

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680053578.7

[43] 公开日 2009年5月6日

[11] 公开号 CN 101426522A

[22] 申请日 2006.12.28

[21] 申请号 200680053578.7

[30] 优先权

[32] 2005.12.29 [33] US [31] 60/755,016

[32] 2006.10.17 [33] US [31] 60/829,809

[86] 国际申请 PCT/US2006/062662 2006.12.28

[87] 国际公布 WO2007/094893 英 2007.8.23

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.29

[71] 申请人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 迈克尔·B·鲁夫

菲利普·韦恩·海斯

马克·艾科迈耶 格雷格·尼采尔

梅里尔·谢弗

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元

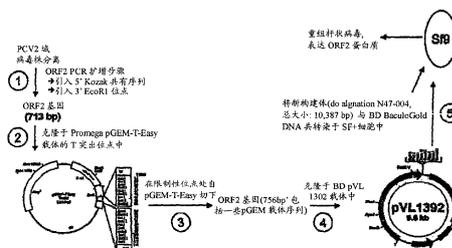
权利要求书3页 说明书57页 附图3页

[54] 发明名称

PCV2 免疫原性组合物用于减轻猪临床症状的用途

[57] 摘要

本发明涉及关于包含猪 2 型圆环病毒 (PCV2) 抗原的免疫原性组合物在治疗若干临床表现 (疾病) 方面的用途。优选地, 这些临床表现与 PCV2 感染相关。优选地, 它们包括淋巴结病、淋巴细胞消减和/或多核组织细胞/巨组织细胞。此外, 这些临床症状包括淋巴结病与猪的一种或多种以下症状的组合: (1) 具有小叶间水肿的间质性肺炎, (2) 皮肤苍白或黄疸, (3) 斑点状萎缩性肝, (4) 胃溃疡, (5) 肾炎及 (6) 生殖病症, 例如流产、死产、干尸等。再者, 这些临床症状包括通常已知与劳索尼亚氏菌 (Lawsonia) 细胞内感染相关的 Pia 样损害。



1. 一种用于减少与PCV2感染相关的临床症状或减轻与PCV2感染相关的临床症状的严重性、减轻动物的总猪圆环病毒负荷量和/或降低猪中猪圆环病毒感染的免疫抑制效应的方法，该方法包括对猪施用猪2型圆环病毒抗原。

2. 如权利要求1所述的方法，其中该抗原包含由与猪2型圆环病毒之ORF2具有至少80%序列同一性的DNA序列编码的蛋白质。

3. 如权利要求1和2中任一项所述的方法，其中该猪2型圆环病毒抗原是重组杆状病毒表达的ORF2抗原。

4. 如权利要求1-3任一项所述的方法，其中该猪2型圆环病毒抗原以每个剂量一(1)毫升配制并施用。

5. 如权利要求1-4任一项所述的方法，其中所述临床症状选自由淋巴结病、淋巴细胞消减和多核组织细胞或巨组织细胞组成之群组。

6. 如权利要求5所述的方法，其中所述淋巴结病、淋巴细胞消减和/或多核组织细胞或巨组织细胞与选自由下列症状组成之群组的另一症状组合：具有小叶间水肿的间质性肺炎、皮肤苍白或黄疸、斑点状萎缩性肝、胃溃疡、肾炎、pia样损害及生殖病症。

7. 如权利要求1-6任一项所述的方法，其中所述施用是对小于15周龄的猪进行的。

8. 如权利要求1-7任一项所述的方法，其中所述施用是对不大于3周龄，优选不大于2周龄的猪进行的。

9. 如权利要求1-8任一项所述的方法，其中所述施用在暴露于毒力型猪2型圆环病毒抗原的约3周内进行。

10. 如权利要求1-9任一项所述的方法，其中该组合物进一步包含至少一种选自由兽医学上可接受的载体、可药用的载体及免疫调节剂组成的群组的额外组份。

11. 如权利要求1-10任一项所述的方法，其中所述施用选自：皮内(intradermal)、气管内、阴道内、肌肉内、鼻内、静脉内、血管内、动脉内、腹膜内、经口、鞘内、皮下、皮内(intracutaneous)、心脏内、小叶内、髓内或肺内。

12. 如权利要求 1-11 任一项所述的方法,其中所述猪 2 型圆环病毒抗原的施用不显示不良事件或注射部位反应。

13. 一种用于改善猪的一般疾病抗性水平的方法,所述方法包括对猪施用有效量的猪 2 型圆环病毒抗原。

14. 一种制造药物的方法,所述药物用于减少与 PCV2 感染相关的临床症状或减轻与 PCV2 感染相关的临床症状的严重性、减轻动物的总猪圆环病毒负荷量或降低猪圆环病毒感染的免疫抑制效应,该方法包括获得猪圆环病毒抗原和将该抗原与兽医学上可接受的载体、可药用的载体或免疫调节剂组合的步骤。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中该抗原包含由猪 2 型圆环病毒之 ORF2 编码的多肽。

16. 猪 2 型圆环病毒抗原在制备用于减少与 PCV2 感染相关的临床症状或减轻与 PCV2 感染相关的临床症状的严重性、减轻动物的总猪圆环病毒负荷量和/或降低猪的猪圆环病毒感染的免疫抑制效应的药物中的用途,其中该药物施用于猪。

17. 如权利要求 16 所述的用途,其中该抗原包含由与猪 2 型圆环病毒之 ORF2 具有至少 80%序列同一性之 DNA 序列编码的蛋白质。

18. 如权利要求 16 和 17 中任一项所述的用途,其中该猪 2 型圆环病毒抗原为重组杆状病毒表达的 ORF2 抗原。

19. 如权利要求 16-18 中任一项的用途,其中该猪 2 型圆环病毒抗原是以每个剂量一(1)毫升配制并施用的。

20. 如权利要求 16-19 中任一项的用途,其中所述临床症状选自由淋巴结病、淋巴细胞消减及多核组织细胞或巨组织细胞组成的群组。

21. 如权利要求 20 之用途,其中所述淋巴结病、淋巴细胞消减和/或多核组织细胞或巨组织细胞与选自由下列症状组成之群组的另一症状组合:具有小叶间水肿的间质性肺炎、皮肤苍白或黄疸、斑点状萎缩性肝、胃溃疡、肾炎、pia 样损害及生殖病症。

22. 如权利要求 16-21 中任一项的用途,其中该施用在小于 15 周龄的猪中进行。

23. 如权利要求 16-22 中任一项的用途,其中该施用在不大于 3 周龄,优选不大于 2 周龄的猪中进行。

24. 如权利要求 16-23 任一项的用途，其中该施用暴露在暴露于毒力型猪 2 型圆环病毒抗原的约 3 周内进行。

25. 如权利要求 16-24 任一项的用途，其中该组合物进一步包含至少一种选自由兽医学上可接受的载体、可药用的载体及免疫调节剂组成的群组的额外组份。

26. 如权利要求 16-25 任一项的用途，其中所述施用为皮内 (intradermal)、气管内、阴道内、肌肉内、鼻内、静脉内、血管内、动脉内、腹膜内、经口、鞘内、皮下、皮内 (intracutaneous)、心脏内、小叶内、髓内或肺内施用。

27. 如权利要求 16-26 任一项的用途，其中所述猪 2 型圆环病毒抗原的施用不显示不良事件或注射部位反应。

28. 猪 2 型圆环病毒抗原在制备用于改善猪的一般疾病抗性水平的药物中的用途。

PCV2 免疫原性组合物用于减轻猪临床症状的用途

序列表

本发明包括纸质和计算机可读的序列表，在此以提述方式并入其教导和内容。

发明背景

发明领域

本发明涉及包含猪 2 型圆环病毒(PCV2)抗原的免疫原性组合物用于治疗若干临床表达(疾病)的用途。优选地，那些临床表达与 PCV2 感染相关。更具体地说，本发明涉及一种可有效地用于产生减缓或减轻与 PCV2 感染相关的临床症状的严重性的免疫反应的免疫学组合物。优选地，免疫学组合物包含重组产生的 PCV2 的抗原。更优选地，PCV2 抗原为由 PCV2 基因组中的开放阅读框架(ORF)之一所编码的重组产生的蛋白质。更优选地，该抗原为 PCV2 ORF2 蛋白质。最具体地说，本发明涉及一种免疫学组合物，它可有效地用于治疗接受该免疫学组合物的猪体内与 PCV2 感染相关的临床症状，且其中该组合物包含由 PCV2 的 ORF2 表达的蛋白质。本发明的另一方面为由此提供的任何组合物作为药物，优选作为兽医学药物，更优选作为疫苗的用途。此外，本发明还涉及本文中描述的任一组合物用于制备供减缓或减轻与 PCV2 感染相关的临床症状之严重性的药物的用途。优选地，该药物系用于预防 PCV2 感染，甚至更优选用于预防猪的 PCV2 感染。本发明的另一方面涉及一种制造药物的方法，包括用于治疗若干临床表现的 PCV2 免疫原性组合物。

现有技术描述

猪 2 型圆环病毒(PCV2)为小型(直径为 17 nm-22 nm)二十面体无包膜

DNA 病毒，其含有单链环状基因组。PCV2 与猪 1 型圆环病毒(PCV1)共享大约 80%的序列同一性。然而，与通常无毒力的 PCV1 相比，感染有 PCV2 的猪表现一种综合征，通常称为断乳后多系统消耗性综合征(PMWS)。PMWS 具有消耗性、皮肤苍白、生长迟滞(unthriftiness)、呼吸窘迫、腹泻、黄疸(icterus 和 jaundice)的临床特征。在一些受感染的猪中将呈现所有症状的组合，而其它受感染的猪将仅仅具有这些症状中的一或两者。在尸体剖检中，微观及肉眼可见的损害亦出现于多数组织及器官上，淋巴器官为最常见的损害部位。已观测到 PCV2 核酸或抗原的量与微观淋巴损害严重性之间的强相关性。感染有 PCV2 的猪的死亡率可达 80%。除 PMWS 外，PCV2 还与包括下列各项的若干其它感染相关：伪狂犬病、猪生殖及呼吸综合征(PRRS)、格拉塞氏病(Glasser's disease)、链球菌性脑膜炎、沙门氏菌病、断乳后大肠杆菌病、饮食性肝功能障碍(dietetic hepatitis)及化脓性支气管肺炎。然而，迄今的研究未曾证实这些临床症状中的任何一种是否事实上为 PCV2 感染的直接结果。此外，尚未知道这些临床症状中的任何一种是否可藉由针对 PCV2 的活性剂得以有效减轻或治愈。

治疗 PCV2 感染的现有手段包括诸如在美国专利第 6,703,023 号中描述的那些基于 DNA 的疫苗。然而，这些疫苗在给与抗 PCV2 感染的保护性免疫力方面，或者在降低、减轻任何与此相关的临床症状的严重性或治愈任何与此相关的临床症状方面，均不起作用。此外，在现有技术中描述的疫苗仅仅关注于预防猪 PCV2 感染，而不考虑任何其它医学用途。

因此，在本领域中需要一种用于治疗若干临床表现的免疫原性组合物。另外，在本领域中需要一种给与抗 PCV2 感染的保护性免疫力，但亦可用于治疗与 PCV2 感染相关的现有临床症状的免疫学组合物。

本发明的公开

本发明解决先前技术中固有的问题且提供明显区别于技术现状的进步。本发明提供一种包含 PCV2 抗原的免疫原性组合物的药物用途。

一般而言，对于本文中使用的任何 PCV2 抗原免疫原性组合物来说，没有不良事件或注射部位反应的记录。由此，当施用于仔猪，优选施用于不大于 15 周龄，更优选不大于 6 周龄，甚至更优选不大于 3 周，最优选不大

于 2 周的仔猪时, 本文所用的免疫原性组合物外观上是安全的。或者, 优选在暴露于毒力型 PCV 至少 2 周内(within at least two weeks of exposure to virulent PCV), 优选至少 3 周内进行本发明免疫原性组合物的施用。根据另一实施方式, 在本文中用于本文所述任何药物用途的免疫原性组合物被施用于 3 周龄或更大, 优选 2 周龄或更大, 最优选但不大于 15 周龄的猪。

意外发现在治疗中应用下文描述的免疫原性组合物可有效地减轻猪的各种临床症状的严重性。具体地, 发现在治疗中应用本发明的免疫原性组合物, 尤其是包含 PCV2 ORF2 抗原的组合物, 可有效地减缓或减轻感染有 PCV2 的猪的淋巴结病、淋巴细胞消减(lymphoid depletion)和/或多核组织细胞/巨组织细胞。此外, 在治疗中使用本文提供的包含 PCV2 抗原(优选 ORF2 抗原)的抗原组合物, 可减少总圆环病毒负荷量及其免疫抑制性影响(immunosuppressive impact), 藉此实现较高水平的一般疾病抗性(general disease resistance)及与 PCV-2 相关的疾病及症状发生率的降低。

因此, 本发明一个方面涉及本文提供的包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原, 更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物用于制备供预防、减轻和/或减缓猪淋巴结病、淋巴细胞消减和/或多核组织细胞/巨组织细胞的药物的用途。优选地, 该药物可有效用于预防、减轻和/或减缓猪与 PCV2 感染相关的淋巴结病(lymphadenopathy)、淋巴细胞消减和/或多核组织细胞/巨组织细胞(multinucleated/giant histocytes)。更优选地, 当施用于不大于 15 周龄, 更优选不大于 6 周龄, 甚至更优选不大于 3 周, 最优选不大于 2 周的猪时, 该药物可有效用于预防、减轻和/或减缓与猪的 PCV2 感染相关的淋巴结病、淋巴细胞消减和/或多核/巨组织细胞。或者, 优选在暴露于毒力型 PCV 的至少 2 周内, 优选至少 3 周内进行本发明的免疫原性组合物的施用。

本发明的另一方面涉及一种治疗猪淋巴结病、淋巴细胞消减和/或多核组织细胞/巨组织细胞的方法, 其包括对猪施用本文提供的免疫原性组合物, 该免疫原性组合物包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原且更优选 PCV2 ORF2 蛋白。在另一方面中, 本发明提供一种治疗猪的与 PCV2 感染相关的淋巴结病、淋巴细胞消减和/或多核组织细胞/巨组织细胞的方法, 其包含对猪施用本文提供的免疫原性组合物, 该免疫原性组合物包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原, 更优选 PCV2 ORF2 蛋白。优选地, 该治疗使得减轻、减缓、预防和/或治愈接受该免疫原性组合物的猪的淋巴结病、淋巴细胞消

减和/或多核组织细胞/巨组织细胞。根据另一方面，所述治疗方法进一步包含对不大于 15 周龄，更优选不大于 6 周龄，甚至更优选不大于 3 周，且最优选不大于 2 周的猪施用所述免疫原性组合物。或者，优选在暴露于毒力 PCV 至少 2 周内，优选至少 3 周内进行本发明的免疫原性组合物的施用。

另外发现使用由此提供的包含 PCV2 抗原，优选重组 PCV2 抗原，最优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物的治疗可减缓或减轻受感染猪的与一或多种以下症状组合的淋巴结病：(1)具有小叶间水肿的间质性肺炎，(2)皮肤苍白或黄疸，(3)斑点状萎缩性肝(mottled atrophic livers)，(4)胃溃疡，(5)肾炎及(6)生殖病症，例如流产、死产、干尸(mummy)等。

因此，本发明的一个方面涉及本文提供的包含 PCV2 抗原，优选重组 PCV2 抗原，更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物用于制备供预防、减轻和/或减缓猪的与一或多种以下症状组合的淋巴结病的药物的用途：猪的(1)具有小叶间水肿的间质性肺炎(interstitial pneumonia with interlobular edema)，(2)皮肤苍白或黄疸，(3)斑点状萎缩性肝，(4)胃溃疡，(5)肾炎及(6)生殖病症，例如流产、死产、干尸等。优选地，该药物有效用于预防、减轻和/或减缓猪的与一或多种以下与 PCV2 感染相关的症状组合的淋巴结病：(1)具有小叶间水肿的间质性肺炎，(2)皮肤苍白或黄疸，(3)斑点状萎缩性肝，(4)胃溃疡，(5)肾炎及(6)生殖病症，例如流产、死产、干尸等。根据另一方面，当施用于不大于 15 周龄，更优选不大于 6 周龄，甚至更优选不大于 3 周且最优选不大于 2 周的猪时，该药物有效用于预防、减轻和/或减缓猪的与一或多种以下症状组合的淋巴结病：猪的(1)具有小叶间水肿的间质性肺炎，(2)皮肤苍白或黄疸，(3)斑点状萎缩性肝，(4)胃溃疡，(5)肾炎及(6)生殖病症，例如流产、死产、干尸等。或者，优选在暴露于毒力 PCV 至少 2 周内，优选至少 3 周内进行本发明的免疫原性组合物的施用。

此外，本发明还涉及一种治疗猪的与一或多种以下症状组合的淋巴结病的方法：(1)具有小叶间水肿的间质性肺炎，(2)皮肤苍白或黄疸，(3)斑点状萎缩性肝，(4)胃溃疡，(5)肾炎及(6)生殖病症，例如流产、死产、干尸等，该方法包含施用本文提供的包含 PCV2 抗原，优选重组 PCV2 抗原，更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物。优选地，本发明亦涉及一种治疗猪的与一或多种与 PCV2 感染相关的以下症状组合的淋巴结病的方法：(1)具有小叶间水肿的间质性肺炎，(2)皮肤苍白或黄疸，(3)斑点状萎缩性肝，(4)胃

溃疡, (5)肾炎及(6)生殖病症, 例如流产、死产、干尸等, 该方法包含对猪施用本文提供的包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原, 且更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物。优选地, 该治疗导致猪的淋巴结病及一或多种与 PCV2 感染相关的以下症状: (1)具有小叶间水肿的间质性肺炎, (2)皮肤苍白或黄疸, (3)斑点状萎缩性肝, (4)胃溃疡, (5)肾炎及(6)生殖病症, 例如流产、死产、干尸等的减轻或减缓。根据另一方面, 所述治疗方法进一步包含对不大于 15 周龄, 更优选不大于 6 周龄, 甚至更优选不大于 3 周, 且最优选不大于 2 周的猪施用所述包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原且更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物。或者, 优选在暴露于毒力 PCV 至少 2 周内, 优选至少 3 周内进行本发明的免疫原性组合物的施用。

还意外地发现, 在治疗中使用本文提供的包含 PCV 抗原, 优选重组 PCV2 抗原, 更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物, 也可减缓或减轻通常已知与胞内劳索尼氏菌(*Lawsonia intracellularis*)感染(回肠炎)相关的 Pia 样损害(Pia like lesion)。

因此, 本发明的一个方面涉及本文提供的包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原, 更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物用于制备供预防、减轻通常认为与猪细胞内劳索尼氏菌感染相关的 Pia 样损害的严重性和/或减缓 Pia 样损害的药物的用途。根据另一方面, 当施用于不大于 15 周龄, 更优选不大于 6 周龄, 甚至更优选不大于 3 周, 且最优选不大于 2 周的猪时, 该药物可有效用于预防、减轻通常认为与细胞内劳索尼氏菌感染相关的 Pia 样损害的严重性和/或减缓 Pia 样损害。或者, 优选在暴露于毒力 PCV 至少 2 周内, 优选至少 3 周内进行本发明的免疫原性组合物的施用。

此外, 本发明亦涉及一种治疗通常认为与细胞内劳索尼氏菌感染相关的 Pia 样损害的方法, 该方法包括对猪施用如本文中提供的包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原, 更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物。优选地, 该治疗使得减轻或减缓通常认为与细胞内劳索尼氏菌感染相关的 Pia 样损害。根据另一方面, 以上所描述的治疗方法进一步包括对不大于 15 周龄, 更优选不大于 6 周龄, 甚至更优选不大于 3 周, 且最优选不大于 2 周的猪施用包含 PCV2 抗原, 优选重组 PCV2 抗原, 更优选 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物。或者, 优选在暴露于毒力 PCV 至少 2 周内, 优选至少 3 周内进行本发明的免疫原性组合物的施用。

免疫原性组合物

用于本文中的免疫原性组合物可有效用于诱发针对 PCV2 的免疫反应和预防、减缓和/或减轻与 PCV2 感染相关的临床症状的严重性。该组合物通常包含至少一种 PCV2 抗原。

除非另外定义，否则在本文中使用的所有技术及科学术语具有如通常由本发明所属的技术领域普通技术人员了解的相同含义。本文中使用的术语"免疫原性组合物"指含有 PCV2 抗原的任何药物组合物，该组合物可用于预防或治疗受试者中与 PCV2 感染相关的疾病或病症。优选的免疫原性组合物能够诱发、刺激或增强针对 PCV2 的免疫反应。因此，术语既涵盖如下所述的亚单位免疫原性组合物，又涵盖含有全灭活(whole killed)或减毒(attenuated)和/或失活化(inactivated) PCV2 的组合物。

本文中使用的术语"亚单位免疫原性组合物"是指这样的组合物，其含有从来自 PCV2 的抗原衍生的或者与来自 PCV2 的抗原同源的至少一种免疫原性多肽或抗原，但并非所有抗原。此组合物基本上不含完整的 PCV2。因此，"亚单位免疫原性组合物"是从至少部分纯化或分级(优选基本上纯化)的来自 PCV2 的免疫原性多肽或其重组类似物制备的。亚单位免疫原性组合物所包含的感兴趣的亚单位抗原可以是基本上不含来自 PCV2 的其它抗原或多肽的，或者是经分级的形式的。优选免疫原性亚单位组合物包含如下所述的 PCV2 ORF2 蛋白。

对组合物或疫苗的"免疫学反应或免疫反应"为宿主对所欲组合物或疫苗产生的细胞免疫反应和/或抗体介导的免疫反应。通常，"免疫反应"包括(但不限于)一种或多种以下效应：产生或活化针对在感兴趣的组合物或疫苗中包括的抗原的特异性抗体、B 细胞、辅助 T 细胞、抑制 T 细胞和/或细胞毒性 T 细胞和/或 γδ T 细胞。优选地，宿主将显示治疗性免疫学反应或保护性免疫学反应，使得对新感染的抗性增强和/或疾病的临床严重性降低。这样的保护作用将表现为：与如上所述的 PCV2 感染相关的一或多种症状的数量或严重性降低，或者与如上所述的 PCV2 感染相关的一或多种症状的缺失。

本文中使用的术语"免疫原性"蛋白质或多肽或"抗原"是指引起如上所述的免疫学反应的氨基酸序列。本文中使用的"免疫原性"蛋白质或多肽包括任何 PCV2 蛋白质的全长序列、其类似物或其免疫原性片段。术语"免疫原

性片段"是指包括一或多种表位且由此引起以上所描述的免疫学反应的蛋白质片段。这些片段可使用在本领域中熟知的任何数目的表位定位技术鉴定。例如参见 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey。例如, 线性表位可藉由, 例如, 同时在固态载体上合成大量肽(所述肽对应于蛋白质分子的部分)且使所述肽与抗体反应(同时, 所述肽仍连接于载体)而测定。这些技术在本领域中已知且描述于, 例如美国专利第 4,708,871 号; Geysen 等人, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen 等人, (1986) Molec. Immunol. 23:709-715。同样, 构象表位易于藉由诸如藉由 x 射线晶体分析仪及 2 维核磁共振测定氨基酸的空间构形而鉴定。例如参见上文 Epitope Mapping Protocols。

该定义中还包括合成抗原, 例如多表位(polyepitopes)、侧翼表位(flanking epitopes), 及其它重组抗原或合成得来的抗原。例如参见 Bergmann 等人, (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann 等人, (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; Gardner 等人, (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998。

在本发明的一个优选实施方式中, 提供一种免疫原性组合物, 其能诱发免疫反应, 并且, 更优选地, 给与针对 PCV2 感染临床征象的保护性免疫力。组合物最优选包含由 PCV2 的 ORF2 表达的多肽或其片段作为该组合物的抗原组份。在本文中用于制备组合物且在本文提供的方法中使用的 PCV2 ORF2 DNA 及蛋白质, 是 PCV2 分离株中的一个高度保守的结构域; 由此, 任何 PCV2 ORF2 都能够有效地充当如本文中使用的 PCV ORF2 DNA 和/或多肽的来源。优选 PCV2 ORF2 蛋白是 SEQ ID NO. 11 的该 PCV2 ORF2 蛋白。在本文中提供的优选 PCV ORF2 多肽为 SEQ ID NO. 5, 但本领域技术人员了解此序列在序列同源性方面的变化可达到 6%-10%而仍保持使其适用于免疫原性组合物中的抗原特征。免疫学组合物的抗原特征可例如通过如实施例 4 提供的攻毒实验加以估计。此外, 当与由 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的多核苷酸序列编码的 PCV2 ORF 2 蛋白质相比, 经修饰抗原给与至少 70%, 优选 80%, 更优选 90%的保护性免疫力时, 仍保持经修饰抗原的抗原特征。本文中使用的"免疫原性组合物"意谓这样的 PCV2 ORF2 蛋白,

其引起宿主对 PCV2 ORF2 蛋白的"免疫学反应",即细胞免疫反应和/或抗体介导的免疫反应。优选地,此免疫原性组合物能够引起或增强抗 PCV2 的免疫反应,藉此给与抗 PCV2 感染的保护性免疫力,并降低一种或多种,优选所有与此相关的临床征象的发生率、严重性或预防一或多种且优选所有与此相关的临床征象。

在有些形式中,PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性部分用作组合物中的抗原组份。本文中使用的术语"免疫原性部分"分别是指 PCV2 ORF2 蛋白和/或聚核苷酸的截短形式和/或经取代形式,或片段。优选地,这些截短形式和/或经取代形式或片段将包含全长 ORF2 多肽的至少 6 个相邻氨基酸。更优选地,截短形式或经取代形式或片段应具有全长 ORF2 多肽的至少 10 个,更优选至少 15 个且更优选至少 19 个相邻氨基酸。在本文中提供的在这方面的两个优选序列为 SEQ ID NO. 9 及 SEQ ID NO. 10。另外应了解这些序列可为较大片段或截短形式的一部分。

在本文中提供的另一优选 PCV2 ORF2 多肽系由 SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 的核苷酸序列编码。然而,本领域技术人员应了解此序列在序列同源性方面可变化达到 6%-20%且仍保持使其适用于免疫原性组合物中的抗原特征。在有些形式中,此 PVC2 ORF2 多肽的截短形式或经取代形式或片段系用作组合物的抗原组份。优选地,这些截短形式或经取代形式或片段将包含例如,SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 的全长 ORF2 核苷酸序列的至少 18 个相邻核苷酸。更优选地,截短形式或经取代形式或片段将具有例如 SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 的全长 ORF2 核苷酸序列的至少 30 个,更优选至少 45 个,更优选至少 57 个相邻核苷酸。

如在本领域中已知的"序列同一性"是指两种或两种以上多肽序列之间或两种或两种以上聚核苷酸序列之间,即参考序列及待与参考序列比较的给定序列之间的关系。序列同一性是在将给定序列与参考序列进行最优比对以产生最高序列相似度后,比较所述序列而确定的,由所述序列段之间的匹配度所决定。在进行这样的比对时,在位置对位置(position-by-position)的基础上确定序列同一性,例如,若在某一特定位置处核苷酸或氨基酸残基是同一的,则所述序列在该位置处是同一的。随后,这些位置同一性的总数除以参考序列中核苷酸或残基的总数以产生百分比序列同一性。可凭借已知方法容易地计算序列同一性,包括但不限于那些在以下文献中描述

的方法: Computational Molecular Biology, Lesk, A. N. 编, Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 编, Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. 及 Griffin, H. G. 编, Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及 Devereux, J. 编, M. Stockton Press, New York (1991); 及 Carillo, H. 及 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), 将它们的教导以提述的方式并入本文中。测定序列同一性的优选方法经设计以产生测试序列间的最大匹配。测定序列同一性的方法被编码成公开可用的计算机程序用于测定给定序列间的序列同一性。这些程序的实例包括(但不限于) GCG program package (Devereux, J. 等人, Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul, S. F. 等人, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)。BLASTX 程序公开地得自 NCBI 及其它来源(BLAST Manual, Altschul, S. 等人, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. 等人, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), 将其教导以引用的方式并入本文中)。这些程序使用缺省空隙权重(default gap weight)对序列进行最优比对, 以产生给定序列与参考序列之间的最高程度的序列同一性。例如, 具有与参考核苷酸序列有至少(例如)85%, 优选 90%, 甚至更优选 95%的"序列同一性"的核苷酸序列的多核苷酸, 意在表示除了相对于参考核苷酸序列每 100 个核苷酸, 给定多核苷酸序列可能包括至多 15 个, 优选至多 10 个, 甚至更优选至多 5 个点突变之外, 给定多核苷酸的核苷酸序列与参考序列是同一的。换言之, 在具有相对于参考核苷酸序列的至少 85%, 优选 90%, 甚至更优选 95%的同一性的核苷酸序列的多核苷酸中, 参考序列中的至多 15%, 优选 10%, 甚至更优选 5%的核苷酸可被删除或被另一核苷酸取代, 或参考序列中可以插入数目占参考序列核苷酸总数的至多 15%, 优选 10%, 甚至更优选 5%的核苷酸。参考序列的这些突变可能发生在参考核苷酸序列的 5'末端位置或 3'末端位置处或这些末端位置之间的任何地方, 或者个别地散布于参考序列中的核苷酸间, 或者散布成参考序列内的一个或多个相邻群体(contiguous group)。类似地, 具有与参考氨基酸序列有至少(例如)85%, 优选 90%, 甚至更优选 95%的序列同一性的给定氨基酸序列的多肽意在表示除了相对于

参考氨基酸序列的每 100 个氨基酸，给定多肽序列可能包括至多 15 个，优选至多 10 个，甚至更优选至多 5 个氨基酸改变之外，给定多肽的氨基酸序列与参考序列是同一的。换言之，为获得具有与参考氨基酸序列的至少 85%，优选 90%，甚至更优选 95% 的序列同一性的给定多肽序列，可将参考序列中的至多 15%，优选至多 10%，甚至更优选至多 5% 的氨基酸残基删除或用另一氨基酸取代，或者可以向参考序列中插入数目占参考序列氨基酸残基总数的至多 15%，优选至多 10%，甚至更优选至多 5% 的氨基酸。参考序列的这些改变可发生于参考氨基酸序列的氨基末端或羧基末端位置处或这些末端位置之间的任何地方，或者个别地散布于参考序列的残基间，或者散布成参考序列内一个或多个相邻群体。优选地，不一致的残基位置是通过保守氨基酸取代而相异的。然而，当测定序列同一性时，保守取代不算作匹配。

本文中使用的"序列同源性"是指一种测定两个序列的相关性的方法。为测定序列同源性，将两个或两个以上序列最优比对，必要时引入空隙。然而，与"序列同一性"相比，当测定序列同源性时，将保守氨基酸取代视为匹配。换言之，为获得与参考序列具有 95% 序列同源性的多肽或多核苷酸，参考序列中的 85%，优选 90%，甚至更优选 95% 的氨基酸残基或核苷酸必须与另一氨基酸或核苷酸匹配或与另一氨基酸或核苷酸构成保守取代，或可向参考序列中插入数目占参考序列氨基酸残基或核苷酸总数(不包括保守取代)的至多 15%，优选至多 10%，甚至更优选至多 5% 的氨基酸或核苷酸。优选地，同源序列包含至少一段 50 个，甚至更优选至少 100 个，甚至更优选至少 250 个，甚至更优选至少 500 个核苷酸。

"保守取代"是指氨基酸残基或核苷酸被具有类似特征或性质(包括大小、疏水性等)的另一氨基酸残基或核苷酸取代，使得总体功能性不发生显著变化。

"分离"意谓"凭借人的手"而从其天然状态发生改变，也即若其出现于自然界，则其自其原始环境变化和/或移出。例如，当术语用于本文中时，天然存在于活有机体中的多核苷酸或多肽不是"分离"的，但相同的多核苷酸或多肽与其天然状态的共存物质分开后，则是"分离"的。

由此，本文中使用的免疫原性组合物还指包含 PCV2 ORF2 蛋白的组合物，其中该 PCV2 ORF2 蛋白为上文所述的那些 PCV2 ORF2 蛋白中的任何

一种。优选地，该 PCV2 ORF2 蛋白为

i) 包含以下的序列的多肽：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11，

ii) 与 i) 的多肽至少 80% 同源的任何多肽，

iii) i) 和/或 ii) 的多肽的任何免疫原性部分，

iv) iii) 的免疫原性部分，其包含在以下的序列中包括的至少 10 个相邻氨基酸：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11，

v) 由包含 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 的序列的 DNA 编码的多肽，

vi) 由与 v) 的多核苷酸至少 80% 同源的多核苷酸编码的任何多肽，

vii) 由 v) 和/或 vi) 的多核苷酸所编码的多肽的任何免疫原性部分，

viii) vii) 的免疫原性部分，其中编码该免疫原性部分的多核苷酸包含在 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 的序列中所包括的至少 30 个相邻核苷酸。

优选地，那些免疫原性部分中的任一个都具有由 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 的序列编码的 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性特征。

根据另一方面，在免疫学组合物中提供 PCV2 ORF2 蛋白，其中 PCV2 ORF2 蛋白的抗原包含水平(antigen inclusion level)可有效用于诱发所需的免疫反应，即降低由 PCV2 感染的发生率，减轻 PCV2 感染的严重性，或预防由 PCV2 感染所致的一或多种临床征象。优选地，PCV2 ORF2 蛋白包含水平为每毫升最终免疫原性组合物至少 0.2 μg 抗原($\mu\text{g}/\text{ml}$)，更优选为约 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，更优选为约 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，甚至更优选为约 0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，更优选为约 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，更优选为约 0.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，更优选为约 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，甚至更优选为约 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，甚至更优选为约 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，更优选为约 1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，甚至更优选为约 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，甚至更优选为约 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，且最优选为约 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

根据另一方面，ORF2 抗原包含水平为每个剂量最终抗原组合物至少 0.2/ μg 如上所描述的 PCV2 ORF2 蛋白($\mu\text{g}/\text{剂}$)，更优选为约 0.2 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 400 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，更优选为约 0.3 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 200 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，甚至更优选为约 0.35 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 100 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，更优选为约 0.4 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 50 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，更优选为约 0.45 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 30 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，更优选为约 0.6 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 15 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，甚至更优选为约 0.75 $\mu\text{g}/\text{剂}$

剂至约 8 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，甚至更优选为约 1.0 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 6 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，更优选为约 1.3 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 3.0 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，甚至更优选为约 1.4 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 2.5 $\mu\text{g}/\text{剂}$ ，甚至更优选为约 1.5 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 至约 2.0 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 且最优选为约 1.6 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 。

用于根据本发明的免疫原性组合物中的 PCV2 ORF2 多肽可以用任何方式获得，包括 PCV2 ORF2 的分离及纯化、标准蛋白质合成及重组方法。用于获得 PCV2 ORF2 多肽的优选方法在美国专利申请第 11/034,797 号中提供，其教导及内容以提述的方式并入本文中。简言之，用含有 PCV2 ORF2 DNA 编码序列的重组病毒载体感染易感细胞，由重组病毒表达 PCV2 ORF2 多肽，通过过滤从上清液回收所表达的 PCV2 ORF2 多肽，并用任何已知的方法，优选使用二元乙撑亚胺，使其失活化，随后将其中和以终止失活化过程。

用于本文中的免疫原性组合物还指这样的组合物，其包括 i)上文所述的任一种 PCV2 ORF2 蛋白，优选具有上文所述的浓度；及 ii)表达该 PCV2 ORF2 蛋白的病毒载体(优选重组杆状病毒)的至少一部分。此外，免疫原性组合物可包含 i)上文所述的任一种 PCV2 ORF2 蛋白，优选具有上文所述的浓度；ii)表达该 PCV2 ORF2 蛋白的病毒载体(优选重组杆状病毒)的至少一部分，及 iii)一部分细胞培养物上清液。

本文中使用的免疫原性组合物还指这样的组合物，其包括 i)上文所述的任一种 PCV2 ORF2 蛋白，优选具有上文所述的浓度；ii)表达该 PCV2 ORF2 蛋白的病毒载体(优选重组杆状病毒)的至少一部分，及 iii)一部分细胞培养物；其中约 90%的组份具有小于 1 μm 的尺寸。

本文中使用的免疫原性组合物还指这样的组合物，其包括 i)上文所述的任一种 PCV2 ORF2 蛋白，优选具有上文所述的浓度；ii)表达该 PCV2 ORF2 蛋白的病毒载体的至少一部分，iii)一部分细胞培养物，iv)和使重组病毒载体失活化的失活化剂，优选为 BEI，其中约 90%的组份 i)至组份 iii)具有小于 1 μm 的尺寸。优选地，BEI 以有效使杆状病毒失活化的浓度存在。有效浓度为上文所述。

本文中使用的免疫原性组合物还指这样的组合物，其包括 i)上文所述的任一种 PCV2 ORF2 蛋白，优选具有上文所述的浓度；ii)表达该 PCV2 ORF2 蛋白的病毒载体的至少一部分，iii)一部分细胞培养物，iv)使重组病毒载体失活化的失活化剂，优选为 BEI，及 v)用于终止由失活化剂所介导的失活化

的中和剂，其中约 90%的组份 i)至组份 iii)具有小于 1 μm 的尺寸。优选地，若失活化剂为 BEI，则该组合物包含与 BEI 等量的硫代硫酸钠。

将多肽掺入可施用于对 PCV2 感染敏感的动物的组合物中。组合物的优选形式亦可包括本领域技术人员已知的额外组份(亦参见 Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)。第 18 版, Mack Publ., Easton)。另外，该组合物可包括一或多种兽医学上可接受的载体。本文中使用的"兽医学上可接受的载体"包括以下载体中的任一项及全部:溶剂、分散介质、包衣(coatings)、佐剂、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂、吸附延迟剂等。在一个优选实施方式中，免疫原性组合物包含本文提供的 PCV2 ORF2 蛋白，优选具有上文所述的浓度，其与佐剂[优选卡巴普(Carbopol)]及生理盐水混合。

本领域技术人员应了解用于本文中的组合物可包括已知的可注射生理学可接受无菌溶液。为了制备非经肠注射或灌注的即用溶液，可以容易地获得含水等张溶液诸如盐水或相应的血浆蛋白质溶液。另外，本发明的免疫原性组合物及疫苗组合物可包括稀释剂、等张剂、稳定剂或佐剂。稀释剂可包括水、盐水、右旋糖、乙醇、甘油等。等张剂典型地可包括氯化钠、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇及乳糖。稳定剂典型地包括白蛋白及乙二胺四乙酸的碱金属盐。

本文中使用的"佐剂"可包括氢氧化铝及磷酸铝，例如 Quil A、QS-21(Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA)、GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL)的皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液。乳液尤其可基于轻液体石蜡油(欧洲药典类型);由烯烃，尤其是异丁烯或癸烯的寡聚而产生的类异戊二烯油，诸如角鲨烷油或角鲨烯油;含有直链烷基的酸或醇的酯，更具体地说为植物油、油酸乙酯、丙二醇二(辛酸酯/癸酸酯)、甘油三(辛酸酯/癸酸酯)或丙二醇二油酸酯;支链脂肪酸或醇的酯，尤其是异硬脂酸酯。油与乳化剂组合使用以形成乳液。乳化剂优选为非离子型表面活性剂，尤其为脱水山梨糖醇(sorbitan)的酯、二缩甘露醇的酯(例如，无水甘露糖醇油酸酯)、乙二醇的酯、聚甘油的酯、丙二醇的酯及油酸、异硬脂酸、蓖麻油酸或羟基硬脂酸的酯，它们任选是乙氧基化的，及聚氧丙烯-聚氧乙烯共聚物嵌段体，尤其是普罗尼克(Pluronic)产品，特别是 L121。参见 Hunter 等人，The Theory and Practical Application of

Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, 第 51-94 页, (1995) 及 Todd 等人, Vaccine 15:564-570 (1997)。

例如, 有可能使用由 M. Powell 及 M. Newman 编写的 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", Plenum Press, 1995 的第 147 页中描述的 SPT 乳液, 及在同一本书的第 183 页中描述的乳液 MF59。

佐剂的另一例子是这样的化合物, 其选自丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物及马来酸酐与烯基衍生物的共聚物。有利的佐剂化合物是丙烯酸或甲基丙烯酸的交联的聚合物, 尤其与糖类或多元醇的聚链烯基醚交联的聚合物。以术语卡波姆(carbomer)(Pharmeuropa, 第 8 卷, 第 2 号, June 1996)来称呼这些化合物。本领域技术人员亦可参见美国专利第 2,909,462 号, 其描述与具有至少 3 个羟基、优选不超过 8 个羟基的多羟基化合物交联的丙烯酸聚合物, 其中至少三个羟基的氢原子被替换为具有至少 2 个碳原子的不饱和脂族基团。优选的基团为含有 2 至 4 个碳原子的那些基团, 例如乙烯基、烯丙基及其它烯系不饱和基团。不饱和基本身可含有其它取代基, 诸如甲基。商品名为卡巴普(Carbapol) (BF Goodrich, Ohio, USA)的产品尤其适用。其与烯丙基蔗糖或与烯丙基季戊四醇交联。其中包括卡巴普 974P、934P 及 971P。最优选使用卡巴普, 尤其是使用卡巴普 971P, 优选用量为每个剂量约 500 μg 至约 5 mg, 甚至更优选用量为每个剂量约 750 μg 至约 2.5 mg, 最优选用量为每剂量约 1 mg。

其它适当佐剂包括(但不限于)RIBI 佐剂系统(Ribi Inc.)、Block 共聚物(CytRx, Atlanta GA)、SAF-M (Chiron, Emeryville CA)、单磷酸基脂质 A、阿夫立定(Avridine)脂质-胺佐剂、来自大肠杆菌(E. coli)的热不稳定肠毒素(重组或其它)、霍乱毒素、IMS 1314 或胞壁酰基二肽, 及其它多种佐剂。

优选地, 佐剂以每剂量约 100 μg 至约 10 mg 的量添加。甚至更优选地, 佐剂以每剂量约 100 μg 至约 10 mg 的量添加。甚至更优选地, 佐剂以每剂量约 500 μg 至约 5 mg 的量添加。甚至更优选地, 佐剂以每剂量约 750 μg 至约 2.5 mg 的量添加。最优选地, 佐剂以每剂量约 1 mg 的量添加。

另外, 该组合物可包括一或多种可药用的载体。本文中使用的"可药用的载体"包括以下载体的任一项及所有: 溶剂、分散介质、包衣(coatings)、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗菌剂及抗真菌剂、等张剂、吸附延迟剂等等。最优选地, 由此提供的组合物含有自活体外培养的细胞的上清液所回收的

PCV2 ORF2 蛋白,其中用含有 PCV2 ORF2 DNA 且表达 PCV2 ORF2 蛋白的重组病毒载体感染所述细胞,且其中用约 2 mM 至约 8 mM BEI,优选用约 5 mM BEI 处理以使病毒载体失活化,并用相等浓度的中和剂,优选硫代硫酸钠溶液处理该细胞培养物至约 2 mM 至约 8 mM,优选约 5 mM 的最终浓度。

本发明还涉及包含以下各项的免疫原性组合物: i)上文所述的任一种 PCV2 ORF2 蛋白,优选具有上文所述的浓度; ii)表达该 PCV2 ORF2 蛋白的病毒载体的至少一部分, iii)一部分细胞培养物, iv)使重组病毒载体失活化的失活化剂,优选为 BEI; v)用于终止由失活化剂所介导的失活化的中和剂,优选为与 BEI 等量的硫代硫酸钠; 及 vi)适当佐剂,优选为具有上述量的卡巴普 971; 其中约 90%的组份 i)至组份 iii)具有小于 1 μm 的尺寸。根据另一方面,此免疫原性组合物进一步包含生理学可接受浓度的可药用盐,优选磷酸盐。优选地,将该免疫原性组合物的 pH 值调节至生理 pH 值,即介于约 6.5 与 7.5 之间。

本文中使用的免疫原性组合物还指这样一种组合物,其每一毫升包含 i)至少 1.6 μg 上述 PCV2 ORF2 蛋白, ii)至少一部分表达该 PCV2 ORF2 蛋白的杆状病毒, iii)一部分细胞培养物, iv)约 2 mM 至 8 mM BEI, v)与 BEI 等量的硫代硫酸钠; 及 vi)约 1 mg 卡巴普 971, 及 vii)生理学可接受浓度的磷酸盐,其中约 90%的组份 i)至组份 iii)具有小于 1 μm 的尺寸且将该免疫原性组合物的 pH 值调节至约 6.5 至 7.5。

免疫原性组合物可进一步包括一或多种其它免疫调节剂,诸如白介素、干扰素或其它细胞因子。免疫原性组合物亦可包括艮他霉素(Gentamicin)及硫柳汞(Merthiolate)。尽管适用于本发明的语境下的佐剂及添加剂的量及浓度可容易地由本领域技术人员决定,但本发明涵盖这样的组合物,其包含约 50 μg 至约 2000 μg , 优选约 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量疫苗组合物的佐剂。因此,本文中使用的免疫原性组合物还指包含约 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗生素,更优选少于约 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗生素的组合物。

本发明还涉及包含以下各项的免疫原性组合物: i)上文所述的任一种 PCV2 ORF2 蛋白,优选具有上文所述的浓度; ii)表达该 PCV2 ORF2 蛋白的病毒载体的至少一部分, iii)一部分细胞培养物, iv)使重组病毒载体失活化的失活化剂,优选为 BEI; v)用于终止由失活化剂所介导的失活化的中和剂,

优选为与 BEI 等量的硫代硫酸钠；vi)适当佐剂，优选为具有上述量的卡巴普 971；vii)可药用浓度的盐水缓冲液，优选磷酸盐，及 viii)抗微生物活性剂；其中约 90%的组份 i)至组份 iii)具有小于 1 μm 的尺寸。

意外地发现，包含 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物在 24 个月期间内高度稳定。亦发现免疫原性组合物在减缓与 PCV2 感染相关的临床症状方面极为有效。亦发现，包含上述由重组杆状病毒表达的 PCV2 ORF2 蛋白的免疫原性组合物意外地比包含失活化形式的完整 PCV2 病毒或分离的病毒 PCV2 ORF2 抗原的免疫原性组合物有效。尤其，意外地发现重组杆状病毒表达的 PCV2 ORF2 蛋白在极低浓度(意谓至多 0.25 μg /剂量的浓度)时有效。PCV2 ORF2 蛋白的这种意料之外的高免疫原性潜能被卡巴普所增强。实施例 1 至实施例 3 详细公开了包含 PCV2 ORF2 的免疫原性组合物的制备。

本文中使用的免疫原性组合物亦指 CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, USA)、CircoVac®(Merial SAS, Lyon, France)、CircoVent (Intervet Inc., Millsboro, DE, USA)或 Suvaxyn PCV-2 One Dose®(Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, USA)。

免疫原性组合物的施用

根据本发明的组合物可皮内(interdermally)、气管内或阴道内施用。该组合物优选可肌肉内或鼻内施用，最优选肌肉内施用。在动物体内，可证实经由静脉内或凭借直接注射于靶组织中施用上述药物组合物为有利的。就全身性施用而言，静脉内、血管内、肌肉内、鼻内、动脉内、腹膜内、经口或鞘内途径是优选的。更局部的施用可在皮下、皮内(intradermally)、皮内(intracutaneously)、心脏内、小叶内、髓内、肺内或直接在待治疗的组织(结缔组织、骨组织、肌肉组织、神经组织、上皮组织)中或其附近实施。视治疗期望的持续时间及有效性而定，本发明的组合物可以施用一次或若干次，亦可间歇地施用，例如每天一次历时若干天、数周或数月，且以不同的剂量施用。

优选地，对有需要的受试者肌肉内施用至少一个剂量的上述免疫原性组合物。根据另一方面，PCV-2 抗原或包含上述任何此 PCV-2 抗原的免疫原性组合物配制成每个剂量一(1)毫升且以每个剂量一(1)毫升施用。因此，根据另一方面，本发明还涉及包含如本文中描述的 PCV-2 抗原的 1 ml 免疫原性组合物，其用于减缓或减轻感染有 PCV2 的猪的淋巴结病、淋巴细胞消

减和/或多核组织细胞/巨组织细胞。

根据另一方面，本发明亦涉及一种包含如本文中所描述的 PCV-2 抗原的 1 ml 免疫原性组合物，用于减缓或减轻猪的与一或多种以下症状组合的淋巴结病：(1)具有小叶间水肿的间质性肺炎，(2)皮肤苍白或黄疸，(3)斑点状萎缩性肝，(4)胃溃疡，(5)肾炎及(6)生殖病症，例如流产、死产、干尸。

根据另一方面，向有需要的受试者额外施用至少一次至少一个剂量的上述免疫原性组合物，其中该第二次或任何更多次的施用是在初始或任何先前施用后至少 14 天时进行的。优选地，免疫原性组合物与免疫刺激物一起施用。优选地，施用该免疫刺激物至少两次。优选地，在免疫刺激物的第一次施用与第二次或任何其它次施用之间相隔至少 3 天，更优选至少 5 天，甚至更优选至少 7 天。优选地，在初始施用本文中提供的免疫原性组合物后至少 10 天，优选 15 天，甚至更优选 20 天，甚至更优选至少 22 天施用免疫刺激物。优选免疫刺激物为，例如钥孔血蓝蛋白(KLH)，优选弗氏不完全佐剂乳化(KLH/ICFA)。然而，由此应了解亦可使用本领域技术人员已知的任何其它免疫刺激物。本文中使用的术语"免疫刺激物"意谓能够触发免疫反应，优选同时不引发或增强特异性免疫反应(例如抗特定病原体的免疫反应)的任何药剂或组合物。进一步指示以适当剂量施用免疫刺激物。

此外，还意外地发现，本文中所用的免疫原性组合物—优选包含表达 PCV2 ORF2 蛋白的重组杆状病毒，甚至更优选与卡巴普组合的那些免疫原性组合物—的免疫原性潜力可进一步通过施用 IngelVac PRRS MLV 疫苗加以证实(参见实施例 5)。当存在 PRRS 感染时，PCV2 临床征象及疾病表现大大增强。然而，本文提供的免疫原性组合物及疫苗接种策略大大地，而且超乎预料地减轻了此效应。换言之，当用本文提供的任何 PCV2 ORF2 免疫原性组合物及 Ingelvac PRRS MLV 疫苗(Boehringer Ingelheim)处理动物，优选仔猪时，观测到意外的协同效应。

附图简要说明

图 1 是一种 PCV2 ORF2 重组杆状病毒的优选构建过程的示意图。

图 2a 和 2b 分别是说明如何制备一种根据本发明使用的组合物的示意图。

优选实施方式详述

以下实施例阐述根据本发明的优选材料及程序。下面描述的是优选的方法、装置及材料，但类似或等效于本文中描述的那些方法及材料的任何方法及材料均可用于实行或测试本发明。然而，应了解这些实施例仅仅是为了说明而提供的，任何内容均不应被认为是对本发明的总体范围的限制。

实施例 1

此实施例比较使用本发明的方法与在现有技术中已知方法的 ORF2 的相对产率。将四个 1000 mL 转瓶各自以大约 1.0×10^6 个 Sf+ 细胞/毫升，于 300 mL 昆虫无血清培养基 Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) 中接种。将母细胞培养物标为 SF+(草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)) 母细胞储备物 (Master Cell Stock)，第 19 代，批号 N112-095W。用以产生 SF+ 母细胞储备物的细胞得自 Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT。将用于此实施例的 SF+ 细胞株限制在第 19 代与第 59 代之间。其它代也可实现本发明的目的，但为了将过程放大以用于大规模生产，或许将需要至少 19 次传代，且超过 59 的代可能对表达有影响 (尽管未研究此情况)。更详细地，在恒定搅动下，使来自液氮贮槽的初始 SF+ 细胞培养物悬浮生长于的无菌转瓶 (spinner flask) 中的 Excell 420 培养基中。使培养物生长于装有 25 mL 至 150 mL Excell 420 无血清培养基的 100 mL 至 250 mL 转瓶中。当细胞繁殖至 $1.0-8.0 \times 10^6$ 个细胞/毫升的细胞密度时，将其以 $0.5-1.5 \times 10^6$ 细胞/毫升的种植密度分至新容器中。随后，在 25°C-29°C 下，使扩大培养物生长于尺寸最多达 36 升的转瓶中或多达 300 升的不锈钢生物反应器中，历时 2-7 天的时间。

接种后，将烧瓶在 27°C 下培养四小时。随后，将每一烧瓶用含有 PCV2 ORF2 基因 (SEQ ID NO : 4) 的重组杆状病毒接种。如下产生含有 PCV2 ORF2 基因的重组杆状病毒：将来自 PCV2 的北美病毒株的 PCV2 ORF2 基因进行 PCR 扩增，使其含有 5'Kozak 序列 (SEQ ID NO : 1) 及 3'EcoR1 位点 (SEQ ID NO : 2)，然后克隆于 pGEM-T-Easy 载体 (Promega, Madison, WI) 中。随后，将其切下并亚克隆于转移载体 pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 中。将亚克隆部分在本文中表示为 SEQ ID NO : 7。将含有 PCV2

ORF2 基因的 pVL1392 质粒命名为 N47-064Y, 随后与 BaculoGold®(BD Biosciences Pharmingen) 杆状病毒 DNA 共转染于 Sf+ 昆虫细胞(Protein Sciences, Meriden, CT)中以产生含有 PCV2 ORF2 基因的重组杆状病毒。本文中提供为 SEQ ID NO: 8 的新构建体。将含有 PCV2 ORF2 基因的重组杆状病毒进行噬斑纯化且使母病毒种株(Master Seed Virus, MSV)在 Sf+ 细胞株中增殖、分成等份试样且储存于 -70 °C。使用杆状病毒特异性引物的 PCR-RFLP, 将 MSV 肯定地鉴定为 PCV2 ORF2 杆状病毒。在间接荧光抗体测定中利用多克隆血清或单克隆抗体检测到感染了 PCV2 ORF2 杆状病毒而产生 MSV 或工作病毒种株(Working Seed Virus)的昆虫细胞表达 PCV2 ORF2 抗原。另外, 凭借 N-末端氨基酸测序确认了 PCV2 ORF2 杆状病毒的身份。还根据 9 C.F.R. 113.27(c)、113.28 及 113.55 测试了 PCV2 ORF2 杆状病毒 MSV 的纯度。接种于转瓶中的每一重组杆状病毒具有不同的病毒感染复数(MOI)。将瓶 1 用 7.52 mL 的 0.088 MOI 的种株接种; 瓶 2 用 3.01 mL 的 0.36 MOI 的种株接种; 瓶 3 用 1.5 mL 的 0.18 MOI 的种株接种; 将瓶 4 用 0.75 mL 的 0.09 MOI 的种株接种。本文提供构建 PCV2 ORF2 重组杆状病毒的基本步骤的示意性流程图作为图 1。

用杆状病毒接种后, 随后将转瓶在 27 °C ± 2 °C 下培养 7 天, 其间还在 100 rpm 下搅动。所述转瓶使用通风盖以允许空气流动。对于接下来的 7 天, 每 24 小时自每一转瓶取样品。提取(extraction)后, 将每一样品离心且将离心沉淀及上清液两者分离, 随后经由 0.45 μm-1.0 μm 孔径的膜微过滤。

随后, 通过 ELISA 测定定量所得样品中存在的 ORF2 的量。用蛋白 G 纯化的猪抗 PCV2 Pab IgG (在 PBS 中 1:250 稀释)作为捕捉抗体, 在 0.05 M 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中稀释至 1:6000 进行 ELISA 测定。随后, 将 100 μL 抗体置于微量滴定板的孔中, 密封, 并在 37 °C 下温育过夜。随后, 用包含 0.5 mL Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO)、100 mL 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA)及 899.5 mL 蒸馏水的洗涤溶液将板洗涤三次。随后, 将 250 μL 封闭溶液(5 g Carnation 脱脂奶粉(Nestle, Glendale, CA)加于 10 mL D-PBS 中, 用蒸馏水补至 100 mL)添加至每个孔中。下一步为洗涤测试板, 然后添加预稀释的抗原。预稀释抗原的制备是通过将 200 μL 稀释剂溶液(999.5 mL D-PBS 中加 0.5 mL Tween 20)添加到稀释板上的每个孔中。随后, 将样品以 1:240 的比率及 1:480 的比率稀释, 且随后将这些稀释样品中的每

一个取 100 μL , 添加至稀释板上的一个顶部孔中(即, 一个顶部孔容纳 100 μL 的 1:240 的稀释物, 另一个顶部孔容纳 100 μL 的 1:480 的稀释物)。随后在板的剩余部分上进行连续稀释, 即连续地从一个孔移出 100 μL 转移至板上相邻的下一个孔中。每个孔在进行下一次转移之前先混合。测试板的洗涤包括用洗涤缓冲液洗涤该板三次。随后, 将该板密封并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育一小时, 然后用洗涤缓冲液再洗涤三次。所使用的检测抗体为 PCV ORF2 的单克隆抗体。将检测抗体以稀释剂溶液稀释至 1:300, 然后将 100 μL 经稀释的检测抗体添加至孔中。随后, 将板密封并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育一小时, 然后用洗涤缓冲液洗涤三次。随后, 将正常兔血清(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) 添加至稀释剂溶液中至 1% 浓度而制备偶联稀释剂。将山羊抗小鼠的偶联抗体(H+I)-HRP (Jackson Immunoresearch) 用偶联稀释剂稀释至 1:10,000。随后, 将 100 μL 经稀释的偶联抗体添加至每个孔中。随后, 将该板密封并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 分钟, 然后用洗涤缓冲液洗涤三次。将与等体积过氧化物酶底物 B (KPL) 混合的 100 μL 底物(TMB 过氧化物酶底物, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD) 添加至每个孔中。将板在室温下温育 15 分钟。随后, 将 100 μL 的 1 N HCl 添加至所有孔中以终止反应。随后, 使该板通过 ELISA 读取器。此测定的结果提供于以下表 1 中:

表 1

天数	转瓶	离心沉淀中的 ORF2(μg)	上清液中的 ORF2(μg)
3	1	47.53	12
3	2	57.46	22
3	3	53.44	14
3	4	58.64	12
4	1	43.01	44
4	2	65.61	62
4	3	70.56	32
4	4	64.97	24
5	1	31.74	100
5	2	34.93	142

5	3	47.84	90
5	4	55.14	86
6	1	14.7	158
6	2	18.13	182
6	3	34.78	140
6	4	36.88	146
7	1	6.54	176
7	2	12.09	190
7	3	15.84	158
7	4	15.19	152

这些结果指示当延长温育时间时, ORF2 在离心后的细胞及培养基的上清液中的表达大于在离心后的细胞及培养基的离心沉淀中的表达。相应地, 使得 ORF2 表达进行至少 5 天且在上清液中回收 ORF2, 而非使表达进行少于 5 天并从细胞回收 ORF2, 可提供 ORF2 产率的极大提高及优于先前方法的显著改良。

实施例 2

此实施例提供在本申请要求保护的本发明的功效的数据。以大约 1.0×10^6 个 Sf+ 细胞/毫升, 300 mL Excell 420 培养基中接种 1000 mL 转瓶。随后, 将瓶在 27°C 下温育且在 100 rpm 下搅动。随后, 温育 24 小时后, 将瓶以 0.1 MOI 的 10 mL PCV2 ORF2/Bac p+6 (含有 PCV2 ORF2 基因, 在 Sf9 昆虫细胞中额外传代 6 次后的重组杆状病毒) 病毒种株接种。

随后, 将瓶在 27°C 下温育共 6 天。温育后, 随后将瓶离心, 收集所得上清液三个样品, 使其失活化。通过使上清液温度到达 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 使上清液失活化。对于第一个样品, 将已经于 0.3 N NaOH 中环化成 0.2 M 二元乙撑亚胺(BEI)的 0.4 M 氢溴酸 2-溴乙撑胺(2-bromoethyleneamine hydrobromide) 溶液添加至上清液中以产生终浓度为 5 mM 的 BEI。对于第二个样品, 将 10 mM BEI 添加至上清液中。对于第三个样品, 不添加 BEI 至上清液中。随后, 将样品连续搅拌 48 小时。添加 1.0 M 硫代硫酸钠溶液产生 5 mM 的最小终

浓度，以中和任何残余 BEI。随后，使用如在实施例 1 中描述的不同 ELISA 测定程序定量每一样品中的 ORF2 的量。此结果可见于下表 2 中：

表 2

样品	上清液中的ORF2(μg)
1	78.71
2	68.75
3	83.33

此实施例说明用 BEI 中和不会移除或降低大量重组 PCV2 ORF2 蛋白产物。这一点的证明是在来自 BEI 或高温的上清液中，没有 ORF2 的大量损失。本领域技术人员应了解回收的 ORF2 为稳定的蛋白质产物。

实施例 3

此实施例说明本发明可从重组 PCV2 ORF2 的小规模生产放大至重组 PCV2 ORF2 的大规模生产。将于 7000 mL ExCell 420 培养基中的 5.0×10^5 个细胞/毫升的 SF+细胞种植于 20000 mL Applikon 生物反应器中。随后，在接下来的 68 个小时，将培养基及细胞在 27°C 下温育并在 100 RPM 下搅动。在第 68 小时时，将 41.3 mL PCV2 ORF2 杆状病毒 MSV+3 添加至 7000 mL ExCell 420 培养基中。随后，将所得混合物添加至生物反应器中。在接下来的七天，将混合物在 27°C 下温育并在 100 RPM 下搅动。自感染后第 4 天开始，每 24 小时自生物反应器抽取样品并将每一样品离心。将样品的上清液保留并随后使用 SDS-PAGE 密度测定法定量 ORF2 的量。此结果可见于下表 3 中：

表 3

感染后天数:	上清液中的ORF2($\mu\text{g}/\text{mL}$)
4	29.33
5	41.33
6	31.33
7	60.67

实施例 4

此实施例测试七种 PCV2 候选疫苗的功效，并进一步定义暴露于一种 PCV2 毒力株后的功效参数。将 9-14 日龄的一百零八(108)只剖腹产术获得的断初乳(CDCD)仔猪随机分成相同大小的 9 个组。表 4 阐述用于此实施例的整体研究设计。

表 4.整体研究设计

组	猪数	处理	处理天数	第 21 天及第 27 天的 KLH/ICFA	第 24 天用毒力 PCV2 攻毒	第 49 天尸体剖检
1	12	1 号 PCV2 疫苗 -(vORF2 16 µg)	0	+	+	+
2	12	2 号 PCV2 疫苗 -(vORF2 8 µg)	0	+	+	+
3	12	3 号 PCV2 疫苗 -(vORF2 4 µg)	0	+	+	+
4	12	4 号 PCV2 疫苗 -(rORF2 16 µg)	0	+	+	+
5	12	5 号 PCV2 疫苗 -(rORF2 8 µg)	0	+	+	+
6	12	6 号 PCV2 疫苗 -(rORF2 4 µg)	0	+	+	+
7	12	7 号 PCV2 疫苗-(灭活的全细胞病毒)	0	+	+	+
8	12	无疫苗-攻毒对照	N/A	+	+	+
9	12	无疫苗-严格阴性对照组	N/A	+	-	+

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; 灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

所述组中的七个(1-7 组)接受 PCV2 ORF2 多肽剂量，一个组充当攻毒对照并不接受 PCV2 ORF2，而另一组充当严格阴性对照组并亦不接受 PCV2 ORF2。在第 0 天，将第 1 至 7 组用指定的疫苗处理。在第 14 天，给与第 7 组中的仔猪增强免疫(booster)处理。疫苗接种后，观测仔猪的不良事件及注射部位的反应并在第 19 天，将仔猪移至第二试验点。在第二试验点，将第 1-8 组群养于一个猪舍(building)中而将第 9 组养于另一猪舍中。在第 21 天及第 27 天，使所有猪接受钥孔血蓝蛋白(KLH)/弗氏不完全佐剂(ICFA)，在第 24 天将第 1-8 组用毒力 PCV2 攻毒。

攻毒前和攻毒后，收集血液样品用于 PCV2 血清学。攻毒后，收集体重

数据用于测定平均每日体重增加(ADWG),并采集临床症状以及鼻拭子(nasal swab)样品用于测定 PCV2 的鼻排出(nasal shedding)。在第 49 天,对所有存活猪进行尸体剖检,对肺损害评分,并将选定的组织保存于福尔马林中用于日后的免疫组织化学(IHC)测试。

材料和方法

本实验为在第 0 天,在 9 至 14 日龄的 CDCD 猪中进行的部分盲法 (partially blinded) 疫苗接种-攻毒可行性研究 (vaccination-challenge feasibility study)。母猪的 PCV2 IFA 效价为 $\leq 1:1000$ 方可纳入该研究中。另外,母猪的血清学状态来自已知的 PRRS-阴性畜群。测试了二十八(28)只母猪的 PCV2 血清学状态。十四(14)只母猪具有 ≤ 1000 的 PCV2 效价,它们被转移至第一试验点。通过剖腹产手术接生一百一十(110)只仔猪并在第-4 天可用于此研究。在第-3 天,将在第一试验点的 108 只 CDCD 猪称体重、用耳标标记、按重量分批(block by weight)并随机分配至如以上在表 4 中列出的 9 组中的 1 组中。若满足纳入标准(inclusion criteria)的任何测试动物参加该研究后由于任何原因而被排除,则研究者及监控者进行商议以决定自该动物所收集的资料在最后分析中的使用。记录参加的仔猪被排除的日期及排除的理由。起初,无母猪被排除。在第-3 天,将可用 110 只猪中的总共 108 只随机分配至 9 个组中的一个组中。两只最小的猪(第 17 号及第 19 号)不分配至组中,需要时可用作备用。在研究过程中,若干只动物被排除。在攻毒之前,各自发现第 82 号猪(第 9 组)在第-1 天,第 56 号猪(第 6 组)在第 3 天,第 53 号猪(第 9 组)在第 4 天,第 28 号猪(第 8 组)在第 8 天,第 69 号猪(第 8 组)在第 7 天及第 93 号猪(第 4 组)在第 9 天死亡。在最后研究结果中不包括这六只猪。将第 17 号猪(备用猪之一)分配至第 9 组。将剩余的备用猪(第 19 号)自该研究排除。

给与每一组的配制剂如下:设计第 1 组施用每毫升含有 16 μg ORF2 的 1 ml 病毒 ORF2(vORF2)。这是通过将 10.24 ml 病毒 ORF2 (256 $\mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml}=10.24 \text{ ml vORF2}$)与 3.2 ml 的 0.5%卡巴普及 pH 值为 7.4 的 2.56 ml 磷酸盐缓冲盐水混合而进行的。由此产生 16 ml 用于第 1 组的配制剂。设计第 2 组施用每毫升含有 8 μg vORF2 的 1 ml vORF2。这是通过将 5.12 ml vORF2 (128 $\mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml}=5.12 \text{ ml vORF2}$)与 3.2 ml 的 0.5%卡巴普及 7.68 ml pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲盐水混合而进行的。由此产生 16 ml 用于第 2 组的配制剂。

设计第3组施用每毫升含有4 µg vORF2的1 ml vORF2。这是通过将2.56 ml vORF2 (64 µg/25 µg/ml=2.56 ml vORF2)与3.2 ml的0.5%卡巴普及10.24 ml pH值为7.4的磷酸盐缓冲盐水混合进行的。由此产生16 ml用于第3组的配制剂。设计第4组施用每毫升含有16 µg rORF2的1 ml重组ORF2 (rORF2)。这是通过将2.23 ml rORF2 (512 µg/230 µg/ml=2.23 ml rORF2)与6.4 ml的0.5%卡巴普及23.37 ml pH值为7.4的磷酸盐缓冲盐水混合而进行的。由此产生32 ml用于第4组的配制剂。设计第5组施用每毫升含有8 µg rORF2的1 ml rORF2。这是通过将1.11 ml rORF2 (256 µg/230 µg/ml=1.11 ml rORF2)与6.4 ml的0.5%卡巴普及pH值为7.4的24.49 ml磷酸盐缓冲盐水混合而进行的。由此产生32 ml用于第5组的配制剂。设计第6组施用每毫升含有8 µg rORF2的1 ml rORF2。这是通过将0.56 ml rORF2 (128 µg/230 µg/ml=0.56 ml rORF2)与6.4 ml的0.5%卡巴普及pH值为7.4的25.04 ml磷酸盐缓冲盐水混合而进行的。由此产生32 ml用于第6组的配制剂。设计第7组施用含有MAX PCV2 KV的2 ml PCV2灭活全细胞疫苗(PCV2 KV)。这是通过将56 ml PCV2 KV与14 ml的0.5%卡巴普混合进行的。由此产生70 ml用于第7组的配制剂。最后,设计第8组施用每2 ml剂量0.5 µg/ml或1.0 µg/ml的KLH。这是通过将40.71 ml KLH (7.0 µg 蛋白质/ml 0.5 µg/ml=570 ml (7.0 µg/ml)(x)=(0.5)(570 ml))、pH值为7.4的244.29 ml磷酸盐缓冲盐水及285 ml弗氏佐剂混合而进行的。表5描述用于此实施例的主要活动的时间范围。

表5.研究活动

研究日	研究活动
-4、0至49	对于总体健康情况及临床症状的一般观测
-3	称体重; 随机化成组; 从所有猪收集血液样品
0	健康检查; 分别向第1-7组施用第1-7号IVP
0-7	观测猪的注射部位反应
14	用第7号PCV2疫苗加强第7组; 来自所有猪的血液样品
14-21	观测第7组的注射部位反应
16-19	用抗生素处理所有猪(数据丢失)
19	将猪自第一测试点转移至第二测试点
21	用KLH/ICFA处理第1-9组

24	自所有猪收集血液及鼻拭子样品；称所有猪的体重；将第1-8组用 PCV2 攻毒材料攻毒
25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47	自所有猪收集鼻拭子样品
27	用 KLH/ICFA 处理第 1-9 组
31	自所有猪收集血液样品
49	自所有猪收集血液及鼻拭子样品；称所有猪的体重；将所有猪尸体剖检；记录可见损害，重点是黄疸及胃溃疡；评估肺的损害；保存新鲜组织样品及经福尔马林固定的组织样品；完成研究的活体阶段(In-life phase)

完成研究的活体阶段后，由病理学者通过免疫组织化学(IHC)检查经福尔马林固定的组织以检测 PCV2 抗原，评估血液样品的 PCV2 血清学，评估鼻拭子样品的 PCV2 排出(shedding)，并测定自第 24 天至第 49 天的平均每日体重增加(ADWG)。

自出生至大约 11 日龄(大约为该研究的第 0 天)，将动物养于在第一试验点的五个房间中的个别笼中。各个房间布局相同，由堆叠的多个单独的不锈钢笼组成，其中将加热并过滤空气独立供应至每一隔离单元。每一房间具有独立的供热和通风，藉此防止在房间之间的空气交叉污染。在第二试验点将动物养于两个不同猪舍中。将第 9 组(严格阴性对照组)单独养于经改装的肥育猪舍(finisher building)中，并将第 1-8 组养于经改装的保育猪舍(nursery building)中。将每一组养于独立围栏(每围栏 11-12 只猪)中，每一围栏提供给每只猪大约 3.0 平方英尺。每一围栏设在具有塑料漏缝地板(plastic slatted floors)的抬高平台(elevated deck)上。围栏下面的坑充当粪便及排泄物的储槽。每一猪舍具有其自身独立的供暖及通风系统，几乎不可能有猪舍间的空气交叉污染。

在第一试验点，从出生至大约 3 周龄，给仔猪喂以特别配制的乳质定粮(milk ration)。到第 19 天(大约 4½ 周龄)为止，所有仔猪都在进食经特别混制的固体状定粮。在第二试验点，给所有仔猪喂以适于其年龄及重量的定制未加药(non-medicated)市售混合定粮(不限量)。在两个试验点，水的供应亦

不限量。

将所有受试猪在第-2天用维生素E处理,在第-1天用铁注射处理,在第16天、第17天、第18天及第19天用NAXCEL®(1.0 mL,两臀部轮流肌注)处理。另外,由于各种健康原因,将第52号猪(第9组)在第3天用铁注射处理,将第45号猪(第6组)在第11天用铁注射处理,将第69号猪(第8组)在第6天用NAXCEL®处理,将第74号猪(第3组)在第14天用地塞米松(dexamethazone)及青霉素(penicillin)处理,将第51号猪(第1组)在第13天用地塞米松及青霉素处理,并在第14天用NAXCEL®处理。

同时,在两个试验点猪均接受了兽医学护理。在第0天进行动物健康检查并记录于健康检查记录表中。第0天的观测确定所有动物在疫苗接种前均具有良好的健康及营养状态。在攻毒前,观测到所有测试动物具有良好健康及营养状态。屠体及组织通过熬炼(rendering)加以处置。将研究动物的最后处置记录于动物处置记录上。

在第0天,分配至第1-6组的猪分别接受1.0 mL PCV2疫苗1-6,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器(Luer-lock syringe)和无菌的20 g×½"针头在左颈区肌注(IM)。分配至第7组的猪接受2.0 mL的第7号PCV2疫苗,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×½"针头在左颈区肌注。在第14天,分配至第7组的猪接受2.0 mL第7号PCV2疫苗,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×½"针头在右颈区肌注。

在第21天,所有受试猪接受2.0 mL KLH/ICFA,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×1"针头在右臀区肌注。在第27天,所有受试猪接受2.0 mL KLH/ICFA,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×1"针头在左臀区肌注。

在第24天,分配至第1-8组的猪接受1.0 mL PCV2 ISUVDL攻毒材料($5.11 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$),使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×1"针头在左颈区肌注。使用3.0 mL Luer锁紧套口注射器及鼻导管,通过经鼻注射(IN)对每只猪额外施用1.0 mL的相同材料(每鼻孔0.5 mL)。

在第-4天及自第0天至第19天,每日观测受试猪的总体健康状况及不良事件。将观测结果记录于临床观测记录上。自第0天至第7天观测所有受试猪,并自第14天至第21天进一步观测第7组的注射部位反应。在第-3天、第24天及第49天或在攻毒后发现猪死亡的当天,在校准后的天平上称

量每只猪的体重以测定平均每日体重增加。将体重记录于体重表中。在随机化之前,利用第-3天的体重将猪分批(block)。利用第24天及第49天的重量数据测定每只猪在这些时间点的平均每日体重增加(ADWG)。对于在攻毒之后第49天之前死亡的猪,将ADWG调整为表示自第24天至死亡之日的ADWG。

为测定PCV2血清学,在第-3天及第14天,自每只仔猪的眼眶静脉窦采集静脉全血。对于每只仔猪,通过将无菌毛细管插入一只眼睛的内眦中从眼眶静脉窦收集血液,并将大约3.0 mL的全血吸入4.0 mL血清分离管(Serum Separator Tube, SST)中。在第24天、第31天及第49天,使用18 g×1½"无菌真空采血针(Vacutainer needle) (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey)、真空采血持针器及13 mL SST,自前腔静脉采集每只猪的静脉全血。将在每一时间点的血液收集记录于样品收集记录上。使每个SST中的血液凝结,随后将每个SST离心并收集血清。将收集的血清转移至无菌搭扣管中并储存于-70℃±10℃下直至日后测试为止。由BIVI-R & D的人员测试血清样品中PCV2抗体的存在。

自第20天至第49天每日一次观测猪的临床症状并将临床观测结果记录于临床观测记录上。

为测试PCV2的鼻排出,在第24天、第25天,和接下来每隔一个奇数研究日的奇数研究日(each other odd numbered study day)直至第49天(含),将无菌涤纶拭子尽可能无菌地鼻内插入每只猪的左鼻孔或右鼻孔(每只猪一个拭子),擦拭几秒钟后移出。随后,将每一拭子置放于含有具2% IFBS、500单位/毫升的青霉素(Penicillin)、500 µg/mL的链霉素(Streptomycin)及2.5 µg/mL两性霉素B(Fungizone)的1.0 mL EMEM培养基的单个无菌搭扣密封管中。将拭子在管中折断并将搭扣管密封并适当标记动物编号、研究编号、收集日期、研究日及"鼻拭子"。将密封搭扣管储存于-40℃±10℃直至隔夜于冰上送至BIVI-St. Joseph。鼻拭子收集记录于鼻拭子样品收集表中。BIVI-R & D对鼻拭子样品进行了PCV2的定量病毒分离(VI)测试。结果以log₁₀值表示。认为1.3 log或更小的值为负,认为大于1.3 log的任何值为正。

将在第一试验点死亡的猪(第28号、第52号、第56号、第69号、第82号及第93号)尸体剖检至确定诊断结果所需要的程度。记录可见损害,这些猪的组织不予保留。在第二试验点,将在第49天前死亡的猪(第45号、

第 23 号、第 58 号、第 35 号)、在第 49 天安乐死前发现死亡的猪(第 2 号、第 43 号)及在第 49 天安乐死的猪尸体剖检。记录任何可见损害并将具有损害的肺叶的百分比记录于尸体剖检报告表中。

对于在第二试验点尸体剖检的 103 只猪,从每只猪的扁桃腺、肺、心脏、肝、肠系膜淋巴结、肾及腹股沟淋巴结取组织样品,置于具有 10%缓冲福尔马林的单个容器中;同时将自上述相同器官的另一组织样品置放于 Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK)中并将每一 Whirl-pak 置放于冰上。将每一容器适当标记。将样品收集记录于尸体剖检报告表中。随后,提交经福尔马林固定的组织样品及诊断申请表供 IHC 测试。IHC 测试根据用于接收样品、样品及切片(slide)制备及染色技术的标准 ISU 实验室程序来进行。将于 Whirl-pak 中的新鲜组织用冰袋运送至研究监控者(Study Monitor)储存(-70°C ± 10°C),供将来可能的使用。由病理学者对福尔马林固定的组织进行 IHC 检查以检测 PCV2,并使用以下计分系统计分: 0=无; 1=少数阳性染色, 几处; 2=中度阳性染色, 多处; 及 3=大量阳性染色, 弥漫于整个组织。由于病理学者不能肯定地区分腹股沟 LN 与肠系膜 LN, 故直接将这组织标记为淋巴结, 对于每只动物, 以两种组织中的每一种的最高分数来计分。

结果

以下给出此实施例的结果。注意到第 0 天前第 9 组的一只猪死亡, 且接种后又有 5 只猪死亡(第 4 组的 1 只猪; 第 6 组的 1 只猪; 第 8 组的 2 只猪; 及第 9 组的 1 只猪)。死后检查表明所有六只猪死于与疫苗接种或 PMWS 不相关的潜在感染。另外, 任何组中无不良事件或注射部位反应记录。

平均每日体重增加(ADWG)的结果呈现于下表 6 中。严格阴性对照组的第 9 组具有最高 ADWG(1.06±0.17 磅/天), 接着为接受一剂 8 µg rORF2 的第 5 组(0.94±0.22 磅/天)。接受一剂 4 µg vORF2 的第 3 组具有最低 ADWG(0.49±0.21 磅/天), 接着为接受 2 剂灭活疫苗的第 7 组(0.50±0.15 磅/天)。

表 6.组平均每日体重增加(ADWG)的总结

组	处理	N	ADWG-磅/天(第 24 天至第 49 天)或对于第 29 天前死亡的猪的调整值

1	vORF2-16 μg (1 剂)	12	0.87 ± 0.29 磅/天
2	vORF2-8 μg (1 剂)	12	0.70 ± 0.32 磅/天
3	vORF2-4 μg (1 剂)	12	0.49 ± 0.21 磅/天
4	rORF2-16 μg (1 剂)	11	0.84 ± 0.30 磅/天
5	rORF2-8 μg (1 剂)	12	0.94 ± 0.22 磅/天
6	rORF2-4 μg (1 剂)	11	0.72 ± 0.25 磅/天
7	KV (2 剂)	12	0.50 ± 0.15 磅/天
8	攻毒对照	10	0.76 ± 0.19 磅/天
9	严格阴性 对照	11	1.06 ± 0.17 磅/天

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; 灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

PCV2 血清学结果呈现于下表 7 中。在第-3 天, 所有九个组对于 PCV2 均为血清反应阴性。在第 14 天, 接受 vORF2 疫苗的组具有最高的效价, 其范围为 187.5 至 529.2。接受灭活病毒疫苗的猪具有第二高的效价, 接着为接受 rORF2 疫苗的组。此时, 第 8 组及第 9 组保持血清反应阴性。在第 24 天及第 31 天, 接受 vORF2 疫苗的猪继续展现强血清学反应, 紧接着为接受两剂灭活病毒疫苗的组。接受 rORF2 疫苗的猪血清学反应要慢一些, 而第 8 组及第 9 组继续保持血清反应阴性。在第 49 天, 接受 vORF2 疫苗、2 剂灭活病毒疫苗及最低剂量 rORF2 的猪展现最强血清学反应。接受 16 μg 及 8 μg rORF2 疫苗的猪具有比攻毒对照稍高的 IFA 效价。第 9 组在第 49 天展现强血清学反应。

表 7.组 PCV2 IFA 效价的总结

IFA 平均效价

组	处理	第-3天	第14天	第24天	第31天 **	第49天 ***
1	vORF2-16 μg(1剂)	50.0	529.2	4400.0	7866.7	11054.5
2	vORF2-8 μg(1剂)	50.0	500.0	3466.7	6800.0	10181.8
3	vORF2-4 μg(1剂)	50.0	187.5	1133.3	5733.3	9333.3
4	rORF2-16μg(1剂)	50.0	95.5	1550.0	3090.9	8000.0
5	rORF2-8 μg(1剂)	50.0	75.0	887.5	2266.7	7416.7
6	rORF2-4 μg(1剂)	50.0	50.0	550.0	3118.2	10570.0
7	KV(2剂)	50.0	204.2	3087.5	4620.8	8680.0
8	攻毒对照	50.0	55.0	50.0	50.0	5433.3
9	严格阴性对照	50.0	59.1	59.1	54.5	6136.4

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; 灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

*为计算的目的, 将 ≤ 100 的 IFA 效价指定为效价"50"; 将 ≥ 6400 的 IFA 效价指定为效价"12,800".

**攻毒之日

***尸体剖检之日

攻毒后临床观察的结果呈现于下表 8 中。此结果的总结包括对于异常行为、异常呼吸、咳嗽及腹泻的观察结果。表 9 包括来自组临床症状的总发生率的总结的结果, 表 10 包括来自组攻毒后死亡率的总结的结果。在此研究中记录的最常见的临床症状是异常行为, 记录为轻度至严重嗜睡。接受 2 个较低剂量 vORF2 的猪、接受 16 μg rORF2 的猪及接受 2 个剂量的 KV 疫苗的猪具有 $\geq 27.3\%$ 的发生率。接受 8 μg rORF2 的猪及严格阴性对照组无异常行为。此研究中, 无一只猪展现任何异常呼吸。在所有组中多见有咳嗽(0 至 25%), 以及腹泻(0-20%)。所见临床症状无一为 PMWS 的病征。

临床症状的总发生率在各组间不同。接受任一 vORF2 疫苗的组、接受 16 μg rORF2 的组、接受 2 剂 KV 疫苗的组及攻毒对照组具有最高的总临床症状发生率($\geq 36.4\%$)。严格阴性对照组、接受 8 μg rORF2 的组及接受 4 μg rORF2 的组分别具有 0%、8.3%及 9.1%的总临床症状发生率。

各组间的总死亡率亦不同。接受 2 剂 KV 疫苗的组具有最高死亡率

(16.7%); 而接受 4 μg vORF2、16 μg rORF2 或 8 μg rORF2 的组及严格阴性对照组全部具有 0% 的死亡率。

表 8. 组的异常行为、异常呼吸、咳嗽及腹泻的观测结果的总结

组	处理	N	异常行为 ¹	异常行为 ²	咳嗽 ³	腹泻 ⁴
1	vORF2-16 μg (1 剂)	12	2/12(16.7%)	0/12(0%)	3/12(25%)	2/12(16.7%)
2	vORF2-8 μg (1 剂)	12	4/12(33.3%)	0/12(0%)	1/12(8.3%)	1/12(8.3%)
3	vORF2-4 μg (1 剂)	12	8/12(66.7%)	0/12(0%)	2/12(16.7%)	1/12(8.3%)
4	rORF2-16 μg (1 剂)	11	3/11(27.3%)	0/11(0%)	0/11(0%)	2/11(18.2%)
5	rORF2-8 μg (1 剂)	12	0/12(0%)	0/12(0%)	1/12(8.3%)	0/12(0%)
6	rORF2-4 μg (1 剂)	11	1/11(9.1%)	0/11(0%)	0/11(0%)	0/12(0%)
7	KV(2 剂)	12	7/12(58.3)	0/12(0%)	0/12(0%)	1/12(8.3%)
8	攻毒对照	10	1/10(10%)	0/10(0%)	2/10(20%)	2/10(20%)
9	严格阴性对照	11	0/11(0%)	0/11(0%)	0/11(0%)	0/11(0%)

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; 灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

¹ 每一组中展现任何异常行为历时至少一天的猪总数

² 每一组中展现任何异常呼吸历时至少一天的猪总数

³ 每一组中展现咳嗽历时至少一天的猪总数

⁴ 每一组中展现腹泻历时至少一天的猪总数

表 9. 组临床症状总发生(incidence)的总结

组	处理	N	具临床症状的猪发生数 ¹ (incidence)	发生率
1	vORF2-16 μg (1 剂)	12	5	41.7%
2	vORF2-8 μg (1 剂)	12	5	41.7%
3	vORF2-4 μg (1 剂)	12	8	66.7%
4	rORF2-16 μg (1 剂)	11	4	36.4%
5	rORF2-8 μg (1 剂)	12	1	8.3%
6	rORF2-4 μg (1 剂)	11	1	9.1%
7	KV (2 剂)	12	7	58.3%

8	攻毒对照	10	4	40%
9	严格阴性对照	11	0	0%

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; 灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

¹ 每一组中展现任何临床症状历时至少一天的猪总数

表 10.组攻毒后死亡率的总结

组	处理	N	攻毒后死亡数	死亡率
1	vORF2-16 μg(1 剂)	12	1	8.3%
2	vORF2-8 μg(1 剂)	12	1	8.3%
3	vORF2-4 μg(1 剂)	12	0	0%
4	rORF2-16 μg(1 剂)	11	0	0%
5	rORF2-8 μg(1 剂)	12	0	0%
6	rORF2-4 μg(1 剂)	11	1	9.1%
7	KV(2 剂)	12	2	16.7%
8	攻毒对照	10	1	10%
9	严格阴性对照	11	0	0%

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; 灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

PCV2 的鼻排出结果呈现于下表 11 中。在第 24 天攻毒后, 第 7 组中的 1 只猪在第 27 天开始排出 PCV2。在第 33 天之前, 其它组无一经历排毒。鼻排毒主要见于第 35 天至第 45 天。接受三种 vORF2 疫苗中的任何一种的组及接受 4 μg 或 8 μg rORF2 的组具有最低的 PCV2 鼻排毒发生率(≤9.1%)。攻毒对照组(第 8 组)具有最高排毒率(80%), 接着为具有 63.6% 的发生率的严格阴性对照组(第 9 组)。

表 11.组 PCV2 鼻排出发生率的总结

组	处理	N	排毒至少一天的猪数	发生率
1	vORF2-16 μg (1 剂)	12	1	8.3%
2	vORF2-8 μg (1 剂)	12	1	8.3%
3	vORF2-4 μg (1 剂)	12	1	8.3%
4	rORF2-16 μg (1 剂)	11	2	18.2%
5	rORF2-8 μg (1 剂)	12	1	8.3%
6	rORF2-4 μg (1 剂)	11	1	9.1%
7	KV (2 剂)	12	5	41.7%
8	攻毒对照	10	8	80%
9	严格阴性对照	11	7	63.6%

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; 灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

组黄疸发生率、组胃溃疡发生率、组平均肺损害计分及组肺损害发生率的总结展示于下表 12 中。在第一测试点,六只猪在研究的接种后阶段死亡(第 4 组, N=1; 第 6 组, N=1; 第 8 组, N=2; 第 9 组, N=2)。六只猪中的四只在一或多个体腔中具有纤维蛋白性损害(fibrinous lesion),一只猪(第 6 组)具有符合梭菌病的损害,一只猪(第 9 组)无可见损害。在该研究的疫苗接种后阶段死亡的猪无一具有符合 PMWS 的损害。

将在攻毒后死亡的猪及在第 49 天安乐死的猪尸体剖检。尸体剖检可见,任何组中均不存在黄疸及胃溃疡。关于平均肺损害百分比,第 9 组具有最低平均肺损害百分比(0%),接着为具有 $0.40 \pm 0.50\%$ 的第 1 组及具有 $0.68 \pm 1.15\%$ 的第 5 组。第 2 组、第 3 组、第 7 组及第 8 组具有最高平均肺损害百分比($\geq 7.27\%$)。这四个组中的每一者都含有肺损害百分比 $\geq 71.5\%$ 的一只猪,拉高了这四个组的结果。除具有所记录的 0%肺损害的第 9 组外,其余 8 组具有 $\leq 36\%$ 的肺损害。几乎所有记录的肺损害均被描述为红色/紫色且为坚实(consolidated)的。

表 12.记录的组黄疸发生数、组胃溃疡发生数、组平均肺损害百分比计分及组肺损害发生数的总结

组	处理	黄疸	胃溃疡	平均肺损害百分比	记录的肺损害发生率
1	vORF2-16 μg (1 剂)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0.40 \pm 0.50%	10/12 (83%)
2	vORF2-8 μg (1 剂)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7.41 \pm 20.2%	10/12 (83%)
3	vORF2-4 μg (1 剂)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9.20 \pm 20.9%	10/12 (83%)
4	rORF2-16 μg (1 剂)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	1.5 \pm 4.74%	4/11 (36%)
5	rORF2-8 μg (1 剂)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0.68 \pm 1.15%	9/12 (75%)
6	rORF2-4 μg (1 剂)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2.95 \pm 5.12%	7/11 (64%)
7	KV(2 剂)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7.27 \pm 22.9%	9/12 (75%)
8	攻毒对照	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9.88 \pm 29.2%	8/10 (80%)
9	严格阴性对照	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11(0%)	0/11 (0%)

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

组 IHC 阳性发生结果的总结展现于表 13 中。第 1 组(vORF2-16 μg)及第 5 组(rORF2-8 μg)具有最低 IHC 阳性发生率的结果(16.7%)。第 8 组(攻毒对照)及第 9 组(严格阴性对照)具有最高的 IHC 阳性结果率,分别为 90%及 90.9%。

表 13.组 IHC 阳性发生率的总结

组	处理	N	具有至少一种对于 PCV2 为阳性的组织的猪数	发生率
1	vORF2-16 μg (1 剂)	12	2	16.7%
2	vORF2-8 μg (1 剂)	12	3	25.0%
3	vORF2-4 μg (1 剂)	12	8	66.7%
4	rORF2-16 μg (1 剂)	11	4	36.3%
5	rORF2-8 μg (1 剂)	12	2	16.7%
6	rORF2-4 μg (1 剂)	11	4	36.4%
7	KV(2 剂)	12	5	41.7%
8	攻毒对照	10	9	90.0%
9	严格阴性对照	11	10	90.9%

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

攻毒后, 接受一剂 8 μg rORF2 抗原的第 5 组表现优于其它 6 个疫苗组。第 5 组具有最高 ADWG(0.94 \pm 0.22 磅/天)、最低异常行为发生率(0%)、第二低的咳嗽发生率(8.3%)、最低总临床症状发生率(8.3%)、最低死亡率(0%)、最低 PCV2 鼻排出率(8.3%)、第二低的平均肺损害百分比比率(0.68 \pm 1.15%)及最低阳性组织发生率(16.7%)。接受不同水平的 rORF2 抗原的组总体优于接受不同水平的 vORF2 的组, 接受 2 剂灭活全细胞 PCV2 疫苗的组表现最差。表 14 及表 15 包含组攻毒后数据的总结。

表 14.组攻毒后数据总结-第 1 部分

组	N	处理	ADWG (磅/天)	异常行为	咳嗽	总临床症状的 发生率
1	12	vORF2-16 μ g(1 剂)	0.87 \pm 0.29	2/12(16.7%)	3/12(25%)	41.7%
2	12	vORF2-8 μ g(1 剂)	0.70 \pm 0.32	4/12(33.3%)	1/12(8.3%)	41.7%
3	12	vORF2-4 μ g(1 剂)	0.49 \pm 0.21	8/12(66.7%)	2/12(16.7%)	66.7%
4	11	rORF2-16 μ g(1 剂)	0.84 \pm 0.30	3/11(27.3%)	0/11(0%)	36.4%
5	12	rORF2-8 μ g(1 剂)	0.94 \pm 0.22	0/12(0%)	1/12(8.3%)	8.3%
6	11	rORF2-4 μ g(1 剂)	0.72 \pm 0.25	1/11(9.1%)	0/11(0%)	9.1%
7	12	KV(2 剂)	0.50 \pm 0.15	7/12(58.3)	0/12(0%)	58.3%
8	10	攻毒对照	0.76 \pm 0.19	1/10(10%)	2/10(20%)	40%
9	11	严格阴性对照	1.06 \pm 0.17	0/11(0%)	0/11(0%)	0%

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

表 15.组攻毒后数据总结-第 2 部分

组	N	处理	死亡率	鼻排毒	平均肺损害 百分比	对于 PCV2 为 IHC 阳性的至少一种 组织的发生率
1	12	vORF2-16 μ g(1 剂)	8.3%	8.3%	0.40 \pm 0.50%	16.7%
2	12	vORF2-8 μ g(1 剂)	8.3%	8.3%	7.41 \pm 20.2%	25.0%
3	12	vORF2-4 μ g(1 剂)	0%	8.3%	9.20 \pm 20.9%	66.7%
4	11	rORF2-16 μ g(1 剂)	0%	18.2%	1.50 \pm 4.74%	36.3%
5	12	rORF2-8 μ g(1 剂)	0%	8.3%	0.68 \pm 1.15%	16.7%
6	11	rORF2-4 μ g(1 剂)	9.1%	9.1%	2.95 \pm 5.12%	36.4%
7	12	KV(2 剂)	16.7%	41.7%	7.27 \pm 22.9%	41.7%
8	10	攻毒对照	10%	80%	9.88 \pm 29.2%	90.0%
9	11	严格阴性对照	0%	63.6%	0/11(0%)	90.9%

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

此研究的结果表明, 所有进一步的疫苗研究工作应当围绕 rORF2 疫苗来进行。总的说来, 攻毒后检测到了 PCV2 的鼻排出, 而用 PCV2 接种导致了排出减少。选定的淋巴组织的免疫组织化学亦可作为疫苗功效的良好参

数,而在组间未检测到 ADWG、临床症状及可见损害方面的大的差异。第 9 组(严格阴性对照组)中的 PCV2 鼻排出、PCV2 血清转化及阳性 IHC 组织证明,在研究中某些地方引入了外来 PCV2,这一事实使得此项研究复杂化。

讨论

在此研究中评估了七种 PCV2 疫苗,其包括在第 0 天施用一次的三个不同剂量水平的 vORF2 抗原、在第 0 天施用一次的三个不同剂量水平的 rORF2 抗原,及在第 0 天及第 14 天施用的一个剂量水平的灭活全细胞 PCV2 疫苗。总的说来,接受一剂含有 8 μg rORF2 抗原的疫苗的第 5 组具有最佳结果。第 5 组具有最高 ADWG、最低异常行为发生率、最低异常呼吸发生率、第二低的咳嗽发生率、最低总临床症状发生率、最低死亡率、最低 PCV2 的鼻排出率、第二低的平均肺损害百分比比率及最低阳性 IHC 组织发生率。

有趣地是,接受比第 5 组更高剂量的 rORF2 抗原的第 4 组并未表现得和第 5 组一样好或好于第 5 组。与第 5 组相比,第 4 组具有稍微较低的 ADWG、较高的异常行为发生率、较高的总临床症状发生率、较高的 PCV2 鼻排出率、较高的平均肺损害百分比及较高的阳性 IHC 组织比率。对这些数据未进行统计分析——该分析可能会指示这两个组间的差异不具有统计学上的显著性——但观察到的倾向是第 4 组表现不如第 5 组好。

接种后,6 只猪在第一试验点死亡。所述六只猪中的四只来自未接受疫苗的第 8 组或第 9 组。六只猪中无一展现符合 PMWS 的损害,无不良事件报导,总的看来,当施用于大约 11 日龄的猪时,所有七种疫苗看来都是安全的。在该研究的接种后阶段,接受三个剂量水平的 vORF2 疫苗或灭活全细胞疫苗的猪具有最高的 IFAT 水平,在疫苗组中第 5 组在即将攻毒前具有最低的 IFAT 水平。

尽管未正式证实,但人们相信 PCV2 传播至断乳后不久的仔猪的主要途径是通过口鼻直接接触,而能在生产环境(production setting)中减少 PCV2 鼻排出的有效疫苗将有助于控制感染的传播。接受三个 vORF2 抗原水平之一的组及接受 8 μg rORF2 的组具有最低的 PCV2 鼻排出发发生率(8.3%)。如预料的那样,攻毒对照组具有最高的鼻排出发发生率(80%)。

在患有继发于 PCV2 感染的 PMWS 的猪中,可见损害通常由与一或多种以下症状组合的全身性淋巴结病(generalized lymphadenopathy)组成: (1)

具有小叶间水肿的间质性肺炎, (2)皮肤苍白或黄疸, (3)斑点状萎缩性肝, (4)胃溃疡, (5)肾炎及(6)生殖病症, 例如流产、死产、干尸等。在尸体剖检时, 在任何组中未见黄疸、肝炎、肾炎及胃溃疡, 对淋巴结病没有进行特定检查。平均肺损害百分比计分在各组间不同。接受 16 μg vORF2 抗原的组具有最低的平均肺损害百分比计分($0.40\pm 0.50\%$), 其次为接受 8 μg rORF2 的组($0.68\pm 1.15\%$)。如预期的, 攻毒对照组具有最高的平均肺损害百分比计分($9.88\pm 29.2\%$)。在所有四个组中, 由于在这些组中各自有一只猪具有极高的肺损害计分, 因此平均肺损害百分比计分被提高。大多数肺损害被描述为红色/紫色且坚实(consolidated)的。通常, 与 PMWS 相关的肺损害被描述为黄褐色并不可萎陷(non-collapsible), 伴有小叶间水肿。在此研究中发现的肺损害与 PCV2 感染无关, 或者可能存在另一肺感染原。在此研究范围内, 肺损害百分比计分可能不反映由 PCV2 所致的肺感染的量的真实量度。

其它研究人员已证明, 通过 IHC 发现的 PCV2 抗原的存在与组织病理学之间有直接相关性。在此研究中未进行所选组织的组织病理学检查。第 1 组(16 μg vORF2)及第 5 组(8 μg rORF2)的 PCV2 抗原阳性猪的发生率最低(8.3%), 而第 9 组(严格阴性对照组-90.9%)及第 8 组(攻毒对照组-90.0%)的 PCV2 抗原阳性猪的发生率最高。由于此测试的非主观性, IHC 结果可能是用来判断疫苗功效的最佳参数之一。

因此, 在本发明的一个方面中, 测定含有提取的 PCV2 ORF2 (rORF2) 抗原的 1 毫升/1 剂重组产物在 CDCD 猪模型中面对 PCV2 攻毒的最小保护性剂量(MPD)。在接受了不同水平的 rORF2 抗原的三个组中, 第 5 组(8 μg rORF2 抗原)明显具有最高的保护水平。对于被检查的所有参数, 第 5 组均具有最佳的结果, 或者与其它组一样具有(tied for)最理想的结果。当攻毒后将第 5 组与其它六个疫苗组进行比较时, 第 5 组具有最高的 ADWG (0.94 ± 0.22 磅/天)、最低的异常行为发生率(0%)、第二低的咳嗽发生率(8.3%)、最低的总临床症状发生率(8.3%)、最低的死亡率(0%)、最低的 PCV2 鼻排出率(8.3%)、第二低的平均肺损害百分比比率($0.68\pm 1.15\%$)及最低的阳性 IHC 组织发生率(16.7%)。

在本发明的另一方面中, 测定的 1 毫升/1 剂常规产品(其为部分纯化的 PCV2 ORF2(vORF2)抗原)在 CDCD 猪模型中面对 PCV2 攻毒的 MPD。在接受不同水平的 vORF2 抗原的三个组中, 第 1 组 (16 μg vORF2)具有最高保护

水平。第1组在ADWG、平均肺损害百分比及IHC方面的表现优于第2组及第3组。在临床症状的总发生率方面，第1组与第2组(8 µg vORF2 抗原)的表现相等，第3组(4 µg vORF2 抗原)具有最低死亡率，而在鼻排毒方面，所有三个组的表现相等。总的说来，vORF 疫苗表现不及 rORF 疫苗好。

在本发明的另一个方面中，测定最大剂量的 2 毫升/2 剂的常规灭活 PCV2 疫苗在 CDCD 猪模型中面对 PCV2 攻毒的功效。在此研究中所评估的七种疫苗中，灭活全细胞 PCV2 疫苗表现最差。接受两剂灭活全细胞 PCV2 疫苗的仔猪具有最低 ADWG、第二高异常行为发生率(58.3%)、第二高临床症状总发生率(58.3%)、最高死亡率(16.7%)、第二高鼻排毒发生率(41.7%)、最高平均肺损害百分比(9.88±29.2%)、高的可见肺损害发生率(75%)及中等的组织中 IHC 发生率(41.7%)。然而，它仍可有效引起免疫反应。

在本发明的另一方面中，评估 PCV2 鼻排出作为功效参数，并再次确证了来自先前研究的先前 PCV2 功效参数。该项研究的结果表明在鼻内攻毒后发生 PCV2 鼻排出，且 PCV2 疫苗可减少攻毒后的 PCV2 鼻排出。此外，此研究的结果及文献中的报导指示，在将来的 PCV2 疫苗试验中亦应继续评估 IHC。

此研究得到的另外一些结论有：淋巴结病为 PMWS 的标志(hallmark)之一。PMWS 的另一标志为淋巴细胞消减及多核组织细胞/巨组织细胞。另外，7 种 PCV2 疫苗中任一个均未见不良事件或注射部位反应，且当施用仔猪时，所有 7 种 PCV2 疫苗看来为安全的。

实施例 5

此实施例测试八种 PCV2 候选疫苗的功效，并从先前暴露于 PCV2 毒力菌株后的攻毒研究获得的 PCV2 攻毒参数进行了再次确证。将 6-16 日龄的一百五十(150)只剖腹产术获得的断初乳(CDCD)小猪按重量分批(block)并随机分入相同规模的 10 个组。表 16 给出了用于此实施例的整体研究设计。

表 16.整体研究设计

组	猪数	处理	处理之日	第 22 天及第 28 天 KLH/ICFA	第 25 天用毒力 PCV2 攻毒	第 46 天 PRRSV MLV	第 50 天尸体剖检

1	15	PVC2 疫苗 1 16 µg rORF2-IMS 1314	0 和 14	+	+	+	+
2	15	PVC2 疫苗 2 16 µg vORF2- 卡巴 普	0 和 14	+	+	+	+
3	15	PCV2 疫苗 3 16 µg rORF2- 卡巴 普	0 和 14	+	+	+	+
4	15	PCV2 疫苗 2 16 µg vORF2- 卡巴 普	0	+	+	+	+
5	15	PVC2 疫苗 3 4 µg rORF2- 卡巴 普	0 和 14	+	+	+	+
6	15	PVC2 疫苗 3 1 µg rORF2- 卡巴 普	0 和 14	+	+	+	+
7	15	PVC2 疫苗 3 0.25 µg rORF2- 卡巴 普	0 和 14	+	+	+	+
8	15	PVC2 疫苗 4 > 8.0 log KV- 卡巴普	0 和 14	+	+	+	+
9	15	攻毒对照	N/A	+	+	+	+
10	15	无疫苗-严格 阴性 对照组	N/A	+	-	+	+

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

给与每一组的疫苗配制剂如下: 1号 PCV2 疫苗, 以 1×2 ml 剂量施用于第 1 组, 是以 IMS 1314 佐剂化的高剂量(16 微克/2 毫升剂量)失活化重组 ORF2 抗原 (16 µg rORF2-IMS 1314)。2号 PCV2 疫苗, 以 1×2 ml 剂量施用于第 2 组, 是以卡巴普佐剂化的高剂量(16 微克/2 毫升剂量)的由 VIDO R-1 产生的部分纯化的 PCV2 ORF2 抗原(16 µg vORF2-卡巴普)。3号 PCV2 疫苗, 以 1×2 ml 剂量施用于第 3 组, 是以卡巴普佐剂化的高剂量(16 微克/2 毫升剂

量)失活化重组 ORF2 抗原(16 μg rORF2-卡巴普)。4 号 PCV2 疫苗,以 1 \times 1 ml 剂量施用于第 4 组,是以卡巴普佐剂化的高剂量(16 $\mu\text{g}/1$ ml 剂量)的部分纯化 VIDO R-1 产生的 PCV2 ORF2 抗原(16 μg vORF2-卡巴普)。5 号疫苗,以 1 \times 2 ml 剂量施用于第 5 组,是以卡巴普佐剂化的 4 $\mu\text{g}/2$ ml 剂量的失活化重组 ORF2 抗原(4 μg rORF2-卡巴普)。6 号 PCV2 疫苗,以 1 \times 2 ml 剂量施用于第 6 组,是以卡巴普佐剂化的 1 $\mu\text{g}/2$ ml 剂量的失活化重组 ORF2 抗原(1 μg rORF2-卡巴普)。7 号 PCV2 疫苗,以 1 \times 2 ml 剂量施用于第 7 组,是以卡巴普佐剂化的低剂量(0.25 $\mu\text{g}/2$ ml 剂量)失活化重组 ORF2 抗原(0.25 μg rORF2-卡巴普)。8 号 PCV2 疫苗,以 1 \times 2 ml 剂量施用于第 8 组,是以卡巴普佐剂化的高剂量(失活前效价 > 8.0 log/2 ml 剂量)的失活化常规灭活 VIDO R-1 产生的 PCV2 Struve 抗原(>8.0 log KV-卡巴普)。在第 0 天,用指配的疫苗处理第 1 至 8 组。在第 14 天,第 1-3 组及第 5-8 组再次接受其各别疫苗的加强接种。对于第 4 组(其在第 14 天未接受加强接种)测试单个剂量的 16 μg vORF2-卡巴普的有效性。在两次疫苗接种后都观测仔猪的不良事件及注射部位反应。在第 21 天,将仔猪移至第二试验点,其中第 1-9 组群养于一个猪舍中,将第 10 组养于另一猪舍中。在第 22 天及第 28 天,所有猪接受用弗氏不完全佐剂乳化的钥孔血蓝蛋白(KLH/ICFA)。在第 25 天,将第 1-9 组用大约 4 log 的毒力 PCV2 病毒攻毒。到第 46 天为止,在攻毒对照组中出现的死亡极少。为了试图免疫刺激猪并增强 PCV2 攻毒材料的毒力,在第 46 天,将所有组用 INGELVAC® PRRSV MLV (猪生殖及呼吸疫苗,修饰活病毒)处理。

在攻毒之前和之后,收集血液样品用于 PCV2 血清学。攻毒之后,收集测定平均每日体重增加(ADWG)的体重资料及临床征象的观测结果。在第 50 天,将所有存活猪进行尸体剖检,记录可见损害、对肺进行病理学计分,并将选择的组织保存于福尔马林中用于日后凭借免疫组织化学(IHC)检测 PCV2 抗原的检查。

材料及方法

本研究是对第 0 天时 6 至 16 日龄的 CDCD 猪进行的部分盲法接种-攻毒可行性研究。纳入该研究中的母猪的 PCV2 IFA 效价为 $\leq 1:1000$ 。另外,母猪的血清学状态来自已知的 PRRS-阴性畜群。测试十六(16)只母猪的 PCV2 血清学状态,所有十六(16)只皆具有 ≤ 1000 的 PCV2 效价,并将它们转移至第

一试验点。通过剖腹产术手术分娩一百五十(150)只仔猪，在第-3天可用于此研究。在第-3天，将在第一试验点的150只CDCD猪称体重、用耳标标记、按重量分批并随机分配至如在以上表16中所述的10个组中的1个组中。自所有猪收集血液样品。若满足纳入标准的任何测试动物参加了该研究，而随后由于任何原因而被排除，则由研究者及监控者商议决定自该动物收集的数据在最后分析中的用途。记录参加的仔猪被排除的日期及排除的理由。满足该纳入标准、选择用于该研究并送至第一试验点的母猪均未被排除。没有仔猪被从该研究排除，且在结束前，无测试动物被从该研究移除。表17描述用于此实施例的重要活动的时段。

表 17.研究活动

研究日	实际日期	研究活动
-3	4-04-03	称猪体重；健康检查；随机化分组；收集血液样品
-3、 0-21	4-04-03 4-07-03 至 5-27-03	观测总体健康状况及疫苗接种后的不良事件
0	4-07-03	向第 1-8 组施用各别 IVP
0-7	4-07-03 至 4-14-03	观测猪的注射部位反应
14	4-21-03	用各别 IVP 加强免疫第 1-3 组、第 5-8 组；取得所有猪的血液样品
14-21	4-21-03 至 4-28-03	观测猪的注射部位反应
19-21	4-26-03 至 4-28-03	用抗生素处理所有猪
21	4-28-03	将猪自 Struve Labs, Inc.送至 Veterinary Resources, Inc. (VRI)
22-50	4-28-03 至 5-27-03	观测猪攻毒后临床征象
22	4-29-03	用 KLH/ICFA 处理第 1-10 组

25	5-02-03	自所有猪收集血液样品;称所有猪的体重;用 PCV2 攻毒材料将第 1-9 组攻毒
28	5-05-03	用 KLH/ICFA 处理第 1-10 组
32	5-09-03	自所有猪收集血液样品
46	5-23-03	将 INGELVAC® PRRS MLV 施用所有组
50	5-27-03	收集血液样品、所有猪称体重并尸体剖检;记录可见损害;评估肺损害;保存新鲜组织样品及经福尔马林固定的组织样品;完成该研究的活体阶段。

完成研究的活体阶段后,对经福尔马林固定的组织由病理学者进行免疫组织化学(IHC)检查以检测 PCV2 抗原,评估血液样品的 PCV2 血清学,并测定自第 25 天至第 50 天的平均每日体重增加(ADWG)。

动物自出生至大约 11 日龄(大约为该研究的第 0 天)被养于第一试验点的七个房间中的个别笼中。每一房间布局相同并由堆叠的多个单独不锈钢笼组成,并将经过加热并过滤的空气独立地供应至每一分离单元。每一房间独立供热并通风,藉此防止房间之间的空气交叉污染。在第二试验点,动物被养于两个不同猪舍中。将第 10 组(严格阴性对照组)独立养于经改装的肥育猪舍中,并将第 1-9 组养于经改装的产仔猪舍中。将每一组养于独立围栏(每围栏 14-15 只猪),每一围栏为每只猪提供大约 2.3 平方英尺。将第 2 组、第 4 组及第 8 组圈入通道一侧的三个相邻围栏中,并将第 1 组、第 3 组、第 5 组、第 6 组、第 7 组及第 9 组圈入通道另一侧的六个相邻围栏中。之所以把各组分开,是因为研究监控者(Study Monitor)担心第 2 组、第 4 组及第 8 组所施用的疫苗未完全失活。每一围栏设置于具塑料漏缝地板的抬高平台上。围栏下面的坑充当粪便及排泄物的储槽。每一猪舍具有其自身独立的供暖及通风系统,几乎不可能有猪舍间的空气交叉污染。

在第一试验点,自出生至大约 3 周龄,给仔猪喂以特定配制的乳质定粮。到第 21 天(大约 4½ 周龄)为止,所有仔猪均在食用固体状特定混合的定粮。在第二试验点,给所有仔猪喂以与其年龄及体重相适应的定制未加药市售混合定粮(不限量)。在两个试验点,水的供应亦不限量。

在第 19 天、第 20 天及第 21 天,将所有受试猪用 1.0 mL NAXCEL® 两臀部轮流肌注处理。另外,出于各种健康原因,将第 11 号猪(第 1 组)在第

10天用0.5 mL NAXCEL®肌注处理,将第13号猪(第10组)在第10天用1 mL 青霉素及1 mL PREDEF® 2X处理,将第4号猪(第9组)在第11天用1.0 mL NAXCEL®肌注处理,将第1号(第1组)、第4号及第11号猪在第14天用1.0 mL NAXCEL®处理。

同时,在两个试验点猪均接受了兽医学护理。在第-3天进行动物健康检查并记录于健康检查记录表中。通过第0天的观察确定了所有动物在疫苗接种之前均具有良好的健康及营养状态。在攻毒前,观察到所有受试动物均具有良好的健康及营养状态。屠体及组织通过熬炼(rendering)加以处置。将研究动物的最后处理记录于动物处置记录上。

在第0天及第14天,分配至第1-3组及第5-8组的猪分别接受2.0 mL的指定PCV2疫苗1-4,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×½"针头分别在右颈区及左颈区肌注。分配至第4组的猪仅在第0天接受1.0 mL 2号PCV2疫苗,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×½"针头在右颈区肌注。

在第22天,所有受试猪接受了2.0 mL KLH/ICFA,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×1"针头在左颈区肌注。在第28天,所有受试猪在右股臀部接受2.0 mL KLH/ICFA,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×1"针头。

在第25天,分配至第1-9组的猪接受1.0 mL PCV2 ISUVDL 攻毒材料(3.98 log₁₀ TCID₅₀/mL),使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×1"针头在右颈区肌注。使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器及鼻导管,对每只猪鼻内注射(IN)额外施用1.0 mL的相同材料(每鼻孔0.5 mL)。

在第46天,所有受试猪接受2.0 mL INGELVAC® PRRS MLV,使用无菌的3.0 mL Luer锁紧套口注射器和无菌的20 g×1"针头在右颈区肌注。施用PRRSV MLV以试图增强PCV2攻毒材料的毒力。

在第-3天及自第0天至第21天,每日观测受试猪的总体健康状况及不良事件。对每一只猪的正常或异常行为、呼吸或咳嗽计分。将观测结果记录于临床观测记录上。自第0天至第7天观测所有受试猪的注射部位反应,并自第14天至第21天进一步观测第7组的注射部位反应。在第-3天、第25天及第50天或在攻毒后发现猪死亡的当天,在校准后的天平上称量每只猪的体重以测定平均每日体重增加。将体重记录于体重表中。在随机化之前,

利用第-3天的体重将猪分批。利用第25天及第50天的重量数据测定每只猪在这些时间点时的平均每日体重增加(ADWG)。对于攻毒后及第50天前死亡的猪,将ADWG调整为表示自第25天至死亡之日的ADWG。

为测定PCV2血清学,在第-3天及第14天,自每只仔猪的眼眶静脉窦采集静脉全血。对于每只仔猪,通过将无菌毛细管插入一只眼睛的内眦中从眼眶静脉窦收集血液,并将大约3.0 mL的全血吸入4.0 mL血清分离管(Serum Separator Tube, SST)中。在第25天、第32天及第50天,使用20 g×1½"真空采血针(Vacutainer®) (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey)、真空采血持针器及13 mL SST,自前腔静脉收集每只猪的静脉全血。将在每一时间点的血液收集记录于样品收集记录上。使各SST中的血液凝结,随后将各SST离心并收集血清。将收集的血清转移至无菌搭扣管中并储存于-70°C ± 10°C下直至日后测试为止。由BIVI-R & D的人员测试血清样品中PCV2抗体的存在。

自第22天至第50天,每日一次观测猪的临床症状并对正常或异常行为、呼吸或咳嗽计分。将观测结果记录于临床观测记录上。

第46号(第1组)及第98号(第9组)猪在第一试验点死亡。这两例死亡均被归为出血死亡(bleeding death),且未对这两只猪进行尸体剖检。在第二试验点,对攻毒之后第50天前死亡的猪及在第50天安乐死的猪进行尸体剖检。记录任何可见损害,并将具有损害的肺叶的百分比记录于尸体剖检报告表中。

将来自在第二试验点尸体剖检的每只猪的扁桃腺、肺、心脏及肠系膜淋巴结的组织样品置于含有10%缓冲福尔马林的单一容器中;同时将来自上述相同器官的另一组织样品置于Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK)中并将每一Whirl-pak®置放于冰上。将每一容器适当标记。将样品收集记录于尸体剖检报告表中。然后,提交经福尔马林固定的组织样品及诊断申请表用于IHC测试。IHC测试依照用于接收样品、样品及切片制备及染色技术的标准实验室程序进行。将置于Whirl-paks®中的新鲜组织用冰袋运送至研究监控者(Study Monitor)储存(-70°C ± 10°C),供将来可能的使用。

经福尔马林固定的组织由病理学者通过IHC检查检测PCV2,并使用以下计分系统计分: 0=无; 1=阳性染色不足,几处; 2=中度阳性染色,多处;

3=大量阳性染色，弥漫于整个组织。为分析的目的，计分0视为"阴性"，大于0的计分视为"阳性"。

结果

以下给出此实施例的结果。注意到第46号猪及第98号猪分别在第14天及第25天死亡。这些死亡被归为出血死亡。在第15天，第11号猪(第1组)气喘，同时呼吸急促。除此之外，在此观测期期间，所有猪在行为、呼吸及咳嗽方面均正常，且任何组均未见全身性不良事件。在第0天疫苗接种后，未见注射部位反应。在第14天疫苗接种后，第1组猪的十四(14)只中的七(7)只(50.0%)在第15天具有计分为"2"的肿胀。第1组的十四(14)只中的四(4)只(28.6%)在第16天仍具有为"2"的肿胀。其它组在任一次疫苗接种后无一发生注射部位反应。

平均每日体重增加(ADWG)的结果呈现于下表18中。将死于出血的第46号及第98号猪从组结果中排除。接受了一剂16 µg vORF2-卡巴普的第4组具有最高的ADWG (1.16 ± 0.26 磅/天)，接着为第1组、第2组、第3组、第5组、第6组及第10组，它们的ADWG在自 1.07 ± 0.23 磅/天至 1.11 ± 0.26 磅/天的范围。第9组具有最低的ADWG (0.88 ± 0.29 磅/天)，接着为第8组及第7组，它们分别具有 0.93 ± 0.33 磅/天及 0.99 ± 0.44 磅/天的ADWG。

表18.组平均每日体重增加(ADWG)的总结

组	处理	N	ADWG-磅/天(第25天至第50天)或对第50天前死亡的猪的调整值
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2剂	14	1.08 ± 0.30 磅/天
2	vORF2-16 µg-卡巴普 2剂	15	1.11 ± 0.16 磅/天
3	rORF2-16 µg-卡巴普 2剂	15	1.07 ± 0.21 磅/天
4	vORF2-16 µg-卡巴普 1剂	15	1.16 ± 0.26 磅/天
5	rORF2-4 µg-卡巴普 1剂	15	1.07 ± 0.26 磅/天
6	rORF2-1 µg-卡巴普 2剂	15	1.11 ± 0.26 磅/天
7	rORF2-0.25 µg-卡巴普 2剂	15	0.99 ± 0.44 磅/天

8	KV > 8.0 log-卡巴普 2剂	15	0.93 ± 0.33 磅/天
9	攻毒对照	14	0.88 ± 0.29 磅/天
10	严格阴性对照	15	1.07 ± 0.23 磅/天

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

PVC2 血清学结果呈现于下表 19 中。在第-3 天,所有十(10)组均为 PCV2 血清反应阴性。在第 14 天,所有十(10)组的 PCV2 效价仍然低(50-113 的范围)。在第 25 天,接受全细胞灭活病毒疫苗的第 8 组具有最高 PCV2 效价(4617),接着为接受 16 μg vORF2-卡巴普的第 2 组、接受单个剂量的 16 μg vORF2-卡巴普的第 4 组,及接受 16 μg rORF2-卡巴普的第 3 组,它们分别具有 2507、1920 及 1503 的效价。在第 32 天(攻毒后一周),第 1-6 组及第 8 组的效价由 2360 至 7619 不等;而第 7 组(0.25 μg rORF2-卡巴普)、第 9 组(攻毒对照)及第 10 组(严格阴性对照)分别具有 382、129 及 78 的效价。在第 50 天(尸体剖检之日),所有十(10)组均展现高 PCV2 效价(≥ 1257)。

在第 25 天、第 32 天及第 50 天,接受两剂 16 μg rORF2-卡巴普的第 3 组具有比接受两剂 16 μg rORF2-IMS 1314 的第 1 组更高的抗体效价。在第 25 天、第 32 天及第 50 天,接受两剂 16 μg vORF2 的第 2 组具有比仅接受一剂相同疫苗的第 4 组更高的效价。接受递减水平的 rORF2-卡巴普—分别为 16 μg 、4 μg 、1 μg 及 0.25 μg —的第 3 组、第 5 组、第 6 组、第 7 组,在第 25 天及第 32 天展现的抗体效价相应地递减。

表 19.组 PCV2 IFA 效价的总结

组	处理	第-3天	第14天**	第25天***	第32天	第50天****
1	rORF2-16 μg -IMS 1314 2剂	50	64	646	3326	4314
2	vORF2-16 μg -卡巴普 2剂	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2-16 μg -卡巴普 2剂	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2-16 μg -卡巴普 1剂	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2-4 μg -卡巴普 1剂	50	61	1867	3933	4533
6	rORF2-1 μg -卡巴普 2剂	50	70	490	2360	5740
7	rORF2-0.25 μg -卡巴普 2剂	50	73	63	382	5819
8	KV > 8.0 log-卡巴普 2剂	50	97	4617	7619	10817
9	攻毒对照	50	53	50	129	4288

10	严格阴性对照	50	50	50	78	11205
----	--------	----	----	----	----	-------

vORF2=分离的病毒ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的ORF2; KV或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的PCV2病毒

*为计算的目的, 将 ≤ 100 的IFA效价指定为效价"50"; 将 ≥ 6400 的IFA效价指定为效价"12,800"

**攻毒之日

***尸体剖检之日

下面给出攻毒后临床观测的结果。表 20 包括异常行为、异常呼吸、咳嗽及腹泻的观测结果。表 21 包括组临床症状的总发生的总结结果, 表 22 包括组攻毒后死亡率的总结结果。接受 16 μg rORF2-IMS 1314 (第 1 组)、16 μg rORF2-卡巴普(第 3 组)、1 μg rORF2-卡巴普(第 6 组)、0.25 μg rORF2-卡巴普(第 7 组)的猪及攻毒对照组(第 9 组)中的猪在攻毒后的异常行为、呼吸及咳嗽的发生率低。接受 16 μg vORF2-卡巴普(第 2 组)、单剂量的 16 μg vORF2-卡巴普(第 4 组)、4 μg rORF2-卡巴普(第 5 组)、 $>8 \log$ KV-卡巴普(第 8 组)的猪及严格阴性对照组(第 10 组)中的猪在攻毒后的异常行为、呼吸及咳嗽的发生率为零。

临床症状的总发生数在各组之间变化。接受 16 μg vORF2-卡巴普(第 2 组)、单剂量 16 μg vORF2-卡巴普(第 4 组)的猪及严格阴性对照组(第 10 组)的猪具有 0%的发生率; 接受 16 μg rORF2-卡巴普(第 3 组)及 1 μg rORF2-卡巴普(第 6 组)的猪具有 6.7%的发生率; 接受 16 μg rORF2-IMS 1314 (第 1 组)的猪具有 7.1%的总发生率; 接受 4 μg rORF2-卡巴普(第 5 组)、0.25 μg rORF2-卡巴普(第 7 组)及 $>8 \log$ KV 疫苗的猪具有 13.3%的发生率; 而攻毒对照组(第 9 组)中的猪具有 14.3%的发生率。

总死亡率亦在各组之间变化。接受 2 剂 KV 疫苗的第 8 组具有 20.0%的最高死亡率; 接着为第 9 组即攻毒对照组, 及接受 0.25 μg rORF2-卡巴普的第 7 组, 它们分别具有 14.3%及 13.3%的死亡率。接受一剂 16 μg vORF2-卡巴普的第 4 组具有 6.7%的死亡率。其它所有组, 即第 1 组、第 2 组、第 3 组、第 5 组、第 6 组及第 10 组, 具有 0%的死亡率。

表 20.组的攻毒后异常行为、异常呼吸及咳嗽的观测结果的总结

组	处理	N	异常行为 ¹	异常行为 ²	咳嗽 ³
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2剂	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7.1%)
2	vORF2-16 µg-卡巴普 2剂	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2-16 µg-卡巴普 2剂	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)
4	vORF2-16 µg-卡巴普 1剂	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2-4 µg-卡巴普 1剂	15	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/15 (0%)
6	rORF2-1 µg-卡巴普 2剂	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)
7	rORF2-0.25 µg-卡巴普 2剂	15	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)
8	KV > 8.0 log-卡巴普 2剂	15	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/15 (0%)
9	攻毒对照	14	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)	2/14 (14.3%)
10	严格阴性对照	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

¹每一组中展现任何异常行为历时至少一天的猪总数

²每一组中展现任何异常呼吸历时至少一天的猪总数

³每一组中展现咳嗽历时至少一天的猪总数

表 21.组攻毒后临床症状的总发生率的总结

组	处理	N	有临床症状猪的 发生数 ¹	发生率
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2剂	14	1	7.1%
2	vORF2-16 µg-卡巴普 2剂	15	0	0.0%
3	rORF2-16 µg-卡巴普 2剂	15	1	6.7%
4	vORF2-16 µg-卡巴普 1剂	15	0	0.0%

5	rORF2-4 µg-卡巴普 1 剂	15	2	13.3%
6	rORF2-1 µg-卡巴普 2 剂	15	1	6.7%
7	rORF2-0.25 µg-卡巴普 2 剂	15	2	13.3%
8	KV > 8.0 log-卡巴普 2 剂	15	2	13.3%
9	攻毒对照	14	2	14.3%
10	严格阴性对照	15	0	0.0%

vORF2=分离的病毒ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的ORF2; KV或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的PCV2病毒

¹每一组中展现任何临床症状历时至少一天的猪的总数

表 22.组攻毒后死亡率的总结

组	处理	N	攻毒后死亡	死亡率
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2 剂	14	0	0.0%
2	vORF2-16 µg-卡巴普 2 剂	15	0	0.0%
3	rORF2-16 µg-卡巴普 2 剂	15	0	0.0%
4	vORF2-16 µg-卡巴普 1 剂	15	1	6.7%
5	rORF2-4 µg-卡巴普 1 剂	15	0	0.0%
6	rORF2-1 µg-卡巴普 2 剂	15	0	0.0%
7	rORF2-0.25 µg-卡巴普 2 剂	15	2	13.3%
8	KV > 8.0 log-卡巴普 2 剂	15	3	20.0%
9	攻毒对照	14	2	14.3%
10	严格阴性对照	15	0	0.0%

vORF2=分离的病毒ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的ORF2; KV或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的PCV2病毒

在下表 23 中给出组平均肺损害百分比及初步诊断率(tentative diagnosis)的总结。攻毒对照组第 9 组具有最高的肺损害百分比, 平均值为 $10.81 \pm 23.27\%$, 接下来是接受 $0.25 \mu\text{g}$ rORF2-卡巴普的第 7 组, 平均值为 $6.57 \pm 24.74\%$; 接受 $4 \mu\text{g}$ rORF2-卡巴普的第 5 组, 平均值为 $2.88 \pm 8.88\%$; 及接受 KV 疫苗的第 8 组, 平均值为 $2.01 \pm 4.98\%$ 。其余六(6)个组具有较低的平均肺损害百分比, 范围在 $0.11 \pm 0.38\%$ 至 $0.90 \pm 0.15\%$ 。

肺炎的初步诊断率在各组之间变化。接受两剂 16 μg rORF2-卡巴普的第 3 组具有最低的肺炎初步诊断率，为 13.3%。攻毒对照组第 9 组中有 50% 被初步诊断为肺炎，接着为严格阴性对照组第 10 组及接受两剂 16 μg vORF2-卡巴普的第 2 组，它们中分别有 46.7% 及 40% 被初步诊断为肺炎。

第 1 组、第 2 组、第 3 组、第 5 组、第 9 组及第 10 组中 0% 被初步诊断为 PCV2 感染；而接受两剂 KV 疫苗的第 8 组的组 PCV2 感染初步诊断率最高，为 20%。而接受两剂 0.25 μg rORF2-卡巴普的第 7 组及接受一剂 16 μg vORF2-卡巴普的第 4 组，组 PCV2 感染初步诊断率分别为 13.3% 及 6.7%。

仅在第 7 组中的一只猪中诊断出胃溃疡(6.7%)；而其它 9 组保持无胃溃疡。

表 23.组平均肺损害百分比及初步诊断率的总结

组	处理	N	排毒至少一天的猪数	发生率
1	rORF2-16 μg -IMS 1314 2 剂	15	0	0%
2	vORF2-16 μg -卡巴普 2 剂	15	1	6.7%
3	rORF2-16 μg -卡巴普 2 剂	15	3	20.0%
4	vORF2-16 μg -卡巴普 1 剂	15	2	13.3%
5	rORF2-4 μg -卡巴普 1 剂	15	3	20.0%
6	rORF2-1 μg -卡巴普 2 剂	15	6	40.0%
7	rORF2-0.25 μg -卡巴普 2 剂	15	7	46.7%
8	KV > 8.0 log-卡巴普 2 剂	15	12	80%
9	攻毒对照	14	14	100.0%
10	严格阴性对照	15	14	93.3%

vORF2=分离的病毒 ORF2；rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2；KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

组 IHC 阳性发生率结果的总结展示于下表 24 中。第 1 组(16 μg rORF2-IMS 1314)具有最低的组 IHC 阳性结果率, 其中 0%的猪对于 PCV2 为阳性; 接下来是第 2 组(16 μg vORF2-卡巴普)及第 4 组(单剂量 16 μg vORF2-卡巴普), 它们分别具有 6.7%及 13.3%的组 IHC 率。攻毒对照组第 9 组具有最高的 IHC 阳性发生率, 其中 100%的猪对于 PCV2 为阳性; 接下来是严格阴性对照组的第 10 组及第 8 组(KV 疫苗), 它们分别有 93.3%及 80%的猪对于 PCV2 为阳性。

表 24.组 IHC 阳性发生率的总结

组	处理	N	排毒至少一天的猪数	发生率
1	rORF2-16 μg -IMS 1314 2 剂	15	0	0%
2	vORF2-16 μg -卡巴普 2 剂	15	1	6.7%
3	rORF2-16 μg -卡巴普 2 剂	15	3	20.0%
4	vORF2-16 μg -卡巴普 1 剂	15	2	13.3%
5	rORF2-4 μg -卡巴普 1 剂	15	3	20.0%
6	rORF2-1 μg -卡巴普 2 剂	15	6	40.0%
7	rORF2-0.25 μg -卡巴普 2 剂	15	7	46.7%
8	KV > 8.0 log-卡巴普 2 剂	15	12	80%
9	攻毒对照	14	14	100.0%
10	严格阴性对照	15	14	93.3%

vORF2=分离的病毒 ORF2; rORF2=重组杆状病毒表达的 ORF2; KV 或灭活的全细胞病毒=在适当细胞培养物中生长的 PCV2 病毒

讨论

在此实施例中评估了七种 PCV2 疫苗, 包括: 以 IMS 1314 佐剂化的高剂量(16 μg) rORF2 抗原, 施用两次; 以卡巴普佐剂化的高剂量(16 μg)vORF2 抗原, 向一组猪施用一次并向另一组猪施用两次; 以卡巴普佐剂化的高剂量

(16 µg)rORF2 抗原,施用两次;以卡巴普佐剂化的 4 µg 剂量的 rORF2 抗原,施用两次;以卡巴普佐剂化的 1 µg 剂量的 rORF2 抗原,施用两次;以卡巴普佐剂化的低剂量(0.25 µg)rORF2 抗原,施用两次;以及以卡巴普佐剂化的高剂量(>8 log)灭活全细胞 PCV2 疫苗。总的说来,接受两剂 16 µg rORF2-IMS 1314 的第 1 组的表现稍好于接受含有不同水平 vORF2 或 rORF2 抗原并以卡巴普佐剂化的疫苗的第 2 组至第 7 组,并比接受两剂灭活全细胞 PCV2 疫苗的第 8 组好得多。第 1 组具有第三高的 ADWG (1.80 ± 0.30 磅/天)、最低的异常行为发生率(0%)、最低的异常呼吸发生率(0%)、低的咳嗽发生率(7.1%)、低的总临床症状发生率(7.1%),与其它三个组一样(tied with three other groups)具有最低的死亡率(0%)、第二低的平均肺损害百分比比率($0.15\pm 0.34\%$)、第二低的肺炎比率(21.4%)和最低的阳性 IHC 组织发生率(0%)。然而,第 1 组是唯一发现注射部位反应的组,包括在第二次疫苗接种后 1 天 50%的受接种者(vaccinate)。施用于第 2 组至第 7 组的其它疫苗表现得比灭活疫苗好,且几乎与施用于第 1 组的疫苗一样好。

接受以卡巴普佐剂化的两剂灭活 PCV2 疫苗的第 8 组,具有对于任何疫苗组而言最差的一组结果。第 8 组具有最低的 ADWG (0.93 ± 0.33 磅/天)、第二高的异常行为发生率(6.7%)、最高的异常呼吸发生率(6.7%),与其它三个组共同具有最高的临床症状总发生率(13.3%),具有所有组中最高的死亡率(20%),并具有任何疫苗组中最高的阳性 IHC 率(80%)。有种担忧是所述灭活全细胞 PCV2 疫苗在施用于第 8 组之前可能并未完全失活化,这可能能够解释该组的不良结果。不幸的是,未获得确定性的数据来确认这种担忧。总的说来,在此实施例的语境下,一种常规的灭活 PCV2 疫苗无助于减少 PCV2 相关疾病。

如先前所述,除以 IMS 1314 佐剂化的疫苗外,受试疫苗没有与不良事件相关。用与 IMS 1314 配制的疫苗进行第二次接种后 1 天,在 50.0%的猪中可见注射部位反应;第二次接种后 2 天,在 28.6%的猪中可见注射部位反应。在任何接受以卡巴普佐剂化的疫苗的猪均中未见反应。包括接种以 IMS 1314 佐剂化的疫苗的猪的任何进一步研究都应当继续密切监控猪的注射部位反应。

所有猪在第-3 天对于 PCV2 均为血清反应阴性,仅第 2 组在第 14 天具有 100 以上的效价。在第 25 天(攻毒之日),第 8 组具有最高 PCV2 抗体效价

(4619), 接着为第 2 组(2507)。除第 7 组、第 9 组及第 10 组外, 到第 32 天为止, 所有组均展现了强抗体反应。到第 50 天为止, 包括第 7 组、第 9 组及第 10 组的所有组均展现了强抗体反应。

后期 PCV2 感染及随后的 PMWS 发病的一个标志是在断乳猪中生长迟缓, 在严重情况下可见体重减轻。组的平均每日体重增加是显示生长迟缓或体重减轻的一种定量性方法。在此实施例中, 各组之间 ADWG 不存在大的差异。第 8 组具有 0.88 ± 0.29 磅/天的最低 ADWG, 而第 4 组具有 1.16 ± 0.26 磅/天的最高 ADWG。在此项研究的背景下, 由于组间的差异不足, 无法将 ADWG 作为未来疫苗功效的基准。

除体重减轻外, PMWS 相关的临床症状还有呼吸困难、嗜睡(leghargy)、皮肤苍白, 有时还有黄疸。在此实施例中, 对于每一组, 异常行为、异常呼吸及咳嗽均不常见。该项研究证明, 该攻毒模型及攻毒病毒株并不导致压倒性的(overwhelming)临床症状, 这不是作为疫苗功效的基准的有力参数。

总的说来, 在此实施例中死亡率不高, 而在攻毒对照组中缺乏高死亡率, 限制了该参数作为疫苗功效基准。在第 46 天前, 第 4 组及第 7 组分别在十五只猪中有一只死亡, 第 9 组十四只猪中有两只死亡, 且在第 8 组十五只猪中有三只死亡。由于攻毒对照组第 9 组未展现 PCV2 临床症状, 而且到第 46 天为止此组中出现仅两例死亡, 因此在第 46 天对所有猪施用猪呼吸及生殖综合征病毒(PRRSV) MLV 疫苗。早些时候的研究已利用 INGELVAC® PRRS MLV 作为免疫刺激剂来加剧 PCV2 相关的 PMWS 病, 且在这些早期研究中死亡率较高。在第 46 天施用 PRRS 疫苗后不久发生两例死亡——第 4 组在第 46 天有一例死亡, 第 7 组在第 47 天有一例死亡——其可能与 PRRS 疫苗的施用并不相关。到第 50 天为止, 接受两剂灭活疫苗的第 8 组具有最高死亡率(20%), 接着是死亡率分别为 14.3%及 13.3%的第 9 组(攻毒对照)及第 7 组($0.25 \mu\text{g}$ rORF2-卡巴普)。总的说来, 在此实施例的攻毒后观测期中较晚的时候将 PRRS 疫苗施用于攻毒模型, 没有显著提高死亡率。

在患有继发于 PCV2 感染的 PMWS 的猪中的可见损害通常由与一种或多种以下症状组合的一般淋巴结病组成: (1)具有小叶间水肿之间质性肺炎, (2)皮肤苍白或黄疸, (3)斑点状萎缩性肝, (4)胃溃疡, (5)肾炎及(6)生殖病症, 例如流产、死产、干尸等。在尸体剖检(第 50 天)时, 在任何组中均未见黄疸、肝炎及肾炎。在第 7 组的一只猪中可见胃溃疡, 但未特定检查淋巴结病。基

于符合 PCV2 感染的损害的存在，初步诊断三个组中有至少一只猪有 PCV2(PMWS)。接受两剂灭活疫苗的第 8 组有 20%初步诊断有 PCV2，而第 7 组及第 4 组分别有 13.3%及 6.7%初步诊断有 PCV2。在尸体剖检时，平均肺损害百分比计分各组之间不同。第 1 组、第 2 组、第 3 组、第 4 组、第 6 组及第 10 组具有 $0.11\pm 0.38\%$ 至 $0.90\pm 0.15\%$ 范围内的低肺损害百分比计分。如所预期的，攻毒对照组第 9 组具有最高的平均肺损害百分比计分 ($10.81\pm 23.27\%$)。在四个组中，由于这些组中各有一至三只猪具有极高的肺损害计分，因此提高了平均肺损害百分比计分。肺损害为红色/紫色且坚实的。通常，与 PMWS 相关的肺损害被描述为黄褐色、不可萎陷并伴有小叶间水肿。在此研究中记录的肺损害与 PCV2 感染不相关或可能存在第二肺传染原。在此研究的语境中，肺损害百分比计分可能不反映由 PCV2 所致肺感染量的真实量度。同样，可能肺炎的初步诊断也可能被过度利用了。任何具有肺损害——有些小至 0.10%——的猪，都在被初步诊断有肺炎之列。在此实施例中，可见损害及肺损害百分比的组间差异不足，无法作为疫苗功效的基准。

IHC 结果所展示的组间差异最大。第 1 组(16 μg rORF2-IMS 1314)具有最低的 PCV2 抗原阳性 IHC 结果(0%); 而第 9 组及第 10 组具有最高的阳性 IHC 结果，发生率分别为 100%及 93.3%。分别接受 16 μg 、4 μg 、1 μg 或 0.25 μg rORF2 抗原的第 3 组、第 5 组、第 6 组及第 7 组 IHC 阳性率分别为 20%、20%、40%及 46.7%。接受两剂以卡巴普佐剂化的 16 μg vORF2 的第 2 组具有 6.7%的 IHC 阳性率，而仅接受一剂相同疫苗的第 4 组具有 13.3%的 IHC 阳性率。由于此测试的客观性且 IHC 结果与预期结果相关的事实，IHC 测试可能是作为疫苗功效基准的最佳参数之一。

因此，在本发明的一个方面中，测定了以卡巴普佐剂化的 PCV2 rORF2 抗原在 CDCD 猪模型中面对 PCV2 攻毒的最小保护性剂量(MPD)。第 3 组、第 5 组、第 6 组及第 7 组各自接受两剂以卡巴普佐剂化的 rORF2 抗原，但 rORF2 抗原的水平各组不同。第 3 组、第 5 组、第 6 组及第 7 组分别各自接受 16 μg 、4 μg 、1 μg 或 0.25 μg rORF2 抗原。通常，减少 rORF2 抗原的水平会降低 PCV2 抗体效价，并提高死亡率、平均肺损害百分比及 IHC 阳性组织的发生率。在接受不同水平的 rORF2-卡巴普的四个组中，分别接受两剂 16 μg rORF2 抗原或 4 μg rORF2 抗原的第 3 组及第 5 组各自具有仅 20%的

IHC 阳性率，且各自具有类似的抗体效价。总的说来，基于 IHC 阳性结果，施用两次的 rORF2 抗原的最小保护性剂量大约为 4 μg 。

在本发明的另一方面中，评估重组(rORF2)及 VIDO R-1 (vORF2) PCV2 抗原的抗原性。第 2 组接受两剂 16 μg vORF2，第 3 组接受两剂 16 μg rORF2。两种疫苗均以卡巴普佐剂化。发现两种疫苗都是安全的，且两者都具有 0% 的死亡率。在第 25 天，第 2 组具有 2507 的 PCV2 抗体效价，而第 3 组具有 1503 的 PCV2 抗体效价。第 3 组具有比第 2 组低的平均肺损害百分比计分 ($0.11\pm 0.38\%$ 对 $0.90\pm 0.15\%$)，但第 2 组具有比第 3 组低的 IHC 阳性发生率 (6.7% 对 20%)。总的说来，两种疫苗的抗原性类似，但与 vORF2 相关的 IHC 结果稍好。

在本发明的另一方面中，测定两种不同佐剂(卡巴普及 IMS 1314)的适用性。第 1 组及第 3 组两者均接受了两剂含有 16 μg rORF2 抗原的疫苗，但第 1 组接受以 IMS 1314 佐剂化的抗原，而第 3 组接受以卡巴普佐剂化的抗原。两个组具有基本上相同的 ADWG、基本上相同的攻毒后临床征象发生率、相同的死亡率及基本上相同的平均肺损害百分比；但第 1 组具有 0% 的 IHC 阳性率，而第 3 组具有 20% 的 IHC 阳性率。然而，接受以卡巴普佐剂化的疫苗的第 3 组在第 25 天、第 32 天及第 50 天具有比接受以 IMS 1314 佐剂化的疫苗的第 1 组高的 IFAT PCV2 效价。总的说来，尽管以 IMS 1314 佐剂化的 PCV2 疫苗确实提供了更好的 IHC 结果，但其提供的抗 PCV2 感染保护并不具有压倒性的优势，而且其确实诱发了注射部位反应。而以卡巴普佐剂化的 PCV2 疫苗表现得几乎与以 IMS 1314 佐剂化的疫苗一样好，却不与任何不良事件相关。

在本发明的另一方面中，测定 PCV2 ORF2 作为 1 ml 1 剂量产品的可行性。第 2 组及第 4 组都在第 0 天接受了以卡巴普佐剂化的 vORF2 疫苗，而第 2 组在第 14 天又接受了一剂。第 4 组的 ADWG 较第 2 组稍高，平均肺损害百分比较第 2 组低，但第 2 组在第 25 天、第 32 天及第 50 天的 IFAT PCV2 效价较高，IHC 阳性组织发生率稍低。这两个组的所有其它结果是类似的。总的说来，以卡巴普佐剂化的一剂 vORF2 的表现类似于两剂的不同疫苗。

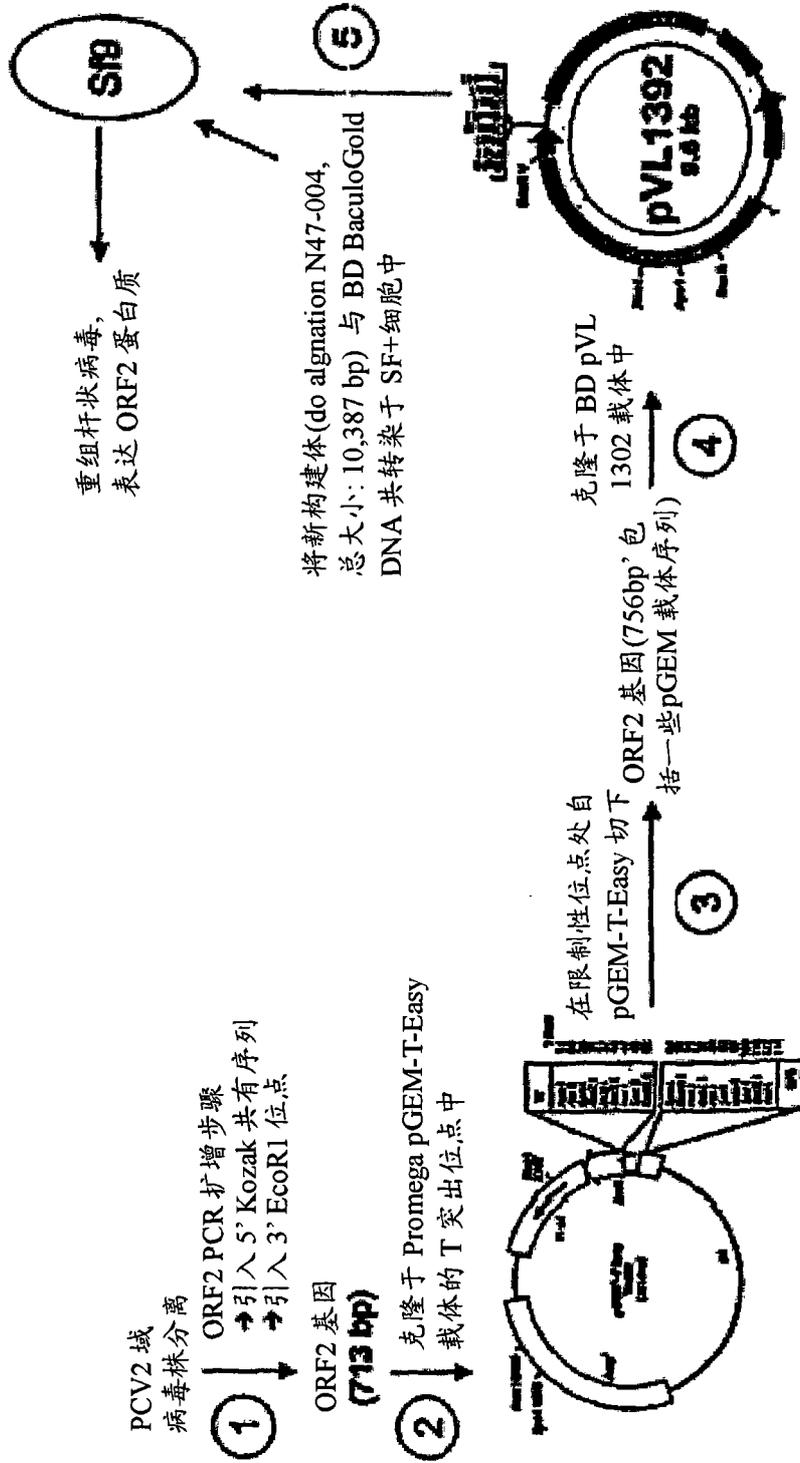


图 1

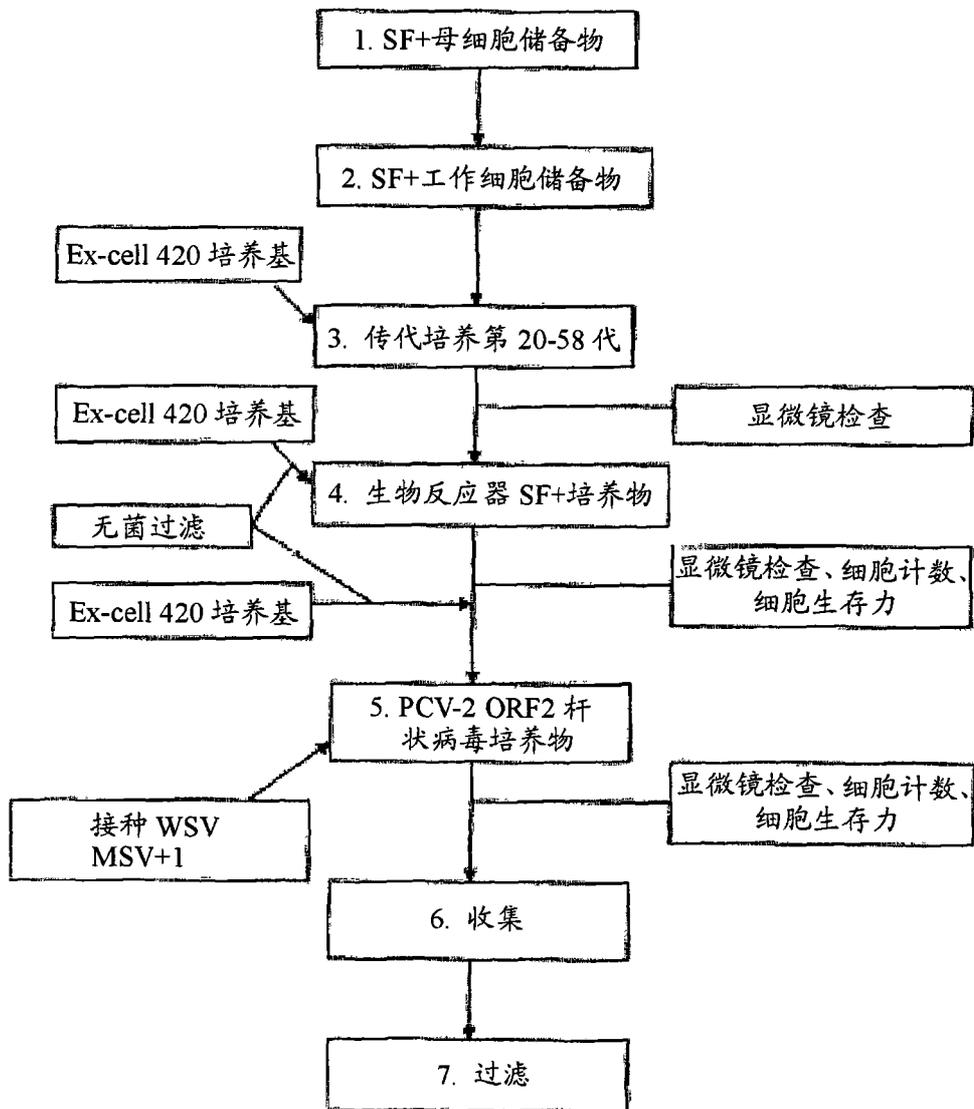


图 2(a)

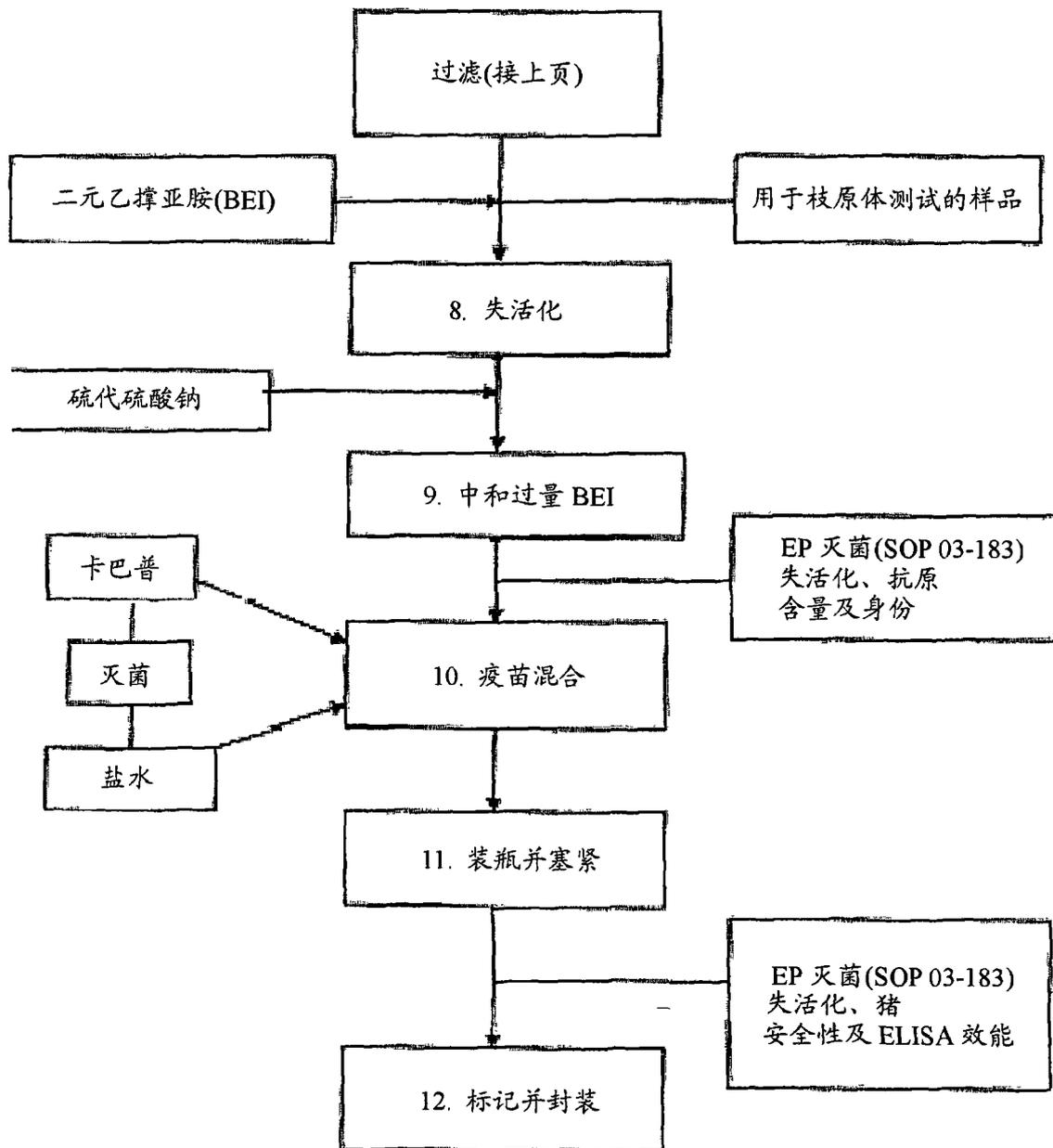


图 2 (b)