



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 101558169 B

(45)授权公告日 2017.08.04

(21)申请号 200780046246.0

(22)申请日 2007.12.14

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 101558169 A

(43)申请公布日 2009.10.14

(30)优先权数据  
60/870,311 2006.12.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2009.06.15

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2007/087628 2007.12.14

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02008/076915 EN 2008.06.26

(73)专利权人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡  
有限公司  
地址 美国密苏里州

(72)发明人 维基·法钦格 克努特·埃尔伯斯  
阿克塞尔·利斯切夫斯基  
玛丽昂·基克斯莫勒  
弗兰科伊斯-泽维尔·奥维伦  
伊莎贝尔·弗赖因冯里克斯芬  
迈克尔·皮翁特科瓦斯基

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

代理人 闵丹

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12N 7/00(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1458167 A,2003.11.26,

CN 1361824 A,2002.07.31,

CN 1309708 A,2001.08.22,

P. Blanchard等.Protection of swine  
against post-weaning multisystemic  
wasting syndrome (PMWS) by porcine  
circovirus type 2 (PCV2) proteins.  
《Vaccine》.2003,第21卷4565-4575.

M. Fenaux等.A Chimeric Porcine  
Circovirus (PCV) with the Immunogenic  
Capsid Gene of the Pathogenic PCV Type 2  
(PCV2) Cloned into the Genomic Backbone  
of the Nonpathogenic PCV1 Induces  
Protective Immunity against PCV2  
Infection in Pigs.《JOURNAL OF VIROLOGY》  
.2004,第78卷(第12期),6297-6303.

审查员 钟辉

权利要求书3页 说明书20页

序列表10页 附图2页

(54)发明名称

以PCV2抗原治疗猪

(57)摘要

本发明涉及一种治疗或预防如下动物PCV2  
感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关  
之临床症状之方法:a)具有抗PCV2抗体和/或b)1  
至22日龄之幼小仔猪,该方法包括向需要该治疗  
之动物施用有效量之PCV2抗原的步骤。所述动物  
优选为猪或幼小仔猪。

1. 有效量PCV2 ORF2抗原在用于制备在动物中预防由PCV2感染引起的淋巴损耗或淋巴性炎症的药物中的用途,所述动物为有母体抗PCV2抗体的动物,其中所述药物是为剂施用而制备的。

2. 权利要求1的用途,其中所述动物在PCV特异性免疫分析中具有大于1:100的抗PCV-2抗体效价。

3. 权利要求1或2的用途,其中所述动物在PCV特异性免疫分析中具有大于1:1000的抗PCV-2抗体效价。

4. 权利要求1或2的用途,其中所治疗的动物在施用PCV2 ORF2抗原时具有所述抗PCV2抗体效价。

5. 权利要求3的用途,其中所治疗的动物在施用PCV2 ORF2抗原时具有所述抗PCV2抗体效价。

6. 权利要求1、2、和5中之一的用途,其中所述PCV2 ORF2抗原在7日龄或之后施用。

7. 权利要求3的用途,其中所述PCV2 ORF2抗原在7日龄或之后施用。

8. 权利要求4的用途,其中所述PCV2 ORF2抗原在7日龄或之后施用。

9. 权利要求1、2、5、7、和8中之一的用途,其中所述PCV2 ORF2抗原在不晚于7周龄时施用。

10. 权利要求3的用途,其中所述PCV2 ORF2抗原在不晚于7周龄时施用。

11. 权利要求4的用途,其中所述PCV2 ORF2抗原在不晚于7周龄时施用。

12. 权利要求1、2、5、7、8、10、和11中之一的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,该预防使病毒血症期间缩短5天以上。

13. 权利要求3的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,该预防使病毒血症期间缩短5天以上。

14. 权利要求4的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,该预防使病毒血症期间缩短5天以上。

15. 权利要求6的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,该预防使病毒血症期间缩短5天以上。

16. 权利要求9的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,该预防使病毒血症期间缩短5天以上。

17. 权利要求1、2、5、7、8、10、11、13-16中之一的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是重组杆状病毒表达的PCV2 ORF-2。

18. 权利要求3的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是重组杆状病毒表达的PCV2 ORF-2。

19. 权利要求4的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是重组杆状病毒表达的PCV2 ORF-2。

20. 权利要求6的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是重组杆状病毒表达的PCV2 ORF-2。

21. 权利要求9的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是重组杆状病毒表达的PCV2 ORF-2。

22. 权利要求12的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是重组杆状病毒表达的PCV2 ORF-2。

23. 权利要求1、2、5、7、8、10、11、13-16、或18-22中之一的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是Ingelvac®CircoFLEX™。

24. 权利要求3的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是Ingelvac®CircoFLEX™。

25. 权利要求4的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是**Ingelvac®CircoFLEX™**。
26. 权利要求6的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是**Ingelvac®CircoFLEX™**。
27. 权利要求9的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是**Ingelvac®CircoFLEX™**。
28. 权利要求12的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是**Ingelvac®CircoFLEX™**。
29. 权利要求17的用途,其中所述PCV-2 ORF2抗原是**Ingelvac®CircoFLEX™**。
30. 权利要求1、2、5、7、8、10、11、13-16、18-22、或24-29中之一的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
31. 权利要求3的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
32. 权利要求4的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
33. 权利要求6的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
34. 权利要求9的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
35. 权利要求12的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
36. 权利要求17的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
37. 权利要求23的用途,其中需要所述治疗的动物被施用0.5至18μg/剂所述PCV2 ORF2抗原。
38. 权利要求1、2、5、7、8、10、11、13-16、18-22、24-29、或31-37中之一的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。
39. 权利要求3的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。
40. 权利要求4的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。
41. 权利要求6的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。
42. 权利要求9的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。
43. 权利要求12的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,

较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。

44. 权利要求17的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。

45. 权利要求23的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。

46. 权利要求30的用途,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比,对PCV2感染的所述预防导致选自下组的疫苗功效参数被改进:降低增重之损失,缩短病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。

47. 权利要求1、2、5、7、8、10、11、13-16、18-22、24-29、31-37、或39-46中之一的用途,其中该动物是猪。

48. 权利要求3的用途,其中该动物是猪。

49. 权利要求4的用途,其中该动物是猪。

50. 权利要求6的用途,其中该动物是猪。

51. 权利要求9的用途,其中该动物是猪。

52. 权利要求12的用途,其中该动物是猪。

53. 权利要求17的用途,其中该动物是猪。

54. 权利要求23的用途,其中该动物是猪。

55. 权利要求30的用途,其中该动物是猪。

56. 权利要求38的用途,其中该动物是猪。

## 以PCV2抗原治疗猪

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2006年12月15日提交的美国申请60/870,311的优先权,该申请的教导和内容引入本文做参考。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表纸件和电子件,其教导和内容都引入本文做参考。所述序列表W006/072065中的相同。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及使用包含猪第二型圆环病毒(PCV2)抗原之免疫原性组合物来防止及治疗具有抗PCV2特异性抗体之动物中之数种临床表现(疾病),减少临床症状的严重性,减少感染的发生率和/或临床症状的发生率。优选地,所述抗PCV-2特异性抗体是母体抗体。

### 背景技术

[0006] 猪第二型圆环病毒(PCV2)是小分子DNA病毒(直径为17-22纳米),二十面体形状,无包膜,含有单链环状基因组。PCV2与猪第一型圆环病毒(PCV1)共享大约80%之序列同一性。然而,PCV1通常无毒性,而猪之PCV2感染最近已与统称为猪圆环病毒相关疾病(PCVAD)(亦称为猪圆环病毒疾病(PCVD))的多种疾病综合症有关(Allan等人,2006,IPVS会议)。断乳后多系统消耗性综合症(PMWS)通常视为PCVAD之主要临床表现。(Harding等人.,1997,Swine Health Prod;5:201-203;Kennedy等人.,2000,J Comp Pathol;122:9-24)。PMWS侵袭在5-18周龄间的猪。PMWS之临床特征在于消瘦、皮肤苍白、生长迟滞、呼吸窘迫、腹泻、黄疸(icterus)及黄疸病(jaundice)。在一些受侵袭之猪中,会明显出现所有症状之组合,而另一些受侵袭之猪仅具有一种或两种所述症状(Muirhead,2002,Vet.Rec.;150:456)。在尸体剖检中,显微镜可见及肉眼可见之损伤亦会出现在多个组织及器官中,其中淋巴器官系损伤之最普遍部位。(Allan及Ellis,2000;J Vet.Diagn.Invest.,12:3-14)。已观察到PCV2核酸或抗原的量与显微镜可见之淋巴损伤之严重性间之强烈相关性。受PCV2感染之猪之死亡率可能接近80%。除PMWS外,PCV2与数种其它感染有关,所述其它感染包括伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合症(PRRS)、格拉塞氏(Glasser's)病、链球菌性脑膜炎、沙门氏菌病、断乳后大肠杆菌病、营养性肝功能障碍及化脓性支气管肺炎。然而,迄今研究仍未证实任何所述临床症状实际上是否为PCV2感染之直接结果。而且,仍未获知能否借助针对PCV2之活性剂有效减轻或治愈任何所述临床症状。

[0007] 基于DNA疫苗治疗PCV2感染之方法阐述于美国专利第6,703,023号中。在W0 03/049703中阐述包含PCV-1骨架之活嵌合疫苗之生产,在该PCV-1骨架中病原性PCV2菌株之免疫原性基因代替PCV-1骨架之一基因。W099/18214提供数种PCV2菌株及制备死PVC2疫苗之程序。然而,未报道功效数据。在W0 06/072065及W0 2007/028823中报道一有效之基于ORF-2之亚单位疫苗。任何所述疫苗皆拟用于大于3周龄之猪(swine或pig)之接种疫苗/治疗。所述疫苗中无一经阐述用于小于3周龄或2周龄之幼小仔猪。

[0008] 已显示源自母体之免疫性赋予一定程度之抵抗PCV2感染及与PCV2感染有关之临床疾病之保护。已显示该保护系效价依赖性的：较高之效价通常系保护性的，而较低之效价则不然 (McKeown等人., 2005; Clin. Diagn. Lab. Immunol.; 12:1347-1351)。估计断乳幼畜中之平均抗体半衰期为19.0天且在群体内PCV2-被动性抗体衰减期限相对较宽 (Opriessnig等人. 2004, J. Swine Health Prod. 12:186-191)。人们发现在10-12日龄存在之低效价PCV2被动性获得抗体在约 $4.9 \pm 1.2$ 周龄时衰减，发现中等水平之抗体在约 $8.1 \pm 1.9$ 周龄时衰减且发现高水平之抗体在约 $11.1 \pm 2.5$ 周龄时衰减 (Opriessnig等人., 2006, 第37届美国猪兽医学协会年会 (Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians))。逐渐减小之抗体效价与时间之密切相关性表明PCVAD之第一临床征兆发生在仔猪约5周龄及12周龄时 (Allan等人, 2000, Vet. Diagn. Investigation, 12:3-14)。此外，亦已自新生仔猪之淋巴结中分离出PCV2 (Hirai等人, 2001, Vet. Record; 148:482-484)，此表明即使较幼小之仔猪在无保护性母体抗体效价存在下亦可能受PCVAD侵袭。抗体效价与保护间之明显相关性在Spanish田间研究中已得到证实：具有低抗体效价之7周龄之猪 (平均抗体效价1:100, 在0至1:320范围内) 在随后5周内比具有较高抗体效价之动物具有显著较高之死亡率 (Rodriguez-Arrioja等人., 2002, Am. J. Vet. Res. 63:354-357)。

[0009] 母体抗体的存在不仅可赋予一定程度之抵抗病毒感染之保护 (然而其系不可预测的)，且亦获知会削弱免疫作用之功效。例如，较高效价之经典猪瘟病毒 (CSFV) 之母体抗体抑制CSFV疫苗之细胞介导及体液免疫反应二者，但是较低效价没有显著影响 (Suradhat及Damrongwatanapokin, 2003, Vet. Microbiol; 92:187-194)。亦对于活PCV2疫苗，已预测当将其给予大于7或8周龄之仔猪时作用会最有效，因为此时母体抗体已大部分减弱。母体抗体干扰受所引发之免疫反应之类型 (Th1对Th2) 影响，免疫反应之类型根据 (除其它外) 疫苗类型、抗原类型、佐剂类型以及所施用抗原的量而定。因此，即使疫苗抵抗相同之病原体，其可能之母体抗体干扰亦可能不同。总而言之，母体抗PCV2抗体可能赋予一定程度之抵抗PCV2之保护，但另一方面所述抗体可能削弱任何PCV2疫苗之功效。

[0010] 以下事实进一步使主动免疫作用对动物之保护变得复杂：a) 母体抗体 (MDA) 之衰减时间各动物有所不同且b) 许多疾病在抗体衰减之后不久发生。为应对该问题，数种接种疫苗策略预示对于幼小动物采用两次注射接种疫苗方案：在生命早期给予第一次接种疫苗以保护所述具有低MDA之动物。申请人认为该第一次接种疫苗由于疫苗抗原之干扰可能在具有高MDA效价之动物中不是有效的。同样为保护所述动物，当预期高MDA量已下降时，需要第二次接种疫苗。该类接种疫苗方案可用于许多小动物疫苗 (抵抗 (例如) 犬细小病毒出血性胃肠炎、犬肝炎)、马疫苗 (抵抗 (例如) 马流行性感冒之疫苗) 及猪疫苗 (抵抗 (例如) 胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*))。因为在5周龄或更大之动物中PCVAD之发作看来似乎与PCV2抗体之衰减有关，据报道PCV2抗体之衰减发生在4-11周龄之动物中，因此已阐述数种使用两次注射接种疫苗方案以避免可能之母体抗体干扰之抵抗PCVAD之疫苗方法。在WO 2007/028823中，阐述用大于20微克/剂抗原使用两次接种疫苗方案之具有母体抗PCV2抗体之仔猪的接种疫苗。初始接种疫苗在1周龄与4周龄间施用。所有动物在初始接种疫苗后3周 (在具有高MDA量之动物中之母体抗体在第一次接种疫苗已下降或终止时) 再次接种疫苗。因此，尚不存在阐述母体抗PCV2抗体对保护或干扰程度之准确影响的信息。为此，申请人建议不要对在三 (3) 周龄之

前至少接受单次注射疫苗方案之仔猪接种疫苗。在3周龄之前之接种疫苗与免疫作用功效之相关性具有一定程度之不确定性。另一方面,尽管仍无人知晓较低量之准确意义,但具有较低量之母体抗PCV2抗体之仔猪在3周龄之前不足以抵抗PCV2感染。换言之,在3周龄之前未实施接种疫苗之具有低MDA效价之畜群由于缺乏足够之免疫体质具有PCV2感染之内在风险。

[0011] 而且,未曾有人阐述在已经具有抗PCV2抗体(优选具有母体抗PCV2抗体)之猪中所述疫苗赋予抵抗PCV2感染之保护性免疫性或减轻、减少与PCV2感染有关之任何临床症状之严重性或治愈所述任何临床症状。

## 附图说明

[0012] 图1示接种时的抗PCV2抗体效价分组。

[0013] 图2示具有低水平( $<1:100$ )和高水平( $>1:1000$ )抗PCV2抗体的接种疫苗的动物的活体重量比较。

[0014] 图3示疫苗接种组(IVP)和安慰剂处理对照组(CP)的体重差异。

## 发明内容

[0015] 本发明克服在先前技术中固有之问题且提供当前技术水平之明显进展。根据总体方面,本发明提供治疗或预防具有抗PCV2抗体之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤。抗PCV2抗体(尤其母体来源的抗PCV2抗体)之存在不会削弱包含PCV2抗原之疫苗的功效系一出人预料且令人惊奇之发现。

[0016] 本文所用术语“疫苗”或“免疫原性组合物”(两个术语同义使用)系指含有PCV2抗原之任何医药组合物,此组合物可用于防止或治疗个体中与PCV2感染有关之疾病或病况。优选之免疫原性组合物能够诱发、刺激或增强抵抗PCV2之免疫反应。因此该术语涵盖如下文所述之亚单位免疫原性组合物以及含有全杀灭的(whole killed)或减毒的(attenuated)和/或灭活的(inactivated)PCV2之组合物二者。

[0017] 因此,本发明另一方面提供治疗或预防具有抗PCV2抗体(尤其系母体抗PCV2抗体)之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤,其中该免疫原性组合物是亚单位免疫原性组合物、含有全杀灭或减毒和/或灭活的PCV2之组合物。

[0018] 本文所用术语“亚单位免疫原性组合物”系指含有源自PCV2或与PCV2抗原同源之至少一种免疫原性多肽或抗原(但并非所有抗原)之组合物。此一组合基本上无完整之PCV2。因此,“亚单位免疫原性组合物”系自至少部分纯化或分级分离(优选为基本上纯化)之PCV2免疫原性多肽或其重组类似物制备。亚单位免疫原性组合物可包含基本上不含来自PCV2之其它抗原或多肽、或呈经分级分离形式之(若干)亚单位目标抗原。优选之免疫原性亚单位组合物包含如下文所述之PCV2ORF-2蛋白。最优选者系包含W006/072065中提供之任何PCV2抗原之免疫原性亚单位组合物,其全文皆以引用方式并入本文中。

[0019] “免疫反应”意指但不限于在宿主中出现对目标组合物或疫苗之细胞和/或抗体介

导之免疫反应。通常，“免疫反应”包括但不限于一或多种下述效应：产生或激活（具体而言）针对目标组合物或疫苗中所含抗原之抗体、B细胞、辅助性T细胞、抑制性T细胞和/或细胞毒性T细胞。优选地，宿主会表现治疗性或保护性免疫（记忆）反应以增强对新感染之抵抗和/或降低疾病之临床严重性。该保护可藉由与PCV2感染有关之症状之数量减少或严重性减轻，或缺失一或多种所述症状，病毒血症发作延迟，病毒持久性减弱，总病毒负荷减少和/或病毒排泄减少来表现。

[0020] 本文所用术语“抗原”系指引发如上所述免疫反应之氨基酸序列。本文所用抗原包括任何PCV2蛋白之全长序列、其类似物或其免疫原性片段。术语“免疫原性片段”系指包括一或多个表位且因此可引发上述免疫反应之蛋白片段。可使用任何数量之本领域已知之表位定位技术鉴别所述片段。参见（例如）Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷（Glenn E. Morris编辑, 1996）Humana Press, Totowa, New Jersey。举例而言，可藉由下述方法来确定线性表位：例如在固态支撑体上同时合成大量肽，所述肽对应于蛋白分子之部分，并在所述肽仍附着于支撑体上时使所述肽与抗体反应。所述技术为业内所熟知且阐述于（例如）美国专利第4,708,871号；Geysen等人（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002；Geysen等人（1986）Molec. Immunol. 23:709-715。类似地，构象性表位可藉由用（例如）x射线结晶照相术及二维核磁共振确定氨基酸空间构象容易地加以鉴别。参见（例如）上文Epitope Mapping Protocols。

[0021] 定义中亦可包括合成抗原，例如多表位、侧翼表位及其它重组或合成来源抗原。参见（例如）Bergmann等人（1993）Eur. J. Immunol. 23:2777-2781；Bergmann等人（1996），J. Immunol. 157:3242-3249；Suhriebier, A.（1997），Immunol. and Cell Biol. 75:402-408；Gardner等人.,（1998）第12届世界AIDS会议（World AIDS Conference），Geneva, Switzerland, 1998年6月28日-7月3日。

[0022] 根据又一方面，本文所用免疫原性组合物最优选包含由PCV2ORF-2表达的多肽或其片段。本文所用于制备所述组合物且在本文所提供之方法范围内之PCV2ORF-2DNA及蛋白系PCV2分离物中之高保守结构域且因此，任何PCV2ORF-2作为本文所用之PCV ORF-2DNA和/或多肽之来源会系有效的。一优选之PCV2ORF-2蛋白系WO 06/072065之SEQ ID NO:11之PCV2ORF-2蛋白。另一优选之PCV ORF-2多肽系以WO 06/072065之SEQ ID NO:5提供。然而，本领域技术人员应了解，该序列之序列同源性可改变至多6-10%且仍保持使其可用于免疫原性组合物之抗原性特征。免疫组合物之抗原性特征可（例如）藉由如WO 06/072065之实例4所提供之攻击实验评估。而且，当经修饰抗原与PCV2ORF-2蛋白相比赋予至少70%（优选为80%，更优选为90%）之保护性免疫性时，仍保留经修饰抗原之抗原性特征，该PCV2ORF-2蛋白由WO 06/072065所提供之SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4多核苷酸序列编码。

[0023] 因此，本发明又一方面提供治疗或预防具有抗PCV2抗体（尤其母体抗PCV2抗体）之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法，该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤，其中该PCV2抗原系与PCV2ORF-2蛋白相比具有至少70%（优选为80%，甚至更优选为90%）保护性免疫力之抗原PCV2ORF-2蛋白，该PCV2ORF-2蛋白由WO 06/072065的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4多核苷酸序列编码。优选地，该PCV2ORF-2具有WO 06/072065之SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:5序列。

[0024] 在一些些形式中,PCV2ORF-2蛋白之免疫原性部分用作包含PCV2抗原之免疫原性组合物中之抗原性组份。本文所用术语“免疫原性部分”分别系指PCV2ORF-2蛋白和/或多核苷酸之经截短和/或经取代形式或片段。优选地,所述经截短和/或经取代形式或片段包含全长ORF-2多肽之至少6个相邻氨基酸。更优选地,所述经截短或经取代形式或片段具有全长PCV ORF-2多肽之至少10个(更优选为至少15个,且仍更优选为至少19个)相邻氨基酸。此方面之两个优选序列为本文及WO 06/072065所述之SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10。还应理解,所述序列可系较大片段或截短形式之一部分。

[0025] 如上所述,另一优选之PCV2ORF-2多肽系由SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4核苷酸序列编码之任何PCV2ORF-2多肽。然而,本领域技术人员应了解,该序列之序列同源性可改变至多6-20%且仍保持使其可用于免疫原性组合物之抗原性特征。在一些形式中,该PVC2ORF-2多肽之经截短或经取代形式或片段用作该组合物中之抗原性组份。优选地,所述经截短或经取代形式或片段包含至少18个(例如)SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4之全长PCV2ORF-2核苷酸序列之邻近核苷酸。更优选地,所述经截短或经取代形式或片段具有至少30个(更优选为至少45个,且仍更优选为至少57个)(例如)SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4之全长PCV2ORF-2核苷酸序列之邻近核苷酸。

[0026] 如业内已知,“序列同一性”系指两个或更多个多肽序列或两个或更多个多核苷酸序列间之关系,即参考序列与相比于该参考序列之指定序列间之关系。序列同一性系对指定序列与参考序列实施能产生最高程度序列相似性(藉由所述序列串间之匹配确定)之最优选比对后藉由比较所述序列来确定。对于该比对,序列同一性系基于位置对位置原理确定,例如若在一特定位置上核苷酸或氨基酸残基系一致的,则序列在该位置系“一致”的。随后用所述位置同一性之总数量除以参考序列中核苷酸或残基之总数量得到%序列同一性。序列同一性可容易地藉由已知方法计算,所述已知方法包括但不限于所述阐述于以下者: Computational Molecular Biology, Lesk, A.N. 编辑, Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编辑, Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. 及 Griffin, H.G. 编辑, Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及 Devereux, J., 编辑, M. Stockton Press, New York (1991); 及 Carillo, H. 及 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988), 其教导以引用方式并入本文中。确定序列同一性之优选方法经设计可给出所测试序列间之最大匹配。将确定序列同一性之方法编入可公开获得之确定指定序列间序列同一性之计算机程序中。所述程序之实例包括(但不限于)GCG程序包(Devereux, J. 等人, Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN及FASTA(Altschul, S.F. 等人, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990))。该BLASTX程序可自NCBI及其它来源公开获得(BLAST Manual, Altschul, S. 等人., NCVINLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S.F. 等人., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), 其教导以引用方式并入本文中)。所述程序利用缺省空位权重最优选地比对序列以在指定序列与参考序列间产生最高程度之序列同一性。作为例示,就具有相对参考核苷酸序列具有至少(例如)85%, 优选为90%, 甚至更优选为95%“序列同一性”之核苷酸序列之多核苷酸而言,意味着除指定多核苷酸序列可能包括至多15个, 优选至多10个, 甚

至更佳至多5个点突变/参考核苷酸序列之每100个核苷酸外,该指定多核苷酸之核苷酸序列与参考序列一致。换言之,在具有相对于参考核苷酸序列具有至少85%,优选为90%,甚至更优选为95%同一性之核苷酸序列之多核苷酸中,参考序列中至多15%,优选为10%,甚至更优选为5%之核苷酸可能经删除或经另一核苷酸取代,或参考序列中总核苷酸之至多15%,优选为10%,甚至更优选为5%数量之核苷酸可能插入参考序列中。参考序列之所述突变可发生在参考核苷酸序列之5'或3'末端位置或所述末端位置间之任何地方,其各散布于参考序列中之核苷酸中或散布于参考序列内之一或多个邻近基团中。类似地,就具有相对参考氨基酸序列具有至少(例如)85%,优选为90%,甚至更优选为95%序列同一性之指定氨基酸序列之多肽而言,意味着除指定多肽序列可能包含至多15个,优选为至多10个,甚至更优选为至多5个氨基酸改变/参考氨基酸序列之每100个氨基酸外,多肽之指定氨基酸序列与参考序列一致。换言之,为获得与参考氨基酸序列具有至少85%,优选为90%,甚至更优选为95%序列同一性之指定多肽序列,参考序列中至多15%,优选为至多10%,甚至更优选为至多5%之氨基酸残基可能经删除或经另一氨基酸取代,或参考序列中氨基酸残基总数量之至多15%,优选为至多10%,甚至更优选为至多5%数量之氨基酸可能插入参考序列中。参考序列之所述改变可能发生在参考氨基酸序列之胺基或羧基末端位置或所述末端位置间之任何地方,其各散布于参考序列中之残基中或散布于参考序列内之一或多个邻近基团中。优选地,不一致之残基位置系因保守的氨基酸取代而不同。然而,在确定序列同一性时保守取代并不作为匹配包括在内。

[0027] 本文所用“序列同源性”系指确定两序列相关性之方法。为确定序列同源性,将两个或更多个序列进行最优选比对,且(若需要)引入空位。然而,与“序列同一性”相比,在确定序列同源性时保守氨基酸取代作为匹配计数。换言之,为获得与参考序列具有95%序列同源性之多肽或多核苷酸,参考序列中85%,优选为90%,甚至更优选为95%之氨基酸残基或核苷酸必须匹配或包含经另一氨基酸或核苷酸之保守取代,或参考序列中总氨基酸残基或核苷酸(不包括保守取代)之至多15%,优选为至多10%,甚至更优选为至多5%数量之氨基酸或核苷酸可能插入参考序列中。优选地,同源序列包含至少50个,甚至更优选为至少100个,甚至更优选为至少250个,且甚至更优选为至少500个核苷酸之片段。

[0028] “保守取代”系指氨基酸残基或核苷酸经另一具有相似特征或特性(包括尺寸、疏水性等等)之氨基酸残基或核苷酸取代,以使整体功能未显著改变。

[0029] “经分离的”意指“人工”使其自其天然状态改变,即,若其天然存在,将其自其起始环境改变或移出,或二者。例如,天然存在于活生物体内之多核苷酸或多肽不是“经分离的”,但是自其天然状态之共存物质分离出之相同的多核苷酸或多肽系“经分离的”,如本文所使用术语。

[0030] 因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防具有抗PCV2抗体(尤其系母体抗PCV2抗体)之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤,其中该PCV2ORF-2蛋白是任一所述上述者。优选地,该PCV2ORF-2蛋白

[0031] i) 包含W0 06/07065之SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11序列之多肽;

[0032] ii) 与i)之多肽具有至少80%同源性之任何多肽;

- [0033] iii) 为i) 和/或ii) 之多肽之任何免疫原性部分;
- [0034] iv) 为iii) 之免疫原性部分,其包含至少10个包括于WO 06/072065之SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11序列中之相邻氨基酸;
- [0035] v) 由包含WO 06/072065之SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4序列之DNA编码之多肽;
- [0036] vi) 由与v) 之多核苷酸有至少80%同源性之多核苷酸编码之任何多肽;
- [0037] vii) 由v) 和/或vi) 之多核苷酸编码之多肽之任何免疫原性部分;
- [0038] viii) 为vii) 之免疫原性部分,其中编码该免疫原性部分之多核苷酸包含至少30个包括于WO 06/072065之SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4序列中之邻近核苷酸。

[0039] 任何所述免疫原性部分优选具有WO 06/072065之SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4序列编码之PCV2ORF-2蛋白之免疫原性特征。

[0040] 根据又一方面,PCV2ORF-2蛋白系以有效诱发期望之免疫反应之抗原包括量提供于免疫原性组合物中,该期望之免疫反应即减少由PCV2感染造成或与PCV2感染有关之临床症状之发生,减轻所述临床症状之严重性,或防止或减少一或多种所述临床症状。该PCV2ORF-2蛋白包括量优选为至少0.2微克抗原/ml最终免疫原性组合物(微克/ml),更优选为约0.2至约400微克/ml,仍更优选为约0.3至约200微克/ml,甚至更优选为约0.35至约100微克/ml,仍更优选为约0.4至约50微克/ml,仍更优选为约0.45至约30微克/ml,仍更优选为约0.5至约18微克/ml,甚至更优选为约0.6至约15微克/ml,甚至更优选为约0.75至约8微克/ml,甚至更优选为约1.0至约6微克/ml,仍更优选为约1.3至约3.0微克/ml,甚至更优选为约1.4至约2.5微克/ml,甚至更优选为约1.5至约2.0微克/ml,最优选为约1.6微克/ml。

[0041] 根据又一方面,该PCV2ORF-2抗原包括量系至少0.2微克如上所述之PCV2ORF-2蛋白/剂最终抗原性组合物(微克/剂),更优选为约0.2至约400微克/剂,仍更优选为约0.3至约200微克/剂,甚至更优选为约0.35至约100微克/剂,仍更优选为约0.4至约50微克/剂,仍更优选为约0.45至约30微克/剂,仍更优选为约0.5至约18微克/剂,甚至更优选为约0.6至约15微克/剂,甚至更优选为约0.75至约8微克/剂,甚至更优选为约1.0至约6微克/剂,仍更优选为约1.3至约3.0微克/剂,甚至更优选为约1.4至约2.5微克/剂,甚至更优选为约1.5至约2.0微克/剂,最优选为约1.6微克/剂。令人惊奇地发现,小于20微克/剂(优选为约0.5至18微克/剂)之PCV2ORF-2蛋白包括量(抗原含量)适宜在幼小动物和/或PCV2抗体呈阳性(尤其系抗PCV2母体抗体呈阳性)之动物中赋予免疫性。因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防具有抗PCV2抗体(尤其系母体抗PCV2抗体)之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用小于20微克/剂,优选为约0.5至18微克/剂之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤。该PCV2抗原系在该专利申请案中所述之任何PCV2抗原。优选地,该PCV2抗原系任何PCV2ORF-2蛋白,更优选为本文所述之任何PCV2ORF-2蛋白。

[0042] 用于本发明免疫原性组合物之PCV2ORF-2多肽可以包括PCV2ORF2之分离及纯化、标准蛋白合成及重组方法之任何方式获得。用于获得PCV2ORF-2多肽之优选方法在WO 06/072065中提供,其教示及内容之全文以引用方式并入本文中。简言之,将易受感染细胞经含有PCV2ORF-2DNA编码序列之重组病毒载体感染,PCV2ORF-2多肽藉由重组病毒表达,且该经表达之PCV2ORF-2多肽藉由过滤自上清液回收并藉由任何习用方法(优选使用二元氮丙啶,其随后经中和以终止灭活过程)灭活。

[0043] 本文所用免疫原性组合物亦系指包含以下之组合物：i) 任何上述PCV2ORF-2蛋白，优选以上述浓度；及ii) 至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之病毒载体（优选为重组杆状病毒）。而且，该免疫原性组合物可包含i) 任何上述PCV2ORF-2蛋白，优选以上述浓度；及ii) 至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之病毒载体（优选为重组杆状病毒）；及iii) 一部分细胞培养物上清液。

[0044] 因此，根据又一方面，本发明提供治疗或预防具有抗PCV2抗体（尤其系母体抗PCV2抗体）之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法，该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤，其中该PCV2抗原系重组PCV2ORF-2，优选为经杆状病毒表达之PCV2ORF-2。优选为所述重组或经杆状病毒表达之具有上述序列之PCV2ORF-2。

[0045] 本文所用免疫原性组合物亦系指包含以下之组合物：i) 任何上述PCV2ORF-2蛋白，优选以上述浓度；ii) 至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之病毒载体（优选为重组杆状病毒）；及iii) 一部分细胞培养物，其中约90%之组份具有小于1微米之尺寸。

[0046] 本文所用免疫原性组合物亦系指包含以下之组合物：i) 任何上述PCV2ORF-2蛋白，优选以上述浓度；ii) 至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之病毒载体；iii) 一部分细胞培养物；iv) 及灭活重组病毒载体之灭活剂，优选为BEI，其中约90%之i) 至iii) 组份具有小于1微米之尺寸。优选地，BEI系以有效灭活杆状病毒之浓度存在，优选以2至约8mM BEI的量，优选为约5mMBEI。

[0047] 本文所用免疫原性组合物亦系指包含以下之组合物：i) 任何上述PCV2ORF-2蛋白，优选以上述浓度；ii) 至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之病毒载体；iii) 一部分细胞培养物；iv) 灭活重组病毒载体之灭活剂，优选为BEI；及v) 终止由灭活剂介导之灭活作用之中和剂，其中约90%之i) 至iii) 组份具有小于1微米之尺寸。优选地，若灭活剂系BEI，则该组合物包含与BEI等效量之硫代硫酸钠。

[0048] 将多肽纳入可施用给易受PCV2感染之动物之组合物中。在优选形式中，该组合物亦可包括本领域技术人员所熟知之其它组份（亦参见Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 第18版, Mack Publ., Easton）。另外，该组合物可包括一或多种兽医学可接受之载剂。本文所用“兽医学可接受之载剂”包括任何及全部溶剂、分散介质、涂布剂、佐剂、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂、吸收延迟剂及诸如此类。在一优选实施例中，该免疫原性组合物包含此处提供之PCV2ORF-2蛋白（优选以上述浓度，其与佐剂（优选为Carbopol）混合）及生理盐水。

[0049] 本领域技术人员会了解，本文所用组合物可纳入已知之可注射之生理学上可接受之无菌溶液。对于制备用于非经肠注射或输注之即用溶液，水性等渗溶液（例如盐水或相应之血浆蛋白溶液）可容易地得到。另外，本发明之免疫原性及疫苗组合物可包括稀释剂、等渗剂、稳定剂或佐剂。稀释剂可包括水、盐水、葡萄糖、乙醇、甘油及诸如此类。等渗剂可尤其包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨醇及乳糖。稳定剂尤其包括乙二胺四乙酸之白蛋白及碱金属盐。

[0050] 本文所用“佐剂”可包括氢氧化铝及磷酸铝；皂苷，例如Quil A、QS-21（Cambridge Biotech公司，Cambridge MA）、GPI-0100（Galenica Pharmaceuticals公司，Birmingham, AL）；油包水乳液；水包油乳液；水包油包水乳液。该乳液可尤其基于轻质液体石蜡油（欧洲

药典类型);类异戊二烯油,例如由烯烃(尤其系异丁烯或癸烯)寡聚产生之角鲨烷或角鲨烯油;含有直链烷基之酸或醇之酯,更具体而言为植物性油、油酸乙酯、丙二醇二-(辛酸酯/癸酸酯)、甘油三-(辛酸酯/癸酸酯)或丙二醇二油酸酯;具支链脂肪酸或醇之酯,尤其系异硬脂酸酯。油可与乳化剂组合使用以形成乳液。乳化剂优选系非离子型表面活性剂,具体而言系山梨醇酐、二缩甘露醇(例如无水甘露醇油酸酯)、二醇、聚甘油、丙二醇与油酸、异硬脂酸、蓖麻油酸或羟基硬脂酸之视情况经乙氧基化之酯,及聚氧丙烯-聚氧乙烯共聚物嵌段,具体而言系普流尼克(Pluronic)产品,尤其系L121。参见Hunter等人.,The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed.Stewart-Tull,D.E.S.).John Wiley and Sons,NY,第51-94页(1995)及Todd等人.,Vaccine 15:564-570(1997)。

[0051] 例如,可使用阐述于"Vaccine Design,The Subunit and Adjuvant Approach"(M.Powell及M.Newman编辑,Plenum Press,1995)第147页上之SPT乳液及阐述于该书第183页上之乳液MF59。

[0052] 佐剂之另一实例系选自丙烯酸或甲基丙烯酸之聚合物及马来酸酐与烯基衍生物之共聚物之化合物。优选之佐剂化合物系丙烯酸或甲基丙烯酸之聚合物,其尤其与糖类或多元醇之聚烯基醚交联。已知此等化合物之名称为聚羧乙烯制剂(Pharmeuropa,第8卷,第2期,1996年6月)。本领域技术人员亦可参考美国专利第2,909,462号,其阐述与聚羟基化化合物交联之所述丙烯酸系聚合物,该聚羟基化化合物具有至少3个(优选不多于8个)羟基,至少3个羟基之氢原子经具有至少2个碳原子之不饱和脂肪族基团取代。优选基团系所述含有2至4个碳原子者,例如乙烯基、烯丙基及其它乙烯系不饱和基团。不饱和基团自身可含有诸如甲基等其它取代基。以名称Carbopol (BF Goodrich,Ohio,USA)出售之产品特别适合。其可与烯丙基蔗糖或与烯丙基异戊四醇交联。其中可提及者系Carbopol 974P、934P及971P。最优选者系使用Carbopol,尤其系使用Carbopol 971P,优选以约500微克至约5毫克/剂的量使用,甚至更佳以约750微克至约2.5毫克/剂的量使用且最优选以约1毫克/剂的量使用。

[0053] 其它适宜佐剂尤其包括(但不限于)RIBI佐剂系统(Ribi公司)、嵌段共聚物(CytRx,Atlanta GA)、SAF-M(Chiron,Emeryville CA)、单磷酸脂质A、阿夫立定(Avridine)脂质-胺佐剂、自大肠杆菌(E.coli)(重组的或其它方式)之不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS 1314或胞壁酰二肽。

[0054] 优选地,该佐剂系以约100微克至约10毫克/剂的量添加。甚至更优选地,该佐剂系以约100微克至约10毫克/剂的量添加。甚至更优选地,该佐剂系以约500微克至约5毫克/剂的量添加。甚至更优选地,该佐剂系以约750微克至约2.5毫克/剂的量添加。最优选地,该佐剂系以约1毫克/剂的量添加。

[0055] 另外,该组合物可包括一或多种可药用载剂。本文所用"可药用载剂"包括任何及全部溶剂、分散介质、涂布剂、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂、吸附延迟剂及诸如此类。最优选地,由此提供之组合物含有自活体外经培养细胞之上清液回收之PCV20RF-2蛋白,其中所述细胞经含有PCV20RF-2DNA且表达PCV20RF-2蛋白之重组病毒载体感染,且其中该细胞培养物系用灭活病毒载体之约2至约8mM BEI(优选约5mM BEI)及等效浓度之中和剂(优选为硫代硫酸钠溶液,最终浓度为约2至约8mM,优选为约5mM)处理。

[0056] 本发明亦涉及包含以下之免疫原性组合物:i)任何上述PCV20RF-2蛋白,优选以上

述浓度;ii)至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之病毒载体;iii)一部分细胞培养物;iv)灭活重组病毒载体之灭活剂,优选为BEI;及v)终止由灭活剂介导之灭活作用之中和剂,优选为与BEI等效量之硫代硫酸钠;及vi)适宜佐剂,优选为上述量之Carbopol 971;其中约90%之i)至iii)组份具有小于1微米之尺寸。根据又一方面,该免疫原性组合物进一步包含医药上可接受之盐,优选为以生理学上可接受之浓度之磷酸盐。优选地,将该免疫原性组合物之pH值调节至生理学pH值,意指介于约6.5与7.5之间。

[0057] 本文所用之免疫原性组合物亦系指每1毫升包含以下之组合物:i)至少1.6微克上述PCV2ORF-2蛋白,优选小于20微克;ii)至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之杆状病毒;iii)一部分细胞培养物;iv)约2至8mM BEI;v)与BEI等效量之硫代硫酸钠;及vi)约1毫克Carbopol 971;及vii)生理学上可接受之浓度之磷酸盐;其中约90%之i)至iii)组份具有小于1微米之尺寸且将该免疫原性组合物之pH值调节至约6.5至7.5。

[0058] 所述免疫原性组合物可进一步包括一或多种其它免疫调节剂,例如介白素、干扰素或其它细胞因子。所述免疫原性组合物亦可包括庆大霉素(Gentamicin)及硫柳汞(Merthiolate)。虽然本领域技术人员可容易地确定用于本发明范围之佐剂及添加剂的量及浓度,但本发明涵盖包含约50微克至约2000微克佐剂且优选约250微克/ml剂量疫苗组合物之组合物。因此,本文所用之免疫原性组合物亦系指包含约1微克/ml至约60微克/ml抗生素,且更优选为小于约30微克/ml抗生素之组合物。

[0059] 本文所用之免疫原性组合物亦系指包含以下之组合物:i)任何上述PCV2ORF-2蛋白,优选以上述浓度;ii)至少一部分表达该PCV2ORF-2蛋白之病毒载体;iii)一部分细胞培养物;iv)灭活重组病毒载体之灭活剂,优选为BEI;及v)终止由灭活剂介导之灭活作用之中和剂,优选为与BEI等效量之硫代硫酸钠;vi)适宜佐剂,优选为上述量之Carbopol 971;vii)医药上可接受之浓度之盐水(优选为磷酸盐)缓冲剂;及viii)抗微生物活性剂;其中约90%之i)至iii)组份具有小于1微米之尺寸。

[0060] 本文所用之免疫原性组合物亦系指Ingelvac®CircoFLEX™(BoehringerIngelheim Vetmedica公司,St Joseph,MO,USA)、CircoVac®(Merial SAS,Lyon,France)、CircoVent(Intervet公司,Millsboro,DE,USA)或Suvaxyn PCV-20neDose®(Fort Dodge Animal Health,Kansas City,KA,USA)。

[0061] 因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防具有抗PCV2母体抗体之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原的步骤,其中该免疫原性组合物系CircoFLEX®、CircoVac®、CircoVent或SuvaxynPCV-20neDose®。最优选地,该免疫原性组合物系Ingelvac®CircoFLEX™,和/或该PCV2抗原系PCV2ORF-2,优选为经杆状病毒表达之PCV2ORF-2,最优选为包括于Ingelvac®CircoFLEX™中者。

[0062] 为研究PCV2抗原之可能的母体抗体干扰,实施一项研究,其中在接种疫苗时测定研究动物之抗体效价,随后将所述抗体效价分成低、中及高抗体等级:小于1:100之几何平均效价视为低抗体效价,1:100至1:1000之效价视为中抗体效价且大于1:1000之效价视为高抗体效价。该分组方式可与在Canadian田间研究中实施之分组方式相当,在Canadian田间研究中1:80之抗体效价视为低,1:640之抗体效价视为中且大于1:1280之抗体效价视为高(Larochelle等人,2003,Can.J.Vet.Res.;67:114-120)。为分析接种疫苗时低、中及高抗

体效价对病毒血症之影响,将接种疫苗及经安慰剂治疗之动物关于病毒血症之发作、终点、持续时间、阳性取样天数及病毒负荷进行比较。令人惊奇地发现,抗PCV2抗体(尤其系母体抗体)之存在对任何所述参数无显著影响。换言之,令人惊奇地发现,PCV2抗原在防止及治疗动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状中之功效在接种疫苗之日并不受抗PCV2抗体存在之影响,抗PCV2抗体效价优选高达1:100,优选大于1:100,甚至更佳大于1:250,甚至更佳大于1:500,甚至更优选为1:640,甚至更佳大于1:750,最优选为大于1:1000。该效果可在一次注射接种疫苗实验中得以证实,一次注射接种疫苗实验意味着仅施用一次PCV2抗原且无任何PCV2抗原之随后施用。

[0063] 抗PCV2抗体之检测及定量方法已为业内所熟知。例如PCV2抗体之检测及定量可藉由阐述于Magar等人.,2000,Can. J. Vet. Res.;64:184-186或Magar等人.,2000,J. Comp. Pathol.;123:258-269中之间接免疫荧光法实施。用于定量抗PCV2抗体之其它分析阐述于Opriessnig等人.,2006,第37届美国猪兽医协会年会中。而且,实例2亦阐述可由本领域技术人员使用之间接免疫荧光法分析。在结果有争议之情形下及在有疑问之任何问题中,本文所提及之抗PCV2效价系指所述系/可藉由实例2中所述之分析评估者。

[0064] 因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防具有抗PCV2抗体(尤其系母体抗体)之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量(优选为小于20微克/剂)之PCV2抗原的步骤,其中该动物具有高达1:100(优选为大于1:100,甚至更优选为大于1:250,甚至更优选为大于1:500,甚至更优选为1:640,甚至更优选为大于1:750,最优选为大于1:1000)之可检测之抗PCV2抗体效价。优选地,所述抗PCV2抗体效价在特异性抗PCV2免疫分析中(优选在如实例2中所述之分析中)系可检测且可定量的。更优选地,所述抗PCV-2抗体系母体抗体。最优选地,该PCV2抗原仅施用一次(优选以小于20微克/剂之剂量)。

[0065] 具有仅低效价(小于1:100)或中效价(小于1:1000)之母体抗PCV2抗体之仔猪不足以抵抗在3周龄前发生之PCV2感染。因此,期望在生命之非常早期接种疫苗。由于本文提供之不可预测且意想不到之结果且表明无抗PCV2抗体之PCV2抗原干扰,因此3周龄之前之动物之接种疫苗/治疗成为现实。而且,令人惊奇地发现,不管现有初始抗体效价之量如何,大于1:1000之抗PCV2抗体效价对PCV2疫苗之功效皆无影响。例如,与未接种疫苗之对照动物相比,高效价动物(抗PCV2抗体效价大于1:1000)之接种疫苗达成病毒血症持续时间缩短9.5天,病毒血症终点提早11.9天,病毒血症取样天数减少1.9天且基因组等效物数/ml之总数减少约2倍。在比较接种疫苗之“高”、“中”及“低效价动物”时,关于PCV2病毒血症之不同参数未观察到显著差异。所述结果表明,在有高抗PCV2抗体效价之情形下用于接种疫苗之PCV2抗原仍同样可显著减轻血液中之病毒血症(病毒血症终点、病毒血症持续时间、病毒负荷)。与此结论一致,当比较接种疫苗组之低及高效价动物时关于活体重未发现差异。而且,与具有初始高抗体效价之经安慰剂治疗之动物相比,在接种疫苗/治疗时具有高抗PCV2抗体效价(大于1:1000)之接种疫苗之动物在病毒血症发作后亦显示显著较高之体重(见图3)。因此,可能对1日龄或更大之动物用PCV2抗原实施接种疫苗/治疗。然而,接种疫苗应在最初8周龄,优选在最初7周龄内实施。因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物在1日龄或稍后(但优选不迟于8周龄)施用有效量之PCV2抗原的步骤。根据

一优选实施例,赋予该动物免疫性需要小于20微克/剂之PCV2抗原。根据一更佳实施例,向需要该治疗之该动物仅施用一次PCV2抗原(优选为小于20微克/剂之PCV2抗原)。

[0066] 根据又一总体方面,本发明提供治疗或预防幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原的步骤。

[0067] 本文所用术语“幼小动物”系指1至22日龄之动物。优选地,术语幼小动物意指1至20日龄之动物。更优选地,术语幼小动物系指1至15日龄之动物,甚至更优选为1日龄至14日龄之动物,甚至更优选为1至12日龄之动物,甚至更优选为1至10日龄之动物,甚至更优选为1至8日龄之动物,甚至更优选为1至7日龄之动物,甚至更优选为1至6日龄之动物,甚至更优选为1至5日龄之动物,甚至更优选为1至4日龄之动物,甚至更优选为1至3日龄之动物,甚至更优选为1或2日龄之动物,最优选为1日龄之动物。因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向如下之需要该治疗之动物施用有效量之PCV2抗原的步骤:1至22日龄,优选为1至20日龄,更优选为1至15日龄,甚至更优选为1至14日龄,甚至更优选为1至12日龄,甚至更优选为1至10日龄,甚至更优选为1至8日龄,甚至更优选为1至7日龄,甚至更优选为1至6日龄,甚至更优选为1至5日龄,甚至更优选为1至4日龄,甚至更优选为1至3日龄,甚至更优选为1或2日龄,最优选为1日龄。例如,证据表明在19至22日龄之接种疫苗/治疗显示较高之接种疫苗功效。此外亦显示,在12至18(优选为12至14日龄)之接种疫苗/治疗非常有效地减轻与PCV2感染有关之临床症状,减少总病毒负荷,缩短病毒血症之持续时间,延迟病毒血症之发作,体重增加。此外亦显示,在1周龄之接种疫苗非常有效地减轻与PCV2感染有关之临床症状,减少总病毒负荷,缩短病毒血症之持续时间,延迟病毒血症之发作,体重增加。优选地,赋予所述幼小动物免疫性需要小于20微克/剂之PCV2抗原。根据更佳实施例,向需要该治疗之幼小动物仅施用一次PCV2抗原(优选为小于20微克)。

[0068] 由于PCV2在该领域普遍存在,因此大部分仔猪就PCV2而言系血清阳性的。因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,所述幼小动物在接种疫苗之日具有抗PCV2抗体,该方法包括向如下之需要该治疗之动物施用有效量之PCV2抗原的步骤:1至22日龄,优选为1至20日龄,更优选为1至15日龄,甚至更优选为1至14日龄,甚至更优选为1至12日龄,甚至更优选为1至10日龄,甚至更优选为1至8日龄,甚至更优选为1至7日龄,甚至更优选为1至6日龄,甚至更优选为1至5日龄,甚至更优选为1至4日龄,甚至更优选为1至3日龄,甚至更优选为1或2日龄,最优选为1日龄。优选地,所述幼小动物在接种疫苗/治疗之日具有高达1:100(优选为大于1:100,甚至更优选为大于1:250,甚至更优选为大于1:500,甚至更优选为1:640,甚至更优选为大于1:750,最优选为在接种疫苗/治疗之日大于1:1000)之可检测之抗PCV2抗体效价。优选地,赋予所述幼小动物足够之免疫性需要小于20微克/剂之PCV2抗原。根据更佳实施例,向需要该治疗之幼小动物仅施用一次该PCV2抗原(优选为小于20微克)。

[0069] 如上所述,与未接种疫苗之对照动物相比,用PCV2抗原之幼小动物之接种疫苗/治疗达成病毒血症期缩短。与未接种疫苗之相同物种之对照动物相比,平均缩短时间为9.5天。因此,根据又一方面,本发明亦提供治疗或预防幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量

之PCV2抗原的步骤,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比该治疗或预防达成5天或更多天之病毒血症期缩短,优选为6天或更多天,甚至更优选为7天或更多天,甚至更优选为8天或更多天,甚至更优选为9天,甚至更优选为10天,甚至更优选为12天,甚至更优选为14天,最优选为多于16天。在一些情形下,病毒血症期缩短多于20天。一般而言,幼小仔猪之接种疫苗达成降低之重量增加损失、较短之病毒血症持续时间、较早之病毒血症终点及较低病毒负荷。因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原的步骤,其中与未经治疗之相同物种之对照组动物相比该PCV2感染之治疗或预防达成选自下列组成之群之疫苗功效参数的改良:降低增重之损失,较短之病毒血症持续时间,较早终止病毒血症,较低之病毒负荷,或其组合。优选地,达成任何上述改良之疫苗功效参数需要小于20微克/剂之PCV2抗原。而且,所述改良之疫苗功效参数系藉由仅一剂量之单次施用达成。

[0070] 本文所用术语“有效量”意指,但不限于,抗原引发或能够引发施用该有效剂量PCV2抗原之动物免疫反应之量。有效量优选定义为抗原赋予至少10周免疫性持续时间(DOI),优选至少12周(DOI),更佳至少15周(DOI),最优选至少20周(DOI)之量。

[0071] 有效量根据疫苗成份及施用时间表(schedule)而定。一般而言,当灭活病毒或经修饰之活病毒制备品用于组合疫苗时,疫苗之量含有约 $10^{2.0}$ 至约 $10^{9.0}$ TCID<sub>50</sub>/剂,优选约 $10^{3.0}$ 至约 $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/剂,更佳约 $10^{4.0}$ 至约 $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/剂。特别地,当经修饰之活PCV2用于疫苗时,向易受感染之动物施用之推荐剂量优选为约 $10^{3.0}$ TCID<sub>50</sub>(50%终点之组织培养物感染剂量)/剂至约 $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/剂,更优选为约 $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub>/剂至约 $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/剂。一般而言,当使用经纯化之抗原时,抗原的量介于0.2与5000微克之间,及介于 $10^{2.0}$ 与 $10^{9.0}$ TCID<sub>50</sub>之间,优选介于 $10^{3.0}$ 与 $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>之间,更佳介于 $10^{4.0}$ 与 $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>之间。

[0072] 亚单位疫苗一般以至少0.2微克抗原/剂之抗原包括量施用,优选以约0.2至约400微克/剂,仍更佳以约0.3至约200微克/剂,甚至更佳以约0.35至约100微克/剂,仍更佳以约0.4至约50微克/剂,仍更佳以约0.45至约30微克/剂,仍更佳以约0.5至约18微克/剂,仍更佳以约0.6至约16微克/剂,甚至更佳以约0.75至约8微克/剂,甚至更佳以约1.0至约6微克/剂,仍更佳以约1.3至约3.0微克/剂之抗原包括量施用。

[0073] 意外发现,上文所述免疫原性组合物之预防使用可有效减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状,优选在幼小动物中和/或在治疗之日具有抵抗PCV2之被动免疫性之动物中。具体而言,发现本文所述免疫原性组合物且尤其包含PCV2ORF-2抗原之组合物之预防使用可有效减轻在治疗/接种疫苗之日感染PCV2且具有母体抗PCV-2抗体之动物中之淋巴结病、淋巴损耗和/或多核/巨组织细胞。此外,发现本文所述免疫原性组合物且尤其包含PCV2ORF-2抗原之组合物之预防使用可有效减轻(1)小叶间水肿之间质性肺炎;(2)肉质苍白或黄疸;(3)具斑点萎缩性肝;(4)胃溃疡;(5)肾炎及(6)生殖障碍,例如流产、死产、干尸化等等;(7)软膜(pia)样损伤,一般认为与胞内劳森菌(*Lawsonia intracellularis*)感染(回肠炎)有关;(8)淋巴结病;(9)淋巴损耗和/或(10)多核/巨组织细胞;(11)猪皮肤炎及肾病综合症(PDNS);(12)PCVAD有关之大量死亡;(13)PCVAD有关之重量减轻;(14)降低之生长变异性;(15)降低之“侏儒”频率;(16)降低之与猪生殖及呼吸疾病综合症(PRRSV)之共感染。该免疫原性组合物亦可有效改良诸如屠宰时间、屠体重量、瘦肉率等经济上重要之生

长参数。因此,本文所用术语“临床症状”意指但不限于(1)小叶间水肿之间质性肺炎;(2)肉质苍白或黄疸;(3)具斑点萎缩性肝;(4)胃溃疡;(5)肾炎及(6)生殖障碍,例如流产、死产、干尸化等等;(7)软膜(Pia)样损伤,一般认为与胞内劳森菌感染(回肠炎)有关;(8)淋巴结病;(9)淋巴损耗和/或(10)多核/巨组织细胞;(11)猪皮肤炎及肾病综合症(PDNS);(12)PCVAD有关之大量死亡;(13)PCVAD有关之重量减轻;(14)降低之生长变异性;(15)降低之“侏儒”频率;(16)降低之与猪生殖及呼吸疾病综合症(PRRSV)之共感染。而且,本文所述抗原性组合物降低总圆环病毒负荷,包括较迟发作、较短之持续时间、较早之病毒血症终点及降低之病毒负荷及其在幼小动物(尤其系所述在接种疫苗之日具有抗PCV2抗体者)中之免疫抑制影响,从而达成较高程度之总体疾病抵抗性及降低之PCV2有关疾病及症状之发生率。

[0074] 因此,根据又一方面,本发明提供治疗或预防幼小动物和/或具有抗PCV2抗体之动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤,其中所述临床症状系选自由下列组成之群:(1)小叶间水肿之间质性肺炎;(2)肉质苍白或黄疸;(3)具斑点萎缩性肝;(4)胃溃疡;(5)炎及(6)生殖障碍,例如流产、死产、干尸化等等;(7)软膜(Pia)样损伤,一般认为与胞内劳森菌感染(回肠炎)有关;(8)淋巴结病;(9)淋巴损耗和/或(10)多核/巨组织细胞;(11)猪皮肤炎及肾病综合症(PDNS);(12)PCVAD有关之大量死亡;(13)PCVAD有关之重量减轻;(14)降低之生长变异性;(15)降低之“侏儒”频率;(16)降低之与猪生殖及呼吸疾病综合症(PRRSV)之共感染。根据又一方面,本发明提供治疗或预防幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状之方法,该方法包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原的步骤,其中所述临床症状系选自由下列组成之群:(1)小叶间水肿之间质性肺炎;(2)肉质苍白或黄疸;(3)具斑点萎缩性肝;(4)胃溃疡;(5)肾炎及(6)生殖障碍,例如流产、死产、干尸化等等;(7)软膜(Pia)样损伤,一般认为与胞内劳森菌感染(回肠炎)有关;(8)淋巴结病;(9)淋巴损耗和/或(10)多核/巨组织细胞;(11)猪皮肤炎及肾病综合症(PDNS);(12)PCVAD有关之大量死亡;(13)PCVAD有关之重量减轻;(14)降低之生长变异性;(15)降低之“侏儒”频率;(16)降低之与猪生殖及呼吸疾病综合症(PRRSV)之共感染。

[0075] 本发明组合物可口服、经真皮内、经气管内或经阴道内施用。该组合物优选可经肌肉内或经鼻内施用,最优选为经肌肉内施用。在动物体内,可证明经由静脉内或藉由直接注射至目标组织中来施用所述上述医药组合物系有利的。对于全身施用,静脉内、血管内、肌肉内、鼻内、动脉内、腹膜内、口服或鞘内途径系优选的。更局部施用可经皮下、经真皮内、经皮内、经心脏内、经叶内(intralobally)、经髓内、经肺内或直接在或靠近拟治疗之组织(结缔组织、骨组织、肌肉组织、神经组织、上皮组织)实现。根据治疗所期望之持续时间及有效性,本发明组合物可施用一次或数次,亦可间歇施用,例如以每日计施用数天、数周或数月且以不同剂量。

[0076] 优选地,一剂量之上述免疫原性组合物系经肌肉内施用至需要其之个体。根据又一方面,PCV2抗原或上述包含任何该PCV2抗原之免疫原性组合物系装入瓶中并以一(1)毫升/剂施用。因此,根据又一方面,本发明亦提供包含上述PCV-2抗原之1毫升免疫原性组合物,其用于治疗或预防幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状,包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原的步骤。根据又一方面,本发明亦

提供包含上述PCV-2抗原之1毫升免疫原性组合物,其用于治疗或预防具有抗PCV2抗体之幼小动物中PCV2感染或减轻由PCV2感染引起或与PCV2感染有关之临床症状,包括向需要该治疗之该动物施用有效量之PCV2抗原或包含PCV2抗原之免疫原性组合物的步骤。

[0077] 根据又一方面,至少向需要之个体另外施用一次至少一剂量之上述免疫原性组合物,其中第二次或任何另外施用系在初始或任何以前施用之后至少14天给予。优选地,该免疫原性组合物系与免疫刺激剂一起施用。优选地,该免疫刺激剂给予至少两次。优选地,在第一次与第二次或任何另外免疫刺激剂之施用中间有至少3天,更优选为至少5天,甚至更优选为至少7天。优选地,该免疫刺激剂系在本文所提供之免疫原性组合物之初始施用之后至少10天,优选为15天,甚至更优选为20天,甚至更优选为至少22天给出。优选之免疫刺激剂系(例如)钥孔虫血兰蛋白(KLH),优选为经不完全弗氏(Freund's)佐剂乳化之钥孔虫血兰蛋白(KLH/ICFA)。然而,同此应了解,亦可使用本领域技术人员所熟知之任何其它免疫刺激剂。本文所用术语“免疫刺激剂”意指可触发免疫反应(优选地)而不引发或增加特定免疫反应(例如抵抗特定病原体之免疫反应)之任何试剂或组合物。进一步指示应以适宜剂量施用该免疫刺激剂。

[0078] 本文所用“动物”意指猪(swine或pig)或仔猪(piglet)。

[0079] 优选实施例之详细阐述

[0080] 以下实例阐明本发明之优选材料及程序。尽管任何类似或等效于本文所述之方法及材料可用于本发明之实践或测试中,但目前所述者系优选之方法、装置及材料。然而,应了解,所述实例仅为阐释提供,且其中任何皆不应视为对本发明总范围之限制。

[0081] 实施例1

[0082] 制备PCV2ORF-2抗原

[0083] 将初始SF+细胞培养物从液氮储存器中取出,在无菌旋转烧瓶中的Excell 420培养基(JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS)中悬浮培养,持续搅拌。使所述培养物在100-250mL旋转烧瓶中含有25-150毫升Excell 420的无血清培养基中生长。当细胞增殖至细胞密度为 $1.0-8.0 \times 10^6$ 细胞/ml时,将其以 $0.5-1.5 \times 10^6$ 细胞/ml之种植密度分至新容器中。随后使经过扩大培养的培养物在至多36公升尺寸之旋转烧瓶中或在至多300公升之不锈钢生物反应器中于25-29℃生长2-7天时间。

[0084] 接种后,将烧瓶在27℃培育4小时。随后,用含有PCV2ORF-2基因(SEQID NO:4)之重组杆状病毒对每个烧瓶进行接种。含有PCV2ORF-2基因之重组杆状病毒按WO 06/072065所述制备。在接种杆状病毒后,随后将所述烧瓶在 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ 培育7天,期间以100rpm搅拌。所述烧瓶使用通风盖以容许空气流动。

[0085] 培育后,收获所得上清液,将其过滤以移除细胞碎片并灭活。上清液通过将温度升至 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 而灭活,添加二元氮丙啶(binary ethylenimine, BEI)至终浓度为5mM。随后将样品持续搅拌72-96小时。添加1.0M硫代硫酸钠溶液,使最终最小浓度为5mM,以中和任何残余BEI。在灭活后,添加约0.5-2.5毫克/剂的、经磷酸盐缓冲液及Carpopol缓冲的PCV2ORF-2。最终每一剂包含约16微克PCV2ORF-2抗原。

[0086] 实施例2

[0087] 抗PCV-2免疫分析

[0088] 将WO 02/07721所述PK15(例如ATCC CCL-33)或VIDO R1细胞接种至96孔板上约

20,000–60,000个细胞/孔)。当单层约65%至85%铺满时,将细胞用PCV2分离物感染。将经感染细胞培育48小时。移除培养基,用PBS将孔洗涤两次。弃去洗涤缓冲剂,将细胞在约-20℃用冷50/50甲醇/丙酮固定剂(约100微升/孔)处理约15分钟。弃去固定剂,所述板在空气中干燥。在PBS中制备猪血清样品之连续稀释液,添加至所述板中,36.5±1℃培育约1小时,若血清样品中有抗体则能够发生结合。抗PCV2的阳性及阴性对样品(阳性对照及阴性对样品)的连续稀释液并行进行。随后将所述板用PBS洗涤三次。弃去PBS。随后将所述板用在PBS中以1:100稀释的市售山羊抗猪FITC偶联物染色,36.5±1℃培育约1小时,这样能够检测出与感染细胞结合的抗体。在培育完成后,自培育箱中移出微滴板,弃去偶联物,用PBS将所述板洗涤两次。通过UV显微镜检读板,将各孔读为阳性或阴性。用阳性对照及阴性对样品监测该测试系统。若对照在预期范围内,则测试方法所用参数导致的结果是可接受的。用显示特异性IFA反应性的最高稀释度计算血清抗体效价,用适合的Reed-Muench公式计算每一稀释度的阳性孔数或50%终点。

[0089] 实施例3

[0090] PCV2ORF-2 (Ingelvac®CircoFLEX™)

[0091] 在具有低或高水平抗PCV2抗体的幼小动物中的功效

[0092] 为研究母体抗体对疫苗的可能干扰,实施一项研究,其中在接种疫苗时测定所有研究动物的抗体效价,随后将动物按照抗体效价的低、中及高水平分组:将几何平均效价小于1:100视为低抗体效价,将1:100至1:1000视为中抗体效价,大于1:1000视为高抗体效价。

[0093] 研究的实施方案

[0094] 该研究涵盖约500只动物。将这些研究动物按初始体重及是否同胎幼仔进行的划分(litter assignment),均衡等分至两个治疗组中。在20日龄,所有研究动物在颈右侧肌肉内注射一剂(1毫升)PCV2疫苗(研究用兽医产品(Investigational Veterinary Product), IVP) 或一剂(1毫升)含有辅助性细胞培养物上清液的安慰剂(对照产品(Control Product), CP)。对这些研究动物进行随访,直至育肥期(fattening)结束。

[0095] 收集所有研究动物之血液样品,随后藉由IFAT进行分析以测定接种疫苗时之抗体效价。此后,将初始抗体效价与重量增加相关联。另外,根据初始抗体效价将动物分成三类(低、中及高水平的初始抗体效价),随后比较两个治疗组的“高效价”动物在重量增加及病毒血症方面可能有的差异。

[0096] 结果

[0097] 初始抗体效价

[0098] 接种疫苗时大多数动物具有中等水平抗体效价(定义为1:100至1:1000)或高水平抗体效价(定义为大于1:1000)。仅大约13%的动物具有低水平抗体效价(定义为小于1:100)。由于在研究开始时无PCV2感染,因此可得知,在研究第0天之抗体效价可能源自母体。两个治疗组间未观察到研究第0天之抗体效价之显著差异。图1给出每类效价水平的动物的百分比。

[0099] 接种疫苗时的抗体效价与血液中病毒血症的相关性

[0100] 为确定接种疫苗时之高抗体效价(大于1:1000)是否对病毒血症有影响,将接种疫苗及经安慰剂治疗之具有高初始抗体效价之动物关于病毒血症之发作、终点、持续时间、阳性取样天数及病毒负荷(virus load)进行比较。表1概述两个治疗组之“高效价动物”之病

毒血症参数的比较。

[0101] 表1:两个治疗组之“高效价动物”中病毒血症之比较

[0102]

| 所研究的参数        | 治疗组    | 猪之数量 | 平均值     | 中值      | P       |
|---------------|--------|------|---------|---------|---------|
| 病毒血症之发作       | CP     | 38   | 111.90天 | 113.00天 | 0.7843  |
|               | IVP    | 36   | 109.50天 | 113.00天 | ns      |
|               | CP-IVP |      | 2.4天    |         |         |
| 病毒血症之持续时间     | CP     | 38   | 27.00天  | 27.50天  | <0.0001 |
|               | IVP    | 36   | 17.50天  | 6.50天   | ***     |
|               | CP-IVP |      | 9.50天   |         |         |
| 病毒血症之终点       | CP     | 38   | 138.90天 | 141.00天 | 0.0033  |
|               | IVP    | 36   | 127.00天 | 122.50天 | **      |
|               | CP-IVP |      | 11.9天   |         |         |
| 阳性取样天数        | CP     | 39   | 3.70天   | 3.00天   | 0.0082  |
|               | IVP    | 47   | 1.80天   | 1.00天   | **      |
|               | CP-IVP |      | 1.9天    |         |         |
| 平均总gE (log10) | CP     | 39   | 18.79gE | 17.21gE | <0.0001 |
|               | IVP    | 47   | 9.12gE  | 5.38gE  | ***     |
|               | CP-IVP |      | 9.67gE  |         |         |

[0103] gE:每毫升中基因组等价物之总数

[0104] P:组间比较之Wilcoxon Mann-Whitney检验之p值;

[0105] ns:不显著,  $p > 0.05$ ; \*\*显著,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*显著,  $p < 0.001$

[0106] 与经安慰剂治疗之高效价动物相比,在研究期间接种疫苗之高效价动物之病毒血症持续时间缩短9.5天,病毒血症终点提早11.9天,病毒血症取样天数减少1.9天,基因组等效物总数/ml减少约2倍。这些结果表明,在有高母体抗体效价之情形下,IVP仍同样可显著减轻血液中之病毒血症(病毒血症终点、病毒血症持续时间、病毒负荷)。

[0107] 接种疫苗时之抗体效价与重量增加之相关性

[0108] 然后研究初始抗体效价是否对研究期间之重量增加有效果。表2给出初始抗体效价与不同时间间隔点重量增加的相关性及p值,所述时间间隔点通过计算Spearman秩系数确定。

[0109] 两个治疗组均在研究第0至7周发现抗体效价与重量增加间有统计学显著负相关性,这表明,母体抗体效价高对饲养阶段(rearing phase)的重量增加有负面影响。未观察到其它具有统计学显著意义的、在不同时间间隔期间的初始抗体效价与重量增加的相关性。因此可得出结论,对于接种疫苗或经安慰剂治疗的动物,自10周龄(研究第7周)起,母体抗体效价水平对重量增加均无影响。

[0110] 表2:接种疫苗时之PCV2抗体效价与研究期间体重增加之相关性

[0111]

|     |   | 接种疫苗时之抗体效价与重量增加之相关性 |              |               |               |
|-----|---|---------------------|--------------|---------------|---------------|
|     |   | 研究第<br>0-7周         | 研究第<br>7-12周 | 研究第<br>12-17周 | 研究第<br>17-22周 |
| CP  | r | -0.09623            | 0.03501      | -0.00521      | -0.02774      |
|     | P | <b>0.0086 **</b>    | 0.3425 ns    | 0.8884 ns     | 0.4617 ns     |
|     | n | 744                 | 737          | 728           | 706           |
| IVP | r | -0.09748            | 0.04309      | -0.00954      | 0.02694       |
|     | P | <b>0.0077 **</b>    | 0.2440 ns    | 0.7974 ns     | 0.4710 ns     |
|     | n | 746                 | 733          | 727           | 718           |

[0112] r: Spearman秩相关系数

[0113] P: 在r=0时之检验p值; ns: 不显著,  $p > 0.05$ ; \*\*显著,  $p \leq 0.01$ 

[0114] n: 动物数

[0115] 与此发现一致, 当比较接种疫苗组的低效价及高效价动物时, 未发现活体重量差异。图2显示, 不管初始抗体效价水平如何, 病毒血症发作后(研究第17及22周)的体重都是相当的(图2)。

[0116] 此外, 与经安慰剂治疗之具有初始高抗体效价之动物相比, 接种疫苗时具有高抗体效价(大于1:1000)之接种疫苗之动物在病毒血症发作后亦显示显著较高之体重。见图3, 在研究第17周及研究第22周, 接种疫苗之“高效价动物”之体重(LS Mean)(研究第17周: 1.55公斤,  $p = 0.0328$ ; 研究第22周: 3.06公斤,  $p = 0.0007$ )确实显著高于经安慰剂治疗之“高效价动物”之体重。这些发现共同表明, 接种疫苗时之抗体效价对IVP无干扰。

[0117] 结论

[0118] 为分析可能之母体抗体干扰, 将初始抗体效价与两个功效参数(血液中病毒血症, 以及活体重)相关联。与经安慰剂治疗之“高效价动物”相比, 可注意到接种疫苗之“高效价动物”具有以下统计学上显著之发现。

[0119] -增重之损失减少

[0120] -病毒血症持续时间缩短, 且病毒血症较早终止

[0121] -病毒负荷较低

[0122] 实施例4

[0123] PCV20RF-2 (Ingelvac®CircoFLEX™)[0124] 在具有抗PCV2抗体之幼小动物中[0125] 对于淋巴损耗、淋巴性炎症及淋巴免疫组织化学(IHC)之功效

[0126] 此盲法接种疫苗-攻击研究之目的是, 评价在有猪第二型圆环病毒(PCV2)母体抗体的情况下, 猪在什么年龄用第二型猪圆环病毒的杆状病毒载体杀灭疫苗进行接种可产生免疫力。攻击后对三个主要参数进行分析。所述三个参数包括淋巴损耗(lymphoid depletion)、淋巴性炎症(lymphoid inflammation)及淋巴免疫组织化学(IHC)。为证实PCV2母体抗体存在时的免疫力, 必需证实, 常规饲养、并在3周龄或8周龄接种PCV2疫苗的猪, 与在3周龄用对照产品治疗之攻击对照猪相比, 在淋巴损耗、淋巴性炎症及淋巴IHC方面有统计学显著差异( $p < 0.05$ )。

[0127] 研究的实施方案

[0128] 将120只常规饲养的猪(在第0天(D0)为21日龄)完全随机地分配至5个治疗组中。在D0,收集所有猪之血液样品,

[0129] 组1a在3周龄用研究用兽医产品(IVP;PCV2参考疫苗)治疗。

[0130] 组1b在8周龄用研究用兽医产品(IVP;PCV2参考疫苗)治疗。

[0131] 组2在3周龄用对照产品(CP)治疗。

[0132] 在接种疫苗后D-1至D59观察猪之临床评定。另外,在D14、D28、D42、D56及D63采集攻击前之血液样品。攻击前各组的PCV2血清学几何平均效价(GMT)概述于下表3中。

[0133] 表3:攻击前各组PCV2血清学几何平均效价

[0134]

| 组别-治疗            | PCV2血清学- GMT |       |       |      |      |      |
|------------------|--------------|-------|-------|------|------|------|
|                  | D0           | D14   | D28   | D42  | D56  | D63  |
| 组1a<br>在3周龄施用IVP | 556.5        | 252.8 | 142.0 | 56.2 | 32.0 | 51.3 |
| 组1b<br>在8周龄施用IVP | 476.2        | 308.2 | 151.6 | 36.2 | 29.3 | 48.3 |
| 组2<br>在3周龄施用CP   | 513.8        | 310.7 | 134.3 | 36.9 | 16.9 | 24.5 |

[0135] 所有剩余的猪在D60(攻击后天数(DPC)-3)及D66(DPC 3)肌肉注射(IM)2.0毫升经不完全弗氏佐剂(ICFA)乳化之钥孔虫血兰蛋白(KLH)。在D63(DPC 0),剩余的猪肌肉注射(IM)1.0毫升PCV2爱荷华州立大学兽医诊断实验室(Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory, ISUVDL)攻击物质( $4.75 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml)及鼻内(IN)接受1.0毫升相同物质。在攻击之日及攻击后定期采集体重、直肠温度、临床观察、血液样品及鼻拭子。在每只猪尸体剖检时,记录肉眼损伤并收集肺及淋巴组织样品。由ISUVDL通过显微镜对肺及淋巴组织损伤进行检测,通过IHC检测PCV2抗原的存在。该研究攻击阶段概述于下表4中。

[0136] 表4:该研究之攻击阶段

[0137]

| 组别-治疗            | 数量 | KLH/ICFA<br>在D60<br>(DPC-3) | PCV2攻击<br>在D63<br>(DPC 0) | KLH/ICFA<br>在D66<br>(DPC 3) | 尸体剖检之日                        |
|------------------|----|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 组1a<br>在3周龄施用IVP | 20 | 是                           | 是                         | 是                           | D87 (DPC 24)<br>或D88 (DPC 25) |
| 组1b<br>在8周龄施用IVP | 21 | 是                           | 是                         | 是                           | D87 (DPC 24)<br>或D88 (DPC 25) |

|          |    |   |   |   |               |
|----------|----|---|---|---|---------------|
| 组2       | 20 | 是 | 是 | 是 | D87 (DPC 24)  |
| 在3周龄施用CP |    |   |   |   | 或D88 (DPC 25) |

[0138] 在D86,几何平均效价分别为906.6、2447.1、2014.9。

[0139] 结果

[0140] 在D63暴露于PCV2攻击及随后进行尸体剖检后,组1a与组2比较,下列参数具有统计学显著意义:呈淋巴损耗阳性之猪的比例较低 ( $p=0.0084$ ),呈淋巴性炎症阳性之猪的比例较低 ( $p=0.0079$ ),有IHC淋巴-阳性组织之猪的比例较低 ( $p=0.0031$ )。PCV2攻击后,组1b与组2比较,下列参数具有统计学显著意义:呈淋巴损耗阳性之猪的比例较低 ( $p=0.0148$ ),呈淋巴性炎症阳性之猪的比例较低 ( $p=0.0036$ ),有IHC淋巴-阳性组织之猪的比例较低 ( $p=0.0013$ )。组1a、1b及2之主要功效参数结果之概述显示于下表5中。

[0141] 表5:组1a及1b与组2相比主要功效参数结果之概述

[0142]

| 组别-治疗            | D0之PCV2<br>血清学状态 | 淋巴损耗<br>(+/总数)              | 淋巴性炎症<br>(+/总数)              | 淋巴IHC<br>(+/总数)              |
|------------------|------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 组1a<br>在3周龄施用IVP | 血清阳性             | 1/20 (5%)<br>* $p=0.0084$   | 3/20 (15%)<br>* $p=0.0079$   | 3/20 (15%)<br>* $p=0.0031$   |
| 组1b<br>在8周龄施用IVP | 血清阳性             | 2/21 (9.5%)<br>* $p=0.0148$ | 3/21 (14.3%)<br>* $p=0.0036$ | 3/21 (14.3%)<br>* $p=0.0013$ |
| 组2<br>在3周龄施用CP   | 血清阳性             | 9/20 (45%)                  | 12/20 (60%)                  | 13/20 (65%)                  |

[0143] \*与组2比较之p值-费希尔氏 (Fisher's) 真实性检验

[0144] 组1a和1b分别与组2相比,显微镜检到的肺部炎症有显著差异 ( $p \leq 0.0407$ ),但经IHC测试发现的PCV2抗原阳性肺组织无显著差异 ( $p \geq 0.2317$ )。组1a和1b分别与组2相比,接种疫苗后的临床评定、ADG、攻击后的临床征兆、发热、PCV2之鼻排毒、%总肺评分及淋巴结病 (lymphadenopathy) 都无显著差异。

[0145] 总之,组1a,这个在3周龄接种疫苗且接种疫苗时GMT为556.6的组,与组2相比,在淋巴损耗、淋巴性炎症、以及由IHC测出的PCV2抗原阳性淋巴组织方面,表现出显著保护。组1b,这个在8周龄接种疫苗且接种疫苗之前1周GMT为151.6的组,与组2相比,在淋巴损耗、淋巴性炎症以及由IHC测出的PCV2抗原阳性淋巴组织方面,表现出显著保护。有PCV2母体抗体的猪在早至3周龄时接种疫苗,可针对猪圆环病毒相关疾病提供保护作用。

|        |                                                                    |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------|-----|
| [0001] | <110>贝林格尔.英格海姆维特梅迪卡 (BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, Inc.)         |     |
| [0002] | <120>以PCV2抗原治疗猪                                                    |     |
| [0003] | <130>P01-2169                                                      |     |
| [0004] | <160>11                                                            |     |
| [0005] | <170>PatentIn version 3.3                                          |     |
| [0006] | <210>1                                                             |     |
| [0007] | <211>8                                                             |     |
| [0008] | <212>DNA                                                           |     |
| [0009] | <213>人工的                                                           |     |
| [0010] | <220>                                                              |     |
| [0011] | <223>经修饰之Kozak序列。                                                  |     |
| [0012] | <400>1                                                             |     |
| [0013] | ccgccca tg                                                         | 8   |
| [0014] | <210>2                                                             |     |
| [0015] | <211>6                                                             |     |
| [0016] | <212>DNA                                                           |     |
| [0017] | <213>人工的                                                           |     |
| [0018] | <220>                                                              |     |
| [0019] | <223>重组Eco R1序列。                                                   |     |
| [0020] | <400>2                                                             |     |
| [0021] | gaat tc                                                            | 6   |
| [0022] | <210>3                                                             |     |
| [0023] | <211>713                                                           |     |
| [0024] | <212>DNA                                                           |     |
| [0025] | <213>猪圆环病毒 (Porcine circovirus)                                    |     |
| [0026] | <400>3                                                             |     |
| [0027] | cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc  | 60  |
| [0028] | ttggccagat cctccgccgc cgccccctggc tegtccaccc ccgccaccgc taccgttgga | 120 |
| [0029] | gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcgc tctccgcac ctteggatat actgtggaga   | 180 |
| [0030] | aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tccgcacct tcggatatac tgtgacgact    | 240 |
| [0031] | ttgttcccc cggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa   | 300 |
| [0032] | gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg  | 360 |
| [0033] | gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg  | 420 |
| [0034] | accatatgt aaactactcc tccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc     | 480 |
| [0035] | gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca  | 540 |
| [0036] | aaaggaatca gctttgctg aggtacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg    | 600 |
| [0037] | gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg  | 660 |
| [0038] | tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat          | 713 |

|        |                                                                     |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| [0039] | <210>4                                                              |     |
| [0040] | <211>713                                                            |     |
| [0041] | <212>DNA                                                            |     |
| [0042] | <213>猪圆环病毒                                                          |     |
| [0043] | <400>4                                                              |     |
| [0044] | ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc   | 60  |
| [0045] | ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tegtccaccc ccgccaccgc taccgttgga   | 120 |
| [0046] | gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcc tctcccgcac ctteggatat actgtcaagg    | 180 |
| [0047] | ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact   | 240 |
| [0048] | ttgttccccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa   | 300 |
| [0049] | gaaaggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg    | 360 |
| [0050] | gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg   | 420 |
| [0051] | accatatgt aaactactec tcccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc     | 480 |
| [0052] | gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaataaca    | 540 |
| [0053] | aaaggaatca gctttgctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg    | 600 |
| [0054] | gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg   | 660 |
| [0055] | tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc           | 713 |
| [0056] | <210>5                                                              |     |
| [0057] | <211>233                                                            |     |
| [0058] | <212>PRT                                                            |     |
| [0059] | <213>猪圆环病毒                                                          |     |
| [0060] | <400>5                                                              |     |
| [0061] | Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg |     |
| [0062] | 1 5 10 15                                                           |     |
| [0063] | Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro     |     |
| [0064] | 20 25 30                                                            |     |
| [0065] | Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg     |     |
| [0066] | 35 40 45                                                            |     |
| [0067] | Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr     |     |
| [0068] | 50 55 60                                                            |     |
| [0069] | Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val     |     |
| [0070] | 65 70 75 80                                                         |     |
| [0071] | Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr     |     |
| [0072] | 85 90 95                                                            |     |
| [0073] | Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr     |     |
| [0074] | 100 105 110                                                         |     |
| [0075] | Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn     |     |
| [0076] | 115 120 125                                                         |     |
| [0077] | Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr     |     |

|        |                                                                 |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0078] | 130                                                             | 135 | 140 |
| [0079] | Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr |     |     |
| [0080] | 145                                                             | 150 | 155 |
| [0081] | Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro |     | 160 |
| [0082] |                                                                 | 165 | 170 |
| [0083] | Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn |     | 175 |
| [0084] |                                                                 | 180 | 185 |
| [0085] | Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp |     | 190 |
| [0086] |                                                                 | 195 | 200 |
| [0087] | Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe |     | 205 |
| [0088] | 210                                                             | 215 | 220 |
| [0089] | Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro                             |     |     |
| [0090] | 225                                                             | 230 |     |
| [0091] | <210>6                                                          |     |     |
| [0092] | <211>233                                                        |     |     |
| [0093] | <212>PRT                                                        |     |     |
| [0094] | <213>猪圆环病毒                                                      |     |     |
| [0095] | <400>6                                                          |     |     |
| [0096] | Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg |     |     |
| [0097] | 1                                                               | 5   | 10  |
| [0098] | Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro |     | 15  |
| [0099] |                                                                 | 20  | 25  |
| [0100] | Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg |     | 30  |
| [0101] |                                                                 | 35  | 40  |
| [0102] | Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr |     | 45  |
| [0103] | 50                                                              | 55  | 60  |
| [0104] | Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val |     |     |
| [0105] | 65                                                              | 70  | 75  |
| [0106] | Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr |     | 80  |
| [0107] |                                                                 | 85  | 90  |
| [0108] | Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr |     | 95  |
| [0109] |                                                                 | 100 | 105 |
| [0110] | Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn |     | 110 |
| [0111] |                                                                 | 115 | 120 |
| [0112] | Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr |     | 125 |
| [0113] | 130                                                             | 135 | 140 |
| [0114] | Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr |     |     |
| [0115] | 145                                                             | 150 | 155 |
| [0116] | Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro |     | 160 |

|        |                                                                    |     |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0117] | 165                                                                | 170 | 175 |
| [0118] | Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn    |     |     |
| [0119] | 180                                                                | 185 | 190 |
| [0120] | Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp    |     |     |
| [0121] | 195                                                                | 200 | 205 |
| [0122] | Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe    |     |     |
| [0123] | 210                                                                | 215 | 220 |
| [0124] | Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro                                |     |     |
| [0125] | 225                                                                | 230 |     |
| [0126] | <210>7                                                             |     |     |
| [0127] | <211>756                                                           |     |     |
| [0128] | <212>DNA                                                           |     |     |
| [0129] | <213>人工的                                                           |     |     |
| [0130] | <220>                                                              |     |     |
| [0131] | <223>来自猪第二型圆环病毒开放阅读框2及pGEM T-easy载体之一部分。                           |     |     |
| [0132] | <400>7                                                             |     |     |
| [0133] | gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccg cagaagaaga  | 60  |     |
| [0134] | caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcgcgc gcccttgget cgtccacccc   | 120 |     |
| [0135] | cgccaccgct accgttggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctccgcacc    | 180 |     |
| [0136] | ttcgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgcct cctgggcggg ggacatgatg    | 240 |     |
| [0137] | agattttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc | 300 |     |
| [0138] | tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc  | 360 |     |
| [0139] | cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag  | 420 |     |
| [0140] | gccacagccc taacctatga cccatatgta aactactcct ccgcccatac aatcccccaa  | 480 |     |
| [0141] | cccttctcct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat  | 540 |     |
| [0142] | tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggtgta ggctacaaac ctctagaaat  | 600 |     |
| [0143] | gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat  | 660 |     |
| [0144] | atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaate ttaaagaccc cccacttgaa  | 720 |     |
| [0145] | ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc                            | 756 |     |
| [0146] | <210>8                                                             |     |     |
| [0147] | <211>10387                                                         |     |     |
| [0148] | <212>DNA                                                           |     |     |
| [0149] | <213>人工的                                                           |     |     |
| [0150] | <220>                                                              |     |     |
| [0151] | <223>猪第二型圆环病毒,ORF-2构建体,含杆状病毒及pGEM T-easy编码序列。                      |     |     |
| [0152] | <400>8                                                             |     |     |
| [0153] | aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt  | 60  |     |
| [0154] | gaaagcacgt gtaaaatgtt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cgccaagt    | 120 |     |
| [0155] | ataaaagatt ctaatctgat atgtttttaa acaccttgc ggcccagatt gtttgcgtac   | 180 |     |

|        |                                                                    |      |
|--------|--------------------------------------------------------------------|------|
| [0156] | gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt  | 240  |
| [0157] | ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atgggtgtgca ttttttgcgg | 300  |
| [0158] | gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata  | 360  |
| [0159] | gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa ttacagaaa agtgtcccg catgttggtg    | 420  |
| [0160] | ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgcag atatttaatg | 480  |
| [0161] | cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac  | 540  |
| [0162] | aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc  | 600  |
| [0163] | tttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagega accaaaacta  | 660  |
| [0164] | tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag  | 720  |
| [0165] | gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacgtt gatgttacgt ttatgctttt  | 780  |
| [0166] | ggttttccac gtacgtcttt tgcccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgtca  | 840  |
| [0167] | cgcacaacac cggatgtttg cgttgtccg cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat   | 900  |
| [0168] | ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttcgtctt  | 960  |
| [0169] | tcttttgcac ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg  | 1020 |
| [0170] | tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgccttgat ggcaacgatg cgttcaataa   | 1080 |
| [0171] | actcttgttt ttaacaagt tctcggttt tttgcgccac caccgcttgc agcgcgtttg    | 1140 |
| [0172] | tgtgctcggc gaatgtgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tctcccgtt    | 1200 |
| [0173] | gtttgatcgc gggatcgta tggccggtgc agagcactg aggaattact tcttctaaaa    | 1260 |
| [0174] | gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc  | 1320 |
| [0175] | cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatacag cgggtcgccc cttttcacga  | 1380 |
| [0176] | cgtgttaga ggtagggccc ccattttgga tggctctgct aaataacgat ttgtatttat   | 1440 |
| [0177] | tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaactg ttagcgacgt   | 1500 |
| [0178] | ccttgccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat   | 1560 |
| [0179] | cttctccaaa ttaaatctt ccaattttaa cgcgagccat ttgatacac gtgtgtcgat    | 1620 |
| [0180] | tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaa ctaacttat tgtggtgaagc aataattaa    | 1680 |
| [0181] | tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg cgccggtctc  | 1740 |
| [0182] | ggcgcaagcg gctaaaacgt gttgcgcgtt caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag  | 1800 |
| [0183] | tacagttttg atttgcata taacggcgat ttttaaat atcttattta ataaatagtt     | 1860 |
| [0184] | atgacgccta caactccccg cccgcgttga ctcgctgcac ctcgagcagt tcgttgacgc  | 1920 |
| [0185] | cttctccgt gtggccgaac acgtcgagcg ggtggtcgat gaccagcggc gtgccgcacg   | 1980 |
| [0186] | cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcga aggcacgtcg gcctccaagt  | 2040 |
| [0187] | ggcaatattg gcaaatcga aaatatatac agttgggtt tttgcgcata tctatcgttg    | 2100 |
| [0188] | cgttgggcat gtacgtccga acgttgattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcattgcgat  | 2160 |
| [0189] | tagtgcgatt aaaacgttgt acatctcgc ttttaatcat gccgtcgatt aaatcgcgca   | 2220 |
| [0190] | atcgagtcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttctt gtattcccga gtcaagcgca   | 2280 |
| [0191] | gcgcgtattt taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc  | 2340 |
| [0192] | aataatatat tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gccggtgtc gcatctcaac   | 2400 |
| [0193] | acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg  | 2460 |
| [0194] | atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca  | 2520 |

|        |                                                                    |      |
|--------|--------------------------------------------------------------------|------|
| [0195] | tgacccccgt agtgacaacg atcacgceca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt  | 2580 |
| [0196] | atgtcgggtga cgttaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc | 2640 |
| [0197] | tggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt  | 2700 |
| [0198] | agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atccccgatga ttttattgat | 2760 |
| [0199] | aaattgacct taactccata cacggtattc tacaatggcg gggttttggg caaaatttcc  | 2820 |
| [0200] | ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc  | 2880 |
| [0201] | aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa  | 2940 |
| [0202] | aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg  | 3000 |
| [0203] | aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta  | 3060 |
| [0204] | aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgt aaaaccgatg tttaatcaag  | 3120 |
| [0205] | gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcactcttta  | 3180 |
| [0206] | atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aaatgaaaac tgtcgacaag  | 3240 |
| [0207] | ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata  | 3300 |
| [0208] | aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa  | 3360 |
| [0209] | catttgtagt attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgtcgagg taatatttta  | 3420 |
| [0210] | aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac  | 3480 |
| [0211] | tagacgcett gtcgtcttct tcttcgtatt cttctctttt ttcatTTTTt tctcataaaa  | 3540 |
| [0212] | aattaacata gtattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt   | 3600 |
| [0213] | tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc  | 3660 |
| [0214] | tgtaatttac aacagtgcta ttttctggta gttcttcgga gtgtgttgct ttaattatta  | 3720 |
| [0215] | aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt  | 3780 |
| [0216] | acgcagcttc ttctagttca attacaccat ttttagcag caccggatta acataacttt   | 3840 |
| [0217] | ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaata acagttcacc tcccttttct atactattgt  | 3900 |
| [0218] | ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaaactaat  | 3960 |
| [0219] | atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaat  | 4020 |
| [0220] | gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa  | 4080 |
| [0221] | aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgg atcagatctg  | 4140 |
| [0222] | cagcggccgc gggaattcga tccgccatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa  | 4200 |
| [0223] | gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tctcgcgcg ccgcccctgg ctctccacc    | 4260 |
| [0224] | cccgccaccg ctaccgttg agaaggaaaa atggcatctt caacaccgc ctctcccgca    | 4320 |
| [0225] | ccttcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctctgggcg gtggacatga   | 4380 |
| [0226] | tgagatttaa tattgacgac ttgtttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac  | 4440 |
| [0227] | cctttgaata ctacagaata agaaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccatca   | 4500 |
| [0228] | cccagggtga taggggagtg ggtccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa   | 4560 |
| [0229] | aggccacagc cctaacctat gaccatatg taaactactc ctcccgcct acaatcccc     | 4620 |
| [0230] | aacccttctc ctaccactcc cgttacttca cacccaaacc tgttcttgac tccactattg  | 4680 |
| [0231] | attacttcca accaaataac aaaaggaatc agctttggct gaggtacaa acctctagaa   | 4740 |
| [0232] | atgtggacca cgtaggcctc ggcactgcgt tcgaaaacag taaatacgac caggactaca  | 4800 |
| [0233] | atatccgtgt aaccatgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccacttg  | 4860 |

|        |                                                                    |      |
|--------|--------------------------------------------------------------------|------|
| [0234] | aaccetaaga attctatcac tagtgaattc gcggccgccg gccgctccag aattctagaa  | 4920 |
| [0235] | ggtaccggg atcctttcct gggaccggc aagaaccaa aactcactct cttcaaggaa     | 4980 |
| [0236] | atccgtaatg ttaaaccga cacgatgaag cttgtcgttg gatggaaagg aaaagagttc   | 5040 |
| [0237] | tacagggaaa cttggaccg cttcatggaa gacagcttc ccattgttaa cgaccaagaa    | 5100 |
| [0238] | gtgatggatg ttttccttgt tgtcaacatg cgtcccacta gacccaaccg ttgttacaaa  | 5160 |
| [0239] | ttcctggccc aacacgctct gcgttgcgac cccgactatg tacctcatga cgtgattagg  | 5220 |
| [0240] | atcgtcgagc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggctaagaag  | 5280 |
| [0241] | ggcggcggt gccaataat gaaccttcac tctgagtaca ccaactcggt cgaacagttc    | 5340 |
| [0242] | atcgatcgtg tcacttggga gaacttctac aagcccatcg ttacatcgg taccgactct   | 5400 |
| [0243] | gctgaagagg aggaaattct ccttgaagtt tccctggtgt tcaaagtaaa ggagtttgca  | 5460 |
| [0244] | ccagacgcac ctctgttcac tggctcggcg tattaaaaca cgatacattg ttatttagtac | 5520 |
| [0245] | atttattaag cgctagattc tgtgcgttgt tgatttacag acaattgttg tacgtatttt  | 5580 |
| [0246] | aataattcat taaatttata atcttttaggg tggtagtata gagcgaaaat caaatgattt | 5640 |
| [0247] | tcagcgtctt tatacttgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt  | 5700 |
| [0248] | cgattagttt caaacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt  | 5760 |
| [0249] | tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc  | 5820 |
| [0250] | gtttgtgttt tgttttgtaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta  | 5880 |
| [0251] | tttctttcat cactgtcgtt agtgtacaat tgactcgacg taaacacggt aaataaagct  | 5940 |
| [0252] | tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattaggcc gattatcgte gtcgtcccaa  | 6000 |
| [0253] | ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta  | 6060 |
| [0254] | attgtgtcgg ctaacacgct cgcgatcaaa tttgtagttg agcttttttg aattatttct  | 6120 |
| [0255] | gattgcgggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac  | 6180 |
| [0256] | acgttagaaa gcgatggtgc aggcggtggt aacatttcag acggcaaate tactaatggc  | 6240 |
| [0257] | ggcgggtggt gagctgatga taaatctacc atcgggtggag gcgcaggcgg ggctggcggc | 6300 |
| [0258] | ggaggcggag gcggagggtg tggcgggtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct | 6360 |
| [0259] | ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcgt ttttggtttg   | 6420 |
| [0260] | accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttgtctg  | 6480 |
| [0261] | tcgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca  | 6540 |
| [0262] | gacatcgatg gtggtggtgg tgggtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt | 6600 |
| [0263] | ggcggcggtg ccgccggtat aatttgttct ggttttagtt gttcgcgcac gattgtgggc  | 6660 |
| [0264] | accggcgcag gcgccgctgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgttgg   | 6720 |
| [0265] | ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt   | 6780 |
| [0266] | gtaatttcgc tatcgtttac cgtgcgata tttacaacc gctcaatgta agcaattgta    | 6840 |
| [0267] | ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgca cgcgataac aagccttttc atttttacta    | 6900 |
| [0268] | cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgacgta catgtatgct ttgttgtcaa  | 6960 |
| [0269] | aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt  | 7020 |
| [0270] | tgctgtaaat gttgtttttg ataatttgcg cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt  | 7080 |
| [0271] | gatgcgcatc aattttgttg ttctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc   | 7140 |
| [0272] | tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgctgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa  | 7200 |

|        |             |             |             |            |            |             |      |
|--------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| [0273] | actgcaaaaa  | cgtcaaaact  | cgggtataaaa | taatcaacgg | gcgctttggc | aaaatatcta  | 7260 |
| [0274] | ttttatcgca  | caagcccact  | agcaaatgt   | atttgcagaa | aacaatttcg | gcgcacaatt  | 7320 |
| [0275] | ttaacgctga  | cgaaataaaa  | gttcaccagt  | taatgagcga | ccacccaaat | tttataaaaa  | 7380 |
| [0276] | tctattttaa  | tcacggttcc  | atcaacaacc  | aagtgatcgt | gatggactac | attgactgtc  | 7440 |
| [0277] | ccgatttatt  | tgaaacacta  | caaattaaag  | gcgagctttc | gtaccaactt | gttagcaata  | 7500 |
| [0278] | ttattagaca  | gctgtgtgaa  | gcgctcaacg  | atttgcacaa | gcacaatttc | atacacaacg  | 7560 |
| [0279] | acataaaaact | cgaaaatgtc  | ttatatattcg | aagcacttga | tcgctgttat | gtttgcgatt  | 7620 |
| [0280] | acggattgtg  | caaacacgaa  | aactcactta  | gcgtgcacga | cggcacgttg | gagtatttta  | 7680 |
| [0281] | gtccggaaaa  | aattcgacac  | acaactatgc  | acgtttcgtt | tgactggtag | gcggcgtgtt  | 7740 |
| [0282] | aacatacaag  | ttgctaacgt  | aatcatggtc  | atagctgttt | cctgtgtgaa | attgttatcc  | 7800 |
| [0283] | gctcacaatt  | ccacacaaca  | tacgagccgg  | aagcataaag | tgtaaagcct | gggggtgccta | 7860 |
| [0284] | atgagtgage  | taactcacat  | taattgcgtt  | gcgtcactg  | cccgcatttc | agtcgggaaa  | 7920 |
| [0285] | cctgtcgtgc  | cagctgcatt  | aatgaatcgg  | ccaacgcgcg | gggagaggcg | gtttgcgtat  | 7980 |
| [0286] | tgggcgtctt  | tccgcttcct  | cgtcactga   | ctcgtgcgc  | tcggctgttc | ggctgcggcg  | 8040 |
| [0287] | agcggtatca  | gctcactcaa  | aggcggtaat  | acggttatcc | acagaatcag | gggataacgc  | 8100 |
| [0288] | aggaaagaac  | atgtgagcaa  | aaggccagca  | aaaggccagg | aaccgtaaaa | aggccgcgtt  | 8160 |
| [0289] | gctggcgttt  | ttccatagge  | tccgcccccc  | tgacgagcat | cacaaaaatc | gacgctcaag  | 8220 |
| [0290] | tcagaggtgg  | cgaaacccga  | caggactata  | aagataccag | gcgtttcccc | ctggaagctc  | 8280 |
| [0291] | cctcgtgcgc  | tctcctgttc  | cgaccctgcc  | gcttaccgga | tacctgtccg | cctttctccc  | 8340 |
| [0292] | ttcgggaagc  | gtggcgtttt  | ctcatagctc  | acgctgtagg | tatctcagtt | cgggtgtaggt | 8400 |
| [0293] | cgttcgctcc  | aagctgggct  | gtgtgcacga  | acccccggtt | cagcccgacc | gctgcgcctt  | 8460 |
| [0294] | atccggtaac  | tatcgtcttg  | agtccaaccc  | ggtaagacac | gacttategc | cactggcagc  | 8520 |
| [0295] | agccactggg  | aacaggatta  | gcagagcgag  | gtatgtaggc | ggtgctacag | agttcttgaa  | 8580 |
| [0296] | gtgggtggcct | aactacggct  | acactagaag  | gacagtattt | ggtatctgcg | ctctgctgaa  | 8640 |
| [0297] | gccagttacc  | ttcggaaaaa  | gagttggtag  | ctcttgatcc | ggcaaacaaa | ccaccgctgg  | 8700 |
| [0298] | tagcgggtgt  | ttttttgttt  | gcaagcagca  | gattacgcgc | agaaaaaaag | gatctcaaga  | 8760 |
| [0299] | agatcctttg  | atctttttcta | cgggggtctga | cgctcagtgg | aacgaaaact | cacgttaagg  | 8820 |
| [0300] | gatttttggtc | atgagattat  | caaaaaggat  | cttcacctag | atccttttaa | attaaaaatg  | 8880 |
| [0301] | aagtttttaa  | tcaatctaaa  | gtatatatga  | gtaaacttgg | tctgacagtt | accaatgctt  | 8940 |
| [0302] | aatcagtgag  | gcacctatct  | cagcgatctg  | tctatctcgt | tcatccatag | ttgcctgact  | 9000 |
| [0303] | ccccgtcgtg  | tagataacta  | cgatacggga  | gggcttacca | tctggcccca | gtgctgcaat  | 9060 |
| [0304] | gataccgcga  | gaccacgct   | caccggctcc  | agatttatca | gcaataaacc | agccagccgg  | 9120 |
| [0305] | aagggccgag  | cgcagaagtg  | gtcctgcaac  | tttatccgcc | tccatccagt | ctattaattg  | 9180 |
| [0306] | ttgccgggaa  | gctagagtaa  | gtagttcgcc  | agttaatagt | ttgcgcaacg | ttgttgccat  | 9240 |
| [0307] | tgctacaggc  | atcgtggtgt  | cacgctcgtc  | gtttggtatg | gcttcattca | gctccggttc  | 9300 |
| [0308] | ccaacgatca  | aggcgagtta  | catgateccc  | catgttgtgc | aaaaaagegg | ttagctcctt  | 9360 |
| [0309] | cggctctccg  | atcgttgtea  | gaagtaagtt  | ggccgcagtg | ttatcactca | tggttatggc  | 9420 |
| [0310] | agcactgcat  | aattctctta  | ctgtcatgcc  | atccgtaaga | tgcttttctg | tgactggtga  | 9480 |
| [0311] | gtactcaacc  | aagtcattct  | gagaatagtg  | tatgcggcga | ccgagttgct | cttgccccgc  | 9540 |

|        |                                                                     |       |
|--------|---------------------------------------------------------------------|-------|
| [0312] | gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa    | 9600  |
| [0313] | acgtttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta  | 9660  |
| [0314] | accactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg     | 9720  |
| [0315] | agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg  | 9780  |
| [0316] | aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat   | 9840  |
| [0317] | gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt    | 9900  |
| [0318] | tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa   | 9960  |
| [0319] | aaataggcgt atcacgagge cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct   | 10020 |
| [0320] | ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag   | 10080 |
| [0321] | acaagcccggt cagggcgcggt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc | 10140 |
| [0322] | ggcatcagag cagattgtac tgagagtgc ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg    | 10200 |
| [0323] | cgtaaggaga aaataccgca tcaggecgca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga   | 10260 |
| [0324] | agggcgatcg gtgcgggcct cttegtatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc    | 10320 |
| [0325] | aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc   | 10380 |
| [0326] | cagtgcc                                                             | 10387 |
| [0327] | <210>9                                                              |       |
| [0328] | <211>20                                                             |       |
| [0329] | <212>PRT                                                            |       |
| [0330] | <213>猪圆环病毒                                                          |       |
| [0331] | <400>9                                                              |       |
| [0332] | Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His His Pro Pro Ser     |       |
| [0333] | 1 5 10 15                                                           |       |
| [0334] | His Leu Gly Gln                                                     |       |
| [0335] | 20                                                                  |       |
| [0336] | <210>10                                                             |       |
| [0337] | <211>19                                                             |       |
| [0338] | <212>PRT                                                            |       |
| [0339] | <213>猪圆环病毒                                                          |       |
| [0340] | <400>10                                                             |       |
| [0341] | Pro Arg His His Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr     |       |
| [0342] | 1 5 10 15                                                           |       |
| [0343] | Thr Leu Ser                                                         |       |
| [0344] | <210>11                                                             |       |
| [0345] | <211>233                                                            |       |
| [0346] | <212>PRT                                                            |       |
| [0347] | <213>人工的                                                            |       |
| [0348] | <220>                                                               |       |
| [0349] | <223>猪第二型圆环病毒之氨基酸序列,开放阅读框2。                                         |       |
| [0350] | <400>11                                                             |       |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0351] | Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg |
| [0352] | 1 5 10 15                                                       |
| [0353] | Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro |
| [0354] | 20 25 30                                                        |
| [0355] | Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg |
| [0356] | 35 40 45                                                        |
| [0357] | Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr |
| [0358] | 50 55 60                                                        |
| [0359] | Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val |
| [0360] | 65 70 75 80                                                     |
| [0361] | Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr |
| [0362] | 85 90 95                                                        |
| [0363] | Arg Ile Lys Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr |
| [0364] | 100 105 110                                                     |
| [0365] | Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn |
| [0366] | 115 120 125                                                     |
| [0367] | Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr |
| [0368] | 130 135 140                                                     |
| [0369] | Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr |
| [0370] | 145 150 155 160                                                 |
| [0371] | Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro |
| [0372] | 165 170 175                                                     |
| [0373] | Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn |
| [0374] | 180 185 190                                                     |
| [0375] | Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp |
| [0376] | 195 200 205                                                     |
| [0377] | Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe |
| [0378] | 210 215 220                                                     |
| [0379] | Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro                             |
| [0380] | 225 230                                                         |

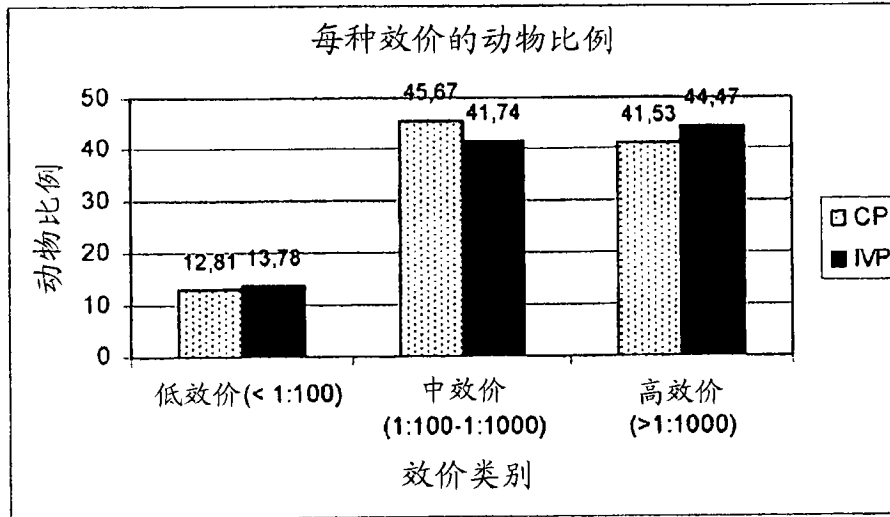


图1

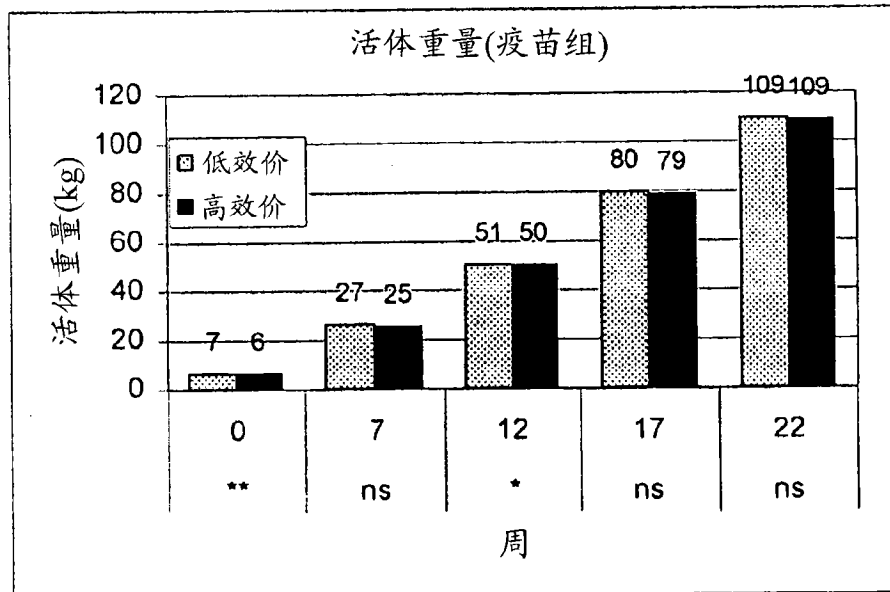


图2

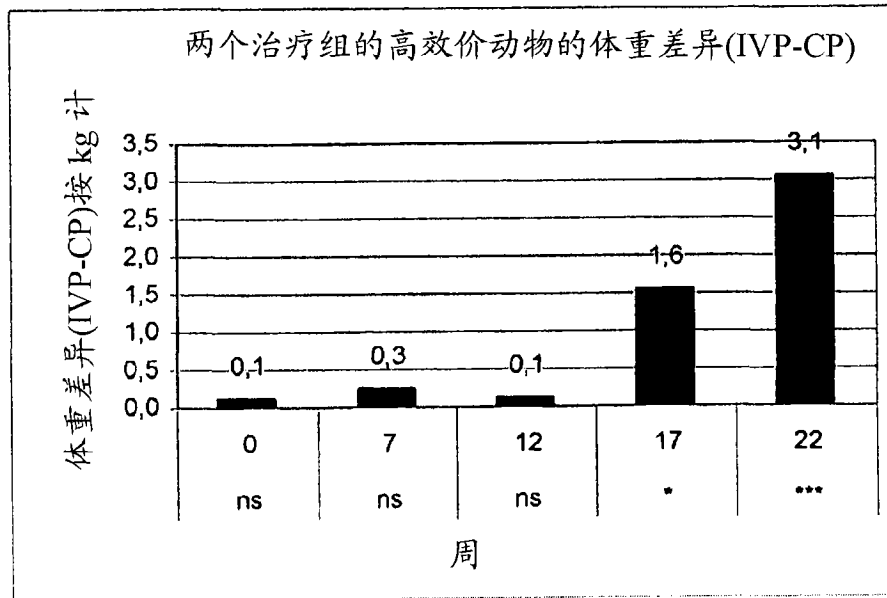


图3