



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0083861
(43) 공개일자 2022년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7019654(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년10월02일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-7011660
원출원일자(국제) 2014년10월02일
심사청구일자 2019년10월01일
(85) 번역문제출일자 2022년06월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/058793
(87) 국제공개번호 WO 2015/051099
국제공개일자 2015년04월09일
(30) 우선권주장
61/885,871 2013년10월02일 미국(US)

(71) 출원인
베링거 인겔하임 애니멀 헬스 유에스에이 인크.
미국 조지아 (우편번호 30096) 델루스 새틀라이트
블러바드 3239
(72) 발명자
헤르난데즈 루이스 알레한드로
미국 코네티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박
스 368 릿지버리 로드 900 베링거 인겔하임 유에
스에이 코포레이션 리갈 아이피 브이피 내
필렌탈러 크리스틴 마가렛
미국 코네티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박
스 368 릿지버리 로드 900 베링거 인겔하임 유에
스에이 코포레이션 리갈 아이피 브이피 내
(릿면에 계속)
(74) 대리인
장훈

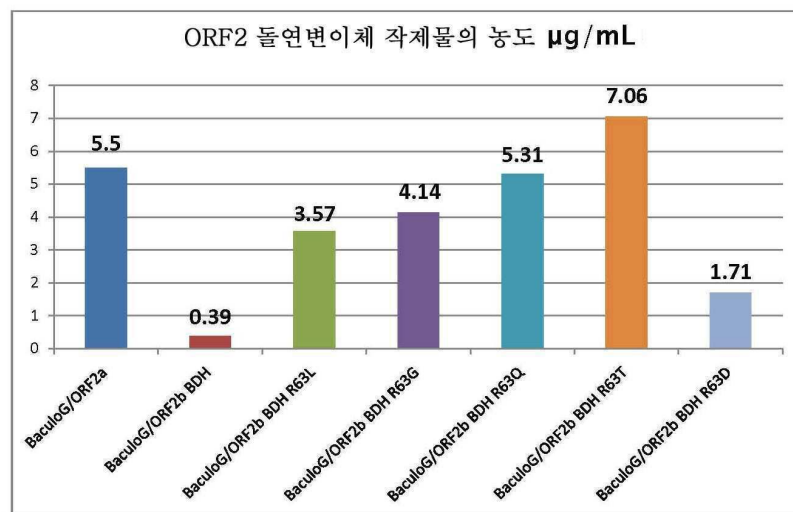
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 PCV2 ORF2 단백질 변이체 및 이로 이루어진 바이러스 유사 입자

(57) 요약

상이한 PCV2 서브타입들로의 PCV2 감염을 제어하기 위한 백신접종 방법이 개시되어 있다. 구체적으로, 동일한 PCV2b 및/또는 상이한 서브타입의 PCV2로의 감염의 치료 또는 예방 방법; 동일한 PCV2b 또는 상이한 서브타입의 PCV2로의 감염에 의해 야기되는 임상 징후의 감소, 예방 또는 치료 방법; 및/또는 동일한 PCV2b 및/또는 상이한 서브타입의 PCV2로의 감염에 의해 야기되는 질환의 예방 또는 치료 방법에 PCV2 서브타입 b(PCV2b) ORF2 단백질 또는 PCV2b ORF2 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 사용한다. 본 발명은 특히 BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하여 발현된 단백질이 바람직하게는 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 더 높은 양으로 발현됨을 특징으로 하는 PCV2 서브타입 b(PCV2b) ORF 단백질에 관한 것이다.

대표도 - 도7b



(52) CPC특허분류

A61P 31/20 (2018.01)

C12N 2750/10021 (2013.01)

C12N 2750/10023 (2013.01)

C12N 2750/10034 (2013.01)

C12N 2799/026 (2013.01)

(72) 발명자

보젠 에릭 마틴

미국 코네티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박스
368 릿지버리 로드 900 베링거 인겔하임 유에스에
이 코포레이션 리갈 아이피 브이피 내

해이위크 그레고리

미국 코네티컷주 06877-0368 릿지필드 피.오. 박스
368 릿지버리 로드 900 베링거 인겔하임 유에스에
이 코포레이션 리갈 아이피 브이피 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기 (a), (b) 및 (c)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 폴리펩타이드:

(a) - 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 및/또는

- 아미노산 위치 88에 프롤린 잔기 및/또는

- 아미노산 위치 151에 트레오닌 잔기 및/또는

- 아미노산 위치 206에 이소류신 잔기 및/또는

- 아미노산 위치 232에 아스파라긴 잔기를 갖고,

아미노산 위치 63에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기를 갖는

PCV2 ORF2 단백질(여기서, 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한다);

(b) (i) BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하고 (ii) 바람직하게는 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 더 높은 양으로 발현됨을 특징으로 하는 PCV2 ORF2 단백질; 및

(c) (a)와 (b)의 조합.

청구항 2

제1항에 있어서, (a)에서 상기 PCV2 ORF2 단백질이 아미노산 위치 63에 바람직하게는 유전학적으로 암호화된 천연 발생 아미노산 잔기를 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, (a)에서 상기 PCV2 ORF2 단백질이 아미노산 위치 63에 극성이지만 하전되지 않은 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 및 글리신 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 극성이지만 하전되지 않은 측쇄를 갖는 상기 아미노산 잔기가 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 티로신 잔기, 아스파라긴 잔기, 및 글루타민 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, 상기 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기가 알라닌 잔기, 발린 잔기, 류신 잔기, 이소류신 잔기, 페닐알라닌 잔기 및 트립토판 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, (a)에서 상기 PCV2 ORF2 단백질이 아미노산 위치 63에 세린 잔기 및 트레오닌 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서 상기 BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 PCV2 ORF2 단백질이 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 더 높은 양으로, 바람직하게는 2배 이상 더 높은 양으로, 보다 바람직하게는 3배 이상 더 높은 양으로, 더욱 바람직하게는 5배 이상 더 높은 양으로, 더욱 더 바람직하게는 8배 이상 더 높은 양으로 발현되고/되거나, 상기 BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 PCV2 ORF2 단백질이 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 배컬로마이러스 발현 시스템에서 더 높은 양으로 발현되고/되거나, 상기 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질이 야생형 PCV2 ORF2 단백질인, 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서 상기 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이가 아미노산 위치 58 내지 66의 영역 내의 1개 이상의 돌연변이이고, 여기서, 상기 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한 것인, 폴리펩타이드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서 상기 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이가 아미노산 위치 60 내지 66의 영역 내의 1개 내지 7개의 아미노산 잔기의 결실, 치환 및/또는 부가를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서, 상기 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한 것인, 폴리펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서 상기 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이가 아미노산 위치 63에서의 1개의 아미노산 잔기의 결실, 치환 및/또는 부가이고, 여기서, 상기 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한 것인, 폴리펩타이드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서 상기 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이가 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 위치 63에서의 아미노산 잔기의 치환이고, 여기서, 상기 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한 것인, 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서 상기 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이가 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 위치 63에서의 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기의 치환이고/이거나, 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 상기 PCV2 ORF2가 아미노산 위치 63에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기를 갖고, 여기서, 상기 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한 것인, 폴리펩타이드.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 상기 아미노산 잔기가 바람직하게는 유전학적으로 암호화된 천연 발생 아미노산 잔기인, 폴리펩타이드.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 상기 아미노산 잔기가 극성이지만 하전되지 않은 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 및 글리신 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 14

제13항에 있어서, 극성이지만 하전되지 않은 측쇄를 갖는 상기 아미노산 잔기가 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 티로신 잔기, 아스파라긴 잔기 및 글루타민 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, 소수성 측쇄를 갖는 상기 아미노산 잔기가 알라닌 잔기, 발린 잔기, 류신 잔기, 이소류신 잔기, 페닐알라닌 잔기, 및 트립토판 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 상기 아미노산 잔기가 세린 잔기 및 트레오닌 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 폴리펩타이드.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 재조합 PCV2 ORF2 단백질, 바람직하게는 재조

합 배콜로바이러스 발현된 PCV2 ORF2 단백질인, 폴리펩타이드.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 PCV2 서브타입 b(PCV2b) ORF2 단백질인, 폴리펩타이드.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 이루어진 PCV2 ORF2 단백질인, 폴리펩타이드.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 서열번호 6 내지 서열번호 9에 제시된 서열들로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, 상기 폴리펩타이드가 서열번호 10 내지 45로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 PCV2 ORF2 단백질이 서열번호 2에 제시된 단백질인, 폴리펩타이드.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 함유하는 면역원성 조성물로서, 임의로 상기 면역원성 조성물은 PCV2a ORF-2 폴리펩타이드를 추가로 함유하고, 여기서, 상기 PCV2a ORF-2 폴리펩타이드는 서열번호 3의 서열과 바람직하게는 94% 이상 또는 바람직하게는 95% 이상 동일한, 면역원성 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 바람직하게는 발현 벡터.

청구항 24

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 바람직하게는 발현 벡터를 포함하는, 세포.

청구항 25

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 복수의 폴리펩타이드로 이루어진 바이러스 유사 입자.

청구항 26

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 배콜로바이러스.

청구항 27

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 배콜로바이러스를 포함하는 세포, 바람직하게는 곤충 세포.

청구항 28

의약, 바람직하게는 백신의 조제를 위한

- 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드,
 - 제21항의 면역원성 조성물,
 - 제22항의 폴리뉴클레오타이드,
 - 제25항의 바이러스 유사 입자,
 - 제26항의 배플로바이러스,
 - 제23항의 플라스미드, 및/또는
 - 제24항 또는 제27항의 세포
- 의 용도.

청구항 29

PCV2로의 감염의 치료 또는 예방, PCV2로의 감염에 의해 야기된 임상 징후의 감소, 예방 또는 치료, 또는 PCV2로의 감염에 의해 야기된 질환의 예방 또는 치료 방법에 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물.

청구항 30

제25에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 PCV2로의 감염은 PCV2 서브타입 b(PCV2b) 및/또는 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 PCV2로의 감염이 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 32

제30항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 PCV2b로의 감염이 (i) PCV2b 및 (ii) 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 동시 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염이 PCV2 서브타입 a(PCV2a) 및/또는 PCV2 서브타입 c(PCV2c)로의 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염이 PCV2a로의 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 35

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 PCV2로의 감염이 (i) PCV2b 및 (ii) PCV2a로의 동시 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 PCV2b로의 감염이, 서열번호 2의 서열과 94% 이상 또는 바람직하게는

95% 이상 동일한 폴리펩타이드를 포함하거나, 서열번호 2의 서열과 94% 이상 또는 바람직하게는 95% 이상 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 PCV2로의 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 37

제23항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 PCV2a로의 감염이, 서열번호 3의 서열과 94% 이상 또는 바람직하게는 95% 이상 동일한 폴리펩타이드를 포함하거나, 서열번호 3의 서열과 94% 이상 또는 바람직하게는 95% 이상 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 PCV2로의 감염인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 38

제29항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, PCV2로의 감염의 치료 또는 예방은 상기 PCV2에 대한 면역 반응의 유도에 기초하거나 이를 포함하거나 이로 구성되고, 상기 임상 징후는 림프성 고갈(lymphoid depletion), 림프성 염증, 림프 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC, 바이러스혈증, 비강 shedding(nasal shedding), 발열, 감소된 평균 1일 체중 증가, 폐 염증, 폐 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC로 이루어진 그룹으로부터 선택되거나 상기 질환이 PMWS인, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 39

제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물로서, 상기 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염의 치료 또는 예방은 2b 이외의 다른 서브타입의 상기 PCV2에 대한 면역 반응의 유도, 또는 2b 이외의 다른 서브타입의 상기 PCV2 및 PCV2b에 대한 면역 반응의 동시 유도에 기초하거나, 이를 포함하거나, 이로 구성되는, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물.

청구항 40

동물에게 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물을 투여함을 포함하는, PCV2로의 감염의 치료 또는 예방, PCV2로의 감염에 의해 야기되는 임상 징후의 감소, 예방 또는 치료, 또는 PCV2로의 감염에 의해 야기되는 질환의 예방 또는 치료 방법으로서, 상기 PCV2로의 감염은 바람직하게는 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 PCV2로의 감염인, 방법.

청구항 41

PCV2로의 감염의 치료 또는 예방, PCV2로의 감염에 의해 야기되는 임상 징후의 감소, 예방 또는 치료, 또는 PCV2로의 감염에 의해 야기되는 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 조제를 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물의 용도로서, 상기 PCV2로의 감염이 바람직하게는 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 PCV2로의 감염인, 용도.

청구항 42

제40항의 방법 또는 제41항의 용도로서, 상기 PCV2로의 감염의 치료 또는 예방이 상기 PCV2에 대한 면역 반응의 유도에 기초하거나 이를 포함하거나 이로 이루어지거나, 서브타입 2a 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염의 예방, 감소 또는 치료가 서브타입 2a 이외의 다른 서브타입의 상기 PCV2에 대한 면역 반응의 유도 또는 서브타입 a 이외의 다른 서브타입의 상기 PCV2 및 PCV2a에 대한 면역 반응의 동시 유도에 기초하거나 이를 포함하거나 이로 이루어지고, 상기 임상 징후는 림프성 고갈, 림프성 염증, 림프 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC, 바이러스혈증, 비강 shedding, 발열, 감소된 평균 1일 체중 증가, 폐 염증, 폐 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC로 이루어진 그룹으로부터 선택되거나 상기 질환이 PMWS인, 방법 또는 용도.

청구항 43

제29항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제21항의 면역원성 조성물, 또는 제40항 또는 제42항의 방법, 또는 제41항 또는 제42항에 따른 용도로서, 상

기 폴리펩타이드 또는 상기 면역원성 조성물이 1일 1회 투여되는, 폴리펩타이드 또는 면역원성 조성물 또는 방법 또는 용도.

청구항 44

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드의 생산 방법으로서, 세포를 제23항의 플라스미드로 형질감염 시킴을 포함하는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드의 생산 방법으로서, 세포, 바람직하게는 곤충 세포를 제26항의 배콜로바이러스로 감염시킴을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 서열 목록
- [0002] 본 출원은 37 C.F.R. 1.821-1.825에 따른 서열목록을 포함한다. 본 출원에 첨부된 당해 서열목록은 그 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다.
- [0003] 본 발명의 배경
- [0004] 돼지 쉰코바이러스 2형(PCV2)은 소형(17-22nm 직경)의 20면체형 비-외피 DNA 바이러스이고, 이는 단일 가닥의 원형 게놈을 함유한다. PCV2는 돼지 쉰코바이러스 1형(PCV-1)과 대략 80%의 서열 동일성을 공유한다. 하지만, 일반적으로 비-병독성인 PCV1과는 대조적으로, PCV2에 감염된 돼지는 통상적으로 이유 후 전신 소모성 증후군(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)이라고 칭하는 증후군을 나타낸다. PMWS는 임상적으로 소모(wasting), 피부의 창백함, 수척, 호흡 곤란, 설사, 황달(icterus), 황달(jaundice)을 특징으로 한다. 일부 병든 돼지에서, 모든 징후들의 조합이 나타날 것이고, 한편, 다른 돼지들은 이들 임상 징후들 중 1개 또는 2개만을 가질 것이다. 부검 동안, 미시적 병변과 거시적 병변 또한 다중 조직 및 기관에서 나타나고, 병변이 가장 흔한 부위는 림프 기관이다. PCV2 핵산 또는 항원의 양과 미시적 림프 병변의 중증도 사이에 강한 상관관계가 관찰되었다. PCV2로 감염된 돼지에 대한 사망률은 80%에 육박할 수 있다. PMWS 이외에, PCV2는 가성 광견병(pseudorabies), 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 글래서 질환(Glasser's disease), 연쇄상구균성 수막염(streptococcal meningitis), 살모넬라증(salmonellosis), 이유 후 대장균증(postweaning colibacillosis), 식이성 간증(dietetic hepatosis), 화농성 기관지폐렴(suppurative bronchopneumonia)을 포함하는 몇몇의 기타 감염과 관련되어 왔다.
- [0005] 현재, PCV2의 3개의 서브타입(PCV2a, PCV2b 및 PCV2c)이 공지되어 있고, 이들은 PCV2 유전자형(genotype)에 대한 통합 명명법에 따라 분류된다(Segales, J. *et al.*, 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8). 2개의 추가의 서브타입(PCV2d 및 PCV2e)이 제안되어 왔지만(Wang *et al.* Virus Res. 2009 145(1):151-6), 이들은 PCV2a 및 PCV2b 클러스터에 속함이 후에 입증되었다(Cortey *et al.* Vet Microbiol. 2011 149(3-4):522-32011). PCV2 유전자형에 대한 이러한 통합 명명법에 따라, orf2 유전자를 이용하여 pcv-2에 대한 유전자형 분석(genotyping)을 수행하였고, 여기서, 상기 유전자형 분석은, 비교하는 2개의 서열이 상이한 뉴클레오타이드 부위의 부분(p 거리)에 기초한다. 이러한 값은 뉴클레오타이드 차이의 수를 비교된 뉴클레오타이드들의 총수로 나눔으로써 얻어지고(Kumar *et al.* 2001 Bioinformatics 17, 1244-1245), 후속적으로, p 거리/빈도 히스토그램의 제작은, 상이한 유전자형을 구별하기 위한 잠재적 컷-오프(cut-off) 값을 측정하는 것을 가능하게 한다(Rogers and Harpending 1992 Molecular Biology and Evolution 9, 552-569; Biagini *et al.* 1999 Journal of General Virology 80, 419-424). 이러한 방법을 이용하여, orf2 pcv-2 서열은 이들 사이의 유전학적 거리가 0인 경우에 상이한 유전자형에 배정된다.
- [0006] US 2011/0305725 A1은, 돼지에서 새로운 백신 제형을 시험하여 돼지 쉰코바이러스 및 엠. 하이오뉴모니아에(*M. hyopneumoniae*)에 대한 이의 효능을 평가하는 것으로 계획된 연구를 기술한다. 이 연구의 과정 동안, 대조군

및 백신접종 그룹의 돼지 중 몇몇이 PMWS의 임상 징후를 나타냈음이 관찰되었다. 이어서, 이들 돼지가 챌린지(challenge) 전에 환경적 PCV2에 노출되었음이 확인되었다. 이들 돼지 유래의 혈액 및 조직 샘플에 대한 분자 분석은, 이들이 챌린지에 사용된 균주와 상이한 2B형 균주를 번식시켰음을 밝혔다(US 2011/0305725 A1의 단락 [0152]).

- [0007] W02011116094 A2는 서브타입 PCV2b의 PCV2를 갖는 키메라 돼지 써코바이러스 감염성 DNA 클론 및 생 약독화된(live attenuated) 키메라 바이러스, 및 비-병원성 PCV1 바이러스 계통에 통합된 서브타입 PCV2b의 캡시드 유전자를 개시하고, 여기서, 약독화된 키메라 바이러스는 생 백신 및 불활성화된(사멸된) 백신으로서 사용할 수 있다.
- [0008] W02013030320 A1은 합성 써코바이러스 타입 캡시드 단백질 및 상기 단백질을 이용한 포유동물에서의 PCV2-관련 질환의 치료 및/또는 예방 방법에 관한 것이다. 2개의 서열은 W02013030320 A1에 따라 고안되었고, 여기서, 하나의 서열은 특히, 하기 최적화를 이용하여 추가로 변형되었다:
- [0009] - 아미노산 위치 165에서 잠재적 개열 부위를 제거하였다.
- [0010] - 위치 200에서 돌연변이를 도입하였다.
- [0011] - 위치 161에서 대체가 이루어졌다.
- [0012] - 위치 170에서 대체가 이루어졌다.
- [0013] - 위치 225에서 S 잔기를 D로 대체하였다.
- [0014] - 위치 143에서 대체가 이루어졌다.
- [0015] - 서열의 N-말단(위치 13 및 20)에서 2회의 대체가 이루어졌다.
- [0016] 그러나, 실제로 야생형 PCV2b ORF2 단백질의 발현이 불충분한 것으로 발견되고, 서브유닛 백신을 제조하는데 유용한 바이러스 유사 입자(VLP)를 수용하기 위해서 추가의 농축 단계가 요구되므로, 발현 효율을 향상시키고 VLP의 생산을 증가시키기 위해서 천연 발생 PCV2b ORF2 단백질 서열의 용이한 변형이 요구되고, 이에 의해 효율적인 PCV2 서브유닛 백신의 신속하고 용이한 생산이 가능해진다.
- [0017] 상기 기술적 문제에 대한 해결책은 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 및 청구범위에 특성확인되는 실시형태들에 의해 달성된다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 본 발명의 상이한 양상들에서 청구범위에 따라 실행된다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1 - PCV2a와 PCV2b ORF2 아미노산 서열 사이의 주요 아미노산 변화.
- 도 2 - PCV2b ORF2에 대한 배큘로바이러스 수거물 상청액의 평가. 레인 1 = Circoflex WSV(PCV2a ORF2), 레인 2 = PCV2b ORF2 BDH SFCO, 레인 4 = PCV2b ORF2 BDH R63T, 레인 5 = PCV2b ORF2 BDH R63K.
- 도 3 - PCV2b ORF2에 대한 100,000g 펠렛의 평가. 레인 1 = PCV2b ORF2 BDH, 레인 2 = PCV2b ORF2 BDH R63K, 레인 3 = PCV2b ORF2 BDH R63T, 레인 4 = Circoflex WSV(PCV2a ORF2).
- 도 4 - 슈크로스 농도구배 분획의 SDS-PAGE 분리. F1 - F12 = 분획 1 내지 12.
- 도 5a 및 도 5b - EM에 의한 VLP 형성의 확인.
- 도 6 - PCV2b ORF2 돌연변이체 작제물 평가의 결과. SFCO = 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)에 최적화된 코돈. 천연 PCV2b ORF2 BDH 및 R63K 작제물은, 동시에 R63T 작제물이 발견되었으므로 VLP에 대해 확인되거나 정량되지 않았다.
- 도 7a 및 도 7b - PCV2b ORF2 돌연변이체 작제물 평가의 결과. SFCO = 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)에 최적화된 코돈. ORF2 돌연변이체 작제물의 VLP 정량은 $\mu\text{g/ml}$ 로서 나타났다.
- 도 8 - PCV2b ORF2 야생형 및 돌연변이체 아미노산 서열의 정렬, 여기서, 서열번호 5 및 서열번호 2로 명시된 서열은 PCV2b ORF2 야생형 서열이고, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9로 명시된 서열은 돌연변이체 서열이고, 서열번호 3은 야생형 PCV2a ORF2 단백질의 서열에 상응한다. 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9로 명시된 서열에서, (위치 8, 53, 57, 68, 89, 90, 121, 134, 169, 190, 215 및 234에서

의) "X"는 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기이고; (위치 63에서의) "X"는 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기이고, (위치 210에서의) "x"는 D 및 E로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은, PCV2 서브타입 b(PCV2b) ORF2 단백질의 아미노산에서의 단일 돌연변이가 VLP 생산 수준을 현저하게 증가시키는데 충분하고, 이에 의해 효과적인 PCV2 서브유닛 백신의 신속한 생산이 가능해진다는 놀라운 발견에 기초한다.
- [0021] 본 발명의 기저가 되는 작업에 있어서, PCV2a와 PCV2b ORF2 서열 사이의 주요 아미노산 차이의 위치는 돌연변이에 대한 잠재적 위치로서 동정되었다.
- [0022] 이러한 맥락에서, PCV2b ORF2 단백질에 관해 전형적인 6개의 아미노산 위치들이 동정되었다, 즉,
- [0023] - 아미노산 위치 59에서 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기,
- [0024] - 아미노산 위치 64에서 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기,
- [0025] - 아미노산 위치 88에서 프롤린 잔기,
- [0026] - 아미노산 위치 151에서 트레오닌 잔기,
- [0027] - 아미노산 위치 206에서 이소류신 잔기, 및
- [0028] - 아미노산 위치 232에서 아스파라긴 잔기.
- [0029] 본원에 기술된 바와 같이, 아미노산 위치의 번호매김(numbering)은 전장(full-length) 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열(서열번호 2 또는 서열번호 5)을 참조한다. 따라서, 본원에 언급된 아미노산 위치의 번호매김은, (N-말단) 아미노산 위치 1에 메티오닌 잔기를 포함하는, 234 또는 233 아미노산 잔기를 갖는 야생형 PCV2 ORF2 단백질 서열에 관한 것이다.
- [0030] 따라서, 본 발명의 맥락에서 사용되는 어구 "여기서, 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한다"는 서열번호 2 또는 서열번호 5에 예시적으로 제시되는 천연 발생 PCV2 ORF2 단백질의 서열에 관한 것이다.
- [0031] PCV2b ORF2 단백질에 대해 전형적인 6개의 아미노산 위치들의 돌연변이는, 예상외로 PCV2b ORF2 단백질의 BC 루프의 아미노산 서열 내의 위치의 1개의 돌연변이, 즉, 위치 63에서의 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기의 치환이, 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2와 비교하여 PCV2 ORF2 단백질의 발현을 유의하게 증가시키는데 충분하였음을 보여주었다.
- [0032] 따라서, 한 양상에서, 본 발명은 하기 (a), (b) 및 (c)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 폴리펩타이드에 관한 것이다: (a) 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 및/또는 아미노산 위치 88에 프롤린 잔기 및/또는 아미노산 위치 151에 트레오닌 잔기 및/또는 아미노산 위치 206에 이소류신 잔기 및/또는 아미노산 위치 232에 아스파라긴 잔기를 갖고, 아미노산 위치 63에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기를 갖는 PCV2 ORF2 단백질(여기서, 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조한다); (b) (i) BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하고 (ii) 바람직하게는 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 유의하게 더 높은 양으로 발현됨을 특징으로 하는 PCV2 ORF2 단백질; 및 (c) (a)와 (b)의 조합.
- [0033] 바람직하게, 이후에 "본 발명의 폴리펩타이드"라고도 칭하는 상기 폴리펩타이드는 단리된 폴리펩타이드이다.
- [0034] 특히, 본 발명의 폴리펩타이드는 비-천연 발생 폴리펩타이드이다.
- [0035] 따라서, 제1 양상 (a)에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 아미노산 위치 59에서의 아르기닌 잔기(R) 또는 리신 잔기(K), 아미노산 위치 88에서의 프롤린 잔기(P), 아미노산 위치 151에서의 트레오닌 잔기(T), 아미노산 위치 206에서의 이소류신 잔기(I), 및 아미노산 위치 232에서의 아스파라긴 잔기(N)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 잔기(괄호안에 단일 문자 암호)를 갖고, 아미노산 위치 63에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기를 갖는 PCV2 ORF2 단백질이다.

- [0036] 특히, 위치 63에서의 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기는 천연 발생 아미노산 잔기, 바람직하게는 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 유전학적으로 암호화된 아미노산 잔기이다.
- [0037] 후속적으로, 하기 약어들도 사용된다:
- [0038] "아미노산 위치 59에서의 아르기닌 잔기"에 대한 약어로서의 "R59",
- [0039] "아미노산 위치 59에서의 리신 잔기"에 대한 약어로서의 "K59",
- [0040] "아미노산 위치 88에서의 아르기닌 잔기"에 대한 약어로서의 "P88",
- [0041] "아미노산 위치 151에서의 트레오닌 잔기"에 대한 약어로서의 "T151",
- [0042] "아미노산 위치 206에서의 이소류신 잔기"에 대한 약어로서의 "I206",
- [0043] "아미노산 위치 232에서의 아스파라긴 잔기"에 대한 약어로서의 "N232".
- [0044] 따라서, 바람직하게, 양상 (a)에 따른 폴리펩타이드는
- [0045] P88을 갖거나,
- [0046] T151을 갖거나,
- [0047] I206을 갖거나,
- [0048] N232를 갖거나,
- [0049] R59 또는 K59를 갖거나,
- [0050] P88 및 T151을 갖거나,
- [0051] P88 및 I206을 갖거나,
- [0052] P88 및 N232를 갖거나,
- [0053] P88 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0054] T151 및 I206을 갖거나,
- [0055] T151 및 N232를 갖거나,
- [0056] T151 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0057] I206 및 N232를 갖거나,
- [0058] I206 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0059] N232 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0060] P88 및 T151 및 I206을 갖거나,
- [0061] P88 및 T151 및 N232를 갖거나,
- [0062] P88 및 T151 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0063] P88 및 I206 및 N232를 갖거나,
- [0064] P88 및 I206 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0065] P88 및 N232 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0066] T151 및 I206 및 N232를 갖거나,
- [0067] T151 및 I206 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0068] T151 및 N232 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0069] I206 및 N232 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0070] P88 및 T151 및 I206 및 N232를 갖거나,

- [0071] P88 및 T151 및 I206 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0072] P88 및 T151 및 N232 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0073] P88 및 I206 및 N232 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0074] T151 및 I206 및 N232 및 R59 또는 K59를 갖거나,
- [0075] P88 및 T151 및 I206 및 N232 및 R59 또는 K59를 갖는
- [0076] PCV2 ORF2 단백질이다.
- [0077] 따라서, 보다 바람직하게, 양상 (a)에 따른 폴리펩타이드는
- [0078] P88을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0079] T151을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0080] I206을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0081] N232를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0082] R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0083] K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0084] P88 및 T151을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0085] P88 및 I206을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0086] P88 및 N232를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0087] P88 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0088] P88 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0089] T151 및 I206을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0090] T151 및 N232을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0091] T151 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0092] T151 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0093] I206 및 N232를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0094] I206 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0095] I206 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0096] N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0097] N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0098] P88 및 T151 및 I206을 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0099] P88 및 T151 및 N232를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0100] P88 및 T151 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0101] P88 및 T151 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0102] P88 및 I206 및 N232를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0103] P88 및 I206 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0104] P88 및 I206 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0105] P88 및 N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0106] P88 및 N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,

- [0107] T151 및 I206 및 N232를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0108] T151 및 I206 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0109] T151 및 I206 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0110] T151 및 N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0111] T151 및 N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0112] I206 및 N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0113] I206 및 N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0114] P88 및 T151 및 I206 및 N232를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0115] P88 및 T151 및 I206 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0116] P88 및 T151 및 I206 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0117] P88 및 T151 및 N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0118] P88 및 T151 및 N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0119] P88 및 I206 및 N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0120] P88 및 I206 및 N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0121] T151 및 I206 및 N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0122] T151 및 I206 및 N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질,
- [0123] P88 및 T151 및 I206 및 N232 및 R59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질, 및
- [0124] P88 및 T151 및 I206 및 N232 및 K59를 갖는 PCV2 ORF 2 단백질
- [0125] 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0126] 제2 양상 (b)에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 특히 (i) BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하고 (ii) 특히 배큘로바이러스 발현 시스템에서, 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 유의하게 더 높은 양으로, 바람직하게는 2배 이상 더 높은 양으로, 보다 바람직하게는 3배 이상 더 높은 양으로, 더욱 바람직하게는 5배 이상 더 높은 양으로, 더욱 더 바람직하게는 8배 이상 더 높은 양으로 발현됨을 특징으로 하는 PCV2 ORF2 단백질이고, 여기서, 상기 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질은 바람직하게는 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이를 제외하고는 본 발명의 폴리펩타이드와 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0127] 따라서, 특히, PCV2 ORF2 단백질들의 발현이 본 발명의 이러한 양상에 따라 비교되는 PCV2 ORF2 단백질들 둘 다의 아미노산 서열은 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이를 제외하고는 동일하다.
- [0128] 본 발명의 맥락 내에서 용어 "BC 루프"는 특히, 본원에 인용에 의해 포함되는 문헌[Khayat *et al.* J Virol 85:7856-62 (2011)]에 공개된 PCV2 ORF2 단백질의 결정 구조에서 나타날 수 있는 바와 같이, β 시트 2차 구조로 폴딩되는 2개의 제1 N-말단 아미노산 스트레치(stretch) 사이에 위치한 PCV2 ORF2 아미노산 서열의 일부를 나타낸다. 특히, 문헌[Khayat *et al.*]은 4 내지 9개의 아미노산 잔기 길이로서 β 가닥 BC, DE, FG 및 HI를 연결시키는 루프, 및 PCV 캡시드 표면으로부터 가장 멀리 연장된 knob-유사(knob-like) 돌출부를 정의하고 5-폴드 축을 장식하는 바와 같은 루프 BC 및 HI를 기술한다.
- [0129] BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 PCV2 ORF2 단백질이 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 더 높은 양으로 발현되는지를 결정하기 위해, 바람직하게는 실시예 1에 이후에 기술되는 방법을 사용한다.
- [0130] 따라서, 한 예에서, BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 PCV2 ORF2 단백질이 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 더 높은 양으로 발현되는지를 결정하기 위해, Sf+ 세포를 0.1의 표적 MOI에서 배큘로바이러스로 감염시키는 단계, 상기 감염을 5 내지 7일 동안 진행시키는 단계, 20,000g에서 20분 동안의 원심분리에 의해 수거하여 세포 잔해물 및 불용성 단백질을 제거하는 단계, 수거 상청액의 0.2 μ m 여과하는 단계, 및 α -PCV2 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 PCV2 ORF2 발현에 대해 직접적으로 평가하는 단계를 포

합하는 방법에서 배콜로바이러스 발현 시스템을 사용한다.

- [0131] 바람직하게, 상기 방법은 Sf+ 세포를 0.1의 표적 MOI에서 감염시키는 단계에 사용되는 배콜로바이러스의 제조를 추가로 포함하고, 특히, 하기 단계들 중 하나 이상을 추가로 포함한다: BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 PCV2 ORF2 단백질을 암호화하는 암호화 서열을 배콜로바이러스 전이 벡터에 클로닝하는 단계, 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질을 암호화하는 암호화 서열을 배콜로바이러스 전이 벡터에 클로닝하는 단계, BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 PCV2 ORF2 단백질을 암호화하는 암호화 서열을 포함하는 상기 배콜로바이러스 전이 벡터를 Sf9 세포 내의 배콜로바이러스 DNA와 함께 동시-형질감염시키는 단계, 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질을 암호화하는 암호화 서열을 포함하는 상기 배콜로바이러스 전이 벡터를 Sf9 세포 내의 배콜로바이러스 DNA와 함께 동시-형질감염시키는 단계.
- [0132] 보다 바람직하게, 상기 방법은 부가적으로 하기 단계들 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 얻어진 재조합 배콜로바이러스를 IFA에 의해 PCV2 ORF2 단백질의 발현에 대해 확인하는 단계, Sf+ 세포에서 각각의 재조합 배콜로바이러스의 증폭된 스톱을 제조하는 단계, TCID₅₀ 방법을 통해 상기 증폭된 스톱을 적정하여 배콜로바이러스 적정 농도(titer)를 측정하는 단계.
- [0133] 특히, BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하는 PCV2 ORF2 단백질인 본 발명의 폴리펩타이드는 동일한 그리고/또는 비슷한 주위 조건 하에, 바람직하게는 배콜로바이러스 발현 시스템에서 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 더 높은 양으로 발현된다.
- [0134] 보다 구체적으로, 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 상기 PCV2 ORF2 단백질은 야생형 PCV2 ORF2 단백질이다.
- [0135] 바람직하게, 본 발명에 따른 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이는 아미노산 위치 58 내지 66의 영역 내의 1개 이상의 돌연변이이고, 특히 아미노산 위치 60 내지 66의 영역 내에 1 내지 7개의 아미노산 잔기의 결실, 치환 및/또는 부가를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0136] 보다 바람직하게, BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이는 아미노산 위치 63에서의 1개의 아미노산 잔기의 결실, 치환 및/또는 부가이고, 여기서, 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 위치 63에서의 아미노산 잔기의 치환이 가장 바람직하다.
- [0137] 더욱 바람직하게, 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 위치 63에서의 아미노산 잔기의 치환은 천연 발생의, 바람직하게는 유전학적으로 암호화된, 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기에 의한 치환이다.
- [0138] 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 위치 63에서의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 본 발명에 따른 BC 루프의 바람직한 서열은 서열번호 10 내지 서열번호 45에 제시된다.
- [0139] 따라서, 특히, 본 발명에 따른 BC 루프 내의 1개 이상의 돌연변이는 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 위치 63에서의 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기의 치환이거나 이를 포함한다.
- [0140] 따라서, 본원에 기술되는 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질은 바람직하게는 아미노산 위치 63에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기를 갖고, 이어서, 이는 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라 치환되고, 이에 의해 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 얻어진다.
- [0141] 가장 바람직하게, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열번호 10 내지 서열번호 45로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열을 포함하고, 여기서, 상기 서열은 특히 본 발명의 폴리펩타이드의 서열의 아미노산 위치 58 내지 66에 위치한다.
- [0142] 제3 양상 (c)에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 본원에 기술된 양상 (a) 및 양상 (b)에 따른 PCV2 ORF2 단백질의 임의의 조합이고, 따라서,
- [0143] - 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기, 및/또는
- [0144] - 아미노산 위치 88에 프롤린 잔기, 및/또는
- [0145] - 아미노산 위치 151에 트레오닌 잔기, 및/또는
- [0146] - 아미노산 위치 206에 이소류신 잔기, 및/또는
- [0147] - 아미노산 위치 232에 아스파라긴 잔기

- [0148] 를 갖고,
- [0149] 아미노산 위치 63에 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기를 갖는 임의의 PCV2 ORF2 단백질이고, 여기서, 상기 아미노산 위치의 번호매김은 야생형 PCV2 ORF2 단백질의 아미노산 서열을 참조하고; (i) BC 루프 내에 1개 이상의 돌연변이를 포함하고 (ii) 바람직하게는 이러한 돌연변이를 포함하지 않는 PCV2 ORF2 단백질과 비교하여 유의하게 더 높은 양으로 발현됨을 특징으로 한다.
- [0150] 본 발명의 맥락에서 기술되는 용어 "아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 유전학적으로 암호화된 아미노산 잔기"는 특히 알라닌 잔기(A), 아스파르테이트 잔기(D), 아스파라긴 잔기(N), 시스테인 잔기(C), 글루타민 잔기(Q), 글루타메이트 잔기(E), 페닐알라닌 잔기(F), 글리신 잔기(G), 히스티딘 잔기(H), 이소류신 잔기(I), 류신 잔기(L), 메티오닌 잔기(M), 프롤린 잔기(P), 세린 잔기(S), 트레오닌 잔기(T), 발린 잔기(V), 트립토판 잔기(W), 및 티로신 잔기(Y)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 잔기(괄호안에 단일 문자 암호)를 말한다.
- [0151] 보다 구체적으로, 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기는 극성이지만 하전되지 않은 측쇄를 갖는 상기 아미노산 잔기, 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 및 글리신 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서, 바람직하게는 극성이지만 하전되지 않은 측쇄를 갖는 아미노산 잔기는 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 티로신 잔기, 아스파라긴 잔기, 및 글루타민 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, 소수성 측쇄를 갖는 상기 아미노산 잔기는 바람직하게는 알라닌 잔기, 발린 잔기, 류신 잔기, 이소류신 잔기, 페닐알라닌 잔기, 및 트립토판 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0152] 가장 바람직하게, 본 발명의 맥락에서 언급되는 아르기닌 잔기 또는 리신 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기는 세린 잔기 및 트레오닌 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0153] 추가의 바람직한 양상에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 재조합 PCV2 ORF2 단백질, 예를 들면, 재조합 배큘로바이러스 발현된 PCV2 ORF2 단백질이다.
- [0154] 본원에서 사용된 용어 "재조합 PCV2 ORF2 단백질"은 특히 재조합 DNA 분자로부터 발현되는 단백질 분자, 예를 들면, 재조합 DNA 기술에 의해 생산되는 폴리펩타이드를 말한다.
- [0155] 이러한 기술의 한 예로는 발현되는 단백질을 암호화하는 DNA를 적합한 발현 벡터, 바람직하게는 배큘로바이러스 발현 벡터(이는 결국 형질감염시키는데 사용됨)에 삽입하는 경우 또는 DNA에 의해 암호화되는 단백질 또는 폴리펩타이드를 생산하기 위한 숙주 세포를 감염시키는 배큘로바이러스 발현 벡터의 경우가 포함된다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "재조합 PCV2 ORF2 단백질"은 특히 재조합 DNA 분자로부터 발현되는 단백질 분자를 말한다.
- [0156] 특정 실시형태에 따르면, 재조합 PCV2 ORF2 단백질은 하기 단계들을 이용한 방법에 의해 생산된다: PCV2 ORF2에 대한 유전자를 배큘로바이러스 전이 벡터에 클로닝하고; 상기 전이 벡터를 사용하여, 곤충 세포에서의 상동 재조합에 의해 상기 유전자를 함유하는 재조합 배큘로바이러스를 제조하고; 이어서, 재조합 배큘로바이러스로의 감염 동안 곤충 세포에서 PCV2 ORF2 단백질이 발현된다.
- [0157] 대안의 실시형태에 따르면, 재조합 PCV2 ORF2 단백질은 재조합 발현 플라스미드로부터 곤충 세포에 발현된다. 이러한 대안의 실시형태의 경우, 배큘로바이러스는 불필요하다.
- [0158] 또한, 용어 "한 서열로 이루어진 재조합 PCV2 단백질"이 특히 임의의 공변역 및/또는 번역후 변형 또는 폴리펩타이드가 발현되는 세포에 의해 영향을 받은 서열의 변형에 관한 것임이 추가로 이해된다. 따라서, 본원에 기술되어 있는 용어 "한 서열로 이루어진 재조합 PCV2 ORF2 단백질"도 또한 폴리펩타이드가 발현되는 세포에 의해 영향을 받은 하나 이상의 변형, 특히, 단백질 생합성 및/또는 바람직하게는 글리코실화, 인산화 및 아세틸화로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단백질 프로세싱에서 영향을 받은 아미노산 잔기의 변형을 갖는 서열에 관한 것이다.
- [0159] 바람직하게, 본 발명에 따른 재조합 PCV2 ORF2 단백질은 특히 배양된 곤충 세포에서 배큘로바이러스 발현 시스템에 의해 생산되거나 이에 의해 수득가능하다.
- [0160] 다른 바람직한 양상에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 PCV2 서브타입 b(PCV2b) ORF2 단백질이다.
- [0161] 또한 추가의 바람직한 양상에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 보다 바람직하게는 94% 이상, 더욱 바람직하게는 96% 이상, 더욱 더 바람직하게는 98% 이상 또

는 특히 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 PCV2 ORF2 단백질이다.

[0162] 가장 바람직하게, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열번호 6 내지 서열번호 9의 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 이는 또한 도 8에 나타낸다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 바람직하게는 하기 서열들 (i) 내지 (iv)로부터 선택된다:

```
MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTXGYT
XKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQXYNIRXTMYVQFREF
```

[0163] (i) NLKDPPLNP (서열번호 6),

```
MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTXGYT
XKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQXYNIRXTMYVQFREF
```

[0164] (ii) NLKDPPLNP (서열번호 7),

```
MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTXGYT
XKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQXYNIRXTMYVQFREF
```

[0165] (iii) NLKDPPLNPX (서열번호 8),

```
MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTXGYT
XKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQXYNIRXTMYVQFREF
```

[0166] (iv) NLKDPPLNPX (서열번호 9),

[0167] 여기서, 상기 서열 (i) 내지 (iv)에서:

[0168] "X"는 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기이고;

[0169] "X"는 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기이고;

[0170] "x"는 D 및 E로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기이다.

[0171] 설명적 목적을 위해 그리고 비-제한적 예에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 하기 서열로 이루어진 폴리펩타이드이다:

```
MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKT
TVXTPSWNVDMMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVG
STAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLDRTIDYFQPNN
KRNLWLRLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLNPK
```

[0172] (서열번호 46),

[0173] 여기서, "X"는 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기이다.

[0174] 본 발명의 또 다른 바람직한 양상에서, 본원에 기술되는 야생형 PCV2 ORF2 단백질은 서열번호 2에 제시되는 단백질이다.

[0175] 다른 양상에 따르면, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 함유하는 면역원성 조성물을 추가로 제공한다.

[0176] 다른 바람직한 양상에 따르면, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드 및 PCV2a ORF-2 폴리펩타이드를 함유하는 면역원성 조성물을 추가로 제공하고, 여기서, 상기 PCV2a ORF-2 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3의 서열

과 94% 이상 또는 바람직하게는 95% 이상 동일한 폴리펩타이드이다.

- [0177] 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서, 본 발명에 따른 상기 폴리펩타이드는 바람직하게는 단리된 폴리뉴클레오타이드이다.
- [0178] 설명적 목적을 위해 그리고 **비-제한적 예**에서, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 4에 제시된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드이다.
- [0179] 본원에 기술되어 있는 폴리뉴클레오타이드의 생산은 당해 분야 기술 범위 내이고, 여러 문헌 중에서도 문헌[Sam brook *et al.*, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Amusable, *et al.*, 2003, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis *et al.* (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; 및 Erlich (ed), 1994, PCR Technology, Oxford University Press, New York, 상기 문헌들은 모두 본원에 인용에 의해 포함된다]에 기술되어 있는 재조합 기술에 따라 수행할 수 있다.
- [0180] 또한, 본 발명은 특히 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 배컬로바이러스를 제공하고, 여기서, 본 발명에 따른 상기 배컬로바이러스는 바람직하게는 단리된 배컬로바이러스이다.
- [0181] 추가로, 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 바람직하게는 발현 벡터를 제공하고, 여기서, 본 발명에 따른 상기 플라스미드는 특히 단리된 플라스미드이다.
- [0182] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 배컬로바이러스 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 바람직하게는 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공하고, 여기서, 상기 본 발명에 따른 세포는 바람직하게는 단리된 세포이다.
- [0183] 또 다른 양상에서, 본 발명은 또한 의약, 바람직하게는 백신의 조제를 위한 본 발명의 폴리펩타이드; 본 발명에 따른 배컬로바이러스; 본 발명에 따른 면역원성 조성물; 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드; 본 발명에 따른 플라스미드; 및/또는 본 발명에 따른 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0184] 이 맥락에서, 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩타이드의 생산 방법을 제공하고, 여기서, 상기 방법은 세포, 바람직하게는 곤충 세포를 본 발명의 배컬로바이러스로 감염시키는 단계를 포함한다.
- [0185] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩타이드의 생산 방법을 제공하고, 여기서, 상기 방법은 세포를 본 발명에 따른 플라스미드로 형질감염시키는 단계를 포함한다.
- [0186] 본 발명의 폴리펩타이드는 바람직하게는 바이러스 유사 입자의 안정한 자기-조립(self-assembly)에 충분히 높은 양으로 발현되고, 이어서, 이는 이들이 면역원성 조성물 내에 함유된 경우에 단발 백신접종(single shot vaccination)에 사용할 수 있고, 이에 의해 PCV2로의 감염, 예를 들면, PCV2b 및/또는 PCV2a로의 감염에 의해 야기되는 임상 징후의 감소 및 예방이 가능해진다.
- [0187] 따라서, 본 발명은 특히 추가로 각각 본 발명의 폴리펩타이드에 또는 본 발명의 면역원성 조성물에 기초하고, 여기서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 상기 면역원성 조성물은 특정 목적을 위해 사용할 수 있다.
- [0188] 따라서, 한 양상에서, 본 발명은 PCV2로의 감염의 치료 또는 예방, PCV2로의 감염에 의해 야기되는 임상 징후의 감소, 예방 또는 치료, 또는 PCV2로의 감염에 의해 야기되는 질환의 예방 또는 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0189] 또한, 본 발명은, 동물에게, 특히, 당해 예방 또는 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물을 투여함을 포함하는, PCV2로의 감염의 치료 또는 예방, PCV2로의 감염에 의해 야기되는 임상 징후의 감소, 예방 또는 치료, 또는 PCV2로의 감염에 의해 야기되는 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0190] 또한, 본 발명은 PCV2로의 감염의 치료 또는 예방, PCV2로의 감염에 의해 야기되는 임상 징후의 감소, 예방 또는 치료, 또는 PCV2로의 감염에 의해 야기되는 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 폴리펩타이드의 용도 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물의 용도를 제공한다.

- [0191] 바람직한 양상에서, 본원에 기술되어 있는 PCV2로의 감염은 PCV2 서브타입 b(PCV2b)로의 감염 및/또는 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염이다.
- [0192] 본원에서 사용되는 용어 "PCV2로의 감염"은 용어 "PCV2 감염"과 동등하다.
- [0193] 특히, 본원에 언급되는 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염은 PCV2 서브타입 a(PCV2a) 및/또는 PCV2 서브타입 c(PCV2c)로의 감염이고, 바람직하게는 PCV2a로의 감염이다.
- [0194] 본원에 기술되는 용어 "PCV2 서브타입 b(PCV2b) ORF2 단백질"은 PCV2 유전자형 정의에 대한 정규화된 명명법에 의해 정의된 바와 같은 PCV-2b의 ORF2 유전자에 의해 암호화되는 단백질에 관한 것이다(본원에 인용에 의해 포함되는 문헌[Segales, J. *et al.*, 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8]).
- [0195] 다른 바람직한 양상에 따르면, 본원에 기술되는 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염은 (i) 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2 및 (ii) PCV2b와의 동시 감염, 특히, PCV2a와 PCV2b의 동시 감염이다.
- [0196] 본원에 기술되는 용어 "PCV2a", "PCV2b" 및 "PCV2c"는 각각 PCV2 유전자형 정의에 대한 정규화된 명명법에 따른 PCV-2a, PCV-2b 및 PCV-2c에 관한 것이다(본원에 인용에 의해 포함되는 문헌[Segales, J. *et al.*, 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8]).
- [0197] 특히, 본원에 언급된 PCV2b로의 감염은 (i) 서열번호 2의 서열과 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상, 더욱 더 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상 동일한 폴리펩타이드를 포함하는 PCV2 또는 (ii) 서열번호 2의 서열과 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상, 더욱 더 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 PCV2로의 감염이다.
- [0198] 본원에서 사용되는 바와 같이, 특히 용어 "서열번호 X의 서열과 동일한"은 각각 용어 "서열번호 X의 길이에 걸쳐 서열번호 X의 서열과 동일한" 또는 용어 "서열번호 X의 전체 길이에 걸쳐 서열번호 X의 서열과 동일한"과 동등함이 이해된다. 이러한 맥락에서, "X"는 1 내지 3으로부터 선택되는 임의의 정수이어서 "서열번호 X"가 본원에 언급된 서열번호 중 어느 하나를 나타낸다.
- [0199] 바람직하게, 본원에 기술되어 있는 PCV2a로의 감염은 (i) 서열번호 3의 서열과 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상, 더욱 더 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상 동일한 폴리펩타이드를 포함하는 PCV2 또는 (ii) 서열번호 3의 서열과 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상, 더욱 더 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 PCV2로의 감염이다.
- [0200] 바람직하게, 본 발명의 맥락에서, PCV2로의 감염의 치료 또는 예방은 상기 PCV2에 대한 면역 반응의 유도에 기초하거나 이를 포함하거나 이로 이루어지고, 본원에 언급된 임상 징후는 림프성 고갈(lymphoid depletion), 림프성 염증, 림프 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC, 바이러스혈증, 비강 shedding(nasal shedding), 발열, 감소된 평균 1일 체중 증가, 폐 염증, 폐 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나 본원에 언급된 상기 질환은 PMWS이다.
- [0201] 특히, 본 발명의 맥락에서, 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염의 치료 또는 예방은 2b 이외의 다른 서브타입의 상기 PCV2에 대한 면역 반응의 유도 또는 2b 이외의 다른 서브타입의 상기 PCV2 및 PCV2b에 대한 면역 반응의 동시 유도에 기초하거나 이를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0202] 본원에서 사용되는 용어 "예방" 또는 "감소" 또는 "예방하는" 또는 "감소시키는"은 각각 동물에게 본 발명의 조성물 내에 포함된 PCV2 항원, 즉, 본 발명의 폴리펩타이드를 투여함을 포함하는 프로세스를 의미하지만 이에 한정되는 것은 아니고, 여기서, 상기 PCV2 항원은 상기 동물에게 투여되는 경우에 PCV2에 대해 상기 동물에서 면역반응을 유발하거나 유발할 수 있다. 종합하면, 이러한 치료는 각각 PCV2에 의해 야기된 질환의 임상 징후의 감소 또는 PCV2 감염과 관련된 임상 징후의 감소를 초래한다. 보다 구체적으로, 본원에 사용되는 용어 "예방" 또는 "예방하는"은 일반적으로 PCV2에 의해 야기된 질환 프로세스의 유도 또는 개시 전에 동물이 본 발명의 면역원성 조성물에 노출되는 예방 프로세스를 의미한다.
- [0203] 여기서, "PCV2 감염과 관련된 임상 징후의 감소"는 야생형 감염과 비교하여, 그룹 내의 감염된 대상체의 수를 감소시키는 것, 감염의 임상 징후를 나타내는 대상체의 수를 감소시키거나 제거하는 것, 또는 대상체에 존재하는 임의의 임상 징후의 중증도를 감소시키는 것을 의미하지만 이들에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 이는

병원체 부하의 임의의 감소, 병원체 웨딩, 병원체 전염의 감소 또는 PCV2 감염의 증상인 임의의 임상 징후의 감소를 나타내야만 한다. 바람직하게, 이들 임상 징후는 본 발명의 조성물을 투여받지 않고 감염될 수도 있는 대상체와 비교하여 본 발명의 조성물을 투여받은 대상체에서 10% 이상 감소된다. 보다 바람직하게, 임상 징후는 본 발명의 조성물을 투여받은 대상체에서 20% 이상, 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게 40% 이상, 더욱 바람직하게는 50% 이상 감소된다.

- [0204] 용어 "바이러스혈증의 감소"는 동물의 혈류에 진입하는 PCV2 바이러스의 감소를 의미하지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 여기서, 바이러스혈증 수준, 즉, 혈청 mL당 RCV2 RNA 카피(copy)의 수 또는 혈청의 데시리터(deciliter)당 플라크 형성 콜로니(plaque forming colony)의 수는 본 발명의 조성물을 투여받지 않고 감염될 수도 있는 대상체와 비교하여 본 발명의 조성물을 투여받은 대상체의 혈청에서 50% 이상 감소된다. 보다 바람직하게, 바이러스혈증 수준은 본 발명의 조성물을 투여받은 otkdcp에서 90% 이상, 바람직하게는 99.9% 이상, 보다 바람직하게는 99.99% 이상, 더욱 바람직하게는 99.999% 이상 감소된다.
- [0205] 본원에서 사용되는 용어 "바이러스혈증"은 특히 PCV2 입자들이 동물의 혈류에 재생성되어 순환하는 병태로서 이해된다.
- [0206] 본원에서 사용되는 용어 "동물"은 특히 포유동물, 바람직하게는 돼지(swine), 보다 바람직하게는 돼지(pig), 가장 바람직하게는 새끼 돼지에 관한 것이다.
- [0207] 본 발명의 특징한 바람직한 양상에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 단지 1회 투여된다.
- [0208] 바람직하게, 본 발명의 맥락에서, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 동물에게, 바람직하게는 돼지에게, 보다 바람직하게는 돼지에게, 특히 바람직하게는 새끼 돼지에게 각각 단지 1회만이 투여될 예정이거나 투여된다.
- [0209] 본 발명은 종래 기술에 내재된 문제를 해소하고, 당해 기술 수준의 분명한 진보를 제공한다. 다른 양상에 따르면, 본 발명은 또한 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0210] 본원에서 사용된 "백신" 또는 "면역원성 조성물"(이 용어들은 둘 다 동의어로 사용된다)은 본 발명의 폴리펩타이드를 함유하는 임의의 약제학적 조성물을 말하고, 이 조성물은 대상체의 PCV2 감염-관련 질환 또는 병태를 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다. 바람직한 면역원성 조성물은 PCV2에 대한 면역 반응을 유도하거나 자극하거나 증강시킬 수 있다. 따라서, 당해 용어는 이하에 기술된 서브유닛 면역원성 조성물뿐만 아니라 완전 사멸되거나 약독화된 및/또는 불활성화된 PCV2b 돌연변이체를 함유하는 조성물도 포함한다.
- [0211] 특히 본원에 기술되는 용어 "PCV2b 돌연변이체"는 본 발명의 폴리펩타이드 및/또는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 PCV2b 돌연변이체에 관한 것이 이해된다.
- [0212] 다른 양상에 따르면, 본 발명은 또한 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체, 특히 모계 유도된 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염에 의해 야기되거나 이러한 PCV2 감염과 관련된 임상 징후를 감소시키기 위한 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법을 제공하고, 여기서, 상기 면역원성 조성물은 완전 사멸되거나 약독화된 및/또는 불활성화된 PCV2b를 함유하는 조성물인 서브유닛 면역원성 조성물이다.
- [0213] 본 명세서에 사용된 용어 "서브유닛 면역원성 조성물"은, PCV2b 돌연변이체 유래의 항원으로부터 유도된 또는 PCV2b 돌연변이체 유래의 항원과 상동성인 하나 이상의 면역원성 폴리펩타이드 또는 항원(그러나, 모든 항원은 아니다)을 함유하는 조성물을 말한다. 이러한 조성물은 온전한 PCV2b 돌연변이체를 실질적으로 포함하지 않는다. 따라서, "서브유닛 면역원성 조성물"은 PCV2b 돌연변이체로부터 적어도 부분적으로 정제되거나 또는 분획화된(바람직하게는 실질적으로 정제된) 면역원성 폴리펩타이드, 또는 이의 재조합 유사체로부터 제조된다. 서브유닛 면역원성 조성물은 PCV2b 돌연변이체 유래의 다른 항원 또는 폴리펩타이드를 실질적으로 포함하지 않는 서브유닛 항원 또는 항원들, 또는 PCV2b 돌연변이체로부터 분획화된 형태의 목적하는 서브유닛 항원 또는 항원들을 포함할 수 있다. 바람직한 면역원성 서브유닛 조성물은 본원에 기술되는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함한다.

- [0214] "면역 반응"은 목적하는 조성물 또는 백신에 대한 세포 및/또는 항체-매개된 면역 반응을 숙주에서 발생시키는 것을 의미하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 보통, "면역 반응"으로는 하기 효과들 중 하나 이상이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다: 목적하는 조성물 또는 백신에 포함된 항원 또는 항원들에 특이적으로 지시되는, 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 억제인자 T 세포 및/또는 세포독성 T 세포의 생산 또는 활성화. 바람직하게, 숙주는 새로운 감염에 대한 저항성이 증가되고/되거나 질환의 임상 중증도가 감소되도록 치료학적 또는 보호성 면역학적(기억) 반응을 나타낼 것이다. 이러한 보호는 PCV2 감염, 특히 PCV2 서브타입 b(PCV2b)로의 감염 및/또는 서브타입 2b 이외의 다른 서브타입의 PCV2로의 감염과 관련된 징후 중 하나 이상의 수 또는 중증도의 감소 또는 결여, 바이러스혈증의 개시 지연, 감소된 바이러스 지속성, 바이러스 총 부하량의 감소 및/또는 바이러스 배출 감소에 의해 입증될 것이다.
- [0215] 본원에서 사용되는 용어 "항원"은 상기 기술된 바와 같은 면역학적 반응을 유발하는 아미노산 서열을 말한다.
- [0216] 추가의 양상에 따르면, 본원에 사용된 면역원성 조성물은 본 발명에 따른 폴리펩타이드에 의해 발현되는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 것이 가장 바람직하다. 본 발명의 바람직한 폴리펩타이드는 서열번호 1의 폴리펩타이드이다. 그러나, 이 서열은 서열 상동성이 1 내지 5%만큼 변할 수 있고, 항원 특성을 그대로 보유하여 본 발명에 따른 면역원성 조성물에 유용하게 사용될 수 있음이 당해 분야 숙련자에게 이해되어 있다.
- [0217] 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같은 "서열 동일성"은 2개 이상의 폴리펩타이드 서열 또는 2개 이상의 뉴클레오타이드 서열, 즉, 참조 서열 및 이 참조 서열과 비교할 주어진 서열 사이의 관계를 말한다. 서열 동일성은 주어진 서열과 참조 서열의 스트링(string) 사이의 정합도(match)에 의해 측정되는 바와 같이, 이러한 서열들을 최고 정도의 서열 유사성을 생산하도록 최적으로 정렬한 후 상기 서열들을 비교하여 결정한다. 이러한 정렬시, 서열 동일성은 위치마다(position-by-position) 확인하고, 예를 들면, 특정 위치에서 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 동일하면 당해 위치의 서열은 "동일한" 것이다. 이어서, 이러한 위치의 총 수를 참조 서열의 뉴클레오타이드 또는 잔기의 총 수로 나누어 서열 동일성 %를 제공한다. 서열 동일성은 공지의 방법, 예를 들면, 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); 및 Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), 이들 문헌의 교시들은 본원에 인용에 의해 포함된다]에 기술된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 공지의 방법에 의해 쉽게 계산할 수 있다. 서열 동일성을 측정하는 바람직한 방법은 시험된 서열들 사이의 최대 정합도를 제공하도록 고안된다. 서열 동일성을 측정하는 방법은 주어진 서열들 사이의 서열 동일성을 측정하는 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램으로 명문화된다. 이러한 프로그램의 예로는 GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN 및 FASTA(Altschul, S. F. *et al.*, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990))가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. BLASTX 프로그램은 NCBI 및 다른 소스로부터 공개적으로 이용가능하다(BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. *et al.*, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), 이들 문헌의 교시는 본원에 인용에 의해 포함된다). 이들 프로그램은 주어진 서열과 참조 서열 사이의 최고 수준의 서열 동일성을 생성시키기 위하여 디폴트 갭 가중치(default gap weight)를 이용하여 서열들을 최적으로 정렬한다. 한 예로서, 참조 뉴클레오타이드 서열과 적어도 예를 들면, 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%의 "서열 동일성"을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 따라, 주어진 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열의 각각의 100개 뉴클레오타이드마다 15개 이하, 바람직하게는 10개 이하, 더욱 바람직하게는 5개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있음을 제외하고는 주어진 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열은 참조 서열과 동일하다. 다시 말하면, 참조 뉴클레오타이드 서열에 비해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에서, 참조 서열의 뉴클레오타이드 중 15% 이하, 바람직하게는 10%, 더욱 바람직하게는 5%가 다른 뉴클레오타이드로 치환되거나 결실될 수 있고, 또는 참조 서열의 총 뉴클레오타이드 중 15% 이하, 바람직하게는 10%, 더욱 바람직하게는 5%의 뉴클레오타이드 수가 참조 서열에 삽입될 수 있다. 이들 참조 서열의 돌연변이는 참조 뉴클레오타이드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서 또는 이들 말단 위치 사이의 임의의 위치에서, 참조 서열의 뉴클레오타이드들 중에서 개별적으로 산재하거나 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 연속적 그룹으로 일어날 수 있다. 유사하게, 참조 아미노산 서열과 적어도 예를 들

면, 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%의 서열 동일성을 갖는 주어진 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드에 따라, 주어진 폴리펩타이드 서열이 참조 아미노산 서열의 각각의 100개의 아미노산마다 15개 이하, 바람직하게는 10개 이하, 더욱 바람직하게는 5개 이하의 아미노산 변경을 포함할 수 있음을 제외하고는 폴리펩타이드의 주어진 아미노산 서열은 참조 서열과 동일함이 의도된다. 다시 말하면, 참조 아미노산 서열과 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%의 서열 동일성을 갖는 주어진 폴리펩타이드 서열을 획득하기 위해, 참조 서열의 아미노산 잔기 중 15% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 더욱 바람직하게는 5% 이하의 다른 아미노산으로 치환되거나 결실될 수 있고, 또는 참조 서열의 총 아미노산 수 중 15% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 더욱 바람직하게는 5% 이하의 아미노산 수가 참조 서열에 삽입될 수 있다. 이들 참조 서열의 변경은 참조 아미노산 서열의 아미노 또는 카르복시 말단 위치에서 또는 이들 말단 위치 사이의 임의의 위치에서, 참조 서열의 잔기들 중에서 개별적으로 산재하거나 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 연속적 그룹으로 일어날 수 있다. 바람직하게, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이하다. 그러나, 보존적 치환은 서열 동일성을 결정할 때에 정합도에 포함되지 않는다.

[0218] 본 명세서에 사용된 "서열 상동성"은 두 서열의 관계성을 측정하는 방법을 말한다. 서열 상동성을 측정하기 위해, 2개 이상의 서열을 최적으로 정렬하고, 필요에 따라 갭을 도입한다. 그러나, "서열 동일성"과는 대조적으로, 보존적 아미노산 치환은 서열 상동성을 측정할 때에 정합도로서 계산된다. 다시 말하면, 참조 서열과 서열 상동성 95%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 획득하기 위해서, 참조 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드 중 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%가 정합하거나 다른 아미노산 또는 뉴클레오타이드로의 보존적 치환을 포함해야만 하고, 또는 참조 서열에, 보존적 치환을 포함하지 않는 총 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드 중 15% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 더욱 바람직하게는 5% 이하의 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 수가 참조 서열에 삽입될 수 있다. 바람직하게, 상동 서열은 적어도 50개, 더욱 바람직하게는 적어도 100개, 더욱 바람직하게는 적어도 250개, 더욱 더 바람직하게는 적어도 500개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0219] "보존적 치환"은 전체 기능성이 유의하게 변화하지 않도록 크기, 소수성 등을 포함한 유사한 특성 또는 성질을 갖는 다른 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드로의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 치환을 말한다.

[0220] "단리된"은 자연 상태에서부터 "사람의 수작업에 의해" 변경된 것을 의미하고, 즉, 자연에서 발생하는 경우 이의 본래 환경으로부터 변화되거나 제거되거나, 변화되고 제거된 것을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 유기체에 자연적으로 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 "단리된" 것이 아니지만, 자연 상태의 공존 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 상기 용어가 본원에서 사용된 바와 같이 "단리된" 것이다.

[0221] 따라서, 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 또한, PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체, 특히 모계 유도된 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 이러한 PCV2 감염과 관련된 임상 징후를 감소시키는 방법을 제공하고, 여기서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 본원에 기술된 것들 중 어느 하나이다. 바람직하게는 본 발명의 폴리펩타이드는: (i) 서열번호 1의 서열을 포함하거나 서열번호 1의 서열로 이루어진 폴리펩타이드; 또는 (ii) (i)의 폴리펩타이드와 적어도 95% 상동성인 임의의 폴리펩타이드이다.

[0222] 추가의 양상에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 원하는 면역 반응의 유도를 유도하는데, 즉, PCV2 감염으로부터 초래되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 하나 이상의 임상 징후를 예방하거나 감소시키거나, 또는 이러한 징후의 발병률을 감소시키거나 또는 이러한 징후의 중증도를 경감시키는데 효과적인 항원 내포 수준으로 면역원성 조성물에 제공된다. 바람직하게, 본 발명의 폴리펩타이드의 내포 수준은 최종 면역원성 조성물 1ml 당 적어도 0.2 μ g 단백질(μ g/ml), 보다 바람직하게는 약 0.2 내지 약 400 μ g/ml, 더욱 바람직하게는 약 0.3 내지 약 200 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.35 내지 약 100 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.4 내지 약 50 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.45 내지 약 30 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.5 내지 약 18 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.6 내지 약 15 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 0.75 내지 약 8 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 1.0 내지 약 6 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3.0 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 1.4 내지 약 2.5 μ g/ml, 더욱 더 바람직하게는 약 1.5 내지 약 2.0 μ g/ml, 가장 바람직하게는 약 1.6 μ g/ml이다.

[0223] 추가의 양상에 따르면, 단백질 내포 수준은 최종 항원 조성물의 용량당 상기 기술된 PCV2b ORF-2 단백질의 적어도 0.2 μ g(μ g/용량), 보다 바람직하게는 약 0.2 내지 약 400 μ g/용량, 더욱 바람직하게는 약 0.3 내지 약 200 μ g/

용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.35 내지 약 100 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.4 내지 약 50 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.45 내지 약 30 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.5 내지 약 18 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.6 내지 약 15 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.75 내지 약 8 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 1.0 내지 약 6 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3.0 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 1.4 내지 약 2.5 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 1.5 내지 약 2.0 μ g/용량, 가장 바람직하게는 약 1.6 μ g/용량이다. 또한, 20 μ g/용량 미만, 바람직하게는 약 0.5 내지 18 μ g/용량의 본 발명의 폴리펩타이드의 내포 수준(항원 함량)이, 어린 동물에 그리고/또는 PCV2 항체에 대해 양성인, 특히 항-PCV2 모계 유도된 항체에 대해 양성인 동물에 면역성을 부여하기에 적합하다. 따라서, 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 또한 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 20 μ g/용량 미만, 바람직하게는 약 0.5 내지 18 μ g/용량의 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체, 특히 모계 유도된 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공한다. 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 본 특허 출원에 기술된 임의의 하나이다.

[0224] 본 발명에 따른 면역원성 조성물에 사용된 본 발명의 폴리펩타이드는 본 발명의 폴리펩타이드의 단리 및 정제, 표준 단백질 합성 및 재조합 방법론을 포함하는 임의의 방식으로 유도될 수 있다. 놀랍게도 PCV2a ORF-2 폴리펩타이드를 수득하기 위한 본원에 기술된 방법은 본 발명의 폴리펩타이드를 수득하기 위해 사용할 수 있음이 발견되었으므로, 본 발명의 폴리펩타이드를 수득하는 바람직한 방법은 WO 06/072065(이 문헌의 교시와 내용은 그 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다)에서 제공된다. 간략하게, 민감성 세포를 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 암호화 서열을 함유하는 재조합 바이러스 벡터로 감염시키고, 본 발명 단백질의 폴리펩타이드는 상기 재조합 바이러스에 의해 발현되고, 상청액으로부터 발현된 본 발명의 폴리펩타이드를 여과에 의해 회수하고, 바람직하게는 2원성 에틸렌이민을 사용한 임의의 종래 방법에 의해 불활성화시키고, 이어서, 이를 중화시켜 불활성화 프로세스를 중지한다.

[0225] 또한, 본 명세서에 사용된 면역원성 조성물은, i) 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드들 중 임의의 폴리펩타이드를, 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고, ii) 상기 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터, 바람직하게는 재조합 배콜로바이러스의 적어도 일부를 포함하는 조성물을 말한다. 또한, 면역원성 조성물은 i) 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드들 중 임의의 폴리펩타이드를, 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고, ii) 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터, 바람직하게는 재조합 배콜로바이러스의 적어도 일부를 포함하고, iii) 세포 배양물 상청액의 일부를 포함할 수 있다.

[0226] 따라서, 추가 양상에 따르면, 본 발명은 또한 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체, 특히 모계 유도된 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공하고, 여기서, 본 발명의 폴리펩타이드는 재조합의, 바람직하게는 배콜로바이러스 발현된 본 발명의 폴리펩타이드이다. 상기 기술된 서열을 갖는 이들 재조합 또는 배콜로바이러스 발현된 본 발명의 폴리펩타이드가 바람직하다.

[0227] 또한, 본원에서 사용된 면역원성 조성물은, i) 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드 중 임의의 폴리펩타이드를, 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고, ii) 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터, 바람직하게는 재조합 배콜로바이러스의 적어도 일부를 포함하고, iii) 세포 배양물의 일부를 포함하고; 여기서, 이 구성성분들의 약 90%가 1 μ m 미만의 크기를 갖는, 조성물을 말한다.

[0228] 또한, 본원에서 사용된 면역원성 조성물은 i) 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드들 중 임의의 폴리펩타이드를 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고, ii) 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터의 적어도 일부를 포함하고, iii) 세포 배양물의 일부를 포함하고, iv) 재조합 바이러스 벡터를 불활성화시키는 불활성화제, 바람직하게는 BEI를 포함하고, 여기서, 상기 구성성분 i) 내지 iii)의 약 90%가 1 μ m 미만의 크기를 갖는 조성물을 말한다. 바람직하게, BEI는 배콜로바이러스를 불활성화시키기에 효과적인 농도로, 바람직하게는 2 내지 약 8mM BEI의 양으로, 바람직하게는 약 5mM BEI의 양으로 존재한다.

[0229] 또한, 본원에서 사용된 면역원성 조성물은 i) 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드들 중 임의의 폴리펩타이드를 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고, ii) 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터의 적어도 일부를 포함하고, iii) 세포 배양물의 일부를 포함하고, iv) 재조합 바이러스 벡터를 불활성화시키는 불활성화제, 바람직하게는 BEI를 포함하고, v) 상기 불활성화제에 의해 매개된 불활성화를 중지시키는 중화제를 포

함하고, 여기서, 상기 구성성분 i) 내지 iii)의 약 90%가 1 μ m 미만의 크기를 갖는 조성물을 말한다. 바람직하게, 상기 불활성화제가 BEI인 경우, 상기 조성물은 나트륨 티오설페이트를 BEI와 등량으로 포함한다.

[0230] 당해 단백질은, PCV2 감염에 민감한 동물에게 투여할 수 있는 조성물에 포함된다. 바람직한 형태로, 당해 조성물은 또한 당해 분야 숙련가에게 공지되어 있는 추가의 구성성분들을 포함할 수도 있다(또한, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, (1990). 18th ed. Mack Publ., Easton]을 참조한다). 추가로, 당해 조성물은 1종 이상의 수의학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "수의학적으로 허용되는 담체"로는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원보강제(adjuvant), 안정화제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 제제, 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 바람직한 실시형태에서, 면역원성 조성물은 여기에 제공된 본 발명의 폴리펩타이드를, 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고, 이는 항원보강제, 바람직하게는 카르보폴(Carbopol) 및 생리학적 염수와 혼합된다.

[0231] 당해 분야 숙련가는 본원에서 사용된 조성물이 공지의 주사가 가능한 생리학적으로 허용되는 멸균 용액을 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 비경구 주사 또는 주입을 위한 즉시-사용형(ready-to-use) 용액을 제조하기 위해, 등장성 수용액, 예를 들면, 염수 또는 상응하는 혈장 단백질 용액을 쉽게 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 면역원성 조성물 및 백신 조성물은 희석제, 등장성 제제, 안정화제 또는 항원보강제를 포함할 수 있다. 희석제는 물, 염수, 텍스트로스, 에탄올, 및 글리세롤 등을 포함할 수 있다. 등장성 제제는 그 중에서도 염화 나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스 등을 포함할 수 있다. 안정화제는 그 중에서도 알부민 및 에틸렌디아민테트라아세트산의 알칼리염을 포함한다.

[0232] 본 명세서에서 사용된 "항원보강제"는 수산화 알루미늄 및 인산 알루미늄, 사포닌, 예를 들면, Quil A, QS-21(Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GP1-0100(Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), 유-중-수(water-in-oil) 에멀전, 수-중-유(oil-in-water) 에멀전, 수-중-유-중-수(water-in-oil-in-water) 에멀전을 포함할 수 있다. 에멀전은 특히 경질 액체 파라핀 오일(유럽 약전 타입); 알케인의 올리고머화, 특히 이소부텐 또는 데센의 올리고머화로부터 초래되는 스쿠알란 또는 스쿠알렌 오일과 같은 이소프레노이드 오일; 선형 알킬 그룹을 함유하는 산 또는 알콜의 에스테르, 보다 구체적으로는 식물성 오일, 에틸 올레에이트, 프로필렌 글리콜 디-(카프릴레이트/카프레이트), 글리세릴 트리-(카프릴레이트/카프레이트) 또는 프로필렌 글리콜 디올레에이트; 분지쇄 지방산 또는 알콜의 에스테르, 특히 이소스테아르산 에스테르를 기반으로 할 수 있다. 에멀전을 형성하기 위해 오일을 유화제와 함께 사용한다. 유화제는 바람직하게는 비이온성 계면활성제, 특히 소르비탄의 에스테르, 만나이드의 에스테르(예를 들면, 안하이드로만니톨 올레에이트), 글리콜의 에스테르, 폴리글리세롤의 에스테르, 프로필렌 글리콜의 에스테르 및 올레산, 이소스테아르산, 리시놀레산 또는 하이드록시스테아르산의 에스테르(이것은 임의로 에톡실화된다), 및 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 공중합체 블록, 특히 플루로닉(Pluronic) 제품, 특히 L121이다. 문헌[Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) 및 Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997)]을 참조한다.

[0233] 예를 들면, 문헌["Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995]의 147쪽에 기술된 SPT 에멀전 및 동일한 문헌의 183쪽에 기술된 에멀전 MF59를 사용하는 것이 가능하다.

[0234] 항원보강제의 추가의 예로는 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 및 말레인 무수물과 알케닐 유도체의 공중합체로부터 선택된 화합물이 있다. 유리한 항원보강제 화합물은 특히 폴리알콜 또는 당의 폴리알케닐 에테르와 가교-결합된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체이다. 이들 화합물은 용어 카르보머(carbomer)(Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996)로 공지되어 있다. 당해 분야 숙련가는 또한 적어도 3개, 바람직하게는 8개 이하의 하이드록실 그룹을 갖고 적어도 3개의 하이드록실의 수소 원자들이 2개 이상의 탄소 원자를 갖는 불포화 지방족 라디칼로 대체되어 있는, 폴리하이드록시화된 화합물과 가교-결합된 상기 아크릴계 중합체를 기술하는 미국 특허 2,909,462를 참조할 수 있다. 바람직한 라디칼은 2 내지 4개의 탄소 원자를 함유하는 것들이고, 예를 들면, 비닐, 알릴 및 다른 에틸렌계 불포화 그룹이 있다. 불포화 라디칼은 자체에 다른 치환체, 예를 들면, 메틸을 포함할 수 있다. 상표명 Carbopol(BF Goodrich, Ohio, USA) 하에 시판되는 제품이 특히 적절하다. 이들은 알릴 슈크로스 또는 알릴 펜타에리트리톨과 가교-결합되어 있다. 이들 중에서, Carbopol 974P, 934P 및 971P가 언급될 수 있다. Carbopol의 사용, 특히 Carbopol 971P의 사용이 가장 바람직하고, 바람직하게는 약 500 μ g 내지 약 5mg/용량의 양, 더욱 더 바람직하게는 약 750 μ g 내지 약 2.5mg/용량의 양, 가장 바람직하게는 약 1mg/용량의 양으로의 사용이다.

- [0235] 추가의 적합한 항원보강제로는 그 중에서도 RIBI 항원보강제 시스템(Ribi Inc.), 블록 공중합체(CytRx, Atlanta GA), SAF-M(Chiron, Emeryville CA), 모노포스포릴 지질 A, 아비리딘 지질-아민 보강제, 이. 콜라이(재조합체 또는 기타) 유래의 열-불안정성 내독소, 콜레라 독소, IMS 1314 또는 뮤라밀 디펩타이드 등이 포함되지만, 이들 에 한정되는 것은 아니다.
- [0236] 바람직하게, 항원보강제는 약 100 μ g 내지 약 10mg/용량의 양으로 첨가한다. 더욱 더 바람직하게, 항원보강제는 약 100 μ g 내지 약 10mg/용량의 양으로 첨가한다. 더욱 더 바람직하게, 항원보강제는 약 500 μ g 내지 약 5mg/용량의 양으로 첨가한다. 더욱 더 바람직하게, 항원보강제는 약 750 μ g 내지 약 2.5mg/용량의 양으로 첨가한다. 가장 바람직하게, 항원보강제는 약 1mg/용량의 양으로 첨가한다.
- [0237] 추가로, 당해 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"로는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원보강제, 안정화제, 희석제, 보존제, 향균제 및 항진균제, 등장성 제제, 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 가장 바람직하게, 여기에 제공된 조성물은 시험관내 배양된 세포의 상청액으로부터 회수된 본 발명의 폴리펩타이드를 함유하고, 여기서, 상기 세포는, 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하고 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 바이러스 벡터로 감염되었고, 여기서, 상기 세포 배양물은 바이러스 벡터를 불활성화시키기 위해 약 2 내지 약 8mM의 BEI, 바람직하게는 약 5mM의 BEI, 및 동등한 농도의 중화제, 바람직하게는 나트륨 티오설페이트 용액으로 최종 농도 약 2 내지 약 8mM, 바람직하게는 약 5mM로 처리하였다.
- [0238] 또한, 본 발명은 i) 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드들 중 임의의 폴리펩타이드를 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고, ii) 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터의 적어도 일부를 포함하고, iii) 세포 배양물의 일부를 포함하고, iv) 재조합 바이러스 벡터를 불활성화시키는 불활성화제, 바람직하게는 BEI를 포함하고, v) 상기 불활성화제에 의해 매개된 불활성화를 중지시키는 중화제, 바람직하게는 나트륨 티오설페이트를 BEI와 등량으로 포함하고; vi) 적합한 항원보강제, 바람직하게는 카르보폴 971을 상기 기술된 양으로 포함하고; 여기서, 상기 구성성분 i) 내지 iii)의 약 90%가 1 μ m보다 더 작은 크기를 갖는 면역원성 조성물을 말한다. 추가의 양상에 따르면, 이러한 면역원성 조성물은 추가로 약제학적으로 허용되는 염, 바람직하게는 포스페이트 염을 생리학적으로 허용되는 농도로 포함한다. 바람직하게, 상기 면역원성 조성물의 pH는 약 6.5 내지 7.5를 의미하는 생리학적 pH로 조정된다.
- [0239] 본 발명에 사용된 면역원성 조성물은 또한 1ml 당 i) 1.6 μ g 이상, 바람직하게는 20 μ g 미만의 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하고, ii) 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 배콜로바이러스의 적어도 일부를 포함하고, iii) 세포 배양물의 일부를 포함하고, iv) 약 2 내지 8mM의 BEI를 포함하고, v) 나트륨 티오설페이트를 BEI와 동등한 양으로 포함하고, vi) 약 1mg의 Carbopol 971을 포함하고, vii) 포스페이트 염을 생리학적으로 허용되는 농도로 포함하고; 여기서, 상기 구성성분 i) 내지 iii)의 약 90%가 1 μ m보다 더 작은 크기를 갖는 조성물을 말하고, 상기 면역원성 조성물의 pH는 약 6.5 내지 7.5로 조정된다.
- [0240] 면역원성 조성물은 추가로 하나 이상의 다른 면역조절제, 예를 들면, 인터류킨, 인터페론 또는 다른 사이토카인을 포함할 수도 있다. 또한, 면역원성 조성물은 겐타마이신(Gentamicin) 및 메르티올레이트(Merthiolate)를 포함할 수도 있다. 본 발명의 맥락에서 유용한 항원보강제 및 첨가제의 양과 농도는 당해 분야 숙련가라면 쉽게 결정할 수 있지만, 본 발명은, 약 50 μ g 내지 약 2000 μ g의 항원보강제를 포함하는 조성물, 바람직하게는 백신 조성물 1ml 용량당 약 250 μ g을 포함하는 조성물을 고려한다. 따라서, 본원에서 사용된 면역원성 조성물은 약 1 μ g/ml 내지 약 60 μ g/ml의 항생제, 보다 바람직하게는 약 30 μ g/ml 미만의 항생제를 포함하는 조성물을 말한다.
- [0241] 또한, 본원에서 사용된 면역원성 조성물은 i) 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드들 중 임의의 폴리펩타이드를 바람직하게는 상기 기술된 농도로 포함하고; ii) 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 바이러스 벡터의 적어도 일부를 포함하고; iii) 세포 배양물의 일부를 포함하고; iv) 재조합 바이러스 벡터를 불활성화시키는 불활성화제, 바람직하게는 BEI를 포함하고; v) 상기 불활성화제에 의해 매개된 불활성화를 중지시키는 중화제, 바람직하게는 나트륨 티오설페이트를 BEI와 등량으로 포함하고; vi) 적합한 항원보강제, 바람직하게는 카르보폴 971을 상기 기술된 양으로 포함하고; vii) 약제학적으로 허용되는 농도의 염수 완충액, 바람직하게는 포스페이트 염, 및 viii) 항-미생물성 활성제를 포함하고; 여기서, 상기 구성성분 i) 내지 iii)의 약 90%가 1 μ m보다 작은 크기를 갖는 조성물을 말한다.
- [0242] 모계 항체에 의한 본 발명의 폴리펩타이드의 가능한 간섭을 조사하기 위하여, 연구 동물의 항체 역가를 백신접종시에 측정하고, 이어서, 이를 저 항체 클래스, 중간 항체 클래스 및 고 항체 클래스로 그룹분류하는 연구를 수행할 수 있다: <1:100의 기하 평균 역가는 저 항체 역가로서 간주되었고, 1:100 내지 1:1000의 역가는 중간

항체 역가로서 간주되었으며, >1:1000 역가는 고 항체 역가로서 간주되었다. 이러한 그룹분류 패턴은 1:80의 항체 역가를 저 항체 역가로서, 1:640의 항체 역가를 중간 항체 역가로서, >1:1280만큼 높은 항체 역가를 고 항체 역가로서 간주한 캐나다 현장 연구(Larochelle et al., 2003, Can. J. Vet. Res.; 67: 114-120)에서 수행된 그룹분류 패턴과 비슷하다. 바이러스혈증에 대한 백신접종시 저 항체 역가, 중간 항체 역가 및 고 항체 역가의 영향을 분석하기 위해서, 백신접종된 동물과 위약-치료된 동물을 바이러스혈증의 개시, 종료 및 지속기간, 양성 샘플링 일 수 및 바이러스 부하량에 관해 비교한다. 항-PCV2 항체의 존재, 특히 모계 유도된 항체의 존재는 바람직하게는 상기 임의의 파라미터들에 유의한 영향을 갖지 않는다. 다시 말하면, 동물에서 PCV2 감염의 예방 및 치료 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소에 있어서 본 발명의 폴리펩타이드의 효능은 백신접종일에 항-PCV2 항체의 존재에 의해, 바람직하게는 1:100 이하의 항-PCV2 항체 역가에 의해, 바람직하게는 1:100 초과, 더욱 바람직하게는 1:250 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:500 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:640 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:750 초과, 가장 바람직하게는 1:1000 초과와 항체 역가에 의해 영향을 받지 않는 것이 바람직하다. 이러한 효과는 단발 백신접종 실험에서 나타날 수 있고, 이것은 본 발명의 폴리펩타이드의 임의의 후속 투여 없이 단지 1회만을 투여함을 의미한다.

[0243] 항-PCV2 항체의 검출 및 정량 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들면, PCV2 항체의 검출 및 정량은 문헌[Magar et al., 2000, Can. J. Vet Res.; 64: 184-186 또는 Magar et al., 2000, J. Comp. Pathol.; 123: 258-269]에 기술된 간접 면역형광법에 의해 수행할 수 있다. 항-PCV2 항체의 정량을 위한 추가의 검정법은 문헌[Opriessnig et al., 2006, 37th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians]에 기술되어 있다. 또한, 당해 분야 숙련가에 의해 사용될 수 있는 간접 면역형광법은 96웰 플레이트 상에 웰당 약 20,000 내지 60,000 PK15 또는 VIDO R1 세포를 씨딩하는 단계; 단일층이 대략 65 내지 85% 컨플루언트(confluent)인 경우 세포를 PCV2 단리물로 감염시키는 단계; 감염된 세포를 48시간 동안 항온배양하는 단계; 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척하는 단계; 세척 완충액을 버리고 세포를 약 -20℃에서 약 15분 동안 냉 50/50 메탄올/아세트산 고정액(fixative)(약 100 μ l/웰)으로 처리하는 단계; 고정액을 버리고 플레이트를 공기 건조시키는 단계; PBS 중의 돼지 혈청 샘플의 일련의 희석물 및 항-PCV2 양성 및 음성 대조군 샘플(양성 대조군 및 음성 대조군 샘플)의 일련의 희석물을 제조하는 단계; 상기 일련의 희석물을 플레이트에 부가하고 혈청 샘플 내에 존재하는 경우 항체가 결합되도록 36.5 \pm 1℃에서 약 1hr 동안 항온배양시키는 단계; 플레이트를 PBS로 3회 세척하고 PBS를 버리는 단계; 플레이트를 PBS 중에 1:100 희석된 시판 염소 항-돼지 FITC 접합체로 염색하고 36.5 \pm 1℃에서 약 1hr 동안 항온배양하는 단계; 항온배양기로부터 마이크로플레이트를 제거하는 단계; 접합체를 버리고 플레이트를 PBS로 2회 세척하는 단계; UV 현미경 관찰을 이용하여 플레이트를 판독하고 개별 웰을 양성 또는 음성으로 보고하는 단계(여기서, 양성 대조군 및 음성 대조군 샘플을 사용하여 시험 시스템을 모니터링한다); 및 특정 IFA 반응성을 나타내는 최고 희석물 및 희석물당 양성인 웰의 수를 이용하여 혈청 항체 역가를 계산하거나 적절한 리드-윈호 식(Reed-Muench formula)을 이용하여 50% 종점을 계산하는 단계를 포함한다.

[0244] 이러한 검정은 WO 2008/076915의 실시예 2에 기술되어 있다.

[0245] 논쟁적 결과인 경우에 그리고 의심의 여지가 있는 경우에, 본원에 언급되는 항-PCV2 역가는 이러한 검정에 의해 추정되거나/추정될 수 있는 것을 말한다.

[0246] 따라서, 추가의 양상에 따르면, 본 발명은, PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량, 바람직하게는 20 μ g/용량 미만을 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체, 특히 모계 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공하고, 여기서, 상기 동물은 1:100 이하, 바람직하게는 1:100 초과, 더욱 바람직하게는 1:250 초과, 더욱 바람직하게는 1:500 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:640 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:750 초과, 가장 바람직하게는 1:1000 초과와 검출가능한 항-PCV2 항체 역가를 갖는다. 바람직하게, 이들 항-PCV2 항체 역가는 특정 항-PCV2 면역 검정법, 바람직하게는 WO 2008/076915 A2의 실시예 2에 예시적으로 기술되어 있는 검정법으로 검출가능하고 정량가능하다. 더욱 바람직하게, 이들 항-PCV-2 항체는 모계 유도된 항체이다. 가장 바람직하게, 본 발명의 폴리펩타이드는 바람직하게는 20 μ g/용량 미만의 용량으로 단지 1회만 투여된다.

[0247] 모계 유도된 항-PCV2 항체의 역가가 낮거나(<1:100) 중간(<1:1000) 정도인 새끼돼지는 3주령 이전에 발생하는 PCV2 감염에 대하여 충분히 보호되지 않는다. 따라서, 매우 어린 시기에서의 백신접종이 바람직하다. 본 발명의 맥락 내에서, 3주령의 또는 3주령 이전의 동물의 백신접종/치료가 바람직하다. 또한, 1:1000 초과와 항-PCV2 항체 역가는 기존의 초기 항체 역가의 수준에 관계없이 PCV2 백신의 효능에 어떠한 영향도 미치지 않는다.

예를 들면, 고-역가 동물(항-PCV2 항체 역가 > 1:1000)의 백신접종은 바람직하게는 백신접종되지 않은 대조군 동물과 비교하여 바이러스혈증의 지속기간을 더 단축시키고, 바이러스혈증의 종료도 더 빨리 종료시켰으며, 바이러스혈증 샘플링 일수도 더 저하시켰고, 계놈 당량의 합계/ml도 감소시켰다. 백신접종된 "고 역가 동물", "중간 역가 동물" 및 "저 역가 동물"의 비교시, PCV2 바이러스혈증의 다른 파라미터와 관련하여 관찰되는 유의한 차이는 없는 것이 바람직하다. 또한, 고 항-PCV2 항체 역가의 존재 하에서도, 백신접종에 사용된 본 발명의 폴리펩타이드는 혈액에서의 바이러스혈증을 여전히 유의하게 감소(바이러스혈증의 종료, 바이러스혈증의 지속기간, 바이러스 부하량)시킨다. 바람직하게, 백신접종된 그룹의 저 역가 및 고 역가 동물을 비교하는 경우 생체 중량에 관한 차이는 전혀 발견되지 않는다. 또한, 백신접종/치료시에 고 항-PCV2 항체 역가(>1:1000)를 갖는 백신접종된 동물도 바람직하게는 초기 고 항체 역가를 갖는 위약-치료된 동물과 비교하여 바이러스혈증 개시 후에 유의하게 더 높은 체중 증가를 나타낸다. 결과적으로, 본 발명의 폴리펩타이드로의 1일령 이상의 동물의 백신접종/치료가 가능하다. 그러나, 백신접종은 처음 8주령 내에, 바람직하게는 처음 7주령 내에 이루어져야 한다. 따라서, 추가 양상에 따르면, 본 발명은, 1일령 이후의, 바람직하게는 8주령 이하의 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공한다. 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 동물에게 면역성을 부여하기 위해서 20 μ g/용량 미만의 본 발명의 폴리펩타이드가 요구된다. 보다 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 치료를 필요로 하는 동물에게 20 μ g/용량 미만이 단지 1회만 투여되는 것이 바람직하다.

[0248] 추가의 보다 일반적인 양상에 따르면, 본 발명은, PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공한다.

[0249] 본원에서 사용되는 용어 "어린 동물"은 1 내지 22일령의 동물을 말한다. 바람직하게, 용어 어린 동물은 1 내지 20일령의 동물을 의미한다. 보다 바람직하게, 용어 어린 동물은 1 내지 15일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1일령 내지 14일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 12일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 10일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 8일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 7일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 6일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 5일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 4일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 3일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 또는 2일령의 동물, 가장 바람직하게는 1일령의 동물을 말한다. 따라서, 추가의 양상에 따르면, 본 발명은, PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 1 내지 22일령의 동물, 바람직하게는 1 내지 20일령의 동물, 더욱 바람직하게는 1 내지 15일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 14일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 12일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 10일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 8일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 7일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 6일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 5일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 4일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 3일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 또는 2일령의 동물, 가장 바람직하게는 1일령의 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공한다. 예를 들면, 19 내지 22일령의 동물에 대한 백신접종/치료가 백신접종의 높은 효능을 나타낸다. 또한, 12 내지 18일령, 바람직하게는 12 내지 14일령의 백신접종/치료는 바람직하게는 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소, 총 바이러스 부하량의 감소, 바이러스혈증의 지속기간의 감소, 바이러스혈증의 개시 지연 및 체중 증가에 매우 효과적이다. 또한, 1주령제의 백신접종도 바람직하게는 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소, 총 바이러스 부하량의 감소, 바이러스혈증의 지속기간의 감소, 바이러스혈증의 개시 지연 및 체중 증가에 매우 효과적이다. 바람직하게, 이들 어린 동물에서 면역성을 부여하기 위해서는 20 μ g/용량 미만의 본 발명의 폴리펩타이드가 요구된다. 보다 바람직한 실시형태에 따르면, 바람직하게는 20 μ g 미만의 본 발명의 폴리펩타이드는 이러한 치료를 필요로 하는 어린 동물에게 단지 1회만 투여된다.

[0250] 야생에서의 PCV2의 편재성으로 인하여, 어린 새끼 돼지의 대부분은 PCV2에 대해 혈청양성이다. 따라서, 추가의 양상에 따르면,

[0251] 본 발명은 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 1 내지 22일령의 동물, 바람직하게는 1 내지 20일령의 동물, 더욱 바람직하게는 1 내지 15일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 14일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 12일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 10일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 8일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 7일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 6일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 5일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 4일령의 동물, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 3일령의 동물,

더욱 더 바람직하게는 1 또는 2일령의 동물, 가장 바람직하게는 1일령의 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물, 바람직하게는 백신접종일에 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공한다. 바람직하게, 상기 백신접종/치료일에 어린 동물은 1:100 이하, 바람직하게는 1:100 초과, 더욱 바람직하게는 1:250 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:500 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:640 초과, 더욱 더 바람직하게는 1:750 초과, 가장 바람직하게는 1:1000 초과,의 검출가능한 항-PCV2 항체 역가를 갖는다. 바람직하게, 이들 어린 동물에게 충분한 면역성을 부여하기 위해서는 20 μ g/용량 미만의 본 발명의 폴리펩타이드가 요구된다. 보다 바람직한 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드, 바람직하게는 20 μ g 미만은 이러한 치료를 필요로 하는 어린 동물에게 단지 1회만이 투여된다.

[0252]

상기 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩타이드를 이용한 어린 동물의 백신접종/치료는 백신접종되지 않은 대조군 동물과 비교하여 바이러스혈증 페이즈(phase)의 단축을 초래한다. 평균 단축 시간은 동일한 종의 백신접종되지 않은 대조군 동물과 비교하여 예를 들면 9.5일일 수 있다. 따라서, 추가 양상에 따르면, 본 발명은 또한 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 상기 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2의 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공하고, 여기서, 상기 치료 또는 예방은 동일 종의 미치료 대조군 그룹의 동물과 비교하여 5일 이상, 바람직하게는 6일 이상, 더욱 바람직하게는 7일 이상, 더욱 더 바람직하게는 8일 이상, 더욱 더 바람직하게는 9일 이상, 더욱 더 바람직하게는 10일 이상, 더욱 더 바람직하게는 12일 이상, 더욱 더 바람직하게는 14일 이상, 가장 바람직하게는 16일 이상의 바이러스혈증 페이즈 단축을 초래한다. 몇몇의 경우에, 바이러스혈증 페이즈는 바람직하게는 20일 이상 단축되기도 한다. 일반적으로, 어린 새끼돼지의 백신접종은 바람직하게는 체중 증가 손실의 감소, 바이러스혈증의 지속기간의 단축, 바이러스혈증의 조기 종결 및 바이러스 부하량 저하를 초래한다. 따라서, 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 상기 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공하고, 여기서, 상기 PCV2 감염의 치료 또는 예방은 동일한 종의 미치료 대조군 그룹의 동물과 비교하여 체중 증가 손실의 감소, 바이러스혈증의 지속기간의 단축, 바이러스혈증의 조기 종결, 바이러스 부하량 저하 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 백신 효능의 파라미터의 개선을 초래한다. 바람직하게, 상기 언급된 임의의 개선된 백신 효능 파라미터를 야기하기 위해서는 20 μ g/용량 미만의 본 발명의 폴리펩타이드가 요구된다. 또한, 이러한 개선된 백신 효능 파라미터는 단지 1회 용량을 1회 투여함으로써 달성된다. 본원에 사용된 용어 "유효량"은 본 발명의 폴리펩타이드의 상기 유효량이 투여된 동물에서 면역 반응을 유발하거나 유발할 수 있는 본 발명의 폴리펩타이드의 양을 의미하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게, 상기 유효량은 적어도 10주(DOI), 바람직하게는 적어도 12주(DOI), 더욱 바람직하게는 적어도 15주(DOI), 가장 바람직하게는 적어도 20주의 면역 지속기간(DOI)을 부여하는 본 발명의 폴리펩타이드의 양으로서 정의된다.

[0253]

효과적인 양은 백신의 성분 및 투여 스케줄에 의존한다. 통상적으로, 불활성화된 바이러스 또는 변형된 생 바이러스 제제가 조합 백신에 사용될 때, 약 $10^{2.0}$ 내지 약 $10^{9.0}$ TCID₅₀/용량, 바람직하게는 약 $10^{3.0}$ 내지 약 $10^{8.0}$ TCID₅₀/용량, 더욱 바람직하게는 약 $10^{4.0}$ 내지 약 $10^{8.0}$ TCID₅₀/용량을 함유하는 백신의 양이 사용된다. 특히, 변형된 생 PCV2가 백신에 사용될 때, 민감한 동물에게 투여하도록 권장되는 용량은 바람직하게는 약 $10^{3.0}$ TCID₅₀(조직 배양물 감염 용량 50% 종말점)/용량 내지 약 $10^{6.0}$ TCID₅₀/용량, 더욱 바람직하게는 약 $10^{4.0}$ TCID₅₀/용량 내지 약 $10^{5.0}$ TCID₅₀/용량이다. 일반적으로, 정제된 항체가 사용될 때, 항원의 양은 0.2 내지 5000 마이크로그램이고, $10^{2.0}$ 내지 $10^{9.0}$ TCID₅₀, 바람직하게는 $10^{3.0}$ 내지 $10^{6.0}$ TCID₅₀, 더욱 바람직하게는 $10^{4.0}$ 내지 $10^{5.0}$ TCID₅₀이다.

[0254]

서브-유닛 백신은 보통 용량당 적어도 0.2 μ g 단백질의 단백질 내포 수준으로 투여되고, 바람직하게는 약 0.2 내지 약 400 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.3 내지 약 200 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.35 내지 약 100 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.4 내지 약 50 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.45 내지 약 30 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.5 내지 약 18 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.6 내지 약 16 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 0.75 내지 약 8 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는 약 1.0 내지 약 6 μ g/용량, 더욱 더 바람직하게는

게는 약 1.3 내지 약 3.0 μ g/용량으로 투여된다.

[0255]

바람직하게, 상기 기술된 면역원성 조성물의 예방학적 용도는 바람직하게는 치료일에 어린 동물에서 및/또는 PCV2에 대한 수동 면역성을 갖는 동물에서 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소에 효과적이다. 특히, 본원에 기술된 면역원성 조성물, 구체적으로 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 예방학적 용도는 바람직하게는 PCV2로 감염되어 치료/백신접종일에 모계 항-PCV-2 항체를 갖는 동물에서 림프선병증, 림프성 고갈 및/또는 다핵/거대 조직구를 감소시키는데 효과적이다. 예를 들면, 본원에 기술된 면역원성 조성물의 예방학적 용도는 림프성 고갈, 림프성 염증, 림프 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC, 바이러스혈증, 비강 채딩, 발열, 감소된 평균 1일 체중 증가, 폐 염증, 폐 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC를 감소시키는데 효과적임이 발견되었다.

[0256]

또한, 본원에 기술된 면역원성 조성물의 예방학적 용도는 바람직하게는 (1) 소엽사이 부종(interlobular edema)이 있는 간질성 폐렴(interstitial pneumonia), (2) 창백한 피부(cutaneous pallor) 또는 황달(icterus), (3) 얼룩덜룩한 위축성 간(mottled atrophic liver), (4) 위 궤양(gastric ulcer), (5) 신염(nephritis) 및 (6) 생식기 장애, 예를 들면, 유산, 사산, 미라 등, (7) 일반적으로 로소니아 인트라셀룰라리스(Lawsonia intracellularis) 감염(회장염)과 관련되어 있는 것으로 공지되어 있는 연막계(Pia like) 병변, (8) 림프선병증, (9) 림프성 고갈 및/또는 (10) 다핵/거대 조직구, (11) 돼지 피부염 및 신장병 증후군(PDNS), (12) PCVAD 관련 사망률, (13) PCVAD 관련 체중 감소, (14) 감소된 성장 변동성, (15) 감소된 빈도의 '왜소병(runts)', (16) 감소된 돼지 생식기 및 호흡기 질환 합병증(PRRSV)으로의 동시-감염을 감소시키는데 효과적이다. 이러한 면역원성 조성물은 또한 경제적으로 중요한 성장 파라미터, 예를 들면, 도살까지의 시간, 사체 중량 및 적육비(lean meat ratio)에도 효과적이다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "임상 징후"는 (1) 소엽사이 부종이 있는 간질성 폐렴, (2) 창백한 피부 또는 황달, (3) 얼룩덜룩한 위축성 간, (4) 위 궤양, (5) 신염, (6) 생식기 장애, 예를 들면, 유산, 사산, 미라 등, (7) 일반적으로 로소니아 인트라셀룰라리스 감염(회장염)과 관련되어 있는 것으로 공지되어 있는 연막계 병변, (8) 림프선병증, (9) 림프성 고갈 및/또는 (10) 다핵/거대 조직구, (11) 돼지 피부염 및 신장병 증후군(PDNS), (12) PCVAD 관련 사망률, (13) PCVAD 관련 체중 감소, (14) 감소된 성장 변동성, (15) 감소된 빈도의 '왜소병', (16) 감소된 돼지 생식기 및 호흡기 질환 합병증(PRRSV)으로의 동시-감염, (17) 림프성 염증, (18) 림프 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC, (19) 바이러스혈증, (20) 비강 채딩, (21) 발열, (22) 감소된 평균 1일 체중 증가, (23) 폐 염증, (24) 폐 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC를 의미하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본원에 기술된 면역원성 조성물은 어린 동물, 특히 백신접종일에 항-PCV2 항체를 갖는 어린 동물에서 개시 지연, 지속기간 단축, 바이러스혈증의 조기 종결, 및 바이러스 부하량 감소 및 이의 면역억제 영향 감소를 포함하는 써코바이러스의 전체 부하량을 감소시키고, 이에 의해 보다 높은 수준의 일반 질환 내성 및 PCV2 관련 질환 및 임상 징후의 발병률 감소를 초래한다.

[0257]

따라서, 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 상기 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물 및/또는 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공하고, 여기서, 이들 임상 징후는 (1) 소엽사이 부종이 있는 간질성 폐렴, (2) 창백한 피부 또는 황달, (3) 얼룩덜룩한 위축성 간, (4) 위 궤양, (5) 신염, (6) 생식기 장애, 예를 들면, 유산, 사산, 미라 등, (7) 일반적으로 로소니아 인트라셀룰라리스 감염(회장염)과 관련되어 있는 것으로 공지되어 있는 연막계 병변, (8) 림프선병증, (9) 림프성 고갈 및/또는 (10) 다핵/거대 조직구, (11) 돼지 피부염 및 신장병 증후군(PDNS), (12) PCVAD 관련 사망률, (13) PCVAD 관련 체중 감소, (14) 감소된 성장 변동성, (15) 감소된 빈도의 '왜소병' 및 (16) 감소된 돼지 생식기 및 호흡기 질환 합병증(PRRSV)으로의 동시-감염, (17) 림프성 염증, (18) 림프 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC, (19) 바이러스혈증, (20) 비강 채딩, (21) 발열, (22) 감소된 평균 1일 체중 증가, (23) 폐 염증, (24) 폐 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 상기 동물에게 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방 방법 또는 PCV2에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소 방법을 제공하고, 여기서, 상기 임상 징후는 (1) 소엽사이 부종이 있는 간질성 폐렴, (2) 창백한 피부 또는 황달, (3) 얼룩덜룩한 위축성 간, (4) 위 궤양, (5) 신염, (6) 생식기 장애, 예를 들면, 유산, 사산, 미라 등, (7) 일반적으로 로소니아 인트라셀룰라리스 감염(회장염)과 관련되어 있는 것으로 공지되어 있는 연막계 병변, (8) 림프선병증, (9) 림프성 고갈 및/또는 (10) 다핵/거대 조직구, (11) 돼지 피부염 및 신장병 증후군(PDNS), (12) PCVAD 관련 사망률, (13) PCVAD 관련 체중 감소, (14) 감소된 성장 변동성, (15) 감소된 빈도의 '왜소병', (16) 감소된 돼지 생식기 및 호흡기 질환 합병증(PRRSV)으로의 동시-감염, (17) 림프성 염증,

(18) 림프 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC, (19) 바이러스혈증, (20) 비강 채딩, (21) 발열, (22) 감소된 평균 1일 체중 증가, (23) 폐 염증, (24) 폐 조직의 PCV2 항원에 대한 양성 IHC로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0258] 본 발명에 따른 조성물은 경구, 피내, 기관지내 또는 질내로 적용될 수 있다. 당해 조성물은 바람직하게는 근육내 또는 비내, 가장 바람직하게는 근육내로 적용될 수 있다. 동물 신체에서, 상기 기술된 바와 같은 약제학적 조성물은 정맥내를 통해 또는 직접 주사를 통해 표적 조직에 적용하는 것이 이로운 것임을 입증할 수 있다. 전신 적용에 관해서는, 정맥내, 혈관내, 근육내, 비내, 동맥내, 복강내, 경구 또는 척수강내 경로가 바람직하다. 더욱 국소적인 적용은 피하, 피내, 피부내, 심장내, 소엽내, 골수내, 폐내로 또는 치료할 조직(결합 조직, 골 조직, 근육 조직, 신경 조직, 상피 조직) 내에 또는 부근에 직접 실시할 수 있다. 원하는 치료 지속기간 및 효과에 따라, 본 발명에 따른 조성물은 예를 들면 1일 기준으로 수일 동안, 수주 동안, 수개월 동안 상이한 용량으로 1회 또는 수회, 또한 간헐적으로 투여될 수 있다.

[0259] 바람직하게는, 상기 기술된 면역원성 조성물의 1회 용량은 치료를 필요로 하는 대상체에게 근육내로 투여된다. 추가의 양상에 따르면, 상기 기술된 본 발명의 폴리펩타이드 또는 임의의 이러한 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물은 병에 담겨지고 용량당 1mL씩 투여된다. 따라서, 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 또한 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명 단백질의 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 어린 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방을 위해, 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소를 위해, 본원에 기술된 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는, 1mL 면역원성 조성물을 제공한다. 추가의 양상에 따르면, 본 발명은 또한 PCV2 감염의 치료를 필요로 하는 동물에게 본 발명 단백질의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 바람직하게는 항-PCV2 항체를 갖는 동물에서의 PCV2 감염의 치료 또는 예방을 위해, 또는 PCV2 감염에 의해 야기되거나 PCV2 감염과 관련되어 있는 임상 징후의 감소를 위해, 본원에 기술된 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는, 1mL 면역원성 조성물을 제공한다.

[0260] 추가의 양상에 따르면, 치료를 필요로 하는 대상체에게 상기 기술된 면역원성 조성물의 적어도 1회 용량의 1회 이상의 추가 투여를 제공하고, 여기서, 상기 제2 투여 또는 임의의 추가 투여는 1차 투여 또는 임의의 이전 투여 후에 적어도 14일째에 제공한다. 바람직하게는, 면역원성 조성물은 면역 자극제와 함께 투여한다. 바람직하게, 상기 면역 자극제는 적어도 2회 제공한다. 바람직하게는 적어도 3일째, 더욱 바람직하게는 적어도 5일째, 더욱 바람직하게는 적어도 7일째에 면역 자극제의 1차와 2차 투여 사이에 또는 임의의 추가 투여 사이에 제공한다. 바람직하게는 면역 자극제는 본원에 제공된 면역원성 조성물의 1차 투여 후 적어도 10일, 바람직하게는 15일, 더욱 바람직하게는 20일, 더욱 더 바람직하게는 적어도 22일이 지나서 제공한다. 바람직한 면역 자극제는 예를 들면 킬로 림프 헤모시아닌(KLH), 바람직하게는 불완전 프로인트 보조제로 유화된 KLH(KLH/ICFA)이다. 그러나, 여기서는 당해 분야 숙련자에게 공지되어 있는 임의의 다른 면역 자극제도 사용될 수 있음이 이해된다. 본 명세서에 사용된 용어 "면역 자극제"는 특정 면역 반응, 바람직하게는 특정 병원체에 대한 면역 반응을 개시하거나 증가시키지 않고 면역 반응을 유발할 수 있는 임의의 제제 또는 조성물을 의미한다. 추가로, 면역 자극제는 적합한 용량으로 투여되도록 지시된다.

[0261] 선호하는 실시형태들의 상세한 설명

[0262] 이하 실시예는 본 발명에 따른 바람직한 재료와 절차를 제시한다. 본원에 기술된 바와 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료들은 본 발명의 실시 또는 시험에 사용할 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 재료는 이하에 기술된다. 그러나, 이들 실시예들은 단지 예시의 방식으로 제공되고, 본 발명의 전반적인 범위를 제한하려는 것으로 간주되어서는 안된다는 것이 이해되어야 한다.

[0263] 실시예 1

[0264] 재료 & 절차/돌연변이체의 고안

[0265] 제품 CIRCOFLEX®에 포함된 PCV2 ORF2 단백질의 PCV2a ORF2 아미노산 서열을, Clustal W 방법을 이용하여 Genbank 유래의 다수의 다른 공개된 PCV2a 및 PCV2b ORF2 아미노산 서열 및 PCV2b ORF2 BDH 아미노산 서열과 정렬하였다. PCV2a와 PCV2b ORF2 서열들 사이의 주요 아미노산 차이의 위치를 돌연변이에 관한 잠재적 위치로서 동정하였다(도 1 참조). 동정된 주요 아미노산 변화를 이용하여, PCV2b ORF2 BDH 유래의 아미노산을 PCV2a ORF2 유래의 상응하는 아미노산으로 교환하여 7개의 PCV2b ORF2 암호화 서열을 제조하였다. PCV2a ORF2(CIROCOFLEX®) 코돈을 이용하여 돌연변이체 아미노산을 암호화하였다. 7개의 PCV2b ORF2 돌연변이체 작제

물은 하기에 상세히 설명한다:

[0266] 1. PCV2b ORF2 BDH K59A

[0267] 2. PCV2b ORF2 BDH R63T

[0268] 3. PCV2b ORF2 BDH R63K

[0269] 4. PCV2b ORF2 BDH SFCO P88K T151P**

[0270] 5. PCV2b ORF2 BDH G191R

[0271] 6. PCV2b ORF2b BDH I206K

[0272] 7. PCV2b ORF2 BDH N232E

[0273] 합성된 PCV2b ORF2b BDH SFCO 암호화 서열의 부위-지시된 돌연변이발생에 의해 생성된 #4를 제외한 모든 암호화 서열은 통합 DNA 기술로 합성되었다.

[0274] ** SFCO = 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)의 최적화된 코돈. 이러한 작제물은 상기 기술된 정렬 이전에 예비 서열 평가를 통해 생성되었다. 또한, 이러한 서열 평가에서 2개의 돌연변이들이 동정되었다.

[0275] 돌연변이체 PCV2b ORF2 배칼로바이러스의 제조

[0276] 7개의 PCV2b ORF2 돌연변이체 암호화 서열의 각각 및 PCV2b ORF2 BDH 암호화 서열을 배칼로바이러스 전이 벡터 pVL1393에 클로닝하였고 Sf9 세포에서 배칼로바이러스 DNA로 동시-형질감염시켰다. 각각의 얻어진 재조합체 배칼로바이러스를 IFA에 의해 PCV2b ORF2 발현에 대해 확인하였다. 각각의 재조합체 배칼로바이러스의 증대된 스톡(stock)을 Sf+ 세포 상에서 제조하였고, TCID₅₀ 방법을 통해 적정하여 배칼로바이러스 역가를 측정하였다.

[0277] 돌연변이체 PCV2b ORF2 배칼로바이러스의 발현 평가

[0278] 0.1의 표적 MOI로 Sf+ 세포를 감염시킴으로써 각각의 재조합체 배칼로바이러스를 PCV2b ORF2 암호화 서열의 발현에 대해 평가하였다. 상기 감염을 5 내지 7일 동안 진행시켰고, 이어서, 20분 동안의 20,000g에서의 원심분리에 의해 수거하여 세포 잔해물 및 불용성 단백질을 제거하였다. 수거물 상청액을 0.2μm 여과하였고, α-PCV2 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 PCV2b ORF2 발현에 대해 직접 평가하였다(예를 들면, 도 2). 또한, 수거물 상청액은 거대분자 구조의 존재에 대해서도 평가하였다. 간략하게, 각각의 수거물 상청액의 샘플을 100,000g에서 2시간 동안 원심분리하였다. 얻어진 펠렛을 소량의 TBS 중에 재현탁시켰고, SDS-PAGE에 의해 분리하였다. PCV2a ORF2에 대한 크기 비교에 의해 염색된 겔에서 PCV2b ORF2 밴드를 검출하였다(예를 들면, 도 3). 또한, 재현탁된 펠렛을 2시간 동안의 100,000g에서의 원심분리에 의해 10% 내지 60% 불연속 슈크로스 농도구배 상에서 분리하여 전자 현미경(EM)에 의한 VLP 확인 및 정량화를 위한 PCV2b ORF2 단백질을 부분적으로 정제하였다(예를 들면, 도 4).

[0279] 슈크로스 농도구배 분리 후, PCV2b ORF2 함유 분획을 풀링하였고, PCV2b ORF2 농도를 SDS-PAGE 겔 밀도측정법(gel densitometry)에 의해 BSA 표준 곡선과 비교하여 측정하였다. 또한, 슈크로스 농도구배-정제된 재료의 샘플을 추가로 농축시켰고, 음성 염색으로서 포스포텅스텐산을 이용한 EM에 의해 VLP 확인을 행하였다(예를 들면, 도 5).

[0280] PCV2b ORF2 BDH 돌연변이체 작제물의 평가로부터의 결과 표는 도 6에 나타낸다. 상기 결과는 위치 63에서의 아르기닌으로부터 트레오닌으로의 단일 아미노산 돌연변이가 Sf+ 세포에서 PCV2b ORF2 BDH의 발현을 거의 10배 증가시켰음을 입증하였다. 단일 R63T 돌연변이는 PCV2b ORF2 BDH 발현을 PCV2a ORF2와 유사한 수준으로 증가시켰다. PCV2b ORF2 BDH의 아미노산 서열의 분석은 BC 루프가 트립신-유사 프로테아제에 의한 개열에 민감성일 수 있음을 시사한다. 2011년 카야트 등(Khayat *et al.*)에 의해 공개된 구조적 데이터는 아르기닌 63이 ORF2 단백질에 의해 형성된 PCV2 바이러스성 캡시드로부터 가장 멀리 돌출된 BC 루프 상에 존재하여 배칼로바이러스 복제 동안 Sf+ 세포의 용해 후 방출된 프로테아제에 대해 민감성이도록 남겨둠을 시사한다.

[0281] 위치 63에서의 트레오닌 치환 이외에도, 본 발명의 다른 실시형태에서, 아르기닌은, 세린, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함하는 다른 비하전된 극성 아미노산에 의해 치환되어 동일한 안정화 효과가 수득된다. 또한, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌 및 트립토판을 포함하는 비극성 아미노산도 동일한 효과를 달성할 수 있다.

- [0282] 실시예 2
- [0283] 이러한 연구는 PCV2a 및/또는 PCV2b 챌린지에 대한 돼지 쉼코바이러스 2형 ORF2b 백신의 한 실시형태의 효능을 입증한다. 이러한 연구에서는 재왕절개-유도된 초유-유도된(CDCD: Cesarean-derived colostrum-deprived) 새끼돼지를 이용하고, 2개의 그룹; 1) 맹독성 PCV2b로 챌린징된 실시예 1의 PCV2b ORF2 R63T 변이체(사멸된 배콜로바이러스 백신)를 포함하는 실험적 돼지 쉼코바이러스 백신으로 백신접종된 돼지, 및 2) 맹독성 PCV2b로 챌린징된 백신접종되지 않은 챌린징된 대조군 돼지로 분리한다. 0일째에, 그룹 1에 1mL의 백신을 근육내(IM) 투여하고, 반면, 그룹 2, 백신접종되지 않은 챌린징된 대조군 돼지는 어떠한 치료도 투여받지 않는다. 28일째에, 그룹 1 및 그룹 2의 모든 돼지에는 맹독성 PCV2b 1mL를 비강내(IN) 챌린징하고, 대략 3.0 Log₁₀TCID₅₀/mL 용량의 생 바이러스 1mL를 IM 챌린징한다. 모든 돼지는 25일째 및 31일째에 불완전 프로인트 항원보강제 중에 유회된 2.0mL의 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH/ICFA)을 IM 투여받는다. 돼지들은 임상 징후에 대해 매일 모니터링되고, 혈청학적 시험을 위해 주기적으로 채혈한다. 56일째에 모든 돼지들을 부검하고, 선택된 조직을 수집하고, 육안 병리학 관찰(gross pathology observation)을 행한다.
- [0284] 전체로서, 백신접종된 동물은 시험된 모든 파라미터들에서 이들 각각의 챌린지 대조군 그룹과 비교하는 경우에 감소를 나타낸다.
- [0285] 실시예 3
- [0286] 아미노산 부위 63에서의 몇몇의 다른 치환이 생성되어 PCV2b ORF BDH 천연 스트레인(strain)과 비교하였다. PCV2b ORF2 BDH 돌연변이체 작제물의 평가로부터의 결과는 도 7a 및 도 7b에 나타낸다. 그 결과는 위치 63에서의 아르기닌(R)으로부터 트레오닌(T)으로의 아미노산 돌연변이 이외에도, 아르기닌(R) 63으로부터 글리신(G)으로의, 아르기닌(R) 63으로부터 글루타민(Q)으로의, 그리고 아르기닌(R) 63으로부터 아스파르트레이트(D)로의 아미노산 돌연변이가 야생형과 비교하여 Sf+ 세포에서의 PCV2b ORF2 BDH의 발현을 적어도 4배 증가시켰음을 입증한다. 특히, 단일 돌연변이 R63G 및 R63Q는 Sf+ 세포에서의 PCV2b ORF2 BDH 발현을 PCV2a ORF2와 유사한 수준으로 증가시켰다.
- [0287] PCV2b ORF2 R63 돌연변이체를 암호화하는 재조합 배콜로바이러스의 생성
- [0288] 아미노산 위치 63에서의 PCV2b ORF2의 암호화 서열 내의 점 돌연변이는 부위-지시된 돌연변이유발에 의해 생성되었다. 간략하게, 배콜로바이러스 전이 플라스미드 pVL1393-PCV2b ORF2는, 표 1의 프라이머를 이용하여 부위-지시된 돌연변이유발시켰다. 얻어진 배콜로바이러스 전이 벡터를 서열분석하여 암호화 서열의 적절한 돌연변이를 확인하였고, 이어서, 선형화된 배콜로바이러스 DNA를 Sf9 세포에 동시-형질감염시켰다. 5일 후에 동시-형질감염물을 수거하였고, PCV2-특이적 항체를 이용한 IFA에 의해 PCV2b ORF2 발현에 대해 평가하였다. 각각의 배콜로바이러스의 증대된 스톱을 Sf9 세포에 대해 생성시켰고, α-배콜로바이러스 gp64 모노클로날 항체를 이용한 IFA-기반 TCID₅₀ 방법을 통해 적정하였다.

표 1

부위-지시된 돌연변이유발을 위한 프라이머들

프라이머	서열
순방향	5'-CTGTCAAGAAAACCACAGTCX ¹ X ² X ³ ACGCCCTCCTGGAATGTG-3'
역방향	순방향 프라이머의 역방향 보체

돌연변이	X ¹	X ²	X ³
R63D	G	A	C
R63Q	C	A	G
R63G	G	G	A
R63L	T	T	G
R63T	A	C	A

- [0289]
- [0290] PCV2b ORF2 VLP의 발현 및 정량화
- [0291] 회전 플라스크 중의 Sf+ 세포를 재조합 배콜로바이러스로 0.1의 MOI로 감염시켰고, 대략 100rpm으로 일정하게 교반하면서 27℃에서 항온배양하였다. 일단 Sf+ 세포 생존률이 30% 미만으로 떨어졌거나 감염 후 7일째에 감염

된 배양물을 수거하였다. 원액(raw) 배컬로바이러스 수거물을 4℃에서 20분 동안 20,000g에서 펠렛 세포 및 불용성 잔해물로 원심분리하였고, 이어서, 0.2μm 여과하였다. 청정화된 배컬로바이러스 수거물 여액(35mL)을 4℃에서 2시간 동안 10,000g RCF에서 펠렛 PCV2b ORF2 VLP로 원심분리시켰다. 얻어진 펠렛을 TBS 중에 재현탁시켰고, 4℃에서 2시간 동안 100,000g RCF에서 10% 내지 60% 불연속 슈크로스 농도구배에 대해 추가로 분리하였다. SDS-PAGE 및 α-PCV2 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 측정시 PCV2b ORF2의 대부분을 함유하는 분획을 풀링하였고, 밀도측정법에 의해 평가하였다. 간략하게, 풀링된 PCV2b ORF2-함유 분획을 SDS-PAGE에 의해 분리하였고, SIMPLYBLUE™ 세이프 스테인(Safe Stain)으로 염색하였다. 겔 화상을 포획하였고, 알파 뷰(Alpha View) 카메라 및 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. PCV2b ORF2 밴드의 질량은 각각의 겔에 포함된 BSA 표준 곡선을 이용하여 계산하였다. 풀(pool)의 PCV2b ORF2 농도는 PCV2b ORF2 밴드(들)의 질량을 겔에 부하된 샘플의 총 체적으로 나눔으로써 계산하였다. 수거물 재료 중의 PCV2b ORF2 농도는 풀 중의 PCV2b ORF2 농도에 풀의 체적을 곱하고, 이어서, 그 결과를 원심분리에 사용된 수거물 여액의 개시 체적으로 나눔으로써 계산하였다.

[0292] 실시예 4

[0293] 이러한 연구는 3주령으로 제공되는 경우에 PCV2b 챌린지에 대한 돼지 쉼코바이러스 2형 ORF2b 원형 백신(서열번호 1의 재조합체 배컬로바이러스 발현된 PCV2b ORF2 단백질 포함)의 효능을 평가한다.

[0294] 42마리의 건강한 CDCD 돼지들(X 한배 새끼들(litters) 각각 유래의 X 돼지 및 X 한배새끼들 각각 유래의 X 돼지)을 차단하였고, 6개의 우리(pens)에 가두었다. 한 우리 내의 돼지들은 5개의 치료 그룹들: X 돼지들로 이루어지고 치료를 투여받지 않은 그룹 1(엄격한 음성 대조군), 치료를 투여받지 않은 그룹 2(챌린지 대조군, n=X), 그룹 3(서열번호 1 + 카르보폴 백신을 포함하는 실험적 PCV2b, n=X), 그룹 4(서열번호 1 + ISA207VG 백신을 포함하는 실험적 PCV2b, n=X) 중 하나에 대해 동등하게 무작위배정되었다. 치료 그룹의 개요는 표 2에 제공된다.

표 2

그룹	돼지의 수	치료	0일째	11일째 및 17일째	14일째	42일째
1	≥5	엄격한 음성 대조군	n/a	n/a	부검	n/a
2	≥20	챌린지 대조군	n/a	KLH/ICFA 치료	PCV2b 챌린지	부검
3	≥20	PCV2b ORF2 단백질 + 카르보폴	백신접종	KLH/ICFA 치료	PCV2b 챌린지	부검
4	≥20	PCV2b ORF2 단백질 + ISA207VG	백신접종	KLH/ICFA 치료	PCV2b 챌린지	부검
5	≥20	PCV2a/ PCV2b ORF2 단백질 + 카르보폴	백신접종	KLH/ICFA 치료	PCV2b 챌린지	부검

[0295]

[0296] D0에서 돼지는 24일령이었고, 그룹 3 돼지에는 1mL 용량의 백신이 근육내(IM) 투여된다. D11 및 D17에서, 모든 돼지들은 2.0mL 용량의 KLH/ICFA를 근육내(IM) 투여받는다. D14에서, 돼지들에게 대략 5.0 log₁₀TCID₅₀/mL의 생맹독성 PCV2b 1.0mL를 우측 목에 IM 챌린징하고, 1.0mL를 비강내 챌린징한다. 돼지들은 전반적 건강에 대해 매일 검사된다. 혈액 샘플을 D-4, D14, D21, D28, D33 및 D42에 수집하고, -4일째를 제외하고 모든 날에 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응에 의해 PCV2 바이러스혈증에 대해 혈청을 실험하였다. 백신접종된 동물은 유의하게 낮은 바이러스혈증 PCV2b 챌린지 후 백신접종되지 않은 동물과 비교하여 임상 증상이 없는 상태로 감소됨을 나타낸다.

[0297] 이루어진 본 발명의 맥락 및 본원으로 제공된 실험적 데이터, 특히 하기가 고려되었다:

[0298] - 림프성 고갈에 관해서: "림프성 고갈의 예방시 보조"의 증거를 지지하기 위해, 4개의 림프 조직 샘플(편도, TBLN, MLN 또는 ILN) 중 하나 이상이 림프성 고갈에 대해 조직학적으로 양성이었던 경우, 돼지는 양성으로 간주되었고;

[0299] - 림프성 염증에 관해서: "림프성 염증의 예방시 보조"의 증거를 지지하기 위해, 4개의 림프 조직 샘플(편도, TBLN, MLN 또는 ILN) 중 하나 이상이 림프성 염증에 대해 조직학적으로 양성이었던 경우, 돼지는 양성으로 간주

되었고;

- [0300] - 림프성 콜로니화에 관해서: 바이러스 노출-후 4주까지 돼지가 감염을 제거하였다는 증거를 지지하기 위해, 4 개의 림프 조직 샘플(편도, TBLN, MLN 또는 ILN) 중 하나 이상이 IHC에 의해 PCV2 림프성 콜로니화에 대해 양성 이었던 경우, 돼지는 양성으로 간주되었고;
- [0301] - 바이러스혈증에 관해서: "바이러스혈증의 예방시 보조"의 증거를 지지하기 위해, 혈청 rt-PCR 시험이 1.0 x 10⁴ PCV2 게놈 등가량(선형의 낮은 수준) 이상이었던 경우 샘플링 날에 양성으로 간주되었고;
- [0302] - 사망률에 관해서, "사망률의 예방시 보조"의 증거를 지지하기 위해, 챌린지에 굴복한 경우(사망하거나 PCV2와 일치하는 기여할 수 있는 임상 징후, 육안 병변 및/또는 조직학적 병변을 갖는 인도적 이유로 요구되는 안락사) 돼지들은 사망률에 대해 양성인 것으로 간주되었다.
- [0303] 서열목록에서:
- [0304] 서열번호 1은 치환 R63T를 포함하는 서열번호 2에 상응한다.
- [0305] 서열번호 2는 야생형 PCV2b ORF2 단백질의 서열에 상응한다.
- [0306] 서열번호 3은 야생형 PCV2a ORF2 단백질의 서열에 상응한다.
- [0307] 서열번호 4는 서열번호 1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 상응한다.
- [0308] 서열번호 5는 야생형 PCV2b ORF2 단백질의 서열에 상응한다.
- [0309] 서열번호 6은 233개 아미노산 잔기 길이이고 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 서열에 상응한다.
- [0310] 서열번호 7은 233개 아미노산 잔기 길이이고 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 서열에 상응한다.
- [0311] 서열번호 8은 234개 아미노산 잔기 길이이고 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 서열에 상응한다.
- [0312] 서열번호 9는 234개 아미노산 잔기 길이이고 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 서열에 상응한다.
- [0313] 서열번호 10은 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 알라닌 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0314] 서열번호 11은 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 시스테인 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0315] 서열번호 12는 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 아스파르테이트 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0316] 서열번호 13은 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 글루탐레이트 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0317] 서열번호 14는 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 페닐알라닌 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0318] 서열번호 15는 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 글리신 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0319] 서열번호 16은 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 히스티딘 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0320] 서열번호 17은 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 이소류신 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0321] 서열번호 18은 아미노산 위치 59에 아르기닌 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 류신 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.

- [illegible]

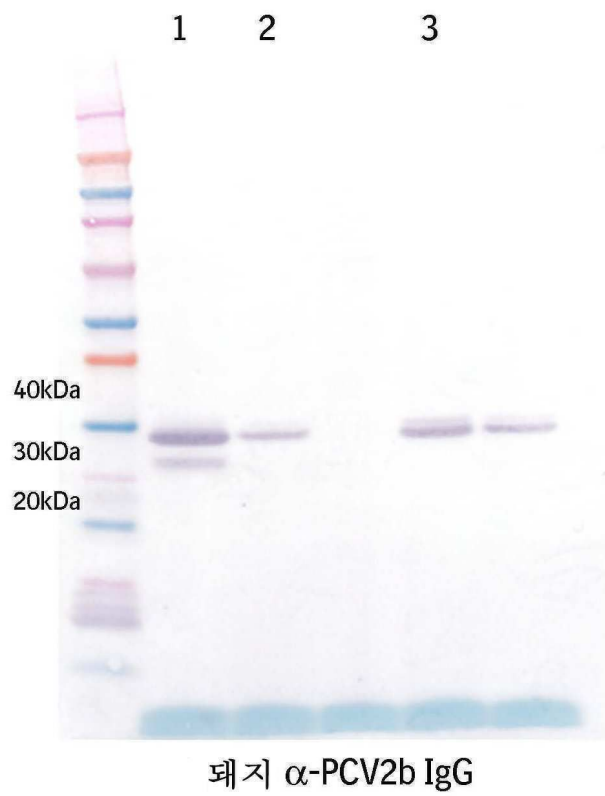
- [0343] 서열번호 40은 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 글루타민 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0344] 서열번호 41은 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 세린 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0345] 서열번호 42는 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 트레오닌 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0346] 서열번호 43은 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 발린 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0347] 서열번호 44는 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 트립토판 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0348] 서열번호 45는 아미노산 위치 59에 리신 잔기를 갖고 아미노산 위치 63에 티로신 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 위치 58 내지 66(본원에서 "BC-루프"로서도 나타냄)의 서열에 상응한다.
- [0349] 서열번호 46은 234개 아미노산 잔기 길이이고 아미노산 위치 63에 트레오닌 잔기를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 서열에 상응한다.

도면

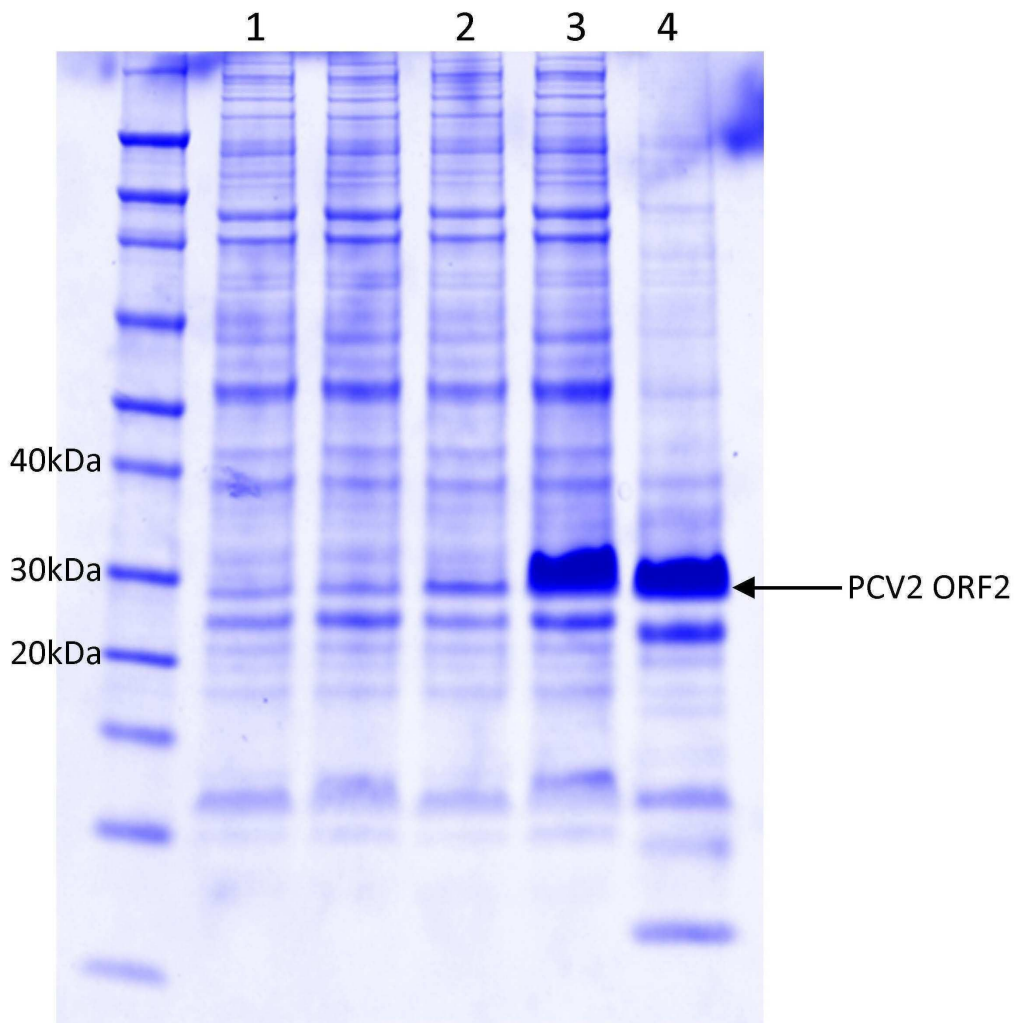
도면1

위치	2a	2b
59	A	R/K
63	T	R/K
88	K	P
151	P	T
191	R	G
206	K	I
232	E	N

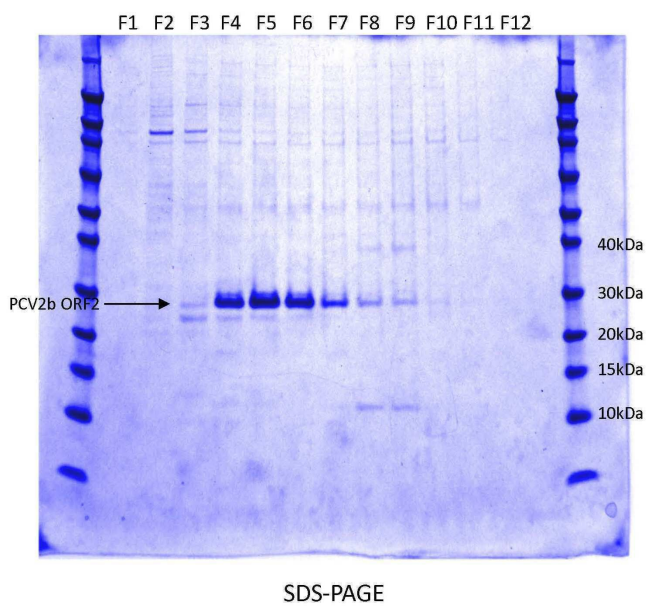
도면2



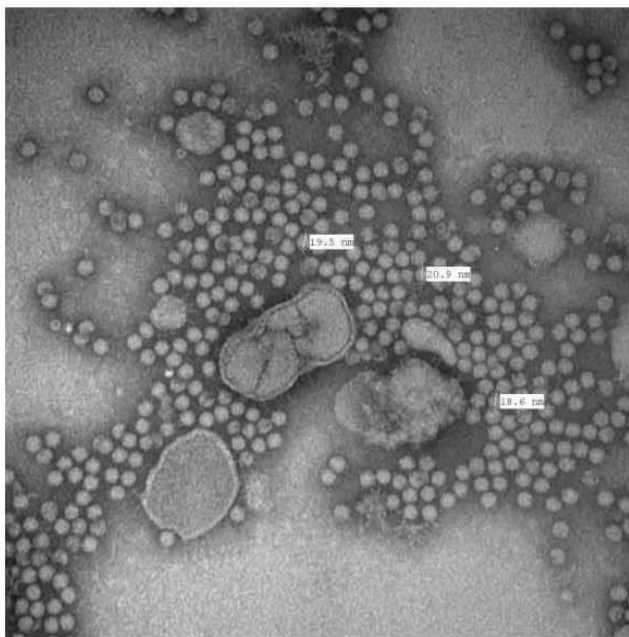
도면3



도면4

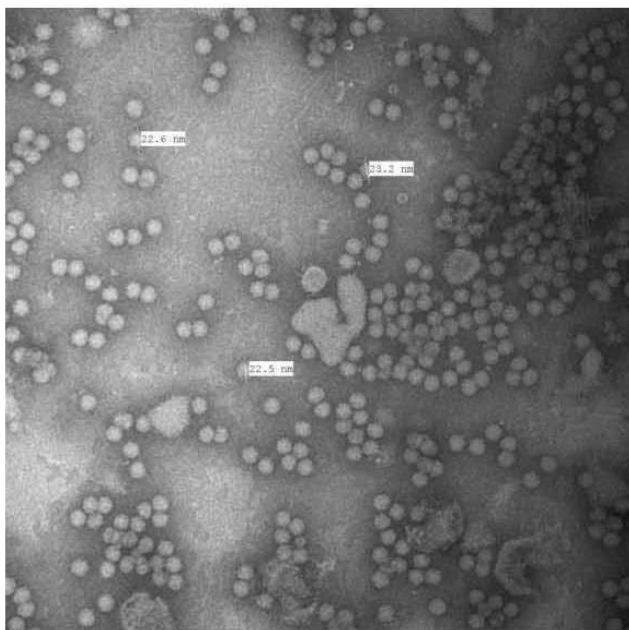


도면5a



PCV2a ORF2 VLPs

도면5b



PCV2b ORF2 VLPs

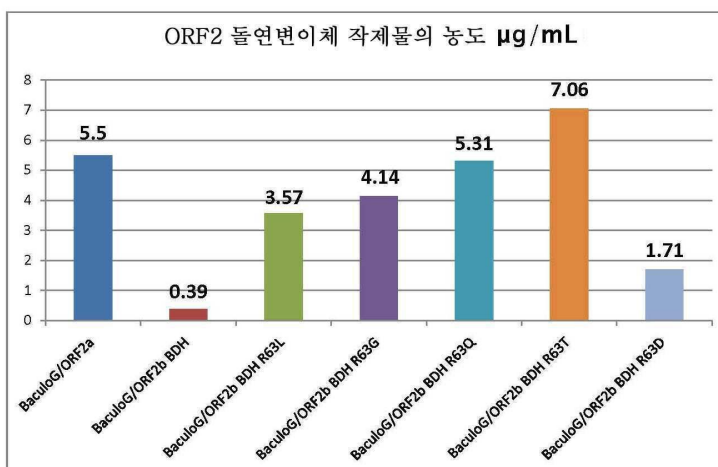
도면6

작제물	EM VLP 확인	1L 규모에서의 VLP 수율
ORF2a	Y	5.5mg/L
ORF2b BDH		
ORF2b BDH SFCO	Y	0.4mg/L
ORF2b BDH K59A	Y	0.34mg/L
ORF BDH R63K		
ORF2b BDH R63T	Y	3.2mg/L
ORF2b BDH SFCO P88K T151P	**	**
ORF2b BDH G191R	N	N/A
ORF2b BDH N232E	Y	0.57mg/L
ORF2b BDH I206K	N	N/A

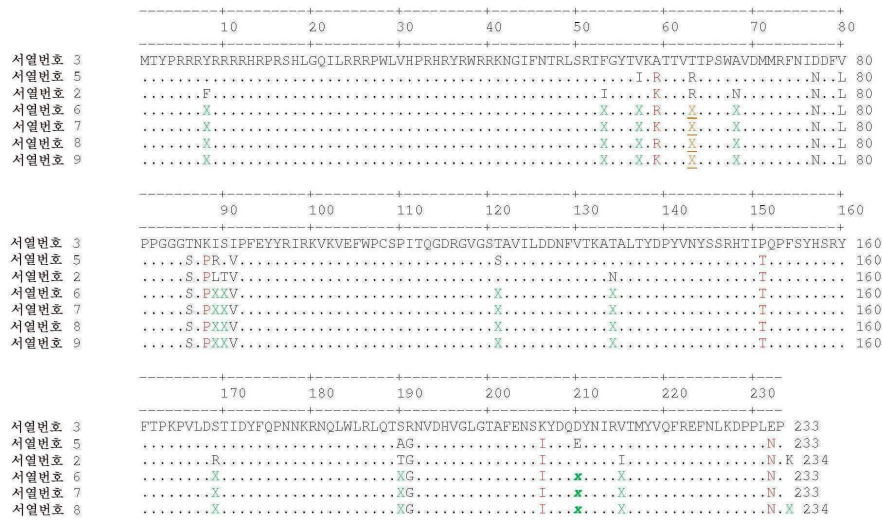
도면7a

작제물	농도 (ug/mL)
BaculoG/ORF2a	5.5
BaculoG/ORF2b BDH	0.39
BaculoG/ORF2b BDH R63L	3.57
BaculoG/ORF2b BDH R63G	4.14
BaculoG/ORF2b BDH R63Q	5.31
BaculoG/ORF2b BDH R63T	7.06
BaculoG/ORF2b BDH R63D	1.71

도면7b



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
- <120> PCV2 ORF2 PROTEIN VARIANT AND VIRUS LIKE PARTICLE COMPOSED THEREOF
- <130> P10-0163
- <150> US 61/885,871
- <151> 2013-10-02
- <160> 46
- <170> Kopatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 234
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> corresponds to SEQ ID NO:2 with the substitution R63T
- <400> 1

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35 40 45

Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr

50 55 60
 Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80

 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140

 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205

 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
 225 230
 <210> 2
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Porcine circovirus
 <400> 2
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

<400> 3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

<210> 4

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> encodes SEQ ID NO:1

<220><221> misc_feature

<222> (187)..(189)

<400> 4

```
atgacgtatc caaggaggcg ttccgcgaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc      60
cagatcctcc gccgcgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttacg ctggagaagg      120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc      180
acagtcacaa cgcctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaattattaa tgattttctt      240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgcccttg aatactacag aataaggaag      300
gttaaggttg agttctggcc ctgctccca atcaccagg gtgacaggg agtgggctcc      360
```

```
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc      420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagcct tctctacca ctcccgtac      480
tttacccega aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga      540
aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact      600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataacat gtatgtacaa      660
ttcagagaat ttaattctaa agacccccca cttaacccta agtga                          705
```

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 5

```
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1           5           10           15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
           20           25           30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
           35           40           45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
```

50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125

 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn
 180 185 190

 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
 225 230
 <210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Porcine circovirus
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa at position 63 is selected from the group consisting of Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, and Val.

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (89)..(90)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (121)..(121)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (134)..(134)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (169)..(169)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (190)..(190)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (210)..(210)

<223> Xaa at position 210 is selected from the group consisting of Asp and Glu.

<220><221> misc_feature

<222> (215)..(215)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 6

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35 40 45

Leu Ser Arg Thr Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Arg Thr Thr Val Xaa Thr

50 55 60

Pro Ser Trp Xaa Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu

65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr

85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr

100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Xaa Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr

130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr

145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Xaa Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro

165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn

180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp

195 200 205

Gln Xaa Tyr Asn Ile Arg Xaa Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe

210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro

225 230

<210> 7

<211> 233

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa at position 63 is selected from the group consisting of Ala,

Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser,
Thr, Trp, Tyr, and Val.

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (89)..(90)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (121)..(121)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (134)..(134)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (169)..(169)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (190)..(190)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (210)..(210)

<223> Xaa at position 210 is selected from the group consisting of Asp and Glu.

<220><221> misc_feature

<222> (215)..(215)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 7

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1	5	10	15
Ser	His	Leu	Gly
Gln	Ile	Leu	Arg
Arg	Arg	Arg	Pro
Trp	Leu	Val	His
Pro			
20	25	30	
Arg	His	Arg	Tyr
Arg	Trp	Arg	Arg
Lys	Asn	Gly	Ile
Phe	Asn	Thr	Arg
35	40	45	
Leu	Ser	Arg	Thr
Xaa	Gly	Tyr	Thr
Xaa	Lys	Lys	Thr
Thr	Thr	Val	Xaa
Thr			
50	55	60	
Pro	Ser	Trp	Xaa
Val	Asp	Met	Met
Arg	Phe	Asn	Ile
Asn	Asp	Phe	Leu

65	70	75	80
Pro	Pro	Gly	Gly
Gly	Ser	Asn	Pro
Xaa	Xaa	Val	Pro
Phe	Glu	Tyr	Tyr
85	90	95	
Arg	Ile	Arg	Lys
Val	Lys	Val	Glu
Phe	Trp	Pro	Cys
Ser	Pro	Ile	Thr
100	105	110	
Gln	Gly	Asp	Arg
Gly	Val	Gly	Ser
Xaa	Ala	Val	Ile
Leu	Asp	Asp	Asn
115	120	125	
Phe	Val	Thr	Lys
Ala	Xaa	Ala	Leu
Thr	Tyr	Asp	Pro
Tyr	Val	Asn	Tyr

130	135	140
Ser	Ser	Arg
His	Thr	Ile
Thr	Gln	Pro
Phe	Ser	Tyr
His	Ser	Arg
Tyr		

145 150 155 160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Xaa Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
 180 185 190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp

 195 200 205
Gln Xaa Tyr Asn Ile Arg Xaa Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro

225 230

<210> 8

<211> 234

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa at position 63 is selected from the group consisting of Ala,
Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser,
Thr, Trp, Tyr, and Val.

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (89)..(90)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (121)..(121)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (134)..(134)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (169)..(169)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (190)..(190)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (210)..(210)

<223> Xaa at position 210 is selected from the group consisting of Asp

and Glu.

<220><221> misc_feature

<222> (215)..(215)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (234)..(234)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 8

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35 40 45

Leu Ser Arg Thr Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Arg Thr Thr Val Xaa Thr

50 55 60
 Pro Ser Trp Xaa Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr

 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Xaa Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Xaa Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro

 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Xaa Tyr Asn Ile Arg Xaa Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa
 225 230

<210> 9

<211> 234

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa at position 63 is selected from the group consisting of Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, and Val.

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (89)..(90)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (121)..(121)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (134)..(134)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (169)..(169)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (190)..(190)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (210)..(210)

<223> Xaa at position 210 is selected from the group consisting of Asp and Glu.

<220><221> misc_feature

<222> (215)..(215)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (234)..(234)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 9

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1 5 10 15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20 25 30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35 40 45
Leu Ser Arg Thr Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Lys Thr Thr Val Xaa Thr

50 55 60
Pro Ser Trp Xaa Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu

65 70 75 80
Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr

85 90 95
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr

100 105 110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

115 120 125
Phe Val Thr Lys Ala Xaa Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr

130 135 140
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr

145 150 155 160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Xaa Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro

165 170 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn

180 185 190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp

195 200 205

Gln Xaa Tyr Asn Ile Arg Xaa Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe

210

215

220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa

225

230

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 10

Lys Arg Thr Thr Val Ala Thr Pro Ser

1

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 11

Lys Arg Thr Thr Val Cys Thr Pro Ser

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 12

Lys Arg Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 13

Lys Arg Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 14

Lys Arg Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 15

Lys Arg Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 16

Lys Arg Thr Thr Val His Thr Pro Ser

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 17

Lys Arg Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 18

Lys Arg Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 19

Lys Arg Thr Thr Val Met Thr Pro Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 20

Lys Arg Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 21

Lys Arg Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 22

Lys Arg Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 23

Lys Arg Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 24

Lys Arg Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 25

Lys Arg Thr Thr Val Val Thr Pro Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 26

Lys Arg Thr Thr Val Trp Thr Pro Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 27

Lys Arg Thr Thr Val Tyr Thr Pro Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 28

Lys Lys Thr Thr Val Ala Thr Pro Ser

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 29

Lys Lys Thr Thr Val Cys Thr Pro Ser

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 30

Lys Lys Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 31

Lys Lys Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 32

Lys Lys Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 33

Lys Lys Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 34

Lys Lys Thr Thr Val His Thr Pro Ser

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 35

Lys Lys Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 36

Lys Lys Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 37

Lys Lys Thr Thr Val Met Thr Pro Ser

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 38

Lys Lys Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 39

Lys Lys Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 40

Lys Lys Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 41

Lys Lys Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 42

Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 43

Lys Lys Thr Thr Val Val Thr Pro Ser

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 44

Lys Lys Thr Thr Val Trp Thr Pro Ser

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 45

Lys Lys Thr Thr Val Tyr Thr Pro Ser

1 5

<210> 46

<211> 234

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa at position 63 is selected from the group consisting of Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, and Val.

<400> 46

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20 25 30
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

 35 40 45
 Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Xaa Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr

 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro

 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
 225 230