



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월11일

(11) 등록번호 10-1734590

(24) 등록일자 2017년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01) C12N 1/36 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01) C12R 1/35 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7030155

(22) 출원일자(국제) 2010년05월19일

심사청구일자 2015년05월18일

(85) 번역문제출일자 2011년12월16일

(65) 공개번호 10-2012-0016282

(43) 공개일자 2012년02월23일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2010/000590

(87) 국제공개번호 WO 2010/132932

국제공개일자 2010년11월25일

(30) 우선권주장

2009902255 2009년05월19일 오스트레일리아(AU)

(56) 선행기술조사문헌

WO2002010343 A2

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 2006, vol. 50, no. 6, PAGEs 1959-1966.

JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY. 1984, vol. 94, no. 1, PAGEs 1- 8.

AUSTRALIAN VETERINARY JOURNAL. 1990, vol. 67, no. 5, PAGEs 159-165.

(73) 특허권자

바이오프로퍼티스 피티와이 엘티디

오스트레일리아 3134 빅토리아주 링우드 차터 스트리트 36

더 유니버시티 오브 멜버른

오스트레일리아, 빅토리아 3010

(72) 발명자

유일, 리마

오스트레일리아 3207 빅토리아주 포트 멜버른 노트 스트리트 54 아파트먼트 612

에이비에스 엘-오스타, 유세프

오스트레일리아 3046 빅토리아주 글렌로이 위드포드 스트리트 37

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 마이코플라스마 하이오뉴모니에의 온도 감수성 백신 균주 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은, 온도 감수성이고 약독화된, 열거된 유전자 중 하나 이상에서의 돌연변이를 포함하거나 수탁 번호 NM04/41259하에 국립성분검사연구소(National Measurements Institute (오스트레일리아))에 기탁된 마이코플라스마 하이오뉴모니에(*Mycoplasma hyopneumoniae*) 백신 균주, 상기 균주를 포함하는 백신, 및 그의 방법 및 용도에 관한 것이다.

(72) 발명자

브라우닝, 글렌

오스트레일리아 3053 빅토리아주 칼튼 그라랜드 스트리트 205-211 더 유니버시티 오브 멜버른 씨/오 멜버른 벤처스 피티와이 엘티디

마크햄, 필립

오스트레일리아 3053 빅토리아주 칼튼 그라랜드 스트리트 205-211 더 유니버시티 오브 멜버른 씨/오 멜버른 벤처스 피티와이 엘티디

명세서

청구범위

청구항 1

온도 감수성이고 약독화된, 수탁 번호 NM04/41259하에 국립성분검사연구소(National Measurements Institute (오스트레일리아))에 기탁된 마이코플라스마 하이오뉴모니에(*Mycoplasma hyopneumoniae*) 백신 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 표에 열거된 유전자 각각에서 돌연변이를 포함하는 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주.

<표> 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주 ts19의 유전자 내에서의 약독화 돌연변이

돌연변이:	
추정 의부막 단백질 P95	YP_278901.1
추정 지질단백질 (MIIJ_0213)	YP_279015.1
추정 지질단백질 (MIIJ_0362)	YP_279161.1
추정 P216 표면 단백질	YP_279290.1
추정 부착 유사-단백질 P146	YP_279457.1
단수화물 대사:	
트리오스포스페이트 아이소미라이제	YP_278904.1
트랜스케플라아제	YP_279223.1
추정 PTS 계 N-아세틸글루코사민-특이적 II ABC	
성분	YP_279370.1
인자질 대사:	
CDP-디아실글리세롤-글리세롤-3-포스페이트-3-포스파티딜	
트랜스페라아제	YP_279075.1
보조-인자 대사:	
나코티네이트 포스포리보실트랜스페라아제	YP_279204.1

<u>전사/번역:</u>		
Gi6A 유전자 [tRNA 우리딘 5-카르복시메틸아미노메틸 번형	YP_278808.1	
효소	YP_278808.1	
50S 리보솜 단백질 L3	YP_278992.1	
류실-tRNA 합성효소	YP_279441.1	
이소류실 tRNA 합성효소	YP_278833.1	
<u>막 수송:</u>		
추정 ABC 수송자 페미아제 단백질	YP_279164.2	
추정 ABC 수송자 ATP 결합	YP_278823.1	
추정 크로메이트 수송 단백질	YP_278943.1	
추정 ABC 수송자 ATP 결합 및 페미아제 단백질	YP_278958.1	
추정 내부막 단백질 트랜스로카제 성분 YidC	YP_279468.1	
추정 ABC 수송자 페미아제 단백질 p69-유사	YP_279157.1	
추정 ABC 수송자 페미아제 단백질	YP_279176.1	
추정 ABC 수송자 ATP-결합-Pr1	YP_279419.1	
<u>DNA 복제/복구/데사</u>		
DNA 토포아이소미라아제 I	YP_279077.1	
우라실-DNA 글리코실라아제	YP_278929.1	
GTP 아제 ObgE	YP_278842.1	
DNA 폴리미라아제 IV	YP_278846.1	
리보뉴클레오티드-디슬레이트 리اكت라아제 서브유닛 일파	YP_279017.1	
티미딜레이트 키나아제	YP_279053.1	
DNA 폴리미라아제 III 서브유닛 엘타	YP_279054.1	
DNA 리가아제	YP_279060.1	
DNA 자이라아제 서브유닛 A	YP_279326.1	
리보뉴클레아제 HII	YP_279388.1	
무기 파이로포스파타아제	YP_279400.1	
액시뉴클레아제 ABC 서브유닛 C	YP_278867.1	
<u>트랜스포사아제</u>		
추정 ISMfp1 트랜스포사아제	YP_279110.1	

YP_숫자는 NCBI 참조 서열을 나타냄

청구항 3

제1항 또는 제2항의 마이코플라스마 하이오뉴모니에 균주 및 담체를 포함하는 백신 조성물이며, 면역화 양의 백신이 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 의해 유발되는 질환에 대한 방어 면역을 유도할 수 있는 것인 백신 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 면역보강제, 하나 이상의 추가의 감염원, 또는 둘다를 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 감염원이 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충인 백신 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 호흡기 투여용으로 제제화된 백신 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 에어로졸 제제인 백신 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 마이코플라스마 하이오뉴모니에 균주를 포함하는, 돼지류 동물에서 동물토착성(enzootic) 폐렴 또는 돼지 마이코플라스마 폐렴의 예방을 위한 의약.

청구항 9

제8항에 있어서, 호흡기로 투여하기 위한 의약.

청구항 10

제9항에 있어서, 흡입에 의해, 비강내로, 또는 에어로졸을 통해 투여하기 위한 의약.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이코플라스마 하이오뉴모니에(*Mycoplasma hyopneumoniae*) 균주, 상기 균주를 포함하는 백신, 및 돼지류에서 마이코플라스마 폐렴에 대한 방어를 위한 상기 백신의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 마이코플라스마 하이오뉴모니에는 돼지 마이코플라스마 폐렴 (돼지유행성 폐렴 (EP)으로도 불림)의 병인체이다. 이는 전세계 돼지류 생산에 영향을 미치는 가장 흔하고 경제적으로 중요한 호흡기 질환 중 하나이다. 상기 질환은 2차 감염, 고-이환률 및 저-사망률, 낮은 사료 전환율과 연관되고, 이는 매해 약 10억 달러로 추산되는 세계적 경제 손실의 원인이 될 수 있다.

[0003] EP에서, 마이코플라스마 하이오뉴모니에 박테리아는 돼지의 폐내 상피성 세포의 섬모에 부착하여 건강한 정상 섬모를 파괴함으로써, 기회감염성 유기체가 스스로 호흡기 조직내로 편입되어 질환을 일으키도록 한다. 일단 편입되면, 마이코플라스마 하이오뉴모니에는 돼지의 폐에서 병변을 일으킨다.

[0004] 상기 질환은 매우 전염성이 크고, 전염은 보통 감염된 기도 분비물, 예를 들어 재채기 또는 기침을 할 때 코나 입으로부터 분출되는 액적과의 직접적인 접촉을 통해 이루어진다.

[0005] 현재, 마이코플라스마 하이오뉴모니에 대한 여러 백신이 존재한다. 현재의 대부분의 백신은, 단일 또는 이가/다가 백신으로서 등록된 22종의 백신 브랜드로 약 10개의 회사에 의해 공급된다. 상기 백신 모두는 사균화 또는 비활성화 마이코플라스마 하이오뉴모니에 제제이다.

[0006] 전세포 비활성화 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신의 예로는 레스피슈어(RESPISURE)TM 및 스텔라뮨(STELLAMUNE)TM (화이자(Pfizer)), 수백신 엠. 하이오(SUVAXYN M. HYO)TM (포트 도지(Fort Dodge)), 하이오レス프(HYORESP)TM (메리엘(Meriel)), 엠+팩(M+PAC)TM (셰링-플라우(Schering-Plough)) 및 포실리스(PORCILIS)TM (인터벳(Intervet))를 들 수 있다.

- [0007] 일부 백신이 EP의 중증도를 감소시킬 수는 있지만, 이용가능한 전세포 사균화 또는 비활성화 백신 중 어떤 것도 마이코플라스마 하이오뉴모니에 감염으로부터의 완전한 방어를 제공하지는 않는다. 따라서, 보다 효과적인 백신이 필요하다.
- [0008] 백신접종에 사용하기에 적합한 마이코플라스마 뉴모니에(*Mycoplasma pneumoniae*)의 생균주를 제공하여 동물토착성(enzootic) 폐렴을 예방하는 것이, 본 발명의 바람직한 실시양태의 목적이다.
- [0009] 본 명세서에서 인용된 모든 참고문헌 (모든 특허 또는 특허 출원을 포함함)은 본원에 참고로 포함된다. 수많은 선행 문헌들이 본원에 거명되지만, 이러한 거명이, 그러한 임의의 문헌이 당업계의 일반 상식의 일부분을 형성한다는 것을 용인하는 것은 아니라는 것을 분명히 이해할 것이다.

발명의 내용

- [0010] <발명의 요약>
- [0011] 본 발명은 일반적으로, 돼지에서의 동물토착성 폐렴 방어에 효과적인 생백신의 제조에 사용될 수 있는 약독화 마이코플라스마 하이오뉴모니에 생균주를 제공한다.
- [0012] 제1 측면은, 표 1에 열거된 유전자 중 하나 이상에서의 돌연변이를 포함하는 약독화 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주를 제공한다.
- [0013] 한 실시양태에서, 백신 균주는 표 1에 열거된 모든 유전자에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0014] 한 실시양태에서, 백신 균주는 온도 감수성이다.
- [0015] 약독화 백신은 일반적으로, 이들이 감염원의 모든 관련 면역원 결정기를 그의 본래 형태로 숙주의 면역계에 제시하고, 백신접종된 숙주에서의 면역화제의 증식 능력으로 인하여 상대적으로 적은 양의 면역화제가 필요하기 때문에 유리하다. 약독화 방법으로는 독성 균주를 다수의 횟수로 계대배양하는 것, 또는 방사선 또는 화학물질에 노출시키는 것을 들 수 있다. 이러한 방법은 계놈에 돌연변이를 도입함으로써, 미생물이 더 적은 독성을 갖지만 여전히 복제가 가능하도록 하는 것으로 추정된다.
- [0016] 이러한 접근법의 단점은, 이들이 분자 수준에서 특징화되지 않은 무작위 돌연변이를 도입한다는 것이다. 또한, 예컨대 연관 온도 감수성 선별에 의한 약독화 선별 방법은, 온도 감수성 균주가 약독화되지 않을 수 있고, 약독화 균주가 온도 감수성일 필요는 없으며, 많은 시행착오를 요구하기 때문에, 종종 시간 소모가 많고, 잘못된 결과를 산출한다. 게다가, 약독화 균주는 추가의 돌연변이가 일어나, 다시 독성을 돌아갈 수 있다.
- [0017] 마이코플라스마 폐렴에 대한 생백신을 제공하기 위한 목적으로, 본 발명자들은 마이코플라스마 하이오뉴모니에 단리물을 화학적 돌연변이유발에 노출시키고, 온도 감수성인 클론을 선별하였다. 본 발명자들은 생박테리아 돌연변이체를 동결건조시켰고, 박테리아가 1주 후에 재구성되어, 연속적인 계대배양 후에도 생존할 수 있기 때문에, 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 대한 백신 균주로서 적합하다는 것을 밝혀냈다. 백신 균주 및 마스터 균주를 서열분석하고, 서열 비교를 통해 백신에서 돌연변이가 일어난 유전자를 확인하여, 약독화 균주의 유전자적 특징화를 가능하게 하였다.
- [0018] 제2 측면은, 온도 감수성이고 약독화된, 수탁 번호 NM04/41259하에 국립성분검사연구소(National Measurements Institute (오스트레일리아))에 기탁된 약독화 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주를 제공한다.
- [0019] 제2 측면의 백신 균주는 방어 면역을 부여하는 것으로 나타나고, 이는 연속적인 계대배양에도 불구하고 독성으로 복귀하지 않는 것으로 나타난다 (나타낸 데이터는 없음).
- [0020] 제3 측면은, 마이코플라스마 하이오뉴모니에의 적합한 출발 단리물을 화학적 돌연변이유발에 노출시키는 단계 및 연속적인 계대배양 후에도 생존력을 유지하는 돌연변이체를 선별하는 단계를 포함하는, 제1 또는 제2 측면의 백신 균주의 제조 방법을 포함한다.
- [0021] 한 실시양태에서, 돌연변이체는 온도 감수성에 기초하여 우선 선별된다.
- [0022] 제4 측면은, 제1 또는 제2 측면의 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주 (면역화 양의 백신이 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 의해 유발되는 질환에 대한 방어 면역을 유도할 수 있음) 및 담체, 임의로 면역보강제, 및 /또는 임의로 하나 이상의 추가의 감염원을 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 감염원은 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충일 수 있다.

- [0023] 제5 측면은, 면역화 양의 제4 측면의 백신 조성물을 돼지류 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 돼지류 동물에서 마이코플라스마 하이오뉴모니에 의해 유발되는 질환에 대한 방어 방법을 제공한다.
- [0024] 제6 측면은, 돼지류 동물에서 마이코플라스마 하이오뉴모니에 의해 유발되는 질환에 대한 방어를 위한 제4 측면의 백신을 제공한다.
- [0025] 제7 측면은, 제1 또는 제2 측면의 마이코플라스마 하이오뉴모니에 균주를 담체, 임의로 면역보강제, 및/또는 임의로 하나 이상의 추가의 감염원과 조합하는 단계를 포함하는, 제4 측면에 따른 백신의 제조 방법을 제공한다. 감염원은 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충일 수 있다.
- [0026] 제8 측면은, 돼지류 동물에서 마이코플라스마 하이오뉴모니에 의해 유발되는 질환 방어용 의약 제조에서의, 제1 또는 제2 측면의 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주의 용도를 제공한다.
- [0027] 제4 내지 제7 측면 중 하나의 실시양태에서, "마이코플라스마 하이오뉴모니에 의해 유발되는 질환"은 동물로 작성 폐렴 또는 돼지 마이코플라스마 폐렴이다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1: 높은 과용량으로 백신접종된 돼지에서의 ts19 백신 균주의 비강 접락화(colonisation).
- 도 2: 높은 과용량의 ts19 백신으로 백신접종된 돼지에서의, 59 DPV (백신접종 후 일수)에서의 기관 접락화.
- 도 3: 다양한 용량의 ts19 백신 균주로 백신접종된 돼지에서의 비강 접락화.
- 도 4: 연구 기간 (105일)에 걸친 차등적인 총 체중.
- 도 5: ts19에 대한 최소 방어 용량 측정.
- 도 6: 폐 병변의 중증도 감소에 기초한, ts19 및 시판 백신의 방어 지수.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] <상세한 설명>
- [0030] 마이코플라스마 하이오뉴모니에 균주 "LKR"은 원래, 도축된 표본으로부터 단리되었다 (문헌 [Lloyd and Etheridge 1981, J of Comp Path 91:77-83]을 참고함). 유기체를 실험적으로 감염된 돼지로부터 재단리시킨 후, 이를 무세포 배지에 약 10회 계대배양하여 클론을 단리시켰다 (빅토리아(Victoria)주 소재 CSIRO). 이어서, 클론을 사우스 오스트레일리아(South Australia)주 소재 애들레이드 대학(University of Adelaide) 마이코플라스마 수집회에 제출하였다. 그 다음, LKR 단리물을 멜버른 대학(University of Melbourne) 수의학과 (마이코플라스마 그룹) (여기서, LKR 단리물은 저장용으로 개질된 프리스 브로스(Friiss broth)에서 3회 시험관내 계대배양됨)에 의해 수득하였다. 저장된 바이알을 "LKR P3 29/5/97"로 명시하였다. 이 클론을 모 균주로 나타낸다.
- [0031] LKR P3 29/5/97을 시험관내에서 계대배양하고, 선행 기재 방법 (문헌 [Nonamura and Imada (1982) Avian Diseases 26:763-775]을 참고함)을 이용하여 NTG 돌연변이유발 (200 mg/mL)에 노출시켰다. 온도 감수성 클론 ("ts-19")을 한천 플레이트로부터 선별하고, 3 mL의 개질된 프리스 브로스에서 배양하였다. 상기 클론의 계대 배양 횟수를 "P0"로 명시하고, 이어서 개질된 프리스 브로스에서 1 계대 당 1:4 v/v로 희석하여 시험관내에서 4 회 더 계대배양하였다. 최종 계대배양 수준을 "LKR ts-19 P4 MS"로 명시하였다.
- [0032] LKR ts-19 P4 MS를 개질된 프리스 브로스에서 다수의 횟수로 시험관내에서 계대배양하며 희석시켜, 3.2×10^{-21} 의 희석액으로 도달시켰다. 최종 돌연변이체 클론을 "LKR ts-19 3.2 \times 10^{-21}"로 명시하였다.
- [0033] LKR ts-19 3.2 \times 10^{-21}을 동결건조시키고, 이를 수탁 번호 NM04/41259하에 오스트레일리아 국가 분석 실험실 (Australian Government Analytical Laboratories)에 제출하였다 (특히 절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약).
- [0034] 마이코플라스마는, 이들의 제한된 생합성 능력 및 이들의 숙주에 대한 기생충 유사 의존성을 반영하는 매우 감소된 계놈 크기를 갖는다. 계놈에서의 이들의 제한된 중복성을 고려할 때, 경로 중 특정 성분의 NTG 돌연변이 유발은 마이코플라스마 세포의 생존에 대해 유의한 효과를 가질 수 있다. NTG 돌연변이유발은 계놈 내에서 무

작위 돌연변이 (뉴클레오티드 전이, 전좌, 결실 또는 삽입)를 일으킨다. 이는 각각 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 변이체 계놈 집단을 생성시킬 것이다. 아마도 다수의 변이체 계놈은, 기능이상이 발생한 하나의 중요한 유전자 또는 유전자들로 인하여 생존하지 못할 것이다. 돌연변이가 유기체의 증식 능력에 유해한 영향을 미치지 않는 경우, 이러한 생존 변이 유기체는 추가의 선별과정 (예를 들어, 온도 선별과정)을 거칠 수 있다. ts19의 발생에서, 선별과정은 33°C의 온도에서 높은 역가로 변이체 균주가 증식하는 능력 및 39.5°C에서의 감소된 증식 능력에 기초한다. 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주 ts19 및 모 균주 (LKR)의 마이코플라스마 하이오뉴모니에 사이의 전체 계놈 서열 비교에 기초하여, 수많은 돌연변이 (뉴클레오티드 변화)가 ts19의 계놈에서 확인되었다. 이러한 돌연변이는 뉴클레오티드 치환 (전이 및 전좌)뿐만 아니라 결실 및 삽입을 포함하였다.

[0035]

돌연변이는 계놈 전체 주변에 위치하였고, 이에는 소정 범위의 발현된 유전자 뿐만 아니라 가설 단백질 (hypothetical protein) 및 비-코딩 서열이 포함된다. 표 1은 염기 치환, 결실 또는 삽입에 의해 돌연변이가 일어난 공지된 유전자들을 열거하고 있다. 상기 유전자들은 이들의 주요 기능에 따라 분류되었다. 당업자는, 제공된 참조 서열 (예를 들어, YP_278901.1)과 약독화 균주의 서열 사이에 차이가 존재하는지를 측정함으로써, 마이코플라스마 하이오뉴모니에 균주가 표 1에 열거된 유전자들 중 하나에 돌연변이를 함유했는지를 검출하는 방법을 쉽게 알 것이다. NM04/41259로서 기탁된 ts19는, 표 1에 열거된 모든 돌연변이를 포함하는 약독화 균주이다.

[0036]

한 실시양태에서, 약독화 균주는 표 1에 열거된 돌연변이 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34종 이상 또는 이들 모두를 포함한다. 한 실시양태에서, 약독화 균주는 표 1에 열거된, 독성 인자 중 하나 또는 이들 각각, 및/또는 탄수화물 대사에 관련된 유전자 중 하나 또는 이들 각각, 및/또는 인지질 대사에 관련된 유전자, 및/또는 보조-인자 대사에 관련된 유전자, 및/또는 전사 또는 번역에 관련된 유전자 중 하나 또는 이들 각각, 및/또는 막 수송에 관련된 유전자 중 하나 또는 이들 각각, 및/또는 DNA 복제, 복구 또는 대사에 관련된 유전자 중 하나 또는 이들 각각, 및/또는 트랜스포사아제(transposase) 유전자에 돌연변이를 포함한다.

[0037]

한 실시양태에서, 약독화 균주는 각각의 독성 인자에 돌연변이를 포함한다.

[0038]

표 1: 마이코플라스마 하이오뉴모니에 백신 균주 ts19의 유전자 내에서의 약독화 돌연변이.

독성 인자:	
추정 의부박 단백질 P95	YP_278901.1
추정 지질단백질 (MIIJ_0213)	YP_279015.1
추정 지질단백질 (MIIJ_0362)	YP_279161.1
추정 P216 표면 단백질	YP_279290.1
추정 부착 유사-단백질 P146	YP_279457.1
탄수화물 대사:	
트리오스포스페이트 아이소머라이제	YP_278904.1
트랜스케롤리아제	YP_279223.1
추정 PTS 계 N-아세틸글루코사민-黠이아제 II ABC	
성분	YP_279370.1
인지질 대사:	
CDP-디아실글리세롤-글리세롤-3-포스페이트-3-포스파티딜	
트랜스페라아제	YP_279075.1
보조-인자 대사:	
나코티네이트 포스포리보실트랜스페라아제	YP_279204.1

[0039]

<u>전사/번역:</u>	
GidA 유전자 [tRNA 우리딘 5-카르복시메틸아미노메틸 번역	
효소	YP_278808.1
50S 리보솜 단백질 L3	YP_278992.1
류실-tRNA 합성효소	YP_279441.1
이소류실 tRNA 합성효소	YP_278833.1
<u>막 수송:</u>	
추정 ABC 수송자 페미아제 단백질	YP_279164.2
추정 ABC 수송자 ATP 결합	YP_278823.1
추정 크로메이트 수송 단백질	YP_278943.1
추정 ABC 수송자 ATP 결합 및 페미아제 단백질	YP_278958.1
추정 내부막 단백질 트랜스로카제 성분 YidC	YP_279468.1
추정 ABC 수송자 페미아제 단백질 p69-유사	YP_279157.1
추정 ABC 수송자 페미아제 단백질	YP_279176.1
추정 ABC 수송자 ATP-결합-Pr1	YP_279419.1
<u>DNA 복제/복구/대사</u>	
DNA 토포아이소미라아제 I	YP_279077.1
우라실-DNA 글리코실라아제	YP_278929.1
GTP 아제 ObgE	YP_278842.1
DNA 폴리미라아제 IV	YP_278846.1
리보뉴클레오티드-디슬레이트 리اكت아제 서브유닛 알파	YP_279017.1
티미딜레이트 키나아제	YP_279053.1
DNA 폴리미라아제 IIII 서브유닛 엘파	YP_279054.1
DNA 리가아제	YP_279060.1
DNA 자이라아제 서브유닛 A	YP_279326.1
리보뉴클레아제 HII	YP_279388.1
무기 파이로포스파타아제	YP_279400.1
액시뉴클레아제 ABC 서브유닛 C	YP_278867.1
<u>트랜스포사아제</u>	
추정 ISMfp1 트랜스포사아제	YP_279110.1

YP_숫자는 NCBI 참조 서열을 나타냄

[0040]

본원에 기재된 박테리아 균주는 온도 감수성이고 약독화된 생균주이고, 생백신에 사용될 수 있다.

[0041]

약독화된 생균주는, 이들의 독성 특성을 감소시키거나 또는 "약화시키는" 조건하에서 배양된 박테리아 생균주이다. 생백신은 전형적으로, 비활성화되거나 사균화된 미생물보다 더 지속적인 면역 반응을 유발한다.

[0042]

제1 측면에 따른 백신 균주는 마이코플라스마 하이오뉴모니에 단리물의 화학적 돌연변이에 의해 생성될 수 있다. 화학적 돌연변이는 특히, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아닌(NTG)으로의 처리 (문헌 [Nonamura and Imada (1982), Avian Diseases 26; 763-775]을 참고함)에 의한 돌연변이 유발을 포함한다. 온도 감수성 돌연변이체 박테리아는, 허용 온도 (33°C)에서는 증식할 수 있고, 비-허용 온도 (39.5°C)에서는 증식할 수 없는 이들의 능력에 대해 선별될 수 있다. 백신에 사용하기 위해, 온도 감수성 돌연변이체를 연속적으로 계대배양하고 회색시킨다.

[0043]

제1 측면에 따른 마이코플라스마 박테리아 백신 균주는 생존가능하다 (또는 살아있다). 생존력은 일반적으로 "생존 능력"을 의미하고, 보다 구체적으로는 우호적인 조건하에서의 생존, 발생 또는 발아 능력을 의미하는 데 사용된다. 박테리아 세포가 적합한 브로스 또는 한천 배지에서 증식할 수 있는 경우, 이는 생존가능하다.

[0044]

LKR P3을 생성하기 위해, (개질된 프리스 브로스 중 1:4 v/v에서) 오스트레일리아 마이코플라스마 하이오뉴모니에 단리물 LKR (멜버른 대학 마이코플라스마 그룹에 의해 애들레이드 대학 마이코플라스마 수집회로부터 수득함)을 3회 (3x) 시험관내 계대배양함으로써, 부다페스트 조약하에 NM 04/41259로서 기탁된 박테리아 균주를 생성하였다. 이어서, LKR P3 단리물을 NTG 돌연변이유발에 노출시켰다. 돌연변이가 일어난 LKR P3을 33°C (허용 온도) 및 39.5°C (비-허용 온도)의 한천 상에서 증식시켰다. 33°C에서는 증식하지만 39.5°C에서는 증식하지

않는 돌연변이체 클론을 선별하였다. 선별된 클론을 수차례 시험관내에서 계대배양하고, 연속적으로 희석시켰다. 최종 계대에서, 선별된 클론 (ts19)을 동결건조된 배양액으로서 부다페스트 조약하에 국립성분검사연구소 (이후, 오스트레일리아 국가 분석 실험실로 불림)에 기탁하였다. 저장한 지 1주 후, 샘플을 재구성하였고, 생존가능함이 밝혀졌다.

- [0046] 용어 "시험관내 연속 계대배양"은 배지에서의 박테리아의 반복적인 계대배양의 실시를 지칭한다. 이는, 브로스 배지를 생박테리아 배양액으로 접종한 다음, 적절한 온도에서 약간의 시간 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다. 이어서, 인큐베이션된 배양액의 일부를 사용하여 새로운 멸균 배양액을 접종한 다음, 약간의 시간 동안 인큐베이션한다. 상기의 순환은 원하는 계대 수를 달성하기 위해 지속된다. 증식 및 재-접종의 각 단계는 단일 계대로서 지칭된다.
- [0047] 제3 측면은, 제1 측면의 박테리아 균주 및 담체 (예컨대, 마이코플라스마 하이오뉴모니에 증식 배지, 멸균수 또는 멸균 등장성 염수)를 포함하는 백신을 제공한다.
- [0048] 백신은 특정 질환에 대한 면역성을 확립하거나 향상시키는 생물학적 제제이다. 백신은 예방적 (예를 들어, 병원체에 의한 후속 감염의 효과를 예방하거나 또는 경감시킴)이거나 또는 치료학적 (예를 들어, 감염을 치료함)일 수 있다. 제2 측면의 백신은 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 의해 유발되는 질환에 대해 예방적이다.
- [0049] 적절한 담체는 당업자에게 명백할 것이고, 투여 경로에 따라 아주 크게 달라질 것이다. 백신은, 이들로 한정되지는 않지만, 혼탁화제, 안정화제 또는 분산제를 비롯한 하나 이상의 추가의 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0050] 또한, 백신에 존재할 수 있는 추가의 성분은 면역보강제, 보존제, 화학적 안정화제 또는 다른 항원성 단백질이다. 전형적으로, 안정화제, 면역보강제 및 보존제는 표적 동물에서 효능에 가장 적합한 제제를 결정할 수 있도록 최적화된다. 적합한 예시적 보존제로는 클로로부탄을 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 들 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 안정화 성분으로는, 예를 들어 카사미노산, 수크로스, 젤라틴, 페놀 레드, N-Z 아민, 모노칼륨 디포스페이트, 락토스, 락트알부민 가수분해물 및 건조유를 들 수 있다. 통상의 면역보강제는 백혈구를 끌어들이거나 또는 면역 반응을 향상시키기 위해 사용된다. 이러한 면역보강제로는, 다른 것들 중에서, MPL.TM. (3-0-데아실화 모노포스포릴지질 A; 몬타나주 해밀턴 소재 RIBI 이뮤노켐 리서치, 인크.(RIBI ImmunoChem Research, Inc.)), 미네랄 오일 및 물, 알루미늄 히드록시드, 암피겐(Amphigen), 아브리딘(Avridine), L121/스쿠알렌, D-락티드-폴리락티드/글리코시드, 플루로닉 폴라이오이스(pluronic ployois), 무라밀 디펩티드, 사멸된 보르데텔라(Bordetella), 사포닌, 예컨대 퀄(Quil) A 또는 스티뮬론(Stimulon).TM. QS-21 (미국 메사추세츠주 프레이밍햄 소재 아퀼라 바이오파마슈티컬즈, 인크.(Aquila Biopharmaceuticals, Inc.)) 및 콜레라 독소 (야생형 또는 돌연변이체 형태 (여기서, 예를 들어 국제 특허 출원 제PCT/US99/22520호에 따르면, 아미노산 위치 29에서 글루탐산은 또다른 아미노산, 바람직하게는 히스티딘에 의해 대체됨))를 들 수 있다.
- [0051] 한 실시양태에서, 백신이 주사되는 경우, 주사 부위에서의 유해하거나 바람직하지 않은 반응, 예를 들어 피부자극, 부기, 발진, 괴사, 피부 민감화는 거의 일어나지 않거나 또는 전혀 일어나지 않는다.
- [0052] 제4 측면의 본 발명은, 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 의해 유발되는 질환에 대한 방어에 관련된다. 제3 측면의 백신은 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 의해 유발되는 질환에 대해 예방적이다.
- [0053] 본원에 지칭된 "예방" 또는 "예방적" 또는 "방지적" 요법, 또는 "방어적"은, 감염의 발생을 방지하거나, 또는 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 의해 유발되는 질환의 발생 또는 중증도를 저해하거나, 방어하거나 또는 보호하는 것 (특정 질환에 걸린 것으로 진단받은 것은 아니지만 질환에 걸릴 수 있는 대상체에서 질환을 예방하거나, 보호하거나, 또는 질환의 증상의 중증도 또는 특징을 줄이는 것을 포함함)을 포함한다. 또한, 이는 감염 기간 또는 증상의 빈도의 감소, 및 임의의 병변의 크기의 감소를 포함한다.
- [0054] 본원에 사용된 "예방"은 질환의 총체적인 방지, 또는 질환의 정도 또는 증상의 감소를 포괄한다. 또한, 이는 마이코플라스마 하이오뉴모니에의 전염의 감소 또는 억제, 또는 숙주에서의 박테리아 편입의 방지, 또는 다른 마이코플라스마 하이오뉴모니에 균주 또는 다른 감염원에 의한 2차 감염에 대한 방어를 지칭한다.
- [0055] 제3 측면의 백신은, 예를 들어 액제, 산제, 에어로졸, 정제, 캡슐, 장용 코팅 정제 또는 캡슐, 또는 좌제의 형태로 돼지에게 투여하도록 제조될 수 있다. 투여 경로에는 비경구 투여, 복막내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장 투여, 질 투여 등이 제한 없이 포함된다.

- [0056] 바람직한 실시양태에서, 백신은 예를 들어, 비강내 투여, 에어로졸 투여, 또는 입 또는 코에 의한 흡입 투여에 의한 기도 투여용으로 제제화된다. 이러한 투여 경로는, 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 대한 방어 면역의 성질이, 질환 방지에 있어서 항체를 순환시키기보다는 국소적 (폐) 면역 및 세포-매개 면역일 수 있기 때문에 바람직하다. 백신을 기도에 노출시키는 것은 국소 면역 반응을 자극시킬 수 있다. 따라서, 백신의 국소 투여가 보다 효과적일 수 있다. 게다가, 백신을 밀폐된 반(barn) 또는 공간으로 투여 (코스 스프레이 매스(coarse spray mass) 투여)하여 돼지가 이를 흡입하도록 함으로써, 상당수 동물의 백신접종과 관련된 노동력이 감소된다. 에어로졸 백신접종 (또는 분사 백신접종)은 현재, 특정 질환에 대해 가금류를 효과적으로 백신접종시키는 데 상업적으로 사용되고 있고, 이것이 돼지 백신접종에 적합하다는 것을 하기 실시예에 나타냈다.
- [0057] 비강내 투여는 비강 또는 코를 통한 모든 투여를 포함한다. 백신은 액제, 혼탁액제 또는 건조 산제로서 비강에 적용될 수 있다. 액제 및 혼탁액제는 예를 들어, 피펫, 드로퍼(dropper) 또는 스프레이, 임의로 에어로졸 스프레이를 사용하여 비강내 투여될 수 있다. 건조 산제는 흡입에 의해 비강내 투여될 수 있다.
- [0058] 에어로졸 투여는, 고체 미립자의 혼탁액 또는 기체 중의 액체 액적으로서의 백신 투여를 지칭한다.
- [0059] 흡입 (흡기로도 공지되어 있음)은 기도를 통한, 그리고 폐내 폐포로의 외부 환경으로부터의 공기의 움직임이다.
- [0060] 치료적으로 이용되는 백신의 유효 용량은, 예를 들어 치료 목적, 투여 경로 및 돼지의 상태에 따라 달라질 것이다.
- [0061] 백신에 대한 투여량 수준은 보통, 용량의 1 mL 당 약 10^4 내지 10^8 색 변화 단위 (CCU), 및 바람직하게는 용량의 1 mL 당 약 10^5 내지 10^7 CCU 정도일 것이다.
- [0062] 그러나, 임의의 특정 돼지류 동물에 대한 구체적인 용량 수준은 사용되는 특정 화합물의 활성도, 연령, 체중, 일반 건강, 성별, 식이, 투여 시간 및 투여 경로를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라질 것이라는 것을 이해할 것이다.
- [0063] 효과적인 용량의 선택 및 상위 또는 하위 조정은 당업계의 기술 범위 내에서 이루어진다.
- [0064] 바람직한 실시양태에서, 백신은 에어로졸에 의해 또는 흡입에 의해 비강내 투여된다.
- [0065] 용어 "돼지" 및 "돼지류"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 이들은 새끼 돼지, 암퇘지, 어린 암퇘지, 거세 돼지(barrow), 수퇘지 및 맷돼지과의 구성원을 지칭한다.
- [0066] 본 명세서 전체적으로, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다" 또는 변형어, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 언급된 요소 또는 정수, 또는 요소들 또는 정수들의 군의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 요소 또는 정수, 또는 요소들 또는 정수들의 군의 배제를 의미하는 것은 아니라는 것을 이해할 것이다.
- [0067] 또한, 본 명세서에서 사용시, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 분명하게 달리 명시되지 않는 한, 복수형의 측면을 포함함을 주목해야 한다.
- [0068] 본 발명이 명료함과 이해의 목적으로 다소 상세히 기술되었지만, 본 명세서에 개시된 발명 개념의 범주를 벗어나지 않으면서, 본원에 기재된 실시양태 및 방법에 대해 다양한 변형 및 변화가 만들어질 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0069] 본 발명은 이제 하기 실시예를 언급함으로써 추가로 상세히 기술된다. 실시예는 오직 예시의 목적으로만 제공되고, 달리 명시되지 않는 한 제한적인 것으로서 간주되어서는 안된다. 따라서, 본 발명은 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해진 임의의 그리고 모든 변형을 포함한다.
- [0070] **실시예 1: 백신 균주의 제조**
- [0071] 오스트레일리아 마이코플라스마 하이오뉴모니에 단리물 LKR은, 전형적인 동물토착성 폐렴 질환을 나타내는 돼지 폐의 도축된 표본이다 (문헌 [Lloyd and Etheridge (1981), J. Comp. Path. 91:77-83]을 참고함). 상기 단리물을 사우스 오스트레일리아주 소재 애들레이드 대학의 마이코플라스마 참조 배양액 수집회에서 배양하고 저장하였다. 이어서, 빅토리아주 소재 멜버른 대학의 마이코플라스마 그룹에 의해 상기 단리물의 배양액을 수득하였다.
- [0072] 배양액을 3회 시험관내 계대배양한 후, 선행 기재 방법 ([문헌 Nonamura and Imada (1982) Avian Diseases 26:763-775]을 참고함)을 이용하여 200 mg/mL로 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘 (NTG)을 사용함으로써 돌

연변이유발에 노출시켰다. 요컨대, 마이코플라스마 하이오뉴모니에 균주 LKR의 배양물을 후기 로그기까지 증식시키고, 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 세포를 포스페이트 완충 염수 (PBS)에서 세척하고, NTG에 노출시켰다. 세포를 펠렛화하고, 개질된 프리스(Friis) 배지 (Friis, N.F. 1975)에 재현탁시키고, 33°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 배양액을 0.45 μm 필터를 통해 통과시키고, 적절하게 희석시키고, 분취액을 한천 플레이트 상에 두고, 33°C에서 인큐베이션하였다. 증식한 접락을 3 mL의 브로스 내로 클론화하고, 33°C에서 인큐베이션하였다. 클론의 앰플을 -70°C에서 저장하고, 각 클론의 온도 감수성을 측정하였다.

[0073] 33°C 및 39.5°C에서 2배수로 적정 및 인큐베이션을 수행함으로써 ts19의 온도 감수성을 측정하였다. 역가는 전형적으로 33°C에서 $>1 \times 10^8$ CCU/mL이고, 39.5°C에서 $<1 \times 10^2$ CCU/mL이다.

[0074] ts19 균주는 부다페스트 조약하에 NM 04/41259로서 기탁되었다.

[0075] ts19 균주 및 LKR 균주를 표준 기법을 이용하여 서열분석하여, 약독화된 균주가 유전자적으로 특징화되도록 하였다. ts19 균주는 그의 마스터 균주와 비교하여 수많은 유전자 돌연변이를 함유하는 것으로 밝혀졌고, 이러한 돌연변이를 함유하는 유전자들은 표 1에서 확인된다.

0076] 실시예 2: 백신 제조

[0077] 백신을 제조하기 위해, ts19의 배양액을, 페놀 레드 (pH 지시자)를 함유하는 개질된 프리스 배지에서 산의 색 변화가 관찰될 때까지 33°C에서 증식시켰다. 96 웰 마이크로타이터 플레이트를 사용하여, 개질된 프리스 배지에서 백신을 적정하였다. 마이크로타이터 플레이트의 12개 컬럼 중 처음 10개를 가로질러 연속적으로 10배 희석시켰다. 마지막 두 레인은 접종되지 않은 채로 남아있고, 오직 배지만 있는 (음성) 대조군으로서의 역할을 한다. 각각의 적정 시, 6개 이하의 마이크로타이터 플레이트를 사용하였다.

[0078] 3주까지의 인큐베이션 후, 플레이트를 색 변화에 대해 점수화하고, 최적화수법 (MPN)을 이용하여 평균 역가를 측정하였다. 최종 평균 역가는 1 mL 당 색 변화 단위 (CCU)로 나타낸다.

[0079] ts19 백신 배양액을 -70°C 내지 -80°C에서 "습윤 냉동된" 형태로서 지속적으로 장기간 저장하였다. 별법으로, ts19 백신 배양액을 동결건조 (냉동 건조)시키고, -20°C에서 지속적으로 장기간 저장하였다.

0080] 실시예 3: 백신 안전성 및 접락화 연구

[0081] ts19 백신 균주의 안전성 프로파일을 평가하기 위하여 연구를 수행하였다. 연구 설계는 마이코플라스마가 없는 돼지 무리로부터 얻은 6주령 돼지의 사용을 수반하였다. CSIRO (연방 혈청 산업 조사 위원회(Commonwealth Serum Industry Research Organisation); 오스트레일리아 빅토리아주 워리비(Werribee, Victoria, Australia) 소재)에서 PC2 생물보안 수준하에서 연구를 수행하였다. 총 20마리의 돼지를, 각각 10마리 돼지의 2개 군에 무작위로 배치하였다 (표 2를 참고함).

[0082] 표 2: ts19 백신 균주에 대한 안전성 연구.

군	목적	시험 제 1 일에 마이코플라스마 하이오뉴모니에 배지로 처리한 돼지 수	시험 제 1 일에 ts-19로 백신접종 (CCU/용량)한 돼지 수	군 당 총 돼지 수
1	상(Sham)- 백신접종됨 (음성 대조군)	10	---	10
2	안전성 (높은 과용량)	---	10	10
총 수				20

[0083]

[0084] 백신을 비강내 경로를 통해 전달함으로써 백신의 점막 노출에 대한 안전성만을 시험하였다. 제1 군 (백신접종되지 않은 대조군) 및 제2 군 (높은 과용량으로 백신접종된 돼지)을 임상적 관찰을 위해 59일 동안 유치하였다 (표 2).

[0085]

상기의 안전성 연구에서 모든 돼지를 직장 체온에 대하여, 백신접종 1일 전부터 시작하여 백신접종 후 4일까지

매일 2회 모니터링하였다. 또한, 모든 돼지를 기침, 재채기, 호흡곤란증 및 빈호흡증을 비롯한 호흡성 징후에 대해 모니터링하였다. 모든 돼지를 미시적 및 거시적 폐 병변에 대해 평가하였다. 거시적 폐 병변을 문헌 [Hannan et al, 1982]의 방법을 이용하여 점수화하였다. 또한, PCR 분석의 목적으로, 비강, 폐 및 기도로부터 면봉으로 샘플을 채취하였다.

[0086] 또한, PCR 기법을 이용하여, 백신접종 3주 후 각각의 군으로부터의 돼지의 비강내에 마이코플라스마 하이오뉴모니에가 존재하는지를 시험하였다. 마지막으로, 연구 기간에 걸쳐 돼지의 체중 증가에 대해 모니터링하였다.

[0087] 결과는, 모든 돼지에서 아무런 임상적 징후가 관찰되지 않았음을 나타냈다. 백신접종된 군과 백신접종되지 않은 대조군 사이에 감지된 유의한 온도 증가가 없었다. 게다가, 백신접종된 군과 백신접종되지 않은 대조군 사이에 유의한 체중 증가 차이도 나타나지 않았다. 검시에서, 높은 과용량 군으로부터의 10마리 중 2마리 돼지는 각각, 동물토착성 폐렴의 전형인 작은 거시적 병변을 가졌다. 폐 조직의 미시적 분석에 의한 추가의 병변은 관찰되지 않았다. 전반적으로, 온도 감수성 백신 군주 ts19는 높은 과용량에서도 안전한 것으로 나타났다.

[0088] PCR 분석 (마이코플라스마 하이오뉴모니에에 대해 특이적인 프라이머를 사용함)은, 백신접종 후 3주 및 8주에 백신접종된 돼지의 비강내에 마이코플라스마 하이오뉴모니에가 존재함을 나타냈다 (도 1을 참고함). 또한, PCR 분석을 이용한 마이코플라스마 하이오뉴모니에 접락화 연구는, 마이코플라스마 하이오뉴모니에가 기도 (상부, 중부 또는 저부 영역 중 하나)에 존재하고, 백신접종된 돼지의 기도에 전체적으로 60% 이상 존재함을 나타냈다 (도 2를 참고함). 이러한 결과는 비강 및 기도에서의 ts19 백신 군주의 접락화를 나타낸다.

[0089] 실시예 4: 백신 효능 연구 시험 모델 - 방어성을 나타냄

[0090] ts19 백신 군주의 효능을 평가하기 위하여 연구를 수행하였다. 연구 설계는 마이코플라스마가 없는 돼지 무리로부터 얻은 6주령 돼지의 사용을 수반하였다. CSIRO (연방 혈청 산업 조사 위원회 (오스트레일리아 빅토리아 주 위리비 소재))에서 PC2 생물보안 수준하에서 연구를 수행하였다. 총 56마리의 돼지를, 각각의 백신접종된 군에 대해 12마리 돼지의 3개의 군으로 그리고 각각의 대조군에 대해 10마리 돼지를 무작위로 배치하였다 (표 3을 참조함).

[0091] 표 3: ts19 백신에 대한 효능 연구

군	목적	시험 제 1 일에 마이코플라스마 하이오뉴모니에 돼지로 처리한 돼지 수	시험 제 1 일에 ts-19를 이용한 백신접종 (ODU/용량)	시험 제 22 일에 오스트레일리아 지역 단리풀로 시험한 돼지 수	군 당 총 돼지 수
1	삼 백신접종됨 (음성 대조군)	10	----	---	10
2	효능	----	10^6	12	12
3	효능	----	10^7	12	12
4	효능	----	10^8	12	12
5	백신접종되지 않음 (양성 대조군)	----	----	10	10
총 수					56

[0092] [0093] 백신을 비강내 경로를 통해 전달함으로써 백신의 점막 노출에 대한 효능만을 시험하였다. 백신접종되지 않은 비-항원투여 음성 군을 제외한 모든 군을, 백신접종 후 22일에, 마이코플라스마 하이오뉴모니에의 오스트레일리아 지역 단리풀의 비강내 투여에 의해 항원을 투여하였다. 3일간 (백신접종 후 57일, 58일 및 59일)에 걸쳐 사후 검사를 수행하였다. 연구 내내, 모든 군을 기침, 재채기, 호흡곤란증 및 빈호흡증을 비롯한 임상적 징후에 대해 매일 모니터링하였다. 연구 시작 및 종료 시, 체중을 측정하였다.

[0094] 백신접종 후 22일에 (그리고 항원투여에 앞서), PCR 분석을 위해 비강에서 면봉으로 표본을 채취하여, 각각의 군으로부터 마이코플라스마 하이오뉴모니에가 존재하는지를 측정하였다.

[0095] 결과는, 시험된 모든 군에서 아무런 임상적 징후 및 유의한 체중 증가 차이도 관찰되지 않았음을 나타냈다. 비

강 표본 분석은, 백신접종 후 22일에, 항원투여 전 백신접종된 돼지의 60 대지 70%에서 마이코플라스마 하이오뉴모니에가 존재함을 나타냈다 (도 3을 참고함). 모든 삼(sham)-백신접종된 돼지 대조군은 PCR 분석에 의하여 마이코플라스마 하이오뉴모니에에 대해 음성이었다. 검시에서, 거시적 병변 분석 (문현 [Hannan et al., 1982]를 참고함)은, 삼-백신접종된 대조군뿐만 아니라 10^6 및 10^7 CCU/mL/용량으로 백신접종된 군에서 병변이 존재하지 않음을 나타냈다. 10^8 CCU/mL/용량으로 백신접종된 10마리 돼지 중 1마리가 작은 거시적 병변의 존재를 나타냈다. 그러나, 백신접종되지 않았지만 항원투여된 10마리 돼지 중 4마리가 기침 및 재채기의 임상적 징후를 나타냈다. 검시에서, 상기 4마리 돼지로부터의 폐 조사는, 마이코플라스마 하이오뉴모니에 감염의 전형인 거시적 폐 병변을 나타냈다.

[0096] 전반적으로, 온도 감수성 백신 군주 ts19는 마이코플라스마 하이오뉴모니에 감염 방어에 효과적인 것으로 나타났다.

[0097] **실시예 5: 상이한 용량에서의 백신 효능 및 시판 사균 백신과의 비교.**

[0098] 4개의 상이한 용량에서의 ts19 백신 군주의 효능을 평가하기 위하여 연구를 수행하였다. 연구 설계는 3 대지 4 주령 spf 돼지의 사용을 수반하였다. 국립동물진단보호센터(Centro de Nacional de Servicios de Diagnostico en Salud Animal (CENASA) - 멕시코 테카막 소재 정부 시험 시설의 PC2 시설)에서 연구를 수행하였다. 총 70 마리의 돼지를 각각 10마리의 돼지를 함유하는 7개의 군에 무작위로 배치하였다 (표 4를 참조함).

표 4: 최소 방어 용량 및 효능 비교 연구

군	목적	백신 용량 ccu/mL/용량	백신접종된 돼지 수	항원투여된 돼지 수	군 당 총 돼지 수
1	삼 대조군	NA	0	0	10
2	ts19 ^a	$10^{3.0}$	10	10	10
3	ts19 ^a	$10^{4.0}$	10	10	10
4	ts19 ^a	$10^{5.0}$	10	10	10
5	ts19 ^a	$10^{6.0}$	10	10	10
6	시판 백신 (비활성화) ^b	2 mL	10	10	10
7	양성 대조군	NA	0	10	10
총 수	NA	NA	50	60	70

^a 백신이 비강내 분사에 의해 전달됨

^b 백신이 근육내 투여에 의해 전달됨

[0100] [0101] 4개의 상이한 용량의 ts19 백신 (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CCU/mL)을 비강내 경로에 의해 4개의 별개의 돼지 군으로 전달하였다. 제5 군은, 근육내 경로에 의해 전달된 2 mL의 비활성화 시판 백신을 투여받았다. 또한, 양성 대조군 (백신접종되지 않았지만 항원투여됨) 및 음성 대조군 (백신접종되지 않고 항원투여되지 않음)이 이 연구에 포함되었다. 음성 대조군을 제외한 모든 군을 두 시점에서 항원투여하였다. 제1 항원투여는, 백신접종 후 22 일에, 마이코플라스마 하이오뉴모니에의 US 단리물 (아이오아 군주(IOWA Strain) 194)을 사용한 비강내 투여에 의해 수행하였다. 제2 항원투여는, 백신접종 후 84일에, 동일한 항원투여 군주를 사용하여 수행하였다. 연구 내내, 모든 군을 기침, 재채기, 호흡곤란증 및 빈호흡증을 비롯한 임상적 징후에 대해 매일 모니터링하였다. 연구 시작 및 종료 시, 체중을 측정하였다.

[0102] 결과는, 105일의 전체 시험 기간에 걸쳐 아무런 임상적 징후를 나타내지 않았다. 양성 대조군과 백신접종된 각각의 군 사이의 체중 측정 변화량의 분석을 통해, 10^5 및 10^6 CCU/mL 용량의 ts19가 양성 대조군과 비교하여 유의한 체중 증가를 나타내는 것으로 나타났다 (도 4를 참고함). 시판 백신으로 백신접종된 군은 양성 대조군과 비교 시, 어떠한 유의한 체중 증가 차이도 나타내지 않았다 (도 4, 표 5를 참고함). 검시에서, 각각의 군에 대하여 거시적 병변 분석을 수행하였다. 최소 방어 용량의 측정을 위한 기준은, 폐 병변의 중증도 감소에 대한 $\geq 70\%$ 의 방어 지수를 기초로 하였다. ts19에 대한 최소 방어 용량은 10^4 CCU/mL로 측정되었다 (상기 용량에서, 폐 병변의 중증도 감소에 대하여 70%의 방어 지수가 달성되기 때문임) (도 5를 참고함). 또한, 더 높은 용량의

ts19 (10^5 및 10^6 CCU/mL)를 시험하였고, 각각 폐 병변의 중증도 감소에 대하여 83% 및 88%의 PI를 제공하는 것으로 밝혀졌다 (도 6을 참고함). 비활성화 시판 백신은 겨우 37%의 PI (사용된 ts19의 최저 용량 (60%의 PI에 도달한 10^3 CCU/mL)의 PI에 비해 훨씬 낮음)에 도달하였다.

[0103] 표 5. DPV-104/105에, 양성 대조군과 비교한, 백신접종된 군의 평균 체중 증가 변화량의 분석

군	처치	양성 대조군과 비교한 변화량 (P)의 분석
1	음성 대조군	0.001
2	ts19 $10^{3.0}$	0.394
3	ts19 $10^{4.0}$	0.175
4	ts19 $10^{5.0}$	0.033
5	ts19 $10^{6.0}$	0.004
6	시판 백신	0.315
7	양성 대조군	NA

ts19 용량 (ccu/mL). 유의한 차이가 없음 ($P>0.05$), 유의한 차이가

있음 ($P<0.05$).

[0104]

수탁번호

[0105]

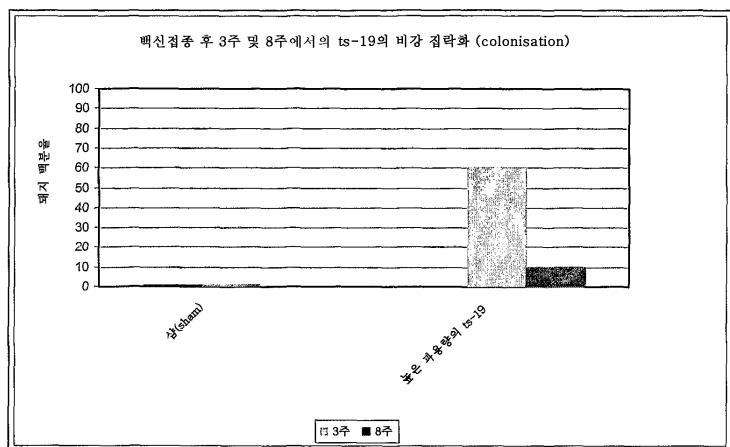
기탁기관명 : 오스트레일리아 국가 분석 실험실(Australian Government Analytical Laboratories)

수탁번호 : NM04/41259

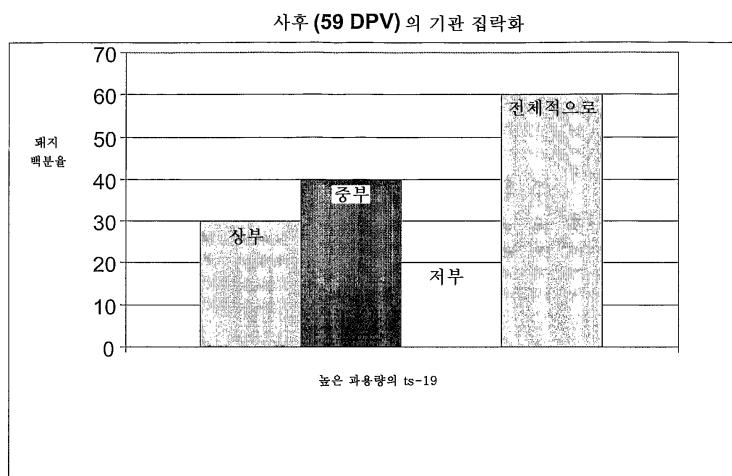
수탁일자 : 20040513

도면

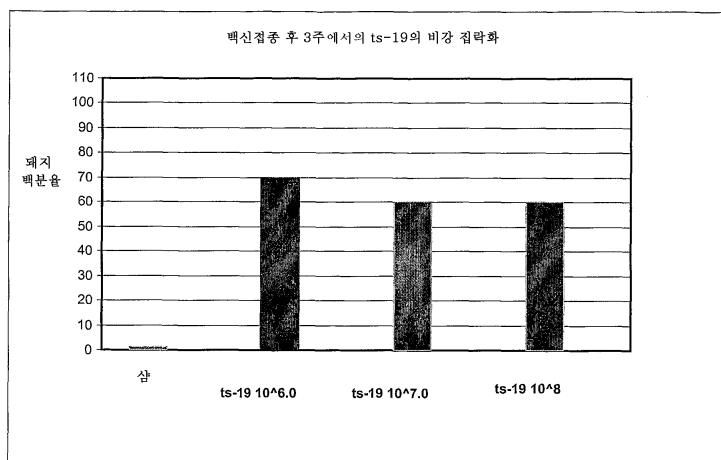
도면1



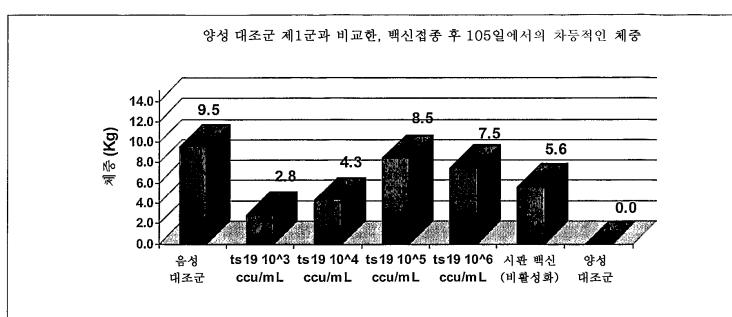
도면2



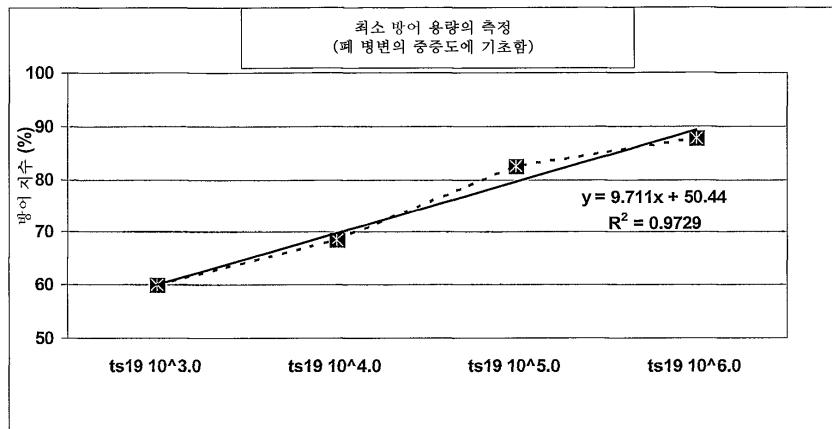
도면3



도면4



도면5



도면6

