

<표지>

(옆면)

201690398

조류인플루엔자

유니버설

백신개발

최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원  
40림축산식품부

(앞면)

보안 과제( ), 일반 과제( 0 ) / 공개( ), 비공개( )발간등록번호( 0 )

발간등록번호

11-1543000-002916-01

# 조류인플루엔자 유니버설 백신 개발 최종보고서

2019.11.22.

주관연구기관 / (주)바이오포아  
협동연구기관 / 서울대학교

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “조류인플루엔자 유니버설 백신 개발”(개발기간 : 2016.9.5 ~ 2019.9.4)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 10. 17.

주관연구기관명 : (주)바이오포아 (대표자) 조선희 (인)

협동연구기관명 : 서울대학교산학협력단



주관연구책임자 : 조선희

협동연구책임자 : 권혁준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	201690398	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.9.5. ~ 2019.9.4	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	조류인플루엔자 유니버설 백신 개발			
연구책임자	조선희	해당단계 참여연구원 수	총: 21명 내부: 12명 외부: 9명	해당단계 연구개발비	정부:352,000천원 민간:118,000천원 계:470,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 21명 내부: 12명 외부: 9명	총 연구개발비	정부:897,000천원 민간:300,000천원 계:1,197,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)바이오포아			참여기업명 (주)바이오포아	
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	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	3	5							5		

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)      보고서 면수

<요약문>

연구의 목적 및 내용	<p>최종 목표: 조류인플루엔자 긴급방역 및 예방용 유니버설 백신 개발</p> <p>1. 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 벡터 백신 개발</p> <p>① 모체이행항체를 극복하는 뉴캐슬병 벡터 개발</p> <p>② DIVA가 가능한 H9N2 ND벡터 불활화 백신</p> <p>③ DIVA가 가능한 H5형 HPAI용 ND벡터 분무용 생 백신</p> <p>④ DIVA가 가능한 H5형 HPAI용 ND벡터 불활화 백신</p> <p>2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 조류 인플루엔자 H9N2/H5N8/H5N1형 백신 개발: 조류 인플루엔자 HA2 fragment common epitope의 면역원성을 향상 및 저병원성 고생산성 백신주 개발</p>				
연구개발성과	<p>1. 모체이행항체를 극복하며 DIVA가 가능한 H9 및 H5형 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 벡터 생 백신 및 불활화 백신 개발: 특허 3(출원)/ 균주기탁4/ 시험 백신 3종/ 정책제안 1</p> <p>2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 H9N2 사독백신개발: SCI 논문 2/ 학술발표 4/ 특허출원1/ 인력양성 2</p> <p>3. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 H5N8/H5N1 사독백신 제품 2종 개발 (clade 2.3.2.1/2.3.4.4; 비상용): SCI 논문 1/ 학술발표 2/ 특허출원1</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>1. H9/H5 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 벡터 백신 제품 사업화 및 상용화</p> <p>① H9N2 ND벡터 불활화 백신: 국내 저병원성 인플루엔자 백신 교체로 인한 DIVA 환경 조성 및 저병원성 조류인플루엔자 근절</p> <p>② 분무용 H5형ND벡터 생백신(1차백신): 손쉬운 대량접종 및 빠른 면역형성가능</p> <p>③ H5형 ND벡터 불활화백신(2차백신): 완벽한 면역 형성 및 DIVA 가능해 조류독감 근절</p> <p>2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 H9N2/H5N1/H5N8 불활화 백신주 개발 및 벡터 시스템 개발</p> <p>① 기존 불활화 백신주 대비 효능향상 및 고생산성</p> <p>② 인체용 고병원성 조류인플루엔자 백신주 제작에 활용</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	뉴캐슬병바이러스 벡터	조류인플루엔자	역유전학	유니버설 백신	고생산성
영문핵심어 (5개 이내)	NDV vector	Avian influenza	Reverse genetics	universal vaccine	high productivity

\* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1장 연구개발과제의 개요 .....	5
1-1. 연구개발 목적 .....	5
1-2. 연구개발 개요 .....	6
1-3. 연구개발 목적 .....	8
1-4. 연구개발 범위 .....	23
2장 연구수행 내용 및 결과 .....	44
2-1. 연구개발의 정량적 성과 .....	44
2-2. 연구개발의 정성적 성과 목표 및 결과요약 .....	46
2-3. 연차별 연구수행 내용 요약 .....	49
2-4. 연차별 연구수행 내용 및 결과 .....	55
3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	116
3-1. 목표 .....	116
3-2. 목표 달성여부 .....	117
3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책 .....	119
4장. 연구결과의 활용 계획 등 .....	120
붙임. 참고 문헌 .....	121

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

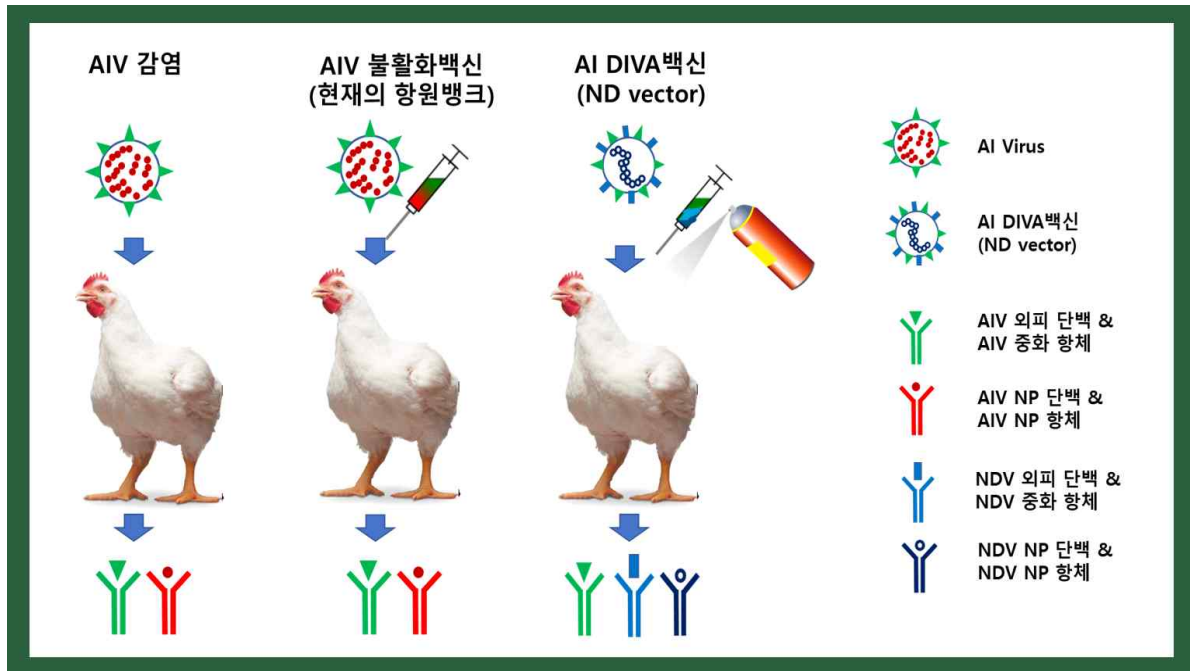
# 1장. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- **현재의 항원뱅크**는 조류인플루엔자 바이러스를 **불활화한 백신**으로 **긴급방역 상황에 적용하기에는 많은 문제점이 있음**
  - 즉, 수많은 닭에 직접 주사해야 하므로 **많은 접종인력이 필요**하고 **신속한 접종이 어렵고**, 면역항체 유도까지의 **기간이 길고**, 백신접종 닭과 감염된 닭의 **혈청학적 구분이 거의 불가능**하며 **DIVA적용이 안되고**, 백신 생산 비용이 **높아 경제성이 떨어지며**, 백신생산 시 조류인플루엔자 바이러스의 **오염 우려** 등이 문제되고 있음.
  
- **H5N1 예방백신**은 야외 바이러스와의 유전자 재조합 등 변이 위험성으로 국제규정상 불활화 사독 오일백신 형태로 제작되어야함.
  - 그러나, 다른 가금류 백신 바이러스 등에 AI 유전자를 삽입한 **생독 벡터 백신** 등은 예외
  
- **NDV 생독백신**은 양계에서 가장 많이 사용하는 백신으로 **벡터 백신 개발 시 야외 적용이 용이**하고 최근 역유전학 기술의 발달로 NDV를 벡터로 사용한 다양한 형태의 재조합 백신 연구가 활발함.
  - 특히, **ND벡터를 이용한 고병원성 조류인플루엔자 백신**은 국내에서도 개발에 성공하였으며, 해외 기술수준을 뛰어 넘는 결과를 보였음.
  
- 고병원성 조류인플루엔자 **ND벡터 백신의 장점**.
  - **분무접종이 가능**하여 긴급 시 **신속한** 접종 및 **항체형성** 기간이 빠르며, 감염된 닭과 백신접종 닭을 쉽게 구분되어 **DIVA적용이 가능한** ND벡터 백신을 개발하여 1일령 병아리에 접종 시에도 **안전**하며, 유전적으로도 안전하도록 개발한다면, **ND에 고도 면역된 닭에서도 적용 가능**할 수 있어 **높은 경제성**도 갖게되며, 불활화 백신으로 사용해도 DIVA가 가능하므로 **기존 항원뱅크의 개선 및 국가 방역에 핵심인 조류인플루엔자 바이러스 근절을 위해 개발**하였음.

## 1-2. 연구개발 개요

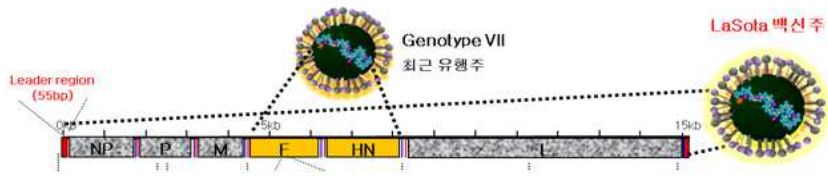
가. DIVA(Differentiation of Infected from Vaccinated Animals)가 가능한 HPAIV HA 및 NA유전자를 발현하는 재조합 NDV백터 백신주 제작



- 개발된 백신주는 분무 접종이 가능하여 신속한 방역 조치에 적합하여야 하며, AIV에 감염된 닭과 백신 접종된 닭 간에 혈청학적으로 쉽게 구분할 수 있는 DIVA가능 백신주로 향후 방역활동에 이점이 있어야함.
- H9 및 H5 바이러스 변이주들도 효과적으로 방어할 수 있도록 HA2 common epitope의 면역원성을 개선시킨 H9 또는 H5 유전자를 고면역원성 뉴캐슬병 바이러스(VIIId) 백터에 삽입하여 역유전학 기법으로 작출한 뉴캐슬병 및 조류인플루엔자 예방용 생독백신(ND-H9N2, ND-H5N1, ND-H5N8)
- 기존의 01310 백신주 대비 계태아 병원성 낮고, 생산성 높으며, HA2 common epitope의 면역원성을 증대시키는 유전자 변이를 가지며 유행하는 바이러스와 internal genes의 T/B cell epitopes을 일치시켜 변이주 예방에 효과적인 H5 및 H9 조류 인플루엔자 사독백신
- 뉴캐슬병바이러스 백터 생독백신과 사독백신의 용법·용량 최적화한 H9 및 H5 조류 인플루엔자 백신 프로그램

### ○ 핵심기술

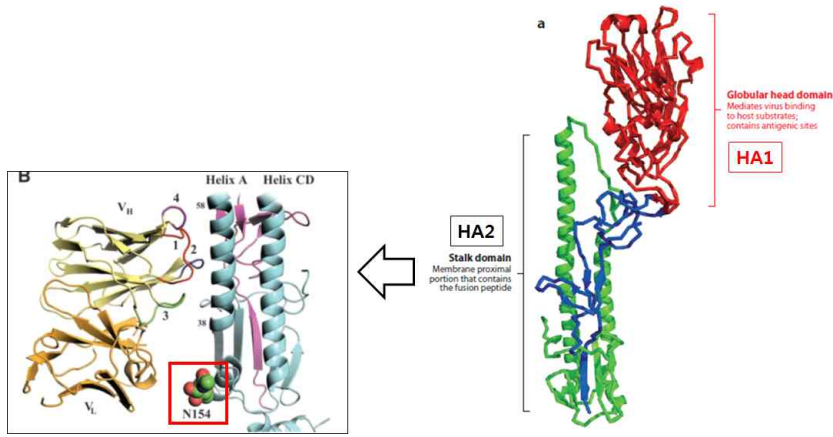
- **뉴캐슬병 바이러스 백터 및 백신 개발 기술** : 본 연구과제의 주관연구기관인 (주)바이오포아는 역유전학을 이용한 뉴캐슬병 백신을 개발하여 전 세계 7개국 이상에 특허를 등록하였고 고려비엔피와 함께 세계 최초로 역유전학을 이용한 NDV백신을 산업화하였으나, 본 연구과제에서는 기존 NDV백터가 아닌 내열성이 강화되고, 모체이행항체를 극복가능한 새로운 ND백터를 이용하여 조류 인플루엔자를 예방하고자하였음.



## 바이오포아 특허기술

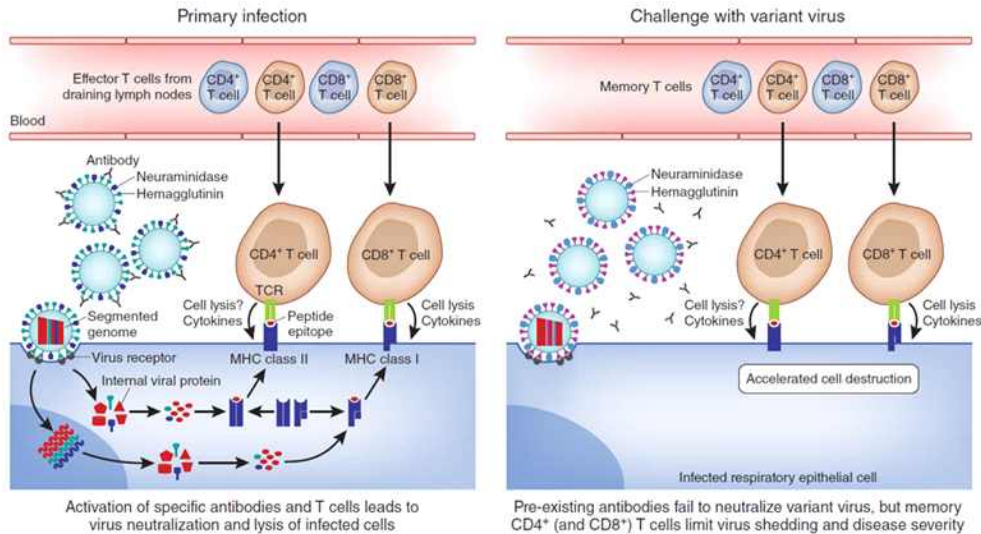
(약독화된 재조합 뉴캐슬병 바이러스 및 이를 함유하는 뉴캐슬병 백신 **US 8,173,136; US8,029,801** 대한민국/미국/일본/중국/인도네시아/말레이시아/태국)

- HA2 common epitope 면역원성 향상 기술 : HA2 154N-glycan 제거 및 증식성 유지를 위한 아미노산 서열/NA stalk deglycosylation & balancing 기술



- 계태아 증식성 향상 기술 : 기존 01310 백신주 PB2 단백질의 계태아 증식성 관련 아미노산 서열을 치환하거나 0028 PB2로 교체하는 기술
- 계태아 병원성 저감 기술 : 기존 01310 백신주 NS genome segment를 병원성이 낮은 0028 NS genome segment로 교체하는 기술
- 계태아 고생산성 기술 : 계태아 증식성 향상 기술과 병원성 저감 기술을 조합하거나 최적화한 기술  
[생산성(EID<sub>50</sub>) = 요막액 수확량(ml) x 바이러스 역가(EID<sub>50</sub>)]
- 유니버설 백신 제작 기술 : 뉴클레오캡시드(NP), polymerases(PB2/PB1/PA), NS1/NEP, M1/M2에 존재하는 T/B cell epitopes 일치를 위해 문제가 되는 바이러스와 동일하거나 유사한 internal genes을 사용하고, HA2 common epitope의 면역원성을 향상기술을 접목하여 heterosubtypic protection이 가능하도록 하는 기술





- **포유류 무병원성 기술** : 백신주 생산과정에서 biosafety/biosecurity 향상을 위해 H9 및 H5 사독백신 생산용 백신주의 PB2 및 NS1 유전자의 아미노산 서열을 포유류 병원성이 없도록 치환하는 기술
- **계태아 저병원성/고생산성/유니버설 조류 인플루엔자 사독백신 제작 기술** : 상기 요소기술의 최적 조합 기술
- **백신 프로그램 최적화 기술** : 생독백신과 사독백신의 최적 병용 기술

### 1-3. 연구개발의 필요성

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

국내 배경:

- 국내 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI)는 1차 (2003년 12월-2004년 3월), 2차 (2006년 11월-2007년 3월), 3차 (2008년 4월-5월), 4차 (2010년 12월-2011년 5월), 5차 (2014년 1월-현재)까지 총 다섯 차례 발생하여 막대한 경제피해를 초래하였다. 4차 고병원성 조류 인플루엔자의 경우 살처분 보상금 669억원, 생계 안정자금 18억원, 경영 안정자금 1,221억원, 수매 도태자금 733억원을 포함한 직접 피해액은 2,641억원 수준임. 가공유통업체, 외식업체, 소매업체 등을 포함하는 경우 총 피해규모 6,324 억원에 이르는 것으로 보고 (한국농촌경제연구원) 되어 막대한 경제피해를 초래하고 있다.
- 특히 5차 발생의 경우 겨울 철새 도래 이전에 재발한 후 현재까지 발생하고 있어 엔데믹에 대한 우려가 커지고 있다. 구제역 사례처럼 차단 방역에 실패하고 백신에 대한 준비도 이루어지지 않아 도입 시점을 놓치는 경우 산업기반 붕괴는 물론 국민 안전을 위협할 수 있는 상황이다.
- 기술현황
- 국내 H9N2 백신은 농림축산검역본부 조류질병과 조류인플루엔자연구실에서 닭의 발육란에 계대배양하여 확립한 고증식성주(01310)가 사독오일백신으로 널리 사용되고 있으나 접종한 계태아의 3일내 폐사율(40-50%)이 비교적 높아 보다 병원성이 낮은 백신주가 필요하며 최근 생조류 시장이나 토종닭에서 분리되는 H9N2 바이러스에 대한 효능이 충분하지 않은 것으로 평가되고 있음.
- 역유전학 기술을 이용한 국내 조류인플루엔자 백신주 개발 연구는 Hoffmann 벡터를 사용하여 이루어졌는데 농림축산검역본부 조류질병과 조류인플루엔자연구실 등에서는 01310 바이러스 및 고병원성 H5

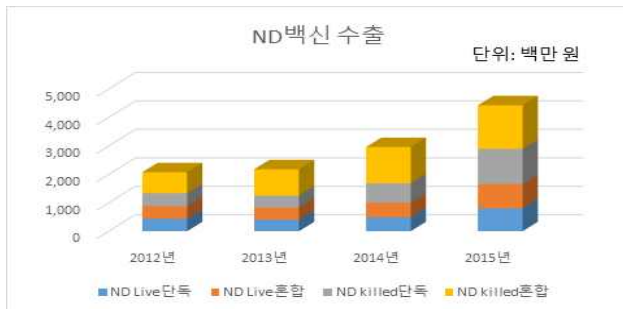
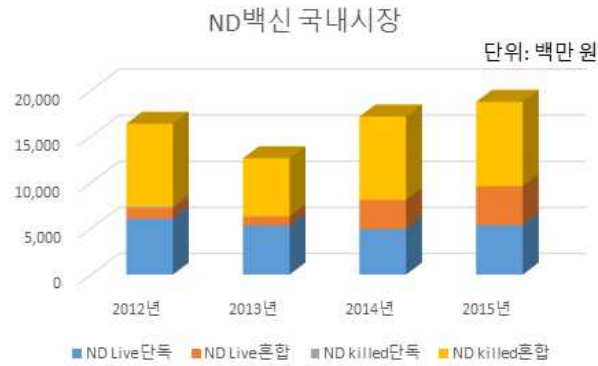
바이러스들의 HA와 NA를 가지면서 나머지 internal genes은 PR8 유래인 바이러스를 제작하여 백신 효능을 평가하였고, 유사한 기술을 사용하여 국내 야외에서 분리된 조류 인플루엔자 바이러스의 HA와 NA를 사용하여 H9N2 및 H5N1 백신주가 건국대학교 송창선 교수, 충남대학교 서상희 교수, 충북대학교 최영기 교수, 고려대학교 박만성 교수에 의해 개발되었음.

- 조류 인플루엔자 바이러스 HA의 N-glycan의 바이러스 증식 및 항원성에 대한 연구가 고려대학교 박만성 교수에 의해 수행된 바 있음.
- 포유류 무병원성 기술 : 본 연구팀은 PR8 바이러스의 internal genes을 갖는 재조합 조류인플루엔자 바이러스가 BALB/c 마우스에 대한 병원성을 보유하고 있다는 사실을 밝혔고, 발육란 증식성이 우수하더라도 포유류 병원성이 전혀 없는 개선된 벡터시스템을 개발함.
- 국내 유니버설 백신 연구 : 농림축산검역본부는 사람, 돼지, 조류 인플루엔자 바이러스 유래 M2e 반복 펩티드를 베골로 바이러스 벡터로 발현하여 VLP(virus like particle)를 제작하여 유니버설 백신 가능성을 보고하였고, 이화여자대학교의 장준 교수와 국제백신연구소의 응규엔 박사는 아데노바이러스 벡터에 M2e 및 HA 유전자를 발현하여 유니버설 백신 효능을 확인한 바 있음. 본 연구팀은 HA2 comon epitope의 면역원성을 향상시켜 유니버설 백신에 활용하기 위한 연구를 수행하였고, 야외주와의 internal genes을 일치시키는 경우 heterosubtypic protection이 가능함을 확인함.
- 국내 조류인플루엔자 생독백신 연구 : 연세대학교 성백린 교수는 신종플루 바이러스의 HA와 NA를 갖는 저온적응 인플루엔자 바이러스를 제작하여 생독백신주로 사용가능함을 보고하였고, 본 연구팀은 저병원성, 고증식성 H5N1 바이러스의 HA와 NA를 가지면서 PR8의 internal genes 중 NS 유전자를포유류 병원성이 없는 0028 NS로 교체하여 포유류 무병원성, 고면역원성 생독백신주를 개발하여 보고한 바 있음.
- 백신 프로그램 최적화 기술 : 국내 생독백신 부재로 생독/사독백신 병용 백신프로그램 최적화 연구는 전무한 상황임.

○ 시장현황

- 뉴캐슬병 백신시장은 생독백신 뿐 아니라 사독 백신시장도 비슷한 규모가 형성되어 있으며, 가금의 가장 기본적인 백신이므로 단일 백신 뿐 아니라 혼합백신에도 기본적으로 사용되고 있어 2015년의 경우 국내 양계 백신 시장 424억 원 중 187억 원(전체의 약 44%)이 ND관련 제품이며 이 중에서 72%에 해당하는 134억 원이 혼합백신이었음. 수출의 경우도 국내 양계 백신 전체 수출 규모 62억 원 중에서 NDV백신이 포함된 제품이 44억 원으로 수출액의 71%는 ND관련 백신이었음.

	국내시장	수출
양계백신 전체	424억 원	62억 원
ND백신 단일&혼합	187억 원(44%)	44억 원(71%)



과거 국내 뉴캐슬병 백신 시장의 90% 이상이 해외 다국적 기업제품이었으나, 세계 최초로 역유전자학 기술이 적용되어 산업화된 뉴캐슬병 백신 제품(제품명 N+)이 2010년 (주)바이오포아에서 고려비엔피(KBNP)로 기술 이전된 이후, 최근에는 상당부분(30% 이상) 수입대체가 이루어지고 있음.

표. 국내 뉴캐슬병 생백신 시장점유율 추세.

국내(2010년 : 단위 억원)		국내(2014년)	
기업명	매출(국내점유율, %)	기업명	매출(국내점유율, %)
메리알코리아 (외국기업)	45억 (74.1%)	-	-
삼지약품 (수입)	8.3억 (13.6%)	-	-
코미팜	1.9억 (3.1%)	-	-
중앙백신연구소(대전)	1.7억 (2.7%)	-	-
인터베트코리아 (외국기업)	1.5억 (2.5%)	-	-
고려비엔피(충남)	1억 (1.8%)	고려비엔피(N+)	30억 (37.9%)
합계	69억원	79억원	

- H9N2 백신 시장은 2015년 현재 국내에서는 사독 백신만 연간 약 50억 원 정도 판매되고 있으며 이 중 93%가 혼합백신으로 사용되고 있음. 그러나 수출의 경우 연간 2~3억 원에 그치고 있어 현재까지는 수출이 미미한 상황임.

AIV 내수용 백신 시장규모	사독 단일	사독 혼합	(단위: 백만 원) 합계
2012	696	4,241	4,937
2013	414	4,439	4,853
2014	289	4,723	5,012
2015	336	4,589	4,925

AIV 수출용 백신 시장규모	사독 단일	사독 혼합	(단위: 백만 원) 합계
2012	46	116	162
2013	72	195	267
2014	26	343	369
2015	17	263	280

○ 경쟁기관현황

- 동물백신업체: 고려비엔피, 녹십자수의약품, 대성미생물연구소, 중앙백신연구소, 코미팜 등은 대학연구실과 백신주 기술이전을 통해 제품화 기술 개발에 치중하고 있음.
- 정부 및 대학연구 기관: 농림축산검역본부, 건국대학교, 충남대학교, 충북대학교, 고려대학교, 연세대학교, 이화여자대학교, 국제백신연구소, 한국파스퇴르연구소는 역유전학 기술을 이용한 백신주 개발 진행 중.

○ 지식재산권현황

- 국내 조류인플루엔자 백신관련 특허는 기존의 PR8 바이러스나 저온적응주의 internal genes과 최근 유행하는 조류 인플루엔자 바이러스의 HA와 NA 유전자를 조합하여 제작한 백신주에 대한 것과 common epitope이 있는 HA2 부분을 대장균 발현한 재조합 단백질 및 유니버설 백신으로의 용도에 관한 것 그리고, 베클로바이러스 벡터를 이용하여 조류인플루엔자 바이러스 항원을 발현시켜 제작한 VLP에 대한 것들임.
- 조류인플루엔자 백신 제작을 위한 발현벡터나 역유전학용 벡터에 대한 원천기술은 모두 국외 연구기관이 소유하고 있는 실정으로 응용기술, 용도, 구성에 대한 특허가 대부분을 차지하고 있음.
- 국내 조류인플루엔자 백신 관련 등록특허는 2010년 58건에서 2013년 160건, 2014년 165건, 2015년 129건으로 증가추세에 있음.
- 조류인플루엔자 백신 관련 특허 등록기관(출원인)으로는 서울대학교 산학협력단 6건 생명공학연구원 5건, 농림축산검역본부 5건, 건국대학교 3건, 충남대학교 1건, 연세대학교 1건으로 집계됨(특허정보넷 등록특허 '인플루엔자 백신' 검색 후 출원인 분류하여 유효 특허 조사).

○ 표준화현황

- H9N2 사독백신 평가 방법 표준화 : 농림축산검역본부는 H9N2 사독백신 효능 평가를 위한 동물실험법을 확립하여 상용백신 평가에 활용하고 있음.

○ 기타

- ABSL3 연구시설 : 국내 고병원성 조류인플루엔자 공격실험이 가능한 기관은 농림축산검역본부, 경기도 축산위생연구소, 건국대학교 수의과대학이며 전북대학교 수의과대학은 시설 허가를 받았고, 서울대학교 수의과대학은 허가신청 준비 중임.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

국외 배경:

- 1997년부터 2014년 5월까지 63개국의 가금 및 야생조류에서 7,526건 이상의 HPAI 발생 사례가 보고되었으며 H5N1 HPAI 연중 발생(endemic) 국가로는 베트남, 방글라데시, 인도네시아, 인도, 이집트, 중국이 있다 (OIE). 이들 국가 중 베트남, 인도네시아, 중국, 이집트에서는 백신접종 정책을 채택하였고, 멕시코에서는 저병원성 및 고병원성 H5N2 예방을 위해 백신정책을 채택하였다 (OIE).
- 중국의 경우 2004년 3km 살처분 구역 바깥 5km 지역에 처음으로 백신을 허가한 이후로 2005년부터 무상으로 백신을 공급하고 있으며, 유행하는 바이러스와 일치하는 항원성을 갖는 백신을 지속적으로 개발하여 보급하고 있다. 2008년에는 150억회 접종 분량이 넘는 백신이 사용되었다 (FAO, 2011).

- 백신을 채택한 국가에서 백신접종 전후의 H5 HPAI 발생율과 백신 접종군 분리주의 유전자 변이 연구를 통해 백신 후 HPAI 발생 및 바이러스 load 감소 등 긍정적인 결과들이 보고되고 있으나, 변이주 발생 위험성이 증가하고 있는 것으로 보고되어 유행 바이러스에 대한 지속적인 모니터링과 현재 유행하는 바이러스를 이용한 백신 접종을 주문하고 있다.

○ 기술현황

- 중국은 PR8 바이러스의 6개 내부 유전자(internal gene: PB2, PB1, PA, NP, M, NS)와 유행하는 바이러스로부터 약독화시킨 HA (cleavage site의 RRRKKR-을 RETR-로 치환하여 약독화한 HA)와 NA 유전자를 갖는 재조합 바이러스를 역 유전학(reverse genetics) 기술로 제작하여 사독백신을 사용하고 있다.

- HA5와 NA1 공여 바이러스들의 발육란 증식성이 낮았으나, 재조합 바이러스들의 증식성은 상당히 개선된 것으로 알려져 있다. 이들 사독백신을 접종하는 경우 오랜 기간 혈구응집억제 항체가 지속되며 오리나 거위에 대한 효과도 좋은 것으로 알려져 있다.

- 생독백신으로는 재조합 계두 벡터 백신과 뉴캐슬병 바이러스 벡터 백신이 개발되었으나 상기의 PR8 재조합 바이러스를 이용한 사독백신들이 지속적으로 많이 사용되고 있다.

- 전 세계적으로 유니버설 백신 개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 저온적응 생독백신주의 heterosubtypic protection 효능이 보고되었고, 이는 내부 단백질에 의해 유도된 세포성면역 때문인 것으로 알려져 있음(Powell *et al.*, 2007).

- 현재 유니버설 백신의 주요 표적은 HA 단백질의 stalk(HA2) 부분과 M2e 부분이며 대장균에서 발현시킨 재조합 단백질을 사용하거나 펩티드 반복구조를 베쿨로 바이러스 벡터로 발현하여 virus like particles(VLP)을 사용하여 백신을 개발하고 있음. 또한 이들을 아데노바이러스 벡터에 넣어 만들어진 아데노바이러스를 백신으로 사용하여 유니버설 백신 효과를 보고 하고 있음.

- 최근 가장 조명을 받고 있는 기술은 chimeric HA 제작기술로 HA의 stalk 부분은 사람에서 유행하는 바이러스 유래(H1, H3 or B type)이면서 head 부분은 사람에서 유행하지 않는 바이러스(H5) 유래인 것을 사용하여 stalk에 대한 항체형성을 증가시키는 기술임(Krammer *et al.*, 2013).

- 현재 유니버설 백신후보주들의 개발 현황은 다음과 같음(WHO, 2014).

<b>Organization Identifier</b>	<b>Approach, Target, Adjuvant</b>	<b>Pre clinical</b>	<b>Phase 1</b>	<b>Phase 2</b>	<b>POC</b>	<b>Phase 3</b>
<b>Novartis (USA)</b>	Use of MF-59 adjuvant to achieve broadly cross-reactive antibody response.					X (and Phase 4)
	Rational antigen design (HA) based on preferential presentation of conserved epitopes for antibody response.	X				
<b>VaxInnate (USA)</b>	Fusion protein between influenza M2e and bacterial flagellin (TLR5 ligand). Self-adjuvanted. Proposed to be used with conventional TIV.			X		
<b>Medicago (Canada)</b>	Recombinant HA expressed as virus-like particle in tobacco plants. Requires adjuvant.			X		
<b>Immune Targeting Systems (UK)</b>	Six long peptides from four core influenza proteins conjugated to fluorocarbon chain, elicits strong T cell response, proposed to be used with conventional TIV.			X		
<b>BiondVax Pharmaceuticals (Israel)</b>	Proposed as "universal primer" to be followed by conventional TIV boost to potentiate HAI responses. Consists of a mixture of peptides comprising nine B and T cell conserved linear epitopes derived from three influenza proteins HA, M1, and NP.			X		
<b>SEEK (formerly PepTcell, U.K.)</b>	Mixture of 4 chemically synthesized peptides targeting conserved T cell epitopes present in M1, NPA, NPB and M2. Proposed to be used with oil-in-water adjuvant			X		
<b>Flanders Institute (Belgium)</b>	Fusion between M2e and hepatitis B virus core protein for virus-like particle expression and antibody-directed response.		X			
<b>Inovio (USA)</b>	DNA plasmids encoding consensus sequences of HA, NA, and NP delivered by intradermal electroporation for eliciting antibody and T cell responses.		X			
<b>Dynavax (USA)</b>	Fusion protein comprised of two highly conserved influenza antigens, NP, and M2e,		X			

Organization Identifier	Approach, Target, Adjuvant	Pre clinical	Phase 1	Phase 2	POC	Phase 3
	covalently linked to proprietary immunostimulatory sequence. Envisioned to be used with conventional TIV.					
<b>Antigen Express (USA)</b>	Synthetic peptides derived from conserved B cell epitopes from HA modified with MHC Class 2 for facilitated T <sub>H</sub> activity. Envisioned to be combined with traditional seasonal vaccine for improved response.		X			
<b>National Institute of Allergy and Infectious Diseases (USA)</b>	Adenovirus encoding HA to prime followed by inactivated vaccine (TIV) boost.		X			
	Fusion protein between self-assembling ferritin protein and HA for nanoparticle presentation of HA.	X				
<b>Jenner Institute, University of Oxford (UK)</b>	Replication-deficient modified vaccinia Ankara (MVA) virus expressing both NP and M1. Designed for strong cross-reactive T cell response. Self-adjuvanted.		X			
	Replication-deficient simian adenovirus expressing both NP and M1. Designed for strong cross-reactive T cell response.		X			
	MVA expressing NP, M1 and conserved portion of HA.	X				
<b>Wistar Institute (USA)</b>	Fusion protein between M2e and NP, expressed in chimpanzee adenovirus vector.	X				
<b>Gamma Vaccines (Australia)</b>	Whole virion gamma-irradiated virus for intranasal application. Elicits B and T cell responses which are cross-protective. Self-adjuvanted.	X				
<b>Florida Vaccine and Gene Therapy Institute (USA)</b>	Computer optimized consensus HA sequence. Elicits broad antibody response. Alum adjuvanted.	X				
<b>FluGen (USA)</b>	Single-replication influenza virus which is not attenuated but unable to shed and designed to elicit humoral, mucosal, and cell mediated immunity.	X				
<b>University of Maryland, College Park (USA)</b>	Rearranged genome of influenza virus permitting expression of two HA on the same virus, while also attenuating it.	X				
<b>Icahn School of Medicine at Mount Sinai (USA)</b>	Various approaches to target conserved broadly reactive epitopes on HA stalk, such as “headless” HA or functional chimeric HA (comprised of non-matched “head” and “stalk”) expressed either in the context of whole virus or as a rHA. Use of recombinant cHA protein requires adjuvant.	X				
<b>CureVac (Germany)</b>	Synthetic mRNA encoding HA and NP. Temperature-stable product, elicits both B and T cell response, self-adjuvanted.	X				
<b>University of</b>	Adenovirus expressing broadly-neutralizing	X				

Organization Identifier	Approach, Target, Adjuvant	Pre clinical	Phase 1	Phase 2	POC	Phase 3
Pennsylvania (USA)	monoclonal antibody against HA delivered by intranasal administration.					
Sanofi Pasteur (USA)	Multiple, including support for Flanders Institute and the Vaccine and Gene Therapy Institute. Internal work attempts to develop sequence-optimized HA.	X				
Georgia State University (USA)	M2e expressed in a virus-like particle (VLP).	X				
Merck (USA)	M2e-based vaccine comprised of peptide fusion to KLH carrier protein.	X				
Bionor (Norway)	Peptide-based approach targeting conserved epitopes.	X				
VBI (formerly Variation Biotechnologies)	Unique technology using a mixture of 8 to 32 peptides which represent hypervariable epitopes of HA to elicit polyclonal immune response	X				
University of Wisconsin (USA)	“Headless” HA expressed together with NA and M1 in Drosophila S2 cell line for induction of anti-stalk antibodies	X				

- 뉴캐슬병 바이러스 벡터 및 백신 개발 기술 :

지금까지 여러 다양한 viral vector system을 사용하여 인플루엔자 표면 단백질(대부분 HA)을 발현하는 연구가 진행되고 있는데 주로 NDV, FPV, HVT, ILT, adenovirus 및 baculovirus 등의 viral vector system을 사용하여 이루어지고 있음.

1. NDV vector system을 이용한 AIV 표면 단백질 발현

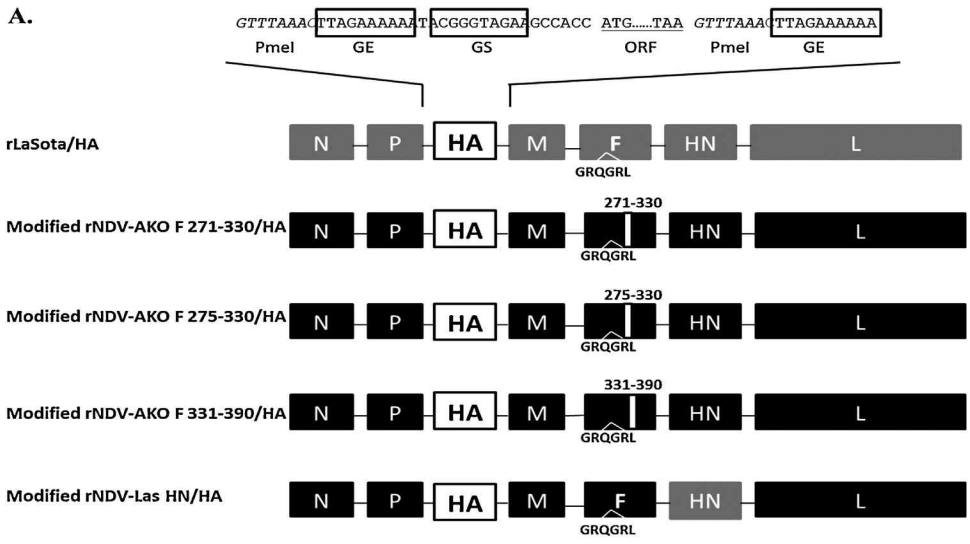
1) Modified Newcastle disease virus vectors expressing the H5hemagglutinin induce enhanced protection against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in chickens.

(Vaccine 32 (2014) 4428-4435)

병원성이 강한 NDV Beaudette C(BC) strain의

- ① F cleavage site를 Lasota 것으로 치환하여 약독화 하고(rBC/LasFc)
- ② F gene amino acid 서열 중 증식성 관련 특정부분을 AKO strain의 것으로 치환하여 증식성을 높인 NDV 발현벡터에(rBC/LasFc 271-330, rBC/LasFc 275-330, rBC/LasFc 331-390)
- ③ 고병원성 H5N1 HPAIV A/Vietnam/1203 /04의 HA gene의 polybasic cleavage site(PQRERRRKKG)를 저병원성 AIV A/chicken/Mexico/31381/94의 cleavage site(PQRETG)로 치환 후
- ④ rNDV vector의 P와 M gene 사이에 삽입(rLasota/HA, rNDV-AKO F271-330/HA, rNDV-AKO F275-330/HA, rNDV AKO F331-390/HA, rNDV-Las HN/HA)한 형태의 재조합바이러스를 작출.





재조합바이러스 증식성 검사결과 약독화 rBC/LasFc는 rBC에 비해 증식율이 떨어지나 AKO strain의 F gene amino acid로 치환한 경우 증식율이 증가하였고 이 중 rBC/LasFc 275-330의 증식율이 가장 높았음. HA 단백질 발현을 비교 시 rNDV-Las HN/HA에서 가장 높았고 그 다음으로 rNDV-AKO F271-330/HA에서 높았음(rNDV-Las HN/HA > rNDV-AKO F 271-330/HA > rNDV-AKO F 275-330/HA > rBC-AKO F331-390/HA > LaSota/HA > rLaSota 순)

공격에 대한 방어효능 실험에서 (rNDV-Las HN/HA, rNDV-AKO F 271-330/HA, LaSota/HA 비교) rNDV-AKO F271-330/HA 접종군 만이 공격 virus의 oral, cloacal shedding이 완벽하게 일어나지 않음을 확인

2) Coexpression of Avian Influenza Virus H5 and N1 by Recombinant Newcastle Disease Virus and the Impact on Immune Response in Chickens.

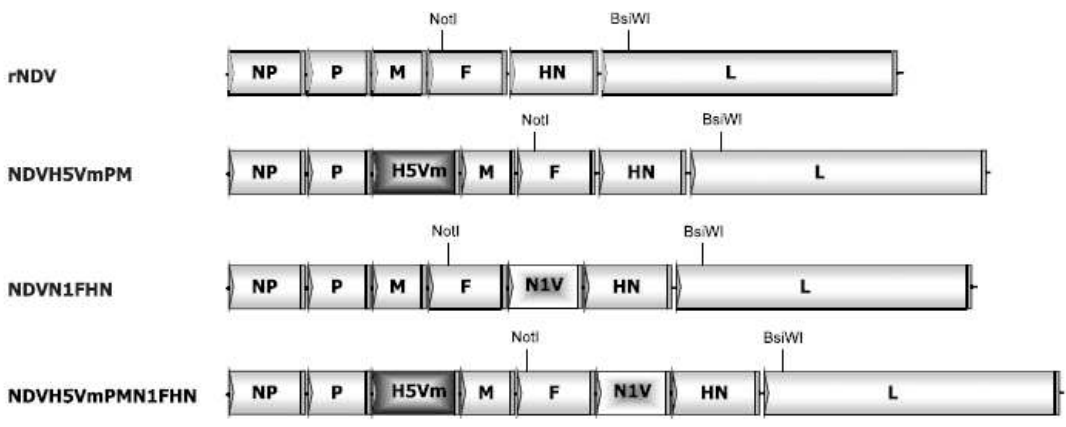
(AVIAN DISEASES 55:413-421, 2011)

NDV clone30 backbone으로 HPAIV HA(strain A/chicken/Vietnam/P41/05 (H5N1)) 또는 NA(A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)) 및 HA와 NA 단백질을 동시 발현함.

NDVH5VmPMN1FHN : NP-P-**HA**-M-F-**NA**-HN-L

NDVH5VmPM : NP-P-**HA**-M-F-HN-L

NDVN1FHN : NP-P-M-F-**NA**-HN-L



재조합바이러스 증식성 검사결과 parental virus(rNDA)와 유사함을 확인( $10^{8.0}$ - $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml). 면역

후 HPAIV 공격에 대한 효력시험에서 N1만을 발현한 재조합바이러스 면역군은 HPAIV H5N1 공격 시 대조군에 비해 1-2일 지연 후 모두 폐사함. H5발현 및 H5 및 N1 동시 발현 재조합바이러스 면역군의 경우 homologous challenge(H5N1) 실험에서 H5 면역군 중 1수가 신경증상을 보였으나 그 외의 모든 닭은 건강하게 유지되었고(대조군 모두 폐사) heterologous challenge(H5N2) 실험에서는 모든 면역군이 건강하게 유지되어 (대조군 모두 폐사) 방어효능을 입증함.

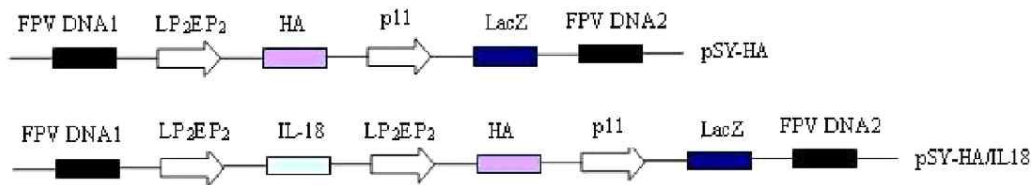
## 2. FPV vector system을 이용한 aiv 표면 단백질 발현

다양한 Fox virus strains를 사용한 면역항원 발현실험이 진행되었고 제품화 되어 있음.

TROVAC™-AIV-H5(MerialSelectInc는 Fowl Pox viral vector system을 이용하여 AIV H5 단백질을 발현한 제품이고, PROTEQ-FLU™는 ALVAC STRAIN에 influenza H3N8항원을 발현한 제품임(목적 동물 Foals)

Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine coexpressing HA of H9N2 avian influenza virus and chicken IL-18. (Antiviral Res, 91(1), 50-56.)

H9N2의 HA 및 HA와 ChIL-18 단백질을 동시에 발현하는 재조합 fowlpox virus를 추출함 (rFPV-HA, rFPV-HA/IL18).



1일령 SPF 병아리 면역 후 H9N2 virus로 공격 시 내부장기 및 swab sample 확인 시 바이러스 배출이 없음.

H5, H7 및 ChIL-18 유전자 발현 rFPV 접종에 의해 상당히 높은 수준의 체액성, 세포성 면역반응이 유도되었고, SPF 에서 H9N2 공격에 대한 방어능 보임(면역 43일 후 10<sup>6.5</sup>EID<sub>50</sub>viruschallenge).특히, rFPV-HA/IL18 면역군에서는 virus shedding이 전혀 일어나지 않았고 유의적인 체중증가를 가져옴.

### ○ 시장현황

#### - 뉴캐슬병 바이러스 벡터 및 백신 개발 기술 :

미국의 경우 농장에서 HPAI H5N1을 방제하기 위해 사독백신으로는 Avian influenza Vaccine(H5)(Lohmann Aminal Health International), Gallimune Flu H5N9(Merial Italia)가, 생독백신으로는 Vectormune® HVT-AIV(Ceva Sante Animale, Turkey herpesvirus(HVT) vector system을 이용하여 AIV H5 단백질을 발현) 및 TROVAC™-AIV-H5(MerialSelectInc.Fowl Pox viral vector system을 이용하여 AIV H5 단백질을 발현)가 사용되고 있음.

**Reverse genetics H5 vaccine 현황**

Laboratory	Strain	Subtype	Vaccine category	Commercial name
Monovalent Reverse genetics H5 vaccines				
Fort Dodge Animal Health, Overland Park, USA	rg-A/ck/VN/C58/04 with N3 gene from /Duck/Germany/1215/73(H2N3) and six internal genes from PR8 vaccine strain	H5N3 RG	Reverse genetic, oil adjuvant	Pouvac Flu Fend H5N3 RG
Harbin Veterinary Research Institute, Harbin, Heilongjiang province, China	A/Goose/Guangdong/1996 (Re-1), BHG/QH/05 (Re-3); DK/AH/06 (Re-5) or CK	H5N1 RG	Reverse genetic, oil adjuvant	
Qingdao Yebio Bioengineering Co. Ltd Qingdao City, Shandong province, China	A/Goose/Guangdong/1996(Re-1), BHG/QH/05 (Re-3); DK/AH/06 (Re-5) or CK/SX/06 (Re-4)and PR8 backbone	H5N1 RG	Reverse genetic, oil adjuvant	
Zhengzhou Bio-pharm Co. Ltd Zhengzhou City, Shandong province, China	reverse genetic virus from A/Goose/Guangdong/1996 (re-1), BHG/QH/05 (Re-3); DK/AH/06(Re-5 ) or CK/SX/06 (Re-4)and a PR8 vaccine strain backbone	H5N1 RG	Reverse genetic, oil adjuvant	
Nanjing Merial Animal Products Co., Ltd Nanjing City, Jiangsu province, China	A/Goose/Guangdong/1996 and PR8 backbone	H5N1, RG	Reverse genetic, oil adjuvant	
IBP-Shigeta, Bogor, Indonesia	PT IPB Shigeta Animal Pharmaceuticals	Reverse genetic virus from A/Ck/Legok/2003	Reverse genetic, oil adjuvant	Bird Close 5.1

**Recombinant vaccines with H5 component**

Harbin Veterinary Research Institute, Harbin, Heilongjiang province, China	Avian pox virus with a cDNA insert of the H5 and N1 gene from A/Goose/Guangdong/1996	H5 derived from H5N1 HP	Live recombinant, freeze dried	
Harbin Veterinary Research Institute, Harbin, Heilongjiang province, China	Live Newcastle disease virus (LaSota) and H5 A/Barheaded goose/Qinghai/3/2005	H5N1 HP	Live recombinant NDV vectored H5, freeze dried	
Merial Select (US)	Fowlpox virus with cDNA insert of H5 gene from A/Turkey/Ireland/83	H5 derived from H5N8 LP	Live recombinant, freeze dried, subcutaneous administration	Trovac AIV-H5 produced in US, Atlanta

출처: FAO비상예방시스템(2009)

○ 지식재산권현황

- 특허명 : 뉴캐슬질화 바이러스-백터를 이용한 조류 백신

출원번호 10-2011-7026051, 출원인 :메리얼 인 코포레이티드

Avinew virus의 특정위치(P와 M, M과 F 사이)에 조류인플루엔자 H5N1의 항원(clade 2.1 또는 2.2) 및 H9N2의 HA항원을 도입하여 발현 후 바이러스 역가 및 방어효능 비교. 최적의 방어율은 제조합항원-불활화항원의 prime-boosting 전략에 의해 획득됨을 확인함.

○ 뉴캐슬병바이러스 백터를 이용한 인플루엔자백신 개발의 중요성

NDV 백터는 비교적 적은 수의 단백질을 코딩하기 때문에 많은 종류의 단백질을 코딩하는 다른 viral vectors와 달리 이중항원 발현 시 백터 내 단백질과 이 종항원 발현의 경쟁이 상대적으로 낮고, 계태아에서 고역가로 증식할 수 있는 장점이 있어 다양한 항원의 발현에 사용되고 있음.

본 과제에 사용하는 NDV 백터는 최근 유행하는 7형 뉴캐슬병 바이러스 백터로 계태아 및 목적동물에 대한 병원성이 없어 In-Ovo에 의한 부화 전 자동화 백신접종법 적용이 가능할 뿐 아니라 1일령 병아리 분무백신도 가능한 사독백신 접종 전 프라이밍 제품으로 적합함. 또한 H5N1 항원발현 뉴캐슬병 바이러스 백신은 현재 사용되고 있는 H9N2 사독백신의 고병원성 조류인플루엔자 H5N1형에 대한 방어 한계를 극복할 수 있는 제품으로 비상용 H5N8/H5N1 백신으로 적합함.

○ 국내 저병원성 조류인플루엔자(LPAI) 발생 현황

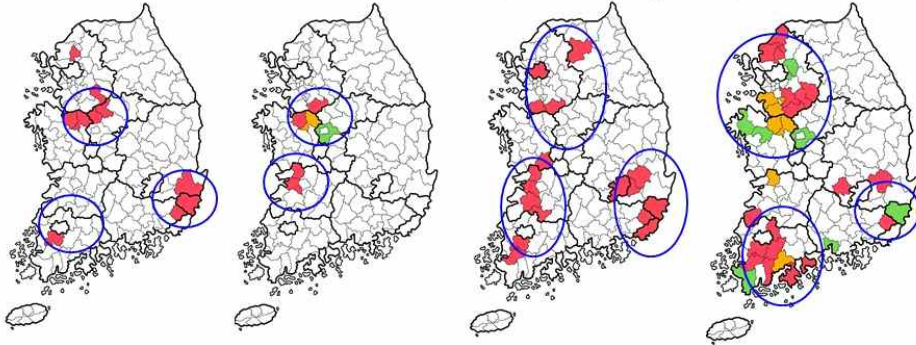
- H9N2 LPAIV에 의해 발생한 국내 LPAI는 1996년 최초로 발생하였으나 대대적인 방역조치로 근절되었으나 1999년 재발한 후 엔데믹으로 지속적인 문제를 일으키고 있으며 현재 농림축산검역본부 조류질병과 조류인플루엔자연구실에서 개발한 01310 백신주가 사독백신으로 사용되고 있으나 토종닭이나 생조류 시장에서 분리되는 최근 야외주들에 대한 방어효능이 떨어지는 것으로 알려져 있음. 따라서, 보다

효과적인 백신 개발이 필요한 상황임.

○ 국내 고병원성 조류인플루엔자(HPAI) 발생 현황

- 국내 HPAI는 1차 (2003년 12월-2004년 3월), 2차 (2006년 11월-2007년 3월), 3차 (2008년 4월-5월), 4차 (2010년 12월-2011년 5월), 5차 (2014년 1월-2015년 4월)까지 총 다섯 차례 발생하여 막대한 경제피해를 초래함. 1차발생부터 4차까지는 H5N1, 5차발생은 H5N8 바이러스가 원인임.

● 2003/04 (1차)    ● 2006/07 (2차)    ● 2008 (3차)    ● 2010/11 (4차)



- 19 농장 - 530만수 - \$8,700만
- 7 농장 - 280만수 - \$3,400만
- 33 농장 - 1,020만수 - \$1억8,200만
- 53 농장 - 650만수 - \$8,100만

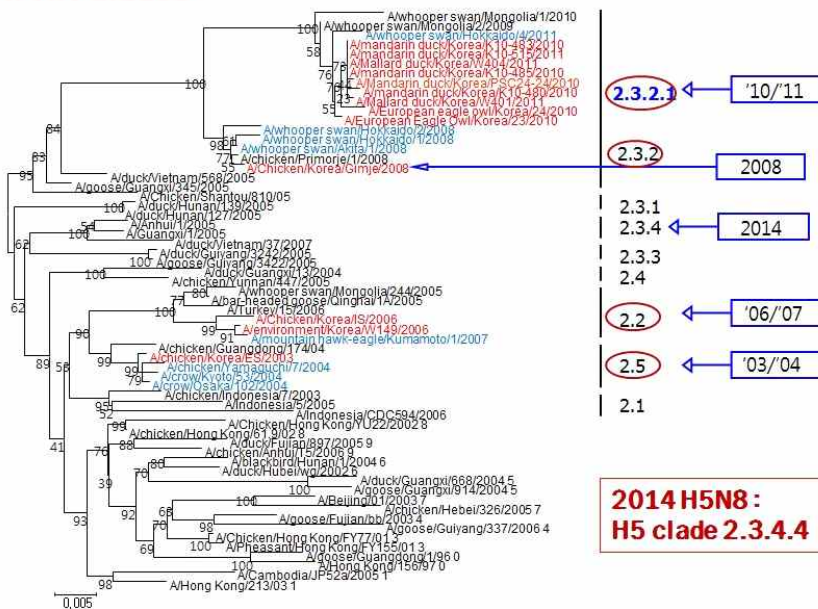
(자료 출처: 이윤정 박사, 검역본부, 2012)

● 2014-2015 (5차): H5N8

- 1,300만수 이상
- 2014. 1. 16-2015. 4. 17: 205개 오리농장과 62개 닭농장에서 발생(KAHIS)

- 국내 HPAIV는 계통분류학적으로 다른 clade에 속하며 서로 다른 clade 간의 교차방어율이 높지 않은 것으로 알려져 충분한 백신효능을 얻기 위해서는 clade를 맞추는 것이 유리함. 동북아시아에서 가장 만연한 clade는 2.3.2.(1)이며 5차발생의 원인인 H5N8 바이러스는 clade 2.3.4.4로 분류됨.

**국내 HPAIV clades**

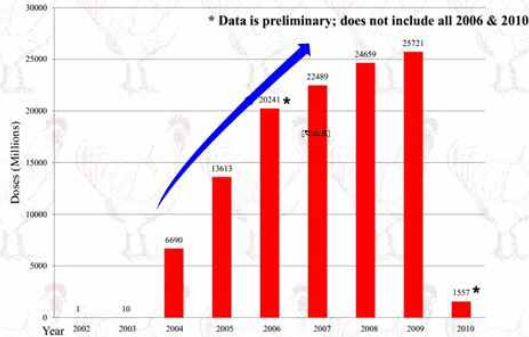


- HPAI 발생국에서는 백신접종이 시도되었으나 현재 중국, 인도네시아, 베트남에서 주로 백신이 접종되고 있으며 중국이 전체 백신 사용량의 91%를 차지하고 있음. 주로 사용되는 백신은 사독백신으로 PR8

바이러스의 internal genes 6개와 유행하는 HPAIV의 HA와 NA를 가지고 있는 바이러스로 생산하고 있으며 유행하는 clade 바이러스에 따라 백신주를 교체하며 사용하고 있음.

## 예외 HPAI 백신 사용의 증가

Doses of H5 AI Vaccine Used 2002-2010\*



(Swayne D. E. et al., 2011)

국가	사용량
중국	91 %
이집트	4.7 %
인도네시아	2.3 %
베트남	1.4 %
기타	0.6



< 국가별 고병원성 AI 백신 사용량 >

- Egypt (2006~): Mex/94 and Re-1 백신주
- China (2004~)
  - Tk/England/1973 (H5N2): 2004-2006 사용
  - Re-1 (rg A/gs/Guangdong/1/1996 [H5N1] clade 0): 2004-2008 사용
  - Re-4 (rg A/ck/Shanxi/2006 [H5N1] clade 7): 2006-2007 사용
  - Re-5 (rg A/dk/Anhui/1/2006 [H5N1] clade 2.3.4): 2008-2012 사용
  - Re-6 (rg A/dk/Anhui/1/2006 [H5N1] clade 2.3.2): 2008-2012 사용
  - Re-7 (rg strain ? clade 7.2): 2014~ 사용
- Vietnam: Re-1 & Re-5 사용했었음. 현재 Re-6 사용
- Hong Kong: [H5N?] clade 2.3.4 (2008년 사용)
- Mexico: notifiable LPAI 백신 주로 North American H5N2 사용

- HPAI의 광범위한 발생 -> **살처분** 효과 난망
- 일부 가금류(오리농장 등) **지속 발생**
- 개발된 HPAI 백신 사용의 타당성이 인정

- 국내에서는 차단방역 및 살처분/모니터링에 의한 근절정책을 선택해 왔으나 비상 상황을 대비한 백신 타당성 연구가 완료되었으며 백신출구전략 수립을 위한 연구가 진행되고 있음. 따라서, **비상 상황을 대비한 HPAI 예방백신 비축 및 허가**와 관련된 정책 기반이 마련될 것으로 예상되어 백신주 개발 및 제품화 연구가 중요함.

### ○ 조류 인플루엔자 생독백신의 중요성

- AIV는 점막을 통해 감염이 시작되므로 전신면역뿐 아니라 점막면역이 중요한데 이를 위해서는 생독백신을 이용한 점막면역 자극이 중요함. 바이러스 계능 재배열에 의한 병원성 획득의 위험성으로 생독백신 사용에 어려움이 있으나 **뉴캐슬병 바이러스 벡터를 이용한 AI 생독백신주 개발은 안전하면서도 양계산업에서 뉴캐슬병 백신은 필수적이므로 현장 적용이 가장 용이할 것으로 평가되므로 이에 대한 연구가 중요함.**
- 뉴캐슬병 벡터 백신은 **중국에서 2006년 26억 도스, 2007년 13억 도스, 2008년 12억 도스가 지속적으로 사용되었음**(Chen, 2009, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 28: 267-274).

### ○ 계태아 고생산성 백신주의 중요성

- OIE에서는 발육란 접종 시 3일 이내에 10% 미만의 계태아 중사율을 보이는 AI 백신주를 사용할 것을 권고하고 있으며 2일 이내에 높은 폐사율을 일으키는 경우 바이러스 역가가 높더라도 수확할 수 있는 요막액의 양이 많지 않아 생산성이 높지 않은 단점이 있음.
- 따라서, **높은 역가로 증식을 하되 3일 이내에 계태아 중사율이 높지 않은 경우 다량의 요막액을 수확할 수 있어 생산성이 높게 나타나므로 이러한 특성을 갖는 백신주를 제작할 필요가 있음.**

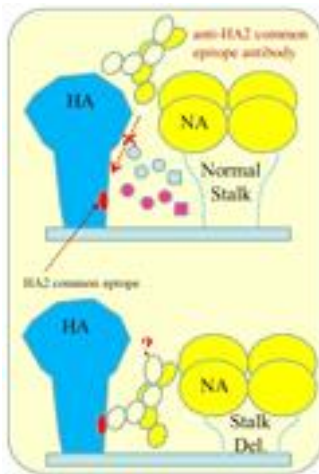
### ○ 포유류 무병원성 백신주의 중요성

- PR8 바이러스는 발육란 증식성이 뛰어나 백신주 제작 시 internal genes donor로 선호되고 있으나 마

우스에 적응시킨 바이러스로 50% mouse lethal dose가  $10^{4.5}$ EID<sub>50</sub>/mouse 정도이며 이러한 병원성은 internal genes과 관련이 있어서 PR8 internal genes을 갖는 H5N1 백신주의 경우 마우스에서 체중 감소와 폐사를 초래하는 것으로 알려져 있어 백신 제조 과정중의 biosafety/ biosecurity 면에서 발육한 증식성이 뛰어나면서도 마우스 병원성이 없는 internal genes 개발이 중요함.

○ 유니버설 백신의 중요성

- HA 단백질은 혈청형에 따라 H1-H16으로 분류되는데 HA2 common epitope은 혈청형 간에 대부분 보존되어 있으며 이 부분에 대한 항체는 heterosubtypic protection이 가능한 것으로 알려져 있음. 그러나, 인근에 존재하는 N-glycans이 epitope 인식을 방해하고 항체 결합도 방해하여 면역원성이 높지 않을 것으로 판단됨. 따라서, HA2 common epitope 인근의 154N-glycan을 제거하고, NA stalk에 존재하는 N-glycans을 제거하면 면역원성을 높일 수 있을 것으로 기대되므로 이에 대한 연구가 중요함. 그러나 N-glycan 제거를 위해서는 N-X-S/T motif에 돌연변이를 일으켜야 하는데 돌연변이에 따라 바이러스 증식을 저하시키는 경우가 있어 증식성 변화시키지 않는 최적의 돌연변이를 선별해야 함.



- Internal genes은 polymerases(PB2, PB1, PA), NP, M, NS 단백질을 코딩하며 T/B cell epitopes 풍부하여 heterosubtypic protection에 중요한 것으로 알려져 있으나 현재 전 세계적으로 널리 사용되는 재조합 백신주들은 PR8 바이러스의 internal genes을 가지고 있어 야외주와 T/B cell epitopes이 달라 heterosubtypic protection 능력이 낮은 것으로 사료됨. 따라서, 야외주와 T/B cell epitope을 비교하고 실험적으로 차이를 규명하여 최적화된 internal genes을 백신주 작출에 사용하는 것이 중요함.
- Heterosubtypic protection에는 세포성 면역이 중요하며 세포성 면역는 생독백신에 의해 주로 유도되는 것으로 알려졌으나 사독백신에 의해서도 세포성면역이 유도된다는 사실이 밝혀져 사독백신의 internal genes을 야외주와 일치시킬 필요성이 대두됨.
- 따라서, 이러한 종합적인 백신 성능 튜닝을 통해 항원성 변이주뿐 아니라 서로 다른 아형의 바이러스가 감염되었을 때에도 일정 정도의 방어효능이 기대됨.

○ 백신 최적화 프로그램의 중요성

- 야외 상황을 고려하여 생독백신 시기, 횟수, 생독/사독백신과의 시간 간격을 최적화 하기 위한 연구를 통해 백신 효과를 극대화 할 수 있으므로 백신 프로그램 최적화 연구가 중요함.

○ 오리용 백신의 면역원성 향상 필요성

- 현재까지 이유를 알 수 없으나 동일한 백신을 닭과 오리에 접종하는 경우 오리에서 효과가 낮은 것으로 알려져 있음. 국내 HPAI의 문제는 오리에서 임상증상이 뚜렷하지 않아 감염이 상당히 진행이 된

다음에 진단이 되어 차단방역에 실패하기 때문임. 따라서, 비상 시 1차적인 접종대상이 오리이지만 효과적인 백신을 기대하기 어려운 상황임. 따라서, 기존 백신의 효능을 개선하기 위한 노력이 필요한데 본 연구팀은 오리의 혈액에 존재하는 **non-specific hemagglutination inhibitor (a2-macroglobulin)**가 항원에 달라붙어 면역자극을 방해한다는 가설을 세워 문제 해결을 시도할 계획임. 가설이 맞는 경우 오리 백신 효능 개선으로 보다 강력한 방역기술(ring vaccine)을 확보할 수 있을 것으로 기대됨.

## 1-4. 연구개발 범위

### 1-4-1 연구개발 최종목표

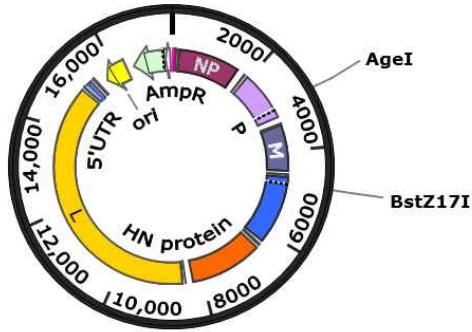
		코드번호	B-05-01
구분	내용		
최종목표	세계 최고 수준의 조류 인플루엔자 예방 백신 제품화		
세부목표	<p>1. 조류 인플루엔자 HA2 fragment common epitope의 면역원성을 향상시킨 H9N2 또는 H5N1, H5N8 유전자를 발현하는 뉴캐슬병 바이러스 벡터 및 생독백신 개발</p> <p>① <b>조류인플루엔자 항원 탑재 NDV 역유전학 시스템 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조류인플루엔자 표면항원 발현 벡터 <b>6개</b> 작성 (전체 vector system 유전자의 염기서열 분석)</li> <li>② <b>역유전학 이용, 조류인플루엔자 HA, NA 항원 발현한 키메라 바이러스 추출</b></li> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 역유전학을 이용한 신규 바이러스 추출 <b>3종</b> 이상 (염기서열 분석 HA 단독 또는 HA, NA 단백질 동시 발현 확인 생물자원센터 특허균주 기탁 3종 완료)</li> <li>③ <b>추출 바이러스 배양법 확립</b></li> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추출된 바이러스의 증식성 <b>10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> EID<sub>50</sub>/ml 이상</b></li> <li>④ <b>시험백신의 안전성시험(10수분)</b></li> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 14일간 점안접종 <b>90% 이상, 분무접종 모두 양호</b></li> <li>⑤ <b>시험백신의 효력시험</b></li> <ul style="list-style-type: none"> <li>- NDV 병원성주 공격에 <b>80% 이상 방어, AIV 항체가 64 이상</b></li> </ul> </ul> </ul> </ul> <p>2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 조류 인플루엔자 벡터 시스템 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 계태아 저병원성 : 계태아 중사육/3일 10% 미만(NS genome segment 최적화)</li> <li>- 계태아 고생산성 : 바이러스 역가 10<sup>9</sup> EID<sub>50</sub>/ml 이상(PB2 genome segment 최적화)</li> <li>- 유니버설 백신 : BALB/c 생독백신 모델에서 백신 접종 2주후 공격시 100% heterosubtypic protection(NP, M1/2, Polymerases, NS genome segment 최적화)</li> </ul> <p>3. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 백신용 H9N2 백신주 및 사독백신 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- H9N2 백신주 : 최근 유행 야외주와 internal genes 일치하며 HA2 common epitope 면역원성 향상된 계태아 저병원성, 고생산성 유니버설 백신주로 야외주 배출을 완벽하게 방어(농림축산검역본부 공시 시험법 준수)</li> </ul> <p>4. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 백신용 H5N8/H5N1 백신주 및 사독백신 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- H5N8 백신주 : 국내 5차발생 HPAI 원인인 clade 2.3.4.4 바이러스의 H5 및 N8 유전자를 가지면서 야외주와 internal genes 일치하며 HA2 common epitope 면역원성 향상된 계태아 저병원성, 고생산성 유니버설 백신주로 야외주 배출을 완벽하게 방어</li> <li>- H5N1 백신주 : 국내 3, 4차발생 HPAI 원인인 clade 2.3.2.1 바이러스의 H5 및 N8 유전자를 가지면서 야외주와 internal genes 일치하며 HA2 common epitope 면역원성 향상된 계태아 저병원성, 고생산성 유니버설 백신주로 야외주 배출을 완벽하게 방어</li> </ul> </ul>		



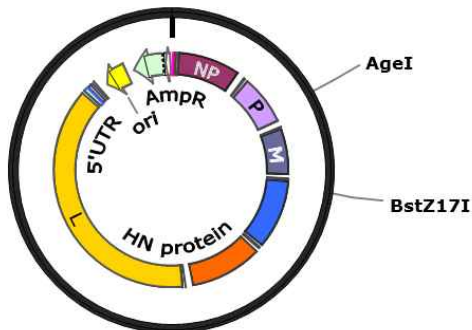
		코드번호	B-05-01
구분	내용		
	5. 생독백신 및 사독백신 효능 극대화를 위한 백신프로그램 확립 - 뉴캐슬병 벡터백신(ND-H9N2)과 H9N2 사독백신과의 최적의 병용법 확립 - 뉴캐슬병 벡터백신(ND-H5N8)과 H5N8 사독백신과의 최적의 병용법 확립 - 뉴캐슬병 벡터백신(ND-H5N1)과 H5N8 사독백신과의 최적의 병용법 확립		

1-4-2 연차별 연구개발 목표 및 내용

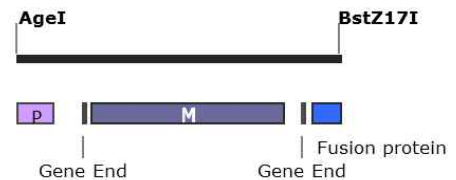
		코드번호	B-05-02
<p>가. 1차년도</p> <p>① 개발 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관연구기관((주)바이오포아) : 조류 인플루엔자 HA2 fragment common epitope의 면역원성을 향상시킨 H9 또는 H5 유전자를 발현하는 뉴캐슬병 바이러스 벡터 제작 생독백신 개발</li> <li>- 협동연구기관(서울대) : 유니버설 H9 및 H5 유전자 최적화 및 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 조류 인플루엔자 벡터 시스템 개발</li> </ul> <p>② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관연구기관((주)바이오포아) :               <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 뉴캐슬병 바이러스 벡터 작성                   <p>역유전학을 이용하여 계태아에서 고역가로 증식할 수 있는 뉴캐슬병 바이러스에</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>i) 면역원성을 향상시킨 common epitope 형태를 가진 조류인플루엔자 H5 또는 H9 단백질을 발현</li> <li>ii) HA 유전자와 조합, 발육란에서의 증식성 및 감염세포로부터 바이러스가 유리되는 것을 억제하여 결과적으로 바이러스 증식에 영향을 미치는 NA 단백질을 HA 단백질과 동시발현하는 재조합 뉴캐슬병 바이러스 벡터백신 개발을 목표로 함.</li> </ol> <p>이를 위해 그 자체로 병원성이 없으며 증식성이 양호한(<math>10^{10}</math>EID<sub>50</sub>이상) 야외분리주를 backbone으로 하는 ND viral vector를 작성(pNDV-C7d).</p> <p>pNDV-C7d ND viral vector내 조류인플루엔자 단백질을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해 필요한 AgeI, BstZ17I 제한효소 site를 인공합성하여 ND viral vector 내에 도입 함</p> <p style="text-align: center;">인공합성 NDV-C7d AgeI-SbfI(M)-AvrII(F) 1,830bp</p> </li> </ol> </li> </ul>			



NDV C7d(SbfI, AvrII site 추가)  
17,446bp



NDV-C7d  
(17,446bp)



인공합성 NDV-C7d AgeI-SbfI(M)-AvrII(F)  
1,830bp

## 2. H5N1 항원발현 NDV 추출 벡터 제작

### (1) H5N1 유전자 선별

국내 발생 clade 2.3.2 H5N1 HPAI 중에서 gene bank에 등록되어 있는 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 H5N1(JF699673, 이하 K10-483)의 유전자 정보를 기준으로,

① HA5 유전자는 cleavage site 아미노산 서열을 병원성주(RXXR, K10-483의 경우 RERR) 형태로부터 계태아와 마우스에 전혀 병원성이 없다고 확인된 KBNP-0028주(ASGR)의 서열로 치환하고, common epitope 면역원을 증대시키기 위해 154N-glycan을 제거(NGT->NGE로 변경)한 형태로 최종 선별 함.

## H5N1(K10-483 ASGR)-HA

		10	20	30	40	50	60	70	80	
JF699673	(K10-483 H5N1)	HEKIVLLETTTISLVKSDHICIGYHANNSTEQVDTEERAVTVTACQILEKTHNGKCDLNDVVKPLILKDCSVAGWLLGN								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....								
		90	100	110	120	130	140	150	160	
JF699673	(K10-483 H5N1)	PLCDEEPIHVFESYIVEKAKPANDLCTPGNFDIYEELEHLLSRINHFBRKIQIIPDQSWSEHBSLVSAACSTQGNSSFF								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....								
		170	180	190	200	210	220	230	240	
JF699673	(K10-483 H5N1)	RNVWMLIKQDNAVPTIKKGYNNFTHQEDLLVLMGIHHPIDBAEOTRLWQNPPTTISIGTSTLWQRVLPKIATRSKINGQSQ								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....								
		250	260	270	280	290	300	310	320	
JF699673	(K10-483 H5N1)	RIDPFWTILKPIDAIHFESNGNPIAPEYANKIVKRDSTIMKSEVEYGRHCITRCQTPIGAINSSMPFHIIHPLTIQECFK								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....								
		330	340	350	360	370	380	390	400	
JF699673	(K10-483 H5N1)	YVKSINKLVLATGLRNSHRERRRRRILPGALAQIEGGWQGHVDGMYGHSINQSSGYAADKESYKAIIDGVTKRNSI								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....								
		410	420	430	440	450	460	470	480	
JF699673	(K10-483 H5N1)	IDRMTQPEAVAREPPIULERRRIENLKKQEDGFLDVTYHAEILLVLEHERTLDPHDSINRILYDKVRIQLKDNARELGN								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....								
		490	500	510	520	530	540	550	560	
JF699673	(K10-483 H5N1)	GCTEPYHRCIRMECSVRNGTIDIPQYSEARLKRREISQVLEISIGTIQLSIYSTVASSLWLAHMAGLSLWMCISGSS								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....								
		570	580	590	600	610	620	630	640	
JF699673	(K10-483 H5N1)	LQCRICI*								
K10-483 ASG	(Cleavage site 지점)	.....*								
K10-483 ASG 154N-(154N glycan 제거 NGT->NGE)		.....*								

② NA 유전자는 HA 유전자와 동일하게 K10-483의 유전자 정보(JF699677)를 기본으로 함.

K10-483은 AF144304 H5N1 NA(A/goose/Guangdong/1/1996)에 비해 20개 아미노산이 결손된 형태의 바이러스임. HA 유전자와 조합하여 발육란 증식성이 좋은 조합을 찾아낸 형태로 최종 선별 함.

```

      10      20      30      40      50      60      70
AF144304(A/goose/Guangdong/1/1996)  MNPNQKIITIGSICMVGIIISLMLQIGNIISIWVSHSIQTGNQHOAEFCNQSIITYENNTWVNTYVNIISNTNPLTEK
JF699677(A/K10-483 mandarin duck/Korea/2010)  .....V..II..V.....M.....R.....N

      90      100     110     120     130     140     150
AF144304(A/goose/Guangdong/1/1996)  ASVTLAGNSSLCPISGWAVHVKDNGIRIGSKGDVVFVIREPPTISCSHLECRTPFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSPHRTL
JF699677(A/K10-483 mandarin duck/Korea/2010)  .....R.....S.....M.....

      170     180     190     200     210     220     230
AF144304(A/goose/Guangdong/1/1996)  CPVGEAPSPYNSRFEVSAWSASACHDGTGSLWTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTOBSECACVNGSC
JF699677(A/K10-483 mandarin duck/Korea/2010)  .....V...D.....K.....G.....

      250     260     270     280     290     300     310
AF144304(A/goose/Guangdong/1/1996)  VMTDGPSTNGQASYKIFRMEKQKWKVSELNAPNYHYEBCSCYPDAGEITCVCRDNWHGNSRNPWVSFNQNLLEYQIGYIC
JF699677(A/K10-483 mandarin duck/Korea/2010)  .....I.....S...I.....

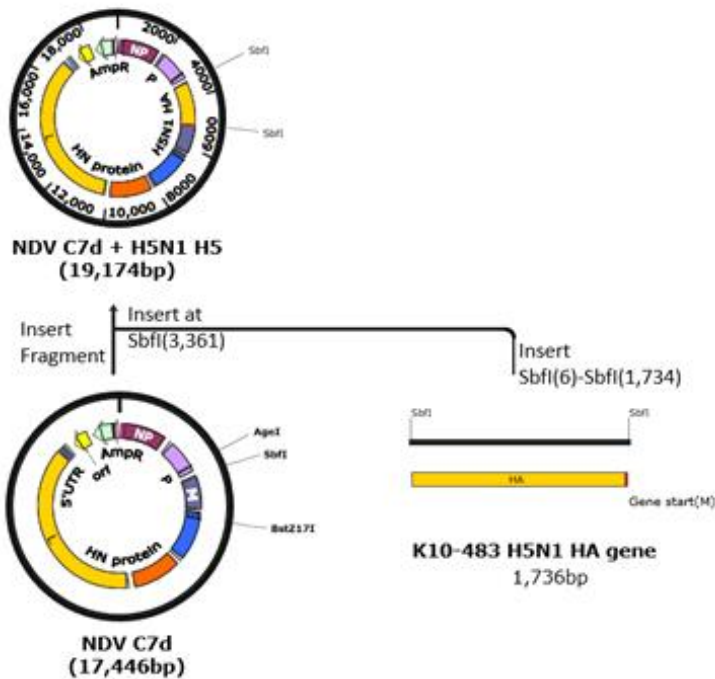
      330     340     350     360     370     380     390
AF144304(A/goose/Guangdong/1/1996)  VFGDNPRPNDGTGSCGVPVSPNGAYGVKGFSPKYGNQVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNGWGTGDSSTFSVKDDIVAITD
JF699677(A/K10-483 mandarin duck/Korea/2010)  .....M.....I.....E.....

      410     420     430     440     450     460     470
AF144304(A/goose/Guangdong/1/1996)  GYSGSFVQHPPELTGLDCIRPCFWEILIRGRPKBESTIWTSGSSISFCGVNSDVTGWSWPDDELPFTIDK*
JF699677(A/K10-483 mandarin duck/Korea/2010)  .....G.....S...G.....*

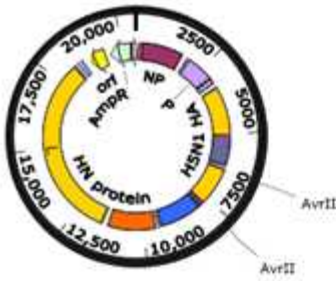
```

(2) 작출벡터 내 인플루엔자 항원발현 유전자 도입  
 NDV 벡터(pNDV-C7d) 내 제한효소를 사용하여 각각의 AIV HA단백, NA단백에 대한 유전자를 ND viral vector 내 M, F 유전자 앞부분에 도입함.

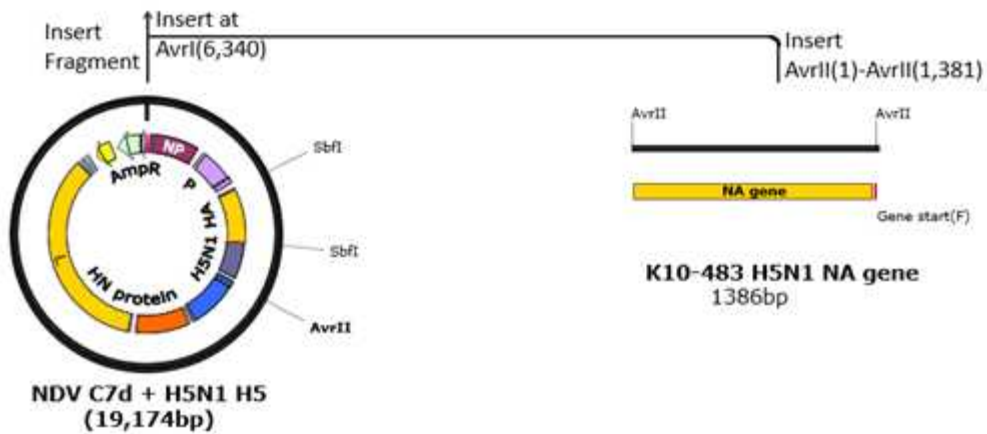
**NDV C7d+H5N1 HA**



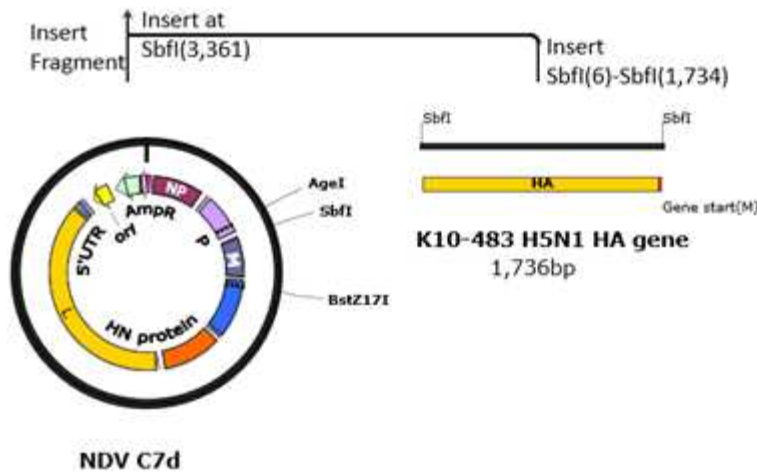
### NDV C7d+H5N1 HA+NA



NDV 7Cd+(H5N1 HA+NA)  
20,554bp



NDV C7d + H5N1 H5  
(19,174bp)



NDV C7d

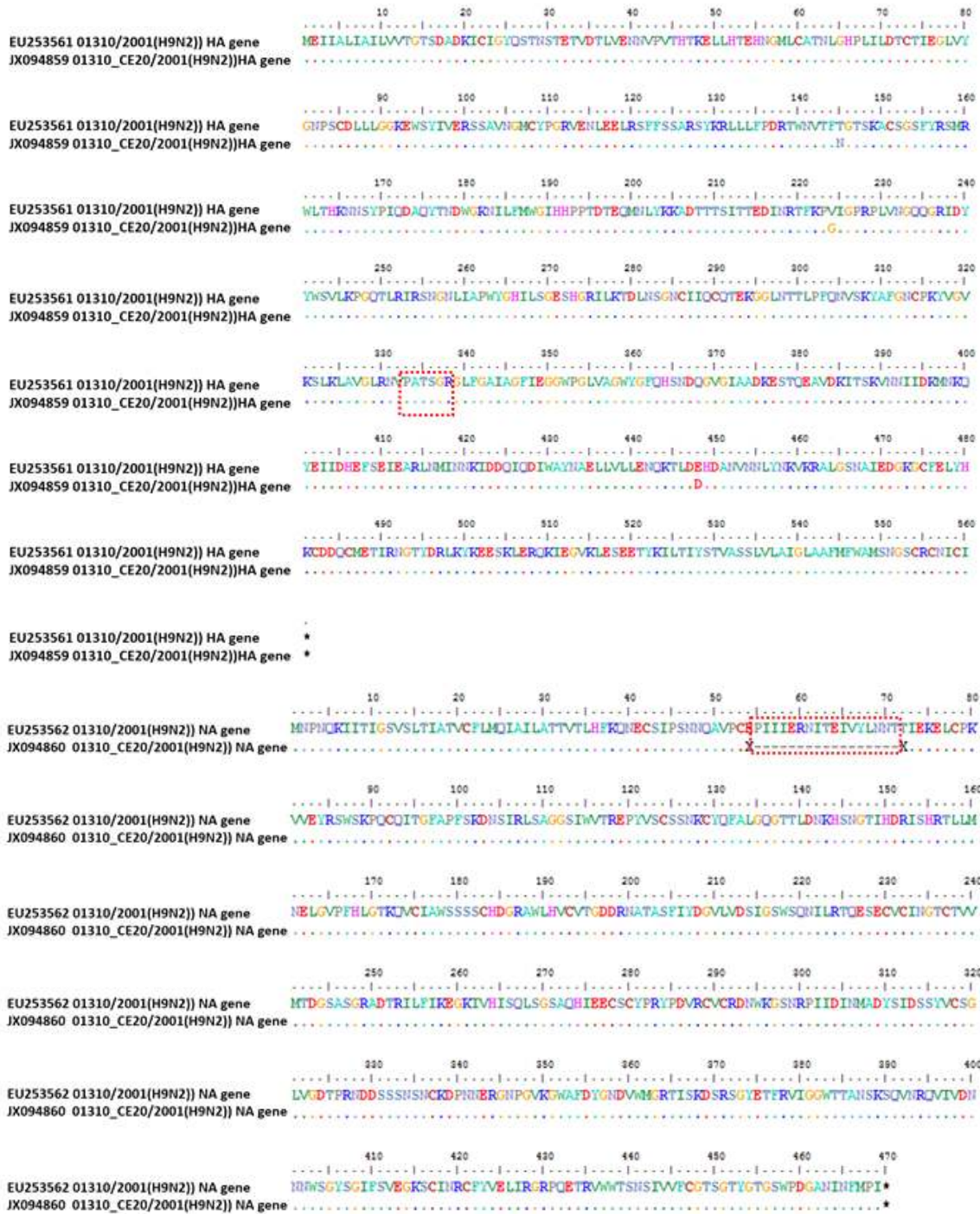
### 3. H9N2 항원발현 NDV 작출 벡터 제작

#### (1) H9N2 유전자 선별

농림축산 검역본부에서 확립하여 국내 H9N2 사독오일백신으로 널리 사용되고 있는 고증식성주 A/chicken/Korea/ 01310/2001(EU253562, 이하 01310)를 발육란에서 20대 계대배양 한 A/chicken/Korea/01310\_CE20/2001(JX094860, 이하 01310-CE20)의 유전자 정보를 기준으로 최종 선별 함.

01310-CE20은 계대배양하는 과정에서 ① 생산성이 10배 이상 증가되었고 계대배양한 바이러스의 hemagglutinin cleavage site amino acid motif (PATSGR/GLF)를 포함, HA 유전자 대부분이 보존 이 되어있으나 ② HA amino acid 3개 변이 발생(T145N, V224G, E448D)하였고 ③ NA stalk

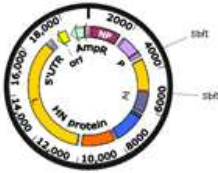
region(55-72)에 18개 아미노산이 결손 된 균주임.



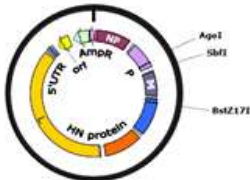
(2) 바이러스 추출 벡터 작성

H5N1과 동일하게, 병원성이 없으며 증식성이 양호한 야외분리주를 back bone으로 하는 ND viral vector를 작성(pNDV-C7d)하고 여기에 제한효소를 사용하여 각각의 AIV HA단백, NA단백에 대한 유전자를 ND viral vector 내 M, F 유전자 앞부분에 도입함.

**NDV C7d+H9N2 HA**



**NDV 7Cd+H9N2 HA**  
19,162bp

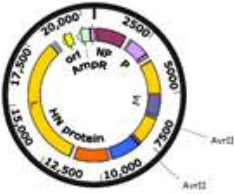


**NDV 7Cd**  
(17,446bp)

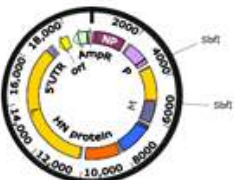


**01310\_CE20(H9N2) HA gene**  
1724bp

**NDV C7d+H9N2 HA+NA**



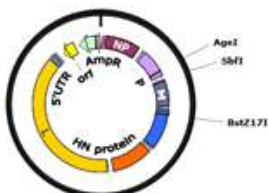
**NDV 7Cd+(H9N2 HA+NA)**  
20,548bp



**NDV 7Cd+H9N2 HA**  
19,162bp



**01310\_CE20(H9N2) NA gene**  
1,392bp

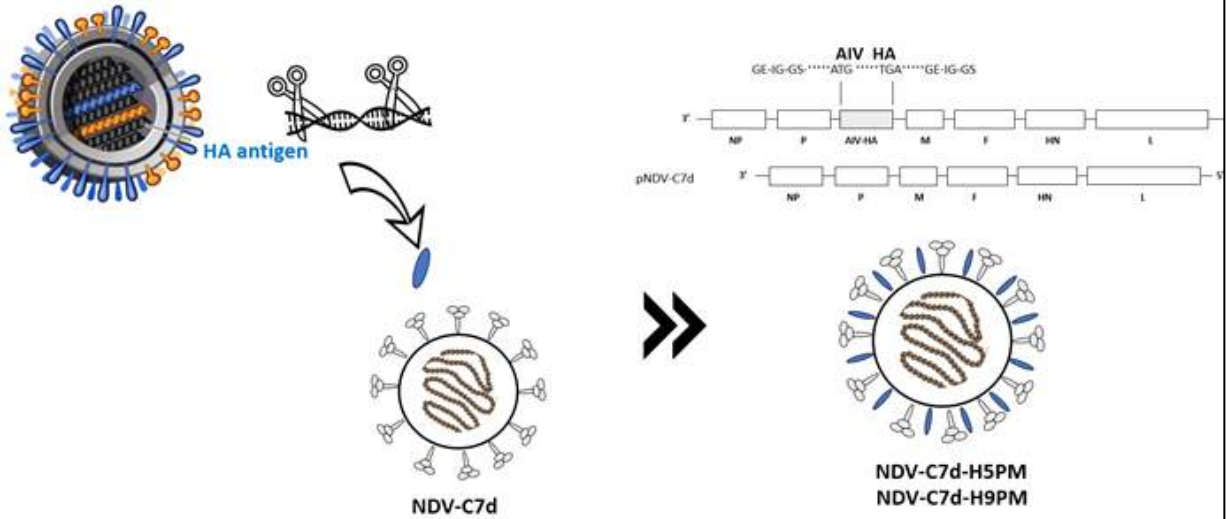


**NDV 7Cd**  
(17,446bp)

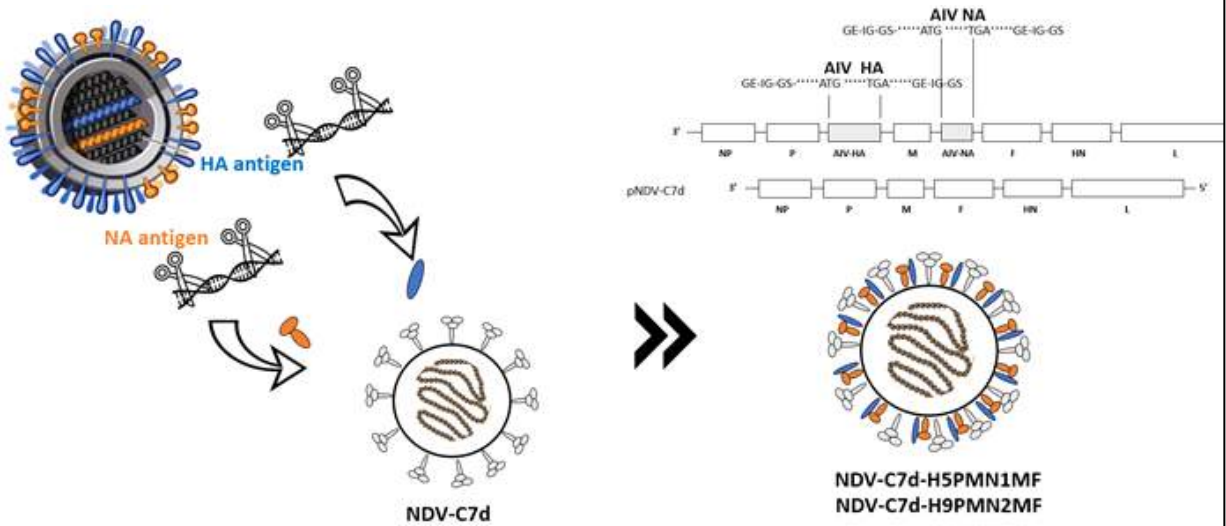


**01310\_CE20(H9N2) HA gene**  
1724bp

< 바이러스 작출 벡터 제작 모식도 >



**Newcastle Disease Virus(닭뉴캐슬병바이러스)**



**Newcastle Disease Virus(닭뉴캐슬병바이러스)**

**4. 마커백신 개발**

백신접종 후 면역이 불충분한 닭의 경우 병원성 야외 병원성 뉴캐슬병 바이러스에 의해 감염이 될 수 있음. 이런경우 임상증상 또는 폐사를 보이지 않더라도 미량의 병원성 뉴캐슬병바이러스를 지속적으로 배출하여 전파원으로 작용할 수 있음. 평상시 SPF 닭을 보초계 계군내 두어 다양한 질병원으로부터 감염여부를 확인하는것이 가장 확실한 방법이지만 관리가 번거롭고 SPF 닭이 전파의 다른 원인으로 작용할 위험성이 존재함. 이론적으로 해당 계군의 뉴캐슬병 감염여부를

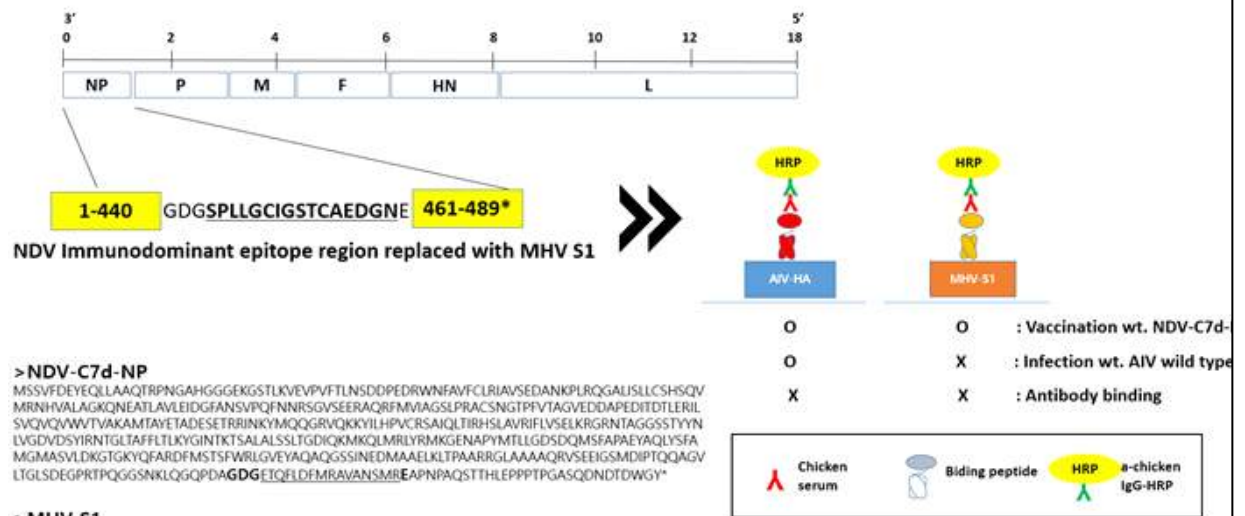


항원검사를 통해 알아볼 수도 있으나 개체수가 많은 경우 사실상 검사에 한계가 있음.

많은 개체수의 닭을 검사하는 가장 효과적인 방법은 감염체과 백신접종개체를 감별(DIVA, Differentiating Infected and Vaccinated Animals)하는 혈청검사법을 이용하는 것임. 기존에 사용되고 있는 혈청학적 검사법으로는 혈구응집억제반응테스트(HI test)와 ELISA법이 주로 사용되고 있는데 이들 방법으로는 감염체와 접종개체를 감별진단하는 것이 불가능 함.

DIVA 방법은 병원성 뉴캐슬병바이러스에만 존재하는 에피토프에 대한 항체를 검출하거나 뉴캐슬병바이러스 내 방어와 관계없는 특정 단백질을 제거한 형태의 백신(마커백신) 접종에 의해 유발되는, 결손부위 단백질에 대한 항체를 검사하는 방법이 있음. 본 과제에서는 NDV vector내 NP의 특정 위치(443-460, immunodominant epitope region)에 닭에서의 병원성과는 전혀 관계가 없는 MHV S1 일부분을 도입하여 이부분에 대한 항체형성 유무로 백신군과 야외바이러스 감염군을 구별하는 DIVA marker vaccine을 개발하고자 함.

### AI-DIVA 시스템용 진단 키트 개발



#### □ H9N2 백신 효능평가-2(방어시험)

- 6주령 SPF 시험계 100수를 10개군으로 나누어, 01310 및 field 계열 Parent 각각과 선발된 백신 후보 주 1주씩, 그리고 PBS를 접종하고, 3주후 농림축산검역본부의 백신 효능 평가용 바이러스인 A/Kr/ck/310/01(H9N2)와 야외주 ( $10^{5.5}$ EID<sub>50</sub>/0.1ml 이상  $10^{7.0}$ EID<sub>50</sub>/0.1ml 이하)을 비강으로 공격접종 함.
- 접종 후 5일 에 시험계를 안락사하여 맹장편도를 포함하여 상하 0.5cm 부분을 채취하고, 10% 유제액을 만들어 3,000rpm에서 10분간 원심하고, 상층액을 수확하여 1%가 되도록 젤 타마이신을 처리한 후 다시 12,000rpm에서 5초 정도 원심한 후 실온에서 1시간 정지함.
- 개체별로 유제액 100 $\mu$ l 씩을 취하여 혼합한 후  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  희석한 후 10-11일령 SPF 종란 5 개에 각각 100 $\mu$ l 접종함. 오전과 오후 검란하며 3일간 배양하여 냉장한 후 요막액을 수확 하고, 평판혈구응집법을 수행한 후 바이러스 배출역가(EID<sub>50</sub>/0.1ml)를 측정함.

→ 상기의 개체별 유제 원액 100 $\mu$ l를 10-11일령 SPF 발육란 3개에 접종하여 3일간 배양한 후 냉장하며 요막액을 수확하여 평판혈구응집법을 수행해 **양성률**을 측정함.

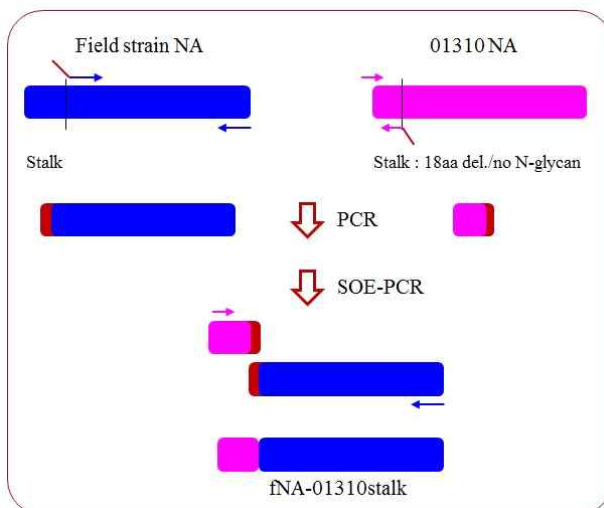
Vaccine	Challenge virus			
	01310		Field	
	배출역가	양성률	배출역가	양성률
01310 계열	P			
	C			
Field 계열	P			
	C			
기존 판매중인 H9N2 백신				
PBS				

- LMO 유해성 유해성 평가
- 작출 바이러스의 배양법 확립(생산 공정기술 개발)
- 시험백신의 조성 및 생산공정 개발(혼합백신)
- 시험백신의 생산(키메라 ND-H9N2)  
CTC 바이오 용역 연구(30,000만원)

- 협동연구기관(서울대) :

1. 최근 유행하는 H9N2 바이러스 야외주 HA 및 NA mutagenesis

- HA mutagenesis
  - HA1 N-glycan 최적화 : 158N glycan 갖도록 해줌
  - HA2 154N-glycan 제거 : 고증식성 유지되도록 하는 최적의 아미노산 3종 이상 제작
- NA mutagenesis
  - Stalk length 조절 및 N-glycan 제거 : 18aa del. 갖도록 01310 NA stalk으로 야외주 NA stalk 교체

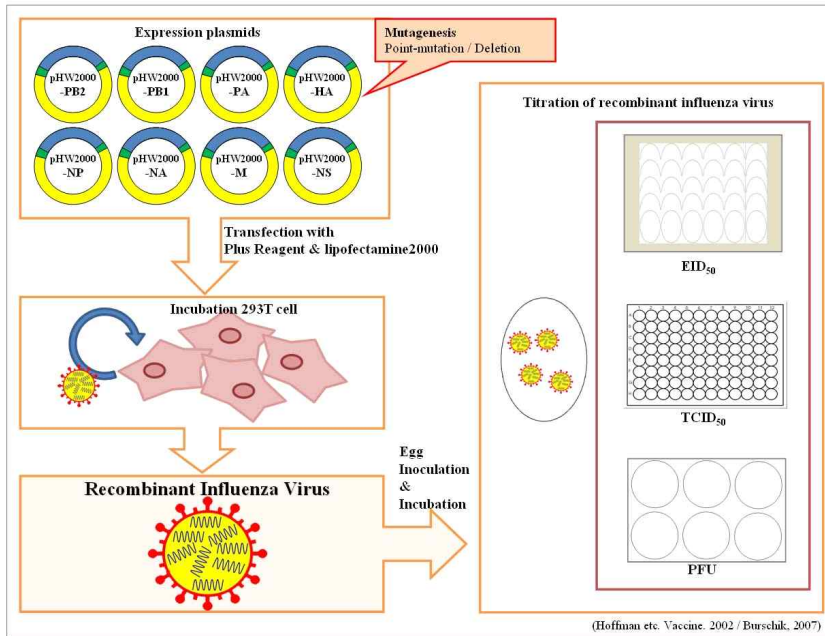


## 2. 역유전학을 이용한 H9N2 바이러스 제작

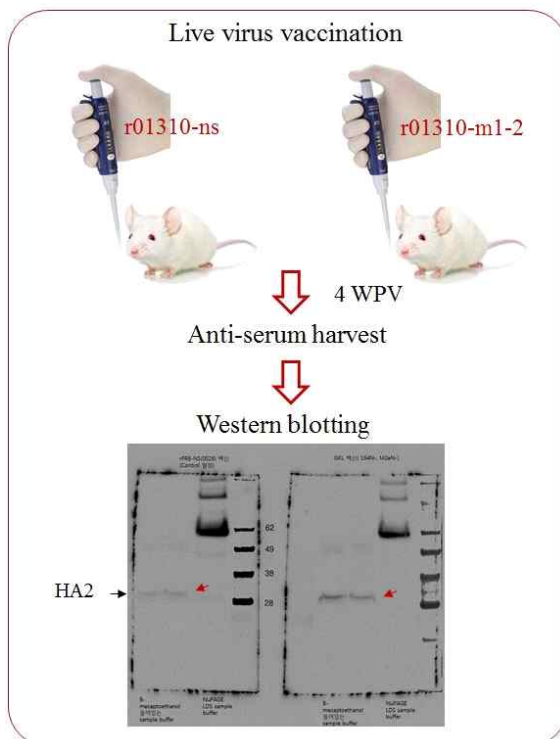
### □ H9N2 재조합 바이러스 작출-1

- 상기 HA 및 NA 돌연변이 중 바이러스 증식성과 HA2 common epitope 면역원성이 뛰어난 HA/NA 유전자 선발용

재조합 바이러스	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
r01310	01310	01310	01310	01310	01310	01310	01310	01310
r01310-ns	01310	01310	01310	01310	01310	01310	01310	0028
01310-m1-1	01310- 154NGdel-1	01310	01310	01310	01310	01310	01310	01310
01310-m1-2	01310- 154NGdel-1	01310	01310	01310	01310	01310	01310	0028
01310-m2-1	01310- 154NGdel-2	01310	01301	01310	01310	01310	01310	01310
01310-m2-2	01310- 154NGdel-2	01310	01310	01310	01310	01310	01310	0028
01310-m3-1	01310- 154NGdel-3	01310	01301	01310	01310	01310	01310	01310
01310-m3-2	01310- 154NGdel-3	01310	01310	01310	01310	01310	01310	0028
rField	Field	Field	01310	01310	01310	01310	01310	01310
rField-ns	Field	Field	01301	01310	01310	01310	01310	0028
rField-m1-1	Field-g- 154NGdel-1	fNA-01310stalk	01310	01310	01310	01310	01310	01310
rField-m1-2	Field-g- 154NGdel-1	fNA-01310stalk	01301	01310	01310	01310	01310	0028



- 고증식성 야외 H9N2 재조합 바이러스 선발 : 01310 NS 유전자 갖는 바이러스 역가(EID<sub>50</sub>) 측정
- 고면역원성 야외 H9N2 재조합 바이러스 선발 : 바이러스 역가가 가장 높은 돌연변이 HA 유전자와 fNA-01310stalk 갖는 재조합 바이러스와 야외주 HA 및 NA 가지면서 0028 NS 유전자 갖는 바이러스 사용하여 면역시킨 후 항혈청으로 western blotting 하여 HA2 및 M2e에 대한 항체 유무와 신호 강도 비교



□ Internal gene 최적화 H9N2 백신주 작출

- 계태아 저병원성/고증식성/유니버설 백신 효능 갖도록 NS(0028 계태아/포유류 저병원성; 0028-EPEC 고증식성), PB2(MVV 고증식성), NP/M(유니버설 백신) 유전자 최적화

계열	재조합 바이러스	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
01310 (H9N2)	r01310(P)	01310	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
	r01310-v1	01310	01310	01310-MVV	01310	01310	01310	01310	0028
	r01310-v2	01310	01310	01310-MVV	01310	01310	01310	01310	0028-EPEV
	r01310-v3	01310-154NGdel	01310	01310-MVV	01310	01310	01310	01310	0028
	r01310-v4	01310-154NGdel	01310	01310-MVV	01310	01310	01310	01310	0028-EPEV
Field (H9N2)	rField(P)	Field	Field	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
	rField-v1	Field	Field	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028
	rField-v2	Field	Field	01301-MVV	01310	01310	Field	Field	0028-EPEV
	rField-v3	Field-g-d154N	fNA-01310 stalk	01301-MVV	01310	01310	Field	Field	0028
	rField-v4	Field-g-d154N	fNA-01310 stalk	01301-MVV	01310	01310	Field	Field	0028-EPEV

□ H9N2 백신 후보주 특성 분석

- 바이러스 역가 측정 : EID<sub>50</sub>/ml

- 증사율 조사 : 10일령 SPF 종란 20개에 각각의 백신 후보주 10<sup>3-4</sup>EID<sub>50</sub>/egg 접종하여 3일간 오전/오후 검란하여 증사율 계산

- 마우스 병원성 조사(MDCK 증식성 조사로 대체 가능) : 6주령 BALB/c 마우스 암컷 5수에 각각의 백신 후보주 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub>/mouse 접종하고 2주간 매일 체중을 측정하여 병원성 유무를 평가

□ H9N2 백신 효능평가-1(항체조사)

- 상기 특성분석 결과 계태아 저병원성, 고증식성, 마우스 무병원성 백신 후보주 2주[01310/field(F) 계열]와 각각의 parent 바이러스[r01310(P), rField(P)] 선발하여 포르말린 불활화 바이러스 배양액(요막액)과 ISA70을 3:7의 비율로 섞어 오일 에멀전 백신을 제조하여 6주령 SPF 시험계 각각 25수를 5개군으로 나누어 01310 계열 백신 접종군(P, C), Field 계열 백신 접종군(P, C), 음성대조군(PBS)에 5수씩 할당하여 접종한 후 3주후 항혈청을 수확하여 H9N2 바이러스(01310, field strain)와 H5N1 바이러스에 대해 HI, VN, plaque reduction tests 및 western blotting 실시

Vaccine	HI test			VN test			Plaque reduction test			Western blotting		
	01310	F	H5	01310	F	H5	01310	F	H5	01310	F	H5
01310	P											
계열	C											
Field	P											
계열	C											
PBS												

H9N2 백신 효능평가-2(방어시험) -> 바이오포아에서 실시

2. H5N8(Donglim 3, clade 2.3.4.4)/H5N1(K10-483, clade 2.3.2.1) 백신주 개발

**(1) H5N8 mutagenesis**

HA mutagenesis

- HA1 N-glycan 최적화 : 158N glycan 갖도록 해줌 (158N)
- HA2 154N-glycan 제거 : 고증식성 유지되도록 하는 최적의 아미노산 1종 이상 제작(d154N)

NA mutagenesis

- Stalk length 조절 및 N-glycan 제거 :
  - 18aa del. 갖도록 01310 NA stalk으로 Donglim 3 NA stalk 교체(N8-01310S)
  - 19aa del. 갖도록 K10-483 NA stalk으로 Donglim 3 NA stalk 교체(N8-483S)
  - 19aa del. 갖도록 K10-483 NA stalk에서 85N-glycan 제거(NSS -> TGT or GSS) 후 Donglim 3 NA stalk 교체(N8-483S-d85G)

**(2) H5N1 mutagenesis**

HA mutagenesis

- A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (H5N1) (이하 K10-483) HA 사용
- HA2 154N-glycan 제거 : 고증식성 유지되도록 하는 최적의 아미노산 1종 이상 제작(d154N)

NA mutagenesis

- K10-483 NA stalk에서 85N-glycan 제거(NSS -> TGT or GSS) 후 Donglim 3 NA stalk 교체(N1-d85G)

**(3) H5N8/H5N1 재조합 바이러스 작출**

Internal gene 최적화 H5 백신주 작출

- H5N8 및 H5N1 바이러스의 NP와 M 유전자 각각 사용
- NS의 경우 H9N2 바이러스 특성 분석 결과에 따라 0028 또는 0028-EPEV 중 선택 사용

계열	재조합 바이러스	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
Major H5N8 (2.3.4.4)	rH5N8 (P)	H5	N8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
	rH5N8-m1	H5	N8	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N8-m2	H5-158N-d154N	N8-01310S	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N8-m3	H5-158N-d154N	N8-483S	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N8-m4	H5-158N-d154N	N8-483S-d85G	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
H5N1 (2.3.2.1)	rH5N1 (P)	H5	N1	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
	rH5N1-m1	H5	N1	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N1-m2	H5-d154N	N1	01301-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N1-m3	H5-d154N	N1-d85G	01301-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV

2차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관((주)바이오포아) : 뉴캐슬병바이러스를 벡터로한 AIV H9/H5 예방 백신 개발
- 협동연구기관(서울대) : 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 AI 백신주 및 사독백신 개발

② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관((주)바이오포아) :

□ H9N2 백신 효능평가-2(방어시험)

- 6주령 SPF 시험계 100수를 10개군으로 나누어, 01310 및 field 계열 Parent 각각과 선발된 백신 후보주 1주씩, 그리고 PBS를 접종하고, 3주후 농림축산검역본부의 백신 효능 평가용 바이러스인 A/Kr/ck/310/01(H9N2)와 야외주 ( $10^{5.5}$ EID<sub>50</sub>/0.1ml 이상  $10^{7.0}$ EID<sub>50</sub>/0.1ml 이하)을 비강으로 공격접종 함.
- 접종 후 5일 에 시험계를 안락사하여 맹장편도를 포함하여 상하 0.5cm 부분을 채취하고, 10% 유제액을 만들어 3,000rpm에서 10분간 원심하고, 상층액을 수확하여 1%가 되도록 겐타마이신을 처리한 후 다시 12,000rpm에서 5초 정도 원심한 후 실온에서 1시간 정지함.
- 개체별로 유제액 100 $\mu$ l 씩을 취하여 혼합한 후  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  희석한 후 10-11일령 SPF 종란 5개에 각각 100 $\mu$ l 접종함. 오전과 오후 검란하며 3일간 배양하여 냉장한 후 요막액을 수확하고, 평판혈구응집법을 수행한 후 바이러스 배출역가(EID<sub>50</sub>/0.1ml)를 측정함.
- 상기의 개체별 유제 원액 100 $\mu$ l를 10-11일령 SPF 발육란 3개에 접종하여 3일간 배양한 후 냉장하며 요막액을 수확하여 평판혈구응집법을 수행해 양성률을 측정함.

Vaccine	Challenge virus			
	01310		Field	
	배출역가	양성률	배출역가	양성률
01310 계열	P			
	C			
Field 계열	P			
	C			
PBS				

LMO 유해성 유해성 평가

농림축산검역본부고시 제2013-131호 동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정의 별표5에 고시된 유전자 변형 생물체 위해성 평가시험 항목에 대한 시험 수행.

[별표5]

유전자변형생물체 위해성 평가를 위한 자료

- 숙주에 관한 자료**  
 가. 명칭, 유래 및 분류학적 특성  
 나. 유전자변형생물체의 사용목적과 같은 용도로 이용된 경험  
 다. 숙주 및 근연종에서의 유해물질 생산 등 위해성 보고자료
- 공여체에 관한 자료**  
 가. 명칭, 유래 및 분류학적 특성  
 나. 유전자변형생물체의 사용목적과 같은 용도로 이용된 경험  
 다. 공여체 및 근연종에서의 유해물질 생산 등 위해성 보고자료
- 벡터에 관한 자료**  
 가. 명칭 및 유전요소의 유래  
 나. 벡터 내 유전적 요소 및 유전자 열거서열  
 다. 벡터가 다른 세포로 전달될 가능성 또는 숙주 의존성  
 라. 중간숙주에 대한 자료
- 도입유전자에 관한 자료**  
 가. 도입유전자의 명칭, 크기 및 기능  
 나. 조절인자 (전사개시인자 및 종결인자) 및 선발표지유전자  
 다. 그 밖의 조절인자 및 위해열거서열의 존재여부  
 라. 외인성(exogenous) 전사 해독프레임(open reading frame)의 유무 및 발현 정도
- 유전자변형생물체의 일반적 특성에 관한 자료**  
 가. 유전자변형생물체 내 도입된 유전자에 관한 자료  
 (1) 유전자변형생물체 내에 도입된 유전자의 도입위치 및 주변을 포함한 열거서열  
 (2) 유전자변형생물체 계통에 도입된 유전자의 도입부위의 수 및 복제 수  
 (3) 유전적 안정성 및 측정방법에 관한 자료  
 나. 유전자산물에 관한 자료  
 (1) 유전자산물의 일반 특성(단백질, 비번역 RNA 등)  
 (2) 유전자산물의 기능  
 (3) 도입결과 변화되는 표적단백질의 발현 정도, 시기 및 측정방법과 미의 민감도  
 다. 숙주와 유전자변형생물체의 생존 및 증식의 차이를 비교한 자료  
 라. 유전자변형생물체의 검출 및 확인방법

작출 바이러스의 배양법 확립(생산 공정기술 개발-1차년도 계속)

시험백신의 조성 및 생산 공정 개발(혼합백신)

- 1) ND, AI, AAV, IBV, aMPV, EDS 등 주요 가금질병 항원 중 혼합백신용 항원 조성 결정
- 2) 각 항원별 최소면역원성 시험 및 최적 항원함량 결정
- 3) 각 항원별 생산 공정 개발.

시험백신의 생산(H9N2포함 혼합사독 백신, H5N8/H5N1)

- CTC바이오 GMP공장 시험용역 의뢰
- 1,000수분/병, 100명 이상씩 각 3개 batch

야외 임상시험계획서 적성

야외임상시험 승인 신청

- 협동연구기관(서울대) :



1. H5N8(Donglim 3, clade 2.3.4.4)/H5N1(K10-483, clade 2.3.2.1) 백신주 개발

□ H5N8/H5N1 백신 후보주 특성 분석

- 바이러스 역가 측정 : EID<sub>50</sub>/ml

- 증사율 조사 : 10일령 SPF 종란 20개에 각각의 백신 후보주 10<sup>3.4</sup>EID<sub>50</sub>/egg 접종하여 3일간 오전/오후 검란하여 증사율 계산

- 마우스 병원성 조사(MDCK 증식성 조사로 대체 가능) : 6주령 BALB/c 마우스 암컷 5수에 각각의 백신 후보주 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub>/mouse 접종하고 2주간 매일 체중을 측정하여 병원성 유무를 평가

□ H5N8/H5N1 백신 효능평가-1(항체조사) : 상기 특성분석 결과 계태아 저병원성, 고증식성, 마우스 무병원성 백신 후보주(C) 2주(H5N8 1주/H5N1 1주)와 각각의 parent 재조합 바이러스(P)를 포르말린 불활화 바이러스 배양액(요막액)과 ISA70을 3:7의 비율로 섞어 오일 에멀전 백신을 제조하여 6주령 SPF 시험계 각각 25수를 5개군으로 나누어 H5N9 P, C, H5N1 P, C 백신 접종군, 음성대조군(PBS)에 5수씩 할당하여 접종한 후 3-4주후 항혈청을 수확하여 H5 바이러스(H5N8, H5N1 strains)와 H9N2 바이러스(01310)에 대해 HI, VN, plaque reduction tests 및 western blotting 실시

Vaccine	HI test			VN test			Plaque reduction test			Western blotting		
	H5 N8	H5 N1	H9	H5 N8	H5 N1	H9	H5 N8	H5 N1	H9	H5 N8	H5 N1	H9
H5N8	P											
	C											
H5N1	P											
	C											
PBS												

□ H5N8/H5N1 백신 효능평가-2(방어시험) :

→ 6주령 SPF 시험계 100수를 10개군으로 나누어, H5N8 및 H5N1 계열에서 선발된 parent 주와 백신 후보주 1주씩, 그리고 PBS를 접종하고, 3주후 H5N8(Donglim 3) 및 H5N1(K10-483) (10<sup>5.5</sup>EID<sub>50</sub>/0.1ml 내외 및 50-100CLD<sub>50</sub>/ck)을 비강으로 공격접종 함.

→ 접종 후 3, 5, 7, 9, 14일에 oropharyngeal swab 및 cloacal swab 시료 채취하고, real-time RT-PCR을 수행하여 바이러스 분비 역가를 측정하고, 14일간 폐사율을 측정함.

Vaccine	Challenge virus			
	H5N8(Donglim 3)		H5N1(K10-483)	
	폐사율	배출역가	폐사율	배출역가
H5N8	P			
	C			
H5N1	P			
	C			
PBS				

다. 3차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관((주)바이오포아) : 생독백신 및 사독백신 효능 극대화를 위한 백신프로그램 확립 및 제품화
- 협동연구기관(서울대) : 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 백신용 H5N8/H5N1 백신주 오리 면역원성 향상 기술 평가

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관((주)바이오포아) : **LMO 유해성 평가 시험 완료 및 시험백신의 야외임상시험승인 절차 진행**
  1. 2차년도 연계, 시험백신의 안정성 및 효력시험 지속 (6, 12, 18, 24개월)
  2. 2차년도 연계, 종독에 대한 LMO 유해성평가 시험 완료 후 보고서 작성
  3. 과제 2차년도 말 신청 야외임상시험을 진행하고 결과서 작성 및 품목허가 신청서를 작성하여 농림축산검역 본부에 신청서 접수함.

- 협동연구기관(서울대) : **계태아 저병원성/고생산성/유니버설 AI 사독백신 개발**

1. ND-H5N8/ND-H5N1 생독백신 및 사독백신 혼용법의 고병원성 HPAI 예방 효능 평가

**(1) 1일령 분무-3주령 사독백신 접종법**

ND-H5N8/ND-H5N1(1일령) + H5N8/H5N1 사독백신(3주령)

- 1일령 SPF 시험계 각각 40수에 ND-H5N8과 ND-H5N1을 분무 접종하고, 3주령에 H5N8 또는 H5N1 사독백신을 접종하고, 생독백신을 접종하지 않은 대조군 20수에는 PBS를 접종한 후 3주후 H5N8(Donglim 3) 및 H5N1(K10-483) ( $10^{5.5}EID_{50}/0.1ml$  내외 및 50-100CLD<sub>50</sub>/ck)을 비강으로 공격접종 함.
- 접종 후 3, 7, 14일에 oropharyngeal swab 및 cloacal swab 시료 채취하고, real-time RT-PCR을 수행하여 바이러스 분비 역가를 측정하고, 14일간 폐사율을 측정함.

생독백신	사독백신	Challenge virus					
		H5N8(Donglim 3)			H5N1(K10-483)		
		폐사율	배출역가		폐사율	배출역가	
		3	7	14	3	7	14
ND-H5N8	H5N8						
	H5N1						
ND-H5N1	H5N8						
	H5N1						
PBS							

**(2) 1일령 분무-2주령 분무-4주령 사독백신 접종법**

□ ND-H5N8/ND-H5N1(1일령) + ND-H5N8/ND-H5N1(2주령) +H5N8/H5N1 사독백신(4주령)

- 각 시험군에 10수의 SPF 시험계를 배정하고 1일령과 2주령에 해당 생독백신주를 분무로 접종하고, 4주령에 사독백신을 근육으로 접종한 후 3주후 H5N8(Donglim 3) 및 H5N1(K10-483) ( $10^{5.5}EID_{50}/0.1ml$  내외 및  $50-100CLD_{50}/ck$ )을 비강으로 공격접종 함. 음성대조군은 PBS만 접종한 후 동일한 방법으로 공격접종 함.
- 접종 후 3, 7, 14일에 oropharyngeal swab 및 cloacal swab 시료 채취하고, real-time RT-PCR을 수행하여 바이러스 분비 역가를 측정하고, 14일간 폐사율을 측정함.

생독백신 1차(1일령)	생독백신 2차(2주령)	사독백신 (4주령)	Challenge virus					
			H5N8(Donglim 3)			H5N1(K10-483)		
			폐사율	배출역가		폐사율	배출역가	
			3	7	14	3	7	14
ND-H5N8	ND-H5N8	H5N8						
		H5N1						
	ND-H5N1	H5N8						
		H5N1						
ND-H5N1	ND-H5N1	H5N1						
		H5N8						
	ND-H5N8	H5N1						
		H5N8						
PBS								

**2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 백신용 H5N8/H5N1 사독백신 오리 효능 향상 연구**

□ 면역복합체의 면역증강 효능 평가

- 항체 음성인 3주령 오리(Pekin duck) 100수를 10수씩 10개 시험군으로 나누고, H5N8 사독백신 (H5N8-C), H5N8 면역복합체 사독백신(H5N8-C+Ab; 불활화 후 항혈청 첨가하고 오일 에멀전 제조), H5N1 사독백신(H5N1-C), H5N1 면역복합체 사독백신(H5N1-C+Ab; 불활화 후 항혈청 첨가하고 오일 에멀전 제조), PBS 접종군에 H5N8 및 H5N1 야외주를 공격접종하고, 2주간 폐사율과 3, 7, 14일에

oropharyngeal swab 및 cloacal swab 시료 채취한 후 real-time RT-PCR 수행하여 바이러스 역가를 추정함.

Vaccine	Challenge virus							
	H5N8(Donglim 3)			H5N1(K10-483)				
	폐사율	배출역가		폐사율	배출역가			
		3	7	14		3	7	14
H5N8	C							
	C+Ab							
H5N1	C							
	C+Ab							
PBS								

## 2장. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 연구개발의 정량적 성과

#### 2-1-1. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Generation of highly productive and mammalian nonpathogenic recombinant H9N2 avian influenza viruses by optimization of 3'end promoter and NS genome	Veterinary Microbiology	안세희	228	국외		SCI (IF:2.79)	2019.1	
2	Bioengineering a highly productive vaccine strain in embryonated chicken eggs and mammals from a non-pathogenic clade 2.3.2.1c H5N8 strain	Vaccine	안세희	37	국외		SCI (IF:3.27)	2019.9	
3	Novel Mutations Evading Avian Immunity around the Receptor Binding Site of the Clade 2.3.2.1c Hemagglutinin Gene Reduce Viral Thermostability and Mammalian Pathogenicity	Viruses	안세희	11,923	국외		SCI (IF:3.79)	2019.10	

#### 2-1-2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	대한수의학회	안세희	2017.10.26.	전남 여수 디오션리조트	대한민국
2	33회 세계수의사대회	이청용	2017.8.27.~31	인천	대한민국
3	33회 세계수의사대회	안세희	2017.8.27.~31	인천	대한민국
4	33회 세계수의사대회	김지운	2017.8.27.~31	인천	대한민국
5	2017 ERD day	안세희	2017.11.10	서울대학교	대한민국
6	2018 world influenza conference(WIC)	안세희	2018.09.08	베이징	중국

#### 2-1-3. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	BP-NDV-C7d-AIV-H5N6	KCTC13576BP	생물자원센터(KCTC)	2018
2	r01310E20-NS(0028)	KCTC13269BP	생물자원센터(KCTC)	2017
3	BP-NDV-C7d	KCTC13595BP	생물자원센터(KCTC)	2018
4	BP-NDV-C7d-AIV-H9N2	KCTC13924BP	생물자원센터(KCTC)	2019
5	BP-NDV-C7d-AIV-H5N1	KCTC13923BP	생물자원센터(KCTC)	2019

2-1-4. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품증, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			기여율
			출원인	출원일	출원번호	
1	변이 뉴캐슬병 바이러스 및 상기 바이러스를 이용한 조류 백신	대한민국	(주)바이오포아	2019.10	10-2019-0129585	100
2	조류 인플루엔자 바이러스 H5N6의 표면항원을 발현하는 뉴캐슬병 바이러스 발현 시스템 및 이를 이용한 조류 백신	대한민국	(주)바이오포아	2019.10	10-2019-0129584	100
3	조류 인플루엔자 바이러스 H9N2의 표면항원을 발현하는 뉴캐슬병 바이러스 발현 시스템 및 이를 이용한 조류 백신	대한민국	(주)바이오포아	2019.10	10-2019-0129583	100
4	계태아 저병원성 및 발육란 고증식성 재조합 H9N2 인플루엔자 바이러스	대한민국	서울대학교	2019		100
5	포유류무병원성, 발육란고증식성, 내열성, 약독화 클레이드 2.3.4.4a H5N8 재조합 인플루엔자 A 바이러스	대한민국	서울대학교	2019		100

2-1-5. 전문 연구 인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
	협동	2019	1				1		1					
	협동	2019		1				1	1					

2-1-6. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
	협동기관 기술 이전실시					
	협동기관 기술 이전실시					
	협동기관 기술 이전실시					

2-1-7. 사업화 투자실적

No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격
		생산 및 연구개발용 GMP 건물 신축 (건축 준공 완료) 설계 건축 60억 생산 시설 25억	생산 및 연구개발용 부지 매입 43억	약 128억	투자유치 (과제시작 전 80억 1차년도 20억, 3차년도 30억)

## 2-2. 연구개발의 정성적 성과 목표 및 결과요약

구분 (연도)	세부과 제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2017)	주관: NDV vector 이용한 AI 유니버 설 백신 개발	조류인플루엔자 표면 항원 발현 NDV 벡터 작성 (6종)	Genotype VII NDV를 비병원성 vector로 개발 (C7d로 명명) ①C7d에 H9N2의 HA 발현벡터 작성 ②C7d에 H9N2의 HA, NA 발현 벡터 작성 ③C7d에 H5N8의 HA 발현벡터 작성 ④C7d에 H5N8의 HA, NA 발현 벡터 작성 ⑤C7d에 H5N1의 HA 발현벡터 작성 ⑥C7d에 H5N1의 HA, NA 발현벡터 작성 ⑦C7d에 H5N6의 HA 발현벡터 작성	당초 목표에서 H5N1, H5N8과 H9N2에 대한 6종을 작성할 예정이었으나, H5N6를 추가하여 총 <b>7종 이상을 작성</b> 하였음.
		키메라AIV HA, NA 항원 발현 백신종독 추출 rNDV-H9	역유전학 NDV벡터 시스템을 이용하여 ①C7d에 H9N2의 HA 발현 virus 추출 ②C7d에 H9N2의 HA, NA 발현 virus 추출	당초 목표한 H9N2 발현 <b>키메라 NDV 2종 추출 달성</b> 하였음.
		키메라AIV HA, NA 항원 발현 백신종독 추출 rNDV-H5	역유전학 NDV벡터 시스템을 이용하여 ①C7d에 H5N1의 HA 발현 virus 추출 ②C7d에 H5N1의 HA, NA 발현 virus 추출 ③C7d에 H5N8의 HA 발현 virus 추출 ④C7d에 H5N8의 HA, NA 발현 virus 추출 ⑤C7d에 H5N6의 HA 발현 virus 추출	당초 목표한 H5N1, H5N8 발현 <b>키메라 NDV 4종의 H5N6 발현 키메라 NDV 추가, 총 5종 추출</b> 하였음.
	협동: AI 사독백 신 개발	H9N2 mutagenesis	- H9N2 01310 바이러스 HA 유전자의 common epitope 변형 돌연변이 유전자 확보 - RBC 인근 N-glycan 돌연변이 유전자 확보	- H9N2 01310 바이러스 HA 유전자의 common epitope 변형 돌연변이 유전자 확보 완료. - RBC 인근 N-glycan 돌연변이 유전자 확보 완료.
		H9N2 바이러스 추출	- HA 및 NA 돌연변이 중 바이러스 증식성, 면역원성 우수한 유전자 선별용 바이러스 추출 - 고증식성 재조합 바이러스 선발 - 고면역원성 야외 H9N2 재조합 바이러스 선발	- HA 및 NA 돌연변이 중 바이러스 증식성, 면역원성 우수한 유전자 선별용 바이러스 추출 완료. - 0028 바이러스의 NS 유전자를 통한 고증식성, 저병원성 바이러스 추출 완료. - Common epitope 노출된 HA 유전자를 통한 고면역원성 재조합 바이러스 추출 완료.
		H9N2 바이러스 특성분석	- 합성된 바이러스의 역가 측정 - 합성된 재조합 바이러스의 중사율 조사	- 합성된 바이러스의 역가 측정 완료. - 0028 NS 유전자 도입 재조합 H9N2 바이러스의 중사율 평가 완료.
		Internal gene 최적화 H9N2백신주추출	- Polymerase 유전자 promoter 서열의 변이에 따른 바이러스 합성 - 0028 NS 유전자를 활용한 고증식성, 저병원성 바이러스 합성	- Polymerase 유전자 promoter 서열에 U를 도입함으로써 성공적으로 H9N2 재조합 바이러스 합성 완료. - 0028 NS 유전자를 활용한 고증식성, 저병원성 바이러스 합성 완료.
		H5N8 / H5N1 mutagenesis	- 국내 유행 H5N8, H5N6, H5N1 바이러스의 consensus 유전자 합성 - Common epitope 돌연변이 유전자 합성 - HA1의 RBS 부위 돌연변이 유전자 합성	- 국내 유행 H5N8, H5N6, H5N1 바이러스의 consensus 유전자 합성 완료. - Common epitope 돌연변이 유전자 합성 완료. - HA1의 RBS 부위 돌연변이 유전자 합성 완료.

구분 (연도)	세부과 제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	
2차 년도 (2018)	주관: NDV vector 이용한 AI 유니버 설 백신 개발	키메라AIV HA, NA항 원발현 백터 작성 및 백 신종독 작출 rNDV-H5	1차년도에 작성된 12종의 키메라AIV HA, NA 항원발현 백터 작성 및 백신종독 작출에 이어 3종 작성 및 작출 수행	백터3종 작성 및 국내최근 유행HPAI에 대한 NDV백터 백신 종독 <b>3주 추가 작출완료</b>	
		Master seed 특성실험 (In vitro & In vivo)	1. 병원성: MDT(embryo mean death time)측정 ICPI(Intra cerebral pathic index)측정 2. 증식성:Embryo infectious dose(EID50) 측정 3. 증식성: 계대아 배양후 HA titer 측정 4. 안정성: 계대별 유전적 안정성 측정 종란계대 20대까지 유전적 안정성(수행중) 생체계대 5대까지 유전적 안정성(수행예정) 5. 안전성: 1일령 병아리 접종 역가별 안전성 6주령 병아리에서의 안전성 6. 면역원성 : 불활화백신 접종 후 HI, SN titer측정 생백신 접종 후 HI, SN titer측정	수행완료 수행예정 수행완료 수행완료 <b>구체적시험결과 아래 첨부</b> 수행완료 수행중 수행완료 수행완료	
		LMO 유해성평가 및 IND계획서작성	농림축산검역본부고시 제2013-131호 동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정의 별표5에 고시된 유전자 변형 생물체 위해성 평가시험 항목에 대한 시험 수행.	1. 숙주에 관한자료: 작성완료 2. 공여체에 관한 자료: 작성완료 3. 백터에 관한 자료: 작성완료 4. 도입유전자에 자료: 작성완료 5. 유전자변형생물체의 일반 특성: 작성 중(3차년도 내 완료 예정)	
		작출바이러스의 배양법 확립	SPF종란에서의 배양법 확립 일반 종란에서의 배양법 확립	수행완료 수행완료	
		시험백신 조성 및 생산 공정 개발	SPF종란에서의 배양법 확립(생독백신) 일반 종란에서의 배양법 확립(사독백신) 생산공정 개발(생산시설 및 공정 개발)	수행완료 수행완료	
		시험백신 생산	GMP 시설을 보유한 CTC-bio와의 MOU체결 1000수분 100병 3개 batch생산(NDV-AIV-H5N6)	체결 생산 중	
		야외임상시험계획서작성	- 고병원성 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 생독 백터 백신 - 고병원성 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 사독 백터 백신	정책제안 후 단계적 사업화 진행 중	
		협동: univer sal protec tive한 HPAI 용 재조합 사독백 신주 개발	재조합 H9N2 바이러스 백신효능평가-2	- 프로모터 변이를 통한 고증식성 H9N2 바이러스 제작 및 평가. - Universal protection 전략을 적용한 재조합 H9N2 바이러스 제작 및 평가.	- H9N2 01310, 0028 바이러스의 프로모터 변이를 통해 고증식성의 H9N2 바이러스 확보 완료. - HA2 common epitope과 M2e 노출시킨 H9N2 재조합 바이러스 제작 및 증식성 평가 완료. - 사독백신 접종 후 항체가 및 HA2 항체 평가 완료.
			H5N8/H5N6/H5N1 백신 후보주 특성 분석	- PR8 바이러스의 내부유전자를 이용하여 재조합 H5N8/H5N6/H5N1 바이러스 제작 및 평가.	- PR8 backbone 바이러스를 이용하여 합성한 HA와 NA의 발육란 및 포유류 세포에서의 증식성 확인 완료. - H5N8 바이러스의 증식성에 영향을 주는 HA변이 확인.
			Internal genes 최적화 H5N8/H5N6/H5N1 바이 러스 제작 및 특성 분석	-저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 내부유전자를 재조합한 H5N8/H5N6/H5N1 바이러스 제작 및 평가.	- 01310 PB2를 재조합한 바이러스의 발육란에서의 증식성 향상 확인 완료. - HPAI database와 비교를 통한 세포성면역에 유리한 NP, M을 가지는 재조합 바이러스 제작 완료. - 조류인플루엔자 내부유전자를 재조합한 바이러스의 발육란 및 포유류세포에서의 증식성 평가 완료.
	H5N8/H5N6 백신효능평 가-1(항체조사)		- 증식성을 높이는 HA변이를 적용한 PR8 backbone 재조합 H5N8/H5N6 바이러스의 항체 형성능 평가.	- 재조합 바이러스의 사독백신 접종 후 혈청 내 항체가 평가 완료.	



구분 (연도)	세부과 제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2019)	주관:	Master seed 특성실험 (In vitro & In vivo)	1. 병원성: MDT(embryo mean death time)측정 ICPI(Intra cerebral pathic index)측정 2. 증식성:Embryo infectious dose(EID50) 측정 3. 증식성: 계대아 배양후 HA titer 측정 4. 안정성: 계대별 유전적 안정성 측정 종란계대 20대까지 유전적 안정성 생체계대 5대까지 유전적 안정성 5. 안전성: 1일령 병아리 접종 역가별 안전성 6주령 병아리에서의 안전성 6. 면역원성:불활화백신 접종 후 HI, SN측정 생백신 접종 후 HI, SN측정	수행완료 수행예정 수행완료 수행완료 구체적시험결과 아래 첨부 수행완료 수행중 수행완료 수행완료 수행완료 수행완료
		시험백신 생산	1000수분 30병 3개 batch 생산 : NDV-AIV-H5N6 생독 1000수분 30병 3개 batch 생산 : NDV-AIV-H9N2 사독	수행완료  수행완료
		LMO 유해성평가	농림축산검역본부고시 제2013-131호 동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정의 별표5에 고시된 유전자 변형 생물체 위해성 평가시험 항목에 대한 시험 수행.	작성완료
		야외임상시험 승인 신청 야외임상시험 수행	국가주요관리 질병으로 개별허가 승인 불가하여 정책 제안 후 단계별 사업화 수행	검역본부연구과제에 직접 참여하여 ND백터 H5N6백신의 효력 평가 완료, ND백터 H9N2백신 개발과제 제안서 채택
	협동:	H5N8/H5N1 백신효 능평가-2(방어시험)	- 1,2차년도에 제작된 고증식성, 포유류 저병원성 제조합 H5N8, H5N6 백신주를 불활화하여 oil-adjutant 사독백신으로 제작 - 제작한 백신을 3주령 SPF닭에 접종 후, 국내 H5N6 야외분리주를 공격접종하여 방어능 및 바이러스 shedding 평가	- HA유전자에 단일 변이를 적용하여 증식성이 높고, 내열성이 높으며, 01310바이러스의 PB2 유전자를 제조합하여 포유류에서의 병원성을 낮춘 안전한 사독백신주를 개발함. - 3주령 닭에 접종 후, H5N6 야외주로 공격접종 하였을 때 다른 subtype임에도 불구하고 100% 방어능을 보였음. - 내부유전자를 맞춘 바이러스의 경우 같은 subtype인 H5N6백신주에서 shedding이 더 짧은 기간 동안 나타나는 것을 확인하였음.
		1일령분무-3주령사 독백신병용접종법평 가	- NDV백터에 넣은 H5N6바이러스를 1일령에 분무 접종 후, 고증식성, 포유류 무병원성 제조합 H5N6 사독백신을 3주령에 접종하여 항체형성능 평가	- 오리에서 사독백신의 효능이 낮은 것을 보완하기 위해서 1일령에 NDV 백터 H5N6 백신을 분무 후, 접종 1주, 2주에 제조합 H5N6 사독백신으로 보강접종한 결과, 사독백신만 한 계군보다 약간 높은 항체가를 보였음.
		H5N8/H5N1 사독백 신오리효능향상연구	- 고증식성, 포유류 저병원성 제조합 H5N8, H5N6 사독백신을 오리에서 1일령, 2주령, 4주령에 접종 후 항체형성능 비교 평가 -오리에서 NDV백터에 넣은 H5N6바이러스를 1일령에 분무 접종 후, 고증식성, 포유류 무병원성 제조합 H5N6 사독백신을 접종하여 항체형성능 평가	- 오리에 사독백신을 접종한 결과 1일령에서는 거의 항체가 형성되지 않았으며, 2주는 약간 증가하였고, 4주차에 가장 높게 나타나 일령에 따라 면역형성능이 증가하여서 항체형성이 증가됨을 확인함. - 더 높은 면역을 위해 1일령에 분무 후 사독백신을 접종한 결과 사독백신만 접종한 것과 약간 더 높은 항체가를 보임. - 1일령에 분무만 한 경우, 항체가 거의 나타나지 않음.

## 2-3. 연차별 연구수행 내용 요약

안전성이 입증된 NDV 백신에 조류인플루엔자 방어에 중요한 표면항원을 발현하여 DIVA가 가능한 생독 백신주 및 사독 백신주를 제작하였으며 국내 비상용 H5 사독백신의 제품화를 위해 기존 사독백신 대비 효능이 향상되고 변이주에 대한 방어능력이 개선된 AIV 사독 백신주를 제작하였음. 또한 개발된 균주에 대해 AIV에 대한 완벽한 방어효과를 얻기 위한 프라이밍-부스팅 백신프로그램을 개발함.

### 1) AIV 표면항원 발현 재조합 NDV 제작

현재까지 국내외에서 사용 중인 뉴캐슬병 백신은 모두 1900년대 초·중반에 분리된 genotype I형 혹은 II형 바이러스들임. 2000년 이후의 야외분리 강병원성 뉴캐슬병 바이러스는 70여 년 전에 분리되어 백신으로 사용되어지던 LaSota주 등과 유전적으로 20%이상 차이를 보이며 백신을 접종한 계군에서도 산란율이 떨어뜨리는 등 경제적 피해를 일으키고 있음.

그러므로 단순히 국내에서 분리된 약병원성 주를 백신으로 개발할 경우 현재의 문제를 극복할 수 없음. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 야외의 강병원성 주의 병원성을 조절한 약 병원성 뉴캐슬병 바이러스를 개발하여야 함.

NDV C7d는 아시아를 비롯한 전 세계에서 유행하고 있는 Genotype VII NDV의 유전형을 갖고 있으나 F 단백질의 cleavage site는 약병원성의 특성을 띠도록 작성된 인공 바이러스 임. 즉, 2008년 경기도에서 검출된 강병원성 뉴캐슬 바이러스의 염기서열을 근간으로 하되 F 단백질의 cleavage site 아미노산 서열은 세포내 효소에 의해 분절이 되지 않도록 "112-GRQARL-117" 서열이 되도록 인공 합성한 바이러스 임. 그러므로 백신으로 사용될 때 발현항원 뿐 아니라 NDV에 대한 방어 효능도 뛰어나며, 이론적으로 병원성 복귀의 가능성 또한 거의 없는 매우 안전한 바이러스임.

지금까지 NDV 백신에서 다양한 항원을 발현하는 수많은 연구들이 있었으나 대부분 Lasota를 backbone으로 개발된 백신임. 이러한 백신시스템으로부터 작출된 바이러스는 NDV에 대한 면역항체가 존재하지 않는 동물에서는 효과가 확인되었으나, NDV에 대한 면역항체가 있는 상용계에서는 효과가 없다고 알려져 있으며 모계로부터 물려받은 항체들이 백신 바이러스를 중화하여 성공적인 면역형성을 방해할 수 있음.

생백신 백신으로 사용되기 위해서는 바이러스의 안정성(내열성) 및 생산성(증식성) 그리고 모체이행항체를 극복할 수 있는 특성이 중요하며 이러한 점을 고려할 때 현재 까지 알려진 NDV vector중 가장 탁월한 vector임.

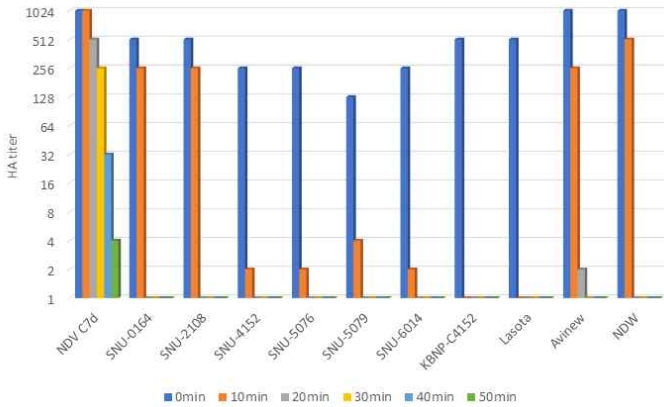
#### 가. NDV C7d 재조합 바이러스의 안정성 및 내열성

뉴캐슬병 바이러스에 대한 역 유전학 기술은 미국을 비롯한 선진국에서 먼저 기술 개발이 이루어져 왔으나 야외 강독주의 항원성을 비병원성 백신주에 이식하는 기술은 본연구팀((주)바이오포아)이 세계 최초로 적용하여 상용화에 이르고 있음.

분무용 생백신주는 열에 대한 안정성이 있어야만 백신 바이러스가 환경에서 쉽게 사멸하지 않고 지속적으로 면역 자극을 줄 수 있으므로 내열성 특성이 요구됨. 그러나 본 연구팀이 기 개발한 백신주의 경우 야외 강독주의 F, HN유전자를 이식받은 비병원성 바이러스를 내열성이 없는 LaSota주를 이용하였기 때문에 사독 백신용으로는 최고의 백신 종독이었으나 분무용 생 백신 주로 사용하기에 내열성이 떨어져 백신의 안정성이 취약한 단점이 있음.

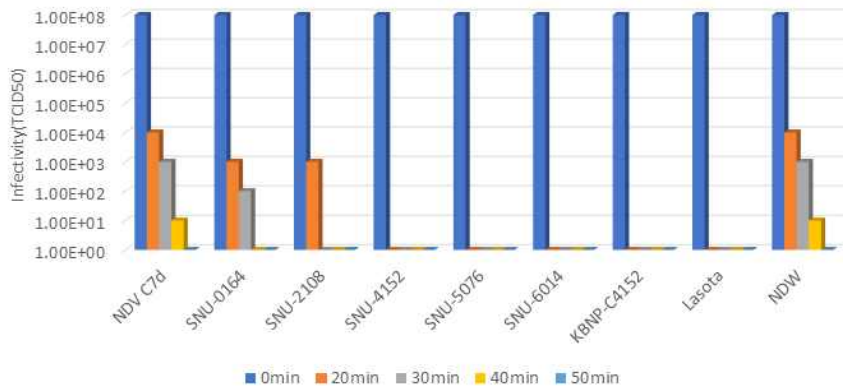
본 연구에서 표면 단백질의 안정성(내열성)을 보기 위해 56℃로 열처리 후 혈구응집능력을 평가해 보았음. NDV C7d는 열처리 후에도 50분 이상 혈구응집능력을 유지하여 Genotype VII유래 주들(SNU-0164, 2108, 4152, 5079, 6014)과 비병원성 백신주 KBNP-C4152, Lasota, Avinew, NDW등 타 NDV 보다 월등한 안정성을 보였음.

56°C 처리 후 HA Titer 비교



열처리한 바이러스를 CEK에 감염시켜 바이러스의 감염역가를 측정해 보았을 때도 NDV C7d주는 현재 까지 가장 내열성이 뛰어나다고 알려진 NDW와 동등한 내열성을 보여 주었음.

56°C 처리 후 Infectivity Titer 비교



#### 나. NDV C7d-AIV 재조합 바이러스의 모체이행항체 및 능동면역항체 극복능력

NDV를 벡터로 사용하기 위해서는 NDV에 대한 모체이행항체나 능동면역항체를 가지고 있는 상용계에서 이들 항체를 극복하고 면역을 유도할 수 있는 능력이 필수적임. NDV를 벡터로 다양한 항원을 발현하는 수많은 연구들이 있었으나 이들 대부분은 Lasota를 backbone로 개발된 벡터임. 그러나 최근 연구결과(David E. Swayne, 2018, Vaccine 36, p6361~6372)에서도 Lasota를 backbone으로 한 벡터는 NDV에 대한 면역항체가 존재하지 않는 SPF 동물에서는 효과가 확인되었으나, NDV에 대한 면역항체가 있는 상용계에서는 효과가 없다고 확인된바 있음. 1일령에서 모체이행항체가 확인된(AIV HIT 2, NDV HIT 64이상) 병아리에 Lasota backbone H5(clade 2.3.4.4) 재조합 바이러스를 1일령 혹은 1일령+3주령에 7.0 log<sub>10</sub>EID<sub>50</sub> 분무백신 후 5주령에 homologous H5(clade 2.3.4.4) 바이러스로 6.9 log<sub>10</sub>EID<sub>50</sub> 공격 접종하였을 경우 rNDV-H5 Lasota 재조합백신 바이러스에 의한 면역항체가 유도되지 못해 공격접종에 따른 폐사를 막지 못함을 확인 함.

최근 이러한 문제를 극복하고자 표면단백질인 F와 HN을 2형 Paramyxovirus로 치환한 키메라가 만들어 졌으나 면역 전달 능력은 뛰어나지 않았음(Siba K. Samal, 2017, Vaccine 35, p4133~4139).

본 연구과제에서 NDV C7d를 벡터로 하여 국내외에서 유행하는 HPAI clade 2.3.4.4 H5N6의 HA와 NA유전자를 발현한 경우 높은 역가(7.3log<sub>2</sub>)의 NDV 특이 모체이행항체를 갖는 1일령 병아리 뿐 아니라 능동면역항체가 있는 중병아리에서도 높은 능동면역이 이루어짐이 확인되어 NDV C7d가 탁월한 벡터임이 증명되었음.

높은 모체이행항체(7.3log<sub>2</sub> HI titer)를 갖는 산란계 병아리에서의 NDV C7d backbone바이러스의 백신 효능(방어능)평가를 수행함. 1일령 산란계 병아리에 백신(바이오포아 HA백신: BP-HA)의 1수분을 사용법에 따라 접종하고 2주후에 시험군 및 대조군에 공격용 바이러스(H5N6:A/broiler duck/Korea/ES2/2016(Clade 2.3.4.4C))를 마리당 10<sup>4.0</sup> ~ 10<sup>5.0</sup>ELD<sub>50</sub>을 비강으로 공격접종하고 14일간 이상 유무를 관찰함. 초생추 1일령에 백신접종 2주후에 비백신 대조군의 경우 ND에 대한 HIT가 2.9±0.8로 초생추 1일령의 7.3±1.1의 높은 모체이행항체가 점차 감소하였으나 백신 접종군의 경우 점안접종은 4.3±1.0, 분무접종군은 4.9±1.3으로 대조군과 달리 능동 면역에 의해 항체가 증가함을 확인하였으며 AI에 대한 HIT는 점안(2.8±0.6) 보다는 분무접종군에서 좀더 높게 나타났음(3.8±0.6). 공격접종 시험에서 백신접종 그룹은 14dpi까지 모두 100%생존하였지만 대조군의 경우 1마리만(1/5, 20%) 생존하였고, 대조군과 달리 백신 접종군에서는 인후두에서는 공격바이러스가 배출되지 않았으며, 총백설강에서는 분무한 경우 바이러스배출 억제력이 통계학적으로 유의성 있게 차이를 보였음(p<0.01).

표. BP-AI(NDV C7d-H5N6) 1일령 분무접종 2주후 NDV에 대한 항체가 측정결과

백신접종					공격접종		
백신 그룹	접종 루트	접종 (수)	dose	백신항체가 (14dpv)	공격 접종주	Virus titer (ELD <sub>50</sub> /0.1ml)	HI titer (14dpi)
BP-HA	점안	14	1	4.3±1.0	Kr-005/00 (NDV)	5.5	10.8±1.6
BP-HA	분무	10	1	4.9±1.3			9.3±1.2
Control	-	15	-	2.9±0.8			11*

\* 비백신 대조군 1마리 생존(1/15)

표. BP-AI(NDV C7d-H5N6) 1일령 분무접종 2주후 AI에 대한 항체가 측정결과

백신접종					공격접종		
백신 그룹	접종 루트	접종 (수)	dose	백신항체가 (14dpv)	공격 접종주	Virus titer (ELD <sub>50</sub> /0.1ml)	HI titer (14dpi)
BP-HA	점안	5	1	2.8±0.6	ES2 (Cl.2.3.4.4)	5.0	5.8±1.2
BP-HA	분무	5	1	3.8±0.6			6.3±0.8
Control	-	5	-	-			-

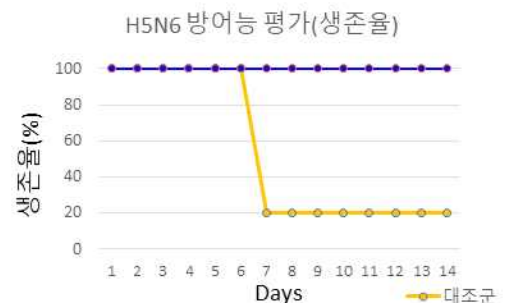


그림. HPAI 및 ND 공격시험에 대한 방어능 평가(생존율)

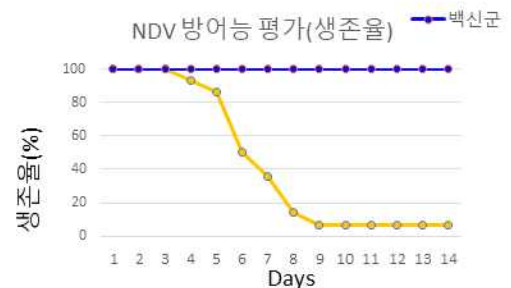


표. BP-HA(NDV C7d-H5N6) 백신접종군의 인후두 및 총배설장에서 AI 공격접종바이러스의 배출확인

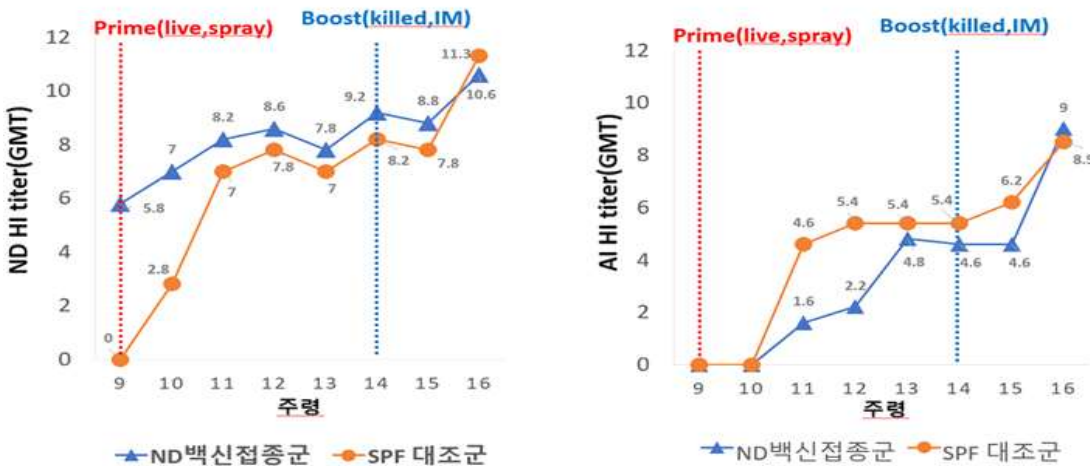
Challenge virus	Group	Sample	No. of chickens shedding virus/total no. chickens on day p.c. (viral titer, log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /0.1ml, mean±standard deviation)					Survival /total
			3	5	7	10	14	
2.3.4.4C (ES2, H5N6) HPAIV	BP-HA (점안)	OP	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
		CL	0/5	2/5 (2.7±0.3)	0/5	0/5	0/5	
	BP-HA (분무)	OP	1/5 (1.5)	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
		CL	0/5	1/5 (1.6)*	0/5	0/5	0/5	
	Control	OP	2/5 (2.9±0.5)	3/5 (1.5±0.5)	0/1	0/1	0/1	1/5
		CL	0/5	3/5 (3.2±0.5)*	0/1	0/1	0/1	

\* 대조군의 총배설장과 비교하여 바이러스배출 억제가 통계학적으로 유의성 있게 나타남 (p<0.01)

공격 접종한 HPAI 바이러스의 배출의 억제 정도를 확인하기 위해 공격접종 후 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 후 공격접종 바이러스를 인후두(OP) 및 총배설장(CL)에서 면봉으로 시료를 채취하여 10진 희석 후 바이러스를 분리 배양하여 분리율 및 역가를 측정

6주령 때 ND 불활화 백신을 접종하여 능동면역이 형성된 SPF닭에서의 NDV 벡터백신의 항체형성능을 평가함. ND 불활화 백신 3주 후 대조군(무백신 그룹)과 ND 백신군에 NDV(C7d)-H5N6 vector live vaccine을 1수당 10<sup>6.5</sup>EID<sub>50</sub>씩 분무 접종하고, 5주후에 NDV(C7d)-H5N6 vector inactivated vaccine을 1수당 10<sup>8.0</sup>EID<sub>50</sub>씩 근육 접종함. 매주 채혈하여 항체가 측정결과 ND 불활화백신에 의한 높은 능동면역(NDV HIT 6.0)을 극복하고 무백신 대조군과 동일수준의 ND, AI에 대한 항체형성이 확인됨.

그림. 능동면역 형성 계체 내 NDV 벡터백신의 효능평가시험



◆ 결론 : 실험동물이 SPF닭이 아니라 NDV에 대해 높은 모체이행항체가 있는 산란계 1일령 병아리에 적용한 것과 고도의 능동면역이 이루어진 닭에서 적용된 것을 고려할 때 ND벡터를 활용한 HPAI백신은 향후 현장적용가능성이 매우 높을 것으로 생각됨.

\* 사독백신의 경우 AIV에 대한 항체가 형성된 이후에는 HPAIV에 의한 폐사 및 바이러스 배출을 낮추어 바이러스의 확산을 줄이고 살처분 시간의 확보가 가능하나 생독에 비해 면역이 유도되는 기간이 오래 걸리는 단점이 있음. NDV 벡터발현 AI 생독백신주는 In-Ovo 또는 1일령 분무백신이 가능하여 현재 긴급백신(링백신) 목적으로 사용하는 사독백신의 단점을 보완할 수 있고, 완벽한 방어효과를 위해 생독백신프라이밍-사독백신 부스팅 백신전략에 적용가능 함. 또한 NDV 벡터백신에 의한 프라이밍-부스팅 백신전략 사용 시 백신과 감염을 구분할 수 있는 장점이 있음.

## 2) 고증식성 및 저병원성 HPAI용 재조합 사독백신주 개발(서울대)

### 1) 계태아 고생산성, 포유류 저병원성 재조합 HPAI/LPAI 사독백신주 개발

#### ● 계태아 고생산성, 포유류 저병원성 사독백신 개발의 필요성

- OIE에서는 발육란 접종 시 3일 이내에 10% 미만의 계태아 증사율을 보이는 AI 백신주를 사용할 것을 권고하고 있으며 2일 이내에 높은 폐사율을 일으키는 경우 바이러스 역가가 높더라도 수확할 수 있는 요막액의 양이 많지 않아 생산성이 높지 않은 단점이 있음. 따라서, 높은 역가로 증식을 하되 3일 이내에 계태아 증사율이 높지 않은 경우 다량의 요막액을 수확할 수 있어 생산성이 높게 나타나므로 이러한 특성을 갖는 백신주를 제작할 필요가 있음.
- PR8 바이러스는 발육란 증식성이 뛰어나 백신주 제작 시 internal genes donor로 선호되고 있으나 마우스에 적응시킨 바이러스로 50% mouse lethal dose가  $10^{4.5}$ EID<sub>50</sub>/mouse 정도이며 이러한 병원성은 internal genes과 관련이 있어서 PR8 internal genes을 갖는 H5N1 백신주의 경우 마우스에서 체중감소와 폐사를 초래하는 것으로 알려져 있어 백신 제조 과정중의 biosafety/ biosecurity 면에서 발육란 증식성이 뛰어나면서도 마우스 병원성이 없는 internal genes 개발이 중요함.

#### ● 연구 결과

##### (1) 계태아 고생산성, 포유류 저병원성 사독백신 제작 및 평가

- 해당 과제를 통하여 개발된 계태아 고생산성, 포유류 저병원성 HPAI 및 LPAI 사독백신주는 양방향성 벡터인 pHW2000과 A/PR/8/34 (H1N1) (이하 PR8)의 유전자를 사용하여 제작되었음(Hoffmann, Erich, et al. 2002).
- 기존의 재조합 사독백신의 경우 HA와 NA만을 치환하여 중화항체를 증가시키는 방향으로 이루어졌으나, 본 연구 과제에서는 PR8 바이러스의 내부유전자를 포유류에서의 병원성이 없는 유전자로 치환함(01310 바이러스의 PB2 유전자, 0028바이러스의 NS 유전자)으로써 포유류에서의 병원성이 제거된 백신주를 제작하였음.
- 국내에서 사용되는 H9N2 백신주의 계태아 병원성을 개선하고자 기존의 방식으로 작출되지 않던 01310 바이러스를 polymerase protein의 promoter 서열 최적화(C4 to U4)를 통하여 작출이 가능하도록 하였음. 이 보완된 역유전자 방식을 이용하여 0028바이러스의 NS 유전자를 재조합한 01310-NS(0028) 바이러스를 제작하였으며, 이는 기존의 01310바이러스와는 달리 계태아에서의 병원성이 현저히 감소함에 따라 계태아에서의 생산성이 증가하였음을 확인하였음.
- 국내에서 발생하였던 clade 2.3.2.1c H5N1 바이러스에 대한 재조합 백신을 제작하기 위해서 K10-483이라는 국내 분리주의 HA, NA 유전자와 01310바이러스의 PB2 유전자를 재조합한 바이러스를 개발하였음
- clade 2.3.4.4 H5N8, H5N6에 대한 백신을 개발하기 위해서 국내외에서 분리된 바이러스의 서열을 모두 취합하여 가장 일치율이 높은 HA, NA유전자를 합성하였고, 역유전학을 통하여 재조합 바이러스를 제작하였음. 그러나 H5N8 재조합 바이러스의 경우 발육란에서의 역가가 낮아 다른 LPAI H5N1 바이러스 (snu50-5) 계대 시 획득한 변이 중 H103Y변이를 적용하여, 발육란에서 증식성이 높고 또한 내열성까지 증가한 재조합 바이러스를 성공적으로 작출하였음.
- 이에 더하여 01310바이러스의 PB2 유전자를 재조합함으로써 포유류 세포에 접종 시와 마우스 접종 시 바이러스가 증식을 하지 못하는 것을 확인함으로써 포유류 저병원성 사독백신으로 이용가능함을 확인하였음.

##### (2) 계태아 고생산성, 포유류 저병원성 사독백신의 항체형성능 평가

- 해당 과제를 통해 제작한 계태아 고생산성, 포유류 저병원성 HPAI, LPAI 사독백신주를 BEI를 이용하여 불활화한 후 ISA70으로 oil-adjuvant 백신으로 제작하여 닭에서의 항체형성능 및 공격접종 시의 방어능을 평가하였음.
- 3주령 SPF닭에 단회 접종 시에도 항체가 높은 수준으로 나타났으며, 야외주 H5N6 HPAI를 100% 방어하였음.

## 2) 유니버설 백신 제작

### ● 유니버설 백신 제작의 필요성

- HA 단백질의 HA2 common epitope은 혈청형 간에 대부분 보존되어 있으며 이 부분에 대한 항체는 heterosubtypic protection이 가능한 것으로 알려져 있음. 그러나, 인근에 존재하는 N-glycans이 epitope 인식을 방해하고 항체 결합도 방해하여 면역원성이 높지 않을 것으로 판단됨. 따라서, **HA2 common epitope** 인근의 **154N-glycan**을 제거하고, **NA stalk**에 존재하는 N-glycans을 제거하면 면역원성을 높일 수 있을 것으로 기대되므로 이에 대한 연구가 중요함. 그러나 N-glycan 제거를 위해서는 N-X-S/T motif에 돌연변이를 일으켜야 하는데 돌연변이에 따라 바이러스 증식을 저하시키는 경우가 있어 증식성 변화시키지 않는 최적의 돌연변이를 선별해야 함.
- Internal genes은 polymerases(PB2, PB1, PA), NP, M, NS 단백질을 코딩하며 T/B cell epitopes 풍부하여 heterosubtypic protection에 중요한 것으로 알려져 있으나 현재 전 세계적으로 널리 사용되는 재조합 백신주들은 PR8 바이러스의 internal genes을 가지고 있어 야외주와 T/B cell epitopes이 달라 heterosubtypic protection 능력이 낮은 것으로 사료됨. 따라서, 야외주와 T/B cell epitope을 비교하고 실험적으로 차이를 규명하여 최적화된 internal genes을 백신주 작출에 사용하는 것이 중요함.

### ● 연구 결과

- 기존의 pHW2000를 이용한 역유전학 시스템은 PR8 바이러스를 기반으로 한 것으로, 조류인플루엔자 바이러스의 8개 전체 유전자를 모두 가지고 있는 바이러스 작출에는 용이하지 않았음. 그러나, 해당 연구과제를 통하여 개발된 polymerase 유전자 promoter 최적화 역유전학 시스템을 사용하면 8개 유전자를 모두 자기것으로 하는 조류인플루엔자도 작출할 수 있음을 확인하였음.
- 또한, NP와 M 유전자에서 T cell epitope으로 예측되는 부분을 모두 비교 평가하여 가장 야외주 HPAI와 일치율이 높도록 한 재조합 바이러스를 작출하였음.
- 내부유전자를 일치하지 않은 재조합 바이러스와 일치시킨 재조합 바이러스를 닭에 사독백신으로 접종한 후, 야외주 H5N6로 공격접종하였을 때 내부유전자를 일치시킨 사독백신 접종 그룹에서 shedding이 더 빨리 종료되는 것을 확인하여 내부유전자 일치가 바이러스의 clearance를 증가시키는 것을 확인할 수 있었음.

## 3) 백신 프로그램 최적화 및 오리용 백신 면역원성 향상

### ● 오리용 백신의 면역원성 향상의 필요성

- 현재까지 이유를 알 수 없으나 동일한 백신을 닭과 오리에 접종하는 경우 오리에서 효과가 낮은 것으로 알려져 있음. 국내 HPAI의 문제는 오리에서 임상증상이 뚜렷하지 않아 감염이 상당히 진행된 다음에 진단이 되어 차단방역에 실패하기 때문임. 따라서, 비상 시 1차적인 접종대상이 오리지지만 효과적인 백신을 기대하기 어려운 상황임. 따라서, 기존 백신의 효능을 개선하기 위한 노력이 필요하며 백신 프로그램의 최적화를 통하여 면역원성 향상이 필요성이 있음.

### ● 연구 결과

- 본 연구과제를 통하여 개발된 재조합 백신주를 오리에 접종하여 오리에서의 항체형성능을 평가하였음.
- 닭에서는 단회 접종만으로도 충분한 항체역가에 도달하는 것과 달리 오리에서는 일령에 따라서 항체형성이 다르게 나타났음. 특히, 1일령에는 거의 항체가 형성되지 않았으며 2주 및 4주로 점차 항체역가가 증가해 이는 면역기능이 점차 형성됨으로써 항체가 잘 형성되는 것임을 간접적으로 확인하였음.
- 오리의 어린 일령에서도 항체형성이 잘 일어나도록 하기 위하여, NDV 벡터 H5N6 백신을 1일령에 분무 후, 재조합 사독백신주를 1주와 2주령에 보강접종하여 항체역가를 평가하였음. 그 결과 사독백신만 접종한 그룹보다 1일령 분무 후 사독백신 접종한 경우 약간 더 높은 항체가가 나타났으며, 1일령분무 후 1주 사독백신 접종그룹보다 1일령 분무 후 2주령 사독백신이 가장 좋은 백신 프로그램임을 확인하였음.

## 2-4. 연차별 연구수행 내용 및 결과

### 가. 1차년도

#### (1) 주관기관: ㈜바이오포아

##### ○ AIV 표면항원 발현 NDV 벡터 작성(6종)

조류 인플루엔자 HA2 fragment common epitope의 면역원성을 향상시킨 H9 또는 H5 유전자를 발현하는 뉴캐슬병 바이러스 벡터 제작 생독백신 개발을 위해

- 역유전학을 이용하여 계태아에서 고역가로 증식할 수 있는 뉴캐슬병 바이러스에

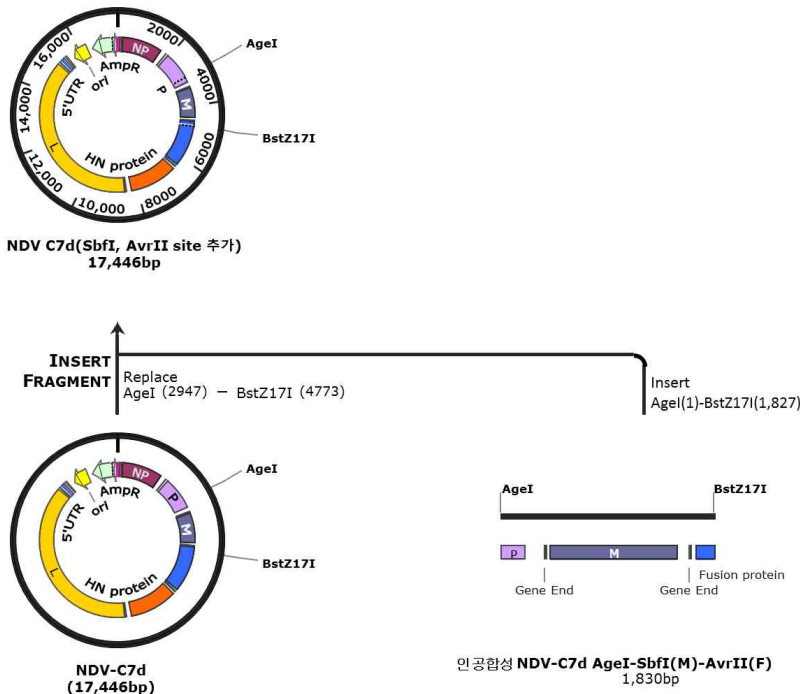
i) 면역원성을 향상시킨 common epitope 형태를 가진 조류인플루엔자 H5 또는 H9 단백질을 발현

ii) HA 유전자와 조합, 발육란에서의 증식성 및 감염세포로부터 바이러스가 유리되는 것을 억제하여 결과적으로 바이러스 증식에 영향을 미치는 NA 단백질을 HA 단백질과 동시 발현하는 재조합 뉴캐슬병 바이러스 벡터 시스템을 개발 함.

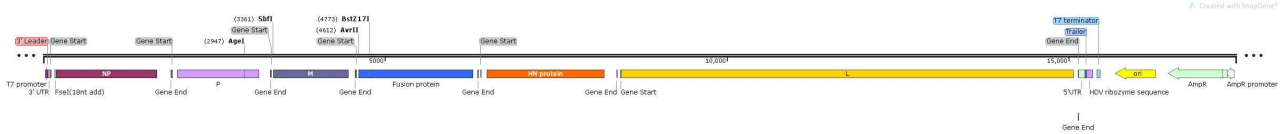
- 발육란에서 고역가로 증식할 수 있는 AIV 표면항원 탑재 뉴캐슬병 viral vector system을 개발함. 이 vector system은 병원성이 없으며 증식성이 양호한 7형 뉴캐슬병 야외분리주가 back bone임.

- NDV 발현벡터(NDV-C7d) 내에 외래유전자를 도입하기 위해서는 발현벡터의 염기서열을 확보하고 있어야 도입 시 사용할 수 있는 제한효소를 선정할 수 있음. 이를 위해 발현벡터의 유전자지도를 작성하고 벡터의 다른 부분에는 영향을 주지 않고 정해진 위치에 외래 유전자를 도입할 수 있는 제한효소를 검색하여 선정하였음. 결과 HA 유전자 도입에는 SbfI 제한효소를, aMPV-F 유전자 도입에는 AvrII 제한효소를 사용할 수 있음을 확인 함.

- SbfI과 AvrII 제한효소 도입을 위해 AgeI-NDV C7d-M gene-BstZ17I fragment를 인공합성하여 NDV 발현벡터의 해당 부분과 교체 함.







PCR 확인용 Primer : 914bp 예상

P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F GGCATGATGAAAATTCTGGAC

P501-NDV-C7d-M-339-R CATGGTGAGGCAGGCTCTC

NDV-C7d vector, "AgeI-SbfI-M-AvrII-BstZ171" 합성유전자 cut



NDV-C7d(RQAR) + "AgeI-SbfI-M-AvrII-BstZ171" 연결확인 colony PCR

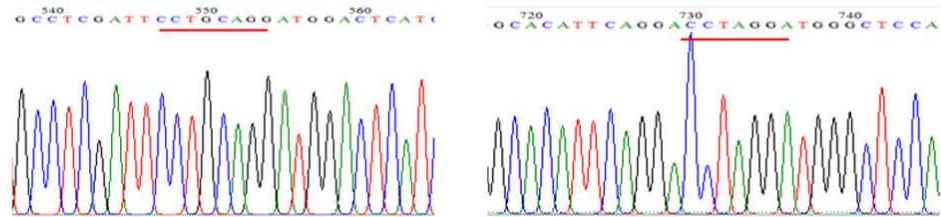


NDV-C7d(RQGR) + "AgeI-SbfI-M-AvrII-BstZ171" 연결확인 colony PCR



25번(RQAR), 16번(RQGR) clone 코스모진택 염기서열 분석의뢰 : OK

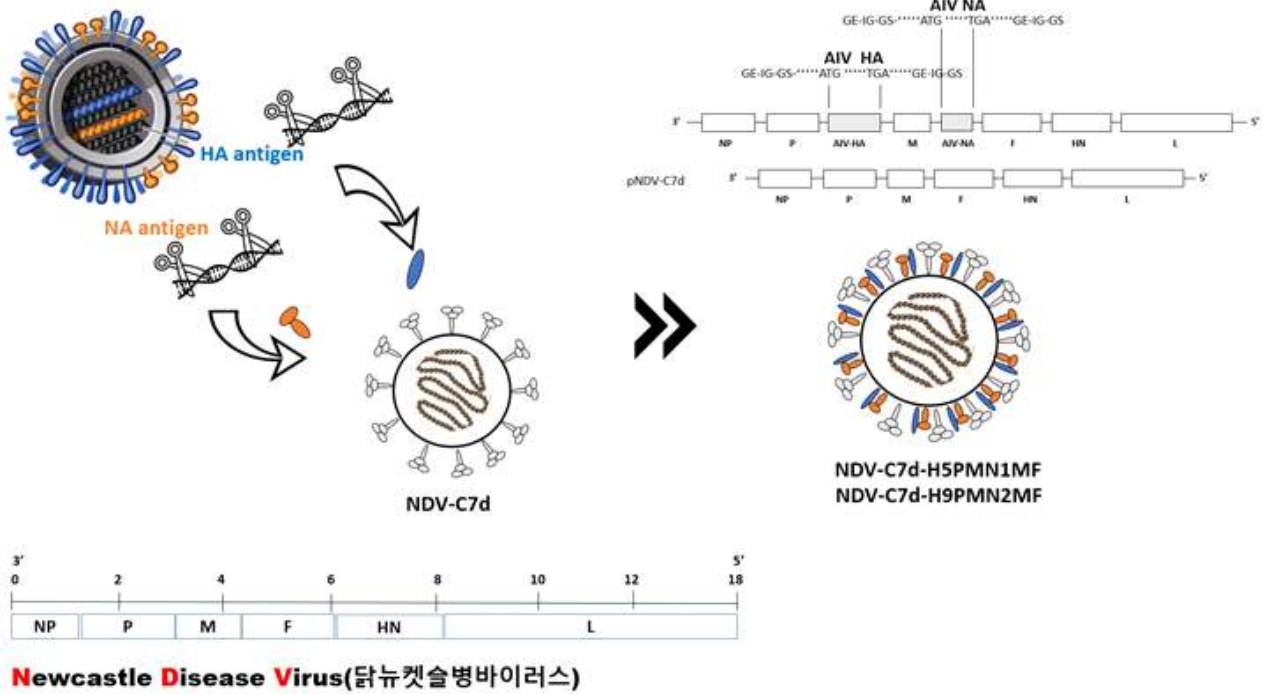
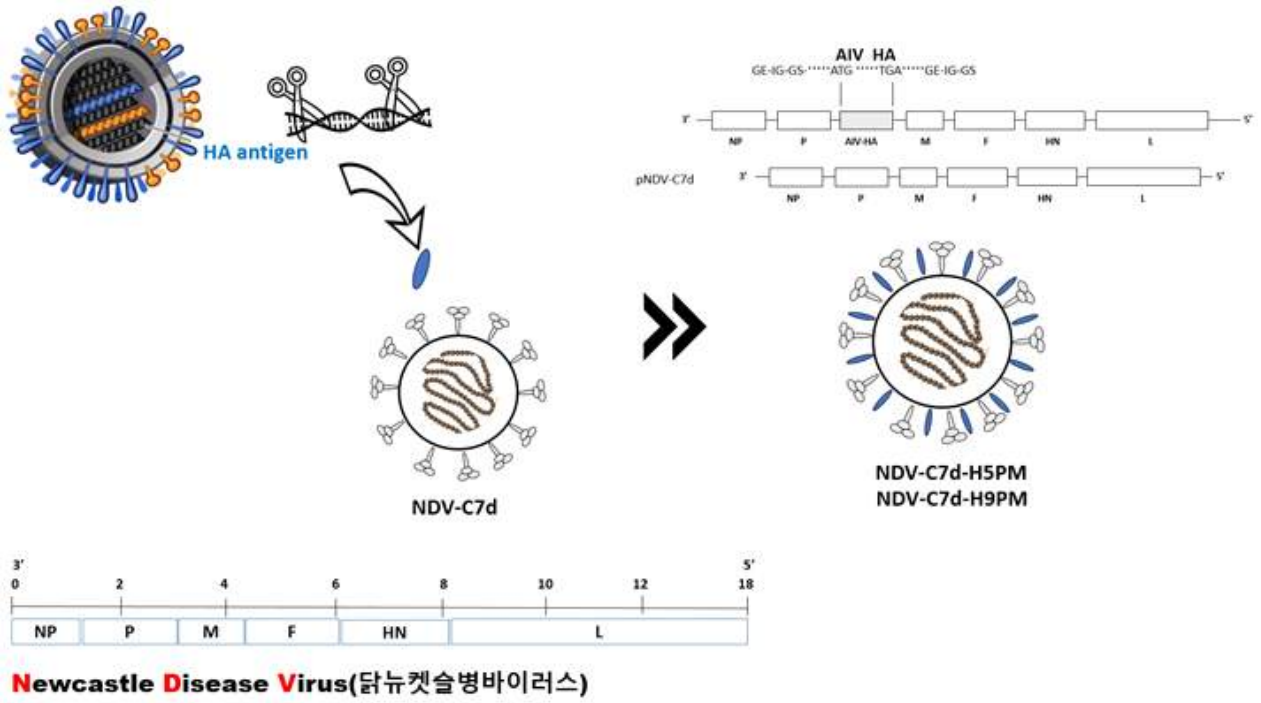
NDV-C7d(RQGR,RQAR) GCCTCGATTGCACCAAATGGACTCAT ~ GCACATTCAGGACACAGCATGGGCTCCA  
 NDV-C7d(SbfI-AvrII도입) GCCTCGATT**CCTG**CAGGATGGACTCAT ~ GCACATTCAGGAC**CCTAGG**ATGGGCTCCA



- 뉴캐슬병 viral vector system에 도입하기 위한 AIV 표면항원에 대한 인공합성유전자 준비  
 AIV 표면항원에 대한 유전자를 인공합성 후 SbfI 및 AvrII 제한효소 인식부위가 부가되어 있는 프라이머를 사용하여 PCR하여 NDV-C7d 발현벡터 도입에 필요한 enzyme site를 생성함.  
 (H5N1, H9N2) 단, H5N6, H5N8의 경우 enzyme site를 도입하여 합성하였음.

- 뉴캐슬병 바이러스의 각 유전자들은 개별적인 프로모터와 종결서열이 있어 각각의 mRNA로 전사됨. 하지만 transcriptional polarity에 의해 5'쪽의 ORF 일수록 전사되는 mRNA가 감소하고 이에 따라 발현되는 단백질량이 저하 됨. 본 연구에서는 외래항원의 발현율을 높이기 위해 NDV-C7d 발현벡터 내에서 비교적 3'쪽에 위치하는 P gene, M gene 이후에 AIV HA, NA 유전자를 각각 도입하도록 계획 함.

<HA, NA 유전자 도입방법에 대한 도식도>



<Enzyme site 도입을 위한 primer sets >

P530-AIV-H5N1-HA-F-SbfI TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTGCTTCTCTTT  
 P531-AIV-H5N1-HA-R-SbfIA TCCTGCAGGTTCTACCCGTGTTTTTCTAATCTCTTA  
 AATGCAAATTCTGCACTGTAAC  
 P532-AIV-H5N1-NA-F-AvrII GACCTAGGATGAATCCAAATCAGAAGATAATAAC

P533-AIV-H5N1-NA-R-AvrII ATCCTAGGTTCTACCCGTGTTTTTCTTACTCTTACTT  
 GTC AATGGTGAATGGCAACTCA

P534-AIV-H9N2-HA-F-SbfI TTCCTGCAGGATGGAAATAATAGCACTAATAGCT

P535-AIV-H9N2-HA-R-SbfI ATCCTGCAGGTTCTACCCGTGTTTTTCTAATCTCTTA  
 TATACAAATGTTGCATCTGCAA

P536-AIV-H9N2-NA-F-AvrII GACCTAGGATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC

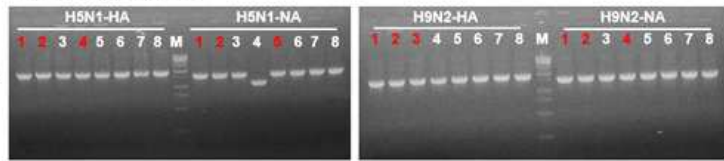
P537-AIV-H9N2-NA-R-AvrII ATCCTAGGTTCTACCCGTGTTTTTCTTACTCTTATAT  
 AGGCATAAAATTGATATTCGCC

- NDV-C7d 발현벡터에 AIV-HA 항원 도입실험결과

H5N1, H9N2 enzyme site 도입을 위한 PCR

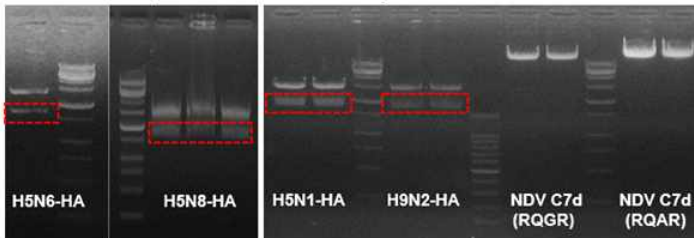


TA clone colony PCR



H5N1-HA-2, H5N1-NA-2, 5, H9N2-HA-1, 2, 3, H9N2-NA-1 sequence OK

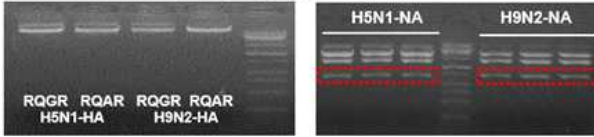
NDV-C7d vector, AIV HA 유전자 SbfI enzyme cut



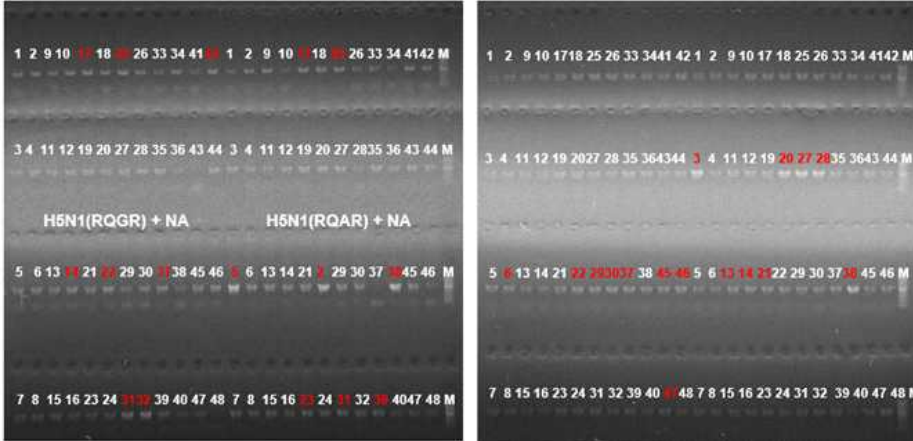
Primer : P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F+P552-AIV-H5N6-HA-R-SbfI primer 확인 : 2kb 예상  
 94°C/5min-(94°C/30sec-55°C/30sec-72°C/3min)40cycles

- NDV-C7d 발현벡터에 AIV-NA 항원 도입실험결과

NDV-C7d vector, insert(NA gene) AvrII cut



NA 유전자 도입 확인 PCR



- NDV-C7d 발현벡터에 AIV-HA, NA 항원 도입 후 염기서열 분석 확인

< 염기서열 분석에 사용한 primer sets >

1) NDV-C7d vector내 AIV H5N1 항원 도입 후 확인

① HA 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	Amplicon size(bp)
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	708
546	P546-H5N1-HA-133R	CATGTGTAACAGTAACGTTC	

② NA 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	Amplicon size(bp)
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	500
547	P547-H5N1-NA-101R	ACCCATATTGAGATCATGTT	

2) NDV-C7d vector내 AIV H9N2 항원 도입 후 확인

① HA 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	Amplicon size(bp)
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	700
548	P548-H9N2-HA-125R	ACATTGTTTTCTACTAGTGT	

② NA 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	Amplicon size(bp)
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	500
549	P549-H9N2-NA-101R	GTTACAGTCGTTGCTAGAAT	

3) NDV-C7d vector내 AIV H5N6 항원 도입 후 확인

① HA 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	Amplicon size(bp)
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	723
567	P567-H5N6-HA-148R	CCAGTATGCTTGGGCATGT	

1)NDV-C7d vector내 AIV HA 항원 도입 후 확인

① 공통

No.	Primer	Sequence
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC

② 개별

534	P534-AIV-H9N2-HA-F-Sbfl	TTCCTGCAGGATGGAAATAATAGCACTAATAGCT
530	P530-AIV-H5N1-HA-F-Sbfl	TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTCTTCTTT
551	P551-AIV-H5N6-HA-F-Sbfl	TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTCTTCTTC
568	P568-H5N6-HA-872-F	GAATATGGCCACTGCAACAC

2)NDV-C7d vector내 AIV NA 항원 도입 후 확인

① 공통

No.	Primer	Sequence
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT
518	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTATATGCCTCC

○ AIV발현 NDV 증독 작출 (3중 이상)

- 재조합 바이러스 작출 방법

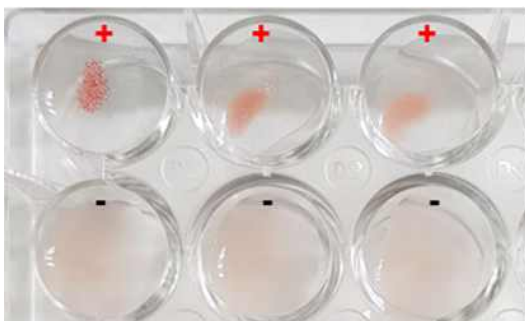
- Hep-2세포 주를 6well 플레이트 에 80%가량 키워놓은 후, vaccinea T7 바이러스를 감염시킨다.
- 이후 세포주에 T7 promoter에 의해 개시되어 단백질이 발현되는 pCR-TM-NP, pCR-TM-P, pCR-TM-L 플라스미드 벡터 3개와 T7 promoter에 의해 개시되어 HDV 라 이보자임에 의해 스스로 절단되어 정확하고 완전한 전체 키메라 내열성 NDV 게놈을 만들어 낼 수 있는 플라스미드인 pTMH-HT-CNDr을 준비한다.
- 각각을 1:1:0.1 :1비율로 섞어 Lipofectamine<sup>TM</sup>(Invitrogen. co)과 적정 비율로 혼합하여 트랜스펙션 해준다.
- 이후 1ug/ml 의 acetylated trypsin을 첨가하여 내열성 비병원성 재조합 바이러스가 생성 되어 감염성을 갖도록 해준다.
- 2-3일간 37℃에서 배양한 후 6웰의 세포를 수확하여 11일령의 SPF 발육란에 접종하여 감염성 NDV 를 얻어낸다.

- 바이러스 확인 실험

11일령 SPF 발육란 접종 후 24시간마다 검란을 실시하여 증사란을 확인하고, 접종 72시간 후 접종란을 4℃ 냉장한 후 요막강액을 채취하여 바이러스 확인실험을 실시함.

- 재조합 바이러스의 작출 확인

< 혈구응집반응 확인 >



< PCR 확인 >



< PCR 확인에 사용한 primer sets >

NDV-C7d vector내 AIV H9N2 항원 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	확인 부분	PCR	Sequencing 진행
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	P-HA	700	P433
548	P548-H9N2-HA-125R	ACATTGTTTCTACTAGTGT			
534	P534-AIV-H9N2-HA-F-Sbfl	TTCCTGCAGGATGGAAATAATAGCACTAATAGCT	HA	1,000	P534
568	P568-AIV-H9N2-HA-990R	CCTTAGACCACTGCCAGTT			
569	P569-AIV-H9N2-HA-830F	GAAGAATCCTGAAGACCGA	HA, HA-M	1,153	P569
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC			
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	NA	1,000	P460
570	P570-AIV-H9N2-NA-601R	ACCATGAGCCAATACTGTCA			
571	P571-AIV-H9N2-NA-462F	CAGGTGTGTATAGCATGGTC	NA-F	1,186	P571
518	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTTATATGCCTCC			
248	P248-ND4152-IF	CAGAACACTGACTACTTTGCT	RQGR/RQAR	776	P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			

NDV-C7d vector내 AIV H5N1 항원 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	확인 부분	PCR	Sequencing 진행
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	P-HA	708	P433
546	P546-H5N1-HA-133R	CATGTGTAACAGTAACGTTTC			
530	P530-AIV-H5N1-HA-F-Sbfl	TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTCTTCTCTTT	HA	1,095	P530
572	P572-AIV-H5N1-HA-1085R	CCATCTACCATTCCCTGCCA			
573	P573-AIV-H5N1-HA-944F	CGGAgAATGTCCCAAATATGT	HA, HA-M	1,041	P573
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC			
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	NA	1,039	P460
574	P574-H5N1-NA-R	CACATGCACATTCAGACTCT			
575	P575-H5N1-NA-490F	GCCATGATGGCACCAGTTGG	NA-F	1,152	P575
518	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTTATATGCCTCC			
248	P248-ND4152-IF	CAGAACACTGACTACTTTGCT	RQGR/RQAR	776	P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			

NDV-C7d vector내 AIV H5N6 항원 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	확인 부분	PCR	Sequencing 진행
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	P-HA	723	P433
567	P567-H5N6-HA-148R	CCAGTATGTCTTGGGCATGT			
551	P551-AIV-H5N6-HA-F-Sbfl	TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTCTTCTTC	HA	1,032	551
576	P576-AIV-H5N6-HA-1022R	CTACCTGATGCTAAAGGACT			
568	P568-H5N6-HA-872-F	GAATATGGCCACTGCAACAC	HA, HA-M	1,130	568
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC			
248	P248-ND4152-IF	CAGAACACTGACTACTTTGCT	RQGR/RQAR	776	P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			

NDV-C7d vector내 AIV H5N8 항원 도입 후 확인

No.	Primer	Sequence	확인 부분	PCR	Sequencing 진행
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	P-HA	723	P433
567	P567-H5N6-HA-148R	CCAGTATGTCTTGGGCATGT			
551	P551-AIV-H5N6-HA-F-Sbfl	TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTCTTCTTC	HA	1,104	P572
572	P572-AIV-H5N1-HA-1085R	CCATCTACCATTCCCTGCCA			
612	P612-H5N8-HA-240-F	CAATGTGCGACGAGTTTCATCAG	HA, HA-M	1,753	P612, P550
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC			
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	NA	1,097	P460, P635
635	P635-H5N8-NA-R	TACCTTGAATGCAAGTACAA			
613	P613-H5N8-NA-563-F	GATGACGATTGGTGAACAG	NA-F	1,117	P613, P518
518	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTTATATGCCTCC			
248	P248-ND4152-IF	CAGAACACTGACTACTTTGCT	RQGR/RQAR	776	P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			

- 작출이 완료된 재조합 바이러스

- NDV-C7d(RQGR)
- NDV-C7d(RQGR)+H5N1-HA (HA 1개 mutation)
- NDV-C7d(RQGR)+H5N6-HA
- NDV-C7d(RQGR)+H9N2-HA
- NDV-C7d(RQGR)+H9N2-HA-NA
- NDV-C7d(RQAR)
- NDV-C7d(RQAR)+H5N1-HA
- NDV-C7d(RQAR)+H5N1-HA-NA
- NDV-C7d(RQGR)+H5N6-HA (확인 중)
- NDV-C7d(RQAR)+H5N8-HA-NA
- NDV-C7d(RQAR)+H9N2-HA

\* 4가지 subtype(H9N2, H5N1, H5N6, H5N8) 조류인플루엔자 바이러스에서 HA유전자는 병원성을 제거하고 면역원성을 향상시킨 형태, NA 유전자는 HA 유전자와 조합하여 발육란 증식성이 좋은 조합으로 NDV 발현백터 내에 도입된 상태임. (단, H5N6는 glycosylation site가 변경되지 않은 상태 임)

○ AIV 항원 발현 재조합 뉴캐슬병 바이러스의 종독 생산 공정개발

바이러스 역가 및 항체형성능이 확인된 백신 후보주들의 벌크 제조법을 확립하기 위하여 최적 접종량 결정 시험 및 최적 채독시기 결정 시험을 진행 중임. 각 생산법에 따라 제조된 바이러스를 수확하여 역가 및 수확된 요막액의 양을 측정하여 최적 생산 조건을 확립 할 계획 임.

○ AIV 항원 발현 재조합 뉴캐슬병 바이러스의 특성시험 및 LMO 유해성 평가

- 백신 후보주 특성 시험

i) 바이러스 역가 측정 : 9-10일령 SPF 종란에 각각의 백신 후보주를  $10^{3-4}$  EID<sub>50</sub>/egg 접종하여 바이러스 역가를 측정 함. 인산완충액으로 희석한 바이러스를 5개 이상의 9~11령 발육계란의 장노막강 내에 0.1ml 씩 접종 함. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 뉴캐슬병 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 5일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사 함. 닭 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 인정하여 EID<sub>50</sub>을 산출함.

또한 계태아 신장세포(CEK)에 각각의 백신 후보주를 접종 후 배양하여 NDV 특이 세포변성효과의 형성 유무로 세포 감염능을 측정 함. 측정 결과 외래 항원 도입 전 후 바이러스 역가에는 유의적인 차이가 없음을 확인 함. 또한 작출 된 바이러스들은 아직 초기 계대 배양 중으로 plaque purification을 통해 생산성 높은 clone을 분리하고, 이에 대해 최적 증식 조건이 확립되면  $10^{10}$  EID<sub>50</sub>/ml에 가깝게 증식되어 종란 1개 당 최소 1,000수분 이상의 백신 생산이 기대 됨.

< 작출 바이러스의 역가 측정 결과 >

Virus	Virus 작출	HAT(log <sub>2</sub> )		TCID <sub>50</sub> /ml		EID <sub>50</sub> /ml	
		계대번호	Titer	계대번호	Titer	계대번호	Titer
NDV-C7d(RQGR)	○	K2E1	10	K2E2	4.89E+ 09		
NDV-C7d(RQGR)+ H5N1-HA	○	K2E1	8	K2E2	3.16E+ 09	K2E2	1.04E+ 09
NDV-C7d(RQGR)+ H5N6-HA	○	K2E2	8	K2E2	3.98E+ 08	K2E2	1.58E+ 09
NDV-C7d(RQGR)+ H9N2-HA	○	K2E3	9	K2E2	7.00E+ 08	K2E2	1.19E+ 08
NDV-C7d(RQGR)+ H9N2-HA-NA	○	K3E3	12				
NDV C7d(RQAR)	○	K2E1	11	K2E2	5.62E+ 09		
NDV C7d(RQAR)+ H5N1-HA	○	K2E1	9	K2E1	2.04E+ 09	K2E2	2.11E+ 09

NDV C7d(RQAR)+H5N1-HA-NA	O			K3E1	3.98E+08		
NDV C7d(RQAR)+H5N6-HA	O						
NDV C7d(RQAR)+H5N8-HA-NA	O						
NDV C7d(RQAR)+H9N2-HA	O	K2E3	9	K2E2	1.97E+09	K2E2	2.81E+08

\* NDV-C7d(RQGR)+H5N1-HA 바이러스의 경우 HA amino acid 1개 변이(D17N) 있음.

ii) 백신 후보주 효능 평가

작출된 재조합 바이러스 배양액(요막액)을 포르말린 불활화하고 ISA70을 3:7의 비율로 섞어 오일 에멀전 백신을 제조하여 6주령 SPF 닭 각 3수씩에 접종한 후 3주후 수확한 혈청에 대해 조류인플루엔자 subtype 별 바이러스에 대한 교차 혈구응집 억제능을 실험하였음.

이들 항체에 대해서는 primary CEF 세포주를 이용하여 교차 중화 시험을 진행할 예정임.

< 사독실험-1차(항체 생성 유무확인실험) >

계대번호 K2E1 바이러스들에 대해 본 실험 전 항체형성 유무를 판단 함. SPF 종란에서 배양한 바이러스 원액을 포르말린 불활화하여 항원으로 사용 함. H5N1, H9N2에 대해 조류인플루엔자 subtype 별 바이러스에 대한 교차 혈구응집 억제능 실험 결과 NDV 벡터 내 도입 된 AIV 외피 당 단백질인 HA 또는 NA 단백질에 의해 형성된 subtype specific 항체 형성을 확인 함. 또한 전달 벡터로 사용된 NDV에 대해서도 NDV 특이적 항체 형성을 확인 함.

Virus		Immunogenicity of recombinant virus (HIT, log2)			
		Lasota	H9N2	rH5N8-M4E2	rH5N1-M7E2
NDV-c7d(RQAR)+H5N1-HA	접종 전	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3 주차	9.7±1.5	0.0±0.0	1.0±0.0	6.7±1.5
	Boosting 3 주		1.0±0.0	1.7±0.6	8.0±0.0
NDV-c7d(RQGR)+H9N2-HA	접종 전	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3 주차	8.3±1.2	5.3±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0
	Boosting 3 주		7.7±0.6	0.0±0.0	0.7±1.2
대조군	접종 전	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3 주차	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6 주차	0.0±0.0	0.7±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0

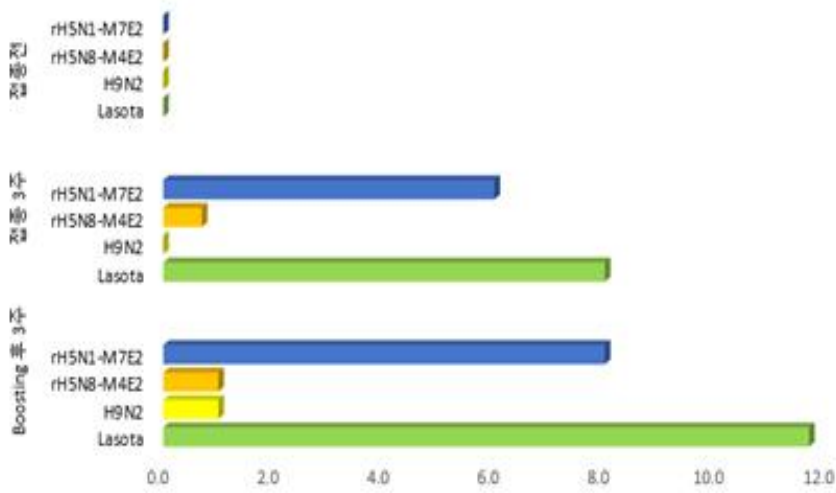
< 사독실험-2차 >

계대번호 K2E2 바이러스들에 대해 subtype specific 항체형성 유무를 판단 함. SPF 종란에서 배양한 바이러스를 수당 10<sup>8.0</sup> EID<sub>50</sub>가 접종되도록 희석한 후 포르말린 불활화하여 항원으로 사용 함. H5N1, H9N2에 대해 조류인플루엔자 subtype 별 바이러스에 대한 교차 혈구응집 억제능 실험 결과 NDV 벡터 내 도입 된 AIV 외피 당 단백질인 HA 또는 NA 단백질에 의해 형성된 subtype specific 항체 형성을 확인 함. 또한 전달 벡터로 사용된 NDV에 대해서도 NDV 특이적 항체 형성을 확인 함.

Virus	TCID <sub>50</sub> /ml	EID <sub>50</sub> /ml		Immunogenicity of recombinant virus(HIT, log2)			
				Lasota	H9N2	rH5N8-M4E2	rH5N1-M7E2
NDV-c7d(RQAR)+H5N1-HA	2.04E+09	2.11E+09	접종 전	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
			3 주차	7.7±2.3	0.0±0.0	0.0±0.0	2.7±2.1
			Boosting 3 주	10.7±0.6	1.0±0.0	0.0±0.0	7.7±0.6
NDV-c7d(RQAR)+H5N1-HA-NA	3.98E+08	1.19E+09	접종 전	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0



### rNDV-H5N1 접종군



### rNDV-H9N2 접종군

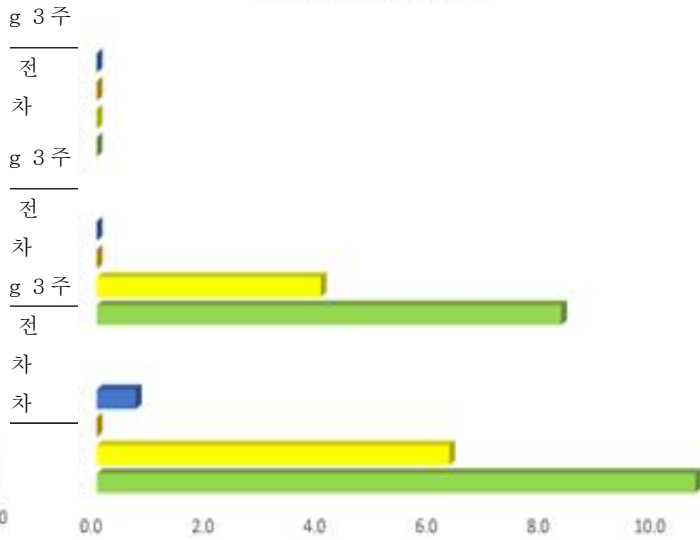


그림. rNDV-H5N1(HA-NA) 백신주 및 rNDV-H9N2(HA) 백신주 접종 계군 혈청의 HI항체 역가.

각각의 백신주를 불활화 하여 6주령 SPF병아리 5수씩 1차 접종하고 3주 후 채혈 및 2차 접종(boosting)하였으며 다시 3주 후에 채혈하여 얻은 혈청을 NDV(LaSota), rH5N1, rH5N8, H9N2 virus등 4종의 HA항원에 대한 혈구응집억제 항체가(HI titer)를 측정하였다.

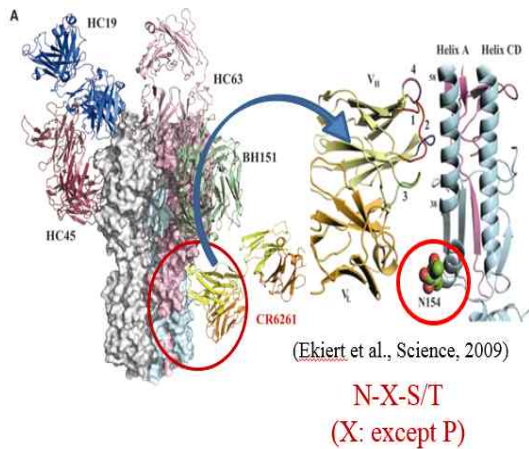
각각의 백신주는 모두 NDV(LaSota)에 대해 1차 백신 후  $2^8(256)$ HI, 2차 백신 후  $2^{11}(2048)$ HI titer 이상을 보였으며, rNDV-H5N1(HA-NA) 백신주의 경우 동일 혈청형의 AIV항원에 대한 HI역가가 1차 접종 시  $2^6(64)$ HI, 2차 접종 시  $2^8(256)$ HI로 목표로한 HI titer 이상을 보여주었다.

## (2) 협동기관: 서울대학교

### 1. 01310 H9N2 바이러스를 이용한 백신주 제작

#### 1) HA mutagenesis

- Common epitope에 대한 면역원성을 높이기 위한 HA2 stalk domain mutagenesis



#### Variation of HA2 common epitope

Subtype	Host	HA2 common epitope			
		42	46	49	53
H1N1	Human	Q	N (90.5%) > D (9.4%)	T	N
	Swine	Q	D (96.2%) > N (3.8%)	T	N
H1N2	Human	Q	N (100%)	T	N
	Swine	Q	D (78.7%) > N (21.3%)	T	N
H3N2	Human	Q	N (83.6%) > D (16.4%)	N (99.9%)	N
	Swine	Q	N (66.1%) > D (33.9%)	N (96.4%) > T (3.6%)	N
H5N1	Human	Q	D (100%)	T	N
	Avian	Q	D (99.1%) > N (0.9%)	T	N
H5N2	Avian	Q	D (98.0%) > N (2.0%)	T	N
H4N6	Avian	Q	D (96.6%) > N (3.4%)	N (100%)	N
H6N1	Avian	Q	D (81.8%) > N (18.2%)	T	N
H9N2	Avian	Q	D (100%)	T	N

- HA2 common epitope은 다양한 subtype의 인플루엔자 바이러스에 대부분 보존되어 있음. 이 보존된 epitope은 현재 인플루엔자 바이러스의 universal vaccine 개발에 주요 target domain으로 고려되고 있음. (Ref 필요). 그러나, 모든 인플루엔자 바이러스는 항체와 common epitope간의 결합 부위 인근에 N-glycan (HA2 154N-glycosylation)이 존재하며, 이는 항체의 epitope 인식에 영향을 미칠 것으로 예측됨 (Ref). 따라서, 본 연구팀은 H9N2 바이러스의 HA유전자에서 HA2 common epitope 인근의 154N-glycan을 제거하였으며, 이는 H9N2백신 바이러스의 HA2 common epitope에 대한 면역원성 향상을 유도할 것으로 기대하고 있음. .
- 본 연구팀은 선행연구를 통하여 HA2 단백질의 154번 N-glycosylation를 제거하되, 바이러스의 증식성에는 영향을 미치지 않는 아미노산 패턴을 확보하였으며 (NGT->TGT) 이에 따라 돌연변이 바이러스를 작출함. 또한 대부분의 인플루엔자 바이러스에서 보존적으로 존재하는 common epitope의 아미노산을 일치시키기 위하여 01310바이러스 HA2 단백질의 49번 아미노산을 돌연변이 시킨 바이러스를 작출함 (표 1).

**표 1. 01310 바이러스 H9 유전자 돌연변이 제작 목록**

H9 유전자 돌연변이 제작 목록	제작 여부
01310(E2)-HA	○
01310(E2)-HA_154TGT	○
01310(E20)-HA	○
01310(E20)-HA_133TGT	○
01310(E20)-HA_154TGT	○
01310(E20)-HA_154TGT, T49N	○

## 2. 역유전학을 이용한 H9N2 바이러스 제작

### 1) H9N2 재조합 바이러스 작출

- 01310 바이러스의 경우 CE2를 10일령 SPF 발육란에 18번 계대하여 증식성을 높인 01310 CE20 바이러스를 사독백신주로 사용하고 있음. 01310 CE2에서 CE20으로 계대되면서 HA 단백질에 T133N, V216G, E439D(H3 numbering) 3개의 아미노산 변이와 NA 단백질에 18개의 stalk deletion 및 E54D 변이가 생성되면서 01310 CE20은 SPF발육란 접종 시 계태아에 대한 높은 병원성을 나타내게 됨. HA 단백질 수용기 결합 부위 주변의 N-glycosylation 생성은 바이러스의 숙주 세포에 대한 결합력을 변화시키며 이는 바이러스의 병원성 및 증식성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있음 (Ref). 본 연구팀은 01310 E20 바이러스에서 추가로 형성된 133번 N-glycosylation이 바이러스의 병원성 및 증식성에 영향을 미칠 것으로 예측하였으며, 이에 따라 133번 NGT를 TGT로 변경한 돌연변이도 제작하였음 (Ref).
- 호프만 벡터에 01310\_CE2와 01310\_CE20의 유전자를 클로닝하였으며, 그를 이용하여 r01310(E2)와 r01310(E20) 재조합 바이러스를 제작하고자 함. 호프만 벡터 시스템 이용시, polymerase 유전자 (PB2, PB1, 그리고 PA)는 바이러스 염기서열 4번째 nucleotide에 Cysteine을 가지고 되며, 이는 Uracil 대비 낮은 전사율을 가진 것으로 알려져 있음 (Ref). 01310 바이러스의 경우 호프만 벡터 시스템을 그대로 이용하였을 시 역유전학을 통해 바이러스 제작이 이루어지지 않았으나, PB2, PB1 및 PA 3가지 polymerase 단백질을 클로닝한 벡터의 promoter 서열을 3'-ucgCuuu-5'에서 3'-ucgUuuu-5'로 변경하였을 시 역유전학을 통하여 01310 바이러스가 작출되는 것을 확인할 수 있었음. 프로모터의 조합별로 증식성에 차이가 있는지는 이후 실험을 통하여 평가할 예정임 (표 2, 표 3).

**표 2. 프로모터 서열 변경한 polymerase 클로닝 벡터 제작 목록**

01310 polymerase vector	제작 여부
PB2(01310)_ucgUuuu	O
PB1(01310)_ucgUuuu	O
PA(01310)_ucgUuuu	O

표 3. 프로모터 조합 별 01310 바이러스 작출 여부

재조합 바이러스	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	HA	NA	작출 여부
r01310(E20)_pro1	01310_U	01310_C	01310_C	01310(E20)					O
r01310(E20)_pro2	01310_C	01310_U	01310_C						O
r01310(E20)_pro3	01310_C	01310_C	01310_U						X
r01310(E20)_pro4	01310_U	01310_U	01310_C						O
r01310(E20)_pro5	01310_C	01310_U	01310_U						O
r01310(E20)_pro6	01310_U	01310_U	01310_U						X
r01310(E20)_pro7	01310_U	01310_C	01310_U						X
r01310(E20)_pro8	01310_C	01310_C	01310_C						X

- 높은 전사율을 가지는 프로모터 서열로 변경한 polymerase를 이용시, 모든 유전자가 01310 유전자를 가지는 01310 CE2 및 CE20 재조합 바이러스를 제작할 수 있었음. 재조합 r01310(E20) 바이러스의 역가 및 SPF 발육란 접종 후 발육란이 죽는 평균 시간인 MDT(Mean Death Time, h)를 측정한 결과, 01310\_CE20의 HA와 NA를 가졌을 때 48시간 이내 발육란이 죽었으며 MDT가 평균 48시간으로 짧은 것을 알 수 있었음 (표 5).
- r01310(E20) 바이러스의 증식성은 높게 유지하면서 계태아에 대한 병원성을 낮추기 위해 선행연구에서 마우스 병원성을 낮추는 것으로 밝혀진 KBNP-0028 바이러스의 NS 유전자를 재조합한 r01310(E20)-NS(0028) 바이러스를 제작함. r01310(E20)-NS(0028) 바이러스는 SPF 발육란에서 높은 바이러스 역가를 보였으며,, MDT가 증가하여 계태아 병원성이 감소한 것을 알 수 있었음. NS 유전자에서 병원성에 영향을 준다고 알려져 있는 PL motif 및 139번, 151번 아미노산을 돌연변이시킨 0028 NS 유전자를 01310(E20) 바이러스에 재조합한 경우에는 다시 MDT가 짧아지는 것을 확인함 (Ref) (표 5). 즉 NS 유전자 내 포유류 병원성에 영향을 미친다고 알려져 있는 PL motif, 139번, 그리고 151번 아미노산은 포유류에서의 병원성뿐 아니라 계태아에서의 병원성에도 관여함을 확인함.

표 4. H9N2 재조합 바이러스 제작 목록

재조합 바이러스	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	제작 여부
r01310(E2)	01310_E2	01310_E2	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310	○
r01310(E20)	01310_E20	01310_E20	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310	○
r01310(E20)-NS(0028)	01310_E20	01310_E20	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	0028	○
r01310(E20)-NS(0028)_EPEV	01310_E20	01310_E20	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	0028_EPEV	○
r01310(E20)-NS(0028)_G139D	01310_E20	01310_E20	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	0028_G139D	○
r01310(E20)-NS(0028)_G139N	01310_E20	01310_E20	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	0028_G139N	○
r01310(E20)-NS(0028)_S151T	01310_E20	01310_E20	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	01310 0	0028_S151T	○

표 5. H9N2 재조합 바이러스 및 MDT 측정 결과

재조합 바이러스	바이러스 역가 (log10EID50/ml)	MDT(Mean Death Time, h)
r01310(E20)	9.17±0.3	48.8±8
r01310(E20)-NS(0028)	9.36±0.1	94.4±5
r01310(E20)-NS(0028)_EPEV	8.77±0.2	61.6±6
r01310(E20)-NS(0028)_G139D	8.37±0.1	75.7±1
r01310(E20)-NS(0028)_G139N	9.43±0.1	82±2.5
r01310(E20)-NS(0028)_S151T	8.7±0.2	67.6±3

- r01310(E20)-NS(0028) 바이러스의 백신주로서의 활용 가능성을 평가하기 위하여 기존에 사용되는 백신주와 동일한 r01310(E20) 바이러스와 r01310(E20)-NS(0028) 바이러스를 각 100 EID50/0.1ml 농도로 0.1ml씩 10일령 SPF 발육란 13개에 접종함. r01310(E20)의 경우 48시간 이내에 계태아 전수 폐사를 유발하기에 접종 후 36시간에 요막액을 수득하여 혈구응집역가를 측정하였음. r01310(E20)-NS(0028) 바이러스의 경우 72시간까지 증식시킨 후 요막액의 양과 혈구응집역가를 확인하였음 (표 6). 요막액의 양 및 총 혈구응집역가에서 기존 백신주인 r01310(E20)와 대비하여 r01310(E20)-NS(0028) 바이러스가 더 나은 생산성을 가진 것을 확인할 수 있었음.

표 6. r01310(E20)과 r01310(E20)-NS(0028) 바이러스의 생산성 비교

r01310 (E20)	요막액량 (ml)	혈구응집 역가	요막액 내 총 혈구응집 역가	r01310 (E20)-NS(0028)	요막액량 (ml)	혈구응집 역가	요막액 내 총 혈구응집 역가
1	12.6	2 <sup>9</sup>	6451.2	1	11.25	2 <sup>9</sup>	5760
2	12.5	2 <sup>8</sup>	3200	2	12.5	2 <sup>9</sup>	6400
3	11.75	2 <sup>9</sup>	6016	3	14.25	2 <sup>9</sup>	7296
4	12	2 <sup>8</sup>	3072	4	14	2 <sup>9</sup>	7168
5	13	2 <sup>8</sup>	3328	5	15	2 <sup>8</sup>	3840
6	9.75	2 <sup>8</sup>	2496	6	13	2 <sup>9</sup>	6656
6(2)	3	2 <sup>6</sup>	192	7	14.75	2 <sup>9</sup>	7552
7	11	2 <sup>8</sup>	2816	8	13	2 <sup>10</sup>	13312
8	11	2 <sup>8</sup>	2816	9	11.75	2 <sup>8</sup>	3008
9	9.75	2 <sup>8</sup>	2496	10	11.5	2 <sup>9</sup>	5888
10	13	2 <sup>8</sup>	3328	11	13.75	2 <sup>9</sup>	7040
11	11.8	2 <sup>9</sup>	6041.6	12	13.75	2 <sup>8</sup>	3520
12	12	2 <sup>8</sup>	3072	13	14.5	2 <sup>9</sup>	7424
13	11.5	2 <sup>8</sup>	2944				
<b>Total</b>	154.65		48268.8	<b>Total</b>	173		84864
<b>Average</b>	11±2.5		3448 ±1668	<b>Average</b>	13.3±1.3		6528 ±2563

- 위의 결과를 통하여 0028 바이러스의 NS 유전자는 H9N2 백신주의 계태아 병원성을 약화시키며, 백신 생산량을 증대시킬 수 있음을 확인하였으며, 이를 토대로 polymerase 유전자의 promoter 강화, HA 유전자의 common epitope을 노출시키는 돌연변이와 조합하는 재조합 바이러스를 제작하였으며, 각 바이러스의 증식성 및 병원성을 평가할 계획임 (표 7).

표 7. 01310 재조합 바이러스 제작목록

재조합 바이러스	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	HA	NA	작출 여부
r01310(E20)-NS(0028) with comon epitope	01310_U	01310_U	01310_C			0028	01310(E20)_15 4TGT, T49N	01310(E20)	○
r01310(E20)-d133N	01310_U	01310_U	01310_C		01310 (E20)	01310	01310(E20)_13 3TGT	01310(E20)	○
r01310(E20)_M(E20)_all U	01310_U	01310_U	01310_U			01310	01310(E20)	01310(E20)	○
r01310(E20)_15 4TGT_all U	01310_U	01310_U	01310_U			01310	01310(E20)_15 4TGT	01310(E20)	○

2. H5N8(Donglim 3, clade 2.3.4.4)/H5N6(clade 2.3.4.4)/H5N1(K10-483, clade 2.3.2.1) 백신주 개발

1) H5N8, H5N6 바이러스의 HA, NA 유전자 제작

(1) HA, NA 유전자 합성

- H5N8, H5N6 백신주 제작을 위해서 현재까지 국내에서 분리된 H5N8와 H5N6 바이러스 서열을 비교하여 consensus한 서열로 HA와 NA유전자를 합성하였음. 인플루엔자의 병원성과 관련되어 있는 HA cleavage site는 multibasic한 RERRRK나 REKRRK에서 ASGR로 변경하여 유전자 합성하였음. 합성한 유전자는 호프만 벡터 플라스미드에 클로닝하였음.(표 8)

(2) HA, NA mutagenesis

- 합성한 HA 단백질에서 H9N2 바이러스와 같이 common epitope을 가지고 있는 HA2의 154번 N-glycan을 TGT로 돌연변이시켜 N-glycan을 제거하였음. H5N1 인플루엔자 바이러스에 높은 빈도로 존재하는 158번 아미노산의 N-glycan은 HA 단백질의 receptor binding affinity에 영향을 주어 표유류 병원성과 관련되어 있는 것으로 알려져 있음. 합성한 유전자에서 158N 돌연변이를 만들어 158N-glycan의 효과를 확인해볼 예정임 (표 8).
- 또한, 백신주 바이러스로 사용하기 위해서는 증식성을 높일 필요가 있었음. 증식성을 높이기 위한 전략으로 H5N1 HPAI가 2.3.2에서 최근 유행주인 2.3.2.1c까지 진화하는 과정에서 receptor binding site에 생긴 돌연변이인 223번 아미노산과 144번 아미노산을 돌연변이 시킨 유전자를 확보함.
- LPAI H5N1인 snu50-5 바이러스가 CE2에서 CE20으로 계대되면서 증식성이 증가하였으며, 그 과정에서 HA에 4개, NA에 1개 돌연변이가 발생하였음. 합성한 H5 단백질과 서열을 비교하여 다른 아미노산인 H103Y, K161E, L317P 돌연변이를 가진 플라스미드와 NA에는 S369N 돌연변이를 가진 플라스미드를 제작하였음. H5N8과 H5N6의 경우 HA의 서열이 매우 유사하기 때문에 H5N8 바이러스로 먼저 돌연변이 적용의 효과를 확인한 후, H5N6에 적용할 예정임. (표 8)

표 8. H5N8, H5N6 바이러스의 HA, NA 클로닝 플라스미드 제작 목록

	segment	제작 플라스미드 목록	제작 여부
H5N8(2.3.4.4)	HA	H5(ASGR)	○
		H5(ASGR)_V223I	○
		H5(ASGR)_144N+	○
		H5(ASGR)_V223I, 144N+	○
		H5(ASGR)_154TGT	○
		H5(ASGR)_158N+	○
		H5(ASGR)_154TGT, 158N+	○
		H5(ASGR)_144N+, 158N+	○
		H5(ASGR)_H103Y	○
		H5(ASGR)_K161E	○
		H5(ASGR)_L317P	○
		H5(ASGR)_H103Y, K161E, L317P	○
	NA	N8	○
N8_S369N		○	
H5N6(2.3.4.4)	HA	H5(ASGR)	○
	NA	N6	○

2) H5N1 바이러스의 HA, NA 유전자 제작

(1) HA, NA 유전자 제작

- H5N1의 경우 유전자를 합성하지 않고 국내 분리주인 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (H5N1) (이하 K10-483) 바이러스로부터 HA와 NA 유전자를 호프만 벡터에 클로닝하였음. HA cleavage site 는 ASGR로 변경하여 병원성을 낮춰주었음. (표 9)

(2) HA mutagenesis



- H5N1 clade 2.3.2에서부터 2.3.2.1c로 진화하는 과정에서 receptor binding site에 생긴 두 가지 돌연 변이를 없애는 돌연변이 유전자를 합성하여 clade 2.3.2.1c 바이러스와 증식성 및 병원성을 비교하여 높은 증식성을 가진 백신 후보주를 확보하고자 함. 2010/2011년 국내에 유행하였던 clade 2.3.2.1c 바이러스의 144번 N-glycan을 TGT로 돌연변이시켜 N-glycan을 제거한 HA 유전자와 I223V 돌연변이를 가지는 HA 유전자, 그리고 두 돌연변이를 가지는 HA 유전자를 클로닝 완료함.

- common epitope을 가리고 있는 154번 N-glycan도 TGT도 돌연변이시켜 N-glycan을 제거한 HA 유전자도 제작 완료함 (표 9).

표 9. H5N1(clade 2.3.2.1c) 플라스미드 제작 목록

	segment	제작 플라스미드 목록	제작 여부
H5N1(2.3.2.1c)	HA	H5(ASGR)	○
		H5(ASGR)_154TGT	○
		H5(ASGR)_144TGT	○
		H5(ASGR)_I223V	○
		H5(ASGR)_144TGT, I223V	○
	NA	N1	○

3) H5N8/H5N6/H5N1 재조합 바이러스 작출

- 기존의 고병원성 조류 인플루엔자 백신이 PR8 backbone으로 HA와 NA만을 조합하여 제작된 것과 달리 internal gene을 조류 인플루엔자 바이러스의 유전자로 맞춰줌으로써 보존적으로 internal gene에 존재하고 있는 T cell epitope에 대한 cytotoxic immunity를 유도할 계획임.
- 위에서 제작된 HA와 NA 유전자 클로닝 벡터 및 01310 internal gene 유전자 클로닝 벡터를 이용하여, 01310 backbone의 고병원성 인플루엔자 백신주 바이러스를 제작할 예정이며, NS 유전자의 경우 0028 바이러스의 유전자를 사용함으로써 더 낮은 병원성과 높은 증식성을 갖도록 할 예정임 (표 10).

표 10. 고병원성 인플루엔자 백신 후보주 작출 계획

계열	재조합 바이러스	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
Major H5N8 (2.3.4.4)	rH5N8 (P)	H5	N8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
	rH5N8-m1	H5	N8	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N8-m2	H5-158N-d154N	N8-01310S	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N8-m3	H5-158N-d154N	N8-483S	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N8-m4	H5-158N-d154N	N8-483S-d85G	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
H5N1 (2.3.2.1)	rH5N1 (P)	H5	N1	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
	rH5N1-m1	H5	N1	01310-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N1-m2	H5-d154N	N1	01301-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV
	rH5N1-m3	H5-d154N	N1-d85G	01301-MVV	01310	01310	Field	Field	0028/EPEV

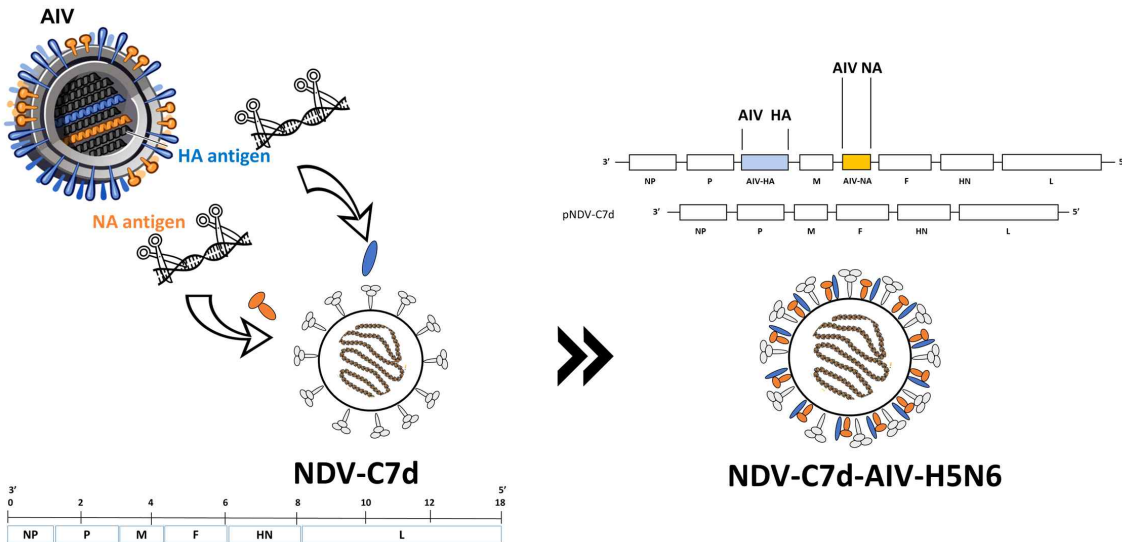


나. 2차년도

(1) 주관기관 : (주)바이오포아

○ AIV 표면항원 발현 NDV 벡터 작성(추가 2종)

- 1차년도 작성 해 놓은 NDV-C7d-AIV-H5N6-HA 벡터에 NA 단백질 발현 유전자를 추가 도입한 재조합 뉴켓슬병 바이러스 벡터 시스템을 개발 함.



- NA 항원 도입확인 실험



P460-NDV-C7d-M-856F +P666-AIV-H5N6-NA-594R primer PCR 확인

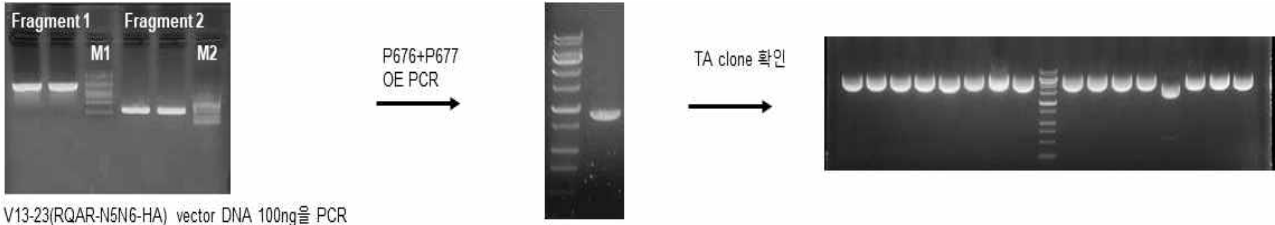
P460-NDV-C7d-M-856F primer CGGACTAAGCTACTTGCTCCT

P666-AIV-H5N6-NA-594R primer CCGTACCACACCACTGCCG

- NDV-C7d-AIV-H5N6-HA-NA 벡터 교정

기존에 제작한 NDV-C7d-AIV-H5N6-HA-NA 발현벡터 게놈(3' 말단에 연결된 리더(leader) 유전자에서 5' 말단에 연결된 트레일러 영역(trailer region)까지)의 nucleotide 수가 NDV와 같은 paramyxovirus의 replication에 필수적인 rule of 6에 맞지 않음을 확인.

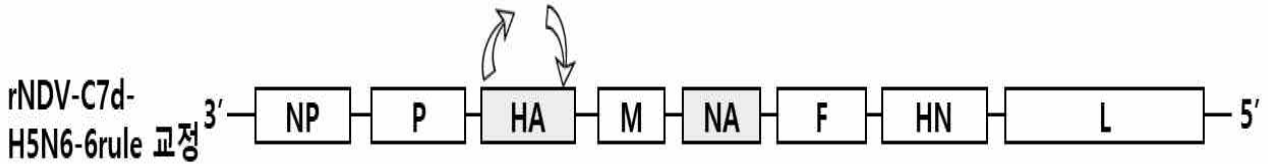
도입하고자 하는 H5N6-HA 유전자 stop codon과 gene end 서열사이에 nucleotide 3개(CTC)를 부과하여 6 rule 규칙에 맞도록 조정 함. (18,345bp -> 18,348bp)



V13-23(RQAR-N5N6-HA) vector DNA 100ng을 PCR

Fragment 1	Primer	Sequence	Amplicon size
676	P676-H5N6-HA-for 6rule-sbf-F	CGATTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTGCCTTCTT	1,521bp
683	P683-H5N6-HA-TGT-R	TACTGGGGATAGTCATACGTCCCGTTCTTACACTTCCATACATTC	

Fragment2	Primer	Sequence	Amplicon size
682	P682-H5N6-HA-TGT-F	GAATGTATGGAAAGTGAAGAACCAGGACGTATGACTATCCCCAGTA	267bp
677	P677-H5N6-HA-for 6rule-sbf-R	CCTGCAGGTTCTACCCGTGTTTTTCTAATCTCGAGTTAAATGCAAAT	



**- Clade 2.3.4.4 group B HA 항원발현 NDV 벡터 작성**

1997년부터 2014년 5월까지 63개국의 가금 및 야생조류에서 7,526건 이상의 HPAI 발생 사례가 보고 되었으며 H5N1 HPAI 연중 발생(endemic) 국가로는 베트남, 방글라데시, 인도네시아, 인도, 이집트, 중국이 있음 (OIE). 국내에는 2003년을 시작으로 2017년 2월까지 총 6회의 HPAI 발생 사례가 보고되었는데 2016년 11월부터 2017년 3월까지 3,430만 수의 닭과 오리 메추리가 살처분 되었으며 피해는 산란계 2,245만 마리에 집중되어 전국에서 사육 중이던 산란계 가운데 32.9%가 살처분 되고 이로 인한 경제적 손실액은 2,090억원에 이릅니다.

우리나라가 AI 발생농가 반경 500m-300km 이내 농장에 대해 예방적 살처분을 실시하는데 비해 미국은 조류독감 발생 농가만 24시간 이내 살처분 하고 반경 3.2km 이내는 모니터링을 하도록 하며 일본의 경우에도 발생 농가만 24시간 이내 살처분 하고 반경 3km 이내는 이동제한을 하는 등 차단방역을 강화하는 정책을 실행하고 있음.

농림축산식품부의 '2014년-2015년 조류독감 발생·확산 원인 및 재발방지 방안연구(AI 백서)'보고서에 따르면 2014년 1-9월 195일간 확진 또는 예방 차원에서 살처분 된 1,396만 마리 중 869만 마리(62.31%)가 정밀검사 결과 '음성'으로 나타나 비효율적인 대량 동물 학살이라는 주장이 커지고 있어 앞으로는 AI 바이러스가 검출된 해당 농가만을 살처분 대상으로 하고, 인근 지역은 이동제한 및 이동중지 명령 등에 의한 차단 방역조치를 강화하며 3-10km 이내의 지역은 링백신을 놓아 외부로 확산되는 것을 막는 방법이 제안되고 있음.

또한 AI가 매년 혹은 격년마다 발생하여 사실상 상재화, 토착화된 상황과 2016년 11월 H5N6 AI 발생에 따른 3,200만 마리의 예방적 살처분 가금류가 3천만수를 넘어서면서 이미 백신 제도가 운영되고 있는 나라와 같이 고병원성 AI백신 접종이 근본적인 예방 정책이라는 주장이 커지고 있음. 현재 15개국에서 HPAI 백신접종이 이루어지고 있으며 이 중 베트남, 인도네시아, 중국, 이집트에서는 전국적인 백신접종 정책을, 멕시코에서는 저병원성 및 고병원성 H5N2 예방을 위한 백신정책을 채택하고 있음(OIE).

사람 인플루엔자 백신의 경우 전 세계적으로 pandemic에 대비하여 유사한 항원성을 가진 바이러스(백신 후보주)로 제조한 mockup 백신에 대한 허가가 이루어지고 있으며 우리나라의 경우 2010년 6월 식약청에서 발간한 「대유행 인플루엔자 백신의 허가·심사가이드」에 이미 mockup 백신의 개념 및 허가를 위한 자료제출범위 등에 대한 가이드가 제공된 바 있음. 이 가이드라인을 바탕으로 모형백신의 안전성과 면역원성을 평가한 후 대유행 발생 시 항원을 대유행 바이러스주로 대체하여 백신을 제조함으로써 대유행 발병에 신속하게 대응할 수 있게 함. 일반적으로 인플루엔자 백신 접종 후 1:15 ~ 1:65의 HI 항체 역가를 보이면 효력시험 결과 피험자 중 50%에서 발병을 예방할 수 있다는 연관성이 제시된 바 있으며 mockup 백신 임상시험 중 면역원성 평가는 백신접종 후 최소 4배이상 HI 항체 역가가 상승된 경우의 seroconversion rate를 측정함.(65세 미만 성인과 소아 집단인 경우 70%, 65세 이상 성인의 경우 60%이상)

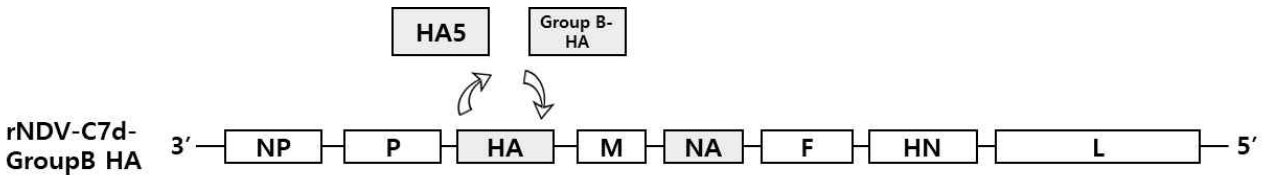
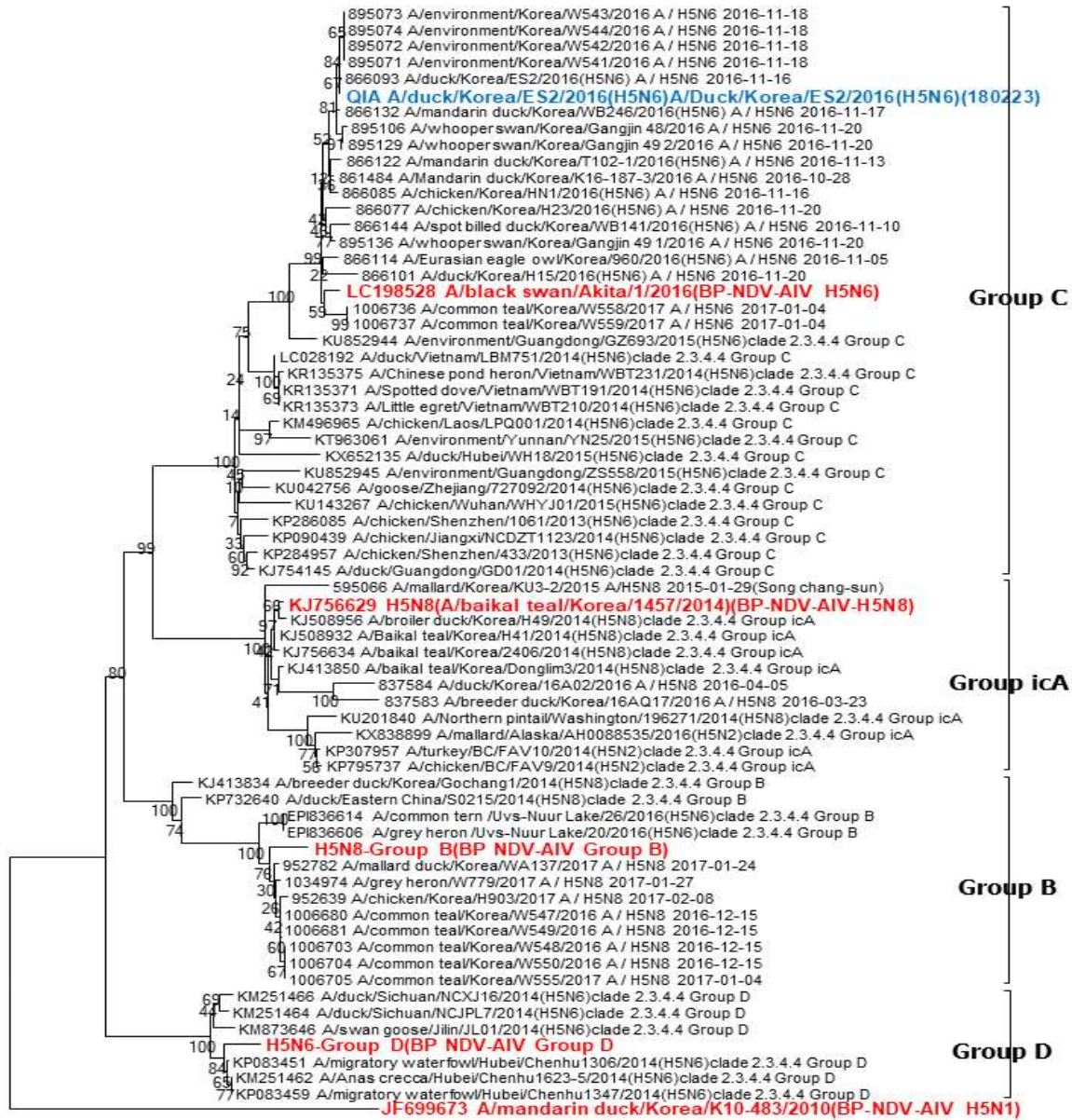
작성된 재조합백신바이러스의 면역원성 평가에서 같은 H5 subtype에 속하더라도 clade간(clade 2.3.4.4 group A/2.3.4.4 group C) 교차면역은 형성되지 않음을 확인 함. 이에 AI 감염에 대한 완벽한 방어(폐사방지 및 oropharynx와 cloaca로 부터의 virus shedding 방지 또는 유의적인 감소)가 가능한 백신개발을 위해 본 과제의 초기 목표였던 유니버설 백신개발 방향에서 벗어나 ND virus를 플랫폼으로 사용한 mockup 백신 개발이 타당하다고 여겨 짐.

ND virus를 이용한 AI mockup 백신은 항원형 선정 후 백신바이러스 작출까지 1개월 밖에 소요되지 않아 새로운 항원형 인플루엔자 발생에 신속하고 효과적으로 대응할 수 있음. 이를 긴급백신(링백신)으로 사용하여 감염계로부터 유출된 바이러스가 주변으로 확산되는 위험을 차단하거나 감소시킬 수 있을 뿐 아니라 백신접종 비용(수당 200원)이 산란계 기준 살처분 보상금(수당 1만원)에 비해 상대적으로 낮아 국가적으로 비용절감 효과가 큼. 또한 최근 유행하는 H5N6형 AI는 빠른 확산속도가 특징인데 대규모 산란계 농장의 잇따른 AI 발생으로 살처분이 지연되면서 이 기간동안 오히려 바이러스가 방치되고 확산되는 위험을 방지할 수 있음.

고병원성 AI 긴급 상황 대비 구축된 항원뱅크에는 최근 국내 및 인접국에서 유행하고 있는 5종 백신주가 포함되어 있음.(Clade 2.3.2.1(C)(베트남주), Clade 2.3.4.4(C)(국내주), Clade 2.3.4.4(A)(국내주), Clade 2.3.4.4(B)(국내주), Clade 2.3.4.4(D)(베트남주))

본 과제에서도 clade 2.3.4.4 내 항원형 A, B, C, D 모두에 대한 각각의 HA 발현 백신종독주 확보를 위해 clade 2.3.4.4 group A(NDV-C7d-AIV-H5N8-HA-NA), 2.3.4.4 group C(NDV-C7d-AIV-H5N6-HA-NA)에 이어 NDV-C7d-AIV-H5N8-HA-NA 백터의 HA 유전자를 clade 2.3.4.4 group B에 해당하는 HA 유전자로 교체한 재조합 뉴캐슬병 바이러스 백터 시스템을 추가로 개발 함

**Phylogenetic trees for HA(Clade 2.3.4.4) – 2016, 2017 국내 분리 등록주(GISAID)28주 포함**



**○ AIV발현 NDV 종독 작출 (추가 2종)**

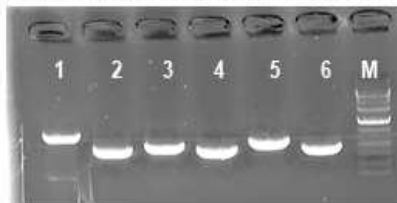
NDV-AI-H5N6-HA-NA와 NDV-AI-groupB-HA-NA 발현벡터로부터 추가 2종의 종독을 작출 함.

**- 재조합 바이러스 작출 방법**

- Hep-2세포 주를 6well 플레이트 에 80%가량 키워놓은 후, vaccinea T7 바이러스를 감염시킨다.

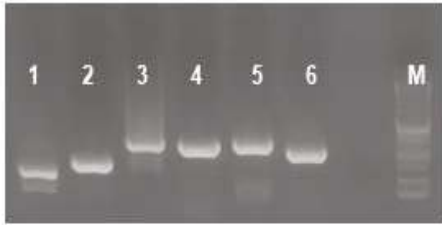
- 이후 세포주에 T7 promoter에 의해 개시되어 단백질이 발현되는 pCR-TM-NP, pCR-TM-P, pCR-TM-L 플라스미드 벡터 3개와 T7 promoter에 의해 개시되어 HDV 라 이보자임에 의해 스스로 절단되어 정확하고 완전한 전체 키메라 내열성 NDV 게놈을 만들어 낼 수 있는 플라스미드인 pTMH-HT-CNDr을 준비한다.
  - 각각을 1:1:0.1 :1비율로 섞어 Lipofectamine™(Invitrogen. co)과 적정 비율로 혼합하여 트랜스펙션 해준다.
  - 이후 1ug/ml 의 acetylated trypsin을 첨가하여 내열성 비병원성 재조합 바이러스가 생성 되어 감염성을 갖도록 해준다.
  - 2-3일간 37°C에서 배양한 후 6웰의 세포를 수확하여 11일령의 SPF 발육란에 접종하여 감염성 NDV를 얻어낸다.

**NDV-C7d vector내 AIV H5N6 항원 도입 바이러스 작출 확인**



No.	Primer	Sequence	확인 부분	PCR	염기서열 분석
698	P698-NDV C7d-P gene-1088-F	GATGCATCCGAGCTCCTCG	P-HA	1,337	P698, P576
576	P576-AIV-H5N6-HA-1022R	CTACCTGATGCTAAAGGACT			
551	P551-AIV-H5N6-HA-F-SbfI	TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTGCTTCTTC	HA	1,032	551, 576
576	P576-AIV-H5N6-HA-1022R	CTACCTGATGCTAAAGGACT			
568	P568-H5N6-HA-872-F	GAATATGGCCACTGCAACAC	HA, HA-M	1,130	568, 550
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC			
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	NA	993	460, 666
666	P666-AIV-H5N6-NA-594R	CCGGTACCACCACTGCCG			
665	P665-AIV-H5N6-NA-467F	CAGTCCATACAACACTAGG	NA-F	1,205	665, 518
518	P518-NDV-C7d-F-reaTime-R	GTGTTCTGTATATGCCTCC			
438	P438-NDV-C7d-Fgene-7536F	TATCCGTGACAAGCTCT	RQGR/RQAR	956	P438, P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			

**NDV-C7d vector내 AIV H5N8-GroupB 항원 도입 바이러스 작출 확인**



No.	Primer	Sequence	확인 부분	PCR	염기서열 분석
698	P698-NDV C7d-P gene-1088-F	GATGCATCCGAGCTCCTCG	P-HA	1,084	P698, 703
703	P703-AIV-H5N6-H5N8-HA-769R	AGTGGATTGCATCATTCGGT			
704	P704-AIV-HA all-HA-478F	TCAGAAATGTGGTATGGCT	HA	707	P704, P527
527	P527-AIV-H5N8-HA-1194R	GTTGACCTTATTGGTAACTCC			
568	P568-H5N6-HA-872-F	GAATATGGCCAAGTCAACAC	HA, HA-M	1,127	P568, P550
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC			
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	NA	1,102	P460, P635
635	P635-H5N8-NA-R	TACCTTGAATGCAAGTACAA			
613	P613-H5N8-NA-563-F	GATGACGATTGGTGAACAG	NA-F	1,142	P613, P518
518	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTTATATGCCTCC			
438	P438-NDV-C7d-Fgene-7536F	TATCCGTCTGACAAGCTCT	RQGR/RQAR	956	P438, P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			

- 작출이 완료된 재조합 바이러스

작출 완료 재조합 바이러스		
재조합 바이러스	1차년도	2차년도
NDV-C7d(RQGR)	○	
NDV-C7d(RQGR)+H5N1-HA (HA 1개 mutation)	○	
NDV-C7d(RQGR)+H5N6-HA	○	
NDV-C7d(RQGR)+H9N2-HA	○	
NDV-C7d(RQGR)+H9N2-HA-NA	○	
NDV-C7d(RQAR)	○	
NDV-C7d(RQAR)+H5N1-HA	○	
NDV-C7d(RQAR)+H5N1-HA-NA	○	
NDV-C7d(RQAR)+H5N6-HA	○	
NDV-C7d(RQAR)+H5N6-HA-NA-6rule(clade 2.3.4.4 group C)		○
NDV-C7d(RQAR)+H5N8-HA	○	
NDV-C7d(RQAR)+H5N8-HA-NA (clade 2.3.4.4 group A)	○	
NDV-C7d(RQAR)+H9N2-HA	○	
NDV-C7d(RQAR)+H9N2-HA-NA		○
NDV C7d(RQAR)+clade 2.3.4.4 groupB-HA-NA		○
3차년도 작출 예정 재조합 바이러스		
NDV C7d(RQAR)+clade 2.3.4.4 groupD-HA-NA		

○ Master seed 특성실험

1. 병원성측정

- MDT(embryo mean death time) 측정

바이러스를  $10^{-1}$  -  $10^{-10}$ 으로 희석한 후 10일령 발육란 5개를 한 그룹으로 접종 당일 오전 9시와 오후 5시에 5개 종란에 바이러스 0.2ml 접종하고 7일간 37도에서 배양하며 관찰함. 치사된 것은 4도 냉장고에서 4시간이상 예냉하여 HA test 후 virus의 감염유무를 확인 함.

최소치사량(Minimum lethal dose)에서의 평균 치사 시간을 계산하는데 경과시간별로 (경과시간 X 치사수)를 산출하여 나온 합계를 치사된 총수로 나누어서 측정 함.  $MDT = (X \text{ 시간의 치사수} * x \text{ 시간}) + (Y \text{ 시간의 치사수} * y \text{ 시간}) + (Z \text{ 시간의 치사수} * z \text{ 시간}) / \text{총 치사수}$

강병원성 바이러스는 60시간 미만, 중병원성 60-90시간, 약병원성은 90시간 이상으로 측정 됨.

- ICPI(Intra cerebral pathic index) 측정

1일령 SPF 병아리 10수에 병아리 1수당 바이러스 0.05ml을 뇌 내로 접종한 후 8일간 관찰하면서 병원성을 측정 함. Alexander의 방법에 따라 계산하는데 정상 병아리는 0, 병증을 보인 병아리는 1, 죽은 병아리는 2로 점수를 매겨 매일 합계를 내어 8일간의 총 점수를 80으로 나눈다. 강병원성 바이러스는 1.2이상, 중병원성 0.6-1.2, 약병원성 0.6 이하로 측정 됨.

2. 증식성

i) 바이러스 역가 측정 : 9-10일령 SPF 종란에 백신 후보주를  $10^{3-4}$  EID<sub>50</sub>/egg 접종하여 바이러스 역가를 측정 함. 인산완충액으로 희석한 바이러스를 10일령 발육계란의 장노막강 내에 0.1ml씩 접종함. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 뉴캐슬병 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 5일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사 함. 닭 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 인정하여 EID<sub>50</sub>을 산출함.

바이러스	희석 배수	중사				혈구응집반응				Titer (EID <sub>50</sub> /ml)
NDV C7d-AIV-H5N6-HANA(E10)	-6	6d	6d			+	+	+	+	9.3
	-7	6d				+	+	+	+	
	-8					+	+	+	-	
	-9	1d				-	-	-	-	
NDV C7d-AIV-H5N1-HANA(E11)	-6	5d	5d	5d	3d	+	+	+	+	9.5
	-7	5d	5d	5d		+	+	+	+	
	-8	5d	5d	5d		+	+	+	+	
	-9					-	-	-	-	

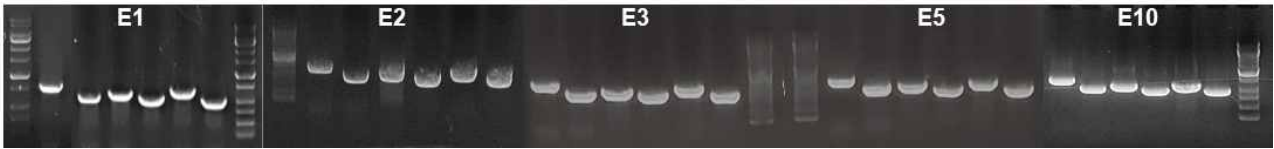
또한 계태아 신장세포(CEK)에 각각의 백신 후보주를 접종 후 배양하여 NDV 특이 세포변성효과의 형성 유무로 세포 감염능을 측정 함. 작출 된 바이러스들은 아직 초기 계대 배양 중으로 plaque purification을 통해 생산성 높은 clone을 분리하고, 이에 대해 최적 증식 조건이 확립되면  $10^{10}$  EID<sub>50</sub>/ml에 가깝게 증식되어 종란 1개 당 최소 1,000수 분 이상의 백신 생산이 기대 됨.

바이러스	희석배수											Titer (TCID <sub>50</sub> /m)
	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	
NDV C7d-AIV-H5N6-HANA(E10)	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	7 / 8	1 / 8	0 / 8	0 / 8	9.2
NDV C7d-AIV-H5N1-HANA(E11)	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8	7 / 8	4 / 8	0 / 8	0 / 8	9.5

### 3. 안정성(계대별 유전적 안정성 측정)

발육란에서 20대까지 계대배양하여 도입 유전자 및 NDV C7d backbone 바이러스의 유전적 안정성을 평가 함. 도입 유전자 전체 및 backbone virus의 특정 부분에 대해 각각 PCR 후 염기서열 분석 진행 함. 현재 NDV C7d-AIV-H5N6-HANA는 E10, NDV C7d-AIV-H5N6-HANA는 E11 계대배양 진행 중 임.  
- NDV C7d-AIV-H5N6-HANA

#### NDV C7d-AIV-H5N6-HANA 계대배양 바이러스 확인

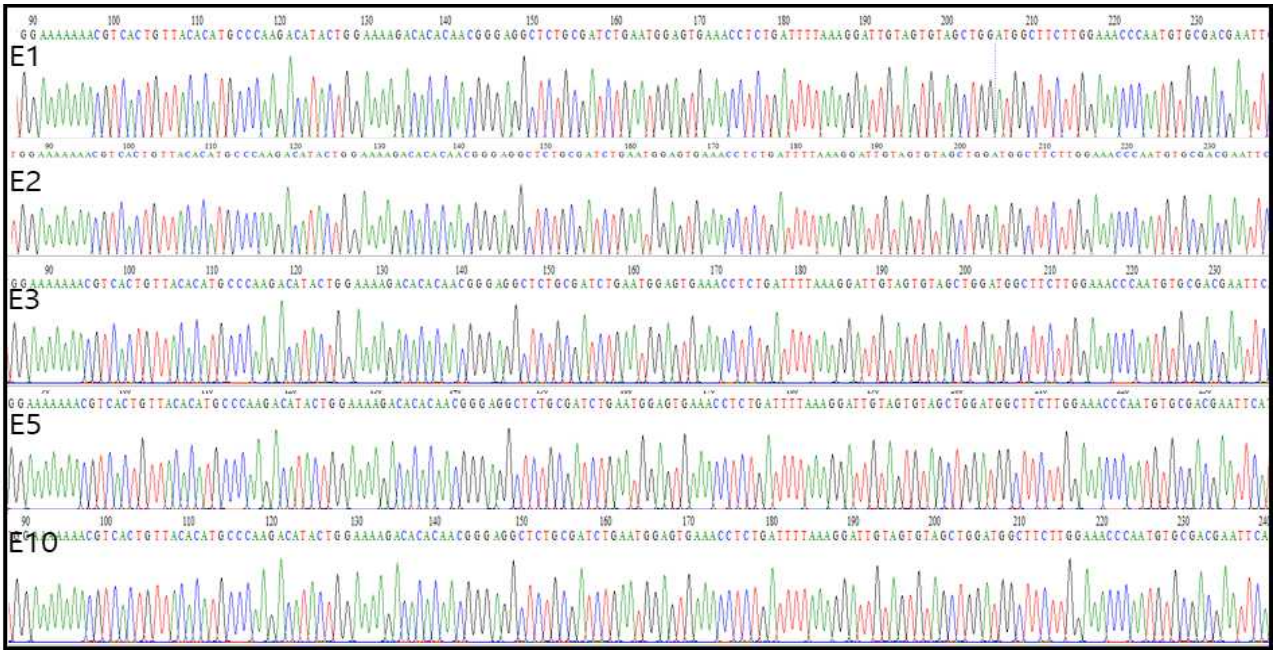


#### < 확인에 사용한 프라이머 세트 >

No.	Primer	Sequence	확인 부분	Amplicon size(bp)	염기서열 분석
698	P698-NDV C7d-P gene-1088-F	GATGCATCCGAGCTCCTCG	P-HA	1,337	P698, P576
576	P576-AIV-H5N6-HA-1022R	CTACCTGATGCTAAAGGACT			
551	P551-AIV-H5N6-HA-F-SbfI	TTCCTGCAGGATGGAGAAAATAGTGCTTCTTC	HA	1,032	P551, P576
576	P576-AIV-H5N6-HA-1022R	CTACCTGATGCTAAAGGACT			
568	P568-H5N6-HA-872-F	GAATATGGCCACTGCAACAC	HA, HA-M	1,130	P568, P550
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCCTGGGATTGTC			
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	NA	993	P460, P666
666	P666-AIV-H5N6-NA-594R	CCGGTACCACCACTGCGG			
665	P665-AIV-H5N6-NA-467F	CAGTCCATACAACACTAGG	NA-F	1,205	P665, P518
518	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTTATATGCCTCC			
438	P438-NDV-C7d-Fgene-7536F	TATCCGCTGACAAGCTCT	F cleavage site	956	P438, P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			



< NDV C7d backbone 바이러스에 도입된 AIV-HA염기서열 확인 >



- NDV C7d-AIV-H5N1-HANA

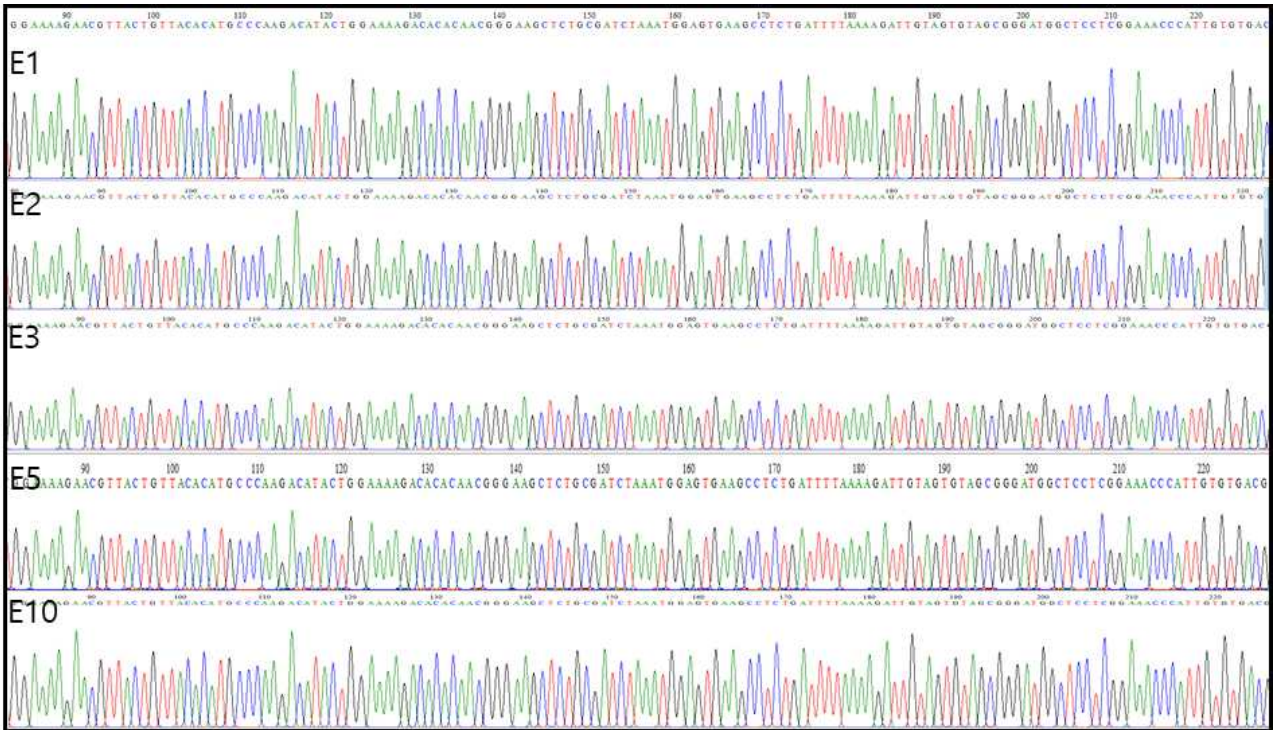
**NDV C7d-AIV-H5N1-HANA 계대배양 바이러스 확인**



< 확인에 사용한 프라이머 세트 >

No.	Primer	Sequence	확인 부분	Amplicon size(bp)	염기서열 분석
433	P433-NDV-C7d-Pgene-2788-F	GGCATGATGAAAATTCTGGAC	P-HA	708	P433, P546
546	P546-H5N1-HA-133R	CATGTGTAACAGTAACGTTT			
530	P530-AIV-H5N1-HA-F-SbfI	TTCTGCGAGGATGGAGAAAATAGTGCTTCTCTTT	HA	1,095	P530, P572
572	P572-AIV-H5N1-HA-1085R	CCATCTACCATTCCCTGCCA			
573	P573-AIV-H5N1-HA-944F	CGGAGAATGTCCCAAATATGT	HA, HA-M	1,041	P573, P550
550	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCTGGGATTGTC			
460	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGTACTTGTCTCCT	NA	1,039	P460, P574
574	P574-H5N1-NA-R	CACATGCACATTCAGACTCT			
532	P532-AIV-H5N1-NA-F-AvrII	GACCTAGGATGAATCCAAATCAGAAGATAATAAC	NA-F	1,650	P532, P518
518	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTTATATGCCTCC			
438	P438-NDV-C7d-Fgene-7536F	TATCCGTCGACAAGCTCT	F cleavage site	956	P438, P471
471	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG			

< NDV C7d backbone 바이러스에 도입된 AIV-HA염기서열 확인 >



5. 안전성 : 1일령 병아리 접종 역가별 안전성

생독바이러스에 대한 안전성을 평가하기 위해 1일령 SPF 병아리에 10dose에 해당하는  $10^7$  virus를 ocular route로 접종 후 2주간 접종바이러스의 병원성 유무를 시험함.

NDV C7d-AIV-H5N6-HANA를 접종하고 관찰한 결과 접종바이러스에 의한 병원성은 관찰되지 않았음.

6. 면역원성

생독바이러스의 면역원성을 평가하기 위해 1일령 SPF 병아리에 각 dose 별 virus를 ocular route 및 분무접종하고 2주후 희생하여 혈구응집억제능을 통해 면역형성을 확인 함.

추가로 불활화 바이러스 boosting 효과를 확인하기 위해 1일령 SPF 병아리에 생독바이러스 접종하고 2 주 후 사독바이러스를 추가 접종 함. 사독바이러스 접종 2주 후 희생하여 혈구응집억제능을 통해 면역형성을 확인 함.

(1) Serum antibody response against NDV(KR005) following vaccination

log10 EID <sub>50</sub> /bird	Number of birds	Age (weeks)	HI titer(2log)												Mean HIT (2log)		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	
10 <sup>7.0</sup> IN	10	2					3	1		4	2						7.40±1.68
10 <sup>7.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	10	4					1		2	7							9.70±0.48
10 <sup>6.0</sup> IN	10	2						1	3	6							7.50±0.85
10 <sup>6.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	10	4					3	3		4							10.20±0.92
10 <sup>5.0</sup> IN	10	2						1	1	8							7.10±1.20
10 <sup>5.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	10	4					1	2		7							10.40±0.84
10 <sup>4.0</sup> IN	9	2					2	2	2	3							6.44±4.31
10 <sup>4.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	9	4						1	3	5							10.89±0.78
10 <sup>6.0</sup> Spray	20	2					2	3	6	7	5						7.00±0.65
10 <sup>6.0</sup> Spray+10 <sup>8.2</sup> IM	20	4						2	14	4							9.50±0.95
Mock(PBS spray)	20	2	20														0.00±0.00
	20	4	15														0.00±0.00

(2) Serum antibody response against AIV(rH5N6) following vaccination

log10 EID <sub>50</sub> /bird	Number of birds	Age (weeks)	HI titer(2log)												Mean HIT (2log)		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	
10 <sup>7.0</sup> IN	10	2					3	1		4	2						6.10±1.66
10 <sup>7.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	10	4					1		2	7							6.50±0.97
10 <sup>6.0</sup> IN	10	2						1	3	6							6.50±0.71
10 <sup>6.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	10	4					3	3		4							5.50±1.35
10 <sup>5.0</sup> IN	10	2						1	1	8							6.70±0.67
10 <sup>5.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	10	4					1	2		7							6.30±1.16
10 <sup>4.0</sup> IN	9	2					2	2	2	3							5.67±1.22
10 <sup>4.0</sup> IN+10 <sup>8.2</sup> IM	9	4						1	3	5							6.44±0.73
10 <sup>6.0</sup> Spray	20	2					1	3	3	8	5						6.65±1.18
10 <sup>6.0</sup> Spray+10 <sup>8.2</sup> IM	20	4						2	14	4							6.10±0.55
Mock(PBS spray)	20	2	20														0.00±0.00
	20	4	15														0.00±0.00

-백신종독(Master Seed)의 약리작용에 관한 자료

- 높은 모체이행항체(7.3log<sub>2</sub> HI titer)를 갖는 산란계 병아리에서의 백신 효능(방어능)평가 표. 초생추 1일령 모체이행항체(NDV 및 H9N2항체가)

No.	HI titer(log <sub>2</sub> )										Mean±S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ND (Kr-005)	7	8	7	7	7	8	9	8	5	7	7.3±1.1
H9N2	6	6	7	5	4	5	7	7	7	6	6.0±1.1

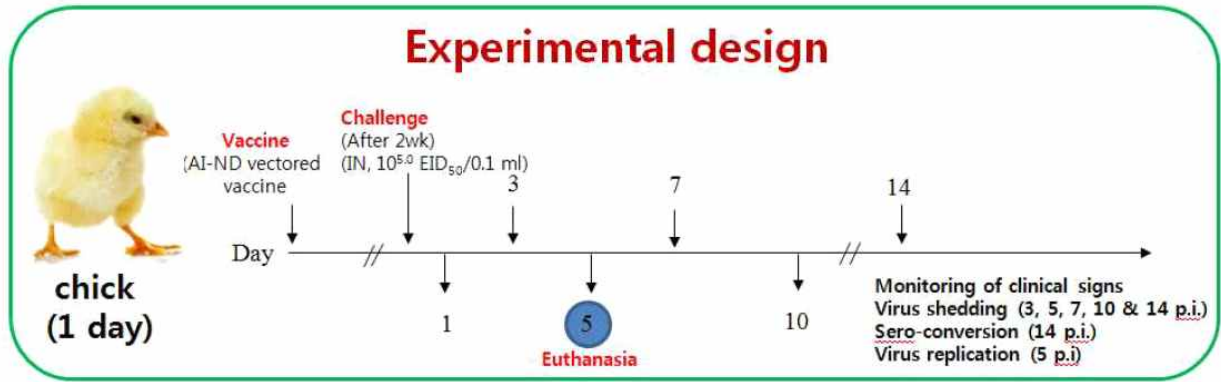
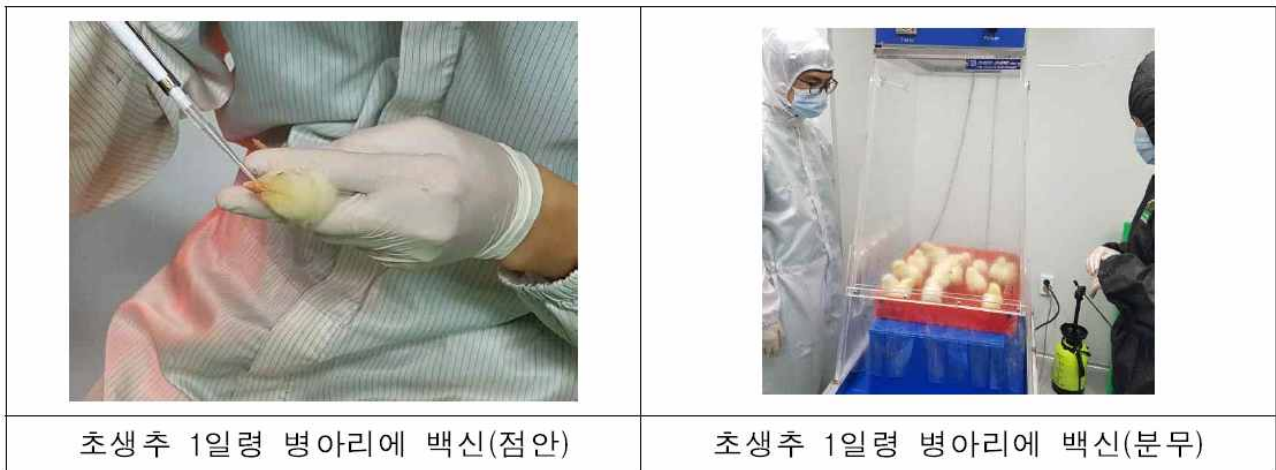


그림. 생독백터 백신주에 대한 효능평가 실험 모식도



#### 【HPAI 바이러스 방어능 시험】

HPAI H5N6에 대한 방어능을 보기위해 각 시험마다 NDV에 대해 높은 모체이행항체( $7.3 \log_2$  HI titer)를 갖고 있으며 HPAI에 감수성이 있는 1일령 산란계 병아리 20마리를 사용하여, 닭 15마리를 시험군으로 하고 5마리를 대조군으로 하였다.

시험군에 백신(바이오포아 HA백신: BP-HA)의 1수분을 사용법에 따라 접종하고 2주후에 시험군 및 대조군에 공격용 바이러스(H5N6:A/broiler duck/Korea/ES2/2016(Clade 2.3.4.4C))를 마리당  $10^{4.0} \sim 10^{5.0}$ ELD<sub>50</sub>을 비강으로 공격접종하고 14일간 이상 유무를 관찰하였다.

표. AI 항체가 측정

백신접종					공격접종		
백신 그룹	접종 루트	접종 (수)	dose	백신항체가 (14dpv)	공격 접종주	Virus titer (EID <sub>50</sub> /0.1ml)	HI titer (14dpi)
BP-HA	점안	5	1	2.8±0.6	ES2 (Cl.2.3.4.4)	5.0	5.8±1.2
BP-HA	분무	5	1	3.8±0.6			6.3±0.8
Control	-	5	-	-			-

초생추 1일령에 백신 접종 2주 후 혈청에 대한 HI test결과 점안(2.8±0.6) 보다는 분무접종군에서 항체가 좀더 높게 나타났음(3.8±0.6)

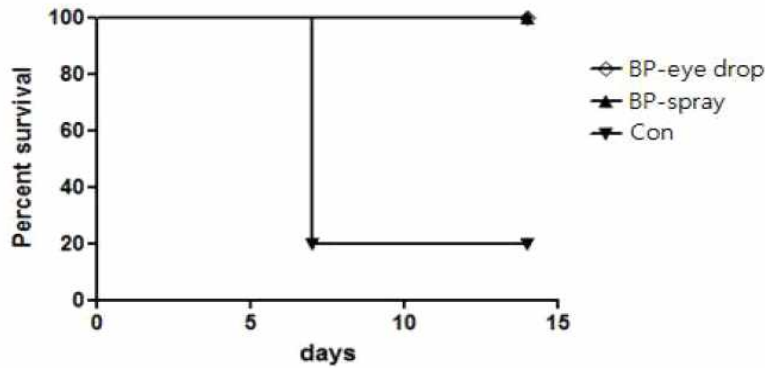


그림. HPAI-방어능 평가(생존율)

백신접종 그룹은 14dpi까지 모두 100% 생존하였지만 대조군의 경우 1마리만(1/5, 20%) 생존하였음.

**【HPAI 바이러스 배출 억제 시험】**

또한 공격 접종한 HPAI 바이러스의 배출의 억제 정도를 확인하기 위해서 공격접종 후 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 후 공격접종 바이러스를 인후두(OP) 및 총배설강(CL)에서 면봉으로 시료를 채취하여 10진 희석 후 바이러스를 분리 배양하여 분리율 및 역가를 측정하였다.

[표 6] AI-인후두 및 총배설강에서의 바이러스 배출

Challenge virus	Group	Sample	No. of chickens shedding virus/total no. chickens on day p.c. (viral titer, log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /0.1ml, mean±standard deviation)					Survival /total
			3	5	7	10	14	
2.3.4.4C (ES2, H5N6) HPAIV	BP-HA (점안)	OP	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
		CL	0/5	2/5 (2.7±0.3)	0/5	0/5	0/5	
	BP-HA (분무)	OP	1/5 (1.5)	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
		CL	0/5	1/5 (1.6)*	0/5	0/5	0/5	
	Control	OP	2/5 (2.9±0.5)	3/5 (1.5±0.5)	0/1	0/1	0/1	1/5
		CL	0/5	3/5 (3.2±0.5)*	0/1	0/1	0/1	

\* 대조군의 총배설강과 비교하여 바이러스배출 억제가 통계학적으로 유의성 있게 나타남 (p<0.01)

시험결과 대조군과 달리 백신 접종군에서는 인후두에서는 바이러스가 배출되지 않았으며, 총배설강에서는 분무한 경우 바이러스배출 억제력이 통계학적으로 유의성 있게 차이를 보였다(p<0.01).

**【ND 바이러스 방어능 시험】**

NDV 방어능 NDV에 모체이행항체를 갖고 있는 1일령 산란계 병아리를 사용하여, 각 시험마다 닭 15마리를 시험군으로 하고 15마리를 대조군으로 하였음.

시험군에 백신의 1수분을 점안 혹은 분무로 접종하고 2주후에 시험군 및 대조군에 공격용 바이러스(교정원주 또는 Kr005)를 마리당 10<sup>5.0</sup> ~ 10<sup>6.0</sup>ELD<sub>50</sub>을 근육으로 공격접종하고 14일간 이상 유무를 관찰하였다.

[표 7] ND-백신 항체가

백신접종				공격접종			
백신 그룹	접종 루트	접종 (수)	dose	백신항체가 (14dpv)	공격 접종주	Virus titer (EID <sub>50</sub> /0.1ml)	HI titer (14dpi)
BP-HA	점안	14	1	4.3±1.0	Kr-005/00 (NDV)	5.5	10.8±1.6
BP-HA	분무	10	1	4.9±1.3			9.3±1.2
Control	-	15	-	2.9±0.8			11*

\* 비백신 대조군 1마리 생존(1/15)

시험결과 백신접종 2주후에 비백신 대조군의 경우 2.9±0.8로 초생추 1일령의 7.3±1.1의 높은 모체이행항체가가 점차 감소하였으나 백신 접종군의 경우 점안접종은 4.3±1.0, 분무접종군은 4.9±1.3으로 대조군과 달리 능동 면역에 의해 항체가가 증가함을 확인하였음.

백신접종 그룹은 14dpi까지 모두 100%생존하였지만 대조군의 경우 1마리만(1/15, 6.7%)생존하였음.

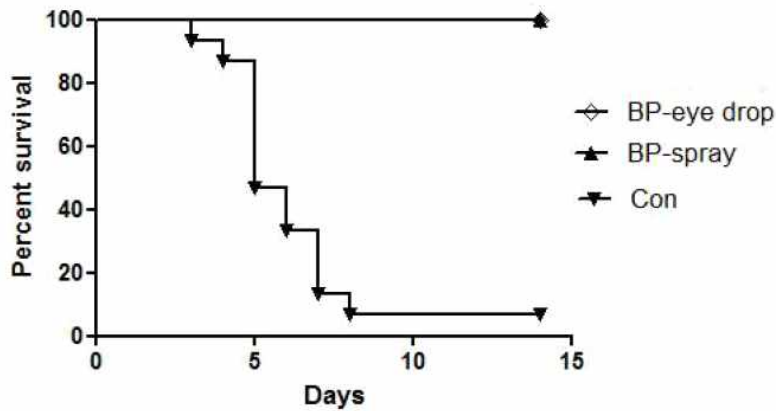


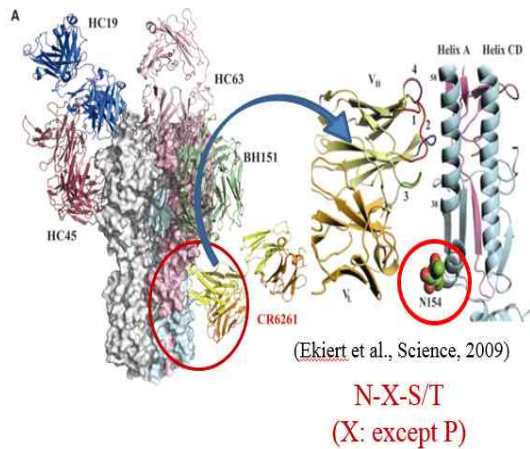
그림. ND-방어능 평가(생존율)

◆ 방어능 평가 결론: 실험동물이 SPF닭이 아니라 NDV에 대해 높은 모체이행항체가 있는 산란계 1일령 병아리를 사용한점을 고려할 때 ND백터를 활용한 HPAI백신은 향후 현장적용가능성이 매우 높을 것으로 생각됨.

(2) 협동기관 : 서울대학교

1. 계대아 저병원성/고생산성/유니버설 H9N2 백신주 제작 및 평가

1) Common epitope에 대한 면역원성을 높이기 위한 HA2 stalk domain mutagenesis



Variation of HA2 common epitope

Subtype	Host	HA2 common epitope			
		42	46	49	53
H1N1	Human	Q	N (90.5%) > D (9.4%)	T	N
	Swine	Q	D (96.2%) > N (3.8%)	T	N
H1N2	Human	Q	N (100%)	T	N
	Swine	Q	D (78.7%) > N (21.3%)	T	N
H3N2	Human	Q	N (83.6%) > D (16.4%)	N (99.9%)	N
	Swine	Q	N (66.1%) > D (33.9%)	N (96.4%) > T (3.6%)	N
H5N1	Human	Q	D (100%)	T	N
	Avian	Q	D (99.1%) > N (0.9%)	T	N
H5N2	Avian	Q	D (98.0%) > N (2.0%)	T	N
H4N6	Avian	Q	D (96.6%) > N (3.4%)	N (100%)	N
H6N1	Avian	Q	D (81.8%) > N (18.2%)	T	N
H9N2	Avian	Q	D (100%)	T	N

- HA2 common epitope은 다양한 subtype의 인플루엔자 바이러스에 대부분 보존되어 있음. 이 보존된 epitope은 현재 인플루엔자 바이러스의 universal vaccine 개발에 주요 target domain으로 고려되고 있음. (Ekiert, Damian C., et al., 2009). 그러나, 모든 인플루엔자 바이러스는 항체와 common epitope간의 결합 부위 인근에 N-glycan (HA2 154N-glycosylation)이 존재하며, 이는 항체의 epitope 인식에 영향을 미칠 것으로 예측됨. 따라서, 본 연구팀은 저병원성 H9N2 바이러스인 01310 22계대주(01310 CE22)의 HA유전자에서 HA2 common epitope 인근의 154N-glycan을 제거한 HA 유전자를 제작하였으며, 이는 H9N2백신 바이러스의 HA2 common epitope에 대한 면역원성 향상을 유도할 것으로 기대하고 있음.

- 본 연구팀은 선행연구를 통하여 HA2 단백질의 154번 N-glycosylation를 제거하되, 바이러스의 증식성에는 영향을 미치지 않는 아미노산 패턴을 확보하였으며 (NGT->TGT) 이에 따라 돌연변이 유전자를 제작함 (표1).

표 1. 01310 바이러스 H9 유전자 돌연변이 제작 목록

H9 유전자 돌연변이 제작 목록	제작 여부
01310(E20)-HA	○
01310(E20)-HA_154TGT	○

## 2) Polymerase 유전자의 프로모터 돌연변이를 통한 고증식성 재조합 H9N2 바이러스 제작

### (1) Polymerase 유전자의 프로모터 돌연변이 및 재조합 H9N2 바이러스 작출

- 현재 국내 저병원성 사독백신주는 01310 바이러스의 CE2를 10일령 SPF 발육란에 18번 계대하여 증식성을 높인 01310 CE20 바이러스가 사용되고 있음.

- 01310 CE20의 유전자를 가진 저병원성 사독백신주를 제작하기 위해 호프만 벡터를 사용한 역유전학 시스템 (Hoffmann, E., et al., 2001, Hoffmann, Erich, et al. 2000)을 사용하였음. 호프만 벡터 시스템은 PR8 바이러스에 최적화된 것으로 이와 동일한 universal primer를 사용하면 세 가지 polymerase 단백질(PB2, PB1, PA)의 viral RNA (vRNA)에 존재하는 프로모터는 4번째 염기가 C인 3'-ucgCuuu-5' (C4)로 맞춰지게 됨. 그러나, 프로모터의 4번째 염기가 U인 경우에 인플루엔자 유전자의 전사와 번역이 증가됨이 여러 연구를 통해 밝혀져 있음(Jiang, Hongbing, et al. 2010, Lee, Mi-Kyung, et al. 2003). 이에 따라 성공적인 01310 바이러스 작출을 위해 01310의 polymerase의 프로모터를 U4로 변경한 유전자를 제작함 (표 2).

표 2. 프로모터 서열 변경한 01310 바이러스 polymerase 클로닝 벡터 제작 목록

01310 polymerase vector	제작 여부
PB2(01310)_U4	○
PB1(01310)_U4	○
PA(01310)_U4	○

- 프로모터 서열 변경한 polymerase 유전자를 이용하여 01310 내부유전자 전체를 가진 재조합 바이러스를 추출하고자 함. 세 가지 polymerase가 모두 C4 프로모터를 가지는 경우(r310-U4)와 PA만 U4인 경우(r310-U4-PA), PB2와 PA가 U4인 경우(r310-U4-PB2A)에는 01310 바이러스가 추출되지 않았음(표 3).

표 3. 프로모터 조합 별 01310 바이러스 추출 여부

재조합바이러스	3'-end promoter			내부유전자	추출여부
	PB2	PB1	PA		
r310-PR8	C4	C4	C4	PR8	○
r310-C4	C4	C4	C4	01310	X
r310-U4-PB2	U4	C4	C4	01310	○
r310-U4-PB1	C4	U4	C4	01310	○
r310-U4-PA	C4	C4	U4	01310	X
r310-U4-PB21	U4	U4	C4	01310	○
r310-U4-PB1A	C4	U4	U4	01310	○
r310-U4-PB2A	U4	C4	U4	01310	X
r310-U4	U4	U4	U4	01310	○

- 이와 동일한 방식으로 저병원성 H9N2인 KBNP-0028 (이하 0028)의 polymerase 유전자의 프로모터 서열을 변경하여 역유전학 시스템으로 추출하였음. 0028은 01310과 달리 프로모터가 모두 U4인 경우에도 성공적으로 추출(표 4)되어 01310과 0028 바이러스의 polymerase 단백질의 활성차이가 있음을 알 수 있었음.



표 4. 프로모터 조합 별 0028 바이러스 작출 여부

재조합바이러스	3'-end promoter			내부유전자	작출여부
	PB2	PB1	PA		
r0028-PR8	C4	C4	C4	PR8	O
r0028-C4	C4	C4	C4	0028	O
r0028-U4-PB2	U4	C4	C4	0028	O
r0028-U4-PB1	C4	U4	C4	0028	O
r0028-U4-PA	C4	C4	U4	0028	O
r0028-U4-PB21	U4	U4	C4	0028	O
r0028-U4-PB1A	C4	U4	U4	0028	O
r0028-U4-PB2A	U4	C4	U4	0028	O
r0028-U4	U4	U4	U4	0028	O

- 실제로 polymerase 활성을 평가하는 mini-genome assay로 바이러스를 작출하기 위해 사용되는 293T cell에서의 01310과 0028의 polymerase 활성을 비교한 결과, 0028이 01310보다 더 높은 활성을 가짐을 확인할 수 있었음(그림 1). 즉, 0028은 polymerase 유전자의 프로모터를 U4로 바꾸지 않아도 바이러스가 충분히 작출될 정도의 polymerase 활성을 가지고 있음을 알 수 있음.

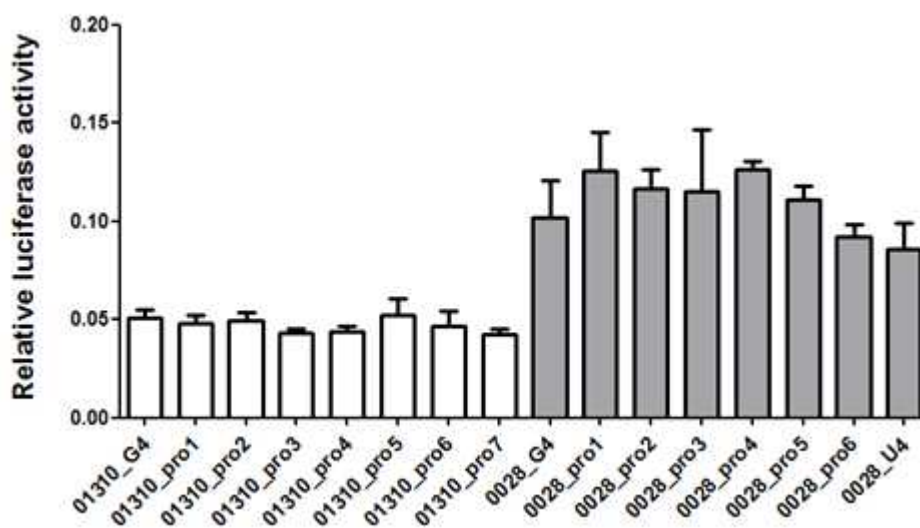


그림 1. 01310과 0028의 polymerase activity 측정 결과

- 이 결과를 통하여 polymerase 단백질의 활성이 낮은 바이러스의 제작에 polymerase 유전자의 프로모터를 U4로 변경하는 방식을 활용할 수 있음을 확인함.

(2) polymerase 유전자의 promoter 조합에 따른 증식성 평가

- 01310과 0028의 내부유전자의 재조합 백신주로서의 사용 가능성을 평가하기 위해서 재조합 바이러스의 계란에서의 역가 및 포유류 세포인 MDCK cell과 A549 cell에서의 증식성을 평가함.

- 재조합 01310 바이러스와 0028 바이러스를 10일령 발육란에 2번 계대한 뒤, 계란에서의 Egg Infectious Dose (EID50/ml)을 평가하였으며, 모두 높은 역가를 나타냈음(표 5).

- 그 중에서도 PB2와 PB1의 프로모터를 U4로 바꿔준 경우, PR8 재조합 바이러스 대비 역가가 약간 증가한 것을 알 수 있었으며, 반면 PA의 프로모터를 U4로 바꿔준 경우에는 오히려 역가가 감소하였음(표 5). 이를 통해 polymerase 단백질 간의 활성을 조절함으로써 발육란에서 증식성을 잘하는 재조합 바이러스를 제작할 수 있을 것으로 보여짐.

표 5. 재조합 01310, 0028 바이러스의 EID<sub>50</sub>/ml 측정 결과

재조합 바이러스	EID <sub>50</sub> /ml (log <sub>10</sub> )
r310-PR8	8.83 ± 0.14
r310-U4-PB2	9.00 ± 0.43
r310-U4-PB1	9.58 ± 0.29
r310-U4-PB21	9.50 ± 0.50
r310-U4-PB1A	9.00 ± 0.00
r310-U4	8.92 ± 0.14

재조합 바이러스	EID <sub>50</sub> /ml (log <sub>10</sub> )
r0028-PR8	9.95 ± 0.14
r0028-C4	8.67 ± 0.29
r0028-U4-PB2	9.08 ± 0.18
r0028-U4-PB1	9.10 ± 0.30
r0028-U4-PA	8.69 ± 0.13
r0028-U4-PB21	10.13 ± 0.15
r0028-U4-PB1A	8.93 ± 0.21
r0028-U4-PB2A	9.25 ± 0.50
r0028-U4	8.75 ± 0.25

- MDCK cell에서의 TCID<sub>50</sub>/ml 측정 결과, 01310은 높은 증식성을 나타냈으며, 0028은 거의 증식하지 않았음(그림 2). MDCK cell은 a-2,3 및 a-2,6 receptor를 모두 가지고 있는 반면, A549 cell의 경우 a-2,6 receptor만 가지고 있는 것으로 알려져 있으며(Ramos, Irene, et al. 2011), 재조합 01310 바이러스는 MDCK cell에서의 달리 A549 cell에서는 증식하지 않아 포유류에서의 증식성이 낮음을 간접적으로 확인하였음(그림 3).

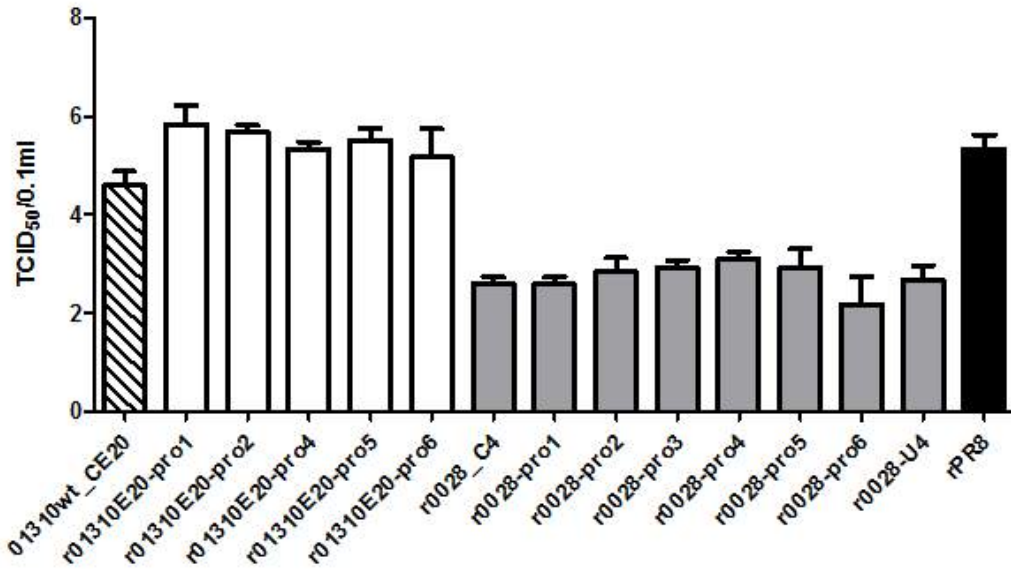


그림 2. MDCK cell에서의 재조합 01310과 재조합 0028 바이러스의 TCID<sub>50</sub>/ml 측정 결과

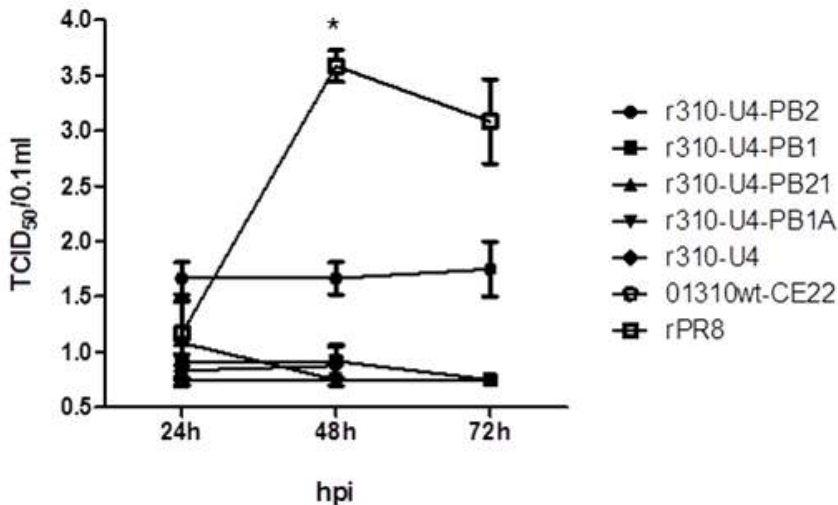


그림 3. A549 cell에서의 재조합 01310의 growth kinetics 측정 결과

- 즉, polymerase 단백질의 프로모터 활성을 조절함으로써 발육란에서의 증식성이 높고 포유류에서의 병원성이 낮은 재조합 H9N2 바이러스를 제작할 수 있음을 알 수 있음.

### (3) 0028 NS 유전자를 이용한 고증식성-계태아 저병원성 백신주 제작

- 01310 CE20의 경우 저병원성인플루엔자 사독백신주로 사용하기 위해서 01310 CE2를 10일령 발육란에 18번 계대하여 증식성을 높였으나, 그와 동시에 계태아에 대한 병원성이 증가하여 10일령 발육란 접종 시 48시간 이내에 계태아가 죽게 됨. 실제로 역유전학을 이용하여 작출한 재조합 01310 바이러스의 경우 SPF 발육란 접종 후 발육란이 죽는 평균 시간인 MDT(Mean Death Time, h)를 측정한 결과, MDT가 평균 48시간으로 짧은 것을 알 수 있었음 (표 7).

- 재조합 01310 바이러스의 증식성은 높게 유지하면서 계태아에 대한 병원성을 낮추기 위해 마우스에서의 병원성이 낮은 0028 바이러스의 NS 유전자를 재조합한 r310-NS28 바이러스를 제작함(표 6). r310-NS28 바이러스

는 SPF 발육란에서 높은 바이러스 역가를 보였으며, MDT가 90시간 이상으로 증가하여 계태아 병원성이 감소한 것을 알 수 있었음(표 7). NS 유전자에서 병원성에 영향을 준다고 알려져 있는 PL motif 및 139번, 151번 아미노산을 돌연변이시킨 0028 NS 유전자를 01310 바이러스에 재조합한 경우에는 다시 MDT가 짧아지는 것을 확인함(표 7). 즉 NS 유전자 내 포유류 병원성에 영향을 미친다고 알려져 있는 PL motif, 139번, 그리고 151번 아미노산은 포유류에서의 병원성뿐 아니라 계태아에서의 병원성에도 관여함을 알 수 있으며, 0028 바이러스의 NS 유전자를 사용하면 계태아에서의 병원성도 낮은 재조합 바이러스를 만들 수 있음을 확인함.

표 6. 0028 바이러스의 NS 유전자를 가진 재조합 01310 바이러스 제작 목록

재조합바이러스	HA	NA	내부유전자	NS	제작여부
r310	01310	CE22	01310	01310	○
r310-NS28	01310	CE22	01310	0028	○
r310-NS28-EPEV	01310	CE22	01310	0028_EPEV	○
r310-NS28-G139D	01310	CE22	01310	0028_G139D	○
r310-NS28-G139N	01310	CE22	01310	0028_G139N	○
r310-NS28-S151T	01310	CE22	01310	0028_S151T	○

표 7. r310-NS28 바이러스의 역가 및 MDT 측정 결과

재조합 바이러스	바이러스 역가 (log <sub>10</sub> EID <sub>50</sub> /ml)	MDT(Mean Death Time, h)
r310	9.17±0.3	48.8±8
<b>r310-NS28</b>	<b>9.36±0.1</b>	<b>94.4±5</b>
r310-NS28-EPEV	8.77±0.2	61.6±6
r310-NS28-G139D	8.37±0.1	75.7±1
r310-NS28-G139N	9.43±0.1	82±2.5
r310-NS28-S151T	8.7±0.2	67.6±3

- r310-NS28의 계태아에서의 낮은 병원성이 요막액 내에서의 증식 시간을 연장시킴으로써 수득할 수 있는 요막액량 및 총 혈구응집역가가 증가할 것으로 예상함. r310과 r310-NS28을 각 100 EID<sub>50</sub>/0.1ml 농도로 0.1ml씩 10일령 SPF 발육란 10개에 접종한 결과 요막액의 양 및 총 혈구응집역가에서 기존 백신주와 동일한 유전자를 지닌 r310 대비 r310-NS28이 더 나은 생산성을 가진 것을 확인할 수 있었음(표 8).

표 8. r310과 r310-NS28 바이러스의 발육란에서의 생산성 비교

	r310		r310-NS28	
Average	Volume of fluid (ml)	11.92	Volume of fluid (ml)	13.25
	HA titer (log 2)	8.3	HA titer (log 2)	8.8
	<b>Total HAU(median)</b>	3975.68	<b>Total HAU(median)</b>	<b>6412.80</b>

- 위의 결과를 통하여 0028 바이러스의 NS 유전자는 H9N2 백신주의 계태아 병원성을 약화시키며, 백신 생산량을 증대시킬 수 있음을 확인하였으며, 이를 토대로 polymerase 유전자의 promoter 강화, HA 유전자의 common epitope을 노출시키는 돌연변이를 모두 가지는 재조합 바이러스를 제작하였음.

### 3) 계태아 저병원성/고생산성/유니버설한 특성을 적용한 H9N2 바이러스의 제작 및 평가

#### (1) 역유전학을 이용한 01310 사독백신주 제작 및 계란에서의 증식성 평가

- 기존의 호프만백터를 사용한 재조합 백신주는 HA와 NA만 유행하는 strain으로 맞추고, 6개의 내부유전자는 증식성이 높은 A/PR/8/34 (H1N1) (이하 PR8)의 유전자를 사용해서 HA와 NA에 대한 항체 형성을 높이는 방식임 (Hoffmann, Erich, et al. 2002). 그러나 HA와 NA는 표면에 노출되어 있어 바이러스의 면역 회피기전으로 많은 변이가 발생하여, 유행하는 strain의 HA와 NA 유전자로 변경해줘야 할 필요가 있음. 이를 극복하기 위해 universal vaccine의 필요성이 대두되고 있으며, universal vaccine 제작의 주요한 타겟은 인플루엔자 바이러스 간에 변이가 적고 보존적으로 존재하는 부분에 대한 면역을 자극하는 것으로 HA 단백질의 HA2 stalk에 대한 항체 형성을 증가시키거나 M2단백질의 extracellular domain(이하 M2e)에 대한 항체 형성을 증가시키는 것임(Pica, Natalie, and Peter Palese. 2013). 또한, 내부유전자에는 T cell epitope이 존재하는데 상대적으로 HA, NA보다 보존적이기 때문에 이에 대한 세포성 면역반응을 유도하는 백신주를 접종한 경우, 다른 HA, NA를 가진 인플루엔자에 대한 방어력이 증가함(Seo, S. H., Peiris, M., & Webster, R. G. 2002, Seo, S. H., & Webster, R. G. 2001).
- PR8 바이러스를 사용한 6+2 형태의 재조합 백신은 내부 유전자 내에 존재하는 T cell epitope이 조류 인플루엔자 바이러스와 다르기 때문에 6개 내부 유전자를 조류인플루엔자 바이러스의 유전자를 사용함으로써 세포성 면역을 자극할 수 있는 백신을 제작하고자 함. 이와 동시에 HA2 stalk에 존재하는 154번 N-glycan을 제거하여 HA2에 대한 항체 형성을 높이고, M2e부분을 가리는 N-glycan이 없는 01310의 M 유전자를 사용함으로써 M2e에 대한 항체 형성도 증가시키고자 하였음.
- 기존 재조합 백신과 동일하게 PR8의 내부 유전자를 사용한 경우와 01310의 내부유전자를 사용한 바이러스 및 HA2의 154번 N-glycan을 제거한 바이러스를 제작하였고, 10일령 발육란에서의 역가를 측정하였음(표 9).

표 9. 사독백신주 후보 바이러스의 유전정보 및 역가

재조합바이러스	HA	NA	내부유전자	EID50/ml(log10)
r310-PR8	01310 CE22	01310 CE22	PR8	8.83 ± 0.14
r310-U4_PB21	01310 CE22	01310 CE22	01310	9.50 ± 0.50
r310-U4-PB21 -HA2(154TGT)	01310 CE22 -HA2(154TGT)	01310 CE22	01310	7.83 ± 0.52

- 8개 전체 유전자가 01310인 경우 PR8의 내부유전자를 사용한 경우보다 계란에서의 증식성이 높았으나, HA2의 154번 N-glycan을 제거한 바이러스의 경우 더 증식성이 낮았음(표 9).

#### (2) 01310 백신후보주 바이러스의 사독백신 접종 및 혈청 내 항체 평가

- 위의 세 바이러스를 BEI로 불활화하고, ISA70 Oil과 7:3으로 섞어서 Oil-adjuvant inactivated 백신을 제작함. 제작된 백신은 6주령 SPF답에 1.5ml씩 근육 접종하여 접종 후 6주까지 항혈청 내의 항체가를 평가하였음.

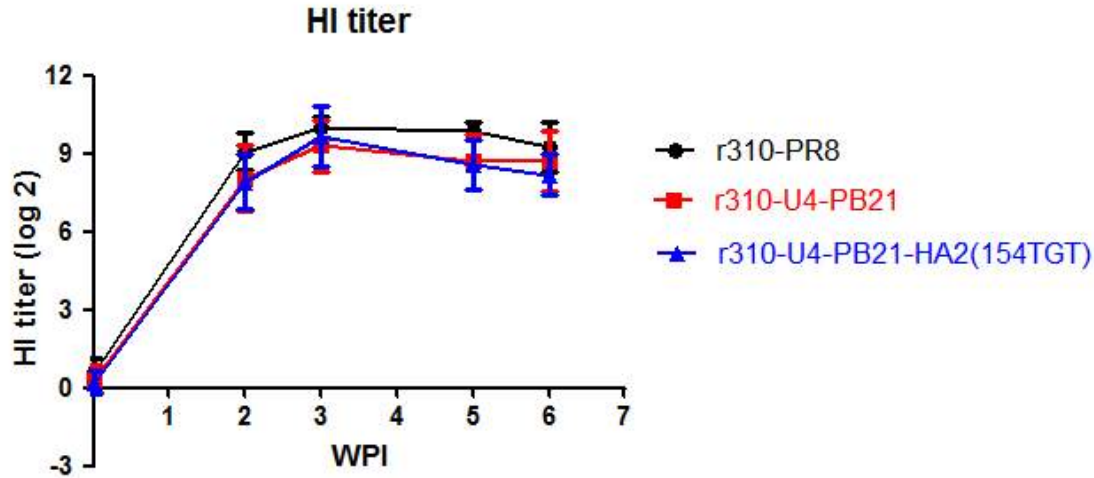


그림 4. 사독백신주 후보 바이러스의 항체 형성능 평가

- 세 가지 사독백신 접종 계군은 접종 후 3주 째에 최고 항체가를 보였으며  $2^9$  이상의 항체가를 보여, 항체 형성능이 우수함을 알 수 있었음. HA2의 154번 N-glycan을 제거한 바이러스의 경우 계란에서의 역가를 낮았으나, 항체 형성능은 비슷하게 나타났음을 확인함(그림 4). 이를 통해 01310의 내부 유전자를 사용하는 것이 PR8의 유전자를 사용하는 것에 비해서 증식성 및 HA에 대한 항체 형성능 부분에서 떨어지지 않음을 알 수 있음. r310-PR8 바이러스의 경우 BALB/c 마우스에서 체중 감소를 보여 포유류에 대한 병원성을 보이는 단점이 있음.

- HA2 stalk의 154번 N-glycan 제거 효과를 확인하기 위해 r310-U4-PB21 와 r310-U4-PB21-HA2(154TGT) 접종 계군의 3WPI 혈청을 이용하여 western blot으로 HA2 에 대한 항체를 비교 하였음(그림 5). 항원으로는 heterogenous한 H1N1 바이러스인 PR8과 homogenous한 야외주 01301 CE22 계대 바이러스를 사용하였음.

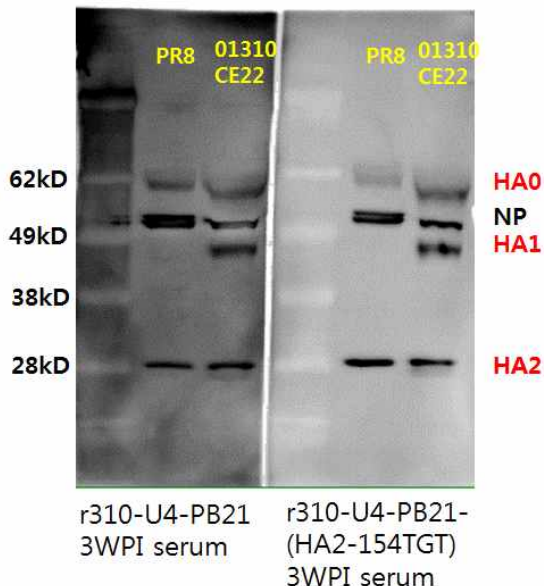


그림 5. r310-U4-PB21 와 r310-U4-PB21-HA2(154TGT) 접종계군의 western blot 결과

- 두 혈청의 HI titer는  $2^7$ 으로 동일하였으나, HA2/M1로 예상되는 크기의 단백질에 r310-U4-PB21-HA2(154TGT) 계군의 항체가 더 많이 결합하여 band가 조금 더 진하게 나타난 것을 확인하였음

(그림 5). HA2와 M1의 위치가 유사하며 HA2 공통항원 부분이  $\alpha$ -helix 구조이므로 SDS-PAGE 하는 경우 항원구조가 변할 수 있으므로 M1 단클론항체로 추가실험을 수행할 계획이며 heterosubtypic protection 여부를 바이러스 중화시험으로 확인할 계획임.

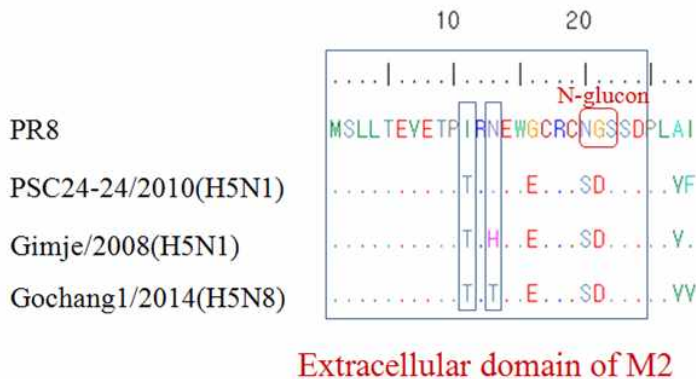


그림 6. PR8과 HPAI 국내 분리주간의 M2e 아미노산 서열 비교

- 재조합 백신주의 backbone으로 주로 사용되는 PR8의 M2e 부분과 국내에서 분리된 HPAI 바이러스들의 M2e 부분을 비교하면 약 5개 정도의 아미노산 차이가 있으며, 특히 PR8에는 N-glycan이 존재하여 이 부분을 가려져있을 수 있기 때문에 HPAI의 M2e와 서열이 동일한 01310의 M 유전자를 사용함으로써 이 부분에 대한 면역반응을 증가시킬 수 있음.
- PR8의 M유전자를 가진 r310-PR8과 01310의 M유전자를 가진 r310-U4-PB21 및 r310-U4-PB21-HA2(154TGT) 접종 계군의 혈청 내에 존재하는 M2e ELISA test를 통하여 01310의 M을 사용하는 것이 M2e부분에 대한 항체를 증가시키는지 확인함.
- Human influenza virus, avian influenza virus 및 H5N8 avian influenza virus의 M2e 부분에 해당하는 펩타이드를 합성하여 ELISA test 진행 중임.

## 2. H5N1(clade 2.3.2.1)/H5N8(clade 2.3.4.4)/H5N6(clade 2.3.4.4) 백신주 개발

### 1) 국내 분리주와 같은 HA, NA 유전자를 가진 H5N1,H5N8,H5N6 바이러스 제작

#### (1) HA, NA 유전자 확보

- H5N1 백신주 제작을 위해 국내 분리주인 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (H5N1) (이하 K10-483) 바이러스로부터 HA와 NA 유전자를 호프만 벡터에 클로닝하고, HA cleavage site는 multibasic한 RERRRK나 REKRRK에서 ASGR로 변경하여 병원성을 낮춰주었음.
- 최근 좀 더 광범위한 HA 단백질에 대한 면역을 유도하는 방법으로써 여러 바이러스들의 'consensus' 서열을 인공적으로 합성하여 백신으로 사용하는 전략이 제시되고 있음 (Kim H, Webster RG, Webby RJ, 2018). 2014년 이후로 국내에서는 H5 clade2.3.4.4 고병원성 조류인플루엔자 (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI) 바이러스에 해당하는 H5N8 바이러스가 전국적으로 유행하였고, database를 통해 국내·외에서의 분리된 야외주의 HA, NA 유전자 정보를 수집하여, 가장 빈도가 높은 아미노산 및 염기서열로 H5 유전자 및 N8 유전자를 합성함. 국내 분리주와 국외분리주가 차이가 나는 아미노산의 경우 국내분리주의 아미노산 서열로 맞춰주었음.
- H5N6 바이러스는 같은 clade 2.3.4.4 임에도 불구하고 H5N8바이러스와의 아미노산 차이가 다수 존재하기 때문에 H5N8의 HA 유전자를 사용하지 않고, 국내·외에서 분리된 H5N6 서열을 모아 가장 빈도가 높은 염기 서열로 HA와 NA 유전자를 합성하였음.
- 합성한 H5 유전자는 병원성을 제거하기 위해 cleavage site를 ASGR로 치환하였음.

(2) PR8 내부유전자를 가진 재조합 H5N1, H5N8, H5N6 바이러스 제작

- 역유전학을 이용하여 호프만 벡터에 클로닝한 H5N1, H5N8, H5N6의 HA, NA 유전자 및 PR8의 6개 내부 유전자를 지닌 6+2 형태의 재조합 바이러스를 제작하고, 10일령 SPF 발육란에서의 역가를 측정하였음. (표 9).

표 10. PR8 내부유전자를 지닌 재조합 H5N1, H5N8, H5N1 바이러스 및 역가

재조합바이러스	HA	NA	내부유전자	EID50/ml(log10)
rH5N1(P)	H5(2.3.2.1c)	N1	PR8	7.35 ± 0.39
rH5N8(P)	H5(H5N8-2.3.4.4.)	N8	PR8	7.25 ± 0.25
rH5N6(P)	H5(H5N6-2.3.4.4.)	N6	PR8	9.33 ± 0.29

- EID50/ml 측정 결과 rH5N1-PR8과 rH5N8-PR8의 역가가 상대적으로 낮아 HA 유전자의 변이를 통해 증식성을 증가시키하고자 하였음.

(3) 증식성 향상을 위한 HA, NA mutagenesis

- 저병원성 H5N1 바이러스인 A/wild duck/Korea/SNU50-5/2009(H5N1) (이하 snu50-5)의 경우, 계태아에서의 20번 이상의 계대를 거치면서 계태아에서의 증식성과 병원성이 높아졌으며, PR8 Backbone으로 snu50-5의 E2와 E20의 HA와 NA 재조합 바이러스의 증식성을 평가한 결과, 내부 유전자 없이도 snu50-5 E20의 HA와 NA만 치환한 경우, CEK와 MDCK에서의 증식성이 snu50-5 E20과 유사한 것을 확인하였음. 이를 통해, 내부 유전자가 아닌 HA와 NA에 생긴 변이가 50-5 바이러스의 증식성과 병원성에 가장 큰 영향을 주는 것을 알 수 있음(Kim and Kwon et al. 2013)(표 11).

표 11. snu50-5 바이러스의 E2와 E20 및 PR8재조합 바이러스의 계태아 증식성 및 CEK, MDCK cell에서의 증식성 비교(Kim and Kwon et al. 2013)

Virus	MDT <sup>a</sup> (hpi)	EID <sub>50</sub> /ml <sup>b</sup> (log <sub>10</sub> )	TCID <sub>50</sub> /ml (log <sub>10</sub> ) <sup>c</sup>					
			CEK <sup>d</sup>			MDCK <sup>d</sup>		
			37 °C	32 °C	37 °C	42 °C	32 °C	37 °C
50-5-E2	35.0 ± 4.0	7.9 ± 0.3	6.4 ± 0.1	6.8 ± 0.5	3.8 ± 0.1	5.4 ± 0.4	6.7 ± 0.1	3.9 ± 0.0
50-5-E20	38.0 ± 4.2	10.0 ± 0.1	7.3 ± 0.3	7.8 ± 0.3	5.5 ± 0.1	6.0 ± 0.2	7.2 ± 0.1	5.3 ± 0.0
rPR8-HN(E2)	104.0 ± 31.7	7.6 ± 0.3	6.6 ± 0.3	7.0 ± 0.3	2.8 ± 0.0	5.7 ± 0.2	6.8 ± 0.1	< 2.25
rPR8-HN(E20)	120 ± 0	9.2 ± 0.3	7.3 ± 0.3	7.9 ± 0.6	3.8 ± 0.0	6.0 ± 0.2	7.8 ± 0.3	3.8 ± 0.0
rPR8-H(E2)N(E20)	NT <sup>e</sup>	7.8 ± 0.6	NT	6.3 ± 0.3	NT	NT	NT	NT
rPR8-H(E20)N(E2)	NT	8.6 ± 0.3	NT	7.3 ± 0.4	NT	NT	NT	NT
rPR8	NT	9.4 ± 0.3	8.3 ± 0.1	8.6 ± 0.3	4.3 ± 0.0	7.9 ± 0.3	8.7 ± 0.2	3.8 ± 0.0

<sup>a</sup> Mean death time of 10-day-old SPF chicken embryos with standard deviation; hpi: hours post inoculation.

<sup>b</sup> 50% of chicken embryo infection dose, EID<sub>50</sub>/ml, geometric mean log<sub>10</sub> titer with standard deviation.

<sup>c</sup> 50% of tissue cell infection dose, TCID<sub>50</sub>/ml, geometric mean log<sub>10</sub> titer with standard deviation.

<sup>d</sup> CEK: chicken embryo kidney cell; MDCK: Mardin-Darby canine kidney cell line.

<sup>e</sup> NT: not tested.

- H5N8 바이러스의 증식성을 높이기 위해 snu50-5 E20의 HA와 NA 유전자에 생긴 아미노산 변이를 적용한 HA, NA 유전자를 지닌 PR8 backbone의 재조합 H5N8 바이러스를 제작하고, 계란에서의 역가를 평가하였음(표 12).



표 12. HA, NA 변이를 적용한 재조합 H5N8 바이러스 및 역가

재조합바이러스	HA	NA	내부유전자	EID50/ml(log10)
rH5N8(P)-m8	H5_H103Y	N8	PR8	9.17 ± 0.14
rH5N8(P)-m9	H5_K161E	N8	PR8	8.25 ± 0.25
rH5N8(P)-m10	H5_L317P	N8	PR8	7.33 ± 0.14
rH5N8(P)-m11	H5	N8_S369N	PR8	7.63 ± 0.32
rH5N8(P)-m12	H5_H103Y,K161E,L317P	N8_S369N	PR8	8.83 ± 0.38

- HA, NA에 변이를 적용한 재조합 H5N8 바이러스의 역가를 측정한 결과, HA 유전자의 103번 아미노산을 히스티딘(H)에서 티로신(Y)으로 변경한 재조합 바이러스에서 증식성이 가장 높게 나타남(표 12). 이 변이를 적용하여 증식성을 높인 H5N8 백신주를 제작 가능함.

(4) 조류인플루엔자 유래의 내부유전자를 갖는 재조합 H5N1/H5N8/H5N6 바이러스 제작 및 평가.

- 다른 subtype 및 strain에 대한 감염 저항성을 높이기 위해 내부 유전자를 PR8이 아닌 조류 인플루엔자의 유전자를 사용함으로써 내부유전자에 존재하는 T cell epitope에 대한 세포성 면역을 높이고자함.
- 01310 바이러스의 PB2유전자는 선행 연구를 통하여 포유류에서의 증식을 하지 못하고, 병원성이 매우 낮음이 확인되었으며(Lee, Chung-Young, et al. 2017), 이를 고병원성 조류인플루엔자 백신에 적용하면 포유류에 병원성이 없는 안전한 백신을 생산할 수 있음.
- clade 2.3.2.1c의 H5N1 바이러스인 K10-483의 HA, NA를 유전자를 이용하여 01310의 PB2와 PR8의 내부유전자를 재조합한 바이러스를 제작하고, 바이러스 역가를 측정하였음. 그 결과, 01310바이러스의 PB2 유전자를 재조합한 rH5N1(P)-PB2(310) 바이러스의 경우 계란에서의 증식성도 증가하였음을 확인할 수 있었음(표 13).

표 13. 01310의 PB2 유전자를 가진 재조합 H5N1 바이러스 및 역가

재조합바이러스	HA	NA	PB2	내부유전자	EID50/ml(log10)
rH5N1(P)	H5(2.3.2.1c)	N1	PR8	PR8	7.35 ± 0.39
rH5N1(P)-PB2(310)	H5(2.3.2.1c)	N1	01310	PR8	8.58 ± 0.14

- 위의 결과를 이용하여 재조합 바이러스의 내부 유전자로 01310의 PB2 유전자를 사용하여 증식성 및 계태아에서의 병원성을 낮추었고, 증식성을 높이기 위해 포유류 및 계태아에 병원성이 낮은 0028의 NS 유전자를 사용하였음. 세포성 면역에서 가장 중요하다고 알려진 NP와 M유전자는 database에 존재하는 고병원성 인플루엔자 서열을 비교하여 가장 유사한 서열을 가진 01310의 M 유전자와 저병원성 H5N1 snu50-5 (50-5)의 NP 유전자를 사용하여 재조합 H5N8, H5N6 바이러스를 제작하였음(표 14).
- H5N8 바이러스의 경우 H103Y 변이를 적용한 HA 유전자를 가진 재조합 바이러스도 함께 제작하여 평가함(표 14).
- 01310의 polymerase 유전자는 포유류 세포에서의 활성이 낮기 때문에 293T cell에서의 효과적인 재조합 바이러스의 작출을 위해 promoter 서열을 C4에서 U4로 변경한 polymerase 유전자를 사용함(표 14).

표 14. 조류인플루엔자의 내부유전자를 이용한 재조합 H5N8, H5N6 바이러스

계열	HA	NA	PB2	PB1, PA	NP	M	NS
H5N8	rH5N8-m7	H5 -H103Y	N8 -S369N	01310 -U4	PR8	50-5	01310 0028
	rH5N8-m8	H5 -103Y	N8	01310 -U4	PR8	50-5	01310 0028
	rH5N8-m10	H5	N8	01310 -U4	PR8	50-5	01310 0028
H5N6	rH5N6-m1	H5	N6	01310 -U4	01310 -U4	50-5	01310 0028
	rH5N6-m2	H5	N6	01310 -U4	PR8	50-5	01310 0028

- 백신으로 사용하기 위한 재조합 H5N8, H5N6 바이러스의 발육란에서의 증식성을 평가하기 위해 10일령 발육란에서의 역가를 측정하였으며, 내부유전자를 PR8이 아닌 조류인플루엔자의 유전자를 사용하였어도 발육란에서의 증식성이 높음을 확인할 수 있었음(표 15).

표 15. 재조합 H5N8, H5N6 바이러스의 EID50/ml 측정 결과

계열	재조합바이러스	EID50/ml(log10)
H5N8	rH5N8-m7	8.67 ± 0.29
	rH5N8-m8	8.50 ± 0.00
	rH5N8-m10	8.58 ± 0.14
H5N6	rH5N6-m1	8.83 ± 0.14
	rH5N6-m2	8.92 ± 0.14

- 재조합 H5N8, H5N6 바이러스의 포유류에서의 증식성 및 병원성을 간접적으로 확인하기 위해 각각의 바이러스를 MDCK cell에 100 MOI로 접종한 뒤, 3일간 배양해 TCID50/0.1ml을 평가하였으며, 조류인플루엔자의 내부유전자를 사용한 재조합 바이러스의 경우 MDCK cell에서 거의 증식하지 못했음(표 16).

표 16. 재조합 H5N8, H5N6 바이러스의 MDCK cell에서의 TCID50/0.1ml 측정 결과

계열	재조합바이러스	TCID50/0.1ml(log10)
H5N8	rH5N8(P)-H103Y	4.08 ± 0.38
	rH5N8-m7	측정 불가
	rH5N8-m8	1.50 ± 0.00
	rH5N8-m10	1.50 ± 0.00
H5N6	rH5N6(P)	6.00 ± 0.25
	rH5N6-m1	3.75 ± 0.25
	rH5N6-m2	1.50 ± 0.25

- 위의 결과를 통해서 조류 유래의 내부 유전자를 사용함으로써 세포성 면역을 자극할 뿐만 아니라 PR8 based 재조합 백신보다 안전한 백신을 만들 수 있음을 확인함.

## 2) H5N8, H5N6 백신 후보주 바이러스의 항체 형성능 평가

- H5N8과 H5N6에 대하여 제작한 HA, NA 유전자의 항체 형성능을 평가하기 위해 PR8 바이러스와 재조합한 바이러스의 닭에서의 항체 형성능을 평가함.
- H5N8 바이러스의 경우 증식성을 높이기 위해 H103Y 단일 돌연변이를 적용한 rH5N8(P)-m8 바이러스를 사용하였고, H5N6 바이러스는 유전자 변이 없이도 높은 증식성을 보여 rH5N6(P) 바이러스를 백신 후보주 바이러스로 사용하였음.
- 두 바이러스를 BEI를 통하여 불활화한 후, ISA70 Oil과 7:3으로 섞어서 Oil-adjutant inactivated 백신을 제작하였으며, 6주령 SPF닭에 1.5ml씩 근육 접종하하고 접종 4주차까지 채혈하여 항체가를 평가하였음(그림 6).

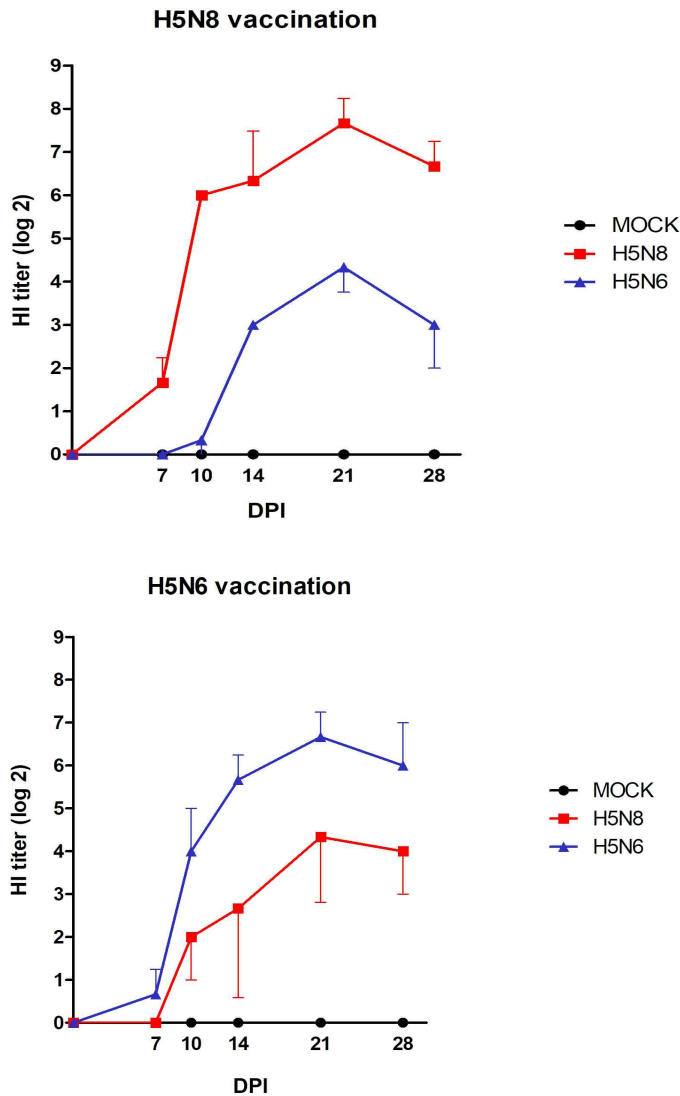


그림 7. H5N8, H5N6 백신 접종 계군의 혈청 내 HI 역가

- 재조합 H5N8 사독백신을 접종한 계군에서는 homogenous virus인 H5N8 항원에 대해서는 상대적으로 높은 항체역가를 확인할 수 있었으며, heterogenous virus인 H5N6 항원에 대해서도 약 16 titer 정도의 의미있는 항체 역가를 확인할 수 있었음 (그림 7). 즉 H5N8 백신 후보주는 homogenous한 바이러스 뿐 아니라, heterogenous한 H5N6 바이러스에 대해서도 일부 방어능을 가질 수 있음을 확인함.
- H5N6 백신 후보주는 증식성에 비하여 상대적으로 낮은 항체 역가를 확인할 수 있었음 (그림 7). 그러나 H5N8 백신 후보주와 마찬가지로 heterogenous 항원에 대해서도 일부 방어능을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었음.

## 다. 3차년도

(1) 주관기관 : (주)바이오포아

### ○ Master seed 특성실험

#### 1. 병원성측정

- MDT(embryo mean death time) 측정

바이러스를  $10^{-1}$  -  $10^{-10}$ 으로 희석한 후 10일령 발육란 5개를 한 그룹으로 접종 당일 오전 9시와 오후 5시에 5개 종란에 바이러스 0.2ml 접종하고 7일간 37도에서 배양하며 관찰함. 치사된 것은 4도 냉장고에서 4시간이상 예냉하여 HA test 후 virus의 감염유무를 확인 함.

최소치사량(Minimum lethal dose)에서의 평균 치사 시간을 계산하는데 경과시간별로 (경과시간 X 치사수)를 산출하여 나온 합계를 치사된 총수로 나누어서 측정 함.  $MDT = (X \text{ 시간의 치사수} * x \text{ 시간}) + (Y \text{ 시간의 치사수} * y \text{ 시간}) + (Z \text{ 시간의 치사수} * z \text{ 시간}) / \text{총 치사수}$

강병원성 바이러스는 60시간 미만, 중병원성 60-90시간, 약병원성은 90시간 이상으로 측정 됨.

- ICPI(Intra cerebral pathic index) 측정

1일령 SPF 병아리 10수에 병아리 1수당 바이러스 0.05ml을 뇌 내로 접종한 후 8일간 관찰하면서 병원성을 측정 함. Alexander의 방법에 따라 계산하는데 정상 병아리는 0, 병증을 보인 병아리는 1, 죽은 병아리는 2로 점수를 매겨 매일 합계를 내어 8일간의 총 점수를 80으로 나눈다. 강병원성 바이러스는 1.2이상, 중병원성 0.6-1.2, 약병원성 0.6 이하로 측정 됨.

#### 2. 증식성

i) 바이러스 역가 측정 : 9-10일령 SPF 종란에 백신 후보주를  $10^{-1}$  ~  $10^{-10}$  희석 접종하여 바이러스 역가를 측정 함. 인산완충액으로 희석한 바이러스를 10일령 발육계란의 장노막강 내에 0.1ml씩 접종함. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 뉴캐슬병 바이러스에 의한 폐사임을 확인 하고 5일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사 함. 닭 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 인정하여 EID<sub>50</sub>을 산출함.

또한 계태아 신장세포(CEK)에 각각의 백신 후보주를 접종 후 배양하여 NDV 특이 세포변성효과의 형성 유무로 세포 감염능을 측정 함. 작출 된 바이러스들은 아직 초기 계대 배양 중으로 plaque purification을 통해 생산성 높은 clone을 분리하고, 이에 대해 최적 증식 조건이 확립되면  $10^{10}$  EID<sub>50</sub>/ml에 가깝게 증식되어 종란 1개 당 최소 1,000수 분 이상의 백신 생산이 기대 됨.

표. 재조합 NDV 바이러스의 증식성 및 병원성 시험 : 작출된 재조합 NDV 바이러스의 SPF 종란에서의 증식성을 측정 한 결과 모두 과제목표 8.0-9.0 EID<sub>50</sub>/ml 이상임을 확인 함. 또한 MDT, ICPI 측정을 통한 중독바이러스의 안전성 시험결과 시험균주 모두 안전한 무병원성 백신 후보주임을 확인 함.

Strain	EID <sub>50</sub> /ml (log10)	TCID <sub>50</sub> /ml (log10)	HA titer (log2)	MDT(h)	ICPI(h)	Pathotype
NDV C7d-AIV-H5N6	9.25	9.9	2 <sup>8</sup>	120hr<	0.05	Avirulent
NDV C7d-AIV-H9N2	9.5	9.9	2 <sup>8</sup>	120hr<	0.26	Avirulent

#### 3. 안정성

1) 계대별 유전적 안정성 측정

발육란에서 20대까지 계대배양하여 도입 유전자 및 NDV C7d backbone 바이러스의 유전적

안정성을 평가 함. NDV C7d-AIV-H5N6-HANA의 도입 유전자 전체 및 backbone virus의 특정 부분에 대해 각각 PCR 후 염기서열 분석 진행 함. 해당 재조합 바이러스를 20대까지 발육란에서 계대배양 후 도입 유전자 및 NDV 주요 항원부위 염기서열을 확인 함. 20대 계대배양까지 도입 유전자 및 NDV 주요 항원부위의 변이가 없음을 확인함.

\* 2차년도 E11까진 진행 후 3차년도 E12-E20진행

그림. NDV C7d-AIV-H5N6-HANA 바이러스의 도입유전자 및 주요 항원부위 RT-PCR

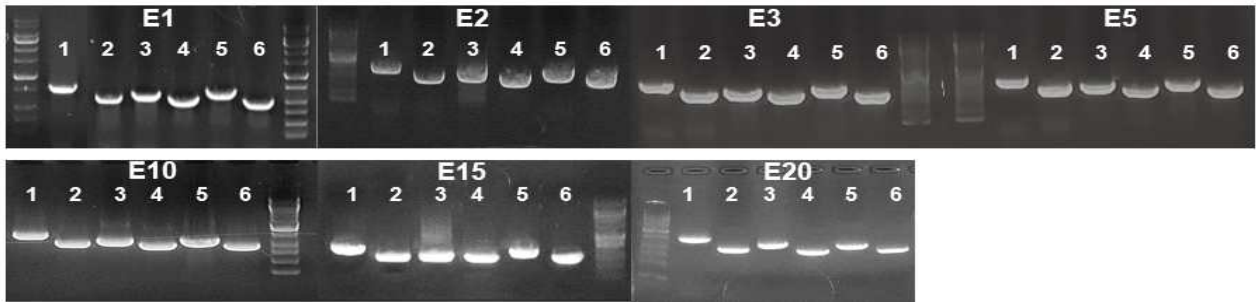
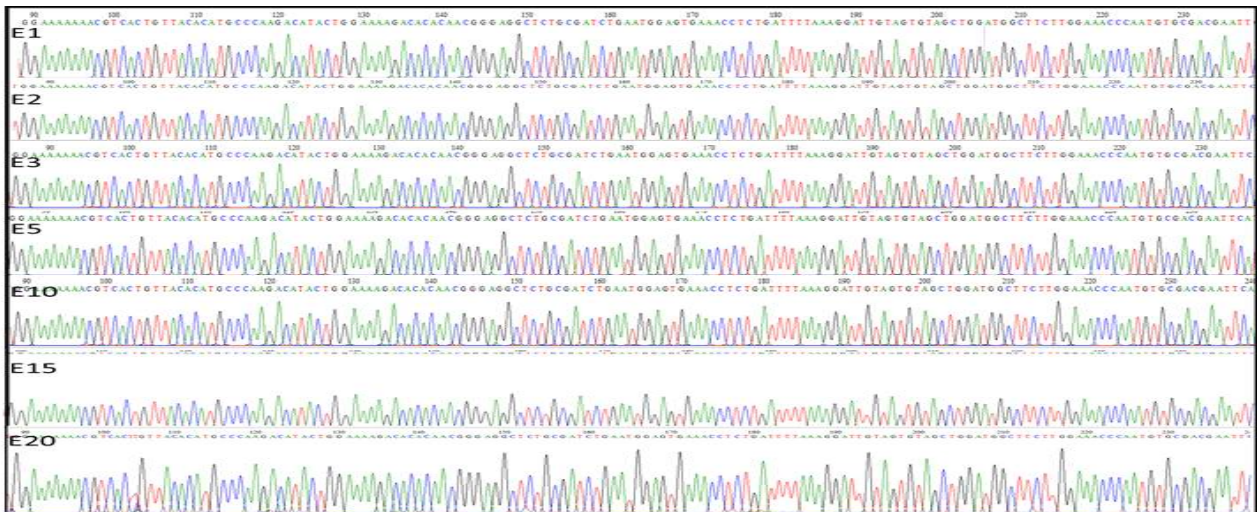


표. NDV C7d-AIV-H5N6-HANA 바이러스의 도입유전자 및 주요 항원부위 확인을 위한 프라이머 세트

No.	Primer	Sequence	확인부분	Amplicon size(bp)
1	P698-NDVC7d-Pgene-1088-F	GATGCATCCGAGCTCCTCG	P-HA	1,337
	P576-AIV-H5N6-HA-1022R	CTACCTGATGCTAAAGGACT		
2	P551-AIV-H5N6-HA-F-SbfI	TTCTGTCAGGATGGAGAAAATAGTGCT	HA	1,032
	P576-AIV-H5N6-HA-1022R	CTACCTGATGCTAAAGGACT		
3	P568-H5N6-HA-872-F	GAATATGGCCACTGCAACAC	H <sup>A</sup> HA-M	1,130
	P550-NDV-C7d-M-3621-R	AGCTCGTGCCTGGGATTGTC		
4	P460-NDV-C7d-M-856F	CGGACTAAGCTACTTGCTCCT	NA	993
	P666-AIV-H5N6-NA-594R	CCGGTACCACACCACTGCCG		
5	P665-AIV-H5N6-NA-467F	CAGTCCATACAACACTAGG	NA-F	1,205
	P518-NDV-C7d-F-realTime-R	GTGTTCTGTTATATGCCTCC		
6	P438-NDV-C7d-Fgene-7536F	TATCCGTCTGACAAGCTCT	F cleavage site	956
	P471-NDV C7d+Ampv-8563R	CCAGATCGGACTCTATACAG		

그림. NDV C7d-H5N6-HANA 바이러스 내 HA 유전자 염기서열 확인



2) 1일령 병아리 접종 계대 수에 따른 유전적 안정성

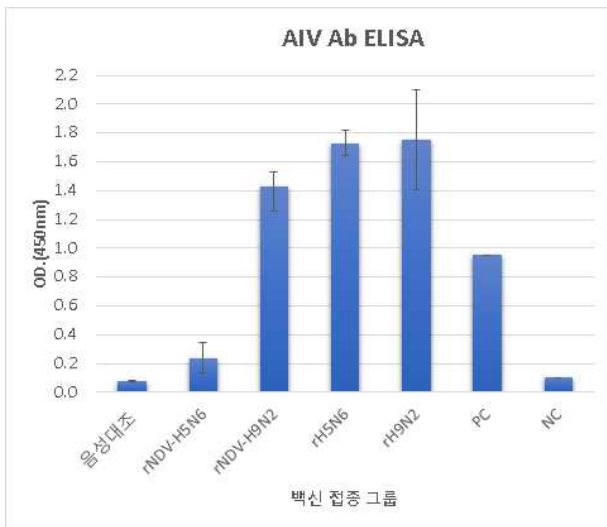
: 유전자변형생물체인 NDV-C7d-H5N6-HANA 재조합 바이러스의 생체 계대를 통한 병원성 증가 혹은 유전적 안전성을 확인하기 위하여  $10^{5.5}$  EID<sub>50</sub>의 접종량으로 1주령 이하의 병아리에 비강 및 점안 접종하고 5일 만에 희생하여 맹장편도 및 기관 샘플을 채취함. 각 개체별 10% 고형분 함량의 장기유제액을 항생제 처리 후 24well plate에 배양해 놓은 CEK primary cell에 0.1ml 씩 접종하여 접종한 바이러스의 분리빈도를 측정하고 pooling 샘플은 10진 희석 후 CEK primary cell에 0.1ml 씩 접종하여 분리된 바이러스의 역가를 측정함. CEK primary cell에서 증식이 확인된 바이러스는 다시 1주령 이하의 병아리로 접종하는 과정을 5번 거친 후 재조합 바이러스 (발육 란 총 15대, 병아리 5대 계대)의 Fusion 단백질의 cleavage site와 HA와 NA gene의 염기서열을 분석. 실험결과 1대-5대 생체계대 병아리의 맹장편도 및 기관 샘플 모두에서 바이러스 검출이 되지 않았음.

표. NDV C7d-AIV-H5N6-HANA 바이러스를 접종한 SPF 병아리에서 접종 바이러스 분리시험결과

Passage	Samples	No. of samples	Virus isolation		
			No. of positives	No. of negatives	Prevalence(%)
C1		3	0	3	0
C2	Trachea	3	0	3	0
C3		3	0	3	0
C4		3	0	3	0
C5		3	0	3	0
C1			3	0	3
C2	C e a c a l tonsil	3	0	3	0
C3		3	0	3	0
C4		3	0	3	0
C5		3	0	3	0

4. 조류인플루엔자바이러스 감염과 백신 면역간의 혈청학적 감별진단(DIVA)

- 시험방법: 시판중인 조류인플루엔자 바이러스 항체진단용 ELISA kit를 이용하여 NDV백터 백신 접종군이 혈청학적으로 재조합 AIV 접종군과 감별되는지 확인하였음. 고병원성 조류인플루엔자용 NDV 백터 백신주 (rNDV-H5N6), 저병원성 조류인플루엔자용 NDV 백터 백신주(rNDV-H9N2)와 재조합 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(rH5N6), 재조합 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(rH9N2)등 총 4종의 백신 주를 모두 불활화하여 ISA70과 혼합한 불활화 오일백신을 3주령 SPF에 접종한 후 3주후에 채혈하여 시판중인 AIV항체 검출용 ELISA kit(VDpro AIV AB ELISA, EP-AIV-01)을 이용하여 혈중항체를 검사하였다.



백신 그룹	HI antigen별 HI titer(log2)		
	NDV	H9N2	H5N6
음성대조군	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
rNDV-H5N6	10.2±0.8	0.0±0.0	5.6±1.3
rNDV-H9N2	10.8±0.4	5.2±0.8	0.0±0.0
rH5N6	NT	NT	5.3±1.6
rH9N2	NT	5.8±0.5	NT

- 시험결과: 재조합 조류인플루엔자 바이러스 백신의 경우 고병원 주와 저병원성 주 모두 양성반응을 보여 야외 감염과 감별이 불가능함을 확인하였다. 그러나 NDV백터 백신의 경우 고병원성 조류인플루엔자 표면 항원을 발현한 NDV 백터백신(rNDV-H5N6)주의 경우 H5N6항원에 대한 평균 HI역가는 5.3(log2)이었으나 ELISA에서는 모두 음성 반응을 보여 **DIVA가 가능함을 보여주었음**. 그러나 저병원성 조류인플루엔자 표면 항원을 발현한 NDV 백터백신(rNDV-H9N2)주의 ELISA에서 모두 양성반응을 보여 DIVA적용이 불가능하였다. 이는 본 시험에 사용한 ELISA kit의 제조과정에서 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(H9N2)주를 사용하면서 고도의 정제과정 없이 뉴클레오캡시드 단백질을 코팅하여 생기는 문제로 해석된다. 만일 AIV진단용 ELISA kit의 제작시 H9와 H5형이 아닌 타 H항원형으로 제작 하거나 재조합 AIV 뉴클레오캡시드 단백질을 이용한다면 저병원성 AIV발현 NDV백터 백신도 DIVA에 적용 가능할 것으로 사료된다.

○ 시험백신의 안전성시험

1) 생독 시험백신의 안전성

NDV C7d-AIV-H5N6-HANA 생독바이러스에 대한 안전성을 평가하기 위해 1일령 SPF 병아리에  $10^{4.5}$ ,  $10^{5.5}$ ,  $10^{6.5}$  EID<sub>50</sub> 및 10dose에 해당하는  $10^{7.5}$  EID<sub>50</sub> virus를 oculonasal route 및 분무 접종 후 2주간 접종바이러스의 병원성 유무를 시험함.

NDV C7d-AIV-H5N6-HANA를 접종하고 관찰한 결과 접종바이러스에 의한 병원성은 관찰되지 않았음.

표. 1일령 SPF 병아리에서 NDV C7d-AIV-H5N6-HANA 생독바이러스의 안전성 시험결과

Group	백신군	임상증상
1	7.5 EID <sub>50</sub> /접안	0/20
2	7.5 EID <sub>50</sub> /분무	0/20
3	6.5 EID <sub>50</sub> /분무	0/10
4	5.5 EID <sub>50</sub> /분무	0/10
5	4.5 EID <sub>50</sub> /분무	0/10
6	대조군	0/10

2) 사독 시험백신의 안전성

NDV C7d-AIV-H5N6 및 NDV C7d-AIV-H9N2사독바이러스에 대한 안전성을 평가하기 위해 6주령 SPF 병아리에  $10^{7.5}$ ,  $10^{8.0}$ ,  $10^{8.5}$  EID<sub>50</sub> 및 2dose에 해당하는  $10^{9.0}$  EID<sub>50</sub> virus를 근육 접종 후 2주간 접종바이러스의 병원성 유무를 시험함.

NDV C7d-AIV-H5N6 및 NDV C7d-AIV-H9N2를 접종하고 관찰한 결과 접종바이러스에 의한 병원성은 관찰되지 않았음.

표. 1일령 SPF 병아리에서 NDV C7d-AIV-H5N6-HANA, NDV C7d-AIV-H9N2 사독바이러스의 안전성 시험결과

Group	NDV-C7d-AIV-H5N6 백신군	임상증상	Group	NDV-C7d-AIV-H9N2 백신군	임상증상
1	9.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	1	9.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
2	8.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	2	8.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
3	8.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	3	8.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
4	7.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	4	7.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
5	대조군	0/5	5	대조군	0/5

표. 1일령 SPF 병아리에서 NDV C7d-AIV-H5N6-HANA, NDV C7d-AIV-H9N2 사독바이러스의 안전성 시험결과

Group	NDV-C7d-AIV-H5N6 백신군	임상증상	Group	NDV-C7d-AIV-H9N2 백신군	임상증상
1	9.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	1	9.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
2	8.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	2	8.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
3	8.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	3	8.0 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
4	7.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5	4	7.5 EID <sub>50</sub> /근육	0/5
5	대조군	0/5	5	대조군	0/5

○ 시험백신의 효력시험

1) 생독시험백신의 효력시험

NDV-AIV-H5N6-HANA 생독시험백신의 면역원성을 평가하기 위해 1일령 SPF 병아리에 각 dose 별 virus를 oculonasal route 및 분무접종하고 2주후 희생하여 혈구응집 억제능을 통해 면역형성을 확인 함.

생독백신, 생독 priming+사독 boost

Vaccine virus	Route	Kr005	Cross-HIT			
			rH5N6	rH5N1	rH5N8	rH9N2
NDV-AIV-H5N6-HANA	7.0 EID <sub>50</sub> O/N	7.4±1.7	6.1±1.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6.0 EID <sub>50</sub> O/N	7.5±0.9	6.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	5.0 EID <sub>50</sub> O/N	7.1±1.2	6.7±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	4.0 EID <sub>50</sub> O/N	6.4±4.3	5.7±1.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6.0 EID <sub>50</sub> spray	7.0±0.7	6.7±1.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
무백신대조군		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0



Vaccine virus	Route	Kr005	Cross-HIT			
			rH5N6	rH5N1	rH5N8	rH9N2
NDV-AIV-H5N6-HANA	7.0EID <sub>50</sub> O/N+10 <sup>8.2</sup> IM	9.7±0.5	6.5±1.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6.0EID <sub>50</sub> O/N+10 <sup>8.2</sup> IM	10.2±0.9	5.5±1.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	5.0EID <sub>50</sub> O/N+10 <sup>8.2</sup> IM	10.4±0.8	6.3±1.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	4.0EID <sub>50</sub> O/N+10 <sup>8.2</sup> IM	10.9±0.8	6.4±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6.0EID <sub>50</sub> spray+10 <sup>8.2</sup> IM	9.5±1.0	6.1±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
무백신대조군		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

2) 사독 시험백신의 효력시험

NDV-AIV-H5N6-HANA 사독시험백신의 면역원성을 평가하기 위해 6주령 SPF 병아리에 각 dose 별 virus를 근육접종하고 3주후 희생하여 혈구응집억제능을 통해 면역형성을 확인 함.

Vaccine virus	Route	Kr005	Cross-HIT			
			rH5N6	rH5N1	rH5N8	rH9N2
NDV-AIV-H5N6-HANA	9.0EID <sub>50</sub> IM	10.2±0.8	5.6±1.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	8.5EID <sub>50</sub> IM	9.4±0.5	5.0±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	8.0EID <sub>50</sub> IM	8.8±0.8	3.4±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	7.5EID <sub>50</sub> IM	8.0±0.7	2.6±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
대조군		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

NDV-AIV-H9N2-HANA 사독시험백신의 면역원성을 평가하기 위해 6주령 SPF 병아리에 각 dose 별 virus를 근육접종하고 3주후 희생하여 혈구응집억제능을 통해 면역형성을 확인 함.

Vaccine virus	Route	Kr005	Cross-HIT			
			rH5N6	rH5N1	rH5N8	rH9N2
NDV-AIV-H9N2-HANA	9.0EID <sub>50</sub> IM	10.8±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	5.2±0.8
	8.5EID <sub>50</sub> IM	9.9±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	5.2±1.4
	8.0EID <sub>50</sub> IM	9.6±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
	7.5EID <sub>50</sub> IM	8.8±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±0.0
대조군		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

(2) 협동기관 : 서울대학교

○ 3차년도

1. clade 2.3.4.4 H5N8, H5N6 백신주 제작

- clade 2.3.4.4 H5N8, H5N6 바이러스의 HA 및 NA 유전자를 모아서 가장 빈도가 높은 아미노산 서열로 consensus H5 (H5N8 strain), H5 (H5N6 strain), N8, N6 유전자를 합성하였음.
- HA 유전자에서 병원성을 나타내는 cleavage site를 polybasic한 서열에서 병원성이 제거된 monobasic한 서열 (ASGR)로 치환하였음.
- 역유전학을 이용하여 1, 2차년도에 진행한 고증식성 변이를 적용한 clade 2.3.4.4. H5N8 및 H5N6 바이러스를 제작함 (표 1).
- HA 유전자에는 H103Y 변이를 적용하고, PB2 유전자는 표유류 무병원성 및 발육란 고증식성의 특성을 갖는 01310바이러스의 PB2 유전자를 사용하였음 .
- NP와 M과 같은 보존적인 서열을 갖는 내부유전자에 대한 세포성 면역을 증진시키기 위해서 조류유래의 바이러스인 01310(H9N2), 0028(H9N2), 50-5(LPAI H5N1) 바이러스의 유전자를 사용하고, 계태아 무병원성 및 고증식성의 특성을 갖는 0028바이러스의 NS 유전자를 사용한 바이러스도 함께 제작하였음.

표 1. clade2.3.4.4. H5N8, H5N6 바이러스 최종 후보주 제작 목록

	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
rH5N8-H103Y-310PB2	H5-H103Y	N8	01310_C4			PR8		
rH5N8-m8	H5-H103Y	N8	01310_U4	PR8	PR8	50-5	01310	0028
rH5N6-310PB2	H5	N6	01310_C4			PR8		
rH5N6-H103Y-310PB2	H5-H103Y	N6	01310_C4			PR8		
rH5N6-m4	H5	N6	01310_U4	PR8	PR8	50-5	01310	0028
rH5N6-m8	H5-H103Y	N6	01310_U4	PR8	PR8	50-5	01310	0028

2. clade 2.3.4.4. H5N8, H5N6 백신주 평가

- 사독백신으로 사용하기 위해서는 고생산성 및 높은 면역원성과 안전성을 모두 갖춰야 함.
- 제작한 백신 후보주 바이러스의 생산성 및 병원성, 면역원성을 평가하기 위해서 발육란에서의 증식성, 포유류 세포주에서의 증식성, 마우스 병원성, 사독백신 접종 후 항체 역가 및 공격접종 후의 방어능을 비교해 보았음.

1) 계란에서의 증식성 평가

- 현재 조류인플루엔자 백신은 SPF 발육란에서 주로 생산되고 있으며, 발육란에서의 증식성이 높은 백신 주가 더 높은 생산성을 가짐.
- 백신 후보주 바이러스를 10일령 발육란에서 2번 계대 후, 2번 계대한 바이러스 (CE2)의 역가 측정하였음. 역가 측정된 바이러스를 100 EID<sub>50</sub> 으로 각각 희석 후 10일령 발육란에 접종하여 발육란에서의 증식성을 평가하였음 (표2).

표 2. 백신 후보주 바이러스의 10일령 발육란에서의 증식성 평가

	EID <sub>50</sub> /ml(log10)
rH5N8-H103Y-310PB2	9.33 ± 0.14
rH5N8-m8	8.67 ± 0.14
rH5N6-310PB2	9.33 ± 0.29
rH5N6-H103Y-310PB2	9.58 ± 0.14
rH5N6-m4	9.25 ± 0.25
rH5N6-m8	8.92 ± 0.38

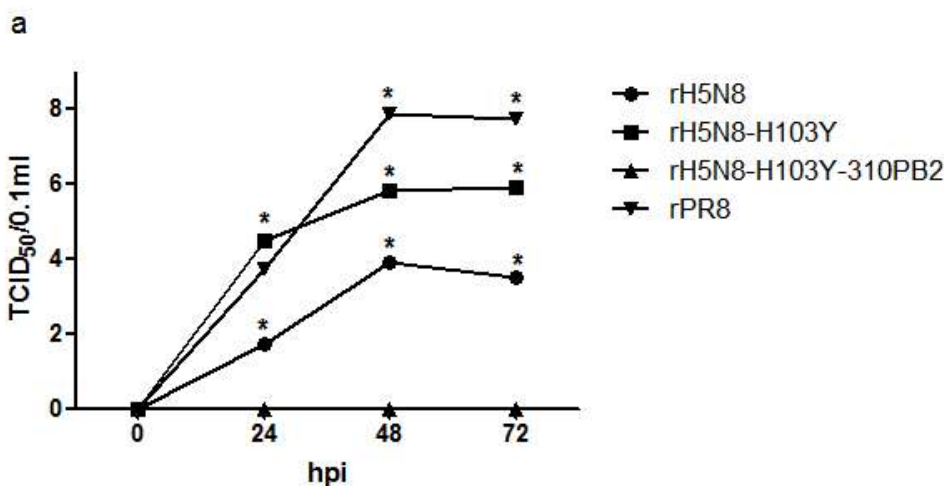
- 여섯가지 백신 후보주 대부분 10<sup>9</sup> 이상의 역가를 나타냈으며, NP, M, NS 유전자를 치환한 바이러스의 경우 상대적으로 약간 낮은 바이러스 역가를 나타냈음. 그러나, 모두 사독백신주로 사용하기에 좋은 높은 증식성을 가지고 있음을 확인함.

2) 포유류 병원성 평가

- H103Y 변이는 여러 선행연구를 통해 포유류에서 공기전파 가능성을 높이는 것으로 알려져 있음 (Herfst, Sander, et al., 2012, Linster, Martin, et al., 2014)
- 증식성을 높이기 위하여 H103Y를 적용했으나, 이 변이가 포유류에서의 병원성을 높이는 위험성이 있기에 백신주의 안전성을 평가하기 위해서 포유류병원성을 포유류 세포에서의 증식성과 마우스 접종 후의 병원성을 확인하는 시험을 진행하였음.

(1) 포유류 세포에서의 growth kinetics 평가

- 백신 후보주 바이러스를 10<sup>5</sup> EID<sub>50</sub>/0.1ml 로 희석하여 12well에서 증식시킨 MDCK cell과 A549 cell에 접종하였음. 바이러스 접종 1시간 후, 바이러스를 제거하고 새 배지로 갈아준 뒤 0,24,48,72시간에 상층액을 수득하여 각각의 TCID<sub>50</sub>를 MDCK cell에서 측정하였음.



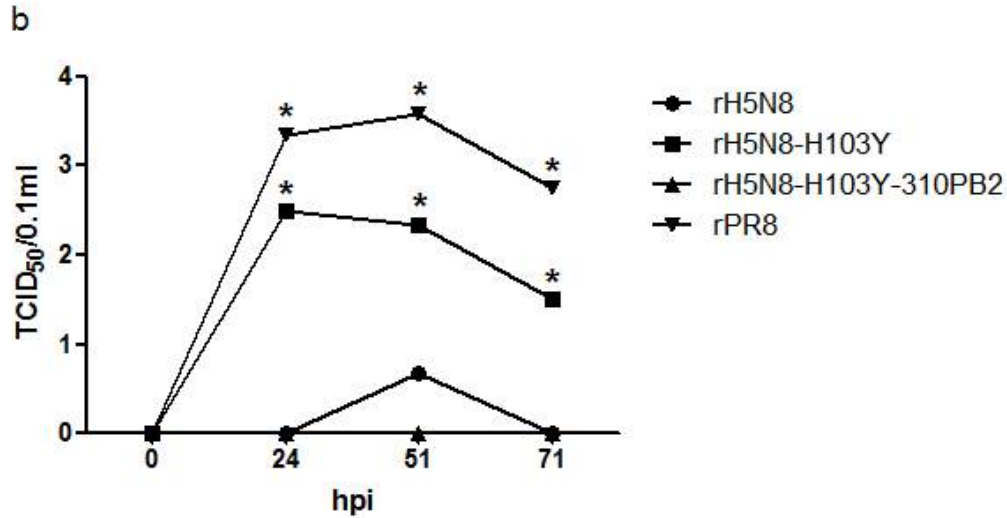


그림 1. clade2.3.4.4 H5N8 바이러스의 포유류 유래 세포주에서의 growth kinetics 평가. (a)MDCK cell 과 (b)A549 cell 두 가지 포유류 유래 세포주에서 모두 H103Y 변이만 적용한 H5N8 바이러스의 경우, 변이를 적용하지 않은 rH5N8 바이러스보다 우의적으로 더 높은 증식능을 보였음. H103Y 변이와 함께 01310 바이러스의 PB2 유전자까지 적용한 H5N8 바이러스는 포유류세포에서 더 낮은 증식성을 보여 01310바이러스의 PB2 유전자를 적용함으로써 포유류 병원성을 더 낮출 수 있음을 확인함.

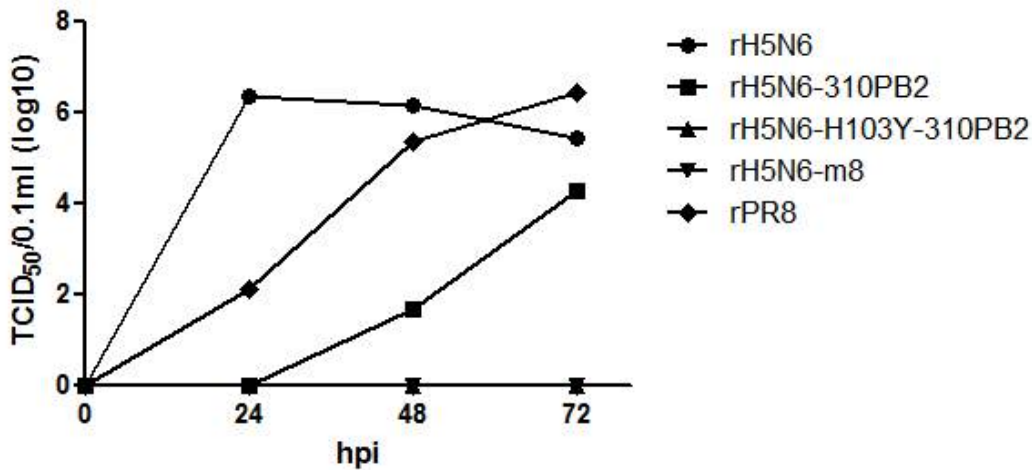


그림 2. clade2.3.4.4 H5N8 바이러스의 MDCK cell에서의 growth kinetics 평가.

- 변이를 적용하지 않은 rH5N6 바이러스의 경우, 접종 후 24시간에 가장 높은 역가를 보인 후 점차 역가가 감소하였음. 반면 rH5N6-310PB2 바이러스의 경우 48시간 후부터 점차 증식하여 72시간에 가장 높은 역가를 나타냈고, rH5N6-H103Y-310PB2와 rH5N6-m8 바이러스는 증식하지 못하였음.
- H5N8 바이러스의 결과와 다르게 01310 바이러스의 PB2를 적용하였음에도 바이러스가 증식하였으며, 이는 rH5N6-H103Y-310PB2와 rH5N6-m8 바이러스가 증식하지 못한 결과로 보아서 재평가가 필요할 것으로 보임.

(2) 마우스 병원성 평가

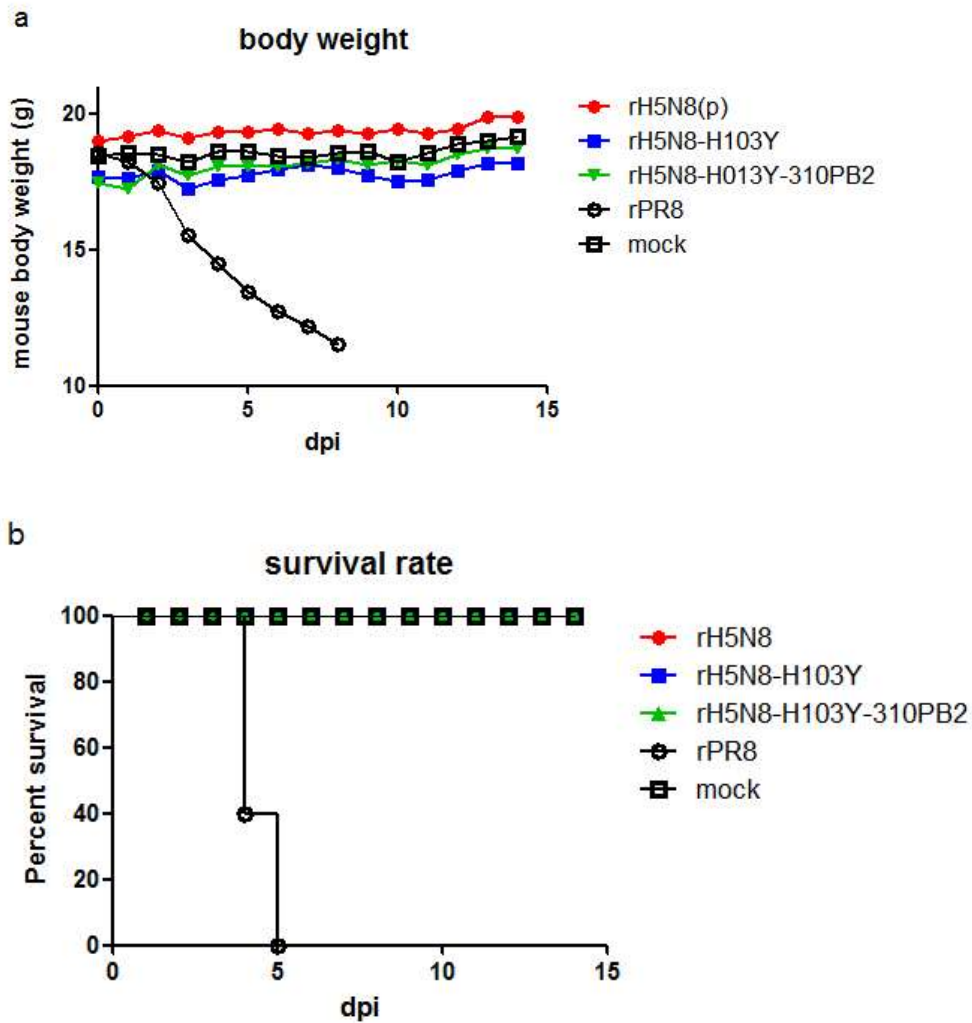


그림 3. clade 2.3.4.4 H5N8 재조합 바이러스의 마우스 병원성 평가시험.

- 실제 포유류에 감염 시의 병원성을 확인하고자, 각각의 재조합 바이러스를  $10^6$  EID/0.05ml로 희석하여, 그룹 당 5마리의 마우스에 각 0.05ml을 비강 내 접종하였음. 접종 후 2주 간 체중 변화를 측정하여, 20% 이상 체중감소가 있는 개체는 안락사를 진행함.
- H103Y 변이를 적용한 rH5N8-H103Y 접종 그룹의 경우에도 체중감소가 없었고, rH5N8 및 rH5N8-H103Y-310PB2도 모두 병원성이 없음을 확인하였음.
- 접종 3일 째에는 각 그룹 당 3마리의 폐를 샘플링하여 폐에서의 바이러스 증식성을 확인하였음 (표 3).

표 3. 재조합 바이러스 접종 3일 째 마우스 폐에서 증식 역가 측정

접종 바이러스	재분리율	EID <sub>50</sub> /ml(log10)
rH5N8	3/3	3.70
rH5N8-H103Y	3/3	4.50
rH5N8-H103Y-310PB2	0/3	0.00
rPR8	3/3	7.25
mock	0/3	0.00

- 그룹 별로 샘플링한 마우스 폐 유제액을 각각 10일령 SPF 발육란에 접종한 뒤, 3일간 배양하여 바이러스 재분리를 확인하였음. 체중 감소가 나타나지 않았던 rH5N8과 rH5N8-H103Y 바이러스도 폐에서 증식함을 확인함.
- 폐에서의 증식 정도를 확인하고자 각 유제액을 pooling 하여 10진 희석한 뒤, 10일령 SPF 발육란에 접종하여 EID<sub>50</sub>으로 바이러스 역가를 측정하였음. H103Y를 적용한 rH5N8-H103Y 바이러스는 세포실험 결과와 동일하게 rH5N8 바이러스보다 더 증식을 잘하는 것을 알 수 있었으며, 01310바이러스의 PB2유전자를 재조합한 경우 아예 증식을 하지 못하여 백신주로서의 안전성을 확보할 수 있음을 확인하였음.

### 3) 내열성 평가

- H103Y 변이의 경우, HA 단백질의 receptor binding site에 존재하지 않음에도 불구하고, 포유류에서의 공기전파를 가능하게 했으며 이는 H103Y 변이가 HA 단백질의 내열성 및 내산성을 높이기 때문이라는 여러 연구 결과가 있음 (Linster, Martin, et al., 2014, de Vries, Robert P., et al., 2014).
- clade 2.3.4.4 H5Nx 바이러스에 H103Y를 적용했을 시에도 내열성이 높아지는지 여부를 확인하기 위해서, rH5N8과 rH5N8-H103Y 두 바이러스를 2<sup>6</sup> HAU로 희석 후 50, 55, 60 °C에서 30분 간 반응시킨 후, HA 역가를 측정하였음 (그림 4).

그림 4. H103Y 변이 차이에 의한 rH5N8 바이러스의 내열성 변화

- rH5N8-H103Y 바이러스의 경우 55°C 까지도 HA titer가 감소하지 않았으며, 반면 rH5N8 바이러스는 55°C에서 2 HAU까지 감소함을 확인하였음. 이를 통해 H103Y 변이가 내열성을 높임을 확인하였음.

- H5N8 바이러스에서만이 아니라 H5N6 바이러스에서도 내열성이 증가하는지 확인하기 위하여 rH5N6, rH5N6-310PB2, rH5N6-H103Y-310PB2 바이러스를  $2^4$  HAU로 희석 후 60 °C에서 0, 5, 15, 30분 간 반응시킨 후, HA 역가를 측정하였음 (그림 5).

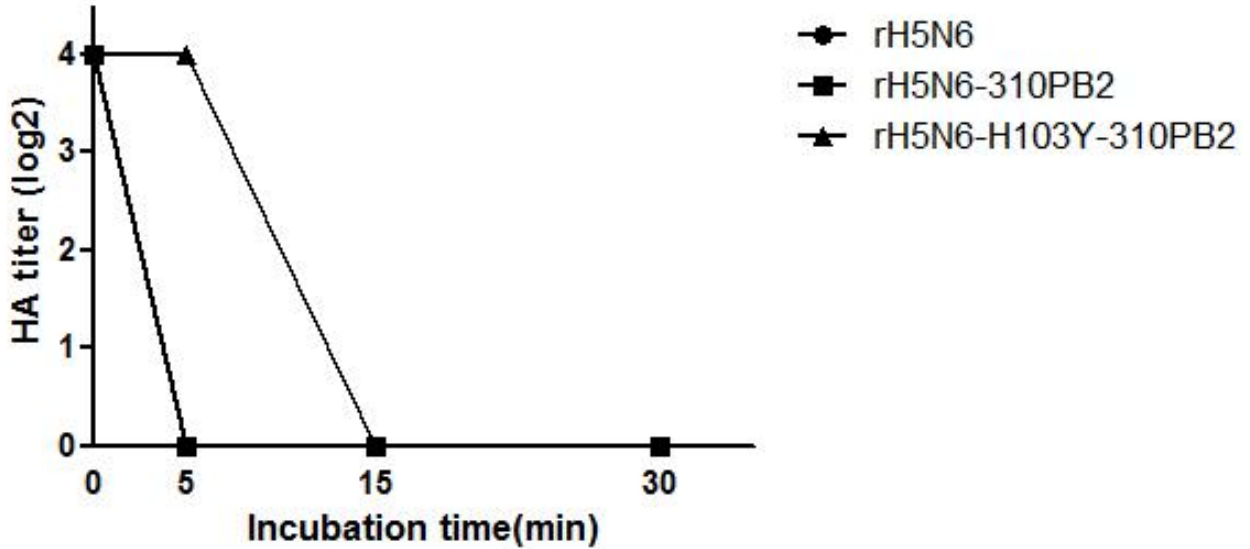


그림 5. H103Y 변이에 의한 rH5N6 바이러스의 내열성 차이

- rH5N6와 rH5N6-310PB2 두 바이러스는 60 °C에서 5분만에 모든 HA 활성이 사라졌으나, rH5N6-H103Y-310PB2 바이러스는 HA 활성이 유지되어 H103Y 변이가 H5N6 바이러스에서도 내열성을 높임을 확인하였음.
- 내열성을 높이는 변이는 백신주로 사용되기 위해서, cold-chain system이 제대로 갖추어지지 않은 상황에서도 HA 활성을 유지할 수 있다는 장점이 있음.

#### 4) 항체형성능 평가

##### (1) 닭에서의 항체형성능 및 방어능 평가

- 닭에서의 사독백신 효능을 확인하기 위해서 총 4종류의 재조합 바이러스를 백신주로 선정하였음 (표 4).
- 백신 후보주 바이러스를 0.1M BEI를 이용하여 불활화하고, 10일령 발육란에 접종하여 불활화확인을 2회 반복하였음. 불활화가 확인된 백신주의 경우 ISA70 oil adjuvant와 7:3의 비율로 섞어 oil emulsion 백신을 제조하였음. 음성대조군의 경우 동량의 바이러스를 접종하지 않은 allantoic fluid를 사용함.
- 각 그룹 당 9마리의 3주령 SPF 닭을 사용하였으며, 개체 당 사독백신은 0.5 ml을 대퇴근육에 접종하였음.

표 4. 계군 별 사독백신 접종 정보

시험군	그룹 당 개체수	접종량, 접종방식
rH5N8-H103Y-310PB2	9	0.5ml, IM
rH5N8-m8	9	0.5ml, IM
rH5N6-310PB2	9	0.5ml, IM
rH5N6-m4	9	0.5ml, IM
control	9	0.5ml, IM

- 접종 전, 접종 3주에 채혈하고, 3주령에 H5N6 야외주 바이러스를  $10^6$  EID/0.1ml 농도로 공격접종하여 1주일간 증상 및 폐사 관찰하였음. 공격접종 1,3,5,7일째에는 인후두 및 총배설강에서 swab하여 바이러스의 shedding되는 양을 real-time RT-PCR로 측정하였고, 공격접종 1주 후에 채혈하여 항체가를 측정하였음.

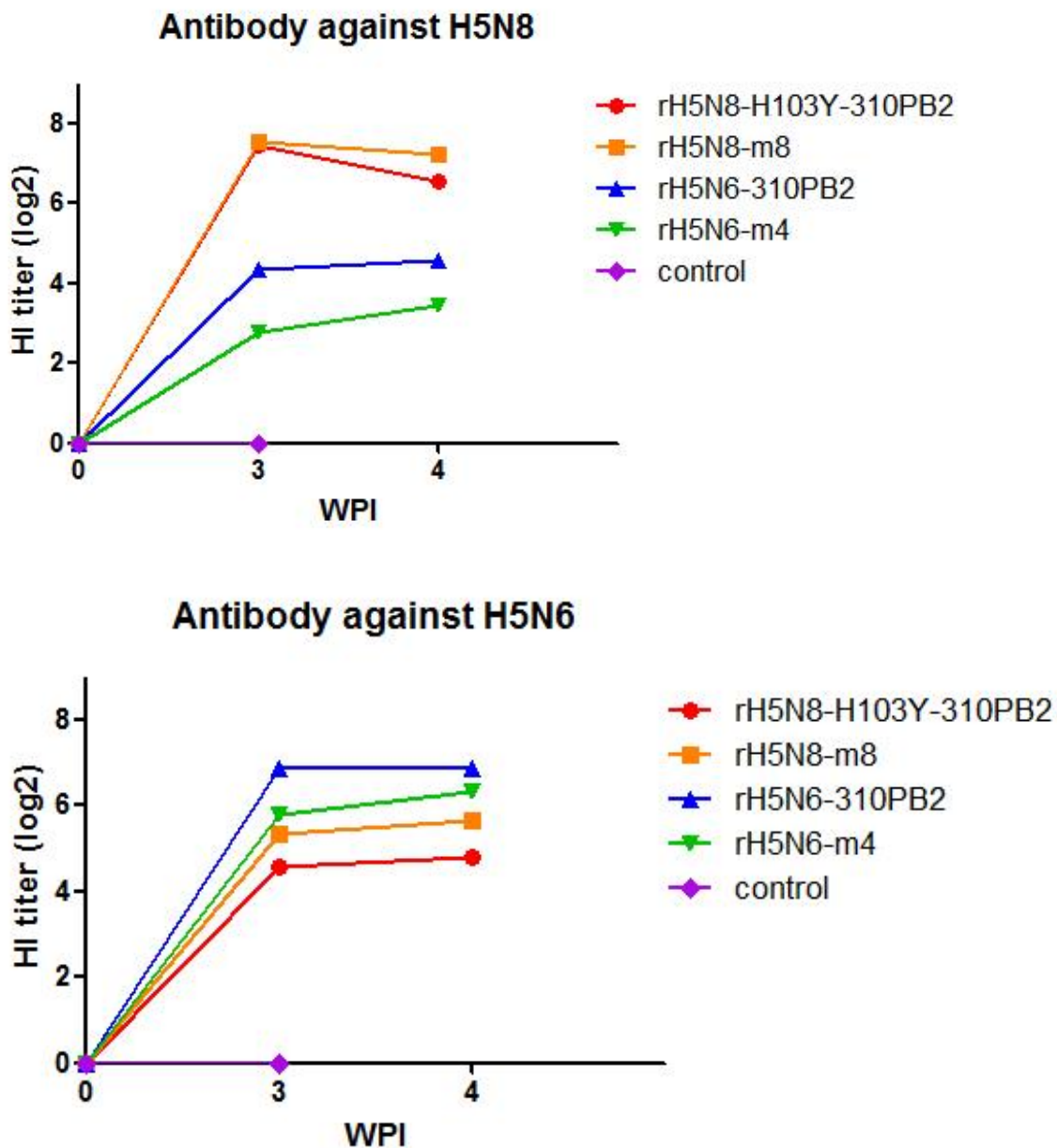


그림 6. 사독백신 접종 계군 혈청 내 항체 역가



- 각 그룹의 혈청은 56 °C에서 30분간 비동화 후 항체 역가를 측정하였음. 항원으로는 rH5N8-H103Y-310PB2 바이러스와 rH5N6-310PB2바이러스 두 가지를 사용하여 항체가를 측정하였음.
- H5N8과 H5N6 두 사독백신 중에서는 H5N8 사독백신 접종 계군에서 더 높은 항체역가를 보임. 같은 H5N6 바이러스로 공격접종한 후에 H5N6 사독백신 접종 계군 항체역가가 더 상승하는 것으로 보아 H5N6 접종 계군은 3주차에 최대 항체역가에 도달하지 못한 것으로 보여짐.
- 또한, 내부 유전자를 모두 avian influenza virus로 맞춰준 rH5N8-m8과 rH5N6-m4의 경우, PR8 내 부유전자를 사용한 백신주보다 더 낮은 항체 형성능을 나타내어 내부 유전자를 맞추는 것은 향후 연구가 더 필요할 것으로 보임.

표 5. 공격접종 1,3,5,7일 후 인후두 (O) 및 총배설강(V)에서의 바이러스 shedding

	rH5N8-H103Y-310PB2		rH5N8-m8		rH5N6-310PB2		rH5N6-m4		control	
	O	V	O	V	O	V	O	V	O	V
1d	0/9	1/9	2/9	1/9	2/9	2/9	4/9	1/9	9/9	7/9
3d	3/9	4/9	3/9	1/9	7/9	6/9	4/9	5/9	9/9	9/9
5d	6/9	4/9	6/9	5/9	4/9	4/9	4/9	4/9		
7d	5/9	1/9	2/9	1/9	3/9	2/9	0/9	0/9		

- rH5N8 사독백신 및 rH5N6 사독백신 접종 계군 모두 H5N6 야외주 공격접종시 전수 방어가 되었으며, 음성대조군은 3일 이내로 모두 폐사함.
- 공격 접종 후 virus shedding 평가를 위해 인후두와 총배설강에서의 swab 샘플에서 M 유전자를 target으로 rRT-PCR로 확인한 결과, 공격접종 바이러스와 다른 subtype 인 H5N8 사독백신주의 경우 내부유전자를 맞춘 rH5N8-m8이 그렇지 않은 rH5N8-H103Y-310PB2 백신주에 비해서 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았음.
- 그러나, 공격접종 바이러스와 같은 subtype인 rH5N6 백신접종 계군의 경우 내부유전자를 맞춘 rH5N6-m4 백신주가 rH5N6-310PB2 백신주에 비해서 더 빨리 shedding이 끝나는 결과를 보여 내부 유전자가 같을 시의 세포성 면역이 더 자극되었을 가능성을 확인할 수 있었음.

(2) 오리에서의 항체형성능 평가

- 오리는 닭보다 고병원성인플루엔자에 대한 저항성이 높으며, 감염 시에도 증상이 없이 바이러스를 배출할 수 있어 오리에서의 백신 접종은 가금에서의 고병원성인플루엔자 감염이 퍼지지 않도록 하는 방법이 될 수 있음 (Alexander, D. J., et al., 1986, van den Brand JMA., et al., 2018).
- 그러나, 오리에서는 닭보다 백신 접종 시 항체 형성이 떨어진다는 여러 연구 결과가 있음 (Kida H., et al., 1980, Middleton D., et al., 2007).
- 본 과제에서 제작한 사독백신주의 오리에서의 항체형성능을 평가하기 위해서 닭 접종 실험에서와 동일하게 사독백신을 제작하여 접종 후 3, 4주차에 항체역가를 평가함 (그림 7,8).
- 1일령오리와 2주령오리에 각각 사독백신 접종 후 항체 역가를 평가하여 일령이 증가함에 따라 면역반응이 성숙함으로써 항체형성이 얼마나 달라지는지 평가하였음.

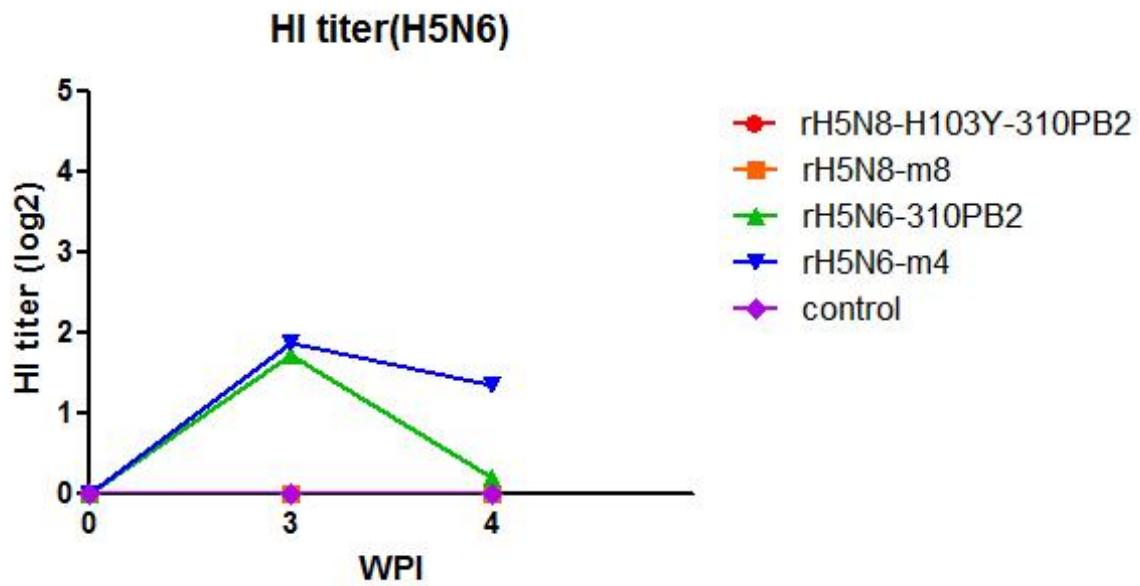
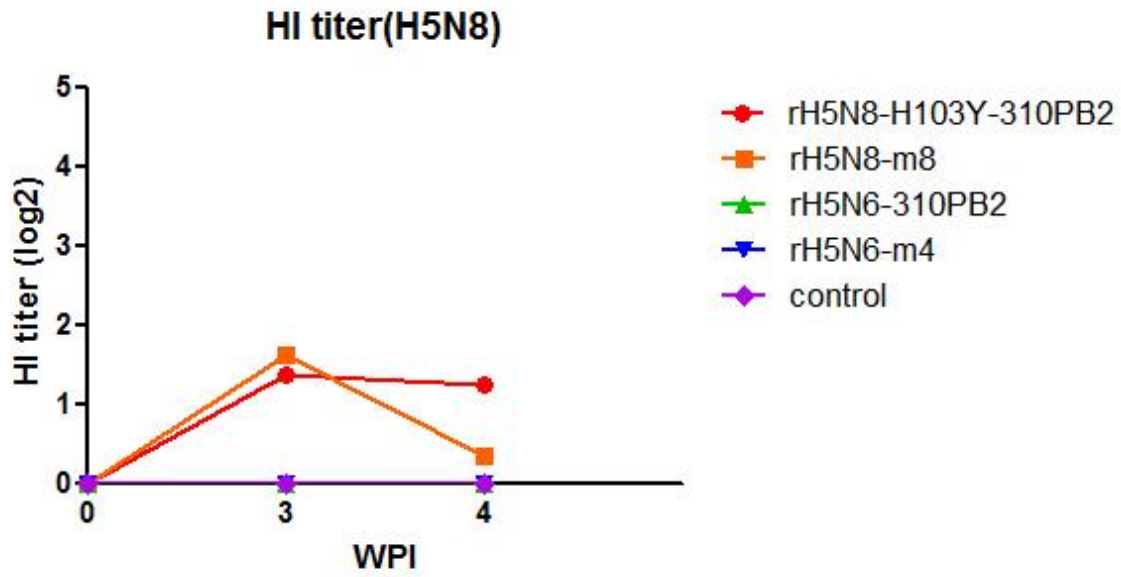


그림 7. 오리 1일령에 사독백신 접종 후 항체역가

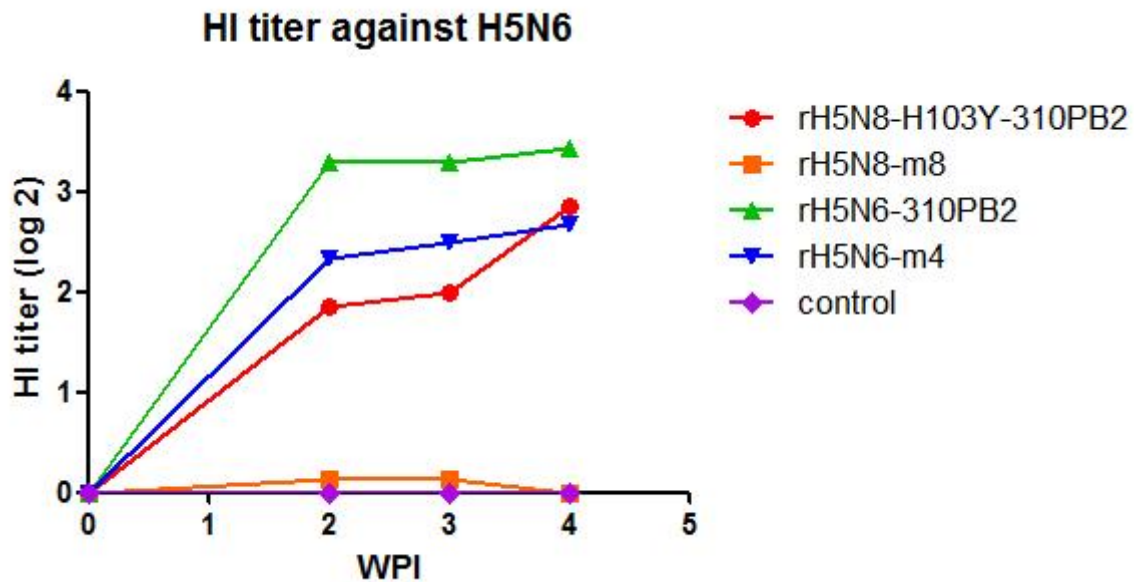
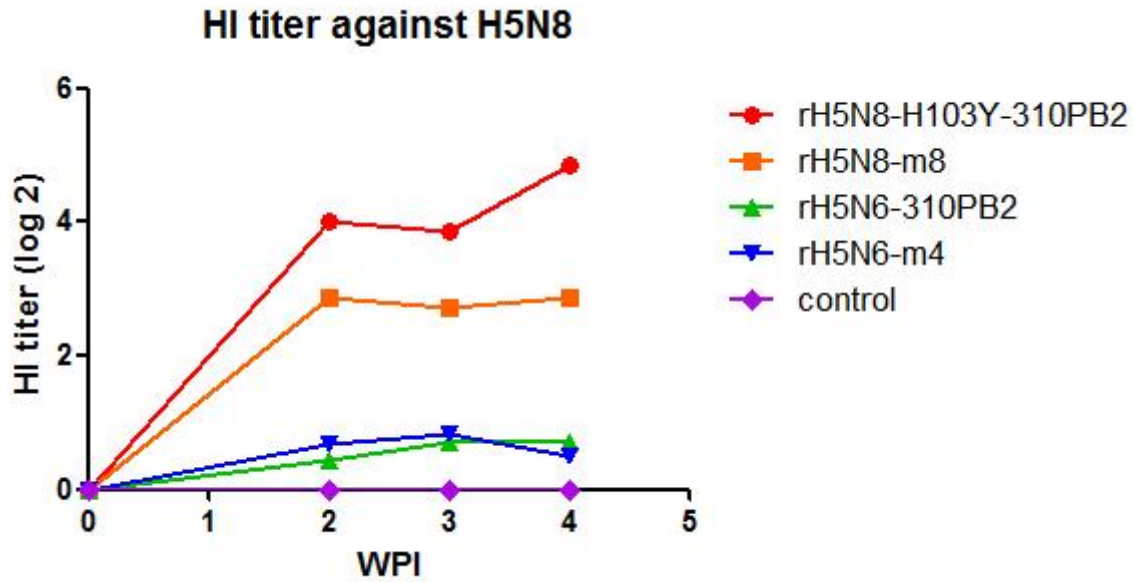


그림 8. 오리 2주령에 사독백신 접종 후 항체역가

- 오리 1일령 및 2주령에 접종 후 항체역가를 평가한 결과, 1일령에서는 항체가 거의 측정되지 않았으며, 2주령에 접종 시에는 혈청 내 항체가 측정되어 면역이 성숙됨에 따라 항체형성능이 증가하는 것을 확인 하였음.
- 그러나 이 항체 수준도 닭 접종 계군에 비해 상대적으로 낮기 때문에 NDV vector H5N6 백신의 1일령 분무 접종 후에 H5N6 사독백신을 접종함으로써 항체역가를 높일 수 있는지 확인하고자 실험을 진행하였음.
- NDV vector-H5N6 생백신 후 H5N6 사독백신 접종 계획은 다음 표와 같음 (표 6).

표 6. 오리 1일령 NDV-H5N6 분무 백신 후 H5N6 사독백신 접종 시험 계획

Group	백신 접종 정보
control	control
1d-live	1일령 NDV-H5N6 생독 (분무)
1d-live+1w-inac	1일령 NDV-H5N6 생독 (분무) + 1주 rH5N6 사독
1d-live+2w-inac	1일령 NDV-H5N6 생독 (분무) + 2주 rH5N6 사독
1w-inac	1주 rH5N6 사독
2w-inac	2주 rH5N6 사독

- rH5N6 사독백신으로는 rH5N6-H103Y-310PB2 바이러스를 불활화한 후, ISA70과 7:3으로 섞어 oil emulsion 백신으로 제작한 뒤, 개체 당 0.5ml을 근육접종하였음.
- 각 그룹은 1일령, 마지막 백신 접종 전에 채혈, 접종 3, 4주 채혈하여 rH5N6-H103Y-310PB2 항원에 대하여 혈청검사를 진행함(그림 9).

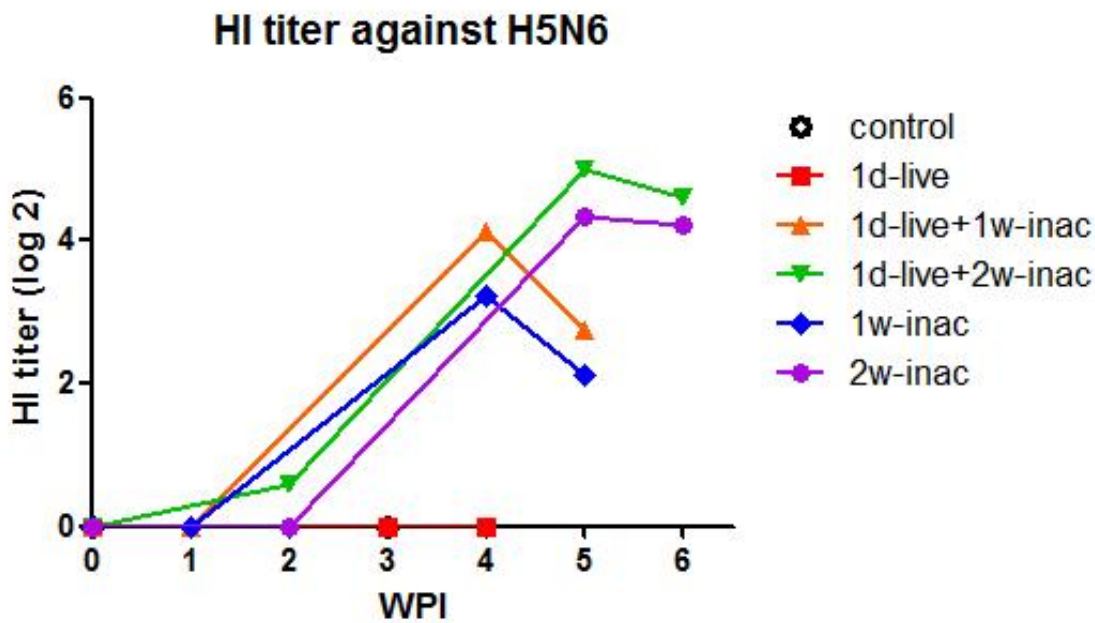


그림 9. NDV vectored H5N6 생백신 분무 접종 후 rH5N6 사독백신 접종 오리실험군 혈청 내 항체역가

- 생백신만 접종한 그룹의 경우 혈청 내 항체가 측정불가능한 수준이었으며, 생백신 후 사독백신을 접종한 그룹은 사독백신만 접종한 그룹보다 항체역가가 약간 높았음.
- 이 결과, 생백신 분무 후 사독백신 접종하는 것이 더 높은 항체역가를 달성하는데 도움이 되는 것을 확인하였음.

## 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

### 3-1. 목표

- 조류인플루엔자 항원 탑재 NDV 역유전학 시스템 개발 되었는가?
  - 조류인플루엔자 표면항원 발현 벡터 6개 작성  
(전체 vector system 유전자의 염기서열 분석)
- 역유전학 이용, 조류인플루엔자 HA, NA 항원 발현한 키메라 바이러스 백신 종독을 작출 했는가?
  - 역유전학을 이용한 신규 바이러스 작출 **3종** 이상  
(염기서열 분석 HA 단독 또는 HA, NA 단백질 동시 발현 확인 생물자원센터 특허균주 기탁 3종 완료)
- 작출 바이러스에 대한 배양법이 확립 되었는가?
  - 작출된 바이러스의 증식성  $10^8$ - $10^9$  EID<sub>50</sub>/ml 이상 (종란 접종법)
- 종독에 대한 LMO 유해성평가 시험은 수행되었는가?
  - 동물용의약품등 규정집 - 별표5 항목 시험 수행- 보고서 작성 완료.
- 시험백신은 제조되었는가?
  - ND-H9N2 사독백신과 ND-H5N6 생백신 및 사독백신등 총 3종의 시험제품에 대하여 1,000 수분 100병식 3 batch 생산.
- 시험백신의 안전성시험(10수분) 결과는 우수한가?
  - 14일간 점안접종 90% 이상, 분무접종 모두 양호(국가검정 동물용의약품 검정기준 법)
- 시험백신의 효력시험 결과는 우수한가?
  - NDV, AIV 100% 방어 및 국가검정 동물용의약품 검정기준 충족함
- 시험백신의 야외임상시험 계획서는 신청되었는가?
  - 농림축산검역본부에 야외임상시험신청서 접수  
(ND-H9(AIV) 생백신 및 H9N2 사독 혼합백신 등 총 2종)
- 시험백신의 야외임상시험은 수행되었는가?(3차 년도~종료 1차년)
  - 야외임상시험결과 및 품목허가 신청서 작성 및 농림축산검역본부에 신청서 접수  
(ND-H9(AIV) 생백신 및 H9N2 사독 혼합백신 등 총 2종)
- 조류 인플루엔자 벡터 시스템 개발이 완료 되었는가?
- H9N2/H5N6/H5N8 백신주 및 사독백신 개발이 완료 되었는가?
- 뉴캐슬병 벡터백신과 조류인플루엔자 사독백신과의 병용법 평가가 이루어졌는가?
- 조류인플루엔자 사독백신 오리 면역원성 향상 기술에 대한 평가가 완료 되었는가?

### 3-2. 목표 달성여부

평가항목	평가 지수(%)	성과목표	수행	달성률 (%)
1. 조류인플루엔자 항원 탑재 NDV 역유전학 시스템 개발 되었는가? -조류인플루엔자 표면항원 발현 벡터 작성	5	6종 작성	15종 작성	250
2. 역유전학 이용, 조류인플루엔자 HA, NA 항원 발현한 키메라 바이러스 백신 종독을 작출 했는가? - 생물자원센터 특허균주 기탁	10	3종 작출 3종 기탁	15종 작출 * 특허기탁 3종 (NDV-C7d NDV-H5N6 NDV-H9N2)	500
3. 작출 바이러스에 대한 배양법이 확립 되었는가? - 바이러스의 증식성 $10^8$ - $10^9$ EID <sub>50</sub> /ml이상 (종란 접종법)	5	$10^8$ - $10^9$ EID <sub>50</sub> /ml 이상	전체 작출 바이러스 $10^9$ EID <sub>50</sub> /ml 이상	1,000
4. 종독에 대한 LMO 유해성평가 시험은 수행되었는가?	7.5	동물용의약품 등 규정 별표 5 항목 시험 수행, 보고서 작성 완료.	해당시험 수행 및 보고서 작성완료	100
5. 시험백신은 제조되었는가?	5	2종 백신 (NDV-H9 생독/사독)	3종 (NDV-H5 생독/사독, NDV-H9 사독)	150
6. 시험백신의 안전성시험(10수분) 결과는 우수한가? - 국가검정 동물용의약품 검정기준 법 기준	2.5	14일간 점안/ 분무 접종 90%이상 모두 양호	점안접종 및 분무접종 모두 양호	100
7. 시험백신의 효력시험 결과는 우수한가? - 국가검정 동물용의약품 검정기준 법 기준	5	NDV 병원성주 공격에 80% 이상 방어, AIV 항체 가 64이상	NDV 방어 100%, HPAI 방어 100%, 2차 백신 시 AIV 항체가 512이상	100
8. 시험백신의 야외임상시험 계획서는 신청 되었는가?	5	농림축산검역본부 야외임상시험 신 청서 접수	정책제안으로 대 체*	50
9. 시험백신의 야외임상시험은 수행되었는가?	5	야외임상시험결과 및 품목허가 신청 서 작성 및 접수	정책제안으로 대 체*	50

평가항목	평가 지수(%)	성과목표	수행	달성률 (%)
10. 계태아 저병원성/ 고생산성/ 유니버설 조류 인플루엔자 벡터 시스템 개발이 완료 되었는가?	5	기존 PR8 backbone 시스템의 높은 병원성 및 낮은 생산성 문제 극복	국내 H9N2 분리주의 유전자를 재조합하여 만든 저병원성 및 고생산성 시스템 개발 완료	100
11. 계태아 저병원성/고 생산성/ 유니버설 백신용 H9N2 백신주 및 사독백신 개발이 완료 되었는가?	17.5	H9N2 백신주 개발	H9N2 백신주 작출 완료	100
12. 계태아 저병원성/ 고생산성/ 유니버설 백신용 H5N8 백신주 및 사독백신 개발이 완료 되었는가?	10	H5N8 백신주 개발	최근 유행 clade 2.3.4.4 H5N6의 consensus sequence를 이용한 사독백신주 개발완료	100
13. 계태아 저병원성/ 고생산성/ 유니버설 백신용 H5N1 백신주 및 사독백신 개발이 완료 되었는가?	10	H5N1 백신주 개발	국내 유입 clade 2.3.2.1c H5N1dp 대한 사독백신주 개발완료	100
14. 뉴캐슬병 벡터백신(ND-H5N8)과 H5N8 사독백신과의 병용법 평가가 이루어졌는가?	2.5	ND 벡터백신과 AI 재조합백신의 병용법 평가	각각의 사독백신 사용 시 닭 및 오리에서의 항체형성능 평가 완료.	100
15. 뉴캐슬병 벡터백신(ND-H5N1)과 H5N1 사독백신과의 병용법 평가가 이루어졌는가?	2.5	ND 벡터백신과 AI 재조합백신의 병용법 평가	각각의 사독백신 사용 시 닭 및 오리에서의 항체형성능 평가 완료.	100
16. H5N8/H5N1 사독백신 오리 면역원성 향상 기술에 대한 평가가 완료 되었는가?	2.5	사독백신의 항체형성능 확인	다양한 일령의 오리에서 사독백신의 항체형성능 평가 완료. 다양한 일령의 오리에서 ND-H5N6 및 AIV 사독백신의 항체형성능 평가 완료.	100

평가항목	평가 지수(%)	성과목표	수행	달성률 (%)
10. 계태아 저병원성/ 고생산성/ 유니버설 조류 인플루엔자 벡터 시스템 개발이 완료 되었는가?	5	기존 PR8 back bone 시스템의 높은 병원성 및 낮은 생산성 문제 극복	국내 H9N2 분리주의 유전자를 재조합하여 만든 저병원성 및 고생산성 시스템 개발 완료	100
11. 계태아 저병원성/고 생산성/ 유니버설 백신용 H9N2 백신주 및 사독백신 개발이 완료 되었는가?	17.5	H9N2 백신주 개발	H9N2 백신주 작출 완료	100
12. 계태아 저병원성/ 고생산성/ 유니버설 백신용 H5N8 백신주 및 사독백신 개발이 완료 되었는가?	10	H5N8 백신주 개발	최근 유행 clade 2.3.4.4 H5N6의 consensus sequence를 이용한 사독백신주 개발완료	100
13. 계태아 저병원성/ 고생산성/ 유니버설 백신용 H5N1 백신주 및 사독백신 개발이 완료 되었는가?	10	H5N1 백신주 개발	국내 유입 clade 2.3.2.1c H5N1dp 대한 사독백신주 개발완료	100
14. 뉴캐슬병 벡터백신(ND-H5N8)과 H5N8 사독백신과의 병용법 평가가 이루어졌는가?	2.5	ND 벡터백신과 AI 재조합백신의 병용법 평가	각각의 사독백신 사용 시 닭 및 오리에서의 항체형성능 평가 완료.	100
15. 뉴캐슬병 벡터백신(ND-H5N1)과 H5N1 사독백신과의 병용법 평가가 이루어졌는가?	2.5	ND 벡터백신과 AI 재조합백신의 병용법 평가	각각의 사독백신 사용 시 닭 및 오리에서의 항체형성능 평가 완료.	100
16. H5N8/H5N1 사독백신 오리 면역원성 향상 기술에 대한 평가가 완료 되었는가?	2.5	사독백신의 항체형성능 확인	다양한 일령의 오리에서 사독백신의 항체형성능 평가 완료. 다양한 일령의 오리에서 ND-H5N6 및 AIV 사독백신의 항체형성능 평가 완료.	100



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

#### \*정책제안으로 대체한 사유

현재 정부에서 준비 중인 항원뱅크사업은 고병원성조류인플루엔자 바이러스를 불활화한 항원을 반제품으로 준비했다가 비상시 완제품으로 제조하여 주사하는 백신으로 비상 상황에 빠른 대처가 불가능하며, 감염동물과 백신접종 동물간의 혈청학적 진단도 불가능(DIVA가 안됨)한 문제점이 있음. 이에 반해 본 과제에서 개발된 ND백터 기술은 분무접종이 가능하여 비상시 대량의 백신접종이 수월하고 빠른 방어항체 형성이 가능하다는 장점과 무엇보다도 백터백신을 사용할 경우 백신접종 동물과 감염된 동물 간의 혈청학적 구분(DIVA)이 가능한 장점이 있어 방역에 도움이 되는 물론 효능마저 뛰어나기 검역본부와의 공동연구 및 평가시험에서 인정되었음.

그러나, 조류인플루엔자 바이러스는 국가에서 중점적으로 방역 관리하는 질병원인체로 현재 고병원성의 경우 백신이 아닌 살처분 정책 중이며 저병원성의 경우에도 국가에서 백신의 종독을 관리하고 국가에서 인정된 단일 종독만 허용하고 있는 상황임. 그러한 이유로 본 연구 과제를 통해 개발된 조류인플루엔자 불활화 백신 및 뉴캐슬병 백터를 이용한 조류인플루엔자 생백신 및 불활화 백신 등도 비록 효과 및 장점이 있으나 민간 독자 개발제품의 승인은 어려우니 야외임상신청서 제출은 곤란하다는 검역본부의 입장을 전달받았음. 또한 현재 저병원성 조류인플루엔자 사독백신 사용으로 DIVA적용이 어려우니 저병원성 백신도 백터 백신으로 교체가 되어야 DIVA가 가능하므로 정책제안 및 협의회 등을 거쳐 단계적으로 백터 백신 사용을 위한 준비를 추진하도록 조언을 받았음.

그러므로 본 연구팀의 기술이 사업화를 준비하기위해 ①2018년부터 2020년 말까지 검역본부에서 자체과제로 수행중인 ND백터를 이용한 조류인플루엔자 백신개발 과제에 연구원으로 참여하여 기술 지원 및 본 연구 과제에서 개발된 백터 백신주의 우수함을 평가받았으며, ②DIVA가 가능한 국내 환경을 만들기 위해 우선 저병원성 조류인플루엔자 백터 백신 개발과제를 검역본부에 제안하였고, 이러한 제안이 받아들여 2020년 검역본부 용역과제가 기획됨. 본 연구팀은 후속연구로 검역본부 용역과제에 선정된다면, 본 과제에서 개발된 저병원성 조류인플루엔자 ND 백터 백신 기술을 활용하여 정부를 통해 타 기업에 기술 이전하여 기존 백신을 대체하여 조류인플루엔자에 대해 DIVA가 가능한 환경을 만들어 고병원성 조류인플루엔자 백터 백신 사업화 기반을 구축할 계획임. ③또한 현재 정부가 구축중인 항원뱅크사업의 조류인플루엔자 불활화 백신 주 대신 단계적으로 불활화된 ND백터 백신으로 교체하고 안전성이 충분히 입증된 이후에는 생 백터 백신까지 적용하여 방역에 활용할 수 있도록 농림축산식품부에 정책 제안하였으며, 전문가 협의회 등을 준비 중에 있음.

## 4장. 연구결과의 활용 계획 등

현재 정부에서 준비 중인 항원뱅크사업은 고병원성조류인플루엔자 바이러스를 불활화한 항원을 반제품으로 준비했다가 비상시 완제품으로 제조하여 주사하는 백신으로 비상 상황에 빠른 대처가 불가능하며, 감염동물과 백신접종 동물간의 혈청학적 진단도 불가능(DIVA가 안됨)한 문제점이 있음. 이에 반해 본 과제에서 개발된 ND백터 기술은 분무접종이 가능하여 비상시 대량의 백신접종이 수월하고 빠른 방어항체 형성이 가능하다는 장점과 무엇보다도 백터백신을 사용할 경우 백신접종 동물과 감염된 동물 간의 혈청학적 구분(DIVA)이 가능한 장점이 있어 방역에 도움이 되는 물론 효능마저 뛰어남이 검역본부와의 공동연구 및 평가시험에서 인정되었음.

그러나, 조류인플루엔자 바이러스는 국가에서 중점적으로 방역 관리하는 질병원인체로 현재 고병원성의 경우 백신이 아닌 살처분 정책 중이며 저병원성의 경우에도 국가에서 백신의 종독을 관리하고 국가에서 인정된 단일 종독만 허용하고 있는 상황임. 그러한 이유로 본 연구 과제를 통해 개발된 조류인플루엔자 불활화 백신 및 뉴캐슬병 백터를 이용한 조류인플루엔자 생백신 및 불활화 백신 등도 비록 효과 및 장점이 있으나 민간 독자 개발제품의 승인은 어려우니 야외임상신청서 제출은 곤란하다는 검역본부의 입장을 전달받았음. 또한 현재 저병원성 조류인플루엔자 사독백신 사용으로 DIVA적용이 어려우니 저병원성 백신도 백터 백신으로 교체가 되어야 DIVA가 가능하므로 정책제안 및 협의회 등을 거쳐 단계적으로 백터 백신 사용을 위한 준비를 추진하도록 조언을 받았음.

그러므로 본 연구팀의 기술이 사업화를 준비하기위해 ①2018년부터 2020년 말까지 검역본부에서 자체과제로 수행중인 ND백터를 이용한 조류인플루엔자 백신개발 과제에 연구원으로 참여하여 기술지원 및 본 연구 과제에서 개발된 백터 백신주의 우수함을 평가받았으며, ② DIVA가 가능한 국내 환경을 만들기 위해 우선 저병원성 조류인플루엔자 백터 백신 개발과제를 검역본부에 제안하였고, 이러한 제안이 받아들여 2020년 검역본부 용역과제가 기획됨. 본 연구팀은 후속연구로 검역본부 용역과제에 선정된다면, 본 과제에서 개발된 저병원성 조류인플루엔자 ND 백터 백신 기술을 활용하여 정부를 통해 타기업에 기술 이전하여 기존 백신을 대체하여 조류인플루엔자에 대해 DIVA가 가능한 환경을 만들어 고병원성 조류인플루엔자 백터 백신 사업화 기반을 구축할 계획임. ③또한 현재 정부가 구축중인 항원뱅크사업의 조류인플루엔자 불활화 백신 주 대신 단계적으로 불활화된 ND백터 백신으로 교체하고 안전성이 충분히 입증된 이후에는 생 백터 백신까지 적용하여 방역에 활용할 수 있도록 농림축산식품부에 정책 제안하였으며, 전문가 협의회 등을 준비 중에 있음.

국내에 제품이 등록되는 시점과 동시에 해외 H9N2 및 H5형 백신의 수출을 위한 준비도 진행될 예정으로 주관기업은 2020년까지 GMP 생산시설에 총 130억 이상을 투자할 예정으로 직접 생산을 준비하고 있음.

## 붙임. 참고문헌

- Ralph A. Tripp and S. Mark Tompkins. Virus-Vectored Influenza Virus Vaccines. *Viruses*(2014) : 3055-3079
- A. Nagy et al. Recombinant Newcastle disease virus expressing H9 HA protects chickens against heterologous avian influenza H9N2 virus challenge. *Vaccine* 34 (2016) 2537 - 2545.
- Qinfang Liu, et al. Newcastle Disease Virus-Vectored H7 and H5 Live Vaccines Protect Chickens from Challenge with H7N9 or H5N1 Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology* 89.14(2015):7401-7408
- Jutta Veits. et al. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *PNAS* 23.103 (2006):8197-8202.
- Zenglei Hu<sup>1</sup>, et. al. Newcastle disease virus (NDV) recombinant expressing the hemagglutinin of H7N9 avian influenza virus protects chickens against NDV and highly pathogenic avian influenza A (H7N9) virus challenges. *Vaccine*(2017):1-5
- Jingjiao Ma<sup>1</sup>, et. al. Newcastle disease virus-based H5 influenza vaccine protects chickens from lethal challenge with a highly pathogenic H5N2 avian influenza virus. *Vaccines*.(2017):1-10
- Kristina Ramp, et. al. Coexpression of Avian Influenza Virus H5 and N1 by Recombinant Newcastle Disease Virus and the Impact on Immune Response in Chickens. *AVIAN DISEASES*(2011) 55:413 - 21,
- Kateri, et. al. Maternal antibody inhibition of recombinant Newcastle disease virus vectored vaccine in a primary or booster avian influenza vaccination program of broiler chickens. *Vaccine* 36(2018)6361-6372.
- Lori w. et. al. Evidence for Mixed membrane topology of the Newcastle disease virus fusion protein. *Journal of virology*.(2003):1951-1963
- Herfst, Sander, et al. "Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets." *science* 336.6088 (2012): 1534-1541.
- Linster, Martin, et al. "Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus." *Cell* 157.2 (2014): 329-339.

- de Vries, Robert P., et al. "Hemagglutinin receptor specificity and structural analyses of respiratory droplet-transmissible H5N1 viruses." *Journal of virology* 88.1 (2014): 768-773.
  
- Alexander DJ, Parsons G, Manvell RJ. Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol.* 1986;15:647 - 62
  
- van den Brand JMA, Verhagen JH, Veldhuis Kroeze EJB, van de Bildt MWG, Bodewes R, Herfst S, et al. Wild ducks excrete highly pathogenic avian influenza virus H5N8 (2014-2015) without clinical or pathological evidence of disease. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7:67
  
- Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infection immunity.* 1980;30:547 - 53.
  
- Middleton D, Bingham J, Selleck P, Lowther S, Gleeson L, Lehrbach P, et al. Efficacy of inactivated vaccines against H5N1 avian influenza infection in ducks. *Virology.* 2007;359:66 - 71.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 조류인플루엔자 유니버설 백신 개발						
	(영문) Development of avian influenza universal vaccine						
주관연구기관	(주)바이오포아		주 관 연 구 책 임 자	(소속)(주)바이오포아			
참 여 기 업	(주)바이오포아			(성명) 조 선 회			
총연구개발비 (1,197,000천원)	계		총 연 구 기 간	2016.9.5. ~ 2019.9.4 (3년)			
	정부출연 연구개발비	897,000		총 인 원	21		
	기업부담금	300,000		총 참 여 연 구 원 수	내부인원	12	
	연구기관부담금				외부인원	9	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>1. 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 벡터 백신 개발</p> <p>① 모체이행항체를 극복하는 뉴캐슬병 벡터 개발</p> <p>② DIVA가 가능한 H9N2 ND벡터 불활화 백신</p> <p>③ DIVA가 가능한 H5형 HPAI용 ND벡터 분무용 생 백신</p> <p>④ DIVA가 가능한 H5형 HPAI용 ND벡터 불활화 백신</p> <p>2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 조류 인플루엔자 H9N2/H5N8/H5N1형 백신 개발</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>1. 모체이행항체를 극복하며 DIVA가 가능한 H9 및 H5형 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 벡터 생 백신 및 불활화 백신 개발: 특허 3(출원)/ 균주기탁4/ 시험백신 3종/ 정책제안 1</p> <p>2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 H9N2 사독백신개발: SCI 논문 2/ 학술발표 4/ 특허출원1/ 인력양성 2</p> <p>3. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 H5N8/H5N1 사독백신 제품 2종 개발 (clade 2.3.2.1/2.3.4.4; 비상용): SCI 논문 1/ 학술발표 2/ 특허출원1</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>1. H9/H5 조류인플루엔자 예방용 뉴캐슬병 벡터 백신 제품 사업화 및 상용화</p> <p>① H9N2 ND벡터 불활화 백신: 국내 저병원성 인플루엔자 백신 교체로 인한 DIVA 환경 조성 및 저병원성 조류인플루엔자 근절</p> <p>② 분무용 H5형ND벡터 생백신(1차백신): 손쉬운 대량접종 및 빠른 면역형성가능</p> <p>③ H5형 ND벡터 불활화백신(2차백신): 완벽한 면역 형성 및 DIVA 가능해 조류독감 근절</p> <p>2. 계태아 저병원성/고생산성/유니버설 H9N2/H5N1/H5N8 불활화 백신주 개발 및 벡터 시스템 개발</p> <p>① 기존 불활화 백신주 대비 효능향상 및 고생산성</p> <p>② 인체용 고병원성 조류인플루엔자 백신주 제작에 활용</p>							

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	201690398		
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	조류인플루엔자 유니버설 백신 개발			과제유형	개발
연구기관	(주)바이오포아			연구책임자	조선희
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.9.5~2017.9.4	290,000	97,000	387,000
	2차연도	2017.9.5~2018.9.4	255,000	85,000	340,000
	3차연도	2018.9.5~2019.9.4	352,000	118,000	470,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		897,000	300,000	1,197,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019.10.17

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)바이오포아	대표이사	조선희

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

모체이행항체를 극복하며 벡터로 활용 시 조류인플루엔자 항원을 최적으로 발현하는 세계 최고의 수준의 ND vector 백신

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

DIVA가 가능하며 모체이행항체극복이 가능하므로 조류인플루엔자 백신 뿐아니라 양계 백신의 생백신 혹은 불활화 백신 개발의 플랫폼으로 활용 가능함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

DIVA가 가능하며 모체이행항체극복이 가능하므로 조류인플루엔자 백신 뿐아니라 양계 백신의 생백신 혹은 불활화 백신 개발의 플랫폼으로 활용 가능함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

대부분의 연구내용 및 목표한 항목에서 과제 목표이상의 초과 성과를 달성하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

발표된 논문 3건 모두 IF3.0이상(평균 3.3)으로 우수한 논문이며 출원한 5건의 특허 역시 국내외 등록가능성이 거의 확실한 신규성이 높은 특허임.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. 조류인플루엔자 항원 탑재 NDV 역유전학 시스템 개발	5	100	15종 작성
2. 역유전학 이용, 조류인플루엔자 HA, NA 항원 발현한 키메라 바이러스 백신 종독을 작출 했는가? - 균주작출 3종, 특허균주 기탁 3종	10	100	15종 작출, 특허기탁 4종
3. 작출 바이러스에 대한 배양법이 확립 되었는가? - 바이러스의 증식성 $10^8$ - $10^9$ EID <sub>50</sub> /ml 이상	5	100	전체 작출 바이러스 $10^9$ EID <sub>50</sub> /ml 이상
4. 종독에 대한 LMO 유해성평가 시험수행	7.5	100	해당시험 수행 및 보고서 작성완료
5. 시험백신은 제조되었는가? 2종 이상	5	100	3종 (NDV-H5생독/사독, NDV-H9 사독)
6. 시험백신의 안전성시험(10수분) 14일간 점안/ 분무 접종 90%이상 모두 양호	2.5	100	점안접종 및 분무접종 모두 양호
7. 시험백신의 효력시험 결과는 우수한가? NDV 80% 이상 방어, AIV 항체가 64배이상	5	100	NDV 및 HPAI 방어 100%, 2차 백신 시 AIV 항체가 512배이상
8. 시험백신의 야외임상시험 계획서 신청	5	50	정책제안으로 대체*
9. 시험백신의 야외임상시험 수행	5	50	정책제안으로 대체*
10. 계태아 저병원성/ 고생산성/ 유니버설 조류 인플루엔자 벡터 시스템 개발이 완료 되었는가?	5	100	국내 H9N2 분리주의 유전자를 재조합하여 만든 저병원성 및 고생산성 시스템 개발 완료
11. 계태아 저병원성/고 생산성/ 유니버설 백신용 H9N2/H5N1/H5N6 백신주 및 사독백신 개발	37.5	100	균주작출 및 안전성 유효성 시험통한 백신주 개발완료
12. 뉴캐슬병 벡터백신과 조류인플루엔자 사독백신과의 병용법 평가가 이루어졌는가?	5	100	각각의 사독백신 사용 시 닭 및 오리에서의 항체 형성능 평가 완료. 다양한 일령의 오리에서 사독백신의 항체형성능 평가 완료.
13. H5N8/H5N1 사독백신 오리 면역원성 향상 기술에 대한 평가가 완료 되었는가?	2.5	100	다양한 일령의 오리에서 ND-H5N6 및 AIV 사독백신의 항체형성능 평가 완료.
합계	100	95	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

대부분의 연구내용 및 목표한 항목에서 과제 목표이상의 초과 성과를 달성하였으며, DIVA가 가능하며 모체이행항체극복이 가능하므로 조류인플루엔자 백신 뿐 아니라 양계 백신의 생백신 혹은 불활화 백신 개발의 플랫폼으로 활용 가능한 기술 및 제품을 개발하여 향후 활용성 및 파급효과가 기대됩니다.



## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

다만 임상시험신청서 제출을 통한 사업화의 경우 국가 통제용 주요 질병이라는 이유로 검역본부에 접수하지 못하여 정책 제안 등을 통해 단계적 사업화를 진행하고 있습니다. 사업화 지연에 대한 이해가 필요합니다.

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구팀의 기술이 사업화를 준비하기 위해 ①2018년부터 2020년 말까지 검역본부에서 자체 과제로 수행중인 ND백터를 이용한 조류인플루엔자 백신개발 과제에 연구원으로 참여하여 기술지원 및 본 연구 과제에서 개발된 벡터 백신주의 우수함을 평가받았으며, ②DIVA가 가능한 국내 환경을 만들기 위해 우선 저병원성 조류인플루엔자 벡터 백신 개발과제를 검역본부에 제안하였고, 이러한 제안이 받아들여 2020년 검역본부 용역과제가 기획됨. 본 연구팀은 후속연구로 검역본부 용역과제에 선정된다면, 본 과제에서 개발된 저병원성 조류인플루엔자 ND 벡터 백신 기술을 활용하여 정부를 통해 타기업에 기술 이전하여 기존 백신을 대체하여 조류인플루엔자에 대해 DIVA가 가능한 환경을 만들어 고병원성 조류인플루엔자 벡터 백신 사업화 기반을 구축할 계획임. ③또한 현재 정부가 구축중인 항원뱅크사업의 조류인플루엔자 불활화 백신 주 대신 단계적으로 불활화된 ND백터 백신으로 교체하고 안전성이 충분히 입증된 이후에는 생 벡터 백신까지 적용하여 방역에 활용할 수 있도록 농림축산식품부에 정책 제안하였으며, 전문가 협의회 등을 준비 중에 있음.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

--

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

--

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	조류인플루엔자 유니버설 백신 개발			
주관연구기관	(주)바이오포아	주관연구책임자	조 선 희	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	897,000	300,000		1,197,000
연구개발기간	2016.9.5. ~ 2019.9.4			
주요활용유형	<p><input type="checkbox"/>산업체이전    <input type="checkbox"/>교육 및 지도    <input type="checkbox"/>정책자료    <input type="checkbox"/>미활용    <input checked="" type="checkbox"/>기타(정책제안 후 활용)</p> <p>사유: 현재 정부에서 준비 중인 항원뱅크사업은 고병원성조류인플루엔자 바이러스를 불활화한 항원을 반제품으로 준비했다가 비상시 완제품으로 제조하여 주사하는 백신으로 비상 상황에 빠른 대처가 불가능하며, 감염동물과 백신접종 동물간의 혈청학적 진단도 불가능(DIVA가 안됨)한 문제점이 있음. 이에 반해 본 과제에서 개발된 ND백터 기술은 분무접종이 가능하여 비상시 대량의 백신접종이 수월하고 빠른 방어항체 형성이 가능하다는 장점과 무엇보다도 백터백신을 사용할 경우 백신접종 동물과 감염된 동물 간의 혈청학적 구분(DIVA)이 가능한 장점이 있어 방역에 도움이 되는 물론 효능마저 뛰어난이 검역본부와의 공동연구 및 평가시험에서 인정되었음.</p> <p>그러나, 조류인플루엔자 바이러스는 국가에서 중점적으로 방역 관리하는 질병원인체로 현재 고병원성의 경우 백신이 아닌 살처분 정책 중이며 저병원성의 경우에도 국가에서 백신의 종독을 관리하고 국가에서 인정된 단일 종독만 허용하고 있는 상황임. 그러한 이유로 본 연구 과제를 통해 개발된 조류인플루엔자 불활화 백신 및 뉴캐슬병 백터를 이용한 조류인플루엔자 생백신 및 불활화 백신 등도 비록 효과 및 장점이 있으나 민간 독자 개발제품의 승인은 어려우니 야외임상신청서 제출은 곤란하다는 검역본부의 입장을 전달받았음. 또한 현재 저병원성 조류인플루엔자 사독백신 사용으로 DIVA적용이 어려우니 저병원성 백신도 백터 백신으로 교체가 되어야 DIVA가 가능하므로 정책제안 및 협의회 등을 거쳐 단계적으로 백터 백신 사용을 위한 준비를 추진하도록 조언을 받았음.</p> <p>그러므로 본 연구팀의 기술이 사업화를 준비하기위해 ①2018년부터 2020년 말까지 검역본부에서 자체과제로 수행중인 ND백터를 이용한 조류인플루엔자 백신개발 과제에 연구원으로 참여하여 기술지원 및 본 연구 과제에서 개발된 백터 백신주의 우수함을 평가받았으며, ②DIVA가 가능한 국내 환경을 만들기 위해 우선 저병원성 조류인플루엔자 백터 백신 개발과제를 검역본부에 제안하였고, 이러한 제안이 받아들여 2020년 검역본부 용역과제가 기획됨. 본 연구팀은 후속연구로 검역본부 용역과제에 선정된다면, 본 과제에서 개발된 저병원성 조류인플루엔자 ND 백터 백신 기술을 활용하여 정부를 통해 타기업에 기술 이전하여 기존 백신을 대체하여 조류인플루엔자에 대해 DIVA가 가능한 환경을 만들어 고병원성 조류인플루엔자 백터 백신 사업화 기반을 구축할 계획임. ③또한 현재 정부가 구축중인 항원뱅크사업의 조류인플루엔자 불활화 백신 주 대신 단계적으로 불활화된 ND백터 백신으로 교체하고 안전성이 충분히 입증된 이후에는 생 백터 백신까지 적용하여 방역에 활용할 수 있도록 농림축산식품부에 정책 제안하였으며, 전문가 협의회 등을 준비 중에 있음.)</p>			

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①조류인플루엔자 항원 탑재 NDV 역유전학 시스템 개발 조류인플루엔자 표면항원 발현 벡터 6개 작성 (5%)	15종 작성
②역유전학 이용, 조류인플루엔자 HA, NA 항원 발현한 키메라 바이러스 백신 종독을 작출 했는가? 역유전학을 이용한 신규 바이러스 작출 3종 이상 (10%)	11종(NDV vector) 작출 4종(rAIV)이상 작출 * 특허기탁 4종 (NDV-C7d, NDV-H5N6, NDV-H9N2, rH9N2)
③작출된 바이러스의 증식성 $10^8$ - $10^9$ EID <sub>50</sub> /ml 이상 (5%)	전체 작출 바이러스 $10^9$ EID <sub>50</sub> /ml 이상
④종독에 대한 LMO 유해성평가는 수행되었는가? (7.5%)	해당시험 수행 및 보고서 작성완료
⑤시험백신은 제조되었는가? (5%)	3종 (NDV-H5N6 생독/사독, NDV-H9N2 사독)
⑥시험백신의 안전성시험(10수분) 결과는 우수한가? 14일간 점안접종 90%이상, 분무접종 모두 양호 (2.5%)	점안접종 및 분무접종 모두 100% 양호
⑦시험백신의 효력시험 결과는 우수한가? NDV 병원성주 공격에 80% 이상 방어, AIV 항체가 64이상 (5%)	NDV, AIV 공격 접종시 100% 방어, 2차 접종시 AIV 항체가 512배 이상 :검역본부에서 방어 효력평가 수행됨.
⑧시험백신의 야외임상시험 계획서는 신청되었는가? (5%)	정책제안으로 대체*
⑨시험백신의 야외임상시험은 수행되었는가? (3차 년도~종료 1차년) (5%)	정책제안으로 대체*
⑩조류 인플루엔자 벡터 시스템 개발이 완료 되었는가? (5%)	국내 H9N2 분리주의 유전자를 재조합하여 만든 저병원성 및 고생산성 시스템 개발 완료
⑪H9N2/H5N1/H5N6 조류인플루엔자 사독백신주 개발이 완료 되었는가? (37.5%)	국내형 H9N2 백신주, 최근 유행 clade 2.3.4.4 H5N6형 백신주, 국내 유입 clade 2.3.2.1c H5N1 백신주 등 개발 완료
⑫뉴캐슬병 생 벡터백신과 조류인플루엔자 사독백신과의 병용법 평가가 이루어졌는가? (5%)	각각의 사독백신 사용 시 닭 및 오리에서의 항체 형성능 평가 완료.
⑬H5N6 사독백신 오리 면역원성 향상 기술에 대한 평가 가 완료 되었는가? (2.5%)	다양한 일령의 오리에서 사독백신의 항체 형성능 평가 완료. 다양한 일령의 오리에서 ND-H5N6 및 AIV 사독백신의 항체 형성능 평가 완료.

\*국가 방역 정책상 정부관리가 필요한 질병으로 민간에서 독자적으로 개발한 백신은 제품등록이 불가하였음. 이에 농림축산검역본부에 정책 건의하였고, 제안이 받아들여져서 우선 저병원성 조류인플루엔자 백신부터 뉴캐슬병 벡터백신으로 대체할 수 있도록 2020년부터 용역과제를 검역본부가 민간에 발주하여 개발이 진행될 예정임.

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 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		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	억 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	30			15				25	5				25						
최종목표	5			3				7			5		5						
연구기간내 달성실적	5			3				23	50		3		3.3	7*	2		1		
달성율(%)	100			100				100			80		100						

\*학술발표 1건은 2019년 추계수의학회에 발표할 예정으로 초록등록 하였으나 ASF로 학회자체가 취소

### 4. 핵심기술

구분	핵심 기술 명
①	변이 뉴캐슬병 바이러스 및 상기 바이러스를 이용한 조류 백신 (내열성이며 모체이행항체 극복이 가능한 ND 백신) (특허출원 10-2019-0129585)
②	AIV H5N6의 표면항원을 발현하는 뉴캐슬병 바이러스 발현 시스템 및 이를 이용한 조류 백신 (특허출원 10-2019-0129584)
③	AIV H9N2의 표면항원을 발현하는 뉴캐슬병 바이러스 발현 시스템 및 이를 이용한 조류 백신 (특허출원 10-2019-0129583)
④	계태아 저병원성 및 발육란 고증식성 재조합 H9N2 인플루엔자 바이러스 (특허출원 10-2019-0143004)
⑤	포유류무병원성, 발육란고증식성, 내열성, 약독화 클레이드 2.3.4.4a H5N8 재조합 인플루엔자 A 바이러스
⑥	포유류무병원성, 발육란고증식성, 내열성, 약독화 클레이드 2.3.4.4c H5N6 재조합 인플루엔자 A 바이러스 (특허출원 10-2019-0143003)
⑦	포유류무병원성, 발육란고증식성, 내열성, 세포면역 최적화 약독화 클레이드 2.3.4.4c H5N6 재조합 인플루엔자 A 바이러스

### 5. 연구결과별 기술적 수준

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

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	모체이행항체 극복이 가능한 ND 백터로 양계의 백신의 플랫폼으로 활용가능
②의 기술	모체이행항체 극복이 가능하며, DIVA가 가능한 고병원성 조류인플루엔자 백신으로 사독으로 활용시 기존 항원 बैं크 대체 가능, 생독으로 사용시 긴급방역용으로 적합하여 조류인플루엔자 백신중 최선 최고의 백신이 될 것임.
③의 기술	DIVA가 가능한 저병원성 조류인플루엔자 백신으로 사독으로 활용 시 기존 백신을 모두 대체하여 DIVA가 가능한 환경을 만들고 이후 조류인플루엔자 근절 정책에 활용할 수 있으며, 고병원성 조류인플루엔자 방역정책에도 도움이 됨. 전 세계 H9N2 유행 국가에 모두 수출 가능 할 것임.
④의 기술	기존 불활화 백신주 대비 효능향상 및 고생산성
⑤의 기술	비상백신 제조용 항원뱅크 및 수출용 고생산성/고저장성 동물/인체용 고병원성 조류인플루엔자 백신주 제작에 활용
⑥의 기술	비상백신 제조용 항원뱅크 및 수출용 고생산성/고저장성 동물/인체용 고병원성 조류인플루엔자 백신주 제작에 활용
⑦의 기술	비상백신 제조용 항원뱅크 및 수출용 고생산성/고저장성 동물/인체용 고병원성 조류인플루엔자 백신주 제작에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SC I	비 SC I			논문 평균 IF	학술발표	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	억 원	건	건	건	건	명			
가중치	25	5		15					25	5				25				
최종목표	5	5		3		2			7		5			5				
연구기간내 달성실적	5								8	50	3		3.3	5	2			1
연구종료 후 성과창출 계획		5		3		2					2			1				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	계태아 저병원성 및 발육란 고증식성 재조합 H9N2 인플루엔자 바이러스		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	매출액 대비 3%내외
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	서울대 산학협력단 결정기간	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2021년 이후
기술이전 시 선행조건 <sup>4)</sup>	수출용 백신(이집트, 베트남 등)으로 상용화 추진하며 현지 상용화를 위한 네트워크 및 실적 있는 동물약품사와 협력		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	포유류무병원성, 발육란고증식성, 내열성, 약독화 클레이드 2.3.4.4a H5N8 재조합 인플루엔자 A 바이러스		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	매출액 대비 3%내외
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	서울대 산학협력단 결정기간	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2021년 이후
기술이전 시 선행조건 <sup>4)</sup>	정부 항원뱅크사업 혹은 긴급백신사업 선정시		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	포유류무병원성, 발육란고증식성, 내열성, 세포면역 최적화 약독화 클레이드 2.3.4.4c H5N6 재조합 인플루엔자 A 바이러스		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	매출액 대비 3%내외
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	서울대 산학협력단 결정기간	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2021년 이후
기술이전 시 선행조건 <sup>4)</sup>	정부 항원뱅크사업 혹은 긴급백신사업 선정시		

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.