



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0062345
(43) 공개일자 2022년05월16일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/12</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 39/02</i> (2006.01) <i>A61K 39/39</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/04</i> (2006.01) <i>A61P 31/20</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 39/12</i> (2013.01)
 <i>A61K 39/0241</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7011595
 (22) 출원일자(국제) 2020년09월11일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2022년04월07일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2020/075454
 (87) 국제공개번호 WO 2021/048338
 국제공개일자 2021년03월18일
 (30) 우선권주장
 19196890.8 2019년09월12일
 유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
 인터벳 인터내셔널 비.브이.
 네덜란드 안 복스메어 5831 빔 데 쿼르페어슈트라
 아트 35</p> <p>(72) 발명자
 얀슨, 데오도뤼스
 네덜란드 안 복스메어 5831 빔 데 쿼르페어슈트라
 아트 35
 스노, 멜라니
 네덜란드 안 복스메어 5831 빔 데 쿼르페어슈트라
 아트 35
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 양영준, 김영</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **피내 투여용 복합 백신**

(57) 요약

본 발명은 수의학 백신학 분야, 즉 돼지용 복합 백신에 관한 것이다. 특히 본 발명은 돼지 쉼코바이러스 2형(PCV2)과 마이코플라즈마 하이오뉴모니아(Mhyo)에 의한 병원성 감염으로부터 보호하기 위한, PCV2의 비복제 면역원과 Mhyo의 비복제 면역원을 포함하는 복합 백신에 관한 것이다. 백신은 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전인 것을 특징으로 한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 피내 투여에 의해 PCV2 및 Mhyo의 병원성 감염으로부터 보호하기 위한 복합 백신에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61P 31/20 (2018.01)

A61K 2039/521 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/552 (2013.01)

A61K 2039/55511 (2013.01)

A61K 2039/55566 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

(72) 발명자

위트블리트, 마르텐, 헨드릭

네덜란드 안 복스메어 5831 빔 데 쿼르페어슈트라
아트 35

피스트, 마르틴

네덜란드 안 복스메어 5831 빔 데 쿼르페어슈트라
아트 35

명세서

청구범위

청구항 1

스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전인 것을 특징으로 하는 돼지 쉼코바이러스 2형의 비복제 면역원 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아의 비복제 면역원을 포함하는 복합 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 1 내지 15 % w/v의 양으로 스쿠알란을 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 2 내지 20 % w/v의 양으로 비타민 E-아세테이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 8 내지 20의 HLB 값을 갖는 유화제를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 5

제4항에 있어서, 유화제가 폴리소르베이트 80인 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 0.5 내지 10 % w/v의 양으로 유화제가 존재하는 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 0.02 내지 2 % w/v의 양으로 실리카를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 돼지 쉼코바이러스 2형의 비복제 면역원이 돼지 쉼코바이러스 2형의 ORF2 유전자에 의해 코딩된 재조합적으로 발현된 단백질인 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 마이코플라즈마 하이오뉴모니아의 비복제 면역원이 사멸된 전체 마이코플라즈마 하이오뉴모니아를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합 백신.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 동물의 진피 내로 투여되는 것을 특징으로 하는, 돼지 쉼코바이러스 2형 감염 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 감염에 대해 동물을 예방적으로 치료하는데 사용하기 위한 복합 백신.

청구항 11

제10항에 있어서, 동물의 진피에 투여되는 복합 백신의 부피가 0.1 내지 0.5 ml인 복합 백신.

청구항 12

복합 백신이 동물의 진피 내로 투여되는 것을 특징으로 하는, 돼지 쉼코바이러스 2형 감염 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 감염에 대해 동물을 예방적으로 치료하기 위한 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 복합 백신의 제조를 위한 돼지 쉼코바이러스 2형의 비복제 면역원 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아의 비복제 면역원

의 용도.

청구항 13

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 복합 백신을 동물의 진피 내로 투여함으로써 돼지 쉼코바이러스 2형 감염 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 감염에 대해 동물을 예방적으로 치료하는 방법.

청구항 14

스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전인 것을 특징으로 하는, 비생백신을 제제화 하기 위한 아쥘반트 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수의학 백신학 분야, 즉 돼지용 복합 백신에 관한 것이다. 특히 본 발명은 돼지 쉼코바이러스 2형(PCV2)과 마이코플라즈마 하이오뉴모니아(Mhyo)에 의한 병원성 감염으로부터 보호하기 위한, PCV2의 비복제 면역원과 Mhyo의 비복제 면역원을 포함하는 복합 백신에 관한 것이다. 백신은 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전인 것을 특징으로 한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 피내 투여에 의해 PCV2 및 Mhyo의 병원성 감염으로부터 보호하기 위한 복합 백신에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오늘날 집중적인 돼지 사육은 동물을 건강하게 유지하고 경제적 운영을 가능하게 하기 위해 수의학적 의료 제품에 크게 의존한다. 사료 및 농장 관리 시스템의 최적화 외에도, 호르몬 또는 항생제 같은 의약품, 및 박테리아 또는 바이러스 병원체에 대한 백신접종과 같은 다양한 치료가 정기적으로 사용된다. 어린 연령부터 계속 돼지에게 영향을 미치는 가장 두드러진 질환 중 일부는 마이코플라즈마 하이오뉴모니아와 같은 박테리아에 의해 및 돼지 쉼코바이러스 2형과 같은 바이러스에 의해 유발된다.

[0003] 마이코플라즈마 하이오뉴모니아(Mhyo)는 전세계적으로 발생하는 돼지의 만성 호흡기 질환인 (돼지) 동물성 폐렴을 유발하는 주요 작용제이다. 특히 어린 새끼돼지는 이 전염성 높은 질환에 취약하다. 박테리아는 비교적 작고, 세포벽이 없고, 물리쿠테스 속에 속한다. 이들 박테리아는 숙주 세포 상에서 또는 내에서 기생 생활방식으로 산다. Mhyo로부터의 폐 질환은 주로 강화 폐렴으로 이어지는 면역-매개 병리상태이다. 박테리아는 폐 섬모 상피를 콜로니화하고 손상시켜 섬모 활성의 상실을 초래한다. 주거 조건과 환경 스트레스에 따라, 이 질환의 가장 문제가 되는 결과는 다른 박테리아 및 바이러스 병원체에 의한 돼지 호흡계의 상이한 2차 감염에 걸리기 쉽게 만든다는 것이다. 이는 종종 폐 병변을 나타내는 소위 돼지호흡기복합증후군(PRDC)을 발생시킨다. 동물의 불편함 외에도, 동물성 폐렴과 PRDC는 성장률 및 사료 전환율의 성능 저하 뿐만 아니라 수의학적 관리 및 항생제 사용에 대한 비용으로 인해 돼지 산업에 중요한 경제적 손실을 유발한다.

[0004] 돼지 쉼코바이러스 2형(PCV2)은 어린 돼지에서 관찰되는 이유후전신소모성증후군(PMWS)과 연관된다. 임상 징후 및 병리상태는 1996년에 공개되었고, 진행성 소모, 호흡곤란, 빈호흡, 및 때때로 황달(icterus) 및 황달(jaundice)을 포함한다. 신규 작용제는 PK-15 세포의 천연 오염물인 공지된 PCV와 상이한 것으로서 PCV2로 불렸다. PCV2는 쉼코바이러스 속의 매우 작은 외피가 없는 바이러스이다. 이는 2개의 주요 유전자를 갖는 원형 단일 가닥 DNA 게놈을 함유한다. ORF2 유전자는 약 233개 아미노산의 바이러스 캡시드 단백질을 코딩한다. 재조합적으로 발현된 PCV2 ORF2 단백질은 서브유닛 백신으로서 고도로 효과적인 바이러스 유사 입자를 형성한다.

[0005] Mhyo에 대한 다양한 상업용 백신이 존재하며, 이들은 대다수의 상업용 돼지 사육 작업에 통상적으로 사용된다. 일반적으로, 이들 백신은 전형적으로 비경구 주사에 의해 투여되는 서브유닛 단백질 및/또는 박테린(즉, 사멸된 박테리아, 무손상 여부 관계없이)과 같은 비복제 면역원을 포함한다. 일부 예는 레스피슈어(Respire)[®] (조에티스(Zoetis)), 인겔백[®] 엠하이오(Ingelvac[®] M. hyo) (베링거 인겔하임(Boehringer Ingelheim)), 및 엠+팩(M+Pac)[®] (머크 애니멀 헬스(Merck Animal Health))이다.

[0006] PCV2에 의한 감염에 대해 동물, 특히 돼지를 예방적으로 치료하기 위한 통상적인 백신은 (비복제) 면역원으로서 전체 불활성화된 PCV2 바이러스를 기반으로 할 수 있다. 또한, 관련 기술분야에서 ORF2 코딩된 캡시드 단백질 (예를 들어, 재조합적으로 발현되는 경우)은 적절한 백신에 사용하기 위한 PCV2의 서브유닛 면역원으로서 적합

한 것으로 밝혀졌다. 이는 신체 내의 이러한 서브유닛이 바이러스 자체와 동일한 방식을 나타내기 때문에(바이러스-유사 입자를 형성한다) 이해될 수 있고, DNA 및 비구조 단백질이 캡시드 내부에 존재하지 않는다는 사실에서만 본질적으로 상이하다. 관련 기술분야에서 PCV2에 대한 여러 백신이 상업적으로 입수가능하다. 포실리스(Porcilis)[®] PCV (네덜란드 박스미어의 MSD 애니멀 헬스(MSD Animal Health)로부터 입수가능)는 3주 이상된 돼지에 사용하기 위한 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 돼지 보호용 백신이다. 2회 접종(2회 용량) 백신으로서 제공되는 경우에, 면역 지속기간(DOI)은 22주이며, 돼지의 비육 기간을 거의 완전히 포괄한다. 인겔백 쉼코플렉스(Ingelvac CircoFlex)[®] (인겔하임의 베링거 인겔하임으로부터 입수가능)는 2주 이상된 돼지에서 사용하기 위한 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 돼지 보호용 백신이다. 이는 1회 접종(1회 용량) 백신으로만 등록되어 있다. 쉼코백(Circovac)[®] (프랑스 리온의 메리알(Merial)으로부터 입수가능)은 3주 이상된 돼지에서 사용하기 위한 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 돼지 보호용 백신이다. 수박신(Suvaxyn)[®] PCV (네덜란드 카펠러 안테 에이설의 조에티스로부터 입수가능)는 3주 이상된 돼지에서 사용하기 위한, 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 돼지 보호용 백신이다. 다른 PCV2 백신은 예를 들어 WO2007/028823, WO 2007/094893 및 WO2008/076915에 기재되어 있다.

[0007] 동물의 스트레스 및 관리자의 비용 및 노동을 낮추기 위해, 일부 돼지 백신이 복합 백신으로서 제조되었다. 예는 다음과 같다: 투여 직전에 혼합될 수 있는 인겔백 쉼코플렉스(Ingelvac CircoFLEX) 및 인겔백 마이코플렉스(Ingelvac MycoFLEX) (베링거), PCV2 및 Mhyo로부터의 항원을 조합한 포스테라(Fostera)[®] PCV MH (조에티스) 및 포실리스[®] PCV Mhyo (MSD 애니멀 헬스).

[0008] 비복제 면역원을 포함하는 백신의 중요한 성분은 아쥬반트이다. 이는 비복제 면역원에 대한 면역-자극을 제공하며, 그렇지 않으면 면역원성이 아닐 것이다. 이는 면역계의 상이한 경로들을 촉발할 것이고, 기본적인 메커니즘은 잘 이해되지 않는다. 수의학적 백신에서, 예를 들어 하기와 같은 매우 다양한 화합물이 아쥬반트로 사용될 수 있다: 미네랄 오일, 예를 들어 베이올(Bayol)[®] 또는 마르콜(Markol)[®], 몬타니드(Montanide)[®] 또는 파라핀 오일; 비-미네랄 오일, 예컨대 스쿠알렌, 스쿠알란, 또는 식물성 오일, 예를 들어 에틸-올레에이트; 알루미늄 염, 예를 들어 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄; 캡티드, 예컨대 디메틸글리신 또는 투프신; 박테리아 세포벽 성분, 예컨대 지질 A 및 류라밀디캡티드; (합성) 중합체, 예컨대 플루로닉, 텍스트란, 카르보미어, 피란 또는 사포닌; 시토키인; 및 톨-유사 수용체의 자극제, 예컨대 비-메틸화 CpG 기를 함유하는 면역자극성 올리고데옥시뉴클레오타이드 등.

[0009] 아쥬반트화 복합 백신을 제조함에 있어서 극복해야 할 주요 문제점은 면역 반응 또는 백신의 안전성 또는 안정성에 부정적인 영향을 주는 다양한 백신 성분들 사이의 상호작용을 방지하는 것이다. 이러한 상호작용은 예를 들어 면역원 자체 사이에서 일어날 수 있는데, 그 이유는 일부가 Mhyo의 박테린과 같이 매우 조생성물이기 때문이다. 그러나, PCV2 및 Mhyo의 경우, 관련 기술분야는 다양한 유형의 이들 병원체의 비복제 면역원이 효과적인 백신에서 조합될 수 있다는 것을 이미 보여주었다. 그러나, 아쥬반트는 백신 면역원을 방해하거나 심지어 손상시킬 수 있다. 이는 또한 마케팅 허가를 제공하는 등록 기관에 의해 인식된다: 예를 들어 USDA는 살아있는 바이러스를 포함하는 불활성화된 백신에서 살바이러스 활성의 검출을 위한 규제 9CFR 113.35를 시행한다. 이외에도, 특정한 투여 경로는 아쥬반트 조성물의 안전성에 유의한 영향을 미칠 수 있다: 아쥬반트는 근육내로 투여될 때 안전할 수 있지만, 피하로 투여될 때 허용되지 않는 안전성 문제를 초래할 수 있다.

[0010] 복잡한 복합 백신의 개발에 있어서의 이러한 잠재적인 문제점들은 일반적으로 인식되어 있다; 예를 들면 EMEA 문헌: "지침 사항: 조합된 수의학적 제품에 대한 요건" (EMEA, 2000, CVMP/IWP/52/97- FINAL); 및 미국 보건복지부, 식품의약국, 생물의약품 평가연구센터, 1997년 4월 문헌: "예방가능한 질환에 대한 복합 백신의 평가를 위한 산업 지침: 생산, 시험 및 임상 연구", Docket No. 97N-0029을 참조하라. 이들 간행물 둘 다 면역원 및 아쥬반트를 조합하는 경우에 백신의 효능 및 안전성에 대한 간섭의 효과에 대해 경고한다.

[0011] 따라서, 다중 종의 병원체와 관련된 면역원의 복잡한 조합에 대해 효과적인 면역 반응을 유도하는 복합 백신을 개발하는 것은 어렵다. 또한, 복합 백신은 동물에 사용시 안전해야 하는데, 다시 말하자면 열, 국소 종창, 식욕 상실 등과 같은 상당한 부반응을 일으키지 않아야 한다. 또한, 보다 실용적인 특성이 관련된다: 복합 백신은 이상적으로는 경제적 생산이 가능해야 하고, 제제화 및 저장하는 동안 충분히 안정해야 하며, 다른 면역원의 존재 하에 각각의 면역원에 대한 효력 시험 방법을 할 수 있게 해야 한다.

[0012] 대체로, 다중 병원체에 대한 복합 백신접종은 간단하지 않고, 특히 복합 백신접종이 아쥬반트화 복합 백신인 경

우에 안전성 및 효능을 결정하기 위한 실험을 필요로 하는 것이 통상적으로 공지되어 있다.

[0013] 따라서, 선행 기술의 하나 이상의 단점을 극복하고, PCV2 및 Mhyo에 의한 감염과 관련된 질환에 대한 효과적인 고 안전한 복합 백신을 제공할 필요가 있다.

[0014] 다수의 동물의 백신접종에서, 동물 및 이들을 백신접종하는 사람 둘 다에 대한 스트레스를 낮추는 것이 중요하다. 추가로, 통상적인 근육내 경로를 통한 백신접종은 종종 동물에 대한 통증 및 스트레스와 연관되고, 부반응 및 감염 위험 증가와 연관된다. 근육내 투여와 연관된 문제를 극복하기 위한 한가지 가능성은 피내 투여로도 지칭되는 진피 내로의 투여에 의한 백신접종이다. 피내 백신접종은 동물에서 더 넓은 범위의 투여 부위를 허용하여, 사용자에게 증가된 유연성을 제공한다. 이는 신속하고 비-침습적인 적용을 허용하여 돼지 및 투여자 둘 다에 대해 보다 적은 스트레스를 생성하기 때문에 큰 군의 돼지를 백신접종할 때 특히 유용하다.

[0015] 근육내 경로를 통해 투여된 2종의 시판 백신 및 음성 대조군과 비교하여 시판 불활성화된 마이코플라스마 하이오뉴모니아 전세포 백신 (포실리스[®] MHYO ID 원스(ONCE) - MSD 애니멀 헬스)의 피내 투여에 의해 유도된 전신 및 호흡 국부 면역 반응은 문헌[P. Martelli et al., Vet Microbiol. 2014;168(2-4):357-64]에 기재되어, 아쥬반트화 Mhyo 박테린의 피내 투여가 전신 및 점막 면역 반응 둘 다를 유도한다는 것을 보여준다.

[0016] 특히, 피내 투여는 아이달(IDAL)[®] 백신접종기(네덜란드 박스미어의 MSD 애니멀 헬스로부터 입수가 가능)와 같은 무바늘 백신접종 장치에 의해 수행될 수 있다는 이점을 갖는다. "피내" 투여 자체는 "무바늘" 투여와 동일시되지 않아야 한다. 무바늘 장치가 "피내 백신접종을 위해 구성된" 경우에만, 백신은 실제로 진피 내로(적어도 부분적으로) 전달될 수 있다. 무바늘 피내 투여는 바늘 주사보다 덜 침습적이고, 동물 내에서 보다 적은 유해 전신 효과를 생성하고, 탁월한 면역 반응을 도출한다. 이는 또한 백신접종 과정 동안 바늘이 돼지 사이에서 질환을 전달하는 위험을 감소시킨다.

[0017] 그러나, 백신의 부피가 전형적으로 약 0.1 내지 0.5 ml의 범위로 매우 작아야 하기 때문에 피내 투여에 적합한 안전하고 효과적인 백신의 제공이 어렵다. 따라서, 면역원 뿐만 아니라 가능한 아쥬반트와 같은 백신의 다른 성분은 매우 농축될 필요가 있으며, 이는 다양한 백신 성분 사이의 상호작용의 위험을 증가시킨다. 상기 언급된 바와 같이, PCV2 및 Mhyo로부터의 면역원을 조합한 백신은 시판된다. 그러나, 이들 복합 백신은 근육내 투여를 위한 것이고, 피내 투여에 적합하지 않다.

발명의 내용

[0018] **발명의 목적**

[0019] PCV2 및 Mhyo에 의한 감염과 관련된 질환에 대해 피내 투여에 적합한 복합 백신을 제공하는 것이 목적이었다. 특히, PCV2 및 Mhyo에 의한 감염에 대해 동물의 예방적 치료에 사용될 수 있는 안전하고 효과적인 백신을 제공하는 것이 목적이었다.

[0020] **발명의 개요**

[0021] 놀랍게도, 돼지 쉼코바이러스 2형(PCV2)의 비복제 면역원 및 마이코플라스마 하이오뉴모니아(Mhyo)의 비복제 면역원을 포함하는 복합 백신을 가능하게 하는 특정 아쥬반트를 고안함으로써 이 목적이 충족될 수 있고, 따라서 하나 이상의 선행 기술의 단점이 극복될 수 있다는 것이 밝혀졌으며, 여기서 복합 백신은 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전이다.

[0022] 특히, 놀랍게도 PCV2의 비복제 면역원 및 Mhyo의 비복제 면역원을 포함하는 복합 백신은 PCV2 감염 및 Mhyo 감염에 대해 피내 투여에 의한 안전한 동물의 예방적 치료에 사용될 수 있다는 것이 밝혀졌고, 여기서 복합 백신은 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전이다(즉, 연속상이 수성이고, 그 안에 분산된 소수성 액체, 불연속상을 갖는 에멀전이고, 후자의 상 자체가 그 안에 분산된 2차 또는 추가의 상을 가질 수 있음).

[0023] 본 발명은 또한 아쥬반트 조성물 자체, 특히 비생백신을 제제화하기 위한 아쥬반트 조성물로 구현되고, 여기서 조성물은 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전이다.

[0024] **정의**

[0025] "복합 백신"은 단일 종 초과 미생물로부터의 면역원을 포함하는 백신이다. 본 발명에 따른 복합 백신은 적어도 돼지 쉼코바이러스 2형으로부터의 및 마이코플라스마 하이오뉴모니아로부터의 면역원을 포함한다. 본 발

명에 따른 복합 백신은 구어체로 PCV2 및 Mhyo에 '대한' 백신으로도 지칭될 수 있다.

- [0026] “백신”은 통상적으로 돼지와 같은 대상 동물에게 투여하기 안전하고, 그 동물에서 병원성 미생물에 대한 방어 면역을 유도할 수 있는 제약 조성물로 지칭된다. 백신은 전형적으로 면역학적 활성 성분 및 제약상 허용 가능한 담체를 포함한다. ‘면역학적 활성 성분’은 PCV2 및 Mhyo로부터의 비복제 면역원과 같은 하나 이상의 면역원성 분자(들)이다. 이들은 대상 동물의 면역계에 의해 인지되고 방어 면역학적 반응을 유도한다.
- [0027] 백신은 일반적으로, 예를 들어 병원체의 수를 감소시키거나 또는 숙주 동물에서 병원체의 복제 지속기간을 단축 시킴으로써 감염의 중증도를 감소시키는데 효과적이다. 또한, 또는 가능하게는 그의 결과로서, 백신은 일반적으로 이러한 감염 또는 복제에 의해, 또는 감염 또는 복제에 대한 동물의 반응에 의해 유발될 수 있는 질환의 (임상) 증상을 감소 또는 개선시키는 데 효과적이다.
- [0028] 병원체의 “비복제 면역원”은 전체로서 살아있는 복제 병원체 (또는 야생형 약독화 형태) 이외의 병원체에 상응하는 임의의 물질 또는 화합물이고, 이 병원체에 대해 면역학적 반응이 도출되어, 상응하는 독성 병원체 또는 그의 하나 이상의 독성 인자가 이러한 면역 반응의 결과로서 숙주의 면역계에 의해 인식될 것이고 궁극적으로 적어도 부분적으로 중화된다. 비복제 면역원의 전형적인 예는 사멸된 전체 병원체(이 용어는 용해된 형태의 이들 병원체를 포함) 및 캡시드 단백질과 같은 이들 병원체의 서브유닛, 표면 발현된 분자(예를 들어 재조합적으로 발현된 단백질 또는 리포폴리사카라이드) 및 독소와 같은 배출된 분자이다.
- [0029] 병원체로의 감염에 대한 “예방적 치료”는 전형적으로, 병원성 병원체의 치료 후 켈린지로부터 유발된, 그 병원체의 감염 또는 그 감염으로부터 발생한 장애를 예방, 개선 또는 치유하는 것을 보조하고, 특히 이러한 켈린지 후에 숙주에서 그의 로드(load)를 감소시키고, 임의로 병원체의 치료 후 감염으로부터 유발된 하나 이상의 임상 징후를 예방 또는 개선하는 것을 보조한다.
- [0030] **본 발명의 실시양태**
- [0031] 제1 실시양태에서, 본 발명은 PCV2의 비복제 면역원 및 Mhyo의 비복제 면역원을 포함하며, 스쿠알란, 비타민 E-아세이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전인 것을 특징으로 하는 복합 백신에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 복합 백신 중 “비복제 면역원” 각각은 단일 유형일 수 있거나, 또는 예컨대 각 병원체의 1종으로부터의 또는 1종을 초과하는 균주로부터의 다중 유형일 수 있다. 본 발명을 위해, PCV2의 비복제성 면역원은 바람직하게는 불활성화된 전체 PCV2 바이러스이다. 전형적으로 재조합 발현 시스템으로부터 획득되거나, 또는 레플리콘 입자를 통해 전달 및 발현되는 서브유닛으로서의 ORF2 단백질의 사용이 보다 더 바람직하다. PCV2 ORF2는 곤충 세포 배양물 중 재조합 바콜로바이러스에 의해 발현되고, 수확될 수 있다. 레플리콘 입자는 결합 바이러스 입자, 예를 들어 알파박스(AlphaVax)에 의해 개발된 알파바이러스 입자이다. 발현되는 ORF2 서열의 모 PCV2는 PCV2 혈청형 a, b, c 또는 d 중 임의의 것일 수 있거나, 또는 이들 혈청형 중 하나 이상으로부터의 키메라로부터의 것일 수 있다.
- [0033] 마이코플라즈마 하이오뉴모니아의 비복제 면역원은 전형적으로 사멸된 전체 마이코플라즈마 하이오뉴모니아, 즉 사멸된 Mhyo 박테린을 포함한다. Mhyo 박테린은 바람직하게는 균주 11 또는 균주 J로부터의 것이다.
- [0034] “수중유 에멀전”은 연속상이 수성이고, 그 안에 분산된 소수성 액체, 불연속상을 갖는 에멀전이고, 후자의 상 자체가 그 안에 분산된 2차 또는 추가의 상을 가질 수 있다. 적절한 종류 및 농도의 유화제(들)의 선택에 의해, 이러한 에멀전이 형성될 수 있다. 백신으로서 사용하기 위한 수중유 에멀전의 제조를 위한 절차 및 장비는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 하기와 같은 안내서에 기재되어 있다: “레밍턴: 약학의 과학과 실시” (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), 및: “수의학적 백신학” (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).
- [0035] 본 발명에서, 외부 수성상은 PCV2 및 Mhyo로부터의 비복제 면역원 및 실리카를 포함할 수 있고; 유성상은 스쿠알란 및 비타민 E-아세이트를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 복합 백신은 수중유 에멀전으로 제조되었을 때 매우 효과적이고, 안전하며, 안정한 것으로 밝혀졌다. 본 발명에 따른 복합 백신용 수중유 에멀전의 제조를 위한 실시양태 및 선호사항이 하기에 기재될 것이다.
- [0037] “스쿠알란”은 비-미네랄 오일이며, 수소화 상어 간 오일, 헥사메틸테트라코산 또는 퍼하이드로스쿠알렌으로도 지칭된다. 이는 다중-불포화 C30 오일이고 콜레스테롤 경로의 화합물로서 대사가 가능한 스쿠알렌(CAS 번호 111-02-4)과 혼동되어서는 안된다. 그러나, 스쿠알란은 스쿠알렌의 완전히 수소화된 형태이고 따라서 산화되기 쉽

지 않다. 따라서, 스쿠알란은 주사 부위로부터 수송될 수 있고(따라서 주사 부위로부터 "사라짐"), 따라서 때때로 "대사가가능한" 것으로 표시되지만, 실제로 불활성의 대사되지 않는 오일이다(이는 단지 물리적으로 주사 부위로부터 수송되고 대사되지 않는다).

[0038] 원래 스쿠알란에 대한 전구체는 상어 간으로부터 수득되었으나, 환경적 우려로 인해 이는 올리브오일과 같은 다른 천연 공급원으로, 또는 화학적 합성으로 이동하였다. 따라서, 스쿠알란의 정의에는 천연, 합성 또는 반합성 형태, 또는 이들의 혼합물이 포함된다. 스쿠알란은 예를 들어 식물성 공급원으로부터, 월리(Worlee)(스쿠알란, 식물성), 또는 크로다(Croda)(프리퓨어 스쿠알란(Pripure Squalane))로부터; 또는 합성물, 예를 들어 쿠라레이(Kuraray)(스쿠알란-PE)로부터 다양한 순도로 시판된다. 본 발명을 위해, 고순도의 스쿠알란이 바람직하다: 바람직하게는 75 % 초과 순도, 보다 바람직하게는 80, 90, 또는 심지어 95 % 초과 순도, 바람직한 순서대로.

[0039] 본 발명에 따른 복합 백신 중 스쿠알란은 전형적으로 백신의 1 내지 15 % w/v의 양으로 존재한다. 보다 바람직하게는, 스쿠알란은 백신 중 3 내지 12 % w/v, 또는 심지어 5 내지 9 % w/v, 바람직한 순서대로, 예를 들어, 5 %, 6 %, 7 %, 8 % 또는 9 % w/v의 양으로 존재한다. 가장 바람직하게는, 스쿠알란은 백신 중 약 6.8 % w/v의 양으로 존재한다.

[0040] 따라서, 본 발명에 따른 복합 백신의 한 실시양태에서, 백신은 스쿠알란을 1 내지 15 % w/v의 양으로 포함한다.

[0041] "비타민 E-아세테이트"는 비타민 E(토코페롤)의 아세테이트-에스테르이고, 종자, 견과류, 과일 또는 잎과 같은 식물성 물질로부터, 또는 지방 옥류로부터 유래될 수 있지만, 또한 합성에 의해 생산될 수 있다. 일부 대체 명칭은 토코페릴 아세테이트 또는 알파-토코페롤-아세테이트이다. 비타민 E-아세테이트의 정의에는 천연, 합성 또는 반-합성 형태, 또는 이들의 혼합물이 포함된다. 비타민 E-아세테이트는 상이한 정도의 순도로 시판된다. 본 발명에 따른 복합 백신에 사용하기 위한 비타민 E-아세테이트는 CAS 번호: 7695-91-2 화학물질의 라세미체인 DL-알파-토코페롤-아세테이트일 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 복합 백신 중 비타민 E-아세테이트는 전형적으로 백신의 2 내지 20 % w/v의 양으로 존재한다. 보다 바람직하게는, 비타민 E-아세테이트는 백신 중 4 내지 16 % w/v, 또는 심지어 6 내지 10 % w/v, 바람직한 순서대로, 예컨대, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % 또는 10 % w/v의 양으로 존재한다. 가장 바람직하게는, 비타민 E-아세테이트는 백신의 약 8 % w/v의 양으로 존재한다.

[0043] 따라서, 본 발명에 따른 복합 백신의 실시양태에서, 백신은 2 내지 20 % w/v의 양으로 비타민 E-아세테이트를 포함한다.

[0044] "실리카"는 이산화규소이다. 실리카는 아췌반트 조성물에서의 사용에 대해 널리 기재되어 있고, 통상적으로 제약 등급 실리카로서 표시된다. 모든 제약 등급 실리카는 이들이 콜로이드성 이산화규소라는 점에서 공통적이며, 거의 50년 동안 제약 산업에서 사용되어 왔다. 이러한 유형의 실리카 내에서, 상이한 표면 영역, 친수성 및 소수성(예를 들어 메틸화), 결정형 또는 무정형(예컨대 발연 실리카), 뿐만 아니라 상이한 과립화 비율이 입수 가능하며, 이들 모두는 아췌반트 조성물에 통상적으로 사용된다. 아췌반트 조성물에 바람직하게 사용되는 유형의 실리카의 예는 무정형 실리카(친수성 또는 소수성일 수 있지만, 바람직하게는 본 발명에서 사용될 때 친수성임)이다. 통상적인 유형의 무정형 실리카는 발연 실리카이며, 이는 화염으로 생산되기 때문에 발열성 실리카로도 알려져 있고, 분지된 쇄형 3차원 2차 입자로 융합된 무정형 실리카의 현미경적 액적으로 이루어지고, 이는 이어서 3차 입자로 응집된다.

[0045] 본 발명의 복합 백신에 사용하기 위한 실리카는 100 내지 700 m²/그램, 보다 바람직하게는 300 내지 500 m²/그램, 추가로 보다 바람직하게는 350 내지 410 m²/그램, 가장 바람직하게는 약 395 ± 25 m²/그램의 입자 크기를 가질 수 있다. 표면적은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예컨대 브루нау어(Brunauer)의 질소 흡착 방법을 사용한 계산에 의해 결정될 수 있다(Brunauer, S. et al., J. Am. Chem. Soc., 60, 309 (1938)).

[0046] 이러한 제품은 예를 들어 상표명 에어로실(Aerosil)[®] 또는 에어로펠(Aeroperl)[®] (상표명 하에 많은 변형물, 예컨대 상이한 표면적, 소수성 및 친수성, 결정형 또는 무정형이 입수가가능함) 하에 시판된다. 예는 약 0.007 μm의 입자 크기, 3.7 내지 4.5의 pH (4 % 분산액), 및 약 50 g/l의 탭 밀도를 갖는, 독일 에보닉 리소스 이퍼션시 게엠베하(Evonik Resource Efficiency GmbH)의 에어로실[®] 380또는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)의 S5130이다.

[0047] 본 발명에 따른 복합 백신 중 실리카는 전형적으로 백신 중 0.02 내지 2 % w/v의 양으로 존재한다. 보다 바람

직하게는, 실리카는 백신의 0.05 내지 1.0 % w/v, 또는 심지어 0.1 내지 0.4 % w/v, 바람직한 순서대로, 예컨대 0.1 %, 0.2 %, 0.3 % 또는 0.4 % w/v의 양으로 존재한다. 가장 바람직하게는, 실리카는 백신의 약 0.2 % w/v의 양으로 존재한다.

[0048] 따라서, 본 발명에 따른 복합 백신의 실시양태에서, 백신은 0.02 내지 2 % w/v의 양으로 실리카를 포함한다.

[0049] 본 발명의 복합 백신은 전형적으로 바람직하게는 물인 제약상 허용되는 담체를 함유한다. 바람직하게는, 물은 이중 증류수, 미세여과수, 역삼투수와 같은 고도의 순도의 것이다. 보다 바람직하게는, 물은 주사용수이고, 멸균되고, 본질적으로 발열원이 없다.

[0050] 수중유 에멀전을 기반으로 하는 백신의 편리한 특징은 면역원이 통상적으로 수성상에 있다는 것이다. 이는, 예를 들어 고온에서의 고-에너지 유화 사용과 같이, 백신 면역원의 품질 또는 생존성을 유지하는데 적합하지 않은 방법 및 기술을 사용하여, 유성상이 별도로 제조 및 물에서 유화될 수 있다는 것을 의미한다. 이는 물 중 스쿠알란, 비타민 E-아세이트 및 실리카의 수중유 에멀전인 본 발명의 유성 에멀전을 생성한다. 본 발명에 따른 복합 백신을 제조하기 위하여, 면역원 및 실리카를 포함하는 수성상, 및 다른 아조반트를 포함하는 유성 에멀전을 실온에서 온화하게 혼합함으로써 조합한다.

[0051] 두 조성물의 조합은 이들 각각의 회석을 유발한다. 결과적으로, 각각은 적용될 회석과 동일한 배수만큼 다양한 성분의 농도가 최종 백신에 존재하는 것보다 높은 중간 조성물로 제조될 필요가 있다. 전형적으로, 수성상 및 유성 에멀전은 10:90 내지 90:10의 임의의 부피 비로 혼합될 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 복합 백신은 바람직하게는 수성상 및 유성 에멀전(둘 다 기재되는 바와 같음)을 20:80 내지 80:20의 부피 비로 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 20:80 내지 80:20의 부피 비의 수성상과 유성 에멀전의 혼합물로부터 제조된다. 바람직하게는, 부피 비는 바람직한 순서대로 30:70 내지 70:30; 40:60 내지 60:40; 또는 심지어 부피 비는 약 50:50이다.

[0053] 명백하게, 수성상 및 유성 에멀전의 조합 비가 약 50:50인 경우, 두 조성물 각각은 두 중간 조성물의 조합으로부터 제조되는 최종 백신 제제에서 원하는 것보다 2배 더 높은 양 또는 농도로 그의 다양한 성분을 포함해야 한다.

[0054] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 유성 에멀전은 8 내지 20의 HLB 값(친수성-친지성 균형)을 갖는 유화제를 사용하여 제조되고; 바람직한 유화제는 폴리소르베이트(polysorbate) 80이다.

[0055] 폴리소르베이트 80은 CAS 번호 9005-65-6을 갖는 화합물질을 지칭하며, 또한 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트로 명명된다. 이는 대략 15의 HLB 값을 갖고, 예를 들어 트윈(Tween) 80으로서 널리 시판된다.

[0056] 바람직하게는, 폴리소르베이트 80은 백신의 0.5 내지 10 % w/v의 양으로 본 발명에 따른 복합 백신에 존재한다. 보다 바람직하게는, 폴리소르베이트 80은 바람직한 순서대로 백신의 0.7 내지 7 % w/v, 1.0 내지 5 %, 또는 심지어 2 내지 4 % w/v의 양으로 존재한다. 가장 바람직하게는, 폴리소르베이트 80은 백신의 약 3.2 % w/v의 양으로 존재한다.

[0057] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 0.5 내지 10 % w/v의 양으로 폴리소르베이트 80을 포함한다.

[0058] 본 발명을 위한 유성 에멀전은 임의의 규모로, 임의의 적합한 균질화 장비, 예컨대 마이크로플루다이저(Microfluidizer)TM, 실버슨(Silverson)TM, 울트라 투락스(Ultra Turrax)TM 또는 디스팍스(Dispax) 반응기(IKA)를 사용하여 제조될 수 있다. 통상의 기술자는 이러한 유화 공정을 수행하고 최적화하여 분산상의 입자(여기서는 유성 아조반트)의 크기를 제어할 수 있다. 유화제(들)의 유형 및 농도의 선택과 함께, 이는 에멀전의 제약 특성, 및 또한 그의 안정성을 제어한다. 유화 공정 자체의 주요 파라미터는 에너지 투입(전력 및 rpm), 온도, 지속기간, 및 반복 사이클의 수이다. 유화 공정의 실시양태의 세부사항은 하기에 제시된다.

[0059] 분산상의 입자의 크기는 바람직하게는 매우 작다. 분산상의 입자의 직경이 약 1 마이크로미터 미만인 경우, 이러한 에멀전은 통상적으로 "서브마이크론 에멀전"으로 불린다. 본 발명에 따른 복합 백신의 수중유 에멀전의 실시양태에서, 에멀전은 서브마이크론 에멀전이다.

[0060] 1 마이크로미터 이하의 입자 크기를, 예를 들어 레이저 회절 측정에 의해, 측정하기 위한 장비는 일반적으로 입수가능하다. 전형적으로, 입자 크기는 나노미터(nm)로 표현되고, 중앙 직경으로도 알려진 평균 입자 크기는 누적 입자 크기 분포의 D50으로 표현된다.

- [0061] 본 발명을 위해, 입자 크기는 마스터사izer(Mastersizer)[®] (말번 인스트루먼트(Malvern Instruments))를 사용하여 결정된 D50의 nm로 표현된다. 입자 크기 측정은 (농축된) 유성 에멀전에서 또는 복합 백신에서 이루어질 수 있고; 본 발명에 대한 유성상의 입자 굴절률은 1.48이다. 말번 마스터사izer 크기 분석 보고서는 D(0.50)로서 D50을 제시한다. 따라서, 본 발명에 따른 복합 백신의 서브마이크론 수중유 에멀전 실시양태에서, 오일-액적은 500 nm 이하의 D50을 가지며; 바람직하게는 D50은 250 nm 이하이다. 보다 바람직하게는, D50은 150 nm 이하이다.
- [0062] 전형적으로 고-에너지 유화 공정의 사용에 의해, 예를 들어 고압 균질화기, 회전자-고정자 장치, 블렌더, 초음파, 미세다공성 막 또는 마이크로채널링 장치를 사용하여, 이러한 서브마이크론 에멀전을 제조하는데 이용가능한 많은 방식이 존재한다.
- [0063] 본 발명에 바람직한 고-에너지 유화 방법은 고압 균질화기, 바람직하게는 마이크로플루다이저[™] (마이크로플루딕스(Microfluidics))의 사용이다. 전형적으로, 500 내지 1500 bar (즉, 7000 내지 22000 psi)의 압력에서의 3 회 통과이면 충분할 것이다. 이러한 방식으로 제조된 에멀전은 전형적으로 500 nm 이하의 D50을 갖는 분산상 입자를 갖고, 좁은 크기 분포를 가지며; 본 발명의 경우, 분산상은 유성 아췌반트의 액적이다.
- [0064] 전형적으로, 분산상의 이러한 매우 미세한 크기의 입자를 갖는 에멀전은 여러 단계로 제조된다. 이러한 방식으로, 초기의 비교적 거친 유성 에멀전은 저-에너지 혼합에 의해 제조되고, 이어서 1회 이상의 후속 고-에너지 처리가 입자 크기의 추가 감소를 달성한다. 이어서, 물 중 아췌반트 및 임의로 유화제를 포함하는 '미세유동화된' 유성 에멀전을 면역원을 포함하는 수성상과 조합하여 본 발명에 따른 복합 백신을 제조한다.
- [0065] 생성물 일관성 및 품질의 이유로, 중앙 입자 직경 뿐만 아니라, 크기 분포로도 알려진 입자 크기의 스프레드가 유리하게 모니터링 및 제어될 수 있다. 본 발명에 따른 복합 백신의 서브마이크론 수중유 에멀전 중 오일-액적의 크기 분포는 바람직하게는 상대적으로 좁다. 입자 크기 분포의 지표는 누적 입자 크기 분포의 D90이다.
- [0066] 따라서, 본 발명에 따른 복합 백신의 서브마이크론 수중유 에멀전 실시양태에서, 오일-액적은 900 nm 미만의 D90을 가지며, 보다 바람직하게는, D90은 바람직한 순서대로 500 nm, 400 nm 미만, 또는 심지어는 300 nm 미만이다. 가장 바람직하게는, D90은 약 150 내지 250 nm이다.
- [0067] 이러한 작은 입자 크기 및 분포를 갖는 에멀전의 이점 중 하나는, 전형적인 멸균 필터가 약 0.2 마이크로미터의 세공 크기를 갖기 때문에, 물질의 유의한 손실 없이 여과에 의해 멸균될 수 있다는 것이다. 이러한 필터 멸균은 가열, 화학물질 또는 조사와 같이 유성 에멀전 성분의 품질을 손상시킬 수 있는 다른 멸균 방법에 대한 필요성을 극복한다.
- [0068] 따라서, 본 발명에 따른 복합 백신은 전형적으로 상기한 바와 같이 동물 표적에서 그의 관련 질환에 대한 보호성 면역 반응을 유도할 수 있는 양으로 PCV2 및 Mhyo로부터의 비복제성 면역원을 포함한다.
- [0069] 본 발명 분야의 통상의 기술자는, 예를 들어 백신접종 후 또는 챌린지 감염 후 면역학적 반응을 모니터링함으로써, 예를 들어 표적의 질환 징후, 임상 점수를 모니터링함으로써, 또는 병원체의 재분리에 의해, 그리고 이러한 결과를 모의 백신접종 동물에서 나타난 백신접종 챌린지 반응과 비교함으로써, 본 발명에 따른 복합 백신의 유효성을 결정할 수 있을 것이다.
- [0070] 지시로서, 본 발명에 따른 복합 백신에서 사용되는 면역원의 양은 이러한 면역원과 함께 각각의 1g 또는 복합 백신에서 사용되는 양에 기초할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 복합 백신은 밀리리터 당 PCV2의 ORF2 1 내지 150 µg; 및 불활성화된 농축 Mhyo 배양물 2 내지 50 % w/v를 포함할 수 있다. 이들 면역원을 정량하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 또한 특정 표준에 대한 ELISA 기반 정량화에 의존할 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 복합 백신은 유리하게는 복제성 또는 비복제성, 전체 또는 파괴된 하나 이상의 추가적인 항원 또는 면역원과 조합될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 적어도 하나의 추가의 항원 또는 면역원을 포함할 수 있다.
- [0072] 추가의 항원 또는 면역원은 돼지에 병원성인 미생물의 약독화된 형태이거나, 또는 돼지에 병원성인 미생물로부터 유래된 비복제성 항원 또는 면역원이다. 미생물은 돼지에 병원성인 임의의 바이러스, 박테리아, 기생충, 진균, 리케차(rickettsia), 원생동물 및/또는 기생충일 수 있다. 돼지에 병원성인 이러한 미생물의 예는 가성광견병 바이러스, 돼지 파보 바이러스, 전형적인 돼지 열 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스, 구제역 바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스, 전염성 위 장염 바이러스, 돼지 호흡기 코로나바이러스, 수포성 구내염 바이러스,

로소니아 인트라셀룰라리스(Lawsonia intracellularis), 악티노바실루스 플레우로뉴모니아(Actinobacillus pleuropneumoniae), 브라키스피라(Brachyspira), 대장균, 헤모필루스(Haemophilus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 살모넬라(Salmonella), 클로스트리디아(Clostridia), 파스테우렐라(Pasteurella), 에리시펠로트릭스(Erysipelothrix), 렙토스피라(Leptospira), 보르데텔라(Bordetella), 톡소플라스마(Toxoplasma), 이소스포라(Isospora) 및 트리키넬라(Trichinella)이다. 바람직한 추가의 항원 또는 면역원은 로소니아 인트라셀룰라리스, 악티노바실루스 플레우로뉴모니아, 헤모필루스 파라수이스(Haemophilus parasuis), 브라키스피라 히오디센테리아(Brachyspira hyodysenteriae), 및 돼지 인플루엔자 바이러스로부터 하나 이상이다.

[0073] 본 발명에 따른 복합 백신의 관찰된 효과는 하기와 같다:

[0074] Mhyo의 경우: 강화 폐렴 및 만성 호흡기 질환과 같은 Mhyo에 의해 유발되는 폐 병변의 예방 및 감소. Mhyo의 경우, 백신 효력의 가장 신뢰성 있는 척도는 Mhyo 켈린지 감염 후 폐 병변 지수의 감소이다. 이러한 병변은 전형적으로 굿윈(Goodwin) 척도(Goodwin et al., 1969, J. Hyg. Camb., vol. 67, p. 465-476)를 기반으로 폐 경화의 육안 평가에 의해 부검 동안 점수화되며; 이 척도는 0에서 전적으로 영향을 받은 폐에 대해 최대 55 포인트/동물까지 진행된다.

[0075] PCV2의 경우: 소모 또는 일 트립트(ill thrift)의 임상 징후, 질환의 특징적인 육안 및 현미경적 병변의 존재, 및 현미경적 림프성 병변에서의 바이러스 항원 또는 DNA의 존재의 예방 및 감소. PCV2의 경우, 백신 효력의 가장 신뢰할 수 있는 척도는 혈청, 분변 스왑 물질, 비강 스왑 물질, 서혜 림프절, 장간막 림프절, 편도 및 폐에서 qPCR에 의해 바이러스 핵산의 존재를 시험하는 것이다. 백신접종 후 PCV2에 대한 항체의 유도는 보호와 상관관계가 있다.

[0076] 바람직한 실시양태에서, 복합 백신은 돼지용이다. 용어 "돼지"는 돼지(Suidae) 과의 동물, 바람직하게는 돼지로도 지칭되는 수스(Sus) 속의 동물을 지칭한다. 예는 야생 또는 가축 돼지, 호그(hog), 야생 멧돼지, 바비루사(babirusa) 또는 워트호그(warthog)이다. 이는 또한, 예를 들어 암돼지(sow), 퀸(queen), 수돼지(boar), 거세돼지(barrow), 호그, 미경산 암돼지(gilt), 이유돼지(weaner), 또는 새끼돼지(piglet)와 같은 그의 성별 또는 연령을 지칭하는 임의의 명칭으로 표시되는 돼지를 포함한다. 추가로, 용어 돼지는 육종 또는 비육 유형과 같은 임의의 유형의 돼지 동물, 및 임의의 이들 유형의 부모 계통을 지칭한다.

[0077] 본 발명에 따른 복합 백신은 본원에 기재되는 바와 같이 상이한 방식으로 구성될 수 있다.

[0078] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 바로 사용가능한 제제, 즉 복합 백신이 어떠한 추가적인 혼합 또는 재구성 단계도 필요 없이 백신접종에 직접 사용될 수 있도록 백신의 모든 성분들이 용이하게 혼합되는 제제로서 제공된다.

[0079] 대안적 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 적어도 2개의 용기: Myho 면역원을 제외한 본 발명에 따른 복합 백신의 모든 성분을 포함하는 1개의 용기; 및 Myho 면역원을 포함하는 1개의 용기를 포함하는 부분들의 키트로부터 생산될 수 있다. PCV 또는 Myho 면역원은, 예를 들어 동결 건조된 형태로, 또는 수성 현탁액과 같은 멸균 현탁액으로서 제공될 수 있다. 동결 건조된 형태는 용기, 예를 들어 병 내의 동결 건조된 케이크일 수 있지만, 스피어(Sphereon)TM 기술에서 적용되는 바와 같은 리오스피어(lysosphere)일 수도 있다.

[0080] 이어서, 부분들의 키트의 요소들은 함께 본 발명에 따른 복합 백신을 구현한다. 적어도 2개의 용기의 내용물은 사용 직전에, 즉 백신접종 전에 계내에서(in situ) 재구성될 수 있다. Mhyo로부터의 비복제 면역원의 재구성시, 본 발명에 따른 완전한 복합 백신이 형성된다. 이는 또한 '현장에서(on-the-spot)' 백신을 혼합하는 것, 또는 '필드사이드(field-side)' 혼합으로 지칭된다.

[0081] 따라서, 추가적인 측면에서, 본 발명은 적어도 2개의 용기를 포함하는 부분들의 키트에 관한 것이다: 스쿠알란, 비타민 E-아세이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전 중 PCV2로부터의 비복제 또는 면역원을 포함하는 하나의 용기; 및 Mhyo로부터의 비복제 면역원을 포함하는 하나의 용기.

[0082] 대안적 실시양태에서, PCV2 및 Mhyo의 두 면역원은 임의로 실리카를 추가로 함유하는, 예를 들어 수용액 또는 분산액 또는 동결건조된 형태로 하나의 용기에 제공될 수 있고, 이는 사용 전에 수중유 에멀전 형태의 (다른) 아유반트를 함유하는 제2 용기의 성분과 재구성된다.

[0083] 본 발명에 따른 부분들의 키트, 및 그의 요소들은 본 발명에 따른 복합 백신에 대하여 본원에 기재되는 바와 같은 실시양태들(바람직하거나 그렇지 않음) 중 임의의 것, 또는 본 발명에 따른 복합 백신의 이들 실시양태들 중 2종 이상의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

- [0084] 따라서, 추가적인 측면에서, 본 발명은 하기의 단계들을 포함하는, 본 발명에 따른 복합 백신의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0085] - PCV2 및 Mhyo로부터의 비복제 면역원을 포함하는 수성상을 제조하는 단계, 및
- [0086] - 상기 수성상을 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 유성 에멀전과 혼합하여 수중유 에멀전을 형성하는 단계.
- [0087] 대안적 측면에서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 복합 백신의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0088] - PCV2로부터의 비복제 면역원을 포함하는 수성상을 제조하는 단계,
- [0089] - 상기 수성상을 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 유성 에멀전과 혼합하여 수중유 에멀전을 형성하는 단계, 및
- [0090] - 상기 수중유 에멀전을 Mhyo로부터의 비복제 면역원과 혼합하는 단계.
- [0091] 추가적인 측면에서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 복합 백신의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0092] - 동결건조된 형태의 Mhyo로부터의 비복제 면역원을 제조하는 단계,
- [0093] - PCV2로부터의 비복제 면역원을 포함하는 수성상을 제조하는 단계,
- [0094] - 상기 수성상을 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 유성 에멀전과 혼합하는 단계, 및
- [0095] - 수성상 및 유성 에멀전의 상기 혼합물을 사용하여 Mhyo로부터의 상기 동결건조된 비복제 면역원을 재구성하는 단계.
- [0096] 추가적인 측면에서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 복합 백신의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0097] - 동결건조된 형태의 PCV로부터의 비복제 면역원을 제조하는 단계,
- [0098] - Mhyo로부터의 비복제 면역원 및 실리카를 포함하는 수성상을 제조하는 단계,
- [0099] - 상기 수성상을 스쿠알란 및 비타민 E-아세테이트를 포함하는 유성 에멀전과 혼합하는 단계, 및
- [0100] - 상기 수성상 및 유성 에멀전의 혼합물을 사용하여 PCV로부터의 상기 동결건조된 비복제 면역원을 재구성하는 단계.
- [0101] 이들 방법의 상이한 시점에서, 예를 들어 정제 또는 저장과 같은 추가의 처리를 위해 추가의 단계가 추가될 수 있다. 또한, 제조 방법은 추가의 항원 또는 면역원, 또는 안정화제 또는 보존제와 같은 제약상 허용되는 부형제와 혼합하는 것을 포함할 수 있다.
- [0102] 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 방법에 의해 제조될 수 있는 본 발명에 따른 복합 백신은 PCV2 및 Mhyo에 의한 감염 및/또는 감염과 관련된 질환에 대해 보호하기 위해 돼지에 대한 피내 투여에 유리하게 사용될 수 있다.
- [0103] 따라서, 추가적인 측면에서, 본 발명은 PCV2 및 Mhyo에 대해 돼지와 같은 동물의 진피로의 백신접종에 사용하기 위한, 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트, 실리카, PCV2 및 Mhyo로부터의 비복제 면역원을 포함하는 수중유 에멀전에 관한 것이다.
- [0104] 추가적인 측면에서, 본 발명은 백신이 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카를 포함하는 수중유 에멀전인 것을 특징으로 하는, 돼지와 같은 동물용 복합 백신의 제조를 위한 PCV2 및 Mhyo로부터의 비복제 면역원의 용도에 관한 것이다.
- [0105] 본 발명에 따른 복합 백신은 PCV2 및 Mhyo에 대한 돼지의 백신접종에 적용될 수 있다.
- [0106] 따라서, 추가적인 측면에서, 본 발명은 돼지와 같은 동물에게 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트, 실리카, 및 PCV2 및 Mhyo로부터의 비복제 면역원을 포함하는 수중유 에멀전을 피내 투여함으로써, 상기 동물을 PCV2 및 Mhyo에 대해 백신접종하는 방법에 관한 것이다.
- [0107] 또는 유사한 실시양태에서, 본 발명은 PCV2 및 Mhyo에 대해 돼지와 같은 동물에게 본 발명에 따른 복합 백신을 피내 투여하는 것에 의한, 상기 동물의 백신접종 방법에 관한 것이다.
- [0108] 따라서, 본 발명에 따른 복합 백신은 전형적으로 동물의 피부에 투여 되는데, 즉 피내 투여에 의해 적용된다. 이는 상이한 방식으로, 예를 들어 전통적인 주사기 및 피하 바늘을 사용하여 달성될 수 있다. 대안적으로, 비

경구 투여는 MSD 애니멀 헬스로부터의 아이달® 어플리케이터(applicator)와 같은 피내 어플리케이터에 의해 백신을 전달하는 일부 무바늘 주사 방법에 의해 수행될 수 있다.

- [0109] 피내 투여에 적합하기 위해서는, 본 발명에 따른 복합 백신의 동물 투여량의 부피는 전형적으로 동물 당 0.05 내지 1.0 ml; 바람직한 순서대로 바람직하게는 동물 투여량 당 0.1 내지 0.5 ml, 더욱 바람직하게는 약 0.2, 0.3 또는 0.4 ml, 가장 바람직하게는 약 0.2 ml이다.
- [0110] 표적 돼지에 대한 본 발명에 따른 백신접종 방법을 위한 투여 요법은 단일 또는 다중 투여일 수 있거나, 또는 돼지 축산업의 실제 측면과 상용성인 방식일 수 있다.
- [0111] 필요한 경우, 동물 표적은 생애 후반에 본 발명에 따른 복합 백신의 2차 또는 추가적인 투여, 소위 부스터 백신 접종을 받을 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 복합 백신은 단일 백신접종 투여량이 일반적으로 동물의 관련 생애 기간 동안, 예를 들면 6개월령까지의 돼지의 비육 단계 동안 면역 보호를 제공하기에 충분하게 되는 방식으로 최적화된다.
- [0112] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 동물 표적당 단 1회만 투여되며, 즉 이는 단일 투여 백신이다.
- [0113] 바람직하게는, 백신접종 방법을 위한 요법은 동물에 대한 스트레스를 추가로 감소시키고 노동 비용을 감소시키기 위해 표적 돼지가 필요로 할 수 있는 다른 백신의 기존 백신접종 스케줄에 통합된다. 이들 다른 백신은 등록된 용도와 상용성인 방식으로 동시, 공동 또는 순차적 방식으로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 돼지 백신접종 방법의 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 또 다른 돼지 백신과의 조합으로 투여된다.
- [0114] 표적 동물이 돼지인 경우, 본 발명의 백신접종을 위한 표적 돼지는 백신접종에 대해 민감하고/거나 백신이 보호하는 질환 또는 감염에 대해 민감한 임의의 연령일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 돼지 백신접종 방법의 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 어린 돼지, 즉 약 2개월령의 돼지에게 투여된다. 대안적으로, 본 발명에 따른 복합 백신은 성체 돼지, 즉 약 6개월령의 돼지에게 투여된다.
- [0115] Mhyo 및 PCV2의 높은 유병률로 인해, 그리고 이들 병원체 중 하나 이상에 대한 백신의 광범위한 사용으로 인해, 많은 암돼지는 Mhyo 및 PCV2 중 하나 이상에 대한 항체에 대해 혈청 반응 양성일 것이다. 결과적으로, 이러한 암돼지로부터 초유를 섭취한 어린 돼지는 MDA+(모계 유래 항체 양성)일 수 있다. MDA+ 돼지에서도 효과적이기 때문에 이는 본 발명에 따른 복합 백신의 효능에 방해가 되지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 백신접종 방법의 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 복합 백신은 MDA+ 돼지에 투여된다.
- [0116] 본 발명에 따른 복합 백신의 투여는 Mhyo 및 PCV2에 의한 감염의 확립 및 진행 둘 다를 방해하기 때문에 예방적 또는 치료적 치료로서, 또는 둘 다로서 적용될 수 있다. 본 발명에 따른 복합 백신의 사용은 돼지 무리, 농장, 또는 지리학적 지역의 돼지에서 Mhyo 및 PCV2 중 하나 또는 둘 다에 의한 감염의 감소를 도울 것이다. 따라서, 추가적인 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 복합 백신의 상기 돼지에의 피내 투여를 포함하는 것을 특징으로 하는, 돼지에서의 Mhyo 및 PCV2 감염 또는 관련 질환 징후의 감소 방법에 관한 것이다.
- [0117] 본 발명은 이제 하기 비제한적인 실시예에 의해 추가로 기재될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0118] **실시예**
- [0119] **실시예 1: 복합 백신의 제조**
- [0120] 본 발명에 따른 복합 백신을 하기와 같이 제조하였다:
- [0121] 2x 농도의 이 유성 에멀전을 하기 후속 공정 단계에 따라 제조하였다:
- [0122] - 필요한 양의 비타민 E-아세테이트 및 스쿠알란을 칭량하고, 비커에서 조합하였다.
- [0123] - 비타민 E-아세테이트/스쿠알란 혼합물을 실온에서 저-에너지 혼합(자기 교반기)에 의해 균질화하였다.
- [0124] - 필요한 양의 폴리소르베이트 80을 칭량하고, 균질화된 비타민 E-아세테이트/스쿠알란 혼합물에 첨가하였다.
- [0125] - 합한 혼합물을 실온에서 저-에너지 혼합에 의해 다시 균질화하였다.
- [0126] - 균질화된 혼합물을 0.2 마이크로미터 필터(폴(Pall), 울티포르(Ultipor)TM N66)를 통한 여과에 의해 멸균하였

다.

[0127] - 필요한 양의 (열 멸균된) 실리카를 칭량하고, 균질화된 혼합물에 첨가한 후, 합한 혼합물을 실온에서 저-에너지 혼합에 의해 다시 균질화하였다.

[0128] - 혼합물을 65 내지 75 °C로 가열하였다.

[0129] - 주사용수(멸균됨)를 65 내지 75 °C로 가열하였다.

[0130] - 가열된 유성상 및 물을 N18 막대를 갖는 울트라 투락스에 의한 고에너지 혼합을 사용하여 5 내지 15분 동안 예비 혼합하고; 온도를 65에서 55 °C로 감소시켰다.

[0131] - 예비 혼합물을 800 bar에서 마이크로플루다이저™를 통해 3회 통과시키고; 냉각 나선을 사용하여 온도를 50 °C 미만으로 유지하였다.

[0132] 최종 유성 에멀전 중에서, 균질화의 완전성 및 수준을 광학 현미경검사에 의해 체크하였다. 또한 추가의 pH (7.34), 및 오스몰랄농도(osmolality) (221 mOsm/kg)를 체크하였다. 입자 크기 측정을 나타내었다: D100 = 300 nm; D99 = 250 nm; D90 = 200 nm, 및 D50 = 130 nm.

[0133] 수성상(2x 농도)은 필요한 양의 각각의 비복제 면역원을 취하여 제조하였다: Mhyo: 6 % v/v의 10x 농축된 불활성화된 배양물 및 PCV: 50 µg ORF2.

[0134] 이어서, 농축된 조성물(아주반트를 갖는 유성 에멀전, 및 면역원을 갖는 수성상) 둘 다를 실온에서 저에너지 혼합에 의해 대략 50:50 부피비로 조합하였다.

[0135] 하기 백신 아주반트 조성물을 상기 기재된 절차를 사용하여 수중유 (o/w) 에멀전으로서 제조하였다(모든 백분율은 % w/v임). 일부 조성물에, 유성 에멀전을 제조할 때 폴리소르베이트 80 및 스쿠알란과 함께 수산화알루미늄을 명시된 양으로 (이중 농축물로서) 첨가하였다:

[0136] 표 1

	조성물 1	조성물 2	기준 조성물 3	기준 조성물 4
폴리소르베이트 80 (d=1.08 g/ml)	3.24 %	3.24 %	3.24 %	3.24 %
스쿠알란 (d=0.81 g/ml)	6.75 %	6.75 %	6.75 %	6.75 %
비타민 E-아세테이트 (d=0.95 g/ml)	7.94 %	7.94 %	7.94 %	7.94 %
에어로실 380	0.2 %	0.2 %	-	-
주사용수	28.78 %	28.78 %	31.97 %	28.98 %
알하이드로젤 (Al(OH) ₃ 3 %)	-	9.83 %	1.73 %	9.83 %
PBS** + 면역원	잔량	잔량	잔량	잔량

[0137] * 인산염 완충 염수

[0138] 실시예 2: Mhyo 챌린지 감염에 대한 돼지에서의 PCV2/Mhyo ID 제제의 효능

[0139] Mhyo 챌린지에 대한 Mhyo 피내 (ID) 제제(0.2 ml, 아이달® 백신으로 목의 우측에 백신접종된다)로의 백신접종의 유효성을 특정 병원체부재 (SPF) 새끼돼지(토자피그(ToJaPigs))에서 시험하였다. 제제는 Mhyo 면역원의 다양한 처리로 제조되었고, 5 PCVU/ml (대략 25 % w/v의 불활성화된 Mhyo 배양물)로 제제화된다. 동물을 하기 계획에 따라 3주령에 백신접종하였다 (표 2). 백신접종 4주 후, 모든 동물이 Mhyo로 감염되었다. 모든 동물을 7주령, 즉 백신접종 4주 후에 각각 10⁹ 및 10⁹ CCU/ml를 갖는 10 ml 기관내 Mhyo 균주 98로 연속 2일 챌린지하였다.

챌린지 3주 후, 동물을 희생시키고, Mhyo-유도 강화 폐렴의 정도를 굿윈에 따라 점수화하였다(최대 점수: 55).

표 2

군 (N)	면역원		아주반트
	PCV2	Mhyo	
1 (15)	X	X	기준 조성물 3
2 (15)	X	X	X-솔브(X-solve)12* + 에어로실 380
3 (15)	-	-	비-백신접종 대조군

* 포실리스® PCV ID(MSD 애니멀 헬스)의 독점적 아주반트

결과:

백신접종의 유효성을 폐 병변 지수(LLS, 평균)에 의해 결정하고, 이를 각각의 돼지에 대해 기록하고, 비-백신접종 대조군과 비교하였다.

표 3

군	폐 병변 지수 (LLS)
1	13.2
2	11.5
3	15.4

대조군과 비교하여 군 1 및 2에서 시험된 백신 중 어느 것에서도 폐 병변 지수의 유의한 감소는 얻어지지 않았다. 대신에, 폐 병변 지수는 비-백신접종 대조군에서와 유사하였다.

따라서, PCV2 및 Mhyo의 면역원과 조합된 아주반트 알로하이드로젤, 스쿠알란, 비타민 E 아세테이트 및 실리카의 조합 또는 아주반트로서 시판되는 PCV 백신 포실리스® PCV ID 및 실리카의 조합은 안전하고 효과적인 피내 투여에 적합하지 않았다.

실시예 3: 돼지에서 PCV2/Mhyo ID 제제 중 재구성된 PRRS 백신의 효능

본 연구의 목적은 5주령 새끼돼지의 목에 피내 (ID) 투여될 때, 포실리스® PRRS로 재구성된 에어로실200 또는 에어로실380을 함유하는 상이한 PCV2 및/또는 Mhyo 백신의 안전성 및 혈청학적 효능을 비교하는 것이었다. 새끼돼지를 하기 나타난 처리군에 할당하였다 (표 4). 대략 5주령일 때 새끼돼지를 피내로 백신접종하였다. 군 4 및 5의 새끼돼지는 하기에 기재된 바와 같이 상이한 PCV2-Mhyo 백신 제제로 재구성된 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 바이러스를 포함하는 포실리스 PRRS로 백신접종하였다.

표 4

군 (N)	면역원		다른 성분
	PCV2	Mhyo	
4 (10)	X	X	포실리스® PRRS + 에어로실 200
5 (10)	X	X	포실리스® PRRS + 에어로실 380
6 (10)	X	-	포실리스® PCV ID + 포실리스® PRRS; 비-혼합 (양성 대조군)
7 (10)	-	-	비-백신접종 대조군

- 군 4로부터의 새끼돼지는 PCV2 (10000 AU/ml; 대략 80 µg/ml) + M. Hyo (10 PCVU/ml) 및 아주반트 에어로실 200으로 제제화된 백신의 단일 투여량(0.2 ml)으로 피내 백신접종되었다.

- 군 5로부터의 새끼돼지는 PCV2 (10000 AU/ml) + M. Hyo (10 PCVU/ml) 및 아주반트 에어로실380으로 제제화된 백신의 단일 투여량(0.2 ml)으로 피내 백신접종되었다.

[0156] - 군 6으로부터의 새끼돼지를 비-혼합 포실리스® PCV ID + 포실리스® PRRS 백신의 단일 투여량(각 0.2 ml)으로 피내 백신접종하였다.

[0157] - 군 7로부터의 새끼돼지는 백신접종하지 않았다(음성 대조군). 모든 동물을 주사 부위 반응에 대해 검사하였다.

[0158] 모든 새끼돼지를 백신접종 후 임상 징후에 대해 매일 관찰하였다. 온도를 측정하고, 모든 동물로부터 혈청 샘플을 수집하였다. 샘플을 PCV2, 엠. 하이오뉴모니아 및 PRRSV에 대한 항체에 대해 시험하였다.

[0159] **결과:**

[0160] 백신접종 후, 모든 군의 체온은 유사하였다. 백신접종일에, 모든 동물은 유사한 PCV2 항체 역가를 가졌다. PCV2 항체 역가는 연구 종료시까지 모든 군에서 일정한 수준으로 유지되었다. 대조군 7의 항체 역가는 시간 경과에 따라 감소하였다. 백신접종일에, 모든 동물은 PRRS 항체에 대해 음성이었다. 하기 모든 군은 0 내지 20 % PRRS 반응자를 나타내었다. 대조군 7은 음성으로 유지되었다. 연구 시작시, 모든 동물은 엠. 하이오뉴모니아에 대해 혈청학적으로 음성이었다. 모든 군은 SD21에서 0 내지 20 % 반응자를 나타내었다. SD28에서 대부분의 군은 양성 동물을 나타내었다. 대조군 7은 엠. 하이오뉴모니아 양성 반응을 나타내지 않았다. PCV2 및 Mhyo에 대한 IgM 항체 반응(백신 섭취에 대한 예측)의 결과를 표 5 및 6에 나타내었다.

[0161] **표 5: 백신접종 후 PCV2 특이적 IgM 양성 동물의 백분율**

군	SD0	SD14	SD21
4	0	80	40
5	20	50	80
6	0	100	100
7	20	20	20

[0162]

[0163] **표 6: 백신접종 후 Mhyo 혈청학적 항체 반응 양성 동물의 백분율**

군	SD0	SD14	SD21	SD28
4	0	0	20	20
5	0	0	0	10
6	0	0	0	10
7	0	0	0	0

[0164]

[0165] 이 연구로부터, 백신접종된 군은 PCV2 또는 Mhyo에 대해 허용가능한 항체 반응을 나타내지 않았다고 결론지을 수 있다. 따라서, 포실리스® PRRS 및 PCV2 및 Mhyo 면역원과 재구성되었을 때 아쥘반트 에어로실 A380 또는 에어로실 A200은 돼지에서의 안전하고 효과적인 피내 투여에 적합하지 않았다.

[0166] **실시예 4: Mhyo 챌린지 감염에 대한 돼지에서의 Mhyo ID 제제로 재구성되는 PRRS 백신의 효능**

[0167] Mhyo 챌린지 감염에 대한 PRRS와 혼합된 Mhyo 피내 (ID) 제제 (A212D, $10^{5.1}$ TCID₅₀ / 투여량) 백신접종의 유효성을 SPF 새끼돼지에서 시험하였다. 제제는 다양한 아쥘반트로 제조되었다. 동물을 하기 계획에 따라 3주령에 목의 우측에 ID (0.2 ml) 백신접종하였다(표 7). 백신접종 3주 후, 모든 동물이 Mhyo로 감염되었다.

[0168] **표 7:**

군 (N)	면역원		백신 아쥘반트
	PRRS	Mhyo	
8 (12)	X	X	기준 조성물 3
9 (12)	-	X	X-솔브 (포실리스® Mhyo ID 원스(once)), Mhyo 에 대한 양성 대조군
10 (12)	X	-	포실리스® PRRS, PRRS 에 대한 양성 대조군

[0169]

[0170] 모든 동물을 6주령에 각각 9 및 8 CCU를 갖는 10 ml 기관내 Mhyo 균주 98로 연속 2일 감염시켰다.

[0171] **결과:**

[0172] 백신접종의 유효성을 폐 병변 지수(LLS)에 의해 결정하였으며, 이를 각각의 돼지에 대해 기록하고, 비-백신접종 대조군과 비교하였다.

[0173] **표 8**

군	폐 병변 지수 (LLS)	
	지수	% 감소
8	9.0	22
9	3.0	74
10	11.5	-

[0174]

[0175] 기준 조성물 3에서와 같이 아쥘반트 조성물로서 알하이드로젤, 스쿠알란 및 비타민 E-아세테이트와 Mhyo 및 PRRS 면역원의 조합의 피내 투여가 시판용 Mhyo 백신을 사용한 양성 대조군에서의 74 %에 비해 매우 낮고, 따라서 허용될 수 없는 22 %의 폐 병변 지수를 제공한다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 면역원과 아쥘반트인 알하이드로젤, 스쿠알란 및 비타민 E-아세테이트의 조합은 안전하고 효과적인 피내 투여에 적합하지 않았다.

[0176] **실시예 5: Mhyo 챌린지 감염에 대한 SPF 돼지에서의 PCV2-Mhyo ID 제제의 효능**

[0177] 12마리 돼지의 군을 3주령(+/- 3일)에 하기 계획(표 9)에 따라 피내 백신접종하였고, 군 17은 백신접종하지 않았고 Mhyo 챌린지 대조군으로서 역할을 하였다. 백신접종 4주 후, 모든 동물이 독성 Mhyo 균주로 감염되었다. 챌린지 3주 후에 모든 동물을 폐 병변에 대해 사후 조사하였다. 백신접종 전에, 챌린지 전 및 사후 혈액 샘플을 채취하였다.

[0178] **표 9**

군 (N)	아쥘반트 / 생성물	Mhyo 면역원	PCV 면역원	부피 & 경로
11 (12)	조성물 1	균주 11	PCV2	0.2 ml ID, 목 우측
12 (12)	조성물 1	균주 J		
13 (12)	조성물 2	균주 11		
14 (12)	기준 조성물 4	균주 11		
15 (12)	ISA28+마이크로-포르타솔(micro-fortasol)* (기준)	균주 11		
16 (12)	포실리스® Mhyo ID 원스**	균주 11	-	
17 (12)	-***	-	-	

[0179]

[0180] * 미세유동화된 비타민 E 아세테이트가 첨가된 세픽(Seppic)의 몬타니드® ISA 28

[0181] ** Mhyo에 대한 양성 대조군

[0182] *** 비-백신접종 대조군

[0183] **실험 절차**

[0184] 혈청학

[0185] 혈액 샘플(경정맥)을 백신접종 직전 (T=0, 3주령), 챌린지 직전 (T=4, 7주령) 및 사후 (T=7, 10주령)에 채취하였다. 샘플을 주위 온도에서 수송하였다. 혈액 샘플로부터 혈청을 이중으로 유도하였다. 모든 혈청 샘플 내의 관련 항체의 존재를 표준 절차에 따라 엠. 하리오 및 PCV에 대한 엘라이자 시험에서 결정하였다.

[0186] 임상 관찰 및 직장 온도

[0187] 임상 관찰을 수행하고, 백신접종 직전, 백신접종 4시간 후 및 1일과 2일 후에 직장 온도를 측정하였다. 관찰

및 온도를 기록하였다.

[0188] 사후 검사

[0189] 챌린지 감염 후 4주째인 본 실험 종료시, 전기 자극에 의해 돼지를 진정시킨 후, 출혈에 의해 사망까지 안락사시켰다. 폐 병변을 고티에 따라 점수화하였다.

[0190] 결과:

[0191] 허용될 수 없는 주사 부위 반응은 관찰되지 않았다. 허용될 수 없는 온도는 관찰되지 않았다.

[0192] 백신접종의 유효성을 폐 병변 지수(LLS)에 의해 결정하였으며, 이를 각각의 돼지에 대해 기록하고, 비-백신접종 대조군과 비교하였다. 결과를 표 10에 제시한다:

[0193] 표 10

군	폐 병변 지수 (LLS)	
	지수	% 감소
11	8.7	47 %
12	6.0	63 %
13	2.8	83 %
14	13.0	20 %
15	20.0	-23 %
16	4.0	75 %
17	16.3	-

[0194]

[0195] 폐 병변 지수의 상기 데이터는 비-백신접종 대조군(군 17)과 비교한 감소가 45 %를 초과하였기 때문에 (이는 실질적인 유효성을 위한 컷-오프 값으로서 사용된다), 군 11, 12 (본 발명의 조성물) 및 13 (기준 조성물 2)이 허용가능한 지수를 제공하였음을 나타낸다. 대신에, 군 15에서의 LLS가 비-백신접종 대조군에서보다 훨씬 더 높았고, 군 14에서의 LLS가 음성 대조군과 비교하여 20 %만 약간 감소되었기 때문에, 군 14 및 15는 허용될 수 없는 지수를 제공하였다.

[0196] 따라서, 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카의 아주반트 조합을 포함하는 본 발명의 백신 조성물이 효과적인 백신접종을 나타내는 허용가능한 폐 병변 지수를 제공한다는 것을 볼 수 있었다.

[0197] 실시예 6: PCV 챌린지 감염에 대한 SPF 돼지에서의 PCV2-Mhyo ID 제제의 효능

[0198] 새끼돼지를 각각 10마리의 새끼돼지의 5개의 처리군으로 할당하고, 대략 3주령일 때 피내로 백신접종하였다. 군 1 내지 3으로부터의 새끼돼지를 하기 기재된 백신으로 백신접종하였다. 군 4는 양성 대조군으로서 포실리스[®] PCV ID 및 포실리스[®] Mhyo ID 원스로 백신접종하였다. 군 5는 백신접종하지 않았다 (음성 대조군). 백신접종 3주 후(6주령)에, 모든 동물을 비강내로 적용된 5.0 log₁₀ TCID₅₀/mL의 야생형 PCV2b 챌린지 바이러스 균주 I12/11 (비공당 3 ml)을 사용하여 챌린지하였다. 처리 계획을 하기 표 11에 나타내었다. 챌린지 감염 3주 후, 모든 동물을 부검하고, PCV2의 검출을 위해 서혜 림프절, 장간막 림프절, 편도 및 폐를 샘플링하였다.

[0199] 모든 새끼돼지를 백신접종 후 임상 징후에 대해 매일 관찰하였다. 백신접종 당일 및 SD14, SD20, SD35 및 SD42(부검 동안)에 혈청 샘플을 수집하였다. 샘플을 qPCR에 의해 PCV2 바이러스 핵산에 대한 항체에 대해 시험하였다. 분변 스왑(fecal swab)을 모든 동물로부터 SD20, 35 및 SD41에 수집하고, qPCR에 의해 PCV2 바이러스 핵산에 대해 검사하였다.

표 11

군 (N)	아주반트 / 생성물	Mhyo 면역원	PCV 면역원	부피 & 경로
18 (10)	조성물 1	균주 11	PCV2	0.2 ml ID, 목 우측
19 (10)	조성물 2			
20 (10)	ISA28*+마이크로-포르타솔			
21 (10)	포실리스® PCV ID + 포실리스® M Hyo ID 원스**			0.2 ml ID R1 (PCV) + 0.2 ml ID R2 (Mhyo)
22 (10)	-***	-	-	-

* 미세유동화된 광유가 첨가된 세픽의 몬타니드® ISA 28

** Myho 및 PCV2에 대한 양성 대조군

*** 비-백신접종 대조군

처리

투여량 및 투여

백신접종은 목의 우측에 피내 경로(0.2 ml)에 의해 수행하였다. 군 21을 우측에 2회 백신접종하였다. 매드 (MAD) 어플리케이션을 사용하여 비강내 경로, 비공 당 6 ml, 3 ml에 의해 챌린지를 수행하였다.

시험 시스템

건강한 동물만을 사용하였다. 건강하지 않은 동물을 배제하기 위해, 이들을 백신접종 전에 검사하였다(일반적인 신체적 외관 및 임상 이상 또는 질환의 부재). 백신접종 직전에, 모든 동물은 개별적으로 귀 태그로 넘버링 될 것이다. 모든 폐지를 질환의 임상 징후에 대해 매일 관찰하였다. 관찰은 식욕 상실, 움직임 감퇴, 누워있는 경향, 나른함 또는 졸음, 떨림, 땀뻘, 부종(특히 눈 주위), 구토 및 설사 및 호흡곤란과 같은 전신 반응으로 이루어질 것이다.

실험 절차

혈액의 샘플링

백신접종 당일, 챌린지 1일 전, 2주 후 및 부검 당일에 모든 동물로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 동물당 최소 4 ml 및 최대 8 ml 혈액을 채취하였다. 이는 표준 절차에 따라 모든 돼지로부터 개별적으로 수행하였다. 혈액 샘플을 항응고제의 첨가 없이 수집하였다.

분변 스왑

분변 스왑을 챌린지 감염 1일 전, 2 wpc 및 부검 1일 전에 채취하였다. 스왑을 항생제를 함유하는 배지에 넣었다.

사후 검사

챌린지 3주 후에, 동물을 부검실로 옮겼다. 이들을 감전 장치를 사용하여 마취시키고, 표준 절차에 따라 방혈 시켰다. 동물의 사체를 표준 절차에 따라 파괴하였다. 부검 동안, 동물을 개방하고, 내장을 계내에서 검사하여, 하기 기관에 특히 주의를 기울였다: 폐, 서혜 및 장간막 림프절, 편도, 흉선, 비장, 간 및 신장. 후속적으로, 편도, 폐, 장간막 림프절 및 서혜 림프절로부터의 샘플을 제거하고, 2개의 부분으로 나누었으며, 1개의 부분은 동결 및 PCV2 qPCR에 의한 분석을 위한 것이고, 1개의 부분은 고정에 이어 (면역)조직화학적 분석을 위한 것이다.

샘플의 가공

응고된 혈액 샘플로부터 혈청을 제조하고, 분취액(예를 들어 2x0.8 ml)을 채웠다. 샘플은 열-불활성화되지 않았다. 분변 샘플을 스왑으로부터 제조하고, 분취액(예를 들어 2x0.8 ml)을 채웠다. 사용시까지 샘플을 ≤ -15

℃에서 저장하였다. 샘플링과 저장 사이의 기간은 36 (혈청) 또는 48 (스왑)시간을 초과하지 않았다.

[0219] PCV2 항체 ELISA

[0220] 혈청을 표준 절차에 따라 PCV2에 대한 항체에 대해 시험하였다. 간략하게, 연속 희석된 혈청 샘플을 바클로바 이러스 발현된 PCV2 ORF2 항원으로 코팅된 미량역가 플레이트 상에서 인큐베이션하였다. 혈청을 제거한 후, 모든 웰을 고정된 양의 비오틴-표지된 PCV2-특이적 모노클로날 항체(MoAb)와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 결합된 MoAb를 퍼옥시다아제-결합된 스트렙타비딘과 함께 인큐베이션한 후, 발색단 검출하였다. 역가는 시험에 대한 50 % 최대 흡광과 동일한 흡광 값을 갖는 내삽된 혈청 희석도의 역수로서 정의되었다. 결과를 $\log_2$ 역가로서 표현하였다. $2.0 \log_2$ 미만의 역가는 음성으로 간주하였다. 음성 샘플의 경우, $1.0 \log_2$ 의 값을 계산 목적을 위해 사용하였다.

[0221] 정량적 PCR

[0222] PCV2 핵산에 대한 정량적 PCR(qPCR)을 표준 절차에 따라 모든 혈청, 분변 스왑, 및 편도, 폐, 장간막 림프절 및 서혜 림프절의 10 % 조직 균질물에 대해 수행하였다. 간략하게, DNA를 시판 키트를 사용하여 샘플로부터 추출하였다. 각각의 샘플 내 PCV2 게놈 DNA를 PCV2-ORF2에 특이적인 프라이머 및 프로브를 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 정량하였다. 특이적 형광이 역치를 초과하는 사이클 수는 공지된 양의 PCV2-ORF2-함유 플라스미드를 함유하는 샘플 세트에 대한 사이클 수와 상관관계가 있다. 결과는 $\log_{10}$ 카피/추출된 DNA μl ($\log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$)로서 표현되었다. $1.00 \log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$ 미만의 값은 음성으로 간주되고, 계산 목적을 위해 $0.00 \log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$ 로서 취하였다.

[0223] 면역조직학(IHC)

[0224] 조직학적 검사를 위해 편도 및 림프절 샘플을 제조하였다. 샘플을 10 % 포르말린 중에 고정시키고, 파라핀 포매시키고, 슬라이드 상의 PCV2 항원의 검출을 위해 면역조직화학을 수행하였다. 항-PCV2 토끼 혈청을 1차 항체로서 사용하고, 엔비전+ (다코, 덴마크)를 검출 시스템으로서 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 슬라이드를 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 현미경 검사를 수행하였다. 편도 및 림프절에 대해, 특징적인 갈색 염색을 하기와 같이 서수 스케일로 점수화하였다:

[0225] 0 특이적 양성 염색 세포는 관찰되지 않았다.

[0226] 1 여포의 10 %(미만)에 존재하는 산란된 (단일) 양성 염색 세포

[0227] 2 여포의 10 내지 50 %에서 관찰된 양성 염색 (단일) 세포, 또는 여포의 <10 %에서 >15개의 양성 염색 세포의 소성 수집물.

[0228] 3 여포의 > 50 %에서의 특이적 염색

[0229] 결과를 개별 조직의 지수의 합계인 총 지수로서 기록하였다.

[0230] **결과:**

[0231] PCV2 혈청학:

[0232] SD1에서 측정을 시작할 때, 모든 군의 $\log_2$ 역가는 4 내지 5였다. 양성 대조군(군 21)은 SD34와 SD41 사이에 10의 $\log_2$ 역가를 제공하였다. 동일한 주에, 군 18, 19 및 20의 $\log_2$ 역가는 8 내지 10이었다. 비-백신접종 음성 대조군 22는 4 미만의 $\log_2$ 역가를 나타냈다.

[0233] 혈청(qPCR 혈청) 중 PCV2 바이러스 로드

[0234] SD0(측정 시작)과 SD19 사이에, 모든 군에서 바이러스 로드가 검출될 수 없었다($\log_{10} \text{ c}/\mu\text{l} = 0$). SD 34에서, 양성 대조군(군 21) 내의 바이러스 로드는 약 $1.0 \log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$ 로 증가하였고, SD41에서 약 1.6으로 추가로 증가하였다.

[0235] SD 34에서, 비-백신접종 음성 대조군(군 22)의 바이러스 로드는 약 $4.1 \log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$ 로 증가하였고, SD41에서 약 3.6으로 약간 감소하였다.

[0236] 군 18, 19 및 20에서의 바이러스 로드는 SD 34에서 1.3 내지 $1.8 \log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$ 및 SD41에서 1.6 내지 2.1이었다.

- [0237] 분변 스왑(qPCR 분변 스왑) 중 PCV2 바이러스 로드
- [0238] SD19 (측정 시작)에서, 모든 군에서 바이러스 로드가 검출될 수 없었다 ($\log_{10} \text{ c}/\mu\text{l} = 0$). SD 34에서, 양성 대조군(군 21) 내의 바이러스 로드는 약 $1.5 \log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$ 로 증가하였고, SD41에서 약 2.2로 추가로 증가하였다.
- [0239] 비-백신접종 음성 대조군(군 22)에서의 바이러스 로드는 SD34에서 약 $3.6 \log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$ 로 증가하였고, SD41까지 기본적으로 일정하게 유지되었다.
- [0240] 군 18, 19 및 20에서의 바이러스 로드는 양성 대조군의 범위였다(SD34에서 약 1.5 내지 1.8 및 SD41에서 약 1.8 내지 2.2).
- [0241] 안전성
- [0242] 허용될 수 없는 주사 부위 반응은 관찰되지 않았다. 최대 평균 온도 증가는 $T=0+4\text{h}$ 에서 0.4°C 였다. 따라서, 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카의 아췌반트 조합을 포함하는 본 발명의 백신 조성물이 허용될 수 없는 부위 반응을 야기하지 않으면서 백신접종 효능과 관련하여 허용가능한 결과를 산출한다는 것을 볼 수 있었다.
- [0243] **실시예 7: 복합 백신을 구성하기 위한 상이한 제약 등급 실리카의 사용**
- [0244] 본 실시예에서 다양한 상이한 유형의 실리카, 모든 제약 등급 (콜로이드성) 무정형 실리카가 본 발명에 따른 복합 백신을 제조하는 데에 유용한 것으로 나타났다. 일부 백신의 경우 실리카가 마이크로플루다이저™를 통과한 후에만 첨가되기는 하였지만, 백신의 제조 방법은 대부분 실시예 1과 일치하였다. 이는 최종 조성물에 실질적인 영향을 미치지 않았고, 모든 실리카는 약 120 nm의 평균 입자 크기로 최종 조성물에 대략 분포되었다. 그러나, 마이크로플루다이저™ 통과 후 실리카를 첨가할 때, 실리카의 총 부피의 매우 작은 백분율이 10 μm 초과 (200 μm 이하)의 큰 응집체(고체 입자)로서 존재하였다. 그러나, 이는 백신의 성능에 부정적인 영향을 미치지 않는다. 다양한 조성물에 대한 데이터는 표 12에 주어진다.

[0245] 표 12

실리카	현미경 뷰	마스터사이즈 μm	외관	pH	오스몰랄농도 mOsmol/kg
에어로실 200	3 μm 이하의 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.12 0.90 = 0.17 0.99 = 0.22	균질, 거의 백색	7.41	214
에어로실 200	3 μm 이하의 입자, 또한 50 μm 이하의 고체 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.12 0.90 = 0.22 0.99 = 66.96	균질, 거의 백색	7.42	189
에어로실 200vv	3 μm 이하의 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.12 0.90 = 0.17 0.99 = 0.23	균질, 거의 백색	7.38	212
에어로실 200vv	3 μm 이하의 입자, 또한 200 μm 이하의 고체 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.12 0.90 = 13.10 0.99 = 143.79	균질, 거의 백색	7.42	186
에어로펠 300	3 μm 이하의 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.12 0.90 = 0.17 0.99 = 0.22	균질, 거의 백색	7.40	211
에어로펠 300	3 μm 이하의 입자, 또한 100 μm 이하의 고체 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.12 0.90 = 0.18 0.99 = 63.65	균질, 거의 백색	7.42	187
에어로실 380F	3 μm 이하의 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.12 0.90 = 0.17 0.99 = 0.22	균질, 거의 백색	7.40	211
에어로실 380F	3 μm 이하의 입자, 또한 100 μm 이하의 고체 입자로 가용화	0.10 = 0.08 0.50 = 0.13 0.90 = 25.44 0.99 = 85.02	균질, 거의 백색	7.41	186

[0246]

[0247] 본 발명에서 사용하기에 적합한 다른 실리카는 에어로실® 90, 에어로실® 130, 에어로실® 150, 에어로실® 200F, 에어로실® 255, 에어로실® OX 50, 에어로실® TT600 및 에어로펠® 300/30이다.

[0248] 결론

[0249] 실시예 1 내지 7은 시험된 조성물 중에서 스쿠알란, 비타민 E-아세테이트 및 실리카의 신규 아쥬반트 조합만이 허용될 수 없는 부위 반응을 야기하지 않으면서 PCV2 및 Mhyo 감염에 대한 백신접종 효능과 관련하여 허용가능한 결과를 제공하였음을 나타낸다. 따라서, 이러한 아쥬반트 조성물을 사용하여, 안전하고 효과적인 피내 투여를 위해 돼지 쉼코바이러스 2형 및 마이코플라스마 하이오뉴모니아의 비복제 면역원을 사용하여 PCV2 및 Mhyo에 대한 복합 백신이 제공될 수 있다.