

118055  
-03

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

농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003

567-01

세포표면발현 기술을 이용한  
저병원성 조류인플루엔자 및  
가금티푸스 방어용  
HA2-M2e-CD154-SG  
백신 개발

세포표면발현 기술을 이용한 저병원성  
조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용  
HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발

2021

2021.06.11

주관연구기관 / 우진비앤지(주)  
협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “세포표면발현 기술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발”(개발기간: 2018. 04. 26 - 2020. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021 . 06 . 11 .

주관연구기관명 : 우진비엔지(주)

강 석 진



협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단

조 기 환



주관연구책임자 : 김 정 한

협동연구책임자 : 이 존 화

참여기관책임자 : 강 석 진

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118055	해 당 단 계 연 구 기 간	2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31	단 계 구 분	3 / 3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	세포표면발현 기술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발			
연구책임자	김 정 한	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 14명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부:200,000천원 민간: 66,667천원 계:266,667천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 31명 내부: 26명 외부: 5명	총 연구개발비	정부:550,000천원 민간:183,334천원 계:733,334천원
연구기관명 및 소속부서명	우진비앤지(주) 백신팀			참여기업명 우진비앤지(주)	
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											

국가과학기술종합정보시스템에 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

- 조류 인플루엔자는 주로 닭, 오리나 같은 조류에서 발생하는 전염성 호흡기 질환으로 국내에서는 매년 같은 패턴으로 발생하고 있으나 백신 개발에는 오랜 시간이 걸려 감염을 막기 어려우며, 조류 이동 억제에도 한계가 있어 실질적 대책은 살처분이 유일함. 단순 이동제한이나 살처분에 의존한 방역활동이 아닌 예방 차원의 백신 개발이 필요함.
- 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 단백질인 HA2 및 M2e 그리고 닭의 CD154를 비병원성 살모넬라 변이체의 세포표면에 발현시켜 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 동시 방어용 백신을 개발하였음.
- 국내에서 유행하고 해외로부터 국내로 쉽게 유입이 가능한 지역에서 유행하는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 적용 가능한 항원의 유전적 서열 확보 및 최적 항원을 선별.
- In vitro 상에서 선별된 항원의 발현여부를 개발된 백신 균주에서 확인.
- 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신 후보 균주의 안전성 (safety) 및 면역원성 평가.
- 경구 투여 및 호흡기 투여를 위한 백신 제형의 최적화.
- 대량배양조건 확립을 통한 시험백신의 생산 및 안정성시험 완료.
- 전임상시험을 통해 저병원성 조류인플루엔자에 대한 야외임상시험 신청을 완료.
- 조류 인플루엔자와 가금티푸스의 동시 방어가 가능한 백신 생산기술의 개발을 통해 세계적으로 매년 유행하고 있는 조류인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 빠르게 대응할 수 있는 효과적인 백신개발 플랫폼을 제공.
- 주사 접종으로 인한 백신 접종방법의 어려움을 극복하기 위해 경구 투여에서도 효과적인 백신제형을 개발함으로써 일반 가축 농가에서도 손쉽게 사용할 수 있을 것임.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 단백질인 HA2 및 M2e 그리고 닭의 CD154를 비병원성 살모넬라 변이체의 세포 표면에 발현시켜 저병원성 조류 인플루엔자 및 가금티푸스 동시 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발 및 상용화.</li> <li>○ 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 유전자원과 비병원성 살모넬라균을 사용해 백신 접종 후 부작용을 최소화하고 면역원성을 높여 백신으로서 효능을 극대화 하고자 함.</li> <li>○ 조류 인플루엔자와 가금티푸스의 동시 방어가 가능한 백신 생산기술의 개발을 통해 세계적으로 매년 유행하고 있는 조류인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 빠르게 대응할 수 있는 효과적인 백신개발 플랫폼을 제공하고자 함.</li> <li>○ 주사 접종으로 인한 백신 접종방법의 어려움을 극복하기 위해 경구 투여에서도 효과적인 백신제형을 개발함으로써 일반 가축 농가에서도 손쉽게 사용할 수 있게 하고자 함.</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내에서 유행하고 해외로부터 국내로 쉽게 유입이 가능한 지역에서 유행하는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 적용 가능한 항원의 유전적 서열 확보 및 최적 항원을 선별.</li> <li>○ In vitro 상에서 선별된 항원의 발현여부를 개발된 백신 균주에서 확인.</li> <li>○ 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신 후보 균주의 안전성 (safety) 및 면역원성 평가.</li> <li>○ 경구 투여 및 호흡기 투여를 위한 제형 최적화.</li> <li>○ 대량배양조건 확립을 통한 시험백신의 생산 및 안정성시험 완료.</li> <li>○ 전임상시험을 통해 저병원성 조류인플루엔자에 대한 야외임상시험 신청을 완료하였음.</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 연구 과제를 통해 개발된 백신은 live <i>Salmonella Gallinarium</i> (SG)에 HA2, M2e와 chicken CD154를 발현해 하나의 백신으로 저병원성 조류 인플루엔자와 가금티푸스 동시 방어가 가능함.</li> <li>○ 본 백신의 사용으로 인해 매년 발생하는 조류인플루엔자를 효과적으로 방어하여 살처분으로 소모되는 비용을 약 200억원 이상 감소할 수 있을 것으로 예상됨.</li> <li>○ 선제적인 백신 사용으로 질병 발생률을 낮춰 바이러스의 장기간 유행을 막고, 이로 인한 바이러스 변이를 억제할 수 있을 것으로 판단됨.</li> <li>○ Euromonitor는 2018년~2023년 베트남 육류 시장이 연평균 4.1% 성장하여 2023년 시장규모가 약 5백만 톤에 달할 것으로 전망하였으며, 2023년까지 가금류 매출액(연평균 7.1%)이 가장 빠르게 성장할 것으로 전망하고 있음. 본 백신의 개발을 통해 베트남을 중심으로 한 동남아에 연 100억원 이상의 수출확대효과를 기대할 수 있음.</li> <li>○ 경구 투여가 가능한 제형으로 인해 가축 농가에서 손쉽게 사료에 혼합해 사용이 가능할 것임.</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>저병원성 조류인플루엔자</p>	<p>가금티푸스</p>	<p>동물용 백신</p>	<p>세포표면발현</p>	<p>경구 투여</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Low Pathogenic Avian influenza</p>	<p>Fowl typhoid</p>	<p>Animal vaccine</p>	<p>Cell surface expression</p>	<p>Oral administration</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## 〈 목 차 〉

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	6
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	11
제 3 장	연구수행 내용 및 결과 .....	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	92
제 5 장	연구결과의 활용계획 .....	97
붙임.	참고문헌 .....	102
[별첨 1]	연구개발보고서 초록 .....	103
[별첨 2]	자체평가의견서 .....	104
[별첨 3]	연구성과 활용계획서 .....	108

# 제1장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발 목적

- 본 연구의 최종목표는 가금류에서 호흡기로 감염 및 전파가 이루어지는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 감염에 의해 야기되는 가금류 농가의 경제적인 손실과 기존 백신 사용 시 나타나는 노동적 한계성 및 현장의 한계성을 극복하는데 있음.
- 이 연구목표의 달성을 위해 국내에서 유행하는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 또는 해외로부터 국내로 쉽게 유입이 가능한 지역에서 유행하는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스들에 적용이 가능한 항원을 디자인하고, 디자인된 항원을 사용하여 가금류에서 점막면역을 유도 할 수 있는 생균 **delivery system**을 이용하여 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 예방 백신을 개발하고, 이들 생균백신을 목적동물 중 하나인 산란계를 이용하여 백신 후보균주 및 백신의 면역화를 증가시킬 수 있는 물질의 효능과 안전성 그리고 백신의 부작용에 관한 연구를 수행하여 실제 현장에서 적용이 가능한 백신을 개발하고자 함.

## 제2절 연구개발의 필요성 및 범위

- 인플루엔자 바이러스는 type A, B, C로 분류되며 감염 바이러스의 종류에 따라 전염성과 증상이 다양하게 나타나는데 주로 인간과 동물에게 문제를 일으키는 바이러스는 type A 바이러스임. Type A 인플루엔자 바이러스는 *Orthomyxoviridae* 과에 속하며 8개의 segmented single-stranded RNA로 구성, 표면 당단백질인 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)의 항원성에 따라 다시 subtype이 나뉘지게 되는데 현재 총 16개의 HA 아형과 9개의 NA 아형이 알려져 있음. H형과 N형을 조합할 경우 이론적으로 144종의 아형이 존재하게 되며 조류는 이 아형 모두가 감염이 가능하나 조류의 종속에 따라 감수성과 질병 발현 여부가 달라짐.
- 계절성 인플루엔자의 주요 원인체인 인플루엔자 바이러스는 1918년 H1N1 아형의 인플루엔자 바이러스에 의해 발생한 스페인 독감(Spanish Flu), 1957년 H2N2 아형에 의한 아시안 독감(Asian Flu) 및 1968년 H3N2 아형에 의한 홍콩 독감(Hong Kong Flu)처럼 갑작스럽게 발생한 세 번의 인플루엔자 대유행(influenza pandemic)으로 인류에게 큰 손해를 초래했음. 특히 야생조류 중 감수성이 높은 종이 바이러스에 감염되면 임상 증상이 없이도 상당량의 바이러스를 체외로 배출하기 때문에 전염도가 높아 피해 규모가 확대되고 있음. 또한 가금산업의 성장으로 인해 이전에는 야생조류에서 문제가 되지 않았던 인플루엔자 바이러스가 조류에서 고병원성으로 나타남에 따라 각종 감염병을 극복하고 건강을 지키기 위한 예방 차원의 신속한 백신 개발 필요성이 대두됨.

- 조류 인플루엔자는 주로 닭, 오리 등의 조류에서 발생하는 전염성 호흡기 질환으로 인간에게 발병할 가능성이 낮았으나 1997년 홍콩에서 H5N1 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 의한 첫 사람 감염사례가 발생한 이래 조류 인플루엔자 바이러스의 인체 감염사례가 지속적으로 발생, 높은 치사율을 나타내고 있음. 이후 2003년 네덜란드에서 H7N7 조류 인플루엔자 바이러스에 의해, 홍콩에서 H9N2 조류 인플루엔자 바이러스에 의한 인체 감염사례가 보고되었음. 대부분의 사람에게는 조류 인플루엔자 바이러스에 감염된 적이 없어 면역성이 없고 H항원이 다를 경우 서로 교차면역이 이뤄지지 않는다는 점에서 고병원성의 조류 인플루엔자 바이러스가 발병할 경우 대유행이 될 가능성을 고려해야 함.
- 대유행, 대테러에 신속히 대비하기 위해서는 꾸준한 국내 생산 기술력 확보를 통한 백신 개발이 필요함. 기본적으로 백신 개발을 위해서는 기초연구단계를 거쳐 최종 선정된 백신주 마스터뱅크 확보 및 전임상, 임상 절차를 거쳐 최종 제품허가를 받은 뒤 시장에 유통되기 까지 오랜 시간과 노력이 필요함. 특히 효과적인 백신주 확보를 위해서는 활발한 기초연구가 필수적인데 국내 기업의 경우 연구 개발 투자비가 글로벌 Top5 내 다국적 제약기업 (GSK) R&D 투자규모의 약 4.7% 수준에 그쳐 연구 개발에 어려움을 겪고 있음. 이로 인해 새로운 백신이나 경제성이 없다고 생각되는 예방백신에는 거의 투자가 이루어지지 않고 있어 주요 감염성 질환의 백신 개발을 위한 인프라 및 기초연구에 국가의 적극적 지지 및 투자가 필수적이며 이후 백신실용화 연구지원 강화를 통해 백신산업 활성화 및 예방백신 국산화를 이뤄야 함.
- 고병원성 조류 인플루엔자(Highly pathogenic avian influenza; HPAI)는 제1종 가축전염병으로 분류되어 관리되고 있으며 발생 시 긴급 방역라인을 설치해 철저한 방역대책이 이뤄지고 있는 반면 저병원성 조류 인플루엔자(Low pathogenic avian influenza; LPAI)는 제2종 가축전염병으로 분류, 백신 접종을 통한 발생 억제 및 피해를 최소화하는 방역대책이 수행되고 있음. 현재 인플루엔자 감염을 억제하는 방법으로 백신과 항바이러스제가 있으며 상용화된 인플루엔자 백신은 A형 인플루엔자 바이러스 중 H1N1과 H3N2 아형의 항원과 B형 인플루엔자 바이러스 항원으로 구성된 3가 백신(trivalent vaccine)이 있음. 항원 변이에 따른 새로운 변이주 바이러스의 출현으로 대유행이 발생한 초기에는 바이러스 전파를 억제하기 위한 항바이러스제를 이용하나 이 또한 내성바이러스의 출현을 야기할 수 있기 때문에 단기적으로만 사용이 가능함. 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 H9N2 아형은 국내에서 발생된 이후 유전형과 병원성이 계속 변화되고 있으며 인체 감염 사례는 아직 보고되고 있지 않으나 공중보건 차원 및 경제적 피해를 최소화하기 위해 효과적인 관리가 필요함.
- 1945년부터 현재까지 유정란 기반 인플루엔자 백신 생산 체계를 구축해왔고 상당히 안정화되었으나 안정적인 유정란 공급, 신속한 백신 생산의 어려움, 유정란에서의 적응 과정 중 백신 균주의 항원성 변이 발생, 유정란 유래 단백질로 인한 과민반응 등 여러 문제점을 갖고 있음. 이러한 유정란 기반 인플루엔자 백신 생산의 문제점을 해결하고자 세포배양 기반 인플루엔자 백신 생산 시스템이 구축되기 시작했으나 인체에 대한 안전성 분석이 필요하다는 측면에서 고효율 백신주 개발을 위한 세포주 연구 또한 지속적으로 이뤄져야 함.

- *Salmonella Gallinarum* (SG)은 2,300여종의 *Salmonella* spp.중 가금에만 보균 및 감염되는 대표적인 숙주 특이성균으로 일반 세균과 달리 세포 내 침습해 닭에 한 번 감염이 되면 치료가 불가능함. 이 균이 원인이 되어 나타나는 질병인 가금티푸스(fowl typhoid)는 특히 육용종계, 갈색계에서 높은 감수성을 보이며 전 일령에서 패혈증 증세로 폐사가 일어나는 재발위험성이 높은 질병 중 하나임. 주로 닭에 감염되나 칠면조나 앵무새 등 다른 조류에서 감수성이 존재, 폐사율은 10에서 최대 100%까지 나오며 난계대로 수직감염, 분변을 통해 수평감염이 가능하기 때문에 발생 시 피해가 막대함. 2001년 이후 생균백신이 도입되면서 가금티푸스로 인한 농장의 피해는 많이 감소하였으나 매년 기온이 올라가면서 전국적으로 가금티푸스 발생이 꾸준히 나타나고 있어 여전히 지속적인 피해 사례가 보고됨.
  
- 현재 국내에서 판매되고 있는 가금티푸스 백신은 크게 생균 백신과 사균 백신이 있음. 사균 백신은 균을 화학물질로 사멸시켰기 때문에 백신균의 병원성으로 유발될 수 있는 안전성에 대한 문제는 배제되지만 체내에서 가금티푸스에 있어 중요한 면역반응인 세포성 면역을 유도할 수 없음. 생균 백신은 방어에 중요한 세포성 면역을 유발시킬 수 있다는 장점이 있으나 가금티푸스가 오염된 농장 내 보균계로 존재해 추후 피해가 나타날 수 있어 안전성 보장에 문제가 있을 수 있음.
  
- 생균 백신으로는 실험실내 계대배양으로 lipopolisaccharide (LPS)의 O-specific chains에 변이가 생긴 semi-rough type 균주인 SG9R이 사용되고 있으나 유전적 특성이 분명하지 않고 무엇보다 생체에 투여 시 병원성이 복귀될 가능성이 있음. 이러한 SG9R의 단점 때문에 유전자의 인위적 결실로 변이균주로 약독화하여 가금티푸스를 좀 더 효과적으로 방어하려는 연구가 진행 중임. *Salmonella Typhimurium* 에서 숙주침입 및 병원성의 역방향효과가 발견된 lon 유전자와 세균의 환경 반응력에 관련된 cpxR 이 두 가지 유전자가 완전히 결실된 비병원성 백신 균주를 이전 연구에서 제작했음(협동연구기관). 세균의 외부환경변화에 대한 단백질 대사에 관여하는 ATP-dependent protease 중 하나인 Lon protease의 유전자 lon은 유전자 발현에 관련되는 단백질을 분해하며 세균 세포 내 중요한 기능을 담당하는 것으로 예상함. 이 유전자가 *S. Typhimurium* 에서는 침입성 및 숙주 내 증식능력 등 병원성에 관련되어 *Salmonella pathogenicity island 1* 및 *2*(SPI1 및 SPI2)의 유전자군들이 알려져 있으며 SPI1은 감염초기단계인 장관상피침입에, SPI2는 그 후의 단계인 대식세포 내 생존 및 증식에 관련된 *Salmonella*의 전신감염에 필요함. Cpx는 세 가지 extra cytoplasmic stress response (ESR) pathways를 통해 변화에 반응하는데 여기에 regulator CpxAR이 포함됨. CpxA/CpxR은 signal transduction pathway에서 sensor kinase/response regulator로 작용하며 특히 CpxR은 target gene의 transcriptional regulator로서의 반응에 관여해 phosphorylation, dephosphorylation에 따라 외부 자극에 대한 초기 특정 유전적 반응에 결정적으로 작용함(Mandre et al., 2015). Prokaryotes, fungi, some higher plants에서 아미노산 생합성에 관여하는 중요한 효소인 Aspartate-semialdehyde dehydrogenase의 유전자 asd는 L-aspartate-semialdehyde (L-ASA)를 형성하는 NADPH 의존적 반응을 촉매하며 balanced lethal host - vector system에 사용된다고 알려짐. 이 유전자는 그람음성균 세포벽을 만드는 NAM-NAG 펩티드 연결에서 발견되는 diaminopimelic acid(DAP)가 필요하며 결핍 시 새로운 세포벽인 proteoglycan 생성 능력이 없

는 채 존재하므로 이 유전자가 결핍된 균주는 자연계에 노출되거나 백신주로 접종되었을 때 전혀 증식이 불가능하게 됨. 따라서 *lon*, *CpxR* 및 *asd* 유전자들을 결손시킨 *S. Gallinarum* (SG) 변이균주는 숙주침입능력은 향상되나 생존 및 숙주감염능력이 감소하고 증식이 불가능해 숙주세포로부터 쉽게 제거가 가능하기 때문에 heterologous antigens 발현을 위한 백신주로 이용이 가능함.

- 인플루엔자 A 바이러스를 구성하는 외부 단백질 중 hemmagglutinin은 크게 HA1와 HA2로 구분할 수 있음. HA 단백질의 HA1 단백질은 감염되는 세포의 sialic acid receptors와 결합하면 식세포 작용을 통해 endosome 형태로 숙주 세포로 들어가 endosome 내 낮은 pH에 의해 HA의 구조적 변이가 일어나며 HA2 단백질에 의해 인플루엔자 A 바이러스의 외막과 endosome의 2중층의 융합이 이루어지면서 인플루엔자 A 바이러스의 RNA들이 숙주 세포의 cytoplasm으로 방출됨(CM Mair 2014). HA1 부분을 코딩하는 RNA와 발현되는 단백질을 구성하는 amino acid 서열을 연도에 따라 alignment 했을 시 동일종의 인플루엔자 A 바이러스들 간에도 매우 다양한 변이를 확인 할 수 있으나 HA2의 경우 극도로 안정적으로 보존되는 것을 확인 할 수 있으며(NCBI influenza virus database) 이러한 HA2 단백질을 이용해 백신으로 개발하고자 하는 다양한 연구들이 보고됨(X Fan 2015, KK To 2015 등). 기존 연구들을 토대로 도출된 HA2 대표 서열을 이용, 기존까지 유행했던 인플루엔자 바이러스를 포함하면서 앞으로 유행할 수 있는 인플루엔자 바이러스를 커버 할 수 있는 HA2 항원을 carrier와 fusion 형태로 제작 가능하며 본 연구에서는 닭의 CD154를 함께 발현시켜 백신으로 제작하고자 함.
- Matrix protein 2 (M2)는 인플루엔자 A 바이러스의 type III transmembrane protein으로 세포 초기 감염 단계에 필수적으로 작용하는 pH-regulated proton channel로서 바이러스 생활사에 중요한 역할을 담당하고 있으며 virus particles에는 드문드문 존재하나 바이러스가 감염된 세포 표면에는 널리 퍼져 존재함. M2의 extracellular domain인 M2e는 보존된 23개 아미노산 잔기로 이루어져 있으며 M2e-directed vaccines에 의한 면역 방어 효능을 마우스, 담비, 돼지 등을 포함한 여러 실험동물모델에서 연구 및 개발되고 있음. 또한 임상1상에서 M2e를 기반으로 한 백신이 인체에 안전하고 면역능이 있음을 보여줬음(Turley et al., 2011). 조류 인플루엔자 바이러스 hemmagglutinin (HA) H5의 extracellular segments와 chicken CD154로 만든 재조합 백신의 체액성 및 세포성 면역반응 증가 확인하기 위해 닭에서 시험한 결과, HA 단독보다 높은 면역 반응을 보였음(Pose et al., 2011). 본 연구에서는 M2e 단량체의 낮은 면역원성을 높이기 위해 Natural 형태인 4량체 M2e로 발현하고자 하며 단량체의 M2e를 코딩하는 DNA 염기서열을 적절한 linker로 연결해 닭의 CD154와 함께 발현시켜 구조적으로 안정화되면서 면역원성을 높일 수 있는 백신을 개발하고자 함.
- 우리나라는 거의 매년 같은 패턴으로 조류 인플루엔자가 발생하고 있으나 실질적으로 이를 막기 위한 대책은 살처분이 유일함. 또한 철새 도래지로 유명해 철새 이동에 따른 바이러스 전파가 원인으로 주목되고 있으나 과학적 진단으로 역학관계는 파악해야 함. 육류 소비 증가로 가금산업의 규모가 날로 방대해지고 그에 따른 철저한 조류독감 예측 및 차단 방어의 중요성이 높아지고 있기에 이동제한이나 살처분에 의존한 방역활동이 아닌 예방 차원의

백신 개발이 필요함. 현재 저병원성 조류인플루엔자바이러스 백신 생산은 기본적으로 독성을 무력화시킨 바이러스를 유정란이나 세포에 주입해 이를 키운 후 여기서 자란 바이러스만 따로 분리해 불활성화 시켜서 만들기 때문에 모든 제반 여건이 차질 없이 준비되어도 바이러스 배양에만 6~8주 정도 소요되며 생산된 백신을 직접 닭에 주입해 효과와 안전성을 평가하는데 한 달 정도 걸린다는 단점이 있음. 따라서 기존 조류독감 백신 생산으로는 조류독감 파동이 일어났을 때는 이미 쓸 수 없으므로 본 연구과제에서 개발하고자 하는 **bacteria** 기반 항원발현 생균백신은 짧은 생산 기간과 경제성을 겸비한 차별화된 백신이라 할 수 있음. 여기에 한 번 감염이 되면 치료가 불가능하며 높은 폐사율을 보이는 가금티푸스 백신까지 동시에 개발해 하나의 백신으로 항생제 내성균에 구애받지 않으면서 두 가지 감염성 질병의 예방에 효과적인 백신을 개발하고자 함.

- 본 연구는 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 단백질 HA2, M2e 및 닭의 CD154를 비병원성 살모넬라 균주 표면에 발현시킨 백신을 제조하고자 함. 비병원성 살모넬라 균주를 만들기 위해 lonx, CpxR 및 asd 유전자들을 결손시켜 숙주침입능력은 있되 생존 및 숙주감염 능력이 감소하게 만들고 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 발현을 위한 백신주로 이용, 체액성 및 세포성 면역 반응을 유도해 백신으로서 높은 효능을 보이게 함. 본 연구에서 추구하는 **Bacteria** 기반 전달계 백신 생산은 현존하는 동물세포 또는 유정란 배양을 통한 인플루엔자 백신 생산에 비해 장점이 많은 미래 지향적인 기술이라 할 수 있음(그림 1).

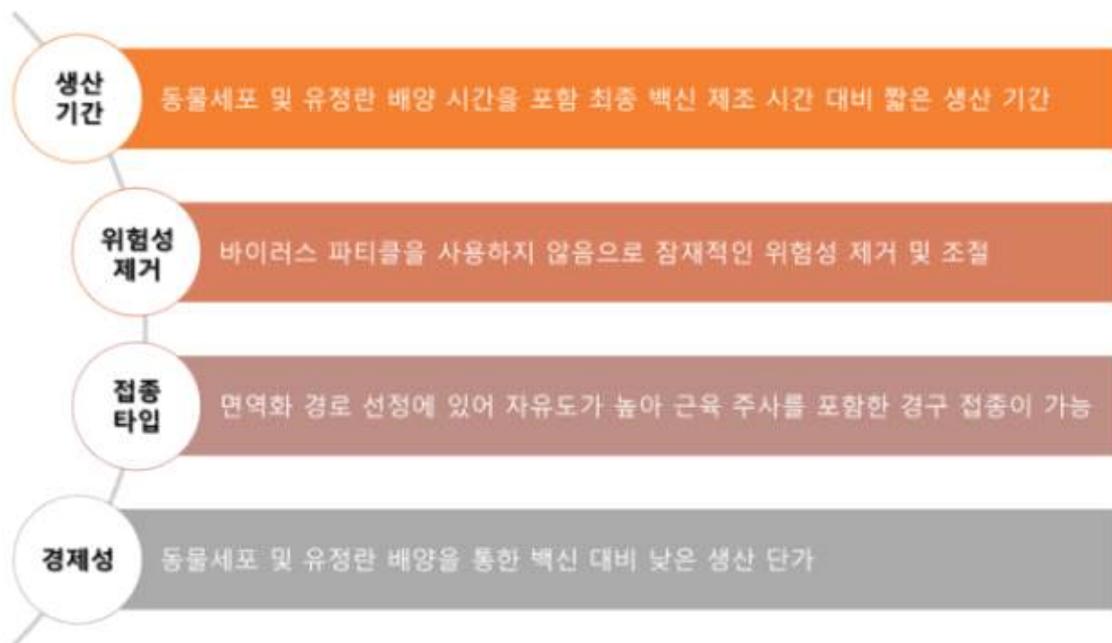


그림 1. **Bacteria** 기반 전달계 백신 생산의 장점

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### 1. 기술현황

- 약독화된 *Salmonella enterical serovar Typhimurium* 변이체에 H1N1의 HA와 M2e를 발현시키거나(Hajam et al., 2017) 약독화된 *S. Typhimurium*에 H7N9의 HA, NA 또는 M2e를 발현시켜(Kim et al., 2018) 인플루엔자 백신으로 개발하고자 하는 연구들이 보고됨.
- 세균 유전체 분석 연구 발달로 *Salmonella* spp. 특정 유전자 결실 mutant (변이주)인 *Salmonella Typhimurium* (ST)  $\Delta$ aroA mutant (미국, 1981),  $\Delta$ cya $\Delta$ crp mutant (미국, 1987)가 제작되며 백신으로서의 가능성이 보고되면서 1980년대 말부터 미국에서 antigen delivery vaccine 연구가 시작되었으며 이후 *Salmonella*-based antigen delivery vaccine 연구를 통한 system 개선 및 실제질병 적용을 위한 최적화가 시도됨. 최근에는 자생 말벌 독 성분인 마스토파란을 이용한 동물용 사균 백신 제조법을 개발하고 이를 살모넬라 사균 백신 제조에 이용함(전북대 허진 교수진, 2016). 마스토파란을 이용한 사균 백신에서는 살모넬라균이 60~80% 생존율을 보여 긍정적 결과를 보였으나 이후 개발 단계에 대한 보고는 없음.
- 닭 가금티푸스의 주요 발병 박테리아 중 폐사율이 높은 *Salmonella Gallinarum* (SG)의 특정 유전자를 homologous recombination을 통해 결실시킨 *Salmonella Gallinarum* (SG)  $\Delta$ lon  $\Delta$ cpxR  $\Delta$ asd 균주에서 *Escherichia coli* heat labile enterotoxin B subunit protein을 발현해 살모넬라 백신으로써의 효능성을 보고함(주관연구기관 종료 과제-유전공학기법을 이용한 효능 개선 살모넬라 백신 개발: 융복합기술개발사업-이전기술과제/중소기업기술정보진흥원).

#### 2. 시장현황

- 2016년부터 현재까지 국내 조류 인플루엔자 발생통계를 살펴보면, 2016년에 인천과 전남의 3개 농장에서 8두수가 저병원성 조류 인플루엔자가 발생하였고 2016년 303개 농장에서 143두수, 2017년에 125개 농장에서 8179두수, 그리고 2018년 현재까지 10개 농장에서 약 65000두수의 고병원성 조류 인플루엔자가 발생했음. 고병원성 조류 인플루엔자에 비해 발생률은 낮으나 저병원성에서 고병원성이 될 가능성을 고려해야 하고 특히 조류 인플루엔자 발생으로 인한 산란계의 강제 폐기 규모가 날로 커지면서 달걀의 소비자 가격이 급증하였음.
- 2016년부터 현재까지 국내 가금티푸스 발생통계를 살펴보면, 2016년에는 경기, 강원, 충남, 전북, 전남, 경남 41개 농장에서 약 11만 두수가 발생했고 2017년에는 대구, 대전, 경기, 충남, 전북, 전남, 경북 33개 농장에서 약 17만 두수가 발생했다고 보고됨에 따라 해마다 증가 추세를 알 수 있음.

### 3. 경쟁기관현황

- 저병원성 조류 인플루엔자에 대해서는 산란계를 중심으로 백신 접종을 실시하고 있고 국내 업체에서 제품을 개발, 판매 중에 있으나 고병원성 조류 인플루엔자에 대한 백신 접종은 이뤄지지 않고 있음. 현재 국내에서는 (주)중앙백신연구소, 코미팜, 녹십자수의약품, 고려 BNP, 대성미생물 5 곳에서 조류 인플루엔자 백신을 생산 중이며 주로 뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염, 산란저하증 및 저병원 조류 인플루엔자(H9N2) 등을 동시에 예방하도록 근육 주사제형 혼합 백신 형태로 판매 중임.
- 현재 국내에서 가금티푸스 예방용 백신으로 (주)중앙백신연구소에서 생균 백신을 주사제형으로 제조, 판매 중이며 항생제와 사균 백신 또한 생균 백신과 더불어 예방책으로 사용 중임. 가금티푸스 치료를 위해 오랫동안 항생제를 사용해 왔기 때문에 광범위한 내성으로 인한 보균계 형성이 문제가 됨.

### 4. 지식재산권현황

- 인플루엔자 A 바이러스 H5N1의 헤마글루티닌(hemagglutinin)을 발현하는 식물체 및 사포닌을 포함하는 경구용 인플루엔자 A 바이러스 H5N1 백신에 대한 특허가 보고됨(10-1525180, 한국, 2015). 식물 조성물 및 사포닌을 포함한 사료 조성물 형태로 가축에 경구 투여하는 방식이며 H5N1 감염 예방이 목적이기 때문에 살모넬라 균주와 H9N2 유전자를 이용할 본 연구 기술은 특허 회피가 가능함.
- 본 연구의 협동연구기관에서 살모넬라 변이균주를 포함하는 가금티푸스 예방용 백신에 대한 특허를 보유함(10-1146372, 한국, 2012). lon 및 cpxR 유전자만 결실된 살모넬라 갈리나룸 변이균주를 이용한 생백신으로 경구 투여와 주사 방식의 가금티푸스 예방이 목적이기 때문에 본 연구 기술은 이 기술을 활용해 새로운 백신 기술을 개발할 예정으로 특허 회피가 가능함.

### 5. 표준화현황

- GC녹십자는 3, 4가 계절독감 백신, 신종 인플루엔자 백신, 조류 인플루엔자 백신을 생산하고 있으나 유정란을 사용한 노막강내 접종을 통해 배양된 바이러스를 불활성화하여 백신을 생산하고 있음(지씨플루프리필드시린지주; 인플루엔자분할백신, 지씨플루퀴드리밸런트프리필드시린지주; 인플루엔자분할백신 등). 이 외 H5N1형의 고병원성 조류인플루엔자에 대해 허가 신청 중이고 임상3상의 4가 세포배양을 통해 만들어지는 인플루엔자 백신을 개발 중이나 사람 접종이 목적임.

- SK케미칼은 사람을 상대로 하는 3, 4가 인플루엔자 백신을 보유(스카이셀플루프리필드시린지; 세포배양 인플루엔자 표면 항원 백신, 스카이셀플루4가프리필드시린지; 세포배양 인플루엔자 표면 항원 백신)하고 있으나 GC녹십자와 마찬가지로 사람 접종이 목적임.
- (주)중앙백신연구소는 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신을 판매하며 근육 주사를 통해 접종이 이루어진다는 한계점과 육계와 같은 품종은 접종을 금한다는 한계점을 지님.
- 고려BNP는 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신을 판매 중이며 (주)중앙백신연구소와 마찬가지로 근육 주사라는 한계점 및 산란계와 종계에만 국한된다는 한계점을 지님.

## 제2절 국외 기술 수준 및 시장현황

### 1. 기술현황

- H7N9 antigen HA1-2과 flagellin을 결합한 재조합 subunit vaccine으로 닭에서 증가된 체액성 및 세포성 면역 반응을 확인함(Song et al., 2017).
- cobS and cbiA 유전자 결실 *S. Gallinarum* 균주를 경구 및 근육 주사 이용해 백신화 후 도전 방어 효과 확인함(Filho et al., 2017).
- *Escherichia coli* heat labile enterotoxin B subunit protein을 발현하는 lon, cpxRa and asd 유전자 결실 *S. Gallinarum* 균주를 사용해 살모넬라 백신의 효능성을 확인함(NM Kamble 2016).

### 2. 시장현황

- 2016년까지 보고된 고병원성 조류 독감의 발병 통보 건수를 보면 베트남이 가장 많고 태국과 이집트가 뒤를 이어 아시아와 유럽 대륙에서 조류 독감이 빈번하게 발생됨을 알 수 있음. 미국이나 유럽의 경우 조류 독감 발병 이후 여러 측면에서 대응책 마련을 빠르게 마련해서 이후 손실을 최소화하려고 노력하나 제도적 장치의 정착 측면에서 오랜 시간이 걸릴 것이라 예상됨. 따라서 효과적인 백신의 개발로 경제적 손실 비용이 높은 조류 독감을 예방하는 방법이 가장 좋음.
- USDA Economic Research Service (ERS)에 따르면 살모넬라증에 의해 매년 지출되는 의료비용과 가축의 경제적 손실비용이 약 1조 2천억 원에 달함.

### 3. 경쟁기관현황

- Megan™Vac 1 (Megan Health사)는 약독화한 *S. Typhimurium*  $\Delta$ cya $\Delta$ crp균주(Hassan JO and Curtiss, 1990, 1997)를 백신화한 것으로 가금류에 접종해 *S. Typhimurium* 및 *S. Enteritidis* 감염 예방이 목적이며 미국, New Zealand, Dominican 공화국에서 사용 중이나 그 방어력이 충분치 않음. 백신균주로 *S. Typhimurium*을 이용하고 세균 내 필수적인 대사에 관련된 cya 및 crp의 양 유전자를 결손시켰기 때문인 것으로 예상됨. Cya와 crp유전자를 결손시킬 경우 세균은 maltose를 포함한 당질발효능력을 잃게 되어 생존능력이 현저히 저하, 약독화가 이루어짐.
- 가금티푸스 예방백신 Nobilis SG9R(Merck animal Health)은 비병원성 살모넬라 균주를 이용한 생균 백신으로 현재 국내 시장에서 효능이 검증된 백신이고 2회 접종이 필요함.

- TAD Salmonella vac® E 및 T(Lohmann Animal Health사, Germany)는 *S. Typhimurium* 및 *S. Typhimurium*를 화학적으로 변형시킨 변이균주임(Schröder, 2002, Gantois et al., 2006).

#### 4. 지식재산권현황

- 유정란을 사용한 종란법으로 만들어지는 조류인플루엔자 H5N1에 대한 백신 개발 방법이 특허로 보고됨(US20090263422A1, 미국, 2006). 유정란을 이용하고 H5N1 바이러스를 예방하는 목적이기에 본 연구 기술인 살모넬라 균주를 이용하고 H9N2에 해당되는 부분은 특허 회피가 가능함.
- 바이러스로부터 얻은 항원으로 만들어진 Virus-like particle(VLP)를 이용하는 인플루엔자 백신에 대한 특허가 보고됨(US20110045022A1, 미국, 2006). 유정란을 통해 배양된 해당 인플루엔자 바이러스로 Virus-like particle(VLP)을 만들어 인플루엔자 예방하는 것이 이 특허의 목적이기 때문에 살모넬라 균주와 H9N2에 해당되는 본 연구 기술은 특허 회피가 가능함.
- DNA를 숙주로 전달해 인플루엔자 바이러스에 대한 면역원성을 유도하고자 하는 DNA백신에 대한 특허가 보고됨(US20080299151A1, 2007, 미국). DNA 형태로 인플루엔자 항원을 코딩할 수 있는 유전자를 숙주로 전달한 뒤 면역원성을 유도하는 기술이기 때문에 본 연구 기술인 살모넬라 균주를 이용하고 H9N2에 해당되는 부분은 특허 회피가 가능함.

#### 5. 표준화현황

- WEIKE BIOTECHNOLOGY사의 H5 subtype avian influenza virus recombinant bivalent vaccine 이 판매 중이나 이는 유정란을 사용하는 종란법으로 만들어진 백신으로 근육 주사를 통해 접종이 이루어진다는 점에서 생산과 접종법의 한계성이 존재함.
- Ringpu(Tianjin) Bio-Pharmacy사의 Newcastle Disease and Avian Influenza Vaccine Inactivated vaccine이 판매 중으로 근육 주사를 통해 접종되는 형태의 백신으로 접종의 한계성을 지님.
- BIOVAC사에서 시판되는 Virsin 126는 불활성화된 H9N2 인플루엔자 바이러스를 사용하는 백신으로 유정란을 통해 배양되는 바이러스 균주를 사용하고 오일 베이스로 만들어져 근육 주사를 통해 접종된다는 한계점과 유정란을 통해 배양되는 한계점을 지님.
- ZHEJIANG EBVAC BIOTECH사에서 시판되는 Qin Gan Nuo는 Avian Influenza inactivated (H9 Subtype, F Strain) vaccine으로 유정란을 사용하여 배양이 이루어지고 근육 주사를 통해 면역화를 진행해야 한다는 점에서 한계점을 지님.

# 제3장 연구수행 내용 및 결과

## 제1절 1차년도 연구수행 내용 및 결과

### 1. 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 백신 개발을 위한 항원의 유전자 확보 및 새로운 항원 디자인

#### 가. 가금류의 주요 바이러스성 호흡기 질병

- 조류인플루엔자(Avian influenza; AI)는 야생조류와 사육하는 가금에서 병원성 인플루엔자 바이러스의 감염에 의해 발생하는 바이러스성 전염병으로서 바이러스의 병원성에 따라 임상 증상과 병원성이 다양하여 무병원성, 저병원성 및 고병원성 조류인플루엔자로 구분됨. 그 중 고병원성 조류인플루엔자(Highly pathogenic avian influenza; HPAI)는 국내에서 ‘제1종 가축전염병’으로, 국제수역사무국(Office International des Epizootic: OIE)에서는 ‘리스트 A 질병’으로 분류되어 관리하고 있으며 대부분의 국가에서 발생과 관련하여 철저한 감시와 검사가 이루어져 발생 시 긴급 방역라인 설치, 이동차단 및 살처분 등의 박멸을 위한 방역대책이 수행됨. 반면, 저병원성 조류인플루엔자는 국내에서 ‘제2종 가축전염병’으로 분류하여 관리되고 있으며 백신접종을 통해 발생을 억제하고 피해를 감소시키며 확산을 줄여가는 방역대책이 수행되고 있음. 따라서 고병원성 조류인플루엔자와 저병원성 조류인플루엔자의 차이를 명확하게 이해하고 고병원성 조류인플루엔자가 발생하거나 혹은 의심될 때에는 즉시 당국(해당 지자체, 가축위생시험소 혹은 국립수의과학검역원 등)에 신고하여 효과적인 박멸책이 수행될 수 있게 하여야 함. 인플루엔자바이러스는 16가지의 혈구응집소(H) 항원과 9가지의 뉴라미니다아제(N) 항원의 조합에 의해 144가지의 복잡한 타입으로 나뉘어 질수 있으나 병원성은 16가지의 H항원에 따라 결정됨. 조류는 이들 16가지의 H항원을 포함한 모든 바이러스에 대해 감염될 수 있으며, 또한 바이러스를 퍼뜨릴 수 있기 때문에 사람에게서의 감염과 관련한 공중보건학적인 차원에서도 초미의 관심이 집중되고 있음. H항원이 다를 경우, 서로 간에 면역학적인 교차방어를 제공하지 않으며, 인플루엔자 바이러스는 언제 든지 변이를 일으킬 수 있음. 특히 야생조류(특히, 오리류)에 감염 시, 뚜렷한 임상증상을 보이지 않으면서 쉽게 바이러스를 확산시킬 수 있기 때문에 동절기에는 야생철새와 오리 등의 관리에 만전을 기해야 함.
- 인플루엔자 바이러스의 주요 외부 항원들인 HA는 바이러스가 숙주로의 침투 시 숙주세포와 결합에 사용되고 이렇게 결합이 이루어진 바이러스는 M2 단백질에 의하여 바이러스 내 pH가 변화하며 HA의 구조적 변화를 유도하여 숙주세포내로 완벽하게 침투하게 됨. 이러한 HA를 구성하는 도메인은 HA1과 HA2 도메인으로 구성이 되고 M2 단백질은 이온채널로 작용함.

## 2. 특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 백신 개발

### 가. 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원 디자인

- 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스로 오르토믹소바이러스 과를 이루는 속의 하나이며 이들을 구성하는 유전물질은 단일가닥의 RNA로 구성됨. 불안정성이 높은 RNA를 유전물질로 지니고 있기 때문에 동일한 H9N2 바이러스 내에서도 변이가 높아 국제적으로도 2003년을 기준으로 과거 유행 하였던 바이러스와는 유전형과 병원성을 달리함. 이러한 잦은 변이로 인해 매년 새롭게 변이하는 인플루엔자 바이러스의 백신으로 큰 효과를 기대하기가 어려움.
- 잦은 변이를 대비 할 수 있는 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신이 필요하고, 이를 위해 H9N2 바이러스를 구성하는 각 항원을 구성하는 유전자원을 확보하였음.
- H9N2 바이러스 발병 보고가 이루어진 2013년도 이후의 바이러스를 구성하는 항원의 유전서열 및 유전서열에 따라 코딩되는 아미노산 서열을 확보하여 이를 분석함. H9N2 바이러스를 구성하는 항원중 하나인 HA에 대한 아미노산 서열은 2013년도 이후 발병에 따라 분석 보고가 이루어진 674개의 아미노산 데이터베이스를 기반으로 총 674개의 아시아권의 발병과 국내 2003년 이후 발병에 따라 분석 보고된 26개의 아미노산 서열 및 유전자 서열을 확보하였음(그림 1). 또한 H9N2 바이러스를 구성하는 항원중 하나인 M2의 아미노산 서열은 2013년도 이후 발병에 따라 분석 보고가 이루어진 550개의 아미노산 데이터베이스를 기반으로 총 550개의 아시아권의 발병과 국내 2003년 이후 발병에 따라 분석 보고된 18개의 아미노산 서열 및 유전자 서열을 확보하였음(그림 2).

Select sequence type:  
 Protein  Protein coding region  Nucleotide

Search for keyword:  
 Keyword  Search in

Define search set:

Type	Host	Country/Region	Protein	Subtype	H	N	Sequence length	Collection date	Release date
any	any	Solomon Islands	PB1-F2	H 6	any	any	Min: <input type="text"/>	From: 2003	<input type="text"/>
A	Avian	Somalia	PA	7	1		Max: <input type="text"/>	To: <input type="text"/>	<input type="text"/>
B	Bat	South Africa	PA-X	8	2			Year Month Day	Year Month Day
C	Blow fly	South Korea	HA	9	3				

Full-length only  Full-length plus

Additional filters: [show](#)

---

Query builder [Permanent link](#)

<input checked="" type="checkbox"/>	Type	Host	Country or region	Protein	Subtype	Length	Full-length only	Full-length plus	Collection date	Release date	Additional filters	Keyword	Number of sequences
<input type="checkbox"/>	A	Avian	Asia	HA	H9N2	any	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2013-2017	any	<a href="#">details</a>		674
<input type="checkbox"/>	A	Avian	South Korea	HA	H9N2	any	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2003-now	any	<a href="#">details</a>		26
												Total unique: 700	
												Selected unique: 0	

Collapse identical sequences

Protein (FASTA)

그림 1. 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2의 항원인 HA를 구성하는 아미노산 서열 및 유전자원의 확보. 아시아 지역에서 2013년도 이후 674건의 발병 보고된 H9N2바이러스를 구성하는 HA의 아미노산 서열을 확보 및 국내에서 2003년 이후 26건의 발병 보고된 H9N2 바이러스를 구성하는 HA의 아미노산 서열의 확보.

The screenshot shows a search interface with the following sections:

- Select sequence type:** Protein (selected), Protein coding region, Nucleotide
- Search for keyword:** Keyword field, Search in: strain name
- Define search set:**
  - Type: any
  - Host: any
  - Country/Region: Tropical continents
  - Protein: NP
  - Subtype: H 6
  - Sequence length: Min: , Max: , From: , To:
  - Collection date: Year, Month, Day
  - Release date: Year, Month, Day
  - Additional filters: show
- Additional filters:** show
- Buttons:** Add query, Clear form

**Query builder**

Type	Host	Country or region	Protein	Subtype	Length	Full-length only	Full-length plus	Collection date	Release date	Additional filters	Keyword	Number of sequences
<input checked="" type="checkbox"/>	A	Avian	M2	H9N2	any	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2003 - now	any	details		18
<input checked="" type="checkbox"/>	A	Avian	M2	H9N2	any	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2013 - now	any	details		550
											Total unique:	568
											Selected unique:	568

Buttons: Show results, Collapse identical sequences, Download results, Protein (FASTA), Customize FASTA define

그림 2. 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2의 항원인 M2를 구성하는 아미노산 서열 및 유전자원의 확보. 아시아 지역에서 2013년도 이후 550건의 발병 보고된 H9N2바이러스를 구성하는 M2의 아미노산 서열을 확보 및 국내에서 2003년 이후 18건의 발병 보고된 H9N2 바이러스를 구성하는 M2의 아미노산 서열의 확보.

#### 나. 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 백신 개발

- 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스를 구성하는 항원들의 아미노산 서열 및 유전 서열을 기반으로 각 항원별 각각의 바이러스들에 있어서 가장 안정적으로 보존이 이루어지고 항원성이 유지되는 부분을 기반으로 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스들에 대한 백신 후보 항원을 선정함.
- H9N2 바이러스 발병 보고가 이루어진 2013년도 이후의 바이러스를 구성하는 항원의 유전 서열 및 유전서열에 따라 코딩되는 아미노산 서열을 확보 이를 분석하였음. H9N2 바이러스를 구성하는 항원중 하나인 HA에 대한 아미노산 서열은 2013년도 이후 발병에 따라 분석 보고가 이루어진 674개의 아미노산 데이터베이스를 기반으로 총 674개의 아시아권의 발병과 국내 2003년 이후 발병에 따라 분석 보고된 26개의 아미노산 서열을 분석을 통하여

가장 안정적으로 유지되고 항원성이 있는 HA1을 코딩하는 도메인과 HA2을 코딩하는 도메인에 대한 대표서열을 도출하고 이러한 항원을 코딩 할 수 있는 유전 서열을 만들어 살모넬라균주에서 발현이 용이하도록 최적화를 진행하였음.

- H9N2 바이러스를 구성하는 항원중 하나인 M2의 아미노산 서열은 2013년도 이후 발병에 따라 분석 보고가 이루어진 550개의 아미노산 데이터베이스를 기반으로 총 550개의 아시아 권의 발병과 국내 2003년 이후 발병에 따라 분석 보고된 18개의 아미노산 서열 및 유전자 서열을 토대로 가장 안정적으로 유지되고 항원성이 나타내는 M2e 도메인을 선정하여 M2e를 구성하는 대표 아미노산 서열을 도출한 후 이를 코딩 할 수 있는 유전 서열을 만들어 살모넬라균주에서 발현이 용이하도록 최적화를 진행하였음.
- 각 후보 항원(HA1, HA2, M2e)을 약독화 살모넬라에서 발현이 가능하도록 디자인되어진 플라스미드 pMMP65에 클로닝 후 살모넬라 갈리나룸으로 도입하였음. 도입된 약독화 살모넬라 갈리나룸에서 항원의 발현 및 분비 여부를 웨스턴블롯, 형광현미경 및 FACS를 이용하여 확인하였음.
- 발현이 확인된 각 벡터와 pMMP65를 해당 제한효소로 절단 후 아가로오스 젤에서 전기영동한 후 AccuPrep 젤 추출 키트(purification kit)를 이용하여 아가로오스 젤로부터 절단된 부착인자와 pMMP65 절편을 정제하고 T4 DNA 리가아제를 이용하여 4℃에서 하룻밤 라이게이션 하였음. 상기 라이게이션된 반응액으로 *E. coli*  $\chi$ 232를 형질전환시켜 DAP를 첨가하지 않은 LB 아가에 골고루 퍼서 말린 다음 하룻밤 배양하여 pMMP65에 의해 형질전환된 균주를 선택하였음.
- 각 부착인자의 확인은 *E. coli*  $\chi$ 232로부터 플라스미드를 분리하여 각 부착인자에 해당하는 제한 효소로 절단한 후 아가로오스 젤에서 전기영동하여 최종 확인하였음. 최종 확인된 각 정제 플라스미드를 전기청공법에 의하여 JOL967에 형질전환시켜 저병원성 조류인플루엔자 H9N2의 항원인 HA1, HA2 그리고 M2e를 발현하는 균주를 확보하였음.
- JOL967를 DAP (50 $\mu$ g/ml)이 포함된 LB broth에서 균주의 성장 중간 단계(mid-log phase) 까지 배양 후, 멸균된 균주를 얼려진 10%의 글리세롤(ice-cold 10% glycerol) 함유된 증류수로 두 번 세척한 다음, JOL967를 0.2 cm 큐벳에 넣고 플라스미드 0.1  $\mu$ g과 섞은 후 Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, USA)의 사전에 프로그램된 세팅 중 Ec2에 따라 전기충격을 가하였음. 반응된 균을 큐벳에서 회수한 후, DAP를 넣지 않은 LB broth 1.0 ml를 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양함. 형질전환된 살모넬라균을 선별하기 위해 배양된 균액 100  $\mu$ l를 다시 DAP를 첨가하지 않은 LB 아가에 골고루 퍼서 말린 다음 37℃에서 하룻밤 배양한 후 형성된 균주를 선별하였음(표 1).

표 1. 실험에 사용된 균주와 플라스미드 리스트

Strains / plasmids	Description
<b>Strains</b> X232	<i>E. coli</i> $\Delta asd$ strain, used for cloning of genes into <i>asd<sup>r</sup></i> plasmid
JOL394	<i>Salmonella</i> Gallinarum wild type challenge strain
JOL967	$\Delta lon$ , $\Delta cpxR$ and $\Delta asd$ mutant of <i>S. Gallinarum</i>
JOL916	$\Delta lon$ , $\Delta cpxR$ mutant of <i>S. Gallinarum</i>
JOL2068	JOL967 with pJHL65 empty plasmid
JOL2074	JOL967 with pJHL65-M2eCD40L plasmid
JOL2076	JOL967 with pJHL65 plus pcDNA-M2eCD40L
JOL2110	X232 with pMMP65-HA2
JOL2111	DH5 with pET28a-HA2
JOL2113	JOL967 with pMMP65-HA2
JOL2118	BI21 with pET28a-HA2
JOL2156	X232 with pMMP65-HA1
JOL2158	JOL967 with pMMP65-HA1
JOL2164	BI21 with pET28a-HA1
JOL2149	DH5 with pET28a-HA1
<b>Plasmids</b>	
pJHL65	An <i>asd<sup>r</sup></i> vector, pBR ori, $\beta$ -lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid, 6xHis, high copy number
pcDNA3.1+	Mammalian expression vector, CMV promoter, high copy number,
pET-32a	IPTG-inducible expression vector; Kanamycin resistant
pET32a-M2eCD40L	M2e-CD40L gene in pET32a vector
pET-28a	IPTG-inducible expression vector; Kanamycin resistant
pET28a-HA1	HA1 gene in pET28a vector
pET28a-HA2	HA2 gene in pET28a vector

## 다. 해당 단백질 항원 확보

### (1) 단백질 항원 확보

#### ○ Cloning

- 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 백신으로 사용하기 위해 디자인된 각 항원인 HA1, HA2 그리고 M2e를 코딩하는 유전자를 cloning 하였음.
- 각 디자인된 항원을 코딩하는 DNA는 합성을 통해 준비되었고 준비된 항원을 코딩하는 유전자 부위를 지닌 플라스미드는 *E. coli* DH5α에 형질전환 후 배양하여 플라스미드를 증폭하고 분리 정제하여 해당 항원에 삽입된 제한효소와 반응하는 서열을 제한효소를 이용하여 절단 후 agarose gel을 이용하여 해당 크기를 확인한 다음 AccuPrep gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였음.

#### ○ 해당 단백질 항원 확보

- 시판되는 발현용 vector (pET28a(+))와 host (*E. coli* DH5α와 *E. coli* BL21)를 이용하여 각 해당 유전자를 발현용 vector에 삽입 후 해당 host에 transformation 시켜 단백질 항원 발현 균주를 확보하였음.
- 정제된 PCR 증폭산물과 pET28a vector를 각 항원 디자인에 사용된 제한 효소로 각각 절단한 후 agarose gel에서 전기영동 하였음. 절단된 각 절편을 AccuPrep gel purification kit를 이용하여 정제한 다음 T4 DNA ligase (Takara, Japan)로 두 산물을 ligation한 후 *E. coli* DH5α 또는 *E. coli* BL21으로 형질전환 되었음. 이들 형질전환 균주를 kanamycin이 각각 첨가된 LB agar에 골고루 퍼서 말린 다음 37°C에서 하룻밤 배양하여 발현 vector로 형질전환 된 *E. coli* DH5α 또는 *E. coli* BL21을 선택하였음.
- 각 H9N2의 디자인된 항원을 발현하는 유전자가 삽입된 vector는 *E. coli* DH5α 또는 *E. coli* BL21 으로부터 AccuPrep plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하여 각 항원의 클로닝에 사용된 제한효소를 사용하여 절단 후 agarose gel에서 전기영동을 통해 확인함. 그리고 이렇게 확인된 colony를 각 발현 vector에 맞는 항생제가 첨가된 LB broth 5 ml에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양 후 배양된 균액 중 1 ml를 LB broth 200에 접종하여 30°C에서 150 rpm의 속도로 흔들며 주면서 하룻밤 배양하였음. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였고, 이 배양액을 8,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 하였음. 상층액은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1 mM이 되도록 첨가된 10 ml의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70°C에서 냉동하였음. 냉동된 부유액을 다시 37°C water bath 내에서 해동한 다음 -70°C에서 냉동하기를 2~3회 반복하여 해동한 후 부유액을 초음파처리하여 cell 들을 분쇄한 다음 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 다음 상층액을 멸균 관에 옮겼음.
- 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4.0 ml를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6.0 ml의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰음. 이 반응액을 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과

결합하도록 30분간 교반하였음. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈음. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris · Cl, 8 M urea, pH 6.3) 6 ml로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거 후 Elution buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 2.0 ml로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1.0 ml씩 첨가하여 단백질을 회수하였음. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였고 정량한 후 -70℃에 보관하였음.

- 정제항원을 ELISA 분석, 점막면역보조제와 함께 사용될 vaccine, 유세포분석(FACS) 그리고 Real Time PCR을 이용한 cytokine의 분석에 자극에 사용될 항원 또는 면역화로 사용될 항원으로 사용하였음.

## (2) 각 해당 항원에 대한 항체 확보

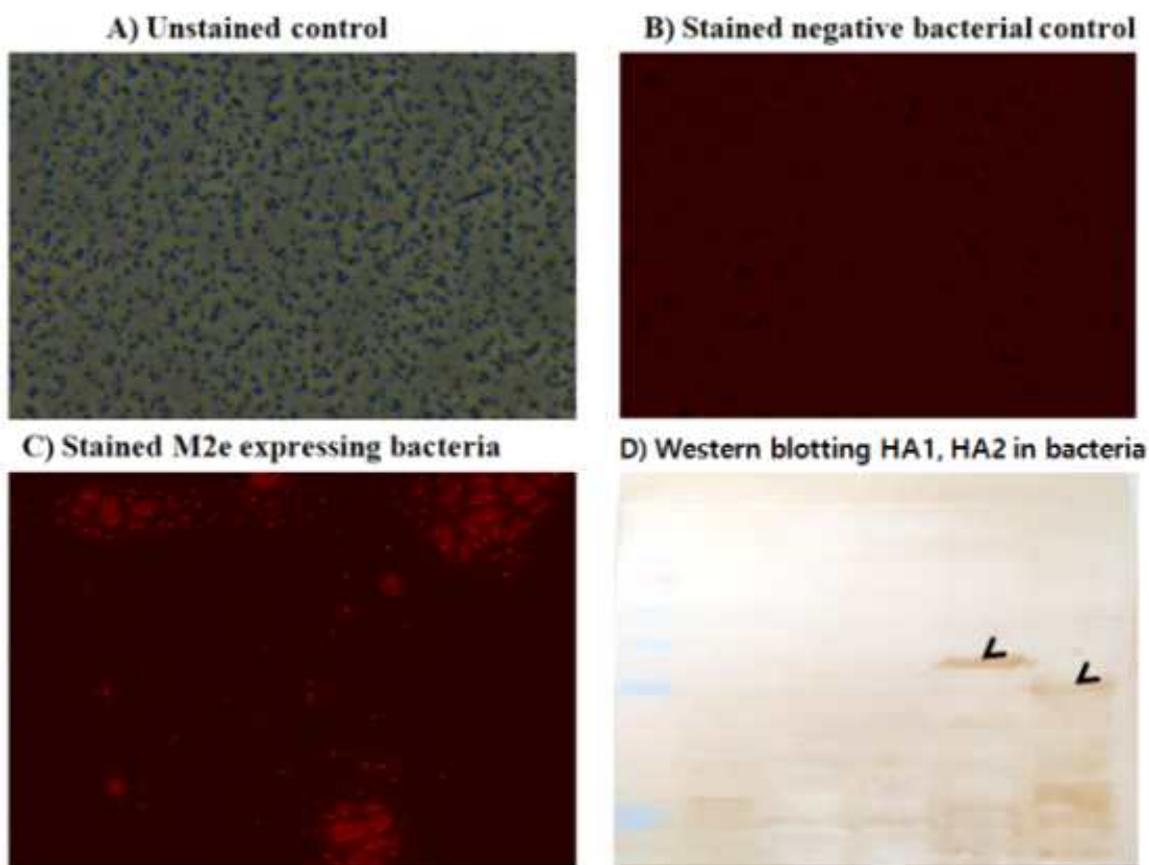
- 각 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 상업적으로 판매가 이루어지는 항체 중 polyclonal antibody를 구매 후 -70℃에 보관하여 항원분석(western blot, FACS, 형광현미경)을 위한 항체로 사용하였음.

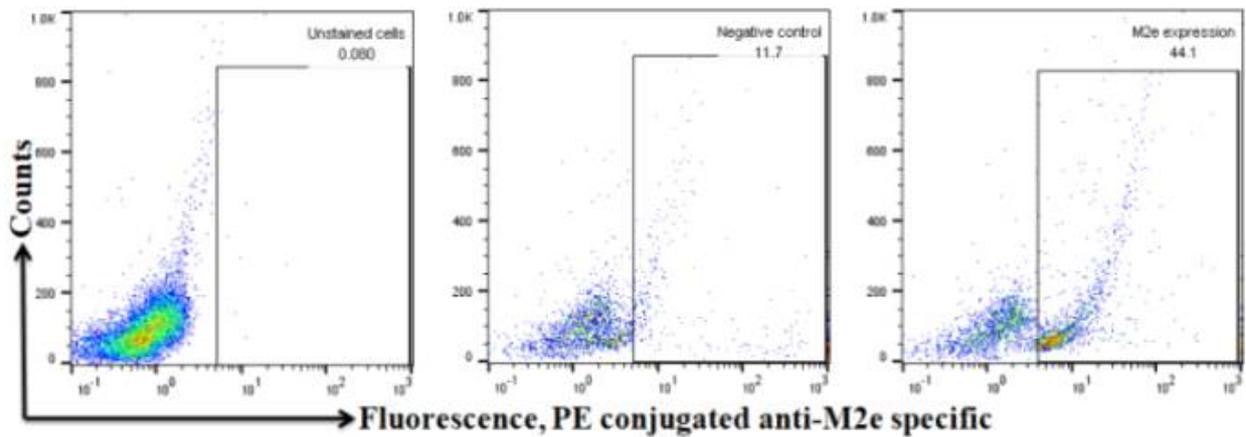
## 라. In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인

### (1) 백신용 살모넬라 변이주의 항원 발현 확인

- 제작된 백신 균주가 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 새롭게 디자인된 항원을 발현하는지 확인하기 위하여 각 백신 후보균주를 100 ml의 LB broth에 하룻밤 배양한 후, 4,000 rpm에서 원심분리하였음. 원심분리 후 상청액과 침전물을 시료로 준비하였고. 상청액은 얼려진 10%의 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)으로 처리하여 세포 밖으로 분비된 발현 항원을 검출하였음. 각 시료는 94℃에서 5분간 끓인 후 SDS-PAGE 전기영동 후, PVDF 막으로 옮겨 블로킹 완충액(blocking buffer; 3% skim milk in PBST)에서 하룻밤 반응시켰음. 다음날 준비한 각 항원에 대한 polyclonal antibody를 1:5,000 으로 희석하여 1시간 반응시킨 후, 1:5,000로 희석된 2차 항체(goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP)로 1시간 반응시킨 다음 최종적으로 WEST-one™ Western Blotting System (Intron Biotechnology, Korea)으로 발색하여 발현을 확인하였음(그림 1 D. HA1 and HA2).
- 제작된 백신 후보 균주에서 저병원성 조류인플루엔자 H9N2바이러스의 항원의 발현여부를 확인하기 위해 백신 후보균주를 LB 액체배지를 이용 37℃에서 하룻밤 진탕배양하여 인플루엔자 바이러스의 항원인 M2e와 면역활성보조인자인 CD154를 발현하는 시료를 준비하였음. 이렇게 준비된 시료는 4,000 rpm으로 원심분리 후 멸균 PBS로 3차례 세척을 진행하였고 M2e에 특이적으로 결합하는 항체(MyBioSource, 미국)를 1차로 사용 백신 후보균주에서 발현된 항원인 M2e항체를 결합 시킨 후 4,000 rpm으로 원심분리한 다음 멸균 PBS로 3차례 세척을 진행한 후 1차 항체에 특이적으로 결합하는 로다민(rhodamine) 형광체가 결합된 2차 항체로 M2e 단백질과 특이적으로 결합된 1차 항체와 반응을 진행하였음. 결합이 이루어진 박테리아를 4,000 rpm으로 원심분리 후 멸균 PBS로 3차례 세척을 진행 하였고, 100 μl의 멸균 PBS로 재부유 후 형광현미경을 사용하여 분석하였음(그림 3).

- 또한 제작된 백신후보균주가 M2e와 결합된 면역활성보조인자의 박테리아에서 발현 유무를 확인하기 위해 백신후보균주를 LB 액체배지를 이용하여 37 °C에서 하룻밤 진탕배양하여 인플루엔자 바이러스의 항원인 M2e와 면역보조활성인자인 CD154를 발현하는 시료를 준비 하였음. 이렇게 준비된 시료는 4,000 rpm으로 원심분리 후 FACS running buffer (Miltenyi Biotec, 독일)로 3회 세척 후, M2e에 특이적으로 결합하는 항체(MyBioSource, 미국)를 1차로 사용하여 백신 후보균주에서 발현된 M2e에 각각의 항체를 결합 시켜줌. 그 후 4,000 rpm으로 원심분리 후 FACS running buffer (Miltenyi Biotec, 독일)로 3회 세척 후 항원인 M2e에 특이적으로 결합된 1차 항체인 토끼 IgG와 특이적으로 결합하는 PE 형광체가 결합된 2차 항체를 사용하여 반응을 진행한 다음 4,000 rpm으로 원심분리 후 FACS running buffer (Miltenyi Biotec, 독일)로 3회 세척하여 100  $\mu$ l의 FACS running buffer (Miltenyi Biotec, 독일)로 재 부유함. 1차, 2차 항체가 결합된 박테리아를 유세포분석기(FACS)를 통해 분석하였음 (그림 3).
- Western blot, 형광현미경 그리고 FACS 분석을 통해 transformation 된 균주로부터 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스가 디자인된 항원인 HA1, HA2 그리고 M2e의 발현을 확인 하였음(그림 3).





**그림 3. 저병원성 조류인플루엔자 백신후보 균주로부터의 바이러스 항원의 발현.** 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 발현하는 균주에서 바이러스 항원의 발현을 형광 현미경을 사용하여 확인함. (A) Unstained control. (B) Bacteria lacking M2e gene. (C) Bacteria harboring M2e gene showing immunofluorescence. (D) Western blotting HA1 and HA2 expressing in bacteria. M2e gene was physically linked to chicken CD154 molecule and cloned into pMMP65, constitutive expression vector. The recombinant plasmid was electroporated into attenuated *Salmonella Gallinarum* (SG), which was confirmed by colony PCR. The SG is lonx, cpxR and asd mutated. The bacterial surface expression of M2e-CD154 was analysed by flow cytometric using primary M2e specific antibody and then secondary PE-conjugated species-specific antibody body. Our data indicated that *Salmonella Gallinarum* efficiently expressed M2e protein as evidenced by dramatic increase in fluorescence compared to bacteria lacking M2e gene.

### 3. 실험동물에서의 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 예방 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 확인

#### 가. 실험에 사용된 균주 또는 바이러스 그리고 플라스미드

- 이 실험에서 사용된 모든 균주와 플라스미드는 표 1. 에 서술되어져 있음. *E. coli* BL21은 새롭게 디자인된 H9N2 바이러스 항원들을 발현시키기 위하여 사용되었음. 약독화된 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*), JOL967은 wild type *S. gallinarum*dm 으로부터 유전적으로 *cpxR*, *lon*, *asd* 가 결실된 약독화 균주임. 플라스미드 pET28a(+)는 새롭게 디자인된 H9N2 바이러스의 항원들을 발현시키기 위해 사용되었으며, pMMP65는 약독화 살모넬라균주로부터 디자인된 H9N2 항원의 발현을 유도하기 위해 사용된 플라스미드임. 또한 새롭게 디자인된 H9N2 바이러스의 항원 중 하나인 M2e-CD154를 숙주세포 시스템을 이용하여 발현 할 수 있는 시스템을 지닌 균주를 만들기 위해 사용된 플라스미드인 pCDNA를 사용하여 해당 항원을 클로닝 후 JOL967균주로 도입함.

- 모든 실험에 사용된 균주와 플라스미드는 37°C Luria-Bertani broth (LB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, U.S.A.) 또는 LB agar에서 배양되었으며, JOL967과 같은 Asd-negative bacteria의 배양을 위해 Diaminopimelic acid (DAP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)를 첨가함. 도전 감염을 위해 사용된 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스는 국립환경과학원으로부터 분양 받아 유정란 또는 MDCK 세포를 통한 배양을 진행 후 유정란 또는 MDCK세포를 이용 감염 감수성 (EID<sub>50</sub> 또는 TCID<sub>50</sub>)을 확인 후 공격 접종에 사용되었음.

#### 나. 경구 접종용 백신 준비

- 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 새롭게 디자인된 항원의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균 또는 숙주세포의 시스템을 통해 H9N2 바이러스의 항원의 발현이 가능한 약독화 살모넬라 균주는 LB broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 새로운 LB broth에 1:20의 배율로 첨가되어 37°C에서 optical density (OD)<sub>600</sub>가 0.8이 될 때까지 배양하였음. 배양된 균주들은 4,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 침전된 균주들은 멸균 phosphate-buffered saline (PBS)로 재부유되어 같은 조건으로 재 원심분리 하였음. 침전된 균주는 sucrose가 20%가 되도록 첨가된 PBS (PBS-sucrose)로 각 항원을 발현하는 균주들은 1.0 X 10<sup>10</sup> CFU colony-formingunits (CFU)/ml가 되도록 재 부유시켰음. 생균이 제조된 당일에 산란계의 구강을 통해 1.0 X 10<sup>9</sup> CFU로 단일 면역화 또는 조합된 형태로 면역화가 진행되었음.

#### 다. 비강 접종용 생균백신 준비

- 경구접종과 달리 새롭게 디자인된 H9N2 바이러스의 항원인 M2e (4량체)를 발현하는 BL21로부터 분리 정제된 단백질과 점막면역활성 보조제인 PEI 와 조합 또는 단독으로 면역화를 진행하였음. 즉 M2e 25 µg 으로 비강을 통한 단독 면역화가 진행된 그룹, PEI 100 µg으로 비강을 통한 단독 면역화가 진행된 그룹 그리고 M2e-PEI (25 µg ~ 100 µg)의 조합의 형태로 1차 면역화가 진행하였고 면역화 2주 후 같은 조건으로 2차 면역화를 진행하였음.

#### 라. 도전 감염용 야생형 바이러스주 준비

- 국립환경과학원에서 분양받은 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 부란기에서 11일간 배양을 통해 혈관생성이 확인된 유정란에 256HAU의 야생형 H9N2 바이러스 100 µl씩 감염 후 48시간 배양하였음. 48시간 후 4 °C에서 유정란을 불활성화한 후 H9N2 바이러스가 배양된 유정란의 요막강을 수거하여 HA값을 확인하고 MDCK 세포를 사용하여 실험동물 감염에 사용할 농도인 TCID<sub>50</sub> 값을 도출한 후 1.0 X 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> 값을 기반으로 실험동물의 비강을 통해 공격접종 하였음.

#### 마. 실험내용

- (1) M2e-CD154를 발현하는 백신 균주 또는 숙주시스템을 통해 발현이 가능한 백신 후보 균주의 경구를 통한 면역화
  - 백신접종이 이루어지지 않은 1일령의 병아리를 부화장으로부터 분양 받아 항생제가 포함되

지 않는 음수와 사료를 급여하며 4주간 배양함. 4주령의 암컷 산란계를 각 항원을 발현하는 균주에 따라 10마리씩 총 40마리의 암컷 산란계에 4그룹으로 나누어 경구를 통한 면역화를 진행하였음.

- M2e-CD154를 발현하는 백신 후보 균주(JOL2047)를 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였고, 또한 숙주세포의 시스템을 사용하여 M2e-CD154를 발현하는 백신 후보 균주(JOL2076)를 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였으며, 항원을 발현하지 않는 박테리아 컨트롤인 JOL2068을 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였음. 산란계에서 진행된 백신의 경구접종에 대한 실험개요는 아래와 같은(표 2).

표 2. 산란계에서 백신 경구접종 실험개요

그룹	NO	항원이 유래한 바이러스	균주
1	10		PBS
2	10		JOL2068
3	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	JOL2047
4	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	JOL2047, JOL2076

(2) H9N2 바이러스의 백신으로 새롭게 디자인된 항원을 발현하는 백신 후보 균주의 단독 또는 조합에 따른 면역화

- 백신접종이 이루어지지 않은 1일령의 병아리를 부화장으로부터 분양 받아 항생제가 포함되지 않는 음수와 사료를 급여하며 4주간 배양하였음. 4주령의 암컷 산란계를 각 항원들이 발현하는 균주에 따라 10마리씩 총 8그룹으로 나누어 경구를 통해 면역화를 진행하였음.
- HA1을 발현하는 백신 후보 균주(JOL2158)를 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였고, HA2을 발현하는 백신 후보 균주(JOL2113)를 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였으며, M2e-CD154를 발현하는 백신 후보 균주(JOL2047)를 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였음.
- HA2를 발현하는 백신 후보 균주(JOL2113)와 M2e를 발현하는 백신 후보 균주(JOL2047) 조합물을 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였고, HA1을 발현하는 백신 후보 균주(JOL2158)와 HA2을 발현하는 백신 후보 균주(JOL2113) 그리고 M2e를 발현하는 백신 후보 균주(JOL2047) 혼합물을 경구로 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였음.

- 대조군으로 항원을 발현하지 않는 박테리아 컨트롤인 JOL2068을 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^9$  CFU의 농도로 면역화를 진행하였음. 또한 상업적으로 판매가 이루어지는 저병원성 조류 인플루엔자 백신은 해당 제조사에서 제공하는 농도와 양으로 근육주사를 통한 면역화를 진행하였음(표 3).

표 3. 산란계에서 백신 경구접종 실험개요

그룹	NO	항원이 유래한 바이러스	균주
1	10		PBS
2	10		JOL2068
3	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	JOL2158
4	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	JOL2113
5	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	JOL2074
6	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	JOL2113, 2074
7	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	JOL2158, 2113, 2074
8	10	<i>Influenza/A H9N2</i>	상업용 백신

### (3) 비강접종

- 백신접종이 이루어지지 않은 1일령의 병아리를 부화장으로부터 분양 받아 항생제가 포함되지 않는 음수와 사료를 급여하며 4주간 배양하였음. 4주령의 암컷 산란계를 면역화가 진행될 그룹에 따라 각 한 그룹 당 10마리의 산란계를 사용하여 면역화를 진행하였음.
- PBS를 사용하여 비강을 통해 면역화를 진행한 대조군 그룹, 점막면역 활성 보조제인 PEI 100  $\mu\text{g}$ 을 사용 비강을 통해 면역화가 진행된 그룹, 4량체의 M2e 25  $\mu\text{g}$ 을 사용하여 비강을 통해 면역화가 진행된 그룹 그리고 4량체의 M2e (25  $\mu\text{g}$ )와 PEI (100  $\mu\text{g}$ )의 조합으로 비강을 통해 면역화를 진행한 그룹으로 나누어 면역화 2주 후 동일한 조건으로 2차 면역화를 비강을 통해 진행하였음(표 4).

표 4. 산란계에서 비강접종 실험개요

그룹	NO	사용된 항원 또는 보조제
1	10	PBS
2	10	PEI
3	10	M2e
4	10	M2e, PEI

#### (4) 가검물 채취

##### ○ 가검물 채취(혈청, 장 세척액, 폐 세척액)

- 각 항원을 발현하는 백신 후보 균주로 면역화를 진행한 3주 후 각각의 실험동물로부터 조직들을 분리하였음. 혈청은 각 항원을 발현하는 균주로 면역화가 이루어진 산란계 목에 위치한 정맥에서 채혈 후 혈청을 분리하여 ELISA 또는 NI assay 분석을 위해 실험 전 까지  $-50^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였음. 장 세척액의 경우 16시간 금식 후 면역화가 이루어진 실험동물로부터 lavage 용액을 경구 투여 후 배설을 유도하여 장세척을 진행하여 장 세척액을 분리하여 ELISA와 같은 분석을 위해  $-50^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였음.
- 폐 세척액은 면역화가 이루어진 5마리의 실험동물로부터 폐조직을 분리하여 멸균 PBS를 이용하여 세척 후 폐 세척액을 분리한 다음 ELISA 분석을 위해  $-50^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였음.

##### ○ 효소면역측정법을 통한 면역반응 측정

- 효소면역측정법을 통한 면역반응 측정은 혈청, 장 세척액, 폐 세척액을 대상으로 IgG 및 sIgA에 대한 항체 역가를 측정함. IgG는 산란계에 경구접종 후 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위한 목적으로 실험동물인 닭 혈청을 사용하여 측정되었으며 ELISA로 IgG의 역가를 측정하였음.
- sIgA는 실험동물인 닭에서 면역화 후 형성된 mucosal 및 systemic immune response 중 mucosal immune response를 확인하기 위한 실험으로 실제 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스가 증식하는 폐와 장의 세척액을 대상으로 ELISA로 sIgA의 역가를 측정하였음.
- 백신 접종 후 형성된 면역 반응을 측정하기 위해 ELISA 항원은 정제를 하여 농도 측정을 한 뒤  $-50^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 실험에 사용하였음.
- Chicken IgG 또는 sIgA의 값은 Bethyl Laboratories의 ELISA Quantitation kit (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX, USA)를 사용하여 제조사에서 제공되는 매뉴얼에 따라 표준 ELISA를 수행하여 혈청에서 IgG를 장 세척액과 폐 세척액에서 sIgA를 각각 측정하였음. IgG와 sIgA를 측정하기 위해 혈청은 1:100 으로 희석하였고, sIgA를 측정하기 위해 질 분비물에서 1:4 로 희석하였음. 그리고 *o*-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 발색 시킨 후 492 nm에서 흡광도를 분석하였음.

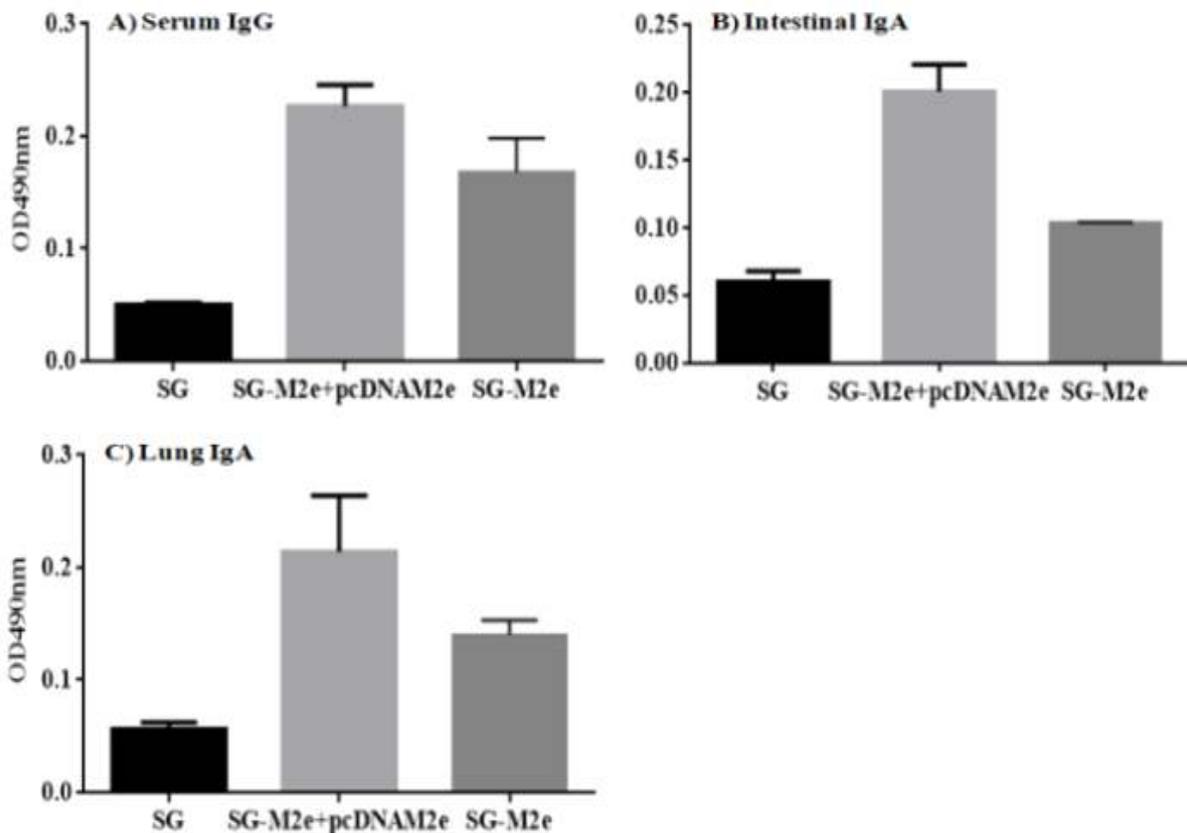
#### 바. 실험결과

##### (1) M2e-CD154를 발현하는 백신 후보균주 또는 숙주세포 시스템을 이용하여 발현 가능한 백신 후보 균주로 면역화가 진행된 실험동물로부터 형성된 IgG 또는 sIgA의 역가 분석

- 혈청, 장 세척액 및 폐 세척액에 대하여 ELISA Quantitation kit (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX, USA)를 제조회사의 사용설명서에 따라 ELISA를 수행하였고, *o*-페닐렌디아민 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 발색시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정하

였음.

- 혈청 IgG의 역가를 측정한 결과, 장 세척액의 sIgA 역가 그리고 폐 세척액의 sIgA 역가를 측정한 결과 **그림 4**와 같았음.
- 경구 접종을 통해 백신 후보군으로 면역화가 이루어진 실험동물은 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 항원인 M2e에 특이적으로 반응하는 항체인 IgG의 역가가 혈청에서 최대 4배 이상 증가되는 것을 확인하였음.
- 폐와 장에서 점막성 면역원성에 의해 유도되는 저병원성 조류인플루엔자 항원에 특이적으로 반응하는 sIgA 역가 또한 장 세척액 과 폐 세척액에서 각각 최대 3배가량 증가하였음 (**그림 4**).

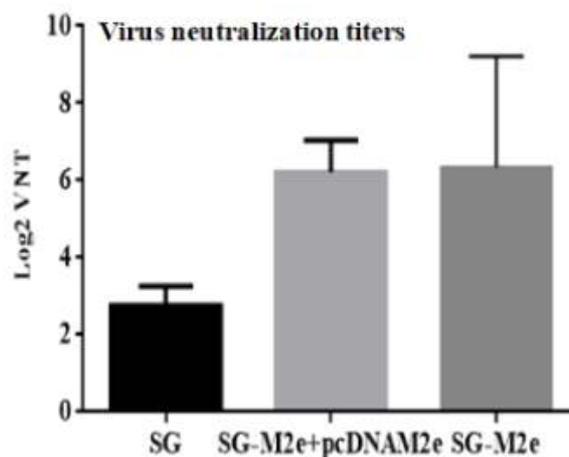


**그림 4. Analysis of IgG and IgA antibodies in vaccinated chickens.** Chickens (n=10) were orally immunized with Salmonella Gallinarum (SG), Salmonella Gallinarum (SG) carrying pMMP65-M2eCD154 plasmid + SG carrying pcDNAM2e (SG-M2e+pcDNAM2e) or SG carrying pMMP65-M2eCD154 plasmid only (SG-M2e). 10<sup>9</sup> CFU of each bacteria was inoculated to each bird. Three weeks later, the chickens were boosted orally with the same dose. 14 days post-2nd booster, serum samples were collected for IgG analysis (A). Further three chickens in each group

were sacrificed and intestinal (B) and lung (C) washings were collected for IgA analysis by indirect ELISA. The coating antigen used was M2e tetramer (200 ng/well). Our results indicated that SGM2eCD154 had significantly increased IgG and IgA responses. The highest antibody were observed in group that received *Salmonella Gallinarum* carrying pMMP65-M2eCD154 and pcDNA-M2eCD154 compared to birds that received *Salmonella Gallinarum* carrying pMMP65M2eCD154 only.

**(2) M2e-CD154를 발현하는 백신 후보균주 또는 숙주세포 시스템을 이용하여 발현 가능한 백신 후보 균주를 이용하여 경구 접종 후, 혈청(Serum) 내 저병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 중화항체역가 분석**

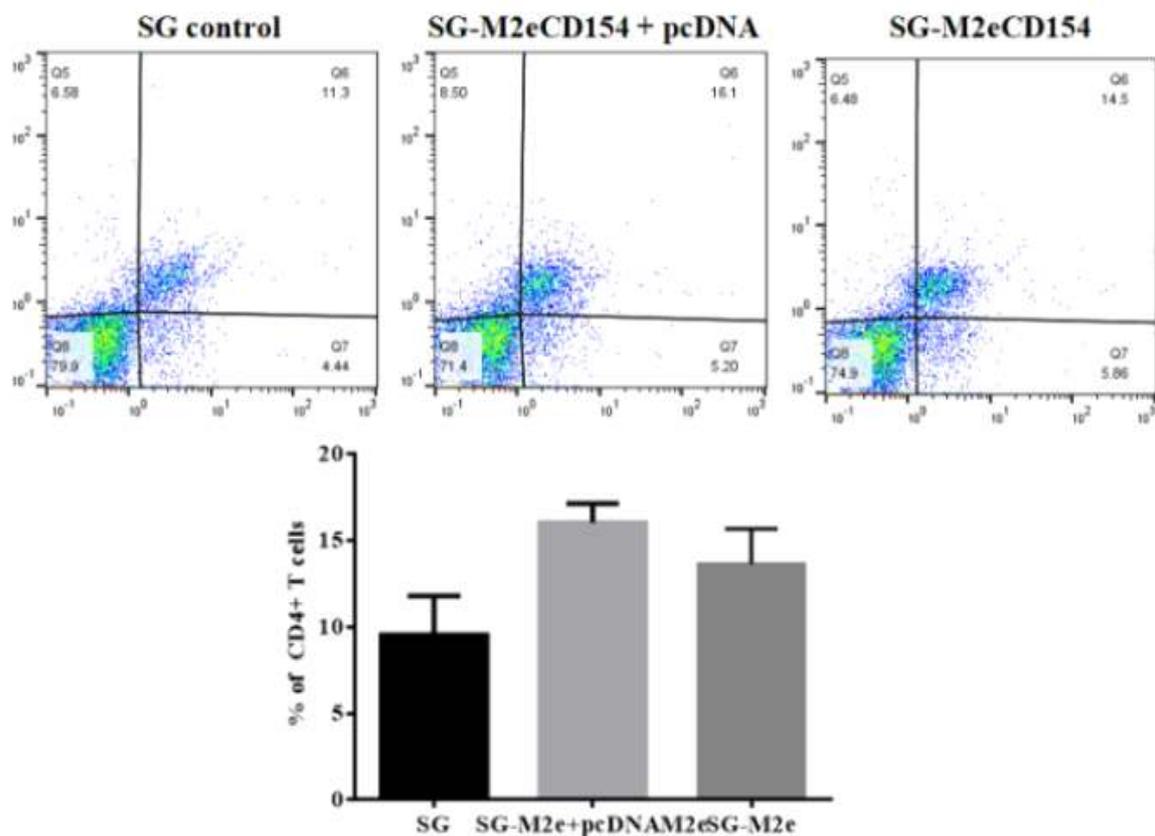
- 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원과 면역활성 보조제를 발현하는 균주 또는 항원인 M2e와 면역활성 보조제를 숙주 내 시스템을 사용하여 발현을 유도 할 수 있는 균주로 면역화가 이루어진 실험동물로부터 분리한 혈청의 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 중화항체 역가를 MDCK 세포를 이용하여 측정하였음.
- 그 결과 공여의 플라스미드를 지닌 균주로 면역화가 이루어진 실험동물과 비교하여 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 항원과 면역활성 보조인자를 분비 또는 숙주세포 시스템을 사용하여 발현을 유도하는 균주로 면역화가 이루어진 그룹의 실험동물에서 실질적으로 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 중화 할 수 있는 항체의 역가가 높게 나타나는 것을 확인하였음(그림 5).



**그림 5.** Serum samples were analysed for their ability to neutralize 100 TCID50 H9N2 virus. Our results suggested that vaccinated sera had demonstrated neutralization activity in vitro and both groups give almost comparable virus titers. Statistical analysis by Students parametric unpaired T test. P values were <0.05.

(3) M2e-CD154를 발현하는 백신 후보균주 또는 숙주세포 시스템을 이용하여 발현 가능한 백신 후보 균주로 면역화가 이루어진 실험동물에서 항원에 특이적으로 반응하는 세포성 면역반응 분석

- 백신 후보 균주로 면역화를 진행한 실험동물로부터 접종 14일 후 무균적으로 채취한 혈액에서 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell, 말초혈액 단핵세포)를 분리하였음.
- 분리된 PBMC는 멸균 PBS로 3번 세척 후 complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin and 10% FBS)로 재 부유시키고 cell 수를 계산한 뒤  $1 \times 10^6$  PBMC를 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 저병원성 조류인플루엔자 항원인 M2e로 자극하여 면역반응을 48시간 유도하였음.
- 48시간 후 면역반응이 유도된 세포를 수거한 후 항원에 특이적으로 반응하여 분화된 림프구에 특이적으로 반응하는 형광체가 결합된 항체를 사용하여 반응시킨 다음 유세포분석기를 통해 항원에 특이적으로 분화되는 림프구를 확인하였음.
- FITC-labeled anti-chicken CD3 antibody 및 AF700-labeled anti-chicken CD4 antibody (Southern Biotech, USA)로 각각 반응 후 유세포 분석을 진행하였고 각각의 항체에 특이적으로 결합된 형광체들의 분획을 구분하여 해당세포의 분화를 확인하였고 데이터 분석은 FlowJo software (Treestar, Inc., San Carlos, CA)를 사용하여 진행하였음.
- 그 결과 공여의 플라스미드가 삽입된 SG 균주로 면역화가 이루어진 그룹과 비교하여 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 분비하는 균주로 면역화가 이루어진 실험동물그룹 또는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 숙주세포의 시스템을 통하여 발현 할 수 있는 시스템을 사용하여 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에서 항원에 특이적으로 반응하는 CD3+ CD4+ T 림프구의 분화가 최대 1.5배 이상 증가하는 것을 확인하였음(그림 6).

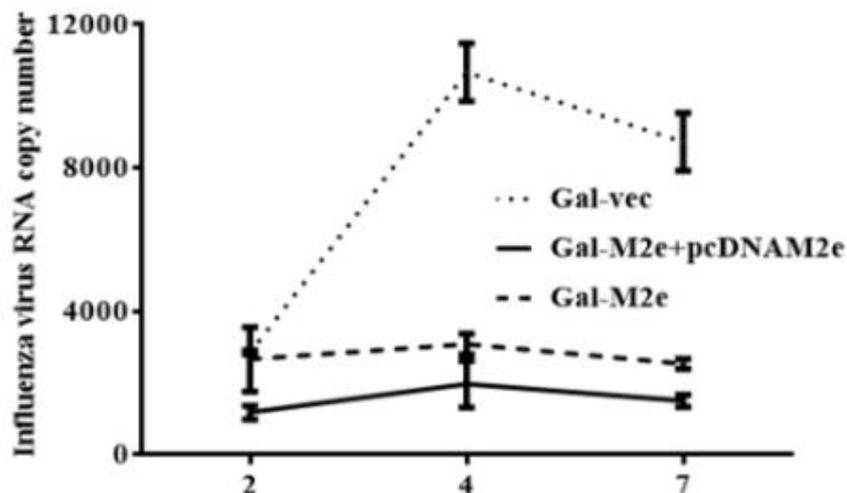


**그림 6. M2e-specific T cell responses.** 14 days post-2nd booster, blood (n=5) was drawn and PBMCs were isolated. The PBMCs ( $1 \times 10^6$ ) were cultured in RPMI media with 10% PBS and challenged in vitro with M2e tetramer ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) for 48 hours. Later, the cells were analysed for M2e-specific CD4+ T cell responses by flow cytometry. Our results showed slight increase in M2e-specific T cell responses. The highest T cell responses were observed in group that received *Salmonella Gallinarum* carrying pMMP65-M2eCD154 and pcDNA-M2eCD154 compared to birds that received *Salmonella Gallinarum* carrying pMMP65M2eCD154 only, although statistically non-significant. However, the responses were significant with respect to gallinarium control.

## 제2절 2차년도 연구수행 내용 및 결과

### 1. 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2의 공격 접종에 의해 분비되는 바이러스 분석

- 유정란을 통해 배양된 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 배양액을 농도별로 MDCK 세포에 감염시켜 TCID<sub>50</sub> 값을 도출하였고 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> 값의 백신후보 균주로 면역화가 이루어진 각 그룹의 실험동물의 비강을 통해 공격 접종하였음. 공격 접종 2일, 4일, 7일 후 각 그룹의 실험동물로부터 분비되는 H9N2 바이러스를 확인하기 위해 각 그룹의 실험동물로부터 fecal swabs을 통해 H9N2바이러스를 채취 후 샘플로부터 RNA를 분리하였고 WHO에서 제시하는 FAN influenza diagnostic의 real time pcr primer 를 사용하여 측정 후 ct 값을 이용하여 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 virus RNA 수를 분석하였음.
- **그림 1**과 같이 공여 플라스미드를 지닌 살모넬라로 면역화가 이루어진 그룹의 실험동물보다 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 분비하거나 또는 H9N2 항원을 숙주세포에서 발현 할 수 있는 시스템을 지닌 균주로 면역화가 이루어진 그룹에 있어서는 현저하게 낮은 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 분비가 되는 것을 확인하였음.
- 감염 2일 차의 비슷한 수준의 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스 수가 검출되는 것을 확인 할 수 있는 대 반해 4일 그리고 7일로 갈수록 형질 전환된 균주로 면역화된 그룹의 실험동물에서는 H9N2 바이러스 항원을 분비하거나 또는 숙주세포시스템을 이용하여 발현을 유도하는 경우 보다 대조군에서 3배 이상의 야생형 조류인플루엔자 H9N2 바이러스가 분비되는 것을 확인 할 수 있었음(**그림 1**).

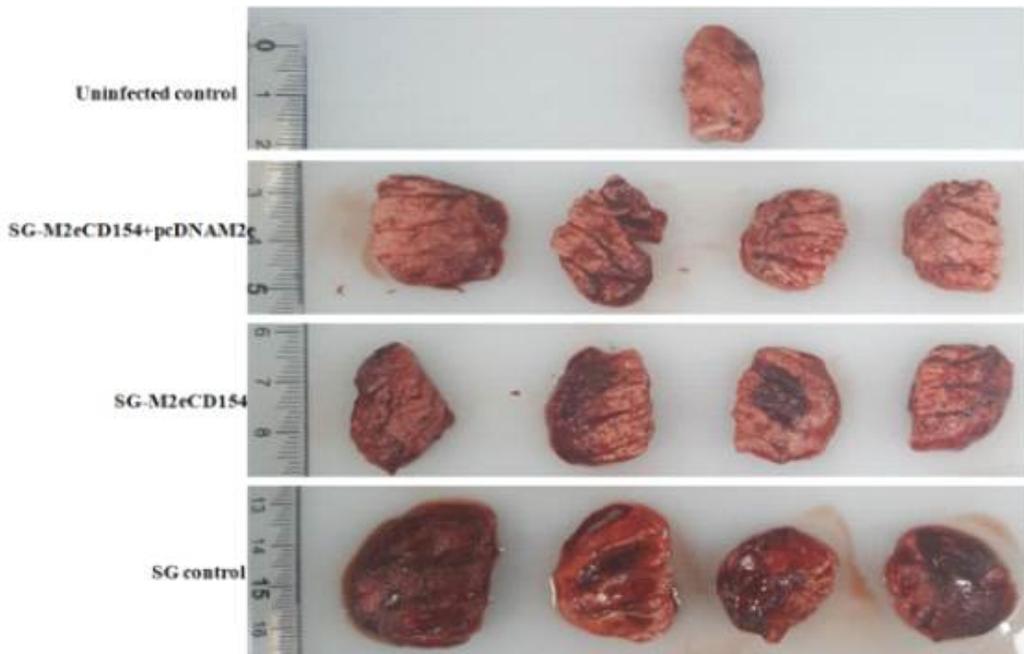


**그림 1. Viral load in fecal samples.** Vaccinated and control birds were challenged with 10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub> H9N2 virus and fecal swabs (n=3) on day 1, 3 and 6 post-challenge were collected for analysis of viral load using OIE recommended primers by qRT-PCR assay. Control birds had shown significantly higher viral load compared to the vaccinated birds. This experiment shows that

vaccination with m2e based vaccines can reduce viral shedding in birds. Further, control birds show depression, anorexia, and diarrhea post-H9N2 challenge while vaccinated birds show normal behavior.

**2. 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2의 공격 접종에 의한 폐조직의 염증 및 비대화 정도 분석**

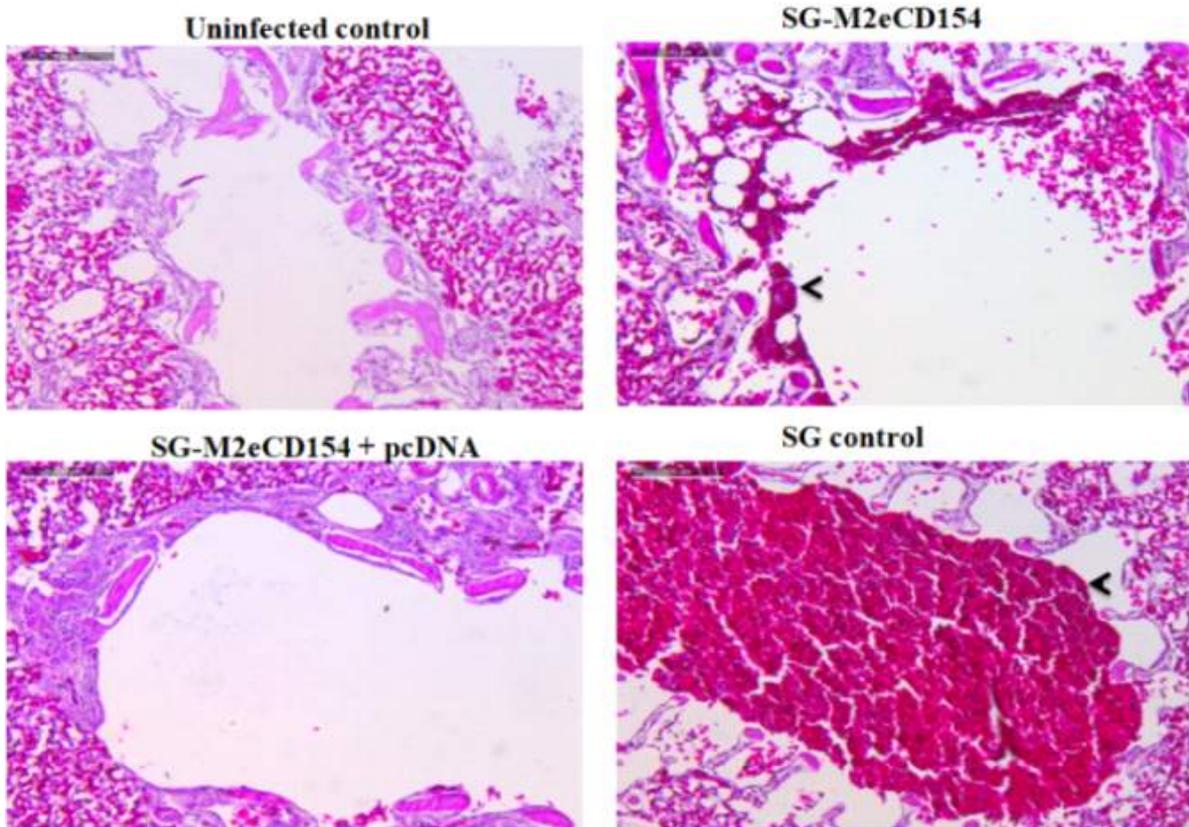
- 백신 후보 균주를 포함한 대조군으로 면역화가 진행된 각 그룹의 실험동물에 공격접종을 하고 7일 후 면역화가 이루어진 그룹과 대조군의 실험동물로부터 폐조직을 분리하여 폐조직의 염증 및 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 의해 유도되는 염증으로 인해 비대해지는 폐조직을 육안으로 확인하였음.
- 공여의 플라스미드를 지닌 균주로 면역화가 진행된 그룹의 실험동물과 비교하여 백신후보 균주로 면역화가 진행된 그룹의 실험동물에서는 확연하게 염증으로 인한 비대화가 감소하는 것을 확인 할 수 있음. 나아가 백신 후보 균주로 면역화가 진행된 그룹의 폐에서는 공격 접종을 진행하지 않은 그룹의 폐와 비교하여 확연한 차이가 나타나지 않았음(그림 2).



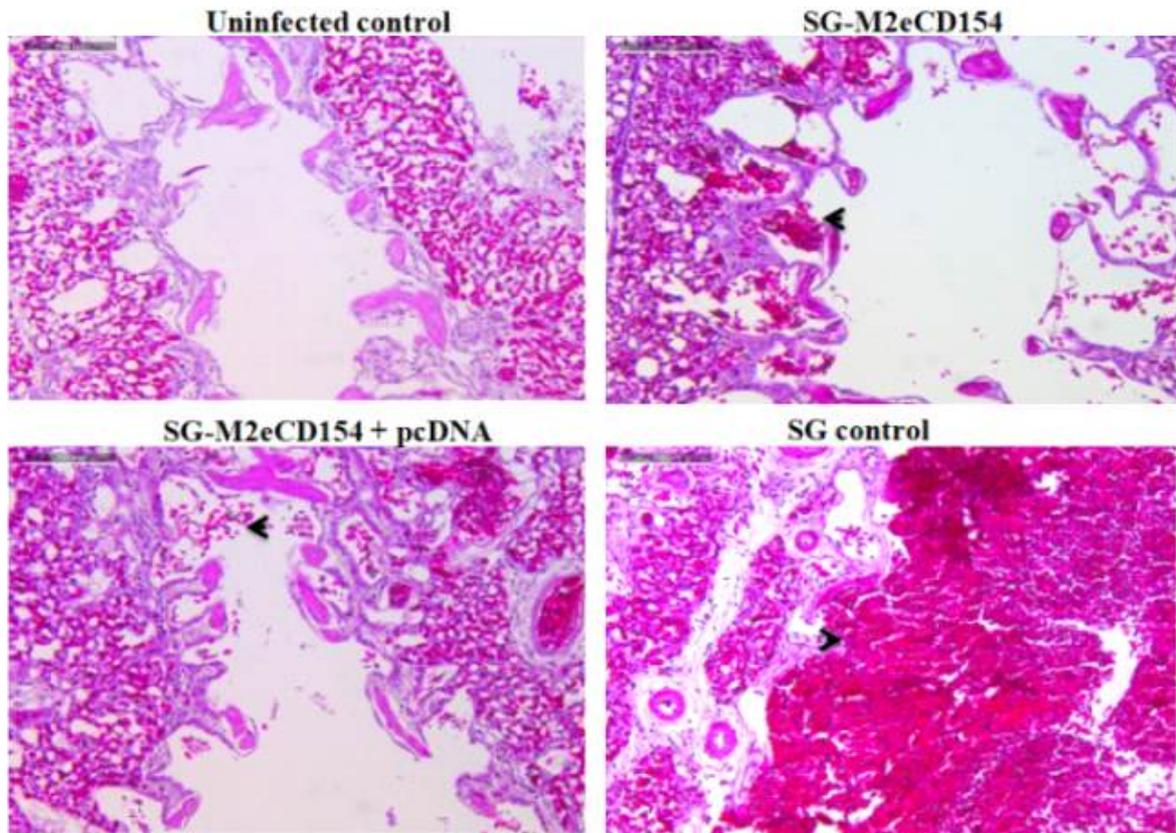
**그림 2. Pathological changes in the vaccinated and the control group chickens after lethal challenge with H9N2 virus.** On 7th day post challenge, chickens (n=4) were sacrificed and examined for gross lesions and histopathological analysis. Our results indicated that vaccinated chickens displayed significantly less pathological changes in lungs compared to control birds.

**3. 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2의 공격 접종에 의해 조직에서 유도되는 염증반응 분석**

- 백신 후보 균주를 포함 대조군으로 면역화를 진행한 각 그룹의 실험동물에 공격접종 3일과 7일 후 면역화가 이루어진 그룹과 대조군의 실험동물로부터 폐조직을 분리 후 포르말린 고정액에 보관하여 파라핀으로 조직을 고정하였고, H-E stain을 통해 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 의하여 유도되는 염증반응을 확인하였음. 고정액에 들어 있던 조직을 카세트에 넣어 하룻밤 방치하여 고정액을 수세하고 알코올에서 탈수시킨 뒤 조직을 soft parafin에서 한 시간 반, hard parafin에서 한 시간 반을 포매 시키고 조직을 절편한 다음 하룻밤 방치시켜 조직절편을 건조함. 건조된 조직은 자일렌을 이용하여 탈파리핀과 수세를 진행하고 헤마톡신린으로 염색한 뒤 다시 수세한 다음 아세트산으로 분별, 암모니아수로 중화시킴. 그리고 흐르는 물에서 빛깔을 내고 에오진액으로 염색한 뒤 알코올로 분별 탈수하고 봉입을 하여 조직을 관찰하였음.
- 조직학 검사를 시행한 결과 **그림 3**과 **그림 4**. 에서와 같이 공여의 플라스미드를 지닌 균주로 면역화가 이루어진 그룹의 실험동물과 비교하여 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 분비하거나 또는 숙주세포시스템을 통해 H9N2 바이러스 항원을 발현할 수 있는 균주로 면역화가 진행된 그룹의 실험동물에서 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 의해 유도되는 염증반응이 확연하게 줄어드는 것을 확인 할 수 있었음(**그림 3, 4**).



**그림 3. Histopathological analysis of Lung samples post 3 day challenge (n=3).** On day 3 post-challenge, three birds from each group were sacrificed and lung samples were analysed by H&E staining. This result shows that vaccinated birds displayed significantly lower inflammatory conditions and thus histopathological changes. Among vaccinated birds, SG-M2eCD154 + pcDNA showed lower histopathological changes. Arrows show inflammation.



**그림 4. Histopathological analysis of Lung samples post 7 day challenge (n=4).** On day 7 post-challenge, four birds from each group were sacrificed and lung samples were analysed by H&E staining. This result shows that vaccinated birds displayed significantly lower inflammatory conditions and thus histopathological changes. Among vaccinated birds, SG-M2eCD154 + pcDNA showed lower histopathological changes. Arrows show inflammation.

- 4. 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2의 공격 접종에 따른 실험동물의 식욕 부진 확인**
- 공여의 플라스미드로 형질전환이 이루어진 균주와 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 분비하거나 또는 H9N2 항원을 숙주세포의 시스템을 이용하여 발현할 수 있는 시스템을 지닌 균주로 면역화가 진행된 각 그룹의 실험동물에 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스  $10^4$  TCID<sub>50</sub> 값으로 공격 접종을 수행한 후 실험동물의 식욕 저하를

확인하였음.

- 백신후보 균주로 면역화가 이루어진 그룹의 실험동물들과 비교하여 공여의 플라스미드로 형질전환된 균주로 면역화가 진행된 그룹의 실험동물에서 식욕이 많이 감소되어 있음을 확인하였음(그림 5).



그림 5. Physical appearance and behavior of birds post-H9N2 challenge. This figure shows that vaccinated birds look normal while infected control birds are anorexic, confused and sick.

### 5. 백신후보균주의 안전성

- 백신접종이 이루어지지 않은 1 일령의 병아리를 부화장으로부터 분양 받아 항생제가 포함되지 않는 음수와 사료를 급여하였고, 항원발현 백신 후보 균주(JOL2158)를 경구를 통해 실험동물 한 마리당  $1.0 \times 10^{10}$  CFU의 농도로 백신을 투여하여 4주간 안전성을 확인하였음. 그 결과 anorexia, diarrhea, 및 depression 등이 나타나지 않았음.
- 백신 후보 균주를 투여한 후 실험동물로부터 분리된 조직들(장, 간, 비장)을 대조군(PBS 처

리)과 비교한 결과로 백신이 동물에 미치는 조직적인 변화는 미비한 것으로 확인되었음. 이 결과로부터 백신균주의 안정성을 입증할 수 있었음(그림 6).

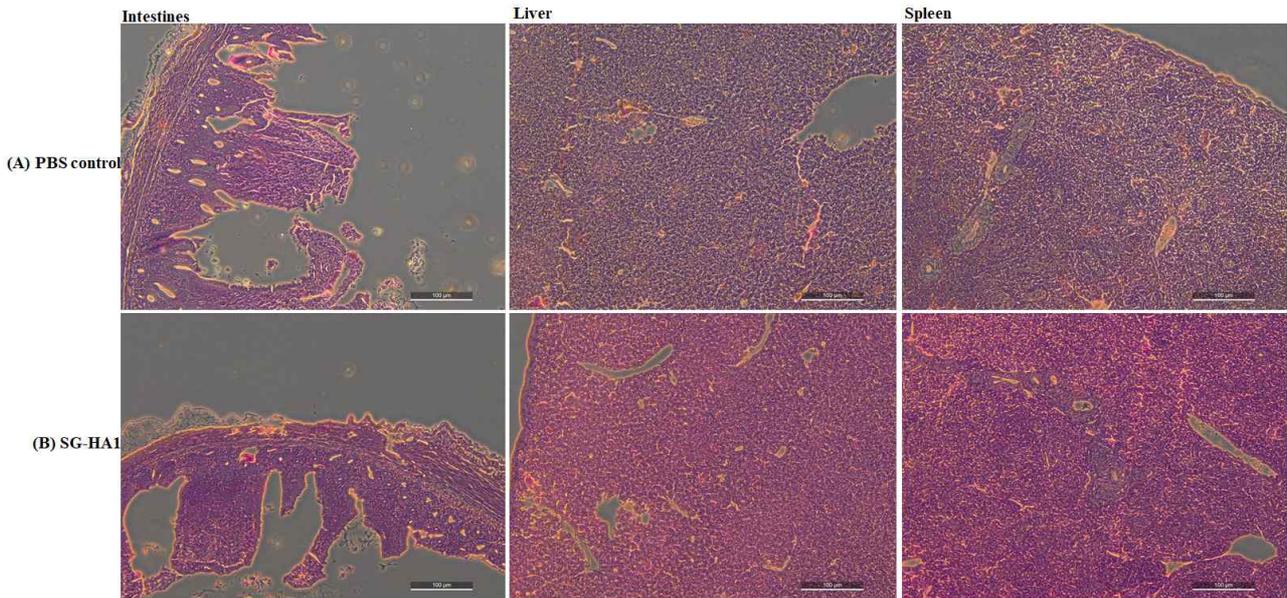


그림 6. Safety evaluation of SG-HA1 based H9N2 vaccine. Chickens (N=3, each group) were administered once orally with either SG-HA1 vaccine ( $10^{10}$  CFU/bird) or sterile PBS in a volume of 100  $\mu$ l, and after 7 days chickens were sacrificed and intestines, liver and spleen were aseptically collected for histological analysis. Scale bar=100  $\mu$ m.

## 6. HA1, HA2 및 M2e 를 발현하는 SG 백신균주의 체액성면역 분석

- 백신의 체액성면역을 분석하기 위해 백신 접종 후 14일과 28일에 상업용 백신과 비교하여 indirect ELISA를 실시하였음.
- 분석결과 본 과제의 백신과 상업용 백신의 HA1, HA2 및 M2e specific IgG 에 대한 반응은 그림 7과 같이 유효한 면역반응을 보였음.
- SG-HA1 또는 SG-HA1-HA2-M2e 백신 균주 혼합 백신을 접종한 닭은 SG 대조군에 비해 HA1 특이적인 전신 IgG 반응이 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았음. 그러나 면역 접종 후 14일째에 HA1 특이 IgG 수치가 확인되었지만 백신 접종 후 28일째에만 반응이 유의미하게 확인되었음( $p < 0.05$ ). 반면, SG-HA1 및 SG-HA1-HA2-M2e 백신 군과 비교하여, 상업용 H9N2 백신으로 접종한 닭은 백신 접종 후 28일째에 HA1에 대한 IgG 반응이 유의하게 유도되는 것을 확인하였음( $p < 0.05$ )(그림 7A).

- SG 대조군에 비해 SG-HA2 또는 SG-HA1-HA2-M2e 혼합 백신으로 접종한 닭은 14일과 28일에 HA2에 특이적인 IgG 반응이 유의하게 증가하였음( $p < 0.05$ ), 두 백신 접종군 모두에서 반응양상이 비슷하게 확인되었음(그림 7B). SG-HA2 및 SG-HA1-HA2-M2e 백신 접종과 비교하여, 상업용 H9N2 백신으로 예방 접종한 닭은 백신 접종 후 14일과 28일에 HA2 specific IgG 반응이 관찰되었음(그림 7B).
- SG-M2e 기반 백신으로 예방 접종된 닭은 SG 대조군과 비교하여 백신 접종 후 14일과 28일에 M2e specific IgG 반응이 유의하게 증가하였음( $p < 0.05$ )(그림 7C).

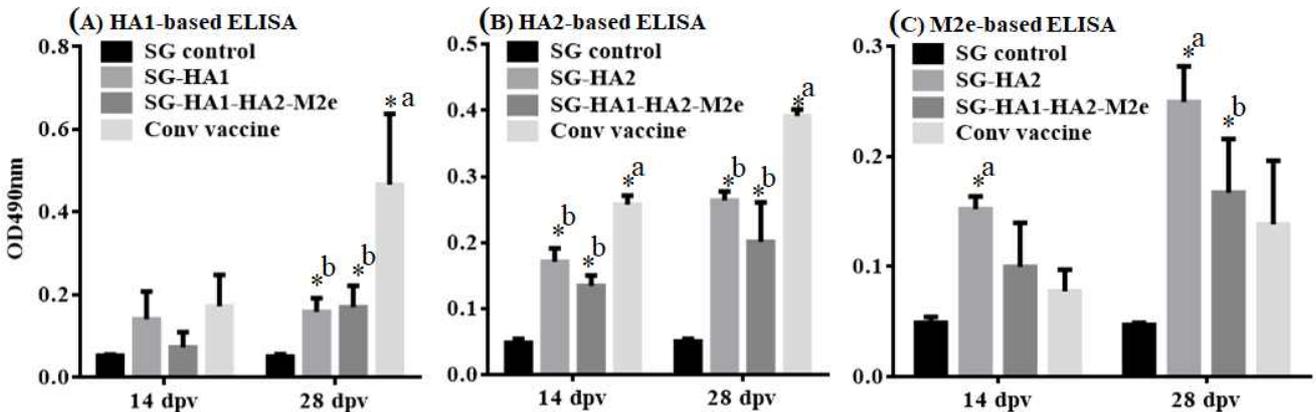


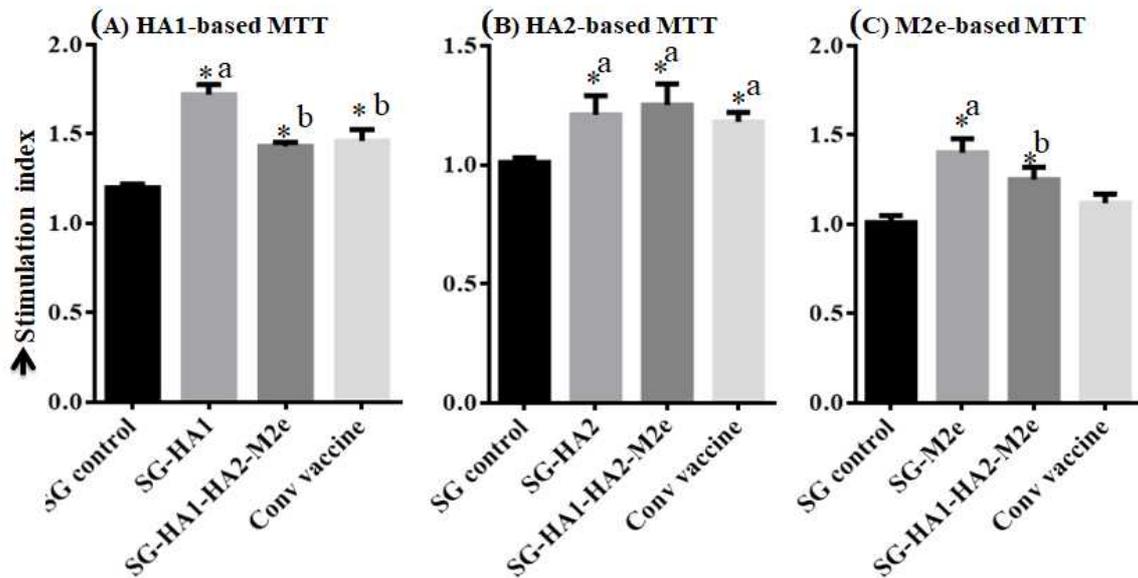
그림 7. Antigen-specific IgG ELISA. Chickens (N=8, each group) were administered once orally with  $10^9$  CFU of SG alone, SG-HA1, SG-HA2, SG-M2e, SG-HA1+SG-HA2+SG-M2e or intramuscularly once injected with an oil-adjuvanted conventional H9N2 vaccine. Blood was drawn on day 14 and 28 post-vaccination and serum samples were isolated for IgG analysis by an indirect ELISA. (A) HA1-specific serum IgG responses. (B) HA2-specific serum IgG responses. (C) M2e-specific serum IgG responses. Each data point represents mean  $\pm$  SD of five chickens per group. a, significant with respect to all other groups; b, significant with respect to SG control group. \* $p < 0.05$ .

### 7. HA1, HA2 and M2e 를 발현하는 SG 백신균주의 세포성면역 분석

- 인플루엔자 특이적 세포성 면역 반응을 유도하기 위한 SG 기반 H9N2 백신 구조물의 효능을 평가하기 위해, HA1, HA2 또는 M2e 항원에 대해 백신 접종을 수행한 실험동물들로부터 백신 접종 후 28일째에 PBMC를 분리하여 시험관 내 증식능을 측정하였음.
- 증식 반응은 SG 대조군에 비해 백신 접종된 닭에서만 관찰됨(그림 8). HA1 에 대한 반응으로, SG-HA1 백신 접종된 닭에서 증식 반응이 SG-HA1-HA2-M2e 및 상업용 H9N2 백신 접

중군에 비해 유의하게 더 높았으며( $p < 0.05$ )(그림 8A), HA2 에 대한 반응으로는 SG-HA2 접종군에서 SG-HA1-HA2-M2e 또는 상업용 H9N2 백신의 접종군과 유사한 증식 반응을 나타내었음(그림 8B). M2e 특이적 증식 반응은 SG-M2e 또는 SG-HA1-HA2-M2e 접종군에서 상업용 H9N2 백신군에 비해 현저하게 더 높게 나타남(그림 8B).

- 이러한 결과는 SG 기반 H9N2 백신이 체액성 면역뿐만 아니라 세포성 면역도 확실히 유도시킬 수 있음을 보여주는 결과라 하겠음(그림 7과 그림 8).



**그림 8. *In vitro* proliferations of lymphocytes from vaccinated chickens in response to recall influenza antigens.** Chickens (N=8, each group) were administered once orally with  $10^9$ CFU of SG alone, SG-HA1, SG-HA2, SG-M2e, SG-HA1+SG-HA2+SG-M2e or intramuscularly once injected with an oil-adjuvanted conventional H9N2 vaccine. Blood was drawn on day 28 post-vaccination and PBMCs were r estimated with  $10\mu\text{g/ml}$  of HA1, HA2 or M2e for 72hr. Thereafter, lymphocyte proliferative responses were determined by MTT-based assay. Results are expressed as stimulation indices, defined as proliferations in response to recall antigen relative to the mock stimulated cells. (A) HA1-specificresponses. (B)HA2-specificresponses. (C)M2e-specificresponses. Each data point represents mean  $\pm$  SD of five chickens per group. a, significant with respect to all other groups; b, significant with respect to SG control group. \* $p < 0.05$ .

## 8. 백신군주에 대한 마스터 세포은행 확립

### 가. 백신주의 기원

- 우진비엔지(주)에서 농림축산식품 농생명산업 기술개발 사업의 [세포 표면 발현기술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발] 과제를

통해 공동연구기관인 전북대학교 이준화 교수진에서 개발한 균주를 기술이전(기술이전 계약을 2019년도 9월 27일 체결) 받아 백신균주로 사용함.

## 나. 백신주의 제작

### ○ 원종독(Master Bacteria Bank, MBB) 확립

- 전북대학교 이준화교수로부터 분양받은 3종의 백신주를 배양배지인 LB broth에 배양하여 원종독을 생산함. 배양 배지인 LB agar 배지에 분양 받은 3종의 백신주를 각각 희석 도달하고, 37°C, 24시간 배양하여 순수 세균 집락을 채득 하였음.
- 순수 세균 집락을 LB broth 배지 10.0 ml에 이식하여 37°C, 24시간 진탕 배양(160 rpm)한 후 새로운 LB broth 배지 90.0 ml에 이식하여 37°C, 24시간 진탕 배양(160 rpm)을 수행하였음. 37°C, 24시간 배양된 세균을 10,000 g에서 15분간 원심분리한 후 배양 상층액 (supernatant)을 제거하고 세균 침전물(pellet)을 채득 하였음. 세균 pellet에 동결보존액인 25% Glycerol로 부유시켰으며, 백신으로 사용하기 전까지 -80°C에 동결하여 원종독으로 사용하였음.

### ○ 원종독의 명칭 및 Master Bacteria Bank 구축

- 원종독의 명칭은 각각 WGB-M-SG-2074, WGB-M-SG-2158, 또는 WGB-M-SG-2158로 명명하였으며, 증균 배지로 배양하여 채득된 원종독을 1.0 ml 씩 100개의 cryovial® (Nunc 368632)에 소분하여 각각의 vial에 1~100번까지 번호를 부여하였고 -60°C 동결 보존하였으며 원종독의 계대는 10회 이내로 제한하였음.

## 다. 백신 생산 및 기초정보

### (1) 사용 백신주의 종류 및 특성

#### ○ WGB-SG-2074

- 세균 배양배지(LB broth)에서 증균 배양
- 나. 세균 증식성은  $1 \times 10^{9.0}$  Colony-forming unit (CFU)/ml 이상

#### ○ WGB-SG-2158

- 세균 배양배지(LB broth)에서 증균 배양
- 나. 세균 증식성은  $1 \times 10^{9.0}$  CFU/ml 이상

#### ○ WGB-SG-2113

- 세균 배양배지(LB broth)에서 증균 배양
- 나. 세균 증식성은  $1 \times 10^{9.0}$  CFU/ml 이상

## 9. 원종독(MCB)의 품질검사

### 가. 원종독의 순수검사

- 원종독(WGB-M-SG-2074, WGB-M-SG-2158, WGB-M-SG-2113) 내 다른 Bacteria 감염여부를 확인하기 위해 순수시험을 수행함.
- 순수시험을 확인하기 위해 nutrient agar (NA) 4개, thioglycolate broth (Thio) 4개에 0.5 ml 씩 넣어 37℃에서 7일간 배양한 후 배양된 colony를 Gram stain 관찰한 결과 SG를 제외한 다른 미생물의 증식이 확인 되지 않았음(표 1, 2, 3).

표 1. WGB-M-SG-2074의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		적합

\*Gram-negative

표 2. WGB-M-SG-2158의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		적합

\*Gram-negative

표 3. WGB-M-SG-2113의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		적합

\*Gram-negative

#### 나. 원종독의 역가 확인

- 원종독의 역가를 확인하기 위해, 동결 보존된 3종의 원종독 1.0 ml을 이용하여 9.0 ml 멸균 증류수에 희석함. 이 희석액을 다시 9.0 ml을 멸균증류수로 10진 희석하여, 단계 희석된 용액 중 0.1 ml을 LB agar 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였음.
- 배양된 세균 집락의 수를 계산하여 원종독의 역가를 최종적으로 확인하였음. 세균 집락의 수를 계산한 결과, 3종의 원종독은 모두  $1 \times 10^9$  CFU/ml 이상으로 확인되었음.

### 10. 생산용 세균주(Working Bacteria Bank, WCB)의 확립

#### 가. 생산용 세균주 배양

- 3종의 원종독 1 vial을 증균배지에 배양하여 각각의 생산용 세균주를 생산하였음. 생산방법은 다음과 같음.
- 원종독 1.0 ml을 LB broth 배지 9.0 ml에 이식하여 37°C, 24시간 진탕 배양(160 rpm) 후 새로운 LB broth 배지 90.0 ml에 이식하여 37°C, 24시간 진탕 배양(160 rpm)을 수행하였음. 37°C, 24시간 배양된 세균을 10,000 g에서 15분간 원심분리한 후 배양 상층액(supernatant)을 제거하고 세균 침전물(pellet)을 채득 하였음. 세균 pellet에 동결보존액인 25% Glycerol로 부유시켰으며, 백신으로 사용하기 전까지 -80°C에 동결하여 생산용 세균주로 사용하였음.

나. 생산용 세균주의 명칭 및 구축

- 3종의 생산용 세균주의 명칭은 각각 WGB-W-SG-2074, WGB-W-SG-2158 또는 WGB-W-SG-2158 으로 명명하였으며, 배양하여 채득된 생산용 세포주는 1.0 ml/vial에 소분하여 #1~#100 까지 Number를 부여하였고 -60℃ 동결 보존하였으며 생산용 세균주의 계대는 5회 이내로 제한하여 생산하였음.

11. 생산용 세균주(WCB)의 품질검사

가. 생산용 세균의 순수검사

- 3종의 생산용 세균주(WGB-W-SG-2074, WGB-W-SG-2158, WGB-W-SG-2113) 내 다른 Bacteria 감염여부를 확인하기 위해 순수시험을 진행하였음.
- 순수시험을 확인하기 위해 nutrient agar (NA) 4개, thioglycolate broth (Thio) 4개에 0.5 ml 씩 넣어 37℃에서 7일간 배양 후 배양된 colony를 Gram stain 관찰법으로 분석한 결과 SG를 제외한 다른 미생물의 증식이 확인 되지 않았음(표 5, 6, 7).

표 5. WGB-W-SG-2074의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		

\*Gram-negative

표 6. WGB-W-SG-2158의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		

\*Gram-negative

표 7. WGB-W-SG-2113의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		

\*Gram-negative

#### 나. 생산용 세균주의 역가 확인

- 3종의 생산용 세균주의 역가를 확인하기 위해, 동결 보존된 각각의 생산용 세균주 1.0 ml을 이용하여 9.0 ml 멸균증류수에 희석함. 이 희석액을 다시 9.0 ml의 멸균증류수로 10진 희석하여, 단계 희석된 용액 중 0.1 ml을 LB agar 배지에 도말한 다음 37°C에서 24시간 배양하였음.

- 배양된 세균 집락의 수를 계산하여 생산용 세균주의 역가를 확인하였음. 최종적인 세균 집락의 수를 계산한 결과, 3종의 생산용 세균주 모두  $1 \times 10^9$  CFU/ml 이상으로 확인되었음.

## 12. 대량생산을 위한 배양 조건 확립

### 가. *Salmonella gallinarum*의 flask scale 배양조건

- 생산용 세균주를 TSA (BD, France) plate에 streaking 하였고, 37°C incubator 에서 overnight 배양 후, single colony 를 100 ml TSB (BD, France)에 접종하여 37°C shaking incubator에서 overnight 배양하였음. 2.0 L flask에서 TSB 1L (BD, France)에 pre-culture 균 100.0 ml을 접종하여 8시간동안 배양하였고 시간별로 흡광도(OD<sub>600</sub>) 값을 측정하였음.
- 실험결과 세균주는 배양 시간이 지남에 따라 OD 값이 감소함을 확인하였음(표 8). 따라서, 생산용 세균주를 flask로 배양하기엔 어려움이 있다고 판단하여 5.0 L fermentor를 사용하여 대량 배양을 수행하였음. 대신 세균주는 flask 에서도 충분히 배양되는 것을 확인하였고, 세균수를 측정한 결과,  $1.21 \times 10^{10}$  cfu/ml 로 확인됨.

표 8. 백신주의 flask 배양 시 흡광도 측정값

균주	배양시간	OD	배양시간	OD
JOL1355	5시간 경과	1.5	9시간 경과	1.089
JOL919	5시간 경과	1.4	9시간 경과	1.781

### 나. 5.0 L fermentor를 이용한 대량 배양 조건 확립

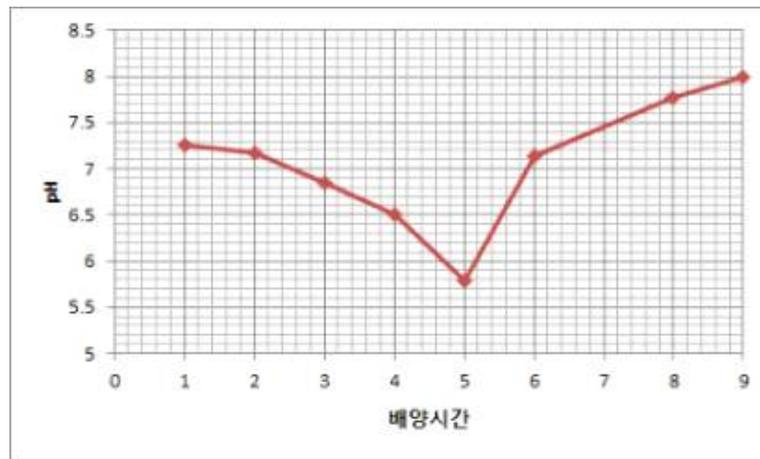
- 생산용 세균주를 사용하여 대량 배양조건을 실험하였음. 생산용 세균주 1 vial을 TSA (BD, France) plate에 streaking 하였고 37°C incubator (JSR, Korea)에서 overnight 배양 후, single colony를 400.0 ml TSB (BD, France)에 접종하여 37°C shaking incubator 에서 overnight 배양하였음. 4.0 L TSB (BD, France)에 pre-culture 균 400.0 ml을 접종함. pH는 7.0을 유지할 수 있도록 1.0 N NaOH와 0.5 N HCl을 첨가하였음.
- 산소포화도는 30% 전후를 유지할 수 있도록 stirrer RPM과 산소주입량을 수동으로 조절하여 배양하였음. 배양 중 1시간 단위로 흡광도(OD<sub>600nm</sub>) 값과 온도, pH, 산소포화도를 측정하였음.

표 9. 세균주에 대한 대량 배양 기록

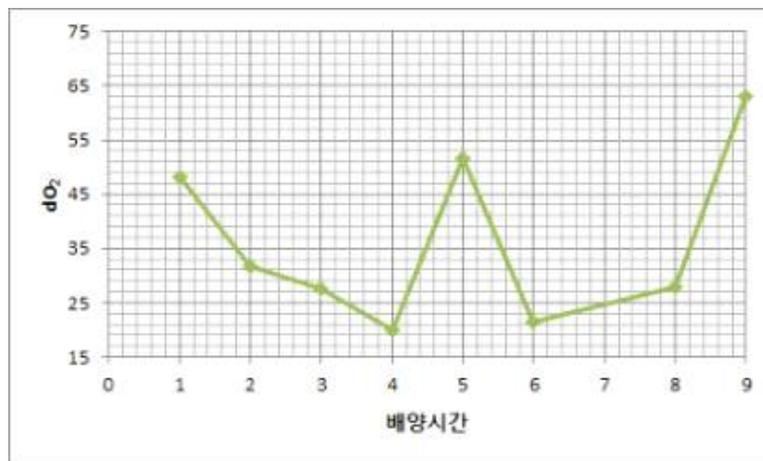
시간	온도(°C)	pH	dO2(%)	OD600nm	비고
11:00	37.1	7.25	48.1	0.146	
12:00	37.0	7.17	31.7	0.359	+ 0.4% antifoam 10ml
13:00	37.0	6.85	27.6	0.978	
14:00	37.0	6.50	20.1	1.285	
15:00	37.0	5.78	51.6	1.701	+ 1N NaOH 50ml
16:00	37.0	7.14	21.4	1.894	
18:00	37.0	7.77	28.0	7.456	
19:00	37.0	8.00	63.0	9.560	배양종료

- 그 결과, 배양이 진행됨에 따라 pH가 낮아졌음. 15시간에서 pH 5.0 수준까지 낮아졌을 때, 산소포화도가 높아지는 현상으로 보아 pH가 대량배양조건에 큰 영향을 주는 것을 확인 할 수 있었음(표 9 및 그림 9A).
- 1N NaOH를 첨가하여 pH를 7.0으로 조절하였을 때 다시 산소포화도가 20%대 낮아지면서 배양이 진행되는 것을 확인할 수 있었음. pH 7.0, 산소포화도 20% 수준을 유지하여 계속 배양한 결과 흡광도(OD600nm) 값이 9.56 까지 증가되는 것을 확인 할 수 있었음(표 9 및 그림 9B, 9C).
- 또한, 흡광도 값에 따른 생균수를 비교하고자, 생균수를 측정하였음. 그 결과, 최종 측정된 세균수는 1.0 ml 당  $10^{10}$  CFU 이상인  $6.45 \times 10^{10}$  cfu/ml 로 백신 생산을 위해 필요로 하는 충분한 세균수를 확보할 수 있을 것으로 판단되었음.
- 대량 배양 종료 후 배양액 일부를 추출하여 Gram staining 으로 분석한 결과, gram negative 균주인 *Salmonella* 임을 확인 할 수 있었음(그림 10).

A.



B.



C.

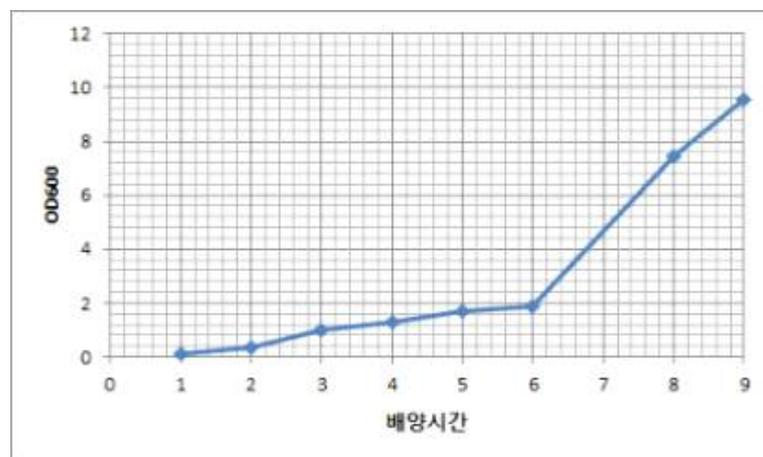


그림 9. 세균주의 대량 배양 기록에 따른 pH 농도, 산소포화도 및 흡광도 값에 따른 그래프 양상. (A) 시간대별 pH 농도 측정 그래프, (B) 시간대별 산소포화도 측정 그래프, (C) 시간대별 흡광도(OD600nm) 측정 그래프.

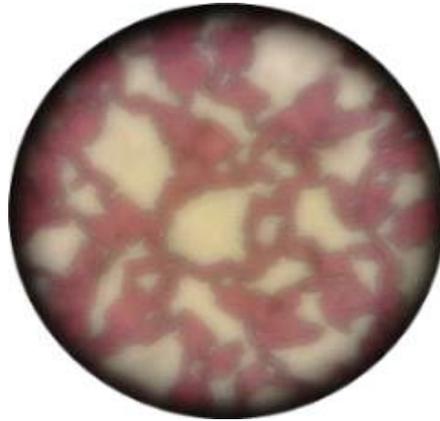


그림 10. 대량 배양된 세균의 Gram staining 결과

### 13. 경구투여 및 호흡기 투여를 위한 제형 최적화

#### 가. 동결건조기를 이용한 전임상 시험용 백신 제조

- $10^{10}$  cfu/ml 이상으로 배양된 백신을 개발하기 위해 3종의 생산용 세균주 각각을 TSB (BD, France) 400 ml로 16시간 동안 전배양한 후 5.0 L fermentor를 이용하여 TSB (BD, France) 4.0 L에 접종하여 8시간 대량 배양하였음. 배양이 완료된 후 High centrifuge (Labogene, Korea) 을 이용하여 각 균주당 4.0 L의 배양액을 cell down하여 1X PBS (Welgene, Korea) 400.0 ml 로 pellet을 재부유하여 농축을 진행하였음. 생균수의 양을 최대한 보존하기 위해 4℃를 유지한 상태로 48시간 동안 동결건조(-60℃)를 진행하였음.

표 10. 동결건조 준비

종류	TPGG	LPGG	SPGG
균+보호제 총량	825 ml	75 ml	75 ml
농도	3 %	3 %	3 %
Trehalose	24.75 g		
Lactose		2.25 g	
Sucrose			2.25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.14 g	0.012 g	0.012 g
K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	0.31 g	0.028 g	0.028 g
L-glutamate	1.24 g	0.1125 g	0.1125 g
Gelatin	2.475 g	0.225 g	0.225 g

나. 동결건조보호제 선정

- 동결건조 시, 세균수의 감소를 방지하고자 동결건조에 효과적인 보호제 선별을 진행하였음. 이를 위해 TPGG, LPGG, SPGG 3가지 동결건조보호제를 사용하여 시험백신을 제조하였음(표 11). 제조된 시험백신에 대한 생균수를 측정하여 동결건조 보호제의 효과를 분석하였음.

표 11. 동결건조 보호제 선별용 시험백신 제작

항원	균량	보호제	보호제 종류
WGB-SG-2074	220 ml	50 ml	TPGG
WGB-SG-2158	220 ml	50 ml	TPGG
WGB-SG-2113	220 ml	50 ml	TPGG
WGB-SG-2074	220 ml	50 ml	LPGG
WGB-SG-2158	220 ml	50 ml	LPGG
WGB-SG-2113	220 ml	50 ml	LPGG
WGB-SG-2074	220 ml	50 ml	SPGG
WGB-SG-2158	220 ml	50 ml	SPGG
WGB-SG-2113	220 ml	50 ml	SPGG

표 12. 시험백신에 대한 동결건조 전후의 생균수 측정

항원	동결건조보호제	생균수	
		동결건조 전	동결건조 후
WGB-SG-2074	TPGG	2.4 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	1.3 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2158	TPGG	1.4 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	0.8 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2113	TPGG	3.1 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	1.9 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2074	LPGG	3.2 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	0.8 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2158	LPGG	2.8 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	0.7 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2113	LPGG	3.5 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	1.1 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2074	SPGG	1.9 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	0.2 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2158	SPGG	3.2 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	0.4 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml
WGB-SG-2113	SPGG	3.7 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml	0.5 x 10 <sup>10</sup> cfu/ml

○ TPGG, LPGG, SPGG 3가지 동결건조보호제를 사용하여 시험백신을 제조하였고 제조된 시험백신의 세균수를 동결건조 전후로 비교하였음. 그 결과, TPGG (Trehalose + phosphate buffer + L-glutamate + Gelatin)를 이용한 동결건조보호제의 세균수 변화가 가장 적게 나타나는 것을 확인하였음(표 12와 그림 11).

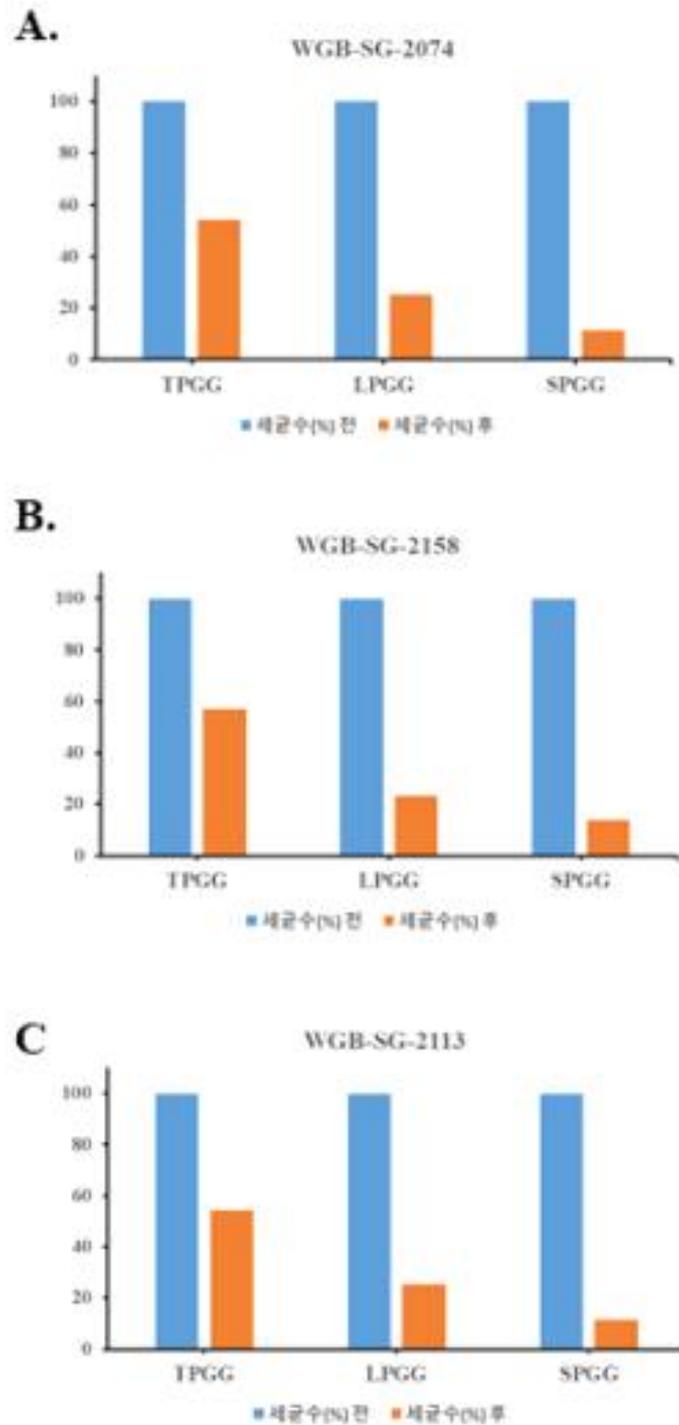


그림 11. 동결건조보호제 구성에 따른 세균수(%)의 변화 결과

**다. 전임상시험을 위한 시험백신의 조성**

- 백신주의 대량생산조건을 확립하였고, 여러 성분의 동결건조보호제 중 최종적으로 TPGG를 선정하여 전임상을 위한 시험백신의 조성을 확립하였음(표 13).
- 확립된 시험백신의 조성을 바탕으로 목적동물에 대한 백신의 전임상시험용(안전성과 효능 분석) 시험백신 제조를 진행하였음.

**표 13. 전임상시험용 시험백신의 조성**

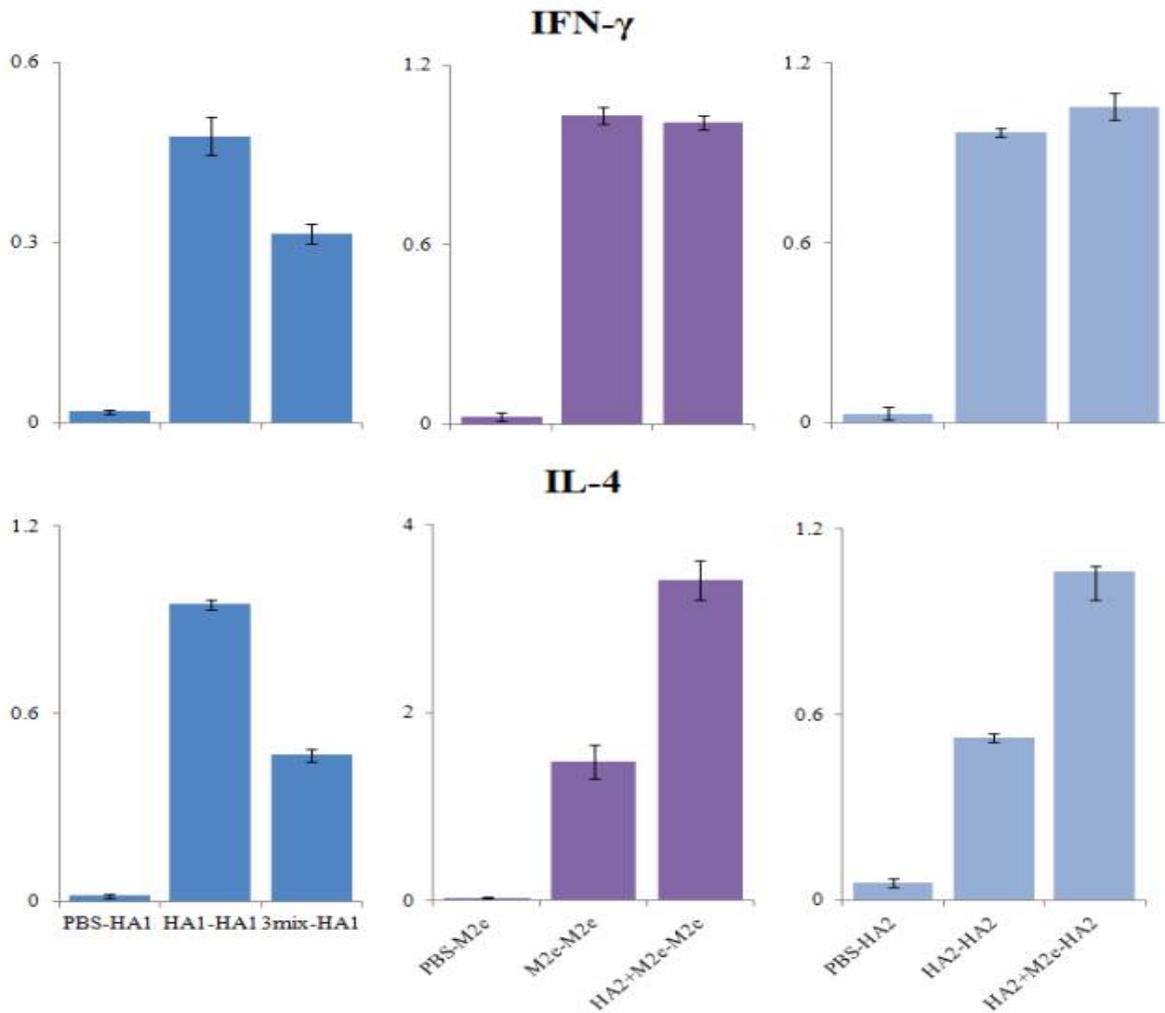
종류	생산량 (vial)	균/vial	보호제/vial	보호제 종류	비고
WGB-SG-2074	100	1.0 ml	0.5 ml	TPGG	전임상 시험용
WGB-SG-2158	100	1.0 ml	0.5 ml	TPGG	전임상 시험용
WGB-SG-2113	100	1.0 ml	0.5 ml	TPGG	전임상 시험용
총 바이알 수	300	특이사항 없음.			

### 제3절 3차년도 연구수행 내용 및 결과

#### 1. HA1, HA2 그리고 M2e 항원을 발현하는 백신 후보 균주로 면역화가 유도된 실험동물에서의 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 면역반응 평가

- 백신 후보 균주로 면역화가 진행된 각 그룹의 실험동물로부터 면역화 4주 후 각 그룹의 실험동물의 혈액으로부터 무균적으로 분리된 PBMC를 이용하여 세포성 면역과 체액성 면역에 관여하는 cytokine 인 interleukin-4 (IL-4)와 interferon-gamma (INF- $\gamma$ )의 분비를 측정하기 위해 면역화에 사용된 항원을 사용하여 면역세포를 자극 시키고 항원에 특이적으로 반응하는 면역반응을 유도하였음.
- 항원에 특이적으로 분비되는 cytokine을 코딩하는 mRNA는 Hybrid-R RNA isolation kit (Geneall, Kroca)를 사용하여 추출한 뒤 cDNA는 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover Kit (TOYOBO, Japan)을 이용 해당 kit에 제공되는 매뉴얼에 따라 합성하였음. 합성된 cDNA를 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Japan)을 사용 Realtime PCR를 진행하였고, 항원에 특이적으로 유도된 cytokine의 RNA 수준을 측정하고 이를 GAPDH를 사용하여 평균화한 후 컨트롤 그룹대비 면역원성을 유도하는 사이토카인의 mRNA에 대한 증가를 확인하였음.
- 그 결과 단일 균주로 면역화를 진행한 그룹의 실험동물 또는 각 항원을 분비하는 균주의 조합으로 면역화를 진행한 그룹에서 Th1에 관여하는 사이토카인 INF- $\gamma$ 와 Th2에 관여하는 사이토카인 IL-4가 대조군에 비해 유의적으로 높게 증가함을 확인할 수 있음(\*P < 0.05) (그림 1).
- JOL2158로 단일면역화가 진행된 그룹과 JOL2158, JOL2113 그리고 JOL2074 균주의 조합으로 면역화가 진행된 그룹에서 HA1 항원으로 자극 시 Th1에 관여하는 사이토카인 INF- $\gamma$ 와 Th2에 관여하는 사이토카인 IL-4가 대조군인 PBS 실험동물 그룹의 PBMC에 HA1으로 자극하여 유도되는 cytokine mRNA에 비해 유의적으로 높게 증가함을 확인할 수 있고 면역화가 진행된 두 그룹 간 비교 시 INF- $\gamma$ 와 IL-4의 경우 단일면역화를 진행한 그룹에 있어 유의적으로 높게 반응하는 것을 확인할 수 있음(그림 1).
- JOL2074로 단일면역화가 진행된 그룹과 JOL2158, JOL2113 그리고 JOL2074 균주의 조합으로 면역화가 진행된 그룹에서 M2e 항원으로 자극 시 Th1에 관여하는 사이토카인 INF- $\gamma$ 와 Th2에 관여하는 사이토카인 IL-4가 대조군인 PBS 실험동물 그룹의 PBMC에 M2e로 자극하여 유도되는 cytokine mRNA에 비해 유의적으로 높게 증가함을 확인할 수 있었고 백신후보 균주로 면역화가 진행된 두 그룹 간에서는 단일 백신 균주로 면역화가 진행된 그룹보다 백신후보균주들의 조합으로 면역화가 진행된 그룹에서 유의적으로 다 높은 반응을 확인할 수 있었음(그림 1).

- JOL2113 균주로 단일면역화를 진행한 실험동물 그룹과 JOL2158, JOL2113 그리고 JOL2074 균주의 조합으로 면역화가 진행된 실험동물 그룹에서 HA2 항원에 의한 자극 시 Th1에 관여하는 사이토카인 INF- $\gamma$ 와 Th2에 관여하는 사이토카인 IL-4가 대조군인 PBS 실험동물 그룹의 PBMC에 HA2로 자극하여 유도되는 cytokine mRNA에 비해 유의적으로 높게 증가함을 확인할 수 있었고 다양한 백신후보 균주의 조합으로 면역화가 진행된 그룹의 실험동물에서 유의적으로 높은 반응을 확인할 수 있었음(그림 1).



**그림 1. Relative quantification of interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), interleukin-4 (IL-4) expression in chicken PBMCs using the cytokine assay based on Real Time PCR.** INF- $\gamma$  graphs represent INF- $\gamma$  stimulated with each antigen (HA1, M2e and HA2). IL-4 graphs represent IL-4 stimulated with each antigen (HA1, M2e and HA2)(\*P < 0.05).

**2. HA1, HA2 그리고 M2e 항원을 발현하는 백신 후보 균주로 면역화가 유도된 실험동물에 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 공격접종 후 분비되는 야생형 H9N2 바이러스의 함량분석.**

- 유정란을 통해 배양된 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 배양액을 농도별 MDCK 세포에 감염시켜 TCID<sub>50</sub> 값을 도출하였고 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> 값을 사용하여 백신 후보 균주로 면역화가 이루어진 각 그룹의 실험동물의 비강을 통한 공격 접종을 진행하였음.
- 공격 접종 3일, 4일 후 각 그룹의 실험동물로부터 분비되는 H9N2 바이러스를 확인하기 위해 각 그룹의 실험동물로부터 fecal swabs을 통해 H9N2 바이러스를 채취한 후 샘플로부터 RNA를 분리하였고, 이를 사용하여 WHO의 FAN influenza diagnostic 에 제시된 real time pcr primer를 사용하여 진단 후 ct 값으로부터 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 virus RNA 수를 도출하였음.
- 공여의 플라스미드를 지닌 살모넬라균주로 면역화가 이루어진 실험동물 그룹보다 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 분비하는 백신 후보 균주(JOL2074, JOL2113, JOL2158)로 단일면역화를 진행한 그룹 또는 조합으로 면역화를 진행한 그룹에서 공격접종용 야생형 H9N2 바이러스의 분비가 감소하는 것을 확인할 수 있었음(그림 2).
- 백신 후보 균주로 단일면역화 또는 각 백신 후보 균주의 조합으로 면역화가 진행된 각 실험동물 그룹들과 공여의 플라스미드를 지닌 살모넬라균주로 면역화가 진행된 그룹을 야생형 H9N2 바이러스로 공격 접종한 다음 3일 후 비교한 결과 대조군에 비해 3배 이상의 야생형 H9N2 바이러스의 분비를 확인할 수 있었음(그림 2).
- 야생형 H9N2 바이러스로 공격 접종한 다음 4일 후 대조군에서 분비되는 야생형 H9N2 바이러스는 백신 후보 균주로 단일면역화를 진행한 실험동물 그룹 또는 백신 후보 균주의 조합으로 면역화를 진행한 실험동물 그룹에서 분비되는 야생형 H9N2 바이러스보다 15배 이상 분비가 이루어지는 것을 확인할 수 있었음(그림 2).
- **그림 2**의 실험결과를 통해 JOL2113과 JOL2074의 조합으로 면역화가 이루어진 실험동물의 그룹에서는 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 검출도 전혀 이루어지지 않음을 확인할 수 있었음.

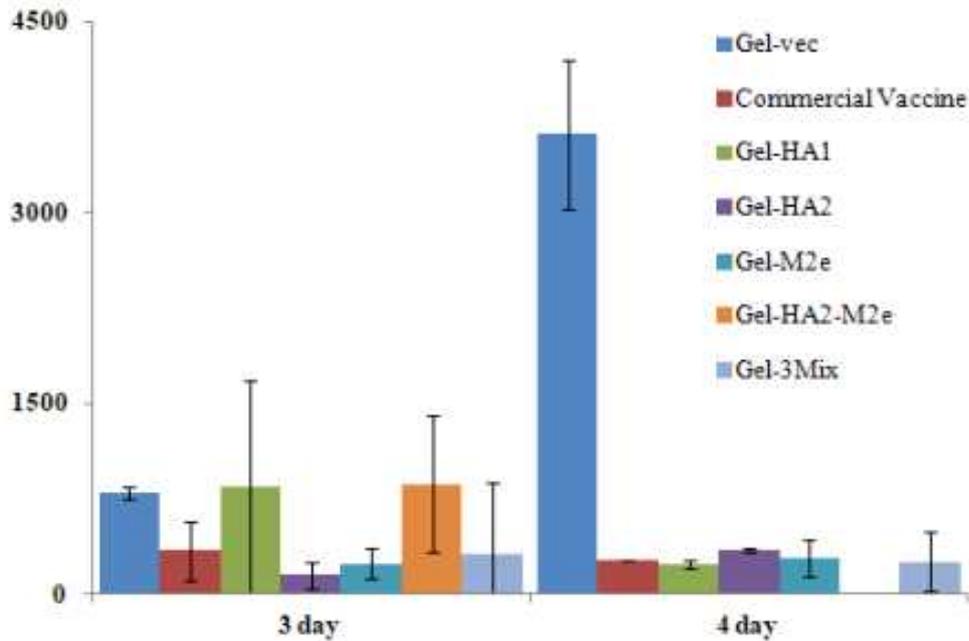


그림 2. Viral load in fecal samples. Vaccinated and control birds were challenged with  $10^4$  TCID<sub>50</sub> H9N2 virus and fecal swabs (n=3) on day 3 and 4 post-challenge were collected for analysis of viral load using OIE recommended primers by qRT-PCR assay. Control birds had shown significantly higher viral load compared to the vaccinated birds. This experiment shows that vaccination with HA1, HA2 and M2e based vaccines can reduce viral shedding in birds. Further, control birds show depression, anorexia, and diarrhea post-H9N2 challenge while vaccinated birds show normal behavior.

### 3. HA1, HA2 그리고 M2e 항원을 발현하는 백신 후보 균주로 면역화가 유도된 실험동물에 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 공격접종 후 조직에서 유도되는 염증반응 분석

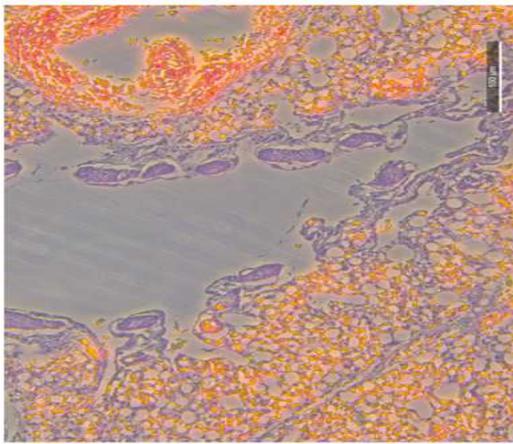
- 백신 후보 균주를 포함 대조군으로 면역화를 진행한 각 그룹의 실험동물에 공격접종 7일 후 면역화가 이루어진 그룹과 대조군의 실험동물로부터 폐조직을 분리 후 포르말린 고정액에 보관하여 파라핀으로 조직을 고정하고 H-E stain을 통하여 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 의해 유도되는 염증반응을 확인하였음.

- 고정액에 들어 있던 조직을 카세트에 넣어 하룻밤 방치하여 고정액을 수세한 뒤 알코올에서 탈수시킨 뒤 조직을 soft parafin 에서 한 시간 반, hard parafin 에서 한 시간 반을 포매시키고 조직을 절편 한 뒤 하룻밤 방치시킨 조직절편을 말린 후 말린 조직은 자일렌을 이용한 탈파리핀과 수세를 시킨 다음 헤마톡실린으로 염색한 뒤 다시 수세한 후 아세트산으로 분별, 암모니아수로 중화시킴. 최종적으로 흐르는 물에서 에오진액으로 염색한 뒤 알코올로 분별탈수하고 봉입을 하여 조직을 관찰하였음.
- 조직학 검사를 시행한 결과 **그림 3.** 에서와 같이 공여의 플라스미드를 지닌 균주로 면역화가 진행된 그룹의 실험동물과 비교하여 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 항원을 발현하는 JOL2074, JOL2113 및 JOL2158 와 같은 백신 후보균주의 단일면역화 또는 백신후보 균주들의 조합에 따른 면역화가 진행된 실험동물 그룹의 폐 조직에서 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 의하여 유도되는 염증반응이 확연하게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었음.

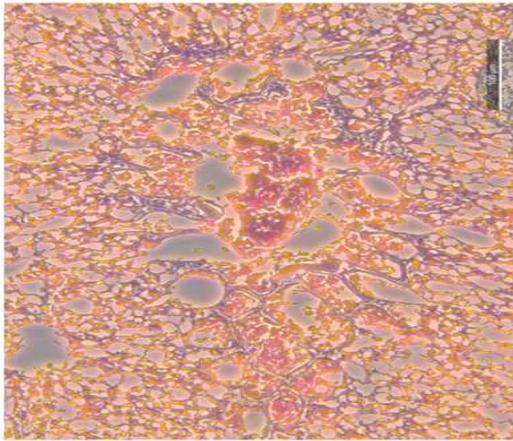
#### 4. H9N2 바이러스에 대해 새롭게 디자인된 M2e 4량체 항원과 PEI로 유도된 체액성 면역반응과 점막성 면역반응 분석

- 1차 면역화 2주 후 동일한 조건으로 2차 면역화가 진행된 실험동물의 그룹들로부터 체액성 면역반응과 점막성 면역반응을 확인하였음. 체액성 면역반응은 IgG 값으로 분석하였음.
- 점막성 면역반응은 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 감염에 의해 폐와 장으로 분비되는 sIgA 의 값으로 분석하였음.
- 그 결과 M2e와 PEI의 조합으로 비강을 통해 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에서 비강을 통해 PEI 단독으로 면역화가 진행된 그룹 또는 M2e 단독으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹 보다 전신 면역을 유도하는 IgG 값과 sIgA의 역가가 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었음(**그림 4**).
- 이러한 실험결과는 M2e 항원에 의한 면역반응이 점막형 adjuvant인 Polyethyleneimine (PEI)에 의해 효과적으로 유도되는 것을 나타내는 결과라 하겠음.

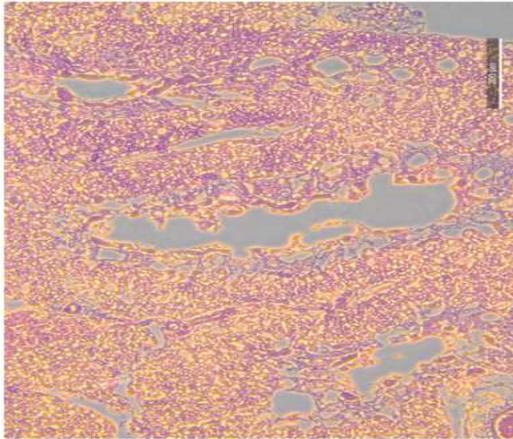
Uninfected control



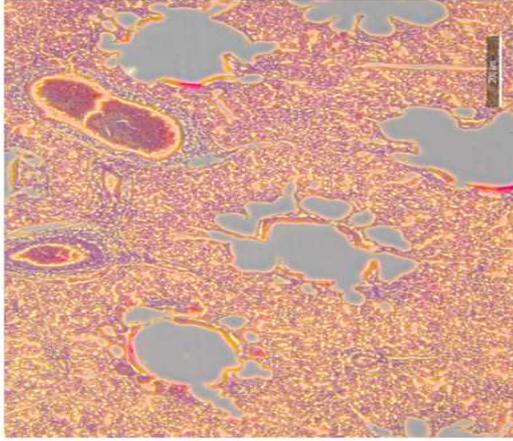
Infected control



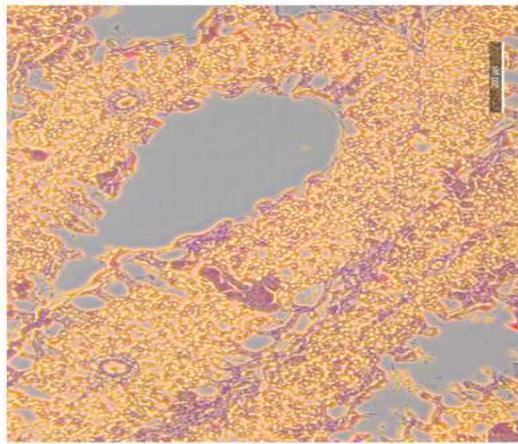
Commercial vaccine



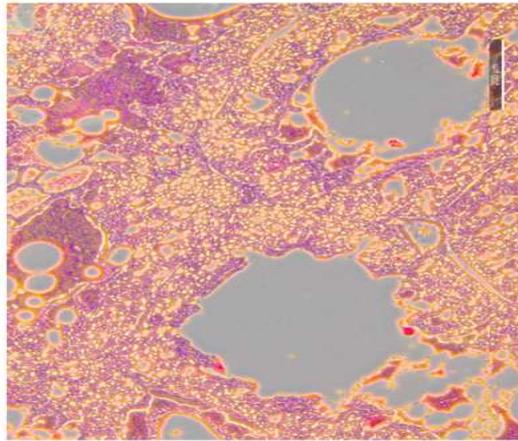
SG-HA1



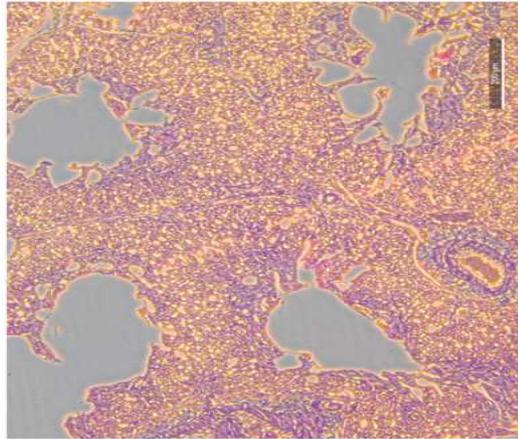
SG-HA2



SG-M2e



SG-HA2+M2e



SG-3Mix

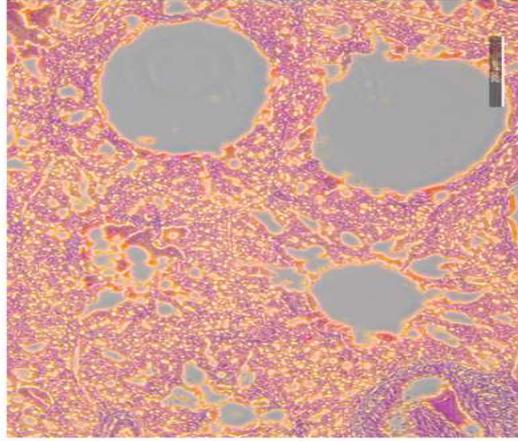


그림 3. Histopathological analysis of Lung samples post 7 day challenge (n=4). On day 7 post-challenge, four birds from each group were sacrificed and lung samples were analysed by H&E staining. This result shows that vaccinated birds displayed significantly lower inflammatory conditions and thus histopathological changes. Among vaccinated birds, SG-HA2 + SG-M2e showed lower histopathological changes.

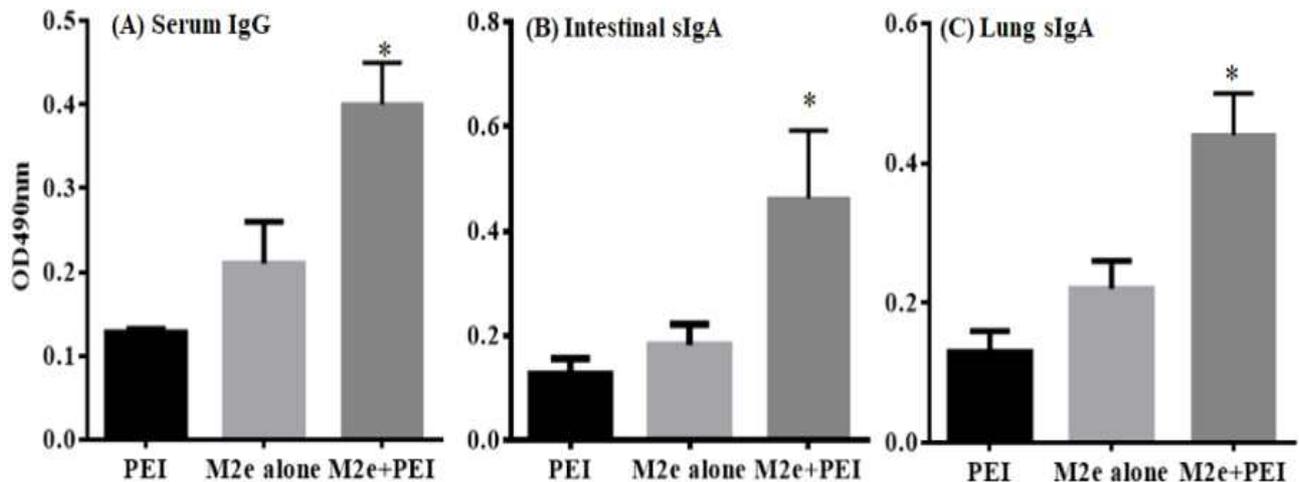


그림 4. Serum IgG and mucosal IgA antibody responses in M2e plus PEI vaccinated chickens. Chickens (n=10) were intranasally immunized with PEI adjuvant, M2e alone or M2e plus PEI adjuvant and two weeks later the vaccinated chickens were boosted intranasally with the same dose. Serum samples (n=5) were collected at 14th day post-booster vaccination for IgG analysis by an indirect ELISA (A). Three chickens in each group were sacrificed 14 days post-booster vaccination, and intestinal (B) and lung (C) washings were collected for IgA analysis by an indirect ELISA. Each data points represent mean  $\pm$  SD. \*p < 0.05.

#### 5. H9N2 바이러스에 대해 새롭게 디자인된 M2e 4량체 항원과 PEI로 유도된 실험동물에서의 세포성 면역반응 분석

- 1차 면역화 2주 후 동일한 조건으로 2차 면역화가 진행된 실험동물의 정맥으로부터 채취한 혈액을 EDTA 처리하여 PBMC를 분리한 후 해당 M2e를 사용하여 림프구의 분화를 72시간 유도하였음.

- M2e 항원에 특이적으로 반응이 진행된 면역세포의 분화 확인은 MTT assay를 사용한 분석과 유세포 분석기를 이용한 분석을 통해 진행되었고 면역세포의 면역반응을 확인하기 위해 cytokine 의 RNA 수준을 분석하였음.
- 각 그룹의 실험동물에서 분리된 PBMC를 M2e 항원으로 자극하여 항원에 특이적으로 반응하는 분화되는 림프구를 FACS를 통해 분석한 결과 Total T 세포인 CD3+ T 림프구 또는 CD3+ CD4+ T 림프구가 M2e와 PEI의 조합으로 면역화를 진행한 실험동물의 그룹에서 M2e 단독으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹 보다 약 1.5 배 이상 유의적으로 높은 결과를 나타내는 것으로 확인되었음(그림 5A).
- M2e 단독으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에서 PEI로 면역화가 진행된 실험동물보다 높게 증가되는 T 림프구를 확인 할 수 있었으나, 이는 유의적인 증가로 확인되지는 않았으며 면역 활성화 보조제로 사용된 PEI가 세포성 면역반응을 유의적으로 증가시키는 것으로 분석되었음(그림 5B).
- 유세포 분석기 사용을 통해 분석된 결과와 MTT assay 를 통해 분석된 결과는 서로 상보성을 보였음. T 림프구가 M2e와 PEI의 조합으로 면역화가 이루어진 실험동물의 그룹에서 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었음(그림 5A).
- 바이러스 감염에 따라 특이적으로 증가되는 IFN- $\gamma$ 를 발현하는 mRNA는 M2e 와 PEI의 조합으로 면역화가 진행된 실험동물의 면역세포에서 PEI 단독으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹보다 대략 3배 이상 유의적으로 증가되는 것으로 확인되었고, M2e 단독으로 면역화가 진행된 실험동물 그룹과 비교하여 2배 이상 유의적으로 높게 증가되는 것으로 나타났음(그림 5A와 5B).
- 이러한 실험결과를 통해 면역활성 보조제로 사용된 PEI는 백신균주와 더불어 세포성 면역 반응을 증가시키는 것으로 판단되었음.

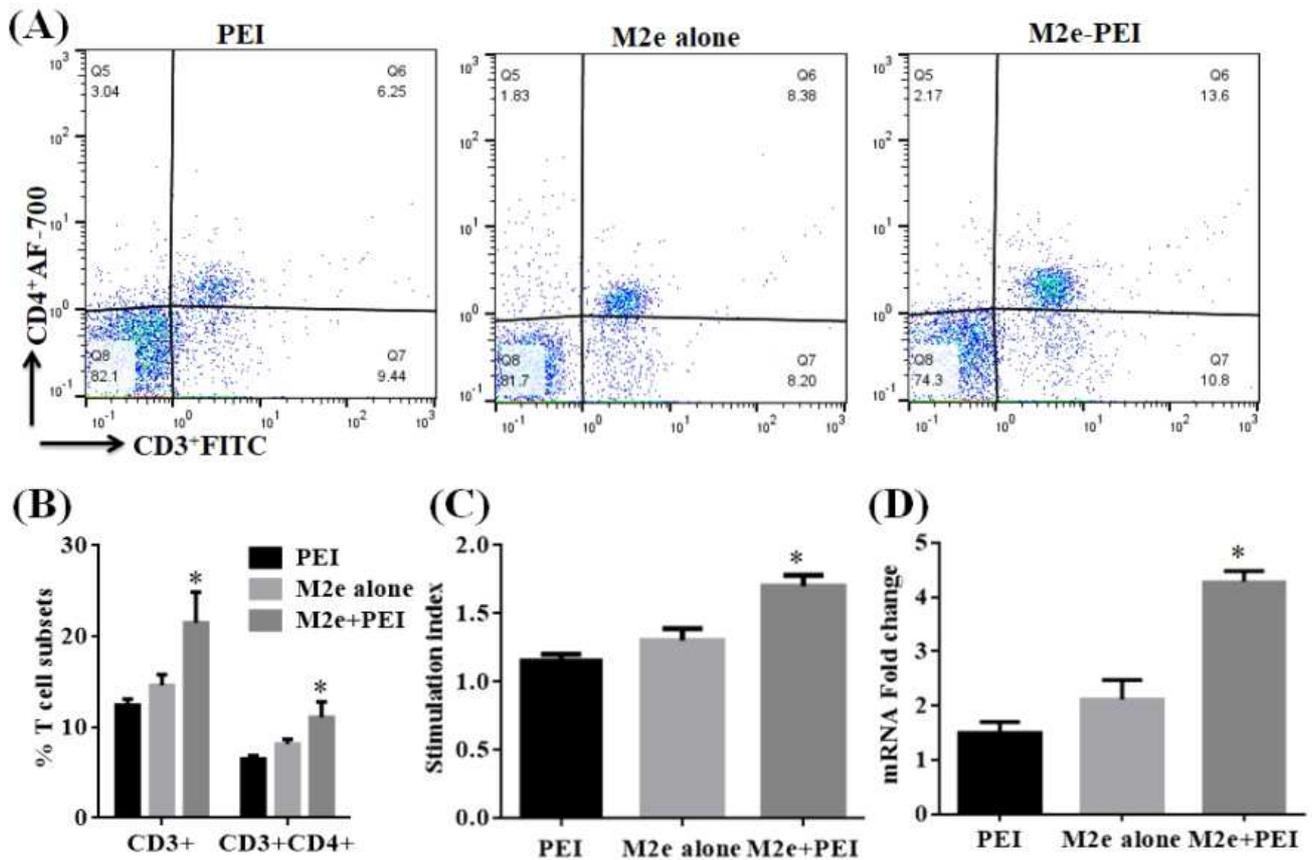


그림 5. Analysis of cellular immune response in M2e plus PEI vaccinated chickens. Chickens (n=10) were intranasally immunized with PEI adjuvant, M2e alone or M2e plus PEI adjuvant, and 14 days post-booster vaccination PBMCs were restimulated with M2e antigen for either 24 h or 72 h for IFN- $\gamma$  and lymphoproliferative responses, respectively. (A) Representative flow cytometry scatter dot plot for CD3+CD4+ T cell population in PEI adjuvant, M2e alone or M2e plus PEI adjuvant chicken groups. (B) The CD3+CD4+ T-cell subset in vaccinated and control chickens are expressed as a percentage of the gated cells. (C) Lymphocyte proliferative responses by MTT-based assay. (D) qRT-PCR analysis of IFN- $\gamma$  mRNA transcription induction levels in vaccinated and control chickens and results are expressed as relative fold change in mRNA transcription levels of stimulated PBMCs from vaccinated chickens compared to the unstimulated naïve PBMCs. Gene expressions were normalized to GAPDH and mRNA levels of naive stimulated cells were used as the calibrator. Data presented are mean  $\pm$  SD of five chickens per group. \*p < 0.05.

## 6. H9N2 바이러스에 대해 새롭게 디자인된 M2e 4량체 항원과 PEI로 면역화된 실험동물에 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 공격접종 후 분비되는 바이러스 함량 분석

- 유정란을 통해 배양된 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 배양액을 농도별로 MDCK 세포에 감염시켜 TCID50 값을 도출하였고,  $10^4$  TCID50 값을 사용하여 백신후보물

질로 면역화가 이루어진 실험동물의 비강에 공격 접종을 진행하였음.

- 공격 접종 1일, 3일 그리고 6일 경과 후 각 그룹의 실험동물로부터 분리되는 바이러스를 Real Time PCR을 사용하여 분석하였음. Real Time PCR 분석에 사용된 primer 은 WHO의 A형 인플루엔자 바이러스 진단 사용에 권장하는 primer set을 사용하였음.
- M2e 와 PEI 의 조합으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에서 M2e 단독 또는 PEI 단독으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹보다 분리되는 바이러스 RNA copy 수가 유의적으로 낮은 것을 확인하였음(그림 6).
- M2e 단독으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에서도 PEI 단독으로 면역화가 진행된 그룹의 실험동물보다 분리된 바이러스가 적은 것으로 확인되었으나 유의적인 결과 값으로 확인되지는 않았음(그림 6).

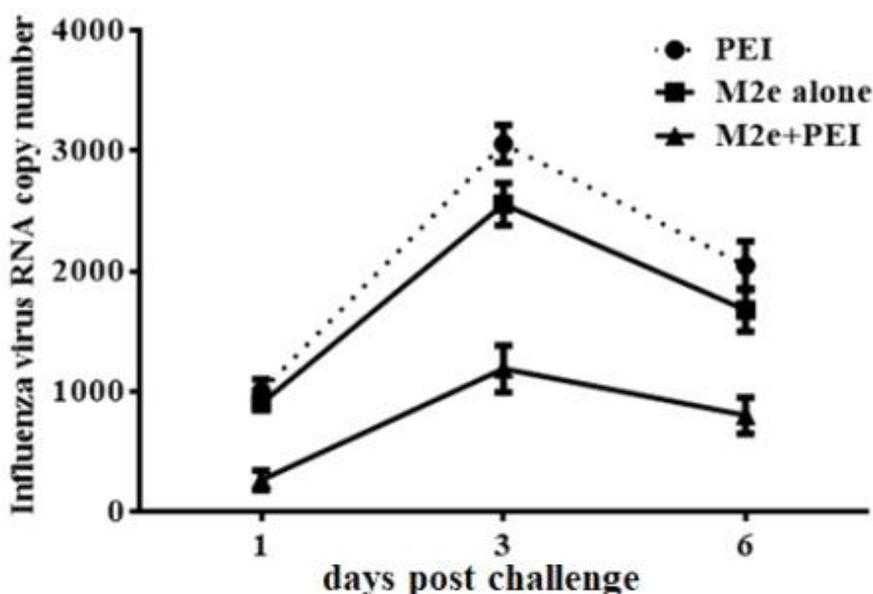
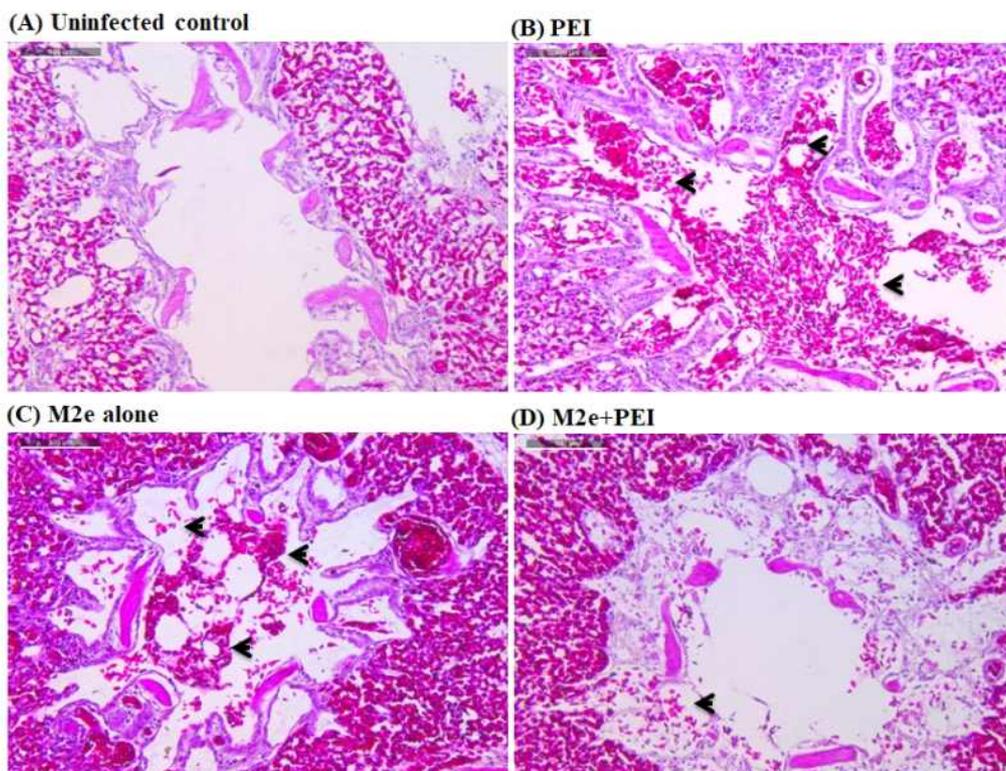


그림 6. Protective efficacy of M2e plus PEI vaccine against LPAI H9N2 challenge. Chickens (n=10) were intranasally immunized with PEI adjuvant, M2e alone or M2e plus PEI adjuvant, and 14 days post-booster vaccination all the immunized chickens were challenged with 104TCID50 H9N2 virus. The protective efficacy was determined by estimation of H9N2 viral RNA copy numbers in the cloacal swab samples of the vaccinated and control chickens (n=5) after challenge with the lethal H9N2 virus

**7. H9N2 바이러스에 대해 새롭게 디자인된 M2e 4량체 항원과 PEI로 유도된 실험동물에 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 공격접종 후 유도되는 폐 조직에서의 염증반응 확인**

- M2e 와 PE I의 조합으로 면역화를 진행된 그룹과 M2e 단독 또는 PEI 단독으로 면역화가 진행된 각 그룹의 실험동물에  $10^4$  TCID<sub>50</sub> 값을 사용하여 공격 접종을 진행 하였고 공격 접종 7일 후 면역화가 이루어진 그룹과 대조군의 실험동물로부터 폐 조직을 분리하였음.
- 각각의 실험동물 그룹에서 분리한 폐 조직을 포르말린 고정액에 보관 후 파라핀으로 조직을 고정하였고 H-E stain 을 통해 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 의해 유도되는 염증반응을 확인하였음. 고정액에 들어 있던 조직을 카세트에 넣어 하룻밤 방치하여 고정액을 수세한 다음 알코올에서 탈수시킨 뒤 조직을 soft parafin 에서 한 시간 반, hard parafin 에서 한 시간 반 동안 포매 시키고 조직을 절편한 다음 하룻밤 방치시킨 후 조직절편을 말림. 말린 조직은 자일렌을 이용한 탈파리핀과 수세를 통해 헤마톡신린으로 염색한 뒤 다시 수세한 다음 아세트산으로 분별, 암모니아수로 중화시킴. 최종적으로 흐르는 물에서 빛깔을 내고 에오진액으로 염색한 뒤 알코올로 분별탈수하고 봉입을 하여 조직을 관찰하였음.
- 조직학 검사를 시행한 결과 **그림 7.과** 같이 M2e 와 PEI 의 조합으로 면역화가 진행된 실험동물의 폐 조직에서 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 의해 유도되는 염증반응이 M2e 단독 또는 PEI 단독으로 면역화가 진행된 실험동물에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음.



**그림 7. Photomicrographs of hematoxylin-and eosin-stained lung sections of chickens on 7th day post-H9N2 challenge.** Chickens (n=10) were intranasally immunized with PEI adjuvant, M2e alone or M2e plus PEI adjuvant, and 14 days post-booster vaccination all the immunized chickens were challenged with 104TCID50 H9N2 virus. At 7th day post-challenge, six chickens were sacrificed and lung tissues were collected for histopathological analysis. Arrows indicate inflammation.

## 8. 대량배양을 통한 시험백신의 생산

### 가. 대량배양(본배양) 및 채독

#### (1) Bacteria bulk의 생산

- 3종의 생산용 세균주 (WGB-W-SG-2074, WGB-W-SG-2158, WGB-W-SG-2113)를 각 1 vial씩 원료 입출고 규정에 의거하여 담당자에서 인계받은 후 SOP에 따라 세균 배양을 진행함.
- 3개의 생산용 세균주 1.0 ml를 LB broth 배지 9.0 ml에 이식하여 37℃, 24시간 진탕 배양 (160 rpm) 하였음(1차 pre-culture).
- 1차 pre-culture 된 세균(10.0 ml)을 새로운 LB broth 배지 190.0 ml에 이식하여 37℃, 24시간 진탕 배양(160 rpm)을 수행하였음(2차 pre-culture).
- 대량배양(본배양)은 2.0 L Roller bottle을 이용하였으며, 새로운 LB broth 배지 1,800 ml에 이식하여 37℃, 24시간 진탕 배양(160 rpm) 하였음. 대량배양은 각 세균별 총 2,000 ml로 생산 하였음.

#### (2) Bacteria bulk의 순수시험

- 채독된 3종의 bacteria bulk 내 다른 Bacteria 감염여부를 확인하기 위해 순수시험을 진행함.
- 순수시험을 확인하기 위해 nutrient agar (NA) 4개, thioglycolate broth (Thio) 4개에 0.5 ml 씩 넣어 37℃에서 7일간 배양한 후 배양된 colony를 Gram stain으로 관찰한 결과 SG를 제외한 다른 미생물의 증식이 확인 되지 않았음(표 1~3).

표 1. SG-2074 bulk의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		

\*Gram-negative

표 2. SG-2158 bulk의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		

\*Gram-negative

표 3. SG-2113 bulk의 순수시험

배양기간(일)	Master seed				Gram stain
	22 °C		37 °C		
	NA	Thio	NA	Thio	
1일	-	-	+	+	-*
2일	-	-	+	+	-
3일	-	-	+	+	-
4일	-	-	+	+	-
5일	-	-	+	+	-
6일	-	-	+	+	-
7일	-	-	+	+	-
판정	적합		적합		

\*Gram-negative

### (3) Bacteria bulk의 역가확인

- 3종의 Bacteria bulk의 역가를 확인하기 위해, 각각 생산된 bulk 중 1.0 ml을 이용하여 9.0 ml 멸균증류수에 희석하였음.
- 이 희석액을 다시 9.0 ml의 멸균증류수로 10진 희석하였으며, 단계 희석된 용액 중 0.1 ml을 LB agar 배지에 도말 하여 37°C에서 24시간 배양하였음. 배양된 세균 집락의 수를 계산하여 생산용 세균주의 역가를 확인하였음.
- 세균 집락의 수를 계산한 결과, 대량배양된 3종의 세균주는 모두  $1.0 \times 10^9$  CFU/ml 이상으로 확인되었음.

### (4) Bacteria bulk의 보관

- 채득된 Bacteria bulk를 보관하기 전 충분히 혼합하여 균질화 시킨 후 자가시험 및 품질관리 부에 시험 의뢰할 sample을 채취한 후 -60°C에서 냉동 보관하였음.

**나. 시험백신의 동결건조**

- 3종의 대량 생산된 세균을 각각 원심분리(7000 rpm, 30분) 하였음. 세균 침전물(pellet)을 수거한 후 PBS 1,000.0 ml로 부유시켜 세척 과정을 수행하였으며, 총 3회 반복하였음.
- 최종 세척된 세균 부유액을 원심분리(7,000 rpm, 30분) 하여 세균 침전물을 확보하였으며, PBS 100.0 ml로 희석하였음. PBS로 희석된 3종의 세균 혼합액(총량 300.0 ml)에 Trehalose phosphate glutamate gelation mixture (TPGG, 표 4) 3%를 첨가하여 동결건조를 수행함. 동결건조 시 시험 백신은 규정용기(vial) 당 2.0 ml 씩 분주하여 수행하였음.

**표 4. TPGG 조성**

Componets	Dose (총량에 대한 %)
Trehalose	3.00%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04%
L-glutamate	0.15%
Gelatin	3.51%

**다. 제품의 표준화**

- 동결건조가 완료된 시험백신은 sealing 한 후, 2~8℃ 냉장소에서 보관하였음(표 5).

**표 5. 연속 3 lot의 시험 백신**

제조번호	제조일자	항원 함량 (dose)	제조수량
AI-SG F001	2020. 06. 22	1×10 <sup>9</sup> CFU/ml	10수분 × 100 vials
AI-SG F002	2020. 06. 29	1×10 <sup>9</sup> CFU/ml	10수분 × 100 vials
AI-SG F003	2020. 07. 06	1×10 <sup>9</sup> CFU/ml	10수분 × 100 vials

## 9. 시험백신의 일반시험

### 가. 특성시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 “동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-01에 따라 색조시험, 혼탁도시험, 이물시험, 이취시험, 내용물의 균일성시험을 실시하였음.
- 검사는 2개의 반제품을 백신 희석액으로 용해하여 관찰하였으며, 유백색 고체형태의 경구 투여용 백신은 이물, 이취 등이 없었고 내용물의 성상이 균일하였음(표 6).

표 6. 시험백신의 특성시험 결과

제조번호	관찰항목			
	색	혼탁도	이물	이취
AI-SG F001	—*	—	—	—
AI-SG F002	—	—	—	—
AI-SG F003	—	—	—	—

\*이상없음

### 나. 진공도시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 “동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-02에 따라 건조백신에 대한 진공도 시험을 실시하였음. 검사는 건조백신을 암실에 두고 백신으로부터 5 ~ 10 mm 떨어진 위치에 테스터코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하였으며, 모든 lot에서 적합임을 확인하였음(표 7).

표 7. 시험백신의 진공도 시험 결과

제조번호	관찰결과
AI-SG F001	—*
AI-SG F002	—
AI-SG F003	—

\*이상없음

#### 다. 수소이온농도시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 “동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-03에 따라 각 lot 별로 수소이온농도를 측정하였으며 모든 lot 에서 pH 6.0 ~ 8.0 이내임을 확인하였음(표 8).

표 8. 수소이온농도 검사 결과

제조번호	수소이온농도 (pH)
AI-SG F001	7.32
AI-SG F002	7.41
AI-SG F003	7.35

#### 라. 함습도시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 “동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-04에 따라 각 lot 별로 함습도를 측정하였으며, 모든 lot에서 4% 이내 함습도를 확인할 수 있었다(표 9).

표 9. 함습도 시험 결과

제조번호	함습도 (%)
AI-SG F001	3.46
AI-SG F002	3.68
AI-SG F003	3.61

#### 마. 마이코플라즈마 부정시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 “동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-2-20-07에 따라 각 lot 별 마이코플라즈마 부정시험을 실시하였음.
- PCR 기법을 이용하여 마이코플라즈마 어염여부를 확인한 결과, 모든 lot의 시험백신에서 마이코플라즈마가 검출되지 않았음(표 10).

표 10. 마이코플라즈마 부정시험 결과

제조번호	마이코플라즈마 PCR 검출 결과
AI-SG F001	-
AI-SG F002	-
AI-SG F003	-

바. 순수시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 “동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-05에 따라 각 lot 별 순수시험을 실시하였으며, 그 결과 살모넬라 갈리나룸 이외의 세균이 검출되지 않았음(표 11).

표 11. 시험백신의 순수시험

배양기간 (일)	AI-SG F001		AI-SG F002		AI-SG F003			
	22 ℃		37 ℃		22 ℃		37 ℃	
	NA	Thio	NA	Thio	NA	Thio	NA	Thio
1일	-	-	-	-	-	-	-	-
2일	-	-	-	-	-	-	-	-
3일	-	-	-	-	-	-	-	-
4일	-	-	-	-	-	-	-	-
5일	-	-	-	-	-	-	-	-
6일	-	-	-	-	-	-	-	-
7일	-	-	-	-	-	-	-	-
판정	합격		합격		합격		합격	

시. 균수시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-3-01-01에 따라 각 lot 별 균수시험을 실시하였으며, 백신 1수분 중 균수는  $1 \times 10^9$  CFU 이상으로 확인되었다(표 12).

표 12. 균수시험 결과

제조번호	균수 (CFU/ml)
AI-SG F001	1×10 <sup>9</sup>
AI-SG F002	1×10 <sup>9</sup>
AI-SG F003	1×10 <sup>9</sup>

아. 안전시험

- 제조된 3 lot의 시험백신에 대하여 “동물용의약품 국가출하승인검정 기준” 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-3-01-01에 따라 2 ~ 8℃ 살모넬라 갈리나룸에 감수성이 있는 8~16 주령 닭 15마리를 사용하여 10마리는 시험군으로, 5마리는 무접종 대조군으로 하였음.
- 시험군에 백신 10수분을 사용법에 따라 접종하였고 14일 동안 임상증상을 관찰하였음. 그 결과 관찰 기간 동안 이상 없이 생존하였음(표 13).

표 13. 시험백신의 안전 시험 결과

제조번호	일							
	0	1	2	3	4	5	6	7
AI-SG F001	0*/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
AI-SG F002	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
AI-SG F003	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
대조군	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
제조번호	일							
	7	8	9	10	11	12	13	14
AI-SG F001	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
AI-SG F002	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
AI-SG F003	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
대조군	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

\*이상 반응 관찰 마리 수

## 10. 백신 항원량 결정 시험

### 가. 실험 디자인

- 항원량 결정 시험은 크게 2개 그룹(백신군, 대조군)으로 실험 디자인을 아래와 같이 설정하여 시행하였음(표 14).

표 14. 실험 디자인

그룹	실험두수	백신접종 (4주령)	공격접종 (8주령)	부검 (11주령)
백신군1	10	$1 \times 10^9$ CFU/mL	가금티푸스	0
백신군2	10	$1 \times 10^8$ CFU/mL	가금티푸스	0
백신군3	10	$1 \times 10^9$ CFU/mL	저병원성 조류인플루엔자	0
백신군4	10	$1 \times 10^8$ CFU/mL	저병원성 조류인플루엔자	0
양성대조군1	5	X	가금티푸스	0
양성대조군2	5	X	조류인플루엔자	0
음성대조군	4	X	X	0

### 나. 평가 항목

- 백신은 다음의 평가 항목에 대한 검사를 실시하였음(표 15).

표 15. 평가 항목

평가 항목	검사방법	비고
임상학적 평가	체중 변화	
면역학적 평가	IgG, IgY, IgA ELISA	
	Cytokine(IL-4, INF- $\gamma$ ) real time PCR	
	PBMC-FACS, MTT	
병리학적 평가	조직 염증 반응(H-E stain)	

## 다. 공시닭 선정 및 백신 접종

### ○ 사육환경

- 공시닭은 23~24℃, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육함. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급함.

### ○ 공시닭 선정 및 백신 접종

- *Salmonella Gallinarium*과 H9N2 바이러스에 대한 항원 및 항체 음성인 1일령의 병아리를 부화장으로부터 분양 받아 항생제가 포함되지 않는 음수와 사료를 급여하며 4주간 축양하였음.
- 4주령의 암컷 산란계에 약독화 살모넬라균 또는 숙주세포의 시스템을 통해 H9N2 바이러스의 항원의 발현이 가능한 동결건조백신분말을 멸균 phosphate-bufferes saline (PBS)로 용해시켰으며, 백신을 함량(1.0 x 10<sup>9</sup>, 1.0 x 10<sup>8</sup> CFU/ml)을 다르게 하여 200.0 ul씩 경구 투여로 면역화를 진행하였음.

## 다. 공격 접종용 살모넬라 및 H9N2 바이러스

### ○ *Salmonella Gallinarium*

- 산란계에 공격접종 실험에 사용할 *Salmonella Gallinarium*은 국내 야생분리주인 JOL422로 하였으며, 세균 함량은 1.0 x 10<sup>5</sup> CFU로 200.0ul씩 구강을 통해 공격 접종에 사용하였음.

### ○ H9N2 바이러스

- 국립환경과학원에서 분양받은 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 MDCK 세포를 사용 실험동물 감염에 사용될 농도인 TCID<sub>50</sub> 값을 도출 후 1.0 x 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> 값을 기반으로 200.0 ul씩 비강을 통해 공격 접종에 사용하였음.

## 라. 임상 평가

### ○ 체중 변화

- 4주령(백신투여), 8주령(공격접종), 11주령(실험 종료)에 닭의 체중을 측정하여 비교함.

### ○ 체중 변화 통계 처리

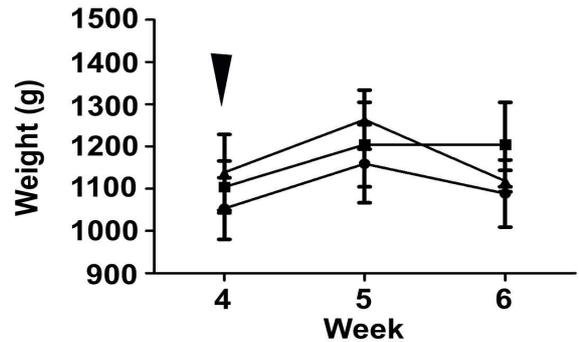
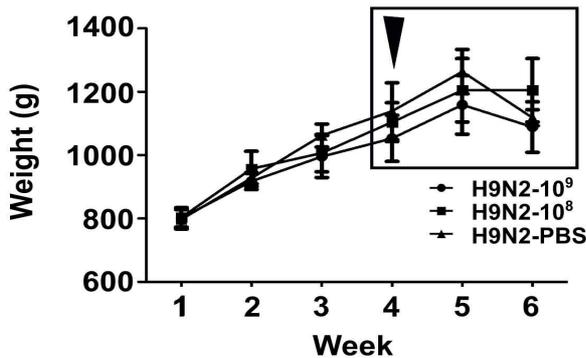
- 각 그룹의 개체에서 측정되는 체중을 확인하는 평가방식을 이용하며, 비모수 통계 분석 방법을 사용함. 통계분석은 먼저 Kruskal-Wallis 방법으로 각 그룹 사이의 유의성 여부를 분석하고, 유의성이 나타나면 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 각각의 그룹간의 정확한 유의성 여부를 확인함.

### ○ 도전감염을 기준으로 전후 체중 측정 결과

- (A) *Salmonella Gallinarum* 그룹과 (B) H9N2 그룹 (N=40, n=10)을 나누어 도전감염 전·후 체중을 주 단위로 측정하였고 그룹 당 10마리를 모두 사용하여 매주 체중을 측정하였음.

- 체중 변화에 대한 결과는, 모든 그룹에서 면역화 후 유의한 변화를 확인할 수 없었지만, *Salmonella Gallinarum* 도전감염 이후  $10^9$  CFU 그룹을 제외한  $10^8$  CFU 그룹과 PBS 그룹의 6~7주 체중에서 유의한 변화를 확인할 수 있었다(그림 8).

(A) H9N2 Challenge study



(B) SG Challenge study

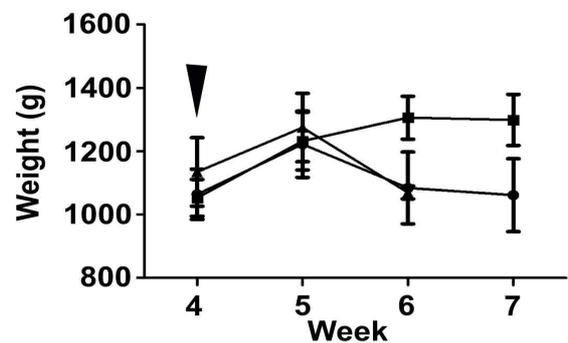
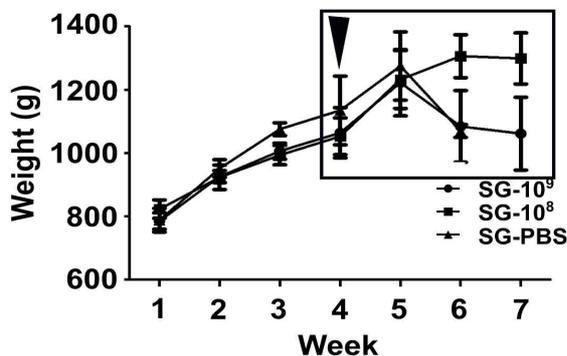


그림 8. Chicken body weight measurements. The body weight of chicken pre and post inoculations were taken at weekly intervals for chicken groups prepared for (A) SG challenge and (B) H9N2 challenged groups (N=30, n=10). Each chicken group was either vaccinated with PBS alone, SG formulation at  $1 \times 10^9$  CFU/chicken or  $1 \times 10^8$  CFU/chicken/200  $\mu$ l PBS by oral route. The challenge with SG wild type strain JOL422 or H9N2 virus were conducted at 4 weeks of post-inoculation. The dose of challenge were  $1 \times 10^5$  CFU/chicken/200  $\mu$ l PBS for SG and  $1 \times 10^6$  PFU/chicken/200  $\mu$ l of H9N2 using oral and nasal route respectively. post-challenge body weight measurements were conducted in weekly intervals using all ten birds per group. SG immunization at  $10^8$  and  $10^9$  CFU/bird did not cause significant body weight variation against the control PBS group. The challenge with SG wild type strain JOL422 and H9N2 influenza took place at 4<sup>th</sup> week, using  $1 \times 10^5$  CFU/chicken orally for SG and nasally for influenza  $1 \times 10^6$  PFU/chicken/200  $\mu$ l. Body weight measurements were conducted over six week period. The average body weight is demonstrated. The right side panel indicates the enlargement of the encaged area for clarity. H9N2-10<sup>9</sup>; Immunized at SG  $10^9$  CFU/chicken and challenged with H9N2, H9N2-10<sup>8</sup>; immunized at SG  $10^8$  CFU/chicken and challenged with H9N2, H9N2-PBS; inoculated with PBS and challenged with H9N2, SG-10<sup>9</sup>;

Immunized at SG  $10^9$  CFU/chicken and challenged with SG, SG- $10^8$ ; immunized at SG  $10^8$  CFU/chicken and challenged with SG, SG-PBS; immunized with PBS and challenged with SG. Arrow indicates the time of challenge.

#### 마. 효소면역측정법을 통한 면역반응 측정

##### ○ ELISA 검사

- 백신 투여 후 14일, 28일째에 혈청을 채취하였으며, 28일째에는 장조직으로부터 장세척액을 채취하여 각각 체액성, 점막성 면역반응을 평가하기 위해 ELISA를 수행하였음.
- 상업화된 ELISA Quantitation kit (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX, USA)를 이용하여 분석하였음.

##### ○ IgG 및 IgA 측정 검사 방법

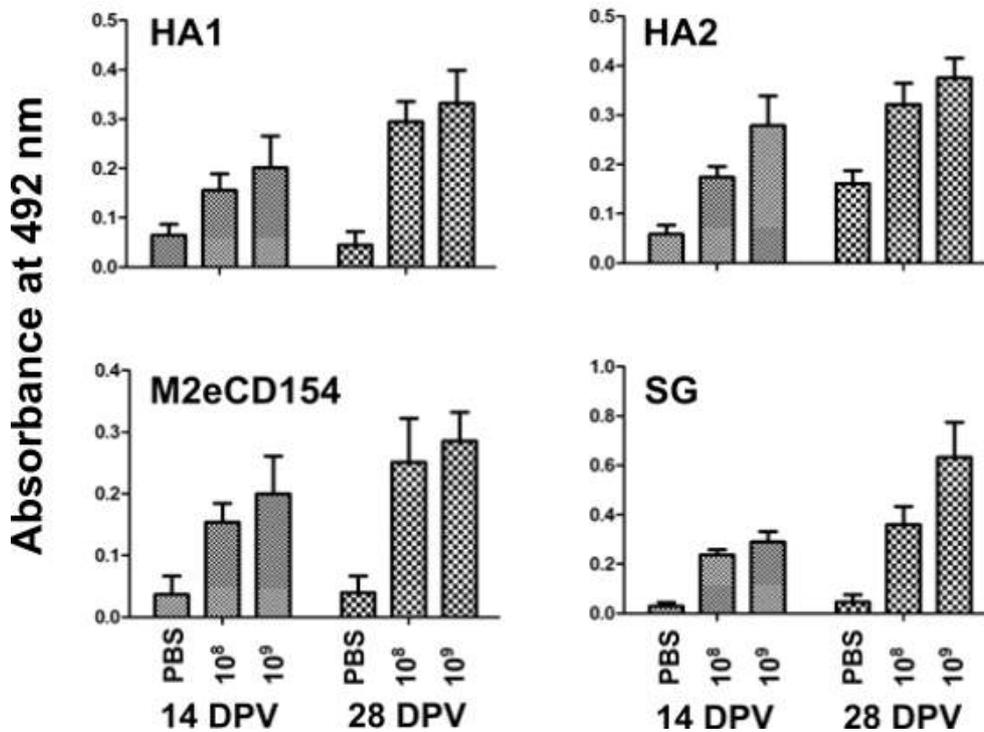
- 각각의 HA1, HA2, M2e 및 SG의 단백질을 400ng/well로 코팅하여 5% skim milk로 blocking 한 후, 1차 항체의 경우 혈청은 1:50, 정 세척액은 1:10으로 PBS에 희석하였고, 2차 항체는 anti-chicken HRP antibody를 1:1000 비율로 희석하여 사용되었음.
- 492 nm에서 흡광도를 측정하기 위해 OD-substrate 반응액을 분주하여 발색처리를 하였으며, 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 중지하였음.

##### ○ IgG 및 IgA 측정 분석

- ELISA 항체가의 경우 보통 S/P 비율이나 titer 값을 분석에 이용함. 일반적으로 측정값이 정규분포를 이루기 때문에 분산분석(ANOVA)을 통해 전체적인 시험군 사이의 유의성 여부를 확인하였음.
- 시험군 사이에 유의성을 확인한 경우, 사후 검정으로 Tukey 방법을 이용하여 각 시험군 사이의 유의적인 차이를 정확히 분석하였음.

##### ○ IgG 및 IgA 측정 결과

- 혈청의 IgG의 역가를 측정한 결과를 확인한 결과 백신 후보군주로 면역화가 이루어진 실험동물의 그룹에서 대부분 2~3배 이상의 역가가 증가되는 것을 확인 할 수 있었음(그림 9).



**그림 9. Antigen specific humoral immune responses.** The humoral immune responses were measured by assessing IgG responses in blood serum collected on 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days post vaccinations (n=8). IgG responses were assayed by indirect ELISA format against each purified protein HA1, HA2, M2e and SG crude protein extract. Each protein was coated on ELISA plates at 400 ng/well in coating buffer. Plates were blocked by 5% skim milk and washed three time with PBS. For primary antibody, the chicken serum was used at 1:50 dilution in PBS. After incubation for 2 h at 37°C, the plates were washed thrice with PBST (0.01%Tween) and incubated with anti-chicken HRP antibody at 1:1000 dilution and incubated for 1 h at 37°C. The final color development was achieved by adding OPD substrate and the reaction was stoped by adding 50  $\mu$ l of 3N H2SO4 per well. Color intensities were measured at 492 nm absorbance. The changes in antibody responses are demonstrated as the mean of all eight birds. \*\*\* indicates significant difference. P<0.05. DPV: Days post vaccination.

**그림 4. Antigen specific humoral immune responses.** The humoral immune responses were measured by assessing IgG responses in blood serum collected on 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days post vaccinations (n=8). IgG responses were assayed by indirect ELISA format against each purified protein HA1, HA2, M2e and SG crude protein extract. Each protein was coated on ELISA plates at 400 ng/well in coating buffer. Plates were blocked by 5% skim milk and washed three time with PBS. For primary antibody, the chicken serum was used at 1:50 dilution in PBS. After incubation for 2 h at 37°C, the plates were washed thrice with PBST (0.01%Tween) and incubated with anti-chicken HRP antibody at 1:1000 dilution and incubated for 1 h at 37°C. The final color development was achieved by adding OPD substrate and the reaction was stoped by adding 50  $\mu$ l of 3N H2SO4 per well. Color intensities were measured at 492 nm absorbance. The changes in antibody responses are demonstrated as the mean of all eight birds. \*\*\* indicates significant difference. P<0.05. DPV: Days post vaccination.

- 장에서 접막성 면역원성에 의해 유도되는 저병원성 조류인플루엔자 항원에 특이적으로 반응하는 sIgA 역가 또한 백신 후보군주로 면역화가 이루어진 실험동물의 장 세척액에서 각각 최대 3배가량 증가되는 것을 확인 할 수 있었음(그림 10).

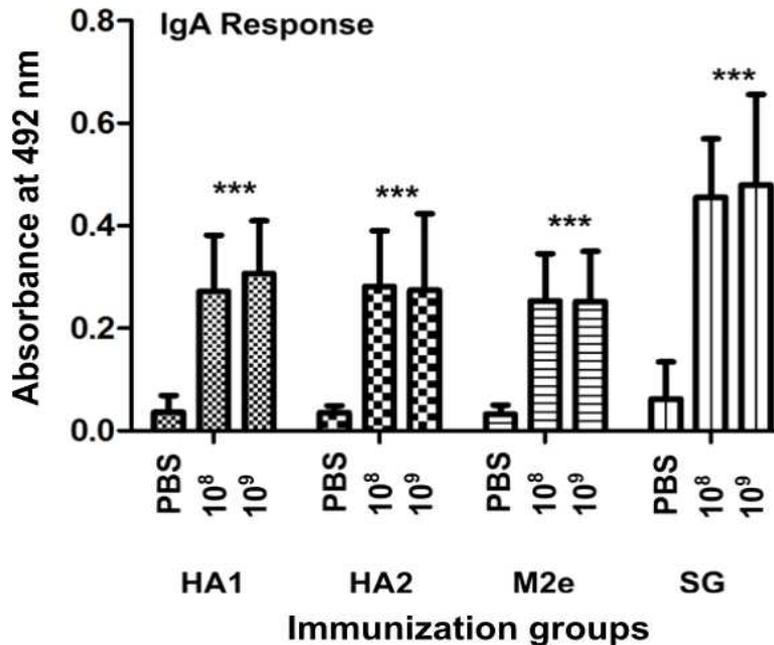


그림 10. Antigen specific IgA response. Elicitation of mucosal IgA responses were evaluated by collecting the intestinal washes at the end of 28 days post immunization. Chicken was (n=5) was sacrificed and the intestinal walls were washed by flushing with 5 ml of PBS. Collected intestinal washes were collected into 15 ml tubes and stored in -70°C for future use. The level of IgA responses were evaluated against the HA1, HA2, M2e purified proteins and SG crude outer membrane proteins in indirect ELISA format. Intestinal washes were used at 1:10 dilution, and the secondary HRP conjugated anti-chicken antibody was used at 1:1000 dilution. After incubation and washing procedures, The color developments was achieved by using OPD substrate and the reaction was stopped by adding 50  $\mu$ l of 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per well. The final color development was measured at absorbance 492 nm.

#### 사. 세포매개 면역반응 측정

##### ○ 세포성 면역반응 검사 방법

- 면역화 28일 후 무균적으로 채취한 혈액을 EDTA처리하여 PBMC를 분리한 후 분리된 PBMC는 멸균 PBS로 3번 세척 다음 complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin and 10% FBS)으로 재부유시키고 cell 수를 계산한 뒤 1 x 10<sup>6</sup> PBMC를 400 ng/well의 항원으로 각각 자극하였고 면역반응을 48시간 동안 유도하였음.

- 48시간 후 반응이 이루어진 세포를 수거하여 항원에 특이적으로 반응이 진행된 면역세포의 분화 정도를 MTT assay를 사용하여 분석하였음.
  - 각 실험동물의 그룹에서 분리된 PBMC를 동일한 농도의 항원으로 자극하여 48시간 후 반응이 이루어진 면역세포를 수거하여 항원에 특이적으로 반응하여 분화된 림프구에 결합하는 항체를 사용하고 유세포분석기를 통해 항원에 특이적으로 분화되는 림프구를 확인하였음.
  - FITC-labeled anti-chicken CD3 antibody, AF700-labeled anti-chicken CD4 antibody (Southern Biotech, USA)으로 각각 반응 후 유세포 분석을 진행하였으며, 각 항체에 특이적으로 결합이 이루어진 형광체에 따른 분획을 구분하여 해당세포의 분화를 확인하였고 데이터 분석은 FlowJo software (Treestar, Inc., San Carlos, CA)를 사용하였음.
- 세포성 면역반응 결과
- 시험백신의  $10^9$  CFU 함량으로 면역화된 그룹이 PBS 그룹에 비해 현저하게 높은 것으로 확인 되었음(그림 11).
  - 이러한 결과는 SG 기반 H9N2 백신이 체액성 면역반응과 세포매개 면역반응 모두를 유도시킬 수 있음을 나타내는 결과라 하겠음.

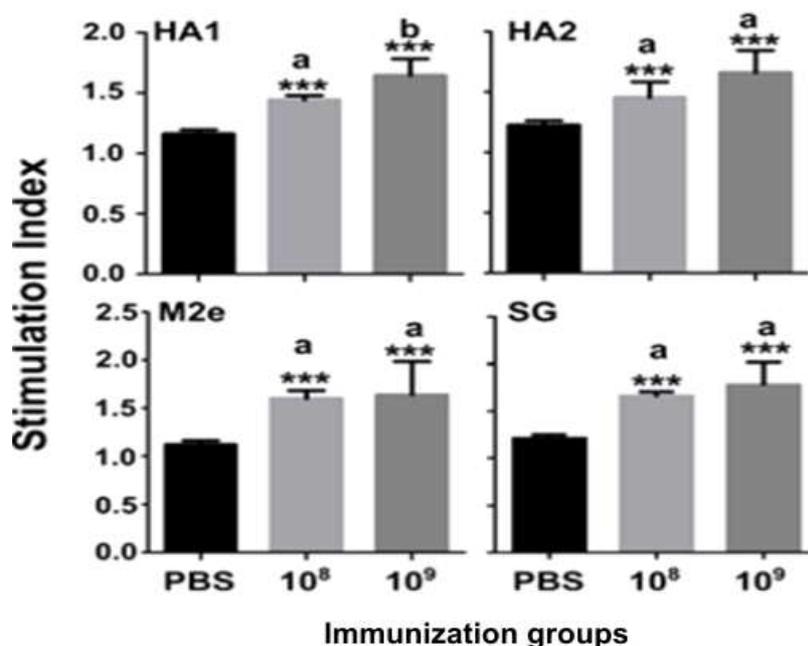


그림 11. Peripheral blood mononuclear cell proliferation assay. The antigen specific cell mediated immune responses were assayed using chicken PBMC by PBMC proliferation assay (n=5). At 28<sup>th</sup> day post immunization blood collection was done via the wing vein and stored in K-EDTA treated 15 ml tubes. The harvest of PBMC was done by Histopaque density separation method (histopaque-1077). The harvested PBMC was seeded in 96 well plates at  $1 \times 10^5$  cells/well in

RPMI1640 10% medium. Cells were stimulated with purified HA1, HA2, M2e or crude SG proteins at 400 ng/well concentration. After incubating for 72 h, the cell proliferative response was assayed by MTT based colorimetric assay. \*\*\*indicates the significant difference against the PBS control. P<0.05.

- 유세포분석기를 통해 항원에서 특이적으로 분화되는 림프구를 확인한 결과에서 PBS 그룹과 비교하여 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 분비하는 균주로 면역화가 이루어진 실험동물의 그룹에서 CD3+ CD4+ T 림프구의 분화가 최대 1.5배 이상 증가하는 것으로 확인되었음(그림 12, 13).

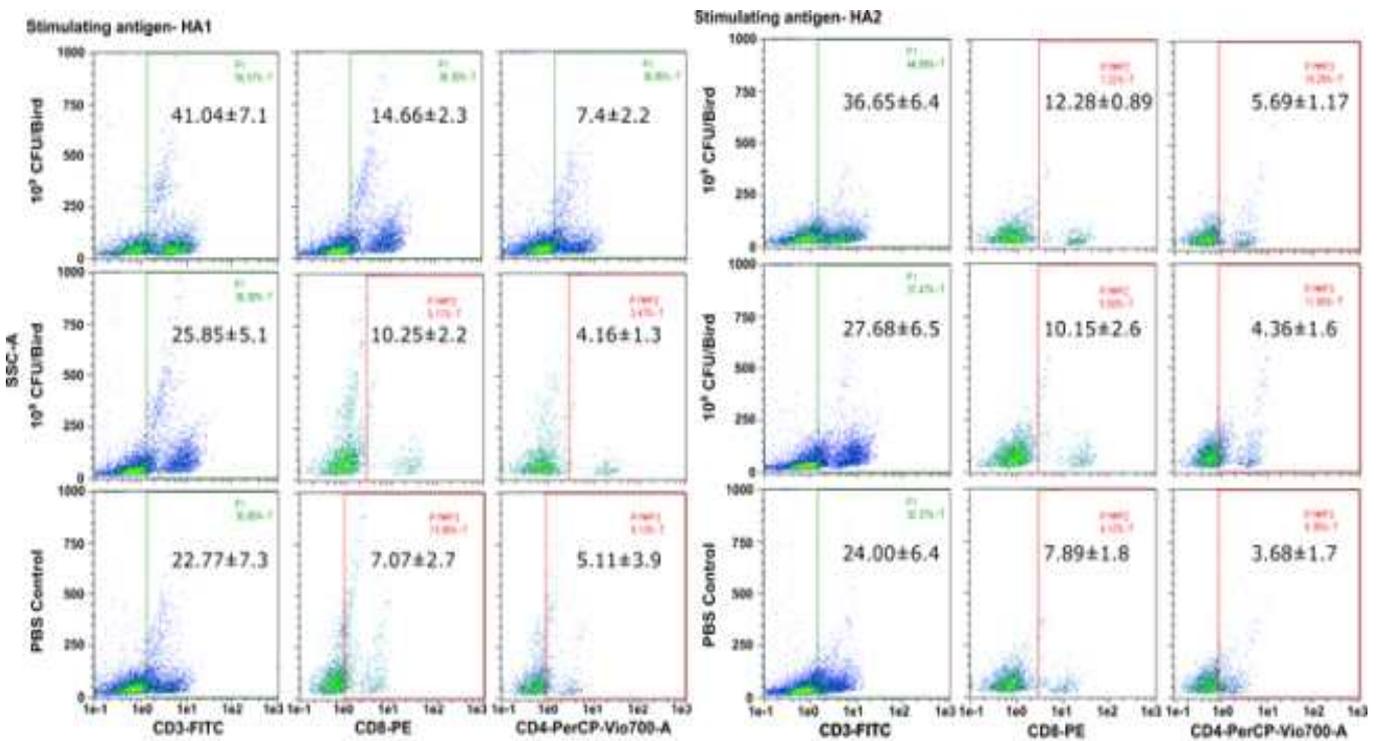
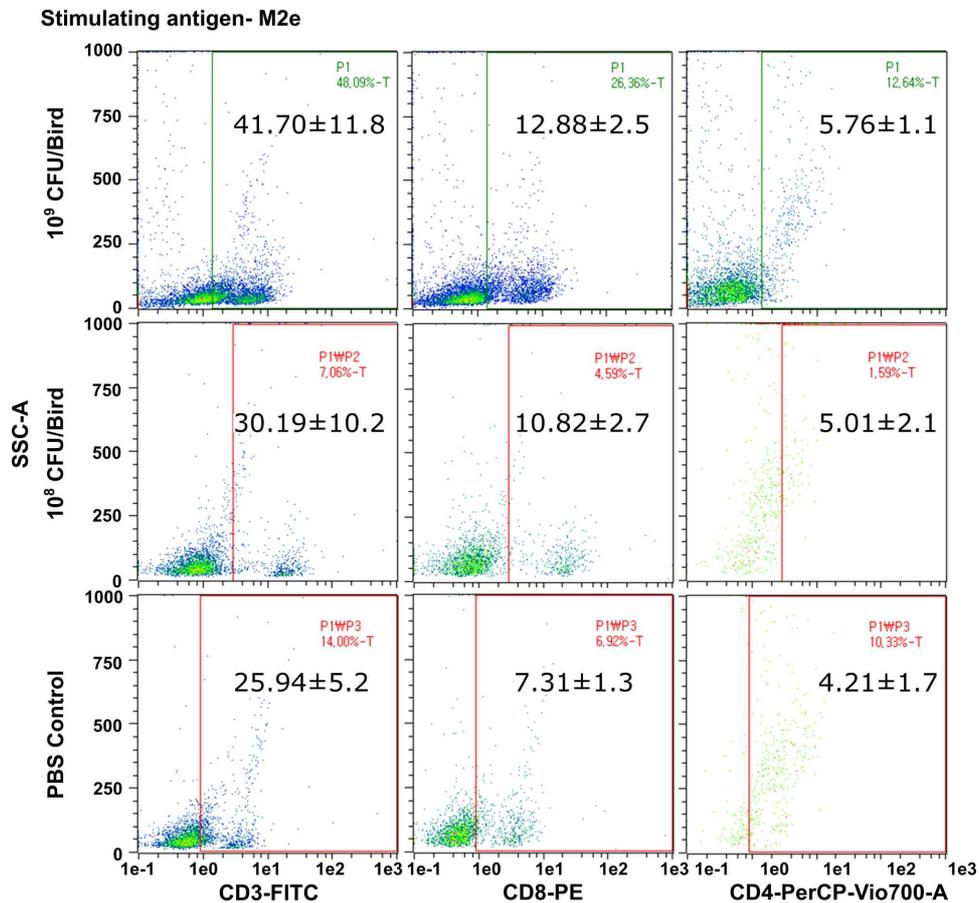


그림 12. Assessment of antigen specific T-cell responses by flow cytometry analysis using HA1 and HA2 proteins. Cell proliferation and differentiation responses demonstrated by PBMC derive T-cells were analyzed by flow cytometry method. Using PBMC harvested on 28<sup>th</sup> post immunization, cells were seeded at 1x10<sup>5</sup>Cells/well in 12well plates. Each well was stimulated by purified HA1, and HA2 using 400ng/well. Cells were incubated for three days. CD3+, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ cell populations were labeled using anti-chicken CD3-FICTS, CD4-PE, and CD8-Per CPVio700. Each CD3+CD4+ and CD3+CD8+ subpopulations were gated from original CD3+ population and quantified. Mean value of five birds with standard deviation was demonstrated in the figure. The figure describes the responses of CD3+, CD8+ and CD4+ responses in each PBS inoculated, 10<sup>8</sup> CFU/chicken inoculated and 10<sup>9</sup> CFU/chicken inoculated groups.



**그림 13. Flow cytometry analysis using M2e protein.** Cell proliferation and differentiation responses demonstrated by PBMC derive T-cells were analyzed by flow cytometry method. Using PBMC harvested on 28<sup>th</sup> post immunization, cells were seeded at  $1 \times 10^5$  Cells/well in 12well plates. Each well was stimulated by purified M2e using 400ng/well. Cells were incubated for three days. CD3+, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ cell populations were labeled using anti-chicken CD3-FICTS, CD4-PE, and CD8-PerCP VIo700. Each CD3+CD4+ and CD3+CD8+ subpopulations were gated from original CD3+ population and quantified. Mean value of five birds with standard deviation was demonstrated in the figure. The figure describes the responses of CD3+, CD8+ and CD4+ responses in each PBS inoculated,  $10^8$  CFU/chicken inoculated and  $10^9$  CFU/chicken inoculated groups.

#### 아. 도전 감염 후 생존율 평가

##### ○ 생존율 관찰

- 저병원성 조류인플루엔자 시험백신으로 면역화 진행 후 도전감염을 진행함에 따른 생존율을 분석하였음. 도전감염은 *Salmonella Gallinarum*의 야생균주를 사용하여  $1 \times 10^5$  CFU의 농도로 구강을 통해, H9N2 바이러스는  $1.0 \times 10^4$  TCID50의 농도로 비강을 통해 공격 접종을 하였고 공격접종 후 생존율을 매일 관찰하였음.

○ 생존율 결과

- 20일 이후 *Salmonella Gallinarum*을 공격 접종한 PBS 그룹에서 생존율은 0%로 모두 폐사 하였으며, 백신 접종 그룹의  $10^9$  CFU 그룹에서 70% 이상의 생존율을 보이며 가장 높은 수치를 나타내었고,  $10^8$  CFU 접종 그룹에서 약 40% 정도의 생존율을 나타내었음(그림 14).
- 결과적으로 PBS 그룹과 비교해서 면역화 그룹이 평균 50% 이상의 생존율을 나타내는 것으로 확인되었음(그림 14). 이는 *Salmonella Gallinarum*에서의 방어효과를 입증하는 결과임. 반면 H9N2 바이러스의 공격접종 그룹에 대한 폐사율은 어떤 그룹에서도 관찰되지 않았음. 본 실험은 1회 반복하였고 총 2회를 실시하였음.

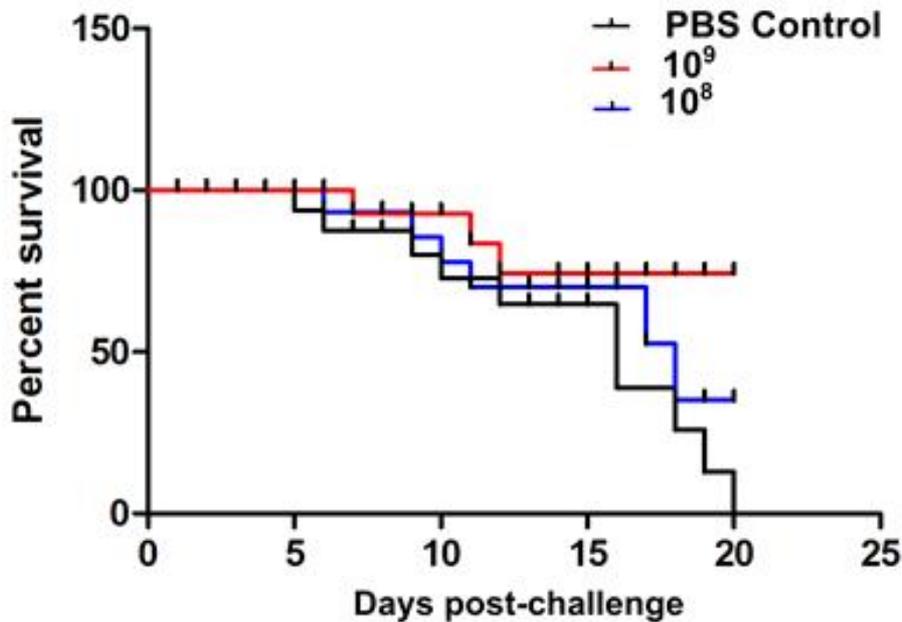


그림 14. Post Gallinarium challenge survival curve. Post-SG challenge chicken survival monitored on daily basis. Chicken was observed twice daily, and any mortality was recorded. The graph demonstrate the percent survival rate over twenty day observation period. PBS control; The chicken group inoculated with PBS alone,  $10^9$ ; the chicken group immunized with SG vaccine strain at  $10^9$  CFU/chicken,  $10^8$ ; the chicken group immunized with SG vaccine strain at  $10^8$  CFU/chicken.

자. H9N2 바이러스 shedding 평가

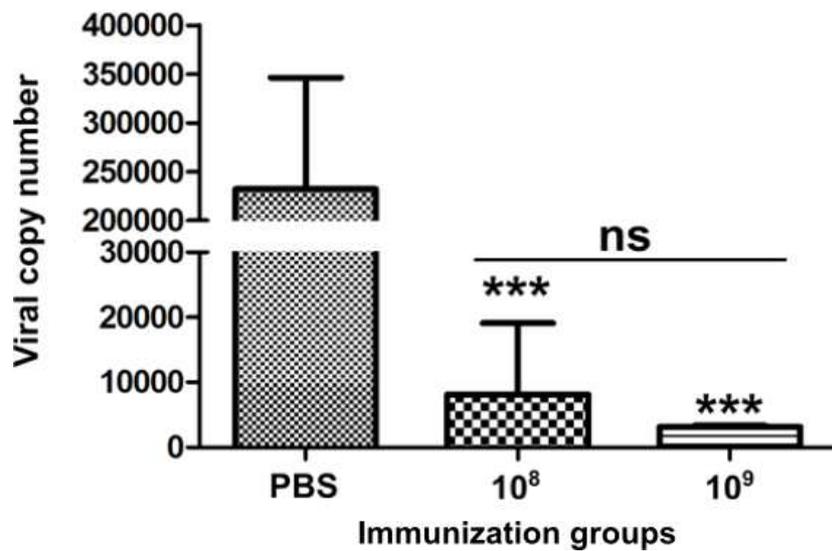
○ 바이러스 shedding 평가 방법

- 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 배양액을 농도별로 MDCK 세포에 감염 시켜 TCID50 값을 도출하였고  $1.0 \times 10^4$  TCID50 값을 사용하여 시험백신으로 면역화가 이루어진 실험동물의 비강을 통해 공격접종 하였음.

- 공격 접종 14일 후 각 그룹의 실험동물로부터 폐 조직을 무균적으로 분리하여 RNA를 추출해 cDNA를 합성하여 분석에 사용하였음.
- 분비되는 H9N2 바이러스의 함량정도는 HA1 specific primer set를 이용해 Real-time PCR 방법으로 분석하였음.

○ 바이러스 shedding 결과

- $1 \times 10^8$  및  $10^9$  CFU 농도의 시험백신으로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에서 PBS 그룹과 비교해 바이러스 RNA 농도가 유의적으로 낮아지는 것을 확인하였음(그림 15).
- 특히  $10^9$  CFU 농도로 면역화된 그룹에서 더 높게 감소하는 결과를 확인 할 수 있었음(\* $P < 0.05$ ).



**그림 15. Post challenge influenza viral copy number.** The lung tissues were collected from chicken two weeks post challenge and homogenized in PBS (n=5). The total RNA was extracted and the cDNA was synthesized. The viral RNA copy number was assayed using HA1 specific primers. The CT values were converted into the viral copy number using a calibration curve developed against HA1 open reading frame cloned plasmid construct (HA1 pMMP65). \*\*\* indicates significant difference against the PBS control.  $P < 0.05$ . PBS control; The chicken group inoculated with PBS alone,  $10^8$ ; the chicken group immunized with SG vaccine strain at  $10^8$  CFU/chicken.  $10^9$ ; the chicken group immunized with SG vaccine strain at  $10^9$  CFU/chicken, All birds were challenged with H9N2 using  $1.4 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>.

## 차. 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스와 *Salmonella Gallinarum* 야생균주의 공격접종으로 유도되는 염증반응 분석

### ○ 실질 장기의 염증반응 확인 방법

- 조류인플루엔자 H9N2 바이러스는 PBS 그룹과 백신균주를 통해 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에  $1.0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>의 바이러스 농도로 공격접종을 진행하였음.
- *Salmonella Gallinarum* 야생균주는  $1 \times 10^5$  CFU로 공격접종 후 7일, 14일차에 면역화가 이루어진 그룹과 대조군의 실험동물로부터 폐, 간, 비장, 장 조직을 분리하여 분석하였음.
- 실질 장기 조직은 포르말린 고정액에 보관하여 파라핀으로 조직을 고정하였고 H&E staining을 통해 공격 접종 후 유도되는 염증반응을 확인하였음.
- 고정액에 들어 있던 조직을 카세트에 넣어 하룻밤 방치하여 고정액을 수세한 뒤 알코올에서 탈수시킨 다음 조직을 soft paraffin에서 한 시간 반, hard paraffin에서 한 시간 반을 포매시켜 조직을 절편 한 뒤 하룻밤 방치시켜 조직절편을 말림.
- 말린 조직은 자일렌을 이용한 탈파리핀과 수세를 시킨 뒤에 hematoxylin으로 염색한 뒤 다시 수세한 다음 아세트산으로 분별 후 암모니아수로 중화시킴.
- 최종적으로 흐르는 물에서 빛깔을 내고 eosin으로 염색한 뒤 알코올로 분별탈수하고 봉입하여 조직을 관찰하였음. 염증반응 결과는 실질장기 별로 각각의 출혈 및 염증정도를 노란색 화살표로 표시하였음.

### ○ 실질 장기의 염증 반응 결과

- 조직학 검사를 시행한 결과 H9N2 공격접종 그룹은 시험백신  $10^9$  CFU로 면역화가 진행된 실험동물의 폐 조직에서 H9N2 바이러스에 의해 유도되는 염증반응이 유의적으로 줄어드는 것을 확인 할 수 있었음(그림 16).
- *Salmonella Gallinarum* 공격접종 그룹에 대해서도 시험백신  $10^9$  CFU로 면역화가 진행된 실험동물의 간 조직에서 두드러진 결과를 확인할 수 있었음(그림 17).

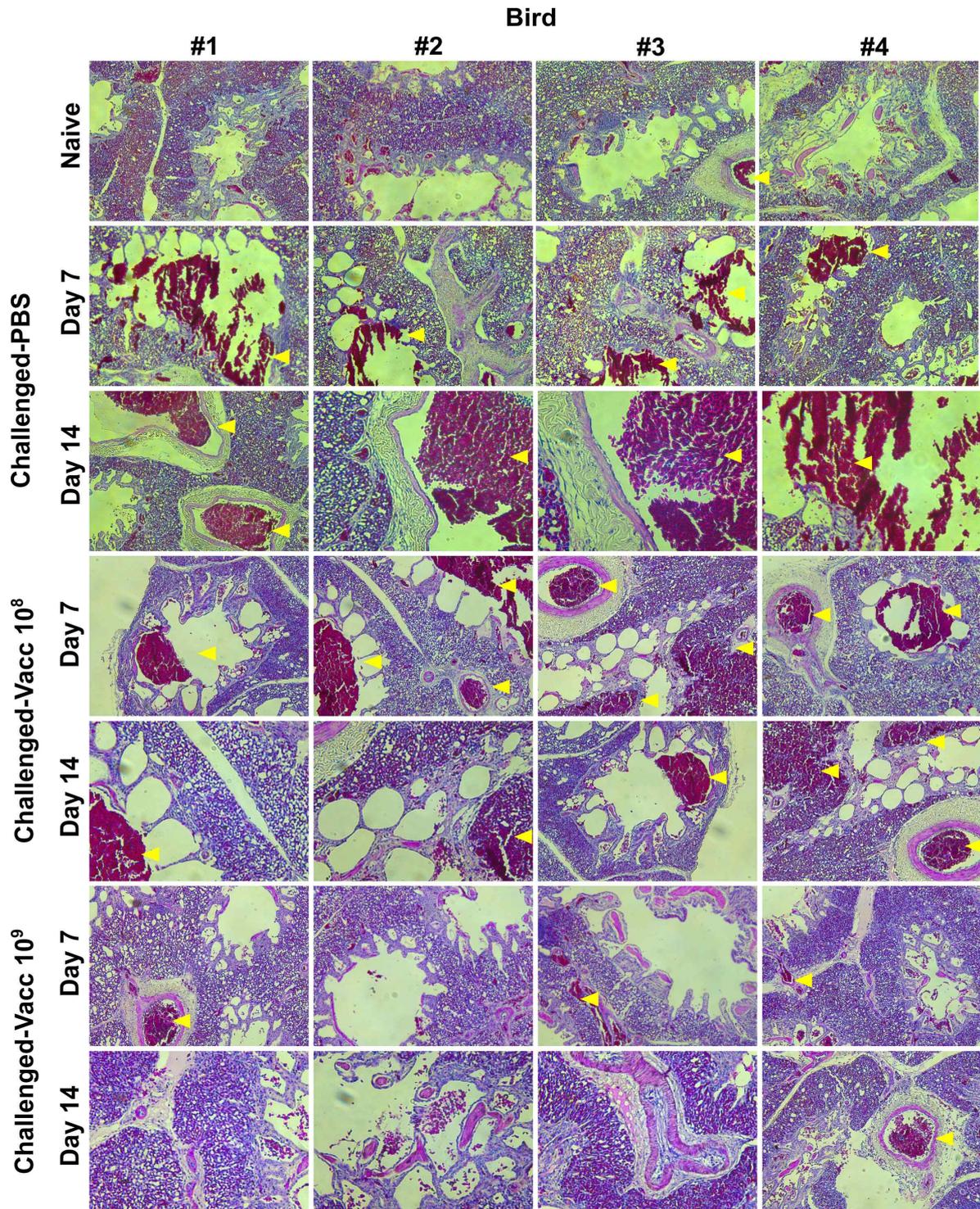


그림 16. Histopathological analysis of lungs after the H9N2 challenge. Post H9N2 challenge lungs were harvested from chicken at the end point of the experiment. Lungs specimens were fixed in 10% formaldehyde for three days, washed for 5 h in mild running water and fixed in paraffin. Sections were cut into 0.5 um thin slices using microtome and stained with eosin and hematoxylin. The level of hemorrhage was demonstrated by yellow color arrows. Highest reduction in symptoms for H9N2 infection was evident in chicken immunized with SG at  $1 \times 10^9$  CDU/bird.

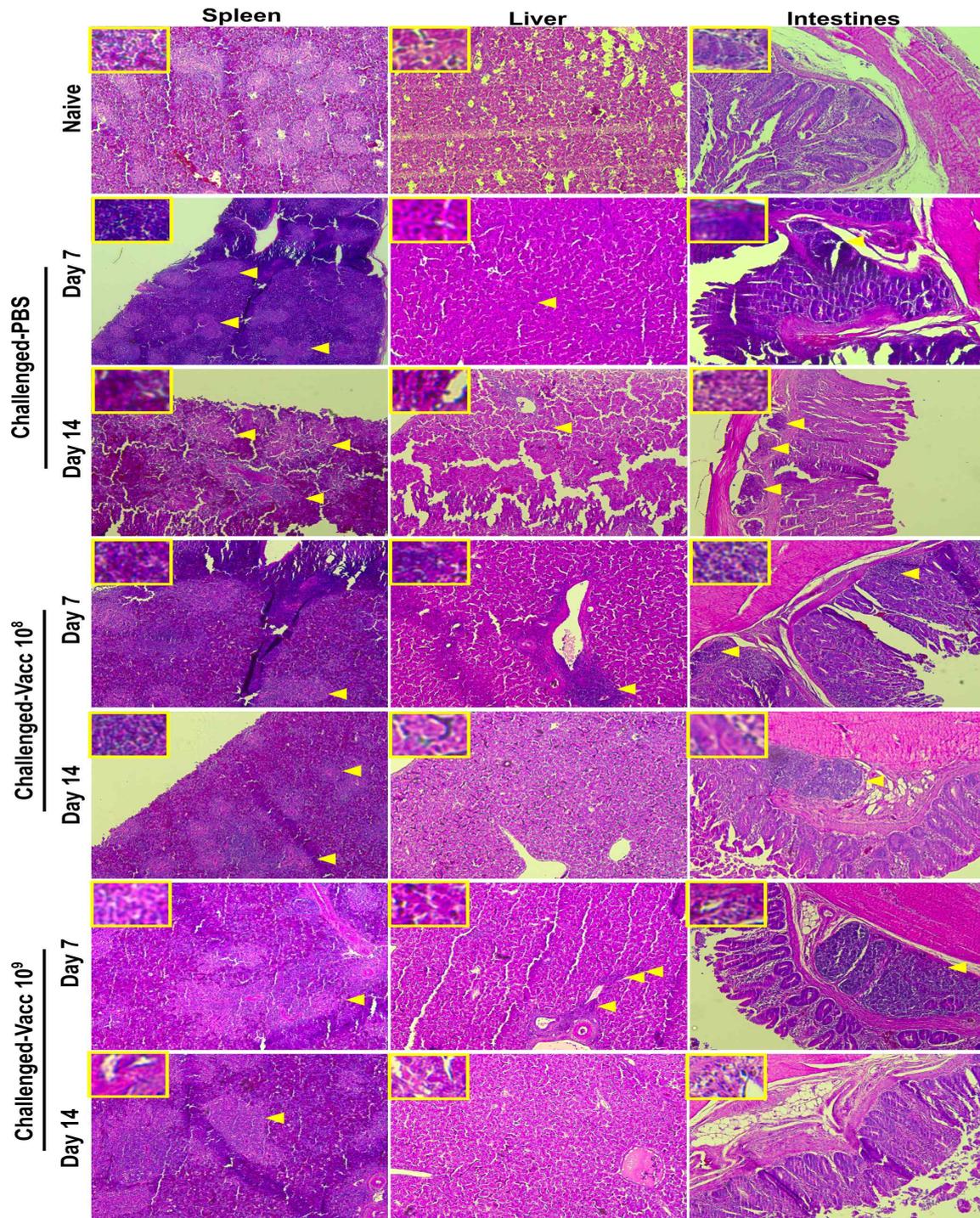


그림 17. **Histopathological analysis for SG challenge.** Spleen, liver and intestine samples were collected from SG challenged birds at the end point of the experiment (n=2). The degree of vaccine derived protection after the SG challenge was investigated. Signs of inflammation marked by macrophage and neutrophil infiltration was observed. The expansion of white pulp area in spleen samples were evident in SG infected PBS control tissues. The vaccine derived protection was prominent in liver sections retrieved from chicken immunized with SG at  $1 \times 10^9$ CFU/bird via the oral route.

카. 백신균주에 의해 면역화가 유도된 실험동물에 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 공격접종 후 일어나는 폐의 외관 변화

○ 폐의 외관 확인 방법

- PBS 그룹과 백신균주를 통해 면역화가 진행된 그룹의 실험동물에 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를  $1.0 \times 10^4$  TCID50 농도로 공격접종 하였으며, 부검 후 폐의 외관을 확인하였음.

○ 폐 관찰 결과

- 도전감염에 의해 닭의 폐사나 현저한 체중감소는 나타나지 않았지만, 폐에서의 출혈을 확인할 수 있었음.
- 도전감염 후 14일차에  $10^9$  CFU 농도의 시험백신으로 면역화된 실험동물의 그룹에서 전반적으로 회복된 폐의 형태를 확인하였으며, PBS 그룹은 상당히 높은 적색의 외관을 나타내었음(그림 18).

Post-challenge appearance of lungs

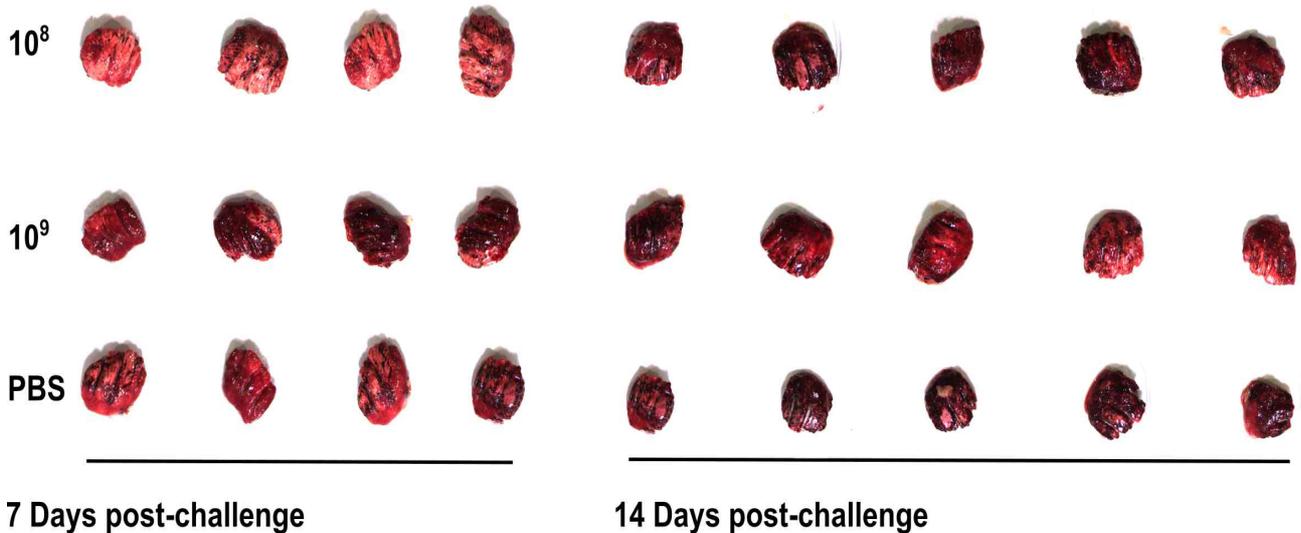


그림 18. The appearance of lungs of chicken post-challenged by H9N2 virus. Upon challenge with H9N2 influenza virus, the appearance of lungs in vaccinated birds was assessed at 7 days and 14 days post challenge. H9N2 infection in chicken did not cause chicken death or significant weight loss, however, hemorrhage in lungs were well evident. At the end of 14 day observation period, chicken immunized with SG at  $1 \times 10^9$ CFU/bird demonstrated the best overall protection with recovered lungs. PBS group demonstrated significantly high red color appearance after 14days from the challenge demonstrating the highest susceptibility to H9N2 influenza infection.

타. *Salmonella Gallinarum* 야생균주의 공격접종으로 유도되는 조직의 병변 평가

○ 조직 병변 확인 방법

- PBS 그룹과 백신균주로 면역화가 진행된 실험동물의 그룹에 *Salmonella Gallinarum* 야생균주를  $1 \times 10^5$  CFU 농도로 공격접종을 진행하였으며, 부검 후 간과 비장의 형태학적 외관을 확인하였음.

○ 조직 병변 결과

- *Salmonella Gallinarum*에 대해 크게 방어효과를 이끌어내지는 못했지만, 백신 접종군과 비접종군을 비교하였을 때 간과 비장의 표면에서 병변의 감소는 확인할 수 있었음. 노란색 상자는 병변을 나타내는 조직의 표면을 400x 배율로 확대하여 나타낸 결과임(그림 19).

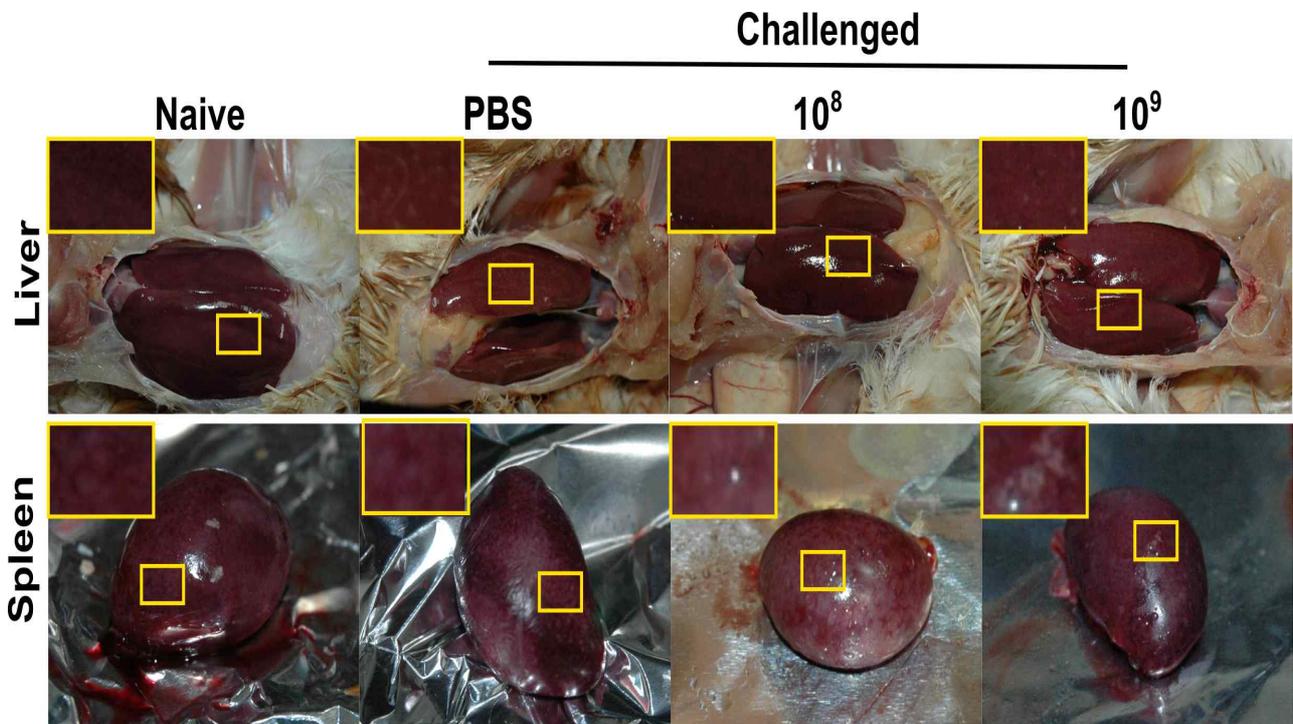


그림 19. Morphological appearance of liver and spleens after SG challenge. The degree of protection delivered by SG vaccination against the SG wild type challenge was evaluated by assessing the morphology of organs recovered from challenged birds. Even though, oral immunization with SG did not derived a significant protection against the lethal challenge, reduction in lesions on the surface of spleen and liver was evident. Tissues were compared against the naïve control. The yellow color box demonstrate 400 x magnification of tissue surface indicating the lesions.

파. H9N2 바이러스에 대해 새롭게 디자인된 HA1, HA2 그리고 M2e 항원을 발현하는 백신 후보 균주로 면역화가 유도된 실험동물에서의 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 면역반응 평가

○ 면역 반응 확인 방법

- 백신 균주로 면역화가 진행된 각 그룹의 실험동물로부터 면역화 2주 후 실험동물로의 혈액에서 무균적으로 분리한 PBMC를 이용하여 세포성 면역과 체액성 면역에 관여하는 cytokine 인 interleukin-6 (IL-6)와 interferon-gamma (INF- $\gamma$ )의 분비를 측정하였음.
- 세포성 면역과 체액성 면역반응을 분석하기 위해 각각의 항원을 사용하여 면역세포를 자극 시키고 항원에 특이적으로 반응하는 면역반응을 유도하였음.
- 항원에 특이적으로 분비되는 cytokine을 코딩하는 mRNA는 Hybrid-R RNA isolation kit (Geneall, Kroea)를 사용하여 추출한 뒤 cDNA는 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover Kit (TOYOBO, Japan)을 이용하여 해당 kit에 제공되는 매뉴얼에 따라 합성한 다음 합성된 cDNA를 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Japan)를 사용해 Realtime PCR을 진행하였음.
- 항원에 특이적으로 유도된 cytokine의 RNA 수준을 측정하였고 이를 GAPDH를 사용하여 평균화한 후 PBS 그룹대비 면역원성에 의해 유도하는 사이토카인의 함량을 분석하였음.

○ 면역 반응 결과

- 면역화를 진행한 실험동물의 그룹에서 면역화가 이루어진 항원에 의해 유도되는 Th1에 관여하는 사이토카인 INF- $\gamma$ 가 대조군에 비해 높게 증가하였음(그림 20).
- Th2에 관여하는 사이토카인 IL-6 또한 대조군에 비해 유의적으로 높게 증가하는 것을 확인하였음(\*P < 0.05)(그림 20).
- 3개의 항원을 발현하는 백신균주로 면역화된 실험동물의 면역세포에서 INF- $\gamma$ 과 IL-6가 대조군인 PBS 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였음(그림 20).
- 이러한 결과들로부터 3개의 항원을 발현하는 백신균주가 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대해 면역반응이 효과적으로 유도됨을 확인할 수 있음.
- 또한 3개의 항원을 발현하는 백신균주는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스를 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 사료됨.

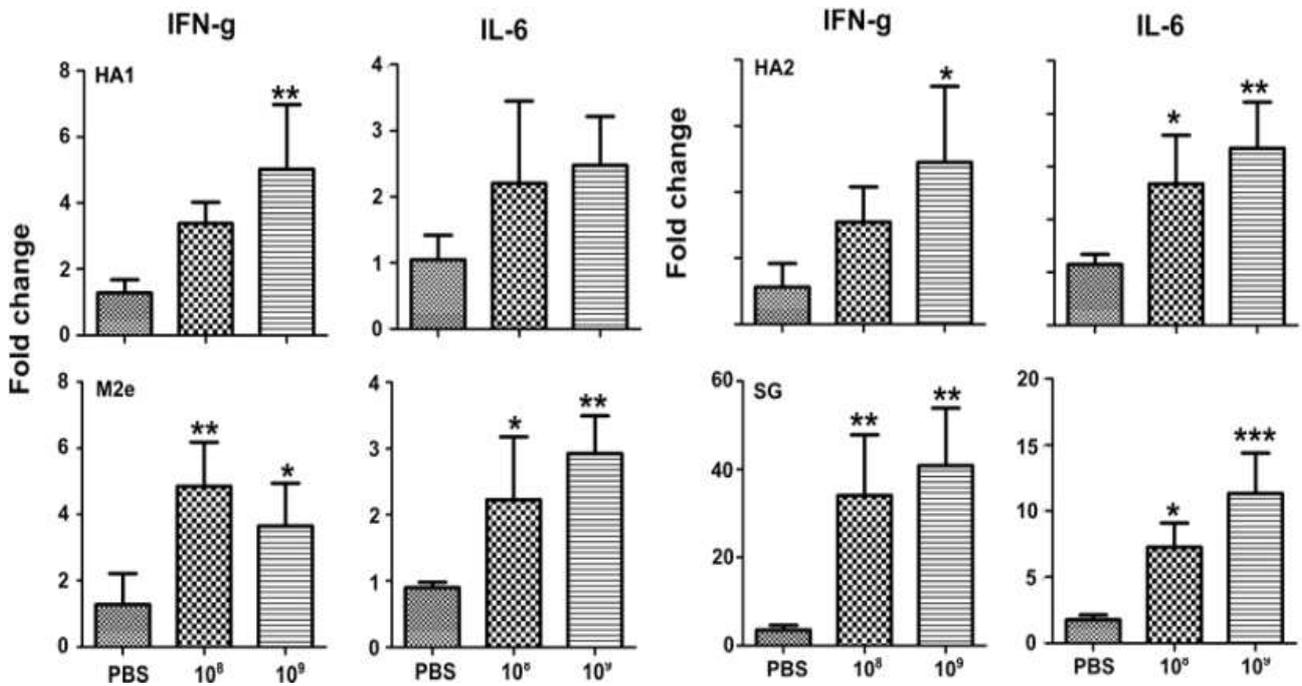


그림 20. Cytokine responses in immunized chicken was assayed on 14<sup>th</sup> day post immunization. The level of mRNA expression of IFN-g and IL-6 was determined by qRT-PCR to determine the engagement of Th1 and Th2 type responses. Peripheral blood mononuclear cells were collected from whole blood. The PBMC was separated by Histopaque density centrifugation method. Cells were seeded in 12 well plates and stimulated with purified HA1, HA2, M2e and crude SG protein using 400 ng/well. After stimulation, cells were further incubated for 24 h. The total RNA was isolated and converted into cDNA. The expression of IFN-g and IL-6 was determined by  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Expression was normalized against GAPDH house-keeping gene.

## 11. 야의 임상 시험

### 가. 시험목적

- 목적 동물에 대한 확대 시험을 통한 안전성 확보와 효과 검증을 위해 야의 임상 시험을 실시함. 주요 검증 포인트는 다음과 같음.
  - 백신 접종 후 목적 동물에서 부작용 발생 유무
  - 백신 접종 그룹(백신군)과 비접종 그룹(대조군)간에 임상 증상의 발현 비율 차이
  - 백신군과 대조군의 증체율, 폐사율 등의 차이 분석

## 나. 공시동물

- 선정된 시험농장 3곳에서 산란계 암탉 각각 50수를 선정하여 백신군 25수, 대조군에 25수를 선정함.

## 다. 백신 접종

- 선정된 3개 농장의 백신군에게 4주령에 1회 200.0 ul씩 이근부에 근육 접종함. 백신군에 접종하고 남은 백신은 전북대학교 수의과대학 이준화 교수님 공중보건학 실험실로 즉시 가져와서 멸균 처리 후 폐기함.

## 라. 평가 항목

- 체중 변화
  - 시험이 시작되는 4주령에서부터 시험이 종료되는 20주령까지 2주에 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에 대해 각 시점에 실험동물들의 평균체중 및 편차를 비교함. 또한 구간별 증체 평균을 비교함.
- 폐사율 측정
  - 실험개시 후 종료까지 백신군과 대조군의 폐사 두수를 기록하여 시기별 폐사 두수를 기록함. 또한 실험기간 중 발생하는 폐사 닭에 대해서 부검을 실시하고, 폐사 원인 검사 후 결과를 기록함.

## 마. 백신 안전성 검사

- 선정된 3개 농장에서 백신 안전성 검사를 실시함. 안전성 시험은 4주령 산란계 암탉에 백신 접종 후 1 ~ 2시간 내에 과민반응을 관찰함.
- 28일간의 관찰기간 동안 주사부위에서 화농, 괴사, 발열 및 피부병변 등의 부작용 여부를 확인함. 또한 백신 접종 후 4주간의 생산성 지수(체중 및 폐사율 등)를 기존 농장성적 및 대조군과 비교함.

## 바. 효소면역측정법을 이용한 면역 반응 측정

- ELISA 검사
  - 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 4주령(1차 백신 접종)에서 시험이 종료되는 시점까지 2주간 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 ELISA Quantitation kit (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX, USA)를 이용하여 백신군과 대조군의 차이를 비교함.

○ IgG 측정 검사 방법

- 각각의 HA1, HA2, M2e 및 SG의 단백질을 400 ng/well로 코팅하여 5% skim milk로 blocking 함. 이후, 1차 항체의 경우 혈청은 1:50, 정 세척액은 1:10으로 PBS에 희석하였고, 2차 항체는 anti-chicken HRP antibody를 1:1000 비율로 희석하여 사용함. OD 492 nm에서 흡광도를 측정하기 위해 OD-substrate 반응액을 분주하여 발색처리를 하였으며, 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 중지하였음.

사. 세포매개 면역반응 측정

○ 세포성 면역반응 검사 방법

- 면역화 후 2주 간격으로 무균적으로 채취한 혈액을 EDTA 처리하여 PBMC를 분리함.
- 분리된 PBMC는 멸균 PBS로 3번 세척 후 complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin and 10% FBS)으로 재부유시키고 cell 수를 계산한 뒤  $1 \times 10^6$  PBMC를 400 ng/well의 각 항원별로 자극을 진행한 후 반응을 48시간 동안 유도함.
- 48시간 후 반응이 이루어진 세포를 수거하여 항원에 특이적으로 반응이 진행된 면역세포의 분화를 MTT assay를 이용하여 분석함.
- 항원에 특이적으로 반응하여 분화된 림프구에 특이적으로 반응하는 형광체가 결합된 항체를 사용하여 반응 후 유세포분석기를 통해 항원에 특이적으로 분화되는 림프구를 확인함.
- FITC-labeled anti-chicken CD3 antibody, AF700-labeled anti-chicken CD4 antibody (Southern Biotech, USA)으로 각각 반응시킨 후 유세포 분석을 진행하며, 각 항체에 특이적으로 결합이 이루어진 형광체에 따른 분획을 구분하여 해당세포의 분화를 확인하고 데이터 분석은 FlowJo software (Treestar, Inc., San Carlos, CA)를 이용하여 분석함.

## 제4장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

### 제1절 연구목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2018)	세포표면발현기 술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>1996년부터 2012년도까지 발병되어 보고된 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 123개의 단백질 서열에 근거 항원성이 높고 서열이 안정적으로 보존되는 항원을 선별</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내 발병 사례의 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 유전적 서열 확보</li> <li>확보된 각 유전적 서열을 이용하여 항원성이 높은 123개의 보고된 서열에서 유전적 변이가 적고 잘 보존된 항원의 선정 및 박테리아에서의 효과적인 발현을 위한 optimization 후 합성</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>In vitro 상에서 선별된 항원의 발현여부를 개발된 백신 균주에서 확인</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>선정된 항원을 코딩하는 유전자를 delivery vector에 cloning</li> <li>각 유전자가 삽입된 plasmid를 약독화된 delivery host로 형질전환하여 백신 제조</li> <li>항원에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 형질전환된 백신 후보균주로부터 각 항원의 발현여부 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 예방 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 확인</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신후보균주 및 숙주세포 시스템을 이용해 면역화가 진행된 실험동물에서의 IgG 및 sIgA에 대한 역가분석</li> <li>백신후보균주를 실험동물에 경구접종 후 생성되는 저병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 중화항체가 분석</li> <li>백신후보균주 및 숙주세포 시스템을 이용해 면역화가 진행된 실험동물에서 항원에 특이적으로 반응하는 세포성 면역반응 분석</li> </ul>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2019)	세포표면발현기 술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신후보균주로 면역화된 실험동물에서의 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 공격접종에 대한 방어효과 분석</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신후보 균주로 면역화된 실험동물에서 분비되는 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 함량 확인</li> <li>백신후보 균주로 면역화된 실험동물과 대조군 그룹과의 폐조직에 대한 염증반응 및 비대화정도 비교</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>실험동물에서의 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 백신 후보 균주의 안전성(safety) 및 면역원성 확인</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신 후보 균주로 면역화된 실험동물에서의 부작용 조사</li> <li>백신후보 균주로 면역화된 실험동물에서의 체액성면역 분석</li> <li>백신후보 균주로 면역화된 실험동물에서의 세포성면역 분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>백신 후보 균주에 대한 세포은행 확립</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>전북대학교 이준화 교수진에서 개발한 균주를 기술이전</li> <li>마스터 박테리아은행(MBB) 및 생산용 박테리아은행(WBB) 구축</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>백신균주의 대량생산을 위한 배양 조건 확립</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신균주의 flask scale 배양조건 확인</li> <li>백신균주의 5.0 L fermentor 배양조건 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>경구 투여 및 호흡기 투여를 위한 제형 최적화</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>동결건조를 이용한 시험백신 제조</li> <li>3가지 종류의 동결건조보호제로 제조된 시험백신의 세포수 비교를 통한 동결건조보호제 선정</li> <li>전임상시험용 시험백신의 조성 확립</li> </ul>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2020)	세포표면발현기 술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신후보균주로 면역화된 실험동물에서의 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 면역반응 평가</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신후보균주들에 의해 유도되는 INF-<math>\gamma</math>와 IL-4의 증가율 비교분석</li> <li>백신균주와 상업용 백신으로 접종된 실험동물에서 분비되는 야행성 H9N2 바이러스의 함량 비교</li> <li>백신후보균주들에 의해 면역화된 실험동물의 조직에서 유도되는 염증반응 비교분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>점막용 adjuvant에 의해 유도되는 면역반응 분석</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>백신후보균주와 PEI에 의해 유도되는 체액성 면역반응(IgG 역가) 확인</li> <li>백신후보균주와 PEI에 의해 유도되는 세포성 면역반응(sIgA 역가) 확인</li> <li>백신균주들과 PEI에 의해 면역화된 실험동물에서 분비되는 야행성 H9N2 바이러스의 함량 비교 및 폐 조직에서의 염증반응 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>대량배양을 통한 시험백신의 생산 및 안정성시험</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험백신의 대량배양 및 채득</li> <li>Bacteria bulk의 순수시험 및 역가확인</li> <li>시험백신의 동결건조 및 표준화</li> <li>일반시험: 특성시험, 진공도시험, 수소이온농도시험, 합습도 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 순수시험, 균수시험, 안전시험</li> <li>항원량 결정시험: 시험백신의 함량에 따른 효능평가</li> <li>저병원성 조류인플루엔자의 공격접종에 대한 방어력 및 조직학적 분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>야외임상시험계획서 제출</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>야외임상시험을 위한 시험백신의 함량 결정</li> <li>야외임상시험계획서 제출</li> </ul>

## 제2절 기대성과 및 파급효과

- 개발하고자 하는 LPAI-salmonella 생백신은 subunit vaccine보다 세포내기생 세균인 살모넬라에 대한 세포성 면역을 효과적으로 유도할 것으로 기대되며, 점막 면역 역시 생균 살모넬라를 이용하여 우수할 것으로 기대됨. 또한 협동연구기관에서 고병원성 조류 인플루엔자인 H7N1을 이용한 연구를 수행했고 연구 결과도 발표했기 때문에 본 연구를 통해 개발된 기술을 응용한 고병원성 조류 인플루엔자 백신도 단시간에 개발이 가능할 것으로 기대됨.
- 2014년 IBIS World 보고서 자료에 의하면, 미국 동물 생명 공학 산업은 연평균 9.1%로 증가해 2019년에는 시장규모가 122억 달러에 이를 것으로 전망했으며 관련 산업제품 수입량 또한 지속적으로 증가될 것으로 예상했음.
- 특히 각종 질병으로부터 축산업 가축 동물을 보호하기 위해 2013년 미국 동물 의약품 백신 수입규모는 전년 대비 41.7% 증가한 908만 달러로 보고됨. 미국 내 주요 경쟁사로는 Merck and Co. Inc.(8.8%), Zoetis Inc.(6.6%), Sanofi(6.3%), Bayer AG(6.1%) 등이 있으며, 그 외 수출업체 및 미국 내 중소기업으로 구성되어 있고 한국 제품에 대한 인지도가 낮은 편이기 때문에 본 연구를 통한 안정적인 효과적 백신 개발은 한국 제품 품질에 대한 신뢰도를 높여 수출까지 이어질 수 있음.
- 한국과 교역하는 아세안 국가 중 교역 규모 2위를 차지하고 있는 베트남은 육류 소비량이 점차 증가 추세에 있기 때문에 가축 사육두수가 점차 확대될 계획이며 특히 가금류의 경우 돼지 다음으로 증가했음.
- 조류 독감 발생으로 인한 생산량 감소와 더불어 소비자의 가금류 구매 심리가 위축되는 경우도 있으나 일반적으로 매년 증가 추세이므로 지속적으로 발생하는 질병에 대한 예방책 일환으로 효과적인 백신 접종이 이루어진다면 산업화에 따른 수출은 가능하리라 예상됨(출처: 베트남의 돼지고기 및 닭고기 시장현황과 축산물 및 동물검역조건조사, 2015, GSP중축사업단 건국대학교).
- 미얀마의 가축 및 가금류 생산량은 인구 증가와 더불어 늘어나고 있으며 특히 닭이 다른 가금류들에 비해 가장 많이 사육되는 것으로 보고됨. 또한 전문적인 부화장을 이용하지 않고 근처 다른 농가에서 구입한 초생추를 많이 사육하고 있어서 질병에 취약해 농가에 큰 손실을 보이는 것으로 예상됨에 따라 질병 예방이 가능한 효과적인 백신의 사용은 산업화 수출로 이어질 수 있음(출처: 미얀마 양계산업 현황, 2016, GSP중축사업단 건국대학교)

### 제3절 목표 미달성 시 사유 및 차후대책

#### 1. 세포표면발현기술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신의 상용화 미달성에 대한 사유와 차후대책

##### 가. 목표 미달성 원인

- 백신후보균주를 선발하였고 백신균주의 안전성 및 효능을 확인하였으며, 선발된 백신균주를 이용하여 시험백신을 제조하였음.
- 생산된 시험백신에 대한 안정성 및 효능을 확인하였고, 시험백신을 이용하여 전임상시험(항원량결정시험 및 공격접종시험)을 진행하였음.
- 이러한 결과들을 바탕으로 야외임상시험계획서를 작성하여 검역본부에 제출하였음.
- 백신후보균주에 대한 기술이전이 늦어져 시험백신에 대한 생산 및 이후 과정이 늦게 진행되었으며 상용화를 위해서는 야외임상시험과 제품에 대한 품목허가 과정이 필요한 상황임

##### 나. 차후 대책

- 야외임상시험계획에 대한 보완을 거쳐 야외임상시험을 진행할 예정임.
- 야외임상시험 진행 후 시험결과를 토대로 제품에 대한 품목허가를 승인 받아 조류인플루엔자 및 가금티푸스 동시 방어용 백신을 세계 최초로 상용화할 계획임.
- 백신 제품화를 위해 LMO 안전성시험(환경위해성 평가)을 진행할 계획임. 이를 위해 관련부처인 국가연구안전관리본부 및 검역본부와 논의 중에 있으며, 환경위해성 평가를 수행할 수 있는 외부업체를 확인 중에 있음.
- 백신의 생산성 및 경제성을 개선하기 위해 본 과제를 통해 개발된 5 L 스케일의 대량배양 조건을 스케일업해서 기존 배양조건과의 생산효율을 비교분석할 예정이고, 실제 생산을 위한 최적화된 배양조건을 재확립할 예정임. 이를 통해 생산성을 더욱 높일 수 있을 것으로 사료됨.
- 또한, 백신의 면역력 지속성을 높이기 위해 본 과제를 통해 개발된 어쥬번트 외 추가적인 어쥬번트 개발을 수행할 계획임. 개발될 가금류 불활화백신용 어쥬번트는 현재, 진행 예정인 야외임상시험에서는 사용할 수 없으나, 추후 개발될 가금티푸스 백신에 사용할 수 있을 것으로 판단됨.

## 제5장 연구결과의 활용 계획

### 제1절 연구개발 결과의 활용방안

- 세계동물보건기구(OIE)에 따르면, 백신을 접종한 가금농장들에서 조류 인플루엔자 바이러스가 장기간 유행할 경우 백신에 의해 형성된 면역이 바이러스의 변이를 촉진시켜서 새로운 변종 바이러스가 출현할 가능성이 높아진다고 하고 이는 멕시코, 중국, 이집트, 인도네시아 등의 국가에서 실제 발생하고 있는 현상임. 또한 긴급 백신에 대한 대비와 백신 개발 및 절차가 부족하다는 문제점을 극복하기 위해 단시간 내 효과적인 백신 제조가 가능한 본 연구 기술 이용이 가능함.
- 2016년 상반기 러시아 동물의약품 수입시장 상위 15위 제품 점유율 및 성장률을 보면 Nobilis(Merck animal Health)가 6.4%로 1위를 차지할 만큼 가금류에 대한 백신의 중요성이 높아지고 있음을 알 수 있는데 현재 상용화 되어 있는 가금티푸스 예방용 생균 백신인 SG9R의 안전성 문제로 새로운 백신 연구 및 개발이 필요함. 또한 유산균에 항원을 발현시킨 경구투여용 조류 인플루엔자 예방 백신에 대한 연구가 최근 많이 보고되고 있는 상황으로 본 연구기술에 사용되는 비병원성 살모넬라 균주 이용은 유산균을 이용한 조류 인플루엔자 백신과 비교했을 때 하나의 백신으로 두 가지 질병을 예방하는 데 도움을 줄 수 있다는 측면에서 활용도가 높음.
- 본 연구개발 결과를 토대로 2차년도에 “비병원성 살모넬라 균주 세포표면발현형 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 예방용 경구 백신 조성물” 특허 출원 및 이후 3차년도에 특허 등록을 하였음.

### 제2절 제품 및 시장분석

#### 1. 생산 및 시장현황

##### 가. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 조류 인플루엔자 백신의 경우 단일 혹은 혼합 형태의 불활화 백신으로 공급 중이며 H9N2 저병원성 조류인플루엔자 예방에 Newcastle disease (ND), Infectious Bronchitis (IB), Egg drop syndrome (EDS) 예방 백신과 혼합 형태의 백신 판매에 집중되어 있고 근육 접종 방식을 사용함. (주)중앙백신연구소에서는 포울샷 BBNE+Flu H9N2 또는 포울샷 Flu H9N2+ND 제품을 판매 중이며 전부 사독 백신임.

- 독십자 수의협회에서는 FLU-ND H9N2, FLU ABBN H9N2, Flu ABBNE Plus, FLU ABEN를, 코미팜에서는 PRO-VAC<sup>®</sup> ABBN, PRO-VAC<sup>®</sup> ABBNE, PRO-VAC<sup>®</sup> ABNE, PRO-VAC<sup>®</sup> AINK 제품을 판매 중이며 이 또한 전부 사독 백신임(출처: the Center for Food Security&Public Health vaccines: Avian influenza).
- 가금티푸스의 경우 9R VAC은 영국의 드레곤 바이오테크놀러지 연구소 지원을 받아 (주)코미팜에서 개발한 제품으로 9R 생독건조백신임(라이브 뉴스, 2009.03.18). *Salmonella gallinarum* 9R주 생균이 2X10<sup>7</sup> CFU 이상 함유되어 있어 1명 당 1000수 접종 가능하며 피하 접종함. (주)코미팜의 경우 2017년 분기보고서를 통해 3분기 매출액이 소폭 늘어났고 영업이익은 흑자 전환했다고 발표했으나 증가된 PAX-1 외 부문 매출액에서 9R VAC이 차지하는 부분을 확인할 수 없음(그림 1).

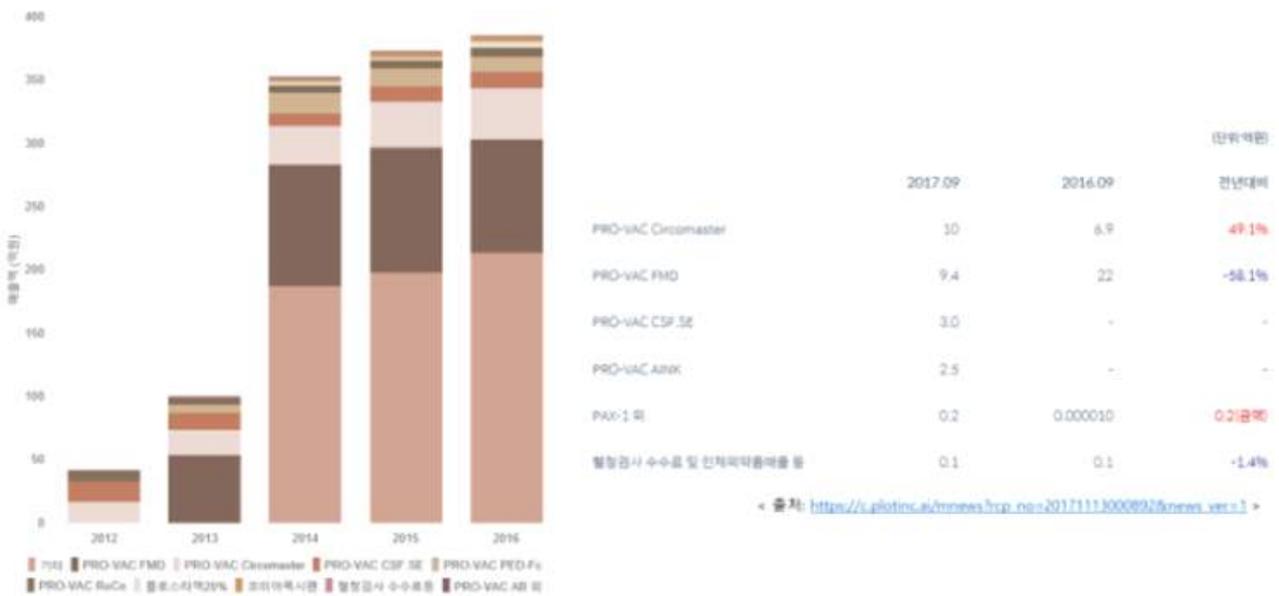


그림 1. (주)코미팜 최근 5년 부문별 매출액 추이 및 전년 동기 대비 매출 비교

- 포울샷 S/9R은 (주)중앙백신연구소에서 개발한 가금티푸스 예방 생균백신으로 1956년 Dr. Williams Smith에 의해 개발된 백신주를 2004년 국내에 도입해 상용화한 백신임(축산경제신문, 2008.04.25.). 1수분 당 가금티푸스균(9R주) 2X10<sup>7</sup> CFU 이상이며 경부피하에 주사하는 방식으로 6~8주령에 1차 접종 후 12주 뒤에 2차 접종을 함. 매출액을 보면 전년 동기 대비 16.5% 감소했고 순이익 또한 2016년 증가했다가 2017년 다시 감소하였음(그림 2). 품목별 매출액 추이에 대한 보고가 없어서 포울샷S/9R의 매출 정도를 확인할 수 없음.



그림 2. (주)중앙백신연구소 최근 5년 추이 및 전년 동기 대비 매출 비교

- 녹십자 수의약품주식회사에서는 판매중인 가급티푸스 전용 예방 백신은 없고 대장균과 살모넬라 등에 의한 세균성 장염 예방 치료제로 녹수 콜리스틴 골드(콜리스틴 황산염)를 판매 중이며 사료에 혼합하여 투여함.
- 대성 SR2 치큰백은 (주)대성미생물연구소와 (주)바이오포아, (주)인트론바이오테크놀로지 및 서울대학교 수의과대학이 공동 연구를 거쳐 개발한 가급티푸스 생백신임(축산경제신문, 2009.04.24.). SG 주요 병원성 유전자 중 최소 2개(SPV 유전자, LPS 변이)를 결손시켜 만든 약독화 백신으로 6주령 이전에 1차 피하 주사 접종한 뒤 12주 간격으로 재접종함. 매출액을 보면 전기 대비 감소했음(그림 3). 품목별 매출액 추이에 대한 보고가 없어서 SR2 치큰백의 매출 정도를 확인할 수 없음.

	2017년 3분기		2017년 2분기		2016년 3분기	
	당기 실적	전기 실적	전기 대비 증감률	전년 동기 실적	전년 동기 대비 증감률	
매출액	63억원	68억원	-7.4%	76억원	-17.5%	
영업이익	3.4억원	10억원	-65.8%	12억원	-71.8%	
당기순이익	3.4억원	9억원	-62.3%	8억원	-58.8%	



그림 3. (주)대성미생물연구소 2017년 3분기 실적

- 통계청 자료 가축동향조사 결과에 따르면 2017년 1분기 산란계는 AI 발생으로 인한 폐사 증가 및 입식 제한 등에 기인해 5,160만 8천 마리로 전년 동기 대비 1,857만 마리(26.5% 감소) 감소되었으며 육계는 7,933만 2천 마리로 전년 동기 대비 720만 9천 마리(8.3% 감소)가 감소함(그림 4).

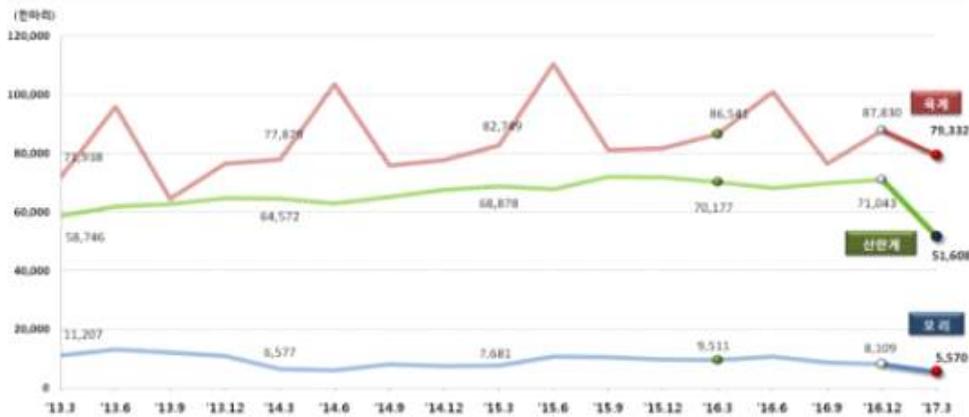


그림 4. 닭(산란계, 육계) 사육마릿수 동향

#### 나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 아래 표에서 보는 바와 같이 조류 인플루엔자 예방 백신을 판매 중인 회사 대부분은 ND와 조류 인플루엔자 strain 혼합 형태의 백신 제품을 판매 중임. Merial 사에서 판매 중인 H5 Fowl Pox Vectored를 이용한 Trovac AIV-H5 제품만 생백신이고 그 외 표에 명시하지 않은 회사들(Guangdong Wens Dahuanong Biotechnology Co., Ltd., Jordan Bio-Industries Center (JOVAC), Liaoning Yikang Biological Corporation Ltd. 등)에서 판매하는 제품들은 대부분 ND 또는 IB와 혼합 형태의 주사 제형 사독 백신임(출처: the Center for Food Security&Public Health vaccines: Avian influenza).

표. 조류 인플루엔자 백신을 판매 중인 국외 회사

Company	Product	Type
Avimex Animal Health(Mexico)	H5N2 A, H7N3, H5 strain 이용. ND와 혼합 백신도 판매.	사독 백신
Boehringer Ingelheim International GmbH	H5N2 A strain 이용. ND와 혼합 백신도 판매.	사독 백신
CEVA Biomune Animal Health	H5N2, H9N2, H5, H7N3 strain 이용. ND와 혼합 백신도 판매.	사독 백신
Intervac (PVT) Ltd.	H7, H9 serotype strain 이용.	사독 백신
Merck Animal Health (MSD Animal Health)	H9N2, H5N2 strain 이용. ND와 혼합 백신도 판매.	사독 백신
Zoetis	H5N1 strain 이용.	사독 백신

< 출처: the Center for Food Security&Public Health vaccines: Avian influenza >

- Labovet 사에서 개발한 가금콜레라와 가금티푸스 예방을 위한 사독백신이 존재하나 strain에 대한 정보는 알 수 없으며 Biovet, CEVA Biomune Animal Health, Farmacológicos Veterinarios S.A.C. (FARVET), Jordan Bio-Industries Center (JOVAC) 등 다수의 국외 회사에서 가금티푸스 예방용 백신으로 *S. gallinarum* 9R 균주를 이용한 생백신 제품을 판매 중임(출처: the Center for Food Security&Public Health vaccines: Avian influenza). 그 중에서 Nobilis SG9R 제품은 Merck Animal Health (MSD Animal Health)에서 출시한 가금티푸스 생백신으로 2001년에 출시함. 살모넬라 갈리나럼 9R주를 1수분 당  $2 \times 10^7$  CFU 이상 함유해 판매 중이며 6주령의 닭에 1차 피하 접종 후 12주 뒤 2차 접종을 실시함.

### 제3절 제품기술의 산업화 방향 및 기대효과

- 본 연구과제를 통해 개발하고자 하는 백신은 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 단백질인 HA2, M2e 그리고 닭의 CD154를 비병원성 살모넬라 변이체 세포 표면에 발현시킨 저병원성 조류인플루엔자 및 살모넬라 균주 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신으로 해마다 변하는 조류 인플루엔자 바이러스의 다양한 type을 포괄적으로 방어가 가능한 백신을 만들고자 함.
- 가금티푸스 원인체인 *Salmonella gallinarum* 균주의 유전자들을 결실시켜 비병원성 균주로 만들어 생균 형태로 가금티푸스 예방 차원의 백신으로 사용하고자 하며 이 비병원성 살모넬라 변이체의 세포 표면에 조류 인플루엔자 바이러스 단백질인 HA2, M2e 그리고 닭의 CD154를 발현시켜 하나의 백신으로 여러 항원을 노출시켜 면역 반응을 동시에 유도하고자 함. 본 연구과제를 통해 개발된 백신은 국내·외 다양한 가금농장에서 사용이 가능하며 현재 사용되는 주사 제형의 백신이 아닌 경구 투여가 가능한 백신으로 편리성까지 더한 효과적인 백신이 되리라 예상함.
- 본 연구에서 제작된 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 생균 백신 및 항원과 함께 사용된 점막면역반응을 유도 할 수 있는 보조제 PEI를 사용한 면역 반응에 있어 기존 상업적으로 판매가 이루어지는 사독백신으로 면역화가 진행된 그룹과 비교하여 백신 접종의 용의성을 확인 할 수 있었고 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스와 살모넬라 동시 방어가 가능하다는 장점을 지니고 있어 개발될 백신은 상당한 가치가 있음.
- 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스 항원을 발현하는 숙주세포 시스템을 사용하여 있는 백신 후보 균주는 경구 접종이 가능하기에 기존 근육주사로 면역화를 진행해야하는 기존백신의 다양한 문제점을 보완 할 수 있다는 장점이 있음.

## 붙임. 참고문헌

1. Lamb RA, Zebedee SL, Richardson CD. 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*. 40: 627-633.
2. De Filette M, Fiers W, Martens W, Birkett A, Ramne A, Lowenadler B, Lycke N, Jou WM, Saelens X. 2006. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine*. 24: 6597-6601.
3. Franca MS, Brown JD. 2014. Influenza pathobiology and pathogenesis in avian species. *Curr Top Microbiol Immunol*. 385:221-242.
4. Olson MR, Seah SG, Edenborough K, Doherty PC, Lew AM, Turner SJ. 2014. CD154+ CD4+ T-cell dependence for effective memory influenza virus-specific CD8+ T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 92:605-611.
5. Layton SL, Kapczynski DR, Higgins S, Higgins J, Wolfenden AD, Liljebjelke KA, Bottje WG, Swayne D, Berghman LR, Kwon YM, Hargis BM, Cole K. 2009. Vaccination of chickens with recombinant Salmonella expressing M2e and CD154 epitopes increases protection and decreases viral shedding after low pathogenic avian influenza challenge. *Poult Sci* 88:2244-2252.
6. Ashraf S, Kong W, Wang S, Yang J, Curtiss R. 2011. Protective cellular responses elicited by vaccination with influenza nucleoprotein delivered by a live recombinant attenuated Salmonella vaccine. *Vaccine*. 29: 3990-4002.
7. Hajam IA, Lee JH. 2017. An influenza HA and M2e based vaccine delivered by a novel attenuated Salmonella mutant protects mice against homologous H1N1 infection. *Frontiers in Microbiology*. 8: 872-885.
8. Hajam IA, Kim JH, Lee JH. 2018. Salmonella Gallinarum delivering M2eCD40L in protein and DNA formats acts as a bivalent vaccine against fowl typhoid and H9N2 infection in chickens. *Veterinary Research*. 49:1-14.
9. Hajam IA, Kim JH, Lee JH. 2019. Intranasally administered polyethylenimine adjuvanted influenza M2 ectodomain induces partial protection against H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 209: 78-83.
10. Hajam IA, Kirthika P, Hewawaduge C, Jawalagatti V, Park SW, Senevirathne A, Lee JH. 2020. Oral immunization with an attenuated Salmonella Gallinarum encoding the H9N2 haemagglutinin and M2 ectodomain induces protective immune responses against H9N2 infection in chickens. 49: 486-495.

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 세포표면발현기술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 HA2-M2e-CD154-SG백신 개발					
	(영문) Development of HA2-M2e-CD154-SG vaccine for the protection of low pathogenic avian influenza and fowl typhoid					
주관연구기관	우진비앤지(주)		주 관 연 구	우진비앤지(주) 백신팀		
참 여 기 업	우진비앤지(주)		책 임 자	김 정 한		
총연구개발비  (천원)	계	733,334 천원	총 연 구 기 간  총 참 여 연 구 원 수	2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31(2년 8월)		
	정부출연 연구개발비	550,000 천원		총 인 원	17	
	기업부담금	183,334 천원		내부인원	14	
	연구기관부담금	-		외부인원	3	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 단백질인 HA2 및 M2e 그리고 닭의 CD154를 비병원성 살모넬라 변이체의 세포 표면에 발현시켜 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 동시 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발 및 상용화.</li> <li>- 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 유전자원과 비병원성 살모넬라균을 사용해 백신 접종 후 부작용을 최소화하고 면역원성을 높여 백신으로서 효능을 극대화하였음.</li> <li>- 세계적으로 매년 유행하고 있는 조류인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 빠르게 대응할 수 있는 효과적인 백신개발 플랫폼을 제공하였음.</li> <li>- 주사 접종으로 인한 백신 접종방법의 어려움을 극복하기 위해 경구 투여에서도 효과적인 백신제형을 개발함으로써 일반 가축 농가에서도 손쉽게 사용할 수 있음.</li> </ul> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내에서 유행하는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 적용 가능한 항원의 유전적 서열 확보 및 최적 항원을 선별.</li> <li>- In vitro 상에서 선별된 항원의 발현여부를 개발된 백신 균주로부터 확인.</li> <li>- 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신 후보 균주의 안전성(safety) 및 면역원성 평가.</li> <li>- 경구 투여 및 호흡기 투여를 위한 제형 최적화.</li> <li>- 대량배양조건 확립을 통한 시험백신의 생산 및 안정성시험 완료.</li> <li>- 전임상시험을 통해 저병원성 조류인플루엔자에 대한 야외임상시험 신청을 완료.</li> </ul> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 백신의 사용으로 인해 매년 발생하는 조류인플루엔자를 효과적으로 방어하여 살처분으로 소모되는 비용을 약 200억원 이상 감소할 수 있을 것으로 예상됨.</li> <li>- 선제적인 백신 사용으로 질병 발생률을 낮춰 바이러스의 장기간 유행을 막고, 이로 인한 바이러스 변이를 억제할 수 있을 것으로 판단됨.</li> <li>- 본 백신의 개발을 통해 베트남을 중심으로 한 동남아에 연 100억원 이상의 수출확대효과를 기대할 수 있음.</li> <li>- 경구 투여가 가능한 제형으로 인해 가축 농가에서 손쉽게 사료에 혼합해 사용이 가능할 것임.</li> </ul>						

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		118055	
사업구분	농생명산업기술개발 사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	세포표면발현기술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발			과제유형	응용
연구기관	우진비앤지(주)			연구책임자	김 정 한
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018. 04. 26 ~ 2018. 12. 31	150,000 천원	50,000 천원	200,000 천원
	2차연도	2019. 01. 01 ~2019. 12. 31	200,000 천원	66,667 천원	266,667 천원
	3차연도	2020. 01. 01 ~2020. 12. 31	200,000 천원	66,667 천원	266,667 천원
	계	2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31	550,000 천원	183,334 천원	733,334 천원
참여기업	우진비앤지(주)				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

### 2. 평가일 :

### 3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
우진비앤지(주) 백신팀	이 사	김 정 한

### 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.

확 약	김 정 한
-----	-------

# 1. 연구개발실적

## 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

본 연구는 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 단백질인 HA2 및 M2e 그리고 닭의 CD154를 비병원성 살모넬라 변이체의 세포 표면에 발현시켜 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스를 동시 방어할 수 있는 백신 개발 및 상용화를 목표로 진행하였음. 선별된 항원의 발현여부와 안전성 및 효능을 확인하였고, 시험백신을 생산하여 전임상시험을 통한 야외임상 시험계획서를 신청하였음. 본 연구과제를 통해 조류인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 빠르게 대응할 수 있는 효과적인 백신개발 플랫폼을 제공할 수 있음.

## 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

조류 인플루엔자와 가금티푸스의 동시 방어가 가능한 백신 생산기술의 개발을 통해 매년 발생하는 조류인플루엔자를 효과적으로 방어하여 살처분으로 소모되는 비용을 약 200억원 이상 감소할 수 있을 것으로 예상하며. 베트남을 중심으로 한 동남아에 연 100억원 이상의 수출확대 효과를 가져올 것으로 기대함.

## 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

조류인플루엔자와 가금티푸스의 동시 방어가 가능한 백신 생산기술은 세계적으로 매년 유행하고 있는 조류 인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 빠르게 대응할 수 있는 효과적인 백신개발 플랫폼을 제공할 수 있을 것으로 판단됨.

## 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

본 연구과제의 계획했던 목표를 완료하기 위해 성실히 연구를 수행하였음. 선별된 저병원성 조류인플루엔자 항원이 발현되는 비병원성 균주에 대한 특허를 등록하였고 기술이전을 통해 사업화를 준비하였음. 또한 해외 유명저널에 연구 성과를 게재하여 연구의 우수성을 홍보하였음.

## 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

당초 연구목표로 정했던 기술이전 및 학술성과를 모두 달성하였음. 또한 본 연구개발의 핵심기술에 대한 시장 우위를 선점하기 위해 지식 재산권을 확보하였고 활발한 연구 활동으로 당초목표를 충실히 수행하였음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 저병원성 조류인플루엔자 항원 선별 및 선별된 항원의 발현여부를 개발된 백신 균주에서 확인	20	20	- 국내 발병 사례의 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 유전적 서열 확보. - In vitro 상에서 선별된 항원의 발현여부를 개발된 백신 균주에서 확인.
○ 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신 후보 균주의 안전성(safety) 및 면역원성 평가.	20	20	- 백신후보 균주로 면역화된 실험 동물에서의 부작용 평가. - 백신후보 균주로 면역화된 실험 동물에서의 체액성 및 세포성면역 분석. - 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 공격접종에 대한 방어효과 분석
○ 백신 후보 균주에 대한 세포은행 확립.	15	15	- 세포표면발현형 HA2-M2e-CD154-SG에 대한 마스터 박테리아은행(MBB) 및 생산용 박테리아은행(WBB) 구축
○ 경구 투여 및 호흡기 투여를 위한 제형 최적화.	15	15	- 동결건조를 이용한 시험백신 제조. - 3가지 종류의 동결건조보호제로 제조된 시험백신의 세포수 비교를 통한 동결건조보호제 선정. - 전임상시험용 시험백신의 조성 확립.
○ 대량배양조건 확립을 통한 시험백신의 생산 및 안정성시험 완료.	20	20	- 시험백신의 대량배양 및 채득. - 시험백신의 동결건조 및 표준화. - 품질시험 완료: 특성시험, 진공도 시험, 수소이온농도시험, 합습도 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 순수시험, 균수시험, 안전시험. - 시험백신의 안전성 및 효능시험 완료.
○ 세포표면발현형 저병원성 조류인플루엔자 백신의 상용화	10	5	- 야외임상시험을 위한 시험백신의 함량 결정. - 야외임상시험계획서 작성 및 제출.
합계	100	95	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구과제는 당초 계획에 따라 성실하게 연구를 수행하였고 관련분야의 핵심기술에 대한 지식 재산권도 확보하였음. 또한 사업화를 위한 기술이전도 실시하였음. 특히, 조류 인플루엔자와 가금티푸스의 동시 방어가 가능한 백신 생산기술은 세계적으로 매년 유행하고 있는 조류인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 빠르게 대응할 수 있는 효과적인 백신개발을 위해 꼭 필요한 기술로서 높은 가치를 가지고 있다고 판단됨.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구과제의 최종목표는 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 단백질인 HA2 및 M2e 그리고 닭의 CD154를 비병원성 살모넬라 변이체의 세포 표면에 발현시켜 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스를 동시 방어할 수 있는 백신 개발 및 제품화하는 것임. 백신 개발이 완료되어 시험백신의 생산과 전임상시험을 완료하였으나, 추가적으로 야외임상시험이 진행되어야 제품화를 진행할 수 있음. 연구과제 기간 내 임상단계에 진입하지는 못 했지만, 과제종료 후에도 백신의 상용화를 위해 계속적으로 실험을 진행할 것임.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구과제를 통해 확보된 백신생산기술을 바탕으로 세계적으로 매년 유행하고 있는 조류인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 대해 선제적으로 대응할 수 있을 것이며 질병 발생률을 낮춰 바이러스의 장기간 유행을 막고, 바이러스 변이를 억제할 수 있을 것으로 판단됨. 또한 조류인플루엔자에 의해 살처분되는 가금류의 수를 획기적으로 감소시킬 수 있을 것으로 사료됨.

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	세포표면발현기술을 이용한 저병원성 조류인플루엔자 및 가금티푸스 방어용 HA2-M2e-CD154-SG 백신 개발			
주관연구기관	우진비앤지(주)	주관연구책임자	김 정 한	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	550,000 천원	183,334 천원	-	733,334 천원
연구개발기간	2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 저병원성 조류인플루엔자 항원 선별 및 선별된 항원의 발현여부를 개발된 백신 균주에서 확인	- 국내 발병된 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 유전적 서열 확보 및 In vitro 상에서 선별된 항원의 발현여부를 확인.
② 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스에 대한 백신 후보 균주의 안전성(safety) 및 면역원성 평가.	- 백신후보 균주로 면역화된 실험동물에서의 부작용 및 면역반응(체액성 및 세포성면역) 분석. - 야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 공격접종에 대한 방어효과 분석.
③ 백신 후보 균주에 대한 세포은행 확립 및 경구 투여 투여를 위한 제형 최적화.	- 세포표면발현형 HA2-M2e-CD154-SG에 대한 마스터 박테리아은행(MBB) 및 생산용 박테리아은행(WBB) 구축. - 시험백신의 세포수 비교를 통한 동결건조보호제 선정 및 전임상시험용 시험백신의 조성 확립.
④ 대량배양조건 확립을 통한 시험백신의 생산 및 안정성시험 완료.	- 시험백신의 대량배양 및 채득. - 시험백신의 품질시험 완료. - 시험백신의 안전성 및 효능시험 완료.
⑤ 세포표면발현형 저병원성 조류인플루엔자 백신의 상용화	- 야외임상시험을 위한 시험백신의 함량 결정. - 야외임상시험계획서 작성 및 제출

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	30	50											20						
최종목표	1	1		1	10 0	1	14 8,3 63	13, 57 3				2		3					
연구기간내 달성실적	1	1		1	10 0							2		3					
달성율(%)	10 0	10 0		10 0	10 0	0	0	0				10 0		10 0					

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 백신 개발 기술.
②	야생형 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 바이러스의 공격 집중에 의해 조직에서 유도되는 면역반응 분석 기술.
③	조류 인플루엔자와 가금티푸스의 동시 방어가 가능한 백신 생산 기술.
④	경구 투여 및 호흡기 투여용 백신의 제형 최적화 기술.

### 5. 연구결과별 기술적 수준

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

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	조류인플루엔자 및 감염성 질병들의 다양한 변종 병원체 출현에 빠르게 대응할 수 있는 효과적인 백신개발 플랫폼을 제공.
②의 기술	조류인플루엔자 백신의 효능평가를 위한 분석방법 및 기준 제공.
③의 기술	조류인플루엔자에 의해 살처분되는 가금류의 수를 획기적으로 감소시킬 수 있을 것으로 사료됨.
④의 기술	경구 투여가 가능한 제형개발로 인해 가축 농가에서 손쉽게 사료에 혼합해 사용할 수 있을 것임.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문	학술발표			정책 활용	홍보 전 시		
										SCI				비SCI	논문 평균 IF				
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	30	50											20						
최종목표	1	1		1	100	1	148,363	13,573					2						
연구기간내 달성실적	1	1		1	100								2						
연구종료 후 성과창출 계획						1	148,363	13,573											



### 주 의

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