(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
C12N 1/20
A61K 35/76

(45) 공고일자 2005년08월18일
(11) 등록번호 10-0484041
(24) 등록일자 2005년04월11일

(21) 출원번호 10-1997-0051704
(22) 출원일자 1997년10월09일

(65) 공개번호 10-1998-0032672
(43) 공개일자 1998년07월25일

(30) 우선권주장 96202804.9 1996년10월09일 유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자 악조 노벨 엔.브이.
네덜란드 엔엘-6824 비엠 아르넴 벨페르베그 76

(72) 발명자 데마레트, 제이.지.제이, 쟝 길라움 조셉
네덜란드, 복스미어, 5831 씨에이치, 스프루스트라트 7

오엔셀, 피.에이.엠.반 페트러스 알폰서스 마리아
네덜란드, 복스미어, 5831 엔엘, 크레켈잔거 49

(74) 대리인 나영환
이상섭
김성기

심사관 : 김재현

(54) 돼지생식 및 호흡증후군 바이러스의 유럽백신 균주

요약

본 발명은 대식세포에 비감염성인 독특한 특징을 갖는 돼지 생식 호흡 증후군(PRRS) 바이러스의 유럽 균주와 그러한 균주의 생산을 위한 방법에 관련된다. 본 발명은 또한 PRRS에 기초한 PRRS에 대해 돼지를 예방하기 위한 백신과 그러한 백신을 생산하기 위한 방법을 제공한다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스(PRRSV)의 유럽 혈청형의 생약독 균주, 그러한 균주의 생산 방법, 그들에 기초한 백신 및 그러한 백신의 생산방법에 관련된다.

1987년, 그때까지 미지였던 돼지의 질병이 북아메리카에서 발견되고, 그후 캐나다로 퍼져갔다(Hill,H.:In:Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee meeting, Oct.6, 1990, Denver, Colorado, Livestock Conservation Institute,Madison Wi,USA., Keffaber et al; Am.Assoc.Swine Pract.Newsletter 1:1-9(1989)). 그 병은 유산과 호흡기 질병을 야기함이 알려졌고, 초기에는 미스테리 스와인 디지즈(Mystery Swine Disease)(MSD)로 명명되었다. 요즘은, 아메리카와 캐나다에서, 그 병은 돼지 불임 및 호흡 증후군(Swine Infertility and Respiratory Syndrome)(SIRS)으로도 알려져 있다.

1990년 이래, 그 병은 유럽에서도 발견되어, 처음에는 독일에서, 이어서 네덜란드와 벨기에에서 발견되었으며, 현재는 전 유럽으로 퍼지고 있다. 유럽에서, 그 병은 일반적으로 돼지 생식 호흡 증후군(Porcine Reproductive Respiratory Syndrome)(PRRS), 그리고 돼지 유행성 유산 및 호흡 증후군(Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome)(PEARS)로 알려져 있다.

현재 그 병은 PRRS로 통칭된다.

그 병상은 유산과 호흡기 질병에 한정되지 않는다. 그 병과 관련된 다른 증상들은 다음과 같다: 식욕부진, 사지 특히 귀의 푸른 변색.

유산과 호흡기 질병에 대한 그 병의 병원성 효과는 Christianson et al.에 의한 논문에서 설명되어 있다(Swine Health and Production 2: 10-28(1994)).

그 병의 원인은 현재 동맥바이러스군에 속하는 소형 외피 RNA 바이러스(enveloped RNA virus)로 알려져 있다. Wensvoort et al.(J.Vet.Diagn.Invest 4:134-138(1992))와 Murtaugh et al.(Arch. Virol. 140: 1451-1460(1995))에 의한 관찰은 상기 바이러스가 두 가지의 완전히 다른 (혈청)타입이 존재함을 명확히 밝혔다: 아메리칸과 유럽 (혈청)타입.

이 바이러스의 유럽 타입은 Wensvoort et al.(The Vet.Quarterly;13:121-130(1991))에 의해 설명되었었다.

"렐리스타드 바이러스"(Lelystad Virus)(LV)로 불리는 이 유럽 타입의 균주는 네덜란드, 렐리스타드, 센트랄 베테리너리 인스티튜트에 의한 PCT 국제 공개 번호 92/21375호와 관련하여 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소에 수탁번호I-1102로 기탁되었다. 다른 유럽 균주는 유럽특허출원 제91.202.646.5호에 기술되며 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 수락번호I-1140로 기탁되었다. 이 유럽 균주는 최근에 Conzelmann et al.(Virology 193: 329-339(1993))에 의해 개시되었다.

이 바이러스의 아메리칸 타입은 Benfield et al.에 의해 개시되었다(J.Vet. Diagn. Invest. 4:127-133(1992)). 아메리칸 타입의 균주는 VR-2332로 ATCC에 기탁되었으며, PCT 국제공개번호 93/03760호와 유럽특허출원 제0.529.584호에 언급된다. 아메리칸 혈청형의 약독 균주는 유럽특허출원 제0.529.584호에 개시되었다. 이 균주는 기탁된 아메리칸 VR-2332균주로부터 직접 유도된다. 그래서, 이 균주로 예방접종된 동물은 유럽 균주의 감염에 대해 효과적인 보호를 얻지 못할 것이다. 이것은 유럽 혈청형에 대한 백신을 위한 기초로서 이용될 유럽 혈청형의 생 약독 백신의 개발이 필요하도록 만들었다.

유럽 특허 출원 제0.676.467호에서, 유럽 혈청형의 생 약독 균주가 처음으로 개시된다. 유럽 혈청형의 약독 균주의 예들은 바이러스 균주 PRRS C와 PRRS D로서 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 수탁번호I-1387(균주 D)과 수탁번호I-1388(균주 C)로 기탁되었다. 이들 균주들은 PRRSV에 대한 생 약독 백신을 위한 기초로서 효과적이다. 그럼에도 불구하고 그들은 어느 정도의 독성을 가진다. 그래서, 다른 약독화된 PRRSV 균주와 그들의 제조를 위한 방법이 필요하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 기존의 약독화된 PRRSV 균주와 비교하여 다른 바람직한 약독 특성을 가진 유럽 혈청형의 생 약독 PRRSV 균주를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 그러한 생 약독 PRRSV 균주의 제조를 위한 방법을 제공하는 것이다.

이러한 목적은 대식세포에 대해 감염성이 없는 독특한 특징을 가진 유럽 혈청형의 생 약독 PRRS 바이러스를 제공하는 본 발명에 의해 충족된다. 그러한 균주가 대식세포에 대해 감염성을 가진 모 균주보다 돼지에서 더욱 약독화된 특성을 나타냄이 실시예에서 보여진다.

"대식세포에 대해 비-감염성"이란 것은 하기와 같이 이해된다: 본 발명에 따른 $<10^4$ 조직 배양 감염성 투여량$(TCID)_{50}$의 투여량이 감염 7일후에도 대식세포 배양에서 가시적인 CPE를 형성하지 않는다. 일반적인 대식세포-감염성 PRRSV 필드 균주는 1 $TCID_{50}$의 감염성 입자 투여량으로 완전한 CPE를 형성한다.

유럽 혈청형의 바이러스는 아메리칸 PRRS 바이러스 SIRSV(ATCC VR-2332)에 대한 항혈청과의 반응과 비교할 때 그들은 유럽 PRRS 바이러스 LV(CDI-NL-2.91; I-1102로 파스퇴르 연구소에 기탁됨)에 대한 항혈청과의 면역과산화효소 단층 분석에서 더 높은 혈청 적가를 형성하는 점에서 특징적이다.

본 발명에 따른 생 약독 PRRS 균주의 제조를 위한 방법을 제공하는 것이 본 발명의 다른 특징이다. 현재, 모든 유럽 PRRSV 균주는 감염된 동물의 대식세포로부터 얻어지며, 이어서 가능하다면 증식을 위해 MA104 세포 또는 클론에서 유지된다. 본 발명에 따른 방법은 MA104에서 자란 PRRS 바이러스를 비-MA104 세포에 적용시키는 것에 관련된다. 이들 비-MA104 세포는 예를 들어 제한된 수명을 가진 세포, 또는 수립된 불멸 세포주일 수도 있다. 일반적으로, 비-MA104세포는 포유동물 세포일 것이다. 포유동물 비-MA104 세포는 예를 들어, BHK 세포주, CRFK 세포주 및 Madin Darby Bovine Kidney 세포주같은 일반적인 목적의 세포주, 또는 돼지 고환 세포 또는 돼지 신장 세포같은 돼지 세포일 수도 있으며, 또는 VERO 세포같은 비-MA104 영장류 세포일 수도 있다. PRRSV를 천연 숙주 세포외의 다른 세포에 적용시키는 것은 하기와 같이 수행될 수 있는 표준적인 방법을 포함한다: 특정 PRRS 바이러스 분리주를 돼지 세포 또는 그 바이러스가 증식할 수 있는 MA104 세포같은 비-돼지 기원의 다른 세포를 포함하는 배지에서 키운다. 성장후, 세포 배양액 및/또는 세포를 모아 PRRSV를 수집하고 이어서 세포 배양액 및/또는 세포를 적용을 위해 다른 세포타입상으로 옮긴다. 처음에 하나의 비-MA104 세포주에 적용된 균주는 부가의 약독화를 위한 다른 비-MA104 세포주에 적용될 수 있다. 원한다면, 이러한 적용 과정은 또 다른 비-MA104 세포주에서 반복될 수 있다. 다른 온도에서의 성장에의 적용은 또한 약독화 과정의 일부일 수 있다.

비-MA104 세포로 옮겨진 후, 비-대식세포-감염성 특징은 몇 번의 이동 후 얻어질 수 있다. 일반적으로 주 접종 바이러스를 얻는 데 필요한 이동수인 5번 이동은 본 발명에 따라 비-대식세포-감염성 바이러스를 얻기에 충분하다.

바람직한 형태로, 상기 방법은 적용을 위한 세포로서 비-MA104 영장류 세포를 이용한다. 비-MA104 영장류 세포로의 적용후 임의의 추가의 적용이 임의의 다른 적절한 세포에서 이루어질 수 있음은 명백하다.

더욱 바람직한 형태에서, 상기 방법은 적용을 위한 비-MA104 영장류 세포로서 Vero 세포를 이용한다.

그렇게 얻어진 생 약독 균주의 비-대식세포-감염성 특징에 대한 검사는 그렇게 얻어진 균주가 생체외에서 대식세포에서 자라는지 여부를 시험하여 쉽게 이루어질 수 있다. 대식세포 배지의 제조와 대식세포-감염성 바이러스의 증식 둘다를 위한 표준 방법은 공지되어 있으며, 예를 들어 국제 공개 번호 93/07898호에 개시되어있다. 표준 조건하에서 분리되고 키워진 대식세포에 기초한 간단한 시험-시스템이 본 발명에 따른 생 약독 PRRS 균주와 여전히 대식세포-감염성을 가진 다른 생 약독 PRRS 바이러스를 구별하는 시험 시스템으로 작용할 것이다. 한 가지 가능한 시험 시스템은 실시예 2에서 개시된다.

발명의 구성 및 작용

본 발명에 따른 PRRSV 균주의 약독 특성은 두 균주로부터 시작하여 설명될 수 있다: 1991년에 네덜란드에서 분리된 병원성 PRRSV 균주인 수탁번호I-1140, 그리고 저 병원성 PRRSV 필드 균주인 수탁번호I-1387(두 균주 모두 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 각자의 번호로 기탁됨). 이들 모 균주는 대식세포에 대해 감염성이다. 이들 모 균주에서, 본 발명에 따른 약독화된 비-대식세포-감염성 균주가 실시예 1에 개시된 대로 만들어졌다. 대식세포-감염성 특징은 실시예2에 개시된 대로 결정되었다.

하기 균주가 시험에 유용했다:

1. MA 104 세포에 88번째 옮겨진 I-1140

2. Vero 세포에 61번째 옮겨진 I-1140

3. MA 104 세포에 20번째 옮겨진 I-1387

4. Vero 세포에 49번째 옮겨진 I-1387.

하기는 이들 균주의 감염성-특성을 검사하는 시험-결과를 보여준다:

표 1

균 주		세포-주	
	대식세포	Vero	MA104
1	+++	---	+++
2	---	+++	+++
3	+++	---	+++
4	---	+++	+++

본 발명에 따른 균주와 높은 이동수의 모 균주의 비교

다른 양상으로 이미 약독화된 PRRS 바이러스 또한 본 발명에 따른 약독화를 위한 모 균주로 매우 적절하다. 그러한 바이러스는 유럽 특허 출원 제0.676.467호에 개시된다. 이들 바이러스 균주는 유럽 혈청형에 속하며 그들은 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 수탁번호 I-1401로 기탁된 하이브리도마 A27에 의해 생성되는 단일클론성 항체 A27과 반응하나, 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 I-1402로 기탁된 하이브리도마 A35에 의해 생성되는 단일클론성 항체 A35와는 반응하지 않는다. 만일 그러한 바이러스가 본 발명의 방법에 따라 대식세포에 대해 비-감염성이 되면, 그들은 그들의 약독화된 특성이 둘 또는 그 이상의 다른 양상에 의존하므로 더욱 안전하며 그중 하나는 비-대식세포-감염성이다. 그래서, 본 발명의 더욱 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 생 약독 PRRSV는 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 수탁번호I-1401로 기탁된 하이브리도마 A27에 의해 생성되는 단일클론성 항체 A27과 반응하나, 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 수탁번호I-1402로 기탁된 하이브리도마 A35에 의해 생성되는 단일클론성 항체 A35와는 반응하지 않는 부가적인 특징을 가진다.

수탁번호I-1387 균주로부터 유래되어 본 발명에 따른 비-대식세포-감염성 균주는 Vero 세포로 이동된 후 매우 약독화되어, 이 생 약독 균주는 동물에 투여될 때 극히 안전하다(실시예 2 등을 참고). 그래서, 본 발명의 다른 더욱 바람직한 구체예에서, 생 약독 PRRSV는 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 악조 노벨 엔브이에 의해 수탁번호I-1758로 기탁된 균주이다. 이 균주는 "PRRSV 균주 DV"로 칭해지며 따라서 본 명세서에서 균주 DV로 칭해질 것이다.

비-대식세포-감염성 바이러스의 안전성에 의해, 이들 바이러스에 기초한 백신은 일반적으로 10^3-10^{10} 생 바이러스 입자를 함유할 수 있다.

본 발명에 따른 백신은 약학적 허용 담체를 포함할 수 있다. 한 가지 가능한 담체는 생리학적 염 용액이다. 다른 약학적 허용 담체는 예를 들어 세포 성장을 이루기 위해 이용되는 조직 배양 액으로 여기서 바이러스는 감염된 세포로부터 유리된다.

아쥬반트 그리고 원한다면 Tween(R)과 Span(R)같은 하나 이상의 유화제가 본 발명에 따른 생 약독 백신에 혼입될 수 있다. 적절한 아쥬반트는 예를 들어 비타민-E 아세테이트 용해제, 알루미늄 히드록사이드,-포스페이트 또는 옥사이드, Bayol(R)과 Marcol52(R)같은 오일 유제, 그리고 사포닌이다. Iscoms내에 항원을 혼입하는 것 또한 가능한 방법이다.

본 발명에 따른 백신은 바람직하게는 동결건조 형태로 생성된다. 안정화제를 생 약독 바이러스에 첨가하는 것이 좋으며, 특히 만일 생 바이러스의 건조 성분이 동결건조에 의해 제조되면 그러하다. 적절한 안정화제는 예를 들어, SPGA(Bovarnik et al., J.Bacteriology 59, 509, 1950), 탄수화물(솔비톨, 만니톨, 트레할로즈, 전분, 슈크로즈, 덱스트란 또는 글루코즈등), 단백질(알부민 또는 카제인등), 또는 그들의 분해 산물, 그리고 완충액(알칼리 금속 포스페이트)이다. 원한다면, 전술한대로 아쥬반트 활성을 가진 하나 이상의 화합물이 첨가될 수 있다.

본 발명에 따른 백신은 근육내 또는 피하 주사에 의해 또는 비강내, 기관내, 경구, 피부, 경피/내피 또는 피내 투여에 의해 투여될 수도 있다. 매우 편리한 투여 방식은 피내 또는 근육내 투여이다. 그래서, 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 백신은 피내 또는 근육내 투여에 적절한 담체를 포함한다. 생리학적 염 용액은 피내 또는 근육내 투여를 위한 간단하고 적절한 담체이다.

본 발명에 따른 백신은 1,3,6 또는 10주의 연령에서 돼지의 면역 내력에 따라 교배전 및/또는 분만 6주전까지의 암퇘지에게, 또는 반년마다 수돼지에게 투여될 수 있다.

바람직한 형태로, 본 발명의 백신은 생 약독 백신 PRRS 바이러스와 함께 다른 무관한(즉, 비-PRRSV-) 약독 백신 또는 불활성화된 병원균 또는 다른 병원균으로부터의 항원성 물질을 포함한다. 그러한 병원균은 예를 들어 박테리아 또는 기생체일 수도 있으나, 또한 바이러스원일 수도 있다. 대개, 무관한 병원균 또는 항원성 물질은 돼지 병원균일 것이다. 그러한 부가적인 약독화된 또는 불활성화된 병원균 또는 다른 병원균으로부터의 항원성 물질을 포함하는 본 발명에 따른 백신은 동시에 여러 가지 감염에 대한 보호를 유도한다는 잇점을 가진다. 항원성 물질은 면역 반응을 유도할 수 있는 물질로 이해된다. 항원성 물질의 예는 단백질, 다당류 및 지다당류이다.

더욱 바람직한 형태로, 병원균은 슈도라비스(Pseudorabies) 바이러스, 돼지 인플루엔자(Porcine influenza) 바이러스, 돼지 파르보(Porcine parvo) 바이러스, 전염성 위장염 바이러스, 로타바이러스(Rotavirus), 이.콜리(Escherichia coli), 에리시펠로 루시오페티(Erysipelo rhusiopathie), 보르데텔라 브론치셉티카(Bordetella bronchiseptica), 살모넬라 콜레라쉬스(Salmonella cholerasuis), 헤모필러스 파라쉬스(Haemophilus parasuis), 파스튜렐라 물토시다(Pasteurella multocida), 스트렙토코커스 쉬스(Streptococcus suis), 마이코플라스마 히오뉴모니에(Mycoplasma hyopneumoniae) 및 액티노바실러스 플루로뉴모니에(Actinobacillus pleuropneumoniae)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명에 따른 백신은 본 발명에 따른 유럽 혈청형의 임의의 생 약독 PRRS 바이러스 분리체로부터 유도될 수도 있다. 본 발명에 따른 방법을 이용하여 개발된 기탁된 PRRSV 균주 DV는 매우 적합한 백신 균주가 될 모든 특징을 가지고 있다. 따라서 바람직한 형태로, 상기 백신은 파스퇴르 연구소에 수탁번호1758로 기탁된 PRRSV 균주 DV로부터 유도된다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 PRRS에 대항하기 위한 생 약독 백신의 제조를 위한 방법을 제공한다.

본 발명에 따라 생 약독 PRRSV에 기초한 백신을 얻는 편리한 방법은 본 발명에 따른 적절한 양의 바이러스와 약학적 허용 담체를 섞는 것을 포함한다.

부가로, 전술한 아쥬반트, 유화제 및 안정화제같은 다른 물질이 백신의 성능과 안전성을 개선시키기 위해 첨가될 수 있다.

실시예 1: 적용 실험

PRRSV 분리균 I-1140의 Vero 세포에의 적용:

1991년에 네덜란드에서 분리된 병원성 PRRSV 균주인 I-1140(프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 기탁됨)을 먼저 돼지 폐 대식세포에서 배양하고, 이어서 하기와 같이 MA-104에서 키웠다:

MA104 세포의 반융합성 단층($70cm^2$)을 1의 MOI로 80% 융합성에서 PRRSV 균주로 접종했다. 조직 배양 배지를 먼저 제거하고, 이어서 1ml의 PRRSV 바이러스를 첨가하고 37℃에서 2시간 이상동안 단층에 놓아둠으로써 접종을 했다. 이 기간후, 새로운 조직 배양 배지를 첨가하고 세포를 가습 CO_2(5% CO_2)에서 37℃에서 추가로 배양했다. CPE가 관찰될 때 상등액를 모으고 세포를 세 번 얼렸다 녹인후, 2000prm에서 10분동안 원심분리하고 상등액을 모았다. 두 상등액을 합치고

동일한 세포의 신선한 단층을 접종하기 위해 이용했다. 이 과정을 이어서 바이러스가 완전히 세포주에 적용하고 대식 세포 배양에 비교할 만한 적정량이 이 세포주에서 얻어질 수 있을 때까지 반복했다. 이 과정동안 바이러스의 동일성은 PRRSV 특이적 다클론성 혈청과 PRRSV 특이적 단클론성 항체 둘다로 면역 형광 분석법(IFA)에 의해 결정되었다.

MA104 세포로 다섯 번째 옮겨진 I-1140을 하기 방법에 의해 CV1(Green African monkey kidney) 세포를 감염시키기 위해 이용했다:

CV1 세포를 표준 세포 성장 조건하에서 키웠다.

70 내지 80% 융합성에서 배지를 CV1 단층으로부터 제거했다. MA104세포의 감염된 단층으로부터 최대의 CPE에서 얻어진 상등액을 먼저 0.2㎛ 필터를 통해 여과하고 이어서 CV1 단층에 놓았다. 37℃, 5% CO_2에서 1일 배양한 후 배지를 새로운 조직 배양 배지로 교환했다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 7일동안 추가로 배양했다. 이 기간동안 세포를 매일 현미경으로 검사했다. 7일후 세포를 세 번 얼렸다 녹인후, 상등액을 원심분리에 의해 수집하고 0.2㎛ 필터를 통해 여과했다. 여과된 물질을 이어서 전술한 대로 CV1 세포의 새로운 단층을 배양하기 위해 이용했다. 이 과정을 세 번 수행하고, 세 번째 수행 후 수집되고 여과된 상등액을 MA104 세포에서 상등액을 배양하기 위해 PRRSV의 존재에 대해 검사했다. PRRSV의 존재는 PRRSV 특이적 단클론성 항체 I-1401을 이용한 PRRSV 특이적 형광의 존재에 의해 나타났다(단클론성 항체 I-1401은 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 기탁됨). 6.6$TCID_{50}$/ml의 PRRSV 적정량이 CV1 세포의 상등액에서 발견되었다. CV1 세포로 13번 옮겨진 I-1140을 전술한 방법에 의해 Vero 세포로 옮겼다. 세 번 옮긴 후 PRRSV가 Vero 세포의 상등액에서 검출되었다. 추가로 이 바이러스를 Vero 세포로 61번 이동시킴으로써 Vero 세포에 적용시켰다. 비교를 위해, MA104 세포로 88번 옮겨져 비-MA104 세포에는 적용되지 않은 모 균주 I-1140을 표 1에서 대조군으로 이용했으며, 다양한 균주의 대식세포 감염성을 비교했다.

PRRSV 분리주 I-1387의 Vero 세포에의 적용

분리주 I-1387을 먼저 돼지 폐 대식세포에서 배양했다. 다섯 번 옮겨진 I-1387을 전술한 방법대로 MA104에 놓았다. MA104 세포로 38번 옮겨진 I-1387을 전술한 방법에 따라 Vero 세포를 감염시키기 위해 이용했다. Vero 세포의 상등액에서 PRRSV가 검출되었다. 이 분리주를 추가로 Vero 세포에 49번 옮겨 Vero 세포에 적용시켰다. 이 균주를 실시예 2와 3에서 기술되는 안전성 실험과 예방 변화 실험에서 이용했다. 비교를 위해, MA104 세포로 20번째 옮겨져 비-MA104 세포에 적용되지 않은 모 균주 I-1387을 표 1에서 대조군으로 사용했으며, 다양한 균주의 대식세포 감염성을 비교했다.

실시예 2: 대식세포-감염성 시험 시스템

이 시험에서, 표 1에 언급된 네 가지의 바이러스 균주를 하기와 같이 대식세포 감염성에 대해 검사했다:

돼지 폐포 대식세포를 하기와 같이 얻었다: SPF-돼지를 죽여서 그들의 폐를 제거하고 3000ml PBS로 세척했다. 원심분리에 의해 세포를 모으고 MEM-배지(GIBCO)+ 10% FCS에 재현탁하여 0.3×10^6세포/ml이 되도록 했다. 마지막으로, 세포를 225㎕세포 현탁액/웰로 96-웰 마이크로컬쳐 플레이트에 접종하고 플레이트를 4일동안 CO_2-배양기에 보관했다. 적정하기 직전에, 마이크로타이터 플레이트를 비우고 새배지로 채웠다. 시험될 10^4 MA104-감염성 바이러스 입자를 포함하는 25㎕ 시료를 웰로 가져가 10배 연속 희석액들을 만들었다. 마지막으로 플레이트를 7일동안 CO_2-배양기에서 배양했다. CPE에 의해 측정된 대로 비-MA 104-세포에 적용된 균주는 대식세포에서 성장하지 않았으며, 반면 비-적용된 대조 균주는 예상대로 대식세포에 대해 감염성이었다. 결과는 표 1에 나타난다.

실시예 3: 약독화 시험

이들 세포에의 바이러스의 적용이 독성의 약화를 유도하는지 여부를 시험하기 위해, 모든 바이러스 균주를 하기 방법에 따라 임신한 돼지에서 시험했다:

PRRS 바이러스와 PRRSV 특이적 항체에 대해 음성인 돼지를 임신 90일째에 전술한 PRRSV 균주중의 하나로 감염시켰다. 주어진 균주의 독성을 시험하기 위해 유산된 새끼돼지와 1주일내에 죽은 새끼돼지의 수를 확인했다. 하기 결과가 얻어졌다:

표 2. 약독화 결과

균주	투여량 ($TCID_{50}$)	사산	1주후 사망	1주 후에도 생존	사망 (%)	생존 (%)
1140	10^5	13	11	9	73	26
1140 61p Vero	$10^{7.5}$	15	5	11	65	35
1387	$10^{7.5}$	16	8	34	50	50
1387 49p Vero	$10^{8.6}$	1	4	25	17	83

상기 표 2로부터 대식세포 감염성을 잃은 PRRSV 균주는 양성의 약독화 특성을 나타내는 것으로 결론지을 수 있다.

I-1140의 경우 비-대식세포-감염성 균주로 돼지를 감염시킨후 훨씬 적은 수의 새끼돼지가 죽었다. 모 균주 I-1140과 비교할 때, Vero 세포에 적용된 I-1140의 투여량이 300배 증가된 것을 감안할 때, 독성의 매우 큰 감소가 이루어졌다. I-1387을 돼지에게 감염시킨 실험에서 유사한 결과가 관찰된다. $10^{7.5}TCID_{50}$의 투여량도 역시 많은 수의 새끼돼지가 죽도록 했다. 하지만, 비-대식세포-감염성 균주에 있어서는 독성의 큰 감소가 관찰되었다; 매우 높은 투여량으로 주어졌는데도 불구하고($10^{7.5}TCID_{50}$의 투여량에 대해 10배 증가된 양), 훨씬 적은 수의 새끼돼지가 죽었다.

실시예 4: 안전성 실험

I) 5-6주된 새끼돼지에서 균주 DV의 안전성. 한 번에 다량 투여함.

세 가지 실험은 표적 동물인 어린 새끼돼지의 면역 접종에 관련된 것이었다. 이들 실험의 내용이 표 3에 요약된다. 안전성 실험을 위해, 예방접종에 기인할 수 있는 가능한 임상적 신호에 대해 동물을 검사했다.

표 3 결과:

실험번호	투여량		투여방법*	연령(주)	수	관찰기간
	$TCID_{50}$	ml				
131	$10^{6.9}$	2	i.m.	5	10	28
135	$10^{5.5}$	2	i.m.	5	10	28
	$10^{5.5}$	0.2	i.d.	5	10	28
	$10^{4.8}$	2	i.m.	5	10	28
	$10^{4.5}$	0.2	i.d.	5	10	28
	$10^{3.5}$	2	i.m.	5	10	28
	$10^{3.8}$	0.2	i.d.	5	10	28
192	$10^{6.6}$	2	i.m.	6	8	3-15
	$10^{6.4}$	0.2	i.d.	6	8	3-15

*i.m. : 근육내 i.d.: 피내

이 실험들에서는 예방접종후 예방접종에 기인할 수 있는 임상적 신호는 나타나지 않았다.

결론

본 발명에 따른 균주들은 표적 동물인 어린 새끼돼지에 대해 완전히 안전하다.

II) 임신중인 돼지에 대한 안전성

임신 90일째에 PRRS 바이러스로 감염시키는 것은 높은 비율로 유산과 미이라화(30-100%)를 일으키며 살아서 태어난 돼지의 1주내의 사망률을 높이므로, 임신중인 돼지는 안전성 연구에 가장 민감한 동물로 간주된다. 본 안전성 시험에서, 각 돼지는 임신 94일째에 근육내와 피내 주사로 각 주사 위치당 $10^{8.3}TCID_{50}$의 투여량으로 접종되었다.

조사는 하기 사항들에 관련된 것이었다:

- 돼지에서 국소 및 전신성 반응

- 백신의 접종을 보여주는 분만시의 돼지의 항체 농도

- 돼지의 생식 능력

- 출생일에 취해진 새끼돼지의 혈청 시료로부터의 바이러스 재-분리

결과:

면역 형광 분석법에서 측정된 항체 농도는 바이러스가 접종되었음을 나타내는 모든 돼지에서 >8(log_2)였다. 예방접종후 조절된 온도의 5일 그리고 임상적 관찰의 14일동안 아무런 전신성 반응도 관찰되지 않았다. 단지 근육내 주사-예방접종 7일째에 하나의 돼지에서 작은 국소 반응이 관찰되었다. 피내 주사후 1주일동안 국소 피부-반응이 나타났다: 붉어짐, 열, 촉지할 수 있는 반점 및 일부 병변. 이들 국소 피부 반응들은 빨리 사라졌으며 2주째에는 더 이상 나타나지 않았다.

생식 기능의 결과는 표 4에 요약된다:

표 4.

돼지 번호	죽은 새끼돼지의 수	
	출생전 또는 출생시	출생후 1주동안
4611	12마리중 0마리	12마리중 1마리
4608*	15마리중 0마리	15마리중 2마리
465	11마리중 1마리	11마리중 1마리

생존한 새끼돼지의 수는 적어도 일반적인 평균수(Handboek voor de Varkenshouderij ISBN 90-800999-3-7에 따르면 >=10.08)로 간주된다. 이는 이들 동일한 돼지에서 이전에 발견된 생식 기능과 완전히 동급이다.

결론

이 실험에서 유산을 유도하기 위해 임신중의 적절한 시기에 매우 높은 투여량을 주었음에도 불구하고 PRRS 바이러스 감염의 어떤 임상적 신호도 관찰되지 않았다.

실시예 5: 예방접종-항원투여 실험

두 가지의 예방접종-항원투여 실험에서 본 발명에 따른 PRRS 바이러스로의 예방접종의 예방 특성을 조사했다. 두 실험 모두에서 열 마리의 PRRS 항체가 없는 새끼돼지군을 5 내지 6주째에 백신 균주 DV PRRS 바이러스로 $10^{3.5}$ 내지 $10^{6.9}$의 $TCID_{50}$의 다양한 적정량으로 예방접종했다. 예방접종 4주후 이들 새끼돼지를 이종의 야생형 PRRS 바이러스 10^5TCID_{50}으로 비강내로 항원투여했다. 예방접종과 항원투여후 혈청학적 반응을 예방접종된 동물뿐만 아니라 피접종동물과 직접 접

촉하도록 놓여진 감시 동물 및 동일한 건물에 놓이나 신체적으로는 분리되어 있는 대조군에서도 검사했다. 백신의 예방 특성을 판단하는 주된 기준은 항원투여후 다양한 시간에 얻어진 혈청으로부터 재분리된 항원균주 바이러스의 양이었다. 재분리는 두 가지 다른 척도로 결정되었다: 항원투여 바이러스가 재분리될 수 있는 기간과 재분리 순간의 바이러스의 적정량을 결정했다.

결과

혈청학적 반응

예방접종과 항원투여후 $\log_2$단위로 IFA에서 측정된 항체 적정량은 피접종동물, 감시동물 및 대조군에 대해 표 5에서 나타난다.

표 5.

피접종동물												
실험 번호	투여 방법	투여량	N	평균항체적정량								
				예방접종				항원투여				
				0	14	21	28[2]	0[2]	3	7	10	13/14
131	i.m.	$10^{6.9}$	9	0	6.9	10.0	11.6	11.6				12.0
135	i.m.	$10^{5.5}$	10	0			9.7	9.7	10.9	10.3	11.6	10.7
	i.d.	$10^{5.5}$	10	0			9.5	0.5	10.9	10.9	10.9	11.1
	i.m.	$10^{4.8}$	10	0			10.0	10.0	11.4	10.8	11.4	11.3
	i.d.	$10^{4.5}$	10	0			9.1	9.1	10.6	10.7	11.5	10.4
	i.m.	$10^{3.5}$	10	0			9.3	9.3	10.2	9.8	12.1	11.4
	i.d.	$10^{3.8}$	10	0			9.2	9.2	10.2	10.0	10.8	10.6
감시동물												
실험 번호	군으로 식별		N									
131	i.m.	$10^{6.9}$	4	0	0	2.5	4.5	4.5				11.5
135	i.m.	$10^{5.5}$	2	0				0	0	0	9.3	9.8
	i.d.	$10^{5.5}$	2	0				0	0	0	11.3	10.3
	i.m.	$10^{4.8}$	2	0				4.7	7.8	7.8	10.8	10.3
	i.d.	$10^{4.5}$	2	0				0	0	0	9.8	8.3
	i.m.	$10^{3.5}$	2	0				0	0	3.7	7.3	9.3
	i.d.	$10^{3.8}$	2	0				0	0	0	7.3	9.3
대조군												
131			5	0	0	0	0	0				1.6
135			12	0			0.7[3]	0.7[3]	0	0	7.4	8.7

[1] i.m.=근육내 i.d.= 피내

[2] 예방접종후 28일째 = 항원투여후 0일째

[3] 비-특이적 농도

가장 높은 항체 적정량은 실험 131에서 발견되었다. 이 실험은 명확한 항체 반응이 예방접종후 2주째에 이미 검출가능함을 보여주었다. 두 실험 모두에서, 예방접종된 동물에서 적정량은 대조군에서보다 훨씬 높았으며, 또한 항원투여후에도 훨씬 높았다. 이것은 실험 131에서 특히 그러했다. 근육내 및 피내 주사후 실험 135에서 측정된 혈청학적 반응은 비교할 만했다. 관찰된 가장 낮은 적정량과 가장 느린 보조 반응이 $10^{3.5}TCID_{50}$의 투여량으로 예방접종된 군에서 발견되었으며 또한 이 가장 낮은 투여량에서 상당한 적정량이 얻어졌다.감시동물: 실험 131에서 4마리 중 2마리, 그리고 실험 135에서 12마리중 1마리가 혈청변환되었다. 두 실험 모두에서 피접종동물과 동일 지역에 있으나 물리적으로 분리되었던 대조군에서는 혈청변환이 전혀 나타나지 않았다.

재-분리(항원투여) 바이러스

혈청에서 발견되는 평균 PRRSV 적정량(log_{10})(각 군에 대한 평균)이 피접종동물, 감시동물 및 대조군에 대해 표 6에서 나타난다.

표 6.

피접종동물									
실험 번호	투여 방법	투여량 $TCID_{50}$	항원투여후 평균 바이러스 적정량					바이러스 분비 평균기간
			0	3	6/7	10	13	
131	i.m.	$10^{6.9}$	0	0	0	0	0	0
135	i.m.	$10^{5.5}$	0	0.3	0.9	1.0	0.3	3.5
	i.d.	$10^{5.5}$	0	0.3	0.4	0.8	0.2	2.4
	i.m.	$10^{4.8}$	0	0.3	0.4	0.2	0	1.7
	i.d.	$10^{4.5}$	0	0.2	0.3	0.5	0.3	1.5
	i.m.	$10^{3.5}$	0	0.4	1.6	1.0	0	3.7
	i.d.	$10^{3.8}$	0	0.2	1.1	1.0	0	2.7
감시동물								
실험 번호	군으로 식별		N					
131	i.m.	$10^{6.9}$	4	0	1.3	2.9	3.3	2.6	>13
135	i.m.	$10^{5.5}$	2	0	2.4	3.8	3.6	1.9	13
	i.d.	$10^{5.5}$	2	0	3.1	3.6	3.1	3.1	13
	i.m.	$10^{4.8}$	2	0.9	0.7	0	1.6	0	6.5
	i.d.	$10^{4.5}$	2	0	2.1	3.9	3.6	1.1	11.5
	i.m.	$10^{3.5}$	2	0	2.4	3.6	4.1	3.1	13
	i.d.	$10^{3.8}$	2	0	2.1	3.6	3.6	2.4	13
대조군									
131			5	0	0	2.9	3.9	3.4	>13
135			12	0	2.6	4.0	3.7	1.5	11.5

[1] i.m. = 근육내 i.d. = 피내

실험 131에서는 예방접종된 동물에서 항원투여 바이러스가 재-분리되지 않았다. 실험 135에서는 재-분리 속도와 재-분리의 기간의 상당한 감소가 예방접종되지 않은 대조군과 비교해 모든 군에서 발견되었다. $10^{3.5}TCID_{50}$의 투여량으로 근육내 예방접종된 군에서의 감소에 대한 효과는 다른 군에서보다 다소 낮았다.

실험 131에서는 4마리 감시동물중 단지 2마리가 예방접종후 혈청변환되었으며, 실험 135에서는 12마리중 단지 1마리가 혈청변환되었다. 동일한 군(i.m. $10^{4.5}$)의 다른 감시 동물에서 PRRS 바이러스가 항원투여시에 분리되었으며 이는 아마도 백신 바이러스일 것이다.

결론:

명확한 항체 반응이 예방접종후 2주째에 이미 검출가능했으며, 높은 적정량에 달한다. 근육내 및 피내 주사후 혈청학적 반응은 비교할 만하다. 심지어 $10^{3.5}TCID_{50}$의 투여량에서도 상당한 적정량이 얻어진다. 예방접종되지 않은 대조군과의 비교에서 재-분리 또는 재-분리 속도와 재-분리 기간의 감소는 모든 군에서 발견되지 않았다. 바이러스는 매우 낮은 속도로 대조군으로 퍼진다.이러한 전파 속도로 백신 바이러스는 몇 번의 복제후 소멸하여 본 발명에 따른 균주의 약독화된 특성을 증명할 것이다.

발명의 효과

본 발명에 따른 생 약독 바이러스는 대식세포를 감염시키지 못하는 그들의 능력의 결과로써, 하기 이유로 인해 백신을 위한 매우 적절한 기초이다. 이들 균주는 대식세포에 감염성이 없다. 대식세포는 야생형 PRRSV의 일차 표적 세포이며 면역 시스템의 중요 세포중의 하나이다. 그럼에도 불구하고, 그들은 여전히 면역 시스템을 야기하는 그들의 능력을 보유한다. 그래서, 유럽 특허 출원 제0.676.467호에 개시된 유럽 혈청형의 공지의 생 약독 균주와는 대조적으로, 본 발명에 따른 생 약독 바이러스를 포함하는 백신은 면역 시스템을 손상시키지 않고 면역 시스템을 유도한다.

따라서, 본 발명의 균주에 기초한 백신은 공지의 약독 균주에 기초한 백신과는 다른 종류의 안전성을 제공한다.

그래서 본 발명은 비-대식세포-감염성 약독 PRRS 균주에 기초한, PRRSV-감염에 대한 돼지의 보호를 위한 백신을 제공한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

대식세포에 감염성이 없는 것을 특징으로 하는, 유럽 혈청형의 생 약독화된 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스(PRRSV) .

청구항 2.

제1항에 있어서, 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 콜렉션 내셔날 드 컬쳐 드 마이크로-오가니즘(CNCM)에 수탁번호 I-1401로 기탁된 하이브리도마 A27에 의해 생성되는 단일클론성 항체 A27과 반응성이 있지만, 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소에 수탁번호 I-1402로 기탁된 하이브리도마 A35에 의해 생성되는 단일클론성 항체 A35와는 반응성이 없는 것을 특징으로 하는 생 약독화된 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스.

청구항 3.

제2항에 있어서, 파스퇴르 연구소에 수탁번호 I-1758로 기탁된 균주인 것을 특징으로 하는 생 약독화된 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스.

청구항 4.

비-MA104 포유동물 세포에 MA104-성장 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스 유럽 혈청형을 적용시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 생 약독화된 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스의 제조 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 비-MA104 영장류 세포가 비-MA104 포유동물 세포로 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, 베로(Vero) 세포가 비-MA104 영장류 세포로 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 생 약독화된 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스와 약학적 허용 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스-감염에 대해 돼지를 예방하기 위한 백신.

청구항 8.

제7항에 있어서, 하나 이상의 비-돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스 약독화된 또는 불활성화된 병원체 또는 그들의 항원성 물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 9.

제8항에 있어서, 상기 비-돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스 병원체가 슈도 라비스(Pseudorabies) 바이러스, 돼지 인플루엔자(Porcine influenza) 바이러스, 돼지 파르보(Porcine parvo) 바이러스, 전염성 위장염 바이러스, 로타바이러스(Rotavirus), 이.콜리(Escherichia coli), 에리시펠로 루시오페티(Erysipelo rhusiopathiae), 보르데텔라 브론치셉티카(Bordetella bronchiseptica), 살모넬라 콜레라쉬스(Salmonella cholerasuis), 헤모필러스 파라쉬스(Haemophilus parasuis), 파스튜렐라 물토시다(Pasteurella multocida), 스트렙토코커스 쉬스(Streptococcus suis), 마이코플라스마 히오뉴모니에(Mycoplasina hyopneumoniae) 및 액티노바실러스 플루로뉴모니에(Actinobacillus pleuropneumoniae)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 10.

제7항에 있어서, 피내 또는 근육내 주사에 적합한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 11.

제7항에 있어서, 동결 건조 형태인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 12.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 생 약독화된 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스를 약학적 허용 담체와 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, PRRS에 대항하기 위한 생 약독화된 백신의 제조 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, 파스퇴르 연구소에 수탁번호 I-1758로 기탁된 생 약독화된 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스가 혼합에 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.