

121006
-01

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004161-01

항상된 약독화 및 DIVA 가능한 생균백신과 안전성 및 면역원성이 증가된 가금티푸스와 살모넬라를 동시 방어 가능한 사균 백신의 개발

2021

2022.09.14

주관연구기관 / 우진비앤지(주)
협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

항상된 약독화 및 DIVA 가능한 생균백신과
안전성 및 면역원성이 증가된 가금티푸스와
살모넬라를 동시 방어 가능한 사균 백신의 개발

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “향상된 약독화 및 DIVA 가능한 생균백신과 안전성 및 면역원성이 증가된
가금티푸스와 살모넬라를 동시 방어 가능한 사균 백신의 개발”(개발기간 : 2021. 04. 01.
~ 2022. 03. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.09.14

주관연구기관명 : 우진비앤지(주)

강 석 진



협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 조 기 환



주관연구책임자 : 김 정 한

협동연구책임자 : 이 존 화

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[√], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		가축질병대응기술개발사업		
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원					내역사업명 (해당 시 작성)		동물의약품개발		
공고번호		제 농축2021-23호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
					연구개발과제번호		121006-01				
기술분류	국가과학기술표준분류	LB0710	60%	LB0702	30%	LB0701	10%				
	농림식품과학기술분류	RB0201	60%	RB0203	30%	RB0202	10%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		향상된 약독화 및 DIVA 가능한 생균백신과 안전성 및 면역원성이 증가된 가급티푸스와 살모넬라를 동시 방어 가능한 사균 백신의 개발							
		영문		Development of enhanced live attenuated vaccine with DIVA capability and inactivated vaccine against Fowl typhoid and <i>Salmonella</i> with increased safety and immunogenicity							
주관연구개발기관		기관명		우진비앤지(주)		사업자등록번호		124-81-14283			
		주소		(우 07299) 서울시 영등포구 경인로 775 에이스아이테크시티 1동 1504호		법인등록번호		124311-0014409			
연구책임자		성명		김 정 한		직위		이사			
		연락처	직장전화				휴대전화				
			전자우편				국가연구자번호				
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2022. 03. 31(12 개월)							
		단계		1단계		2021. 04. 01 - 2022. 03. 31(12 개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()		합계			연구개발비 외 지원금
		현금		현금		현금		현금		합계	
총계		261,000		-		37,000		-		298,000	
1단계 1년차		261,000		-		37,000		-		298,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		전북대학교		이존화		교수				비고 역할 기관유형	
연구개발담당자 실무담당자		성명		서 병 주		직위		부장			
		연락처	직장전화				휴대전화				
			전자우편				국가연구자번호				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022 년 08 월 17 일

연구책임자: 김 정 한 (인)

주관연구개발기관의 장: 강 석 진 (직인)

공동연구개발기관의 장: 조 기 환 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		동물의약품개발			연구개발과제번호		제 농축2021-23호
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	60%	LB0702	30%	LB0701	10%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	60%	RB0203	30%	RB0202	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		향상된 약독화 및 DIVA 가능한 생균백신과 안전성 및 면역원성이 증가된 가금티푸스와 살모넬라를 동시 방어 가능한 사균 백신의 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2022. 03. 31(12 개월)					
총 연구개발비		총 348,000 천원 (정부지원연구개발비 : 261,000천원, 기관부담연구개발비 : 87,000천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점기준() 종료시점목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	향상된 약독화 및 DIVA 가능한 생균백신과 안전성 및 면역원성이 증가된 가금티푸스와 살모넬라를 동시 방어 가능한 사균 백신의 개발					
	전체 내용	<p>○ 1994년 이후 전국적으로 발병하여 양계농가에 막대한 경제적 손실을 준 가금티푸스에 대한 대책 마련 시급</p> <ul style="list-style-type: none"> - 가금티푸스(Fowl typhoid: FT)는 닭 및 칠면조 등의 조류에서 발생하는 급, 만성 전염병으로서 모든 일령에 나타나는 패혈 증에 의한 높은 폐사율이 특징인 질병이며, 원인체는 살모넬라 균의 일종인 살모넬라 갈리나룸(<i>Salmonella gallinarum</i>, SG)이라 는 세균으로 알려져 있음. 상기 세균은 형태학적으로 그람음성 인 단간균으로 운동성이 없는 것이 특징임. 1900년대 초기에 전 세계적으로 발생하여 양계산업에 막대한 손실을 주었으며, 캐나다, 미국 및 일부 유럽국가 등 양계선진국에서는 국가적인 차원에서의 방역프로그램을 실시하여 그 발생이 매우 낮으나, 남미, 아프리카 및 동남아시아 등지에서는 최근에도 발생빈도 가 높은 것으로 보고되고 있음. 국내에서의 발생은 1992년 처 음 보고되었고, 최근에도 전국적으로 발병하여 양계농가에 막 대한 경제적 손실을 주고 있는 실정임. 농림축산검역본부의 통 계에 의하면 유럽에서 개발된 SG9R 이라는 생균백신을 현재 농가에서 사용하고 있음에도 불구하고 가금질병 중 가장 많이 발생하여 가금산업에 막대한 피해를 주고 있음. - 가금티푸스의 감염은 주로 감염계와의 접촉이나 감염된 모계 로부터 종란을 통한 후대 병아리의 수직 감염에 의해 이루어지 거나, 계사주변의 오염된 환경을 경유하여 전염될 수 있을 뿐 					

		<p>만 아니라 농장 내 감염계군에서 분변으로 배출된 균이 양계기 구나 음수, 사료 등을 통해 다른 계군으로 전염되기도 함. 닭이 가금티푸스에 감염되어 나타나는 일반적인 외부 증상으로는 빈혈, 침울 및 소화기 증상(녹변, 혈변, 또는 설사) 등이 있고, 그에 따라 사료 섭취율 및 산란율이 저하되며, 내독소에 의한 급성폐사나 빈혈 및 사료섭취 저하에 의한 만성폐사가 나타남.</p> <p>- 이러한 감염 예방의 중요성을 감안하고 현재 통용되는 백신의 문제점을 극복하고자, 농장단계에서 살모넬라 갈리나룸의 철저한 예방을 위해 <u>사균백신과 같은 안전성을 지닌 생균백신의 개발뿐만 아니라, 안전성과 증강된 면역원성을 지닌 사균 백신의 개발이 시급한 실정임.</u> 또한 농장단계에서 혈청학적 감별방법에 의한 살모넬라 감염진단을 하는 것을 고려 할 때 백신 접종군과 감염군의 감별이 가능한 <u>DIVA (differentiating infection in vaccinated animals)</u> 가능 백신 주의 개발은 백신의 현장 적용 시 그 실용성을 증가시킴에 따라 오진단율을 낮추는데도 크게 기여할 것으로 예상됨. 주요 양계 치사균인 살모넬라 갈리나룸 감염을 생산 단계에서 저감화하기 위해 DIVA 감별진단이 가능하며 외독성과 내독성이 사라진 약독화 살모넬라 생균 백신 및 생물형 면역력보강제 (adjuvant; SE-<i>FliC-fimA</i>)를 개발하고자 함. 또한 강화된 면역원성 및 방어효과가 생균 백신과 유사하고, holin-endolysin system을 적용하여 유전공학적으로 안전하게 자가용해 가능한 Ghost cassette (Holin-endolysin system)를 이용하여 살모넬라 갈리나룸과 살모넬라증을 동시에 예방할 수 있는 생균백신 및 사균 백신을 개발함으로써, 생체로의 감염원 자체를 없애는데 그 목적이 있음.</p>
	<p>1단계 (해당 시 작성)</p>	<p>목표</p> <p>기존 상용화된 생균백신과 사균백신의 한계를 극복하고 새로운 개념의 백신을 고안하여 가금티푸스와 살모넬라증을 동시 방어 가능한 획기적인 백신을 개발</p> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 독성관련유전자 <i>lon</i> 과 <i>cpxR</i> 및 LPS O-antigen 합성에 관여하는 <i>rfaL</i> 유전자의 결실을 통한 DIVA 감별진단이 가능한 살모넬라 갈리나룸 생균 백신 후보 제작. 생균백신 안전성 및 체액성 세포성 면역원성 조사 ○ 생물형 면역력보강제(adjuvant; SE <i>FliC-fimA</i>)를 통해 면역력을 강화하여 방어효과가 생균백신과 유사하고, 박테리오파지의 E-lysis와 holin-endolysin system을 적용하여 자가용해 가능하고 안전한 Ghost cassette (Holin-endolysin system)를 이용하여 살모넬라 갈리나룸과 살모넬라증 동시 예방용 사균 백신을 개발 - <i>lon</i> 과 <i>cpxR</i> 및 <i>rfaL</i> 유전자의 결실을 통해 안전성이 강화된 살모넬라 갈리나룸 생균 백신 시스템을 구축 - 면역증강 단백질 발현 살모넬라 고스트 사균백신 개발을 위해 이중 항원 세포벽 발현 벡터를 이용 생물형 TLR 기반 면역증강 단백질(adjuvant; SG-<i>FliC-fimA</i>)이 발현되는 살모넬라 고스트 사균화 시스템을 구축 - 신개념 생균 백신 및 고스트 사균 백신의 안전성과 효능 평가

			<ul style="list-style-type: none"> - 목적동물모델에서의 LPS-O antigen 결실 약독화 생균백신과 야외균주의 DIVA 감별진단 유효성조사 - 신개념 생균 및 고스트 사균백신 방어 효능 최적화 확립 ○ 백신 시드의 마스터 세포은행(MCB)과 제조용 세포은행(WCB) 구축 및 대량배양조건 확립 ○ 전임상시험용 시험백신 제조 및 품질시험 완료
--	--	--	--

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> • 특허출원 : 국내 특허출원 1건 • 기술이전 : 전용실시권 1건 • 논문게재 : 국외 SCI(E) 학술논문 2건 • 학술발표 : 국제학술대회 3건 • 수상실적 : 우수초록상 1건 • 연구인력양성 : 박사학위 1명 • 홍보실적 : 국내기사 3건 • 경제사회파급효과 : 고용창출 2건
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - DIVA 가능한 균주 개발을 통해 안전성이 향상된 생균백신 시스템 개발 - 이중 항원 발현 유전자 기술을 통한 맞춤형 백신개발 가능 - 살모넬라 갈리나룸 생균백신 수준의 극대화된 방어력을 확보한 사균 백신 개발 기술 확보 및 방어 효과 증명 가능 ○ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 백신시스템을 통해 가금티푸스와 살모넬라증에 의한 살처분의 최소화로 인해 경제적 손실 예방 및 생산성 증대로 축산산업의 국제 경쟁력 강화 - 살모넬라 갈리나룸 저감 백신 및 항생제 대체 첨가제로의 응용으로 안정적인 공급, 수입 대체 절감 효과 및 시장 선점 효과 - 안전한 축산물 생산·공급을 통한 소비자 신뢰 확보 및 소비 증대 ○ 사회적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 공중보건학적으로 문제가 되고 있는 살모넬라증에 대한 인체감염원을 동시방어할 수 있는 백신개발로 식품유래 질병에 대한 국민의 불안감 해소 가능 - 안정성이 향상된 생균 백신의 개발로 축산 농가의 살모넬라 갈리나룸 예방 수단의 다양화 도모 가능
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명정보	생물자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	가금티푸스		살모넬라증		동물용 백신		약독화 생백신		불활화 백신			
영문핵심어 (5개 이내)	Fowl typhoid		Salmonellosis		Animal vaccine		Live attenuated vaccine		Inactivated vaccine			

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	08
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용	15
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	31
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	58
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	59
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	60
※ 별첨자료 (증빙서류 및 참고문헌)	61

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구 개발과제의 필요성

- 가금티푸스(Fowl typhoid :FT)는 닭 및 칠면조 등의 조류에서 발생하며 특히, 육용종계 및 갈색계의 모든 일령에 나타나고 주로 감염된 병아리에 의해 전파되는 패혈증으로 인해 높은 폐사율을 보이는 급, 만성적 단계 전염병이다. 원인체는 살모넬라균의 일종인 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*, SG)으로 알려져 있으며 상기 세균은 형태학적으로 그람음성인 단간균으로 운동성이 없는 것이 특징이다. 1900년대 초기에 전 세계적으로 발생하여 양계산업에 막대한 손실을 주었으며, 캐나다, 미국 및 일부 유럽국가 등 양계선진국에서는 국가적인 차원에서 방역프로그램을 실시하여 그 발생이 감소하였으나, 남미, 아프리카 및 동남아시아 등지에서는 최근에도 발생빈도가 높은 것으로 보고되고 있다.
- 국내에서의 발생은 1992년에 처음 보고되었으며, 농림축산검역본부의 통계 (2017, 그림1)에 의하면 최근 해마다 국내 평균기온이 상승함에 따라 전국적으로 꾸준히 발병하여 양계농가에 막대한 경제적 손실을 주고 있는 실정이다. 또한 닭 진드기에 의해 살모넬라균이 운반됨에 따라 닭에 티푸스와 살모넬라증을 유발하고 이는 곧 닭이 집단 폐사하는 주요 원인으로 작용하고 있다. 현재 유럽에서 개발한 SG9R 이라는 생균백신을 농가에 사용하였음에도 불구하고 충분하지 못한 방어력과 병원성이 복원되는 등 효과가 제한적이며 항생제 등의 치료약으로도 완치가 되지 않고 항생제 내성으로 인한 한계에 달하고 있어 방제에 어려움이 많은 상황이다.

- 또한 살모넬라 감염증은 조류 및 전 세계 대부분 국가에서 공중보건학적 문제로 여겨지고 있고 미국의 경우 매년 약 400만 명에 달하는 사람들이 살모넬라균에 감염되고 있으며, 축산식품에서 식중독 발생과 가장 밀접하게 연루된 원인균의 대부분이 살모넬라균이라는 사실이 국내 연구진에 의해 알려져 있다(그림 1). 살모넬라 감염증의 주원인균으로 알려진 엔테라이티디스

(*Salmonella Enteritidis*, SE)는 조류 및 가축에서 질병을 일으킬 뿐만 아니라 감염된 육류와 가금류 등의 식자재를 사용한 덜 익힌 음식을 섭취했을 때에도 사람에게 전파되어 살모넬라 식중독을 일으키는 등 전 세계 대부분의 국가에서 공중보건학적 문제로 여겨지고 있다. 국내 연구조사 결과에 따르면 식중독에 감염된 사람에서의 분리빈도가 높은 혈청형인 살모넬라 엔테라이티디스(17; 47.2%)와 육계에서의 분리빈도가 높은 살모넬라 엔테라이티디스(14; 21.9%)가 일치하는 것으로 확인되었다(cheong,



자료: 경희대 식품영양학과 윤기선 교수팀
 그림1. 2008~2012년 식중독 원인균 빈도 비교
 (식품의식경제 <http://www.foodbank.co.kr>)

et al., J Korean Med Sci. 2007). 미국에서도 매년 4백만 명 이상이 살모넬라균에 감염되며 유럽의 식중독 감염원 통계에서도 확인된 병원체 중 약 21.8%가 살모넬라로 가장 많이 발생한 것으로 보고되어 있다. 발생한 살모넬라 혈청형 중 엔테라이티디스가 50%정도를 차지하여 인체에 살모넬라증을 유발하는 혈청형은 엔테라이티디스가 압도적으로 우세함을 알 수 있다.

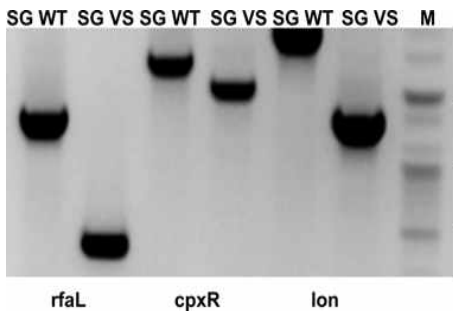
- USDA Economic Research Service (ERS)은, 살모넬라증에 의해 매년 지출되는 의료비용과 가축의 경제적 손실비용이 약 1조 2천억 원에 달한다고 보고하였다. 우리나라에서 육계의 경우 27% (축산경제, 2006.11.02.), 오리의 경우 47.4% (2011년 농림수산검역검사본부 연보, 2012)인 것으로 보고되고 있다.

- 항생제 없이 가축위생을 유지할 수 있는 적합한 백신의 수요가 증가하고 있는 상황이다. 또한, 현재 항생제의 첨가가 금지된 상황에서 예방에 차질이 생길 수 있기에, 해외에서 사균 백신을 수입하여 사용하고 있다. 범용으로 사용되고 있는 엔테라이티디스 백신을 포함하여 여러 연구팀에 의해 개발된 백신에 이르기까지, 모두 동물에서의 감염만을 감소시킬 뿐 축산물 오염을 완전히 방어할 수 있는 만족스러운 수준의 백신이 현재까지 존재하지 않는다. 따라서 축산물 오염을 충분히 방어할 수 있는 백신을 개발한다면, 향상된 효과를 지닌 국산 백신 생산이 가능해질 것이며 이로 인해 상당한 부가가치를 창출할 수 있다.
- 현재 이용 가능한 가금티푸스 및 살모넬라증 백신은 크게 생균백신과 사균백신이 있다. 생균백신은 일반적으로 야생형 균주를 화학물질이나 항생제, 배양온도조건 등을 이용한 계대배양법 또는 특정유전자 조작법으로 약독화 하여 세포성 면역을 효과적으로 활성화 할 수 있다. 그러나 변이균주(mutant)로 인해 농장 내 오염의 우려가 있으며 인체에 대한 악영향이 있는 문제점이 있다. 한편 사균백신이나 subunit 백신의 경우 생균과 같은 안전성의 우려는 없지만 가금티푸스의 예방에 있어서 세포성 면역반응 활성이 미약하므로 충분한 방어력을 보이지 못하는 것으로 알려져 있다.
- 이러한 가금티푸스 및 살모넬라 감염 예방의 필요성이 중요해짐에 따라 양계농가 단계에서 가금티푸스 및 살모넬라증의 효과적인 예방을 위해 사균백신과 같은 안전성을 가진 약독화 생균 백신의 개발뿐만 아니라, 향상된 안전성과 면역원성을 지니며 동시예방이 가능한 사균 백신의 개발이 절실하다.
- 또한 양계농장 단계에서 생균백신 적용의 한계로 작용했던 백신균주와 야생균주의 혈청학적 감별 방법에 의한 감염 진단을 고려하였을 때, 백신 균주와 야생 균주에 의한 감염군을 감별할 수 있는 DIVA (differentiating infection in vaccinated animals) 가능 약독화 생균 백신주의 개발은 생균 백신의 현장 적용 시 그 실효성을 증가 시킬 수 있다.

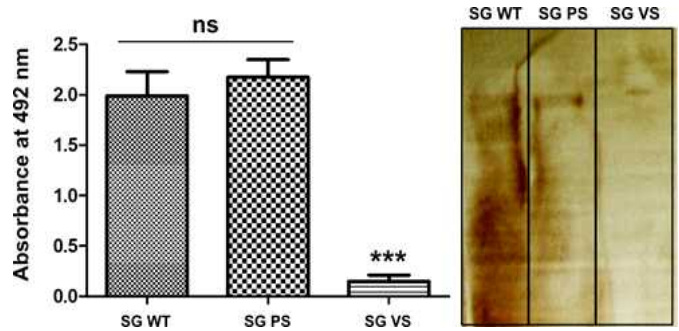
2) 본 연구팀의 선행기술

가. 약독화 생균백신 개발을 위한 LPS 관련 O-antigen 결실 가금티푸스 백신 후보균주 제작

- ① ***rfaL* 결실 살모넬라 갈리나룸 백신 후보균주 제작** - lambda red 결실 방법을 이용하여 선행 연구에 의해 제작된 SG Δlon , $\Delta cpxR$ 변이주로부터 *rfaL* 유전자를 결실한 후 *lon*, *cpxR*, *rfaL* 특이 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 각 유전자의 결실을 확인한다.
- ② ***rfaL* 결실 살모넬라 갈리나룸 백신 후보균주 특성 확인** - 야생형 균주(SG WT)와 모균주(SG $\Delta cpxR \Delta lon$, SG PS)를 이용하여 *rfaL* 유전자 결실에 의한 LPS의 O항원 결실을 ELISA와 western blot을 통해 확인한 결과 변이균주(SG VS)에서 O항원의 활성이 낮게 보였으며 항원 특이 밴드가 관찰되지 않기에 성공적으로 결실되었음을 알 수 있다.

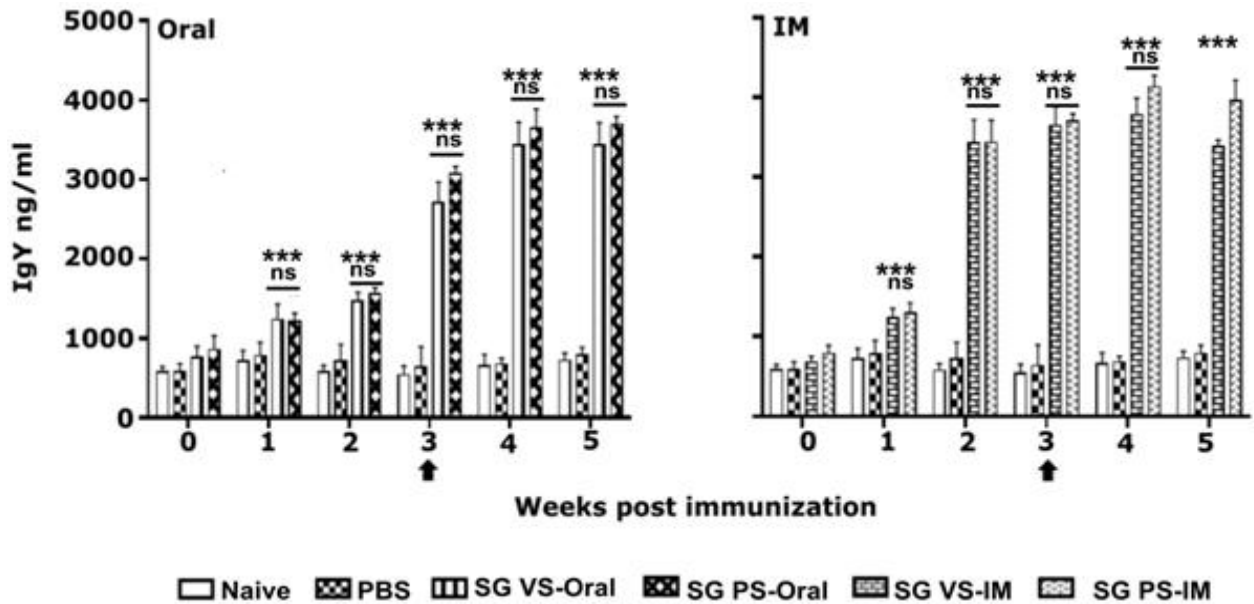


<살모넬라 갈리나룸 변이균주의 유전자 결실 확인>



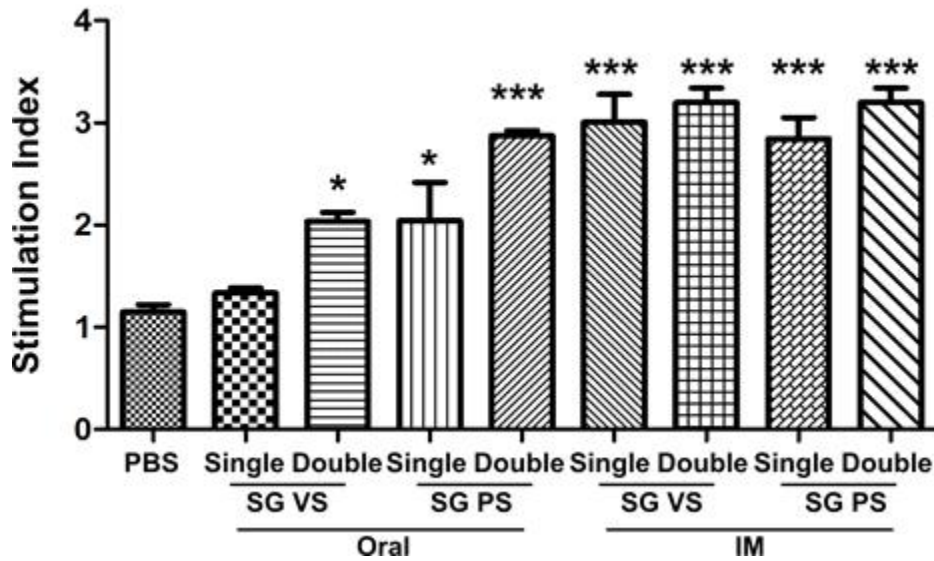
<ELISA 및 Western blot을 통한 O-항원 결실 확인>

③ 백신 후보균주에 의한 면역원성 및 안정성 예비평가 - 목적동물인 닭을 이용하여 면역 활성화 및 변이균주에 대한 안전성을 확인하였다. 그룹 당 8마리의 닭을 이용하여 1×10^8 CFU/200 μ l의 변이균주 및 모균주를 각각 근육 및 경구접종을 하고 3주 후 부스팅 하여 1, 2, 3, 4, 5주 동안 PBMC를 통해 IgY 항체의 농도를 확인한 결과, 모균주와 동일한 수준의 면역 활성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 접종 후 모든 그룹의 닭이 생존하여 백신 후보균주의 안전성을 확인하였고 가금티푸스 야생형 균주로부터 방어 가능한 향상된 면역능을 가짐을 알 수 있다.



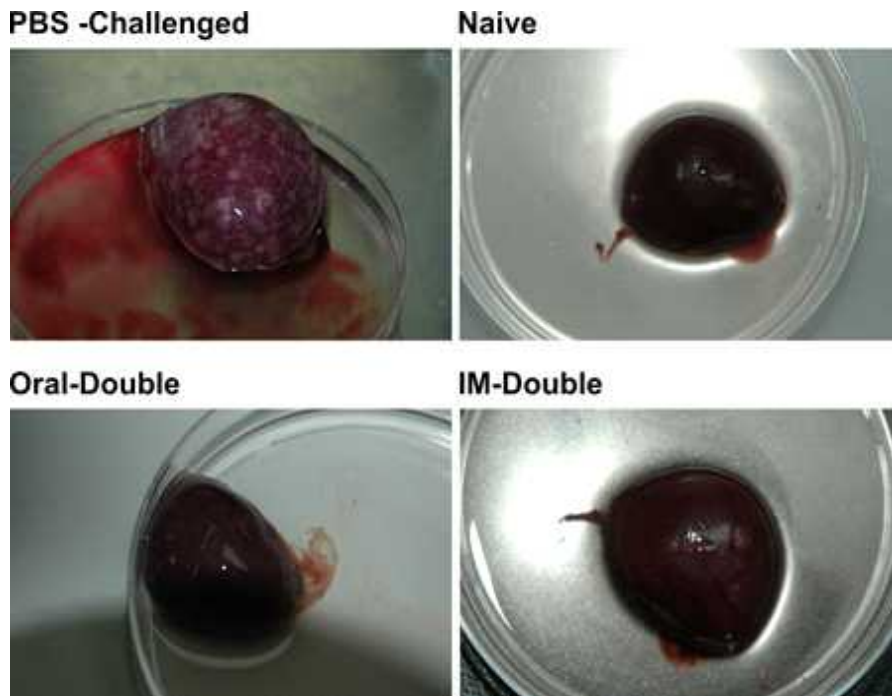
<접종 경로에 따른 면역 활성화 확인>

④ PBMC 세포증식을 통한 면역원성 예비평가 - 목적동물인 닭을 이용하여 PBMC를 통해 세포증식반응을 관찰하였다. 각 그룹에 변이균주 및 모균주를 근육 및 경구접종을 하고 2주 후 부스팅하여 부스팅하지 않은 그룹과 비교 분석하였다. 닭의 말초혈액에서부터 PBMC를 분리하여 살모넬라 갈리나룸 항원으로 자극한 후 MTT 분석을 통해 세포증식반응을 관찰한 결과 IM으로 접종된 샘플에서 높은 수준의 증식반응을 보였으며 모균주와 유사한 정도의 결과를 보였다.



<PBMC 세포증식 분석>

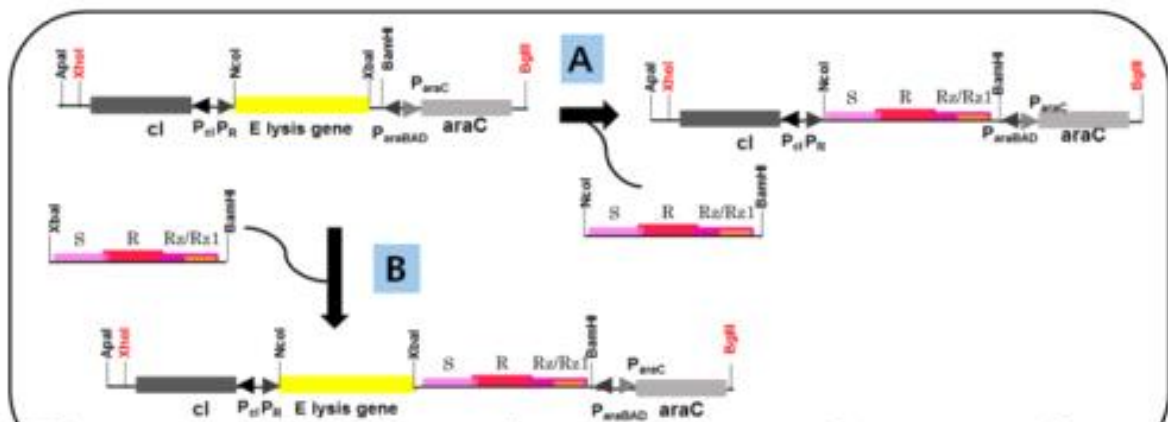
⑤ 백신 후보주의 방어효능 확인 - 백신 후보균주를 각 그룹의 닭에 접종하고 2주 후 부스팅하여 야생형의 살모넬라 갈리나룸 균주인 JOL402를 1×10^8 CFU/200 μ l로 경구 접종하였다. 2주후 닭에서 감염에 의한 질병 여부를 비장을 통해 관찰하였으며, 그 결과 비면역화 그룹에서 비장의 병변이 확인되었다. 면역화가 이루어진 비장의 경우 방어 효과에 의해 정상과 유사한 정도를 나타내었다. 따라서 본 예비평가를 통하여 개선된 살모넬라 갈리나룸 약독화 생균 백신 후보 균주에 대한 접종량 및 경로 최적화, 체내 및 배설물, 달걀을 통한 환경오염 여부 그리고 야생형 균주의 공격접종에 따른 방어 효능에 대한 추가적인 연구가 요구된다.



<닭의 비장을 통한 면역화에 따른 방어효능 평가>

나. 신개념 사균백신 개발을 위한 Holin-Endolysin system과 생물학적 면역증강제를 응용한 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균백신 개발

◎ **방법1:** Holin-Endolysin은 두 개의 각기 다른 단백질로써 Holin이 먼저 발현이 되어 세균의 내막에 축적되고 몇 개의 holin 단백질은 monomer로 세포질에 남아 있게 된다. 충분히 holin이 합성되었을 때 남아있던 holin monomer가 holin raft를 형성하여 내막에 축적되어 박혀있던 holin 단백질이 내막을 용해시키는 것을 도와 합성되어진 Endolysin이 periplasmic space로 나갈 수 있게 도와준다. 이 과정을 거쳐 발현된 Endolysin은 soluble 세포벽을 구성하는 성분인 peptidoglycan을 분해하는 요소인 soluble transglycosylase를 coding 하여 세포벽을 분해한다. 기존에 고스트화에 사용되었던 phiX174 lysis gene E 유전자는 약 155bp의 작은 크기로 단일 유전자로 구성되어 있지만 Holin-Endolysin system은 총 4개의 유전자로 이루어진 1.2kb의 유전자 카세트에 holin 단백질을 발현하는 S 유전자, Endolysin을 발현하는 R 유전자, 그리고 Rz, Rz1 유전자로 구성되어 있다. 본 연구에서는 R 고스트 카세트와 E 용해 유전자를 동시에 발현시키는 고스트 백신 균주를 조성하여 자가용해력을 크게 향상 시켰다.



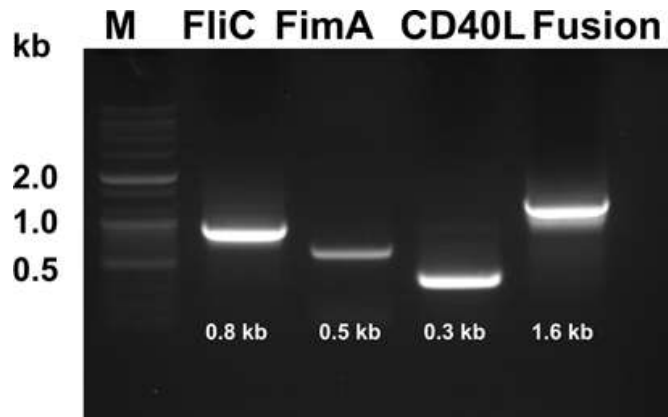
기존의 ϕ 1857- λ PR-E gene-araBAD-araC의 ghost cassette system에 A: E lysis gene을 delete 하고 S-R-Rz gene의 holin-endolysin system (NcoI-BamHI cut) 을 삽입 B: E lysis gene 과 holin-endolysin 시스템이 결합시 나타날 수 있는 ghost vaccine 시스템의 효율을 알아보기 위해 E lysis gene 뒤쪽에 holin-endolysin system을 삽입 (XbaI-BamHI cut)

◎ **방법2. 면역보강제로 *Salmonella enteritidis flic-fimA*를 발현하는 *Salmonella enterica* serovar Gallinarium의 제작, 특성 및 면역원성 확인**

- 사균백신은 생균백신에 비해 안전성이 우수하나 낮은 면역활성이 문제되어 방어력이 떨어진다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 살모넬라 갈리나룸 고스트의 면역은 체액성 그리고 세포성 면역반응을 모두 효과적으로 야기시켜야 한다. 이를 위하여 다음과 같은 SE 활성단백질들을 fusion 시켜 생물학적 면역작용제로 사용하고자한다.
- FliC: TLR5 작용제로서 Receptor에 부착 TLR5 signaling을 자극하여 선천면역 반응을 유도함
- FimA: FimA는 유형 I 부착관여 단백질이며 균주 특이적으로 염증반응을 가져올 수 있는 PAMP 분자 역할을 한다. FimA는 주로 면역유도를 위한 TLR2 신호와 연관되어 염증을 일으키는 사이토카인 생산을 촉진함.
- CD40L (CD154): CD40L은 활성화된 T 세포에 존재하는 CD40 수용체와 상호작용하여 체액성 및 세

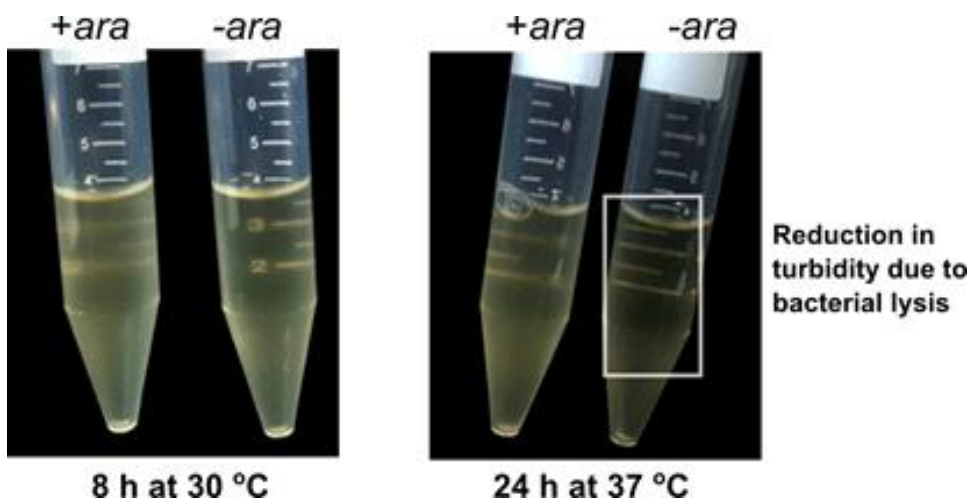
포성 면역반응 모두에서 중요한 역할을 함. 즉, CD40 수용체와의 결합 및 상호작용 후, CD40은 광범위한 신호전달 경로를 촉진할 수 있는 TRAF 단백질과 결합하여 궁극적으로 체액 성 및 세포성 면역을 활성화함. 이러한 fusion 단백질을 ghost 카세트에 클로닝하여 사균백신이 부족한 면역활성을 한층 보강하였으며, 이러한 면역활성은 같은 살모넬라 D그룹인 SE에 대한 방어력도 가질 수 있어 가급티프스 뿐만 아니라 살모넬라증에 대한 동시방어력을 유발할 수 있다.

- ① **pJHL184::*fliC-fimA-CD40L* 고스트 벡터 제작** : 면역증강제로의 *liC-fimA-CD40L* 유전자를 pJHL184 고스트 사균화 벡터에 재조합한 후 특이 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 각 유전자를 확인.



<pJHL184벡터에 재조합된 면역 활성 인자 확인>

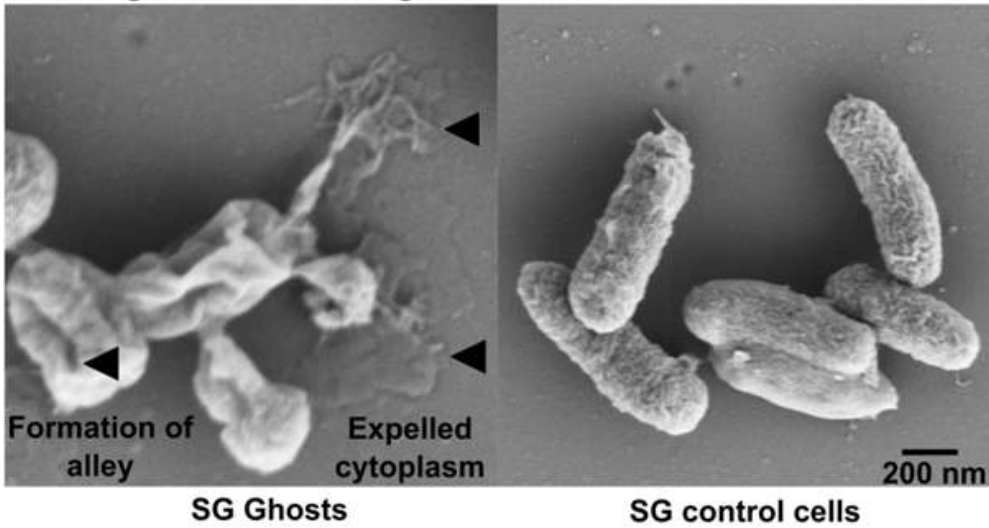
- ② **제작된 고스트 균주의 용해능 확인** : 최적 온도조건하에서 박테리아의 용해를 관찰하였다. 아라비노스를 첨가하지 않은 비허용 온도인 37°C조건에서 탁도가 점진적으로 감소했음을 알 수 있다.



<제작된 고스트 균주의 온도조건에 따른 용해능 확인>

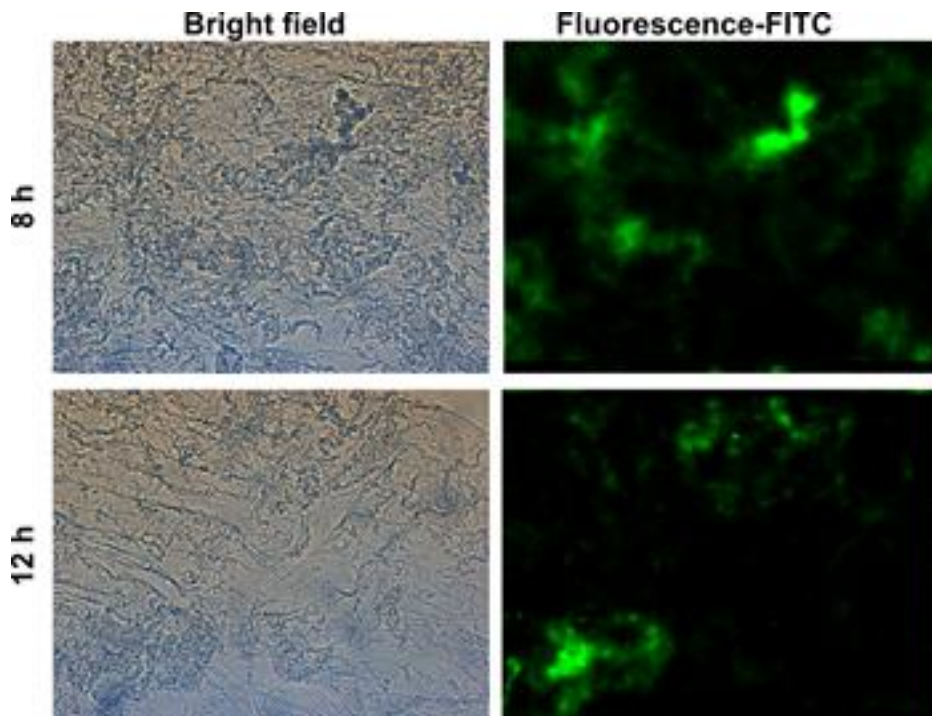
- ③ **SEM을 통한 균주의 사균화 확인** : 주사전자현미경을 통해 *FliC-FimA-CD40L* 발현 살모넬라 갈리나룸 고스트 균주와 야생형 균주를 비교한 결과 용해 유전자 E의 발현으로 세포외피는 유지하지만 박테리아 세포질의 내부 물질이 배출됨을 확인할 수 있다.

SEM images of *S. Gllinarium* ghosts



<SEM을 통한 고스트 사균화 백신 균주의 사균화 확인>

- ④ 세포 부산물의 세포 표면에 제시된 *FliC-FimA-CD40L* 확인 : 개발된 사균화 백신균주의 세포 용해와 세포 표면에 제시된 외래 항원을 FliC 특이 항체와 FITC가 표지된 항 토기 항체를 사용하여 확인하였다. 용해된 살모넬라 갈리나룸 박테리아에 대한 녹색 형광을 통해 융합된 단백질이 세포 표면에 존재함을 간접적으로 관찰할 수 있다.



<세포 표면에 제시된 *FliC-FimA-CD40L* 발현 확인>

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

제1절 동물 및 환경에서 안전하며 DIVA 가능한 O항원 결핍 살모넬라 갈리나룸 백신 균주의 개발

● 연구배경

- 가금류 장티푸스(FT)는 환경에 존재 그람 음성 박테리아인 *Salmonella enterica* serovar Gallinarium 에 의해 발생하는 패혈증성 질병으로 닭, 칠면조 및 관련 조류 종에서 발생함. 숙주의 적응력이 높기 때문에 인간 감염의 원인으로 보고되는 경우는 드물지만[1], 이 질병이 가금류 산업에 미치는 영향은 막대하여 면역이 저하된 조류에서는 10-100% 이환율과 때때로 100% 폐사를 초래함[2].
- 최근 연구에 따르면 질병의 심각성은 어린 닭과 성체 닭 모두에게 똑같이 치명적임[3]. 개선된 위생 조건과 격리 시설로 인해 선진국에서는 가금티푸스를 더 잠재울 수 있지만 이 질병은 여전히 많은 다른 개발도상국, 특히 전 세계적으로 열대 지역에 피해를 주고 있음[2,4]. 게다가, 생물 보안 지침, 가금류 장티푸스에 대한 조류 예방접종 계획은 매우 성공적이고 신뢰할 수 있는 예방 방법임. 지금까지 약독화 생백신, 불활성화 백신 및 사균 백신과 같은 다양한 백신 설계 전략이 실험 수준에서 효과적인 결과를 보임[5,6]. 상대적으로 약독화 생백신 균주는 가금티푸스와 같은 닭의 치명적인 질병에 대하여 더욱 효과적임. SG9R 과 같은 약독화 생백신 균주는 수십 년 동안 가금티푸스 예방에 성공적으로 사용되어 왔지만 때때로 독성을 일으켜 어린 닭의 체중 감소와 조류 사망을 초래하기도 함[7].
- SG9R 접종 시 비장과 간 조직의 병변이 관찰되었으며, 아직 불완전한 안전성 프로파일을 가지고 있음을 확인함. 이러한 이유로 최근 연구에서는 SG9R 을 비롯한 무독화 살모넬라 갈리나룸 백신 균주를 만들기 시작하였기에 안전성과 효능에 관하여 기존의 것보다 우월할 수 있는 새로운 백신 균주 개발의 필요성이 대두되고 있음. 체액성 및 세포성 면역 반응의 유도는 살모넬라 갈리나룸과 같은 세포내 병원체의 제거에 필수적임. 약독화 생백신은 세포 및 체액반응 활성화에 효과적임. 살아있는 병원체이기 때문에, 백신균주는 질병을 일으키지 않고 숙주 장벽을 관통하기에 충분한 활력을 전달하기 위해 정확한 독성 수준으로 배치되어야 함.
- 현재 연구에서 우리는 *lon* 및 *cpxR* 유전자결실을 이용하여 손상된 균주으로써 지속성을 갖지만 과면역원성을 가져올 수 있는 유전자결실 조합을 사용함[8,9]. 두 유전자 모두 *Salmonella* pathogenicity island I (SPI I)에 위치한 독성 관련 유전자이며 결실에 의한 영향은 이전 연구에 의해 증명된 바 있음. 결론적으로, *lon* 및 *cpxR* 제거는 특정 독성 유전자의 과발현을 유도하지만 환경 스트레스를 견디는 세포의 능력을 감소시키므로 우수한 면역반응을 일으키며, 균주에 의한 질병을 일으키지 않으면서 세포 내에서 신속하게 제거될 수 있음. 추가적으로, O-항원 연결효소를 인코딩하는 *rfaL* 유전자를 제거하여 세번째 변이균주를 제작함. 변이균주는 지질다당류 구조의 O-항원 성분의 결핍으로 더욱 약독화되며, 항원 제시 정도가 우수하고[10], DIVA 가 가능한 장점이 있음[11]. 또한, *rfaL* 유전자의 제거는 일반적으로 항-LPS 항체의 생성을 감소시키므로, 백신 균주가 동일한 동물 숙주에서 여러 번 반복 사용이 가능하다면 균주의 혈청 감수성을 효과적으로 저하시킬 수 있음.

<p>cpxR Attenuation marker Enhances membrane stress susceptibility Boosts immune responses Inflict on rapid intracellular clearance</p>
<p>lon Attenuation marker Impaired intracellular proliferation Enhances immune responses by upregulating SPI 1 genes Increases adhesion and invasion Induces internal and external oxidative damage</p>
<p>rfaL Eliminates O-antigen component from the LPS structure Reduces the susceptibility to O-antigen specific antibodies Lower the effect of pre-existing immunity Causes DIVA capability Strain attenuation Enhanced antigen presentation</p>

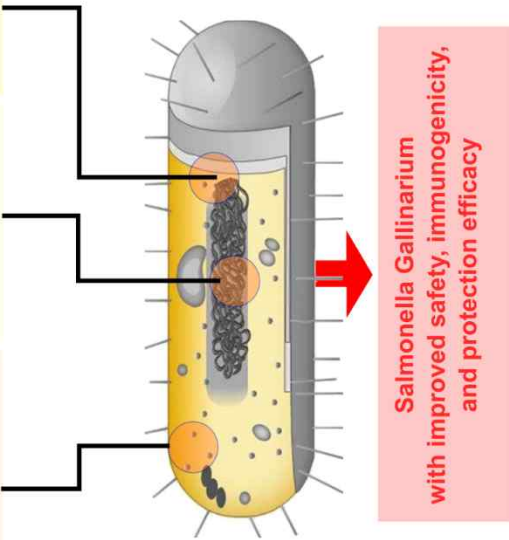


그림 1. 약독화된 살모넬라 갈리나룸 백신 균주 제작을 위한 약독화 마커의 주요 역할. 약독화 및 과면역 반응을 단일 균주로 가져오기 위해서는 lon 및 cpxR 유전자의 결실이 중요한 역할을 함. Lon 결함효소체는 SPI I 유전자에 대한 음성 조절제로 작용하므로 결실시 SPI I 유전자의 상향 조절을 유발함. 또한, cpxR의 제거는 막 스트레스를 완화하는 박테리아의 능력을 잃음으로써 환경 스트레스에 대한 감수성을 더욱 증가시키므로 Lon 및 CpxR 결실에 따른 누적 효과는 숙주 박테리아를 과침습성으로 만들지만 숙주에서 만성 질환을 일으키지 않고 숙주로부터 신속하게 제거 되도록 함. 점막면역활성을 위하여 경구 및 근육내 경로를 통해 닭을 면역화함. 그 결과 백신 후보 균주가 고도로 약독화 되었으며 7일 정도의 어린 닭에서 폐사를 초래하지 않는 것을 확인함. 두 균주 모두 IM 경로를 통해 접종될 때 분변 배출로 환경을 오염시키지 않음. 경구接种의 경우, 대변내 배출은 접종 첫 주에만 관찰됨. 체액성 및 세포성 면역 반응의 평가는 두 가지 접종 경로를 통한 면역 유도를 보여주지만 IM 경로를 통한 높은 수준의 면역 활성을 보임. 개발 균주의 DIVA 능력은 면역화 된 닭으로부터 수집된 혈청에서 낮은 반응성을 유지하므로 동일한 숙주에 반복 접종될 경우 백신 균주의 생존을 예상할 수 있음.

- 약독화 생백신에 대한 주요 맹점은 배설물을 통한 균의 배출로 유발되는 잠재적인 환경오염 문제임. 이상적인 약독화 생백신 후보균주는 환경을 오염시키지 않아야 하며, 다른 농장의 가축과 인간 전체의 건강에 영향을 미치지 않아야 함. 따라서 본 연구에서는 lon, cpxR 및 rfaL 유전자의 결실을 포함하는 3종 변이균주를 개발하고 숙주 및 환경 안전성, 면역원성, DIVA 능력 및 보호 효능을 증명함.
- 이러한 장점을 고려하여 세 가지 주요 독성 유전자인 lon, cpxR 및 rfaL을 결실하여 살모넬라 갈리나룸 균주를 구성 및 제작하고 닭 모델에서 야생형 살모넬라 갈리나룸의 공격접종에 대한 효능을 조사함. 결과적으로 점막 및 전신 경로를 통한 안전성, 환경 배출, 장기 지속성, 면역원성, DIVA 능력 및 야생형 공격에 대한 방어효능을 광범위하게 조사함. 개발 살모넬라 갈리나룸 균주에 의한 상당히 높은 안전성과 방어효능은 가금티푸스에 대한 새로운 형태의 백신 접종 플랫폼으로의 제시가 가능하도록 함.

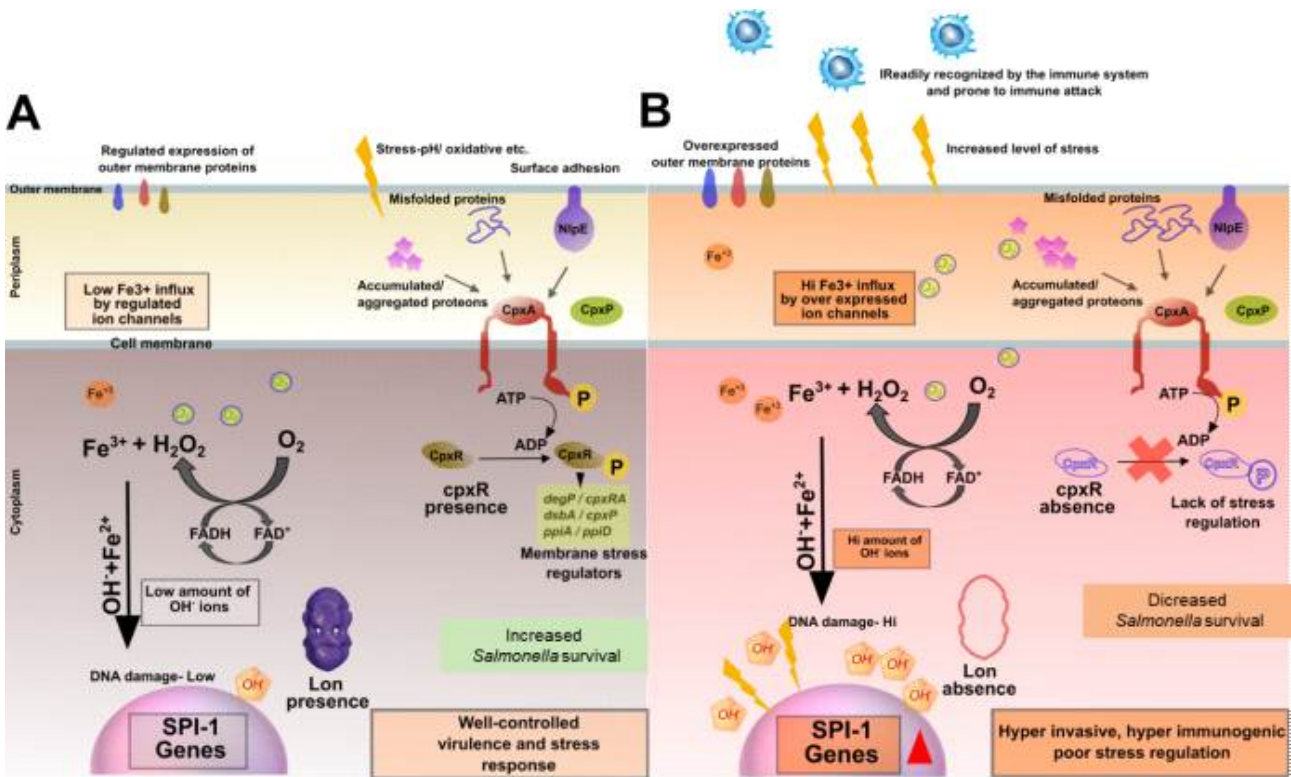


그림 2. 살모넬라 갈리나룸 유전자에서 Lon 결합효소 및 CpxR 결실에 의한 균주 내 작용 방식. 산화 스트레스 유도하에 Lon 결합효소와 CpxR의 작용 방식은 숙주 유기체에서 살모넬라균을 제거하며 생성된 하이드록실 및 산소 자유 라디칼은 박테리아의 세포 구조와 핵산을 손상시킴.

● 세부 연구방법

○ 연구에 사용된 박테리아 균주, 플라스미드, 프라이머와 유전자 조작법

- 연구에 사용된 모든 박테리아 균주, 플라스미드 및 프라이머는 [표 1.]에 나열되어 있음. 개발 균주는 37°C에서 Luria Bertani (LB; BD, Sparks, USA) 배지 또는 Brilliant Green Agar (BGA; BD, Sparks, USA)를 이용하여 배양함. *lon*, *cpxR* 유전자 결실을 가진 살모넬라 갈리나룸 균주는 선행 연구에서 개발됨. 선행연구에 개발한 살모넬라 갈리나룸 백신 후보균주를 모균주로 하여 *rfaL* 유전자 결실은 람다 레드 재조합 방법을 사용하였으며, *pagL* 유전자의 결실 및 *Francisella tularensis lpxE* 유전자의 삽입은 기존의 람다 레드 재조합 방법을 수정하여 단일 단계 유전자 교체를 수행함. FRT 측면에 chloramphenicol 유전자가 존재하는 플라스미드로부터 pKD3 프라이머를 이용하여 증폭한 후 유전자카세트를 *rfaL* 유전자의 프라이머를 사용하여 증폭하였고 PCR 산물은 DpnI으로 처리하여 잔류 플라스미드를 제거함. 정제된 선형 PCR 산물은 전기천공법을 통해 pKD46으로 인코딩된 재조합효소 양성 살모넬라 갈리나룸 모균주($\Delta lon \Delta cpxR$)로 형질전환되었으며 형질전환된 세포를 CatR LB Agar를 이용하여 스크리닝 함. 또한 *rfaL* 내부 및 외부 프라이머를 사용하여 형질전환된 균주의 유전자 결실을 확인함. 또한, 37°C에서 배양 후 콜로니는 숙주로부터 *CatR* 유전자의 완전한 제거를 위해 pCP20 플라스미드로 형질전환되었으며 완전한 제거는 *rfaL* 유전자 플랭킹 프라이머에 의해 확인됨. 약독화 변이균주는 LPS (Intron, Korea)를 사용하여 silver staining으로 확인하여 O 항원의 결실을 확인함.

표 1. 개발 백신의 후보균주 리스트, 각종 플라스미드 및 프라이머 정보

Strain/plasmid /primers	Description	References
Strain		
JOL422	<i>Salmonella enterica</i> Gallinarium wild type strain	
JOL916	<i>Salmonella enterica</i> Gallinarium $\Delta lon \Delta cpxR$ mutant	
JOL2624	<i>Salmonella enterica</i> Gallinarium $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$ mutant	This study
Plasmids		
pKD46	Ori101-repA101ts; encodes Lambda red genes (exo, bet, gam); native terminator (tL3); arabinose-inducible for expression (ParaB);bla	
pKD3	oriR6K gamma, bla (ampR), rgnB (Ter), catR, FRT	
pCP20	Helper plasmid, contains a temperature-inducible flp gene for removing the FRT flanked chloramphenicol gene	
rfaL FP	CCTGATGATGGAAAACGCGCTGATACCGTAATAAGTATCAGCGCGCTTT T GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
rfaL RP	AGATTCATTAAGAGACTCTGTCTCATCCCAAACCTATTGTGGAGAAAA G ATGGGAATTAGCCATGGTCC	This study
rfaL inner FP	CCATAGCCGTAGCCCTTGAT	This study
rfaL inner RP	GTTTAGGACTTCGCTGCCTTG	This study
rfaL flank FP	GCAGCGTTTCGAGGAACAAA	This study
rfaL flank RP	TCGTATCGGTTGATACCGGC	This study

○ 연구에 사용된 동물모델 및 동물윤리

- 모든 동물 실험 및 절차는 동물보호협의회 및 동물보호법, 2007: 제13조(동물 실험) 지침에 따라 전북대학교(CBNU-2018-00264)의 승인을 받았음. 1일령의 암갈색 암닭을 한국 합동 부화장에서 구입하여 음식과 물을 자유롭게 공급할 수 있는 에어컨이 완비된 동물 시설에서 사육함. 1개월령에 닭모델을 그룹화하여 면역화 연구를 수행하였으며, 행동 및 생리학적 징후를 매일 2회 모니터링 함. 날개 정맥을 이용하여 절차에 따라 혈액을 수집하였으며 실험 완료 시점에서 모든 그룹을 안락사하여 병리학적 평가 및 잔여 박테리아 수 계산에 사용함.

○ 살모넬라 갈리나룸 백신 균주의 안전성 평가

- 살모넬라 갈리나룸 백신 균주의 안전성은 1개월령 닭에 접종하여 분변 배출에서 세균의 존재를 평가함. 닭모델을 6개 그룹(n=15)으로 나눈 후 A: SGPS-경구, B: SGPS-IM, C: SGVS-경구, D: SGVS-IM, E: SGWT-경구 및 F: PBS로 접종을 진행함. SGVS 및 SGPS의 경구 접종 용량은 마리 당 1×10^8 CFU/200 μ l이며, IM 및 SGWT 경구 용량은 1×10^7 CFU/200 μ l, SGWT 의 경우 1×10^6 CFU/200 μ l 로 설정함. 배설강 면봉 채취는 1일, 3일, 5일, 7일, 14일에 무작위로 선택된 5마리의 새를 사용하여 수행된 면봉을 배설강에 삽입하고 점액과 함께 분비물을 수집한 후 4 ml의 멸균 완충 펩톤수에 풀어준 후 1 ml의 혼합물을 9 ml의 Rappaport Vassiliadis (RV; Sigma) 배양액에 넣고 42°C에서 48시간 동안 인큐베이션함. 인큐베이션 후, 100 μ l의 농축물을 연속적으로 희석하고 BGA 플레이트에 플레이팅하여 생성된 콜로니를 PCR로 확인함. 닭 내부에 잔존하는 살모넬라 갈리나룸을 계산하기 위해 접종 후 1일, 3일, 5일, 7일 및 14일에 각각 희생된 2마리의 닭에서 비장 및 간 조직의 박테리아를 측정하고 박테리아 균주는 혈청형 특이적 프라이머에 의해 확인됨.

○ 닭모델을 이용한 면역화

- 각 그룹의 면역화는 1개월령 nick layer 닭으로(n=16)에 수행됨. 모든 닭을 무작위로 6개의 그룹으로 나누고, [표2.]에 제시된 계획에 따라 면역화함. 부스팅은 1차 접종 후 3주에 수행되었으며 야생형 살모넬라 갈리나룸 균주 JOL422에 대한 공격은 부스터 접종 후 2주에 수행하였고 혈청 회수는 매주 간격으로 수행됨. 추가접종 2주 후 말초혈액단핵세포(PBMC) 수집을 수행하여 비장세포 증식 분석, 유세포 분석(FACS) 및 사이토카인 RT-PCR에 사용함. 마지막 일정에는 각 그룹으로부터 비장 및 간 조직을 분리한 후 균질화하여 BGA 플레이트에 10배 희석액을 플레이팅하여 잔여 균수를 측정함. 균수는 표준편차(SD)와 함께 log CFU/ml로 표시되며 잔여 조직은 eosin과 hematoxylin으로 염색하여 조직병리학적 검사를 위해 처리함[19]. 모든 실험은 2개의 독립적인 실험에서 수행됨.

표 2. 면역화 수행 일정

Group (n=16)	Strain	Route	Inoculation dose	Challenge dose (Oral)
A	SG $\Delta lon\Delta cpxR$	Oral	10^8 CFU/bird/200 μ l	1×10^6 of JOL422
B	SG $\Delta lon\Delta cpxR$	IM	10^7 CFU/bird/200 μ l	1×10^6 of JOL422
C	SG $\Delta lon\Delta cpxR\Delta rfaL$	Oral	10^8 CFU/bird/200 μ l	1×10^6 of JOL422
D	SG $\Delta lon\Delta cpxR\Delta rfaL$	IM	10^7 CFU/bird/200 μ l	1×10^6 of JOL422
E	PBS	Oral	PBS 200 μ l	1×10^6 of JOL422
F	Naive			

○ 대식세포 생존 및 세포독성 평가

- 대식세포 생존 및 세포독성 분석은 닭의 대식세포를 사용하여 수행됨. 골수세포는 생후 2개월 된 닭에서 채취해 50 ng/ml에서 GM-CSF (Granulocyte Macrophage colony 자극 인자)로 처리한 후 37°C에서 7일 동안 5% CO2로 배양함. 배양배지는 이틀마다 추가함. 부착 세포(마크로파지 세포)는 계대배양되어 실험에 사용함. 세포는 2시간 동안 40 MOI로 SGPS, SGVS 및 SGWT 균주에 감염됨. 비감염 세포는 2시간 동안 Gentamycin (100 μ g/ml)처리에 의해 제거됨. 대식세포 내 세균은 colony forming unit (CFU) 측정으로 정량화되었고, SG변이균주 유발 세포독성은 20시간 동안 2 ng/ml (Essen Bioscience, MI, USA) 농도에서 Cytotox 형광녹색 시약을 사용하는 IncuCyte 라이브 이미징 시스템으로 평가함.

○ 체액성 면역 반응 평가

- 백신후보주에 의한 면역화활성 효과는 면역화된 살모넬라 갈리나룸 변이균주에 대해 발생한 항체 반응 정도를 측정함으로써 평가함. 항 IgY 측정을 위한 혈액 수집 및 항 IgA에 대한 배설강 분비물은 무작위로 선택된 5마리의 닭으로부터 매주 간격 수행함. 혈액 수집은 날개 정맥을 통해 수행되었고 배설강 분비물의 수집은 면봉을 배설강에 삽입하여 수행되었음. 면봉을 2 ml의 PBS (phosph- ate-buffered saline)에 수집함. 향상된 항체 아형 IgY 및 IgA의 평가는 살모넬라 갈리나룸 야생형 균주를 ELISA 코팅 완충액(0.5 M Na2CO3/NaHCO3)에 1×10^5 CUF/well

로 코팅함으로써 간접 ELISA 분석법으로 수행함. 플레이트를 PBS-T (0.01% Tween)로 3회 세척하고 실온에서 2시간 동안 5% BSA으로 blocking한 후 PBS-T로 3회 세척함. 이후, 플레이트를 혈청 1:100 및 배설강 세척 샘플과 함께 1:10 희석으로 37도에서 2시간 동안 반응시킴. 플레이트를 PBS-T로 4회 세척하고 HRP로 태깅된 anti-chicken-IgY 또는 IgA 2차 항체를 분주하여 37도에서 1시간 동안 반응한 후. 플레이트를 PBS-T로 5회 세척하고 O-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(OPD; Sigma)를 첨가하여 발색한 후 종말점 50 μ l의 2N H₂SO₄를 첨가하여 발색 반응을 중단하여 마이크로플레이트 리더(Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 492 nm 파장에서 측정함. 반응성은 표준 보정 곡선을 이용하여 ng/ml로 변환함.

○ PBMC 증식에 의한 세포 매개 면역 반응 평가

- 부스팅 2주 후에 닭으로부터 PBMC를 분리한 후 증식 반응을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 분석함. 부스터 면역화 후 2주에, PBMC는 Histopaque 밀도 원심분리(Histopaque, Sigma, Germany)를 사용하여 혈액에서 무균적으로 분리하였으며, 세포를 5% FBS가 함유된 RPMI에서 1×10^5 cell/well로 96 well plate에 분주함. 정제된 살모넬라 외막 단백질(omp, 40 μ g/ml)로 자극한 후, 세포를 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양하고, 570 nm의 흡광도에서 MTT 포르마잔의 생성을 측정함. 면역화에 의해 유도된 T 림프 세포의 변화를 관찰하기 위해, 1×10^5 cell/well로 비장세포를 96 well plate에 분주하고 정제된 omp항원(40 μ g/ml) 또는 RPMI 배지 단독으로 72시간 동안 자극하고 anti-chicken CD3a-FITC (Cat#8200-02), anti-chicken CD8-PE (Cat#8220-09) and anti-chicken CD4-AF-700 (Cat#8210-27)항체를 처리한 후 100만개의 세포를 FACS로 분석함. 또한, MacsQuant 소프트웨어(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용하여 결과분석을 수행함.

○ 사이토카인 발현 측정

- 닭으로부터 부스터 면역 2주 후 PBMC를 분리하고, 96 well plate에 well당 1×10^6 개의 세포를 분주한 후 정제된 omp 단백질(40 μ g/ml)과 함께 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 배양함. RNeasy Plus mini kit (Qiagen, GmbH. Hilden, Germany)를 사용하여 세포 현탁액으로부터 total RNA를 추출한 다음 High Capacity cDNA Reverse Transcription 키트를(Applied Biosystems, Foster, USA)를 사용하여 cDNA로 합성함. 사이토카인, 인터루킨(IL)-4 및 인터페론(IFN)- γ mRNA의 발현 유도는 real-time RT-PCR로 정량화함

○ DIVA 가능 평가

- 살모넬라 갈리나룸 모균주 및 개발 백신균주 그리고 PBS로 면역화하여 LPS 특이 항체 형성을 평가함. 혈청 채취는 프라이밍 후 1주 후와 부스터 예방접종 후 2주 후에 수행하였으며, 정제된 살모넬라 갈리나룸 LPS (Sigma)를 37°C에서 2시간 동안 코팅 완충액(0.5M Na₂CO₃, NaHCO₃)에 10 μ g/ml로 분주하여 ELISA 플레이트에 코팅함. 5% skim milk가 함유된 PBS로 blocking 한 후 혈청을 1:100으로 희석하여 분주한 ELISA 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 반응시킴. 1x PBS로 3회 세척하고 anti-mouse-HRP-IgG의 2차 항체를 1:3000으로 희석하여 사용함. 1x PBS로 3회 세척한 후, O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 기질을 이용하여 발색하고 최종 발색은 492 nm에서 측정함.

○ 통계분석

- 모든 데이터는 GraphPad Prism 6.00 프로그램 (미국 캘리포니아 주 샌디에고)을 사용하여 분석하였으며 테스트 그룹 간의 통계적 차이를 확인하기 위해 Tukey의 다중 비교 테스트를 통한 일원 분산 분석(ANOVA)을 수행함. P-value<0.05 수치를 유의한 수치로 간주함.

제 2 절 $N^{\text{FliC-FimA}^{\text{C}}}$ 와 $CD40L^{\text{C}}$ 이중항원 발현 살모넬라 갈리나룸 사균 백신 개발과 면역활성 및 방어효능 평가

● 연구배경

- 약독화 생균백신의 잔류 독성문제는 주요 관점이 되고 있으며 간혹, 약독화된 백신 번이주는 어린이나 면역력이 약한 사람들에서 질병을 유발할 수 있음[1]. 이 같은 문제점은 SG9R과 같은 살모넬라 갈리나리움 백신에 의해서도 발생하고 있음에도 불구하고 가금류 장티푸스의 예방을 위해 상업적으로 이용되고 있는 상황임[2]. 현재 이용되는 SG9R 백신은 약 50년 전에 개발되었으며 백신 접종이 생후 6주부터 이루어질 수 있는 제한이 있음. 또한, 간헐적인 독성문제와 함께 낮은 방어능, 체중 감소, 성장률 감소와 같은 문제점이 산란계의 생산성에 직접적인 영향을 미치고 성적 성숙을 지연시켜 산란 시작 기간을 연장할 수 있음. 또 다른 주요 위험은 배설물을 통한 배출로 인한 환경오염으로 인간과 인전 농장의 동물이 감염 위험에 노출되는 점이 보고됨. 따라서 전 세계적으로 이러한 문제를 해결하기 위한 대체 예방 접종 전략 수단에 대한 연구가 절실함.
- 안전성 문제를 해결하기 위해 기존 약독화 생균백신에 대한 대안으로 단백질 서브유닛 백신 및 불활성화 백신과 같은 백신 전략이 개발되고 있음[3, 4]. 실험상 이러한 백신은 적절한 보조제를 투여했을 때 그럴듯한 효능을 보임[3]. 대부분의 불활성화 기술은 보존된 항원 에피토프에 약영향을 미칠 수 있는 열이나 포름알데히드와 같은 화학 물질과 같은 열악한 조건에 의존함[5]. 따라서 이러한 방법으로 생성된 불활성화 백신은 면역학적 프로파일을 변경하여 접종 시 면역 활성이 효과적으로 이루어지지 않을 수 있음[6, 7]. 면역학적으로, 불활성화 백신이 유도하는 면역활성은 체액성 면역 반응으로 치우쳐 있으며, 대다수의 불활성화 백신 후보들은 거의 세포성 매개 면역(CMI) 반응을 유도하지 않는 것으로 알려짐[8].
- 세포내 침투한 외부 병원체에 대한 특정 면역반응은 효과적인 방어를 위해 CMI 반응을 필요로 함. 따라서 효과적인 면역원성을 가지며 체액성 및 CMI 반응 모두 유도할 수 있는 불활성화 백신의 개발은 어려운 과제임. 이러한 맥락에서 제작 및 이용이 간편하고 직접적인 기술의 사용은 세계에서 자원이 제한된 지역에서 이상적으로 기술보급이 가능할 것이므로 큰 도움이 될 수 있는 수단이 될 수 있음.
- 약독화 생백신의 주요 문제점은 간헐적인 안전성 문제와 분변 배출을 통한 환경 오염문제임. 숙주와 환경에 대한 안전성 측면에서 불활성화 백신은 생백신보다 훨씬 안전하지만 면역원성과 보호 효능을 유지하기 위해서는 세심한 주의를 기울여야함. 불활성화 과정에서 면역원성 감소를 억제하기 위해 정상적인 성장 조건에서 작동하는 생물학적 수단과 같은 백신 제작을 위한 새로운 전략이 절실함[9].

- 박테리아 고스트화 기술은 일반적인 생물학적 조건에서 작동할 수 있는 불활성화에 대한 하나의 혁신적인 접근법임. 박테리아 고스트는 화학적 또는 생물학적 수단으로 생성되는 생명력이 없는 빈 세포 외피이며 세포 외피에서 보존된 항원성을 증가시키기 위해 박테리오파지 phiX174의 용해 유전자 E를 사용하는 것이 화학적 수단보다 유리할 수 있음. 박테리아에서 용해 유전자 E의 발현은 세포질을 외부 환경과 연결하는 막 횡단 터널을 유발함. 삼투압 차이로 인해 세포질은 밖으로 배출되어 빈 세포 외피는 손상되지 않으며 생성된 박테리아 고스트는 세포 표면에 기능적, 형태학적 및 면역학적 결정인자를 보유하고 체액 및 세포 매개 면역 반응을 유도하는데 있어서 효과적으로 면역활성을 향상시킬 수 있음[10, 11]. 생물학적 파지 용해 유전자에 의해 생성 동안, 선모와 같은 취약한 대부분의 구조는 잘 보존될 수 있음[12, 13]. 유전자 E에 의해 매개되는 용해 과정은 숙주 세포를 완전히 용해하지 않으며 이는 모세포의 작은 부분이라는 점이 중요함. 세포 표면 구조의 보존으로 인해 이러한 박테리아 고스트 다른 형태의 박테리아 비활성화 백신에 비해 심층적으로 장기간 면역활성을 유도할 수 있음[14, 15].
- 생물학적 박테리아 고스트 생성의 독특한 이점은 면역강화를 위해 표면에 표지할 수 있는 추가 항원을 발현할 수 있다는 것임. lysis 유전자 E와 추가 항원 유전자의 발현은 플라스미드 발현 메커니즘에 따라 동시에 발생할 수 있음. 고스트 플라스미드 pJHL184는 30°C 이하의 온도에서 정상적인 성장이 가능하며 42°C 이상의 온도에서 용해가 가능하도록 하는 스위치 장치를 활성화하여 용해 유전자 E와 이중 항원 모두의 동시 발현이 가능하도록 특별히 설계됨. 성장 단계에서 세균의 수는 기하급수적으로 증가할 수 있지만 이때, 누출 프로모터로 인한 용해 유전자 E의 발현으로 인해 성장에 한계가 발생할 수 있음. 이 한계는 pJHL184 플라스미드 시스템에서 아라비노스의 존재 하에 용해 유전자 E의 안티센스 가닥을 생성할 수 있는 ParaBAD 프로모터 시스템에 의해 제어되는 안티센스 기술을 활용함으로써 극복되어야 함. 따라서, 본 고스트 플라스미드 시스템은 20 mM L-아라비노스의 보조배지에서 저온(<30 °C)에서 안정적으로 성장 조건에 도달할 수 있음. 일정 O.D₆₀₀ 값에 도달하면, 온도 상승과 L-아라비노스의 결핍으로 용해 유전자 E의 전사를 유발하여 살아있는 박테리아가 고스트화 되도록 함.
- 박테리아 고스트는 다양한 외래항원 기능을 보조제 또는 교차보호항원으로 발현하도록 프로그래밍될 수 있으며, 이는 유전자 E 발현 시 동시에 발현될 수 있는 고스트 균주의 표면에 표지될 수 있음. 이러한 표지항원은 면역원성의 낮은 활성을 극복하고 고스트 생성 과정 동안 발생할 수 있는 면역원성의 손실을 보존하는 완충제 역할을 할 수 있음. 본 연구에서 선택된 항원은 닭에 주로 존재하는 또 다른 D군 살모넬라 혈청형인 살모넬라 엔테리티디스에서 유래한 *FliC* [16] 및 *FimA* [17]항원의 에피토프 융합 구조물임. 이들은 강력한 보조인자로, 두 유형의 살모넬라 균주에 대한 교차 보호 능력을 유도할 수 있으며, 이는 인간의 건강과 관련된 면역의 추가적인 장점이 될 수 있음[18]. 이후, T 세포 매개 세포성 면역 반응을 효과적으로 유도하기 위하여 *FliC-FimA* 구조를 CD40 리간드에 물리적으로 융합하여[19] 표면 발현을 위한 대장균 유래 *OmpA* 신호 서열과 함께 pJHL184 다중 복제 부위(MCS)에 재조합 됨[20]. 결과적으로 개발 고스트 백신 후보가 숙주 내 살모넬라 제거를 위한 살모넬라 갈리나룸 고스트 백신으로써 T 세포 반응의 현저한 활성과 함께 항원 특이적 체액성 및 세포 매개 면역 반응을 유발할 수 있음을 보여줌. 또한, 본 연구에서는 피하경로 접종을 통하여 면역화를 진행한 닭모델에서 개발 고스트 백신의 잠재적인 방어효능을 평가함.
- 본 개발 백신 균주는 1개월령 닭에서 안전성을 확인했으며 환경오염이 전혀 발생하지 않았고 살모넬라 갈리나룸 고스트 백신은 면역화된 닭에서 고용량의 도전감염으로 닭을 부분적으로 보호하였으며, 적절한 보조제를 사용하고 접종 용량을 최적화함으로써 방어효능의 개선을 확인할 수 있었음.

● 세부연구방법

○ 박테리아 균주, 프라이머 및 플라스미드 정보

- 본 연구에 사용 된 박테리아 균주, 플라스미드 및 프라이머는 [표 1]에 나열되어 있음. 모든 박테리아 균주는 Lauria Bertani (LB; BD, Sparks, USA) 배지 또는 Brilliant Green Agar (BGA; BD, BD, USA, Sparks) 배지를 이용하여 배양함. 37°C에서 교반하였으며 고스트 플라스미드를 보유하는 균주는 L-arbinose 존재하에 30°C 조건에서 배양하고 제작된 모든 박테리아는 장기간 보관하기 위해 30% 글리세롤을 첨가한 후 -80°C에 보관함.

표 3. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study

Strain/Plasmid/ Primers	Description	Reference
Strains		
X232	<i>E. coli</i> Δasd mutant strain	(Hajam et al., 2018)
JOL967	<i>Salmonella Gallinarium</i> mutant ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)	(Nandre et al., 2013)
JOL422	<i>Salmonella Gallinarium</i> challenge strain-wild-type	
JOL860	<i>Salmonella Enteritidis</i> challenge strain - wild-type	Nandre et al., 2012
JOL2596	<i>Salmonella Enteritidis</i> Ghost184:: <i>fliC</i> ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)	This study
JOL2727	<i>Salmonella Enteritidis</i> Ghost184 vector control	This study
JOL2737	<i>Salmonella Gallinarium</i> Ghost184:: <i>mCherry</i> ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)	Senevirathne et al., 2020.
JOL1940	<i>E. coli</i> DH5 α hosting pET28a:: <i>fliC</i> (<i>Salmonella Typhimurium</i>)	This study
JOL1991	<i>E. coli</i> BL21-DE, expression strain for pET28a:: <i>fliC</i>	This study
Plasmids		
pJHL184	An <i>asd</i> ⁺ vector, pBR ori plasmid carrying <i>ss ompA/His6</i> , multiple cloning site, <i>ncI857/λPR</i> promoter, <i>araC ParaBAD</i> , <i>phiX174</i> lysis gene E	Hur and Lee, 2015
pJHL184:: <i>fliC-fimA-CD40L</i>	pJHL184 harboring <i>fliC-fimA-CD40L</i>	This study
pJHL184:: <i>mCherry</i>	pJHL184 hosting <i>mCherry</i> open reading frame in the multiple cloning site	(Senevirathne et al. 2020)
Primers		
<i>FliC EcoR1 FP</i>	GAGA GAATTC ATGGCACAAAGTCATTAATAC	This study
<i>FliC BamH1 RP</i>	AGAG GGATCC CTCTGTCAAATCAGCATTTG	This study
<i>FimA BamHI FP</i>		
<i>FimA NCOI RP</i>	GAGAGGATCCCCGGGCCCGGGCATGAAACATAAATTAATGAC	This study
<i>FP CD40LBgLI</i>	GAGACCATGGCCGGGCCCGGGCTTATTCGTATTTTCATGATAA	This study
<i>RP CD40LHindII</i>	GAGAAGATCTTGGATGACGACGAGCTACGC GAGAAAGCTTCATGCCAAAGTAGGTGTTGCC	This study
OMPCF	ATCGCTGACTTATGCAATCG (<i>Salmonella</i> genus specific)	(Alvarez et al., 2004)
OMPCR	CGGGTTGCGTTATAGGTCTG	„
ENTF	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG (SE specific)	„
ENTR	TGAACTACGTTTCGTTCTTCTGG	„

○ E용해 유전자 발현 고스트 벡터 제작

- pJHL184 고스트 플라스미드는 수렴 프로모터 구조를 가지고 있으며[4], *E. coli* lysis 유전자는 온도에 의해 유도되는 *C1857* 프로모터와 역방향 *ParaBAD* 프로모터를 갖는 λPR 사이에 위치함. 면역 보조 단백질인 *fliC*(NC_003197.2)와 *fimA* (NC_003197.2)는 살모넬라 엔테리티디스의 것을 사용하였으며 *FliC*의 C-말단 부분인 D0/D1 도메인을 운반하는 1-291a.a를 PCR 증폭시키고 GS 링커서열을 통해 *FimA*에 연결함. 이후 닭 *CD40L* (NM_204733.1)의 C-말단 도메인의 일부가 *CD40* 수용체와의 결합에 필수적이므로 앞의 구조물에 결합함. 따라서 본 구조물을 *EcoRI* 및 *SphI* 제한효소 부위를 사용하여 pJHL184 플라스미드 벡터의 다중 클로닝 부위 (MCS)로 서브 클로닝함(그림 3A). 재조합 플라스미드는 *E. coli* x232(Δasd)로 형질전환 되었고 PCR로 신규의 *fliC-fimA-CD40L* 삽입을 확인함. 닭의 면역화를 위해 약독화된 살모넬라 갈리나룸($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$) 균주로 형질전환 시킨 후(그림 3B) 생성된 균주를 JOL2596으로 명명하고, 벡터 단독으로 형질전환된 균주는 대조군으로써 JOL2727로 명명함.

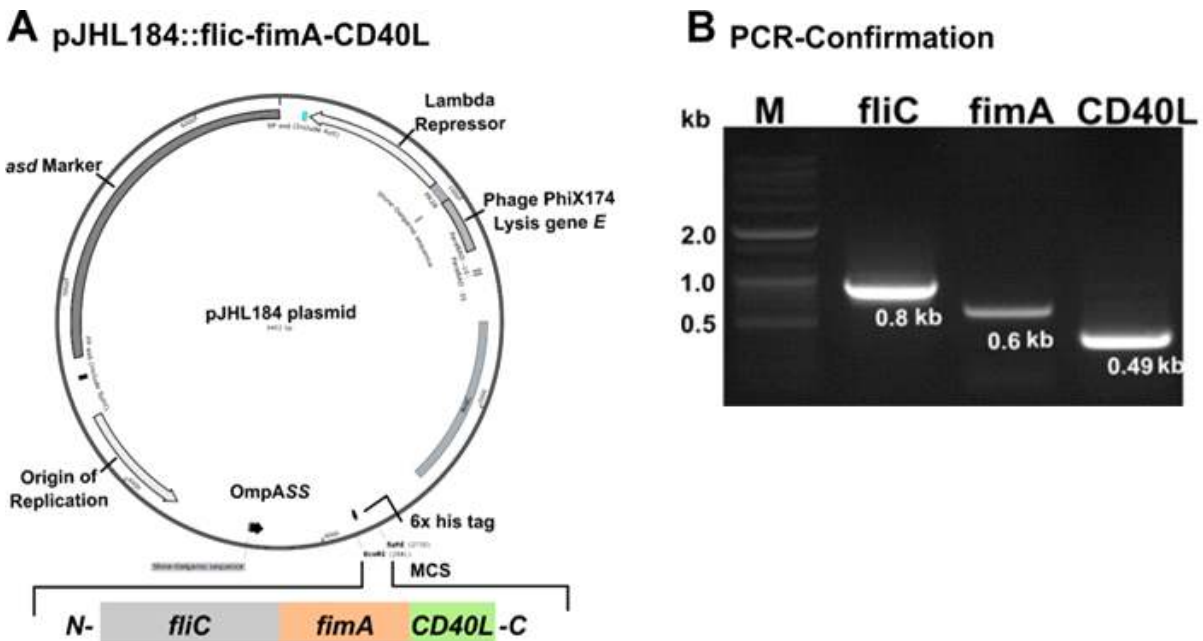


그림 3. Schematic representation of pJHL184 ghost plasmid and multiple cloning site (A) and confirmation of each element of the fusion antigen (B) is demonstrated.

○ 항원 제시능 평가

- 온도 유도에 의한 단백질 발현 및 외래항원의 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석 및 pJHL184 플라스미드에 내장된 mCherry의 발현을 통해 평가함. 변이균주는 20 mM *L*-arabinose의 존재하에 30°C의 허용 조건에서 최대 0.6 OD₆₀₀까지 성장하도록 제작됨. 배양액을 원심분리하여 균을 수확하고 PBS로 1회 세척하여 잔류 아라비노스를 제거함. 균을 다시 LB 배지에 재현탁하고 2 mL을 유리 시험관에 접종하고 42°C에서 2시간, 4시간, 6시간, 8시간 배양 후 배양된 균을 원심분리로 수집하고 PBS로 1회 세척하고 2 ml의 새로운 SDS 샘플 완충액에 용해시킴. 단백질을 95°C에서 10분 동안 가열하고 SDS-PAGE로 전기영동함. 단백질을 Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Tullagreen, Ireland)으로 옮긴 후 *FliC* 특이적 토끼 다클론 혈청을 사용하여 융합 항원 발현을 테스트함[23]. *OmpA* 신호 서열로 인한 표면 국소화를 추가로 입증하기 위해

살모넬라 갈리나룸은 pJHL184::mCherry 플라스미드로 형질전환 되었고, mCherry의 발현을 야생형 및 벡터 단독 살모넬라 갈리나룸과 비교함[23].

○ 용해능평가

- 개발 살모넬라 갈리나룸 백신균주인 JOL2596의 용해능은 42°C의 비허용 온도에 노출시켜 테스트함. 첫째, 성장 단계 동안 새로 접종된 배양물을 20 mM L-arabinose의 존재하에 30°C에서 성장시키고 600 nm 파장에서의 광학밀도가 0.6에 도달했을 때, 세포를 원심분리로 수집함. 펠릿을 PBS에 재현탁하여 잔류 아라비노스를 제거하고 LB 배지를 보충한 후 42°C에 노출시킴. 각 0시간, 24시간 및 36시간에 배양액의 OD 측정하고 각 배양물에 대해 생성된 콜로니 수의 측정을 위해 한천배지에 도말하고 100 µl의 배양물을 연속적으로 희석하여 LB 한천에 두 번 플레이팅함.

○ 전자현미경을 통한 용해 확인

- 개발 살모넬라 갈리나룸 백신균주에 대한 온도의 유도에 따른 용해여부는 주사 전자현미경(SEM)으로 평가함. 고스트 pJHL184가 있거나 없는 박테리아를 42°C에 8시간 동안 노출시키고 SEM 처리를 위해 세포를 수집함. 세포를 PBS로 2회 세척하여 배지 오염을 제거하고 소수의 세포를 슬라이드에 장착하여 전도성 물질로 코팅함. 표면 스캐닝은 10kV 가속 전압에서 Supra 40VP Gemini 주사 전자 현미경 시스템(Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 수행함.

○ 단백질 정제

- SG JOL422 및 SE JOL860 야생형 균주로부터 막 단백질을 얻은 후 1×10^8 /ml개의 세포를 수집하고 cold PBS로 세척함. 이들을 4°C에서 5분 동안 500xg에서 원심분리하고 PBS를 제거함. 이후 펠릿을 protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 함께 2 ml의 cold PBS (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 7.2 pH)에 재현탁함. probe sonicator (Sonics Vibra Cell, Newtown, CT, USA)를 사용하여 샘플을 30초 정지와 10초 펄스로 간단히 초음파 처리하고 균질액을 1.5 ml 튜브에서 700xg, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 온전한 세포와 잔여물을 제거한 다음, 상등액을 수집함. 4°C에서 2시간 동안 최대 속도로 원심분리를 하고 펠릿을 0.05% TritonX100이 함유된 PBS로 현탁하여 사용함[24].

○ 산란계 면역화 및 도전감염

- 1일령 nick layer hens 암탉(N=60, n=15)은 한국 공동 부화장에서 구입하여 생후 1개월이 될 때까지 식량과 물을 자유롭게 공급함. 동물 실험 및 동물 보호법 2007: 제13조 (동물 실험)의 지침에 따라 전북대학교(CBNU-2018-00264)의 승인을 받은 산란계를 4개의 그룹으로 나누고 그룹 A; JOL2596 고스트 백신, 그룹 B; JOL2727 벡터 대조군, 그룹 C; PBS 및 그룹 D; naive JOL2596 박테리아 고스트 백신 균주로 마리당 2×10^8 CFU로 피내 접종하여 면역화함. 1차 접종 후 3주 후에 1차 접종과 동일한 경로 및 용량에 따라 추가 접종을 수행함. 부스터 적용 2주 후, 살모넬라 갈리나룸 야생형 균주인 JOL422를 2×10^6 CFU/200 µl 도전감염한 후 체액성 면역 반응은 표준지침에 따라 날개 정맥에서 주기적으로 수집된 혈청으

로 평가함[25]. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 PBMC 증식 분석에 의한 세포 매개 면역 반응(CMI), 유세포 분석에 의한 T 세포 반응 및 면역조절 사이토카인 반응의 유도를 평가하기 위해 부스팅 후 2주에 분리함. 살모넬라 갈리나룸으로 도전감염 2주 후, 그룹당 3마리의 새를 조직병리학적 평가 및 비장 및 간의 잔여 박테리아 개체군 계수를 위해 안락사하고, 작은 조직 조각은 H&E 염색을 위해 처리함[26]. 고스트 사균백신에 의한 환경오염은 면역화 후 1주 및 2주에 배설강 면봉으로 채취된 샘플을 현탁하여 42°C에서 Rappaport Vassiliadis 배지(RV 배지, BD)로 배양하고 농축하여 평가함.

○ 체액성 면역활성 평가

- JOL2596으로 면역화 된 산란계의 체액성 면역 반응 평가는 야생형 균주의 살모넬라 갈리나룸 외막 단백질과 정제된 FliC 단백질을 이용하여 간접 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)을 수행하여 조류 항체 아형 IgY의 발현정도를 측정함으로써 이루어짐. ELISA 플레이트를 0.5 M Na₂CO₃/NaHCO₃ 코팅 완충액에 포함된 500 ng의 각 단백질 항원으로 4°C에서 코팅함. 플레이트를 1xPBST로 2회 세척하고 실온에서 1시간 동안 5% Bovine Serum Albumin으로 blocking 함. 혈청 샘플을 1:50 비율로 희석하고 37°C에서 2시간 동안 반응하고 1xPBST로 3회 세척함. 이후 1시간 동안 1:3000 희석배율로 anti-chicken IgY 항체와 함께 배양하고 1xPBST로 4회 세척함. 비색 측정을 위하여 o-phenylenediamine dihydrochloride 기질을 37°C에서 10분간 반응시킨 후 50 µl의 2N H₂SO₄을 처리하여 발색반응을 중단한 후 492 nm에서 측정함.

○ 세포성 면역활성 평가

- 항원 자극에 대한 CMI 반응은 PBMC 증식으로 평가함. 따라서 PBMC 증식 반응은 살모넬라 갈리나룸 외막 단백질 또는 FliC 정제 단백질로 재자극하고 세포수의 증가는 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석으로 정량함. 부스터 면역화 2주 후, PBMC를 전혈로부터 Histopaque 1077 (Sigma) 밀도 분리 절차로 분리하고 수집된 세포를 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지로 세척하여 10% FBS를 함유하는 RPMI를 이용하여 1x10⁵ 세포수로 96 well plate에 배양함. 각 단백질 항원 500 ng 또는 배지 단독으로 처리하고 자극한 후, 세포를 5% CO₂배양기에서 72시간 동안 37°C에서 배양함. MTT 용액 100 µl를 세포가 배양된 well에 분주한 후 빛에 노출시키지 않고 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션함. 각 well에 50 µl의 DMSO를 첨가하고 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하여 생성된 포르마잔 산물은 570 nm에서 흡광도를 이용하여 측정함.

○ T세포 분화능 평가

- T세포 집단의 분화는 PBMC 유래 T 세포를 40 MOI의 고스트 백신 균주에 재노출시켜 평가함. 각각의 anti-mouse CD3a-PE, CD8-FITC, and anti-mouse CD4-perCP-vio700 항체 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에 대한 분화 정도를 정량화함. 면역화 그룹 및 대조군 그룹으로부터 PBMC를 부스터 적용 2주 후에 수확하고 앞서 설명한 바와 같이 단백질 항원으로 자극하기 위해 처리함. 10% FBS를 함유하는 RPMI로 1x10⁵ cell/well로 세포를 분주한 후 96 well plate에 배양하여 항원으로 재자극하고 CD3a-PE, CD8-FITC, anti-mouse CD4-perCP-vio700 항체로 30분간 반응한 후 FACS running buffer로 3회 세척함. 최종적으로 200 µl의 FACS running buffer에 현탁하고 유세포 분석기(MacsQuant)에

서 분석함. MacsQuant 소프트웨어를 사용하여 적절한 CD3+, CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ 집단을 계수하여 분석을 수행함[27].

○ 사이토카인 발현 측정

- 면역화 유도능 측정을 위한 면역조절 사이토카인 IFN- γ 및 TNF- α 발현수준을 정량적 실시간 PCR로 평가함. 부스터 면역화 2주 후에 수집된 PBMC를 1×10^6 cell/well로 24 well plat에 분주함. 전염증성 보호 면역반응을 나타내는 사이토카인으로서, 상기 2가지 사이토카인을 선택하였고 배양된 세포를 살모넬라 갈리나룸 또는 정제된 FliC 단백질로 자극하고 24시간 동안 반응함. total RNA (HybridR; GeneAll, Seoul, Korea)를 분리하고 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster, USA)를 사용하여 cDNA로 합성함. 이용한 프라이머 서열은 [표 3.]에 기재하였음. 사이토카인의 유도는 SYBR Green master mix를 사용하여 qRT-PCR에 의해 평가하고 발현 정도는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법으로 나타냄[28].

○ 통계분석

- 모든 데이터는 GraphPad Prism 6.00 소프트웨어(미국 캘리포니아 주 샌디에고)를 사용하여 분석함. Tukey의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 분산 분석(ANOVA)을 수행하여 P-value <0.05로 테스트 그룹 간의 통계적 유의한 차이를 평가함.

제3절 백신균주 구축 및 대량배양조건 확립

● 백신주의 기원

- 우진비앤지(주)에서 가축질병대응기술개발사업의 [향상된 약독화 및 DIVA 가능한 생균백신과 안전성 및 면역원성이 증가된 가금티푸스와 살모넬라를 동시 방어 가능한 사균 백신의 개발] 과제를 통해 공동연구기관인 전북대학교 이준화 교수팀에서 개발한 균주를 기술이전(기술이전 계약을 2021년도 11월 11일 체결) 받아 백신균주로 사용하였음.

● 백신주의 제조

○ 마스터 세포은행(Master Cell Bank, MCB) 제조

- 전북대학교 이준화 교수로부터 분양받은 2종의 백신주를 배양배지인 LB broth에 배양하여 MCB를 제조함. 배양 배지인 LB agar 배지에 분양 받은 2종의 백신주를 각각 획선 도말(streaking) 하고, 37°C 또는 30°C, 24시간 배양하여 순수 세균 집락을 채득 하였음.

- 순수 세균 집락을 LB broth 배지 10.0 ml에 이식하여 37°C 또는 30°C, 24시간 진탕 배양(160 rpm)한 후 새로운 LB broth 배지 90.0 ml에 이식하여 37°C 또는 30°C, 24시간 진탕 배양(160 rpm)을 수행하였음. 37°C 또는 30°C, 24시간 배양된 세균을 10,000 g에서 15분간 원심분리한 후 배양 상층액(supernatant)을 제거하고 세균 침전물(pellet)을 채득 하였음.

세균 pellet에 동결보존액인 30% Glycerol로 부유시켰으며, 제조용 세포은행 시까지 -80℃에서 동결보존 하였음.

- 고스트 플라스미드를 보유한 사균 백신주의 경우, 20 mM L-arbinose 포함된 LB broth 배지 내 30℃ 조건에서 배양하여 제조하였음.

○ 제조용 세포은행(Working Cell Bank, WCB) 제조

- 제조된 2종의 마스터 세포은행(MCB)을 배양배지인 LB broth에 배양하여 WCB를 제조함. 배양 배지인 LB agar 배지에 분양 받은 2종의 백신주를 각각 획선 도말(streaking) 하고, 37℃ 또는 30℃, 24시간 배양하여 순수 세균 집락을 채득 하였음.
- 채득된 순수 세균 집락은 MCB 배양 방법과 동일한 조건으로 제조하였고, 시험백신 제조 시까지 -80℃에서 동결보존 하였음.

● 대량배양조건 확립

○ 제조용 세포은행(WCB)의 flask scale 배양조건

- WCB를 LB agar (BD, France) plate에 streaking 하였고, 37℃ 또는 30℃ incubator에서 overnight 배양 후, single colony를 100 ml LB broth (BD, France)에 접종하여 37℃ 또는 30℃ shaking incubator에서 overnight 배양하였음. 2.0 L flask에서 LB broth (BD, France) 900 ml 에 pre-culture된 세균 배양액 100.0 ml을 접종하여 8시간동안 배양하였고, 시간대 별로 흡광도(OD₆₀₀) 값을 측정하였음.
- 고스트 플라스미드를 보유한 사균 백신의 flask 배양은 20 mM L-arbinose가 포함된 LB broth 배지 내 30℃ 조건에서 배양하였음.

○ 5.0 L fermentor 를 이용한 대량배양 조건

- WCB를 사용하여 대량배양 조건을 확인하였음. WCB 1 vial을 LB agar plate에 streaking 하였고, 37℃ 또는 30℃ incubator에서 overnight 배양한 후, single colony를 400 ml LB broth에 접종하여 37℃ 또는 30℃ shaking incubator에서 overnight 배양하였음. 3.6 L LB broth에 pre-culture된 세균 배양액 400 ml을 접종하였음. 배양액의 pH가 7.0을 유지할 수 있도록 1.0 N NaOH와 0.5 N HCl을 첨가하여 조절하였음.
- 고스트 플라스미드를 보유한 사균 백신의 경우, 대량배양은 20 mM L-arbinose가 포함된 LB broth 배지를 이용하였고, 30℃ 조건에서 배양하였음.
- 산소포화도는 30% 전후를 유지할 수 있도록 stirrer RPM과 산소주입량을 수동으로 조절하여 배양하였음. 배양 중 1시간 단위로 흡광도(OD_{600nm}) 값과 온도, ph, 산소포화도를 측정하였음.

제4절 제조용 백신주를 이용한 시험백신 제조 및 품질시험

● 시험백신 제조

○ 전임상시험용 시험백신 제조

- WCB를 사용하여 5.0 L fermentor를 통해 대량배양을 진행하였고, 이로부터 시험백신 2종을 제조하였음. 시험백신은 생백신용과 사백신용으로 제조하였고, 추후 전임상시험에 사용할 예정임.

● 백신주 및 시험백신의 품질시험

○ 마스터(MCB) 및 제조용 세포은행(WCB)과 시험백신의 마이코플라즈마 부정시험

- MCB (WGB-M-SG-2596, WGB-M-SG-G184), WCB (WGB-W-SG-2596, WGB-W-SG-G184) 및 시험백신 내 마이코플라즈마 감염여부를 확인하기 위해 마이코플라즈마 부정시험을 수행함. 각각의 세포은행 및 시험백신의 균주로부터 DNA를 추출한 후 표 4에 있는 프라이머를 사용하여 94℃에서 5분간 denature시킨 후, 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초씩 반응되게 30 cycles 수행한 후 72℃에서 7분간 extension 하는 조건으로 PCR을 수행하였음.

표 4. *Mycoplasma* 검출용 특이 PCR Primer 염기서열

Primer name	Nucleotide sequence (5'→3')
Universal forward primer	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
Universal reverse primer	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G

○ 마스터(MCB) 및 제조용 세포은행(WCB)과 시험백신의 순수시험

- MCB (WGB-M-SG-2596, WGB-M-SG-G184), WCB (WGB-W-SG-2596, WGB-W-SG-G184) 및 시험백신 내 다른 세균의 감염여부를 확인하기 위해 순수시험을 수행하였음. 각각의 세포은행 및 시험백신을 각각 nutrient agar 4개, 액체 thioglycollate broth 4개에 0.5 ml씩을 넣어 37℃와 22℃에서 각각 2개씩 7일간 배양하였음. 배양종료 후 현미경 확인 및 그람염색법으로 세균을 염색하였음.

○ 마스터(MCB) 및 제조용 세포은행(WCB)과 시험백신의 역가 확인

- MCB (WGB-M-SG-2596, WGB-M-SG-G184), WCB (WGB-W-SG-2596, WGB-W-SG-G184) 및 시험백신의 역가를 확인하였음. 이를 위해 2종의 시험백신 각 1.0 ml씩을 9.0 ml LB 배지에 희석하였고, 이 희석액을 다시 9.0 ml의 LB 배지에 10진 희석하였음. 단계 희석된 용액 중 0.1 ml을 LB agar plate에 도말하여 37℃ 또는 30℃에서 24시간 배양하였음.

제5절 경구 투여를 위한 제형 개발 및 최적화 연구

● 전임상시험용 시험백신의 제형 최적화

○ 전임상시험용 시험백신의 동결건조

- 5.0 L fermentor를 통해 대량배양을 진행하였고, 이로부터 시험백신 2종을 제조하였음. 시험백신은 생백신용과 사백신용으로 제조하였고, 추후 전임상시험에 사용할 예정임.
- 동결건조 조건 확인할 것. 생균수의 양을 최대한 보존하기 위해 4℃를 유지한 상태로 48시간 동안 동결건조(-60℃)를 진행하였음.

○ 동결건조 보호제 선정

- 생독백신의 동결건조 시, 백신 균주의 역가 감소를 방지하고자 동결건조에 효과적인 보호제 선별을 진행하였음. 이를 위해 3종류(TPGG, LPGG 및 SPGG)의 동결건조 제형을 사용하여 시험백신을 제조하였음(표 5). 제조된 시험백신에 대한 생균수를 측정하여 동결건조 보호 제형의 효과를 분석하였음.

표 5. 동결건조 제형의 조성

종류	TPGG	LPGG	SPGG
균+보호제 총량	83 ml	75 ml	75 ml
농도	3 %	3 %	3 %
Trehalose	2.48 g		
Lactose		2.25 g	
Sucrose			2.25 g
KH ₂ PO ₄	0.14 g	0.012 g	0.012 g
K ₂ HPO ₄	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

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

제1절 동물 및 환경에서 안전하며 DIVA가능한 O항원 결핍 살모넬라 갈리나룸 백신 균주의 개발

● 수행결과

○ 약독화 살모넬라 살리나룸 백신 균주 제작 및 특성 분석

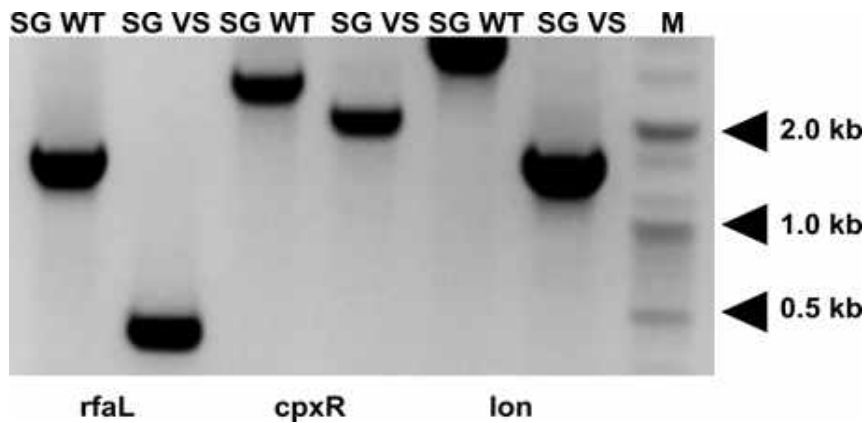
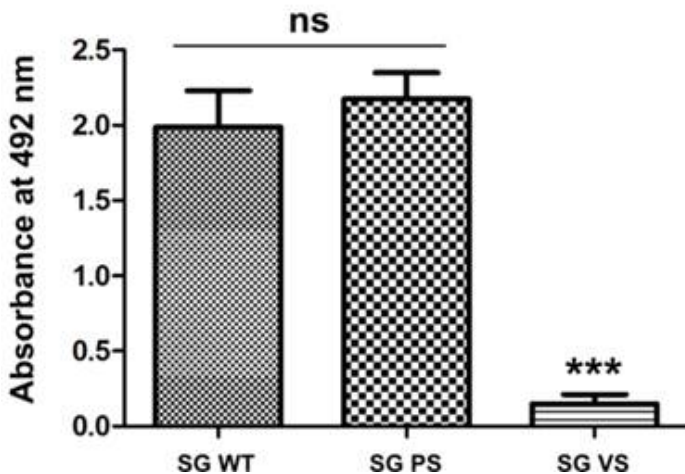


그림 4. *Salmonella Gallinarium* mutant confirmation by PCR using gene flanking primers. [선행연구결과]

- 살모넬라 갈리나룸의 *lon*, *cpxR* 유전자결실 모변이주로부터 Lambda Red 재조합 방법을 통해 프레임 내에 존재하는 *rfaL* 유전자를 결실시킨 후 표1에 나열된 flanking 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 목적 유전자의 결실을 확인함(그림 4).

(A) Surface reactivity



(B)

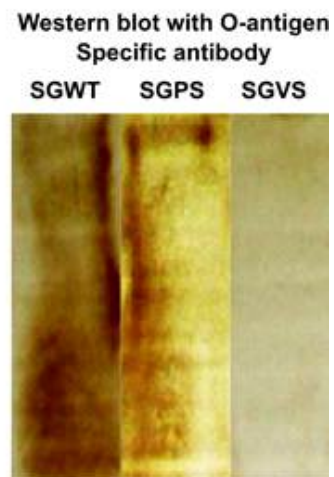


그림 5. Confirmation of absence of O-antigen on *Salmonella Gallinarium* by (1) whole cell ELISA and (2) by Western blot analysis. [선행연구결과]

- 또한, *rfaL* 유전자의 결실로 O-항원 성분의 제거가 이루어져 LPS의 절단을 유발함. O-항원의 절단은 살모넬라 갈리나룸 돌연변이체의 정제된 LPS의 SDS PAGE에 의해 확인됨(그림 5).

○ **약독화 살모넬라 갈리나룸 백신 균주의 안전성 평가**

- SGVS의 안전성은 경구 및 IM 경로를 통한 접종 시 SGPS 및 SGWT 균주의 안전성과 비교됨. Cloacal 면봉으로 분변을 각 산란계 그룹에서 면역 후 1일, 3일, 5일, 7일, 14일째에 채취함. 분변의 균질화된 샘플은 BGA 플레이트에 직접 도금하거나 농축 후 살모넬라 갈리나룸 변이주 또는 살모넬라 갈리나룸 야생형 균주의 오염 가능성을 테스트함. SGVS는 접종 후 1주일 동안 채취한 검체에서 발견되지 않았으나, 접종 후 1주일 동안 경구 접종 검체에서는 SGWT 균주가 나타남. 또한 혈청형별 프라이머(표1.)를 사용하여 PCR로 잔존 여부를 확인하였으며 산란계에서 SGVS, SGPS, SGWT 균주의 회복은 살모넬라 갈리나룸 변이주가 2주 만에 숙주 조직에서 쉽게 제거되는 반면 SGWT 균주는 산란계가 죽을 때까지 지속된다는 것을 보여줌. SGWT 접종 조류에서는 심한 설사와 체중 감소를 보였으며 40 MOI로 감염 후 산란계 대식세포에서 백신 균주의 감소 수준을 확인함. 20시간 동안의 세포내 생존과 대식세포에 대한 독성을 측정함 결과 감염 후 12시간 후에 명백한 세포독성이 나타난 반면, SGVS에 접종된 그룹에서는 매우 적은 세포독성을 보임(그림 6). 이러한 결과는 SGVS 변이주가 대식세포와 같은 항원제시세포에 심각한 독성을 유발하지 않으며 야생형과 같이 오랜 기간 지속되지 않는다는 것을 보여줌.

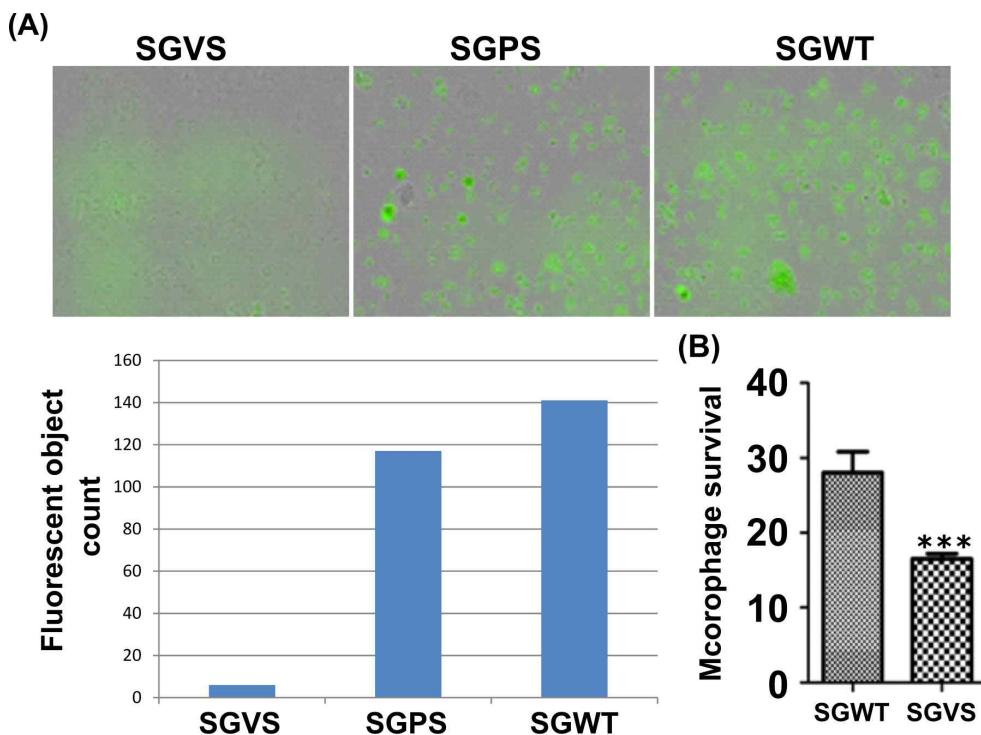


그림 6. *In vitro* cytotoxicity reduction and Confirmation of absence of O-antigen.

○ **약독화 균주에 의한 전신성 및 체액성 면역반응 평가**

- 경구 및 IM 경로를 통해 살모넬라 갈리나룸 변이균주 또는 야생형 균주로 면역화 된 산란계에서 조류 항체의 아형IgY의 반응을 평가함. 경구 및 IM 경로로 접종된 그룹 모두에서 1차 면역화 2주

후 살모넬라 갈리나룸 특이 IgY 반응의 현저한 증가를 보임. 또한, IM 경로를 통한 추가 면역 후 경구면역화 그룹보다 살모넬라 갈리나룸 특이 IgY 반응이 현저히 증가한 것을 확인함(그림 7).

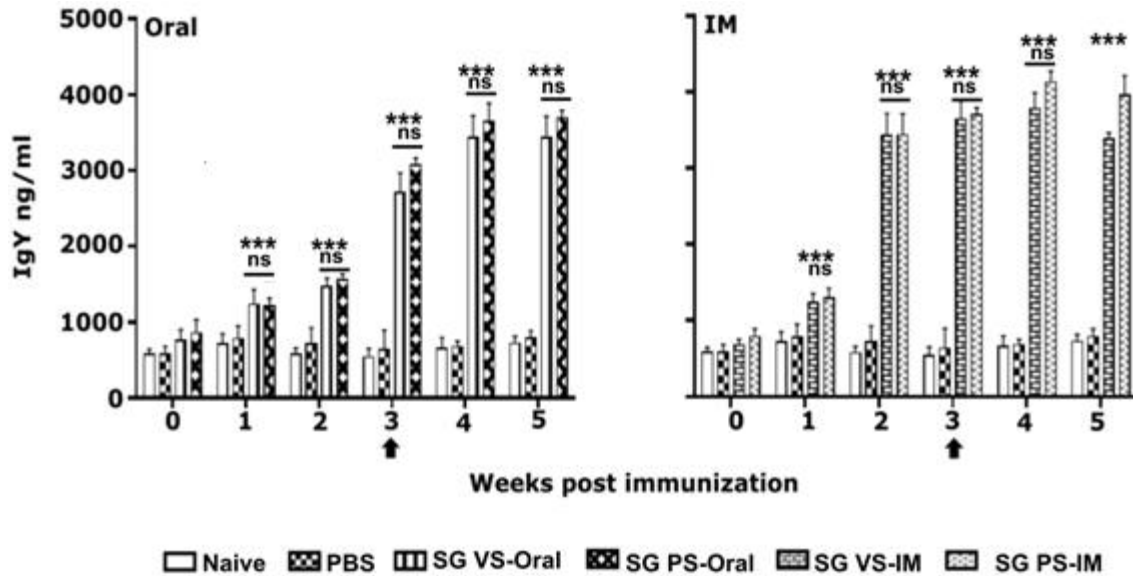


그림 7. Antibody responses in immunized chicken. [선행연구결과]

○ 말초혈액의 단핵 세포 증식 반응 평가

- 경구 및 IM 경로로 면역화 된 각 산란계 그룹의 부스터 적용 후 PBMC를 2주 동안 샘플링 함. 획득한 세포를 살모넬라 갈리나룸 외막 단백질로 다시 자극한 후 3일 동안 배양하여 MTT 기반 분석으로 세포 증식반응을 평가함. 경구 면역된 그룹(P<0.05)보다 IM 접종된 그룹에서 상당히 높은 증식반응이 관찰됨(그림 8).

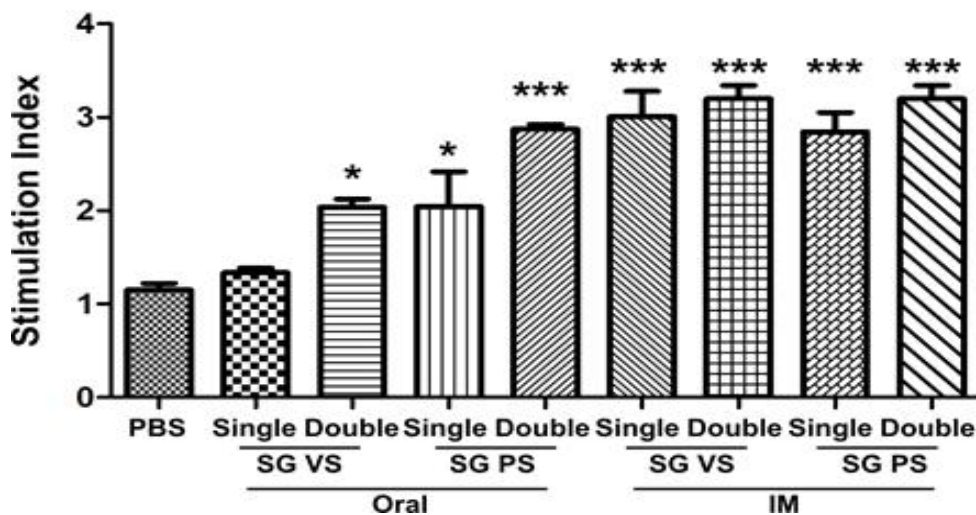


그림 8. Peripheral blood mononuclear cell proliferation assay. [선행연구결과]

○ 약독화 균주에 의한 세포성 면역반응 평가

- 면역화에 의해 유도된 T림프구 분화의 변화를 분석하기 위해 PBMC에서 T세포마커인 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+에 대한 유세포 분석을 통해 조사함. 면역화 후 부스팅한 산란계

으로부터 14일에 PBMC를 수확하여 96웰 플레이트에 1×10^5 세포를 분주한 후 3일 동안 SGWT omp 단백질로 재자극 함. CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ 마커로 집단을 나누고 각 집단의 비율을 비교 평가함(그림 9). PBS 대조군과 비교한 결과 경구 접종군에 비해 IM 접종군 상당히 높은 CD8+ 의 분화가 관찰됨에 따라 CD4+ 보다는 CD8+ 세포로의 분화가 효과적으로 유도됨을 확인함($P < 0.05$).

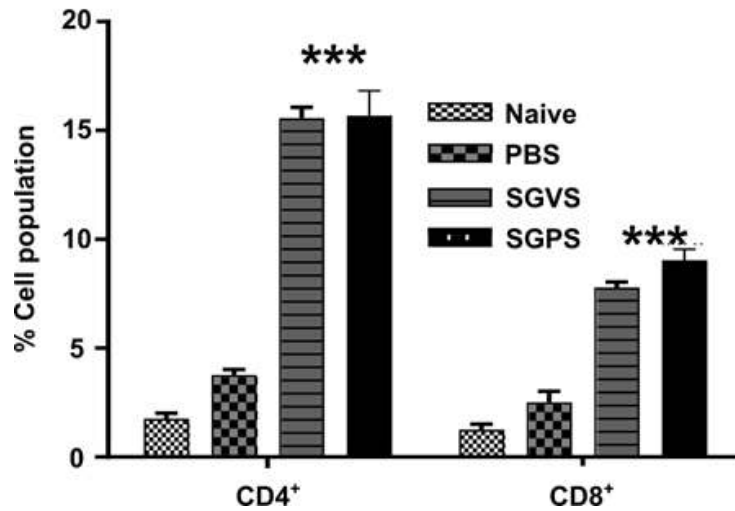


그림 9. T-Cell responses by Flow cytometric assessments

○ 약독화 균주에 의한 사이토카인 활성 측정

- 살모넬라 갈리나룸 특이적 사이토카인 활성 또한 IFN- γ 및 IL-2, IL-12, IL-4에 대한 항원 특이 유도반응을 qRT-PCR로 mRNA 활성을 통해 확인함. 부스터 면역화 2주 후, PBMC를 각 산란계 그룹에서 채취하고 살모넬라 갈리나룸의 omp로 자극하고 24시간 배양 후 total RNA를 추출하여 동일한 농도의 RNA로 cDNA를 합성함. 사이토카인 프로파일에서 IM으로 접종된 산란계 그룹에서 I형 사이토카인 IFN- γ , IL-2, IL-12의 현저한 유도와 경구 및 IM 접종 그룹 모두에서 IL-4 사이토카인의 발현이 다소 증가한 것을 알 수 있음(그림 10).

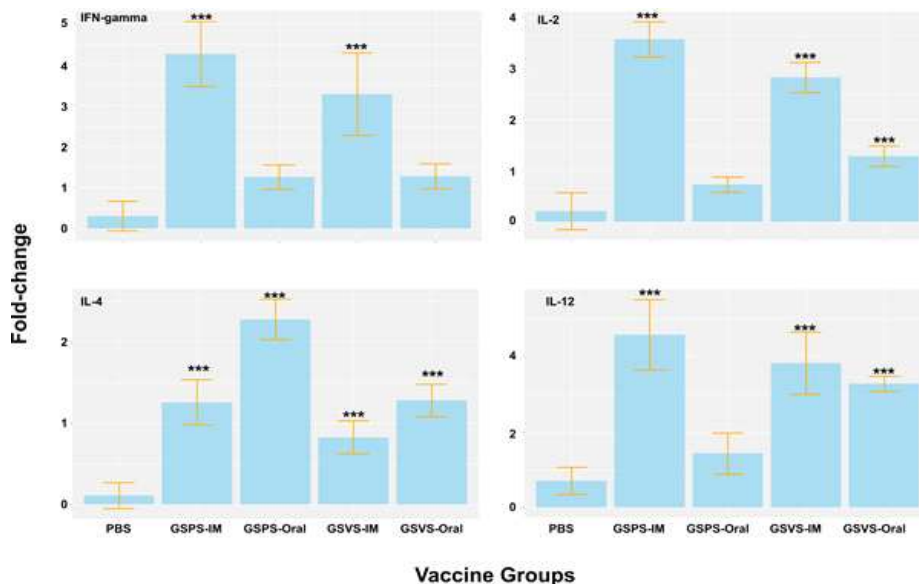


그림 10. Immunomodulatory cytokine induction. Induction of cytokines in PBMC, assessing for IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-12 expression.

○ 방어능 평가

- 개발 살모넬라 갈리나룸 백신 후보주의 면역화에 따른 방어효능은 후보 균주의 1차 접종 2주 후 그리고 부스터 접종 후 2주에 야생형 살모넬라 갈리나룸 균주인 JOL422 (1×10^6 CFU)를 경구투여로 도전감염한 각 산란계 그룹을 통해 확인함. 도전감염 후 비장 및 간 조직에서의 잔존하는 야생형 균주를 확인하였으며, 가장 낮은 전신 감염은 부스터 적용 유무에 관계없이 IM 경로를 통해 면역화된 그룹에서 관찰되어 그 효능에 있어서는 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않음(그림 8). 또한, 비장 및 간 조직의 H&E 염색은 야생형 살모넬라 갈리나룸 도전감염 시 살모넬라 갈리나룸 변이주로 면역화된 산란계에서 향상된 방어 효과를 나타낸 것을 보임(그림 11).

Comparison of safety by SGVS

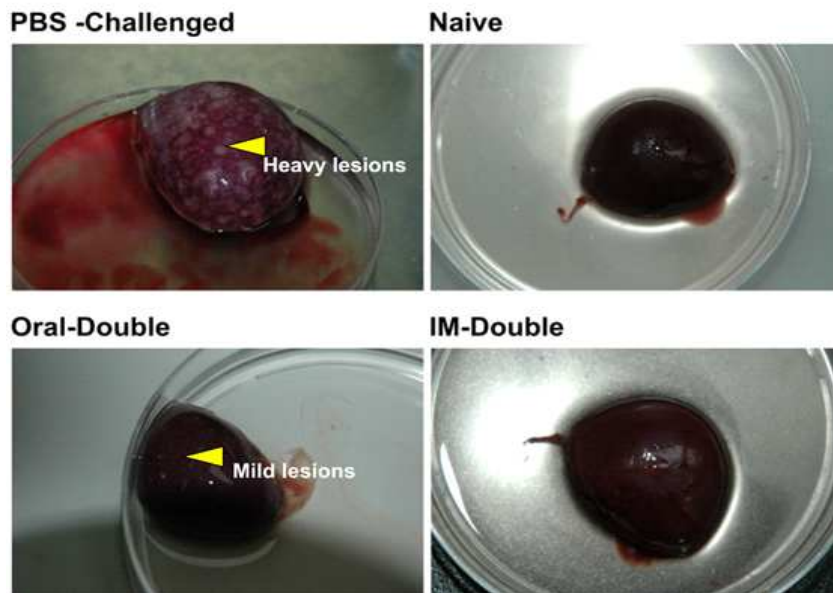


그림 11. Post-challenge disease burden in SGVS immunized and non-immunized chicken by phenotypic observations.

○ DIVA 감별 능력 평가

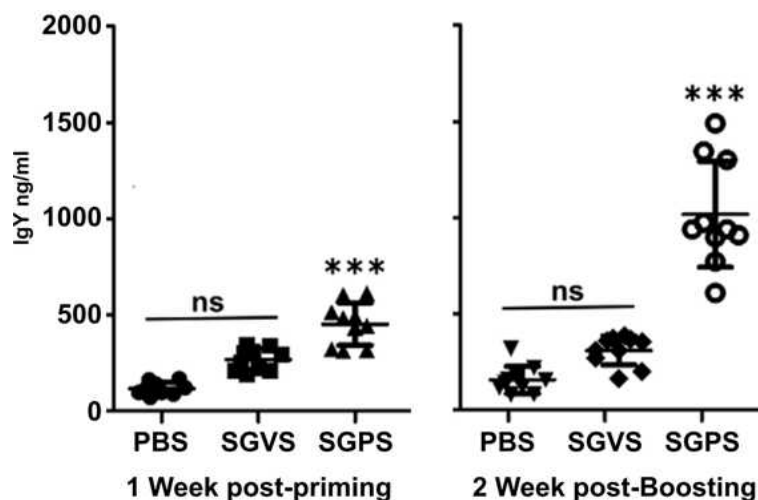


그림 12. DIVA ELISA.

- 본 연구에서 개발된 살모넬라 갈리나룸 변이 균주의 DIVA 감별 능력을 조사하기 위해 면역화 된 산란계 혈청에서 간접 ELISA를 사용하여 정제된 ST의 LPS로 재반응성을 확인함. 살모넬라 갈리나룸 변이균주로 면역화했을 때 LPS 특이 항체에 대한 반응을 완전한 LPS 구조를 가지는 SGPS 균주와 비교함. LPS 특이 항체 반응은 부스터 적용 7일 후 채취된 혈청에서 측정하였으며, IM 경로를 통해 살모넬라 갈리나룸 변이균주를 접종 한 모든 산란계 그룹에서 SGPS 균주로 접종 한 그룹보다 현저히 낮은 LPS 특이 항체 반응을 나타냄(그림 12).

● 결론

- 결과적으로, 본 연구에서는 고도로 약독화된 SGVS 살모넬라 갈리나리움 균주(SG $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)를 개발함과 동시에 동물모델과 환경에서의 모든 조건에서 안전함을 입증함. 모균주인 살모넬라 갈리나룸주(SG $\Delta lon \Delta cpxR$)에 비해 세포독성이 현저히 낮았고 대식세포에 대하여 유의미한 세포독성이 관찰되지 않음. 또한, *rfaL* 유전자의 제거로 현장에서 응용가능한 DIVA 능을 확인함. 현저한 약독화에도 불구하고, 본 개발 SG 변이균주는 치명적인 도전감염에 대하여 상당한 수준의 방어효능을 보였으며 이러한 특성으로, $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$ 삼중 돌연변이로 제작된 살모넬라 갈리나룸 백신 후보주는 임상 수준에서의 추가 연구의 가능성이 확인됨.

제2절 ^NFliC-FimA^C와 CD40L^C 이중항원 발현 살모넬라 갈리나룸 사균 백신 개발과 면역활성 및 방어효능 평가

● 수행결과

○ 고스트 플라스미드 제작 및 특성

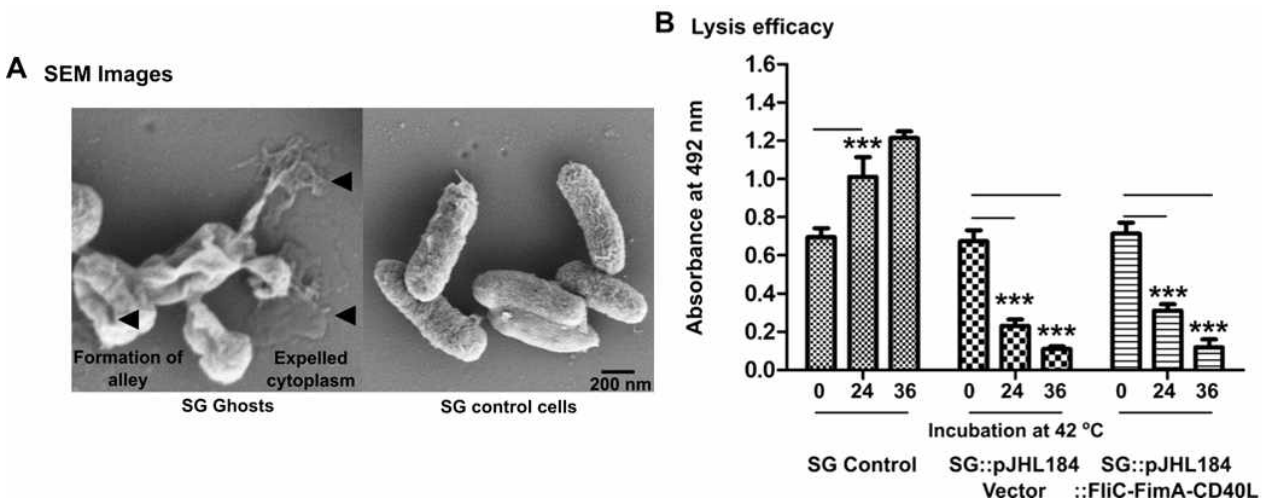


그림 13. Characterization of bacterial ghosts. (A) Scanning electron microscopy (SEM). (B) Lysis efficacy.

- 제작된 박테리아 고스트의 형성 유무는 주사형 전자현미경으로 평가함. pJHL184 고스트 플라스미드가 형질도입된 살모넬라 갈리나리움과 야생형 균주를 비교하였으며 혈질도입 및 배양 후 8 시간에 세포질을 배출하는 균의 형태는 막 터널의 형성을 관찰할 수 있지만(그림 13A), 야생형 균주는 손상되지 않은 막 구조를 가지고 있음. 또한 용해 유전자 E의 발현이 세포막을 파괴하지 않고 전체 외피 구조를 손상시키지 않은 것을 확인함. 고스트 플라스미드 pJHL184는 42°C에서 용해 유전자 E와 외래항원 발현을 동시에 활성화하는 온도 민감성 플라스미드이므로 용해 효능을 평가하기 위해 박테리아 고스트 JOL2596 및 벡터 대조군 균주 JOL2727을 30°C 및 20mM L-아라비노스를 추가하여 증식시킴. OD₆₀₀이 0.6에 도달하면 배양된 균주를 세척하여 잔류 아라비노스를 제거하고 LB 배지에 접종하여 42°C의 비허용 온도에서 증식시킴. 배양액의 밀도 감소 여부는 시간 경과 및 콜로니 계수를 통해 측정됨. 30°C에서 성장한 일반 배양 균주와 비교하여, 고스트화 균주는 24시간 이내에 상청액의 밀도가 상당히 감소함을 보여주었으며(<0.25 OD₆₀₀), 36시간까지 <0.2로 지속적으로 감소하여 튜브 바닥에 응괴를 형성함(그림 13B). 외부 항원 fliC-fimA-CD40L의 발현은 용해 유전자 E의 활성화와 동시에 일어나며 항원은 융합 항원의 N-말단에 부착된 OmpA 신호 서열로 인해 고스트 균주의 표면에 표지될 것임. 항원 발현의 증가는 각기 다른 유도 시간을 통해 수행된 웨스턴 블롯 분석을 통해 관찰할 수 있음(그림 14A), 또한 표면에서의 발현은 박테리아 표면의 mCherry 발현으로 입증되었음(그림 14B).

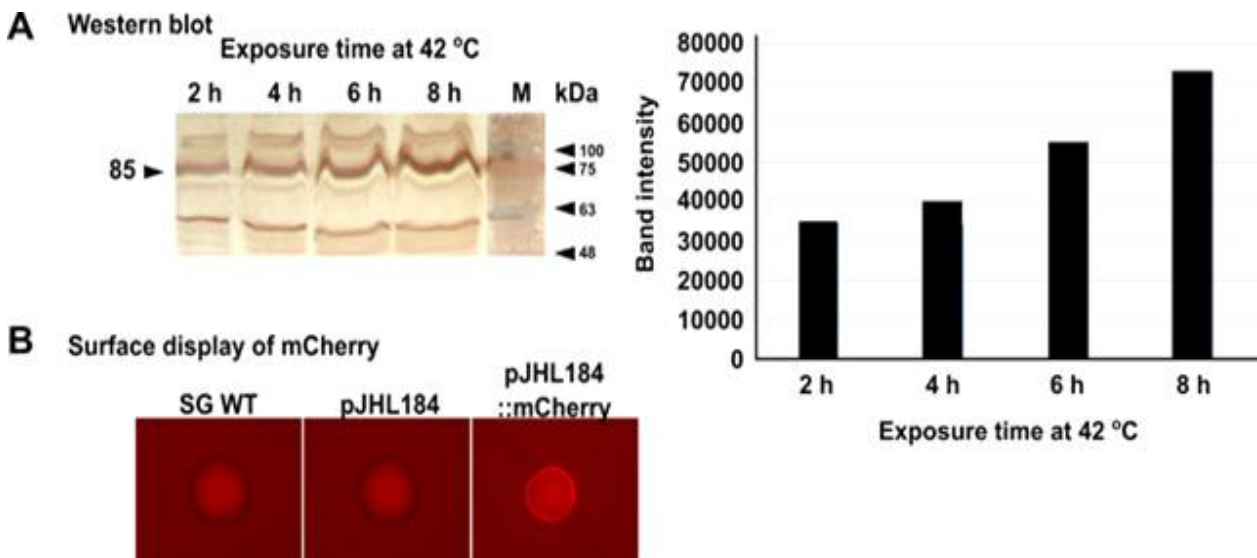


그림 14. Expression of target antigen upon temperature induction. (A) Western blot demonstrates the expression of fusion antigen upon induction at 42 °C for 2, 4, 6, and 8 h post-induction. (B) The surface display of antigen on bacterial cells was demonstrated by SG transformed with pJHL184::mCherry protein.

○ 환경오염능 평가

- 고스트 사균 백신의 경우 비활성화된 백신이기 때문에 환경오염 문제를 일으키지 않아야 함에 따라 RV 배양액에 배설강 면봉으로 채취된 배설물의 농축을 수행하여 확인함. 농축 후, 배양액 100 μl를 계대희석하고 BGA 플레이트에 도말하여 생성된 콜로니를 무작위로 선택하고 PCR로 확인한 결과 살모넬라 갈리나리움 백신 균주는 관찰되지 않았음.

○ 체액성 면역활성 평가

- 체액성 면역 반응은 고스트 사균백신으로 면역화 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주 후에 수집된 혈청을 사용하여 살모넬라 갈리나룸 외막 단백질 및 FliC 정제 단백질을 재자극함으로써 평가됨. IgY 항체 반응의 증가는 반응이 2 주째부터 PBS 대조군과 대비하여 확연하게 관찰됨. 살모넬라 갈리나룸 특이적 반응은 3 주째까지 JOL2569 백신 균주와 JOL2727 벡터 대조군 사이에서 비슷하게 보임. 부스터 적용 후, 살모넬라 갈리나룸 백신 균주에서 유의한 살모넬라 갈리나룸 특이적 반응이 관찰되었으며 FliC 특이적 항체에 의해 표시된 반응은 1 차 면역화 3 주 이후에 SG JOL2569 백신 균주에서 유의하게 높았으며, 부스터 적용 시 유의하게 증가함(그림 15B).

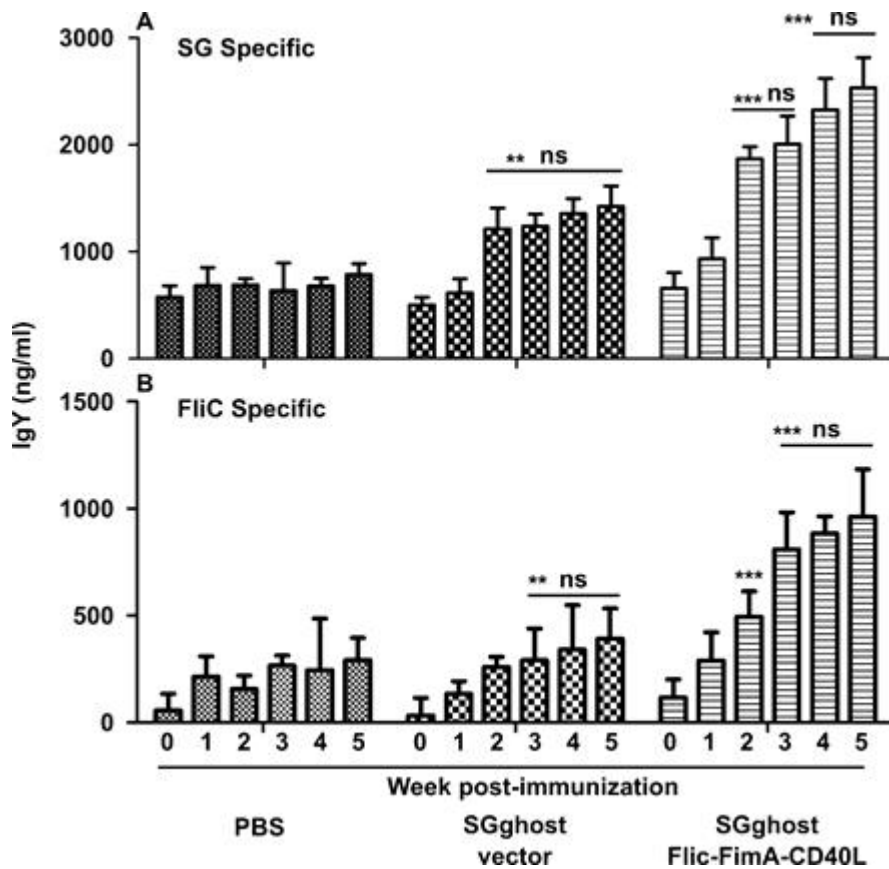


그림 15. Humoral immune responses. Humoral IgY antibody responses were assessed by indirect ELISA against SG- and FliC-purified proteins.

○ PBMC 증식분석

- 항원 특이적 세포 증식 반응은 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)를 사용하여 분석됨. 부스터 적용 2 주 후에 각 닭 그룹에서 수집된 PBMC 를 살모넬라 갈리나룸 또는 엔테라이티디스 외막 단백질 또는 FliC 정제 단백질로 자극하고 3 일 후, MTT 분석은 PBS 대조군과 비교하여 각 항원으로 자극된 모든 면역화된 그룹에서 유의한 세포 증식 반응을 나타냄. 살모넬라 갈리나룸 고스트 균주인 JOL2569 와 벡터 대조군인 JOL2727 모두 비슷한 수준의 세포증식 반응을 보인 반면, FliC 특이적 반응은 표면에 표시된 증강제 역할을 하는 항원으로 인해 SG JOL2569 백신 균주에서 상당히 높은 수준의 증식반응을 보임(그림 16).

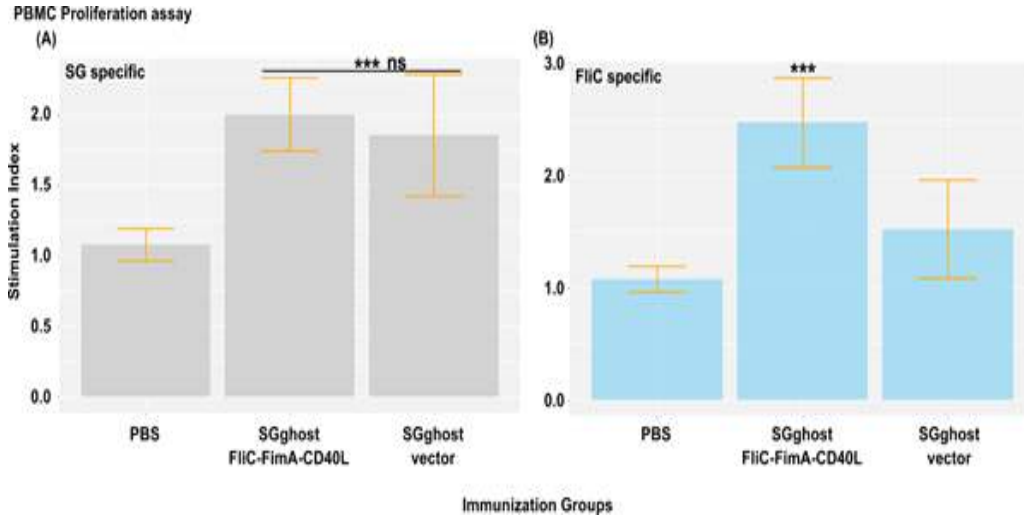


그림 16. Peripheral blood mononuclear cell proliferation assay. Cell-mediated immune responses were assessed by PBMC proliferative responses.

○ 사이토카인 유도 반응

– 면역화에 의해 유도된 면역조절 사이토카인 활성 반응은 IFN- γ , TNF- α , IL-12 및 IL-4의 정량화로 평가됨. IFN- γ 와 TNF- α 는 모두 Th1형 면역활성으로 유래된 전염증 반응을 구분하는 반면, IL-4는 Th2형 면역 유도에 의해 구분되는 반대 반응을 나타냄. SG JOL2569 백신 균주 또는 JOL2727 벡터로 면역화된 닭은 PBS 대조군과 비교하여 유의하게 더 높은 수준의 사이토카인 유도능을 가짐. 그러나 FliC-FimA-CD40L을 표지하는 살모넬라 갈리나룸 고스트는 벡터 대조군보다 더 높은 수준의 전염증 반응을 보여 살모넬라 갈리나룸 및 살모넬라 엔터라이티디스 균주와 같은 세포 내 병원체의 제거에 중요한 역할을 할 수 있음(그림 17).

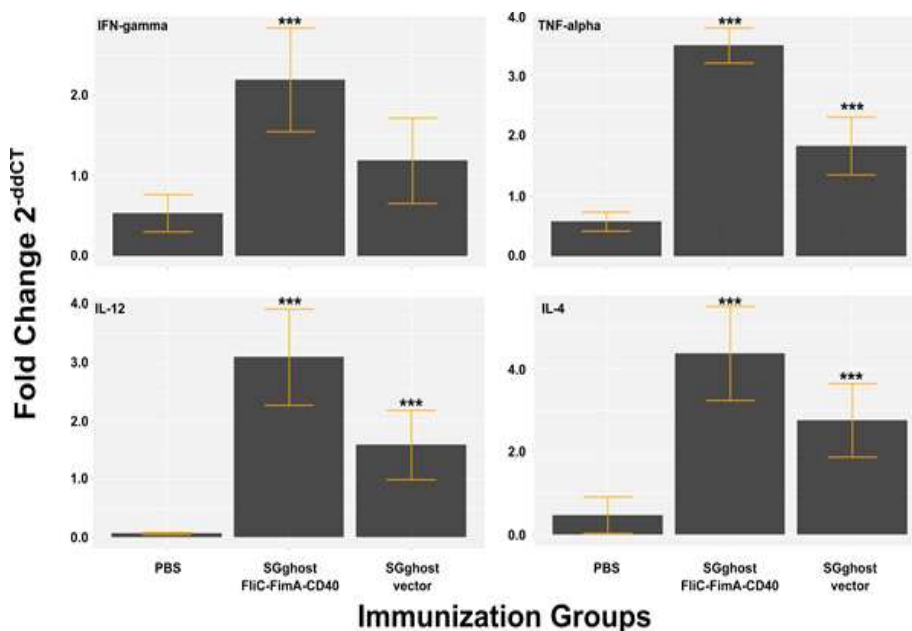


그림 17. Cytokine responses. Pro-inflammatory cytokine induction was assessed by quantifying IFN- γ , TNF- α , IL-12, and IL-4 levels using PBMCs collected two weeks after the booster immunization.

○ 면역화로 인한 T세포 반응 분석

- T 세포의 평가는 닭에서 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균 백신에 의해 활성화된 면역 반응의 지표가 될 수 있음. CD3+CD4+/CD3+CD8+ T 세포 집단 간의 비율은 PBS 그룹의 경우 약 3.8인 반면, 살모넬라 갈리나룸 벡터 단독 대조군 JOL2727은 2.6의 비율을 보이고 살모넬라 갈리나룸 고스트 JOL2569 백신 군주는 1.16의 비율을 보임. 이 결과는 CD3+CD4+ T세포 반응을 상쇄하면서 CD3+CD8+ T세포 집단의 순차적인 증가를 나타냄. CD8+ 세포독성 T-세포의 증가는 세포독성 T-세포의 증식 및 항원 제시를 수월하게 유도할 수 있는 표지된 FliC-FimA-CD40L 구조물에 의한 것일 수 있음. 모든 면역화된 그룹에서 생성된 T-세포 반응은 PBS 대조군보다 유의하게 높은 결과를 보임(그림 18).

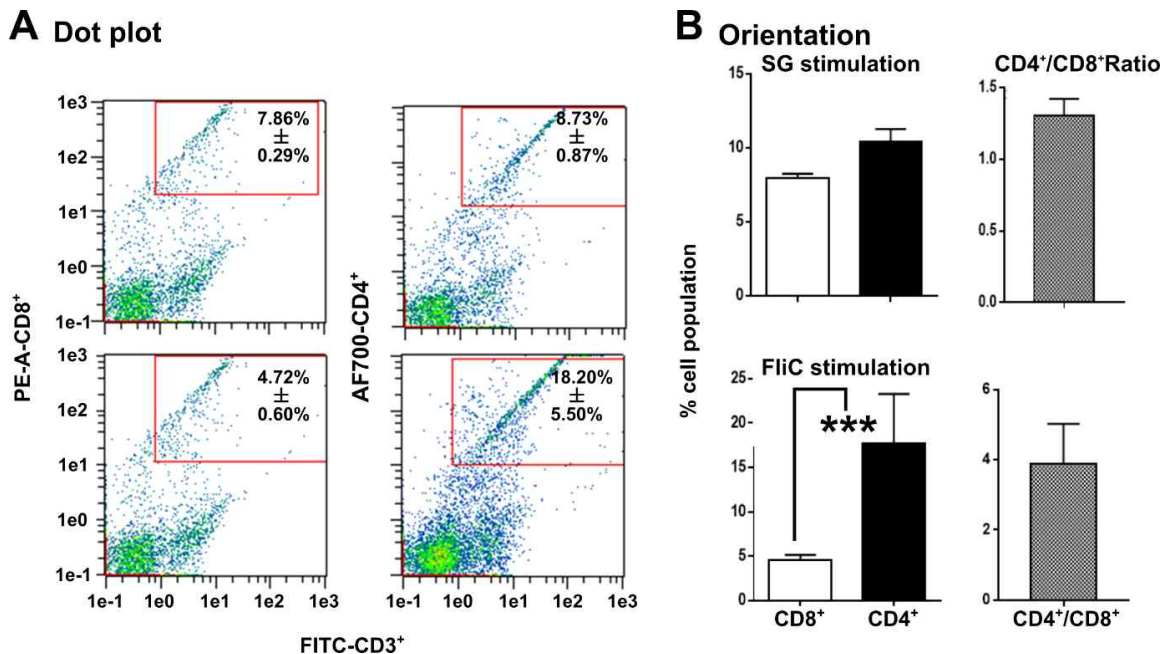


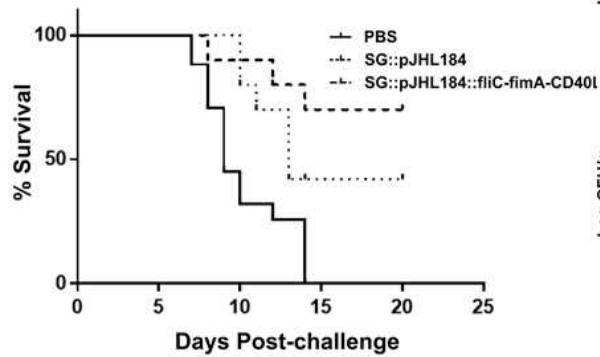
그림 18. T-cell immune responses. (A) representative scatter plot graphs, (B) percent population of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ were demonstrated. The ratio of CD4⁺CD8⁺ was also demonstrated.

○ 면역화에 따른 방어능 확인

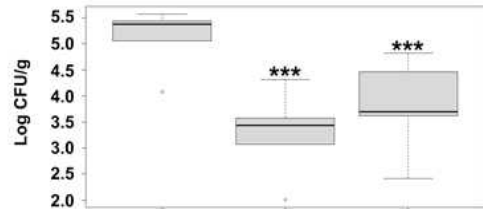
- 면역화 된 닭에서의 방어능은 도전감염 후 생존 개체수와 비장과 간에 잔존하는 세균수를 측정함으로써 평가함. 살모넬라 갈리나룸 고스트 백신 군주인 JOL2596와 벡터 대조군인 JOL2727로 면역화가 이루어진 그룹은 유의한 방어효능을 보임. JOL2596에 의해서 75%의 닭이 보호되었으며 JOL2727에 의해 43%의 방어효율을 보임(그림 19A). 또한, 도전감염 2주 후 비장과 간 조직에서의 살모넬라 갈리나룸 콜로니 형성은 JOL2596 백신주에 면역화된 그룹에서 효과적으로 그 수가 감소한 것을 관찰할 수 있음(그림 19B).

- 또한, H&E 염색으로 도전감염에 의한 간과 비장 조직절편에서 조직의 손상 및 염증 반응 정도의 차이를 평가한 결과 고스트 벡터 또는 PBS 대조군에서는 염증 및 조직 내 심각한 손상을 확인할 수 있음. 그러나 PBS대조군과 비교하여 고스트 백신 군주로 면역화된 그룹에서 분리한 간 조직에서 강력한 방어 효과를 관찰할 수 있으며 비장의 백색속질의 변형 및 간의 염증병변 부위의 크기가 줄어든 것을 확인함(그림 20).

A SG-challenge survival curve



B Spleen



C Liver

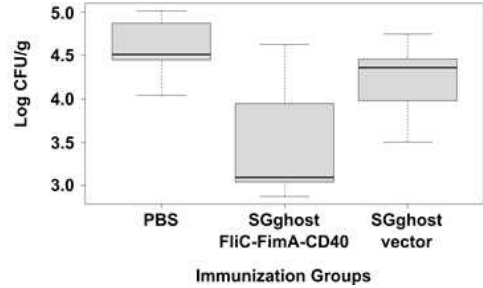


그림 19. Protection efficacy. Efficacy protection against (A) SG wild-type JOL422 (B,C) Organ persistence of challenge bacteria.

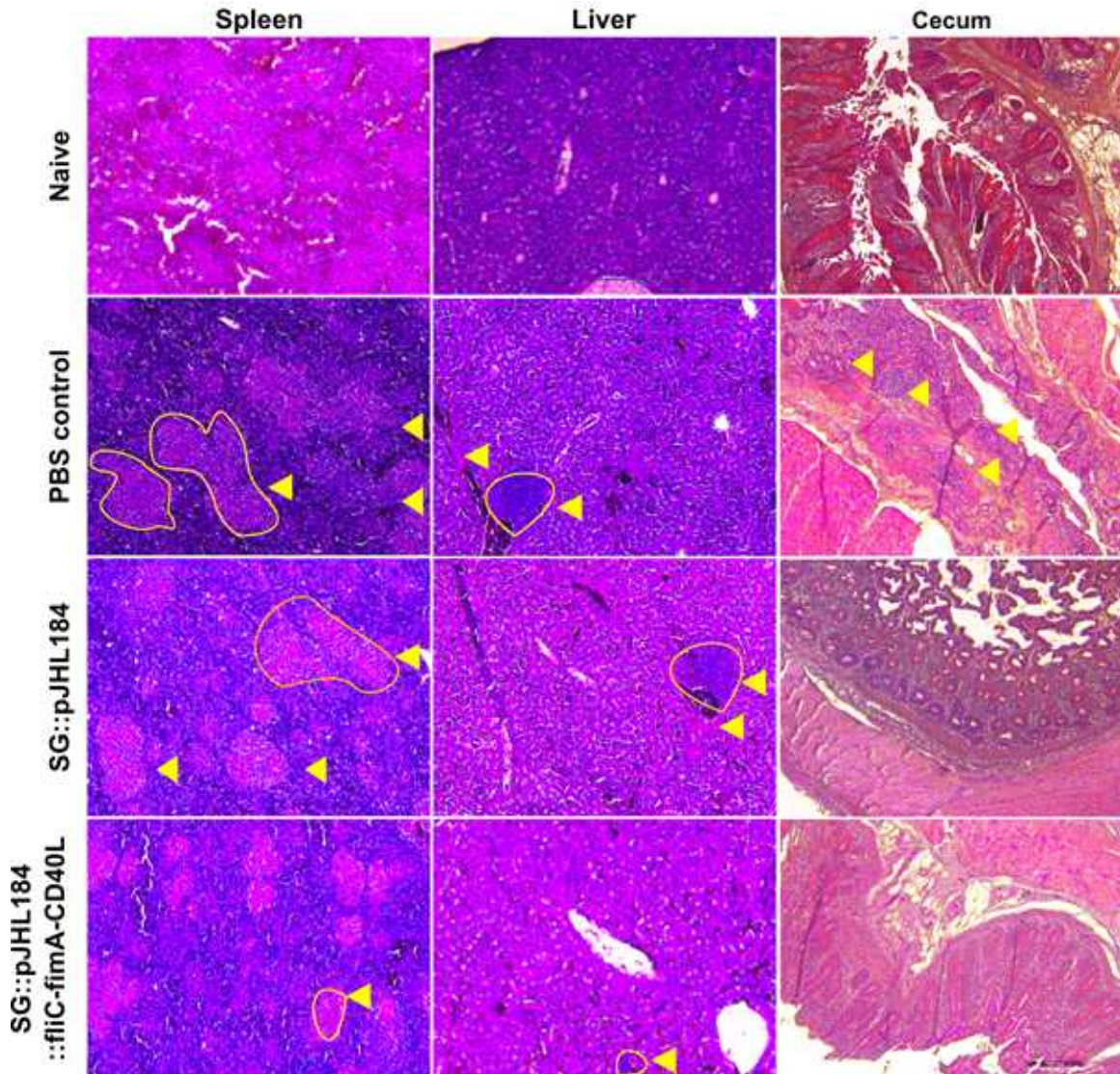


그림 20. Histopathological assessment. Histopathological assessments of inflammation and tissue damages were evaluated on spleen and liver tissues by eosin and hematoxylin staining.

● 결론

- 본 연구를 통하여 살모넬라 엔테리티디스 유래 FliC 및 FimA 단백질과 닭 유래 CD40L 단백질로 이루어진 FliC, FimA 및 CD40L 단백질로 이루어진 융합 항원을 면역활성 보조인자로서 발현하는 살모넬라 갈리나룸 변이주를 이용한 백신 후보균주를 제조하였고, 이를 이용하여 산란계에 면역화를 실시한 결과, PBS로 면역화가 이루어진 대조군 대비 체액성 및 세포성 면역 반응이 활성화되는 것을 확인함. 야생형 살모넬라 갈리나룸 균주로 도전감염한 결과, PBS로 면역화가 이루어진 대조군 대비 생존율이 증가하였고, 간과 비장에 잔존하는 균수가 감소한 것을 확인함으로써 방어가 가능하고 야생형 살모넬라균의 제거에 있어 충분한 면역원성 유도하는 것을 알 수 있음. 또한, 균주 배양 방법으로 경제적이고 간편하게 백신을 제조할 수 있어 가금티푸스 및 살모넬라증 동시 예방 또는 치료용 백신 조성물로 유용하게 사용될 것으로 기대됨. 또한, 본 연구 결과에 따른 살모넬라 갈리나룸 고스트 변이주는 생균백신과 유사한 효과를 나타내면서 숙주 내 병원성 회복 및 생태계 오염의 우려가 없는 장점이 있음을 확인함. 따라서 본 연구결과물은 가금티푸스 및 살모넬라증 동시 예방을 위한 백신 뿐 아니라 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제로의 응용 가능성을 제안할 수 있음.

제3절 백신균주 구축 및 대량배양조건 확립

● 수행결과

○ 백신주의 종류 및 특성

- 생독 백신용 백신 균주(WGB-SG-2596)
 - 세균 배양배지(LB broth)에서 증균배양
 - 세균 증식성은 $1 \times 10^{9.0}$ Colony-forming unit (CFU)/ml 이상
- 고스트 사독 백신용 백신 균주(WGB-SG-G184)
 - 세균 배양배지(LB broth)에서 증균배양
 - 세균 증식성은 $1 \times 10^{9.0}$ CFU/ml 이상

○ 2 L flask 배양 조건 확인

- 실험결과 제조용 세포은행(WGB-SG-2596 및 WGB-SG-G184)은 배양 시간이 경과함에 따라 흡광도(OD) 값이 점차 감소함을 확인하였음(표 8). 따라서, 제조용 세포은행(WCB)을 flask로 배양하기엔 어려움이 있다고 판단하여 5.0 L fermentor를 사용하여 대량배양을 수행하였음. OD값 분석결과 2종의 WCB는 모두 2 L flask에서도 충분히 배양되는 것으로 확인되었고, 세균수를 측정 한 결과, $1 \times 10^{9.0}$ cfu/ml 이상인 것으로 확인되었음.

표 6. 백신주의 flask 배양 시 흡광도 측정값

백신주	배양시간	OD	배양시간	OD
WGB-SG-2596	5시간 경과	1.812	10시간 경과	1.338
WGB-SG-G184	5시간 경과	1.523	10시간 경과	1.191

○ 5.0 L fermentor 를 이용한 대량배양 조건 확인

- 산소포화도는 30% 전후를 유지할 수 있도록 stirrer RPM과 산소주입량을 수동으로 조절하여 배양하였음. 배양 중 1시간 단위로 흡광도(OD600nm) 값과 온도, pH, 산소포화도를 측정하였음.

표 7. 백신주 WGB-SG-2596에 대한 대량 배양 기록

시간(hr)	온도(℃)	pH	dO2(%)	OD600nm	비고
0	37.1	7.01	100	0.312	
1	37.0	7.01	84.5	0.524	
2	37.1	6.98	42.7	1.278	+ 0.4% antifoam 10 ml
3	36.9	7.05	30.7	3.625	
4	37.1	7.02	21.1	10.711	+ 1N NaOH 62 ml
5	37.0	7.02	32.4	13.154	
6	37.1	7.01	35.9	19.154	
7	37.2	7.04	72.3	23.541	
8	37.0	7.01	100	22.187	배양종료

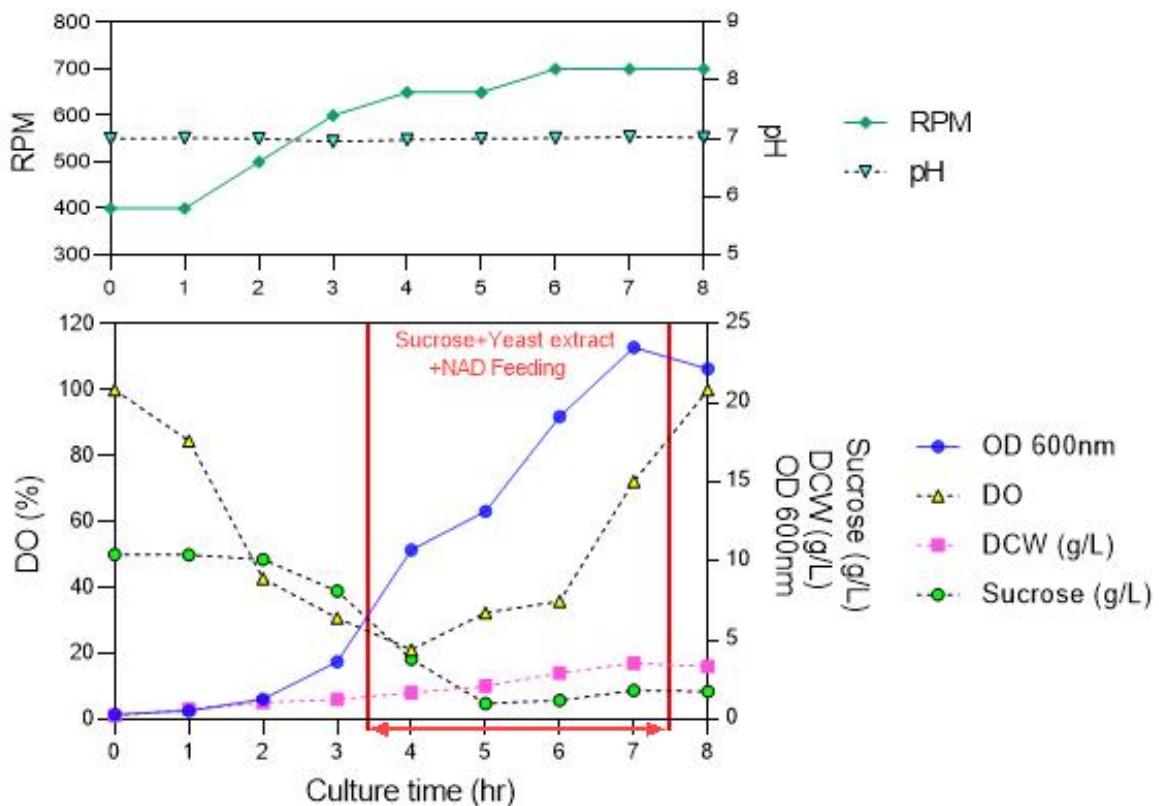


그림 21. 백신주의 대량 배양 기록에 따른 pH 농도, 산소포화도 및 흡광도 값에 따른 그래프 양상.

표 8. 백신주 WGB-SG-G184에 대한 대량 배양 기록

시간	온도(°C)	pH	dO2(%)	OD600nm	비고
0	30.1	7.00	100	0.242	
1	30.0	7.01	88.2	0.411	
2	30.0	7.00	53.5	0.927	+ 0.4% antifoam 10 ml
3	29.9	6.95	28.2	4.025	
4	29.9	6.98	19.3	11.215	+ 1N NaOH 53 ml
5	30.0	7.00	27.2	14.364	
6	30.1	7.01	40.3	18.321	
7	30.1	7.03	68.1	22.052	
8	30.0	7.02	100	20.115	배양종료

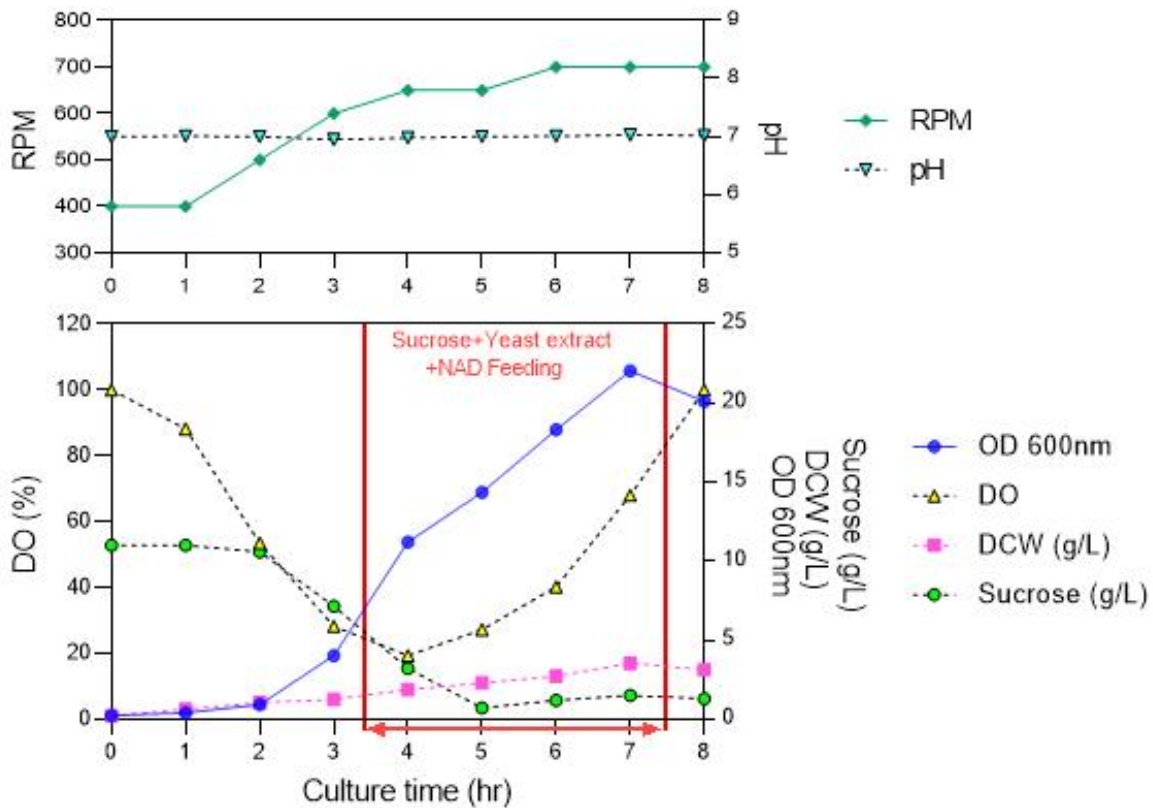


그림 22. 백신주의 대량 배양 기록에 따른 pH 농도, 산소포화도 및 흡광도 값에 따른 그래프 양상.

- 그 결과, 배양이 진행됨에 따라 pH가 낮아졌음. 4시간 이후에서 pH 5.0 수준까지 낮아졌을 때, 1N NaOH를 첨가하여 pH를 7.0으로 조절하였고, 추가적으로 sucrose, yeast 및 NAD를 feeding 해 주었을 때, 산소포화도가 높아지면서 세균의 성장이 증가하는 현상을 확인하였음 (표 9, 10 및 그림 21, 22). 두 백신균주 모두 유사한 실험결과를 나타 내었음.

- 또한, 흡광도 값에 따른 생균수를 비교하고자, 생균수를 측정하였음. 그 결과, 두 종류의 백신균주 모두 최종 측정된 세균수는 1.0 ml 당 10^{10} CFU 이상인 것으로 확인되었음. 이러한 결과로부터 전임상시험 및 야외임상을 진행하기 위한 시험백신을 제조하는데 충분한 배양조건을 확보한 것으로 판단됨.
- 대량 배양 종료 후 배양액 일부를 추출하여 그람염색법으로 분석한 결과, 그람음성 균주인 살모넬라 갈리나룸을 확인 할 수 있었음(그림 23).

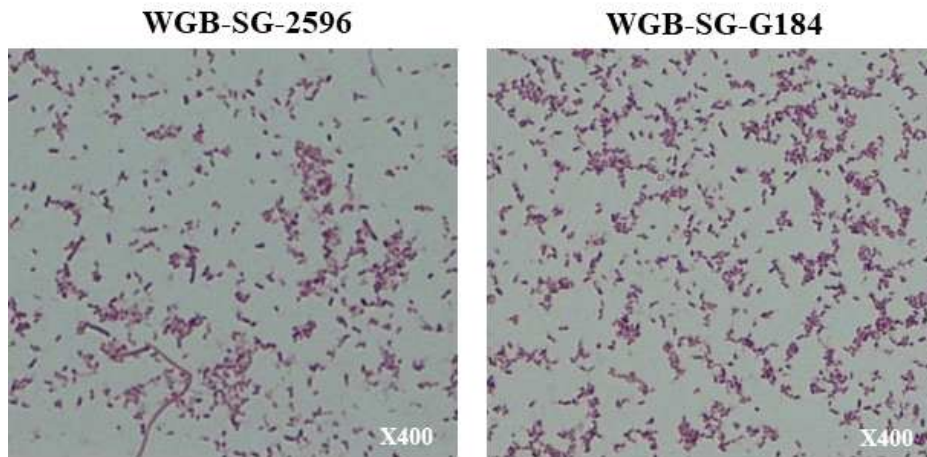


그림 23. 대량 배양된 세균의 Gram staining 결과.

● 결론

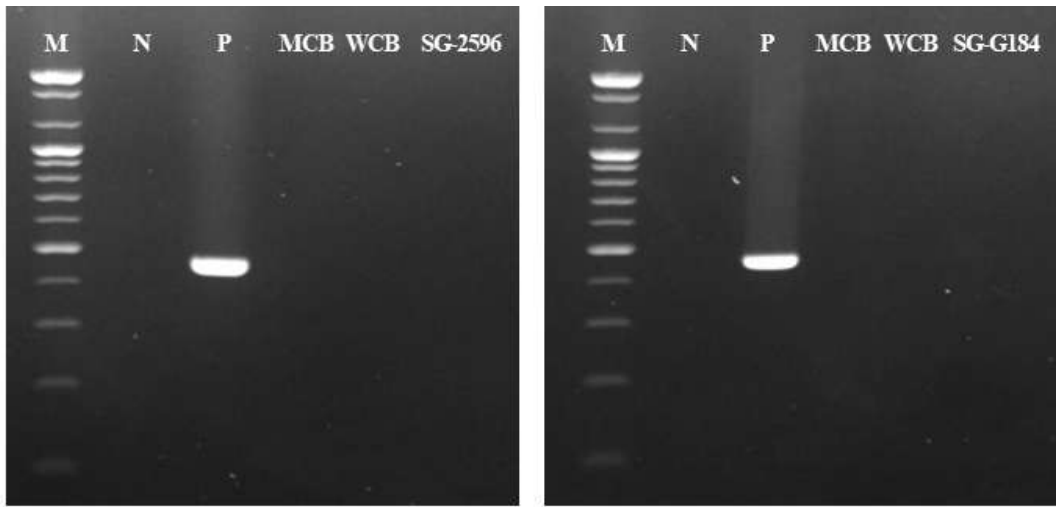
- 본 연구를 통해 살모넬라 갈리나룸 생독백신주인 WGB-SG-2596와 고스트 사독 백신용 백신 균주인 WGB-SG-G184를 5 L fermentor로 대량 배양을 진행한 결과, 두 백신균주 모두 전임상시험과 야외임상시험용 시험백신의 제조를 위한 충분한 세균수를 확보할 수 있을 것으로 판단됨. 추후 생산효율을 고려할 때, 추가적인 대량공정개발을 통해 백신의 생산효율을 높일 예정임.

제4절 백신주 및 시험백신의 품질시험

● 수행결과

○ 마스터 세포은행(MCB)의 품질시험

- 동물용의약품 국가출하승인검정 기준(농림축산검역본부 고시 제2021-53호, 2021년 9월 29일)의 일반시험법 1-10-20-07에 따라 MCB (WGB-M-SG-2596, WGB-M-SG-G184), WCB (WGB-W-SG-2596, WGB-W-SG-G184) 및 시험백신의 마이코플라즈마 부정시험을 수행한 결과, 그림 11과 같이 마이코플라즈마 음성을 확인하였음.



M: Marker (100bp), N: Negative, P: Positive (*Mycoplasma* spp.),

MCB: Master Cell Bank, WCB: Working Cell Bank, SG-2596: WGB-SG-2596, SG-G184: WGB-SG-G184

그림 24. 마이코플라즈마(*Mycoplasma* spp.) PCR 실험결과.

- 동물용의약품 국가출하승인검정 기준(농림축산검역본부 고시 제2021-53호, 2021년 9월 29일)의 일반시험법 1-10-20-05에 따라 MCB (WGB-M-SG-2596, WGB-M-SG-G184)의 순수시험을 진행한 결과, 살모넬라 갈리나룸을 제외한 다른 미생물의 증식이 확인되지 않았음(표 9, 10).

표 9. WGB-M-SG-2596의 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 10. WGB-M-SG-G184의 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

○ 마스터 세포은행(MCB)의 역가확인

- 배양된 세균 집락의 수를 계산하여 2종의 MCB 역가를 최종적으로 확인하였음. 세균 집락의 수를 계산한 결과, 생독백신주인 WGB-M-SG-2596의 세균수는 1×10^9 CFU/ml 이상 이였고, 사독백신주인 WGB-M-SG-G184는 1×10^8 CFU/ml 이상으로 확인되었음.

○ 제조용 세포은행(WCB)의 품질시험

- 동물용의약품 국가출하승인검정 기준(농림축산검역본부 고시 제2021-53호, 2021년 9월 29일)의 일반시험법 1-10-20-05에 따라 MCB (WGB-W-SG-2596, WGB-W-SG-G184)의 순수시험을 진행한 결과, 살모넬라 갈리나룸을 제외한 다른 미생물의 증식이 확인되지 않았음(표 11, 12).

표 11. WGB-W-SG-2596의 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 12. WGB-W-SG-G184의 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

○ 제조용 세포은행(WCB)의 역가확인

- 배양된 세균 집락의 수를 계산하여 2종의 WCB 역가를 최종적으로 확인하였음. 세균 집락의 수를 계산한 결과, 생독백신주인 WGB-W-SG-2596의 세균수는 1×10^9 CFU/ml 이상 이였고, 사독백신주인 WGB-W-SG-G184는 1×10^8 CFU/ml 이상으로 확인되었음.

○ 전임상용 시험백신의 품질시험

- 순수시험을 확인하기 위해 nutrient agar (NA) 4개, thioglycolate broth (Thio) 4개에 0.5 ml 씩 넣어 37°C에서 7일간 배양 후 배양된 colony를 그람염색 관찰법으로 분석한 결과 SG를 제외한 다른 미생물의 증식이 확인 되지 않았음(표 13, 14).

표 13. WGB-SG-2596의 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 14. WGB-SG-G184의 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

○ 전임상시험용 시험백신의 역가확인

- 전임상시험용으로 제조된 시험백신 2종의 배양된 세균 집락의 수를 계산하여 시험백신의 역가를 최종적으로 확인하였음. 세균 집락의 수를 분석한 결과, 생독 시험백신인 WGB-SG-2596의 세균수는 1×10^9 CFU/ml 이상 이였고, 사독 시험백신인 WGB-SG-G184는 1×10^8 CFU/ml 이상으로 확인되었음.

● 결론

- 본 연구를 통해 생독백신주인 살모넬라 갈리나리움 균주와 고스트 사독 백신용 백신 균주의 생산주를 5 L fermentor로 대량 배양을 진행한 결과, 두 백신균주 모두 전임상시험과 야외임상시험용 시험백신의 제조를 위한 충분한 세균수를 확보할 수 있을 것으로 판단됨. 추후 생산효율을 고려할 때, 추가적인 대량공정개발을 통해 백신의 생산효율을 높일 예정임.

제5절 경구 투여를 위한 제형 개발 및 최적화 연구

● 수행결과

○ 생독백신의 동결건조 제형 선정

- TPGG, LPGG, SPGG 3가지 동결건조 제형을 이용하여 생독백신의 시험백신을 제조하였고, 제조된 시험백신의 세균수를 동결건조 전후로 비교하였음. 그 결과, TPGG (Trehalose + phosphate buffer + L-glutamate + Gelatin)를 이용한 동결건조보호제 제형의 세균수 변화가 가장 적게 나타나는 것을 확인하였음(표 15와 그림 25).

표 15. 시험백신에 대한 동결건조 전후의 세균수 측정

항원	동결건조보호제	세균수	
		동결건조 전	동결건조 후
WGB-SG-2596	TPGG	2.4×10^{10} cfu/ml	1.8×10^{10} cfu/ml
WGB-SG-G184	TPGG	2.7×10^{10} cfu/ml	1.9×10^{10} cfu/ml
WGB-SG-2596	LPGG	2.7×10^{10} cfu/ml	1.2×10^{10} cfu/ml
WGB-SG-G184	LPGG	2.6×10^{10} cfu/ml	1.3×10^{10} cfu/ml
WGB-SG-2596	SPGG	3.1×10^{10} cfu/ml	1.4×10^{10} cfu/ml
WGB-SG-G184	SPGG	2.9×10^{10} cfu/ml	1.0×10^{10} cfu/ml

○ 전임상시험을 위한 시험백신의 조정

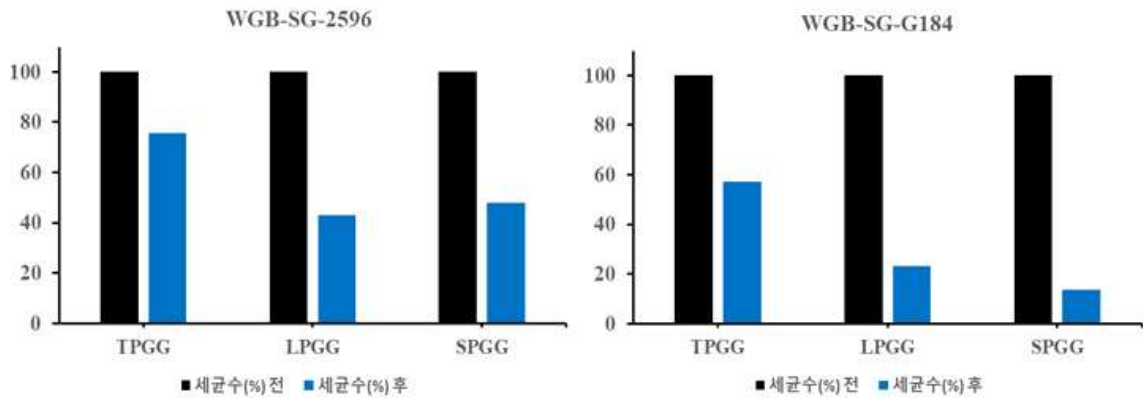


그림 25. 동결건조보호제 조성에 따른 세균수(%)의 변화 결과

- 백신주의 대량배양조건을 확립하였고, 여러 성분의 동결건조보호제 제형 중 최종적으로 TPGG를 선정하여 전임상을 위한 시험백신의 조성을 확립하였음(표 16).
- 확립된 시험백신의 조성을 바탕으로 추후 목적동물에 대한 백신의 안전성과 효능분석을 진행할 예정임.

표 16. 전임상시험용 시험백신의 조성

종류	생산량 (vial)	균주/vial	보호제/vial	보호제/vial	비고
WGB-SG-2596	100	8.0 mL	2.0 mL	TPGG	전임상시험용
WGB-SG-G184	100	8.0 mL	2.0 mL	Formalin	전임상시험용
총 바이알 수	200	특이사항 없음.			

● 결론

- 본 연구를 통해 생독백신주인 살모넬라 갈리나리움 균주와 고스트 사독 백신용 백신 균주의 생산주를 5 L fermentor로 대량 배양을 진행한 결과, 두 백신균주 모두 전임상시험과 야외임상시험용 시험백신의 제조를 위한 충분한 세균수를 확보할 수 있을 것으로 판단됨. 추후 생산효율을 고려할 때, 추가적인 대량공정개발을 통해 백신의 생산효율을 높일 예정임.

● **목표 달성 정도 :** 최종 목표인 DIVA 감별진단이 가능한 주요 살모넬라증 예방을 위한 약독화 생백신 및 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신의 구축을 위하여 산란계 등에서 살모넬라 생백신 및 고스트 사균 백신의 안정성 및 효능 평가와 기존 제품 간의 효능 비교 평가를 모두 수행하였으며, 백신주의 마스터 세포은행(MCB)과 제조용 세포은행(WCB)을 구축하였음. 또한 대량배양조건을 확립하여 전임상시험용 시험백신을 제조하였고, 백신주 및 시험백신에 대한 기본 품질검사를 완료하였음. 이러한 결과들을 통해 연구 계획하였던 목표를 100% 달성하였음.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

- 특허출원 : 국내 특허출원 1건
 - 기술이전 : 전용실시권 1건
 - 논문게재 : 국외 SCI(E) 학술논문 2건
 - 학술발표 : 국제 학술대회 3건
 - 수상실적 : 우수초록상 1건
 - 연구인력양성 : 박사학위 1명
 - 홍보실적 : 국내기사 3건
 - 경제사회파급효과 : 고용창출 2건
-

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE /비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Immunization of chicken with flagellin adjuvanted <i>Salmonella enteritidis</i> bacterial ghosts confers complete protection against chicken salmonellosis	Poultry Science	Amal Senevirathne, Chamith Hewawaduge, John Hwa Lee	100	네덜란드	elsevier	SCIE	2021. 07	0032-5791	100
2	Immunization of chickens with <i>Salmonella gallinarum</i> ghosts expressing <i>Salmonella Enteritidis</i> NFliC-FimAC and CD40LC fusion antigen enhances cell-mediated immune responses and protects against wild-type challenges with both species	Developmental & Comparative Immunology	Amal Senevirathne, Chamith Hewawaduge, John Hwa Lee	126	네덜란드	elsevier	SCIE	2022. 01	0145-305X	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	대한수의학회	이존화	2021년 10월 28일	군산새만금컨벤션센터	대한민국
2	생화학분자생물학회	이존화	2021년 05월 25일	BEXCO	대한민국
3	대한백신학회	이존화	2021년 9월 24일	온라인	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	<i>FliC-FimA-CD40L</i> 융합 항원을 발현하는 살모넬라 갈리나룸 변이주를 유효성분으로 포함하는 가금티푸스 및 살모넬라증 동시 예방 또는 치료용 백신 조성물	대한민국	이존화, 아말 나야나지트 세네비라트네, 차미뜨 해바바두게, 박지영	2021.06.14	10-2021-0076714				100	전용 실시	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1			√						√	

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	전용실시권	기술이전 계약서	우진비앤지(주)	2021.11.01	-	-

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과						
사업화 계획	사업화 소요기간(년)					
	소요예산(천원)					
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후	
		국내				
	국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후		
	수출					

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
1	백신개발	우진비앤지(주)	1명		1
2	백신개발	우진비앤지(주)	1명		1
합계					2

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2021	1									1	

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	온라인 기사	한국동물약품협회	우진비앤지(주), DIVA 감별진단 가능한 약독화 생균백신 및 가금티푸스와 살모넬라증 동시예방 사균 백신 개발	2021.12.01
2	온라인 기사	뉴스핍	우진비앤지 "가금류 위한 생균백신 및 사균백신 개발...효능 개선에 기여할 것"	2021.12.02
3	온라인 기사	이데일리	우진비앤지, 농림식품기술기획평가원 지원 가금 백신 연구개발	2021.12.02

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	대한백신학회 우수초록상	우수 초록 발표상	이존화 교수	2021.09.24	대한백신학회

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

해당사항 없음.

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

해당사항 없음.

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 약독화 살모넬라 갈리나룸 생균 백신 균주 구축.	○ O-항원 관련 <i>lon</i> , <i>cpxR</i> , <i>rfaL</i> 유전자 결실 <i>Salmonella enterica</i> Gallinarium 제작 및 결실 O-항원 확인.	○ 100
○ <i>fliC-fimA-CD40L</i> 발현 신개념 고스트 살모넬라 사균화 백신 시스템 구축.	○ 용해 플라스미드에 <i>fliC-fimA-CD40L</i> 를 재조합하여 균주 표면에 발현하여 숙주동물로 하여금 항원에 대한 면역활성의 효과를 높여 줄 수 있는 사균화 백신 균주를 제작 및 표지항원 발현과 용해능 확인.	○ 100
○ 백신 후보균주의 접종량, 경로 최적화 시험.	○ 각 제작 백신후보주의 Oral과 IM 접종 경로 및 접종량 최적화 수행완료.	○ 100
○ 산란계에서 백신 후보균주의 안전성 및 면역원성, 방어효능 평가.	○ 제작 생균 백신 및 사균백신을 통한 면역활성 및 야생형 도전감염을 통한 방어효능 확인.	○ 100
○ 백신후보주 투여 면역 산란계에서 DIVA 감별진단 가능 여부 확인.	○ 야외감염 여부를 LPS특이항체 반응을 ELISA로 측정함으로써 DIVA 감별능을 확인.	○ 100
○ 산란계에서 신개념 생균백신 및 사균백신의 환경 오염능 평가.	○ 분변 샘플을 통한 환경내 배출 유무 확인	○ 100
○ 백신 시드 구축 및 대량배양조건 확립.	○ 마스터 세포은행 및 제조용 세포은행을 제조하였고 제조용 세포은행을 이용하여 대량배양조건을 확립.	○ 100
○ 생산용 백신주를 이용한 시험백신 제조 및 품질시험	○ 대량배양된 배양액을 이용하여 전임상용 시험백신을 제조하였고, 백신 시드 및 시험백신에 대한 품질시험을 완료.	○ 100
○ 경구 투여를 위한 제형 개발 및 최적화 연구	○ 경구 투여를 위한 동결보존제 조건을 확인하였고 백신을 잘 보존할 수 있는 동결보존 조건을 확인.	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

해당사항 없음.

2) 자체 보완활동

해당사항 없음.

3) 연구개발 과정의 성실성

해당사항 없음.

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)
(22쪽 중 13쪽)]

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 개발하고자 하는 살모넬라 생백신은 subunit vaccine 보다 세포내 기생 세균인 살모넬라에 대한 세포성 면역을 효과적으로 유도할 것으로 기대되며, 점막 면역 역시 생균 살모넬라를 이용하여 우수할 것으로 기대됨.

- 2014년 IBIS World 보고서 자료에 의하면, 미국 동물 생명 공학 산업은 연평균 9.1%로 증가해 2022년에는 시장규모가 150억 달러에 이를 것으로 전망했으며 관련 산업제품 수입량 또한 지속적으로 증가될 것으로 예상했음.

- 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.

- 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 편임. 이에 본 연구를 통한 안정적인 효과적 백신 개발은 한국 제품의 품질에 대한 신뢰도를 높여 수출까지 이어질 수 있음.

- 항생제 없이 가축위생을 유지할 수 있는 적합한 백신의 수요가 지속적으로 증가하고 있는 상황이며, 항생제의 첨가가 금지된 상황에서 질병 예방에 큰 차질이 생길 수 있음. 해외에서 사균 백신을 수입하여 사용하고 있는 실정이나. 범용으로 사용되고 있는 엔테라이티디스 백신을 포함하여 여러 연구팀에 의해 개발된 백신에 이르기까지, 모두 동물에서의 감염만을 감소시킬 뿐 축산물 오염을 완전히 방어할 수 있는 수준의 백신이 현재까지 존재하지 않는 현실에서 본 백신의 개발은 살모넬라로 인한 질병을 효과적으로 방어할 수 있을 것임.

- 양계농가에서 가금티푸스 및 살모넬라증의 효과적인 예방을 위해 사균백신과 같은 안전성을 가진 약독화 생균백신의 개발은 향상된 안전성과 면역원성을 지니기 때문에 방어효능을 크게 개선시켜 양계농가의 소득을 증대시킬 것임.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 개발된 제품의 특징은 이제까지 국내에 개발되지 않았던 살모넬라 갈리나룸 생균백신 및 사균백신이 될 것임. 특히 이번 과제를 통해 개발될 기술은 가금류뿐만 아니라 다른 축종의 백신 개발에도 이용될 수 있을 것임. 우선 가금류의 살모넬라 감염을 예방할 수 있는 백신 제품을 개발할 예정임.

 - 본 과제를 통해 확보된 기술과 실험결과들을 통해 과제종료 후에도 제품개발을 지속적으로 수행할 예정임. 특히 안전성과 효능이 크게 개선될 것으로 기대되는 사균백신은 과제로부터 얻어질 시험백신을 이용하여 과제종료 후 1차년도에 전임상시험을 통해 백신의 항원량 결정 및 방어효능에 대한 평가를 진행할 것임. 이를 바탕으로 제조시설에서 야외임상용 시험백신을 제조하여 2차년도에 야외임상시험을 진행할 계획임.

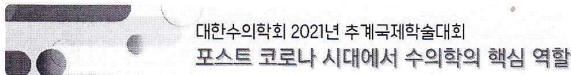
 - 과제종료 2차년도에 야외임상시험을 진행한 후 이 결과를 바탕으로 과제종료 3차년도에 허가자료를 제출하여 가금티푸스 생균조백신 및 고스트 사균백신의 제품화를 진행할 것임.

 - 산란계, 오리의 가금티푸스 및 살모넬라 동시 저감 백신을 통한 경제적 부가가치 창출이 가능하며, 가금티푸스 및 살모넬라 동시 저감 사균백신 및 사료첨가제의 농장적용을 통한 질병의 초기 예방과 살모넬라증 인체 전파 그리고 감염의 방지 및 사양관리 강화에 활용 가능할 것임.

 - 두 가지 이상의 항원이 발현될 수 있는 시스템을 이용하여 다양한 병원체를 동시에 예방할 수 있는 백신으로의 활용이 가능하며, 이를 통해 질병을 선제적으로 예방할 수 있을 것임.
-

※ 별첨 자료(학회포스터발표)

1. 대한수의학회



대한수의학회 2021년 추계국제학술대회
포스트 코로나 시대에서 수의학의 핵심 역할

P-001

Construction of fowl typhoid vaccine candidate by deletions of *lon*, *cpxR*, and *rfaL* from *Salmonella* Gallinarium

John Hwa Lee*, Ram Prasad Aganja, Vijayakumar Jawalagatti

College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan Campus, 54596, Iksan, Republic of Korea

This study describes the construction and characterization of a novel *Salmonella* Gallinarium (SG) live vaccine strain that is DIVA capable, and with dramatically reduced cytotoxicity and endotoxicity. The SG strain was attenuated by deleting two major virulence-related genes that reside in the *Salmonella* pathogenicity island I (SPI I) namely *lon* and *cpxR*. To create SG strain DIVA (differentiation of the infected from the vaccinated animals) capable, the *rfaL* gene was also eliminated. The resultant strain was hyper-immunogenic, proficient in eliciting antigen-specific immune responses and yet, undergoes rapid elimination from the host environment due to enhanced susceptibility to environmental stresses. Despite the elimination of three virulence-associated genes, the strain still contains lipid A structure, that can be endotoxic in the animals. To minimize lipid A driven endotoxicity, dephosphorylation of 1' phosphate was incorporated into the SG vaccine strain by chromosomal integration of Francisella tularensis dephosphorylase enzyme encoded by *lpxE* gene. The codon-optimized *lpxE* was placed in-frame into the *pagL* locus by lambda red mediated replacement strategy that eliminates the *pagL* gene product which is a palmitoyltransferase. The resultant strain was assessed for cytotoxicity, endotoxicity, immunogenicity, and DIVA capacity using *in vitro* and *in vivo* models. Results demonstrate that the SG parent strain; SG $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$, was comparable to SG $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL \Delta pagL::lpxE$ regarding the immunogenicity, yet the novel *lpxE* strain was significantly low in endotoxicity induction in immunized birds. Both strains were significantly eradicated from the host by the 14th day of immunization ensuring that, the birds are not prone to chronic disease. In conclusion, this is a genuine attempt made to eliminate endotoxicity of live attenuated SG vaccine strain. The resultant strain was observed comparable immunogenicity with its parent strain SG $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$, yet it was significantly low endotoxic and attenuated. The strain was completely safe in young birds (less than 3 weeks old), no contaminants in eggs of their laying, DIVA capable and promoted protective immune responses as observed by *in vitro* and *in vivo* models.

P-002

S. Enteritidis^N FliC-FimA^C and CD40L^C fusion antigen expression by *Salmonella* Gallinarium enhances protects against salmonellosis and fowl typhoid

John Hwa Lee*

College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan Campus, 54596, Iksan, Republic of Korea

This study describes the construction and characterization of a novel *Salmonella* Gallinarium ghost vaccine candidate designed to give protection against *Salmonella* serogroup D infection in chickens. The prominent serogroup D species in the poultry industry include both S. Gallinarium and S. Enteritidis serotypes. To enhance the engagement of the host immune system, the SG ghost was designed to express N-terminus FliC (D0-D1 domain), C-terminus FimA retrieved from SE genome, and the receptor-binding domain (RBD) of CD40L from the chicken genome into a single fusion construct. The construct covers, the TLR5 interaction domain of FliC, the adhesion domain of FimA for strain-specific protection, and CD40L RBD to enhance T-cell mediated responses. The construct was built in pJHL184, phage lysis gene E mediated ghost plasmid and the expression of fusion antigen was confirmed by western blot resulting in a band with 82 kDa. To assess immune induction and protection, chicken immunization was conducted by intramuscular immunization either with SG ghosts:: FliC-FimA-CD40L (JOL2596), vector control (JOL2727), or PBS alone in a prime-boost immunization schedule in three weeks apart. Development of antibody responses, cell-mediated immune responses, cytokine induction was assessed against both SG and SE outer membrane proteins and subsequently challenged by intramuscular inoculation of wild type SG and SE strains. SG ghosts expressing fusion antigen delivers a significantly high level of IgY antibody responses, CMI responses marked by peripheral blood mononuclear cell proliferation assay, increase in CD8⁺ T-cell responses in flow cytometry analysis compared to PBS control. The protective immune responses were confirmed by significant elicitation of IFN- γ , TNF- α , IL-4 immunomodulatory cytokines demonstrating the variable engagement of Th1 and Th2 type immune responses. Upon challenge, all SG challenged birds in the PBS group resulted in 100% mortality, while 50% death in vector alone group and only 30% death in SG ghost fusion antigen immunized groups. The efficacy against SE challenge demonstrates a complete absence of challenged strain in the JOL2596 SG ghost immunized group, while only four birds and six birds were positive for vector and PBS groups respectively. This novel SG ghost vaccine proves to be a safe and effective vaccination strategy, thus further studies are warranted for dose optimization and environmental safety, etc.

P-003

Improvement of mannitol-yolk-polymyxin B agar by addition of ceftazidime for the quantitative detection of *Bacillus cereus* in food samples

Jungwhan Chon¹, Kunho Seo^{2,*}

¹Department of Pet Total Care, Division of Nursing and Welfare, Kyung-in Women's University, Incheon 21041, Republic of Korea, ²Center for One Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea

Bacillus cereus group, which causes foodborne disease, is detected using selective media. However, competing flora is the most common factor preventing the correct enumeration of *B. cereus* group on selective agars. In this study, we aimed to improve the selectivity of mannitol-yolk-polymyxin B agar (MYPA) and its modified version containing trimethoprim (mMYPA) developed in our previous study by supplementation with ceftazidime (16 μ g/mL). Ceftazidime-supplemented MYPA (C-MYPA16) and mMYPA (C-mMYPA16) were evaluated for bacteria recoverability and selectivity using three types of ready-to-eat vegetables. Four *B. cereus* and one *B. thuringiensis* strains were mixed and artificially inoculated into vegetable salad, radish sprouts, and sprout mix, and then recovered using MYPA, mMYPA, C-MYPA16, and C-mMYPA16. In all tested vegetables, mMYPA, C-MYPA16, and C-mMYPA16 exhibited similar recoverability of *B. cereus thuringiensis* ($p > 0.05$), whereas MYPA showed undistinguishable colonies in the case of radish sprouts and sprout mix. At the same time, C-mMYPA16 provided the best selectivity compared with the other agars because it eliminated most of competing flora in the tested vegetables, especially in sprouts, without negatively affecting the recovery of *B. cereus thuringiensis*. Our results indicate that the supplementation of mMYPA with ceftazidime may improve medium selectivity for *B. cereus thuringiensis* in food testing.

P-004

Phylogenetic analysis of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated in Cambodia, 2020

Jae-In Shin¹, Seng Bunary², Ren Theary², Sothya Tum², Ra Mi Cha¹, Eun-Kyoung Lee¹, Youn-Jeong Lee¹, Yu-Na Lee^{1,*}

¹Avian Influenza Research & Diagnostic Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Republic of Korea, ²Department of Animal Health and Production, National Animal Health and Production Research Institute, Phnom Penh, Cambodia

Since 2004, several outbreaks of highly pathogenic avian influenza (HPAI) have been reported in Cambodia. Until 2014, H5N1 viruses identified in Cambodia were known to belong to clade 1. In 2015, HPAI outbreaks caused by clade 2.3.2.1c virus were firstly reported. Here, we isolated eight H5N1 HPAI viruses from poultry farm in Cambodia from January to July 2020 and performed phylogenetic analysis. The viruses were isolated in embryonated chicken eggs. The whole genome of isolates was sequenced by using Next Generation Sequencing. All isolates belonged to clade 2.3.2.1c and had multi-basic amino acid sequence (PQRERRRRK/RLF) at the HA cleavage site. They had a 20-amino acid deletion in the stalk region of NA, which has been associated with adaptation of influenza viruses to poultry. Our phylogenetic analysis showed that the isolates sequenced in this study were divided into three genotypes (G1-3) by gene constellation. Previously, it has been reported that the viruses belonged to the G1 and G2 genotype were circulated in Cambodia from 2015 to 2019. The G3 genotype possessed three different gene segments (PB2, PB1, and NP) on a genetic backbone of the G1 genotype. The G3 genotype showed high similarity with A/H5N1 virus detected in southern Vietnam: A/goose/Vietnam/HU8-1596/2017 (98.9-99.4%). Given that the isolates were classified as the same genotype of viruses identified in Vietnam, the outbreaks in Cambodia were probably affected by neighboring countries including Vietnam. Thus, our study emphasizes the needs for enhanced surveillance and consideration on effective border management.

2. 생화학분자생물학회



	the Endoplasmic reticulum is important for intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in macrophages			
M-23	Identification of microRNAs as diagnostic biomarkers for active and latent tuberculosis in whole blood	김준성	Junseong Kim	부산가톨릭대
M-24	Identification of small molecules which inhibit human noro virus RNA genome replication	고해리	ko haeli	스크립스코리아항체연구원
✓ M-25	Immunization of chicken with Salmonella Gallinarium ghost expressing S. Enteritidis NFliC-FimAC-and CD40LC fusion antigen enhances immune responses and protects against wild both Salmonella	이존화	John Hwa Lee	전북대(익산)
M-26	Immunological role of Foxo6 in endotoxin sepsis model	김미은	Mi Eun Kim	조선대
M-27	Infectivity and drug susceptibility profiling of different Leishmania-host cell combinations	백경화	Kyung-Hwa Baek	한국파스퇴르연구소
M-28	Inhibitory effect of Rhododendron brachycarpum D. Don ex G. Don on atopic dermatitis-like skin lesions	강진주	Jinjoo Kang	경북대
M-29	Inhibitory effect of Rhododendron brachycarpum D. Don ex G. Don on atopic dermatitis-like skin lesions	강진주	Jinjoo Kang	School of medicine, Kyungpook National University
M-30	Macrophage-preferable delivery of the NLRX1 protein ameliorates lethal sepsis by regulating NF- κ B and inflammasome signaling activation	구자현	Ja-Hyun Koo	한양대학교
M-31	MiR-135-5p-p62 feedback loop mediates autophagic flux and tumorigenic potential during allergic inflammation.	최윤지	yunji choi	강원대
M-32	miR-154-5p mediates cell-to-cell communications through	김미선	misun Kim	강원대

3. 대한백신학회- 우수초록상 수상



KVS
대한백신학회



The Korean Vaccine Society

**유바이오로지스
우수초록상**

제 목 : Salmonella Gallinarium ghost expressing S. Enteritidis NFliC-
FimAC-and CD40LC fusion antigen enhances immune
responses in chickens and protects against salmonellosis

소 속 : 전북대학교 수의과대학

성 명 : 이존화

귀하는 2021 제18차 대한백신학회
추계학술대회에서 우수한 초록을
발표하였기에 상장 및 상금을 수여합니다.

2021년 9월 24일



대한백신학회 회장 황 응 수



※ 별첨 자료(특허출원)

- *FliC-FimA-CD40L* 융합 항원을 발현하는 살모넬라 갈리나룸 변이주를 유효성분으로 포함하는 가금티푸스 및 살모넬라증 동시 예방 또는 치료용 백신 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.06.14
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2021-0076714 (접수번호 1-1-2021-0682115-77)
 (DAS접근코드5870)
 출원인명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9)
 대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
 발명자성명 이준희 아말 나야나지트 세네비라트네 자미프 해바바두게 박지영
 발명의명칭 *FliC-FimA-CD40L* 융합 항원을 발현하는 살모넬라 갈리나룸 변이주를 유효성분으로 포함하는 가금티푸스 및 살모넬라증 동시 예방 또는 치료용 백신 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
 ※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

※ 별첨 자료(논문게재)

1. Immunization of chicken with flagellin adjuvanted *Salmonella enteritidis* bacterial ghosts confers complete protection against chicken salmonellosis

Immunization of chicken with flagellin adjuvanted *Salmonella enteritidis* bacterial ghosts confers complete protection against chicken salmonellosis

Amal Senevirathne, Chamith Hewawaduge, and John Hwa Lee¹

College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan Campus, 54596, Iksan, Republic of Korea

ABSTRACT The present study describes the generation of *Salmonella enteritidis* (SE) ghosts with a surface decorated *Salmonella* Typhimurium (ST) flagellin (FliC) antigen for immune enhancement and strain-specific protection. The ghosts were generated by biological means using pJHL184::fliC temperature inducible plasmid where the lysis occurs by phage PhiX174 lysis gene E expression. Being an inactivated strain, no environmental contamination was observed by fecal shedding upon inoculation into the chicken. To test the protective immune responses, ghost vaccination was conducted via the intramuscular route using chicken as the model organism. The development of antigen-specific humoral, cell-mediated, and protective immune responses was assessed. Compared to vector alone and phosphate-buffered saline (PBS) control groups, pJHL184::fliC ghost could generate significantly high antigen-specific IgY and cell-mediated immune (CMI) responses measured

by a peripheral blood mononuclear cell proliferation, flow cytometer, and cytokine responses elicited by stimulated splenic T-cells ($P < 0.05$). The adjuvant effect induced by FliC was demonstrated by elicitation of Toll-like receptor 5 (TLR5). To test the protection efficacy, chickens were challenged with both SE and ST wild type (WT) strains, and the protection efficacy was assessed by determining the presence of challenging strains in the spleen and liver, and by assessing the histopathological alterations. Complete clearance of the challenged strain and least inflammatory signs were evident in the SE ghosts vaccinated group compared to the vector and PBS control. The elimination of both SE and ST in chicken organs ensures the intramuscular immunization of the present SE ghost vaccine can reduce SE and ST contamination levels in chicken that can be beneficial to prevent enteric infections in humans.

Key words: *Salmonella enteritidis*, flagellin, phage PhiX174, gene E, wild type challenge

2021 Poultry Science 100:101205

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101205>

INTRODUCTION

Nontyphoidal salmonellosis (NTS) is one of the major causes of acute gastroenteritis among humans (Kirk et al., 2015). The global incidence of NTS is estimated to be 94 million annual cases, with over 155,000 deaths. Out of it, approximately more than 94% of incidences are due to foodborne transmission (Majowicz et al., 2010; CDC, 2021). *Salmonella* infections in the USA alone are 1.35 million human cases with 26,500 hospitalizations and 420 deaths annually (CDC, 2021). Both domestic and wild animals are colonized by *Salmonella* species often without signs of infection. Hence these animals act as carriers causing contamination of the environment and subsequently human food sources. Up to date, over 2500 different

Salmonella serotypes have been identified (Eng et al., 2015), and 2 of the serotypes are responsible for the majority of human incidences namely *Salmonella enteritidis* (SE), responsible for 24.7 %, and *Salmonella* Typhimurium, responsible for 23.5 % of total human cases in the globe (CDC, 2003; de Freitas Neto et al., 2010). Both these serotypes are prevalent in poultry as the poultry industry is one of the top culprits in the human acquisition of these enteric infections (de Freitas Neto et al., 2010; Antunes et al., 2016). To prevent *Salmonella* in poultry products, vaccination is one of the most promising strategies available (Nandre et al., 2012; Jawale and Lee, 2016; Jia et al., 2020). In animal vaccination programs, the safety of vaccine candidates is of utmost importance as the vaccine strains should not cause environmental contamination or disease in immunized animals. According to safety perspectives, inactivated vaccines are the safest, however, their immunogenic capacity can be lower than live vaccines (Singh, 2000). An inactivated vaccine that can compensate for the reduction in immune responses could be utterly important to provide both efficacy and safety in a single vaccine design.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Received February 11, 2021.

Accepted April 9, 2021.

¹Corresponding author: johnhlee@jnu.ac.kr

2. Immunization of chickens with *Salmonella gallinarium* ghosts expressing *Salmonella Enteritidis* NFliC-FimAC and CD40LC fusion antigen enhances cell-mediated immune responses and protects against wild-type challenges with both species

Developmental and Comparative Immunology 126 (2022) 104265

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

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



Immunization of chickens with *Salmonella gallinarium* ghosts expressing *Salmonella Enteritidis* ^NFliC-FimA^C and CD40L^C fusion antigen enhances cell-mediated immune responses and protects against wild-type challenges with both species

Amal Senevirathne, Chamith Hewawaduge, **John Hwa Lee***

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan Campus, 54596, Iksan, South Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
Salmonella gallinarium
Salmonella Enteritidis
FliC
FimA
CD40L
Lysis gene E

ABSTRACT

This study describes the construction and immunological characterization of a novel *Salmonella gallinarium* ghost vaccine to protect against *S. gallinarium* (SG) and *S. Enteritidis* (SE) serotypes. The SG ghost was designed to express N-terminus FliC (D0-D1 domain) and FimA retrieved from the SE genome, and the receptor-binding domain (RBD) of CD40L from the chicken as a single fusion construct. The construct was built in pJHL184, a phage lysis gene E-mediated ghost plasmid and the expression was confirmed by western blot resulting in an 85-kDa band. Chicken immunization was conducted by intramuscular route with SG ghost FliC-FimA-CD40L, vector control, or PBS alone in a prime-boost schedule. Antibody responses, cell-mediated immune responses (CMI), and cytokine induction was assessed in chicken demonstrating significantly high levels of IgY, CMI, cytokine responses in ghost immunized group delivering partial protection against SG wild type challenge and near complete protection against SE challenge wild type challenge.

1. Introduction

Residual virulence is a major concern with live attenuated vaccines. Occasionally, attenuated vaccine strains can induce disease conditions in young or immune-compromised individuals (Adriaenssen et al., 2007a,b). This is a fact for *Salmonella gallinarium* vaccines, such as SG9R, that are commercially used for control of fowl typhoid (Yin et al., 2015). The vaccine strain SG9R was developed about 50 years ago and remains in use to date. In countries like in South Korea, the SG9R was limited for commercial layer flocks above 6 weeks of age (Lee et al., 2005), however, the strain can be applied for both layer and broilers between 4 and 8 weeks of age. In addition to occasional toxicity, there are other disadvantages such as insufficient protection, weight loss, and reduction in growth rate that can have a direct impact on the productivity of birds, especially for layer flocks which may significantly delay age at egg laying. Another major risk is environmental contamination by fecal shedding, leaving humans and other farm animals at risk of infection.

To mitigate safety concerns, other safe vaccine strategies have been developed as alternatives to conventional live attenuated vaccines, such as protein subunit vaccines and inactivated vaccines (Hajam et al., 2010; Li et al., 2020). Under experimental conditions, these vaccines too were plausible candidates when administered with a suitable adjuvant (Li et al., 2020). For inactivated vaccines, their immunogenicity can be affected by the inactivation procedure. Most of the inactivation techniques rely on harsh conditions such as heat or chemicals like formaldehyde, which can adversely affect conserved antigenic epitopes (Kogut et al., 2012). Therefore, inactivated vaccines generated by such methods can have altered immunological profiles, leading to poor or altered immune responses upon immunization (Ferguson et al., 1993; Melamed et al., 1991). The immune responses derived by inactivated vaccines are oriented more toward humoral responses, and the majority of inactivated vaccine candidates barely induce cell-mediated immune (CMI) responses (Pham and McGorley, 2015). However, immunization against intracellular pathogens essentially requires CMI responses for significant protection. To harness the engagement of CMI responses, we incorporated CD40L, a T-cell activator molecule in the vaccine construct. The CD40L domain that interacts with the T-cell receptor bioinformatically predicted and incorporated. Here we anticipate FliC and FimA attributed strain specific immunity and CD40L driven T-cell engagement into

* Corresponding author.
E-mail address: johnhlee@jbnu.ac.kr (J.H. Lee).

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104265>

Received 27 April 2021; Received in revised form 18 September 2021; Accepted 18 September 2021

0145-305X/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

※ 별첨 자료(기술이전 계약서)

기술이전 계약서



전북대학교 수의과대학 교수 이준화(이하, "연구책임자"라 한다)가 개발하여 전북대학교 산학협력단(이하, "甲"이라 한다)이 보유하고 있는 기술에 대하여 우진비엔지(이하 "乙"이라 한다)에게 이전하기 위하여 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.

제1조 (목적)



본 계약은 "甲"이 개발하여 보유하고 있는 아래의 특허 및 기술(이하 "본 기술"이라 한다)에 대한 기술 및 노하우에 대해서 전용실시권 허여 및 이의 활용에 있어서 양 당사자의 권리 및 의무를 규정하는 것을 목적으로 한다.

기술이전 대상	특허출원번호/균주번호	비고
FliC-FimA-CD40L 융합 항원을 발현하는 살모넬라 갈리나룸 변이주를 유효성분으로 포함하는 가금티푸스 및 살모넬라증 동시 예방 또는 치료용 백신 조성물	특허 : 10-2021-0076714 균주 : JOL2596	<i>Salmonella</i> Gallinarium ghost strain - pJHL184: FliC-FimA-CD40L

제2조 (신의성실 및 상호협조)

- ① "甲"과 "乙"은 신의를 가지고 본 계약의 내용을 성실히 이행하여야 한다.
- ② 양 당사자는 본 기술 내용에 관하여 서로 협의하여야 하며, "甲"과 "乙"은 필요한 사항에 관하여 상호적극 협조하여야 한다.
- ③ "甲"과 "乙"은 본 기술의 실시를 허여 받지 아니한 제3자의 실시에 대한 증거확보에 노력하여야 하고, 확보된 증거에 대하여는 상호 이를 서면으로 통지하고 필요한 조치를 위하여 협조하여야 한다.

제3조 (실시기간)

- ① 전용실시권의 허여기간은 [redacted]으로 (특허 등록이 완료 된 경우 특허권의 존속기간까지) 하며, 계약 종료일까지 계약기술에 대한 산업재산권 획득 및 유지비용은 "乙"의 부담으로 한다.
- ② "甲"은 본 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의 변동 상황에 대해서는 책임지지 아니한다. 또한 본 기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여도 "甲"은 책임지지 아니한다.

제4조 (기술료 지급)

"乙"은 다음과 같이 기술이전에 따른 기술료를 "甲"에 지급한다.

JBNU - 1 -

※ 별첨 자료(고용창출)


1. 정규직/연구개발부서

1 / 1



발급번호 : G202112130321735				
건강보험자격득실확인서				
확인청구자	성명	주민등록번호		
	이소민	[REDACTED]		
자격득실확인내역				
No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	우진비엔지(주)	2021.09.01	
2	직장가입자	전북대학교산학협력단 연구지원과	2019.09.01	2021.09.01
	-----	이하어백	-----	-----

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인 합니다.
2021.12.13

국민건강보험공단 이사장 

- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다. (공인인증서 필요)
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(채직증명용, 경력증명용, 대출용 등)



※ 별첨 자료(고용창출)

2. 계약직/연구개발부서

재 직 증 명 서

제 2022-01-0011 호

성 명	이주영	주민등록번호	[REDACTED]
주 소	[REDACTED]		
직 위		부 서	백신팀
입사일자	2022/01/10	근속기간	00년00월04일
제 출 처		비 고	
용 도	기관제출용		

위 사람은 2022년01월13일 현재 당사에 위와 같이 재직중임을 증명 합니다.

2022년01월13일

우진비앤지(서울지점)

대표이사 강석진

서울특별시 영등포구 경인로 775 (문래동3가, 에이스하이테크시티)



(인)

※ 별첨 자료(인력양성)

1. 박사학위

 2022/07/22 22:09:56 학위예정	제출용도 : 제출처 : 농림식품기술기획평가	발급일 : 2022/07/22 유효기간 : 2022/10/20
	제 2022-74843 호	
학 위 예 정 증 명 서		
성 명	박지영	
생년월일		
대학원	대학원 박사과정	
학과	생리활성소재과학과	
입학년월일	2016년 9월 1일	
학위예정년월일	2022년 8월 22일	
이학박사		
위의 사실을 증명합니다.		
2022년 7월 22일		
전 북 대 학 교		
<small>* 무) 54896 전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 전북대학교 학사관리과 (063) 270-2094 본 증명서는 전자증명서(파일)이므로 단정스형트 및 전자서명여 있는 증명서는 위조로 간주 되어 파일 여요해 출력물과 사본입니다. (INTERNET NO) I01748025622</small>		
<small>본 증명서는 전자증명서(PDF파일)로 발급되었습니다. 전자증명서는 출력시 출력물은 사본으로 인정됩니다. 전자증명서 확인용 전용부여가 아닌 경우 진본 여부 및 전자서명을 확인 할 수 없으며 진본여부가 표시되지 않습니다. 전자증명서 확인용 전용부여는 www.certpia.com/eDown 에서 다운 받을 수 있습니다.</small>		

※ 별첨 자료(홍보실적)

1. 온라인 기사(한국동물약품협회)

The screenshot shows the KAHPA (Korea Animal Health Products Association) website. The main navigation bar includes '협회안내', '회원사 정보', '수출시장', '제품명 검색', '온라인민원업무', '자료실', and '고객지원'. A secondary navigation bar lists '포지셔널', 'FAQ', 'Q&A', '회원사소개', '회원사게시판', 'E-MAIL', '주요', '문의', and '공천기관'. The header banner features the text '동물약품산업 발전과 동물복지에 이바지함으로써 국민보건향상에 기여하겠습니다.' Below the banner, there is a sidebar for '고객지원' and a main content area titled '회원사 소식'. The article, dated 2021-02-01, is titled '우진비엔지(대표이사 김성진)는 최근 농림식품기술기획평가원의 지원을 받아 가축질병대응기술개발사업의 일환으로 가금백신의 연구개발을 진행하였다고 밝혔다. 과제명은 "항상된 약독화 및 DIVA가능한 생공백신과 안전성 및 면역원성이 증가된 가금티푸스와 살모넬라증을 동시에 방어 가능한 사균백신의 개발"이다.'

우진비엔지(대표이사 김성진)는 최근 농림식품기술기획평가원의 지원을 받아 가축질병대응기술개발사업의 일환으로 가금백신의 연구개발을 진행하였다고 밝혔다. 과제명은 "항상된 약독화 및 DIVA가능한 생공백신과 안전성 및 면역원성이 증가된 가금티푸스와 살모넬라증을 동시에 방어 가능한 사균백신의 개발"이다.

우진비엔지 백신팀은 본 연구를 통해 국내 양계농가에 많은 피해를 끼치는 가금티푸스를 효과적으로 예방하면서도 필드감염과 백신주를 구분할 수 있는 감별진단이 가능한 (DIVA) 살모넬라 생공백신 및 방머력이 향상된 면역증강 단백질을 발현하는 살모넬라 고스트 사균백신을 개발하였다고 밝혔다.

국내에서 살모넬라 감염증은 매년 꾸준히 발생하고 있어 닭의 집단폐사의 원인이 되며, 이로 인해 양계농가에 막대한 손실을 주고 있다. 연구진은 항생제 사용을 줄이기 위한 백신을 개발하되, 안전하고 환경오염의 우려가 적은 생공백신을 개발하기 위해서는 독성유전자 제거된 후보균주가 필요하며, 이를 위해 독성유전자를 제거하였고, 체외외피는 유지하면서도 박테리아 세포질의 내부 물질이 완전히 배출되도록 하는 기술을 활용하여 방머력이 개선된 고스트 사균백신을 제작하였다.

또한 연구진은 선정된 백신균주의 최적화된 대량 배양조건과 경구투여를 위한 제형개발 및 보존제 최적화 시험 등을 통해 신라계에서 신개발 생공백신 및 티푸스와 살모넬라증을 동시에 방어 가능한 고스트 사균백신에 대한 효능을 평가할 계획이다. 우진비엔지 관계자는 본 연구를 통하여 추후 안전성과 효능이 개선된 백신을 선보일 수 있을 것으로 기대한다고 언급하였다.

우진비엔지는 1977년 창립되어 올해로 창립 44주년이 되는 동물용 및 인체 의료의약품 제조판매 전문 기업이다. 1996년 품질관리우수업체 (KVGMP) 로 지정되었고, 2009년에 국제규격의 GMP 주사제 공장을 준공하며 2019년 호주경부 APYMA 설사를 완료하였으며, 동물용의약품 제조 부문 자율점검 우수업체 "검역본부장상"을 수상하였다. 우진비엔지는 2020년 한국동물약품 협회 주최 수출유공업체 농업축산식품부장관 표창을 받았으며, 세계적인 동물약품 회사로 성장하고 있다.

2. 온라인 기사(뉴스핌)

우진비엔지 "가금류 위한 생균백신 및 사균백신 개발...효능 개선에 기여할 것"

기사등록 : 2023-12-02 08:56

가+ 7+



[서울=뉴스핌] 김준희 기자 = 우진비엔지는 생명공학기술기술평가원의 지원을 받아 가금 질병 대응 기술개발 사업의 일환으로 진행한 가금 백신의 연구개발에 성공했다고 2일 밝혔다.

과제명은 '항상화 완독화 및 디바(DIVA) 가능한 생균백신과 안전성 및 면역원성이 증가한 가금티푸스와 살모넬라증을 동시에 방어할 수 있는 사균 백신의 개발'이다.



[자료:우진비엔지]

우진비엔지 백신 팀은 필드 감염과 백신 주를 구분할 수 있는 감염진단이 가능한 디바(DIVA) 살모넬라 생균백신과 방어력이 향상된 면역증강 단핵질을 함유한 살모넬라 고스트 사균 백신을 개발했다. 회사 측은 본 연구를 통해 국내 양계농가에 큰 피해를 끼치는 가금티푸스를 보고감으로 예방할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

! 국내 최고의 해외투자 뉴스 GAM

- ▶ [골목 Pick] 2022년 주목해야 할 세 가지 압도파워 관련주
- ▶ 12/02 GAM 뉴스브리핑
- ▶ 가이언스프스크립트 투자 하프인 GM, 상승 기대감 모락

살모넬라 감염증은 국내에서 매년 꾸준히 발생되고 있으며, 닭의 집단에서의 원인이 돼 양계농가에 막대한 손실을 주고 있다. 고스트 사균 백신은 세포외피를 유지하면서 박테리아 세포질 내부 물질이 완전히 파괴되는 기술을 활용해 방어력을 개선했다. 그리고 연구진은 안전하고 면역원성의 우려가 적은 '살모백신'을 개발하기 위해 특정 유전자가 제거된 백신주를 개발했다.

우진비엔지 관계자는 "안전한 백신 개발의 최정확한 대량 배양공정과 연구 투자를 위한 제형 개발 및 특관계 최적화 시범 등을 통해 백신들의 효능을 '해가할 계획'이라며 "본 연구를 통해 우리 양계농장 비용이 개선된 백신을 선보일 수 있을 것으로 기대한다"고 밝혔다.

※ 참고 문헌

1. H.L. Shivaprasad, Fowl typhoid and pullorum disease, OIE Rev. Sci. Tech. (2000).
2. D. Arora, S. Kumar, N. Jindal, G. Narang, P.K. Kapoor, N.K. Mahajan, Prevalence and epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum from poultry in some parts of Haryana, India, Vet. World. (2015).
3. H.W. Smith, J.F. Tucker, The virulence of *Salmonella* strains for chickens: Their excretion by infected chickens, J. Hyg. (Lond). (1980).
4. D.F. Alves Batista, O.C. de Freitas Neto, A.M. de Almeida, G. Maboni, T.F. de Carvalho, T.P. de Carvalho, P.A. Barrow, A. Berchieri, Evaluation of pathogenicity of *Salmonella Gallinarum* strains harboring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*, PLoS One. (2018).
5. N.M. Kamble, C.V. Jawale, J.H. Lee, Interaction of a live attenuated *Salmonella Gallinarum* vaccine candidate with chicken bone marrow-derived dendritic cells, Avian Pathol. 45 (2016) 235–243.
6. I.A. Hajam, J.H. Kim, J.H. Lee, Incorporation of membrane-anchored flagellin into *Salmonella Gallinarum* bacterial ghosts induces early immune responses and protection against fowl typhoid in young layer chickens, Vet. Immunol. Immunopathol. (2018).
7. R.M. Nandre, J.H. Lee, Generation of a safe *Salmonella Gallinarum* vaccine candidate that secretes an adjuvant protein with immunogenicity and protective efficacy against fowl typhoid, Avian Pathol. (2014).
8. J.H.L. Perumalraja Kirthika, Amal Senevirathne, Vijayakumar Jawalagatti, SungWoo Park, Deletion of the *lon* gene augments expression of *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-1 and metal ion uptake genes leading to the accumulation of bactericidal hydroxyl radicals and host pro-inflammatory cytokine-mediated rapid intracellular clearance, Gut Microbes. 11 (2020) 1–18.
9. K. Matsuda, A.A. Chaudhari, S.W. Kim, K.M. Lee, J.H. Lee, Physiology, pathogenicity and immunogenicity of *lon* and/or *cpxR* deleted mutants of *Salmonella Gallinarum* as vaccine candidates for fowl typhoid, Vet. Res. (2010).
10. B. Leyman, F. Boyen, A. Van Parys, E. Verbrugghe, F. Haesebrouck, F. Pasmans, *Salmonella Typhimurium* LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs, Vaccine. (2011).
11. J. Lalsiamthara, J.H. Kim, J.H. Lee, Engineering of a rough auxotrophic mutant *Salmonella Typhimurium* for effective delivery, Oncotarget. (2018).
12. K. Matsuda, A.A. Chaudhari, J.H. Lee, Evaluation of safety and protection efficacy on *cpxR* and *lon* deleted mutant of *Salmonella Gallinarum* as a live vaccine candidate for fowl typhoid, Vaccine. (2011).
13. A.A. Chaudhari, S.W. Kim, K. Matsuda, J.H. Lee, Safety evaluation and immunogenicity of arabinose-based conditional lethal *Salmonella Gallinarum* mutant unable to survive Ex vivo as a vaccine candidate for protection against fowl typhoid, Avian Dis. (2011).
14. K.A. Datsenko, B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, Proc. Natl. Acad. Sci. 97 (2000) 6640–6645.
15. S. Parasuraman, R. Raveendran, R. Kesavan, Blood sample collection in small laboratory animals, J. Pharmacol. Pharmacother. (2010).
16. L.M. Kelly, L.C. Alworth, Techniques for collecting blood from the domestic chicken, Lab Anim. (NY). (2013).
17. Z. Wu, L. Rothwell, J.R. Young, J. Kaufman, C. Butter, P. Kaiser, Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells, Immunology. (2010).

18. A.A. Tarique, J. Logan, E. Thomas, P.G. Holt, P.D. Sly, E. Fantino, Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2015).
19. H. Sui, M. Luo, Y. Miao, W. Cheng, S. Wen, B. Zhao, Y. Li, Z. Qiao, Y. Liu, C. Xu, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting autophagy through PI3K/AKT/mTOR pathway in mice, *Respir. Physiol. Neurobiol.* (2020).
20. J. Lalsiamthara, J.H. Lee, Brucella lipopolysaccharide reinforced *Salmonella* delivering Brucella immunogens protects mice against virulent challenge, *Vet. Microbiol.* 205 (2017) 84–91.
21. I.A. Hajam, J.H. Kim, J.H. Lee, Incorporation of membrane-anchored flagellin into *Salmonella Gallinarum* bacterial ghosts induces early immune responses and protection against fowl typhoid in young layer chickens, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2018).
22. Q. Kong, J. Yang, Q. Liu, P. Alamuri, K.L. Roland, R. Curtiss, Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Infect. Immun.* (2011).
23. Adriaensen C, De Greve H, Tian JQ, De Craeye S, Gubbels E, Eeckhaut V, et al. A live *Salmonella enterica* serovar enteritidis vaccine allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Infect Immun.* 2007.

[뒷면지]

주 의

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