

Cell Culture-based Influenza Vaccines as Alternatives to Egg-based Vaccines

Ilseob Lee^{1,2}, Jin Il Kim^{1,2} and Man-Seong Park^{1,2*}

¹Department of Microbiology, ²Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do, Korea

Influenza viruses have raised public health concerns by seasonal epidemics and intermittent pandemics. Vaccination is considered as the most effective method for preventing influenza infection in humans. Current influenza vaccines are mostly produced in fertile chicken eggs. However, disadvantages of egg-based vaccines, such as egg dependency, labor-intensive manufacturing system, and hurdle for large-scale output, allow us to make an alternative method. A cell-culture platform may be a fine alternative for the next generation vaccine technique. Compared with a classical egg-based method, cell-grown vaccines provide stable pipeline even in the pandemic situation with shorter lead-in times. In addition, cell-grown vaccines are flexible for altering production scales because stocked cell batches can be easily sub-cultured in large quantity without worrying avian diseases and a resultant decrease in egg production. By World Health Organization, MDCK, PER.C6, and Vero cells are only recommended for manufacturing influenza vaccines. In this review, we discuss the necessity, immunogenicity, and efficacy of cell-grown influenza vaccines compared with egg-based vaccines.

Key Words: Egg, Influenza, MDCK, Vaccine, Vero

서론

인플루엔자바이러스는 10~13종류의 단백질을 발현하는 단일 음성가닥의 8개의 RNA 분절로 구성된 바이러스(single-stranded, negative-sense RNA virus)로 *Orthomyxoviridae* 과(family)에 속한다 (1). 바이러스는 일반적으로 호흡기를 통해 감염되어 두통, 오한, 근육통과 같은 전신 증상과 호흡기 증상을 유발한다. 인플루엔자바이러스는 A, B, C의 세 가지 형으로 구분되는데, 주로 A형과 B형이 사람 사이에 유행하고 있다. 특히 A형 인플루엔자바이러스는 표면 당단백질인 hemagglutinin (HA)

과 neuraminidase (NA)의 항원성 차이에 의해 다시 아형(subtype)으로 나뉘지며, 현재까지 17개의 HA 아형과 10개의 NA 아형이 알려져 있다 (2).

인플루엔자바이러스는 매년 겨울철에 반복적으로 유행하여 공중보건학적 문제를 발생시키고 있다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 따르면, 겨울철에 발생하는 계절성 유행성 독감(seasonal influenza)은 매년 전세계적으로 약 25만~50만 명의 사망자를 발생시키고 있는 것으로 보고되고 있다 (3). 또한, 예상치 못한 시기에 갑작스럽게 발생하는 인플루엔자 대유행(pandemic)은 매우 심각한 사회적, 경제적 피해를 발생시킨다. 지난 20세기 세 번의 인플루엔자 대유행이 발생하였는데(1918년;

Received: December 15, 2012/ Revised: February 5, 2013/ Accepted: February 15, 2013

*Corresponding author: Man-Seong Park, Ph.D. Department of Microbiology, Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do, 200-702, Korea.

Phone: +82-33-248-2632, Fax: +82-33-252-2843, e-mail: ms0392@hallym.ac.kr or manseong.park@gmail.com

**This study was supported by a grant from the Korea Healthcare Technology R&D Project of the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Grant No. A103001).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

H1N1 아형, 1957년; H2N2 아형, 1968년; H3N2 아형), 1918년에는 전세계적으로 약 5천만 명, 1957년과 1967년에는 약 백만 명의 사람이 인플루엔자바이러스에 의해 사망하였다 (4). 더불어 치사율이 약 59%(2012년 8월 10일 기준, WHO)에 이르는 고병원성 H5N1 조류 인플루엔자(highly pathogenic avian influenza, HPAI)도 매년 지속적으로 발생하고 있다 (5).

현재 다양한 항바이러스제가 사용 또는 개발되고 있지만 (6), 인플루엔자바이러스 감염에 대응하는 가장 효과적인 방법은 백신을 접종하는 것으로 알려져 있다 (7). 현재 사용되는 계절성 인플루엔자 백신(seasonal influenza vaccine)은 A형 인플루엔자바이러스 중 H1N1, H3N2 아형 항원과 인플루엔자 B형 바이러스 항원으로 구성된 삼가백신(trivalent influenza vaccine)이다. 최근에는 WHO의 권고에 따라 인플루엔자 B형 바이러스의 두 계통(Yamagata 계통과 Victoria 계통) 항원을 모두 포함하는 사가백신(quadrivalent influenza vaccine)의 개발도 이루어지고 있다 (8, 9). 인플루엔자바이러스는 항원성의 변이가 자주 일어나 매년 WHO에서 전세계의 역학조사 결과

를 바탕으로 인플루엔자 백신생산에 사용될 백신주를 선정하고 이를 이용하여 백신을 생산한다 (10).

현재 사용되고 있는 대부분의 인플루엔자 백신은 유정란을 이용하여 생산된다. 1945년 인플루엔자 백신이 첫 사용 허가를 받은 이후 약 70여 년 동안 유정란은 인플루엔자 백신을 생산하는데 사용되어 (11), 현재 대량의 인플루엔자 백신을 생산하기 위한 최적화 시스템이 구축되어 있다. 하지만 유정란을 이용하여 백신을 생산하는 경우 유정란의 안정적인 공급 및 사용 후 폐기물 처리와 같은 문제점들이 지속적으로 제기되어 왔다. 이에 따라 세포를 인플루엔자 백신생산에 이용하려는 시도는 1980년대부터 시작되었으며 (12~15), 최근 들어 세포배양 관련 기술이 발달함에 따라 세포를 기반으로 한 인플루엔자 백신 개발에 관련 연구자 및 산업체들의 관심이 더욱 증폭되고 있는 실정이다.

현재 세포배양을 기반으로 하여 생산된 다양한 바이러스성 감염질환에 대한 예방백신이 사용되고 있다(Table 1). 이러한 사실은 유정란 기반 백신생산의 문제점을 해결하기 위한 하나의 대안으로 세포배양 기반 예방백신

Table 1. Licensed cell-culture based viral vaccines in the United States[†].

Virus	Type	Trade name	Cell line	Company
Adenovirus	Live	No Trade Name	WI-38	Barr Labs, Inc.
Hepatitis A	Inactivated	Havrix	MRC-5	Merck & Co, Inc.
	Inactivated	VAQTA	MRC-5	GlaxoSmithKline Biologicals
Japanese Encephalitis	Inactivated	Ixiaro	Vero	Intercell Biomedical
Measles	Live-attenuated	Attenuvax	CEF	Merck & Co, Inc.
Poliovirus	Inactivated	IPOL	Vero	Sanofi Pasteur, SA
Rabies	Inactivated	Imovax	MRC-5	Sanofi Pasteur, SA
	Inactivated	RabAvert	CEF	Novartis
Rotavirus	Live-attenuated	ROTARIX	Vero	GlaxoSmithKline Biologicals
	Live-attenuated	RotaTeq	Vero	Merck & Co., Inc.
Vaccinia	Live-attenuated	ACAM2000	Vero	Sanofi Pasteur Biologics Co.
Varicella-zoster virus	Live-attenuated	Varivax	MRC-5	Merck & Co, Inc.
	Live-attenuated	Zostavax	MRC-5	Merck & Co, Inc.
MMR [‡]	Live-attenuated	M-M-R II	CEF, CEF, WI-38	Merck & Co, Inc.
MMRV [§]	Live-attenuated	ProQuad	CEF, CEF, WI-38, MRC-5	Merck & Co, Inc.

[†]Data are collected from U.S. Food and Drug Administration (FDA)

[‡]Measles, Mumps, and Rubella

[§]Measles, Mumps, Rubella, and Varicella

의 생산공정을 인플루엔자에 적용할 수 있음을 시사하고 있다. 이에 따라 저자들은 현재 대두되고 있는 세포배양 기반 인플루엔자 백신에 대해 고찰해보고자 한다.

본 론

1. 세포배양 기반 인플루엔자 백신의 필요성

지난 수십 년간 인플루엔자 백신은 유정란을 이용하여 생산되어 왔기 때문에 유정란 기반 인플루엔자 백신생산 시스템은 상당히 안정화된 방법으로 여겨지고 있다. 하지만 유정란 기반 인플루엔자 백신생산은 많은 양의 유정란이 안정적으로 미리 확보되어야 하고, 생산과정이 노동 집약적이며 다수의 복잡한 처리과정을 거쳐야 순수 백신을 얻을 수 있다는 단점을 갖고 있다.

유정란 기반 인플루엔자 백신생산에 있어 대두되는 가장 큰 문제점은 필요한 만큼의 백신을 기간 내에 생산하기 위해서 유정란을 적시에 안정적으로 확보하여야 한다는 것이다. 일반적으로 1도즈(dose)의 인플루엔자 백신을 생산하기 위해서는 1~2개의 유정란이 필요한 것으로 알려져 있다 (16). 지난 2006~2007 인플루엔자바이러스 유행시기에는 전세계적으로 약 4억 1,300만 도즈의 삼가백신(trivalent vaccine)이 생산되었는데 (17), 이러한 수치는 상당한 양의 유정란이 백신생산 개시 이전까지 반드시 준비되어야 한다는 것을 의미한다. 하지만 유정란 생산시설이 위치한 지역에 조류 질병이 유행하거나 자연재해로 인해 유정란의 공급에 차질이 빚어질 가능성은 항상 존재한다 (12) 또한 예상하지 못한 시기에 갑작스러운 인플루엔자 대유행이 발생하여 단기간에 백신수요가 급격히 증가할 경우, 유정란의 공급이 신속하게 이루어지기 어려워 백신생산 규모는 제한적일 수 밖에 없다 (18).

유정란 기반 인플루엔자 백신생산의 또 다른 문제점은 신속한 백신생산이 어렵다는 점이다. 현재 충분한 양의 유정란을 준비하는 단계부터 백신생산이 완성되는 단계까지는 약 5~6개월이 소요되는 것으로 알려져 있다 (19). 이러한 오랜 기간에 걸쳐 생산되는 백신은 새로운 인플루엔자바이러스에 의한 갑작스러운 대유행 발생 시 신속한 백신생산을 어렵게 하여 인플루엔자바이러스를 효과적으로 방어하지 못하게 한다. 실제로 지난 2009년 대유행을 일으킨 H1N1 아형의 신종 인플루엔자바이러스의 경우, 첫 발생이 보고된 후 2개월 만에 전세계적으로 전파되어 대유행을 발생시켰다 (20). 이런 인플루엔자 대유행

이 발생하면 단기간에 백신에 대한 수요가 5~10배 정도 증가하는 것으로 분석되었으며 (21), 이러한 상황 하에서 유정란 기반 백신생산 체계로는 단기간에 신속한 인플루엔자 백신의 공급이 어렵다 (18).

한편 인플루엔자 백신생산용 seed 바이러스가 간혹 유정란에서 잘 자라지 못하는 특성을 나타내는 경우도 있다. 이에 유정란 기반 인플루엔자 백신의 생산성을 높이기 위해서는 유정란에서 높은 바이러스 성장특성을 나타내는 백신균주(high growth reassortants, HGR)가 요구되는데, 이를 위해 유정란에서 인플루엔자바이러스를 적응(adaptation)시켜 유정란에서 잘 자라는 백신균주를 선택(selection)해야 한다. 그러나 이런 과정 중에 HGR 바이러스의 항원성에 변이가 올 수 있는데, 이는 유정란 기반 인플루엔자 백신생산에 큰 문제를 야기할 수 있다. 이전의 연구 결과를 살펴보면 인플루엔자 B형 바이러스를 유정란과 MDCK 세포주에서 적응시킨 경우, 유정란에 적응된 바이러스에서만 HA1 부위의 196-198번째 아미노산의 돌연변이로 HA 단백질의 당쇄화(glycosylation) 변이가 발생하여 항원성 변이가 초래되었다 (22, 23). 이러한 현상은 H1N1 아형 또는 H3N2 아형의 인플루엔자바이러스에서도 보고되었다. 즉 유정란 또는 MDCK 세포주 유래의 다양한 H1N1 아형의 인플루엔자바이러스를 이용한 혈청학적 연구 결과, 유정란에서 유래된 바이러스에서만 항원성 변이가 일어남을 확인하였다 (24). 그리고 임상시료를 유정란과 동물세포주에서 배양한 후 염기서열을 분석한 결과, 유정란에서 배양된 바이러스는 원래의 임상시료와는 다른(heterogeneous) 유전자 염기서열을 갖는다는 결과가 보고되었다 (25, 26).

이러한 문제점 외에도 유정란 기반 인플루엔자 백신은 외래성 바이러스(adventitious virus)나 세균에 오염될 수 있는 위험성을 갖고 있으며, 유정란 유래 단백질이 백신에 포함될 수 있기 때문에 백신을 접종 받은 사람에게 과민 반응이나 발열을 유발시킬 수 있는 단점을 갖고 있다 (27).

이에 세포배양 기반 인플루엔자 백신은 위와 같은 유정란 기반 인플루엔자 백신의 단점을 극복할 수 있는 새로운 방법 중의 하나로 여겨지고 있다 (28). 세포배양은 유정란과는 달리 필요한 시기에 대량의 세포를 안정적으로 확보하는 것이 가능해 인플루엔자 백신을 약 3개월 정도의 기간 안에 대량생산할 수 있는 것으로 분석되었다 (21). 그러므로 이러한 백신생산 기간의 단축은 갑작

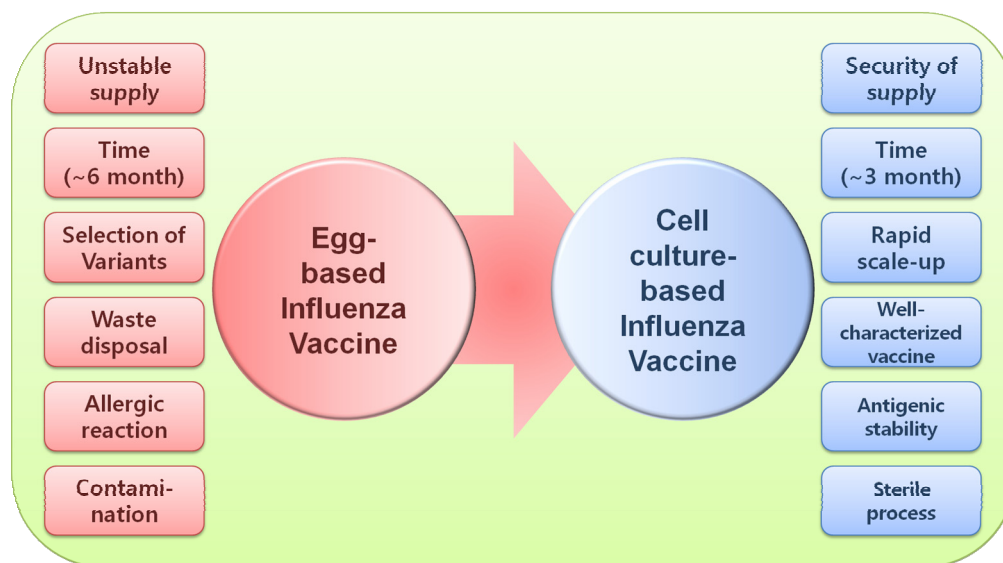


Figure 1. A new paradigm for next generation of influenza vaccine. Cell culture-based influenza vaccine is challenging to issues caused by egg-based influenza vaccine.

스립게 발생하는 새로운 인플루엔자바이러스의 대유행 또는 H5N1 HPAI의 유행에 좀 더 신속히 방어할 수 있어 국가위기 시 좀 더 효과적인 안전망 역할을 할 수 있다. 실제로 지난 2009년 신종 인플루엔자바이러스가 2~3개월 만에 전세계적으로 전파되어 대유행이 일어났다는 사실은 신속한 백신생산이 얼마나 중요한지 깨우쳐 주는 좋은 사례이다. 최근 마이크로캐리어(microcarrier)를 이용하여 세포를 배양했을 경우 1 ml의 세포주 한 바이알(vial)을 8주 만에 6,000리터(L) 규모로 증폭시킬 수 있는 보고가 있었다 (29). 그러므로 이렇게 개선된 세포배양 기술을 적용할 경우 세포배양 기반 인플루엔자 백신은 더욱 신속히 효율적인 비용으로 대량생산 될 수 있어 유정란 기반 인플루엔자 백신을 대체할 수 있는 가능성이 있다. 또한 앞에서 제시된 것처럼 인플루엔자바이러스는 세포주에서 배양될 경우 항원성 변이가 유정란에 비해 상대적으로 낮은 장점이 있다. 그리고 세포배양 인플루엔자 백신은 폐쇄된(closed) 시스템 내에서 생산되어 무균화가 가능하고 동일한 배지를 사용하여 생산되기 때문에 세포주간의 개체 차이가 적어 균질한 효능을 가진 백신의 생산이 가능하다는 장점도 갖고 있다(Fig. 1).

이에 이러한 장점을 가진 세포배양 기반 인플루엔자 백신개발의 필요성이 점점 더 강조되고 있다. 지난 2006년 미국 보건복지부는 약 10억불을 세포배양 기반 인플루엔

자 백신개발에 지원하였으며 (30), 2009년 약 4억 8,700만 불을 지원하여 Novartis사와 함께 세포배양 기반 인플루엔자 백신생산 시설을 구축하기 시작하였다 (31). 이러한 세포배양 기반 인플루엔자 백신개발 및 생산관련 인프라 구축을 위한 정부의 적극적인 지원은 언젠가 인류에 또 다른 대유행이 올 경우 막강한 효력을 발휘할 것으로 기대된다.

2. 세포배양 기반 인플루엔자 백신개발

2-1. 세포배양 기반 인플루엔자 백신생산에 사용되는 세포주와 이를 이용하여 개발된 백신

세포배양 기반 인플루엔자 백신에 사용되는 세포주는 1) seed 백신균주가 생산에 충분한 역가(titer)까지 잘 성장할 수 있어야 하고, 2) 안전성, 특히 발암원성(tumorigenic)과 무관하다는 증명이 있어야 하며, 3) 세포주가 우태아혈청(fetal bovine serum)이 존재하지 않는 배지에서도 충분히 자라야 하는 등 위의 세 가지 조건이 모두 충족되어야 한다 (28).

WHO는 인플루엔자바이러스의 성장특성을 기초로 Vero (Africa green monkey kidney cell), MDCK (Madin-Darby canine kidney cell), PER.C6 (Embryonic human retinal cell derived)의 세 가지 세포주가 인플루엔자 백신생산에 가장 적절한 것으로 분석하였으며 (28), 현재 세포배양 기

Table 2. Authorized cell-culture based influenza vaccines.

Trade name	Viruses	Cell line	Authorization	Company
Influvac [†]	Seasonal	MDCK	2001; The Netherlands	Solvay
Influvect	Seasonal	Vero	2002; The Netherlands	Baxter
Optaflu	Seasonal	MDCK	2007; EU	Novartis
Celvapan	Pandemic	Vero	2009; EU	Baxter
Celtura	Pandemic	MDCK	2009; Germany	Novartis
PreFluCel	Seasonal	Vero	2010; Austria	Baxter
FluceIVax [‡]	Seasonal	MDCK	2012; U.S.	Novartis

[†]Never commercially distributed[‡]The first cell-culture based seasonal vaccine in U.S.

반 인플루엔자 백신은 위의 세 가지 세포주를 이용하여 개발되고 있다(Table 2).

2-1-1. Vero 세포주

Vero 세포주는 현재 사람에게 접종하고 있는 다양한 백신들을 생산하는데 가장 널리 이용되고 있는 세포주 중의 하나이다(Table 1). 1980년대 Montagnon 등이 Vero 세포주를 이용하여 불활화 poliovirus 백신(inactivated poliovirus vaccine)을 생산한 것을 (32) 시작으로 1985년 광견병백신, 1988년 poliovirus 생백신 등이 Vero 세포주를 이용하여 생산되었다 (33, 34). 최근에는 일본뇌염백신 (Japanese encephalitis vaccine) (35~38) 및 로타바이러스 (rotavirus) 백신생산 (39)에 Vero 세포주가 이용되고 있다. 이와 같이 Vero 세포주는 약 30여 년의 기간 동안 사람 백신생산에 성공적으로 사용되었으며, WHO가 선정한 인플루엔자 백신용 세포주 중 유일하게 안전성이 증명된 세포주이다.

Vero 세포주가 인플루엔자 백신생산용 세포주로 대두되기 시작한 초기, 인플루엔자바이러스가 Vero 세포주에서는 높은 역가로 잘 증식하지 못해 백신생산에 적합하지 않은 세포주로 평가되었다 (40, 41). 왜냐하면 다른 바이러스 질환의 백신생산에 이용되어 아무리 안전성이 확보된 세포주일지라도 인플루엔자 seed 백신균주가 잘 성장하지 못한다면 필요한 양만큼의 백신을 생산할 수 없는 문제가 일어날 수 있기 때문이다. 하지만 지속적인 연구를 통해 1990년대 중반 Govorkova 등은 trypsin (TPCK-treated trypsin)을 여러 번 반복적으로 첨가해 주는 방법을 통해 Vero 세포주에서 인플루엔자바이러스의 성장능을 향상시킨 결과를 보고하였고 (42), Kaverin 등은 trypsin의

활성저하가 Vero 세포주에서 바이러스의 증식을 억제하는 원인임을 보고하였다 (43). 또한 Govorkova 등은 Vero 세포주에서 인플루엔자 A형 바이러스뿐만 아니라 B형 바이러스도 trypsin의 반복투여 방법으로 증폭시킬 수 있음을 보고하였고 (44), Kistner 등은 혈청이 첨가되지 않은 배지(serum-free)에서 배양한 Vero 세포주를 이용하여 인플루엔자 백신을 대량생산하는 시스템에 대해 보고하였다 (16). 이런 향상된 세포배양 기술을 적용하여 현재는 Vero 세포주에서 인플루엔자 백신의 대량생산이 가능하게 되었다 (29).

현재 Baxter사는 Vero 세포주를 이용한 인플루엔자 백신을 개발하고 있다(Table 2). 현재 계절성 인플루엔자 (seasonal influenza)바이러스와 2009년 대유행을 일으킨 H1N1 아형의 신종 인플루엔자바이러스, H5N1 HPAI에 대한 백신이 개발되어 임상시험 중에 있다 (28, 45, 46).

2-1-2. MDCK 세포주

MDCK 세포주는 인플루엔자바이러스에 대한 감수성이 매우 높아 세포배양 기반 인플루엔자 백신의 생산효율 측면에서 가장 적합한 세포주로 여겨지고 있다 (47~49). 또한 MDCK 세포주는 온도나 pH 변화에 덜 민감하다는 특징도 가지고 있다 (50). 이러한 장점을 바탕으로 MDCK 세포주를 이용한 세포배양 기반 백신개발 연구가 활발히 이루어지고 있다. 하지만 많은 장점에도 불구하고, MDCK 세포주는 크게 두 가지의 잠재적인 문제점을 갖고 있다. 즉 MDCK 세포주는 현재까지 백신생산에 실제적으로 이용된 적이 없는 세포주라는 것이다. 사람 백신 생산용 세포주로 오랫동안 사용된 Vero 세포주와는 달리 실제로 사람에게 대한 안전성 분석이 이루어지지 못했다.

또 다른 문제점은 발암원성(tumorigenicity)에 대한 것이다. WHO는 MDCK 세포주가 Vero 세포주보다 발암원성이 높은 것으로 확인하였다 (28). 하지만 최근 Liu 등이 MDCK 세포주의 안전성을 분석한 결과, 인플루엔자 백신을 생산하는데 MDCK 세포주를 이용하여도 발암원성은 큰 문제가 되지 않을 것이라 보고를 하였다 (51). 이러한 결과들로 미루어 볼 때, MDCK 세포주도 유정란을 대체할 수 있는 효과적인 백신생산 세포주가 될 수 있을 것으로 판단된다.

현재 Novartis, Solvay, GlaxoSmithKline, 및 MedImmune사가 MDCK 세포주를 이용하여 인플루엔자 백신을 개발하고 있다. Solvay사가 개발한 Influvac®이라는 제품은 세포배양 기반 인플루엔자 백신으로서 최초로 허가를 받은 제품이지만(Table 2), 실제 판매까지 이루어지지는 못했다 (50). 이후 2007년과 2009년에 Novartis사에서 개발한 백신이 각각 EU와 독일의 허가를 받았다(Table 2). 그리고 지난 2012년 11월, Novartis사에서 개발한 MDCK 세포주를 이용한 세포배양 기반 인플루엔자 백신인 FlucelVax®가 세계 최초로 미국 식품의약품안전청의 허가를 받았다 (Table 2) (52).

2-1-3. PER.C6 세포주

PER.C6 세포주를 인플루엔자 백신생산에 이용하는 연구는 비교적 최근에 시작되었다. 2001년에 Pau 등은 최초로 PER.C6 세포주를 인플루엔자 백신생산에 이용할 수 있음을 보고하였다 (53). PER.C6 세포주를 이용한 인플루엔자 백신생산의 경우 Crucell사가 특허권을 갖고 있으며, H7N1 백신을 개발하여 현재 임상시험 중에 있다 (54). PER.C6 세포주를 이용한 백신 중 허가를 받은 백신은 현재까지는 없으나, 발암원성(tumorigenicity)에 대한 연구를 수행한 결과 누드 마우스와 햄스터에서 종양원성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다 (55).

2-2. 높은 성장특성을 갖는 seed 백신균주의 개발

세포배양 인플루엔자 백신에 있어 중요하게 고려되어야 할 점 중의 하나는 높은 성장특성을 나타내는 seed 백신균주를 개발하는 것이다. 이는 백신생산에 있어 항원의 양이 매우 중요한 의미를 갖기 때문이다. 이러한 이유로 성장특성이 높은 세포배양용 seed 인플루엔자 백신균주를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. MDCK 세포주의 경우 NA 유전자의 stalk 부위에 H5N1 조류 인플루엔자바이러스로(A/Goose/Guangdong/3/97)부터 유래한 38개의 아미노산을 삽입하여 MDCK 세포주

에서 높은 성장특성을 나타내는 재조합 H5N1 백신주를 개발한 연구 결과가 보고되었다 (56). 또한 현재 H5N1 조류인플루엔자 seed 백신균주로 개발되어 있는 NIBRG-14을 Vero 세포주에서 계대배양하여 성장능을 향상시킨 보고가 있다 (57). 또 다른 연구에서는 H1N1 아형의 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 인플루엔자바이러스를 Vero 세포주에서 계대배양하여 높은 성장특성을 나타내는 PR8 바이러스를 얻은 뒤, 유전자를 비교분석하여 성장특성에 영향을 미치는 결정인자를 발굴하였다. 이를 다른 H1N1 또는 H3N2 아형의 재조합 백신균주에 적용하여 Vero 세포주에서 높은 역가로 자랄 수 있는 seed 백신균주를 개발하였다 (58).

3. 세포배양 기반 인플루엔자 백신의 효능평가

세포배양 기반 인플루엔자 백신의 효능은 유정란 기반 인플루엔자 백신과 비교해 거의 차이가 없는 것으로 보고되고 있다. Szymczakiewicz-Multanowska 등은 MDCK 세포주에서 생산한 인플루엔자 백신효능을 유정란 기반 인플루엔자 백신과 비교한 임상 3상 시험 결과, 세포배양 기반 인플루엔자 백신의 효능이 유정란 기반 인플루엔자 백신과 매우 비슷함을 보고하였다 (59). Reisinger 등도 백신 임상시험 결과, 세포배양 기반 인플루엔자 백신은 유정란 기반 인플루엔자 백신과 비교하여 안전성 및 면역원성에 거의 차이가 없음을 보고하였다 (60). Groth 등은 MDCK 세포주를 이용하여 개발한 계절성 인플루엔자 백신(Optaflu, Novartis)을 독일에서 임상 1상 및 2상 시험을 수행한 결과, 세포배양 기반 인플루엔자 백신은 18~40세 사이의 성인과 61세 이상의 노인에서 대조군으로 사용된 유정란 유래 인플루엔자 백신과 거의 비슷한 면역원성을 유도한다고 보고하였다 (61). 또한 Hatz 등은 18~60세의 성인을 대상으로 MDCK 세포주에서 생산된 2009년 H1N1 대유행 인플루엔자 백신(Celtura, Novartis)의 임상시험을 수행하였다. 그 결과 7.5 µg(HA 항원량 기준)의 백신을 면역보조제(adjuvant)와 함께 접종하였을 때 높은 면역원성이 유도되는 것을 확인하였다 (62).

한편 Ehrlich 등은 Vero 세포주를 이용하여 개발된 H5N1 HPAI 백신(Baxter)의 임상 1상과 2상 시험에서 18~45세 사이의 성인에게 7.5 µg과 15 µg을 2회 접종하였을 경우 면역보조제(adjuvant)의 사용 없이도 면역원성이 유도되는 결과를 보고하였다 (63).

이러한 결과들을 종합하여 볼 때, 세포배양 기반 인플

루엔자 백신의 효능은 유정란 기반 인플루엔자 백신의 효능과 큰 차이가 없는 것으로 판단된다.

결 론

세포배양 기반 인플루엔자 백신은 유정란 기반 인플루엔자 백신에 비해 1) 단기간에 대량으로 백신을 생산할 수 있고, 2) 안정적인 백신생산 세포주의 공급이 가능하며, 3) 백신생산 규모를 상대적으로 쉽게 확대할 수 있고, 4) 화학적으로 조성이 정해진(chemically defined) 배지를 사용하기 때문에 항상 일정한 양의 백신을 생산할 수 있으며, 5) 무균배양이 가능하고, 6) 알러지 반응을 일으키는 유정란 단백질 성분이 포함되지 않는 등의 여러 장점을 갖고 있다. 그러므로 세포배양 기반 인플루엔자 백신은 갑작스러운 인플루엔자 대유행 또는 H5N1 HPAI와 같은 새로운 아형의 인플루엔자바이러스가 유행하여 단기간에 백신수요가 급격히 증가할 경우 효과적으로 대응할 수 있는 강력한 도구가 될 수 있다. 이에 WHO에서는 Vero, MDCK, PER.C6 세포주를 인플루엔자 백신생산에 이용하도록 선정하였으며, 최근 세포배양 기술의 발달에 힘입어 유정란 기반 인플루엔자 백신과 마찬가지로 대량으로 백신을 생산할 수 있게 되었다. 또한 그 효능이 유정란 기반 인플루엔자 백신과 거의 다르지 않는 것으로 보고되었다.

이러한 사실들을 종합하여 볼 때, 세포배양 기반 인플루엔자 백신은 기존의 유정란 기반 인플루엔자 백신의 문제점을 극복하여 효과적으로 사용될 충분한 가능성을 갖고 있는 것으로 판단된다. 그러므로, 백신주권을 자체적으로 마련하기 위해서는 유정란 기반 백신생산 시설뿐만 아니라 세포배양 기반 백신생산관련 인프라를 구축하는 것도 미래를 대비한 현명한 선택이 될 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Lee I, Kim JI, Park MS. A Novel PA-X Protein Translated from Influenza A Virus Segment 3. *J Bacteriol Virol* 2012;42: 368-71.
- 2) Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:4269-74.
- 3) WHO. Fact sheet on influenza. 2009.
- 4) Klenk HD, Garten W, Matrosovich M. Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic. *Bioessays* 2011;33: 180-8.
- 5) WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO. 2012.
- 6) Park S, Kim JI, Park MS. Antiviral Agents Against Influenza Viruses. *J Bacteriol Virol* 2012;42:284-93.
- 7) Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999;354:1277-82.
- 8) Kim JI, Park MS. An Universal Approach to Getting Ahead for Influenza B Vaccines. *J Bacteriol Virol* 2012;42:363-7.
- 9) Traynor K. First quadrivalent flu vaccine approved. *Am J Health Syst Pharm* 2012;69:538.
- 10) WHO. A description of the process of seasonal and H5N1 influenza vaccine virus selection and development. 2007.
- 11) Nicholson KG WR, Hay AJ. Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1998.
- 12) WHO. Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1995;73:431-5.
- 13) Magrath DI. Safety of vaccines produced in continuous cell lines. *Dev Biol Stand* 1991;75:17-20.
- 14) Merten OW, Hannoun C, Manuguerra JC, Ventre F, Petres S. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. *Adv Exp Med Biol* 1996;397:141-51.
- 15) Tannock GA, Bryce DA, Paul JA. Evaluation of chicken kidney and chicken embryo kidney cultures for the large-scale growth of attenuated influenza virus master strain A/Ann/Arbor/6/60-ca. *Vaccine* 1985;3:333-9.
- 16) Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dörner F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 1998;16:960-8.
- 17) PATH. Influenza Vaccine Strategies for Broad Global Access. www.oliverwyman.com/media/VAC_infl_publ_rpt_10-07.pdf. 2007.
- 18) Feng SZ, Jiao PR, Qi WB, Fan HY, Liao M. Development and strategies of cell-culture technology for influenza vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:893-902.
- 19) Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 2003;21:1776-9.
- 20) WHO. World now at the start of 2009 influenza pandemic. 2009.

- 21) Pandey A, Singh N, Sambhara S, Mittal SK. Egg-independent vaccine strategies for highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Hum Vaccin* 2010;6:178-88.
- 22) Robertson JS, Naeve CW, Webster RG, Bootman JS, Newman R, Schild GC. Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology* 1985;143:166-74.
- 23) Oxford JS, Schild GC, Corcoran T, Newman R, Major D, Robertson J, *et al.* A host-cell-selected variant of influenza B virus with a single nucleotide substitution in HA affecting a potential glycosylation site was attenuated in virulence for volunteers. *Arch Virol* 1990;110:37-46.
- 24) Oxford JS, Corcoran T, Knott R, Bates J, Bartolomei O, Major D, *et al.* Serological studies with influenza A(H1N1) viruses cultivated in eggs or in a canine kidney cell line (MDCK). *Bull World Health Organ* 1987;65:181-7.
- 25) Katz JM, Webster, RG. Amino acid sequence identity between the HA1 of influenza A (H3N2) viruses grown in mammalian and primary chick kidney cells. *J Gen Virol* 1992;73:1159-65.
- 26) Katz JM, Wang M, Webster RG. Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol* 1990;64:1808-11.
- 27) James JM, Zeiger RS, Lester MR, Fasano MB, Gern JE, Mansfield LE, *et al.* Safe administration of influenza vaccine to patients with egg allergy. *J Pediatr* 1998;133:624-8.
- 28) WHO. Use of Cell Lines for the Production of Influenza Virus Vaccines: An Appraisal of Technical, Manufacturing, and Regulatory Considerations. 2007.
- 29) Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:607-18.
- 30) U.S. Health and Human Services. HHS Awards Contracts Totalling More Than \$1 Billion To Develop Cell-Based Influenza Vaccine. 2006.
- 31) U.S. Health and Human Services. HHS Awards \$487 Million Contract to Build First U.S. Manufacturing Facility for Cell-Based Influenza Vaccine. 2009.
- 32) Montagnon BJ, Fanget B, Nicolas AJ. The large-scale cultivation of VERO cells in micro-carrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Dev Biol Stand* 1981;47:55-64.
- 33) SanofiPasteur. Our vaccines: a history of innovation. www.sanofipasteur.com/index.jsp?codeRubrique=14&lang=EN.
- 34) Montagnon BJ. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. *Dev Biol Stand* 1989;70:27-47.
- 35) Schuller E, Jilma B, Voicu V, Golor G, Kollaritsch H, Kaltenböck A, *et al.* Long-term immunogenicity of the new Vero cell-derived, inactivated Japanese encephalitis virus vaccine IC51 Six and 12 month results of a multicenter follow-up phase 3 study. *Vaccine* 2008;26:4382-6.
- 36) Tauber E, Kollaritsch H, von Sonnenburg F, Lademann M, Jilma B, Firbas C, *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial of the safety and tolerability of IC51, an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *J Infect Dis* 2008; 198:493-9.
- 37) Tauber E, Kollaritsch H, Korinek M, Rendi-Wagner P, Jilma B, Firbas C, *et al.* Safety and immunogenicity of a Vero-cell-derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine: a non-inferiority, phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370:1847-53.
- 38) Lyons A, Kanesa-athan N, Kuschner RA, Eckels KH, Putnak R, Sun W, *et al.* A Phase 2 study of a purified, inactivated virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 2007; 25:3445-53.
- 39) Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:198-208.
- 40) Lau SC, Scholtissek C. Abortive infection of Vero cells by an influenza A virus (FPV). *Virology* 1995;212:225-31.
- 41) Nakamura K, Homma M. Protein synthesis in Vero cells abortively infected with influenza B virus. *J Gen Virol* 1981; 56:199-202.
- 42) Govorkova EA, Kaverin NV, Gubareva LV, Meignier B, Webster RG. Replication of influenza A viruses in a green monkey kidney continuous cell line (Vero). *J Infect Dis* 1995; 172:250-3.
- 43) Kaverin NV, Webster RG. Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero (WHO) cells by loss of trypsin activity. *J Virol* 1995;69:2700-3.
- 44) Govorkova EA, Murti G, Meignier B, de Taisne C, Webster RG. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J Virol* 1996;70:5519-24.
- 45) Baxter. Baxter Receives European Commission Approval for CELVAPAN H1N1 Pandemic Influenza Vaccine. 2009.
- 46) Baxter. Baxter Receives EMEA Positive Opinion for

- CELVAPAN, the First Cell Culture-based Pandemic Flu Vaccine. 2008.
- 47) Minor PD, Engelhardt OG, Wood JM, Robertson JS, Blayer S, Colegate T, *et al.* Current challenges in implementing cell-derived influenza vaccines: implications for production and regulation, July 2007, NIBSC, Potters Bar, UK. *Vaccine* 2009; 27:2907-13.
 - 48) Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* 2001;19:3444-50.
 - 49) Liu J, Shi X, Schwartz R, Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 2009; 27:6460-3.
 - 50) Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8: 1681-92.
 - 51) Liu J, Mani S, Schwartz R, Richman L, Tabor DE. Cloning and assessment of tumorigenicity and oncogenicity of a Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line for influenza vaccine production. *Vaccine* 2010;28:1285-93.
 - 52) Novartis. Novartis receives FDA approval for Flucelvax[®], the first cell-culture vaccine in US to help protect against seasonal influenza. 2012.
 - 53) Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytendaele F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 2001;19:2716-21.
 - 54) Cox RJ, Madhun AS, Hauge S, Sjursen H, Major D, Kuhne M, *et al.* A phase I clinical trial of a PER.C6 cell grown influenza H7 virus vaccine. *Vaccine* 2009;27:1889-97.
 - 55) Ledwith BJ, Lanning CL, Gumprecht LA, Anderson CA, Coleman JB, Gatto NT, *et al.* Tumorigenicity assessments of Per.C6 cells and of an Ad5-vectored HIV-1 vaccine produced on this continuous cell line. *Dev Biol (Basel)* 2006;123:251-63.
 - 56) Zhang W, Xue T, Wu X, Zhang P, Zhao G, Peng D, *et al.* Increase in viral yield in eggs and MDCK cells of reassortant H5N1 vaccine candidate viruses caused by insertion of 38 amino acids into the NA stalk. *Vaccine* 2011;29:8032-41.
 - 57) Tseng YF, Hu AY, Huang ML, Yeh WZ, Weng TC, Chen YS, *et al.* Adaptation of high-growth influenza H5N1 vaccine virus in Vero cells: implications for pandemic preparedness. *PLoS One* 2011;6:e24057.
 - 58) Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura H, Shimajima M, *et al.* Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J Virol* 2012;86:1405-10.
 - 59) Szymczakiewicz-Multanowska A, Groth N, Bugarini R, Lattanzi M, Casula D, Hilbert A, *et al.* Safety and immunogenicity of a novel influenza subunit vaccine produced in mammalian cell culture. *J Infect Dis* 2009;200:841-8.
 - 60) Reisinger KS, Block SL, Izu A, Groth N, Holmes SJ. Subunit influenza vaccines produced from cell culture or in embryonated chicken eggs: comparison of safety, reactogenicity, and immunogenicity. *J Infect Dis* 2009;200:849-57.
 - 61) Groth N, Montomoli E, Gentile C, Manini I, Bugarini R, Podda A. Safety, tolerability and immunogenicity of a mammalian cell-culture-derived influenza vaccine: a sequential Phase I and Phase II clinical trial. *Vaccine* 2009;27:786-91.
 - 62) Hatz C, Cramer JP, Vertruyen A, Schwarz TF, von Sonnenburg F, Borkowski A, *et al.* A randomised, single-blind, dose-range study to assess the immunogenicity and safety of a cell-culture-derived A/H1N1 influenza vaccine in adult and elderly populations. *Vaccine* 2012;30:4820-7.
 - 63) Ehrlich HJ, Müller M, Oh HM, Tambyah PA, Joukhadar C, Montomoli E, *et al.* A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Engl J Med* 2008;358: 2573-84.