(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6839714号
(P6839714)
(45)発行日　令和3年3月10日(2021.3.10)　(24)登録日　令和3年2月17日(2021.2.17)

(51)Int.Cl.　F I
A61K 39/00 (2006.01)　A61K 39/00 ZNAJ
A61K 39/12 (2006.01)　A61K 39/12
A61K 39/295 (2006.01)　A61K 39/295
A61P 31/04 (2006.01)　A61P 31/04
A61P 31/20 (2006.01)　A61P 31/20

請求項の数 13　(全 20 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-534139(P2018-534139)
(86)(22)出願日　平成28年12月14日(2016.12.14)
(65)公表番号　特表2019-501180(P2019-501180A)
(43)公表日　平成31年1月17日(2019.1.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/066481
(87)国際公開番号　WO2017/116698
(87)国際公開日　平成29年7月6日(2017.7.6)
審査請求日　平成30年8月28日(2018.8.28)
(31)優先権主張番号　62/272,017
(32)優先日　平成27年12月28日(2015.12.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　519064665
ベーリンガー　インゲルハイム　アニマル　ヘルス　ユーエスエイ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ジョージア州　３００９６　ダルース　サテライト　ブールヴァード　３２３９
(74)代理人　100094569
弁理士　田中　伸一郎
(74)代理人　100088694
弁理士　弟子丸　健
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田　和彦
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｍ　Ｈｙｏ多重ワクチン及びその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下を含むワクチン：
i）マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエ（M hyo）抗原、ii）不活化ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）抗原、及び、iii）改変生PRRSV抗原。
【請求項２】
更にブタシルコウイルス2型（PCV2）抗原を含む、請求項1に記載のワクチン。
【請求項３】
前記PCV2抗原が不活化PCV2である、請求項2に記載のワクチン。
【請求項４】
前記M hyo抗原が不活化M hyoである、請求項1～3のいずれかの項に記載のワクチン。
【請求項５】
前記不活化PRRSV抗原が、配列番号:2、3、4、5、6、7、8又は9に示される配列と少なくとも91%配列同一性を有するORF5タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む不活化PRRSVを含む、請求項1－4のいずれかの項に記載のワクチン。
【請求項６】
ブタの体重増加又は死亡ロス改善の能力を高める、請求項1－5のいずれかの項に記載のワクチン。
【請求項７】
さらに１つ以上の医薬的又は獣医的に許容できる担体、アジュバント、ベヒクル、又は

賦形剤を含む、請求項1－6のいずれかの項に記載のワクチン。
【請求項８】
１つ以上のブタ病原体に対抗してイノシシ科の動物をワクチン免疫するか又はイノシシ科の動物で免疫原性若しくは防御性応答を誘発するか、或いはブタの体重増加若しくは死亡ロス改善の能力を高める使用のための請求項1-7のいずれかの項に記載のワクチンであって、前記使用が、少なくとも1回の投与を含む、前記ワクチン。
【請求項９】
前記投与が、少なくとも１回の一次投与及び少なくとも１回のブースト投与を含む、請求項8に記載のワクチン。
【請求項１０】
前記投与が、M hyo抗原及びPRRSV抗原を含むワクチンの一次投与、及びPRRSV抗原を含むワクチンのブースト投与を含む、請求項9に記載のワクチン。
【請求項１１】
一次投与のPRRSV抗原が改変生PRRSVであり、ブースト投与のPRRSV抗原が不活化PRRSVである、請求項10に記載のワクチン。
【請求項１２】
動物がブタ類である、請求項8－11のいずれかの項に記載のワクチン。
【請求項１３】
請求項1－7のいずれかの項に記載のワクチンを含む１つ以上のワクチンバイアルを含む、ワクチン免疫キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互作用）本出願は、米国仮特許出願62/272,017（2015年12月28日出願）に対し優先権を主張する。
（技術分野）
本発明は、動物のマイコプラズマ・ヒオプニューモニアエ（Mycoplasma hyopneumoniae）（M hyo）、ブタシルコウイルス2型（PCV2）、及びブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）感染と戦い、ブタの体重増加能力又は死亡ロス改善能力を高める組成物若しくはワクチン、前記感染に対してワクチン免疫する方法、並びにそのような方法及び組成物で使用されるキットに関する。
【背景技術】
【０００２】
シルコウイルス（シルコウイルス科と呼ばれるウイルスの一科の一般名で、前記は動植物種領域で見いだされる）は、球形でエンベロープの無い平均直径が17から23.5nmのビリオンを特徴とし、環状の一本鎖デオキシリボ核酸（ssDNA）を含む。シルコウイルスのssDNAゲノムは、既知の最小ウイルスDNAレプリコンである。
PCVを含む多様なシルコウイルスが動物種領域で同定されている。PCV I型（“PCVI”又は“PCV1”）とは対照的に、CPV II型（“PCVII”又は“PCV2”）は、離乳ブタの離乳後多器官性消耗症候群（PMWS）と密接に関係する（以下を参照されたい：Allan et al.Eur.J.Vet.Diagn.Investig.1998, 10, 3-10；Ellis et al.Can.Vet.J.1998, 39, 44-51；及びMorozov et al.J.Clin.Microbiol.1998, 36, 2535-2541）。PCV2はPMWSの一次原因因子と認定されている。PMWSは、米国豚獣医師協会（American Association of Swine Veterinarians（AASV））が2006年3月に名称を変更して以来、現在はPCVAD（ブタシルコウイルス関連疾患）として知られている。自然に得られた又は実験的に誘発されたPCV2感染ブタは、進行性体重低下、頻呼吸、呼吸困難、及び黄疸を示す（Allan et al.1998；Allan et al.1999；Ellis et al.1998；Ellis et al.1999）。PCV2が直接関係する肉眼的病理所見には、リンパ節症、間質性肺炎、肝炎及び腎炎が含まれる（Allan et al.1998；Allan et al.1999；Ellis et al.1998；Ellis et al.1999）。
【０００３】

マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエ（地域性動物肺炎の原因）は養豚産業ではなお重要な病原体である。この小さく複雑な生物は気道の繊毛細胞にコロニーを形成し、結果として免疫系にほとんど暴露されない。肺病巣（概ね若齢ブタで観察される）は、上皮細胞の過形成並びに血管周囲及び細気管支周囲の単核細胞の集積を特徴とする。M.ヒオプニューモニアエ感染に続いて、ブタでは免疫反応が観察され抵抗性が誘発される（Thacker, Anim Health Res Rev.2004 Dec;5(2):317-20；及びKobisch & Friis, Rev Sci Tech.1996 Dec;15(4):1569-605）。臨床的症状及び病巣の発達は、M.ヒオプニューモニアエの病原性能力及び肺の防御反応の帰結である。肺炎の経済的関係性は、最初のM.ヒオプニューモニアエ感染の後に続くありふれた二次感染によって大きく影響される。個々のブタ及び集団における肺炎診断のために種々の検査が利用可能である。地域性動物肺炎は多要素性疾患であるのでその治療及び管理は簡単ではない（Maes et al., Vet Q.1996, 18(3):104-9）。

M.ヒオプニューモニアエはまたブタ呼吸器疾患群（PRDC）と関係し、前記は、いくつかの呼吸器病原体を含む多要素性呼吸器症候群である。PRDCの臨床的徴候を有するブタからもっとも通常的に単離される病原体は、免疫系の細胞に感染するか又は顕著な免疫病変を誘発する。したがって、ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）及びM.ヒオプニューモニアエ（PRDCと関係を有するもっともありふれた2つの病原体）は、それら病原体の存在及び他の病源体の存在に応答する呼吸器の免疫系の能力を変化させる。呼吸器の免疫系を変化させることによって、これら2つのありふれた病原体は、PRDCと関係する他の多くの病源体に対する感受性を高める（Thacker, Vet Clin North Am Food Anim Pract.2001, 17(3):551-65）。

【０００４】

M.ヒオプニューモニアエに対する既知ワクチンの大半が、アジュバントが添加されたM.ヒオプニューモニアエの不活化全細胞調製物を土台にしている。市場の供給源には以下が含まれる：RESPIFEND（Fort Dodge, American Home Products）、HYORESP（Merial Ltd）又はSPRINTVAC（MERIAL Ltd）、M+PAC（Schering Plough）、PROSYSTEM M（Intervet）、INGELVAC M（Boehringer）、RESPISURE（Pfizer Inc.）、及びSTELLAMUNE MYCOPLASMA（Pfizer Inc.）。

ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）は、ブタ生殖器呼吸器症候群（PRRS）（ブタ蒼白耳病としても知られている）を引き起こすウイルスである。この経済的に重要な汎流行型動物疾患は、繁殖用家畜群における繁殖の失敗及び若齢ブタにおける気道の疾病を引き起こす。PRRSの臨床的徴候には、雌ブタの繁殖障害（例えば流産及び死産又はミイラ化胎児の娩出）並びに耳及び外陰部のチアノーゼが含まれる。PRRSVは小さい、エンベロープを有するRNAウイルスである。前記ウイルスは、約15000塩基の一本鎖でプラスセンスのRNAゲノムを含む。前記ゲノムは10のオープンリーディングフレームを含む（Meulenberg et al., Virology.1993, 192(1):62-72；Lee and Yoo, J Gen Virol.2005, 86(11):3091-6；Johnson et al., J of Gen Virol.2011, 92(5), pp.1107-1116）。

米国特許出願US 20130266603は三価の免疫原性組成物に関し、前記組成物は、マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエ（M hyo）全細胞調製物の可溶性部分、ブタシルコウイルス2型（PCV2）抗原、及びPRRSウイルス抗原を含む。

【０００５】

過去数年間に及ぶいくつかの伝染性疾患の蔓延は、適切な多重ワクチン及び付随するワクチン免疫スケジュールの開発を要求した。これらのスケジュールは成熟前のブタのワクチン免疫を含み、前記は物流的問題（すなわち大量のブタのワクチン免疫）を提起する。別の実際的な問題は、複数のワクチンを動物に共同投与していくつかの伝染病を治療する際の干渉である。前記は、ワクチン学及び免疫学で周知であり、“有効性の干渉”と呼ばれる予想不能の現象である。ワクチンの共同投与に際して、2つのワクチンが干渉しえる（例えば、２つ以上のワクチンが一緒に（同じ処方物に一緒に混合されるか、又は連続的に例えば本発明のようにプライム投与及びブースト投与として）投与される）。この現象は最初に三価Sabinポリオワクチンで見いだされた。前記ワクチンでは、ワクチン中の血

清型2のウイルス量を減少させてワクチン中の血清型1及び3のウイルスの“テイク”（“take”）の干渉を停止させなければならなかった。

ブタ類の伝染性因子（特にウイルス）は、畜産業に甚大な影響を及ぼすだけでなく、人間に対して潜在的な公衆衛生リスクをもたらす。したがって、PMWS又はPCVADの予防及びPCV用ワクチン免疫の開発は必須である。

さらにPCV2、マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエ（M hyo）、及びブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）の多重感染と戦うための単独ワクチンもまた希求されている。そのようなワクチンは多重投与を必要とせず、したがって全世界的なブタ類家畜群の大量ワクチン免疫に付随するコスト及び労力を顕著に削減するであろう。有効かつ効果的で大量の動物への投与が容易で費用効率の高い多重ワクチンがなお希求されている。

【発明の概要】

【０００６】

本発明は多価M hyo組成物又はワクチンを提供し、前記は、i）M hyo抗原及びii）PCV2抗原、PRRSV抗原又は前記の組合せの少なくとも1つを含む。

本発明はまた、改変生PRRSV抗原及び不活化PRRSV抗原を含む組成物又はワクチンを提供する。

本発明は、多様なブタ類病原体に対して動物を防御し、ブタの体重増加及び死亡ロス低下能力を高めるために多重ワクチンで用いられるM.ヒオプニューモニアエワクチン免疫の驚くべき利点を示した。驚くべきことに本発明はまた、改変生PRRSV抗原及び不活化PRRSV抗原が一緒に投与されるとき、動物の死亡率が低下することを示した。

本発明は、動物をワクチン免疫する方法、又は動物で免疫原性若しくは防御性応答を誘発する方法に関し、前記方法は、本発明の組成物又はベクターの少なくとも1回の投与を含む。

本発明はまたワクチン免疫キット又はセットを提供し、前記は、M hyoワクチン、PCV2ワクチン及びPRRSVワクチンを含む１つ以上のワクチンバイアルを含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【０００７】

以下の詳細な説明（例示として提供され、記載の具体的な実施態様に本発明を限定する意図はない）は、参照により本明細書に取り込まれる下記添付図面と一緒にして理解されよう：

【図１】試験の第一日目の採取血清で実施されたqPCRを示す。

【図２】0日目及び21日目採取血清のFFN力価を示す。

【図３】グループ間における体重増加率の算術平均を示す。

【図４】試験の0日目及び61日目のグループの算術平均体重を示す。

【図５】マイコプラズマワクチン免疫状況を基準とする仕上がり体重の比較を示す。

【図６】各DNA及びタンパク質配列に割り当てた配列番号を示す表である。

【図７Ａ－７Ｃ】配列アラインメント及び系統樹を示す。

【発明を実施するための形態】

【０００８】

詳細な説明

本開示及び特に特許請求の範囲では以下が指摘される：例えば“含む”（“comprises”、“comprised”、“comprising”など）という用語は、米国特許法で当該用語に帰せられた意味を有することができ（例えば、それら用語は、“含む”（“includes”、“included”、“including”など）を意味することができる）、さらに例えば“本質的に～から成る”（“consisting essentially of”及び“consists essentially of”）という用語は、米国特許法でそれら用語に割当てられた意味を有することができ、例えば、それら用語は、明白に列挙されていない成分を許容するが、従来技術で見いだされるか又は当該発明の基本的若しくは新規な特徴に影響を及ぼす成分を排除する。

文脈が明瞭にそうではないことを指示しないかぎり、単数用語“a”、“an”及び“the”は、複数の対応語を含む。同様に、“or”という語は、文脈が明らかにそうではないこ

とを指示しないかぎり“and”を含むことが意図される。“or”という語は、個別のリストにおける任意の1つのメンバーを意味し、さらにまた当該リストのメンバーの任意の組合せを含む。

“動物”という用語は、本明細書では全ての哺乳動物、鳥類及び魚類を含むために用いられる。本明細書で用いられる動物は以下から成る群から選択できる：ウマ類（例えばウマ）、イヌ類（例えばイヌ、オオカミ、キツネ、コヨーテ、ジャッカル）、ネコ類（例えばライオン、トラ、家ネコ、野生ネコ、他の大型のネコ、及び他のネコ類（チーター及びオオヤマネコを含む））、ウシ類（例えば畜牛、バッファロー）、ブタ類（例えばブタ）、ヒツジ類（例えばヒツジ）、ヤギ類（例えばヤギ）、ラクダ類（例えばラマ）、鳥類（例えばニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、ダチョウ、エミュ及びヒクイドリ）、霊長類（例えば原猿、メガネザル、サル、テナガザル、類人猿）、ヒト、及び魚類。“動物”という用語はまた、全ての発育段階（胚性期及び胎児期を含む）の個々の動物を含む。

本明細書で用いられるように、“ブタ”又は“仔豚”はブタ類起原の動物を意味し、一方、“雌ブタ”は、繁殖齢の繁殖能力を有する雌を指す。

【０００９】

“ポリペプチド”及び“タンパク質”という用語は本明細書では互換的に用いられ、連続するアミノ酸残基のポリマーを指す。

“核酸”、“ヌクレオチド”、及び“ポリヌクレオチド”という用語は互換的に用いられ、RNA、DNA、cDNA、又はcRNA、及び前記の誘導体（例えば改変骨格を含むもの）を指す。本発明は本明細書に記載するものと相補的な配列を含むものを提供することは理解されよう。本発明で意図される“ポリヌクレオチド”は、フォワード鎖（5’から3’）及びリバース鎖（3’から5’）の両方を含む。本発明のポリヌクレオチドは種々の方法で（例えば化学合成、遺伝子クローニングなどによって）調製でき、多様な形態（例えば直線状若しくは分枝状、一本鎖若しくは二本鎖、又は前記のハイブリッド、プライマー、プローブなど）を採ることができる。

“ゲノムDNA”又は“ゲノム”という用語は互換的に用いられ、宿主生物の伝承しえる遺伝情報を指す。ゲノムDNAは、核のDNA（染色体DNAとも称される）だけでなくプラスチド（例えば葉緑体）及び他の細胞小器官（例えばミトコンドリア）のDNAを含む。本発明で意図されるゲノムDNA又はゲノムはまたウイルスのRNAを指す。前記RNAはプラス鎖又はマイナス鎖RNAでもよい。本発明で意図される“ゲノムDNA”という用語には本明細書に記載のものと相補的な配列を含むゲノムDNAが含まれる。“ゲノムDNA”という用語はまた、メッセンジャーRNA（mRNA）、相補性DNA（cDNA）、及び相補性RNA（cRNA）を指す。

【００１０】

“遺伝子”という用語は広範囲に用いられ、生物学的機能を伴うポリヌクレオチドの任意のセグメントを指す。したがって、遺伝子又はポリヌクレオチドは、ゲノム配列のようにイントロン及びエクソンを含むか、又はcDNAのようにまさにコード配列（例えばオープンリーディングフレーム（ORF）、開始コドン（メチオニン）から始まり終止シグナル（停止コドン）で終わる）のみを含む。遺伝子及びポリヌクレオチドはまた、それらの発現を調節する（例えば転写開始、翻訳及び転写終了）領域を含むことができる。したがって、プロモーター及びリボソーム結合領域（概ねこれら調節エレメントはコード配列又は遺伝子の開始コドンの上流約60から250ヌクレオチドの間に存在する）、転写ターミネーター（概してターミネーターはコード配列又は遺伝子の終止コドンの下流約50ヌクレオチド内に位置する）がまた含まれる。遺伝子又はポリヌクレオチドはまた、mRNA若しくは機能的RNAを発現するか、又は特定のタンパク質をコードする核酸フラグメントを指し、前記は調節配列を含む。

本明細書で用いられる“異種DNA”という用語は、異なる生物（例えばレシピエントとは異なる細胞タイプ又は異なる種）に由来するDNAを指す。当該用語はまた宿主DNAの同じゲノム上のDNA又はそのフラグメントを指し、この場合、異種DNAはその本来の位置とは異なるゲノム領域に挿入される。

【００１１】
本明細書で用いられるように、“抗原”又は“免疫原”という用語は、特異的な免疫応答を宿主動物で誘発する物質を意味する。抗原は、全生物（死滅、弱毒化又は生）；生物のサブユニット又は部分；免疫原性特性を有する挿入物を含む組換えベクター；宿主動物への提示に際して免疫応答を誘発できるDNA片又はフラグメント；ポリペプチド、抗原、エピトープ、ハプテン、又は前記の任意の組合せを含むことができる。また別には、免疫原又は抗原は毒素又は抗毒素を含むことができる。
本明細書で用いられる“免疫原性タンパク質又はペプチド”という用語は、いったん宿主に投与されたら、当該タンパク質に向けられる液性及び/又は細胞性タイプの免疫応答を引き起こすことができるという意味で免疫学的に活性であるポリペプチドを含む。好ましくは、タンパク質フラグメントは、全タンパク質と同じ免疫学的活性を実質的に有するものである。したがって、本発明のタンパク質フラグメントは、少なくとも1つのエピトープ又は抗原性決定基を含むか、又は本質的に前記から成るか、又は前記から成る。本明細書で用いられる、“免疫原性”タンパク質又はポリペプチドには、当該タンパク質の完全長配列、そのアナローグ、又はその免疫原性フラグメントが含まれる。“免疫原性フラグメント”とは、１つ以上のエピトープを含み、したがって上記に記載した免疫学的応答を引き出すタンパク質のフラグメントを意味する。そのようなフラグメントは、当業界で周知の多数のエピトープマッピング技術を用いて識別することができる。例えば、線状エピトープは、例えば固体支持体上で多数のペプチド（当該タンパク質分子の複数の部分に対応するペプチド）を同時合成し、当該ペプチドが当該支持体にまだ付着している間に当該ペプチドを抗体と反応させることによって決定できる。同様に、立体的エピトープは、アミノ酸の空間配座を例えばX-線結晶学及び二次元核磁気共鳴で決定することによって容易に識別される。
【００１２】
“免疫原性タンパク質又はペプチド”という用語はさらに当該配列への欠失、付加及び置換を意図するが、ただし当該ポリペプチドが機能して本明細書で定義される免疫学的応答を生じる場合に限られる。“保存的変型”は、あるアミノ酸残基の別の生物学的に類似する残基による取替え、又は核酸配列中のヌクレオチドの取替えであってコードされるアミノ酸残基が変化しないか又は別の生物学的に類似する残基である取替えを指す。これに関しては、特に好ましい置換は概ね本質的に保存的であろう（すなわち1つのアミノ酸ファミリー内で生じる置換）。例えば、アミノ酸は概ね4つのファミリーに分割される：（1）酸性--アスパラギン酸及びグルタミン酸；（2）塩基性--リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性--アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び（4）非荷電極性--グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン及びチロシン。フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンはときに芳香族アミノ酸として分類される。保存的変型の例には以下が含まれる：1つの疎水性残基（例えばイソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニン）による別の疎水性残基の置換、又は1つの極性残基による別の極性残基の置換、例えば、アルギニンによるリジンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、又はグルタミンによるアスパラギンの置換など；又はあるアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸による同様な保存的取替え（前記は生物学的活性に大きな影響を及ぼさない）。タンパク質の免疫原性に実質的に影響を及ぼさない小さなアミノ酸置換を有するが、参照分子と実質的に同じアミノ酸配列を有するタンパク質は、したがって参照ポリペプチドの定義内である。これらの改変によって生成される全てのポリペプチドが本明細書に含まれる。“保存的変型”という用語はまた未置換親アミノ酸に代って置換アミノ酸が使用されることを含むが、ただし当該置換ポリペプチドに対して生じた抗体がまた未置換ポリペプチドと免疫的に反応することを条件とする。
【００１３】
組成物又はワクチンに対する“免疫学的応答”は、当該宿主における問題の組成物又はワクチンに対する細胞性及び/又は抗体媒介性免疫応答の発達である。通常、“免疫学的

応答”には以下の作用の１つ以上が含まれる（ただしこれらに限定されない）：問題の組成物又はワクチンに含まれる1つ又は複数の抗原を特異的に指向する抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、及び/又は細胞傷害性T細胞の産生。好ましくは、宿主は治療的又は防御的な免疫学的応答のどちらかを示し、それにより新たな感染に対する耐性が強化され、及び/又は当該疾患の臨床的重篤度が軽減されるであろう。そのような防御は、感染宿主によって通常示される症状の軽減又は欠失、より迅速な回復期間、及び/又は感染宿主病原体負荷の低下によって示されるであろう。

“多価ワクチン又は組成物”、“組合せ若しくはコンボワクチン又は組成物”、及び“多重ワクチン又は組成物”という用語は互換的に用いられ、２つ以上の組成物又はワクチンを含む組成物又はワクチンを指す。多価ワクチン又は組成物は、2つ、3つ、4つ又は5つ以上の組成物又はワクチンを含むことができる。多価ワクチン又は組成物は、組換えウイルスベクター、活性又は弱毒化若しくは殺滅野生型ウイルス、サブユニット（タンパク質/抗原）、DNAプラスミド、又は前記の混合物を含むことができる。

本明細書で用いられるように、“不活化ワクチン”という用語は、もはや複製又は増殖することができない伝染性生物又は病原体を含むワクチン組成物を意味する。病原体の起原は細菌、ウイルス、原生動物又は真菌性でもよい。不活化は以下を含む多様な方法によって達成できる：凍結融解、化学的処理（例えばチメロサール、ホルマリン、（ベータプロピオラクトン）又はBEI（二元エチレンイミン）による処理）、音波処理、照射、熱、又はその免疫原性を維持しつつ当該生物の複製若しくは増殖を防止するために十分な任意の他の通常手段。

【００１４】

PCV2組成物又はワクチンは、全細胞若しくは部分細胞調製物及び/又は上清（例えば殺滅ビリオン若しくは改変生調製物）、サブユニットワクチン（例えば１つ以上のPCV2由来ポリペプチド又はタンパク質を含むことができるサブユニットワクチン）を含みえる。PCV2組成物又はワクチンは不活化ウイルスを含むことができる。

PCV2は、米国特許6,368,601号、6,391,314号、6,660,272号、7,122,192号、7,144,698号、7,192,594号、7,504,206号、7,741,039号、7,833,783号、7,803,613号、7,803,926号、7,211,379号、6,517,843号に開示された任意のPCV2株でもよい。PCV2は、US7,211,379及びUS7,122,192に開示されたImp.1008、Imp.1010、Imp999、Imp.1011-48285、Imp.1011-48121、Imp.1103、Imp.1121株でもよい。PCV2株はImp.1010（CIRCOVAC(商標)）でもよい。

PCV2由来ポリペプチド又はタンパク質はPCV2 ORF2のものでもよい。本明細書で用いられる“ORF2”という用語は、オープンリーディングフレームORF2から発現されるシルコウイルス抗原を指す（ORF2はMeehanら（Meehan et al.(1998) J.Gen.Virol.78:221-227）によって指摘された）。ORF2はウイルスキャプシドに寄与するポリペプチドと考えられている。13のオープンリーディングフレーム（ORF）がPCV2ゲノムで識別されている。PCV2 ORF2に関する更なる記述は以下で見出すことができる：米国特許6,368,601号、6,391,314号、6,660,272号、7,122,192号、7,144,698号、7,192,594号、7,504,206号、7,741,039号、7,833,783号、7,803,613号、7,803,926号、7,211,379号、6,517,843号、6,943,152号、6217883号、6,953,581号、6,497,883号、7,109,025号。

PCV2組成物又はワクチンはさらにまた、マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエ（M hyo）、又はブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）、又は前記の組合せに由来する追加の抗原を含むことができる。M hyo又はPRRSVに由来する抗原は、全生物（殺滅、弱毒化又は生）；生物のサブユニット又は部分；免疫原性特性を有する抗原をコードする挿入物を含む組換えベクター；キメラ組換えベクター；ポリペプチド、抗原、又は前記の組合せでもよい。

【００１５】

不活化生物又は病原体は、通常的な濃縮技術、特に限外ろ過によって濃縮するか、及び/又は通常的な精製手段、特にクロマトグラフィー技術（ゲルろ過を含むがただし前記に限定されない）を用いることによって又は限外ろ過によって精製することができる。本明

細書で用いられるように、“免疫原性”という用語は、宿主動物で1つの抗原又は複数の抗原に対して免疫応答を生じる能力を意味する。この免疫応答は、特異的な伝染性生物に対するワクチンによって引き出される防御免疫の基礎を形成する。

本発明の組成物又はワクチンはサブユニットワクチンを含むことができ、前記サブユニットワクチンは、精製PCV2、M.ヒオプニューモニアエ又はPRRSV免疫原性タンパク質、ポリペプチド、抗原、並びにそのようなタンパク質及びポリペプチドの免疫原性フラグメントを有する。そのようなタンパク質及びポリペプチドは当業界で公知の技術を用いて調製することができる。例えば、抗原又はタンパク質は原核細胞又は真核細胞で生成できる。本発明で意図される原核細胞には、アビバクテリウム（Avibacterium）、ブルセラ（Brucella）、大腸菌（Escherichia coli）、ヘモフィルス（Haemophilus）（例えばヘモフィルス・スイス（Haemophilus suis））、サルモネラ（Salmonella）（例えば腸炎菌（Salmonella enteridis）、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、サルモネラ・インファンチス（Salmonella infantis））、シゲラ（Shigella）、パスツレラ（Pasteurella）、及びリメイレラ（Rimeirella）が含まれえる。原核細胞系では、多数の発現ベクターを選択できる。そのようなベクターには以下が含まれる（ただしそれらに限定されない）：多機能性大腸菌クローニング発現ベクター、例えばPBLUESCRIPT（Stratagene）；pETベクター（Novagen）；piNベクター（Van Heeke & Schuster, J.Biol.Chern.264:5503-5509, 1989）など；PGEXベクター（Promega, Madison, Wis.）。真核細胞系では、細胞株は、酵母（例えばサッカロミセス・セレビシアエ（Saccharomyces cerevisiae）、ピキア・パストリス（Pichia pastoris））、バキュロウイルス細胞（例えばSf9、Sf21、Tn5B1-4及びS2）、哺乳動物細胞、植物細胞（例えばアオウキクサ及び微細藻類）でもよい。真核細胞系の発現ベクターには、pVR1020又はpVT1012ベクター（Vical Inc., San Diego, CA）、ピキアピンク（PichiaPink）ベクター（Invitrogen, CA, USA）、pFasBac TOPOベクター（Invitrogen）が含まれるが、ただし前記に限定されない。

【００１６】

さらにまた、当業者に周知の方法を用いて、タンパク質の純度又は均質性を決定することができる。例えば、サンプルのポリアクリルアミドゲル電気泳動に続いて染色ゲル上で単一のポリペプチドバンドが可視化される。HPLC又は当業界で周知の他の類似の方法を用いてより高度な解析を実施できる。具体的な実施態様では、組成物又はワクチンは、M.ヒオプニューモニアエの少なくとも1つのタンパク質、例えばP46、P65、P97、P102、P70、P50及びP44（ただしこれらに限定されない）を含む。M.ヒオプニューモニアエゲノムの配列については、以下が参照される：Minion et al., J Bacteriol.2004 Nov;186(21):7123-33。別の具体的な実施態様では、組成物又はワクチンはPRRSVの少なくとも1つのタンパク質、例えばE、ORF3及びM（ただしこれらに限定されない）を含む。

他の実施態様では、本発明の組成物又はワクチンは、M.ヒオプニューモニアエバクテリン（不活化全細胞又は部分細胞）、又は改変生M.ヒオプニューモニアエ、又はM.ヒオプニューモニアエタンパク質若しくはポリペプチド又は前記の免疫原性フラグメントを含む。M hyoバクテリンは、MAINSAIL(商標)（ProtaTek International, Inc., Saint Paul, MN）に含まれる不活化バクテリンでもよい。M hyoバクテリンはSPRINTVAC(商標)に含まれる不活化バクテリンでもよい。

M hyo組成物又はワクチンはさらにまた、PCV2、又はブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）、又は前記の組合せに由来する追加の抗原を含むことができる。

【００１７】

他の実施態様では、本発明の組成物又はワクチンは、PRRSV（不活化全細胞又は部分細胞）、又は改変生PRRSV、又はPRRSVタンパク質若しくはポリペプチド、又は前記の組合せを含む。本発明の組成物又はワクチンは、改変生PRRSV及び不活化PRRSVを含むことができる。PRRSVはいずれの北アメリカPRRSV又はヨーロッパPRRSVでもよい。北アメリカPRRSVには、ATCC VR-2332株（Collins et al., 1992, J Vet Diagn Invest 4:117-126）、807/94株（カナダ）、MN-1b株（Kwang, J.et al., 1994, J, Vet.Diagn.Invest.6:293-296）、VR 2385株（Meng, X.-J et al., 1994, J.Gen.Virol.75:1795-1801）、ケベックLAF-exp91

株（Mardassi, H.et al., 1995, Arch.Virol.140:1405-1418）が含まれえるが、ただしこれらに限定されない。ヨーロッパPRRSVには、Olot株（スペイン）、Lelystad及びl10株（オランダ）、PROGRESSIS(商標)株（メリアル社（Merial Limited）の商標登録製品）が含まれえるが、ただしこれらに限定されない。PRRSVは、INGELVAC PRRS(商標) MLVワクチン（Boehringer Ingelheim）に含まれる改変生PRRS株でもよい。PRRSVはまたアジア又は南アメリカで単離された株を含むことができる。

ある実施態様では、本発明は新規な不活化/殺滅PRRSV組成物又はワクチンを包含する。PRRSV株は米国で新規に同定されたPRRSV血清型である。不活化は、列挙可能な構造的変化（例えば化学的架橋による新規な化学結合の形成、核酸及びタンパク質コートの不可逆的化学変化を含む）を生じる化学的不活化でもよい。

【００１８】

本発明のある実施態様は、PRRSV株のゲノムDNA及び遺伝子配列、並びにコードされるタンパク質配列を提供する。

別の実施態様では、PRRSVのORF5（糖タンパク質5（GP5）としてもまた知られている）タンパク質又は抗原の配列を提供する。当該実施態様のある特徴では、PRRSVのORF5タンパク質は、配列番号:2、3、4、5、7、8又は9に示されるポリペプチド配列を有する。別の特徴では、ORF5タンパク質は、配列番号:2、3、4、5、7、8又は9に示される配列を有するポリペプチドと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%又は99.9%配列同一性を有する。さらに別の特徴では、ORF5タンパク質は、配列番号:1に示される配列を有するポリヌクレオチドと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%又は99.9%配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる。

本発明はさらに組換えPRRSV抗原を包含する。組換えPRRSV抗原には以下が含まれえる（ただしこれらに限定されない）：組換えPRRSVアビポックスウイルスベクター（WO2003000 3112）、PRRSVプラスミドベクター（US6,576,243）、改変PRRSV（WO2006129139）、PRRSVのキメラ又は組換えタンパク質（EP1882478、EP0952219）、キメラPRRSV（WO2008153572；US7,666,585；CN101603035；Res Vet Sci.2013, 95(2):742-51）、及び遺伝的に改変されたPRRSV（US6,841,364）。

【００１９】

別の実施態様では、本発明は、PRRSVの子孫又は遺伝的継承体（descendant）の調製及び単離を意図する。本発明はしたがって、同一又は派生形で、特に寄託株の本質的特徴を保有する遺伝的継承体としてPRRSV株から繁殖又は増殖中に派生したPRRSVに及ぶ。持続的繁殖に際して、当該株は変異を獲得することがあり、前記変異の大半はこれらの株の特性を顕著には変化させないであろう。子孫又は遺伝的継承体は、配列番号:2、3、4、5、7、8又は9に示される配列と少なくとも91%配列同一性を有するORF5タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は配列番号:1に示される配列を有するORF5タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

本発明はさらに、ベクター分子又は発現ベクターに含まれ、かつプロモーターエレメント及び場合によってエンハンサーに作動できるように連結された少なくとも1つのPCV2、M.ヒオプニューモニアエ、又はPRRSV抗原を包含する。

“ベクター”は、標的細胞にin vitro又はin vivoでデリバリーされる異種ポリヌクレオチドを含む組換えDNA若しくはRNAプラスミド又はウイルスを指す。異種ポリヌクレオチドは治療の目的のために問題の配列を含むことができ、場合によって発現カセットの形態を有することができる。本明細書で用いられるように、ベクターは最終的な標的細胞又は対象で複製能力を有する必要はない。当該用語にはクローニングベクター及びウイルスベクターが含まれる。

【００２０】

本発明のポリヌクレオチドは追加の配列を含むことができる。前記は、例えば、同じ転写ユニット内の追加のコード配列、制御エレメント（例えばプロモーター）、リボソーム

結合部位、ポリアデニル化部位、同じ又は異なるプロモーターの制御下にある追加の転写ユニット、クローニング、発現、相同組換え及び宿主細胞の形質転換を可能にする配列、並びに本発明の実施を提供するために所望できる任意の構築物である。

本発明は、PCV2、M.ヒオプニューモニアエ、若しくはPRRSV抗原、又は変種若しくはアナローグ若しくはフラグメントを発現するベクターを包含する。有利には抗原発現のためのエレメントが本発明のベクターに存在する。最小限、前記は、開始コドン（ATG）、終止コドン及びプロモーター、及び場合によってはまた、ある種のベクター（例えばプラスミド及びある種のウイルスベクター（例えばポックスウイルス以外のウイルスベクター））についてはポリアデニル化配列を含むか、本質的にこれらから成るか、又はこれらから成る。ポリヌクレオチドが、ベクターでポリプロテインフラグメント（例えばPCV2抗原又はM.ヒオプニューモニアエ抗原又はPRRSV抗原）をコードするときには、ATGはリーディングフレームの5’に配置され、終止コドンは3’に配置される。発現制御のための他のエレメント、例えばエンハンサー配列、安定化配列（例えばイントロン）、及びタンパク質の分泌を可能にするシグナル配列が存在してもよい。

【００２１】

ある実施態様では、本発明は、PCV2、M.ヒオプニューモニアエ、又はPRRSV抗原を標的細胞にデリバリー及び発現するために処方物又は組成物の治療的に有効な量の投与を提供する。治療的に有効な量の決定は当業者には日常的実験である。

医薬的又は獣医的に許容可能な担体、アジュバント、ベヒクル、又は賦形剤は当業者には周知である。例えば、医薬的又は獣医的に許容可能な担体又はベヒクル又は賦形剤は、0.9%のNaCl（例えば食塩水）溶液又はリン酸緩衝液でありうる。本発明の方法に用いることができる医薬的又は獣医的に許容可能な他の担体、アジュバント、ベヒクル、又は賦形剤にはポリ-(L-グルタミン酸)又はポリビニルピロリドンが含まれるが、ただし前記に限定されない。医薬的に又は獣医的に許容可能な担体、アジュバント、ベヒクル、又は賦形剤は、ベクター（又は本発明のベクターからin vitroで発現されるタンパク質）の投与を促進する任意の化合物又は化合物の組合せでもよい。当該担体、ベヒクル、アジュバント、又は賦形剤はトランスフェクションを促進することができ、及び/又はベクター（又はタンパク質）の保存を改善することができる。用量及び一用量体積は一般的な記述として本明細書で考察され、さらに当業者は当業界の知識とともに本開示を一読することにより一切の煩瑣な実験を実施することなくそれらを決定できる。

【００２２】

本発明の免疫学的組成物及びワクチンは、１つ以上のアジュバントを含むか又は本質的に前記から成りうる。本発明の実施に使用される適切なアジュバントは、（1）アクリル酸又はメタクリル酸ポリマー、無水マレイン酸及びアルケニル誘導体ポリマー、（2）免疫刺激性配列（ISS）、例えば１つ以上の非メチル化CpGユニットを有するオリゴデオキシリボヌクレオチド配列（Klinman et al., 1996；WO98/16247）、（3）水中油エマルジョン、例えばSPTエマルジョン（“Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach” M.Powell, M.Newman, Plenum Press刊（1995）の147ページに記載）及びエマルジョンMF59（同書の183ページに記載）、（4）四級アンモニウム塩を含む陽イオン脂質（例えばDDA）、（5）サイトカイン、（6）水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウム、（7）サポニン、又は（8）本出願に引用され及び参照により含まれるいずれかの資料で考察される他のアジュバント、又は（9）前記の任意の組合せ若しくは混合物である。

水中油エマルジョン（3）は、以下を基剤とすることができる：軽質流動パラフィン油（欧州局方型）、イソプレノイド油（例えばスクアラン、スクアレン）、アルケンのオリゴマー化から生じる油（例えばイソブテン又はデセン）、直鎖アルキル基を有する酸又はアルコールのエステル（例えば植物油、オレイン酸エチル、プロピレングリコール、ジ(カプリレート/カプレート)、グリセロールトリ(カプリレート/カプレート)、及びジオレイン酸プロピレングリコール）、又は分枝脂肪アルコール又は酸のエステル（特にイソステアリン酸エステル）。

油を乳化剤と組み合わせて用いてエマルジョンを形成する。乳化剤は非イオン性界面活

性剤でもよい。前記は例えば以下である：一方でソルビタン、マンニド（例えばアンヒドロマンニトールオレエート）、グリセロール、ポリグリセロール又はプロピレングリコール、及び他方でオレイン酸、イソステアリン酸、リシノール酸又はヒドロキシステアリン酸のエステル（前記エステルが場合によってエトキシル化される）、又はポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンコポリマーブロック（例えばプルロニック（Pluronic）、例えばL121。エマルジョンのいくつか（例えばTS6、TS7、TS8及びTS9エマルジョン）は、US7,608,279及びUS7,371,395に記載されている。

ある実施態様では、アジュバントは、LR3及びLR4（US7,691,368）、TSAP（US20110129494）、TRIGEN™（Newport Labs）、合成dsRNA（例えばポリIC、ポリICLC［HILTONOL(商標)］）、及びMONTANIDE™アジュバント（W/O、W/O/W、O/W、IMS及びゲル（いずれもSEPPICの製品））を含むことができる。

【００２３】

具体的な実施態様では、本発明の医薬及び/又は治療組成物及び/又は処方物は、本明細書で考察される１つ以上の抗原の治療的応答を引き出すために有効な量を含むか、又は本質的に前記から成るか、又は前記から成り、有効な量は、煩瑣な実験を実施することなく、本開示（本明細書に取り込まれた資料を含む）及び当業界の知識から決定することができる。

前記用量は、約10^2から約10^{20}、約10^3から約10^{18}、約10^4から約10^{16}、約10^5から約10^{12}のVLP（ウイルス様粒子）を含むことができる。ウイルス粒子は、以下を含む（ただしこれらに限定されない）任意のウイルス滴定方法を基準にして計算できる：FFA（フォーカス形成アッセイ）若しくはFFU（フォーカス形成単位）、$TCID_{50}$（50%組織培養感染用量）、PFU（プラーク形成単位）、及び$FAID_{50}$（50%蛍光抗体感染用量）。一用量体積は約0.1から約10mL、有利には約0.2から約5mLでありうる。

M hyoバクテリンワクチンの場合には、組成物又はワクチンは、約1×10^6から約5×10^{10}コロニー形成ユニット(CFU)/用量、約1×10^8から約5×10^{10} CFU/用量、及び約5×10^8から約5×10^{10} CFU/用量を含むことができる。

当該組成物又はワクチンは、約$10^{2.0}$から約$10^{10.0}$ $TCID_{50}$又はPFU/用量、約$10^{2.0}$から約$10^{8.0}$ $TCID_{50}$又はPFU/用量、及び約$10^{2.0}$から約$10^{6.5}$ $TCID_{50}$又はPFU/用量を含むことができる。当該組成物又はワクチンは、不活化/殺滅組成物又はワクチンの場合には等価の$TCID_{50}$又はPFUを含むことができる。

本明細書の開示は例示として提供され、本発明は前記に限定されないことは当業者には理解されよう。本明細書の開示及び当業界の知識から、当業者は、一切の煩瑣な実験を実施することなく、それぞれの注射プロトコルについて用いられるべき投与の回数、投与経路、及び用量を決定することができる。

【００２４】

本発明は、本発明にしたがって作製される治療組成物の有効量の少なくとも1回の動物への投与を意図する。動物は、雄、雌、妊娠中の雌及び新生仔でありうる。この投与は以下を含む（ただしこれらに限定されない）多様な経路を経ることができる：筋肉内（IM）、皮内（ID）若しくは皮下（SC）注射又は鼻内若しくは経口投与。本発明の治療組成物はまた、無針装置（例えばピグジェット（Pigjet）、バイオジェクター（Biojector）又はビタジェット（Vitajet）装置（Bioject, Oreg., USA））によって投与することができる。

本発明のある実施態様では、プライム-ブーストレジメンを利用することができる。前記は、少なくとも1回の一次投与及び少なくとも1回のブースター投与を含み、少なくとも1つの共通のポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原を用いる。一次投与で用いられる免疫学的組成物又はワクチンはブースターとして用いられるものと本来相違する。しかしながら、同じ組成物を一次投与及びブーストとして用いてもよいことが指摘される。この投与プロトコルは“プライム-ブースト”と呼ばれる。プライム投与は1回以上の投与を含むことができる。同様に、ブースト投与は1回以上の投与を含むことができる。

組成物又はワクチンはブタ又は離乳ブタに投与される。ブースター投与は、必要な場合

には最初の投与後2から8週間頃に実施できる。別の実施態様では、組成物又はワクチンは、仔豚が、初乳及び乳を吸うことによりPCV2、M.ヒオプニューモニアエ、及び/又はPRRSV感染に対して受動免疫を獲得できるようにブタ又は雌ブタに投与される。ブースター投与はまた、6カ月毎に又は1年毎に、特にブタ又は雌ブタで繰り返すことができる。

別の目的はワクチンキット又はセットであり、前記は、M hyo組成物若しくはワクチン、又はM hyo多重組成物若しくはワクチン、又はM hyo/PCV2組成物若しくはワクチン、又はPRRS組成物若しくはワクチン、又は前記の組合せを含む少なくとも1つのワクチンバイアルを含み、前記は、イノシシ科の動物にワクチン投与を実施できるように効果的に詰め合わされている。

そのようなワクチン免疫キット又はセットは、PCV2、M.ヒオプニューモニアエ、及び/又はPRRSV感染に対して安全かつ防御的な免疫応答を引き出すことができる。

本発明は、以下の非限定的な例示によってこれからさらに詳述されるであろう。

【実施例１】

【００２５】

M hyo多重ワクチン及びPRRSVワクチンの有効性試験

ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）及びマイコプラズマ・ヒオプニューモニアエは、ブタ呼吸器疾患群で単離されるもっともありふれた病原体のうちの2つである。これらの病原体の両方が存在するブタ群では、M.ヒオプニューモニアエによる感染は、しばしばブタをPRRSVに感染しやすくする。（1）in vitroモデルでは、炎症性サイトカインのレベル上昇が同時感染によって誘発され、これは肺の感染部位へより多くのマクロファージを引き寄せて感染を長引かせる可能性がある。（2）このことを野外に変換するならば、同時感染によって誘発された肺炎は、当該ウイルスだけで感染が生じたときに観察されるよりも長期間のPRRSV誘発肺炎を生じる可能性がある。野外でこれまで循環しているPRRSVは、高レベルの遺伝的不均一性を保有し、したがって市販ワクチンは異種株ウイルスに対してしばしば防御を提供できない。（3）最近、1-7-4 RELPパターンを示す新規なPRRSV株が米国内で優勢となりつつある。（4）野外の予備的報告書は、この病毒性を有する新規な株に対して市販ワクチンでは防御が得られないことを記載している。M.ヒオプニューモニアエが飼育場に存在するとき、このウイルスによる感染の結果は悪くなりうる。ブタが感染に対してもっとも感受性が高くなるとき、特に離乳後に、これら2つの病源体が関係する合併病変と戦うことができる新規なワクチン免疫手法が希求される。

本試験では、野外試験を実施した。この野外試験では、4つの異なるワクチン免疫手法を試験して、それらが、離乳から12週齢までの体重増加を強化できるか否かを決定した。

PRRSV株は、PRRSVの臨床的徴候を示す保育場の28日目のブタ血清から単離された。RNAを抽出し配列を決定した。BEI（二元エチレンイミン）を用いて化学的反応によって、増殖させたPRRSVウイルスを不活化した。ホルムアルデヒド又はBPL（ベータプロピオラクトン）もまたPRRSウイルスの不活化に用いることができる。160匹のPRRS陽性ブタを4つのグループに分けた。これらのブタは雄と雌が混ざっていた。ブタは約21日齢で、体重は平均して約18ポンド（約8.165kg）であった。

【００２６】

表1：処置グループ

【表１】

グループ	処置	n
A	市販PRRSV MLVワクチン[1]、Circovac PCV2ワクチン[2]、不活化PRRSV自家ワクチン[3]	40
B	市販PRRSV MLV及びCircovac PCV2ワクチン	40
C	市販PRRSV MLV、Circovac PCV2ワクチン、MAINSAIL(商標) マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエワクチン[4]、不活化PRRSV自家ワクチン	40
D	市販PRRSV MLV、Circovac PCV2ワクチン、及びMAINSAIL(商標) マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエワクチン	40

市販PRRSV MLVワクチン[1]：INGELVAC PRRS(商標)MLVワクチン（Boehringer Ingelheim）、標識の用量。
Circovac PCV2ワクチン[2]：PCV2ワクチンCIRCOVAC(商標)（メリアル社が販売する不活化ワクチン）でPCV2株Imp.1010を含む、2mL/用量。
不活化PRRSV自家ワクチン[3]：TS6アジュバント/エマルジョン中（66.66% TS6＋33.33% PRRSV採集液）（TS6はUS 7,608,279及びUS 7,371,395並びに表3に記載されている）、用量は1cc。
MAINSAIL(商標)マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエワクチン[4]：不活化M hyoバクテリンワクチン（ProtaTek International, Inc., Saint Paul, MN）、1mL/用量。
【００２７】
表2：処置計画

【表２】

グループ	処置	経路	体積	頻度	チャレンジ
A	1用量のIngelvac PRRS(商標)MLVワクチン（離乳時に首の右側） 1用量のCircovacワクチン（離乳時に首の右側） 1用量の殺滅PRRSワクチン(首の左側）、3週間後に2回目の殺滅PRRSワクチン（首の左側）	IM	0.5mL MLV PRRS 0.5mL Circovac 1.0mL 殺滅PRRS	Ingelvac PRRSを1回投与 Circovacを1回投与 殺滅PRRSを2回投与	自然暴露
B	1用量のIngelvac PRRS(商標)MLVワクチン（離乳時に首の右側） 1用量のCircovacワクチン（離乳時に首の右側）	IM	0.5mL MLV PRRS 0.5mL Circovac	Ingelvac PRRSを1回投与 Circovacを1回投与	自然暴露
C	1用量のIngelvac PRRS(商標)MLVワクチン（離乳時に首の右側） 1用量のCircovacワクチン（離乳時に首の右側） 1用量の殺滅PRRSワクチン(首の左側）、3週間後に2回目の殺滅PRRSワクチン（首の左側） 1用量のMainsailワクチン（離乳時に首の右側）	IM	0.5mL MLV PRRS 0.5mL Circovac 1.0mL 殺滅 PRRS 1mL Mainsail	Ingelvac PRRSを1回投与 Circovacを1回投与 殺滅PRRSを2回投与 Mainsailを1回投与	自然暴露
D	1用量のIngelvac PRRS(商標)MLVワクチン（離乳時に首の右側） 1用量のCircovacワクチン（離乳時に首の右側） 1用量のMainsailワクチン（離乳時に首の右側）	IM	0.5mL MLV PRRS 0.5mL Circovac 1mL Mainsail	Ingelvac PRRSを1回投与 Circovacを1回投与 Mainsailを1回投与	自然暴露

【００２８】

表3：TS6エマルジョン（US 7,608,279 and US 7,371,395に記載のプレマルジョン）

【表３】

油相（120mL）	
ソルビタンモノオレエート（SPAN 80(商標)）	1.8% w/v
ソルビタントリオレエート(20 OE)（TWEEN 85(商標)）	10.2% w/v
パラフィン油（MARCOL 82(商標)）	88% v/v
水相（120mL）	
ソルビタントリオレエート(20 OE)（TWEEN 80(商標)）の20%（w/v)溶液	11.25% w/v
0.02Mのリン酸二ナトリウム一カリウム等張緩衝液（pH7.8）	85.75% v/v
水に1%のマーキュロチオレートナトリウム（Thionersal(商標)）	1.5% v/v

【００２９】

動物を61日間追跡観察し、0日目及び61日目に体重を測定した。血清もまた両時点で採取し、qPCRによってPRRSVの存在について（図1）さらに蛍光巣中和アッセイ（FFN）を用いて中和抗体力価について査定した。中和抗体力価は、ワクチン免疫処置で用いた株とともに異種株（NADC20）の両方に対して測定した（図2）。二元ANOVA（α＝0.05）を用い体重増加を全グループ間で査定し、当該因子（開始体重及び処置グループ）が結果の変数（仕上がり体重）に統計的に有意な影響を与えたか否かを決定した（図3）。続いてスチューデントｔ検定（α＝0.05）を用いてグループをランク付けし、統計的に有意なグループ間差異を可視化した（図4）。同様にブタを査定し、M.ヒオプニューモニアエによるワクチン免疫が、提供した他の処置成分と比較して統計的に有意な影響を仕上がり体重に与えたか否かを決定した（図5）。

本試験の結果は、処置グループA及びBの動物が試験開始時にグループC及びDの動物よりも有意に軽かったという事実によって複雑化された。試験開始時に採取した血清によるqPCRの結果に基づいて、前記の差異はグループA及びBでより重篤なPRRSV感染に起因する可能性があったように思われる。このことはさらにFFN試験の結果によって支持された。FFN試験は、試験終了時のグループAのブタについて1-7-4 RFLPウイルスに対する中和抗体力価で統計的に有意な差異を明示した。これらのブタはワクチン免疫の前にこのウイルスでより重篤なチャレンジを受けたと思われる。0日目にデリバリーされた不活化ワクチンはこのチャレンジに続くブースターワクチン免疫として機能した。このことは、ワクチンを投与されなかったか又は試験の開始時点で重篤な感染が無かった他のグループと比較して、本試験の終了時に中和抗体の増強をもたらした可能性がある。

別の試験を実施して、同じ時期にPRRSV MLVとともに用いたときの不活化PRRSV自家ワクチンの効果を査定した。結果は、殺滅PRRSをMLVとともに用いたとき2－5%の死亡ロス改善を示した（表4）。

【００３０】

表4：不活化PRRSワクチンの効果

【表４】

グループ	死亡ロス改善
A：コントロール（1用量のIngelvac PRRS(商標)MLVワクチン)	－
B：1用量のIngelvac PRRS(商標)MLVワクチン＋1用量の不活PRRSV自家ワクチン	2.5%
C：1用量のIngelvac PRRS(商標)MLVワクチン＋1用量の不活PRRSV自家ワクチン＋1用量のMAINSAIL(商標)マイコプラズマ・ヒオプニューモニアエワクチン	5.0%

試験終了までに体重増加の顕著な増加をもたらす処置を比較したとき、M.ヒオプニュー

モニアエワクチン免疫が、ブタの体重増加能力を高める因子として明らかに突出していた。M.ヒオプニューモニアエワクチンを投与されたブタは、この処置を受けなかったブタよりも平均して11ポンド（4.99kg）重く、死亡ロスの改善は、M.ヒオプニューモニアエワクチン免疫グループで3.7%である。したがって、有意な経済的利点をM.ヒオプニューモニアエワクチン免疫に与えることができる。これらの結果は、M.ヒオプニューモニアエワクチン免疫を受けた動物について体重に関し有意な利益を明示する。

これらのデータは、M.ヒオプニューモニアエワクチン免疫の利点がこれまで野外で過小評価されていることを指摘する。これらのデータはまた、PRRSV MLVとともに不活化PRRSVワクチンを投与することによる死亡率の減少を指摘した。さらにまた、これらの結果は、M hyoワクチンがPCV2及びPRRSVワクチンと混合されたとき干渉は観察されなかったことを示す。

【００３１】

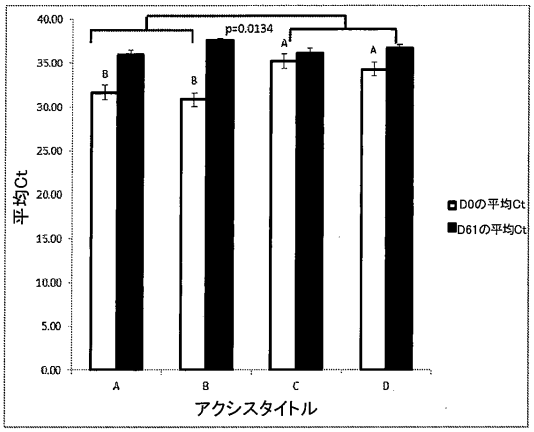
これまで本発明の好ましい実施態様を詳細に述べてきたが、上記によって明らかにした本発明は、上記に示した個々の細目に限定されないことは理解されるべきである。なぜならば、前記の多くの明白な変型は本発明の趣旨又は範囲を逸脱することなく可能だからである。

本明細書で引用又は参照された全ての資料（“本明細書引用資料”）、及び本明細書引用資料で引用又は参照された全ての資料は、本明細書又は本明細書に参照により含まれる一切の資料に記載された一切の製品に関する一切の製造業者の指示、説明、製品仕様書及び製品明細書とともに参照により本明細書に含まれ、かつ本発明の実施で利用することができる。

【図１】

Figure 1

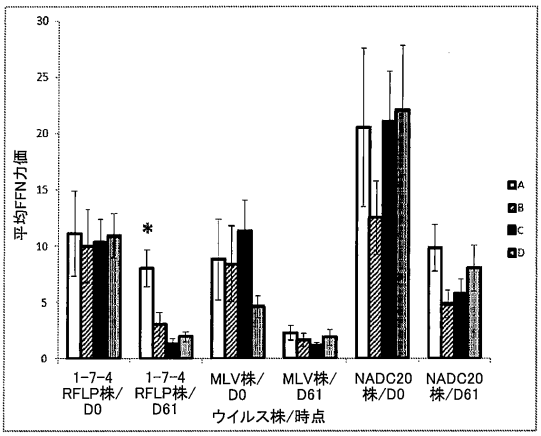
試験初日に採取した血清で実施したqPCR



【図２】

Figure 2

0日目及び21日目に採取した血清のFFN力価

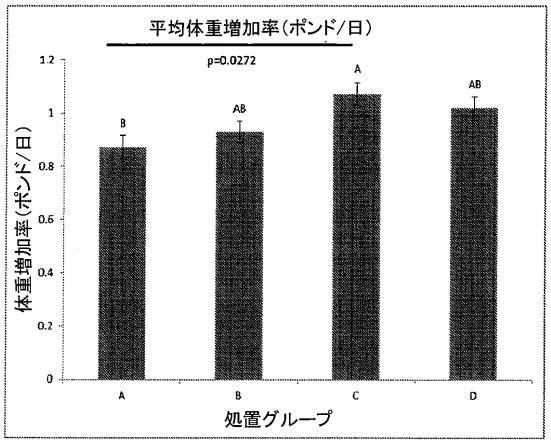


(*)はスチューデントt検定（α＝0.05）の結果に基づき有意に高い力価を有したグループを示す

【図３】

Figure 3

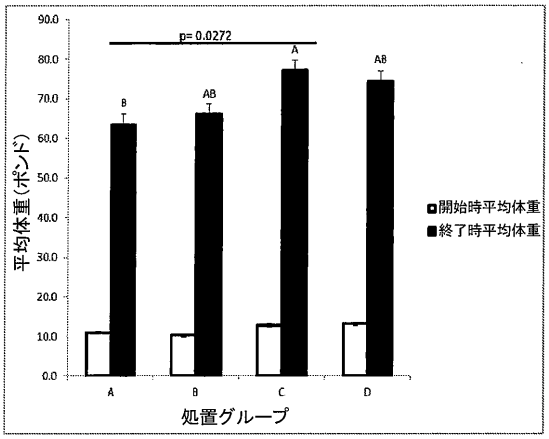
全グループ間の体重増加率比較



【図４】

Figure 4

試験0日目及び61日目のグループ平均体重

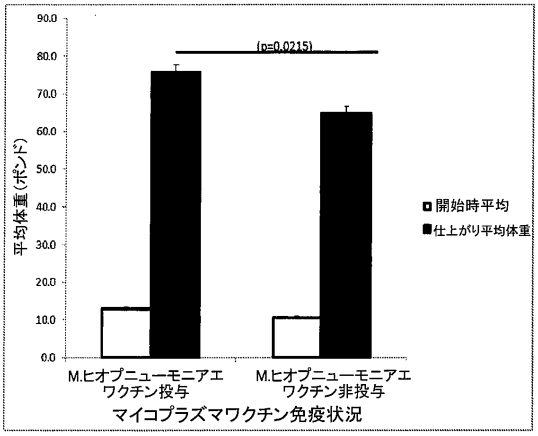


接続文字記録はスチューデントt検定（α＝0.05）の結果を示す

【図５】

Figure 5

マイコプラズマワクチン免疫状況に基づく仕上がり体重の比較



p値は二元ANOVAの結果を示す

【図６】

Figure 6

配列番号:	タイプ	遺伝子の詳細
1	DNA	PRRSV株、14-02227-1単離株のORF5のDNA配列
2	タンパク質	PRRSV株、14-02227-1単離株のORF5のタンパク質配列
3	タンパク質	PRRSV株、14-02094-1単離株のORF5のタンパク質配列
4	タンパク質	PRRSV株、S11-1118-1単離株のORF5のタンパク質配列
5	タンパク質	PRRSV株、参照単離株のORF5のタンパク質配列
6	タンパク質	PRRSV株、PRRSV Ref. Pfizer FosteraのORF5のタンパク質配列
7	タンパク質	PRRSV株、RespPRRS-BI Ingelvac MLVのORF5のタンパク質配列
8	タンパク質	PRRSV株、PRRS-BI Ingelvac ATPのORF5のタンパク質配列
9	タンパク質	PRRSV株、*EURO PRRS株Lelystad株のORF5のタンパク質配列

【図７Ａ】

Figure 7A

配列番号:1（ORF5 PRRSV 603bpのDNA配列）
ATGTTGGGGAAATGCTTGACCGCGGGCTGCTGCTCGCAATTGCCTTTTTTGTGGTGTATCGTGCCGTTCT
GTTTTGTTGCGCTCGTCAACGCCAACAACAGCAGCAGCTCCCATTTACAGTTGATTTATAACCTGACGAT
ATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAAACAAAAGTTTGATTGGGCGGTGGAGACCTTTGTTATTTTT
CCTGTGTTGACTCATATTGTCTCCTATGGCGCCCTCACCACCAGCCATTTCCTTGACACAGTCGGCCTGA
TCACCGTGTCTGCCGCCGGATATTACCACGGGCGGTATGTCTTGAGTAGCATTTATGCCGTCTGCGCCCT
GGCTGCGTTAACTTGCTTCGTCATCAGGCTAACAAAAAATTGTATGTCCTGGCGTTACTCATGCACCAGA
TATACTAATTTTCTTCTGGACACCAAGGGCAAACTCTATCGTTGGCGGTCTCCTGTCATCATAGAGAAAG
GGGGTAAAATTGAGGTCGAAGGTCACCTGATCGACCTCAAGAGAGTTGTGCTTGACGGTTCCGCGGCAAC
CCCTGTAACCAAAGTTCAGCGGAACAATGGGGCCGTCCT

配列番号:2（ORF5 PRRSV 200aa、14-02227-1単離株）
MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFVALVNANNSSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNKSFDWAVETFVIF
PVLTHIVSYGALTTSHFLDTVGLITVSAAGYYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLTKNCMSWRYSCTR
YTNFLLDTKGKLYRWRSPVIIEKGGKIEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAEQWGRP

配列番号:3　14-02094-1単離株
MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFVALVNANNSSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNKSFDWAVETFVIFP
VLTHIVSYGALTTSHFLDTVGLITVSAAGYYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLTKNCMSWRYSCTRYT
NFLLDTKGKLYRWRSPVIIEKGGKIEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAEQWGRP

配列番号:4　S11-1118-1単離株
MLGKCLTAGYCSQLPFLWCIVPFCFAALVNANSNSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNNKFDWAVETFVIFP
VLTHIVSYGALTTSHLLDTVGLITVSTAGYCHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLAKNCMSWRYSCTRYT
NFLLDTKGKLYRWRSPVIIEKGGKVDVGGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKISAEQWGRP

配列番号:5　参照単離株
MLGKCLTAGCCSQLPSLWCIVPFCFAALVNANSSSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLNNKFDWAVETFVIFP
VLTHIVSYGALTTSHFLDTVGLITVSTAGFYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLAKNCMSWRYSCTRYT
NFLLDTKGRLYRWRSPVIIEKGGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPVTRVSAEQWGRP

配列番号:6　PRRSV ref. isolate Fostera
MLGKCLTAGCCSRLLSLWCIVPFWFAVLGNANSSSSSHFQLIYNLTLCELNGTDWLAEKFDWAVETFVIFP
VLTHIVSYCALTTSHFLDTVGLVTVSTAGFYHGRYVLSSIYAVCALAALICFVIRLAKNCMSWRYSCTRYT
NFLLDTKGRLYRWRSPVIIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVATPLTRVSAEQWGRL

配列番号:7　RespPRRS-BI Ingelvac MLV
MLEKCLTAGCCSQLLSLWCIVPFCFAVLANASNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWAVESFVIFP
VLTHIVSYGALTTSHFLDTVALVTVSTAGFVHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRFAKNCMSWRYACTRYT
NFLLDTKGGLYRWRSPVIIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVATPITRVSAEQWGRP

配列番号:8　PRRS-BI Ingelvac ATP
MLGRGVTGGCGSRTLSVWCIVPFCFAALVNANSNSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLKNKFDWALETFVIFP
VLTHIVSYSALTTSHFLDTVGLVTVSTAGFYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLAKNCMSWRYSCTRYT
NFLLDTKGRLYRWRSPVIIEKGGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVATPLTRVSAEQWGRP

【図７Ｂ】

Figure 7B

配列番号:9　*EURO PRRS株Lelystad株

MRCSHKLGRFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFADGNGDSSTYQYIYNLTICELNGTDWLSSHFGWAVETFVL
YPVATHILSLGFLTTSHFFDALGLGAVSTAGFVGGRYVLCSVYGACAFAAFVCFVIRAAKNCMACRYARTR
FTNFIVDDRGRVHRWKSPIVVEKLGKAEVDGNLVTIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQWE

```
                1                                                  50
配列番号: 2   (1) -----MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFVALVNANNSSSSHLQLIYNL
配列番号: 3   (1) -----MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFVALVNANNSSSSHLQLIYNL
配列番号: 4   (1) -----MLGKCLTAGYCSQLPFLWCIVPFCFAALVNANSNSSSHLQLIYNL
配列番号: 5   (1) -----MLGKCLTAGCCSQLPSLWCIVPFCFAALVNANSSSSSHLQLIYNL
配列番号: 8   (1) -----MLGRGVTGGCGSRTLSVWCIVPFCFAALVNANSNSSSHLQLIYNL
配列番号: 6   (1) -----MLGKCLTAGCCSRLLSLWCIVPFWFAVLGNANSSSSSHFQLIYNL
配列番号: 7   (1) -----MLEKCLTAGCCSQLLSLWCIVPFCFAVLANASNDSSSHLQLIYNL
配列番号: 9   (1) MRCSHKLGRFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFADGNG---DSSTYQYIYNL

                51                                                 100
配列番号: 2  (46) TICELNGTDWLNKSFDWAVETFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVGLIT
配列番号: 3  (46) TICELNGTDWLNKSFDWAVETFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVGLIT
配列番号: 4  (46) TICELNGTDWLNNKFDWAVETFVIFPVLTHIVSYGALTTSHLLDTVGLIT
配列番号: 5  (46) TLCELNGTDWLNNKFDWAVETFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVGLIT
配列番号: 8  (46) TLCELNGTDWLNNKFDWAIETFVIFPVLTHIVSYSALTTSHFLDTVGLVT
配列番号: 6  (46) TLCELNGTDWLAEKFDWAVETFVIFPVLTHIVSYCALTTSHFLDTVGLVT
配列番号: 7  (46) TLCELNGTDWLANKFDWAVESFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVALVT
配列番号: 9  (48) TICELNGTDWLSSHFGWAVETFVLYPVATHILSLGFLTTSHFFDALGLGA

               101                                                 150
配列番号: 2  (96) VSAAGYYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLTKNCMSWRYSCTRYTNFL
配列番号: 3  (96) VSAAGYYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLTKNCMSWRYSCTRYTNFL
配列番号: 4  (96) VSTAGYCHGRYVLSSIYAVCALAALICFAIRLAKNCMSWRYSCTRYTNFL
配列番号: 5  (96) VSTAGFYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLAKNCMSWRYSCTRYTNFL
配列番号: 8  (96) VSTAGFYHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRLAKNCMSWRYSCTRYTNFL
配列番号: 6  (96) VSTAGFYHGRYVLSSIYAVCALAALICFVIRLAKNCMSWRYSCTRYTNFL
配列番号: 7  (96) VSTAGFVHGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRFAKNCMSWRYACTRYTNFL
配列番号: 9  (98) VSTAGFVGGRYVLCSVYGACAFAAFVCFVIRAAKNCMACRYARTRFTNFI

               151                                                 200
配列番号: 2 (146) LDTKGKLYRWRSPVIIEKGGKIEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAE
配列番号: 3 (146) LDTKGKLYRWRSPVIIEKGGKIEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAE
配列番号: 4 (146) LDTKGKLYRWRSPVIIEKGGKVDVGGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKISAE
配列番号: 5 (146) LDTKGRLYRWRSPVIIEKGGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPVTRVSAE
配列番号: 8 (146) LDTKGRLYRWRSPVIIEKGGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVATPLTRVSAE
配列番号: 6 (146) LDTKGRLYRWRSPVIIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVATPLTRVSAE
配列番号: 7 (146) LDTKGGLYRWRSPVIIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVATPITRVSAE
配列番号: 9 (148) VDDRGRVHRWKSPIVVEKLGKAEVDGNLVTIKHVVLEGVKAQPLTRTSAE
```

【図７Ｃ】

Figure 7C

```
                201
配列番号: 2  (196) QWGRP
配列番号: 3  (196) QWGRP
配列番号: 4  (196) QWGRP
配列番号: 5  (196) QWGRP
配列番号: 8  (196) QWGRP
配列番号: 6  (196) QWGRL
配列番号: 7  (196) QWGRP
配列番号: 9  (198) QWE--
```

配列同一性パーセンテージ

配列番号:	2	3	4	5	6	7	8	9
2	100%	100%	92.0%	94.0%	87.0%	86.5%	86.0%	53.7%
3		100%	92.0%	94.0%	87.0%	86.5%	86.0%	53.7%
4			100%	93.0%	86.5%	85.5%	86.0%	53.2%
5				100%	92.5%	91.0%	92.0%	55.1%
6					100%	90.5%	90.5%	56.1%
7						100%	87.5%	54.1%
8							100%	53.0%
9								100%

系統樹



【配列表】
0006839714000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A61P 31/14 (2006.01) A61P 31/14

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
(74)代理人 100154988
弁理士 小林 真知
(72)発明者 ウィルソン キース
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ５６３０８ アレクサンドリア カーサ マリーナ レーン ノースウェスト １３０２
(72)発明者 ローレンス ポールラジ
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ５５１１２ アーデン ヒルズ スネリング アベニュー ノース ４４６２

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特表２０１５－５１２４５０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５２０７７１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３９／００
Ａ６１Ｋ ３９／１２
Ａ６１Ｋ ３９／２９５
Ａ６１Ｐ ３１／０４
Ａ６１Ｐ ３１／１４
Ａ６１Ｐ ３１／２０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）