(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 7/00
A61K 39/12

(45) 공고일자 2003년12월24일
(11) 등록번호 10-0374295
(24) 등록일자 2003년02월18일

(21) 출원번호 10-1995-0703246
(22) 출원일자 1995년08월04일
번역문제출일자 1995년08월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US1994/00951
(86) 국제출원일자 1994년01월26일
(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 헝가리 일본 대한민국 스리랑카 노르웨이 루마니아 EP 유럽특허 : 핀랜드
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

(65) 공개번호 특1996-0701194
(43) 공개일자 1996년02월24일
(87) 국제공개번호 WO 1994/18311
(87) 국제공개일자 1994년08월18일

(30) 우선권주장 08/014915 1993년02월08일 미국(US)

(73) 특허권자 바이엘 코포레이션
미국 15205 펜실바니아주 피츠버그 바이엘 로드 100아이오와 스테이트 유니버시티 리써치 파운데이션, 인크.
미국 50011-3020 아이오와주 아메스 오 앤드 엘 214

(72) 발명자 토마스샌더슨
미합중국일리노이60077스코키셜파크웨이4901
마이클제이.맥진레이
미합중국캔사스66216레넥사몬로비아스트리트7703
제프리제이.짐머만
미합중국아이오와50010에임즈알.알.#3
하워드티.힐
미합중국아이오와50046캠브리지박스6루트1
마이클씨.미츠
미합중국아이오와50501네바다박스24알.알.#2
유진씨.퍼틀
미합중국아이오와50010에임즈브룩리지아비뉴810
사브리나엘.스웬슨
미합중국아이오와50158마드리드노스웨스트166-번아비뉴11
죠지피.쉬블레이
미합중국캔사스66209리우드더블유.128테라스4149

(74) 대리인 김석중, 최규팔

심사관 : 임혜준

(54) 돼지생식및호흡증후군바이러스의생육방법과백신에서그의용도

명세서

배경기술

<2> 발명의 분야 : 본 발명은 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스(PRRSV) 분리체에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 돼지 생식 및 호흡 질병용 백신과 진단 및 방위 항원, 그의 제조 방법과 용도에 관한 것이다.

<3> 선행 기술의 간단한 설명 : 돼지 생식 및 호흡 증후군은 미합중국 및 유럽 돼지 생산업자에게 있어서 경제적으로 파괴적인 질병 문제로서 빠르게 출현하고 있다. 이 증후군은 1987년에 미합중국에서 최초로 기재되었고, 이와 유사한 기재가 2 내지 3 년후 유럽 및 캐나다에서 있었다. 이 질병 증후군은 신비한 돼지 질병, 블라우(blau) 유산, 귀가 푸른 색인 돼지 질병, 돼지 유행성 유산 및 호흡 증후군(PEARS), 돼지 불임성 및 호흡 증후군(SIRS) 등을 포함하여 많은 서로 다른 이름으로 보고되어 왔다. 이하 돼지 생식 및 호흡 증후군(PRRS) 이라고 명명한다.

<4> 질병 증후군을 생식시킬 수 있는 병인은 비리온의 평균 직경이 62 nm, 외피에 의해 둘러싸인 중심이 25-30 nm 인, 외피를 가진 작은 구형의 RNA 바이러스 임이 밝혀졌다. 이 바이러스는 로콰비리다에(logavirida)과의 아르테리바이러스 속의 일원으로서 임시 분류되어 왔다. 본 명세서에서 설명되는 돼지

생식 및 호흡 증후군 바이러스(PRRSV) 분리체는 이러한 임시 분류에 적합하며, 질병 증후군을 생식시키는 것으로 보여져 왔다.

<5> PRRSV 에 관련된 질병 증후군은 다 자란 암컷 돼지에서는 급성 및 만성 생식 부전증을, 어린 돼지에서는 중증 내지 경증의 호흡 질병을 일으키는 특색을 가지고 있다. 생식 부전증은 생존 가능성이 크게 감소한 건성괴저의 (mummified), 사산의, 및 약하게 태어나는 돼지 발생 빈도를 증가시키는 결과를 초래하는 말기 유산의 특징을 가지고 있다. 또한 감염된 암퇘지에서 발정기로의 회귀가 늦은 고질적인 문제점이 있었다. 어린 돼지에서 나타나는 호흡 질병 후유증의 범위는 현저한 열병과 간질성 폐렴에서 경증의 상부 호흡 증세 (예: 재채기, 기침, 및 코와 눈의 분비물)이다. 최근(1990년) 혈청학적 및 가축 해부 연구를 통해 미합중국 돼지중 50% 이상이 PRRSV 에 노출되어 있거나 생식 부전증을 경험하였고, PRRSV 감염의 호흡 질병 증후군을 나타내고 있다.

<6> 최근 상기의 질병 증후군 출현으로 인해, 질병 발병론, 역학(疫學) 및 질병의 조절에 관한 연구는 제한되었다. 현실화되겠지만, PRRSV 를 포함한 항원의 유효한 증식 및 처리는 돼지 생식 및 호흡 증후군의 예방 및 조절에서 보조제로서 PRRSV 백신의 개발을 촉진시킬 것이다.

<7> 발명의 개요

<8> 전술한 바와 같이, 본 발명은 돼지 생식 및 호흡 증후군 진단과 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스(PRRSV) 에 대한 방위 면역 반응의 유도를 위한 항원 제조에 유용한 ISU-P로 지정된 바이러스 분리체를 포함하고 있다. 또한 본 발명에는 항원의 제조 방법 및 용도가 포함되어 있다.

<9> 본 발명의 구현예에서, PRRSV 분리체는 35℃에서 연속 세포계 배양 또는 일차성 돼지 폐포의 대식세포와 함께 돼지를 감염한 바이러스로부터 10 중량/부피 (W/V) % 폐 균등액의 공동-배양물에 의해 PRRSV를 분리시키는 방법에 의해 얻을 수 있다.

<10> 본 발명은 또한 아프리카 녹색 원숭이 (African Green Monkey) 신장 연속 세포주 (MA 104) 및 이와 동일물의 유일한 클론 유도체(9009B)와 같은 일정한 세포주에서 바이러스의 증식을 높은 역가로 하는 것을 포함하고 있다.

<11> 또한 본 발명에는 살아 있는 바이러스 또는 죽은 바이러스 항원 (통상의 또는 재조합된)의 제조 방법과 용도 및 이로 부터 면역학적으로 유효량의 바이러스와 희석액 및/또는 보조제(adjuvant)를 각각 배합함으로써 생성되는 백신을 포함하고 있다.

<12> 살아 있는 바이러스를 가지는 돼지에 대한 직접적인 실험상 면역화 또는 살아 있는 바이러스와 면역된 돼지와의 접촉은 독성이 강한 PRRSV 를 비강내의 항원 투여 후에 발생하는 생식 부전증을 방지한다는 사실을 발견하였다.

<13> 또한 백신을 접종하지 않은 대조용 돼지와 비교할 때, 백신 접종물에서는 바이러스 복제가 일어나지 않는 것으로 측정된 바와 같이, 불활성화된 백신, 보조된 PRRSV 백신이 항원 투여후의 PRRS 감염으로부터 돼지를 보호한다는 사실을 발견하였다.

발명의 상세한 설명

<14> 전술한 바와 같이, 본 발명은 백신 및 진단용 분석에서 사용하기 위한 바이러스 항원을 얻기 위하여 PRRSV 바이러스 분리체 ISU-P(아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 1993년 3월 16일자로 기탁; 기탁번호 ATCC VR 2402)의 분리에 관한 것이다. ISU-P 분리체는 약하게 태어난 돼지의 폐 조직으로 부터 수득하였다. 구체적으로 폐, 지라 및 림프 결절로 부터의 10 % W/V 조직 균등액을 오염 가능성을 최소화 하기 위하여 항생 물질이 보강된 최소 필수 배지 (MEM + A) 에서 제조하였다. 조 균등액을 4℃ 에서 15 분간 1500 x g 로 원심 분리함으로써 정화하였다. 정화한 부유액을 MEM + A 에서 1 : 5 배율로 희석시키고, 1.0 mL을 25 cm^2 플라스크에서 MA 104 세포 또는 일차성 폐포 대식세포로 된 48 시간 융합 단층위에 흡착시켰다. 35℃ 에서 2 시간 흡착 기간후 단층을 MEM+A 와 함께 2 회 세척하고, 5.0 %의 *r*-선 조사된 태내 송아지 혈청이 보강된 MEM+A 5.0 mL를 첨가하였다. 바이러스 분리 플라스크를 35℃ 에서 5 % CO_2 분위기하에 배양하고 세포 변성 효과 (CPE)를 위해 매일 측정하였다. PRRSV ISU-P 세포 변성 효과는 5 내지 10 개의 세포의 작은 병소(病巢)의 둘레에서 시작해서, 많은 세포들이 색혈되었다가 감염후 4 내지 7 일 이상 기질로 부터 떨어졌을 때 진행된다.

<15> ISU-P 분리체는, 공지된 영역에서 SDOW 17 로 지정된 PRRSV 군 특수 단일 클론 항체를 가지고 행한 형광 항체 염색법에 의해 PRRSV 분리체임이 확인되었다. 또한 네거티브 염색 바이러스에 감염된 세포는 바이러스 입자의 존재 확인을 위하여 투과형 전자 현미경으로 검사하였다. 측정된 바이러스 입자들은 구형으로, 평균 직경이 65 nm 인 비리온과 직경이 27 nm 인 중심 (core)으로 덮여져 있다. 상기 방법에서 특징있는 조직 배양 바이러스를 사용하여 임신 중인 돼지에서 실험적으로 말기 유산 및 생식 부전증을 생식시켰다 (표 1). 표 1은 ISU-P-감염 폐 균등액 (PRRS-hm) 또는 세포 배양에서 생육한 ISU-P (PRRS-tc)에 노출된 임신한 어린 암퇘지가 돼지 생식 및 호흡 증후군 (PRRS)의 전형적인 질병 증상을 나타내고 있음을 보여주고 있다. PRRS-hm 군에서는 어떠한 돼지도 정상적으로 새끼를 낳지 못하였다. PRRS-tc 군에서는 33 마리의 돼지중 단지 4마리만이 정상적으로 새끼를 낳았다. 비교하자면, 비노출된 돼지는 30 분의 29 (96.7 %)가 출산시 정상이었다. 조직 배양에서 정제 단계이후에서 조차 ISU-P 가 PRRS 질병을 생식시킬 수 있다는 사실은 이 분리체가 토과비리다에(Togaviridae) 과의 아르테리바이러스 속의 일원으로서 정확하게 분류됨을 보이고 있다. 이 분리체는 또한 실험상 감염된 돼지에서 경중의 간질성 폐렴을 일으키는 것으로 밝혀졌다.

<16> 본 발명에 의한 PRRSV 는 돼지 및/또는 임신한 어린 암퇘지 또는 암퇘지를 PRRS 공격으로부터 보호할 수 있는 백신에 함침될 필요가 있는 항원성 매스(mass)를 제공하기에 충분한 수준까지 바이러스를 유효하게 복제할 수 있는 소정의 조직 배양에서 양육시킬 수 있다는 점이 본 발명의 한 가지 특징이다. 구체적으로 PRRSV 는 휘태커 바이오프로덕트 (Whittaker BioProducts)에 의해 MA 104로 지정된 조직 배양

세포에서 생육시킬 수 있다. 서로 다른 세 가지의 소스로부터 얻은 MA 104 세포를 가지고 상기와 동일한 배양 조건을 사용하여 행한 바이러스 증식 실험은 PRRSV 복제를 높은 역가로 지지할 수 있는 능력에 있어서 MA 104 세포중에는 많은 변종이 존재하고 있음을 보여주고 있다. 본 연구에서 사용하였고, 본 명세서에 기재된, Miles Inc., Agriculture Division, Animal Health Products Group 에 의해 MA 104 (M)로 지정된 하나의 MA 104 세포 배양은 계속해서 PRRSV 생식을 고 역가로 지지하였다. 또한 MA 104 (M) 로 부터 유래하였고, 9009B로 지정하였으며, Miles Inc., Agriculture Division, Animal Health Products Group 에서 생성된 세포주 클론은 모 세포주 보다 높은 역가로 PRRSV의 복제를 지지한다. 그러므로 ISU-P 의 생장을 위한 바람직한 조직 배양 세포는 9009B(아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 1993년 3월 16일자로 기탁; 기탁번호 ATCC CRL 11302)이다. PRRSV IS UP 의 세포 배양 증식에 대하여 다음에 보다 충분히 설명한다.

<17> 조직 배양물 세포 [MA 104 (M) 와 9009B] 를 5 % 태내의 송아지 혈청이 보강하고 1.3 g/L의 중탄산나트륨으로 완충한 고 포도당의 둘베코(Dulbecco)의 변형된 최소 필수 배지 (DMEM/HG)에서 생육 유지하였다. 48 시간내에 80-100 % 융합 단층을 달성하기 위하여 충분한 세포 수를 가지고 세포 계대를 행하였다. PRRSV ISU-P 바이러스 군체를 PIPES 로 pH 6.8로 완충시킨 5 % 태내의 송아지 혈청 + DMEM/HG 에서 희석시켰다. 바이러스를 낮은 감염다중성 (MOI)으로 세포 시트에 접종하고, 36℃ 에서 배양하였다. 감염된 배양물을 4-7 일 동안 매일 CPE를 관찰하였다. CPE가 90-100 % 임이 명백해졌을 때 감염된 배양물을 회수하였다. 최대의 바이러스 항원성 매스는 한 번의 -70 ℃ 냉동/해빙 주기 이후에 얻었다. MA 104 (M) 세포에서 증식 결과 얻어지는 평균 바이러스 역가의 범위는 $10^{3.0}$ 내지 $10^{4.5}$ 형광성 항체 감염량 $_{50}$/mL (FAID $_{50}$ /mL) 이었다. 9009B 세포 클론에서 증식에 의해 얻어진 바이러스 역가의 범위는 $10^{5.5}$ 내지 $10^{6.5}$ FAID $_{50}$/mL이었다. 상기 범위의 역가는 부피가 50 L 보다 큰 상업용 PRRSV 백신 제제에 충분한 항원성 매스를 혼입시키는 것을 가능하게 한다.

<18> 당업자에 의해 현실화되겠지만, 일단 PRRSV는 높은 정도의 항원성 매스로 증식될 수 있고, 본 발명에 따라 유효한 그의 서브-유니트를 포함하는 상기 바이러스의 유도체는 바이러스로 부터의 추출과 같이 당업계에 공지된 방법에 의해 얻어질 수 있다. 또한 방위 항원은 분자 수준으로 확인될 수 있고, 재조합 기술을 사용하여 생식 및 발현될 수 있다.

<19> 백신 제제용 바이러스 액은 두 가지 방법에 의해 불활성화된다. 선택된 불활성화물은 포르말린과 이원성(binary) 에틸렌이민(BEI) 이었다. 불활성화 현상은 본 명세서에서 보다 충분하게 기재된 표준 방법에 의해 진행된다. 포르말린 불활성화는 바이러스 액을 최종 포르말린 농도가 0.05 %가 되도록 군체 37 % 포름알데히드와 혼합함으로써 진행된다. 포르말린-바이러스 혼합물을 24 시간동안 일정하게 혼합시키면서 실온 (약 25℃)으로 유지하였다. 시료를 0, 8, 12 및 24 시간 마다 취하여 9009B 세포에서 살아 있는 바이러스를 분석하였다. 그룹에 특수한 단일 클론 항체를 가지고 한 세포변성 효과 및 형광 염색은 오직 0 시간인 경우에만 살아 있는 PRRSV를 검색하였다.

<20> BEI를 가지고 행한 불활성화는 바이러스 액과 군체 0.1 M BEI (0.175 N NaOH중 20.5 g/L 2-브로모-에틸아민 HBR)을 배합하여 최종 BEI의 농도가 1.0mM 이 되도록 함으로써 진행된다. 불활성화는 BEI-바이러스 혼합물을 실온에서 48 시간 동안 일정하게 혼합함으로써 진행된다. 바이러스 불활성화는 1.0 M의 티오황산 나트륨을 최종 농도인 0.1 mM 에 2시간 동안 혼합하면서 첨가함으로서 중지된다. 시료를 0, 2, 4, 8, 12, 24 및 48 시간 마다 취하고, 상술한 바와 같이 살아있는 바이러스를 분석하였다. 살아 있는 PRRSV는 단지 0, 2 및 4 시간에서만 검색되었다.

<21> 본 발명의 변형된 생 또는 약독화(attenuated) 백신 제조시, PRRSV는 변형되어 한정된 방법으로 여전히 숙주를 감염시킬 수 있지만, 숙주에 질병의 증상을 일으킬 수는 없다. 정상적으로 이와 같은 바이러스의 변형은 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포와 같은 비-숙주 세포에 이를 투입함으로써 발생한다. 처음에 바이러스는 잘 증식하지 못하거나 전혀 증식하지 못한다. 후자의 경우에는 바이러스가 세포 배양물에서 생육할 수 있도록 강제로 적응시킬 필요가 있다. 이는 바이러스를 높은 또는 낮은 감염 다중성(MOI)으로 세포 배양물에 가함으로써 이루어질 수 있다. 또한 충분한 세포변성 효과가 관찰될 수 있을 때까지, 바이러스를 세포와 함께 강제로-투입하거나 맹목적으로 투입하고, 따라서 바이러스는 적응하게 됨을 의미한다. 적응하게 되면, PRRSV 분리체 ISU-P가 MA 104(M) 세포주에서 9009B 세포주로 통과할 때 관찰되듯이 바이러스 역가는 증가하게 될 것이다. 표 1 은 PRRSV ISU-P (PRRS-tc) 가 통과한 조직 배양물이 폐 균등액으로 부터 분리시킨 것보다 독성이 약할 수 있다고 하는 전형적인 적응 결과를 보여주고 있다. 표 2에 개시된 자료는 본 발명에 따라 제조된 백신의 제조 방법이 특히 PRRS 에 대한 보호를 부여하는데 효과적임을 보여주고 있다.

<22> 불활성화된 PRRSV ISU-P 는 다음과 같이 보조제가 첨가된다. 불활성화된 액은 프로인트의 완전 보조액(complete adjuvant) (FCA), 프로인트의 불완전 보조액 (FIA), 카르보폴 계 보조제, 및 다이어몬드 사이언티픽 보조제 B (Adj B)으로 구성된 군으로 부터 선택된 보조제로 보조된다. 이들 보조제는 백신 제조에 사용된 주요 형태를 나타낸다. 오일-계 보조제는 FCA, FIA 및 ADJ B로 지정된다. 수성-계 보조제는 카르보폴로 지정된다. 불활성화된 PRRSV ISU-P는 적절한 보존제를 포함할 수도 있다.

<23> FCA 와 FIA를 가지는 백신 제제는 전형적으로 동량의 불활성화 바이러스 액과 18 게이지 이중 로어(lure) 자물쇠 장치와 두 개의 주사기를 사용한 보조제에서 불활성화 바이러스를 유화시킴으로서 제조한다. 액은 두꺼워진 반-고체 유제가 형성될 때까지 주사기 사이의 어셈블리를 통해 반복적으로 나타낸다. 유제는 투여용 주사기에 직접 적하한다.

<24> Adj B를 가지는 백신 제제는 군체 Adj B와 동량의 불활성화 PRRSV ISU-P 바이러스 액을 혼합함으로써 제조한다. 보조제와 바이러스를 실온에서 1시간 동안 교반함으로써 혼합한다. 보조제 백신을 살균된 다-투여량(multidose) 유리병 속에 무균적으로 넣고 투여하기 전에 4 ℃ 에서 저장한다.

<25> 카르보폴-계 백신 제제는 보조제의 최종 농도가 10 % v/v가 될 때까지 군체 카르보폴 보조제와 불활성화 바이러스 액을 혼합 제조한다. 보조제와 바이러스는 실온에서 4시간 동안 교반함으로써 혼합한다. 보조제가 첨가된 백신을 살균된 다-투여량 유리병속에 무균적으로 넣고 투여하기 전에 4℃ 에서 저장

한다.

<26> 기재된 각종 백신 제제에서는 $10^{5.0}$ $FAID_{50}$/mL 만큼 낮은 예비 불활성화 역가로 PRRSV ISU-P 바이러스를 사용한다.

<27> PRRSV 분리체 ISU-P가 돼지 생식 및 호흡 증후군에 대해 보호할 수 있음을 증명하기 위해서, 두 가지의 백신/항원 투여 연구를 진행한다. 첫 번째 연구에서는 직접적인 경로 또는 질병있는 돼지와의 접촉을 통하여 바이러스에 대한 구비 노출에 의하여 4 마리의 어린 암퇘지를 살아있는 PRRSV ISU-P 로 면역화시킨다. 연령이 같은 두 마리의 어린 암퇘지는 비면역(비노출) 상태로 남겨두고, 대조하기 위하여 따로 따로 살게 한다. 직접-노출 백신 접종물 (# 57 과 # 58) 은 3.0 mL의 바이러스 접종물을 비강내로 받는다. 이들은 간접 형광 항체 시험에 따라 노출 후 14 일쯤 혈청변환하였다. 접촉-노출된 어린 암퇘지 (# 476 과 # 480) 를 질병이 있는 돼지와 밀접하게 접촉되도록 위치시킨 후, 구비(oronasal) 경로를 통해 면역시킨다. 이들 돼지는 노출 후 90 일쯤 혈청변환하였다. 혈청변환 현상은 IFA 역가가 1 : 20 보다 더 큰 것으로 표시된다.

<28> 면역화된 어린 암퇘지가 혈청변환된 후, 이들의 발정기를 동 기간으로 하고 이들을 양육한다. 임신은 초음파로 확인한다. 임신 90 일째에 백신 접종물과 대조용의 임신한 어린 암퇘지에 1×10^{4} $FAID_{50}$ 역가의 PRRS 항원 투여 바이러스 3.0 mL을 비강내 투여한다.

<29> 대조용 어린 암퇘지 # 52 와 # 477는 항원 투여후 2 내지 3 일 동안 식욕 감퇴와 체온 상승 (103 - 104 °F) 현상이 발생한다는 점에서 질병의 초기 증세가 있음을 입증하였다. ISU-P 노출된 (백신 접종한) 어린 암퇘지에서는 어떠한 질병의 임상 증세도 나타나지 않았다. 이 결과는 임상적인 호흡 질병 증후군으로 부터의 보호를 입증하고 있다.

<30> 돼지들이 이유할 때 (출산 4 주후) 까지 모든 어린 암퇘지를 계속 유지하였다. 표 2 는 이 실험으로부터 출산 결과를 보여주고 있다.

<31> 출산 결과는 임신 기간 (임신 기간은 PRRS 감염에 의해 정상적으로 단축된다), 사산 또는 죽은 태아, 약한 돼지 및 건성괴저(mummified)에 관하여 기록된다. 이들 출산의 어려움은 임신한 어린 암퇘지 또는 암퇘지에서 PRRS 감염으로 인한 모든 징조로 나타난다. 또한 많은 정상적인 돼지들에 관하여도 보고되어 있다.

<32> 대조용 어린 암퇘지 중 그 어느 것도 정상적인 돼지를 출산하지 못하였다(22 마리중 0 마리가 정상이었다). 22 마리의 돼지중 7 마리가 사산하였고, 22 마리 중 15 마리는 약하게 태어난 돼지였다. 대조용 어린 암퇘지의 임신 기간은 임신한 돼지에서 PRRS 에서 통상적인 2.5일 정도 단축되었다. 면역된 군 (n = 50) 에서는 40 마리의 돼지 또는 80 %가 정상적으로 태어났다. 출산시 50 마리의 돼지중 6 마리가 사산하였고, 50 마리의 새끼중 4 마리가 건성괴저를 보였다. 백신 접종한 군에서는 약한 돼지가 전혀 없었다. 어린 암퇘지에서 직접적인 질병의 임상 증상이 결핍되어 있고 이들이 임신한 새끼를 보호한다는 사실에 의해 입증되었듯이, 양육된 후 항원 투여된 살 있는 PRRSV ISU-P에 이미 노출된 어린 암퇘지는 항원 투여로 부터 보호받고 있음이 명백하다.

<33> 현실화되겠지만, 본 연구에서 어린 암퇘지의 혈청상(serostatus)을 측정하기 위하여 사용한 IFA 시험 시약이 PRRSV ISU-P 에서 유래하고, 어린 암퇘지의 혈청상과 PRRS 로 부터의 보호 사이에 직접적인 관계가 존재하기 때문에, PRRSV ISU-P 분리체는 여기에서 입증된 간접 형광 항체 시험, ELISAs, 혈청 중화 분석, 직접 형광 항체 분석과 같은 진단용 시험 및 기타 업계에서 공지된 진단 시험에서 유용할 수 있다. 따라서 PRRSV ISU-P로부터 얻은 항원에서 유도한 진단용 분석은 본 발명에 따라 제조 및 사용될 수 있다.

<34> 두 번째 백신/항원 투여 연구에서, 어린 돼지 (4 - 6 주생) 에 수 회에 걸쳐 불활성화되고 보조제가 첨가된 PRRSV ISU-P 백신을 접종한다. 전술한 바와 같이 백신 항원 풀은 BEI로 PRRSV ISU-P를 불활성화함으로써 제조하고, 카르보폴, FCA/FIA 또는 Adj B로 보조된다. 두 번째 백신 항원 풀은 전술한 바와 같이 포르말린으로 PRRSV ISU-P 를 불활성화함으로써 제조하고, 3개의 상기와 동일한 보조제가 첨가된다. 보조제와 세포가 잘못된 면역 반응을 촉진시킬 수 없도록 확실하게 하기 위하여 3 개의 모의(mock) 백신을 제조한다. 모의 백신은 감염되지 않은 조직 배양물 세포에 보조제를 첨가함으로써 제조한다. 두 마리의 돼지를 각각 백신으로 접종한다. 백신은 0, 21, 42 및 64 일째에 피하 투여된다. 최후의 백신 접종 7 일후, 돼지에 독성의 살아 있는 PRRSV의 $10^{3.5}$ $FAID_{50}$ 으로 비강내 항원 투여한다. 모든 돼지들에 대하여 질병의 임상 증상을 위하여 항원 투여를 한후 매일 관찰한다. 또한 조직 배양에서 바이러스를 회수할 목적으로 혈액 시료를 채취하여 가공 처리한다. 항원 투여후 혈류에서 발견된 살아 있는 바이러스는 바이러스 혈증이 발생하였음을 의미한다.

<35> 혈청 중화 역가는 연구 초기, 항원 투여한 날 및 항원 투여후 19 일에 측정한다. 혈청 중화 시험은 이전 시험에서 사용된 IFA 시험보다 덜 민감함을 주목해야 한다. 따라서 이들의 역가 결과를 이전의 역가 결과와 비교할 수 없다.

<36> 표 3 은 항원 투여 결과를 기재하고 있다. 질병의 어떤 임상적인 증상도 백신을 접종한 돼지나 대조용 돼지에서 관찰하지 못하였다. 또한 백신 접종 기간중 백신 접종물 또는 대조용 그 어느 것도 혈청 중화 역가를 발생시키지 않았다. 이는 상기 기간중에 살아 있는 바이러스에 대한 노출이 전혀 없었음 (대조용은 네거티브로 남아 있음)을 의미하며, 또한 백신이 혈청 중화 시험에 의해 측정될 수 있을 만큼 충분히 높은 체액 반응을 촉진시키지 않았음을 의미한다. 항원 투여후 혈청 중화 역가 반응이 증대되었다고 하는 사실은 모든 돼지에 살아 있는 PRRS 바이러스가 유효하게 항원 투여되었음을 의미한다. 이러한 항원 투여 노출에 대한 입증은 바이러스 혈증을 보이는 대조용 돼지의 백분율이다. 대조용 돼지중 하나를 제외한 모두 (87.5 %) 는 감염되었다. 백신 접종한 돼지에서 면역 반응은 바이러스 혈증을 저지할 수 있을 만큼 강하였다. 백신 접종한 돼지 12 마리중 단지 1 마리 (8.3 %)만이 바이러스 혈증을 나타내었다. 따라서 백신은 돼지의 91.7 %를 보호하였다.

<37> 본 발명의 어떤 구체적인 이론과도 관계없이, 원래의 PRRSV 분리체를 MA 104 (M) 아프리카 녹색 원숭이 세포 (9009B)의 특수-적응 클론을 통해 강제-통과시키는 것은, 다른 과학자들이 실패한 분야에서 백신을 제조할 수 있도록 하기 위하여 상기 바이러스의 면역성이 증진되는 결과를 초래할 수 있도록 바이러스의 하나 이상의 에피토프(epitopes)를 성공적으로 변경시킬 수 있다고 믿어진다.

<38> [표 1]

비-노출된 대조용 암퇘지와 비교할 때 PRRSV 분리체 ISU-P 에 노출된 암퇘지에서 말기 유산의 생식 및 생식 실패

I. PRRS 노출 군

암퇘지 번호	임신 기간(a)	바이러스 제제	사산	약함	건성괴저	정상
57	112 일	PRRS-hm[b]	6	8	0	0
54	108 일	PRRS-hm	6	1	0	0
649	112 일	PRRS-hm	3	7	0	0
58	112 일	PRRS-hm	4	4	3	0
166	112 일	PRRS-tc[c]	0	2	6	1
164	113 일	PRRS-tc[d]	2	2	5	1
80	110 일	PRRS-tc[e]	2	2	2	2
총			23	26	16	4

a = 정상적인 돼지의 임신 기간은 114 일임.
b = PRRSV 포지티브 노토바이오토 돼지 폐 균등액 접종물.
c = PRRSV 유래의 조직 배양물, $10^{3.0}$ 형광성 항체 감염량 50/ml (FAID $_{50}$/ml)
d = PRRSV 유래의 조직 배양물, $10^{4.0}$ FAID $_{50}$/ml
e = PRRSV 유래의 조직 배양물, $10^{5.0}$ FAID $_{50}$/ml

II. 비-노출 대조군

암퇘지 번호	임신 기간(a)	바이러스 제제	사산	약함	건성괴저	정상
52	114 일	na	0	0	0	11
56	115 일	na	0	0	0	12
163	116 일	na	1	0	0	7
총			1	0	0	30

<40> [표 2]

ISU-P 면역 및 비면역된 어린 암퇘지의 출산 결과

어린 암퇘지 번호	IFA 역가	임신 기간	사산	약한 돼지	건성괴저	정상
57 V	+	113 일	2*	0	0	7
58 V	+	114 일	4	0	3	11
476 V	+	113 일	0	0	1	10
480 V	+	114 일	0	0	0	12
52 C	-	111 일	5	7	0	0
477	-	112 일	2	8	0	0
총			6 V 7 C	0 V 15 C	4 V 0 C	40 V 0 C

+ 는 IFA 역가가 > 20 임을 의미한다.
- 는 IFA 역가가 < 20 임을 의미한다.
V 는 백신 접종물을 의미한다.
C 는 대조용을 의미한다.

<42> [표 3]

PRRSV 불활성화 백신 시험 요약

백신 군		평균 SN 각 항원 투여	평균 SN 항원 투여 후[a]	바이러스 분 리[b]
BEI, PRRS-카르보폴	n = 2	< 1 : 2	1 : 82	neg/neg
BEI, PRRS-FCA/FIA	n = 2	< 1 : 2	1 : 4	neg/neg
BEI, PRRS-Adj B	n = 2	< 1 : 2	1 : 5	neg/neg
Form., PRRS-카르보폴	n = 2	< 1 : 2	1 : 23	neg/pos
Form., PRRS-FCA/FIA	n = 2	< 1 : 2	1 : 2	neg/neg
Form., PRRS-Adj B	n = 2	1 : 3	1 : 8	neg/neg
모의 백신 군				
모의 AG - 카르보폴	n = 2	< 1 : 2	< 1 : 2	pos/pos
모의 AG - FCA/FIA	n = 2	< 1 : 2	< 1 : 2	pos/pos
모의 AG - Adj B	n = 2	< 1 : 2	< 1 : 2	pos/pos

a = 항원 투여후 19 일째 SN 반응, 실험 종료
b = 항원 투여 시험 기간후 19 일동안 플라스마로에서 바이러스 분리. 9009B 에서 CPE에 의해 검색되고, PRRSV 군 특수 단일클론 항체 SDOW17 으로 동일물을 FA 염색에 의해 확인한 바이러스 분리.

<44> 본 발명은 예해(例解)의 목적으로 이미 상세하게 기재하였지만, 이와 같은 설명은 단지 예해의 목적뿐이며, 특허청구의 범위에 의해 한정될 수 있는 경우를 제외하고는 본 발명의 정신 및 범위에서 벗어나지 않고 당 업계의 전문가에 의해 각종 변형이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

기탁된 미생물의 표시

(PCT Rule 13*bis*)

A. 하기 표시는 명세서에 언급된 미생물에 관한 것이다
페이지 _____, 라인 _____

B. 기탁 표시

기탁기관의 명칭
아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션

기탁기관의 주소
미국 MD 20652 록크빌 파크로운 드라이브 12301

기탁일자	수탁번호
1993년 3월 16일	ATCC VR 2402 및 ATCC CRL 11302

C. 추가 표시

없음

D. 표시된 지정국

전체

E. 표시의 분리공급

■ 본 문서는 국제출원과 함께 접수되었다.	□ 본 문서는 국제사무국에 의해 접수되었다.
인증된 관리자	인증된 관리자

Form PCT/RO/134

(57) 청구의 범위

청구항 1

ISU-P로 지정된 PRRSV 분리체(기탁번호: ATCC VR 2402)를 9009B로 지정된 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주의 클론(기탁번호: ATCC CRL 11302) 상에 접종하고 복제된 바이러스를 회수하는 단계를 특징으로 하여 감염에 대한 감수성이 있는 조직 배양물에서 ISU-P로 지정된 PRRSV 분리체(기탁번호: ATCC VR 2402)를 증식시키는 방법.

청구항 2

ISU-P로 지정된 PRRSV 분리체(기탁번호: ATCC VR 2402)를 포함하는 조직 배양물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, PRRSV 분리체를 $>10^{5.0}$/mL의 $FAID_{50}$ 역가에서 >25L의 상업상 규모로 포함하는 조직 배양물.

청구항 4

ISU-P로 지정된 PRRSV 분리체(기탁번호: ATCC VR 2402)를 제공하고, 조직 배양 세포로부터 바이러스를 방출시키고, 희석, 농축 또는 추출에 의해 항원성 매스(mass)를 조절하여 변형된 생제제(약독학 제제), 불활성화 제제, 서브유니트 또는 재조합 제제를 위한 면역학적 유효량의 항원성 매스를 생성시키는 단계를 포함하여, PRRS로 부터 돼지를 보호하는데 유효한 백신을 제조하는 방법.

청구항 5

ISU-P로 지정된 PRRSV 분리체(기탁번호: ATCC VR 2402)를 포함하는 백신.

청구항 6

PRRSV가 변형된 생(약독화) 바이러스이고, 액체, 동결 또는 건조된 형태인 제 10 항의 방법에 의해 제조된 백신.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, PRRSV가 불활성화되고 보조제가 첨가되어 있으며, 보존제를 포함할 수 있는 백신.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 보조제가 오일계 또는 수성계 보조제인 백신.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 보조제가 프로인트의 완전 보조제 및 프로인트의 불완전 보조제로 구성된 군으로 부터 선택되는 백신.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 불활성화제가 이원성(binary) 에틸렌이민, 베타 프로피오락톤 또는 포르말린인 백신.

청구항 11

제 6 항에 있어서, 조직 배양물이 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주인 백신.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포가 9009B로 지정된 세포주 클론(기탁번호: ATCC CRL 11302)인 백신.

청구항 13

ISU-P로 지정된 PRRSV 분리체(기탁번호: ATCC VR 2402).

청구항 14

9009B로 지정된 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 클론(기탁번호: ATCC CRL 11302).

요약

본 발명은 PRRSV를 조직 배양물상에 접종하고 복제된 바이러스를 회수하는 단계를 포함하여, PRRS로 부터 동물을 보호하거나 PRRS를 진단하거나 재조합 생성물을 개발하기 위하여 PRRSV의 분자 구조를 확인하기에 충분한 양으로 바이러스가 복제되도록 감염에 대한 감수성이 있는 조직 배양물에서, PRRSV를 증식시키는 방법에 관한 것이다.