



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0105965
(43) 공개일자 2007년10월31일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01)
 <i>C12Q 1/70</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2007-7009110
 (22) 출원일자 2007년04월20일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2007년04월20일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2005/033760
 국제출원일자 2005년09월21일
 (87) 국제공개번호 WO 2006/034319
 국제공개일자 2006년03월30일</p> <p>(30) 우선권주장
 11/022,262 2004년12월23일 미국(US)
 60/611,824 2004년09월21일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 베링거인겔하임베트메디카인코퍼레이티드
 미국 미주리 64506 세인트조세프 노스 벨트 하이웨이 2621</p> <p>(72) 발명자
 루프 마이클
 미국 아이오와주 50016 에임즈 투펠로 서클 3222
 보혼 에릭
 미국 아이오와주 50014-7067 에임즈 애쉬 애비뉴 509
 존슨 웨슬리
 미국 아이오와주 50010 에임즈 25번 스트리트 1210</p> <p>(74) 대리인
 이범래, 장훈</p> |
|---|--|

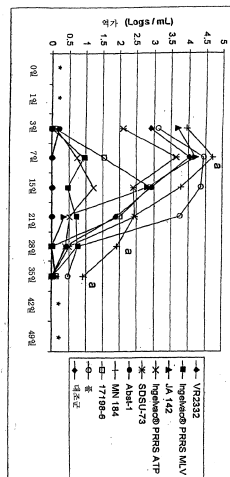
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 돼지 생식기 호흡기 증후군 분리물 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 신규하거나 특성이 밝혀지지 않은 PRRS 바이러스 분리물의 바이러스 독성을 예측하는 방법을 제공하는 것이고, 여기서, 분리물은 돼지에 주사되고 약 3일 내지 15일 기간동안 복제되도록 방지한다. 당해 기간동안에, 바이러스 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도를 측정하고 당해 데이터는 신규하거나 특성이 밝혀지지 않은 분리물의 바이러스 독성의 척도로서, 공지된 바이러스 독성을 갖는 PRRS 바이러스 분리물의 상응하는 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도와 비교한다. 추가로, 본 발명은 예측된 바이러스 독성을 기초로 면역원성 조성물중에 함유되는 분리물을 선별하는 방법 및 바이러스 독성으로 예측된 약독화된 형태의 바이러스가 혼입된 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

돼지 생식기 호흡기 증후군(PRRS) 바이러스 분리물의 특정양을 PRRS 비감염 돼지에게 투여하는 단계, 약 3 내지 15일 기간 동안 당해 돼지에서 바이러스가 복제되도록 방지하는 단계, 당해 기간 동안에 바이러스 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도를 측정하는 단계 및 증식 속도 또는 바이러스 혈증 정도를, 미지의 바이러스 독성을 갖는 PRRS 분리물의 바이러스 독성 예측 척도로서, 공지된 바이러스 독성을 갖는 PRRS 바이러스 분리물의 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도와 비교하는 단계를 포함하는, 미지의 바이러스 독성을 갖는 PRRS 바이러스 분리물의 바이러스 독성을 예측하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 기간이 약 3일 내지 7일인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 기간동안에 바이러스 혈증 정도를 측정하는 단계 및 당해 바이러스 혈증 정도를 공지된 PRRS 바이러스 분리물의 바이러스 혈증 정도와 비교하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 투여되는 바이러스의 양이 동물이 천연에서 노출되는 양과 유사한 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, PRRS 바이러스가 경구, 비내, 근육내, 림프절내, 피내, 복강내, 피하내 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법에 의해 투여되는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 증식 속도 또는 바이러스 혈증 정도가 당해 돼지 기원의 생물학적 샘플에서 측정되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 바이러스 혈증이 Log_{10} TCID₅₀/ml, 역전사효소-폴리머라제 연쇄 반응, PRRS 특이적 ELISA, PRRS 단백질-특이적 ELISA 및 이의 조합에 의해 측정되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, PRRS 분리물의 투여 후 PRRS 감염의 임상적 징후에 대해 돼지를 관찰하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 임상적 징후가 호흡기 징후, 행동, 기침 및 이의 조합을 포함하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 증식 속도 또는 바이러스 혈증 정도가 바이러스 독성이 높은 분리물의 독성과 유사한 경우 PRRS 분리물의 바이러스 독성이 높다는 것을 예측하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 증식 속도 또는 바이러스 혈증 정도가 바이러스 독성이 낮은 분리물의 독성과 유사한 경우 PRRS 분리물의 바이러스 독성이 낮다는 것을 예측하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 투여되는 PRRS 바이러스의 양이, 5.0Log_{10} TCID₅₀/ml 이하의 바이러스 농도를 갖는 약 5ml 이하

의 접종물인 방법.

청구항 13

제1항에 따른 방법에 의해 바이러스 독성으로 예측되는 약독화된 형태의 PRRS 바이러스 및 Abst-1으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 약독화된 PRRS 바이러스 분리물 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 약독화된 분리물이 Abst-1인 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 제1항에 따른 방법에 의해 바이러스 독성으로 예측되는 PRRS 바이러스가 ATCC VR-2332, ATCC PTA-6504, ATCC PTA-6319, ATCC PTA-6321 및 ATCC PTA-6322로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 16

- a) 미지의 바이러스 독성을 갖는 PRRS 분리물을 수득하는 단계;
- b) 특정 양의 PRRS 바이러스 분리물을 PRRS 비감염 돼지에게 투여하는 단계;
- c) 당해 분리물이 약 3 내지 15일의 기간동안 돼지에서 복제되도록 방치하는 단계;
- d) 당해 기간동안에 바이러스 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도를 측정하는 단계;
- e) 증식 속도 또는 바이러스 혈증 정도를 공지된 바이러스 독성을 갖는 PRRS 바이러스 분리물의 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도와 비교하는 단계 및
- f) 공지된 바이러스 독성을 갖는 분리물과 비교하여 증식 속도 및/또는 이의 바이러스 혈증 정도를 기초로 하여 약독화와 면역원성 조성물중으로의 포함을 위해 분리물을 선별하는 단계를 포함하는, 약독화시키고 면역원성 조성물중에 함유시키기 위해 PRRS 바이러스 분리물을 선별하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 단계(f)가 바이러스 독성이 높은 분리물과 유사한 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도를 갖는 분리물을 선별하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 선별된 바이러스를 약독화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 바이러스가, 세포 배양에서 반복적인 연속 계대, 유전자 삽입, 유전자 스위칭, 유전자 결실, 염기쌍 치환 및 온도 민감성 돌연변이로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법에 의해 약독화되는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 선별된 바이러스를 면역원성 조성물중에 혼입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

명세서

<1> 관련 출원

<2> 본원은 2004년 9월 21일자로 출원된 가출원 번호 제60/611,824호의 우선권을 청구하는, 2004년 12월 23일자로 출원된 특허원 제11/022,262호의 부분 계속 출원이다. 이들 우선권의 교시 및 내용은 본원에 참조로서 인용된다.

기술분야

<3> 본 발명은 신규 분리된 야생형 PRRS 바이러스 분리물 및 상응하게 개선된 약독화 PRRS 바이러스, 당해 약독화

바이러스의 백신 및 면역학적 조성물에서의 용도 및 당해 분리물 및 바이러스에서 바이러스 혈증 정도, 증식 속도, 항체 반응 및 이의 조합적 상태를 측정하는 방법에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 신규하거나 이전에 특성화되지 않은 PRRS 분리물의 바이러스 독성을 예측하고 약독화시키는 방법 및 백신 및 면역학적 조성물에서의 당해 분리물의 용도를 제공한다.

<4>

배경 기술

<5> 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)는 아테리비리데(Arteriviridae) 과에서 분류되는, 외피를 갖는 단일쇄 RNA 바이러스이다[문헌참조: Cavanaugh, 1997]. 이는 돼지의 전염병을 유발하고 처음에는 1987년 미국에서 "미스터리 돼지 질환"으로서 보고되었다[문헌참조: Hill, 1990]. 당해 질환은 모든 나이 계층의 돼지에서 호흡병으로서 발병하여 몇몇 어린 돼지를 죽이고 육종 나이의 암컷에 심각한 생식 문제를 유발한다.

<6> PRRSV의 동적 특성은 질환에서 지속적인 변화를 유도하고 신규 분리물이 출현할 높은 가능성을 제공한다(문헌참조: Andreyev et al., 1997; Murtaugh et al. 1998; Meng, 2000). PRRSV는 너무 빠르게 변화한다는 사실때문에 양돈업자에게 큰 문제점을 일으키는 능력과 맞물려서 연구[문헌참조: Mengeling et al., 1998; Pejsak et al., 1997] 및 백신 개발 및 감염 효과를 감소시키는 기타 방법을 위한 중요한 대상이 되었다. 분리물의 바이러스 독성 수준의 다양성이 죽은 돼지의 폐 병변에서 입증되었지만(문헌참조: Halbur et al., 1996) 생물학적 및 면역학적 차이를 특정 유전자 차이로 연계시키기 위한 노력이 거의 성공적이지 못하였다[문헌참조: Albina et al., 1998; Key et al., 2001; Yuan et al., 2001; Murtaugh et al., 2002; Grebennikova et al., 2004]. PRRS 백신의 안전성 및 효능을 조사하는 연구는 라바르크(Labarque) 등(2003), 멩겔링(Mengeling) 등 (2003a) 및 노델리지크(Nodelijik) 등 (2001)의 연구를 포함한다. 이들 연구는 환경적 조건하에, 변형된 생존 PRRS 백신이 바이러스 혈증의 정도 및 지속시간 뿐만 아니라 독성 바이러스 투여 후 발열 및 폐 병변을 감소시킴을 보여준다.

<7> 오프리썩(Opriessing) 등(2002)은 개방 판독 프레임 5(ORF5)에서 아미노산 서열 상동성이 높은 분리물이 돼지에서 상당히 상이한 수준의 폐렴을 유발함을 보여주었다. 또한 PRRSV에 대한 돼지 반응의 다양성은 숙주 다양성에 의해 영향받는다[멩겔링 등, 2003b]. 바이러스 독성은 돼지에서 PRRSV의 복제율 및 분포(Haynes et al., 1997), 대식세포 구리 제거 능력(Thanawongnuwech et al., 1998) 및 숙주 동물의 빈혈 수준(Halbur et al., 2002)과 관련하여 조사되었다. 그러나, 이들 방법은, 신규하거나 이전에 규명되지 못한 PRRS 분리물의 바이러스 독성을 예측하는 효과적인 방법을 제공하는데는 역부족이었다.

<8> 따라서, 당업계에 요구되는 것은 PRRS 분리물의 바이러스 독성을 예측하는 방법이다. 당업계에 추가로 요구되는 것은 분리물을 이전에 PRRS 비감염 돼지에게 투여하거나 노출시킨 후 돼지에서 생체내 PRRS 바이러스 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도를 기초로 PRRS 분리물의 바이러스 독성을 예측하는 방법이다.

<9> 발명의 요약

<10> 본 발명은 상기 명시된 문제점을 해결하고 신규 분리된 야생형 PRRS 바이러스 분리물, 당해 바이러스의 약독화된 버전 및 약제학적 조성물중에 약독화된 PRRS 바이러스를 포함하는 상응하는 백신을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 야생형 바이러스는 SDSU 73, 17198-6 및 MN 184, 및 이의 혼합물로 명시된다. 약독화된 버전의 당해 바이러스 분리물 및 당해 약독화된 분리물을 포함하는 완전한 백신은 돼지내에서 PRRS에 대한 생체내 면역을 부여할 수 있고 PRRSV의 상당한 임상적 징후를 나타내지 않는다.

<11> 본 발명의 약독화된 PRRS 분리물의 또 다른 특징은 이들이 야생형 비약독화된 바이러스에서 발견되는 상당 부분의 바이러스 혈증을 나타낸다는 것이다. 따라서, 약독화된 바이러스는 야생형의 비약독화된 바이러스에 의해 나타나는 바이러스 혈증의 약 50% 이상, 보다 바람직하게는 약 75% 이상을 나타낸다. 이러한 방식으로, 약독화된 바이러스는 돼지에 보다 신속하고 완전한 PRRS 면역성을 부여할 수 있다.

<12> 야생형 바이러스는 세포 배양에서 반복적인 연속 계대, 유전자 삽입, 유전자 스위칭, 유전자 결실, 염기쌍 치환 및 온도 민감성 돌연변이와 같은 다양한 방법에 의해 약독화될 수 있다. 이어서 당해 약독화된 바이러스는 당업계에 널리 공지된 방법을 사용하여, 백신을 포함하는 다양한 면역학적 조성물에 사용될 수 있다. 몇몇 형태에서, 당해 약독화된 바이러스는 본 발명에 따른 면역학적 조성물에 혼입 또는 포함시키기 전에, 당업계에 널리 공지된 방법을 사용하여 추가로 사멸시키거나 불활성화시킬 수 있다. PRRS 감염을 예방하거나 PRRS 감염의 임상적 징후의 증증도를 감소시키는데 유용한 면역원성 조성물의 예는 Abst-1 또는 JA-142로 제조된 백신을 포함

한다.

- <13> 또한 본 발명의 백신은 사용하기 전까지, 백신으로서의 요구되는 특성을 상실하지 않으면서 동결된 조건에서 저장될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이것은 선행 PRRS 백신이 동결 저장을 위해 적합하지 않았던 당업계에서의 문제점을 해결한다.
- <14> 본 발명은 추가로 신규하거나 특성이 밝혀지지 않은 PRRS 바이러스 분리물의 바이러스 독성 정도를 예측하는 방법을 제공한다. 당해 방법은 일반적으로 하기의 매개변수중 하나 이상에 대해 신규하거나 이전에 특성이 밝혀지지 않은 PRRS를 평가함을 포함한다: 바이러스 증식 속도; 바이러스 혈증 정도; 항체 반응 또는 이의 조합된 상태. 이어서 당해 평가 결과를 사용하여 신규하거나 이전에 특성이 밝혀지지 않은 분리물의 바이러스 독성 정도를 예측한다. 당해 방법은 일반적으로 PRRS 비감염 돼지에 신규하거나 특성이 밝혀지지 않은 PRRS 분리물의 특정 양을 투여하거나 노출시키고 약 15일까지, 보다 바람직하게는 약 2 내지 12일까지, 보다 더 바람직하게는 약 3일 내지 10일까지 및 보다 더 바람직하게는 3 내지 7일까지의 기간동안 바이러스를 복제시키는 단계를 포함한다. 투여 방식은 경구, 비내, 근육내, 림프절내, 표피내, 복강내, 피하내 및 이의 조합을 포함하는, 임의의 통상적인 방식을 사용하여 성취될 수 있지만 가장 바람직하게는 비내 투여를 통해 성취될 수 있다. 비내 투여용 투여량은 바람직하게 약 5ml 이하, 보다 더 바람직하게는 약 0.5ml 내지 약 4ml, 보다 더 바람직하게는 약 1ml 내지 약 3ml 및 보다 더 바람직하게는 약 2ml이다. 각 투여량에서 바이러스의 농도는 약 5.0 Log₁₀ TCID₅₀/ml 이하, 보다 바람직하게는 약 1.0 내지 약 4.0Log₁₀ TCID₅₀/ml 및 보다 더 바람직하게는 약 2.5 내지 3.5Log₁₀TCID₅₀/ml 및 가장 바람직하게는 약 3.0Log₁₀TCID₅₀/ml이하이어야만 한다. 당해 복제 기간동안에 특정 시점에서, 생물학적 샘플은 돼지로부터 채취하고 투여된 바이러스의 증식 속도, 바이러스 혈증 정도, 항체 반응 및/또는 이를 조합적으로 측정한다. 이어서 이들 측정으로부터 수거된 데이터를, 신규하거나 공지되지 않은 분리물의 예측된 바이러스 독성의 척도로서, 공지되고 특성화된 분리물에 대한 증식 속도, 바이러스 혈증 정도, 항체 및/또는 이들의 조합적 상태와 비교한다.
- <15> 본 발명의 방법을 사용하여, PRRS 바이러스 증식 속도, 바이러스 혈증 정도, 항체 반응 및/또는 이들 특성의 조합은 8개의 상이한 PRRSV 분리물중 하나가 투여된 돼지에서 측정하였다. 이들 분리물 각각은 공지된 수준의 바이러스 독성 및 임상 질환 증상을 갖는다. 또한 이들 동일한 특성은 모든 8개 분리물의 배합물이 투여된 돼지에서 측정하였다.
- <16> 보다 구체적으로, 100마리의 건강한 2내지 3주된 돼지를 체중에 따라, 각각의 그룹이 10마리의 돼지를 갖도록 10개의 그룹으로 무작위로 나누었다. 모든 돼지는 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME)을 사용하여 PRRS 감염에 대해서 시험되었다. 8개의 그룹에 8개 분리물중 하나를 투여하였고, 하나의 그룹에는 모든 8개의 분리물로 이루어진 배합물을 투여하였고 마지막 그룹에는 대조군 그룹으로서 작용하도록 하기 위해 이글 최소 필수 배지(EMEM)를 투여하였다. 각각의 바이러스 접종 샘플은 역가 확인을 위해 다시 적정되었다. 바람직하게, 투여된 바이러스의 역가는 천연 노출 수준의 바이러스를 모방하도록 디자인한다. 혈액 형태의 생물학적 샘플은 실험 전반에 걸쳐 다양한 시점에서 수거하였다. 각각의 샘플은 바이러스 분리, 정량적 역전사효소-폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR), HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR 및 PRRSV 단백질 특이적 ELISA를 사용하여 분석하였다.
- <17> 바이러스 분리는 혈청을 연속적으로 희석하고 이를 EMEM, 젠타마이신(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 및 펀지존(Fungizone)(Invitrogen Corp., Grand Island, NY)과 배합하여 CL2621(MA 104 세포주) 세포상에서 수행하였다. 이어서 희석물을 배양하고 세포병리 효과(CPE)에 대해 조사하였다. 리드-뮤엔흐(Reed-Muench) 계산법을 사용하여 역가를 측정하였다.
- <18> RT-PCR은 QIAamp Viral RNA Mini-Kit[®] (Qiagen, Inc., Valencia, CA)를 사용하여 수행하였고 PRRSV는 제조원 [Tetracore, Inc. (Gaithersburg, MD)]의 단일- 튜브 분석을 사용하여 검출하였다. 바이러스의 양을 측정하기 위해, 표준 곡선을 작성하였고 미지의 샘플 농도는 공지된 농도의 3'UTR 전사체에 대해 플롯팅된 사이클 역치의 직비례 외삽에 의해 측정하였다.
- <19> ELISA S/P 비율을 사용한 항체 측정은 제조업자의 지침에 따라 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR을 사용하여 수행하였다. PRRSV 단백질 특이적 ELISA는 BL21(DE3)-RP 세포(Stratagene, La Jolla, CA)에서 발현되는 재조합 분리물 VR2332 뉴클레오패시드(N) 및 비-구조적 단백질 4(nsp 4)를 사용하여 수행하였다.

- <20> 연구 개시 및 말기에 모든 돼지의 체중을 칭량하였다. 추가로, 연구 기간중 매일, 돼지 각각은 PRRS 질환의 임상적 징후에 대해 수의사가 평가하고 점수를 매겼다. 모든 수득한 데이터를 통계학적으로 분석하고 그룹별로 비교하였다.
- <21> 이어서 10개 그룹중 9개 그룹에는 바이러스 독성이 높은 바이러스 분리물로 2회 챌린지하여 동종 보호 및 백신 대 야생형 이중 보호(생 바이러스 노출 개념) 수준을 추가로 평가한다. 이러한 챌린지 후, 바이러스 분리 및 면역조직화학을 사용한 분석을 위해 동물을 평가하고 해부한다.
- <22> 따라서, 본 발명은 또한 약독화된 PRRS 바이러스 분리물을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 바람직한 양태에서, 당해 조성물은 또한 약리학적으로 허용되는 담체 및/또는 보조제를 함유할 수 있다. 당해 조성물의 예는 Abst-1 및/또는 상기된 방법에 의해 바이러스 독성인 것으로 예측되는 약독화된 형태의 PRRS 바이러스를 함유한다.
- <23> 본 발명은 또한 약독화시켜 면역원성 조성물중에 함유시키기 위해 PRRS 바이러스 분리물을 선별하는 개선된 방법을 제공한다. 당해 방법은 일반적으로, a) 미지의 바이러스 독성을 갖는 PRRS 분리물을 수득하는 단계; b) 특정 양의 PRRS 바이러스 분리물을 PRRS 비감염 돼지에게 투여하는 단계; c) 당해 분리물이 약 3 내지 15일의 기간동안 돼지에서 복제되도록 방지하는 단계; d) 당해 기간동안에 바이러스 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도를 측정하는 단계; e) 증식 속도 또는 바이러스 혈증 정도를 공지된 바이러스 독성을 갖는 PRRS 바이러스 분리물의 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도와 비교하는 단계 및 f) 공지된 바이러스 독성을 갖는 분리물과 비교하여 증식 속도 및/또는 이의 바이러스 혈증 정도를 기초로하여 약독화 및 면역원성 조성물중에 함유시키기 위한 분리물을 선별하는 단계를 포함한다. 바이러스 무독성인 것으로 예측되는 것들을 포함하는, 분리물의 바이러스 독성이 낮은 것으로 예측되지만 면역원성 조성물중에 함유되어 바이러스 독성이 높을 것으로 예측되는 분리물을 선별하는 것이 바람직하다. 이것은 바이러스 독성이 높을 것으로 예측되는 분리물이 증식 속도 및/또는 바이러스 혈증 정도가 높아 일반적으로 보다 왕성하고 보호적인 면역 반응을 유도하기 때문이다. 본 발명의 방법을 사용함에 의해 면역원성 조성물에 함유시키기 위해 사용되는 분리물의 선별은 단순화될 수 있고 백신이 바이러스 독성 PRRS 분리물로부터 보호하는데 유용하게 될 가능성은 증가될 것이다.
- <24> 본원에 사용되는 바와 같이, "증식 속도"는 돼지에서 시간 경과에 따른 바이러스 복제에 대한 측정을 의미한다. 당해 측정에 대한 바람직한 예는 실시예 1에 제공된다. 본원에 사용된 바와 같은 "바이러스 혈증 정도"는 돼지 혈액에서 순환하는 바이러스 농도를 의미한다. 당해 측정의 바람직한 예는 실시예 1에 제공된다.

발명의 상세한 설명

- <35> 하기의 실시예는 본 발명에 따른 바람직한 분리물 및 과정을 제시한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 설명을 목적으로 제공되는 것이고 여기서 어떠한 것도 본 발명의 전체 범위를 제한하는 것으로 간주되지 말아야 한다.
- <36> 실시예 1
- <37> 재료 및 방법
- <38> 100마리의 건강한 2 내지 3주된 돼지를 PRRS 비감염 상업용 무리로부터 수득하였고 수의사의 감독하에 특정 장소(Veterinary Resources, Inc., Ames, Iowa)에서 유지시켰다. 동물은 자유롭게 음식과 물을 섭취하였다. 연구에 참여한 동물 관리자 및 실험실 요원 모두는 다양한 그룹의 동물에게 주어진 처치에 대해서 알지 못했다. 돼지는 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR (IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME)에 의해 시험되어 돼지가 PRRSV로 감염되었는지를 측정하였다. 본 실시예에 대한 모든 돼지는 음성으로 판정되었다. 이어서 돼지는 체중에 따라 10개 그룹으로 무작위로 나누고 그룹당 10마리의 돼지를 갖는다.
- <39> 총 8개의 PRRSV 분리물을 본 실시예에 사용하였다. 이들 분리물은 VR-2332, Ingelvac[®] PRRSMLV, JA 142, Ingelvac[®] PRRS ATP, SDSU73, Abst-1, MN 184 및 17198-6으로 명시하였다. 이들 8개의 분리물은 PRRS 질환 역사를 대표하는 것들이고 광범위한 바이러스 독성 수준을 나타내며 관련 임상 질환 증세를 나타낸다. 모든 바이러스 분리물은 ATCC 세포주 CL2621(CL2621은 기관(NVSL, Ames, IA)으로부터 수득한 소유권 세포주이다)(MA-104 원숭이 신장 세포주) 세포상에서 빠르게 증식한다. 원발성 야생형 분리물중 3개인 VR-2332, JA-142 및 SDSU 73은 또한 약독화된 형태로서 각각 Ingelvac[®] PRRS MLV(Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, MO), Ingelvac[®] PRRS ATP(Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, MO) 및 Abst-1이다.

이들 약독화된 형태 모두는 시험관내 계대에 의해 역독화되어 유래된 낮거나 감지할 수 없는 바이러스 독성을 나타낸다. PRRSV 분리물 ATCC VR-2332는 미네소타에서 1991년에 분리되었고 3회 세포 배양 계대에서 사용되었다. 당해 바이러스의 약독화된 형태는 상표명 Ingelvac[®] PRRS MLV하에 시판되고 있다. 기관(William Mengeling, National Animal Disease Center, Ames, Iowa)에 의해 제공된 PRRSV 분리물 JA 142(ATCC No. PTA-6504)는 생식 실패의 "유산-사태" 사건으로부터 이오와(Iowa)에서 1997년에 분리되었고 5회 세포 배양 계대에 사용되었다. 약독화된 형태의 JA 142는 상표명 Ingelvac[®] PRRS ATP하에 시판되고 있고 ATCC No. VR-2638로 지정되었다. PRRSV SDSU 73(ATCC No. PTA-6322)는 1996년에 심각한 생식 질환 사건으로부터 아이오와주(Iowa)에서 회수되었고 1회 세포 배양 계대에 사용되었다. Abst-1(ATCC No. PTA-6320)으로 명명된 약독화된 형태의 SDSU 73은 52회 계대에 의해 획득되었다. PRRSV 분리물 17198-6(ATCC No. PTA-6321)은 심각한 생식 질환을 경험한 가축 무리로부터 1997년에 오클라호마에서 획득되었고 4회 계대 수준에서 사용되었다. PRRSV MN 184 분리물(ATCC No. PTA-6319)은 심각한 생식 질환을 경험한 돼지 농장 및 미네소타 남부 암돼지 주검으로부터 2001년에 획득되었고 기관[Kurt Rossow, University of Minnesota, St. Paul]에 의해 제공되었다. 당해 분리물은 1회 세포 배양 계대에 사용되었다. 추가로, 모든 분리물의 배합물로 이루어진 풀을 제조하였다.

<40> 0일째에, 8개 PRRSV 분리물 각각 및 PRRSV 풀을 4% FBS(JRH Bioscience, Lenexa, KS)를 함유하는 이글 최소 필수 배지(EMEM)(JRH Bioscience, Lenexa, KS)에서 약 3.0 Log₁₀ TCID₅₀/ml로 희석시키고 2ml의 투여량(콧구멍당 1ml)으로 돼지에 비내 투여하였다. 비처리된 대조군 그룹에는 2ml의 배지를 투여하였다. 접종물을, 리드-뮤엔흐 방법(Reed et al., 1938)을 사용한 역가 확인을 위해 3일된 CL2621 세포를 함유하는 96웰 플레이트상에서 적정하였다. 바이러스 독성 수준 및 분리 정보의 기재와 함께 돼지에게 투여된 관찰된 역가는 표 1에 나타낸다.

표 1

분리물의 바이러스 독성 및 접종 역가

그룹	분리물	분리된 연도	바이러스 독성***	중간 정도	역가 log ₁₀ TCID ₅₀ /ml
1	VR 2332	1991		중간 정도	3.43
2	Ingelvac® PRRS MLV*	USDA 허가 1996		약독화된 VR2332	3.02
3	JA 142	1997		높음	3.13
4	Ingelvac® PRRS ATP*	USDA 허가 1999		약독화된 JA 142	4.14
5	SDSU 73	1996		높음	2.75
6	Abs-1*	약독화된 1999		약독화된 SDSU 73	4.18
7	MN 184	2001		높음	4.10
8	17198-6	1997		높음	2.81
9	폴**	N/A		높음	3.71
10	대조군	N/A		N/A	N/A

* 약독화된 PRRSV 분리물

** 8개 분리물 모두를 함유하는 혼합물

*** 모임 [Symposium on Emerging Diseases, Rome 2003.]에서 보고된 폐 병변의 개요

<41>

<42>

이어서 분리물을 비교하여 이들의 서열 동일성 %의 분석을 통해 이들의 유전자 유사성을 측정하였다. 서열 동일성은 서열 분석을 위해 대학[University of Minnesota Diagnostic Laboratory]에 바이러스 샘플을 보내어 측정하였다. ORF 5-6의 결과가 제공됨에 따라서 PRRS 바이러스 보존성 서열과 비교하였다. 각각의 염기쌍 차이가 나타남에 따라 % 서열 동일성에 대해 분리물들을 비교하였다. 당업자는 블래스트(blast) 검색이 또한 다양한 웹 사이트에서 수행될 수 있음을 인지하고 있다. 예를 들어, 미네소타 대학은 1989년 부터 2003년 까지의 분리물에 대한 서열을 열거하는 PRRSV 데이터베이스(ccgb.umn.edu/cgi-bin/common.web_blast.cgi)를 제공한다. 또 다른 흔히 사용되는 사이트는 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST에서 발견되는 NCBI BLAST 링크이다.

<43>

표 2의 % 서열 동일성 및 덴드로그램(dendrogram)에 의해 나타나는 바와 같이 바이러스 독성 야생형 분리물은 유전자 특징에 의해 명백히 구분되고 다양한 그룹의 PRRSV 분리물을 나타낸다. 대조적으로, 모 PRRSV 및 백신 PRRSV 쌍은 유전학적으로 거의 동일하다. 표 2의 쌍방 비교 및 덴드로그램을 서열분석 도구(DNASTAR, Inc, (Madison, WI))의 레이저진 소프트웨어를 사용하여 작성하였다.

표 2

본 연구에 사용되는 바이러스 독성 및 약독화된 PRRSV 분리물의 ORF5 뉴클레오타이드 서열의 쌍방 비교. % 유사성은 표의 상부 오른쪽편에 나타내고 % 상이성은 표의 하부 왼쪽편에 나타낸다. 덴드로그램은 분리물의 유전자 관련성을 보여준다. 막대는 100개의 잔기당 1개 뉴클레오타이드의 변화를 지적한다. VR2332는 Ingelvac PRRS MLV의 모 분리물이고 JA 142는 Ingelvac PRRS ATP의 모 분리물이고 SDSU 73은 Abst-1의 모 분리물이다.

	% 동일성							
	VR 2332	Ingelvac PRRS MLV	JA-142	Ingelvac PRRS ATP	SDSU 73	Abst-1	MN 184	17198-6
VR 2332		99.7	91.0	90.5	90.0	89.6	86.4	90.4
Ingelvac PRRS MLV	0.3		90.7	90.2	89.7	89.2	86.4	90.0
JA-142	9.7	10.1		99.2	92.7	92.2	87.2	92.2
Ingelvac PRRS ATP	10.3	10.7	0.8		91.9	91.4	86.4	91.4
SDSU 73	10.9	11.3	7.8	8.8		99.5	87.2	91.7
Abst-1	11.5	11.9	8.4	9.4	0.5		86.7	91.2
MN 184	15.5	15.5	14.4	15.5	14.4	15.1		86.1
17198-6	10.5	10.9	8.8	9.7	9.0	9.6	15.9	

% 상이성

<44>

<45>

49일째에, 2ml의 바이러스 독성 분리물 PRRS MN 184를 그룹 1 내지 9의 비내에 투여하였다. MN 184 분리물은 MEM + 4% FCS에 희석하여 농도가 log3.0 +/- 0.5/ml이 되도록 하였다. 희석된 챌린지 바이러스는 시험을 위해 3일된 CL2621 세포 함유 96-웰 플레이트에 적정하였다. 당해 동물을 14일동안 평가함에 이어서 해부하였다.

<46>

바이러스 혈증 평가

<47>

혈액 샘플은 0일, 1일, 3일, 7일, 15일, 21일, 28일, 35일, 42일 및 49일째에 진공관을 사용하여 각 그룹 돼지로부터 채혈하였다. 20분동안 6000RPM에서 원심분리하여 응고된 전혈로부터 혈청을 분리하였다. 이어서 혈청 샘플을, 바이러스 분리, TCID₅₀ 분석, 정량적 역전사효소-폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR), HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR, 및 PRRSV 단백질 특이적 ELISA에 의한 분석을 위해 나누었다. 본 연구에서 혈청 샘플은 수거 후 즉시 가공하였고 수득된지 3시간 이내에 빙상에 냉각시켰다. 당해 샘플은 최대 24시간동안 4°C에서 및 이후 -70°C에서 저장하였다. RT-PCR에 의해 시험된 혈청은 수거한 날에 -70°C에서 동결시키고 24시간이내에 시험될 수 있는 다수의 샘플이 해동되고 추출되고 시험되는 시점에서 시험이 수행될 수 있을때까지 저장하였다.

<48>

TCID₅₀ 분석을 위해, 돼지 각각으로부터의 혈청 100µl를 900µl의 EMEMm + 2% FBS + 50µg/ml의 젠타마이신(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) + 2.5µg/ml 편지존(Invitrogen Corporation, Grand Island NY)를 함유하는 희석 튜브에 첨가하였다. 당해 튜브를 볼텍싱하고 100µl를 900µl의 EMEMm + 2% FBS + 50µg/ml의 젠타마이신 + 2.5µg/ml 편지존을 함유하는 또 다른 희석 튜브로 이전시켰다. 최종 희석이 10⁻⁶이 될때까지 당해 과정을 반복하였다. 각각의 희석물에 대한 4개 복사물을 8일동안 37°C 및 4% CO₂에서 웰당 100µl의 CL2621(MA 104 세포)를 함유하는 96웰 플레이트상에서 항온처리하였다. 이어서 각각의 웰에서 세포병리효과(CPE)에 대해 조사하고 리드-뮤엔흐 계산법을 사용하여 역가를 측정하였다. 바이러스 분리를 위해, 100µl의 혈청을 MA 104 세포 함유 2개 복사물 시험 웰 각각에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 37°C 및 4% CO₂에서 1시간동안 항온처리하였다. 다음에, 500µl의 EMEMm + 2% FBS + 50µg/ml의 젠타마이신 + 2.5µg/ml 편지존을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 8일동안 4% CO₂ 및 37°C에서 배양함에 이어서 각각의 웰에서 CPE를 조사하였다.

<49>

정량적 RT-PCR을 위해 혈청으로부터 바이러스 RNA를 추출하기 위해, QIAamp Viral RNA Mini-Kit[®](Qiagen

Inc. Valencia, CA)를 키트 지침서에 기재된 바와 같이 사용하였다. 실시간 PCR에 대해, U.S. PRRSV의 검출을 위해 시판되는 실시간 단일 튜브 RT-PCR 분석은 제조원[Tetracore Inc.(Gaithersburg, MD)에 의해 제공되었고 이를 사용하여 PRRSV RNA를 검출하였다. 마이너 그루브 결합(MGB) 5' 뉴클레아제 프로브 및 프라이머는 GenBank 분리물 정렬 및 3' UTR 프라이머 및 프로브 영역의 보존성 영역을 기초로 3' 비독 영역(UTR) PRRSV 게놈 영역으로부터 디자인하였다. PRRSV RNA는 Tetracore U.S. PRRSV 마스트 믹스(18.9 μ l의 마스터 믹스, 2 μ l의 효소 믹스, 0.1 μ l의 효소 믹스 2) 및 4 μ l의 추출된 RNA로 이루어진 25 μ l의 반응 용적을 사용하여 단일 튜브에서 전사시켰다. 반응 튜브를 Smart Cycler II[®] block(Cepheid, Sunnyvale, CA)에 로딩하고 형광 검출의 소프트웨어 세팅은 배경 공제와 함께 기준선을 자동으로 계산하도록 설정하였다. 열 순환 프로그램은 1800초 동안 52 $^{\circ}$ C, 900초 동안 95 $^{\circ}$ C 및 30초 동안 94 $^{\circ}$ C, 60초동안 61 $^{\circ}$ C 및 60초동안 72 $^{\circ}$ C의 45사이클로 이루어져 있다. PCR 반응은 사이클 역치(Ct) 수준이 45사이클 이하에서 수득된다면 양성인 것으로 간주되었다. 정량을 위해, 공지된 양의 연속 희석된 시험관내 전사체 RNA 생성물(1 x 10⁻¹ 내지 1 x 10⁸ 카피수/ μ l)을 사용하여 표준 곡선을 작성하였다. 미지 샘플의 카피수/ml 농도는 3'UTR 전사체 생성물의 공지된 농도에 대해 플롯팅된 Ct 값의 직비례 외삽에 의해 측정하였다.

<50> 항체 측정

<51> ELISA S/P 비율은 제조업자의 지침에 따라 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME)을 수행하여 생성하였다. HerdChek[®] 를 위한 PRRSV 단백질 특이적 ELISA는 아미노 말단 myc-tag 및 카복실 말단 6x 히스티딘 태그를 함유하는 융합 단백질로서, 플라스미드 pET24b로부터 BL21(DE3)-RP 세포(Stratagene)로부터 발현되는 재조합 분리물 VR2332 뉴클레오펜시드(N) 및 비구조적 단백질 4(nsp 4)를 사용하여 수행하였다. 변성 단백질은 0.1M 트리스 HCl, pH 8.0, 6M 구아니딘-HCl, 2mM EDTA에 희석시키고 3mg/ml의 농도로 조정하였다. DTT는 300mM에 첨가하고 용액을 0.45 μ m 막을 통해 여과하였다. 환원된 단백질을 재폴딩 완충액(100mM 트리스 HCl, pH 8.0, 0.5M L-아르기닌, 8mM의 산화된 글루타티온, 2mM의 EDTA, 10 μ M의 펩스타틴 A, 10 μ M의 류페틴 및 1mM의 PMSF)에 첨가하고 여과(0.22 μ m)하고 밤새 교반하였다. 정제된 단백질을 접선 유동 여과(Pellicon XL Ultracel PLC 5kd, Millipore)에 의해 농축시키고 20mM 트리스 HCl, pH 8.0에 대해 투석하였다. 단백질 랩칩을 갖는 Agilent 2100 생분석기상에서 단백질을 분석하였다. 정제된 단백질 용액은 -80 $^{\circ}$ C에 저장하였다.

<52> 단백질 특이적 ELISA는 미세역가 플레이트를 카보네이트 완충액(pH 9,6)중에 100ng 재조합 단백질로 피복하거나 완충액 단독으로 피복하여 수행하였다. 0.1% Tween 20를 함유하는 인산 완충 식염수중의 2.5%의 무지방 건조 밀크를 사용하여 플레이트를 차단하였다. 1:2000로 희석된 100 μ l의 혈청을 2중 복사물 웰에 2시간동안 적용하고 이후 플레이트를 PBST로 세척하고 항체 결합을 1시간동안 1:5000으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다제 결합된 염소 항 돼지 IgG(중쇄 + 경쇄(KPL, Gaithersburg MD))와 항온처리하여 검출함에 이어서 세척하고 100 μ l의 TMB 기질(KPL)로 발색시킨다. 반응을 1M 인산으로 종료시키고 플레이트를 450nm에서 판독하였다.

<53> 체중

<54> 0일째(연구 첫날) 및 49일째(연구 종료)에 모든 돼지의 체중을 칭량하였다. 돼지는 휴대용 칭량기(portable electronic weigh-bar scale system Weigh-Tronix[™] 모델 615XL(Weigh-Tronix Inc., Fairment, MN)상에서 체중을 칭량하였다. 저울은 각각 사용 전후에 보증된 시험 체중을 사용하여 보정하였다.

<55> 임상 스코어

<56> 연구동안 매일, 각각의 돼지를 수의사가 각각의 임상적 징후에 대한 1개 내지 4개의 스케일상에서 호흡증 징후, 행동 및 기침에 대해 스코어하였다. 정상적인 동물에 3의 스코어를 부여하고 최대 임상적 질병은 9의 스코어를 부여하고 죽은 동물에게는 12의 스코어를 부여하였다. 연구중에 죽은 모든 동물로부터의 샘플을 병리학적 조사를 위해 대학(Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory)에 제출하였다.

<57> 폐의 면역조직학적 평가

<58> 돼지 각각의 폐 샘플을 PRRSV에 해당하는 병변에 대한 면역조직화학분석 및 현미경 조사를 사용한 시험을 위해, 해부 날짜에 포르말린으로 고정시켰다. 당해 시험은 대학(Iowa State University Veterinary Diagnostic Lab)에서 수행되었다.

<59> 모든 데이터는 데이터 관리 및 분석을 위해 SAS 버전 8.02에 전송되었다. 평균, 표준 오차 표준 오류, 평균 및

횡수 분포를 포함하는 개요적인 통계치를 적당한 모든 결과 변수에 대해 작성하였다. 체중, RT-PCR 및 \log_{10} TCID₅₀/ml 데이터는 리스트 시그니피칸트 디퍼런스 t 시험(Least Significant Difference t test)에 의한 처리 군간의 차이에 대한 쌍방 시험을 사용하여 전체 차이에 대한 원 웨이 ANOVA로 분석하였다. 그룹간의 차이에 대한 모든 시험은 이측면(two-side) 시험으로서 디자인하였다. 차이는 통계학적으로 $p \leq 0.05$ 로서 유의적인 것으로 간주되었다.

- <60> 상호 관계 분석을 용이하게 하기 위해 데이터를 약간 변화시켰다. < 2.00으로서 목록된 \log_{10} TCID₅₀/ml 값을 1.0으로 설정하였다. 음성 RT-PCR 값을 1.0으로 설정하고 모든 RT-PCR 값은 분석 전에 로그 베이 10으로 전환시켜 표준화하였다. 대조군 그룹 결과는 상호 관계 분석에 포함되지 않는다. 돼지 각각에 대한 결과는 트라페조이달 법칙을 사용한 곡선 이하의 대략적인 면적으로 변환시켰다. 당해 곡선 이하의 면적은 제1 관찰일로부터 15일까지 및 15일째부터 마지막 관찰때까지의 전체 연구 기간동안 계산하였고 전체 연구 기간은 도면에 나타낸다.
- <61> 결과
- <62> 바이러스 분리 및 \log_{10} TCID₅₀/ml 정량
- <63> 감염 일자에 노출시키기 전에, 어떠한 동물도 PRRSV에 대해 양성이었다. 비내 감염 후 제1일째에, 5개 그룹중 단지 13마리의 동물이 바이러스에 대해 양성인 것으로 나타났다. 그러나, 감염 후 제3일째에, 분리물 17198-6을 제외한 야생형 분리물로 감염된 모든 동물이 바이러스 양성되었고 평균 \log_{10} TCID₅₀/ml의 값은 2.1(SDSU-73) 내지 3.9(MN 184) 범위이다. 대조적으로, 약독화된 분리물로 접종된 동물은 세포 배양에 따라 균일하게 음성이었다. 이들 결과는 도 1에 제공한다. 3.6에서 4.6 \log_{10} TCID₅₀/ml의 바이러스 혈증 피크 수준은 5개의 바이러스 독성 분리물중 4개에서 제7일째에 달성되었다. 분리물 17198-6은 제15일째에 최대치에 도달했다. 역가는 21일동안의 모든 바이러스 독성 바이러스에서 2 \log_{10} TCID₅₀/ml의 근접 또는 이상으로 유지되었지만 JA142-감염된 돼지는 당해 수준 미만의 역가를 나타내었다.
- <64> 약독화된 PRRSV 분리물이 접종된 돼지에서 바이러스 혈증 수준은 바이러스 독성 야생형 분리물로 접종된 돼지에서 보다 낮았다. 약독화된 분리물의 평균 그룹은 최저 바이러스 독성 그룹 역가의 최고치 보다 로그 지수적으로 낮은 이상의 역가에서 최고치였다. 접종 후 제3일째를 제외하고는 Abst-1 분리물은 결코 다시 분리되지 않았다. Ingelvac[®] PRRS MLV 바이러스 혈증은 제7일에서 제28일까지 0.5 내지 1.0 \log_{10} TCID₅₀/ml에서 변동하였고 Ingelvac[®] PRRS ATP는 제7일에서 제28일까지 0.4 내지 1.2 \log_{10} TCID₅₀/ml에서 변화하였다. 약독화된 분리물 바이러스는 제28일 이후에는 혈청으로부터 회수되지 않았고 바이러스는 35일에 걸쳐 바이러스 독성 야생형 분리물 그룹중 단지 2개 그룹인 풀 감염된 돼지 및 MN 184 감염된 돼지로부터 회수하였다(또한 도 1 참조). 거의 모든 돼지는 제42일 및 제49일에서 바이러스 분리물에 의한 바이러스 혈증을 나타내지 않았다.
- <65> 전반적으로, 보다 바이러스 독성이 높은 분리물은 약독화된 분리물 보다 돼지에서 보다 신속하게 복제하고 보다 높은 역가가 관찰되었다. MN 184 분리물로 감염된 돼지는 특히, 3일전에 시작한 바이러스 복제에서 매우 신속한 증가를 보여주었고 제7일째에 4.5 \log_{10} TCID₅₀/ml 이상의 최대치에 도달하였다. 최대치 이후, MN 184 바이러스 혈증은 일정하게 감소하지만 제28일 및 제35일째에 모든 다른 분리물 보다 상당히 높은 역가(t-시험, $p \leq 0.05$)를 여전히 유지하였다. 유사한 경향이 모든 나머지 바이러스 독성 그룹, 즉, VR2332, JA 142, SDSU 73 및 풀에서 관찰되었다(도 1 참조). 17198-6으로 감염된 돼지는 MN 184 감염된 그룹에 대해 기재된 것과 동일한 일반적 경향을 나타내었지만 밀접하게 관련된 것은 아니다.
- <66> 약독화된 분리물(Ingelvac[®] PRRS MLV, Ingelvac[®] PRRS ATP 및 Abst-1)이 투여된 돼지 그룹은 다른 경향을 나타내었다. 이들은 제3일 이후부터 시작하여 바이러스 역가가 약간 증가함을 보여주었고 바이러스 독성 노출 그룹보다 로그 급수로 낮고 MN 184-감염된 그룹 보다는 몇배 낮은 바이러스 역가로서 제7일 내지 제15일째에 최대치에 도달하였다. 이들 약독화된 노출 그룹에서 관찰되는 역가는 제35일째 또는 이전에 0으로 감소한다(도 1).
- <67> 제2 노출 후 그룹 평균을 비교하는 경우, 약독화된 그룹의 바이러스 역가가 매우 크게 증가한 반면 바이러스 독성 그룹은 소폭 증가하거나 전혀 증가하지 않았다. 예를 들어, Abst-1은 제2 노출 후 제7일째에 3.76 로그 역가를 갖는 반면 MN 184는 0의 역가를 갖는다. 다른 약독화된 그룹은 제2 노출 후 제3일째에 최대치에 도달하였

다. 제2 노출 후 임의의 바이러스 독성 그룹에서 관찰되는 최고 역가는 JA 142에서 노출 후 제3일째에서 1.32 로그인 것으로 나타났다.

- <68> 바이러스 혈증 수준은, CL2621 세포에 대한 성장이 모든 분리물에 대해 동일하지 않을 가능성이 있고 RT-PCR은 바이러스 혈증에 대한 세포 증식 보다 민감한 측정일 수 있기 때문에 실시간 RT-PCR로 측정하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 바이러스 독성 노출 그룹은 제1일째에 평균 농도가 급격히 증가함을 보여주었고 모든 그룹은 제7일 내지 제15일째에 8 log/ml 이상의 최대치에 도달하였다. 이어서, 바이러스 독성 노출 그룹 농도는 다음 몇주를 거쳐 점차 감소하여 제49일째에 4log/ml 미만의 농도에 도달하였다.
- <69> 약독화된 분리물 노출 그룹은 또한 제1일경에 시작하여 훨씬 적은 급속 증가를 보여주었고 평균 그룹 역가는 7log/ml 이상으로 도달하지 못했다(도 2). 약독화된 노출 그룹에 대해 관찰된 농도는 노출 후 몇주에 광범위한 값을 보여주는 변동 수준으로 유지되었다. 변동은 주로 단일 돼지내에 산발적으로 높은 값 때문이었다. 3개의 약독화된 분리물 노출 그룹 모두는 연구동안에 상이한 날에 최대치에 도달하였다. Ingelvac[®] PRRS MLV 그룹은 제28일째에 4.31 log/ml의 농도로 최대치에 도달하였고 Ingelvac[®] PRRS ATP 그룹은 제3일째에 6.58 log/ml의 최대치에 도달하였으며, Abst-1 그룹은 제35일째에 6.85log/ml로 최대치에 도달하였고 이는 약독화된 분리물에 의해 성취된 최고의 역가였다(도 2). 추가로, 바이러스 독성 분리물 그룹의 평균 농도는 제3일 및 제15일째에 약독화된 분리물 그룹의 평균 농도 보다 상당히 높은($P < 0.05$)은 것으로 관찰되었지만 제49일째에 바이러스 독성 분리물 그룹의 평균 농도는 약독화된 분리물 그룹 보다 상당히 낮았다($P < 0.05$).
- <70> HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR
- <71> 도 3에 나타난 바와 같이, HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR S/P 비율에 의해 측정된 PRRSV에 대한 체액 면역 반응은 바이러스 독성 분리물 노출 그룹 평균이 제15일째에 양성 결과에 대해 0.4 컷오프 이상으로 증가하였다. 대조적으로, 약독화된 분리물 노출 그룹 평균은 음성이었고 모든 3개의 그룹은 제21일 이후때까지 0.4미만으로 유지되었다. Ingelvac[®] PRRS MLV 및 Ingelvac[®] PRRS ATP 그룹은 제28일째에 양성 결과를 보여주었지만 Abst-1 그룹은 42일째까지 0.4 이상의 평균 S/P 비율을 나타내지 않았다.
- <72> 바이러스 독성 분리물 또는 풀로 감염된 그룹에 대한 체액성 반응을 약독화된 분리물로 접종된 그룹과 비교하는 경우, 항체 반응의 역학 및 정도가 특히 감염 후 제14일 내지 제35일째의 바이러스 혈증 수준과 연관되어 있음이 명백하였다. 이러한 관찰은 추가로 바이러스 역가 또는 RT-PCR에 대한 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR S/P 비율의 쌍방 비교에 의해 측정되는 바이러스 혈증 수준과 체액성 항체 반응간의 상호 관계에 의해 지지된다. 도 4 및 5는 체액성 항체 반응이 전체 연구 기간에 걸쳐 바이러스 로드와 연관되어 있음을 보여주었고 바이러스 역가에 대한 상호 관계 계수 r 은 0.858이고 RT-PCR에 대한 r 은 0.794이다. 이들 연관성은 상당히 높았다(각각의 경우 $p < 0.0001$). 더욱이, 약독화된 분리물은 낮은 항체 반응 및 바이러스 로드를 보여준 반면 바이러스 독성 분리물은 높은 반응을 나타낸다.
- <73> PRRSV 단백질 특이적 ELISA
- <74> PRRSV 접종과 체액성 면역 반응의 차이에 관계를 추가로 통찰하기 위해, 주요 구조 단백질인 N에 대한 항체 역가 및 필수이지만 최소 비구조성 프로테아제인 nsp4에 대한 항체 역가를 측정하였다. 도 6a는 뉴클레오캡시드 항-N IgG 반응의 역학이 돼지의 모든 그룹에서 동일함을 설명하고 제28일째에 최대 역가에 이어서 다음 7일 내지 14일째에 신속하게 감소한 후, 당해 수준은 제42일 내지 제49일째에 약간 오르거나 유지되었다.
- <75> 각각의 분리물에 대한 반응 정도는 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR에서 관찰되는 것과 유사하였고 바이러스 혈증 수준과 일치한다. 제28일째에 최저 역가는 약독화된 분리물로 접종된 그룹에서 관찰되었고 최고 역가는 고도로 바이러스 독성인 MN 184 분리물로 감염된 돼지에서 달성되었다. 제49일째까지, 항-N 역가는 MN 184 및 풀을 제외한 모든 그룹에서 동등하였고 이는 MN 184에 대한 체액성 반응이 질적으로 상이할 수 있음을 시사한다. 추가로, 5마리의 돼지만이 이들 2개 그룹 각각에서 제49일까지 생존하였고 이는 MN 184 그룹에서 49일째에 증가된 표준 오류에 반영된다.
- <76> 도 6b에 나타난 바와 같이, nsp 4에 대한 IgG 반응은 실질적으로 N에 대한 것과는 상이하였다. 제21일 전까지는 어떠한 항-nsp 4 항체도 검출되지 않았고 전체 반응은 훨씬 약하였고 Ingelvac[®] PRRS MLV 및 Abst-1을 투

여받은 그룹에서 어떠한 상당한 반응이 검출되지 않았다. 더욱이, 항-nsp 4 반응 정도는 바이러스 혈증 수준과는 연관성이 없었다. VR2332, JA142, MN 184 및 풀에 대한 반응은 모두 동일하였고 제28일째에 최대치에 이어서 제35일째에 감소하고 제42일째에 다시 증가하는 반면, 바이러스 혈증의 정도, 경과 및 지속시간은 이들 4개 그룹간에 다양하였다. 도 7은 반복된 측정 분석을 조사하는 경우, Log₁₀ TCID₅₀/ml 데이터와 비교되는 nsp 4 ELISA에 대한 데이터는 바이러스 혈증과 nsp 4 체액성 항체 반응 수준간에 어떠한 상관관계가 없음을 나타낼 수 있는 것으로 설명하고 있다. 또한 MN 184를 분리하기 위한 제49일째에 제2 노출 후 2차 반응이 거의 없었다.

<77> 체중

<78> 실험 0일째에 어느 그룹에서도 평균 체중의 상당한 차이(P = 0.099)가 없었다. 제49일째에, 약독화된 분리물 Abst-1이 접종된 돼지는 최고의 평균 체중을 나타내었고 이는 대조군 그룹을 제외한 기타 모든 그룹에서 상당히 높았다(표 3). 또한 제49일째에, 17198-6 그룹을 제외한 모든 바이러스 독성 분리물 노출 그룹의 평균 체중은 대조군 그룹 보다 상당히 낮았다(표 3). 약독화된 분리물 노출 그룹 Ingelvac® PRRS MLV 및 Ingelvac® PRRS ATP의 평균 체중은 통계학적으로 동등하였다(표 3).

표 3

분리물	평균 체중	
	0일	49일
VR 2332	6.38 ¹	33.5 ^b
Ingelvac® PRRS MLV	6.56	34.6*
JA 142	6.42	32.7 ^b
Ingelvac® PRRS ATP	6.24	35.0*
SDSU-73	6.59	32.9 ^b
Abst-1	6.69	39.4 ^a
MN 184	6.73	23.7 ^c
17198-6	6.36	34.5*
풀**	6.51	23.0 ^c
대조군	6.48	38.4*

- <79>
- <80> ¹중량은 kg이다. 0일째에 평균 중량에는 상당한 차이가 없었다.
- <81> * 제49일째에 이들 그룹간에 통계학적으로 동등한 중량을 나타낸다.
- <82> ** 풀은 모든 8개의 분리물을 함유하는 혼합물이었다.
- <83> ^a는 대조군 그룹을 제외한 모든 그룹 보다 상당히 높았다(p≤0.05).
- <84> ^b는 대조군 그룹 보다 상당히 낮았다.
- <85> ^c는 모든 다른 그룹 보다 상당히 낮았다.
- <86> 임상적 스코어
- <87> 평균 임상적 스코어의 증가는 바이러스 독성 노출 그룹중 4개 그룹에서만 관찰되었다: JA 142, SDSU 73, MN 184 및 풀. 이들 보다 높은 스코어는 연구 전반에 걸쳐 일정하였지만 잔여 그룹으로서 바이러스 독성 노출 및 약독화된 노출 둘다 연구 기간동안에 근본적으로 표준 임상 스코어를 가졌다. 당해 연구에 관찰된 평균 임상적 스코어의 변화에 대한 주요 원인은 하나 이상의 동물이 연합 처리군에서 죽었을때 일어났다(표 4).

표 4

노출 후 돼지의 치사율

그룹	분리물	치사율	죽은 날짜
1	VR 2332	0/10	N/A
2	Ingelvac® PRRS MLV	0/10	N/A
3	JA 142	1/10 = 10%	17
4	Ingelvac® PRRS ATP	0/10	N/A
5	SDSU 73	2/10 = 20%	9, 23
6	Abst-1	0/10	N/A
7	MN 184	5/10 = 50%	14, 14, 17, 23, 41
8	17198-6	0/10	N/A
9	폴**	5/10 = 50%	12, 16, 17, 21, 21
10	대조군	2/10*	41, 48

약독화된 PRRSV 0/30 = 0%

바이러스 독성 PRRSV 13/60 = 22%

<88>

<89> 치리군의 모든 죽음은 2차 세균 감염과 함께 PRRSV로 인한 중간 정도 또는 심한 비화농성 간질성 폐렴 때문이었다.

<90> * 어떠한 PRRS가 관여하지 않은 세균성 폐렴때문에 죽었다.

<91> ** 폴은 모든 8개의 분리물을 함유하는 혼합물이었다.

<92> 임상적 질환의 중증성은 고도로 바이러스 로드와 연관되어 있다(바이러스 적정에 대해 $p < 0.001$). 도 8에 나타낸 바와 같이, 임상적 스코어는 MN 184 및 폴로 감염된 그룹에서 가장 높았다. 각 그룹의 50%는 죽었고 바이러스 적정은 감염 수준이 실질적으로 모든 다른 그룹 보다 높았음을 지적했다. RT-PCR에 의해 측정된 바와 같이 바이러스 로드의 차이는 덜 현저하였고(데이터는 나타내지 않음) RT-PCR에 의한 임상적 징후와 바이러스 로드간의 상관관계는 바이러스 적정에서 보다 낮았다(각각, $r = 0.556$ 대 $r = 0.803$). 그룹 10(대조군)에서 임상적 스코어는 세균 폐렴으로부터 2개의 돼지가 죽은 후 증가하였다. 2개의 돼지는 폐 조직의 면역조직화학적 염색, 음성 바이러스 분리 및 실시간 PCR 분석 및 HerdChek[®] 31 PRRS ELISA 2XR 또는 단백질 특이적 ELISA에 의한 혈청전환 완전 부재로서 PRRSV 음성인 것으로 밝혀졌다. 후반부 발견은 다양한 세균 병원체가 연구 동안에 돌변사한 동물에 존재하고 이들 죽음이 2차 세균성 감염일 가능성이 높음을 지적했다(표 5).

표 5

노출 후 치사율 원인

페이지	그룹	치사 원인	죽은 날짜
993	JA 142	PRRS & 스트렙토코커스 수이스 (<i>Streptococcus suis</i>)	17
948	음성 대조군	아르카노박테리움 피오게네스 (<i>Arcanobacterium pyogenes</i>) 및 파스테우렐라 멀토시다 (<i>Pasteurella multocida</i>)	41
983	음성 대조군	에이. 피오게네스 (<i>A. pyogenes</i>) 및 피. 멀토시다 (<i>P. multocida</i>)	48
922	SDSU 73	PRRS 및 세균성 폐렴*	9
918	SDSU 73	PRRS 및 에스케리치아 콜리 (<i>Escherichia coli</i>)	23
973	MN 184	PRRS 및 액티노바실러스 수이스 (<i>Actinobacillus suis</i>)	14
992	MN 184	PRRS 및 에이. 수이스 (<i>A. suis</i>)	14
980	MN 184	PRRS 및 이. 콜리 (<i>E. coli</i>)	17
971	MN 184	PRRS 및 이. 콜리 (<i>E. coli</i>)	23
958	MN 184	PRRS 및 이. 콜리 (<i>E. coli</i>)	41
976	풀	PRRS 및 브이에스. 수이스 (<i>A. suis</i>)	12
970	풀	PRRS 및 에스. 수이스 (<i>A. suis</i>)	16
972	풀	PRRS 및 에스. 수이스 (<i>A. suis</i>)	17
995	풀	PRRS 및 에스. 수이스 (<i>A. suis</i>)	21
969	풀	PRRS 및 에이. 피오게네스 (<i>A. pyogenes</i>)	21

<93>

<94> * 진단 보고는 열거된 어떠한 특별한 제제가 없는 "세균성 폐렴"임을 지적했다.

<95> 폐의 면역조직화학적 평가

<96> 개별 그룹에 대해 관찰된 평균 IHC 스코어 및 PRRSV 병변이 크게 상이하지는 않았지만 바이러스 독성에 따른 IHC 스코어와 비교하는 경우 상당한 차이를 나타내었다. 평균 IHC 스코어 및 PRRSC 병변에 대해서 도 9 및 표 6를 참조한다.

표 6

<97> 바이러스 독성을 근거로 하는 평균 IHC 스코어

가변성	AVIR 평균	VIR 평균	ANOVA p 값
IHC	2.36	1.49	<0.0001*

<98> * = P ≤ 0.05에서 유의적임

<99> 토론

<100> 본 실시예의 한가지 목적은 조절된 챌린지 실험을 수행할 필요 없이 PRRSV 분리물의 바이러스 독성을 예측하는데 사용될 수 있는 생체내 복제와 관련이 있는지를 측정하기 위해 바이러스 독성 수준이 공지된 다양한 PRRSV 분리물을 조사하는 것이었다. 추가의 대상은 분리물 바이러스 독성, 바이러스 혈증 수준 및 체액성 항체 반응 간의 관계를 측정하는 것이다. 최종적으로, 본 발명의 방법을 사용하여 바이러스 독성인 것으로 밝혀진 PRRSV 분리물에 대한 백신을 개발하는 것이 대상일 수 있다. 당해 백신이 기타 바이러스 독성 분리물에 대한 어느 정도의 보호를 제공하는 것이 목표이지만 당해 교차-효과는 모든 PRRSV 분리물에 대해 일반적인 것은 아닐 수 있고 추가의 시험이 요구된다. 그러나, 본 발명은 백신 개발을 위한 주요 후보물을 동정하는데 효과적인 도구를 제공한다.

<101> 동일한 조건하에 PRRSV를 시험하기 위해, USDA에서 설정한 최소 면역 투여량 미만이고 상업적 투여량을 대표하

는 것이 아닌, 허가된 백신의 투여량을 사용할 필요가 있었다. 또한, 본 연구에 사용되는 MLV 백신의 비강 투여 경로는 USDA 지침에 따른 것은 아니고 단지 보다 천연 노출을 모방하기 위해 사용되었다. 변형된 생 PRRS 백신(Ingelvac PRRS 및 Ingelvac PRRS ATP)에 대한 이들 실험적으로 낮은 투여량은 본 실험에서 사용된 것 보다 훨씬 높았다. 변형된 생 PRRS 백신에 대한 이들 실험적으로 낮은 투여량은 실질적인 제품 용량 형태 및 본 분야에 사용되는 양태가 아니고 보고된 혈청학적 반응을 용이하게 설명하기 위한 것이다. 백신의 상업적 투여량을 사용하여, IDEXX 분석을 통해 측정된 바와 같은 혈청학적 역가는 14일까지 검출 가능하다. 대략 3log의 역가를 사용한 당해 시험에서, 혈청학적 반응은 지연되고 낮았다. 이것은 예상된 것이었지만 그룹간의 역가 투여의 일관성을 확실히하고 바이러스 독성 및 약독화된 분리물 간의 분석 및 비교를 용이하게 하기 위해 수행되었다. 본 실시예에서 구체적으로 설명되지 않았지만, 투여량의 효과는 노출 3 내지 7일 이내에 돼지 혈청에서 신속하게 증식하여 4log/ml 이상으로 회수될 수 있는 바이러스 독성 야생형 바이러스에 대한 것 보다 약독화되거나 이보다 못한 바이러스 독성 바이러스에서 훨씬 더 상당할 가능성이 있다. 보다 높은 용량으로 추천되는 근육내 상업적 투여량은 백신 접종 후 14일까지는 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR S/P 비율을 0.4 컷오프 이상이 되게하고 이것은 본 연구에 사용되는 투여량에 대해서 관찰되는 시간의 절반이다[문헌참조: Roof et al., 2003]. 본 연구에 사용되는 표준 용량, 즉 동물당 2×10^3 TCID₅₀은 분리물 MN 184를 투여받은 그룹에서 50% 치사율을 유발하고 모든 그룹에서 항-뉴클레오캡시드 반응이 나타난다. 보다 높은 투여량은 고도로 바이러스 독성인 분리물이 켈린지된 그룹에서의 과도한 치사율이 연구 목적을 손상시킬 수 있기 때문에 시험되지 않았다. 추가로, 이전의 연구는 동물당 $10^{2.2}$, $10^{3.2}$ 및 $10^{4.2}$ TCID₅₀의 투여량으로 PRRSV 분리물 VR2332가 접종된 어린 돼지에서 임상적 징후 및 바이러스 혈증에 대해 어떠한 차이를 나타내지 않았다.

<102> Log₁₀ TCID₅₀/ml 및 실시간 RT-PCR 결과 둘다 PRRSV 노출 후 바이러스 혈증 수준이 그룹간에 상당히 다양함을 보여주었다. 이것은 돼지에서 PRRSV의 증식 속도가 돼지의 감염 민감성에 대해 가능한 다양성과는 상관없는 바이러스의 표현형 특징임을 지적한다. 추가로, CL2621 세포에 대한 증식 적응에 의한 PRRSV의 약독화는 돼지에서의 증식 능력을 감소시킬 뿐만 아니라 바이러스 복제 역학을 변화시켜 최대 바이러스 혈증이 후기에 나타났다. 또한 창(Chang et al.(2002))등은 중간 정도의 바이러스 독성 PRRSV 분리물 VR2332에 대한 제한된 기간의 세포 배양 계대일지라도 돼지에서 바이러스 증식을 감소시키고 최대 바이러스 혈증이 나타나는 시간을 상당히 지연시킬 수 보여줌으로써 유사한 관찰이 이루어졌다. 그러나, 최대 바이러스 혈증을 나타내는 지연된 시간은 시험관내 세포 배양 계대 또는 약독화를 진단하는 것은 아닌데 그 이유는 고도로 바이러스 독성인 분리물 17198-6이 또한 최대 바이러스 혈증을 나타내는 시간을 지연시키기 때문이다.

<103> 종합적으로, 바이러스 독성 분리물은 동등한 접종 용량에서 약독화된 분리물 보다 혈청에서 실질적으로 높은 바이러스 혈증 수준을 보여주었다. 예를 들어, 약독화된 분리물의 임의의 노출 그룹에서 최고인 것으로 관찰된 바이러스 역가는 Ingelvac[®] PRRS ATP가 투여된 돼지에서 제15일째에 1.22 로그인 반면 제15일째에 임의의 바이러스 독성 그룹의 최저 역가는 SDSU 73 그룹에서 2.40 로그였다. 제3일 내지 제7일째의 바이러스 혈증 최대치 및 검출된 바이러스 수준(모두 3.5 log/ml 초과)은 바이러스 독성 PRRSV 분리물간에 매우 일정하였지만 MN 184는 이의 정도 및 지속기간이 상당히 높았고 제28일 및 제35일째에도 여전히 바이러스 역가가 존재하였다. 이것은 고도로 바이러스 독성인 PRRSV 분리물은 약독화되거나 보다 낮은 바이러스 독성 분리물 보다 생체내에서 실질적으로 높은 역가로 복제하지만 이들은 야생형 PRRSV중에 바이러스 독성 수준과 생체내 증식 속도간에 직접적인 정량적 관계를 설정하지 못한다는 개념을 지지한다[문헌참조: Haynes et al. 1997]. 당해 그룹은 MN 184 분리물을 사용한 제2 노출로부터 다양한 보호를 보여주었다. 예를 들어, 초기에 MN 184 분리물을 투여 받은 MN 184 또는 풀 그룹에서 어떠한 바이러스도 검출되지 않았다. 이것은 Abst-1이 MN 184에 대한 노출 후 매우 적은 보호를 제공함을 나타내는 것일 수 있다. 이들 관찰은 추가로 동종성 노출이 이종성 노출 보다 큰 보호를 제공한다는 개념을 확고히한다. 동종성 바이러스 독성 노출은 보다 보호적이고 이종성 바이러스 독성 노출은 덜 보호적이지만 이종성 약독화된 노출 보다는 여전히 보호적이다.

<104> 실시간 RT-PCR 결과는 통계학적으로 Log₁₀ TCID₅₀/ml 결과 매우 유사하고 이것은 2개의 방법이 그룹중에 감염 바이러스의 상대적 수준을 측정함을 시사한다. 제7일째에 RT-PCR과 Log₁₀/ml간의 피어슨(Pearson) 상관관계 계수는 0.89였고 평균 실시간 RT-PCR과 log₁₀ TCID₅₀/ml 결과에 대해서는 0.88이었다. 실시간 RT-PCR에 의해 측정된 농도값은, 표적 앰플리콘을 함유하는 바이러스 입자의 출현 횟수와 CL2621 세포에 대해 완전히 감염성인 입자 및 감염성을 저하시킬 수 있는 중화 항체의 존재를 포함하는 여러 이유때문에 log₁₀ TCID₅₀/ml 값 보다 몇배 높

을 수 있다[문헌참조: Dianzani et al., 2002]. 그러나, 중화 항체는 그 차이를 설명할 수 없는데 그 이유는 항-PRRSV 항체 반응이 나타나기 전의 시간을 포함하는 모든 시점에서 관찰되었기 때문이다.

<105> 실시간 PCR에 의해 측정된 카피수/ml 값은 TCID₅₀/ml로 세포 배양에서 측정된 감염성 역가보다 높았다. 이것은 바이러스 계승 카피수를 기초로 하는 표준 곡선이 통상적으로 공지된 감염성 비리온 보다는 차라리 바이러스의 계승 서열을 직접적으로 증폭시키는 정량적 PCR을 위해 사용되기 때문이다. 세포 배양과 같은 생물학적 분석은 감염성의 존재를 측정하지만 이들은 체내에 존재하는 모든 감염성 입자를 나타낼 수는 없다. 세포 배양 조건 및 바이러스를 중화시킬 수 있는 생체내 항체와 같은 감염성 역가에 영향을 줄 수 있는 인자는 기타 연구에서 관찰되었고 혈청에서 TCID₅₀/ml에서 측정되는 감염성 바이러스의 양을 과소평가한다. 또한, 고카피수에 의해 반영되는 몇몇 비감염성 또는 복제 결손 바이러스가 존재할 수 있다.

<106> 일반적으로, ELISA 관찰은 체액성 면역 반응 정도가 급성 감염동안에 바이러스 복제 수준과 관련이 있다는 개념을 지지한다. 도 4 및 5에 나타난 경향은 당해 관계를 설명한다. 보다 느리거나 강도가 덜한 체액성 면역 반응은 세포 배양 약독화된 바이러스 분리물에 의해 유발되는 반면, 보다 신속하고 보다 강한 체액성 면역 반응은 바이러스 독성 분리물에 의해 유발된다. 추가로, 이들 관찰은 또한 2개 이상의 인자, 즉 분리물 유형 및 감염성 용량이 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR에서 상대적 S/P 비율 값에 영향을 미침을 입증한다. 도 3에 나타난 ELISA 결과는 명백한 양성 또는 음성 평균 그룹 반응을 나타내지만 개별 동물간의 다양성을 나타내는데 중요하다. 약독화된 바이러스 그룹내의 몇몇 돼지는 제21일 전에 양성이었다고 바이러스 독성 글루에서 몇몇 돼지는 제 21일 까지도 음성이었다.

<107> N 및 nsp 4에 대한 특이적 항체 반응 분석은 PRRSV에 대한 면역 반응이 접종 분리물에 상관없이 강도에 있어서 다양함을 보여준다. 바이러스 독성이 높은 분리물 MN 184 및 JA 142가 접종된 동물에서 N 단백질에 대한 항체 반응은 모든 분리물의 반응과 유사한 경향을 나타내지만 세밀하게는 보다 높다. MN 184 및 JA 142가 접종된 돼지는 또한 도 1 및 2에 나타난 바와 같이 최고의 바이러스 역가를 가졌다. 이것은 체액성 면역 반응의 수준이 바이러스 역가에 의해 측정되는 바와 같이 급성 감염에서 바이러스 로드와 관련될 수 있음을 지적한다. 흥미롭게도, 반응 경과는 모든 그룹에서 동일하지만 최고 역가에 도달하는 시간은 바이러스 독성이 높은 분리물 17198-6 및 약독화된 분리물에 대해 지연되었다. 대조적으로 nsp 4 항체 반응은 모든 시점에서 및 약독화되거나 바이러스 독성인 분리물 모두에서 낮았다. 항-nsp 4 반응의 시간 경과, 항-N-항체 반응에 대해서 관찰되는 바와 같이 그룹간의 최대 바이러스 로드와 대한 시간의 차이에도 불구하고 모든 그룹에서 동등하였다. 모든 돼지는 도 7에 나타난 바와 같이 낮은 항-nsp 4 반응을 갖는다.

<108> 이들 관찰은 몇몇 PRRSV 단백질이 노출 분리물 바이러스 독성과는 상관없이 숙주 면역 시스템으로부터 보다 강한 반응을 유발함을 지적한다. 그러나, 당해 관찰은 또한 보다 면역원성인 단백질에 대한 면역 반응 정도가 노출 분리물의 바이러스 독성 또는 분리물의 생체내에서의 복제 능력과 관련될 가능성이 있음을 지적한다. 또한, 항체 반응의 차이는 단순히 분리물간의 유전자 차이로 인해 항원 반응성의 차이를 유발하여 기타 분리물의 N 및 nsp4에 대한 항체가 ELISA 플레이트를 피복하는데 사용되는 분리물 VR2332로부터 발현된 재조합 단백질에 반응하지 않거나 불량하게 반응할 가능성이 있다. 그러나, 여러 증거는 관찰된 항체 수준의 차이가 면역학적으로 관련된 반응을 반영하는 것임을 시사한다. 분리물 MN 184는 ORF 5 비교에 의해 측정되는 바와 같이 VR2332와 가장 큰 유전자 차이를 나타내지만 여전히 가장 높은 항-N 항체 반응을 갖는다. 문헌[참조: Kapur et al.(1996)은 이전에 하나의 개방 판독 프레임에서 PRRSV 분리물간의 상대적 차이가 또한 다른 개방 판독 프레임에 존재함을 보여주었다. 추가로, 개별 단백질은 보존성 및 비보존성 영역을 함유하고(예를 들어, Kapur et al., 1996) 광범위한 면역 반응성이 보존성 에피토프에 대한 것일 수 있다[문헌참조: Ostrowski et al., 2002]. 그럼에도 불구하고, 정제된 PRRSV 단백질과 항체 반응을 근거로하는 ELISA 결과는 유전자 및 항원 다양성에 의해 영향받을 수 있고 이들 효과가 고려되어야만 한다. 재조합 단백질의 재폴딩이 수행되었지만 재폴딩되지 않거나 재폴딩된 단백질로 피복된 ELISA 피복물간에는 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

<109> 접종한지 약 4 내지 5주째에, N 및 nsp 4 단백질 둘다에 대한 항체 반응이 상대적으로 크게 감소하였다. 1 내지 2주째의 유사한 최대치 이후에 항체 반응이 감소한다는 것이 이전에 문헌[Foss et al. (2002)]에 의해 주요 외피 당단백질인 GP5에 대해서도 주지되었다. 이를 종합해 보면, 당해 관찰은 개별 바이러스 단백질에 대한 반응이 또한 PRRSV에 대한 돼지의 면역 반응의 완전한 윤곽을 나타내지 못함을 시사하는데, 그 이유는 HerdChek[®] PRRS ELISA 2XR에 의해 측정된 바와 같은 체액성 면역 반응이 항체 반응성에 대한 유사한 일시적 최대치가 나타나지 않기 때문이다.

- <110> 감소된 증식 및 치사율은 바이러스 독성 및 바이러스 생체내 증식율의 주요 상관관계이다. 바이러스 독성 분리물 노출 그룹에서 관찰되는 보다 낮은 평균 체중은 PRRSV 분리물이 생체내에서 복제하고 돼지에서 보다 심각한 질병을 유도하는 능력의 차이를 반영할 가능성이 높다. 이들 관찰은 PRRSV 감염이 매일 체중 증가의 25 내지 40% 감소와 함께 식욕 감퇴를 유발할 수 있다는 이전에 보고된 데이터와 일치한다[문헌참조: Thacker, 2003]. 바이러스 독성 분리물에 노출된 동물의 임상적 스코어는 접종 후 일찍이 급속히 증가함을 보여주는 반면 약독화된 바이러스 노출 동물의 스코어는 실질적으로 어떠한 변화가 없었다. 임상적 징후에서의 이러한 증가는 PRRSV 분리물 MN 184, SDSU 73 및 JA 142 각각을 투여받은 바이러스 독성 노출 그룹에서 관찰된 50%, 20% 및 10% 치사율을 반영하였다. 대조적으로, 약독화된 노출 그룹에서는 어떠한 죽음을 초래하지 않았다. 동일한 바이러스 노출 조건하에 신속한 바이러스 증식과 바이러스 병원성과의 관계는 MN 184와 Abst-1에 노출된 그룹과 비교하는 경우에 가장 명백하다. 접종 역가는 각각 4.10log/ml 및 4.18 log/ml로서 실질적으로 동일하지만 도 8에 지적된 바와 같이, 2개의 분리물이 돼지에 영향을 미치는 방식에는 뚜렷한 차이가 있었다. Abst-1 분리물은 거의 불활성이어서 생체내에서 거의 복제하지 못하여 어떠한 임상적 징후를 유발하지 않았다. 대조적으로, MN 184 분리물은 생체내에서 고도로 높은 역가로 복제하여 심각한 임상적 징후를 유발함으로써 노출된 동물의 50%가 죽었다. 또한 명백하게도, 모든 바이러스 분리물의 풀에 노출된 돼지 그룹은 MN 184에 노출된 돼지와 거의 동일한 바이러스학적, 임상적 및 면역학적 반응을 나타내었다. 이러한 발견은 혼합 감염에서 가장 신속하게 복제하는 바이러스가 기타 분리물과의 경쟁을 능가하여 결국 결과는 가장 높은 증식력을 갖는 단일 분리물에 의한 감염과 실질적으로 동일할 가능성이 있음을 지적한다.
- <111> 바이러스 독성 분리물과 약독화된 PRRSV 분리물간의 명백한 생체내 차이는 분리물의 독성과 이의 생체내 증식 및 복제간의 관계를 해명한다. 돼지에서 동등한 용량으로 투여되는 경우, 바이러스 독성이 보다 높은 분리물이 Log₁₀ TCID₅₀/ml 역가를 보여주고 RT-PCR 농도는 약독화된 분리물 보다 지수적으로 높다. 바이러스 독성 분리물은 보다 신속하고 강력한 체액성 면역 반응을 유도한다. 바이러스 독성 분리물은 약독화된 분리물에 비교하여 체중 증가에 악영향을 미치고 치사율을 증가시키고 임상적 징후를 보다 심각하게 한다.
- <112> 결론적으로, 본원의 실시예 및 시험은 약독화된 PRRSV 분리물 및 바이러스 독성 PRRSV 분리물이 강도가 상이한 면역 반응 뿐만 아니라 현저하게 상이한 임상적 징후를 유도함을 시사한다. 이들 차이는 혈청 샘플에서 정량적으로 측정될 수 있고 PRRSV 분리물의 바이러스 독성을 예측하기 위해 개발될 수 있는 표현형 특성인 바이러스의 생체내 복제 능력때문이다.
- <113> 실시예 2
- <114> 본 실시예는 PRRS 분리물을 약독화시키는 여러 방법 및 면역원성 조성물에 이를 포함시키는 방법을 제공한다.
- <115> 재료 및 방법
- <116> 백신 제제는 PRRS에 의한 감염으로부터 돼지를 면역화시키기 위해 변형되거나 약독화된 생 바이러스를 혼입하여 제형화한다. 백신 제제를 위한 PRRSV 바이러스는 MA-104 연속 세포주, 바람직하게는 ATCC No. CL2621에서 증식시킨다. 세포주는 10% 태아 소 혈청이 첨가된 MEM 함유 플라스크에서 증식시킨다. 배지 pH는 약 7.2로 조정하고 약 37°C에서 배양한다. 이어서 약 1ml의 동결 접종물을 유체 배지에 첨가하여 세포에 바이러스를 접종한다. 바이러스가 24시간동안 세포에 흡수되도록 방치한다. 이 시점에서, 증식 배지는 4% 태아 소 혈청(pH 7.6)이 첨가된 MEM으로 이루어진 유지 배지로 변환된다. 당해 환경은 바람직하게 35°C 내지 37°C이다. 바이러스는 MA-104 세포 스위트의 50%가 바이러스에 의해 파괴될때까지 증식시킨다. 이어서 샘플을 동결시키고 MA-104 세포의 또 다른 플라스크에 계대할 준비를 하였다. 이러한 과정은 세포주에서 바이러스의 25회 계대동안 계속한다. 이어서 바이러스는 상기된 바와 동일한 기술을 사용하여 35°C 내지 37°C에서와는 반대로 약 31°C에서 또한 12배 증식된다. 12번째 계대물을 소적으로 동결시키고 마스터 씨드 바이러스로서 지정한다.
- <117> 하기에서 바람직한 방법의 세부 사항을 제시한다.
- <118> I. 배지:
- <119> a. 제조원[JRH Biosciences, #200-2014]으로부터의 이글 최소 필수 배지(MEM)
- <120> b. 제조원[JRH biosciences]으로부터 태아 소 혈청(FCS)
- <121> c. 세포 배양 증식 배지-MEM + 10% 태아 소 혈청
- <122> d. 유지 배지-MEM 4% 태아 소 혈청

- <123> e. 트립신-베르센 IX
- <124> f. 중탄산나트륨 5% 또는 포화됨
- <125> II. 조직 배양
- <126> 사용된 세포주: MA-104(20회 계대 수준(계대 58-78) 이내로 유지되는 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포),
- <127> III. 장치:
- <128> 75cm 조직 배양 플라스크
- <129> 35 내지 37°C로 설정된 배양기
- <130> 3°C로 설정된 배양기
- <131> 원심분리
- <132> IV. 25°C 내지 37°C에서 증식된 PRRSV 바이러스를 약독화시키는데 사용되는 방법
- <133> A. 조직 배양 스톱의 제조:
- <134> 5 내지 7일된 MA-104 75cm² 스톱 병을 하기의 방식으로 1:4로 분할한다:
- <135> a. 모든 배지(병당 50ml)를 버린다.
- <136> b. 5 내지 10분동안 37°C에서 항온처리함에 의해 트립신-베르센 10ml을 사용하여 세포 슈트를 제거한다.
- <137> c. 병으로부터 세포를 제거하고 5 내지 10분동안 270 x g에서 원심분리한다.
- <138> d. 상등액을 버리고 세포를 증식 배지 5 내지 10ml중에 재현탁시킨다(MEM 10% FCS).
- <139> e. 1:4의 분할을 위해 병당 50ml의 4개의 75cm 병으로 분배되는 200ml의 MEM 10% FCS에 모든 세포를 넣는다. 이어서 병을 필요할때까지 35°C 내지 37°C에 유지시킨다(또한 CQ 부재하에 수행될 수 있다).
- <140> f. 온전한 세포 슈트를 형성한 3 또는 4일된 병의 사용 준비를 완료한다.
- <141> g. 플라스크중 배지 50ml의 pH를 7.2로 조정함에 이어서 1ml의 바이러스를 배지에 첨가하고 플라스크를 필요할 때까지 35°C 내지 37°C에 유지시킨다(또한 CQ 부재하에 수행될 수 있다).
- <142> h. 24시간 후, 배지를 버리고 플라스크에 MEM 4% FCS(pH 7.6) 50ml을 재주입하고 35°C 내지 37°C에 다시 넣는다.
- <143> i. 이러한 유체 변화 24시간 후에 CPE가 나타나야만 하고 50 내지 60%의 공극이 세포 슈트에 존재하는 경우 동결시킨다.
- <144> j. 상기 병을 해동시키고 당해 유체 1ml을 취하여 상기된 바와 같이 새로운 75cm 병에 담아서 다음 바이러스 계대를 수행한다.
- <145> 이러한 상기 과정은 총 25회 동안 35 내지 37°C에서 수행한다.
- <146> 31°C에서 증식한 PRRSV 바이러스를 약독화시키는데 사용되는 방법. 바이러스 35°C 내지 37°C에서 25회 계대된 바이러스를 사용하여 31°C에서 증식한 바이러스를 1회 계대시킨다.
- <147> A. 조직 배양 스톱의 제조:
- <148> 5 내지 7일된 MA-104 75cm² 스톱 병을 하기의 방식으로 1:4로 분할한다:
- <149> a. 모든 배지(병당 50ml)를 버린다.
- <150> b. 5 내지 10분동안 37°C에서 항온처리함에 의해 트립신-베르센 10ml을 사용하여 세포 슈트를 제거한다.
- <151> c. 병으로부터 세포를 제거하고 5 내지 10분동안 270 x g에서 원심분리한다.
- <152> d. 상등액을 버리고 세포를 증식 배지 5 내지 10ml중에 재현탁시킨다(MEM 10% FCS).
- <153> e. 1:4의 분할을 위해 병당 50ml의 4개의 75cm 병으로 분배되는 200ml의 MEM 10% FCS에 모든 세포를 넣는다.

이어서 병을 필요할 때까지 35°C 내지 37°C에 유지시킨다(또한 CO₂ 부재하에 수행될 수 있다).

- <154> f. 온전한 세포 슈트를 형성한 3 또는 4일된 병의 사용 준비를 완료한다.
- <155> g. 플라스크중 배지 50ml의 pH를 7.2로 조정함에 이어서 1ml의 바이러스를 배지에 첨가하고 플라스크를 31°C에 유지시킨다(또한 CO₂ 부재하에 수행될 수 있다).
- <156> h. 24시간 후, 배지를 버리고 플라스크에 MEM 4% FCS(pH 7.6) 50ml을 재주입하고 31°C에 다시 넣는다.
- <157> i. 이러한 유체 변화 24시간 후에 CPE가 나타나야만 하고 50 내지 60%의 공극이 세포 슈트에 존재하는 경우 동결시킨다.
- <158> j. 상기 병을 해동시키고 당해 유체 1ml을 취하여 SIRS VR-2332 바이러스의 다음 바이러스 계대를 수행한다.
- <159> 이러한 상기 과정을 총 12회 동안 31°C에서 수행한다. 31°C에서 증식한 바이러스의 12번째 계대물은 백신 제조를 위한 마스터 씨드 바이러스로서 지정한다.
- <160> 유전자 결실에 의한 PRRS 바이러스의 약독화
- <161> 당업자는 유전자 결실의 통상적인 방법을 통해 PRRSV를 약독화시킬 수 있다. 일반적으로, 당해 방법은 바이러스의 독성 표현형을 암호화하는 유전자의 결실을 포함한다. 당해 방법은 본원에 참조로서 인용되는 문헌[참조: Elbers et al. (미국 특허원 제 20020012670호) 또는 Schall et al (미국 특허 제 6,740,324호)]으로부터 채택될 수 있다.
- <162> 온도 민감성 돌연변이에 의한 PRRS 바이러스의 약독화
- <163> 당업자는 또한 온도 민감성 돌연변이의 통상적인 방법을 통해 PRRSV를 약독화시킬 수 있다. 일반적으로 당해 방법은 바이러스가 활성인 온도 범위를 제한하는 돌연변이의 유발을 포함한다. 예를 들어, 문헌[참조: Skiadopoulos et al., "dentification of Mutations Contributing to the Temperature-Sensitive, Cold-Adapted, and Attenuation Phenotypes of the Live-Attenuated Cold-Passage 45 (cp45) Human Parainfluenza Virus 3 Candidate Vaccine" 73 No. 2 *Journal of Virology* 1374, (February 1999)]의 방법은 PRRSV에 대해 사용하기 위해 채택할 수 있다. 문헌[Skiadopoulos et al]의 교시 및 내용은 본원에 참조로서 인용된다.
- <164> 감염성 클론 생성에 의한 PRRS 바이러스의 약독화
- <165> 당업자는 또한 감염성 클론을 생성시키는 통상적인 방법을 통해 PRRSV를 약독화시킬 수 있다. 당해 방법은 일반적으로 목적하는 바이러스 유전자형의 전장 cDNA 클론의 제조를 포함하고 이때 당해 클론은 표적 동물에서 바이러스 독성이다. 예를 들어, 문헌[참조: Nielson et al., "Generation of an Infections Clone of VR-2332, a Highly Virulent North American-Type Isolate of Procine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus" 77 *Journal of Virology* 3702 (Mar. 2003)]의 방법은 약독화된 버전의 PRRSV에 대해 채택될 수 있다. 문헌[참조: Nielson et al]의 교시 및 내용은 본원에 참조로서 인용된다.
- <166> 유전자 삽입에 의한 PRRS 바이러스의 약독화
- <167> 당업자는 또한 유전자를 삽입시키는 통상적인 방법을 통해 PRRSV를 약독화시킬 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 당해 바이러스의 병원성 바이러스를 억제하는 바이러스내로 유전자를 삽입시키는 방법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[참조: Schall et al. (미국 특허 제6,740,324호)]은 당해 약독화된 버전의 PRRSV에 대해 채택할 수 있다. 문헌[참조: Schall et al]의 교시 및 내용은 본원에 참조로서 인용된다.
- <168> 치환에 의한 PRRS 바이러스의 약독화
- <169> 당업자는 또한 코돈 및 염기쌍을 치환시키는 통상적인 방법을 통해 PRRSV를 약독화시킬 수 있다. 일반적으로, 코돈 또는 염기쌍 치환은 코돈 또는 염기쌍을 상이한 코돈 또는 염기쌍으로 치환시켜 바이러스 유전자가 바이러스의 병원성을 제한하는 단백질을 암호화하도록 하는 방법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[참조: McAuliffe et al., "Codon Substitution Mutations at Two Positions in the L Polymerase Protein of Human Parainfluenza Virus Type 1 Yield Viruses with a Spectrum of Attenuation In Vivo and Increased Phenotypic Stability In Vitro" 78 *Journal of Virology* 2029 (February 2004)]의 코돈 치환 방법은 PRRSV를 약독화시키는 유전자 치환 방법을 제조하기 위해 채택할 수 있다. 또한 문헌[참조: Hurrelbrink and McMinn, "Attenuation of Murray Valley Encephalitis Virus by Site-Directed Mutagenesis of the Hinge and Putative Receptor-Binding Regions of the Envelope Protein" 75 *Journal of Virology* 7692 (August 2001)

and Elbers et al. (US Pat. App. No. 20020012670)]은 약독화된 PRRSV 분리물을 제조하는데 채택할 수 있는 염기쌍 치환 방법을 제공한다. 문헌[참조: McAuliffe et al., Hurrelbrink and McMinn, and Elbers et al.]의 교시 및 내용은 본원에 참조로서 인용된다.

- <170> 키메라 PRRS 작제물의 사용에 의한 PRRS 바이러스의 약독화
- <171> 당업자는 또한 키메라를 작제하는 통상적인 방법을 통해 PRRSV를 약독화시킬 수 있다. 일반적으로, 키메라 작제물은 상이한 종 기원의 유전자를 함유하여 숙주 세포에서 항원 반응을 유도하는 작제물이다. 예를 들어, 당해 작제물은 문헌[참조: Harris et al. (미국 특허원 제20040157307호)]의 방법을 PRRS 유전자와 함께 키메라 유전자를 작제하는데 사용하여 작제할 수 있다.
- <172> 약독화된 PRRS 분리물의 면역원성 조성물로의 혼입
- <173> 신규 분리물이 바람직하게 상기된 방법중 하나에 의해 약독화된 후, 약독화된 분리물은 PRRS의 바이러스 독성 분리물에 대한 면역 반응을 제공하는데 효과적인 조성물로 혼입될 수 있다. 바람직한 형태에서, 당해 조성물은 유효량의 조성물을 투여받은 동물에게 PRRS 감염에 대한 보호 면역을 제공한다. 당해 보호 면역는 바이러스 접종됨에 이어서 바이러스 독성 PRRS 분리물에 노출되거나 이에 의해 감염된 동물에서 PRRS의 심각한 임상적 징후를 감소시킨다. 바람직하게, 당해 임상 징후는 유효량의 면역원성 조성물 또는 백신의 투여에 의해 예방된다. 몇몇 형태에서, 약독화된 PRRS 분리물을 사용하여 변형된 생 바이러스 백신을 제조하고 이때 약독화된 분리물은 면역원성 조성물중에 이의 생존 상태로 사용된다. 또 다른 형태에서, 약독화된 분리물은 면역원성 조성물에 혼입시키기 전에 사멸되거나 불활성화된다.
- <174> 문헌참조

<175> 하기 참조문헌 각각의 교시 및 내용은 본원에 참조로서 인용된다

Albina, E., Piriou, L., Hutet, E., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., 1998. Immune Responses in Pigs Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61**, 49-66.

Andreyev, V. G., Wesley, R. D., Mengeling, W. L., Vorwald, A. C., Lager, K. M., 1997. Genetic Variation and Phylogenetic Relationships of 22 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Field Strains Based on Sequence Analysis of Open Reading Frame 5. *Arch. Virol.* **142**, 993-1001.

Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a New Order Comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* **142**, 629-633.

Chang, C. C., Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., Harmon, K. M., Dixon, P. M., Dvorak C. M. T., Murtaugh, M. P., 2002. Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus During Sequential Passages in Pigs. *J. Virology.* **76**, 4750-4763.

Grebennikova, T. V., Clouser, D. F., Vorwald, A. C., Musienko, M. I., Mengeling, W. L., Lager, K. M., Wesley, R. D., Biketov, S. F., Zaberezhny, A. D., Aliper, T. I., Nepoklonov, E. A., 2004. Genomic Characterization of Virulent, Attenuated, and Revertant Passages of North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain. *Virology.* **321**, 383-390.

Dianzani F., G. Anelli, E.Riva, O. Turriziani, L. Antonelli, S. Tyring, D. Carrasco, H. Lee, D. Nguyen, J. Pan, J. Poast, M. Cloyd, S. Baron. 2002. Is Human Immunodeficiency Virus Rna Load Composed Of Neutralized Immune Complexes? *Journal of Infectious Diseases.* **185**:1051-1054.

Foss, D.L., Zilliox, M.J., Meier, W., Zuckermann, F., Murtaugh, M.P. 2002. Danger Signals Increase the Immune Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Virus Res.* **15**, 557-566.

Halbur, P. G., Pallares, F. J., Rathje, J. A., Evans, R., Hagemoser, W. A., Paul, P. S., Meng, X. J., 2002. Effects of Different Us Isolates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) on Blood and Bone Marrow Parameters of Experimentally Infected Pigs. *Vet Rec.* **21**, 344-348.

Halbur, P. G., Paul, P. S., Meng, X. J., Lum, M. A., Andrews, J. J., Rathje, J. A., 1996. Comparative Pathogenicity of Nine Us Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Isolates in a Five-week-old Cesarean-derived, Colostrums-deprived Pig Model. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**, 11-20.

Haynes, J. S., Halbur, P. G., Sirinarumitr, T., Paul, P. S., Meng, X. J., Huffman, E. L., 1997. Temporal and Morphologic Characterization of the Distribution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) by in Situ Hybridization in Pigs Infected with Isolates of PRRSV That Differ in Virulence. *Vet. Pathol.* **34**, 39-43.

Hill, H., 1990. Overview And History Of Mystery Swine Disease (Swine Infertility And Respiratory Syndrome). In *Mystery Swine Disease Communication Meeting. Denver, CO*, pp. 29-31.

Kapur, V., Elam, M.R., Pawlovich, T.M. Murtaugh, M.P. 1996. Genetic Variation In PRRS Virus Isolates In The Midwestern United States. *J. Gen. Virol.* **77**, 1271-1276.

Key, K. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Swenson, S. L., Toth, T. E., Meng, X. J., 2001. Genetic Variation And Phylogenetic Analyses Of The Orf5 Gene Of Acute Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Isolates. *Vet. Micro.* **83**, 249-263.

<176>

Labarque, G., Van Gucht, S., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 2003. Respiratory Tract Protection Upon Challenge Of Pigs Vaccinated With Attenuated Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Vaccines. *Vet. Micro.* **95**, 187-197.

Meng, X. J., 2000. Heterogeneity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Implications for Current Vaccine Efficacy and Future Vaccine Development. *Vet. Micro.* **74**, 309-329.

Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., Clouser, D. F., 2003a. Comparative Safety and Efficacy of Attenuated Single-strain and Multi-strain Vaccines for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet. Micro.* **93**, 25-38.

Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., Koehler, K. J., 2003b. Strain Specificity of the Immune Response of Pigs Following Vaccination with Various Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Micro.* **93**, 13-24

Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., 1998. Clinical Effects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on Pigs During the Early Postnatal Interval. *Amer. J. Vet Res.* **59**, 52-55.

Murtaugh, M.P., K.S. Faaberg, J. Laber, M. Elam, and V. Kapur. 1998. Genetic Variation In The PRRS Virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 787-794.

Murtaugh, M. P., Xiao, Z., Zuckermann, F., 2002. Immunological Responses Of Swine To Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Infection. *Viral Immunology.* **15**, 533-547.

Nodelijk, G., de Jong, M. C. M., van Leengoed, L. A. M. G., Wensvoort, G., Pol, J. M. A., Steverink, P. J. G. M., Verheijden, J. H. M., 2001. A Quantitative Assessment Of The Effectiveness Of PRRSV Vaccination In Pigs Under Experimental Conditions. *Vaccine* **19**, 3636-3644.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J. 2002. Identification Of Neutralizing And Nonneutralizing Epitopes In The Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Gp5 Ectodomain. *J. Virol.* **76**, 4241-4250.

Opriessnig, T., Halbur, P. G., Yoon, K. J., Pogranichniy, R. M., Harmon, K. M., Evans, R., Key, K. F., Pallares, F. J., Thomas, P., Meng, X. J., 2002. Comparison Of Molecular And Biological Characteristics Of A Modified Live Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccine (Ingelvac PRRS Mlv), The Parent Strain Of The Vaccine (Atcc Vr2332), Atcc Vr2385, And Two Recent Field Isolates Of PRRSV. *J. Virol.* **76**, 11837-11844.

Pejsak, Z., Stadejek, T., Markowska-Daniel, I., 1997. Clinical Signs And Economic Losses Caused By Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus In A Large Breeding Farm. *Vet. Micro.* **55**, 317-322.

Reed, L., Muench, H., 1938. A Simple Method For Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am J Hyg.* **27**, 493-497.

Roof, M.B., Vaughn, E.M., Burkhart, K.M., Faaberg, K.S. 2003. Efficacy Of Modified Live Virus Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Vaccines Against Heterologous Respiratory Challenge. *Proc. 4th Inter. Symp. Emerging Re-emerging Pig Diseases.* pp. 117-118.

Thacker, B., 2003. Clinical Manifestations Of PRRS Virus. In: *Zimmerman, J., Yoon, K. J. (Eds.), 2003 PRRS Compendium Second Edition. National Pork Board, Des Moines IA USA*, pp. 7-12.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., Ackermann, M. R., Thacker, E. L., Royer, R. L., 1998. Effects Of Low (Modified-live Virus Vaccine) And High (Vr-2385)-virulence Strains Of Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus On Pulmonary Clearance Of Copper Particles In Pigs. *Vet. Pathol.* **35**, 398-406.

<177>

Yuan, S., Mickelson, D., Murtaugh, M. P., Faaberg, K. S., 2001. Erratum To "Complete Genome Comparison Of Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Parental And Attenuated Strains". *Virus Research.* **79**, 189-200.

<178>

도면의 간단한 설명

<25>

도 1은 실시예 1의 돼지 시험을 위해 log₁₀ TCID₅₀/ml로서 나타내는 평균 혈청 바이러스 역가 대 시간에 대한 그래프이다.

<26>

도 2는 실시간 RT-PCR에 의해 측정된 바와 같이, 실시예 1의 돼지 시험에서 혈청내 평균 PRRSV 바이러스 농도에 대한 그래프이다.

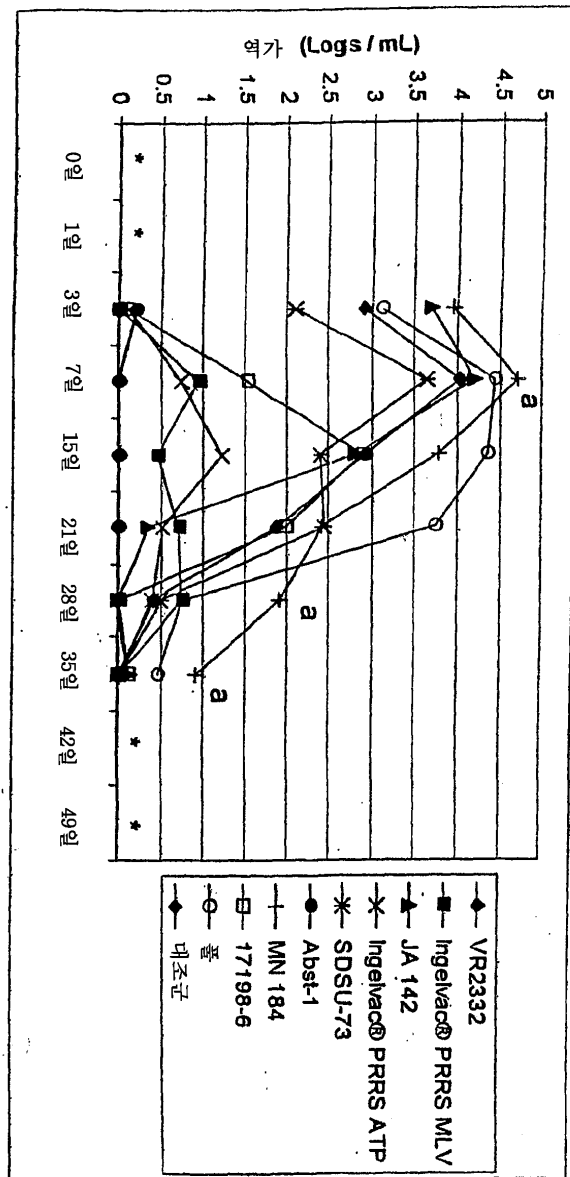
<27>

도 3은 시판되는 ELISA 분석을 사용하여 평균 S/P 비율 대 시간에 대한 그래프이다.

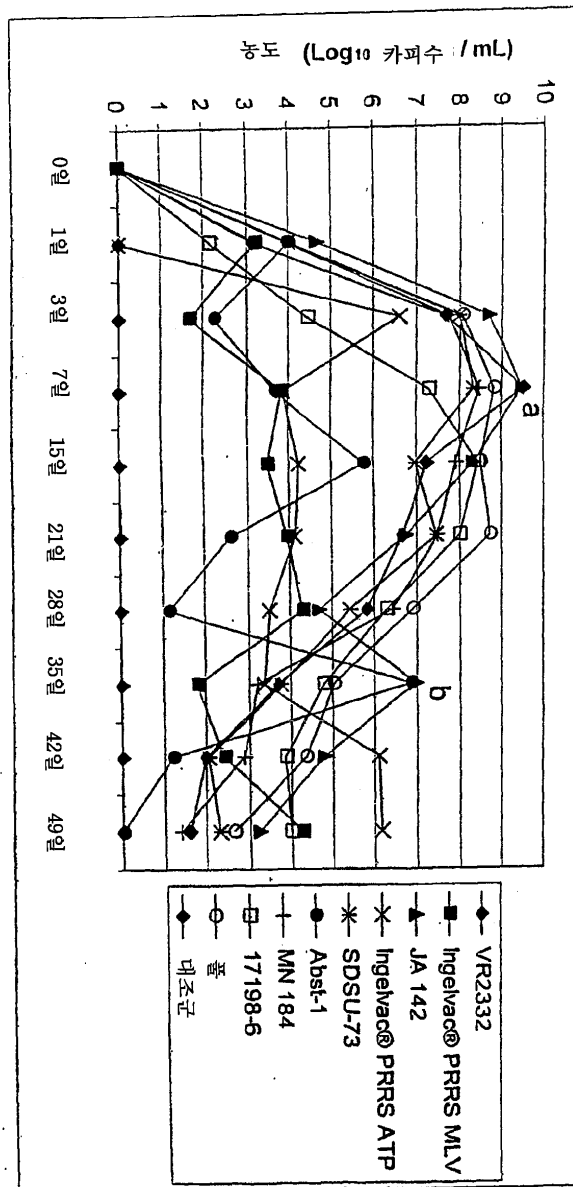
- <28> 도 4는 실시예 1의 시판되는 ELISA 분석 및 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 데이터에 대해 반복되는 측정 분석을 설명하는 그래프로서 여기서, ELISA S/P 비율 곡선하의 그룹 평균 면적은 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 하의 그룹 평균 면적에 대해 플롯팅되었다.
- <29> 도 5는 실시예 1의 시판되는 ELISA 분석 및 RT-PCR 농도 데이터에 대해 반복되는 측정 분석을 설명하는 그래프로서, 여기서, ELISA 비율 곡선 이하의 그룹 평균 면적은 RT-PCR 농도 곡선하의 그룹 평균 면적에 대해 플롯팅되었다.
- <30> 도 6a는 실시예 1의 흡광도 대 시간에 대한 그래프이다.
- <31> 도 6b는 nsp-4 IgG 반응에 대한 PRRSV 분리물의 효과를 설명하는 흡광도 대 시간의 그래프로서, 당해 데이터는 동물이 죽은 경우를 제외한 10마리 동물의 평균 값이다.
- <32> 도 7은 실시예 1의 nsp-4 및 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 데이터를 사용하는 반복되는 측정 분석을 설명하는 그래프로서, 여기서, nsp-4 곡선하의 그룹 평균 면적은 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 곡선하의 그룹 평균 면적에 대해 플롯팅되었다.
- <33> 도 8은 실시예 1의 임상 스코어 및 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 데이터를 사용하는 반복되는 측정 분석에 대한 그래프로서, 여기서, 임상 스코어하의 그룹 평균 면적은 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 곡선의 그룹 평균 면적에 대해 플롯팅되었다.
- <34> 도 9는 본원에서 각각의 분리물의 IHC 스코어에 대한 그래프이다.

도면

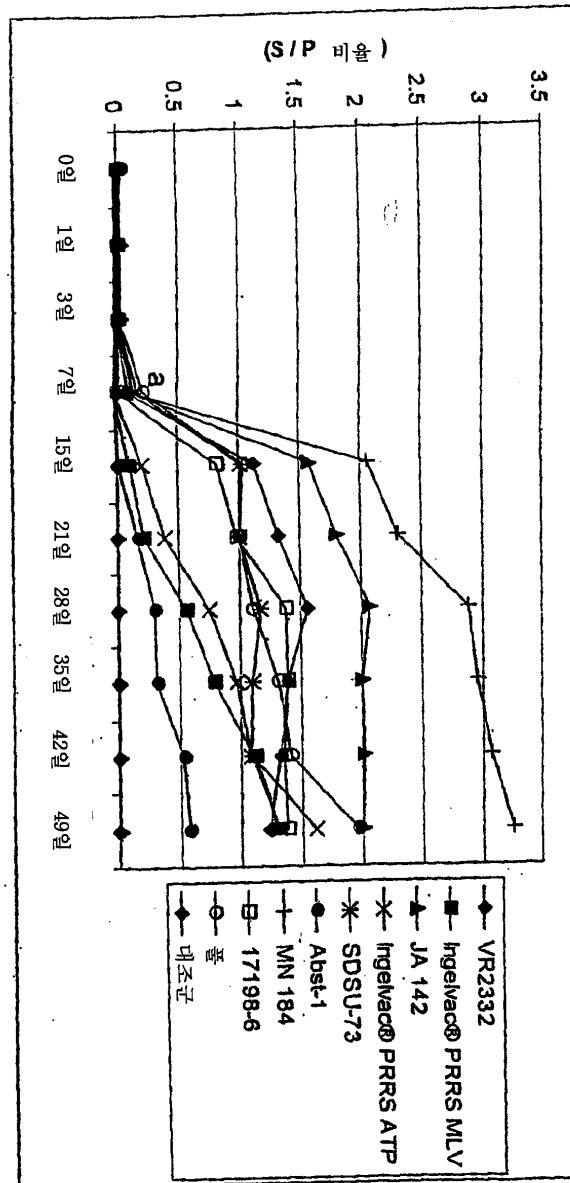
도면1



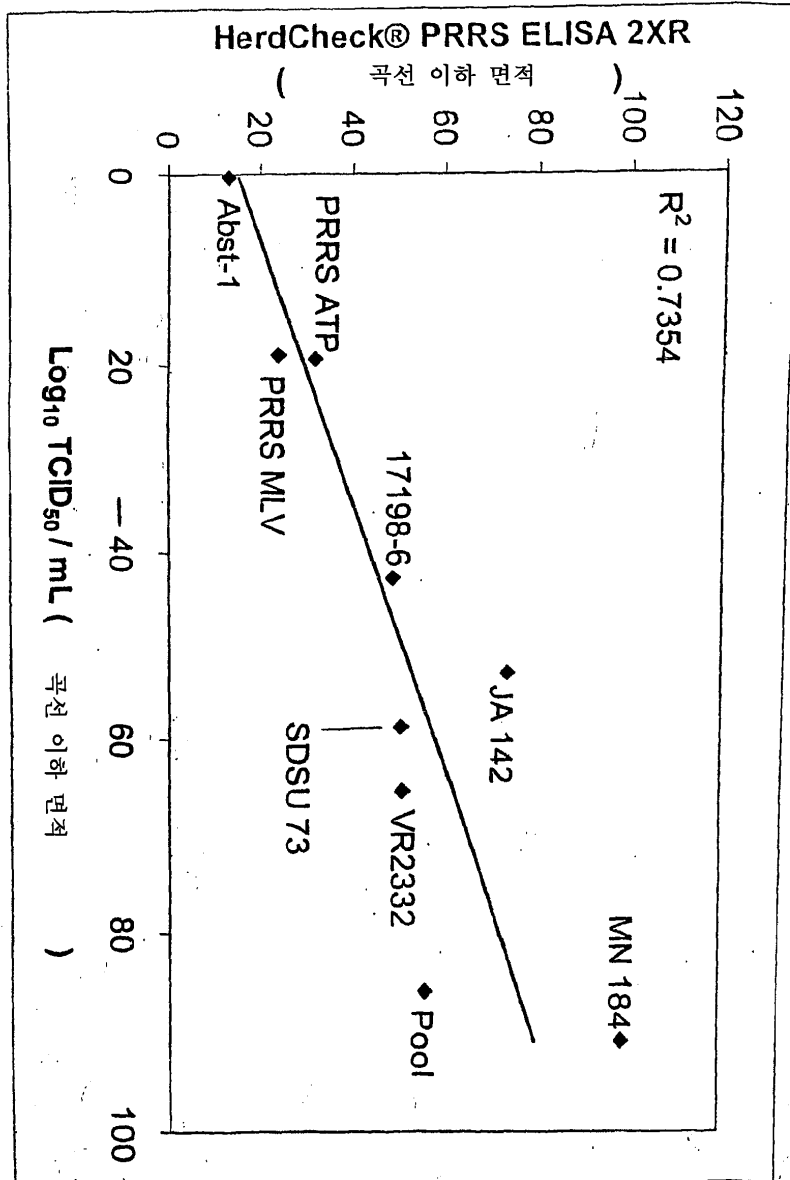
도면2



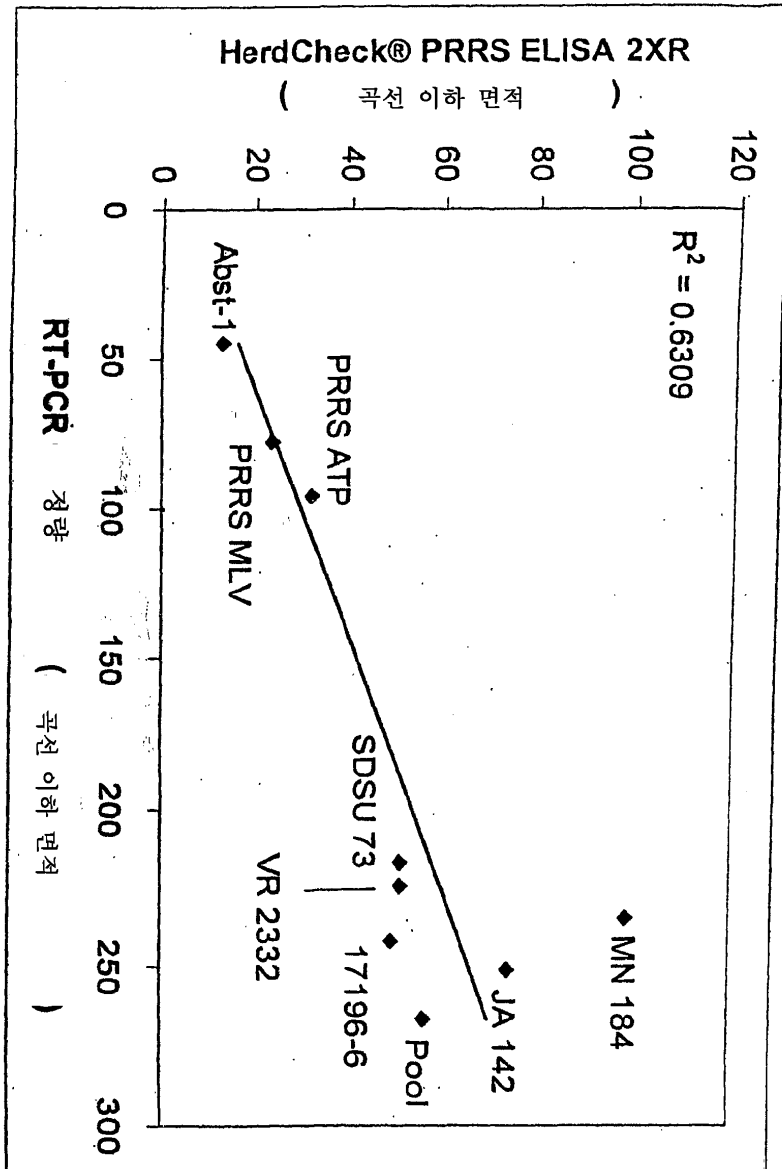
도면3



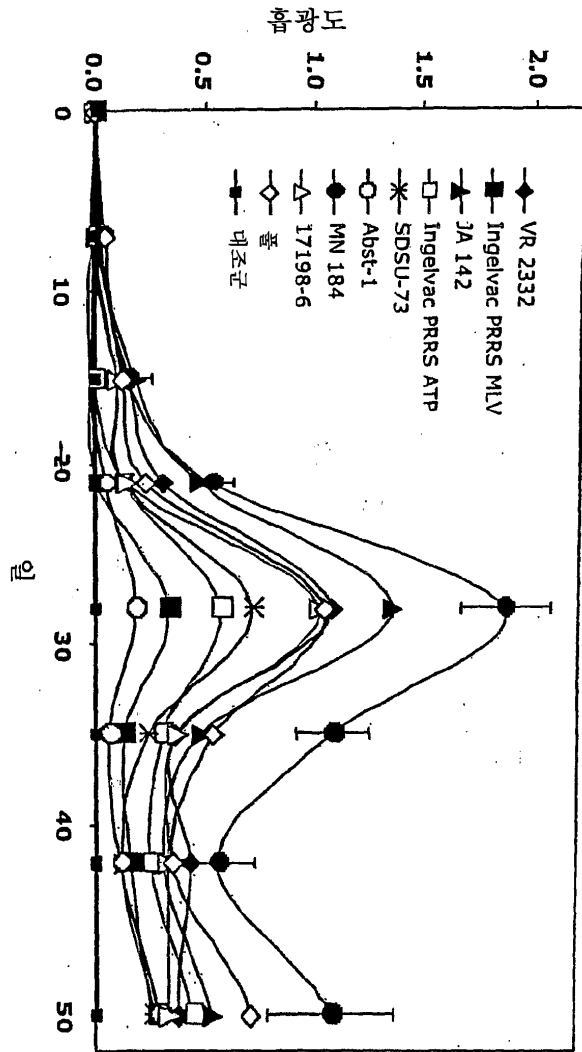
도면4



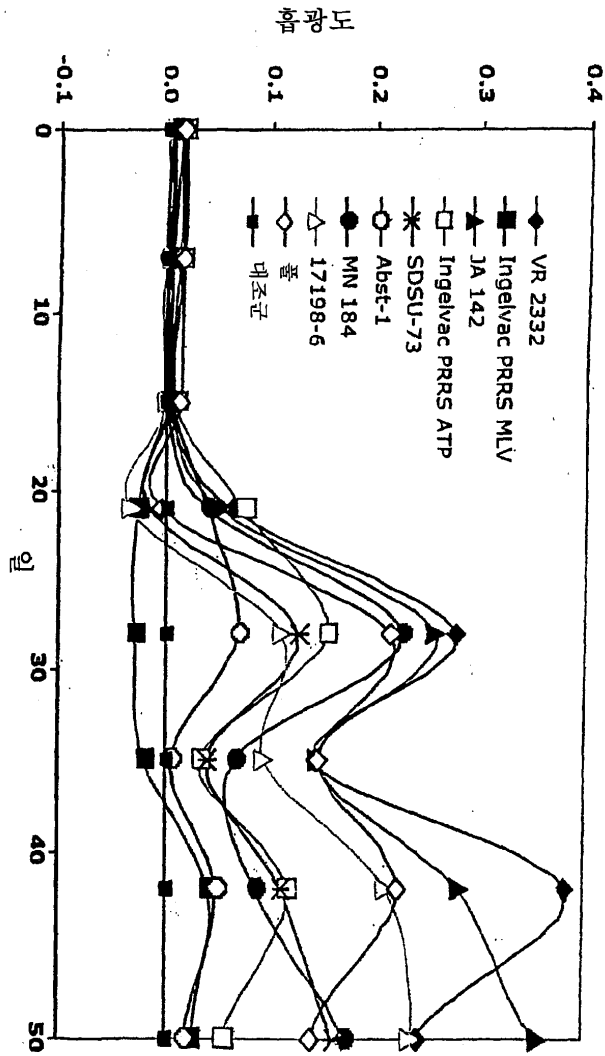
도면5



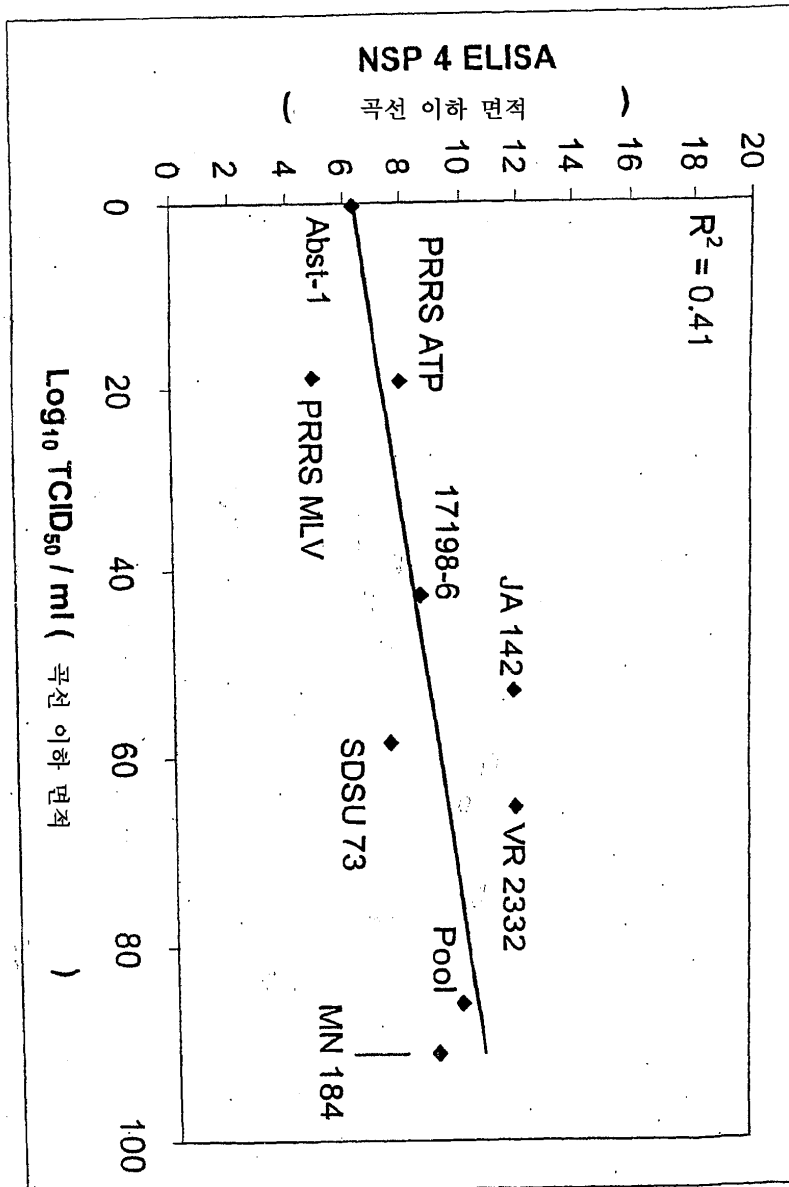
도면6a



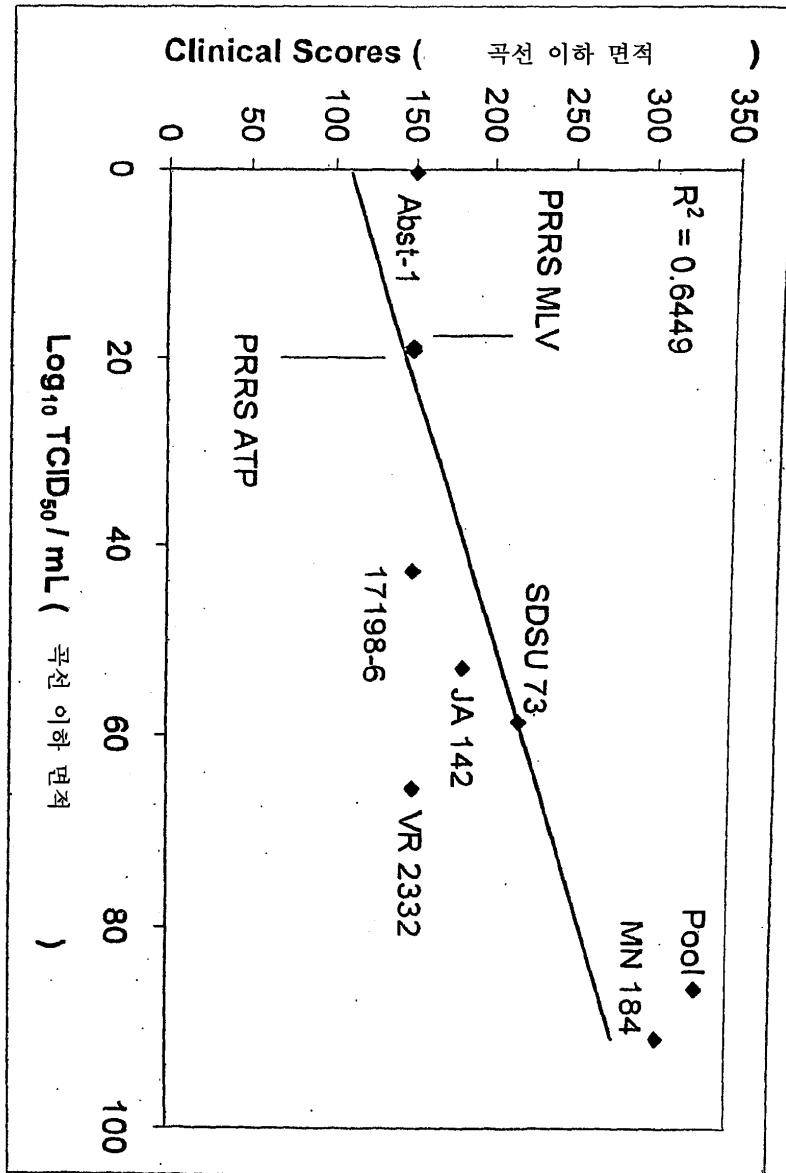
도면6b



도면7



도면8



도면9

평균 IHC 스코어

