

(옆면)

(앞면)

116074-3

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호()

농생명산업기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002601-01

2019
안전성/면역원성
최적화 및 산업화
최종보고서
SAVE 기술을 이용한
PRRSV 생독백신의

농림축산식품부
농림축산기술기획평가원

SAVE 기술을 이용한 PRRSV 생독백신의 안전성/면역원성 최적화 및 산업화

2019 . 3 . 19 .

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 바이오포아(주)
협동연구기관 / 농림축산 검역본부
협동연구기관 / 서울대학교

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “SAVE 기술을 이용한 PRRSV 생독백신의 안전성/면역원성 최적화 및 산업화”(개발기간 : 2016. 09. 05 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 02 . 14 .

주관연구기관명 : (주) 바이오포아	(대표자)	조 선 희 (인)
협동연구기관명 : 농림축산검역본부	(대표자)	박 봉 균 (인)
협동연구기관명 : 서울대학교	(대표자)	박 노 식 (인)

주관연구책임자 : 박 창 훈

협동연구책임자 : 차 상 호

협동연구책임자 : 채 찬 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116074-3	해 당 단 계 연구 기 간	2016. 09. 05 - 2018. 12. 31 (28개월)	단 계 구 분	(해당단계)3/ (총 단 계)3
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	SAVE 기술을 이용한 PRRSV 생독백신의 안전성/면역원성 최적화 및 산업화			
연구 책임자	박 창 훈	해당단계 참여연구원 수	총: 21 명 내부: 21 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 31 명 내부: 31 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:700,000천원 민간:234,000천원 계:934,000천원
연구기관명 및 소속부서명	바이오포아			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: CTC 바이오			연구책임자: 김재훈	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		출원3 등록2				개발1			기탁3		

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

1. 본 과제 수행을 위하여 유전자 사에 존재하는 Codon -pair 간의 선호도 (Codon pair bias)를 측정할 수 있는 컴퓨터 프로그램 개발하였음.
2. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)의 약독화 원리가 적용된 인공적으로 합성한 바이러스를 작출하기 위해 다수의 infectious clone을 제작하였음.
3. 제작된 infectious clone을 최적화된 조건에서 바이러스 작출을 시도하여 총 10여종의 인공적으로 합성된 바이러스를 작출하였음.
4. Codon pair bias를 컴퓨터 프로그램을 통해 감소시킨(SAVE원리를 적용한) 바이러스를 작출하였음.
5. SAVE 약독화 원리가 적용된 바이러스가 세포와 생체에서 유의적으로 증식성이 감소된 것을 확인하였음.
6. 해당 바이러스들을 균주 기탁하였음.
7. SAVE 원리의 적용과 작출된 바이러스들의 성질을 분석하여 특허를 3건의 특허를 출원하였으며 이들 중 2건이 등록되었음.
8. 백신으로서 안전성을 확인하기 위한 다양한 검증을 실시하였고 SAVE 원리가 적용된 바이러스가 돼지 생체 내에서 안전한 것을 확인함.
9. 백신으로서 면역원성을 확인하기 위한 다양한 시도를 실시하였고 유의적으로 면역원성을 향상시킬 방법을 확보함.
10. 선택한 균주를 백신으로서 수습 회를 반복해 계대하여 안정화 시켰으며 동시에, 계대에 따른 유전적 안정성을 평가하였음.
11. 대량 생산을 위한 시험을 실시하였고 시험 백신을 생산해 국가검정기준에 의거해 검정하였음.
12. 생산된 시험 백신의 야외임상시험을 위한 신청서를 제출하였음.

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>안전성과 면역원성을 향상 시킨 자돈용 PRRS 생독 백신의 개발</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 본 과제의 수행을 위하여 유전자 사에 존재하는 Codon -pair 간의 선호도 (Codon pair bias)를 측정할 수 있는 컴퓨터 프로그램 개발하였음. 2. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)의 약독화 원리가 적용된 인공적으로 합성한 바이러스를 작출하기 위해 다수의 infectious clone을 제작하였음. 3. 제작된 infectious clone을 최적화된 조건에서 바이러스 작출을 시도하여 총 10여종의 인공적으로 합성된 바이러스를 작출하였음. 4. Codon pair bias를 컴퓨터 프로그램을 통해 감소시킨(SAVE원리를 적용한) 바이러스를 작출하였음. 5. SAVE 약독화 원리가 적용된 바이러스가 세포와 생체에서 유의적으로 증식성이 감소된 것을 확인하였음. 6. 해당 바이러스들을 균주 기탁하였음. 7. SAVE 원리의 적용과 작출된 바이러스들의 성질을 분석하여 특허를 3건의 특허를 출원하였으며 이들 중 2건이 등록되었음. 8. 백신으로서 안전성을 확인하기 위한 다양한 검증을 실시하였고 SAVE 원리가 적용된 바이러스가 돼지 생체 내에서 안전한 것을 확인함. 9. 백신으로서 면역원성을 확인하기 위한 다양한 시도를 실시하였고 유의적으로 면역원성을 향상시킬 방법을 확보함. 10. 선택한 균주를 백신으로서 수습 회를 반복해 계대하여 안정화 시켰으며 동시에, 계대에 따른 유전적 안정성을 평가하였음. 11. 대량 생산을 위한 시험을 실시하였고 시험 백신을 생산해 국가검정기준에 의거해 검정하였음. 12. 생산된 시험 백신의 야외임상시험을 위한 신청서를 제출하였음. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 야외 임상 시험을 진행하고, 얻은 결과는 향후 백신 등록을 위해 사용될 예정임 (2019년). 2. 개발된 백신 품목 허가 및 등록에 성공하면 국내 협력사와 돼지 호흡기 질환예방을 위한 의약품으로서 출시할 예정임 (2020년). 3. 국내 시장 뿐 아니라 동남아시아를 비롯한 해외 시장으로 확장할 예정임. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스</p>	<p>청정화</p>	<p>면역원성</p>	<p>백신</p>	<p>약독화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus</p>	<p>Clearance</p>	<p>Immunogenicity</p>	<p>Vaccine</p>	<p>Codon Pair Deoptimization</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	2
2. 연구수행 내용 및 결과	17
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	119
4. 연구결과의 활용 계획 등	123
붙임. 참고 문헌	127

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가) 안전성과 면역원성을 향상시킨 PRRS 생독백신의 개발

*안전성을 강화시킬 새로운 기전과 면역증강물질을 탑재시킨 PRRSV 생독 백신의 개발 및 산업화

1-2. 연구개발의 필요성

가) 현재 국내 PRRSV 역학적 상황 및 피해

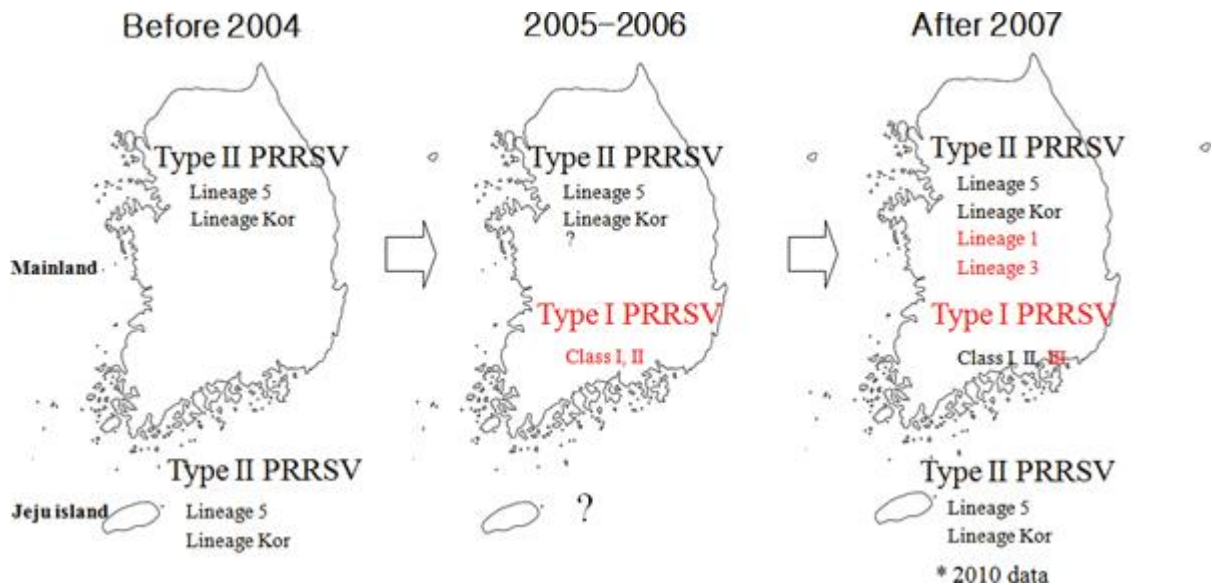


그림. 국내 PRRSV의 역학적 변화

· 1990년대 최초 보고된 이래, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)는 전국 양돈 농가에 상재하고 있으며 아직도 청정화에 도달하는 길은 요원함.

· 국내 PRRS의 역학적인 상황은 2000년대 초반까지 독보적이었던 Type2(북미형, 북미대륙 유래 PRRSV) 유전자형을 Type1(유럽형, 유럽대륙 유래 PRRSV) 유전자형이 급격하게 대체하고

있음. 현재 국내 농가에서는 Type1 & Type2 PRRSV의 혼합 감염 양상 증가하는 추세임. 서로 다른 유전자형 PRRSV의 감염은 상호 보완의 관계로 숙주 내에서 바이러스의 잔류를 지속시켜 주는 것으로 추정됨.

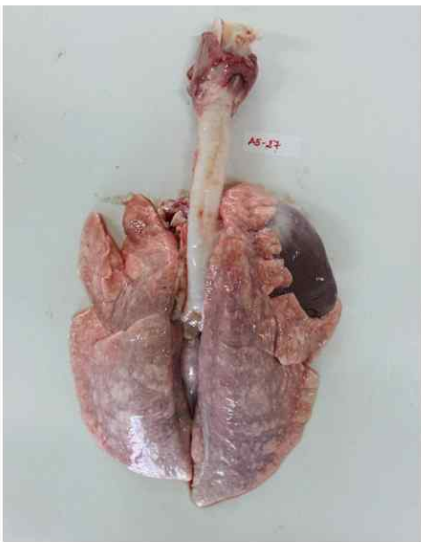
- PRRSV 감염에 따른 임상증상도 변하고 있는데, ‘급성호흡기성 폐렴 및 유산’에서 임상 증상이 뚜렷하지 않은 ‘준임상형’으로 변하고 있음. 이로 인해 농장에서 PRRSV의 침투와 감염을 인지하지 못하고 있어 질병의 전파를 더욱 용이하게 만들고 있음.

- PRRSV는 단독감염으로 인한 증상보다 돼지의 면역력을 저하시켜 세균과 여타 바이러스와의 복합감염을 용이하게 만들고 이로 인한 돼지 복합 호흡기 질병(PRDC; porcine respiratory disease complex)을 유발함. 다양한 병원체의 혼합감염으로 PRRSV에 의한 증상을 예방하기가 더욱 어려워지고 있음.

- 중국 및 동남아시아 유래 고병원성 PRRSV 국내 유입 가능성이 커지고 있음. 이 균주의 국내 유입은 균주가 그동안 보여준 자돈에서 90%에 달하는 폐사율과 강력한 전파력으로 미루어 볼 때, 재앙적인 피해를 입힐 것으로 예상됨.

- 일반적으로 PRRSV가 감염되면 어린연령의 돼지(자돈)에서 폐렴이 발생하여 동반된 소모성 질환으로 출하시기를 늦추며 사료효율을 떨어뜨림. 반면 어미 돼지(모돈)에서는 유산을 유발하여 산자수를 감소시킴

자돈에서 폐렴유발



모돈에서 유산유발

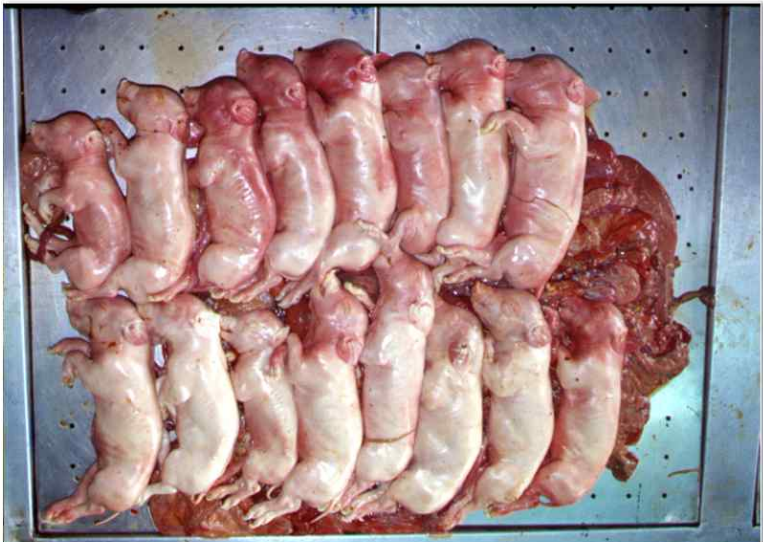


그림. 이유자돈에서 유발된 간질성 폐렴(좌), 모돈에서 발생한 사산된 개체(우)

	연간 모돈 이유두수(PSY)	연간 모돈 출하두수(MSY)	도태율(%)
덴마크	25.5두	25두	<1%
한국	20두	16두	약 20%

표. 한국과 덴마크 양돈 생산지수 비교.

· PRRS는 한창 자라는 돼지(육성기)의 사료효율을 떨어뜨리고 심하면 폐사를 유발할 뿐 아니라, 모돈의 산자수도 감소시킴. 2016년 현재 국내 양돈 농가의 생산성은 선진국에 비해 매우 낮는데(PSY는 선진국의 80%, MSY는 선진국의 64%수준) 그 이유는 전국에 창궐한 PRRSV와 그로 인한 피해가 가장 크다고 할 수 있음.

· 국내 양돈 농가 항체 양성률 : 대한 한돈 협회에서 실시한 전국 2014년도 질병실태 보고서에 따르면 ELISA를 통한 혈청 검사에서 전국 양돈농가의 70%이상에서 항체 양성 판정을 받았음. 모돈에서의 양성률은 80%이상, 이유자돈에서 45%이상, 비육돈은 85% 이상임.

Profile	형태	특징	항체검사	비고
1(3N)	음성농장	전구간 항체 음성	-모돈 및 자돈군 모두 항체 음성 -후보돈에서만 낮은 수준의 항체가	음성(청정)돈군
2(SNN)	안정화농장	항체양전 및 항원검출 없음	-모돈 : 항체수준이 낮고 균일함 -포유자돈 : 모돈과 유사한 수준의 항체가 -자돈-비육구간 : 항체 양전 없음 -일령 증가에 따라 항체가 상승하나 항원음성	안정돈군
3(SNI)	자돈감염농장	이유자돈 감염	-모돈군 : 항체수준이 낮고 균일함 -포유자돈 : 비감염 -육성-비육구간에서 항체 양전 및 지속 상승	모돈안정/자돈감염군 자돈단계 순환감염 임상증상 있음 모돈안정/수평감염
4(SII)	역감염농장	포유돈 감염	-모돈군 : 항체수준이 낮고 균일함 -포유자돈 : 감염(항원 양성 또는 항체가 상승) -자돈-비육돈구간: 다양한 시기에 항체 양전	군 포유기 수평(직)감염 백신주 검출가능 육성단계 순환감염
5(UII)	순환감염농장	전구간 감염 양상	-모돈군 : 항체수준이 다양함(또는 항원양성) -특정 사육구간에서 급격한 항체양전이 관찰 -SP 2.0이상의 높은 항체가를 보이며 지속 상승	전돈군 순환감염군 포유기 수직감염 전구간 순환감염 외부유입 요인 있음 (후보돈/정액)

표. 양돈 농가 PRRSV 감염 유형 분석

또한 항원, 항체검사를 통해 농가의 감염양상을 위의 표와 같이 5단계로 구분하여 전국의 양돈 농가를 분석한 결과, 3,4,5 유형(감염이 현재 진행되고 있는 농장)이 전체의 53%에 달하는 것으로 확인되었음. 즉 국내 절반 이상의 농가는 현재 PRRSV 감염이 진행중인 상황임.

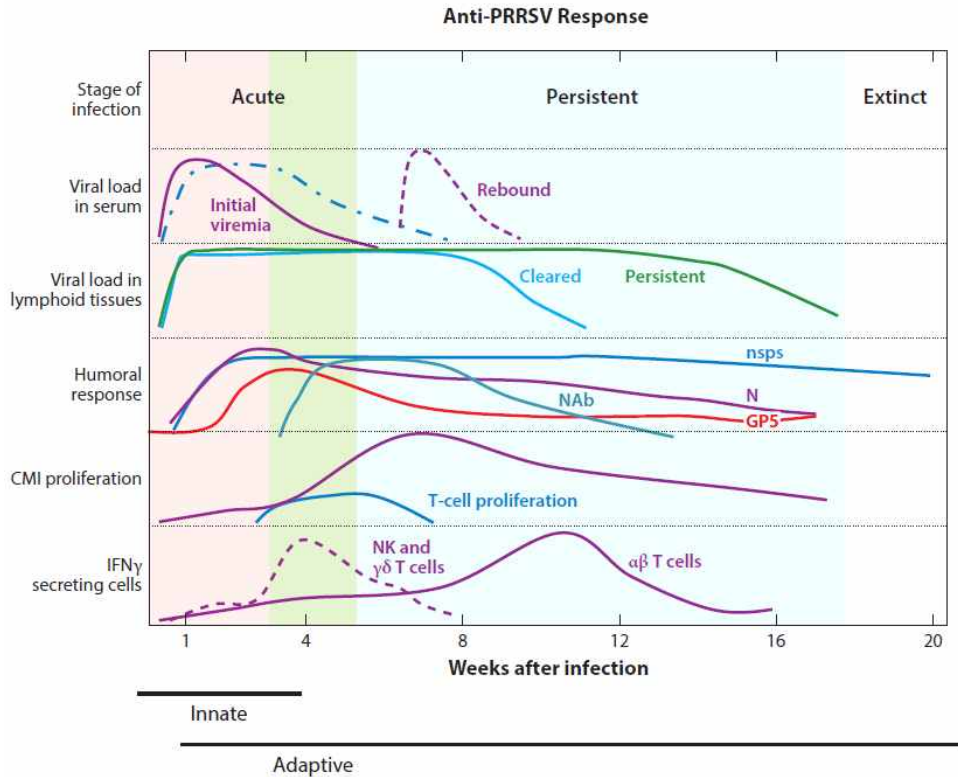
- 2004년 미국에서의 PRRSV로 인한 피해액은 5억6천만 달러로 잠정 추산됨. 2015년 국내 피해액은 폐사와 유산을 바탕으로 추정 시, 최소 1000억원에 달하는 것으로 학자들은 추정하고 있음. 그러나 돼지 1두당 생산비의 57%가 사료비로 지출되는 국내 상황에서 PRRSV에 감염된 돼지는 발육이 저하되어 사료효율을 크게 떨어뜨림. PRRSV에 의한 경제적 피해를 계산할 때, 이러한 사료효율 저하와 출하일수의 증가에 의한 피해액은 규모조차 잡히지 않음. 따라서 PRRSV에 의한 실제 피해액은 폐사와 유산에 의한 규모를 훨씬 뛰어넘는 수천억 원 이상일 것임.

나) PRRSV 청정화의 어려움과 감염 시 면역반응

- 이렇듯 심각한 경제적 피해를 입히고 있는 질병임에도 아직까지 확실한 청정화 방법이 없음. 대표적으로 돈군폐쇄나 백신을 이용한 Mass immunization 등 다양한 방법을 시도하였지만 확실하게 농장을 청정화시킬 방법이 없음.
- 설사 청정화에 성공하더라도 한국 농장의 지리적 여건 상 좁은 지역에 농장들이 밀집되어 있어 청정화 상태 유지가 매우 어려움.

또한 가장 중요한 효과적인 백신이 없으므로 농장에서 바이러스를 통제할 수단이 없음

- PRRSV는 Positive sense RNA virus로서 변이가 무척 다양하고 변이간의 교차면역 양상이 다양함. 무엇보다도 감염 시, 특유의 면역회피 기전으로 인해 숙주가 매우 비효율적으로 면역을 유도하여 무력화시킴.



*그림 PRRS에 대항하는 면역반응의 시간별 비교

- PRRS는 Decoy epitope, glycosylation을 통해 중화항체 epitope의 노출을 최소화하며 중화항체의 생성을 최대한 억제함 또한 존재하는 중화항체의 작용을 방해함.

- PRRS는 감염 초기 면역반응을 무력화시키기 위해서 Type I Interferon(IFN)의 분비를 억제함. 대표적으로 IFN- α 의 분비를 억제함. 억제된 IFN- α 반응은 차례로 바이러스를 통제할 T helper cell의 성숙을 저하시킴. 또한 바이러스 특이적인 IFN- γ 반응 역시 억제시킴. PRRS 감염 시 혈중 바이러스의 양을 감소시킬 수 있는 IFN- γ 가 매우 늦게 유도되며 그 반응의 크기 역시 ELISPOT 기법으로 분석 시 낮음.

- 바이러스가 특이적으로 IL-10분비를 촉진하며 regulatory T cell의 반응을 유도하여 바이러스에 대항하는 면역계의 작동을 억제시킴 더불어 dendritic cell의 Antigen presenting 기능을 억제시킴.

- 중화항체는 4주 이후에나 생성되며 T cell에 의한 IFN- γ 는 8주 이후에 생성됨. 이렇듯 선천성 면역을 회피하면서도 후천성 면역인 체액성, 세포성 면역이 매우 늦고 약한 것이 PRRS 감염이 갖는 중요한 면역학적 특징임.

- 따라서 개발될 백신은 감염 초기 바이러스의 급격한 증식을 막으면서 PRRS의 면역 회피 능력을 억제할 수 있어야함.

다) 새로운 PRRS 백신 개발의 필요성

효과적인 PRRSV 백신의 부재 : 질병 통제에 성공한 썬코나 돼지 열병과 달리 PRRS의 경우 효과적이면서 안정적으로 바이러스를 방어할 수 있는 백신이 없음. 시판중인 백신에는 세포에서 바이러스를 키워서 불활화시킨 불활화 백신과 약독화된 생독백신 두 가지 형태가 있는데, 각각의 장점과 단점은 다음과 같음

◆ 불활화 백신 : 우수한 안전성을 보유하나 동일한 바이러스조차도 매우 낮은 방어효능

◆ 약독화 백신 :

안전성에 대한 의구심(바이러스의 변이에 의한 병원성의 재획득 우려)

백신주와 동일 그룹에 속한 야외주 바이러스에 대해 임상증세 개선, 실제적인 바이러스 감소

그러나 다양한 야외주에 대해 모두 똑같은 방어효능을 기대할 수 없음.

방어효능이 형성되기까지 오랜 시간 소요. (4주 이상)

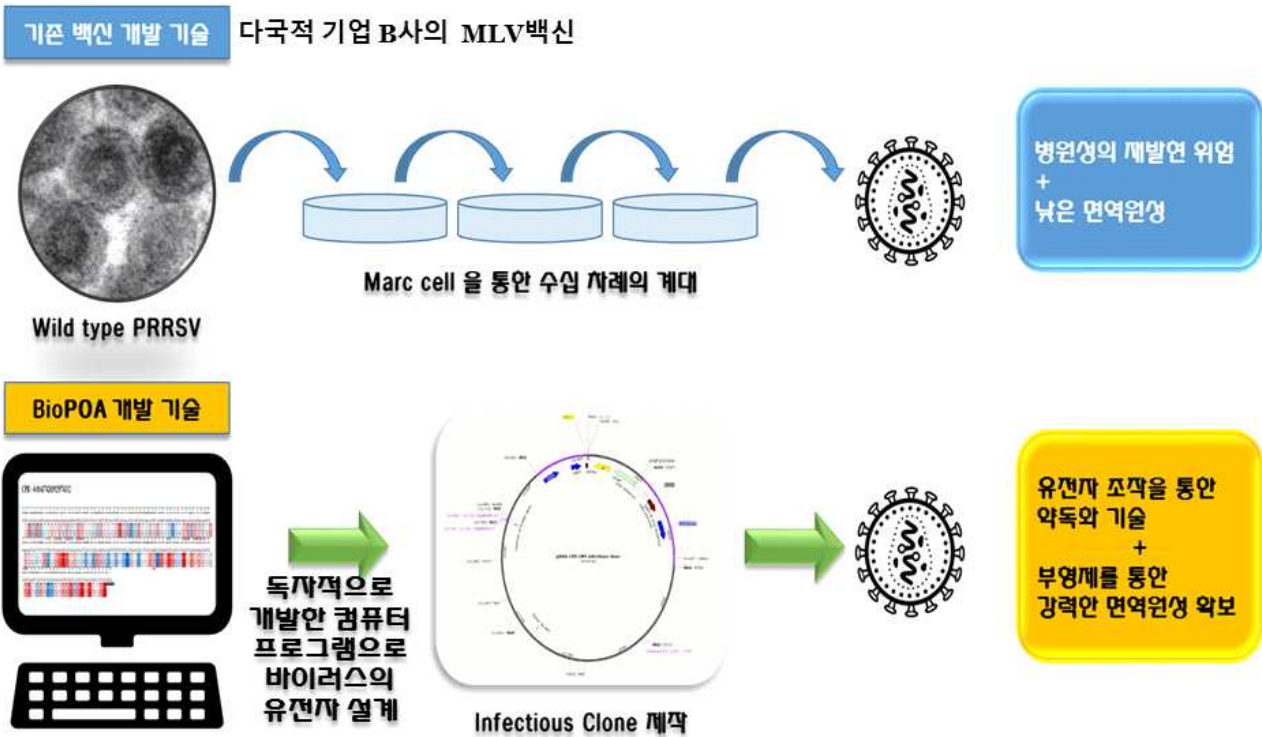


그림. 병원성 복귀에 의해 안전성이 우려되는 기존 생백신 개발 기술 및 병원성 복귀 우려가 없는 CPD(Codon Pair De-optimization)법을 적용해 유전적으로 약독화하는 바이오포아의 백신개발 신기술.

· 불활화 백신은 다양한 야외주에 대응할 교차면역을 유도하는 능력이 매우 떨어짐. 보다 근본적으로 PRRS의 경우, 불활화 백신은 백신주와 동일한 균주의 감염도 막지 못할 만큼 매우 낮

은 면역력을 유도함. 백신을 접종한 이후 중화항체는 2의 3승을 넘어가지 못하며 IFN- α , IFN- β , IFN- γ 반응이 매우 약함. 공격접종 실험에서 불활화 및 subunit 백신은 혈중 바이러스의 양과 조직 내 병변을 감소시키지 못하였으며 임상적으로 농장 평가에서 효능을 입증하지 못하였음. 따라서 안전성 측면에서 생독백신에 비해 탁월하지만 불활화백신의 낮은 교차면역과 저하된 면역반응을 고려할 때 차세대 개발 PRRS백신은 불활화 백신보다 생독백신이 적합함.

Vaccine	Pigs	Route	Dose (mL)	Program
Progressis®/ Ingelvac® PRRS KV	Gilt	im	2	Primary: twice, 3-4 wk interval, at least 3 wk prior to breeding Booster: 60-70 d of each gestation
	Sow			Primary: twice, 3-4 wk interval, at any stage of production Booster: 60-70 d of each gestation
Stuipravac-PRRS	Gilt	im	2	Primary: twice, 3-4 wk interval, when entering the farm Booster: Follow sows' vaccination program
	Sow	im	2	Primary: twice, 3-4 wk interval, during pregnancy or lactation Booster: every 4 mo
Suivac PRRS-INe/ Suivac PRRS-IN	Gilt/Sow	im	2	Primary: three times; 1st at 5-6 mo of age, 2nd at 3-4 wk after 1st, and 3rd at 6-4 wk prior to expected farrowing Booster: twice; 1st at 3-4 wk after the farrowing, and 2nd at 6-4 wk prior to the further expected farrowing
	Boar			Primary: twice, 4 wk interval, starting at 6 mo of age Booster: every 4-6 mo
	Nursery/Growing			Three times: 3-4 wk interval, starting at 6-10 wk of age

im: Intramuscularly; KV: Killed virus.

Vaccine ¹	Pigs ²	Route	Dose (mL)	Program
Ingelvac® PRRS MLV	Gilt/Sow	im	2	At any stage of production ³
	Piglet/Nursery/Growing	im	2	At any stage of production ³
ReproCyc® PRRS-PLE	Gilt/Sow	im	5	Primary: 4-6 wk prior to breeding Booster: prior to subsequent breeding
Ingelvac® PRRS ATP Porcilis PRRS®	Nursery/Growing	im	2	At 3-18 wk of age
	Gilt/Sow	im/id	2/0.2	Primary: 2-4 wk prior to breeding Booster: 2-4 wk prior to subsequent breeding/or every 4 mo At 2 wk of age or older
Amervac-PRRS® Pyrsvac-183®	Piglet/Nursery/Growing	im/id	2/0.2	
	Nursery/Growing	im	2	At 4 wk of age or older
	Gilt/Sow	im	2	Primary: 2-4 wk prior to breeding Booster: 3-4 wk prior to subsequent breeding
	Piglet/Nursery/Growing	im	2	At 2-3 wk of age or older

*시판중인 불활화백신(위), 시판중인 생독백신(아래)

· 약독화된 생독 백신은 전세계적으로 PRRS에 대항하기 위한 가장 확실한 수단으로 인정받고 있음. 백신은 공격접종 실험에서 혈중 바이러스의 양을 감소시켜주고 조직 내 병변을 감소시켰으며 임상적으로 농장에서 대조군에 비해 유의적인 개선효과를 보여줌. 그러나 그 수치는 썩코바이러스나 돼지 열병 백신이 가지는 효능에 비교하면 매우 낮음. 또한 현재 개발된 백신은 출시된 지 20년이 지난 백신으로 안전성 문제와 낮은 효능에 대한 의구심이 끊임없이 제기되고 있음. 불활화 백신보다는 낫지만 시판 중인 생독백신 또한 농장의 PRRS 야외주에 대응할 면역을 제대로 유도하지 못한 사례가 많으며 유산된 개체(유산 태자)에서 백신주의 항원이 발견되는 등 효능과 안전성에 대한 비판이 지속적으로 제기되고 있는 상황임

· 시판중인 생독백신은 Marc 145 cell(유인원 신장유래 초대 배양세포)에서의 계대를 통해 돼지 PAM(peripheral alveolar macrophage) cell에서의 증식 능력을 저하시켜 약독화한 바이러스로서 백신접종이 감염과 유사한 면역반응을 유도하는 것을 이용함. pseudo rabies 백신과 비교

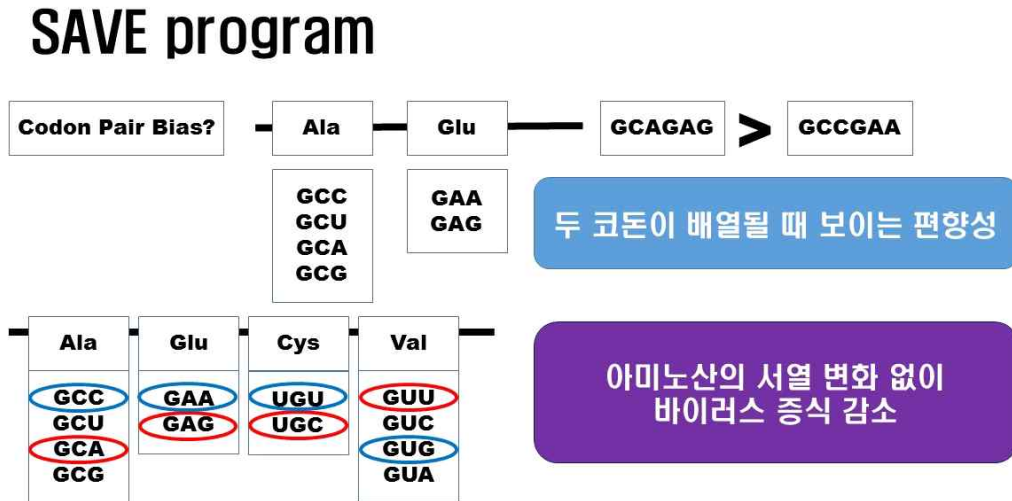
해면 같은 생독백신이라도 PRRS 생독백신은 중화 항체 역가와 바이러스 특이적인 IFN- γ 반응이 월등히 낮고 발생하는 시점도 늦음. 이는 생독백신 바이러스라도 원래 고유의 PRRSV가 가지는 낮은 면역유도능력에 기인한 것으로 보임.

- 임상적으로도 농장에서 PRRS 백신은 자돈에서 사용하지 않음. 대부분의 농가에서 이유 후 기 자돈의 호흡기 증상은 PRRS 감염과 관련이 있지만 백신의 낮은 효능 때문에 권장하지 않고 있음. 다만 모돈에서 유산을 막기 위해서 사용되지만 이때도 3개월 단위로 지속적으로 사용해야만 함.

- 이미 효과적인 질병 통제에 성공한 돼지 썩코 2형 바이러스나 돼지 열병의 경우, 안정된 효능을 유도하는 효과적인 백신의 존재가 성공의 핵심 열쇠였음. 따라서 PRRS의 경우에도 청정화에 도달하기 위해서는 효과적인 백신의 개발이 매우 중요함.

1-3. 연구개발 범위

가) 안전성 확보 전략 - SAVE 방법의 적용

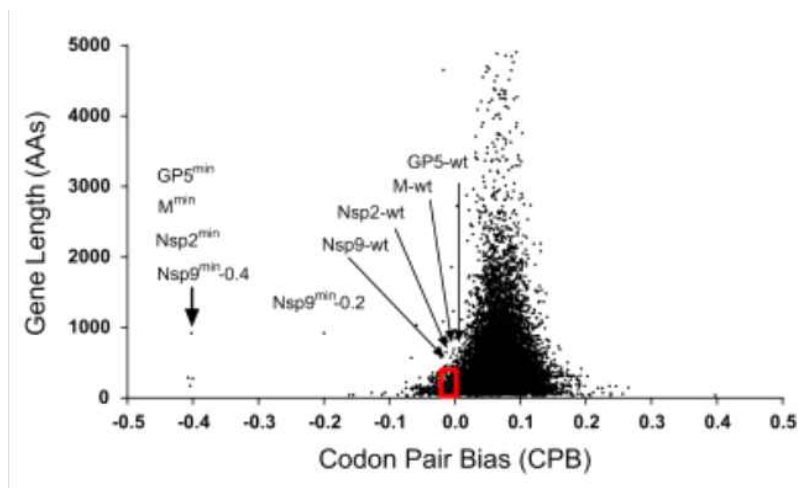


· SAVE program : SAVE(Synthetic Attenuated Virus Engineering) program은 Codon Pair상에 존재하는 편향성(Bias)을 이용하여 virus의 Translation 효율을 떨어뜨려 바이러스를 약독화시키는 방법임. 예를 들어 Ala-Glu 두 아미노산이 발현할 protein 상에 존재한다고 하면, GCC-GAA는 Ala과 Glu 각각의 가장 편향성이 높은 codon이므로 당연히 Ala-Glu을 코딩하는 genome상에 GCC-GAA이 가장 많이 존재할 것으로 예상할 수 있음. 그러나 실제 genome을 분석해보면 Ala-Glu을 코딩하는 genome상에서 GCA-GAG가 가장 많다는 것이 실제로 관찰됨. 이처럼 Codon bias와는 별도로 두 codon이 배열될 때 생기는 편향성을 Codon pair bias라 함. 이 편향성은 유전자의 translation 효율에 영향을 미치는 것으로 추측됨. 이 Codon pair bias를 일반적인 평균치 보다 대폭 낮추어 virus의 Translation 효율을 떨어뜨려 바이러스를 약독화시키는 방법이 바로 SAVE, 다른 말로 Codon pair deoptimization임.

- 예를 들어, GCC-GAA-UGU-GUG로 배열된 서열(CPB : 0.0123)을 codon pair bias가 낮은 GCA-GAG-UGC-GUU(CPB : -1.232)로 바꾸는 것이 codon pair deoptimization임
- Codon pair deoptimization을 통해 유전자의 서열을 point mutation을 다수에 가하면 유전자에 대한 translation효율이 떨어지고 단백질 발현이 감소하면서 바이러스 증식 또한 떨어짐
- Codon pair deoptimization을 거치면 필연적으로 CpG, UpA가 상승함.
- Codon bias optimization 과는 다른 개념으로, Codon pair deoptimization과정에서 Codon bias는 대체로 감소함.

· 이 방법의 가장 큰 장점은 Deoptimazation을 위해서 수십에서 수백 base pair에 걸쳐 point mutation을 가해주는 과정 자체가 약독화 바이러스의 병원성을 반영구적으로 없애준다는 점이다.

- Codon pair deoptimization은 프로그램으로 웹상에서 구현 가능함. 먼저 Codon pair score(CPS)는 예상되는 codon 조합 분에 실제로 관찰된 codon 조합의 값을 자연상수로 계산하여 구하고 이 CPS의 평균을 그 유전자의 Codon Pair Bias(CPB)로 구할 수 있음.



*돼지 유전자의 모든 codon-pair를 분석하여 얻은 CPB 수치, 0~0.1 수치 사이에 평균적으로 존재

		WT				CPD					
Virus	Gene	Prop'n	CP bias	CpG	UpA	CP bias	CpG	UpA	Replication Reduction	Ref	
Polio											
PV-X	Capsid	14.8%	-0.03	0.52	0.75	-0.46	1.34	1.25	X25	Coleman et al	
PV-Y	Capsid	25.9%	-0.03	0.54	0.75	-0.46	1.31	1.27	X400		
Influenza A											
HA	Segs4	11.4%	0.02	0.43	0.64	-0.42	1.65	1.11	X3.5	Muller et al	
HA/NP	Segs4,5	21.3%	0.02	0.44	0.55	-0.42	1.56	1.14	X14		
PR8	Segs1,4,5	29.1%	0.01	0.43	0.53	-0.41	1.55	1.07	X35		
HIV-1											
A	gag	4.6%	0.03	0.47	1.04	-0.43	1.43	1.25	X7	Martrus et al	
B	gag	4.7%	0.08	0	0.91	-0.37	1.22	1.15	X3		
C	gag	4.8%	0.03	0.31	1.00	-0.38	1.50	1.09	X8		
D	gag	2.1%	-0.02	0	0.49	-0.42	1.47	0.99	X1.5		
PRRSV											
SAVE5	gp5	2.6%	-0.06	0.73	0.73	-0.38	1.37	1.14	X4	Ni et al	

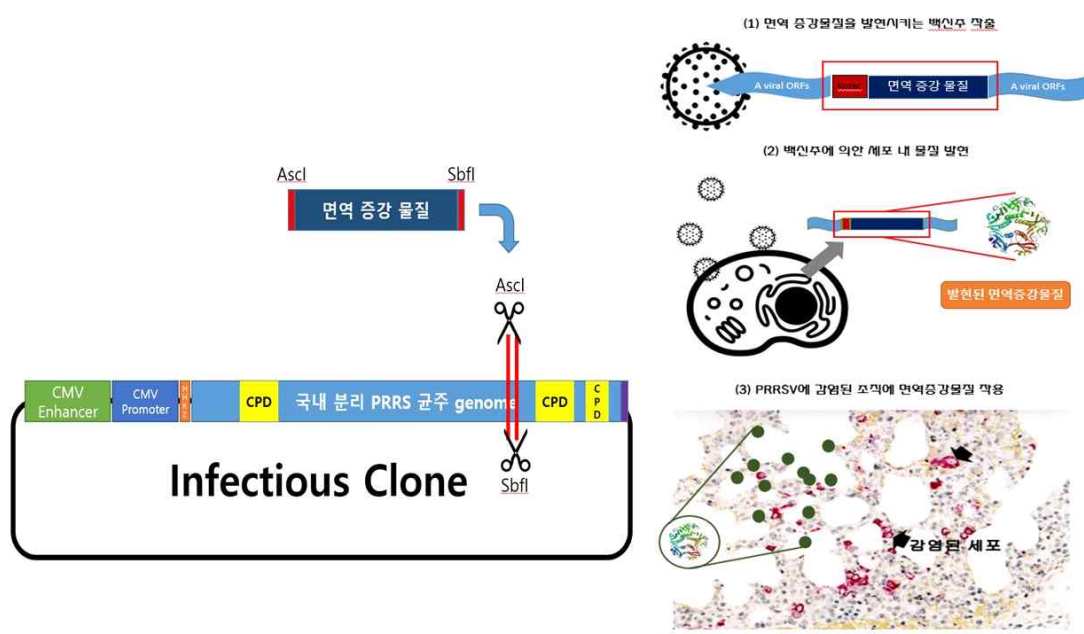
*2015년까지 SAVE 방법에 의해 약독화에 성공한 virus.

- Codon Pair Deoptimization을 통해 다양한 virus의 약독화가 성공함. 대표적으로 Polio virus, Influenza A, HIV의 성공한 사례가 있음. 이미 PRRSV에서도 동일한 원리를 적용하여 약독화에 성공한 바가 있음. ORF5 상에 존재하는 유전자를 SAVE를 적용하여 약독화하여 wild type virus 보다 약 4배 정도 역가가 감소하였음. 따라서 이 방법은 PRRS에서 약독화를 적용하는데 전혀 문제가 없음이 이미 입증된 상황임. 바이오포아에서 개발하고자하는 생독 백신은 PRRS에서 숙주 면역계를 교란하는 바이러스 입자인 NSP1 β , GP5, N protein을 코딩하고 있는 NSP1 β , orf5,

orf7 부위를 codon pair deoptimization 처리하고자 함. 기존 성공 사례보다 다양한 부위에 걸쳐 SAVE를 적용하여 보다 안전성을 높일 수 있을 것으로 기대됨. 또한 virus의 recombination에 의한 병원성 획득 가능성 역시 감소시킬 수 있음.

나) 면역원성 강화 전략 - 면역 증강 물질 탑재

· 이미 역유전학을 통해 ND(뉴캐슬병 원인체)백신과 가금티프스 백신을 개발한 바이오포아에서는 PRRS생독백신의 개발을 위해 역유전학을 활용하고자 함. 검역원에서 분양받는 국내 분리 PRRSV의 infectious clone을 제작하고 백신의 면역 유도 능력을 강화시킬 기전을 탑재하여 효능을 대폭 강화시키고자 함.



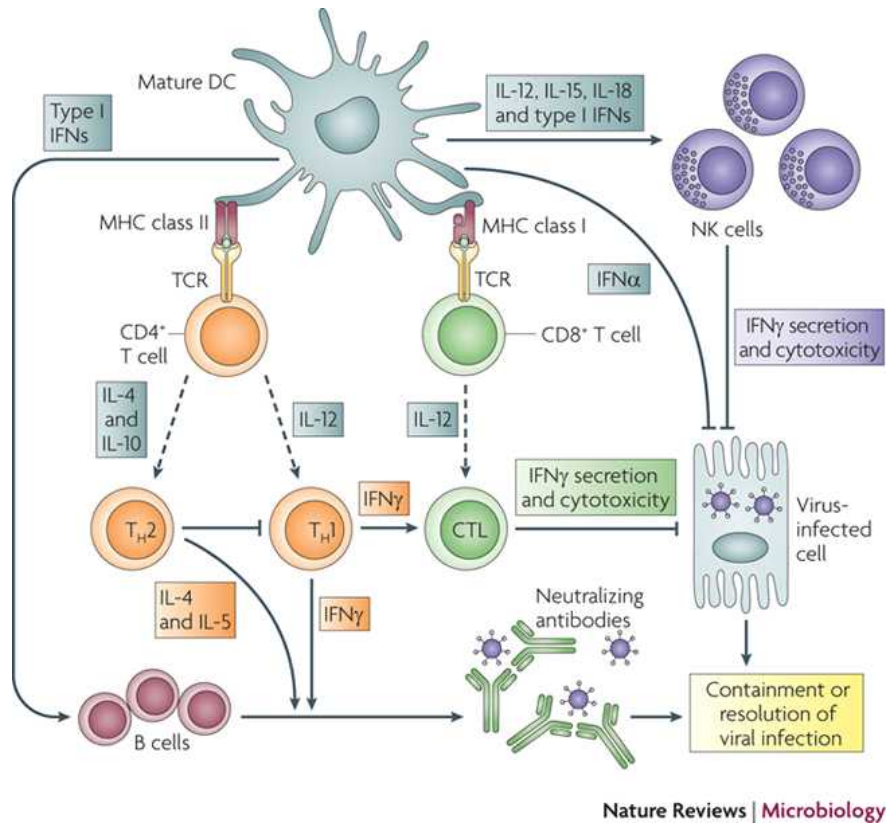
* 개발 백신의 제작 방법 (좌) 및 작용 기전 (우) 모식도

· 구체적으로 면역증강물질이 탑재된 생독 백신 균주를 추출하고자함. 이 탑재된 유전자는 숙주의 면역계에 작용하는 물질로서 백신주의 증식과 함께 생성 분비되어 숙주의 면역력을 높여 줄 수 있을 것으로 기대함. *Varun Dwivedi et al. 2011*의 연구에서 확인할 수 있듯이 PRRS 생독 백신은 적절히 면역을 강화시켜줄 수 있는 부형제와 함께 투여된다면 그 효능이 극대화 될 수 있다. 근육주사로 주입된 부형제가 백신의 효능을 강화시킬 수 있다면 백신주 genome 자체에 탑재된 면역 증강물질은 PRRS가 주로 증식하는 폐와 림프절에 곧바로 작용하여 야외주가 감염되는 부위에 대한 국소면역(local immunity)을 강화시켜 줄 것으로 예상함.

· PRRS infectious clone을 통해 유전자를 조작한 바이러스를 추출한 사례는 많음. PRRS의 genome 내부에 외래 유전자를 삽입 발현 시키는 기법 역시 성공 사례가 있음. 따라서 바이오포아가 하고자 하는 방법은 기술적으로 전혀 문제없음.

· 생독백신이 야외주에 감염된 상황과 유도하는 면역반응이 다른 것은 아님. 약독화되어 채내

에서 바이러스의 증식이 약화되어 임상적으로 폐렴이 유발되지 않을 뿐, 생독백신은 감염과 다른 종류의 면역기전이 작용하는 것이 아님. PRRS는 숙주의 면역계를 회피하는 능력이 뛰어난 바이러스이기에 그 후손인 백신 바이러스 또한 면역을 유도하는 능력이 떨어짐. 이 점을 보완하기 위해서 두 가지 전략이 고안함. 1) 백신이 porcine dendritic cell에 직접적으로 작용하여 antigen presenting기능을 강화시키거나 2) 또는 백신 자체가 type I IFN 반응을 강하게 유도할 수 있어야함.



Nature Reviews | Microbiology

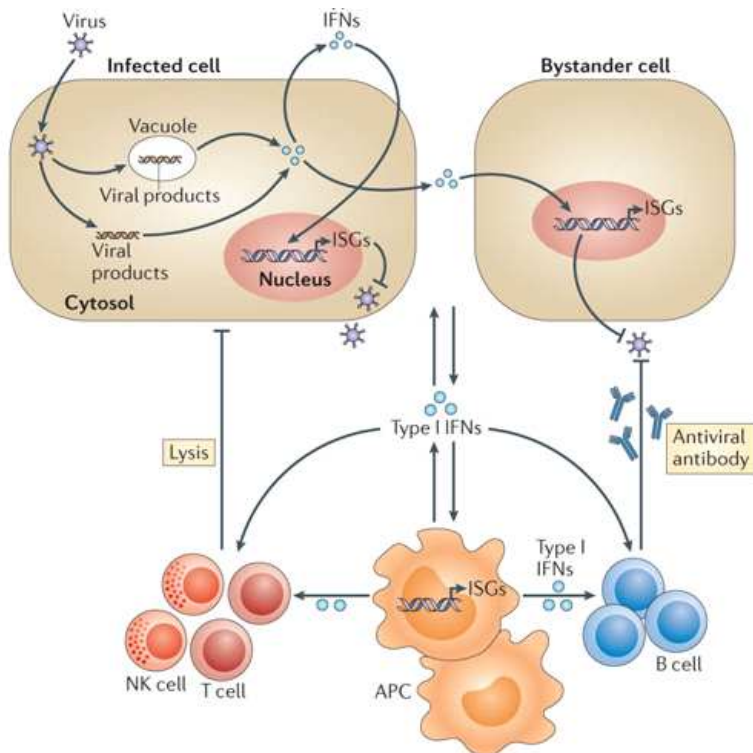
*dendritic cell의 작용과 기능

- dendritic cell은 antigen presenting cell의 일종으로 항원을 탐식, 처리하고 가공된 항원을 T cell에 제시하며 cytokine을 분비함. 구체적으로 PRRS와 같은 persistent infection 상황에서 dendritic cell은 virus의 항원을 탐식한 이후, lymphoid 조직으로 이동하여 naive CD4+ T cells과 CD8+ T cells을 성숙시킴. 추가적으로 바이러스에 대항하고 natural killer (NK) cells과 T cell을 활성화시킬 다양한 cytokine(IFN α, IL-12, IL-15등)또한 분비함. 분비된 cytokine에 따라 CD4+ T cell은 T helper 1 (TH1) 나 TH2 cells 로 분화함.

- 분화된 TH1 cell에 분비된 IFN γ는 cytotoxic T lymphocytes (CTLs)을 활성화하며 동시에 B cell에 의한 immunoglobulin G2a antibodies 분비를 촉진함. 분비된 항체는 중화항체로 작용할 수 있으며 바이러스를 체내에서 제거하는 데 중요한 역할을 담당함. 결론적으로 dendritic cell은 선천성 면역계(innate immunity)를 자극하는 요인이면서 동시에 체액성, 세포성 면역을 활성화시키는 핵심적인 역할을 담당함

- 백신의 효능을 극대화기 위해서는 백신이 dendritic cell에 항원을 직접 전달하거나 dendritic

cell의 활성을 유도할 수 있어야 함. 특히 이 dendritic cell은 macrophage, monocyte등과 같은 APC들 중에서도 antigen presenting에 있어서 그 효율이 월등함. 기존 생독 백신의 낮은 면역유도 능력은 PRRS 자체가 갖고 있는 dendritic cell의 기능 저하 작용과도 관계가 있음. 따라서 이를 극복하기 위해서 PRRSV에 대한 강화된 채역성, 세포성 면역반응을 유도할 dendritic cell에 대한 차별화된 작용 기전이 필요함.



* Type I Interferon 의 기능과 작용

- Type I IFN은 바이러스 또는 세균의 감염 시 숙주를 보호하기 위해 작동함. 바이러스에 감염되거나 바이러스의 항원이 자극할 경우, 세포는 IFN-stimulated genes (ISGs)을 활성화시키고 type I interferon의 생산을 촉진함. 이는 feedback 으로 다시 세포에 작용하여 바이러스의 증식이나 항원 생산을 억제함.

- Dendritic cell과 같은 APC에서 분비된 Type I IFN은 NK cell과 T cell의 성숙과 작용을 유도하며 B cell의 항체 생산을 촉진함. 활성화된 CTL과 B cell에서 생산된 항체는 체내의 바이러스의 증식을 억제하고 감염을 종료시키는 핵심적인 adoptive immunity 역할을 담당함.

- PRRSV는 감염된 세포에서 type I IFN의 생산을 억제함. 감염 초기 바이러스의 면역 회피 기전과 관계가 깊음. PRRSV의 NSP1 α, β 는 NF- κ B, IRF3의 활성화를 억제하여 궁극적으로 IFN- α, β 의 생산을 방해함. 이 때문에 바이러스는 세포 내에서 증식하는 데 방해가 되는 interferon의 작용을 무력화시킴. 더욱이 PRRSV에 감염된 세포가 Dendritic cell, macrophage같은 APC이므로 억제된 IFN- α, β 반응으로 면역계는 바이러스에 대항할 시스템을 정상적으로 작동시키지 못함. 이러한 면역억제 기전은 생독백신에도 동일하게 적용됨. 생독백신 역시 Type I IFN유도능력은 떨어짐. 따라서 개발될 생독백신이 dendritic cell의 type I IFN분비를 증가시킨

다면 이어지는 adoptive immunity의 활성을 강화시켜 백신의 효능을 극대화시킬 수 있음.

· 차세대 백신은 1) dendritic cell에 대한 작용을 강화시키고 2) type I IFN의 분비를 촉진시킬 수 있는 면역증강물질을 탑재하고자함. 후보 예상 물질은 이미 위의 요건을 충족시킬 수 있는 물질로서 다음의 특징을 보유함

물질 A	물질 B
<ul style="list-style-type: none"> ○ Dendritic cell maturation 및 activation ○ Dendritic cell의 MHC-I, II을 이용한 antigen presenting기능 강화 ○ APC의 B7-2발현 유도, CD4 T cell에 대한 동시자극 ○ lymphocyte의 선별적인 분화 및 maturation 강화 ○ B lymphocyte의 activation marker(MHC II, B7, CD40, CD25, ICAM-1) 발현 유도 ○ IL-4 분비 증가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ NF-κB의 activation 및 pro-inflammatory signal activation ○ Dendritic cell의 activation 및 innate immunity의 유도 ○ MHC-II 단백질을 통한 antigen presenting 기능 강화 ○ Chemokine(IL-1β, TNF-α, IL-6)의 분비유도 ○ IL-12, IFN-γ의 분비증가, IL-4 분비 감소시킴
<p>특징 : 전반적으로 Th-2 response를 강화시킴</p>	<p>특징 : 전반적으로 Th-1 response를 강화시킴</p>

· 탑재하고자 하는 후보 물질은 위의 두 가지임

· 후보 물질들은 PRRS가 감염된 APC의 내부에서 MHC단백질을 통한 antigen presenting 기능을 강화시키는 능력을 보유함.

· 두 후보물질은 생산 분비된 이후 주위 세포의 외부의 receptopr에 작용하여 면역계의 작용을 활성화시킬 수 있음. 물질 A는 GM1 receptor, 물질 B는 CD40, TLR4 complex에 작용하여 면역세포의 activation을 유도함

· 물질 A는 특히 Dendritic cell을 비롯한 APC의 분화와 성숙을 적극적으로 유도하며 연속적으로 adoptive immunity를 활성화시킴. 이러한 물질 A의 특성은 PRRS의 APC antigen presenting 저하된 기능을 강화시켜줄 수 있음. 또한 물질 A는 특징적으로 IL-4분비를 촉진하여 T helper 2 response를 유도하는 경향이 있음.

· 물질 B는 dendritic cell과 macrophage의 NF- κ B signaling을 활성화시킴. 연속적으로 pro-inflammatory signal activation을 통해 각종 cytokine의 분비를 촉진할 수 있음. 이러한 물질 B의 특성은 PRRS의 면역회피 기전 중, 감염 초기 NF- κ B signaling을 억제하는 작용을 보상할 수 있음. 또한 물질 B는 특징적으로 세포성 면역을 강화시킴. 또한 항바이러스 작용을 하는 IFN- γ 의 분비를 촉진하는 작용을 함.

Disease	Antibody response	T cell response	Protection level
IBDV (Infectious Bursal Disease Virus)	O	not tested	22~100%
SuHV-1(Suid Herpesvirus type-1)	O(high response)	not tested	32~56%
EDS(Adenovirus Egg Drop Syndrome)	O	not tested	not tested
Influenza	O	not tested	100%
<i>Helicobacter pylori</i>	O	not tested	not tested
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	O	IFN- γ	not tested

*각 질병에 대항하기 위해 물질 A를 부형제로 함께 투여한 백신의 효능평가

Disease	Antibody response	T cell response	Protection level
IBDV (Infectious Bursal Disease Virus)	O	O	100%
PCV2 (Porcine Circovirus type2)	O(IgG2)	IFN- γ	not tested
Influenza A	O(high response)	IFN- γ , IFN- γ ,	80~100%
<i>Yersinia Pestis</i>	O	TNF α , CD4+/8+cell	100%

*각 질병에 대항하기 위해 물질 B를 부형제로 함께 투여한 백신의 효능평가

- 백신균주의 genome에 탑재된 면역증강물질은 PRRS 감수성이 있는 dendritic cell을 비롯한 APC에서 생산 분비되어 주위의 local immunity를 활성화시킬 수 있음.
- 면역증강물질의 안전성에 대해서는 이미 백신 부형제로 사용한 논문들에서 평가되었음. 각 후보 물질은 intramuscular, intranasal injection상황에서 어떠한 부작용도 보고된 바 없으나, 생독백신의 경우 바이러스의 증식에 따라 물질의 분비 양이 좌우되는 특성 상 정확한 안전성 검사를 위해 조직 병리학적인 안전성 규명 작업이 반드시 필요함. 예상 가능한 면역증강물질의 부작용은 국소염증 증세임.
- 백신이 항원의 antigen presenting 기능을 강화시킨다면 백신이 유도할 수 있는 체액성, 세포성 면역는 충분히 강화될 수 있음. PRRS 자체가 가지는 면역회피 및 type I IFN 반응을 저하시키는 작용 역시 백신에 탑재된 면역 증강 물질의 기능으로 보상할 수 있음. 이렇게 강화된 백신의 면역원성을 바탕으로 PRRS의 clearance에 핵심적인 기전인 INF- γ 의 분비와 Cytotoxic T cell(CTL) 반응을 유도하여 기존의 시판 백신 보다 강력한 효능을 보일 것으로 예상함.
- 기존의 백신의 효능을 개발 백신이 안전성 측면이나 효능 측면에서 충분히 극복할 수 있을 것으로 예상함. 개발 백신의 성공은 국내 양돈 농가에 큰 피해를 입혀온 PRRS의 청정화에 큰 도움이 될 것임.

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구수행 추진전략 및 체계

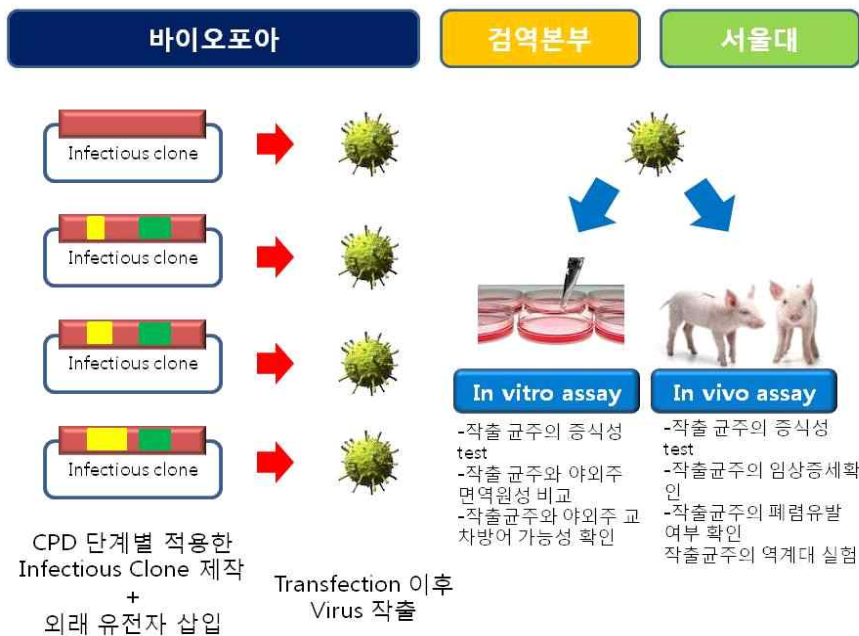
1) 1차년도 연구개발 목표 및 추진체계

개발 목표

- 주관연구기관(주 바이오포아) : 생독백신 후보균주의 작출 및 *in-vitro* 증식성 분석
- 제1 협동연구기관(농림축산 검역본부) : 작출 균주의 면역원성 평가
- 제2 협동연구기관(서울대학교) : 작출 균주의 *in-vivo* 안전성 평가



2) 개발 내용 및 범위



- (주 바이오포아) : PRRSV 예방을 위한 생독 백신 균주의 작출

- (1) 분리 Type2 PRRSV 균주를 이용한 표준화된 PRRSV 생독 백신 주 바이러스의 역유전학 시스템 확립
 - codon pair deoptimization(CPD) 단계별 작용한 infectious clone의 제작 및 작출
 - 작출 단계별 발현 정도 PRRS 특이 형광 항체를 이용하여 확인
- (2) 후보균주의 in vitro kinetics 증식성확인 생존성 확인 및 유전자 서열 비교분석
 - MARC, Vero cell에서의 0.1moi 감염 시 자란 바이러스의 양을 Real time PCR수치로 확인
 - PRRSV 전체 genome의 sequencing 작업을 통한 서열 비교
 - 후보균주의 in vitro 단백질 발현 확인
 - Marc, Vero cell에서 바이러스 단백질 및 외래 유전자 발현을 western blot을 통해 확인
- (3) 후보균주의 계대 배양 및 유전자 변이 확인, kinetics 확인
 - 10계대 별 바이러스의 변이를 sequencing 과 cell에서의 copy 수 변화를 realtime PCR로 확인

- 1 협동연구기관(농림축산 검역본부) :바이오포아 작출 생독 백신 균주의 면역원성 분석

- (1) 최근 국내에서 유행하는 다양한 균주 (타입내 그룹별, 타입간 유전적 다양성)의 분리 확보
 - 확보된 야외 분리 균주의 유전적, 면역적 다양성 분석
 - 바이오포아 작출 균주와 야외 균주의 유전적 면역적 차이 분석
 - PRRSV 전체 genome의 서열 비교
- (2) FACS를 통한 CD4CD8 double possitive cell 분석
 - porcine PAM cell의 바이러스 증식 정도 TCID 수치 비교 평가

- 제2 협동연구기관(서울대학교) : 바이오포아 작출 생독 백신 균주의 안전성 평가

- (1) 면역조직학적 방법을 통하여 작출한 균주의 돼지에서 증식성 분석
 - PRRS 특이 항체를 통한 폐 조직에서의 면역염색기법 평가
- (2)병리조직학적 방법을 통하여 간질성 폐렴 유발 여부 분석
 - 폐 조직에서의 폐렴 발생 정도를 scoring
 - 작출 균주의 역계대 실험을 통한 병원성 재확득 여부 분석
 - 역계대 바이러스 감염 시 돼지의 임상증상 체온 혈중 바이러스 양 수치 변화를 비교

) 2.3 차년도 연구개발 목표 및 추진체계

① 개발 목표

- 주관연구기관(주 바이오포아) : 작출 균주의 안전성, 공격접종 실험 및 야외임상 실험 진행.
- 제1 협동연구기관(농림축산 검역본부) : 돼지 실험에서 시험 백신의 면역학적 효능 분석
- 제2 협동연구기관(서울대학교) : 돼지 실험에서 시험 백신의 병리학적 효능 분석
- 주관 위탁연구기관(주 CTC 바이오) : 작출균주의 대량 생산을 위한 최적 배양 조건 확립, 시험백신 생산



개발 내용 및 범위

- (주 바이오포아) :백신 후보 균주의 안전성 평가, 공격접종 야외임상 시험 진행

- (1) 단계별 CPD 처리된 작출 바이러스의 약독화 기전을 in vitro 상에서 약독화 정도를 분석함.
- (2) 야외 임상 시험 농장 섭외
- (3) 시험 백신 검정
- (4) 동물 실험 진행

- 제1 협동연구기관(농림축산 검역본부) : 시험 백신의 면역학적 효능 분석

- (1) 돼지에서 시험백신 접종 후 시기별 면역유도 수준 분석
- (2) 시험백신의 감염에 따라 유도된 면역능에 대한 유전적/항원적으로 다양한 최근 유행 국내분리주 방어가능성 분석

- 제2 협동연구기관(서울대학교) : 시험 백신의 병리조직학적 효능 분석

- (1) 시험 백신 접종후 야외 PRRS 바이러스 공격 접종을 통한 돼지 폐장에서 육안적 폐렴 병변 분석
- (2) 시험 백신 접종후 야외 PRRS 바이러스 공격 접종을 통한 돼지 폐장에서 병리조직학적 병변 분석
- (3) 시험 백신 접종후 야외 PRRS 바이러스 공격 접종을 통한 돼지 폐장에서 PRRS 바이러스 항원 분석

- 주관 위탁연구기관(주 CTC 바이오) : 시험 백신 생산

- 생독백신 대량 생산을 위한 최적화 시스템 확립
- 시험 백신 대량 생산 및 역가 생존성 비교 확인

2-2. 연구수행 내용 정리

가) 후보균주의 선정

본 과제를 수행하기 위해 국내에서 분리된 북미형 균주인 LMY, BP2017-2 균주의 계놈을 기반으로 역유전학을 이용하여 총 10종의 재조합 바이러스를 제작하였다.

작출 균주 목록 :

LMY 계열	
균주명	상세내역
LMY-Original	SAVE 또는 외래 유전자 삽입되지 않은 LMY 원본 균주
LMY ver1	SAVE가 적용시킨 LMY 재조합 균주
LMY ver2	SAVE가 적용되어 약독화 된 LMY 재조합 균주
LMY Ala	NSP1 부위에 point mutation을 주어 type I IFN의 분비를 강화시킨 LMY 재조합 균주
LMY-HSPX	외래 유전자 HSPX를 발현하는 LMY 재조합 균주

BP2017-2 계열	
균주명	상세내역
BP2017-original	SAVE 또는 외래 유전자 삽입되지 않은 BP2017-2원본균주
BP2017 ver2	SAVE가 적용되어 약독화 된 BP2017-2 재조합 균주
BP2017-HSPX	외래 유전자 HSPX를 발현하는 BP2017-2 재조합 균주
BP2017 ver2-HSPX	SAVE가 적용되어 약독화 되었으며, 외래 유전자 HSPX를 발현하는 BP2017-2 재조합 균주

Chimera	
균주명	상세내역
LMY-BP chimera	LMY ver2 균주의 ORF1 부위와 BP2017-2 균주의 ORF2-7 부위를 가진 Chimeric 재조합 균주

나) 후보균주의 안전성 평가

작출된 백신 후보균주에 대한 안전성 평가 시험을 진행하였다. 평가한 후보 균주 목록은 다음과 같다.

제목	실험동물	수행내용	결과
SAVE 안전성 평가 (LMY, BP2017-2 SAVE 평가)	자돈 50두	Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	비병원성
LMY Ala 안전성 평가	자돈 30두	Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	비병원성
LMY-BP chimera 안전성 평가	자돈 20두	Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	비병원성
LMY-BP chimera 동거돈 실험	자돈 5두	Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	동거돈 감염 없음

백신 후보 균주의 자돈에서의 안전성을 평가하기 위하여 돼지에서 TCID₅₀ 이상 역가로 후보 균주를 접종하여 체온과 호흡기 증세를 관찰하였다. 실험 설계에 따라 접종 이후 7, 14일에 일정수의 자돈을 부검하여 폐에서 간질성 폐렴을 확인하고 스코어링을 하였다.

제작된 균주의 안전성 검토 결과, 돼지에서 작출한 후보 균주들은 매우 안전하며 병원성을 보이지 않은 것을 확인하였다.

다) 후보균주의 면역원성 평가

백신으로서 면역원성을 평가하기 위한 다양한 공격접종 시험을 수행하였다.

제목	수행내용	결과
LMY ver2, BP2017 ver2 heterologous challenge	공격접종 이후 Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	Partial protection
LMY Ala homologous challenge	공격접종 이후 Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	Complete protection
BP2017-2 부형제 평가(1)	공격접종 이후 Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	Partial protection
BP2017-2 부형제 평가(2)	공격접종 이후 Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	Partial protection
LMY-BP chimera 최소면역원성 평가	공격접종 이후 Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	Complete protection
LMY-BP chimera heterologous challenge	공격접종 이후 Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	Partial protection
LMY-BP chimera 부형제 평가	공격접종 이후 Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	Enhanced protection

백신 후보 균주들의 효능을 공격접종 실험을 통해 분석하였다. 대부분의 작출 균주는 매우 안전하지만 heterologous challenge 상황에서 Partial protection 효능을 제공하는 것으로 확인되었다. 부형제의 종류에 따른 면역원성의 차이를 확인하였으며 백신의 교차방어 효능을 향상시킬 수 있는 다양한 시도를 수행하였다.

라) 시험백신의 생산

1) 시험 백신 제조 : 위탁 기업 CTC 바이오
 다음과 같이 시험백신을 제조하였다.

표. 시험백신의 Lot별 생산일 및 생산량

제조번호	제조일자	제조수량(10두/병)	함량
			TCID ₅₀ / mL
Biopoa111	2018.10.01	500병	4.5
Biopoa112	2018.10.08	500병	4.5
Biopoa113	2018.10.17	500병	4.7

2) 야외임상 시험 농장의 선정

- 축종 : 돼지 (자돈)
- 농장수 및 공시 두수
 야외 임상시험을 위하여 아래 표와 같이 3개 농장을 선정하였으며, 각 농장에서 임상시험에 공시할 공시축의 수를 표기하였다.

표. 야외시험 양돈장

농장명	행복농장	녹돈농장	태광농장
사육규모	자돈7000두	모돈450두	모돈472두 자돈 5,500두
주소	강원도 철원군 동송읍 왜매길 153-106	경기도 평택시 청북읍 고잔리 710-4	경기도 안성시 대덕면 만세로 395-8
평균포유개시두수	12두	11.5두	12.2두
평균이유두수	11.5두	10.8두	11.3두
이유자돈의 폐사율	8%	3%	7%
육성, 비육돈의 폐사율	5%	4~5%	3%

마) 시험백신의 검정평가

제조된 3개 Lot의 검정시험을 국가 검정 평가 기준에 의거해 진행하였으며 결과적으로 시험 백신은 검정기준을 통과한 것으로 확인되었다.

바) 시험백신의 역계대 평가

시험 백신의 역계대 시험

계대수	접종 내용	실험동물	수행내용	결과
0계대	시험백신	자돈 5두	Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	감염
1계대	0계대 유제액	자돈 5두	Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	비감염 역계대 중단
1계대 반복	0계대 유제액	자돈 10두	Viremia, 임상증세, 조직병리 관찰	비감염 역계대 중단

시험 백신의 안전성을 확인하기 위해 접종 이후, 역계대 실험을 수행하였다. 역계대 시험 결과 시험백신은 1계대 이상에서 어떠한 감염의 증거를 확인할 수 없었으며 반복 실험 결과에서도 어떠한 돼지에서 감염의 증거를 확인하지 못하였다. 이로써 백신 접종 이후 역으로 1계대 이후 감염이 되지 않는 것으로 결론 내렸다.

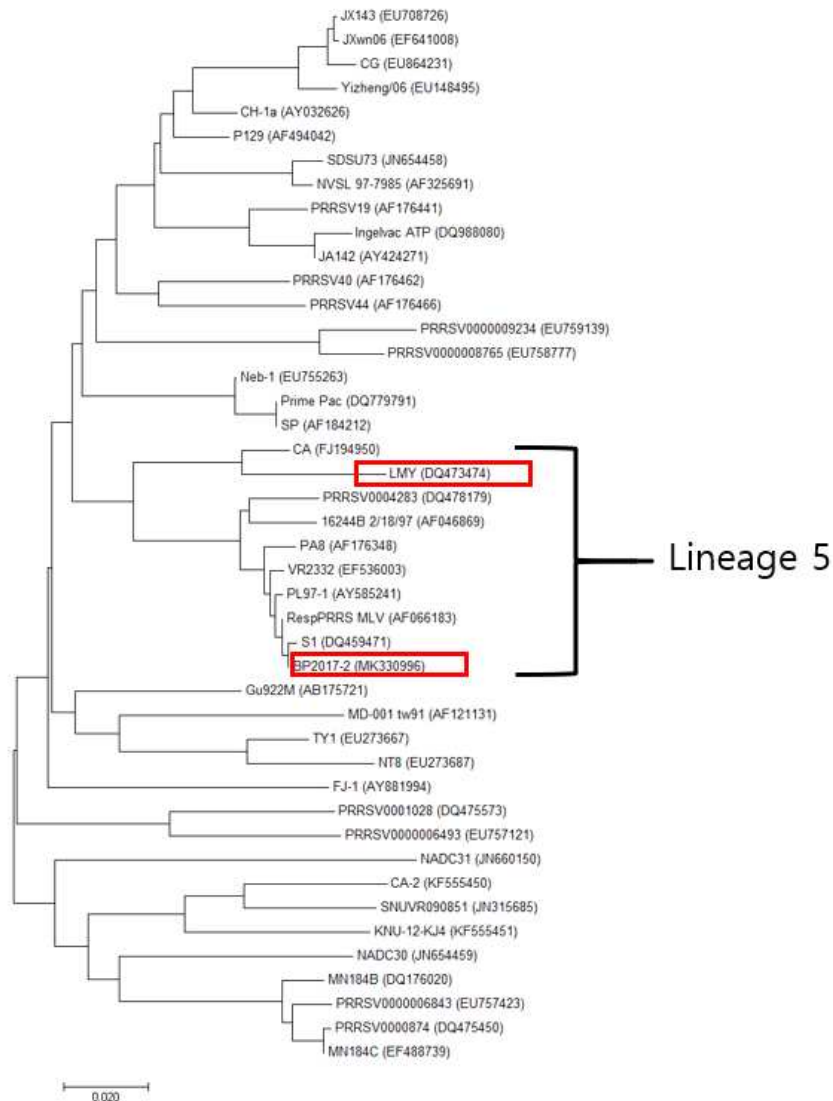
2-3. 연구수행 내용 및 결과

가) 후보균주의 제작

1) 백신 후보 균주 (LMY, BP2017-2 strain의 세부사항)

본 연구과제를 수행하기 위하여 두 종의 국내 분리 Type 2 PRRSV를 사용하였다. 한 종은 2002년에 국내 농림축산 검역본부에서 분리된 LMY strain이고 다른 종은 2017년 (주) 바이오포아에서 분리한 BP2017-2 이다.

두 균주는 모두 Type2 북미형으로 분리되는 균주이며 ORF5를 기준으로 북미형 PRRSV를 분류하는 체계상에서 Lineage 5에 속한다.[1]



*그림. 북미형 PRRSV의 계통분류, LMY와 BP2017-2의 Lineage 분류 상황.

Pylogenetic analysis of ORF5, Neighbor-Joining method (Mega ver4.0)

LMY strain의 경우 2002년 호흡기 증세를 보인 자돈의 폐에서 분리한 것으로 알려져 있다.

PRRSV의 병원성 진단은 임상적인 체온의 상승과 호흡기 증세가 주요하며, 조직병리학적으로 간질성 폐렴의 정도를 판별하는 것이 가장 중요하다. LMY strain은 mild-moderate 수준의 병원성을 보유한 것으로 알려져 있다.

Level	score	비고
Normal	0	Alveolar wall의 어떠한 비후도 관찰되지 않음
Mild	1	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 10% 미만
Moderate multifocal	2	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 40% 미만
Moderate diffuse	3	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 80% 미만.
Severe	4	Air soc의 존재가 확인되지 않음. 혹은 출혈을 동반함.

*표 간질성 폐렴 scoring 기준

BP2017-2균주는 국내 PRRS백신 접종 농가에서 2017년 자돈의 혈청에서 분리하였다. 이 균주는 위축성 질환을 앓고 있는 자돈이 아닌 임상적인 증상이 없는 자돈에서 분리한 것으로 해당 농장은 장기간 PRRS 백신을 접종하는 농장이었으나 분리 당시에는 백신 사용이 중단된 상태였다. BP2017-2 균주는 높은 항체가를 보이지만 임상적인 증세는 없는 자돈의 혈청에서 분리하였으며 상당히 mild 한 병원성을 보유한 것으로 판단하고 있다.

본 연구팀은 두 종의 바이러스를 백신 후보로서 선정하였으며 역유전학을 이용하여 해당 균주의 유전자를 조작하여 약독화되고 면역원성을 강화시킨 균주로 개발하고자 하였다.

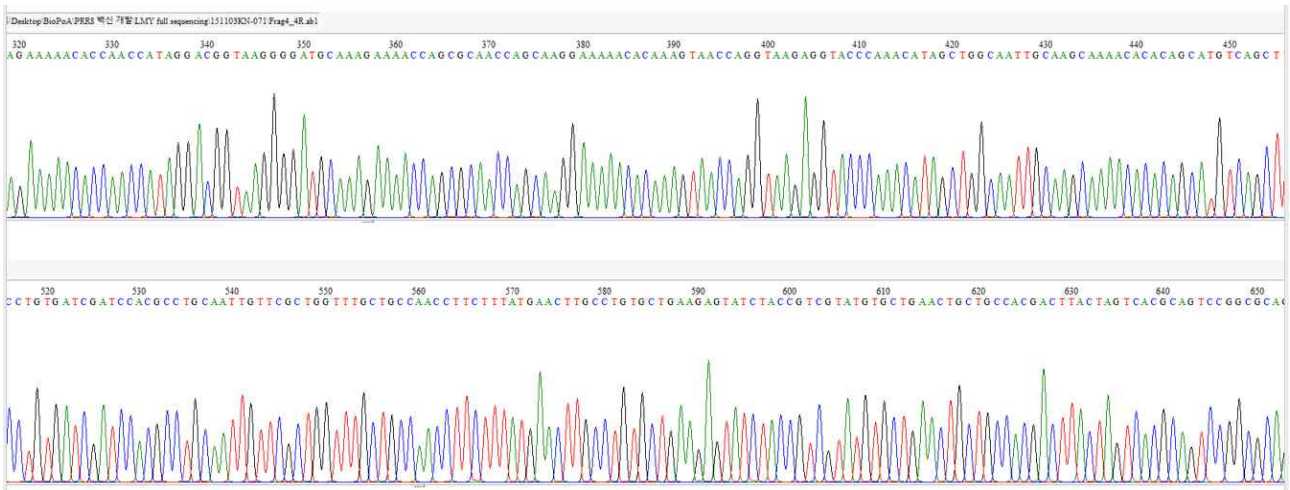
2) 후보균주의 Full sequencing

Fragment	primer	sequence	Temp	Size
1	F	ATGACGTATAGGTGTTGGCTCTA	58	1654
	R	CTGAGGATTTGGATGGCATT	60	
2	F	GCTTTGTCCTCGTAAAT	60	1637
	R	ACTCAACTTCTCGCCTGCT	59	
3	F	ACACCTTCGAGTGAGCCAGT	60	1541
	R	AGTCCAGCCAAGACACAGT	60	
4	F	TGCTGTTGGTCTGTTCAAGC	60	1634
	R	CTGACTTCCCGTCAATGGT	60	
5	F	ACCTACTAGCCGCTGTTTCG	60	1602
	R	GGAGGGTATGCTTGGTGCTA	60	
6	F	GTTGGTGCAGGTTGATAAGGTT	60	1563
	R	ACAGGTATTTCCGCACAAGG	60	
7	F	GTCTGCTTGTATTACCTTGACTC	58	1693
	R	CTTTGCAGGTAGGGAGCAAG	60	
8	F	TGTAGGAAAGGCACAAACC	60	1653
	R	TGACTCTTTGGGAAGGAAGC	59	
9	F	AACCCAGAACAATGAAAAGTGG	60	1625
	R	GGTTGGAAAAACAGCAAC	59	
10	F	CCACGCTGTCTCGGATTAGT	60	1621
	R	CAGTGACCAAACCGACTGTG	60	
11	F	ATGTGAGCTGAATGGCACAG	60	1503
	R	TAATTTGGCCGTGTGGT	60	

Fragment	primer	Sequence	Temp	size
1	F	TATGACGTATAGGTGTTGGCTCTATG	58	1367
	R	AGCGTGCTTTTCTTGCTCTCT	59	
2	F	CGGGAGAACCAGCTACTCTG	58	1641
	R	AGGACACAATCACCAGCTCAC	58	
3	F	AGTTCAGCCTCGAAAAACGA	58	561
	R	GACACGGACGCAGGTTTAATG	58	
4	F	CAATCCCACCGTACCAGAAC	57	1653
	R	ATACCCGCAAGCACTTTACG	58	
5	F	GGAAATGACCCCAATTTTCTC	59	1544
	R	CCCCCTTGTTTATTCGATCC	60	
6	F	CCGTGCCTATTGGCTAACATC	60	1566
	R	CCCTTCTCAGGGTCAAAGTCG	58	
7	F	TAAGAAGAAGAGGCGCAGGA	61	1393
	R	GGGTGACAGTTTCCAGTTT	60	
8	F	GCCTTGTCGGAAATACCTG	59	1676
	R	CATGGTCTGGTGAAGTGGTG	58	
9	F	CTTGCTCCCTACCTGCAAG	58	1672
	R	ACGGATGTACGAGGCATAGC	57	
10	F	GGAATCAGTTGCGGTAGTCG	57	1644
	R	GCCGTGTAGCTGAAGGACA	58	
11	F	ACGAACCCGGTAGGTCTCTT	57	1618
	R	GTGCAGAAGCCCTAGCAGTC	58	
12	F	AAAGGGGCAAAGTTGAGGTC	58	1137
	R	AATTTGGCCGCATGGTTC	59	

*표. LMY(좌), BP2017-2(우) full sequencing primer 목록

위의 제시한 표와 같이 디자인한 primer를 이용하여 두 PRRSV의 전체 게놈을 분석하였다. 양 말단의 5'UTR, 3'UTR 부위는 Invitrogen 사의 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends ; RACE) system과 3'RACE system를 이용하여 분석하였다.



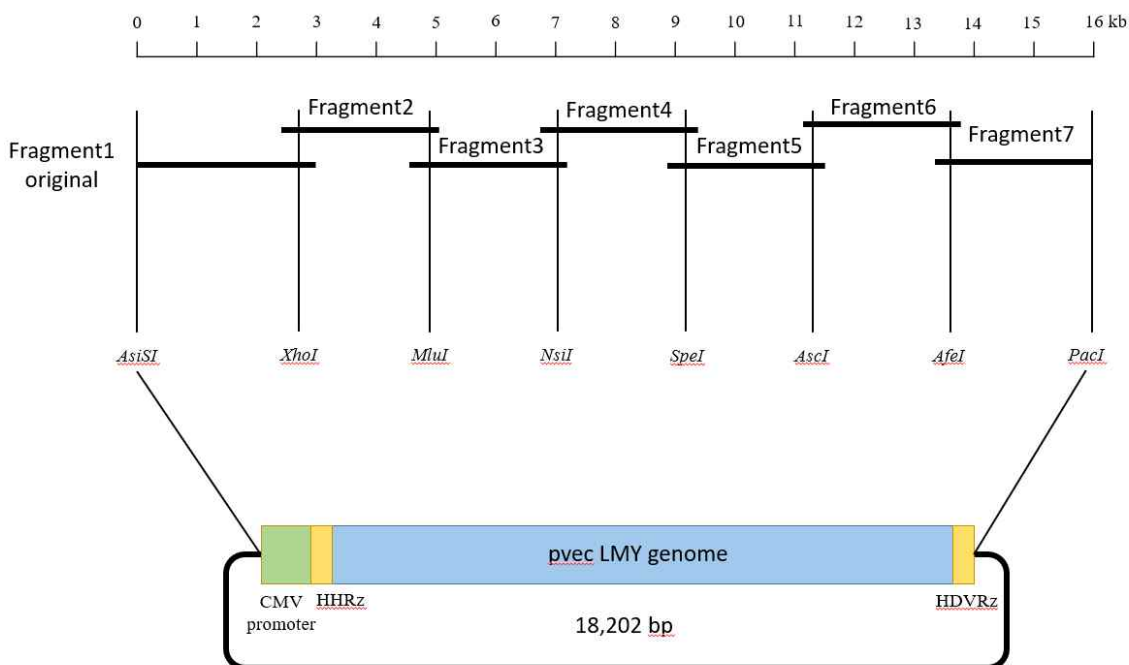
*그림. LMY(위), BP2017-2(아래) genome full sequencing 결과

두 종의 바이러스의 게놈을 전체를 sequencing 하였으며 peak의 이상이 있거나 중복된 경우 2회 이상 다시 sequencing을 수행하였다.

3) Infectious clone의 제작

3-1) Original strain infectious clone의 제작

a) LMY-original infectious clone의 제작



*그림. LMY-original infectious clone의 모식도

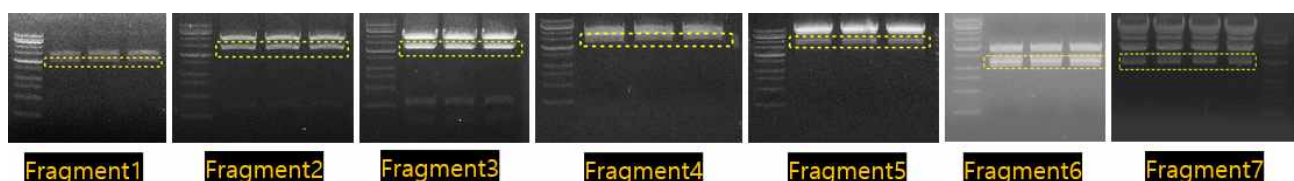
SAVE (Codon Pair Deoptimization) 원리가 적용되지 않고 원래의 서열을 유지한 LMY strain의 infectious clone (LMY-original)을 제작하였다. 전체 15000여개의 염기로 이루어진 LMY full genome을 7개의 단편으로 나누어 인공적으로 합성한 뒤, 적절한 제한효소로 자르고 T4 Ligase를 이용하여 이어 붙여 하나의 clone으로 만든 것이다. 작업은 다음과 같았다.

합성한 유전자는 항생제 (Ampicillin or Kanamycin) 내성 유전자가 삽입된 공벡터에 삽입되어 제공받았다. 본 유전자의 합성을 위해서 연구진은 바이오니아, 바이오닉스, Invitrogen 등의 업체에 의뢰하여 앞서 확인된 유전자 서열대로 합성을 진행하였다.

합성된 유전자는 DH5a C cell에 Transformation 되어 유지하였으며, 제한효소 cutting을 위해서 midi prep 후 대략 6~7ug의 유전자를 수확한 후 작업에 사용하였다.

Fragments	Restriction E	Tm	Buffer	Point
1	AsiSI	37	CutSmart	GCGATCGC
	XhoI	37	CutSmart	CTCGAG
2	XhoI	37	NEB3.1	CTCGAG
	MluI	37	NEB3.1	ACGCGT
3	MluI	37	NEB3.1	ACGCGT
	NsiI	37	NEB3.1	ATGCAT
4	NsiI	37	CutSmart	ATGCAT
	SpeI	37	CutSmart	ACTAGT
5	SpeI	37	CutSmart	ACTAGT
	Ascl	37	CutSmart	GGCGCGCC
6	Ascl	37	CutSmart	GGCGCGCC
	AfeI (blunt)	37	CutSmart	AGCGCT
7	AfeI (blunt)	37	CutSmart	AGCGCT
	PacI	37	CutSmart	TTAATTAA

*표. 각 Fragment 와 해당 제한효소의 종류



*그림. Fragment 1~7까지 제한효소 cutting 후 사진

1번 Fragment부터 7번까지 차례로 합성된 유전자를 잘라 이어붙였다. 정확하게는 1번과 2번 Fragment를 동일한 제한효소로 자른 뒤, gel 상에서 타겟 유전자를 추출하여 잘려진 1번 plasmid와 T4 Ligase를 함께 17° C에서 2시간 반응시켰다. 이후 적정량을 DH5a C cell에 heat shock을 통해 Transformation시켰다. ligation 확인 여부는 다음의 연결 primer를 이용하여 Colony PCR을 통해 확인하였다.

제목	방향	Primer 내용	TM	Size
Frag1-2	F	TTGCCCGTCACAGCGGAGGAA	64	260
	R	AGCACAACGTCCCAATCAAAGA	60	
Frag2-3	F	CTCAAACCTTGGGACCCTGTTC	60	381
	R	GGGTTTTTCAGAGGGTTGCTC	59	
Frag3-4	F	CCTTTGGAATGTTTGTGCTATCCTG	60	374
	R	CTTTCCTTCGGCAAATATCG	57	
Frag4-5	F	GCAAACCTGTCACCCCTTGACTC	60	647
	R	GAAACCCCAGCATCAAATTCAG	58	
Frag5-6	F	TCACTGGAAATGGTGAGGATTG	57	457
	R	TCCACTTGACACTGGGTGAGGA	58	
Frag6-7	F	AAGCCATGTTTCAGTTCGAGTC	58	394
	R	GGAGCAGCCGTACATGATTGA	58	

*표. Ligation 확인용 primer 목록.

확인 후 배양기간을 거쳐 midi prep을 통해 수확한 plasmid를 sequencing 작업을 통해 최종적으로 ligation 여부와 변이 여부를 확인하였다. 1,2번 연결 후 7번 까지 차례로 동일하게 작업을 수행하였다.



* 그림. Fragment 4번 5번의 연결 확인, colony PCR 결과.

최종적으로 일련의 Ligation 작업을 통해 1번부터 7번 Fragment까지 연결된 완벽한 Infectious clone을 제작하는데 성공하였으며 C cell에서 배양 후 midi prep 후 수확한 clone의 양(100ul)은 6534ng/ul 로 Spectrophotometer 기기를 이용하여 농도를 측정하였다.

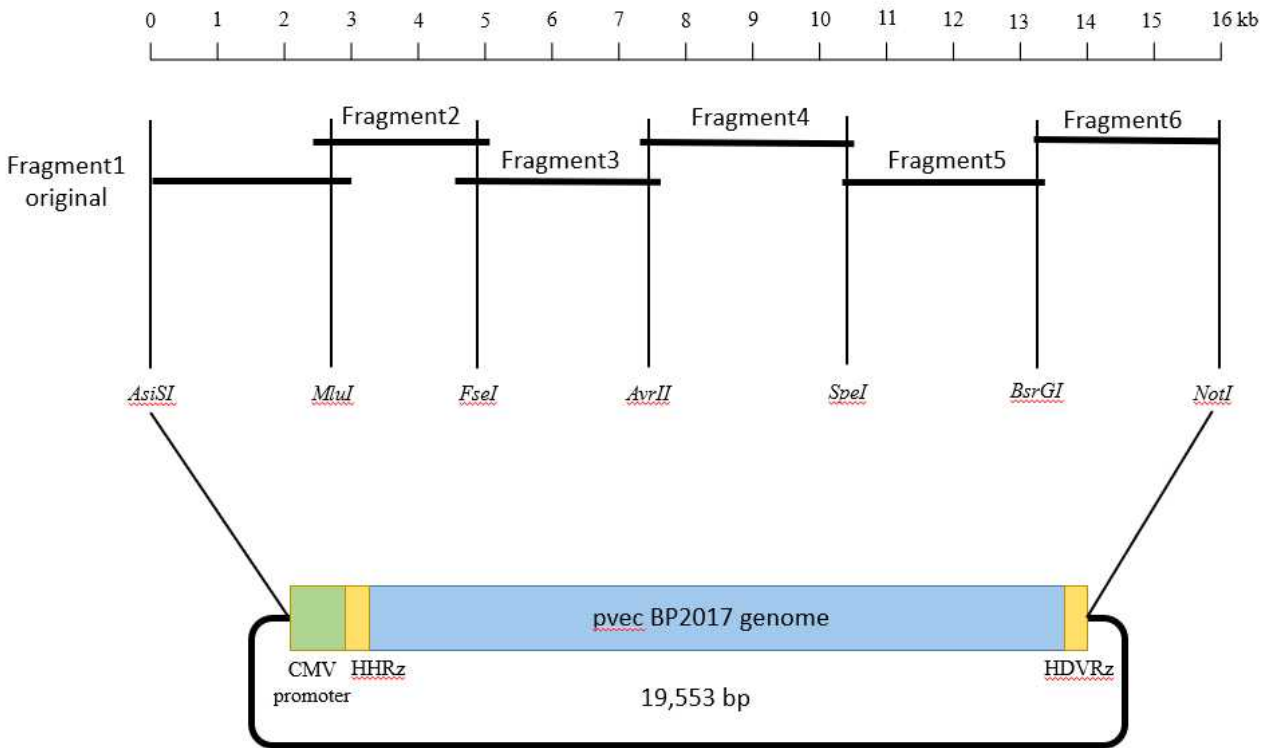
수확한 clone은 다음의 primer를 이용하여 full sequencing 작업을 수행하여 변이여부를 최종적으로 확인하였다.

Primer	Sequence
F1	GCGATCGCATAGTAATCAATTACGG
F2	TTTGTATTGTCAGGAGCTGTGACC
F3	CACGTATTAACCAACCTGCCAC
F4	GAGAGCAAGGAAAGCACGCTC
F5	ATCGACACCTTCTTTGATTGGGA
F6	GTGGGCATCTCCAAGAGGTGAA
F7	TGTGAGTTTGACTCGCCAGAATG
F8	CTGCTCGATGATTTTGCACATGT
F9	GTGCCTATTGGCTAACATCCTC
F10	TCATGAGTCTCTGACTGGTGCC
F11	AATAATTGACAAACTCCAGGGCC
F12	AAATACCTGTTTGCCCATGTAGG
F13	TGATGCTGGGGTTTCAGACGG
F14	GTTGGTGCCTGGCAAGAATTC
F15	ACAACCTGGGGTTTTATTCTCACC
F16	CCTATGATTATGGCGCCAAGAT
F17	GAATGTACCGCATCATGGAAAAG
F18	AGCCATGTTTCAGTTCGAGTC
F19	CAAAAGAGTTGTGCTTGATGGTT
F20	GGCATTCTGTGGCATCCCAG

*표 LMY-original full sequencing primer

확인 결과 LMY-original infectious clone은 어떠한 변이도 발생하지 않은 genome sequence와 동일한 것을 확인하였다.

b) BP2017-original infectious clone의 제작



*그림. BP2017-original infectious clone의 모식도

SAVE (Codon Pair Deoptimization) 원리가 적용되지 않고 원래의 서열을 유지한 BP2017-2 strain의 infectious clone (BP2017-original)을 제작하였다. 전체 15000여개의 염기로 이루어진 BP2017-2 full genome을 6개의 단편으로 나누어 인공적으로 합성한 뒤, 적절한 제한효소로 자르고 T4 Ligase를 이용하여 이어 붙여 하나의 clone으로 만든 것이다. 작업은 다음과 같았다.

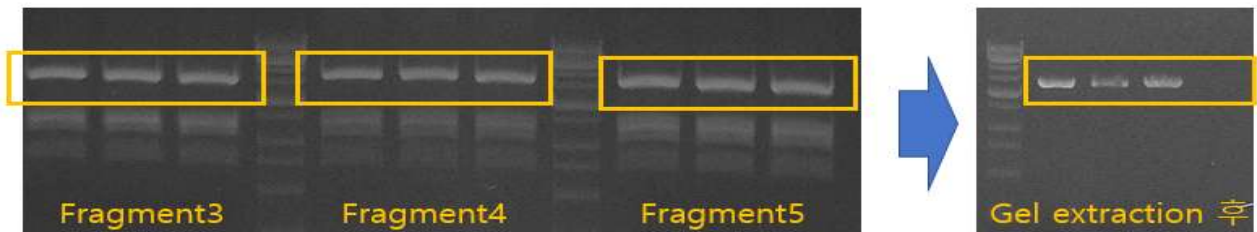
합성한 유전자는 항생제 (Ampicillin or Kanamycin) 내성 유전자가 삽입된 공벡터에 삽입되어 제공받았다. 본 유전자의 합성을 위해서 연구진은 바이오니아, 바이오닉스, Invitrogen 등의 업체에 의뢰하여 앞서 확인된 유전자 서열대로 합성을 진행하였다.

합성된 유전자는 DH5a C cell에 Transformation 되어 유지하였으며, 제한효소 cutting을 위해서 midi prep 후 대략 6~7ug의 유전자를 수확한 후 작업에 사용하였다.

Fragments	Size	Restriction E	Tm	Buffer	Point
1	2866	AsiSI	37	NEB3.1	GCGATCGC
		MluI	37	NEB3.1	ACGCGT
2	2373.	MluI	37	NEB3.1	ACGCGT
		FseI	37	CutSmart	GGCCGGCC
3	3063	FseI	37	CutSmart	GGCCGGCC
		AvrII	37	CutSmart	CCTAGG
4	2336	AvrII	37	CutSmart	CCTAGG
		SpeI	37	CutSmart	ACTAGT

5	3290	SpeI	37	NEB2.1	ACTAGT
		BsrGI	37	NEB2.1	GGCGCGCC
6	2807	BsrGI	37	NEB3.1	GGCGCGCC
		NotI	37	NEB3.1	GCGGCCGC

*표. 각 Fragment 와 해당 제한효소의 종류



*그림. Fragment 3,4,5 제한효소 cutting 후 gel extraction 사진

1번 Fragment부터 6번까지 차례로 합성된 유전자를 잘라 이어붙였다. 정확하게는 1번과 2번 Fragment를 동일한 제한효소로 자른 뒤, gel 상에서 타겟 유전자를 추출하여 잘려진 1번 plasmid와 T4 Ligase를 함께 17° C에서 2시간 반응시켰다. 이후 적정량을 DH5a C cell에 heat shock을 통해 Transformation시켰다. ligation 확인 여부는 다음의 연결 primer를 이용하여 Colony PCR을 통해 확인하였다.

제목	방향	Primer 내용	TM	Size
Frag1-2	F	GGACTGTTTCGCAGTTCCTTG	60	372
	R	GGACCGAGTTGTTGTCCA	58	
Frag2-3	F	CAGACTGTATCTTGGCTGGAG	57	406
	R	GAAACCTTGACCACTTTTGG	57	
Frag3-4	F	ATGAGGAGGTCCATAATAACACAG	58	423
	R	GTGAAGGTCCGTTGTGA	58	
Frag4-5	F	CACTCCACCAGCATTGTC	57	394
	R	GAAGGAGCCAGTATGTTTTCC	57	
Frag5-6	F	GCTCATTTTCAGCATCTAGCC	59	416
	R	CCTGCACCAAAGAGACCTAC	57	

*표. Ligation 확인용 primer 목록.

확인 후 배양기간을 거쳐 midi prep을 통해 수확한 plasmid를 sequencing 작업을 통해 최종적으로 ligation 여부와 변이 여부를 확인하였다. 1,2번 연결 후 6번 까지 차례로 동일하게 작업을 수행하였다.

최종적으로 일련의 Ligation 작업을 통해 1번부터 7번 Fragment까지 연결된 완벽한 Infectious clone을 제작하는데 성공하였으며 C cell에서 배양 후 midi prep 후 수확한 clone의 양(100ul)은 2324ng/ul 로 Spectrophotometer 기기를 이용하여 농도를 측정하였다.

수확한 clone은 다음의 primer를 이용하여 full sequencing 작업을 수행하여 변이여부를 최종적으로 확인하였다.

Primer	sequence
F1	ACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAA
F2	CCGTCATGTATGTGGCCGAAAG
F3	GAAACCACCCTTCCC GAAAGAG
F4	TGGCTAACTACTACTACCGTGCG
F5	CACCTCGCGGAACTGTGTCTC
F6	GAGGCCTGACGAGAGCACATCA
F7	GAAGCCCCATTGAGCAACCCT
F8	TATGCCTTCAGGAATCTTGGCC
F9	ACATAAGCGAGGTGCCTTCAGA
F10	CGAGGTA CTTTGGCCAAACTTG
F11	TCACAACCGGACCTTCACCCT
F12	GTTCCCAACCAAGGACATTCAG
F13	CAACCGTGACAGGATCCTCGC
F14	CAGGCACAACGCTGCAATTC
F15	TAGAACTTGACCTCACTGGC
F16	CGGATACAAAATTCTGGCGTGCG
F17	GGATGCTTTCACGGAGTTCTTG
F18	GGTGCAGGATAGGGTATGACC
F19	GACACCTGAGACCATGAGGTGG
F20	TGAATTGTGCTTTCACCTTCGGG
F21	CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGC

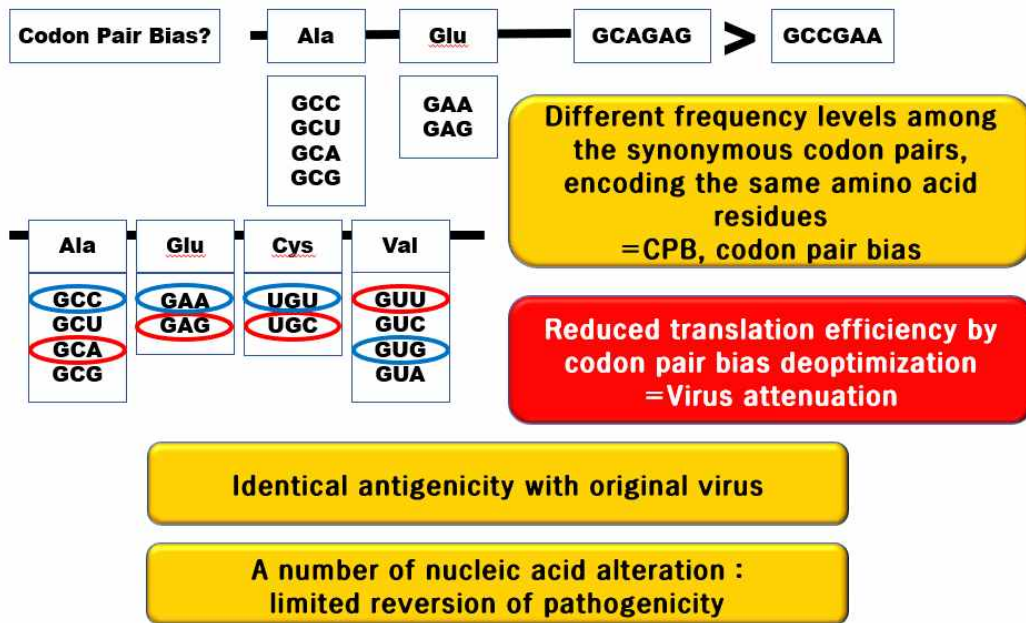
*표 BP2017-original full sequencing primer

확인 결과 BP2017-original infectious clone은 어떠한 변이도 발생하지 않은 genome sequence 와 동일한 것을 확인하였다.

3-2) SAVE (Synthetic Attenuated Virus Engineering, Codon Pair Deoptimization) program 제작

Synthetic Attenuated Virus Engineering

(Codon Pair Deoptimization, CPD)



* 그림 SAVE 기법에 대한 모식도

SAVE 기법은 Codon이 쌍으로 배열될 때 (Pair) 생기는 편향성을 이용하여 아미노산의 변화 없이 오직 silent mutation 만으로 이러한 편향성을 낮추는 방향으로 유전자를 조작하는 것을 의미한다. 이렇게 조작된 바이러스는 아미노산의 변화 없이 translation 효율이 떨어져 증식이 억제되는 것이 SAVE 기법의 핵심이다[2].

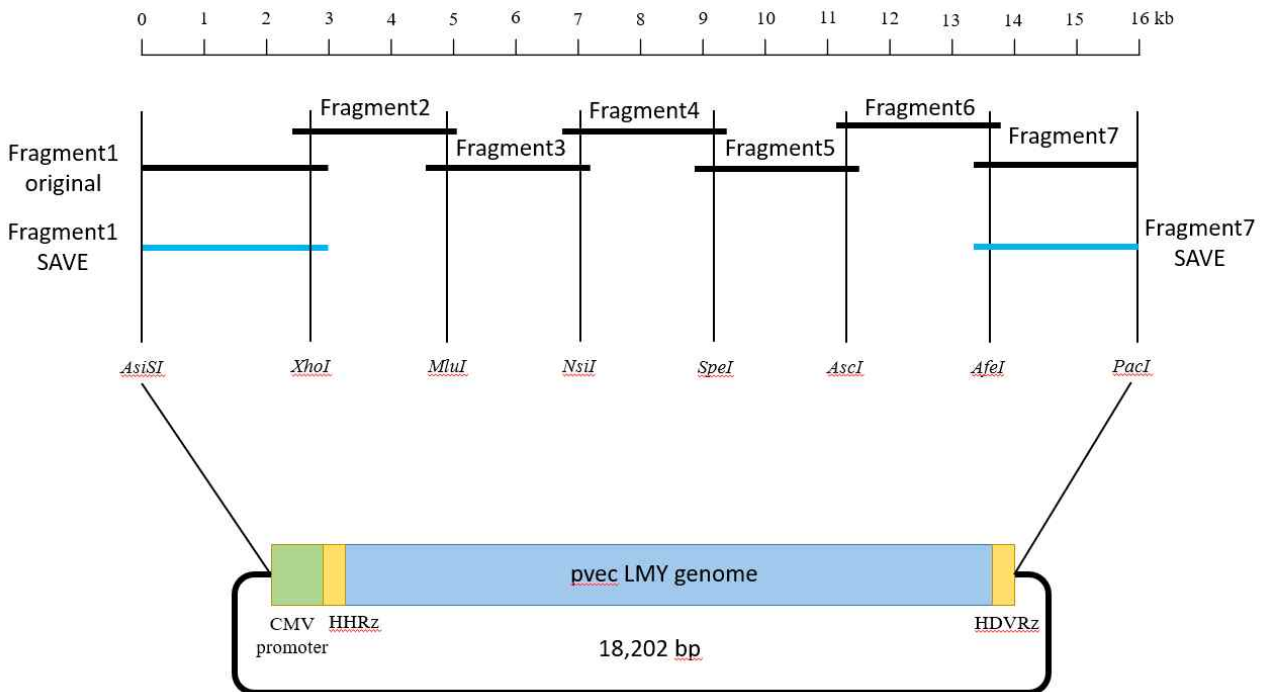
SAVE는 특징적으로 각각의 codon pair가 가지는 편향성을 수치화해야 하기 때문에 컴퓨터 프로그램이 필수적이다. 본 연구팀에서는 이러한 편향성을 수치화하기 위한 프로그램을 독자적으로 개발하여 PRRS 약독화에 적용하였다. 개발한 프로그램은 돼지의 약 4만 개 유전자를 기반으로 돼지의 codon pair가 갖는 편향성(codon pair score)을 수치화하였으며 돼지 감염 바이러스의 유전자를 입력 시 전체 유전자에 대한 평균값(codon pair bias, CPB)을 수치화시킬 수 있다[3].

알고리즘이 적용되어 개발된 프로그램을 유전자 서열을 입력 시, 자동으로 codon pair score의 평균(codon pair bias)이 산출되어 나오도록 디자인하였으며 색감으로 구분 가능하도록 bias가 높을수록 붉은 색을 낮을수록 파란색을 보이도록 구현하였다.

수한 silent mutation를 적용한 서열을 합성하여 infectious clone에 해당부위를 치환한 뒤, 역유전학적으로 재조합 바이러스를 추출하는 것으로 진행하였다.

a) LMY-SAVE infectious clone 제작

초기에 LMY 균주의 SAVE 적용은 NSP1 부위와 ORF5,7에 이루어졌으며 실제로 바이러스의 추출이 성공한 것은 오직 NSP1 부위에 SAVE를 적용한 상태에서 성공하였다. (ORF5,7에 적용한 것은 추출에 실패함)



*그림. LMY 균주의 SAVE 적용

PRRS의 NSP1부위는 거대한 ORF1 부위의 분할된 NSP중 하나로서 숙주의 면역을 억제하는 IFN antagonist의 역할을 하는 것으로 알려져 있다[4]. 또 ORF5, ORF7은 바이러스 입자를 구성하는 주요 항원으로서 이들 역시 숙주 면역체계를 교란 시키는 과정에 참여하는 것으로 알려져 있다[5]. 본 연구팀은 이러한 숙주 면역을 억제하는 것으로 밝혀진 바이러스 항원에 SAVE를 적용하여 PRRS가 가지는 면역 억제능력을 감소시켜 백신으로서의 효능을 최대한 향상시키 고자 하였다.

	NSP1 beta		ORF5		ORF7	
CPB	0.01391223202788301	-0.045794755673792036	-0.014374203925576312			
	-0.2534356506709487	-0.2834544632947958	-0.3868857964939458			
Free energy	-202.20 kcal/mol	-198.10 kcal/mol	-118.90 kcal/mol			
	-198.80 kcal/mol	-191.60 kcal/mol	-94.30 kcal/mol			
CpG, UpA	0.6394	0.7066	0.8459	0.7121	0.5175	0.5949
	1.1753	1.0300	1.3062	0.9343	1.4555	1.0340

*표 SAVE 적용 전후의 codon pair bias의 차이와 CpG,UpA 차이

>LMY NSP1 Original sequence, 0.01391223202788301

GCTGCTGTCTACGATGTTGGTCATGGCGCGTCATGTATGTGGCCGATGAGAGAGTCTCCTGGGCCCTCGTGGCGGGGATGAAGTA
AGATTTGAAACTGTCCCACAGGAGCTCAAGTCGGTTGCGAACCAACTCTGCACCTCCTTCCCACCCCACCACGTAGTGGACATGTCT
AAGTTCGCCTTTACAGCCCCTGGGTGTGGTGTCTTCTATGCGGGTTCGAACGTCAATATGGCTGTCTCCCCGCTGACACTGTCCCGGAA
GGCAACTGCTGGTGGAGCTTGTGTTGACTCGCTCCCATTGGAAGTCCAGGGCAAAGAAATTCGCCATGCTAACCAATTTGGCTACCAG
ACCAAGCATGGTGTCTCTGGTAAGTACCTACAGCGGAGGCTGCAAATTAATGGTCTCCGAGCAGTAGCTGACCCAAATGGACCTTTC
GTCGTACAGTACTTCTCCGTCAAGGAGAGTTGGATCCGCCACTTGAAACTAGCGGAAGAACCAGTTACCCTGGGTTTGAGGACCTC
CTCAGAATAAGGGTTGAGTCTAACACGTACCATTGGCTAACAAAGGATGAAAAATTTTCCGGTTTGGCAGTCATAAGTGGTACGGC

>CPD modified LMY NSP1 ver1, -0.2534356506709487

GCTGCT GTCTAC GATGTT GGTCAT GGCGCC GTCATG TATGTG GCCGAT GAGAGA GTCTCC TGGGCC CCTCGC
GGCGGG GACGAA GTTAGA TTCGAA ACGGTC CCACAG GAGCTT AAGTCG GTTGCG AACCAA CTCTGC ACGTCG
TTCCA CCCCAC CACGTA GTCGAT ATGTCT AAGTTC GCCTTT ACCGCC CCGGT TGGGC GTATCT ATGCGG
GTCGAA CGTCAA TACGGC TGTCTC CCCGCC GATACG GTCCCC GAAGGC AACTGC TGGTGG AGCTTG TTCGAT
TCGCTC CCACTC GAAGTG CAAGGC AAAGAG ATTTCG CACGCT AACCAA TTCGGG TATCAG ACTAAG CATGGC
GTATCC GGTAAG TACCTA CAGCGG AGGCTG CAAATT AACGGT CTCCGC GCAGTC GCTGAC CCTAAC GGACCT
TTCGTC GTACAG TACTTC TCCGTC AAGGAG AGTTGG ATCCGC CACTTG AAATA GCGGAA GAACCT AGTTAC
CCCGGG TTCGAG GACCTC CTCCGC ATAAGG GTTGAG TCTAAC ACGTCA CCATTG GCTAAC AAGGAC GAAAAA
ATTTTC CGGTTT GGCAGT CATAAG TGGTAC GGC

>CPD modified LMY NSP1 ver2, -0.3377269630038442

GCCGCC GTATAC GACGTC GGACAT GGCGCC GTTATG TACGTT GCCGAC GAGAGA GTCTCC TGGGCC CCTCGC
GGCGGC GACGAA GTTAGA TTCGAA ACGGTC CCACAG GAGCTT AAGTCG GTTGCG AACCAA TTATGT ACGTCG
TTCCA CCCCAC CACGTA GTCGAT ATGTCT AAGTTC GCCTTT ACCGCC CCGGT TGGGC GTATCT ATGCGG
GTCGAA CGTCAA TACGGC TGTCTC CCCGCC GATACG GTCCCC GAAGGC AACTGT TGGTGG AGCTTG TTCGAT
TCGCTC CCACTC GAAGTG CAAGGC AAAGAG ATTTCG CACGCT AACCAA TTCGGG TATCAG ACTAAG CATGGC
GTATCC GGTAAG TACCTA CAGCGT AGGCTG CAAATC AACGGT CTCCGC GCAGTC GCTGAC CCTAAC GGACCT
TTCGTC GTACAG TACTTC TCCGTC AAGGAG AGTTGG ATCCGC CACTTG AAATG GCGGAA GAACCT AGTTAC
CCCGGG TTCGAG GACCTC CTCCGC ATAAGG GTTGAG TCTAAT ACGTCA CCATTG GCTAAC AAGGAC GAAAAA
ATTTTC CGGTTT GGCAGT CATAAG TGGTAC GGC

>CPD modified LMY NSP1 ver3, -0.39989700745812695

GCCGCC GTATAC GACGTC GGACAT GGCGCC GTTATG TACGTT GCCGAC GAGAGA GTCAGT TGGGCC CCTCGC
GGCGGC GACGAA GTTAGA TTCGAA ACGGTC CCACAG GAGCTT AAGTCG GTTGCG AACCAA TTATGT ACGTCG
TTCCA CCGCAT CACGTA GTCGAT ATGTCT AAATTC GCTTTT ACCGCC CCGGT TGGGC GTATCT ATGCGG
GTCGAA CGTCAA TACGGC TGTCTC CCCGCC GATACG GTACCC GAAGGC AACTGT TGGTGG AGCTTG TTCGAT
TCGCTC CCACTC GAAGTG CAAGGC AAAGAG ATTTCG CACGCT AACCAA TTCGGG TATCAG ACTAAG CATGGC
GTATCC GGTAAG TACCTA CAGCGT AGGCTG CAAATC AACGGT CTCCGC GCAGTC GCTGAC CCTAAC GGACCT
TTCGTC GTACAG TACTTT TCCGTT AAAGAG AGTTGG ATACGC CACTTG AAATG GCGGAA GAACCT AGTTAC

CCCGGG TTCGAG GACCTC CTCCGC ATAAGG GTTGAG TCTAAT ACGTCA CCGTTA GCTAAC AAGGAC GAAAAA
ATCTTT CGCTTC GGAAGT CATAAG TGGTAC GGA

LMY 균주 NSP1 부위의 단계별 SAVE의 적용 서열. original 서열에서 SAVE 적용 단계를 높일 수록 더 많은 silet mutation이 적용되었으며 하위 단계의 변이는 상위단계에서 그대로 유지하였다.

>LMY ORF5 Original sequence, -0.045794755673792036

ATGTTGGGGAGATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCAATTGCTTTTTTGTGGTGTATCGTGCCGTCTTGTGTTTGTGCGATCGTC
AGCGCCAACAACAGCAGCAGCTCAAATTTACAGCTGATTTACAACCTTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAGCTAAC
AGATTTGACTGGGCGGTGGAGTGTTTTGTTATTTTTCTGTATTGACTCACATTGTCTTATGGTGCCCTAACCACTAGCCACTTC
CTTGACACAGTCGGTTTGGTCACTGTGTCTACCGCCGGATTTGTTACGGGCGGTATGTTTTGAGTAGCATTACGCGGTCTGTGCC
CTGGCTGCGTTGATTTGCTTCGTCATTAGGCTTGCGAAGAATTGCATGTCCTGGCGCTACTCATGTACCAGATATACCAACTTTCTT
CTAGATACCAAGGGCAGACTCTACCGTTGGCGGTGCCTGTCAATTATAGAGAAAAGGGGCAAAGTTGAGGTCGAGGGTAAAAAATC
GACCTCAAAGAGTTGTGCTTGATGGTCCGCGGCAACCCCTGTAACCAGAGTTTCGGCGGAGCAATGGGGTCATCCTTAG

>CPD modified LMY ORF5, -0.2834544632947958

ATGTTG GGGAGA TGCTTG ACCGCG GGCTGT TGCTCG CAATTG CTTTTT TTGTGG TGTATC GTGCCG TCTTGT
TTTTGT GCGATC GTCAGC GCCAAC AACAGC AGCAGC TCAAAT TTACAG CTGATT TACAAC TTGACG CTATGT
GAGCTT AACGGT ACCGAT TGGTTA GCTAAT AGGTTG GATTGG GCTGTC GAATGC TTCGTA ATTTTT CCTGTA
TTGACT CACATT GTCTCA TACGGA GCGTTA ACCACG AGCCAT TTCCTT GATACG GTCGGA CTGGTT ACGGTG
TCTACC GCCGGG TTCGTA CACGGT AGGTAC GTTTTG TCTAGC ATTTAC GCCGTA TGCACA CTCGCA GCGTTG
ATTTGT TTCGTA ATCAGG CTTGCG AAAAC TGTATG AGCTGG CCGTAT TCATGT ACCAGA TATACG AACTTT
CTGTTA GATACT AAGGGA AACTA TACCGT TGGCGG TCGCCC GTAATC ATCGAA AAACGG GGCAAG GTAGAG
GTCGAG GGTAAG AAAATC GACCTC AAAAGA GTTGTG CTTGAT GGTTCG GCGGCA ACCCCT GTAACC AGAGTT
TCCGCT GAGCAA TGGGGT CATCCT TAG

LMY 균주 ORF5 부위의 SAVE의 적용 서열. original 서열에서 SAVE를 적용한 부위는 파란색으로 표시하였다.

>LMY ORF7 Original sequence, -0.014374203925576312

ATGCCAAATAACAACGGCAAGCAGCAGAAGAGAAAGAAGGGGGATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGTGCCAAATGCTGGGCAAAATT
ATCGCCCAGCAAAACAGTCCAGAGGCAAGGGACCGGAAAGAAAATAAGAAGAAAAACCCGGAGAAGCCCATTTCCCTCTTGCG
GCTGAAGATGATGTCAGACATCACTTTACCCCTAGTGAGCGGCAATTGTGTCTGTGTCGAATCCAGACCGCCTTTAATCAAGGGCGT
GGGACCTGCACCCTATCAGATTCAGGGAGGATAAGTTATACTGTGGAGTTTAGTTTGCTACGCATCATACTGTGCGCCTGATCCGT
GTCACAGCATCACCTTCAGCATGA

>CPD modified LMY ORF7, -0.38688579649394583

ATGCCA AATAAT AACGGT AAGCAA CAGAAG AGAAAA AAGGGG GACGGA CAACCG GTTAAC CAATTG TGCCAA
ATGCTC GGAAAA ATTATC GCGCAA CAAAAC CAGTCG AGAGGC AAGGGA CCGGGT AAGAAA AATAAG AAAAAG

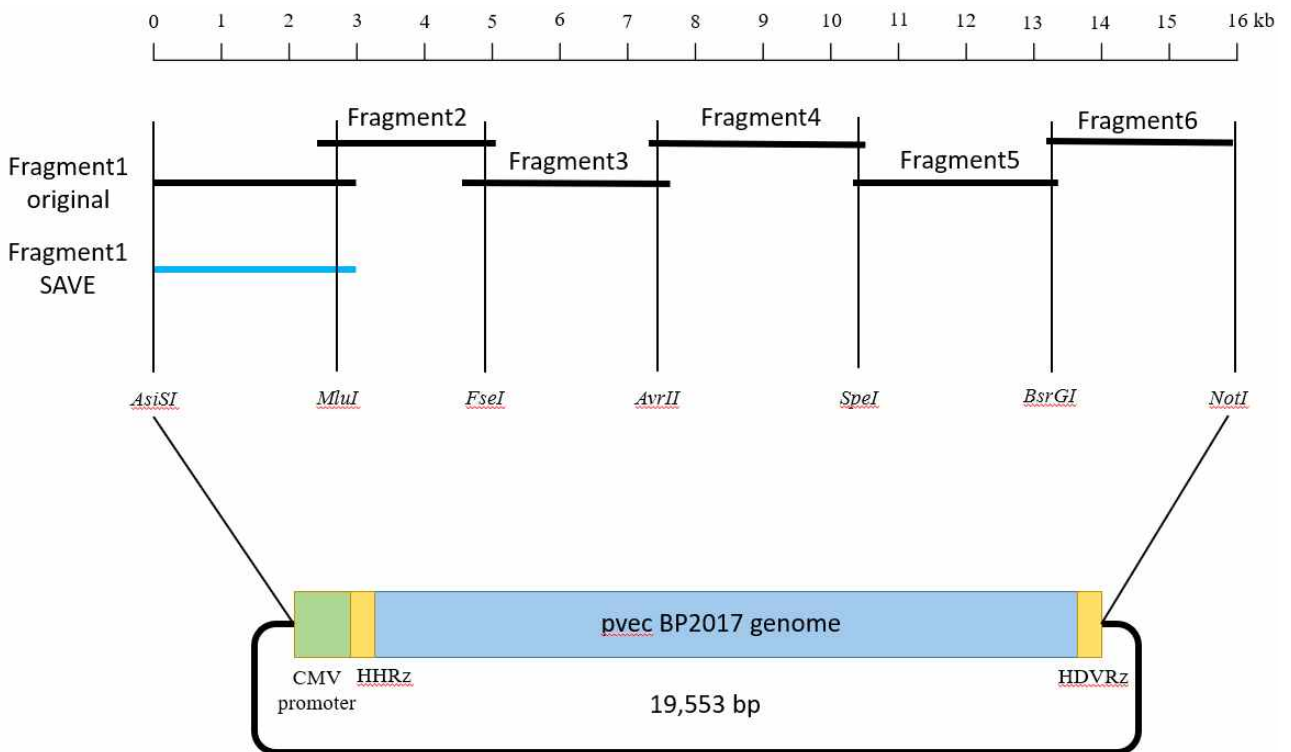
AATCCG GAAAG CCGCAT TTCCCG TTAGCG GCCGAA GACGAT GTCGGG CATCAC TTTACC CCTAGC GAACGC
 CAATTG TGTCTG TCGTCA ATACAG ACCGCC TTTAAT CAGGGC GCCGGT ACGTGC ACCCTA TCCGAT TCCGGT
 AGGATT AGCTAT ACGGTC GAATTT AGCTTG CCTACG CATCAT ACGGTG CGGTTA ATCCGC GTAACC GCTTCA
 CCTTCC GCTTGA

LMY 균주 ORF7 부위의 SAVE의 적용 서열. original 서열에서 SAVE를 적용한 부위는 파란색으로 표시하였다.

NSP1 부위의 SAVE 적용은 Infectious clone 상의 Fragment1 부위를 치환하여 제작하였고 ORF5, ORF7은 Fragment 7을 치환하여 제작하였다.

b) BP2017 SAVE infectious clone의 제작

LMY 균주의 SAVE 적용 경험을 바탕으로 BP2017-2 균주의 SAVE 적용은 NSP1 부위에만 이루어졌으며 바이러스의 작출도 LMY에서와 유사한 수준의 SAVE를 적용한 것에서 성공하였다.



*그림. BP2017 균주의 SAVE 적용

앞선 진행한 LMY-SAVE 균주의 infectious clone 제작 및 작출 결과를 바탕으로 BP2017-2의 균주의 제작은 최대한 유사한 방식으로 진행하였다. ORF5 또는 ORF7을 SAVE 적용한 LMY-SAVE 균주가 작출되지 않았으므로 BP2017-2의 제작에는 NSP1 부위만을 선택하였다. 또 SAVE 수준을 가급적 유사한 수준으로 조절하여 성공적으로 약독화 된 균주를 작출하고자 하였다.

	original	SAVE
CPD	0.013621128597937435	-0.22389044431114663
RNA	-183.6 kcal/mol	-183.9 kcal/mol
CpG	0.6305	1.1565
UpA	0.5947	1.1823
Nt	ID	86

*표 SAVE 적용 전후의 codon pair bias의 차이와 CpG,UpA 차이

>BP2017 NSP1 Original sequence, 0.013621128597937435

ATGTCTGGGATACTTGATCGGTGCACGTGTACCCCAATGCCAGGGTGTATTATGGCGGAGGGCCAAGTCTACTGCACACGATGCCTC
AGTGCACGGTCTCTCCTTCCCCTGAACCTCCAAGTTTCTGAGCTCGGGGTGCTAGGCCTATTCTACAGGCCCGAAGAGCCACTCCGG
TGGACGTTGCCACGTGCATTCCCCTGTTGAGTGCTCCCCGCCGGGGCCTGCTGGCTTTCTGCAATCTTCCAATCGCACGAATG
ACCAGTGAAACCTGAACTTCCAACAAAGAATGGTACGGGTCGCAGCTGAGCTTTACAGAGCCGGCCAGCTCACCCCTGCAGTCTTG
AAGGCTCTACAAGTTTATGAACGGGGTGGCGCTGGTACCCATTGTTGGACCTGTCCCTGGAGTGGCCGTTTTTCGCCAATCCCTA
CATGTGAGTGATAAACCTTTCCCGGGAGCAACTCACGTGTTGACCAACCTGCCGCTCCCGCAGAGACCCAAGCTGAAGACTTTTGC
CCCTTTGAGTGTGCTATG

GCTACTGTCTATGACATTGGTCATGACCGGTCATGTATGTGGCCGAAAGGAAAATCTCCTGGGCCCTCGTGGCGGGGATGAAGTG
AAATTTGAAGCTGTCCCGGGGAGTTGAAGTTGATTGCGAACCGGCTCCGCACCTCCTTCCCGCCCCACCACACAGTGGACATGTCT
AAGTTCGCCTTACAGCCCCTGGGTGTGGTGTTTCTATGCGGGTGAACGCCAACACGGCTGCCTTCCCGCTGACACTGTCCCTGAA
GGCAACTGCTGGTGGAGCTTGTTTGACTTGCTTCCACTGGAAGTTCAGAACAAAGAAATTCGCCATGCTAACCAATTTGGCTACCAG
ACCAAGCATGGTGTCTCTGGCAAGTACCTACAGCGGAGGCTGCAAGTTAATGGTCTCCGAGCAGTAAGTACCTAAACGGACCTATC
GTCGTACAGTACTTCTTCGTTAAGGAGAGTTGGATCCGCCATTTGAAACTGGCGGGAGAACCAGCTACTCTGGGTTTGGAGACCTC
CTCAGAATAAGGGTTGAGCCTAACACGTCCGCATTGGCTGACAAGGAAGAAAAATTTTCCGGTTTGGCAGTCACAAGTGGTACGGC

>ver2 Ingelvac NSP1 beta, -0.22389044431114663

ATGTCT GGGATA CTTGAT CGGTGC ACGTGT ACCCCC AATGCC AGGGTG TTTATG GCGGAG GGCCAA GTCTAC
TGCACA CGATGC CTCAGT GCACGG TCTCTC CTTCCC CTGAAC CTCAA GTATCC GAGCTC GGGGTG CTAGGC
CTATTC TACAGG CCCGAA GAGCCA CTCCGG TGGACG TTGCCA CGTGCA TTCCCC ACTGTT GAGTGC TCCCC
GCCGGG GCCTGC TGGCTT TCCGCT ATCTTT CCAATC GCACGA ATGACT AGCGGT AACCTG AACTTC CAACAA
AGAATG GTACGG GTCGCA GCTGAG CTTTAC AGAGCC GGCCAG CTTACG CCGGCC GTATTG AAGGCG CTACAA
GTATAC GAACGC GGTTCG CGCTGG TACCCC ATCGTA GGACCC GTCCCT GGCGTG GCCGTT TTCGCC AATTCC
CTACAT GTTAGC GATAAA CCGTTC CCGGGC GCTACG CACGTG TTGACG AACCTG CCGCTC CCGCAG AGACCT
AAGCCT GAAGAC TTTTGC CCCTTC GAGTGC GCTATG

GCTACC GTCTAC GATATC GGTACG GACGCC GTTATG TACGTG GCCGAA AGGAAA ATCTCC TGGGCC CCTCGC
GGCGGG GACGAA GTGAAA TTCGAA GCGGTA CCGGGC GAATTG AAGTTG ATTGCG AACCGG CTCCGT ACGTCG
TTCCCG CCGCAT CACACA GTCGAT ATGTCT AAGTTC GCCTTC ACAGCC CCTGGG TGCGGC GTATCT ATGCGG
GTCGAA CGCCAA CACGGC TGCCTT CCCGCC GATACC GTACCG GAAGGT AACTGC TGGTGG AGCTTG TTCGAC
TTGCTT CCGCTG GAAGTA CAGAAC AAAGAA ATACGC CACGCT AACCAA TTCGGC TACCAG ACTAAG CACGGC

GTATCT GGCAAG TACCTA CAGCGG AGGCTG CAAGTA AACGGT CTCCGC GCGGTA ACCGAC CTAAAC GGACCT
 ATCGTC GTACAG TACTTC TTCGTT AAGGAG AGTTGG ATACGC CATTG AACTC GCGGGC GAACCT AGCTAC
 TCTGGG TTTGAG GACCTC CTCAGA ATAAGG GTTGAG CCTAAT ACGTCG CCATTG GCGGAT AAGGAA GAAAAA
 ATTTTC CGGTTT GGTAGC CACAAG TGGTAC GGC

BP2017-2 균주 NSP1 부위의 SAVE의 적용 서열. original 서열에서 SAVE를 적용한 부위는 붉
 색으로 표시하였다.

NSP1 부위의 SAVE 적용은 Infectious clone 상의 Fragment1 부위를 치환하여 제작하였다.

4) Infectious clone 의 transfection과 재조합 바이러스의 작출

Original sequence를 가진 LMY, BP2017-2 infectious clone (LMY-original, BP2017-original)과
 SAVE를 적용한 LMY, BP2017-2 infectious clone (LMY ver1, LMY ver2, LMY ver3, LMY
 ORF57 SAVE, BP2017-SAVE) 을 적절한 시약을 이용하여 transfection 하였다.

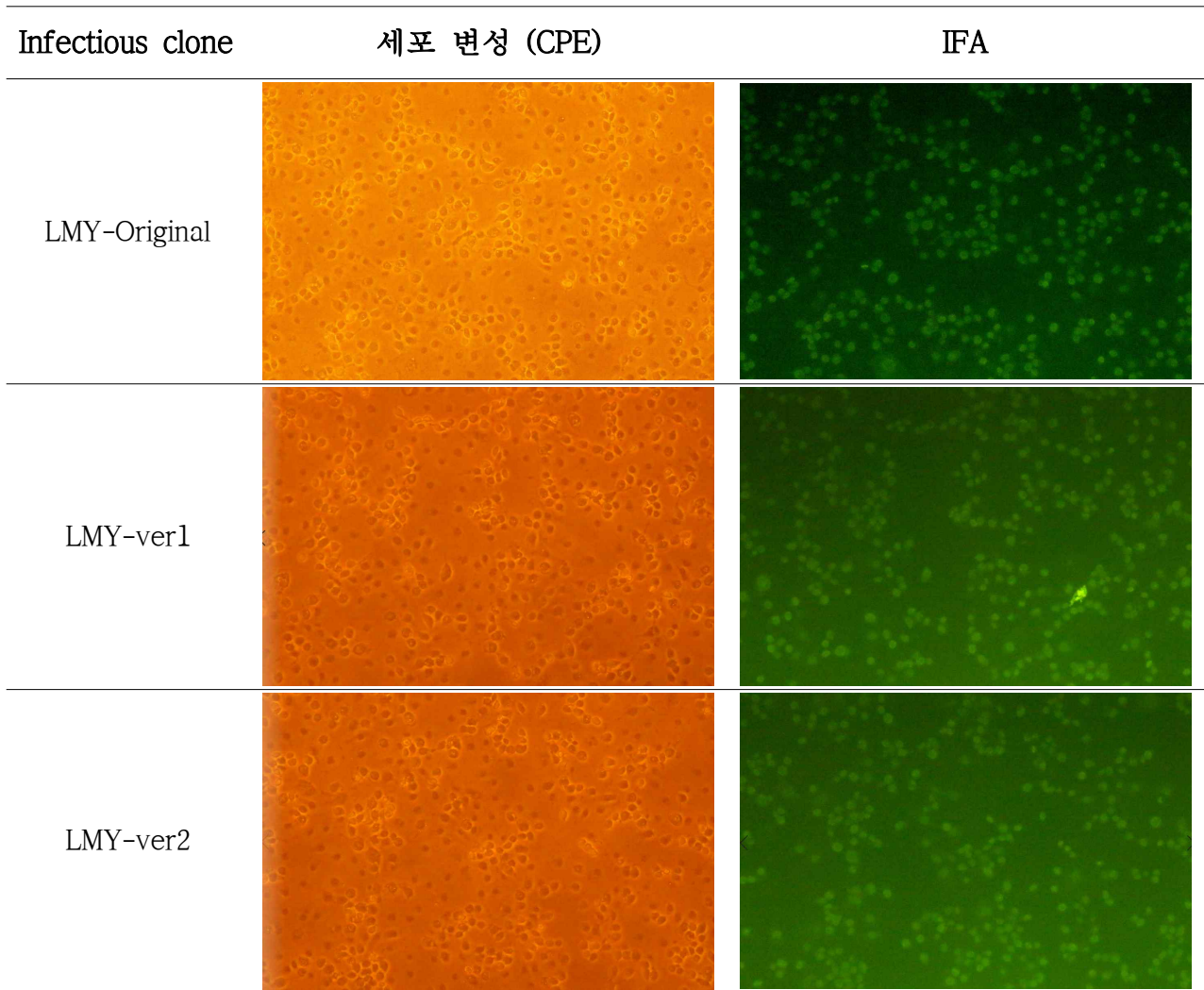
transfection은 6well plate에 전날 미리 분주해놓은 BHK cell과 MARC 145 cell이 80%의
 confluency에 도달했을 때, 수행하였다. 시약과 plasmid의 비율은 반복수행을 통해 최적화 시켰
 으며 6시간의 배양 후 시약을 배양액에서 제거하였다. 세포변성효과(CPE)는 transfection 약 3
 일 후부터 관찰이 가능하였으며 virus의 작출 여부는 1세대 이후의 MARC 145 cell에서의 CPE
 와 PRRS N protein에 특이적인 항체 (SR-30)을 이용한 IFA 기법으로 확인된 항원의 존재를 통
 해 증명하였다. 결과는 다음과 같았다.

Infectious clone	CPB	CpG	UpA	작출여부
LMY-Original	0.0139	0.6394	0.7066	O
LMY-ver1	-0.2534	1.1753	1.0300	O
LMY-ver2	-0.3377	1.3340	1.1544	O
LMY-ver3	-0.3998	1.5067	1.1972	X

*NSP1 beta 부위에 SAVE를 적용한 LMY 균주 작출 여부

Infectious clone	CPB	CpG	UpA	작출여부
LMY-Original	-0.0457	0.8459	0.7121	O
	-0.0143	0.5175	0.5949	
LMY ORF57 SAVE	-0.2834	1.3062	0.9343	X
	-0.3868	1.4555	1.0340	

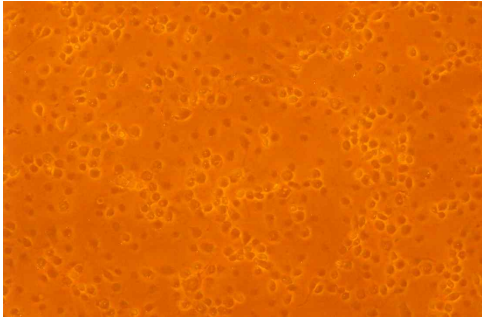
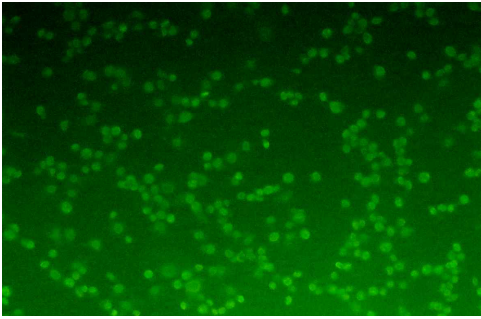
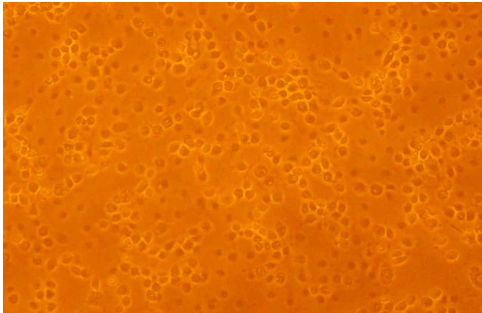
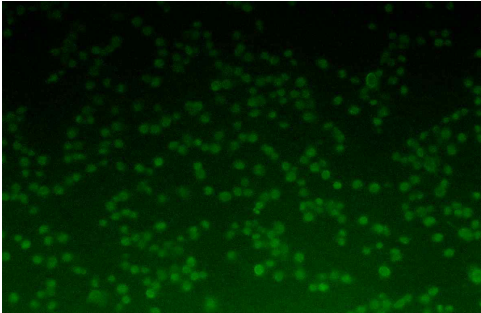
*ORF5와 ORF7에 SAVE를 적용한 LMY 균주 작출 여부 (위; ORF5, 아래; ORF7)



*그림. infectious clone 과 추출된 바이러스의 CPE, IFA

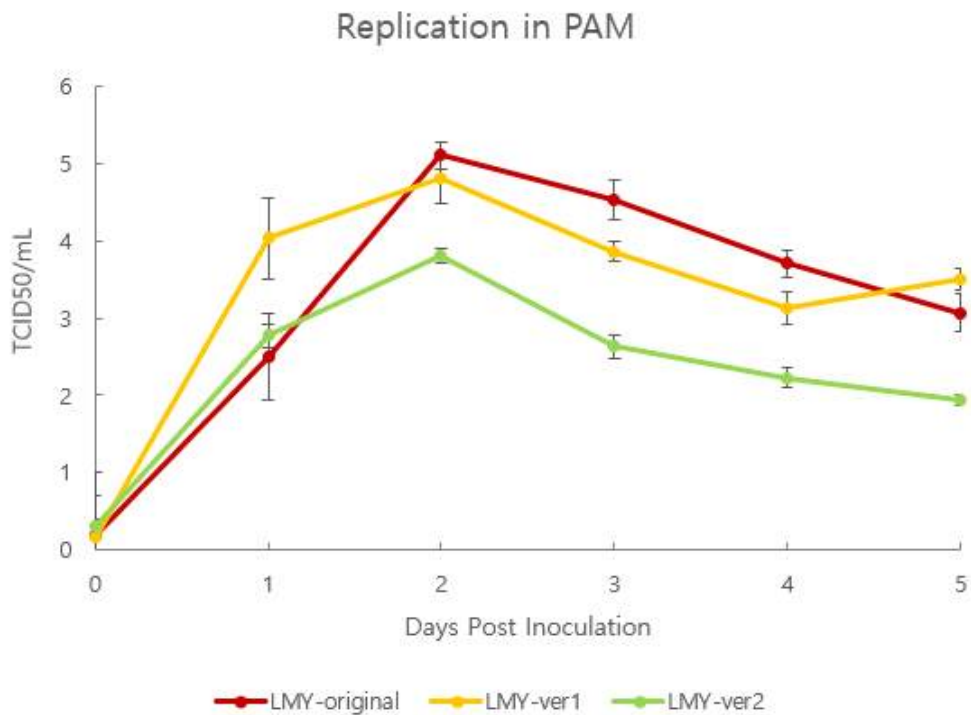
Infectious clone	CPB	CpG	UpA	작출여부
BP2017-Original	0.0136	0.6305	0.5947	○
BP2017-SAVE	-0.2238	1.1565	1.1823	○

*NSP1 부위에 SAVE를 적용한 BP2017 균주 추출 여부

Infectious clone	세포 변성 (CPE)	IFA
BP2017-Original		
BP2017-SAVE		

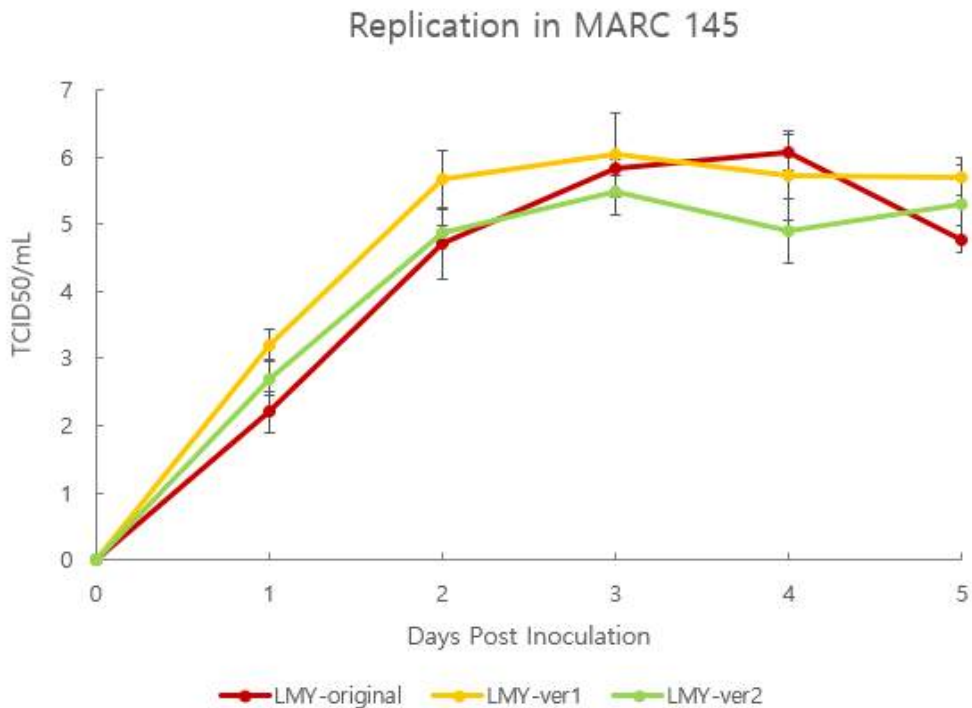
*그림. infectious clone 과 작출된 바이러스의 CPE, IFA

바이러스의 작출이 확인된 균주는 MARC 145에서 8계대까지 안정화시킨 뒤 원래의 모균주와 *in-vitro* 상에서 증식성을 비교하였다. PAM(Porcine Aleolar Macrophage)와 MARC145 세포에 작출된 균주와 모균주를 동일한 MOI로 접종한 뒤 시간에 따른 증식한 바이러스의 역가를 TCID로 분석하였다. SAVE 에 의한 바이러스 증식성 감소는 다음과 같았다.



*그림. SAVE 단계에 따른 LMY 유래 균주의 PAM에서의 증식성 비교

PRRSV의 주요 감염세포인 PAM에서의 증식성을 비교한 결과 SAVE를 강화시킨 LMY ver2의 경우 모균주인 LMY에 비해 2~5일 까지 유의적으로 증식성이 감소하였음을 확인하였다. 최대 100배 증식성이 감소하였다. 반면 LMY ver1은 모균주인 LMY보다 일부 감소한 구간이 있으나 전반적인 통계적인 분석에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 모균주와 SAVE 균주와의 통계학적인 비교는 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

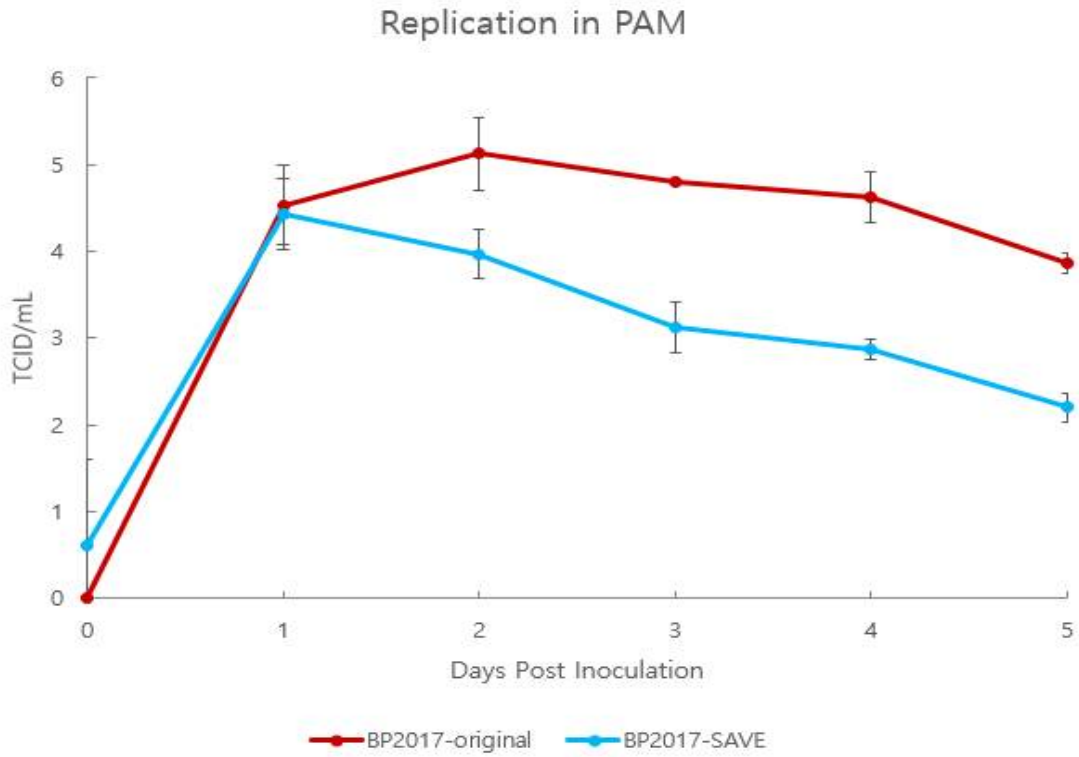


*그림. SAVE 단계에 따른 LMY 유래 균주의 MARC에서의 증식성 비교

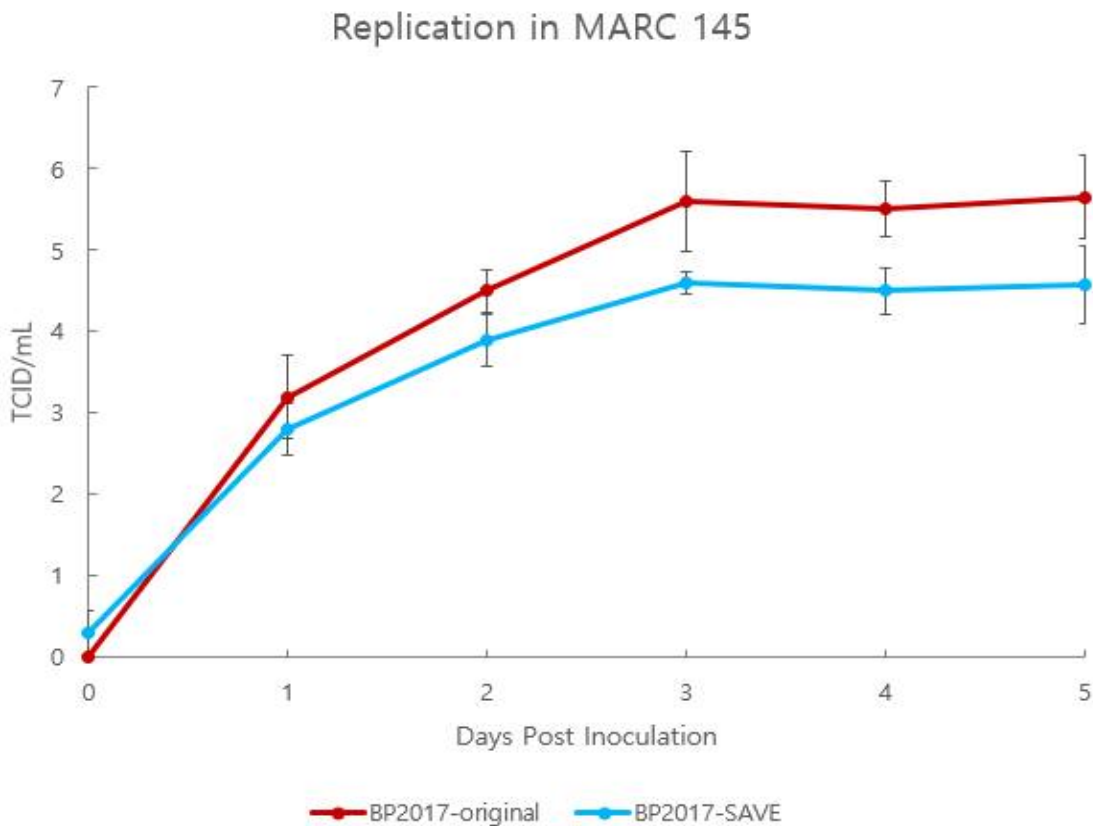
PRRSV의 생산용 세포인 MARC 145 cell에서의 증식성을 비교한 결과 SAVE를 적용시킨 LMY ver1, ver2의 생산 역가가 모균주인 LMY와 차이가 없음을 확인하였다. 모균주와 SAVE 균주와의 통계학적인 비교는 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

SAVE를 적용한 바이러스는 돼지에서의 감염세포인 PAM에서 바이러스의 증식성은 감소하였으나 생산용 세포인 MARC cell에서는 감소하지 않았다. 세포마다 존재하는 Translation 효율의 차이가 존재할 수도 있지만 적용한 SAVE의 수준에 의해서도 영향을 받았을 가능성이 있다. LMY ver1의 경우 모균주와 codon pair bias가 약 0.2673 차이가 나는 반면, LMY ver2의 경우 모균주와 codon pair bias가 약 0.3516 차이가 보였다. 이러한 차이가 정확히 세포에서 어떤 의미를 지니는 지에 대해 알 수는 없다. 그러나 LMY ver2의 경우 PAM에서 증식성이 분명히 감소한 반면, LMY ver1의 경우 모균주와 차이를 보이지 않았다.

BP2017-2의 경우, SAVE를 적용한 균주는 PAM과 MARC 모두에서 증식성이 감소하였다.



*그림. SAVE 적용에 따른 BP2017-2 유래 균주의 PAM에서의 증식성 비교



*그림. SAVE 적용에 따른 BP2017-2 유래 균주의 MARC 145에서의 증식성 비교

BP2017-2 유래 SAVE 적용 균주는 모균주인 BP2017-2에 비해 유의적으로 돼지에서 주요 PRRSV의 감염 세포인 PAM에서 증식성이 2~5일 까지 감소하였다. 생산용 세포인 MARC145에서 SAVE 적용 균주는 모균주에 비해 3~5일 까지 유의적으로 증식이 감소하였다. 모균주와 SAVE 균주와의 통계학적인 비교는 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정 (Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

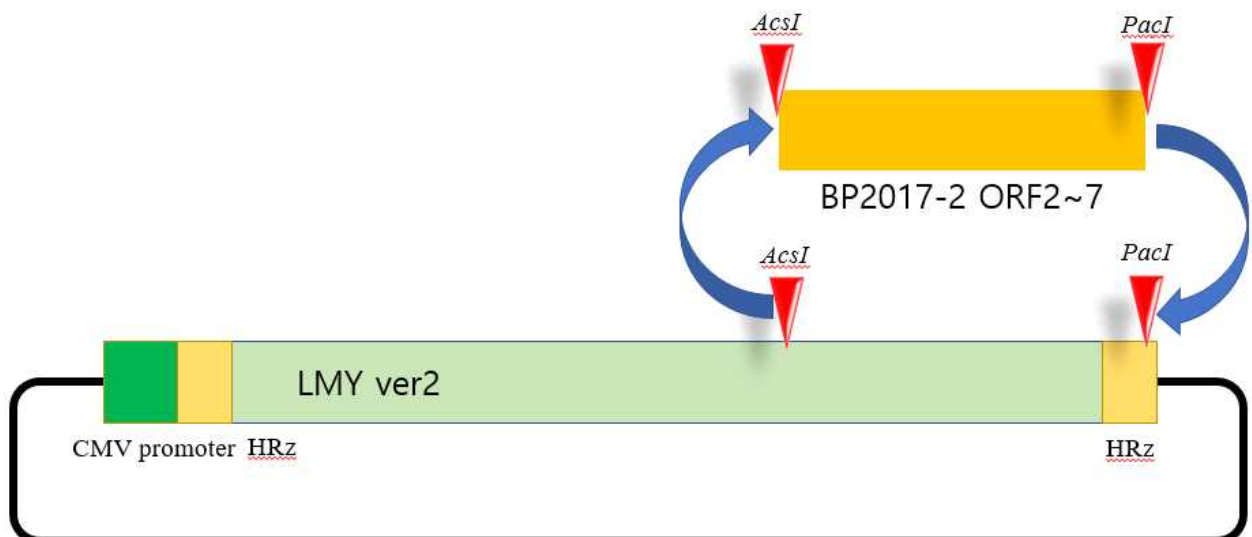
두 종의 국내 분리 PRRSV에 SAVE를 적용한 결과 각각의 바이러스는 유의적으로 in-vitro 상에서 증식이 감소한 것을 확인하였다. 분석한 결과 SAVE의 수준에 따라 감소정도에 차이가 있으며 LMY의 경우 ver2에서 유의적인 감소효과를 확인할 수 있었다. 돼지의 면역세포의 일종인 PAM에서의 증식성은 감소하는데 비해, 영장류에서 유래한 MARC 145 세포에서는 바이러스의 증식성이 감소하지 않았다. SAVE에 대한 민감도가 in vitro 상에서 세포마다 차이가 존재할 수 있는 것으로 보인다.

BP2017의 경우 한 종의 SAVE 균주를 제작하였지만 해당 수준의 SAVE가 유의적으로 PAM과 MARC에서 바이러스의 증식을 감소시킨 것을 확인하였다.

해당 작출 균주 LMY-SAVE, BP2017-SAVE 균주는 KCTC 생물자원센터에 기탁하였다. (기탁번호 : KCTC 13393BP, KCTC 13394BP) 또한 약독화 원리의 적용과 백신으로서의 면역 효과 자료를 바탕으로 특허 출원하였으며 (출원번호 : 10-2017-0181550호, 10-2017-0181551호) 2018년 해당 출원 특허 2종 모두 등록되었다 (등록 번호 :제 10-1933931호 제 10-1933932호).

5) LMY-BP2017 chimera virus의 제작 및 바이러스 작출

상기 제작한 LMY 유래 균주와 BP2017-2 균주의 유전자를 일부씩 포함하는 chimera 균주를 제작하였다. SAVE를 적용하여 안전하면서 chimera를 통하여 보다 높은 교차면역능력을 지니는 것을 목표로 하였다.



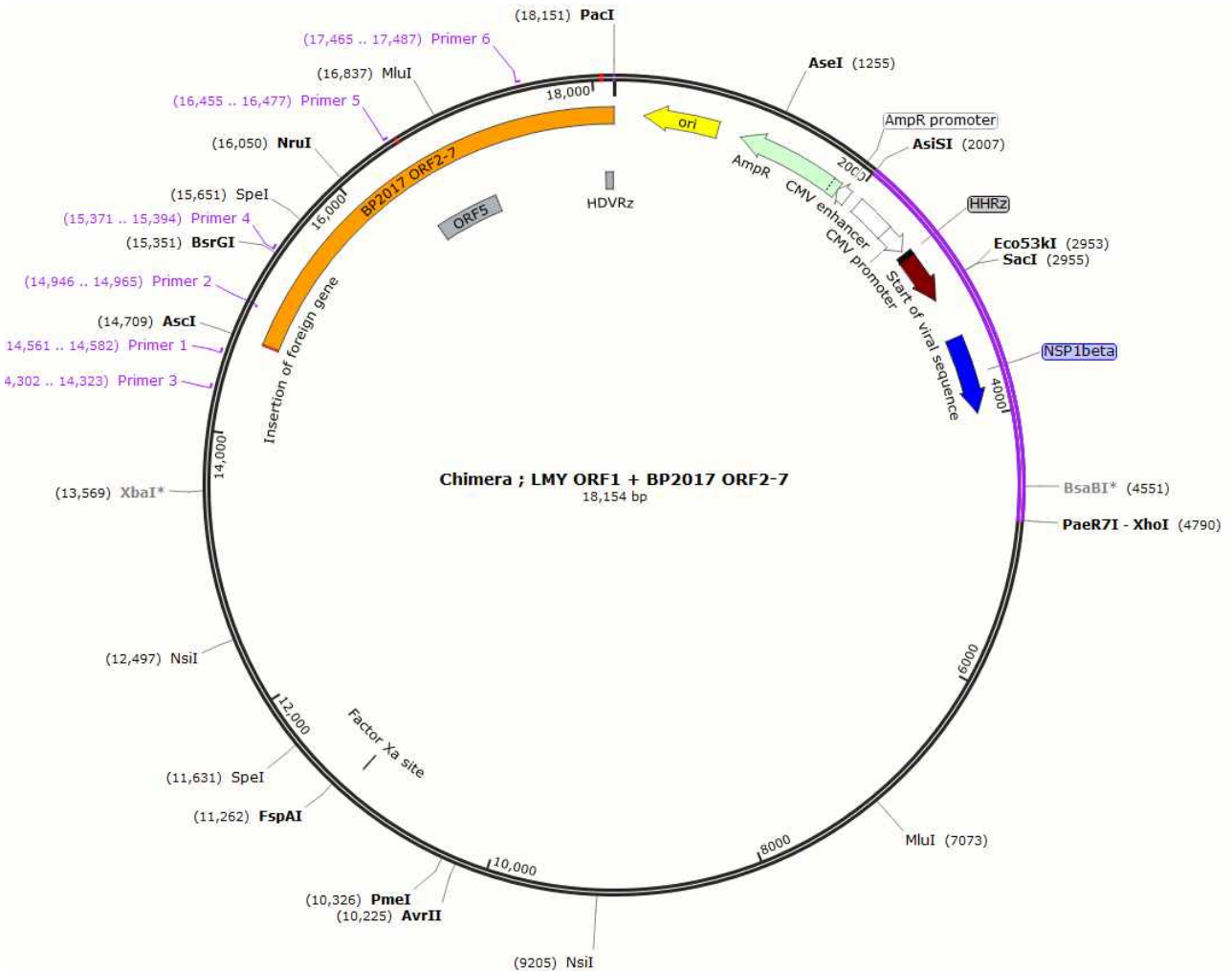
*그림 LMY ver2 infectiuous clone에 ORF2~7 부위를 치환한 chimera 제작 모식도

LMY infectious clone 제작 단계에서 ORF1과 ORF2 사이에 AcsI (GGCGCGCC) 를 삽입시켜

합성하였다. BP2017-2 infectious clone의 ORF2~7에서 3'UTR까지 포함한 부분은 다음의 primer를 이용하여 pfu polymerase를 이용해 PCR로 증폭한 뒤, 증폭된 산물을 TOPcloner™ Blunt Kit (Enzymomics)를 이용하여 cloning 하였다. 대장균과 함께 배양된 후 6~7ug의 plasmid를 LMY ver2 infectious clone과 동일하게 AclI과 PacI으로 절단하였다.

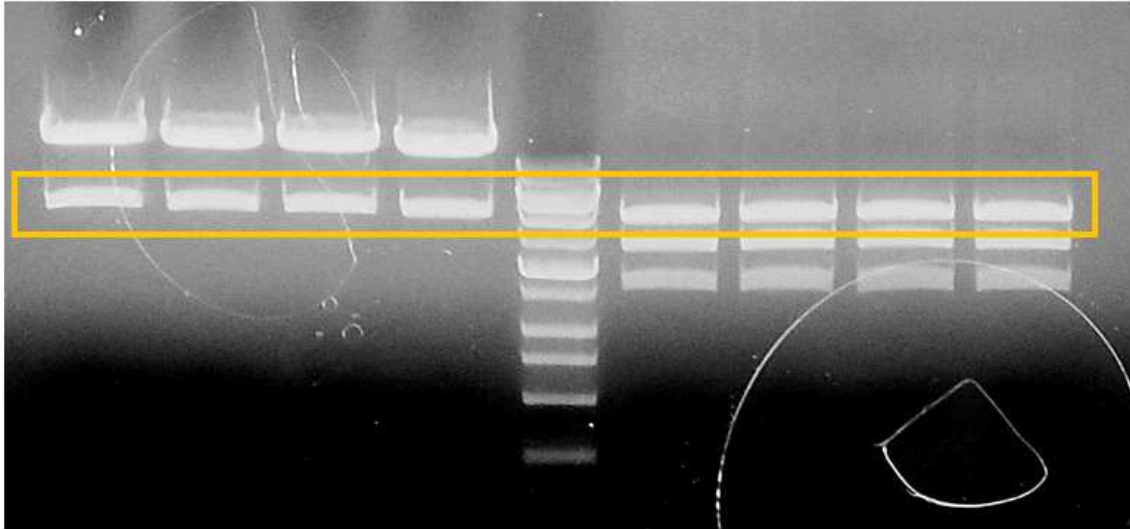
F : GGCGCGCC(AclI) ATGAAATGGGGTCCATGCAAAG

R : TTAATTAA(PacI) GTCCATTCGCCATGCCGAAG



* LMY ver2 ORF1과 BP2017 ORF2~7을 포함한 chmera infectious clone 설계도

LMY ver2 는 앞선 실험에서 제작한 SAVE를 NSP1 beta 부위에 적용시킨 infectious clone로서 작출된 바이러스는 PAM에서 증식이 감소한 것이 확인된 균주이다. 이미 제작된 LMY ver2 infectious clone을 동일한 제한효소로 자른 뒤, 동일한 말단을 가진 BP2017의 ORF2~7 부위를 삽입하여 치환하였다.



LMY ver2 Infectious clone

BP2017 ORF2~7 plasmid

*그림 AcsI과 PacI으로 잘려진 LMY ver2 infectious clone과 BP2017 ORF2~7 clone

T4 ligase로 두 plasmid를 연결한 뒤, 다음의 PCR primer를 이용하여 DH5a C cell에 Transformation 하였으며 다음의 PCR primer를 이용하여 colony PCR을 통해 온전히 연결된 chimera infectious clone을 보유한 C cell을 선발하였다.

F: TCACTGGAAATGGTGAGGATTG (57)

R: CTTGGCACTGGGAAAGAAAG (59)

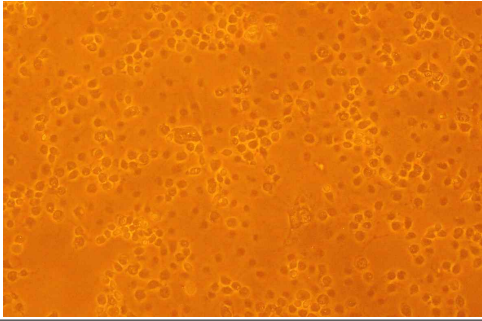
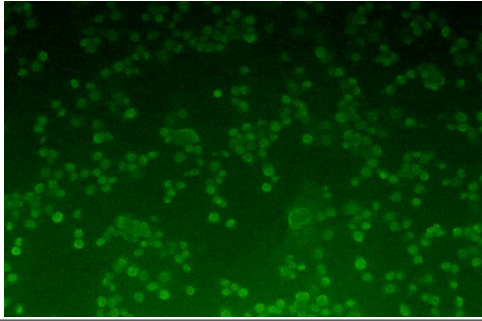
size : 390bp

C cell에서 배양 후 midi prep 후 수확한 clone의 양(100ul)은 3416ng/ul 로 Spectrophotometer 기기를 이용하여 농도를 측정하였다. 앞서 정립된 tranfection 시약을 이용하여 MARC 145 cell 에 transfectoin 후 PRRS의 CPE 병변의 발생을 관찰하였으며, 1계대 이후의 MARC 145 cell에 서의 CPE와 PRRS N protein에 특이적인 항체 (SR-30)을 이용한 IFA 기법으로 확인된 항원의 존재를 통해 증명하였다. 결과는 다음과 같았다.

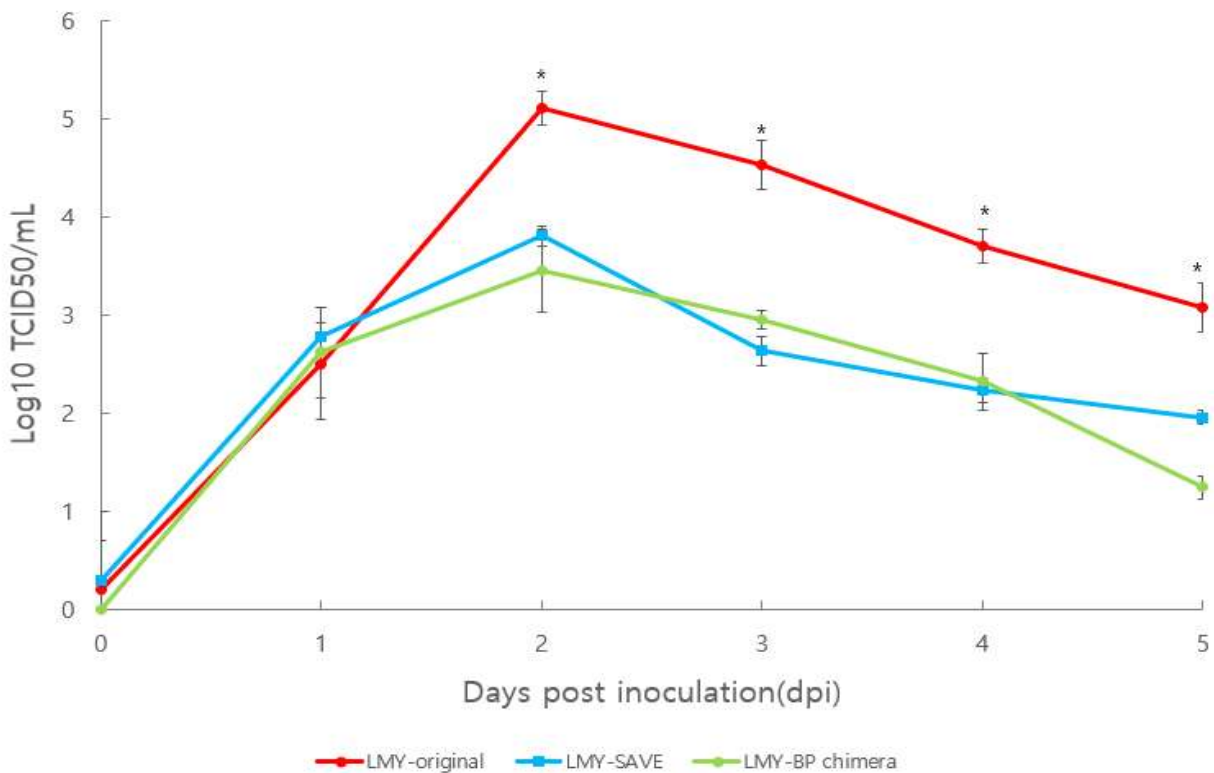
Infectious clone	CPB	CpG	UpA	작출여부
LMY-Original	0.0139	0.6394	0.7066	O
LMY-BP chimera	-0.3377	1.3340	1.1544	O

*LMY-original과 LMY-BP chimera의 NSP1 beta 부위의 SAVE 적용 수준 비교

*LMY-BP chimera은 LMY ver2과 동일한 ORF1 서열을 보유함

Infectious clone	세포 변성 (CPE)	IFA
LMY-BP chimera		

연속적으로 MARC cell에서 8계대 진행한 후 균주의 증식성을 PAM에서 분석하였다.



*그림 PAM에서의 LMY-original과 LMY ver2(LMY-SAVE), 그리고 LMY-BP chimera의 증식수준 비교

앞선 실험 결과와 비교해서 LMY original에 비해 NSP1 beta에 SAVE가 적용된 LMY ver2(LMY-SAVE)와 LMY-BP chimera 유사하게 증식성이 감소하였다. LMY-original에 비해 유의적으로 2-5일 동안 더 낮은 TCID 수치를 보였다.

유의성은 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

결론적으로 개발된 SAVE program을 이용하여 바이러스의 유전자를 재조합하는 경우 유의적으로 in-vitro 상에서 PAM에서 바이러스의 증식이 감소된 것을 확인하였다. 동일한 SAVE 적용

부위를 보유한 Chimera 균주 또한 증식이 감소한 것을 확인하였으며, SAVE가 적용된 PRRSV가 돼지에서 증식성이 감소하여 약독화 될 수 있는 가능성이 있음을 결론 내렸다.

또한 일부 균주의 경우 생산용 세포에서는 SAVE의 적용으로 인한 생산 역가의 감소를 피할 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.

해당 작출 균주 LMY-BP chimera 균주는 KCTC 생물자원센터에 기탁하였다. (기탁번호 : KCTC 13675BP) 약독화 원리의 적용과 백신으로서의 면역 효과 자료를 바탕으로 특허 출원하였으며 (출원번호 : 10-2018-0171306호) 현재 등록을 위한 심사 중이다.

6) IFN 분비 강화 NSP1 변이 주 제작

PRRSV의 면역억제 주요 기전은 감염된 세포에서 IFN 분비를 억제하여 초기 면역계가 바이러스의 항원을 인지하는 것을 방해하는 것으로 알려져 있다[4]. 이러한 PRRSV의 감염 초기 면역을 억제하는 기전을 무력화 시키면 보다 백신의 효능을 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다. 최근 주요 IFN antagonist 기능을 하는 것으로 알려진 PRRSV의 NSP1 부위를 mutation을 일으켜 IFN 분비를 강화시키는 방법이 제시되었다[6]. NSP1 beta 부위의 123~131번 아미노산 부위는 상당히 유전적으로 안정된 부위(conserved motif)로서 이 단백질의 type I IFN antagonist기능과 PRF transactivator(Programmed ribosomal frameshifting signal; NSP2 protein 중 NSP2TF, NSP2N이 frameshift에 의해 발현되는 기전)로서 작용하기 위해 필수적인 부위로 알려져 있다 [ref]. 128번 129번 아미노산인 “R(아르기닌, 128), R(아르기닌, 129)” 에서 “A(알라닌, 128), A(알라닌, 129)” 으로 치환하면 위의 IFN antagonist로서의 기능이 억제되고 감염된 세포에서 IFN alpha 와 IFN gamma의 분비가 증가하였다[6].

본 연구팀에서는 이러한 밝혀진 기전을 개발백신에 적용하여 생독 백신이 감염 초기, IFN의 분비를 증가시켜 보다 우수한 면역원성을 보유할 수 있게 개발하였다.

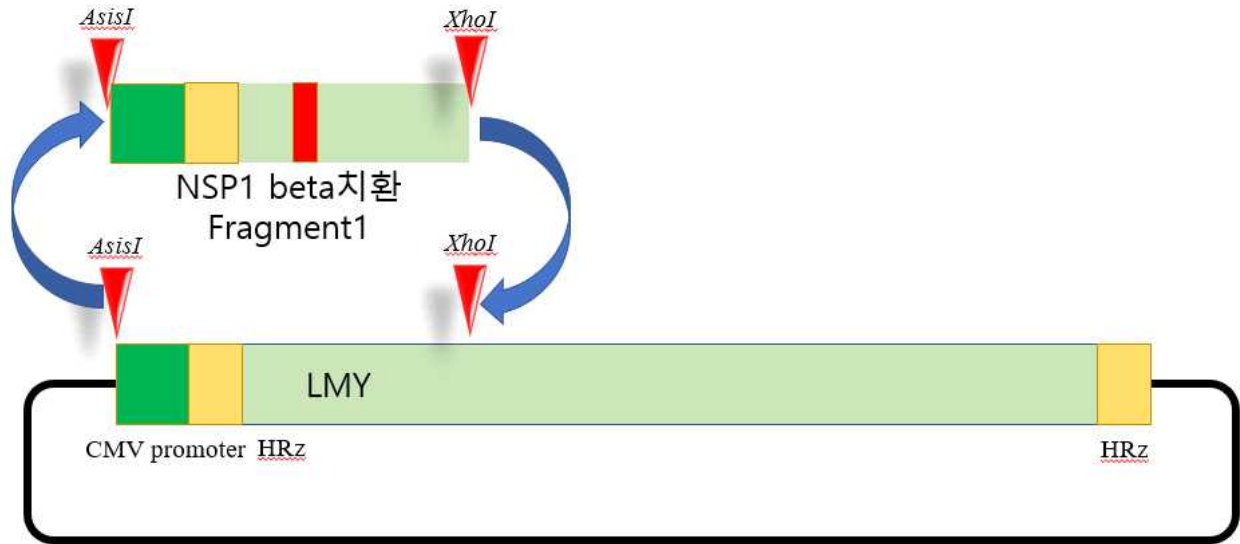
a) LMY 균주 기반의 NSP1 beta 의 치환 균주 제작

총 2종의 LMY 기반의 NSP1 beta의 128번 129번 아미노산을 치환한 infectious clone을 제작하였다.

*그림. LMY infectious clone의 NSP1 beta 부위 치환 모식도

LMY 기반의 이미 앞서 제작한 infectious clone의 Fragment 1부위에서 NSP1 beta 부위의 128번 129번 아미노산을 “RR->AA“로 치환한 서열과(1) “RR->GG“로 치환한 서열(2) 두 종류를 합성하였다.

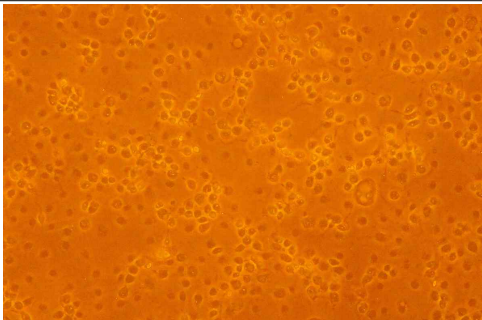
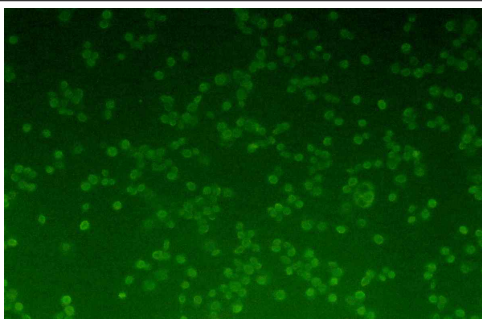
균주	LMY	LMY-Ala	LMY-Gly
128,129번 염기서열	CGGAGG	GCGGCA	GCCGGA
128,129번 아미노산서열	RR	AA	GG



*표. 원본 균주와 염기서열을 조작한 균주의 NSP1 beta 128,9번 아미노산 변화

각각의 NSP1 beta 128,129번 아미노산을 치환하기 위해 염기서열을 조작하여 합성된 Fragment와 이미 제작된 LMY-original infectious clone을 동일하게 AsisI, XhoI을 이용하여 동일한 말단을 가진 Fragment로 삽입하여 치환하였다. 앞서 제시한 infectious clone full sequencing용 primer를 이용하여 전체 유전자 염기서열을 분석하여 치환여부를 확인하였다.

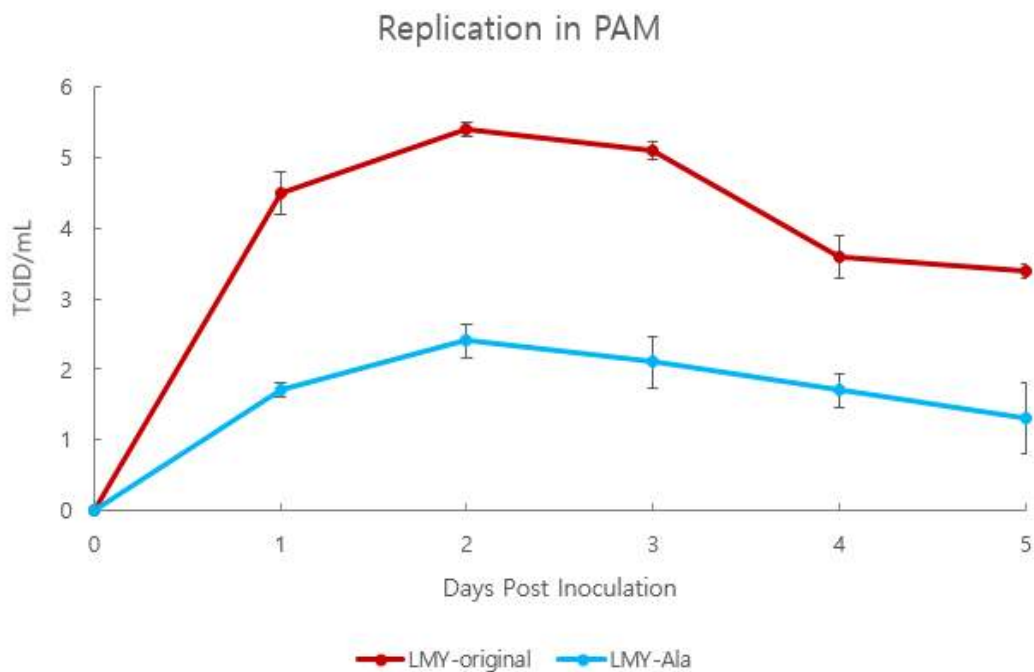
확인된 infectious clone은 각각 LMY-Ala (LMY 기반의 염기서열을 보유하고 있으나 NSP1 beta 128,9번 아미노산을 AA로 치환한 plasmid), LMY-Gly (LMY 기반의 염기서열을 보유하고 있으나 NSP1 beta 128,9번 아미노산을 GG로 치환한 plasmid)로 명명하였다. C cell에서 배양 후 midi prep 후 수확한 clone의 양(100ul)은 3254ng/ul (LMY-Ala), 3668ng/ul (LMY-Gly)로 Spectrophotometer 기기를 이용하여 농도를 측정하였다. 앞서 정립된 tranfection 시약을 이용하여 MARC 145 cell에 transfectoin 후 PRRS의 CPE 병변의 발생을 관찰하였으며, 1계대 이후의 MARC 145 cell에서의 CPE와 PRRS N protein에 특이적인 항체 (SR-30)을 이용한 IFA 기법으로 확인된 항원의 존재를 통해 증명하였다. 결과는 다음과 같았다.

Infectious clone	세포 변성 (CPE)	IFA
LMY-Ala		
LMY-Gly	작출 실패	작출 실패

*그림. LMY-Ala와 LMY-Gly의 작출 사진

실험 결과 LMY-Ala의 경우에만 작출이 성공하였음을 확인하였다. LMY-Gly의 경우 어떠한 세포 변성 효과나 PRRSV 특이적인 항원의 발현을 계대에 걸쳐 확인할 수 없었다.

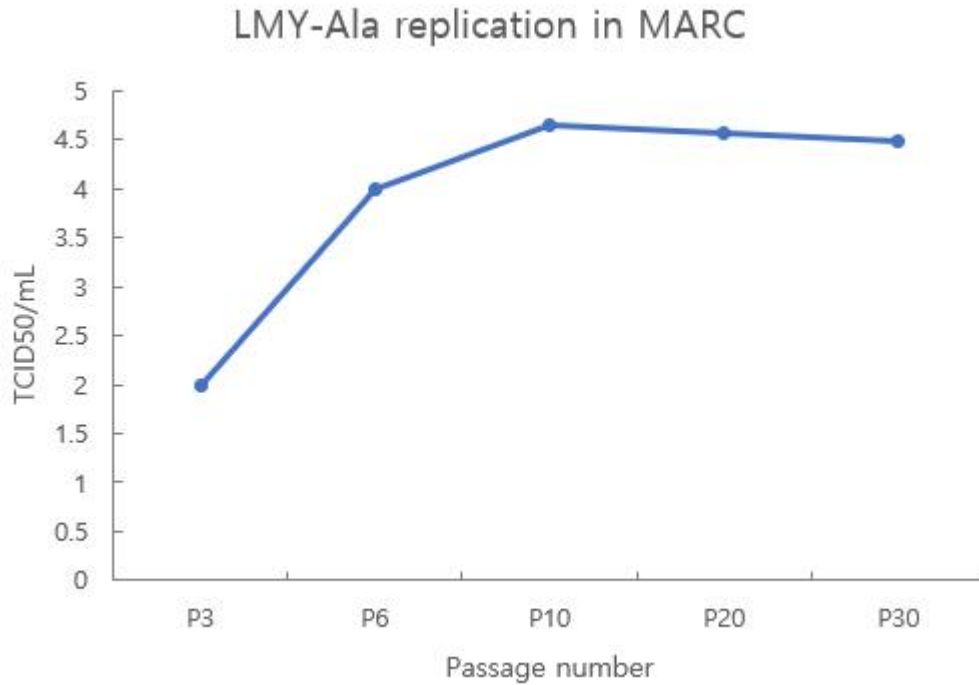
LMY-Ala의 경우 IFA를 통한 항원의 확인은 작출 계대(0계대, P0)에서부터 성공하였으나, 세포 변성 효과는 4계대 이상 계대를 거쳐 확인되었다. 바이러스의 역가와 증식성이 매우 떨어지는 것으로 추정하였는데 동일한 계대(P8)의 LMY와 LMY-Ala의 증식성을 다음과 같이 동일하게 0.01 MOI로 PAM에 접종한 결과 차이를 보였다.



*그림. LMY NAP1 beta 치환에 따른 증식성 감소

LMY-Ala의 경우 유의적으로 LMY-original에 비해 1~5일 까지 낮은 증식성을 보였다. 유의성은 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리하였다.

계대에 따른 치환부위의 변이여부를 확인하기 위해 30계대 MARC cell에서 계대를 진행하여 시퀀싱을 수행하였다. 확인 결과 30계대 에도 치환부위는 변이 없이 일정하게 유지되는 것을 확인하였다. 또한 30계대 동안 MARC cell에서 백신주로서의 역가를 확인하였다.

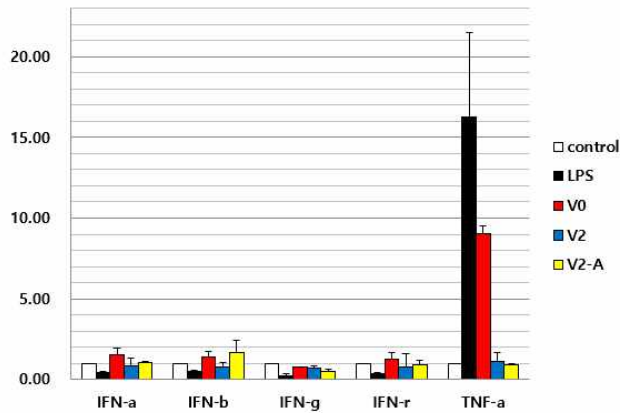


*그림. LMY-Ala의 MARC cell에서의 생산 역가

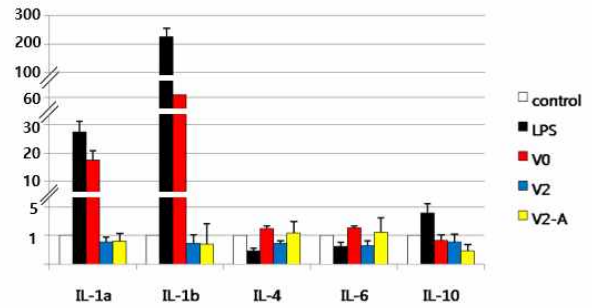
NSP1 beta의 아미노산 치환에 따른 Type I IFN 분비의 증가를 확인하기 위하여 in-vitro상에서 PAM에 감염시킨 후 12시간 후 cytokine 분비 양상을 측정하였다. cytokine 에 특이적인 primer 를 이용하여 탐지하였다.

Genes	Forward Primer (5'- 3')	Reverse Primer (5'- 3')
<u>β-Actin</u>	GCGGGACATCAAGGAGAAG	AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG
IFN-α	TTCATGCACCAGAGCCA	CCTGGACCACAGAAGGGA
IFN-β	AGTGCATCCTCCAAATCGCT	GCTCATGGAAAGAGCTGTGGT
TNF-α	TTATTCAGGAGGGCGAGGT	AGCAAAAGGAGGCACAGAGG
IL-1α	GTGCTCAAACGAAGACGAACC	CATATTGCCATGCTTTTCCCAGAA
IL-1β	AACGTGCAGTCTATGGAGT	GAACACCACTTCTCTCTTCA
IL-8	TAGGACCAGAGCCAGGAAGA	CAGGAAAAGTGCCAAGAAGG

*표. Porcine cytokine primer

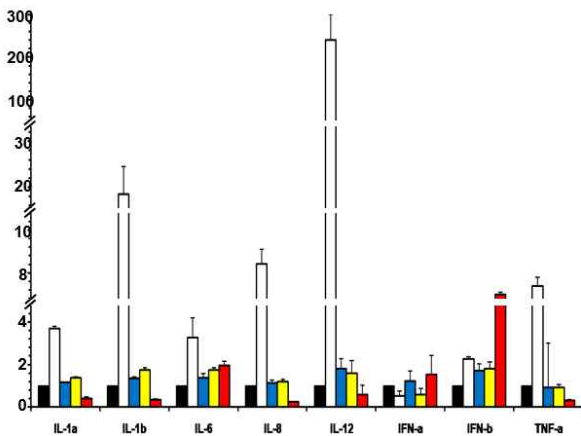


		control	LPS	V0	V2	V2-A
12 hpi	IFN-a	1.00	0.40	1.51	0.82	1.01
	IFN-b	1.00	0.49	1.38	0.80	1.68
	IFN-g	1.00	0.24	0.75	0.70	0.48
	IFN-r	1.00	0.34	1.26	0.80	0.89
	TNF-a	1.00	16.25	9.03	1.10	0.87

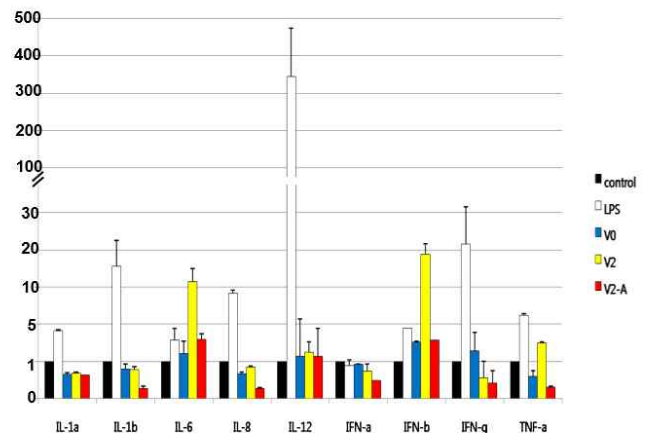


		control	LPS	V0	V2	V2-A
12 hpi	IL-1a	1.00	27.88	18.75	0.79	0.80
	IL-1b	1.00	230.35	61.24	0.73	0.70
	IL-4	1.00	0.47	1.74	0.72	1.09
	IL-6	1.00	0.62	1.77	0.66	1.13
	IL-10	1.00	4.21	0.82	0.77	0.47

*그림. PAM에서 감염 12시간 후 Cytokine 분비 양상



		control	LPS	V0	V2	V2-A
24h	IL-1a	1.00	3.69	1.16	1.40	0.41
	IL-1b	1.00	19.70	1.34	1.74	0.36
	IL-6	1.00	3.29	1.39	1.74	1.96
	IL-8	1.00	8.72	1.14	1.22	0.25
24h	IL-12	1.00	181.02	1.81	2.35	0.38
	IFN-a	1.00	0.41	0.88	0.87	1.09
	IFN-b	1.00	1.83	1.72	2.73	3.80
	IFN-g	1.00	19.09	3.24	1.30	1.31
	TNF-a	1.00	7.01	0.89	0.92	0.31



		control	LPS	V0	V2	V2-A
36h	IL-1a	1.00	4.46	0.66	0.69	0.63
	IL-1b	1.00	15.67	0.80	0.78	0.28
	IL-6	1.00	3.58	2.20	11.39	2.97
	IL-8	1.00	8.43	0.67	0.85	0.28
36h	IL-12	1.00	337.79	1.22	28.64	3.77
	IFN-a	1.00	0.94	1.04	8.08	1.51
	IFN-b	1.00	5.15	3.80	109.52	10.78
	IFN-g	1.00	9.11	1.34	0.12	0.02
	TNF-a	1.00	6.48	0.59	3.51	0.32

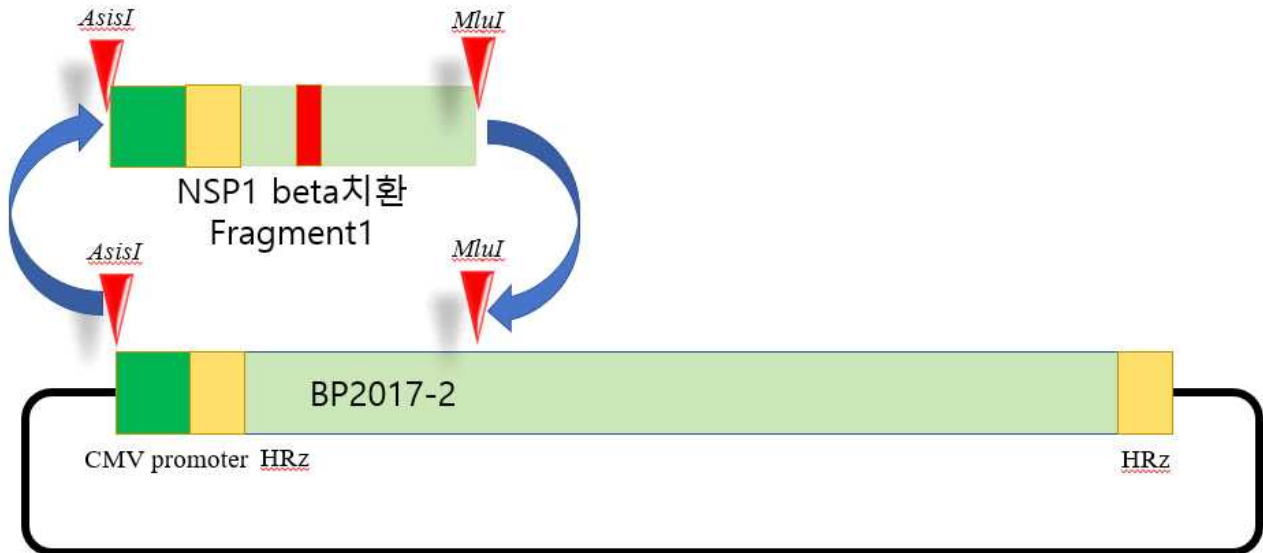
*그림. PAM에서 감염 24시간, 36시간 후 Cytokine 분비 양상

*V0 ; LMY-original, V2 ; LMY-ver2, V2-A ; LMY-Ala

확인 결과, LMY-Ala를 감염시키고 24시간 뒤, IFN beta의 유의적인 증가를 확인하였으나. 전반적인 수치는 낮았다. 36시간 뒤 결과에서는 LMY ver2가 도리어 LMY-Ala 또는 LMY-original을 감염시킨 PAM 에서보다 IFN-beta 수치가 높았다. cytokine 수치를 측정할 때 생기는 편차를 고려할 때 in-vitro 상에서의 균주에 따른 IFN 분비 증가는 확인되지 않은 것으로 결론 내렸다.

b) BP2017-2 균주 기반의 NSP1 beta 의 치환 균주 제작

앞선 LMY-Ala 작출 실험과 더불어 BP2017-2 기반 균주의 NSP1 beta 128,9번 아미노산 치환 균주를 제작하였다.



*그림. BP2017-2 infectious clone의 NSP1 beta 부위 치환 모식도

BP2017-2 기반의 이미 앞서 제작한 infectious clone의 Fragment 1부위에서 NSP1 beta 부위의 128번 129번 아미노산을 “RR→AA“로 치환한 서열을 인공적으로 합성 의뢰하였다. 앞서 LMY-Gly가 작출되지 않았으므로 BP2017-2는 오직 Alanine으로 치환한 균주만 제작하였다.

균주	BP2017-2	BP2017-Ala
128,129번 염기서열	CGGAGG	GCGGCA
128,129번 아미노산서열	RR	AA

*표. 원본 균주와 염기서열을 조작한 균주의 NSP1 beta 128,9번 아미노산 변화

NSP1 beta 128,129번 아미노산을 치환하기 위해 염기서열을 조작하여 합성된 Fragment와 이미 제작된 BP2017-original infectious clone을 동일하게 *AsisI*, *MluI*을 이용하여 동일한 말단을 가진 Fragment로 삽입하여 치환하였다. 앞서 제시한 infectious clone full sequencing용 primer를 이용하여 전체 유전자 염기서열을 분석하여 치환여부를 확인하였다.

확인된 infcetious clone은 BP2017-Ala (BP2017-2 기반의 염기서열을 보유하고 있으나 NSP1 beta 128,9번 아미노산을 AA로 치환한 plasmid)로 명명하였다. C cell에서 배양 후 midi prep 후 수확한 clone의 양(100ul)은 2138ng/ul 로 Spectrophotometer 기기를 이용하여 농도를 측정하였

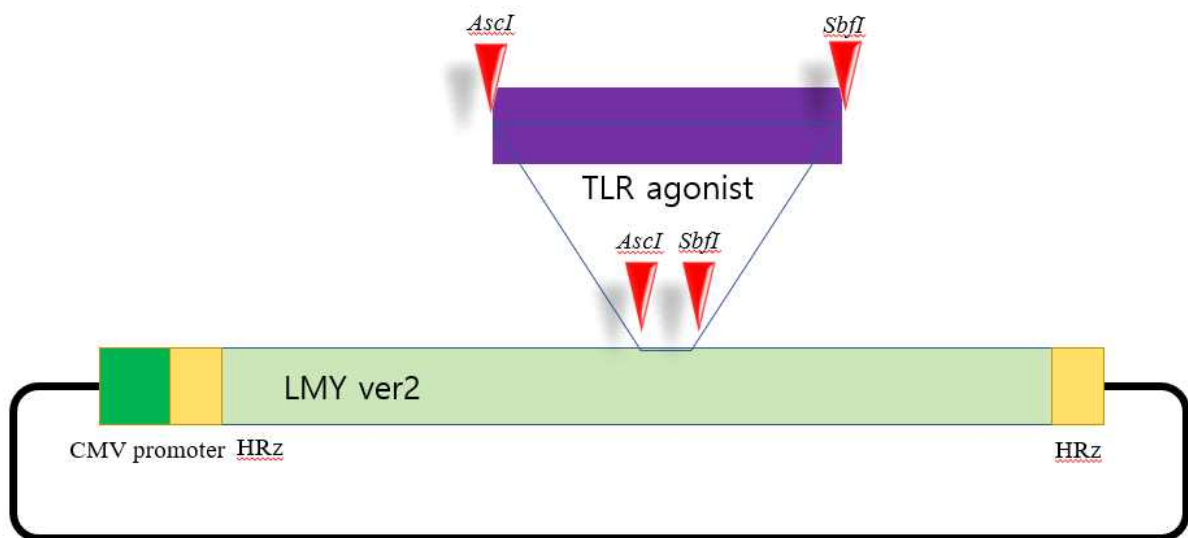
다. 앞서 정립된 tranfection 시약을 이용하여 MARC 145 cell에 transfectoin 후 PRRS의 CPE 병변의 발생을 관찰하였으며, 1계대 이후의 MARC 145 cell에서의 CPE와 PRRS N protein에 특이적인 항체 (SR-30)을 이용한 IFA 기법으로 확인된 항원의 존재를 통해 증명하였다.

실험 결과, 어떠한 세포 변성 효과나 PRRSV 특이적인 항원의 발현을 계대에 걸쳐 확인할 수 없었다. 앞서 LMY-Ala는 작출에 성공하였지만 BP2017-Ala는 작출에 실패하였다. infectious clone의 유전자 서열을 전체 시퀀싱을 통해 확인한 결과 어떠한 오류를 확인하지 못하였으므로 작출의 실패는 과정에서 발생한 문제보다는 균주 자체의 특성인 것으로 추정하였다. PRRSV 특성 상 균주마다 차이가 큰 편인데 BP2017-2의 경우 NSP1 beta의 변이에 보다 민감했을 가능성이 있다.

결론적으로 원래의 목표였던 NSP1 beta의 Alanine 치환의 효과는 IFN 분비 증가로 이어지지 않았다. 30계대에 걸쳐 치환한 부위는 유전적으로 안정되게 유지되었지만, NSP1 beta의 구조적 변이는 바이러스의 증식성을 심각하게 감소시켰다.

7) TLR agonist 발현 균주의 제작

a) HSP70 / LTb / HSPX 발현 LMY 균주의 제작



*그림 TLR agonist 발현 LMY infectious clone의 모식도

TLR agonist는 백신의 Adjuvant로서 초기 면역반응을 증가시키고[7], APC의 일종인 dendritic cell의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다[8]. 본 연구팀은 부형제를 항원과 함께 첨가하는 것이 아닌 백신균주 자체가 이러한 TLR agonist를 발현해 감염부위 면역계를 직접 자극하여 백신의 효능을 극대화하는 것을 계획하였다.

선택한 TLR agonist는 다음과 같았다.

TLR agonist	HSP70	HSPX	LTb
	765 bp	435 bp	375 bp
주요 기능	Dendritic cell maturation 및 activation	Dendritic cell maturation 및 activation	NF- κ B의 activation 및 pro-inflammatory signal activation

*표. 선택한 TLR agonist와 크기 및 기능

*HSP70은 c-terminal부위임.

본 연구팀이 선택한 TLR agonist은 3종으로 먼저, HSP70 c-terminal은 Mycobacteria tuberculosis의 70kDa 크기의 Heat shock protein (HSP70)으로서 대표적인 TLR4를 활성화시키는 물질로 알려져 있다. 여러 백신 관련 실험에서 이 물질의 CMI 유도 능력이 입증된 바 있다[9].

유사한 기능을 보유한 것으로 알려진 Mycobacteria tuberculosis의 Heat shock protein X (HSPX)는 역시 TLR 4 agonist로서 CMI 유도과 dendritic cell의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다[10].

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)에서 분비하는 Heat labile toxin b (LTb) 는 TLR2를 활성화시키는 물질로 알려져 있다. 여러 백신 관련 실험에서 이 물질의 HI 유도 능력이 입증된 바 있다 [11].

PRRS genome은 외래 유전자가 삽입되어 발현이 가능하다는 것이 알려져 있으며 대략 700bp 크기가 ORF1과 ORF2 사이에 삽입되어 유지가능하다는 것이 알려져 있다[ref]. 이미 제작한 LMY infectious clone은 clone의 합성 단계에서부터 미리 외래 유전자가 삽입 가능하도록 ORF1과 ORF2 부위 사이에 제한효소 자리와 TRS (Transcriptional regulatory signal)을 삽입한 상태로 제작하였다.

ORF1> GGCGCGCC(AscI) AGA CCTGCAGG (SbfI)
 GTTCCGCGGCAACCCCTGTAACCAGAGTTTCGGCGGAGCA(TRS) >ORF2

*LMY ORF1과 ORF2 사이 제한효소 (AscI, SbfI)와 TRS

발현할 유전자는 Kozac sequence (GCCACC)를 ATG 개시 코돈 앞에 삽입하였다.

3종의 TLR agonist는 유전자 서열을 합성 의뢰하였으며 합성한 유전자를 동일하게 AscI과 SbfI 제한 효소를 사용하여 infectious clone과 처리하여 자른 뒤, T4 ligase를 이용하여 삽입하였다. 삽입한 유전자의 존재는 다음의 PCR primer를 이용하여 확인하였다.

F: CTGGGGATTTGAGTCGGATAC(57)

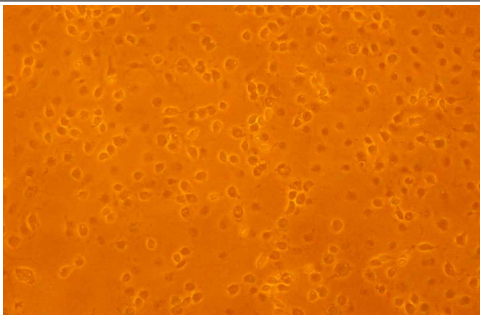
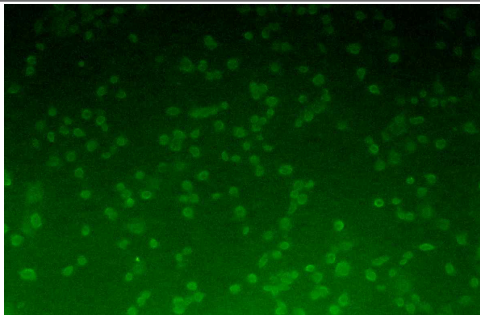
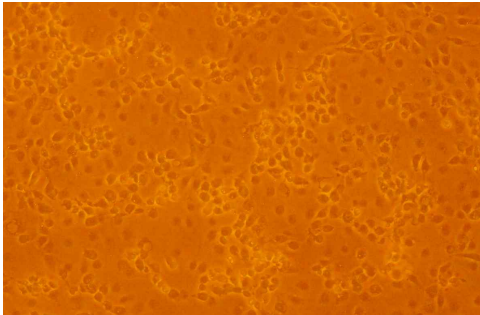
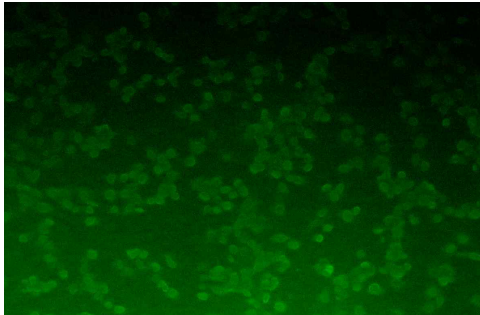
R: CCACTTGACACTGGGTGAGGA(59)

Size : 494bp + 삽입 유전자 크기

C cell에 transformation 후 위의 primer를 이용하여 colony PCR을 통해 해당 유전자의 삽입 여부를 확인하였으며, 확인된 colony는 배양 후 midi prep을 통해 정제하였다. 수확한 clone의

양(100ul)을 Spectrophotometer 기기를 이용하여 농도를 측정하였다. 앞서 정립된 tranfection 시약을 이용하여 MARC 145 cell에 transfection 후 PRRS의 CPE 병변의 발생을 관찰하였으며, 1세대 이후의 MARC 145 cell에서의 CPE와 PRRS N protein에 특이적인 항체 (SR-30)을 이용한 IFA 기법으로 확인된 항원의 존재를 통해 증명하였다.

삼입 유전자의 발현은 MARC에서 작출된 균주의 접종 이후 세포 배양액과 세포 파쇄액에서 western blot을 통해 발현 여부를 확인하였다.

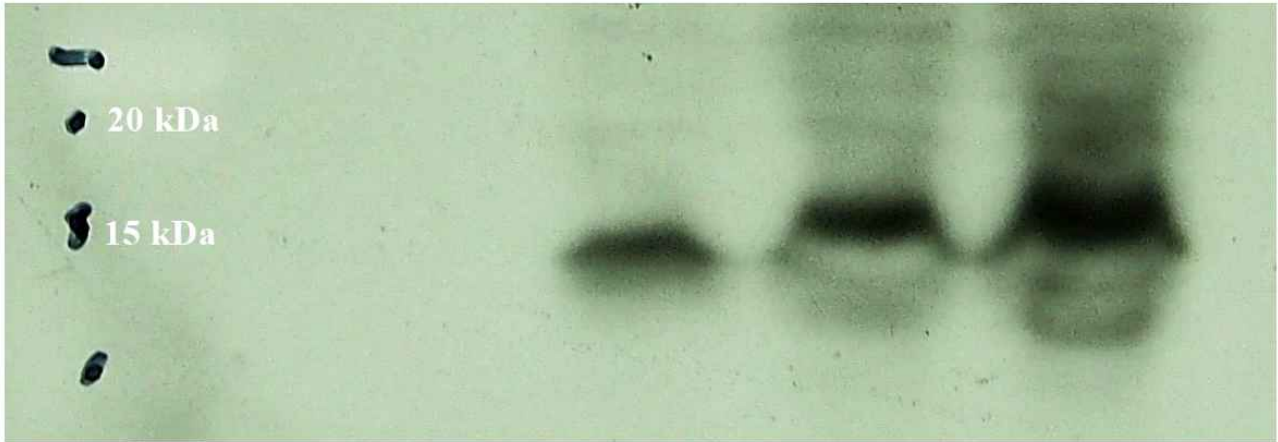
Infectious clone	세포 변성 (CPE)	IFA
LMY-HSP70	작출 실패	작출 실패
LMY-HSPX		
LMY-LTb		

*그림. 외래 유전자 발현 균주의 세포변성과 IFA

LMY-HSP70은 작출에 궁극적으로 실패하였다. 어떠한 바이러스의 증식의 증거를 확인할 수 없었다. 추정하건데 700bp 크기의 외래 유전자를 LMY genome이 감당하지 못하는 것으로 보인다.

b) 삼입한 TLR agonist 의 발현 확인

작출에 성공한 LMY-HSPX의 HSPX의 발현을 HSPX에 특이적인 항체(anti-HSPX (N-term, antibody) cat.ABIN966323)를 이용하여 western blot 상에서 세포 배양액과 세포 파쇄액에서 발현된 항원의 존재를 확인하였다.



세포 배양액 세포 세포 + 세포배양액

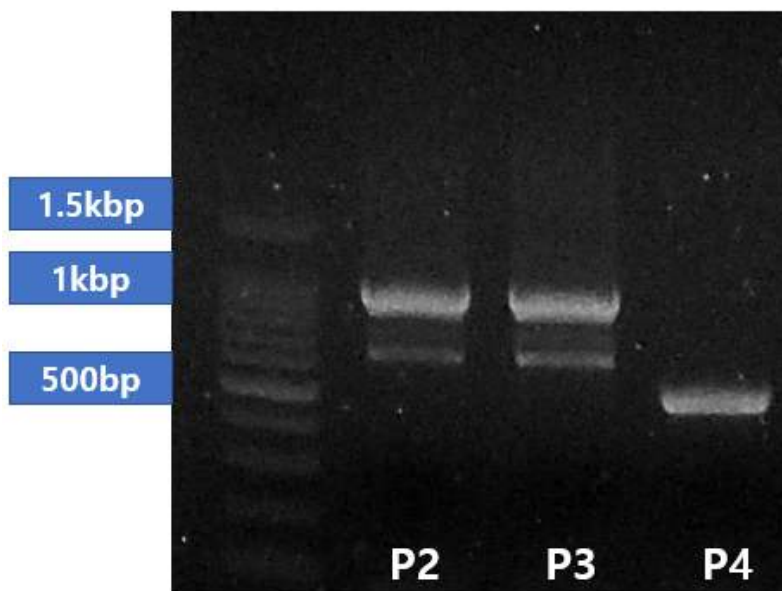
*그림. LMY-HSPX를 배양한 세포에서 HSPX의 발현 확인

삽입한 외래 유전자의 발현을 확인하기 위하여 Western blot기법을 시도하였다. LMY-HSPX 균주를 배양한 MARC cell을 접종 5일 후 CPE를 확인하고 배양 상층액과 세포를 각각 분리하여 항원을 탐지하였다. 확인결과, HSPX에 특이적인 monoclonal antibody는 세포 배양 상층액과 세포 모두에서 16kDa의 HSPX의 항원을 탐지하였다.

항원의 발현을 확인하기 위하여 western blot 이외에 MARC cell에서 동일한 항체를 이용하여 IFA 기법도 시도하였으나, IFA는 HSPX의 항원이 확인되지 않았다. [본 실험에 사용한 항체 (anti-HSPX (N-term, antibody) cat.ABIN966323)는 IFA용이 아니라 western blot 상에서만 탐지하는 것을 보증하였다.]

c) 삽입 유전자의 안정성 확인

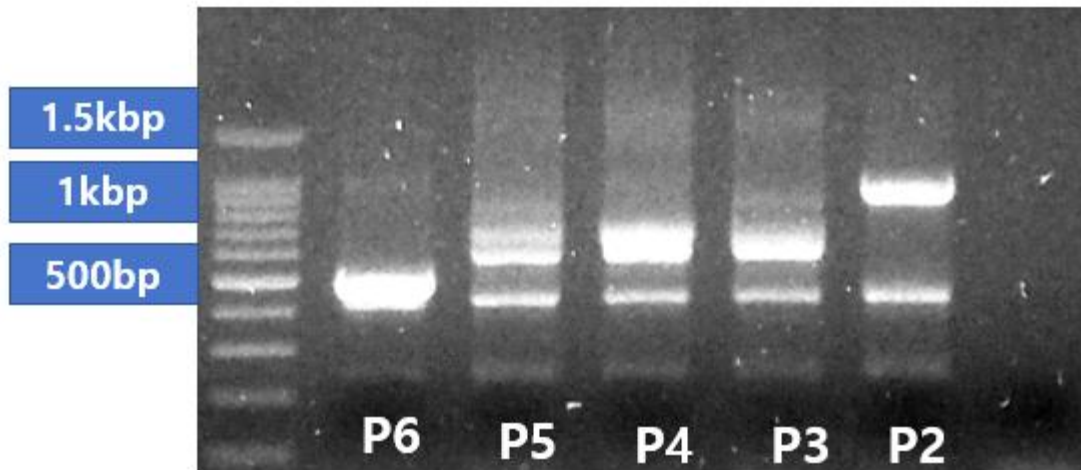
계대에 따른 외래 유전자의 안전성을 확인하기 위해 앞선 제시한 primer를 이용하여 PCR을 수행한 뒤 시퀀싱 작업을 진행하였다.



*그림. LMY-HSPX의 MARC cell에서 계대에 따른 외래 유전자 절단(deletion)

*예상 target size는 494 + 493(HSPX size) bp임

LMY-HSPX는 MARC cell에서 2계대 배양 단계부터 외래 유전자가 잘려나간 band가 확인되어 2개의 band가 PCR 상에서 확인되었다. 계대가 진행되어 4계대에 도달하면, 원래 외래 유전자가 삽입된 987 bp 크기의 band는 소멸하고 470~480bp 크기의 단일 band만 남게 되었다.



*그림. LMY-LTb의 MARC cell에서 계대에 따른 외래 유전자 절단(deletion)

*예상 target size는 494 + 375 (LTb size) bp임

LMY-LTb에서도 MARC cell에서 2계대 배양 단계부터 외래 유전자가 잘려나간 band가 확인되어 2개의 band가 PCR 상에서 확인되었다. 4계대가 더 진행하여 6계대에 도달하면, 원래 외래 유전자가 삽입된 869 bp 크기의 band는 소멸하고 470~480bp 크기의 단일 band만 남게 되었다.

10계대 균주를 시퀀싱한 결과에서도 LMY-HSPX와 LMY-LTb는 제한효소 삽입 부위인 AscI 과 SbfI 사이에 각각 10~30bp의 삽입한 TRS sequence의 일부만 남고 삽입한 TLR agonist 는 모두 잘려나갔다. 이로써 LMY 균주에 삽입한 외래 유전자의 유전자 안정성이 떨어지는 것으로 판단하였다.

d) TLR agonist의 부형제 효과 확인

돼지에서 LMY-HSPX, LMY-LTb의 면역원성 확인 시험

그룹명	균주	두수	평가항목
T01	LMY	2	
T02	LMY-HSPX	2	체온, viremia,
T03	LMY-LTb	2	ELISA, ELISPOT
T04	Control	2	

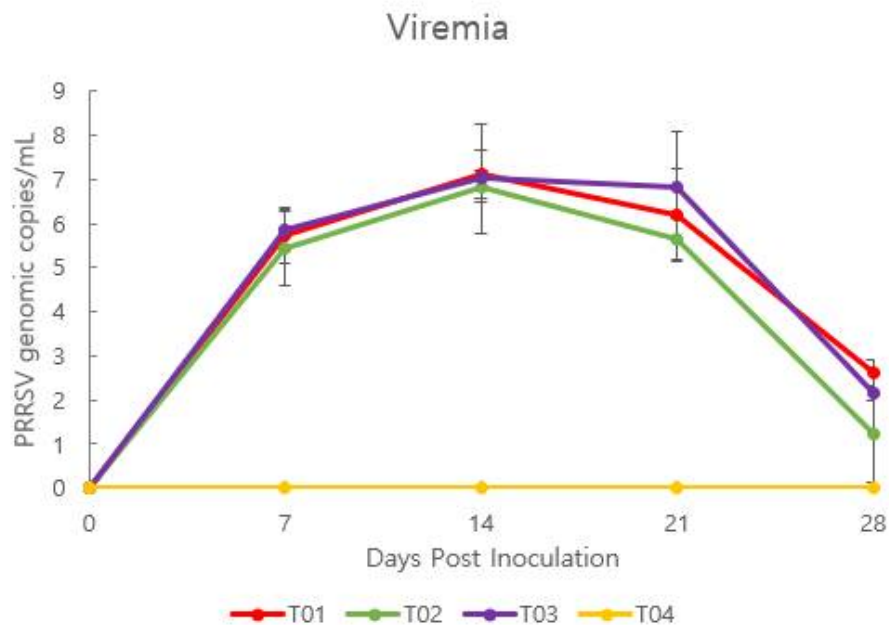
*표. 면역원성 확인시험.

삽입한 TLR agonist의 부형제로서 면역원성을 확인하기 위해 동물실험을 진행하였다. 작출 된 균주를 그룹별로 접종하고 항체가과 IFN gamma secreting cell을 분석하였다.

d-1) 임상증상

4개 그룹에서 어떠한 돼지도 접종 이후 40.5° C이상의 직장 체온을 실험기간 동안 보이지 않았다. 또한 어떠한 돼지에서도 헐떡거림과 같은 호흡기 증상을 보이지 않았다. LMY-HSPX와 LMY-LTb는 접종 부위에서 어떠한 염증 소견이 관찰되지 않았으며 접종 1시간 뒤 어떠한 체온의 상승도 보이지 않았다.

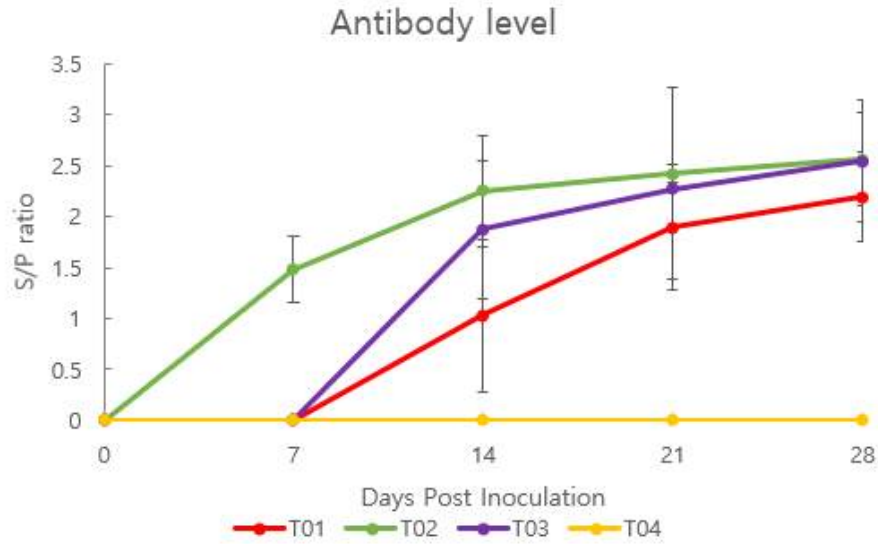
d-2) 혈청 바이러스 역가



*그림. 접종 균주에 따른 혈청 내 바이러스 역가

LMY와 LMY-HSPX, LMY-LTb는 실험기간 동안 유의적인 바이러스의 차이를 보이지 않았다.

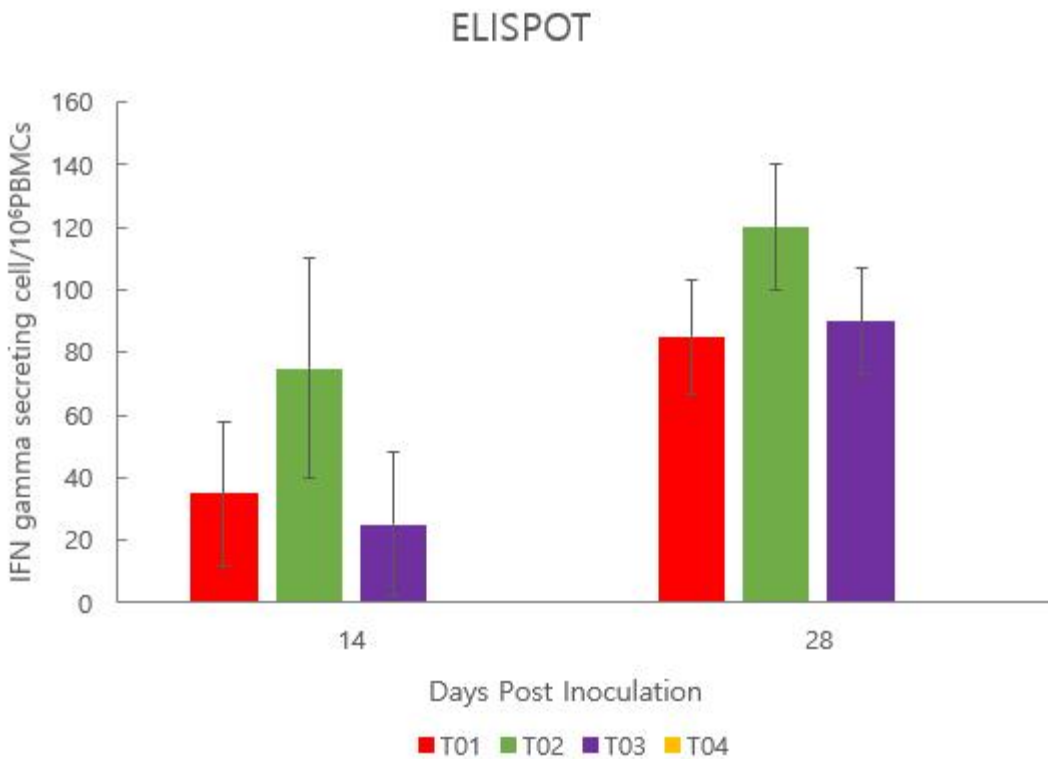
d-3) Anti-PRRSV antibody level



*그림. 접종 군주에 따른 항체가 차이

IDEXX 3XR kit를 이용하여 혈청 내 항체를 측정 한 결과, 7,14일에 LMY-HSPX를 접종한 그룹은 LMY 군주만 접종한 그룹에 비해 유의적으로 높은 항체를 보였다. 그룹 간의 유의성은 ANOVA test 후 사후 검정(Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다.

d-4) PRRSV specific IFN gamma secreting cell (ELISPOT)



*그림. 접종 군주 별 ELISPOT 반응 차이

접종 14일 28일에 Porcine IFN- γ ELISpot BASIC (ALP, MABTECH사) kit를 이용하여 10⁶ 개

PBMC당 PRRSV 에 특이적인 IFN gamma를 분비하는 세포 수를 측정하였다. LMY-HSPX를 접종한 돼지에서 수치가 높았지만 유의적이지는 않았다. 항원자극은 LMY-original 균주를 사용하였다.

d-5) 삼입한 외래 유전자의 안정성

7, 14, 21일에 채취한 혈청에서 나온 바이러스의 외래 유전자를 확인하기 위해 위에서 제시한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 확인 결과, 7일부터 채취한 혈청에서 유래한 LMY-HSPX와 LMY-LTb는 모두 삼입한 TLR agonist 가 절단된 상태였다.

결론) TLR agonist를 삼입한 LMY 유래 균주는 백신 제조용 세포인 MARC cell에서 유전적 안정성이 떨어져 백신으로서 사용이 부적합하다 판단함.

돼지에서의 접종 실험에서 체온 상승이나 염증 소견 임상증세를 유발하지는 않았다. HSPX를 접종한 돼지는 초기에 유의적으로 높은 항체가 유도하고 ELISPOT 반응을 유도하는 것으로 미루어 백신의 면역원성을 향상시킬 가능성이 있는 것으로 보이나 접종한 돼지에서도 삼입한 유전자는 절단되는 것으로 미루어 PRRSV 자체가 외래 유전자를 전달하는 vector로 사용하기에는 부적합한 것으로 판단함.

b) HSPX 발현 BP2017-2 균주의 제작

앞선 LMY 균주를 기반으로한 TLR agonist 발현 균주 제작과정과 동일하게 HSPX를 분비하는 BP2017-2 기반 균주를 제작함.

과정은 LMY-HSPX와 동일하였음. HSPX 발현 BP2017-2 균주 역시 MARC cell에서 10계대 이후 삼입한 유전자가 절단되어 소실되었음. 유전적 안정성에 문제가 있는 것으로 판단해 해당실험을 종료하였음.

최종 작출 균주 목록 정리

LMY 계열	
균주명	상세내역
LMY-Original	SAVE 또는 외래 유전자 삽입되지 않은 LMY 원본 균주
LMY ver1	SAVE가 적용시킨 LMY 재조합 균주
LMY ver2	SAVE가 적용되어 약독화 된 LMY 재조합 균주
LMY Ala	NSP1 부위에 point mutation을 주어 type I IFN의 분비를 강화시킨 LMY 재조합 균주
LMY-HSPX	외래 유전자 HSPX를 발현하는 LMY 재조합 균주

BP2017-2 계열	
균주명	상세내역
BP2017-original	SAVE 또는 외래 유전자 삽입되지 않은 BP2017-2원본균주
BP2017 ver2	SAVE가 적용되어 약독화 된 BP2017-2 재조합 균주
BP2017-HSPX	외래 유전자 HSPX를 발현하는 BP2017-2 재조합 균주
BP2017 ver2-HSPX	SAVE가 적용되어 약독화 되었으며, 외래 유전자 HSPX를 발현하는 BP2017-2 재조합 균주

Chimera	
균주명	상세내역
LMY-BP chimera	LMY ver2 균주의 ORF1 부위와 BP2017-2 균주의 ORF2-7 부위를 가진 Chimeric 재조합 균주

나) 후보균주의 안전성 평가

1) SAVE 안전성 평가

SAVE를 적용한 후보균주의 안전성 여부를 평가하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. 실험은 고역가 (TCID50 5이상)의 후보균주를 3주령 자돈에 접종하여 병원성 발현 여부를 확인하였다.

접종 균주	투여량	마리수 두	일정(dpi)		
	TCID50		0w	2w	4w
LMY	5	10	접종	5두 부검	5두 부검
LMY ver2	5	10	접종	5두 부검	5두 부검
BP2017-2	5	10	접종	5두 부검	5두 부검
BP2017-2 ver2	5	10	접종	5두 부검	5두 부검
NC(Negative Control)	-	10	-	5두 부검	5두 부검

실험 결과

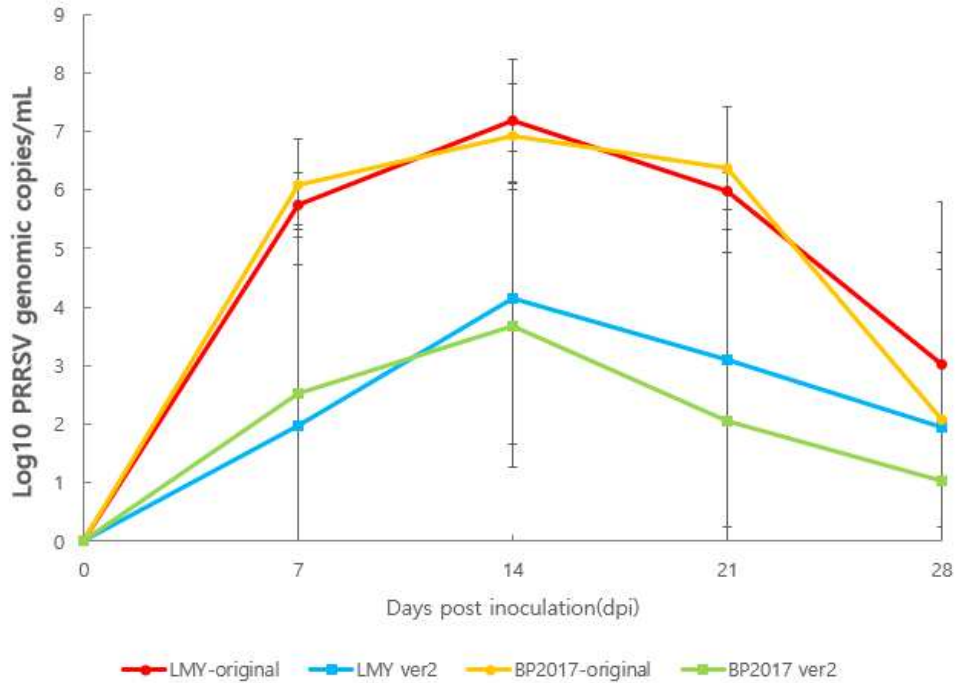
a) 임상증세

접종 7일간 어떠한 고온의 발생도 확인되지 않았다. LMY 균주를 접종한 그룹은 다른 그룹과 다르게 접종 1일에 38도 이하의 낮은 체온을 보였으나 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다. LMY ver2 접종 균주를 접종한 그룹의 경우 음성 대조군과 체온에 차이를 보이지 않았으며, 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다. BP2017-2 ver2를 접종한 그룹은 음성 대조군과 체온에 차이를 보이지 않았으며, 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다.

체중은 5개 그룹 모두 유의적인 차이 없이 일정한 ADG(Average Daily Weight Gain)을 보였다.

b). 혈중 바이러스 양

혈청 바이러스 역가는 접종 이후 날수에 맞춰 각각의 바이러스에 특이적인 realtime PCR용 Primer로 탐지하였다. 원래의 모균주에 비해 SAVE를 적용한 LMY ver2 와 BP2017 ver2는 각각 **접종 7, 14 그리고 21 일에 통계적으로 유의적으로 혈중 바이러스의 역가 감소를 보였다.** 따라서 SAVE 원리가 실제적으로 바이러스의 역가를 낮춘 것을 확인하였다. 유의성은 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.



* . 모균주와 SAVE 적용 균주의 돼지에서의 증식 차이.

c). 병변 분석

접종 2주 후 부검 결과, 모균주에 비해 SAVE를 적용한 균주 LMY ver2와 BP2017 ver2는 각각 간질성 폐렴 조직 병변 score가 ($P < 0.05$) 낮았다. LMY와 BP2017-2 균주의 유의적인 조직병리적인 차이는 확인되지 않았다. 다만 LMY의 경우 BP2017-2보다 다소 폐렴 병변이 강하게 나타났다. 음성 대조군과 LMY ver2, BP2017 ver2의 차이는 보이지 않았다. 간질성 폐렴 병변은 다음의 기준을 따라 평가하였다.

Level	score	비고
Normal	0	Alveolar wall의 어떠한 비후도 관찰되지 않음
Mild	1	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 10% 미만
Moderate multifocal	2	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 40% 미만
Moderate diffuse	3	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 80% 미만.
Severe	4	Air soc의 존재가 확인되지 않음. 혹은 출혈을 동반함.

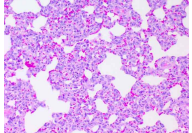
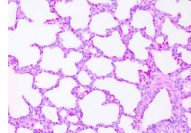
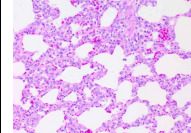
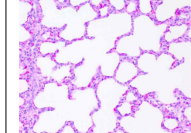
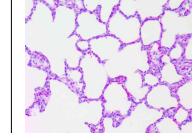
*표. PRRSV에 의한 간질성 폐렴 병변 스코어링 기준

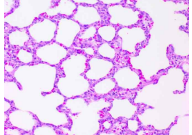
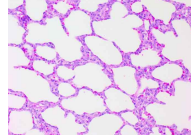
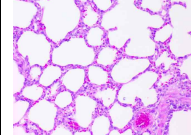
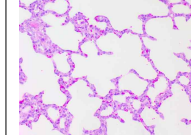
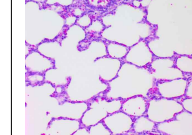
그룹간의 유의성은 분석한 스코어를 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 분석하였다.

폐 조직 내 PRRS 항원 score의 경우, PRRSV의 N protein에 특이적인 monoclonal antibody(SR-30)을 이용하여 IHC기법을 통해 조직 내 항원의 존재를 탐지하였다. 모균주에 비해 SAVE를 적용한 균주 LMY ver2와 BP2017 ver2는 각각 폐 조직 내 항원 갯수가 ($P < 0.05$) 낮았다. LMY를 접종한 그룹이 다른 4개

유의적으로 ($P < 0.05$) 높은 수치를 보였다. 그룹 간의 유의성은 ANOVA test 후 사후 검정 (Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다.

접종 4주 후에는 5개 그룹 모두 폐렴 조직 병변 score와 조직 내 PRRS 항원 score에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다.

접종 2주 후	LMY	LMY ver2	BP2017-2	BP2017-2 ver2	NC
조직병변 score	2.6±0.3	0.3±0.3	2.1±0.4	0.3±0.2	0
조직 내 PRRS 항원	20.2±2.7	3.9±2.5	15.4±3.6	2.8±2.1	0
조직병변 사진					

접종 4주 후	LMY	LMY ver2	BP2017-2	BP2017-2 ver2	NC
조직병변 score	0.5±0.3	0.3±0.2	0.4±0.2	0.2±0.2	0
조직 내 PRRS 항원	2.5±1.7	1.8±1.3	2.3±1.4	1.5±0.7	0
조직병변 사진					

2) LMY-Ala 안전성 평가

NSP1 beta 부위 128,9번 아미노산을 AA로 치환하여 숙주에서 type I IFN 분비를 강화시킨 LMY 기반의 균주(LMY-Ala)의 백신 후보로서 안전성 여부를 평가하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. 실험은 고역가 (TCID₅₀ 5이상)의 후보균주를 3주령 자돈에 접종하여 병원성 발현 여부를 확인하였다.

접종 균주	투여량	마리수	일정(dpi)		
	TCID ₅₀		두	0w	2w
LMY	5	10	접종	5두 부검	5두 부검
LMY-Ala	5	10	접종	5두 부검	5두 부검
NC(Negative Control)	-	10	-	5두 부검	5두 부검

실험 결과

a) 임상증세

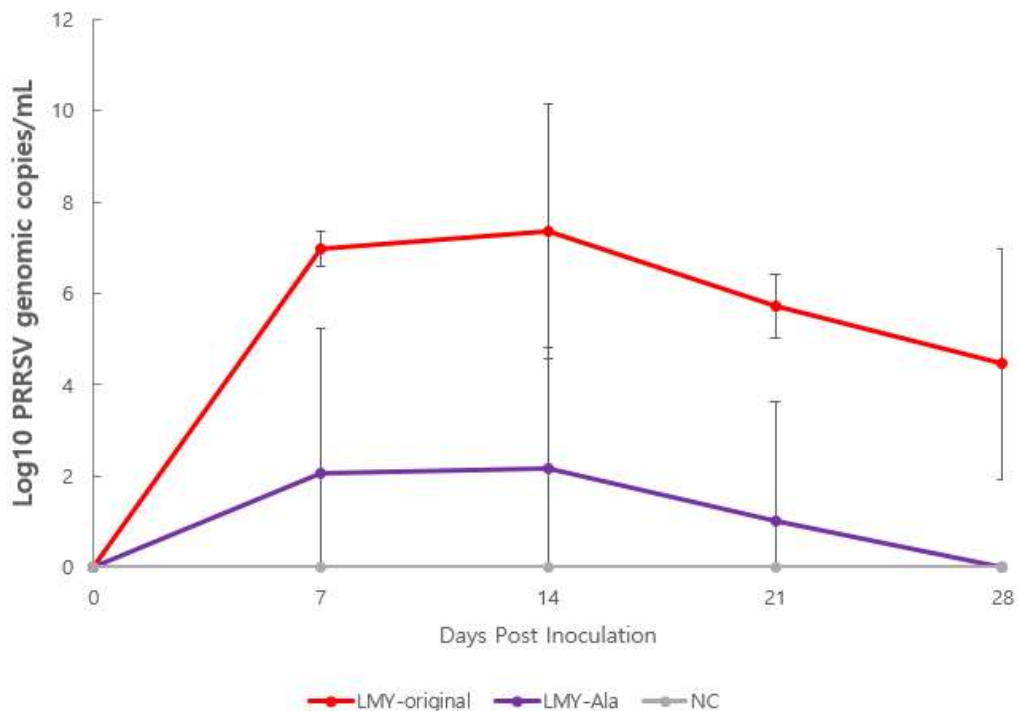
모든 실험군은 접종 7일간 어떠한 고온의 발생도 확인되지 않았다. LMY 균주를 접종한 그룹은 다른 그

유의적이지 않은 높은 체온을 보였으나 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상 증세도 보이지 않았다. LMY-Ala 접종 균주를 접종한 그룹의 경우 음성 대조군과 체온에 차이를 보이지 않았으며, 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다.

체중은 3개 그룹 모두 유의적인 차이 없이 일정한 ADG(Average Daily Weight Gain)을 보였다.

b). 바이러스 양

혈청 바이러스 역가는 접종 이후 날수에 맞춰 각각의 바이러스에 특이적인 realtime PCR용 Primer로 탐지하였다. 원래의 모균주에 비해 NSP1 beta를 치환한 LMY-Ala는 각각 **접종 7, 14, 21, 28일에 통계적으로 유의적으로 혈중 바이러스의 역가 감소를 보였다.** 따라서 NSP1 beta의 아미노산 변이가 실제적으로 바이러스의 역가를 낮춘 것을 확인하였다. 유의성은 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.



*그림. 모균주와 NSP2 beta 치환 균주의 돼지에서의 증식 차이.

c). 폐조직 병변 분석

접종 2주 후 부검 결과, 모균주에 비해 NSP1 beta 128,9번 아미노산을 치환한 균주 LMY-Ala는 간질성 폐렴 조직 병변 score가 ($P < 0.05$) 낮았다. 모균주인 LMY의 경우, 음성 대조군과 LMY-Ala 접종군에 비해 유의적으로 높은 간질성 폐렴 병변을 보였다. 음성 대조군과 LMY-Ala의 차이는 보이지 않았다. 간질성 폐렴 병변은 다음의 기준을 따라 평가하였다.

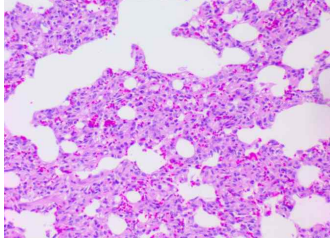
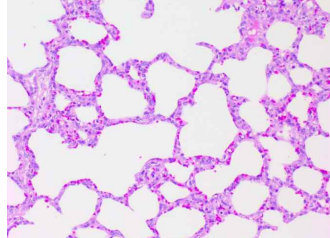
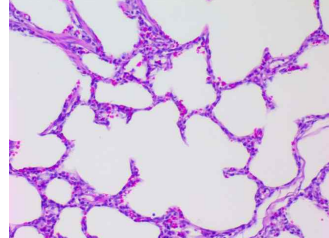
Level	score	비고
Normal	0	Alveolar wall의 어떠한 비후도 관찰되지 않음
Mild	1	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 10% 미만
Moderate multifocal	2	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 40% 미만
Moderate diffuse	3	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 80% 미만.
Severe	4	Air soc의 존재가 확인되지 않음. 혹은 출혈을 동반함.

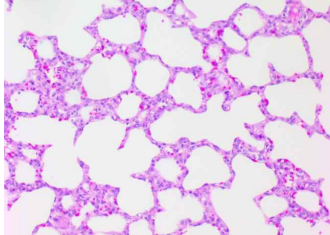
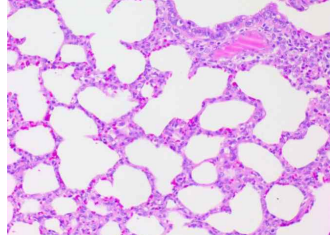
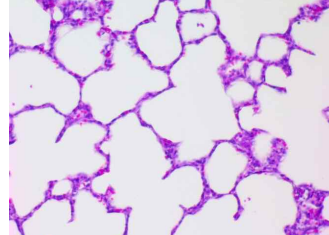
* . PRRSV에 의한 간질성 폐렴 병변 스코어링 기준

그룹간의 유의성은 분석한 스코어를 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 분석하였다.

폐 조직 내 PRRS 항원 score의 경우, PRRSV의 N protein에 특이적인 monoclonal antibody(SR-30)을 이용하여 IHC기법을 통해 조직 내 항원의 존재를 탐지하였다. 모균주인 LMY에 비해 NSP1 beta 아미노산을 치환한 균주 LMY Ala는 폐 조직 내 항원 갯수가 ($P < 0.05$) 낮았다. 그룹 간의 유의성은 ANOVA test 후 사후 검정(Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다.

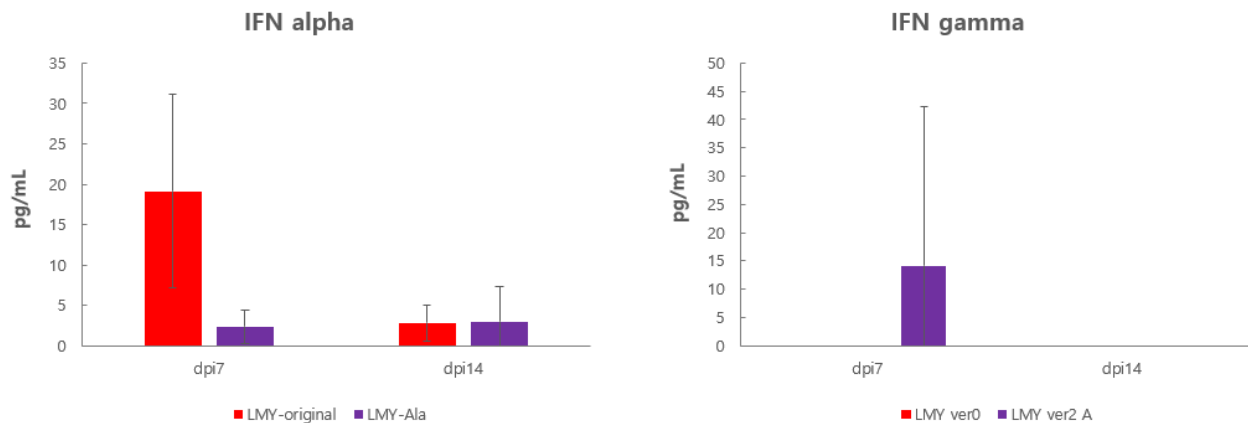
접종 4주 후에는 3개 그룹 모두 폐렴 조직 병변 score와 조직 내 PRRS 항원 score에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다.

접종 2주 후	LMY	LMY-Ala	NC
조직병변 score	3.1±0.4	0.3±0.3	0
조직 내 PRRS 항원	31.9±5.4	3.6±3.0	0
조직병변 사진			

접종 4주 후	LMY	LMY-Ala	NC
조직병변 score	0.3±0.3	0.2±0.2	0
조직 내 PRRS 항원	1.7±1.3	1.4±0.9	0
조직병변 사진			

d) Luminex를 이용한 Porcine cytokine 분석

7일 14일에 채취한 혈청 내 Cytokine 및 Chemokine의 분비양상을 ProcartaPlex Porcine Cytokine & Chemokine Panel 1 (Affymetrix, eBioscience, Austria)을 이용하여 분석하였다. 해당 kit는 총 9개의 돼지 cytokine (IFN- α , IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-4, IL-6 and IL-10) 의 동시 분석이 가능한 제품이다.



*그림. 접종 이후 7, 14일에 그룹 별 Type I IFN의 분비 양상 차이

분석 결과 7일 차에 LMY-original을 접종한 경우 LMY-Ala을 접종한 군주보다 유의적으로 IFN alpha의 수치가 높았다. LMY-Ala의 돼지에서 증식이 매우 낮아 도리어 초기 면역이 떨어지는 것으로 보였다. IFN gamma는 7일 차에 LMY-Ala을 접종한 돼지에서 높은 수치를 보였지만 유의적이지 않았다. 그 외 IL-12p40, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-4, IL-6 and IL-10의 수치는 그룹에 차이 없이 매우 낮았다.

NSP1 beta의 AA 치환이 Type I IFN의 분비를 강화시킨다고 보고되었으나 [ref], 본 연구팀의 실험 결과 군주마다 차이가 있는 것으로 보이며 LMY-Ala의 경우 유의적인 어떠한 강화된 IFN 분비를 확인할 수 없었다.

3) LMY-BP chimera 안전성 평가

LMY ver2 군주의 ORF1 부위와 BP2017-2 군주의 ORF 2~7 부위를 가진 chimeric 군주 (LMY-BP chimera)의 후보로서 안전성 여부를 평가하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. 실험은 고역가 (TCID₅₀ 5이상)의 후보군주를 3주령 자돈에 접종하여 병원성 발현 여부를 확인하였다.

접종 균주	투여량	마리수	일정(dpi)		
	TCID50	두	0w	2w	4w
LMY-BP chimera	5	10	접종	5두 부검	5두 부검
NC(Negative Control)	-	10	-	5두 부검	5두 부검

결과

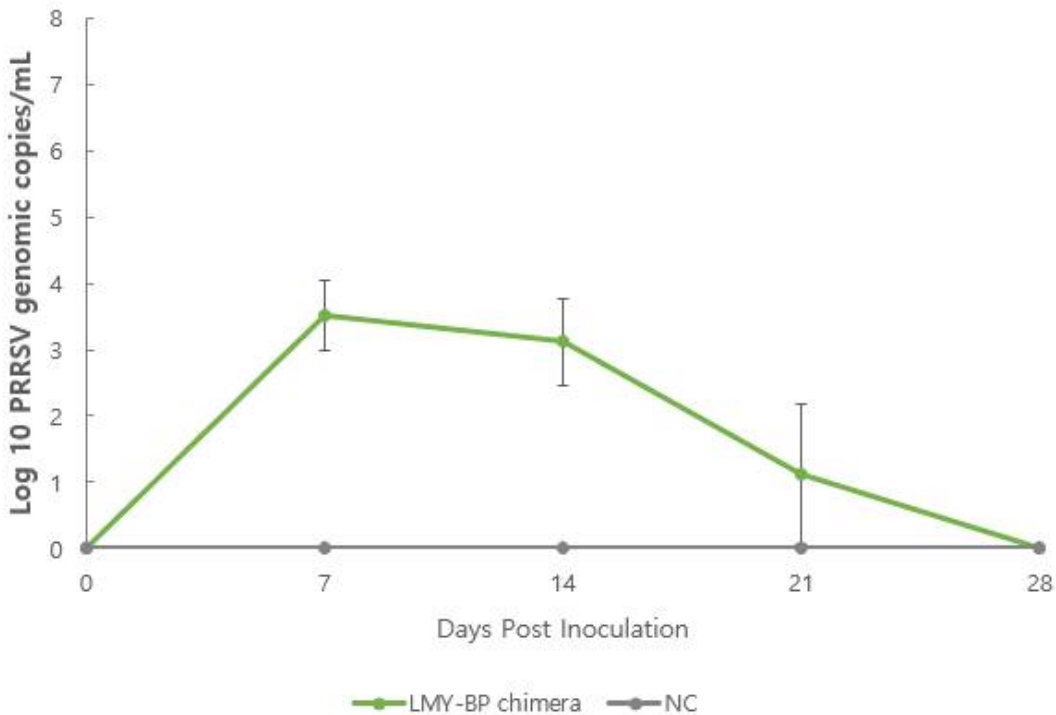
a) 임상증세

실험군은 접종 7일간 어떠한 고온의 발생도 확인되지 않았다. LMY-BP chimera 균주를 접종한 그룹은 음성 대조군과 차이를 보이지 않았다. 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다.

체중은 두 그룹 모두 유의적인 차이 없이 일정한 ADG(Average Daily Weight Gain)을 보였다.

b). 혈중 바이러스 양

혈청 바이러스 역가는 접종 이후 날수에 맞춰 각각의 바이러스에 특이적인 realtime PCR용 Primer로 탐지하였다.



*그림. LMY-BP chimera 균주의 접종 이후 혈청에서의 바이러스 역가.

c). 폐조직 병변 분석

접종 2주 후 부검 결과, LMY-BP chimera를 접종한 돼지의 폐 병변은 음성대조군과 차이를 보이지 않았다. 간질성 폐렴과 육안병변을 확인하지 못하였다. 간질성 폐렴 병변은 다음의 기준을 따라 평가하였다.

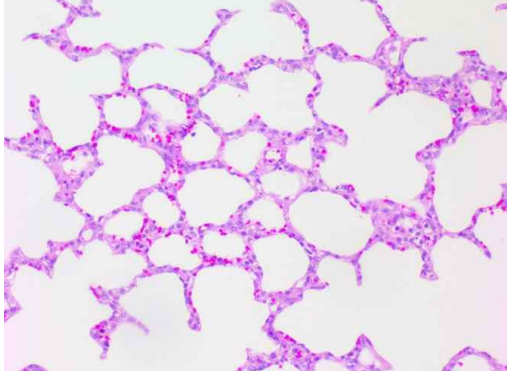
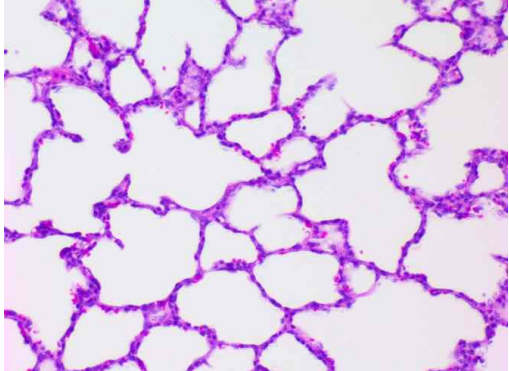
Level	score	비고
Normal	0	Alveolar wall의 어떠한 비후도 관찰되지 않음
Mild	1	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 10% 미만
Moderate multifocal	2	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 40% 미만
Moderate diffuse	3	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 80% 미만.
Severe	4	Air soc의 존재가 확인되지 않음. 혹은 출혈을 동반함.

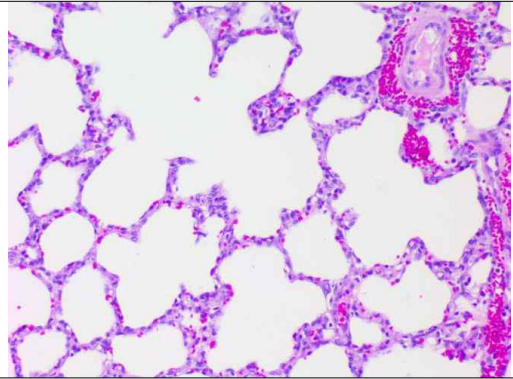
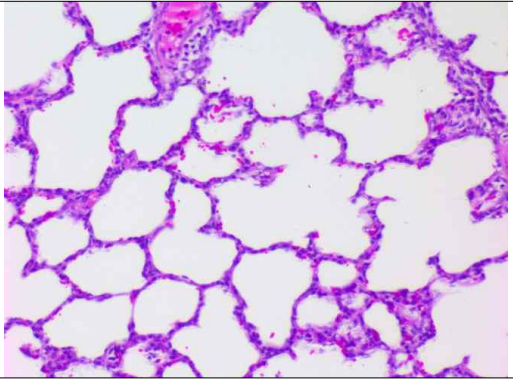
* . PRRSV에 의한 간질성 폐렴 병변 스코어링 기준

그룹간의 유의성은 분석한 스코어를 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 분석하였다.

폐 조직 내 PRRS 항원 score의 경우, PRRSV의 N protein에 특이적인 monoclonal antibody(SR-30)을 이용하여 IHC기법을 통해 조직 내 항원의 존재를 탐지하였다. 폐 조직 내 Chimera 균주가 감염된 PAM은 매우 적은 수가 확인되었다.

접종 4주 후에는 2개 그룹 모두 폐렴 조직 병변 score와 조직 내 PRRS 항원 score에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다.

접종 2주 후	LMY-BP chimera	NC
조직병변 score	0.3±0.2	0
조직 내 PRRS 항원	0.9±0.9	0
조직병변 사진		

접종 4주 후	LMY-BP chimera	NC
조직병변 score	0.1±0.2	0
조직 내 PRRS 항원	0.5±0.5	0
조직병변 사진		

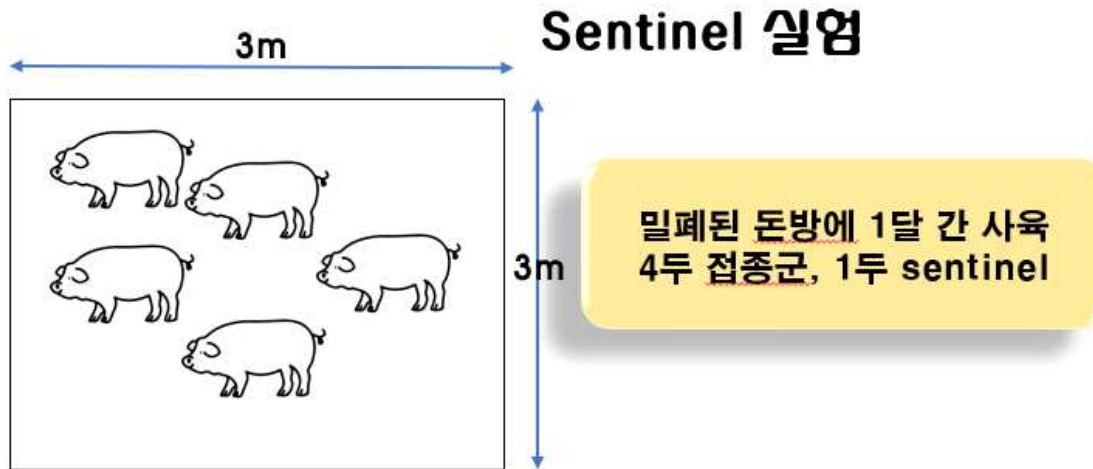
: LMY-BP chimera 균주는 자돈에 감염되었을 때, 간질성 폐렴을 유발하지 않으며, 어떠한 임상적인 증세를 유발하지 않는다. 그러나 혈청에서 viremia의 존재와 항체의 발현으로 미루어(항체가는 제시하지 않았음) 분명히 생체 내 일부 증식이 가능한 것으로 보인다. 안전하고 면역원성이 확인된 백신균주로서 가능성을 확인하였음.

4) LMY-BP chimera 동거돈 평가

LMY-BP chimera균주가 백신 후보로서 안전성 여부를 평가하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. 밀폐된 사육시설에서 LMY-BP chimera 균주를 접종한 돼지에서 shedding 된 바이러스가 주변의 다른 돼지에 전염되는 지를 확인한 실험이다. 실험은 고역가 (TCID50 5이상)의 후보균주를 3주령 자돈에 접종하여 이후 shedding 여부를 확인하였다.

접종 균주	투여량	마리수	일정(dpi)	
	TCID50		0w	4w
LMY-BP chimera	5	1	접종	1두 부검
NC(Negative Control)	-	4	-	4두 부검

실험은 본사 바이오포아의 동물 실험실에서 진행하였으며 해당 돈사는 HEPA필터로 외부 공기의 유입을 필터링 한 뒤 공급하고 격벽으로 외부 노출을 차단한 시설이다. 약 가로 세로 3m의 크기로 이루어져 있으며 자동 사료 급이시설 및 자동 오수 처리 시설을 갖춰 최소한으로 사람의 접근을 차단하였다.



*그림. 동거돈 실험의 모식도

결과

a) 임상증세

실험 개체는 접종 7일간 어떠한 고온의 발생도 확인되지 않았다. LMY-BP chimera 균주를 접종한 돼지는 나머지 비접종 돼지들과 차이를 보이지 않았다. 이후 28일 동안 7일 간격으로 측정한 체온에서 어떠한 개체도 고온(41도 이상) 혹은 저온(37도 이하)의 증세를 보이지 않았다. 또 실험 기간동안 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다.

체중은 모두 차이 없이 일정한 ADG(Average Daily Weight Gain)을 보였다.

b) 혈중 바이러스 양

LMY-BP chimera를 접종한 돼지는 14일에 혈중 바이러스가 탐지되었고 28일에 소멸하였다. 나머지 4두에서는 어떠한 혈중 바이러스도 탐지되지 않았다.

혈청에서 유래한 바이러스를 분리(isolation)해 PCR로 탐지하지 못한 혈중 바이러스의 존재를 확인하고자 혈청을 MARC cell에 접종하여 2회 계대를 진행하고 CPE와 IFA를 통해 바이러스의 분리 여부를 조사하였다.

실험 결과, 28일 동안 4두의 비접종 동거돈은 혈청에서 어떠한 바이러스도 확인되지 않았다.

c) 비강 분비물 내 바이러스 양

7, 14, 21, 28일 에 비강 분비물 속 바이러스의 존재를 realtime PCR로 확인하였다. 방법은 혈청 내 바이러스 역가와 동일하게 실험하였다. 실험결과, **접종 돼지를 포함한 어떠한 돼지에서도 바이러스가 확인되지 않았다.**

d) 혈청 Anti-PRRSV antibody level

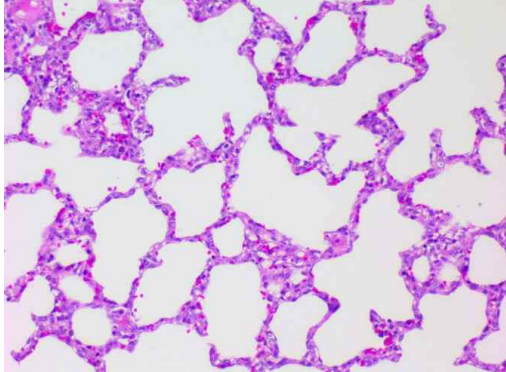
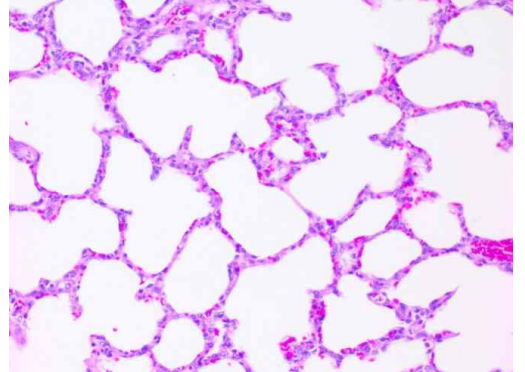
0,7,14,21,28일에 혈청에서 항체의 존재를 IDEXX 3X Anti-PRRSV antibody detection kit를 사용하여 혈청 내 항체의 존재를 확인하였다. LMY-BP chimera를 접종한 돼지에서 14일부터 항체가 탐지되었다. 그러나 4두의 비접종 동거돈에서는 어떠한 항체도 탐지되지 않았다.

d. 폐조직 병변 분석

4주 후 부검 결과, LMY-BP chimera를 접종한 돼지의 폐 병변은 나머지 4두의 동거돈과 차이를 보이지 않았다. 간질성 폐렴과 육안병변을 확인하지 못하였다. 간질성 폐렴 병변은 다음의 기준을 따라 평가하였다.

Level	score	비고
Normal	0	Alveolar wall의 어떠한 비후도 관찰되지 않음
Mild	1	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 10% 미만
Moderate multifocal	2	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 40% 미만
Moderate diffuse	3	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 80% 미만.
Severe	4	Air soc의 존재가 확인되지 않음. 혹은 출혈을 동반함.

*표. PRRSV에 의한 간질성 폐렴 병변 스코어링 기준

접종 4주 후	LMY-BP chimera	Sentinel
조직병변 score	0.3	0
조직병변 사진		

다) 후보균주의 면역원성 평가

1) LMY ver2, BP2017 ver2 heterologous / homologous challenge test.

SAVE를 적용한 균주의 백신으로서 효능을 평가하기 위해 Heterologous / Homologous challenge를 시험을 수행하였다. 공격접종에 사용한 균주는 다음과 같다.

균주명	복미 / 유럽형	Lineage
LMY-original	복미형	5
BP2017-original	복미형	5
SNU strain	복미형	1

*그림. 공격접종에 사용한 균주와 계통 분류

LMY, BP2017은 SAVE를 적용한 균주의 각각의 homologous challenge를 위해 사용하였다. SNU strain은 heterologous challenge를 위하여 사용하였다. 이 균주는 2000년대 초에 서울대학교 수의과대학에서 폐렴과 위축이 동반된 자돈에서 분리한 강병원성의 복미형 균주로서 이미 공격접종 실험에서 자돈에 심각한 간질성폐렴과 임상적인 질환을 유발하는 것이 확인된 균주이다. 실험에서는 MARC cell에서 5회 계대 배양한 것을 일괄적으로 사용하였다. ORF5를 기반으로 한 분류 체계상 Lineage 1에 속한다 [ref].

실험계획

접종 균주	test	투여량	마리수	일정(dpi)		
		TCID50	두	0w	4w	6w
LMY ver2	Heterologous challenge	5	5	접종	SNU strain challenge	5두 부검
LMY ver2	Homologous challenge	5	5	접종	LMY-original challenge	5두 부검
BP2017 ver2	Heterologous challenge	5	5	접종	SNU strain challenge	5두 부검
BP2017 ver2	Homologous challenge	5	5	접종	BP2017-original challenge	5두 부검
NC	-	-	5	-	-	5두 부검
PC1	Heterologous challenge	-	5	-	SNU strain challenge	5두 부검
PC2	Homologous challenge	-	5	-	LMY-original challenge	5두 부검
PC3	Homologous challenge	-	5	-	BP2017-original challenge	5두 부검

*표. 공격접종 실험 계획안

실험 결과

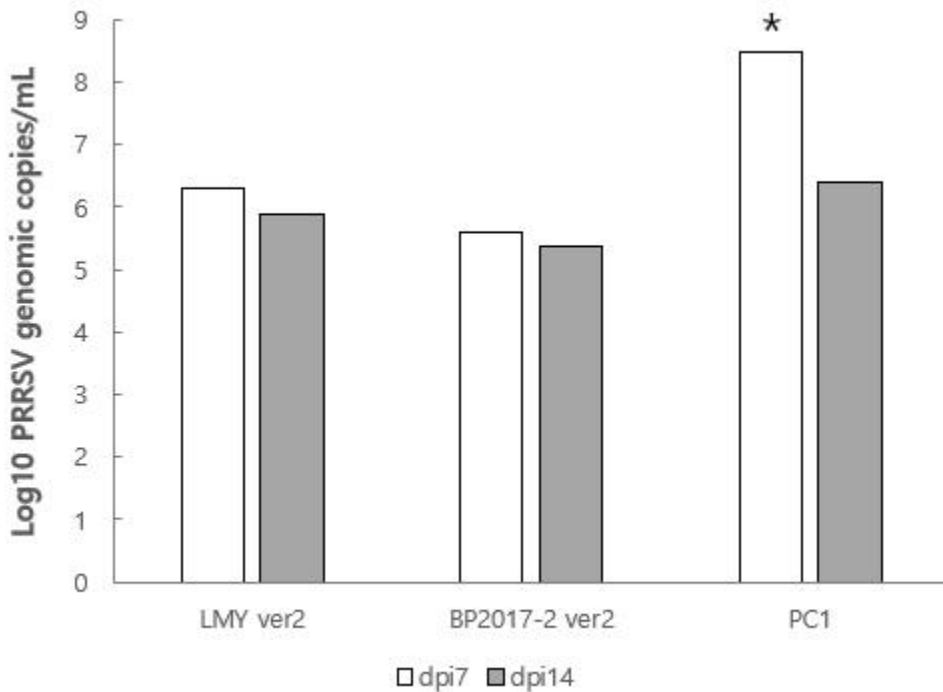
a) 임상증세

균주를 접종하고 4주 후 실시한 공격 접종 1,2,3일 후에 양성대조군은 BP2017-2를 접종한 경우를 제외하고 SNU strain과 LMY를 접종한 그룹이 음성대조군과 유의적으로 체온이 높았다. 양성대조군은 기침과 설사를 보이지 않았지만 일시적인 침울과 식욕부진을 보였다. SAVE를 적용한 백신 후보 균주(LMY ver2, BP2017 ver2)를 접종한 그룹은 음성대조군과 체온에 있어 유의적인 차이를 보이지 않았다. 후보균주를 접종한 그룹 간에는 임상적인 차이를 보이지 않았다. 체온과 ADG에서 차이를 보이지 않았다.

그룹 간의 유의성은 ANOVA test 후 사후 검정(Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다.

b) 혈중 바이러스 양

b-1) SNU strain (Heterologous challenge) 접종 결과

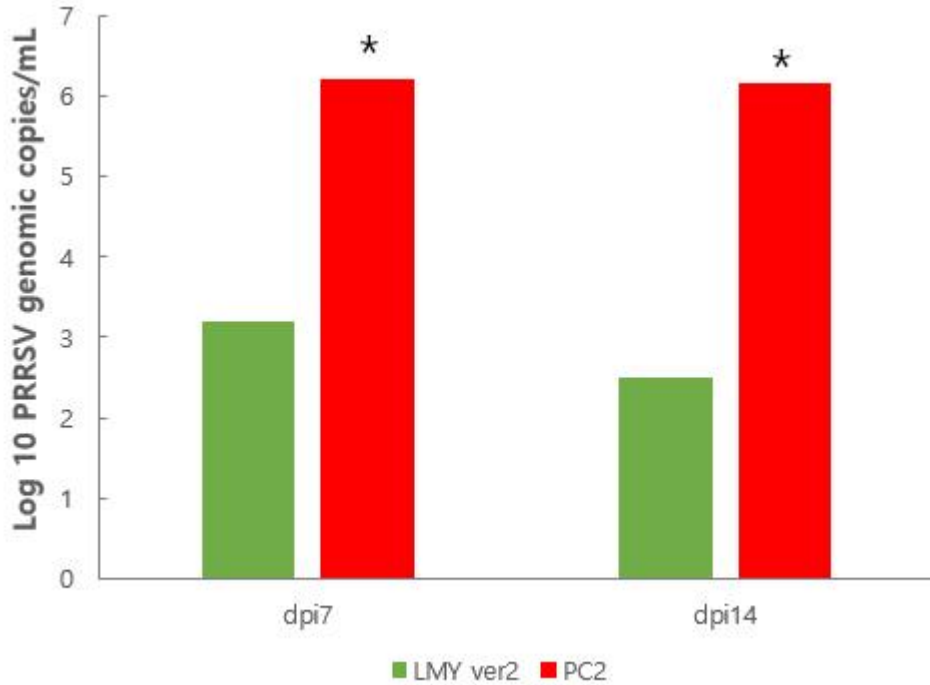


*그림. Heterologous challenge 7, 14일 후 혈중 바이러스 양

후보균주 LMY ver2와 BP2017 ver2를 접종한 그룹은 Heterologous challenge한 SNU strain에 대해서 접종 7일차에 유의적으로 양성 대조군에 비해 혈중 바이러스의 역가가 낮았다. 14일차에는 BP2017 ver2를 접종한 그룹만 양성 대조군보다 유의적으로 낮았다.

그룹 간의 유의성은 ANOVA test 후 사후 검정(Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다.

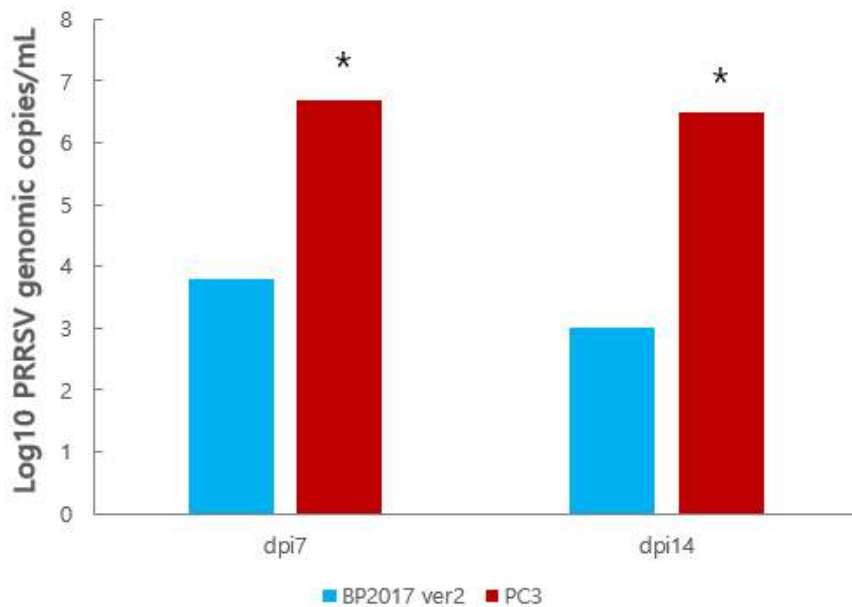
b-2) LMY strain (Homologous challenge) 접종 결과



*그림. LMY ver2 접종 그룹의 homologous challenge 7, 14일 후 혈중 바이러스 양

LMY ver2를 접종한 그룹은 Homologous challenge에 접종 7, 14일에 유의적으로 양성대조군에 비해 혈중 바이러스 역가가 낮았다. 약 1000배 감소효과를 보였다. 유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

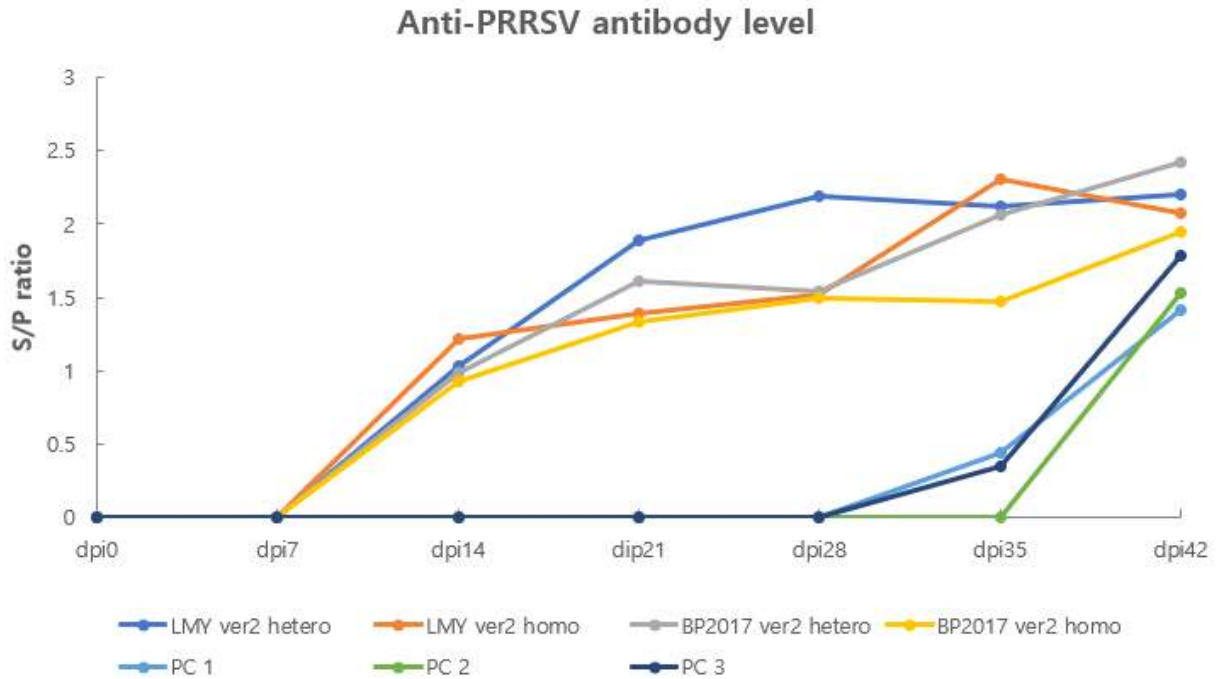
b-3) BP2017 strain (Homologous challenge) 접종 결과



*그림. BP2017 ver2 접종 그룹의 homologous challenge 7, 14일 후 혈중 바이러스 양

BP2017 ver2를 접종한 그룹은 Homologous challenge에 접종 7, 14일에 유의적으로 양성대조군에 비해 혈중 바이러스 역가가 낮았다. 약 1000배 감소효과를 보였다. 유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

c) 항체 역가

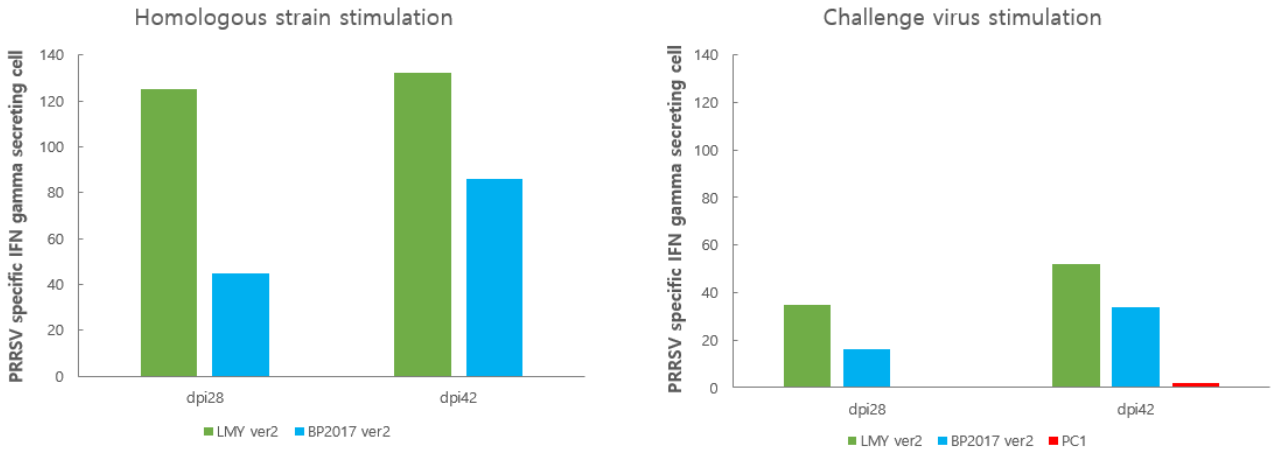


*그림. 실험 기간 동안 항체 역가의 변화

후보 균주를 접종한 그룹은 모두 14일차에 항체가 양성으로 전환되었다. 공격접종 전까지 그룹간의 차이는 보이지 않았다. 공격접종 이후 dpi28에 비해 dpi35에 LMY ver2를 접종하고 homologous challenge를 수행한 그룹의 항체 역가가 유의적으로 올라갔다. 모든 양성 대조군 또한 감염 14일에 양성으로 항체가 전환되었다.

그룹 간의 유의성은 ANOVA test 후 사후 검정(Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다. 공격접종한 SNU strain에 대한 중화항체 역가를 측정된 결과, 어떠한 돼지에서도 실험 종료까지 2이상의 항체 역가를 보이지 않았다.

d) ELISPOT



*그림. 접종 28, 42일 homologous / challenge virus로 각각 항원 자극했을 때 IFN gamma 분비 PMBC cell 개수 (10^6 cell당)

ELISPOT kit 이용하여 PRRSV 특이적인 IFN gamma 분비 세포의 개수를 측정하였다. 각각의 homologous strain으로 항원자극 하였을 때, LMY ver2를 접종한 그룹은 BP2017 ver2를 접종한 그룹에 비해 접종 28, 42(공격 접종 당일, 공격 14일 후)일에 유의적으로 높았다. 그러한 SNU strain으로 항원 자극한 경우 두 그룹은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다. ELISPOT 결과와 혈청 항원은 어떠한 상관관계도 보이지 않았다.

e) 병변 분석

e-1). 조직 병변 score

SNU strain으로 공격 접종 했을 경우, LMY ver2와 BP2017 ver2는 양성 대조군(PC1)에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 조직 병변 score를 보였다. 그러나, LMY ver2와 BP2017 ver2 두 그룹 간에는 유의성이 없었다.

homologous challenge로서 LMY를 공격 접종 했을 때, LMY ver2를 접종한 돼지들은 양성 대조군(PC2)에 비해 조직 병변 score가 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다. 또한, BP2017의 경우에도, BP2017-2 ver2를 접종한 돼지들은 양성 대조군(PC3)에 비해 간질성 폐렴 조직 병변 score가 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다.

LMY ver2를 접종한 후, heterologous challenge와 homologous challenge를 수행한 두 그룹을 비교해 보았다. LMY ver2는 SNU strain으로 공격 접종했을 때(heterologous challenge) LMY로 공격 접종 했을 때(homologous challenge)에 유의적으로 ($P < 0.05$) 높은 간질성 폐렴 병변을 보였다.

BP2017 ver2를 접종한 후, heterologous challenge와 homologous challenge를 수행한 두 그룹을 비교해 보았다. BP2017 ver2는 SNU strain으로 공격 접종했을 때(heterologous challenge) BP2017로 공격 접종 했을 때(homologous challenge)에 유의적으로 ($P < 0.05$) 높은 간질성 폐렴 병변을 보였다.

그룹간의 유의성은 분석한 스코어를 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 분석하였다.

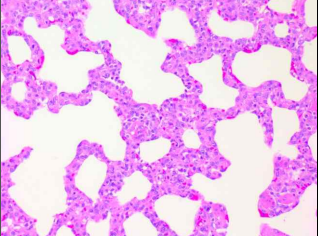
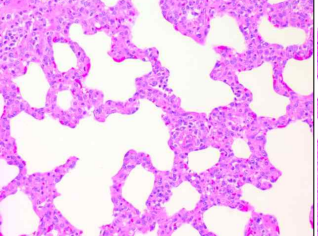
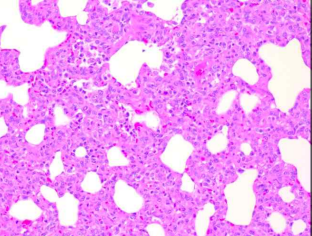
e-2). 조직 내 PRRS 항원 score

SNU strain 공격 접종 했을 경우, LMY ver2와 BP2017-2 ver2는 양성 대조군(PC1)에 비해 조직 내 PRRS 항원 score 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다. 그러나, LMY ver2와 BP2017-2 ver2 두 그룹 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

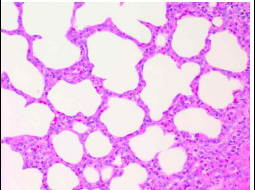
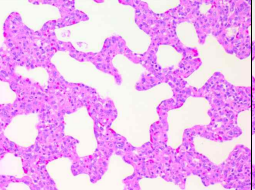
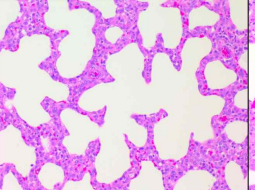
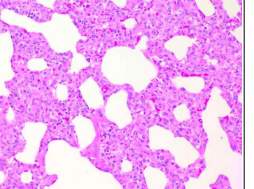
LMY를 공격 접종한 경우, LMY ver2는 양성 대조군(PC2)에 비해 조직 내 PRRS 항원 score가 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다. 또한, BP2017의 경우에도, BP2017 ver2를 접종한 그룹은 양성 대조군(PC3)에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 조직 내 PRRS 항원 score를 보였다.

LMY ver2를 접종한 후, heterologous challenge와 homologous challenge를 수행한 두 그룹을 비교해 보았다. LMY ver2는 heterologous challenge 보다 homologous challenge 상황에서 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 조직 내 PRRS 항원 score를 보였다.

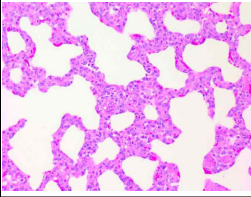
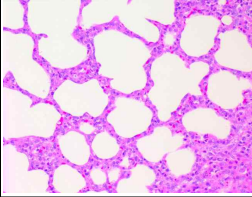
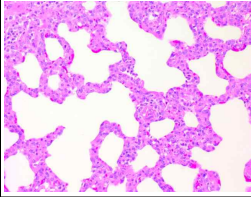
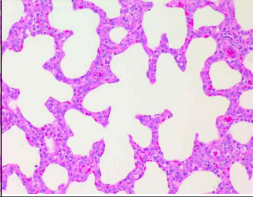
BP2017 ver2를 접종한 후, heterologous challenge와 homologous challenge를 수행한 두 그룹을 비교해 보았다. BP2017 ver2는 heterologous challenge 보다 homologous challenge 상황에서 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 조직 내 PRRS 항원 score를 보였다.

Heterogous challenge	LMY ver2	BP2017-2 ver2	PC1
조직병변 score	2.2±0.4	2.0±0	3.4±0.5
조직 내 PRRS 항원	24.8±5.0	23.4±5.5	42.6±7.5
조직병변 사진			

*표. Heterologous challenge 후 폐 조직 간질성 폐렴 비교

Homolgous challenge	LMY ver2	PC2	BP2017 ver2	PC3
조직병변 score	0.8±0.4	1.8±0.4	1.2±0.4	2.8±0.4
조직 내 PRRS 항원	15.2±6.1	21.0±7.2	14.2±4.8	31.8±6.9
조직병변 사진				

*표. Homologous challenge 후 폐 조직 간질성 폐렴 비교

Hetero vs Homo	LMY ver2 Hetero	LMY ver2 Homo	BP2017 ver2 Hetero	BP2017 ver2 Homo
조직병변 score	2.2±0.4	0.8±0.4	2.0±0	1.2±0.4
조직 내 PRRS 항원	24.8±5.0	15.2±6.1	23.4±5.5	14.2±4.8
조직병변 사진				

* . Heterologous vs Homologous challenge 후 조직 병변 차이 비교

결론 : SAVE를 적용하여 약독화 된 균주는 heterologous / homologous challenge 실험에서 대조군에 유의적으로 항원을 감소시키고 임상증세를 개선시키는 방어효능을 보여주었다. 그러나 heterologous 의 경우 공격한 바이러스의 증식을 완전히 막아내지는 못하였고 간질성 폐렴의 병변이 발생하였다.

2) LMY-Ala homologous challenge test.

LMY의 NSP1 beta 부위 128, 129번 아미노산을 Alanine으로 치환한 균주의 면역원성과 백신으로서 방어 효능을 평가하기 위한 homologous challenge 실험을 진행하였다.

실험계획

접종 균주	그룹명	투여량	마리수		일정(dpi)	
		TCID50	두	0w	4w	6w
LMY-Ala	T01	5	5	접종	LMY-original challenge	5두 부검
LMY-Ala	T02	5	5	접종	-	5두 부검
PC	T03	-	5	-	LMY-original challenge	5두 부검
NC	T04	-	5	-	-	5두 부검

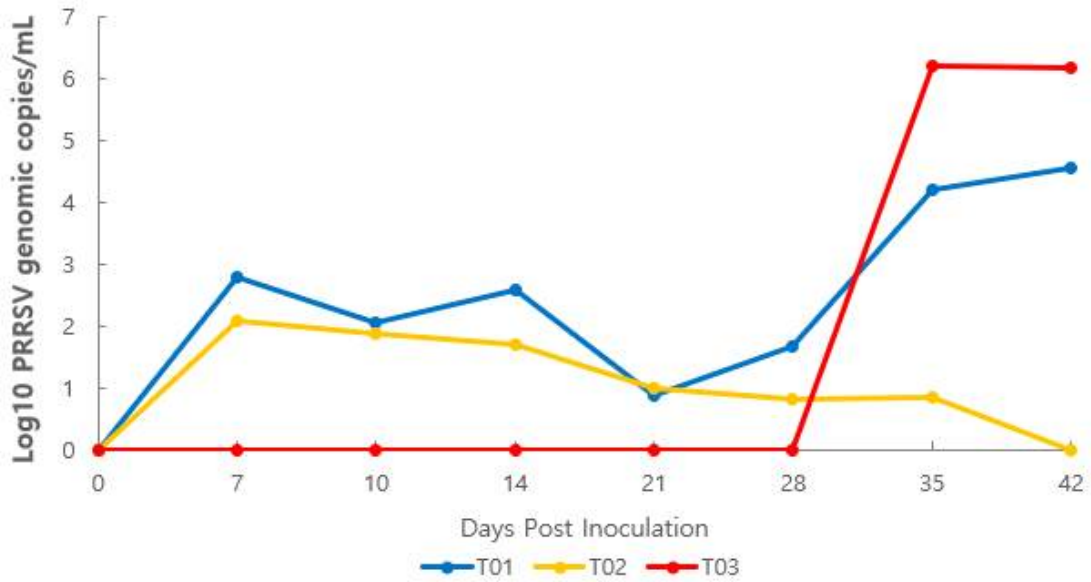
*표 LMY-Ala 공격접종 실험 계획안.

실험결과

a) 임상증세

LMY-Ala를 접종한 그룹은 접종 7일간 어떠한 체온의 상승도 관찰되지 않았다. 또한 공격 이후 후보균주를 접종한 그룹은 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다.

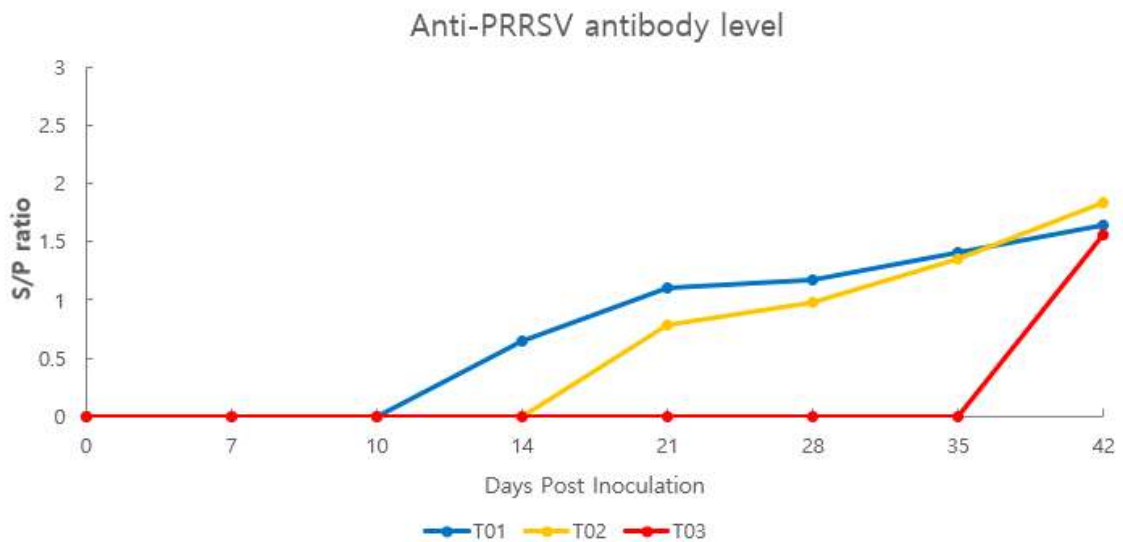
b) 혈중 바이러스 양



*그림. LMY-Ala 접종 이후 혈중 바이러스의 역가

LMY Ala 돼지에서 기존의 LMY에 비해 월등히 낮은 혈중 내 항원 양을 보였다(기존 자료 비교 분석 결과). 이 균주는 증식성이 LMY나 SAVE가 적용된 LMY ver2보다도 낮은 증식성을 가지는 것으로 보였다. 공격접종 이후 LMY-Ala를 접종한 그룹(T01)은 유의적으로 7, 14일에 양성 대조군 (T03)보다 낮은 혈중 바이러스 역가를 보였다.

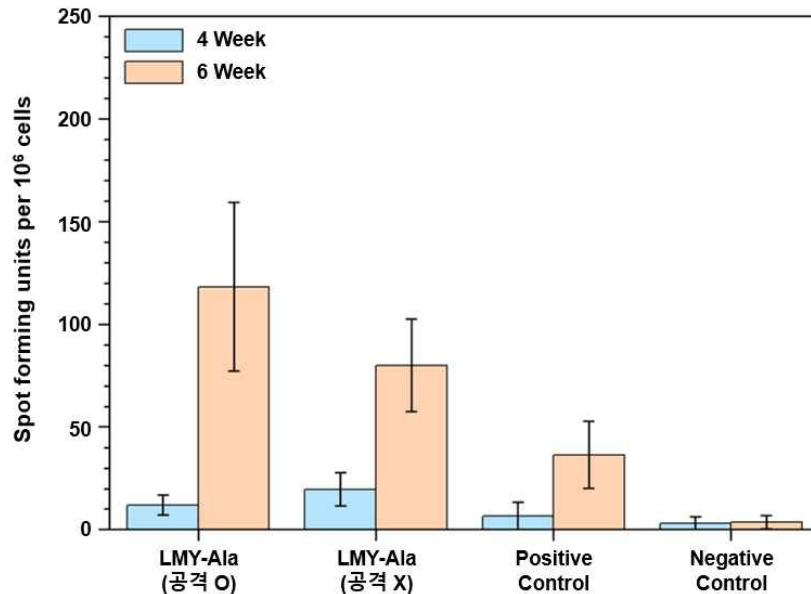
c) 항체 역가



*그림. LMY-Ala 접종 이후 항체가

여타의 PRRS가 감염 14일차에 대부분 항체가 양성으로 전환되는데 비해, LMY Ala를 접종한 돼지들 중 일부는 접종 21일 후에 전환되는 개체가 있었다.

d). ELISPOT



*그림. LMY-Ala 접종 이후 LMY 특이적인 IFN gamma 분비세포 수

LMY-Ala 접종하고 4주 동안 IFN gamma 분비세포의 그룹 별 차이는 확인되지 않았다. 공격접종 이후 2주 후 LMY-Ala를 접종한 그룹(T01,T02)에서 유의적으로 양성대조군(T03)에 비해 높은 IFN gamma 분비세포가 확인되었다. 그러나 T01과 T02 그룹에서도 dpi42(공격접종 14일후) 유의적인 차이가 없었다. T01은 LMY균주를 이용한 homologous challenge를 수행한 그룹이기 때문에 challenge를 하지 않은 T02와 차이가 나지 않은 것은 공격접종 전후의 유의적인 세포성 면역의 recall반응이라 할 수 없다.

e). Luminex Porcine cytokine assay

확인 가능한 cytokine IFN gamma, IFN alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF alpha, IL-12p40을 후보균주 접종 7일, 14일에 돼지의 혈액에서 분리한 혈청에서 측정하였다. 확인 결과 IL12를 제외한 대부분의 cytokine 분비가 극히 낮았으며 기대했던 type I IFN의 분비는 강화되지 못한 것을 확인하였다. 이는 매우 낮은 바이러스의 증식성과 관련이 있는 것으로 보인다.

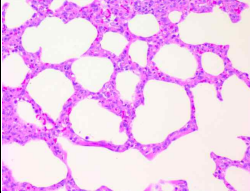
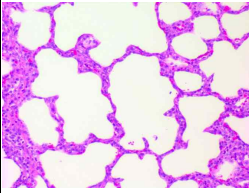
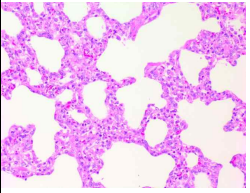
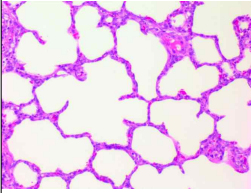
f). 병변 분석

f-1). 조직 병변 score

LMY-Ala만 접종한 그룹(T02)과 LMY-Ala 접종 후 공격 접종한 그룹(T01)은 조직 병변 score에서 유의적인 차이가 없었다. 그러나, LMY-Ala를 접종한 두 그룹(T01, T02)은 양성 대조군(T03)에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 간질성 폐렴 병변 score를 보였다.

f-2). 조직 내 PRRS 항원 score

LMY-Ala만 접종한 그룹(T02)과 LMY-Ala 접종 후 공격 접종한 그룹(T01)은 조직 내 PRRS 항원 score에서 유의적인 차이가 없었다. 하지만 LMY-Ala를 접종한 두 그룹(T01, T02)은 양성 대조군에 비해 조직 내 PRRS 항원 score가 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다.

	LMY-Ala C	LMY-Ala	PC	NC
조직병변 score	0.6±0.5	0.2±0.4	1.8±0.4	0±0
조직 내 PRRS 항원	10.4±3.36	2.2±3.5	21.0±7.2	0±0
조직병변 사진				

결론 : LMY-Ala는 homologous challenge 실험에서 유의적으로 항원을 감소시켰으며 백신으로서 방어효능을 보였다. 그러나 이 균주는 기대했던 type I IFN의 분비는 강화시키지 못했다. 또한 homologous challenge 결과를 이전의 LMY ver2 결과와 비교해보면 혈중 바이러스의 역가를 감소시키는 능력이 떨어지고 항체 양전 시기가 다소 늦은 것을 확인할 수 있다. 따라서 LMY-Ala는 백신 후보 균주로서 LMY ver2에 비해 유의미한 개선점을 확인할 수 없었다.

3) BP2017-2 부형제 평가(1).

TLR agonist인 HSPX를 BP2017-2 백신 후보 균주와 함께 접종하여 백신의 효능을 평가하기 위한 공격접종 실험을 실시하였다.

계획

접종 균주	투여량	마리수	일정(dpi)		
	TCID50	두	0w	4w	6w
BP2017-2	5	5	접종	공격접종	5두 부검
BP2017-2 HSPX	5	5	접종	공격접종	5두 부검
PC	5	5	접종	공격접종	5두 부검
NC	-	5	-	-	5두 부검

*HSPX는 Mycobacteria Tuberculosis의 Heat shock protein X를 대장균에서 발현한 것을 사용하였음.

*HSPX의 정제는 SDS PAGE상에서 확인하였고 western blot 기법으로 항원의 존재를 확인하였음.

*접종 당시 HSPX는 돼지 당 1mg을 접종하였음.

*공격접종은 Heterologous challenge로서 SNU strain을 접종하였음.

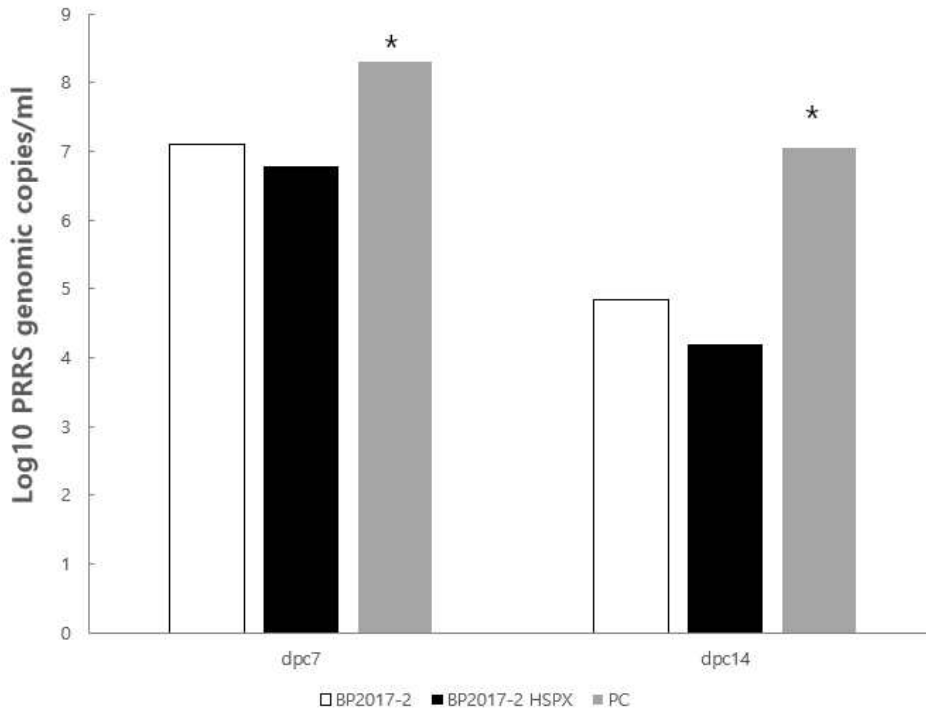
실험 결과

a) 임상증세

BP2017-2와 HSPX를 함께 접종한 돼지는 접종 이후 1시간동안 어떠한 고온의 발생도 확인되지 않았다.

접종 7일간 모든 그룹에서 어떠한 40.5도 이상의 고온이 발생하지 않았다. BP2017-2를 접종한 그룹은 실험기간 동안 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다. SNU strain을 공격 접종한 이후 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 접종 2일간 유의적으로 높은 체온을 보였으며 기침을 동반하지 않는 식욕부진을 보였다. 체중은 양성 대조군과 음성대조군 간의 유의적인 차이를 확인할 수 있었으나 BP2017-2군주를 접종한 그룹은 음성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

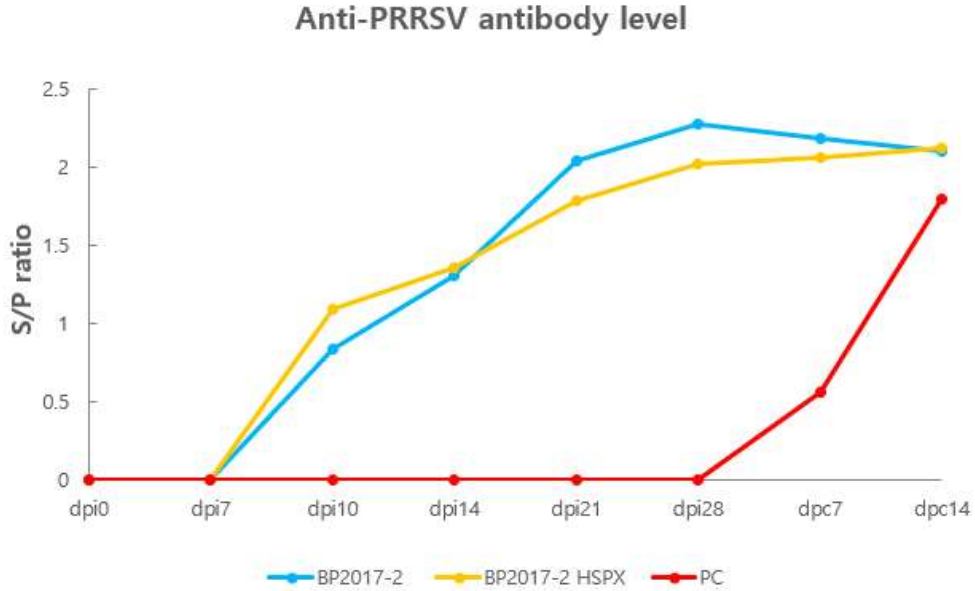
b) 바이러스 양



*그림. 공격접종 7일 14일에 혈중 바이러스 역가

BP2017-2를 접종한 그룹은 유의적으로 양성대조군에 비해 7, 14일에 혈중 항원의 양이 적었다. 그러나 두 그룹간의 차이는 보이지 않았다. 유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

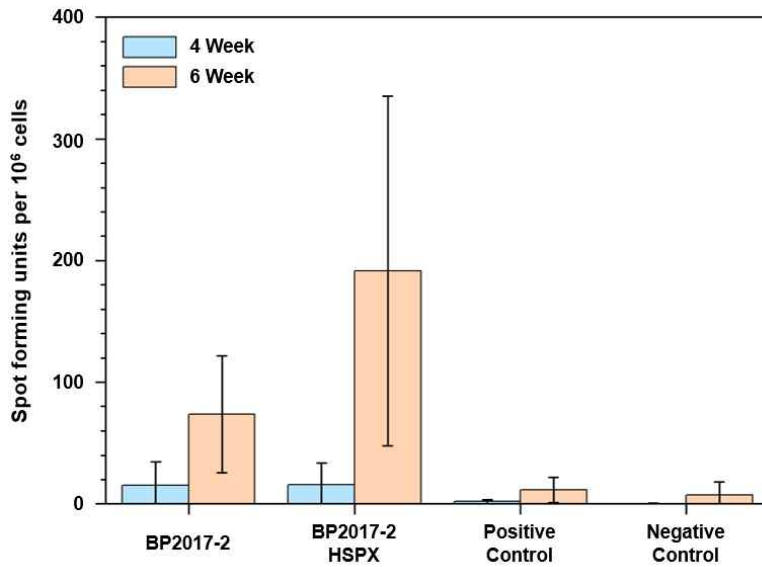
c) 항체 역가



* . BP2017-2 접종 이후 항체가

BP2017-2를 HSPX를 함께 접종한 경우와 그렇지 않은 경우를 비교한 결과 유의적인 항체가의 차이는 없었다. 양성 대조군은 접종 7일차에 양성으로 전환되었다. 유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

d) ELISPOT



*그림. BP2017-2 ver2 접종 이후 BP2017-2 특이적인 IFN gamma 분비세포 수

BP2017-2를 접종하고 4주 후 IFN gamma 분비세포를 ELIPOT 기법을 이용해 분석하였다. 접종 4주후 그룹 간의 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 접종 6주 후 (공격접종 이후 2주 후) BP2017-2를 접종한 그룹에서 유의적으로 대조군에 비해 높은 IFN gamma 분비 세포가 확인되었다. 그러나 HSPX에 의한 IFN

gamma 세포 증가는 확인되지 않았다. 그룹 내 일부 개체에서 매우 높은 반응을 보였으나, BP2017-2를 접종하고 HSPX를 접종한 그룹과 그렇지 않은 그룹의 통계적인 차이는 확인되지 않았다. 유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

e) Porcine cytokine Luminex assay

확인 가능한 cytokine IFN gamma, IFN alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF alpha, IL-12p40을 BP2017-2 접종 7일, 14일에 돼지의 혈액에서 분리한 혈청에서 측정하였다. 분석 결과, HSPX의 삽입이 혈중 cytokine의 분비 증감에 어떠한 영향도 주지 않았다.

f) 병변 분석

f-1). 조직 병변 score

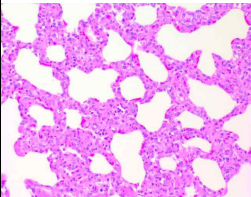
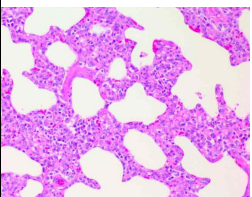
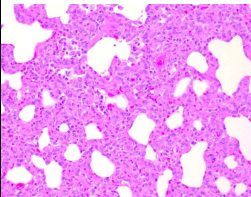
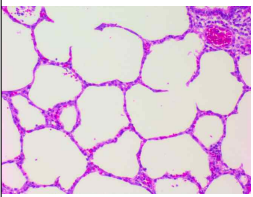
부검했을 때, BP2017-2를 접종한 그룹과 BP2017-2와 BSPX를 접종한 그룹은 공격 접종 후 부검했을 때, 조직 병변에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 하지만, 두 백신군과 양성 대조군을 비교하였을 때, 두 백신군은 양성 대조군에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 간질성 폐렴 병변을 보였다.

그룹간의 유의성은 분석한 스코어를 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 분석하였다.

f-2). 조직 내 PRRS 항원 score

폐 조직을 면역 염색하였을 때 보이는 PRRS 항원의 score를 분석해보면, BP2017-2와 BP2017-2 BSPX 두 그룹 사이에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 단, 후보군주 접종 없이 공격접종만 실시한 양성 대조군에 비해 조직 내 PRRS 항원 score가 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다.

유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

	BP2017-2	BP2017-2 BSPX	PC	NC
조직병변 score	2.4±0.5	2.2±0.4	3.6±0.5	0±0
조직 내 PRRS 항원	25.6±7.1	26.2±5.2	42.6±7.5	0±0
조직병변 사진				

결론 : 부형제로서 HSPX는 대장균에서 대량 생산이 가능하고 TLR agonist 로서 면역증강 능력이 보고된 물질이다. 백신 후보군주인 BP2017-2 ver2와 첨가해 접종한 실험에서 IFN gamma 분비를 증가시켰다. 그러나 공격 이후 감염 증상 및 혈중 바이러스의 유의미한 감소는 보여주지 못하였다.

4) BP2017-2 부형제 평가(2).

의한 효능이 미진하여 추가적으로 PRRS 생독백신에 사용가능한 면역원성을 강화시키는 것으로 알려진 Oil- adjuvant를 후보군주에 첨가하여 접종하여 그 면역강화 효능을 평가하였다. 실험에 사용한 부형제는 MVP corp사의 부형제로서 미국에서 PRRS 자가백신에 사용하는 Oil- adjuvant이다. 해당 제품은 HI, CMI 유도 능력이 탁월한 것으로 보고되어 있다 [ref].

계획

접종 군주	투여량	마리수	일정(dpi)		
	TCID50	두	0w	4w	6w
BP2017-2 ver2	5	5	접종	공격접종	5두 부검
BP2017-2 ver2 + Adjuvant A	5	5	접종	공격접종	5두 부검
PC	5	5	접종	공격접종	5두 부검
NC	-	5	-	-	5두 부검

*부형제의 첨가용량은 용법에 따라 전체 볼륨의 20%로 이내로 한정하였다.

*접종 전 충분한 교반 과정을 거쳐 접종하였다.

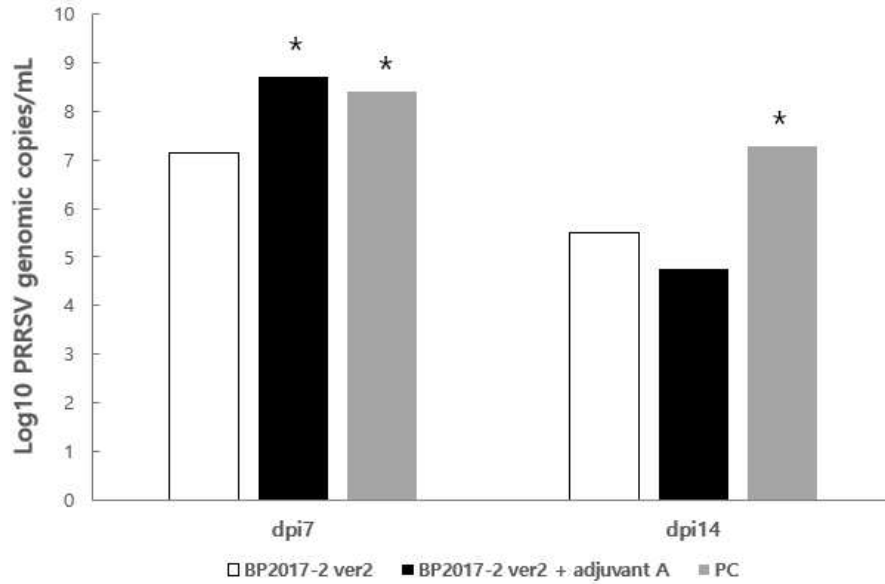
*공격접종은 Heterologous challenge로서 SNU strain을 접종하였음.

실험 결과

a). 임상증세

부형제를 첨가하여 BP2017-2 ver2와 접종한 그룹은 접종 7일간 어떠한 체온의 상승도 관찰되지 않았다. 또한 백신군은 임상적인 기침, 침울, 식욕부진, 및 설사 등의 어떠한 임상증세도 보이지 않았다. 공격접종 이후 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 접종 2일간 유의적으로 높은 체온을 보였으며 기침을 동반하지 않는 식욕부진을 보였다. 체중은 양성 대조군과 음성대조군 간의 유의적인 차이를 확인할 수 있었으나 후보군주를 접종한 그룹은 음성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

b). 혈중 바이러스 양

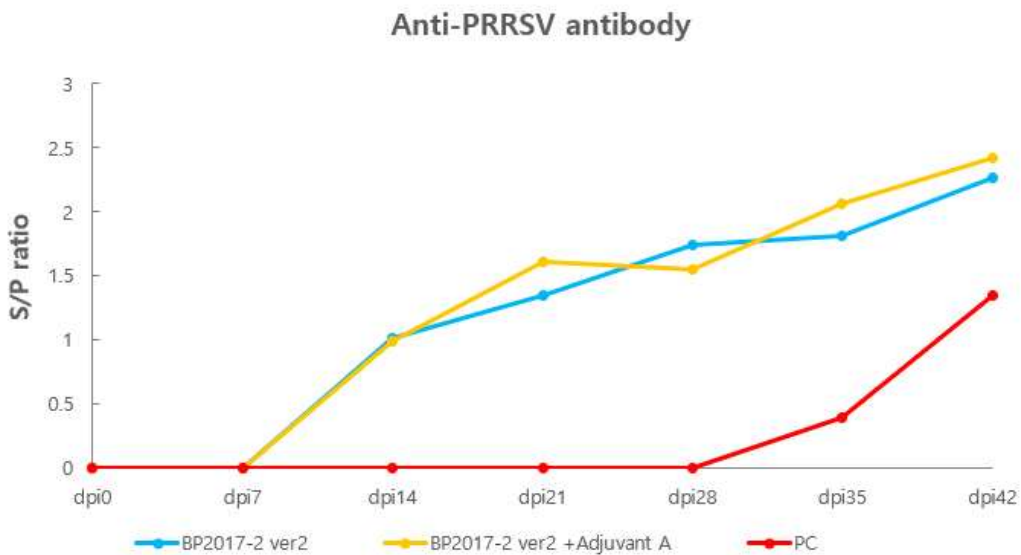


* . 공격접종 7일 14일에 혈중 바이러스 역가

공격 접종 7일 후 부형제를 첨가한 그룹은 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 양성대조군과 부형제를 첨가하고 BP2017-2 ver2를 접종한 그룹은 부형제를 첨가하지 않은 BP2017-2 ver2접종 그룹과 혈중 항원의 양에서 유의적인 차이를 보였다. 공격 14일 후, 양성대조군은 BP2017-2 ver2를 접종한 두 그룹과 유의적인 차이를 보였다.

유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

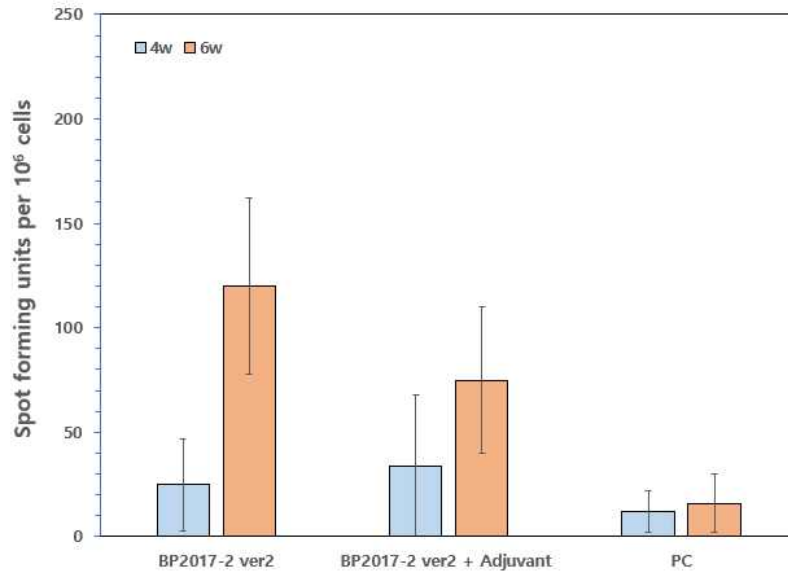
c) 역가



*그림. BP2017-2 접종 이후 항체가

첨가한 그룹과 부형제를 첨가하지 않은 그룹의 항체가 유의적인 차이는 확인할 수 없었다. 부형제는 항체에 유의미한 효과를 보이지 못하였다. 유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

d) ELISPOT



*그림. BP2017-2 ver2 접종 이후 BP2017-2 특이적인 IFN gamma 분비세포 수

BP2017-2 ver2를 접종하고 4주 후, IFN gamma 분비세포는 그룹간의 차이를 보이지 않았다. 접종 6주후 (공격접종 이후 2주 후) BP2017-2 ver2를 접종한 그룹에서 유의적으로 대조군에 비해 높은 IFN gamma 분비 세포가 확인되었다. 그러나 부형제에 의한 IFN gamma 분비 세포 증가는 확인되지 않았다.

e). 병변 분석

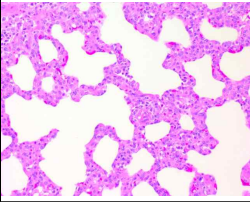
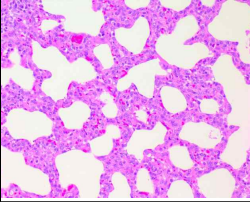
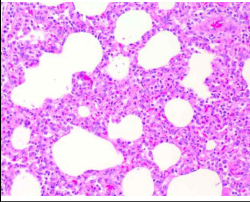
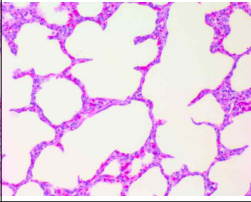
e-1). 조직 병변 score

BP2017-2 ver2를 접종한 그룹은 공격접종 후 부검했을 때, Ajuvant A를 첨가한 그룹과 양성 대조군에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 조직 병변 score를 보였다. 그러나 BP2017-2 ver2에 Ajuvant A를 첨가한 후 공격 접종한 그룹은 양성 대조군에 비해 간질성 폐렴 병변 score에서 유의적인 차이가 없었다.

그룹간의 유의성은 분석한 스코어를 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 분석하였다.

e-2). 조직 내 PRRS 항원 score

BP2017-2 ver2를 접종한 그룹은 폐 조직 내 PRRS 항원 score에서 Ajuvant A를 첨가한 그룹과 양성 대조군에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 감소된 수치를 보였다. 하지만, BP2017-2 ver2 없이 공격 접종만 실시한 양성 대조군과 BP2017-2 ver2에 Ajuvant A를 첨가한 그룹은 조직 내 PRRS 항원 score에서 유의적인 차이가 없었다.

	BP2017-2 ver2	BP2017-2 ver2 + Adjuvant A	PC	NC
조직병변 score	2.0±0	2.8±0.4	3.4±0.5	0±0
조직 내 PRRS 항원	22.4±3.6	33.8±6.7	43.4±7.2	0±0
조직병변 사진				

결론 : Oil- adjuvant는 백신 후보 균주인 BP2017-2 ver2의 유의미한 면역원성을 향상시키지 못하였다. 도리어 해당 부형제를 첨가한 돼지들은 공격 이후 공격접종 균주에 의한 병변과 항원을 감소시키지 못하였다.

5) LMY-BP chimera 최소면역원성 평가(항원량 결정 시험).

백신 후보 균주로서 LMY-BP chimera 균주의 최소면역원성을 평가 하였다. 용법은 TCID50를 기준으로 평가하였으며 최소 용법을 확인하고 이를 바탕으로 백신의 적정 함유용량을 정하는 것을 목표로 하였다.

실험계획

그룹	접종 균주	투여량	마리수	일정(days post inoculation)		
		TCID50	두	0	3w	4w
1	LMY-BP chimera	3.8	4	백신접종	공격접종	부검
2	LMY-BP chimera	2.8	4	백신접종	공격접종	부검
3	LMY-BP chimera	1.8	4	백신접종	공격접종	부검
4	PBS	-	4	PBS접종	공격접종	부검

*공격접종은 VR2332로 수행하였음

*LMY-BP chimera의 구조 단백질 ORF5는 VR2332와 99.3% 상동성을 가짐.

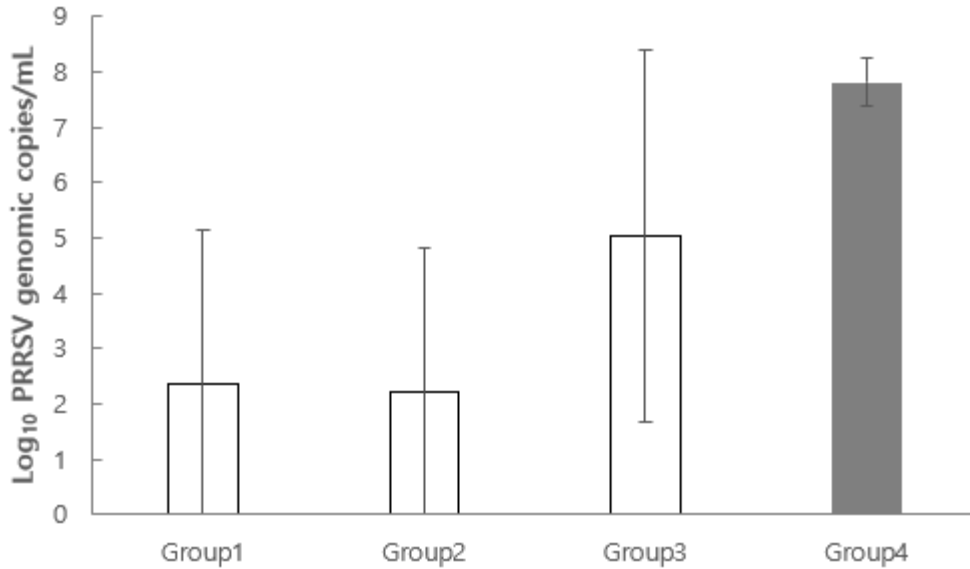
실험결과

a). 임상증상

백신 접종 21일 후에 VR2332 균주로 공격접종하였다. 이후 7일 동안 백신 접종군의 체온은 38.5° C~40.5° C 사이의 정상 체온을 보였다. 그러나 양성 대조군(그룹4)과도 유의적인 차이를

보이지 않았다. 이는 VR2332가 병원성 균주로서 체온을 올리지 못한 이유 때문인 것으로 보인다. 양성 대조군에서도 40.5° C 이상의 고온을 보인 돼지는 없었다. 그룹 간의 통계적 차이는 ANOVA test 후 사후 검정(Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다.

b) 혈중 바이러스 역가

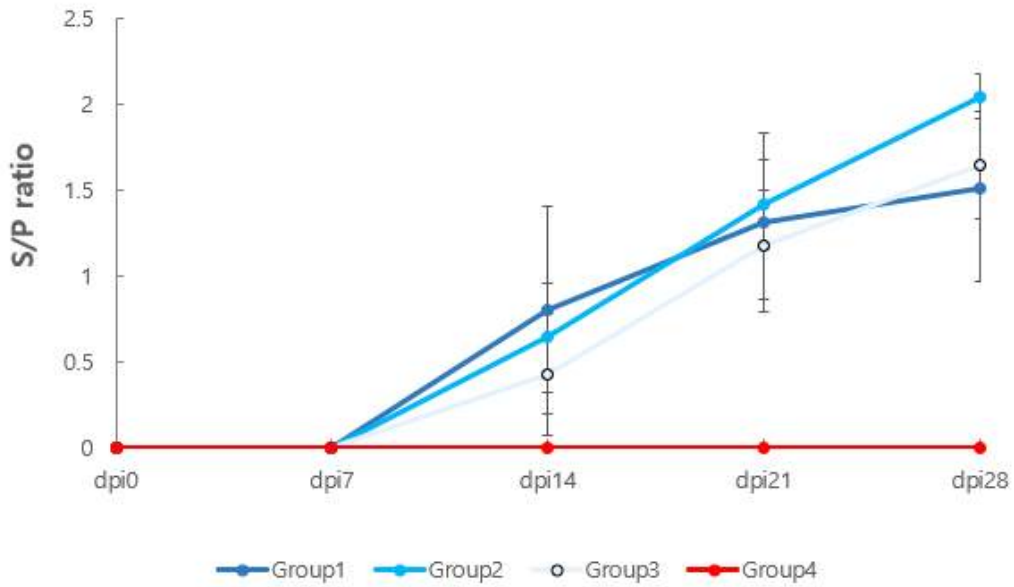


*그림. 공격 접종 7일 후 혈중 바이러스 역가

공격 접종 이후 혈청에서의 Real Time-PCR을 통한 항원량을 측정하였다. PCR은 공격 접종한 바이러스에 특이적인 primer를 이용하여 백신 균주와 구분되게 탐지하였으며 위의 결과는 공격 접종한 바이러스 VR2332 의 항원 수치를 의미한다. 모든 백신 접종군 (그룹1,2,3)은 양성 대조군(그룹4)에 비해 낮은 항원량을 보였다. TCID 2.8 이상 역가의 백신 접종군(그룹1,2)은 양성 대조군(그룹4)과 유의적인 차이를 보였다. 그룹 간의 통계적 차이는 ANOVA test 후 사후 검정(Tukey t-test)을 통해 유의성을 확인하였다.

c). 항체 역가

Anti PRRSV antibody level



*그림. 접종 이후 항체가

LMY-BP chimera 접종 이후 14일 시점에서 그룹1,2는 100%항체 양전율을 보이고 3번 그룹은 75%양전율을 보였다. 21일차에 LMY-BP chimera를 접종한 돼지는 모두 항체 양성을 보였다. 대조군은 실험 종료 까지 음성이었다.

d). 병변 분석

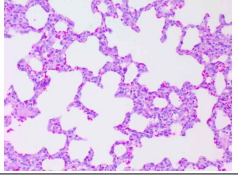
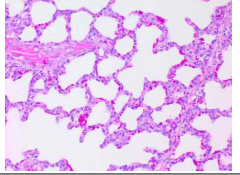
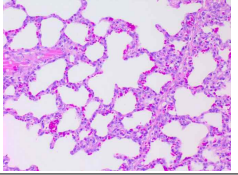
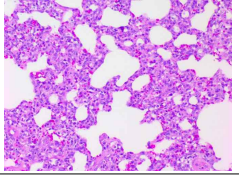
d-1). 조직 병변 score

LMY-BP chimera 접종한 그룹은 공격접종 후 부검했을 때, 접종량에 상관없이 양성 대조군에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮은 조직 병변 score를 보였다.

그룹간의 유의성은 분석한 스코어를 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 분석하였다.

d-2). 조직 내 PRRS 항원 score

BLMY-BP chimera를 접종한 그룹은 공격접종 후 부검했을 때, 접종량에 상관없이 양성 대조군에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 감소된 수치를 보였다.

	Group1 (TCID50 : 3.8)	Group1 (TCID50 : 2.8)	Group1 (TCID50 : 1.8)	Group4 (PC)
조직병변 score	0.8±0.6	0.6±0.2	1.1±0.5	2.2±0.1
조직 내 PRRS 항원	6.5±6.6	7.2±1.8	12.5±5.3	25.1±2.3
조직병변 사진				

결론 : TCID50 1.8 이상의 백신 접종군은 접종 2주 후부터 PRRS에 특이적인 항체 양전을 보였다. 백신 접종 3주 이후의 homologous challenge 결과에서 유의적으로 공격 접종한 바이러스 VR2332의 혈청 항원 수치를 감소시켰고, 폐조직 간질성 폐렴 병변을 감소시켰다. 따라서 항체가와 항원 감소 효과, 및 조직 병리적인 분석 결과를 통해 백신균주는 TCID50 1.8 이상 접종의 경우 유의미한 방어효능을 보유하는 것으로 확인하였다. 본 실험을 바탕으로 실제 시험백신과 제품은 그 100배인 TCID50 3.8 이상의 함량을 포함할 것을 결정하였다.

6) LMY-BP chimera heterologous challenge test.

백신 후보균주 LMY-BP chimera의 백신으로서의 면역원성과 방어효능을 평가하기 위한 공격접종 실험을 수행하였다.

실험계획

그룹	접종 균주	투여량	마리수		일정	
		TCID50	두	0w	4w	6w
백신군	LMY-BP chimera	3.8	5	접종	공격접종	부검
양성대조군	PBS	-	5	접종	공격접종	부검
음성대조군	PBS	-	5	접종	공격접종	부검

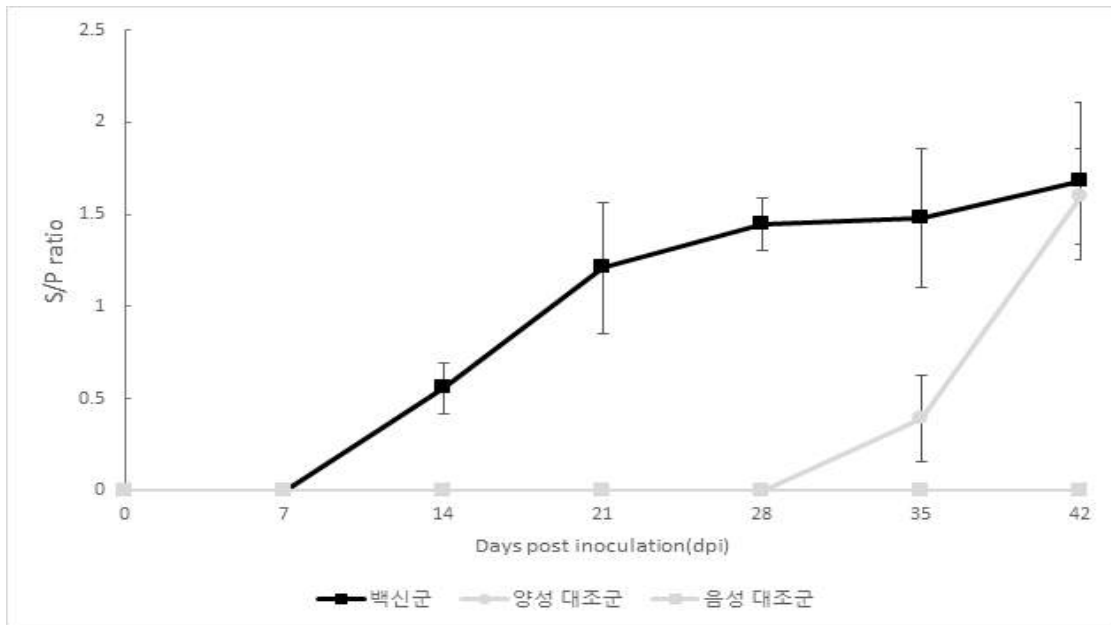
*PRRS, PCV2에 항원 항체 음성인 건강한 3주령 이유자돈 5두의 이근부에 후보균주를 3.8 (TCID50) 역가로 2mL 접종하였음.

*공격 접종은 백신 접종 4주 후 Heterologous strain 인 SNU strain 균주(TCID50 5역가, 3ml)를 비강으로 접종함.

실험 결과

a) 항체 역가

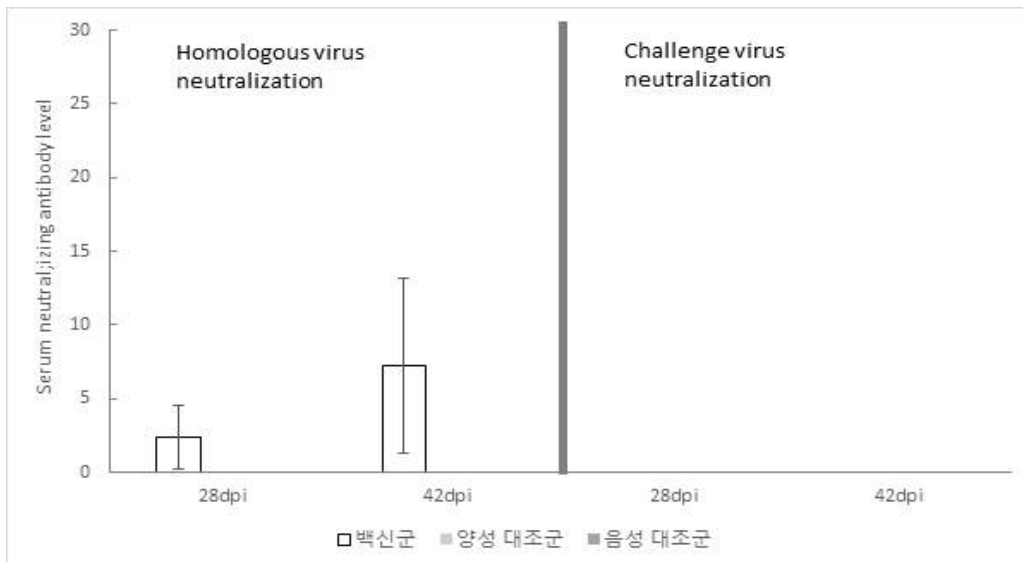
a-1) ELISA S/P ratio



*그림. 접종 이후 항체가

LMY-BP chimera를 접종한 이후 14일까지 모든 접종 돼지의 항체가 양성으로 전환되었다. 접종 28일 이후 실험 종료까지 일정 수준으로 유지 되었다. 양성대조군은 공격 이후 7일 차부터 돈군의 80%가 항체 양성으로 전환되었고 14일 차에 100% 양성으로 전환되었다. 음성 대조군은 실험 종료까지 음성이었다.

a-2) 혈청 중화항체

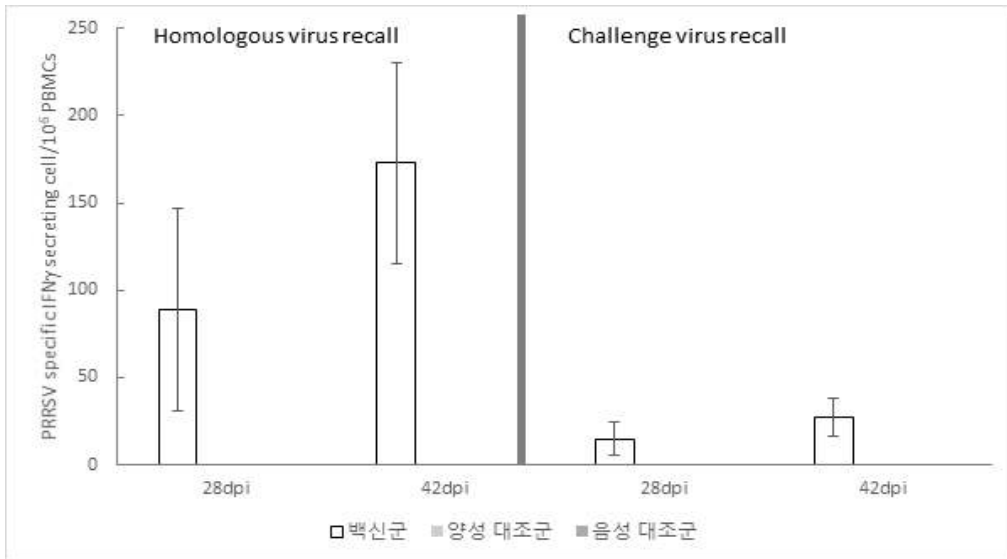


*그림. 접종 28, 42일 후 중화항체 역가

LMY-BP chimera 접종 이후 28일(공격접종 당일), 42일(공격접종 14일)에 측정된 중화항체는 백신 접종군에서만 미약하게 확인되었다. 28일에 백신군의 3마리의 개체에서 homologous strain에 대한 중화항체가 확인되었고(평균 역가 5 이하) 42일에 4마리에서 확인되었다 (평균

역가 5이상). Challenge virus에 대한 중화항체는 전혀 확인되지 않았다. 양성대조군과 음성대조군에서는 어떠한 중화항체도 확인되지 않았다.

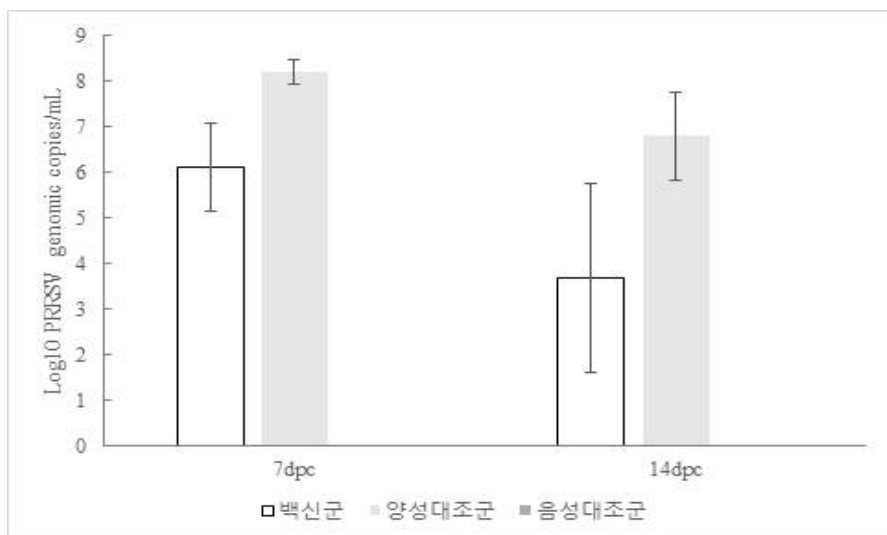
b) ELISPOT



*그림. 접종 이후 28, 42일 PRRS 특이적인 IFN gamma 분비 세포

LMY-BP chimera 접종 이후 28일(공격접종 당일), 42일(공격접종 14일)에 측정된 PRRS 특이적인 IFN gamma 분비세포는 백신군에서 확인되었다. 백신군은 homologous strain에 반응하는 평균 80여개 이상의 IFN gamma 분비세포가 확인되었다. Challenge virus에 반응하는 IFN gamma 분비세포는 28일에 평균 20개 이하에서 42일경에 30개 수준으로 증가 하였다. 양성대조군과 음성대조군에서는 어떠한 IFN gamma 분비세포도 확인되지 않았다.

c) 혈청 내 공격접종 바이러스 항원 검사



*그림. 공격 접종 이후 혈청 바이러스 역가

공격 접종 7, 14일 이후 PRRS 바이러스의 혈청 내 항원의 양은 백신군이 양성 대조군에 비해

유의적으로 감소하였다. 백신군의 혈청 내 바이러스의 양은 양성 대조군에 비해 평균 83배에서 182배 감소하였다. 음성 대조군에서는 어떠한 바이러스도 검출되지 않았다. 유의성 검사는 개체별 항원량 합계를 사용하지 않고, 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

d) 폐 조직 병변 분석

d-1). 병변 score

폐조직의 간질성 폐렴 병변을 분석한 결과, 백신군이 양성 대조군에 비해 유의적으로 낮은($P < 0.05$) 수치를 보였다.

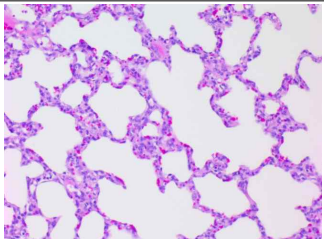
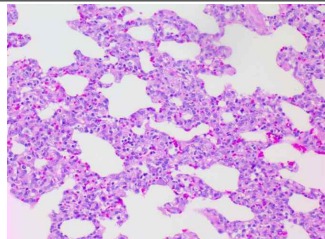
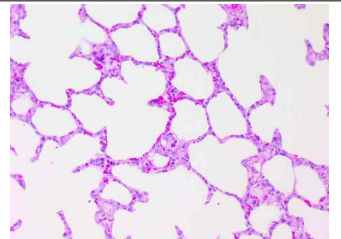
그룹간의 유의성은 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 유의성을 분석하였다.

d-2). 조직 내 PRRS 항원 score

폐 조직의 항원 개수는 백신군이 양성 대조군에 비해 유의적으로 낮은($P < 0.05$) 수치를 보였다.

항체에 염색된 세포의 개수를 바탕으로 분석하였으며 조직 슬라이드 상의 0.95mm^2 사이즈 당 양성 세포의 수를 확인하였다.

유의성 검사는 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

	백신군	양성 대조군	음성 대조군
조직병변 score	1.2 ± 0.5	2.8 ± 0.2	0 ± 0.1
조직 내 PRRS 항원	9.5 ± 4.4	29.3 ± 6.2	0
조직병변 사진			

결론 : 백신군주로서 LMY-BP chimera는 병원성을 보유한 heterologous strain에 대해 유의미한 방어 효능을 보유하고 있다. 그러나 공격한 바이러스의 증식 자체를 막아내지 못하였다.

7) LMY-BP chimera 부형제 평가.

백신 후보 균주 LMY-BP chimera의 면역원성을 향상시키기 위한 부형제 첨가 실험을 진행하였다. 두 종류의 TLR agonist를 동시에 백신 바이러스와 혼합하여 접종한 뒤, 유도되는 HI 와 CMI를 비교 분석하였다.

실험계획

접종 균주	그룹명	부형제	투여량	마리수		일정(dpi)		
			TCID50	두	0w	4w	6w	
LMY-BP chimera	T01	A+B	5	5	접종	heterologous challenge	5두 부검	
LMY-BP chimera	T02	-	5	5	접종	heterologous challenge	5두 부검	
PC	T03	-	-	5	-	-	5두 부검	
NC	T04	-	-	5	-	-	5두 부검	

* A와 B를 동일한 용량으로 혼합하여 접종하였음.

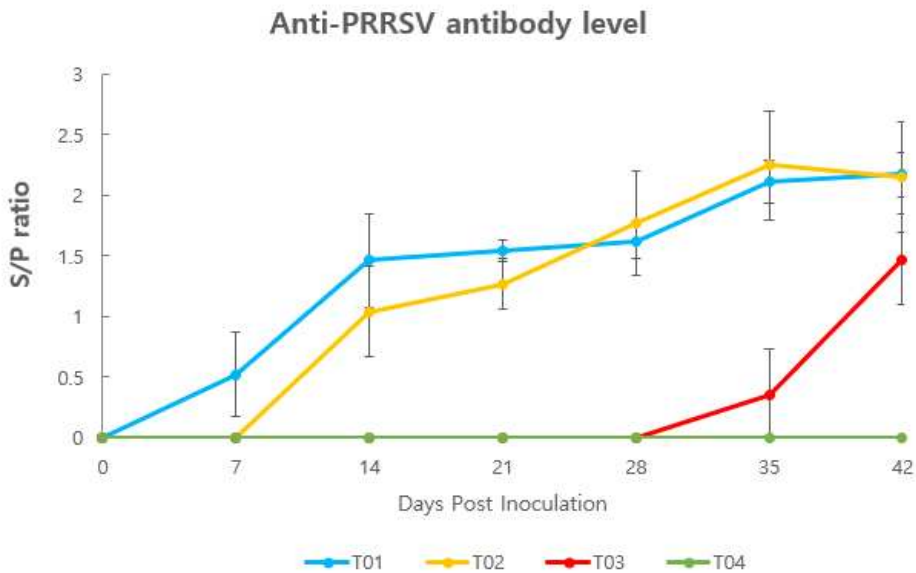
*부형제의 정제는 SDS PAGE상에서 확인하였고 western blot 기법으로 항원의 존재를 확인하였음.

*공격접종은 Heterologous challenge로서 SNU strain을 접종하였음.

실험 결과

a) 항체 역가

a-1) ELISA S/P ratio



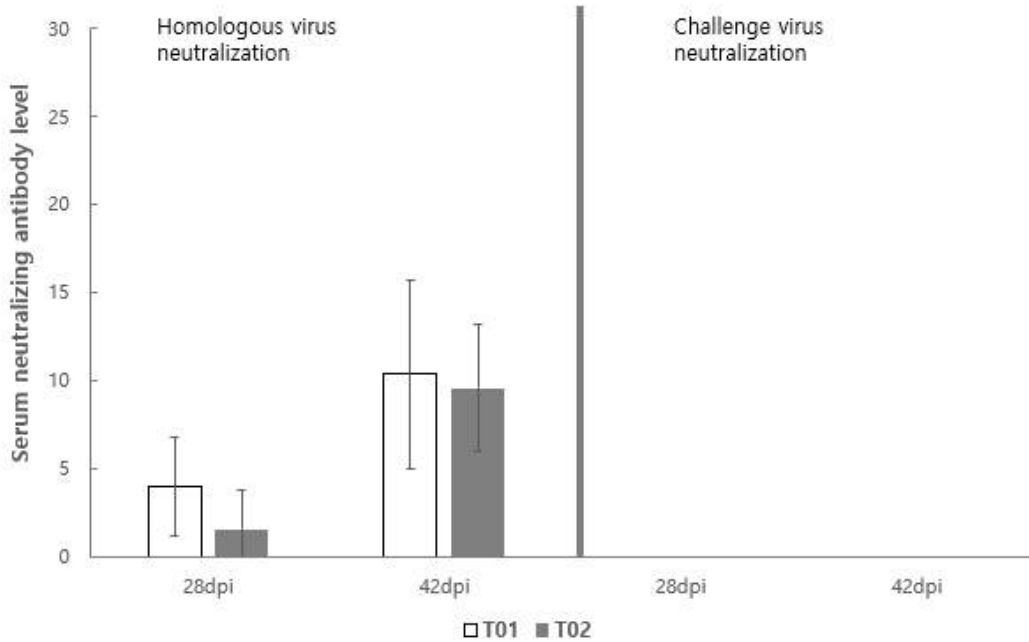
*그림. 접종 이후 항체가

LMY-BP chimera를 접종한 이후 14일까지 모든 접종 돼지의 항체가 양성으로 전환되었다. 흥미롭게도 접종 7일 후 부형제를 첨가해 접종한 그룹(T01)은 유의적으로 부형제를 첨가하지 않은 그룹(T02)보다 높은 항체가를 보였다. 5마리 중 4마리의 항체가 양전되었다. 접종 14일까지 부형제 첨가해 접종한 그룹은 부형제를 첨가하지 않은 그룹보다 높은 항체가를 보였으나, 21일 이후부터 차이를 보이지 않았다. 양성대조군은 공격 이후 7일 차부터 평균의 60%가 항체 양성으로 전환되었고 14일 차에 100% 양성으로 전환되었다. 음성 대조군은 실험

종료까지 음성이었다.

유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

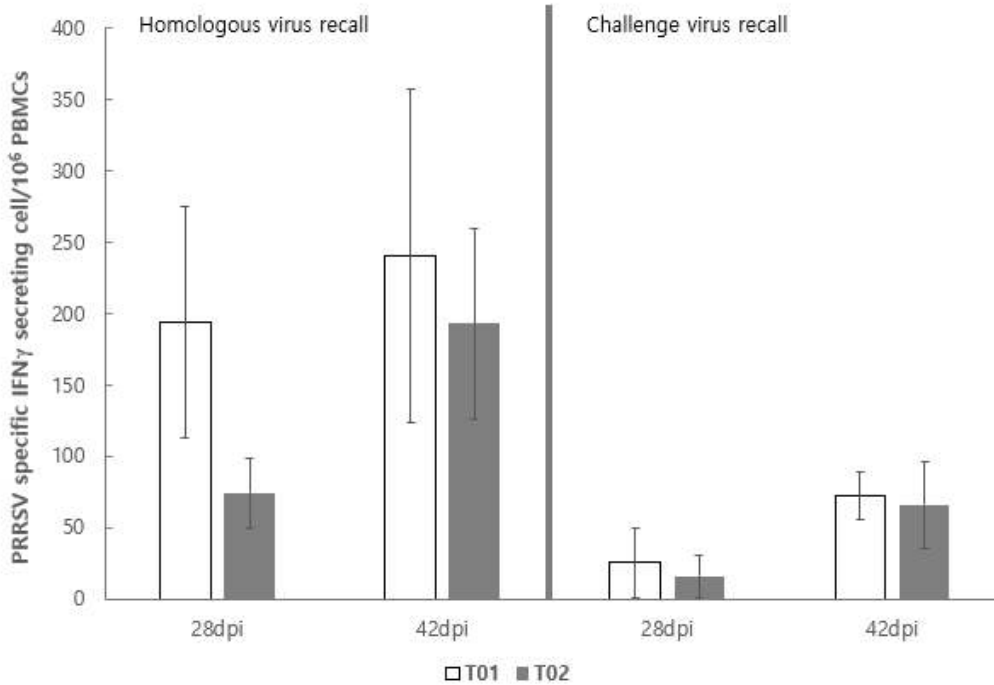
a-2) 혈청 중화항체



*그림. 접종 28, 42일 후 중화항체 역가

백신 바이러스인 LMY-BP chimera 접종 이후 28일(공격접종 당일), 42일(공격접종 14일)에 측정된 중화항체는 부형제의 첨가 유무에 관계없이 미약하게 확인되었다. 두 그룹(T01, T02)간의 유의적인 차이는 확인되지 않았다. Challenge virus에 대한 중화항체는 전혀 확인되지 않았다. 양성대조군과 음성대조군에서는 어떠한 중화항체도 확인되지 않았다.

b) ELISPOT

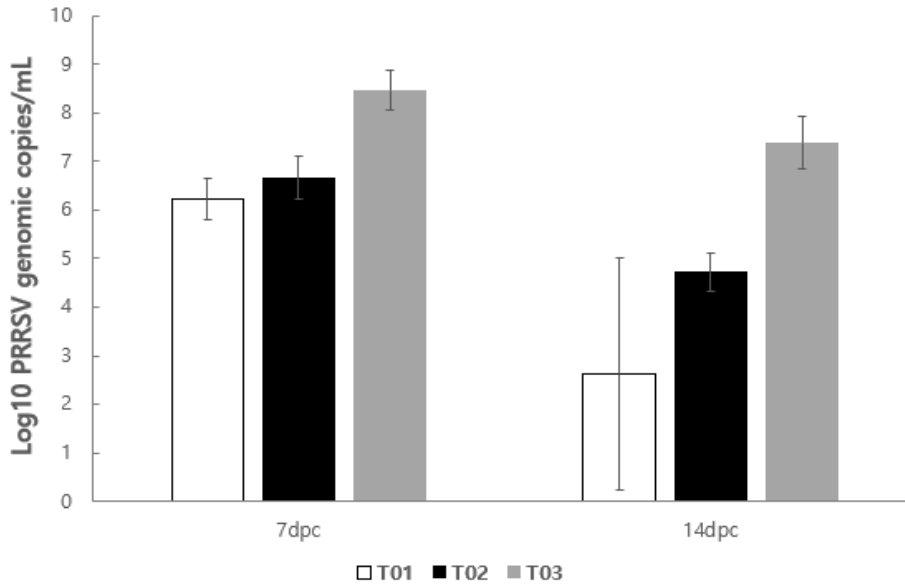


*그림. 접종 이후 28, 42일 PRRS 특이적인 IFN gamma 분비 세포

백신 바이러스인 LMY-BP chimera 접종 이후 28일(공격접종 당일), 42일(공격접종 14일)에 측정된 PRRS 특이적인 IFN gamma 분비세포는 백신군에서 확인되었다. 부형제를 첨가한 그룹(T01)은 접종 이후 28일에 homologous strain에 반응하는 IFN gamma 분비세포가 유의적으로 부형제를 첨가하지 않은 백신군(T02)에 비해 높은 것이 확인되었다. 그러나 42일(공격접종 14일)에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. Challenge virus에 반응하는 IFN gamma 분비세포는 두 그룹이 차이를 보이지 않았다. 양성대조군과 음성대조군에서는 어떠한 IFN gamma 분비세포도 확인되지 않았다.

유의성은 그룹 내 개체의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

c) 혈청 내 공격접종 바이러스 항원 검사



*그림. 공격 접종 이후 혈청 바이러스 역가

공격 접종 7, 14일 이후 PRRS 바이러스의 혈청 내 항원의 양은 두 백신군(T01, T02)이 양성 대조군(T03)에 비해 유의적으로 감소하였다. 부형제를 첨가한 백신군(T01)은 부형제를 첨가하지 않은 대조군(T02)와 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 낮은 혈청 바이러스 역가를 보였다. 흥미롭게도 14일에 부형제를 첨가한 백신군의 돼지 2두에서는 바이러스가 검출되지 않았다. 음성 대조군에서는 어떠한 바이러스도 검출되지 않았다.

유의성 검사는 개체별 항원량 합계를 사용하지 않고, 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

d) 폐 조직 병변 분석

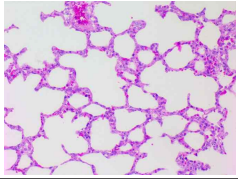
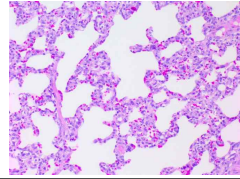
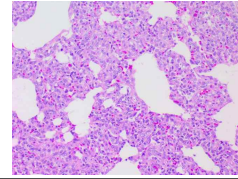
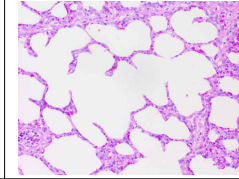
d-1). 병변 score

폐조직의 간질성 폐렴 병변을 분석한 결과, 두 백신군 (T01, T02)은 양성 대조군에 비해 유의적으로 낮은($P < 0.05$) 수치를 보였다. 두 백신 군의 조직병변 상의 차이는 보이지 않았다. 그룹간의 유의성은 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 유의성을 분석하였다.

d-2). 조직 내 PRRS 항원 score

폐 조직의 항원 개수는 두 백신군(T01, T02)이 양성 대조군에 비해 유의적으로 낮은($P < 0.05$) 수치를 보였다. 두 백신군의 조직 내 항원의 차이는 보이지 않았다. 항체에 염색된 세포의 개수를 바탕으로 분석하였으며 조직 슬라이드 상의 0.95mm^2 사이즈 당 양성 세포의 수를 확인하였다.

유의성 검사는 그룹 내 개체의 항원량 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

	T01	T02	T03	T04
조직병변 score	0.7±0.2	1.1±0.3	3.1±0.4	0
조직 내 PRRS 항원	4.1±0.9	8.9±4.3	31.1±3.1	0
조직병변 사진				

결론 : 부형제의 효과를 확인하기 위한 공격접종 실험 결과, 부형제는 유의적으로 항체를 상승시키고 PRRS에 특이적인 IFN 감마의 분비를 증가시키는 등의 면역학적 지표를 개선시키는 것을 확인하였다. 다만 중화항체를 높이지는 못하였다.

공격접종한 바이러스의 증식을 감소시키는 효과가 있었으나, 이전의 실험과 마찬가지로 바이러스가 가장 급성으로 증식하는 시기인 공격 7일차의 바이러스의 항원을 일부 감소시키는데 그쳤다. 다만 공격 14일차에 일부 돼지에서 항원이 소멸하고 병변이 매우 감소한 것으로 미루어, 보다 빠르게 공격 접종한 바이러스의 clearance 에 도달할 수 있는 가능성을 보여주었다.

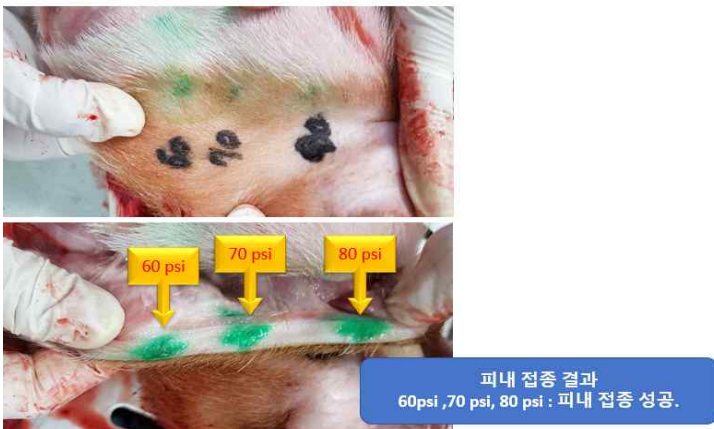
*** 피내 접종 예비 실험 (Intradermal Injection test)**

가스 충전식 피내접종기를 이용한 안정적인 백신 주입을 평가하였다.

대상 동물 : 3주령, 6kg 내외 햄프셔 거세돈

주사액 : 액상 식용 녹색 색소

압력 (psi)	주사부위		
	견갑부위	이근부	몸통
60	실패	성공	실패
70	성공	성공	실패
80	성공	성공	실패



시험 결과, 안정적으로 백신 접종 일령인 3주령 자돈에 피내 주사하기 위해서는 접종 부위를 이근부에 60~80psi의 압력으로 접종하는 것이 중요함을 확인하였다.

피내 주입의 특성상 매우 적은 양이 주입되고 일반 근육 주사와 달리 실제 주입 여부를 확인하는 것이 어렵다. 따라서 본 연구팀은 안정적인 피내 주사를 위해 다름의 가이드라인을 설정하였다.

- (1) 3주령 자돈의 피내 백신 주사부위는 이근부로 한정한다.
- (2) 주사 후 피부의 용기 (vesicle형상)를 확인해야 한다.
- (3) 백신의 제형은 색상을 포함하여 피내 주입 이후 주사액의 역류를 보다 용이하게 확인할 수 있게 한다.
- (4) 주사기의 사용법에 대한 충분한 숙지가 필요하다. 사용자가 피내 주사기를 미리 시험해 봐야 한다.
- (5) 주사 시 자돈의 이근부가 충분히 노출될 수 있도록 돼지의 머리를 접종 부위 반대편으로 고정시킨다.
- (6) 최소 접종 용량은 0.2ml이나 보다 안정적인 접종을 위해 0.5ml 접종량을 권장한다.

라) 시험백신의 생산

1) 시험 백신 제조 : 위탁 기업 CTC 바이오
다음과 같이 시험백신을 제조하였다.

표. 시험백신의 Lot별 생산일 및 생산량

제조번호	제조일자	제조수량(10두/병)	함량
			TCID ₅₀ / mL
Biopoa111	2018.10.01	500병	4.5
Biopoa112	2018.10.08	500병	4.5
Biopoa113	2018.10.17	500병	4.7

a) 기원물질에 관한 자료

a-1) 사용 Seed의 명칭 및 유래

가. 균주명 : LMY-BP chimera

나. 분양기관 : 바이오포아 역유전학 기술을 이용한 균주 개발

다. 개발 연월일 : 2018. 01. 03

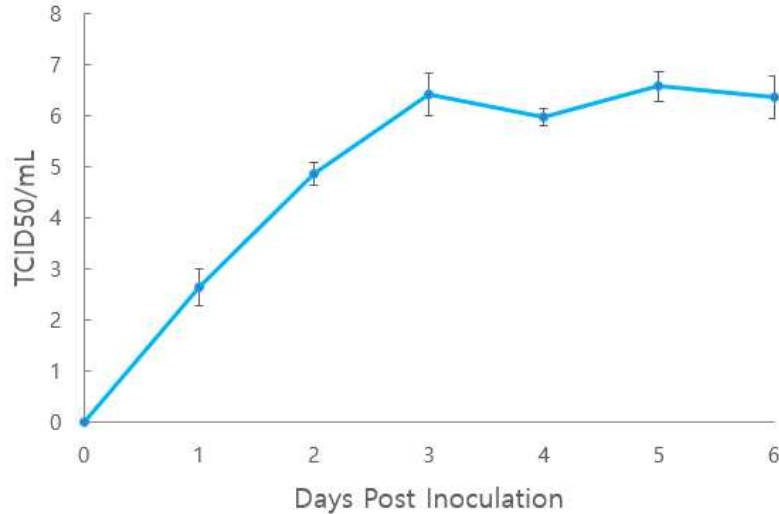
a-2) 사용 Seed의 정상

가. 배양 세포 : MARC 145 cell

나. CPE 형성 유무 : Apoptosis, clumping

다. 병원성 : 없음

라. 증식성 : $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml로 0.01moi 접종 후 72시간(3일)에 최고역가 도달



*그림. 접종 이후 백신주 증식성 분석자료

b) 종독의 관리

b-1) 원세포주(Master cell bank)확립.

원세포주로 분류된 MARC 145 cell을 PVMWC 로 명칭을 명명하였으며, 배양하여 소분된 원세포주는 DMSO(Dimethyl sulfoxide)9%, FBS 50%가 첨가된 배지에 2×10^5 cells/ml 으로 되게 희석하여 Vial에 소분 후 “#1~ #100” 의 번호를 부여하고 -196°C LN2-tank에 보관하여 원세포주으로 하였으며 원세포주의 계대는 25 회 이내로 제한하였다.

원세포주는 Mycoplasma, BVDV 등의 미입바이러스 부정시험을 통해 검증하였다.

b-2) 생산용 세포주(Working cell bank)의 확립

원세포주 1vial을 해동한 후 배양용 배지로 희석하여 원심분리하여 순수한 Cell을 분리한 후 배양용 배지에 배양하여 T-flask에서 100% Monolayer가 형성된 Cell을 EDTA처리하여 T-flask로부터 탈락시키고 배양용 5%FBS 가 첨가된 배지로 중화하여 원심분리한 후 Pellet(Cell)을 수거하여 DMSO(Dimethyl sulfoxide)9%, FBS 50%가 첨가된 배지에 2×10^5 cells/ml 이상으로 되게 희석하여 소분 후 생산용 세포주로 하였다. 생산용 세포주는 PVMWC 로 명칭을 명명하였으며, 배양하여 소분된 생산용 세포주는 1ml/vial에 소분하여 “#1~#100” 까지 Number를 부여하였고 -196°C 냉동 보존하였으며 생산용 세포주의 계대는 5 회 이내로 제한하였다.

생산용 세포주는 Mycoplasma, BVDV 등의 미입바이러스 부정시험을 통해 검증하였다.

b-3) 원종독 바이러스주(Master Virus Bank)의 확립

바이오포아에서 개발한 LMY-BP chimera 바이러스 균주를 30회 계대하여 약독화 되었음을 확인하였으며 70% Monolayer가 형성된 Marc-145 세포주에 접종용 배지에 LMY-BP chimera

virus를 적량 희석하여 90분간 흡착 후 접종용 배지를 제거 후 바이러스 배양용 배지를 넣어 72시간 배양하고 90%이상의 세포변성(Cytopathic Effect : CPE)이 발생하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 원종독으로 하였다. 원종독의 명칭은 PVMMV 로 명명 하였으며, 원종독은 1ml/vial 소분하여 #1 ~ 100까지의 번호를 부여하고 -80℃에 냉동 보관하였으며 원종독의 계대는 5 회 이내로 제한하였다.

b-3) 생산용 바이러스주 (Working Virus Bank)의 확립.

원종독 바이러스주 1vial을 적량 희석하여 70% Monolayer가 형성된 Marc-145 세포주에 접종용 배지에 PRRS virus를 적량 희석하여 90분간 흡착 후 접종용 배지를 제거 후 바이러스 배양용 배지를 넣어 72시간 배양하고 90%이상의 세포변성(Cytopathic Effect : CPE)이 발생하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 채득하여 생산용 바이러스주 로 하였다. 생산용 바이러스주의 명칭은 PVMWV 로 명명 하였으며, 생산용 바이러스주는 1ml/vial 소분하여 #1 ~ 100까지의 번호를 부여하고 -80℃에 냉동 보관하였으며 생산용 바이러스주의 계대는 5 회 이내로 제한하였다.

2) 야외임상 시험 농장의 선정

- 축종 : 돼지 (자돈)
- 농장수 및 공시 두수

야외 임상시험을 위하여 아래 표와 같이 3개 농장을 선정하였으며, 각 농장에서 임상시험에 공시할 공시축의 수를 표기하였다.

표. 야외시험 양돈장

농 장 명	행복농장	녹돈농장	태광농장
사육규모	자돈7000두	모돈450두	모돈472두 자돈 5,500두
주소	강원도 철원군 동송읍 왜매길 153-106	경기도 평택시 청북읍 고잔리 710-4	경기도 안성시 대덕면 만세로 395-8
평균포유개시두수	12두	11.5두	12.2두
평균이유두수	11.5두	10.8두	11.3두
이유자돈의 폐사율	8%	3%	7%
육성, 비육돈의 폐사율	5%	4~5%	3%

해당 시험 백신에 대한 자가 시험 결과는 아래 참조.

야외임상시험 계획서 2019년 2월 제출 완료. 현재 심사중. (2019.02.14.)

마) 시험백신의 검정평가

제조된 3개 Lot의 검정시험을 국가 검정 평가 기준에 의거해 진행하였으며 제시된 기준에 적합한가를 확인함으로써 백신의 안전성과 유효성을 검증하였으며 결과는 다음과 같다.

가. 특성시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 수행하였다. 공시한 시험백신 모두 이물 및 이취가 없고 희석액으로 희석하면 쉽게 균질화되며 소분된 내용물의 성상이 균일한 담적색의 부유물로 특성에 적합하였다.

나. 진공도 시험

동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-02에 따라 수행하였다. Lot별 시험백신에 대하여 동물용생물학적제제 일반검정기준의 진공도 시험법에 따라 진공도를 측정한 결과 검정기준에 적합하였다.

다. 수소이온 농도 시험

Lot별 시험백신에 대하여 동물용생물학적제제 일반검정기준의 수소이온농도 시험법(동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03)에 따라 수소이온농도를 측정한 결과는 표 3과 같이 pH 6.5~8 범위에 있어 검정기준에 적합하였다.

제 조 번 호	수소이온농도
Biopoal11	7.3
Biopoal12	7.3
Biopoal13	7.3

*표. 시험백신의 수소이온농도

라. 합습도시험

Lot별 시험백신에 대하여 동물용생물학적제제 일반검정기준의 합습도 시험법(동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-04)에 따라 합습도를 측정한 결과 검정기준에 적합하였다.

마. 무균 시험

시험백신 제조 후 동물용생물학적제제 일반검정기준(동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-06)에 따라 무균시험을 실시한 결과, 모든 Lot의 시험백신에서 어떠한 세균의 발육도 없었다 (표 2).

제조번호	시험기간	보 관 온 도					
		22.5℃			32.5℃		
		TSA	TSB	Thio*	TSA	TSB	Thio*
Biopoa111	18.10.5~18.10.19	-	-	-	-	-	-
Biopoa112	18.10.12~18.10.26	-	-	-	-	-	-
Biopoa113	18.10.22~18.11.05	-	-	-	-	-	-

*Thio: Liquid thioglycollate broth

*표. 무균시험 결과

바. 마이코플라즈마 부정시험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준 일반시험법(1-11-20-07)의 마이코플라즈마 부정시험 검사법에 따라 시험을 실시한 결과 시험백신에서 마이코플라즈마가 검출되지 않았다.

사. 안전시험

시험백신 제조 후 기준 및 시험방법에 따라 안전시험을 실시한 결과, 모든 Lot의 시험백신은 시험동물 및 목적동물에서 안전성이 확인 되었다. 다음의 기준을 따라 진행하였다.

a) **마우스** : 체중 15 ~ 20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 0.5 ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

b) **기니픽** : 체중 300 ~ 350 g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2 ml(2두분)를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2 ml(2두분)를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

c) **돼지** : 체중 8 ~ 10 kg(4 ~ 6주령)의 PRRSV 항체음성 건강한 돼지 2마리에 백신의 10두분을 근육 접종한다. 접종 후 1 ~ 2시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 21일간의 관찰하는 동안 주사 부위의 화농, 괴사, 발열 및 호흡기질환 등의 부작용이 없어야 한다.

제조번호	시험기간	임상증상 관찰결과			
		자돈	기니픽		마우스 (복강)
			근육	피내	
Biopoa111	18.10.22.~18.11.16	0/2	0/2	0/2	0/8
Biopoa112	18.10.22.~18.11.16	0/2	0/2	0/2	0/8
Biopoa113	18.10.22.~18.11.16	0/2	0/2	0/2	0/8

* 표. 안전시험 결과

자. 미입바이러스 부정시험

백신 내 포함된 미입바이러스의 확인을 위해 다음의 실험을 진행하였다.

a) 시험방법

소바이러스성설사병바이러스(BVDV)에 대한 특이면역반응에 대하여는 MARC-145, 또는 BHK21 세포에 시험품 0.1 ml씩 분주하여 5~8일간 배양한 후 검사한다. 소바이러스성설사병 바이러스에 대한 특이면역 항체(BVDV(13/G4): sc-101592, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC)를 이용하여 면역형광염색을 실시하고 반응을 확인한다.

시험품에서 RNA를 뽑아 소바이러스성설사병바이러스에 특이적인 primer를 포함한 키트 (LiliF™ BVDV RT-PCR Kit, iNtRON)를 이용하여 RT-PCR 기법으로 확인한다.

b) 시험결과

3개 배치의 시험백신 각각 MARC cell에 접종하고, 소바이러스성설사병바이러스에 특이적인 항체 (BVDV(13/G4): sc-101592, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC)를 이용한 형광면역 염색 시험 결과, 어떠한 소바이러스성설사병바이러스에 대한 특이면역반응이 관찰되지 않았다.

3개 배치의 시험백신에 대한 PCR 결과 BVDV는 확인되지 않았다.

차. 바이러스 함량 시험

시험백신의 1ml 당 TCID 역가는 검정 기준을 통과하였다.

시험백신	TCID50 / mL 역가
Biopoa 111	4.5
Biopoa 112	4.5
Biopoa 113	4.7

카. 혈청 역가 시험

검정기준에 따라 1두분의 백신을 2마리의 자돈에 1회 접종 후 5주후 채혈하여 중화항체 시험을 실시한 결과 세 로트의 시험백신에서 4배 이상의 중화항체를 확인할 수 있었다.

시험군	Biopoa 111	Biopoa 112	Biopoa 113
접종-1	4	4	4
접종-2	4	4	4
평균	4	4	4
대조-1	0	0	0
대조-2	0	0	0
평균	0	0	0
판정	적합	적합	적합

*표 6. 혈청역가 시험 결과

시험백신은 검정기준을 통과하였다.

바) 시험백신의 역계대 평가

균주의 안전성 평가 - 역계대 시험

제조된 PRRS 생독백신의 내용물인 바이러스의 병원성 복귀 및 면역원성 차이를 알아보기 위함을 목적으로 역계대 실험을 수행하였다.

1) 시험방법

a) 대상 : 3주령 PRRS 음성 자돈(그룹당 5두)

b) 접종 :

- ① 0계대 그룹은 BIOPOA 시험백신(제조번호 Biopoa 111, TCID 4.5) 을 2ml 근육접종
- ② 1계대 그룹은 ①에서 부검한 다음의 조직 유제액 중 realtime PCR을 통해 가장 높은 역가를 보인 조직 유제액을 2ml 근육으로 접종한다.
- ③ 2계대 그룹은 ②에서 부검한 다음의 조직 유제액 중 realtime PCR을 통해 가장 높은 역가를 보인 조직 유제액을 2ml 근육으로 접종한다.
- ④ 3계대 그룹은 ③에서 부검한 다음의 조직 유제액 중 realtime PCR을 통해 가장 높은 역가를 보인 조직 유제액을 2ml 근육으로 접종한다.
- ⑤ 4계대 그룹은 ④에서 부검한 다음의 조직 유제액 중 realtime PCR을 통해 가장 높은 역가를 보인 조직 유제액을 2ml 근육으로 접종한다.

3) 부검 : 계대 별로 돼지는 접종 이후 3주간 유지하며 접종 3주 시점에 부검하여 tonsils, tracheal bronchial lymph nodes (LN), spleen, lungs, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) 를 채취한다.

● 육안 병변 및 조직 병리학적 평가

부검 직후 폐의 간질성 병변을 전체 폐의 %단위로서 판단한다.

폐 조직의 일부를 10% 중성포르말린으로 고정하여 H&E staining을 통해 폐 조직 내 alveolar wall의 비후도에 따라 스코어링을 실시한다. 기준은 다음을 따르도록 한다.

Level	score	비고
Normal	0	Alveolar wall의 어떠한 비후도 관찰되지 않음
Mild	1	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 10% 미만
Moderate multifocal	2	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 40% 미만
Moderate diffuse	3	Alveolar wall의 두께와 Air soc의 직경이 동일하거나 더 비후된 병소가 전체의 80% 미만.
Severe	4	Air soc의 존재가 확인되지 않음. 혹은 출혈을 동반함.

● 부검 장기의 항원 정량

부검 이후 채취한 tonsils, tracheal bronchial lymph nodes (LN), spleen, lungs, peripheral blood mononuclear cell (PBMC)의 장기 및 혈구를 real time PCR을 통해 체내 바이러스 항원의 양을 측정한다.

4) 채혈 : 채혈은 접종 0, 7, 14, 21 일 후에 진행한다. 채혈한 혈액은 혈청 분리 후 혈액 내 바이러스 역가(realtime PCR)와 ELISA 항체 검사를 진행하도록 한다.

5) 임상증상 관찰

접종 이후 부검 종료까지 날마다 임상증세를 관찰하도록 한다. 다음의 기준을 따르도록 한다.

		score	Level	비고
Anorexia	식욕부진	0	no abnormality	특이증상 없음
		1	Mild	섭식 감소
		2	Moderate	사료에 관심만 보임
		3	Severe	전혀 섭식 없음
Recumbence	기립불능	0	no abnormality	특이증상 없음
		1	Mild	스스로 기립 가능
		2	Moderate	손으로 만질때만 기립
		3	Severe	손으로 만질때도 기립 불가
Skin Cyanosis	hemorrhage/ 출혈/충혈	0	no abnormality	특이증상 없음
		1	Mild	macure, patch수준, single lesion
		2	Moderate	국소적이거나 병변이 중 대한 수준
		3	Severe	전신에 걸친 병변 확인
Swelling	관절 부종	0	no abnormality	특이증상 없음
		1	Mild	관절 부종
		2	Moderate	절뚝거림, 괴사성 종괴 관찰
		3	Severe	심각한 파행, 보행 불 가
laboured coughing	breathing/ 호흡곤란/ 기침	0	no abnormality	특이증상 없음
		1	Mild	
		2	Moderate	
		3	Severe	
Ocular discharge	안와 삼출물	0	no abnormality	특이증상 없음
		1	Mild	
		2	Moderate	
		3	Severe	
Digestive finding	소화불량	0	no abnormality	특이증상 없음
		1	Mild	간헐적 설사, 24시간 내 멈춤
		2	Moderate	24시간 이상 지속적인 설사 및 구토
		3	Severe	출혈성 설사
Temperature (Rectal)	체온	0	39.5도 이하	
		1	39.5-40.5도	
		2	40.5-41	
		2.5	41-41.5	
		3	41.5	
Total score				

6) 체온 및 체중 측정

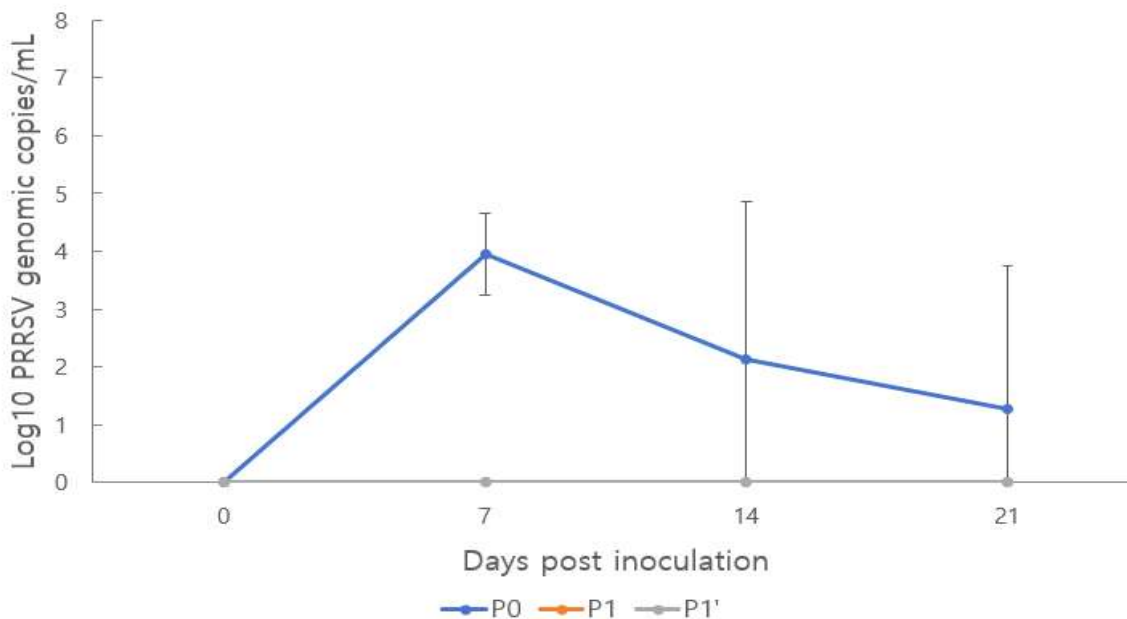
체온은 접종 0일부터 21일간 직장 온도를 체온계로 측정한다. 체온의 측정은 항문에서 최소 3cm 체중은 7일 단위로 0,7,14,21일간 측정한다. 작업 시 동물이 받게 될 스트레스를 최소화한다. 접종 이후 2시간 뒤, 접종부위 부종 및 열감을 확인한다.

7) 접종 이후 감염이 되지 않아 계대가 중단된 경우

접종 이후 감염이 되지 않고 어떠한 감염의 증거(항원, 항체)가 발견되지 않을 경우, 이전 계대 유래 물질을 이용해 10마리의 돼지를 이용해 실험한다. 재실험에서 바이러스가 분리된 경우 계대를 이어간다. 재실험을 계대 하나로 인정한다. 재실험에서 바이러스가 분리되지 않을 경우 바이러스가 독립의 증가 또는 회복을 보이지 않는다고 판단하고 실험을 종료한다.

b. 시험 결과

1) 혈청 바이러스 항원 정량



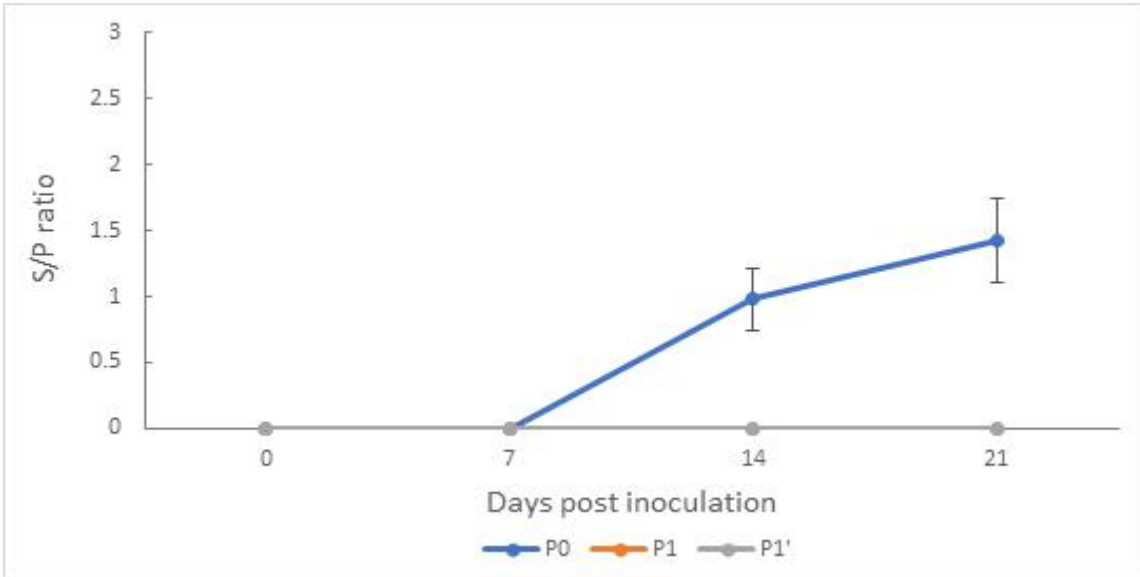
* P0 : 0계대 접종 그룹. 시험 백신을 접종한 그룹(5두).

** P1 : 1계대 접종 그룹. 0계대 접종 그룹(P0)의 부검 장기에서 가장 높은 항원 역가를 보인 유제액을 근육 접종한 그룹(5두)

*** P1' : 1계대 재접종 그룹. P1에서 감염이 되지 않아, 0계대 접종 그룹(P0)의 부검 장기에서 가장 높은 항원 역가를 보인 유제액을 다시 근육 접종한 그룹(10두)

P1에서 어떠한 항원도 확인되지 않았다. 재실험한 P1' 그룹에서도 어떠한 혈청 내 항원이 검출되지 않았다.

2) 혈청 항체가 ELISA



P0그룹은 접종 이후 21일 까지 모든 접종 돼지에서 항체 양전이 확인되었다. P1, P1' 그룹은 어떠한 개체에서도 항체가 검출되지 않았다.

3) 부검 장기 병변

3-1) 계대에 따른 폐 조직 병변 수치 변화 양상

개체	P0	P1	P1'
1	1	0.33	0
2	0.66	0.33	1
3	0.33	0.33	0.33
4	0.33	0	0
5	0.33	0	0.33
6			0
7			0
8			0
9			0
10			0.66
평균	0.53±0.29	0.2±0.18	0.23±0.35

계대에 따른 폐 조직의 병리학적인 분석결과, 어떠한 폐 병변의 유의적인 증가를 확인하지 못하였다.

3-2) 조직 유제액의 항원 정량

-P0 그룹의 조직 유제액 항원 정량 결과

개체번호	조직 유제액 Log10 PRRSV genomic copies/mL	PBMC Log10 PRRSV genomic copies/10 ⁶ cell
1	4.2448	0
2	6.12	0
3	4.4563	4.2186
4	5.1990	0
5	0	4.1592

* 개체 번호 2의 조직 유제액을 다음 계대 접종액으로 선택하였다.

-P1 그룹의 조직 유제액 항원 정량 결과

개체번호	조직 유제액 Log10 PRRSV genomic copies/mL	PBMC Log10 PRRSV genomic copies/10 ⁶ cell
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0

P1 그룹에서 어떠한 항원도 조직에서 검출되지 않았다.

-P1 ‘ 그룹의 조직 유제액 항원 정량 결과

개체번호	조직 유제액 Log10 PRRSV genomic copies/mL	PBMC Log10 PRRSV genomic copies/10 ⁶ cell
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

P1 ‘ 그룹에서 어떠한 항원도 조직에서 검출되지 않았다.

4) 임상 증상 결과

접종 이후 21일 간 P0, P1, P1’ 그룹에서 가벼운 설사를 보인 개체가 확인되었다. 이는 백신 접종과는 무관하게 이유 후 스트레스로 인한 수양성 설사로 보인다. 대부분의 개체는 실험 종료 까지 설사 증상이 사라졌다. 그 외 기타 특이적인 임상적인 병증은 관찰되지 않았다.

5) 체온 및 체중의 측정

P0, P1, P1’ 그룹은 접종 이후 2시간 후 체온의 특이적인 증가가 없었다.

접종 이후 1,2,3,4,5,6,7,14,21일에 측정한 체온은 41도 이상의 고온을 보인 개체는 없었다.

-체중 결과

		Dpi0	Dpi7	Dpi14	Dpi21
P0	평균 체중(kg)	6.66±0.99	8±0.88	10.18±0.67	12.9±1.03
	일당 증체율(g)		191.4±79.9	311.4±58.3	388.5±93.3
P1	평균 체중(kg)	7.22±0.63	9.58±1.5	13.06±2.81	16.5±3.48
	일당 증체율(g)		337.1±131.5	497.1±194.1	491.4±109
P1’	평균 체중(kg)	6.86±0.75	8.29±0.77	10.36±1	13.4±1.62
	일당 증체율(g)		204.2±71.2	295.7±112.6	434.2±102.1

6) 결론

P0 그룹은 조직과 혈청에서 항원 검출되었고 또한 모든 개체에서 혈청 항체가 검출된 것으로 미루어 실제로 백신 바이러스가 접종 돼지에서 증식하였음을 의미한다. 그러나 21일 종료 후 2회에 걸친 재실험에도 역계대 접종한 돼지에서 전혀 항원과 항체가 검출되지 않았다. 이는 백신 바이러스가 역계대에서 감염되지 않았음을 의미하는 것으로 보인다. 접종 이후 돼지의 임상적인 결과와 증체율 및 체온의 변화를 분석해보면 역계대 후 바이러스의 병원성 재보유 증거를 확인할 수 없었다. 어떠한 유의적인 병변의 증가나 임상적인 증상의 발현 및 증체율의 감소 등이 전혀 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험 결과 P1에서 역계대 감염이 이루어지지 않은 것으로 결론 내렸다.

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5년 예상 (과제 종료 후 2년 뒤 제품화)			
	소요예산(백만원)	300,000,000 이상			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	100	400	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	50	90
국외		0	10	30	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	SAVE 기술을 응용한 닭 바이러스 1종, 돼지 바이러스 1종의 백신 개발을 진행중임.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	100	400	
	수 출	0	100	400	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

최종목표	안전성과 면역원성을 향상시킨 자돈용 PRRS 생독백신의 개발
1차년도 목표	백신 후보 균주의 작출 및 검증
2차년도 목표	백신 후보 균주의 선정 및 면역원성 안전성 평가, 시험백신의 생산
3차년도 목표	시험백신의 평가 및 야외임상 시험 실시

3-2. 목표 달성여부

구분	목표	성과지표			
		성과지표(단위)	성과 목표치	실적	중요도 가중치
1년차 (2016)	SAVE 기술을 이용한 바이러스 약독화	· 국내 분리 PRRSV 계놈 염기서열 분석	1종	2종	10
		· SAVE 프로그램의 개발	1개	3종의 프로그램 개발	30
	PRRSV 역유전학 기법 확립	· PRRS 백신 후보 균주 작출	2종	4종	30
		· 후보균주의 in vitro kinetics 증식성 비교	증식성 감소	100배 감소	20
	PRRS 병리 분석 기법 확립	· 백신후보균주의 in-vivo 안전성 확인 시험 진행	폐렴 완화	폐렴병변 없음	10
	소계				100%

구분	목표	성과지표			
		성과지표(단위)	성과 목표치	실적	중요도 가중치

2년차 (2017)	SAVE 기술을 이용한 약독화 바이러스 개발	· SAVE 적용 백신 후보 균주 개발	2종	2종 특허 2종 출원	10
		· IFN 분비 강화 백신 후보 균주 개발	2종	1종	10
		· 외래 유전자 발현 백신 후보 균주 개발	6종	3종	10
		· 면역원성 강화 Adjuvant 탐색	2개	3개 규명	10
		· 백신균주 유전자 안정성 검증	분석	30계대 full sequencing	10
	백신균주 안전성 평가	· 과용량 접종 시험	안전성 증명	안전성 입증	20
		· 백신 후보균주 역계대 시험	5회 역계대	1회 역계대 확인	20
	백신균주 면역원성 평가	· Homologous/ heterologous challenge 시험	평가	평가	10
	소계				100%

구분	목표	성과지표			
		성과지표(단위)	성과 목표치	실적	%
3년차 (2018)	SAVE 기술을 이용한 약독화 바이러스 개발	· SAVE 적용 chimeric 균주 개발	1종	1종, 특허 1종 출원	5
		· Adjuvant 첨가 효능 평가	면역지표 향상	면역지표 향상	10
		· 최소면역원성 평가	TCID ₅₀ 2이상	TCID ₅₀ 1.8이상	5
		· PRRSV 세포성 면역 지표 확립		기법 확립	5
	시험백신 생산 및 검정	· 시험백신 생산	3 Lot X 500병	생산완료	15
		· 시험백신 유효성 평가	시험	시험완료	10
		· 시험백신 안전성 평가	시험	시험완료	10
		· 시험백신 역계대 시험	5회	0회 역계대	20

		역계대	확인	
야외임상시험	· 시험백신의 안정성 시험	18개월	시험중	5
	· 시험백신의 야외시험 승인 신청	신청	심사중	5
	· 시험백신의 야외시험 결과 분석 및 서류작성	작성	진행중	5
	· 백신 허가 신청 등록	등록	진행중	5
소계				100 %

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

백신 개발을 목표로 진행하면서 계획 당시의 정량적 목표를 완수하였다. SAVE 기법을 적용한 백신 후보 균주 다수를 작출하는 데 성공하였고 각각의 안전성과 면역원성을 분석하여 최종 백신 후보를 선정하였다. 해당 백신 균주는 차세대 백신 후보로서 안전성과 면역원성을 과용량 접종 시험, 역계대 시험, 공격접종 시험을 통해 증명하였다.

3차년도 종료 시점에 개발한 백신을 품목 허가를 받아 시장에 출시하는 것을 목표로 진행하였으나, 현재까지 진행상황은 개발된 백신을 야외임상시험 신청만 한 상태이고 향후 1년간 야외임상시험을 진행해야하는 상황이다. 3차년도 일정이 늦어진 것은 백신 후보 균주의 선정과 백신 재형에 들어갈 Adjuvant의 선정이 늦어졌기 때문이다. 백신균주는 안전성과 면역원성을 모두 고려해서 최종적으로 선택하였다. 한국의 상황에 맞는 보다 넓은 교차면역을 보장하고 강력한 면역원성을 갖추고 있는 균주로 최종 선정하였다.

백신 균주의 선정이 늦어진 가장 중요한 원인은 SAVE 기법을 통해 안전성을 보장하였으나, 백신의 면역원성을 향상시키는 방법을 찾는 것이 상당한 기간이 소요되었기 때문이다. 초기 계획안이었던 백신 균주의 유전자에 TLR agonist를 삽입시키는 방법은 유전자의 안정성에 문제가 있었다. 실험을 통해 확인한 결과, 바이러스의 계대가 진행될수록 삽입된 유전자가 잘려나가면서 유지가 되지 않았다. 생독백신 균주로서 유전자의 안정성이 보장되지 않는 것은 상용화가 불가능하기 때문에 본 연구팀에서는 해당 백신 균주를 제외하였다. 또한 당초 계획중 하나였던 NSP1 부위 mutation을 통해 바이러스의 IFN 분비를 강화시키는 것은 in vitro와 in vivo 모두에서 균주의 증식성이 매우 떨어져 도리어 제대로 생독백신으로서의 면역효과를 보이지 않았다. 기대했던 type I IFN 분비 강화 역시 확인되지 않았다.

당초 계획하였던 면역원성을 강화를 위한 시도들이 실패하면서 PRRSV의 면역을 강화시키는 것으로 보고된 여러 종류의 Adjuvant을 백신균주와 혼합하여 접종하는 방법으로 시도하였다. in vivo 실험 특성상 실험 기간이 최소 6주 이상이 소요되므로 다수의 실험으로 소요된 기간이 당초 예상보다 늦어져 백신 균주의 선정과 시험백신의 생산 그리고 야외임상시험 계획서 제출이 늦어졌다.

현재 농림축산 검역본부에 생산한 시험백신의 야외임상 시험계획서를 제출한 상태이며, 검역본부 측의 검토 및 평가 이후 야외임상 시험을 개시하여 후속 실험을 진행할 예정이다. 야외임상 시험에는 대략 6개월 가량이 소요될 예정이며 결과를 분석하고 최종적으로 품목 허가서 제출과 백신 허가 등록까지는 그 뒤 최소 8개월 이상이 더 소요될 것으로 예상된다.

PRRSV는 인체감염이 사례가 없는 바이러스로서 생물안전등급 4에 해당하지만 개발 백신이 LMO이기 때문에 허가 관련 사항과 실험을 검토 중에 있다. LMO 생독 백신은 품목 허가까지 안전성에 관련된 여러 요구 사항이 있으므로 제품화 진행과정에서 일정 기간이 소요될 것으로 예상된다.

정성적 평가기준인 논문 및 학술 발표는 현재까지 연구 결과를 바탕으로 작성 중에 있으며 SAVE 약독화 관련 내용을 기반으로 작성한 논문 초안을 SCI 저널인 Virology journal에 투고할 예정이다. 추가로 해당 사업을 통해 얻어진 연구결과를 논문 출판 및 학술 대회 발표 등을 진행할 계획이다.

본 연구팀은 개발한 SAVE 적용 국내 PRRS 백신을 출시하여 돼지 호흡기 질환으로 고통 받고 있는 한국 양돈 산업에 도움을 주고, 나아가 최신 생명공학기술로 부가 가치를 향상시킨 백신으로 국가 산업 경쟁력을 향상시키는 데 도움이 되고자 하였다.

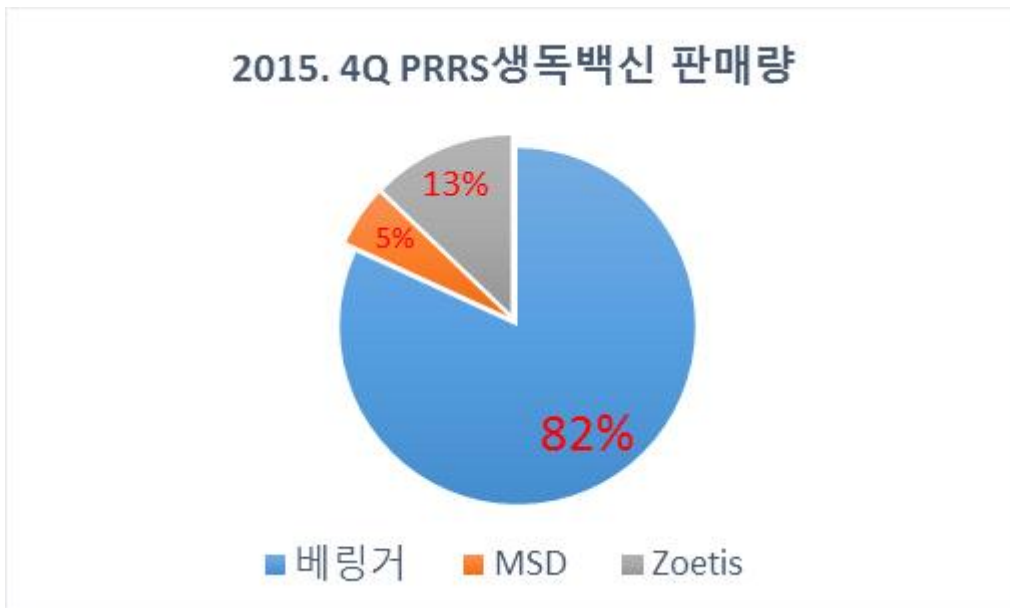
4. 연구결과의 활용 계획 등

4.1. 국내 PRRS 백신 시장과 사업화 계획

a) 국내 PRRS 백신 시장 현황

PRRS는 양돈산업에 있어서 한번 농가에 침투하면 박멸하기가 대단히 어려운 질병으로 자돈의 위축성 질환과 모돈의 유산 질환으로 생산성을 떨어뜨리는 대표적인 질환이다. 현재 제 3종 가축법정전염병으로 분류되어 우리나라에서는 초기부터 외국계 백신을 수입하여 대처해온 실정이다. 한국 동물약품 협회의 보고에 따르면 국내 PRRS 백신시장 규모는 2015년 약 90억 규모로서 제품 자체는 생독, 불활화 백신 두 종류가 시판 중이다.

2015년	금액(단위: 천원)	비율(%)
생독백신(외국계)	8,795,912	98.4
불활화백신(국내산)	142,971	1.6



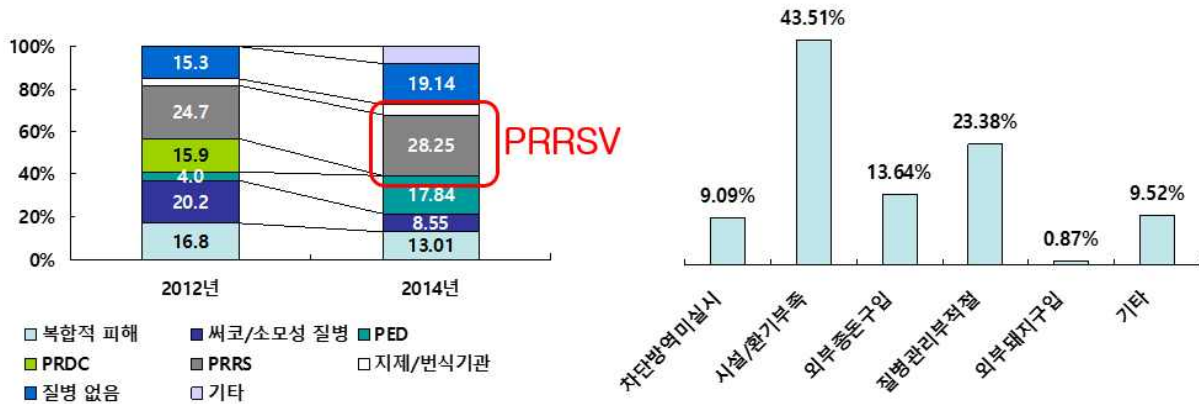
*2015년도 PRRS 국내 백신 시장 (위), 2015년 4분기 생독백신 판매 % (아래).

*출처 : 한국동물약품 협회

이 중 판매 제품의 99%는 생독 백신이고 이는 전량 외국계 백신이 점유하고 있다(2019년 현재 베링거, MSD, 히프라, Zoetis 4개 다국적 회사 제품이 출시된 상황). 북미형 백신 2종(베링거, Zoetis) 유럽형 백신 2종이 출시되어 있는데 이들 다국적 제약회사의 백신 군주는 국내 분리와 항원적인 차이가 있고 안전성에도 문제가 제기되고 있으며 더 중요하게는 백신의 효능에 대한 끈임 없는 의심을 받고 있는 상황이다. 모든 뿐 아니라 자돈의 호흡기 질환에서 PRRS가 차지하는 중요도는 매우 크다.

2년간 가장 많은 피해 질병

질병발생원인



*2014년도 대한 한돈협회 경영 실태 보고서 중 피해 질병 현황 조사

농가에서는 PRRS를 생산성 저하의 가장 큰 원인으로 생각할 정도로 매우 위협적인 질병이지만 자돈 백신접종율은 10% 미만일 정도로 썬코 바이러스에 비하면 매우 낮은 수치이다. 썬코 바이러스는 자돈 백신 접종을 통해 400~500억 원 규모의 시장을 형성하였으나 PRRS는 국내 가장 큰 생산성 저하의 원인임에도 백신 시장이 90억원 규모에 불과한 것을 보면 알 수 있다.

본 연구팀이 개발한 백신은 SAVE 기법을 적용하여 약독화시켜 백신 균주의 역계대 및 돈군에서 퍼지는 것이 거의 불가능하다. 이러한 우수한 안전성은 자돈에서 농가에서 사용자의 우려 없이 폭넓은 선택이 가능하게 만드는 장점이라 할 수 있다. 또한 더불어서 국내 병원성 heterologous strain 과의 공격접종을 통해 강화된 교차면역 효능을 입증하여 매우 효과적으로 국내 PRRS 인한 피해를 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

그러므로 개발 백신은 우수한 안전성과 면역원성을 바탕으로 시장을 개척할 수 있을 것으로 예상하며 백신 출시 예상 시점인 2020년을 전후로 다음과 같은 산업화를 통한 기대효과를 예상하고 있다.

	(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년	(2022년) 개발 종료 후 4년
시장점유율(%)	10	30	50
판매량(단위:10두분/병)	216,000	648,000	1,080,000
내 판매단가(원)	20,000(10두 분)	20,000(10두 분)	20,000(10두 분)
국내매출액(백만원)	4,320	12,960	21,600
당사 생산능력	40,000병/1회/1주(2,080,000병/연간) CTC바이오 2018년 예상		

사업화를 위한 모델로서 본사는 직접 생산이 아닌 CTC 바이오를 통한 위탁제조 방식으로 진행할 예정이다. 해당 사업 모델은 정부에서 2015년 10월 5일 시장진입규제를 완화한 「동물용 의약품등 취급규칙(농식품부령)」을 개정된 법률에 의거하여 기획하였다. 주요 개정 내용은 동물용의약품을 제조설비 없이도 제조·판매할 수 있도록 위탁제조판매업 신고제를 도입함으로써

써 제조시설의 중복투자 방지 및 기존 시설 활용성 증대는 물론, 자금력이 부족한 연구 개발자 등에 대한 시장진입을 활성화하여 동물용의약품 산업을 수출 산업으로 육성하려는 것이다.

본사의 뛰어난 vaccine seed 개발 능력과 약 300억 규모의 세계최고 수준의 EuGMP 규격의 동물용 의약품 생산 시설을 갖춘 CTC 바이오와의 협력을 통해 이미 과포화 상태인 국내 생산 시설을 더 이상 확충하지 않고 안정적으로 제품을 생산할 방법을 모색하고자 한다.

또한 해당 백신 제품의 판매는 안정적인 유통 구조를 갖추고 판매 영업 조직을 보유한 국내 대기업 00 회사와의 전략적 제휴를 통해 진행하고자 한다. 00 기업은 본사의 투자자로서 개발 백신의 판매와 영업에 참여하기로 계약하였다.

b) 품목 허가와 사업화 계획

양우 수진 일정



본 과제는 협동기관인 농림축산검역본부와의 공동 연구의 산물이다. 연구 산물인 백신의 야외 임상 시험과 품목 허가를 위한 평가가 진행 중이며 구체적인 계획은 다음과 같다.

- 2019년 4월 : 시험 백신 야외임상 시험 승인 후 야외 임상 시험 수행
- 2019년 10월 : 시험 백신의 야외임상 시험 종료 및 결과 분석
- 2019년 12월 : 품목 허가 승인 신청
- 2020년 8월 : 제품 최종 등록
- 2020년 10월 : 제품 출시

통상적으로 백신의 품목 허가와 관련된 평가는 2회에 걸친 수정요구와 각 2개월의 기간이 소요되어 최소 6개월 이상의 기간이 소요된다. 본 과제의 개발 백신의 품목허가는 따라서 2020년 하반기가 될 것으로 예상된다.

4.2. 특허, 품종, 논문, 지식 재산권 확보계획

a) 특허

현재 백신 균주로서 SAVE 원리를 적용한 방법과 균주에 대하여 2종의 특허가 출원 및 등록된 상태이다.

- ① 특허명 : 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스 변이주 및 이를 이용한 백신 { 제 10-1933931 호 }

② 특허명 : 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스 변이주 및 이를 이용한 백신 { 제 10-1933932 호 }

현재 백신 균주로서 개발한 Chimera 균주의 특허가 출원되었으며 (돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스의 키메라 바이러스 및 이를 이용한 백신, 출원번호 : 10-2018-071306), 개발 백신의 재형에 사용된 Adjuvant 관련 면역증가 효과 방법을 특허 출원 준비 중에 있다.

b) 논문 및 학술 발표

PRRSV의 SAVE 적용을 통한 약독화 및 관련 내용을 바탕으로 논문 투고 직전에 있으며, 백신 Adjuvant 관련 내용 및 역유전학 기법을 관련하여 2편의 추가 논문을 투고 진행 중에 있음.

붙임. 참고문헌

- [1] Shi M, Lam TT, Hon CC, Murtaugh MP, Davies PR, et al. (2010) Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 84: pp.8700-8711.
- [2] Coleman JR, Papamichail D, Skiena S, Futcher B, Wimmer E, et al. (2008) Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* 320: pp.1784-1787.
- [3] Ni YY, Zhao Z, Opriessnig T, Subramaniam S, Zhou L, et al. (2014) Computer-aided codon-pairs deoptimization of the major envelope GP5 gene attenuates porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 450-451: pp. 132-139.
- [4] Chen Z, Lawson S, Sun Z, Zhou X, Guan X, et al. (2010) Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398: pp. 87-97.
- [5] Sagong M, Lee C. (2011) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein modulates interferon-beta production by inhibiting IRF3 activation in immortalized porcine alveolar macrophages. *Arch Virol* 156: pp.2187-2195.
- [6] Li Y, Shyu DL, Shang P, Bai J, Ouyang K, et al. (2016) Mutations in a highly conserved motif of nsp1beta protein attenuate the innate immune suppression function of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 90: pp. 3584-3599.
- [7] Reed SG, Orr MT, Fox CB, (2013) Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Med* 19: pp. 1597-1608.
- [8] Re F, Strominger JL. (2001) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 276: pp. 37692-37699.
- [9] Harmala LA, Ingulli EG, Curtsinger JM, Lucido MM, Schmidt CS, et al. (2002) The adjuvant effects of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8+ T cells in vivo *J Immunol* 169: pp. 5622-5629.

[10] Jung ID et al. (2014) Enhancement of tumor-specific T cell-mediated immunity in dendritic cell-based vaccines by Mycobacterium tuberculosis heat shock protein X. J Immunol 193: pp. 1233-1245.

[11] M. Pizza, M.M. Giuliani, M.R. Fontana, et al. (2001) Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. Vaccine 19: (2001), pp. 2534-2541.