



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월14일
(11) 등록번호 10-1747507
(24) 등록일자 2017년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/295 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) C07K 14/08 (2006.01)
C07K 14/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7030860
(22) 출원일자(국제) 2013년04월03일
심사청구일자 2014년11월03일
(85) 번역문제출일자 2014년11월03일
(65) 공개번호 10-2015-0003257
(43) 공개일자 2015년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/035083
(87) 국제공개번호 WO 2013/152081
국제공개일자 2013년10월10일
(30) 우선권주장
61/620,165 2012년04월04일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Aust Vet J, Vol 75, Pages 504-511(1997)*
W02009126356 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조에티스 서비스즈 엘엘씨
미국 뉴저지 (우편번호 07054) 파시파니 실반 웨이 10
(72) 발명자
갈빈 제프리 이
미국 네브라스카주 68516 링컨 아론 서클 5500
니켈 그레고리 피
미국 미시간주 49071 매타완 핀치 스트리트 45620
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

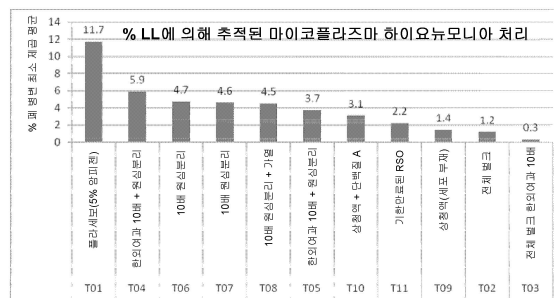
심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 백신

(57) 요약

본 발명은 마이코플라즈마 하이에뉴모니아(*Mycoplasma hyopneumoniae*) 전체 세포 제제의 가용성 부분을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하고, 이때 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 제제의 가용성 부분은 (i) IgG 및 (ii) 면역글로불린에 결합된 항원으로 구성된 면역복합체 둘다를 실질적으로 갖지 않는다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

가렛 존 케이트

미국 네브라스카주 68504 링컨 폴레처 애비뉴 3137
아파트먼트 278

쿨라워 제임스 알 세컨드

미국 네브라스카주 68506 링컨 사우스 72번 스트리트 2910 60

릭커 트레이시 엘

미국 미시간주 49002 포트지 란셀롯 코트 1550

스무치 메간 마리

미국 미시간주 49004 칼라마주 사우스 서클 드라이브 3609 아파트먼트 10

명세서

청구범위

청구항 1

마이코플라즈마 하이요뉴모니아(*Mycoplasma hyopneumoniae*) 배양물의 상청액을 포함하는 면역원성 조성물로서, 상기 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물의 상청액이, 원심분리, 여과 또는 침전에 의해 불용성 세포 물질로부터 분리된 것이고, (i) IgG 및 (ii) 면역글로불린에 결합된 항원으로 구성된 면역복합체 둘 다를 갖지 않는, 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상청액이 면역원성 조성물에 첨가되기 전에 단백질 A 또는 단백질 G로 처리되는, 면역원성 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

항원보강제(adjuvant)를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

항원보강제가 수중유 항원보강제, 중합체 및 물 항원보강제, 유중수 항원보강제, 수산화알루미늄 항원보강제, 비타민 E 항원보강제 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 17

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

단회 용량 투여로서 투여되었을 때 마이코플라즈마 하이에뉴모니아에 대한 보호 면역 반응을 이끌어내는 면역원성 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

제 1 항의 면역원성 조성물을 돼지에게 투여하는 단계를 포함하는, 마이코플라즈마 하이에뉴모니아에 대해 돼지를 면역화하는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

면역원성 조성물이 근육내, 피내, 경피 또는 피하 투여되는, 방법.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

면역원성 조성물이 단회 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

면역원성 조성물이 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 대한 모체 유래의 항체를 갖는 돼지에게 투여되는, 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

면역원성 조성물이 3주령 이상의 연령을 갖는 돼지에게 투여되는, 방법.

청구항 29

마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물의 상청액을 포함하는 면역원성 조성물을 포함하는 병(bottle)을 포함하는 키트로서,

상기 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물의 상청액이, 원심분리, 여과 또는 침전에 의해 불용성 세포 물질로부터 분리된 것이고, (i) IgG 및 (ii) 항원/면역글로불린 면역복합체 둘 다를 갖지 않는, 키트.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

면역원성 조성물의 투여에 대한 정보를 함유하는 설명 매뉴얼을 추가로 포함하는 키트.

청구항 31

면역원성 조성물을 제조하는 방법으로서,

- i) 마이코플라즈마 하이요뉴모니아를 적합한 배지에서 18시간 내지 144시간에 걸쳐 배양하는 단계;
 - ii) 후속적으로 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물을 불활성화시키는 단계;
 - iii) 가용성 액체 분획 및 불용성 세포 물질 둘 다를 포함하는 불활성화된 배양액을 회수하는 단계;
 - iv) 불용성 세포 물질로부터 가용성 액체 분획을 분리하여 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물의 상청액을 형성하는 단계; 및
 - v) 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물의 상청액으로부터 IgG 및 항원/면역글로불린 면역복합체 둘 다를 제거하는 단계
- 를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아(*Mycoplasma hyopneumoniae*)에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분, 및 유행성 폐렴으로부터 돼지를 보호하기 위한 백신에서의 그의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코플라즈마 폐렴으로도 지칭되는 돼지 유행성 폐렴은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 의해 야기된다. 이 질환은 모든 연령의 돼지들에게 영향을 미치는 만성 비-치명적 질환이다. 감염된 돼지는 기침 및 발열이라는 경미한 증상만을 보이지만, 상기 질환은 감소된 사료 효율 및 감소된 체중 증가로 인해 상당한 경제적 영향을 미친다. 유행성 폐렴은 감염된 돼지의 폐로부터 배출되는 공기전염성 유기체에 의해 비도를 통해 돼지들 사이에 전염된다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 의한 1차 감염에 이어서 다른 마이코플라즈마 종(마이코플라스

마 하이요리니스(*Mycoplasma hyorhinis*) 및 마이코플라즈마 플로쿨라레(*Mycoplasma flocculare*))뿐만 아니라 다른 세균 병원체에 의한 2차 감염이 뒤따를 수 있다.

[0003] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아는 외생성 스테롤 및 지방산을 절대적으로 요구하기 때문에 종종 진핵 세포와 함께 발견될 수 있지만 자유롭게 생존할 수 있는 작은 원핵 미생물이다. 이들 요구는 일반적으로 혈청 함유 배지에서의 성장을 필요로 한다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아는 세포막에 의해 결합되지만 세포벽에 의해서는 결합되지 않는다.

[0004] 마이코플라즈마와 숙주 세포 표면의 물리적 결합은 유행성 폐렴의 발전 및 지속을 위한 기반이다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아는 돼지의 호흡관을 감염시켜 기관, 기관지 및 세기관지에서 콜로니를 형성한다. 상기 마이코플라즈마는 호흡 기도의 내층을 형성하는 섬모가 박동을 멈추게 하는 섬모정지 인자(ciliostatic factor)를 생성한다. 결과적으로, 섬모가 퇴화하여 돼지가 2차 병원체에 의해 용이하게 감염되게 된다. 자주색 내지 회색 경화 영역이라는 특징적인 병변이 감염된 동물에서 관찰된다. 도살된 동물들의 검사는 돼지의 30% 내지 80%에서 병변을 보여주었다. 13개 주에서 37개 돼지떼들로부터 수득된 결과는 돼지떼의 99%가 유행성 폐렴의 전형적인 폐렴 병변을 갖는 돼지를 갖는다는 것을 보여주었다. 따라서, 효과적인 예방 및 치료 조치에 대한 필요성이 크다.

[0005] 항생제, 예컨대, 티아몰린, 트라이메토프림, 테트라사이클린 및 린코마이신은 약간의 이점을 갖지만, 값비싸고 오랜 사용을 필요로 한다. 또한, 항생제는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 전염 또는 재감염을 효과적으로 제거하는 것으로 밝혀져 있지 않다. 병원체 무함유 돼지떼를 유지함으로써 예방하는 것이 종종 가능하지만, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 재도입이 종종 일어난다. 돼지 폐렴의 심각한 경제적 결과 때문에, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 대한 백신이 요구되어 왔다. 혈청 함유 배지에서 성장된 마이코플라즈마 유기체의 체제를 함유하는 백신이 시판되고 있지만, 면역화 물질에 존재하는 혈청 성분(예컨대, 면역복합체 또는 비-면역원성 특이적 단백질)에 의해 유도된 불리한 반응에 대한 우려를 상승시킨다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신을 제공하기 위한 다른 시도가 성공적이었지만, 질환이 널리 퍼진 상태로 남아 있다.

[0006] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 및 돼지 서코바이러스 2형(PCV2)은 양돈 산업에서 우연히 발생하는 2종의 가장 흔한 병원체이다. PCV2로 감염된 돼지는 통상적으로 이유후 전신소모성 증후군(PMWS)으로서 지칭되는 증후군을 나타낸다. PMWS는 임상적으로 쇠약, 피부의 창백, 수척, 호흡 곤란, 설사, 황화병 및 황달을 특징으로 한다. PCV2는 PMWS 이외에 가성광견병, 돼지 생식 및 호흡 증후군(PRRS), 글래스병(Glasser's disease), 연쇄상구균 수막염, 살모넬라증, 이유후 대장균혈증, 식이성 간장증 및 화농성 기관지폐렴을 비롯한 여러 다른 감염과도 관련되어 있다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아는 유행성 폐렴과 관련되어 있고 돼지 서코바이러스 관련 질환(PCVAD)의 발생에 있어서도 주요 보조인자들 중 하나로서 연루되어 있다.

[0007] 돼지 생식 및 호흡 증후군(PRRS)은 대식세포, 특히 폐에서 발견되는 대식세포(폐포 대식세포)에 대한 특정 친화성을 갖는 아테리바이러스(arterivirus)에 의해 야기된다. 이들 대식세포들은 침입 세균 및 바이러스를 섭취하여 제거하지만, PRRS 바이러스의 경우에는 그러하지 않다. PRRS 바이러스의 경우, PRRS 바이러스는 보다 많은 바이러스를 생성하는 대식세포 내에서 증식하고 대식세포를 사멸시킨다. 일단 PRRSV가 돼지떼에 들어오면, 이 바이러스는 무기한으로 활성 상태로 존재하는 경향을 나타낸다. 대식세포의 최대 40%가 파괴되고, 이로 인해 세균 및 다른 바이러스가 증식하여 손상을 입힌다. 이의 통상적인 예는 사육/마무리가공 시설들이 PRRS 바이러스로 감염되었을 때 이들 시설들 내에서의 유행성 폐렴의 중증도의 현저한 증가이다. 이유기 PRRS 바이러스 음성 돼지의 절반 이상이 시판되기 전에 감염된다.

[0008] 돼지에서 마이코플라즈마 감염에 대한 개선된 백신이 필요하다. 바람직하게는, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신은 별도의 단일 백신으로서 동시에 제공되든 아니면 사용 준비된 백신에서 조합되든 관계없이 다른 돼지 항원, 예컨대, PCV2 및 PRRS 바이러스와 상용가능할 것이다. 사용 준비된 단위 용량의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합 백신을 제공하는 것이 매우 바람직할 것이다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는데, 이때 상기 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 (i) IgG 및 (ii) 면역글로불린에 결합된 항원으로 구성된 면역복합체 둘다를 실질적으로 갖지 않는다. 한 양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전

체 세포 제제의 가용성 부분은 면역원성 조성물에 첨가되기 전에 단백질 A 또는 단백질 G로 처리된다.

- [0010] 한 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 하나 이상의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 2개 이상의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원들을 포함한다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 추가 항원을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 하나 이상의 추가 항원은 돼지에서 질환을 야기할 수 있는 미생물로부터 보호한다.
- [0012] 한 실시양태에서, 상기 미생물은 세균, 바이러스 또는 원생동물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 미생물은 하기 미생물들로부터 선택되거나 이들로 한정되지 않는다: 돼지 서코바이러스(circovirus) 2형(PCV2), 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스(PRRSV), 돼지 파보바이러스(parvovirus)(PPV), 해모필루스 파루스(Haemophilus parasuis), 파스테우렐라 물토시다(Pasteurella multocida), 스트렙토코커스 수이스(Streptococcus suis), 스태필로코커스 하이커스(Staphylococcus hyicus), 악티노바실러스 플레우로뉴모니아(Actinobacillus pleuropneumoniae), 보르데텔라 브론키셉티카(Bordetella bronchiseptica), 살모넬라 콜레라 수이스(Salmonella choleraesuis), 살모넬라 엔테리티디스(Salmonella enteritidis), 에리시펠로쓰릭스 루시오 패씨아(Erysipelothrix rhusiopathiae), 마이코플라즈마 하이요리니스(Mycoplasma hyorhinis), 마이코플라즈마 하이요사이노비아(Mycoplasma hyosynoviae), 렙토스피라(leptospira) 세균, 로우소니아 인트라셀룰라리스(Lawsonia intracellularis), 돼지 인플루엔자 바이러스(SIV), 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli) 항원, 브라키스피라 하이오다이센테리아(Brachyspira hyodysenteriae), 돼지 호흡 코로나바이러스(coronavirus), 돼지 유행성 설사(PED) 바이러스, 로타바이러스(rotavirus), 토크 테노(Torque teno) 바이러스(TTV), 돼지 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus), 돼지 엔테로바이러스(enterovirus), 뇌심근염 바이러스, 오우제스카이병(Aujesky's Disease)의 원인 병원체, 고전적인 돼지 열병(CSF) 및 돼지 전염성 위장염의 원인 병원체, 또는 이들의 조합물.
- [0013] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 추가 항원은 돼지 서코바이러스 2형(PCV2) 항원, PRRS 바이러스 항원 또는 이들의 조합물이다. 한 실시양태에서, 조성물은 돼지에서 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 및 PCV2 둘다에 대한 보호 면역 반응을 이끌어낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 돼지에서 마이코플라즈마 하이요뉴모니아, PCV2 및 PRRS 바이러스에 대한 보호 면역 반응을 이끌어낸다.
- [0014] 한 실시양태에서, PCV2 항원은 돼지 서코바이러스 2형 ORF2 단백질을 발현하는 불활성화된 재조합 돼지 서코바이러스 1형을 포함하는 키메라 바이러스인 키메라 1형-2형 서코바이러스의 형태로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, PCV2 항원은 재조합 ORF2 단백질의 형태로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 ORF2 단백질은 바칼로바이러스 벡터로부터 발현된다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 항원보강제를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 항원보강제는 하기 항원보강제들로부터 선택되거나 이들로 한정되지 않는다: 수중유 항원보강제, 중합체 및 물 항원보강제, 유중수 항원보강제, 수산화알루미늄 항원보강제, 비타민 E 항원보강제 및 이들의 조합물. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0016] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 단위 용량 투여로서 투여되었을 때 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 대한 보호 면역 반응을 이끌어낸다. 추가 실시양태에서, 상기 조성물은 단위 용량 투여로서 투여되었을 때 마이코플라즈마 하이요뉴모니아, 및 돼지에서 질환을 야기할 수 있는 하나 이상의 추가 미생물에 대한 보호 면역 반응을 이끌어낸다. 추가 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 2회 용량 투여로서 투여되었을 때 마이코플라즈마 하이요뉴모니아, 및 돼지에서 질환을 야기할 수 있는 하나 이상의 추가 미생물에 대한 보호 반응을 이끌어낸다.
- [0017] 본 발명은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 대해 돼지를 면역화하는 방법도 제공한다. 이 방법은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분을 포함하는 면역원성 조성물을 돼지에게 투여하는 단계를 포함하는데, 이때 상기 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 (i) IgG 및 (ii) 면역글로불린에 결합된 항원으로 구성된 면역복합체 둘다를 실질적으로 갖지 않는다. 한 실시양태에서, 투여되는 조성물의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 하나 이상의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원을 포함한다.
- [0018] 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 상기 조성물은 근육내, 피내, 경피 또는 피하 투여된다. 본 발명의 방법의 또 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 단위 용량으로 투여된다. 본 발명의 방법의 또 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 2회 용량으로 투여된다.

[0019] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, 조성물은 돼지에서 질환을 야기할 수 있는 미생물, 예컨대, 전술된 미생물들 중 하나 이상의 미생물로부터 보호하는 하나 이상의 추가 항원과 함께 투여된다. 이러한 다른 항원은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조성물과 동시에(즉, 별도의 단일 백신으로서) 제공될 수 있거나 사용 준비된 백신 내에 조합된 상태로 제공될 수 있다.

[0020] 추가 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 대한 모체 유래의 항체를 갖는 돼지에게 투여된다. 추가 실시양태에서, 상기 조성물은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아, 및 돼지에서 질환을 야기할 수 있는 하나 이상의 다른 미생물 둘다에 대한 모체 유래의 항체를 갖는 돼지에게 투여된다.

[0021] 한 실시양태에서, 상기 조성물은 3주령 이상의 연령을 갖는 돼지에게 투여된다.

[0022] 본 발명은 키트도 제공한다. 이 키트는 면역원성 조성물을 포함하는 병을 포함한다. 이 면역원성 조성물은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분을 포함하는데, 이때 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 (i) IgG 및 (ii) 항원/면역글로불린 면역복합체 둘다를 실질적으로 갖지 않는다. 한 실시양태에서, 상기 키트는 면역원성 조성물의 투여에 대한 정보를 함유하는 설명 매뉴얼도 추가로 포함한다.

[0023] 추가로, 본 발명은 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 i) 마이코플라즈마 하이요뉴모니아를 적합한 배지에서 18시간 내지 144시간에 걸쳐 배양하는 단계; ii) 후속적으로 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물을 불활성화시키는 단계; iii) 가용성 액체 분획 및 불용성 세포 물질 둘다를 포함하는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제를 포함하는 불활성화된 배양액을 회수하는 단계; iv) 불용성 세포 물질로부터 가용성 액체 분획을 분리하는 단계; 및 v) 분리된 가용성 액체 분획으로부터 IgG 및 항원/면역글로불린 면역복합체 둘다를 실질적으로 제거하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 상이한 처리들(실시에 3에 기재된 T02 내지 T10) 대 플라세보(T01)로부터 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원으로 제조된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 1가 백신의 효능을 보여주는 그래프이다. 결과는 % 폐 병변 최소 제곱 평균 값으로서 제시되어 있다.

도 2는 사멸된 PCV 1형-2형 키메라 바이러스와 조합된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신의 PCV2 항원 효능 결과(PCV2 항원 ELISA)를 보여주는 그래프이다. 상기 키메라 바이러스는 약 $1.6 \leq RP$ 의 초기 수준으로 조성물에 포함되었다. 각각의 샘플의 상태는 상대적 효능(RP)로서 표현되어 있다.

도 3은 상이한 항원보강제 플랫폼을 사용하는 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신 제제를 사용하여 관찰한 PCV2 바이러스혈증 결과(PCV2 정량 PCR)를 보여주는 그래프이다.

도 4는 켈린지의 1일째 날, 20일째 날 및 42일째 날에 상이한 항원보강제 플랫폼을 사용하는 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신 제제를 사용하여 관찰한 PCV2 항체 ELISA(S/P) 혈청학적 결과를 보여주는 그래프이다.

도 5는 실시에 7에 기재된 T02 내지 T04 처리 대 플라세보(T01)를 사용하여 수득한 PCV2 분변 배출을 보여주는 그래프이다. 결과는 PCV2 DNA 복제/㎖로서 표현되어 있다.

도 6은 실시에 7에 기재된 T02 내지 T04 처리 대 플라세보(T01)를 사용하여 수득한 PCV2 코 배출을 보여주는 그래프이다. 결과는 PCV2 DNA 복제/㎖로서 표현되어 있다.

도 7(7a 및 7b)은 PCV2 특이적 세포 매개 면역(CMI) 반응을 측정하는 인터페론-감마(IFN- γ) 시험의 결과를 보여주는 그래프이다. 백신접종 후/켈린지 전의 결과는 도 7a에 제시되어 있고, 백신접종 후/켈린지 후의 결과는 도 7b에 제시되어 있다. 5×10^6 개 세포의 자극이 유의한 것으로서 간주되었다.

도 8(8a 및 8b)은 SP-오일 중의 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능을 보여준다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 처리 T02 내지 T08 대 플라세보(T01)를 사용하는 제제에 대한 폐 점수는 도 8a에 그래프로 도시되어 있다. 도 8b의 표는 처리 T02 내지 T08을 플라세보와 비교하여 보여준다.

도 9는 PCV2-상용가능성 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 제조하기 위해 이용된 제조 공정의 한 실시양태를 보여주는 순서도이다.

도 10은 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스 활성에 대한 항원보강제 평가를 보여주는 표이다.

[서열의 간단한 설명]

서열번호 1은 마이코플라즈마 하이에뉴모니아의 P-5722 균주로부터의 p46을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 2는 마이코플라즈마 하이에뉴모니아의 P-5722 균주로부터의 p46에 상응하는 아미노산 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 3은 마이코플라즈마 하이에뉴모니아의 P-5722 균주로부터의 p97을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 4는 마이코플라즈마 하이에뉴모니아의 P-5722 균주로부터의 p97에 상응하는 아미노산 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 5는 키메라 PCV1-2 바이러스를 코딩하는 게놈 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 6은 돼지 서코바이러스의 ORF2에 상응하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 7은 돼지 서코바이러스의 ORF2 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 8은 키메라 PCV1-2 바이러스를 코딩하는 게놈 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 9는 돼지 서코바이러스의 ORF2에 상응하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 10은 돼지 서코바이러스의 ORF2 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 11은 돼지 서코바이러스의 ORF2 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 12는 서열번호 11의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 13은 돼지 서코바이러스의 ORF2 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 14는 서열번호 13의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 15는 돼지 서코바이러스의 ORF2 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 16은 P129로서 명명된 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물의 비-병독성 형태의 게놈 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 17은 ISU-55로서 명명된 PRRS 바이러스 단리물의 ORF2 내지 ORF5에 상응하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이고;

서열번호 18은 ISU-55로서 명명된 PRRS 바이러스 단리물의 ORF6 및 ORF7에 상응하는 뉴클레오티드 서열의 한 실시양태이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는데, 이때 상기 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 제제의 가용성 부분은 (i) IgG 및 (ii) 항원-결합된 면역복합체 둘다를 실질적으로 갖지 않는다.
- [0026] 본 출원인은 놀랍게도 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 전체 세포 제제의 불용성 부분이 면역원성을 나타내지 않는다는 것을 발견하였다. 대조적으로, IgG 무함유 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 가용성 제제는 면역원성을 나타내고 항원들 사이의 분석학적 또는 면역학적 간섭 없이 다른 병원체, 예컨대, PCV2의 항원과 효과적으로 조합될 수 있다. 이것은 본 발명의 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 가용성 제제가 사용 준비된 1-병 제제를 비롯한 다가 백신을 위한 효과적인 플랫폼이 되게 한다. 본 발명의 출원인은 놀랍게도 면역글로불린 및 불용성 세포 debris(bris)의 제거가 면역원성 조성물의 안전성을 향상시킨다는 것도 발견하였다.
- [0027] 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 내용이 달리 명시하고 있지 않은 한, 단수형 용어는 복수형 지시대상을 포함한다. 예를 들면, 용어 "1개의 단백질 항원"은 복수의 단백질 항원들(이들의 혼합물을 포함함)을 포함한다.
- [0028] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는"은 조성물 및 방법이 인용된 요소를 포함하지만 다른 요소를 배제

하지 않는다는 것을 의미하기 위한 것이다.

- [0029] 본원에서 정의된 바와 같이, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 체제의 가용성 부분은 불용성 물질의 분리, 및 IgG 및 항원-결합된 면역복합체의 실질적인 제거 후 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 체제의 가용성 액체 분획을 지칭한다. 대안적으로, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 부분은 본원에서 상청액 분획, 배양물 상청액 등으로서 지칭될 수 있다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 부분은 통상적인 수단, 예컨대, 원심분리, 여과 또는 침전에 의해 불용성 단백질, 전체 세균 및 다른 불용성 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 세포 물질로부터 분리되어 있거나 단리되어 있는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아-발현된 가용성 단백질(마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원)을 포함한다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 체제의 가용성 부분은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 특이적 가용성 단백질을 포함하는 것 이외에 이중 단백질, 예컨대, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 발효에 사용된 배양 배지에 함유된 단백질도 포함한다.
- [0030] 용어 "항원"은 동물에서 항체 또는 T 세포 반응, 또는 이들 둘다의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 면역원성 물질(동물 내로 주사되거나 흡수되는 조성물을 포함함)을 지칭한다. 전체 분자, 또는 이 분자의 부분(예를 들면, 에피토프 또는 헵텐)에 대한 면역 반응이 발생할 수 있다.
- [0031] 본원에서 정의된 바와 같이, "면역원성 또는 면역학적 조성물"은 숙주에서 관심있는 조성물 또는 백신에 대한 세포 및/또는 항체 매개 면역 반응인 면역학적 반응을 이끌어내는 하나 이상의 항원을 포함하는 물질의 조성물을 지칭한다.
- [0032] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 동물에서 이끌어낸 반응을 지칭한다. 면역 반응은 세포성 면역(CMI) 또는 체액성 면역을 지칭할 수 있거나 이들 둘다를 포함할 수 있다. 본 발명은 면역 시스템의 부분으로 한정된 반응도 고려한다. 통상적으로, "면역학적 반응"은 하기 효과들 중 하나 이상의 효과를 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 관심있는 조성물 또는 백신에 포함된 항원 또는 항원들에 대해 특이적으로 유도된 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 억제제 T 세포, 및/또는 세포독성 T 세포 및/또는 yδ T 세포의 생성 또는 활성화. 바람직하게는, 숙주는 새로운 감염에 대한 저항성이 향상되고/되거나 질환의 임상적 중증도가 감소되도록 치료 또는 보호 면역학적 반응을 나타낼 것이다. 이러한 보호는 감염된 숙주에 의해 통상적으로 나타나는 증상의 감소 또는 결여, 보다 빠른 회복 시간 및/또는 감염된 숙주 내의 낮은 바이러스 역가에 의해 입증될 것이다.
- [0033] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역원성"은 숙주 동물에서 항원 또는 항원들에 대한 면역 반응을 생성할 수 있다는 것을 의미한다. 이 면역 반응은 특정 감염성 유기체에 대한 백신에 의해 이끌어내진 보호 면역의 기반을 형성한다.
- [0034] 본원에서 사용된 바와 같이, "항원보강제"는 항원(들)에 대한 면역 반응을 향상시키는 하나 이상의 물질로 구성된 조성물을 의미한다. 항원보강제가 작용하는 기작은 완전히 공지되어 있지 않다. 일부 항원보강제들은 항원을 서서히 방출시킴으로써 면역 반응을 향상시킨다고 생각되는 반면, 다른 항원보강제들은 그들 자체가 강력한 면역원성을 나타내고 상승작용적으로 작용한다고 생각된다.
- [0035] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "다가"는 동일한 종으로부터 유래된 하나 초과 항원(들)(즉, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 상이한 단리물들) 또는 상이한 종으로부터 유래된 하나 초과 항원(들)(즉, 파스테우렐라 헤몰라이티카 및 파스테우렐라 톨토시다 둘다의 단리물들)을 함유하는 백신, 또는 상이한 종으로부터 유래된 항원들의 조합물을 함유하는 백신(예를 들면, 파스테우렐라 톨토시다, 살모넬라, 에스케리키아 콜라이, 헤모필루스 솜너스(*Haemophilus somnus*) 및 클로스트리듐(*Clostridium*)으로부터 유래된 항원들을 포함하는 백신)을 의미한다.
- [0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "돼지" 또는 "새끼돼지"는 돼지와 유래의 동물을 의미하는 반면, "암돼지(sow)"는 생식 연령의 가임 암컷을 지칭한다. "미경산돈(gilt)"은 임신한 경험이 없는 암컷 돼지이다.
- [0037] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "병독성"은 동물 숙주에서 감염성을 나타내는 그의 능력을 유지하는 단리물을 의미한다.
- [0038] "불활성화된 백신"은 더 이상 복제 또는 생장을 할 수 없는 감염성 유기체 또는 병원체를 함유하는 백신 조성물을 의미한다. 상기 병원체는 세균, 바이러스, 원생동물 또는 진균 유래의 병원체일 수 있다. 불활성화는 유기체의 면역원성을 유지하면서 유기체의 복제 또는 생장을 방해하기에 충분한 동결-해동, 화학적 처리(예를 들면, 티메로살 또는 포르말린을 사용한 처리), 초음파처리, 방사선, 열 또는 임의의 다른 통상적인 수단을 포함하는 다양한 방법들에 의해 달성될 수 있다.
- [0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변이체"는 상응하는 폴리펩티드가 야생형 폴리펩티드에 비해 실질적으로 동

등한 기능을 갖도록 하나 이상의 보존적 아미노산 변경 또는 다른 소수의 변경을 갖는 폴리펩티드 또는 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 지칭한다.

[0040] "보존적 변경"은 한 아미노산 잔기가 또 다른 생물학적으로 유사한 잔기로 치환되는 것, 또는 코딩된 아미노산 잔기가 변하지 않거나 또 다른 생물학적으로 유사한 잔기이도록 핵산 서열에서 뉴클레오티드를 치환시키는 것을 의미한다. 보존적 변경의 예에는 또 다른 소수성 잔기에 의한 한 소수성 잔기, 예컨대, 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 치환, 또는 한 극성 잔기의 치환, 예컨대, 라이신에 의한 아르기닌의 치환, 아스파르트산에 의한 글루탐산의 치환 또는 아스파라긴에 의한 글루타민의 치환 등이 포함된다. 용어 "보존적 변경"은 비치환된 모 아미노산 대신에 치환된 아미노산의 사용도 포함하되, 치환된 폴리펩티드에 대해 발생된 항체는 비치환된 폴리펩티드와도 면역반응한다.

[0041] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용가능한 담체" 및 "약학적으로 허용가능한 비히클"은 상호교환가능하고, 부작용 없이 숙주 내로 주입될 수 있는 백신 항원을 함유하기 위한 유체 비히클을 지칭한다. 당분야에서 공지되어 있는 적합한 약학적으로 허용가능한 담체는 멸균수, 식염수, 글루코스, 텍스트로스 또는 완충된 용액을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 담체는 희석제, 안정화제(즉, 당 및 아미노산), 보존제, 습윤화제, 유화제, pH 완충제, 점도 향상 첨가제, 색소 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 보조제를 포함할 수 있다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "백신 조성물"은 숙주에서 면역 반응을 유도하는 데에 유용한 약학적으로 허용가능한 비히클 중의 하나 이상의 항원 또는 면역원을 포함한다. 백신 조성물은 수용 동물의 연령, 성별, 체중, 종 및 상태, 및 투여 경로와 같은 인자를 고려하여 의학 또는 수의학 분야에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있는 용량 및 기법으로 투여될 수 있다. 투여 경로는 피부를 통한 투여, 점막을 통한 투여(예를 들면, 경구, 코, 항문, 질), 또는 비경구 경로를 통한 투여(피내, 경피, 근육내, 피하, 정맥내 또는 복강내)일 수 있다. 백신 조성물은 단독으로 투여될 수 있거나, 다른 치료 또는 요법과 함께 투여될 수 있거나 순차적으로 투여될 수 있다. 투여 제형은 현탁액, 시럽 또는 엘릭시르, 및 비경구, 피하, 피내, 근육내 또는 정맥내 투여(예를 들면, 주사 투여)용 제제, 예컨대, 멸균 현탁액 또는 유화액을 포함할 수 있다. 백신 조성물은 음식물 및/또는 물 중의 분무제 또는 혼합물로서 투여될 수 있거나, 적합한 담체, 희석제 또는 부형제, 예컨대, 멸균수, 생리식염수, 글루코스 등과 혼합된 상태로 전달될 수 있다. 상기 조성물은 원하는 투여 경로 및 제제에 따라 보조제, 예컨대, 습윤화제, 유화제, pH 완충제, 항원보강제, 겔화 또는 점도 향상 첨가제, 보존제, 방항제, 색소 등을 함유할 수 있다. 과도한 실험 없이 적합한 제제를 제조하기 위해 표준 약학 교재, 예컨대, 문헌("Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990)을 참조할 수 있다.

[0043] "북아메리카 PRRS 바이러스"는 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물, 예컨대, 약 1990년대 초반에 미국에서 처음 단리된 PRRS 바이러스(예를 들면, 문헌(Collins, J. E., et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126) 참조); 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물 MN-1b(문헌(Kwang, J. et al., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296)); PRRS 바이러스의 퀵백 LAF-exp91 균주(문헌(Mardassi, H. et al., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418)); 및 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물 VR2385(문헌(Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801))(그러나, 이들로 한정되지 않음)와 관련된 유전적 특징을 갖는 임의의 PRRS 바이러스를 의미한다. 북아메리카 PRRS 바이러스 균주의 추가 예는 본원에 기재되어 있다. 유전적 특징은 북아메리카 PRRS 바이러스 균주들에 의해 공유된 게놈 뉴클레오티드 서열 유사성 및 아미노산 서열 유사성을 의미한다. 중국 PRRS 바이러스 균주는 일반적으로 북아메리카 균주에 대한 약 80% 내지 93% 뉴클레오티드 서열 유사성을 나타낸다.

[0044] "유럽 PRRS 바이러스"는 약 1991년에 유럽에서 처음 단리된 PRRS 바이러스(예를 들면, 문헌(Wensvoort, G., et al., 1991, Vet. Q. 13:121-130) 참조)와 관련된 유전적 특징을 갖는 PRRS 바이러스의 임의의 균주를 지칭한다. "유럽 PRRS 바이러스"는 종종 당분야에서 "렐리스타드(Lelystad) 바이러스"로서도 지칭된다. 유럽 PRRS 바이러스 균주의 추가 예는 본원에 기재되어 있다.

[0045] 유전적으로 변경된 바이러스는 이 바이러스가 그의 비-변경된 모균주보다 더 낮은 병독성을 갖는 경우 "약독화"되어 있다. 균주는 이 균주가 질환 중증도를 결정하는 하나 이상의 파라미터의 통계적으로 유의한 감소를 보이는 경우 "보다 낮은 병독성"을 갖는다. 이러한 파라미터는 바이러스혈증의 수준, 발열, 호흡 곤란의 중증도, 생식 증상의 중증도, 또는 폐 병변의 수 또는 중증도 등을 포함할 수 있다.

[0046] "감염성 클론"은 실험실에서 특이적으로 및 고의적으로 변경된 후 살아있는 유전적으로 변경된 유기체를 재생성하는 데에 사용될 수 있는 병인체(예를 들면, 바이러스)의 단리된 또는 클로닝된 게놈이다. 감염성 클론으로부터 생성된 유전적으로 변경된 생바이러스는 바이러스 생백신에서 사용될 수 있다. 대안적으로, 불활성화된 바

이러스 백신은 감염성 클론으로부터 유래된 생바이러스를 불활성화제, 예컨대, 포르말린 또는 소수성 용매, 산 등으로 처리하거나, 자외선 광 또는 X-선으로 조사하거나, 가열함으로써 제조될 수 있다.

[0047] 모든 현재 사용가능한 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신은 사멸된 전체 세포 마이코플라즈마 제제(박테린)로부터 만들어진다. 대조적으로, 본 발명은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분을 사용하는데, 이때 상기 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 (i) IgG 및 (ii) 면역글로불린에 결합된 항원으로 구성된 면역복합체 둘다를 실질적으로 갖지 않는다.

[0048] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아는 외재성 스테롤 및 지방산을 절대적으로 요구한다. 이들 요구는 일반적으로 혈청 함유 배지, 예컨대, 돼지 혈청에서의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 생장을 필요로 한다. (예를 들면, 원심분리, 여과 또는 침전에 의한) 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분으로부터의 불용성 물질의 분리는 돼지 IgG 또는 면역복합체를 제거하지 않는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 배양물 상청액에 함유된 IgG 및 면역복합체를 실질적으로 제거하기 위해 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 부분을 단백질 A 또는 단백질 G로 처리한다. 이 실시양태에서, 단백질 A 처리는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 발효 후 일어나는 것으로 생각된다. 이것은 대안적으로 본원에서 다운스트림 단백질 A 처리로서도 치칭된다. 또 다른 실시양태에서, 생장 배지의 업스트림(즉, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 발효 전) 단백질 A 처리가 사용될 수 있다. 단백질 A는 IgG의 Fc 부분에 결합한다. 단백질 G는 IgG의 Fc 부분에 우선적으로 결합하지만, Fab 영역에도 결합할 수 있다. 미정제 단백질 혼합물, 예컨대, 조직 배양물 상청액, 혈청 및 복수액으로부터 총 IgG를 정제/제거하는 방법은 당분야에서 공지되어 있다.

[0049] 일부 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 하나 이상의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원을 포함한다. 다른 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 2개 이상의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원을 포함한다.

[0050] 한 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 상청액 분획은 하기 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 특이적 단백질 항원들 중 하나 이상의 단백질 항원을 포함한다: 대략 46 kD 분자량의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질(p46), 대략 64 kD 분자량의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질(p64) 및 대략 97 kD 분자량의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질(p97). 또 다른 실시양태에서, 상청액 분획은 적어도 p46 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원, p64 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원 및 p97 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 항원을 포함한다. 대략 64 kD의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질(p64)은 대안적으로 본원에서 문헌(Kim et al., Infect. Immun. 58(8):2637-2643 (1990)) 및 미국 특허 제5,788,962호에 기재된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아로부터의 p65 표면 항원으로서 지칭될 수 있다.

[0051] 푸토(Futo)와 그의 동료들은 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아로부터의 46 kD 표면 단백질의 클로닝 및 특징규명을 기재하였다(문헌(J. Bact 177: 1915-1917 (1995))). 한 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물 상청액은 P-5722 균주로부터의 상응하는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 각각 서열번호 1 및 2에 기재되어 있는 p46을 포함한다. 이러한 p46 서열들의 변이체들도 후술되어 있는 바와 같이 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다고 생각된다.

[0052] 장(Zhang)과 그의 동료들은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 p97 어드헤신(adhesin) 단백질을 기재하고 특징규명하였다(문헌(Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995)). 추가로, 킹(King)과 그의 동료들은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 P-5722 균주로부터의 Mhp1로서 명명된 124 kD 단백질을 기재하고, Mhp1과 p97이 동일한 단백질이라는 것을 암시하는 데이터를 제시하였다(문헌(Vaccine 15:25-35 (1997))). 이러한 p97 단백질은 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물 상청액은 P-5722 균주로부터의 상응하는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 각각 서열번호 3 및 4에 기재되어 있는 p97을 포함한다. 이러한 p97 서열들의 변이체들도 후술되어 있는 바와 같이 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다고 생각된다.

[0053] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물 상청액은 추가 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 특이적 단백질 항원, 예컨대, 대략 41 kD의 단백질(p41), 42 kD의 단백질(p42), 89 kD의 단백질(p89) 및 65 kD의 단백질(p65)(그러나, 이들로 한정되지 않음)을 포함할 수 있다. 문헌(Okada et al., 2000, J. Vet. Med. B 47:527-533) 및 문헌(Kim et al., 1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643)을 참조한다. 추가로, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물 상청액은 대략 102 kD의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 특이적 단백질 항원(p102) 및 216 kD의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 특이적 단백질 항원(p216)을 포함할 수 있다. 미국 특허 제6,162,435호 및 제7,419,806호(Minnion et al.)를 참조한다.

- [0054] 임의의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 균주가 본 발명의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분을 제조하기 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 적합한 균주는 수탁기관, 예컨대, 어메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)(미국 버지니아주 마나사스 소재) 및 NRRL 컬처 콜렉션(미국 농무부 농업연구서비스, 미국 일리노이주 페오리아 소재)을 비롯한 상업적 또는 학술적 공급처로부터 입수될 수 있다. ATCC만이 판매를 위한 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 하기 6개 균주들을 나열한다: 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 ATCC 25095, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 ATCC 25617, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 ATCC 25934, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 ATCC 27714, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 ATCC 27715 및 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 ATCC 25934D. 본 발명의 실시양태에서 사용되기에 바람직한 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 균주는 미국 특허상표청에 의해 요구된 접근성 규칙에 따라 1990년 5월 30일자로 기탁된 균주 P-5722-3(ATCC #55052)로서 확인된다. 질환의 광범위한 전염에 비추어 볼 때, 균주는 돼지에서 마이코플라즈마 폐렴을 야기하는 공지된 균주로 감염된 돼지의 폐 분비물 또는 조직으로부터 마이코플라즈마 하이요뉴모니아를 회수함으로써 취득될 수도 있다.
- [0055] 당업자는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 서열의 변이체가 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다는 것을 이해한다. 이러한 변이체는 서열 동일성 면에서 10% 내지 20%만큼 상이할 수 있고 그를 면역원성 조성물에서 유용하게 만드는 항원성 특징을 여전히 보유할 수 있다. 바람직하게는, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 변이체는 야생형 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 균주의 전장 게놈 서열에 대한 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 면역학적 조성물의 항원성 특징은 예를 들면, 실시예에서 제공된 캘린지 실험에 의해 평가될 수 있다. 나아가, 변형된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원의 항원성 특징은 변형된 항원이 야생형 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질에 비해 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 보호 면역을 부여할 때 여전히 보유되어 있다.
- [0056] 한 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 p46 항원은 약 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 바람직하게는 약 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 본 발명의 조성물에 포함된다. p46이 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능 시험을 위해 사용된 단백질이라는 것을 주목한다(예를 들면, 하기 실시예 단락 참조). 또 다른 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 배양물 단백질 A-처리된 상청액의 약 5.5% 내지 약 35%의 최종 양으로 조성물에 포함될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 제제는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 대한 안전성 및 효능 둘다를 갖고 단회 용량 투여에 적합하다. 또한, 본 출원인은 놀랍게도 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 제제가 항원들 사이의 면역학적 간섭 없이 다른 병원체로부터의 항원과 효과적으로 조합될 수 있다는 것을 발견하였다. 이것은 본 발명의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 제제가 다가 백신을 위한 효과적인 플랫폼이 되게 한다. 추가 항원은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조성물과 동시에(즉, 별도의 단일 백신으로서) 제공될 수 있거나, 사용 준비된 백신에서 조합될 수 있다.
- [0058] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 항원 및 하나 이상의 추가 항원을 포함한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 추가 항원은 돼지에서 질환을 야기할 수 있는 미생물로부터 보호한다.
- [0059] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 항원 성분은 돼지를 감염시키는 것으로 공지되어 있는 세균, 바이러스 또는 원생동물로부터 보호한다. 이러한 미생물의 예에는 하기 미생물들이 포함되나 이들로 한정되지 않는다: 돼지 서코바이러스 2형(PCV2), 돼지 생식 및 호흡 증후군 바이러스(PRRSV), 돼지 파코바이러스(PPV), 헤모필루스 파라수이스, 파스테우렐라 물토시다, 스트렙토코커스 수이스, 스태필로코커스 하이이커스, 악티노바실러스 플레우로뉴모니아, 보르데텔라 브론키셉티카, 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 엔테리티디스, 에리시펠로쓰릭스 루시오페시아, 마이코플라즈마 하이요리니스, 마이코플라즈마 하이요사이노비아, 랩토스피라 세균, 로우소니아 인트라셀룰라리스, 돼지 인플루엔자 바이러스(SIV), 에스케리키아 콜라이 항원, 브라키스피라 하이오다이센테리아, 돼지 호흡 코로나바이러스, 돼지 유행성 설사(PED) 바이러스, 로타바이러스, 토크 테노 바이러스(TTV), 돼지 사이토메갈로바이러스, 돼지 엔테로바이러스, 뇌심근염 바이러스, 오우체스카이병의 원인 병원체, 고전적인 돼지 열병(CSF) 및 돼지 전염성 위장염의 원인 병원체, 또는 이들의 조합물.
- [0060] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상(예를 들면, 2개 이상)의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 항원과 PCV2 항원의 조합물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 돼지에서 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 및 PCV2 둘다에 대한 보호 면역 반응을 이끌어낸다.
- [0061] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합 백신은 단회 용량의 사용 준비된

1-병 백신으로서 제공된다. 이러한 사용 준비된 조합 백신은 별도의 백신들의 혼합을 요구하지 않으므로, 혼합과 관련된 오염의 위험 또는 추가 노동력이 없고 수시간 이내에 혼합물을 사용해야 한다는 요건이 없다. 또한, 1-병 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합 백신은 폐기물 및 냉장고 저장 공간을 절반으로 줄인다. 더욱이, 단위 용량 투여는 제2용량을 포유동물에게 투여하는 것과 관련된 노동력을 제거한다. PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조합 백신들이 현재 존재하지만, 이들이 2회 용량의 사용 준비된 백신(서큐먼트(Circumvent)[®] PCVM), 또는 별도의 백신들의 동시적인 투여를 요구하는 단위 용량의 2병 백신(예를 들면, 인겔백 서코플렉스(Ingelvac CircoFLEX)[®] 및 인겔백 마이코플렉스(Ingelvac MycoFLEX)[®])으로서 제공된다는 것을 주목한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합물은 다른 항원, 예컨대, PRRS 바이러스 항원과 상용가능할 것이므로, 모든 항원들이 단위 용량으로 투여될 수 있다.

[0062] 일부 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합 백신의 PCV2 항원 성분은 키메라 1형-2형 서코바이러스의 형태로 존재한다. 상기 키메라 바이러스는 돼지 서코바이러스 2형 ORF2 단백질을 발현하는 불활성화된 재조합 돼지 서코바이러스 1형을 포함한다. 키메라 돼지 서코바이러스 및 이의 제조 방법은 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 03/049703 A2호, 및 미국 특허 제7,279,166호 및 제7,575,752호에 기재되어 있다.

[0063] 한 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스의 게놈의 전장 DNA 서열은 후술되어 있는 바와 같이 서열번호 5 또는 이의 변이체에 상응한다. 또 다른 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스의 면역원성 ORF2 캡시드 유전자는 서열번호 6에 상응한다. 추가 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스에 의해 발현된 면역원성 ORF2 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 7에 상응한다.

[0064] 또 다른 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스의 게놈의 전장 DNA 서열은 서열번호 8에 상응한다. 한 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스의 면역원성 ORF2 캡시드 유전자는 서열번호 9에 상응한다. 추가 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스에 의해 발현된 면역원성 ORF2 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 10에 상응한다.

[0065] 그러나, 키메라 PCV1-2 바이러스의 PCV2 ORF2 DNA 및 단백질은 PCV2 ORF2 DNA 및 단백질이 PCV2 단리물 내의 고도로 보존된 도메인이기 때문에 전술된 서열들로 한정되지 않는다.

[0066] 일부 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합 백신의 PCV2 항원 성분은 재조합 ORF2 단백질의 형태로 존재한다. 한 실시양태에서, 재조합 ORF2 단백질은 바쿨로바이러스 벡터로부터 발현된다. 대안적으로, 다른 공지된 발현 벡터, 예컨대, 파라폭스(parapox) 벡터(그러나, 이것으로 한정되지 않음)가 사용될 수 있다.

[0067] 한 실시양태에서, 재조합 PCV2 ORF2 단백질은 서열번호 12(진뱅크 접수번호 AF086834)에 의해 코딩된 서열번호 11의 단백질이다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 ORF2 단백질은 서열번호 14에 의해 코딩된 서열번호 13의 단백질이다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 ORF2 단백질은 서열번호 15에 상응한다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 PCV2 ORF2 단백질은 서열번호 17에 상응한다. 추가 실시양태에서, 재조합 PCV2 ORF2 단백질은 서열번호 10에 상응한다.

[0068] 그러나, 본 발명은 전술된 특정 ORF2 DNA 및 단백질 서열들로 한정되지 않는다. PCV2 ORF2 DNA 및 단백질이 PCV2 단리물 내의 고도로 보존된 도메인이기 때문에, 임의의 PCV2 ORF2가 키메라 PCV1-2 바이러스 또는 재조합 PCV2 단백질에서 사용될 때 PCV2 ORF2 DNA 및/또는 폴리펩티드의 공급원으로서 효과적인 가능성이 매우 높다.

[0069] PCV2 ORF2 DNA 및 단백질 서열의 기원이 될 수 있는 적합한 PCV2 단리물의 한 예는 PCV2 단리물 번호 40895(2001년 12월 7일자로 ATCC에 기탁되어 ATCC 특허 기탁번호 PTA-3914를 배정받았음)이다. PCV2 단리물 번호 40895의 게놈(뉴클레오티드) 서열은 진뱅크 접수번호 AF264042 하에서 입수가 가능하다. PCV2 ORF2 DNA 및 단백질 서열의 기원이 될 수 있는 적합한 PCV2 단리물의 다른 예에는 하기 단리물들이 포함될 수 있으나 이들로 한정되지 않는다: Imp.999, Imp.1010-Stoon, Imp.1011-48121 및 Imp.1011-48285. 이들 PCV2 단리물들에 상응하는 게놈 서열의 진뱅크 접수번호는 각각 AF055391, AF055392, AF055393 및 AF055394이다.

[0070] 일부 형태들에서, PCV2 ORF2 단백질의 면역원성 부분은 조성물에서 항원성 성분으로서 사용된다. 예를 들면, PCV2 ORF2 단백질의 절두된 및/또는 치환된 형태는 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다.

[0071] 당업자는 PCV2 서열의 변이체가 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다는 것을 이해한다. 이러한 변이체는 서열 동일성 면에서 10% 내지 20%만큼 상이할 수 있으나, 이 변이체를 면역원성 조성물에서 유용하게 만드는 항원성 특징을 여전히 보유한다. 바람직하게는, PCV2 변이체는 야생형 PCV2 단리물의 전장 게놈 서열에 대한 80%

이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 면역학적 조성물의 항원성 특징은 예를 들면, 실시예에서 제공된 챌린지 실험에 의해 평가될 수 있다. 변경된 PCV2 항원의 항원성 특징은 변경된 항원이 야생형 PCV2 ORF2 단백질에 비해 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 보호 면역을 부여할 때 여전히 보유되어 있다.

[0072] PCV2 항원 성분은 원하는 면역 반응을 유도하는 데에, 즉 PCV2 감염으로부터 비롯된 임상 증상의 발생률을 감소 시키거나 이러한 임상 증상의 중증도를 경감시키는 데에 효과적인 항원 포함 수준으로 면역원성 조성물 내에 제공된다.

[0073] 한 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스는 적어도 $1.0 \leq RP \leq 5.0$ 의 수준으로 본 발명의 조성물에 포함되는데, 이때 RP는 기준 백신에 비해 ELISA 항원 정량(시험관내 효능 시험)에 의해 측정된 상대적 효능 단위이다. 또 다른 실시양태에서, 키메라 PCV1-2 바이러스는 약 0.5% 내지 약 5%의 20배(20X) 농축된 벌크 PCV1-2 항원의 최종 농도로 본 발명의 조성물에 포함된다.

[0074] 또 다른 실시양태에서, PCV2 ORF2 재조합 단백질은 최종 면역원성 조성물 ml 당 적어도 0.2 μg 항원($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 수준으로 본 발명의 조성물에 포함된다. 추가 실시양태에서, PCV2 ORF2 재조합 단백질 포함 수준은 약 0.2 내지 약 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, PCV2 ORF2 재조합 단백질 포함 수준은 약 0.3 내지 약 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. 추가 실시양태에서, PCV2 ORF2 재조합 단백질 포함 수준은 약 0.35 내지 약 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, PCV2 ORF2 재조합 단백질 포함 수준은 약 0.4 내지 약 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다.

[0075] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상(예를 들면, 2개 이상)의 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 가용성 항원, 돼지 서코바이러스 2형(PCV2) 및 PRRS 바이러스 항원의 조합물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 돼지에서 마이코플라즈마 하이에뉴모니아, PCV2 및 PRRS 바이러스에 대한 보호 면역 반응을 이끌어낸다.

[0076] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 마이코플라즈마 하이에뉴모니아/PCV2/PRRS 조합 백신은 단위 용량의 2-병 백신으로서 제공된다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이에뉴모니아/PCV2 조합물이 제1병 내의 안정한 액체 조성물로서 제공되고, PRRS 바이러스가 제2병 내의 동결건조된 상태로 제공된다. 일부 실시양태에서, 추가 돼지 항원이 제1병 또는 제2병에 첨가될 수 있다.

[0077] 한 실시양태에서, PRRS 바이러스 성분은 동결건조된 유전적으로 변경된 생바이러스로서 제공된다. 투여 전, 모든 3개의 항원들이 단위 용량으로 동물에게 투여될 수 있도록 제1병으로부터의 마이코플라즈마 하이에뉴모니아/PCV2 액체는 제2병 내의 PRRS 바이러스를 재수화시키는 데에 사용될 수 있다. PCV2/마이코플라즈마 하이에뉴모니아/PRRS 조합 백신들이 현재 존재하지만, 이들은 3개의 별도의 백신들(예를 들면, 인겔백 서코플렉스®, 인겔백 마이코플렉스® 및 인겔백® PRRS MLV)의 동시적인 투여를 요구하는 단위 용량의 3-병 백신으로서 제공된다는 것을 주목한다.

[0078] PRRS 병원체는 네덜란드에서 처음으로 단리되었고 렐리스타드 바이러스로서 명명되었다. 이 바이러스는 국제 특허출원 공개 제WO 92/21375호(Stichting Centraal Diegeneeskundig Instituut)에 기재되었다. 유럽 PRRS 바이러스의 단리물은 기탁번호 I-1102 하에 파리 파스퇴르 연구소에 기탁되었다. 북아메리카 유형은 유럽 유형 바이러스의 단리와 거의 동시에 단리되었고, 국제 특허출원 공개 제WO 93/03760호(Collins et al.)에 기재되어 있다. 북아메리카 유형 바이러스의 단리물은 기탁번호 VR2332 하에 어메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)에 기탁되었다.

[0079] 상이한 균주들이 유럽 바이러스 유형 및 북아메리카 바이러스 유형 둘다로부터 단리되었다. 국제 특허출원 공개 제WO 93/07898호(Akzo)에는 기탁번호 I-1140 하에 CNCM(파스퇴르 연구소)에 기탁된 유럽 균주, 및 이로부터 유래된 백신이 기재되어 있다. 또한, 국제 특허출원 공개 제WO 93/14196호(Rhone-Merieux)에는 프랑스에서 단리되어 기탁번호 I-1153 하에 CNCM(파스퇴르 연구소)에 기탁된 신규 균주가 기재되어 있다. 나아가, 유럽 특허 제0595436 B1호(Solvay)에는 가장 먼저 기재된 균주보다 더 높은 병독성을 갖는 신규 북아메리카 유형 균주 및 이의 백신이 기재되어 있다. 이 균주는 ATCC에 기탁되었지만, 기탁번호는 특허출원에 상세히 기재되어 있지 않다. 또한, 스페인 특허 제2074950 BA호(Cyanamid Iberica) 및 이의 대응특허인 영국 특허 제2282811 B2호에는 다른 유럽 균주 및 북아메리카 균주와 상이한 소위 "스페인 균주"가 기재되어 있다. 이 "스페인 균주"는 기탁번호 V93070108 하에 유로피언 애니멀 셀 컬처 콜렉션(EACCC)에 기탁되었다.

[0080] 본 발명의 마이코플라즈마 하이에뉴모니아/PCV2/PRRS 조성물에서 사용되기에 적합한 PRRS 바이러스 항원은 북아

메리카 PRRS 바이러스 단리물, 중국 PRRS 바이러스 단리물 및 유럽 PRRS 바이러스 균주뿐만 아니라, 이러한 단리물들/균주들의 유전적으로 변경된 버전도 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물에서 사용되는 PRRS 바이러스 항원 성분은 북아메리카 PRRS 바이러스이다.

- [0081] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물에서 사용되는 PRRS 바이러스 항원 성분은 P129로서 명명된 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물 또는 이의 살아있는 유전적으로 변경된 버전이다. 바람직하게는, 유전적으로 변경된 PRRS 바이러스는 병원성 감염을 야기할 수 없지만, 야생형 PRRS 바이러스에 의한 감염에 대한 효과적인 면역보호 반응을 이끌어낼 수 있다.
- [0082] 본 발명의 조성물에서 사용되는 유전적으로 변경된 PRRS 바이러스는 감염성 클론으로부터 생성될 수 있다. P129로서 명명된 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물의 감염성 cDNA 클론의 제조는 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,500,662호에 기재되어 있다. P129 cDNA의 서열은 진뱅크 접수번호 AF494042 및 미국 특허 제6,500,662호에 개시되어 있다.
- [0083] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물에서 사용되는 P129의 비-병독성 형태의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 16으로 표시된다. 그러나, 본 발명은 이 서열로 한정되지 않는다. 이 서열 및 P129의 다른 비-병독성 형태의 서열은 2011년 11월 9일자로 출원된 국제 특허출원 제PCT/IB2011/055003호(이의 내용(이 국제 특허출원에 근거한 임의의 미국 국내 단계 출원들을 포함함)은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다. 바람직하게는, PRRS 바이러스는 인터페론 매개 기능의 하향조절을 방지하도록 변경된다.
- [0084] 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물에서 사용되는 PRRS 바이러스 항원 성분은 ISU-55로서 명명된 PRRS 바이러스 단리물이다. ISU-55 단리물은 기탁번호 VR2430 하에 어메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)에 기탁되었다. ISU-55 단리물의 ORF2 내지 ORF5의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 17로 표시된다. ISU-55 단리물의 ORF6 및 ORF7의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 18로 표시된다.
- [0085] 상기 조성물에서 사용될 수 있는 또 다른 적합한 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물은 기탁번호 VR2385[3 x 정제된 플라크] 및 VR2386[정제된 비-플라크] 하에 ATCC에 기탁된 ISU-12이다. 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있는 다른 적합한 북아메리카 PRRS 바이러스 단리물은 다음과 같다: 각각 기탁번호 VR2498, VR2431, VR2475, VR2429 및 VR2474 하에 ATCC에 기탁된 ISU-51, ISU-3927, ISU-1894, ISU-22 및 ISU-79. 이들 ISU 단리물들 중 임의의 ISU 단리물의 유전적으로 변경된 버전이 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다. 이들 ISU 단리물들 및 ISU-55 단리물은 하기 미국 특허들(Paul et al.)에 상세히 기재되어 있다: 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,695,766호, 제6,110,467호, 제6,251,397호, 제6,251,404호, 제6,380,376호, 제6,592,873호, 제6,773,908호, 제6,977,078호, 제7,223,854호, 제7,264,802호, 제7,264,957호 및 제7,517,976호.
- [0086] 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물에서 사용되는 PRRS 바이러스 항원 성분은 기탁번호 VR2332 하에 어메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)에 기탁된 북아메리카 유형 또는 이의 유전적으로 변경된 버전이다. 예를 들면, PRRS 바이러스는 보링거 인겔하임 베크메디카 인코포레이티드(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.)의 인겔백® PRRS ATP 및 인겔백® PRRS MLV에서 사용되는 ATCC VR2332로서 확인된 단리물에 근거한 변경된 생바이러스일 수 있다.
- [0087] 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물에서 사용되는 PRRS 바이러스 항원 성분은 유럽 PRRS 바이러스 단리물 또는 렐리스타드 바이러스, 또는 이의 유전적으로 변경된 버전이다. 적합한 PRRS 바이러스 균주의 한 예는 전술된 기탁번호 I-1102로서 확인된다. I-1102 기탁물에 상응하는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,620,691호(Wensvoort et al.)에 기재되어 있다. 유럽 PRRS 바이러스 단리물 또는 렐리스타드 바이러스의 감염성 클론의 제조는 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,268,199호에 기재되어 있다.
- [0088] 적합한 PRRS 바이러스 단리물의 다른 예에는 전술된 단리물들이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 또한, PRRS 바이러스 단리물의 살아있는 유전적으로 변경된 버전도 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다. 감염성 클론은 이러한 살아있는 유전적으로 변경된 유기체를 재생성하는 데에 사용될 수 있다.
- [0089] 당업자는 PRRS 바이러스 서열의 변이체가 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다는 것을 이해한다. 이러한 변이체는 서열 동일성 면에서 10% 내지 20%만큼 상이할 수 있고, 이러한 변이체를 면역원성 조성물에서 유용하게 만드는 항원성 특징을 여전히 보유한다. 바람직하게는, PRRS 바이러스 변이체는 야생형 PRRS 바이러스 단리물의 전장 게놈 서열에 대한 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 면역학적 조성물의 항원성 성질은 예를 들면, 켈린지 실험에 의해 평가될

수 있다. 나아가, 변경된 PRRS 바이러스 항원의 항원성 성질은 변경된 항원이 야생형 PRRS 바이러스 항원에 비해 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 보호 면역을 부여할 때 여전히 보유되어 있다.

[0090] 한 실시양태에서, PRRS 바이러스 항원 성분은 적어도 $2.1 \leq \text{TCID}_{50} \leq 5.2$ 의 수준으로 본 발명의 조성물에 포함되는 유전적으로 변경된 생바이러스이고, 이때 TCID_{50} 은 항원 정량(시험관내 효능 시험)에 의해 측정된 조직 배양 감염 용량 50%이다.

[0091] 본 발명의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2/PRRS 조성물의 PCV2 항원 성분은 돼지 서코바이러스 2형 ORF2 단백질을 발현하는 불활성화된 재조합 돼지 서코바이러스 1형을 포함하는 키메라 바이러스인 키메라 1형-2형 서코바이러스의 형태로 존재할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2/PRRS 조성물의 PCV2 항원 성분은 재조합 ORF2 단백질의 형태로 존재한다.

[0092] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2/PRRS 조성물에서 사용되기에 적합한 PCV2 항원은 전술된 PCV2 단리물들 중 임의의 PCV2 단리물뿐만 아니라 다른 PCV2 단리물로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 조성물에서 사용되기에 적합한 PCV2 항원은 전술된 PCV2 서열들 및 이들의 변이체들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0093] 본 발명의 백신은 (적용가능한 경우) 인간을 비롯한 동물에 대한 허용가능한 담체, 예컨대, 표준 완충제, 안정화제, 희석제, 보존제 및/또는 가용화제를 포함하도록 승인된 약정에 따라 제제화될 수 있고, 지속 방출을 용이하게 하도록 제제화될 수도 있다. 희석제는 물, 식염수, 텍스트로스, 에탄올, 글리세롤 등을 포함한다. 등장성용 첨가제는 특히 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스를 포함한다. 안정화제는 특히 알부민을 포함한다. 변경된 생백신을 제제화하는 데에 특히 유용한 백신 비히클 및 첨가제를 비롯한 다른 적합한 백신 비히클 및 첨가제는 당업자에게 공지되어 있거나 자명할 것이다. 예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing)을 참조한다.

[0094] 본 발명의 백신은 특히 하나 이상의 추가 면역조질 성분, 예컨대, 항원보강제 또는 사이토카인을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에서 사용되기에 적합한 항원보강제의 종류는 하기 항원보강제들을 포함한다: 수중 유 항원보강제, 중합체 및 물 항원보강제, 유중수 항원보강제, 수산화알루미늄 항원보강제, 비타민 E 항원보강제 및 이들의 조합물. 항원보강제의 일부 구체적인 예에는 하기 항원보강제들이 포함되나 이들로 한정되지 않는다: 완전 프로인트 항원보강제, 불완전 프로인트 항원보강제, 코리네박테리움 파뮴(*Corynebacterium parvum*), 바실러스 칼메트 구에린(Calmette Guérin), 수산화알루미늄 겔, 글루칸, 텍스트란 셀레이트, 산화철, 알긴산나트륨, 박토-항원보강제, 특정 합성 중합체, 예컨대, 폴리아미노산 및 아미노산들의 공중합체, 블록 공중합체(사이트알렉스(CytRx), 미국 조지아주 아틀란타 소재), QS-21(캠브리지 바이오텍 인코포레이티드(Cambridge Biotech Inc.), 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재), SAF-M(키론(Chiron), 미국 캘리포니아주 에머리빌 소재), 암피젠(AMPHIGEN)[®] 항원보강제, 사포닌, 퀴(Quil) A 또는 다른 사포닌 분획, 모노포스포릴 지질 A 및 애브리딘 지질-아민 항원보강제(N,N-다이옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판다이아민), "레그레신(REGRESSIN)"(베트레팜(Vetrepharm), 미국 조지아주 아텐스 소재), 파라핀유, RIBI 항원보강제 시스템(리비 인코포레이티드(Ribi Inc.), 미국 몬타나주 해밀턴 소재), 뮤라밀 다이펩티드 등.

[0095] 본 발명의 백신에서 유용한 수중유 유화액의 비-한정적 예에는 변경된 SEAM62 및 SEAM 1/2 제제가 포함된다. 변경된 SEAM62는 5%(부피/부피) 스쿠알렌(시그마(Sigma)), 1%(부피/부피) SPAN[®] 85 세제(아이씨아이 서팩탄츠(ICI Surfactants)), 0.7%(부피/부피) 트윈[®] 80 세제(아이씨아이 서팩탄츠), 2.5%(부피/부피) 에탄올, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 쉘 A, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 콜레스테롤 및 0.5%(부피/부피) 레시틴을 함유하는 수중유 유화액이다. 변경된 SEAM 1/2은 5%(부피/부피) 스쿠알렌, 1%(부피/부피) SPAN[®] 85 세제, 0.7%(부피/부피) 트윈[®] 80 세제, 2.5%(부피/부피) 에탄올, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 쉘 A 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 콜레스테롤을 함유하는 수중유 유화액이다.

[0096] 본 발명의 조성물에서 유용한 항원보강제의 또 다른 예는 SP-오일이다. 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 용어 "SP-오일"은 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체, 스쿠알란, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 및 완충된 염 용액을 포함하는 오일 유화액을 의미한다. 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체는 고체 및 액체 성분을 현탁하는 데에 있어서 도움을 주는 계면활성제이다. 이들 계면활성제들은 상표명 플루로닉(Pluronic)[®] 하에 중합체로서 상업적으로 입수가능하다. 바람직한 계면활성제는 상표명 플루로닉[®] L-121 하에 상업적으로 입수가능한 플록사머 401이다. 일반적으로, SP-오일 유화액은 약 1% 내지

3%(부피/부피)의 블록 공중합체, 약 2% 내지 6%(부피/부피)의 스쿠알란, 보다 구체적으로 약 3% 내지 6%(부피/부피)의 스쿠알란 및 약 0.1% 내지 0.5%(부피/부피)의 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트를 포함할 면역 자극 항원보강제 혼합물이고, 이때 나머지는 완충된 염 용액이다. 한 실시양태에서, SP-오일 유화액은 약 1% 내지 25%, 바람직하게는 약 2% 내지 15%, 보다 바람직하게는 약 5% 내지 12%의 부피/부피 양으로 최종 조성물에 존재한다.

[0097] 본 발명의 조성물에서 사용되기에 적합한 항원보강제의 또 다른 예는 오일, 통상적으로 경질 액체 파라핀에 용해된 탈지된 레시틴으로 구성된 암피젠™ 항원보강제이다.

[0098] 본 발명의 조성물에서 유용한 항원보강제의 다른 예는 하기 전매특허 항원보강제들이다: 마이크로졸 다일루백 포르테(Microsol Diluvac Forte)® 이중 유화액 항원보강제 시스템, 에무나데(Emunade) 항원보강제 및 엑스솔브(Xsolve) 항원보강제. 에무나데 및 엑스솔브 항원보강제 둘다가 물 중의 경질 미네랄 오일로 구성된 유화액이지만, 에무나데는 알하이드로겔도 함유하고, d,l- α -토코페릴 아세테이트는 엑스솔브 항원보강제의 부분이다. 본 발명의 조성물에서 사용되기에 적합한 항원보강제의 추가 예는 임프란플렉스(ImpranFLEX)™ 항원보강제(유중수 항원보강제)이다. 적합한 항원보강제의 추가 예는 카보머(카보폴(Carbopol)®) 기재의 항원보강제이다. 바람직한 카보폴® 항원보강제는 카보폴® 934 중합체 및 카보폴® 941 중합체를 포함한다.

[0099] 한 실시양태에서, 항원보강제 및 항원보강제 혼합물은 용량 당 약 100 μ g 내지 약 10 mg의 양으로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 항원보강제/항원보강제 혼합물은 용량 당 약 200 μ g 내지 약 5 mg의 양으로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 항원보강제/항원보강제 혼합물은 용량 당 약 300 μ g 내지 약 1 mg의 양으로 첨가된다.

[0100] 항원보강제 또는 항원보강제 혼합물은 전형적으로 약 1% 내지 25%, 바람직하게는 약 2% 내지 15%, 보다 바람직하게는 약 5% 내지 12%의 부피/부피 양으로 본 발명의 백신 조성물에 존재한다.

[0101] 백신에 포함될 수 있는 다른 "면역조절제"는 예를 들면, 하나 이상의 인터류킨, 인터페론 또는 다른 공지된 사이토카인을 포함한다. 한 실시양태에서, 항원보강제는 사이클로텍스트린 유도체 또는 다가음이온성 중합체, 예컨대, 각각 미국 특허 제6,165,995호 및 제6,610,310호에 기재된 사이클로텍스트린 유도체 또는 다가음이온성 중합체일 수 있다.

[0102] 추가 양태는 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 i) 마이코플라즈마 하이요뉴모니아를 적합한 배지에서 18시간 내지 144시간에 걸쳐 배양하는 단계; ii) 후속적으로 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 배양물을 불활성화시키는 단계; iii) 가용성 액체 분획 및 불용성 세포 물질 둘다를 포함하는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제를 포함하는 불활성화된 배양액을 회수하는 단계; iv) 불용성 세포 물질로부터 가용성 액체 분획을 분리하는 단계; 및 v) 분리된 가용성 액체 분획으로부터 IgG 및 항원/면역글로불린 면역복합체 둘다를 실질적으로 제거하는 단계를 포함한다.

[0103] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아를 배양하기에 적합한 배지의 한 예는 영양 강화제로 보충되었을 때 마이코플라즈마를 단리하고 배양하는 데에 사용되는 PPLO 브로쓰(Broth)(마이코플라즈마 브로쓰 베이스)이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 배양물을 후기 대수기 성장까지 성장시킨 후, 배양물을 불활성화시킨다. 일부 다른 실시양태에서, pH를 (예를 들면, 약 7.8까지) 상승시켜 상기 배양물을 불활성화시킨다. 이것은 생산 배양물을 불활성화제, 예컨대, 이원 에틸렌아민(BEI)에 노출시킴으로써 일어난다. BEI는 생산 배양물에서 L-브로모에틸아민 하이드로브로마이드(BEA)의 항원처리 동안 제자리에서 발생된다. 그 후, 예컨대, 용액 내의 불활성화제를 중화하는 물질을 동등한 양으로 첨가함으로써 불활성화된 배양물의 pH를 중화한다. 일부 실시양태에서, 불활성화제는 BEI이고, 중화제는 나트륨 티오설파이트이다. 한 실시양태에서, 나트륨 티오설파이트를 첨가하여 불활성화된 배양물의 pH를 약 7.4로 조절한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 통상적인 방법을 이용하여 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 액체 분획을 불용성 세포 물질로부터 분리한다. 한 실시양태에서, 이 분리는 여과 단계에 의해 달성된다. 또 다른 실시양태에서, 이 분리는 원심분리 단계에 의해 달성된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 분리는 침전 단계에 의해 달성된다.

[0106] 한 실시양태에서, 불활성화되고 중화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 액체 분획을 단백질 A 수지로 처리하여 그의 내부에 존재하는 IgG 및 항원/면역글로불린 면역복합체 둘다를 실질적으로 제거한다. 다른 실시양태에서, 단백질 G 수지를 사용하여 가용성 액체 분획에 함유된 IgG 및 항원/면역글로불린 면역복합체 둘다를 실질적으로 제거한다. 단백질 A 또는 단백질 G를 사용하여 IgG 및 항원/면역글로불린 면역복

합체 둘다를 제거하는 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있다.

- [0107] 추가 양태에 따라, 본 발명에 따른 면역원성 조성물, 예컨대, 백신을 제조하는 방법은 전술된 가용성 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 제조하는 단계 및 이를 적합한 항원보강제 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함한다. 이 방법은 임의적으로 하나 이상의 추가 돼지 항원, 예컨대, 전술된 PCV2 항원 및/또는 PRRS 바이러스 항원을 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0108] 본 발명의 추가 양태는 키트에 관한 것이다. "키트"는 함께 분류되는 복수의 성분들을 지칭한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 키트는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 세포 제제의 가용성 부분을 포함하는 면역원성 조성물을 포함하는 병(또는 다른 적합한 용기)을 포함하는데, 이때 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분은 (i) IgG 및 (ii) 항원/면역글로불린 면역복합체 둘다를 실질적으로 갖지 않는다. 임의적으로, 키트는 설명 매뉴얼을 추가로 포함할 수 있다. 이 설명 매뉴얼은 면역원성 조성물의 투여에 대한 정보를 포함한다.
- [0109] 일부 실시양태에서, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제의 가용성 부분을 함유하는 병은 PCV2 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병 내의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합물은 사용 준비된 액체 조성물로서 제공된다.
- [0110] 다른 실시양태에서, 상기 키트는 PRRS 바이러스 항원을 포함하는 제2병을 포함한다. 일부 실시양태에서, PRRS 바이러스 항원은 동결건조된 상태로 제공되는 유전적으로 변경된 생바이러스의 형태로 존재한다. 이러한 경우, 설명 매뉴얼은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합물을 함유하는 병의 액체 내용물로 PRRS 바이러스 성분을 재수화시키라는 지시를 포함할 것이다. 상기 설명 매뉴얼은 발생된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2/PRRS 3가 제제(들)의 투여에 대한 정보도 포함할 것이다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아에 대한 모체 유래의 항체를 갖는 돼지에게 투여된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아, 및 돼지에서 질환을 야기할 수 있는 하나 이상의 다른 미생물 둘다에 대한 모체 유래의 항체를 갖는 돼지에게 투여된다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물, 예컨대, 1가 또는 다가 백신은 3주령 이상의 연령을 갖는 새끼 돼지에게 투여된다. 그러나, 본 발명에 따른 1가 또는 다가 백신 조성물은 번식 전 미경산돈을 재백신접종하는 데에 사용될 수도 있다는 것이 고려된다. 당분야에서 공지되어 있는 바와 같이, 미경산돈은 임신한 경험이 없는 암컷 돼지이다. 백신접종된 미경산돈은 초유를 통해 그들의 젖먹이 새끼에게 모체 유래의 항체를 전달할 것이다.
- [0113] 본 발명에 따른 1가 또는 다가 백신이 번식 돼지떼를 해마다 재백신접종하는 데에 사용될 수 있다는 것도 고려된다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 1가 또는 다가 백신은 단회 용량으로 돼지(예를 들면, 새끼돼지 또는 미경산돈)에게 투여된다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 1가 또는 다가 백신은 투여 전에 별도의 1가 백신들의 혼합을 요구하지 않는다. 즉, 상기 1가 또는 다가 백신은 사용 준비된 제제로서 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 다가 제제는 제1병에 함유된 2가 백신과 제2병에 함유된 1가 백신의 혼합을 요구한다. 임의적으로, 추가 항원은 이들 병들 중 어느 한 병에 첨가될 수 있다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 면역 발생시기는 본 발명에 따른 1가 또는 다가 백신 조성물을 사용한 백신접종 후 2주 내지 3주이다. 다른 실시양태에서, 면역의 지속기간은 본 발명에 따른 1가 또는 다가 백신 조성물을 사용한 백신접종 후 약 17주 내지 23주이다.
- [0115] 하기 실시예에는 본 발명에 따른 바람직한 재료 및 절차가 기재되어 있다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시하기 위해 제공되고, 하기 실시예 내의 어떠한 것도 본 발명의 전체 범위에 대한 한정으로서 간주되어서는 안 된다.
- [0116] **실시예**
- [0117] **실시예 1: PCV2 조합가능한 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제조 방법**
- [0118] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 발효 및 불활성화
- [0119] 시드(seed) 스케일 및 항원 생산을 위한 배지를 다음과 같이 제조하였다. 돼지 심장 유래의 플레우로뉴모니아 유사 유기체(PPLO) 브로쓰(비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences) 카탈로그 번호 21498)를 제조자의

설명서(즉, 21 g/ℓ)에 따라 제조하고, 효모 추출물 용액을 USP 물 중의 21 g/ℓ로 제조하였다. 그 다음, 6.25%의 효모 추출물 용액을 PPL0에 첨가하고, 혼합물을 121℃에서 30분 이상 동안 가열함으로써 멸균하였다. 시스테인 하이드로클로라이드를 90 g/ℓ의 양으로 제조하고 필터 멸균하였다. USP 물 ℓ 당 450 g의 텍스트로스를 첨가한 후 가열 멸균하여 텍스트로스 용액을 제조하였다. 최종 배지를 제조하기 위해, 10%의 돼지 혈청을 기초 배지에 첨가한 후, 0.01%의 시스테인 및 1.0%의 텍스트로스를 첨가하였다. 배지를 10%(부피/부피)의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아(균주 P-5722-3)의 대수기 배양물로 접종하였다. 배양물을 37℃에서 유지하고 pH 및 d0를 각각 7.0 및 25%로 유지하였다. 후기 대수기 생장에서, 배양물을 2-브로모에틸아민 하이드로브로마이드로부터 생성된 아지리딘 화합물인 이원 에틸렌이민(BEI)으로 불활성화시켰다. 구체적으로, 2-브로모에틸아민 하이드로브로마이드(BEA)를 4 mM의 최종 농도로 첨가하여 pH를 7.8까지 상승시키고 24시간 동안 항온처리하여 불활성화를 발생시켰다. 나트륨 티오설페이트를 1:1 몰비로 첨가한 후 24시간 동안 더 항온처리하여 BEI를 중화하였다. 불활성화된 배양액을 추가 프로세싱까지 2℃ 내지 8℃에서 유지하였다.

[0120] **실시예 2: 키메라 돼지 서코바이러스(cPCV)1-2 제조 방법**

[0121] 병원성 돼지 서코바이러스 2형(PCV2)의 면역원성 캡시드 유전자를 비-병원성 돼지 서코바이러스 1형(PCV1)의 게놈 골격 내로 클로닝함으로써 cPCV1-2를 구축하였다. 키메라 DNA 클론의 구축 절차는 예를 들면, 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제7,279,166호에 기재되어 있다. 키메라 바이러스의 감염성 스톡을 멩(Meng) 박사(Dr. X. J. Meng, 버지니아 폴리테크닉 주립 대학교, 미국 버지니아주 블랙스버그 소재)로부터 획득하였고, 0.05% 락트알부민 가수분해물(LAH), 30 µg/ml의 젠타미신 설페이트 및 5% 태아소 혈청으로 보충된 최소 필수 배지(MEM)에서 성장된 돼지 신장(PK)-15 세포를 감염시키는 데에 사용하였다. 발생된 cPCV1-2-감염된 PK-15 세포를, 2% 내지 3% 태아소 혈청을 함유한다는 점을 제외하고 동일한 성장 배지를 사용하여 4회 이상 연속 계대배양함으로써 더 증폭시켰다. 5번째 계대배양물을 동결하고 해동하고 여과하고, 발생된 용해물을 사용하여 프리-마스터 시드 및 후속 마스터 시드를 제조하였다.

[0122] 바이러스 시드의 제조에 사용된 배지는 바이러스 스톡의 제조에 사용된 배지와 동일한 배지이었다. 성장 배지의 경우, MEM, OptiMEM 또는 등가물은 과다생장을 위해 PK-15 세포주를 확립하는 데에 사용될 수 있는 기초 배지이다. 성장 배지를 최대 10%의 소 혈청, 최대 0.5%의 락트알부민 가수분해물, 최대 0.5%의 소 혈청 알부민 및 최대 30 µg/ml의 젠타미신으로 보충할 수 있다. 바이러스 증식 배지의 경우, MEM, OptiMEM 또는 등가물을 사용하였다. 바이러스 증식 배지를 최대 0.5%의 락트알부민 가수분해물, 최대 2%의 소 혈청, 최대 0.5%의 태아소 혈청 및 최대 30 µg/ml의 젠타미신으로 보충할 수 있다. 세포를 유지하는 데에 필요한 경우 최대 5 g/ℓ의 글루코스 및 최대 5 mmol/ℓ의 L-글루타민을 성장 배지 및/또는 바이러스 증식 배지에 첨가할 수 있다.

[0123] cPCV1-2 마스터 시드 바이러스를 PK-15 세포의 세포 현탁액에 첨가하고 최대 3시간 동안 흡착시켰다. 시드 바이러스를 성장 기초 배지로 희석하여 0.1 내지 0.0001의 감염 다중도(MOI)를 제공하였다.

[0124] 세포 확립 시 또는 세포가 대략 20% 내지 50% 전면성장률에 도달하였을 때 PK-15 세포의 배양물을 먼저 작업 시드 바이러스로 접종하였다. 이 초기 계대배양은 항원 스톡의 제조를 위한 "1 단계 감염 방법"으로서 지칭될 수 있거나, 연속 계대배양을 위해 더 이용될 수 있다. 연속 계대배양의 경우, 바이러스의 증식을 위해 cPCV1-2-감염된 PK-15 세포를 1:5 내지 1:20의 비로 연속적으로 분할함으로써 계대배양 7까지 더 증폭할 수 있다. 이전 계대배양으로부터의 감염된 세포 현탁액을 함유하는 배양 배지를 다음 계대배양을 위한 시드 물질로서 사용하였다. 세포가 90% 이상의 전면성장률에 도달하였을 때 36±2℃에서 각각의 계대배양 당 3일 내지 14일 동안 cPCV1-2-감염된 세포를 항온처리하였다. cPCV1-2 바이러스는 바이러스 복제 동안 관찰가능한 세포병변 변화를 야기한다. 회수 시, 세포의 둥글어진 형태 및 상당한 부유 데브리스가 관찰되었다. 또한, 배양물은 세균 또는 진균 오염의 가시적 증거에 대해서도 관찰되었다. cPCV 항원에 대한 회수 사이의 항온처리 시간은 하기 표 1에서 제공되어 있다:

표 1

cPCV 항원을 회수하기 위한 최소 및 최대 시간

방법	최소/최대 시간	온도 범위
1-단계 감염	5일 내지 16일	36±2℃
연속 계대배양(MSV+3 내지 MSV+7)	16일 내지 36일	36±2℃

[0125]

- [0126] 공지된 방법을 이용하여 cPCV1-2 배양액을 멸균 용기 내로 회수하고 마이코플라스마 시험을 위해 샘플링하였다. 다회 회수가 물러 병, 생물반응기 및 관주 용기로부터 수행될 수 있다.
- [0127] 회수된 cPCV1-2 바이러스의 불활성화 전, 하나 이상의 항원 로트를 한외여과로 (예를 들면, 최대 60배) 농축할 수 있다. 농축물을 균형잡힌 염 용액으로 세척하여 혈청 단백질을 감소시킬 수 있다.
- [0128] cPCV1-2 바이러스의 불활성화, 약독화 또는 해독 방법이 지금부터 기재될 것이다. cPCV 항원 농축 후, 베타-프로피오락톤(BPL)을 모아진 cPCV1-2 바이러스 물질에 첨가하여 대략 0.2%(부피/부피)의 농도를 수득하였다. 그 다음, 모아진 바이러스액을 최소 15분 동안 교반한 후, 불활성화 벌크 항원액을 멸균된 제2용기로 옮겼다. 옮겨진 항원액을 최소 24시간 동안 일정하게 교반하면서 2°C 내지 7°C에서 유지하였다. 최소 24시간 후, 다시 0.2%(부피/부피)의 BPL을 모아진 현탁액에 첨가하였다. 그 후, 내용물을 교반하고 제3 용기로 옮기고 84시간 이상의 추가 시간 동안 일정하게 교반하면서 2°C 내지 7°C에서 유지하였다. 일반적으로, 총 불활성화 시간은 108시간 이상 내지 120시간 이하이다. 불활성화 방법은 하기 표 2에 요약되어 있다:

표 2

불활성화 방법			
불활성화제	최종 농도	온도 범위	시간-시 (최소/최대)
베타-프로피오락톤(BPL)	0.4%(부피/부피)(2 x 0.2%(부피/부피) 첨가)	2°C 내지 7°C (교반하면서)	108 내지 120

- [0129]
- [0130] 최종 농도 0.1 M 이하의 나트륨 티오설페이트 용액을 첨가하여 불활성화를 종결하였다. NaOH 또는 HCl을 사용하여 불활성화된 항원 스톱의 pH를 약 6.8로 조절하였다. 불활성화 후, 대표적인 샘플을 풀(pool)로부터 채취하고 불활성화의 완료에 대해 시험하였다. 불활성화된 cPCV1-2 항원 생성물은 효능 ELISA를 통해 측정되었을 때 1.0 RP 초과 목표를 충족시키도록 표준화되었다.
- [0131] **실시예 3: 마이코플라스마 하이요뉴모니아 항원의 다운스트림 프로세싱 및 이들 프로세싱된 항원의 분석 시험**
- [0132] 마이코플라스마 하이요뉴모니아 항원의 다운스트림 프로세싱:
- [0133] 불활성화된 발효액(상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조됨)을 다음과 같이 각각의 표시된 군에 대해 처리하였다. 이들 프로세싱된 마이코플라스마 하이요뉴모니아 항원을 하기 실시예 4에서 사용하였다.
- [0134] T02: (전체 벌크) 프로세싱되지 않았다.
- [0135] T03: (10배 한외여과 농축됨) 100 kD 분자량 컷오프 막(중공형 섬유)을 통한 접선 유동 여과를 통해 농축하였다. 최종 부피 감소는 10배와 동등하였다.
- [0136] T04 및 T05: (10배 한외여과 농축되고 원심분리됨) (T03으로부터의) 농축된 마이코플라스마 세포를 수집하고 약 20,000xg(소발 모델(Sorvall model) RC5B)에서 원심분리를 통해 PBS로 1회 세척하였다.
- [0137] T06 및 T07: (10배 원심분리됨) 불활성화된 발효액을 약 20,000xg(소발 RC5B)에서 원심분리하고 세포를 PBS에 재현탁한 후 추가로 원심분리함으로써 1회 세척하였다. 최종 부피 감소는 10배와 동등하였다.
- [0138] T08: (10배 원심분리되고 가열됨) 마이코플라스마 세포를 농축하고 T06에 따라 세척하고 65°C에서 10분 동안 가열하였다.
- [0139] T09: (세포 무함유 상청액) T06에 대하여 기재된 첫번째 원심분리로부터 수집된 상청액을 0.2 µm 필터(날진(Nalgene))를 통해 필터 멸균하였다.
- [0140] T10: (세포 무함유 상청액-단백질 A로 처리됨) 멸균 상청액(T09에 따라 제조됨)을 4시간 동안 10:1 부피비로 단백질 A 수지(단백질 A 세파로스, 파마샤 인코포레이티드(Pharmacia Inc.))와 혼합하였다. 수지를 멸균 여과로 제거하고 여과된 유체를 2°C 내지 8°C에서 저장하였다. 이 공정은 발효 후 "다운스트림" 단백질을 이용하여 항체 및 면역복합체를 제거한다. 본 발명이 업스트림 단백질을 배제하지 않지만, 본 발명자들은 마이코플라스마 하이요뉴모니아의 경우 생장 배지의 업스트림 단백질 A 처리가 비-처리된 배지에 비해 더 낮고 일관성이 없는 p46 결과를 초래하였다는 것(데이터는 제시되어 있지 않음)을 발견하였다.

[0141] 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 다운스트림 프로세싱된 항원의 분석 시험

[0142] 다운스트림 프로세싱된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 제제(전술된 바와 같이 제조됨)를 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 특이적 p46 항원의 회수 및 PCV2 항체의 존재에 대해 시험하였다. 또한, 이들 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 제제를 유전형 1(g1TTV) 및 유전형 2(g2TTV)를 비롯한 토크 테노 바이러스(TTV)의 존재에 대해 시험하였다. 결과는 하기 표 3에 제시되어 있다:

표 3

마이코플라즈마 하이요뉴모니아 다운스트림 프로세싱된 항원의 특징규명

처리	벌크 마이코플라즈마 하이요뉴모니아	PCV2 항체	qPCR DNA	
	p46 RU/ml	S/P 비	g1TTV	g2TTV
전체 벌크	809	0.248	1.00E+ 03	1.78E+ 03
10배 한외여과 농축	6666	0.819	1.00E+ 03	9.94E+ 03
10배 한외여과 농축 + 원심분리	614	0.019	0	0
10배 원심분리	763	-0.015	1.90E+ 02	1.91E+ 02
10배 원심분리 + 가열	690	-0.012	0	2.07E+ 02
세포 무함유 상청액	719	0.242	4.20E+ 02	3.23E+ 03
세포 무함유 상청액 (단백질 A)	826	-0.014	0	2.06E+ 03

[0143]

[0144] 상기 표 3을 참조하건대, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 특이적 p46 항원의 회수는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 다운스트림 프로세싱된 항원 제제 각각에 대해 입증되었다. 추가로, 하기 처리는 PCV2 항체를 성공적으로 제거하였다: 10배 한외여과 농축 및 원심분리, 10배 농축, 10배 원심분리 및 가열, 및 세포 무함유 상청액(단백질 A 처리). TTV의 경우, 하기 처리는 g1TTV를 성공적으로 제거하였다: 10배 한외여과 농축 및 원심분리, 10배 원심분리 및 가열, 및 세포 무함유 상청액(단백질 A 처리). 10배 한외여과 농축 및 원심분리로 명명된 처리만이 g2TTV를 제거하였다. 유전형 1 및 2를 비롯한 토크 테노 바이러스 단일물들은 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공개 제20110150913호에 기재되어 있다.

[0145] 단백질 A가 IgG에 결합한다는 것이 당분야에서 공지되어 있기 때문에, 당업자는 PCV2 항체뿐만 아니라 다른 돼지 항체(PRRS 항체, HPS 항체 및 SIV 항체를 포함함)도 단백질 A 처리에 의해 효과적으로 제거될 것임을 이해한다. 이것은 본 발명의 세포 무함유 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 상청액이 항원들 사이의 면역학적 간섭의 결여로 인해 PCV2 항원뿐만 아니라 다른 돼지 항원과도 상용가능하게 만든다. 추가로, 비-보호성 세포 데브리스의 제거, 및 면역글로불린 및 항원/면역글로불린 결합체의 제거는 보다 안전한 백신을 만들 것이라고 합리적으로 예측된다.

[0146] **실시예 4: 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제의 제조**

[0147] 최종 농도 5%의 암피젠 항원보강제를 사용하여 모든 실험 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신들을 제제화하였다. 추가로, 모든 백신들을 p46 ELISA로 표준화하고 티메로졸로 보존하였다. 실험 백신 제제를 상기 처리군 T02 내지 T10에 따라 프로세싱된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원으로 제조하였다. 또한, 처리군 T01은 플라세보(마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 부재, 5% 암피젠 항원보강제만이 존재)에 상응하는 반면, 처리군 T11은 기한만료된 박테린 기제의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신(레스피슈어-원(RespiSure-ONE)[®], 화이자 애니멀 헬스(Pfizer Animal Health))에 상응하는 양성 대조군이다. 이들 제제들은 하기 표 4에 기재되어 있다:

표 4

마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제

처리군	일련의 IVP*	목표 p46 유닛/ds	마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원(ml)	항원보강제 (ml)	제제 부피(ml)
T01	123639(플라세보)	5% 암피젠 단독, 항원 부재			
T02	L100211A	452	279.36	250	1000
T03	L100211B	452	6.78	50	200
T04	L100211C	452	73.62	50	200
T05	L100211D	816	132.90	50	200
T06	L100211E	452	59.24	50	200
T07	L100211F	816	106.95	50	200
T08	L100211G	452	65.51	50	200
T09	L100211H	452	62.87	50	200
T10	L100211J	452	54.72	50	200
T11	A827870	기한만료된 “레스피슈어” 백신			

*일련의 연구용 수의학 제품(IVP)

실시예 5: 상이한 다운스트림 공정들로부터 수득된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 갖는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신의 생체내 효능의 평가

이 연구는 상이한 다운스트림 공정(DSP)들로부터 수득된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 갖는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신의 생체내 효능을 평가하기 위해 수행되었다. 3주령의 돼지를 상기 표 4에 기재된 단위 용량의 상이한 백신 제제들로 근육내 접종하였다. 16마리의 동물들이 각각의 처리군에 포함되었다. 백신 접종 후 21일째 날에 동물들을 병독성 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 사육장 단리물로 챌린지하였다. 챌린지 후 28일째 날에 동물을 부검하고, 폐를 제거하여 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 감염과 일치하는 경화에 대해 점수화하였다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 챌린지로부터의 보호에 대한 1차 기준은 폐 경화 점수이었다. 유행성 폐렴에 의해 야기된 폐 병변의 크기와 성장 속도에 대한 불리한 효과 사이의 관계는 일반적으로 인정된다. 하기 표 5는 각각의 처리군에 대한 폐 병변 점수를 함유한다. 통계학적 유의성을 각각의 군에 대한 폐 점수의 혼합 모델 분석으로 측정하였다.

표 5

폐 병변 결과

처리군	설명	p46 RP 목표치/ 관측치	% 폐 병변 역변환된 LS 평균	범위 % 병변을 갖는 폐	대비	P-값	유의성
T01	플라세보(5% 압피젠)	N/A	11.7	1.2 - 44.3	N/A	N/A	N/A
T02	전체 벌크	13/15.6	1.2	0.1 - 18.5	T01 대 02	0	유
T03	전체 벌크 한외여과 10배	13/11.9	0.3	0.0 - 2.8	T01 대 03	0	유
T04	한외여과 10배 + 원심분리	13/28.1	5.9	0.0 - 40.5	T01 대 04	0.1589	무
T05	한외여과 10배 + 원심분리	24/48.2	3.7	0.0 - 42.3	T01 대 T05	0.0309	유
T06	10배 원심분리	13/30.4	4.7	0.0 - 23.6	T01 대 06	0.0388	유
T07	10배 원심분리	24/57.4	4.6	0.3 - 37.3	T01 대 T07	0.0323	유
T08	10배 원심분리 + 가열	13/17.7	4.5	0.3 - 21.7	T01 대 T08	0.0137	유
T09	상청액(세포 부재)	13/14.1	1.4	0.0 - 33.0	T01 대 T09	0.0004	유
T10	상청액 + 단백질 A	13/12.1	3.1	0.0 - 25.8	T01 대 T10	0.0094	유
T11	기완만료된 RSO	13/12.5	2.2	0.1 - 32.1	T01 대 T11	0.0009	유

[0151]

[0152]

상기 표 5를 참조하건대, 상이한 다운스트림 공정으로부터 수득된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 사용하여 수득한 결과는 T04를 제외한 모든 실험 백신들이 플라세보와 유의하게 상이하였다는 것을 보여주었다. 이들 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 병변 결과는 도 1에 그래프로 도시되어 있다. 도 1에 제시된 바와 같이, T04는 허용불가능한 결과를 제공하였다. 모든 다른 처리군들은 플라세보(T01)와 유의하게 상이하였다. 폐 경화 점수는 T02, T03 및 T09 내지 T11이 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 챌린지로부터의 가장 효과적인 보호를 제공한다는 것을 보여주었다.

[0153]

이중 항체 샌드위치 효소-연결된 면역흡착 분석(DAS ELISA)을 이용하여 실험 백신의 p46 상대적 효능을 평가하였다. 상기 표 5에 제시된 p46 DAS ELISA 결과는 모든 실험 백신들이 목표 효능을 초과하였다는 것을 보여준다. 또한, p46 상대적 효능은 1개월에 걸쳐 백신의 저장 동안 유지되었거나 증가되었다(데이터는 제시되어 있지 않음). 시간의 경과에 따른 효능의 인지된 증가는 열에 노출된 항원을 제외하고 원심분리된 항원들에서 관찰되었다. 어느 한 이론에 의해 구속받으려 하는 것은 아니지만, 원심분리된 항원의 경우 세포 "잔해"가 시간의 경과에 따라 파괴되고 보다 많은 막 결합된 p46 항원이 방출될 가능성이 높다.

[0154]

실시예 6: PCV2 항원을 갖는 실험 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신의 상용가능성의 평가

[0155]

이 연구는 상이한 다운스트림 공정으로부터 수득된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 갖는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신과 PCV2 항원의 상용가능성을 평가하기 위해 수행되었다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제는 상기 표 4 및 5에 기재되어 있다. 이들 백신들에 대한 관찰된 p46 상대적 효능은 상기 표 5에 기재되어 있다. 이들 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신들을 PCV2 항원과 각각 조합하였다. 이 실시예에서, PCV2 항원은 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 사멸된 PCV 1형-2형 키메라 바이러스(포스테라 PCV)이었다. 상기 키메라 바이러스는 약 $1.6 \leq RP$ 의 초기 수준으로 조성물에 포함되었는데, 이때 RP는 효능 기준 백신에 비해 PCV2 ELISA 항원 정량(시험관내 효능 시험)에 의해 측정된 상대적 효능이다.

[0156]

실험 마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PCV2 조합 제제를 PCV2 ELISA로 평가하였다. 결과는 도 2에 제시되어 있다. 도 2에 제시된 바와 같이, 하기 다운스트림 공정으로부터 수득된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 제제만이 PCV2 항원과 상용가능하였다: 한외여과 및 농축(T04 및 T05), 원심분리(T06 및 T07), 원심분리 및 가열(T08) 및 단백질 A-처리된 상청액(T10). 이들 중 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 A-처리된 상청액은 키메라 바이러스 및 압피젠 항원보강제를 포함하되 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 포함하지 않는 플라세보 대조군에 비해 PCV2 항원과 가장 상용가능하였다. 단백질 A-처리된 상청액에서 키메라 PCV 바이러스의 수준

은 플라세보에 대한 1.69 RP에 비해 1.5 RP이었다. 따라서, 상기 키메라 바이러스의 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 가용성 항원 제제와 PCV2 항원 사이에 면역학적 간섭이 전혀 없거나 최소한으로 존재한다는 결론을 도출하였다.

[0157] 본 실시예에 기재된 결과와 함께 상기 실시예 5에서 입증된 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 상청액의 생체내 효능은 단백질 A-처리된 상청액이 마이코플라즈마 하이에뉴모니아-PCV2 조합을 위한 잠재적으로 효과적인 플랫폼이라는 것을 시사하였다.

[0158] **실시예 7: 상이한 항원보강제 제제 중의 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이에뉴모니아 조합 백신의 PCV2 효능의 평가**

[0159] 이 연구는 상이한 항원보강제 제제 중의 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이에뉴모니아 조합 백신의 PCV2 효능을 평가하기 위해 디자인되었다. 이 실시예에서, PCV2 항원은 사멸된 PCV 1형-2형 키메라 바이러스(포스테라 PCV)이었다. 상기 키메라 바이러스를, IgG를 실질적으로 갖지 않는 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 가용성 항원 제제(즉, 단백질 A-처리된 상청액)와 조합하였다.

[0160] 유체의 프로세싱:

[0161] 불활성화된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 발효액(상기 실시예 1에 기재됨)을 다음과 같이 각각의 표시된 군에 대해 처리하였다.

[0162] T02 내지 T04: 살아있는 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 세포(전술되어 있음)를 함유하는 전체 발효액을 약 20,000xg(소발 RC5B)에서 원심분리하고 상청액을 수집하고 0.2 μ m 필터를 통해 멸균하였다. r단백질 A 세파로스(파트 번호 7-5199-03, 지이 헬스케어(GE Healthcare))를 1 ℓ 크로마토그래피 컬럼 내에 채워넣었다. 저장 완충제를 제거하고 2 컬럼 부피의 1 M 아세트산으로 처리한 후, 수지를 5 컬럼 부피의 50 mM NaPO₄/1 M NaCl 완충제(pH 7.04)로 평형화시켰다. 대략 2 ℓ 의 정화된/여과된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 항원 함유 유체를 100 cm/hr의 유속으로 단백질 A 수지에 통과시켰다. 유동 관통액을 수집하고 0.2 μ m 필터를 통해 멸균하였다.

[0163] T05: 이것은 포스테라 PCV 유사 제제(마이코플라즈마 하이에뉴모니아 항원 부재)에 상응하는 양성 대조군이다. 이 포스테라 PCV 유사 제제 중의 키메라 바이러스의 수준은 대략 최소 면역화 용량(MID) 제제 수준이었다. 키메라 바이러스를 유사한 제제 수준으로 PCV2/마이코플라즈마 하이에뉴모니아 실험 백신에 포함시켰다.

[0164] 모든 실험 PCV2/마이코플라즈마 하이에뉴모니아 백신을 상이한 항원보강제 제제로 제제화하였다. 상기 처리군 T02 내지 T04에 따라 프로세싱된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 항원을 사용하여 실험 백신 제제를 제조하였다. 또한, 처리군 T01은 플라세보(멸균 식염수)에 상응하였다.

[0165] 모든 백신들을 p46 ELISA로 표준화하고 티메로졸로 보존하였다. 이들 실험 제제들은 하기 표 6에 기재되어 있는데, 이때 부호 *는 전체 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 시드의 단백질 A-처리된 상청액으로부터의 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 항원을 표시하고, 부호 **는 일련의 연구용 수의학 제품(IVP)을 표시한다.

표 6

PCV2 효능 연구를 위해 사용된 PCV2/마이코플라즈마 하이에뉴모니아 실험 백신 제제

처리군	일련의 IVP **	PCV1-2 항원	마이코플라즈마 하이에뉴모니아* 항원	항원보강제	기타
T01	87-244-DK(플라세보)	NA			멸균 식염수
T02	L0411RK08	1.6 RP	7.5 RP	10% SP-오일	NA
T03	L0411RK09			5% 암피젠	
T04	L0611RK03			5% 암피젠 +	
T05	L0611RK04		NA	20% SLCD	

[0166]

[0167] 3주령의 돼지를 상기 표 6에 기재된 단위 용량의 상이한 백신 제제들로 근육내 접종하였다. 16마리의 동물들을

각각의 처리군에 포함시켰다. 백신접종 후 21일째 날에 동물을 병독성 PCV2 사육장 단리물로 챌린지하였다.

[0168] 도 3은 상이한 항원보강제 플랫폼들에서 관찰된 PCV2 바이러스혈증 결과(PCV2 정량 PCR)를 보여주는 그래프이다. PCV2 바이러스혈증이 1차 효능 변수로서 사용되었다는 점을 주목한다. PCV2 바이러스혈증 결과는 DNA 복제/㎖로서 제시되어 있다. 도 3에 제시된 바와 같이, 모든 처리군들은 28일째 날, 35일째 날 및 42일째 날에 플라세보에 비해 유의하게 더 적은 바이러스혈증을 가졌다(챌린지는 21일째 날에 수행되었음). 10% SP-오일 항원보강제는 28일째 날 및 35일째 날에 5% 암피젠에 비해 유의하게 더 적은 바이러스혈증을 가졌다. 5% 암피젠 + 5% SLCD 항원보강제는 28일째 날 및 35일째 날에 5% 암피젠에 비해 유의하게 더 적은 바이러스혈증을 가졌다. 20% SLCD 항원보강제 플랫폼은 28일째 날, 35일째 날 및 42일째 날에 5% 암피젠에 비해 유의하게 더 적은 바이러스혈증을 가졌다.

[0169] PCV2 혈청학, PCV2 분변 배출, PCV2 코 배출, 세포 매개 면역(CMI) 반응, 림프 고갈 및 면역조직화학(IHC)도 2차 효능 변수로서 모니터링하였다. 이들 결과들은 지금부터 기재될 것이다.

[0170] 도 4는 연구의 1일째 날, 20일째 날 및 42일째 날의 PCV2 ELISA 결과를 보여주는 그래프이다(챌린지는 21일째 날에 수행되었음). 각각의 샘플의 상태는 샘플 대 양성 비(S/P)로서 표현되었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 20% SLCD는 20일째 날 및 42일째 날에 플라세보(T01)와 유의하게 상이한 유일한 처리이었다. 5% 암피젠은 20일째 날에 플라세보와 유의하게 상이하지 않은 유일한 처리이었다.

[0171] 도 5는 T02 내지 T04 처리 대 플라세보(T01)에서 수득된 PCV2 분변 배출을 보여주는 그래프이다. 이들 결과는 PCV2 DNA 복제/㎖로서 표현된다. 도 5의 결과는 모든 처리들이 42일째 날에 플라세보에 비해 유의하게 더 적은 분변 배출을 가졌다는 것을 보여준다. 또한, 5% 암피젠 및 5% SLCD(T04)는 42일째 날에 5% 암피젠(T03)에 비해 유의하게 더 적은 분변 배출을 가졌다. 다른 처리 차이는 인지되지 않았다.

[0172] 도 6은 T02 내지 T04 처리 대 플라세보(T01)에서 수득된 PCV2 코 배출을 보여주는 그래프이다. 이들 결과는 PCV2 DNA 복제/㎖로서 표현된다. 도 6의 결과는 모든 처리들이 42일째 날에 플라세보에 비해 유의하게 더 적은 코 배출을 가졌다는 것을 보여준다. 또한, 20% SLCD(T05)는 42일째 날에 5% 암피젠(T03)에 비해 유의하게 더 적은 코 배출을 가졌다. 다른 처리 차이는 인지되지 않았다.

[0173] 도 7(7a 및 7b)은 PCV2 특이적 세포 매개 면역(CMI) 반응을 측정하는 인터페론-감마(IFN- γ) 시험의 결과를 보여주는 2개의 그래프들을 보여준다. 백신접종 후/챌린지 전 CMI 결과(도 7a) 및 백신접종 후/챌린지 후 CMI 결과(도 7b)가 제시되어 있다. 이들 그래프들에서, 5×10^6 개 세포의 자극이 유의한 것으로 간주되었다. 모든 PCV2/마이크로플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신들은 백신접종 후 검출가능한 IFN- γ 반응을 제공하였다. 10% SP-오일(T02)은 백신접종 후 가장 강한 IFN- γ 반응을 유도하였다. 20% SLCD(T05)는 보다 빠른 반응을 유도하였지만 20일째 날에 가장 낮은 반응을 유도하였다. 특히 플라세보 군에서 관찰된 큰 챌린지 후 반응이 존재하였다. 추가로, 챌린지 후 반응은 플라세보 군에 비해 백신접종된 돼지 처리군에서 더 낮았다.

[0174] 하기 표 7은 플라세보와 대조된 실험 처리군에서 수득된 림프 고갈을 보여준다:

표 7

PCV2 조직병리학(림프 고갈)

처리	림프 고갈			플라세보와 대비됨	
	양성	음성	% 항상 양성	P-값	유의성
플라세보	9	7	56%	NA	NA
10% SP-오일	1	15	6%	0.0059	유
5% 암피젠	1	15	6%	0.0059	유
5% 암피젠+5% SLCD	0	16	0%	0.0008	유
20% SLCD	1	15	6%	0.0059	유

[0175]

[0176] 상기 표 7에 제시된 결과는 모든 백신들이 림프 고갈로부터의 강한 보호를 부여하였다는 것을 보여준다. 또한, 통계적으로 유의한 백신 처리 차이는 관찰되지 않았다. 하기 표 8은 플라세보와 대조된 실험 처리군에서 수득된 면역조직화학을 보여준다:

표 8

PCV2 조직병리학 (면역조직화학)

처리	면역조직화학			플라세보와 대비됨	
	양성	음성	% 항상 양성	P-값	유의성
플라세보	12	4	75%	NA	NA
10% SP-오일	0	16	0%	0.0001	유
5% 압피젠	1	15	6%	0.0002	유
5% 압피젠 + 5% SLCD	0	16	0%	0.0001	유
20% SLCD	0	16	6%	0.0001	유

[0177]

[0178] 상기 표 8에 제시된 결과는 면역조직화학에 의해 입증된 바와 같이 모든 백신들이 PCV2 콜로니화로부터의 강한 보호를 부여하였다는 것을 보여준다. 또한, 통계적으로 유의한 백신 처리 차이는 관찰되지 않았다.

[0179] 종합하건대, 이 실시예에서 제시된 결과는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 가용성 항원 제제가 PCV2 효능을 방해하지 않는다는 것을 입증한다. 상기 결과는 모든 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제들이 PCV2 챌린지에 대한 효능을 제공한다는 것도 보여준다. 추가로, 상기 결과는 상이한 항원보강제 제제를 사용하였을 때 수득된 일부 통계학적 및 수치적 차이가 존재한다는 것을 보여주는데, 이때 10% SP-오일이 가장 강한 효능을 제공하였다.

[0180] **실시예 8: 상이한 항원보강제 제제 중의 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조합 백신의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능의 평가**

[0181] 이 연구는 상이한 항원보강제 제제를 갖는 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조합 백신의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능을 평가하기 위해 디자인되었다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 1개의 병 내에서 돼지 서코바이러스(1형-2형 키메라 또는 PCV1-2 사멸된 바이러스)와 조합하였다.

[0182] 유체의 프로세싱:

[0183] 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 발효액(상기 실시예 1에 기재됨)을 다음과 같이 각각의 표시된 군에 대해 처리하였다.

[0184] T02 내지 T04: 이들 처리들은 상기 실시예 7에서 처리군 T02 내지 T04에 대해 기재된 바와 동일하였다.

[0185] T05: 이것은 "발효 및 불활성화"라는 표제 하에 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 세포(마이코플라즈마 하이요뉴모니아 박테린)로 제제화되었다.

[0186] 모든 실험 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신들을 상이한 항원보강제 제제들로 제제화하였다. 실험 백신 제제들을 처리군 T02 내지 T04에 따라 프로세싱된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원으로 제조하였다. 또한, 처리군 T01은 플라세보(멸균 식염수)에 상응하였다. 처리군 T05는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 박테린 기체의 백신(화이자 애니멀 헬쓰)인 기한만료된 레스피슈어® 백신에 상응하는 양성 대조군이다.

[0187] 이들 실험 제제들은 하기 표 9에 기재되어 있는데, 이때 부호 *는 전체 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 시드의 단백질 A-처리된 상청액으로부터의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 표시하고, 부호 **는 일련의 연구용 수의학 제품(IVP)을 표시한다.

표 9

상이한 항원보강제 제제들에서 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능 연구를 위해 사용된 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제

처리군	일련의 IVP**	PCV1-2 항원	마이코플라즈마 하이요뉴모니아* 항원	항원보강제	기타
T01	87-244-DK (플라세보)	NA			멸균 식염수
T02	L0411RK08	1.6 RP	7.5 RP	10% SP-오일	NA
T03	L0411RK09			5% 암피젠	
T04	L0611RK03			5% 암피젠 + 5% SLCD	
T05	A827870	기한만료된 “레스피슈어” 백신			

[0188]

[0189]

3주령의 돼지들을 상기 표 9에 기재된 단위 용량의 상이한 백신 제제들로 근육내 접종하였다. 14마리의 동물들을 플라세보 군 및 10% SP-오일 군에 포함시키고, 13마리의 동물들을 양성 대조군에 포함시키고, 16마리의 동물들을 5% 암피젠 군 및 5% 암피젠 + 5% SLCD 군에 포함시켰다.

[0190]

백신접종 후 21일째 날에 동물을 병독성 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 사육장 단리물로 챌린지하였다. 챌린지 후 28일째 날에 동물을 부검하고, 폐를 제거하여 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 감염과 일치하는 경화에 대해 점수화하였다. 하기 표 10은 각각의 처리군에 대한 폐 병변 점수를 함유한다. 통계학적 유의성을 각각의 군에 대한 폐 점수의 혼합 모델 분석으로 측정하였다.

표 10

마이코플라즈마 하이요뉴모니아 폐 병변

처리	# 동물	LS 평균 폐 병변	범위 % 폐 병변
플라세보(T01)	14	13.1%	0.1 - 50.5
10% SP-오일(T02)	14	4.3%	0.0 - 50.8
5% 암피젠(T03)	16	4.7%	0.0 - 38.5
5% 암피젠+ 5% SLCD(T04)	16	12.0%	0.1 - 55.8
기한만료된 RSO(T05)	13	2.28%	0.0 - 34.5

[0191]

[0192]

상기 표 10에 표시된 바와 같이, 플라세보 군은 각각 4.3% 및 4.7%의 평균 폐 점수를 갖는 10% SP-오일 처리군 및 5% 암피젠 처리군에 비해 13.1%의 평균 폐 병변 점수를 가졌다. 10% SP-오일 제제 및 5% 암피젠 제제 둘다 가 폐 병변을 감소시켰고/시켰거나 예방하였다. 따라서, 10% SP-오일 또는 5% 암피젠으로 제제화된 실험 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신은 효과적인 것으로 간주되었다. PCV2 항원은 이들 제제들의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능을 방해하지 않는 듯하였다.

[0193]

대조적으로, 5% 암피젠 + 5% SLCD 군은 플라세보와 상이하지 않았다는 점에서 허용불가능한 결과인 12.0%의 평균 폐 병변 점수를 가졌다. 결과적으로, 5% 암피젠 + 5% SLCD로 제제화된 실험 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신은 효과적인 것으로 간주되지 않았다.

[0194]

감소된 동물 수 및 폐 병변 점수에서의 높은 가변성으로 인해 이 연구에서 통계학적 처리 효과는 결정적으로 입증될 수 없었다는 것을 주목한다. 이러한 이유로, 10% SP-오일 중의 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 제제의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능을 시험하기 위해 또 다른 연구를 디자인하기로 결심하였다. 이 반

복 연구는 하기 실시예 9에 제시되어 있다.

- [0195] **실시예 9: 10% SP-오일 중의 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조합 백신의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능의 평가**
- [0196] 이 연구는 표준 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제조 공정으로 제조된 대조군 백신에 비해 IgG 제거를 위해 단백질 A를 사용한 상이한 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제조 공정으로 제조된 4개의 실험 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신들(하기 표 11에 기재된 일련의 L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 및 L0711RK14)의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 분획 효능을 평가하기 위해 디자인된 개념의 증거이다. 이들 4개의 실험 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신들 각각은 항원보강제로서 10% SP-오일을 포함하였다.
- [0197] 유체의 프로세싱:
- [0198] T02: 상기 실시예 1에서 "발효 및 불활성화" 하에 기재된 바와 같이 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원.
- [0199] T03 및 T04: 상기 실시예 1에서 "발효 및 불활성화" 하에 기재된 바와 같이 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 세포로 제제화되었다.
- [0200] T05: 마이코플라즈마 하이요뉴모니아를 성장시키는 데에 사용된 배지의 단백질 A 처리. PPL0(돼지 심장 유래)를 제조자의 설명서에 따라(즉, 21 g/ℓ) 제조하고 효모 추출물 용액을 USP 물 중의 21 g/ℓ로 제조하였다. 6.25%의 효모 추출물 용액을 PPL0에 첨가하고, 혼합물을 121℃에서 30분 이상 동안 가열함으로써 멸균하였다. 시스테인 하이드로콜로라이드를 90 g/ℓ의 양으로 제조하고 필터 멸균하였다. USP 물 ℓ 당 450 g의 텍스트로스를 첨가한 후 가열 멸균하여 텍스트로스 용액을 제조하였다. 최종 배지를 제조하기 위해, 10%의 돼지 혈청을 기초 배지에 첨가한 후, 0.01%의 시스테인 및 1.0%의 텍스트로스를 첨가하였다. 완전 PPL0 배지 중의 항체를 단백질 A를 사용한 처리로 제거하였다. 요약하건대, 1 ℓ의 r단백질 A 세파로스(파트 번호 7-5199-03, 지이 헬쓰케어)를 유리 컬럼(10배 11.5 cm) 내에 채워넣었다. 저장 완충제를 제거한 후, 컬럼을 2 컬럼 부피의 1 M 아세트산으로 처리하였다. 수지를 5 컬럼 부피의 50 mM NaPO₄/1 M NaCl 완충제(pH 7.04)로 평형화시켰다. 15 ℓ의 완전 PPL0 배지를 140 cm/시간의 선형 유속으로 수지에 적재하였다. 컬럼 유동 관통액을 수집하고 0.2 μm 필터(사토리우스)를 통해 필터 멸균하였다. 처리된 배지를 상기 "발효 및 불활성화" 하에 기재된 바와 같이 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 세포를 증식시키는 데에 사용하였다. (세포를 포함하는) 전체 불활성화된 배양물을 최종 백신으로 제제화하였다.
- [0201] T06: 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 세포를 상기 실시예 1에서 "발효 및 불활성화" 하에 기재된 바와 같이 제조하였다. 불활성화된 발효액을 약 20,000xg(소발 RC5B)에서 30분 동안 원심분리하고 상청액을 0.2 μm 여과를 통해 멸균하였다. 115 ml의 r단백질 A 수지(파트 번호 12-1279-04, 맵셀렉트(MAbSelect), 지이 헬쓰케어)를 크로마토그래피 컬럼(5x6 cm) 내에 채워넣었다. 저장 완충제를 제거하고 2 컬럼 부피의 1 M 아세트산으로 처리한 후, 수지를 5 컬럼 부피의 50 mM NaPO₄/1 M NaCl 완충제(pH 7.01)로 평형화시켰다. 대략 1.2 ℓ의 정화된/여과된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 함유 유체를 120 cm/시간의 유속으로 수지에 통과시켰다. 유동 관통물을 수집하고 0.2 μm 필터를 통해 멸균하였다.
- [0202] T07: 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 세포를 상기 실시예 1에서 "발효 및 불활성화" 하에 기재된 바와 같이 제조하였다. 불활성화된 발효액을 집선 유동 여과를 통해 정화하였다. 요약하건대, 공칭 공극 크기가 0.2 μm인 폴리에테르 실론 필터(지이 헬쓰케어, 파트 번호 56-4102-71)를 0.5 N 수산화나트륨 용액으로 살균한 후 멸균 USP 물로 광범위하게 세정하였다. 불활성화된 마이코플라즈마 배양액을, 14.6 ℓ/분을 목표로 하는 제순환 속도 및 2 내지 3.4 PSI의 경막 압력에서 장치에 도입하였다. 정화를 실온에서 수행하였다. 필터 투과액을 수집하고 추가 프로세싱까지 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다. 115 ml의 r단백질 A 수지(파트 번호 12-1279-04, 맵셀렉트, 지이 헬쓰케어)를 크로마토그래피 컬럼(5x6 cm) 내에 채워넣었다. 저장 완충제를 제거하고 2 컬럼 부피의 1 M 아세트산으로 처리한 후, 수지를 5 컬럼 부피의 50 mM NaPO₄/1 M NaCl 완충제(pH 7.01)로 평형화시켰다. 대략 2.3 ℓ의 정화된/여과된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 함유 유체를 120 cm/시간의 유속으로 수지에 통과시켰다. 유동 관통물을 수집하고 0.2 μm 필터를 통해 멸균하였다.
- [0203] T08: 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 세포를 상기 "발효 및 불활성화" 하에 기재된 바와 같이 제조하였다. 불활성화된 발효액을 약 20,000xg(소발 RC5B)에서 30분 동안 원심분리하고 상청액을 0.2 μm 여과를 통해 멸균하였다. 115 ml의 r단백질 A 세파로스(파트 번호 17-5199-03, 지이 헬쓰케어)를 크로마토그래피 컬럼

(5x6 cm) 내에 채워넣었다. 저장 완충제를 제거하고 2 컬럼 부피의 1 M 아세트산으로 처리한 후, 수지를 5 컬럼 부피의 50 mM NaPO₄/1 M NaCl 완충제(pH 7.01)로 평형화시켰다. 대략 1.2 ℓ의 정화된/여과된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 함유 유체를 120 cm/시간의 유속으로 수지에 통과시켰다. 유동 관통물을 수집하고 0.2 μm 필터를 통해 멸균하였다.

[0204] 실험 백신 제제들을 상기 처리군 T02 내지 T08에 따라 프로세싱된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원으로 제조하였다. T02, T03 및 T04는 양성 대조군에 상응하였다. 추가로, 처리군 T01은 플라세보(멸균 식염수)에 상응하였다.

[0205] 이들 실험 제제들은 하기 표 11에 기재되어 있다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원은 전체 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 시드의 단백질 A-처리된 상청액으로부터의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원에 상응한다. "단백질 A 처리" 컬럼에 기재된 정보는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 상청액이 발효 전에 단백질 A로 처리되었는지 아니면 발효 후에 단백질 A로 처리되었는지를 표시한다.

표 11

SP-오일 항원보강제에서 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능 연구를 위해 사용된 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제

처리군	일련 번호	PCV1-2 항원	마이코 플라즈 마 하이 요뉴모 니아 항원	단백질 A 처리	상청액 정화 방법	단백질 A 브랜드	항원보강제	기타
T01	L0311AS11	NA						멸균 식염수
T02	A828718	NA	13	기한만료된 레스피슈어-원			암피젠	NA
T03	L0711RK09	1.5 RP	7.5 RP	단백질 A로 처리되지 않고 PCV2를 갖는 마이코플라즈 마 하이요뉴모니아			10% SP-오일	
T04	L0711RK10	NA		단백질 A로 처리되지 않고 PCV2를 갖지 않는 마이코플 라즈마 하이요뉴모니아				
T05	L0711RK11	1.5 RP		전	NA	세파로스		
T06	L0711RK12			후	원심분리	맘셀렉트		
T07	L0711RK13			후	필터	맘셀렉트		
T08	L0711RK14			후	원심분리	세파로스		

[0206]

[0207] 3주령의 돼지들을 상기 표 11에 기재된 단위 용량의 상이한 백신 제제들로 근육내 접종하였다. 각각의 처리군에 포함된 18마리의 돼지들이 존재하였다. 백신접종 후 21일째 날에 동물들을 병독성 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 사육장 단리물로 켈린지하였다. 켈린지 후 28일째 날에 동물들을 부검하고, 폐를 제거하여 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 감염과 일치하는 경화에 대해 점수화하였다. 도 8(8a 및 8b)은 각각의 처리군에 대한 폐 병변 점수를 보여준다. 통계학적 유의성을 각각의 군에 대한 폐 점수의 혼합 모델 분석으로 측정하였다.

[0208] 도 8a 및 8b에 도시된 폐 병변 결과는 모든 처리군들 중 2개의 처리군들(T07 및 T08)만이 5% 미만 폐 병변 카테고리 내에서 100%의 돼지들을 가졌다는 것을 보여준다. 이 연구에서 강한 통계학적 차이가 관찰되었다는 것을 주목한다.

[0209] 본 실시예의 결과는 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 상청액을 사용하고 SP-오일을 항원보강제로서 사용하는 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 제제의 유의한 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 효능을 입증한다. 추가로, 상기 실시예 7은 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 상청액을 사용하고 SP-오일을 항원보강제로서 사용하는 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 제제의 PCV2 효능을 입증하였다. 이와 더불어, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 및 PCV2 효능 둘다가 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 상청액을 사용하는 1-병 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조합물에서 입증되었다.

[0210] **실시예 10: PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신의 생체내 안전성**

[0211] 이 연구는 가장 어린 연령(3주령)에서 제공되었을 때 숙주 동물에서 다양한 항원보강제 제제 중에 최대 항원 용

량으로 제제화된 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신의 생체내 안전성을 평가하기 위해 수행되었다. 상이한 항원보강제 플랫폼들 중 어떤 것이 온도, 주사 부위 반응 및 임상적 관찰에 근거한 허용가능한 안전성 프로파일을 제공하는지를 확인하기 위해 이들 플랫폼들을 평가하였다. 이 연구 군에 의해 관찰된 주사 부위 반응 등을 갖는 종래 문제점으로 인해 20% SLCD/10% SP-오일 제제를 양성("불안전한") 대조군으로서 사용하였다.

유체의 프로세싱:

모든 백신들을 실시예 1에서 "발효 및 불활성화" 하에 기재된 바와 같이 불활성화된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원으로 제조하였다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 벌크 항원이 단백질 A 처리 시 제거될 면역글로불린 및 면역복합체 이외에 가용성 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 및 불용성 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 함유한다고 공지되어 있기 때문에, 이 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 전체 벌크 항원을 사용하였다. 불용성 세포 데브리스, 및 면역글로불린 및 면역복합체의 제거가 백신 제제의 안전성만을 더 향상시킬 것이라는 결론을 도출하는 것은 타당하다. 이 연구의 목적은 PCV2 항원 및 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 함유하는 다양한 항원보강제 제제들의 안전성을 엄격히 시험하는 것이다. PCV2 항원 및 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 최대 방출 수준으로 제제화하여 안전성을 더 평가하였다. 이들 실험 제제들은 하기 표 12에 기재되어 있다. IVP는 연구용 수의학 제품(IVP)을 표시한다.

표 12

안전성 연구를 위해 사용된 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 실험 백신 제제

일련의 IVP	PCV1-2 항원	마이코플라즈마 하이요뉴모니아* 항원	항원보강제	기타	최소 백신 부피(ml)
87-244-DK (플라세보)	NA			평균 식염수	NA
L0411RK15	7.8 RP	13 RP	10% SP-오일	NA	200
L0411RK16			5% 암피젠		200
L0611RK05			5% 암피젠 + 5% SLCD		200
L0611RK06			20% SLCD + 10% SP-오일		200

* 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 = 전체 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 시드로부터의 항원(전체 벌크 항원)

이 연구에서 사용된 안전성 파라미터는 직장 온도 프로파일 및 주사 부위 반응이었다. 이 연구의 결과는 모든 후보자 항원보강제 플랫폼들이 직장 온도 프로파일 및 임상적 관찰의 관점에서 허용가능한 안전성 프로파일을 제공하였다는 것을 보여주었다(결과는 제시되어 있지 않음). 20% SLCD + 10% SP-오일(즉, 양성 대조군)만이 플라세보 백신과 유의하게 상이하였고 다수의 중증 주사 부위 반응을 가졌다(결과는 제시되어 있지 않음).

실시예 11: 핵심 연구를 위한 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원의 제조

도 9는 PCV2 상용가능한 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원의 제조에 사용되는 제조 공정의 한 실시양태를 보여주는 순서도이다. 접선 유동 여과를 통해 마이코플라즈마 하이요뉴모니아의 불활성화된 전체 배양물로부터 세포를 정화하였다. 요약하건대, 공칭 공극 크기가 0.45 μm 인 폴리에테르 설푼 필터(지이 헬쓰케어, 파트 번호 56-4102-49)를 0.5 N 수산화나트륨 용액으로 살균한 후 멸균 USP 물로 광범위하게 세정하였다. 불활성화된 마이코플라즈마 배양액을, 11.0 ℓ /분을 목표로 하는 재순환 속도 및 약 5 PSI의 경막 압력에서 장치에 도입하였다. 정화를 실온에서 수행하였다. 필터 투과액을 수집하고 추가 프로세싱까지 2°C 내지 8°C에서 저장하였다.

정화 후, 항원 함유 유체를 단백질 A 수지로 처리하여 항체 수준을 감소시켰다. 요약하건대, 맵셀렉트 단백질 A 수지(지이 헬쓰케어)를 유리 컬럼 내에 12 cm의 높이까지 채워넣었다. 상기 수지를 5 컬럼 부피의 50 mM 인산나트륨/250 mM NaCl 완충제(pH 7.0)로 평형화시켰다. 10 컬럼 부피와 동등한 항원 함유 유체를 상기 수지에 100 cm/시간의 선형 유속으로 적재하였다. 컬럼 유동 관통액을 수집하고 0.2 μm 필터를 통해 필터 멸균하였다. 3 컬럼 부피의 25 mM 아세트이트 용액(pH 3.7)에 이어서 4 컬럼 부피의 1 M 아세트산 용액을 유동시킴으로써 컬

럼의 재생을 달성하였다. 각각 PCV2 특이적 항체 ELISA 및 p46 항원 정량 ELISA를 통해 최종 항원 유체에서 항-PCV2 항체 및 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원 수준을 측정하였다.

[0219] **실시예 12: PRRS 바이러스에 대한 살바이러스 활성의 평가**

[0220] 이 실시예에서 제공된 연구는 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스 활성에 대한 다양한 항원보강제 플랫폼들을 평가하기 위해 디자인되었다. 초기 실험은 항원보강제 단독(즉, 제제는 PCV 또는 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 항원을 함유하지 않았음)에 초점을 두었다. PRRS 살바이러스 활성에 대한 항원보강제 평가는 도 10에 제시되어 있다. 예비 살바이러스 평가는 10% SP-오일, 0.2% 카보폴 및 2.5% 암피젠이 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스 성을 나타내지 않는다는 것을 보여주었다. 대조적으로, 20% SLCD 항원보강제는 PRRS 바이러스에 살바이러스성을 나타내는 듯하였다.

[0221] 상이한 항원보강제 플랫폼들로 항원보강된 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제들이 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않는지를 평가하기 위해 추가 연구를 수행하였다. 이들 결과는 하기 표 13에 제시되어 있고, 이때 부호 *는 PRRSV에 대한 살바이러스성을 나타내는 일련의 백신들을 표시한다.

표 13

상이한 제제를 사용한 PRRS 살바이러스성 분석의 결과

실시예 7, 8 및 10의 연구에서 사용된 일련의 백신			효능		PRRS 살바이러스성	
연구	설명	일련 번호	p46 RP (ru/ds)	PCV2 NVSL RP	A	B
실시예 7, 8 및 10	멸균 식염수(0.9% 염화나트륨)	87-244-DK (플라세보)				
실시예 7 및 8	10% SP-오일 중의 cPCV(RP 1.6) + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아(RP 7.5)	L0411RK08	7.1	1.29	-0.10	-0.13
실시예 7 및 8	5% 암피젠 중의 cPCV(RP 1.6) + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아(RP 7.5)	L0411RK09	7.3	1.33	-0.10	+0.14
실시예 7 및 8	5% 암피젠 + 5% SLCD 중의 cPCV(RP 1.6) + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이에뉴모니아(RP 7.5)	L0611RK03	6.9	1.15	-0.36	-0.33
실시예 7	20% SLCD 중의 cPCV(RP 1.6) 1가	L0611RK04		1.50	-1.86*	-0.50
실시예 8	기한만료된 레스피슈어-원	A827870	12.6			
실시예 10	10% SP-오일 중의 cPCV(RP 7.8) + 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 전체 벌크(RP 13.3)	L0411RK15	14	1.03	-0.32	-0.03
실시예 10	5% 암피젠 중의 cPCV(RP 7.8) + 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 전체 벌크(RP 13.3)	L0411RK16	15.5	1.12	-0.36	-0.53
실시예 10	5% 암피젠 + 5% SLCD 중의 cPCV(RP 7.8) + 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 전체 벌크(RP 13.3)	L0611RK05	17.5	1.50	-0.54	-0.33
실시예 10	20% SLCD + 10% SP-오일 중의 cPCV(RP 7.8) + 마이코플라즈마 하이에뉴모니아 전체 벌크(RP 13.3)	L0611RK06	15.9	1.13	-1.93*	-0.99*

*는 살바이러스성(>0.7 log 손실)을 표시한다

A - 살바이러스성 분석 대조군 GMT 약 5.53 log/ml

B - 살바이러스성 분석 대조군 GMT 약 6.42 log/ml

[0222]

[0223] 상기 표 13에 제시된 결과는 10% SP-오일이 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않는다는 것을 보여준다.

[0224] 10% SP-오일을 항원보강제로서 사용하여 일련의 추가 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신들을 제조하였다(표 14). 일련의 이들 백신들의 항원성 효능을 0.688%의 20배 PCV2 항원 농축물(실시예 2에 기재된 바와 같이 제조됨) 및 9.40%의 마이코플라즈마 하이요뉴모니아(실시예 11에 기재된 바와 같이 제조됨)를 함유하는 기준 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 백신(L1211RK15)과 비교하였다. 하기 표 14에 제시된 결과도 10% SP-오일이 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않는다는 것을 보여준다. 표 14의 시험 샘플 값들은 약 $5.9 \pm 0.5 \log/\text{mL}$ 의 기하 평균 역가(GMT)를 갖는 살바이러스성 분석 대조군보다 각각 더 높았다(+ 표시).

표 14

10% SP-오일로 항원보강된 상이한 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제를 사용한 살바이러스성 분석의 결과

사용된 일련의 백신		효능		PRRS 살바이러스성
설명	일련 번호	p46 RP (ru/ds) 기준 L1211RK15	PCV2 NVSL 기준 L1211RK15	log10 TCID ₅₀ /mL
별균 회석제(별균수)	1949122	na	na	
10% SP-오일 중의 cPCV + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아	L0912RK12	1.62	2.60	+0.58
10% SP-오일 중의 cPCV + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아	L0912RK10	0.88	1.23	+0.58
10% SP-오일 중의 cPCV + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아	L0912RK11	1.24	2.62	+0.58
10% SP-오일 중의 cPCV + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아	L0912RK08	1.08	1.03	+0.91
10% SP-오일 중의 cPCV + 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아	L0912RK09	1.65	2.06	+0.50

[0225] 살바이러스성 분석 대조군 GMT 약 $5.9 \pm 0.5 \log/\text{mL}$

[0226] 이 실시예에 제시된 결과는 10% SP-오일이 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않는다는 것을 입증한다. 이 실시예에 제시된 결과는 10% SP-오일로 항원보강된 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제가 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않는 것으로 간주된 일련의 백신들에 속한다는 것도 입증한다(표 13 및 표 14). 결론적으로, 10% SP-오일로 항원보강된 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제는 PCV, 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 및 PRRS 바이러스를 포함하는 3가 조합물의 기반이 되는 효과적인 플랫폼으로서 간주되었다.

[0227] 실시예 13: PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아/PRRS 조합 백신의 제조

[0228] PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않은 항원보강제 플랫폼으로 항원보강된 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제(상기 표 13 및 14 참조)는 사용 준비된 1-병 액체 조성물로서 제공된다. 이 1-병 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제는 단백질 A-처리된 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 상청액을 사용한다. 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 및 PCV2 효능은 마이코플라즈마 하이요뉴모니아 단백질 A-처리된 상청액을 사용하는 이러한 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제에서 입증되었다(실시예 7 내지 9 참조). 본 실시예에서, 이 2가 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제는 1가 PRRS 바이러스 항원과 조합된다.

[0229] 한 실시양태에서, 일련의 백신들, 즉 상기 표 11의 L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 및 L0711RK14 중 하나에 상응하는, 10% SP-오일 중의 PCV/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 조합물은 사용 준비된 1-병 액체 조성물로서 제공된다. 상기 실시예 12에 제시된 결과는 10% SP-오일이 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않는다는 것을 입증하였다. 실시예 12는 10% SP-오일로 항원보강된 PCV2/마이코플라즈마 하이요뉴모니아 제제가 PRRS 바이러스에 대한 살바이러스성을 나타내지 않는 것으로 간주된 일련의 백신들에 속한다는 것도

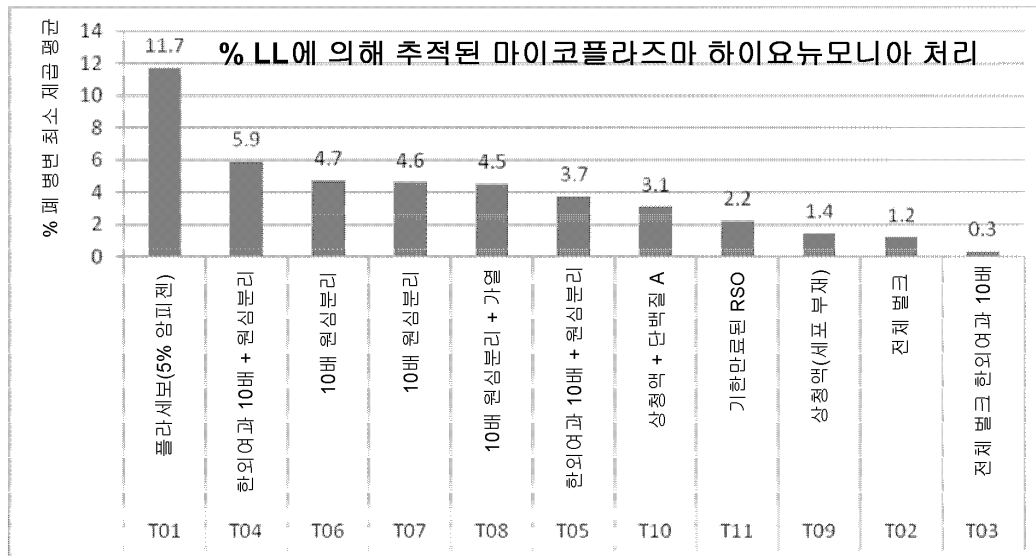
입증하였다. 본 실시예에서, 이러한 1-병 PCV2/마이코플라스마 하이요뉴모니아 액체 조성물은 제2병에 함유된 동결건조된 유전적으로 변경된 PRRS 생바이러스 조성물을 재수화시키는 데에 사용되므로, 모든 항원들은 적합한 연령(예를 들면, 3주령 이상의 연령)의 돼지에게 투여되기 전에 단일 병 내에 함유된다.

[0230]

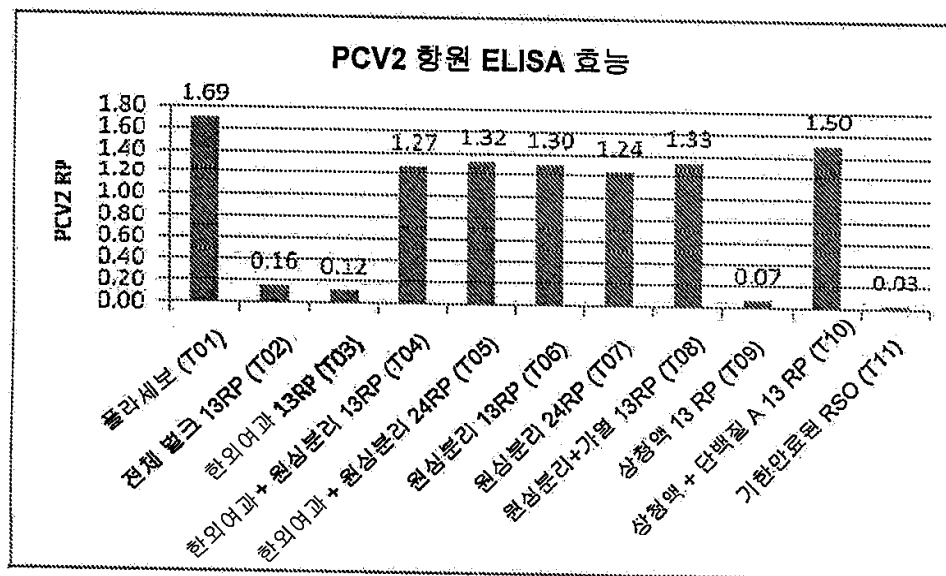
한 실시양태에서, PRRS 바이러스는 서열번호 16에 상응하는 게놈 서열 또는 이의 변이체를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 3가 조성물에서 사용된 PRRS 바이러스는 기탁번호 VR2430 하에 ATCC에 기탁된 ISU-55로서 명명된 PRRS 바이러스 단리물이다. 각각의 항원의 적합한 양은 본원에 기재되어 있다. 바람직하게는, 모든 항원들은 돼지에게 단위 용량으로 투여된다.

도면

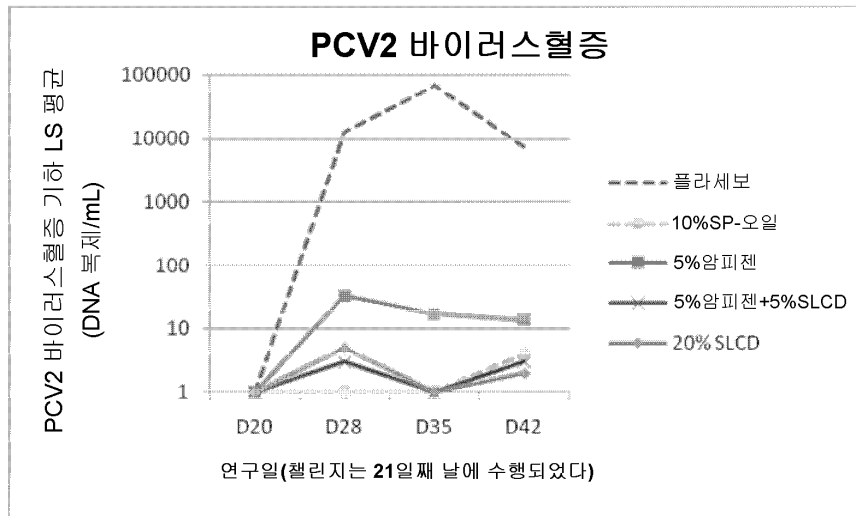
도면1



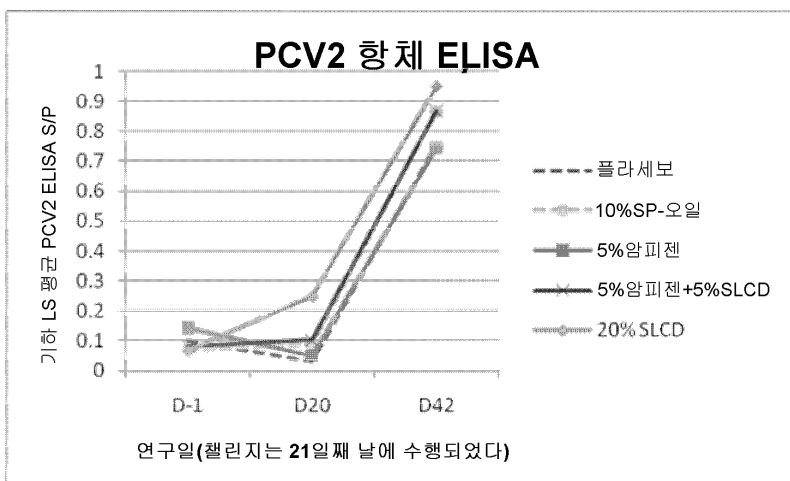
도면2



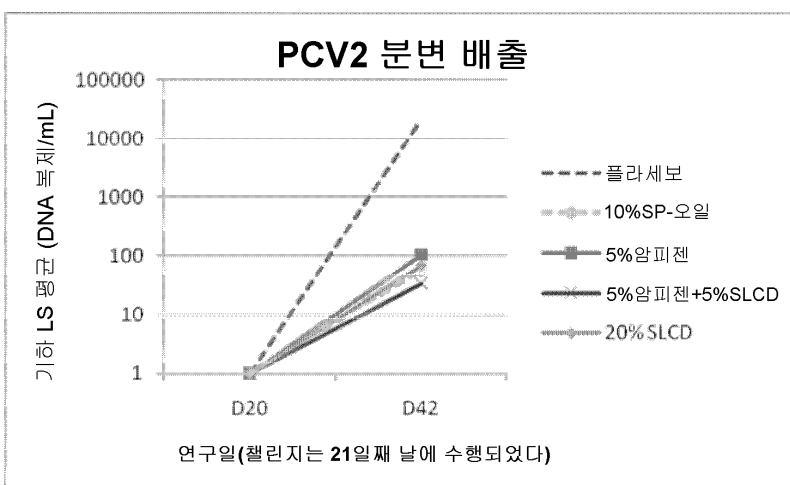
도면3



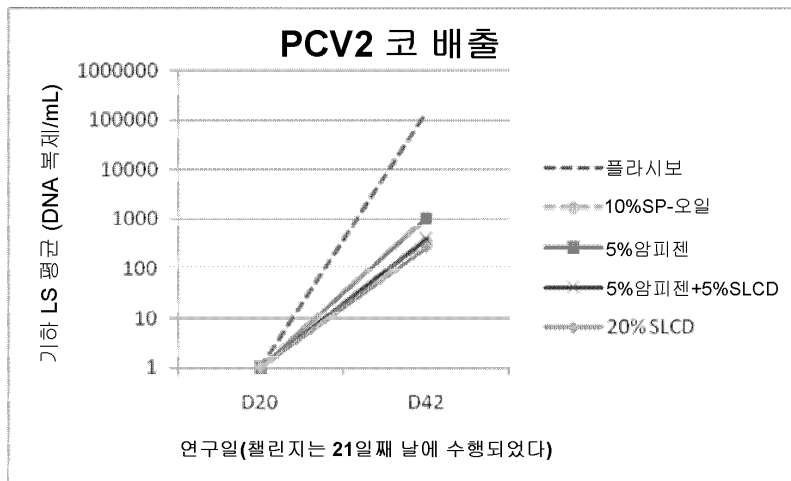
도면4



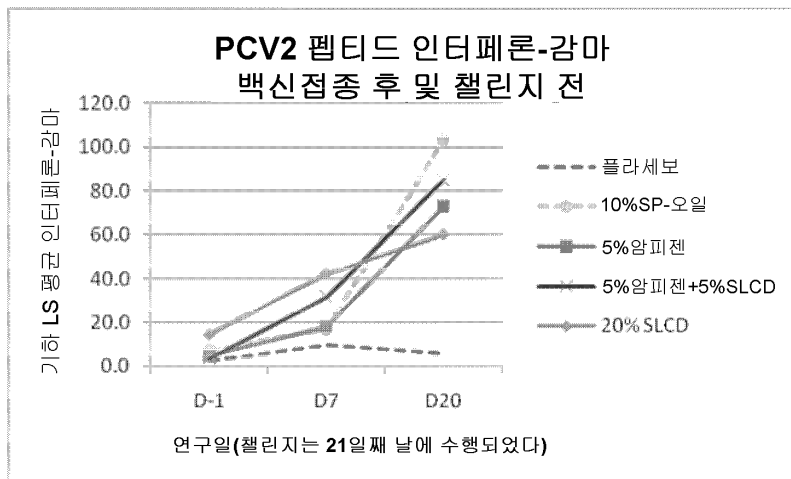
도면5



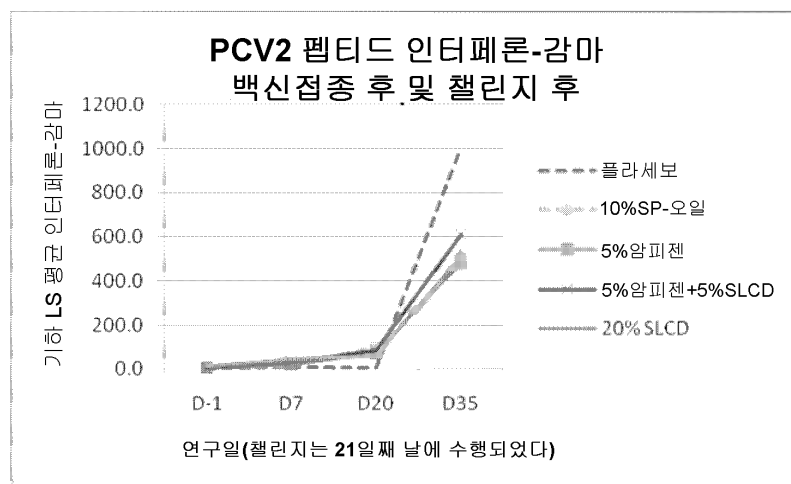
도면6



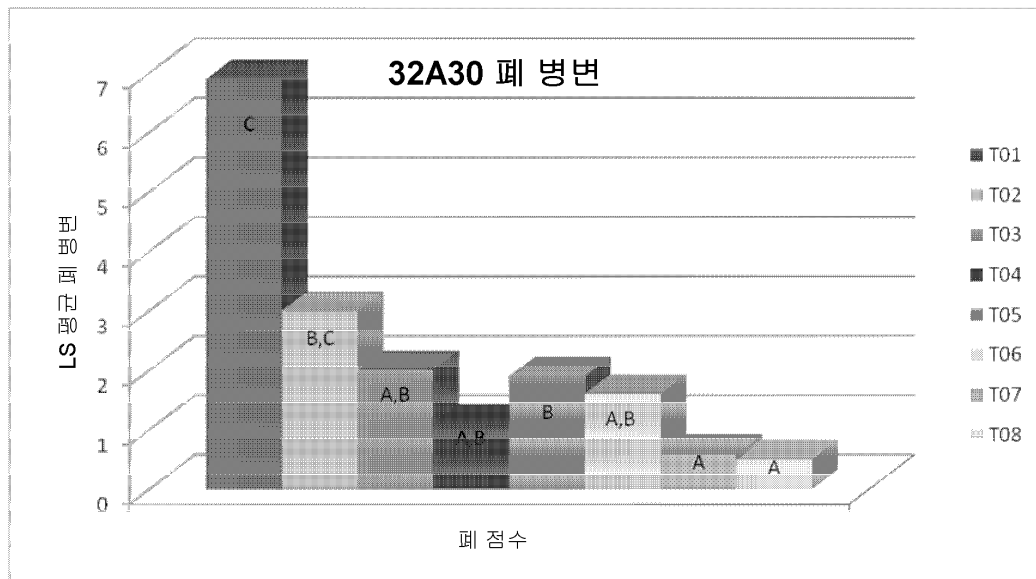
도면7a



도면7b



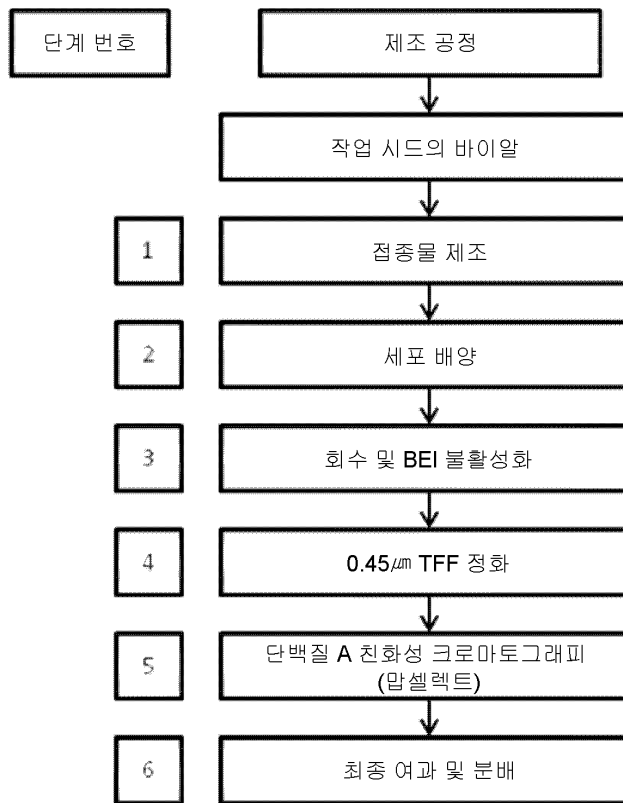
도면8a



도면8b

대비	감소된 분획	95% 신뢰구간
T01 대 T02	41.2	-5.9 내지 76.5
T01 대 T03	64.7	29.4 내지 100
T01 대 T04	76.5	41.2 내지 100
T01 대 T05	73.3	33.3 내지 100
T01 대 T06	62.5	25 내지 100
T01 대 T07	87.5	62.5 내지 100
T01 대 T08	88.2	64.7 내지 100

도면9



도면10

예비 살바이러스 활성	물과의 차이			
	100% 재수화	90/10	90/10	평균 살바이러스 활성
	동결건조된 상태 역가	액체 (DMEM) 90/10	액체 (한외여과) 90/10	
20% SLCD	0.8	0.7	2.0	1.3
0.2% 카보폴	0.3	-0.3	0.2	-0.1
10% SP-오일	0.2	0.0	0.0	0.0
10% SP-오일/0.2% 카보폴	0.3	-0.2	0.0	-0.1
20% SLCD/10% SP-오일	1.0	0.3	0.7	0.5
20% SLCD/10% SP-오일/0.2% 카보폴	0.2	0.0	0.5	0.3
5% 암피젠 (40% 원액으로부터)	1.0	0.7	1.5	1.1
2.5% 암피젠 (40% 원액으로부터)	NA	-0.2	NA	-0.2
5% 암피젠 (20% 원액으로부터)	NA	0.8	NA	0.8
2.5% 암피젠 (20% 원액으로부터)	NA	0.2	NA	0.2
5% 암피젠 (40% 원액으로부터)	NA	1.3	NA	1.3
2.5% 암피젠 (40% 원액으로부터)	NA	0.8	NA	0.8
잠재적 살바이러스 활성을 표시함				

서열 목록

<120> Mycoplasma Hyopneumoniae Vaccine

<130> PC71911A

<140> PCT/US2013/035083

<141> 2013-04-03

<150> US 61/620,165

<151> 2012-04-04

<160> 18

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1260

<212> DNA

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 1

```

atgaaaaaaa tgcttagaaa aaaattcttg tattcatcag ctatttatgc aacttcgctt      60
gcatcaatta ttgcatttgt tgcagcaggt tgtggacaga cagaatcagg ttcgacttct      120
gattctaacc cacaagccga gacgctaaaa cataaagtaa gtaatgattc tattcgaata      180

gcactaaccg atccggataa tcctcgatga attagtgtc aaaaagatat tatttcttat      240
gttgatgaaa cagaggcagc aacttcaaca attacaaaa accaggatgc acagaataac      300
tgactcactc agcaagctaa ttttaagccca gcacaaaaag gatttattat tgcccctgaa      360
aatggaagtg gagttggaac tgctgttaat acaattgctg ataaaggaat tccgattgtt      420
gcctatgac gactaattac tggatctgat aaatatgatt ggtatgttcc ttttgataat      480
gaaaaagtgt gcgaattaca aggtctttca ctgcagcgg gtctattagg aaaagaagat      540
ggtgcttttg attcaattga tcaaatgaat gaatatctaa aatcacatat gccccagag      600

acaatttctt tttatacaat cgcggttcc caagatgata ataactecca atatttttat      660
aatggtgcaa tgaaagtact taaagaatta atgaaaaatt cgggaaataa gataattgat      720
ttatctctg aaggcgaaaa tgctgtttat gtcccaggat gaaattatgg aactgccggt      780
caaagaatcc aatcttttct aacaattaac aaagatccag caggtggtta taaaatcaaa      840
gctgttggtt caaaaccagc ttctattttc aaaggatttc ttgccccaaa tgatggaatg      900
gccgarcaag caatcaccaa attaaaactt gaaggatttg atacccaaaa aatctttgta      960
actggtcaag attataatga taaagccaaa acttttatca aagacggcga tcaaaatatg      1020

acaatttata aacctgataa agtttttagga aaagttgctg ttgaagttct tcgggtttta      1080

```

attgcaaaga aaaataaagc atccagatca gaagtcgaaa acgaactaaa agcaaaaacta 1140
 ccaaataattt catttaaata tgataatcaa acatataaag tgcaaggtaa aaatattaat 1200
 acaatttttag taagtcagcgt aattgttaca aaagctaagtg ttgataatcc tgatgcctaa 1260

<210> 2

<211> 419

<212> PRT

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 2

Met Lys Lys Met Leu Arg Lys Lys Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Ile Tyr

1 5 10 15

Ala Thr Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ala Phe Val Ala Ala Gly Cys Gly

20 25 30

Gln Thr Glu Ser Gly Ser Thr Ser Asp Ser Lys Pro Gln Ala Glu Thr

35 40 45

Leu Lys His Lys Val Ser Asn Asp Ser Ile Arg Ile Ala Leu Thr Asp

50 55 60

Pro Asp Asn Pro Arg Trp Ile Ser Ala Gln Lys Asp Ile Ile Ser Tyr

65 70 75 80

Val Asp Glu Thr Glu Ala Ala Thr Ser Thr Ile Thr Lys Asn Gln Asp

85 90 95

Ala Gln Asn Asn Trp Leu Thr Gln Gln Ala Asn Leu Ser Pro Ala Pro

100 105 110

Lys Gly Phe Ile Ile Ala Pro Glu Asn Gly Ser Gly Val Gly Thr Ala

115 120 125

Val Asn Thr Ile Ala Asp Lys Gly Ile Pro Ile Val Ala Tyr Asp Arg

130 135 140

Leu Ile Thr Gly Ser Asp Lys Tyr Asp Trp Tyr Val Ser Phe Asp Asn

145 150 155 160

Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Gly Leu Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu

165 170 175

Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr

180 185 190

Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala
195 200 205

Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Asn Gly Ala Met
210 215 220

Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gly Asn Lys Ile Ile Asp
225 230 235 240

Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr
245 250 255

Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp
260 265 270

Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser
275 280 285

Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala
290 295 300

Ile Thr Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val
305 310 315 320

Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly
325 330 335

Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val
340 345 350

Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser
355 360 365

Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser
370 375 380

Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Ile Asn
385 390 395 400

Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn
405 410 415

Pro Asp Ala

<210> 3

<211> 3324

<212> DNA

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 3

atgagtaaaa aatcaaaaac atttaaaatt ggtttgactg ccggaattgt tggctcttga	60
gtttttggtc taactgtcgg acttagcagc ttggcaaaat acagatcaga aagtcacga	120
aagattgcaa atgattttgc cgcaaaagt tcaacattag cttttagtcc ttatgctttt	180
gagactgatt ctgattataa aatagtcaaa aggtgactag ttgattctaa taacaatatt	240
agaaataaag aaaaagttat tgattccttt tcctttttta ctaaaaacgg tgatcagtta	300
gaaaaatta attttcaaga tcctgaatat accaaggcga agataacttt tgagattctt	360
gaaattatcc ctgatgatgt caatcaaaat ttttaaggtaa aatttcaggc attacaaaaa	420
cttcataatg gtgatattgc caaatctgat atttatgagc aaacagttgc ttttgccaaa	480
cagtcaaadc ttttagttgc cgaatttaat ttttcgctta aaaaaattac cgaaaaatta	540
aatcaacaaa ttgaaaattt atcaacaaaa attacaaatt ttgctgatga aaaaacaagc	600
agccaaaaag atccctcaac tctaagagct attgacttcc aatacgattt aaatacagcg	660
cgaaatcctg aggattttaga tataaagctt gctaattatt ttccagtact taaaaattta	720
ataaacagac taaataatgc tcctgagaat aaattaccta ataatttggg taatatTTTT	780
gaatttagct ttgcaaaaga tagttcaact aatcaatatg taaglatcca gaaccaaatt	840
ccttcgctgt ttttaaaagc agatcttagt caaagtgccg gtgaaatttt agctagccca	900
gatgaagttc agccagttat taacatttta agattaatga aaaaagataa ttcttcttat	960
tttctaaatt ttgaggattt tgtaataat ttaacactga aaaatagca aaaagaagat	1020
ttaaatgcaa agggtcaaaa tctttctgcc tatgaatttc tagcagatat taaatctgga	1080
tttttcctg gagacaagag atccagtcac accaaggcag aaattagtaa tcttttaaat	1140
aaaaaagaaa atatttatga ctttggtaaa tacaatggaa aattcaacga ccgtcttaac	1200
tcgccaaatt tagaatatag cctagatgca gcaagcgcaa gtcttgataa aaaagataaa	1260
tcaatagttt taattcccta ccgccttgaa attaaagata aattttttgc cgatgattta	1320
tatccagata caaaagataa tattctcgta aaagaaggga ttcttaaat aactggattt	1380
aaaaaaggct caaaaattga tctcccta atcaatcagc aaatttttaa aaccgaatat	1440
ttaccatttt ttgaaaagg taaagaagaa caagcaaat tagactatgg taatatctta	1500
aatccatata atactcaact tgccaaagt gaagttgaag ctctttttta agggaataaa	1560
aaccaagaaa tctatcaagc acttgatgga aattatgcct atgaattcgg ggccttttaa	1620

tccgtgctta attcctgaac aggaaaaatt cagcatcctg aaaaagctga tatccaaaga 1680
 tttaacagac atttagaaca agttaaaatt ggttctaatt cagtttttaa tcaaccacaa 1740
 acaacaaaag aacaagtaat ttcaagtctt aaaagtaata acttttttaa aaatggacat 1800
 caagttgcaa gtiatttcca ggatttactic accaaggaca aattaacaat tttagagact 1860
 ctttatgata tagcaaaaaa atggggacta gaaactaaca gagcacaatt cccaaaaggg 1920

gttttccaat atacaaaaga tatttttgca gaagcagata aattaaaatt ttggaattg 1980
 aagaaaaagg atccttaca ttagataaaa gaaattcacc aactttcctt taatatatta 2040
 gcccgtaacg atgtaataaa atctgatgga ttttacggag ttttattatt gcccacaaagt 2100
 gtaaaaactg aattagaagg caaaaatgag gcgcaaattt ttgaagcgct taaaaagtat 2160
 tctttaattg agaactcggc ttttaaaact actatttttag ataaaaattt acttgaaggg 2220
 actgatttta aaaccttcgg tgatttttta aaagcatttt tccttaaagc agcccaattt 2280
 aataattttg ctcttgagc aaaattagac gataatcttc agtattcatt tgaagctatc 2340

aaaaaagggg aaactacaaa agaaggtaaa agagaagaag tagataaaaa agttaaggaa 2400
 ttggataata aaataaaaagg tatattgcct cagccccag cagcaaaacc agaagcagca 2460
 aaaccagtag cggctaaacc agaaacaaca aaaccagtag cagctaaacc tgaagcagct 2520
 aaacctgaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2580
 aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2640
 aaaccagaag cagcaaaacc agttgtact aatactggct tttcattac aaataacca 2700
 aaagaagact atttccaat ggcttttagt tataaattag aatatactga cgaataaaa 2760

ttaagcctaa aaacaccgga aattaatgia tttttagaac tagttcatca aagcgagtat 2820
 gaagaacaag aaataataaa ggaactagat aaaactgttt taaatcttca atatcaattc 2880
 caggaagtca aggtactag tgaccaatat cagaaactta gccaccaat gatgaccgaa 2940
 ggatcttcaa atcaaggtaa aaaaagcgaa ggaactccta accaaggtaa aaaagcagaa 3000
 ggcgcgcta accaaggtaa aaaagccgaa ggaactccta accaaggga aaaagcagag 3060
 ggagcaccta gtcaacaaag cccaactacc gaattaacta attaccttc tgacttaggt 3120
 aaaaaattg acgaaatcat taaaaacaa ggtaaaaatt gaaaaacaga ggttgaacta 3180

atcgaggata atacgctgg agatgctaaa ttgctatact ttatcctaag ggatgattca 3240
 aaatccggtg atcctaaaaa atcaagtcta aaagttaaaa taacagtaaa acaagtaat 3300
 aataatcagg aaccagaatc taaa 3324

<210> 4

<211> 1108

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 4

Met Ser Lys Lys Ser Lys Thr Phe Lys Ile Gly Leu Thr Ala Gly Ile

1 5 10 15

Val Gly Leu Gly Val Phe Gly Leu Thr Val Gly Leu Ser Ser Leu Ala

20 25 30

Lys Tyr Arg Ser Glu Ser Pro Arg Lys Ile Ala Asn Asp Phe Ala Ala

35 40 45

Lys Val Ser Thr Leu Ala Phe Ser Pro Tyr Ala Phe Glu Thr Asp Ser

50 55 60

Asp Tyr Lys Ile Val Lys Arg Trp Leu Val Asp Ser Asn Asn Asn Ile

65 70 75 80

Arg Asn Lys Glu Lys Val Ile Asp Ser Phe Ser Phe Phe Thr Lys Asn

85 90 95

Gly Asp Gln Leu Glu Lys Ile Asn Phe Gln Asp Pro Glu Tyr Thr Lys

100 105 110

Ala Lys Ile Thr Phe Glu Ile Leu Glu Ile Ile Pro Asp Asp Val Asn

115 120 125

Gln Asn Phe Lys Val Lys Phe Gln Ala Leu Gln Lys Leu His Asn Gly

130 135 140

Asp Ile Ala Lys Ser Asp Ile Tyr Glu Gln Thr Val Ala Phe Ala Lys

145 150 155 160

Gln Ser Asn Leu Leu Val Ala Glu Phe Asn Phe Ser Leu Lys Lys Ile

165 170 175

Thr Glu Lys Leu Asn Gln Gln Ile Glu Asn Leu Ser Thr Lys Ile Thr

180 185 190

Asn Phe Ala Asp Glu Lys Thr Ser Ser Gln Lys Asp Pro Ser Thr Leu

195 200 205

Arg Ala Ile Asp Phe Gln Tyr Asp Leu Asn Thr Ala Arg Asn Pro Glu

210 215 220

Asp Leu Asp Ile Lys Leu Ala Asn Tyr Phe Pro Val Leu Lys Asn Leu
 225 230 235 240
 Ile Asn Arg Leu Asn Asn Ala Pro Glu Asn Lys Leu Pro Asn Asn Leu
 245 250 255
 Gly Asn Ile Phe Glu Phe Ser Phe Ala Lys Asp Ser Ser Thr Asn Gln
 260 265 270
 Tyr Val Ser Ile Gln Asn Gln Ile Pro Ser Leu Phe Leu Lys Ala Asp
 275 280 285

 Leu Ser Gln Ser Ala Arg Glu Ile Leu Ala Ser Pro Asp Glu Val Gln
 290 295 300
 Pro Val Ile Asn Ile Leu Arg Leu Met Lys Lys Asp Asn Ser Ser Tyr
 305 310 315 320
 Phe Leu Asn Phe Glu Asp Phe Val Asn Asn Leu Thr Leu Lys Asn Met
 325 330 335
 Gln Lys Glu Asp Leu Asn Ala Lys Gly Gln Asn Leu Ser Ala Tyr Glu
 340 345 350

 Phe Leu Ala Asp Ile Lys Ser Gly Phe Phe Pro Gly Asp Lys Arg Ser
 355 360 365
 Ser His Thr Lys Ala Glu Ile Ser Asn Leu Leu Asn Lys Lys Glu Asn
 370 375 380
 Ile Tyr Asp Phe Gly Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Asn Asp Arg Leu Asn
 385 390 395 400
 Ser Pro Asn Leu Glu Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Ser Ala Ser Leu Asp
 405 410 415

 Lys Lys Asp Lys Ser Ile Val Leu Ile Pro Tyr Arg Leu Glu Ile Lys
 420 425 430
 Asp Lys Phe Phe Ala Asp Asp Leu Tyr Pro Asp Thr Lys Asp Asn Ile
 435 440 445
 Leu Val Lys Glu Gly Ile Leu Lys Leu Thr Gly Phe Lys Lys Gly Ser
 450 455 460
 Lys Ile Asp Leu Pro Asn Ile Asn Gln Gln Ile Phe Lys Thr Glu Tyr

465					470								475								480										
Leu	Pro	Phe	Phe	Glu	Lys	Gly	Lys	Glu	Glu	Gln	Ala	Lys	Leu	Asp	Tyr																
				485								490								495											
Gly	Asn	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Gln	Leu	Ala	Lys	Val	Glu	Val																
				500								505								510											
Glu	Ala	Leu	Phe	Lys	Gly	Asn	Lys	Asn	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu																
				515								520								525											
Asp	Gly	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Ser	Val	Leu	Asn																
				530								535								540											
Ser	Trp	Thr	Gly	Lys	Ile	Gln	His	Pro	Glu	Lys	Ala	Asp	Ile	Gln	Arg																
				545								550								555								560			
Phe	Thr	Arg	His	Leu	Glu	Gln	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Leu																
				565								570								575											
Asn	Gln	Pro	Gln	Thr	Thr	Lys	Glu	Gln	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser																
				580								585								590											
Asn	Asn	Phe	Phe	Lys	Asn	Gly	His	Gln	Val	Ala	Ser	Tyr	Phe	Gln	Asp																
				595								600								605											
Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Lys	Leu	Thr	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Tyr	Asp	Leu																
				610								615								620											
Ala	Lys	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Thr	Asn	Arg	Ala	Gln	Phe	Pro	Lys	Gly																
				625								630								635								640			
Val	Phe	Gln	Tyr	Thr	Lys	Asp	Ile	Phe	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	Leu	Lys																
				645								650								655											
Phe	Leu	Glu	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Pro	Tyr	Asn	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile																
				660								665								670											
His	Gln	Leu	Ser	Phe	Asn	Ile	Leu	Ala	Arg	Asn	Asp	Val	Ile	Lys	Ser																
				675								680								685											
Asp	Gly	Phe	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Ser	Val	Lys	Thr	Glu																
				690								695								700											
Leu	Glu	Gly	Lys	Asn	Glu	Ala	Gln	Ile	Phe	Glu	Ala	Leu	Lys	Lys	Tyr																
				705								710								715								720			

Ser Leu Ile Glu Asn Ser Ala Phe Lys Thr Thr Ile Leu Asp Lys Asn
725 730 735

Leu Leu Glu Gly Thr Asp Phe Lys Thr Phe Gly Asp Phe Leu Lys Ala
740 745 750

Phe Phe Leu Lys Ala Ala Gln Phe Asn Asn Phe Ala Pro Trp Ala Lys
755 760 765

Leu Asp Asp Asn Leu Gln Tyr Ser Phe Glu Ala Ile Lys Lys Gly Glu
770 775 780

Thr Thr Lys Glu Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys Val Lys Glu
785 790 795 800

Leu Asp Asn Lys Ile Lys Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro Ala Ala Lys
805 810 815

Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Thr Thr Lys Pro
820 825 830

Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val
835 840 845

Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala
850 855 860

Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala
865 870 875 880

Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Thr Asn Thr Gly Phe Ser Leu
885 890 895

Thr Asn Lys Pro Lys Glu Asp Tyr Phe Pro Met Ala Phe Ser Tyr Lys
900 905 910

Leu Glu Tyr Thr Asp Glu Asn Lys Leu Ser Leu Lys Thr Pro Glu Ile
915 920 925

Asn Val Phe Leu Glu Leu Val His Gln Ser Glu Tyr Glu Glu Gln Glu
930 935 940

Ile Ile Lys Glu Leu Asp Lys Thr Val Leu Asn Leu Gln Tyr Gln Phe
945 950 955 960

Gln Glu Val Lys Val Thr Ser Asp Gln Tyr Gln Lys Leu Ser His Pro

965 970 975
Met Met Thr Glu Gly Ser Ser Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly Thr
980 985 990

Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys
995 1000 1005
Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro
1010 1015 1020
Ser Gln Gln Ser Pro Thr Thr Glu Leu Thr Asn Tyr Leu Pro Asp
1025 1030 1035
Leu Gly Lys Lys Ile Asp Glu Ile Ile Lys Lys Gln Gly Lys Asn
1040 1045 1050

Trp Lys Thr Glu Val Glu Leu Ile Glu Asp Asn Ile Ala Gly Asp
1055 1060 1065
Ala Lys Leu Leu Tyr Phe Ile Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ser Gly
1070 1075 1080
Asp Pro Lys Lys Ser Ser Leu Lys Val Lys Ile Thr Val Lys Gln
1085 1090 1095
Ser Asn Asn Asn Gln Glu Pro Glu Ser Lys
1100 1105

<210> 5

<211> 1773

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<400> 5

ggtacctcgc tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga	60
tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcctgattg	120
ctggtaatca aaatactcgc ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc	180
aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca	240
tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc	300
cagtaggtgt ccctaggtc agcaaaatta cgggccact ggctcttccc acaaccgggc	360
gggccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact	420

ttcaaaagt cagccagccc gcggaaattt ctacatacg ttacaggaaa ctgctcggct 480
 acagtcacca aagaccccggt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc 540
 ttccctgggt tccgcgagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat 600
 tctttattct gciggtcgggt tcttttcgct ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac 660
 cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga 720
 gtctaccct cttccaaacc ttctcgcca caaacaat aatcaaaaag ggagattgga 780
 agctcccgta tttgttttt ctctctctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840

 ttatggggtt gcgggcccgt tttcttgctt ggcattttca ctgacgtgc cgaggtgctg 900
 ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgact tctttcactt ttataggatg 960
 acgtatcaa ggaggcgta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgccag 1020
 atctccgcc gccgccctg gtcgtccac cccgccacc gctaccgtg gagaaggaaa 1080
 aatggcatct tcaacacccg cctctccgc acctcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140
 gtcagaacgc cctctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc 1200
 ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata cctttgaat actacagaat aagaaaggtt 1260

 aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggtccact 1320
 gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaaccta tgaccatat 1380
 gtaaactact cctcccgcca tacaatcccc caaccttct cctaccactc cgtttacttc 1440
 acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaaataa caaaaggaat 1500
 cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560
 ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taaccatgta tgtacaattc 1620
 agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaccat 1680

 tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt 1740
 ggggtccactg cttcaaatcg gccttcgggt acc 1773

 <210> 6
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus
 <400> 6
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatctcc gccgccgcc ctggtcgtc cccccgcc accgtaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgctctcc cgcacctcg gatatactgt caaggctacc 180

acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240

ccccgggag gggggaccaa caaaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300

gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggtcc 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420

tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctctacca ctcccgttac 480

ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540

aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600

gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 660

ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaacct aa 702

<210> 7

<211> 233

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 7

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> 8

<211> 1767

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<400> 8

ggtagctccg 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
 tccaaaacaa caactttctc tccatgatat ccatccacc acttatttct actaggtctc 300
 cagtaggtgt cgctaggctc agcaaaatta cgggccact ggctcttccc acaaccgggc 360
 gggcccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgt gctgcatctt cccgctcact 420

 ttcaaaagtt cagccagccc gcggaattt ctacatacg ttacaggga ctgctcggct 480
 acagtcacca aagacccgt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc 540
 ttcccctggt tccgcgagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat 600
 tctttattct gctggctcgt tctttcgt tctcgtatgt ggcagcgggc accaaaatac 660
 cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga 720
 gtctaccct ctccaaacc ttctctccg caaacaaat aatcaaaaag ggagattgga 780

agctcccgtg ttttgTTTT ctcctcctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840

ttatggggtt gggggccgct tttcctgctt ggcatTTTca ctgacgtgc cgaggTctg 900

ccgtgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgcaact tctttcaatt ttataggatg 960

acgtatccaa ggaggcgTta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgccag 1020

atcctccgcc gccgcccctg gctcgtccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080

aatggcatct tcaacacccg cctctcccg ccttcggat ataactgtcaa ggctaccaca 1140

gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgTtccc 1200

ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata ccctttgaat actacagaat aagaaaggTt 1260

aaggTtgaat tcTggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggctccact 1320

gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaaccta tgaccatat 1380

gtaaactact cctcccgcca tacaatcgcc caaccttct cctaccactc ccgttacttc 1440

acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaaataa caaaaggaaT 1500

cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560

ttcgaaaaca gtatataga ccaggactac aatatccgtg taaccatgta tgtacaattc 1620

agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaacat 1680

tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt 1740

gggtccactg ctTcaaatcg gccttcg 1767

<210> 9

<211> 702

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<400> 9

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60

cagatctcc gccgcgcc ctggtcgtc cccccgcc accgtaccg ttggagaagg 120

aaaaatggca tttcaaac ccgctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggtacc 180

acagtcaaa cgccctctg ggcgtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240

ccccgggag gggggaccaa caaatctct atacctttg aatactacag aataagaaag 300

gttaaggTt aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agTgggtcc 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420

tatgtaaact actcctccg ccatacaat gcccaacct tctctacca ctccgttac 480

ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540

aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660

ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 10

<211> 233

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 10

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 Ala 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> 11
 <211> 233
 <212> PRT

 <213> Porcine circovirus
 <400> 11
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60

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

 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 12

<211> 713

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<400> 12

cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60

ttggccagat cctccgcccgc cgccccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120

gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgcac cttcggatat actgtggaga 180

aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240

ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300

gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360

gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420

acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc 480

gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540

aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600

gcactgcgtt cgaacacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660

tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccaactaa accctaaatg aat 713

<210> 13

<211> 233

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr

50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val

65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro

225 230

<210> 14

<211> 713

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<400> 14

```

ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc      60
ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc cgcaccgcg taccgttgga      120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgcac cttcggatat actgtcaagg      180
ctaccacagt cacaacgccc tcttgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact      240
ttgttcccc  gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa      300

gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg      360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg      420
acctatatgt aaactactcc tcccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc      480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca      540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg      600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg      660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc          713

```

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<400> 15

```

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 Lys Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn

180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser 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> 16
 <211> 15450
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400

> 16

atgacgtata ggtgttggct ctatgccacg gcatttgtat tgtcaggagc tgtggccatt	60
ggcacagccc aaaacttgct gcacggaaaa cgcccttctg tgacagcctt cttcagggga	120
gcttaggggt ctgtccctag caccttgctt ctggagtgc actgctttac ggtctctcca	180
ccccttaac catgtctggg atacttgatc ggtgcacgtg caccaccaat gccagggtgt	240
ttatggcgga gggccaagtc tactgcacac gatgtctcag tgcacggtct ctccttcctc	300
tgaatctcca agttcttgag cttggggtgc tgggcctatt ttatagcccc gaagagccac	360
tccggtggac gttgccacgt gcattcccca ctgtcgagtg ctccctgcc ggggcctgct	420

ggctttctgc gatctttcca attgcacgaa tgaccagtgg aaacctgaac tttaacaaa 480
 gaatgggtgcg gggtgcagct gagatttaca gagccggcca actcaccct gcagttttga 540
 aggcctctaca agtttatgaa cggggttctc gctggtagcc cattgtcgga cctgtccctg 600
 gagtggccgt ttacgccaac tccctacatg tgagtacaa acctttccg ggagcaactc 660
 atgtgttaac caacctaccg ctcccgcaga ggcccaagcc tgaagacttt tgccctttt 720
 agtgtgttat ggctaacgtc tatgacattg gccataacgc cgtcatgtat gtggccagag 780
 ggaaagtctc ctgggccct cgtggcgggg atgaagtga atttgaaacc gtcccgaag 840

 agttgaagtt gattgcgaac cgactccaca tctccttccc gcccaccac gcagtggaca 900
 tgtctgagtt tgccctcata gcccttggga gtgggtgtct cttgcgggtc gagcaccaac 960
 acggctgcct tcccgtgat actgtccctg atgggaactg ctgggtgtac ttgtttgact 1020
 tgctcccacc ggaagttcag aataaagaaa ttcccggtgc taaccaattt ggctatcaaa 1080
 ccaagcatgg tgtccatggc aagtacctac agcggaggct gcaagttaat ggtctccgag 1140
 cagtactga tacagatgga cctattgtcg tacagtactt ctctgttagg gagagtggga 1200
 tccgccactt cagactggcg gaagaaccta gcctccctgg gtttgaagac ctctcagaa 1260

 taagggtaga gcctaatacg tcgccaatgg gtggcaaggg tgaaaaaatc ttccggtttg 1320
 gcagtcacaa gtggtacggt gctggaaaga gagcaaggag agcacgtctt ggtgcgactg 1380
 ccacggctgc tcaccgcgt ttgcccgtc gcgaagccca gcaggccaag aagctcgagg 1440
 ttgccagcgc caacagggt gagcatctca agtactattc cccgcctgcc gacgggaact 1500
 gtggttgga ctgcatttcc gccattacca accggatggt gaattccaaa ttgaaacca 1560
 ctcttccga gagagtgaga cttcagatg actgggctac tgacaggat cttgtgaata 1620
 ccatccaaat ctcaggctc cccgcggcct tggacaggaa cgggtcttgt gctggcgcca 1680

 agtacgtgt caagctggaa ggtgagcact ggaccgtctc tgtgaccct gggatgacct 1740
 cttctttgt ccccttgaa tgtgttcagg gttgttgtga gcataagagc ggtcttggtt 1800
 tcccagacgt ggtcgaagtt tccgatttg accctgctg tcttgaccga cttgtgaga 1860
 taatgcactt gcttagcagt gtcacccag ctgctctggc cgagatgtcc gacgacttca 1920
 atcgtctggc ttccccggc gccactgtgt ggactgtttc gcaattctt gcccgccaca 1980
 gaggaggaga gcatcctgac caggtgtgt tagggaaaat tatcaacctt gtgaggtga 2040
 ttgaggaatg ctgctgttcc cggaacaaag ccaaccgggc taccggga gaggttgcgg 2100

 caaaagtga ccagtacct cgtggtgcag caagccttg agaatgctt gccaaagctt 2160
 agagggtcgc cccgcggagc gcgacggaca cctccttga ttggaatgt gtgcttctg 2220
 gggttgagac gggaatcag acaaccaaag agtccatgt caaccagtgc cgcgctctg 2280

ttctgtcgt gactcaagag cctttggaca gagactcggg cctctgacc gccttctcgc 2340
 tgtcaattg ctactacct gcacaagggt acgaggtccg tcaccgtgag aggctaaact 2400
 ccttgcctc taagtggag ggggtgttc gtgaggaata tgggtcacg ccaactggac 2460
 ctggcccgcg acccgactg ccgaacgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg 2520

 atctgtgaa attagtcaac gccaggcaa cttcagaaat gatggcctgg gcagccgagc 2580
 aggttgatct aaaagcttgg gtcaaaaatt acccacgggt gacaccgca cccctccac 2640
 caagagttca gcctcgaana acgaagtctg tcaagagctt gctagagaac aagcctgtcc 2700
 ctgctcccg caggaagggt agatctgatt gtggcagccc gattttgatg ggcgacaatg 2760
 ttctaacgg ttgggaagat tcgactgttg gtggccccct tgatctttcg gcaccatccg 2820
 agccgatgac acctctgagt gagcctgtac ttatttccag gccagtgaca tctttgagtg 2880
 tgccggcccc agttctgca ccgcgtagag ctgtgtcccg accgatgacg cctcagagtg 2940

 agccaatfff tgtgtctgca ctgcgacaca aatttcagca ggtggaaaaa gcaaatctgg 3000
 cggcagcagc gccgatgtgc caggacgaac ccttagattt gtctgcatcc tcacagactg 3060
 aatatgagge ttcccccta acaccaccgc agaacgtggg cattctggag gtaagggggc 3120
 aagaagctga ggaagtctg agtgaatct cggatatctt gaatgatacc aaccctgcac 3180
 ctgtgtcatc aagcagctcc ctgtcaagtg ttaagatcac acgccccaaa tactcagctc 3240
 aagccattat cgactcgggc gggccctgca gtgggcacct ccaaaggga aaagaagcat 3300
 gcctccgcat catgcgtgaa gcttgtgatg cggccaagct tagtgaccct gccacgcagg 3360

 aatggctttc tcgcatgtgg gatagggtgg acatgtgac ttggcgcaac acgtctgctt 3420
 accaggcgtt tcgcacctta gatggcaggt ttgggtttct ccaaagatg atactcgaga 3480
 cgcccgccg ctaccctgtt gggtttgtga tgttcctca caccctgca cttccgtga 3540
 gtgcagagag cgaccttacc attggttcag tcgacctga agatattcca cgcacctcg 3600
 ggaaaataga aaataccgtt gagatgatca accagggacc cttggcatcc tctgaggaag 3660
 aaccgtata caaccaacct gccaaagact ccgcatatc gtcgcggggg tctgacgaga 3720
 gcacagcagc tccgtccggt ggtacagggt gcgcccgtt atttactgat ttgccacctt 3780

 cagacggcgt agatgcggac ggtggggggc cgttcagac ggtaagaaa aaagctgaaa 3840
 ggctcttcga ccaattgagc cgtcaggttt ttaacctcgt ctccatctc cctgttttct 3900
 tctcacacct ctcaaatct gacagtgttt attctccggg tgattgggtt ttgcagctt 3960
 ttactctatt ttgcctctt ttgtgttaca gctaccatt cttcggttgc gtccctctt 4020
 tgggtgtatt ttctgggtct tctcggcgtg tgcgcatggg ggtttttggc tgctggctgg 4080
 cttttgctgt tggcctgttc aagcctgtgt ccgaccagt cggcactgct tgtgagtttg 4140

actcgccaga gtgcaggaac gtccttcatt cttttgagct tctcaaacct tgggaccctg 4200

ttcgcagcct tgttgtgggc cccgtcggtc tcggtcttgc cattcttggc aagttactgg 4260

gcggggcacg ctacatctgg cattttttgc ttaggcttgg cattgttgca gattgtatct 4320

tggctggagc ttatgtgctt tctcaaggta ggtgtaaaaa gtgctgggga tcttgtataa 4380

gaactgtcc taatgaaatc gccttcaacg tgttcccttt tacacgtgcg accaggtcgt 4440

cactcatcga cctgtgcgat cggtttttg cgccaacagg catggacccc attttcctcg 4500

ccactgggtg gcgtgggtgc tggaccggcc gaagtcccat tgagcaaccc tctgaaaaac 4560

ccatcgcgtt cgcccagttg gatgaaaaga ggattacggc tagaactgtg gtcgctcagc 4620

cttatgatcc taatcaagcc gtgaagtgc tgcgggtgtt acaggcgggt ggggcgatgg 4680

tggccgaggc agtcccaaaa gtggccaaag tttctgctat tccattccga gccccttttt 4740

ttcccaccgg agtgaaagt gatcccgagt gcaggatcgt ggttgacccc gatactttta 4800

ctacagccct ccggtctggt tactctacca caaacctcgt ccttgggttg ggggactttg 4860

cccagctgaa tgactaaag atcaggcaaa ttccaagcc ttcgggagga ggcccacacc 4920

tcattgctgc cctgcatgtt gcctgctcga tggcgttgca catgcttgc ggggtttatg 4980

taacttcagt ggggtcttgc ggtgccggca ccaacgatcc atggtgcact aatccgtttg 5040

ccgttcctgg ctacggacca ggctctctct gcacgtccag attgtgcatc tcccaacatg 5100

gccttacctt gcccttgaca gcacttgttg cgggattcgg tcttcaggaa atcgcttgg 5160

tcgttttgat tttcgtttcc atcggaggca tggtcatag gttgagttgt aaggctgata 5220

tgctgtgcat ttactttgca atcgccagct atgtttgggt accccttacc tggttgcttt 5280

gtgtgtttcc ttgttggttg cgctggttct ctttgacccc ccttaccatc ctatggttgg 5340

tgtttttctt gattttctga aatatgcctt cgggaatctt ggccgtggtg ttattggttt 5400

ctctttggct tttgggacgt tatactaaca ttgctggtct tgtcaccccc tatgatattc 5460

atcattacac cagtggcccc cgcggtgttg ccgcttggc taccgcacca gatggaacct 5520

acttggtgc cgtccgccc gctgcgttga ctggtcgac catgctgttc acccgtctc 5580

agcttgggtc cttctttgag ggcgtttca gaactcga gcccctactg aacaccgtca 5640

atgtggttgg gtctccatg ggctctggtg gagtgttcac catcgacggg aaaattaggt 5700

gcgtgactgc cgcacatgtc cttacgggta attcggttag ggtttccgga gtcggcttca 5760

atcaaatgct tgactttgat gtgaaagggg acttcgcat agctgattgc ccgaattggc 5820

aaggagctgc tcccaagacc caattctgcg aggacggatg gactggccgt gcctattggc 5880

tgacatcctc tggcgtcgaa cccggtgtta ttgggaatgg attcgccttc tgcttcaccg 5940
 cgtgcggcga ttccgggtcc ccagtgatca ccgaagctgg tgagattgtc ggcgttcaca 6000
 caggatcaaa taaacaagga ggtggcatcg tcacgcgccc ttcaggccag ttttgtaacg 6060
 tggcacccat caagctgagc gaattaaagt aattctttgc tggaccaag gtcccgtcgc 6120
 gtgatgtgaa ggttggcagc cacataatta aagacacgtg cgaagtacct tcagatcttt 6180
 gcgccttgct tgcgtccaaa cctgaactgg agggaggcct ctccaccgtc caacttctgt 6240
 gtgtgttttt cctactgtgg agaattgatgg gacatgcctg gacgcccttg gttgctgtgg 6300

 ggtttttcat tctgaatgag gttctcccag ctgtcctggg tggagtggtt ttctcctttg 6360
 ggatgtttgt gctatcttgg ctacacccat ggtctgcgca agttctgatg atcaggcttc 6420
 taacagcagc tctaacagg aacagatggt cacttgcttt ttacagcctt ggtgcggtga 6480
 ccggttttgt cgcagatctt gcggtaaact aagggcaccg gttgcaggca gtaatgaatt 6540
 tgagcaccta tgccttctcg cctcgatga tggttgtgac ctaccagtc ccagtattg 6600
 cgtgtggtgt tgtgcaccta cttgccatca tttgtactt gttcaagtac cgcggcctgc 6660
 acaatgttct tgttggtgat ggagcgtttt ctgcagcttt cttcttgcga tactttgccg 6720

 agggaaagt gagggaagg ggtgcgaat cctgcggaat gaatcatgag tcattgactg 6780
 gtgcctcgc tatgagactc aatgacgagg acttggactt ccttacgaaa tggactgatt 6840
 ttaagtgtt tgtttctgcg tccaacatga ggaatgcagc aggccaattc atcagggtg 6900
 cctatgcaa agcacttaga attgaacttg ccagttggt gcaggttgat aaggttcgag 6960
 gtactttggc caagcttgag gcttttctg ataccgtggc accccaactc tcgcccggtg 7020
 acattgtgt tgccttggc catagcctg ttggcagcat cttcgaccta aaggttggtg 7080
 glaccaagca tactctcaa gtcattgaga ccagagtcct tgccgggtcc aaaatgaccg 7140

 tggcgcgct cgttgacca acccccacgc cccacccgc acccgtgcc atccccctec 7200
 caccgaaagt tctagagaat ggtcccaacg cctgggggga tggggaccgt ttgaataaga 7260
 agaagaggcg taggatggaa accgtcggca tctttgtcat gggtgggaag aagtaccaga 7320
 aattttggga caagaattcc ggtgatgtgt ttacgagga ggtccatgac aacacagatg 7380
 cgtgggagt cctcagatt ggtgacctg ccgacttta ccctgagaag ggaactctgt 7440
 gtgggcatac tactattgaa gataaggatt acaaagtcta gcctcccca tctggcaaga 7500
 agttctggt cccgtcaac ccagagagcg gaagagcca atgggaagct gcaaagcttt 7560

 ccgtggagca ggcccttggc atgatgaatg tcgacgtga actgacggc aaagaagtgg 7620
 agaaactgaa aagaataatt gacaaacttc agggccttac taaggagcag tgtttaaact 7680
 gctagccgc agcggttga cccgtgtgg tcgcgcggc ttggtgtta ctgagacagc 7740

ggtaaaaata gtcaaatttc acaaccggac ttccacccta gggcctgtga atttaaaagt 7800
 ggccagttag gttagctga aagacgcggt cgagcacaac caacacccgg ttgcaagacc 7860
 ggttgacggt ggtgttggtc tctgcgttc cgcagttcct tcgcttatag atgtcctgat 7920
 ctccggtgct gacgcatttc ctaagttact cgctcgtaac gggccgggga acactgggat 7980

 cgatggcacg ctttgggact ttgaggccga ggccacaaa gaggaattg cgctcagtgc 8040
 gcaaataata caggcttggt acattaggcg cgtgacgca cctgaaattg gtctccctta 8100
 caagctgtac cctgttaggg gcaaccctga gcgggtaaaa ggagttttac agaatacaag 8160
 gtttgagac ataccttaca aaacccccag tgacactggg agccagtgc acgcggctgc 8220
 ctgcctcacg cccaatgcca ctccggtgac tgatgggcgc tccgtcttgg ctactacat 8280
 gccctccggt ttgaattgt atgtaccgac cattccagcg tctgtccttg attatcttga 8340
 ctctaggcct gactgcccc aacagttgac agagcacggc tgtgaggatg ccgattgag 8400

 agacctctcc aagtatgact tgtccacca aggctttgtt ttacctgggg ttcttcgcct 8460
 tgtgcgtaag tacctgtttg ccacagtggg taagtgcccg cccgttcac gccctccac 8520
 ttacctgcc aagaattcta tggctggaat aaatgggaac aggtttccaa ccaaggacat 8580
 tcagagcgtc cccgaaatcg acgttctgtg cgcacaggcc gtgcgagaaa actggcaaac 8640
 tgttaccct tgtacctca agaaacagta ttgtgggaag aagaagacta ggacaatact 8700
 cggcaccaat aatttcattg cgttggccca ccgggcagcg ttgagtgggt tcaccagggt 8760
 ctcatgaaa aaggcgttta actcgccat cgccctcggg aaaaacaaat ttaaggagct 8820

 acagactccg atcttaggca ggtgccttga agctgatctt gcatcctgtg atcgatccac 8880
 acctgcaatt gtccgctggt ttgccgcaa ccttctttat gaacttgct gtgctgaaga 8940
 gcacctaccg tcgtacgtg tgaactgtg ccatgacctt ttggtcacgc agtccggcgc 9000
 agtgactaag aggggtggcc tgtcgtctgg cgacccgac acttctgtgt ctaacacat 9060
 ttacagcttg gtgatatag cacagcacat ggtgcttagt tactttaaa gtggtcaccc 9120
 tcatggcctt ctgttctac aagaccagct gaagttcgag gacatgtca aagtccaacc 9180
 cctgatcgtc tattcgagc acctcgtgct gtatgccgaa tctccacca tgccgaacta 9240

 ccaactggtg gtcgaacatc tgaatttgat gctgggtttt cagacggacc caaagaagac 9300
 agccataacg gactcgccat catttctagg ctgtaggata ataaatggac gccagctagt 9360
 ccccaaccgt gacaggatcc tcgcgccct cgcttaccat atgaaggcaa acaatgtttc 9420
 tgaatactac gccgcggcgg ctgcaatact catggacagc tgtgcttgt tagagtatga 9480
 tcttgaatgg tttaagagc ttgtggttgg gatagcgcat tgcgccgca aggacggcta 9540
 cagctttccc ggcccccggt tcttctgtc catgtgggaa aaactcagat ccaatcatga 9600

ggggaagaag tccagaatgt gcgggtattg cggggccctg gctccgtacg ccactgcctg 9660

 tggcctcgac gtctgtattt accacacca ctccaccag cattgtccag tcacaatctg 9720
 gtgtggccac cgggtggtt ctggttcttg tagtgagtgc aaaccccccc tagggaaagg 9780
 cacaagccct ctagatgagg tgtagaaca agtcccgtat aagcctccac ggactgtaat 9840
 catgcatgtg gaggagggtc tcacccctct tgaccaggc agataccaga ctgcgcgcgg 9900
 attagtctcc gttaggcgtg gcatcagagg aaatgaagtt gacctaccag acggtgatta 9960
 tgctagcacc gccctactcc ccacttgtaa agagatcaac atggtcgtg tcgcctctaa 10020
 tgtgttgccg agcaggttca tcatcggtcc gcccggtgct gggaaaacat actggctcct 10080

 tcagcaggtc caggatggtg atgtcattta cacaccgact caccagacca tgctcgacat 10140
 gattagggtt ttggggacgt gccggttcaa cgtcccagca ggtgcaacgc tgcaattccc 10200
 tgccccctcc cgtaccggcc cgtgggttcg cactctagcc ggcggttggt gtcctggtaa 10260
 gaattccttc ttggatgaag cagcgtattg taatcacctt gatgtcttga ggctccttag 10320
 caaaaccacc ctacactgtc tgggagactt caaacaactc caccagtgg gttttgattc 10380
 tcattgctat gtttttgaca tcatgcctca gaccagtig aagaccatct ggagattcgg 10440
 acagaacatc tigtatgcca tccaaccaga ttacagggac aaacttgtgt ccatggtcaa 10500

 cacaaccctg gtaaccacg tggaaaaacc tgtcaagtat gggcaagtcc tcaccctta 10560
 ccacagggac cgagaggacg gcgccatcac aattgactcc agtcaaggcg ccacatttga 10620
 tgtggtcaca ctgcatttgc ccactaaaga ttactcaac aggcaaagag cccttggtgc 10680
 tatcaccagg gcaagacatg ctatctttgt gtatgacca cacaggcaat tgcagagcat 10740
 gtttgatctt cctgcgaagg gcacaccctg caacctcgca gtgcaccgtg atgagcagct 10800
 gatcgtactg gatagaaata ataaagaatg cacagttgct caggctctag gcaacggaga 10860
 taaatttagg gccaccgaca agcgcgttgt agattctctc cgcgccattt gtgctgatct 10920

 ggaagggtcg agctctccgc tccccagggt cgcacacaac ttgggatttt atttctcacc 10980
 tgatttgaca cagtttgcta aactcccggt agaccttgca cccactggc ccgtggtgac 11040
 aaccagaac aatgaaaagt ggccggatcg gctggttgcc agccttcgcc ctgtccataa 11100
 gtagaccgt gcgtgattg gtgccggcta tatggtgggc cctcgggtgt ttctaggcac 11160
 ccctggggtc gtgtcatact acctcacaaa atttgtcaag ggcgaggctc aagtgtctcc 11220
 ggagacagtc ttcagcaccg gccgaattga ggtggattgc cgggagtatc ttgatgacag 11280
 ggagcgagaa gttgctgagt cctcccaca tgccttcatt ggcgacgtca aaggcaccac 11340

cgttggggga tgcacatcatg tcacctccaa ataccttccg cgcttccttc ccaaggaatc 11400
 agtcgcggta gtcgggggtt cgagccccgg gaaagccgca aaagcagtgt gcacattgac 11460
 ggatgtgtac ctcccagacc ttgaggccta cctccacca gagactcagt ccaagtgtg 11520
 gaaagttaat ttggacttca aggaagtctg actgatggtc tggaaagaca agacggccta 11580
 tttccaactt gaaggccgct atttcacctg gtatcagctt gcaagctacg cctcgtacat 11640
 ccgtgttctt gtcaactcca cgggtgtatct ggacccttgc atgggccctg ccttttgcaa 11700
 cagaagagtt gtcgggtcca cccattgggg agctgacctc gcagtcaccc cttatgatta 11760

 cgggtgctaaa atcatcttgt cttagcgtta ccatggtgaa atgcctctg gatacaagat 11820
 tctggcgtgc gcggagtctt cgctcgacga cccagtcaag tacaacaca cctgggggtt 11880
 tgaatcggat acagcgtatc tgtatgagtt caccggaaac ggtgaggact gggaggatta 11940
 caatgatgcg tttcgtgcgc gccagaaagg gaaaatttat aaggccactg ctaccagcat 12000
 gaagttttat tttccccgg gccccgtcat tgaaccaact ttaggcctga attgaaatga 12060
 aatggggctt atacaaagcc tcttcgacaa aattggccag cttttgtgg atgctttcac 12120
 ggaatttttg gtgtccatg ttgatatcat catattttg gccattttgt ttggcttcac 12180

 catcgccggt tggctgggtg tcttttgcac cagattgggt tgctccgagg tattccgtgc 12240
 gcgcctgcc attcacctg agcaattaca gaagatccta tgaggccttt ctttctcagt 12300
 gccgggtgga cattccacc tggggggtaa aacacccttt ggggatgttt tggcaccata 12360
 aggtgtcaac cctgattgat gaaatggtgt cgcgtcgaat gtaccgcgtc atggataaag 12420
 cagggaagc tgcctgaaa cagggtggtga gcgaggtac gctgtctcgc attagtagtc 12480
 tggatgtggt ggctcatttt caacatcttg ccgccattga agccgagacc tgtaaatatt 12540
 tggcttctcg actgcccatg ctacacaacc tgcgcatgac aggggtcaaat gtaaccatag 12600

 tgtataatag cactttaaat cagggttttg ctatttttcc aaccctggt tcccggccaa 12660
 agcttcatga ttttcagcaa tggctaatag ctgtacattc ctccatattt tctctgttg 12720
 cagcttcttg tactcttttt gttgtgctgt ggttgcgggt tccaatgcta cgtactgttt 12780
 ttggtttccg ctggttaggg gcaatttttc tttcgaactc atggtgaatt acacggtgtg 12840
 tccaccttgc ctacccgac aagcagccgc tgaggtcctt gaaccggta ggtctctttg 12900
 gtgcaggata gggcatgacc gatgtgggga ggacgatcac gacgaactgg ggttcattgt 12960
 tccgcctggc ctctccagcg aaagccactt gaccagtgtt tacgcctggt tggcgttcct 13020

 gtccttcage tacacggccc agttccatcc cgagatattt gggataggga acgtgagtga 13080
 agtttatgtt gacatcaagc accaatcat ctgcgccgtt catgacgggc agaaccacc 13140
 cttgcctcgc catgacaata tttcagccgt atttcagacc tactatcaac atcaggtcga 13200

cggcggcaat tggtttcacc tagaatggct gcgtcccttc ttttcctctt ggttggtttt 13260
aatgttttcg tggttttctca ggcgttcgcc tgcaagccat gtttcagttc gagtctttca 13320
gacatcaaaa ccaacactac cgcagcatca ggctttgttg tctccagga catcagctgc 13380
cttaggcatg gcgactcgtc ctttccgacg attcgcaaaa gctctcaatg ccgcacggcg 13440

atagggacac ctgtgtatat caccatcaca gccaatgtga cagatgagaa ttacttacat 13500
tctttctgate tctcatgct ttttcttgc cttttctatg cttctgagat gagtgaagaa 13560
ggattcaagg tgglatittg caatgtgtca ggcatcgtgg ctgtgtgtgt caactttacc 13620
agctacgtcc aacatgtcaa agagtttact caacgtcct tgggtggtcga tcatgtgcgg 13680
ctgcttcatt tcatgacacc tgagaccatg aggtgggcaa ccgttttagc ctgtcttttt 13740
gccatcctac tggcaatttg aatgttcaag tatgttgggg aaatgcttga ccgcgggctg 13800
ttgctcgca ttgctttctt tgtggtgtat cgtgccgttc tggtttctg tgctcggcaa 13860

cgccaacagc agcagcagct ctcatctcca gttgatttat aacttgacgc tatgtgagct 13920
gaatggcaca gattggctgg cagaaaaatt tgattgggcg gtggagactt ttgtcatctt 13980
tcccgtgttg actcacattg tttctattg tgactcacc accagccatt tctttgacac 14040
agttggtctg gttactgtgt ccaccgccgg gttttatcac gggcggtatg tcttgagtag 14100
catctacgcg gtctgtgctc tggctgcgtt gatttgcttc gttattagc ttgcgaagaa 14160
ctgcatgtcc tggcgctact cttgtaccag atataccaac ttccttctgg aactaaggg 14220
cagactctat cgttggcggg cgcccggtat catagaaaaa aggggtaagg ttgaggtcga 14280

aggtcatctg atcgacctca aaagagttgt gcttgatggt tccgtggcaa cccctttaac 14340
cagagtttca gcggaacaat ggggtcgtct ctagacgact ttgccatga tagcactgct 14400
ccacaaaagg tgcttttggc gttttccatt acctacacgc cagtaatgat atatgtctta 14460
aaggtaagtc gcggccgact gctagggctt ctgcaccttt tgatctttct gaattgtgct 14520
tttaccttcg ggtacatgac attcgcgcac tticagagca caaatagggt cgcgctcgt 14580
atgggagcag tagttgact tctttggggg gtgtactcag ccatagaaac ctggaaattc 14640
atcacctcca gatgcgctt gtgcttgcta ggccgcaagt acattctggc cctgcccac 14700

cacgtcgaac gtgccgcggg ctttcatccg attgcggcaa atgataacca cgcatttgtc 14760
gtccggcgtc ccggtccat tacggttaac ggacattgg tgccgggtt gaaaagcctc 14820
gtgttgggtg gcagaaaagc tgttaaacag ggagtggtaa accttgtcaa atatgcaaaa 14880
taacaacggc aagcagcaaa agaaaaagaa gggaatggc cagccagtca accagctgtg 14940
ccagatgctg ggtaaaatca tcgccagca aaaccagtcc agaggcaagg gaccgggcaa 15000
gaaaagtaag aagaaaaacc cggagaagcc ccattttct ctacgacgc aagatgacgt 15060

caggcatcac ttcacccctg gtgagcggca attgtgtctg tcgtcgatcc agactgcctt 15120

taaccagggc gctggaactt gtacctgtc agattcaggg aggataagtt acactgtgga 15180

gtttagtttg ccgacgcac atactgtgcg cctgatccgc gtcacagcat caccctcagc 15240

atgatgggct ggcatctttt aggcacctca gtgtcagaat tggaagaatg tgtgggtgat 15300

ggcactgatt gacattgtgc ctctaagtca cctattcaat tagggcgacc gtgtgggggt 15360

aaaatttaat tggcgagaac catgcggccg caattaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15420

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15450

<210> 17

<211> 2352

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 17

cctatcattg aaccaacttt aggcctgaat tgaatgaaa tggggtctat gcaaagcctt 60

tttgacaaaa ttggccaact ttctgtgat gctttcacgg agttcttggg gtccattgtt 120

gatatcatta tatTTTTTggc cattttgttt ggcttcacca tcgccggttg gctgggtgtc 180

ttttgcatca gattggtttg ctccgcgata ctccgtgcgc gccctgccat tcaactctgag 240

caattacaga agatcctatg aggcctttct ttctcagtgc caggtggaca ttcccacctg 300

gggaattaaa catcctttgg ggatgctttg gcaccataag gtgtcaacc tgattgatga 360

aatggtgtcg cgtcgaatgt accgcatcat ggaaaaagca ggacaggctg cctggaacaa 420

ggtgggtgagc gaggctacgc tgtctcgcat tagtagtttg gatgtggtgg ctcactttca 480

gcatcttgcc gccattgaag ccgagacctg taaatatTTT gcctctcggc tgcccatgct 540

acacaacctg cgcatgacag ggtcaaatgt aaccatagtg tataatagta ctttgaatca 600

ggtgcttgct attttccaa cccctgggtc ccggccaaag cttcatgatt ttcagcaatg 660

gctaatagct gtacattcct ctatatTTT ctctgttgca gcttcttgta ctctttttgt 720

tgtgctgtgg ttgcgggttc caatgctacg tattgctttt ggtttccgct ggttaggggc 780

aatttttctt tcgaactcac agtgaactac acggtgtgtc caccttgcct caccggcaa 840

gcagccacag aggcctacga acctggcagg tctctttggg gcaggatagg gtatgatcgc 900

tgtggggagg acgatcatga tgaactaggg tttgtgtgtc cgtctggcct ctccagcgaa 960

ggccacttga ccagtgttta cgcctgggtg gcgttcctgt ctttcagtta cacagcccag 1020

ttccatcctg agatattcgg gataggggaat gtgagtcaag tttatgttga catcaggcat 1080

caattcatTT gcgccgttca cgacgggcag aacgccactt tgcctcgcca tgacaatatt 1140

tcagccgtgt tccagactta ttaccaacat caagtcgacg gcggcaattg gtttcaccta	1200
gaatggctgc gtccttctt ttctcttgg ttggtttta atgtctcttg gtttctcagg	1260
cgttcgctg caagccatgt ttcagttcga gtcttgcaga cattaagacc aacaccaccg	1320
cagcggcagg ctttgcgtc ctccaagaca tcagttgcct taggtatcgc aactcggcct	1380
ctgaggcgtt tcgaaaaatc cctcagtgtc gtacggcgat agggacaccc atgtatatta	1440
ctgtcacagc caatgtaacc gatgagaatt atttgcattc ctctgacctt ctcattgttt	1500
cttcttgcct ttctacgtc tctgagatga gtgaaaaggg atttaaagtg gtatttggca	1560
atgtgtcagg catcgtggct gtgtgcgtca actttaccag ctacgtccaa catgtcaagg	1620
aatttaccca acgtctcttg gtagtcgacc atgtgcggct gctccatttc atgacacctg	1680
agaccatgag gtgggcaact gttttagcct gtctttttgc cattctgttg gccatttgaa	1740
tgtttaagta tgttggggaa atgcttgacc gcgggctatt gctcgtcatt gctttttttg	1800
tgggtgatcg tgccgtcttg gtttgttgcg ctgccagcg ccaacagcag caacagctct	1860
catttacagt tgatttataa cttgacgcta tgtgagctga atggcacaga ttggttagct	1920
ggtgaatttg actgggcagt ggagtgtttt gtcatttttc ctgtgttgac tcacattgtc	1980
tcctatgggt cctcaccac cagccatttc cttgacacag tcggtctggt cactgtgtct	2040
accgccggct tttccacgg gcggtatgtt ctgagtagca tctacgcggt ctgtgccctg	2100
gctgcgttga ttigcttctg cattaggttt acgaagaatt gcatgtcctg gcgctactca	2160
tgtaccagat ataccaactt tcttctggac actaaggga gactctatcg ttggcggtcg	2220
cctgtcatca tagagaaaag gggtaaagtt gaggtcgaag gtcattctgat cgacctcaag	2280
agagtgtgac ttgatggttc cgcggcaacc cctataacca aagtttcagc ggagcaatgg	2340
ggtcgtcctt ag	2352
<210> 18	
<211> 886	
<212> DNA	
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	
<400> 18	
atggggctgt ccttagatga cttctgcat gatagcacgg ctccacaaaa ggtgcttttg	60
gcgttctcta ttacctacac gccagtgatg atatatgcc taaaagtaag tcgcggccga	120
ctgctagggc ttctgcacct ttgatcttc ctaaattgtg ctttcacctt cgggtacatg	180
acattcgtgc actttcagag cacaacaag gtgcgctca ctatgggagc agtagttgca	240
ctcctttggg ggggtgtactc agccatagaa acctggaaat tcatcacctc cagatgccgt	300

ttgtgcttgc taggccgcaa gtacattttg gcccctgccc accacgttga aagtgccgca	360
ggctttcatc cgatagcggc aaatgataac cacgcatttg tcgtccggcg tcccggctcc	420
actacggtta acggcacatt ggtgcccggg ttgaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa	480
gctgtcaaac agggagtggg aaaccttggt aaatatgcca aataacaacg gcaagcagca	540
gaagaaaaag aagggggatg gccagccagt caatcagctg tgccagatgc tgggtaagat	600
catcgtcag caaaaccagt ccagaggcaa gggaccggga aagaaaaaca agaagaaaaa	660
cccgagaag ccccatcttc ctctagcgac tgaagatgat gtcagacatc acttcacctc	720
tggtgagcgg caattgtgtc tgtcgtcaat ccagacagcc tttaatcaag gcgctggaac	780
ttgtaccctg tcagattcag ggaggataag ttacactgtg gagtttagtt tgccgacgca	840
tcatactgtg cgcctgatcc gcgtcacagc gtcaccctca gcatga	886