



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년02월16일
(11) 등록번호 10-1014544
(24) 등록일자 2011년02월08일

(51) Int. Cl.

C12N 15/34 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7009126

(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년12월11일

심사청구일자 2007년12월11일

(85) 번역문제출일자 2004년06월11일

(65) 공개번호 10-2004-0086243

(43) 공개일자 2004년10월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2002/039646

(87) 국제공개번호 WO 2003/049703

국제공개일자 2003년06월19일

(30) 우선권주장

60/340,775 2001년12월12일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

Viral Immunology, vol.13(2),
pp.143-153(2000.)*

Journal of Virology, vol.77(20), pp.
11232-11243.(2003. 10.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아이오와 스테이트 유니버시티 리서치
파운데이션, 인코퍼레이티드

미국, 아이오와 50011-2131, 아메스, 랩 오브 미
케닉스 아이오와 스테이트 유니버시티 310

버지니아 테크 인터렉추얼 프라퍼티스, 인크.

미국, 버지니아 24060, 블랙스버그, 스위트
1050, 크라프트 드라이브 2200

(72) 발명자

명 상-진

미국 버지니아주 24060 블랙스버그 크레이그 드라
이브 401

페녹스 마르틴

미국 캘리포니아주 94062 레드우드 시티 알링턴
로드 207비

할부르 패트릭 지

미국 아이오와주 50014 에임즈 킹맨 로드 3211

(74) 대리인

이병호, 장훈

전체 청구항 수 : 총 23 항

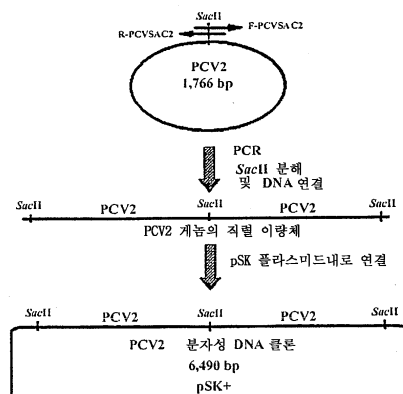
심사관 : 정진욱

(54) 감염성 키메라 DNA 클론, 키메라 돼지 서코바이러스 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 돼지 서코바이러스(PCV)의 감염성 DNA 클론, 감염성의 키메라 DNA 클론, 백신, 및 돼지를 PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)으로부터 돼지를 보호하는 수단에 관한 것이다. 신규한 키메라 감염성 DNA 클론 및 그의 유도된, 병원성 키메라 바이러스는 병원성 PCV2의 면역원성 ORF 유전자가 바람직하게는 동일한 위치에 있는 비병원성 PCV1의 유전자를 대신하는 비병원성 PCV1으로부터 작제된다. 키메라 바이러스는 유리하게도 PCV1의 비병원성 표현형을 유지하지만, 병원성 PCV2에 대한 특이적 면역반응을 유도한다. 본 발명은 면역원성 폴리펩타이드 발현 생성물을 추가로 포함한다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

60/424,840 2002년11월08일 미국(US)

10/314,512 2002년12월09일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

돼지 서코바이러스(porcine circovirus) 1형(PCV1) 핵산 분자의 개방 판독 프레임 2(open reading frame 2: ORF2) 유전자 대신에 병원성 돼지 서코바이러스 2형(PCV2)의 번역원성 ORF2 유전자를 함유하는, 감염성의 비병원성 PCV1을 암호화하는 핵산 분자를 가짐을 특징으로 하는, 돼지 서코바이러스(PCV1-2)의 감염성 키메라 핵산 분자.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 키메라 핵산 분자가 서열번호 2에 제시한 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적 쌍을 가짐을 특징으로 하는, 키메라 핵산 분자.

청구항 5

제4항에 따른 키메라 핵산 분자를 함유함을 특징으로 하는, 생물학적 기능성 플라스미드 또는 바이러스 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, ATCC 특허 기탁 번호가 제PTA-3912호임을 특징으로 하는 플라스미드.

청구항 7

제4항에 따른 키메라 핵산 분자를 포함함을 특징으로 하는 벡터에 의해 형질감염된 숙주 세포.

청구항 8

제4항에 따른 키메라 핵산 분자를 함유하는 세포에 의해 생산됨을 특징으로 하는, 비독성의 감염성 키메라 돼지 서코바이러스.

청구항 9

제8항에 있어서, 세포에 함유된 키메라 핵산 분자가 ATCC 특허 기탁 번호 제PTA-3912호의 플라스미드내에 함유되어 있거나 이로부터 유래됨을 특징으로 하는, 감염성 키메라 돼지 서코바이러스.

청구항 10

제4항에 따른 핵산 분자로 형질감염된 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 번역원성 폴리펩타이드 생성물을 발현하도록 성장시키는 단계 및 상기 핵산 분자의 목적하는 폴리펩타이드 발현 생성물을 분리시키는 단계를 포함함을 특징으로 하는, 번역원성 폴리펩타이드 생성물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 따른 방법에 의해 발현된 번역원성 폴리펩타이드 생성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

(a) 서열번호 2에 제시한 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적 쌍을 갖는 키메라 핵산 분자;

(b) 서열번호 2에 제시한 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적 쇄를 갖는 키메라 핵산 분자를 함유하는 생물학적 기능성 플라스미드 또는 바이러스 벡터;

(c) 제1항에 따른 키메라 핵산 분자를 포함하는 비독성의 감염성 키메라 돼지 서코바이러스;

(d) ATCC 특허 기탁 번호 제PTA-3913호의 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론 또는 이로부터 유래된 PCV2 DNA 클론 및

(e) ATCC 특허 기탁 번호 제PTA-3913호의 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론 또는 이로부터 유래된 PCV2 DNA 클론을 함유하는 생물학적 기능성 플라스미드 또는 바이러스 벡터

로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성원의 면역원성 양, 및 비독성의 생리학적으로 허용되는 담체를 포함함을 특징으로 하는, PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)으로부터 돼지를 보호하는 바이러스 백신.

청구항 14

제13항에 있어서, 생(live) 키메라 돼지 서코바이러스를 함유함을 특징으로 하는 바이러스 백신.

청구항 15

PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)으로부터의 보호가 필요한 돼지에게 면역학적 유효량의 제13항에 따른 백신을 투여함을 포함함을 특징으로 하는, PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)으로부터 돼지를 보호하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 키메라 핵산 분자(a) 또는 키메라 돼지 서코바이러스(c)를 포함하는 제13항에 따른 백신을 돼지에게 투여함을 포함하고, 이때 상기 키메라 돼지 서코바이러스(c)가 생 키메라 돼지 서코바이러스임을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 백신을 돼지에게 비경구, 비내, 피하내 또는 경피적으로 투여함을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 백신을 돼지에게 림프계내 또는 근육내 투여함을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

감염성의 비병원성 PCV1을 암호화하는 핵산 분자의 개방 판독 프레임 2(ORF2) 유전자를 제거하는 단계; PCV1의 ORF2 유전자 위치를 병원성 PCV2로부터의 면역원성 ORF2 유전자로 대체시키는 단계 및 키메라 핵산 분자를 회수하는 단계를 포함함을 특징으로 하는, 제1항에 따른 PCV1-2의 감염성 키메라 핵산 분자의 제조방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제19항에 있어서, PCV2의 ORF2 유전자가 ATCC 특허 기탁 번호 제PTA-3913의 발현 벡터내에 함유된 PCV2의 분자성 핵산 분자로부터 수득됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

ATCC 특허 기탁 번호가 제PTA-3913호임을 특징으로 하는, 감염성의 PCV2 분자성 DNA 클론 또는 이로부터 유래된

PCV2 DNA 클론.

청구항 24

제23항에 따른 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론을 함유함을 특징으로 하는, 생물학적 기능성 플라스미드 또는 바이러스 벡터.

청구항 25

PCV2 핵산 분자의 ORF2 유전자 대신에 비병원성 PCV1으로부터의 면역원성 ORF2 유전자를 갖는 감염성의 병원성 PCV2를 암호화하는 핵산 분자를 포함함을 특징으로 하는, PCV2-1의 감염성 역 키메라 핵산 분자.

청구항 26

제13항 또는 제14항에 있어서, 하나 이상의 추가 돼지 항원의 면역원성 양을 추가로 포함하는 바이러스 백신.

청구항 27

제26항에 있어서, 하나 이상의 추가 돼지 항원이 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV) 및 돼지 파르보바이러스(PPV)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 바이러스 백신.

청구항 28

보호가 필요한 돼지에게 제26항에 따른 백신의 면역학적 유효량을 투여함을 포함함을 특징으로 하는, PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)으로부터 돼지를 보호하는 방법.

명세서

- [0001] 관련 미국 출원에 대한 상호참조
- [0002] 당해 비가출원은 제35 USC 119조하에 2001년 12월 12일자로 출원된 미국 가출원 제60/340,775호에 대한 우선권을 주장하는 2002년 11월 8일자로 출원된 미국 가출원 제60/424,840호에 대한 우선권을 제35 USC 119조하에 주장한다.
- [0003] 연방 정부가 지원하는 연구 또는 개발에 관한 진술
- [0004] 해당되지 않음
- [0005] "서열 목록"에 대한 참조
- [0006] 본 출원서에 제공된 서열 목록 파일을 포함하는 하나의 콤팩트 디스크상의 자료는 본원에서 참조로 인용된다. 제조일은 2003년 1월 27일이며 크기는 약 9.5kb이다.
- [0007] 발명의 배경
- [0008] 발명의 분야
- [0009] 본 발명은 감염성 돼지 서코바이러스 1형(PCV1) 및 2형(PCV2) DNA 클론, 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론 및 백신으로서 유용한, 상기 키메라 DNA 클론으로부터 유래된 키메라 생 바이러스에 관한 것이다.
- [0010] 관련 분야의 설명
- [0011] 본 명세서에서 인용되는 모든 특허 및 공개공보는 이의 전문이 본원에서 참조로 인용된다.
- [0012] 돼지 서코바이러스(PCV)는 돼지 신장 세포주 PK-15의 세포 배양물 오염원으로부터 최초로 분리되었다[참조: I. Tischer et al., "A very small porcine virus with circular single-stranded DNA, "Nature 295 : 64-66 (1982); I. Tischer et al., "Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines, "Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Otg. A. 226 (2): 153-167 (1974)]. PCV는

약 1.76kb의 일본쇄 환상 DNA 게놈을 함유하는 소형 정이십면체 비-외피형 바이러스이다. PCV는 서코비리데 (Circoviridae)과 로 분류되고, 이는 3가지의 다른 동물 서코바이러스(닭 빈혈 바이러스(CAV), 프시타신 부리 및 깃털 질병 바이러스(psittacine beak and feather disease virus; PBFDV) 및 최근에 발견된 비둘기 유래의 콜럼비드 서코바이러스(CoCV)) 및 3가지의 식물 서코바이러스(바나나 번치 탑 바이러스(banana bunchy top virus), 코코넛 잎 부패 바이러스(coconut foliar decay virus) 및 지하클로버 발육저지 바이러스(subterranean clover stunt virus))[참조: M. R. Bassami et al., "Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus, "Virology 249: 453-459 (1998); J. Mankertz et al., "Transcription analysis of porcine circovirus (PCV), "Virus Genes 16: 267-276(1998) ; A. Mankertz et al., "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons, "Arch. Virol. 145: 2469-2479 (2000); B. M. Meehan et al., "Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses, "J. Gen. Virol. 78: 221-227 (1997); B. M. Meehan et al., "Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs, "J. Gen. Virol. 79: 2171-2179 (1998); D. Todd et al., "Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes, "Arch. Virol. 117: 129-135 (1991)]로 이루어져 있다. 이미 인식된 3가지의 동물 서코바이러스 구성원(PCV, CAV 및 PBFDV)은 서로 뉴클레오타이드 서열 상동성 또는 항원결정부를 공유하지 않는다[참조: M. R. Bassami et al., 1998, supra ; D. Todd et al., 1991, supra]. 새롭게 확인된 CoCV의 게놈은 PCV의 게놈과 약 40%의 뉴클레오타이드 서열 동일성을 공유한다 [참조: A. Mankertz et al., "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons, "Arch. Virol. 145: 2469-2479 (2000)]. 최근에는, 수혈 전과 바이러스 또는 TT 바이러스(TTV)로 명명되는, 환상 게놈을 갖는 신규한 사람 서코바이러스가 수혈후 간염과 관련된 개체로부터 확인되었다[참조: H. Miyata et al., "Identification of a novel GC-rich 113- nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus, "J. Virol. 73: 3582-3586 (1999); T. Nishizawa et al., "A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology, "Biochem. Biophys. Res. Commun. 241: 92-97 (1997)]. 추가로, 사람 TTV-유사 미니 바이러스(TLMV)가 정상 혈액 공여자로부터 확인되었고[참조: P. Biagini et al., "Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates, "J. Gen. Virol. 82: 379-383 (2001); K. Takahashi et al., "Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus, "Arch. Virol. 145: 979-93 (2000)], SEN 바이러스(SENV)로서 공지된 제3의 신규한 사람 서코바이러스가 수혈후 간염을 앓는 사람으로부터 발견되었다[참조: T. Umemura et al., "SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis, "Hepatology 33: 1303-1311 (2001)]. 사람 TTV 및 TLMV 둘다의 게놈 구성은 CAV의 것과 유사하다[참조: P. Biagini et al., 2001, supra ; H. Miyata et al., 1999, supra ; K. Takahashi et al., 2000, supra]. PCV에 대한 항체가 사람, 마우스, 소 및 돼지를 포함하는 다양한 동물 중에서 발견되었다 해도[참조: G. M. Allan et al., "Production, preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus, "Vet. Immunol. Immunopathol. 43: 357-371 (1994); G. C. Dulac and A. Afshar, "Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs, "Can. J. Vet. Res. 53: 431-433 (1989); S. Edwards and J. J. Sands, "Evidence of circovirus infection in British pigs, "Vet. Rec. 134: 680-1 (1994); J. C. Harding and E. G. Clark, "Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), "Swine Health and Production 5: 201-203 (1997); R. K. Hines and P. D. Lukert, "Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States, "Swine Health and Production 3: 71-73 (1995); G. P. Nayar et al., "Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses, "Can. Vet. J. 40: 277-278 (1999); I. Tischer et al., "Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms, "Arch. Virol. 140: 737-743 (1995); I. Tischer et al., "Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle, "Arch. Virol. 140: 1427-1439 (1995)], 이들 동물 중에서의 PCV의 발병기전에 관해서는 거의 공지된 바가 없다. 돼지의 PK-15 세포 유래의 PCV로의 실험 감염은 임상적 질환을 유발시키지 않았으므로, 상기 바이러스는 돼지에 대해 병원성인 것으로 고려되지 않는다[참조: G. M. Allan et al., "Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material, "Vet. Microbiol. 44: 49-64 (1995); I. Tischer et al., "Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus, "Arch. Virol. 91: 271-276 (1986)]. 오염된 PK-15

세포주로부터 유래된 비병원성 PCV는 돼지 서코바이러스 1형 또는 PCV1로서 명명되었다.

[0013]

1991년[참조: J. C. Harding and E. G. Clark, 1997, supra]에 최초로 기술된 이유자돈 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)은 보다 점점 만연되어가는 이유자돈의 복합 질환이다. 양돈 산업에 미치는 잠재적인 심각한 경제적 영향의 위협으로, PMWS의 1차적 병인체인 PCV2에 대한 백신의 개발이 시급해졌다. PMWS는 주로 5주령 내지 18주령의 돼지에게 발생된다. 임상적 PMWS 징후는 점진적 체중 손실, 호흡곤란, 빠른호흡, 빈혈, 설사 및 황달을 포함한다. 치사율은 1% 내지 2% 및 영국에서 일부 합병증인 경우에는 40% 이하로 다양할 수 있다[참조: M. Muirhead, "Sources of information on PMWS/PDNS, "Vet. Rec. 150: 456 (2002)]. PMWS의 특징적인 현미경적 병소로는 육아종 간질성 폐렴, 림프절병증, 간염 및 신염[참조: G. M. Allan and J. A. Ellis, "Porcine circoviruses: a review, "J. Vet. Diagn. Invest. 12: 3-14 (2000); J. C. Harding and E. G. Clark, 1997, supra]이 포함된다. 현재 PMWS는 캐나다, 미국[참조: G. M. Allan et al., "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes, "Vet. Rec. 142: 467-468 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe, "J. Vet. Diagn. Invest. 10: 3-10 (1998); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, supra ; J. Ellis et al., "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, "Can. Vet. J. 39: 44-51 (1998); A. L. Hamel et al., "Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs, "J. Virol. 72: 5262-5267 (1998); M. Kiupel et al., "Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana, "Vet. Pathol. 35: 303-307 (1998); R. Larochelle et al., "Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined byPCR, "Vet. Rec. 145: 140-142 (1999); B. M. Meehan et al., 1998, supra ; I. Morozov et al., "Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, "J. Clin. Microbiol. 36: 2535-2541 (1998)], 대부분의 유럽 국가 [참조: G. M. Allan et al., "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe, "J. Vet. Diagn. Invest. 10: 3-10 (1998); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, supra ; S. Edwards and J. J. Sands, 1994, supra ; S. Kennedy et al., "Porcine circovirus infection in Northern Ireland, "Vet. Rec. 142: 495-496 (1998); A. Mankertz et al., "Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France, "Virus Res. 66: 65-77 (2000); C. Rosell et al., "Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet. Rec. 146: 40-43 (2000); P. Spillane et al., "Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland, "Vet. Rec. 143: 511-512 (1998); G. J. Wellenberg et al., "Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands, "Vet. Quart. 22: 167-72 (2000)] 및 일부 아시아 국가[참조: C. Choi et al., "Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction, "J. Vet. Diagn. Invest. 12: 151-153 (2000); A. Onuki et al., "Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan, "J. Vet. Med. Sci. 61: 1119-1123 (1999)]에서 돼지에서 인식되고 있다. 잠재적으로, PMWS는 전세계적으로 양돈 산업에 경제적으로 심각한 영향력을 갖는다.

[0014]

PMWS의 1차 병인체는 돼지 서코바이러스 2형 또는 PCV2로서 명명되는 병원성 PCV이다[참조: G. M. Allan et al., "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes, "Vet. Rec. 142: 467-468 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe, "J. Vet. Diagn. Invest. 10: 3-10 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland, "Vet. Microbiol. 66: 115-23 (1999); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, supra ; J. Ellis et al., 1998, supra ; A. L. Hamel et al., 1998, supra ; B. M. Meehan et al., 1998, supra ; I. Morozov et al., 1998, supra]. PMWS-관련 PCV2의 완전한 게놈 서열이 결정되었다[참조: M. Fenaux et al., "Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2, "J. Clin. Microbiol. 38: 2494-503 (2000); A. L. Hamel et al., 1998, supra ; J. Mankertz et al., 1998, supra ; B. M. Meehan et al., 1997, supra ; B. M. Meehan et al., 1998, supra ; I. Morozov et al., 1998, supra].

- [0015] PCV1는 돼지에서 편재한 것이지만, 돼지에게 병원성은 아니다. 대조적으로, 유전학적으로 관련된 PCV2는 병원성이며 돼지에서 PMWS를 유발한다. 서열 분석으로 PMWS-관련 PCV2가 비병원성 PCV1과 약 75%의 뉴클레오타이드 서열 동일성만을 공유하는 것으로 드러났다. 비병원성 PCV1 및 병원성 PCV2 둘다의 ORF2 유전자는 주요 면역원성 바이러스 캡시드 단백질을 암호화한다[참조: P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV, "Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1: 33-40 (2002); P. Nawagitgul et al., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, "J. Gen. Virol. 81: 2281-2287 (2000)].
- [0016] 통상적 돼지에서 PCV2 접종으로 임상적 PMWS를 재현하고자 하는 초기의 시도는 성공적이지 못했다[참조: M. Balaschet al., "Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome, "J. Comp. Pathol. 121: 139-148 (1999); M. Fenaux et al., "Cloned Genomic DNA of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) Is Infectious When Injected Directly into the Liver and Lymph Nodes of SPF Pigs: Characterization of Clinical Disease, Virus Distribution, and Pathologic Lesions, "J. Virol. 76: 541-551 (2002)]. 무균(gnotobiotic) 돼지 및 통상적 돼지에서 천연 PMWS를 앓는 돼지로부터의 조직 균질화액, 및 세포 배양물에서 증식된 PCV2를 이용한 임상적 PMWS의 실험적 재현은 혼합된 결과를 산출하였다. 임상적 PMWS는 면역계가 불완전 프로인트 보조제 중의 키텔 헤모시아닌으로 활성화된 경우에, PCV2와 돼지 파르보바이러스(PPV)로 공감염된 무균(SPF) 돼지, 초유 무섭취 돼지 및 제왕절개술로 유도된 돼지[참조: G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus, "J. Comp. Pathol. 121: 1-11 (1999); S. Krakowka et al., "Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus, "Vet. Pathol. 37: 254-263 (2000)], 및 PCV2-접종된 무균 돼지[참조: S. Krakowka et al., "Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2), "Vet. Pathol. 38: 31-42 (2001)]에서 재현되었다.
- [0017] 임상적 PMWS는 또한 PCV2만으로 접종된, 제왕절개술로 유도된/초유 무섭취 돼지(CD/CD)[참조: P. A. Harms et al., "Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus, "Vet. Pathol. 38: 528-539 (2001)] 및 PCV2와 돼지 파르보바이러스(PPV) 또는 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)로 공감염된 통상의 돼지[참조: A. Rivora et al., "Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2, "J. Virol. 76: 3232-3239 (2002)]에서도 재현되었다. PRRSV/PCV2 공감염의 경우에, 림프구 고갈, 육아종 염증 및 괴사성 간염과 같은 PMWS의 특징적인 병리학적 징후는 PCV2에 의해 유도되며 PRRSV에 의해 유도되지 않는다[참조: P. A. Harms et al., 2001, supra]. 그러나, 임상적 PMWS는 PCV2만으로 감염된 무균 돼지에서는 재현되지 않았다[참조: G.M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication, "Arch. Virol. 145: 2421- 2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation, J. Vet. Med. 47: 81-94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus, "J. Comp. Pathol. 121: 1-11 (1999); M. Balaschet al., 1999, supra ; J. Ellis et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets, "J. Vet. Diagn. Invest. 11: 3-14 (1999); S. Kennedy et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus"J. Comp. Pathol. 122: 9-24 (2000); S. Krakowka et al., 2001, supra ; S. Krakowka et al., 2000, supra ; R. M. Pogranichnyy et al., "Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection, "Viral. Immunol. 13: 143-153 (2000)]. 이들 연구에서 사용된 바이러스 접종 물은 천연 PMWS를 앓는 돼지 또는 PK-15 세포 배양물에서 증식된 바이러스를 갖는 돼지로부터의 조직 균질화액이었다[참조: G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication, "Arch. Virol. 145: 2421- 2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of

cryostat sections and virus isolation, J. Vet. Med. 47: 81-94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus, "J. Comp. Pathol. 121: 1-11 (1999); M. Balaschet al., 1999, supra ; J. Ellis et al., 1999, supra ; S. Kennedy et al., 2000, supra ; S. Krakowka et al., 2001, supra ; S. Krakowka et al., 2000, supra ; R. M. Pogranichnyy et al., 2000, supra]. 조직 균질화액은 PPV 및 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)과 같은 다른 공통의 돼지 병원체를 함유할 수 있고[참조: G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication, "Arch. Virol. 145 : 2421-2429 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus, "J. Comp. Pathol. 121: 1-11 (1999); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, supra ; J. A. Ellis et al., "Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome, "J. Vet. Diagn. Invest. 12: 21-27 (2000); C. Rosellet al., 2000, supra], PCV2 증식에 사용된 ATCC PK-15 세포주가 PCV1로 지속적으로 감염되었기 때문에[참조: G. C. Dulac and A. Afshar, 1989, supra], 상기 연구들에서 재현된 임상 질환 및 병리학적 병소는 오직 PCV2 감염에 기인하는 것이 아닐 수 있다[참조: G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication, "Arch. Virol. 145: 2421-2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation, J. Vet. Med. 47: 81-94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus, "J. Comp. Pathol. 121: 1-11 (1999); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, supra ; J. A. Ellis et al., 2000, supra].

[0018] 임상적 PMWS는 미코플라즈마 히오뉴모니아(*Mycoplasma hyopneumoniae*)으로 백신처리된 PCV2-접종된 CDCD 돼지에서도 재현되었다[참조: G. M. Allan et al., "Immunostimulation, PCV- 2 and PMWS, "Vet. Rec. 147: 171-172 (2000)]. 문헌[참조: G. M. Allan et al., "Neonatal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae* and postweaning multisystemic wasting syndrome: a field trial, "Pig J. 48: 34-41 (2001)] 및 문헌[참조: S. C. Kyriakis et al., "The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome, "J. Comp. Pathol. 126: 38-46 (2002)]에 의한 최근의 두 현장 연구는 풍토병 집단에서의 PMWS의 발병에 미치는 미코플라즈마 히오뉴모니아 백신에 의한 면역-조절의 효과를 시험하여, 백신처리된 동물에 비해서 백신처리되지 않은 그룹에서 PMWS 사례가 현저하게 감소하였음을 제시하였다. 그러나, 조절된 실험실 조건하에 통상의 SPF 돼지를 사용한 또 다른 최근의 연구는 이러한 효과를 재현할 수 없었으며, 이는 미코플라즈마 히오뉴모니아에 의한 백신처리가 잠재적으로 임상적 PMWS의 발병에 영향을 미칠 수 있으나, 명백히 PCV2 감염에 대해 2차적 역할을 함을 제시한다. 그럼에도 불구하고, 이러한 연구 및 다른 연구를 토대로 하여, PCV2는 PMWS의 1차 병원체인 한 유일한 병원체는 아닌 것으로 고려된다.

[0019] 생물학적으로 순수한 형태의 PCV2의 감염성 바이러스 스톱의 결여는 PMWS에서의 PCV2 발병기전과 PCV2의 병인학적 역할에 대한 이해를 방해하였다. PPV 및 가능하게는 PRRSV에 대한 백신처리는 PCV2 감염된 돼지에서 PMWS의 발병을 예방하는 것으로 일관되게 보여주지 못했다. 따라서, 특이적으로 PMWS를 표적으로 하는 안전하지만 강력한 백신을 발견하는 것은 곤란하였다. 수의학 분야에는 PCV2 및 PMWS에 대한 효과적이고 안전한 백신을 제조하고자 하는 분야에서 인정된 명확한 요구가 있다.

[0020] 미국 특허 제6,287,856호[참조: Poet et al.] 및 WO 99/45956는 조류 종에 감염되는 서코바이러스인 부리 및 깃털 질병 바이러스(PBFDV), 및 돼지 서코바이러스(PCV)로부터의 핵산에 관한 것이다. 상기 특허는 나출형 DNA 또는 mRNA를 포함하는 백신 조성물을 제안하고 있으며, 당해 서열의 핵산에 기능적으로 연결된 사람 사이토메갈로바이러스 즉시 또는 초기 유전자 인핸서 또는 프로모터로부터 유래된 시스(cis)-작용 전사 또는 해독 조절 서열을 포함하는, 진행 세포내에서의 PCV의 일시적 발현을 위한 핵산 벡터를 기술하고 있다. 그러나, PCV DNA가 PK-15 세포주로부터만 유도되기 때문에, PCV DNA는 약 30년 전에 티셔 등[참조: I. Tischer et al., 1974, supra]에 의해 발견된 비병원성 PCV1을 포함할 수 있으므로 PCV2 또는 PCV2에 의해 유발되는 감염에 대한 면역 반응을 유도하는데 있어서 효과적이지 않을 수 있다. 개방 판독 프레임을 포함하는 벡터로부터 제조된 재조합 단백질의 서브유닛 백신도 상기 특허에 제안되어 있으나, PCV로부터의 개방 판독 프레임은 잘 특성화되지 않거나 서로 구별되지 않는다. PCV DNA의 공급원이 PK-15 세포이기 때문에, PCV1으로부터의 개방 판독 프레임을 포

합하는 이러한 벡터로부터 제조된 단백질은 PCV2에 대한 신뢰할만한 면역원성 특성을 지니지 않을 것이다.

[0021] 미국 특허 제6,217, 883호(Allan et al.) 및 프랑스 특허 제2,781,159B호는 캐나다, 캘리포니아주 및 프랑스(Brittany)에서 PMWS로 감염된 돼지로부터 취한 폐 또는 신경절 샘플로부터의 5가지 PCV 균주의 분리 및 면역원성 조성물 중의 하나 이상의 돼지 파르보바이러스 항원과의 배합물에서의 이의 용도에 관한 것이다. ORF1 내지 ORF13으로 이루어진 PCV2 개방 관독 프레임(ORF)에 의해 암호화되는 단백질은 상기 특허에 광범위하게 기술되어 있으나, 면역원성 특성을 나타내는 임의의 특정 단백질에 대한 예시는 없다. 상기 특허는 선형 DNA 분자인 DNA 플라스미드로 이루어진 벡터 및 PCV 항원을 암호화하는 핵산 분자를 함유하고 이를 생체내에서 발현시키는 제조합 바이러스를 추가로 기술하고 있다. 몇몇 다른 참조문헌, 예를 들어, 미국 특허 제6,391,314 B1호; 미국 특허 제6,368,601 B1호; 프랑스 특허 제2,769,321호; 프랑스 특허 제2,769,322호; WO 01/96377 A2; WO 00/01409; WO 99/18214; WO 00/77216 A2; WO 01/16330 A2; WO 99/29871 등에도 PCV1 또는 PCV2 폴리펩타이드 또는 각종 균주의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 투여가 기재되어 있다.

[0022] 그러나, 비병원성 PCV1은 PCV2 감염에 대해 유용하지 않을 수 있으며, 당해 분야에 기술된 병원성 PCV2 균주는 약독화될지라도, 생 바이러스가 이의 독성 상태로 복귀하는 통상적 경향으로 인해 그 유용성이 제한될 수 있다. 따라서, 당해 분야에서는 동물용 백신으로서 효과적이고 안전한, PCV2에 의해 유발되는 중증 감염 또는 PMWS에 대한 돼지의 접종을 위한 살아있는 감염성의 비병원성 항원이 여전히 지속적으로 요구되고 있다. 이러한 목적은 약 30년전에 티체르 등에 의해 분리된 비병원성 PCV1의 계놈 골격에 기초하는, 본원에서 기술하는 신규한 살아있는 키메라 돼지 서코바이러스의 작제에 의해 달성된다. 본 발명의 신규한 키메라 돼지 서코바이러스는 PCV1의 비병원성 표현형은 고유하고 유리하게 유지시키지만 병원성 PCV2에 대한 특이적 면역 반응을 유도함으로써 장기간 지속된 요구를 충족시킬 수 있다.

[0023] 발명의 요약

[0024] 본 발명은 돼지 서코바이러스(PCV)의 감염성 키메라 DNA 클론 및 백신으로서 유용한, 상기 DNA 클론으로부터 유래된 키메라 생 바이러스에 관한 것이다. 유전학적으로 비독성인 신규한 키메라 생 바이러스는, 병원성 PCV2 균주의 면역원성 유전자가 전형적으로 동일한 상응하는 위치에서 PCV1의 유전자를 대체하는 비병원성 PCV1 계놈 구조로부터 제조된다. 본 발명은 본원에서 기술하는 신규한 제조합 핵산 분자를 함유하는 생물학적 기능성 플라스미드 및 바이러스 벡터 등, 당해 DNA를 포함하는 벡터로 형질감염된 적합한 숙주 세포 및 면역원성 폴리펩타이드 발현 생성물을 포함한다. 본 발명의 범주에는 또한 PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군으로부터의 보호가 필요한 돼지에게 예를 들어, 플라스미드내의 클로닝된 키메라 DNA, 상기 키메라 DNA로부터 유래된 키메라 바이러스, 본원에서 기술하는 DNA로부터 발현된 폴리펩타이드 생성물 등을 포함하는 백신의 면역학적 유효량을 투여함을 포함하여, PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)으로부터 돼지를 보호하는 방법이 포함된다. 본 발명은 신규한 비독성 바이러스 백신을 수득하거나 특성화하는데 있어 실험 모델로서의 용도를 제공하는, 신규한 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론 및 PCV의 역 키메라 DNA 클론을 추가로 제공한다.

[0025] 도면의 간단한 설명

[0026] 발명의 배경 및 당해 분야와 이의 차이점은 첨부된 도면을 참고로 하여 하기에서 추가로 설명될 것이다.

[0027] 도 1은 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론의 작제를 나타낸 것이다. 완전한 PCV2 계놈을 증폭시키는데 사용된 프라이머 쌍의 상대적 위치는 화살표로 표시한다(역방향 프라이머 PCVSAC2, 정방향 프라이머 PCVSAC2). PCR로 증폭된 PCV2 계놈 DNA는 SacII 제한 효소로 분해시키고 정제한다. 정제되고 SacII로 분해된 계놈 DNA를 연결시켜 콘카터머(concatamer)를 형성시킨다. 연결된 콘카터머를 겔 전기영동으로 분리시키고, PCV2의 직렬(tandem) 계놈 이량체를 정제하고, SacII 효소로 미리 분해시킨 pSK 벡터내로 클로닝시켜 PCV2 분자성 DNA 클론을 제조한다.

[0028] 도 2A 및 2B는 클로닝된 PCV2 플라스미드 DNA가 시험관내에서 PK-15 세포내로 형질감염된 경우에 감염성임을 설명하는 것이다. 도 2A는 클로닝된 PCV2 플라스미드 DNA로 형질감염된 PK-15 세포에서 면역형광 검정(IFA)에 의한 PCV2의 검출을 나타낸 것이다. PCV2 항원의 강한 면역표지화는 형질감염된 세포의 핵에서 가시화되며, 보다 적은 정도로 세포질에서 가시화된다. 도 2B는 모의로 형질감염된(mock-transfected) PK-15 세포를 나타낸 것이다.

[0029] 도 3A는 21 DPI에서 림프계내 경로에 의해 PCV2 DNA로 접종된 돼지로부터의 폐를 나타낸 것이다. 상기 폐는 고무질이고 허탈(虛脫)되지 못하고 황적색 반점이 있다. 기관기관지 림프절은 현저하게 비대해지며 황색이다(하

살표). 도 3B는 대조군 돼지로부터의 정상 폐의 현미경 절편(25X)을 나타낸 것이다. 도 3C는 도 3A의 돼지로부터의 폐의 현미경 절편을 나타낸 것이다. 세기관지주위 림프조직구성 염증(peribronchiolar lymphohistiocytic inflammation) 및 경미한 괴사성 세기관지염이 주지된다(25X). 도 3D는 도 3A의 폐의 면역조직화학 염색을 도시한 것이다. 대식세포내의 PCV2 항원(화살표) 및 기도 주위의 섬유모세포-유사 세포(화살촉)가 주지된다(64X).

[0030] 도 4A는 대조군 돼지로부터의 정상 림프절을 나타낸 것이다. 명확히 한정된 림프소포(화살표)가 주지된다(25X). 도 4B는 21일 전에 림프계내 경로에 의해 클로닝된 PCV2 게놈 DNA로 접종시킨 도 3A의 돼지로부터의 세기관지 림프절의 현미경 절편이다. 림프소포는 명확히 한정되지 않으며, 경미한 내지 중간 정도의 림프구 고갈 및 경미한 다발성 육아종 염증이 있다(25X). 도 4C는 하나의 소포에 초점을 맞추어 배율을 증가시킨 도 4B의 림프절의 현미경 절편이다. 소포성 림프구를 대체하는 대식세포 및 거대세포를 갖는 명확히 한정되지 않은 소포(화살표)가 주지된다. 도 4D는 상기 소포내의 대식세포(화살표) 및 거대세포(작은 화살촉), 및 수지상-유사 세포(큰 화살촉)에서 도 4B와 동일한 림프절내의 PCV2 항원의 면역조직화학 검출을 설명한 것이다(64X).

[0031] 도 5는 병원성 PCV2의 면역원성 ORF2 캡시드 유전자를 보유한 비병원성 PCV1 게놈을 갖는 키메라 PCV1-2(PCV1/PCV2) DNA 클론의 작제를 설명한 것이다. 이량체화된 DNA 클론은 PCV2의 ORF2 단백질을 발현하는 키메라 생 바이러스를 생산하기 위한 PK-15 세포의 시험관내 형질감염 및 활성을 확인하기 위한 생체내 동물 실험용으로 사용된다.

[0032] 도 6은 감염성 PCV1, PCV2, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 분자성 DNA 클론의 작제 및 구성을 나타낸다. PCV2 DNA 클론은 이미 기술된 일반적 방법[참조: M. Fenaux et al., 2002, supra]을 이용하여 2개의 전체 길이 선형 PCV2 게놈을 Bluescript SK 벡터(pSK)내로 직렬로 연결시켜 작제한다. PCV1 DNA 클론은 2개의 전체 길이 선형 PCV1 게놈을 pSK 벡터내로 직렬로 연결시켜 작제한다. 키메라 PCV1-2 DNA 클론은 pSK 벡터내의 비병원성 PCV1 게놈 골격내에 PCV1의 ORF2 캡시드 유전자를 PCV2의 ORF2 캡시드 유전자로 대체시켜 작제한다. 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론은 pSK 벡터내의 병원성 PCV2 게놈 골격내에서 병원성 PCV2의 ORF2 캡시드 유전자를 비병원성 PCV1의 ORF2 캡시드 유전자로 대체시켜 작제한다. 두 키메라 클론은 모두 pSK 벡터내에서 이량체이다. 화살표는 접종된 동물내의 PCV1, PCV2, PCV1-2 및 PCV2-1 바이러스혈증 검출을 위한 PCR 프라이머의 상대적 위치를 나타낸다.

[0033] 도 7A 내지 7J는 PCV1, PCV2, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론이 시험관내에서 PK-15 세포에 형질감염될 경우에 감염성이며 각각의 바이러스 항원을 발현함을 입증한다. 좌측 패널(7A, 7C, 7E, 7G 및 7I)은 PCV1 ORF2에 대한 모노클로날 항체로 염색된다. 우측 패널(7B, 7D, 7F, 7H 및 7J)은 PCV2에 대한 항체로 염색된다. 패널 7A 및 7B는 모의로 형질감염된 PK-15 세포이다. 패널 7C 및 7D는 PCV1 DNA 클론으로 형질감염된 PK-15 세포이다. 패널 7E 및 7F는 PCV2 DNA 클론으로 형질감염된 PK-15 세포이다. 패널 7G 및 7H는 키메라 PCV1-2 DNA 클론으로 형질감염된 PK-15 세포이다. 패널 7I 및 7J는 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론으로 형질감염된 PK-15 세포이다.

[0034] 도 8은 클로닝된 PCV2 분자 DNA의 전체길이 DNA 서열(이는 서열번호 1에 상응한다)을 나타낸다.

[0035] 도 9는 클로닝된 키메라 PCV1-2 DNA의 전체길이 DNA 서열(이는 서열번호 2에 상응한다)을 나타낸다.

[0036] 도 10은 클로닝된 키메라 PCV1-2 DNA의 면역원성 ORF2 캡시드 유전자의 DNA 서열(이는 서열번호 3에 상응한다)을 나타낸다.

[0037] 도 11은 키메라 PCV1-2 DNA의 면역원성 ORF2 캡시드 유전자의 해독된 추정상 아미노산(이는 서열번호 4에 상응한다)을 나타낸다.

[0038] 발명의 상세한 설명

[0039] 본 발명에 따라서, 돼지 서코바이러스(PCV)의 감염성의 분자성 핵산 분자 및 키메라 핵산 분자, 상기 키메라 핵산 유전자로부터 생산된 키메라 생 바이러스 및 PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)로부터 돼지를 보호하기 위한 동물용 백신이 제공된다. 본 발명은 백신으로서 사용될 수 있는 면역원성 폴리펩타이드 발현 생성물을 추가로 제공한다.

[0040] PCV의 신규한 비독성의 감염성 키메라 DNA 분자(PCV1-2)는 PCV1 게놈내에 ORF 유전자 대신에 병원성 PCV2의 면역원성 개방 관독 프레임(ORF) 유전자를 함유하는, 감염성의 비병원성 PCV1를 암호화하는 핵산 분자를 포함하다. 감염성의 키메라 PCV1-2 DNA 클론은 바람직하게는 감염성의 비병원성 PCV1 DNA 클론의 게놈 골격내

에 클로닝된 PCV2 DNA의 면역원성 캡시드 유전자(ORF2)를 함유한다. 일반적으로, PCV2 DNA의 캡시드 유전자가 비병원성 PCV1 계통 구조내에서 PCV1 DNA의 ORF2 유전자를 대신하지만, 다른 비독성 또는 약독화된 키메라 DNA 클론을 수득하기 위해 유전 공학을 통해 다양한 위치적 과돌연변이가 작제될 수 있는 것으로 고려된다. PCV1과 PCV2 간의 역 키메라 감염성 PCV2-1 DNA 클론은 본 발명의 키메라 PCV1-2 클론을 분석하기 위한 대조군으로서 기술되며, 병원성 PCV2 감염성 DNA 클론의 골격내에서 PCV2의 캡시드 유전자를 PCV1의 캡시드 유전자로 대체함으로써 작제한다. 실험 모델이 되는 것 이외에도, 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론은 특수하게 맞춤형 백신을 제조하는데 있어 용도를 제공할 수 있다.

[0041] 본원에서 기술된 PCV2의 클로닝된 계통 DNA는 PK-15 세포내로 형질감염되어 돼지에게 제공되는 경우 시험관내 및 생체내에서 감염성인 것으로 나타난다. 감염성 PCV2 DNA 클론은 돼지에서 PMWS의 특징적인 병리학적 병소를 생성시켜, 임상 질환의 개선된 특징분석 및 조직 세포내의 바이러스 분포의 이해를 가능하게 한다. 이러한 신규한, 즉시 재현가능한 병원체는 그 자체로 돼지에서 PMWS를 예방하기 위한 적합한 백신처리 프로그램의 개발을 유도한다.

[0042] 신규한 키메라 PCV1-2 DNA 클론은 또한 PK-15 세포의 시험관내 형질감염 및 돼지에게의 생체내 투여 둘다에 의해서도 감염성이다. 형질감염된 PK-15 세포에서, 키메라 PCV1-2 DNA 클론은 PCV2 캡시드 항원(PCV2의 면역원성 캡시드 단백질)을 발현하는 반면에, 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론은 PCV1 캡시드 항원을 발현하며, 이는 PCV1 또는 PCV2 캡시드 항원에 특이적인 항체를 사용한 면역형광 검정(IFA)으로 입증된다. PCV2-특이적 항체로의 혈청 전환은 감염성 PCV2 클론 뿐만 아니라 키메라 PCV1-2 클론으로 접종된 돼지에서 검출된다. PCV2-특이적 항체로의 혈청전환의 검출은, 키메라 PCV1-2 DNA 클론이 감염된 돼지에서 PCV2-특이적 항체를 유도함으로써 접종된 돼지를 PCV2 감염으로부터 보호하도록 작용한다는 사실을 확립시킨다.

[0043] 하기 실시예는 접종된 돼지에서 키메라 DNA 클론의 면역원성 및 병원성에 대한 평가를 보다 상세히 기술한다. 기본적으로, PCV2 ORF2 항원에 대한 항체로의 혈청전환은 PCV2 DNA 클론으로 접종된 돼지(그룹 3) 및 키메라 PCV1-2 DNA 클론으로 접종된 돼지(그룹 4)에서 검출된다. PCV1 클론 및 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론(각각 그룹 2 및 5)으로 접종된 모든 돼지들은 PCV1 항체로 혈청전환된다. 각 그룹의 선택된 돼지로부터 회수된 바이러스를 부분적으로 서열분석한 결과, 당해 접종시에 사용된 진정한 각각의 감염성 DNA 클론인 것으로 확인된다. PCV2 DNA 클론으로 접종된 동물의 다양한 조직내의 육안적 및 현미경적 병소는 PCV1, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론으로 접종된 돼지에서 발견된 병소들에 비해 현저하게 보다 중증이다.

[0044] 놀랍고도 유리하게도, 비병원성 PCV1 계통 골격내로 클로닝된 병원성 PCV2의 면역원성 캡시드 유전자(ORF2)를 갖는 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론은 병원성 PCV2 캡시드 항원에 대한 특이적 항체 반응을 유도하는 한편, 돼지에서 PCV1의 비병원성 성질을 고유하게 유지한다. 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론으로 접종된 동물은 PCV1이 접종된 동물과 유사한 경미한 감염을 나타내는 한편, 병원성 PCV2의 ORF2 캡시드 단백질에 대한 항체로 혈청전환된다. PCV1 및 키메라 PCV1-2가 접종된 동물에서 관찰된 바이러스혈증의 평균 기간은, 약 2.12주인 병원성 PCV2 접종된 동물에서의 기간보다 짧은, 각각 0.625주 및 1주이다. 일부 접종된 동물에서 검출가능한 키메라 PCV1-2 바이러스혈증의 결여는 PCV1-2 접종된 돼지(그룹 4)에서 PCV2 ORF2 캡시드 단백질에 대한 항체로의 혈청전환에 영향을 미치지 않는다. 이러한 결과는, 키메라 PCV1-2 바이러스혈증이 일부 접종된 동물에서 보다 짧거나 검출될 수 없더라도, 키메라 PCV1-2 바이러스가 PCV2 ORF2 캡시드 단백질에 대한 항체 반응을 유도할 수 있음을 나타낸다. 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론이 병원성 PCV2 면역원성 ORF 2 캡시드 단백질에 특이적인 면역반응을 유도하나 돼지에 대해서 비병원성을 유지하는 능력은 키메라 PCV1-2 클론을 유전자 조작된 약독화된 생 백신 및 기타 종류의 백신으로서 특히 유용하게 만든다.

[0045] 본 발명의 신규한 정제 및 분리된 핵산 분자는 도 9에 제시하고 특허 기탁 번호 제PTA-3912호하에 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)에 기탁한, 서열번호 2에 제시한 클로닝된 키메라 PCV1-2 DNA의 전체길이 DNA 서열 및 이의 상보적 쇄(즉, 반대되는 다른 한쪽의 염기 쌍) 또는 상기 키메라 뉴클레오타이드 서열과 95% 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열(즉, 전체 유전자의 실질적으로 활성인 부분)을 포함한다. 당해 분야에 익히 공지된 종래의 방법을 사용하여, 예를 들어, 당해 분야에 인정된 표준 또는 높은 엄격성(stringency) 하이브리드화 기술을 사용함으로써 높은 상동성을 지니는 상보적 쇄 또는 뉴클레오타이드 서열을 제조할 수 있다. 또한, 클로닝된 키메라 PCV1-2 DNA의 면역원성 캡시드 유전자의 DNA 서열을 포함하는 정제 및 분리된 핵산 분자를 서열번호 3 및 도 10에 제시한다.

[0046] 키메라 핵산 분자를 함유하는 적합한 세포는 고유하게, 살아있는 감염성 키메라 돼지 서코바이러스를 생산한다. 이러한 살아있는 감염성 키메라 바이러스는 본원에서 설명하는 바와 같은 시험관내 및 생체내 형질감염을 통해

PK-15 세포를 형질감염시킴으로써 키메라 DNA 클론으로부터 유도한다. 클로닝된 키메라 PCV1-2 DNA의 바람직한 예는 서열번호 2 및 도 9에 제시한 뉴클레오타이드 서열이다. 본 발명에서는 키메라 바이러스가 상보적 채 또는 키메라 뉴클레오타이드 서열과 95% 이상의 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열로부터 유래되는 것으로 추가로 고려하고 있다.

[0047] 본 발명의 범주내에는 본원에서 기술하는 신규한 재조합 핵산 분자를 함유하는 생물학적 기능성 플라스미드 및 바이러스 벡터 등, 키메라 DNA 클론 및 분자성 DNA 클론을 포함하는 벡터로 형질감염된 적합한 숙주 세포 및 면역원성 폴리펩타이드 발현 생성물이 또한 포함된다. 특히 바람직한 면역원성 단백질은 서열번호 4 및 도 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 이의 생물학적 활성 변이체도 본 발명에 추가로 포함된다. 당해 분야의 숙련가는 과도한 노력없이 폴리펩타이드 서열로부터의 아미노산 서열(들)을 변형, 치환, 결실시켜, 모 서열과 동일하거나 실질적으로 동일한 활성을 유지하는 생물학적 활성 변이체를 제조하는 방법을 알고 있을 것이다.

[0048] 본 발명의 면역원성 폴리펩타이드 생성물을 제조하기 위해, 당해 방법은 다음 단계들을 포함할 수 있다: 적합한 영양 조건하에 본원에서 기술하는 신규한 재조합 핵산 분자로 형질감염된 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 상기 폴리펩타이드 생성물을 발현하도록 성장시키는 단계 및 상기 핵산 분자에 의해 발현된 목적하는 폴리펩타이드 생성물을 당해 분야에 공지된 표준 방법으로 분리시키는 단계. 면역원성 단백질은 예를 들어, 생화학적 합성 등과 같은 기타 기술로 제조할 수 있는 것으로 고려된다.

[0049] 키메라 바이러스성 및 분자성 DNA 클론의 백신 및 이를 이용하는 방법도 본 발명의 범주내에 포함된다. 접종된 돼지는 PCV2에 의해 유발되는 중증 바이러스 감염 및 PMWS로부터 보호된다. 신규한 방법은 바이러스 감염 또는 PMWS로부터의 보호가 필요한 돼지에게 본 발명에 따른 백신, 예를 들어, 면역학적 유효량의 키메라 PCV1-2 DNA, 클로닝된 키메라 바이러스, PCV1-2의 키메라 DNA를 함유하는 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 폴리펩타이드 발현 생성물, 재조합 PCV2 DNA 등을 포함하는 백신의 면역학적 유효량을 투여함으로써 상기 돼지를 보호한다. PRRSV, PPV, 기타 감염성 돼지 병원체 및 면역 자극제와 같은 기타 항원을 동시에 돼지에게 투여하여, 바이러스 감염에 대한 광범위한 보호 스펙트럼을 제공할 수 있다.

[0050] 백신은, 예를 들어, 감염성 키메라 PCV1-2 DNA, pSK 벡터와 같은 적합한 벡터 또는 플라스미드내에 클로닝된 PCV 키메라 DNA 게놈, 비독성 키메라 생 바이러스, 불활성화된 키메라 바이러스 등과 함께 비독성의 생리학적으로 허용되는 담체 및 임의로 하나 이상의 보조제를 포함한다. 당해 백신은 또한 본원에서 기술하는 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론을 포함할 수도 있다. 감염성 키메라 PCV1-2 DNA, 감염성 키메라 바이러스 게놈을 함유하는 플라스미드 DNA 및 키메라 생 바이러스가 바람직하고, 키메라 생 바이러스가 보다 바람직하다. 본 발명의 비독성 생 바이러스 백신은 독성 상태로 돌아갈 위험이 있는 약독화된 생 바이러스 또는 바이러스 질환으로부터 보호하기에 충분한 항체 면역반응을 유도할 수 없는 치사된 세포 배양물 증식된 전체 바이러스를 사용하는 종래의 바이러스 백신에 비해서 많은 잇점을 제공한다.

[0051] 본 발명의 백신과 함께 투여될 수 있는 보조제는 백신에 대한 돼지의 면역학적 반응을 증가시키는 물질이다. 보조제는 백신과 동시에 동일한 부위에 투여될 수 있거나, 예를 들어, 부스터로서 상이한 시간에 투여될 수 있다. 보조제는 또한 백신이 투여되는 방식 또는 부위와 상이한 방식으로 또는 상이한 부위에 유리하게 투여될 수 있다. 적합한 보조제로는 수산화알루미늄(alum), 면역자극 복합체(ISCOMS), 비이온성 블록 중합체 또는 공중합체, 사이토킨(IL-1, IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 등), 사포닌, 모노포스포릴 리피드 A(MLA) 및 무라밀 디펩타이드(MDP) 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 다른 적합한 보조제로는 예를 들어, 황산칼륨알루미늄, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터 분리된 열-불안정성 또는 열-안정성 내독소, 콜레라 독소 또는 이의 B 서브유닛, 디프테리아 독소, 파상풍 독소, 백일해 독소, 프로인트 불완전 또는 완전 보조제 등이 포함된다. 독소계 보조제, 예를 들어, 디프테리아 독소, 파상풍 독소 및 백일해 독소는 예를 들어, 포름알데히드로 처리하여 사용 전에 불활성화시킬 수 있다.

[0052] 백신은 감염성 키메라 PCV DNA 클론의 면역학적 활성을 촉진시키는 추가의 항원, 예를 들어, 돼지 생식기 및 호흡기 중후군 바이러스(PRRSV), 돼지 파르보바이러스(PPV), 기타 감염성 돼지 병원체 및 면역 자극제를 추가로 함유할 수 있다.

[0053] 본 발명의 신규 백신은 임의의 특정한 제조 유형 또는 방법에 제한되지 않는다. 클로닝된 바이러스 백신에는 감염성 DNA 백신(즉, DNA를 돼지에게 직접 주사하기 위해 플라스미드, 벡터 또는 기타 통상의 담체를 사용한 백신), 생 백신, 변형된 생 백신, 불활성화된 백신, 서브유닛 백신, 약독화된 백신, 유전자 조작된 백신 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 이들 백신은 당해 분야에 공지된 표준 방법으로 제조한다.

- [0054] 생 바이러스 백신은 일반적으로, 전신계적, 국소적, 체액성 및 세포-매개된 반응을 포함하는 모든 가능한 면역 반응이 백신 수용자에서 활성화되는 가장 바람직한 백신이다. 반면에, 사백신은 체액성 면역반응만을 유도할 수 있다. 그러나, 가장 바람직함에도 불구하고 생 바이러스 백신은 우발적 생 바이러스 병원체로 오염될 수 있는 잠재적 위험 또는 바이러스가 현장에서 병원성으로 복귀할 수 있는 위험과 같은 몇가지 단점을 갖는다. 주목할 만하게도, 본 발명의 고유한 PCV1-2 키메라 DNA는 이러한 단점을 해결한다. 병원성 PCV2의 면역원성 유전자만을 이용하여, 키메라 DNA로, 비병원성이지만 병원성 PCV2 바이러스에 대한 생 바이러스 백신의 완전한 유리한 면역반응을 유도하는 살아있는 복제 키메라 바이러스를 작제한다. 이러한 키메라 바이러스에 기초하는 생 바이러스 백신은 병원성 표현형으로 복귀될 가능성이 거의 없을 것이다. 따라서, 비병원성 PCV1의 구조에 기초하는 신규한 키메라 바이러스는 임의의 재조합 PCV2 DNA 바이러스, 임의의 약독화된 생 PCV2 바이러스 또는 PCV2 감염에 대한 면역을 위한 PCV2에만 기초하는 임의의 기타 유형의 백신보다 큰 잇점을 갖는다.
- [0055] 생 바이러스 백신이 가장 바람직하다 해도, 다른 유형의 백신을 사용하여 돼지를 신규한 키메라 바이러스 및 본원에서 기술하는 다른 항원으로 접종할 수 있다. 불활성화된 바이러스 백신을 제조하기 위해, 예를 들어, 당해 분야에 공지되어 있거나 본원에서 기술하는 방법을 사용하여 감염성 DNA 클론으로부터 바이러스를 증식시킨다. 이어서, 일련의 바이러스 불활성화를 당해 분야의 숙련가에게 일반적으로 공지된 프로토콜을 이용하여 최적화시킨다.
- [0056] 불활성화된 바이러스 백신은 클로닝된 PCV DNA로부터 유래된 키메라 바이러스를 불활성화제, 예를 들어, 포르말린 또는 소수성 용매, 산 등으로 처리하거나, 자외선 또는 X-선을 조사하거나, 가열함으로써 제조할 수 있다. 불활성화는 당해 분야에서 이해되고 있는 방식으로 수행한다. 예를 들어, 화학적 불활성화시에는, 적합한 바이러스 샘플 또는 바이러스를 함유하는 혈청 샘플을 충분한 시간 동안 충분히 높은(또는 낮은, 불활성화제에 따라) 온도 또는 pH에서 충분한 양 또는 농도의 불활성화제로 처리하여 바이러스를 불활성화시킨다. 가열에 의한 불활성화는 바이러스를 불활성화시키기에 충분한 온도에서 불활성화시키기에 충분한 시간 동안 수행한다. 조사에 의한 불활성화는 바이러스를 불활성화시키기에 충분한 시간 동안 광선의 과장 또는 기타 에너지를 사용하여 수행한다. 바이러스는 감염되기 쉬운 세포를 감염시킬 수 없을 경우에 불활성화된 것으로 고려한다.
- [0057] 서브유닛 백신의 제조는 전형적으로 변형된 생 백신 또는 불활성화된 백신의 제조와는 상이하다. 서브유닛 백신을 제조하기 전에, 백신의 보호성 성분 또는 항원성 성분을 확인해야 한다. 이러한 보호성 또는 항원성 성분은 돼지에서 강한 보호 또는 면역학적 반응을 유발시키는 바이러스 캡시드 단백질의 특정 아미노산 분절 또는 단편; 단일 또는 다중 바이러스 캡시드 단백질 자체, 이의 올리고머 및 바이러스 하부구조 또는 이러한 하부구조의 확인가능한 일부분 또는 단위를 형성시키는 바이러스 캡시드 단백질의 고차 연관; 바이러스의 표면 상에 또는 이의 주변에 또는 바이러스 구조내에 존재하는 올리고글리코시드, 당지질 또는 당단백질, 예를 들어, 바이러스와 관련된 당단백질 또는 지질 그룹 등이 포함된다. 바람직하게는, ORF2 유전자에 의해 암호화되는 단백질과 같은 캡시드 단백질은 서브유닛 백신의 항원성 성분으로서 사용한다. 감염성 DNA 클론에 의해 암호화되는 다른 단백질을 사용할 수도 있다. 이러한 면역원성 성분은 당해 분야에 공지된 방법으로 용이하게 확인된다. 일단 확인되면, 바이러스의 보호성 또는 항원성 부분(즉, "서브유닛")을 당해 분야에 공지된 방법으로 후속적으로 정제 및/또는 클로닝한다. 서브유닛 백신은 서브유닛, 예를 들어, 바이러스의 고도로 정제된 서브유닛이 전체 바이러스에 비해 덜 독성이기 때문에 생 바이러스에 기초한 다른 백신에 비해 유리한 잇점을 제공한다.
- [0058] 서브유닛 백신이 재조합 유전자 기술을 통해 제조된 경우, ORF2 (캡시드) 유전자와 같은 클로닝된 서브유닛의 발현은 예를 들어, 당해 분야에 공지된 방법[참조: Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, "Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, MA., 1989]을 이용하여 최적화시킨다. 사용된 서브유닛이 전체 캡시드 단백질과 같은 바이러스의 완전한 구조적 특징을 대표한다면, 서브유닛을 바이러스로부터 분리시키는 과정을 최적화시켜야 한다. 또 다른 경우에는, 불활성화 프로토콜을 최적화시킨 후에 서브유닛 정제 프로토콜을 제조 전에 최적화시킬 수 있다.
- [0059] 병원성 클론으로부터 약독화된 백신을 제조하기 위해, 살아있는 병원성 PCV2인 적합화된 조직 배양물을 먼저 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여, 전형적으로는 세포 배양을 통한 연속적 계대에 의해 약독화(비병원성이 되게 하거나 해롭지 않도록)시킨다. 병원성 클론의 약독화는 유전자 결실 또는 바이러스 생산 유전자 돌연변이에 의해 제조할 수도 있다. 이어서, 약독화된 PCV2 바이러스를 이용하여, 재조합 기술을 통해 PCV1의 비병원성 표현형을 유지하지만 PCV2 계놈으로부터 선택된 면역원성 특성의 강도는 상이할 수 있는 추가의 키메라 PCV1-2를 작제할 수 있다.
- [0060] 가장 바람직한 백신은 생 키메라 바이러스성 DNA 클론, 특히 비병원성 PCV1의 골격내에 클로닝된 PCV2의 면역원

성 유전자를 함유하는 클론을 사용한다. 유리하게는, 유전 공학을 통해 작제된 경우에 천연적으로 비독성인 키메라 생 바이러스는 시간 소모적인 약독화 과정을 요구하지 않는다. 바이러스는, 바이러스 복제 동안 PCV2에 대한 면역원성 단백질을 생산하고 이어서 병원성 PCV2에 대한 완전한 범위의 면역반응을 유도할 수 있는, 살아 있지만 비병원성인 복제 바이러스로서 고유하게 작용한다.

[0061] 추가의 잇점으로서, 본 발명의 바람직한 키메라 생 바이러스는 다른 유형의 약독화된 백신보다 제조, 저장 및 운반하기가 용이한, 유전학적으로 안정한 백신을 제공한다. 키메라 바이러스에 기초한 비독성 또는 약독화된 백신은 일반적으로 종래방식으로 변형된 생 백신보다 안전하진 않다해도 이와 유사한 정도로 안전한 것으로 고려된다[참조: J. Arroyo et al., "Molecular basis for attenuation of neurovirulence of a yellow fever Virus/Japanese encephalitis virus chimera vaccine (ChimeriVax-JE), "J. Virol. 75 (2): 934-942 (2001); F. Guirakhoo et al., "Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates, "J. Virol. 74 (12): 5477-5485 (2000); S. Tanget al., "Toward a poliovirus-based simian immunodeficiency virus vaccine: correlation between genetic stability and immunogenicity, "J. Virol. 71 (10): 7841-7850 (1997)]. 예를 들어, YFV17D의 구조 단백질 prM 및 E를 암호화하는 유전자가 약독화된 JEV SA14-14-2 균주의 상응하는 유전자로 대체된 황열 바이러스 백신 YFV17D의 유전자 조작된 유도체인, 일본뇌염 바이러스(JEV)에 대한 ChimeriVax-JE 백신은 시험관내 및 생체내 둘다에서 연장된 계대 후에도 유전학적으로 안정한 것으로 제시되었다[참조: J. Arroyo et al., 2001, supra]. 약독화된 키메라 황열(YF)-뎡기 2형(뎡기-2) 바이러스인, 뎡기 바이러스 2형에 대한 다른 키메라 바이러스 백신 ChimeriVax-D2도 또한 유전학적으로 안정한 것으로 밝혀졌으며, 이의 서열은 Vero 세포내에서 18회의 계대 후에 변화되지 않은 것으로 보고되었다[참조: F. Guirakhoo et al., 2000, supra].

[0062] 본 발명의 또 다른 바람직한 백신은 비병원성 키메라 DNA 클론을 돼지에게 전달하기 위한 적합한 플라스미드를 사용한다. 살아있거나 치사된 세포 배양물 증식된 전체 바이러스를 사용하는 종래의 백신과 대조적으로, 본 발명은 감염성 키메라 바이러스 게놈을 함유하는 플라스미드 DNA의 돼지에게의 직접 접종을 제공한다.

[0063] 본 발명에서 바람직한 추가의 유전자 조작된 백신은 당해 분야에 공지된 기술로 제조한다. 이러한 기술은 재조합 DNA의 추가 조작, 재조합 단백질의 아미노산 서열의 조작 또는 치환 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0064] 재조합 DNA 기술에 기초한 유전자 조작된 백신은 예를 들어, 돼지에서 보다 강력한 면역반응 또는 보호반응을 유도할 수 있는 단백질(예: ORF3, ORF4 등으로부터 유래된 단백질)을 암호화하는 바이러스 유전자의 대안적 부분을 확인함으로써 제조한다. 이러한 확인된 유전자 또는 면역우세 단편은 베를로바이러스 벡터와 같은 표준 단백질 발현 벡터내로 클로닝하여, 적절한 숙주 세포[참조: O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual, "Freeman & Co., 1992]를 감염시키는데 사용할 수 있다. 숙주 세포를 배양하여, 목적하는 정도로 정제할 수 있고 적합한 백신 제품으로 제형화할 수 있는 목적하는 백신 단백질을 발현시킨다.

[0065] 클론이 질병을 유발하는 목적하지 않는 임의의 천연적 능력을 유지하는 경우, 독성의 원인이 되는, 바이러스 게놈내의 뉴클레오타이드 서열의 위치를 정확하게 알아낼 수 있고, 예를 들어, 부위-지시된 돌연변이유발을 통해 비병원성 바이러스를 유전자 조작할 수도 있다. 부위-지시된 돌연변이유발은 하나 이상 뉴클레오타이드를 첨가, 결실 또는 변화시킬 수 있다[참조: Zoller et al., DNA 3:479-488, 1984]. 올리고뉴클레오타이드는 목적하는 돌연변이를 함유하도록 합성하고 일본쇄 바이러스성 DNA의 일부분에 어닐링시킨다. 당해 과정으로부터 초래된 하이브리드 분자를 사용하여 세균을 형질전환시킨다. 이어서, 적절한 돌연변이를 함유하는 분리된 일본쇄 DNA를 사용하여, 이의 제한 단편에 연결시켜 전체 길이 DNA를 생성시킨 다음, 이를 적합한 세포 배양물내로 형질감염시킨다. 게놈은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 표준 기술을 통해 적합한 전달용 벡터에 연결시킬 수 있다. 바이러스 자손 생산을 위해 벡터를 숙주 세포내로 형질감염시키는 것은 칼슘-포스페이트 또는 DEAE-텍스트란 매개된 형질감염, 전기천공, 원형질체 융합 및 기타 익히 공지된 기술과 같은 임의의 통상적 방법을 이용하여 수행할 수 있다[참조: Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, "Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989]. 이어서, 클로닝된 바이러스는 목적하는 돌연변이를 나타낸다. 대안으로, 2개의 올리고뉴클레오타이드를 적절한 돌연변이를 함유하도록 합성할 수 있다. 이를 어닐링시켜, 바이러스성 DNA 내에 삽입되어 전체 길이 DNA를 생산할 수 있는 일본쇄 DNA를 형성시킬 수 있다.

[0066] 백신에서 유용한 유전자 조작된 단백질은 예를 들어, 곤충 세포, 효모 세포 또는 포유동물 세포에서 발현시킬 수 있다. 통상의 방법으로 정제하거나 분리할 수 있는 유전자 조작된 단백질을 돼지에게 직접 접종시켜 PCV2에 의해 유발되는 바이러스 감염 또는 이뮤자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)에 대한 보호를 부여할 수 있다.

[0067] 곤충 세포주(예: HI-FIVE)는 바이러스로부터 수득되었거나 바이러스의 면역우성 단백질 하나 이상을 암호화하는

바이러스 게놈으로부터 복제된 핵산 분자를 함유하는 전달 벡터로 형질전환시킬 수 있다. 전달 벡터로는, 예를 들어, 선형화된 벡로로바이러스성 DNA, 및 목적하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 플라스미드가 포함된다. 제조할 벡로로바이러스를 제조하기 위해, 숙주 세포주를 벡로로바이러스성 DNA 및 플라스미드로 공감염시킬 수 있다.

[0068] 대안으로, 하나 이상의 캡시드 단백질을 암호화하는, PMWS를 앓는 돼지로부터의 DNA, 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론 또는 클로닝된 PCV 키메라 DNA 게놈을 폭스바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 생 벡터내로 삽입시켜 백신으로서 사용할 수 있다.

[0069] 면역학적 유효량의 본 발명의 백신을 바이러스 감염 또는 PMWS로부터의 보호가 필요한 돼지에게 투여한다. 돼지에게 접종되는 면역학적 유효량 또는 면역원성 양은 통상의 시험으로 쉽게 측정하거나 용이하게 역가측정할 수 있다. 유효량은 백신에 대한 충분한 면역학적 반응을 유도하여, PMWS를 유발하는 바이러스에 노출된 돼지를 보호하는 양이다. 바람직하게는, 돼지는 1가지 내지 모든 유해한 생리학적 증상 또는 바이러스 질환의 영향이 현저하게 감소 또는 개선되거나 완전히 예방되는 정도로 보호된다.

[0070] 백신은 단일 투여 또는 반복 투여될 수 있다. 투여량은 예를 들어, 감염성 키메라 DNA 게놈을 함유하는 플라스미드 DNA 1 내지 1,000 μ g(백신의 면역활성 성분의 농도에 따라서)의 범위일 수 있으나, 유해 반응 또는 생리학적 바이러스 감염 증상을 초래하기에 충분한 양의 바이러스계 항원을 함유하지 않아야 한다. 돼지의 체중을 기준으로 하는 활성 항원계의 적합한 투여량, 항원의 농도 및 기타 전형적 요소를 측정하거나 역가측정하기 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 바람직하게는, 감염성 키메라 바이러스성 DNA 클론을 백신으로서 사용하거나, 감염성 키메라 생 바이러스를 시험관내에서 생성시킨 다음, 이러한 키메라 생 바이러스를 백신으로서 사용할 수 있다. 이러한 경우에는, 클로닝된 키메라 PCV DNA 100 내지 200 μ g 또는 50% 조직 배양물 감염량(TCID₅₀) 약 10,000의 키메라 생 바이러스를 돼지에게 투여할 수 있다.

[0071] 바람직하게는, 백신은 PCV 바이러스에 아직 노출되지 않은 돼지에게 투여한다. 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론 또는 이의 기타 항원성 형태를 함유하는 백신은 편의상 비내, 경피(즉, 전신성 흡수를 위해 피부 표면 상에 또는 피부 표면에 적용한다), 비경구 투여할 수 있다. 비경구 투여 경로로는 근육내, 정맥내 및 복강내, 피하내(즉, 피부에 투여하거나 다르게는 피부 아래에 위치시킨다) 경로 등이 포함하나 이에 제한되지 않는다. 감염성 바이러스성 DNA 클론을 사용한 다른 연구에서 근육내 및 피하내 접종 경로가 성공적이었기 때문에[참조: E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," *Virology* 238: 157-160 (1997); L. Willems et al., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," *Virology* 189: 775-777 (1992)], 실용적인 비내 투여경로 이외에도 이들 경로가 가장 바람직하다. 비록 덜 편리하더라도, 백신을 림프계내 접종 경로를 통해 돼지에게 투여하는 것도 고려된다. 매우 바람직한 고유한 투여방법은 PCV1-2 키메라를 함유하는 플라스미드 DNA를 돼지에게 근육내, 피하내, 림프계내로 직접 주사하는 것과 관련된다.

[0072] 액체로서 투여하는 경우, 본 발명의 백신은 수용액, 시럽제, 엘릭서제 및 덩크제 등의 형태로 제조할 수 있다. 이러한 제형은 당해 분야에 공지되어 있고 통상적으로 항원과 다른 전형적 첨가제를 적절한 담체 또는 용매 시스템 속에 용해시켜 제조할 수 있다. 적합한 담체 또는 용매로는 물, 식염수, 에탄올, 에틸렌 글리콜, 글리세롤 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 전형적 첨가제로는 예를 들어, 승인된 염료, 풍미제, 감미제 및 티메로살(나트륨 에틸수은티오살리실레이트)와 같은 항미생물 방부제가 있다. 이러한 용액은 예를 들어, 부분 가수분해된 젤라틴, 솔비톨 또는 설탕 배양 배지를 첨가하여 안정화시킬 수 있으며, 인산수소나트륨, 인산이수소나트륨, 인산수소칼륨, 인산이수소칼륨 및 이들의 혼합물 등과 같은 당해 분야에 공지된 시약을 이용하여 통상의 방법으로 완충시킬 수 있다.

[0073] 액체 제형으로는 현탁화제 또는 유화제와 함께 기타 표준 공제형화제(co-formulant)를 함유하는 현탁액 및 유액이 포함될 수도 있다. 이러한 유형의 액체 제형은 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 현탁액은 예를 들어, 콜로이드 밀을 이용하여 제조할 수 있다. 유액은 예를 들어, 균질화기를 이용하여 제조할 수 있다.

[0074] 체액계내로 주사하기 위해 디자인된 비경구 제형은 상응하는 돼지 체액 수준으로 완충시키는 적절한 등장성 및 pH를 요한다. 등장성은 염화나트륨 및 필요한 기타 염으로 적절하여 조정할 수 있다. 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 적합한 용매를 사용하여 제형 중 성분의 용해도와 액체 제제의 안정성을 증가시킬 수 있다. 본 발명의 백신에서 사용할 수 있는 추가의 첨가제로는 텍스트로즈, 통상의 항산화제 및 통상의 킬레이트제(예: 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA))가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 비경구 투여형태도 사용전에 멸균시켜야

한다.

- [0075] 본 발명의 또 다른 양태는 감염성의 비병원성 PCV1을 암호화하는 핵산 분자의 개방 관독 프레임(ORF) 유전자를 제거하는 단계, 동일 위치를 감염성 병원성 PCV2를 암호화하는 핵산 분자의 번역원성 ORF로 대체시키는 단계 및 키메라 핵산 분자를 회수하는 단계를 포함하여, PCV1-2의 감염성의 비병원성 키메라 핵산 분자를 제조하는 방법과 관련된다. 핵산 분자는 전형적으로 DNA이다. 바람직한 방법은 비병원성 PCV1 DNA의 ORF2 유전자를 본원에서 기술하는 PCV2의 감염성 병원성 분자 DNA의 번역원성 ORF2 캡시드 유전자로 대체시키는 것이다. 본원에서 기술하는 방법에 따라 약독화된 감염성 키메라 DNA 클론을 작제하기 위해 PCV1 및 PCV2 DNA 간에 다른 ORF 위치 또는 이의 번역원성 단편을 교환할 수 있음이 고려된다.
- [0076] 이어서, 제조한 핵산 분자를 사용하여, 유리하게 PCV1의 비병원성 성질을 유지하지만 병원성 PCV2의 번역원성 ORF2 단백질을 발현하고 병원성 PCV2에 대한 완전한 면역반응을 유도하는 본 발명의 살아있는 감염성 복제 키메라 바이러스를 작제한다. 바람직하게는, PCV1-2 DNA 클론은 돼지에서 PCV2 감염 및 PMWS에 대한 유전자 조작된 비독성의 생 백신으로서 작용한다.
- [0077] PCV2의 감염성 DNA 클론을 본원에서 기술한 바와 같이 작제하여, 발병기전 연구 및 비병원성 키메라 백신의 개발을 위해 생물학적으로 순수하고 균질한 감염성 바이러스 스톱을 제조할 수 있다. 임상 질환의 과정, 바이러스 분포 및 PCV 감염과 관련된 병리학적 병소는, 이러한 분자성 DNA 클론, 및 과거에 관찰된 것보다 생물학적으로 순수하고 균질하고 자체로 본 발명의 목적하는 백신 제품의 개발을 유도하는 이러한 분자성 DNA 클론 유래의 감염성 PCV2 바이러스 스톱을 이용하여 보다 명확하게 특성화된다.
- [0078] PCV2 분자 클론은 2개의 완전한 PCV2 게놈 복사체를 pSK 벡터내로 직렬로 연결시켜 제조한다. 당해 분야에 기술된 단일 복사체 게놈과 명확히 대조적으로, 본원에서 기술된 방법으로 제조된 감염성 DNA PCV2 게놈은 직렬 반복부(tandem repeat)로서 함께 연결된 2개의 완전한 PCV2 게놈 복사체를 함유한다. 2개의 게놈 복사체를 직렬로 연결시키면, PCV2의 통상적 환상 게놈을 모사하는 유사한 환상 게놈이 제공된다. 감염성 DNA PCV2 클론내에 직렬로 연결된 게놈의 2개의 복사체를 가질 경우의 잇점은, 감염성 DNA 클론을 시험관내 및 생체내 형질감염시킬 경우에 복제를 최대화할 수 있다는 것이다. 따라서, 본 발명의 클론은 선행 기술의 단일 복사체 게놈에 비해서 보다 효율적이고 효과적으로 작동한다.
- [0079] 분자성 바이러스 클론으로 동물을 감염시키는 것은 숙주에서 바이러스 복제의 유전적 결정인자 및 독성을 연구하는데 매우 유용하다. 2형 돼지 서코바이러스(PCV2)는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(PMWS)의 병원체로서 인식되어 왔다. PMWS는 돼지의 복합 질환 증후군이며, 다수의 요인들이 PMWS의 임상조건에 관여할 수 있다. 그러나, 질환에 걸린 돼지의 조직 균질화액 중의 기타 통상의 돼지 병원체의 존재로 인해 생물학적으로 순수한 형태의 PCV2의 생산의 곤란함은 오직 PCV2 감염만에 기인할 수 있는 임상 질환 및 병리학적 병소의 명확한 특성화를 방해하였다. PCV2의 감염성 분자성 DNA 클론을 작제하여, 돼지를 이러한 분자성 클론으로 직접 생체내 형질감염시킴으로써 PCV2와 관련된 질환 및 병리학적 병소를 특성화하는데 사용한 것은 이번이 최초이다.
- [0080] 상기 분자성 클론으로부터 유래된 균질한 PCV2 생 바이러스 스톱은 PK-15 세포내로 형질감염된 경우에 시험관내에서 감염성인 것으로 나타난다. 클로닝된 PCV2 게놈 DNA는 또한 특정 병원균 부재(specific pathogen free: SPF) 돼지의 간과 표재성 장골 림프절로 직접 주사된 경우에도 감염성이다. 클로닝된 PCV 플라스미드 DNA가 주사된 동물은 균질한 감염성 PCV2 생 바이러스 스톱을 비내 접종함으로써 유도된 바와 유사한 염증 및 질환을 나타낸다. PCV2-특이적 항체로의 형질전환은 35 접종후 경과일(DPI)에, 접종된 그룹 중의 대다수의 돼지에서 검출된다.
- [0081] 키메라 PCV1-2 DNA 클론으로 접종된 돼지에서의 바이러스혈증의 개시 및 기간은 비병원성 PCV1 DNA 클론으로 접종된 돼지에서의 바이러스혈증의 개시 및 기간과 유사한 반면에, PCV2 클론으로 접종된 돼지에서의 바이러스혈증은 보다 조속하고 보다 오랜 기간 지속되는 것으로 보인다. 14 DPI에서 시작하여 약 2 내지 4주 동안 지속되면서, 바이러스혈증은 대다수의 PCV2-접종된 동물에서 검출된다. 유사하게, 35 DPI에 부검한 대다수의 접종된 돼지는 PCV2-항체로 혈청전환되었다. PCV2 항원은 접종된 돼지의 다양한 조직 및 기관에서 검출된다. 육안적 병소는 폐와 림프절로 제한되며, 전신계적으로 비대해진 황갈색 림프절, 허탈되지 못하는 폐 및 경미한 다초점 황갈색 경화 병소에 의해 특성화한다. 비병원성 PCV1 접종된 돼지 및 키메라 PCV1-2 접종된 돼지 둘다에서 림프절에 나타나는 육안적 병소는 경미하지만 일부 동물로만 제한된 반면에, 병원성 PCV2 접종된 돼지는 모두 중간 정도 내지 중증의 림프 조직의 팽창 및 변색을 나타낸다(하기 표 9). 통계학적 분석은 키메라 PCV1-2 접종된 돼지의 림프절내의 육안적 병소가 비병원성 PCV1 접종된 돼지의 육안적 병소와 유사함을 드러낸다. 21 DPI에, PCV2 접종된 돼지는 PCV1 및 키메라 PCV1-2 접종된 돼지의 육안적 병소에 비해 통계학적으로 보다

중증이다. 조직병리학적 병소 및 PCV2-특이적 항체는 접종된(감염된) 돼지의 뇌, 폐, 심장, 신장, 편도, 림프절, 비장, 회장 및 간을 포함하는 수많은 조직 및 기관에서 검출된다. PMWS의 것과 유사한 다수의 조직 및 기관내의 조직병리학적 병소는 PCV2 분자성 DNA 클론 뿐만 아니라 분자성 DNA 클론으로부터 생체내 제조된 감염성 바이러스로 재현된다. 현미경상으로, 21 및 49 DPI에서, 키메라 PCV1-2 접종된 동물은 PCV2 접종된 동물에 비해 통계학적으로 적은 현미경적 병소를 나타낸다. 키메라 PCV1-2 접종된 돼지의 림프절내 현미경적 병소 스코어는 비병원성 PCV1, 역 키메라 PCV2-1 및 접종되지 않은 대조군 돼지의 현미경적 병소 스코어와 유사하다. 중간 정도 내지 중증 현미경적 병소는 폐, 간, 림프계, 비장, 뇌, 심장, 신장 및 편도 조직을 포함하는 병원성 PCV2 접종된 동물의 다수의 조직에서 발견된다. 그러나, 키메라 PCV1-2 접종된 동물에서는, 경미한 내지 중간 정도의 현미경적 병소는 간, 림프절 및 신장 조직으로만 제한된다(하기 표 10 참조)

[0082] 대조군 돼지 또는 모든 접종된 돼지에서도 주목할만한 PMWS의 임상징후는 없다. 비록 PMWS의 특징적 임상 증상이 클로닝된 PCV2 플라스미드 DNA(감염성 PCV2 DNA 클론) 또는 생물학적으로 순수한 PCV2 감염성 바이러스 스톱을 사용한 경우에 관찰되지 않는다 해도, PCV2는 하기 설명적 실시예에서 재생된 PMWS-유사 조직병리학적 병소의 명백한 원인이 될 수 있다. 일반적으로 PCV2가 임상적 PMWS의 원인이 될 수 있는 1차 병원체인 하나 단독 병원체는 아닌 것으로 사료되고 있다.

[0083] 본 발명은 오직 PCV2 감염에만 기인할 수 있는 임상 과정 및 병리학적 병소를 보다 명백히 특성화한다. 하기 설명적 실시예의 본 데이터는 용이하게 재생된 클로닝된 PCV2 게놈 DNA가 PCV2 발병기전 및 면역화 연구를 위한 감염성 바이러스를 대체하는데 유용할 수 있음을 나타낸다. PCV2가 PMWS의 발병에 필수적인 것으로 나타난 한편, PRRSV, PPV 등과 같은 기타 요소 또는 인자는 진전된 PMWS 사례와 관련된 임상 징후 및 병소의 완전한 스펙트럼을 유도하는데 필요할 수 있다. 그러나, PCV2가 주요 요소임을 압으로써, 본 발명의 신규한 감염성 복제 바이러스 클론을 추가로 변형시키거나 유전자 조작하여, 면역학 및 분자유전학의 숙련자에게 공지된 방법을 통해 목적하는 최적의 면역원성 효과를 달성할 수 있다.

[0084] 본원에서 기술하는 PCV2의 감염성 DNA 클론의 유용성은 돼지에서 PCV2 감염 및 PMWS를 예방하기 위한 유전자 조작된 약독화된 백신의 개발을 가능하게 한다. PCV2가 자연감염 동안에 림프절, 폐 및 간내에서 복제하며 다수의 병원성 효과 중 하나가 림프 구조를 분해시킴으로써 면역계를 손상시킨다는 것은 공지되어 있다[참조: S. Krakowka et al., 2001, supra; G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, supra; S. Kennedy et al., 2000, supra; G. J. Wellenberg et al., 2000, supra; G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus, "J. Comp. Pathol. 121: 1-11 (1999); J. Ellis et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets, "J. Vet. Diagn. Invest. 11: 3-14 (1999); J. C. Harding and E. G. Clark, 1997, supra]. 이러한 신규한 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론을 사용함으로써, 오직 PCV2 감염에만 기인할 수 있는 임상 질환, 병리학적 병소 및 바이러스 분포가 보다 명확히 특성화된다.

[0085] PCV 유전자의 구조적 및 기능적 관련성은 본원에서 기술하는 PCV2, PCV1, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 감염성 DNA 클론의 유용성으로 인해 보다 잘 이해된다. 문헌[참조: Will et al., "Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees, "Nature 299: 740-742 (1982)]은 직접적 생체내 주사에 의해 침팬지를 감염시키기 위한 클로닝된 B형 간염 바이러스성 DNA의 사용 가능성을 최초로 입증하였다. 이러한 접근법은 일부 기타 바이러스의 발병기전 및 바이러스 복제를 연구하는데 사용되어 왔다[참조: T. W. Dubensky et al., "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7529-7533 (1984); R. Girones et al., "Complete nucleotide sequence of a molecular clone of woodchuck hepatitis virus that is infectious in the natural host, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1846-1849 (1989); N. L. Letvin et al., "Risks of handling HIV, "Nature 349: 573 (1991); C. Seeger et al., "The cloned genome of ground squirrel hepatitis virus is infectious in the animal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 5849-5852 (1984); E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone, "Virology 238: 157-160 (1997); R. Sprengel et al., "Homologous recombination between hepadnaviral genomes following in vivo DNA transfection: implications for studies of viral infectivity, "Virology 159: 454-456 (1987); H. t. Will et al., 1982, supra; L. Willems et al., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep, "Virology 189: 775-777 (1992)].

[0086] 본 발명의 범주내에서 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론을 작제하고 클로닝된 PCV2 플라스미드 DNA를 돼지의 간과 림프절내로 직접 주사함으로써 감염을 입증하는 것은 PCV2 연구에 유리하다. 이러한 생체내 형질감염 시스템은

PCV2의 상이한 영역 또는 유전자를 숙주에서의 바이러스 복제 및 발병기전에 있어 이들의 역할에 대해 시험하는, 시험관내에서 작제된 재조합 플라스미드를 사용한 PCV2 유전자의 구조적 및 기능적 관련성의 연구를 강화시킬 것이다. PCV2의 복제 및 발병기전은 PCV2를 세포 배양물에서 증식시켜 감염성 바이러스 스톱을 제조할 필요 없이 생체내에서 연구할 수 있다. 이는 일련의 세포 배양 계대에서 바이러스 변이체를 선택할 수 있기 때문에 유리하다. 동물 연구에 있어 생 바이러스 대신에 클로닝된 PCV2 게놈 DNA를 사용할 경우의 또 다른 잇점은 접종량의 정량화가 상대적으로 용이하다는 점이다. 동물 접종용으로 사용되는 클로닝된 PCV2 DNA의 양을 분광광도계로 용이하게 측정할 수 있는 반면에, 생 PCV2 바이러스의 양은 세포 배양물 중의 감염력 역가측정 및 IFA에 의한 감염의 확인을 요한다. 동물에게 클로닝된 PCV2 플라스미드 DNA를 직접 주사하면, 동물 연구시에 조직 균질화 접종물 중의 다른 고유한 돼지 병원체의 존재와 관련된 문제가 제거된다.

[0087] 본 발명에서, 면역원성 ORF2 캡시드 유전자는 병원성 PCV2와 비병원성 PCV1 간에 교환되어 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론의 고유한 구조를 생성시킨다. 놀랍고도 유리하게도, 키메라 PCV1-2 감염성 클론은 복제하고, 시험관내 및 생체내에서 면역원성 ORF2 캡시드 항원을 발현시켰으며 PCV2 ORF2에 대한 특이적 항체 반응을 유도하였으나, PCV1의 비병원성 성질은 유지하였다. 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론은 PCV2에 대한 강력한 면역반응을 유도하는 한편 비병원성 PCV1의 병리학적 병소와 유사한 경미한 병리학적 병소와 함께 제한된 감염만을 유도하는 능력을 지닌다. 백신 개발에 있어, 클로닝된 DNA의 비교적 용이한 저장 및 안정성 및 대규모 재조합 PCV2 플라스미드 DNA와 PCV1-2 DNA 클론 생산의 경제성은, 감염성 DNA 생 백신 또는 유전자 조작된 약독화된 바이러스 백신을 돼지에게 전달하는 흥미로운 수단을 제공한다. 따라서, 본 발명에서 교시된 키메라 PCV1-2 감염성 DNA 클론은 PCV2 감염 및 PMWS에 대한 유용한 백신 후보이다.

[0088] 본원에서 사용되는 모든 과학 및 기술 용어가 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다는 것이 이해되어야 한다. 이러한 본 발명의 목적상, 용어 "감염성"은 바이러스가 임의의 질환을 유발하는지 또는 유발하지 않는지의 여부와 관계없이 이러한 바이러스가 돼지에서 복제하는 것을 의미한다. "SPF"는 특정 병원균 부재 돼지를 지칭한다. "무균" 돼지는 병원균을 함유하지 않는 돼지를 의미한다. 용어 "PCV2 플라스미드 DNA", "PCV2 게놈 DNA" 및 "PCV2 분자 DNA"는 동일한 클로닝된 뉴클레오타이드 서열을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0089] 중증 PMWS를 앓는 돼지로부터 분리되었고 분리체 번호 40895(균주명 "PCV2 #40895")로서 동정된 PCV2의 아이오와 샘플로부터 유래된 감염성 PCV1/PCV2 키메라 DNA 클론(균주명 "PCV1-2 키메라"), 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론(균주명 "PCV2 클론") 및 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 스톱은, 37 C.F.R. § 1.808에 규정되었고 부다페스트 조약에 따라 유지되는 조건하에 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection; ATCC 미국 버지니아주 20110-2209 마나사스 유니버시티 블러바드 10801 소재)에 기탁되었다. 본원에서 기술하는 DNA 서열은 pBluescript SK(+) 벡터(pSK)(제조원: Stratagene Inc., La Jolla, CA)내로 클로닝된 6,490bp 이내의 플라스미드를 함유하였으며 에스케리키아 콜라이 DH 5α 수용능 세포내로 형질전환시켰다. 감염성 키메라 PCV1-2 DNA 클론("키메라 돼지서코바이러스 1형(PCV2) 및 2형(PCV2)의 감염성 DNA 클론"으로서 확인됨) 및 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론("2형 돼지 서코바이러스(PCV2)의 감염성 DNA 클론"으로서 확인됨)을 함유하는 플라스미드는 2001년 12월 7일자로 ATCC에 기탁하였고 각각 ATCC 특허 기탁 번호 PTA-3912 및 PTA-3913를 부여받았다. 부위-지시된 돌연변이유발 및 본원에 기재된 기술을 이용하여 용이하게 작제할 수 있는 기타 플라스미드도 또한 본 발명의 범주에 포함됨이 이해되어야 한다. 분리체 번호 40895의 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 샘플("2형 돼지 서코바이러스(PCV2)"로서 확인됨)도 또한 2001년 12월 7일자로 ATCC에 기탁되었고 ATCC 특허 기탁 번호 PTA-3914를 부여받았다. PCV2 분리체 번호 40895의 게놈(뉴클레오타이드) 서열은 Genbank 데이터베이스에 저장되었고 승인번호 AF264042하에 2000년 7월 23일부터 공개적으로 입수가 가능하다.

[0090] 다음 실시예는 본 발명의 특정한 측면을 입증한다. 그러나, 이러한 실시예가 단지 설명하기 위함이며 본 발명의 조건 및 범주를 완전히 한정하기 위함은 아니다. 전형적 반응조건(예: 온도, 반응 시간 등)이 기재된 경우에 상기 및 하기에 범위를 한정하는 조건이 비록 일반적으로 덜 편리하다 해도 사용될 수도 있다는 것이 이해되어야 한다. 실시예는 실온(약 23°C 내지 약 28°C) 및 대기압에서 수행한다. 본원에서 인용되는 모든 특허 및 비율은 중량을 기준으로 하며, 모든 온도는 달리 언급하지 않는 한 섭씨 온도로 표현한다.

[0091] 본 발명의 추가의 이해는 하기의 비제한적 실시예로부터 수득할 수 있다.

[0092] 실시예 1

[0093] PCV1로 오염되지 않은 PK-15 세포주의 제조

- [0094] PCV2 분리체의 공급원은 천연 PMWS를 앓는 돼지의 비장 조직 샘플(PCV2 일련 확인 번호 40895, "분리체 40895"로서 지칭됨)이었다[참조: M. Fenaux et al., 2000, supra]. PCV2-특이적 항체를 이용한 면역조직화학적 염색은 조직내에 PCV2 항원의 존재를 확인시켰다. 비장 조직을 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다.
- [0095] 아메리칸 타입 컬처 컬렉션으로부터 입수한 PK-15 세포주(ATCC 수탁번호 CCL-33)를 PCV1로 지속적으로 감염시켰다[참조: G. C. Dulac and A. Afshar, 1989, supra]. PK-15 세포의 아집단만이 지속적으로 감염되었기 때문에(id.), 종말점 회석법에 의해 PCV1 오염원을 함유하지 않는 PK-15 세포주를 생성시켰다. 프로토콜은 다음과 같이 진행하였다: PK-15 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS) 및 1X 항생제(제조원: Life Technologies, Inc.)가 보충된, 얼(EARL) 염 및 L-글루타민을 함유하는 MEM(제조원: Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y.)에서 성장시켰다. 합류성(confluent) 세포 단층을 트립신으로 처리한 다음, 세포를 계수하고 0.2ml당 1개의 세포가 되도록 하여 종말점까지 연속적으로 회석시켰다. 종말점 회석액을 96-웰 플레이트에 도말하고, 1개의 세포로부터 출발하여 단층으로 성장하도록 하였다. 각 웰로부터의 세포를 PCV1 및 PCV2를 검출하고 분별할 수 있는 PCR-RFLP 검정법을 사용하여 PCV1 DNA에 대해 시험하였다[참조: M. Fenaux et al., 2000, supra]. 이어서, PCR-RFLP 검정에 의해 PCV1에 대해 음성인 것으로 시험된 웰로부터의 PK-15 세포를 증식시켰다. PCV1 비함유 PK-15 세포주를 5회의 추가 계대로 아배양하고, PCR에 의해 각 계대에서 PCV1 DNA에 대해 음성임을 확인하였다.
- [0096] PCV1 오염에 대해 음성인 4개의 세포주를 지속적으로 감염된 PK-15 세포(입수원: ATCC)의 종말점 회석액을 이용하여 제조하였다. 상기 세포주들은 5회의 추가 계대 후에 PCR에 의해 PCV1에 대해 음성을 유지하였다. 이어서, 상기 세포주들 중 하나를 증식시켰고, 이는 세포를 PCV2 분자성 DNA 클론(도 2)으로 형질감염시키고 PCV2 바이러스로 감염시킨 경우에 PCV2 복제를 원조할 수 있는 것으로 나타났다. 클로닝된 세포를 추가로 PCV2 분자 DNA의 시험관내 형질감염에 사용하여, 동물 접종 실험을 위한 생물학적으로 순수한 PCV2 감염성 바이러스 스톱을 제조하였다.
- [0097] 실시예 2
- [0098] PCV2 감염성 DNA 클론의 작제
- [0099] PCV2 분자성 DNA 클론을 작제하기 위해, 한 쌍의 PCR 프라이머를 PCV2 분리체 40895의 공개된 서열에 따라서 디자인하였다[참조: M. Fenaux et al., 2000, supra]: 정방향 프라이머 F-PCVSAC2 (5'-GAACCGCGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGT-3')(서열번호 5에 제시함) 및 역방향 프라이머 R-PCVSAC2 (5'-GCACCGCGGAAATTTCTGACAAACGTTACA-3')(서열번호 6에 제시함). 상기 프라이머 쌍은 고유한 SacII 제한 효소 부위를 함유하는 중첩 영역을 갖는 PCV2의 완전한 게놈(도 1)을 증폭시킨다. DNA를 QIAamp DNA Minikit(제조원: Qiagen, Inc., Valencia, Calif.)를 이용하여 천연 PMWS(분리체 40895)를 앓는 돼지의 비장 조직 샘플로부터 추출하였다[참조: M. Fenaux et al., 2000, supra]. 추출된 DNA를 AmpliTaq Gold 폴리머라제(제조원: Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.)을 이용하여 PCR로 증폭시켰다. PCR 반응은 95℃에서 9분 동안의 초기 효소 활성화 단계, 이어서 94℃에서 1분 동안 변성시키고 48℃에서 1분 동안 어닐링시키고 72℃에서 3분 동안 신장시키고 72℃에서 7분 동안 최종 신장시키는 35회 사이클로 이루어진다. 예상되는 크기의 PCR 생성물을 겔 전기영동으로 분리시키고 GeneClean Kit(제조원: Bio 101, Inc., La Jolla, Calif.)을 이용한 글래스밀크(glassmilk) 과정을 이용하여 정제하였다.
- [0100] PCV2 게놈의 직렬 이량체를 함유하는 분자성 DNA 클론을 작제하기 위해, 완전한 PCV2 게놈을 함유하는 PCR 생성물을 먼저 advanTage 플라스미드 벡터(제조원: Clontech, Palo Alto, Calif.)에 연결시켰다. 이. 콜라이 DH 5 α 수용능 세포를 형질전환시켰다. 재조합 플라스미드를 제한 효소 분해로 확인하였다. 전체 길이 PCV2 게놈 DNA를 SacII 제한 효소로 분해시켜 advanTage 벡터로부터 절단시켰다. 분해된 PCV2 게놈 DNA를 37℃에서 단지 10분(이는 직렬 이량체의 생성을 촉진시킨다) 동안만 T4 DNA 리가제로 연결시켰다. 이어서, 직렬 이량체를 pBluescript SK(+) 벡터(pSK)(제조원: Stratagene Inc., La Jolla, Calif.)(도 1)내로 클로닝시켰다. PCV2 게놈의 직렬 이량체를 함유하는 재조합 플라스미드(본원에서 PCV2 분자성 DNA 클론으로 지칭됨)를 PCR, 제한 효소 분해 및 DNA 서열분석으로 확인하였다. 재조합 플라스미드의 DNA 농도를 분광광도계로 측정하였다.
- [0101] 구체적으로, PCV2의 완전한 게놈(분리체 40895)을 PCR로 증폭시켜 감염성 PCV2 분자성 DNA 클론을 작제하였다. 2개의 완전한 PCV2 게놈 복사체를 pSK 벡터내에서 직렬로 연결시켜 PCV2 분자성 DNA 클론(도 1)을 제조하였다. PCV2 분자성 DNA 클론의 감염력은 PK-15 세포를 시험관내에서 형질감염시켜 측정하였다. PCV2- 특이적 항체를 이용한 IFA는 상기 분자성 DNA 클론이 시험관내에서 감염성이며 약 10 내지 15%의 PK-15 세포가 형질감염되었음

을 확인시켰다. PCV2-특이적 항원은 IFA에 의해 형질감염된 세포의 핵내에서 및 보다 적은 정도로 세포질내에서 가시화되었다(도 2). 공 pSK 벡터로 모의 형질감염된 세포는 PCV2 항원에 대해 음성을 유지하였다.

[0102] 실시예 3

[0103] PCV2 분자성 DNA 클론으로의 시험관내 형질감염 및 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 감염성 바이러스 스톱의 제조

[0104] 시험관내에서 분자성 DNA 클론의 감염력을 시험하기 위해, PCV1으로 오염되지 않은 PK-15 세포를 3-웰 LabTek 챔버 슬라이드에서 성장시켰다. PK-15 세포가 약 85%의 합류성에 도달하면, 세포를 제조업자(Life Technologies, Inc)에 의해 공급된 프로토콜에 따라 리포펙타민 플러스 시약(Lipofectamine Plus Reagent)을 이용하여 분자성 DNA 클론으로 형질감염시켰다. 공 pSK 벡터로 모의 형질감염된 세포를 대조군으로서 포함시켰다. 형질감염한지 3일 후, 세포를 4℃에서 20분 동안 80% 아세톤과 20% 메탄올을 함유하는 용액으로 고정시키고, PCV2-특이적 래빗 폴리클로날 항혈청을 이용하여 면역형광 검정을 수행하여 분자성 DNA 클론의 시험관내 감염력을 측정하였다(하기 참조).

[0105] 동물 접종용의 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 감염성 바이러스 스톱을 제조하기 위해, PCV1으로 오염되지 않은 PK-15 세포를 T-25 배양 플라스크에서 배양하고 PCV2 분자성 DNA 클론으로 형질감염시켰다. PK-15 세포를 T-25 플라스크에서 약 85%의 합류성으로 성장시켰다. 상기 세포를 형질감염 전에 멸균 PBS 완충액으로 1회 세척하였다. T-25 플라스크에서의 각각의 형질감염 반응을 위해, PCV2 플라스미드 DNA 12μg를 MEM 배지 0.35ml 중의 플러스 시약 16μl와 혼합하였다. 공 pSK 벡터로 모의 형질감염된 세포의 플라스크를 음성 대조군으로서 포함시켰다. 실온에서 15분 동안 항온처리한 후, MEM 배지 0.35ml 속에 희석된 리포펙타민 시약 50μl을 혼합물에 첨가하고 실온에서 다시 15분 동안 항온처리하였다. 이어서, 형질감염 혼합물을 새로운 MEM 2.5ml를 함유하는 PK-15 세포의 T-25 플라스크에 첨가하였다. 37℃에서 3시간 동안 항온처리한 후, 배지를 2% FBS와 1X 항생제를 함유하는 새로운 MEM 배지로 교체하였다. 형질감염된 세포를 형질감염 후 3일째에 수거하고 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 바이러스 스톱의 감염 역가를 IFA로 측정하였다(하기 참조).

[0106] 기본적으로, 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 감염성 바이러스 스톱을 PK-15 세포를 PCV2 분자성 DNA 클론으로 형질감염시켜 제조하였다. 형질감염된 세포 용해물이 PK-15 세포를 감염시키는데 성공적으로 사용되었기 때문에, 시험관내 형질감염으로 생성된 PCV2 비리온은 감염성이었다. 따라서, PCV2 분자성 DNA 클론은 시험관내에서 형질감염되는 경우에 감염성 PCV2 비리온을 생산할 수 있다. 형질감염된 세포로부터 제조된 균질한 PCV2 바이러스 스톱의 감염 역가는 $1 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀/ml 인것으로 측정되었다. 상기 바이러스 스톱을 사용하여 그룹 2의 돼지를 접종하였다. 공 pSK 벡터로 모의 형질감염된 세포의 용해물은 PK-15 세포를 감염시키지 못했다.

[0107] 실시예 4

[0108] 면역형광 검정(IFA)에 의한 바이러스 역가측정

[0109] 균질한 PCV2 바이러스 스톱의 감염 역가를 측정하기 위해, PK-15 세포를 8-웰 LabTek 챔버 슬라이드에서 배양하였다. 바이러스 스톱을 MEM 속에 연속적으로 10배 희석시키고, 각 희석액을 LabTek 챔버 슬라이드에서 성장중인 PK-15 세포의 단층의 10웰에 접종하였다. 접종되지 않은 세포의 웰을 대조군으로서 포함시켰다. 감염 후 3일째에, 감염된 세포를 4℃에서 20분 동안 80% 아세톤과 20% 메탄올을 함유하는 용액으로 고정시켰다. 세포를 PBS 완충액으로 세척한 후, 감염된 세포를 37℃에서 1시간 동안 1:1,000 희석된 PCV2-특이적 래빗 폴리클로날 항체[참조: S. D. Sorden et al., "Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, "J. Vet. Diagn. Invest. 11:528-530 (1999)]로 접종하였다. 이어서, 세포를 PBS 완충액으로 3회 세척하고 2차 FITC-표지된 염소 항-래빗 IgG(제조원: Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, Md.)와 함께 항온처리하였다. 슬라이드를 PBS 완충액으로 3회 세척하고 슬라이드를 플루오로마운트-G(fluoromount-G)로 봉입(mounting)하고 커버슬립으로 덮고 형광 현미경으로 검사하였다. ml당 50% 조직 배양물 감염량(TCID₅₀/ml)을 계산하였다. 먼저, 세포를 PCV2 게놈의 단일 복사체를 함유하는 플라스미드 작제물로 형질감염시켰지만, 단일 게놈 작제물로부터의 감염성 PCV2 역가는 직렬 게놈을 함유하는 작제물보다 매우 낮았다. 따라서, PCV2 게놈의 이량체 형태를 함유하는 플라스미드 작제물을 시험관내 및 생체내 형질감염 실험용으로 사용하였다.

- [0110] 실시예 5
- [0111] PCV2 분자성 DNA 클론을 이용한 돼지의 생체내 형질감염 및 균질한 PCV2 감염성 바이러스 스톱을 이용한 돼지의 실험 접종
- [0112] 40마리의 4주령 특정 병원균 부재(SPF) 돼지를 각각 10마리씩 4개의 방에 무작위적으로 배정하였다. 접종 전에, SPF 돼지를 PCV, PRRSV, PPV 및 돼지 B형 간염 바이러스에 대한 항체에 대해 시험하였다. 그룹 1의 돼지는 접종하지 않았으며 음성 대조군으로서 사용하였다. 그룹 2의 돼지는 각각 PCV2 분자성 DNA 클론으로부터 유래된 약 1.9×10^5 TCID₅₀의 PCV2 감염성 바이러스 스톱으로 비내 접종하였다. 그룹 3의 돼지에게는 PCV2 분자 클론의 재조합 플라스미드 DNA를 직접 간내 주사하였다. 각 돼지에게 초음파유도 기술을 통해 재조합 플라스미드 DNA(클로닝된 PCV2 플라스미드 DNA) 전체 200 μ g을 간의 6곳의 상이한 부위에 주사하였다. 그룹 4의 돼지에게는 표재성 장골 림프절내로 직접 재조합 PCV2 플라스미드 DNA 전체 200 μ g을 각각 주사하였고, 각 림프절에 2회 별도로 주사하였다. 동물들을 임상 질환에 대해 매일 모니터링하였다. 혈청 샘플을 0, 7, 14, 21, 28, 35일 접종후 경과일(DPI)에 각 동물로부터 수집하였다. 21 DPI에, 5마리의 돼지들을 각 그룹으로부터 무작위적으로 선택하여 부검하였다. 각 그룹의 나머지 5마리의 돼지들은 35 DPI에 부검하였다. 각종 조직 및 기관을 부검 동안 수집하였고 조직 검사 및 면역조직화학 염색을 위해 가공하였다(하기 참조).
- [0113] 결과는 하기 표 1에 제시한다. 그룹 2, 3 및 4로부터의 모든 접종된 돼지들은 0 DPI에서 PCV2 항체에 대해 음성이었다. 접종되지 않은 대조군 그룹 1의 2마리 돼지들은 0 DPI에서 검출가능한 PCV2 모체이행 항체(maternal antibody)를 지녔다. 상기 2마리의 돼지들의 모체이행 항체는 7 DPI까지 감소되었다. 10마리의 접종되지 않은 대조군 돼지 중 어떠한 돼지에서도 PCV2 항체로의 혈청전환은 검출되지 않았다. PCV2 감염성 바이러스가 접종된 그룹 2 돼지에서는 1마리의 돼지가 21 DPI에서 PCV2 항체로 혈청전환되었다. 35 DPI까지, 나머지 5마리의 그룹 2 돼지들은 혈청전환되었다. 그룹 3 및 4로부터의 형질감염된 동물에서의 혈청전환은 28 DPI에서 최초로 나타났다. 35 DPI까지, 그룹 3으로부터의 나머지 5마리 돼지들 중 5마리 및 그룹 4로부터의 나머지 5마리 돼지들 중 3마리가 PCV2 항체로 혈청전환되었다.
- [0114] PPV 항체를 모든 돼지들에 대해 3 및 21 DPI에 시험하고, 35 DPI에 나머지 돼지들에 대해 시험하였다. 편재하는 돼지 병원체 PPV에 대한 모체이행 항체는 SPF 돼지에서 검출되었다. 1마리를 제외한 모든 돼지에서의 PPV HI 항체 역가는 3 DPI(1:2,665의 평균 역가)부터 21 DPI(1:246의 평균 역가)까지 현저하게 감소했으며, 이는 이들 돼지에서 검출된 항체가 수동적으로 유도되었음을 나타낸다. 1마리의 돼지는 PPV HI 역가가 3 DPI에서의 1:31로부터 21 DPI에서의 1:64로 약간 증가했으며, 이는 시험 변동으로 인한 것일 수 있다. 0, 21 및 35 DPI에 모든 돼지로부터 수집한 혈청 샘플을 공개된 PCR 검정[참조: J. M. Soucie et al., "Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate, "Transfusion 40:708-711 (2000)]을 사용하여 PPV DNA에 대해 추가로 시험하였다. 모든 DPI에서 어떠한 돼지로부터도 PPV 바이러스혈증이 검출되지 않았으며, 이는 돼지가 PPV에 감염되지 않았음을 나타낸다.

표 1

- [0115] PCV2 생 바이러스가 접종된 돼지 또는 클로닝된 PCV2 플라스미드 DNA가 직접 주사된 돼지에서의 PCV2 특이적 항체로의 혈청전환

그룹	접종물	접종 경로	접종후 경과일					
			0	7	14	21	28	35
1	없음		2/10 ^a	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5
2	PCV2 생 바이러스 ^b	비내	0/10	0/10	0/10	1/10	1/5	4/5
3	PCV2 DNA ^c	간내	0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	5/5
4	PCV2 DNA ^c	림프계내	0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	3/5
^a PCV2 항체는 ELISA로 측정하였다(양성인 마릿수/시험된 마릿수). ^b PK-15 세포를 PCV2 분자성 DNA 클론으로 형질감염시켜 제조한 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 바이러스 스톱 ^c pSK 플라스미드내의 클로닝된 PCV2 게놈 DNA								

[0116] 실시예 6

[0117] PCR-RFLP 분석

[0118] PCV2 분자성 DNA 클론으로 형질감염된 돼지 및 PCV2 감염성 바이러스 스톱으로 감염된 돼지에서의 PCV2 바이러스혈증을 측정하기 위해, 상이한 DPI에서 수집한 혈청 샘플을 이미 기술된 PCR-RFLP 검정[참조: M. Fenaux et al., 2000, supra]의 일반적 방법을 이용하여 PCV2 DNA의 존재에 대해 시험하였다. 바이러스성 DNA를 DNazol(R) 시약을 제조업자(Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio)에 의해 공급된 프로토콜에 따라 사용하여 각 혈청 샘플 50 μ l로부터 추출하였다. 추출된 DNA를 DNase-, RNase-, 및 프로테이나제 비함유 물 속에 재현탁시키고 PCR-RFLP (id.)를 사용하여 PCV2 DNA에 대해 시험하였다. 선택된 동물로부터의 PCR 생성물을 서열분석하여 돼지를 감염시키는 바이러스의 기원을 확인하였다.

[0119] 혈청 샘플을 0, 7, 14, 21, 28 및 35 DPI에 모든 대조군 및 접종된 동물로부터 수집하고 PCV2 DNA(id.)를 검출하여 PCV2 바이러스혈증에 대해 검정하였다. 결과는 하기 표 2에 제시한다. PCV2 DNA는 모든 DPI에서 그룹 1 접종되지 않은 대조군 돼지에서 검출되지 않았다. 바이러스 혈증은 14 DPI에서 그룹 2로부터의 10마리의 돼지 중 7마리에서 검출되었으며 35 DPI까지 10마리 중 8마리에서 검출되었다. PCV2 DNA를 28 DPI 및 35 DPI에서 그룹 2로부터의 모든 나머지 5마리 돼지에서 검출할 수 없었기 때문에 바이러스혈증은 단지 수주 동안만 지속되었다. PCV2 분자성 DNA 클론을 간내 주사한 그룹 3 돼지에서는, 10마리의 돼지 중 8마리가 바이러스혈증을 나타냈으며 10마리의 돼지 중 9마리는 35 DPI까지 검출가능한 바이러스혈증을 나타냈다. 그룹 4 돼지에게는 PCV2 분자성 DNA 클론을 림프절내로 주사하였다. 그룹 4에서, 14 DPI에서 10마리 돼지 중 2마리 및 21 DPI에서 10마리 돼지 중 8마리가 바이러스혈증을 나타냈다. 당해 결과는 PCV2 분자성 DNA 클론이 SPF 돼지의 간 및 표재성 장골 림프절내로 직접 주사된 경우에 감염성임을 나타낸다. 선택된 동물로부터 증폭된 PCR 생성물의 서열은 PCV2 분자성 DNA 클론의 상응하는 영역과 동일하였다.

표 2

[0120] 접종된 돼지 및 대조군 돼지의 혈청 중에서 PCR에 의한 바이러스혈증(PCV2 DNA)의 검출

그룹	접종물	접종 경로	접종후 경과일						
			0	7	14	21	28	35	전체
1	없음		0/10 ^a	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/10
2	PCV 생 바이러스 ^b	비내	0/10	0/10	7/10	5/10	0/5	0/5	8/10
3	PCV2 DNA ^c	간내	0/10	0/10	8/10	6/10	3/5	3/5	9/10
4	PCV2 DNA ^c	림프계내	0/10	0/10	2/10	8/10	2/5	0/5	8/10
^a 각 그룹의 10마리 돼지, 양성인 마릿수/시험된 마릿수 ^b PK-15 세포를 PCV2 분자성 DNA 클론으로 형질감염시켜 제조한 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 바이러스 스톱 ^c pSK 플라스미드내의 클로닝된 PCV2 게놈 DNA									

[0121] 실시예 7

[0122] 임상 평가

[0123] 돼지를 0 DPI 및 부검시에 청량하였다. 직장 온도, 및 0 내지 6(0= 정상, 6= 중증) 범위의 임상 호흡기 질환 스코어[참조: P. G. Halbur et al., "Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus, "Vet. Pathol. 32:648-660 (1995)]를 0 DPI부터 35 DPI까지 격일로 기록하였다. 중추신경계 질환, 간 질환(황달), 근골격 질환 및 신체 조건의 변화를 포함하는 임상적 관찰도 매일 기록하였다.

[0124] 육안적 병리학 및 조직병리학을 평가하기 위해, 각 그룹으로부터의 5마리 돼지들을 21 및 35 DPI에 부검으로부터 무작위적으로 선택하였다. 부검 팀은 부검시에 돼지의 감염 상황에 대해 알지 못하도록 하였다. 완벽한 부

검을 모든 돼지에 대해 수행하였다. 상당히 가시적인 폐렴을 앓는 폐의 추정된 비율을 미리 기술한 스코어 시스템(id.)에 기초하여 각 돼지에 대해 기록한다. 스코어 시스템은 각 폐엽이 전체 폐를 구성하는 대략적 용적에 기초한다: 우측 두개엽, 우측 중간엽, 좌측 두개엽의 두개 부분 및 좌측 두개엽의 뒷쪽 부분 각각은 전체 폐 용적의 10%를 구성하며, 부엽은 5%를 구성하며, 우측 및 좌측 미엽 각각은 27.5%를 구성한다. 림프절의 비대와 같은 기타 병소가 별도로 주지되었다. 조직병리학 검사용 절편을 비갑개, 폐(7개의 절편)(id.), 심장, 뇌, 림프절(기관기관지, 장골, 장간막, 설하), 편도, 흉선, 간, 담낭, 지라, 관절, 소장, 결장, 췌장 및 신장으로부터 취하였다. 조직을 맹검 방식으로 검사하고 폐, 림프절 및 간 병소의 중증도에 대한 주관적 스코어로서 기록하였다. 폐 스코어는 0(정상) 내지 3(중증 림프조직구성 간질성 폐렴)의 범위였다. 간 스코어는 0(정상) 내지 3(중증 림프조직구성 간염)의 범위였다. 림프절 스코어는 소포의 림프구 고갈의 추정량에 대한 것이며 0(정상 또는 림프구 고갈이 없음) 내지 3(중증 림프구 고갈 및 소포의 조직구 대체)의 범위였다.

[0125] 혈청학 프로토콜은 돼지가 11일 내지 12일령이 되자마자 혈액을 수집하고 0, 7, 14, 21, 28 및 35 DPI에서는 모든 돼지로부터 혈액을 수집하는 것을 포함한다. PRRSV에 대한 혈청 항체를 Herd Check PRRSV ELISA(제조원: IDEXX Laboratories, Westbrook, Mass.)를 사용하여 검정하였다. PCV에 대한 항체는 적혈구응집 억제(HI) 검정[참조: H. S. Joo et al., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody, "Aust. Vet. J. 52:422-424 (1976)]으로 검출하였다. PCV2에 대한 혈청 항체를 PCV2의 제조항 ORF2 단백질에 기초하여 변형된 간접 ELISA로 검출하였다[참조: P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV, "Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1:33-40 (2002)]. 부분적으로 정제된 PCV2를 PCV2의 주요 캡시드 ORF2 단백질을 함유하는 제조항 벡로로바이러스로 감염된 Hi Five 세포(제조원: Invitrogen, Carlsbad, Calif.)로부터 제조하였다[참조: P. Nawagitgul et al., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, "J. Gen. Virol. 81:2281-2287 (2000)]. 야생형 벡로로바이러스로 감염된 Hi Five 세포의 세포 용해물을 유사하게 제조하였고, 이는 음성 대조군 항원으로 제공되었다. Immulon 2HB 폴리스티렌 미세역가 플레이트(제조원: Dynex Technologies Inc, Chantilly, Va.)를 4°C에서 36시간 동안 최적 농도의 양성 및 음성 항원으로 피복하였다. 5% 우유 희석액(제조원: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) 속에 1:1000 희석된 각 혈청 샘플 100 μ l를 각 웰에 첨가하였다. 혈청 샘플을 4중으로 시험하였다: 음성 대조군 항원에 대한 2개의 웰 및 PCV2 항원에 대한 2개의 평행한 웰. 양성 대조군 및 음성 대조군 혈청을 각 플레이트에 포함시켰다. 혈청을 37°C에서 30분 동안 항온처리한 다음, 0.1% 트윈-20을 함유하는 0.1M PBS 완충액으로 5회 세척하였다. 퍼옥시다제-표지된 2차 항-돼지 IgG(제조원: Sigma Co, St. Louis, Mo.)을 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 다시 세척하고, 발색을 위해 2,2'-아지노-디-(3-에틸 벤즈티아졸린-6-설포네이트)(제조원: Kirkegaard & Perry Laboratories Inc)와 함께 37°C에서 15분 동안 항온처리하였다. 흡광도(OD)를 405nm에서 판독하였다. 각각의 시험된 혈청 및 대조군 혈청의 교정된 OD를, PCV2 항원을 함유하는 평행한 웰의 OD 값으로부터 음성 항원을 함유하는 웰의 OD 값을 공제하여 계산하였다. 데이터를 시험된 혈청 샘플의 교정된 OD 값(S)을 양성 대조군 혈청의 교정된 OD 값(P)으로 나누어 정규화시키고 S/P 비로서 보고하였다. S/P 비가 ≤ 0.12 , 0.12 내지 0.2, 및 > 0.2 인 샘플을 각각 음성, 분명치 않은 및 양성인 것으로 고려하였다.

[0126] 임상 평가의 결과로부터, 대조군 및 접종된 돼지는 임상적 PMWS의 징후와 유사한 명백한 질환 징후를 나타냈다. 모든 네 그룹 간에 체중 증가 또는 평균 직장 온도의 차이는 없었다. 그룹 1의 대조군 돼지는 실험 전반에 걸쳐 정상을 유지하였다. 8 내지 14 DPI에서, PCV2 DNA-형질감염된 및 PCV2 바이러스-감염된 그룹의 대다수의 돼지에서 경미한 일시적 호흡기 질환이 관찰되었다. 이는 개개의 돼지에서는 1 내지 2일 동안 및 그룹의 경우에는 5 내지 6일 동안의 경미한 호흡곤란(1 내지 2의 임상 호흡기 스코어)으로 특성화되었다.

[0127] 부검시에 대조군 돼지에서는 육안적 병소가 관찰되지 않았다. 접종된 세 그룹의 돼지는 폐 및 림프절로 제한된 육안적 병소가 나타났다(하기 표 3 참조). 병소는 PCV2 플라스미드 DNA-형질감염된 그룹 및 PCV2 바이러스-감염된 그룹의 돼지들 간에 유사하였다. 폐는 허탈되지 못했으며, 21 DPI에서 폐의 0 내지 2%(도 3) 및 35 DPI에서 폐의 0 내지 13%를 포함하여 무작위적인, 다초점의 중간 정도의 잘 구별된 황갈색 내지 자주색 경화 영역을 나타냈다. 림프절은 모든 PCV2-접종된 세 그룹으로부터의 대부분의 돼지에서 21 및 35 DPI 둘다에서 정상 크기의 2배 내지 5배로 전체적으로 비대해졌으며 단단하고 황색이었다(도 3).

[0128] 현미경 검사는 간을 제외한 대조군 돼지의 모든 조직에서 병소가 없음을 드러냈다. 10마리의 대조군 돼지 중 8마리는, 정상 돼지에서 통상적으로 관찰되고 정상 배경으로 고려되는, 간의 문맥주위 부위에서 우세한 매우 경미한 다초점 림프혈장구성 염증(multifocal lymphoplasmacytic inflammation)을 나타냈다[참조: P. G. Halbur

et al., 2001, supra].

[0129]

PCV2 플라스미드 DNA-형질감염된 두 그룹(간내 및 림프계내) 및 PCV2-감염된 그룹(비내)로부터의 돼지는 뇌, 폐, 심장, 신장, 림프 조직(편도, 림프절, 비장), 회장 및 간에서 유사한 병소를 나타냈다(하기 표 4 참조). 뇌 병소는 접종된 세 그룹으로부터의 돼지 30마리 중 23마리에서 관찰되었으며 혈관주위 세포침윤 및 신경아교증을 동반한 경미한 내지 중간 정도의 다초점 림프혈장구성 수막염으로서 특성화되었다. 폐 병소는 PCV2 접종된 30마리의 돼지 중 28마리에서 관찰되었으며 경미한 내지 중간 정도의 세기관지주위 림프혈장구성 및 조직구성 기관지간질성 폐렴으로서 특성화되었다(도 3C). 21 DPI에 부검한, PCV2 바이러스 감염된 그룹 2로부터의 1마리 및 35 DPI에 부검한, PCV2 플라스미드 DNA 형질감염된 두 그룹으로부터의 각각 1마리의 돼지는 기관지의 점막고유관 및 세기관지주의 부위에서 섬유증 및 육아종 염증을 동반한 폐양성 및 증식성 세기관지염을 나타냈다. 경미한 다초점 림프혈장구성 심근염이 또한 30마리의 PCV2 접종된 돼지 중 18마리에서 관찰되었다. 30마리의 PCV2 접종된 돼지 중 14마리에서, 경미한 내지 중간 정도의 다초점 림프혈장구성 간질성 신염이 관찰되었다. 흉선에서는 병소가 관찰되지 않았다. 경미한 내지 중간 정도의 림프구 고갈(도 4B) 및 소포의 조직구 대체가 30마리의 PCV2 접종된 돼지 중 8마리의 편도에서, 30마리 중 7마리의 비장에서 및 30마리 중 26마리의 림프절에서 관찰되었다. 거대 세포를 동반한 중간 정도의 육아종 림프절염은 21 DPI에 PCV2 바이러스로 비내 접종된 3마리의 돼지에서 관찰되었고, 35 DPI에 PCV2 플라스미드 DNA 형질감염된 그룹 중 각각 1마리의 돼지에서 관찰되었다. 경미한 림프혈장구성 및 조직구성 소장결장염은 35 DPI에, PCV2 바이러스 감염된 그룹의 5마리의 돼지 중 3마리에서, PCV2 플라스미드 DNA로 간내 형질감염된 그룹의 5마리의 돼지 중 3마리에서 및 PCV2 플라스미드 DNA로 림프계내 형질감염된 그룹의 5마리의 돼지 중 1마리에서 관찰되었다. 각각의 PCV2 플라스미드 DNA-형질감염된 그룹의 1마리의 돼지는 조직구 대체 및 파이어소절(Peyer's patch)내 적은 수의 거대 세포를 동반한 경미한 림프구 고갈을 나타냈다. 경미한 내지 중간 정도의 림프혈장구성 간염은 30마리의 PCV2 접종된 돼지 중 29마리에서 관찰되었다. 림프조직구 염증에 의해 둘러싸인 개별적으로 광범위하게 산재되어 있는 적은 수의 괴사성 간세포는 21 DPI에 각각의 PCV2 플라스미드 DNA 형질감염된 그룹의 1마리의 돼지에서 관찰되었다. 다른 조직내의 병소는 두드러지지 않았다.

[0130]

폐, 간 및 림프절내의 현미경적 병소를 공개된 스코어 시스템에 따라서 스코어를 매겼다(하기 표 4)[참조: P. G. Halbur et al., 2001, supra; P. G. Halbur et al., 1995, supra]. 기타 조직 및 기관용으로 적절한 스코어 시스템은 없었다. PCV2 접종된 세 그룹의 돼지에서의 폐 및 림프절의 평균 스코어는 그룹 1의 대조군 돼지에서의 평균 스코어와 통계학적으로 상이하였다. PCV2 접종된 세 그룹의 돼지에서 간 병소의 평균 스코어는 대조군 돼지의 평균 스코어와 통계학적으로 상이하지 않았다.

표 3

[0131]

대조군 및 PCV2 접종된 돼지에서의 폐 및 림프절의 육안적 병소

그룹	접종물	감염 경로	21 DPI		35 DPI	
			림프절	폐	림프절	폐
1	없음		0/5 ^a	0/5	0/5	0/5
2	PCV2 생 바이러스 ^b	비내	5/5	1/5(0-1) ^c	5/5	4/5(0-5)
3	PCV2 DNA ^d	간내	2/5	2/5(0-2)	5/5	2/5(0-13)
4	PCV2 DNA ^d	림프계내	4/5	5/5(0-1)	3/5	1/5(0-9)

^a 각 그룹으로부터의 5마리의 돼지를 21 DPI에 부검하였고, 나머지 5마리의 돼지를 35 DPI에 부검하였다. 양성인 마릿수/시험된 마릿수

^b PK-15 세포를 PCV2 분자성 DNA 클론으로 형질감염시켜 제조한 생물학적으로 순수하고 균질한 PCV2 바이러스 스톱

^c 병소를 지닌 마릿수/시험된 마릿수(상당히 가시적인 폐렴 병소가 있는 폐의 추정된 비율의 범위, 0 내지 100%)

^d pSK 플라스미드내의 클로닝된 PCV2 게놈 DNA

표 4

대조군 및 PCV2-접종된 돼지에서의 조직병리학적 병소의 분포

그룹	접종물	투여 경로	DPI ^a	폐 ^b	간 ^c	LN ^d	비장	흉선	회장	뇌	심장	신장	편도
1	없음		21	0/5(0.0)	4/5(0.8)	0/5(0.0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
			35	0/5(0.0)	4/5(0.8)	0/5(0.0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	PCV2 virus	비내	21	5/5(1.6)	5/5(1.2)	3/5(1.2)	1/5	0/5	0/5	4/5	3/5	1/5	0/5
			35	3/5(0.6)	4/5(1.0)	4/5(0.8)	3/5	0/5	3/5	4/5	0/5	1/5	3/5
3	PCV2 DNA	간내	21	5/5(1.0)	5/5(1.0)	5/5(1.0)	1/5	0/5	0/5	5/5	4/5	1/5	0/5
			35	5/5(1.2)	5/5(1.0)	4/5(1.0)	2/5	0/5	3/5	3/5	4/5	5/5	3/5
4	PCV2 DNA	림프계내	21	5/5(1.2)	5/5(1.0)	5/5(0.8)	0/5	0/5	0/5	4/5	4/5	3/5	0/5
			35	5/5(1.0)	5/5(1.2)	5/5(1.4)	0/5	0/5	1/5	3/5	3/5	3/5	2/5

^a 접종후 경과일(DPI): 각 그룹으로부터의 5마리의 동물들은 20 DPI에서 부검하였고 각 그룹으로부터의 나머지 5마리 동물들은 35 DPI에서 부검하였다.

- ^b 양성인 마릿수/시험된 마릿수(평균 조직학적 폐 스코어:0= 정상, 1= 경미한 간질성 폐렴, 2= 중간 정도, 3= 중증)
^c 양성인 마릿수/시험된 마릿수(평균 조직학적 간 스코어:0= 정상, 1= 경미한 간염, 2= 중간 정도, 3= 중증)
^d 양성인 마릿수/시험된 마릿수(평균 조직학적 림프구(LN) 고관 스코어:0= 정상, 1= 경미함, 2= 중간 정도, 3= 중증)

실시예 8

면역조직화학

PCV2-특이적 항원의 면역조직화학(IHC) 검출을 DPI 21 및 35에서 부검 동안 수집한 모든 조직에 대해 수행하였다. 래빗 폴리클로날 PCV2-특이적 항원체를 IHC 용으로 사용하였고, 일반적 과정은 미리 기술한 바 있다[참조: S. D. Sorden et al., 1999, supra].

PCV2 항원의 검출 및 조직 분포를 위해, PCV2 항원을 21 및 35 DPI에 부검한 모든 돼지의 뇌, 폐, 비갑개, 심장, 신장, 편도, 림프절, 비장, 흉선, 회장, 간, 담낭 및 췌장에서 IHC 염색하였다. 대조군 돼지로부터의 모든 조직은 PCV2 항원에 대해 음성이었다. PCV2 접종된 세 그룹의 PCV2 항원의 조직 분포는 유사하였다(하기 표 5 참조). 뇌에서는, PCV2 항원은 수막 및 맥락층(choroid plexus)내의 단핵구, 섬유모세포-유사 세포 및 내피 세포에서 우세하게 발견되었으며, 대뇌 및 소뇌내의 내피세포 및 혈관주위 단핵구에서는 덜 흔하게 발견되었다. 폐에서는, PCV2 항원은 폐포 대식세포 및 중격 대식세포 내에서 및 기도의 점막유관내의 섬유모세포-유사 세포에서 검출되었다(도 3D). 심장에서는, PCV2 항원은 광범위하게 산재되어 있는 대식세포 및 내피세포에서 검출되었다. 신장에서는, PCV2 항원은 간질내의 관상 상피세포 및 단핵구 내에서 검출되었다. 림프 조직(림프절, 비장, 편도 및 파이어소절)에서는, PCV2 항원은 주로 대식세포 및 수상돌기-유사 세포 내에서 및

소포내의 거대 세포에서 검출되었다(도 4D). PCV2 항원은 또한 소장의 점막고유판내의 대식세포 내에서도 검출되었다. 간에서는, PCV2 항원은 단핵구 및 쿠퍼세포 내에서 검출되었다. PCV2 항원은 비갑개, 흉선 또는 담낭에서는 검출되지 않았다.

표 5

대조군 및 PCV2-접종된 폐지에서 면역조직화학에 의한 PCV2-특이적 항원의 검출 및 분포													
그룹	접종물	투여 경로	DPI ^a	폐	간	LN	비장	흉선	회장	뇌	신장	신장	편도
1	없음		21	0/5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	PCV2 바이러스 비내		35	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
			21	4/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3/5	3/5	1/5	1/5	2/5
3	PCV2 DNA 간내		35	1/5	2/5	3/5	2/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
			21	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	1/5	0/5	2/5
4	PCV2 DNA 림프계내		35	4/5	4/5	3/5	4/5	0/5	3/5	4/5	2/5	2/5	3/5
			21	4/5	4/5	5/5	4/5	0/5	3/5	3/5	0/5	0/5	3/5
			35	3/5	4/5	5/5	4/5	0/5	2/5	3/5	1/5	0/5	4/5

^a 접종후 경과일(DPI) : 각 그룹으로부터의 5마리의 동물들은 20 DPI에서 부검하였고 각 그룹으로부터의 나머지 5마리 동물들은 35 DPI에서 부검하였다.

^b 양성인 마릿수/시행된 마릿수

^a 접종후 경과일(DPI): 각 그룹으로부터의 5마리의 동물들은 20 DPI에서 부검하였고 각 그룹으로부터의 나머지 5마리 동물들은 35 DPI에서 부검하였다.

^b 양적인 마릿수/시험된 마릿수

[0137]

[0138] 실시예 9

[0139] 비병원성 PCV1 감염성 DNA 클론의 작제

[0140] PCV1 감염성 DNA 클론을 작제하는데 사용되는 과정은 본원에서 PCV2에 대해 기술한 바와 본질적으로 동일하다. 한 쌍의 PCR 프라이머, 즉 서열번호 7에 제시한 KPNPCV1.U 및 서열번호 8에 제시한 KPNPCV1.L(하기 표 6 참조)를 PCV1의 공개된 서열에 기초하여 디자인하였다. 상기 프라이머 쌍은 고유한 KpnI 제한 효소 부위를 함유하는 중첩 영역을 갖는 PCV1의 완전한 게놈을 증폭시킨다. PCV1의 DNA를 아메리칸 타입 컬처 컬렉션으로부터 입수한 오염된 ATCC PK-15 세포주(ATCC 수탁번호 CCL-33)로부터 추출하였다. PCV1 DNA를 QIAamp DNA 미니키트(제조사: Qiagen, Inc., Valencia, Calif.)를 이용하여 PCV1으로 지속적으로 감염시킨 ATCC PK-15 세포로부터 추출하였다[참조: M. Fenau et al., 2000, supra]. 추출된 DNA를 AmpliTaq Gold 폴리머라제(제조사: Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.)를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. PCR 사이클은 95℃에서 10분 동안의 초기 단계, 이어서 94℃에서 1분 동안 변성시키고 48℃에서 1분 동안 어닐링시키고 72℃에서 2분 동안 신장시키고 72℃에서 7분 동안 최종 신장시키는 35회 사이클로 이루어진다. 예상되는 크기의 PCR 생성물을

겔 전기영동으로 분리시키고, Geneclean Kit(제조원: Bio 101, Inc., La Jolla, Calif.)을 이용한 글래스밀크 과정을 이용하여 정제하였다. 완전한 PCV1 게놈을 함유하는 정제된 PCR 생성물을 먼저 advanTAge 플라스미드 벡터(제조원: Clontech, Palo Alto, Calif.)에 연결시켰다. 이, 콜라이 DH 5α 수용능 세포를 형질전환을 위해 사용하였다. 제조합 플라스미드를 제한 효소 분해로 확인하였다. 전체 길이 PCV1 게놈 DNA를 KpnI 제한 효소로 분해시켜 advanTAge 벡터로부터 절단시켰다. 전체 길이 PCV1 게놈 DNA를 T4 DNA 리가제를 이용하여 37℃에서 밤새 pBluescript SK(+) 벡터(pSK)(제조원: Stratagene Inc., La Jolla, Calif.)내로 연결시켰다. 전체 길이 PCV1 게놈을 함유하는 제조합 플라스미드를 Qiagen 플라스미드 미니 키트(제조원: Qiagen, Valencia, CA)로 분리시키고, 제한 효소 분해 및 DNA 서열분석으로 확인하였다. 전체 길이 PCV1 게놈 DNA를 KpnI 분해로 pSK 벡터로부터 추출하고 이량체화시켜, PCV2 감염성 클론에 대해 실시예 2에서 상기한 바와 같은 PCV1 감염성 DNA 클론을 제조하였다. 이량체화된 직렬 DNA 클론이 유리하게도 세포를 형질감염시키고 감염성 비리온을 생성시키는데 보다 효과적인 것으로 밝혀졌기 때문에, 이러한 직렬 이량체를 제조하였다. PCV1 DNA의 직렬 이량체를 제조하기 위해, 분해된 PCV1 게놈 DNA를 37℃에서 단지 10분(이는 직렬 이량체의 생성을 촉진시킨다) 동안만 T4 DNA 리가제로 연결시켰다. 이어서, 직렬 이량체를 pBluescript SK(+) 벡터(pSK)(제조원: Stratagene Inc., La Jolla, Calif.)내로 클로닝시켰다. PCV1 게놈의 직렬 이량체를 함유하는 제조합 플라스미드(본원에서 PCV1 분자성 DNA 클론으로 지칭됨)을 PCR, 제한 효소 분해 및 DNA 서열분석으로 확인하였다. 제조합 플라스미드의 DNA 농도를 분광광도계로 측정하였다.

표 6

포라이머	방향	포라이머 서열번호	격음
전체 포라이머			
KPNPCV1.U.	>	5'-TTTGGTACCCCGAAGCCGATT-3 (서열번호 7에 상응함)	PCV1 DNA 클론 작제
KPNPCV1.L.	<	5'-ATTGGTACCTCCGTGGATTGTTCT-3 (서열번호 8에 상응함)	PCV1 DNA 클론 작제
Hpa 1-2	<	5'-GAAGTTAACCCCTAATGAATATAAATAAACACCATTAAG-3 (서열번호 9에 상응함)	PCV1-2 DNA 클론 작제
Nar 1-3	>	5'-GGTGGCGCCTCCTTGATACGTCATCCTATAAAGTG-3 (서열번호 10에 상응함)	PCV1-2 DNA 클론 작제
Psi 1-5	>	5'-AGGTTATTAAGTGGGGGCTTTAAGATTAA-3 (서열번호 11에 상응함)	PCV1-2 DNA 클론 작제
Acl 1-6	<	5'-GGAAACGTTACCCGACGAGAAAGACAC-3 (서열번호 12에 상응함)	PCV1-2 DNA 클론 작제
Bgl-II-ORE2	>	5'-ACTATAGATCTTATTATTAGAGGGTCTTCAG-3 (서열번호 13에 상응함)	PCV2-1 DNA 클론 작제
SpH-1-ORE2	<	5'-TACGGGCAATGATGACGTGGCCAAAGAGG-3 (서열번호 14에 상응함)	PCV2-1 DNA 클론 작제
Bgl-II-PCV2	<	5'-AGAGGAGATCTATGAATATAAATAACATTAAGAA-3 (서열번호 15에 상응함)	PCV2-1 DNA 클론 작제
SpH-1-PCV2	>	5'-CGTAAGCATGACGCTGAACGAAAGAAAGTG-3 (서열번호 16에 상응함)	PCV2-1 DNA 클론 작제
검출 포라이머			
MCV1	>	5'-GCTGAACCTTTGAAAGTGAAGCGGG-3 (서열번호 17에 상응함)	PCV1 및 PCV2 검출
MCV2	<	5'-TCACACAGTCTCAGTGAATGATCCCA-3 (서열번호 18에 상응함)	PCV1 및 PCV2 검출
Of-PCV1	<	5'-CCACTTTGTAACCCCTCCCA-3 (서열번호 19에 상응함)	PCV1 및 PCV2-1 검출
Gen.PCV1	>	5'-GTGGACCCACCCCTGTGC-3 (서열번호 20에 상응함)	PCV1 및 PCV1-2 검출
Of-PCV1	<	5'-CCAGCTGTGGCTCCATTAA-3 (서열번호 21에 상응함)	PCV1 및 PCV1-2 검출
Of-PCV1	>	5'-TTCCCATATAAATAAATTAAGTGTCT-3 (서열번호 22에 상응함)	PCV1 및 PCV1-2 검출
Gen.PCV2	<	5'-CAGTCAGAACGCGCTCTCTG-3 (서열번호 23에 상응함)	PCV2 및 PCV1-2 검출
Gen.PCV2	>	5'-CTAGAAACAGAGTGGGATG-3 (서열번호 24에 상응함)	PCV2 및 PCV2-1 검출
Of-PCV2	<	5'-TTGTAAACAAGGACACAGC-3 (서열번호 25에 상응함)	PCV2 및 PCV2-1 검출
Of-PCV2	>	5'-GTGTGATGATATTCATTTGACTTG-3 (서열번호 26에 상응함)	PCV2 및 PCV2-1 검출

본 발명에서 사용된 올리고뉴클레오타이드 포라이머

[0141]

실시예 10

바이러스로 오염되지 않은 PK-15 세포내로 형질감염시킨 경우의 PCV1 DNA 클론의 감염력 평가

[0142]

[0143]

[0144]

PCV1 분자성 DNA 클론의 감염력을 PK-15 세포의 시험관내 형질감염에 의해 측정하였다. PCV1 특이적 모노클로날 항체(고르돈 알란 박사(Dr. Gordon Allan, Belfast, U.K.)로부터 입수함)를 이용한 IFA는 PCV1 분자성 DNA 클론이 PK-15 세포에서 감염성임을 확인시켰다. PCV1 특이적 항체는 IFA에 의해 형질감염된 세포의 형질감염된

세포의 핵내에서 및 보다 적은 정도로 세포질내에서 가시화되었다. 공 pSK 벡터로 모의 형질감염된 세포는 PCV1 항원에 대해 음성을 유지하였다.

[0145] 실시예 11

[0146] 키메라 PCV1-2 바이러스성 DNA 클론의 작제

[0147] 키메라 바이러스는 PCV1 및 PCV2의 감염성 DNA 클론을 사용하여 비병원성 PCV1 및 PMWS-관련 PCV2 간에 작제하였다. 키메라 PCV1-2 DNA 클론을 작제하기 위해, 비병원성 PCV1의 ORF2 캡시드 유전자를 PCV1의 게놈 골격내에서 PCV1 감염성 DNA 클론으로부터 제거하고 병원성 PCV2의 면역원성 ORF2 캡시드 유전자로 대체시켰다(도 5 및 6 참조). 2쌍의 PCR 프라이머를 디자인하였다. PCV2 ORF2에 대한 첫번째 프라이머 쌍, 즉 서열번호 11에 제시한 Psi I-5 및 서열번호 12에 제시한 Acl I-6를, 제한 효소 부위 AclI 및 PsiI를 생성시키는 프라이머의 5' 말단에서의 점 돌연변이를 이용해 디자인하여, PCV2의 ORF2 유전자를 증폭시키고 점 돌연변이에 의해 플랭킹(flanking) PsiI 및 AclI 제한 효소 부위를 도입시켰다. PCV2 ORF2 증폭을 위한 PCR 반응은 95℃에서 9분 동안의 초기 단계, 이어서 95℃에서 1분 동안 변성시키고 48℃에서 1분 동안 어닐링시키고 72℃에서 1분 동안 신장시키고 72℃에서 7분 동안 최종 신장시키는 35회 사이클로 이루어진다.

[0148] 두번째 PCR 프라이머 쌍, 즉 서열번호 9에 제시한 Hpa I-2 및 서열번호 10에 제시한 Nar I-3을 pSK+ 벡터 및 이의 PCV1 게놈 삽입체의 증폭용으로 디자인하였다. 점 돌연변이를 PCR 프라이머의 5' 말단에 도입시켜 플랭킹 제한 효소 부위 NarI 및 HpaI를 생성시켰다. 상기 프라이머 쌍으로, PCR 주형으로서 PCV1 감염성 DNA 클론을 이용하여 pSK+ 벡터, 및 ORF2 캡시드 유전자가 결여된 이의 삽입체 PCV1 게놈 DNA, 즉 PCV1 게놈 - PCV1 ORF2(pSK-PCV1 ΔORF2)를 증폭시켰다. PCR 반응은 95℃에서 9분 동안의 초기 단계, 이어서 95℃에서 1분 동안 변성시키고 50℃에서 1분 동안 어닐링시키고 72℃에서 3.5분 동안 신장시키고 72℃에서 7분 동안 최종 신장시키는 35회 사이클로 이루어진다. PCV2 ORF2 PCR 생성물을 AclI 및 PsiI로 분해시켜 PCR 도입된 점 돌연변이를 제거하였다. pSK-PCV1 ΔORF2 생성물(PCV1의 ORF2 유전자 부재인 pSK 벡터-PCV1 게놈 PCR 생성물)을 NarI 및 HpaI로 분해하여 PCR 도입된 점 돌연변이를 제거하였다. 후자 분해는 AclI 및 PsiI 제한 효소에 의해 분해된 PCV2 ORF2 PCR 생성물에 상보적인 점착성 말단 및 평활 말단을 생성시켰다. 분해된 PCV2 ORF2 생성물 및 ORF2-결실된 pSK-PCV1 생성물을 T4 DNA 리가제로 연결시켜, PCV1의 ORF2 유전자가 PCV2의 ORF2 유전자로 대체된 키메라 PCV1-2 게놈 DNA 클론을 형성시켰다. 일단 2개의 PCR 생성물이 분해되고 재연결되면, 클로닝을 촉진시키는 데 사용한 모든 PCR 도입된 점 돌연변이가 수득된 키메라 클론에서 제거되었다. 에스케리키아 콜라이 DH5 α 수용능 세포를 형질전환시켰다. 키메라 DNA 클론을 함유하는 재조합 플라스미드를 분리시키고, PCR, 제한 효소 분해 및 부분적 DNA 서열분석으로 확인하였다. 전체 길이 키메라 PCV1-2 게놈을 KpnI 분해로 pSK+ 벡터(재조합 플라스미드)로부터 절단하였다. 이어서, 키메라 DNA 게놈을 선형 이량체의 형성을 촉진하는, T4 DNA 리가제에 의한 짧은 10분 연결 반응으로 이량체화시켜 PCV1-2 키메라 감염성 DNA 클론을 제조하였다(도 6). 2개의 키메라 바이러스 게놈 복사체를 함유하는 재조합 플라스미드를 PCR, 제한 효소 분해 및 DNA 서열분석으로 확인하였다.

[0149] 실시예 12

[0150] PCV1-2 키메라 DNA 클론의 시험관내 감염력의 평가

[0151] 키메라 PCV DNA 클론(PCV2의 면역원성 캡시드 유전자를 갖는 비병원성 PCV1)을 PK-15 세포에서 시험하였다. PK-15 세포를 키메라 바이러스성 DNA 클론으로 형질감염시킨 경우, PCV2 ORF2 캡시드에 특이적인 바이러스 항원이 형질감염후 약 2일째에 IFA에 의해 검출되었다. PCV1 캡시드 항원은 형질감염된 세포에서 검출되었다. 당해 실험은 키메라 DNA 클론이 시험관내에서 감염성이며 PK-15 세포에서 복제되며 PCV2의 면역원성 캡시드 단백질을 생산함을 나타낸다.

[0152] 실시예 13

[0153] 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론의 작제

[0154] 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론을 작제하기 위해, 병원성 PCV2의 게놈 골격내의 PCV2의 ORF2 캡시드 유전자를 비병원성 PCV1의 ORF2 캡시드 유전자로 대체시킨다(도 6). 2개의 PCR 프라이머 쌍을 디자인하였다: 서열번호 13에 제시된 BglI-II-ORF2 및 서열번호 14에 제시된 SpH-I-ORF2의 한쌍은 PCV1 ORF2 유전자를 증폭시키고 점 돌연변이에 의해 플랭킹 BglII 및 SpHI 제한 효소 부위를 도입시킨다. 두번째 PCR 프라이머 쌍, 즉 서열번호 15에 제시

된 BglI-II-PCV2 및 서열번호 16에 제시된 SpH-I-PCV2로, PCR 주형으로서 PCR2 감염성 DNA 클론을 이용하여 pSK 벡터 및 PCV2 게놈 - ORF2 유전자(pSK-PCV2 ΔORF2)를 증폭시키고, 점 돌연변이에 의해 플랜킹 제한 효소 부위 BglII 및 SpHI를 도입시켰다. pSK-PCV2 ΔORF2 생성물 및 PCV1 ORF2 PCR 생성물을 BglII 및 SpHI 제한 효소로 분해시켜 서로 상보적인 접착성 및 평활 말단을 생성시켰다. 이. 콜라이내로 형질전환시킨 후, 진정한 재조합 플라스미드를 분리시키고, 효소 분해 및 부분적 DNA 서열분석으로 확인하였다. 전체 길이 역 키메라 PCV2-1 게놈을 SacII 분해로 재조합 플라스미드로부터 절단하고, 본원에서 기술한 바와 같이 이량체화시켜 역 키메라 PCV2-1 감염성 클론을 제조하였다.

[0155] 실시예 14

[0156] PCV1, PCV2, PCV1-2 및 PCV2-1 DNA 클론에 의한 PK-15 세포의 시험관내 형질감염

[0157] 시험관내 및 생체내에서의 PCV2 클론의 감염력은 상기 실시예 3 내지 5에서 입증되었다. 시험관내에서의 PCV1 및 2개의 키메라 클론의 감염력을 시험하기 위해, 실시예 1의 방법에 따라 제조한, PCV1으로 오염되지 않은 PK-15 세포를 8-웰 LabTek 챔버 슬라이드 (제조원: Nalge Nunc Int., Denmark)에서 성장시켰다. PK-15 세포가 약 80% 합류성에 도달하면, 세포를 제조업자(Life Technologies, Inc.)에 의해 공급된 프로토콜에 따라 리포펙타민 플러스 시약을 이용하여 각각 PCV1, PCV2, PCV1-2 및 PCV2-1 DNA 클론으로 형질감염시켰다. 공 pSK 벡터로 모의 형질감염된 세포를 대조군으로서 포함시켰다. 형질감염한지 3일 후, 세포를 4℃에서 20분 동안 80% 아세톤과 20% 메탄올을 함유하는 용액으로 고정시켰다. PCV1 및 PCV2-1 DNA 클론으로 형질감염된 세포에서의 감염력 및 바이러스 복제의 증거를 G. M. 알란 박사[참조: G. M. Allan et al., "Production, preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus, "Vet. Immunol. Immunopathol. 43:357-371 (1994)]가 친절하게 제공한 PCV1 ORF2 캡시드 유전자에 대한 모노클로날 항체를 이용하여 간접 면역형광 및 점진(IFA)으로 확인하였다. 고정된 세포를 포스페이트 완충된 식염수(PBS)로 세척하고 1:20 희석된 PCV1 모노클로날 항체와 함께 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 세포를 PBS 완충액으로 3회 세척하고 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 표지된 염소 항-마우스 면역글로불린 G(제조원: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.)과 함께 37℃에서 45분 동안 항온처리하였다. PBS 완충액으로 3회 세척한 후, 슬라이드를 플루오로마운트-G로 봉입하고 커버슬립을 덮고 형광 현미경으로 검사하였다. PCV2 및 키메라 PCV1-2 DNA 클론으로 형질감염된 세포의 감염력을 실시예 4에서 이미 기술한 바와 같은 PCV2에 특이적인 항체를 이용하여 IFA로 확인하였다.

[0158] PCV1, 키메라 PCV1-2 DNA 및 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론의 감염력을 PK-15 세포의 시험관내 형질감염으로 입증하였다. 2개의 동일한 완전한 PCV1 게놈 복사체를 pSK 벡터내에서 직렬로 연결시켜 PCV1 DNA 클론을 제조하였다(도 6). 키메라 PCV1-2 DNA 클론은 비병원성 PCV1 게놈의 골격내에서 PCV1의 ORF2 캡시드 유전자가 병원성 PCV2의 ORF2 캡시드 유전자로 대체되어 있다. 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론은 병원성 PCV2 게놈의 골격내에서 PCV2의 ORF2 캡시드 유전자가 비병원성 PCV1의 ORF2 캡시드 유전자로 대체되어 있다. 시험관내에서 감염성이라면, 키메라 PCV1-2 DNA 클론은 형질감염된 PK-15 세포에서 PCV2의 ORF2 캡시드 유전자를 생산할 것이고 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론은 PCV1 ORF2 캡시드 항원을 발현할 것이다. 당해 결과는 PCV1, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론이 PK-15 세포로 형질감염된 경우 놀랍게도 모두 감염성인 것으로 나타났으며, PCV1 또는 PCV2에 특이적인 항체를 이용한 IFA로 입증되는 바와 같이 각각의 바이러스 캡시드 항원을 발현하였다. PCV1 ORF2에 대한 모노클로날 항체 및 PCV2에 대한 항체를 이용한 IFA는 PCV1 DNA 및 PCV1-2 DNA 클론이 감염성임을 확인시켰다. PCV1 ORF2-특이적 모노클로날 항체를 이용한 IFA는 PCV1-2 키메라 DNA 클론도 또한 감염성임을 나타냈다. 형질감염된 PK-15 세포중 약 10 내지 20%가 PCV1 캡시드 항원 및 PCV2 항원에 대해 양성이었으며 형질감염된 세포의 핵내에서 PCV1 ORF2 항원을 발현하였다(도 7).

[0159] 실시예 15

[0160] PCV1, PCV2, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론을 이용한 돼지의 실험 접종

[0161] 키메라 DNA 클론의 면역원성 및 병원성을 평가하기 위해, 40마리의 4주령 특정 병원균 부재(SPF) 돼지를 각각 10마리씩 4개의 룸에 무작위적으로 배정하였다. 접종 전에, 동물을 PCV, PRRSV, PPV 및 돼지 B형 간염 바이러스에 대한 항체에 대해 시험하였다. 또한, 접종전 혈청 샘플을 PCV1 및 PCV2 핵산에 대해 PCR로 시험하여 돼지가 어떠한 바이러스로도 자연 감염되지 않았음을 확인하였다. PCV1, PCV2, PCV1-2 및 PCV2-1 DNA 클론은 모두, 클로닝된 플라스미드 DNA를 돼지의 표재성 장골 림프절내로 직접 주사함으로써 접종하였다. 그룹 1의 돼지에게는 포스페이트 완충된 식염수(PBS)를 투여하였고 음성 대조군으로서 사용하였다. 그룹 2 돼지에게는 각각 감염성 PCV1 DNA 클론 200μg을 표재성 좌골 림프절에 주사하였다. 그룹 3 돼지에게는 각각 감염성 PCV2 클론

200 μ g을 표재성 좌골 림프절에 주사하였다. 그룹 4 돼지에는 각각 감염성 키메라 PCV1-2 DNA 클론 200 μ g을 표재성 좌골 림프절에 주사하였다. 그룹 5 돼지에게는 각각 감염성 역 키메라 PCV2-1 DNA 클론 200 μ g을 표재성 좌골 림프절에 주사하였다. 모든 동물은 질환의 임상 징후에 대해 매일 모니터링하였다. 혈청 샘플을 -2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 및 49 접종후 경과일(DPI)에 각각의 동물로부터 수집하였다. 21 DPI에, 각 그룹으로부터 무작위적으로 선택한 4마리의 동물을 부검하였다. 각 그룹의 나머지 4마리 동물은 49 DPI에 부검하였다. 다양한 조직 및 기관을 실시예 7에서 이미 기술한 바와 같이 부검 동안 수집하고, 조직학적 검사를 위해 가공하였다.

[0162] PCV1, PCV2 및 키메라 감염성 DNA 클론의 면역원성을 돼지에서 검사하였다. 모든 대조군 및 접종된 동물로부터 -2 (0), 7, 14, 21, 28, 35, 42 및 49 DPI에서 수집한 혈청 샘플은, 클론-특이적 DNA 서열을 PCR로 검출함으로써 PCV1, PCV2, PCV1-2 및 PCV2-1 바이러스혈증에 대해 검정하고, IFA로 항-PCV1 항체에 대해 검정하고 ELISA로 항-PCV2 ORF2 항체에 대해 검정하였다. 접종전에 -2 DPI에서, 모든 다섯 그룹으로부터의 동물은 PCR에 의해 PCV1 및 PCV2 DNA 둘다에 대해 음성인 것으로 판명되었다.

[0163] 음성 대조군 동물은 연구 전반에 걸쳐 PCV1 및 PCV2 바이러스혈증 둘다에 대해 음성이었다(하기 표 7 참조). 접종되지 않은 대조군 그룹의 5마리의 돼지는 -2 DPI에서 검출가능한 PCV2 모체이행 항체를 지녔으며 2마리의 돼지는 7 DPI에서 검출가능한 PCV1 모체이행 항체를 지녔다(하기 표 8 참조). 이들 돼지에서 PCV1 및 PCV2 둘다에 대한 모체이행 항체는 21 DPI까지 감소되었다. 연구 전반에 걸쳐서 8마리의 접종되지 않은 대조군 돼지 중 어떠한 돼지에서도 PCV1 또는 PCV2로의 혈청전환은 검출되지 않았다.

[0164] PCV1 접종된 그룹에서, 바이러스혈증은 7 DPI에서 접종된 돼지에서 먼저 검출되었으며 35 DPI에서 나중에 검출되었다. PCV1 감염성 DNA 클론으로 접종된 8마리의 동물 중 5마리는 PCV1 바이러스혈증에 대해 양성이었다. 연속적 PCV1 바이러스혈증의 평균 기간은 0.625주였다. 21 DPI까지, PCV1 접종된 그룹의 모든 동물은 PCV1으로 혈청전환되었으며 49 DPI에 연구가 종결될 때까지 PCV1 항체에 대해 양성을 유지하였다.

[0165] 본원에서 PCV2 DNA 클론은 돼지에서 감염성인 것으로 나타난다. PCV2 DNA 클론이 접종된 그룹에서, PCV2 바이러스혈증은 7 DPI에서 먼저 검출되었다(하기 표 7). 21 DPI까지, 모든 PCV2 접종된 그룹 3 동물은 PCV2 바이러스혈증에 대해 양성이었다. PCV2 바이러스혈증의 평균 기간은 2.12주이었다. PCV2 접종된 그룹의 2마리의 돼지는 7 DPI에서 검출가능한 수준의 PCV2 모체이행 항체를 지녔으며(하기 표 8), 3마리 돼지의 모체이행 항체는 14 DPI까지 감소되었다. PCV2-특이적 ELISA에 의해 검정된 PCV2로의 혈청전환은 35 DPI에서 먼저 검출되었다. 42 DPI까지, PCV2 감염성 DNA로 접종된 모든 돼지들은 PCV2로 혈청전환되었다.

[0166] PCV1-2 키메라 감염성 DNA 클론으로 접종된 그룹 4 돼지에서, 키메라 바이러스에 특이적인 바이러스혈증은 14 DPI에서 먼저 검출되었다(하기 표 7). 7마리의 접종된 동물 중 4마리는 14 DPI 내지 42 DPI에 PCV1-2에 대한 바이러스혈증을 나타냈다. 키메라 PCV1-2 바이러스혈증의 평균 기간은 1주이었다. 1마리의 돼지는 7 및 14 DPI에서 측정가능한 수준의 PCV2 모체이행 항체를 지녔지만, 모체이행 항체는 21 DPI까지 감소되었다(하기 표 8). PCV2 ORF2-특이적 항체는 28 DPI에서 먼저 발생되었다. 49 DPI까지, 키메라 PCV1-2 DNA 클론으로 접종된 모든 돼지들은 PCV2 ORF2-특이적 항체로 혈청전환되었다.

[0167] 역 키메라 PCV2-1 DNA로 접종된 돼지에서, PCV2-1 키메라 바이러스에 특이적인 바이러스성 DNA는 혈청 샘플에서 검출되지 않았다(하기 표 7). 그러나, 21 DPI까지, 그룹 5의 모든 동물들은 PCV1 항체로 혈청전환되었다. 각 그룹의 선택된 돼지로부터 증폭된 PCR 생성물을 서열분석하여, 각 그룹의 접종시에 사용된 진정한 각각의 감염성 클론임을 확인하였다.

표 7

[0168] 접종된 돼지 및 대조군 돼지의 혈청내에서 네스티드 PCR에 의한 바이러스혈증의 검출

그룹	접종물	DPI								총계
		-2	7	14	21	28	35	42	49	
1	PBS ^a	0/8 ^b	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8
2	PCV1 DNA ^c	0/8	1/8	1/8	2/8	0/4	2/4	0/4	0/4	5/8
3	PCV2 DNA ^c	0/8	3/8	6/8	7/8	1/4	2/4	2/4	0/4	8/8
4	PCV1-2 DNA ^c	0/7	0/7	1/7	2/7	2/4	2/4	2/4	0/4	4/7

5	PCV2-1 DNA ^c	0/8	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8
^a 포스페이트 완충된 식염수(PBS)를 음성 대조군으로서 사용하였다. ^b 각 그룹의 8마리의 돼지; 양성인 마릿수/시험된 마릿수 ^c 클로닝된 계통 PCV 또는 키메라 PCV DNA										

표 8

PCV2 또는 키메라 PCV1-2 DNA 클론으로 접종된 돼지에 서서의 PCV2에 대한 항체로의 혈청정화 및 PCV1 또는 PCV2-1 DNA 클론으로 접종된 돼지에 서서의 PCV1에 대한 항체로의 혈청정화										
그룹	접종물 ^a	시험된 항체	DPI ^c							
			2	7	14	21	28	35	42	49
1	PBS	PCV1 PCV2	NA	2/8	2/8	1/8	0/4	0/4	0/4	0/4
2	PCV1 DNA	PCV1 ORF2	5/8	5/8	2/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4
3	PCV2 DNA	PCV2 완전한 바이러스	NA	3/8	2/8	8/8	4/4	4/4	4/4	4/4
4	PCV1-2 DNA	PCV2 완전한 바이러스	3/8	2/8	0/8	0/8	0/4	3/4	4/4	4/4
5	PCV2-1 DNA	PCV1 ORF2	2/8	1/8	1/8	0/8	1/4	1/4	3/4	4/4
			NA	3/8	3/8	8/8	3/4	3/4	4/4	4/4

^a 포스페이트 완충된 식염수(PBS)를 음성 대조군으로서 사용하였다.
^b 접종물은 PSK 클라스트내의 클로닝된 계통 PCV 및 PCV 키메라 DNA이었다.
^c ORF2에 대한 PCV1 항체는 PCV1 항원에 특이적인 간접 면역형광 검정으로 측정하였다. PCV2 항체는 효소-연관 면역흡착 검정으로 측정하였다.
^d 접종 후 경과일, 양성인 마릿수/시험된 마릿수

[0169]

[0170] 실시예 16

[0171] 임상 평가

[0172] 돼지들을 0 DPI 및 부검시에 청량하였다. 직장 온도, 및 0 내지 6(0= 정상, 6= 중증) 범위의 임상 호흡기 질환 스코어[참조: P. G. Halbur et al., "Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus, "Vet. Pathol. 32:648-660 (1995)]를 0 DPI부터 49 DPI까지 격일로 기록하였다. 중추신경계 질환, 간 질환(황달), 근골격 질환 및 신체 조건의 변화를 포함하는 임상적 관찰도 매일 기록하였다. 2명의 사람으로 이루어진 팀이 모든 임상 평가를 수

행하였다.

[0173] 대조군 또는 접종된 돼지 중 어떠한 돼지도 전체-스펙트럼 임상 PMWS의 명백한 징후를 나타내지 않았다. 모든 그룹 간에 체중 증가 또는 평균 직장 온도의 차이는 없었다. PCV1-2 접종된 그룹 3으로부터의 돼지 중 1마리는 접종한지 1일 후에 사망하였다. 부검 및 임상 분석 후, 병원체는 검출되지 않았으며, 접종 과정 또는 키메라 PCV1-2 바이러스와 관련되지 않았다.

[0174] 실시예 17

[0175] 육안적 병리학 및 조직병리학

[0176] 각 그룹으로부터의 4마리 돼지들을 각각 21 및 49 DPI에 부검하였다. 부검 팀은 부검시에 돼지의 감염 상황에 대해 알지 못하도록 하였다. 완벽한 부검을 모든 돼지에 대해 수행하였다. 상당히 가시적인 폐렴을 앓는 폐의 추정된 비율을 이미 기술한 스코어 시스템[참조: P. G. Halbur et al., 1995, supra]에 기초하여 각 돼지에 대해 기록한다. 림프절의 팽창과 같은 기타 병소가 별도로 주지되었다. 조직병리학 검사용 절편을 비갑개, 폐(7개의 절편)(id.), 심장, 뇌, 림프절(기관기관지, 장골, 장간막, 설하), 편도, 흉선, 간, 담낭, 지라, 관절, 소장, 결장, 췌장 및 신장으로부터 취하였다. 조직을 실시예 7에서 기술한 바와 같이 맹검 방식으로 검사하고 폐, 림프절 및 간 병소의 중증도에 대한 주관적 스코어로서 기록하였다. 폐 스코어는 0(정상) 내지 3(중증 림프조직구성 간질성 폐렴)의 범위였다. 간 스코어는 0(정상) 내지 3(중증 림프조직구성 간염)의 범위였다. 림프절 스코어는 소포의 림프구 고갈의 추정량에 대한 것이며 0(정상 또는 림프구 고갈이 없음) 내지 3(중증 림프구 고갈 및 소포의 조직구 대체)의 범위였다.

[0177] 돼지에서 PCV1, PCV2, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 감염성 DNA 클론의 병원성을 측정하기 위해, 육안적 병소를 먼저 검사하였다. 결과는 하기 표 9에 제시한다. 접종되지 않은 대조군 그룹 1로부터의 동물의 림프절은 21 및 49 DPI 둘다에서 정상이었다. 접종된 네 그룹의 돼지들은 림프절로 제한되는 다양한 정도의 육안적 병소를 지녔다. PCV1 접종된 그룹 2 돼지에서, 림프절은 21 DPI에서 육안상으로는 정상이었으나, 경미한 내지 중간 정도의 림프절의 팽창 및 변색이 49 DPI에 검출되었다. 모든 PCV2 접종된 그룹 3 돼지들은 21 및 49 DPI 둘다에서 정상 크기의 2배 내지 5배로 팽창된, 단단하고 황갈색의 림프절을 나타냈다. 키메라 PCV1-2 접종된 동물로부터의 림프절은 7마리의 돼지 중 5마리에서 21 및 49 DPI 둘다에서 경미한 내지 중간정도로 팽창되고 변색되었다. PCV2-1 클론으로 접종된 그룹 5 돼지에서, 8마리의 동물 중 1마리는 21 DPI에 림프절의 경미한 팽창 및 변색을 나타냈다. 키메라 PCV1-2 클론으로 접종된 돼지에서의 림프절의 육안적 병소의 평균 스코어는 그룹 1, 2 및 5의 돼지들의 평균 스코어와 통계학적으로 상이하지 않았지만, 21 및 49 DPI에서 병원성 PCV2 접종된 그룹 3 돼지들의 평균 스코어와는 통계학적으로 상이하였다. 49 DPI에서 PCV1, PC2 및 PCV1-2 접종된 동물의 평균 림프구 육안적 병소 스코어는 서로 통계학적으로 상이하지 않았지만, 모두 그룹 1과 5의 평균 육안적 병소 스코어와는 통계학적으로 상이하였다.

[0178] 이어서, 현미경적 병소를 검사하였다. 결과는 하기 표 10에 제시한다. 모든 DPI에서 접종되지 않은 대조군 그룹 1 돼지 또는 PCV1 접종된 그룹 2 돼지 중 어떠한 돼지에서도 현미경적 병소는 검출되지 않았다. 경미한 세 기관지주위 림프혈장구성 및 조직구성 기관지간질성 폐렴을 특징으로 하는 현미경적 폐 병소는 8마리의 PCV2 접종된 돼지 중 1마리에서 관찰되었다. PCV1-2 및 PCV2-1 접종된 동물에서, 현미경적 병소는 폐에서 관찰되지 않았다. 모든 접종된 동물의 흉선에서는 병소가 관찰되지 않았다. 경미한 다초점 림프혈장구성 심근염이 PCV2 접종된 그룹의 8마리의 돼지 중 2마리에서 관찰되었다. PCV1-2 및 PCV2-1 접종된 동물로부터의 심장 조직에는 현미경적 병소가 없었다. 경미한 다초점 림프혈장구성 간질성 신염은 PCV2 접종된 그룹의 8마리의 돼지 중 4마리에서, 7마리의 PCV1-2 접종된 돼지 중 2마리에서 및 8마리의 PCV2-1 접종된 돼지 중 1마리에서 관찰되었다. 경미한 내지 중간 정도의 림프구 고갈 및 소포의 조직구 대체는 PCV2-접종된 그룹에서 8마리의 돼지 중 5마리의 편도에서, 8마리의 돼지 중 3마리의 비장에서 및 8마리의 돼지 중 8마리의 림프절에서 관찰되었다. 키메라 PCV1-2 접종된 동물에서, 경미한 림프구 고갈 및 소포의 조직구 대체는 7마리의 돼지 중 2마리의 림프절에서 관찰되었지만, 비장 또는 편도에서는 관찰되지 않았다. 림프구 고갈 및 소포의 조직구 대체는 역 키메라 PCV2-1 접종된 동물의 림프절, 비장 또는 편도에서는 관찰되지 않았다. 경미한 내지 중간 정도의 림프혈장구성 간염은 8마리의 PCV2-1 접종된 돼지 중 7마리에서 관찰되었다. 경미한 림프혈장구성 간염은 7마리의 키메라 PCV1-2 접종된 돼지 중 2마리에서 관찰되었다. 역 키메라 PCV2-1 접종된 돼지에서는 림프혈장구성 간염이 관찰되지 않았다. 다른 조직내의 병소는 두드러지지 않았다.

[0179] 폐, 간 및 림프절내의 현미경적 병소는 공개된 스코어 시스템[참조: P. G. Halbur et al., 1995, supra]에 따라 스코어를 매겼다. 결과는 하기 표 10에 제시한다. 키메라 PCV1-2 접종된 그룹 4로부터의 돼지의 림프절내

의 병소의 평균 스코어는 그룹 1, 2 및 5로부터의 스코어와 유사하였지만, 21 및 49 DPI 둘다에서 병원성 PCV2 접종된 그룹 3 돼지의 스코어와 통계학적으로 상이하였다. 21 DPI에서 키메라 PCV1-2 접종된 그룹으로부터의 평균 현미경적 간 스코어는 PCV2 접종된 그룹 3의 스코어와 통계학적으로 상이하지 않았지만, 21 DPI에서 그룹 1, 2 및 5 돼지의 평균 현미경적 간 스코어와 유사하였다. 49 DPI에서, 그룹 4 키메라 PCV1-2 접종된 돼지로부터의 평균 현미경적 간 스코어는 그룹 1, 2, 3 및 5 돼지들의 평균 현미경적 간 스코어와 통계학적으로 상이하지 않았다. 기타 조직이나 기관용으로 적절한 스코어 시스템은 없었다.

표 9

대조군 및 접종된 돼지에서 림프절의 육안적 병소

그룹	접종물 ^a	DPI ^b	
		21	49
1	PBS	0/4(0.0)	0/4(0.0)
2	PCV1 DNA	0/4(0.0)	4/4(1.5)
3	PCV1 DNA		4/4(2.25)
4	PCV1-2 DNA	4/4(2.5)	3/4(1.25)
5	PCV2-1 DNA	2/3(0.66)	0/4(0.0)
		1/4(0.25)	
^a 포스페이트 완충된 식염수(PBS)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 접종물은 pSK 플라스미드내의 클로닝된 게놈 PCV 및 PCV 키메라 DNA이었다. ^b 각 그룹으로부터의 4마리의 돼지들은 21 DPI에서 부검하였고 나머지 돼지들은 49 DPI에서 부검하였다; 양성인 마릿수/시험된 마릿수. 병소를 지닌 마릿수/시험된 마릿수(검사된 중증 림프절 팽창의 범위)			

표 10

대조군 및 접종된 돼지로부터의 상이한 조직/기관에서의 조직병리학적 병소의 분포

그룹	접종물 ^a	DPI ^b	폐 ^c	간 ^d	림프절 ^e	비장	흉선	회장	뇌	심장	신장	편도
1	PBS	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
2	PCV1 DNA	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	PCV2 DNA	21	0/4(0.0)	4/4(1.5)	4/4(1.75)	3/4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	3/4
		49	1/4(0.25)	3/4(0.75)	4/4(1.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	2/4
4	PCV1-2-DNA	21	0/3(0.0)	1/3(0.33)	1/3(0.33)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	1/4(0.25)	1/4(0.25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4
5	PCV2-1-DNA	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	1/4(0.25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

^a 포스페이브 완충된 식염수(PBS)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 접종물은 PSK 플라스미드내의 클로닝된 게놈 PCV 또는 키메라 PCV DNA이었다.

^b 각 그룹은 49 DPI에서 부검하였다.

^c 양성인 마릿수/시험된 마릿수(평균 조직학적 배 스코어: 0= 정상, 1= 경미한 간염, 2= 중간 정도, 3= 중증)

^d 양성인 마릿수/시험된 마릿수(평균 조직학적 간 스코어: 0= 정상, 1= 경미한 간염, 2= 중간 정도, 3= 중증)

^e 양성인 마릿수/시험된 마릿수(평균 조직학적 림프구(림프절) 포괄 스코어: 0= 정상, 1= 경미함, 2= 중간 정도, 3= 중증)

실시예 18

혈청화

혈액을 -2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 및 49 DPI에서 모든 동물로부터 수집하였다. PRRSV에 대한 혈청 항체를 Herd Check PRRSV ELISA(제조사: IDEXX Laboratories, Westbrook, Mass.)를 사용하여 검정하였다. PPV에 대한 혈청 항체를 적혈구응집 억제(HI) 검정[참조: H. S. Joo et al., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody, "Aust. Vet. J. 52:422-424 (1976)]으로 검출하였다. PCV2에 대한 혈청 항체를 상기한 바와 같은 PCV2의 제조함 ORF2 캡시드 단백질에 기초하여 변형된 간접 ELISA [참조: P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV, "Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1:33-40 (2002)]로 검출하였다. PCV1에 대한 혈청 항체를 간접 면역형광 검정(IFA)으로 검출하였다. PCV1으로 감염된 PK-15 세포를 8-웰 LabTek 챔버 슬라이드에서 성장시켰다. 감염된 PK-15 세포가 약 95 내지 100% 합류성에 도달하면, 감염된 세포를 4℃에서 20분 동안 80% 아세톤과 20% 메탄올을 함유하는 용액으로 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS 완충액으로 1회 세척하였다. PBS 중의 1:10 희석된 돼지 혈청 샘플 100μg를 챔버에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 세포를 PBS로 3회 세척하고 37℃에서 45분 동안 FITC-표지된 염소 항-돼지 2차 항체와 함께 항온처리하였다. 이어서, 슬라이드를 PBS로 3회 세척하고, 플루오로마운트-G로 봉입시키고 커버슬립으로 덮고 형광 현미경으로 검사하였다. 양성 대조군의 경우, PCV1 감염된 세포를 희석된 PCV1 특이적 모노클로날 항체(G. M. 알란 박사가 제공함)와 함께 항온처리한 다음, FITC-표지된

염소 항-마우스 IgG(제조원: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.)와 함께 항온처리하였다. 음성 대조군의 경우, PCV1 감염된 세포를 PCV1 및 PCV2 항체를 함유하지 않는 1:10 희석된 돼지 혈청과 함께 항온처리한 다음, FITC-표지된 염소 항-돼지 IgG(제조원: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.)과 함께 항온처리하였다.

[0185] 실시예 19

[0186] PCR 검출

[0187] 접종된 돼지로부터의 혈청내에서 PCV1, PCV2, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1 바이러스혈증을 검출하기 위해, 상이한 DPI에서 수집한 혈청 샘플을 PCR로 시험하였다. 바이러스성 DNA를 제조업자의 프로토콜(Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio)에 따라 DNAzol 시약을 이용하여 각 혈청 샘플 100 μ l로부터 추출하였다. 추출된 DNA를 DNase, RNase 및 프로테이나제 비함유 물 속에 재현탁시켰다. PCV1, PCV2, 키메라 PCV1-2 및 역 키메라 PCV2-1의 클론-특이적 게놈 서열을 증폭시키기 위해, 두 세트의 네스티드(nested) PCR 프라이머 쌍을 디자인하였다(상기 표 6). 첫번째 세트의 네스티드 프라이머는 공개된 PCV1 서열에 기초하여 디자인하였다. 프라이머, 즉 서열번호 20에 제시한 Gen.PCV1 및 서열번호 19에 제시한 Orf.PCV1로 PCV1 게놈의 존재하에 400bp 단편을 증폭시켰다. 네스티드 프라이머, 즉 서열번호 22에 제시한 네스티드.Gen.PCV1 및 서열번호 21에 제시한 네스티드.Orf.PCV1로 220bp 단편을 증폭시켰다.

[0188] PCV2 바이러스혈증을 검출하기 위해, PCV2 프라이머 쌍, 즉 서열번호 24에 제시한 Gen.PCV2 및 서열번호 23에 제시한 Orf.PCV2로 제1회의 PCR에서 PCV2의 존재하에 900bp 단편을 증폭시켰다. 프라이머 서열번호 26에 제시한 네스티드.Gen.PCV2 및 서열번호 25에 제시한 네스티드.Orf.PCV2로 네스티드 PCR에서 600bp 단편을 증폭시켰다.

[0189] 키메라 PCV1-2 바이러스혈증을 검출하기 위해, 제1회전의 PCR 반응에서 서열번호 20에 제시한 PCV1-특이적 프라이머 Gen.PCV1 및 서열번호 23에 제시한 PCV2 ORF2-특이적 프라이머 Orf.PCV2를 사용하여 580bp의 키메라 단편을 증폭시켰다. 네스티드 PCR의 경우, 서열번호 22에 제시한 PCV1-특이적 프라이머 네스티드.Gen.PCV1 및 서열번호 25에 제시한 PCV2 ORF2-특이적 프라이머 네스티드.Orf.PCV2를 사용하여 370bp의 키메라 단편을 증폭시켰다.

[0190] 역 키메라 PCV2-1 바이러스혈증을 검출하기 위해, 제1회전의 PCR에서 서열번호 24에 제시한 PCV2-특이적 프라이머 Gen.PCV2 및 서열번호 19에 제시한 PCV1 ORF2-특이적 프라이머 Orf.PCV1를 사용하여 700bp의 키메라 단편을 증폭시켰다. 네스티드 PCR의 경우, 서열번호 26에 제시한 PCV2-특이적 프라이머 네스티드.Gen.PCV2 및 서열번호 21에 제시한 PCV1 ORF2-특이적 프라이머 네스티드.Orf.PCV1를 사용하여 460bp의 키메라 단편을 증폭시켰다. 모든 PCR 매개변수는 본질적으로 동일하며, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 변성시키고 45 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 어닐링시키고 72 $^{\circ}$ C에서 1.5분 동안 신장시키는 35회 사이클로 이루어진다. 음성 대조군 돼지로부터의 혈청 샘플을 이미 기술한 바와 같이 PCV1 및 PCV2 둘다를 검출하고 분별할 수 있는 PCR-RFLP[참조; M. Fenaux et al., "Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2, "J. Clin. Microbiol. 38: 2494-503 (2000)]로 시험하였다. 각 그룹에서 선택된 동물로부터의 PCR 생성물을 서열분석하여 바이러스 감염된 돼지의 기원을 확인하였다.

[0191] 실시예 20

[0192] 면역조직화학 (IHC)

[0193] PCV2-특이적 항원의 IHC 검출을 21 및 49 DPI에서 부검한 모든 돼지로부터 수집한 림프절 조직에서 수행하였다. PCV2에 대한 래빗 폴리클로날 항혈청을 이미 기술한 일반적 과정에 따라서 IHC용으로 사용하였다[참조: S. D. Sorden et al., "Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, "J. Vet. Diagn. Invest. 11:528-530 (1999)].

[0194] PCV2-특이적 항원의 IHC 염색에 기초하여, 접종되지 않은 대조군, PCV1 및 PCV2-1 접종된 돼지로부터의 림프 조직은 PCV2 항원에 대해 음성이었다. PCV2 항원은 PCV2 접종된 그룹에서 8마리의 동물 중 7마리의 림프 조직에

서 검출되었다. PCV2 항원은 또한 키메라 PCV1-2 접종된 그룹으로부터의 7마리의 돼지 중 1마리의 림프 조직에서도 검출되었다.

[0195]

상기에서, 제한하기 위한 것이 아니라 설명을 위해 본 발명의 특정 양태가 상세하기 기술되었다. 본 내용에 기초하여 당해 분야의 숙련자에게 명백한 모든 다른 변형, 세분화 및 등가물은 청구된 본 발명의 범주내에 포함된다.

출원인 또는 관리인의 파일 번호 AM 100878	국제 출원 번호
-----------------------------	----------

(3면 중 1면)

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시

(PCT 규칙 13조)

A. 30면의 22행 내지 27행의 설명에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질(키메라 PCV1-2 DNA)에 관해 하기에 표시한다	
B. 기탁의 동정 추가의 기탁은 추가의 문서상에 등정되어 있다 <input checked="" type="checkbox"/>	
기탁기관명 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명을 포함) 미국 버지니아주 20110-2209 마나사스 유니버시티 블러바드 10801	
기탁일: 2001년 12월 7일(2001. 12. 07)	수탁번호: PTA-3912
C. 추가의 표지(해당되지 않는 경우 공백으로 남김) 이 정보는 추가의 문서상에서 계속된다 <input type="checkbox"/>	
D. 표시된 지정국(모든 지정국에 대해 표시되지 않은 경우)	
E. 표시의 별도 제공(해당되지 않는 경우 공백으로 남김) 하기 기재한 표시는 이후에 국제 사무국에 제출될 것이다(표시의 일반적 성질, 예를 들어, "기탁의 수탁번호"를 상술한다)	
수리관청용 <input checked="" type="checkbox"/> 본 문서는 국제 출원과 함께 접수되었다	국제 사무국용 <input type="checkbox"/> 본 문서는 다음 날짜에 국제 사무국에 의해 접수되었다:
공인사무관 호스타드 에스	공인사무관

서식 PCT/R0/134(1998년 7월)

[0196]

출원인 또는 대리인의 파일 번호 AM100878	국제 출원 번호
----------------------------	----------

(3면 중 2면)

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시

(PCT 규칙 13조)

A. 30면의 22행 내지 27행의 설명에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질(PCV2 DNA 클론)에 관해 하기에 표시한다	
B. 기탁의 동정 추가의 기탁은 추가의 문서상에 동정되어 있다 <input checked="" type="checkbox"/>	
기탁기관명 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명을 포함) 미국 버지니아주 20110-2209 마나사스 유니버시티 블러바드 10801	
기탁일: 2001년 12월 7일(2001. 12. 07)	수탁번호: PTA-3913
C. 추가의 표지(해당되지 않는 경우 공백으로 남김) 이 정보는 추가의 문서상에서 계속된다 <input type="checkbox"/>	
D. 표시된 지정국(모든 지정국에 대해 표시되지 않은 경우)	
E. 표시의 별도 제공(해당되지 않는 경우 공백으로 남김) 하기 기재한 표시는 이후에 국제 사무국에 제출될 것이다(표시의 일반적 성질, 예를 들어, "기탁의 수탁번호"를 상술한다)	
수리관청용 <input checked="" type="checkbox"/> 본 문서는 국제 출원과 함께 접수되었다	국제 사무국용 <input type="checkbox"/> 본 문서는 다음 날짜에 국제 사무국에 의해 접수되었다:
공인사무관 호스타드 에스	공인사무관

서식 PCT/RO/134(1998년 7월)

[0197]

출원인 또는 대리인의 파일 번호 AM100878	국제 출원 번호
----------------------------	----------

(3면 중 3면)

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시

(PCT 규칙 13조)

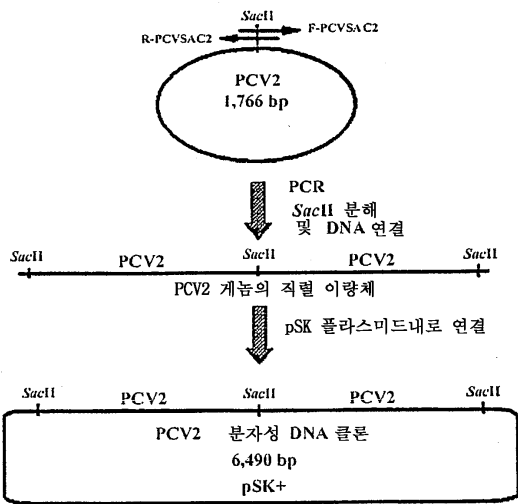
A. 30면의 29행 내지 31행의 설명에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질(PCV2 샘플 #40895)에 관해 하기에 표시한다	
B. 기탁의 동정 추가의 기탁은 추가의 문서상에 동정되어 있다 <input checked="" type="checkbox"/>	
기탁기관명 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명을 포함) 미국 버지니아주 20110-2209 마나사스 유니버시티 블러바드 10801	
기탁일: 2001년 12월 7일(2001. 12. 07)	수탁번호: PTA-3914
C. 추가의 표지(해당되지 않는 경우 공백으로 남김) 이 정보는 추가의 문서상에서 계속된다 <input type="checkbox"/>	
D. 표시된 지정국(모든 지정국에 대해 표시되지 않은 경우)	
E. 표시의 별도 제공(해당되지 않는 경우 공백으로 남김) 하기 기재한 표시는 이후에 국제 사무국에 제출될 것이다(표시의 일반적 성질, 예를 들어, "기탁의 수탁번호"를 상술한다)	
수리관청용 <input checked="" type="checkbox"/> 본 문서는 국제 출원과 함께 접수되었다	국제 사무국용 <input type="checkbox"/> 본 문서는 다음 날짜에 국제 사무국에 의해 접수되었다:
공인사무관 호스타드 에스	공인사무관

서식 PCT/RO/134(1998년 7월)

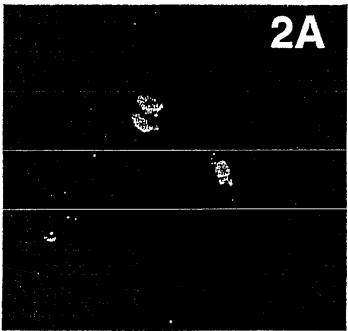
[0198]

도면

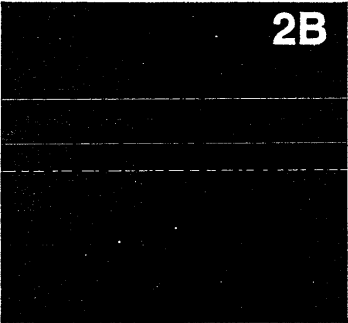
도면1



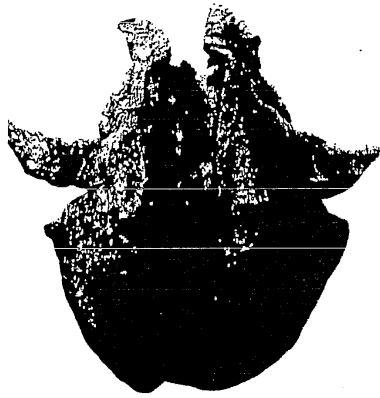
도면2A



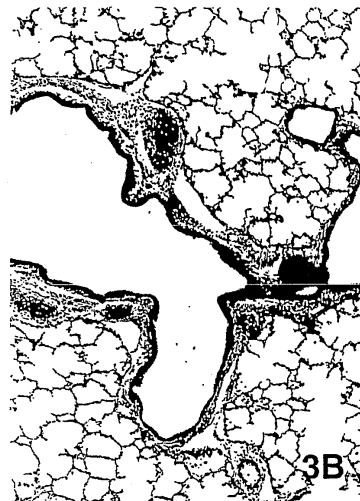
도면2B



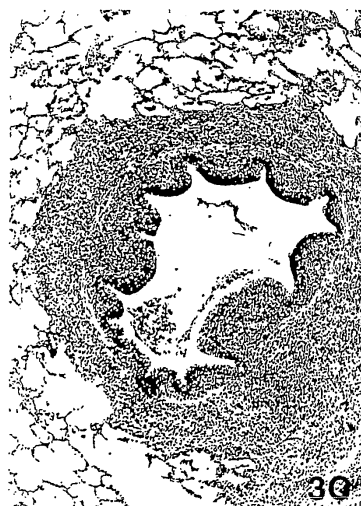
도면3A



도면3B



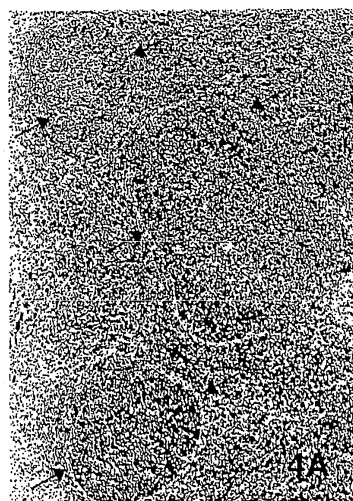
도면3C



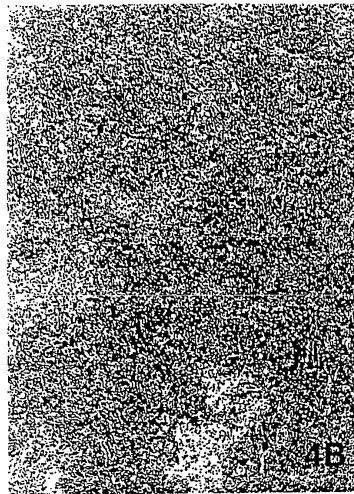
도면3D



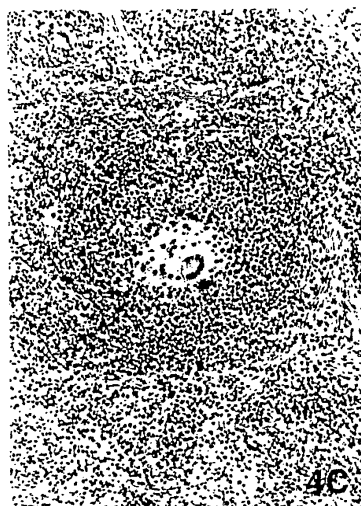
도면4A



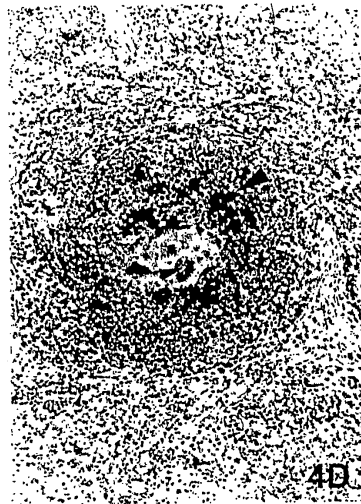
도면4B



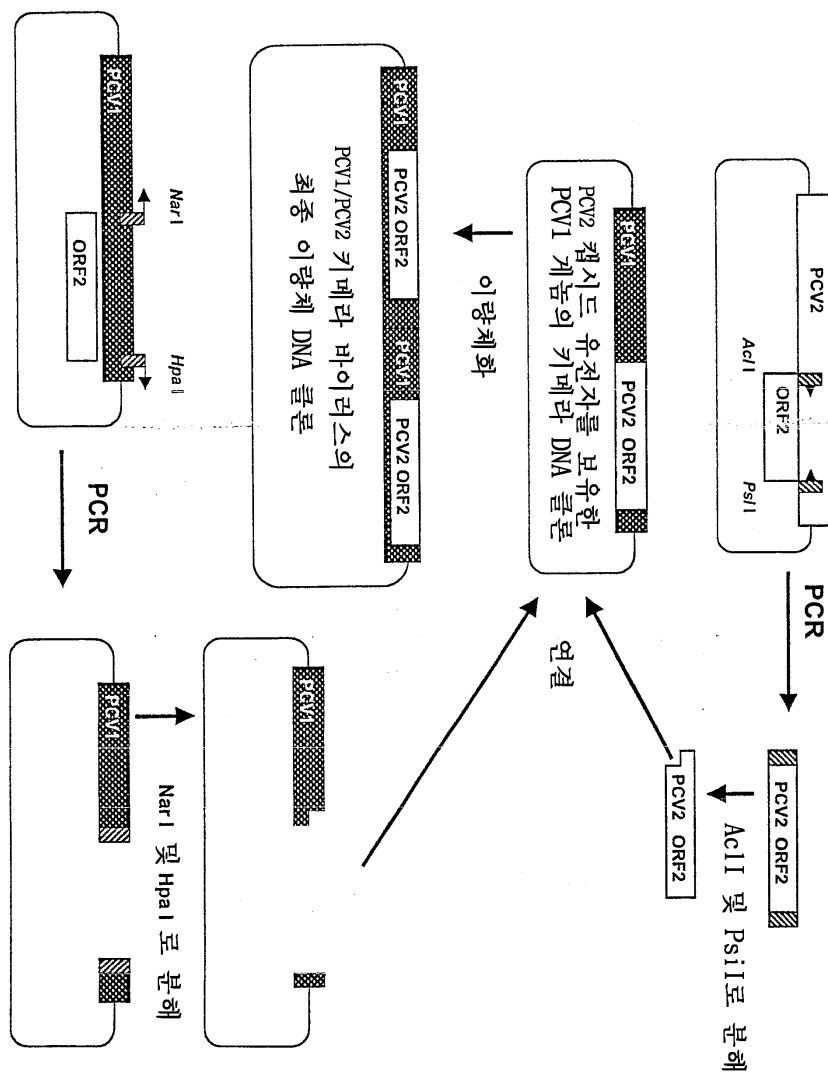
도면4C



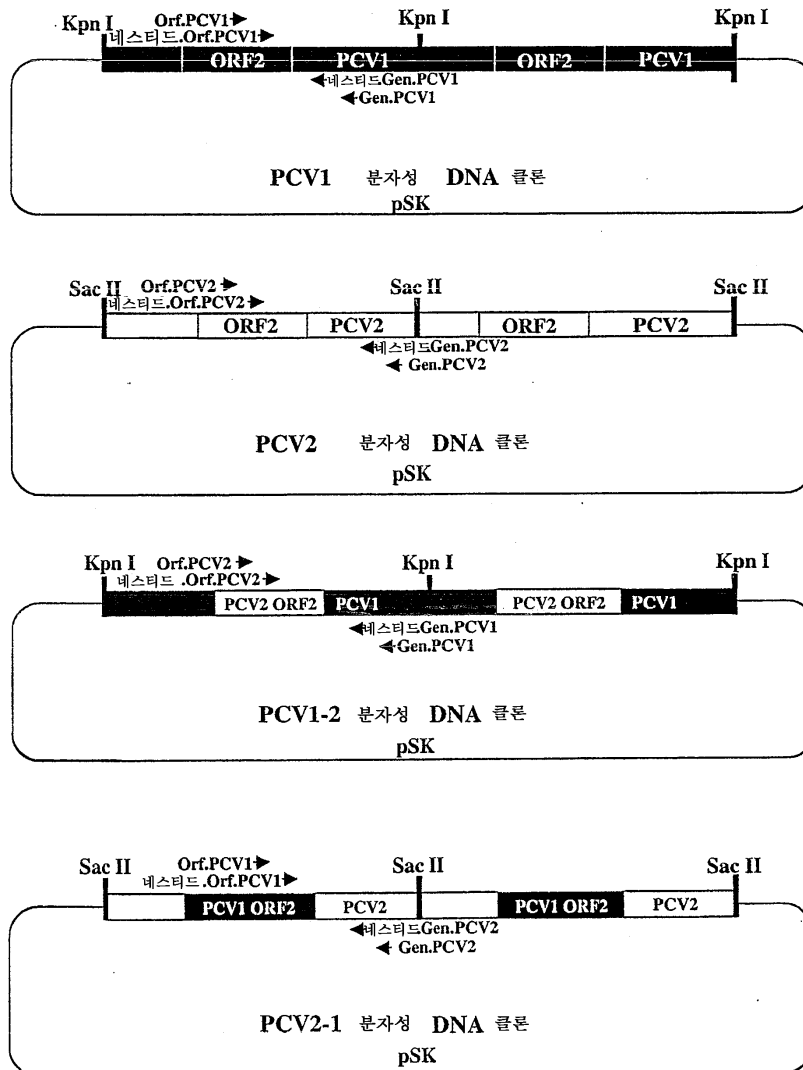
도면4D



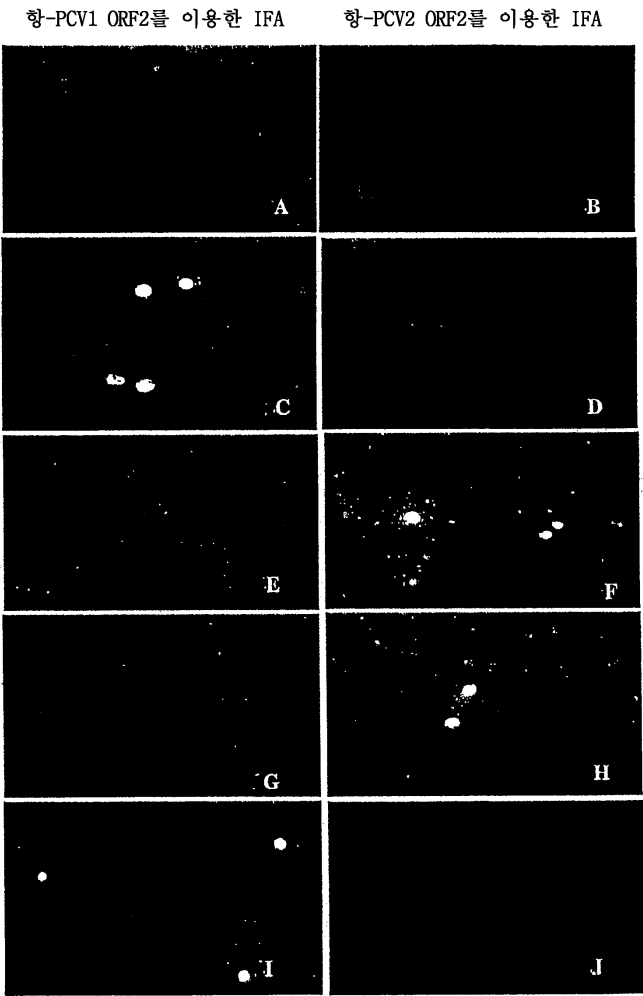
도면5



도면6



도면7



도면8

AAATTTCTGACAAACGTTACAGGGTGCTGCTCTGCAACGGTCACCAGACTCCCGCTCTCC
 AACAAAGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTCACCTCGTTGCTCTTGAGATCGAGGAGCTCCA
 CATTCAATAAGTAAGTTGCCTTCTTTACTGCAATATCTTTATTTCTGCTGATCAGTTCTCT
 TTGGCTTTCTCGATATGGCAGCGGGCACCCAAATACCACTTCACTTTATTAAAAAGTTGCT
 TTCTTACAAAAATTAGCGAACCCCTGGAGGTGAGGTGTTCTGCTCTTCTCATTACCTCTCC
 TCGCCAACAATAAAATAATCAAATAGGGAGATTGGGAGCTCCCGTATTTTCTTGCGCTCG
 TCTTCGGAAGGATTATTACAGCGTGAACACCCACCTTTTATGTGGTTGGGGTCCGCTTCTT
 CCATTCTTCTTGCTGGGCATGTTGCTGCTGAGGTGCTGCCGAGGTGCTGCCGCTGCCGAA
 GTGCGCTGGTAATACTTACAGCGCACTTCTTTCTGTTTTAGCTATGACGTATCCAAGGAG
 GCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCGCGAGCCATCTGGCCAGATCCTCCGCGCCG
 CCCCTGGCTCGTCCACCCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAA
 CACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACCACAGTCAGAACGCCCTC
 CTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTGTTCCTCCCGGAGGGGGGAC
 CAACAAAAATCTCTATACCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATCTG
 GCCCTGCTCCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGA
 TGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATATGTAAACTACTCTC
 CCGCCATACAAATCCCCAACCCCTTCTCTTACCCTCCCGTTACTTTCACACCCAAACCTGT
 TCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAAAATAACAAAGGAATCAGCTTTGGATGAG
 GCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACACAGTAGGCTCGGCACTGCGTTCGAAAAACAGTAT
 ATACGACAGGACTACAAATATCCGTGTAAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCT
 TAAAGACCCCCCACTTAAACCCCTAAATGAATAATAAAACCATTCAGAAAGTGATAAAAA
 GACTCAGTAATTTATTTTATATGCAAAATTCAGGGCATGGGGGGGAAAGGGTGACGAACCTG
 GCCCTTCTCCGTGGATTGTTCTGTAGCATTTCTTCCAAATACCAAGAAAGTAATCCT
 CCGATAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCATTCCAACGGGGTCTG
 ATTGCTGGTAATCAGAATACTGCGGGCCAAAAAGGTACAGTTCCACCTTTAGTCTCTAC
 AGTCAATGGATATCGATCACACAGTCTCAGTAGATCATCCACGGCAGCCAGCCATAAAA
 GTCATCAATAACAACCACTTCTTCAACCATGGTAACCATCCACCACTTGTCTTAGGTGG
 TTTCCAGTATGTGGTTTCCGGGTCTGCAAAATTAGCAGCCATTTGCTTTTACCACACCC
 AGGTGCCCCCAATGACGTGTACATTGTTCTTCCAATCAGCTTCTGCAATTTTCCGCT
 CACTTTCAAAAGTTACAGCCAGCCGCGG

도면9

GGTACCTCCGTGGATTGTTCTCCAGCAGTCTTCCAAATTTGCAAAGTAGTAATCCTCCGA
 TAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCATTCTGGGGGGCTGATTG
 CTGGTAATCAAAATACTGCGGGCCAAAAAGGAACAGTACCCCTTTAGTCTCTACAGTC
 AATGGATACCGGTACACAGTCTCAGTAGATCATCCAAGGTAACAGCCATAAAAAATCA
 TCCAAAAACAACCTTCTTCTCATGATATCCATCCACCACTTATTCTACTAGGCTTC
 CAGTAGGTGTCCTAGGCTCAGCAAAATTACGGGGCCACTGGCTCTTCCACAAACCGGGC
 GGGCCCACTATGACGTGTACAGCTGTCTTCCAATCAGCTGCTGCATCTTCCCGCTCACT
 TTCAAAGTTACAGCCAGCCCGCGGAAATTTCTCACATACGTTACAGGAACTGCTCGGCT
 ACAGTCACCAAGACCCCGTCTCCAAAGGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTGCTGCGC
 TTCCCTGGTTCCGCGGAGCTCCACACTCGATAAGTATGTGGCCTTCTTTACTGCAGTAT
 TCTTTATTCTGCTGGTTCGTTCTTCTCGCTTTCTCGATGTGGCAGCGGGCACCAAAATAC
 CACTTCACCTTGTAAAAAGTCTGCTTCTTAGCAAAATTCGCAAAACCCCTGGAGGTGAGGA
 GTTCTACCTCTTCCAAACCTTCTCGCCACAAACAAATAATCAAAAGGGAGATTGGA
 AGCTCCCGTATTTGTTTTCTCTCTCGGAAGGATTATTAAGGGTGAACACCCACCTC
 TTATGGGGTTGCGGGCCGCTTTTCTGCTTGGCATTTTCACTGACGCTGCCGAGGTGCTG
 CCGCTGCCGAAGTGCGCTGGTAATACTACAGCAGCGCACTTCTTCACTTTTATAGGATG
 ACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCGCGAGCCATCTTGGCCAG
 ATCTTCCCGCGCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAA
 AATGGCATCTTCAACACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGTACACACA
 GTCAGAACGCCCCTCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTGTCTCC
 CCGGAGGGGGGACCAACAAATCTCTATACCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTT
 AAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCCACT
 GCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATAT
 GTAAACTACTCTCCCGCCATACAAATCCCCAACCCCTTCTCTTACCCTCCCGTTACTTC
 ACACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAAAATAACAAAGGAAT
 CAGCTTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCTCGGCACTGCG
 TTCGAAAACAGTATATACGACAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTC
 AGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCACTTAAACCCCTAAATGAATAAAAAATAAAACCAT
 TACGATGTGATAACAAAAAGACTCAGTAATTTTATATGGGAAAAGGGCACAGGGT
 GGGTCCACTGCTTCAATCGGCCTTCGGGTACC

도면10

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACGCCCCCGCAGCCATCTTGGC
CAGATCCTCCGCCCGCCGCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGG
AAAAATGGCATCTTCAACACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACC
ACAGTCAGAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTT
CCCCCGGAGGGGGGACCAACAAATCTCTATACCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAG
GTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCATCACCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCC
ACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCA
TATGTAACTACTCCTCCCGCCATACAATCCCCCAACCTTCTCCTACCACTCCCGTTAC
TTCACACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAATAACAAAGG
AATCAGCTTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCACT
GCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAA
TTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTTAAACCTAA

도면11

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL VHPRHRYRWRKNGIFNTRL SRTFGYTVKAT
TVRTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGD RGVGS
TAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPF SYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPN NKR
NQLWMRLQTSRNV DHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP*

* 해독 종결 코돈

서열 목록

<110> VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES, INC.
IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC.

<120> Chimeric infectious DNA clones, chimeric porcine circoviruses
and uses thereof

<130> AM100878 PCT

<140> PCT/US 02/39646

<141> 2002-12-11

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1768

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<400> 1

aaatttctga caaacgttac aggggtgctgc tctgcaacgg tcaccagact cccgctctcc	60
aacaaggtac tcacagcagt agacaggta ctcggttgtc cttgagatcg aggagctcca	120
cattcaataa gtaagttgcc ttctttactg caatattctt tattctgctg atcagttcct	180
ttggctttct cgatatggca gcgggcaccc aaataccact tcactttatt aaaagtttgc	240
ttcttcacaa aattagcgaa cccctggagg tgagggttgc gtccttctc attaccctcc	300
tcgccaacaa taaaataatc aaataggagg attgggagct cccgtatctt cttgcgctcg	360
tcctcggaag gattattcag cgtgaacacc caccttttat gtggttgggg tccgcttctt	420
ccattcttct tgctgggcat gttgctgctg aggtgctgcc gaggtgctgc cgctgccgaa	480
gtgcgctggt aatacttaca gcgcacttct ttcgttttca gctatgacgt atccaaggag	540
gcgttaccgc agaagaagac accgccccg cagccatctt ggccagatcc tccgccgccg	600
cccctggctc gtccaccccc gccaccgcta ccgttgaga aggaataatg gcattctcaa	660
caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtcaaggct accacagtca gaacgcctc	720
ctgggcggtg gacatgatga gatttaatat tgacgacttt gttcccccg gaggggggac	780
caacaaaatc tctataccct ttgaatacta cagaataaga aaggttaagg ttgaattctg	840
gccctgctcc cccatcaccc aggggtgatag gggagtgggc tccactgctg ttattctaga	900
tgataacttt gtaacaaagg ccacagccct aacctatgac ccatatgtaa actactctc	960
ccgccataca atcccccaac ctttctctta ccactccgt tacttcacac ccaaactgt	1020
tcttgactcc accattgatt acttccaacc aaataacaaa aggaatcagc tttggatgag	1080
gtacaaaacc tctagaaatg tggaccacgt aggcctcggc actgcgttcg aaaacagtat	1140
atagcaccag gactacaata tccgtgtaac catgtatgta caattcagag aatttaactt	1200

taaagacccc ccacttaaac cctaaatgaa taataaaaaac cattacgaag tgataaaaaa 1260

gactcagtaa tttatttcat atggaaattc agggcatggg ggggaaaggg tgacgaactg 1320

gcccccttc tccgtggatt gttctgtagc attcttccaa aataccaaga aagtaatcct 1380

ccgatagaga gcttctacag ctgggacagc agttgaggag taccattcca acggggtctg 1440

attgctggta atcagaatac tgcgggccaa aaaaggtaca gttccacctt tagtctctac 1500

agtcaatgga tatcgtacac acagtctcag tagatcatcc cacggcagcc agccataaaa 1560

gtcatcaata acaaccactt cttcaccatg gtaaccatcc caccacttgt ttctaggtgg 1620

tttccagtat gtggtttccg ggtctgcaaa attagcagcc catttgcttt taccacaccc 1680

aggtggcccc acaatgacgt gtacattggt cttccaatca cgcttctgca ttttcccgt 1740

cactttcaaa agttcagcca gcccgcgg 1768

<210> 2
 <211> 1773
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 2

ggtacctcgg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga 60

tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcctgattg 120

ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc 180

aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca 240

ttcaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actagcttc 300

cagtaggtgt ccttaggtc agcaaaatta cgggccact ggctcttccc acaaccgggc 360

gggccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgt gctgcatctt cccgtcact 420

ttcaaaagt cagccagccc gcggaaattt ctacatacg ttacaggaaa ctgctcggt 480

acagtcacca aagaccccg tccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgtgcgc 540

ttcccctggt tccgcggagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat 600

tctttattct gctggtcggt tctttcgct ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac 660

cattcacct tgtaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga 720

gttctacct ctccaaacc ttctcgcca caaacaat aatcaaaaag ggagattgga 780

agctcccgt tttgtttt ctctcctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840

ttatggggtt gcgggccgt tttctgtt ggcatcttca ctgacgtgc cgaggtgctg 900

ccgtgccga agtgcgtgg taatactaca gcagcgact tcttctactt ttataggatg 960

acgtatcaa ggaggcgta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgccag 1020

atctccgcc gccgcccctg gctctccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080

aatggcatct tcaacaccg cctctccgc accttcgat atactgtcaa ggctaccaca 1140

gtcagaacgc cctctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc 1200

ccgggagggg ggaccaaca aatctctata ccctttgaat actacagaat aagaaaggtt 1260

aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggtccact 1320

gctgttattc tagatgataa ctttgaaca aaggccacag ccctaaccta tgaccatat 1380

gtaaactact cctcccgcca tacaatccc caaccttct cctaccactc ccgttacttc 1440

acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaataa caaaaggaat 1500

cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560

ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taaccatgta tgtacaattc 1620
 agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaacat 1680
 tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt 1740
 ggggtccactg cticaaatcg gccttcgggt acc 1773

<210> 3
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 3
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgcgccc ctggetcgtc ccccccgcc accgtacag ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggetacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240
 cccccgggag gggggaccaa caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaaggttg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420
 tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctctacca ctcccgttac 480
 ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540
 aatcagcttt ggatgaggt acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaacct aa 702

<210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Porcine circovirus

<400> 4
 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 Arg 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 Met Arg Leu Gln Thr Ser Arg 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 Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<400> 5
gaaccgcggg ctggctgaac ttttgaaagt 30

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<400> 6
gcaccgcgga aatttctgac aaacgttaca 30

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<400> 7
tttggtaccc gaaggccgat t 21

<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 8	
attgttacct ccgtggattg ttct	24
<210> 9	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 9	
gaagttaacc ctaaataaat aaaaataaaa accattacg	39
<210> 10	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 10	
ggtggcgct ccttgatac gtcacctat aaaagtg	37
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 11	
aggttataag tgggggtct ttaagattaa	30
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 12	
ggaaacgtta ccgcagaaga agacacc	27

<210> 13	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 13	
actatagatc tttattcatt tagagggtct ttcag	35
<210> 14	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 14	
tacgggcatg catgacgtgg ccaaggagg	29
<210> 15	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 15	
agacgagatc tatgaataat aaaaaccatt acgaag	36
<210> 16	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 16	
cgtaagcatg cagctgaaaa cgaaagaagt g	31
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Porcine circovirus	
<400> 17	
gctgaacttt tgaaagtgag cggg	24

<210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 18
 tcacacagtc tcagtagatc atccca 26

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 19
 ccaactttgt aacccctec a 21

<210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 20
 gtggaccac cctgtgcc 18

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 21
 ccagctgtgg ctccatttaa 20

<210> 22
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 22
 ttcccatata aaataaatta ctgagtctt 29

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 23
 cagtcagaac gccctcctg 19

<210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 24
 cctagaaaca agtgggtggga tg 22

<210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 25
 ttgtaacaaa ggccacagc 19

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 26
 gtgtgatcga tatccattga ctg 23