



(21)申請案號：102111966

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 02 日

(51)Int. Cl. : A61K39/295 (2006.01)
C07K14/01 (2006.01)

C07K14/30 (2006.01)

(30)優先權：2012/04/04 美國

61/620,175

(71)申請人：碩騰有限責任公司(美國) ZOETIS LLC (US)
美國

(72)發明人：尼裘爾 葛瑞格里 P NITZEL, GREGORY P. (US)；蓋爾文 傑佛瑞 E GALVIN, JEFFREY E. (US)；蓋瑞特 約翰 基斯 GARRETT, JOHN KEITH (US)；庫拉維克 詹姆士 R 二世 KULAWIK, JAMES R. II (US)；里克 翠西 L RICKER, TRACY L. (US)；史穆瑟 梅根 瑪莉 SMUTZER, MEGAN MARIE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：10 共 108 頁

(54)名稱

P C V / 豬肺炎黴漿菌組合疫苗

PCV/MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE COMBINATION VACCINE

(57)摘要

本發明提供多價免疫原性組合物，其包括豬肺炎黴漿菌(Mycoplasma hyopneumoniae, M.hyo)全細胞製劑之可溶部分及豬環狀病毒 2 型(PCV2)抗原，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i)IgG 與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。

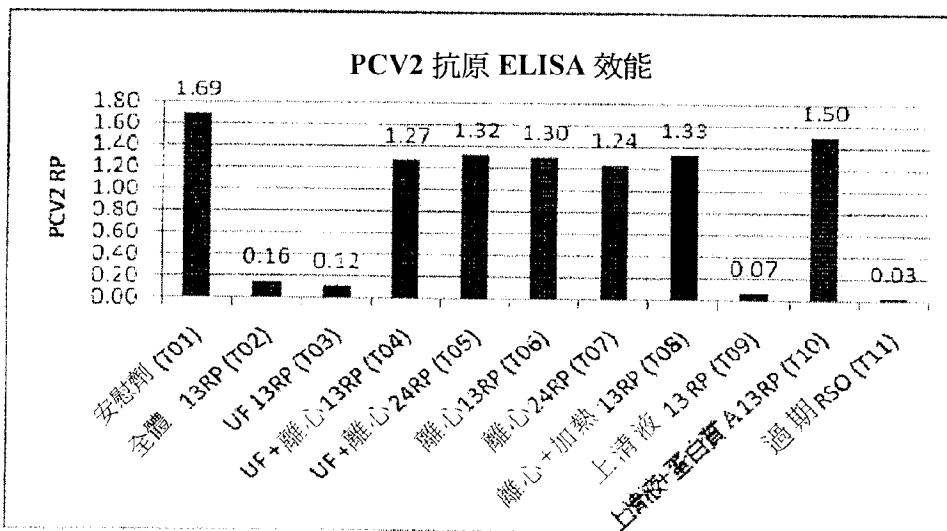


圖 2



(21)申請案號：102111966

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 02 日

(51)Int. Cl. : A61K39/295 (2006.01)
C07K14/01 (2006.01)

C07K14/30 (2006.01)

(30)優先權：2012/04/04 美國

61/620,175

(71)申請人：碩騰有限責任公司(美國) ZOETIS LLC (US)
美國

(72)發明人：尼裘爾 葛瑞格里 P NITZEL, GREGORY P. (US)；蓋爾文 傑佛瑞 E GALVIN, JEFFREY E. (US)；蓋瑞特 約翰 基斯 GARRETT, JOHN KEITH (US)；庫拉維克 詹姆士 R 二世 KULAWIK, JAMES R. II (US)；里克 翠西 L RICKER, TRACY L. (US)；史穆瑟 梅根 瑪莉 SMUTZER, MEGAN MARIE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：10 共 108 頁

(54)名稱

P C V / 豬肺炎黴漿菌組合疫苗

PCV/MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE COMBINATION VACCINE

(57)摘要

本發明提供多價免疫原性組合物，其包括豬肺炎黴漿菌(Mycoplasma hyopneumoniae, M.hyo)全細胞製劑之可溶部分及豬環狀病毒 2 型(PCV2)抗原，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i)IgG 與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。

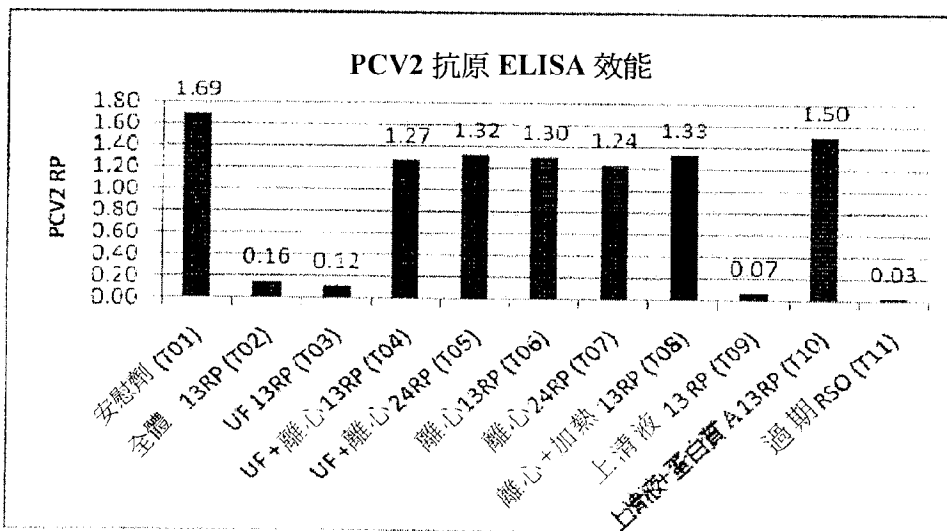


圖 2

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

PCV/豬肺炎黴漿菌組合疫苗

PCV/MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE COMBINATION
VACCINE

【技術領域】

本發明係關於豬環狀病毒及豬肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*、*M. hyopneumoniae*或M.hyo)。更特定而言，本發明係關於包括豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分及PCV2抗原之多價免疫原性組合物以及其在用於保護豬抵抗地方性肺炎及離乳後多系統消耗症候群(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)之疫苗中之用途。

【先前技術】

豬地方性肺炎(亦稱為黴漿菌性肺炎)係由豬肺炎黴漿菌引起。該疾病係影響所有年齡豬之慢性非致命性疾病。受感染豬僅顯示輕微咳嗽及發熱症狀，但該疾病因飼料效率降低及增重減小而具有顯著經濟影響。地方性肺炎由自受感染豬肺排出之空浮有機體經由鼻道自豬傳播至豬。原發性豬肺炎黴漿菌感染之後可為其他黴漿菌種(豬鼻黴漿菌(*Mycoplasma hyorhinis*)及絮狀黴漿菌(*Mycoplasma flocculare*))以及其他細菌病原之繼發性感染。

豬肺炎黴漿菌係能夠游離生存之小原核微生物，但發現其通常與真核細胞相關，此乃因其對外源性固醇及脂肪酸具有絕對需求。該等需求通常使得必需在含血清培養基中生長。豬肺炎黴漿菌被細胞膜而非細胞壁包圍。

黴漿菌與宿主細胞表面之物理相關性係產生及持續存在地方性肺炎之基礎。豬肺炎黴漿菌感染豬之呼吸道，定殖於氣管、枝氣管及小氣管。黴漿菌產生使呼吸道之纖毛襯裏停止擺動(beat)之纖毛靜止因子(ciliostatic factor)。最後，纖毛退化，使豬易受繼發性病原感染。在受感染動物中觀察到紫色至灰色實變區域之特徵性病灶。對屠宰動物之調查揭示30%至80%豬有病灶。來自13個州中37個豬群之結果指示，99%豬群具有地方性肺炎所特有之肺炎病灶豬。因此，極需有效預防及治療措施。

諸如泰妙素(tiamulin)、甲氧苄啶(trimethoprim)、四環素(tetracycline)及林可黴素(lincomycin)等抗生素具有某種益處，但費用昂貴且需要延長使用。另外，尚未顯示，抗生素有效消除豬肺炎黴漿菌之擴散或再感染。有時可藉由維持無病原豬群進行預防，但經常會再次引入豬肺炎黴漿菌。由於豬肺炎具有嚴重經濟後果，因此已在探尋抗豬肺炎黴漿菌之疫苗。含有在含血清培養基中生長之黴漿菌有機體之製劑的疫苗已有銷售，但引發有關由存於免疫材料中之血清組份(例如免疫複合物或非免疫原性特定蛋白質)誘導之不良反應的擔憂。儘管已成功地進行提供豬肺炎黴漿菌疫苗之其他嘗試，但該疾病仍廣泛存在。

豬肺炎黴漿菌及豬環狀病毒2型(PCV2)係豬產業所遭遇的兩個最盛行之病原。感染PCV2之豬展現通常稱作離乳後多系統消耗症候群(PMWS)之症候群。PMWS之臨床特徵在於消瘦、皮膚蒼白、生長遲滯、呼吸窘迫、腹瀉、黃疸及黃疸病。除PMWS外，PCV2亦與若干其他感染相關，該等其他感染包括假性狂犬病、豬生殖與呼吸症候群(PRRS)、格拉氏病(Glasser's disease)、鏈球菌性腦膜炎、沙氏桿菌病(salmonellosis)、離乳後大腸桿菌病、飲食性肝障礙及化膿性枝氣管肺炎。豬肺炎黴漿菌與地方性肺炎相關且亦已表明為產生豬環狀病毒

相關疾病(PCVAD)的主要輔助因子之一。

豬生殖與呼吸症候群(PRRS)係由對巨噬細胞、尤其彼等在肺中發現者(肺泡巨噬細胞)具有特定親和力之動脈病毒屬(arterivirus)引起。該等巨噬細胞攝取並去除侵入細菌及病毒，但在PRRS病毒(PRRSV)之情況下不會被去除。在PRRS病毒之情況下，其在巨噬細胞內部繁殖產生更多病毒並殺死巨噬細胞。在PRRSV進入豬群後，其往往無限地保持存在及活性。高達40%巨噬細胞受到破壞，此允許細菌及其他病毒增殖並造成損害。其常見實例係生長豬/肥育豬單元(grower/finisher unit)中當其感染PRRS病毒時地方性肺炎嚴重程度之顯著增加。超過半數離乳年齡PRRS病毒陰性豬在上市前受到感染。

業內需要抵抗豬之PCV2與黴漿菌感染二者之PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗。較佳地，此多價疫苗將與諸如PRRS病毒抗原等其他豬抗原相容。可非常合意地提供即用型單瓶式單劑量PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗。

【發明內容】

本發明提供多價免疫原性組合物，其包括豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分及豬環狀病毒2型(PCV2)抗原，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。在一個態樣中，豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分在添加至免疫原性組合物中之前已用蛋白質A或蛋白質G處理。在又一態樣中，組合物係呈即用型液體組合物形式。

在一個實施例中，豬肺炎黴漿菌製劑之可溶部分包括至少一種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。在另一實施例中，豬肺炎黴漿菌製劑之可溶部分包括兩種或更多種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。

在一些實施例中，本發明組合物誘發對抗豬肺炎黴漿菌及PCV2之保護性免疫反應。在一個實施例中，PCV2抗原係呈嵌合1型-2型環

狀病毒形式，該嵌合病毒包括表現豬環狀病毒2型ORF2蛋白質之失活重組豬環狀病毒1型。在另一實施例中，PCV2抗原係呈重組ORF2蛋白質形式。在再一實施例中，重組ORF2蛋白質係自桿狀病毒載體表現。

在一些實施例中，本發明之PCV2/豬肺炎黴漿菌組合物進一步包括至少一種其他抗原。在一個實施例中，該至少一種其他抗原具有對抗引起豬疾病之微生物之保護作用。

在一個實施例中，該微生物包括細菌、病毒或原生動物。在另一實施例中，該微生物係選自(但不限於)以下：豬生殖與呼吸症候群病毒 (PRRSV)、豬小病毒 (PPV)、副豬嗜血桿菌 (*Haemophilus parasuis*)、多殺性巴氏桿菌 (*Pasteurella multocida*)、豬鏈球菌 (*Streptococcus suis*)、豬葡萄球菌 (*Staphylococcus hyicus*)、胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、枝氣管敗血性包台拉菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、豬霍亂沙氏桿菌 (*Salmonella choleraesuis*)、腸炎沙氏桿菌 (*Salmonella enteritidis*)、豬丹毒桿菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、豬鼻黴漿菌 (*Mycoplasma hyorhinis*)、豬關節滑膜黴漿菌 (*Mycoplasma hyosynoviae*)、細螺旋體細菌 (*leptospira bacteria*)、細胞內勞索尼亞菌 (*Lawsonia intracellularis*)、豬流感病毒 (SIV)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 抗原、豬赤痢螺旋菌 (*Brachyspira hyodysenteriae*)、豬呼吸道冠狀病毒、豬流行性腹瀉 (PED) 病毒、輪狀病毒、纖鍊病毒 (Torque teno virus, TTV)、豬細胞巨大病毒、豬腸道病毒、腦心肌炎病毒、引起奧傑士基氏病 (Aujeszky's Disease) 之病原、引起古典型豬瘟 (Classical Swine fever, CSF) 之病原及引起豬傳染性胃腸炎之病原或其組合。

在一些實施例中，本發明組合物進一步包括佐劑。在一個實施例中，佐劑係選自(但不限於)以下：水包油佐劑、聚合物及水佐劑、

油包水佐劑、氫氧化鋁佐劑、維生素E佐劑及其組合。在另一實施例中，本發明組合物進一步包括醫藥上可接受之載劑。

在某些實施例中，本發明組合物當以單劑量投藥形式投與時，誘發對抗豬肺炎黴漿菌與PCV2二者之保護性免疫反應。在其他實施例中，該組合物當以單劑量投藥形式投與時，誘發對抗豬肺炎黴漿菌、PCV2及至少一種可引起豬之疾病之其他微生物的保護性免疫反應。在其他實施例中，當以兩劑量投藥形式投與，本發明組合物誘發對抗豬肺炎黴漿菌與PCV2二者之保護性反應。

本發明亦提供使豬肺炎黴漿菌及PCV2對豬免疫之方法。該方法包括向豬投與免疫原性組合物，該免疫原性組合物包括豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分及豬環狀病毒2型(PCV2)抗原，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。在一個實施例中，所投與組合物之豬肺炎黴漿菌製劑之可溶部分包括至少一種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。

在本發明方法之一個實施例中，該組合物係經肌內、經皮內、穿皮式或經皮下投與。在本發明方法之另一實施例中，該組合物係以單劑量投與。在本發明方法之再一實施例中，該組合物係以兩個劑量投與。

在本發明方法之又一實施例中，PCV2/豬肺炎黴漿菌組合物係結合至少一種具有對抗引起豬疾病之微生物(例如一或多種上述微生物)之保護作用之其他抗原投與。此等其他抗原可與PCV2/豬肺炎黴漿菌組合物同時給予(即，以單獨單一疫苗形式)或以即用型疫苗形式組合。

在又一實施例中，向具有抵抗豬肺炎黴漿菌及PCV2中之至少一者之母源性抗體之豬投與該組合物。在再一實施例中，向具有抵抗豬

肺炎黴漿菌與PCV2二者之母源性抗體之豬投與該組合物。

在一個實施例中，向3週齡或更大之豬投與該組合物。

本發明進一步提供套組。此套組含有包括免疫原性組合物之瓶。此免疫原性組合物包括PCV2抗原與豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分二者，其中豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者。在一個實施例中，此套組進一步包括含有投與免疫原性組合物之資訊之說明手冊。在另一實施例中，瓶中之免疫原性組合物係以即用型液體組合物形式提供。

另外，本發明提供製備免疫原性組合物之方法。此方法包括：i) 將豬肺炎黴漿菌在適宜培養基中培養18小時至144小時範圍內之時期；ii) 隨後使豬肺炎黴漿菌培養物失活；iii) 收穫失活培養液，其中該失活培養液包含含有可溶液體部分與不可溶細胞材料二者之豬肺炎黴漿菌全細胞製劑；iv) 分離可溶液體部分與不可溶細胞材料；v) 自經分離可溶液體部分實質上去除IgG與抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者，以形成豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分；及vi) 隨後組合豬肺炎黴漿菌細胞製劑之可溶部分與PCV2抗原。

【圖式簡單說明】

圖1係顯示利用經不同處理(闡述於實例3中之T02-T10)之豬肺炎黴漿菌抗原製備之豬肺炎黴漿菌單價疫苗對安慰劑(T01)之功效的圖。結果表示為肺病灶%最小二乘均數值。

圖2係顯示豬肺炎黴漿菌疫苗與已殺死之PCV 1型-2型嵌合病毒組合之PCV2抗原效能結果(PCV2抗原ELISA)的圖。嵌合病毒在該組合物中之初始含量為約 $1.6 \leq RP$ 。各試樣之狀態表示為相對效能(RP)。

圖3係顯示利用採用不同佐劑平臺之PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗調配物觀察到之PCV2病毒血症結果(PCV2定量PCR)的圖。

圖4係顯示利用採用不同佐劑平臺之PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗調配物在第1天、第20天及第42天攻毒時觀察到之PCV2抗體ELISA (S/P)血清學結果的圖。

圖5係顯示利用闡述於實例7中之T02-T04處理對安慰劑(T01)獲得之PCV2糞便流出物的圖。結果表示為PCV2 DNA複本數/ml。

圖6係顯示利用闡述於實例7中之T02-T04處理對安慰劑(T01)獲得之PCV2鼻流出物的圖。結果表示為PCV2 DNA複本數/ml。

圖7 (A及B)係顯示量測PCV2特異性細胞介導之免疫(CMI)反應之干擾素- γ (IFN- γ)測試之結果的圖。接種疫苗後/攻毒前結果呈現於圖7A中，且接種疫苗後/攻毒後結果呈現於圖7B中。 5×10^6 個細胞之刺激視為顯著。

圖8繪示存於SP油中之PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物之豬肺炎黴漿菌功效。採用豬肺炎黴漿菌處理T02-T08之調配物對安慰劑(T01)之肺評分以圖表方式繪示於圖8A中。圖8B中之表繪示處理T02-T08與安慰劑之對比。

圖9係顯示用於製備PCV2相容性蛋白質A處理豬肺炎黴漿菌抗原之製造方法之一個實施例的流程圖。

圖10係顯示評估佐劑對PRRS病毒之殺病毒活性之表。

序列簡單說明

SEQ ID NO: 1係編碼P-5722株豬肺炎黴漿菌之p46之核苷酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 2係對應於P-5722株豬肺炎黴漿菌之p46之胺基酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 3係編碼P-5722株豬肺炎黴漿菌之p97之核苷酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 4係對應於P-5722株豬肺炎黴漿菌之p97之胺基酸序

列的一個實施例；

SEQ ID NO: 5係編碼嵌合PCV1-2病毒之基因組序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 6係對應於豬環狀病毒之ORF2之核苷酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 7係對應於豬環狀病毒之ORF2多肽之胺基酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 8係編碼嵌合PCV1-2病毒之基因組序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 9係對應於豬環狀病毒之ORF2之核苷酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 10係對應於豬環狀病毒之ORF2多肽之胺基酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 11係對應於豬環狀病毒之ORF2多肽之胺基酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 12係編碼胺基酸序列SEQ ID NO: 11之核苷酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 13係對應於豬環狀病毒之ORF2多肽之胺基酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 14係編碼胺基酸序列SEQ ID NO: 13之核苷酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 15係對應於豬環狀病毒之ORF2多肽之胺基酸序列的一個實施例；

SEQ ID NO: 16係命名為P129之北美PRRS病毒分離物之無毒形式之基因組序列的一個實施例；及

SEQ ID NO: 17係對應於命名為ISU-55之PRRS病毒分離物之

ORF2至ORF5之核苷酸序列的一個實施例。

SEQ ID NO: 18係對應於命名為ISU-55之PRRS病毒分離物之ORF6及ORF7之核苷酸序列的一個實施例。

【實施方式】

本發明提供多價免疫原性組合物，其包括豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分及豬環狀病毒2型(PCV2)抗原，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。在一個實施例中，組合物在豬中誘發對抗PCV2與豬肺炎黴漿菌二者之保護性免疫反應。

申請者已驚奇地發現，豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之不可溶部分無免疫原性。相比之下，無IgG豬肺炎黴漿菌可溶製劑具有免疫原性且可與來自其他病原(例如PCV2)之抗原有效地組合，而不會有抗原之間之分析或免疫學干擾。此使豬肺炎黴漿菌可溶製劑成為用於本發明多價疫苗(包括單瓶式即用型調配物)之有效平臺。申請者亦已驚奇地發現，自豬肺炎黴漿菌製劑去除免疫球蛋白及不可溶細胞碎片增強免疫原性組合物之安全性。

除非上下文另有明確說明，否則說明書及申請專利範圍中所用單數形式「一(a, an)」及「該」包括複數個指示物。例如，術語「蛋白質抗原」包括複數種蛋白質抗原，包括其混合物。

本文所用術語「包含」意欲指組合物及方法包括所列舉要素，但並不排除其他要素。

如本文所定義，豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分係指在分離不可溶材料並實質上去除IgG及抗原結合免疫複合物後豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶液體部分。豬肺炎黴漿菌可溶部分或者可在本文中稱為上清液部分、培養上清液諸如此類。其包括已藉由諸如離心、過濾或沈澱等習用手段自不可溶蛋白質、全細菌及其他不可溶豬肺炎

黴漿菌細胞材料分開或分離之由豬肺炎黴漿菌表現之可溶蛋白質(豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原)。除包括豬肺炎黴漿菌特異性可溶蛋白質外，豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分亦包括異源性蛋白質，例如彼等含於用於豬肺炎黴漿菌發酵之培養基中者。

術語「抗原」係指可在動物中刺激產生抗體或T細胞反應或二者之化合物、組合物或免疫原性物質，包括注射或吸收至動物中之組合物。免疫反應可針對完整分子或該分子之一部分(例如，表位或半抗原)產生。

如本文所定義，「免疫原性或免疫組合物」係指包含至少一種抗原之物質組合物，該抗原在對所關注組合物或疫苗具有細胞及/或抗體介導免疫反應的宿主中誘發免疫反應。

本文所用術語「免疫反應」係指在動物中誘發之反應。免疫反應可指細胞免疫(CMI)；體液免疫或可涉及二者。本發明亦涵蓋限於免疫系統之一部分之反應。通常，「免疫反應」包括(但不限於)以下效應中之一或多者：特異性地針對一或多種包括在所關注組合物或疫苗中之抗原之抗體、B細胞、輔助T細胞、抑制性T細胞及/或細胞毒性T細胞及/或 $\gamma\delta$ T細胞的產生或活化。較佳地，宿主將展示治療性或保護性免疫反應以增強對新感染之抵抗及/或可降低疾病之臨床嚴重程度。此保護將藉由受感染宿主通常展示之症狀減少或缺失、更快之恢復時間及/或受感染宿主中降低之病毒滴定度來證明。

本文所用術語「免疫原性」意指能夠在宿主動物中產生針對一或多種抗原之免疫反應。此免疫反應形成由針對特定感染性有機體之疫苗誘發之保護性免疫的基礎。

本文所用「佐劑」意指包括一或多種增強對抗原之免疫反應之物質的組合物。吾人尚未完全瞭解佐劑之操作機制。相信一些佐劑藉由緩慢釋放抗原來增強免疫反應，而其他佐劑本身具有強免疫原性且

相信其協同地發揮功能。

本文所用術語「多價」意指含有一種以上來自相同種(即，豬肺炎黴漿菌之不同分離物)抑或來自不同種(即，來自溶血性巴氏桿菌(*Pasteurella hemolytica*)與多殺性巴氏桿菌二者之分離物)之抗原的疫苗或含有來自不同屬之抗原之組合的疫苗(例如，包含來自多殺性巴氏桿菌、沙氏桿菌(*Salmonella*)、大腸桿菌、睡眠嗜血桿菌(*Haemophilus somnus*)及梭菌屬(*Clostridium*)之抗原之疫苗)。

本文所用術語「豬」或「仔豬」意指豬來源之動物，而「母豬」係指具有生殖年齡及能力之雌性動物。「母豬」係尚未懷孕之雌性豬。

本文所用術語「毒性」意指保持在動物宿主中之感染能力之分離物。

「失活疫苗」意指含有不再能夠複製或生長之感染性有機體或病原之疫苗組合物。病原可為細菌、病毒、原生動物或真菌來源。可藉由多種方法達成失活，該等方法包括冷凍-解凍、化學處理(例如，用硫柳汞(thimerosal)或福馬林(formalin)處理)、音波處理、輻射、加熱或足以阻止有機體複製或生長同時維持其免疫原性之任何其他轉化手段。

本文所用術語「變體」係指多肽或編碼多肽之核酸序列，該多肽具有一或多個保守胺基酸變異或其他微小修飾，以使得相應多肽與野生型多肽相比具有實質上等效之功能。

術語「保守性變異」表示一胺基酸殘基由生物上相似之另一殘基替代，或核酸序列中一核苷酸經替代使得所編碼胺基酸殘基不改變或為生物上相似之另一殘基。保守性變異之實例包括一疏水殘基(例如異白胺酸、纈胺酸、白胺酸或甲硫胺酸)取代另一疏水殘基，或一極性殘基之取代，例如精胺酸取代離胺酸、麩胺酸取代天冬胺酸或麩^S

醯胺酸取代天冬醯胺，及諸如此類。術語「保守性變異」亦包括使用經取代胺基酸代替未經取代親代胺基酸，前提條件為所產生針對經取代多肽之抗體亦與未經取代多肽發生免疫反應。

本文所用術語「醫藥上可接受之載劑」及「醫藥上可接受之媒劑」可互換且係指可注射至宿主中而無不良效應之用於容納疫苗抗原之流體媒劑。業內已知之醫藥上可接受之適宜載劑包括(但不限於)無菌水、鹽水、葡萄糖、右旋糖或緩衝溶液。載劑可包括助劑，包括(但不限於)稀釋劑、穩定劑(即，糖及胺基酸)、防腐劑、潤濕劑、乳化劑、pH緩衝劑、增黏添加劑、顏料及諸如此類。

本文所用術語「疫苗組合物」包括用於在宿主中誘導免疫反應之存於醫藥上可接受之媒劑中之至少一種抗原或免疫原。疫苗組合物可以一定劑量且藉由彼等熟習醫學或獸醫技術者熟知之技術考慮諸如受體動物之年齡、性別、重量、物種及狀況以及投與途徑等因素來投與。投與途徑可為經皮、經由黏膜投與(例如，經口、鼻、肛門、陰道)或經由非經腸途徑(皮內、穿皮式、肌內、皮下、靜脈或腹膜內)。疫苗組合物可單獨投與或可與其他治療或療法共投與或依序投與。投藥形式可包括用於非經腸、皮下、皮內、肌內或靜脈內投與(例如，可注射投與)之懸浮液、糖漿或醃劑及製劑，例如無菌懸浮液或乳液。疫苗組合物可以噴霧劑形式投與或混合於食物及/或水中或與適宜載劑、稀釋劑或賦形劑(例如無菌水、生理鹽水、葡萄糖或諸如此類)混合遞送。組合物可含有輔助性物質，例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝劑、佐劑、凝膠或增黏添加劑、防腐劑、矯味劑、顏料、諸如此類，此取決於投與途徑及期望製劑。可查閱諸如「Remington's Pharmaceutical Sciences」1990等標準醫藥教材來製備適宜製劑，而無需過多實驗。

「北美PRRS病毒」意指具有與北美PRRS病毒分離物相關之遺傳

特性之任何PRRS病毒，例如但不限於大約在1990年代早期於美國首先分離之PRRS病毒(例如，參見Collins, J. E.等人，1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126)；北美PRRS病毒分離物MN-1b (Kwang, J.等人，1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296)；魁北克LAF-exp91株PRRS病毒(Mardassi, H.等人，1995, Arch. Virol. 140:1405-1418)；及北美PRRS病毒分離物VR 2385 (Meng, X.-J等人，1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801)。本文闡述北美PRRS病毒株之其他實例。遺傳特性係指由北美PRRS病毒株共享之基因組核苷酸序列相似性及胺基酸序列相似性。中國PRRS病毒株通常證明與北美株有約80-93%核苷酸序列相似性。

「歐洲PRRS病毒」係指具有與大約在1991年於歐洲首先分離之PRRS病毒相關之遺傳特性的任何PRRS病毒株(例如，參見Wensvoort, G.等人，1991, Vet. Q. 13:121-130)。「歐洲PRRS病毒」有時在業內亦稱作「萊利斯塔德(Lelystad)病毒」。本文闡述歐洲PRRS病毒株之其他實例。

若經基因改造之病毒之毒性小於其未經修飾之親代株，則其係「減毒的」。若株顯示一或多個確定疾病嚴重程度之參數在統計學上顯著降低，則其「毒性較小」。此等參數可包括病毒血症程度、發熱、呼吸窘迫之嚴重程度、生殖症狀之嚴重程度或肺病灶之數目或嚴重程度等。

「感染性純系」係可在實驗室中特定地且有目的地修飾且隨後用於重新產生經基因改造之活有機體的經分離或選殖病原(例如病毒)基因組。自感染性純系產生之經基因改造之活病毒可用於活病毒疫苗中。或者，失活病毒疫苗可藉由用諸如福馬林或疏水性溶劑、酸等失活試劑、藉由用紫外光或X射線輻照、藉由加熱等處理源自感染性純系之活病毒來製備。

所有現行可用豬肺炎黴漿菌及豬肺炎黴漿菌組合疫苗皆係自己殺死之全細胞黴漿菌製劑(菌苗)製成。相比之下，本發明採用豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分用於與PCV2抗原組合，其中豬肺炎黴漿菌製劑之可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。

豬肺炎黴漿菌對外源性固醇及脂肪酸具有絕對需求。該等需求通常使得豬肺炎黴漿菌必需在諸如豬血清等含血清培養基中生長。自豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分分離不可溶材料(例如，藉由離心、過濾或沈澱)不去除豬IgG或免疫複合物。在本發明之一個實施例中，用蛋白質A或蛋白質G處理豬肺炎黴漿菌可溶部分以實質上去除含於培養上清液中之IgG及免疫複合物。在此實施例中，應理解，蛋白質A處理發生於豬肺炎黴漿菌發酵後。此在本文中或者稱作下游蛋白質A處理。在另一實施例中，可採用生長培養基之上游蛋白質A處理(即，在豬肺炎黴漿菌發酵前)。蛋白質A結合至IgG之Fc部分。蛋白質G優先結合至IgG之Fc部分，但亦可結合至Fab區。自粗蛋白質混合物(例如組織培養上清液、血清及腹水液)純化/去除總IgG之方法為業內已知。

在一些實施例中，豬肺炎黴漿菌製劑之可溶部分包括至少一種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。在其他實施例中，豬肺炎黴漿菌製劑之可溶部分包括兩種或更多種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。

在一個實施例中，豬肺炎黴漿菌上清液部分包括以下豬肺炎黴漿菌特異性蛋白質抗原中之一或多者：約46kD (p46)、64kD (p64)及97kD (p97)分子量之豬肺炎黴漿菌蛋白質。在另一實施例中，上清液部分至少包括p46、p64及p97豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。約64kD (p64)之豬肺炎黴漿菌蛋白質在本文中或者可稱作豬肺炎黴漿菌之p65表面抗原，如由Kim等[*Infect. Immun.* 58(8):2637-2643 (1990)]以及於

美國專利第5,788,962中所述。

Futo等人闡述可用於本發明組合物中之來自豬肺炎黴漿菌之46kD表面蛋白質之選殖及表徵[J. Bact 177: 1915-1917 (1995)]。在一個實施例中，豬肺炎黴漿菌培養上清液包括p46，其來自P-5722株之相應核苷酸及胺基酸序列分別闡述於SEQ ID NO: 1及2中。進一步涵蓋，此等p46序列變體可用於本發明組合物中，如下文所述。

Zhang等人闡述並表徵豬肺炎黴漿菌之p97黏附素蛋白質[Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995]。另外，King等人闡述P-5722株豬肺炎黴漿菌之稱為Mhp1之124kD蛋白質及表明Mhp1及p97為相同蛋白質之呈現數據[Vaccine 15:25-35 (1997)]。此等p97蛋白質可用於本發明組合物中。在一個實施例中，豬肺炎黴漿菌培養上清液包括p97，其來自P-5722株之相應核苷酸及胺基酸序列分別闡述於SEQ ID NO: 3及4中。進一步涵蓋，此等p97序列可用於本發明組合物中，如下文所述。

豬肺炎黴漿菌培養上清液可包括其他豬肺炎黴漿菌特異性蛋白質抗原，例如但不限於約41kD (p41)、42kD (p42)、89kD (p89)及65kD (p65)之蛋白質。參見Okada等人，2000, J. Vet. Med. B 47:527-533及Kim等人，1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643。另外，豬肺炎黴漿菌培養上清液可包括約102kD (p102)及216kD (p216)之豬肺炎黴漿菌特異性蛋白質抗原。參見頒予Minnion等人之美國專利第6,162,435號及第7,419,806號。

任何豬肺炎黴漿菌株皆可用作起始材料來產生本發明組合物之豬肺炎黴漿菌製劑之可溶部分。適宜豬肺炎黴漿菌株可自商業或學術來源獲得，包括諸如美國菌種保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC) (Manassas, Va.)及NRRL培養物保藏中心(NRRL Culture Collection)(農業研究署(Agricultural Research Service)，美國

農業部，Peoria, Ill.)等寄存處。ATCC單獨列示以下6株供待售豬肺炎黴漿菌：豬肺炎黴漿菌ATCC 25095、豬肺炎黴漿菌ATCC 25617、豬肺炎黴漿菌ATCC 25934、豬肺炎黴漿菌ATCC 27714、豬肺炎黴漿菌ATCC 27715及豬肺炎黴漿菌ATCC 25934D。用於本發明實施例中之較佳豬肺炎黴漿菌株鑑別為P-5722-3株，ATCC編號為55052，依照美國專利及商標局(U.S. Patent and Trademark Office)所要求之可存取性規則(accessibility rule)於1990年5月30日寄存。鑒於疾病之廣泛散播，毒株亦可藉由自感染引起豬黴漿菌肺炎之已知株之豬之肺分泌物或組織回收豬肺炎黴漿菌獲得。

彼等熟習此項技術者應理解，豬肺炎黴漿菌序列變體可用於本發明組合物中。此等變體可在序列一致性方面變化多達10-20%且仍保留其可用於免疫原性組合物中之抗原特性。較佳地，豬肺炎黴漿菌變體與野生型豬肺炎黴漿菌株之全長基因組序列具有至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%、甚至更佳至少95%序列一致性。免疫組合物之抗原特性可(例如)藉由如實例中所提供之攻毒實驗估計。此外，當經修飾豬肺炎黴漿菌抗原與野生型豬肺炎黴漿菌蛋白質相比賦予至少70%、較佳80%、更佳90%保護免疫性時，仍保持經修飾抗原之抗原特性。

在一個實施例中，豬肺炎黴漿菌可溶p46抗原以約1.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約10 $\mu\text{g/ml}$ 、較佳以約2 $\mu\text{g/ml}$ 至約6 $\mu\text{g/ml}$ 之最終濃度包括在本發明組合物中。應注意，p46係用於豬肺炎黴漿菌效能測試之蛋白質(參見下文實例部分)。在另一實施例中，豬肺炎黴漿菌抗原可以約5.5%至約35%最終量之豬肺炎黴漿菌完全培養蛋白質A處理之上清液包括在組合物中。

本發明豬肺炎黴漿菌可溶製劑針對豬肺炎黴漿菌安全且有效且適於單劑量投與。另外，申請者已驚奇地發現，豬肺炎黴漿菌可溶製

劑可與來自其他病原(包括PCV2)之抗原有效地組合，而不會有抗原之間之免疫學干擾。此使豬肺炎黴漿菌可溶製劑成爲用於本發明多價疫苗(包括PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗)之有效平臺。PCV2抗原可與豬肺炎黴漿菌組合物同時給予(即，以單獨單一疫苗形式)，但較佳以即用型單瓶式疫苗形式組合。

在一個實施例中，本發明之免疫原性PCV2/豬肺炎黴漿菌組合物包括至少一種其他抗原。在一個實施例中，該至少一種其他抗原具有對抗引起豬疾病之微生物之保護作用。

在一些實施例中，該至少一種其他抗原組份具有對抗已知會感染豬之細菌、病毒或原生動物之保護作用。此等微生物之實例包括(但不限於)以下：豬生殖與呼吸症候群病毒(PRRSV)、豬小病毒(PPV)、副豬嗜血桿菌、多殺性巴氏桿菌、豬鏈球菌、豬葡萄球菌、胸膜肺炎放線桿菌、支氣管敗血性包台拉菌、豬霍亂沙氏桿菌、腸炎沙氏桿菌、豬丹毒桿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌、細螺旋體細菌、細胞內勞索尼亞菌、豬流感病毒(SIV)、大腸桿菌抗原、豬赤痢螺旋菌、豬呼吸道冠狀病毒、豬流行性腹瀉(PED)病毒、輪狀病毒、纖鍊病毒(TTV)、豬細胞巨大病毒、豬腸道病毒、腦心肌炎病毒、引起奧傑士基氏病之病原、引起古典型豬瘟(CSF)之病原及引起豬傳染性胃腸炎之病原或其組合。

在一個實施例中，本發明之PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗係以單劑量即用型單瓶式疫苗形式提供。此一即用型組合疫苗無需混合單獨疫苗，因此不存在與混合相關之污染風險或額外勞力且無需在數小時內使用混合物。此外，單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗將廢物與冰箱儲存空間削減一半。此外，單劑量投藥法可免除向動物投與第二劑量時之相關勞力。應注意，儘管目前已有PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗，但其係以兩劑量即用型疫苗(Circumvent® PCVM)形式或以需

要同時投與單獨疫苗(例如, Ingelvac CircoFLEX®及 Ingelvac MycoFLEX®)之單劑量雙瓶式疫苗形式提供。較佳地, 本發明之PCV2/豬肺炎黴漿菌組合將與其他抗原(例如PRRS病毒抗原)相容, 使得所有抗原皆可呈單劑量投與。

在一些實施例中, PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗之PCV2抗原組份係呈嵌合1型-2型環狀病毒形式。嵌合病毒包括表現豬環狀病毒2型ORF2蛋白質之失活重組豬環狀病毒1型。嵌合豬環狀病毒及其製備方法闡述於WO 03/049703 A2亦及美國專利第7,279,166號及第7,575,752號中, 該等專利之全部內容以引用方式併入本文中。

在一個實施例中, 嵌合PCV1-2病毒基因組之全長DNA序列對應於SEQ ID NO: 5或其變體, 如下文所述。在另一實施例中, 嵌合PCV1-2病毒之免疫原性ORF2殼體基因對應於SEQ ID NO: 6。在又一實施例中, 由嵌合PCV1-2病毒表現之免疫原性ORF2蛋白質之胺基酸序列對應於SEQ ID NO: 7。

在再一實施例中, 嵌合PCV1-2病毒基因組之全長DNA序列對應於SEQ ID NO: 8。在一個實施例中, 嵌合PCV1-2病毒之免疫原性ORF2殼體基因對應於SEQ ID NO: 9。在又一實施例中, 由嵌合PCV1-2病毒表現之免疫原性ORF2蛋白質之胺基酸序列對應於SEQ ID NO: 10。

然而, 嵌合PCV1-2病毒之PCV2 ORF2 DNA及蛋白質並不限於上述序列, 此乃因PCV2 ORF2 DNA及蛋白質係PCV2分離物內高度保守之域。

在一些實施例中, 豬肺炎黴漿菌/PCV2組合疫苗之PCV2抗原組份係呈重組ORF2蛋白質形式。在一個實施例中, 重組ORF2蛋白質係自桿狀病毒載體表現。或者, 可使用其他已知表現載體, 例如包括(但不限於)副痘病毒(parapox)載體。

在一個實施例中，重組PCV2 ORF2蛋白質係由SEQ ID NO: 12 (GenBank登錄號為AF086834)編碼之SEQ ID NO: 11。在另一實施例中，重組ORF2蛋白質係由SEQ ID NO: 14編碼之SEQ ID NO: 13。在再一實施例中，重組ORF2蛋白質對應於SEQ ID NO: 15。在再一實施例中，重組PCV2 ORF2蛋白質對應於SEQ ID NO: 7。在再一實施例中，重組PCV2 ORF2蛋白質對應於SEQ ID NO: 10。

然而，本發明並不限於上述特定ORF2 DNA及蛋白質序列。由於PCV2 ORF2 DNA及蛋白質係PCV2分離物內高度保守之域，因此任何PCV2 ORF2皆極有可能有效地作為用於嵌合PCV1-2病毒或重組PCV2蛋白質中之PCV2 ORF2 DNA及/或多肽來源。

可獲得PCV2 ORF2 DNA及蛋白質序列之適宜PCV2分離物之實例係PCV2分離物編號40895 (於2001年12月7日寄存於ATCC且指派ATCC專利寄存名稱PTA-3914)。PCV2分離物編號40895之基因組(核苷酸)序列可以GenBank登錄號AF264042獲得。可獲得PCV2 ORF2 DNA及蛋白質序列之適宜PCV2分離物之其他實例包括(但不限於)以下：Imp.999、Imp.1010-Stoon、Imp.1011-48121及Imp.1011-48285。對應於該等PCV2分離物之基因組序列之GenBank登錄號分別係AF055391、AF055392、AF055393及AF055394。

在一些形式中，使用PCV2 ORF2蛋白質之免疫原性部分作為組合物中之抗原組份。例如，PCV2 ORF2蛋白質之截短及/或取代形式或片段可用於本發明組合物中。

彼等熟習此項技術者應理解，PCV2序列變體可用於本發明組合物中。此等變體可在序列一致性方面變化多達10-20%且仍保留其可用於免疫原性組合物中之抗原特性。較佳地，PCV2變體與野生型PCV2分離物之全長基因組序列具有至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%、甚至更佳至少95%序列一致性。免疫組合物之抗原特性可(例

如)藉由如實例中所提供之攻毒實驗估計。此外，當經修飾PCV2抗原與野生型PCV2 ORF2蛋白質相比賦予至少70%、較佳80%、更佳90%保護免疫性時，仍保持經修飾抗原之抗原特性。

PCV2抗原組份在免疫原性組合物中之抗原含量為有效誘導所需免疫反應(即減少因PCV2感染所致之臨床癥兆之發生率或減輕其嚴重程度)之量。

在一個實施例中，本發明組合物中嵌合PCV1-2病毒含量係至少 $1.0 \leq RP \leq 5.0$ ，其中RP係由ELISA抗原定量法(活體外效能試驗)相對於參考疫苗所測定之相對效能單位。在另一實施例中，嵌合PCV1-2病毒在本發明組合物中之終濃度係約0.5%至約5%之濃縮20倍(20×)之主體PCV1-2抗原。

在另一實施例中，PCV2 ORF2重組蛋白質在本發明組合物中之含量係至少0.2 μg 抗原/ml最終免疫原性組合物($\mu\text{g}/\text{ml}$)。在又一實施例中，PCV2 ORF2重組蛋白質之含量係約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至約400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在再一實施例中，PCV2 ORF2重組蛋白質之含量係約0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在再一實施例中，PCV2 ORF2重組蛋白質之含量係約0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在再一實施例中，PCV2 ORF2重組蛋白質之含量係約0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至約50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

在一個實施例中，本發明免疫原性組合物包括至少一種(例如，兩種或更多種)豬肺炎黴漿菌可溶抗原與豬環狀病毒2型(PCV2)抗原以及PRRS病毒抗原之本發明組合。在另一實施例中，組合物在豬中誘發對抗豬肺炎黴漿菌、PCV2及PRRS病毒之保護性免疫反應。

在一個實施例中，PCV2/豬肺炎黴漿菌/PRRS組合疫苗係以單劑量雙瓶式疫苗形式提供。例如，在一些實施例中，PCV2/豬肺炎黴漿菌組合係以穩定液體組合物形式提供於第一瓶中且PRRS病毒係以凍乾狀態提供於第二瓶中。在一些實施例中，可將其他豬抗原添加至第

一或第二瓶中。

在一個實施例中，PRRS病毒組份係以經基因改造之活凍乾病毒形式提供。在投與前，來自第一瓶之PCV2/豬肺炎黴漿菌液體可用於將第二瓶中之PRRS病毒再水合，以使得所有三種抗原形成單一劑量投與動物。應注意，儘管當前存在PCV2/豬肺炎黴漿菌/PRRS組合疫苗，但其係呈需要同時投與三種單獨疫苗(例如，Ingelvac CircoFLEX®、Ingelvac MycoFLEX®及Ingelvac® PRRS MLV)之單劑量3-瓶式疫苗形式提供。

PRRS病原體首次於荷蘭分離，且稱為萊利斯塔德病毒。此病毒闡述於WO 92/21375 (Stichting Centraal Diegeneeskundig Instituut)中。歐洲PRRS病毒分離物寄存於巴黎巴斯德研究所(Institut Pasteur of Paris)，編號為I-1102。北美型之分離與歐洲型病毒之分離幾乎同時，且闡述於WO-93/03760 (Collins等人)中。北美型病毒分離物寄存於美國菌種保藏中心(ATCC)，編號為VR-2332。

已自歐洲與北美病毒型二者分離不同株。WO 93/07898 (Akzo)闡述寄存於CNCM (巴斯德研究所)且編號為I-1140之歐洲株及源自其之疫苗。此外，WO 93/14196 (Rhone-Merieux)闡述於法國分離且寄存於CNCM (巴斯德研究所)之新株(編號為I-1153)。此外，EP0595436 B1(Solvay)闡述毒性強於最初闡述者之新北美型株及其疫苗。此株已寄存於ATCC，但寄存號未在專利申請案中詳細說明。另外，ES2074950 BA (Cyanamid Iberica)及副本GB2282811 B2闡述不同於其他歐洲及北美株之所謂的「西班牙株」。此「西班牙株」已寄存於歐洲動物細胞培養物保藏中心(European Animal Cell Culture Collection，EACCC)，編號為V93070108。

用於本發明PCV2/豬肺炎黴漿菌/PRRS組合物中之適宜PRRS病毒抗原包括北美PRRS病毒分離物、中國PRRS病毒株及歐洲PRRS病毒

株以及此等分離物/株之經基因改造形式。在一個實施例中，用於本發明組合物中之PRRS病毒抗原組份係北美PRRS病毒。

在一些實施例中，用於本發明組合物中之PRRS病毒抗原組份係命名為P129之北美PRRS病毒分離物或其經基因改造之活形式。較佳地，經基因改造之PRRS病毒不能產生病原感染，但仍能誘發對抗野生型PRRS病毒感染之有效免疫保護反應。

用於本發明組合物中之經基因改造之PRRS病毒可自感染性純系產生。命名為P129之北美PRRS病毒分離物之感染性cDNA純系的製備闡述於美國專利第6,500,662號中，該專利以引用方式完全併入本文中。P129 cDNA之序列揭示於Genbank登錄號AF494042及美國專利第6,500,662號中。

在一個實施例中，用於本發明組合物中之無毒形式之P129之核苷酸序列由SEQ ID NO: 16代表。然而，本發明並不限於此序列。此序列及其他無毒形式之P129之序列闡述於2011年11月9日提出申請之國際申請案第PCT/IB2011/055003號中，該專利(包括基於此國際申請案之任何美國國家階段申請)之全文以引用方式併入本文中。較佳地，PRRS病毒經修飾以防止干擾素介導功能之下調。

在其他實施例中，用於本發明組合物中之PRRS病毒抗原組份係命名為ISU-55之PRRS病毒分離物。ISU-55分離物以登錄號VR2430寄存於美國菌種保藏中心(ATCC)。ISU-55分離物之ORF2至ORF5基因之核苷酸序列由SEQ ID NO:17代表。ISU-55分離物之ORF6及ORF7基因之核苷酸序列由SEQ ID NO: 18代表。

可用於組合物中之另一適宜北美PRRS病毒分離物係以登錄號VR2385 [經3×噬斑純化]及VR2386 [未經噬斑純化]寄存於ATCC之ISU-12。可用於本發明組合物中之其他適宜北美PRRS病毒分離物如下：分別以登錄號VR2498、VR2431、VR2475、VR2429及VR2474寄

存於ATCC之ISU-51、ISU-3927、ISU-1894、ISU-22及ISU-79。該等ISU分離物中任一者之經基因改造之形式皆可用於本發明組合物中。該等ISU分離物及ISU-55分離物詳細地闡述於頒予Paul等人之以下美國專利中：US 5,695,766、6,110,467、6,251,397、6,251,404、6,380,376、6,592,873、6,773,908、6,977,078、7,223,854、7,264,802、7,264,957及7,517,976，所有該等專利之全文皆以引用方式併入本文中。

在其他實施例中，用於本發明組合物中之PRRS病毒抗原組份係寄存於美國菌種保藏中心(ATCC)且編號為VR-2332之北美型或其經基因改造之形式。例如，PRRS病毒可為基於鑑別為ATCC VR2332之分離物之經修飾的活病毒，其用於INGELVAC® PRRS ATP及INGELVAC® PRRS MLV中且來自Boehringer Ingelheim Vetmedica公司。

在其他實施例中，用於本發明組合物中之PRRS病毒抗原組份係歐洲PRRS病毒分離物或萊利斯塔德病毒或其經基因改造之形式。適宜PRRS病毒株之實例鑑別為上述寄存號I-1102。對應於I-1102寄存物之核苷酸及胺基酸序列闡述於頒予Wensvoort等人之美國專利第5,620,691號中，該專利以引用方式完全併入本文中。歐洲PRRS病毒分離物或萊利斯塔德病毒之感染性純系之製備闡述於美國專利第6,268,199號中，該專利以引用方式完全併入本文中。

適宜PRRS病毒分離物之其他實例包括(但不限於)彼等上述者。此外，PRRS病毒分離物之經基因改造之活形式可用於本發明組合物中。感染性純系可用於重新產生此等經基因改造之活有機體。

彼等熟習此項技術者應理解，PRRS病毒序列變體可用於本發明組合物中。此等變體可在序列一致性方面變化多達10-20%且仍保留其可用於免疫原性組合物中之抗原特性。較佳地，PRRS病毒變體與

野生型PRRS病毒分離物之全長基因組序列具有至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%、甚至更佳至少95%序列一致性。免疫組合物之抗原特性可(例如)藉由攻毒實驗估計。此外，當經修飾PRRS病毒抗原與野生型PRRS病毒抗原相比賦予至少70%、較佳80%、更佳90%保護免疫性時，仍保持經修飾抗原之抗原特性。

在一個實施例中，PRRS病毒抗原組份係以至少 $2.1 \leq \text{TCID}_{50} \leq 5.2$ 之量包括在本發明組合物中之經基因改造之活病毒，其中 TCID_{50} 係藉由抗原量化(活體外效能測試)確定之50%組織培養感染劑量。

本發明PCV2/豬肺炎黴漿菌/PRRS組合物之PCV2抗原組份可呈嵌合1型-2型環狀病毒形式，該嵌合病毒包括表現豬環狀病毒2型ORF2蛋白質之失活重組豬環狀病毒1型。在另一實施例中，本發明PCV2/豬肺炎黴漿菌/PRRS組合物之PCV2抗原組份係呈重組ORF2蛋白質形式。

用於PCV2/豬肺炎黴漿菌/PRRS組合物中之適宜PCV2抗原可源自任一上述PCV2分離物以及其他PCV2分離物。欲用於本發明組合物中之適宜PCV2抗原包括(但不限於)上述PCV2序列及其變體。

本發明疫苗可依照公認慣例調配以包括動物(包括人類(若適用))可接受之載劑，例如標準緩衝劑、穩定劑、稀釋劑、防腐劑及/或增溶劑，且亦可經調配以促進持續釋放。稀釋劑包括水、鹽水、右旋糖、乙醇、甘油及諸如此類。針對等滲性之添加劑尤其包括氯化鈉、右旋糖、甘露醇、山梨醇及乳糖。穩定劑尤其包括白蛋白。其他適宜疫苗媒劑及添加劑(包括彼等尤其可用於調配經修飾之活疫苗者)為彼等熟習此項技術者已知或將為其明瞭。例如，參見Remington's Pharmaceutical Science，第18版，1990，Mack Publishing，該文獻以引用方式併入本文中。

本發明疫苗可進一步尤其包含一或多種其他免疫調節組份，例

如，佐劑或細胞介素。用於本發明組合物中之適宜佐劑之類型包括以下：水包油佐劑、聚合物及水佐劑、油包水佐劑、氫氧化鋁佐劑、維生素E佐劑及其組合。佐劑之一些具體實例包括(但不限於)完全弗氏佐劑(complete Freund's adjuvant)、不完全弗氏佐劑、短小棒狀桿菌菌苗(*Corynebacterium parvum*)、卡介苗(*Bacillus Calmette Guerin*)、氫氧化鋁凝膠、葡聚糖、硫酸葡聚糖、氧化鐵、海藻酸鈉、細菌佐劑(Bacto-Adjuvant)、某些合成聚合物(例如聚胺基酸及胺基酸共聚物)、嵌段共聚物(CytRx, Atlanta, Ga.)、QS-21 (Cambridge Biotech公司, Cambridge Mass.)、SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.)、愛菲金®(AMPHIGEN®)佐劑、皂苷、Quil A或其他皂苷部分、單磷丁基脂質A及阿夫立定(Avridine)脂質-胺佐劑(N,N-二十八基-N',N'--雙(2-羥乙基)-丙二胺)、「REGRESSIN」(Vetrepharm, Athens, Ga.)、石蠟油、RIBI佐劑系統(Ribi公司, Hamilton, Mont.)、胞壁醯二肽及諸如此類。

可用於本發明疫苗中之水包油乳液之非限制性實例包括經修飾之SEAM62及SEAM 1/2調配物。經修飾之SEAM62係含有5% (v/v)鯊烯(Sigma)、1% (v/v) SPAN® 85清潔劑(ICI Surfactants)、0.7% (v/v) TWEEN® 80清潔劑(ICI Surfactants)、2.5% (v/v)乙醇、200 µg/ml Quil A、100 µg/ml膽固醇及0.5% (v/v)卵磷脂之水包油乳液。經修飾之SEAM 1/2係包含5% (v/v)鯊烯、1% (v/v) SPAN® 85清潔劑、0.7% (v/v) Tween 80清潔劑、2.5% (v/v)乙醇、100 µg/ml Quil A及50 µg/ml膽固醇之水包油乳液。

可用於本發明組合物中之佐劑之另一實例係SP油。如說明書及申請專利範圍中所用，術語「SP油」指示包含聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物、鯊烷、聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯及緩衝鹽溶液之油乳液。聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物係輔助懸浮固體及液體組份之表

面活性劑。該等表面活性劑可以商品名普流尼克® (Pluronic®)作為聚合物購得。較佳表面活性劑係以商品名普流尼克® L-121購得之泊洛沙姆401 (poloxamer 401)。一般而言，SP油乳液係免疫刺激佐劑混合物，其將包含約1% vol/vol至3% vol/vol嵌段共聚物、約2% vol/vol至6% vol/vol鯊烷、更特定而言約3%至6%鯊烷及約0.1% vol/vol至0.5% vol/vol聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯，其餘為緩衝鹽溶液。在一個實施例中，SP油乳液以約1%至25%、較佳約2%至15%、更佳約5%至12% v/v之v/v量存在於最終組合物中。

用於本發明組合物中之適宜佐劑之再一實例係由溶於油(通常為輕質液體石蠟)中之去油卵磷脂組成之愛菲金™佐劑。

可用於本發明組合物中之佐劑之其他實例係以下專利佐劑：Microsol Diluvac Forte®雙重乳液佐劑系統、伊蔓納得(Emunade)佐劑及埃克索夫(Xsolve)佐劑。伊蔓納得佐劑與埃克索夫佐劑二者皆為輕質礦物油存於水中之之乳液，但伊蔓納得亦含有鋁膠，且乙酸d,1- α -生育酚係埃克索夫佐劑之一部分。用於本發明組合物中之適宜佐劑之再一實例係ImpranFLEX™佐劑(油包水佐劑)。適宜佐劑之再一實例係基於卡波姆(Carbomer) (卡波普® (Carbopol®))之佐劑。較佳卡波普®佐劑包括卡波普® 934聚合物及卡波普® 941聚合物。

在一個實施例中，以約100 μg 至約10 mg/劑量之量添加佐劑或佐劑混合物。在另一實施例中，以約200 μg 至約5 mg/劑量之量添加佐劑/佐劑混合物。在再一實施例中，以約300 μg 至約1 mg/劑量之量添加佐劑/佐劑混合物。

佐劑或佐劑混合物通常以約1%至25%、較佳約2%至15%、更佳約5%至12% v/v之v/v量存在於本發明疫苗組合物中。

可包括在疫苗中之其他「免疫調節劑」包括(例如)一或多種介白素、干擾素或其他已知細胞介素。在一個實施例中，佐劑可為環糊精

衍生物或聚陰離子聚合物，例如彼等分別闡述於美國專利第6,165,995號及第6,610,310號中者。

又一態樣係關於製備本發明免疫原性組合物之方法。此方法包含：i)將豬肺炎黴漿菌在適宜培養基中培養18小時至144小時範圍內之時期；ii)隨後使豬肺炎黴漿菌培養物失活；iii)收穫失活培養液，其中該失活培養液包含含有可溶液體部分與不可溶細胞材料二者之豬肺炎黴漿菌全細胞製劑；iv)分離可溶液體部分與不可溶細胞材料；v)自經分離可溶液體部分實質上去除IgG與抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者，以形成豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分；及vi)隨後組合豬肺炎黴漿菌細胞製劑之可溶部分與PCV2抗原。

用於培養豬肺炎黴漿菌之適宜培養基之實例係PPLO肉湯(黴漿菌肉湯基質)，其當補充有營養富集物時用於分離及培育黴漿菌。

在一些實施例中，使豬肺炎黴漿菌培養物生長直至對數期晚期生長，此後將培養物失活。在一些其他實施例中，藉由提高pH(例如，至約7.8)將培養物失活。此藉由將產生培養物暴露於失活劑(例如二伸乙基亞胺(BEI))來發生。BEI係在產生培養物中培育L-溴乙基胺氫溴酸鹽(BEA)期間原位產生。隨後，藉由(例如)在溶液內添加等效量之中和失活劑之藥劑來中和失活培養物之pH。在一些實施例中，失活劑係BEI且中和劑係硫代硫酸鈉。在一個實施例中，藉由添加硫代硫酸鈉將失活培養物之pH調節至約7.4。

在一些實施例中，使用習用方法分離豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶液體部分與不可溶細胞材料。在一個實施例中，此分離係藉由過濾步驟進行。在另一實施例中，此分離係藉由離心步驟進行。在再一實施例中，分離係藉由沈澱步驟進行。

在一個實施例中，用蛋白質A樹脂處理失活中和豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶液體部分以實質上去除其中之IgG與抗原/免疫球蛋白。

免疫複合物二者。在其他實施例中，可使用蛋白質G樹脂來實質上去除含於可溶液體部分中之IgG與抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者。用蛋白質A或蛋白質G樹脂去除IgG與抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者之方法為業內熟知。

根據又一態樣，製備本發明多價免疫原性組合物之方法包含製備上述可溶豬肺炎黴漿菌抗原及混合此抗原與PCV2抗原、適宜佐劑及一或多種醫藥上可接受之載劑。此方法視情況包括添加至少一種其他豬抗原，例如但不限於上述PRRS病毒抗原。

本發明之又一態樣係關於套組。「套組」係指複數個集中在一起之組件。在一個實施例中，本發明套組包括包含免疫原性組合物之瓶(或其他適宜容器)。此免疫原性組合物包括PCV2抗原與豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分二者，其中豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者。視情況，套組可進一步包括說明手冊。說明手冊包括投與免疫原性組合物之資訊。

在一些實施例中，套組瓶中之PCV2/豬肺炎黴漿菌組合係以即用型液體組合物形式提供。在其他實施例中，套組包括包含PRRS病毒抗原之第二瓶。在一些實施例中，PRRS病毒抗原係呈以凍乾狀態提供之經基因改造之活病毒形式。在此等情形下，說明手冊將包括有關用來自含有PCV2/豬肺炎黴漿菌組合之瓶之液體內含物將PRRS病毒組份再水合的指導。說明手冊亦將包括投與所得PCV2/豬肺炎黴漿菌/PRRS三價調配物之資訊。

在一些實施例中，向具有抵抗豬肺炎黴漿菌之母源性抗體之豬投與本發明免疫原性組合物。在其他實施例中，向具有抵抗豬肺炎黴漿菌與PCV2二者之母源性抗體之豬投與本發明免疫原性組合物。

在一些實施例中，向年齡為3週或更大之仔豬投與本發明多價免

疫原性組合物。然而，涵蓋本發明多價疫苗組合物亦可用於在交配前對母豬再接種疫苗。如業內已知，母豬係尚未懷孕之雌性豬。接種疫苗之母豬經由初乳將母源性抗體傳遞至其未斷奶新生幼仔。

進一步涵蓋本發明多價疫苗可用於每年對交配豬群再接種疫苗。較佳地，將本發明多價疫苗以單一劑量投與豬(例如，仔豬或母豬)。在一個實施例中，本發明多價疫苗無需在投與前混合單獨單價疫苗，即，其係以含於一瓶中之即用型PCV2/豬肺炎黴漿菌調配物形式提供。在另一實施例中，多價調配物需要混合含於第一瓶中之本發明二價疫苗與含於第二瓶中之單價疫苗。在一個實施例中，含於第二瓶中之單價疫苗包括PRRS病毒抗原。視情況，可將其他抗原添加至該等瓶中之任一者中。

在一些實施例中，免疫起始係接種本發明多價疫苗組合物後2-3週。在其他實施例中，免疫持續時間係接種本發明多價疫苗組合物後約17-23週。

以下實例闡述本發明之較佳材料及程序。然而，應理解，該等實例僅係以闡釋方式提供，且其中任何內容皆不應視為對本發明總範圍之限制。

實例

實例1：用於PCV2可組合豬肺炎黴漿菌抗原之豬肺炎黴漿菌產生方法 豬肺炎黴漿菌發酵及失活

如下製備用於接種規模及抗原產生之培養基。依照製造商指導製備自豬心獲得之胸膜肺炎樣有機體(PPLO)肉湯(BD Biosciences目錄編號為21498) (即，21 g/L)且於USP中以21 g/L製備酵母抽出物溶液。然後將酵母抽出物溶液以6.25%添加至PPLO中且藉由加熱至121°C並保持≥ 30分鐘將混合物滅菌。製備90 g/L半胱胺酸鹽酸鹽並過濾滅菌。藉由添加450 g右旋糖/升USP水製備右旋糖溶液，之後加熱滅菌。

菌。為製備最終培養基，將豬血清以10%添加至基礎培養基中，之後以0.01%添加半胱胺酸且以1.0%添加右旋糖。用10% v:v豬肺炎黴漿菌(P-5722-3株)之對數期培養物接種該培養基。使培養物保持在37°C下且將pH及dO分別維持在7.0及25%。在對數期晚期生長時，藉由自2-溴乙基胺氫溴酸鹽產生之二伸乙基亞胺(BEI) (氮丙啶化合物)將培養物失活。具體而言，藉由添加2-溴乙基胺氫溴酸鹽(BEA)至最終濃度為4 mM將pH提高至7.8並培育24小時來發生失活。藉由以1:1莫耳比添加硫代硫酸鈉、之後再培育24小時來中和BEI。將失活培養液保持在2-8°C下直至進一步處理。

實例2：嵌合豬環狀病毒(cPCV) 1-2產生方法

藉由將病原豬環狀病毒2型(PCV2)之免疫原性殼體基因選殖至非病原豬環狀病毒1型(PCV1)之基因組骨架中來構築cPCV1-2。用於構築嵌合DNA純系之程序闡述於(例如)美國專利第7,279,166號中，該專利之全文以引用方式併入本文中。自Dr. X. J. Meng, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA獲得嵌合病毒之感染性母液，且用於感染生長於補充有0.05%乳白蛋白水解產物(LAH)、30 µg/mL硫酸正大黴素(gentamicin sulfate)及5%胎牛血清之最低必需培養基(MEM)中之豬腎(PK)-15細胞。藉由使用不含有2-3%胎牛血清之相同生長培養基再連續傳代4次來進一步擴增所得經cPCV1-2感染之PK-15細胞。將第5次傳代冷凍、解凍並過濾，且使用所得溶解物來製備前母種(master seed)及後續母種。

用於產生病毒種之培養基與用於產生病毒母液之培養基相同。對於生長培養基而言，MEM、OptiMEM或等效物係可用於種植PK-15細胞系以供過度生長之基礎培養基。生長培養基可補充有至多10%牛血清、至多0.5%乳白蛋白水解產物、至多0.5%牛血清白蛋白及至多30 µg/mL正大黴素。對於病毒繁殖培養基而言，使用MEM、

OptiMEM或等效物。病毒繁殖培養基可補充有至多0.5%乳白蛋白水解產物、至多2%牛血清、至多0.5%牛血清白蛋白及至多30 µg/mL正大黴素。可視需要將至多5 g/L葡萄糖及至多5 mmol/L L-麩醯胺酸添加至生長培養基及/或病毒繁殖培養基中以維持細胞。

將cPCV1-2母種病毒添加至PK-15細胞之細胞懸浮液中並吸附至多3小時。在生長基礎培養基中稀釋種病毒以提供0.1 - 0.0001之感染複數(multiplicity of infection, MOI)。

於細胞種植時或當細胞達到約20%至50%鋪滿時，首先用病毒菌種接種PK-15細胞培養物。此初始傳代可稱作產生抗原母液之「一步感染法」，或可進一步用於連續傳代。對於連續傳代而言，藉由以1:5-20之比率連續分裂將cPCV1-2感染之PK-15細胞進一步擴增至多傳代7次以供病毒繁殖。含有前一次傳代之受感染細胞懸浮液之培養基用作下一次傳代用種材料。當細胞達到≥ 90%鋪滿時，對於每次傳代而言，在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 下將cPCV1-2感染之細胞培育三(3)至14天。cPCV1-2病毒在病毒複製期間引起可觀察到之細胞病變性變化。收穫時，觀察到細胞變圓及大量漂浮碎片。亦針對細菌或真菌污染之目視證據觀察培養物。收穫cPCV抗原之間之培育時間提供於下表1中：

表1 收穫cPCV抗原之最小及最大時間

方法	最小/最大時間	溫度範圍
一步感染	5至16天	$36 \pm 2^\circ\text{C}$
連續傳代(MSV + 3至MSV + 7)	16至36天	$36 \pm 2^\circ\text{C}$

將cPCV1-2培養液收穫至無菌器皿中並取樣以供使用已知方法進行黴漿菌測試。可自滾瓶、生物反應器及灌注器皿實施多次收穫。

在將所收穫cPCV1-2病毒失活之前，可藉由超濾濃縮(例如，至多60×)一或多個抗原批次。可用經平衡鹽溶液洗滌濃縮物以減少血清s

蛋白質。

現在將闡述將cPCV1-2病毒失活、滅毒或去毒之方法。在cPCV抗原濃縮後，將β-丙內酯(BPL)添加至所彙集cPCV1-2病毒材料中以獲得0.2% v/v之近似濃度。然後將所彙集病毒流體攪拌最少15分鐘且隨後將失活主體抗原流體轉移至第二無菌器皿中。在恆定攪拌的同時將所轉移抗原流體維持在2 - 7°C下最少24小時。在最少24小時後，將第二次添加之0.2% v/v BPL添加至所彙集懸浮液中。隨後攪拌內含物，將其轉移至第三器皿中，且在恆定攪拌的同時維持在2 - 7°C下不小於84小時之額外時間。一般而言，總失活時間不小於108小時且不超過120小時。失活方法匯總於下表2中。

表2 失活方法

失活劑	最終濃度	溫度範圍	時間-小時 (Min/Max)
β-丙內酯(BPL)	0.4% v/v (2 × 0.2% v/v 添加)	2 - 7°C (w/攪 拌)	108 - 120

藉由添加最終濃度不超過0.1 M之硫代硫酸鈉溶液來終止失活。使用NaOH或HCl將失活抗原母液之pH調節至約6.8。在失活後，自彙集物獲取代表性試樣並測試失活之完成。將失活cPCV1-2抗原產物標準化以滿足大於1.0 RP之目標，如經由效能ELISA所量測。

實例3：豬肺炎黴漿菌抗原之下游處理及該等經處理抗原之分析測試
豬肺炎黴漿菌抗原之下游處理：

針對如下各所示分組處理失活之發酵液(如上文實例1中所述製備)。下文實例4中採用該等經處理豬肺炎黴漿菌抗原。

T02：(全體) 不處理。

T03：(10× UF濃縮)經過100 KDa分子量截止膜(中空纖維)切向流過濾來濃縮。最終體積等於縮減10×。

T04及T05：(10× UF濃縮及離心)收集經濃縮黴漿菌細胞(來自T03)並使用PBS經由約20,000×g (Sorvall RC5B型)離心洗滌一次。

T06及T07：(10×離心)以約20,000×g (Sorvall RC5B)離心失活之發酵液，再將細胞再懸浮於PBS中，然後再離心洗滌一次。最終體積等於縮減10×。

T08：(10×離心及加熱)濃縮黴漿菌細胞並依照T06進行洗滌且將其加熱至65°C並保持10分鐘。

T09：(無細胞上清液)取來自如T06所述第一次離心收集之上清液經過0.2微米過濾器(Nalgene)過濾滅菌。

T10：(無細胞上清液-經蛋白質A處理)將無菌上清液(依照T09製備)與蛋白質A樹脂(Protein A Sepharose，Pharmacia公司)以10:1體積比混合4小時。經無菌過濾去除樹脂並將經過濾流體儲存在2-8°C下。此過程使用發酵後「下游」蛋白質A處理法來去除抗體及免疫複合物。儘管本發明不排除上游蛋白質A處理法，但本發明者已發現，在豬肺炎黴漿菌之情況下，生長培養基之上游蛋白質A處理法所產生之p46結果低於未經處理之培養基且不一致(數據未顯示)。

豬肺炎黴漿菌下游處理抗原之分析測試

測試下游處理豬肺炎黴漿菌抗原製劑(如上文所述製備)中豬肺炎黴漿菌特異性p46抗原之回收及PCV2抗體之存在。另外，測試該等豬肺炎黴漿菌抗原製劑中纖鍊病毒(TTV)(包括基因型1(g1TTV)及基因型2(g2TTV))之存在。結果呈現於下表3中。

表3 豬肺炎黴漿菌下游處理抗原之表徵

處理	主體豬肺炎黴漿菌	PCV2 ab	qPCR DNA	
	p46 RU/mL	S/P比率	g1TTV	g2TTV
全體	809	0.248	1.00E+03	1.78E+03

10× UF濃縮	6666	0.819	1.00E+03	9.94E+03
10× UF濃縮+ 離心	614	0.019	0	0
10×離心	763	-0.015	1.90E+02	1.91E+02
10×離心+加熱	690	-0.012	0	2.07E+02
無細胞上清液	719	0.242	4.20E+02	3.23E+03
無細胞上清液 (蛋白質A)	826	-0.014	0	2.06E+03

參照上表3，展示各豬肺炎黴漿菌下游處理抗原製劑中豬肺炎黴漿菌特異性p46抗原之回收。另外，以下處理成功地去除PCV2抗體：10× UF濃縮及離心、10×離心、10×離心及加熱以及無細胞上清液(蛋白質A處理)。就TTV而言，以下處理成功地去除g1TTV：10× UF濃縮及離心、10×離心及加熱以及無細胞上清液(蛋白質A處理)。僅命名為10× UF濃縮及離心之處理去除g2TTV。包括基因組1及2之纖鍊病毒分離物闡述於US20110150913中，該專利之全文以引用方式併入本文中。

由於業內已知蛋白質A結合IgG，因此彼等熟習此項技術者應理解，不僅PCV2抗體而且其他豬抗體(包括PRRS抗體、HPS抗體及SIV抗體)皆可藉由蛋白質A處理有效地去除。此使得本發明之無細胞蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液因缺乏抗原之間之免疫學干擾而不僅與PCV2抗原相容，且亦與其他豬抗體原相容。另外，合理地預計，去除無保護細胞碎片之及去除免疫球蛋白及抗原/免疫球蛋白複合物可達成較安全疫苗。

實例4：豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物之製備

用最終濃度為5%之愛菲金佐劑調配所有實驗豬肺炎黴漿菌疫苗。另外，用p46 ELISA將所有疫苗標準化且用硫柳汞保藏。用根據

上文處理T02-T10處理之豬肺炎黴漿菌抗原製備實驗性疫苗調配物。另外，處理T01對應於安慰劑(無豬肺炎黴漿菌抗原，僅5%愛菲金佐劑)，而處理T11係對應於基於過期菌苗之豬肺炎黴漿菌疫苗(瑞倍適-旺® (RespiSure-ONE®)，Pfizer Animal Health)之陽性對照。該等調配物闡述於下表4中。

表4 豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物

處理	IVP系列*	目標p46 單位/ds	豬肺炎黴漿菌 抗原(mL)	佐劑 (mL)	調配物體積 (mL)
T01	123639 (安慰劑)	僅5%愛菲金，無抗原			
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	過期「瑞倍適」疫苗			

*研究性獸醫產品(IVP)系列

實例5：具有來自不同下游處理之豬肺炎黴漿菌抗原之豬肺炎黴漿菌疫苗之活體內功效的評估

實施此研究以評估具有來自不同下游處理(DSP)之豬肺炎黴漿菌抗原之豬肺炎黴漿菌疫苗的活體內功效。用單劑量之闡述於上表4中之不同疫苗調配物經肌內接種3週齡豬。各處理組中包括16隻動物。在接種疫苗後21天用毒性豬肺炎黴漿菌野外分離物對動物實施攻毒。在攻毒後28天對動物實施屍體剖檢且移出肺並針對與豬肺炎黴漿菌感染一致之實變進行評分。針對豬肺炎黴漿菌攻毒進行保護之主要準則 5

係肺實變評分。人們普遍認為，在由地方性肺炎引起之肺病灶大小與對生長速率之不良效應之間有關係。下表5含有各別處理組之肺病灶評分。藉由對各組之肺評分之混合模型分析測定統計學顯著性。

表5 肺病灶結果

處理	說明	p46 RP 目標值/ 觀察值	肺病灶 %逆轉 化LS平 均值	具有病灶 之肺%範 圍	對比	p值	顯著
T01	安慰劑(5% 愛菲金)	N/A	11.7	1.2 - 44.3	N/A	N/A	N/A
T02	全體	13/15.6	1.2	0.1 - 18.5	T01對02	0	是
T03	全體 UF 10×	13/11.9	0.3	0.0 - 2.8	T01對03	0	是
T04	UF 10× + 離心	13/28.1	5.9	0.0 - 40.5	T01對04	0.1589	否
T05	UF 10× + 離心	24/48.2	3.7	0.0 - 42.3	T01對T05	0.0309	是
T06	10×離心	13/30.4	4.7	0.0 - 23.6	T01對06	0.0388	是
T07	10×離心	24/57.4	4.6	0.3 - 37.3	T01對T07	0.0323	是
T08	10×離心+ 加熱	13/17.7	4.5	0.3 - 21.7	T01對T08	0.0137	是
T09	上清液 (無細胞)	13/14.1	1.4	0.0 - 33.0	T01對T09	0.0004	是
T10	上清液+ 蛋白質A	13/12.1	3.1	0.0 - 25.8	T01對T10	0.0094	是
T11	過期RSO	13/12.5	2.2	0.1 - 32.1	T01對T11	0.0009	是

參照上表5，來自不同下游處理之豬肺炎黴漿菌抗原之結果指示，除T04外之所有實驗性疫苗皆顯著不同於安慰劑。該等豬肺炎黴漿菌病灶結果以圖表方式繪示於圖1中。如圖1中所示，T04產生不可

接受之結果。所有其他處理皆顯著不同於安慰劑(T01)。肺實變評分指示，T02、T03及T09-T11產生針對豬肺炎黴漿菌攻毒最有效之保護。

藉由使用雙抗體夾心酶聯免疫吸附分析(DAS ELISA)評價實驗性疫苗之p46相對效能。呈現於上表5中之p46 DAS ELISA結果指示，所有實驗性疫苗皆超過目標效能。另外，在一個月時期之疫苗儲存期間維持或增加p46相對效能(數據未顯示)。在除彼等經受加熱之抗原外之離心抗原中觀察到效能隨時間之感知增加。儘管不希望受任一理論限制，但在離心抗原之情況下，細胞「屍體」可能隨時間分解並釋放較多膜結合p46抗原。

實例6：對實驗豬肺炎黴漿菌疫苗與PCV2抗原之相容性之評估

實施此研究以評估具有來自不同下游處理之豬肺炎黴漿菌抗原之豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗與PCV2抗原之相容性。豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物闡述於上表4及5中。該等疫苗之所觀察p46相對效能闡述上表5中。將該等豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗各自與PCV2抗原組合。在此實例中，PCV2抗原係如上文實例2中所述製備之已殺死之PCV 1型-2型嵌合病毒(Fostera PCV)。該嵌合病毒在該組合物中之初始含量為約 $1.6 \leq RP$ ，其中RP係由PCV2 ELISA抗原定量法(活體外效能試驗)相對於有效參考疫苗所測定之相對效能單位。

藉由PCV2 ELISA評估實驗豬肺炎黴漿菌/PCV2組合調配物。結果呈現於圖2中。如圖2中所示，僅來自下列下游處理之豬肺炎黴漿菌抗原製劑與PCV2抗原相容：超濾及離心(T04及T05)、離心(T06及T07)、離心+加熱(T08)及蛋白質A處理之上清液(T10)。其中，當與包括嵌合病毒及愛菲金佐劑但不含豬肺炎黴漿菌抗原之安慰劑對照相比時，蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液與PCV2抗原最相容。相較於安慰劑之 $1.69 RP$ ，嵌合PCV病毒在蛋白質A處理之上清液中之量係

1.5 RP。因此推斷，在蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌可溶抗原製劑與嵌合病毒之PCV2抗原之間不存在或存在最低免疫學干擾。

由上文實例5中所證實蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液之活體內功效與闡述於本實例中之結果一起顯示，蛋白質A處理之上清液係有可能用於豬肺炎黴漿菌-PCV2組合之有效平臺。

實例7：對存於不同佐劑調配物中之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗之PCV2功效之評估

設計此研究以評估存於不同佐劑調配物中之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗之PCV2功效。在此實例中，PCV2抗原係已殺死之PCV 1型-2型嵌合病毒(Fostera PCV)。將嵌合病毒與實質上不含IgG之豬肺炎黴漿菌可溶抗原製劑(即，蛋白質A處理之上清液)組合。

流體之處理：

針對如下各所示組處理失活豬肺炎黴漿菌發酵流體(如上文實例1中所述)。

T02-T04：以約20,000×g (Sorvall RC5B)離心含有活豬肺炎黴漿菌細胞之全發酵流體(上文所述)並收集上清液且經由0.2 μM過濾器滅菌。將rProtein A Sepharose (部件編號為17-5199-03, GE Healthcare)裝入1L層析管柱中。在去除儲存緩衝液並用2管柱體積之1M乙酸處理後，用5管柱體積之50 mM NaPO₄/1M NaCl緩衝液(pH 7.04)平衡樹脂。使約2升經淨化/過濾之含豬肺炎黴漿菌抗原流體以100 cm/hr之流速經過蛋白質A樹脂。收集溢流物並經由0.2 μM過濾器滅菌。

T05：此係對應於Fostera PCV樣調配物(無豬肺炎黴漿菌抗原)之陽性對照。存於此Fostera PCV樣調配物中之嵌合病毒之量大約在最低免疫劑量(MID)調配含量下。嵌合病毒以類似調配含量包括在PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗中。

用不同佐劑調配物調配所有實驗性PCV2/豬肺炎黴漿菌疫苗。用

根據上文處理T02-T04處理之豬肺炎黴漿菌抗原製備實驗性疫苗調配物。另外，處理T01對應於安慰劑(無菌鹽水)。

用p46 ELISA將所有疫苗標準化並用硫柳汞保藏。

該等實驗性調配物闡述於下表6中，其中符號*指示來自全豬肺炎黴漿菌種蛋白質A處理之上清液之豬肺炎黴漿菌抗原且符號**指示研究性獸醫產品(IVP)系列。

表6 用於PCV2功效研究之PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物

處理	IVP系列**	PCV1-2 Ag	豬肺炎黴漿菌* Ag	佐劑	其他
T01	87-244-DK (安慰劑)	NA			無菌鹽水
T02	L0411RK08	1.6 RP	7.5 RP	10% SP油	NA
T03	L0411RK09			5%愛菲金	
T04	L0611RK03			5%愛菲金 +	
				5% SLCD	
T05	L0611RK04	NA	20% SLCD		

用單劑量之闡述於上表6中之不同疫苗調配物經肌內接種3週齡豬。各處理組中包括16隻動物。在接種疫苗後21天用毒性PCV2野外分離物對動物實施攻毒。

圖3係顯示利用不同佐劑平臺觀察之PCV2病毒血症結果(PCV2定量PCR)的圖。應注意，使用PCV2病毒血症作為主要功效變量。PCV2病毒血症結果係以DNA複本數/ml表示。如圖3中所示，在第28天、第35天及第42天(攻毒日為第21天)，所有處理組之病毒血症均比安慰劑組顯著減少。在第28天及第35天，10% SP油佐劑組之病毒血症比5%愛菲金組顯著減少。在第28天及第35天，5%愛菲金+5% SLCD佐劑組之病毒血症比5%愛菲金組顯著減少。在第28天、第35天及第42天，

20% SLCD佐劑平臺組之病毒血症比5%愛菲金組顯著減少。

亦監測PCV2血清學、PCV2糞便流出物、PCV2鼻流出物、細胞介導之免疫(CMI)反應、淋巴流失及免疫組織化學(IHC)作為次要功效變量。現在將於下文闡述該等結果。

圖4係顯示第1天、第20天及第42天研究(攻毒日為第21天)之PCV2 ELISA結果的圖。各試樣之狀態係以試樣對陽性之比率(S/P)表示。如圖4中所示，在第20天及第42天，20% SLCD係唯一顯著不同於安慰劑(T01)之處理。此外，在第20天，5%愛菲金係唯一與安慰劑無顯著不同之處理。

圖5係顯示利用T02-T04處理相對於安慰劑(T01)獲得之PCV2糞便流出物之圖。該等結果係以PCV2 DNA複本數/ml表示。圖5中之結果指示，在第42天，所有處理組之糞便流出物均比安慰劑組顯著減少。另外，在第42天，5%愛菲金及5% SLCD (T04)組之糞便流出物均比5%愛菲金(T03)顯著減少。未注意到其他處理差異。

圖6係顯示利用T02-T04處理相對於安慰劑(T01)獲得之PCV2鼻流出物之圖。該等結果係以PCV2 DNA複本數/ml表示。圖6中之結果指示，在第42天，所有處理組之鼻流出物均比安慰劑顯著減少。另外，在第42天，20% SLCD (T05)組之鼻流出物比5%愛菲金 (T03)組顯著減少。未注意到其他處理差異。

圖7 (A及B)為兩個圖，其顯示量測PCV2特異性細胞介導之免疫(CMI)反應之干擾素- γ (IFN- γ)測試結果。CMI結果顯示接種疫苗後/攻毒前(圖7A)及接種疫苗後/攻毒後(圖7B)。在該等圖中， 5×10^6 個細胞之刺激視為顯著(...)。所有PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗在接種疫苗後皆產生可檢測IFN- γ 反應。10% SP油(T02)在接種疫苗後驅使最強IFN- γ 反應。20% SLCD (T05)誘導較早期反應，但在第20天反應最低。仍有大的攻毒後反應，尤其出現在安慰劑組中。另外，接種疫苗

豬處理組之攻毒後反應低於安慰劑組。

下表7顯示利用與安慰劑對比之實驗性處理獲得之淋巴流失。

表7 PCV2組織病理學(淋巴流失)

處理	淋巴流失			對比安慰劑	
	陽性	陰性	始終陽性%	P值	顯著
安慰劑	9	7	56%	NA	NA
10% SP油	1	15	6%	0.0059	是
5%愛菲金	1	15	6%	0.0059	是
5%愛菲金+5% SLCD	0	16	0%	0.0008	是
20% SLCD	1	15	6%	0.0059	是

呈現於上表7中之結果顯示，所有疫苗皆提供針對淋巴流失之強保護。此外，未觀察到統計學顯著之疫苗處理反差。

下表8顯示利用與安慰劑對比之實驗性處理獲得之免疫組織化學。

表8 PCV2組織病理學(免疫組織化學)

處理	免疫組織化學			對比安慰劑	
	陽性	陰性	始終陽性%	P值	顯著
安慰劑	12	4	75%	NA	NA
10% SP油	0	16	0%	0.0001	是
5%愛菲金	1	15	6%	0.0002	是
5%愛菲金 +5% SLCD	0	16	0%	0.0001	是
20% SLCD	0	16	6%	0.0001	是

上表8中呈現之結果顯示，所有疫苗皆提供針對PCV2定殖之強保護，如藉由免疫組織化學所證明。此外，未觀察到統計學顯著之疫苗處理反差。

總之，此實例中呈現之結果證實，豬肺炎黴漿菌可溶抗原製劑不會干擾PCV2功效。結果亦顯示，所有PCV/豬肺炎黴漿菌實驗性疫

苗調配物皆提供抗PCV2攻毒之功效。另外，結果指示，存在利用不同佐劑調配物獲得之一些統計學及數值差異，其中10% SP油產生最強功效。

實例8：對與不同佐劑調配物組合之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗之豬肺炎黴漿菌功效之評估

設計此研究以評估具有不同佐劑調配物之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗之豬肺炎黴漿菌功效。將豬肺炎黴漿菌抗原與豬環狀病毒(1型-2型嵌合體或PCV1-2死病毒)組合於一瓶中。

流體之處理：

針對如下各所示組處理失活豬肺炎黴漿菌發酵流體(如上文實例1中所述)。

T02-T04：該等處理與彼等針對上文實例7中之處理組T02-T04所述者相同。

T05：用如上文實例1中在標題「發酵及失活」下方所述失活豬肺炎黴漿菌細胞(豬肺炎黴漿菌菌苗)調配此流體。

用不同佐劑調配物調配所有實驗性PCV2/豬肺炎黴漿菌疫苗。用根據處理T02-T04處理之豬肺炎黴漿菌抗原製備實驗性疫苗調配物。另外，處理T01對應於安慰劑(無菌鹽水)。處理T05係對應於過期瑞倍適®疫苗之陽性對照，該疫苗係基於豬肺炎黴漿菌菌苗之疫苗(Pfizer Animal Health)。

該等實驗性調配物闡述於下表9中，其中符號*指示來自全豬肺炎黴漿菌種蛋白質A處理之上清液之豬肺炎黴漿菌抗原且符號**指示研究性獸醫產品(IVP)系列。

表9 用於豬肺炎黴漿菌功效研究之存於不同佐劑調配物中之PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物

處理	IVP系列**	PCV1-2 Ag	豬肺炎黴漿菌* Ag	佐劑	其他
T01	87-244-DK (安慰劑)	NA			無菌鹽水
T02	L0411RK08	1.6 RP	7.5 RP	10% SP油	NA
T03	L0411RK09			5%愛菲金	
T04	L0611RK03			5%愛菲金 +	
T05	A827870	過期「瑞倍適」疫苗			

用單劑量之闡述於上表9中之不同疫苗調配物經肌內接種3週齡豬。安慰劑組與10% SP油組二者中皆包括14隻動物，陽性對照組中包括13隻動物，且5%愛菲金組與5%愛菲金+ 5% SLCD組二者中皆包括16隻動物。

在接種疫苗後21天用毒性豬肺炎黴漿菌野外分離物對動物實施攻毒。在攻毒後28天對動物實施屍體剖檢且移出肺並針對與豬肺炎黴漿菌感染一致之實變進行評分。下表10含有各別處理組之肺病灶評分。藉由對各組之肺評分之混合模型分析測定統計學顯著性。

表10 豬肺炎黴漿菌肺病灶

處理	動物數	LS平均肺病灶	肺病灶%範圍
安慰劑(T01)	14	13.1%	0.1 - 50.5
10% SP油(T02)	14	4.3%	0.0 - 50.8
5%愛菲金(T03)	16	4.7%	0.0 - 38.5
5%愛菲金+5% SLCD (T04)	16	12.0%	0.1 - 55.8
過期RSO (T05)	13	2.28%	0.0 - 34.5

如上表10中所示，安慰劑組與10% SP油及5%愛菲金處理組(其分別具有4.3%及4.7%之平均肺評分)相比具有13.1%之平均肺病灶評分。

10% SP油與5%愛菲金調配物二者皆減少及/或預防肺病灶。因此，用10% SP油或5%愛菲金調配之實驗性PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗視為有效。PCV2抗原似乎不會干擾該等調配物之豬肺炎黴漿菌功效。

相比之下，5%愛菲金+ 5% SLCD組具有12.0%之平均肺病灶評分，此係不可接受之結果，此乃因其與安慰劑相比並無不同。因此，用5%愛菲金+ 5% SLCD調配之實驗性PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗不視為有效。

應注意，由於動物數減少及肺病灶評分之高可變性，因此在此研究中不能決定性地證實統計學處理效應。出於此原因，決定將設計另一研究以測試10% SP油中之PCV/豬肺炎黴漿菌實驗性調配物之豬肺炎黴漿菌功效。此重複研究呈現於以下實例9中。

實例9：對存於10% SP油中之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗之豬肺炎黴漿菌功效之評估

此研究係概念驗證設計，用以評估藉由利用蛋白質A去除IgG之不同豬肺炎黴漿菌製造方法製備之4種實驗性PCV2/豬肺炎黴漿菌疫苗(下表11中之系列L0711RK11、L0711RK12、L0711RK13及L0711RK14)與利用標準豬肺炎黴漿菌製造方法製備之對照疫苗相比之豬肺炎黴漿菌部分功效。該4種實驗性PCV2/豬肺炎黴漿菌疫苗中之每一者皆包括10% SP油作為佐劑。

流體之處理：

T02：如上文實例1中在「發酵及失活」下方所述失活豬肺炎黴漿菌抗原。

T03及T04：用如上文實例1中在「發酵及失活」下方所述失活豬肺炎黴漿菌細胞調配。

T05：蛋白質A處理用於生長豬肺炎黴漿菌之培養基。依照製造商指導(即，21 g/L)製備PPLO (自豬心獲得)且於USP中以21 g/L製備

酵母抽出物溶液。將酵母抽出物溶液以6.25%添加至PPLO中且藉由加熱至121°C並保持≥ 30分鐘將混合物滅菌。製備90 g/L半胱胺酸鹽酸鹽並過濾滅菌。藉由添加450 g右旋糖/升USP水製備右旋糖溶液，之後加熱滅菌。為製備最終培養基，將豬血清以10%添加至基礎培養基中，之後以0.01%添加半胱胺酸且以1.0%添加右旋糖。藉由用蛋白質A處理來去除完全PPLO培養基中之抗體。簡言之，將1升rProtein A Sepharose (部件編號為17-5199-03 GE Healthcare)裝入玻璃管柱(10 × 11.5 cm)中。在去除儲存緩衝液後，用2管柱體積之1M乙酸處理管柱。用5管柱體積之50 mM NaPO₄、1M NaCl緩衝液(pH 7.0)平衡樹脂。以140 cm/小時之線性流速將15升完全PPLO培養基加載至樹脂上。收集管柱溢流物且經由0.2微米過濾器(Sartorius)過濾滅菌。使用經處理培養基來繁殖如在上文「發酵及失活」下方所述豬肺炎黴漿菌細胞。將全失活培養物(包括細胞)調配成最終疫苗。

T06：如上文實例1中在「發酵及失活」下方所述製備失活豬肺炎黴漿菌細胞。將失活之發酵液以約20,000 ×g (Sorvall RC5B)離心30 min，且經由0.2 μM過濾器將上清液滅菌。將115 ml rProtein A樹脂(部件編號為12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare)裝入層析管柱(5 × 6 cm)中。在去除儲存緩衝液並用2管柱體積之1M乙酸處理後，用5管柱體積之50 mM NaPO₄/1M NaCl緩衝液(pH 7.01)平衡樹脂。使約1.2升經淨化/過濾之含豬肺炎黴漿菌抗原流體以120 cm/hr之流速經過樹脂。收集溢流物並經由0.2 μM過濾器滅菌。

T07：如上文實例1中在「發酵及失活」下方所述製備失活豬肺炎黴漿菌細胞。藉由經由切向流過濾使失活之發酵液淨化。簡言之，用0.5 N氫氧化鈉溶液將標稱孔徑為0.2 μM之聚醚砜過濾器(GE HealthCare，部件編號為56-4102-71)消毒，之後用無菌USP水充分沖洗。將失活黴漿菌培養液引入再循環速率定為14.6 L/分鐘且跨膜壓為5

2-3.4 PSI之裝置中。在室溫下實施淨化。收集過濾滲透物且將其儲存在2-8°C下直至進一步處理。將115 ml rProtein A樹脂(部件編號為12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare)裝入層析管柱(5 × 6 cm)中。在去除儲存緩衝液並用2管柱體積之1M乙酸處理後，用5管柱體積之50 mM NaPO₄/1M NaCl緩衝液(pH 7.01)平衡樹脂。使約2.3升經淨化/過濾之含豬肺炎黴漿菌抗原流體以120 cm/hr之流速經過樹脂。收集溢流物並經由0.2 μM過濾器滅菌。

T08：如上文在「發酵及失活」下方所述製備失活豬肺炎黴漿菌細胞。將失活之發酵液以約20,000 ×g (Sorvall RC5B)離心30 min，且經由0.2 μM過濾器將上清液滅菌。將115 ml rProtein A Sepharose (部件編號為17-5199-03 GE Healthcare)裝入層析管柱(5 × 6 cm)中。在去除儲存緩衝液並用2管柱體積之1M乙酸處理後，用5管柱體積之50 mM NaPO₄/1M NaCl緩衝液(pH 7.01)平衡樹脂。使約1.2升經淨化/過濾之含豬肺炎黴漿菌抗原流體以120 cm/hr之流速經過樹脂。收集溢流物並經由0.2 μM過濾器滅菌。

用根據上文處理T02-T08處理之豬肺炎黴漿菌抗原製備實驗性疫苗調配物。T02、T03及T04對應於陽性對照。另外，處理T01對應於安慰劑(無菌鹽水)。

該等實驗性調配物闡述於下表11中。豬肺炎黴漿菌抗原對應於來自全豬肺炎黴漿菌種蛋白質A處理之上清液之豬肺炎黴漿菌抗原。「蛋白質A處理」欄中之資訊指示，豬肺炎黴漿菌上清液在發酵之前或之後是否用蛋白質A處理。

表11 用於豬肺炎黴漿菌功效研究之存於SP油佐劑中之PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物

處理	系列號	PCV1-2 Ag	豬肺炎黴 漿菌 Ag	蛋白質 A處理	上清液淨 化方法	蛋白質A 品牌	佐劑	其他
T01	L0311AS11	NA						無菌 鹽水
T02	A828718	NA	13	過期瑞倍適旺			愛菲金	NA
T03	L0711RK09	1.5 RP	7.5 RP	無蛋白質A處理且具有PCV-2之豬肺炎黴漿菌			10% SP 油	
T04	L0711RK10	NA		無蛋白質A處理且無PCV-2之豬肺炎黴漿菌				
T05	L0711RK11	1.5 RP		之前	NA	Sepharose		
T06	L0711RK12			之後	離心	MABSelect		
T07	L0711RK13			之後	過濾	MABSelect		
T08	L0711RK14			之後	離心	Sepharose		

用單劑量之闡述於上表11中之不同疫苗調配物經肌內接種3週齡豬。各處理組中包括有18頭豬。

在接種疫苗後21天用毒性豬肺炎黴漿菌野外分離物對動物實施攻毒。在攻毒後28天對動物實施屍體剖檢且移出肺並針對與豬肺炎黴漿菌感染一致之實變進行評分。圖8 (A及B)顯示各別處理組之肺病灶評分。藉由對各組之肺評分之混合模型分析測定統計學顯著性。

圖8A及8B中繪示之肺病灶結果指示，在所有處理中，僅兩個(T07及T08)之100%豬在<5%肺病灶分類中。應注意，在此研究中觀察到強統計學差異。

本實例中之結果證實採用蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液且

利用SP油作為佐劑之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性調配物的顯著豬肺炎黴漿菌功效。另外，上文實例7證實採用蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液且利用SP油作為佐劑之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌調配物的PCV2功效。總之，已在採用蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合中證實豬肺炎黴漿菌功效與PCV2功效二者。

實例10：實驗性PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗之活體內安全性

實施此研究以評估以最大抗原劑量在各種佐劑調配物中調配之實驗性PCV2-豬肺炎黴漿菌疫苗在宿主動物(當於最小年齡(3週齡)給予時)中之活體內安全性。基於溫度、注射部位反應及臨床觀察評估不同佐劑平臺以確定該等平臺中之哪一個提供可接受之安全性特徵。因具有藉由此研究組及其他觀察到之注射部位反應之歷史問題而使用20% SLCD/10% SP油調配物作為陽性(「不安全」)對照。

流體之處理：

用如實例1中在「發酵及失活」下方所述失活豬肺炎黴漿菌抗原製備所有疫苗。使用豬肺炎黴漿菌全體抗原，此乃因已知其含有可溶及不可溶豬肺炎黴漿菌抗原，以及將在蛋白質A處理後去除之免疫球蛋白及免疫複合物。可合理地推斷，去除不可溶細胞碎片及免疫球蛋白及免疫複合物將僅進一步增強疫苗調配物之安全性。此研究之意圖係嚴格地測試含有PCV2抗原及豬肺炎黴漿菌抗原之各種佐劑調配物之安全性。以最大釋放量調配PCV2及豬肺炎黴漿菌抗原以進一步評價安全性。該等實驗性調配物闡述於下表12中。IVP指示研究性獸醫產品(IVP)。

表12 用於安全性研究之PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性疫苗調配物

IVP系列	PCV1-2 Ag	豬肺炎黴漿菌* Ag	佐劑	其他	最小疫苗 體積(mL)
87-244-DK (安慰劑)	NA			無菌 鹽水	NA
L0411RK15	7.8 RP	13 RP	10% SP油	NA	200
L0411RK16			5%愛菲金		200
L0611RK05			5%愛菲金 + 5% SLCD		200
L0611RK06			20% SLCD + 10% SP油		200

*豬肺炎黴漿菌抗原=來自全豬肺炎黴漿菌種(全體抗原)。

用於此研究中之安全性參數係直腸溫度特徵及注射部位反應。此研究之結果指示，所有候選佐劑平臺皆在直腸溫度特徵及臨床觀察方面提供可接受之安全性特徵(結果未顯示)。僅20% SLCD + 10% SP油(即，陽性對照)顯著不同於安慰劑疫苗且具有多個嚴重注射部位反應(結果未顯示)。

實例11：用於關鍵研究之蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌抗原之製備

圖9係顯示用於製備PCV2相容性蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌抗原之製造方法之一個實施例的流程圖。經由切向流過濾自豬肺炎黴漿菌之失活全培養物淨化細胞。簡言之，用0.5 N氫氧化鈉溶液將標稱孔徑為0.45 μM 之聚醚砜過濾器(GE Healthcare，部件編號為56-4102-49)消毒，之後用無菌USP水充分沖洗。將失活黴漿菌培養液引入再循環速率定為11.0 L/分鐘且跨膜壓為約5 PSI之裝置中。在室溫下實施淨化。收集過濾滲透物且將其儲存在2-8°C下直至進一步處理。

在淨化後，用蛋白質A樹脂處理含抗原流體以降低抗體含量。簡言之，將MAbSelect蛋白質A樹脂(GE Healthcare)裝入玻璃管柱中至高

度為12 cm。用5管柱體積之50 mM磷酸鈉、250 mM NaCl緩衝液(pH 7.0)平衡樹脂。將等效於10管柱體積之含抗原流體以100 cm/小時之線性流速加載至樹脂上。收集管柱溢流物且經由0.2微米過濾器過濾滅菌。藉由流動3管柱體積之25 mM乙酸鹽溶液(pH 3.7)、之後4管柱體積之1M乙酸溶液達成管柱之再生。分別經由PCV2特異性抗體ELISA及p46抗原量化ELISA量測最終抗原流體中抗PCV2抗體及豬肺炎黴漿菌抗原之含量。

實例12：在肌內投與存於10% SP油中之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗後PCV1-2嵌合部分之功效

設計此實例中呈現之研究以評估實驗性單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗之PCV1-2嵌合體死病毒部分之功效，該疫苗向 21 ± 3 天齡豬投與一次且該豬於約6週齡時用毒性PCV2分離物攻毒。

用最高傳代抗原調配4種抗原劑量不同但平衡之實驗性二價PCV1-2/豬肺炎黴漿菌疫苗及一種實驗單價豬肺炎黴漿菌(陰性對照)疫苗。如上文實例11中所述製備豬肺炎黴漿菌抗原對照批次。PCV2抗原係如上文實例2中所述製備之已殺死之cPCV1-2抗原。在將嵌合病毒失活之前，將PCV2抗原批次濃縮 $20\times$ 且用經平衡鹽溶液洗滌濃縮物。使用10% SP油作為佐劑來處理最終實驗性疫苗調配物。該等實驗性調配物闡述於下文及表13中，其中提供抗原劑量(PCV2及豬肺炎黴漿菌抗原批次之%)。

T01：無PCV 1型-2型嵌合體死病毒部分(0%)之豬肺炎黴漿菌抗原(14.1%-高)之實驗性製劑(L1211RK11)。此對應於陰性對照(單價豬肺炎黴漿菌)。

T02：高傳代PCV 1型-2型嵌合體死病毒(1.375%-高)及豬肺炎黴漿菌抗原(14.1%-高)之實驗性製劑(L1211RK09)。

T03：高傳代PCV 1型-2型嵌合體死病毒(0.688%-中)及豬肺炎黴

漿菌抗原(9.4%-中)之實驗性製劑(L1211RK15)。

T04：高傳代PCV 1型-2型嵌合體死病毒(0.344%-低)及豬肺炎黴漿菌抗原(4.7%-低)之實驗性製劑(L0112RK03)。

T05：高傳代PCV 1型-2型嵌合體死病毒(0.172%-極低)及豬肺炎黴漿菌抗原(2.32%-極低)之實驗性製劑(L1211RK17)。

表13實驗設計

組	N	CP或IVP ¹	接種疫苗				
			系列號/ 批號	抗原劑量(PCV2/豬 肺炎黴漿菌)	佐劑	劑量	途徑
T01	24	安慰劑	L1211RK11	無/高	10% SP油	2 mL	IM， 右頸
T02	24	PCV2-豬肺 炎黴漿菌	L1211RK09	高/高			
T03	24	PCV2-豬肺 炎黴漿菌	L1211RK15	中/中			
T04	24	PCV2-豬肺 炎黴漿菌	L0112RK03	低/低			
T05	24	PCV2-豬肺 炎黴漿菌	L1211RK17	極低/極低			

¹ IVP = 豬環狀病毒1型-2型嵌合體(PCV2)死病毒疫苗-豬肺炎黴漿菌細菌提取物
CP = 利用SP油10%作為佐劑處理之豬肺炎黴漿菌細菌提取物(無豬環狀病毒1型-2型嵌合體部分)

IM = 經肌內

在第0天(3週齡)，藉由在研究中募集之各豬右頸中進行IM注射來投與單一2 mL劑量之指派疫苗。在接種疫苗後未觀察到不良事件。在攻毒前每週自所有豬收集血清試樣。自研究去除在攻毒前檢測出PCV2病毒血症之任何豬。在攻毒前一天，收集糞便拭子及血清試樣。隨後用PCV2a攻毒病毒對豬實施攻毒。在接種疫苗後約3週(第21天)實施攻毒。將總共3 mL (2 mL經鼻內及1 mL經肌內) PCV2a攻毒病

毒(分離物編號為40895，預稀釋至 $5.10 \log_{10}$ FAID₅₀/mL)接種於各豬之左頸中。在攻毒後滴定攻毒病毒之保留等分試樣以確認實際攻毒劑量。將未經稀釋主體預稀釋2倍且回復滴定結果達成 $5.10 \log_{10}$ FAID₅₀/mL攻毒量。在屍體剖檢前，在3週攻毒階段期間每週收集血清及糞便拭子。在攻毒後3週，將所有豬無痛致死並實施屍體剖檢。連同4種不同淋巴組織一起收集血清試樣及糞便拭子。在屍體剖檢期間，收集各豬之三種淋巴結(氣管枝氣管、腸繫膜、腹股溝)及扁桃腺之切片且進行個別地鑑別並固定在10%緩衝福馬林溶液中。測試結果提供於下文。

疫苗效能測試

上述L1211RK15 PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗系列視為參照候選物。因此，相對於此候選參照物測定豬肺炎黴漿菌部分與PCV2部分二者之相對效能。該等結果呈現於下表14中。系列L1211RK11對應於安慰劑(無PCV2部分)。

表14效能結果

系列	參照L1211RK15	
	豬肺炎黴漿菌效能	PCV效能
L1211RK11	1.57	0.00
L1211RK09		2.08
L1211RK15		1.05
L0112RK03		0.56
L1211RK17		0.27

針對各系列所示之結果係所有所測試重複之平均值。

PCV2病毒血症

在攻毒後，當與安慰劑組比較時，所有接種疫苗組皆具有病毒血症豬百分比之顯著降低[$P \leq 0.05$]，且在整個研究中處理組(T02-T05)中至少有47%之豬保持PCV2病毒血症為陰性(下表15)。類似地，所有

疫苗組在攻毒後皆具有顯著低於安慰劑組($P=0.0001$)之PCV2 DNA複本數(數據未顯示)。

表15 qPCR定量血清病毒血症-始終陽性百分比及預防分數估計值

Trt	疫苗	始終陽性?				總觀察	P值
		陽性		陰性			
		數目	%	數目	%	數目	
T01	L1211RK11	23	95.8	1	4.2	24	
T02	L1211RK09	2	8.3	22	91.7	24	<0.0001
T03	L1211RK15	7	31.8	15	68.2	22	0.0006
T04	L0112RK03	12	52.2	11	47.8	23	0.0063
T05	L1211RK17	7	29.2	17	70.8	24	0.0004

PCV2糞便流出

攻毒後糞便拭子揭示，83.3%安慰劑組豬(T01)之PCV2糞便流出為陽性。相比之下，所有疫苗組(T02-T05)皆具有豬流出PCR可檢測PCV2 DNA百分比之顯著降低($P\leq 0.0061$)。該等結果呈現於下表16中。類似地，所有疫苗組在攻毒後皆具有顯著低於安慰劑組之PCV2 DNA複本數(數據未顯示)。

表16 在攻毒後(天數>21)始終存在之糞便流出

Trt	疫苗	始終存在之糞便?				總觀察	P值
		陽性		陰性			
		數目	%	數目	%	數目	
T01	L1211RK11	20	83.3	4	16.7	24	
T02	L1211RK09	6	25.0	18	75.0	24	0.0002
T03	L1211RK15	9	40.9	13	59.1	22	0.0049
T04	L0112RK03	10	43.5	13	56.5	23	0.0061
T05	L1211RK17	6	25.0	18	75.0	24	0.0002

血清抗體反應

所有豬在接種疫苗前皆為PCV2血清反應陰性。安慰劑組中之豬在攻毒前保持血清反應陰性。相比之下，當與安慰劑比較時，除T05組外之所有疫苗組中之豬在接種疫苗後第20天皆顯示PCV2抗體滴定度之顯著增加($P \leq 0.0287$)，從而指示在接種疫苗後對PCV2之活躍免疫反應。PCV2 ELISA抗體滴定度匯總於下表17中。攻毒前滴定度指示，在第7-20天T02組及T03組與T01組具有顯著差異($P \leq .0393$)且在第20天T01組與T04組之間具有顯著差異($P \leq .0287$)。在28至42天，所有疫苗組皆具有顯著高於T01之滴定度($P \leq .0129$ ；下表17)。

表17 依照研究天數實施之PCV2 ELISA S/P滴定度處理比較

對比	第-1天	第07天	第14天	第20天	第28天
T01對T02	ns	0.0229	0.0005	0.0001	<0.0001
T01對T03	ns	0.0302	0.0393	0.0060	<0.0001
T01對T04	ns		ns	0.0287	<0.0001
T01對T05	ns		ns	ns	<0.0001
對照	第35天	第42天			
T01對T02	<0.0001	0.0056			
T01對T03	<0.0001	0.0024			
T01對T04	<0.0001	0.0114			
T01對T05	<0.0001	0.0129			

*當對比顯著(≤ 0.05)時，報告P值，P值> 0.05命名為ns (不顯著)

淋巴病灶及定殖

在屍體剖檢時，當與安慰劑組比較時，所有接種疫苗組在組織中檢測到之PCV2抗原總量皆顯著降低。有關淋巴組織中PCV2感染之數據(IHC評分)匯總於下表18中。如表18中所示，所有疫苗組皆具有顯著低於T01安慰劑組之IHC評分。

表18 PCV2 IHC評分：淋巴或扁桃腺組織是否始終異常

處理	LSM	與L12111RK11相比 P值
L1211RK11	0.75	
L1211RK09	0.15	0.0003
L1211RK15	0.30	0.0055
L0112RK03	0.34	0.0106
L1211RK17	0.41	0.0273

*若在任何淋巴組織或扁桃腺試樣中評分> 0，則將動物視為異常。

所有接種疫苗組亦皆顯示PCV2淋巴流失之顯著減少，如下表19中所示。

表19 PCV2淋巴流失：淋巴或扁桃腺組織是否始終異常

處理	LSM	與L12111RK11相比 P值
L1211RK11	0.48	
L1211RK09	0.04	0.0053
L1211RK15	0.13	0.0181
L0112RK03	0.08	0.0069
L1211RK17	0.11	0.0116

*若在任何淋巴組織或扁桃腺試樣中評分> 0，則將動物視為異常。

另外，所有接種疫苗組皆顯示組織細胞更換之顯著減少，如下表20中所示。

表20 PCV2組織細胞更換：淋巴或扁桃腺組織是否始終異常

處理	LSM**	與L12111RK11相比 P值
L1211RK11	ND	

處理	LSM**	與L1211RK11相比 P值
L1211RK09	ND	0.0006
L1211RK15	ND	0.0098
L0112RK03	ND	0.0098
L1211RK17	ND	0.0173

*若在任何淋巴組織或扁桃腺試樣中評分> 0，則將動物視為異常。

**因不收斂性而使用費雪精確測試(Fisher exact test)，因此未測定最小二乘均數(ND)。

此實例中呈現之數據指示疫苗組：

顯著保護且有助於預防攻毒後PCV2病毒血症；

顯著有助於預防所有接種疫苗動物在攻毒後從糞便中流出PCV2；

在第T02-T05組中在接種疫苗後28天誘發統計學顯著之血清學反應。另外，當與T01比較時，T02及T03早在接種疫苗後7天即顯示統計學顯著之反應；

顯著減少所有接種疫苗動物之微觀病灶(淋巴流失及組織細胞更換)；且

所有疫苗皆證明有效並選擇疫苗系列L1211RK15作為參照候選物。

實例13：在肌內投與存於10% SP油中之單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌組合疫苗後豬肺炎黴漿菌部分之功效

此實例中呈現之研究目標係評估實驗性豬環狀病毒(PCV)1型-2型嵌合體死病毒-豬肺炎黴漿菌細菌提取物之豬肺炎黴漿菌部分之功效，該提取物經肌內向 21 ± 3 天齡豬投與一次且該等豬於接種疫苗後7週用豬肺炎黴漿菌之毒性肺均質物攻毒。

調配4種抗原劑量不同但平衡之實驗性二價PCV1-2/豬肺炎黴漿菌疫苗及一種實驗單價PCV2 (陰性對照)疫苗。如上文實例11中所述製備豬肺炎黴漿菌抗原對照批次。PCV2抗原係如上文實例2中所述製備之已殺死之cPCV1-2抗原。在將嵌合病毒失活之前，將PCV2抗原批次濃縮20×且用經平衡鹽溶液洗滌濃縮物。使用10% SP油作為佐劑來處理最終實驗性疫苗調配物。該等實驗性調配物闡述於下文及下表21中，其中提供抗原劑量(PCV2及豬肺炎黴漿菌抗原批次之%)。

T01：無豬肺炎黴漿菌部分(0%)之高傳代PCV 1型-2型嵌合體死病毒(1.375%-高)之實驗性製劑(L1211RK10)。此對應於陰性對照(單價PCV2)。

T02：高傳代PCV 1型-2型嵌合體死病毒(1.375%-高)及豬肺炎黴漿菌抗原(14.1%-高)之實驗性製劑(L1211RK09)。

T03：高傳代PCV 1型-2型嵌合體死病毒(0.688%-中)及豬肺炎黴漿菌抗原(9.4%-中)之實驗性製劑(L1211RK15)。

表21 實驗設計

組	N	CP或IVP ¹	接種疫苗				
			系列號/批號	抗原劑量RP (PCV2/豬肺炎 黴漿菌)	佐劑	劑量	途徑
NTX	9	哨兵(Sentinel)	NA	無接種疫苗			
T01	38	安慰劑-PCV2	L1211RK10	高/無	10% SP油	2 mL	IM， 左頸
T02	38	PCV2-豬肺炎 黴漿菌	L1211RK09	高/高			
T03	38	PCV2-豬肺炎 黴漿菌	L1211RK15	中/中			

¹ IVP = 研究性獸醫產品=豬環狀病毒1型-2型嵌合體(PCV2)死病毒疫苗-豬肺炎黴漿菌細菌提取物

CP =對照產品=利用SP油10%作為佐劑處理之已殺死之嵌合PCV 1-2部分(無豬

肺炎黴漿菌部分)

IM = 經肌內

在第0天，在此研究中募集123頭3週齡臨床健康之易感豬。藉由窩將豬分類且隨機指派至哨兵(NTX)組或三個處理組(T01-T03)中之一者；經肌內向該等豬投與2 mL最低免疫劑量(MID)之實驗性PCV1-2/豬肺炎黴漿菌疫苗、略高於MID之劑量之實驗性PCV1-2/豬肺炎黴漿菌疫苗或僅MID之含有PCV1-2之安慰劑。在接種疫苗後7週，將哨兵豬無痛致死並實施屍體剖檢以確認不存在豬肺炎黴漿菌且用活毒性豬肺炎黴漿菌肺均質物對所有經處理豬實施兩次攻毒(連續兩天)。在攻毒後4週，將所有剩餘豬無痛致死並實施屍體剖檢。在屍體剖檢時，針對豬肺炎黴漿菌之典型病灶對肺進行評分。攻毒後肺病灶係主要結果變量。若緩解分數的95%信賴區間的下限 > 0，則將接種疫苗視為有效。

疫苗效能測試

上述L1211RK15 PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗系列視為參照候選物。因此，相對於此候選參照物測定用於此豬肺炎黴漿菌功效研究中之豬肺炎黴漿菌部分與PCV2部分二者之相對效能。該等結果呈現於下表22中。系列L1211RK10對應於安慰劑(無豬肺炎黴漿菌部分)。

表22效能結果

系列	參照L1211RK15	
	豬肺炎黴漿菌 ¹ 效能	PCV效能 ²
L1211RK10	0.00	2.33
L1211RK09	1.48	2.20
L1211RK15	1.00	1.07

針對各系列所示之結果係所有所測試重複之平均值。

¹ 以5個重複測試之豬肺炎黴漿菌效能。

² 以一個重複(L1211RK10)或5個(L1211RK09、L1211RK15)重複測試之PCV效能。

血清學

豬肺炎黴漿菌抗體滴定度指示，所有豬在第0天皆為血清學豬肺炎黴漿菌陰性且在攻毒前保持陰性。在接種疫苗後所有時間點(第21天、第47天及第75天)，T02及T03與T01相比具有顯著更高($P \leq 0.0004$)之幾何最小二乘均數豬肺炎黴漿菌抗體滴定度(血清學數據未顯示)。

具有病灶之肺之總百分比

藉由處理來計算各肺葉之肺病灶評分之頻率分佈。使用下式來計算具有病灶之肺之總百分比：具有病灶之肺之總百分比 = $\{(0.10 \times \text{左前}) + (0.10 \times \text{左中}) + (0.25 \times \text{左尾}) + (0.10 \times \text{右前}) + (0.10 \times \text{右中}) + (0.25 \times \text{右尾}) + (0.10 \times \text{附件})\}$ 。在分析前將反正弦平方根變換應用於具有病灶之肺之總百分比。使用混合線性模型分析具有病灶之肺之總百分比。若處理效應顯著，則在處理組之間進行成對比較。計算具有病灶之肺之總百分比之逆變換最小二乘均數及其95%信賴區間以及最小值及最大值。利用分層緩解分數及95%信賴界限來概述肺病灶。肺病灶結果呈現於下表23中。

表23 對具有病灶之肺之總百分比之分析

最小二乘均數之匯總						
組	系列	N	具有病灶之肺 % ¹	範圍		
NTX		9	0.1	0.0至0.8	緩解分數	
組	系列	N	具有病灶之肺 % ¹	範圍	對比對 T01	95% CI ⁴
T01	L1211RK10	36	6.1 ^b	0.0至32.3		
T02	L1211RK09	36	2.7 ^a	0.0至23.5	40.9	13.3至61.8
T03	L1211RK15	38	2.6 ^a	0.0至49.0	46.9	18.2至68.3

¹逆變換最小二乘均數

具有相同字母之處理組無顯著不同，P值為0.05。

在NTX豬肺中觀察到數個低百分比肺病灶，此歸因於包台拉菌在此豬群中之已知發生率。肺組織拭子上之細菌培養物確認若干豬為支氣管敗血性包台拉菌培養物陽性且豬肺炎黴漿菌培養物確認所有NTX豬在攻毒投與前皆為豬肺炎黴漿菌培養物陰性。

該方案滿足有效性準則，此乃因T01之LS平均肺病灶>4%。T02及T03之LS平均肺病灶顯著($P \leq 0.05$)低於T01且二者皆滿足95%信賴區間之下限>0之緩解分數準則。滿足對此研究之有效性要求，此乃因沒有攻毒前暴露於豬肺炎黴漿菌之證據。攻毒係有效的，此乃因安慰劑豬(T01)之逆變化平均肺病灶評分>4%。

與陰性對照組(T01)相比，處理組T02及T03與T01相比顯示具有病灶之肺之百分比之顯著降低($P \leq 0.05$)。T02及T03與T01相比之緩解分數滿足用於功效之方案準則。

在此研究之條件下，兩種疫苗(T02及T03)皆有助於緩解主要功效變量肺病灶。本實例中之結果證實單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌實驗性

調配物之顯著豬肺炎黴漿菌功效。

實例14：對針對PRRS病毒之殺病毒活性之評估

設計此實例中呈現之研究以評估各種佐劑平臺針對PRRS病毒之殺病毒活性。初始實驗僅集中於佐劑(即，調配物不含有PCV或豬肺炎黴漿菌抗原)。對佐劑之PRRS殺病毒活性之評估呈現於圖10中。初步殺病毒評價指示，10% SP油、0.2%卡波普及2.5%愛菲金對PRRS病毒不具有殺病毒性。相比之下，20% SLCD佐劑似乎對PRRS病毒具有殺病毒性。

實施其他研究以評估利用不同佐劑平臺作為佐劑處理之PCV/豬肺炎黴漿菌調配物是否對PRRS病毒不具有殺病毒性。該等結果呈現於下表24中，其中符號*指示彼等對PRRS病毒具有殺病毒性之疫苗系列。

表24 不同調配物之PRRS殺病毒分析結果

用於實例7、8、10之研究中之疫苗系列			效能		PRRS殺病毒性	
研究	說明	系列編號	p46 RP (ru/ds)	PCV2 NVSL RP	A	B
實例 7、8、10	無菌鹽水(0.9%氯化鈉)	87-244-DK (安慰劑)				
實例 7、8	cPCV (RP 1.6)+蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌(RP 7.5)，存於10% SP油中	L0411RK08	7.1	1.29	-0.10	-0.13
實例 7、8	cPCV (RP 1.6)+蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌(RP 7.5)，存於5%愛菲金中	L0411RK09	7.3	1.33	-0.10	+0.14

實例 7、8	cPCV (RP 1.6)+蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌(RP 7.5)，存於5% 愛菲金 +5% SLCD中	L0611RK03	6.9	1.15	-0.36	-0.33
實例7	單價 cPCV (RP 1.6)，存於20% SLCD中	L0611RK04		1.50	-1.86*	-0.50
實例8	過期瑞倍適旺系列	A827870	12.6			
實例10	cPCV (RP 7.8)+全體豬肺炎黴漿菌(RP 13.3)，存於10% SP油中	L0411RK15	14	1.03	-0.32	-0.03
實例10	cPCV (RP 7.8)+全體豬肺炎黴漿菌(RP 13.3)，存於5%愛菲金中	L0411RK16	15.5	1.12	-0.36	-0.53
實例10	cPCV (RP 7.8)+全體豬肺炎黴漿菌(RP 13.3)，存於5%愛菲金+ 5% SLCD中	L0611RK05	17.5	1.50	-0.54	-0.33
實例10	cPCV (RP 7.8)+全體豬肺炎黴漿菌(RP 13.3)，存於20% SLCD + 10% SP油中	L0611RK06	15.9	1.13	-1.93*	-0.99*

*指示殺病毒(>0.7 log損失)

A -殺病毒分析對照GMT為約5.53 log/mL

B -殺病毒分析對照GMT為約6.42 log/mL

上表24中呈現之結果指示，10% SP油對PRRS病毒不具有殺病毒性。

使用10% SP油作為佐劑來製備其他PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗系列(表25)。比較該等疫苗系列之抗原效能與上述參照PCV/豬肺炎黴漿菌疫苗系列(L1211RK15)。下表25中所示之結果進一步指示，10% SP油對PRRS病毒不具有殺病毒性。表25中之測試試樣值各自高於(+符號)幾何平均滴定度(GMT)為約 $5.9 \pm 0.5 \log/\text{ml}$ 之殺病毒分析對照。

表25 利用10% SP油作為佐劑處理之不同PCV/豬肺炎黴漿菌調配物之殺病毒分析結果

所用疫苗系列	系列編號	效能		PRRS 殺病毒
		p46 RP (ru/ds) 參照 L1211RK15	PCV2 NVSL 參照 L1211RK15	\log_{10} TCID ₅₀ /mL
無菌稀釋劑(無菌水)	1949122	na	na	
cPCV+蛋白質A處理 之豬肺炎黴漿菌，存 於10% SP油中	L0912RK12	1.62	2.60	+0.58
cPCV+蛋白質A處理 之豬肺炎黴漿菌，存 於10% SP油中	L0912RK10	0.88	1.23	+0.58
cPCV+蛋白質A處理 之豬肺炎黴漿菌，存 於10% SP油中	L0912RK11	1.24	2.62	+0.58
cPCV+蛋白質A處理 之豬肺炎黴漿菌，存 於10% SP油中	L0912RK08	1.08	1.03	+0.91
cPCV+蛋白質A處理 之豬肺炎黴漿菌，存 於10% SP油中	L0912RK09	1.65	2.06	+0.50

殺病毒分析對照GMT為約 $5.9 \pm 0.5 \log/ml$

此實例中呈現之結果證實，10% SP油對PRRS病毒不具有殺病毒性。此實例中呈現結果進一步證實，利用10% SP油作為佐劑處理之PCV/豬肺炎黴漿菌調配物屬於彼等視為對PRRS病毒不具有殺病毒性之疫苗系列(表24及表25)。總之，利用10% SP油作為佐劑處理之PCV/豬肺炎黴漿菌調配物視為包括PCV、豬肺炎黴漿菌及PRRS病毒之三價組合所基於之有效平臺。

實例15：PCV/豬肺炎黴漿菌/PRRS組合疫苗之製備

利用對PRRS病毒不具有殺病毒性之佐劑平臺作為佐劑處理之PCV/豬肺炎黴漿菌調配物(參見上表24及25)係以即用型單瓶式液體組合物形式提供。此單瓶式PCV/豬肺炎黴漿菌調配物採用蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液。已在採用蛋白質A處理之豬肺炎黴漿菌上清液之此等PCV2/豬肺炎黴漿菌調配物中證實豬肺炎黴漿菌功效與PCV2功效二者(參見實例7-9)。在本實例中，將此二價PCV2/豬肺炎黴漿菌調配物與單價PRRS病毒抗原組合。

在一個實施例中，存於10% SP油中且對應於上表11中之疫苗系列L0711RK11、L0711RK12、L0711RK13及L0711RK14或上表13中之L1211RK09、L1211RK15、L0112RK03及L1211RK17中之一者的PCV/豬肺炎黴漿菌組合係以即用型單瓶式液體組合物形式提供。上文實例14中呈現之結果證實，10% SP油對PRRS病毒不具有殺病毒性。實例14亦證實，利用10% SP油作為佐劑處理之PCV2/豬肺炎黴漿菌調配物屬於彼等視為對PRRS病毒不具有殺病毒性之疫苗系列。在本實例中，使用此單瓶式PCV2/豬肺炎黴漿菌液體組合物來將含於第一瓶中之經基因改造之活凍乾PRRS病毒組合物再水合，以使得所有抗原在投與適宜年齡(例如，3週齡或更大)之豬之前皆含於單一瓶中。

在一個實施例中，PRRS病毒具有對應於SEQ ID NO: 16或其變體

之基因組序列。在另一實施例中，用於三價組合物中之PRRS病毒係命名為ISU-55之PRRS病毒分離物，其以登錄號VR 2430寄存於ATCC。各別抗原之適宜量闡述於本文中。合意地，所有抗原皆係以單劑量投與豬。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商輝瑞大藥廠
葛瑞格里 尼裘爾
傑佛瑞 E 蓋爾文
基斯 蓋瑞特
詹姆士 庫拉維克 二世
翠西 里克
梅根 史穆瑟
<120> PCV/豬肺炎黴漿菌組合疫苗
<130> PC71912A

<160> 18

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1260

<212> DNA

<213> 豬肺炎黴漿菌

<400> 1

```

atgaaaaaaa tgcttagaaa aaaattcttg tattcatcag ctatttatgc aacttcgctt    60
gcatcaatta ttgcatttgt tgcagcaggt tgtggacaga cagaatcagg ttcgacttct    120
gattctaaac cacaagccga gacgctaaaa cataaagtaa gtaatgattc tattcgaata    180
gactaaccg atccgataa tcctcgatga attagtgtc aaaaagatat tatttcttat    240
gttgatgaaa cagaggcagc aacttcaaca attacaaaa accaggatgc acagaataac    300
tgactcactc agcaagctaa ttaagccca gcaccaaag gatttattat tgcccctgaa    360
aatggaagtg gagtggaac tgcgtttaat acaattgctg ataaaggaat tccgattgtt    420
gcctatgac gactaattac tggatctgat aaatatgatt ggtatgtttc ttttgataat    480
gaaaagttg gcgaattaca aggtcittca cttgcagcgg gtctattagg aaaagaagat    540
ggtgcttttg attcaattga tcaaatgaat gaatatctaa aatcacatat gccccaagag    600
acaatttctt ttatacaat cgcgggttcc caagatgata ataactcca atatttttat    660
aatggtgcaa tgaaagtact taaagaatta atgaaaaatt cgggaaataa gataattgat    720
ttatctctcg aaggcgaaaa tgcgttttat gtcccaggat gaaattatgg aactgccggt    780
caaagaatcc aatcttttct acaattaac aaagatccag caggtggtaa taaaatcaaa    840
gctgttgggt caaaaccagc ttctattttc aaaggatttc ttgcccmaa tgatggaatg    900
gccgarcaag caatcaccaa attaaaactt gaaggatttg atacccaaa aatctttgta    960
actggtcaag attataatga taaagccaaa acttttatca aagacggcga tcaaatatg   1020
acaatttata aacctgataa agtttttagga aaagttgctg ttgaagttct tcgggtttta   1080
attgcaaaga aaaataaagc atccagatca gaagtcgaaa acgaactaaa agcaaaacta   1140
ccaatatatt catttaata tgataatcaa acatataaag tgcaaggtaa aatatattaat   1200
acaattttag taagtccagt aattgttaca aaagctaag ttgataatcc tgatgcctaa   1260

```

<210> 2

<211> 419

<212> PRT

<213> 豬肺炎黴漿菌

<400> 2

Met Lys Lys Met Leu Arg Lys Lys Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Ile Tyr
1 5 10 15

201345549

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

aaaaagaaa atatttatga ctttggtaaa tacaatggaa aatcaacga ccgctttaac	1200
tcgccaatt tagaatatag cctagatgca gcaagcgcaa gcttgataa aaaagataaa	1260
tcaatagttt taattcccta cgccttgaa attaaagata aatTTTTTgc cgatgattta	1320
tatccagata caaaagataa tattctcgtt aaagaagggg ttcttaaatt aactggattt	1380
aaaaaggct caaaaattga tctcccta atcaatcagc aaTTTTTaa aaccgaatat	1440
ttaccatttt ttgaaaaagg taaagaagaa caagcaaat tagactatgg taatatctta	1500
aatccatata atactcaact tgccaaagt gaagtgaag ctctTTTTaa agggataaa	1560
aaccaagaaa tctatcaagc acttgatgga aattatgctt atgaattcgg ggcctttaaa	1620
tccgtgctta attcctgaac aggaaaaatt cagcatcctg aaaaagctga tatccaaaga	1680
ttacaagac atttagaaca agttaaatt ggttctaatt cagttttaaa tcaaccacaa	1740
acaacaaaag aacaagtaatt tcaagctt aaaagtaata actTTTTTaa aaatggacat	1800
caagttgcaa gttatttcca ggatttactc accaaggaca aattaacaatt tttagagact	1860
ctttatgatc tagcaaaaa atggggacta gaaactaaca gagcacaatt cccaaaagg	1920
gtttccaat atacaaaaga ttttttgca gaagcagata aattaaaatt tttggaattg	1980
aagaaaaagg atccttaca tcagataaaa gaaattcacc aactttcctt taatatttta	2040
gcccglaacg atgtaataaa atctgatgga ttttacggag ttttattatt gcccacaagt	2100
gtaaaaactg aattagaagg caaaaatgag gcgcaaatTT ttgaagcgt taaaaagtat	2160
tctttaattg agaactcggc ttttaaaact actattttag ataaaaattt acttgaagg	2220
actgatttta aaacctcgg tgatttttta aaagcatttt tccttaaagc agcccaattt	2280
aataatttg ctcttgagc aaaattagac gataatcttc agtattcatt tgaagctatc	2340
aaaaaagggg aaactacaaa agaaggtaaa agagaagaag tagataaaaa agttaaggaa	2400
ttggataata aaataaaagg tatattgcct cagccccag cagcaaaacc agaagcagca	2460
aaaccagtag cggctaaacc agaacaaca aaaccagtag cagctaaacc tgaagcagct	2520
aaacctgaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct	2580
aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct	2640
aaaccagaag cagcaaaacc agttgctact aatactggct tttcacttac aaataacca	2700
aaagaagact atttccaat ggcttttagt tataaattag aatatactga cgaaaataaa	2760
ttaagcctaa aaacaccgga aattaatgta tttttagaac tagttcatca aagcgagtat	2820
gaagaacaag aaataataaa ggaactagat aaaactgttt taaatcttca atatcaattc	2880
caggaagtca aggttaactag tgaccaatat cagaaactta gccaccaat gatgaccgaa	2940
ggatcttcaa atcaaggtaa aaaaagcgaa ggaactccta accaaggtaa aaaagcagaa	3000
ggcgcgcta accaaggtaa aaaagccgaa ggaactccta accaaggaa aaaagcagag	3060
ggagcaccta gtcaacaaag cccaactacc gaattacta attaccitcc tgaacttagt	3120
aaaaaattg acgaaatcat taaaaacaa ggtaaaaatt gaaaaacaga ggttgaacta	3180
atcgaggata atatcgctgg agatgctaaa ttgctatact ttatcctaag ggatgattca	3240
aatccggtg atcctaaaa atcaagtcta aaagttaaaa taacagtaaa acaaagtaat	3300
aataatcagg aaccagaatc taaa	3324

<210> 4
 <211> 1108
 <212> PRT
 <213> 豬肺炎黴漿菌

<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> 豬環狀病毒

<400> 5

ggtacctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga 60

tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggccigtattg 120

ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc 180

aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatcccaag gtaaccagcc ataaaaatca 240

tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggttc 300
 cagtaggtgt ccctaggctc agcaaaatta cgggccact ggctcttccc acaaccgggc 360
 gggcccacta tgacgigtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact 420
 ttcaaaagt cagccagccc gcggaaattt ctacatacag ttacaggaaa ctgctcggct 480
 acagtcacca aagaccccgt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc 540
 ttccccgggt tccgcggagc tccacactcg ataagtatgt ggcttcttt actgcagtat 600
 tctttattct gctggcgggt tcctttcgtt ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac 660
 cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gaaaattcg caaacccctg gaggtgagga 720
 gttctacct ctccaacc ttctcgcga caaacaat aatcaaaaag ggagatigga 780
 agtcccgtta tttgtttt ctctcctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840
 ttatgggggt gcggccgctt tttcttctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggctg 900
 ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgcact tcttctactt ttataggatg 960
 acgtatcaa ggaggcgtta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgccag 1020
 atctccgcc gccgccctg gctcgtccac cccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080
 aatggcatct tcaacaccg cctctccgc acctcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140
 gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc 1200
 ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata ccctttgat actacagaat aagaaaggtt 1260
 aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggctccact 1320
 gctgttattc tagatgataa ctttghtaaca aaggccacag ccctaacctg tgaccatata 1380
 gtaaaactact cctcccgcca tacaatcccc caacccttct cctaccactc ccgttacttc 1440
 acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaataa caaaaggaat 1500
 cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560
 ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taaccatgta tgtacaattc 1620
 agagaattta atcttaaaga cccccactt aaacctaaa tgaataaaaa taaaaccat 1680
 tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt 1740
 gggctccactg ctccaatcg gccttcgggt acc 1773

<210> 6
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 豬環狀病毒

<400> 6
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccactctggc 60
 cagatctctc gccgccgcc ctggctctgc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgctctcc cgcacctcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctctg ggcggiggac atgatgat ttaataatga cgactttgtt 240
 cccccgggag gggggacca caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300
 gtttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420
 tatgtaaact actctcccg ccatacaat cccaaccct tctctacca ctcccgttac 480

ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggaigaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 7
<211> 233
<212> PRT
<213> 豬環狀病毒
<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> 豬環狀病毒

<400> 8
 ggtacctecg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga 60
 tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcttgattg 120
 ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac ccccttiagt ctctacagtc 180
 aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca 240
 tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggtctc 300
 cagtaggigt cgctaggctc agcaaaaata cgggccact ggctcttccc acaaccgggc 360
 gggcccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact 420
 ttcaaaagtt cagccagccc gcggaattt ctacatacg ttacaggga ctgctcggct 480
 acagtcacca aagaccccg tcccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc 540
 ttccccggg tccgcgaggc tccacactcg ataagtaigt ggcttcttt actgcagtat 600
 tctttattct gctggtcggg tctttcgtt ttctcgtat ggcagcgggc accaaaatac 660
 cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga 720
 gttctaccct ctccaaacc ttctctccg caaacaaaat aatcaaaaag ggagattgga 780
 agctcccgta ttttgtttt ctctctctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840
 ttatgggggt gcggggcgt tttctgctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggtgctg 900
 ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgcact tctttcactt ttataggatg 960
 acgtatccaa ggaggcgta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttggccag 1020
 atctctcgcc gccgcccctg gctcgtccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080
 aatggcatct tcaacaccg cctctcccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140
 gtcagaacgc cctctggggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc 1200
 ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata cctttgaa actacagaat aagaaagggt 1260
 aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggctccact 1320
 gctgttattc tagatgataa ctttgaaca aaggccacag ccctaacctg tgacctat 1380
 gtaaaactact cctcccgcc tacaatgcc caaccctct cctaccactc ccgttacttc 1440
 acaccaaac ctgttctiga ctccaccatt gattacttcc aaccaataa caaaaggaa 1500
 cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560
 ttcgaaaaca gatatatga ccaggactac aatatccgtg taacctgta tgtacaattc 1620
 agagaattta alcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaccat 1680
 tacgatgta taacaaaaa gactcagtaa ttattttat atgggaaaag ggcacagggt 1740
 gggctccactg ctcaaatcg gccttcg 1767

<210> 9
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 豬環狀病毒

<400> 9

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctctgc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcitcaaac ccgctctcc cgcacctcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatattga cgactttgtt 240
 cccccgggag gggggaccaa caaatctct atacccttgg aalactacag aataagaaag 300
 gttaaggttg aattctggcc cigctcccc atcacccagg gtgatagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420
 tatgtaact actctcccg ccatacaatc gcccaaccct tctctacca ctccgttac 480
 ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
 aatcagcttt ggataggct acaacctct agaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacct gatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaactctaa agacccccca cttaaacct aa 702

<210> 10
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 豬環狀病毒

<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> 豬環狀病毒

<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> 豬環狀病毒

<400> 12
 cagctatgac gtatccaagg aggcggttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttggga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgcac ctteggatat actgtggaga 180
 aggaaaaatg gcattctcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaaggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgcata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gcttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcggt cgaaacaggt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaatg aat 713

<210> 13
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 豬環狀病毒

<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> 豬環狀病毒

<400> 14
 ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cggccctggc tegtccacc cccaccgc taccgttggga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
 ctaccacagt cacaacgcc tcttggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaanaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaaggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgitattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctaig 420
 acccatatgt aaactactec tccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaact gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggtacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcaactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc 713

<210> 15
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 豬環狀病毒

<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> 豬生殖與呼吸症候群病毒
 <400> 16
 atgacgtata ggtgttgct ctatgccacg gcatttgtat tgtcaggagc tgtggccatt 60
 ggcacagccc aaaacttgct gcacggaaaa cgcccttctg tgacagcctt cttcagggga 120
 gcttaggggt ctgtccctag caccttgctt ctggagttgc actgctttac ggtctctcca 180
 cccctttaac catgtctggg atacttgatc ggtgcacgtg caccccaat gccagggtgt 240
 ttatggcggg gggccaagtc tactgcacac gatgtctcag tgcacggtct ctccttctc 300
 tgaatctcca agttcctgag cttgggggtc tgggcctatt ttataggccc gaagagccac 360
 tccggtggac gttgccacgt gcattcccca ctgtcagatg ctcccctgcc ggggcctgct 420

ggctttctgc gatctttcca attgcacgaa tgaccagtgg aaacctgaac tttcaacaaa 480
 gaatggtgcg ggttgcagct gagatttaca gagccggcca actcaccctt gcagtttga 540
 aggctctaca agtttatgaa cggggttgc gctggtacct cattgtcgga cctgtccctg 600
 gagtggccgt ttacgccaac tccctacatg tgagtgaaca acctttcccg ggagcaactc 660
 atgtgttaac caacctaccg ctcccgcaga ggccaagcc tgaagacttt tgccttttg 720
 agtgtgctat ggctaacgct tatgacattg gccataacgc cgtcatgtat gtggccagag 780
 ggaaagtctc ctgggcccct cgtggcgggg atgaagtga atttgaacc gtccccgaag 840
 agttgaagtt gattgcgaac cgactccaca tctccttccc gcccaccac gcagtggaca 900
 tgtctgagtt tgccttcata gcccctggga gtgggtctc cttgcgggtc gagcaccaac 960
 acggctgcct tcccgtgat actgtccctg atgggaactg ctgggtggac ttgtttgact 1020
 tgctcccacc ggaagttcag aataaagaaa ttcgccgtgc taaccaattt ggctatcaaa 1080
 ccaagcatgg tgtccatggc aagtacctac agcggaggct gcaagtaat ggtctccgag 1140
 cagtgactga tacagatgga cctatgtcg tacagtactt cctgttagg gagagtggga 1200
 tccgccactt cagactggcg gaagaaccta gcctccctgg gtttgaagac ctccctcaga 1260
 taagggtaga gcctaatacg tcgccaatgg gtggcaaggg tgaaaaaatc tcccggttg 1320
 gcagtcaaca gtgttacggt gctggaaaga gagcaaggag agcacgctct ggtgcgactg 1380
 ccacggtcgc tcaccgcgct ttgcccgtc gcgaagccca gcaggccaag aagctcgagg 1440
 ttgccagcgc caacagggct gagcatctca agtactattc cccgcctgcc gacgggaact 1500
 gtggttggca ctgcattcc gccattacca accggatggt gaattccaaa ttgaaacca 1560
 ctcttcccga gagagtgaga ccttcagatg actgggctac tgacgaggat cttgtgaata 1620
 ccatccaat cctcaggctc cccgcggcct tggacaggaa cgggtgctgt gctggcgcca 1680
 agtacgtgct caagctggaa ggtgagcact ggaccgtctc tgtgaccctt gggatgacc 1740
 ctcttttctc ccccctgaa tgtgttcagg gttgttga gcataagagc ggtcttggtt 1800
 tcccagacgt ggtcgaagt tccgatttg acctgcctg tcttgaccga ctgtctgaga 1860
 taatgcactt gcctagcagt gtcattccag ctgctctggc cgagatgtcc gacgacttca 1920
 atcgtctggc ttccccggc gccactgtgt ggactgttc gcaattctt gcccgccaca 1980
 gaggaggaga gcatcctgac cagggtgct tagggaaaat tatcaacctt tgcaggiga 2040
 ttgaggaatg ctgctgttcc cggacaacaag ccaaccgggc taccggga gaggttgcgg 2100
 caaaagtiga ccagtacctc cgtggtgcag caagccttg agaatgctt gccaagctt 2160
 agagggtcgc cccgccgagc gcgacggaca cctccttga ttggaatgtt gtgcttctg 2220
 gggttgagac ggccaatcag acaaccaaac agctccatgt caaccagtgc cgcgctctg 2280
 ttctgtcgt gactcaagag cctttggaca gagactcgtt cctctgacc gccttctcgc 2340
 tgtccaattg ctactacct gcacaagggt acgaggtccg tcaccgtgag aggctaaact 2400
 ccttgcctc taagttggag ggggtgttc gtgaggaata tgggctcag ccaactggac 2460
 ctggcccgcg acccgactg ccgaacgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg 2520
 atctgctgaa attagtcaac gccagggcaa ctccagaaat gatggcctgg gcagccgagc 2580
 aggttgatct aaaagcttgg gtcaaaaatt acccacggtg gacaccgcca cccctccac 2640
 caagattca gcctcgaaaa acgaagctg tcaagagctt gctagagaac aagcctgtcc 2700

ctgctccgcg caggaaggtc agatctgatt gtggcagccc gattttgatg ggcgacaatg 2760
 ttccaaacgg ttgggaagat tcgactgttg gtggccccct tgatctttcg gcaccatccg 2820
 agccgatgac acctctgagt gagcctgtac ttatttccag gccagtgaca tctttgagtg 2880
 tgccggcccc agttcctgca ccgcgtagag ctgtgtcccc accgatgacg cctctgagtg 2940
 agccaatttt tgtgtctgca ctgcgacaca aatttcagca ggtggaaaaa gcaaatctgg 3000
 cggcagcagc gccgatgtgc caggacgaac ccttagattt gtctgcatcc tcacagactg 3060
 aatatgaggc ttcccccta acaccaccgc agaacgiggg cattctggag gtaagggggc 3120
 aagaagctga ggaagttctg agtgaaatct cggatattct gaatgatacc aaccctgcac 3180
 ctgtgtcatc aagcagctcc ctgtcaagtg ttaagatcac acgccccaaa tactcagctc 3240
 aagccattat cgactcgggc gggccccgca gtgggcacct ccaaagggaa aaagaagcat 3300
 gcctccgcat catgcgtgaa gcttgtgatg cggccaagct tagtgacct gccacgcagg 3360
 aatggctttc tcgcatgtgg gatagggtgg acatgctgac ttggcgcaac acgtctgctt 3420
 accaggcgtt tcgcacctta gatggcagggt ttgggtttct ccaaagatg atactcgaga 3480
 cgccgccgcc ctaccctgtt gggtttgtga tgtgcctca caccctgca ccttccgtga 3540
 gtgcagagag cgaccttacc attggttcag tcgccactga agatattcca cgcacccctg 3600
 ggaaaataga aaataccggt gagatgatca accagggacc cttggcatcc tctgaggaag 3660
 aaccggtata caaccaacct gccaaagact cccggatata gtcgcggggg tctgacgaga 3720
 gcacagcagc tccgtccgcg ggtacaggtg gcgccggctt atttactgat ttgccacctt 3780
 cagacggcgt agatgcggac ggtggggggc cgttgcagac ggtaagaaag aaagctgaaa 3840
 ggctcttcga ccaattgagc cgtcagggtt ttaacctcgt ctcccatctc cctgttttct 3900
 tctcacacct ctcaaatct gacagtggtt attctccggg tgattggggt tttgcagctt 3960
 ttactctatt ttgctcttt ttgtgttaca gctaccatt cttcggtttc gttcccctct 4020
 tgggtglatt tcttggtct tctcggcgtg tgcgcatggg ggtttttggc tgctggctgg 4080
 ctittgctgt tggcctgttc aagcctgtgt ccgaccaggt cggcactgct tgtgagtttg 4140
 actcgcaga gtgcaggaac gtccttcatt cttttgagct tctcaaacct tgggaccctg 4200
 ttgcagcct tgttgtgggc cccgtcggtc tcggtcttgc cattcttggc aagttactgg 4260
 gcggggcagc ctacatctgg cattttttgc ttaggcttgg cattgttga gattgtatct 4320
 tggctggagc ttatgtgctt tctcaaggta ggtgtaaaaa gtgctgggga tcttgataa 4380
 gaactgtccc taatgaaatc gccttcaacg tgttcccttt tacacgtgcg accaggtcgt 4440
 cactcatcga cctgtgcgat cggttttgtg cgccaacagg catggacccc atttccctcg 4500
 ccactgggtg gcgtgggtgc tggaccggcc gaagtcccat tgagcaacce tctgaaaaac 4560
 ccatcgcgtt cggccagtig gatgaaaaga ggattacggc tagaactgtg gtcgctcagc 4620
 cttatgatcc taatcaagcc gtgaagtgtc tgcgggtgtt acaggcgggt ggggcgatgg 4680
 tggccgaggc agtccccaaa gtggccaaag tttctgctat tccattccga gcccttttt 4740
 ttcccaccgg agtgaaagt gatcccgagt gcaggatcgt ggttgacccc gatactttta 4800
 ctacagccct ccggtctggt tactctacca caaacctcgt ccttgggtgt ggggactttg 4860
 cccagctgaa tggactaaag atcaggcaaa ttccaagcc ttcgggagga ggccccacac 4920

tcattgctgc cctgcatgtt gcctgctcga tggcgttgca catgcttgct ggggtttatg 4980
 taacttcagt ggggtcttgc ggtgccggca ccaacgatcc atggtgcaact aatccgtttg 5040
 ccgttccitgg ctacggacca ggctctctct gcacgtccag attgtgcatc tccaacatg 5100
 gccttaccct gcccttgaca gcacttgigg cgggattcgg tcttcaggaa atcgccttgg 5160
 tcgttttgat tttcgtttcc atcggaggca tggctcatag gttgagtgt aaggctgata 5220
 tgcgtgcat tttacttgca atcggccagct atgtttgggt accccttacc tggttgcttt 5280
 ggtgttttcc ttgttggtg cgctggttct ctttgacccc cttaccatc ctatggttgg 5340
 tgtttttctt gatttctgta aatatgcctt cgggaatctt ggccgtggtg ttattggttt 5400
 ctctttggct tttgggacgt tatactaaca ttgctggtct tgtcaccccc tatgatattc 5460
 atcattacac cagiggcccc cgcggtgttg ccgccttggc taccgcacca gatggaacct 5520
 acttggctgc cgtccgcccgc gctgcgttga ctggctgcac catgctgttc accccgtctc 5580
 agcttgggtc ccttctttag ggcgctttca gaactcgaaa gccctcactg aacaccgtca 5640
 atgtggttgg gtctccatg ggctctggtg gagtgttcc catcgacggg aaaattaggt 5700
 gcgtgactgc cgcacatgtc cttacgggta attcggctag ggtttccgga gtcggcttca 5760
 atcaaatgct tgaactttag gtgaaagggg acttcgcat agctgatggc ccgaattggc 5820
 aaggagctgc tccaagacc caattctgcg aggacggatg gactggccgt gcctattggc 5880
 tgacatctc tggcgtcga cccggtgtta ttgggaatgg attcgccttc tgcctcaccg 5940
 cgtgcggcga ttccgggtcc ccagtgatca ccgaagctgg tgagattgtc ggcgttcaca 6000
 caggatcaaa taaacaagga ggtggcatcg tcacgcgccc ttcaggccag ttttctaagc 6060
 tggcaccat caagctgagc gaattaagt aattctttgc tggacccaag gtcccgtcgc 6120
 gigtatgtaa ggttggcagc cacataatta aagacacgtg cgaagtacct tcagatcttt 6180
 gcgcttctgt tgcctccaaa cctgaactgg agggaggcct ctccaccgtc caacttctgt 6240
 gigtgttttt cctactgtgg agaattgatgg gacatgcctg gacgcccttg gttgctgtgg 6300
 ggtttttcat tctgaatgag gttctcccag ctgtcctggt tccgagtgtt ttctccttg 6360
 ggatgtttgt gctatcttgg ctacacccat ggtctgcgca agttctgatg atcaggcttc 6420
 taacagcagc tcttaacagg aacagatggt cacttgcctt ttacagcctt ggtgcggtga 6480
 ccggttttgt cgcagatctt gcggtaacct aagggcaccg gttgcaggca gtaatgaatt 6540
 tgagcaccta tgccttctct cctcggatga tggtttgac ctaccagtc ccagtgatg 6600
 cgtgtggtgt tgtgcaccta cttgccatca tttgtactt gttcaagiac cgcggcctgc 6660
 acaatgttct tgttggatg ggagcgttt ctgcagcttt ctcttgcga tactttgccg 6720
 agggaaagt gagggaagg gttctgcaat cctgcggaat gaatcatgag tcattgactg 6780
 gtgccctcgc tatgagactc aatgacgagg acttggactt ccttacgaaa tggactgait 6840
 ttaagtgcct tgtttctgcg tccaacatga ggaatgcagc aggccaattc atcaggcctg 6900
 cctatgcaaa agcacttaga attgaacttg ccagttggt gcaggttgat aaggttcgag 6960
 gtactttggc caagctttag gcttttctg ataccgtggc accccaactc tgcgccgtg 7020
 acattgttgt tgccttggc catacgcctg ttggcagcat cttcgaccta aaggttgggt 7080
 gtaccaagca tactctccaa gtcattgaga ccagagtcct tgcgggttcc aaaatgaccg 7140
 tggcgcgcgt cgttgacca acccccacgc ccccaccgc acccgtgcc atccccctcc 7200

caccgaaagt tctagagaat ggtcccaacg cctgggggga tggggaccgt ttgaataaga 7260
agaagaggcg taggatggaa accgtcggca tctttgtcat ggggtgggaag aagtaccaga 7320
aatTTTggga caagaattcc ggtgatgtgt tttacgagga ggtccatgac aacacagatg 7380
cgtgggagtg cctcagagtt ggtgaccctg ccgactttaa ccctgagaag ggaactctgt 7440
gtgggcatac tactattgaa gataaggatt acaaagtcta cgcctcccca tctggcaaga 7500
agttcctggt ccccgtaac ccagagagcg gaagagccca atgggaagct gcaaagcttt 7560
ccgtggagca ggcccttggc atgatgaatg tcgacgggta actgacggcc aaagaagtgg 7620
agaaactgaa aagaataatt gacaaacttc agggccttac taaggagcag tgtttaaact 7680
gctagccgcc agcggcttga cccgctgtgg tcgcgggcggc ttggttgtta ctgagacagc 7740
ggtaaaaata gtcaaatttc acaaccggac tttacccta gggcctgtga atttaaagt 7800
ggccagtgag gttgagctga aagacgcggt cgagcacaac caacaccggg ttgcaagacc 7860
ggttgacggg gggttgtgc tcctgcgttc cgcagttcct tcgcttatag atgtcctgat 7920
ctccggigtct gacgcatctc ctaagtact cgctcgtcac gggccgggga aactgggat 7980
cgatggcacg ctttgggact ttgaggccga ggccaccaa gaggaattg cgctcagtgc 8040
gcaaataata caggcttgtg acattaggcg cgtgacgca cctgaaattg gtctccctta 8100
caagctgtac cctgttaggg gcaaccctga gcgggtaaaa ggagttttac agaatacaag 8160
gtttggagac atacctaca aaacccccag tgacactggg agcccagtgc acgcggtgc 8220
ctgcctcacg cccaatgcca ctccggtgac tgatggggc tccgtcttgg ctactacat 8280
gccctccgtt ttgaattgt atgtaccgac cattccagcg tctgtccttg attatctga 8340
ctctaggcct gactgcccc aacagttgac agagcacggc tgtgaggatg ccgcatlgag 8400
agacctctcc aagtatgact tgtccacca aggccttgtt ttacctggg ttcttcgct 8460
tgtgcgtaag tacctgtttg cccacgtggg taagtgcccg cccgttcac gccctccac 8520
ttacctgccc aagaattcta tggctggaat aaatgggaac aggtttcaa ccaaggacat 8580
tcagagcgtc cccgaaatcg acgttctgtg cgcacaggcc gtgcgagaaa actggcaaac 8640
tgttaccctt tgtaccctca agaaacagta ttgtgggaag aagaagacta ggacaatact 8700
cggcaccat aatttcattg cgttggccca cggggcagcg ttgagtggg tcaccaggg 8760
cttcatgaaa aaggcgttta actcgcccat cgccctcggg aaaaacaaat ttaaggagct 8820
acagactccg atcttaggca ggtgccttga agctgatctt gcatcctgtg atcgatccac 8880
acctgcaatt gtccgctggt ttgccccaa ccttctttat gaacttgcct gtgctgaaga 8940
gcacctaccg tcgtacgtgc tgaactgctg ccatgacctt ttggtcacgc agtccggcgc 9000
agtgactaag aggggtggcc tgtcgtctgg cgaccgac acttctgtgt ctaacacat 9060
ttacagcttg gtgatatatg cacagcacaat ggtgcttagt tactttaaa gtggcacc 9120
tcatggcctt ctgttctac aagaccagct gaagtccgag gacatgctca aagtccaacc 9180
cctgatcgtc tattcggacg acctcgtgct gtatgccgaa tctcccacca tgccgaacta 9240
ccaciggtgg gtcgaacatc tgaatttgat gctgggtttt cagacggacc caaagaagac 9300
agccataacg gactcgccat catttctagg ctgtaggata ataaatggac gccagctagt 9360
ccccaaccgt gacaggatcc tcgcgccct cgttiacat atgaaggcaa acaatgtttc 9420

tgaatactac gccgcggcgg ctgcaatact catggacagc lgtgcttgtt tagagtatga 9480
 tcctgaatgg tttgaagagc ttgtggttgg gatagcgcac tgcgcccgca aggacggcta 9540
 cagctttccc ggccccccgt tcttcttgtc catgtgggaa aaactcagat ccaatcatga 9600
 ggggaagaag tccagaatgt gcgggtattg cggggccctg gctccgtacg ccaactgcctg 9660
 tggcctcgac gtcigtatftt accacaccca cttccaccag cattgtccag tcacaatctg 9720
 gtgtggccac ccggcttggtt ctggttcttg tagtgagtgc aaaccccccc tagggaaagg 9780
 cacaagccct ctatagtagg tgttagaaca agtcccgtat aagcctccac ggactgtaat 9840
 catgcatgtg gagcagggtc tcacccctct tgaccaggc agataccaga ctgcgccggg 9900
 attagtctcc gttaggcgtg gcatcagagg aatgaagtt gacctaccag acggtgatta 9960
 tgctagcacc gccctactcc ccacttgiaa agagatcaac atggctcgtg tcgcctctaa 10020
 tigtgtgcgc agcaggttca tcatcggctc gcccggtgct gggaaaacat actggctcct 10080
 tcagcaggtc caggatggtg atgtcattta cacaccgact caccagacca tgctcgacat 10140
 gattagggct ttggggacgt gccggttcaa cgtcccagca ggtgcaacgc tgcaattccc 10200
 tgccccctcc cgtaccggcc cgtgggttcg catcctagcc ggcggttggt gtcctggtaa 10260
 gaattccttc ttggatgaag cagcgtattg taatcacctt gatgtcttga ggctccttag 10320
 caaaaccacc ctacctgtc tgggagactt caaacaactc caccagtggt gttttgattc 10380
 tcattgctat gttttgaca tcatgcctca gaccagttg aagaccatct ggagattcgg 10440
 acagaacatc tgtgatgcca tccaaccaga ttacagggac aaacttgtgt ccatggtcaa 10500
 cacaaccctg gtaaccacg tggaaaaacc tgtcaagtat gggcaagtc tcaccctta 10560
 ccacaggac cgagaggac gcgccatcac aattgactcc agtcaaggcg ccacattiga 10620
 tttggtcaca ctgcatttgc ccactaaaga ttactcaac aggcaaagag cccttgttgc 10680
 taccaccagg gcaagacatg ctatcttgt glatgacca cacaggcaat tgcagagcat 10740
 gtttgatctt cctgcgaagg gcacaccctg caacctcgca gtgcaccgtg atgagcagct 10800
 gatcgtactg gatagaaata ataaagaatg cacagttgct caggctctag gcaacggaga 10860
 taaatttagg gccaccgaca agcgcgttgt agattctctc cgcgccattt gtctgatct 10920
 ggaagggctg agctctccgc tccccaaagt cgcacacaac ttgggatttt atttctcacc 10980
 tgatttgaca cagtttgcta aactccgggt agaccttga cccactggc ccgtggtgac 11040
 aaccagaac aatgaaaagt ggccggatcg gctggttggc agccttcgcc ctgtccataa 11100
 gtatagccgt gcgtgcattg gtgccggcta tatggtgggc ccctcgggtt ttctaggcac 11160
 ccctggggtc gtgtcatact acctcacaaa atttgtcaag ggcgaggctc aagtcttcc 11220
 ggagacagtc ttcagcaccg gccgaattga ggtggattgc cgggagtatc ttgatgacag 11280
 ggagcgagaa gttgtctagt ccctcccaca tgccttcatt ggcgacgta aaggcaccac 11340
 cgttggggga tgtcatcatg tcacctcaa ataccttccg cgttctctc ccaaggaatc 11400
 agtcgcggta gtcggggttt cgagccccgg gaaagccgca aaagcagtg gcacattgac 11460
 ggatgtgtac ctcccagacc ttgaggccta cctccacca gagactcagt ccaagtgtg 11520
 gaaagttatg ttggacttca aggaagttcg actgatggtc tggaaagaca agacggccta 11580
 tttcaactt gaaggccgct atttccctg gtatcagctt gcaagctacg cctcgtacat 11640
 ccgtgttctt gtcaactcca cgggtatctt ggaacccctg atgggccctg cccttgc 11700

cagaagagtt gtcgggtcca cccatigggg agctgacctc gcagtcaccc cttatgatta 11760
cgggtgctaaa atcatcttgt cttagcgctta ccatggtgaa atgcttctg gatacaagat 11820
tctggcgtgc gcgaggttct cgctcgacga cccagtcaag tacaacaca cctggggttt 11880
tgaatcggat acagcgtatc tgtatgagtt caccggaaac ggtgaggact gggaggatta 11940
caatgatgcg tttcgtgccc gccagaaagg gaaaatttat aaggccactg ctaccagcat 12000
gaagttttat tttcccccgg gccccgtcat tgaaccaact ttaggcctga attgaaatga 12060
aatgggggtct atacaaagcc tcttcgacaa aattggccag ctttttggg atgctttcac 12120
ggaatttttg gigtccatig ttgatatcat cataattttg gccattttgt ttggcttcac 12180
catcgccggt tggctggtag tcttttgcag cagattgggt tgcctccgagg tattccgtgc 12240
gcccctgcc attcaccctg agcaattaca gaagatccta tgaggccttt cttctcagt 12300
gccgggtgga cattcccacc tggggggtaa aacacccttt ggggatggtt tggcaccata 12360
aggtgtcaac cctgattgat gaaatgggtg cgcgtcgaat gtaccgcgtc atggataaag 12420
cagggaagc tgcctggaaa caggtagtga gcgaggctac gctgtctcgc attagtagtc 12480
tggatgtggt ggctcatttt caacatcttg ccgccattga agccgagacc tgaatatatt 12540
tggcttctcg actgcccalt ctacacaacc tgcgcatgac agggatcaat gtaaccatag 12600
tgtataatag cactttaaat cagggttttg ctatttttcc aaccctggg tcccggccaa 12660
agcttcatga ttttcagcaa tggctaatag ctgtacattc ctccatattt tctctgttg 12720
cagcttcttg tactcttttt gttgtgctgt ggttgcgggt tccaatgcta cgtactgttt 12780
ttggtttccg ctggttaggg gcaatttttc tttcgaactc atgggtgaatt acacgggtgtg 12840
tccaccttgc ctaccaccgac aagcagccgc tgaggctcct gaaccggta ggtctctttg 12900
gtgcaggata gggcatgacc gatgtgggga ggacgatcac gacgaactgg ggttcatggt 12960
tccgcttggc ctctccagcg aaagccactt gaccagtgtt tacgcttggg tggcgttcc 13020
gtccttcagc tacacggccc agttccatcc cgagalattt gggataggga acgtgagtga 13080
agtttatgtt gacatcaagc accaattcat ctgcgccgtt catgacgggc agaaccacc 13140
cttgccctgc catgacaata tttcagccgt atttcagacc tactatcaac atcaggtcga 13200
cggcggcaat tggtttcacc tagaatggct gcgtcccttc ttttctctt ggttggtttt 13260
aaatgtttcg tggtttctca ggcgttcgcc tgaagccat gtttcagttc gagtctttca 13320
gacatcaaaa ccaacactac cgcagcatca ggctttgttg tctccagga catcagctgc 13380
cttaggcatt gcgactcgtc ctttccgacg attcgcaaaa gctcicaatg ccgcacggcg 13440
atagggacac ctgtgtatat caccatcaca gccaatgtga cagatgagaa ttacttacat 13500
tcttctgac tctctatgct ttcttcttgc ctttctatg ctcttgagat gagtgaaaag 13560
ggattcaagg tggattttgg caatgtgtca ggcatcgttg ctgtgtgtgt caactttacc 13620
agctacgtcc aacatgtcaa agagtttact caacgctcct tggtagtcca tcatgtcggg 13680
ctgcttcatt tcatgacacc tgagaccatg aggtgggcaa ccgtttttag ctgtcttttt 13740
gccatcctac tggcaatttg aatgttcaag tatgttgggg aatgcttga ccgagggtg 13800
ttgctcgcga ttgctttctt tgtgggtgat ctgcccgttc tggtttctg tgcctcggca 13860
cgccaacagc agcagcagct ctcatctcca gitgatttat aacttgacgc tatgtgagct 13920

gaatggcaca gattggctgg cagaaaaatt tgattgggcg gtggagactt ttgtcatctt 13980
 tcccgtgttg actcacattg ttctctattg tgcactcacc accagccatt tccttgacac 14040
 agttggctcg gttactgtgt ccaccgccgg gttttatcac gggcggtatg tcttgagtag 14100
 catctacgcg gtcctgtgctc tggctgcggt gatttgcttc gttattaggc ttgcaagaa 14160
 ctgcatgtcc tggcgctact ctgttaccag atataccaac ttccttctgg aactaaggg 14220
 cagactctat cgttggcggg cggccgttat catagaaaaa aggggtaagg ttgaggtcga 14280
 aggtcatctg atcgacctca aaagagtgtt gcttgatggt tccgtggcaa ccccttaac 14340
 cagagtttca gcggaacaat ggggtcgtct ctgacgact ttgccaiga tagcactgct 14400
 ccacaaaagg tgcctttggc gttttccatt acctacacgc cagtaatgat atatgctcta 14460
 aaggtaagtc gcggccgact gctagggctt ctgcacctt tgatcttct gaattgtgct 14520
 tttacctcg ggtacatgac attcgcgcac ttfcagagca caaatagggt cgcgctcgt 14580
 atgggagcag tagttgcact tctttggggg gtgtactcag ccatagaaac ctggaaattc 14640
 atcacctcca gatgccgttt gtgcttgcta ggccgcaagt acattctggc cctgcccac 14700
 cacgtcgaag gtgccgcggg ctctcatccg attgcgcaa atgataacca cgcatttgc 14760
 gtccggcgtc ccggctccat tacggttaac ggcacattgg tggccgggti gaaaagcctc 14820
 gtgttgggtg gcagaaaagc tgttaaacag ggagtggtaa acctgtcaa atatgcaaaa 14880
 taacaacggc aagcagcaaa agaaaaagaa ggggaatggc cagccagtca accagctgtg 14940
 ccagatgctg ggtaaaatca tgcgccagca aaaccagtcc agaggcaagg gaccgggcaa 15000
 gaaaagtaag aagaaaaacc cggagaagcc ccatcttct ctagcgaccg aagatgacgt 15060
 caggcatcac ttaccacctg gtgagcggca attgtgtctg tgcctgatcc agactgcctt 15120
 taaccagggc gctggaactt gtaccctgtc agattcaggg aggataagtt aactgtgga 15180
 gtttagttg ccgacgcac atactgtgc cctgatccgc gtcacagcat caccctcagc 15240
 atgatgggtt ggcatcttt aggcacctca gtgtcagaat tggagaatg tgtggtgat 15300
 ggcaactgatt gacattgtc ctctaagtca cctattcaat tagggcgacc gtgtgggggt 15360
 aaaatttaat tggcgagaac catgcggccg caattaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15420
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15450

<210> 17
 <211> 2352
 <212> DNA
 <213> 豬生殖與呼吸症候群病毒

<400> 17
 cctatcattg aaccaacttt aggcctgaat tgaatgaaa tggggtctat gcaaagcctt 60
 ttgacaaaa ttggccaact ttctgtggat gctttcacgg agttcttggg gtccattgtt 120
 gatatcatta tatttttggc cattttgttt ggcttcacca tcgccggttg gctggtggtc 180
 ttttgcatca gattggtttg ctccgcgata ctccgtgcgc gccctgcat tcaactctgag 240
 caattacaga agatcctatg aggcctttct ttctcagtc caggltggaca ttcccacctg 300
 gggaaatlaa catcctttgg ggatgctttg gcaccataag gigtcaacce tgattgatga 360
 aatggtgtcg cgtcgaatgt accgcatcat ggaaaaagca ggacaggctg cctggaaca 420
 gglggtgagc gaggctacgc tgtctcgcatt tagtagtttg gatgtggtgg ctcaatttca 480

gcatcttgcc gccattgaag ccgagacctg taaatatttg gcctctcggc tgcccatgct 540
 acacaacctg cgcattgacag ggtcaaatgt aaccatagtg tataatagta ctttgaatca 600
 ggtgcttgct attttcccaa cccttggttc ccggccaaag cttcatgatt ttacagcaatg 660
 gctaatagct giacattcct ctatattttc ctctgttgca gcttcttgta ctctttttgt 720
 tgtgctgtgg ttgcgggttc caatgctacg tatigctttt ggtttccgct ggttaggggc 780
 aatttttctt tcgaactcac agtgaactac acgggtgtgc caccttgccct caccggcaa 840
 gcagccacag aggcctacga acctggcagg tctctttggt gcaggatagg gtatgatcgc 900
 tgtggggagg acgatcatga tgaactaggg tttgtggtgc cgtctggcct ctccagcga 960
 ggccacttga ccagtgttta cgcctggttg gcgttcctgt ctttcagita cacagcccag 1020
 ttccatcctg agatattcgg gatagggaaat gtgagtcaag tttatgttga catcaggcat 1080
 caattcattt gcgccgttca cgacgggcag aacgccactt tgcctcgcca tgacaatatt 1140
 tcagccgtgt tccagactta ttaccaacat caagtgcagc gcggcaattg gtttcaccta 1200
 gaatggctgc gtccctctt ttctcttgg ttggttttaa atgtctctt gtttctcagg 1260
 cgttcgctg caagccatgt ttcagttcga gtcttgcaga cattaagacc aacaccaccg 1320
 cagcggcagg ctttgcctgc ctccaagaca tcagttgcct taggtatcgc aactcggcct 1380
 ctgaggcgtt tcgcaaaatc cctcagtgtc gtacggcgat agggacacce atgtatatta 1440
 ctgtcacagc caatgtaacc gatgagaatt atttgcattc ctctgacctt ctcatgctt 1500
 cttcttgccct tttctacgct tctgagatga gtgaaaaggg atttaaagtg gtatttggca 1560
 atgtgtcagg catctggct gtgtgcgtca actttaccag ctactgcaa catgtcaagg 1620
 aatttacca acgctccttg gtagtcgacc atgtgcgct gctccatttc atgacacctg 1680
 agaccatgag gtgggcaact gttttagcct gtctttttgc cattctgttg gccatttgaa 1740
 tgtttaagta tgttggggaa atgcttgacc gcgggctatt gctcgtcatt gctttttttg 1800
 tggigtatcg tgccgtctt gtttgttgcg ctgccagcg ccaacagcag caacagctct 1860
 catttacagt tgattataa cttgacgcta tgtgagctga atggcacaga ttggttagct 1920
 ggtgaatttg actgggcagt ggagtgttt gtcattttc ctgtgttgac tcacattgtc 1980
 tctatggtg cctcaccac cagccatttc cttgacacag tcggtctggt cactgtgtct 2040
 accgccggct tttcccacgg gcggtatgtt ctgagtagca tctacgggt ctgtgccctg 2100
 gctgcgttga tttgcttctg cattaggttt acgaagaatt gcatgtcctg gcgctactca 2160
 tgiaccagat ataccaactt tcttctggac actaaggcca gactctatcg ttggcggtcg 2220
 cctgtcatca tagagaaaag gggtaaagt gtggtcgaag gtcatctgat cgacctcaag 2280
 agagtgtgc ttgatggttc cgcggcaacc cctataacca aagtttcagc ggagcaatgg 2340
 ggtcgtcctt ag 2352

<210> 18
 <211> 886
 <212> DNA
 <213> 豬生殖與呼吸症候群病毒

<400> 18
 atggggtcgt ccttagatga cttctgcat gatagcacgg ctccacaaaa ggtgcttttg 60
 gcgttctcta ttaacctac gccagtgatg atatatgcc taaaagtaag tcgcggccga 120

ctgctagggc ttctgcacct tttgatcttc ctaaattgtg ctttcacctt cgggtacatg	180
acattcgtgc actttcagag cacaacaag gtcgcgctca ctatgggagc agtagttgca	240
ctcctttggg ggggttactic agccatagaa acctggaaat tcatcacctc cagatgccgt	300
ttgtgcttgc taggccgcaa gtacattttg gccccigccc accacgttga aagtgccgca	360
ggctttcatic cgatagcggc aaatgataac cacgcatttg tcgtccggcg tcccggctcc	420
actacgggta acggcacatt ggtgcccggg ttgaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa	480
gctgtcaaac agggagtggg aaaccttgtt aaatatgcca aataacaacg gcaagcagca	540
gaagaaaaag aaggggatg gccagccagt caatcagctg tgccagatgc tgggtaagat	600
catcgctcag caaaaccagt ccagaggcaa gggaccggga aagaaaaaca agaagaaaa	660
cccggagaag ccccattttc ctctagcgac tgaagatgat gtcagacatc acttcacctc	720
tggtagcgg caattgtgtc tgtcgtcaat ccagacagcc tttaatcaag gcgctggaac	780
ttgtaccctg tcagattcag ggaggataag ttacactgtg gagtttagtt tgccgacgca	840
tcatactgtg cgctgatcc gcgtcacagc gtcacctca gcatga	886

發明摘要

※ 申請案號：102-111966

※ 申請日：102-4-2

※IPC 分類：A61K 39/545(2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C09K 21/01 (2006.01)

【發明名稱】

PCV/豬肺炎黴漿菌組合疫苗

PCV/MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE COMBINATION
VACCINE

○ 【中文】

本發明提供多價免疫原性組合物，其包括豬肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, M.hyo)全細胞製劑之可溶部分及豬環狀病毒2型(PCV2)抗原，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。

【英文】

This invention provides a multivalent immunogenic composition including a soluble portion of a *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo) whole cell preparation; and a porcine circovirus type 2 (PCV2) antigen, wherein the soluble portion of the M.hyo preparation is substantially free of both (i) IgG and (ii) immunocomplexes comprised of antigen bound to immunoglobulin.

○

申請專利範圍

1. 一種多價免疫原性組合物，其包含豬肺炎黴漿菌(*Mycoplasma hyopneumoniae*, M.hyo)全細胞製劑之可溶部分及豬環狀病毒2型(PCV2)抗原，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)由結合至免疫球蛋白之抗原組成之免疫複合物二者。
2. 如請求項1之組合物，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分在添加至該免疫原性組合物中之前已用蛋白質A或蛋白質G處理。
3. 如請求項1或2之組合物，其中該組合物係呈即用型液體組合物形式。
4. 如請求項1至3中任一項之組合物，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分包含至少一種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。
5. 如請求項4之組合物，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分包含兩種或更多種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。
6. 如請求項1至5中任一項之組合物，其中該組合物在豬中誘發對抗豬肺炎黴漿菌及PCV2之保護性免疫反應。
7. 如請求項1至6中任一項之組合物，其中該PCV2抗原係呈嵌合1型-2型環狀病毒形式，該嵌合病毒包含表現該豬環狀病毒2型ORF2蛋白質之失活重組豬環狀病毒1型。
8. 如請求項1至6中任一項之組合物，其中該PCV2抗原係呈重組ORF2蛋白質形式。
9. 如請求項8之組合物，其中該重組ORF2蛋白質係由桿狀病毒載體表現。
10. 如請求項4之組合物，其進一步包含至少一種其他抗原。
11. 如請求項10之組合物，其中該至少一種其他抗原具有對抗引起

豬疾病之微生物之保護作用。

12. 如請求項11之組合物，其中該微生物包含細菌、病毒或原生動物。
13. 如請求項12之組合物，其中該微生物係選自由以下組成之群：
豬生殖與呼吸症候群病毒(PRRSV)、豬小病毒(PPV)、副豬嗜血桿菌 (*Haemophilus parasuis*)、多殺性巴氏桿菌 (*Pasteurella multocida*)、豬鏈球菌 (*Streptococcus suis*)、豬葡萄球菌 (*Staphylococcus hyicus*)、胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、支氣管敗血性包台拉菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、豬霍亂沙氏桿菌 (*Salmonella choleraesuis*)、腸炎沙氏桿菌 (*Salmonella enteritidis*)、豬丹毒桿菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、豬鼻黴漿菌 (*Mycoplasma hyorhinis*)、豬關節滑膜黴漿菌 (*Mycoplasma hyosynoviae*)、細螺旋體細菌 (*leptospira bacteria*)、細胞內勞索尼亞菌 (*Lawsonia intracellularis*)、豬流感病毒 (SIV)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 抗原、豬赤痢螺旋菌 (*Brachyspira hyodysenteriae*)、豬呼吸道冠狀病毒、豬流行性腹瀉 (PED) 病毒、輪狀病毒、纖鍊病毒 (Torque teno virus, TTV)、豬細胞巨大病毒、豬腸道病毒、腦心肌炎病毒、引起奧傑士基氏病 (Aujeszky's Disease) 之病原、引起古典型豬瘟 (Classical Swine fever, CSF) 之病原及引起豬傳染性胃腸炎之病原或其組合。
14. 如請求項1至13中任一項之組合物，其中該組合物進一步包含佐劑。
15. 如請求項14之組合物，其中該佐劑係選自由以下組成之群：水包油佐劑、聚合物及水佐劑、油包水佐劑、氫氧化鋁佐劑、維生素E佐劑及其組合。

16. 如請求項1至15中任一項之組合物，其中該組合物進一步包含醫藥上可接受之載劑。
17. 如請求項1至16中任一項之組合物，其中該組合物當以單劑量投藥形式投與時，誘發對抗豬肺炎黴漿菌與PCV2二者之保護性免疫反應。
18. 如請求項11之組合物，其中該組合物當以單劑量投藥形式投與時，誘發對抗豬肺炎黴漿菌、PCV2及至少一種已知會感染豬之其他微生物的保護性免疫反應。
19. 一種使豬對豬肺炎黴漿菌及PCV2免疫之方法，其包括向該豬投與如請求項1之組合物。
20. 如請求項19之方法，其中該組合物係經肌內、經皮內、穿皮式或經皮下投與。
21. 如請求項19或20之方法，其中該組合物係以單劑量投與。
22. 如請求項19至21中任一項之方法，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分包含至少一種豬肺炎黴漿菌蛋白質抗原。
23. 如請求項22之方法，其中該組合物係結合至少一種具有對抗已知會感染豬之微生物之保護作用的其他抗原投與。
24. 如請求項23之方法，其中該微生物係選自由以下組成之群：豬生殖與呼吸症候群病毒(PRRSV)、豬小病毒(PPV)、副豬嗜血桿菌、多殺性巴氏桿菌、豬鏈球菌、豬葡萄球菌、胸膜肺炎放線桿菌、支氣管敗血性包台拉菌、豬霍亂沙氏桿菌、腸炎沙氏桿菌、豬丹毒桿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌、細螺旋體細菌、細胞內勞索尼亞菌、豬流感病毒(SIV)、大腸桿菌抗原、豬赤痢螺旋菌、豬呼吸道冠狀病毒、豬流行性腹瀉(PED)病毒、輪狀病毒、纖鍊病毒(TTV)、豬細胞巨大病毒、豬腸道病毒、腦心肌炎病毒、引起奧傑士基氏病之病原、引起古典型豬瘟(CSF)5

之病原及引起豬傳染性胃腸炎之病原或其組合。

25. 如請求項19至24中任一項之方法，其中向具有對抗豬肺炎黴漿菌及PCV2中之至少一者之母源性抗體之豬投與該組合物。
26. 如請求項25之方法，其中向具有對抗豬肺炎黴漿菌與PCV2二者之母源性抗體之豬投與該組合物。
27. 如請求項19至26中任一項之方法，其中向3週齡或更大之豬投與該組合物。
28. 一種套組，其包含：包含免疫原性組合物之瓶，該免疫原性組合物包括PCV2抗原與豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分二者，其中該豬肺炎黴漿菌製劑之該可溶部分實質上不含(i) IgG與(ii)抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者。
29. 如請求28之套組，其進一步包括含有投與該免疫原性組合物之資訊之說明手冊。
30. 如請求項28或29之套組，其中該瓶中之該免疫原性組合物係以即用型液體組合物形式提供。
31. 一種製備免疫原性組合物之方法，該方法包括：
 - i) 將豬肺炎黴漿菌在適宜培養基中培養18小時至144小時範圍內之時期；
 - ii) 隨後使該豬肺炎黴漿菌培養物失活；
 - iii) 收穫該失活培養液，其中該失活培養液包含含有可溶液體部分與不可溶細胞材料二者之豬肺炎黴漿菌全細胞製劑；
 - iv) 分離該可溶液體部分與該不可溶細胞材料；
 - v) 自該經分離可溶液體部分實質上去除IgG與抗原/免疫球蛋白免疫複合物二者，以形成該豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之可溶部分；及
 - vi) 隨後組合該豬肺炎黴漿菌全細胞製劑之該可溶部分與PCV2抗原。

圖式

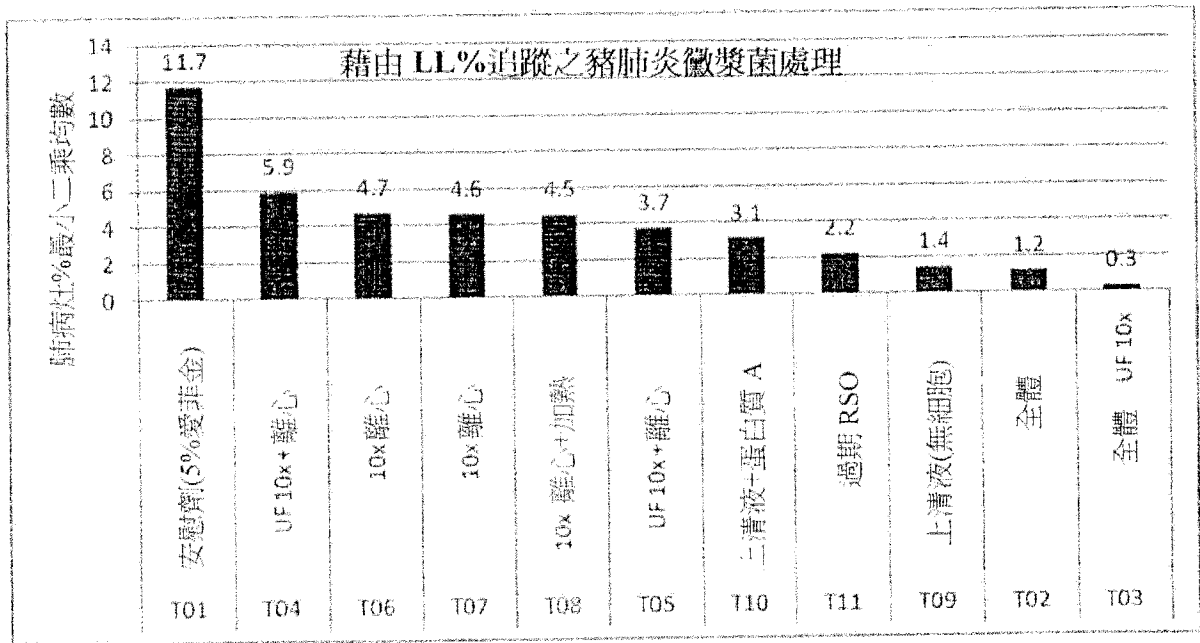


圖 1

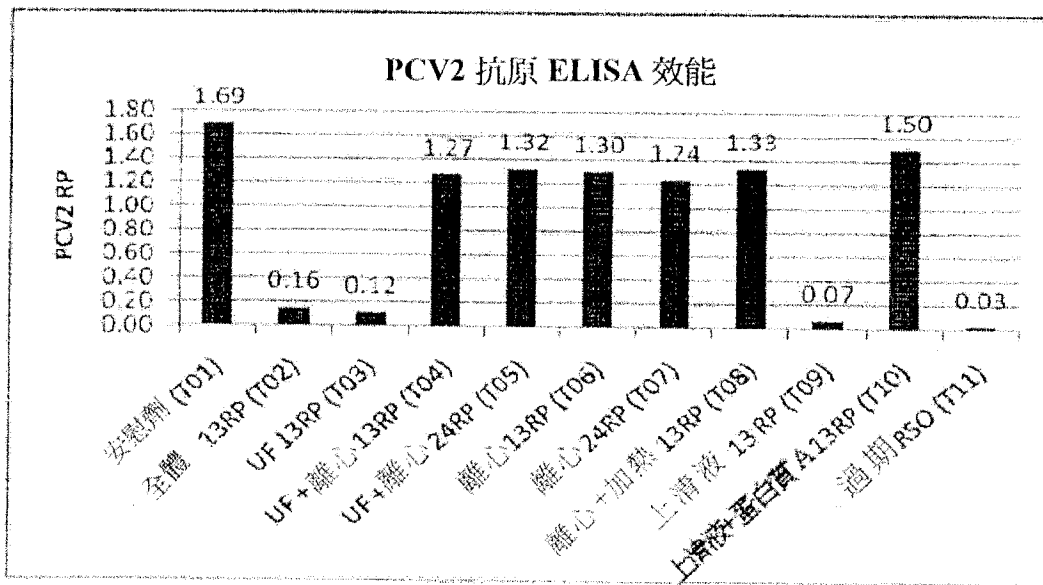


圖 2



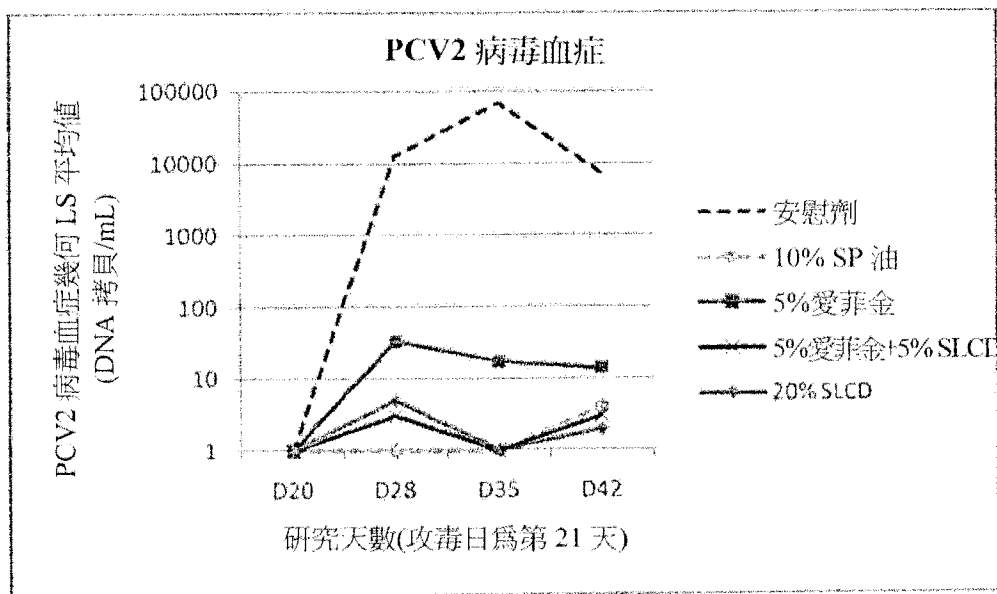


圖 3

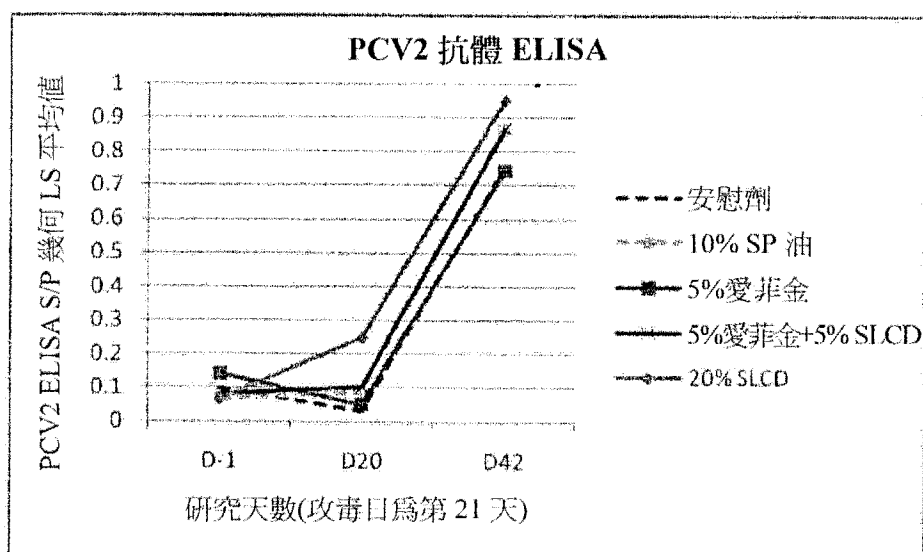


圖 4

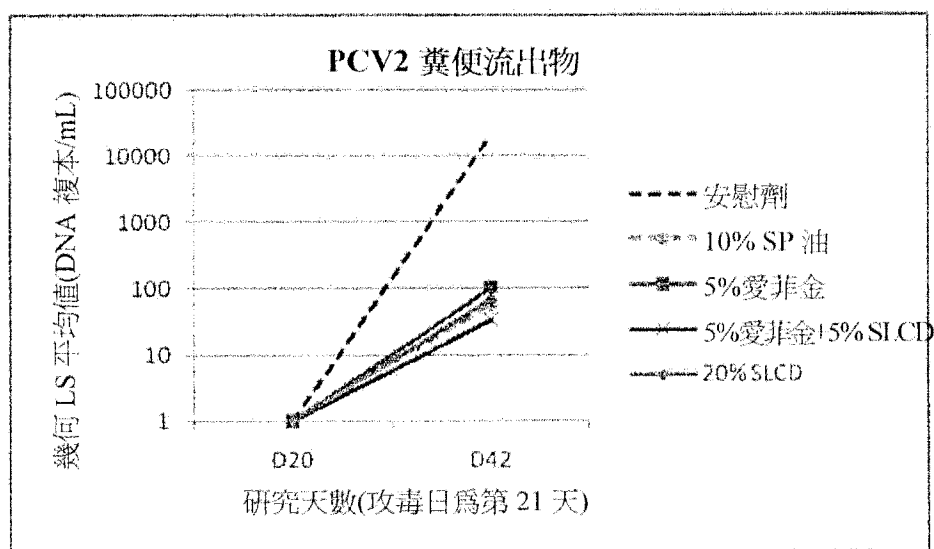


圖 5

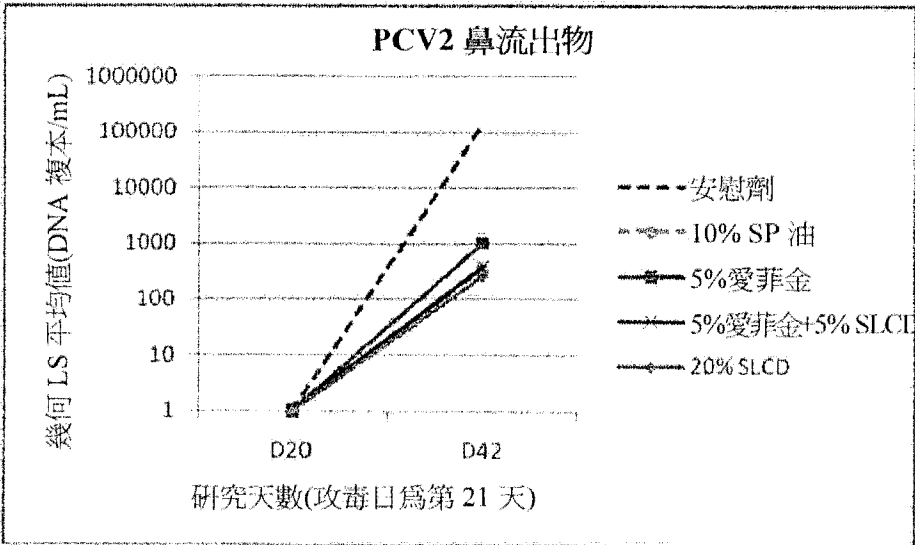


圖 6

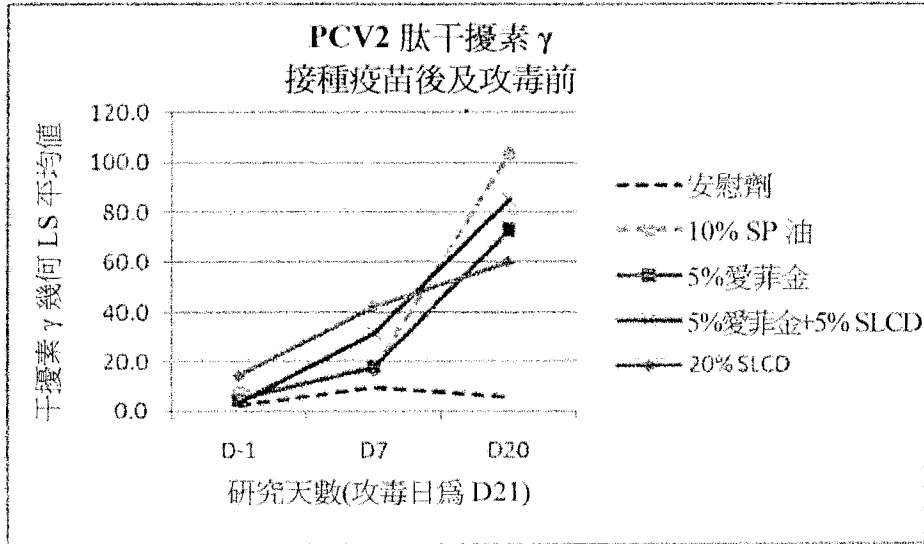


圖 7A

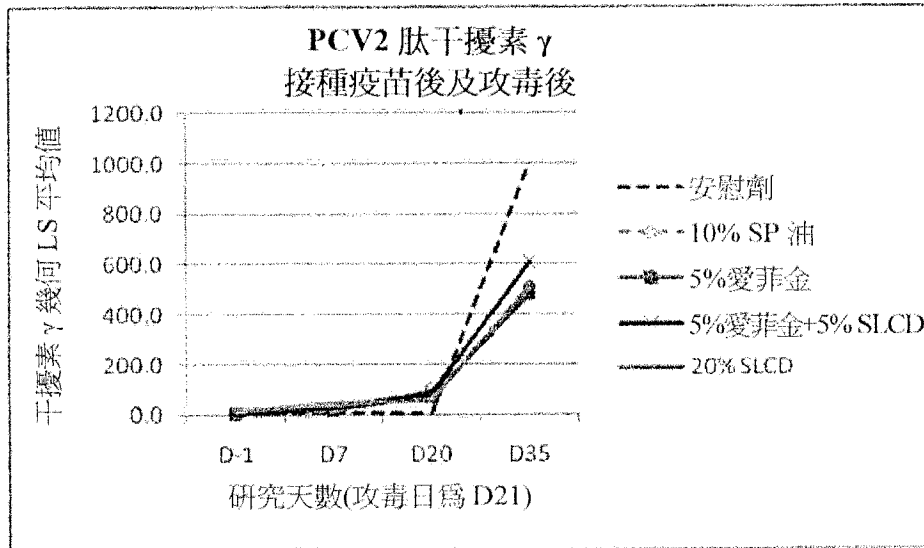


圖 7B

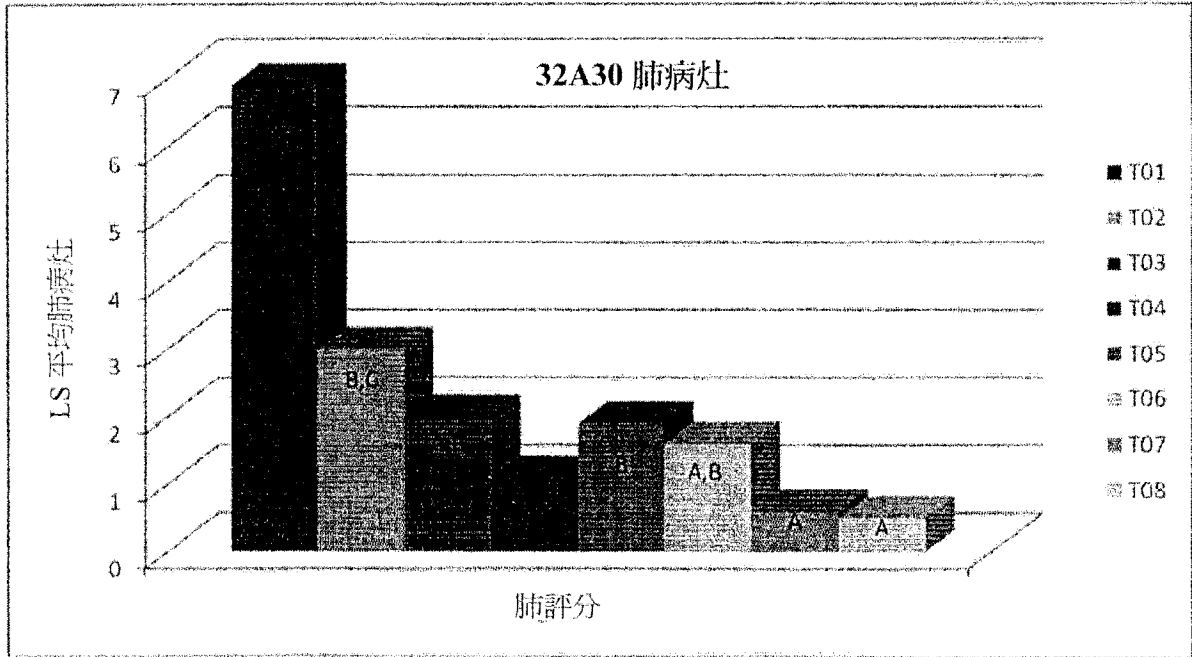


圖 8A

對比	緩解分數	95%信賴區間
T01 對 T02	41.2	-5.9 至 76.5
T01 對 T03	64.7	29.4 至 100
T01 對 T04	76.5	41.2 至 100
T01 對 T05	73.3	33.3 至 100
T01 對 T06	62.5	25 至 100
T01 對 T07	87.5	62.5 至 100
T01 對 T08	88.2	64.7 至 100

圖 8B

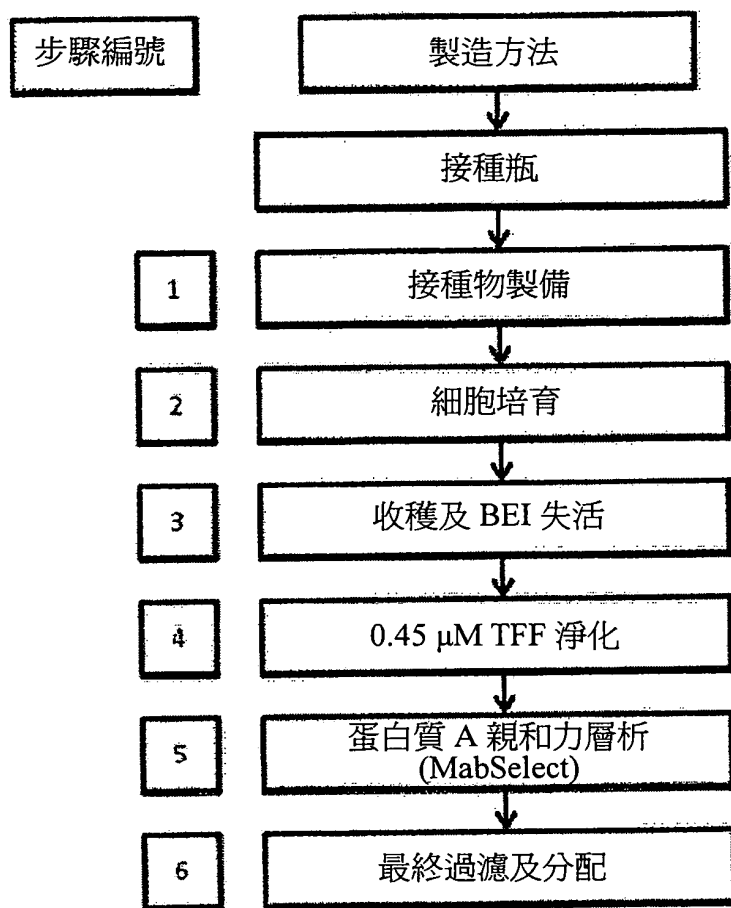


圖 9

初步殺病毒活性	與水之差異			
	100% 再水合	90/10	90/10	平均殺 病毒活性
	凍乾滴定度	液體 (DMEM) 90/10	液體 (Ultra) 90/10	
20% SLCD	0.8	0.7	2.0	1.3
0.2%卡波普	0.3	-0.3	0.2	-0.1
10% SP 油	0.2	0.0	0.0	0.0
10% SP 油/0.2%卡波普	0.3	-0.2	0.0	-0.1
20% SLCD/10% SP 油	1.0	0.3	0.7	0.5
20% SLCD/10% SP 油/0.2%卡波普	0.2	0.0	0.5	0.3
5%愛菲金(來自 40%母液)	1.0	0.7	1.5	1.1
2.5%愛菲金(來自 40%母液)	NA	-0.2	NA	-0.2
5%愛菲金(來自 20%母液)	NA	0.8	NA	0.8
2.5%愛菲金(來自 20%母液)	NA	0.2	NA	0.2
5%愛菲金(來自 40%母液)	NA	1.3	NA	1.3
2.5%愛菲金(來自 40%母液)	NA	0.8	NA	0.8
	指示潛在殺病毒活性			

圖 10

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（2）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無