거나 상어의 간, 혹은 동물의 피지 등에서 발견되는 오일로 항산화기능과 면역기능을 촉진시키는 효능이 있다고 알려져 있으며, 1997년 이후부터 인플루엔자 바이러스에 대한 백신 첨가제로 사용되고 있는 면역증강제이다.

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 ergosterol, squalene 등 이소프레노이드 화합물을 원래 많이 생산하는 것으로 알려져 있어 이소프레노이드 생산을 위한 합성생물학의 숙주세포로서 적합한 장점을 가지고 있다. 또한 ergosterol에 이르는 효모 mevalonate 경로에 있어서 종종 중간물질인 스쿠알렌이 축적되는 경우가 있다. 따라서 mevalonate 경로를 통한 스쿠알렌의 생산을 증가시키고자 하였다.

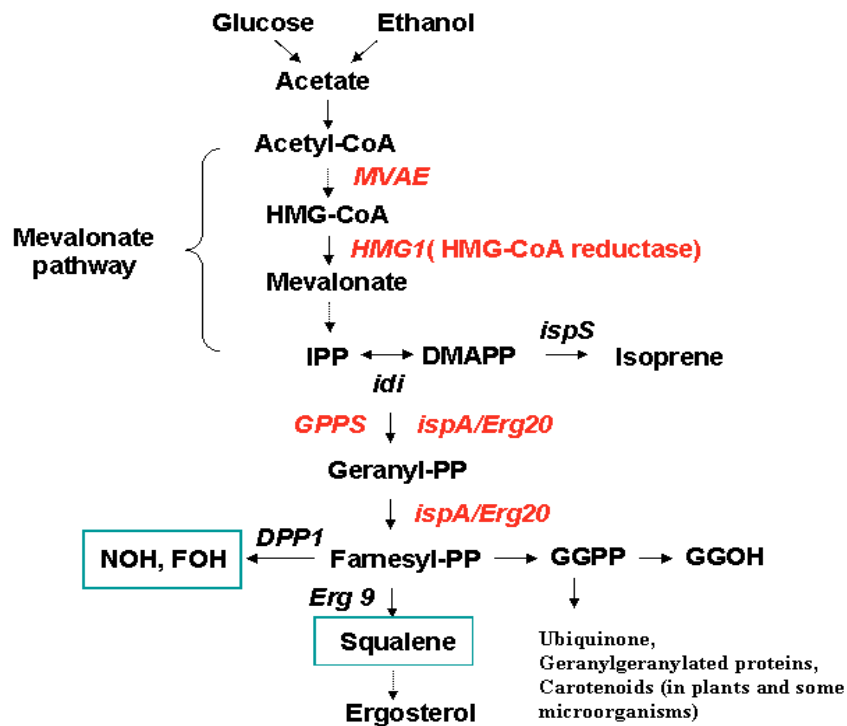


그림 1. *S. cerevisiae* 의 mevalonate pathway에 의한 이소프레노이드 생합성 경로

선행연구에서 스쿠알렌 생합성을 증가시키기 위하여 생합성 경로 (그림 1 참조)에 붉은 색으로 표시한 5개의 유전자와 그들의 조합을 과발현 하였다. 발현을 증폭한 유전자로는 *Enterococcus faecalis* 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제인 *mvaE*를 효모 codon에 맞게 GenScript corp에서 합성한 유전자를 이용하여 제한효소인 *EcoRI* 및 *SaI*으로 잘라내고 동일한 제한효소로 절단한 발현벡터에 삽입하였다. 발현벡터로는 *S. cerevisiae* 균주에서 많이 사용하는 GAL10 promoter를 가지는 플라스미드 pYEG α -HIR525를 backbone으로 사용하였다.

Hydroxymethyl glutaryl CoA로부터 mevalonate를 생합성하는 효소인 hydroxymethyl glutaryl CoA reductase (HMG1)은 조절 메커니즘에 의한 효소 단백질의 degradation을 유발하는 것으로 알려져 있는 아미노 말단의 trans-membrane domain (597aa)을 제거하고 사용하였다. 아미노 말단 transmembrane domain이 제거되어 catalytic domain만을 가지고 있는 *S. cerevisiae* 유래의 HMG1 유전자와 함께 *Abies grandis* 식물체에서 확보한 GPP synthas e 유전자 (GPPS), *E.*

*coli*에서 확보한 FPP synthase 유전자 (*ispA*)를 PCR 방법으로 클로닝하여 사용하였다.

선행연구에서 스쿠알렌을 효율적으로 생산할 수 있는 최적 유전자 조합을 가지는 플라스미드 pGAL-*ispA*/HMG1으로 형질전환된 *S. cerevisiae* Y2805 균주에서 스쿠알렌이 1.2g/L로 가장 높은 스쿠알렌 생산성을 나타내었으므로 이 균주를 분자면역 증강제 실험에 사용하였다.

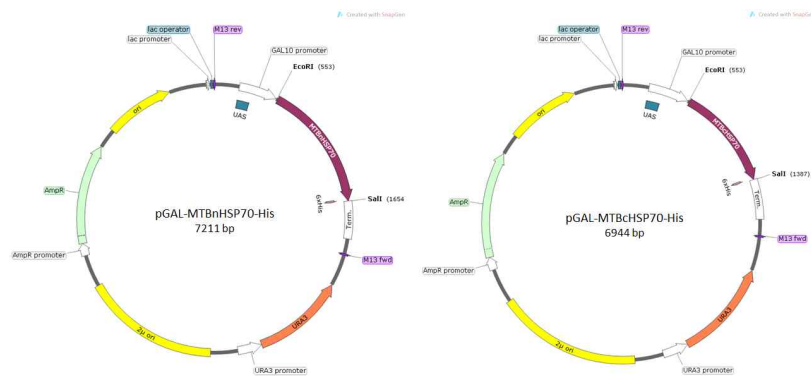
2-2-2. 재조합 발현 시스템 구축

○ 효모 발현 시스템 적용

1) 결핵균 유래 HSP70, 닭 유래 gp96 및 Salmonella 유래 flagellin의 세포 내 발현

결핵균 유래의 HSP70 (MTB-HSP70) 유전자는 *M. tuberculosis* H37Rv strain의 HSP70의 서열을 사용하였으며 C-말단 (MTBcHSP, 269 아미노산)과 N-말단 (MTBnHSP, 358 아미노산)으로 나누어 효모 선호코돈으로 최적화하여 GenScript 사에서 합성하였으며 C-terminal 부분에 His-tagging 하여 발현정도를 확인하는데 사용하였다. 합성한 유전자는 세포내 발현을 위해 *EcoRI/SalI* 으로 제한하여 효모 발현벡터인 pYEG α -HIR525에 클로닝 하였다. 구축된 MTBnHSP와 MTBcHSP의 발현벡터 모식도는 아래 그림 2에 표시하였다.

닭 유래의 gp96(GALLUS-gp96, 340 아미노산)과 Salmonella 유래의 flagellin(FliC $_{\Delta 180-400}$, 285 아미노산)의 유전자는 효모 선호코돈으로 최적화하여 GenScript 사에서 합성하였으며 C-terminal 부분에 His-tagging 하여 발현정도를 확인하는데 사용하였다. 합성한 유전자는 *EcoRI/SalI* 으로 제한하여 효모 발현벡터인 pYEG α -HIR525에 클로닝 하였다. 구축된 GALLUS-gp96의 발현벡터 및 FliC 발현벡터의 모식도는 그림 2에 표시하였다.



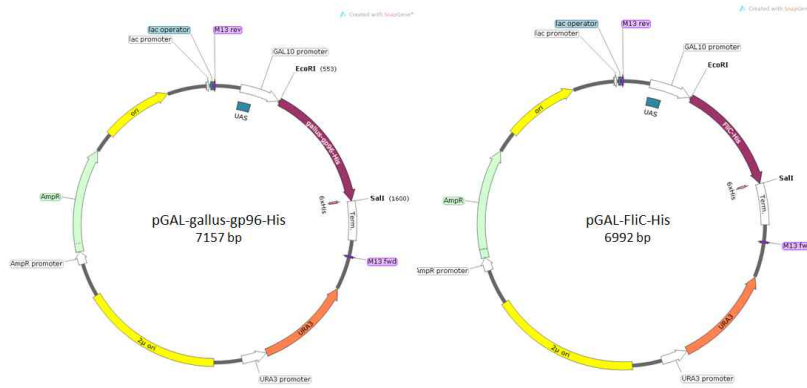


그림 2. Gal promoter를 이용한 HSP70, gp96 그리고 FliC 세포내 발현 플라스미드

2) Fungi 유래의 hydrophobin, HfbI과 Sc3의 분비 발현 및 표면발현

Hydrophobin은 *Schizophyllum commune* 유래의 Sc3(Genbank KU173824)과 *Trichoderma reesei* 유래의 HfbI(GenBank KU173825)를 후보로 선정하여 신호서열을 제외한 나머지 부분에 C-terminal His-tagging 한 후 효모 선호코돈으로 최적화 하여 Genscript 사에서 합성하였다.

Hydrophobin의 발현은 분비발현과 표면발현 시스템을 적용하였으며 효모의 신호서열인 MF α 를 N-말단에 함께 발현하도록 하여 분비를 유도하고 세포표면 발현을 위해 *Hansenula polymorpha*의 cell wall protein (CWP) anchor가 결합되도록 클로닝 하였다 (그림 3 참조).

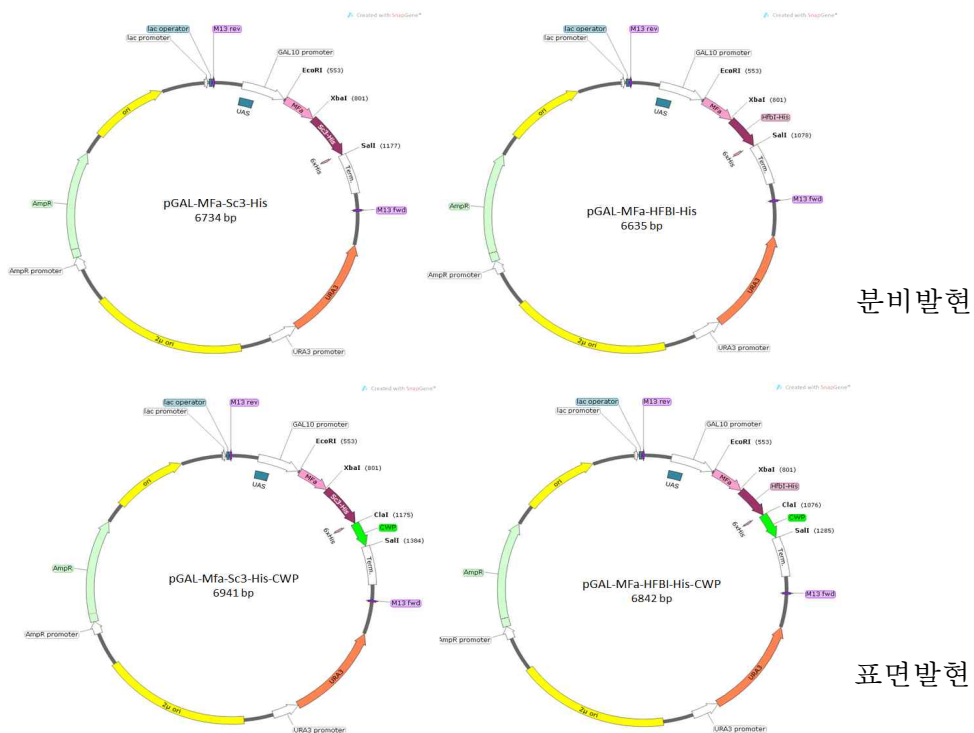


그림 3. MF α 신호서열과 CWP를 이용한 Hydrophobin 2 종의 효모 분비발현 및 세포표면발현 플라스미드

3) 재조합 발현 확인

① Western blot을 통한 발현 유무 확인

클로닝 된 다양한 분자면역증강제 후보의 서열을 시퀀싱을 통해 확인한 뒤 구축된 벡터를 리튬/아세테이트 방법으로 *S. cerevisiae* Y2805와 그의 GAL80 유전자 결핍주인 Y2805 Δ gal80에 형질전환하고, UD (Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L) 고체배지에서 선별하였다.

선별된 형질전환체는 UD 액체배지 2 ml에 단일집락을 접종하고 30°C, 200 rpm에서 16 시간 초기 배양한 후 본 배양을 하였다. 본 배양은 Y2805 균주는 YPDG(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 10 g/L 그리고 galactose 10 g/L)액체 배지를 사용하였고, galactose를 요구하지 않는 특징을 가지는 Y2805 Δ gal80 균주는 YPD(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 10 g/L) 액체 배지를 이용하여 250 ml flask에 25 ml 씩 분주한 뒤 초기 배양 한 균주를 1 % 가 되도록 접종하여 30°C, 200 rpm에서 48 시간 배양하였다. 배양액 1 ml을 12,000 rpm 에서 2 분간 원심 분리하여 균체를 회수한 후, 200 μ l의 20 mM Tris/HCl (pH7.5) 를 넣어 균체를 풀어준 뒤 glass beads를 첨가하여 20분 동안 파쇄 하였다.

파쇄 된 균체는 hydrophobin의 세포표면발현을 확인하기 위한 시료에서는 cell wall, debris 등을 포함한 lysate 상태로 사용 하였고 세포내 발현을 확인하기 위한 시료에서는 파쇄 된 균체를 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액만을 사용하였다(cell free extracts). 또한 hydrophobin의 분비발현을 확인하기 위해 배양액 1 ml을 12,000 rpm 에서 2 분간 원심 분리하여 배지를 포함한 배양 상등액의 시료를 준비하였다. 각각의 시료는 발현의 유무를 확인하기 위해 His-tag에 대한 항체를 이용하여 Western blot 분석하였다 (그림 4).

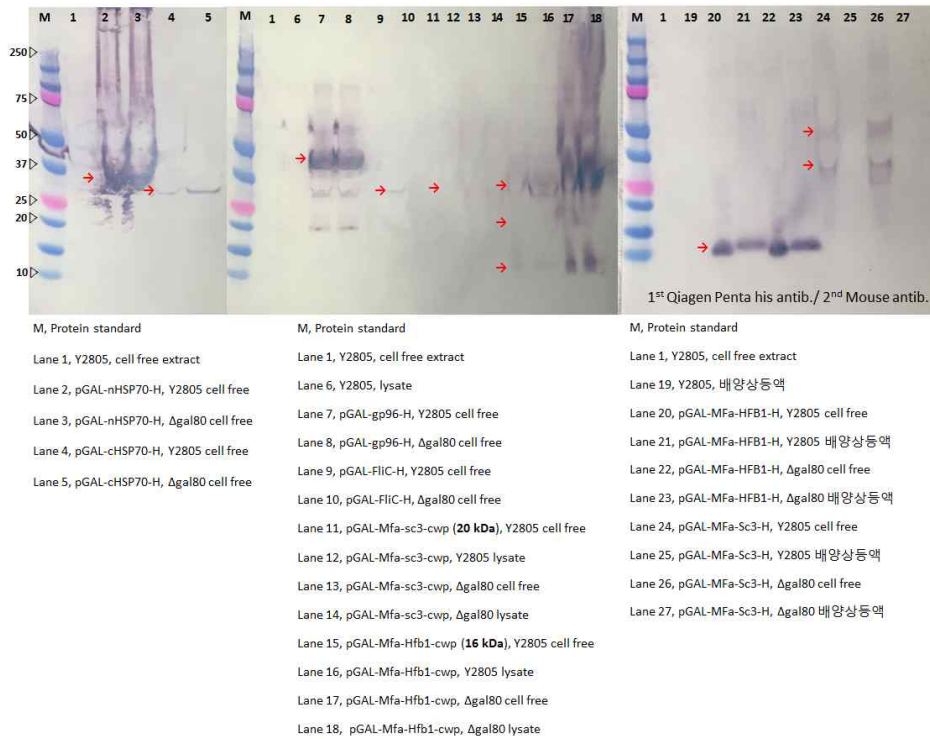


그림 4. 효모 발현 시스템을 이용한 분자면역증강제 후보의 발현확인

세포내 발현의 결과, MTBnHSP70 과 닭 유래의 gp96의 경우에는 다량 발현되는 것이 확인되었으며, 면역증강의 효과가 크다고 알려져 있는 MTBcHSP70과 FliC 의 경우에는 발현양이 비교적 적은 것으로 보인다. 따라서 MTBcHSP70은 원래의 전체 서열인 MTB-HSP70으로 발현 시켜 발현 양을 증가 시키는 것을 시도해 볼 수 있으며 FliC는 다른 Fusion 단백질과 함께 발현하여 발현 양을 늘리는 것을 시도해 볼 수 있다.

세포 표면발현 및 분비발현의 결과, hydrophobin 2종 중에서 HFBI이 Sc3 보다 많은 양 발현되며 Sc3는 발현 양이 Western blot 상에서 확인이 어려울 정도로 적으며 분비발현은 되지 않은 것처럼 보인다. Sc3이 항암효과 및 면역증강의 효과가 높다고 알려져 있어 발현 양을 늘리는 것이 중요한 과제가 될 듯 하며, 분비 및 표면 발현 시스템에서 사용한 MFa 신호서열과 CWP의 조합 이외에 효모의 표면발현에 많이 사용하는 AGA2를 이용한 발현 시스템을 이용하는 것도 하나의 방법이 될 수 있을 것이다.

② 세포표면의 소수성 분석

Hydrophobin의 효모 표면 발현을 확인하기 위해 배양액에 유기용매를 첨가하여 대조군과 비교하여 유기용매와 배양액 사이에서의 거동 변화를 확인하였다.

48시간 본 배양한 배양액을 멸균수로 한번 씻어내고 흡광도 A600 값이 2가 되도록 물로 희석하여 균체 2 ml을 준비하였다. 여기에 2 ml 의 n-butyl alcohol을 첨가하여 1분간 vortexing 하

여 잘 섞이도록 한 후, 수층과 유기용매 층으로 분리되도록 1 시간 동안 상온에 놔두어 두 층 사이에서의 partitioning 변화를 관찰하였다.

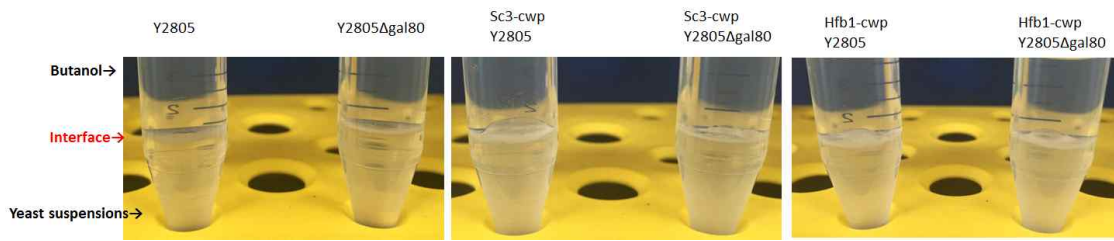


그림 5. Hydrophobin displayed 효모의 세포표면 성질 변화 확인

Hydrophobin이 올바르게 세포표면에 display 되었는지는 Western blot상에서 확인하기가 어렵기 때문에 n-butyl alcohol을 이용한 효모의 세포표면 성질 변화를 확인하였다 (그림 5 참조).

대조군으로 hydrophobin을 발현하지 않는 균주를 사용, 세포표면 발현 균주와 비교하여 n-butyl alcohol층과 효모배양액 사이의 interface의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 대조군과는 다르게 hydrophobin을 표면발현 한 효모의 interface에서 기름 층과 유사한 층이 생겼으며 효모 배양액의 효모가 가라앉는 데에도 시간이 더 많이 걸렸다.

따라서 표면에 hydrophobin이 display 되었을 것이라는 추측을 할 수 있었고, 추후 이를 수치상으로 나타낼 수 있는 실험이 추가 되어야 할 것 이다.

○ 대장균 발현 시스템 적용

다양한 분자면역증강제 후보를 maltose binding protein (MBP, 367 아미노산)를 결합하여 발현, 정제가 용이하도록 대장균 발현 시스템을 구축하였다.

대장균 발현벡터인 pJexpress의 T5 promoter 하류에 NdeI/BamHI을 사용하여 MBP를 먼저 클로닝 한 후, BamHI/SalI을 사용하여 분자면역증강제를 추가로 클로닝 하여 MBP fusion 단백질을 발현하도록 구축하였다 (그림 6 참조).

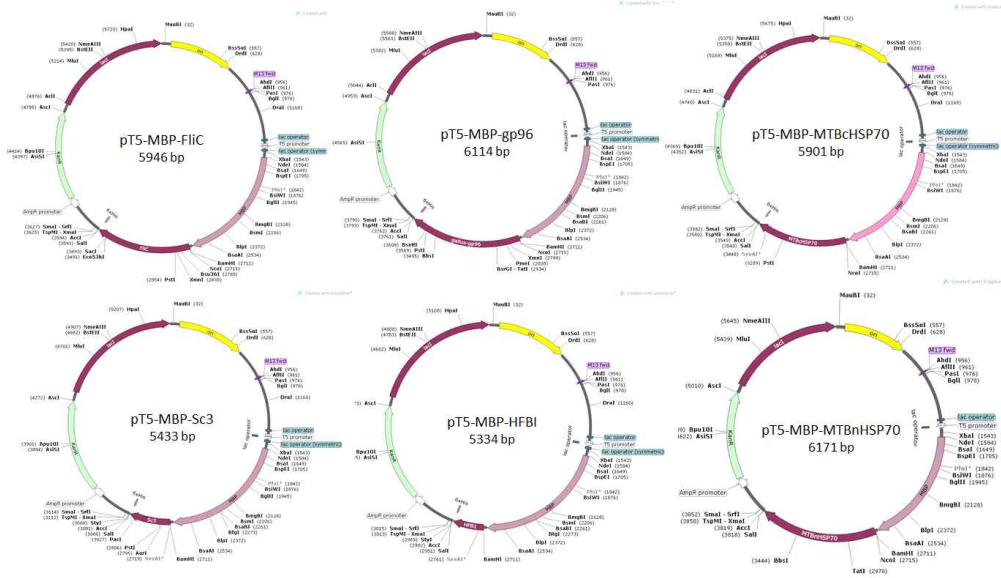


그림 6. T5 promoter를 이용한 MBP-fusion 단백질 발현 플라스미드

구축된 벡터들은 대장균 발현균주인 BL21로 형질전환하여 Kanamycin 항생제가 포함된 LB고체배지에서 형질 전환체를 선별한 뒤, LB 액체배지에서 본 배양하여 MBP fusion 단백질의 발현을 확인하였다.

25 ml LB 액체배지에 초기배양한 배양액을 1 %가 되도록 접종한 뒤 37°C, 200 rpm 에서 약 2시간 배양하였다. 흡광도 A₆₀₀ 값이 0.5-0.6이 되는 시점에 1 mM IPTG를 첨가하고 37°C, 200 rpm 에서 3시간 추가배양 한 후, 배양액 1 ml을 12,000 rpm 에서 1분간 원심 분리하여 회수하였다. 회수한 균체는 500 µl의 20 mM Tris/HCl (pH7.5) 를 넣어 균체를 풀어준 뒤 sonicator를 이용하여 10분간 파쇄 하였고, 12,000 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 분리하였다. 각각의 상등액과 침전물에 대한 SDS-PAGE를 실시하여 MBP-fusion 단백질의 발현 양상과 양을 확인하였다.

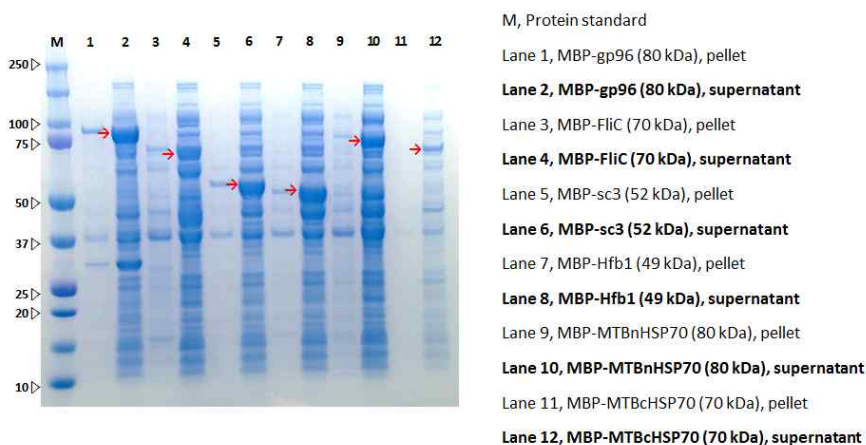


그림 7. 대장균 발현 시스템을 이용한 MBP-fusion 단백질 발현 확인

SDS-PAGE 상에서 모든 분자면역증강제 후보들이 대장균 발현 시스템을 이용한 MBP-fusion 발현이 가능하고 가용(soluble) 발현되는 것을 확인하였다. 가용 발현된 모든 분자 면역증강제는 MBP-tag을 이용하여 정제가 가능하며, 이를 동물실험의 시료로 사용 할 수 있을 것이다 (그림 7 참조).

그러나 MBP-MTBcHSP70의 경우, IPTG induction 이후에 배양액의 흡광도 값이 거의 증가하지 않아 발현되는 MBP-MTBcHSP70 단백질이 대장균의 성장에 영향을 미치는 것으로 보인다. 따라서 이를 극복하기 위해 induction 이후 온도 및 IPTG 농도 조절, fusion 단백질 및 발현균주를 교체 하는 실험을 진행 중이다.

2-2-3. 재조합 분자 면역증강제 시료 생산

재조합 분자면역증강제의 면역원성 증진 효과 분석을 위해 일부 분자면역증강제 후보를 생산하는 *S. cerevisiae* Y2805 재조합 균주를 배양하여 주관기관에 전달하였다.

squalene을 세포내에서 생산하는 *S. cerevisiae* Y2806 효모 전세포(스쿠알렌)과 *Mycoplasma hyopneumoniae* 유래 HSP70를 발현하는 효모 전세포(MHP-HSP70), 그리고 돼지유래의 gp96을 발현하는 효모 전세포(SUSgp96)를 1차적으로 전달하기로 하였다.

MHP-HSP70은 결핵균 유래의 HSP70과 유사하게 항원 및 면역증강의 기능을 가진다고 알려져 있어, N 말단과 C 말단을 따로 준비한 결핵균 유래의 HSP70 이전에 전체의 HSP70의 기능을 확인하고자 시료로 준비하였다.

그리고 돼지 유래의 gp96은 닭 유래의 gp96과 alignment 한 결과(서열2), 91%의 상동성을 가지고 있어 그 효과가 유사할 것이라 생각되어 우선 확인해 보기로 하였다.

[서열 2]

```
gallus -EEVDVDATVEEDLGKSREGSRTDDEVVQREEEAIQLDGLNASQIKEIREKSERFAFQAE
SUS    EDEVDVDGTVEEDLGKSREGSRTDDEIVQREEEAIQLDGLNASQIRELREKSEKFAFQAE
      .*****.*****.*****.*****.*****.*****

gallus VNRMTKLIINSLYKNKEIFLRELISNASDALDKIRLISLTDENALAGNEELTVKIKCDKE
SUS    VNRMMKLIINSLYKNKEIFLRELISNASDALDKIRLISLTDENALAGNEELTVKIKCDKE
      ****.*****

gallus KNMLHVTDGTGIGMTKEELIKNLGTIAKSGTSEFLNKMTEMQDDSQSTSELIGQFGVGFYS
SUS    KNLLHVTDGTGVGMTREELVKNLGTIAKSGTSEFLNKMTEAQEDGQSTSELIGQFGVGFYS
```

.***.***.***.*****.*****.***** *.* *****.*****

gallus AFLVADRIVVTSKHNNDTQHIWESDSNEFSVIDDPRGNTLGRGTTITLVLKGEASDHLEL
 SUS AFLVADKVIVVTSKHNNDTQHIWESDSNEFSVIADPRGNTLGRGTTITLVLKEEASDYLEL

*****.*****.*****.*****.***** *****.***** *****.***

gallus DTVINLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPVEEEEEAKEEKEETDDDEAAVEEEEEEEKP
 SUS DTIKNLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPMEEEEAAKEEKEESDDEAAVEEEEEEEKP

. *****.*****.*****.***** *.* *****.*****

gallus KTKKVERTVWDWELMNDIKPIWQRPSKEVEEDEYKAFYK
 SUS KTKKVEKTVWDWELMNDIKPIWQRPSKEVEDDEYKAFYK

*****.*****.*****.*****.*****

배양은 초기배양과 본 배양으로 나뉘지며, UD (Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L)액체배지 3 ml에 단일집락을 접종하고 30°C, 200 rpm 에서 16시간 초기배양 한 후 본 배양은 YPDG (Yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 10 g/L 그리고 galactose 10 g/L)액체 배지를 사용하였다. 1 l Flask 에 200 ml YPDG에 초기배양 액을 1%가 되도록 접종하여 30°C, 200 rpm 에서 48 시간 배양하였다.

효모 배양액을 8,000 rpm에서 20 분간 원심분리 하여 균체를 회수한 후 멸균된 PBS를 이용해 한번 씻어주었다. 200 ml 본 배양으로 얻어진 각각의 재조합 균주 배양액의 최종 흡광도 값 및 균체 수, 그리고 wet cell의 무게는 아래에 표시하였다.

	스쿠알렌	MHP-HSP70	SUSgp96
흡광도 <i>A</i> ₆₀₀	29.5	23.4	29.7
균체수	1.2X10 ¹¹ cell/200 ml	9.4X10 ¹⁰ cell/200 ml	1.2X10 ¹¹ cell/200 ml
wet cell weight	4.16 g	3.87 g	4.22 g

* Yeast *A*₆₀₀=1, 2X10⁷ Cell/ ml

이후 면역원성 증진 효과 분석을 위해 효모 전세포 그대로를 전달하였으며, 이는 분자면역증강제 자체의 면역증강 효과에 더하여 닭의 TLR (toll-like receptor)15 리간드로서 효모 세포벽 베타글루칸의 분자면역증강 효과를 동시에 얻기 위해서이다.

2-2-4. 분자면역증강제의 재조합 발현

1) 분자면역증강제의 재조합 발현

1차 년도에서 확보한 분자면역증강제 후보들로는 mycobacteria 유래의 HSP70과 T cell의 peptide presentation을 증가시켜주는 것으로 알려진 glycoprotein96인 gp96 등의 Heat shock protein 2종, 면역반응을 일으킨다고 알려진 Flagellin, 항암 효과 및 면역증강 기능을 가지는 Sc3과 HFB1등의 곰팡이 유래의 hydrophobin 2종, 그리고 항산화기능과 면역기능을 촉진시키는 효능이 있다고 알려진 스쿠알렌이 있다.

이들은 효모 및 대장균에서 발현 되도록 재조합 발현 시스템을 이용하여 발현하였으며 효모 발현의 경우, 효모 세포내 발현 시스템과 분비 및 표면발현 시스템을 적용하였다. 대장균 발현의 경우에는 발현 및 정제가 용이하도록 maltose binding protein (MBP, 367 아미노산)를 결합한 시스템을 이용하였다. 이들 재조합 분자면역증강제들을 각각 His probe를 이용한 Western blot 과 SDS-PAGE를 통해서 발현을 확인하였으며 스쿠알렌은 배양 후 GC분석을 통해 스쿠알렌의 생산을 확인하였다.

효모 발현시스템을 이용한 재조합 발현의 경우 mycobacteria유래의 HSP70과 닭 유래의 gp96의 발현은 Western blot으로 확인되었고, hydrophobin의 경우 HFB1은 발현이 잘 되는 것으로 확인 되었으나 Sc3는 Western blot 상에서 확인이 어려울 정도로 발현양이 적었으며 분비발현은 되지 않은 것으로 나타났다. Sc3는 항암효과 및 면역증강의 효과가 높다고 알려져 있어 발현 양을 늘리는 것이 과제이고 분비 및 표면 발현 시스템에서 사용한 MFa 신호서열과 CWP의 조합 이외에 효모의 표면발현에 많이 사용되는 AGA2를 이용한 발현 시스템을 이용하는 것도 하나의 방법이 될 수 있을 것으로 사료되어 새로이 시도하였다.

대장균에서의 재조합 발현의 경우 MBP 융합발현 단백질들은 모두 대장균의 세포내에서 soluble하게 발현됨을 확인하였다. 특이적으로 mycobacteria 유래의 C-terminal HSP70의 경우에는 단백질 발현의 유도를 위해 induction 한 이후에 흡광도 값이 크게 증가하지 않아 발현균주의 성장에 영향을 미치는 것으로 생각되었다. 따라서 면역력 증강에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 c-terminal HSP70의 대장균 발현양의 증가 및 발현균주 성장의 안정화를 위해 GST (glutathione-S-transferase, 218 아미노산) 및 TrxA(Thioredoxin, 109 아미노산) 을 이용한 발현과 발현균주의 변화를 새로이 시도하였다.

① AGA2 표면발현 시스템을 사용한 효모에서의 hydrophobin 발현

분비 및 표면 발현 시스템에서 사용한 MFa 신호서열과 CWP의 조합 이외에 효모의 표면발현에 많이 사용되는 AGA2를 이용한 발현 시스템을 이용하여 Sc3과 HFB1의 발현양상을 조사하기 위한 시스템을 구축하였다.

AGA2(Adhesion subunit of a-agglutinin)는 효모세포벽의 AGA1(Anchorage subunit of a-agglutinin)과 disulfide bond를 형성하여 다른 외부 단백질을 융합하여 display 할 수 있는 단백질로서 효모 표면발현에 많이 사용되고 있으며 AGA2 시스템을 이용하여 Hydrophobin을 발현할 경우, 세포벽에 표면 발현되는 형태를 아래의 그림 1에 나타내었다.

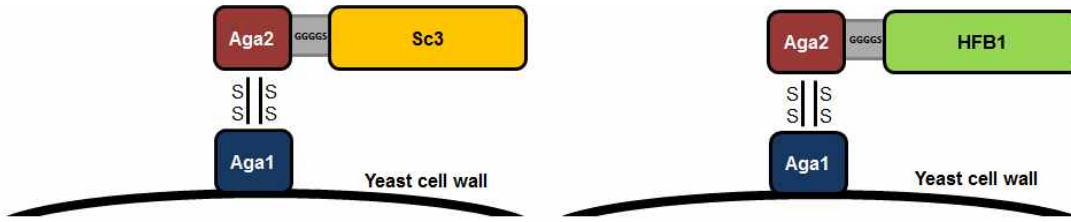


그림 1. AGA2를 이용한 단백질의 효모 세포 표면 디스플레이

AGA2 유전자는 pYD1 vector로부터 얻어와 (GGGGS)₂ linker로 Sc3와 HFB1을 융합 발현하는 벡터를 구축하였으며 벡터의 모식도는 아래 그림 2에 표시하였다. 이렇게 구축된 벡터를 효모에 형질전환 하여 AGA2를 이용한 표면발현이 제대로 이루어졌는지 확인 중이다.

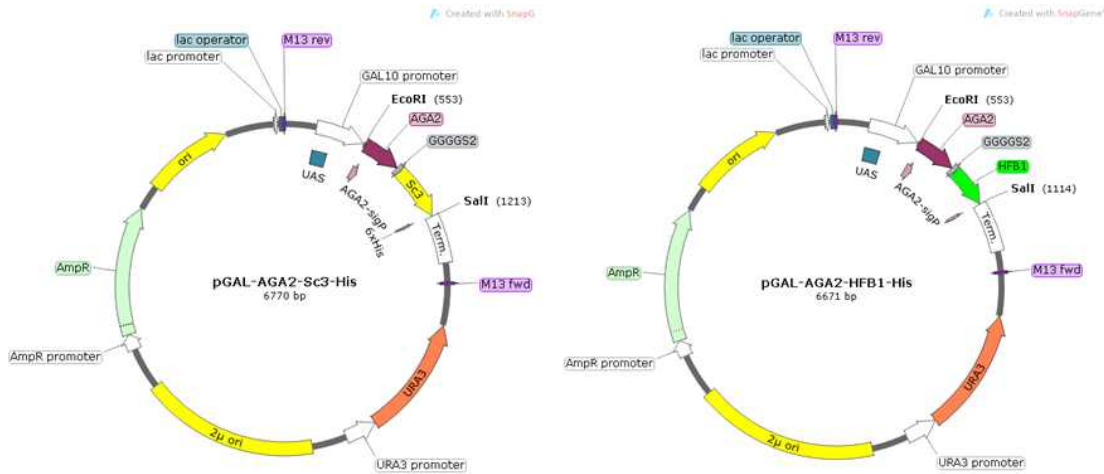


그림 2. AGA2를 이용한 Sc3 및 HFB1의 표면발현 플라스미드

② MBP, GST, TrxA를 이용한 대장균에서의 cHSP70 발현

MBP 융합 cHSP70 대장균 발현벡터인 pJexpress-MBP-cHSP70의 T5 promoter 하류에 *NdeI/BamHI*을 사용하여 GST와 TrxA를 각각 클로닝하여 삽입하여 cHSP70과 융합 발현하도록 플라스미드를 추가로 구축하였다 (그림 3).

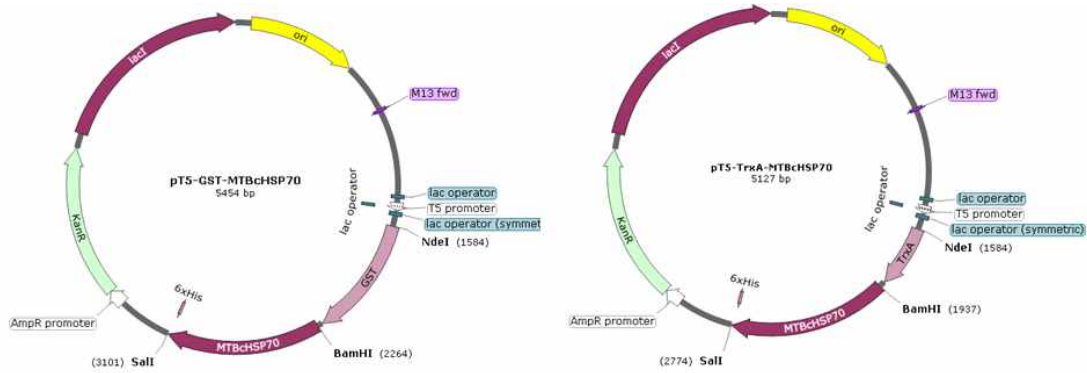


그림 3. cHSP70의 GST- 및 Trx-융합 발현 플라스미드

구축된 벡터들은 대장균 발현균주인 BL21로 형질전환하여 Kanamycin 항생제가 포함된 LB 고체배지에서 형질 전환체를 선별한 뒤, LB 액체배지에서 본 배양하여 GST 융합 단백질과 TrxA 융합단백질의 발현을 확인하였다. 또한 대장균 발현균주에 따라 발현양상이 달라 질 수 있으므로 BL21에서 균주성장에 좋지 않은 영향을 미치는 것처럼 보였던 MBP-cHSP70을 DH5alpha 균주에 형질전환 하여 대장균 균주의 성장을 확인하였다.

25 ml LB 액체배지에 초기배양한 배양액을 1%가 되도록 접종한 뒤 37°C, 200 rpm 에서 약 2시간 배양하였다. 흡광도 A600 값이 0.5-0.6이 되는 시점에 1 mM IPTG를 첨가하고 37°C, 200 rpm 에서 3시간 추가배양 한 후, 배양액 1 ml을 12,000 rpm 에서 1분간 원심 분리하여 회수하였다. 동일한 대장균 수 일 때의 발현량을 비교하기 위하여 회수한 균체는 흡광도 3.0으로 통일하였다. 500 µl의 PBS 를 넣어 균체를 풀어준 뒤 sonicator를 이용하여 10분간 파쇄 하였고, 12,000 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 분리하였다. 각각의 상등액과 침전 물에 대한 SDS-PAGE를 실시하여 MBP, GST 그리고 TrxA 융합 단백질의 발현 양상과 발현량을 확인하였다 (그림 4).

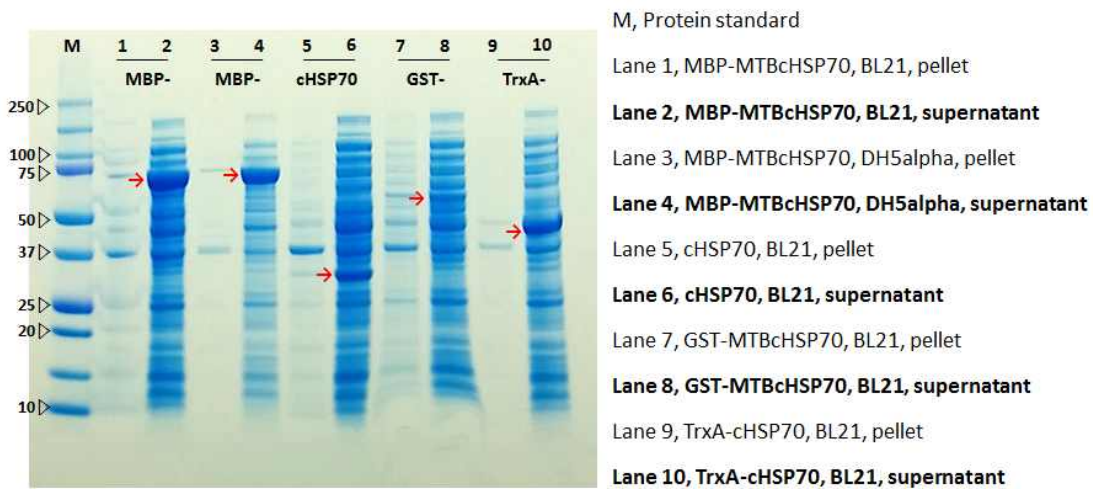


그림 4. cHSP70의 MBP-, GST- 및 Trx-융합 발현 양상 분석

먼저 발현균주에 따른 MBP-cHSP70의 발현양상을 확인한 결과, BL21과 DH5alpha 균주 모두에서 induction 이후 대장균의 성장이 더뎠는 것으로 확인 되었다. cHSP70 단일 단백질 발현 시에는 대장균 성장에 영향이 없었으므로 기존의 MBP-cHSP70 생산균주의 저조한 성장은 균주에 따른 차이가 아니라 특이하게도 MBP와 cHSP70이 동시에 발현될 경우, 미생물의 성장에 영향을 미치는 특성에 기인하는 것으로 판단되었다.

MBP-, GST-, TrxA-융합발현 한 경우와 cHSP70을 단일로 발현한 경우, 모두 대장균 내에서 soluble하게 발현이 되는 것으로 보였다. 또한 동일한 대장균 수일 때의 발현양을 비교하였을 경우, GST-융합발현일 때에 cHSP70 단일 발현 보다 적은 양이 발현되었으며 MBP-융합 발현일 때에 가장 많은 양이 발현 되는 것으로 나타났다. MBP-, GST-, TrxA-융합발현 한 cHSP70 중에서 어떠한 것에서 면역증강의 효과를 보일지 확인이 필요할 것으로 보였다.

2) 분자면역증강제 후보의 항원-증강제 융합발현 형태의 시도

HSP70과 Flagellin과 같은 분자면역증강제의 경우, 항원과 융합한 형태로 발현하여 면역반응을 강화시키는 역할이 가능한 것으로 알려져 있다. 따라서 현재 확보된 분자면역증강제 후보 중 hydrophobin인 HFBI을 항원과 융합발현을 시도하여 면역반응의 증가가 가능한지 확인해 보고자 하였다.

Trichoderma reesei 유래의 Hfbl(GenBank KU173825)은 양친매성의 작은 단백질로 자가조립(self-assembly)을 통하여 탄탄한 층을 형성하게 된다. 따라서 이 양친매성의 작은 단백질을 항원과 융합발현 하여 현재 시중에 판매되고 있는 ISA70 혹은 현 과제에서 사용하고자 하는 CAWIO (water in oil)와 같은 백신보조제에 항원이 거부감 없이 섞이는 것을 가능하게 하고 백신보조제의 비율을 줄이고 면역증강의 효과를 보일 것으로 기대하고 있다. 또한 Hfbl을 다른 단백질에 융합하여 발현하는 경우 그 단백질의 발현 효율이 증가하는 것으로 보고되고 있어 우리 연구실이 보유하고 있는 다양한 종류의 백신 항원들을 후보로 선정하여 융합발현을 시도하였다.

① Infectious bronchitis virus 항원의 융합발현

Infectious bronchitis virus (닭 전염성기관지염 바이러스, IBV)는 조류에게 발생하는 전염성이 매우 강한 호흡기계 질환을 일으키는 바이러스로서 기침, 기관지잡음, 재채기와 콧물 등을 특징으로 하며 닭의 산란율을 감소시킨다. IBV는 바이러스의 표면에 위치한 Spike protein의 Head 도메인인 S1 부분이 항원으로 작용할 것으로 알려져 있다. 따라서 IB의 항원후보인 S1에 HFBI을 융합발현하여 S1만을 단일 발현했을 때 보다 단백질 발현 효율과 면역원성이 증가되

는지 조사하기 위하여 발현 균주를 구축하였다.

IBS1(519 아미노산, 효모코돈으로 최적화하여 GenScript 사에서 합성)의 C-terminal 부분에 (GGGGS)₂ linker를 이용하여 HFBI를 overlap PCR 방법으로 IBS1LHFBI를 얻었다. 이후 *EcoRI/SalI* 으로 제한하여 효모발현벡터인 pYEG α -HIR525에 클로닝 하였으며 구축된 발현벡터의 모식도는 아래에 표시하였다 (그림 5).

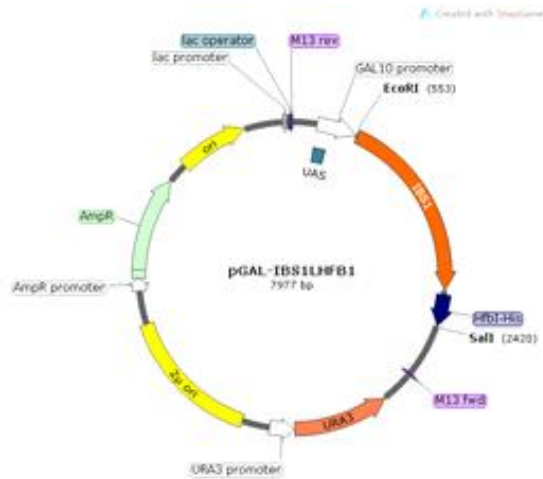


그림 5. IBV S1의 HFBI 융합발현 플라스미드

② Newcastle disease virus 항원의 융합 발현

Newcastle disease virus (뉴캐슬병 바이러스, NDV)는 가금류, 특히 닭에서 발병되는 무서운 전염병으로 폐사율이 높고 전염성도 강하며, 호흡기 증세와 신경 증세 등을 일으키는 법정 전염병이다. 바이러스의 표면에 위치한 F (fusion protein)와 HN (hemagglutinin neuraminidase)이 항원으로 작용하는 것으로 알려져 있어 이들 항원에 분자면역증강제 후보인 HFBI를 융합 발현하여 항원의 단일 발현 시 보다 단백질 발현 효율과 면역원성이 증가되는지 조사하기 위한 발현 균주를 구축하였다. 발현 및 정제의 용이함을 위해 효모의 신호서열인 MFa를 함께 발현하여 효모 분비발현 시스템을 적용하였다.

ND의 F와 바이러스의 표면에 위치한 HN의 ecto 도메인만을 효모 선호코돈으로 최적화하여 Genscript 사에서 합성하였으며 각각의 C-terminal 부분에 (GGGGS)₂ linker로 HFBI를 융합한 융합유전자, NDFLHFBI와 NDHNectoLHFBI를 얻어 효모의 신호서열인 MFa와 함께 발현벡터에 클로닝 하였다. 구축된 발현벡터의 모식도는 아래그림에 표시하였다 (그림 6).

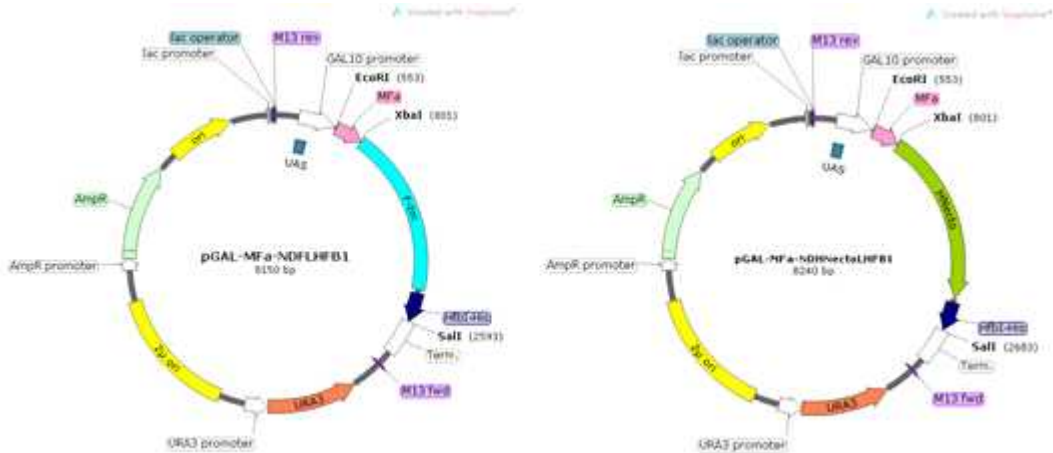


그림 6. NDV F 및 HN의 HFB1 융합발현 플라스미드

③ Porcine epidemic diarrhea virus 항원의 융합 발현

HFB1의 효과를 조류에 국한 하지 않고 돼지 등 다른 동물에서도 범용적으로 분자면역증강제로서 사용 가능한지를 알아보려고 본 실험실이 보유하고 있는 PEDV의 항원에 융합발현 해 보았다. Porcine epidemic diarrhea virus (돼지 유행성 설사병 바이러스, PEDV)는 돼지에 감염하여 심한 장염, 구토, 설사, 탈수를 유발하며 신생 자돈에서 특히 높은 폐사율을 보이는 전염병이다.

PED 바이러스는 표면에 위치한 Spike protein이 항원으로 작용하는 것으로 알려져 있어 Spike protein의 Head 부분인 S1과 Stalk 부분인 S2에 분자면역증강제 후보인 HFB1을 융합발현 하였다. 또한 바이러스의 표면에 위치한 membrane protein인 M protein의 ecto domain에 HFB1을 융합발현 하였다. 이들은 발현 및 정제의 용이함을 위해 효모의 신호서열인 MFa를 함께 발현하여 분비 발현 시스템을 적용하였다.

항원들은 모두 효모 선호코돈으로 최적화하여 Genscript 사에서 합성하였으며 C-terminal 부분에 (GGGS)₂ linker를 이용하여 각각의 항원후보에 HFB1을 overlap PCR 방법으로 융합하였다. 얻어진 융합 유전자, PEDS1LHFB1, PEDS2LHFB1, PEDM19LHFB1는 효모의 신호서열 MFa와 함께 발현벡터인 pYEG α -HIR525에 클로닝 하였으며 구축된 발현벡터의 모식도는 아래에 표시하였다 (그림 7).

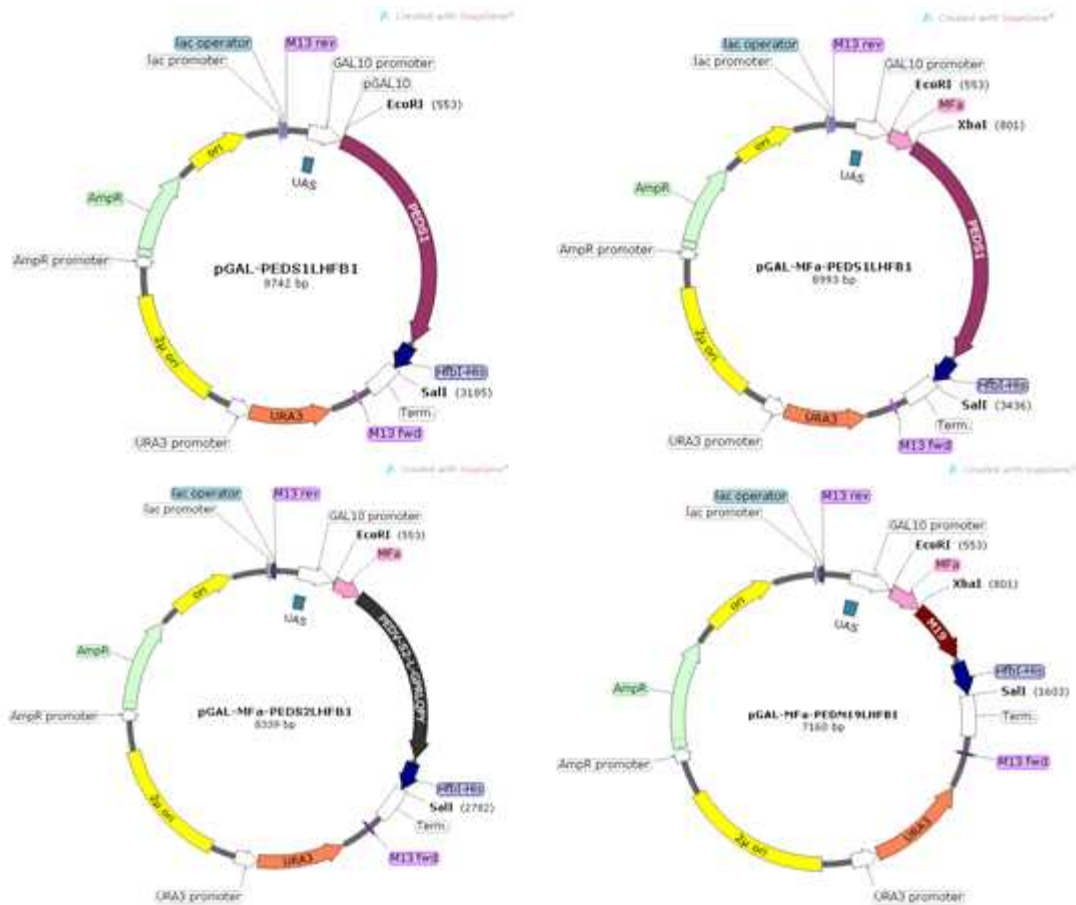


그림 7. 다양한 PEDV 항원의 HFB1 융합발현 플라스미드

④ 발현 양상 분석

위에서 구축된 다양한 백신 후보 항원-HFB1 융합발현 벡터를 리튬/아세테이트 방법으로 *S. cerevisiae* Y2805에 형질전환하고, UD (Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L) 고체배지에서 선별하였다.

선별된 형질전환체는 UD 액체배지에서 30℃, 200 rpm에서 16 시간 초기 배양한 후 본 배양을 하였다. 본 배양은 YPDG(yeast extract 10 g/L, pepton 20 g/L, glucose 10 g/L 그리고 galactose 10 g/L)액체 배지를 이용하였다. 250 ml Flask에 25 ml 씩 분주한 뒤 초기 배양한 균주를 1 % 가 되도록 접종하여 30℃, 200 rpm에서 72 시간 배양하였다. 배양액 1 ml을 12,000 rpm 에서 2 분간 원심 분리하여 균체를 회수한 후, 200 µl의 PBS를 넣어 균체를 풀어준 뒤 glass beads를 첨가하여 20분 동안 파쇄 하였다.

파쇄 된 균체는 cell wall, debris 등을 포함한 lysate 상태로 사용 하였다. 각각의 시료는 발현의 유무를 확인하기 위해 His probe와 HFB1(중양백신 제공)에 대한 항체를 이용하여 Western blot 분석하였다 (그림 8, 그림 9).

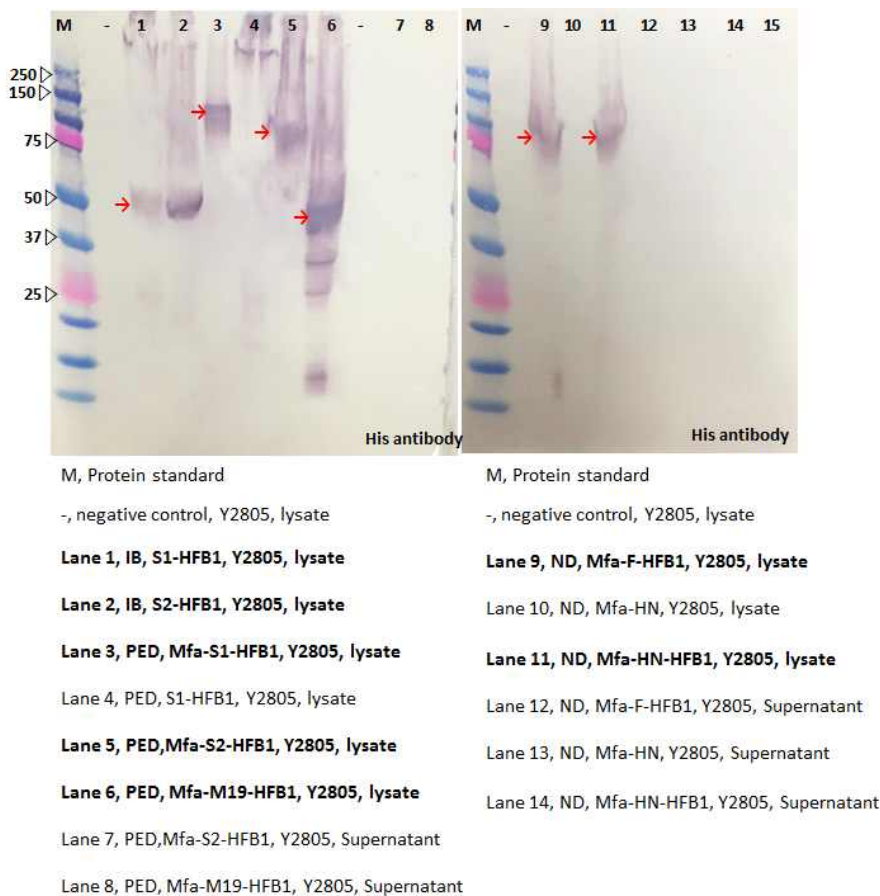


그림 8. 다양한 백신 후보 항원-HFB1 융합발현의 His-probe Western blot 분석

위의 Western blot 결과에 표시한 바와 같이 IB, ND 그리고 PED 바이러스의 백신 항원후보 등과 분자면역증강제 후보인 HFB1을 융합 발현한 경우, 대부분 발현이 잘 되는 것으로 확인되었다.

그런데 특이적으로 분비서열인 MFa와 함께 분비발현 했을 때에 NDV 및 PEDV에서 확인한 모든 경우에서 밖으로 분비 되지 않고 세포내에서 발현 단백질이 확인되었다. 이는 HFB1만 단일로 발현 했을 경우에는 분비발현이 가능했던 것과는 차이를 보이는 결과이며 아마도 hydrophobin의 자가조립의 특성에 기인하는 것으로 추정되었다. 약 9 kDa의 작은 사이즈인 HFB1은 자가조립을 하더라도 일부는 세포내, 일부는 분비가 가능하나 큰 사이즈의 항원과 융합발현 하였을 경우에는 대부분이 세포내에서 밖으로 분비가 되지 않는 것으로 생각된다.

기존에 단독발현 시에는 발현이 되지 않았던 PED의 S1과 ND의 HN이 HFB1과 융합하였을 때에 발현이 되는 것이 확인됨에 따라서 HFB1이 발현이 어려운 단백질의 발현을 도와주는 역할이 가능할 것으로 기대된다 (그림 8).

HFB1 융합 단백질의 발현을 확실히 하기 위해 중앙백신연구소에서 제공받은 HFB1-항체를 이용하여 Western blot을 실시한 결과 위의 His probe 결과와 마찬가지로 항원-HFB1 융합 단

백질들 모두 HFB1 항체와 반응하는 것으로 확인되었다 (그림 9).

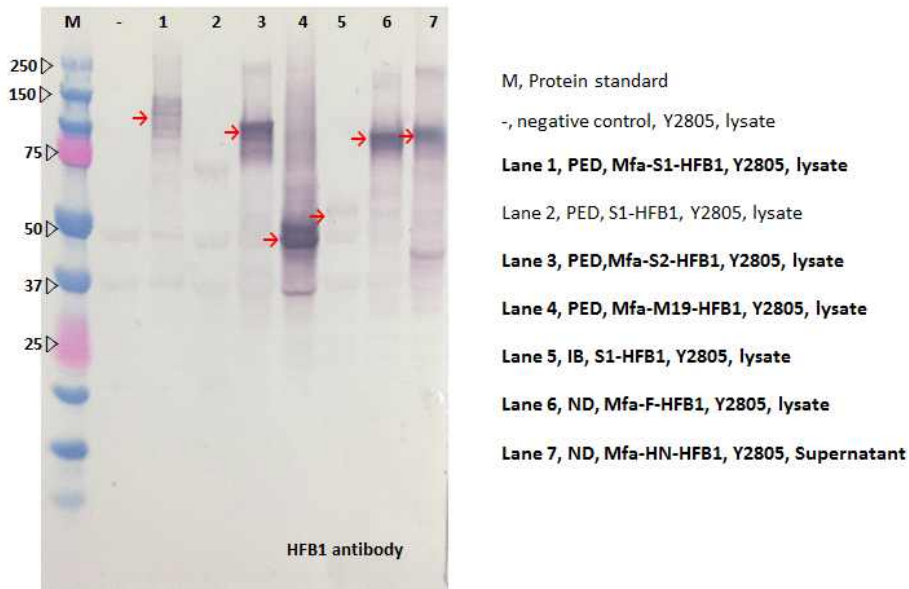


그림 9. 다양한 백신 후보 항원-HFB1 융합발현의 HFB1 항체 Western blot 분석

3) 면역증강 효과를 가지는 *Kluyveromyces marxianus* 효모 균주의 신규 재조합 발현 시스템 구축

Kluyveromyces marxianus 균주는 장 점막 부착 특성을 가지는 효모 균주로서 최근 프로바이오틱으로 개발하려는 시도가 있어 왔고 특히 균체 세포벽의 특수 구성성분으로 인한 세포 자체의 면역증강 효과도 알려 지고 있다. 따라서 1차년도 연구에서 다양한 분자면역증강제의 재조합 발현 숙주세포로서 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 이용한 유전자 발현을 연구한데 이어서 2차년도 연구에서는 *S. cerevisiae* 균주에서의 재조합 발현 연구에 더하여 *K. marxianus* 균주를 분자면역증강제나 백신 항원 등의 유전자 재조합 발현의 새로운 숙주세포로 활용함으로써 숙주 세포 균체 자체의 면역증강 효과를 추가로 얻을 수 있는 기술개발을 시도하였다. 먼저 이를 위한 기본기술인 재조합 발현 시스템 구축을 수행하였다.

K. marxianus 균주에서의 효율적인 발현 시스템을 구축하기 위해 효모에서 재조합 단백질 생산에 많이 사용되고 있는 *S. cerevisiae* 유래의 ScGAL10, 그리고 ScADH1(alcohol dehydrogenase)프로모터와 *K. marxianus* 유래의 KmGAL10, KmPGK1(phosphoglycerate kinase), KmINU(inulinase), KmGAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)프로모터를 사용하여 각 프로모터간의 활성을 비교하였다. 또한 selection marker 유전자로 *K. marxianus* 균주에서 사용 가능한 항생제인 G418의 내성유전자를 포함하는 KanMX 카세트를 사용하였다. 정량적인 프로모터 활성의 비교를 위해서 발현의 측정은 본 연구실이 보유하고 있는 lipase인 CalB14를 리포터로 발현하여 lipase assay를 통해 발현율을 비교 조사하였다.

ScGAL10프로모터를 포함하는 효모발현벡터인 pYEG α -HIR525를 *XbaI/SaI*으로 제한하여 리

포터 유전자인 CalB14를 효모신호서열인 MFa와 함께 발현 하여 분비되도록 하였으며, *NdeI/NarI*으로 제한하고 G418 내성 유전자인 KanMX 카세트를 넣어 G418항생제에서 선별가능 하도록 바꾸었다. 이후 *SmaI/EcoRI*로 제한하여 KmGAL10, KmPGK1, KmINU, KmGAPDH, ScADH1 프로모터를 각각 발현벡터에 클로닝 하였다.

G418 내성 유전자인 KanMX 카세트는 pFA6-kanMX4 벡터에서 증폭하였으며 각각의 프로모 터는 *K. marxianus* NCYC 2887의 genomic DNA, *S. cerevisiae* Y2805 genomic DNA를 주형으 로 하여 증폭하였다. 구축된 벡터의 모식도는 아래에 표시하였다 (그림 10).

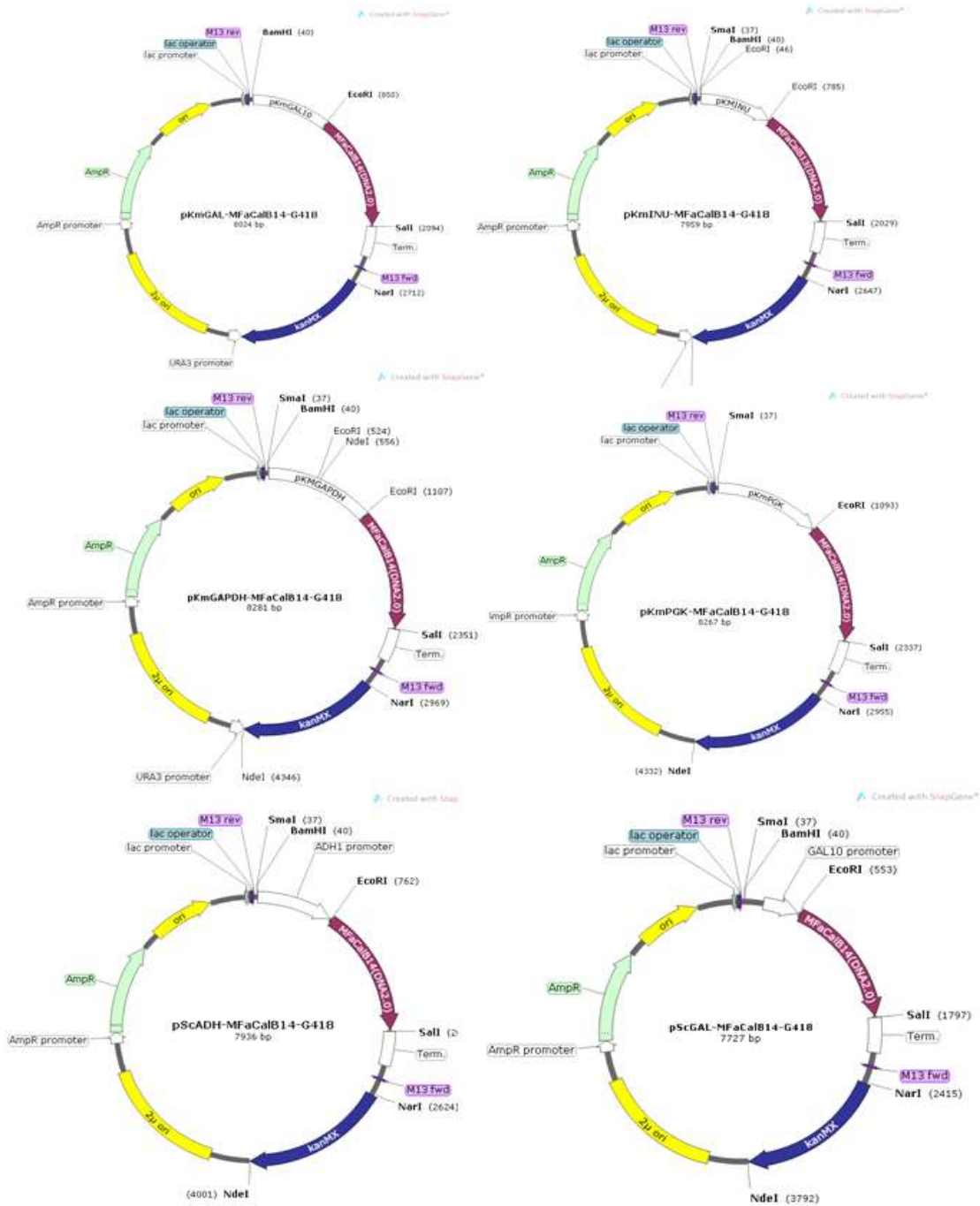


그림 10. 다양한 프로모터 비교를 위한 CALB14 분비발현 플라스미드

구축된 벡터는 *Bam*H으로 제한처리하여 linearized 시킨 후, LiAc/PEG 방법으로 *K. marxianus* NCYC 2887에 형질전환 하였다. 200 μ g/ml G418을 포함하는 YPD 고체배지에서 얻은 형질전환체를 GAL 프로모터의 것은 YPDG-Tributyryn 고체배지에 다른 프로모터는 YPD-Tributyryn 고체배지에 옮겨 30°C에서 24시간 배양시킨 후 가장 큰 halo를 보인 colony를 각각 선별하였다.

선별된 우수 균주를 YPD G418 액체배지에 3 ml 접종하여 30°C에서 24시간 배양 한 후 250 ml baffled flask의 액체배지 25 ml 에 1%가 되도록 접종하였다. 각 균주의 사용배지는 pScADH, pKmGAPDH, pKmPGK는 YPD(glucose 2%), pKmINU는 YPD, YPL(lactose 2%), YPS(sucrose 2%) 그리고 YPF(fructose 2%), pScGAL과 pKmGAL은 YPD, YPDG(glucose 1%, galactose 1%), YPL, 그리고 YPG(galactose 2%) 배지를 각각 사용하였다. 30°C에서 48시간 동안 배양하여 CalB14 유전자의 발현을 유도하였다.

각각의 배양액으로부터 얻은 상등액의 분비 발현된 단백질을 이용하여 pNPP(p-nitrophenyl palmitate)를 기질로 하여 반응 시킨 후 lipase 활성을 측정하였다. 반응은 3분간 진행하여 30초 간격으로 기질의 변화를 측정하였으며 측정된 흡광도 값을 계산하여 각각의 활성을 U/L로 환산하여 그래프로 나타내었다 (그림 11).

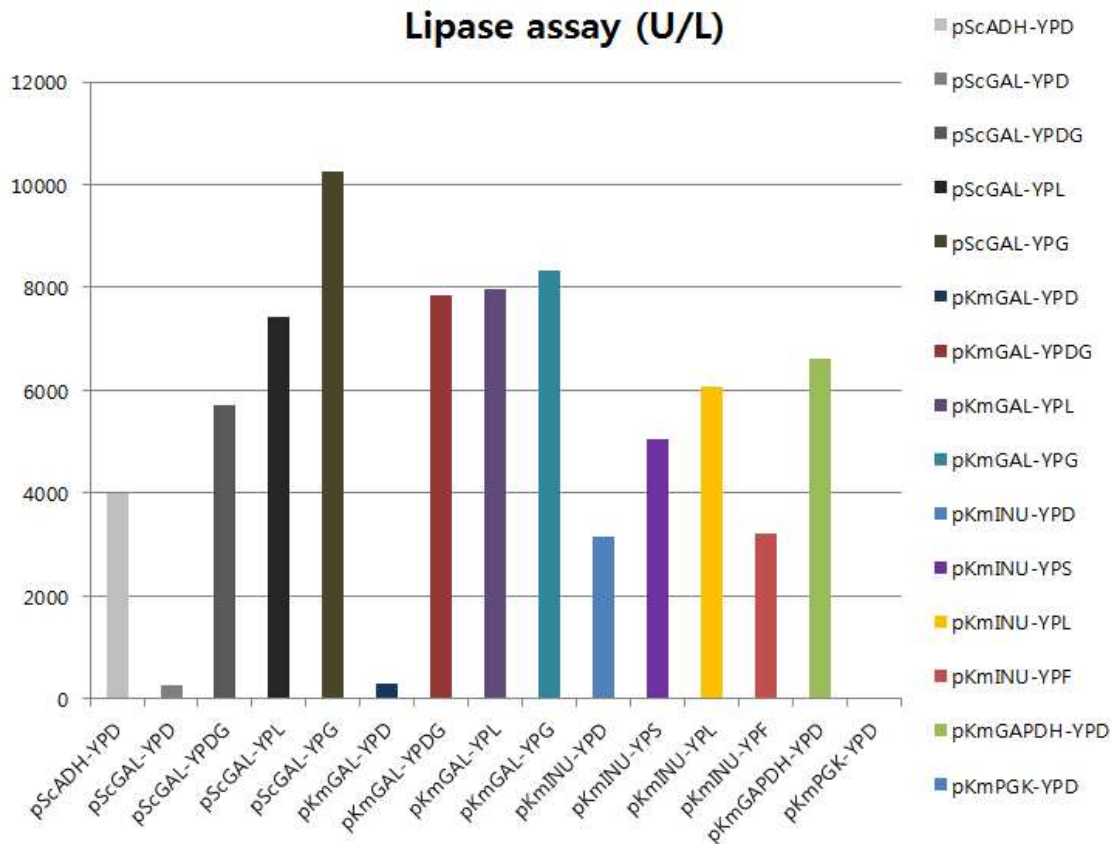


그림 11. 프로모터 활성 비교를 위한 배양상등액의 리파제 활성 분석

위의 연구 결과 ScGAL10 프로모터가 *K. marxianus* 균주에서 lactose 및 galactose를 발현 유도물질 (inducer)로 사용하여 유도적 발현 (inducible expression)이 가능함을 확인하였으며 특히 lactose는 galactose 대비 매우 값싼 탄소원으로서 이러한 특성은 *S. cerevisiae* 균주가 galactose는 잘 이용하는 반면 lactose를 이용하는 능력이 결여 되어 있는 점을 감안하면 *K. marxianus* 균주에서 ScGAL10 promoter를 사용함으로써 *S. cerevisiae* 균주에서와 달리 저렴한 탄소원 lactose를 inducer로 사용할 수 있는 추가적 장점을 제공할 수 있다. 이 결과를 바탕으로 국내 특허 출원을 준비 중이다. (특허명 : 클루이베로마이세스 막시아누스 균주에서 유도 발현이 가능한 프로모터 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템).

4) *Kluyveromyces marxianus* 균주를 활용한 분자면역증강제의 재조합 발현

위에서 구축한 *K. marxianus* 균주의 재조합 발현 시스템을 사용하여 분자면역증강제 후보 중의 하나인 flagellin의 재조합 발현 양상을 조사하였다. *K. marxianus* 발현벡터인 pScGAL-FliC-G418 벡터의 모식도는 아래에 나타냈으며 (그림 12) *Bam*HI으로 제한처리하여 *K. marxianus* NCYC 2887 균주에 형질전환 하였다.

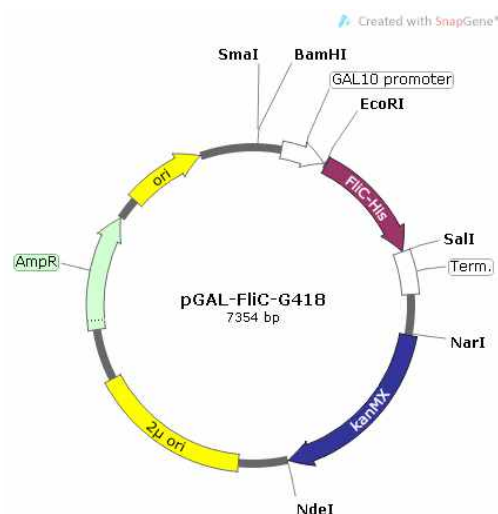


그림 12. Flagellin 생산을 위한 *K. marxianus* 발현 플라스미드

YPD-G418 고체배지에서 얻은 형질전환체 중 몇 개의 colony 를 선택하여 YPL(lactose 2%)액체 배지에서 30°C 에서 48시간 배양하였다. 배양액 1 ml을 12,000 rpm 에서 2 분간 원심 분리하여 균체를 회수한 후, 200 μl의 PBS를 넣어 균체를 풀어준 뒤 glass beads를 첨가하여 20분 동안 파쇄 하였다. 파쇄 된 균체는 FliC 발현의 유무를 확인하기 위해 His-tag에 대한 항체를 이용하여 Western blot 분석하였다 (그림 13).

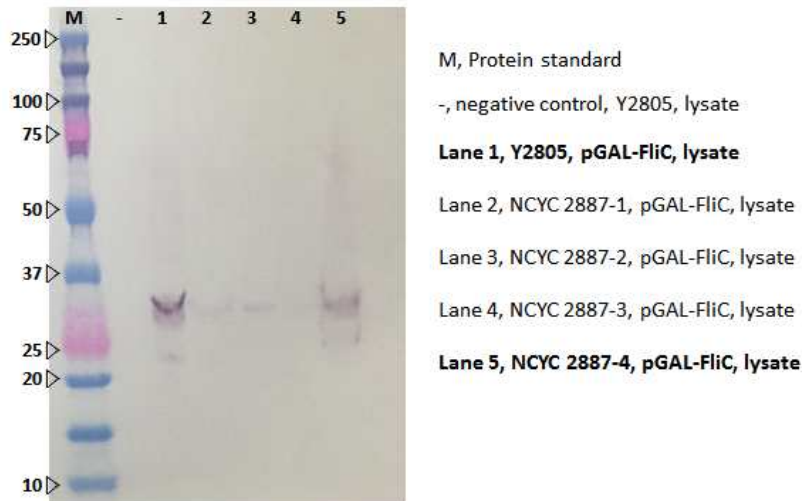


그림 13. *S. cerevisiae*와 *K. marxianus*에서의 FliC 발현 Western blot 분석

1차 년도에서 확인한 *S. cerevisiae* 발현 FliC와 비교한 결과, Western blot 상에서는 발현양이 다소 적은 것으로 보였다. 하지만 *K. marxianus*의 경우에는 발현백터가 genomic DNA 상에 임의로 integration 되어 발현되는 시스템을 가지고 있어 integration이 되는 copy 수에 따라 발현양이 달라 질 수 있다. 따라서 추가로 좀 더 많은 수의 형질전환체의 확인이 필요할 것으로 보인다.

2-2-5. 재조합 분자면역증강제 시료 생산 및 주관연구기관으로의 공급

재조합 분자면역증강제의 면역원성 증진 효과 분석을 위해 분자면역증강제 후보를 생산하는 5종의 *S. cerevisiae* Y2805 재조합 균주와 그의 gal80 유전자 결핍주 및 1종의 대장균 균주를 배양하여 불활화 균체 및 세포파쇄물을 주관연구기관에 전달하였다.

(효모 5종)

1. chicken gp96 (pGAL-gp96-His Y2805Δgal80)
2. Hydrophobin HFB1 (pGAL-Mfaopt-HFB1-His-cwp Y2805Δgal80)
3. *S. typhimurium* flagellin (pGAL-FliC-His Y2805Δgal80)
4. 스쿠알렌 (pGAL-HMG1/ispA Y2805)
5. *M. bovis* BCG c-terminal HSP70 (pGAL-cHSP70-His Y2805Δgal80)

(대장균 1종)

6. *S. typhimurium* flagellin (pT5-MBP-FliC BL21)

효모 배양은 초기배양과 본 배양으로 나뉘지며, UD (Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L, uracil dropout supplement 0.77 g/L, glucose 20 g/L)액체배지 3 ml에 단일집락을 접종하고 30°C, 200

rpm 에서 16시간 초기배양 한 후 본 배양은 Y2805 균주는 YPDG (Yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 10 g/L 그리고 galactose 10 g/L)액체 배지, Y2805 Δ gal80 균주는 YPD (yeast extract 10 g/L, pepton 20 g/L, glucose 20 g/L)를 사용하였다. 2 l Flask에 본배양 배지 200 ml 에 초기배양액을 1%가 되도록 접종하여 30°C, 200 rpm 에서 72 시간 배양하였다. 효모 배양액을 8000 rpm에서 20 분간 원심분리 하여 균체를 회수한 후 멸균된 PBS를 이용해 한번 씻어주었다. 이후 면역원성 증진 효과 분석을 위해 효모 전세포를 불활화 하여 전달하였으며, 이는 분자면역증강제 자체의 면역증강 효과에 더하여 닭의 TLR (toll-like receptor)15 리간드로서 효모 세포벽 베타글루칸의 분자면역증강 효과를 동시에 얻기 위해서이다.

대장균 배양은 100 ml LB 액체배지에 초기배양한 배양액을 1 %가 되도록 접종한 뒤 37°C, 200 rpm 에서 약 2시간 배양하였다. 흡광도 A600 값이 0.5-0.6이 되는 시점에 1 mM IPTG를 첨가하고 37°C, 200 rpm 에서 3시간 추가배양 한 후, 배양액을 8,000 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 회수하였다. 회수한 균체는 20 ml의 PBS를 넣어 균체를 풀어준 뒤 sonicator를 이용하여 10분간 파쇄 하였고, 12,000 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 분리하였다. 증강제를 포함하는 상등액을 전달하였다.

본 배양으로 얻어진 각각의 재조합 균주 배양액의 최종 흡광도 값은 아래에 표시하였다.

시료	효모			대장균		
	발현시스템	발현균주	A ₆₀₀	발현시스템	발현균주	A ₆₀₀
Chicken gp96	세포내	Δ gal80	30.6			
Hydrophobin HFB1	표면발현	Δ gal80	28.2			
<i>S. typhimurium</i> flagellin	세포내	Δ gal80	33.8	MBP-fusion	BL21	2.9
Mycobacterial HSP70(C)	세포내	Δ gal80	25.2			
Squalene	세포내	Y2805	34.2			

* Yeast A₆₀₀=1, 2X10⁷ Cell/ ml

○ 동물시험 시료의 추가 전달

동물시험을 위한 분자면역 증강제의 소진으로 인해 분자면역증강제 후보를 생산하는 5종의 *S. cerevisiae* Y2805 재조합 균주와 그의 gal80 유전자 결핍주를 추가로 배양하여 불활화 균체 및 세포파쇄물을 주관연구기관에 전달하였다.

배양조건은 위의 배양 조건과 동일하며 65°C에서 2 시간 열처리하여 효모세포를 불활화 하여 전달하였다. 또한 일부는 glass bead를 이용하여 파쇄한 후 세포파쇄물의 형태로 전달하였다.

시료	효모		
	발현시스템	발현균주	A ₆₀₀
Chicken gp96	세포내	△gal80	19.8
Hydrophobin HFB1	표면발현	△gal80	25.7
<i>S. typhimurium</i> flagellin	세포내	△gal80	29.3
Mycobacterial HSP70(C)	세포내	△gal80	15.5
Squalene	세포내	Y2805	32.1

* Yeast OD₆₀₀=1, 2X10⁷ Cell/ ml

3. 면역원성 증가 효과 평가

위에서 기술한 바와 같이 다양한 재조합 분자면역증강제를 생산하여 불활화 전세포 및 세포 파쇄액의 형태로 주관 및 협동연구기관에 전달하여 동물실험을 통하여 면역원성 증강 효과를 평가하였다.

2-2-6. 면역증강 프로바이오틱 효모 균주를 이용한 분자면역증강제 및 백신 항원 단백질 재조합 생산 기술개발

효모 *Saccharomyces boulardii* 균주는 효모 세포벽 자체의 구성성분이 면역유발 증진에 특히 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 현재 인체에 허가된 유일한 프로바이오틱 효모로서 설사 예방 및 치료제로 사용되고 있다. 본 연구에서는 2차년도에 이와 유사한 면역증강 효과를 가지는 것으로 연구되고 있는 효모 *Kluyveromyce marxianus* 균주를 사용하여 백신 항원 단백질을 발현 하는 연구를 진행한 바 있으며 3차년도에는 상기한 *S. boulardii* 균주를 사용하여 백신 항원의 재조합 발현을 시도하였다.

1) *S. boulardii* 효모 균체의 발효 생산

먼저 *S. boulardii* 균주의 균체를 경제적으로 대량 생산할 수 있는 발효 배양 기술 개발을 위하여 값싼 농산부산물물을 발효 배양 배지로 사용할 수 있는 가능성을 조사한 결과 일반적인 *Saccharomyces* 속 효모 균주들과 달리 특이하게도 돼지감자 등에 함유되어 있는 inulin-type fructan을 탄소원으로 잘 활용함을 알게 되었다.

돼지감자는 식량자원으로 사용되는 곡물자원과 경쟁적이지 않은 비곡물 작물로서 경제적인

바이오에탄올 생산 등에 매우 적합하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 산업적으로 바이오 에탄올 생산에 가장 많이 사용되고 있는 *Saccharomyces spp.* 중 제한된 소수의 종만이 돼지감자를 가수분해 전처리 없이 발효시키는 것으로 보고되고 있으며 본 연구에서 프로바이오틱 효모 균주 *S. boulardii* ATCC MYA-796가 돼지감자에 존재하는 fructo-oligosaccharides를 추가적인 가수분해 전처리 없이 에탄올 발효와 세포괴 (cell mass) 생산을 위한 탄소원으로 활용할 수 있음을 밝혔다.

S. boulardii ATCC MYA-796은 돼지감자의 fructo-oligosaccharides DP (degree of polymerization) 15-16까지 사용이 가능한 것으로 나타났으며 그림 1에 표시한 바와 같이 5리터 발효조에서 180 g/L 의 돼지감자분말 분산액을 이용한 직접 발효에서 40.0 g/L 의 에탄올을 생산함과 동시에 4.4×10^8 cells/mL의 프로바이오틱 효모 세포괴를 36시간의 발효로 생산할 수 있음을 확인하였다.

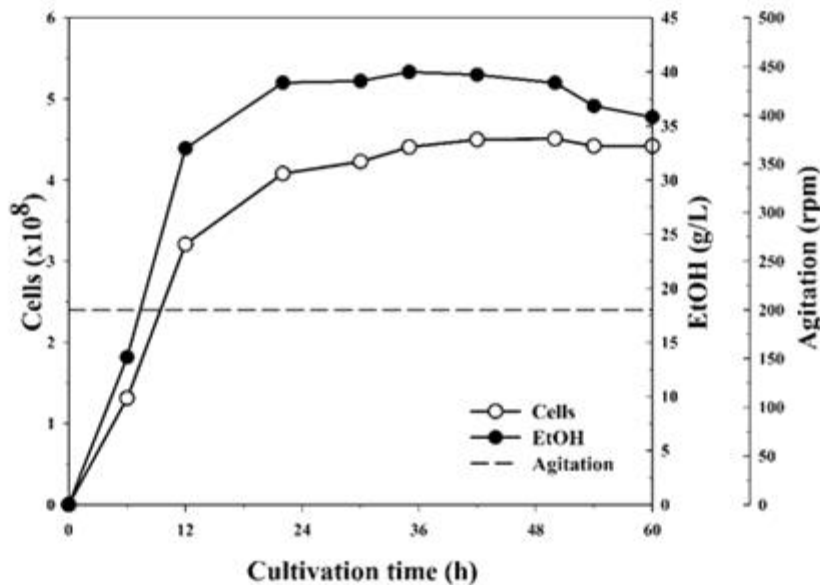


그림 1. Fermentation of Jerusalem artichoke powder suspension by ATCC MYA-796 in a 5-L jar fermenter. Medium (2 L) containing 180 g/L Jerusalem artichoke was used. The fermentation was carried out at 30°C with agitation at 200 rpm and aeration at 0.2 vvm for 48 h. The medium pH was maintained at 5.0. (Symbols: ● : EtOH, ○ : Cells, - - : Agitation)

2) 분자면역증강제 squalene을 함유하는 *S. boulardii* 효모 균체 생산 기술개발

S. boulardii ATCC MYA-796 세포의 면역증강 효과를 더욱 증진시킬 수 있는 방안으로서 효모의 이소프레노이드 대사에 관여하는 유전자를 과발현 시킴에 있어서 특정 유전자 조합이 분자면역증강제 squalene의 세포내 축적에 매우 중요함을 알 수 있었다.

이소프레노이드 유전자를 도입하지 않은 *S. boulardii* 야생형 균주는 전혀 squalene을 축적하지 않는 것으로 나타났으므로 (Fig. 2) 이소프레노이드 생합성의 중요한 율속단계 유전자로 알려진 *HMG1*과 *ispA* (Wang et al., 2010)를 과발현하는 플라스미드 (pG-tH-I)를 도입하여 squalene 축적 여부를 조사하였으나 거의 축적되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 이소프레노이드 생합성의 초기 단계 유전자 *ERG10* (acetoacetyl-CoA thiolase)을 추가로 과발현하는 플라스미드 (pG-tH-I-E10)를 도입한 균주를 제조하였고 이 경우 앞서 제조한 균주보다 대폭 증가한 82 mg/L의 squalene을 생산할 수 있었다 (그림 2).

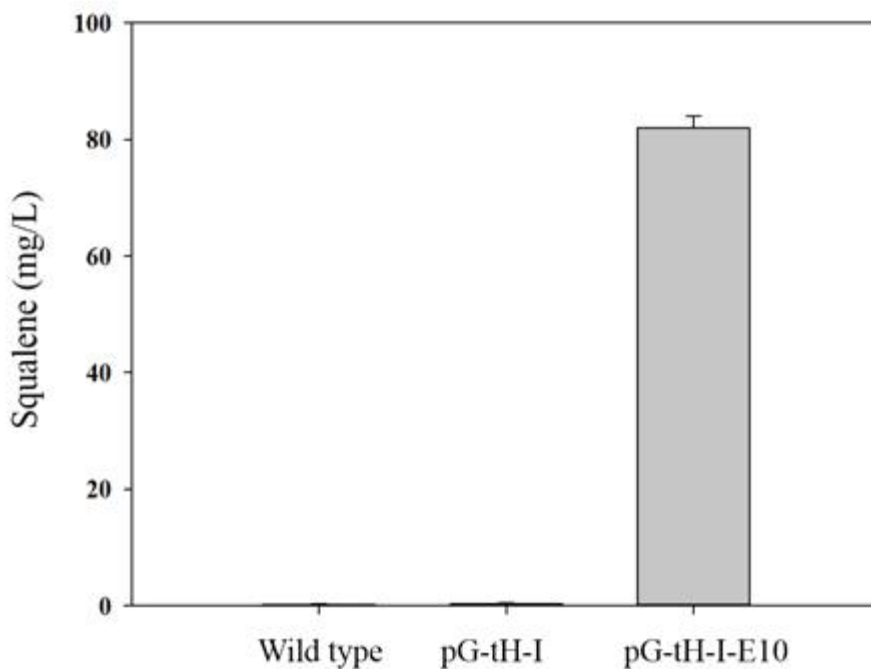


그림 2. Squalene production by *S. boulardii* ATCC MYA-796 overexpressing genes. Strains were grown at 30°C and 200 rpm in YPDG medium for 72 h. Abbreviations of plasmids are as follows: pG-tH-I, overexpressing *tHMG1* and *ispA*; pG-tH-I-E10, overexpressing *tHMG1*, *ispA* and *ERG10*.

3) *S. boulardii* 균주를 숙주세포로 사용한 백신 항원 단백질의 발현

S. boulardii ATCC MYA-796의 면역증강 효과를 활용하고 더욱 증진시킬 수 있는 방안의 하나로서 효모 세포내에서 조류 바이러스 (Newcastle disease virus, NDV) 백신 항원 fusion protein (F)와 hemagglutinin-neuraminidase (HA) 등을 추가적으로 발현할 수 있는 벡터를 구축하였다. 또한 효모에서 발현이 어려운 것으로 알려진 돼지 바이러스 항원 단백질 (PEDV S1)도 reference로 포함하여 발현을 진행하였다. 각각의 단백질은 2차년도 연구에서 그 효과를 확인한 바 있는 hydrophobin 단백질을 코딩하는 HFBI과 융합발현 하였으며 각 항원의 발현 여부를 확인하였다.

이렇게 구축된 PEDV S1-L-HFBI, ND F-L-HFBI, 그리고 ND HN-L-HFBI 플라스미드를 가지는 효모 균주를 배양하고 배양액과 cell lysate로 각각 분획하여 발현 양상을 분석한 결과 그림 3에 표시한 Western blot 분석에서 보는 바와 같이 효모에서 분비 발현을 위하여 signal sequence를 가지고 있음에도 불구하고 모든 항원 단백질이 배지로 분비되지 않았으나 cell lysate에서 기대되는 분자량 위치에서 검출됨을 확인하였다.

한편 특이하게도 HFBI이 융합되지 않은 경우에는 단백질이 전혀 발현 되지 않는 것으로 나타났다으며 (자료 미제시) 이는 식물체에서 보고된 바 있는 HFBI의 발현을 증진 효과와 일치하는 결과로서 효모에서도 다른 난발현 단백질의 발현 효율 증진에 유용할 것으로 전망되었다.

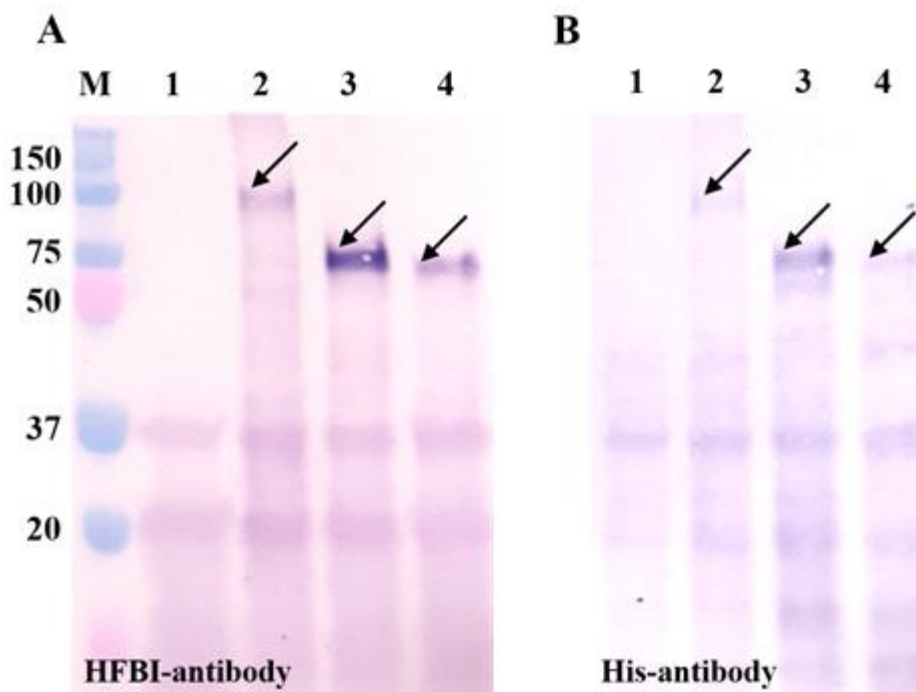


그림 3. Results of western blot using HFBI-antibody (A) and His-antibody (B). The M, prestained protein marker; Lane 1, *S. boulardii* ATCC MYA-796 lysate; lane 2, PEDV S1-L-HFBI transformant lysate; lane 3, ND HN-L-HFBI transformant lysate; lane 4, ND F-L-HFBI lysate, respectively.

2-2-7. *S. cerevisiae* 균주에서 분자면역증강제 squalene의 과생산 최적화 및 스케일-업

1) 효모 *S. cerevisiae* 균주에서 squalene 과생산을 위한 발현 최적화 및 배양 최적화

선행연구를 통하여 면역증강 가능성이 확인된 squalene을 효모에서 대량생산하기 위하여 먼

저 과생산을 위한 유전자 발현 최적화 및 발효배양 최적화 연구를 수행하였다. Squalene은 최근에는 백신의 adjuvant로도 많이 쓰이고 있으나 천연물로부터 이들을 추출하는 방법은 여러가지 문제가 있어, 미생물이나 미세조류를 이용하여 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

효모 *S. cerevisiae*에서 squalene의 생합성은 엄격하게 조절되고, 정상적인 생육 동안에는 세포 내에 매우 적은 양의 squalene만이 축적된다. 정상적인 조건에서 *S. cerevisiae*는 squalene 대부분을 효모 세포 생존에 필수 성분중 하나인 ergosterol 생합성에 사용하게 된다. 대사경로 이내의 다양한 효소들에 의해 squalene이 ergosterol로 전환되지만 그중 첫 번째 단계 효소인, squalene epoxidase를 암호화하는 *ERG1*이 squalene 생산성을 향상시키기 위한 핵심 유전자로 여겨진다. 이미 *ERG1*의 활성을 부분적으로 저해하는 terbinafine을 첨가하면 squalene 축적량이 향상 된다고 알려져 있다 (Drozdikova et al., 2015; Garaiova et al., 2014).

본 연구에서는 squalene 생산에 많이 이용되는 다양한 *S. cerevisiae* 균주들에서 *ERG1*의 부분적인 저해자인 terbinafine을 첨가하여 이들의 생육을 조사함으로써 squalene 생산을 위한 잠재성 있는 균주들을 선별해 보고자 하였다. *HMGI*을 과발현한 37개의 ATCC 균주들에서 축적된 squalene 수준이 높은 것으로 보고된 바 있는 균주들인 ATCC200589, ATCC201238, ATCC201741을 선별하였고 (Ohto et al., 2009) 이외에도 squalene 축적에 자주 사용되는 *S. cerevisiae* BY4741, W303, YPH499를 사용하였으며 본 실험실에서 일반적으로 사용하는 *S. cerevisiae* Y2805 균주 역시 함께 비교해보고자 하였다.

배양은 초기배양과 본 배양으로 구분하여, 초기배양에는 UD 배지를 사용하였다. UD 배지는 0.67% yeast nitrogen base W/O amino acids, 0.077% ura drop out supplement base, 2% glucose가 첨가된 배지이며 UD배지 3 mL에 단일집락을 접종하고 30° C, 200 rpm에서 초기 배양 후 본 배양을 하였다. 본 배양은 YPD 배지 (YP media containing 2% glucose)를 250 mL 배플 플라스크 (baffled flask)에 25 mL씩 분주한 뒤 초기 배양한 균주를 OD가 0.1이 되도록 접종하였고 10 µg/mL terbinafine을 각각 첨가하였다. 그리고 30° C, 200 rpm,에서 교반하면서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 수확하여 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer에 현탁하였다. 현탁 후, glass-beads (425-600 µm; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 vortexing하여 10분간 파쇄하였다. 그리고 pentane을 첨가하여 10분간 추가로 vortexing 한 후 12,000 rpm 에서 10 분간 centrifugation하여 취한 상층액을 gas chromatography (GC)로 분석하였다.

GC는 Agilent 7890A를 사용하였고 column은 HP-5 (5% Diphenyl-95% Demethylsiloxane Copolymer, 30mX0.32mmX0.25 µm film thickness), detector는 H₂와 Air를 이용한 FID detector, carrier gas로는 고순도 He를 사용하였다. 분석조건은 detector temp 320° C, injector temp 300° C이었으며, oven temp는 40° C에서 3분, 240° C에서 5분 (rate of 10° C/min), 300° C에서 1분(rate of 10° C/min)으로 맞추어 수행하였다. 측정된 squalene의 농도는 squalene 시약을 구매하여 standard로 사용하여 비교하였고, internal standard로는 methyl laurate를 사용하였다. 그리고 매 sample당 3 반복 측정을 기본으로 수행하였다.

Terbinafine을 첨가하지 않았을 경우 *S. cerevisiae* 7 가지 균주의 squalene 축적량은 0.3 ±

0.01 mg/L에서 1.4 ± 0.3 mg/L로 매우 미미한 수준임을 확인 할 수 있었다 (그림 4). 그러나 terbinafine을 첨가한 경우에는, 11.4 ± 0.3 mg/L에서 40.5 ± 4.5 mg/L까지 squalene 축적량이 전반적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다.

이를 토대로 보아 terbinafine을 사용함으로써, *ERG1*에 의해 암호화되는 squalene epoxidase를 부분적으로 저해시켜 squalene이 축적됨을 확인 할 수 있었고, *ERG1*이 효모 세포내의 squalene 축적량 향상에 잠재성을 갖는 주요한 효소임을 확인할 수 있었다.

그러나 squalene 과생산을 위해 대사공학적으로 많은 조작이 행해진 바 있는 *S. cerevisiae* BY4741의 경우, 다른 *S. cerevisiae* 균주들에 비해 squalene 축적량이 상대적으로 저조한 것을 확인할 수 있었다. 특히, W303 균주가 40.5 ± 4.5 mg/L로 가장 우수한 squalene 축적량을 보였으며, Y2805 (28.9 ± 1.0 mg/L)와 YPH499 (28.0 ± 2.2 mg/L) 역시 다른 균주에 비해 우수함을 확인할 수 있었다 (그림 4). 그러나 W303과 YPH499 균주에서 squalene을 과생산하기 위해, *tHMG1*을 과발현 하는 대사공학을 시도하였으나 squalene 생산량이 매우 미미함을 확인한 바 있었다.

이를 토대로 보아, squalene을 과생산하기 위한 대사공학과 terbinafine 첨가 실험의 결과가 서로 상충되는 결과임을 확인할 수 있었고, 이는 아마도 균주 간의 서로 다른 유전적 배경에 기인하는 것으로 여겨진다. 결과적으로 *S. cerevisiae* 균주에서 squalene 생산이 매우 균주 의존적으로 나타남을 확인할 수 있었다.

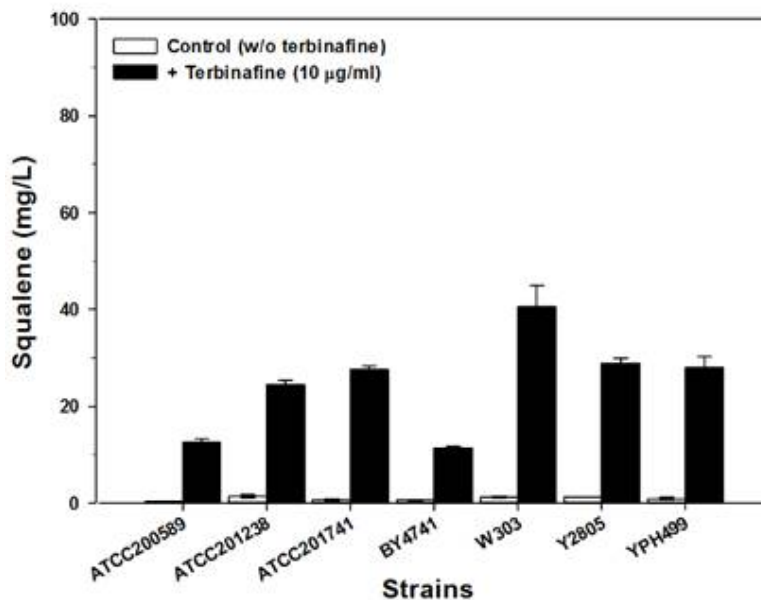


그림 4. Terbinafine의 존재 또는 부재 하에 유전자 조작하지 않은 *S. cerevisiae* 균주들에서의 squalene 축적

선행 연구를 통해 *S. cerevisiae* Y2805에서 *E. coli* 유래의 FPP synthase인 *ispA*와

Hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase의 trans-membrane domain을 제거한 *tHMG1*을 과발현 시킴으로써 squalene 생산량을 상당히 증가 시킬 수 있음을 확인한 바 있으므로 이를 토대로, 앞선 terbinafine 첨가 실험에서 squalene 축적량 향상에 잠재성을 보인 *S. cerevisiae* 균주들에서도 *tHMG1*과 *ispA*를 과발현 시키는 대사공학을 시도해 보고자 하였다.

선행 연구를 통해 구축한 pGal-*tHMG1/ispA* 플라스미드를 *S. cerevisiae* 균주들에 각각 도입한 후 이들의 squalene 생산 수준을 비교 분석하기 위하여, 플라스미드가 도입된 재조합 *S. cerevisiae* 균주들을 30° C, 200 rpm에서 교반하면서 72시간 동안 배양하였다.

그림 5에서 볼 수 있듯이, 어떠한 대사공학도 행하지 않은 이들의 야생형 균주들과 비교하여 *tHMG1*과 *ispA*를 과발현하는 재조합 *S. cerevisiae* 균주들의 squalene 생산량이 전반적으로 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 특히 Y2805 균주의 경우, 400 ± 35 mg/L의 squalene 생산성으로서 다른 재조합 균주들에 비해 가장 높은 squalene 생산성을 확인 할 수 있었다.

그러나 terbinafine 첨가 실험에서 squalene 축적량이 준수하였던 대부분의 ATCC 균주들의 경우에는 *tHMG1*과 *ispA*를 과발현 시키는 대사공학을 도입했음에도 불구하고 squalene 생산수준이 미미함을 확인 할 수 있었다. 이와는 반대로 terbinafine 첨가 실험에서 squalene 축적 수준이 가장 저조 하였던 BY4741의 경우에는, *tHMG1*과 *ispA*를 과발현 하였을 때 상당히 많은 squalene 생산됨을 확인 하였다 (240 ± 15 mg/L).

앞서 언급한 바와 같이 상충되는 결과들은 terbinafine 존재 하에 조작하지 않은 *S. cerevisiae* 균주들에서 squalene 축적 수준의 비교는 squalene 생합성을 위한 효모 대사 경로를 조작하기 위한 숙주 균주의 선별에 대한 기준으로는 적합하지 않음을 나타내고 있다. 이에 더하여, 효모에서 squalene 생산이 매우 균주 의존적으로 나타남을 다시 한 번 확인 할 수 있었다.

결과적으로 squalene 생산을 위해 시험된 7개의 균주 중 본 실험실에서 사용하고 있는 Y2805균주가 최적의 균주임을 확인 하였다. 또한 7개의 균주들 간의 squalene 축적의 현저한 차이를 일으킬 수 있는 유전적 배경의 변이를 조사하기 위해, squalene 생합성에 중요한 관련 유전자들의 염기서열을 분석해 보았다. 그러나 예상과는 달리 *ERG9*, *ERG1*, *MGA2* 유전자의 프로모터를 포함하는 이들 서열을 비교 분석해 보았으나 특별한 차이점을 찾지는 못하였다. 따라서 Y2805 균주가 다른 균주들에 비해 squalene 생산성이 우수한 이유를 규명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

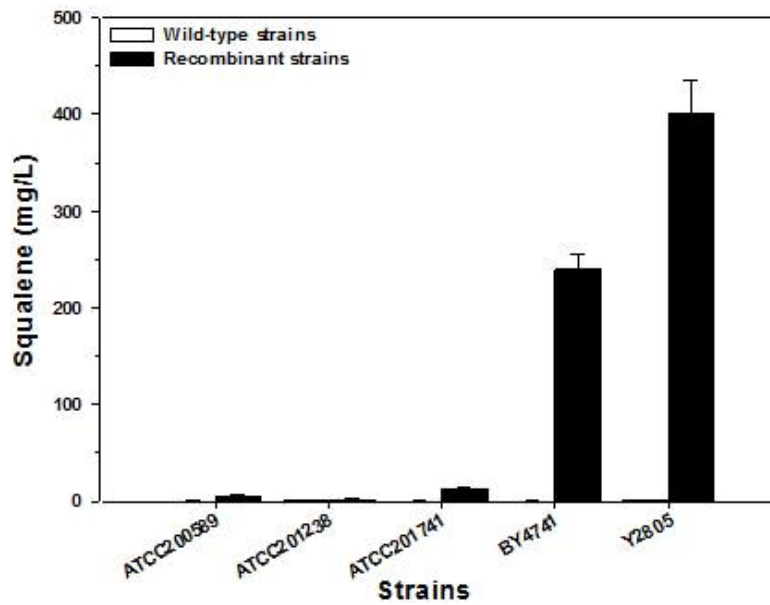


그림 5. *tHMG1*과 *ispA*를 과발현하는 *S. cerevisiae* 균주들에서의 squalene 생산성 비교

앞선 연구결과를 통하여 squalene 생산이 효모 *S. cerevisiae* 균주들에서 매우 균주 의존적으로 나타나는 것을 확인하였다. 또한 *tHMG1*과 *ispA*를 과발현하는 대사공학을 각각의 *S. cerevisiae* 균주들에 도입해 보았으나 결과적으로 *S. cerevisiae* Y2805 균주가 squalene 생산을 위한 최적의 숙주균주임을 확인할 수 있었다.

따라서 대사공학적으로 조작한 *S. cerevisiae* Y2805 균주에서 squalene 생산성을 추가적으로 향상시키기 위하여, 배양 온도의 조절, terbinafine 농도의 조절과 같은 최적화 실험을 수행하였다.

온도 최적화는 원하는 화합물의 생산을 향상시키고 세포 성장에 영향을 주는데 사용되는 가장 쉬운 방법이다. 최근에 Henderson et al. (2013)은 *S. cerevisiae* 균주를 이용한 에탄올 발효를 35° C에서 수행함으로써 squalene 생산을 2배 증가 시켰고, 반면에 Loertscher et al. (2006) 및 Tronconi et al. (2012)은 저온에서의 *S. cerevisiae* 배양이 높은 수준의 squalene을 축적한다고 보고하였다. 그러므로 대사공학적으로 조작한 *S. cerevisiae* Y2805 균주를 각각, 25° C와 35° C에서 배양하여 이들의 squalene 생산성을 분석해 보고자 하였다.

예상했던 것과는 달리, Y2805 균주를 25° C에서 배양한 경우 156 ± 19 mg/L의 squalene을 생산하였고, 35° C에서 배양한 경우에는 277 ± 47 mg/L의 squalene이 생산되었다 (그림 6A). 결과적으로 30° C에서 배양하여 얻은 squalene 생산성에 비해 감소된 것을 확인할 수 있었다. 본 연구결과가 이전의 연구결과들과 상충되는 이유는 서로 다른 효모 균주들이 갖는 유전적

배경의 차이로 생각되어 진다. 본 연구에서 사용된 균주는 *tHMG1*과 *ispA*를 과발현 시키는 재조합 균주로서, 다른 연구에서 사용된 균주들은 대사공학을 하지 않은 야생형 효모 균주이기 때문이다.

앞선 terbinafine 첨가 실험을 통하여 squalene epoxidase의 부분적인 저해가 squalene 생산성 향상에 매우 중요한 요인임을 확인하였으므로 *tHMG1*과 *ispA*를 과발현하는 재조합 *S. cerevisiae* Y2805 균주에서도 squalene epoxidase의 부분적인 저해가 squalene 생산성의 추가적인 향상을 가져오는지 여부를 확인해 보고자 하였다.

재조합 균주 Y2805를 25 mL의 YPDG 배지와 5-40 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 terbinafine이 첨가된 플라스크에서 72시간 동안 배양한 후 이들의 squalene 생산성을 비교분석하였다. 5-20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 terbinafine이 첨가된 경우에는, terbinafine 농도가 증가함에 squalene 축적량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 6B). 특히 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 terbinafine이 첨가되었을 때, 804 ± 31 mg/L의 squalene이 생산되는 것을 확인할 수 있었고, 대조구 대비 2배 이상 squalene 생산량이 증가하였다 (그림 6B). 그러나 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 terbinafine을 첨가한 경우에는, 세포 생육이 상당히 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 결과적으로 squalene 생산량 역시 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 2배 이상의 squalene 생산성을 향상시키는 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 terbinafine이 첨가된 경우에도 세포 생육이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 squalene 생산을 위한 발효 실험에는 terbinafine 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도가 세포 생육에도 영향을 주지 않고 squalene 생산성을 향상시키기 위한 최적의 농도임을 확인할 수 있었다.

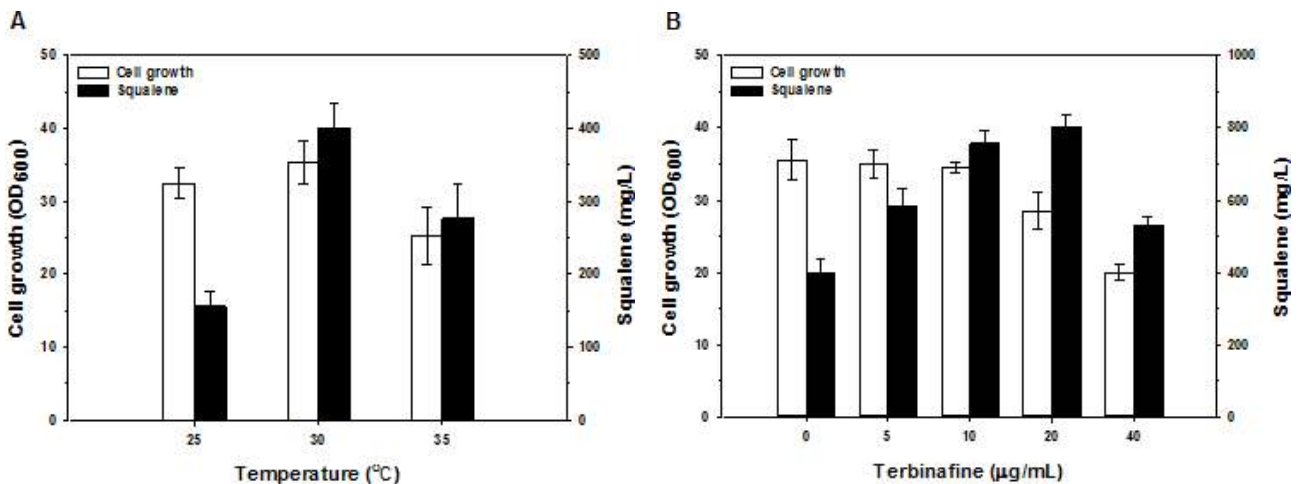


그림 6. 대사공학적으로 조작한 *S. cerevisiae* Y2805에서의 squalene 생산을 위한 최적화

2) Squalene 생산 스케일-업을 위한 재조합 *S. cerevisiae* 균주의 30-L 발효배양

앞선 균주선별, 배양온도, terbinafine 농도 조절과 같은 효모에서 squalene 과생산을 위한 최적화 실험을 토대로 pGal-*tHMG1/ispA*를 보유하는 *S. cerevisiae* Y2805 균주의 30-L

fermentation을 수행하였다. 이를 통해 squalene의 산업규모의 생산을 위한 가능성 여부 역시 확인해보고자 하였다.

30-L 발효조의 초기배양은 250 mL 플라스크(baffled flask) 5개에 각각, UD 배지 20 mL (0.67% yeast nitrogen base W/O amino acids, 0.077% ura drop out supplement base, 2% glucose)을 분주한 후, 단일집락을 접종하고 30° C, 200 rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 2차 배양은 1-L 플라스크(baffled flask) 5개에 각각, 200 mL YPD 배지 (YP media containing 2% glucose)를 분주한 후, 초기배양 한 배양액을 접종 한 후, 30° C, 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 본 배양인 30-L 발효조에는 2차 배양한 총 배양액 1 L을 접종하였다. 30-L 발효조의 working volume은 10-L로서 회분식 배양을 수행하였다. 배지조성은 yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L 이다. 배양조건은 온도는 30° C로 설정하였으며, pH는 10 N NaOH를 사용하여 6.0으로 유지하였다.

Agitation은 발효조 내의 용존산소의 농도가 30% 이상으로 유지가 되도록 교반속도를 100-300 rpm까지 단계적으로 증가시켰으며, 통기량은 1vvm으로 일정하게 유지하였다. 또한 본 배양을 시작하기에 앞서서 terbinafine 첨가 실험에서 확인한 결과를 토대로, 10 µg/mL 농도의 terbinafine을 배지에 첨가하여 squalene epoxidase를 암호화하는 *ERG1*을 부분적으로 저해시킴으로써 추가적으로 squalene 축적량을 향상시키고자 하였다. feeding 배지조성은 600 g/L glucose, 40 g/L yeast extract으로서 초기 당이 소모됨에 따라 0 g/L/h에서 5 g/L/h까지 feeding rate를 점진적으로 증가 시켰다. 총 배양은 6일간 수행하였으며, Gal promoter의 발현 유도를 위하여 galactose 5 g/L를 매 24시간 마다 첨가하였다. 또한 squalene 생산성 분석은 발효조로부터 배양액을 24시간부터 12시간 마다 sampling하여 앞서 언급한 squalene 추출방법으로 추출한 후, pentane층을 gas chromatography (Agilent 7890A)로 분석하였다.

30-L 발효를 수행한 결과, pGal-tHMG1/ispA를 보유한 Y2805균주의 경우, 78시간에 세포성장 (optical density, OD₆₀₀) 값이 최대치, 103.2를 나타내었고, glucose 역시 OD₆₀₀가 증가함에 점진적으로 소모되는 것을 확인하고 8시간부터 feeding을 수행하였다 (그림 7).

Squalene 생산은 약 24시간부터 점차 생산량이 증가되기 시작하여 약 96시간에 최대 생산량인 1.48 g/L의 squalene이 생산됨을 확인 할 수 있었다 (그림 7).

96시간부터 glucose가 배지 내에 점점 축적되는 것으로 보아 세포의 생육에 문제가 생긴 것으로 여겨진다. 이것은 아마도 feeding 속도의 조절 실패로 인하여 너무 많은 glucose를 공급함으로써 glucose repression을 받았거나, 또는 용존 산소량의 조절 실패로 생각되어 진다. 차후, 이를 해결하기 위해 좀 더 정밀한 feeding 속도 조절과 용존 산소량 조절이 필요 할 것으로 여겨진다.

그럼에도 불구하고 96시간에 squalene 생산량이 1.48 g/L까지 도달하는 것으로 보아 squalene 생산성의 추가적인 향상 가능성을 기대해 볼 수 있을 것으로 여겨지며 30-L 발효를 통해 산업 규모의 squalene 생산을 위한 가능성 또한 확인해 볼 수 있었다.

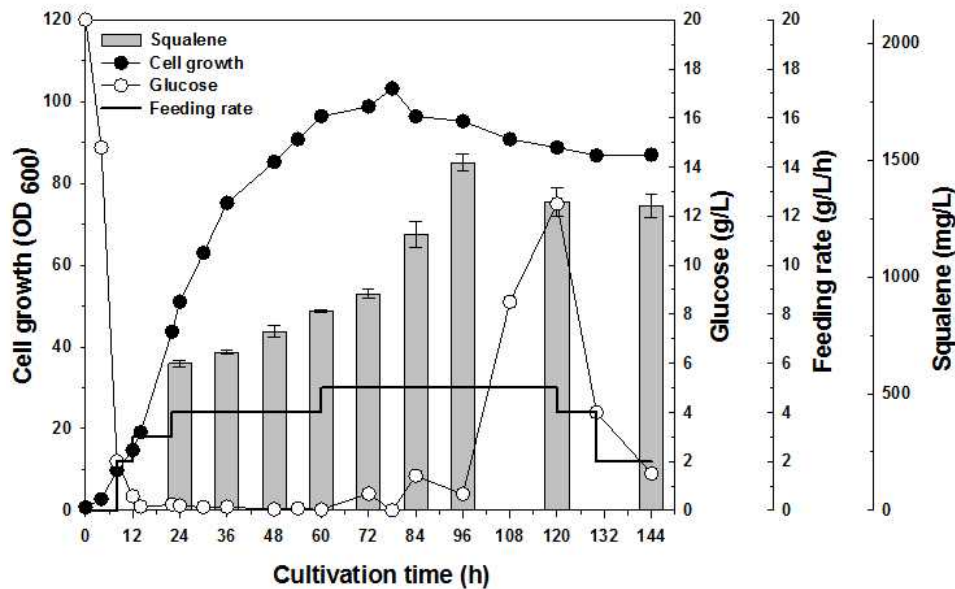


그림 7. pGal-HMG1/ispA가 도입된 *S. cerevisiae* Y2805 균주의 squalene 생산을 위한 30-L 발효

3) Squalene의 non-GMO 생산을 위한 self-cloning 효모균주의 제조

효모 *S. cerevisiae*는 제빵, 와인, 사케, 맥주 등과 같은 사람이 직접적으로 소비하는 다양한 제품의 생산에 사용되어 지고 있다. 또한 진핵세포에서 잘 규명된 유기체 중 하나이며, GRAS (generally recognized as safe)로 등록된 균주이다. 다양한 산업분야에 사용되고 있는 *S. cerevisiae* 균주의 중요성으로 인하여 균주를 개량하기 위한 다양한 유전자 조작이 행해지고 있다. 일반적으로 유전자 조작은 최종산물의 생산성을 향상시키기 위한 주요 효소를 암호화하는 유전자를 항생제 내성 유전자나 선별 마커가 포함된 플라스미드에 도입한 후, 원하는 숙주 균주에 형질전환하여 생산성을 분석하여 효과가 있는지 여부를 판단하므로 GMO (genetically modified organisms)에 해당하게 되며 다양한 유전자 조작 기술이 발전함에 따라, GMO에 대한 문제 역시 증가되고 있는 고려사항이다. 대부분의 소비자들은 사람들의 직접적인 섭취가 이뤄지는 식품 및 음료 생산에 사용되는 균주로서 GMO 균주를 선호하지 않는다. 그 이유는 GMO가 직접적으로 사람의 몸으로 섭취되는 경우 잠재적인 독성효과나 또는 알러지 효과를 일으킬 수 있음을 우려하기 때문이다 (Lack, 2002).

이와 같은 문제를 해결하기 위한 대체 방안으로서, 외래 유전자의 어떠한 흔적도 남기지 않고 자기 본래의 유전자만을 사용하는 self-cloning 전략이 있다. 현재, 중국과 일본에서는 self-cloning 전략에 대하여 활발히 연구개발 중이다. 이미 일본에서는 사케나 맥주등과 같은 주조 생산에 사용하는 효모 균주를 이 self-cloning을 이용하여 개량하고 있으며, 이들을 self-cloning 효모 균주라고 명명한다. 또한 상업적인 생산에도 역시 이들 개량한 self-cloning

효모 균주를 사용하고 있다. *S. cerevisiae*로부터 생합성하여 얻어지는 squalene 역시, 사람의 직접적인 소비를 하는 제약품, 화장품, 식품등과 같은 제품 생산에 사용되어 지고 있다. 본 연구에서도 분자면역증가제로서 squalene을 사용하기 때문에, 대두되고 있는 GMO문제를 완화시켜줄 수 있는 self-cloning 효모 균주를 개발해 보고자 하였다.

Squalene을 과생산하는 self-cloning 효모 균주를 구축하기 위해서는 외래 유전자를 사용하지 않고 *S. cerevisiae* 유래의 유전자와 promoter만을 사용해야만 한다. 그러므로 앞선 재조합 *S. cerevisiae* Y2805에서 사용하였던 *E. coli* 유래의 FPP synthase인 *ispA*를 *S. cerevisiae* 유래의 FPP synthase인 *ERG20*으로 대체하였다. 또한 본 연구를 진행하면서 squalene 생산의 추가적인 향상을 위한 잠재성 있는 유전자로서 Acetyl-CoA를 acetoacetyl-CoA로 전환하는 효소인 acetoacetyl-CoA thiolase를 선별하였다.

Acetyl-CoA는 *S. cerevisiae*에서 원하는 고부가 가치산물을 생산하기 위한 중요한 전구체로서 자주 사용된다. 이 acetyl-CoA pool을 squalene과 같은 원하는 화합물로 유도하는 첫 번째 효소가 바로 acetoacetyl-CoA thiolase이고 이를 암호화하는 유전자가 *ERG10*이다. 이미 *S. cerevisiae*에서 *ERG10*을 과발현하여 squalene의 생산량을 향상 시킨 사례가 보고된 바 있다 (Kwak et al. 2017). 앞선 연구 결과에서 *tHMG1*과 *ispA*를 과발현하는 *S. cerevisiae* Y2805의 squalene 생산성이 가장 우수하였으므로 이를 토대로 *ispA*를 *ERG20*으로 대체하고, 이에 추가적으로 *ERG10*을 과발현하는 재조합 플라스미드를 구축하여 squalene 생산의 추가적 향상 가능성을 확인해보고자 하였다. 또한 Y2805 균주 외에도 squalene 생산을 위한 잠재성 있는 숙주 균주들을 선별하여 같이 확인해보고자 하였다.

그림 8에서 볼 수 있듯이, *tHMG1*과 *ERG20*을 과발현하는 대부분의 *S. cerevisiae* 균주들 (그림 8A)에 비해 *tHMG1*, *ERG20*, *ERG10*을 과발현 균주들 (그림 8B)에서 squalene 생산성이 대부분 증가한 것을 확인 할 수 있었다. BY4741과 KCCM50549 균주들의 경우, *ERG10*을 추가적으로 발현 하였을 때 (275 ± 8.5 mg/L, 250 ± 7.7 mg/L) 대조구 (206 ± 8 mg/L, 210 ± 18 mg/L) 에 비해 squalene 생산량이 증가한 것을 확인 할 수 있었다.

특히 Y2805 균주의 경우, *tHMG1*과 *ERG20*을 과발현하는 대조구 (320 ± 34 mg/L)에 비해 *ERG10*를 추가적으로 발현하였을 때 거의 2배의 squalene 생산량이 증가하였다 (630 ± 33 mg/L). 이 결과를 토대로 보아 대사공학적으로 조작한 Y2805 균주에서 *ERG10*에 의해 암호화 되는 acetoacetyl-CoA thiolase도 squalene 생산 향상을 위한 잠재성 있는 주요 효소임을 확인 할 수 있었다.

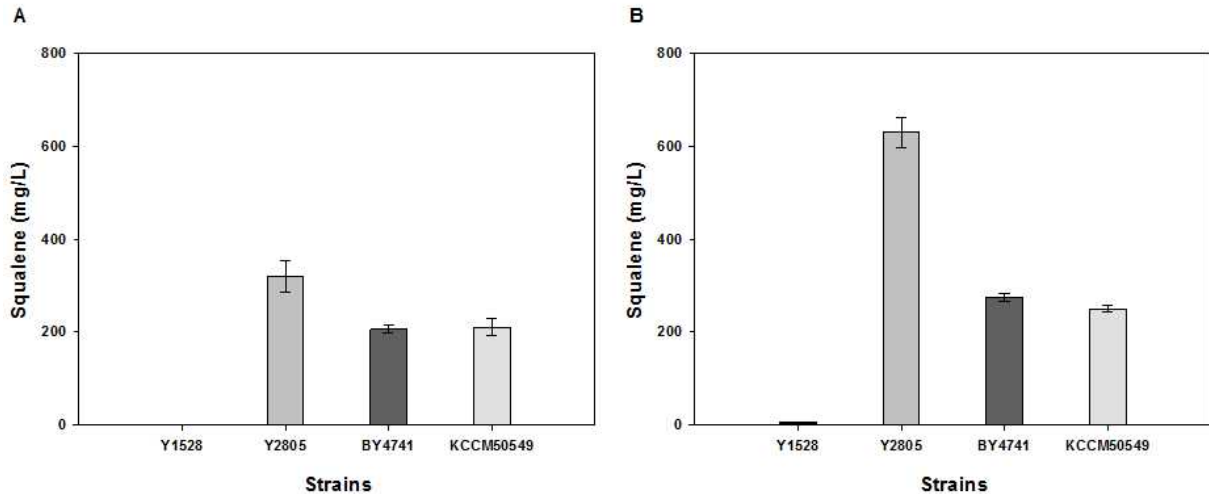


그림 8. Squalene 생산을 위한 *S. cerevisiae* 균주들에서의 acetyl-CoA thiolase의 과발현 효과

Squalene을 과생산하는 self-cloning 효모 *S. cerevisiae* Y2805 균주를 구축하기 위해, *S. cerevisiae* 유래의 *GAL10* promoter 또는 *ADH1* promoter와 *GAL7* terminator를 사용하였다. 그리고 플라스미드 유사형태로 구축되는 이들의 replication을 위해, *S. cerevisiae* 유래의 yeast 2 μ origin을 사용하였고, 이들 fragment가 도입된 균주선별을 위해 auxotrophic marker 유전자인 *S. cerevisiae*로부터 유래된 *URA3*를 사용하였다.

먼저 구축한 pGal-tHMG1/ERG20과 pADH1-tHMG1/ERG20 플라스미드들에서 *Sma*I과 *Nar*I으로 제한효소 처리하여 GAL10p-tHMG1-GAL7t-GAL10p-ERG20-GAL7t (4.7-kb) fragment와 ADH1p-tHMG1-GAL7t-ADH1p-ERG20-GAL7t (4.7-kb) fragment를 각각 얻는다. 그리고 *URA3*의 프로모터와 coding sequence가 포함된 fragment와 yeast 2 μ origin를 얻기 위하여, 효모 발현 플라스미드인 pYEG α vector로부터 *URA3* and 2 micron ins-F/*URA3* and 2micron ins-R 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 통해 *URA3*-2 μ origin fragment (2.5-kb)를 증폭하여 얻었다. 또한 이 fragment는 추후에 두개의 fragment를 연결시키기 위한 4.7kb fragment의 양쪽 말단의 15-bp homologous region이 포함되어 있다. 얻은 2개의 fragment를 연결시키기 위해 In fusion HD-cloning kit (Takara)를 사용하였다. In-fusion cloning은 두 개의 선형의 fragment들에 homologous region이 존재한다면 homologous recombination을 통해 이들을 연결시켜주는 것이 가능하다.

두 개의 fragment와 In-fusion 효소를 EP tube에 넣은 후, 50 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응하였다. 반응이 끝난 후, 최종적으로 얻어진 8.2-kb의 플라스미드 유사형태의 DNA가 포함된 mixture를 *S. cerevisiae* Y2805 균주에 도입하기 위하여 LiAc/TE 방법을 사용하여 형질전환 하였다. 그리고 UD plate에 이들을 3일간 생육시켜 균주를 선별하였다.

실질적으로 self-cloning 효모균주가 잘 구축되었는지 여부를 판단하기 위하여,

pGal-tHMG1/ERG20과 pADH1-tHMG1/ERG20 플라스미드를 각각 보유한 재조합 *S. cerevisiae* Y2805 균주들과 구축한 self-cloning 효모 Y2805 SC1 (*ADH1* promoter의 조절 하에 *tHMG1*과 *ERG20*을 발현)과 SC2 (*GAL10* promoter의 조절 하에 *tHMG1*과 *ERG20*을 발현)균주들의 squalene 생산성을 비교 분석해보았다. 또한 self-cloning 효모 Y2805 SC2에 acetoacetyl-CoA thiolase를 암호화하는 *ERG10* 유전자를 과발현하는 균주도 구축하였다.

구축한 pGal-ERG10 플라스미드로부터 Gal10p-ERG10-Gal7t-F/Gal10p-ERG10-Gal7t (linker)-R 프라이머 쌍을 사용하여 PCR를 통하여 *GAL10* promoter와 *GAL7* terminator를 포함하는 *ERG10* fragment (2-kb)를 증폭하였다. 그리고 URA3 and 2 micron ins (linker)-F/URA3 and 2micron ins-R 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 통해 URA3-2 μ origin fragment 2(2.5-kb)를 증폭하여 얻었다. 얻은 2개의 fragment를 overlapping PCR를 통하여 연결하여 4.5-kb fragment을 얻었다. 그 후에, *Sma*I과 *Nar*I으로 제한효소 처리한 GAL10p-tHMG1-GAL7t-GAL10p-ERG20-GAL7t (4.7-kb) fragment와 연결한 4.5-kb fragment를 앞서 언급한 In-fusion cloning 사용하여 연결시키고 *S. cerevisiae* Y2805에 도입하여 self-cloning 효모 Y2805 SC3도 구축하였다.

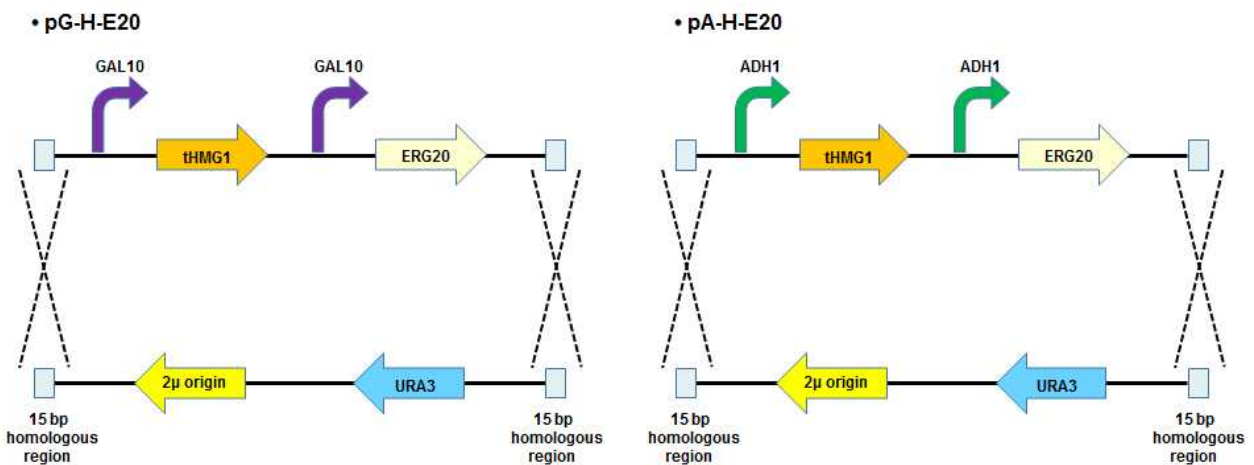


그림 9. *S. cerevisiae* 균주에서 homologous recombination을 통한 self-cloning 방법의 모식도

Table 1. Self-cloning 효모 균주 구축에 사용된 프라이머 목록

Name	Oligonucleotides (5'-3')	Description
Gal10p-ERG10	TGAATGGCGAATGGCGCCATCGCTTCGCTGATTA	Y2805 SC3
-Gal7t-F	ATTACC	
Gal10p-ERG10	AATTTCTTTAAGTTTCCCCTCTAGAGAAGCTCTA	Y2805 SC3
-Gal7t-(linker)-R	ATTTGTGAGTT	
URA3 and 2 micron ins-F	TGAATGGCGAATGGCGCCGAAGCTCTAATTTGTG	Self-cloning yeast strains
micron ins-R	AGTTTAGTA	

URA3 and 2 micron ins (linker)-F	CTTTAAGTTTCCCCTCTAGAGAAGCTCTAATTTG TGAGTTTAGTA	Self-cloning yeast strains
URA3 and 2 micron ins-R	AAGCGATGGATCCCCGGGCTGGCTTAACTATGC GGCATCA	Self-cloning yeast strains

구축한 self-cloning 효모 Y2805 SC1 (*ADHI* promoter의 조절 하에 *tHMG1*과 *ERG20*을 발현)과 SC2 (*GAL10* promoter의 조절 하에 *tHMG1*과 *ERG20*을 발현)의 능력을 평가하기 위하여, 이들의 squalene 생산성 비교를 위하여 플라스크 배양을 수행한 결과 그림 10에서 볼 수 있듯이, pADH1-tHMG1/ERG20을 보유한 재조합 Y2805 균주와 self-cloning 효모 Y2805 SC1과 squalene 생산성이 유사한 것을 확인 할 수 있었다.

특히 Y2805 SC2 균주의 경우, pGal-tHMG1/ERG20을 보유하는 재조합 Y2805 균주의 squalene 생산성 (320 ± 34 mg/L)에 비해 squalene 생산성이 약간 증가한 것을 확인 할 수 있었다 (350 ± 39 mg/L).

이 결과로 보아, squalene 생산을 위한 self-cloning 효모 균주 Y2805 SC1과 SC2가 성공적으로 구축되었음을 확인할 수 있었다. 또한 self-cloning 효모 균주 개발을 위한 promoter로는 *ADHI* promoter에 비해 *GAL10* promoter가 더 뛰어난 것을 확인 할 수 있었다.

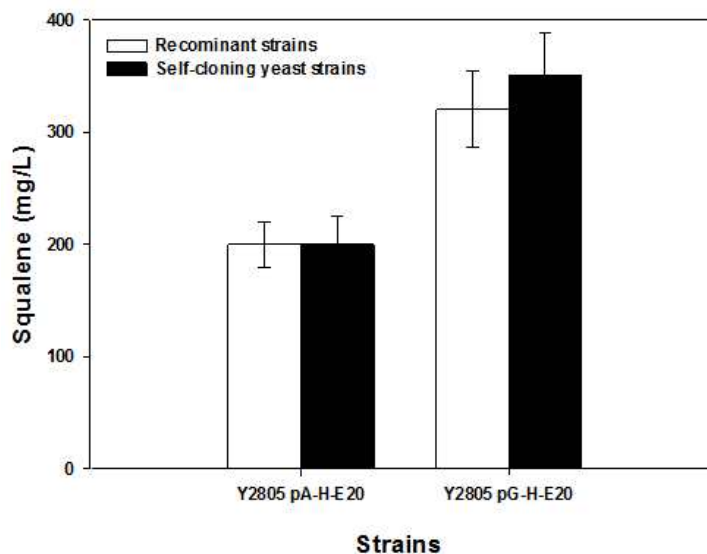


그림 10. *S. cerevisiae* Y2805 균주에서 다른 cloning 전략에 의한 squalene 생산성 비교

앞선 재조합 *S. cerevisiae* Y2805 균주에서 acetoacetyl-CoA thiolase를 암호화하는 *ERG10*을 과발현 시킴으로써 squalene 생산량이 2배 가까이 증가한 것을 확인 한 바 있으므로 이를 토

대로, Self-cloning 효모 Y2805 에도 *ERG10*을 추가적으로 발현시킴으로써 squalene 생산의 추가적인 향상 가능성을 확인해 보고자 하였다.

구축한 self-cloning 효모 Y2805 SC3 균주와 pGal-tHMG1/ERG20/ERG10을 보유하는 재조합 균주의 squalene 생산성을 비교하기 위하여 이들을 25 mL YPDG 배지가 포함된 플라스크에서 30° C에서 72시간 동안 배양을 수행한 후, 이들의 squalene 생산성을 비교 분석한 결과 그림 11에서 볼 수 있는 바와 같이 pGal-tHMG1/ERG20/ERG10을 보유하는 재조합 균주의 squalene 생산량 (630 ± 33 mg/L)과 self-cloning 효모 Y2805 SC3의 squalene 생산량 (633 ± 43 mg/L)이 유사한 수준임을 확인 할 수 있었다.

이 결과를 토대로 보아, self-cloning 효모 Y2805 SC3가 성공적으로 구축되었음을 확인 할 수 있었으며, *ERG10*의 과발현이 self-cloning 효모 Y2805에서도 squalene 과생산을 위한 중요한 유전자임을 다시 확인할 수 있었다. 또한 효모 *S. cerevisiae*에서 squalene 생산을 위해 본 연구에서 시도한 새로운 self-cloning 전략은 다른 isoprenoid와 같은 고부가가치 산물을 효모에서 생산하려고 할 때 매우 유용하게 사용되어 질수 있을 것이다. 그리고 증가되고 있는 소비자들의 고려사항인 GMO 문제 역시 어느 정도 완화시켜 줄 수 있는 대체방안으로 생각된다.

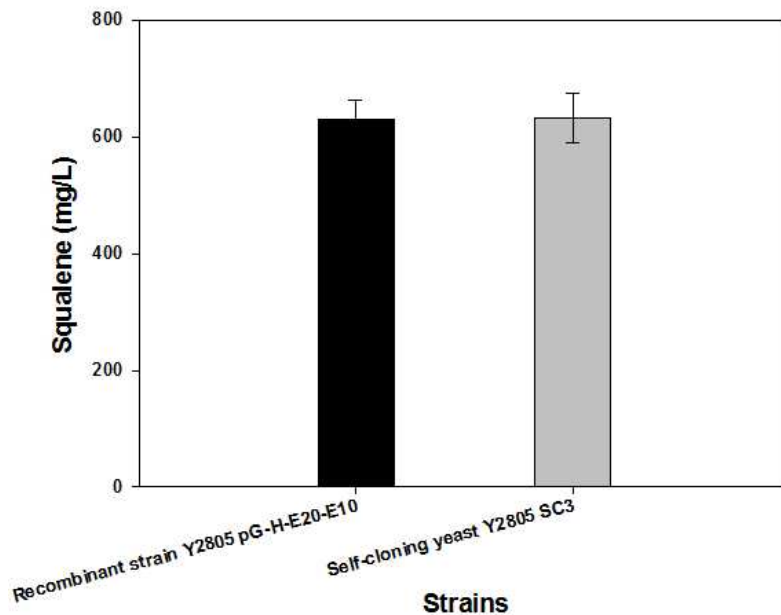


그림 11. Self-cloning 효모 Y2805 균주에서 squalene 생산에 대한 *ERG10*의 과발현 효과

2-3. 가금백신용 신규의 분자면역증강물질 발굴 및 개발

1. 신규의 TLR agonist 기반 분자면역증강 물질 개발

- ◎ 아미노아실 tRNA 합성효소 (aminoacyl tRNA synthetase, ARS)
- ◎ 아미노산은 단백질을 구성하는 기본 요소로 mRNA의 codon을 아미노산으로 바꾸는 번역 (translation) 과정을 거침.
- ◎ 이때의 번역(translation) 과정에 중요한 물질이 tRNA로 tRNA는 자신의 anticodon을 이용하여 mRNA의 codon을 인식하고 자신의 anticodon에 맞는 아미노산을 운반함.
- ◎ 아미노아실 tRNA합성효소는 tRNA의 anticodon에 맞게 아미노산을 연결시켜주는 효소임.
- ◎ 아미노아실 tRNA합성효소는 아미노산의 갯수와 같이 20개가 있어야 하나 글루탐산을 활성화 시키는 ERS와 프롤린을 활성화 시키는 PRS가 합쳐져 EPRS로 존재하기 때문에 19개로 존재함.
- ◎ 아미노아실 tRNA 합성효소 (ARS)들 각각은 상기의 전형적인 기능이외에 다양한 생물학적 기능들 즉, inflammation, cell metabolism, angiogenesis 그리고 tumorigenesis등과 관련한 기능들을 갖고 있음이 속속 밝혀지고 있음.
- ◎ 본 연구진은 이들 19개의 아미노아실 tRNA 합성효소 (ARS)들 중 하나의 효소 WRS가 숙주 내로 병원체의 침입시 면역세포인 항원제시세포 (Antigen presenting cell; macrophage, dendritic cell)에서 분비되어 선천면역(Innate immunity)을 증가시켜 1차적으로 병원체 방어에 역할을 하고, 2차적으로 적응면역 (Adaptive immunity)를 향상시킨다는 결과를 확인하였음.

1) 병원체 (세균 및 바이러스) 감염시 사람 혹은 마우스 WRS 단백질의 분비 검증

- ◎ 선천면역은 병원체 감염시 세포에서 빠른 시간내에 시작되어 병원체 감염에 대한 세포의 방어를 매개하는 시스템임.
- ◎ 분비되는 대표적인 사이토카인으로 IFN-β와 IL-6가 있으며 이러한 사이토카인의 분비는 병원체 감염 초기에 있어 중요한 역할을 수행함.
- ◎ 사람 macrophage 세포인 THP-1 및 U-937 세포에 바이러스 (Vesicular stomatitis virus-GFP; VSV-GFP)를 감염시킨 후 세포외로 분비되는 사람 WRS 단백질을 ELISA로 검증하였음.
- ◎ 그림에서 보는 바와 같이 바이러스 감염시 macrophage 세포에서 방어를 위해 분비되는 IFN-β와 염증성 사이토카인인 IL-6와 마찬가지로 사람 WRS 단백질이 분비가 됨.
- ◎ 이는 병원체 감염에 대해 다른 사이토카인과 마찬가지로 분비되는 사람 WRS 단백질이 선천면역의 한 구성요소로 작용할 수 있음을 의미함.

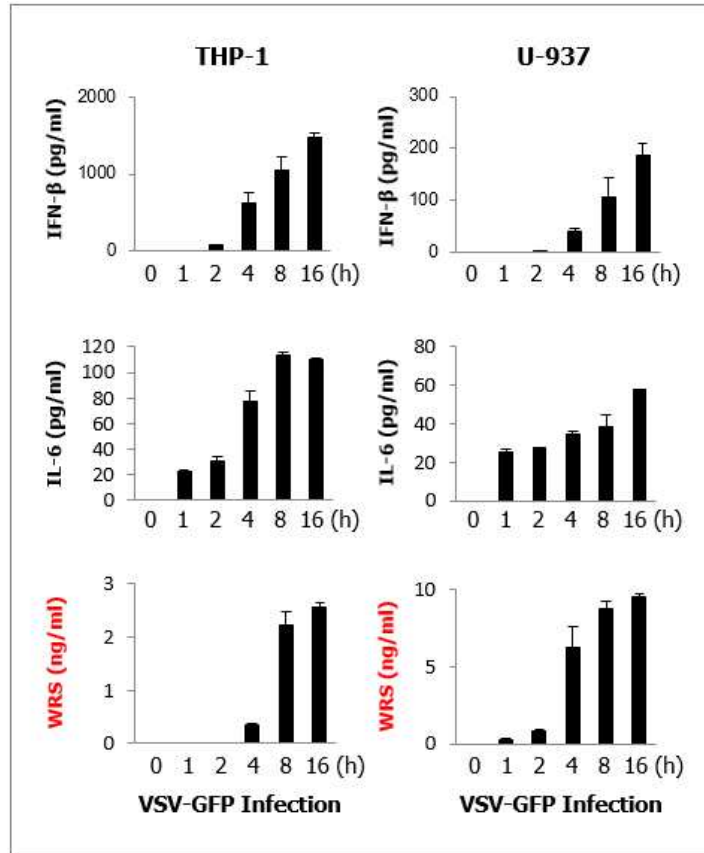


그림 1. 바이러스 감염에 의한 사람 WRS 단백질의 분비 검증

- ◎ 사람 WRS 단백질이 병원체 감염에 대해 세포 밖으로의 분비를 확인한 후, 세포 내에서 사람 WRS 단백질의 mRNA 합성을 real-time PCR을 이용해 측정하였음.
- ◎ 아래의 그림에서 보듯이 바이러스 감염시 macrophage 세포내에서는 IFN-β 단백질 생성을 위한 IFN-β mRNA 합성과 더불어 사람 WRS 단백질에 대한 mRNA 합성이 이루어짐을 알 수 있음.

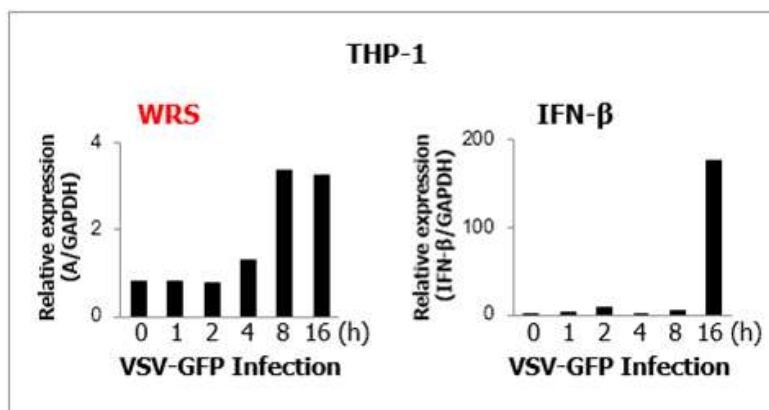


그림 2. 바이러스 감염에 의한 WRS 단백질에 대한 mRNA 유도 검증

- ◎ 이어서 마우스 macrophage 세포인 Raw264.7 세포에 바이러스 (Vesicular stomatitis virus-GFP; VSV-GFP)를 감염시킨 후 세포외로 분비되는 마우스 WRS 단백질을 ELISA로 검증하였음.

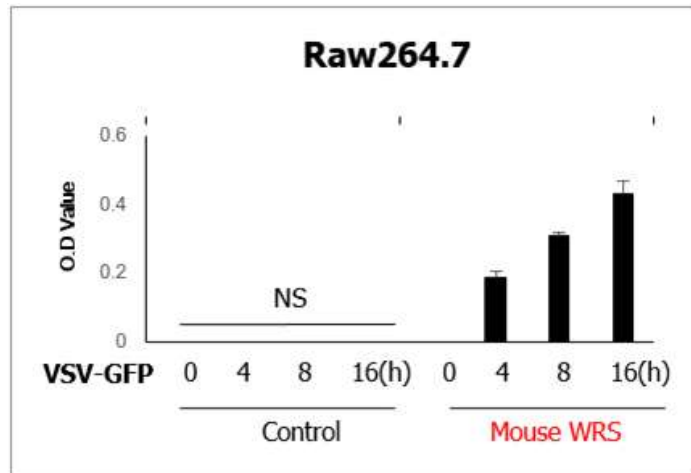


그림 3. 바이러스 감염에 의한 마우스 WRS 단백질의 분비 검증

- ◎ 그림에서 보는 바와 같이 바이러스 감염시 macrophage 세포에서 마우스 WRS 단백질이 분비됨.
- ◎ 이에 더해 상기와 같은 실험을 RNA 바이러스 유전자 유사물질인 poly(I:C)와 DNA 바이러스 유전자 유사물질인 poly(dA:dT)에 대해 수행하였으며 그림에서 보이는 바와 같이 두 가지 자극에 대해 마우스 WRS 단백질이 모두 분비되는 것을 검증하였음.
- ◎ 즉 WRS 단백질은 병원체 감염에 대해 감염초기에 세포에서 합성되어 외부로 분비되며, 이러한 현상은 사람 macrophage 세포와 마우스 macrophage 세포에서 모두 확인됨.

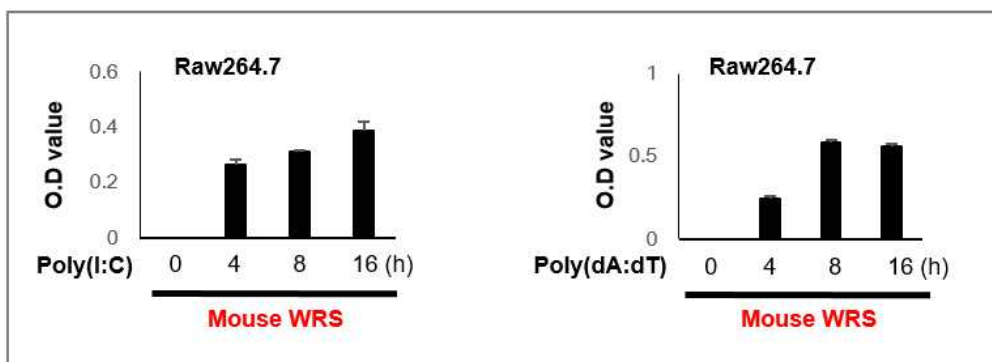


그림 4. 바이러스 유전자 유사물질에 의한 마우스 WRS 단백질의 분비 검증

- ◎ 다음으로, WRS 단백질의 분비 민감성을 확인하기 위한 연구를 진행하였음.
- ◎ 사람 macrophage 세포인 THP-1 세포주에 최소한의 감염을 나타내는 양의 바이러스를 감염시키고 상기와 같이 사람 WRS 단백질에 대한 ELISA와 mRNA 양의 측정을 위한 real time PCR을 수행하였음.
- ◎ 그 결과, 그림에서 보는 바와 같이 낮은 용량의 바이러스 감염에 대해서도 사람 WRS 단백질이 외부로 분비되며 세포 내의 mRNA양이 증가하였음을 확인함.

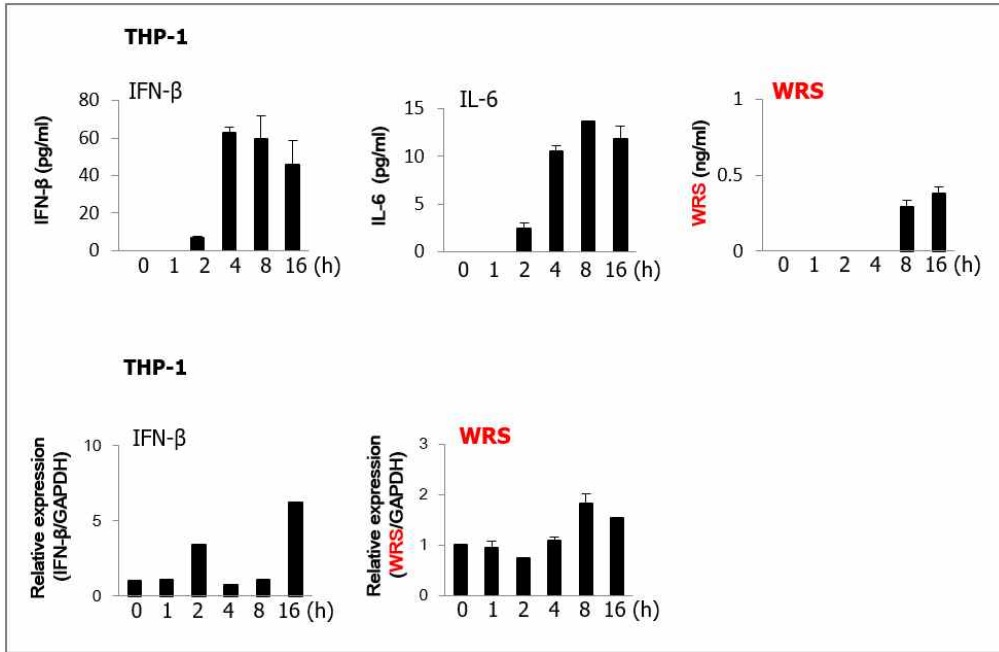


그림 5. 낮은 농도 바이러스 감염에 의한 사람 WRS 단백질의 분비 검증

- ◎ 역시, 사람 WRS 단백질의 분비 특이성을 확인하기 위한 연구를 진행함.
- ◎ 병원체 감염에 대한 WRS 단백질의 분비를 ELISA를 통해 사람 상피세포인 HEK293T 세포주에서 확인하였음.
- ◎ 그림에서 보는 바와 같이 사람 상피세포인 HEK293T 세포주에서는 바이러스가 감염됨에 따라 세포 외부로의 WRS 단백질 분비와 세포 내에서의 mRNA 합성에 변화가 없음을 확인하였음.
- ◎ 따라서, 병원체 감염에 대한 사람 WRS 단백질의 분비는 면역세포에서만 특이적으로 이루어짐.

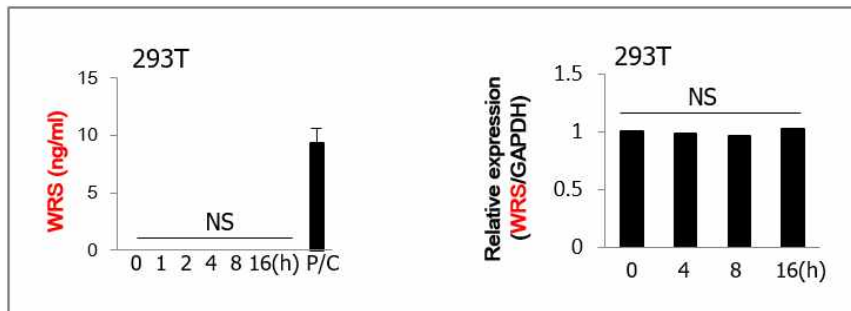


그림 6. 상피세포에서 바이러스 감염에 의한 사람 WRS 단백질 분비 실험

- ◎ 마지막으로, WRS 단백질이 다른 사이토카인에 대한 반응으로 2차적으로 분비되는 것이 아닌, 병원체 감염에 대해서 일차적인 반응임을 검증하였음.
- ◎ 그림에서 보는 바와 같이, 사람 macrophage 세포주인 THP-1에 IFN-β 100unit와 1000unit을 처리했을 때에는 WRS 단백질의 분비가 나타나지 않는 것이 확인됨.

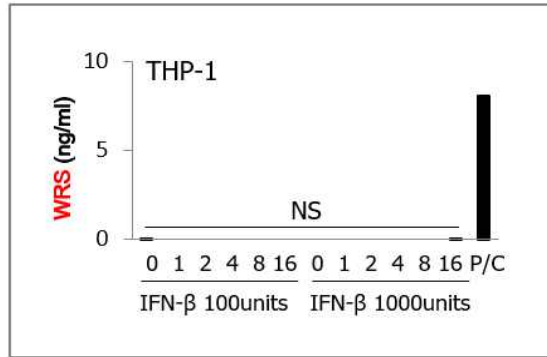


그림 7. 인터페론 처리에 따른 WRS 단백질 분비 실험

2) 대장균 발현시스템을 이용한 수용성의 WRS 단백질 발현 및 실험실적 정제

- ◎ 병원체의 침입시 숙주의 항원제시세포 (Antigen presenting cell; macrophage, dendritic cell)에서 분비되는 마우스 유래의 WRS 단백질을 재조합으로 생산하고 그 기능을 확인하기 위해 마우스 WRS 단백질 유전자를 대장균의 발현시스템에 맞게 변형시킨 후 대장균에서 발현을 유도하였음.
- ◎ 그 결과 그림에서 보는 바와 같이 수용성의 마우스 WRS 단백질 발현 (레인 4, 8)을 확인하였음.

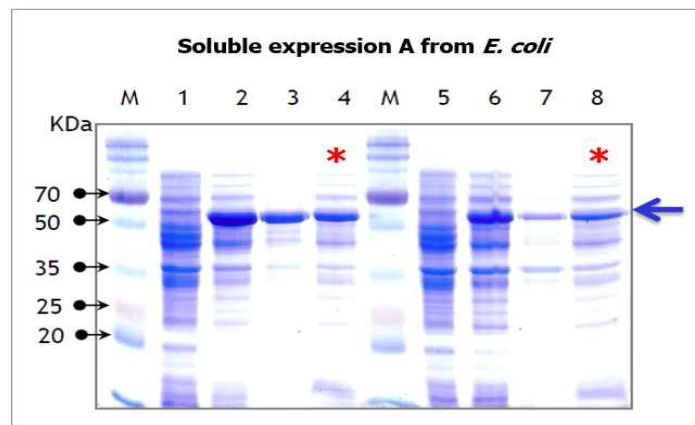


그림 8. 대장균 발현시스템을 이용한 수용성의 마우스 WRS 단백질 발현

- ◎ 수용성으로 발현된 마우스 WRS 단백질을 Histidine column 및 FPLC을 이용한 정제법으로 정제하여 아래와 같이 정제된 마우스 WRS 단백질을 확인하였음.

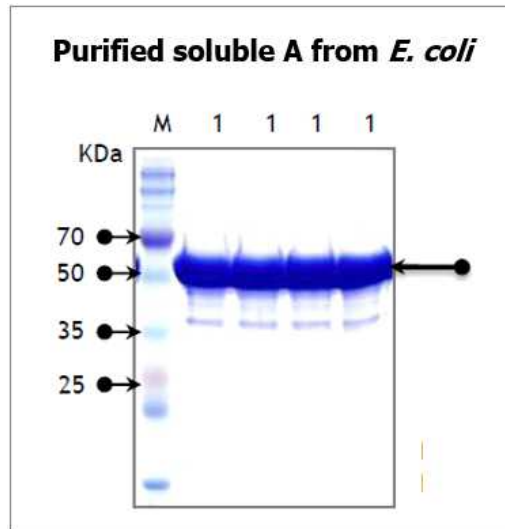


그림 9. 수용성의 마우스 WRS 단백질 정제

- ◎ 즉, 마우스 WRS 단백질은 대장균 발현시스템을 이용해 수용성으로 정제가 가능하며, 이는 마우스 WRS 단백질이 용도에 맞게 대량으로 합성되어 여러 목적으로 응용되어 사용될 수 있음을 의미함.
- ◎ 마지막으로, 수용성으로 발현된 단백질을 이후 면역자극실험에 이용하기 위해 대장균 발현 시스템에서 포함될 수 있는 LPS를 triton x-114을 이용해 제거 한 뒤 LAL assay를 통해 LPS의 양을 측정하였음.
- ◎ 그림에서 보는 바와 같이 WRS 단백질에 혼합되어있던 LPS가 제거되었으며, 이 용량이 면역작용에 영향을 주지 않는 것을 확인함.

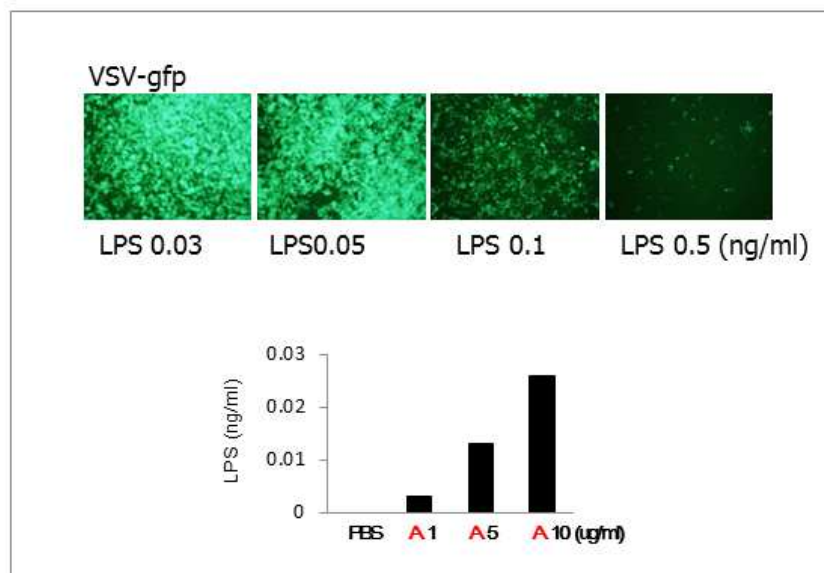


그림 10. 정제 마우스 WRS 단백질에서의 LPS 제거 확인

3) WRS 단백질에 의한 면역세포의 선천면역 자극 효능 검증

◎ 정제된 마우스 WRS 단백질내 대장균의 LPS를 제거한 후 항원제시세포 (APC)중 하나인 Raw264.7 macrophage 세포에 농도별로 처리를 한 후 분비되는 인터페론과 염증성 사이토카인을 각각의 ELISA kit로 확인을 한 결과, 마우스 WRS 단백질의 자극에 의해 상당한 양의 인터페론- α , 인터페론- β , 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 그리고 케모카인인 MCP-1등의 분비가 되었음.

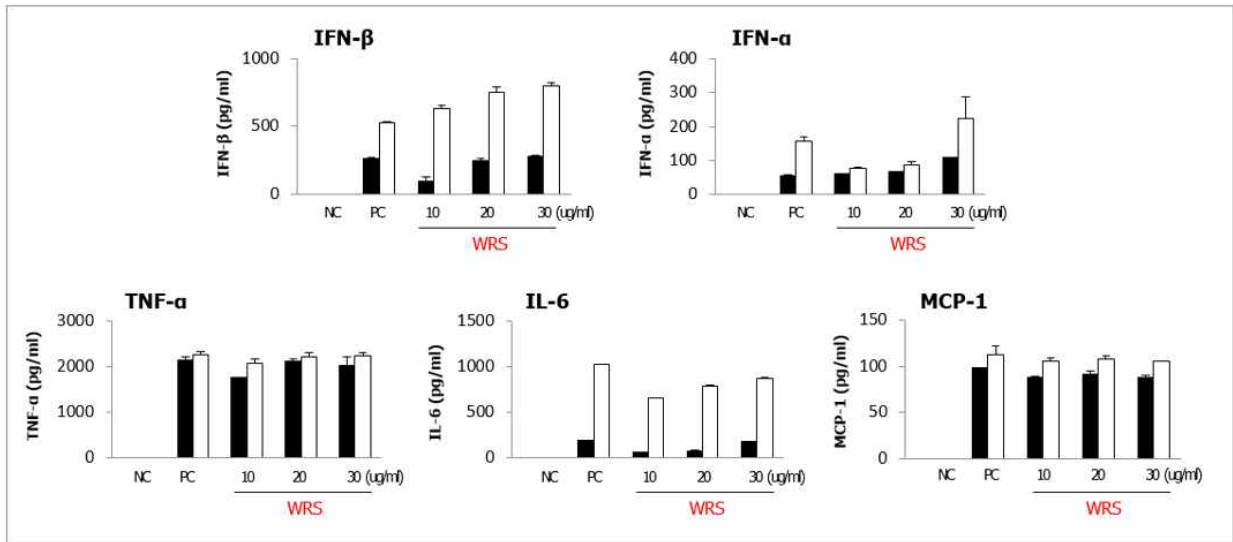
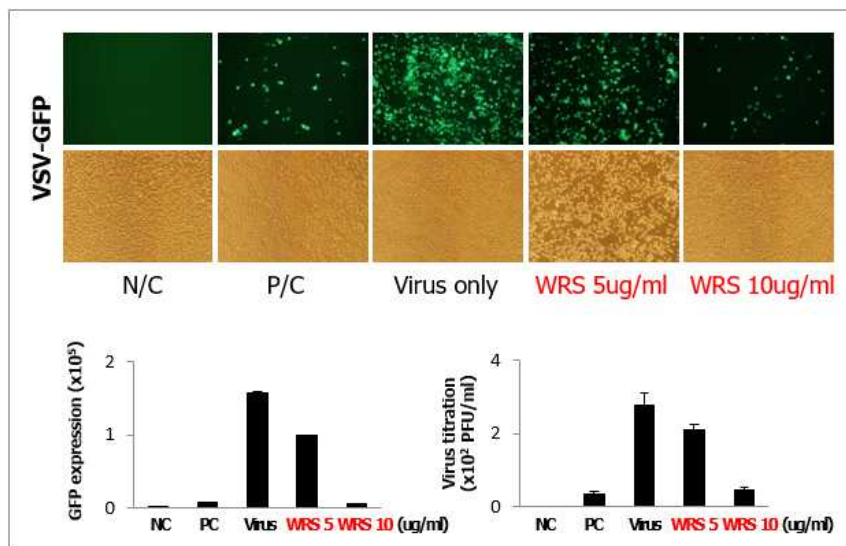


그림 11. 정제된 마우스 WRS 단백질의 자극에 의한 macrophage 세포에서의 사이토카인 분비

◎ 상기의 결과는 마우스 WRS 단백질에 의해 면역세포인 macrophage 세포가 자극을 받아 즉, 면역세포의 선천면역이 작동하였음을 뜻함.

◎ 면역세포의 선천면역이 작동이 되면 바이러스의 감염 즉 바이러스의 증식을 억제할 수 있음. 이를 증명하기 위해 마우스 WRS 단백질로 자극을 시킨 Raw264.7 macrophage 세포에 복제시 GFP (Green Fluorescence protein)을 타나내는 바이러스인 Vesicular stomatitis virus (VSV-GFP)와 Influenza virus (PR8-GFP)를 각각 감염시킨 후 각 바이러스의 증식 정도를 확인하였음.



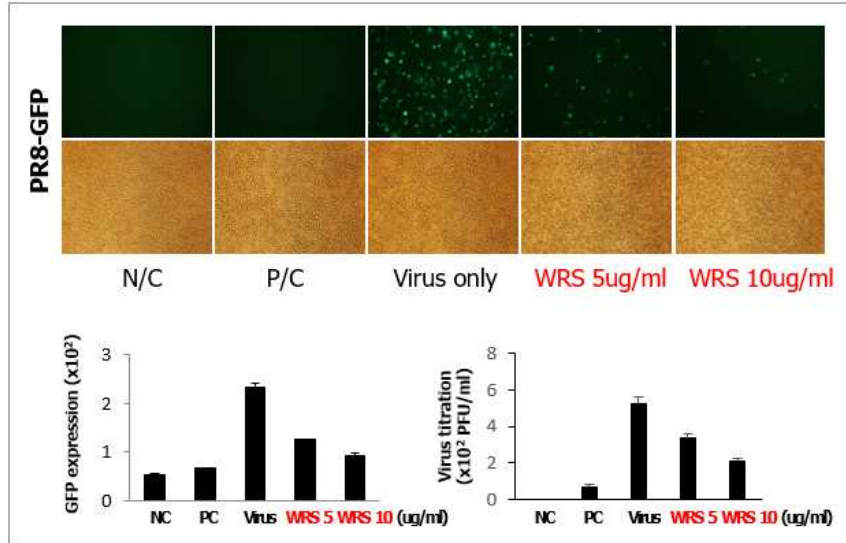


그림 12. 정제된 마우스 WRS 단백질의 자극에 의한 macrophage 세포에서의 바이러스 증식 억제 효능

- ◎ 그 결과 그림에서 보는바와 같이 마우스 WRS 단백질로 자극을 받은 면역세포에서는 바이러스 증식이 저해됨을 확인할 수 있었음. 이는 마우스 WRS 단백질로 자극을 받아 활성화된 면역세포의 선천면역이 바이러스의 증식을 억제한 것임.
- ◎ 다음으로 항원제시세포 (APC)중 중요한 위치를 차지하고 있는 dendritic 세포에서의 마우스 WRS 단백질에 의한 선천면역 자극 및 항원제시 능력의 지표 활성화를 확인하기 위하여 마우스로부터 Bone marrow derived dendritic cell (BMDC)을 분화 준비한 후 마우스 WRS 단백질을 자극시켰음.

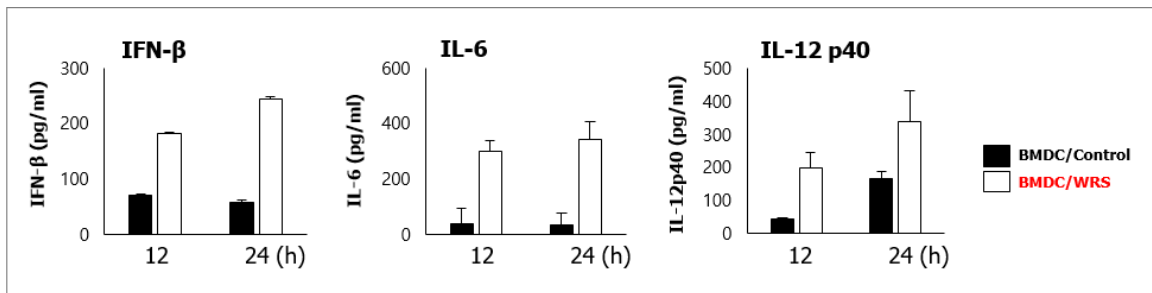


그림 13. 정제된 마우스 WRS 단백질의 자극에 의한 BMDC에서의 사이토카인 분비

- ◎ 그 결과 마우스 WRS 단백질은 BMDC에서도 역시 인터페론 및 사이토카인의 분비를 유도하였음.
- ◎ 또한, 마우스 WRS 단백질의 자극을 받은 BMDC에서 인터페론, 염증성 사이토카인 및 항원제시 관련 분자들의 mRNA 수준을 Real-time PCR로 확인해 본 결과 Raw264.7 macrophage 세포에서와 마찬가지로 상당한 수준의 mRNA 유도를 확인할 수 있었음.

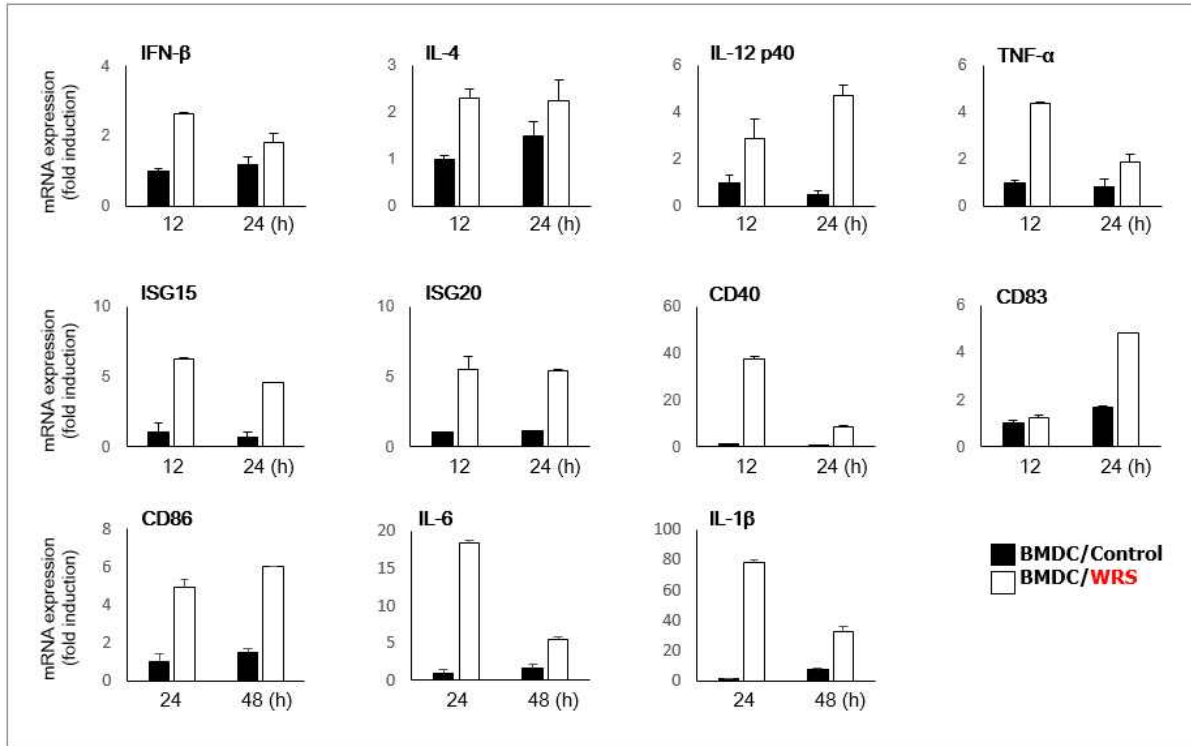


그림 14. 정제된 마우스 WRS 단백질의 자극에 의한 BMDC에서의 항원제시 관련 분자 mRNA 확인

- ◎ 즉, 마우스 WRS 단백질은 항원제시세포 (APC)를 강하게 자극하여 선천면역을 유도하고 더불어 항원제시와 관련된 분자들의 발현을 유도함으로써 적응면역으로의 연결을 매개한다고 사료 됨.
- ◎ 다음으로, 마우스 WRS 단백질이 나타내는 선천면역자극효과를 사람 macrophage 세포주인 THP-1에서 측정하였음.
- ◎ 마우스 WRS 단백질의 자극으로 인한 인터페론, 염증성 사이토카인의 분비를 ELISA를 이용해 측정하였으며 이로 인해 인터페론과 염증성 사이토카인이 마우스 macrophage 세포와 마찬가지로 증가하는 것을 확인함.

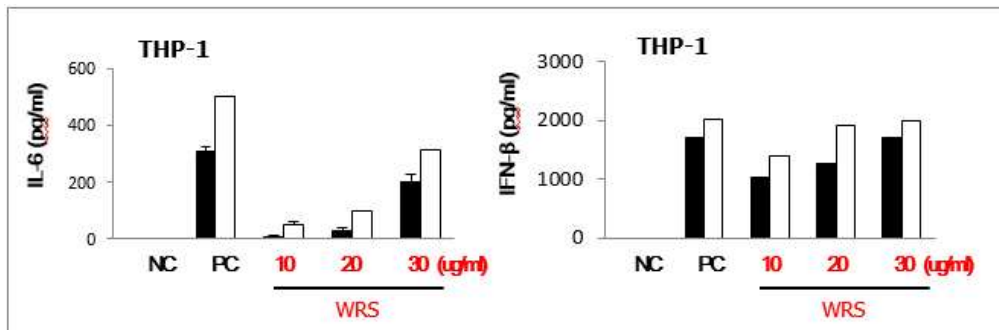


그림 15. 정제된 마우스 WRS 단백질의 자극에 의한 사람 macrophage 세포에서의 사이토카인 분비

- ◎ 이후 이러한 WRS 단백질의 자극이 면역세포에서 특이적으로 나타나는 것을 확인하기 위해

사람 상피세포인 HEK293T 세포주를 이용한 실험을 진행하였음.

◎ 그림에서 보는 바와 같이, 사람 상피세포인 HEK293T 세포주에서는 WRS 단백질에 의한 바이러스 증식의 억제 효과가 나타나지 않았음.

◎ 이는 WRS 단백질의 면역작용효과가 면역세포에 특징적으로 발현되는 리셉터에 작용할 수 있음을 의미하며 이후 각각의 리셉터가 결여된 세포를 이용한 실험 결과와도 상응함.

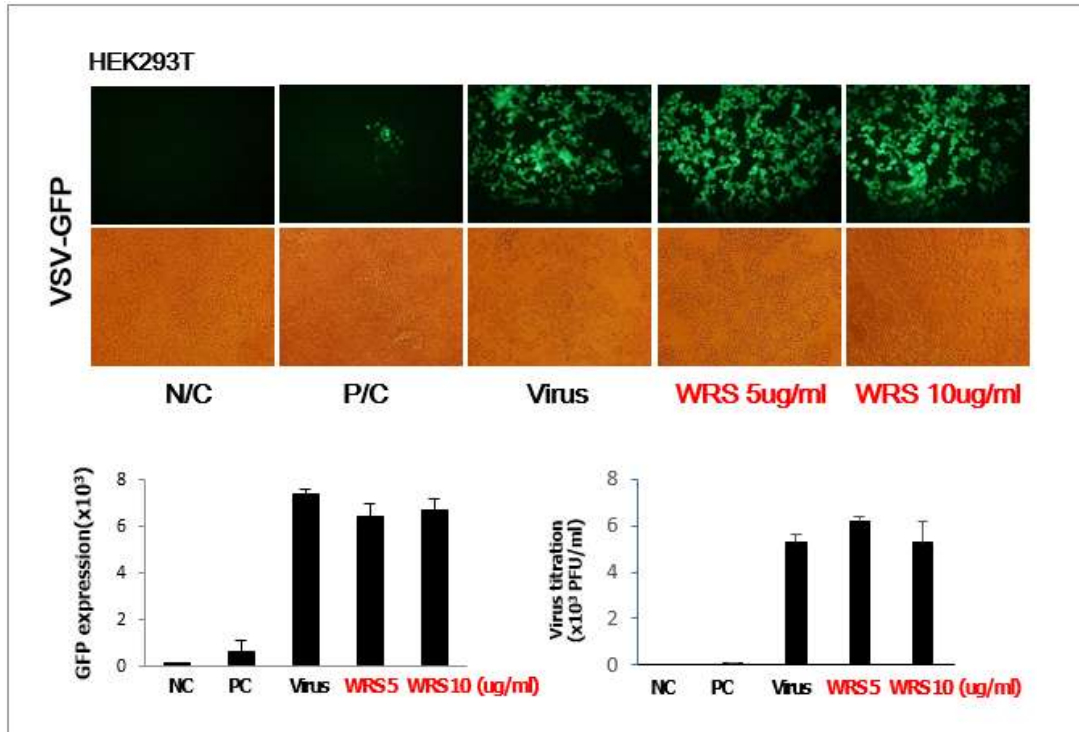


그림 16. 상피세포에서 정제된 마우스 WRS 단백질의 자극에 의한 효과 확인

4) 마우스 WRS 단백질에 의한 면역세포의 자극 효과는 TLR4를 필요로 함

◎ 마우스 WRS 단백질에 의한 항원제시세포 (APC)의 선천면역 유도능이 어떠한 수용체와의 관계에 의함인지 확인하기 위하여 wild type, TLR2, TLR4, MyD88 KO 마우스로부터 각각 분리한 bone marrow derived macrophage cell (BMDM)을 이용하여 확인하였음.

◎ 즉, 각각의 마우스로부터 추출한 BMDM에 마우스 WRS 단백질을 처리하여 선천면역을 유도시킨 후 바이러스를 감염시켜 바이러스의 증식을 확인하였음.

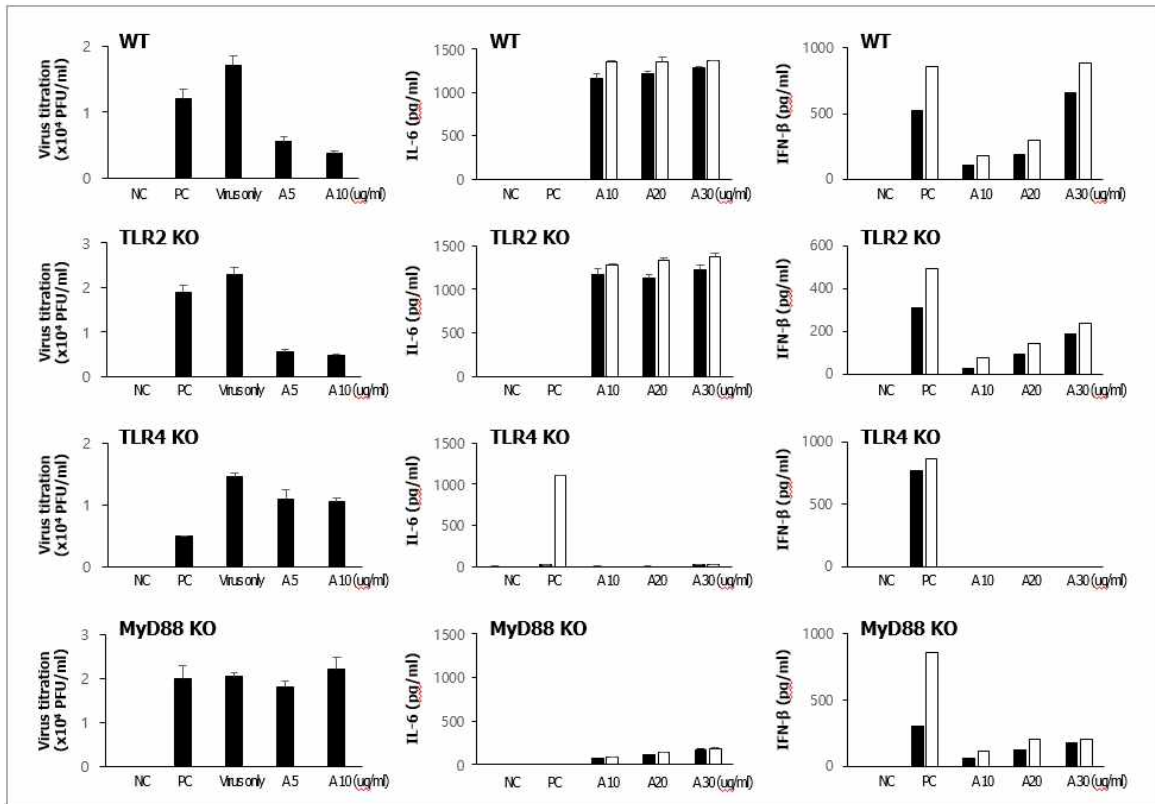


그림 17. 정제된 마우스 WRS 단백질의 자극에 의한 BMDC에서의 사이토카인 분비

- ◎ 그 결과 그림에서 보는 바와 같이 wild type 및 TLR2 KO BMDM에서는 마우스 WRS 단백질에 의해 사이토카인의 분비가 유도되어 바이러스의 증식이 억제되었으나, TLR2 KO 및 MyD88 KO BMDM에서는 마우스 WRS 단백질에 의한 사이토카인의 분비가 적게 혹은 유도되지 않았으며 이에 의해 바이러스의 증식 억제가 이루어지지 않았음을 확인할 수 있었음.
- ◎ 즉, 마우스 WRS 단백질에 의해 유도되는 선천면역 활성화는 항원제시세포 (APC)의 TLR4가 중요하게 역할을 함.
- ◎ 결론적으로 병원체의 숙주 침입시 병원체를 방어 혹은 억제하기 위해 면역세포인 항원제시세포 (APC)에서는 다양한 사이토카인과 더불어 신규의 WRS 단백질을 분비하여 숙주의 선천면역을 활성화시켜 병원체의 침입을 막으며 더 나아가 적응면역을 활성화시킴.
- ◎ 이러한 숙주의 방어면역을 유도할 수 있는 숙주 자체의 WRS 단백질은 사람을 비롯한 모든 축종에 존재를 함. 실험결과 마우스 유래의 WRS 단백질을 사람 유래의 면역세포에 처리를 하여도 선천면역이 유도됨을 확인하였음.
- ◎ 이후, 본 연구진은 LPS를 제거한 WRS 단백질을 고농도로 농축하여 WRS 단백질의 선천면역 자극 효능이 in vivo에서도 유효함을 검증하였음.
- ◎ 6주령의 C57BL 마우스에 WRS 단백질을 비강 내로 투여하여 마우스의 serum과 BALF에서

ELISA를 이용해 IFN- β 와 IL-6의 분비량을 측정함.

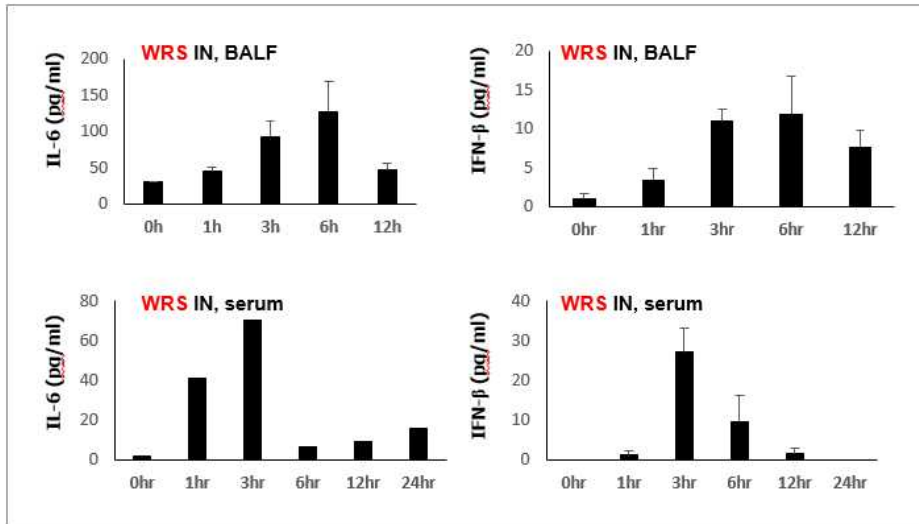


그림 18. WRS 단백질 자극에 의한 마우스에서의 사이토카인 유도 효능

◎ 그림에서 보는 것과 같이 WRS 단백질에 의한 자극으로 인해 마우스의 serum과 BALF에서 IFN- β , IL-6가 분비되는 것이 확인됨.

◎ 즉, 본 실험결과는 WRS 단백질의 in vivo에서의 효능과 그 활용 가능성을 나타냄.

5) WRS 단백질에 의한 항원의 체액성면역 증진 효능 검증

◎ WRS 면역증강 효과를 확인하기 위해서 본 연구진이 앞서 백신 효과를 확인하였던 재조합항원 A를 이용하여 그림과 같이 재조합항원 A의 양을 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g 3개의 접종그룹으로 나누고 WRS를 각각 0 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g 혼합하여 아래 그림의 일정으로 마우스에 접종하였음. 최종 접종 후 7일 뒤 혈청을 채취하여 항체생성률을 확인하였음.

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crlJori mice Route of administration : Intramuscular Injection Days of inoculation : 1, 14days					
Groups			Inoculum (항원 A + WRS)	Route	No. of Mice
1	PBS	PBS	0 μ g+0 μ g	I.M	4
2	항원 A 10 μ g	WRS 0 μ g	10 μ g+0 μ g	I.M	4
3		WRS 10 μ g	10 μ g+10 μ g	I.M	4
4		WRS 20 μ g	10 μ g+20 μ g	I.M	4
5		WRS 30 μ g	10 μ g+30 μ g	I.M	4
6		항원 A 20 μ g	WRS 0 μ g	20 μ g+0 μ g	I.M
7	WRS 10 μ g		20 μ g+10 μ g	I.M	4
8	WRS 20 μ g		20 μ g+20 μ g	I.M	4
9	WRS 30 μ g		20 μ g+30 μ g	I.M	4
10	항원 A 30 μ g	WRS 0 μ g	30 μ g+0 μ g	I.M	4
11		WRS 10 μ g	30 μ g+10 μ g	I.M	4
12		WRS 20 μ g	30 μ g+20 μ g	I.M	4
13		WRS 30 μ g	30 μ g+30 μ g	I.M	4

그림 19. 재조합항원 A의 항체가 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 검증 실험 그룹

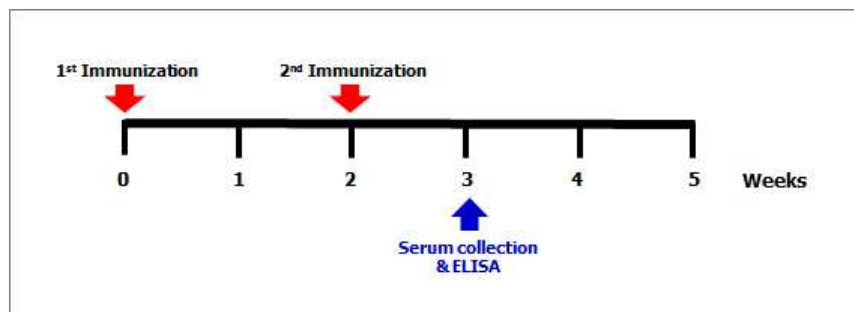


그림 20. 재조합항원 A의 항체가 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 검증 실험 일정

◎ A 항원 단백질을 코팅하고 각 마우스 그룹으로 채취한 혈청을 이용해 ELISA를 수행하여 항체생성률을 분석한 결과 아래 그림과 같이 WRS의 투여량이 증가함에 따라 재조합항원 A에 대한 항체생성률도 증가한 것을 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g의 재조합 항원 A 접종그룹에서 모두 확인할 수 있었음. 이 실험을 통해 WRS가 면역증강 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었음.

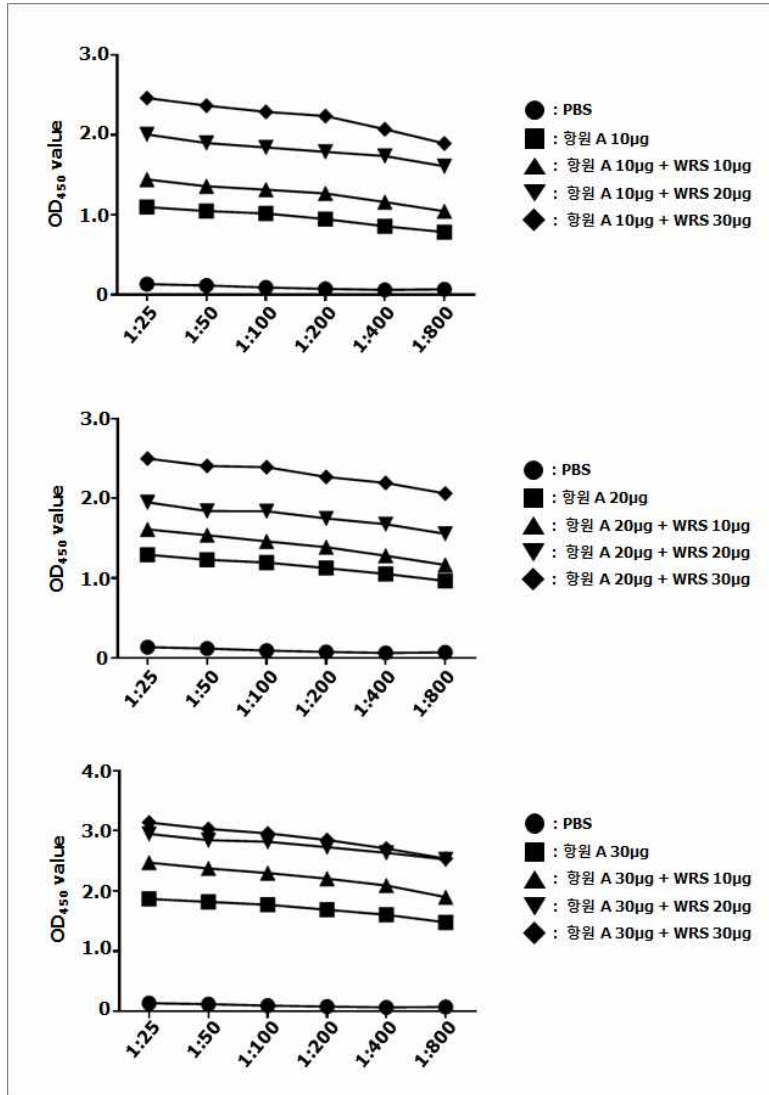


그림 21. 재조합항원 A의 항체가 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 검증

6) WRS 단백질에 의한 항원의 세포성면역 증진 효능 검증

◎ WRS가 재조합항원 A에 의한 T-면역세포의 면역작용에도 면역증강 효과를 보이는지 확인하기 위해 그림과 같이 재조합항원 A 40µg에 WRS를 각각 0µg, 40µg을 혼합하여 그림의 일정으로 마우스에 접종하였음. 최종 접종 후 2주일 뒤 마우스의 비장내 비장세포를 분리, 재조합항원 A로 비장세포의 면역을 자극하여 BDTM ELISPOT set을 이용한 T-면역세포 반응 실험을 실시하였음.

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crl jori mice Route of administration : Intramuscular Injection Days of inoculation : 1, 14days					
Groups		Inoculum (항원 A + WRS)	Route	No. of Mice	
1	PBS	PBS	0µg+0µg	I.M	3
2	항원 A 40µg	WRS 0µg	40µg+0µg	I.M	3
3	항원 A 40µg	WRS 40µg	40µg+40µg	I.M	3

표 2. 항원 A에 대한 T-면역세포 면역반응 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 검증 실험 그룹

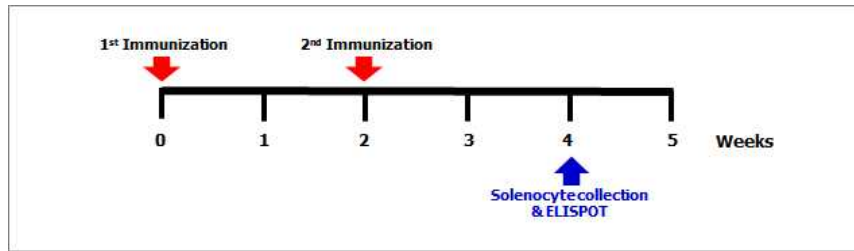


그림 22. 항원 A에 대한 T-면역세포 면역반응 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 검증 실험 일정

◎ 그 결과 그림 에서 보는 바와 같이, Mitogen 자극제 (1 μ g/well)를 처리한 양성 대조군(PC)과 음성 대조군(NC)을 통해 실험이 올바르게 진행되었음을 확인하였음., 백신 그룹에서 IFN- γ 와 IL-4가 생성되어 발색으로 인한 점의 생성을 확인하였고 WRS를 함께 접종한 그룹에서 더 활발히 IFN- γ 와 IL-4가 생성된 것을 확인하였음. 이 실험을 통해 WRS에 의해 재조합항원 A에 대한 T-면역세포의 면역작용이 더 활성화되었음을 확인하였음.

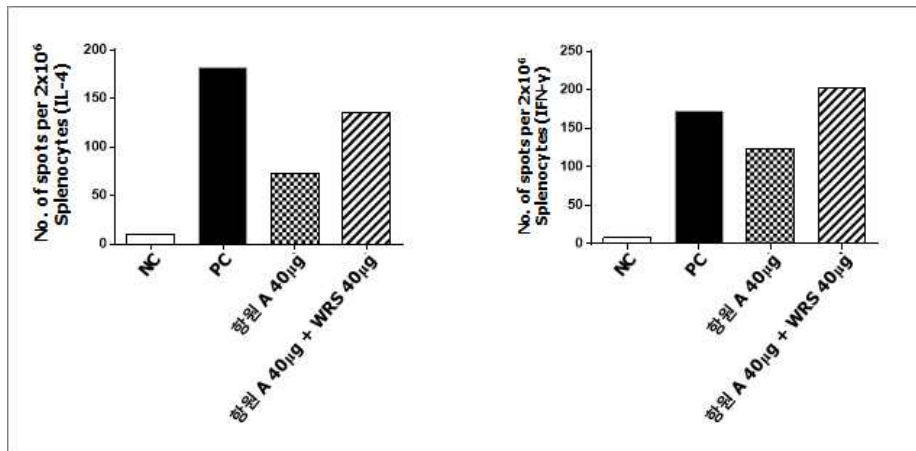


그림 23. 재조합항원 A에 대한 T-세포 면역반응 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 검증 결과

7) WRS 단백질에 의한 항원의 지속적 면역 증진 효능 검증

◎ 다음으로 WRS의 면역증강효과의 지속성을 확인 하고자 그림과 같이 재조합항원 A 10 μ g, 30 μ g에 WRS를 각각 0 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g을 혼합하여 그림의 일정으로 마우스에 접종하였 음. 최초 접종 후 3달 뒤 혈청을 채취하여 항체생성률을 확인하였음.

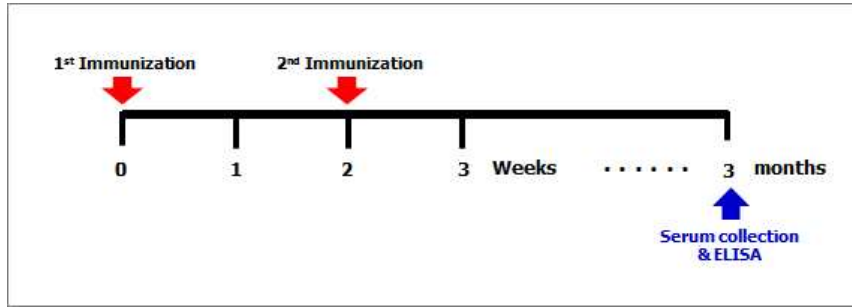


그림 24. 항원 A의 항체가 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 지속성 검증 실험 일정

Animal : 5 week old Female C57BL/6N crl jori mice Route of administration : Intramuscular Injection Days of inoculation : 1, 14days					
Groups			Inoculum (항원 A + WRS)	Route	No. of Mice
1	PBS	PBS	0 μ g+0 μ g	I.M	4
2	항원 A 10 μ g	WRS 0 μ g	10 μ g+0 μ g	I.M	4
3		WRS 10 μ g	10 μ g+10 μ g	I.M	4
4		WRS 20 μ g	10 μ g+20 μ g	I.M	4
5		WRS 30 μ g	10 μ g+30 μ g	I.M	4
6		항원 A 30 μ g	WRS 0 μ g	30 μ g+0 μ g	I.M
7	WRS 10 μ g		30 μ g+10 μ g	I.M	4
8	WRS 20 μ g		30 μ g+20 μ g	I.M	4
9	WRS 30 μ g		30 μ g+30 μ g	I.M	4

표 3. 항원 A의 항체가 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 지속성 검증 실험 그룹

- ◎ 채취한 혈청을 이용해 ELISA를 수행하여 항체생성률을 분석한 결과 아래의 그림과 같이 WRS의 투여량이 증가함에 따라 재조합항원 A에 대한 항체생성률이 증가한 것을 확인하였음. 즉 접종 후 3달 뒤에도 WRS의 면역증강 효과가 지속되고 있음을 확인할 수 있었음.

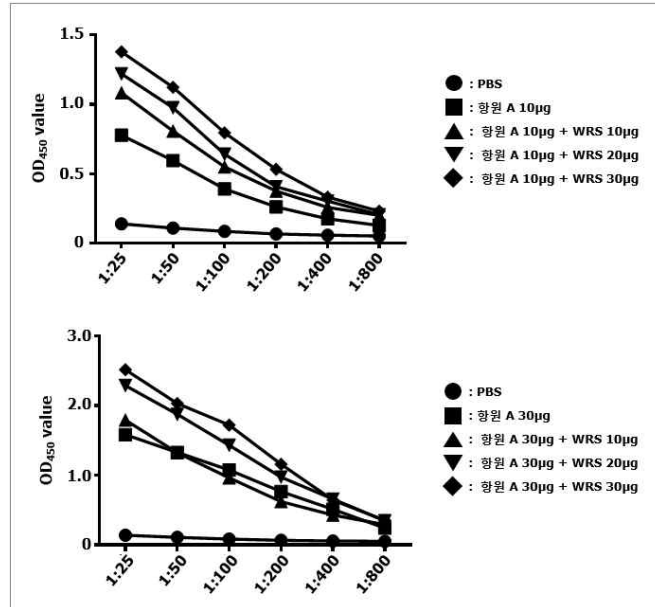


그림 25. 항원 A의 항체가 측정을 통한 WRS의 면역증강 효과 지속성 검증

8) Influenza A virus의 M2HA2 항원을 이용한 Influenza in vivo challenge 모델에서의 hWRS의 효능검증

가) hWRS의 효능평가를 위한 M2HA2 항원 및 Influenza virus (H1N1) 용량 설정

◎ hWRS의 효능평가 및 백신보조제 실험을 위해 앞으로의 실험에 사용될 모델인 Influenza virus H1N1 strain의 감염용량과 백신에 이용될 항원단백질 M2HA2의 투여용량을 아래의 일정과 같이 시험하였음.

◎ M2HA2는 influenza virus의 주요 항원부위 (M2와 HA2)를 포함하는 재조합단백질로 대장균 발현 시스템을 이용해 정제하여 사용함. 본 항원단백질은 근육투여에 의해 마우스에서 다양한 종류의 influenza 바이러스 감염에 대해 높은 면역능을 유도하는 것이 사전 검증되어 있음.

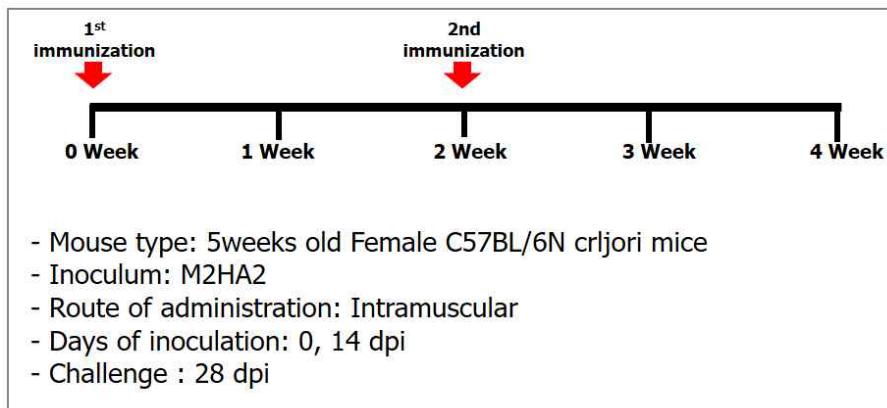


그림 26. H1N1과 M2HA2 용량 설정 시험 일정

시험동물 대조군 및 실험군				
	Antigen	Total amount	Inoculation time	No.of animals
PBS		100ul	2	4 heads
M2HA2 1LD50 (H1N1)	3ug	100ul	2	4 heads
	5ug	100ul	2	4 heads
	10ug	100ul	2	4 heads

시험동물 대조군 및 실험군				
	Antigen	Total amount	Inoculation time	No.of animals
PBS		100ul	2	4 heads
M2HA2 2LD50 (H1N1)	3ug	100ul	2	4 heads
	5ug	100ul	2	4 heads
	10ug	100ul	2	4 heads

시험동물 대조군 및 실험군				
	Antigen	Total amount	Inoculation time	No.of animals
PBS		100ul	2	4 heads
M2HA2 3LD50 (H1N1)	5ug	100ul	2	4 heads
	15ug	100ul	2	4 heads
	20ug	100ul	2	4 heads

표 4. H1N1과 M2HA2 용량 설정 시험 그룹

- ◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 투여 용량은 1*LD50 와 2*LD50 감염 예정 그룹은 3, 5, 10 μ g, 3*LD50 감염 예정 그룹은 5, 10, 15 μ g으로 설정하였음.
- ◎ 바이러스 감염은 마지막 접종 이후 2주 후에 수행하였음. Influenza virus H1N1 strain LD50의 1배, 2배, 3배 용량의 바이러스가 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음.
- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

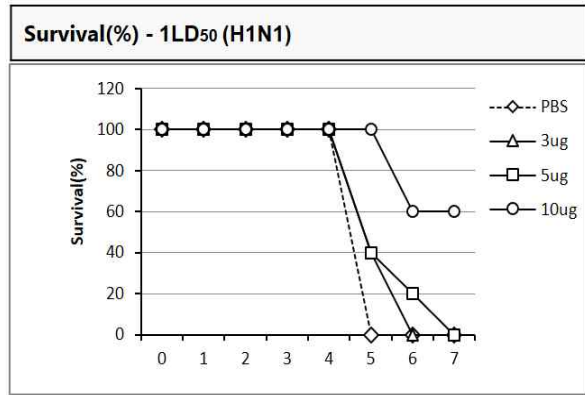
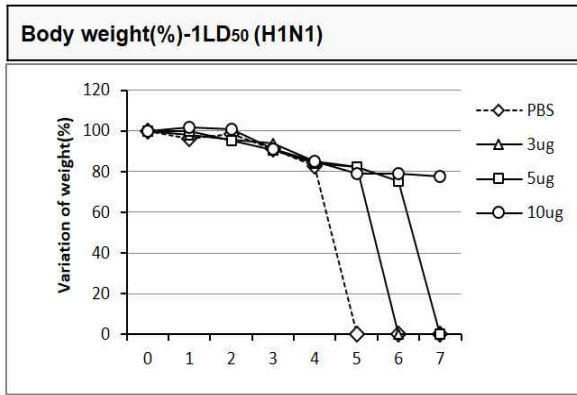


그림 27. H1N1 1LD50 감염에 따른 마우스의 체중과 생존율

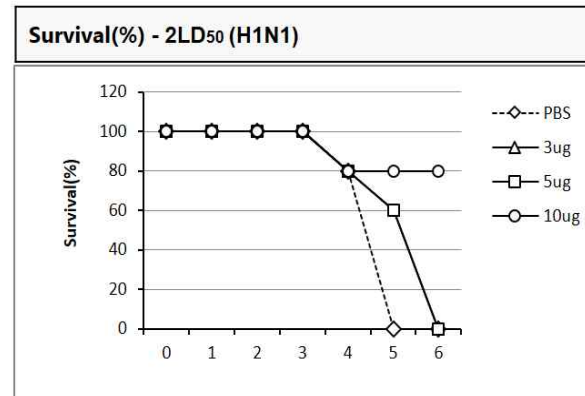
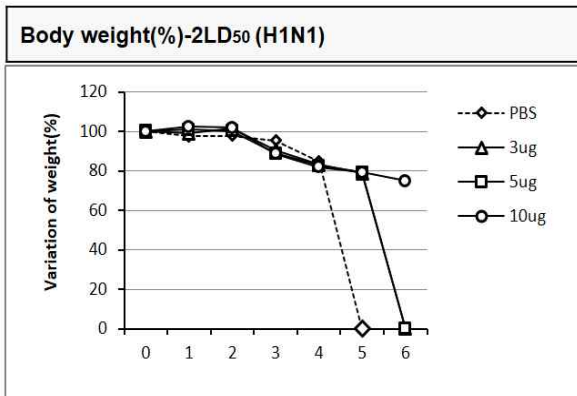


그림 28. H1N1 2LD50 감염에 따른 마우스의 체중과 생존율

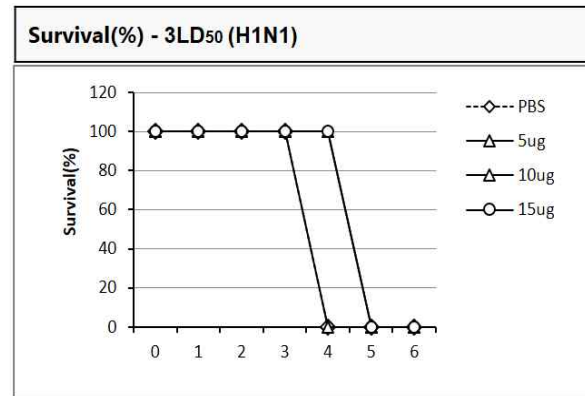
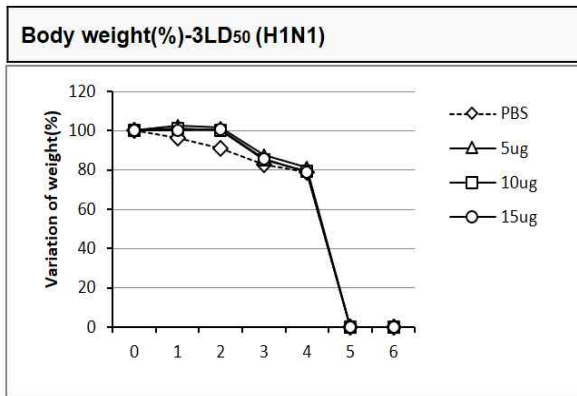


그림 29. H1N1 3LD50 감염에 따른 마우스의 체중과 생존율

- ◎ 항원단백질 접종 후 Influenza A virus H1N1 strain 1LD50를 감염시킨 결과, 대조군 마우스에 비해 항원을 접종한 마우스가 바이러스에 대한 저항성이 더 높은 것을 확인하였음. 항원단백질 10μg을 접종한 그룹에서 가장 큰 효과가 나타났으며 체중과 생존율 모두 같은 경향을 보임. 본 실험 결과를 기초로 1LD50 감염에 대한 항원단백질의 접종용량을 10μg으로 결정하였음.
- ◎ 항원단백질 접종 후 Influenza A virus H1N1 strain 2LD50를 감염시킨 결과 역시 대조군 마우스에 비해 항원을 접종한 마우스가 바이러스에 대한 저항성이 더 높은 것을 확인하였음. 항원단백질 10μg을 접종한 그룹에서 가장 큰 효과가 나타났으며 체중과 생존율 모두 같은 경

향을 보임. 본 실험 결과를 기초로 2LD50 감염에 대한 항원단백질의 접종용량을 10 μ g으로 결정하였음.

- ◎ 항원단백질 접종 후 Influenza A virus H1N1 strain 3LD50를 감염시킨 경우, 모든 그룹에서 체중감소에 차이가 없었으나 생존률은 15 μ g 접종 그룹에서 약간 더 높게 확인되었음. 3LD50 감염은 마우스의 면역 형성에 비해 감염되는 바이러스의 용량이 높은 것으로 사료됨.
- ◎ 결론적으로, 앞으로의 백신보좌제 효능검증 실험에 이용될 Influenza A virus H1N1 strain의 감염용량은 1LD50 및 2LD50로 결정하였으며 두 용량의 감염에 대해 항원단백질 M2HA2의 접종용량은 모두 10 μ g으로 결정하였음.

나) 항원단백질(M2HA2)과 hWRS를 이용한 in vivo 효능평가

- ◎ 항원단백질 접종에 따른 hWRS의 면역증강 효능평가를 위해 마우스에 2주간격으로 항원단백질과 hWRS를 함께 접종한 후 Influenza virus H1N1 strain의 1LD50 감염에 대해 마우스의 체중과 생존율을 아래와 같은 일정으로 실험해 비교하였음.
- ◎ WRS는 바이러스 감염에 대해 체내에서 자연분비되는 단백질로 숙주의 선천면역 시스템을 자극하는 병원체 감염 초기에 있어 중요한 역할을 수행하는 단백질임. 본 실험에서는 hWRS의 백신보좌제로서의 기능을 M2HA2-influenza A virus in vivo 시스템을 통해서 검증할 목적으로 10 μ g, 20 μ g의 hWRS를 항원단백질과 함께 근육접종 하였음.

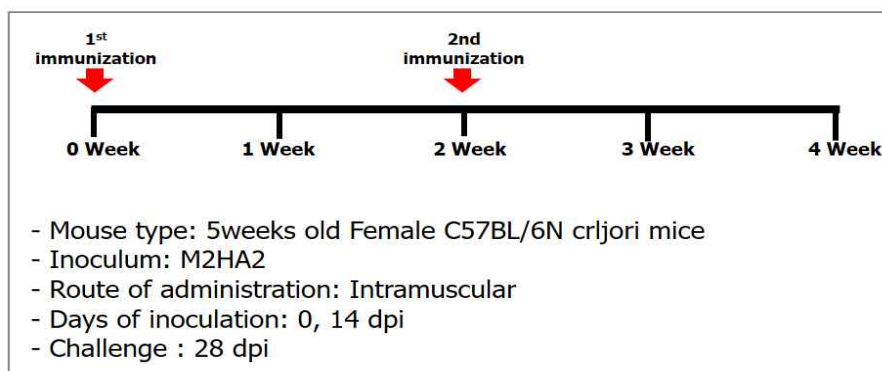


그림 30. 항원단백질과 hWRS 동시 접종 효능평가 시험 일정

시험동물 대조군 및 실험군						
	Antigen	hWRS	Total amount	Inoculation time	for ELISA	No. of animals
PBS 1LD50 (H1N1)	-	-	100ul	2	3 heads	5 heads
M2HA2 1LD50(H1N1)	10ug	-	100ul	2	3 heads	5 heads
M2HA2 + hWRS 1LD50 (H1N1)	10ug	10ul	100ul	2	3 heads	5 heads
	10ug	20ul	100ul	2	3 heads	5 heads

표 5. 항원단백질과 hWRS 동시 접종 효능평가 시험 그룹

- ◎ 항원단백질의 접종용량은 첫 실험에서 결정한 용량인 10 μ g을 사용하였으며, 정제한 hWRS 단백질 10, 20 μ g을 함께 2주 간격으로 근육투여 하였음. 마우스는 각 그룹당 5마리로 구성하였음.
- ◎ 바이러스 감염은 마지막 접종 이후 2주 후에 수행하였음. influenza virus H1N1 strain 1LD50의 용량의 바이러스를 이용했으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음.
- ◎ 항체생성을 확인할 마우스의 경우 그룹당 3마리로 구성하였음. 마지막 접종 이후 2주 후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 다음 혈청 내 항체를 ELISA를 통해 측정하였음.

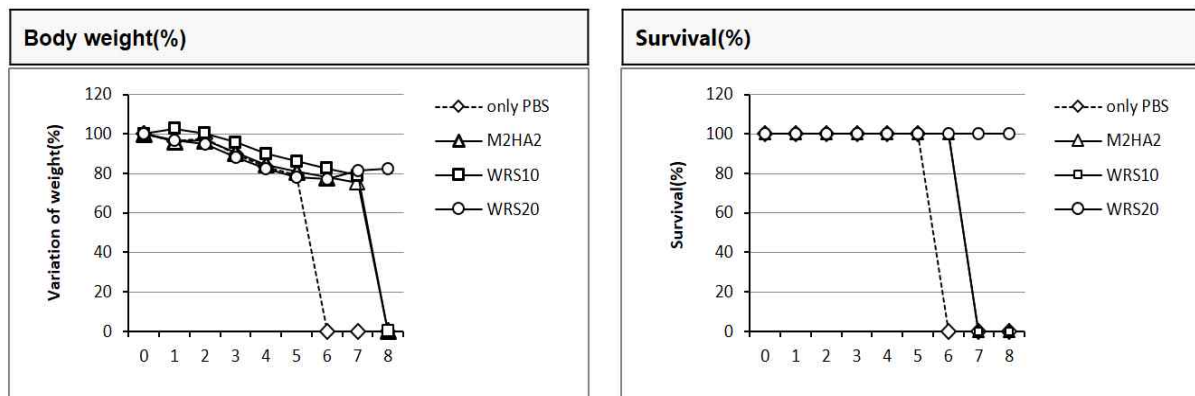


그림 31. 항원단백질과 hWRS 접종 이후 H1N1 1LD50에 대한 마우스의 체중변화와 생존율

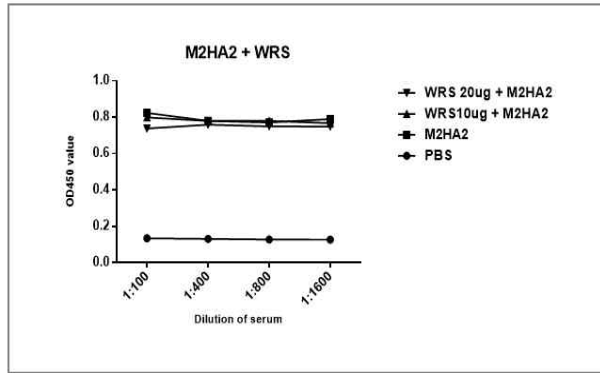


그림 32. 항원단백질과 hWRS 접종에 따른 마우스 혈청 내 항체가 측정

- ◎ 항원단백질 접종 후 Influenza A virus H1N1 strain 1LD50를 감염시킨 결과, 대조군 마우스에 비해 항원을 접종한 마우스가 바이러스에 대한 저항성이 더 높은 것을 확인하였음.
- ◎ 항원단백질과 hWRS를 함께 접종한 경우, hWRS 10 μ g을 접종한 그룹에서는 항원단백질만을 접종한 그룹과 같은 경향을 보였으나 hWRS 20 μ g을 접종한 그룹에서는 보다 높은 생존율을 나타내었음.
- ◎ 접종 직전에 마우스 혈청에서 항체를 측정한 결과, 항원단백질만 접종한 그룹과 hWRS를 함께 투여한 그룹 모두에서 대조군에 비해 높은 항체가 형성을 나타냈지만 실험그룹간 차이를 보이지 않음. 이는 ELISA과정의 항원-항체 반응이 과반응되어 보이는 결과로 생각됨.
- ◎ 결론적으로, 마우스 in vivo 실험모델을 이용하여 hWRS가 항원단백질과 함께 접종되었을 경우 Influenza A virus에 대한 마우스의 항원단백질의 백신 효과를 증강시키는 것으로 확인되었음. 본 실험결과를 기초하여 hWRS를 가금 백신 보조제로 적용하기 위한 계획을 수립하였음.

9) Chicken bone marrow derived macrophages (cBMDMs)를 이용한 WRS의 면역증강능 확인

- ◎ 앞선 마우스시험에서 hWRS의 면역보좌제로서의 기능은 확인하였고 닭에서의 hWRS에 대한 면역증강 효능을 확인하기 위해 Chicken bone marrow derived macrophages (cBMDMs)를 이용하여 실험을 수행하였음.

가) Chicken bone marrow derived macrophages (cBMDM)를 이용한 hWRS의 효능검증

- ◎ 시험계의 Femur bone와 Tibia bone으로부터 분리한 골수세포를 Macrophage로 분화시켜 LPS와 hWRS를 12, 24시간동안 아래의 표와 같이 처리하였음.

chicken BMDMs					
Treat Time	N/C	LPS	hWRS		
12hr	Media only	100ng/ml	10µg/ml	20µg/ml	30µg/ml
24hr			10µg/ml	20µg/ml	30µg/ml

표 6. chicken BMDM을 hWRS의 효능검증

◎ 이후, 자극에 의한 사이토카인의 분비를 chicken IL-6 ELISA kit를 이용해 측정하였음.

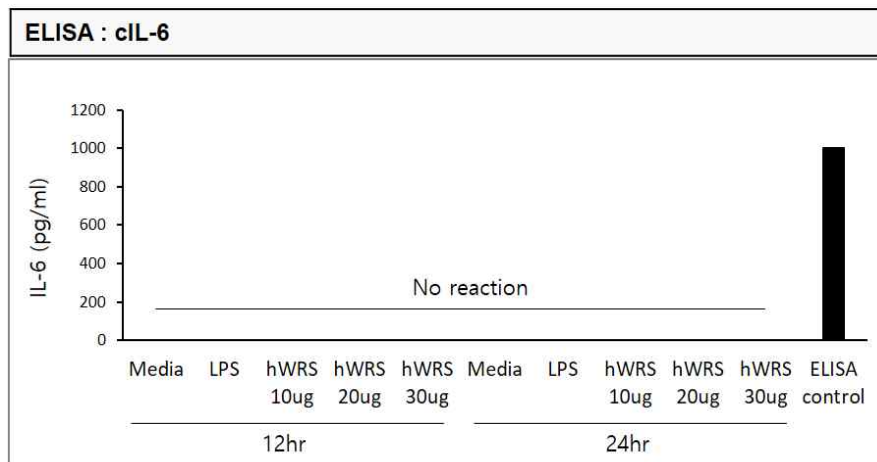


그림 33. Chicken BMDM을 이용한 hWRS의 효능검증 chicken IL-6 ELISA

◎ 실험 결과, hWRS의 처리에 의한 IL-6 의 분비가 확인되지 않았음.

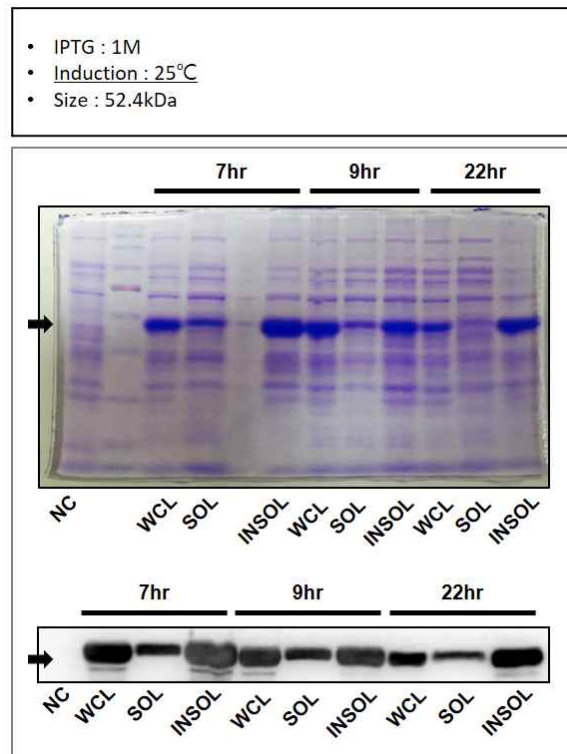
◎ hWRS는 사람 및 마우스의 면역 세포에서 성공적인 면역자극능력이 검증되었으나 chicken 세포에서 반응이 나타나지 않음.

◎ 이는 면역세포의 표면에 발현하는 면역 receptor의 종간 차이로부터 발생하는 결과일 수 있음. 또는 human WRS와 chicken WRS의 homology 차이에 의한 이유일 수 있음. 실질적으로 그림에서 보는바와 같이 마우스 WRS 단백질과 조류 유래의 WRS 단백질 아미노산 서열분석 결과 약 73.6%의 homology를 나타냈음. 따라서 다음과 같은 이유로 chicken 유래 WRS의 정제를 진행하였음.

.mouse WRS aa	1:	MADMFSGESCTS-PIELENSIATQGELVRS	SLKAGNAPKDEIDS	AVKMLLSLKVSYKPAAMG	59
gallus WRS aa	1:	MADSNCDLKSLSPLQLEEKVTEQGEKVR	ALKAGRAPKDEILAAVRLLSLKVSYKTTTG	60	
.mouse WRS aa	60:	EEYKAGCFFGNPIAGRNCDSDAFRASE-DE	VDFWVWRTSSAKGIDYDKLIVQFGSSKIDK	118	
gallus WRS aa	61:	QDYQAGLPPKDHALINNGT---TRKEEDE	LVDFWVWQTSNAKGVVDYDKLIVRFGSTKIDT	117	
.mouse WRS aa	119:	ELINRIEFATGQRPHRFLRRGIFFSHRDMN	QILDAYENKKPFYLYTGRGPSSSAMHLGHL	178	
gallus WRS aa	118:	DLINRIEFATGQRPHRFLRRGIFFSHRDMD	QILHAYENKKPFYLYTGRGPSSQAMHVGH	177	
.mouse WRS aa	179:	VFFLFTKWLQDVENVPLVIQMSDDEKYLW	KDLTLEQAYSITVENAKDIACGFDHNTFI	238	
gallus WRS aa	178:	IPFLFTKWLQEARFDVPLVIQLTDEKYLW	KDMTEKAYEVAKENARDIACGFDVWNTFI	237	
.mouse WRS aa	239:	FSDLEVMGQSPGFYRNVVKIQKHVTFNQ	VGIFGFTSDDCIGKISFAVCAAPSFNSN	298	
gallus WRS aa	238:	FSDLVYLGSSSTGFYKNIKVKQKHVTFNQ	VGIFGFTSDDCIGKISFAVCAAPSFSS	297	
.mouse WRS aa	299:	KIFRDRTDIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDV	VAPRIGYFKPALLHSTFFFALQGAQTRMS	358	
gallus WRS aa	298:	QIFNGKENIQCLIPCAIDQDPYFRMTRDV	VAPRIGYFKPALLHSTVFFFALQGAQTR	357	
.mouse WRS aa	359:	PNSSIFLTDIAKQIKSKVKNKHAFFSGGR	DTVEEHRQFQGGNCDVDVSEMYLTFFL	418	
gallus WRS aa	358:	VNSSVFLNDTPKQIKTKVKNKHAFFSGGR	DTVEEHRKYGGNCDVDVSEMYLTFFL	417	
.mouse WRS aa	419:	QIRKDYTSGAMLTGELKKTLLIDVLPPLI	AHQARRKAVTEETVKEFMTPRQLSEHF	478	
gallus WRS aa	418:	QLKQAYTSGELLTGELKKTLLIETLPPLI	AHQERRKQITDEVVKEFMTPRKLAEFE	473	
.mouse WRS aa	479:	FDT		481	
gallus WRS aa	474:	---		474	

그림 34. 마우스 WRS 단백질과 조류유래 WRS 단백질의 아미노산 서열비교

© Chicken WRS의 정제를 위해 대장균 발현 벡터인 pHis-parallel vector에 cWRS의 유전자를 합성하였으며 합성된 플라스미드를 competent cell에 형질전환시켰음. 이후 25, 30, 37도에서 배양하여 Western blotting을 이용해 cWRS의 가용성 발현 여부를 확인하였음.



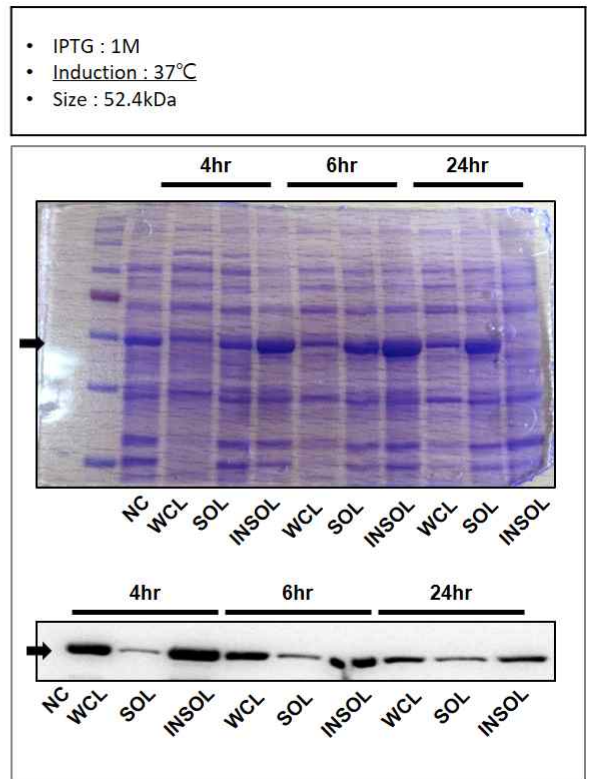
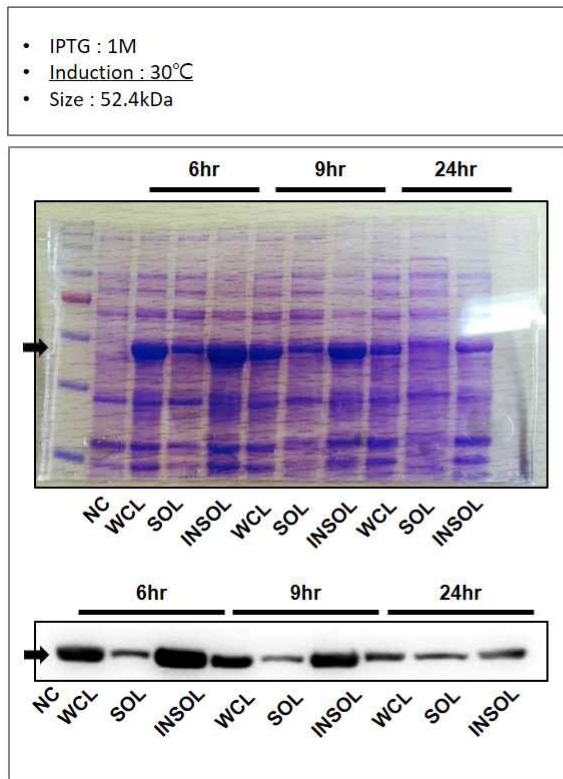


그림 35. 닭 유래 WRS의 가용성 발현 시험

◎ 최종적으로, 상기의 실험 결과와 같이 cWRS의 가용성 발현이 확인되었으며 이를 토대로 FPLC 정제법을 통해 cWRS 재조합 단백질을 정제하였음.

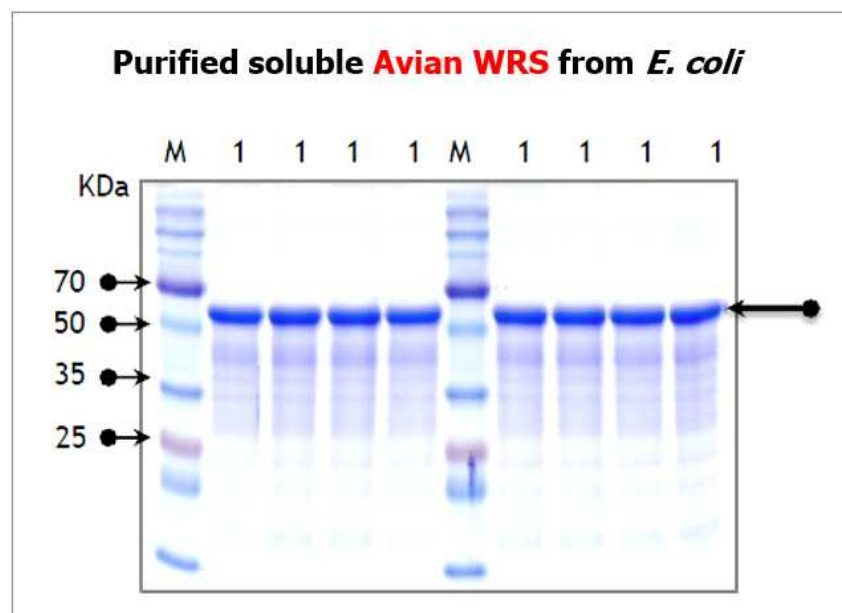


그림 36. 대장균 발현시스템을 이용한 수용성의 조류 WRS 단백질 발현 및 정제

◎ 그 결과 그림에서 보는 바와 같이 수용성의 조류 WRS 단백질 발현하고 Histidine column 및 FPLC을 이용한 정제법으로 정제하여 정제된 조류 WRS 단백질을 확인 및 확보하였음.

나) Chicken bone marrow derived macrophages를 이용한 cWRS의 효능검증

◎ Chicken의 Femur bone와 Tibia bone으로부터 분리한 골수세포를 Macrophage로 분화시켜 LPS와 hWRS, cWRS를 12, 24시간동안 아래의 표와 같이 처리하였음.

chicken BMDMs - 2차 실험								
Treat Time	N/C	LPS	hWRS			cWRS		
12hr	Media only	100ng/ml	10µg/ml	20µg/ml	30µg/ml	10µg/ml	20µg/ml	30µg/ml
24hr								

표 7. chicken BMDM을 이용한 cWRS의 효능검증

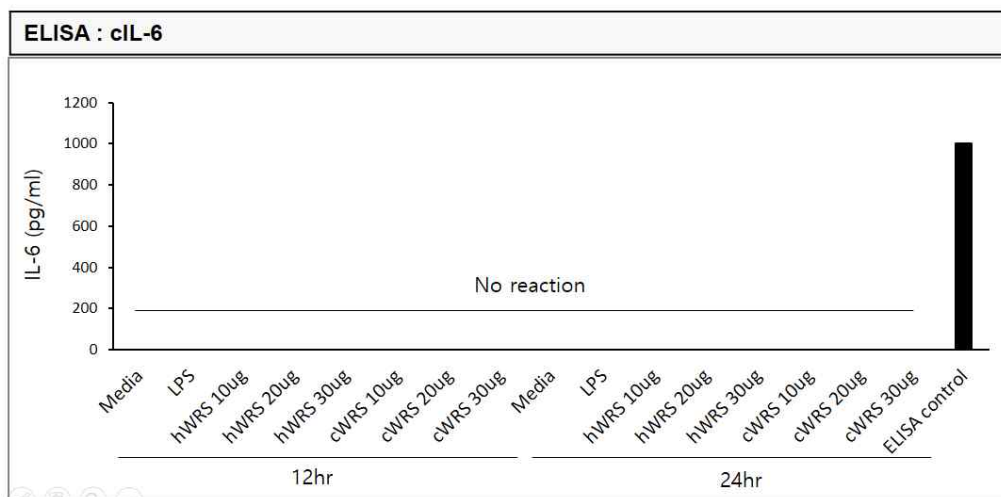


그림 37. chicken BMDM을 이용한 cWRS의 효능검증 : chicken IL-6 ELISA

Real time PCR			
primer	IL-6	IFN-a	IFN-b
Sample			
hWRS	X	X	X
cWRS	X	X	X

표 8. chicken BMDM을 이용한 WRS의 효능검증 : real time PCR

◎ ELISA를 수행한 결과, hWRS와 마찬가지로 cWRS에 의한 자극에서도 반응이 나타나지 않았음.

◎ Real time PCR은 chicken IL-6, chicken IFN-alpha, chicken IFN-beta의 primer를 합성해 실험에 이용하였음. hWRS와 cWRS를 각각 이용해 자극시킨 세포 모두에서 유전자가 증가하지 않았음.

◎ hWRS는 사람과 마우스의 면역세포에서 사이토카인의 분비를 유도하는 것이 검증된 면역자극

제이나 닭의 면역세포에서는 그 효능을 나타내지 못함. 또한, 닭에서 hWRS와 같은 종류의 aminoacyl tRNA 합성 기능을 가지는 cWRS를 정제해 chicken BMDM에서 실험을 수행하였으나 역시 사이토카인의 분비를 유도하지 못하였음.

◎ 이러한 결과는 포유류의 면역세포와 조류의 면역세포의 receptor 구조의 차이에 기인하는 것으로 사료됨.

◎ 이러한 차이를 교차 검증하고자 마우스 면역세포에서 cWRS에 의한 반응 여부를 Raw264.7 cell에서 확인하였음.

표. Raw cell line - cWRS					
Treat Time	N/C	LPS	cWRS		
12hr	Media only	100ng/ml	10µg/ml	20µg/ml	30µg/ml
24hr					

표 9. Raw264.7 세포에서의 cWRS 처리 시험

◎ 마우스 면역세포인 Raw264.7 세포에 cWRS를 상기의 표와 같은 농도로 처리해 12, 24시간 째에 상층액에서 mIL-6 ELISA를 수행하였음.

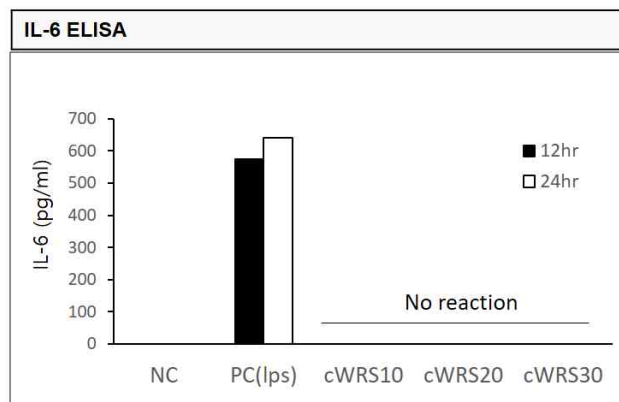


그림 38. cWRS를 처리한 Raw264.7 cell의 IL-6 ELISA 측정

◎ 실험 결과, cWRS를 자극시킨 세포의 상층액에서 사이토카인의 분비가 나타나지 않음.

◎ hWRS와 chicken BMDM 사이의 반응이 없던 것과 마찬가지로 cWRS와 마우스 면역세포 사이에서도 면역자극이 이루어지지 않음. 이는 결과적으로 hWRS에 대해서는 포유류의 면역세포와 조류의 면역세포의 receptor 구조 차이 및 TLR4와 TLR4와 관련한 표면 단백질들의 발현 부재에 기인한 결과라 사료되며, cWRS에 대해서는 hWRS와는 다르게 면역자극 효능 없음에 의한 결과라 사료됨.

◎ 결론적으로 닭의 면역세포를 자극해 선천면역을 유도할 수 있는 다른 종류의 면역보조제를 탐색할 예정이나, WRS 단백질은 포유류 특히, 돼지와 소 같은 동물의 백신을 위한 면역증강

물질로 사용될 수 있으리라 사료됨.

10) FMDV-VP3와 IFN-lambda 재조합 단백질의 정제 및 in vivo 효능검증

가) FMDV-VP3 재조합 단백질의 대장균 발현 및 정제

- ◎ 가끔 백신보조제의 역할을 수행할 수 있는 새로운 후보물질 탐색을 위해 구제역바이러스의 capsid 단백질인 VP3를 대장균 발현 시스템을 이용해 생산할 목적으로 실험을 진행하였음.
- ◎ 구제역바이러스의 VP3 단백질의 경우 세포의 표면에 작용하여 닭의 면역세포를 자극해 선천 면역을 유도할 수 있음을 연구하였음.
- ◎ 대장균 발현 시스템에서 가용성으로 발현될 수 있도록 VP3의 유전자를 codon-usage를 통해 유전자의 코돈을 변경하여 대장균 발현 벡터인 pHis-parallel vector에 합성하였음.
- ◎ 이후, competent cell을 해당 플라스미드로 형질전환 시킨 후 30도에서 12, 22시간동안 배양하여 단백질의 가용성 발현 여부를 확인함.
- ◎ 실험 결과, VP3 단백질이 가용성으로 발현되지 않음. 이는 대장균 발현 시스템을 이용한 대량 생산이 어렵기 때문에 가용성 발현을 위한 다른 접근이 필요하기 때문에 VP3 단백질의 가용성 발현을 위해 다른 tagging protein을 이용한 벡터에 재조합하는 방법으로 실험을 진행하였음.
- ◎ 본 실험실에서는 porcine WRS(pWRS) 단백질을 목표단백질의 N말단에 tagging하여 대장균 내에서 목적단백질을 가용성으로 발현하는 기술을 확보하고 있음.
- ◎ 따라서, 대장균 발현 시스템에서 VP3 단백질의 가용성 발현을 위해 VP3 단백질의 N말단에 pWRS를 tagging한 뒤 상기와 같은 조건으로 competent cell에서 단백질의 발현을 확인하였음.
- ◎ 실험 결과, 아래의 그림과 같이 competent cell을 이용한 발현에서 pWRS-VP3 단백질이 가용성으로 발현되었음. 12시간과 24시간 배양 조건에서 모두 높은 발현량을 보임.

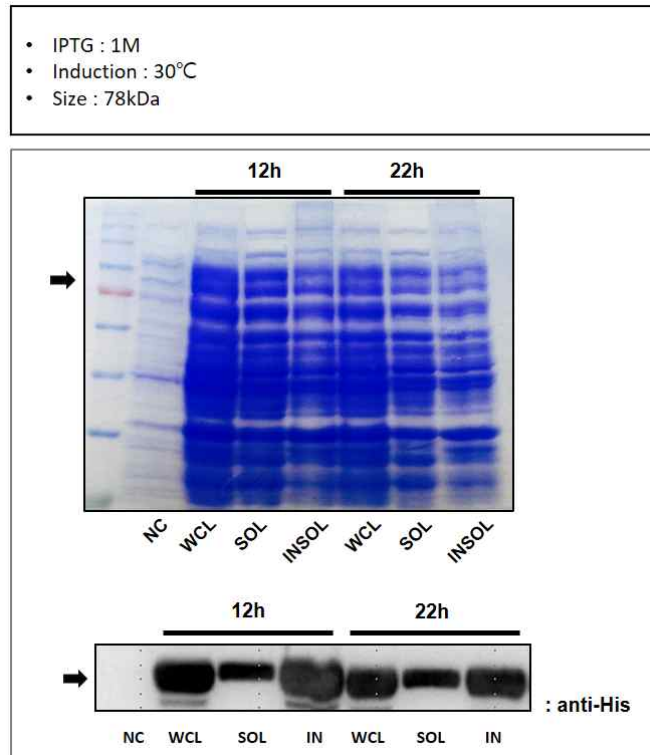


그림 39. pWRS-VP3의 대장균내 발현

◎ 따라서 pWRS-VP3 단백질을 아래와 같이 정제해 in vivo 효능검증시험에 이용하였음.

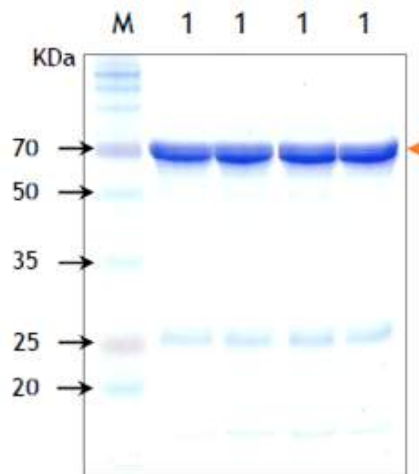


그림 40. 대장균 발현시스템을 이용한 수용성의 pWRS-VP3 단백질 정제

2) IFN-lambda 재조합 단백질의 대장균 발현 및 정제

◎ 가금 백신보조제의 역할을 수행할 수 있는 새로운 후보물질 탐색을 위해 마우스와 닭의 IFN-lambda를 대장균 발현 시스템을 이용해 생산할 목적으로 실험을 진행하였음.

- ◎ IFN-lambda는 type 3 interferon으로서 세포를 자극하여 antiviral status로 전환할 수 있도록 해 주는 사이토카인으로 알려져 있음. 최근 그 연구가 활발히 진행되어 그 분비 과정과 역할이 규명되고 있음.
- ◎ 따라서, IFN-lambda의 효능이 검증되고 대장균 발현 시스템을 이용한 대량 생산이 가능할 경우 가금백신보조제로서의 그 활용이 기대되는 바임.
- ◎ IFN-lambda가 대장균 발현 시스템에서 가용성으로 발현될 수 있도록 유전자를 codon-usage를 통해 유전자의 코돈을 변경하여 대장균 발현 벡터인 pHis-parallel vector에 합성하였음. IFN-lambda의 유전자는 mouse IFN-lambda 2와 chicken IFN-lambda 2를 이용하였음. chicken의 경우, 세 종류의 IFN-lambda 중 IFN-lambda 2만 발현하는 것으로 알려져 있음.
- ◎ 이후, competent cell을 해당 플라스미드로 형질전환 시킨 후 30도에서 12, 22시간동안 배양하여 단백질의 가용성 발현 여부를 확인함.

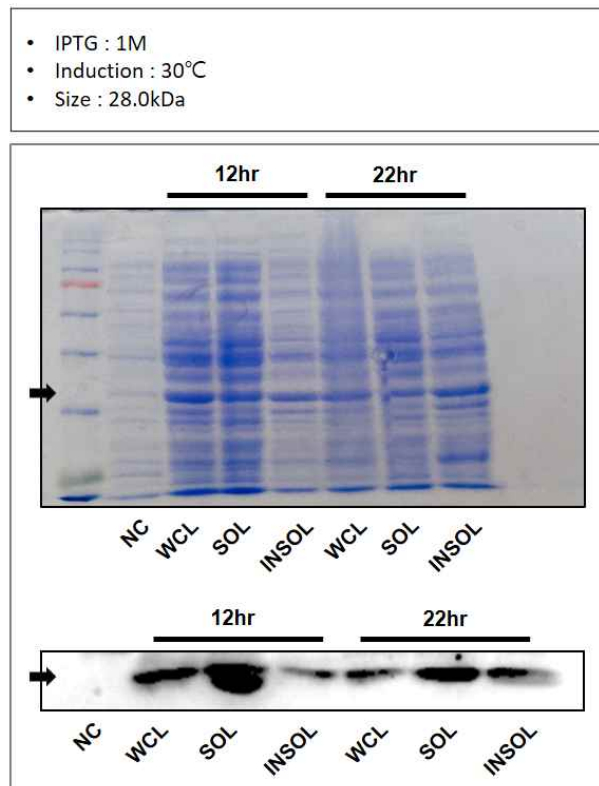


그림 41. Chicken IFN-lambda 2의 발현

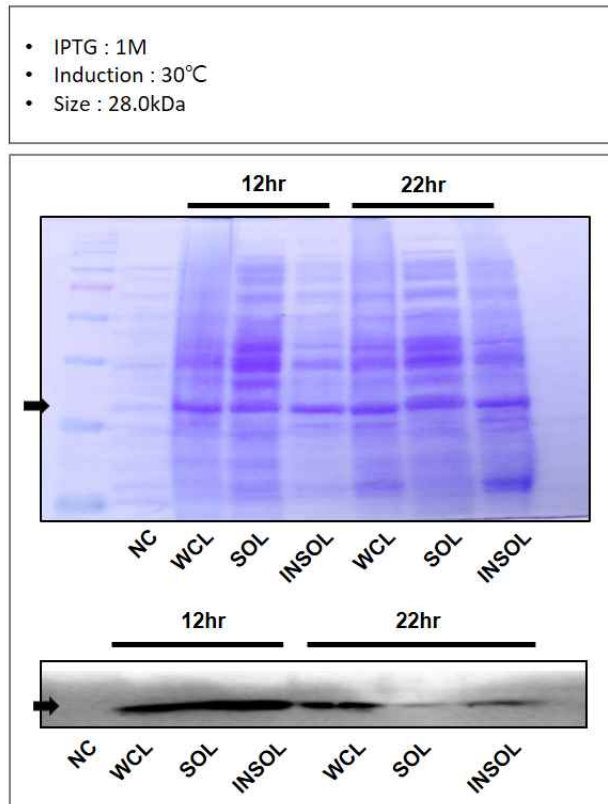


그림 42. Mouse IFN-lambda 2의 발현

- ◎ mouse IFN-lambda 2의 경우 competent cell에서 가용성으로 발현하는 것을 확인하였음.
- ◎ chicken IFN-lambda 2의 경우 역시 competent cell에서 가용성으로 발현하는 것을 확인하였음.
- ◎ 두 종류의 IFN-lambda 2 재조합 단백질 모두 가용성으로 발현되는 것을 확인하였으나 정제 과정상의 문제로 충분한 양의 정제가 불가능해 추후 실험이 불가능함.
- ◎ 따라서, 대장균 발현 시스템에서 chicken IFN-lambda 2 단백질의 가용성 발현을 위해 cIFN-lambda 2 단백질의 N말단에 pWRS를 tagging한 뒤 상기와 같은 조건으로 competent cell에서 단백질의 발현을 확인하였고, 최종적으로, 아래의 그림과 같이 pWRS-cIFN-lambda 2를 FPLC 정제법을 통해 정제하였음.

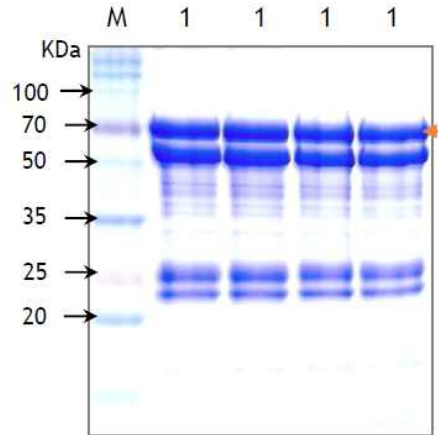


그림 43. 대장균 발현시스템을 이용한 수용성의 WRS-IFN-lambda 단백질 정제

◎ 정제된 pWRS-cIFN-lambda 2 단백질을 in vivo 효능검증시험에 이용하였음.

◎ 아래의 그림과 같이 pWRS-VP3 단백질과 pWRS-cIFN-lambda 2 단백질을 이용하여 이들 단백질들의 항원성 증진 효능을 검증하였음.

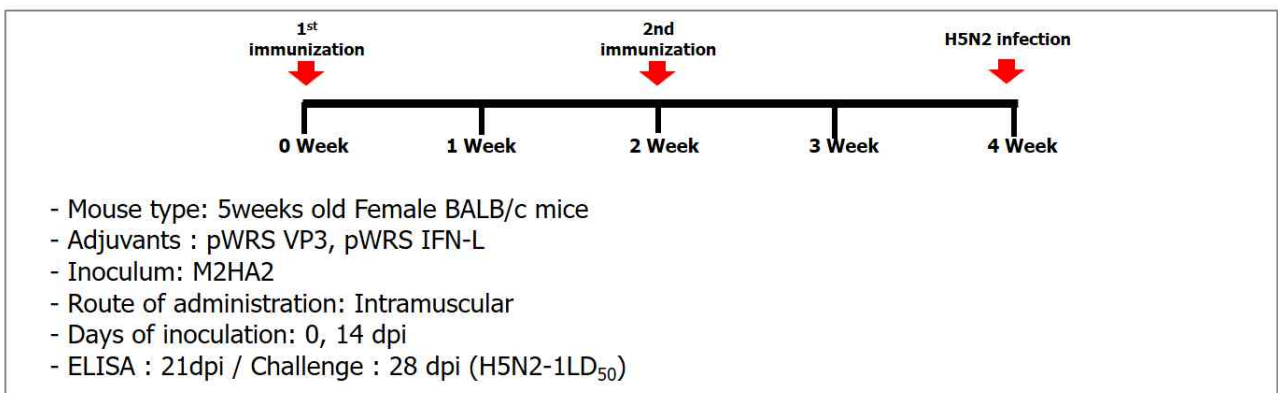


그림 44. 항원단백질(M2HA2)과 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda를 이용한 in vivo 효능평가 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군								
Groups		Inoculum				Inoculum Volume	Route	No. of Mice For challenge
		Antigen	PWRS vp3	PWRS IFN λ	PBS			
1	PBS	-	-	-	100 μL	100 μL	I.M	5
2	M2HA2	30 μL	-	-	70 μL	100 μL	I.M	5
3	M2HA2+ PWRS vp3	30 μL	15 μg (30 μL)	-	40 μL	100 μL	I.M	5
4	M2HA2+PWRS IFN λ	30 μL	-	15 μg (15 μL)	55 μL	100 μL	I.M	5

표 10. 항원단백질(M2HA2)과 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda를 이용한

in vivo 효능평가 시험그룹

- ◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질에 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda 단백질을 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 4가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 5마리로 구성함.
- ◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 15 μ g으로 설정하였음.
- ◎ 항원과 후보물질의 혼합은 항원 3, pWRS-VP3 또는 pWRS-IFN-lambda 단백질 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.
- ◎ 총 접종용량은 100 μ l 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 바이러스 감염을 수행하였음. influenza virus H5N2 strain 1LD50 용량의 바이러스가 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음
- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

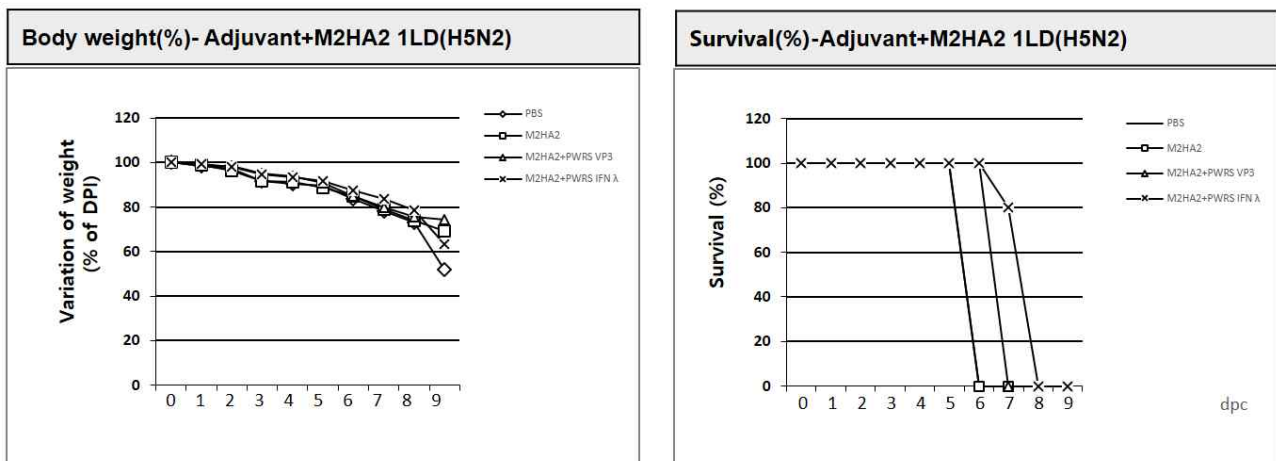


그림 45. 항원단백질과, pWRS-VP3 또는 pWRS-IFN-lambda 접종 이후 H5N2 1LD50에 대한 마우스의 체중변화와 생존율

- ◎ 실험 결과, PBS를 접종한 그룹은 6일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음. 항원 단백질을 접종한 그룹은 7일째에 모든 마우스가 폐사함.
- ◎ 후보물질인 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda 단백질을 혼합하여 접종한 그룹에서는 각각 7일째에와 8일째에 모든 마우스가 폐사함.
- ◎ 결론적으로, pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda 단백질이 혼합되어 접종된 경우에도 Influenza

A virus H5N2 strain 1LD50 감염에 대한 마우스의 생존율에 영향을 미치지지는 못하였음.

◎ 다음으로, 항원단백질 접종에 따른 항체형성에 대한 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda 단백질의 영향을 알아보기 위해 아래와 같은 일정으로 ELISA를 수행하였음. 마우스에 2주 간격으로 항원단백질과 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda를 접종의 후 아래와 같은 일정으로 혈청을 채취해 ELISA를 진행함.

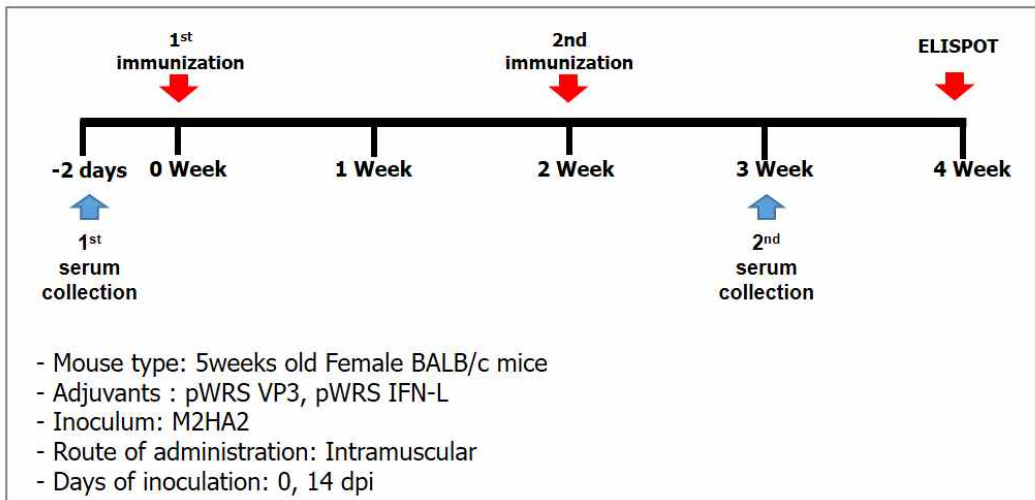


그림 46. 항원단백질(M2HA2)과 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda를 이용한 항체생성 실험일정

시험동물 대조군 및 실험군								
Groups		Inoculum				Inoculum Volume	Route	No. of Mice For ELISA
		Antigen	PWRS vp3	PWRS IFN λ	PBS			
1	PBS	-	-	-	100 μL	100 μL	I.M	3
2	M2HA2	30 μL	-	-	70 μL	100 μL	I.M	3
3	M2HA2+ PWRS vp3	30 μL	15 μg (30 μL)	-	40 μL	100 μL	I.M	3
4	M2HA2+PWRS IFN λ	30 μL	-	15 μg (15 μL)	55 μL	100 μL	I.M	3

표 11. 항원단백질(M2HA2)과 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda를 이용한 ELISA 시험그룹

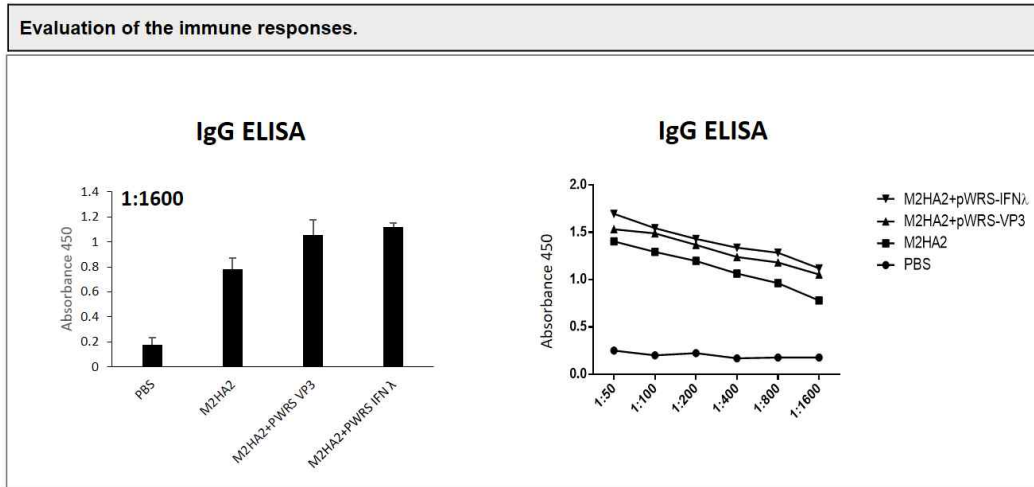


그림 47. 항원단백질(M2HA2)과 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda 단백질 접종 이후 ELISA를 통한 항체가 측정

- ◎ 실험 결과, 항원단백질(M2HA2)만 단독으로 접종한 마우스 실험그룹에 비해 pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda 단백질을 함께 접종한 그룹에서 항체형성이 증가했음을 확인하였음.
- ◎ 결론적으로, pWRS-VP3, pWRS-IFN-lambda 단백질은 항원단백질 접종에 의한 항체형성을 증가시키는 등의 효능이 확인되어 향후 면역보좌제와 혼합하여 백신의 효능을 증강시킬 수 있는 면역증강제로 활용할 수 있으리라 사료됨.

2. 천연물 기반 신규의 면역증강 물질 개발

1) 천연물 기반 단일물질 Q의 효능시험

- ◎ 본 연구진은 수년전부터 천연 한방생약소재 약 300여종의 추출물을 이용하여 항원제시세포 (Antigen presenting cell; macrophage, dendritic cell)를 포함하는 면역세포를 자극함으로써 선천면역(Innate immunity)을 증가시킬 수 있는 한방생약소재들을 screening 하였고 그 중 하나인 EYK (본 계획서에는 EYK라고 표현함 - 현재 특허출원 준비를 하고 있음)가 면역세포를 자극하여 선천면역과 관련한 cytokine의 분비능력이 탁월하였음.
- ◎ 본 연구진은 EYK 추출물로부터 면역세포를 자극하여 선천면역을 유도하는 단일물질 Q(본 계획서에는 Q라고 표현함 - 현재 특허출원 준비를 하고 있음)를 분리 선별하였음.
- ◎ 선별된 단일물질 Q를 항원제시세포 (APC)중 하나인 Raw264.7 macrophage 세포에 농도별로 처리를 한 후 분비되는 인터페론과 염증성 사이토카인을 각각의 ELISA kit로 확인을 한 결과 단일물질 Q의 농도와 비례한 자극에 의해 상당한 양의 인터페론- β , 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 등의 분비를 확인할 수 있었음.

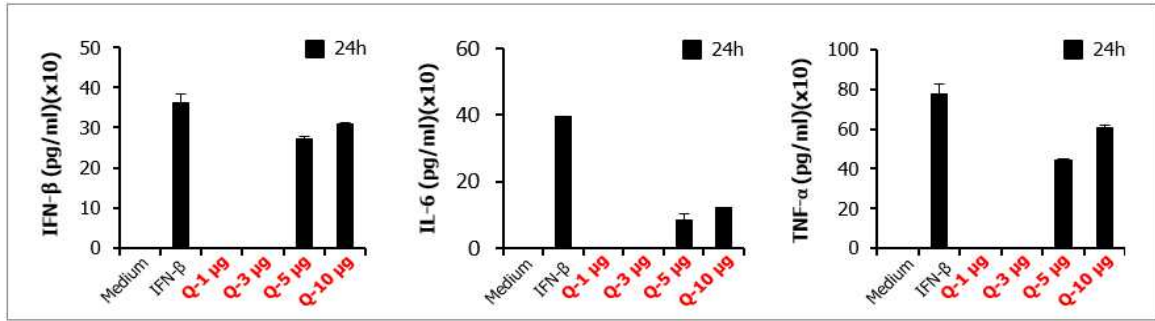


그림 48. 단일물질 Q의 자극에 의한 Raw264.7 세포에서의 사이토카인 분비

◎ 면역세포의 선천면역이 작동이 되면 바이러스의 감염 즉 바이러스의 증식을 억제할 수 있음. 이를 증명하기 위해 단일물질 Q로 자극을 시킨 Raw264.7 macrophage 세포에 복제시 GFP (Green Fluorescence protein)을 타나내는 바이러스인 Influenza virus (PR8-GFP)를 감염 시킨 후 각 바이러스의 증식 정도를 확인하였음.

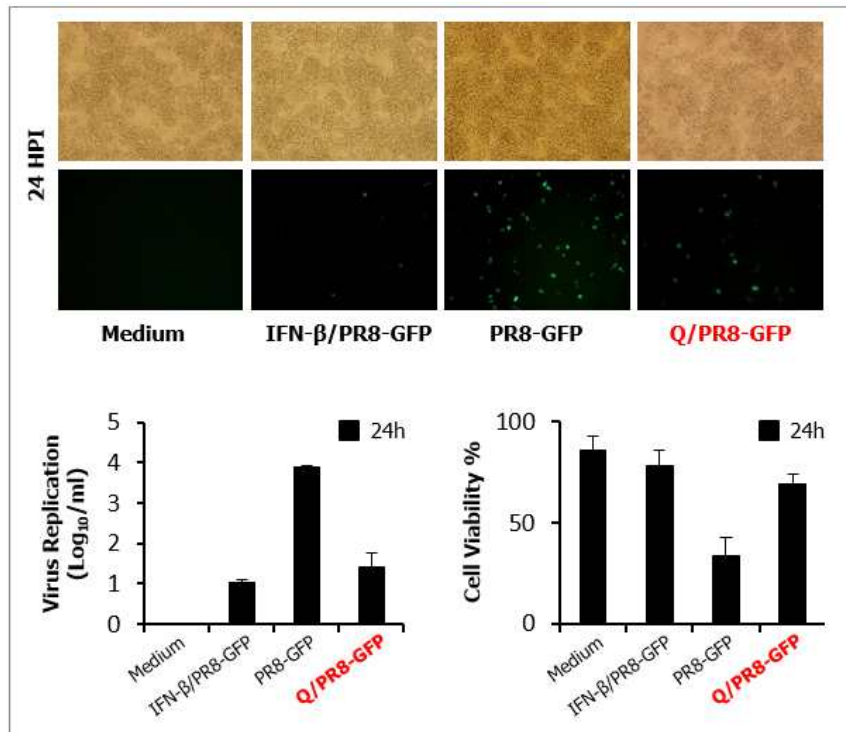


그림 49. 단일물질 Q의 자극에 의한 macrophage 세포에서의 바이러스 증식 억제

◎ 그 결과 그림에서 보는바와 같이 단일물질 Q로 자극을 받은 면역세포에서는 바이러스 증식이 저해됨을 확인할 수 있었음. 이는 단일물질 Q로 자극을 받아 활성화된 면역세포의 선천면역이 바이러스의 증식을 억제한 것임.

◎ 결론적으로 선별된 단일물질 Q는 면역세포인 항원제시세포 (APC)의 자극을 유도하여 숙주의 선천면역을 활성화시켜 병원체의 침입을 막으며 더 나아가 적응면역을 활성화시킬 수 있음.

◎ 단일물질 Q의 면역 활성화기능은 백신의 면역을 증강시키기 위한 새로운 방법이 될 수 있음

리라 사료되며 면역증강제(Immune stimulator)로의 기능을 확인 할 예정임.

- ◎ 본 연구진에 의해 선별된 단일물질 Q는 현재 100mg 당 약 700원으로 상용화되어 있는 물질로 경제적인 면에 있어서도 그 장점이 있음.

2) Chicken bone marrow derived macrophages를 이용한 면역증강 후보물질 탐색

- ◎ 앞선 In vivo 실험들과 시험 닭의 BMDM을 이용한 WRS 효능 검증 실험에서 WRS가 시험닭에서 백신보조제로써 사용되기 어려움이 확인되었음.
- ◎ 이러한 이유로 WRS를 대체할 수 있는 새로운 후보물질의 탐색을 수행하였음. 후보물질 탐색에는 아래의 표와 같이 다양한 종류의 물질을 사용함. 본 물질들은 모두 마우스 면역세포에서 선천면역을 자극하여 면역활성을 조절함이 사전에 검증되어 있는 물질들임.
- ◎ 이를 위해 chicken의 Femur bone와 Tibia bone으로부터 분리한 골수세포를 Macrophage로 분화시켜 3차실험에 사용된 후보 물질을 포함한 다양한 종류의 후보물질을 24시간동안 아래의 표와 같이 처리하였음.

chicken BMDMs - screening											
Treat Time	N/C	LPS	Poly(I:C)	BSA218	SL153	OVM		OVM-crude		GRA7	
24hr	Media only	100ng/ml	20µg/ml	5X10 ⁸	5X10 ⁸	3µg/ml	5µg/ml	3µg/ml	5µg/ml	3µg/ml	5µg/ml

Treat Time	W175	W272	W308	W314	W162		W263		W277		W364	
24hr	5%	5%	5%	5%	3%	5%	3%	5%	3%	5%	3%	5%

Treat Time	EYK	황련	고본	황백	고련피	Bee Venom		Berberin		Quercetin	
24hr	3%	1%	1µg/ml	1µg/ml	1%	3µg/ml	5µg/ml	50 µM	100 µM	50 µM	100 µM

표 12. Chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색

- ◎ BSA218과 SL153 strain의 배양액은 antiviral effect를 가지며, 그 결과는 면역세포 자극에 의한 사이토카인 분비에서 나타나는 것이 실험적으로 이미 검증되어 있음.
- ◎ OVM과 OVM-crude, GRA7은 재조합 단백질 및 재조합 단백질을 발현하는 대장균임. W175, W272, W308, W314, W162, W263, W277, W364, EYK, 황련, 고본, 황백, 고련피는 천연생약추출물이며 이외에도 Bee Venom, Berberin, Quercetin등의 물질이 탐색에 이용되었음.
- ◎ 처리 농도는 상기의 표와 같으며 모두 앞서 수행되었던 실험 프로토콜을 기반으로 정립하였음. 실험 결과 분석을 위해 세포와 세포 상층액을 샘플링하였으며 세포에서는 real time

PCR, 상층액에서는 cIFN-alpha ELISA가 수행되었음.

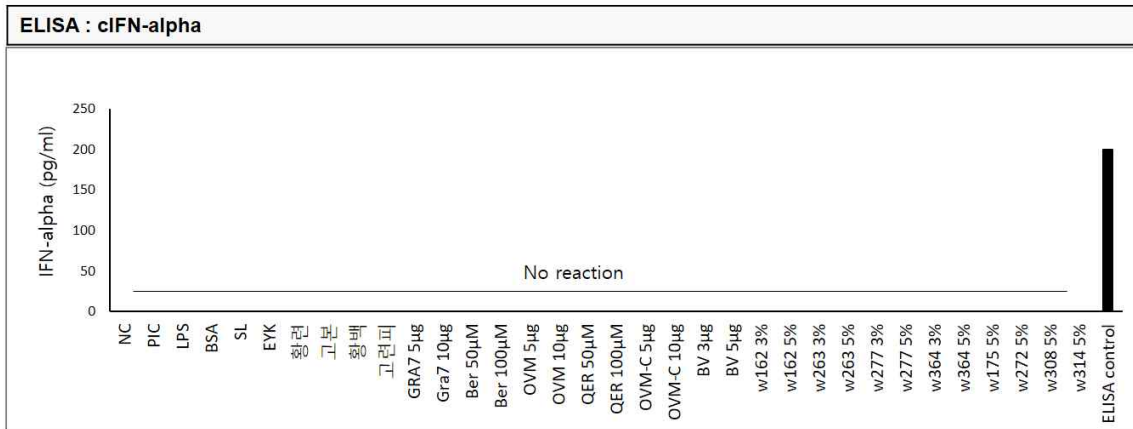
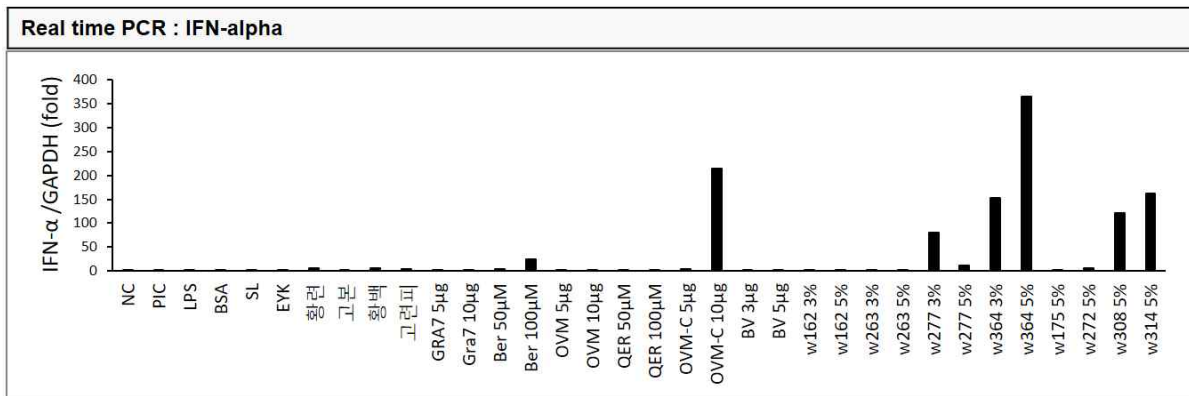


그림 50. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : chicken IFN-alpha ELISA

◎ ELISA 실험 결과, 전체의 샘플에서 반응이 검출되지 않았음. 이는 사용중인 chicken ELISA kit의 민감도가 낮거나 자극에 의한 분비량이 적을 가능성을 내포함.



NC	PIC	LPS	BSA	SL	EYK	황련	고분	황백	고련피
1	0.54	0.71	0.44	0.44	0.5	6.06	0.72	5.02	4.02

GRA7 5µg	GRA7 10µg	Ber 50µM	Ber 100µM	OVM 5µg	OVM 10µg	QER 50µM	QER 100µM	OVM-C 5µg	OVM-C 10µg	BV 3µg	BV 5µg
0.24	0.31	3.38	23.75	0.22	0.93	1.48	0.27	3.26	213.75	0.28	0.15

w162 3%	w162 5%	w263 3%	w263 5%	w277 3%	w277 5%	w364 3%	w364 5%	w175 5%	w272 5%	w308 5%	w314 5%
0.415	0.635	0.553	0.5	79.509	11.448	152.74	364.299	0.83	5.113	121.132	162.561

그림 51. Chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : chicken IFN-alpha real time PCR

◎ 유전자적인 분석을 위해 세포 cBMDM을 이용한 real time PCR을 수행하였음.

◎ 실험 결과, Berberine, OVM-crude, W277, W364, W308, W314를 자극한 세포에서 GAPDH 대비 IFN-alpha의 증가를 유전자 수준에서 확인하였음.

◎ 실험 결과의 보다 정확한 확인을 위해 다른 종류의 GAPDH primer를 재합성하여 추가 실험

을 진행함.

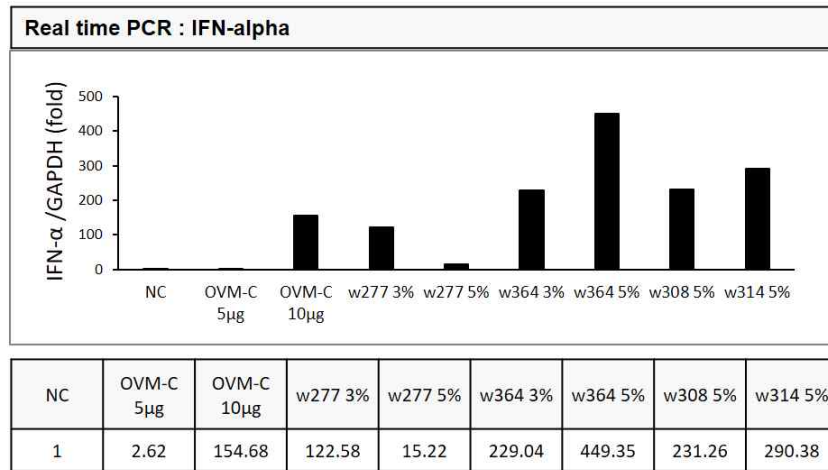


그림 52. Chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : chicken IFN-alpha real time PCR

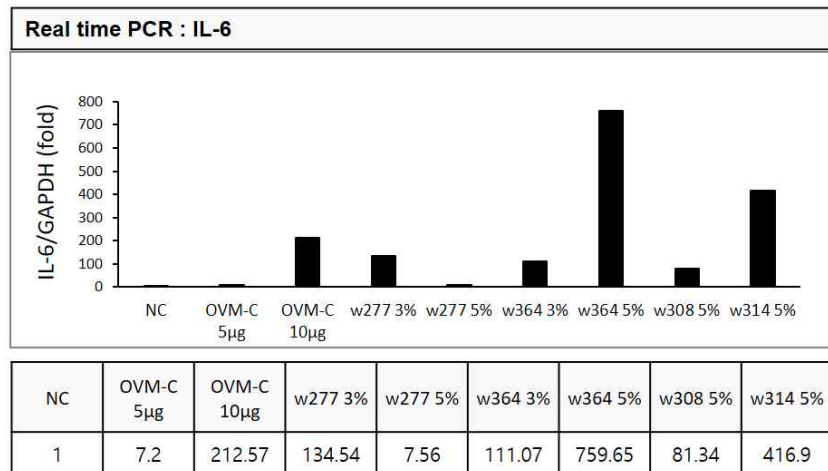


그림 53. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : chicken IFN-alpha real time PCR

- ◎ 실험 결과, 처음과 마찬가지로 IFN-alpha가 증가하는 것이 확인되었음. 또한 IL-6의 유전자 역시 동일한 양상으로 증가하는 것이 확인되었음.
- ◎ 결론적으로, OVM-crude, W277, W364, W308, W314가 닭에서의 면역 반응을 자극해 사이토카인 유전자의 증가를 나타낼 수 있음이 확인되었음.

W277				W314				Zymosan				Poly(I:C)				Berberine			
1	3	5	10 (%)	1	3	5	10 (%)	100	200	400	800 (ug)	40	80	160	320 (ug)	50	100	200	400 (uM)

W175	W272	W308	W162	W263	W364
5	5	5	5	5	5 (%)

BSA218		SL153		Control	
5*10^8	1*10^9	5*10^8	1*10^9	NC	NC

EYK (%)		황련 (%)			고본 (ug/ml)			황백 (ug/ml)			#B (%)		
3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5

표 13. Chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색

- ◎ 후보물질의 추가 탐색과 정확한 후보물질 도출을 위해 chicken의 Femur bone와 Tibia bone으로부터 분리한 골수세포를 Macrophage로 분화시켜 이전 실험에 사용된 후보 물질을 포함한 다양한 종류의 후보물질을 24시간동안 표와 같이 처리하였음.
- ◎ 후보물질의 탐색에는 상기의 탐색에 사용된 W175, W272, W308, W314, W162, W263, W277, W364, EYK, 황련, 고본, 황백, 고련피와 같은 천연추출물, BSA218과 SL153이 사용되었음. 세포의 면역반응이 잘 일어났는지에 대한 확인을 위해 TLR ligand인 Zymosan, Poly(I:C)가 함께 사용되었음.
- ◎ 처리 농도는 상기의 표와 같으며 모두 앞서 수행되었던 실험 프로토콜을 기반으로 정립하였음. 실험 결과 분석을 위해 세포를 샘플링하여 real time PCR을 수행하였음.

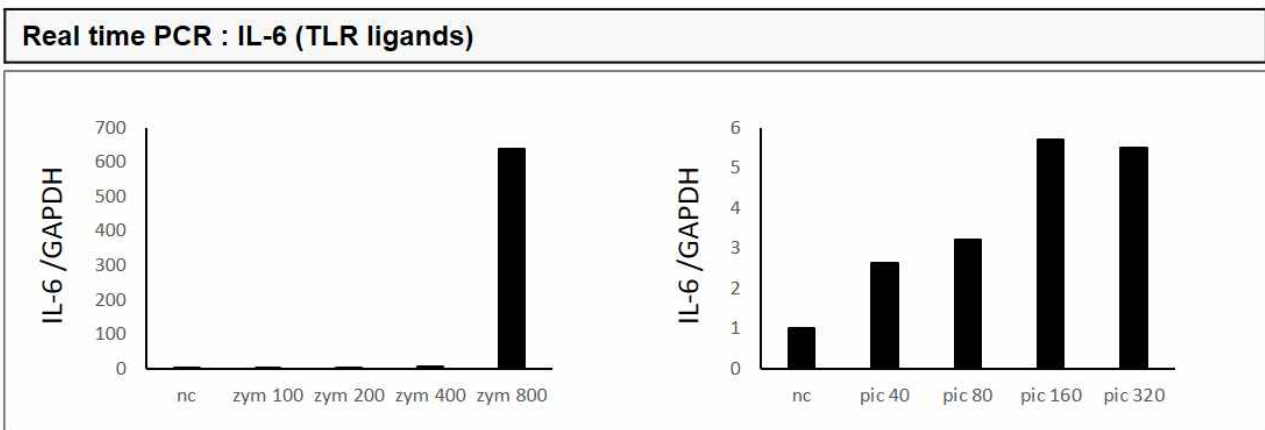


그림 54. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : TLR ligands

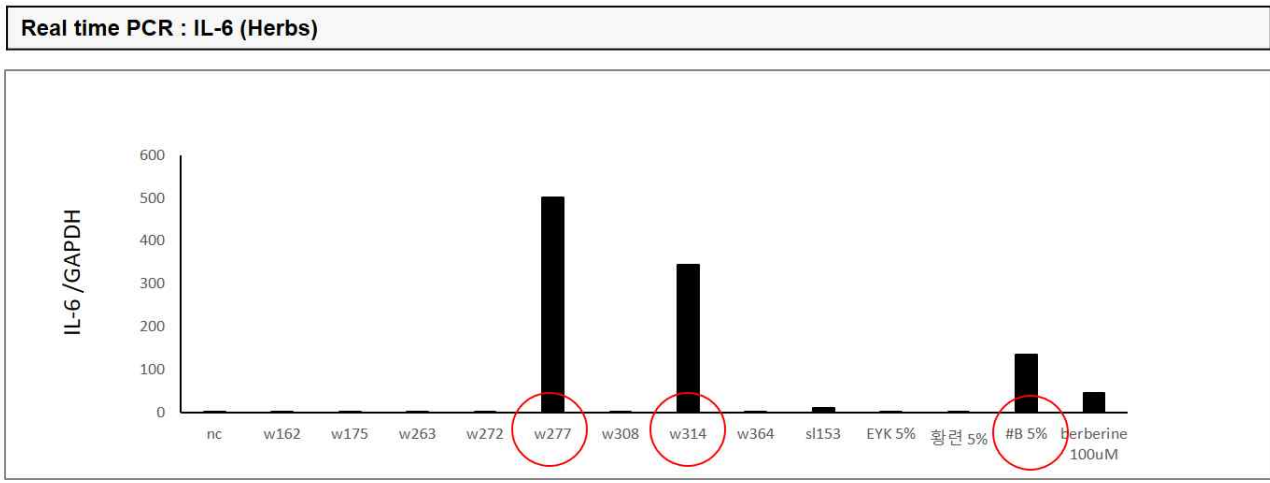


그림 55. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : chicken IL-6 real time PCR

◎ 실험 결과, TLR ligand인 Zymosan과 Poly(I:C)의 처리 농도가 늘어감에 따라 농도에 비례하게 세포 내에서 IL-6 mRNA expression level이 증가하였음. 즉, 세포에서 정상적으로 면역 반응이 일어남을 확인하였음.

◎ 천연추출물질을 처리한 세포에서 측정된 real time PCR에서는 W277과 W314, 고려피가 높은 수준의 IL-6 gene induction을 나타내었음. 위 실험결과를 기반으로 하여 W277과 W314, 고려피를 농도에 따라 처리한 세포를 이용해 real time PCR을 수행하였음.

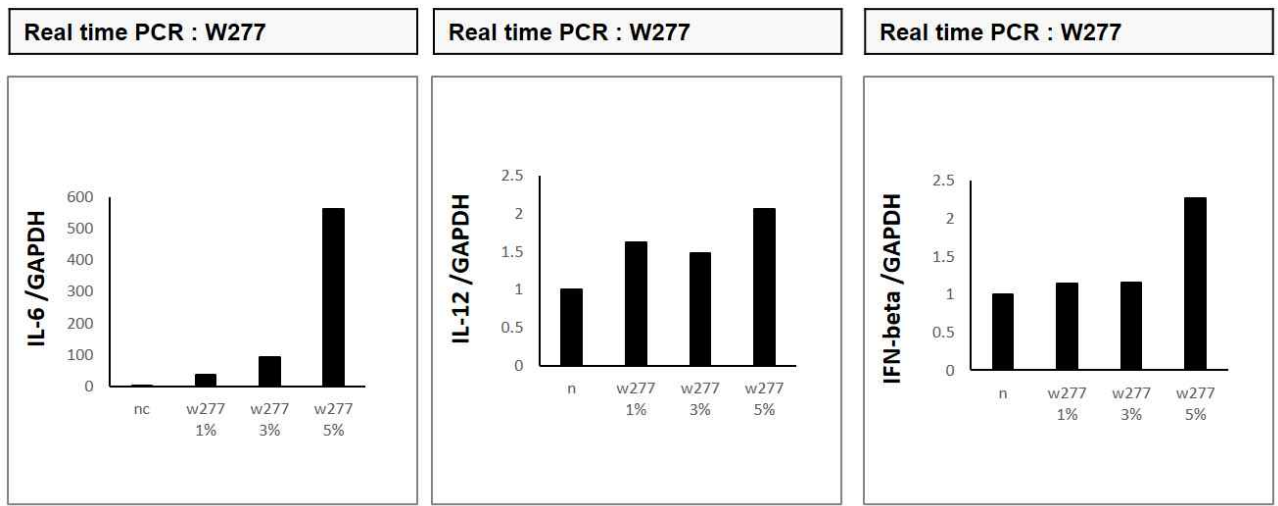


그림 56. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : W277

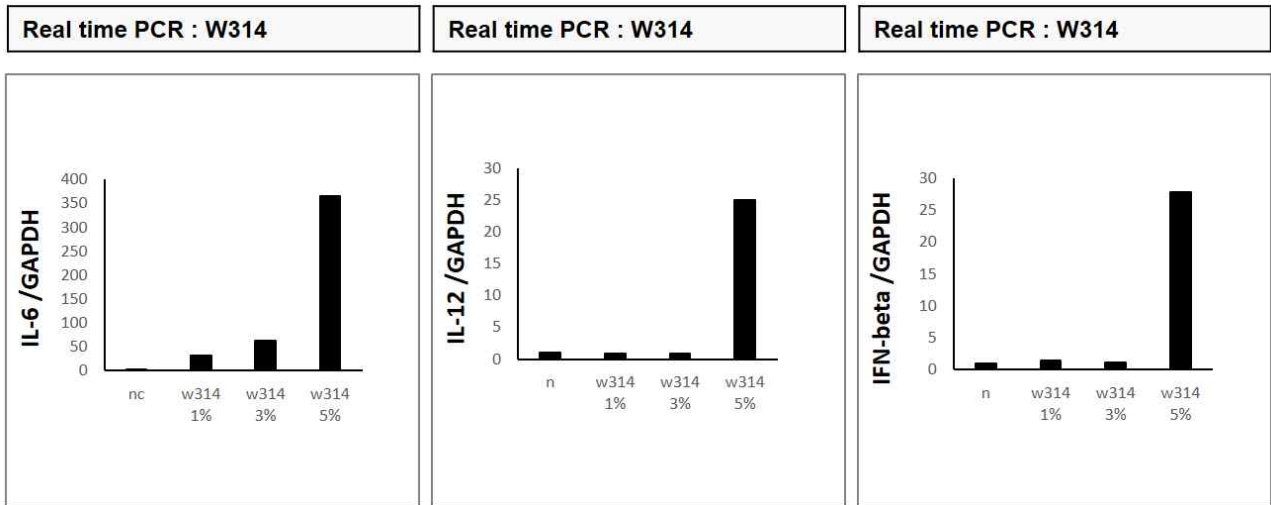


그림 57. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : W314

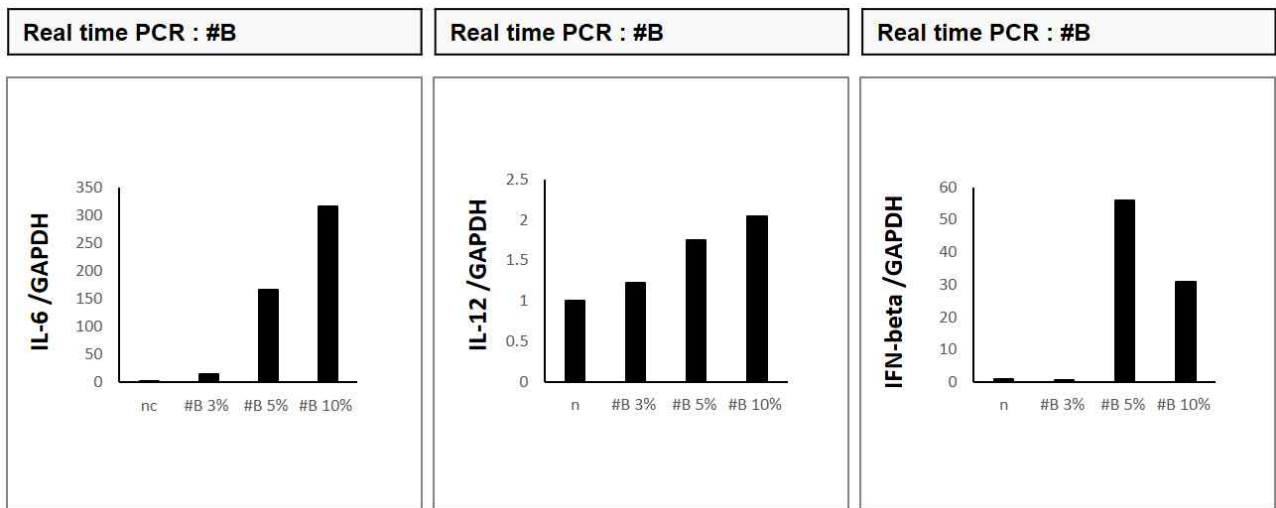


그림 58. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : 고련피

- ◎ 각각의 천연추출물질을 농도별로 처리한 chicken BMDM의 cDNA에서 real time PCR을 수행하였으며, 타겟 유전자로는 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-12, 1형 인터페론인 IFN-beta를 각각 측정하였음.
- ◎ W277의 경우 모든 사이토카인을 증가시켰으나 IL-12나 IFN-beta에 비해 IL-6를 높은 수준으로 유도하였음. W314는 세 종류의 사이토카인을 모두 높은 수준으로 유도하였으며 고련피의 경우는 IL-12의 발현이 낮았고 IL-6와 IFN-beta를 잘 유도하였음. 고련피 10% 처리군에서의 결과는 고농도 처리에 따른 side effect로 사료됨.
- ◎ 결론적으로, 본 실험에서는 최종적인 천연물 유래 면역증강 물질로 W314를 선별 확보하여 면역증강 효능을 검증하였음.

3) 천연물 W314에 의한 면역증강 효능 검증

◎ 상기의 실험 결과를 바탕으로, 모든 종류의 사이토카인을 균일하게 증가시킨 W314에 대한 in vivo 시험을 진행하였음. 시험은 M2HA2접종에 따른 H5N2 감염 모델을 사용하여 진행하였음.

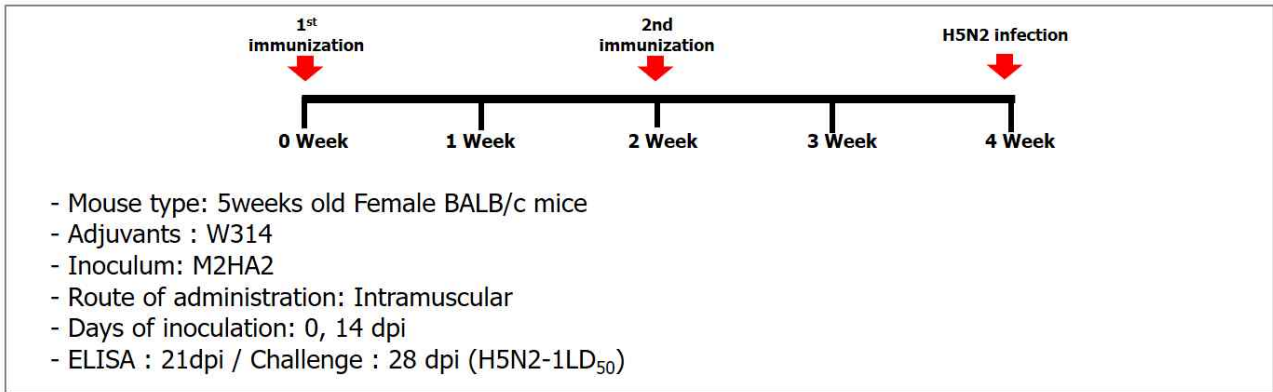


그림 59. 항원단백질(M2HA2)과 천연추출물(W314)를 이용한 in vivo 효능평가 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군					
	M2HA2	Herb W277 (1mg/ml)	Total amount	Inoculation time	For Challenge
PBS	-	-	100ul	2	5 heads
M2HA2	30ul(15ug)	70ul	100ul	2	5 heads
M2HA2+W314	30ul(15ug)	70ul	100ul	2	5 heads

표 13. 항원단백질(M2HA2)과 천연추출물(W314)를 이용한 in vivo 효능평가 시험그룹

◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질에 W314 추출물을 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 3가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 5마리로 구성함.

◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 15μg으로 설정하였음.

◎ 항원과 후보물질의 혼합은 항원 3, W314 추출물 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.

◎ 총 접종용량은 100μl 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 바이러스 감염을 수행하였음. influenza virus H5N2 strain 1LD50 용량의 바이러스가 이용되었으며

마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음

- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

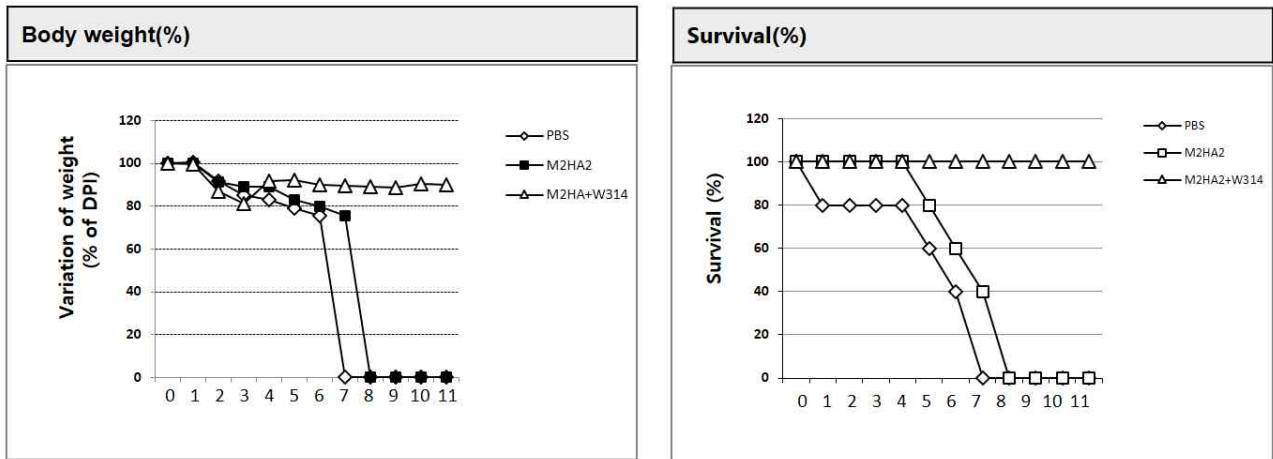


그림 60. 항원단백질, W314 추출물 접종 이후 H5N2 1LD50 감염에 대한 마우스의 체중변화와 생존율

- ◎ 실험 결과, PBS를 접종한 그룹은 7일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음. 항원 단백질을 접종한 그룹은 8일째에 모든 마우스가 폐사함.
- ◎ 후보물질인 W314 추출물을 혼합하여 접종한 그룹에서는 시험 종료 일시까지 100%의 생존율을 나타내었음. W314 혼합 접종 그룹에서는 단 3일째까지만 체중의 감소가 일어났으며 그 이후로는 체중이 증가하여 회복하였음.
- ◎ 결론적으로, W314 추출물이 혼합되어 접종될 경우, Influenza A virus H5N2 strain 1LD50 감염에 대한 마우스의 생존율을 크게 향상하였음. W314 추출물에 의해 항원단백질의 백신능이 크게 향상되었음.
- ◎ 다음으로, 항원단백질 접종에 따른 항체형성에 대한 W314 추출물의 영향을 알아보고자 아래와 같은 일정으로 ELISA를 수행하였음. 마우스에 2주 간격으로 항원단백질과 W314 추출물을 접종한 후 아래와 같은 일정으로 혈청을 채취해 ELISA를 진행함.

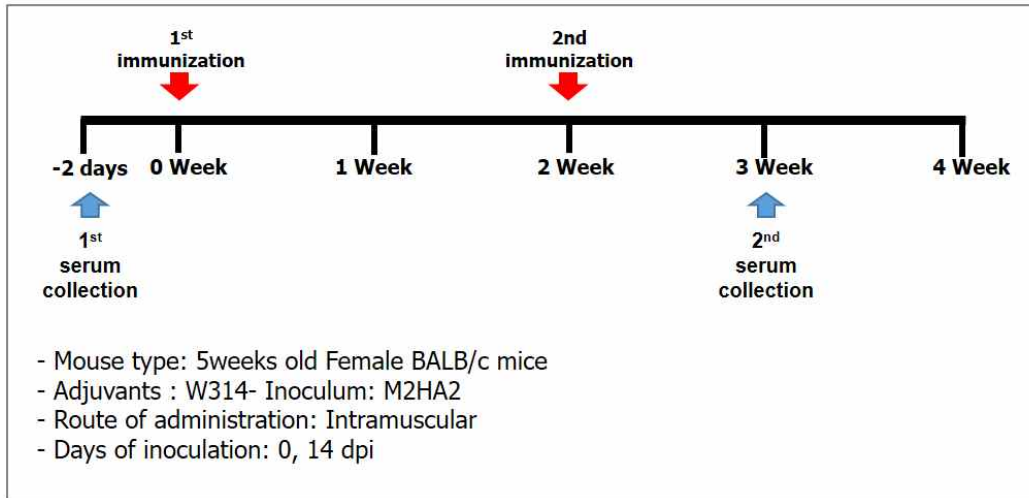


그림 61. 항원단백질(M2HA2)과 W314 추출물을 이용한 ELISA 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군					
	M2HA2	Herb W277 (1mg/ml)	Total amount	Inoculation time	mice
PBS	-	-	100ul	2	5 heads
M2HA2	30ul(15ug)	70ul	100ul	2	5 heads
M2HA2+W314	30ul(15ug)	70ul	100ul	2	5 heads

표 14. 항원단백질(M2HA2)과 W314 추출물을 이용한 ELISA 시험그룹

- ◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질을 접종한 그룹, 항원단백질에 W314 추출물을 혼합하여 접종한 그룹, 도합 3가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 5마리로 구성함.
- ◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 15 μ g으로 설정하였음. 항원과 백신보좌제의 혼합은 항원 3, 백신보좌제 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.
- ◎ 총 접종용량은 100 μ l 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 실험을 수행하였음. 1, 3주째에 안와정맥에서 혈액을 샘플링하였음. 샘플링한 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리한 후 항원단백질을 코팅해 ELISA를 수행하여 혈청 내의 항체를 측정하였음.

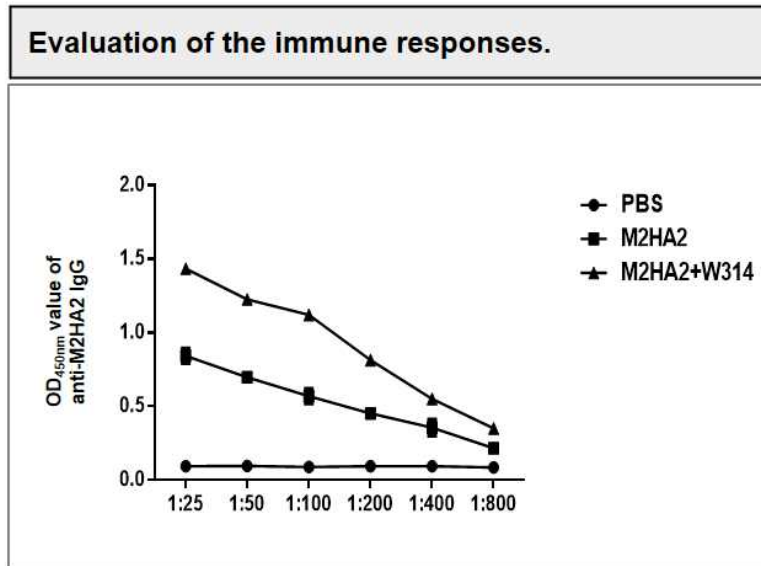


그림 62 항원단백질, W314 추출물 접종 이후 ELISA를 통한 항체가 측정

- ◎ 실험 결과, 3주째 샘플링한 혈청에서 항원단백질에 대한 항체가 생성되는 것이 확인되었음. W314 추출물을 접종한 그룹에서는 항원단백질만 접종한 그룹에 비해 아주 높은 수준의 항체가를 나타내었음. 1:25에서 1:800까지의 희석 배수를 적용시켜 각각에 대해 ELISA를 수행한 결과, 모든 희석 배수에서 같은 경향이 확인되었음.
- ◎ 결론적으로, 본 실험에서는 천연물 유래 면역증강 물질인 W314의 면역증강 효능을 검증하였음.

4) Chitosan, Squalene의 면역증강 효능 검증

- ◎ 가금 백신보조제의 역할을 수행할 수 있는 새로운 후보물질로 도출된 Chitosan과 Squalene의 조류 세포에서의 효능을 chicken BMDM에서 확인하였음. chicken BMDM을 분리, 배양하여 준비한 다음 아래의 그림과 같은 농도로 세포에 24시간동안 처리하였음.

NC	Chitosan			Squalene		
	SQ 1X10*5	SQ 5X10*5	SQ 1X10*6	Chi 10	Chi 25	Chi 100
PBS						

표 15. Chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색

- ◎ 24시간동안 각각의 농도로 chitosan과 squalene을 처리한 후, 세포독성이 없는 것을 확인하였음. 이후 세포를 샘플링해 mRNA를 추출한 다음 cDNA를 합성해 각각의 유전자 발현을 real time PCR을 통해서 측정함.

◎ 타겟 유전자로는 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-12, 1형 인터페론인 IFN-beta와 IFN-alpha를 각각 측정하였음.

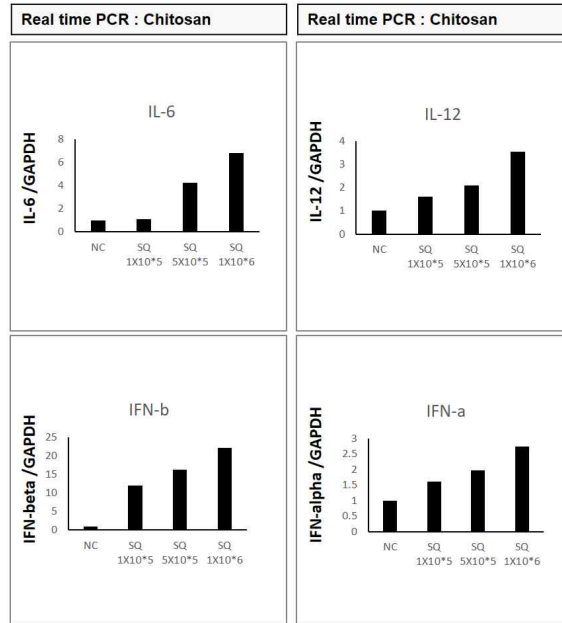


그림 63. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : Chitosan

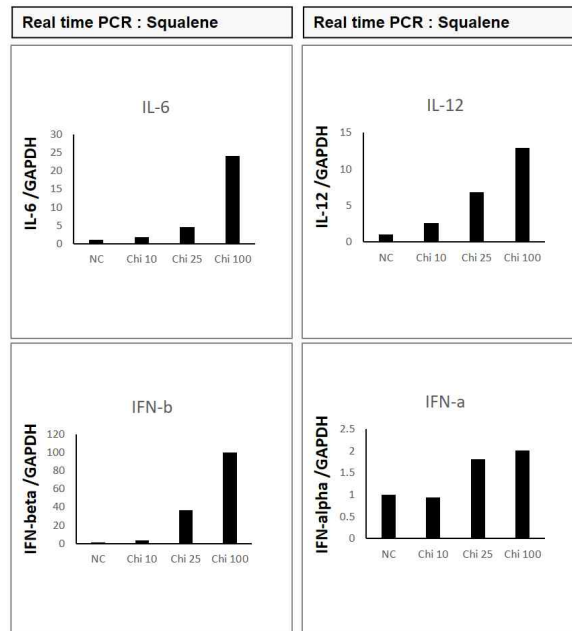


그림 64. chicken BMDM을 이용한 후보물질탐색 : Squalene

◎ 실험 결과, 두 가지 물질 모두 IL-6, IL-12, IFN-beta와 IFN-alpha의 유전자 레벨을 처리 농도에 비례하게 증가시켰음. Chitosan의 경우 IFN-beta를 높은 수준으로 증가시켰으며 Squalene의 경우는 IFN-beta, IL-12와 IL-6를 모두 높은 수준으로 증가시켰음.

◎ 즉, 두 가지 후보물질 모두 조류에서 면역을 유도하는 것이 확인되었음. 세포에서의 실험 결과를 바탕으로 in vivo test를 진행하였음.

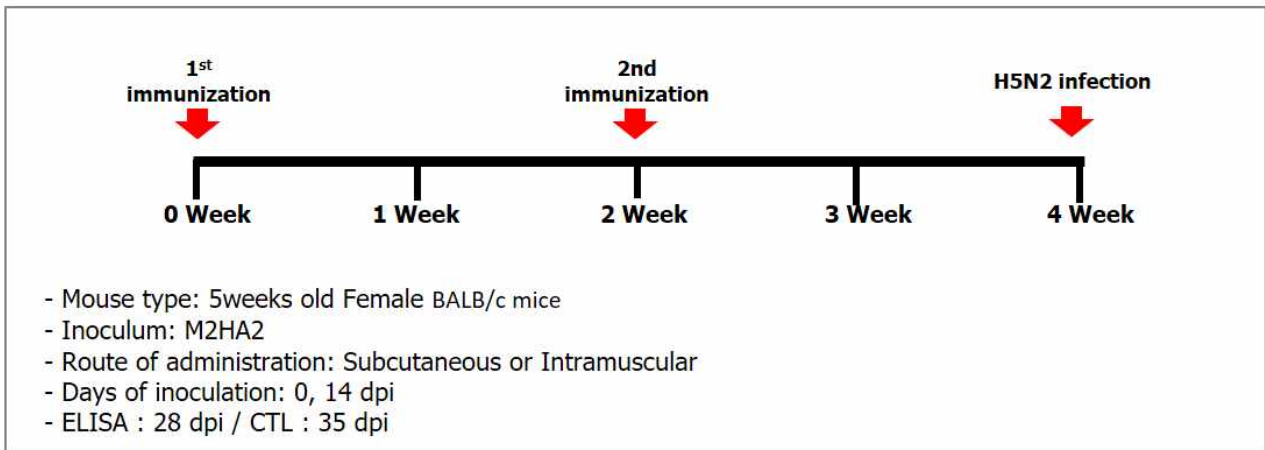


그림 65. 항원단백질(M2HA2)과 Chitosan, Squalane을 이용한 in vivo 효능평가 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군						
	M2HA2	PBS/Herb (1mg/ml)		Total amount	Inoculation time	Challenge
PBS	-	-		100ul	2	4 heads
M2HA2	30ul(15ug)	70ul		100ul	2	4 heads
M2HA2+chitosan	30ul(15ug)	70ul	1,000(ug/ml)	100ul	2	4 heads
M2HA2+squalene	30ul(15ug)	70ul	2*10 ⁸ (CFU/ml)	100ul	2	4 heads

표 16. 항원단백질(M2HA2)과 Chitosan, Squalane을 이용한 in vivo 효능평가 시험그룹

◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질에, Chitosan, Squalane을 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 4가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 4마리로 구성함.

◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 15µg으로 설정하였음.

◎ 항원과 후보물질의 혼합은 항원 3, 후보물질 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.

◎ 총 접종용량은 100µl 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 바이러스

감염을 수행하였음. influenza virus H5N2 strain 1LD50 용량의 바이러스가 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음

- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

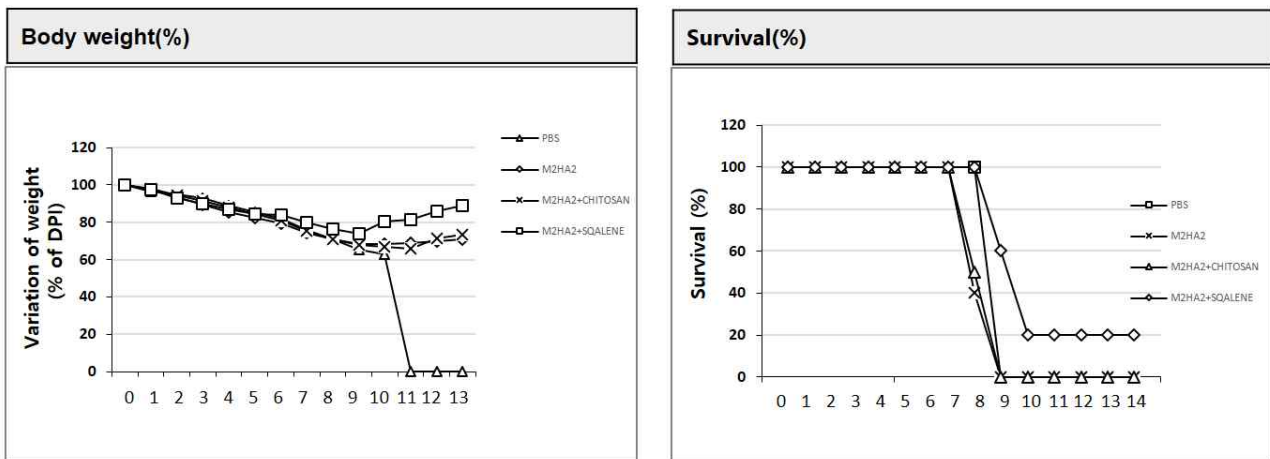


그림 66. 항원단백질과 Chitosan, Squalene 접종 이후 H5N2 1LD50에 대한 마우스의 체중변화와 생존율

- ◎ 실험 결과, PBS를 접종한 그룹은 9일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음.
- ◎ 후보물질인 Chitosan의 경우 대조군과 마찬가지로 모든 마우스가 폐사하였음. Squalene의 경우 20%의 생존율을 나타내었음.
- ◎ 결론적으로, Chitosan과 Squalene 두 가지 후보물질 모두 만족스러운 효능을 보이지 못하였으나 이 결과는 면역보좌제 (adjuvant)가 포함되지 않은 실험으로 Chitosan과 Squalene의 면역증강 효능의 정도차이 문제임.
- ◎ 다음으로, 항원단백질 접종에 따른 항체형성에 대한 후보물질들의 영향을 알아보기 위하여 아래와 같은 일정으로 ELISA를 수행하였음. 마우스에 2주 간격으로 항원단백질과 후보물질을 접종한 후 아래와 같은 일정으로 혈청을 채취해 ELISA를 진행함.

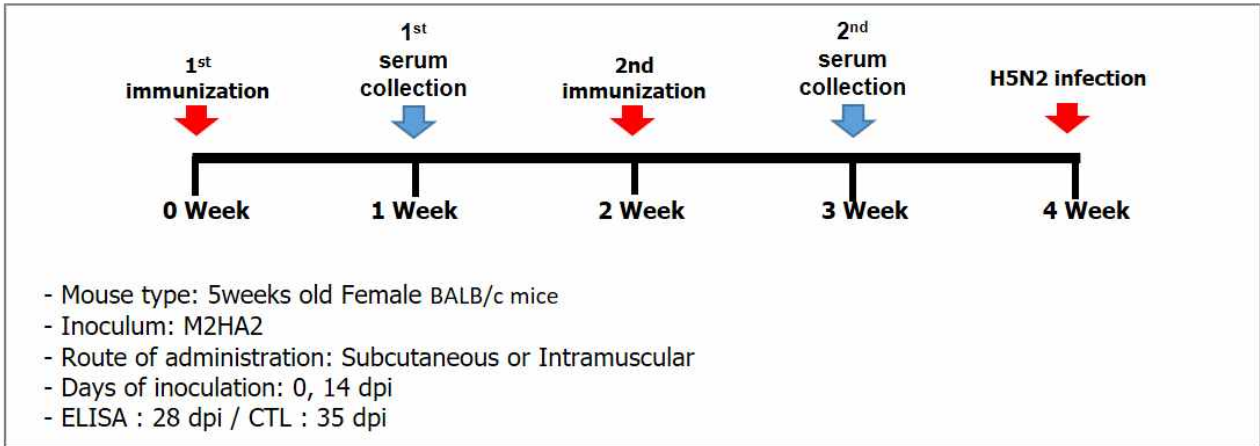


그림 67. 항원단백질(M2HA2)과 Chitosan, Squalane을 이용한 ELISA 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군						
	M2HA2	PBS/Herb (1mg/ml)		Total amount	Inoculation time	ELISA
PBS	-	-		100ul	2	4 heads
M2HA2	30ul(15ug)	70ul		100ul	2	4 heads
M2HA2+chitosan	30ul(15ug)	70ul	1,000(ug/ml)	100ul	2	4 heads
M2HA2+squalene	30ul(15ug)	70ul	2*10 ⁸ (CFU/ml)	100ul	2	4 heads

표 17. 항원단백질(M2HA2)과 Chitosan, Squalane을 이용한 ELISA 시험그룹

- ◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질을 접종한 그룹, 항원단백질에 후보물질 또는 W314 추출물을 혼합하여 접종한 그룹, 도합 5가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 4마리로 구성함.
- ◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 15µg으로 설정하였음. 항원과 백신보좌제의 혼합은 항원 3, 후보물질 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.
- ◎ 총 접종용량은 100µl 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 실험을 수행하였음. 1, 3주째에 안와정맥에서 혈액을 샘플링하였음. 샘플링한 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리한 후 항원단백질을 코팅해 ELISA를 수행하여 혈청 내의 항체를 측정하였음.

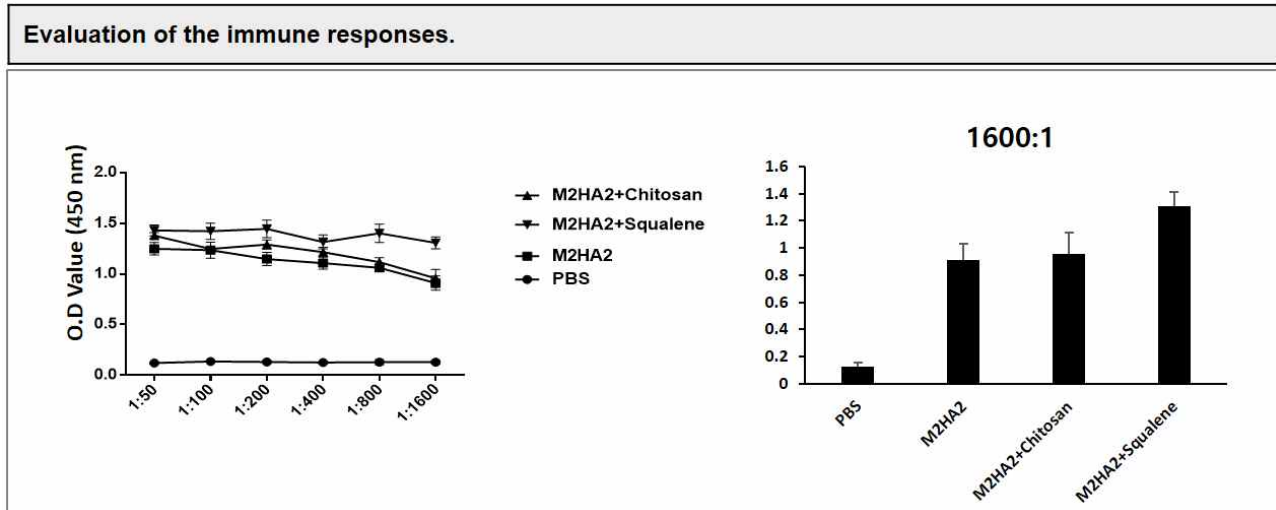


그림 68. 항원단백질(M2HA2)과 Chitosan, Squalene 접종 이후 ELISA를 통한 항체가 측정

- ◎ 실험 결과, 3주째 샘플링한 혈청에서 항원단백질에 대한 항체가 생성되는 것이 확인되었음. Squalene을 접종한 그룹에서는 항원단백질만 접종한 그룹에 비해 높은 수준의 항체를 나타내었음.
- ◎ 결론적으로 상기의 결과들을 종합하면 후보 물질로 도출된 Chitosan과 Squalene은 항원에 대한 항체의 상승을 유도할 수 있는 면역증강 물질로 백신에 대한 면역증강제로의 개발이 기대됨.

3. 인플루엔자 재조합항원을 이용한 백신보좌제 면역원성 검증 및 백신 효능 검증시스템 구축

1) M2HA2-Influenza A virus infection in vivo challenge 모델을 이용한 CAWIO와 ISA70의 면역보좌제 효능비교평가

- ◎ 가금 백신보좌제 이용을 위한 CAWIO의 효능을 M2HA2-Influenza A virus infection in vivo 모델을 이용해 확인하였음.
- ◎ H1N1 strain 뿐 아니라 H5N2 strain을 이용하여 백신 보좌제의 효능을 검증하였음.

가) H1N1 감염에 대한 CAWIO와 ISA70의 효능비교평가

- ◎ 항원단백질과 백신보좌제(CAWIO, ISA70)의 효능평가를 위해 마우스에 2주 간격으로 M2HA2를 접종한 후 Influenza virus H1N1 strain의 1LD50 감염에 대해 마우스의 체중과 생존율을 아래와 같은 일정으로 실험해 비교하였음.

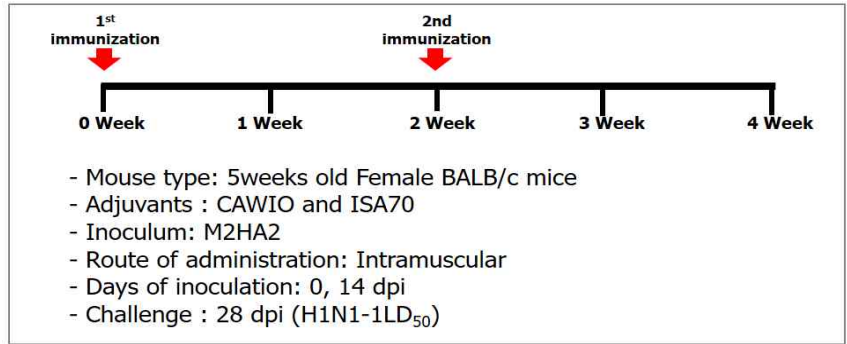


그림 69. 항원단백질(M2HA2)과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 in vivo 효능평가 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군						
		Adj.	Antigen	Total amount	Inoculation time	for Challenge
1 LD50 (H1N1)	PBS 1 LD50 (H1N1)	-	-	100ul	2	4 heads
	CAWIO+M2HA2 1 LD50 (H1N1)	CAWIO 45ul	10ug (20ul)	100ul	2	4 heads
	ISA70+M2HA2 1 LD50 (H1N1)	ISA70 45ul	10ug (20ul)	100ul	2	4 heads

표 18. 항원단백질(M2HA2)과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 in vivo 효능평가 시험그룹

- ◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질(M2HA2)에 두 종류의 백신보조제를 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 3가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 4마리로 구성함.
- ◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 10 μ g 설정하였음.
- ◎ 항원과 백신보조제의 혼합은 항원 3, 백신보조제 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock 과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.
- ◎ 총 접종용량은 100 μ l 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 바이러스 감염을 수행하였음. influenza virus H1N1 strain 1LD50 용량의 바이러스가 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음.
- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

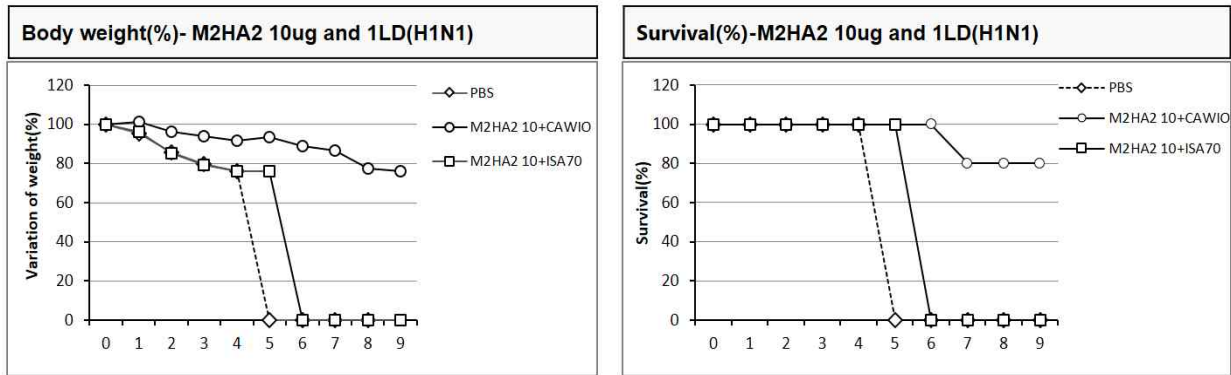


그림 70. 항원단백질, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 H1N1 1LD50에 대한 마우스의 체중변화와 생존율

- ◎ 실험 결과, PBS를 접종한 그룹은 5일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음.
- ◎ 항원단백질과 ISA70를 혼합하여 접종한 실험그룹에서는 PBS 접종그룹보다 약간 늦은 6일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음.
- ◎ 반면 CAWIO를 혼합하여 접종한 그룹에서는 7일째에 한 마리의 마우스가 폐사하였으나 이후 모든 마우스가 생존하였음.
- ◎ 결론적으로, 항원단백질이 CAWIO와 혼합되어 접종된 경우, Influenza A virus H1N1 strain 1LD50 감염에 대한 마우스의 생존율을 크게 향상하였음. 이는 CAWIO에 의해 항원단백질의 백신능이 향상되었음을 의미하며 기존의 백신보좌제 ISA70과 비교해도 높은 향상을 보여주는 결과임.

2) H5N2 감염에 대한 CAWIO와 ISA70의 효능비교평가

- ◎ Influenza A virus H5N2 strain에 대한 CAWIO와 ISA70의 효능을 비교 평가하기 위해 H5N2 strain의 감염용량을 결정하는 사전 실험을 아래의 표와 같이 구성하였음.

시험동물 대조군 및 실험군	
for Challenge	No.of animals
1 LD50 (H5N2)	4 heads
2 LD50 (H5N2)	4 heads
3 LD50 (H5N2)	4 heads

표 19. H5N2 감염용량 평가 시험 그룹

- ◎ Influenza virus H5N2 strain LD50의 1배, 2배, 3배 용량의 바이러스가 감염에 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음.
- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

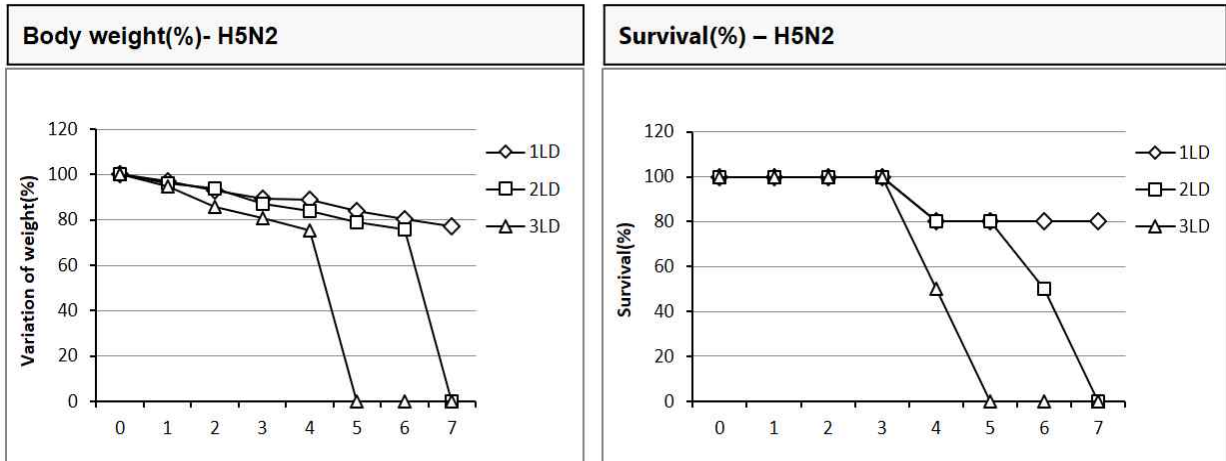


그림 71. H5N2 바이러스 1, 2, 3LD50 감염에 따른 마우스의 체중과 치사율

- ◎ Influenza A virus H5N2 strain 1, 2, 3LD50를 감염시킨 결과 바이러스 감염이 마우스에 치명적이며 용량이 증가함에 따라 마우스의 폐사 기간이 줄어드는 것을 확인하였음. 3LD50의 경우는 5일째에, 2LD50는 7일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음. 1LD50를 감염시킨 그룹은 4일째에 일부의 마우스가 폐사하였음.
- ◎ 다만, 바이러스의 감염이 마우스의 방어능보다 지나치게 강할 경우에 관찰하고자 하는 백신의 효능을 정확하게 평가하기 어렵기 때문에 본 실험결과를 토대로 앞으로의 마우스 실험에서 사용될 H5N2 strain의 감염용량은 1LD50로 결정하였음.
- ◎ 이후 항원단백질과 백신보조제(CAWIO, ISA70)의 효능평가를 위해 마우스에 2주 간격으로 항원단백질을 접종한 후 influenza virus H5N2 strain의 1LD50 감염에 대해 마우스의 체중과 생존율을 아래와 같은 일정으로 실험해 비교하였음.

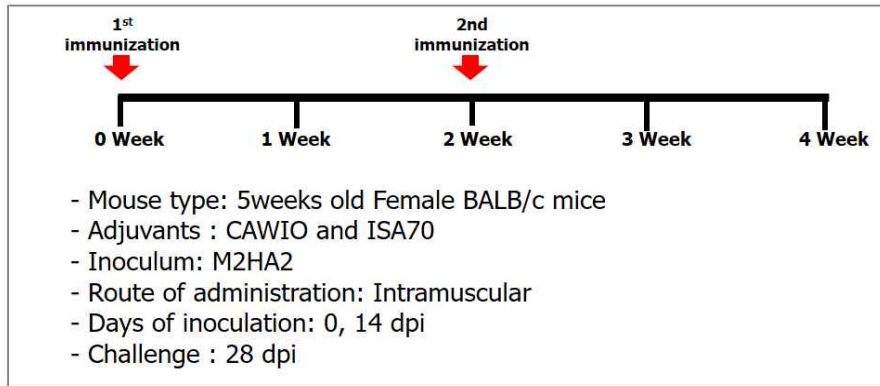


그림 72. 항원단백질(M2HA2)과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 in vivo 효능평가 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군					
	Adj.	M2HA2	Total amount	Inoculation time	for Challenge
PBS 1LD50 (H5N2)	-	-	100ul	2	4 heads
M2HA2 1 LD50 (H5N2)	-	10ug (20ul)	100ul	2	4 heads
CABIO+M2HA2 1 LD50 (H5N2)	CABIO 45ul	10ug (20ul)	100ul	2	4 heads
ISA70+M2HA2 1 LD50 (H5N2)	ISA70 45ul	10ug (20ul)	100ul	2	4 heads

표 20. 항원단백질(M2HA2)과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 in vivo 효능평가 시험그룹

- ◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질에 두 종류의 백신보조제를 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 3가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 4마리로 구성함.
- ◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 10 μ g으로 설정하였음.
- ◎ 항원과 백신보조제의 혼합은 항원 3, 백신보조제 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock 과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.
- ◎ 총 접종용량은 100 μ l 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 바이러스 감염을 수행하였음. influenza virus H5N2 strain 1LD50 용량의 바이러스가 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음
- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

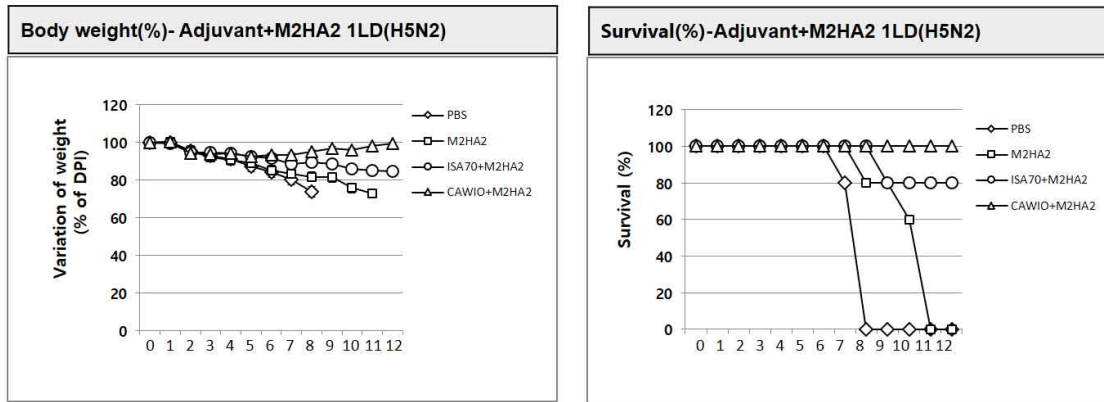


그림 73. 항원단백질, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 H5N2 1LD50에 대한 마우스의 체중변화와 생존율

- ◎ 실험 결과, PBS를 접종한 그룹은 8일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음.
- ◎ 항원단백질을 접종한 그룹은 11일째에 모든 마우스가 폐사함. ISA70을 혼합하여 접종한 실험 그룹에서는 80%의 생존율을 기록하였음.
- ◎ 반면 CAWIO를 혼합하여 접종한 그룹에서는 시험 종료 일시까지 100%의 생존율을 나타내었음.
- ◎ 결론적으로, 항원단백질이 CAWIO와 혼합되어 접종된 경우, Influenza A virus H5N2 strain 1LD50 감염에 대한 마우스의 생존율을 크게 향상하였음. 이는 양성 대조군으로 사용한 ISA70보다도 높은 결과를 보임. 즉, CAWIO에 의해 항원단백질의 백신능이 크게 향상되었음을 의미함.
- ◎ 다음으로, 3일째와 5일째에 마우스의 폐를 적출해 감염 후 증식한 바이러스의 양을 TCID₅₀을 측정해 나타내었음.

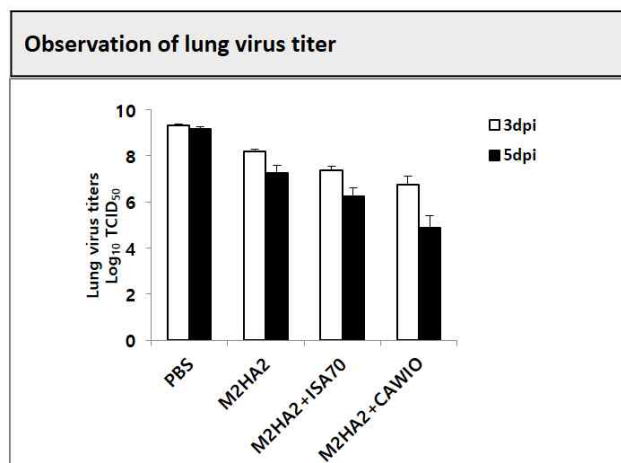


그림 74. 항원단백질, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 H5N2 1LD50에 대한 폐에서의 바이러스 titration.

◎ 다음으로, 항원단백질과 백신보좌제(CAWIO, ISA70)의 면역 증강 효능평가를 위해 마우스에 2주 간격으로 항원단백질을 접종한 후 아래와 같은 일정으로 혈청을 채취해 ELISA를 수행하고 spleen에서 ELISPOT을 수행하였음.

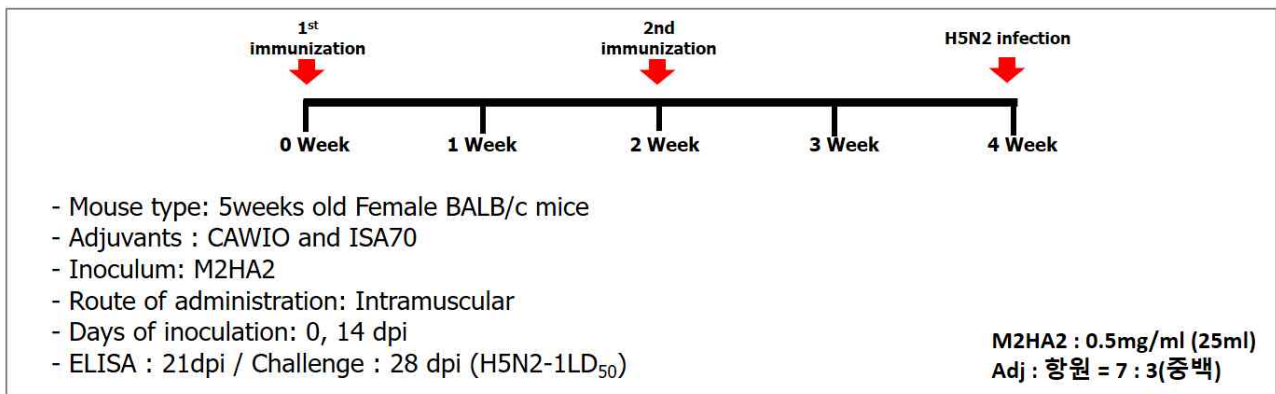


그림 75. 항원단백질(M2HA2)과 백신보좌제(CAWIO, ISA70)를 이용한 ELISA, ELISPOT 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군						
	Adj.	M2HA2	Total amount	Inoculation time	for ELISPOT	for Challenge
PBS 1LD50 (H5N2)	-	-	100ul	2	5 heads	5 heads
M2HA2 1 LD50 (H5N2)	-	30ul(15ug)	100ul	2	5 heads	5 heads
CABIO+M2HA2 1 LD50 (H5N2)	CAWIO 70ul	30ul(15ug)	100ul	2	5 heads	5 heads
ISA70+M2HA2 1 LD50 (H5N2)	ISA70 70ul	30ul(15ug)	100ul	2	5 heads	5 heads

표 21. 항원단백질(M2HA2)과 백신보좌제(CAWIO, ISA70)를 이용한 ELISA, ELISPOT 시험그룹

◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, 항원단백질을 접종한 그룹, 항원단백질에 두 종류의 백신보좌제를 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 3가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 5마리로 구성함.

◎ 항원단백질의 접종은 정제된 M2HA2 단백질을 2주 간격으로 근육투여 하였음. 항원단백질의 투여 용량은 10μg으로 설정하였음. 항원과 백신보좌제의 혼합은 항원 3, 백신보좌제 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.

◎ 총 접종용량은 100μl 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 실험을 수

행하였음. 1, 3주째에 안와정맥에서 혈액을 샘플링하였음.

◎ 샘플링한 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리한 후 항원단백질을 코팅해 ELISA를 수행하여 혈청 내의 항체를 측정하였음. 이후 4주, 6주, 8주, 10주, 12주에 혈액을 추가로 채취하여 같은 방법으로 혈액을 샘플링하여 ELISA를 수행하였음.

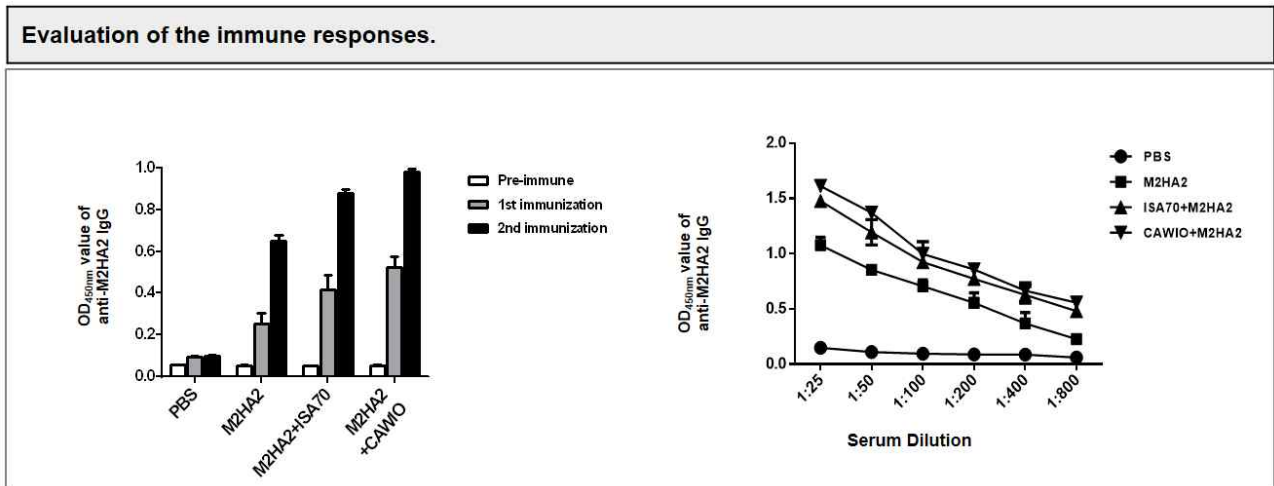


그림 76. 항원단백질, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 ELISA를 통한 항체가 측정

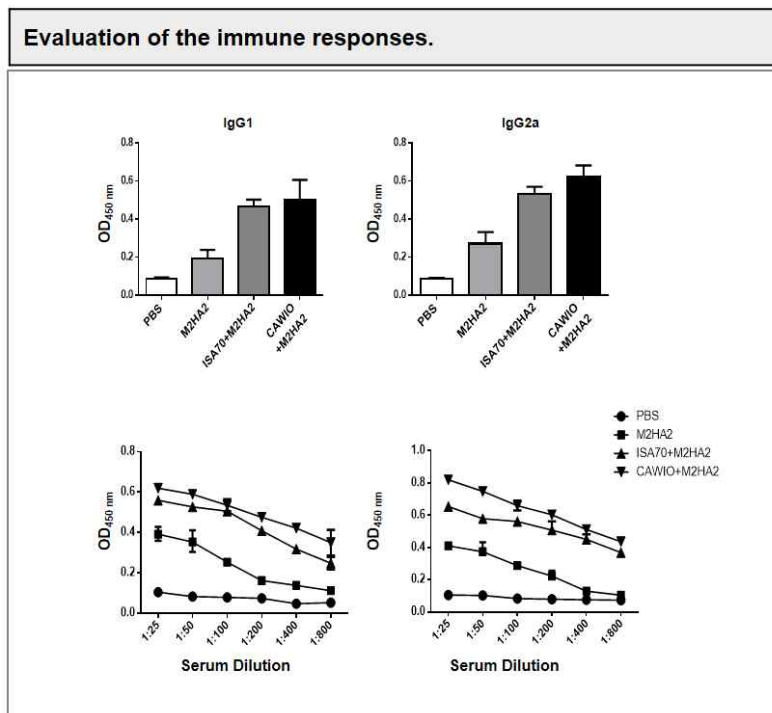


그림 77. 항원단백질, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 IgG1, IgG2 specific ELISA를 통한 항체가 측정

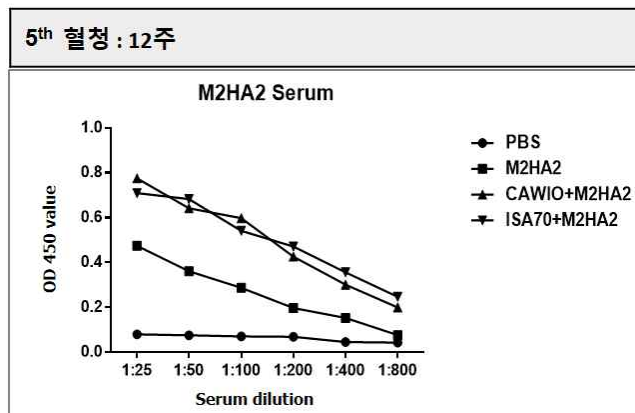
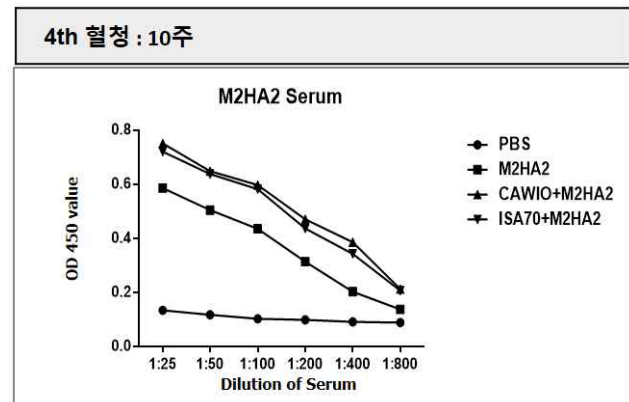
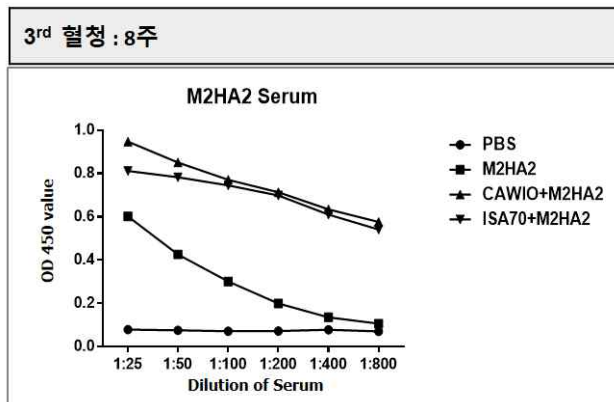
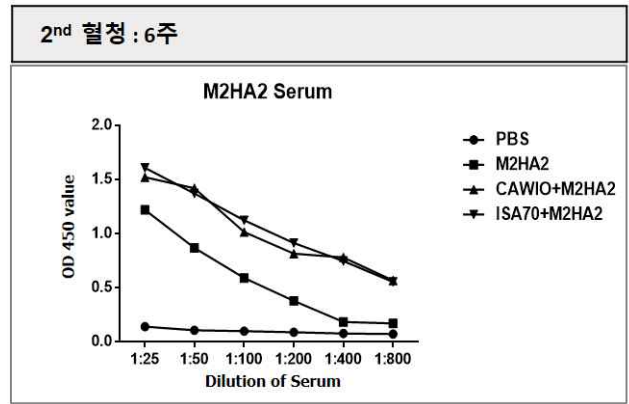
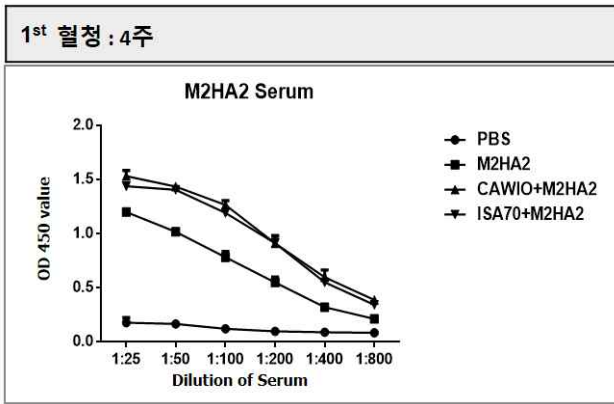


그림 78. 항원단백질, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 ELISA를 통한 항체가 측정 - 4, 6, 8, 10, 12주

- ◎ 실험 결과, 3주째 샘플링한 혈청에서 항원단백질에 대한 항체가 생성되는 것이 확인되었음. 0주차, 1주차, 3주차로 진행될수록 항체 형성이 증가하는 경향을 보임. 혈청 내 항체가가 높게 형성되어 1:25에서 1:800까지의 희석 배수를 적용시켜 각각에 대해 ELISA를 수행한 결과, 모든 희석 배수에서 같은 경향이 확인되었음.
- ◎ 항원단백질만 접종한 그룹에 비해 백신보좌제를 함께 접종한 경우에 항체가가 높게 형성되었음. 항원단백질과 CAWIO를 함께 접종한 그룹의 경우, 항원단백질과 ISA70을 함께 접종한 그룹에 비해 더 높은 항체가를 나타내었음.

- ◎ 혈청 내 형성된 각각의 IgG type에 대해 specific한 ELISA를 수행하여 각각의 항체가를 측정 한 결과, 항원단백질 접종에 따라 IgG1과 IgG2이 모두 형성되었음이 확인되었음.
- ◎ 항원단백질을 단독으로 접종한 경우보다 항원단백질과 ISA70을 함께 접종한 그룹이 높은 항체가를 나타내었으며 항원단백질과 CAWIO를 함께 접종한 그룹의 경우는 이보다 더 높은 값을 나타내었음.
- ◎ 이후 항체가 지속적으로 형성되어 혈액 내에 유지되는지를 확인하기 위해 마우스 그룹을 이 후에도 계속 유지하며 혈액을 샘플링해 항체가를 측정함. 실험 결과 두 종류의 백신보좌제를 함께 접종한 그룹에서 높은 항체가를 나타내었음.
- ◎ 즉, CAWIO에 의해 항원단백질이 단독으로 접종된 것 보다 더 강력한 체액성 면역을 유도한 다는 것이 확인되었음.

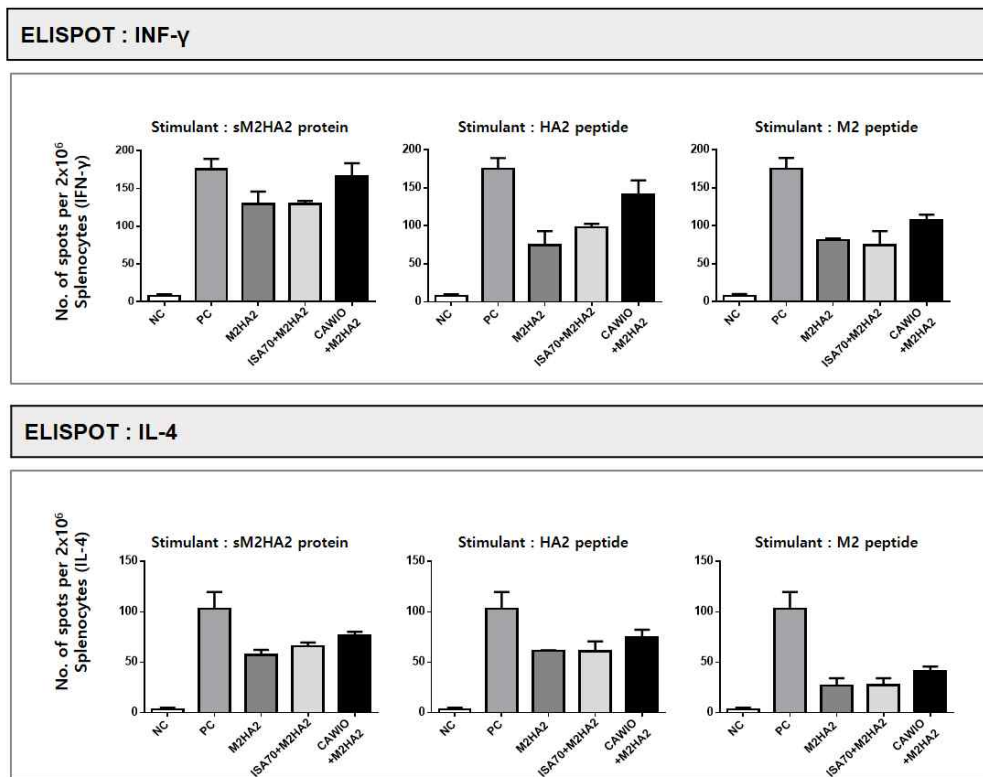


그림 79. 항원단백질, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 ELISPOT을 통한 세포성 면역의 측정

- ◎ 다음으로 세포성 면역의 유도를 확인하기 위해 4주째에 마우스에서 얻은 splenocyte를 이용하여 IFN-gamma와 IL-4에 대한 ELISPOT을 sM2HA2 protein, HA2 peptide, M2 peptide를 각각 이용하여 수행하였음.
- ◎ 실험 결과, 항원단백질 단독 접종에 비해 백신보좌제를 함께 접종한 그룹에서 더 강한 세포성

면역반응이 나타남을 확인하였음. 마우스 splenocyte에서의 세포성 면역반응은 sM2HA2 protein, HA2 peptide, M2 peptide 자극에 대해 모두 같은 경향으로 나타났음.

- ◎ CAWIO와 항원단백질이 함께 접종된 그룹의 경우, 가장 높은 세포성 면역반응이 확인되었음. 즉, CAWIO에 의해 항원단백질이 만드는 세포성 면역반응이 증가했으며 기존의 백신보좌제인 ISA70보다 강한 효과를 나타냄.

3) H9N2 감염에 대한 CAWIO와 ISA70의 효능비교평가

- ◎ H9N2 백신을 이용한 백신보좌제(CAWIO, ISA70)의 효능평가를 비교 평가하기 위해 우선적으로 mouse adapted Influenza A virus H9N2 strain의 감염용량을 결정하는 사전 실험을 아래의 표와 같이 구성하였음.

시험동물 대조군 및 실험군	
for Challenge	No.of animals
0.5 LD50 (H9N2)	4 heads
1 LD50 (H9N2)	4 heads
2 LD50 (H9N2)	4 heads

표 22. H9N2 감염용량 평가 시험 그룹

- ◎ influenza virus H9N2 strain LD50의 1배, 2배, 3배 용량의 바이러스가 감염에 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음.
- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

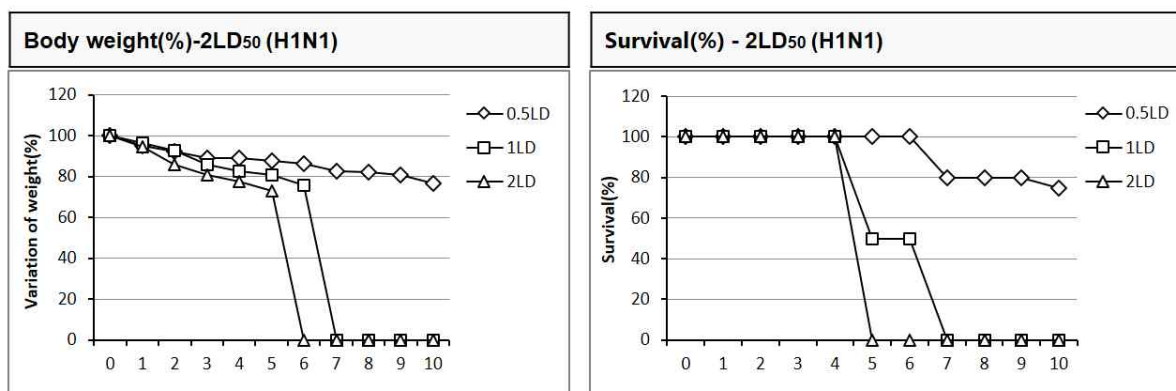


그림 80. H9N2 바이러스 1, 2, 3LD50 감염에 따른 마우스의 체중과 치사율

- ◎ Influenza A virus H9N2 strain 1, 2, 3LD50를 감염시킨 결과 바이러스 감염이 마우스에

치명적이며 용량이 증가함에 따라 마우스의 폐사 기간이 줄어드는 것을 확인하였음. 3LD50의 경우는 5일째에, 2LD50는 7일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음. 1LD50를 감염시킨 그룹은 7일째에 일부의 마우스가 폐사하였음.

- ◎ 본 실험결과를 토대로 앞으로의 마우스 실험에서 사용될 H5N2 strain의 감염용량은 1LD50로 결정하였음.
- ◎ 이후 항원단백질과 백신보조제(CAWIO, ISA70)의 효능평가를 위해 마우스에 2주 간격으로 항원단백질을 접종한 후 influenza virus H9N2 strain의 1LD50 감염에 대해 마우스의 체중과 생존율을 아래와 같은 일정으로 실험을 진행하였음.

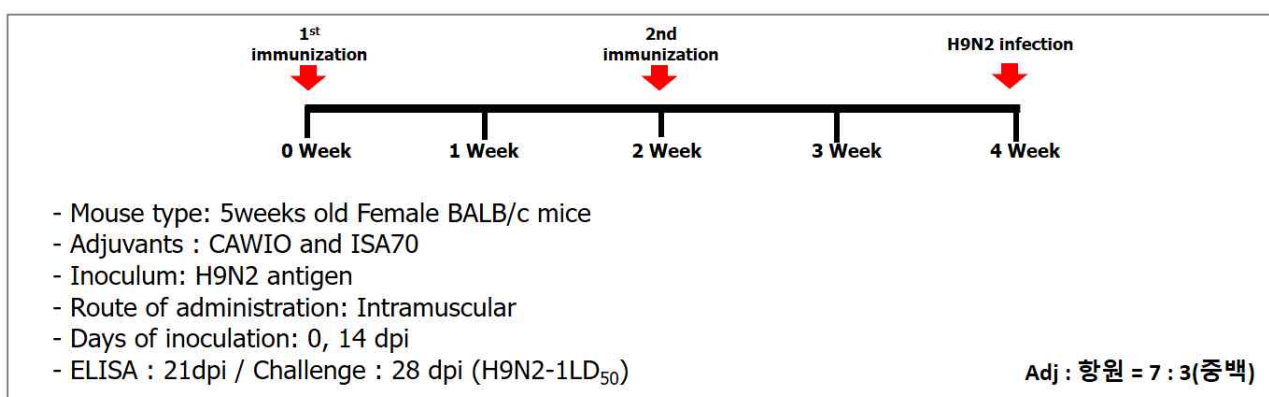


그림 81. H9N2 antigen과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 H9N2 감염 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군					
	Adj.	H9N2 antigen	Total amount	Inoculation time	for Challenge
PBS 1LD50 (H9N2)	-	-	100ul	2	5 heads
H9N2 antigen 20 1 LD50 (H9N2)	-	20 ul	100ul	2	5 heads
H9N2 antigen 10 1 LD50 (H9N2)	CAWIO 70ul	10 ul	100ul	2	5 heads
	ISA70 70ul				5 heads
H9N2 antigen 20 LD50 (H9N2)	CAWIO 70ul	20 ul	100ul	2	5 heads
	ISA70 70ul				5 heads

표 24. H9N2 antigen과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 H9N2 감염 시험 시험그룹

◎ 실험그룹은 PBS 대조군과, H9N2 antigen을 접종한 그룹, H9N2 antigen에 두 종류의 백신 보조제를 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 4가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 3마리씩으로 구성함.

◎ H9N2 antigen은 2주 간격으로 근육투여 하였음. H9N2 antigen의 투여 용량은 20μl, 으로

설정하였음. 항원과 백신보좌제의 혼합은 항원 3, 백신보좌제 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.

- ◎ 총 접종용량은 100 μ l 로 설정하여 실험을 진행하였으며 마지막 접종 후 2주 뒤에 바이러스 감염을 수행하였음. influenza virus H9N2 strain 1LD50 용량의 바이러스가 이용되었으며 마우스를 마취시킨 후 비강을 통하여 접종하였음.
- ◎ 바이러스 감염 이후 마우스의 상태를 모니터링하며 체중을 측정하였음. 동물윤리실험위원회의 방침에 따라 바이러스 감염 이후 25% 이상의 체중감소를 보인 개체는 안락사한 뒤 치사한 것으로 처리함.

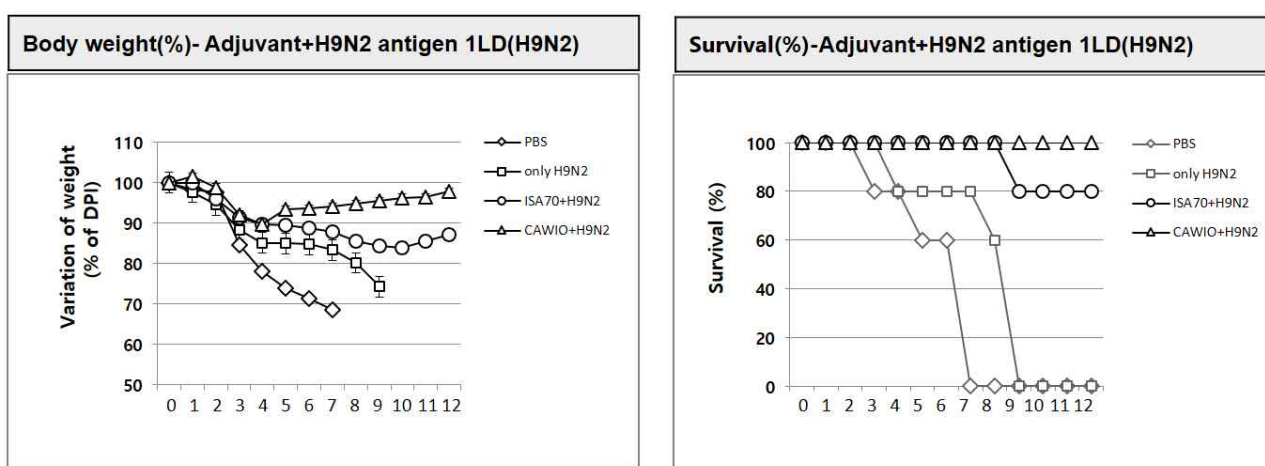


그림 82. H9N2 antigen, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 H9N2 1LD50에 대한 마우스의 체중변화와 생존율

- ◎ 실험 결과, PBS를 접종한 그룹은 7일째에 모든 마우스가 폐사하는 것으로 확인되었음. H9N2 antigen을 접종한 그룹은 9일째에 모든 마우스가 폐사하였음 ISA70를 혼합하여 접종한 실험 그룹에서는 80%의 생존율을 기록하였음.
- ◎ 반면 CAWIO를 혼합하여 접종한 그룹에서는 시험 종료 일시까지 100%의 생존율을 나타내었음.
- ◎ 결론적으로, 항원단백질이 CAWIO와 혼합되어 접종된 경우, Influenza A virus H9N2 strain 1LD50 감염에 대한 마우스의 생존율을 크게 향상하였음. 이는 양성 대조군으로 사용한 ISA70보다도 높은 결과를 보임. 즉, CAWIO에 의해 항원단백질의 백신능이 크게 향상되었음을 의미함.
- ◎ 다음으로, 3일째와 5일째에 마우스의 폐를 적출해 감염 후 증식한 influenza virus H9N2 strain의 양을 TCID50을 측정해 나타내었음.

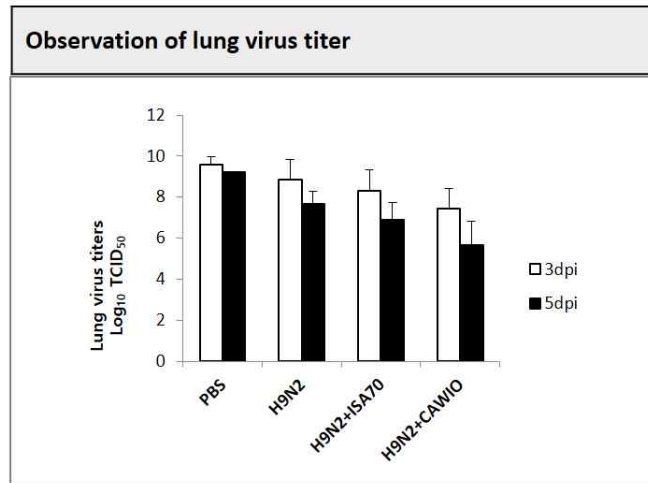


그림 83. H9N2 antigen, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 H9N2 1LD50에 대한 폐에서의 바이러스 titration.

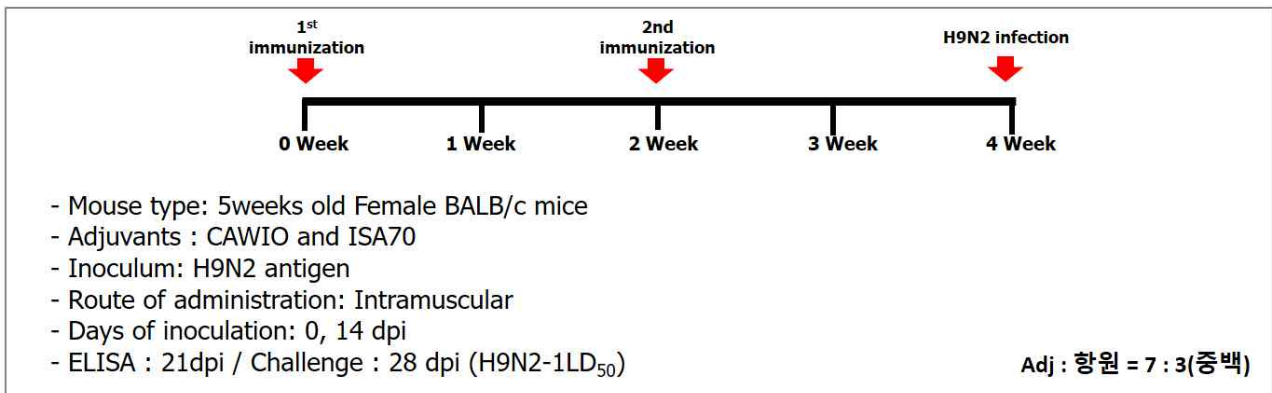


그림 84. H9N2 antigen과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 ELISA, ELISPOT 시험일정

시험동물 대조군 및 실험군							
	Adj.	Antigen	PBS	Total amount	Inoculation time	for ELISA	For ELISPOT
PBS 1LD50 (H9N2)	-	-	100ul	100ul	2	3 heads	3 heads
Antigen 1LD50 (H9N2)	-	20ul	80ul	100ul	2	3 heads	3 heads
CAWIO+Antigen 1LD50 (H9N2)	70ul	20ul	10ul	100ul	2	3 heads	5 heads
ISA70+Antigen 1LD50 (H9N2)	70ul	20ul	10ul	100ul	2	3 heads	5 heads

표 24. H9N2 antigen과 백신보조제(CAWIO, ISA70)를 이용한 ELISA, ELISPOT 시험그룹

© 실험그룹은 PBS 대조군과, H9N2 antigen을 접종한 그룹, H9N2 antigen에 두 종류의 백신

보조제를 각각 혼합하여 접종한 그룹, 도합 4가지의 그룹을 설정하였음. 한 그룹당 마우스는 3마리씩으로 구성함.

- ◎ H9N2 antigen은 2주 간격으로 근육투여 하였음. H9N2 antigen의 투여 용량은 20 μ l, 으로 설정하였음. 항원과 백신보좌제의 혼합은 항원 3, 백신보조제 7의 비율로 만든 혼합물을 3-way stopcock과 실린지를 이용하여 15분간 수행하였음.
- ◎ 총 접종용량은 100 μ l 로 설정하여 실험을 진행하였으며 1, 3주째에 안와정맥에서 혈액을 샘플링하였음.
- ◎ 샘플링한 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리한 후 H9N2 antigen을 코팅해 ELISA를 수행하여 혈청 내의 항체가를 측정하였음.

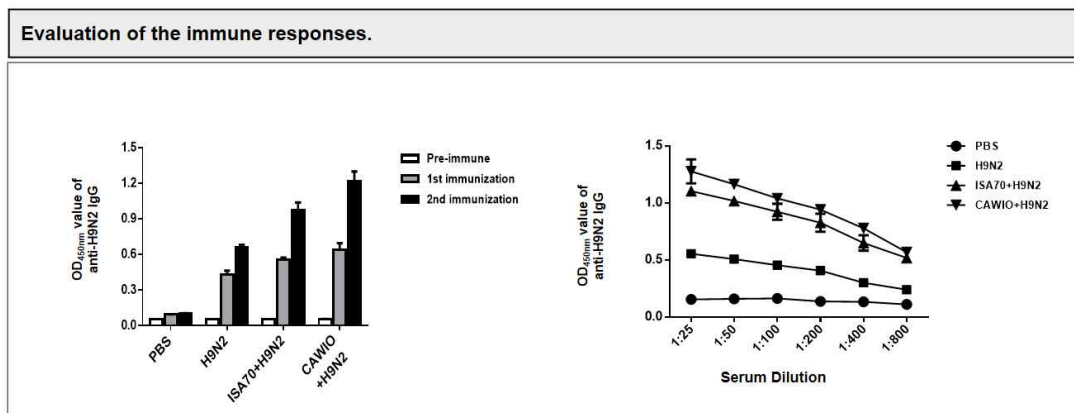


그림 85. H9N2 antigen, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후 ELISA를 통한 항체가 측정

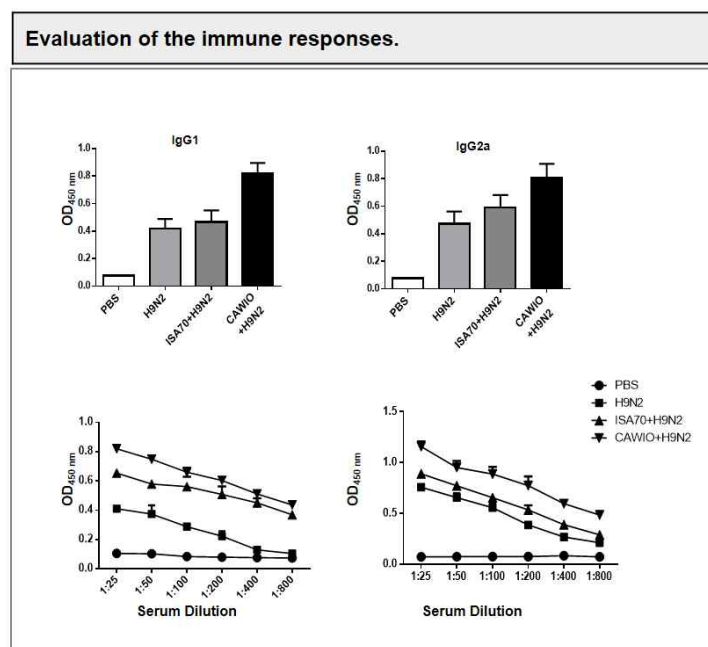


그림 86. H9N2 antigen, 백신보좌제(CAWIO, ISA70) 접종 이후
IgG1, IgG2 specific ELISA를 통한 항체가 측정

- ◎ 실험 결과, 1, 3주째 샘플링한 혈청에서 H9N2 antigen에 대한 항체가 생성되는 것이 확인되었음. 0주차, 1주차, 3주차로 진행될수록 항체 형성이 증가하는 경향을 보임. 혈청 내 항체가 높게 형성되어 1:25에서 1:800까지의 희석 배수를 적용시켜 각각에 대해 ELISA를 수행한 결과, 모든 희석 배수에서 같은 경향이 확인되었음.
- ◎ H9N2 antigen만 접종한 그룹에 비해 백신보좌제를 함께 접종한 경우에 항체가가 높게 형성되었음. H9N2 antigen과 CAWIO를 함께 접종한 그룹의 경우, H9N2 antigen과 ISA70을 함께 접종한 그룹에 비해 더 높은 항체가를 나타내었음.
- ◎ 혈청 내 형성된 각각의 IgG type에 대해 specific한 ELISA를 수행하여 각각의 항체가를 측정 한 결과, H9N2 antigen 접종에 따라 IgG1과 IgG2이 모두 형성되었음이 확인되었음.
- ◎ H9N2 antigen을 단독으로 접종한 경우보다 H9N2 antigen과 ISA70을 함께 접종한 그룹이 높은 항체가를 나타내었으며 H9N2 antigen과 CAWIO를 함께 접종한 그룹의 경우는 이보다 더 높은 값을 나타내었음.
- ◎ 다음으로 세포성 면역의 유도를 확인하기 위해 4주째에 마우스에서 얻은 splenocyte를 이용하여 IFN-gamma와 IL-4에 대한 ELISPOT을 H9N2 antigen을 이용하여 수행하였음.
- ◎ 실험 결과, H9N2 antigen 단독 접종에 비해 백신보좌제를 함께 접종한 그룹에서 더 강한 세포성 면역반응이 나타남을 확인하였음. 마우스 splenocyte에서의 세포성 면역반응은 H9N2 antigen 자극에 대한 각각의 ELISPOT에서 모두 같은 경향으로 나타났음.
- ◎ CAWIO와 H9N2 antigen이 함께 접종된 그룹의 경우, 가장 높은 세포성 면역반응이 확인되었음. 즉, CAWIO에 의해 H9N2 antigen이 만드는 세포성 면역반응이 증가했으며 기존의 백신보좌제인 ISA70보다 강한 효과를 나타냄.

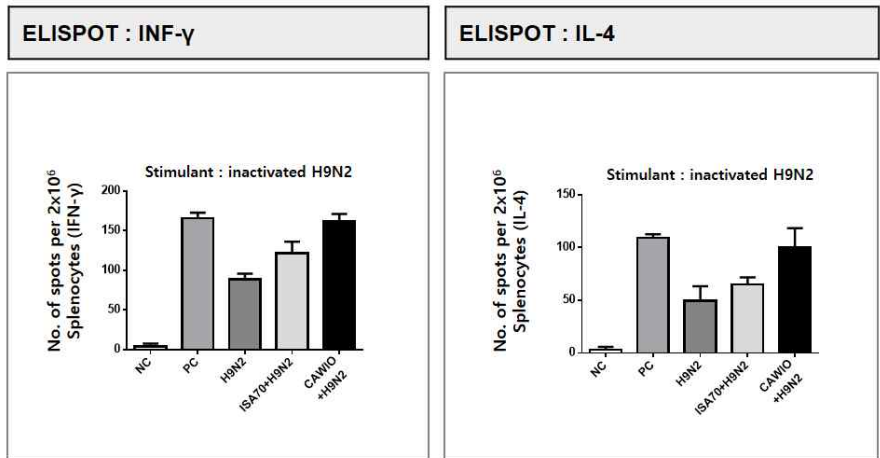


그림 87. H9N2 antigen, 백신보좌제(CAW10, ISA70) 접종 이후 ELISPOT을 통한 세포성 면역의 측정

4. 닭에서 면역보좌제의 세포성면역 검증

1) Chicken splenocytes에서의 CTL response 평가 시험

◎ 충북대학교에서 in vivo 시험을 수행한 시험닭의 CTL response를 측정하였음.

가) Chicken splenocyte CTL 평가 시험 개요

- ◎ 하기의 표와 같이 각 그룹당 3마리의 시험계에서 in vivo 시험 이후 CTL response를 확인 하였음.
- ◎ Serum을 채취하여 CTL response의 지표인 IFN-gamma와 IL-2를 ELISA를 이용해 측정 함.
- ◎ 분리해 배양한 splenocyte와 그 상층액에서 IFN-gamma와 IL-2를 ELISA를 이용해 측정하였으며 CD8-PE 항체와 IFN-gamma-FITC 항체를 이용해 splenocyte중 CD8+ T cell의 IFN-gamma를 FACS를 통해 분석하였음.

시험동물 대조군 및 실험군					
Adjuvant	Control	CAW10	CNU	ISA70	KR
No. of animals	3	3	3	3	3

표 25. CTL response 측정 시험계 실험그룹

샘플 및 분석	
Serum	Interferon gamma 및 IL-2 ELISA 분석
Splenocytes	real time qPCR 및 FACS 분석
Supernatant	Interferon gamma 및 IL-2 ELISA 분석

표 26. 시험동물 대조군 및 실험군, 샘플에 따른 CTL 반응 분석방법.

- ◎ 시험계의 비장을 적출한 뒤 nylon mesh를 이용해 분쇄하여 Histopaque 1.077을 이용해 원심분리로 세포를 분리한 뒤 chicken serum이 함유된 배지를 이용해 배양하였음.
- ◎ Splenocyte 분리 배양 이후의 항원자극은 아래와 같은 일정으로 진행하였음.
- ◎ 분리 후 12well plate에 2×10^6 개의 세포를 분주한 뒤 12시간째에 세포가 플레이트에 붙은 것을 확인하고 Qx-Flu5, NDV-K, AIV-K 세 종류의 항원(중양백신항원)을 처리함. 항원 처리는 10, 20, 40, 60ug/ml 으로 이루어졌으며 처리 후 24시간째에 세포 및 상층액을 샘플링해 실험에 이용하였음.
- ◎ FACS 분석용 세포의 경우 Qx-Flu5 항원을 40ug/ml의 농도로 처리하여 자극하였음.

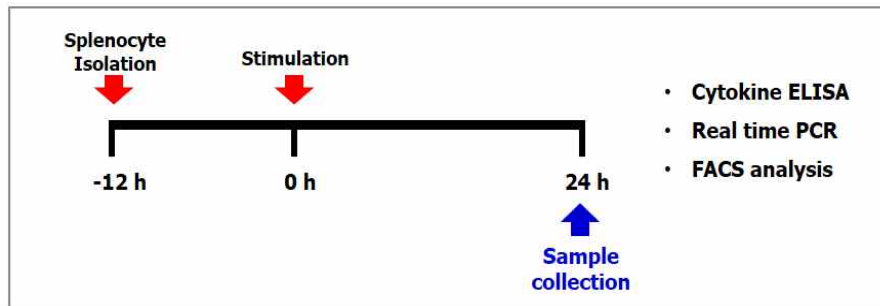


그림 88. Splenocyte 실험 일정

splenocytes 자극 항원 및 용량					
Stimulation Antigen	Stimulation dose (μ g)				
Qx-Flu5	NC	10	20	40	60
NDV-K	NC	10	20	40	60
AIV-K	NC	10	20	40	60

표 27. Splenocyte 자극 항원 및 용량

2) 혈청에서의 CTL response 확인

- ◎ 날개정맥에서 채취한 시험계의 혈액에서 혈청을 분리한 뒤 혈청 내 IFN-gamma와 IL-2를

ELISA를 이용해 측정하였음.

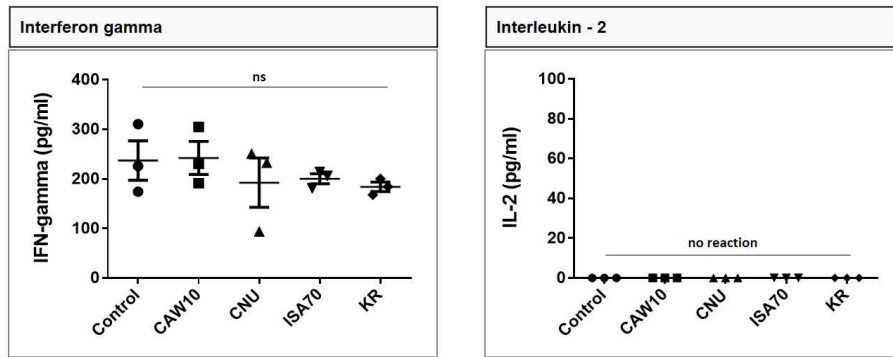


그림 89. 혈청의 IFN-gamma, IL-2 ELISA 측정값

- ◎ IFN-gamma의 경우 모든 개체에서 혈청 내에서 100-300pg/ml의 농도로 확인되었으나 각 그룹간의 유의성을 확인할 수 없었음.
- ◎ IL-2의 경우 모든 개체에서 혈청 내 분비가 확인되지 않음.
- ◎ 혈청 내의 분비는 체내의 여러 종류의 세포가 관여하고, 실험 이후 추가 항원자극이 없었기 때문에 반응의 부재가 나타날 수 있음. 또한 사이토카인의 분비가 음성 대조군에서도 함께 확인되었기 때문에 항원으로 자극한 splenocyte에서의 분석이 추가로 요구됨.

3) Splenocyte에서의 사이토카인 측정을 통한 CTL response 확인

- ◎ 투여 항원인 Qx-Flu5과 NDV specific 항원인 NDV-K 그리고 Influenza 특이 항원인 AIV-K를 각각 처리한 세포에서 CTL response에 관여하는 사이토카인의 분비를 ELISA로 측정하였음.

IFN-gamma ELISA 결과				
(Stimulation)	10µg	20µg	40µg	60µg
Qx-Flu5	X	X	X	O
NDV-K				O
AIV-K				O

표 28. IFN-gamma ELISA 결과

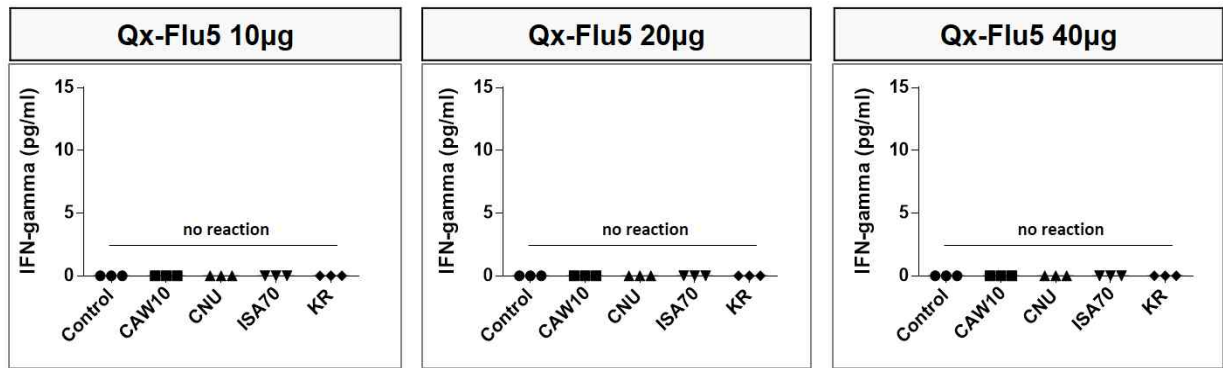


그림 90. Qx-Flu 자극에 대한 splenocyte 상층액에서의 IFN-gamma ELISA

- ◎ Qx-Flu5 항원 10, 20, 40µg/ml을 자극한 splenocyte의 상층액에서는 IFN-gamma의 분비가 나타나지 않음. 이는 항원의 농도가 세포의 반응을 유도할 수 있는 충분한 양의 자극을 이끌어내지 못했기 때문으로 사료됨.
- ◎ 이후 각각의 항원에 대해 최대 용량으로 자극한 splenocyte의 상층액을 ELISA 분석에 이용하였음.

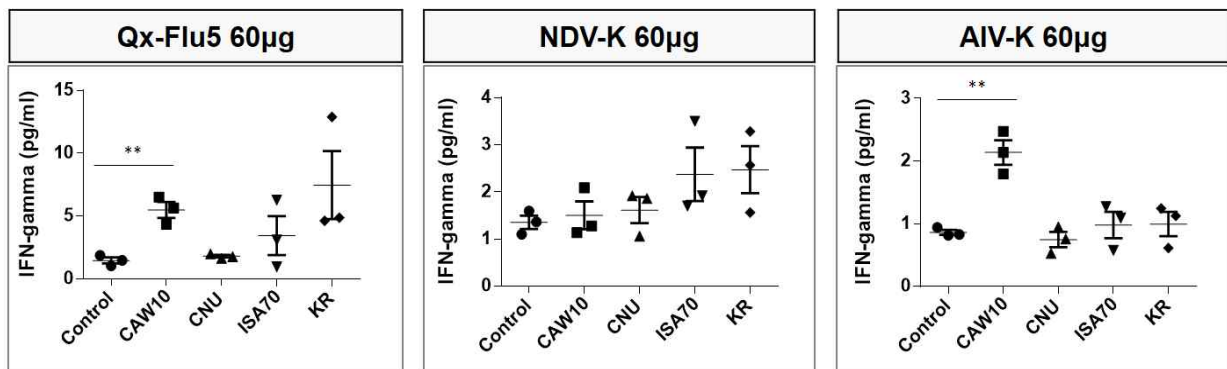


그림 91. Qx-Flu-5, NDV-K, AIV-K 60µg/ml 처리 후 IFN-gamma ELISA 측정값

- ◎ Qx-Flu5 60µg/ml을 처리한 세포의 상층액에서는 IFN-gamma의 분비가 확인되었음. 실험 결과, 대조군 그룹에서는 IFN-gamma가 분비되지 않았지만 CAWIO 그룹에서 세 개체가 모두 증가하여 유의성 있는 차이값을 보임.
- ◎ ISA70, KR 그룹에서는 통계적으로 유의성이 인정되는 차이를 보이지는 않았으나 IFN-gamma의 분비가 증가하는 경향이 확인되었음. CNU 그룹의 경우 대조군과 마찬가지로 값의 증가가 확인되지 않음.
- ◎ NDV-k 항원 60µg/ml을 처리한 세포의 상층액에서는 모든 그룹에서 유의성있는 차이값을 나타내지 않음. CAWIO 그룹은 Qx-Flu5 처리에 대해서는 IFN-gamma 분비량이 늘었지만 NDV-K 항원에 대해서는 분비가 확인되지 않았음. ISA70과 KR 그룹에서는 대조군에 비해 약간의 증가하는 경향을 보임.
- ◎ AIV-K 항원 60µg/ml을 처리한 세포의 상층액에서는 CAWIO 그룹에서 유의성있는 차이를

나타냄.

- ◎ 결론적으로, CAWIO의 경우 Qx-Flu5와 AIV-K 항원처리에 대해 CTL response를 향상시키는 것이 확인되었으나 사이토카인 분비량이 크지 않기 때문에 추가적인 분석이 필요할 것으로 보임. 또한 ISA70과 KR의 경우도 유의성이 있는 수치는 아니지만 대체적으로 증가하는 경향을 보였기에 추후 실험조건의 변경을 통한 긍정적인 결과가 예상되는 바임.

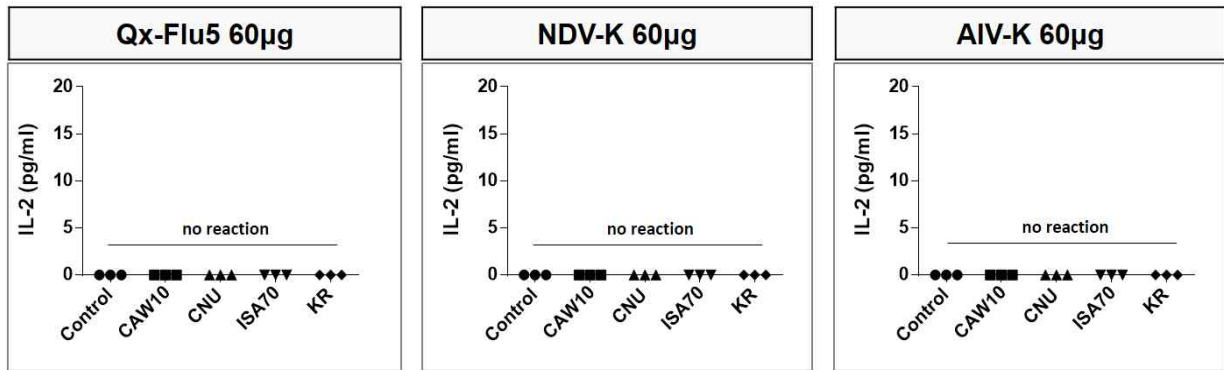


그림 92. Qx-Flu-5, NDV-K, AIV-K 60µg/ml 처리 후 IL-2 ELISA

IFN-gamma real time PCR 결과					
(Stimulation)	NC	10µg	20µg	40µg	60µg
Qx-Flu5	O			X	X
NDV-K					X
AIV-K					X

● x : no response

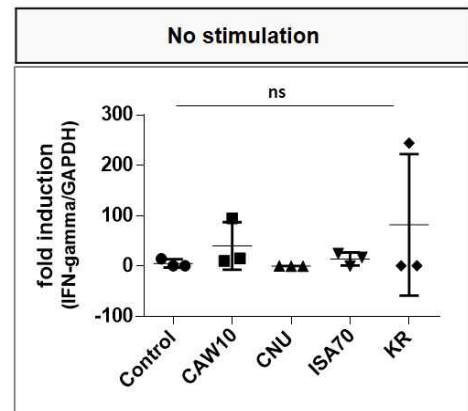


그림 93. Splenocyte에서의 real time PCR 결과

- ◎ IL-2 ELISA의 경우 모든 샘플에서 반응을 확인할 수 없었음.
- ◎ 이는 자극조건이 약하기 때문에 생기는 사이토카인 분비량의 부재로 인한 현상이거나 상용화 되어 판매되는 ELISA kit의 민감도가 떨어지기 때문에 나타나는 문제로 보임.
- ◎ 세포를 이용한 real time PCR 분석에서도 역시 유전자 수준에서의 사이토카인 증가를 확인할 수 없었음. 모든 그룹에서 유의성있는 변화가 나타나지 않았음.

4) Splenocyte에서의 FACS 분석을 통한 CTL response 확인

- ◎ Splenocyte에서 CTL response를 확인하기 위해 CD8+과 IFN-gamma에 대한 항체를 이용해 FACS 분석을 수행하였음. 분석은 Qx-Flu5 40µg/ml으로 24시간동안 자극한 세포가 이용

되었음.

◎ CD8+ T 세포의 경우 CTL에 직접적으로 관여하는 세포이며 CD8+ T 세포 중 IFN-gamma를 발현하고 있는 세포의 비율을 측정하는 방법으로 분석하였음.

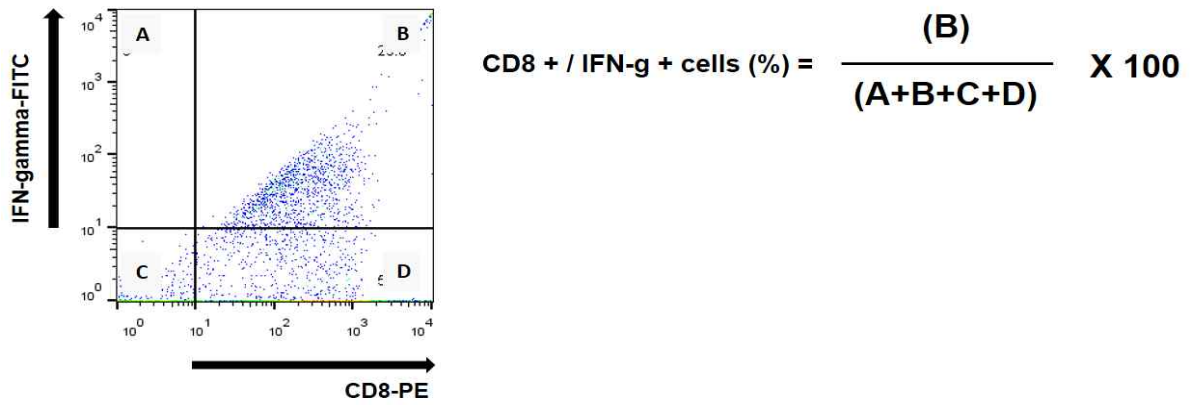
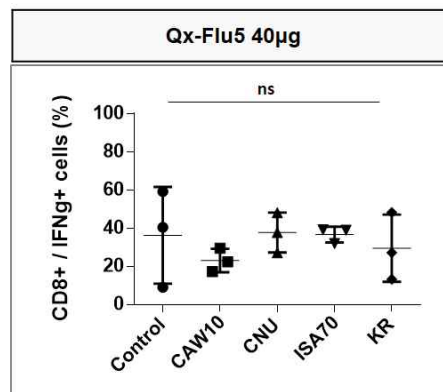


그림 94. FACS 분석 샘플

◎ 상기의 그림과 같이 CD8-PE 항체가 반응한 세포의 경우 B, D 섹션에 위치하게 됨. IFN-gamma-FITC 항체가 반응한 세포의 경우는 A, B 섹션에 위치하며 본 분석을 위해서는 전체 세포중에 CD8+/IFN-gamma+를 나타내는 B섹션의 비율을 상기의 수식과 같이 계산하여 이용하였음.



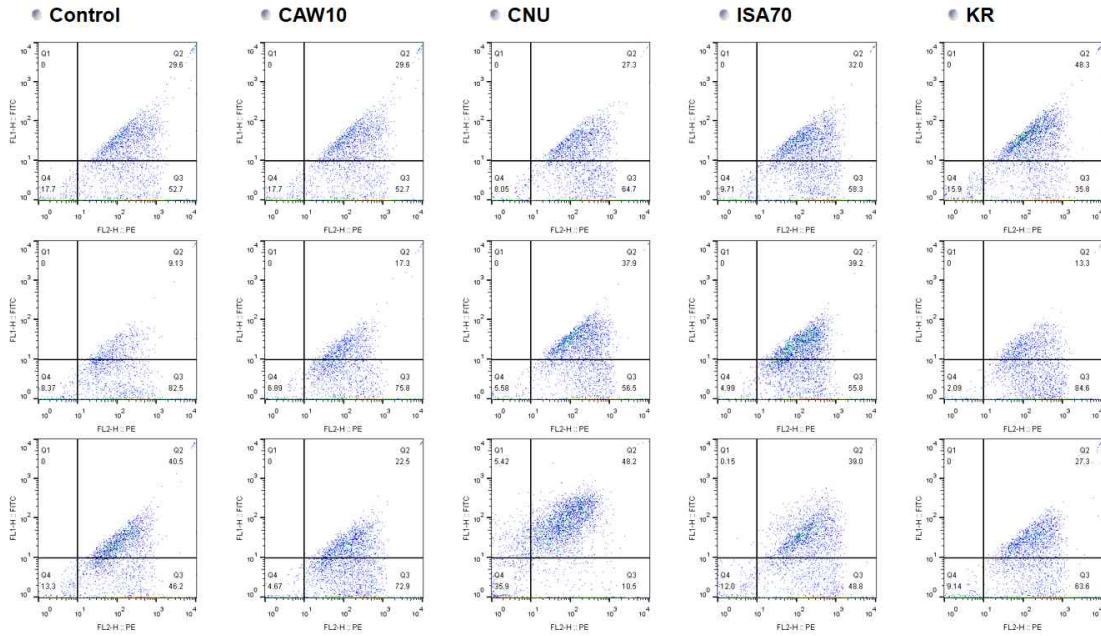


그림 95. FACS 분석 결과 및 그래프

- ◎ 실험 결과, 각 그룹간의 유의성있는 차이를 확인할 수 없었음. 모든 개체에서 비슷한 양상으로 결과가 나타났으며 수치화시킨 분석 결과에서도 차이를 확인할 수 없음. 이는 시험동물의 자극 정도 또는 splenocyte의 자극이 충분치 못했기 때문으로 생각되는 결과임.
- ◎ 결론적으로 CAW10의 경우 IFN-gamma 측정 시험에서 CTL 유도능을 보였으나 향후 심층적인 분석 필요할 것으로 사료됨.

2-3. 개발된 면역증강제 및 백신보조제 혼합백신의 평가

2-3-1. 개발된 백신보조제(CAvant WO-A1) 함유 조류핵심질병(조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 전염성 기관지염, 산란저하증 등) 다가혼합백신의 실험실적 시험 평가

1) 백신보조제와 면역증강제에 따른 안전성 평가

백신보조제의 면역원성 증진을 위해, 세부협동기관에서 선행되었던 면역증강제의 스크리닝 시험결과를 토대로 백신보조제(CAvant WO-A1) 와 면역증강제를 혼합하여 시험 백신이 제조되었다.

제조된 시험백신의 백신보조제 및 면역증강제 조성에 따라 백신의 안전성을 SPF 닭에서 확인해보고 목적 실험동물인 일반 닭에서의 면역학적 효능을 비교해 보고자 본 실험을 실시하였다.

Table 1. Experimental design to evaluate the efficacy of oil adjuvant vaccines mixed with different composition of adjuvants and immunomodulants

Group	Composition	Number of birds*	Inoculation**	Measurement***
CAvant WO-A1	CAvant WO-A1, Antigen	12	Yes	
KR-1	CAvant WO-A1, KR-1, Antigen	12	Yes	Body weight
CNU-1	CAvant WO-A1, CNU-1, Antigen	12	Yes	Antibody titer
ISA70	ISA70, Antigen	12	Yes	Clinical sign
Control	No	12	No	

* 8 weeks old SPF chicken

** Treatment groups were inoculated twice with 0.5 ml of vaccines at 8 weeks old and 3 weeks after first vaccination.

*** All birds were bleed and measured body weight at designed day. Also any clinical signs were observed daily basis during the experiments.

Table 2. Comparison of body weight changes among groups vaccinated with different composition of adjuvants and immunomodulants

Group	Body weight*				
	Weight at weeks post vaccination			Post challenge**	
	0	3	6	Per oral	Intramuscular
Control	658.89±59.61	894±64.7 ^{ab***}	1037.18±157.53 ^{ab}	NT****	NT
CNU-1	722.80±65.42	901.45±103.36 ^{ab}	924.58±214.48 ^b	1400±166.43	1321.67±105.19
CAvant WO-A1	709.64±90.23	848.5±82.94 ^b	951.33±78.183 ^b	1093±188.51	1478.33±256.43
KR-1	708.31±91.02	902.25±158.52 ^{ab}	1098.17±199.04 ^{ab}	1368.33±349.87	1305±246.22
ISA70	730.34±76.82	997.58±123.34 ^a	1213.25±151.68 ^a	1159.67±107.28	1368.33±87.65

* Body weight : mean±standard deviation

** Challenge with Newcastle disease virus with either per oral or intramuscular inoculation

*** Superscripts indicate between the same column, means having different letters are significant (P<0.05) but same letters are not significant.

**** NT = Not tested because of dead after challenge

각 그룹의 체중을 백신 접종 후 주차에 따라 One-way ANOVA 분석법으로 분석하였다.

- 체중 측정은 접종 전, 1차 백신 접종 3주 후, 2차 백신 접종 3주 후에 실시하였다. 그 결과 1차 접종 후에는 ISA70과 CAvant WO-A1가 통계학적 유의한 차이가 인정되었으며, 2차 접종 후에는 ISA70이 CAvant WO-A1와 CNU-1과 통계학적 유의한 차이가 있음이 확인되었다.

- 전체적으로 백신 접종 후 체중의 감소는 없었으며, 모든 그룹의 체중 증가가 확인되었으나, 증가의 차이는 그룹별로 다르게 확인되었다. 가장 높은 증가 폭을 나타낸 것은 ISA70 이었으며, 가장 낮은 증가 폭을 나타낸 것은 CNU-1 이었다.

- 뉴캐슬병 바이러스의 공격 접종 후 각 그룹에 대한 영향을 보기 위하여 체중을 측정 하였다. 체중 측정은 공격 접종 후 2주 후에 실시하였으며, 경구 투여 (P/O)나 근육 접종 (I/M) 모두 그룹 간에는 체중의 차이는 없는 것으로 확인되었다. 따라서 뉴캐슬 바이러스의 공격 접종에 따른 체중 감소는 없었으며 각 그룹은 공격 접종에 대하여 방어가 된 것으로 판단된다.

Table 3. Mortality among groups vaccinated with different composition of adjuvants and immunomodulants

Groups	Mortality at weeks post vaccination						Survived / Dead	Survival rate
	1	2	3	4	5	6		
Control	0	0	0	0	0	0	12/0	100%
CNU-1	0	0	0	0	0	0	12/0	100%
CAvant WO-A1	0	0	0	0	0	0	12/0	100%
KR-1	0	0	0	0	0	0	12/0	100%
ISA70	0	0	0	0	0	0	12/0	100%

- 각 그룹의 모든 SPF 닭은 시험 백신 접종 후 1차, 2차 백신 접종 후인 6주령까지 매일 관찰하였으며, 매일 폐사 수를 기록하였다.
- 모든 그룹의 시험 닭은 시험 기간 동안 폐사가 발생하지 않고 모두 생존하였으며, 질병으로 의심되는 특징적인 임상 증상을 관찰할 수 없었다.

2) 백신보조제와 면역증강제에 따른 효능성 평가

제조된 시험백신의 백신보조제 및 면역증강제 조성에 따라 백신의 효능성을 SPF 닭에서 확인해보고자 시험이 진행되는 동안 채혈한 혈청으로 항체 역가를 측정한다.

Table 4. Comparison of H9 subtype avian influenza antibody titers among groups vaccinated with different composition of adjuvants and immunomodulants

Group	Hemagglutination inhibition titer (mean ± standard deviation)		
	Weeks post vaccination		
	0	3	6
Control	0 ± 0	0 ± 0 ^{c*}	0 ± 0 ^c
CNU-1	0 ± 0	6.75 ± 1.42 ^{ab}	6.7 ± 1.34 ^{ab}
CAvant WO-A1	0 ± 0	5.08 ± 1.44 ^b	6.17 ± 0.94 ^b
KR-1	0 ± 0	6.09 ± 0.83 ^b	7 ± 0.74 ^{ab}
ISA70	0 ± 0	7.17 ± 0.58 ^a	7.58 ± 0.67 ^a

* Superscripts indicate between the same column, means having different letters are significant (P<0.05) but same letters are not significant

- 각 그룹의 AI HI titer를 백신 접종 후의 주차에 따라 One-way ANOVA 분석법으로 비교하였다.
- 각 그룹의 닭에서 채혈은 접종 전, 1차 백신 3주 후, 2차 백신 3주 후에 실행하였다.
- 대조군을 제외하고, 백신 접종 후 모든 그룹에서 AI HI 역가가 상승하였다.
- 2차 백신 접종 후에도 CNU-1을 제외하고는 대부분 한 단계 정도의 역가 상승이 관찰되었다.
- 백신 1차 접종 3주 후 ISA70이 가장 높은 역가를 형성하였으며, CNU-1 과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그리고 CAvant WO-A1와 KR-1 각각에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 수치를 기록하였다.
- 백신 1차 접종 3주 후, 백신 2차 접종 3주 후에 CAvant WO-A1가 가장 낮은 역가 수치를 보였으나, CNU-1, KR-1과 유의한 차이를 나타내지는 않았다.
- 종합적으로 백신 접종 후 AI 역가는 그룹 간 다소 차이가 있었으나, 가장 높은 역가를 형성한 것은 ISA70 이었으며, 가장 낮은 역가를 형성한 것은 CAvant WO-A1 였지만 통계학적 측면에서는 CAvant WO-A1, CNU-1, KR-1 간에는 유의미한 차이가 없는 것으로 확인되었다.

Table 5. Comparison of Newcastle disease antibody titers among groups vaccinated with different composition of adjuvants and immunomodulants

Group	Hemagglutination inhibition titer (mean±standard deviation)				
	Weeks post vaccination			Post challenge*	
	0	3	6	P/O**	I/M
Control	0±0*	0±0 ^{c***}	0±0 ^c	NT ^{****}	NT
CNU-1	0±0	4.08±1.92 ^a	4.0±1.05 ^a	6.0±0	7.33±1.52
CAvant WO-A1	0±0	1.58±1.44 ^b	2.41±0.90 ^b	8.0±0	7.33±1.55
KR-1	0±0	4.0±1.34 ^a	4.25±0.96 ^a	8.33±1.52	7.66±2.08
ISA70	0±0	4.0±0.73 ^a	5.54±1.21 ^a	8.33±1.52	7.33±1.54

* Challenge with Newcastle disease virus with either per oral or intramuscular inoculation

** P/O = per oral inoculation, I/M = intramuscular administration

*** Superscripts indicate between the same column, means having different letters are

significant (P<0.05) but same letters are not significant.

**** NT = Not tested because of dead after challenge

- 각 그룹의 ND HI titer를 백신 접종 후 주차에 따라 One-way ANOVA 분석법으로 분석하였다.
- 1차 백신 접종 3주 후 CAvant WO-A1를 제외한 나머지 그룹의 역가는 비슷한 수준을 이루었으며, CAvant WO-A1의 역가는 통계학적으로 유의미한 차이가 인정이 되었다. 2차 백신 접종 3주 후에도 마찬가지로 이러한 역가의 차이는 계속하여 유지가 되었다.
- 1차 백신 접종 후 2차 백신 접종 후 3 주차까지 시험이 진행되는 동안 모든 그룹의 항체 역가는 상승하였으며, ISA70 및 KR-1, CNU-1은 그룹 간 통계학적으로 유의미한 차이는 확인되지 않았다.
- 뉴캐슬 바이러스의 공격 접종 후에는 반전된 역가가 경구 접종이나 근육 접종 모두 그룹 간 차이가 나타나지 않았기에 그룹 간 방어는 통계학적 유의한 차이가 없는 정도로 유지된 것으로 판단되었다.

Table 6. Comparison of infectious bronchitis antibody titers among groups vaccinated with different composition of adjuvants and immunomodulants

Group	ELISA titer (mean±SD) at weeks post vaccination		
	0	3	6
Control	0	32.58±38.19	128.58±143.60 ^{b*}
CNU-1	0	214.42±247.68	432.42±669.28 ^{ab}
CAvant WO-A1	0	79.17±82.73	188.58±180.51 ^b
KR-1	0	82±71.33	676.17±376.16 ^a
ISA70	0	34.42±19.22	104.33±171.5 ^b

* Superscripts indicate between the same column, means having different letters are significant (P<0.05) but same letters are not significant.

- 각 그룹의 IB ELISA titer를 백신 접종 후 주차에 따라 One-way ANOVA 분석법으로 비교하였다.
- 1차 백신 접종 후 모든 접종 그룹에서 IB ELISA 역가가 상승하였으나, 야외감염을 막을

수 있는 수준의 충분한 역가를 형성하지 못하였다.

- 2차 백신 접종 후 모든 접종 그룹에서 IB ELISA 역가가 1차 접종에 비하여 항체역가의 상승을 보였다. 특히, KR-1이 높은 상승 추이를 나타냈으며 뒤를 이어 CNU-1이 높은 수준을 형성하였다.
- 2차 백신 접종 3주 후인 6주차에 KR-1이 ISA70과 CAvant WO-A1, 대조군에 비하여 통계적으로 유의미하게 높은 값을 기록하였다.
- 종합적으로 판단하였을 때 AI, ND 항원에 비하여 IB 항원에 의한 역가 상승이 전반적으로 저조하였으나, 백신 접종에 따른 역가 상승은 관찰할 수 있었다. 단, IB의 특성상 ELISA의 역가가 충분히 확인될 수 없기에 필요에 따라서는 HI 역가의 측정을 실시할 필요가 있을 것으로 판단된다.

3) 시험 백신 접종 후 공격 접종 시 생존율 비교

시험 백신을 접종한 그룹과 대조군에 뉴캐슬병 바이러스 강독주 (Kr005주)를 근육, 구강으로 공격 접종하여 임상 증상을 관찰한다

Table 7. Comparison of survival rate among groups vaccinated with different composition of adjuvants and immunomodulants

Groups	Mortality post challenge*		Survival rate
	I/M	P/O	
Control	3/3	3/3	0%
CNU-1	0/3	0/3	100%
CAvant WO-A1	0/3	0/3	100%
KR-1	0/3	0/3	100%
ISA70	0/3	0/3	100%

* I/M = intramuscular administration, P/O = per oral inoculation

- 각 그룹의 모든 닭은 공격 접종 후 14일간 매일 관찰하였으며 폐사 수를 기록하였다.
- 공격 접종에 관계없이 공격 접종 후 대조군은 100% 폐사하였다.
- 대조군에서 근육 접종 후 4일에 1수, 5일에 2수 폐사하였고, 구강 접종 후 6일, 7일, 8일에 1수씩 폐사하였다.
- 시험군은 공격 접종 후 공격 접종에 관계없이 100% 생존하는 것을 확인하였다.
- 종합적으로 보았을 때, 최소한 ND의 경우 백신 접종군은 야외 강독주에 대하여 충분히 방어할 수 있는 항체가 있는 것으로 판단이 되었으며 시험대상 4개 백신 모두 만족할만한 결과를 도출한 것으로 확인되었다.

2-3-2. 개발된 백신보조제(CAvant WO-A1) 함유 조류핵심질병(조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 전염성 기관지염, 산란저하증 등) 다가혼합백신의 야외실증시험 평가

1) 다가혼합백신의 야외 실증 시험 농장 선정 및 백신 조성

세부협동기관에서 선행된 면역증강제의 스크리닝 시험결과를 토대로 백신보조제(CAvant WO-A1)와 서로 다른 면역증강제를 포함한 시험 백신을 제조하였다. 그리고 농장별 서로 다른 면역증강제를 포함한 시험 백신을 제작하여 농장의 다가백신 접종 프로그램일정에 맞추어 접종하였다.

Table 8. Summary of poultry layer farms inoculated with CAvant WO-A1 based oil vaccines with different immunomodulant

Group	Location	Number of birds	Age at vaccination*	Composition	Measurement**
Farm A	Yeo-ju	52000	15 weeks	CAvant WO-A1, Chitosan, Antigen	Clinical sign Mortality Antibody titer Egg production rate
Farm B	Yang-san	52000	16 weeks	CAvant WO-A1, hWRS, Antigen	
Farm C	Yang-san	24000	15 weeks	CAvant WO-A1, Squalene, Antigen	

* The chickens were inoculated intramuscularly with 0.5 ml of vaccines at designed age.

** The chickens were bleed at designed day. Also any clinical signs, mortality and egg production rate were recorded daily basis during the experiments.

- 지역이 다른 농장 3군데를 선정하였다. 현지 농장에서의 백신 접종 실험은 부분적인 백신 접종이 될 수 없기 때문에 적절한 농장을 선정하는데 많은 시간이 소요되었다.
- 특히 농장의 백신접종 프로그램을 유지하면서 부분적인 시험오일 백신으로 대체하는 방법은 많은 설득이 필요하였다.
- 야외농장의 특성상 야외감염의 기회가 많으며, 이를 방지하기가 어렵고 기타 다양한 질병들의 감염이 우려되어 자료의 확보와 분석이 쉽지 않았다.

1) 다가혼합백신의 안전성 평가

다가혼합백신의 안전성 평가를 위하여 각 농장의 백신프로그램에 맞추어 접종 후 도태 및 폐사율, 주간 산란율을 측정하였다.

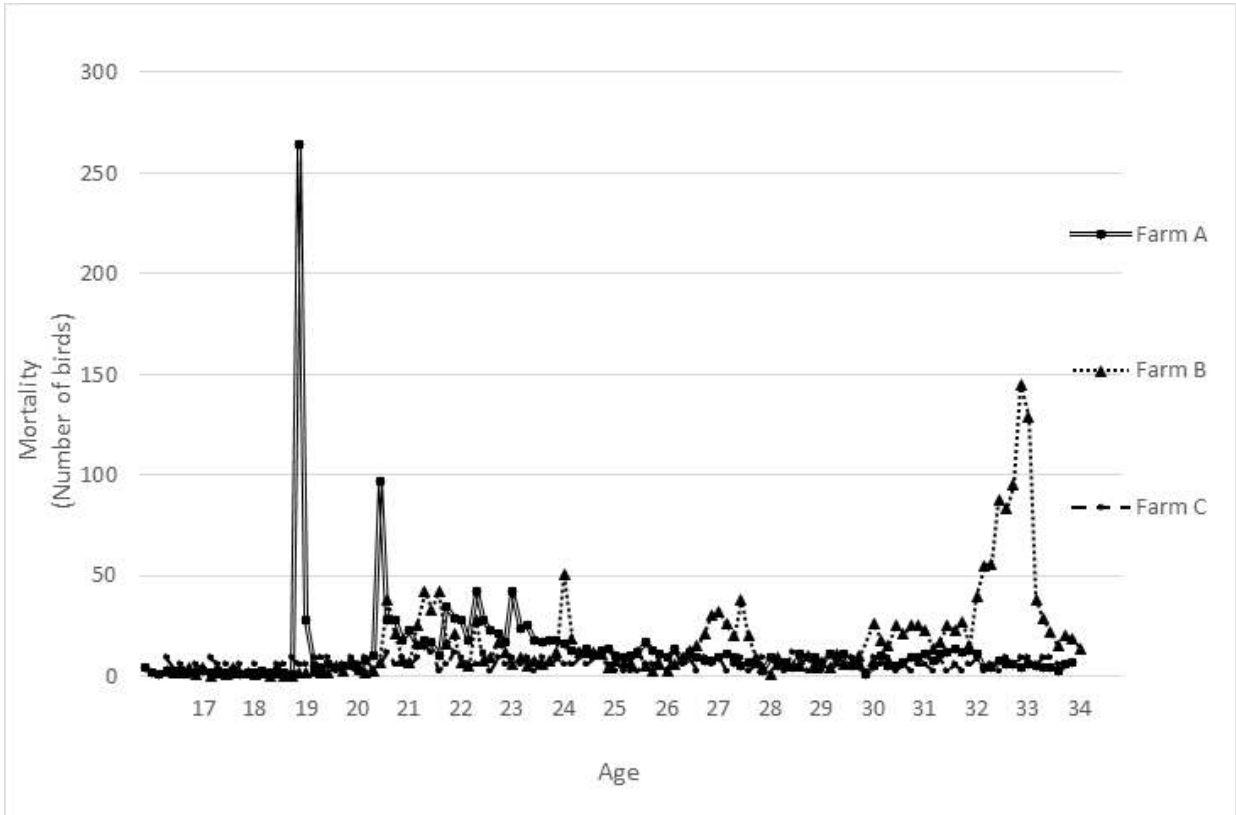


Figure 1. Comparison of daily mortality and condemnation rate among farms vaccinated with different composition of immunomodulants

- A 농장에서 7월 중순인 15주령에 일 폐사 수수가 250수까지 증가하였으며 이후 평균수준으로 감소하였으나 8월 초인 20주령에 다시 일 폐사 수수가 100수로 증가하였다. 이러한 현상은 급격한 기온이 상승함으로써 나타난 현상에 대하여 적절한 시설이나 조치를 취하지 못한 것으로 판단되었다.
- A 농장에는 쿨링 패드가 설치되었으나, 급격한 기온 변화에 대응하기엔 절대적으로 부족한 것으로 확인되었다. 이후 기온의 저하 및 관련된 조치로 폐사율은 감소하기 시작했다.
- B 농장은 급격히 날씨가 더워지던 7월 중순부터 도태 및 폐사율의 증가가 관찰되었다. 이후 10월 초에서 중순까지인 3주령에 일 폐사 수수가 150수까지 증가하여 원인을 확인한 결과, 가금 티푸스의 감염으로 판정되었다.
- C 농장에서는 A, B 농장과는 달리 폐사율의 증가가 없이 일반적인 농장이 정상적인 폐사율 범위 내로 유지하였다. A, B 농장과 달리 더운 날씨에 의한 영향이 없었던 것으로 판단되었다.

- 결론적으로 A, B, C 농장에서의 폐사율은 본 연구와 직접적인 관계가 있는 AI, ND 및 IB에 의한 영향은 없었던 것으로 판단되었다.

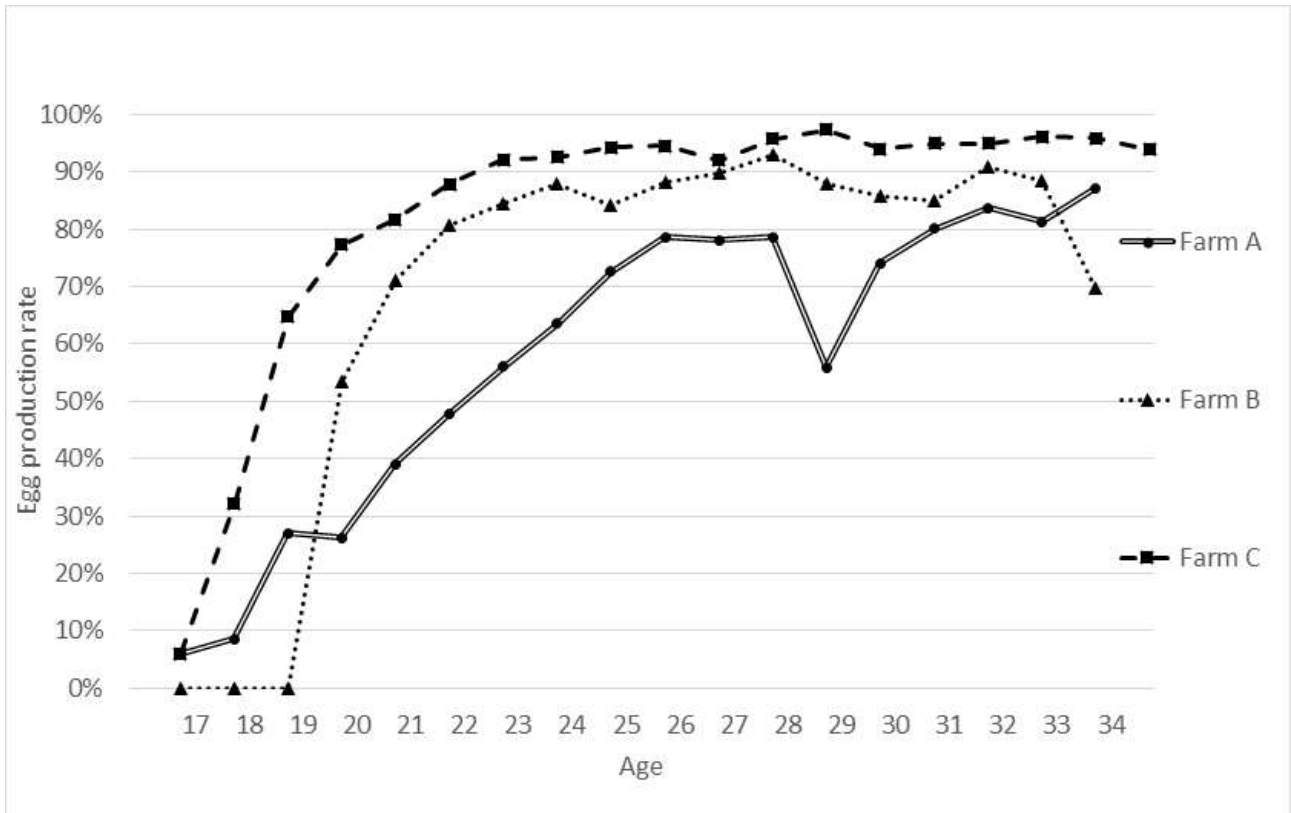


Figure 2. Comparison of weekly egg production rate among commercial layer farms vaccinated with different composition of immunomodulants

- A 농장에서는 급격한 기온의 상승으로 폐사율이 급격히 증가하였던 시기인 7월 초인 19주령에 산란율이 상승의 폭이 일부 하락하였다. 이후 산란율이 증가하는 추세를 보였으나, 상승이 낮았고, 표준 산란율 곡선으로 회복하지 못하였다.
- 따라서 9월 초에 A 농장에서는 28주령에 단기 환우를 실시하였고 그 이후 피해를 입었던 산란 초기와 비교하면 높은 산란율의 수준으로 회복되었다.
- B 농장은 A 농장과 비교하면, 산란 초기부터 높은 산란율을 기록하며 지속하였으나, 10월 초 33주령에 가금티푸스의 감염으로 인한 폐사율이 증가한 시기에 하락한 것으로 나타났다.
- C 농장에서는 A, B 농장과 달리 큰 감소폭이 없이, 증가하는 양상을 나타냈고 10월 중순 기점인 34주령까지 정상적인 산란율 곡선을 유지하였다.
- A, B, C 농장에서의 산란율은 본 연구와 직접적인 관계가 있는 AI, ND 및 IB에 의한 영향은 없었던 것으로 판단되었다.

2) 다가혼합 시험백신의 효능성 평가

각 농장의 백신 프로그램일정에 맞추어 다가혼합 시험백신을 접종하고 접종 전, 접종 후 2주, 4주, 8주, 12주에 채혈한 혈청으로 다가혼합 시험백신에 포함된 질병의 항체 역가를 측정한다.

Table 9. Comparison of H9 subtype avian influenza antibody titers among commercial layer farms vaccinated with different composition of immunomodulants

Farms	Hemagglutination inhibition titer (mean±SD) at weeks post vaccination				
	0	2	4	8	12
Farm A	0±0*	4.7±1.3 ^b	4.35±1.04 ^b	2.77±1.24 ^c	3.65±1.39 ^b
Farm B	0±0	4.05±0.89 ^b	4.4±0.99 ^b	4±0.86 ^b	3.9±1.37 ^b
Farm C	5.63±0.85	7.4±1.06 ^a	6.07±1.65 ^a	6.73±1.08 ^a	6.8±0.78 ^a

* Superscripts indicate between the same column, means having different letters are significant (P<0.05) but same letters are not significant.

각 농장 별 AI HI titer를 백신 접종 후 주차에 따라 One-way ANOVA로 분석하였다.

- A, B, C 농장 간 백신 접종 후 2 주차부터 12 주차까지 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었고, C 농장이 통계적으로 높은 역가 수치를 지속적으로 유지하였다. 그러나, C 농장의 경우 본 시험 백신이 접종되기 전 이미 AI 항원이 포함된 백신을 1차 접종하였다. 그로 인하여 boosting 효과로 높은 역가를 유지할 수 있었다.

- A 농장은 접종 후 2주 후 역가를 나타내기 시작하였다. 4, 8 주차에 실험 농장 중 가장 낮은 역가 평균 수치를 보였지만, 역가 수치의 분포는 정규 분포와 유사한 형태를 이루었다.

- B 농장은 접종 후 꾸준한 역가 수치를 나타내었으며 시험 기간 동안 수치의 변화는 크게 나타내지 않았다.

- A 농장은 시험기간 전반기에, B 농장은 시험기간 후반기에 다소 높은 역가 분포를 나타냈지만, 대체적으로 시험기간 동안 두 농장은 비슷한 수준의 역가 변화를 보였으며 일반적인 오일백신에서 기대되는 역가 분포를 보였다.

Table 10. Comparison of Newcastle disease virus antibody titers among commercial layer farms vaccinated with different composition of immunomodulants

Farms	Hemagglutination inhibition titer (mean±SD) at weeks post vaccination				
	0	2	4	8	12
Farm A	6.4±1.26 ^{b*}	8.35±2.45	7.85±1.90	6.46±2.3 ^b	6.05±1.39 ^b
Farm B	5.15±1.27 ^b	9.25±1.44	7.85±1.66	8.25±1.16 ^a	7.58±1.43 ^a
Farm C	7.34±0.89 ^a	8.47±0.97	8.6±1.79	8.63±0.72 ^a	6.8±1.46 ^{ab}

* Superscripts indicate between the same column, means having different letters are significant (P<0.05) but same letters are not significant.

각 농장 별 ND HI titer를 백신 접종 후 주차에 따라 One-way ANOVA로 분석하였다.

- 본 개발된 백신을 접종하기 전 A, B, C 농장 모두 일반적인 생독백신과 사독백신을 접종한 상태였기 때문에 일정 수준 이상의 역가를 이미 형성하고 있었다.

- A, B, C 농장 모두 백신 접종 후 역가 상승이 나타났으며, 이후 12주까지 다소 역가의 하락이 공통적으로 확인되었으나, 모두 오차범위 내의 수준으로 판단되어 지속적인 높은 역가를 유지하는 것으로 판단되었다.

- 접종 후 2 주차에 측정한 결과, 접종 전 역가 수치보다 상승하였으며, 8 주차, 12 주차에 농장 간 통계적으로 유의미한 차이가 있었으나 12 주차까지 모든 농장은 2⁶ 이상의 높은 평균 역가 수치를 유지하고 있었다.

- B 농장은 A, C 농장과 비교할 때, 접종 후 증가하는 역가 수치의 폭은 컸으며, 8주차에는 A, C 농장과 함께 비교할 때 통계학적 유의한 차이를 보였다.

- C 농장은 A, B 농장에 비하여 접종 전 높은 역가 수치를 나타냈으며, 접종 후 증가하는 폭은 크지 않았다.

- 전반적으로 A, B, C 농장 간의 다소의 차이가 인정이 되었으나, 백신 접종 후 역가의 상승이 공통적으로 관찰되었고 그 역가가 실험기간 동안인 12주까지 유지하는 것으로 확인되었다.

Table 11. Comparison of Infectious bronchitis virus antibody titers among commercial layer farms vaccinated with different composition of immunomodulants

Farms	ELISA titer (mean±standard deviation) at weeks post vaccination				
	0	2	4	8	12
Farm A	5245±2561 ^{ab*}	6955±3790 ^b	7813±2082 ^a	6416±4255 ^{ab}	6548±2279
Farm B	6949±3210 ^a	9850±2137 ^a	6914±1434 ^a	6843±1969 ^a	6776±1357
Farm C	3488±2050 ^b	2965±2037 ^c	2198±401 ^b	3910±2178 ^b	5031±3276

* Superscripts indicate between the same column, means having different letters are significant (P<0.05) but same letters are not significant.

각 농장의 IB ELISA titer를 백신 접종 후 주차에 따라 One-way ANOVA 분석법으로 분석하였다.

- A, B, C 농장 모두 개발된 본 백신을 접종하기 전에 이미 IB 생독백신과 사독백신을 하였기 때문에 일정수준 이상의 역가를 형성하고 있었다.
- 백신 접종 후 농장에 따라 역가의 상승과 하락의 양상을 보였으나 본 실험의 마지막 관찰 시기인 12주에는 3 농장 모두 양호한 수준의 역가를 형성하였다.
- 본 실험을 하는 동안 야외 IB 바이러스의 감염은 임상학적 혹은 실험실적으로 없었던 것으로 판단되어 현재의 역가는 모두 백신에 의한 것으로 판단을 하였다.
- A 농장은 4 주차까지 증가하는 양상을 보였으나 접종 후 8 주차에 이후 일부 하락하는 현상을 보인 후 12 주차까지 높은 수준의 역가를 유지하고 있는 것으로 판단이 되었다.
- B 농장은 다른 농장에 비하여 접종 2주 후에 매우 높은 역가 수치를 기록하고 이후 일부 하락하였으나, 12 주차까지 비슷한 수준의 역가를 유지하였고 가장 높은 역가를 유지하고 있는 것으로 판단이 되었다.
- C 농장은 접종 후 4 주차까지 오히려 감소하는 양상을 보였으나, 8 주차 이후 역가 수치가 증가하였고, 12 주차에는 가장 높은 역가 상승 폭을 형성하고 유지하고 있는 것으로 판단이 되었다.
- A, B, C 농장은 12주령을 제외하고 실험 기간 동안 농장 간 모든 주차에 통계적으로 유의미한 차이를 나타냈다. 실험 기간 동안 C 농장의 경우 다른 농장에 비하여 낮은 역가 형성을 보였으며, 접종 2주 후에는 B 농장, 접종 4주 후에는 A 농장의 역가가 가장 높은 것으로 확인되었다. 하지만 A 농장과 B 농장은 전반적으로 비슷한 역가의 형성을 보이는 것으로 판단된다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

3-1-1. 연차별 연구개발 목표

구분	연도	연구개발의 목표
1차년도	2016	유화제(surfactants)들의 조성별 유화제조조건 확립 및 특성분석
		후보군 유화제로 조성된 유화액의 안정성 평가
		재조합 분자면역증강제 발굴
		천연물 혹은 화합물 기반 면역증강 물질 스크리닝 및 발굴
		신규 TLR agonist 기반 분자면역증강 단백질 발현시스템 구축
		분자면역증강 단백질 발현 및 정제 최적화
		신규 면역증강 물질의 선천면역 자극 효율 검증
		개발시험물질(백신보조제)의 생체 내 안전성평가에 의한 스크린
		선정된 백신보조제 및 면역증강제의 안전성 및 면역원성 비교
		독자적인 중앙백신 백신보조제 개발
2차년도	2017	개발된 백신보조제를 함유하는 조류핵심질병 다가혼합백신 제제화
		개발된 백신보조제를 함유하는 조류핵심질병 다가혼합백신 목적동물 안전 및 효능 평가
		다가혼합백신 임상시험계획서 제출 및 승인
		분자면역증강제의 재조합 발현 및 특성 분석
		제제형태 (전세포 (whole cell), 파쇄 등)에 따른 면역원성 증가 효과 평가
		시험백신 제조를 위한 재조합 분자면역증강제를 주관연구기관에 공급
		신규 면역증강 물질 및 단백질의 면역증강 기작 규명 (In vitro) 연구
		개발된 백신보조제를 함유하는 조류핵심질병 다가혼합백신의 야외실 증시험
3차년도	2018	야외 임상 결과 분석 및 보완
		개발된 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 산업화 방안 연구
		백신보조제 scale-up 최적 조건 확립
		분자면역증강제가 포함된 백신보조제의 상품 등록 및 특허 출원
		조류 핵심질병 다가혼합백신의 품목허가서류 제출

3-1-2. 연차별 연구 성과 목표

(단위 : 백만원, 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시
											SCI	비 SCI							
최종목표	7	7		2		6			3		2	9		3			2	3	
1차년도	목표																		
	실적	1										2		1					
2차년도	목표	3				3			1		1	4		2					
	실적	1	1			1			2		0	8		14		1			
3차년도	목표	4			2	3			2		1	3		1			2	3	
	실적	4	1		2	5			1		1	2		8		1	1	3	
소계	목표	7	0		2	6			3		2	7		3		0	2	3	
	실적	6	2		2	6			3		1	12		23		2	1	3	
종료 1차년도							2,600	440				1							
종료 2차년도		3					2,820	528				1							
종료 3차년도		4					2,980	1,100											
종료 4차년도							3,200	1,300											
종료 5차년도							3,500	1,500											
소계		7					15,100	4,868				2							
합계	6	9		2		6	15,100	4,868	3		1	14		23		2	1	3	

3-2. 목표 달성여부

3-2-1. 세부연구목표별 연구개발 내역

연구기관	세부연구목표	연구 내역
(제1세부) 중앙백신 연구소	가금용 오일 백신보조제의 개발	<ul style="list-style-type: none"> 후보군 유화제들의 조성별 유화제조 조건 확립 및 특성 분석 완료 후보군 유화제로 조성된 유화액의 안정성 평가 수행 유화액의 항원 방출 시험 수상액의 부피에 따라 적합한 CAvant WO-A1 백신보조제 개발 이화학분석
	가금용 오일 백신보조제가 포함된 혼합백신의 평가	<ul style="list-style-type: none"> 혼합백신 제제화 평가 개발된 가금용 오일 백신보조제의 SPF 닭에서의 항체가 지속성 평가
	가금용 오일 백신보조제가 포함된 혼합백신의 임상시험	<ul style="list-style-type: none"> 시험백신 제조내역 시제품의 3개월 마다 안전시험 및 효능시험 반복 야외임상평가 실시 백신 제품 허가 등록 완료
	가금용 오일 백신보조제의 대량생산 시스템 구축 및 상용화	<ul style="list-style-type: none"> 제조시설 구축 (논산 사진 및 설명) 개발 제품명 및 상품의 상표등록 사진 추가 신기술 인증
	면역증강제가 포함된 가금용 오일 백신보조제의 개발	<ul style="list-style-type: none"> 분자면역증강제가 함유된 백신보조제의 효능평가 분자면역증강제 함유 백신보조제 평가 분자면역증강제 함유 백신 효능 평가
(제1협동) 한국생명공 학연구원	다양한 분자면역증강제 후보의 확보	<ul style="list-style-type: none"> HSP, hydrophobin, flagellin 및 squalene 등을 후보로 선정하고 유전자를 확보
	재조합 발현 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> 효모에서의 세포내발현, 분비발현, 세포벽 부착 등의 생산 시스템을 구축하여 각각의 재조합 면역증강제의 발현을 확인 완료
	면역원성 증진 효과 평가 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> 재조합 면역증강제의 효과를 분석하기 위해 일부 시료를 생산하여 협력기관에 제공

	<p>분자면역증강제의 재조합 발현 및 특성분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • hydrophobin의 효모 세포 표면 발현 균주, cHSP70의 MBP-등 융합 발현 대장균 균주를 제조하고 발현을 확인. 또한 분자면역증강제 HFB1과 여러 바이러스 항원을 융합 발현 하고 단백질 발현 효율 증가를 확인
	<p>제재 형태에 따른 면역원성 증가효과 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 세포내 발현, 세포 표면 발현 및 분비 발현 등 발현 양태 별 재조합 발현을 확인하고 전세포 및 세포 파쇄물 시료 제조
	<p>시험 백신 제조를 위한 재조합 분자면역증강제 주관연구기관 공급</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 재조합 분자면역증강제의 면역원성 증진 효과 분석을 위하여 효모 및 대장균 배양 후 시료 제조
	<p>유전자 발현 최적화 등 분자면역증강제 재조합 기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 세포자체가 면역증강 효과를 가지는 새로운 효모 <i>Kluyveromyces marxianus</i> 및 <i>Sacharomyces boulardii</i> 균주를 활용하여 백신 항원의 재조합 발현을 확인하고 스쿠알렌의 세포내 과량 축적을 위한 생합성 유전자 조합 발현의 최적화 연구 수행
	<p>발효배양 최적화 및 대량생산 기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 스쿠알렌의 대량 발효 생산을 위한 재조합 효모균주의 발효 배양 최적화를 수행하고 30리터 발효조 규모에서 스케일-업을 수행
	<p>분자면역증강제 대량 생산 및 협동연구기관 공급</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 스쿠알렌 생산 효모균주를 최적 유전자 발현 및 최적 발효 배양 조건으로 30리터 발효조 규모에서 배양한 후 스쿠알렌 축적 효모 전세포를 협동연구기관에 공급
<p>(제2협동) 충남대학교</p>	<p>신규의 TLR agonist 기반 분자면역증강 물질 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 바이러스 감염시 면역세포에서 신규 TLR agonist 기반 분자면역증강 단백질 (WRS)의 분비 검증 • 대장균 발현시스템을 이용한 가용성의 면역증강 재조합 단백질 WRS 발현시스템 확립 및 정제 • 면역세포에서 분자면역증강 단백질 WRS의 선천면역 자극 효능 검증 및 기전 검증 • 마우스 모델을 이용한 분자면역증강 단백질 WRS의 백신 항원에 대한 체액성, 세포성면역증강 효능 검증 • 마우스 모델을 이용한 분자면역증강 단백질 WRS의 인플루엔자 백신항원에 대한 면역증강 효능 및 인플루엔자 방어효능 검증 • 대장균 발현시스템을 이용한 가용성의 Chicken 유래 분자면역증강 단백질 cWRS 발현시스템 확립 및 정제 • 닭유래 면역세포에서 분자면역증강 단백질 cWRS의 선천면역 자극 효능 검증

		<ul style="list-style-type: none"> • 신규의 분자면역증강 단백질 WRS-chicken IFN-lamda와 WRS-VP3을 대장균 발현시스템을 이용하여 가용성 단백질 발현 및 정제 • 분자면역증강 단백질 WRS-chicken IFN-lamda와 WRS-VP3의 동물모델 (마우스)를 이용한 면역증강 효능 검증
	천연물 기반 신규의 면역증강 물질 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 한방생약소재중 음양곽으로부터 선천면역 유도 물질인 Quercetin을 분리, 선별 • Quercetin의 선천면역 자극효능 검증 및 항바이러스 효능 검증 • Chicken BMDM을 이용하여 선천면역을 유도하는 한방생약소재를 W314등 선별 • 닭유래 면역세포에서 한방생약소재 W314의 선천면역 자극 효능 검증 • 동물모델 (마우스)를 이용한 선별 한방생약소재 (W314)의 면역증강 효능 및 인플루엔자 방어효능 검증
	인플루엔자 재조합항원을 이용한 백신보조제 면역원성 검증 및 백신효능 검증시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> • 인플루엔자 재조합항원 M2HA2를 이용한 선별백신보조제의 면역원성 검증 및 백신효능 검증방법 구축 • 인플루엔자 재조합항원 M2HA2를 이용하여 면역보조제 CAvant WO-A1과 ISA70의 면역원성 및 백신효능을 비교 검증 • 백신보조제 CAvant WO-A1의 세포성면역 효능 비교/검증
	닭에서 면역보조제의 세포성면역 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 닭을 대상으로 수행한 면역보조제 연구에서 세포성면역 검증
(제3세부) 충북대학교	개발된 백신보조제 및 면역증강제를 함유한 백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 안전성 평가 (조직검사 등) 에 관한 부분 실시하였고, 임상 증상 등 별 다른 문제 없음
	선정된 백신보조제 및 면역 증강제 혼합제에 대한 안전성 및 면역원성 시험	<ul style="list-style-type: none"> • 시험 기간 중 증체량의 안전성 및 폐사 없음 • 뉴캐슬 공격접종 후 생존 등 확인됨

<p>개발된 백신보조제 함유 조류핵심질병 다가혼합백신의 실험실적 안전성 및 효능성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 증체량의 유의한 차이는 확인되었고, 시험기간 동안 폐사는 발생하지 않음 • 뉴캐슬 공격 접종 시 백신 접종 그룹에서는 폐사 발생하지 않았고, 항체 역가 수치는 접종 후 상승 유지 되는 양상을 보임
<p>개발된 백신보조제 함유 조류핵심질병 다가혼합백신의 야외 실증 시험 안전성 및 효능성, 생산지수 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 날씨 변화와 외부 세균 감염으로 인하여 폐사가 발생함, 이러한 외부 요인으로 초기 산란율에 영향이 있었으나 요인이 제거 된 후 회복되었음 • 백신에 포함된 질병의 항체 역가는 접종 후 증가하여 유지되는 양상을 나타냈음 • 특히, 2차적으로 접종된 경우, Boosting 효과로 높은 역가 수치의 상승 수준을 보였음

3-2-2. 연차별 연구 성과 목표 달성 여부

(단위 : 백만원, 건수)

성과목표		사업화지표										연구기반지표								
		지식재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과		교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 · 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
		특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SCI	비 SCI							
소 계	목 표	7	0		2		6			3		2	7		3		0	2	3	
	실 적	6	2		2		6			3		1	12		23		2	1	3	

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

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 백신보조제 및 면역증강제의 연구 및 개발로 관련 생물학 분야 연구 증대
- 독자적인 국내 기술로 백신보조제 개발로 백신 보조제 수입대체 효과
- 백신 보조제 및 면역증강제의 자체상품화로 국내 및 해외(중국 및 동남아) 백신보조제 시장 진출
- 원가 절감 및 고품질 조류 백신 개발로 국내 백신의 수출 경쟁력 강화
- 원천 기술로 관련된 백신 및 백신보조제 연구개발에 플랫폼 기술로 활용

○ 기술적 측면

- 우수한 효능과 낮은 독성의 백신개발에 필수적인 백신보조제로서 에멀전 보조제를 개발함으로써 다국적 기업만이 보유하여 신규 백신제품개발에 있어 기술종속이 심각한 백신 보조제의 국내 독자적 기술 확보 효과
- 동물백신용 에멀전 보조제 핵심기술을 기반으로 이중 및 다중 에멀전 보조제를 개발하여 타겟 동물별, 백신 종류별 다양한 신규 백신제품군 개발 효과
- 에멀전 보조제의 효능, 안전성 및 면역원성 향상 기전의 이해로 향후 개발이 예상되는 서브유닛 백신, 재조합 백신 등에 적용가능한 기반기술의 확보 효과
- 발굴 개발한 신규의 면역자극 단백질의 면역증강제(Immune stimulator)로의 개발은 국내 혹은 세계적으로 독자적인 면역증강제(Immune stimulator) 개발 기술을 확보하는 효과
- 안전하고 경제성이 확보된 재조합 면역증강제 생산시스템 확보 효과
- 최종적인 백신보조제(adjuvant) 제조를 위한 재조합 면역증강제 제조공정 기술의 확보
- 숙주 맞춤형의 독자적 생산 및 적용으로 조류 백신을 위한 백신보조제(adjuvant)의 개발에 활용 및 더 나아가 적용의 범위를 다양한 축산분야를 비롯한 사람의 백신보조제(adjuvant)로 개발 활용
- 기술적 측면에서 중요한 분자면역 증강제의 효능 제고를 위하여 항원과의 융합 발현 등의 추가 연구를 진행할 계획임

○ 경제적·산업적 측면

- 해외 다국적 기업만이 보유하고 있으며 국내에 아직 시장이 형성되어 있지 않은 백신보조제의 국내 시장 창출 효과
- 현재 대부분을 수입에 의존하고 있는 에멀전 보조제의 수입대체 효과

표. 개발된 백신보조제의 기술 사업화 및 실용화 방안

구분		대상
백신	조류 불활화 백신 (국내 및 수출)	자사 백신
제품	백신보조제 면역증강제	국내외 동물용 백신 제조사

- 국내에 유통되고 있는 조류용 백신보조제는 수입 제품인 Seppic사의 ISA70 이며, 조류용 백신보조제 개발에 성공하여 주관기관인 중앙백신연구소에서는 개발제품인 CAvant WO-A1로 대체하여 사용할 예정임. 신규 허가등록 제품에 해당 내용 명시 예정
- 중국, 파키스탄, 이란 등 조류 백신의 수요가 많은 지역의 백신보조제 수출사업을 추진하여 기존 수입제품 대비 가격 경쟁력을 갖춘 CAvant WO-A1를 수출할 계획을 가지고 있음.
- 국내 동물용 백신의 고품질화와 생산단가 절감으로 국내외 시장 경쟁력 강화 효과
- 에멀전 보조제의 동물백신 적용 결과와 유전공학 기술의 발전으로 백신보조제의 작용기전의 이해를 통해 치료 및 예방이 어려운 질환의 정복을 위한 백신산업의 발전에 기여
- NDV 및 AIV 불활화 백신 등에 적용하여 양계용 백신 제품화에 활용
- 에멀전 보조제 자체의 안전성과 면역원성 검증을 통하여 에멀전 보조제 상품화에 활용
- 국내 동물백신제조에 활용할 뿐만 아니라 기 확보된 동남아 시장 진출용 제품개발과 중남미 및 아프리카 시장 개척용 제품개발에 활용
- 산업화에 관건이 되는 경제성 확보를 위하여 재조합 단백질 분자면역증강제의 생산에 있어서 세포파쇄 및 분리정제 공정을 피함으로써 획기적 공정 단순화를 이룰 수 있는 효모전세포 활용 방안 등을 모색할 계획임

○ 사업화 계획

- 개발된 조류 백신보조제의 상품화 (CAvant WO-A1) 및 기술이전
- 개발된 조류 백신보조제로 자사 사용으로 수입하고 있는 백신보조제 대체 효과
- 개발된 조류 백신보조제 및 조류용 백신의 수출 증대 계획

5. 실적 자료

5-1. 특허 (출원 6건, 등록 2건)

- 1) 특허출원 (10-2016-0084656)
 - 트립토판닐-tRNA 합성효소 단백질을 함유하는 조성물의 백신보조제로서의 활용
- 2) 특허출원 (10-2017-0118709)
 - 트립토판닐-tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이의 용도
- 3) 특허출원 (10-2018-0159687)
 - 클루이베로마이세스 막시아누스 균주에서 유도 발현이 가능한 프로모터 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템
- 4) 특허출원 (10-2018-0095792)
 - 프럭탄을 함유하는 바이오 매스로부터 바이오 에탄올과 면역증강 프로바이오틱 효모 균체를 동시 생산하는 방법
- 5) 특허출원 (10-2018-0141588)
 - 안정성과 면역원성이 증대된 동물용 백신보조제 조성물
- 6) 특허출원 (10-2019-0012317)
 - 동물용 백신보조제 조성물
- 7) 특허등록 (10-1729547)
 - 트립토판닐-tRNA 합성효소 단백질을 함유하는 조성물의 백신보조제로서의 활용
- 8) 특허등록 (10-1886415)
 - 트립토판닐-tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이의 용도

5-2. 기술이전 (2건)

- 1) ‘분자 면역증강제 생산 노하우 기술’ 한국생명공학연구원과 기술이전
- 2) ‘자완 조성물의 백신보조제로서의 활용’ 충남대학교와 기술이전

5-3. 사업화 (제품화 6건)

- 1) 개발된 조류용 백신보조제의 상품화: 제품명 CAvant WO-A1
 - 마케팅 상표 등록



- 2) 개발된 조류용 백신보조제가 적용된 조류 백신의 상품화: 제품명 NEO-6
- 3) 개발된 조류용 백신보조제가 적용된 조류 백신의 상품화: 제품명 QX Flu-4
- 4) 개발된 조류용 백신보조제가 적용된 조류 백신의 상품화: 제품명 QX Flu-5
- 5) 개발된 면역증강제를 포함하는 조류용 사료첨가제 상품화: 제품명 포올가드
- 6) 면역증강제가 포함된 조류용 백신보조제 상품화: 제품명 CAWIO-A

2018-01-12

【상표권본】

CAWIO-A

5-4. 고용창출 (정규직 채용 3명)

- 1) 박상찬(중앙백신연구소)
- 2) 김민호(중앙백신연구소)
- 3) 강현정(중앙백신연구소)

5-5. 기술인증 (1건)

1) 농림축산식품부 인증 NET 신기술 인증

기술명 '안정성이 증대된 W/O type 백신보조제 유화기술'

제23-056호



신 기술 인증서

기술명 : 안정성이 증대된 W/O type 백신보조제 유화기술

기관명 : (주)중앙백신연구소

대표자 : 윤인중

소재지 : 대전광역시 유성구 유성대로 1476-37

인증번호 : 23-056

유효기간 : 2018년 7월 5일부터 2020년 7월 4일까지

위 기술을 「농림식품과학기술 육성법」 제12조의2에 따른
신기술로 인증합니다.

2018년 7월 5일

농림축산식품부장관



5-6. 논문 (SCI 11건, 비SCI 1건)

1) J Microbiol. 2017 Jun;55(6):488-498

- *Coptidis Rhizoma* extract inhibits replication of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by inducing antiviral state.

Journal of Microbiology (2017) Vol. 55, No. 6, pp. 488-498
DOI 10.1007/s12275-017-7088-x

eISSN 1976-3794
pISSN 1225-8873

Coptidis Rhizoma extract inhibits replication of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by inducing antiviral state

Byeong-Hoon Lee^{1†}, Kiramage Chathuranga^{1†},
Md Bashir Uddin^{1,2}, Prasanna Weeratunga¹,
Myun Soo Kim³, Won-Kyung Cho⁴,
Hong Ik Kim³, Jin Yeul Ma⁴, and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

²Faculty of Veterinary and Animal Science, Sylhet Agricultural University, Sylhet 3100, Bangladesh

³Vitabio Corporation, Daejeon 34540, Republic of Korea

⁴Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu 41062, Republic of Korea

(Received Feb 27, 2017 / Accepted Mar 15, 2017)

Coptidis Rhizoma is derived from the dried rhizome of Ranunculaceae plants and is a commonly used traditional Chinese medicine. Although *Coptidis Rhizoma* is commonly used for its many therapeutic effects, antiviral activity against respiratory syncytial virus (RSV) has not been reported in detail. In this study, we evaluated the antiviral activities of *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) against RSV in human respiratory tract cell line (HEp2) and BALB/c mice. An effective dose of CRE significantly reduces the replication of RSV in HEp2 cells and reduces the RSV-induced cell death. This antiviral activity against RSV was through the induction of type I interferon-related signaling and the antiviral state in HEp2 cells. More importantly, oral administration of CRE exhibited prophylactic effects in BALB/c mice against RSV. In HPLC analysis, we found the presence of several compounds in the aqueous fraction and among them; we confirmed that palmatine was related to the antiviral properties and immunomodulation effect. Taken together, an extract of *Coptidis Rhizoma* and its components play roles as immunomodulators and could be a potential source as promising natural antivirals that can confer protection to RSV. These outcomes should encourage further allied studies in other natural products.

Keywords: *coptidis rhizoma* (CR), palmatine, respiratory syncytial virus (RSV), antiviral effect

Introduction

In 1956, RSV was discovered and isolated from a captive Chimpanzee (Simoes, 1999). It was soon identified as a human

pathogen when it was recovered from infants with lower respiratory tract infections (LRTI) (Chanock *et al.*, 1957). RSV, a negative-strand non-segmented RNA virus, belongs to the genus *Pneumovirus* of the family *Paramyxoviridae* (Falsey *et al.*, 2000). It is considered to be a leading cause of lower respiratory tract illness in infants and children worldwide, and at least 33 million children under 5 years of age were suffering from RSV-related disease (Hall *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2014). It is also an important cause of acute respiratory illness in the elderly (Collins *et al.*, 2011). Moreover, RSV can be devastating in immune-compromised individuals (Dudas *et al.*, 1998). Although the majority of individuals are infected with RSV at an early age, susceptibility to re-infection with RSV is common throughout life and old age (Varga and Braciale, 2013). Almost six decades later, it remains the most common viral cause of serious respiratory illness, and a licensed RSV vaccine is not yet available (Durbin *et al.*, 2003). The continued lack of any specific therapeutic or a safe and effective vaccine indicates the vital importance in making progress toward reducing global mortality and morbidity from RSV infection. There is also no effective therapeutics targeting RSV. Ribavirin is the only approved medicine for RSV infection, and immunoglobulin preparations do exist for RSV prevention. However, neither of these options is cost-effective or simple to administer (Kneyber *et al.*, 2000; Pelaez *et al.*, 2009) and they are currently under clinical trials for all RSV vaccines as prophylactic and therapeutic candidates (Lindsay *et al.*, 2015). Therefore, other effective therapies for overwhelmed RSV infection warrant investigation.

Medicinal uses of natural plants began with human civilization, and their use eventually spread around the globe (Hoareau *et al.*, 1999). Approximately 70,000 plant species are used for herbal medicinal purposes (Neelesh *et al.*, 2014). Among many herbal medicines, *Coptidis Rhizoma* (CR) is the dried rhizome of *Coptischinensis* Franch, which belongs to the *Ranunculaceae* family, and is recorded in the Chinese Pharmacopeia with the Chinese name of Huang Lian (Hui *et al.*, 2014; Bing *et al.*, 2015). Aqueous extracts of CR have been used in China since ancient times to treat vomiting, diarrhea, and abdominal pain (Hu *et al.*, 2000). Moreover, recent research on CR has discovered that CR has anti-inflammatory, anti-viral, anti-cancer, anti-bacterial, and anti-Alzheimer activities (Hu *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2009; Chin *et al.*, 2010). However, no study currently exists on the CR inhibition of RSV replication and immune modulation.

Initially, almost 200 natural oriental herbs were screened against RSV infection in HEp2 cells and among them *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) was selected. In this present study, we demonstrated that CRE has the ability to inhibit

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: jongsool@cnu.ac.kr; Tel.: +82-42-821-6753; Fax: +82-42-825-7910

Copyright © 2017, The Microbiological Society of Korea

Dense Granule Protein-7 (GRA-7) of *Toxoplasma gondii* inhibits viral replication *in vitro* and *in vivo*

Prasanna Weeratunga^{1†}, Thilina U. B. Herath^{1†},
Tae-Hwan Kim¹, Hyun-Cheol Lee¹,
Jae-Hoon Kim¹, Byeong-Hoon Lee¹,
Eun-Seo Lee¹, Kiramage Chathuranga¹,
W. A. Gayan Chathuranga¹, Chul-Su Yang²,
Jin Yeul Ma³, and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

²Department of Molecular and Life Science, College of Science and Technology, Hanyang University, Ansan 15588, Republic of Korea

³Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu, Republic of Korea

(Received Sep 14, 2017 / Revised Oct 15, 2017 / Accepted Oct 16, 2017)

Dense granule protein-7 (GRA-7) is an excretory protein of *Toxoplasma gondii*. It is a potential serodiagnostic marker and vaccine candidate for toxoplasmosis. Previous reports demonstrated that GRA-7 induces innate immune responses in macrophages by interacting with TRAF6 via the MyD88-dependent pathway. In the present study, we evaluated the antiviral activity and induction of an antiviral state by GRA-7 both *in vitro* and *in vivo*. It was observed that GRA-7 markedly reduced the replication of vesicular stomatitis virus (VSV-GFP), influenza A virus (PR8-GFP), coxsackievirus (H3-GFP), herpes simplex virus (HSV-GFP), and adenovirus-GFP in epithelial (HEK293T/HeLa) and immune (RAW264.7) cells. These antiviral activities of GRA-7 were attributed to the induction of type I interferon (IFN) signaling, resulting in the secretion of IFNs and pro-inflammatory cytokines. Additionally, in BALB/c mice, intranasal administration of GRA-7 prevented lethal infection by influenza A virus (H1N1) and exhibited prophylactic effects against respiratory syncytial virus (RSV-GFP). Collectively, these results suggested that GRA-7 exhibits immunostimulatory and broad spectrum antiviral activities via type I IFN signaling. Thus, GRA-7 can be potentially used as a vaccine adjuvant or as a candidate drug with prophylactic potential against viruses.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, GRA-7, antiviral activity

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: jongsool@cnu.ac.kr; Tel.: +82-42-821-6753; Fax: +82-42-825-7910

Copyright © 2017, The Microbiological Society of Korea

Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate, intracellular, protozoan parasite that infects humans and warm-blooded animals throughout the world (Grimwood and Smith, 1996; Jacobs *et al.*, 1998). It is estimated that almost one-third of the world's human population is affected by *T. gondii*, which is responsible for causing toxoplasmosis, a commonly occurring disease (Opsteegh, 2011; Zhou *et al.*, 2011). *T. gondii* has two main secretory organelles: rhoptries and the dense granules that are associated with host invasion. Dense granule proteins (GRA proteins) are required by the parasite in order to multiply, establish, and evade host immune responses (Carruthers and Sibley, 1997). About 16 GRA proteins have been identified so far and each of these proteins have its own specific function during infection (Mercier and Cesbron-Delauw, 2015). Importantly, GRA-7 has been studied as a vaccine candidate (Sun *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2012). It is a highly immunogenic molecule and has the ability to stimulate significant humoral and cellular immune responses against *T. gondii* (Selseleh *et al.*, 2012; Alaganaan *et al.*, 2014).

Previous studies have also demonstrated that GRA-7 plays important roles in regulating host innate immune responses. It initiates innate signaling via NADPH oxidase (NOX)-dependent reactive oxygen species (ROS) generation and TRAF6 activation in a MyD88-dependent manner and enhances the inflammatory responses (Yang *et al.*, 2016; Koh *et al.*, 2017). However, the roles of GRA-7 in interferon-mediated signaling pathways in response to viral infections have not been elucidated.

Development of vaccines and antiviral drugs are proximate measures for the prevention of highly contagious viral diseases (Smith *et al.*, 2005; Takeuchi and Akira, 2007). Although prophylactic or therapeutic drugs and vaccines have been developed against viral diseases, the emergence of resistance by mutations is associated with clinical non-response and viral persistence, thereby preventing viral clearance. Thus, developing novel antiviral agents against RNA and DNA viruses is immensely important (Cho *et al.*, 2015). During viral infection, induction of an antiviral state at an early stage is crucial to control the dissemination and pathogenesis of viruses (Takeuchi and Akira, 2007). Viral invasion is initially recognized by pattern recognition receptors (PRR) in host cells and rapidly induces innate immune responses, including the induction of interferons and pro-inflammatory cytokines (Smith *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2011). Thus, developing a biological compound or agent that can enhance the innate immune responses is a vital approach for controlling viral infections (Tan *et al.*, 2012). Currently, numerous compounds derived from natural sources or from the pathogens

3) PLoS Pathog. 2018 Sep 21;14(9):e1007302.

- FAS-associated factor-1 positively regulates type I interferon response to RNA virus infection by targeting NLRX1

RESEARCH ARTICLE

FAS-associated factor-1 positively regulates type I interferon response to RNA virus infection by targeting NLRX1

Jae-Hoon Kim^{1*}, Min-Eun Park^{1*}, Chamilani Nikapitiya¹, Tae-Hwan Kim¹, Md Bashir Uddin^{1,2}, Hyun-Cheol Lee¹, Eunhee Kim³, Jin Yeul Ma⁴, Jae U. Jung⁵, Chul-Joong Kim¹, Jong-Soo Lee^{1*}

1 College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea, **2** Faculty of Veterinary & Animal Science, Sylhet Agricultural University, Sylhet, Bangladesh, **3** College of Biological Sciences and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon, Korea, **4** Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), Daegu, Republic of Korea, **5** Department of Molecular Microbiology and Immunology, Keck School of Medicine, University of Southern California, California, United States of America

* These authors contributed equally to this work.

* jongsool@cnu.ac.kr



OPEN ACCESS

Citation: Kim J-H, Park M-E, Nikapitiya C, Kim T-H, Uddin MB, Lee H-C, et al. (2017) FAS-associated factor-1 positively regulates type I interferon response to RNA virus infection by targeting NLRX1. PLoS Pathog 13(5): e1006398. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006398>

Editor: Mark T. Heise, University of North Carolina at Chapel Hill, UNITED STATES

Received: December 22, 2016

Accepted: May 4, 2017

Published: May 22, 2017

Copyright: © 2017 Kim et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 315044031, 316043-3), National Research Foundation (Grant No. 2015020957), the Internal Research Fund of Animal Quarantine and Inspection Agency (QIA) (Grant No. 2013-1181) and the Korean Institute of Oriental Medicine (KIOM) (Grant No. K16281), Republic of Korea.

Abstract

FAS-associated factor-1 (FAF1) is a component of the death-inducing signaling complex involved in Fas-mediated apoptosis. It regulates NF- κ B activity, ubiquitination, and proteasomal degradation. Here, we found that FAF1 positively regulates the type I interferon pathway. FAF1^{del/del} mice, which deficient in FAF1, and FAF1 knockdown immune cells were highly susceptible to RNA virus infection and showed low levels of inflammatory cytokines and type I interferon (IFN) production. FAF1 was bound competitively to NLRX1 and positively regulated type I IFN signaling by interfering with the interaction between NLRX1 and MAVS, thereby freeing MAVS to bind RIG-I, which switched on the MAVS-RIG-I-mediated antiviral signaling cascade. These results highlight a critical role of FAF1 in antiviral responses against RNA virus infection.

Author summary

Type I interferon-mediated antiviral response is critical for controlling virus infections. However, interferon-mediated immune responses need to be tightly regulated to maintain host immune homeostasis. Recently, molecules involved in regulating interferon-mediated innate immune response are the subject of much research. Among these, the first protein to be identified as a negative regulator of MAVS was the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family member, NLRX1. NLRX1 associates with MAVS to inhibit antiviral signaling by interrupting virus-induced RLR-MAVS interactions. Interestingly, we found that FAF1 interacts with NLRX1 in response to RNA virus infection and this interaction inhibits binding of MAVS to NLRX1, which in turn switches on RIG-I mediated antiviral immune responses. As results, we showed that FAF1^{del/del} mice, which deficient in FAF1, and FAF1 knockdown immune cells were highly

- 4) Scientific Reports volume 7, Article number: 4875 (2017)
– Inhibition of highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus by a peptide derived from vFLIP through its direct destabilization of viruses

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Inhibition of highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus by a peptide derived from vFLIP through its direct destabilization of viruses

Received: 12 August 2016
Accepted: 22 May 2017
Published online: 07 July 2017

Ho-Jin Moon^{1,2}, Chamilani Nikapitiya¹, Hyun-Cheol Lee¹, Min-Eun Park^{1,3}, Jae-Hoon Kim¹, Tae-Hwan Kim¹, Ji-Eun Yoon^{1,3}, Won-Kyung Cho⁴, Jin Yeul Ma⁴, Chul-Joong Kim¹, Jae U. Jung⁵ & Jong-Soo Lee¹

The antiviral activities of synthesized K α 2-helix peptide, which was derived from the viral FLICE-like inhibitor protein (vFLIP) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), against influenza A virus (IAV) were investigated *in vitro* and *in vivo*, and mechanisms of action were suggested. In addition to the robust autophagy activity of the K α 2-helix peptide, the present study showed that treatment with the K α 2 peptide fused with the TAT peptide significantly inhibited IAV replication and transmission. Moreover, TAT-K α 2 peptide protected the mice, that were challenged with lethal doses of highly pathogenic influenza A H5N1 or H1N1 viruses. Mechanistically, we found that TAT-K α 2 peptide destabilized the viral membranes, depending on their lipid composition of the viral envelope. In addition to IAV, the K α 2 peptide inhibited infections with enveloped viruses, such as Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Respiratory Syncytial Virus (RSV), without cytotoxicity. These results suggest that TAT-K α 2 peptide is a potential antiviral agent for controlling emerging or re-emerging enveloped viruses, particularly diverse subtypes of IAVs.

Seasonal influenza A virus (IAV), a RNA virus of the Orthomyxoviridae family, presents a considerable threat to human health in terms of both morbidity (with 2–5 million cases of severe illness per year) and mortality (with 250,000–500,000 deaths per year) worldwide^{1,2}. Although vaccination is one of the proven method for the control of infectious diseases, antigenic drift among influenza viruses means that vaccines need to be reformulated in every year to provide strain specific immunity, and this reformulation process is complex, costly and time consuming. Thus, the researchers have sought to produce universal influenza virus vaccines to provide extended or even lifelong protection against broad spectrum of influenza virus^{3–10}. In addition to these efforts, development of new antiviral agents with high efficacy is crucial for situations where no effective flu vaccine is available for use against pandemic strains, which arise at irregular intervals. For example, antiviral drugs such as oseltamivir and zanamivir were reported to be effective against the H1N1 pandemic in 2009–2010¹¹. However, increases in the number of influenza strains that are resistant to currently available antiviral drugs, as well as the occurrence of adverse effects with some available drugs¹², necessitates the development of new strategies for controlling virus infections. Furthermore, novel prophylactic options are still necessary for immunocompromised individuals, such as very young and older populations¹³. Therefore, the continuous research are required for the investigation of effective preventive and controlling methods against these viruses.

Natural antimicrobial peptides (AMP) are reported to have diverse antimicrobial activities against bacteria, fungi, viruses and parasites¹⁴. Natural peptides or synthetic counterparts represent a new generation of antiviral agents with properties of selectivity and specificity, low level of adverse effects and low probability of developing

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea. ²Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA, USA. ³Animal and Plant Quarantine Agency, 175 Anyang-ro, Manangu, Anyang City, Gyeonggi-do, 430-757, Republic of Korea. ⁴Korean Medicine (KM) Application Centre, Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu, 41062, Republic of Korea. ⁵Department of Molecular Microbiology and Immunology, University of Southern California, Keck School of Medicine, Los Angeles, CA, USA. Ho-Jin Moon and Chamilani Nikapitiya contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-S.L. (email: jongsool@cnu.ac.kr)

- Inhibitory effects of an aqueous extract from Cortex Phellodendri on the growth and replication of broad-spectrum of viruses in vitro and in vivo

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Inhibitory effects of an aqueous extract from Cortex Phellodendri on the growth and replication of broad-spectrum of viruses in vitro and in vivo

Jae-Hoon Kim^{1†}, Prasanna Weeratunga^{1†}, Myun Soo Kim², Chamilani Nikapitiya¹, Byeong-Hoon Lee¹, Md Bashir Uddin^{1,3}, Tae-Hwan Kim¹, Ji-Eun Yoon¹, Chung Park⁵, Jin Yeul Ma⁴, Hongik Kim^{2*} and Jong-Soo Lee^{1*}

Abstract

Background: Cortex Phellodendri (*C. Phellodendri*), the dried trunk bark of *Phellodendron amurense* Ruprecht, has been known as a traditional herbal medicine, showing several bioactivities. However, antiviral activity of *C. Phellodendri* aqueous extract (CP) not reported in detail, particularly aiming the prophylactic effectiveness.

Methods: In vitro CP antiviral activity evaluated against Influenza A virus (PR8), Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Newcastle Disease Virus (NDV), Herpes Simplex Virus (HSV), Coxsackie Virus (H3-GFP) and Enterovirus-71 (EV-71) infection on immune (RAW264.7) and epithelial (HEK293T/HeLa) cells. Such antiviral effects were explained by the induction of antiviral state which was determined by phosphorylation of signal molecules, secretion of IFNs and cytokines, and cellular antiviral mRNA expression. Furthermore, Compounds present in the aqueous fractions confirmed by HPLC analysis and evaluated their anti-viral activities. Additionally, in vivo protective effect of CP against divergent influenza A subtypes was determined in a BALB/c mouse infection model.

Results: An effective dose of CP significantly reduced the virus replication both in immune and epithelial cells. Mechanically, CP induced mRNA expression of anti-viral genes and cytokine secretion in both RAW264.7 and HEK293T cells. Furthermore, the main compound identified was berberine, and shows promising antiviral properties similar to CP. Finally, BALB/c mice treated with CP displayed higher protection levels against lethal doses of highly pathogenic influenza A subtypes (H1N1, H5N2, H7N3 and H9N2).

Conclusion: CP including berberine play an immunomodulatory role with broad spectrum antiviral activity, due to induction of antiviral state via type I IFN stimulation mechanism. Consequently, *C. Phellodendri* could be a potential source for promising natural antivirals or to design other antiviral agents for animal and humans.

Keywords: Cortex Phellodendri, Herbal medicine, Berberine, Anti-viral effect

Background

Several viruses cause malignant diseases worldwide, resulting in significant mortality and economic losses. For instance, Influenza A viruses are responsible for seasonal epidemics and have caused three pandemics in the 20th century (1918, 1957, and 1968) [1]. In addition, viral

diseases cause serious threats to livestock sector and animal welfare together with productivity losses, uncertain food security and negative impacts on human health [2].

Although various prophylactic or therapeutic drugs and vaccines have been developed to prevent and treat viral diseases, the emergence of novel mutants or resistant virus strains reduces their efficacy and lead to the public health problems. Especially, with a view to provide effective methods for preventing viral diseases, researches have been attempted to identify novel materials with antiviral activities from natural or synthetic resources.

* Correspondence: hongiknice@hanmail.net; jongsool@cnu.ac.kr

[†]Equal contributors

²Vitabio, Inc., Daejeon 305-764, Republic of Korea

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, 220

Gung-Dong, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Full list of author information is available at the end of the article



Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses *in vitro* and *in vivo*

Md Bashir Uddin^{1,2†}, Byeong-Hoon Lee^{1†},
Chamilani Nikapitiya¹, Jae-Hoon Kim¹,
Tae-Hwan Kim¹, Hyun-Cheol Lee¹,
Choul Goo Kim³, Jong-Soo Lee^{1*},
and Chul-Joong Kim^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

²Faculty of Veterinary and Animal Science, Sylhet Agricultural University, Sylhet-3100, Bangladesh

³Chung Jin Biotech Corporation, Ansan 15577, Republic of Korea

(Received Aug 8, 2016 / Revised Sep 13, 2016 / Accepted Oct 4, 2016)

Bee venom (BV) from honey bee (*Apis Mellifera L.*) contains at least 18 pharmacologically active components including melittin (MLT), phospholipase A₂ (PLA₂), and apamin etc. BV is safe for human treatments dose dependently and proven to possess different healing properties including antibacterial and antiparasitidal properties. Nevertheless, antiviral properties of BV have not well investigated. Hence, we identified the potential antiviral properties of BV and its component against a broad panel of viruses. Co-incubation of non-cytotoxic amounts of BV and MLT, the main component of BV, significantly inhibited the replication of enveloped viruses such as Influenza A virus (PR8), Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Respiratory Syncytial Virus (RSV), and Herpes Simplex Virus (HSV). Additionally, BV and MLT also inhibited the replication of non-enveloped viruses such as Enterovirus-71 (EV-71) and Coxsackie Virus (H3). Such antiviral properties were mainly explained by virucidal mechanism. Moreover, MLT protected mice which were challenged with lethal doses of pathogenic influenza A H1N1 viruses. Therefore, these results provides the evidence that BV and MLT could be a potential source as a promising antiviral agent, especially to develop as a broad spectrum antiviral agent.

Keywords: anti-viral activity, bee venom, melittin, virucidal effect

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. (J.-S. Lee) E-mail: jongsool@cnu.ac.kr; Tel.: +82-42-821-6753; Fax: +82-42-825-7910 / (C.-J. Kim) E-mail: cjkim@cnu.ac.kr; Tel.: +82-42-821-6783; Fax: +82-42-825-7910

Copyright © 2016, The Microbiological Society of Korea

Introduction

Massive growth in human population, immense rise in urbanization, drastic changes in global environment, and improved connectivity worldwide in terms of better transportation facilities have led to the emergence and re-emergence of viral diseases in human population (Li *et al.*, 2011). Outbreaks of many RNA viruses are still the leading cause of morbidity and mortality in worldwide population. Many antiviral agents against diverse viruses have been reported. However, effective antiviral agents which specifically target to some RNA viruses such as SARS-CoV, influenza A (H5N1, H1N1) and measles are in shortage due to genetic variations of the virus and the lack of approved or universally recommended therapies (Wen *et al.*, 2003; Lorin *et al.*, 2005; Triggiani *et al.*, 2006). Hence, there is a global requirement for continued development of new antiviral agents, especially from natural sources to provide several alternatives for the control, prevention, and management of the spread of diseases caused by RNA and DNA viruses. Number of compounds derived from natural sources are reported to have numerous biological activities, thus considered potential sources of various modern pharmaceuticals including antiviral agents (Jacobs and Coyne, 2013; Kim *et al.*, 2016; Weeratunga *et al.*, 2016).

Bee venom (BV) of the honey bee *Apis mellifera* has been utilize as a traditional medicine for the treatment of rheumatism, arthritis, skin diseases, cancerous tumors, and back pains (Billingham *et al.*, 1973; Son *et al.*, 2007) due to its antibacterial, antiviral and anti-inflammatory effects (Habermann, 1972; Son *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2015). Such bio activities are explained by the variety of components contain in the BV such as peptides melittin (MLT), adolapin, apamin, and mast cell degranulating peptide; several enzymes including phospholipase A₂ (PLA₂); biologically active amines (histamine and epinephrine); and non-peptide components (carbohydrates, lipids, and free amino acids) (Lariviere and Melzack, 1996; Park *et al.*, 2004; Son *et al.*, 2007). However, antiviral properties of BV have not well investigated and also its mechanisms are not fully understood.

In the present study, we investigated the antiviral activity of BV and its components against enveloped and non-enveloped viruses including RNA and DNA viruses *in vitro* and attempted to understand the mechanism of this property is mainly owing to the virucidal effect of both BV and MLT. Additionally, we evaluated the antiviral activity of MLT against lethal doses of pathogenic influenza A H1N1 viruses in mice *in vivo*.

7) Vet Microbiol. 2017 Mar;201:240–251

- 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 201 (2017) 240–251



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

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



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



Mohammed Y.E. Chowdhury^{a,b,1}, Tae-Hwan Kim^{a,1}, Md Bashir Uddin^{a,c}, Jae-Hoon Kim^a, C.Y. Hewawaduge^a, Zannatul Ferdowshi^{a,e}, Moon-Hee Sung^d, Chul-Joong Kim^{a,*}, Jong-Soo Lee^{a,*}

^a College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

^b Faculty of Veterinary Medicine, Chittagong Veterinary and Animal Sciences University, Chittagong, Bangladesh

^c Faculty of Veterinary & Animal Science, Sylhet Agricultural University, Sylhet •3100, Bangladesh

^d BioLeaders Corporation, Daejeon, Republic of Korea

^e Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Science and Technology Chittagong, Bangladesh

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2016

Received in revised form 18 January 2017

Accepted 18 January 2017

Keywords:

Influenza vaccine

Mucosal immunity

Matrix protein-2 (sM2)

Hemagglutinin fusion peptide (HA2)

Cholera toxin subunit A1 (CTA1)

Poly-γ-glutamic acid (γ-PGA)

Chitosan nanoparticles (PC NPs)

ABSTRACT

To develop a safe and effective mucosal vaccine that broad cross protection against seasonal or emerging influenza A viruses, we generated a mucosal influenza vaccine system combining the highly conserved matrix protein-2 (sM2), fusion peptide of hemagglutinin (HA₂), the well-known mucosal adjuvant cholera toxin subunit A1 (CTA1) and poly-γ-glutamic acid (γ-PGA)-chitosan nanoparticles (PC NPs), which are safe, natural materials that are able to target the mucosal membrane as a mucosal adjuvant. The mucosal administration of sM2HA2CTA1/PC NPs could induce a high degree of systemic immunity (IgG and IgA) at the site of inoculation as well as at remote locations and also significantly increase the levels of sM2- or HA2-specific cell-mediated immune response. In challenge tests in BALB/c mice with 10 MLD₅₀ of A/EM/Korea/W149/06(H5N1), A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Aquatic bird/Korea/W81/2005 (H5N2), A/Aquatic bird/Korea/W44/2005 (H7N3) or A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2) viruses, the recombinant sM2HA2CTA1/PC NPs provided cross protection against divergent lethal influenza subtypes and also the protection was maintained up to six months after vaccination. Thus, sM2HA2CTA1/PC NPs could be a promising strategy for a universal influenza vaccine.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Vaccination remains the preferred option for controlling influenza infection and the currently used vaccines are inactivated whole-virus vaccines that primarily rely on generating antibody responses to the hemagglutinin (HA) or neuraminidase (NA) proteins specific to the vaccine strains of influenza (Kang et al., 2011; Lambert and Fauci, 2010). Although the egg-based production method for seasonal influenza vaccine is well established, it has many drawbacks, including the length of time required to produce a new vaccine, dependence on a supply of eggs (Gerdl,

2003) and the administrative process. Most importantly, vaccine strains must frequently be updated to match the currently circulating strains (Webster et al., 1992), and the antibody levels induced by the inactivated vaccine have been observed to decrease by 75% over an eight-month period (Ohmit et al., 2008). Thus, it is necessary to develop safe, effective and convenient anti-influenza vaccines capable of inducing long-term cross-protection against seasonal drift variants as well as occasionally emerging reassortant viruses.

Vaccine strategies based on conserved subunits of influenza proteins have been investigated for their potential to offer protection against constantly evolving influenza viruses. Extensive previous work has focused primarily on the stalk domain (HA₂) of HA and on matrix protein-2 (M2), as well as on other conserved antigens. The abilities of vaccines containing individual antigens to

* Corresponding authors.

E-mail addresses: cjkim@cnu.ac.kr (C.-J. Kim), jongsoo@cnu.ac.kr (J.-S. Lee).

¹ These authors contributed equally to this study.

8) J Virology. 2017 Jul;91(14)

- Rubicon Modulates Antiviral Type I Interferon (IFN) Signaling by Targeting IFN Regulatory Factor 3 Dimerization



CELLULAR RESPONSE TO INFECTION



Rubicon Modulates Antiviral Type I Interferon (IFN) Signaling by Targeting IFN Regulatory Factor 3 Dimerization

Jae-Hoon Kim,^a Tae-Hwan Kim,^a Hyun-Cheol Lee,^a Chamilani Nikapitiya,^a Md Bashir Uddin^{a,b}, Min-Eun Park,^a Prabuddha Pathinayake,^a Eun Seo Lee,^a Kiramage Chathuranga,^a Thilina U. B. Herath,^a W. A. Gayan Chathuranga,^a Jong-Soo Lee^a

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea^a; Faculty of Veterinary and Animal Science, Sylhet Agricultural University, Sylhet, Bangladesh^b

ABSTRACT Rubicon is part of a Beclin-1-Vps34-containing autophagy complex. Rubicon induces antimicrobial responses upon Toll-like receptor (TLR) stimulation and functions as a feedback inhibitor to prevent unbalanced proinflammatory responses depending on dectin-1 signaling. However, the role played by Rubicon during antiviral immune responses, particularly the type I interferon (IFN) responses, remains largely unknown. Here, we report that Rubicon acts as a negative regulator for virus-triggered IFN signaling. Knockdown of Rubicon promoted type I interferon signaling and inhibited virus replication, while overexpression of Rubicon had the opposite effect. Rubicon specifically interacts with the interferon regulatory factor (IRF) association domain (IAD) of IRF3, and this interaction leads to inhibition of the dimerization of IRF3, which negatively regulates IFN-mediated antiviral response. Thus, our findings suggest the novel additional role of Rubicon as a negative regulator that inhibits the IFN signaling and cellular antiviral responses, providing a novel cellular mechanism of IRF3 inhibition.

IMPORTANCE The type I IFN system is a critical innate immune response that protects organisms against virus infection. However, type I IFN signaling must be tightly regulated to avoid excessive production of IFNs. Hence, negative regulatory mechanisms for type I IFN signaling are important, and to date, several related molecules have been identified. Here, we show that Rubicon is a major negative regulator of type I IFN signaling, and unlike previous reports of cellular molecules that inhibit IRF3 activation via proteasomal degradation or dephosphorylation of IRF3, we show that Rubicon interacts with IRF3 and that ultimately this interaction leads to inhibition of the dimerization of IRF3. Thus, we identified a novel negative regulator of type I IFN signaling pathways and a novel cellular mechanism of IRF3 inhibition. The results of this study will increase our understanding of the role of negative-feedback mechanisms that regulate type I IFN signaling and maintain immune homeostasis.

KEYWORDS IRF3 dimerization, interferon, Rubicon

Upon virus infection, a series of cellular signaling events are induced, and ultimately, proinflammatory cytokines and type I interferons (IFNs), such as alpha interferon (IFN- α) and IFN- β , are produced.

These cytokines play a crucial role in the innate immune responses, which are involved in the inhibition of virus replication and induction of adaptive immune responses (1–6). In particular, type I IFNs are potent inhibitors of viral replication; they act as such by promoting apoptosis of infected cells and stimulating surrounding cells to induce transcription of IFN-related genes, which work to synergistically inhibit viral replication and to activate innate and adaptive immune cells (7, 8). Type I IFNs are

Received 11 February 2017 Accepted 28 April 2017

Accepted manuscript posted online 3 May 2017

Citation Kim J-H, Kim T-H, Lee H-C, Nikapitiya C, Uddin MB, Park M-E, Pathinayake P, Lee ES, Chathuranga K, Herath TUB, Chathuranga WAG, Lee J-S. 2017. Rubicon modulates antiviral type I interferon (IFN) signaling by targeting IFN regulatory factor 3 dimerization. *J Virol* 91:e00248-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00248-17>.

Editor Jae U. Jung, University of Southern California

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jong-Soo Lee, jongsool@cnu.ac.kr.

Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on June 26, 2017 by Chungnam National University

- The anti-Influenza effect of a water soluble herbal extract from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) *in vivo*

pISSN 2508-1357, eISSN 2508-139X
J Biomed Transl Res 2018;19(1):021-025
<https://doi.org/10.12729/jbtr.2018.19.1.021>
Received 10 Jan, 2018, Revised 14 Mar, 2018, Accepted 15 Mar, 2018

Short communication

The anti-Influenza effect of a water soluble herbal extract from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) *in vivo*

Eun-Seo Lee^{1†}, Myun Soo Kim^{2†}, Prasanna Weeraratunga¹, Hyun-Cheol Lee¹, Kiramage Chaturanga¹, Jin Yeul Ma³, Hong Ik Kim^{2*}, Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²R&D Division, VITABIO Inc., Daejeon 34540, Korea

³Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu 41062, Korea

[†]These authors contributed equally to this study.

^{*}These corresponding authors contributed equally to this work.

Salvia miltiorrhiza (Danshen) is perennial plant and commonly used in traditional Chinese medicine to treat numerous diseases like cardiovascular and cerebrovascular diseases, coronary heart disease, myocardial infarction, stroke and some viral diseases. Nevertheless, no study has been conducted on the antiviral properties of crude extract of *Salvia miltiorrhiza* against Influenza virus. In an attempt to identify new potential anti-influenza virus agents, 200 natural oriental herbal medicines were screened and we found that *Salvia miltiorrhiza* has a potential anti-influenza effect. Therefore, in this study, we investigated the protective effect of aqueous extract from *Salvia miltiorrhiza* against divergent influenza A subtypes using murine model of influenza A infection. Effective dose of aqueous extracts of *Salvia miltiorrhiza* in BALB/c mice displayed higher survival rate and lower lung viral titers when challenged with lethal doses of influenza A subtypes ({A/Aquatic bird/Korea/W81/2005(H5N2)}, {A/PR/8/34(H1N1)}, {A/Aquatic bird/Korea/W44/2005(H7N3)} and {A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2)}). *In vivo* results exhibited that *Salvia miltiorrhiza* induced prophylactic effect in BALB/c mice against Influenza virus by disrupting viral replication or preventing viral infection by creating an antiviral state in the lungs. Taken together, the use of aqueous extracts of *Salvia miltiorrhiza* as an orally active antiviral agent, will be potential candidates for prophylactic treatments against Influenza A virus for humans and animals.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), aqueous extract, antiviral effect, anti influenza effect, influenza A virus

A형 인플루엔자 바이러스는 *Orthomyxoviridae*과에 속하는 RNA 바이러스로 사람, 가금, 돼지, 말 등에 감염성을 가지며, 전 세계적으로 유행하여 연간 약 250,000명이 사망하는 등 사람과 가축에 공중보건학적 및 경제적 피해를 야기한다 [1,2]. 이로 인해 A형 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제의 개발은 세계적으로 지속적인 관심사가 되어 왔으며, 보다 안전하고 광범위한 항바이러스제의 개발을 위한 다양한 방법들이 시도되고 있고, 그 중에서 천연 물질들 중 항바이러스 물질의 탐색 역시 한가지의 방법으로 지속적으로 연구되어 왔다 [3]. 이러한 천연 물질들 중 식물성 천연물들은 역사적으로 경험적 지식에 기반하여 바이러스 감염에 대한 치료 및 예방 목적으로 사용되어 왔고, 현대 의약품 자원의 약 40%를 차지하는 식물성 천연물들은 분석 기술의 발전에 힘입어 다양한 바이러스들에 대한 항바이러스제로서의 응용 가능성이 밝혀지고 있다 [4-8]. 하지만 아직도 많은 식물성 천연물들은 그 활용의 역사가 지엽적이고, 구체적인 작용 기전이 검증되지 않아 많은 추가 연구가 필요한 실정이다 [9]. 즉, 기존의 합성 항바이러스제들의 이용과 더불어 이를 효율적으로 대체할 수 있는 자원인 식물성 천연물과 그 유래 물질들의 탐색 및 연구의 필요성이 점차 커지고 있다 [10-12].


본 연구에서는 인플루엔자 바이러스에 대한 새로운 항바이러스 제제를 발견하기 위해 200여 가지의 천연 한방 생약을 탐색하였고, 그 중 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)이 인플루엔자 바이러스에 대해 항바이러스 효능이 있다는 것을 확인하였다. 단삼은 Saliva 속에 속하는 다년생 식물로, 단삼의 뿌리가 약 이천년에 걸쳐 전통 의학에서 약재로 이용되어 왔다 [13,14]. 단삼은 전상동맥질환, 급성 심근성 경색 등의 심혈관계 및 뇌혈관 질환에 대한 치료제로 사용되어 왔을 뿐 아니라 [15], 항산화효과와 항염증 효과가 밝혀지는 등 임상적으로 다양한 질환에 대해서 응용될 수 있음이 연구되었다 [16]. 또한, 단삼에

*Corresponding author: Jong-Soo Lee

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

Tel: +82-42-821-7907 Fax: +82-42-825-7910, E-mail: jongsoo@cnu.ac.kr

Ty1-fused protein-body formation for spatial organization of metabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*

Jong Yun Han^{1,2} | Jae Myeong Song^{1,2} | Sung Hwa Seo¹ | Chonglong Wang³ |
Seung-Goo Lee⁴ | Hongweon Lee^{1,2} | Seon-Won Kim⁵ | Eui-Sung Choi^{1,2} 

¹ Biotechnology Process Engineering Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Cheongju, Republic of Korea

² Department of Bioprocess Engineering, KRIBB School of Biotechnology, Korea University of Science and Technology (UST), Daejeon, Republic of Korea

³ School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou, P.R. China

⁴ Industrial Biotechnology and Bioenergy Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon, Republic of Korea

⁵ Division of Applied Life Science (BK21 Plus), PMBBRC, Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea

Correspondence

Seon-Won Kim, Division of Applied Life Science (BK21 Plus), PMBBRC, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Republic of Korea.

Email: swkim@gnu.ac.kr

Eui-Sung Choi, Biotechnology Process Engineering Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Cheongju, 28116, Republic of Korea. Email: choi4162@kribb.re.kr

Funding information

Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Grant number: 316043-3; KRIBB Research Initiative Program; National Research Foundation of Korea, Grant number: NRF-2016R1A2B4009432

Abstract

Metabolite production through a multistep metabolic pathway can often be increased by efficient substrate channeling created by spatial sequestration of the metabolic reactions. Here, Tya, a structural component in the Ty1 retrotransposon element that forms virus-like particles (VLPs) in *Saccharomyces cerevisiae*, was used to spatially organize enzymes involved in a metabolic pathway into a multi-enzyme protein body in yeast. As a proof of principle, Tya fusion to three key enzymes involved in biosynthesis of the isoprenoids farnesene and farnesol was tested to assess its potential to improve productivity. The Tya-fusion protein resulted in three and fourfold increases in farnesene and farnesol production, respectively, as compared with that observed in a non-fused control. Specifically, two-phase partitioning fed-batch fermentations of *S. cerevisiae* ATCC200589 overexpressing Tya-fused enzymes (tHmg1, IspA, and α -farnesene synthase) yielded 930 ± 40 mg/L of farnesene after 7 days. Additionally, we observed that the Tya-fusion proteins tended to partition into particulate fractions upon 100,000g ultracentrifugation, suggesting the formation of large aggregates of protein bodies, with their particulate structure also observed by transmission electron microscopy. The dramatic increase in the biosynthetic productivity of metabolites via use of a Tya-fusion protein suggested that this approach might be useful for the creation of multi-enzyme complexes to improve metabolic engineering in yeast.

KEYWORDS

isoprenoids, protein body, *Saccharomyces cerevisiae*, Ty1, virus-like particles

1 | INTRODUCTION

Many metabolic pathways occur in subcellular compartments and through the assembly of multi-enzyme complexes for efficient substrate channeling to prevent the loss of intermediates or the release of toxic or unstable intermediates. Recently, strategies to enhance the efficiency of metabolic engineering by mimicking the natural setup for spatial sequestration of these metabolic reactions

were developed (Agapakis, Boyle, & Silver, 2012; Lee, DeLoache, & Dueber, 2012; Pröschel, Detsch, Boccacini, & Sonnewald, 2015). A prominent example of spatial organization is bacterial microcompartments (BMCs), where a broad range of bacteria is used to segregate and optimize metabolic reactions. BMCs are self-assembled by shell proteins and protect cells from toxic compounds formed by encapsulated enzymes, thereby preventing the loss of intermediates and excluding adverse competing substrates or enzymes

11) J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 45:239–251 (2018)

– High-level recombinant production of squalene using selected strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2018) 45:239–251
https://doi.org/10.1007/s10295-018-2018-4

SIMB
Society for Industrial Microbiology
and Biotechnology

METABOLIC ENGINEERING AND SYNTHETIC BIOLOGY - ORIGINAL PAPER



High-level recombinant production of squalene using selected *Saccharomyces cerevisiae* strains

Jong Yun Han^{1,2} · Sung Hwa Seo¹ · Jae Myeong Song^{1,2} · Hongweon Lee^{1,2} · Eui-Sung Choi^{1,2}

Received: 19 September 2017 / Accepted: 29 January 2018 / Published online: 2 February 2018
© Society for Industrial Microbiology and Biotechnology 2018

Abstract

For recombinant production of squalene, which is a triterpenoid compound with increasing industrial applications, in microorganisms generally recognized as safe, we screened *Saccharomyces cerevisiae* strains to determine their suitability. A strong strain dependence was observed in squalene productivity among *Saccharomyces cerevisiae* strains upon overexpression of genes important for isoprenoid biosynthesis. In particular, a high level of squalene production (400 ± 45 mg/L) was obtained in shake flasks with the Y2805 strain overexpressing genes encoding a bacterial farnesyl diphosphate synthase (*ispA*) and a truncated form of hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA reductase (*tHMG1*). Partial inhibition of squalene epoxidase by terbinafine further increased squalene production by up to 1.9-fold (756 ± 36 mg/L). Furthermore, squalene production of 2011 ± 75 or 1026 ± 37 mg/L was obtained from 5-L fed-batch fermentations in the presence or absence of terbinafine supplementation, respectively. These results suggest that the Y2805 strain has potential as a new alternative source of squalene production.

Keywords Squalene · *Saccharomyces cerevisiae* · Metabolic engineering · Farnesyl diphosphate synthase · HMG-CoA reductase

Introduction

Squalene (2,6,10,14,18,22-hexamethyltetracosane; $C_{30}H_{50}$) is a linear polyunsaturated triterpene with common uses mainly related to the cosmetics industry as a moisturizing agent and emollient. Recently, squalene attracted attention due to multiple studies showing its therapeutic effects and pharmaceutical applications [32, 35], including significant antitumor activities [22, 28, 33]. In addition, it has also been used as a common method of delivering drugs into cells (squalenoylation) [7] and as an emollient in adjuvants for vaccines [9].

The major commercial sources of squalene are liver oil from deep-sea sharks and certain plant-seed oils. However, continuous supply of the liver oils is uncertain due to

environmental concerns, and the supply of plant-seed oils is also uncertain due to the low squalene yield and unstable production in certain plant species [24, 36, 39]. Recently, microalgae and other microorganisms have emerged as new alternative sources for squalene production. Among these microorganisms, yeast is a good alternative due to the ease of genetic and physiological manipulation necessary for squalene production. In particular, *Saccharomyces cerevisiae* is an attractive microorganism for the production of isoprenoids, such as squalene, due to its intrinsically large pools of precursors [20, 21] and its status as generally recognized as safe (GRAS). Moreover, the food-grade status of microorganisms is an essential prerequisite when industrial production is intended for human consumption. Therefore, *S. cerevisiae* have been successfully employed in metabolic engineering for the production of sterols [42].

In yeast *S. cerevisiae*, squalene is synthesized as the first precursor via the mevalonate pathway to produce sterols, such as ergosterol (Fig. 1) [6]. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase and squalene synthase are the major control enzymes for squalene production in the yeast metabolic pathway [6]. Overexpression of a cytosolic truncated form of HMG-CoA reductase (encoded by *tHMG1*) leads to squalene accumulation in *S. cerevisiae*

✉ Eui-Sung Choi
choi4162@kribb.re.kr

¹ Biotechnology Process Engineering Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Cheongju 28116, Republic of Korea

² Department of Bioprocess Engineering, KRIBB School of Biotechnology, Korea University of Science and Technology (UST), Daejeon 34113, Republic of Korea

12) JVI Accepted Manuscript Posted Online 24 October 2018

- Released Tryptophanyl-tRNA Synthetase Stimulates Innate Immune Responses against Viral Infection

JVI Accepted Manuscript Posted Online 24 October 2018
J. Virol. doi:10.1128/JVI.01291-18
Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

1 **Released tryptophanyl-tRNA synthetase stimulates innate immune responses against**
2 **viral infection**

3

4 Hyun-Cheol Lee,^{a,†} Eun-Seo Lee,^{a,†} Md Bashir Uddin,^{a,b,†} Tae-Hwan Kim,^a Jae-Hoon Kim,^{a,c}
5 Kiramage Chathuranga,^a W. A. Gayan Chathuranga,^a Mirim Jin,^{d,e} Sunghoon Kim,^{f,g} Chul-
6 Joong Kim,^a and Jong-Soo Lee^a

7

8 ^aCollege of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic
9 of Korea,

10 ^bFaculty of Veterinary & Animal Science, Sylhet Agricultural University, Sylhet-3100,
11 Bangladesh,

12 ^cLaboratory Animal Resource Center, KRIBB, University of Science and Technology (UST),
13 Daejeon 305-806, Korea,

14 ^dLaboratory of Microbiology, College of Medicine, Gachon University, Incheon 21999,
15 Republic of Korea,

16 ^eDepartment of Health Science and Technology, GAIHST, Gachon University, Incheon
17 21999, Republic of Korea,

18 ^fMedicinal Bioconvergence Research Center, College of Pharmacy, Seoul National
19 University, Gwanak-gu, Seoul 08826, South Korea,

20 ^gDepartment of Molecular Medicine and Biopharmaceutical Sciences, Graduate School of
21 Convergence Science and Technology, Seoul National University, Gwanak-gu, Seoul 08826,
22 South Korea.

23

24

25 **Running title:** WRS alerts innate immunity against viral invasion

26

27 #Address correspondence to ^{*}Jong-Soo Lee, jongsool@cnu.ac.kr.

28 [†]These authors contributed equally to this work.

29

30

31 **Abstract word count :** 153 words

32 **Importance word count :** 117 words

33 **Main text word count :** 5147 words

5-7. 학술대회 발표 (해외 11건, 국내 12건)

1) 해외 (포스터 11 건 발표)

- Coptidis Rhizoma extract inhibits replication of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by inducing antiviral state



Abstract Submission

Virology
Antivirals

IUMS2017-2493

Coptidis Rhizoma extract inhibits replication of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by inducing antiviral state

Jong-Soo Lee*

Would you like to apply for a travel grant?: No

Objectives: RSV, a negative-strand non-segmented RNA virus, belongs to the genus *Pneumovirus* of the family *Paramyxoviridae*. It is considered to be a leading cause of lower respiratory tract illness in infants and children worldwide. However, there are no commercial RSV vaccines and application of ribavirin which is only approved drug, to manage RSV infection is limited by its side effects. Therefore, novel antiviral agents for RSV with better effects and safety than ribavirin is target for study. In this study, we demonstrated several lines of evidence showing that *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) has the immunomodulatory ability to inhibit RSV replication.

Methods: In this study, we evaluated the antiviral activities of *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) against RSV in human respiratory tract cell line (HEp2) and BALB/c mice. We determined the induction of antiviral, IFN-stimulated genes (ISGs) and the secretion of IFN- β and IL-6 by CRE *in vitro*. To elucidate the features in antiviral signaling, we also evaluated the effect of CRE on the signaling molecules including IRF-3, TBK1, p65, ERK and p38 in the type I IFN and NF- κ B signaling pathways. In mouse model, we tested whether oral administration of CRE is influence on the lung RSV titer and we checked the immune status in blood serum, BALF and SIF of CRE inoculated BALB/c Mice. In HPLC analysis, we found the presence of several compounds in CRE and we confirmed that palmatine was related to the antiviral properties.

Results: An effective dose of CRE significantly reduced the replication of RSV in HEp2 cells and reduces the RSV-induced cell death. This antiviral activity against RSV was through the induction of type I interferon-related signaling and the antiviral state in HEp2 cells. More importantly, oral administration of CRE exhibited prophylactic effects in BALB/c mice against RSV. In HPLC analysis, we found the presence of several compounds and confirmed that palmatine was related to the antiviral properties and immune-modulation effect.

Conclusion: Taken together, an extract of *Coptidis Rhizoma* and its components play roles as immunomodulators and could be a potential source as promising natural antivirals that can confer protection to RSV. These outcomes should encourage further allied studies in other natural products. [This study was supported in part by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 316043-3)]

Disclosure of Interest: None Declared

Keywords: Coptidis Rhizoma , palmatine, RSV

- Mucosal Immunization with Lactobacillus-displayed CTA1-conjugated sM2HA2 of Influenza Virus induces Broad Protective Immune Responses in Balb/c Mice



IUMS 2017
SINGAPORE
International Union of
Microbiological Societies

Abstract Submission

Bacteriology and Applied Microbiology
Applied Microbiology and Biotechnology

IUMS2017-2604

Mucosal Immunization with Lactobacillus-displayed CTA1-conjugated sM2HA2 of Influenza Virus induces Broad Protective Immune Responses in Balb/c Mice

Jong-Soo Lee*

Would you like to apply for a travel grant?: No

Objectives: The development of a universal influenza vaccine that provides broad cross protection against existing and unforeseen influenza viruses is a critical challenge.

Methods: In this study, we constructed and expressed cholera toxin subunit A1 (CTA1) with conserved sM2 and HA2 influenza antigens on the surface of *Lactobacillus casei* (pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei*). Mice were inoculated with pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei* orally or intranasally and we evaluated the potent mucosal, humoral and cell-mediated immune responses. In the challenge mouse model, pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei* inoculated mice were tested with 10 MLD₅₀ of divergent influenza subtypes (A/EM/Korea/W149/06(H5N1) or A/Aquatic bird /Korea/W81/2005 (H5N2) and heterologous A/Puerto Rico/8/34(H1N1), or A/Chicken/Korea/116 /2004(H9N2) or A/Philippines/2/08(H3N2) viruses)

Results: In this study, we constructed and expressed conserved sM2 and HA2 influenza antigens with cholera toxin subunit A1 (CTA1) on the surface of *Lactobacillus casei* (pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei*). Oral and nasal administrations of recombinant *L. casei* into mice resulted in high levels of serum immunoglobulin G (IgG) and their isotypes (IgG1 & IgG2a) as well as mucosal IgA. The mucosal administration of pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei* may also significantly increase the levels of sM2- or HA2-specific cell-mediated immunity because increased release of both IFN- γ and IL-4 was observed. The recombinant pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei* provided better protection of BALB/c mice against 10 times the 50% mouse lethal doses (MLD₅₀) of homologous A/EM/Korea/W149/06(H5N1) or A/Aquatic bird /Korea/W81/2005 (H5N2) and heterologous A/Puerto Rico/8/34(H1N1), or A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2) or A/Philippines/2/08(H3N2) viruses, compared with *L. casei* harboring sM2HA2 and also the protection was maintained up to seven months after administration.

Conclusion: These results indicate that recombinant *L. casei* expressing the highly conserved sM2, HA2 of influenza and CTA1 as a mucosal adjuvant could be a potential mucosal vaccine candidate or tool to protect against divergent influenza viruses for human and animal. [This study was supported in part by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 316043-3)]

Disclosure of Interest: None Declared

Keywords: Influenza virus, Lactobacillus

- Mucosal immunization of conserved sM2, HA2 of Influenza virus and cholera toxin subunit A1 (CTA1) fusion protein with PC nanoparticles induces protection against divergent influenza subtypes

Important notes:

Do **NOT** write outside the grey boxes. Any text or images outside the boxes **will** be deleted.

Do **NOT** alter the structure of this form. Simply enter your information into the boxes. The form will be automatically processed – if you alter its structure your submission will not be processed correctly.

Do not include keywords – you can add them when you submit the abstract online.

Title:

Mucosal immunization of conserved sM2, HA2 of Influenza virus and cholera toxin subunit A1 (CTA1) fusion protein with PC nanoparticles induces protection against divergent influenza subtypes

Authors & affiliations:

Jong-Soo Lee, Mohammed Y.E. Chowdhury, Chul-Joong Kim

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Preparation of Your Abstract

1. The title should be as brief as possible but long enough to indicate clearly the nature of the study. Capitalise the first letter of the first word **ONLY** (place names excluded). No full stop at the end.

2. Abstracts should state briefly and clearly the purpose, methods, results and conclusions of the work.

Introduction: Clearly state the purpose of the abstract

Methods: Describe your selection of observations or experimental subjects clearly

Results: Present your results in a logical sequence in text, tables and illustrations

Discussion: Emphasize new and important aspects of the study and conclusions that are drawn from them

To develop a safe and effective mucosal vaccine that broad cross protection against seasonal or emerging influenza A viruses, we generated a mucosal influenza vaccine system combining the highly conserved matrix protein-2 (sM2), fusion peptide of hemagglutinin (HA₂), the well-known mucosal adjuvant cholera toxin subunit A1 (CTA1) and poly- γ -glutamic acid (γ -PGA)-chitosan nanoparticles (PC NPs), which are safe, natural materials that are able to target the mucosal membrane as a mucosal adjuvant. The mucosal administration of sM2HA2CTA1/PC NPs could induce a high degree of systemic immunity (IgG and IgA) at the site of inoculation as well as at remote locations and also significantly increase the levels of sM2- or HA2-specific cell-mediated immune response. In challenge tests in BALB/c mice with 10 MLD₅₀ of A/EM/Korea/W149/06(H5N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Aquatic bird/Korea/W81/2005(H5N2), A/Aquatic bird/Korea/W44/2005(H7N3) or A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2) viruses, the recombinant sM2HA2CTA1/PC NPs provided cross protection against divergent lethal influenza subtypes and also the protection was maintained up to six months after vaccination. Thus, sM2HA2CTA1/PC NPs could be a promising strategy for a universal influenza vaccine [This study was supported in part by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 315044031, 316043-3)].

- Inactivated Enterovirus 71 (EV71) Adjuvanted with PC Nanoparticles Induces High Cellular and Humoral Immune Responses in BALB/c Mice

Important notes:

Do NOT write outside the grey boxes. Any text or images outside the boxes **will** be deleted.

Do NOT alter the structure of this form. Simply enter your information into the boxes. The form will be automatically processed – if you alter its structure your submission will not be processed correctly.

Do not include keywords – you can add them when you submit the abstract online.

Title:

Inactivated Enterovirus 71 (EV71) Adjuvanted with PC Nanoparticles Induces High Cellular and Humoral Immune Responses in BALB/c Mice

Authors & affiliations:

Jong-Soo Lee, Prabuddha S. Pathinayake, Chul-Joong Kim

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Abstract: (Your abstract must use **Normal** style and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Preparation of Your Abstract

1. The title should be as brief as possible but long enough to indicate clearly the nature of the study. Capitalise the first letter of the first word **ONLY** (place names excluded). No full stop at the end.

2. Abstracts should state briefly and clearly the purpose, methods, results and conclusions of the work.

Introduction: Clearly state the purpose of the abstract

Methods: Describe your selection of observations or experimental subjects clearly

Results: Present your results in a logical sequence in text, tables and illustrations

Discussion: Emphasize new and important aspects of the study and conclusions that are drawn from them

Enterovirus 71 (EV71) is the major causative agent of hand-foot-and-mouth disease (HFMD) and many neurological manifestations. Recently, this virus has become a serious concern because of consecutive epidemics in the Asia-Pacific region. However, no effective vaccine for EV71 has been discovered. To develop a safe and efficient vaccine, we generated inactivated EV71 and evaluated its efficacy with γ -PGA/Chitosan nanoparticles (PCNPs), which are safe, biodegradable and effective as an adjuvant. The subcutaneous administration of inactivated EV71 with PCNPs adjuvant induces higher levels of virus specific humoral (IgG, IgG1, and IgG2a) and cell-mediated immune responses (IFN- γ and IL-4) compared to the alum adjuvant with virus groups. Additionally, inactivated EV71 with PCNPs induces virus neutralizing antibody similar to the group treated with the well-known adjuvant alum. In addition, PCNPs treated murine BMDC exhibited strong induction of cytokine secretion. These findings demonstrated that PCNPs are safe and effective immunogenic adjuvants to generate inactivated virus vaccines with potential clinical application against EV71 infection [This study was supported in part by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 315044031, 316043-3)].

- Mucosal Immunization with *Lactobacillus*-displayed CTA1-conjugated influenza sM2HA2 induces Broad Protective Immune Responses against Divergent Influenza Subtypes

Important notes:

Do NOT write outside the grey boxes. Any text or images outside the boxes **will** be deleted.

Do NOT alter the structure of this form. Simply enter your information into the boxes. The form will be automatically processed – if you alter its structure your submission will not be processed correctly.

Do not include keywords – you can add them when you submit the abstract online.

Title:

Mucosal Immunization with *Lactobacillus*-displayed CTA1-conjugated influenza sM2HA2 induces Broad Protective Immune Responses against Divergent Influenza Subtypes

Authors & affiliations:

Jong-Soo Lee, Mohammed Y.E. Chowdhury, Chul-Joong Kim
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Abstract: (Your abstract must use Normal style and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Preparation of Your Abstract

1. The title should be as brief as possible but long enough to indicate clearly the nature of the study. Capitalise the first letter of the first word ONLY (place names excluded). No full stop at the end.

2. Abstracts should state briefly and clearly the purpose, methods, results and conclusions of the work.

Introduction: Clearly state the purpose of the abstract

Methods: Describe your selection of observations or experimental subjects clearly

Results: Present your results in a logical sequence in text, tables and illustrations

Discussion: Emphasize new and important aspects of the study and conclusions that are drawn from them

The development of a universal influenza vaccine that provides broad cross protection against existing and unforeseen influenza viruses is a critical challenge. In this study, we constructed and expressed conserved sM2 and HA2 influenza antigens with cholera toxin subunit A1 (CTA1) on the surface of *Lactobacillus casei* (pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei*). Oral and nasal administrations of recombinant *L. casei* into mice resulted in high levels of serum immunoglobulin G (IgG) and their isotypes (IgG1 & IgG2a) as well as mucosal IgA. The mucosal administration of pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei* may also significantly increase the levels of sM2- or HA2-specific cell-mediated immunity because increased release of both IFN- γ and IL-4 was observed. The recombinant pgsA-CTA1sM2HA2/*L. casei* provided better protection of BALB/c mice against 10 times the 50% mouse lethal doses (MLD₅₀) of homologous A/EM/Korea/W149/06(H5N1) or A/Aquatic bird /Korea/W81/2005 (H5N2) and heterologous A/Puerto Rico/8/34(H1N1), or A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2) or A/Philippines/2/08(H3N2) viruses, compared with *L. casei* harbouring sM2HA2 and also the protection was maintained up to seven months after administration. These results indicate that recombinant *L. casei* expressing the highly conserved sM2, HA2 of influenza and CTA1 as a mucosal adjuvant could be a potential mucosal vaccine candidate or tool to protect against divergent influenza viruses for human and animal [This study was supported in part by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 316043-3)]

- Mucosal administration with recombinant *Lactobacillus*-displayed CTA1-conjugated PEDSe induces neutralizing immune responses against porcine epidemic diarrhea (PED) virus

Important notes:

Do NOT write outside the grey boxes. Any text or images outside the boxes **will** be deleted.

Do NOT alter the structure of this form. Simply enter your information into the boxes. The form will be automatically processed – if you alter its structure your submission will not be processed correctly.

Do not include keywords – you can add them when you submit the abstract online.

Title:

Mucosal administration with recombinant *Lactobacillus*-displayed CTA1-conjugated PEDSe induces neutralizing immune responses against porcine epidemic diarrhea (PED) virus

Authors & affiliations:

Jong-Soo Lee, C.Y. Hewawaduge

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Abstract: (Your abstract must use **Normal** style and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Preparation of Your Abstract

1. The title should be as brief as possible but long enough to indicate clearly the nature of the study. Capitalise the first letter of the first word ONLY (place names excluded). No full stop at the end.

2. Abstracts should state briefly and clearly the purpose, methods, results and conclusions of the work.

Introduction: Clearly state the purpose of the abstract

Methods: Describe your selection of observations or experimental subjects clearly

Results: Present your results in a logical sequence in text, tables and illustrations

Discussion: Emphasize new and important aspects of the study and conclusions that are drawn from them

Porcine epidemic diarrhea (PED) causes significant economic impact throughout the swine-raising countries including Korea. PED virus (PEDV), the causative agent of PED belongs to the member of family Coronaviridae, is enveloped RNA virus. Due to the tremendous productivity losses to the pig farms, PED infection has been one of the major concerns of the Korean swine industry. Even though several commercial vaccines have been developed and periodic vaccination strategies have been implemented to control PED in Korean swineherds, PEDV has continually emerged, causing tremendous harm to the swine farms. Failing to produce effective vaccines has been mostly due to the continuous evolving of new subtypes of PEDV, and showing antigenic and genetic differences between spike proteins of vaccines and field strains. Thus, the development of an effective PEDV vaccine that provides broad cross protection against existing PEDV strain and emerging subtypes is urgently needed.

In this study, we used PEDSe multi-epitope (Spike multi-epitope, Se=COE, SS2, SS6) gene with or without non-toxic mucosal immunogenic adjuvant, Cholera toxin subunit A1 (CTA1) for the construction and we express PEDSe multi-epitope with CTA1 on the surface of *Lactobacillus casei* (pgsA-CTA1-PEDSe/*L. casei*) using the pgsA surface display system. Oral or intranasal inoculations of pgsA-CTA1-PEDSe/*L. casei* into mice induced more potent mucosal, humoral and cell-mediated immune responses. Additionally, we checked the long lasting immune responses to produce neutralizing antibodies against PEDV infection. Therefore, the recombinant *L. casei* (pgsA-CTA1-PEDSe/*L. casei*) could be a promising mucosal vaccine candidate against currently circulating PEDV. [This study was supported in part by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 315044031, 316043-3)]

Production of porcine circovirus nucleocapsid protein in *Saccharomyces cerevisiae*

Sung Hwa Seo¹, Kyung Min Park¹, Young Jung Shim², Choong-sik Kim², Sung-Sik Yoo², Eul-Sung Choi¹

¹ Bio Process Engineering Center, KRIBB, Cheongju 28116, Republic of Korea

² ChoongAng Vaccine Laboratories Co., Ltd., Daejeon 34055, Republic of Korea

Backgrounds:

Porcine circoviruses are associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The nucleocapsid protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) encoded by ORF2 is a promising subunit vaccine against porcine circovirus. Recombinant production of PCV2 ORF2 was studied in *Saccharomyces cerevisiae*.

Objectives:

To develop a high-efficacy subunit vaccine of porcine circovirus using yeast.

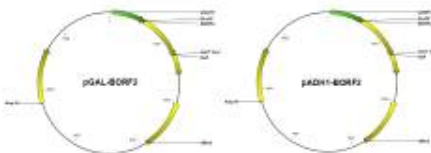
Methods:

For intracellular expression of ORF2, the gene was chemically synthesized according to yeast codon preference, was placed under GAL10 promoter and the resulting plasmid was transformed into *S. cerevisiae* Y2805 and Y2805Δgal80 strains. The ORF2 protein formed virus-like particle (VLP) in the cytoplasm of *S. cerevisiae* as observed by electron microscopy. The secretion of capsid protein into the culture supernatant was, however, unsuccessful. Purification of the VLP using various column chromatography was almost impossible due to the formation of large aggregates. Whole yeast containing ORF2 was immunized to guinea pigs and then serum titer was measured by ELISA. The antibody titer T/C values were higher than 2.0.

Porcine Circovirus

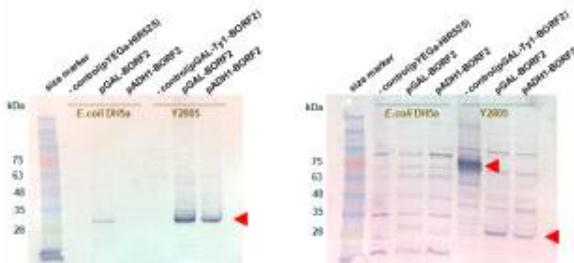
- Porcine Circovirus
 - Single stranded circular DNA
 - Envelope(-), size(15-17nm), Circoviridae
 - PCV type 1, 2 : Late 1990s (PMWS)
 - Capsid protein, encoded by ORF2 is subunit vaccine candidate
- Porcine Circovirus Associated disease (PCVAD)
 - PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome)
 - PDNS (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome)
 - PRDC (Porcine Respiratory Disease Complex)
 - Bacterial complex infection (HPS, MH) is more severe than PCV alone infection

Construction of yeast expression plasmids



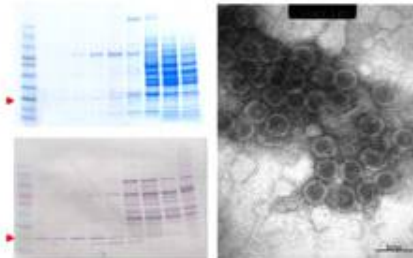
Western blot analysis

- Western blot analysis for confirming expression of ORF2 using yeast expression systems.



Electron microscopy of VLP formation in yeast cytoplasm

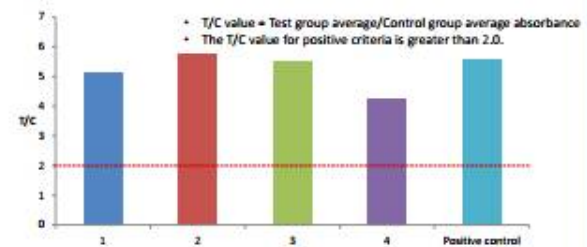
pGAL-BORF2



ELISA test

- Guinea pigs of each group were subcutaneously inoculated with each test vaccine.
- Serum titer was measured by Ab detection Sandwich indirect ELISA method.
- Three weeks after, all groups of guinea pig sera were tested.

	1	2	3	4	Positive control	Negative control
Test vaccine	Heat treated yeast whole cell	Formalin-treated yeast whole cell	Yeast cell lysate	His-tagging ORF2 Yeast cell lysate	Circoflex	PBS
Dose/ Guinea pig	2x10 ⁸ cells/ml	2x10 ⁸ cells/ml	2 mg/ml	2 mg/ml	-	-
Adjuvant	Aluminum hydroxide gel				-	-
Injection type	subcutaneous					



Conclusions:

The ORF2 gene of porcine circovirus was expressed in yeast and it was observed that the VLP was efficiently formed. The feasibility of use of whole yeast cells containing the VLP as vaccine was tested in guinea pig experiments. In the ELISA test, the whole yeast cell containing VLP was found to be immunogenic. The recombinant ORF2 expressed in yeast is expected to be a candidate for a subunit vaccine for porcine circovirus.

- Recombinant production of SpaA, a subunit vaccine for swine erysipelas, in *Saccharomyces cerevisiae*



Recombinant production of SpaA, a subunit vaccine for swine erysipelas, in *Saccharomyces cerevisiae*

Sung Hwa Seo¹, Kyung Min Park¹, Young Jung Shim², Sung-Sik Yoo², Jungoh Ahn¹, and Eui-Sung Choi¹

¹ Bio Process Engineering Center, KRIBB, Cheongju 28116, Republic of Korea

² ChoongAng Vaccine Laboratories Co., Ltd., Daejeon 34055, Republic of Korea

Backgrounds:

A surface protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, SpaA is a promising subunit vaccine against swine erysipelas. Recombinant production of SpaA was studied in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* is a GRAS (generally regarded as safe) microorganism that has been exploited for thousands of years for fermentation, thus proven to be safe.

Objectives:

To efficiently produce SpaA for use as a subunit vaccine for swine erysipelas, using yeast expression systems including intracellular and surface-display expression.

Methods:

For intracellular expression of SpaA, the SpaA gene that was chemically synthesized according to yeast codon preference, placed under GAL10 promoter and the resulting plasmid was transformed into *S. cerevisiae* Y2805 and Y2805Δgal80 strains. Since SpaA is a surface protein in *E. rhusiopathiae*, rSpaA was also expressed as surface-displayed protein. For surface display, SpaA gene was fused to the mating-factor alpha secretion signal sequence and an anchor motif of a cell wall protein (CWP) gene was fused at C-terminus of SpaA. The expression was confirmed by Western blot and the localization of the surface-displayed protein was monitored by fluorescence microscopy. The vaccine efficacy was evaluated by challenging mouse with virulent strain of *E. rhusiopathiae*.

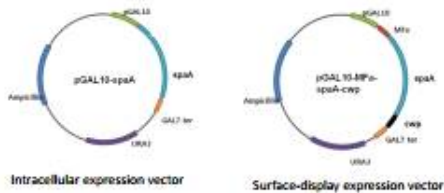
Erysipelothrix rhusiopathiae



Erysipelothrix rhusiopathiae

- *E. rhusiopathiae*
 - Cause swine erysipelas
 - Gram-positive bacteria
 - Facultative anaerobic rod
 - Classified into 25 serovars
- Virulence factors (reviewed by Shimaji (2000))
 - Neuraminidase and hyaluronidase
 - Surface protein (SpaA)
 - Capsule

Construction of yeast expression plasmids

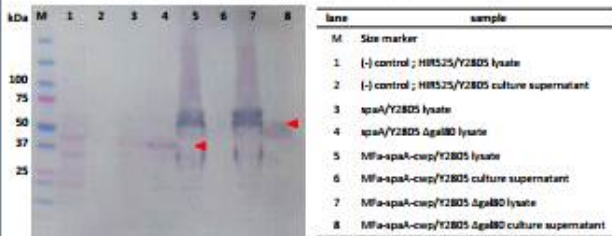


Intracellular expression vector

Surface-display expression vector

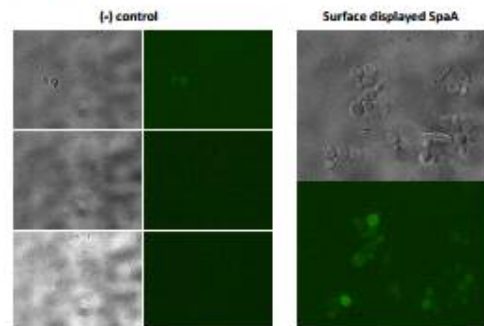
Western blot analysis

- Western blot analysis for confirming expression of SpaA using yeast expression systems.



Fluorescence microscopy of yeast surface displayed SpaA

- Surface displayed SpaA was monitored by fluorescence microscopy using phycoerythrin conjugated antibody.



Protection test in mouse by vaccine candidates

- Mouse of each group were subcutaneously inoculated with each immunogen.
- Two weeks after, all five groups of mouse were challenged with *E. rhusiopathiae*.
- Mouse were observed for 10 days post-challenge.

	1	2	3	4	5
Immunogen	spaA yeast whole cell	spaA yeast lysate	spaA yeast lysate	Positive control	Negative control
Dose/mouse	2x10 ⁸ cell/ml	20 μg/ml	100 μg/ml	ERT2T	-
Adjuvant	Aluminum hydroxide gel			-	-
Injection type	subcutaneous	subcutaneous	subcutaneous	subcutaneous	-
Survived/total (Protective rate)	0/15 (0%)	8/15 (53%)	12/15 (80%)	15/15 (100%)	0/5 (0%)

Conclusions:

The SpaA gene was expressed successfully both in cytoplasm and at the cell surface. The surface-display of the protein was confirmed by fluorescence microscopy. In mouse experiment, the crude preparation of SpaA from yeast lysate leads to 80% survival of mouse against lethal challenge with *E. rhusiopathiae*. The recombinant SpaA expressed in yeast is expected to be a useful candidate for a subunit vaccine for erysipelas.

- Surveillance of amino acid substitutions in avian influenza viruses isolated from wild birds from south korea, 2014-2016

Surveillance of amino acid substitutions in avian influenza viruses isolated from wild birds from South Korea, 2014-2016

Kwang-Hyun Oh, Yeon-Ji Bae, Seung-Baek Lee, Jong-Suk Mo, Van Dam Lai, In-Pil Mo

Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, South Korea

INTRODUCTION

Wild birds are considered natural hosts of Influenza A viruses and provides the environment to generate genetic diversity in many types of animal and human influenza A viruses. Also, reassortments and point mutations of the genes of influenza viruses especially occur in host wild birds. Various amino acid substitutions generated by point mutations in the gene of influenza viruses have been known to contribute to replication, pathogenicity, virulence, transmission and antiviral resistance to the viruses. Mutated viruses can be responsible for potentially severe influenza pandemics that may result from cross-host evolution of the influenza viruses. Therefore, the main objectives of the surveillance were to identify major amino acid substitutions of 8 different gene segments of avian influenza viruses isolated from wild birds and to confirm that wild birds can facilitate replication, increase pathogenicity, virulence, transmission and antiviral resistance of avian influenza viruses. A nationwide surveillance system has been implemented and fecal samples were collected from wild bird habitats from January 2014 to April 2016 in South Korea. 125 avian influenza viruses were isolated, for an overall prevalence of 0.32%. H1N1 was the most frequently detected subtype and surveillance of amino acid substitutions in avian influenza viruses isolated is confirmed

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Total 38,921 fresh fecal samples were collected from major wild birds habitats from January 2014 to April 2016 in South Korea.

Province	No. Fecal sample	No. AI isolates	Prevalence(%)
Gyeonggi	4,935	17	0.34%
Changbuk	4,507	9	0.19%
Changwon	7,262	13	0.18%
Kwangju	2,462	3	0.12%
Kyongsang	3,735	1	0.03%
Kyongsang	4,277	16	0.37%
Jeonbuk	5,135	59	1.15%
Jeonnam	5,687	5	0.09%
Jeju	521	0	0.00%
Total	38,921	123	0.32%

Virus isolation and identification

Every fecal sample was suspended in an antibiotic solution and were centrifuged. Supernatant was collected after high-speed centrifuging, were inoculated into 10 day old embryonated eggs and allantoic fluid from the incubated eggs were harvested after 5 day incubation period. Virus presence was determined by hemagglutination assay and were confirmed by RT-PCR using influenza-specific primers.

Molecular and amino acid substitution analyses

Viral RNA was extracted from the allantoic fluid of embryonated eggs using Viral RNA Mini kit (Qiagen). The RNA was transcribed into cDNA by using cDNA Synthesis Kit (Takara). The cDNA was amplified using segment specific primers. PCR products were purified from agarose gel using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and sequencing of the template DNA was performed at CosmoGenetech (Seoul, South Korea). Amino acid sequences were completed and compared using CLC Sequence 6 Program.

List of amino acid substitution

Major amino acid substitutions of 8 different gene segments of avian influenza viruses isolated are identified

Gene	Strain	Position	Effector	Reference
PB2	H1N1	H0761N	*Replication, Pathogenicity, *Transmissibility	*Han Zhou et al. 2013
		H0761N	*Replication, Pathogenicity	*Walker-Cramer-Merfeld et al. 2014
	H1N1	H158G	*Pathogenicity	*Shaw et al. 2011
		H258I	*Replication	*Zhouping Zhao et al. 2012
PB1	H1N1	H627K	*Virulence	*Hout W. Jagger et al. 2016
		H197V	*Virulence	*Kabat cheng et al. 2014
	H38Y	*Pathogenicity, Transmissibility	*Yaneshi Suzuki et al. 2014	
PA	H1N1	H185K	*Virulence, Pathogenicity	*Shuhang Fan et al. 2014
		H197V	*Virulence	*Kabat cheng et al. 2014
HA	H1N1	H0222G	*Replication, Pathogenicity	*Liu Xu et al. 2009
		H0223R	*Transmissibility	*Hayasugi et al. 2012
	H2N2	H2186V	*Replication	*Harris et al. 2006
		H318E		
NP	H1N1	H0319K	*Pathogenicity	*Gibelin et al. 2005
		H319K	*Replication, Pathogenicity	*Gandy L. Washko et al. 2009
NA	H1N1	H1274Y	*Anti-viral resistance	*Timothy CALLI et al. 2015
		H293K		
	H1N1	H118V		
		H1274Y		
	H2N9	H293K		
		H031N	*Anti-viral resistance	*Timothy CALLI et al. 2015
NSI	H1N1	H031N		*Chang-Lan Chung et al. 2006
		H126F		
		H276L,A		
NS2	H1N1	H168L	*Virulence, Replication	*Samar K. Dandekar et al. 2011
		H038G		



AVIAN DISEASE LABORATORY
Veterinary Medicine, Chungbuk National University

RESULTS

Table 1. Annual prevalence, number of fecal samples collected and number isolates for low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses in South Korea, 2014-2016

Year	No. Fecal sample	No. LPAI isolates	Prevalence(%)
'14	14,213	39	0.27%
'15	13,991	59	0.42%
'16	10,717	25	0.23%
Total	38,921	123	0.32%

Table 2. Proportion of low pathogenic avian influenza virus hemagglutinin and neuraminidase subtypes among the 120 isolated viruses.

Subtype	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	Total
H1	15							1		16
H2					1				1	2
H3	1					4		17		22
H4	4	4	1			12	2	2	1	26
H5	1		3			1			1	6
H6	3	3			2			3		11
H7	1			1		2	5			9
H8										8
H9	4	3								7
H10	2	1			2			1	2	10
H11			1	1	1					9
Total	31	11	5	1	6	19	9	24	14	120

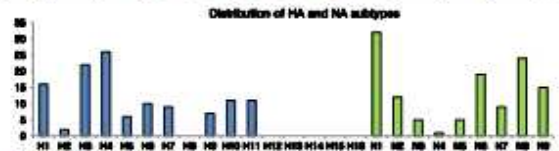


Figure 2. Distribution of HA and NA subtypes in low pathogenic avian influenza virus isolated from wild birds

Table 3. Incidence of HA, NA, NP, NS1, M2, PA, PB1 and PB2 mutants among avian influenza

Gene of AI viruses	mutation	No. of mutation(No. of isolated(%))		
		2014	2015	2016
PB2	D701N	0/18(0)	1/13(7.6)	0/7(0)
	E158G	0/18(0)	0/13(0)	0/7(0)
	T588I	0/18(0)	0/13(0)	0/7(0)
	E627K	0/18(0)	0/13(0)	1/7(14.2)
	C38Y	1/18(6.1)	8/11(72.7)	0/0(0.0)
	R185K	0/18(0)	3/12(25)	0/7(0)
HA(H1)	T97I	0/18(0)	0/12(0)	0/7(0)
	D222G	2/4(50.0)	4/7(57.1%)	0/0
HA(H3)	Q223R	0/4(0)	0/7(0)	0/0
	G186V	0/7(0)	0/12(0)	0/0
NP	A196T	2/7(28.5)	0/12(0)	0/0
	A184K	13/19(68.4)	11/13(84.6)	7/9(77.7)
NA(N1)	S319K	0/18(0)	0/13(0)	0/7(0)
	H274Y	0/6(0)	2/9(16.5)	0/0
NA(N2)	R292K	0/4(0)	0/5(0)	0/3(0)
	E119V	0/4(0)	0/5(0)	0/3(0)
NA(N9)	R292K	0/7(0)	0/5(0)	1/5(20.0)
	S31N	0/18(0)	0/10(0)	0/9(0)
M2	L26F	0/18(0)	0/10(0)	0/9(0)
	V276L,A	0/18(0)	0/10(0)	0/9(0)
	A30S	0/18(0)	0/10(0)	0/9(0)
NS1	F163L	0/18(0)	0/13(0)	0/7(0)
	M168I	1/19(5.2)	0/13(0)	0/10(0)

0/0 : not met

*: another amino acid mutation


SUMMARY AND DISCUSSION

- Kang et al. (2010) found that the dominant AI subtype in South Korea was H4N8 (13.9%) during the period of 2009-2008. However, the subtype H5N8 was more frequently isolated, up to 14.2% from the total number of viruses isolated from our survey.
- The 2014 Korean H5N8 HPAI outbreak started at January 2014, which continued throughout the whole year, eventually up to 25th March 2015 (Lee et al., 2014, MAPRA 2015). Compared to previous surveys, the prevalence of H5N8 Subtype LPAI increased, which may indicate genetic correlation with the H5N8 HPAI virus responsible for the outbreak. Further study is required on the issue.
- The main Amino Acid point mutations were concentrated on PB1, HA1 and NP gene from AI viruses isolated in South Korea.

• It is known that the M2 gene Amino Acid mutation responsible for generating Amantadine resistance was discovered from over 95% from the wild strain viruses isolated from Thailand and Vietnam but the particular mutation was not discovered in both South Korea and Japan from previous study (Kang et al., 2009) and this study.

• This is the first published surveillance of the influenza virus isolated from wild birds in South Korea. Cheongju, Chungbuk, Korea, 361-763


- Evaluation of safety of multivalent oil based vaccines containing different adjuvant and immunostimulant materials



Evaluation of safety of multivalent oil based vaccines containing Different adjuvant and immunostimulant materials

Joo-Hyung Kim¹, Eun-Oh Kim², Gwang-Ho Kim³, Yong-Il Lee⁴
Joo-Hyung Kim¹, Joo-Hyung Kim¹, Joo-Hyung Kim¹, Joo-Hyung Kim¹ and Joo-Hyung Kim¹

¹ Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 387-126, Seongju-Si, Chungbuk-Do, 387-126, South Korea
² Microbiology Research Group, School of Biomedical Sciences and Biotechnology, Chungbuk National University, Seongju, South Korea
³ Laboratory of Food Hygiene, Chungbuk National University, Seongju, South Korea
⁴ Chungbuk National University, Seongju, South Korea



INTRODUCTION

The reason for including adjuvants in the inactivated vaccine are, 1. To compensate for the low titer of immunogenic proteins contained in the vaccine, 2. To allow various combinations of vaccine components, further boosting their protective properties, 3. To improve the limited efficacy of vaccines in newborns and elderly subjects, 4. To increase effector T cell response and antibody titers, 5. To extend the duration of immune response by enhancing memory B and T cell activity and immune response. (O'Hagan et al, 1998) In the case of vaccines used in veterinary medicine, adjuvants should be stable and safe to use, thus avoiding negative effects on livestock production, growth and so on. Reduction in production costs required vaccination doses and the threshold of the required antigenic concentration for effective use as a vaccine. In the poultry industry, adjuvants are generally required antigenic concentration for effective use as a vaccine. In the poultry industry, adjuvants are generally required to produce long-term immunity, as achieving efficacy by a low cost is important. Thus, use of water-in-oil emulsions are recommended. (Aucouturier et al, 2001)

Most adjuvants have been developed into formulations that include oil-based components. For this study, we developed this new mineral oil-based W/O CAW10. In addition we have developed hWRS molecular immunostimulants and squalene based recombinant molecular immunostimulants, which are substances to be included with our adjuvant solution. Squalene is a natural product which can be acquired from both animal and plant sources. It is an endogenous molecule which is involved in the synthesis of cholesterol. Chemistry properties of squalene include high molecular surface tension and is known for its stability thus, being effective in inducing antibody response. (Stone, 1990, Aucouturier, 2006) Tryptophanyl-tRNA (WRS) is known to stimulate the immune response in event of an invasion by various pathogens. hWRS is also categorized as a WRS. (Ahn et al, 2017)

In this study, we have developed a multivalent vaccine for poultry use, containing adjuvants and immunostimulants of our choice and was evaluated through experimental and field experiments.

RESULTS

Laboratory test

Table 2. Comparison of weight change among groups vaccinated with different adjuvant and immunostimulants

Group	Weight at weeks post vaccination			Post challenge	
	0	3	6	P/O	I/M
CONTROL	658.89±59.61 ^a	894±64.7	1037.18±157.53	-	-
CNU-1	722.80±65.42	961.45±103.26	924.58±214.48 ^b	1400±166.43	1321.67±105.19
CAW10	709.64±96.23	848.5±82.94 ^a	951.33±78.18 ^b	1893±188.51	1478.33±256.43
KR-1	708.21±91.82	982.25±158.52	1098.17±199.04	1368.33±349.87	1385±246.22
ISA70	720.24±74.82	907.58±123.3 ^a	1213.25±151.68 ^b	1159.67±107.28	1368.23±87.65

* average±standard deviation
** Superscripts indicate between the same column, Means having different letters are significant (P<0.05) but same letters are not significant.
P/O = per oral administration, I/M = intramuscular administration

Table 3. Comparison on AI, ND and IB antibody titers in the SPF chickens inoculated with multivalent vaccine with different adjuvant and immunostimulant materials

Group	Weeks post vaccination									Post challenge							
	0			3			6			P/O		I/M					
CONTROL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CNU-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CAW10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KR-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISA70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* average±standard deviation
** Superscripts indicate between the same column, Means having different letters are significant(P<0.05) but same letters are not significant.

Field test

Table 4. AI, ND and IB antibody titer in the chickens of layer farms vaccinated with different immunostimulants

FARM	Antibody titer at weeks post vaccination																
	0			2			4			8			12				
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* average±standard deviation
** Superscripts indicate between the same column, Means having different letters are significant(P<0.05) but same letters are not significant.

MATERIALS and METHODS

Experimental design

Laboratory test
Sixty five weeks old specific-pathogen-free (SPF) White leghorn chickens were used. All animals were housed in the high level biosecurity isolator (Three shine, Kumsan, Korea) at college of veterinary medicine Chungbuk national university that were ventilated under pressure with HEPA-filtered air and maintained 20~25°C. All birds feed and water were available *ad libitum*. The chickens were vaccinated at five weeks of age by injection into the muscle with 0.5 ml of the vaccine. After primary vaccination 3 weeks, the chickens were given secondary vaccination. Blood samples were collected from each of the chickens at 0, 3 and 7 weeks post vaccination and 2 weeks post challenge. Body weight was measured every time blood samples were taken. Clinical sign, morbidity and mortality of each groups were observed daily during all experiment.

Field test
Three different commercial layer farms were selected for field test. According to their vaccination program, the layers groups that were scheduled for multivalent vaccine are selected as the test group and inoculated with the test vaccine. Blood samples were collected from each of the chickens at 0, 2, 4, 8 and 12 weeks post vaccination.

Vaccine preparation
A multivalent vaccine contains viruses, avian influenza virus (A/Chicken/Korea/01310/2001(H9N2)), Newcastle disease virus (rNDV-mF), Infectious bronchitis virus (KM91, ADL05258), Egg drop syndrome virus (EDSV, K11). The viruses are inactivated by treatment with formalin (final concentration 0.02%) with incubation at 37°C for 6~24 hours. The inactivated viruses mixed with different oil adjuvant and immunostimulant. Briefly, inactivated virus mixed with oil adjuvant at a ratio 3.5:6.5 (volume/volume). The composition of the antigen dose per one chicken is NDV (rNDV-mF): 10⁶~8.0 EID₅₀, IBV (KM91): 10⁶~6.0 EID₅₀, IBV (ADL05258): 10⁶~6.0 EID₅₀, AIV (A/Chicken/Korea/01310/2001(H9N2) strain 01310): 10⁶~8.0 EID₅₀, EDSV (K11): 10⁶~5.5 EID₅₀.

Serological test

Hemagglutination test: Hemagglutination inhibition (HI) test using β procedure (constant antigen and diluted serum) was used to quantify antibodies against AI, ND. A 2-fold serial dilution was used to run the serum samples in the HI test. And control (positive antiserum control, negative antiserum control) were included in each test.

Enzyme-linked immunosorbent assay: The Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed using a commercial indirect ELISA kit (IDEXX laboratories, Westbrook, Maine, USA) following the manufacturer's protocol. From these protocols, ELISA titers were calculated using xCheck software (IDEXX Assay management System, IDEXX laboratories, Version 3.3).

Challenge

- In laboratory test, six birds from five groups of laboratory test were challenged with NDV (Kr005) 10⁶~5.0 ELD₅₀ through intramuscular or per oral administration. Morbidity, mortality and clinical sign observed daily for 14 days. Blood samples of birds of laboratory test were collected at 14 days post-challenge for serological analysis.
- In field test, birds from each vaccinated birds were challenged with NDV (Kr005) with dose of 10⁶~5.0 ELD₅₀. Morbidity, mortality and clinical sign observed daily for 14 days. Blood samples of birds were collected at 14 days post-challenge for serological analysis.

Statistical analysis

- Differences between experimental and control groups were analyzed by analysis of variance (ANOVA) with IBM SPSS statistics for Windows, version 24.0 and considered significant at P < 0.05.

Table 1. Experimental design

Experiment	Group	Birds	Boosting date	Challenge date	Bleeding date	Adjuvant % content	Immunostimulant Content
Laboratory Test	Control				- 0, 2, 4 and 8 weeks post vaccination		No
	CAW10		3 week post vaccination	6 week post vaccination	- 0, 2, 4 and 8 weeks post vaccination	CAW10 65%	No
	CNU-1	SPF Chickens	1 st vaccination	3 rd vaccination	- 2 week post challenge		hWRS
	KR-1						Yeast squalene
Field test	ISA 70					ISA70 60%	
	Farm A	Commercial layer		6 week post vaccination	week post vaccination		Chitosan
	Farm B	Commercial layer				CAW10 65%	hWRS
	Farm C	Commercial layer			- 2 week post challenge		Yeast squalene

ADL AVIAN DISEASE LABORATORY
Veterinary Medicine, Chungbuk National University

17 Ganshik-dong, Seongju-si
Chungbuk, Korea, 381-763

- 223 -

Prevalence of Salmonella spp. isolated from commercial duck farms in South Korea



Tae-sik Kim, Gang-san Kim, Joo-sung Son, Van Dam Lai, In-Pil Mo

Avian Disease Laboratory, college of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, South Korea

Abstract

According to FAO statistics, duck meat consumption of South Korea has greatly increased in the recent years. However, the level of biosecurity and hygiene at the industrial field is relatively lagging behind. To evaluate the overall status of hygiene and level of biosecurity, and especially the status of Salmonella contamination in the duck farms, we selected 39 broiler duck farms located at Jeonnam province which accounts for almost half of duck production in Korea. Samples were collected from December 2017 to April 2018. The samples were collected at pre-designated periods, which consists of three separate periods, including pre-rearing period, 1-3 weeks old period and 4-6 weeks old period. In the pre-rearing period, 9 farms out of the 37 farms (24.3%) were positive for Salmonella. However, the positive rate for Salmonella significantly increased at 1-3 weeks (87.5%) and 4-6 weeks (75%). Salmonella was detected in the surrounding environment such as litter (39.4%), feed pan (39.4%), as well as nipples (26%). The incidence of Salmonella isolated from samples tended to increase with proportion to growth of age. From a total of 496 samples collected from duck farms, 161 Salmonella were isolated. The most frequently observed Salmonella serovars were Salmonella Albany (23.2%), Salmonella London (18.4%), and Salmonella Shubra (17.3%). Our results indicate that the rearing environment of domestic ducks showed a high contamination of Salmonella and continuous efforts are required to reduce Salmonella contamination.

Materials And Methods

Sample Collection

We have selected 39 duck broiler farms from Jeonnam province and collected various environmental samples from December 2017 to April 2018. The samples were collected at pre designated periods, which consists of three separate time periods including pre-rearing period, 1-3 weeks old period and 4-6 weeks old period. A sterile surgical gauze was moistened with buffered peptone water (BPW). Sampling was conducted aseptically at 4 pre-determined sites including the house walls, water nipples, feeding pan and dust from the surrounding. The sites were swabbed 2-3 times each. Litter was also collected from the sites three times at different locations surrounding the sites.

Isolation and serotyping

Samples were examined for the presence of Salmonella according to the experimental methods described by the U.S. Department of Agriculture (USDA, 2018). The pre-enrichment step of all samples in BPW was performed at 37°C for 18 h, followed by selective enrichment using a Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis agar by growing the pre-enriched samples at 41.5°C for 24 h, followed by further selection in Rambach agar at 37°C for 24 h. Serotyping of suspected colonies (one to three per plate) was performed according to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. If several isolates originating from the same type of samples displayed identical serotypes and antimicrobial susceptibility patterns, only one of these isolates was selected randomly and included in the data analysis.

Antimicrobial susceptibility testing

The antimicrobial susceptibility profiles were determined using by the disk diffusion method by using the Mueller-Hinton agar detailed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). Eighteen antimicrobial agents were tested using the following concentrations: amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg), ampicillin (10µg), cefotaxime (30µg), cefoxitin (30µg), ceftazidime (30µg), cephalothin (30µg), ciprofloxacin (5µg), gentamicin (10µg), kanamycin (30µg), nalidixic acid (30µg), streptomycin (10µg), erythromycin (15µg), amikacin (30µg), tetracycline (30µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75µg), cefuroxime (30µg), ceftazolin (30µg), and cefepime (30µg).

Results

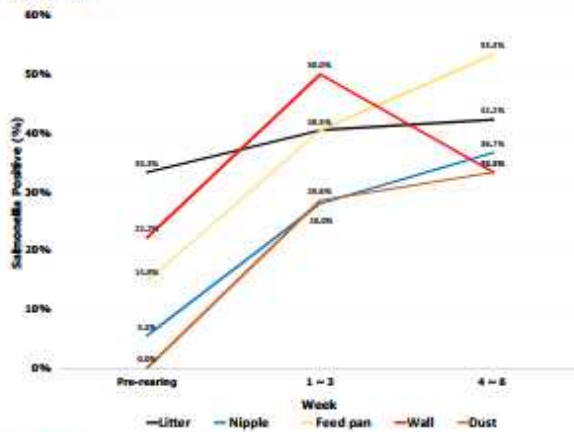


Figure 1. Comparison of Salmonella positive rate in the various samples collected from duck farms at separate time periods

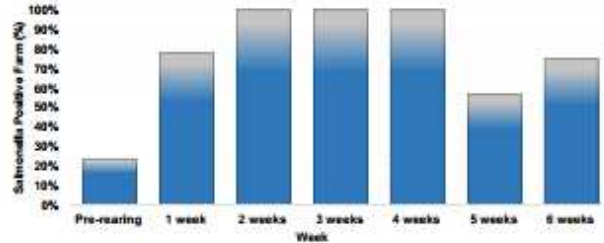


Figure 2. Weekly comparison of Salmonella positive farm rate in the samples collected from the 39 duck farms. Farms were designated as positives when one or more positive were detected from any of litter, dust, wall, nipple or feed pan

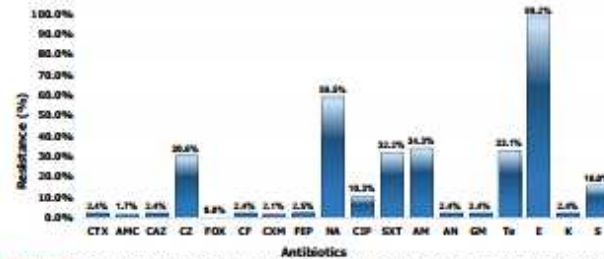


Figure 3. Antimicrobial resistant pattern in the Salmonella spp. isolated from duck farms

AMC, amoxicillin/clavulanic acid; AMC, ampicillin; CAZ, ceftazidime; CF, cefepime; CMX, cefuroxime; GM, gentamicin; CTX, cefotaxime; E, erythromycin; FEP, cefepime; FOX, cefoxitin; CF, cefepime; CZ, ceftazidime; NA, nalidixic acid; S, streptomycin; TE, tetracycline; AM, amikacin; CMX, cefuroxime; K, kanamycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole

Serotype	Farm	Period	Sample type	Antimicrobial resistance profile
ST	A	1-3weeks	nipple	NA, E
ST	B	1-3weeks	wall	NA, E
ST	C	4-6weeks	feed pan	NA, CTX, TE, E
ST	D	4-6weeks	wall	NA
ST	E	Pre-rearing	litter	NA, S, E
ST	F	1-3weeks	litter	E
ST	F	1-3weeks	feed pan	NA, SXT, AM, TE, S, E
ST	G	1-3weeks	feed pan	E
ST	H	4-6weeks	feed pan	NA
ST	I	4-6weeks	nipples	E
ST	J	4-6weeks	nipples	E
ST	K	4-6weeks	feed pan	E
ST	L	1-3weeks	feed pan	E
ST	L	1-3weeks	feed pan	CZ, E
ST	M	1-3weeks	nipples	E
SE	N	1-3weeks	nipples	CTX, CAZ, CZ, CF, CMX, NA, AM, GM, TE, E, K, S
SE	O	1-3weeks	litter	CTX, CAZ, CZ, CF, CMX, NA, AM, GM, TE, E, K, S
SE	O	1-3weeks	nipples	CTX, CAZ, CZ, CF, CMX, NA, AM, GM, TE, E, K, S
SE	O	1-3weeks	wall	CTX, CAZ, CZ, CF, CMX, NA, AM, GM, TE, E, K, S

Table 1. Summary of isolation history of Salmonella enteritidis (SE) and Salmonella typhimurium (ST) isolated from duck farms. Of the 161 Salmonella isolates from various environmental samples, 15 (9.3%) and 4 (2.4%) isolates were observed to be positive for ST and SE respectively.

AMC, amoxicillin/clavulanic acid; AMC, ampicillin; CAZ, ceftazidime; CF, cefepime; CMX, cefuroxime; GM, gentamicin; CTX, cefotaxime; E, erythromycin; FEP, cefepime; FOX, cefoxitin; CF, cefepime; CZ, ceftazidime; NA, nalidixic acid; S, streptomycin; TE, tetracycline; AM, amikacin; CMX, cefuroxime; K, kanamycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole

DISCUSSION

- The rate of Salmonella contamination in litter, water nipples, house walls and dust increased proportionally with growth of age. The level of Salmonella contamination was highest in the feeding pan and litter. This is mostly due to the accumulation of feces throughout the rearing periods with lack of cleaning. The relatively high prevalence of Salmonella might represent the overall level of hygiene and sanitation.
- One point to note is that the samples collected at 5 weeks during the 4-6 weeks showed a dramatic decrease in the positive rate for salmonella. This may be due to implementation of enhanced management practices, such as replacing caked litter with use of machinery like tractor rotators. These practices may help lower the incidence of Salmonella as fewer microorganisms with potential pathogenicity are present in freshly replaced litter.
- All the isolates were shown to be resistant to erythromycin. A large percentage of Salmonella serovars were also resistant to nalidixic acid (60%) and streptomycin (18%). One important point is that Salmonella enteritidis obtained from duck farms were resistant to more than 10 types antibiotics, including potent ones such as third-generation cephalosporins. Multidrug-resistant Salmonella poses a potential risk to public health and therefore should be regularly monitored in order to develop proper control measures.

- 2) 국내 (포스터 12건 발표)
- KMB 2017 국제학술대회 및 정기학술대회 (6건)

Inhibition of Respiratory Syncytial Virus replication in vitro and in vivo by *Coptidis Rhizoma* extract

Kiramage Chathuranga¹, Hyun-Cheol Lee¹, Tae-Hwan Kim¹, C.Y. Hewawaduge¹, Thilina U.B. Herath¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Eun-Seo Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹, Myun Soo Kim², Hong Ik Kim², Jin Yeul Ma³ and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea,

²Vitabio Corporation, Daejeon, Republic of Korea,

³Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu 41062, Republic of Korea.

Coptidis Rhizoma is derived from the dried rhizome of Ranunculaceous plants and is a commonly used traditional Chinese medicine. Although *Coptidis Rhizoma* is commonly used for its many therapeutic effects, antiviral activity against RSV has not been reported in detail. In this study, we evaluated the antiviral activities of *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) against RSV in human respiratory tract cell line (HEp2) and BALB/c mice. An effective dose of CRE significantly reduces the replication of RSV in HEp2 cells and reduces the RSV-induced cell death. This antiviral activity against RSV was through the induction of type I interferon-related signaling and the antiviral state in HEp2 cells. More importantly, oral administration of CRE exhibited prophylactic effects in BALB/c mice against RSV. In HPLC analysis, we found the presence of several compounds in the aqueous fraction and among them; we confirmed that palmatine was related to the antiviral properties and immune-modulation effect. Taken together, CRE and its components play roles as immunomodulators and could be a potential source as promising natural antivirals that can confer protection to RSV. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 316043-3)]

Key Words: *Coptidis Rhizoma* (CR), Palmatine, RSV, Antiviral effect

Mucosal administration of conserved sM2HA2 and cholera toxin subunit A1 (CTA1) fusion protein with PC-NPs induces protection against divergent influenza subtypes

Tae-Hwan Kim¹, Mohammed Y.E. Chowdhury¹, Hyun-Cheol Lee¹, C.Y. Hewawaduge¹, Kiramage Chathuranga¹, Thilina U.B. Herath¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Eun-Seo Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹, Moon-Hee Sung², Chul-Joong Kim¹ and Jong-Soo Lee¹

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

²BioLeaders Corporation, Daejeon, Republic of Korea

To develop a safe and effective mucosal vaccine that broad cross protection against seasonal or emerging influenza A viruses, we generated a mucosal influenza vaccine system combining the highly conserved matrix protein-2 (sM2), fusion peptide of hemagglutinin (HA₂), the well-known mucosal adjuvant cholera toxin subunit A1 (CTA1) and poly- γ -glutamic acid (γ -PGA)-chitosan nanoparticles (PC NPs), which are safe, natural materials that are able to target the mucosal membrane as a mucosal adjuvant. The mucosal administration of sM2HA2CTA1/PC NPs could induce a high degree of systemic immunity at the site of inoculation as well as at remote locations and also significantly increase the levels of sM2- or HA2-specific cell-mediated immune response. In challenge tests in BALB/c mice with 10 MLD₅₀ of Influenza H5N1, H1N1, H5N2, H7N3 or H9N2 viruses, the recombinant sM2HA2CTA1/PC NPs provided cross protection against divergent lethal influenza subtypes and also the protection was maintained up to six months after vaccination. Thus, sM2HA2CTA1/PC NPs could be a promising strategy for a universal influenza vaccine. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 315044031, 316043-3)]

Key words: Mucosal vaccine, Influenza Virus, PC-Nanoparticles (PC-NPs).

Released Tryptophanyl-tRNA-Synthetase Functions as a Cytokine on Virus Infection

Hyun-Cheol Lee¹, Eun-Seo Lee¹, Tae-Hwan Kim¹, C.Y. Hewawaduge¹, Kiramage Chathuranga¹, Thilina U.B. Herath¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹ and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

Tryptophanyl-tRNA Synthetase (WRS) is one of the aminoacyl tRNA synthetase that possess non-canonical functions. Full-length WRS is released during bacteria infection as an important factor priming toll-like receptor 4 (TLR4) - myeloid differentiation factor 2 (MD2) complex to elicit innate immune response. However, role of full-length WRS in virus infection remains unknown. Here, we show that full-length WRS is secreted by immune cells in the early time of virus infection and functions as an antiviral cytokine. Treatment of recombinant WRS promotes production of inflammatory cytokines and type 1 interferons, and curtails virus replication in THP-1 and Raw264.7 cells. However, we could not observe the similar effects in epithelial cells, TLR4^{-/-} BMDMs, and MD2^{-/-} BMDMs. In vivo, intravenous and intranasal administration of recombinant WRS provoke innate immunity and block vesicular stomatitis virus replication. These findings suggest that secreted full-length WRS has a non-canonical function in activating and mediating innate immune responses to virus infection as well as to bacterial infection. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 315044031, 316043-3)]

Key words: WRS, innate immunity

The recombinant *Lactobacillus*-displayed CTA1-conjugated PEDSe antigen induces protective mucosal immune responses against porcine epidemic diarrhea (PED) virus

C.Y. Hewawaduge¹, Md Bashir Uddin¹, Jae-Hoon Kim¹, Tae-Hwan Kim¹, Hyun-Cheol Lee¹, Kiramage Chathuranga¹, Thilina U.B. Herath¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Eun-Seo Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹, Chul-Joong Kim¹ and Jong-Soo Lee¹

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

PED virus (PEDV), the causative agent of PED belongs to the member of Coronaviridae, is enveloped RNA virus. PEDV infection has been one of the major concerns of the Korean swine industry and even though several commercial vaccines have been developed, PEDV has continually emerged, causing tremendous harm to the swine farms. For the development of an effective PEDV vaccine that provides broad cross protection against existing PEDV strain and emerging subtypes, we used PEDSe multi-epitope (Spike multi-epitope, Se=COE, SS2, SS6) gene with non-toxic mucosal immunogenic adjuvant, Cholera toxin subunit A1 (CTA1) for the construction and we display PEDSe multi-epitope with CTA1 on the surface of *Lactobacillus casei* (pgsA-CTA1-PEDSe/*L. casei*) using the pgsA surface display system. Oral or intranasal inoculations of pgsA-CTA1-PEDSe/*L. casei* into mice induced more potent mucosal, humoral and cell-mediated immune responses. Additionally, we checked the long lasting immune responses to produce neutralizing antibodies against PEDV infection. Thus, the recombinant *L. casei* (pgsA-CTA1-PEDSe/*L. casei*) could be a promising mucosal vaccine candidate against currently circulating PEDV. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 316043-3)]

Key words: *Lactobacillus*, PEDV, Mucosal immunity, Vaccine

Dense Granule protein 7 of *Toxoplasma gondii* has the antiviral activity in vitro and in vivo by inducing antiviral state

Thilina U. B. Herath¹, Tae-Hwan Kim¹, Hyun-Cheol Lee¹, C.Y.Hewawaduge¹, Thilina U.B. Herath¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹, Eun Seo Lee¹, Kiramage Chathuranga¹, W. A. Gayan Chathuranga¹, Chul-Su Yang², and Jong-Soo Lee¹

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea,

²Department of Microbiology and Infection Signaling Network Research Center, Chungnam National University School of Medicine, Republic of Korea

Dense Granule Protein-7 (GRA-7) which well-studied as a vaccine candidate, is an excretory protein of *T. gondii*. However, the roles of GRA-7 against virus infection are not completely investigated. Here, we identified the antiviral properties of GRA-7 *in vitro* and *in vivo* against diverse viruses. Non-toxic amounts of GRA-7 antigen significantly inhibited the replication of Influenza PR8, VSV, and HSV on RAW264.7 cells. GRA-7 also displayed antiviral activity in epithelial (HEK293T and HELA) cells against VSV, PR8, HSV, and Adenoviruses. For the detail explanation of these antiviral activities, we checked the induction of type I interferon and pro-inflammatory cytokines both in mRNA and cytokine levels upon treatment of GRA-7 *in vitro*. Moreover, intra-nasal inoculation of GRA-7 protected BALB/c mice from lethal infection with Influenza A virus (H1N1). Furthermore, intra-nasal administration of GRA-7 in BALB/c mice showed lower lung viral titer, when challenge with RSV. Therefore, these results clearly showed that GRA-7 has an antiviral activity both *in vitro* and *in vivo* suggesting the potential use of GRA-7 antigen as a candidate drug for prophylactic purposes. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 315044031, 316043-3)]

Key words: *Toxoplasma gondii*, GRA-7, Antiviral Activity

Inhibition of highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus by a peptide derived from vFLIP through its direct destabilization of viruses

Jong-Soo Lee¹, Ho-Jin Moon¹, Chamilani Nikapitiya¹, Hyun-Cheol Lee¹, Tae-Hwan Kim¹, C.Y. Hewawaduge¹, Kiramage Chathuranga¹, Thilina U.B. Herath¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Eun-Seo Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹ and Dung Tan Huynh¹

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea,

The antiviral activities of synthesized K α 2-helix peptide, which was derived from the viral FLICE-like inhibitor protein (vFLIP) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), against influenza A virus (IAV) were investigated *in vitro* and *in vivo*, and mechanisms of action were suggested. In addition to the robust autophagy activity of the K α 2-helix peptide, the present study showed that treatment with the K α 2 peptide fused with the TAT peptide significantly inhibited IAV replication and transmission. Moreover, TAT-K α 2 peptide protected the mice, which were challenged with lethal doses of highly pathogenic influenza A H5N1 or H1N1 viruses. Mechanistically, we found that TAT-K α 2 peptide destabilized the viral membranes, depending on their lipid composition of the viral envelop. In addition to IAV, the K α 2 peptide inhibited infections with enveloped viruses, such as Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Respiratory Syncytial Virus (RSV), without cytotoxicity. These results suggest that TAT-K α 2 peptide is a potential antiviral agent for controlling emerging or re-emerging enveloped viruses, particularly diverse subtypes of IAVs. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 316043-3)]

Key words: K α 2 peptide, Enveloped RNA viruses, Virucidal

GRA7 has the antiviral activity in vitro and in vivo by inducing antiviral state

Jong-Soo Lee^{1*}, Thilina U. B. Herath¹, Tae-Hwan Kim¹, Hyun-Cheol Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹, Eun Seo Lee¹, Kiramage Chathuranga¹, W. A. Gayan Chathuranga¹, Chul-Su Yang²

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea,

²Department of Microbiology and Infection Signaling Network Research Center, Chungnam National University School of Medicine, Republic of Korea

Dense Granule Protein-7 (GRA-7) is an excretory protein of *T. gondii*. However, the roles of GRA-7 against virus infection are not completely investigated. Here, we identified the antiviral properties of GRA-7 *in vitro* and *in vivo* against diverse viruses. Non-toxic amounts of GRA-7 antigen significantly inhibited the replication of Influenza PR8, VSV, and HSV on RAW264.7 cells. GRA-7 also displayed antiviral activity in epithelial (HEK293T and HELA) cells against VSV, PR8, HSV, and Adenoviruses. For the detail explanation of these antiviral activities, we checked the induction of type I interferon and pro-inflammatory cytokines both in mRNA and cytokine levels upon treatment of GRA-7 *in vitro*. Moreover, intra-nasal inoculation of GRA-7 protected BALB/c mice from lethal infection with Influenza A virus (H1N1). Furthermore, intra-nasal administration of GRA-7 in BALB/c mice showed lower lung viral titer, when challenge with RSV. Therefore, these results clearly showed that GRA-7 has an antiviral activity both *in vitro* and *in vivo* suggesting the potential use of GRA-7 antigen as a candidate drug for prophylactic purposes. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 315044031, 316043-3)]

Key words: *Toxoplasma gondii*, GRA-7, Antiviral Activity

Coptidis Rhizoma* extract inhibits Respiratory Syncytial Virus *in vitro* and *in vivo

Kiramage Chathuranga¹, Hyun-Cheol Lee¹, Tae-Hwan Kim¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Eun-Seo Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹, Myun Soo Kim², Hong Ik Kim² and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea,

²Vitabio Corporation, Daejeon, Republic of Korea,

Huang Lian (*Coptidis Rhizoma*) is derived from the dried rhizome of Ranunculaceae plants and is frequently used in many traditional formulas for properties of “clearing damp-heat, quenching fire and counteracting poison” in Asia for centuries. However underlying mechanism of *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) exhibited antiviral activity against RSV has not been reported in detail. In here, we investigated the antiviral activities of CRE against RSV in human respiratory tract cell line (HEp2) and BALB/c mice. An effective dose of CRE significantly reduces the replication of RSV in HEp2 cells and reduces the RSV-induced cell death. This anti-RSV activity was through the induction of type I interferon-related signaling and the antiviral state in HEp2 cells. Furthermore, oral inoculation of CRE exhibited prophylactic effects in BALB/c mice against RSV. Compounds present in the aqueous fractions of CRE confirmed by HPLC analysis and among them; we confirmed that palmatine was related to the antiviral properties and immune-modulation effect. Collectively, CRE and its components exhibit promising immunomodulatory role with prophylactic effect thus, could be a potential source as promising natural antivirals that can confer protection to RSV. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 315044031, 316043-3)]

Key Words: *Coptidis Rhizoma* (CR), Palmatine, RSV, Antiviral effect, Prophylactic effect

Influenza vaccine candidates emulsified with CAWIO induces protection against lethal Influenza challenge

Eun-Seo Lee¹, Hyun-Cheol Lee¹, Gayan Chathuranga¹, Tae-Hwan Kim¹, Kiramage Chathuranga¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹, Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

Avian influenza virus (AIV) can infect poultry, mammals, and other hosts and causes enormous economic losses to the global poultry industry. Many centuries are preparing avian influenza vaccine which provide the good protection efficacy and also developing the new adjuvant for avian. In this study, we evaluated that the new adjuvant CAWIO (CAVAC, Korea) is safe and effective to enhance the immunogenicity of Influenza antigens and compared with ISA70 (SEPPIC, France). As antigens, we used the conserved Influenza antigen (sM2HA2) which studied previously and inactivated H9N2 antigen. As results, CAWIO mice groups which immunized with recombinant conserved antigens (sM2HA2) or inactivated H9N2 antigen can induce higher level of anti-serum IgG and better secretion of IFN- γ and IL-4 from splenocytes comparative to ISA70 groups. Moreover, in challenge tests with 10 MLD50 of A/Aquatic bird/Korea/W81/2005(H5N2) or A/Chicken/Korea/116/2004(H9N2) viruses in BALB/c mice, CAWIO mice groups provided better protection of BALB/c mice compared with ISA70 groups. These results indicate that CAWIO is a promising adjuvant for avian influenza vaccines. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant no. 316043-3)]

Key words: Influenza virus, sM2HA2, CAWIO, Adjuvant

Inhibition of Respiratory Syncytial Virus replication in vitro and in vivo by *Plantago asiatica* and *Clerodendron trichotomum*

H.M.S.M. Wijerathne¹, Kiramage Chathuranga¹, Hyun-Cheol Lee¹, Tae-Hwan Kim¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Eun-Seo Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, Dung Tan Huynh¹, Myun Soo Kim², Hong Ik Kim² and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

²Vitabio Corporation, Daejeon, Republic of Korea

Plantago asiatica (PA) and *Clerodendron trichotomum* (CT) are common herbal medicine, native to East Asia. PA seed is renowned for its diuretic, antipyretic, antiphlogistic, and defecation-facilitating properties. Meanwhile, the dried leaf and stem of CA contains miscellaneous pharmacological activities including antihypertensive, sedative, analgesic, and anti-inflammatory effects. Although both herbs are used for its many therapeutic effects, antiviral activity against RSV has not been reported in detail. The present study discovered the antiviral activities of *Plantago asiatica* extract (PAE) and *Clerodendron trichotomum* extract (CTE) against Respiratory Syncytial Virus (RSV) in human respiratory tract cell line (HEp2) and BALB/c mice. An effective dose of both herb extracts significantly reduce the replication of RSV in HEp2 cells and subsequent cell death. Moreover, herb treatments diminish syncytial formation after RSV infection in HEp2 cells significantly. Time dependent treatment of PAE and CTE after RSV infection in HEp2 cells expressed that treatment with two-hour post infection of virus infection can provide better result by demolishing further replication of RSV virus in Hep2 cell line. More importantly, in vivo results illustrate oral administration of PAE and CTE exhibited prophylactic effects in BALB/c mice against RSV. Taken together, PA and CT extracts will be a potential source as promising natural antivirals that can confer protection to RSV. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 315044031, Grant No. 316043-3)]

Key Words: *Plantago asiatica*, *Clerodendron trichotomum*, RSV

***Lactobacillus*-Displayed CTA1-Conjugated PEDSe Antigen Induces Protective Immune Responses against PED Virus**

Dung Tan Huynh¹, C.Y. Hewawaduge¹, Md Bashir Uddin¹, Tae-Hwan Kim¹, Hyun-Cheol Lee¹, Kiramage Chathuranga¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Eun-Seo Lee¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Chul-Joong Kim¹, and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

Abstract:

Porcine epidemic diarrhea (PED) causes significant economic impact throughout the swine-raising countries including Korea. PED virus (PEDV), the causative agent of PED belongs to the member of family Coronaviridae, and COE, SS2 and SS6 regions of PEDV spike protein plays a role in neutralizing antibody production against PEDV. We used PEDSe multi-epitope (Spike multi-epitope, Se=COE, SS2, SS6) with or without non-toxic mucosal immunogenic adjuvant, cholera toxin subunit A1 (CTA1) to develop an effective and safe mucosal vaccine against PEDV, from the recently circulating strain in Korea. Our target antigens PEDSe and CTA1 were expressed on surface of *Lactobacillus casei*. Surface localization of the fusion proteins on *L.casei* was verified by cellular fractionation and FACS. Oral and intranasal inoculations of *rL.casei* into mice generated high serum IgG and mucosal IgA levels. Interestingly, *rL.casei* conjugated with CTA1 induced more potent mucosal, humoral and cell-mediated immune responses than pgsA-PEDSe/*L.casei*. Mucosal immunization with *rL.casei* stimulated cellular immune responses, provided long-lasting immune responses and produced neutralizing antibodies against PEDV infection. In short, these results suggest that mucosal immunization with *rL.casei*-displayed CTA1-conjugated-PEDSe antigen could be a promising vaccine candidate against currently circulating PEDV. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 315044031, 316043-3)]

Key words: PEDSe and CTA1, mucosal administration, *rL.casei*

Tryptophanyl-tRNA-Synthetase Functions as a Cytokine on Virus Infection

Hyun-Cheol Lee¹, Eun-Seo Lee¹, Tae-Hwan Kim¹, Kiramage Chathuranga¹, W.A. Gayan Chathuranga¹, Pathum Ekanayaka¹, H.M.S.M. Wijerathne¹, Dung Tan Huynh¹ and Jong-Soo Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

The ARSs are the essential enzymes in translation that catalyze specific amino acid to its cognate tRNA. However, some ARS in higher eukaryotes possess non-canonical function to regulate additional cell metabolisms. As a part of the non-canonical functions of ARS, here we report the new ability of WRS in antiviral innate immune system. We show rapid secretion of WRS in response to virus infection and the extracellular function of WRS to priming innate immunity. This stimulation enhances the level of cytokines and finally mediates inhibition of virus replication *in vitro* and *in vivo*. Thus, we subjoin the WRS to the antiviral innate immune system as a new factor provoking the defence responses. This study suggests that secreted full-length WRS has a non-canonical function in activating and mediating innate immune responses to the virus infection and the WRS is able to be utilized for application in potential. [The Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Grant no. 315044031, 316043-3, 318039-3)]

Key words: WRS, innate immunity

5-8. 인력양성 (2건)

- 수의학 관련 석사 인력양성 1명
- 수의학 관련 석사 인력양성 및 취업 1명

5-9. 정책활용 (1건)

- 아래 공문과 같이 “고병원성 AI 항원뱅크 구축 사업” 중 백신화를 위한 조류용 백신보조제 사용에 대한 내용을 농림축산식품부 조류인플루엔자방역과에 제안함.
- 해당 내용에 대한 검토의견에 따라 진행 예정

5-10. 홍보전시 (3건)

- 1) IPET 농림식품기술기획평가원 소식지 창(2018 vol73)
 - 신기술인증업체 ‘안정성 및 효능성 뛰어난 백신보조제 개발’

R&D 우수업체를 찾아서

신기술인증업체 - (주)중앙백신연구소

안정성·효능성 뛰어난 백신보조제 개발

1968년에 설립돼 백신영역에 모든 역량을 집중하는 동물백신 전문 제조회사로서 산업동물의 질병피해 감소와 생산성 향상 및 반려동물과 인간의 삶을 향상시켜 온 (주)중앙백신연구소, 돼지, 소, 닭, 개, 고양이 및 토끼에 대한 주요 전염병을 예방할 수 있는 백신을 생산·공급하고 있는 (주)중앙백신연구소를 둘러보고, 농림축산식품부로부터 '농림식품신기술(NET)'을 인증 받을 정도로 안정성이 증대된 W/O(Water-in-oil) type 백신보조제 유휴기술에 대해 들어왔다.



중앙백신연구소는 1968년에 설립된 동물용 백신 전문기업이다.

2) 2018 EuroTier CAVac WO 소개 및 홍보전시

- 개발된 백신보조제 CAVac WO의 제품 소개 및 현지 백신 관련 회사에 홍보



3) 파키스탄 CAVAC 양계제품 런칭 세미나. 2018.04

- 파키스탄 CAVAC 양계제품 런칭 세미나를 열어 양계백신에 대한 홍보를 실시함.
- 양계제품에는 개발된 오일 백신보조제가 포함된 혼합 사독 백신도 포함되어 있음.



5-11. 기타 (1건)

- 한국연구재단 2018 원천기술개발사업 신규 연구과제 선정
과제명 ‘안전성과 효능성이 최적화된 구제역 백신보조제 개발 및 적용’

붙임. 참고문헌

1. Reed, Steven G., Mark T. Orr, and Christopher B. Fox. "Key roles of adjuvants in modern vaccines." *Nature medicine* 19.12 (2013): 1597.
2. Drozdíková, E., Garaiová, M., Csáky, Z., Obernauerová, M., Hapala, I. (2015), 'Production of squalene by lactose-fermenting yeast *Kluyveromyces lactis* with reduced squalene epoxidase activity', *Lett Appl Microbiol*, 61, 77-84.
3. Garaiová, M., Zambojová, V., Šimová, Z., Griač, P., Hapala, I. (2014), 'Squalene epoxidase as a target for manipulation of squalene levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Yeast Res*, 14, 310-323.
4. Henderson, C.M., Zeno, W.F., Lerno, L.A., Longo, M.L., Block, D.E. (2013), 'Fermentation temperature modulates phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol levels in the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*', *Appl Environ Microbiol*, 79, 5345-5356.
5. Kwak, S., Kim, S.R., Xu, H., Zhang, G.C., Lane, S., Kim, H., Jin, Y.S. (2017), 'Enhanced isoprenoid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*', *Biotechnol Bioeng*.
6. Lack, G. (2002), 'Clinical risk assessment of GM foods', *Toxicol Lett*, 127, 337-340.
7. Loertscher, J., Larson, L.L., Matson, C.K., Parrish, M.L., Felthouser, A., Sturm, A., Tachibana, C., Bard, M., Wright, R. (2006), 'Endoplasmic reticulum-associated degradation is required for cold adaptation and regulation of sterol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Eukaryot Cell*, 5, 712-722.
8. Ohto, C., Muramatsu, M., Obata, S., Sakuradani, E., Shimizu, S. (2009), 'Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols', *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 837-845.
9. Tronchoni, J., Rozès, N., Querol, A., Guillamón, J.M. (2012), 'Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature', *Int J Food Microbiol*, 155, 191-198.
10. Stewart-Tull, D. E. S., et al. "Immimosuppressive Effect in Mycobacterial Adjuvant Emulsions of Mineral Oils Containing Low Molecular Weight Hydrocarbons." *International Archives of Allergy and Immunology* 52.1-4 (1976): 118-128.
11. O' Hagan, Derek T., ed. *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols*. Vol. 42. Springer Science & Business Media, 2000.
12. Edelman, Robert. "Vaccine adjuvants." *Reviews of infectious diseases* 2.3 (1980): 370-383.
13. Petrovsky, Nikolai, and Julio César Aguilar. "Vaccine adjuvants: current state and future trends." *Immunology and cell biology* 82.5 (2004): 488-496.
14. Singh, Manmohan, and Derek O'Hagan. "Advances in vaccine adjuvants." *Nature biotechnology* 17.11 (1999): 1075.
15. Guy, Bruno. "The perfect mix: recent progress in adjuvant research." *Nature Reviews Microbiology* 5.7 (2007): 505.
16. Lee, Gye-Won, et al. "Solubilization of Talniflumate in Microemulsion Systems." *Journal of*

Pharmaceutical Investigation 38.3 (2008): 171-176.

17. Aucouturier, J., L. Dupuis, and V. Ganne. "Adjuvants designed for veterinary and human vaccines." *Vaccine* 19.17-19 (2001): 2666-2672.
18. 손은수, 손은화, and 표석능. "면역보조제의 작용 및 개발." *Immune Network* 4.3 (2004): 131-142.
19. Kullenberg, Fred W. "Adjuvant for dose treatment with antigens." U.S. Patent No. 5,084,269. 28 Jan. 1992.
20. Fox, Christopher B., et al. "Technology transfer of oil-in-water emulsion adjuvant manufacturing for pandemic influenza vaccine production in Romania." *Vaccine* 31.12 (2013): 1633-1640.
21. 미세 유동화된 수중 유적형 유화액 및 백신 조성물. KR100720213B1.
22. *Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics* edited by Robert M. Nervig, Patricia M. Gough, Merlin L. Kaeberle and Cecelia A. Whetstone, Iowa State University Press, 1986.

<뒷면지>

주 의

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