

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-503234

(P2004-503234A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/20	4 B O 6 5
C O 7 K 14/005	C O 7 K 14/005	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 147 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-510517 (P2002-510517)
(86) (22) 出願日 平成13年6月15日 (2001.6.15)
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月13日 (2002.12.13)
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/019220
(87) 国際公開番号 W02001/096377
(87) 国際公開日 平成13年12月20日 (2001.12.20)
(31) 優先権主張番号 60/211, 710
(32) 優先日 平成12年6月15日 (2000.6.15)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 598063203
パーデュー・リサーチ・ファウンデーション
PURDUE RESEARCH FOUNDATION
アメリカ合衆国・インディアナ州 479
06・ウエスト・ラファイエット・セント
アヴェニュー 3000
(74) 代理人 100064908
弁理士 志賀 正武
(74) 代理人 100108578
弁理士 高橋 昭男
(74) 代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブタの先天性振せん用ワクチン

(57) 【要約】

ブタ・シルコウイルス (PCV) とブタにおける先天性振せん (震顫) との関連性の同定に関し、関連する診断および治療組成物および方法に関する。より詳細には、特定の先天性振せん関連 PCV 核酸およびポリペプチドに関する。特に、ブタ・シルコウイルス (PCV) から単離された核酸であって、配列番号 1 から配列番号 7 からなる群から選択された配列と同一の配列を有する核酸を提供する。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブタ・シルコウイルス（PCV）から単離された核酸であって、配列番号 1 から配列番号 7 からなる群から選択された配列と同一の配列を有する核酸。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の単離された核酸を含む核酸。

【請求項 3】

ブタ・シルコウイルス（PCV）から単離された核酸であって、配列番号 1 から配列番号 7 の任意の配列の任意の ORF 1 から ORF 1 1 によってコードされた配列からなる群から選択された配列を有する、シルコウイルス・ポリペプチドをコードする配列を含む核酸

10

【請求項 4】

配列番号 1 から配列番号 7 の任意の配列の ORF 1 から ORF 1 1 の配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列を有する請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 5】

発現調節配列と機能的に結合された請求項 3 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターおよび薬学的に許容される賦形剤を含むワクチン。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項 8】

PCV タンパク質を産生する方法であって、シルコウイルスタンパク質をコードする核酸の発現をもたらす条件下で、請求項 7 に記載の宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 9】

PCV タンパク質が、配列番号 1 から配列番号 7 の任意の配列によって付加された配列の、任意の ORF 1 から ORF 1 1 によってコードされた配列からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ブタ・シルコウイルス（PCV）から単離されたポリペプチドであって、配列番号 1 から配列番号 7 の任意の配列の任意の ORF 1 から ORF 1 1 によってコードされた配列からなる群から選択された配列を有するポリペプチド。

30

【請求項 11】

請求項 10 に記載の単離されたポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 12】

単離されたブタ・シルコウイルス株であって、配列番号 1 から配列番号 6 の配列からなる群から選択された配列を含むゲノムを有する単離された株。

【請求項 13】

弱毒化、不活化、または死滅化された請求項 12 に記載のブタ・シルコウイルス。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のブタ・シルコウイルスおよびアジュバントを含むワクチン。

40

【請求項 15】

ブタにおいて先天性振せんの病因を診断する方法であって、そのブタが、ブタ・シルコウイルス株 1 型または 2 型に感染しているかどうかを判別することを含む方法。

【請求項 16】

ブタ・シルコウイルスが、配列番号 1 から配列番号 6 の配列からなる群から選択された配列を含むゲノムを有する請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ブタにおいて先天性振せんの病因を診断する方法であって、そのブタが、配列番号 1 から配列番号 6 の配列からなる群から選択された配列を含むゲノムを有するブタ・シルコウイルス株に感染しているかどうかを判別することを含む方法。

50

【請求項 18】

感染の判別が、ブタから得た生物試料中の P C V 核酸の存在を検出することによって行われる請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

配列番号 1 から配列番号 6 の 20 個の連続塩基に見出される配列、またはその相補配列を有する少なくとも約 20 塩基のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

感染の判別が、ブタから得た生物試料中の P C V ポリペプチドの存在を検出することによって行われる請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 21】

配列番号 1 から配列番号 6 の任意の配列の任意の O R F 1 から O R F 11 によってコードされた配列からなる群から選択された配列を有するポリペプチドを特異的に結合する抗体の結合を検出することを含む請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

感染の判別が、ブタから得た生物試料中の P C V ポリペプチドに対する抗体の存在を検出することによって行われる請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 10 に記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項 24】

ブタまたはその子孫において先天性振せんを予防または治療する方法であって、そのような治療を必要とするブタに、1 型または 2 型 P C V 株の免疫原性ポリペプチド、およびアジュバントを含む免疫防御量のワクチンを投与することを含む方法。

20

【請求項 25】

P C V ポリペプチドが、配列番号 1 から配列番号 6 の任意の配列の任意の O R F 1 から O R F 11 によってコードされた配列からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

ブタまたはその子孫において先天性振せんを予防または治療する方法であって、そのような治療を必要とするブタに、配列番号 1 から配列番号 6 の任意の配列の任意の O R F 1 から O R F 11 によってコードされた配列からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する免疫原性ポリペプチド、およびアジュバントを含む免疫防御量のワクチンを投与することを含む方法。

30

【請求項 27】

ブタまたはその子孫において先天性振せんを予防または治療する方法であって、そのような治療を必要とするブタに、1 型または 2 型 P C V 株の免疫原性ポリペプチドをコードする免疫防御量の P C V 核酸を、薬学的に許容される担体と共に投与することを含む方法。

【請求項 28】

P C V ポリペプチドが、配列番号 1 から配列番号 6 の任意の配列の任意の O R F 1 から O R F 11 によってコードされた配列からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する請求項 27 に記載の方法。

40

【請求項 29】

ブタまたはその子孫において先天性振せんを予防または治療する方法であって、そのような治療を必要とするブタに、配列番号 1 から配列番号 6 の任意の配列の任意の O R F 1 から O R F 11 によってコードされた配列からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する免疫原性ポリペプチドをコードする免疫防御量の P C V 核酸を、薬学的に許容される担体と共に投与することを含む方法。

【請求項 30】

ブタまたはその子孫において先天性振せんを予防または治療する方法であって、そのような治療を必要とするブタに、免疫防御量の請求項 23 に記載の抗体を投与することを含む

50

方法。

【請求項 3 1】

ブタ・シルコウイルス株を培養する方法であって、配列番号 1 から配列番号 6 からなる群から選択された配列を含む核酸を、配列番号 1 から配列番号 6 からなる群から選択された配列を含むゲノムを有するブタ・シルコウイルス粒子の産生をもたらす条件下で、適切な宿主細胞に導入することを含む方法。

【請求項 3 2】

宿主細胞が P K - 1 5 細胞である請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

核酸がクローン化された 2 本鎖 D N A の形態で導入される請求項 3 1 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本出願は、3 5 U . S . C . § 1 1 9 (e) に基づいて 2 0 0 0 年 6 月 1 5 日に出願された米国特許仮出願第 6 0 / 2 1 1 7 1 0 の優先権を主張するものであり、その出願の全体を参照により本明細書の一部とする。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

本発明は、ブタ・シルコウイルス (P C V) とブタにおける先天性振せん (震顫) との関連性の同定に関し、関連する診断および治療組成物および方法に関する。本発明は、より詳細には、特定の先天性振せん関連 P C V 核酸およびポリペプチドに関する。

20

【0 0 0 3】

ブタ・シルコウイルス (P C V) は、当初は、ブタ腎臓細胞系、P K - 1 5 の非細胞変性性混入物として発見された (T i s c h e r 等、M e d i z i n i s c h e M i k r o b i o l o g i e u n d P a r a s i t o l o g i e 2 2 6 : 1 5 3 - 1 6 7 、 1 9 7 4) 。このウイルスは、1 9 8 2 年に特性決定され (T i s c h e r 等、N a t u r e 、 2 9 5 : 6 4 - 6 6 、 1 9 8 2) 、ニワトリ貧血ウイルス (Y u a s a 等、A v i a n D i s e a s e s 2 3 : 3 6 6 、 1 9 7 9) 、オウム嘴羽毛病ウイルス (P a s s および P e r r y 、A u s t r i a l V e t e r i n a r y J o u r n a l 、 6 1 : 6 9 - 7 4 、 1 9 8 4) 、およびハト・シルコウイルス (W o o d s 等、J o u r n a l o f V e t e r i n a r y D i a g n o s t i c I n v e s t i g a t i o n s : 5 : 6 0 9 - 6 1 2 、 1 9 8 3) と共にシルコウイルス科に分類された。シルコウイルスのゲノムは、環状 1 本鎖アンピセンス D N A ゲノムの単一コピーからなる (L u k e r t 等、S i x t h R e p o r t o f t h e I n t e r n a t i o n a l C o m m i t t e e o n T a x o n o m y o f V i r u s e s 、 1 6 6 - 1 6 8 、 1 9 9 5) 。このゲノムの大きさは、1 . 7 から 2 . 3 k b の間で多様である。シルコウイルスは、非エンベロープ型であり、正 2 0 面体対称を有する。P K - 1 5 細胞由来の P C V は、初め病原性ではないと考えられていた。その完全ゲノムが配列決定され (M e e h a n 等、J o u r n a l o f G e n e r a l V i r o l o g y 7 8 : 2 2 1 - 2 2 7 、 1 9 9 7) 、電子顕微鏡検査法によって特性決定された (S t e v e n s o n 等、V e t e r i n a r y P a t h o l o g y 3 6 : 3 6 8 - 3 7 8 、 1 9 9 9) 。P K - 1 5 - P C V は自然発生疾患と関連づけて考えられたことはなく、ブタの実験接種は臨床的疾患を生じなかった (T i s c h e r 等、A r c h i v e s o f V i r o l o g y 9 1 : 2 7 1 - 2 7 6 、 1 9 8 6 、A l l a n 等、J o u r n a l o f C o m p a r a t i v e P a t h o l o g y 1 2 1 : 1 - 1 1 、 1 9 9 5) 。

30

40

【0 0 0 4】

P K - 1 5 - P C V 、ニワトリおよびオウム動物シルコウイルス、植物ジェミニウイルスおよびナノウイルス (以前には植物シルコウイルスとして知られていた) の系統発生分析は、P K - 1 5 - P C V をオウム嘴羽毛病ウイルスにもっとも近いと分類し、P K - 1 5 - P C V とオウム・シルコウイルスは共に、2 種の植物ウイルス群と特徴を共有しており、それらの中間であった (N i a g r o 等、A r c h i v e s o f V i r o l o g y

50

143:1723-1744、1998)。さらなる分析は、PK-15-PCVおよび/またはオウム・シルコウイルスの前身は、脊椎動物宿主に感染して、脊椎動物感染RNAウイルス、おそらくカリチウイルスと組み換えられた植物ナノウイルスに源を発することを示唆した(GibbsおよびWeiller、Proceedings of the National Academy of Sciences、USA、96:8022-8027、1999)。

【0005】

PCVによる感染は、離乳後多臓器性発育不全症候群(PMWS)と関連づけられており、この症候群は離乳後のブタにおける進行性体重減少、呼吸困難、頻呼吸、および黄疸によって臨床的に特徴づけられる(Daft等、Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians、Little Rock、AR、USA、32頁、1996、Clark、Proceedings of the 28th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners、Quebec City、Quebec、499-501頁、1997、Kiupel等、Indiana Veterinary Pathology 35:303-307、1998、Ellis等、Canadian Veterinary Journal 39:44-51、1998、AllanおよびEllis、Journal of Veterinary Diagnostic Investigations 12:3-14、2000)。いくつかのPMWS関連PCVの完全ゲノム配列は入手可能である(Hamel等、Journal of Virology 72:5262-5267、1998、Meehan等、Journal of General Virology 79:2171-2179、1998、Morozov等、Journal of Clinical Microbiology 9:2535-2541、1998、Mankerts等、Virus Research、6665-77、2000、WO99/18214、WO99/45956、米国特許第6217883号)。PMWS-PCVの単離株は、抗原的および遺伝子的にPK-15-PCVと異なる(Allan等、Journal of Veterinary Diagnostic Investigations 10:3-10、1998、Hamel等、Journal of Virology 72:5262-5267、1998)。したがって、PCV1と呼ばれる元のPK-15細胞培養単離株と対照的に、これらのPMWS-関連PCVはPCV2と呼ばれた(Meehan等、Journal of General Virology 79:2171-2179、1998)。

【0006】

ブタにおける先天性振せん(CT)は、ミエリン欠損と関連づけられており、遺伝的異常(Harding等、Vet Rec 92:527-529、1973、Patterson等、J Neurochem 26:481-485、1976)、胎内トリクロルフオン毒性(Knox等、Nord Veterinaermed 30:538-545、1978)、および古典的ブタコレラ・ウイルスの胎内感染(Harding等、Vet Rec 79:388-390、1966)、またはアウエスキー・ウイルス(Mare等、J Am Vet Med Assoc 164:309-310、1974)が原因である可能性がある。北米でもっとも一般的なCTの形態は伝染性であり、A2型と分類されている(Done等、Veterinary Annual 16:98-102、1976)。CTA2型の疫学はこれまで検討されてきた(Bolin等、Leman AD、Straw BE、Mengeling WL、D'Allaire S、Taylor DJ編、第7版、247-249頁、1992)。疾患はすべての品種で起こり、季節性ではなく、初産雌ブタの同腹子でより一般的であり、しばしば外部からの補充繁殖家畜の導入に伴う(Stromberg等、Am J Vet Res 19:377-382、1958)。冒された同腹子内の有病率は0-100%まで多様である。発生は一般に1-8週間続くが、疾患が風土性であることはまれである。罹患ブタは、異なる重篤度で骨格

筋の間代性収縮を示し、これは一般に4週齢までに減少、消散するが、屠殺齢まで持続する可能性もある。ブタが安静にしているとき、ミオクロヌスは弱まり、外部刺激によって増悪する(Christensen等、Nord Veterinærmed 8:921-943、1956、Stromberg等、Am J Vet Res 20:319-323頁および627-633頁、1959)。罹患ブタの死亡率は50%という高い率となる可能性があり、これは哺乳ができないことによる。

【0007】

ウイルスとCTA2型との関連性は長い間知られてきたが、これまでのところそのウイルス株は同定されていない。最初の研究は、CTA2型を有する新生ブタ由来の1次腎細胞培養物から得た濾液中の約20nmの立方体様未同定ウイルスを記載している(Kanitz CL、1972、Myoclonia congenita: Studies of the resistance to viral infection of tissue culture cell lines derived from myoclonic pigs、博士論文、Purdue University、West Lafayette、IN)。これらの研究には、腎細胞培養物上澄みの濾液として調製された立方体様ウイルスによる妊娠雌ブタの筋肉内接種も含まれており、これによって先天性振せんを有する同腹子が分娩された。他の研究者等は、CTA2型を有するブタから得た1次腎細胞培養物から塩化セシウム勾配でウイルスを精製し、そのウイルスを形態学および間接免疫法に基づいてPCVと同定した(Hines RK、1994、Porcine circovirus causes congenital tremors type A-11 proved by fulfilling Koch's postulates、博士論文、University of Georgia、Athens、GA)。続いて妊娠第3三半期の妊娠ブタに精製ウイルスを皮下、経鼻、および経口接種することによって、先天性振せんを有するブタが分娩された。PCVは、CTを有するブタの腸管組織から再単離されたが、神経組織からは再単離されず、擬接種雌親由来の正常な対照ブタの組織からは再単離されなかった。PMWSPCV単離株を増幅するために設計されたPCRプライマー・セットを用いて、CTを有するブタ群の試料からPCVDNAも見出された(G.W. Stevenson等、IX International Symposium、College Station、Texas、1999年6月)。

【0008】

しかしながら、CTに関連するPCV単離株の遺伝子分析は、まだ報告されていない。したがって、PCVと先天性振せんとの関連性を確認すること、この疾患に関わるPCVの型を正確に同定することが求められている。現在は先天性振せんに対する有効な診断試験もワクチンも入手不可能であり、実際のところ、そのような分析によってのみ、ブタの先天性振せんに対する診断用および治療用ツールの製造が可能となるかもしれない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】

本発明は、先天性振せんを有するブタのブタ・シルコウイルス(PCV)株のクローニングに基づく。

【0010】

これらの結果は、診断および治療応用例の発展の第一段階を提供する。

【0011】

したがって本発明は、ブタの先天性振せんの病理原因を診断する方法を提供し、その方法は、そのブタがブタ・シルコウイルス株の1型または2型に感染しているかどうかを判別することを含む。

【0012】

本発明はさらに、ブタの先天性振せんを予防または治療する方法を提供し、その方法は、有効量の免疫原性PCV1またはPCV2ポリペプチド、あるいはこのポリペプチドをエンコードする核酸をそのブタに投与することを含む。

【0013】

10

20

30

40

50

本発明の他の主題は、本発明者等によって同定された新規な P C V 核酸配列、その配列によってエンコードされたポリペプチド、ならびに新規な P C V 単離株およびその免疫原性製剤である。

【 0 0 1 4 】

したがって、本発明は単離されたブタ・シルコウイルス (P C V) に関し、その核酸は、配列番号 1 から配列番号 7 からなる群から選択された配列と同一である配列を有する。

【 0 0 1 5 】

本発明はさらに、ブタ・シルコウイルス (P C V) から単離された核酸に関し、その核酸は、任意の配列番号 1 から配列番号 7 の配列の、任意の O R F 1 から O R F 1 1 によってコードされた配列かならなる群から選択された配列を有するシルコウイルス・ポリペプチドをコードする配列を含む。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の他の主題は、発現制御配列と有効に結合しているこの核酸を含む発現ベクターである。

【 0 0 1 7 】

この発現ベクターは、薬学的に許容される賦形剤と結合してワクチンを形成することができ、これも本発明の一部である。

【 0 0 1 8 】

本発明はさらに、この発現ベクターを含む宿主細胞を対象とする。

【 0 0 1 9 】

20

本発明はさらに、 P C V タンパク質を産生する方法を提供し、その方法は、シルコウイルスをコードする核酸の発現をもたらす条件下で、この宿主細胞を培養することを含む。

【 0 0 2 0 】

任意の配列番号 1 から配列番号 7 の O R F 1 から O R F 1 1 によってエンコードされたアミノ酸配列を含むポリペプチド、ならびにそれらのポリペプチドに対する抗体も本明細書に記載される。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらなる主題は、ブタ・シルコウイルス株を培養する方法であり、その方法は、配列番号 1 から配列番号 6 からなる群から選択された配列を含む核酸を、配列番号 1 から配列番号 6 からなる群から選択された配列を含むゲノムを有するブタ・シルコウイルス粒子の産生をもたらす条件下で、適切な宿主細胞に導入することを含む。

30

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、配列番号 1 から配列番号 6 から選択された配列を含むゲノムを有する単離 P C V 株を包含する。

【 0 0 2 3 】

【 発明の実施の形態 】

本発明は、先天性振せんに関する病原体の株を確実に同定するという問題を解決する。先天性振せんを有するブタのブタ・シルコウイルス (P C V) 株をクローニングおよび配列決定し、それらを P M W S に関連する P C V 株と比較することによって、プライマー、プローブ、またはウイルス株などの多くの有用な材料の発展に至った。本発明は、知られている C T 病原性の株のクローニング、ウイルスの培養を可能にする。

40

【 0 0 2 4 】

本発明は、ブタのニューロンに存在する、ならびにより少ない程度で脳のグリア細胞および脊髄に存在する P C V ゲノム D N A が、離乳後多臓器性発育不全症候群 (P M W S) に関連する株のゲノム D N A と、約 9 5 % を超える非常に近い配列類似性を共有するという発見に部分的に基づいている。先天性振せん (C T) または P M W S を有するブタから得た 7 種の P C V 単離株の全ゲノムを、クローン化し、配列決定した。単離株の 1 種は、1 9 6 0 年代終わりに単離された C T A 2 型を有する新生ブタから得たものであった。2 種の新しい P C V 単離株は、無関係に発生した C T A 2 型を有する異なる農場の 2 頭の感染新生ブタから得た。4 種の単離株は、P M W S を有するブタの、4 つの異なる農場を起源

50

とするものであった。この4種のPMWS-PCVの比較分析は、それらが互いに99%の配列同一性を共有し、以前に配列決定されたPMWS-PCVと96%を超える配列同一性を共有することを実証した。しかしながら2種の新しいCT-PCVは、互いに、さらに興味深いことに新しいPMWS-PCV単離株とも99%の同一性を共有した。PMWSと新しいCT単離株との間に、一貫したゲノムの相違はなかった。古いCT-PCVは、PK-I5由来PCV株と98%の同一性を示し、新しいCT-PCVとはわずか72%の同一性を示した。系統発生分析は、PCV単離株が2つのグループに分類できることを確認した。PCVI型は、PK-15-PCV、および本発明の古いCT-PCV単離株からなり、PCV2型は、PMWS、および本発明の新しいCT単離株を含む。

【0025】

さらなる研究によって、*in-situ*ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、および凍結組織切片の間接蛍光抗体試験を用いて、天然CTA2型を有する1-2日齢ブタにおけるPCVの組織分布、および遺伝子型を確立した。CTA2型が発生した米国中西部の4つの農場を起源とする、CT罹患ブタ、および臨床的に正常なブタを選択した。CTブタのすべて、および正常ブタのほとんどが、PCVに感染していた。PCVは感染ブタの組織に広範に分布しており、中枢神経組織、および肝臓にもっとも一般的に分布していた。すべての感染ブタにおいて、非神経組織に比べて、脳および脊髄により多くのPCV感染細胞が存在した。CTブタは、分布が広汎で、感染細胞の割合が高いために、臨床的に正常なブタに比べて、脳および脊髄により多くのPCV感染細胞を有した。脳および脊髄において、もっとも一般的にPCVが感染した細胞は、大ニューロンであった。非神経組織では、マクロファージがもっとも高頻度に感染した細胞型であった。PCR試験は、4つのすべての農場のすべてのPCV感染ブタにおいて、PCV2型のみを実証し、PCV1型は実証されなかった。

【0026】

本発明はさらに、PCV2が感染雌ブタから胎内の同腹子に伝播され得るという証拠に基づいている。したがってPCV2は、単独で、あるいは補因子との組合せによって、先天的に伝播可能である。

【0027】

上述のとおり、これらの発見は、PCVのCTとの病因論的關係、ならびにPMWSに関連するPCVウイルス間の關係のあいまいさを解明する(従来の研究は、たとえば、実際にPCVがCTの病原体であった場合にも、別のPCVウイルス株がCTに関連する可能性を残していた)。したがって、本明細書に記載した新規なPCV株(たとえば、PMWS-PCV-P1、PMWS-PCV-P2、PMWS-PCV-P3、PMWS-PCV-P4、CT-PCV-P5、CT-PCV-P6、およびCT-PCV-P7)に加えて、本発明は、これらの試薬をベースとする診断および治療方法および材料を提供し、診断上の評価、および治療的、特に免疫学的介入の標的としてPCV、特にPCV2型を同定する。

【0028】

本明細書では、「PCV」という用語は、たとえばブタおよびウシ・シルコウイルス単離株の全ゲノムの距離マトリクス分析(図3)に示したように、特にブタ・シルコウイルスを指す。特に、PCVという用語は、PMWS-PCV-P1(配列番号1)、PMWS-PCV-P2(配列番号2)、PMWS-PCV-P3(配列番号3)、PMWS-PCV-P4(配列番号4)、CT-PCV-P5(配列番号5)、およびCT-PCV-P6(配列番号6)を意味する。さらに、PCVには、CT-PCV-P7(配列番号7)、PK-15 PCV(Meehan等、1997)、およびPMWS-PCV(Hamel等、1998)が含まれる。

【0029】

「PCVポリペプチド」(または「PCVタンパク質」)は、PCVオープン・リーディング・フレーム(ORF)によってエンコードされたポリペプチド遺伝子産物を指す。各PCVは11のORFを有し、したがって上記のとおり、各株に対してORF1、ORF

10

20

30

40

50

2、ORF 3、ORF 4、ORF 5、ORF 6、ORF 7、ORF 8、ORF 9、ORF 10、およびORF 11が存在する。ORFおよびそれらがエンコードするポリペプチドの特徴は、以下の実施例1の表、および図4 - 14に示す。

【0030】

「ワクチン」という用語は、レシピエント（受容者）において防御免疫性を誘導するために用いることのできる組成物（タンパク質またはベクター。後者は、厳密でなく「DNAワクチン」と呼ぶこともできるが、RNAベクターも使用可能である）を指す。本発明のワクチンは母集団の一部において免疫性を誘導することができ、いくつかの個体では、強固な免疫応答、または防御的な免疫応答を開始できず、あるいは場合によってはいかなる免疫応答も開始できない可能性があることに留意されたい。この無効性は、個々の遺伝的背景に由来するか、あるいは免疫欠損状態（後天性または先天性）、または免疫抑制（たとえば、器官拒絶を防ぐため、または自己免疫状態を抑制するための免疫抑制剤による治療）によるものである。

10

【0031】

「免疫療法」という用語は、病原体特異免疫応答の活性化に基づく治療計画を指す。ワクチンは、免疫療法の一形態であり得る。ex vivo（その後、対象に移植）、またはin vivoで、樹状細胞に、PCVポリペプチド、場合によっては刺激サイトカイン、たとえばGM-CSFまたはFlt3リガンドを負荷することも免疫療法の一形態である。

【0032】

本明細書では、「防御する」という用語は、対象におけるPCV感染の予防または治療、あるいは適宜その両方を意味する。したがって、ワクチンの予防的投与は、レシピエント対象をPCV感染から防御することができ、たとえば感染性単核球症、またはリンパ増殖性疾患を予防することができる。ワクチンの治療的投与または免疫療法は、レシピエントをPCV感染媒介性病因から防御することができ、たとえばPMWSまたはCTなどの疾患または障害を治療することができる。

20

【0033】

本明細書では、「対象」という用語は、PCVを支持（維持）する動物を指す。特に、この用語はブタを指す。

【0034】

本明細書では、「ブタにおける発現のためのベクター」、または「ブタ発現ベクター」という用語は、ブタ細胞において有効なプロモータを少なくとも含むベクターを意味し、好ましくはブタにおいて安全で有効なベクターを意味する。そのようなベクターは、たとえば、免疫性の発展に関与しない外来遺伝子を除外する。ベクターがウイルス・ベクターである場合、強固な感染の複製および展開を可能にする部位を除外し、in vivoでの複製能力の発達を回避するために操作される。そのようなベクターは、好ましくは、農場のブタに用いるのに安全であり、より好ましい実施形態において、ベクターは、ブタにおける臨床試験または使用に関して、政府規制機関（たとえば、米国農務省など）によって承認されている。特定のベクターは以下に詳しく記載する。

30

【0035】

本明細書では、「免疫原性ポリペプチド」という用語は、そのポリペプチドが、体液性または細胞性、好ましくは両方の免疫応答を誘導できることを意味する。免疫原性ポリペプチドは抗原性でもある。ある分子は、免疫系の抗原認識分子、たとえば免疫グロブリン（抗体）、またはT細胞抗原受容体などと特異的に相互作用することができるとき、「抗原性」である。抗原性ポリペプチドは、少なくとも約5個、好ましくは少なくとも約10個のアミノ酸のエピトープを含有する。本明細書ではエピトープとも呼ばれるポリペプチドの抗原性部分は、抗体またはT細胞受容体認識に関して免疫優性な部分であることが可能であり、あるいはその抗原性部分を免疫化のための担体ポリペプチドと複合して、その分子に対する抗体を産生するために用いられる部分であることができる。抗原性である分子は、それ自体が免疫原性である、すなわち担体なしに免疫応答を誘導できる必要はない。

40

50

【0036】

「アジュバント」という用語は、抗原に対する免疫応答を増強する化合物または混合物を指す。アジュバントは、ゆっくりと抗原を放出する組織貯蔵所として機能することができ、さらに非特異的に免疫応答を増強するリンパ系活性化剤として機能することも可能である（Hood等、Immunology、第2版、1984、Benjamin/Cummings、Menlo Park、California、384頁）。多くの場合、アジュバントが存在しないとき、抗原単独による1次投与は、体液性または細胞性免疫応答を誘導できないであろう。アジュバントには、これに限定されるものではないが、Freund完全アジュバント、Freund不完全アジュバント、サポニン、鉍物ゲル、たとえば水酸化アルミニウムなど、界面活性物質、たとえばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油、または炭化水素エマルジョンなど、および潜在的に有用なヒト・アジュバント、たとえばBCG（カルメット・گران杆菌）および挫瘡プロピオンバクテリウムなどが含まれる。別法として、またはこれに加えて、以下に記載する免疫刺激タンパク質をアジュバントとして、またはワクチンに対する免疫応答を高めるために用いることができる。好ましくは、このアジュバントは薬学的に許容される。

10

【0037】

「薬学的に許容される」、または「獣医学的に許容される」という語句は、動物に投与されたとき、生理的に耐性であり、典型的にアレルギー反応、または類似の不都合な反応、たとえば胃の不調、めまい感などを生じない分子実体、および組成物を指す。本明細書では、好ましくは、「薬学的に許容される」という用語は、連邦政府または州政府の規制機関によって承認されている、あるいは米国薬局方、または動物に用いるための一般に認められている他の薬局方に挙げられていることを意味する。「担体」という用語は、それと共に化合物を投与する、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。滅菌水または水溶液、食塩水、ならびにデキストロスおよびグリセロール水溶液は、特に注射可能溶液用に担体として好ましく用いられる。適切な薬剤担体は、E. W. Martinの「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

20

【0038】

本明細書では、「単離」という用語は、言及された材料が、その天然の環境、たとえば細胞から取り出されることを意味する。したがって、単離された生物材料は、いくつかの、またはすべての細胞成分、すなわちその天然材料が天然に発生する細胞の成分（たとえば、細胞質成分または細胞膜成分）を含まないことが可能である。ある材料が細胞抽出物中に存在する場合、または異種細胞または細胞抽出物中に存在する場合、単離されたものとみなされる。核酸分子の場合、単離核酸には、PCR産物、単離mRNA、cDNA、または制限フラグメントが含まれる。単離核酸分子には、プラスミド、コスミド、人工染色体などに挿入された配列が含まれ、すなわちそれがキメラ組換え核酸構成体の一部を形成する。したがって、特定の実施形態において、組換え核酸は単離核酸である。単離タンパク質は、それが細胞内で結合する他のタンパク質、または核酸、あるいはその両方と結合していてもよく、あるいは膜結合タンパク質である場合、細胞膜と結合していてもよい。単離小器官、細胞、または組織は、生体においてそれが見出される解剖学的部位から取り出される。単離材料は、必要ではないが、精製することができる。

30

40

【0039】

本明細書では、「精製」という用語は、その材料が得られた天然材料を含む関連のない材料、すなわち不純物の存在を低減または排除する条件下で単離された材料を指す。たとえば、精製タンパク質は、好ましくは、細胞内でそれが結合している他のタンパク質、または核酸を実質的に含まず、精製核酸分子は、好ましくは、細胞内でそれとともに見出される可能性のある、タンパク質、または他の関連のない核酸分子を実質的に含まない。本明細書では、「実質的に含まない」という用語は、材料の分析試験のコンテキストにおいて適切に用いられる。好ましくは、実質的に不純物を含まない精製材料は、少なくとも50%の純度である。純度は、クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、イムノアッセイ、組成分析

50

、生物学的検定、および当分野で知られる他の方法によって評価することができる。

【0040】

本発明に従って、当分野の技術の範囲内である通常の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技法を用いることができる。そのような技法は文献において十分に説明されている。たとえば、Sambrook、Fritsch、およびManiatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York(本明細書において「Sambrook等、1989」とする)、DNA Cloning: A Practical Approach、第1巻および第2巻(D. N. Glover編、1985)、Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編、1984)、Nucleic Acid Hybridization[B. D. HamesおよびS. J. Higgins編(1985)]、Transcription And Translation[B. D. HamesおよびS. J. Higgins編(1984)]、Animal Cell Culture[R. I. Freshney編(1986)]、Immobilized Cells And Enzymes[IRL Press(1986)]、B. Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning(1984)、F. M. Ausubel等(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons, Inc. (1994)を参照されたい。

【0041】

「オープン・リーディング・フレーム」、「コード配列」、または発現産物、たとえばRNA、ポリペプチド、タンパク質、または酵素などを「エンコードする」配列は、発現したときに、RNA、ポリペプチド、タンパク質、または酵素の産生をもたらすヌクレオチド配列であり、すなわちそのヌクレオチド配列は、そのポリペプチド、タンパク質、または酵素のアミノ酸配列をエンコードする。タンパク質のコード配列には、開始コドン(一般にATG)、および終止コドンを含むことができる。

【0042】

RNAポリメラーゼがコード配列をRNA、特にmRNAに転写し、次いでそれがトランスRNAスプライシングされ(イントロンを含有する場合)、そのコード配列によってエンコードされたタンパク質に翻訳されるとき、コード配列は、細胞内で転写および翻訳制御配列の「制御下にある」か、あるいは「機能的に結合している」。

【0043】

「発現調節配列」は、エンハンサ、レプレッサ、またはプロモータ配列を含む、転写または翻訳調節配列である。

【0044】

「プロモータ」または「プロモータ配列」は、細胞内でRNAポリメラーゼを結合し、下流(3'方向)のコード配列の転写を開始することのできるDNA調節領域である。本発明を定義するために、プロモータ配列は、転写開始部位によってその3'末端に結合され、バックグラウンドを超えて検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基または要素を含むために上流(5'方向)に延長する。プロモータ配列内で、転写開始部位(たとえば、ヌクレアーゼS1を用いるマッピングによって都合よく定義される)、ならびにRNAポリメラーゼの結合を起こすタンパク質結合領域(コンセンサス配列)が見出される。

【0045】

「ベクター」、「クローニング・ベクター」、および「発現ベクター」という用語は、それによってDNAまたはRNA配列(たとえば、外来遺伝子)を宿主細胞に導入し、それによって宿主を形質転換し、導入された配列の発現(たとえば、転写および翻訳)を促進することのできるビヒクルを意味する。ベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルスなどが含まれ、それらについては以下に詳しく論じる。

【0046】

ベクターは典型的に、伝達性因子のDNAを含有し、その中に外来DNAが挿入される。DNAの1つの断片をDNAの別の断片に挿入する一般的な方法には、制限部位と呼ばれる特定の部位（特定のヌクレオチド群）でDNAを開裂する制限酵素と呼ばれる酵素を使用することが含まれる。

【0047】

「カセット」は、定義された制限部位でベクターに挿入されることのできる発現産物をコードするDNAコード配列、またはDNAの断片を指す。カセット制限部位は、適切なリーディング・フレーム内に確実にカセットを挿入するように設計されている。一般に、外来DNAは、ベクターDNAの1つまたは複数の制限部位に挿入され、次いで、ベクターによって伝達性ベクターDNAと共に宿主細胞に運ばれる。発現ベクターなどの挿入または付加DNAを有するDNAの断片または配列は、「DNA構成体」と呼ぶこともできる。ベクターの一般的な型は「プラスミド」であり、これは一般的に、通例は細菌起源の2本鎖DNAの自己完結型分子であり、容易に追加の（外来）DNAを受容することができ、容易に適切な宿主細胞に導入される。プラスミド・ベクターは多くの場合、コーディングDNAおよびプロモータDNAを含有し、外来DNAの挿入に適した1つまたは複数の制限部位を有する。コーディングDNAは、特定のタンパク質または酵素に関する特定のアミノ酸配列をエンコードするDNA配列である。プロモータDNAは、コーディングDNAの発現を開始、調節、あるいは仲介、または制御するDNA配列である。プロモータDNA、およびコーディングDNAは、同一の遺伝子由来であることができ、あるいは異なる遺伝子由来であることができ、さらに同一の生体由来、または異なる生体由来であることができる。プラスミドおよび菌類ベクターを含む多数のベクターが、多様な真核生物および原核生物宿主における複製および/または発現に関して記載されてきた。非限定的な例には、pKKプラスミド（Clontech）、pUCプラスミド、pETプラスミド（Novagen, Inc., Madison, WI）、pRSETまたはpREPプラスミド（Invitrogen, San Diego, CA）、またはpMALプラスミド（New England Biolabs, Beverly, MA）、および本明細書に記載または引用した方法、あるいは関連分野の技術者に知られている方法を用いる多くの適切な宿主細胞が含まれる。組換えクローニング・ベクターは多くの場合、クローニングまたは発現のための1つまたは複数の複製系、宿主における選択のための1つまたは複数のマーカ、たとえば抗生物質抵抗性など、および1つまたは複数の発現カセットを含む。

10

20

30

【0048】

「発現する」および「発現」という用語は、遺伝子またはDNA配列の情報が顕性となるのを可能にすること、あるいはそれをもたらすことを意味し、たとえば対応する遺伝子またはDNA配列の転写および翻訳に関わる細胞機能を活性化することによってタンパク質を産生する。DNA配列は、細胞において、または細胞によって発現し、タンパク質などの「発現産物」を形成する。発現産物自体、たとえば生じたタンパク質も、その細胞によって「発現した」と言うことができる。発現産物は、細胞内、細胞外、または分泌型として特徴づけることができる。「細胞内」という用語は、細胞の内部にあるものを意味する。「細胞外」という用語は、細胞の外部にあるものを意味する。ある物質が細胞上または内部のどこからか、著しい程度で細胞外部に現れる場合、その物質は細胞によって「分泌」されている。

40

【0049】

「トランスフェクション」という用語は、細胞への外来核酸の導入を意味する。「形質転換」という用語は、「外来」（すなわち、外在または細胞外）遺伝子、DNAまたはRNA配列の宿主細胞への導入を意味し、それによって宿主細胞は導入遺伝子または配列を発現し、所望の物質、典型的には導入遺伝子または配列によってコードされたタンパク質または酵素を産生することになる。導入遺伝子または配列は、「クローン」または「外来」遺伝子または配列と呼ぶこともでき、調節または制御配列、たとえば開始、終止、プロモ

50

ータ、シグナル、分泌、または細胞の遺伝子機構によって用いられる他の配列などを含むことができる。この遺伝子または配列は、非機能性配列、または未知の機能を有する配列を含むことができる。導入DNAおよびRNAを受容し、発現する宿主細胞は、「形質転換」されており、「形質転換体」または「クローン」である。宿主細胞に導入されたDNAまたはRNAは、任意の供給源由来であることができ、宿主細胞と同一の属または種の細胞、あるいは異なる属または種の細胞を含む。

【0050】

「宿主細胞」という用語は、たとえば遺伝子、DNAまたはRNA配列、タンパク質、または酵素の細胞による発現など、細胞による物質の産生のために、選択、修飾、形質転換、増殖、あるいは任意の方法で用いられるか、操作される任意の生体の任意の細胞を意味する。適切な宿主細胞には、1次マクロファージ、特にブタ・マクロファージ、またはそのマクロファージ細胞系、ブタ腎細胞、あるいはPCVがウイルスを産生できる、またはそれがウイルス感染を支持できる、またはその両方であるような他の哺乳動物細胞が含まれる。

10

【0051】

「発現系」という用語は、たとえばベクターによって運ばれ、宿主細胞に導入された外来DNAによってコードされるタンパク質の発現のためなどの、適切な条件下にある宿主細胞、および適合性ベクターを意味する。一般的な発現系には、大腸菌宿主細胞およびプラスミド・ベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルス・ベクター、ならびに哺乳動物宿主細胞およびベクターが含まれる。特定の実施形態において、当該タンパク質は、COS-1、またはC₂C₁₂細胞に発現する。他の適切な細胞には、CHO細胞、HeLa細胞、293T（ヒト腎細胞）、マウス1次筋芽細胞、およびNIH3T3細胞が含まれる。

20

【0052】

ポリヌクレオチド配列の「配列保存的変異体」とは、所与のコドン位置における1つまたは複数のヌクレオチドの変化が、その位置でエンコードされたアミノ酸に変更を生じない変異体である。

【0053】

「機能保存的変異体」とは、タンパク質または酵素中の所与のアミノ酸残基が、ポリペプチドの全体的なコンフォメーションおよび機能を変更することなく、変化している変異体であって、これに限定されるものではないが、類似の特性（たとえば、極性、水素結合能、酸性、塩基性、疎水性、芳香性など）を有するものによるアミノ酸の置換が含まれる。類似の特性を有するアミノ酸は、当技術分野においてよく知られている。たとえば、アルギニン、ヒスチジン、およびリシンは、親水性・塩基性アミノ酸であり、互換性である可能性がある。同様に、疎水性アミノ酸のイソロイシンは、ロイシン、メチオニン、またはバリンと置換することができる。そのような変化は、見かけの分子量、あるいはタンパク質またはポリペプチドの等電点にほとんど、またはまったく影響を及ぼさないことが予期される。保存として指示された以外のアミノ酸はタンパク質または酵素中で異なっている可能性があり、そのため類似の機能を有する任意の2つのタンパク質の、タンパク質またはアミノ酸配列の類似性パーセントは多様であり、MEGALIGNアルゴリズムに基づくCluster Methodなどによるアライメント・スキームによって求めた類似性は、たとえば70%から99%であることができる。「機能保存的変異体」はさらに、BLASTまたはFASTAアルゴリズムによって求めたアミノ酸同一性が、少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、もっとも好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%であって、比較される天然または親タンパク質または酵素と同一の、または実質的に類似の特性または機能を有するポリペプチドまたは酵素を含む。

30

40

【0054】

本明細書では、すべての文法形態および綴りの変形形態の「相同性(homologous)」という用語は、スーパーファミリー由来のタンパク質（たとえば、免疫グロブリン・スーパーファミリー）、および異なる種由来の相同性タンパク質（たとえば、ミオシン

50

軽鎖など)を含む、「共通の進化学的起源」を有するタンパク質間の関係を指す (Reeck 等、Cell 50: 667、1987)。そのようなタンパク質 (およびそれらのエンコード遺伝子) は、類似性パーセントまたは保存位置における特定の残基またはモチーフの存在という点において、それらの配列類似性によって表される配列相同性を有する。

【0055】

したがって、すべての文法形態の「配列類似性」という用語は、共通の進化学的起源を共有していても、共有していなくてもよいタンパク質の核酸またはアミノ酸配列間の同一性または対応の程度を指す (上述の Reeck 等を参照のこと)。しかしながら、慣例的な使用、および本出願において、「高度に」などの副詞によって修飾されているとき、「相

10

【0056】

特定の実施形態において、BLAST、FASTA、DNASTriderなどの配列比較アルゴリズムによって求められたDNA配列の定義された長さに渡るヌクレオチドの一致が、少なくとも約80%、もっとも好ましくは少なくとも約90または95%であるとき、2つのDNA配列は、「実質的に相同性」、または「実質的に類似性」である。そのような配列の例は、本発明の特定の遺伝子の対立遺伝子、または種変異体である。実質的に相同性である配列は、たとえば特定のシステムに関して定義された厳格な条件下で、配列データバンクで入手可能な標準的なソフトウェアを用いて、またはサザン・ハイブリダイゼーション実験において、配列を比較することによって同定できる。

20

【0057】

同様に、特定の実施形態において、80%を超えるアミノ酸が同一であるとき、または約90%を超えるアミノ酸が類似している (機能的に同一である) とき、2つのアミノ酸配列は、「実質的に相同性」、または「実質的に類似性」である。好ましくは、類似性または相同性配列は、たとえばGCG (Genetics Computer Group、Program Manual for the GCG Package、バージョン7、Madison、Wisconsin) パイルアップ・プログラム、または上記の任意のプログラム (BLAST、FASTAなど) を用いるアライメントによって同定される。

【0058】

核酸分子の1本鎖形態が、温度および溶液イオン強度の適切な条件下で、他の核酸分子とアニール可能なとき、その核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAなどの別の核酸分子と「ハイブリダイゼーション可能」である (上述の Sambrook 等を参照)。温度およびイオン強度の条件が、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。相同性核酸の予備スクリーニングの場合、 T_m (融解温度) 55 に対応するストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーション条件を用いることができ、たとえば、 $5 \times SSC$ 、0.1% SDS、0.25% 乳、ホルムアミド非含有、または30%ホルムアミド、 $5 \times SSC$ 、0.5% SDSである。中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、より高い T_m に対応し、たとえば、40%ホルムアミド、 $5 \times$ または $6 \times SSC$ である。ストリンジェンシーの高いハイブリダイゼーション条件は、最高温度の T_m に対応し、たとえば、50%ホルムアミド、 $5 \times$ または $6 \times SSC$ である。 SSC は、0.15 MのNaCl、0.015 Mのクエン酸Naである。ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が相補的配列を含有していることを必要とするが、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに応じて塩基間の誤対合も可能である。核酸をハイブリダイズするための適切なストリンジェンシーは、核酸の長さ、および相補性の程度に応じて決まり、変数は当分野においてよく知られている。2つのヌクレオチド配列の類似性または相同性の程度が高いほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドに対する T_m 値は高くなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対安定性 (より高い T_m に対応する) は、以下の順序で減少する。RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。ヌクレオチドが100を超える長さのハイブリッドの場合、 T_m を算出するための等式がすでに得られ

30

40

50

ている（上述のSambrook等、9.50～9.51を参照のこと）。短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの場合、誤対合の位置はより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（上述のSambrook等、11.7～11.8を参照のこと）。ハイブリダイゼーション可能な核酸の最短の長さは、少なくとも約10のヌクレオチド、好ましくは約15のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約20のヌクレオチドの長さである。

【0059】

特定の実施形態において、「標準的なハイブリダイゼーション条件」という用語は、 T_m 55 を指し、上述の条件を用いる。好ましい実施形態において、 T_m は60 であり、より好ましい実施形態において、 T_m は65 である。特定の実施形態において、「高いストリンジェンシー」は、 $0.2 \times SSC$ 中68 、50%ホルムアミド、 $4 \times SSC$ 中42 のハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件、またはこれら2つのいずれかの条件下で認められるものと同等のハイブリダイゼーションレベルが得られる条件下を指す。

10

【0060】

本明細書では、「オリゴヌクレオチド」という用語は、一般にヌクレオチドが少なくとも10、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも20で、好ましくはヌクレオチドが100以下の核酸を指し、遺伝子、mRNA、cDNA、または他の対象となる核酸をエンコードするゲノムDNA分子、cDNA分子、またはmRNA分子とハイブリダイゼーション可能である。オリゴヌクレオチドは、たとえば³²P-ヌクレオチド、またはビオチンなどの標識が共有的にコンジュゲートしているヌクレオチドで標識することができる。一実施形態において、標識ヌクレオチドは、核酸の存在を検出するためのプローブとして用いることができる。他の実施形態において、オリゴヌクレオチド（1つまたは両方が標識されていてよい）は、遺伝子の全長またはフラグメントをクローニングするため、またはそのタンパク質をエンコードする核酸の存在を検出するためのPCRプライマーとして用いることができる。さらなる実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、DNA分子と共に3重らせんを形成することができる。一般にオリゴヌクレオチドは、合成によって、好ましくは核酸合成装置で調製される。したがって、オリゴヌクレオチドは、非天然ホスホエステルアナログボンド、たとえばチオエステルボンドなどを用いて調製することができる。

20

30

【0061】

PCVのクローニングおよび発現

本発明は、7種のブタ・シルコウイルス（PCV）株のクローン化、および配列決定に成功した。1960年代終わりに単離され（本明細書ではCT-PCV7と称する）、2型の先天性振せん（CT）を有する新生ブタを起源とする1種のウイルス株、CTを示すブタから得た2種の新しいPCV単離株（本明細書ではCT-PCV-P5、およびCT-PCV-P6と称する）、および離乳後多臓器性発育不全症候群（PMWS）の徴候を示すブタから得た4種のPCV株（本明細書ではPMWS-PCV-P1、PMWS-PCV-P2、PMWS-PCV-P3、およびPMWS-PCV-P4と称する）である。

【0062】

PMWS-PCV単離株は、互いに約99%のヌクレオチド配列同一性を生じることが見出された。さらに、1990年代終わりの新しいCT-PCV単離株、および1960年代終わりの古いCT-PCV単離株はCT A2型を有する新生ブタを起源としたが、それらはわずか72%のヌクレオチド配列同一性を共有した。2種の新しいCT-PCVのゲノムは、2型のPMWS-PCV単離株と高い配列相同性を共有する。他方、CT-PCV-7株は、1型のPK-15-PCV変株に非常に近いことが見出された。

40

【0063】

したがって本発明の主題は、PCVから単離された核酸であって、その核酸は、配列番号1から配列番号7からなる群から選択された配列を含む。

【0064】

50

本発明の他の主題は、P C V から単離された核酸であって、配列番号 1 から配列番号 7 からなる群から選択された配列と同一の配列を有する。

【0065】

本発明の核酸配列は、生物試料中の P C V 核酸の存在を検出するためのプローブまたはプライマーを設計するのに有用である可能性がある。そのようなプローブまたはプライマーは、より詳細にはオリゴヌクレオチドの形態であることができ、ストリンジェンシーの高い条件下で P C V 核酸配列に特異的にハイブリダイズする。そのようなオリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも約 20 の塩基を含み、配列番号 1 から配列番号 7 の 20 個の連続塩基に見出される配列、またはそれらの相補鎖を有する。

【0066】

11 種のオープン・リーディング・フレーム (O R F) 配列が決定され、それを実施例の表 2 および 4 に示す。対応するポリペプチド配列も、図 4 から 14 に示す。

【0067】

したがって、本発明はさらに、その核酸が任意の配列番号 1 から配列番号 7 の配列の、任意の O R F 1 から O R F 11 によってコードされたアミノ酸配列からなる群から選択された配列を有するシルコウイルス・ポリペプチドをコードする配列を含む、P C V 由来の核酸を提供する。より詳細には、本発明の核酸は、任意の配列番号 1 から配列番号 7 の配列の、任意の O R F 1 から O R F 11 から選択された配列を含む。これらの中で、O R F 1、2、3、または 4 が特に興味深い。

【0068】

本発明は、保存的配列、すなわち記載された配列、またはその配列によってエンコードされたポリペプチドの機能性または株特異性を変化しない配列を包含する。これらの配列はまた、「機能保存的変異体」とも呼ばれる。「配列保存的変異体」と呼ばれる、コードの縮重によって異なる配列も包含される。

【0069】

本発明はさらに、ストリンジェンシーの高い条件下で上記の配列とハイブリダイズすることができ、かつ / または本発明の株と非常に高い相同性を有するという点において同等の配列を包含する。

【0070】

任意のこれらの核酸配列を含むクローニング・ベクターも、本発明の一部である。そのようなベクターの調製は、当分野の技術者によく知られており、上述の定義に記載されている。

【0071】

これらの核酸配列およびそのフラグメントは、適切な発現ベクターの助力によって、*i n v i t r o* または *i n v i v o* でのポリペプチドの発現に有利に用いることができる。

【0072】

これらのベクターは、より詳細には、発現制御配列と有効に結合した、任意の配列番号 1 から配列番号 7 の配列の任意の O R F 1 から O R F 11 からなる群から選択された配列を含む。

【0073】

本発明のベクターは、宿主細胞をトランスフェクトするために用いることができ、これも本発明の一部である。ベクターは当分野で知られている方法、たとえば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈降、リポフェクション (リソーム融合)、遺伝子銃、または D N A ベクター・トランスポータの使用によって所望の宿主細胞に導入される (たとえば Wu 等、J . B i o l . C h e m . 267 : 963 - 967、1992、Wu および Wu、J . B i o l . C h e m . 263 : 14621 - 14624、1988、H a r t m u t 等、カナダ特許出願第 2012311 号、1990 年 3 月 15 日出願を参照されたい)。

【0074】

本発明はさらに、PCVタンパク質を産生する方法を提供し、その方法は、シルコウイルス・タンパク質をコードする核酸の発現を生じる条件下で、上に定義したように発現ベクターを用いてトランスフェクトされた細胞を培養することを含む。大腸菌、またはバキュロウイルスは、この目的のために用いることのできる発現系である（米国特許第4745051号）。コード配列は、バキュロウイルスゲノム（たとえば、baculovirus Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV）に組み込むことができ、次いで後者を昆虫細胞、たとえば *Spodoptera frugiperda* Sf9（寄託番号 ATCC CRL 1711）上で増殖できる。

【0075】

10

より一般的には、本発明は、*in vivo*、*in vitro*、または *ex vivo* でのPCVポリペプチドまたはタンパク質の発現を対象とする。これらの様々な目的に関して、当分野の技術者は、以下に記載する任意の適切な発現系を選択することができる。

【0076】

発現系

多様な宿主/発現ベクターの組合せ（すなわち、発現系）を、本発明のポリペプチドの発現に用いることができる。有用な発現ベクターは、たとえば、染色体、非染色体、および合成DNA配列のセグメントからなることができる。適切なベクターには、SV40の誘導体、および既知の細菌プラスミド、たとえば大腸菌プラスミド *colE1*、*pCR1*、*pBR322*、*pMal-C2*、*pET*、*pGEX*（Smith等、Gene 67:31-40、1988）、*pMB9* およびその誘導体、プラスミド、たとえば *RP4* など；グラム陽性ベクター、たとえば *Strep. gardonii* など；ファージDNA、たとえばファージ1の多数の誘導体、たとえば *NM989*、および他のファージDNA、たとえば *M13*、および糸状1本鎖ファージDNA；酵母プラスミド、たとえば 2μ プラスミドまたはその誘導体など；真核細胞に有用なベクター、たとえば昆虫または哺乳動物細胞に有用なベクター；プラスミドおよびファージDNAの組合せから誘導されたベクター、たとえばファージDNAまたは他の発現制御配列を用いるように修飾されたプラスミドなどが含まれる。

20

【0077】

タンパク質またはポリペプチドの発現は、当分野で知られる任意のプロモータ/エンハンサ因子によって制御することができるが、これらの調節因子は、発現のために選択された宿主において機能性でなければならない。遺伝子発現を制御するために用いることのできるプロモータには、これに制限されるものではないが、サイトメガロウイルス（CMV）プロモータ、SV40初期プロモータ領域（Benoit等、Nature 290:304-310）、ラウス肉腫ウイルスの3'側長末端反復に含有されたプロモータ（Yamamoto等、Cell 22:787-797、1980）、ヘルペスチミジンキナーゼ・プロモータ（Wagner等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445、1981）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster等、Nature 296:39-42、1982）；原核生物発現ベクター、たとえば *b*-ラクタマーゼ・プロモータ（Villa-Komaroff等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731、1978）、または *tac* プロモータ（DeBoer等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25、1983）；さらに「Useful proteins from recombinant bacteria」、Scientific American、242:74-94、1980を参照のこと；酵母または他の真菌のプロモータ因子、たとえば *GAL4* プロモータ、*ADC*（アルコールデヒドロゲナーゼ）プロモータ、*PGK*（ホスホグリセロールキナーゼ）プロモータ、アルカリホスファターゼプロモータなど；造血組織特異性を示す制御部位、特に骨髓性細胞において活性である β -グロビン遺伝子制御部位（Mogram等、Nature 315:338-340、1985、Kollias等、Cell 46:89-94

30

40

50

、1986)、造血幹細胞分化因子プロモータ、エリトロポイエチン受容体プロモータ(Maouche等、Blood、15:2557、1991)など、および粘膜上皮細胞特異性を示す制御部位が含まれる。

【0078】

特に*in vitro*細胞アッセイ、および*in vivo*または*ex vivo*ワクチン接種に好ましいベクターは、ウイルス・ベクター、たとえばレンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ関連性ウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、および望ましい細胞親和性を備えた他の組換えウイルスなどである。したがって、免疫原性ポリペプチドをエンコードするベクターは、ウイルス・ベクターを用いて、またはDNAの直接導入によって、*in vivo*、*ex vivo*、または*in vitro*で導入することができる。標的組織における発現は、ウイルス・ベクターまたは受容体リガンドなどを用いてトランスジェニック・ベクターを特定の細胞に向けることによって、または組織特異性プロモータを用いて、あるいはその両方によって実施することができる。標的遺伝子送達は、1995年10月公開の国際特許公開WO95/28494に記載されている。

【0079】

*in vivo*または*ex vivo*での標的化およびワクチン接種手順に一般に用いられるウイルス・ベクターは、DNAをベースとするベクター、およびレトロウイルス・ベクターである。ウイルス・ベクターを構成する方法、および用いる方法は、当分野で知られている(Miller、およびRosman、Bio Techniques、7:980-990、1992を参照のこと)。好ましくは、ウイルス・ベクターは複製欠損であり、すなわち標的細胞において自律的に複製することができない。好ましくは、この複製欠損ウイルスは最小ウイルスであり、すなわちウイルス粒子を産生するためにゲノムを包膜するのに必要なゲノムの配列のみを保持している。

【0080】

DNAウイルス・ベクターには、弱毒または欠損DNAウイルスが含まれ、たとえば、これに限定されるものではないが、単純疱疹ウイルス(HSV)、パピローマウイルス、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、アデノウイルス、アデノ関連性ウイルス(AAV)、ワクシニアウイルスなどである。特定のベクターの例には、これに限定されるものではないが、欠損ヘルペスウイルス1(HSV1)ベクター(Kaplitte等、Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330、1991、国際特許公開WO94/21807、1994年9月29日公開、国際特許公開WO92/05263、1994年4月2日公開)、弱毒アデノウイルス・ベクター、たとえばStratford-Perricaudet等によって記載されているベクターなど(J. Clin. Invest. 90:626-630、1992、さらにLaSalle等、Science 259:988-990、1993を参照のこと)、および欠損アデノ関連性ウイルス・ベクター(Samulski等、J. Virol. 61:3096-3101、1987、Samulski等、J. Virol. 63:3822-3828、1989、Lebkowski等、Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996、1988)が含まれる。

【0081】

多数の会社が商業的にウイルス・ベクターを製造しており、これに限定されるものではないが、Avigen, Inc. (Alameda, CA、AAVベクター)、Cell Genesys (Foster City, CA、レトロウイルス、アデノウイルス、AAVベクター、およびレンチウイルス・ベクター)、Clontech (レトロウイルス、およびバキュロウイルスベクター)、Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA、アデノウイルス、およびAAVベクター)、Genvec (アデノウイルス・ベクター)、IntroGene (Leiden, Netherlands、アデノウイルス・スベクター)、Molecular Medicine (レトロウイルス、アデノウイルス、AAV、およびヘルペスウイルス・ベクター)、Norgen (アデノウイルス

・ベクター)、Oxford BioMedica (Oxford、英国、レンチウイルス・ベクター)、およびTransgene (Strasbourg、フランス、アデノウイルス、ワクシニア、レトロウイルス、およびレンチウイルス・ベクター)が含まれる。

【0082】

アデノウイルス・ベクター。アデノウイルスは、本発明の核酸を多様な細胞型に有効に送達するために修飾することのできる真核生物DNAウイルスである。アデノウイルスの様々な血清型が存在する。これらの血清型において、本発明の範囲内で、2型または5型ヒト・アデノウイルス (Ad2またはAd5)、あるいは動物起源のアデノウイルス (WO 94/26914 参照) を用いることが好ましい。本発明の範囲内で用いることのできるそのような動物起源アデノウイルスには、イヌ、ウシ、マウス (例 Mav1、Beard 等、Virology 75 (1990) 81)、ヒツジ、ブタ、鳥類、およびサル (例 SAV) 起源のアデノウイルスが含まれる。好ましくは、動物起源のアデノウイルスはイヌ・アデノウイルスであり、より好ましくはCAV2アデノウイルスである (たとえば、Manhattan、またはA26/61株 (ATCCVR-800))。種々の複製欠損アデノウイルス、および最小アデノウイルス・ベクターが記載されている (WO 94/26914、WO 95/02697、WO 94/28938、WO 94/28152、WO 94/12649、WO 95/02697、WO 96/22378)。本発明による複製欠損組換えアデノウイルスは、当分野の技術者に知られている任意の技法で調製することができる (Levrero 等、Gene 101:195、1991、EP 185573、Graham、EMBO J. 3:2917、1984、Graham 等、J. Gen. Virol. 36:59、1977)。組換えアデノウイルスは、標準的な分子生物学技法を用いて回収、および精製され、それらは当分野の技術者によく知られている。

【0083】

アデノ関連性ウイルス。アデノ関連性ウイルス (AAV) は、安定な部位特異的な方式で、それらが感染する細胞のゲノムに組み込まれることのできる比較的小さなサイズのDNAウイルスである。アデノ関連性ウイルスは、細胞増殖、形態、または分化への影響を誘発することなく広範囲の細胞に感染することができ、ヒトの病理には関係していないと考えられる。AAVゲノムはクローン化され、配列決定され、特性付けされている。in vitroおよびin vivoで遺伝子を伝達するためにAAVから誘導されたベクターを用いることが記載されている (WO 91/18088、WO 93/09239、US 4797368、US 5139941、EP 488528を参照のこと)。本発明による複製欠損組換えAAVは、2つのAAV逆位末端反復 (ITR) 領域に脇を固められた対象となる核酸配列を含有するプラスミド、およびAAV包膜遺伝子 (repおよびcap遺伝子) を有するプラスミドを、ヒト・ヘルパー・ウイルス (たとえば、アデノウイルス) に感染している細胞系に共トランスフェクションすることによって調製できる。その後、産生されたAAV組換え型を標準的な技法によって精製する。

【0084】

レトロウイルス・ベクター。他の実施形態において、たとえば、Anderson 他、米国特許第5399346号、Mann 等、Cell 33:153、1983、Temin 他、米国特許第4650764号、Temin 他、米国特許第4980289号、Markowitz 等、J. Virol. 62:1120、1988、Temin 他、米国特許第5124263号、EP 453242、EP 178220、Bernstein 等、Genet. Eng. 7 (1985) 235、McCormick、BioTechnology 3 (1985) 689、Dougherty 他による1995年3月16日公開の国際特許公開WO 95/07358、およびKuo 等、Blood 82:845、1993に記載されているように、遺伝子をレトロウイルス・ベクターに導入することができる。レトロウイルスは、分裂細胞に感染する組込みウイルスである。レトロウイルス・ゲノムは、2つのLTR、包膜配列、3つのコード領域 (gag、pol、およびenv) を含む。組換えレトロウイルス・ベクターにおいて、gag、pol、およびenv

遺伝子は一般に、全体的または部分的に除去され、対象となる異種核酸配列と置き換えられる。これらのベクターは、異なる型のレトロウイルス、たとえばHIV、MoMuLV（マウスモロニー白血病ウイルス）、MSV（マウスモロニー肉腫ウイルス）、HaSV（ハーベイ肉腫ウイルス）、SNV（脾臓壊死ウイルス）、RSV（ラウス肉腫ウイルス）、およびフレンドウイルスなどから構成することができる。適切なパッケージング細胞系統は従来技術に記載されており、特に細胞系PA317（US4861719）、PsiCRIP細胞系（WO90/02806）、およびGP+envAm-12細胞系（WO89/07150）である。さらに、組換えレトロウイルス・ベクターは、転写活性を抑制するためのLTP内の修飾、ならびにgag遺伝子の一部を含むことのできる延長包膜配列を含有することができる（Bender等、J. Virol. 61:1639、1987）。組換えレトロウイルス・ベクターは、当分野の技術者に知られている標準的な技法によって精製される。

10

【0085】

レトロウイルス・ベクターはまた、DNAウイルスによって導入されることができ、それにより1サイクルのレトロウイルス複製が可能となり、トランスフェクション効率が増幅される（WO95/22617、WO95/26411、WO96/39036、WO97/19182を参照のこと）。

【0086】

レンチウイルス・ベクター。他の実施形態において、脳、網膜、筋肉、肝臓、および血液を含むいくつかの組織型で、導入遺伝子を直接送達し、持続発現させるための因子としてレンチウイルス・ベクターを用いることができる。このベクターは、それらの組織において分裂および非分裂細胞を有効に形質導入し、対象となる遺伝子の長期発現を維持することができる。概説として、Naldini、Curr. Opin. Biotechnol.、9:457-63、1998、さらにZufferey等、J. Virol.、72:9873-80、1998を参照されたい。レンチウイルス・パッケージング細胞系は入手可能であり、当分野で一般に知られている。これらは、遺伝子治療のための高力価レンチウイルス・ベクターの産生を促進する。例としては、テトラサイクリン誘導VSV-Gシュードタイプ・レンチウイルス・パッケージング細胞系であり、これは少なくとも3から4日間、106IU/mlを超える力価でウイルス粒子を産生することができる（Kafri等、J. Virol.、73:576-584、1999）。in vitro およびin vivoで非分裂細胞を有効に形質導入するための必要に応じて、誘導細胞系によって産生されたベクターを濃縮することができる。

20

30

【0087】

非ウイルス・ベクター。他の実施形態において、ベクターは、naked DNAとしてリポフェクションによって、または他のトランスフェクション促進剤（ペプチド、ポリマーなど）を用いてin vivoで導入することができる。マーカをエンコードする遺伝子のin vivoトランスフェクションのリポソームを調製するために、合成カチオン脂質を用いることができる（Felgner等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:7413-7417、1987、FelgnerおよびRingold、Science 337:387-388、1989、Mackey等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:8027-8031、1988参照、Ulmer等、Science 259:1745-1748、1993）。核酸を伝達するのに有用な脂質化合物および組成物は、国際特許公開WO95/18863、およびWO96/17823、ならびに米国特許第5459127号に記載されている。脂質は、標的化のために他の分子と化学的に結合することができる（上記のMackey等を参照のこと）。標的化ペプチド、たとえばホルモンまたは神経伝達物質、およびタンパク質、たとえば抗体、または非ペプチド分子などは、化学的にリポソームと結合することができる。

40

【0088】

他の分子も、in vivoでの核酸のトランスフェクションを促進するのに有用であり

50

、たとえばカチオンオリゴペプチド（たとえば、国際特許公開WO95/21931）、DNA結合タンパク質から誘導されたペプチド（たとえば、国際特許公開WO96/25508）、またはカチオンポリマー（たとえば、国際特許公開WO95/21931）などである。

【0089】

さらに、*in vivo*で*naked* DNAプラスミドとしてベクターを導入することも可能である。遺伝子治療に用いる*naked* DNAベクターは、当分野で知られている方法、たとえばエレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降、遺伝子銃の使用（弾道トランスフェクション）、またはDNAベクター・トランスポータの使用によって所望の宿主細胞に導入することができる（たとえばWu等、*J. Biol. Chem.* 267:963-967、1992、WuおよびWu、*J. Biol. Chem.* 263:14621-14624、1988、Hartmut等、カナダ特許出願第2012311号、1990年3月15日出願、Williams等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-2730、1991を参照されたい）。受容体媒介DNA送達法も用いることができる（Curriel等、*Hum. Gene Ther.* 3:147-154、1992、WuおよびWu、*J. Biol. Chem.* 262:4429-4432、1987）。米国特許第5580859号および第5589466号は、トランスフェクション促進剤を含まない外因性DNA配列の哺乳動物における送達を開示している。最近、比較的低電圧で効率の高い、電気伝達と呼ばれる*in vivo*のDNA伝達技法が記載された（M 20
ir等、*C. P. Acad. Sci.*、321:893、1998、WO99/01157、WO99/01158、WO99/01175）。

【0090】

PCVポリペプチドの精製

そのようにして産生されたポリペプチドは回収し、好ましくは精製することができる。精製方法は当分野でよく知られている。精製方法には、これに限定されるものではないが、分取ディスク・ゲル電気泳動および等電点電気泳動；アフィニティ、HPLC、逆相HPLC、ゲル濾過またはサイズ排除、イオン交換、および分配クロマトグラフィ；沈降および塩析クロマトグラフィ；抽出、および向流分配が含まれる。目的によっては、タンパク質が精製を促進する追加の配列標識を含有するような組換え系でポリペプチドを生成する 30
ことが好ましく、これに限定されるものではないが、たとえばポリヒスチジン配列、またはFLAGおよびGSTなどの抗体と特異的に結合する配列などである。次いでこのポリペプチドを、適切な固相マトリクスのクロマトグラフィによって、宿主細胞の粗溶解産物から精製することができる。別法として、タンパク質に対して、またはそれから誘導されたペプチドに対して産生された抗体を、精製試薬として用いることができる。

【0091】

抗PCV抗体

そのような抗体には、これに限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリが含まれる。

【0092】

PCVポリペプチド、あるいはその誘導体または類似体に対するポリクローナル抗体を産生するために、当分野で知られる様々な手順を用いることができる。抗体の産生のために、抗原性ポリペプチドを注入することによって種々の動物を免疫化することができ、これに限定されるものではないが、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどが含まれる。好ましくは、免疫化動物は、抗体に対するアレルギー反応を回避するために、受動免疫法においてその抗体を受容する動物と同一の種である。

【0093】

PCVポリペプチドに対するモノクローナル抗体を調製するために、培養において連続細胞系による抗体分子の産生を提供する任意の技法を用いることができる。これらの技法には、これに限定されるものではないが、KohlerおよびMilsteinによって最 50

初に開発されたハイブリドーマ技法 (Nature 256: 495-497, 1975)、ならびにトリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kozbor等、Immunology Today 4: 72, 1983、Cote等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2026-2030, 1983)、およびヒト・モノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技法 (Cole等、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁, 1985) が含まれる。本発明のさらなる実施形態では、モノクローナル抗体は、無菌動物において産生することができる (国際特許公開WO89/12690、1989年12月28日公開)。

【0094】

本発明によれば、単鎖抗体を産生するために記載された技法 (Hustonの米国特許第5476786号および第5132405号、米国特許第4946778号) を、PCVポリペプチド特異単鎖抗体を産生するために適合させることができる。さらに、これらの遺伝子は、*in vivo*での発現のために送達することができる。本発明のさらなる実施形態は、Fab発現ライブラリを構成するために記載された技法 (Huse等、Science 246: 1275-1281, 1989) を用い、PCVポリペプチド、あるいはその誘導体または類似体に対する所望の特異性を備えたモノクローナルFabフラグメントの迅速で容易な同定を可能にする。

【0095】

抗体分子のイディオタイプを含有する抗体フラグメントは、知られている技法によって産生することができる。たとえば、そのようなフラグメントには、これに限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化によって産生することのできるF(ab')₂フラグメント、F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋の還元によって産生することのできるFab'フラグメント、および抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって産生できるFabフラグメントが含まれる。

【0096】

抗体の産生において、所望の抗体のスクリーニングは、当分野で知られている技法によって達成することができ、たとえばラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合イムノソルベントアッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、*in situ*イムノアッセイ (たとえば、金コロイド、酵素または放射性同位体標識を用いる)、ウエスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ (たとえば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどである。一実施形態において、抗体結合は、1次抗体における標識を検出することにより検出することができる。他の実施形態において1次抗体は2次抗体または試薬の1次抗体との結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態において、2次抗体は標識される。イムノアッセイにおいて結合を検出するための多くの手段が当分野で知られており、それらは本発明の範囲内である。

【0097】

PCVの*in vitro*での培養

本発明はさらに、ブタ・シルコウイルス株を培養する方法に関し、その方法は、配列番号1から配列番号6からなる群から選択された配列を含む核酸を、配列番号1から配列番号6からなる群から選択された配列を含むゲノムを有するブタ・シルコウイルス粒子の産生をもたらす条件下で、適切な宿主細胞に導入することを含む。

【0098】

任意の型の非感染細胞、好ましくはブタ細胞 (たとえば、Sus scrofa、またはTayassu tajacu由来の細胞)、より好ましくは神経誘導ブタ細胞 (たとえば、グリア細胞)、ブタ腎細胞 (たとえば、PK-15細胞)、またはブタ・マクロファージ細胞は、本発明のPCV核酸 (たとえば、1本鎖、好ましくは2本鎖ゲノムDNA、あるいはPCVゲノムDNAを含む1つまたは複数のプラスミド) を細胞に導入すること

10

20

30

40

50

によって感染させることができる。宿主細胞系の感染またはトランスフェクションは、当分野で一般に知られている技法であり、当分野の技術を有する任意の実施者によって行うことができる。たとえば、実施例 1 は、P C V D N A を用いて P K - 1 5 細胞をトランスフェクトする手順を含む（クローン化 P C V D N A のトランスフェクションおよび P C V の検出を参照されたい）。

【 0 0 9 9 】

感染後、感染細胞系の 1 つまたは複数のクローンを選択し、増殖させることができる。選択されたクローンの細胞を貯蔵（たとえば、凍結）し、マスター細胞バンクとして用いることができ、そこから試料を取り、複数の使用細胞系を産生するために用いることができる。ワクチンの生成のために用いられ、かつウイルスタンパク質源として用いられるウイルス粒子は、この使用細胞系から得ることができる。詳細には、使用細胞系は、凍結マスター細胞系の試料を融解し、培養においてその細胞を増殖することによって産生することができ、その増殖細胞培養の細胞を使用細胞系として用いる。たとえば、マスター細胞系を融解し、多量の細胞を産生するために、N u n c C e l l F a c t o r y (N a l g e N u n c I n t e r n a t i o n a l , R o c h e s t e r , N Y) で増殖することができる。

10

【 0 1 0 0 】

ウイルス粒子は、当分野の技術者に一般に知られている方法によって、使用細胞系から得ることができる。たとえば、使用細胞系の培養上澄み中のウイルス粒子を採取し、濾過し、精製して（たとえば、勾配遠心分離によって）、ワクチン生成に用いることができる。

20

【 0 1 0 1 】

先天性振せんの診断

ブタ・シルコウイルスと先天性振せん（C T）とが関連するという証拠によって、本発明者等は、ブタまたはその子孫における先天性振せん（C T）の病因を診断する方法を提供することができ、その方法は、そのブタがブタ・シルコウイルスに感染しているかどうかを判別することを含む。

【 0 1 0 2 】

本明細書では、「診断」という用語は、進行の任意の病期にある疾患の同定を指し、さらに胎児または新生子ブタがその疾患を発現する素因、または雌ブタが胎児にその疾患を伝染する素因を判別することを含む。

30

【 0 1 0 3 】

本発明の診断方法は、1 型または 2 型の任意の P C V 株を検出することを含むことができる。2 種の型間の P C V 株の再分配を図 3 に示す。1 型の P C V 株には、より詳細には、P K - 1 5 P C V、または配列番号 7 の核酸配列を含むいわゆる「C T - P C V - 7」株が含まれる。2 型の P C V 株には、より詳細には、配列番号 1 から配列番号 6 の任意の核酸配列を含む株が含まれる。P M W S に関連する P C V 株（P M W S - P C V）も、この標的 P C V 株に含まれる。

【 0 1 0 4 】

本発明の診断方法は、たとえば国際出願 W O 9 9 / 1 8 2 1 4 に概説されているとおり、当分野の技術者によく知られている標準的な技法で実施することができる。

40

【 0 1 0 5 】

第 1 の実施形態において、感染の判別は、試験ブタの生物試料中の P C V 核酸の存在を検出することを包含できる。

【 0 1 0 6 】

第 2 の実施形態において、感染の判別は、試験ブタの生物試料中の P C V ポリペプチドの存在を検出することを包含できる。

【 0 1 0 7 】

第 3 の実施形態において、感染の判別は、試験ブタの生物試料中の P C V ポリペプチドに対する抗体の存在を検出することによって行うことができる。

【 0 1 0 8 】

50

生物試料は任意の種類であることができ、流体試料（血液、血漿、血清、脳脊髄液など）、あるいは器官または組織試料（神経節、肝臓など）を含む。より詳細には死後診断のために、中枢神経系から得た細胞または細胞抽出物を用いることができる。

【0109】

しかしながら、好ましい試験試料および方法は、農場において獣医師または動物飼育者によって容易に実施できるものである。したがって、ウエスタンブロット、免疫蛍光検査法、ELISA、または免疫クロマトグラフィは、これらの応用例に非常によく適合する。

【0110】

ELISAアッセイでは、本発明のポリペプチド、またはそのエピトープ・フラグメントを、選択された表面上、たとえばポリスチレンのマイクロタイタ・プレートのウェルなどタンパク質を結合することのできる表面上に固定する。不完全に吸着されたポリペプチドを洗浄によって除去した後、試験試料に対して抗原性が中性であることが知られているウシ血清アルブミン（BSA）溶液などの非特異タンパク質を、選択された表面に結合することができる。これによって固定化表面の非特異吸着部位が遮断され、したがって抗血清の表面への非特異結合によって起こるバックグラウンドが低減される。次いで固定化表面を、免疫複合体（抗原／抗体）が形成されるようなやり方で、試験される臨床材料または生物材料などの試料と接触させる。これには、試料を、BSA溶液、ウシ・ガンマグロブリン（GG）、および／またはリン酸緩衝食塩水（PBS）／Tweenなどの希釈剤で希釈することを含むことができる。その後、2から4時間、約25 から37 程度の温度で、試料をインキュベートする。インキュベーションに続いて、試料に接触した表面を洗浄して、非免疫複合体化材料を除去する。洗浄手順には、PBS／Tween、またはホウ酸緩衝液などの溶液で洗浄することを含むことができる。試験試料と結合ポリペプチドとの間の特異的免疫複合体の形成、その後の洗浄に続いて、第1の抗体に対して特異性を有する第2の抗体にその免疫複合体を供することによって、免疫複合体形成の発生を判別し、さらにはその量まで求めることができる。検出手段を提供するために、第2の抗体は、たとえば適切な色素形成基質と共にインキュベートすることによって発色を生じる酵素活性など、関連した活性を有することができる。次いで、たとえば可視スペクトル分光計を用いて発色の程度を測定することによって、定量化を行うことができる。

【0111】

免疫クロマトグラフィ技法に関して、当分野の技術者は、F. Z u r k 等の C l i n . C h e m . 3 1 / 7、1 1 4 1 - 1 1 5 0 (1 9 8 5)、ならびに特許および特許出願 WO 8 8 / 0 8 5 3 4、WO 9 1 / 1 2 5 2 8、EP 2 9 1 1 7 6、EP 2 9 9 4 2 8、EP 2 9 1 1 9 4、EP 2 8 4 2 3 2、US 5 1 2 0 6 4 3、US 5 0 3 0 5 5 8、US 5 2 6 6 4 9 7、US 4 7 4 0 4 6 8、US 5 2 6 6 4 9 7、US 4 8 5 5 2 4 0、US 5 4 5 1 5 0 4、US 5 1 4 1 8 5 0、US 5 2 3 2 8 3 5、US 5 2 3 8 6 5 2 に詳細な情報を見出すことができる。

【0112】

別法には、生物試料中のPCV核酸の存在を検出するために、オリゴヌクレオチドなどの核酸配列を用いることが含まれる。

【0113】

この目的のために、当分野の技術者は、溶液ハイブリダイゼーションにおいて、および固相法を用いる実施形態において、ハイブリダイゼーション・プローブを用いることができる。固相法を含む実施形態において、選択されたマトリクスまたは表面に試料を吸着させるか、あるいは付着させる。次いで、固定1本鎖核酸を、選択されたプローブと共に特異ハイブリダイゼーションに供する。

【0114】

他の実施形態において、当分野の技術者は、生物試料に潜在的に存在する標的PCV核酸を特異的に増幅するために、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの増幅技法において、オリゴヌクレオチド・プライマーを用いることができる。そのようなプライマーの例を、実施例1の表1に示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

先天性振せんの予防および治療

本発明は、先天性振せんを予防または治療するための、ワクチン接種、または受動免疫化を企図する。本発明の抗原性または免疫原性組成物は、ブタ・シルコウイルスによる感染からブタまたはその子孫を防御するために、広く適用可能である。本明細書では、「防御する」という用語は、PCV感染および先天性振せんの治療または予防を意味する。したがって、この種の感染に対して感受性である任意の動物にワクチン接種することができる。ブタは任意の年齢で治療することができ、新生子ブタを含む。雌ブタの治療は、胎児を防御するために特に有用である。

【 0 1 1 6 】

本発明は、より詳細には、シルコウイルス抗原、獣医学的に許容されるビヒクルまたは賦形剤、さらに通例は獣医学的に許容されるアジュバントを含む抗原性または免疫原性組成物に関する。

【 0 1 1 7 】

免疫原性組成物は、免疫応答を誘導し、その必要はないが防御的であり得る。ワクチン組成物は、防御反応を誘導する。したがって、「免疫原性組成物」という用語は、ワクチン組成物を含む（前者は防御的組成物であり得る）。

【 0 1 1 8 】

本発明の主題はさらに、先天性振せんに対する免疫化またはワクチン接種の方法であって、ブタ・シルコウイルスに対する免疫原性組成物またはワクチンを投与することを含む。この免疫化またはワクチン接種の方法は、特に以下に定義されるワクチンを用いる。

【 0 1 1 9 】

したがって本発明の主題は、先天性振せん（CT）に対する抗原性製剤であり、少なくとも1種のブタ・シルコウイルス（PCV）抗原を含む。この抗原は、弱毒化生全PCV、不活性化全PCV、サブユニット抗原、組換え生ベクター、またはDNAベクターからなることができる。

【 0 1 2 0 】

全PCVワクチン

本発明の主題は、単離ブタ・シルコウイルス株であり、配列番号1から配列番号7の任意の配列の、任意のORF1からORF11からなる群から選択された核酸配列を含むゲノムを有する。これらの配列を承知する当分野の技術者は、ビリオンの精製製剤を得ることができる。

【 0 1 2 1 】

これらのウイルスは、先天性振せんに対してブタにワクチン接種するための抗原性組成物に用いることができる。この目的のために、以下に記載するとおり、当分野の技術者によく知られている標準的な技法によって、ウイルス粒子を弱毒化、不活性化、または不活化することができる。

【 0 1 2 2 】

シルコウイルス抗原性製剤を生成するために、細胞、特に細胞系、たとえばPK/15細胞における継代後、シルコウイルスを得ることができる。場合によって標準的な技法で精製した、培養上澄みまたは抽出物を抗原性製剤として用いることができる。

【 0 1 2 3 】

弱毒化抗原性製剤、および弱毒化免疫原性組成物またはワクチンというコンテキストにおいて、弱毒化は、慣例的な方法によって行うことができ、たとえば細胞での継代、好ましくはブタ細胞での継代、PK/15など、特に細胞系での継代による（たとえば継代50から150、特に100程度）。これらの免疫原性組成物およびワクチンは一般に、獣医学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤、場合によってはさらに獣医学的に許容されるアジュバント、ならびに場合によっては凍結乾燥安定剤を含む。

【 0 1 2 4 】

これらの抗原性製剤、免疫原性組成物、およびワクチンは、好ましくは、TCID₅₀

10

20

30

40

50

10^3 から 10^7 の対象弱毒化ウイルスを含むことになる。

【0125】

それらは、不活性化全抗原をベースとする抗原性製剤、免疫原性組成物およびワクチンであることができる。不活性化免疫原性組成物およびワクチンはさらに、獣医学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤、場合によってはさらに獣医学的に許容されるアジュバントを含む。

【0126】

本発明によるシルコウイルスは、存在する可能性のある分画と共に、当分野の技術者に知られている技法によって不活性化される。不活性化は、好ましくは、化学的経路によって、たとえばホルムアルデヒド（ホルマリン）、パラホルムアルデヒド、 β -プロピオラク 10
トン、またはエチレンイミン、あるいはその誘導体などの化学薬剤に抗原を暴露することによって行われる。本発明において不活性化の好ましい方法は、化学薬剤、特にエチレンイミン、または β -プロピオラクトンへの暴露であろう。

【0127】

抗原性製剤、免疫原性組成物、およびワクチンは、好ましくは、TCID₅₀が 10^5 から 10^8 の当該不活性化全ウイルスを含むことになる。

【0128】

好ましくは、本発明による弱毒化または不活性化抗原性製剤、ならびに弱毒化または不活性化免疫原性組成物およびワクチンにはアジュバントが補足され、有利には、当分野の技術者によく知られる技法に従って、エマルジョン、たとえば油中水型、または水中油型の 20
形態で提供される。有効成分に慣例的なアジュバント化合物を組み込むことで、アジュバントの特性を得ることも可能である。

【0129】

用いることのできるアジュバントのなかで、例として挙げることができるのは、水酸化アルミニウム、サポニン（たとえば、QuillajaサポニンまたはQuilA、Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Michael F. Powell, Mark J. Newman編、Plenum Press, New York, London, 210頁を参照のこと）、Avridine, RTM. (Vaccine Design 148頁)、DDA（臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、Vaccine Design 157頁）、ポリ 30
ホスファゼン（Vaccine Design 204頁）、あるいは鉱油をベースとする水中油型エマルジョン、スクアレン（たとえば、SPTエマルジョン、Vaccine Design 147頁）、スクアレン（たとえば、MF59、Vaccine Design 183頁）、または代謝可能な油をベースとする油中水型エマルジョン（好ましくはWO94/20071による）、ならびに米国特許第5422109号に記載のエマルジョンである。アジュバントの組合せ、たとえばエマルジョンと組み合わせたAvridine, RTM. またはDDAを選択することも可能である。

【0130】

凍結乾燥安定剤として、例として挙げることができるのは、SPGA（Bovarnik等、J. Bacteriology 59, 509, 950）、炭水化物、たとえばソル 40
ビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、デキストラン、またはグルコースなど、タンパク質、たとえばアルブミン、またはカゼインなど、これらの化合物の誘導体、または緩衝剤、たとえばアルカリ金属リン酸塩などである。

【0131】

サブユニットおよびベクター・ワクチン

本明細書では、「サブユニット抗原」という用語は、抗原性PCVポリペプチド、またはその抗原性フラグメントを指す。「サブユニットまたはポリペプチド・ワクチン」という用語は、免疫原性ポリペプチド、および通例はアジュバントを含むワクチンを指す。

【0132】

「ベクター・ワクチン」は、「組換え生ベクター」、または「DNAベクター」を含む。 50

【0133】

本明細書では、「組換え生ベクター」という用語は、*in vivo*または*ex vivo*ワクチン接種のための抗原性または免疫原性ポリペプチドを発現するために用いられるベクターを指す。好ましいベクターは、DNAをベースとするベクター、およびレトロウイルス・ベクターなどのウイルス・ベクターである。適切な生ベクターとして、好ましく用いることができるのは、当分野の技術者によく知られている技法に従って、好ましくはブタにおいて増殖することができ、ブタに対して非病原性の（天然に非病原性であるか、あるいはそのようにされた）生ウイルスである。特に用いることができるのは、パルボウイルス（US 6 217 883）、ブタ・ヘルペスウイルス、たとえばアウエスキー病ウイルスなど、ブタ・アデノウイルス、ポックスウイルス、特にワクシニアウイルス、トリ・ポックスウイルス、カナリア痘ウイルス、ブタ痘ウイルスである。DNAベクターも、ベクターとして用いることができる（WO 90/11092、WO 93/19813、WO 94/21797、WO 95/20660）。一般に、ベクターは*in vivo*で投与されるが、適切な抗原呈示細胞、たとえば樹状細胞などの*ex vivo*形質導入、その形質導入細胞の*in vivo*投与も企図される。

10

【0134】

他の実施形態において、ベクターは、*naked DNA*として、または他のトランスフェクション促進剤（ペプチド、ポリマーなど）と共にリポフェクションによって*in vivo*で導入されることのできるDNA分子の形態であることができる。この実施形態は、本明細書において「DNAベクター」技術と呼ばれる。*in vivo*トランスフェクションのためのリポソームを調製するために、合成カチオン脂質を用いることができる（Felgner等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 7413-7417、1987、FelgnerおよびRingold、Science 337: 387-388、1989、Mackey等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 8027-8031、1988参照、Ulmer等、Science 259: 1745-1748、1993）。核酸の伝達に有用な脂質化合物および組成物は、国際特許公開WO 95/18863、およびWO 96/17823、ならびに米国特許第5459127号に記載されている。脂質は、標的化のために他の分子と化学的に結合することができる（上記のMackey等を参照のこと）。標的ペプチド、たとえばホルモンまたは神経伝達物質、およびタンパク質、たとえば抗体、または非ペプチド分子などは、化学的にリポソームと結合することができる。他の分子も、*in vivo*での核酸のトランスフェクションを促進するのに有用であり、たとえばカチオンオリゴペプチド（たとえば、国際特許公開WO 95/21931）、DNA結合タンパク質から誘導されたペプチド（たとえば、国際特許公開WO 96/25508）、またはカチオンポリマー（たとえば、国際特許公開WO 95/21931）などである。さらに、*in vivo*で*naked DNA*プラスミドとしてベクターを導入することも可能である。遺伝子治療に用いる*naked DNA*ベクターは、当分野で知られている方法、たとえばエレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降、遺伝子銃の使用（弾道トランスフェクション）、またはDNAベクター・トランスポータの使用によって所望の宿主細胞に導入することができる（たとえばWu等、J. Biol. Chem. 267: 963-967、1992、WuおよびWu、J. Biol. Chem. 263: 14621-14624、1988、Hartmut等、カナダ特許出願第2012311号、1990年3月15日出願、Williams等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2726-2730、1991を参照されたい）。受容体媒介DNA送達法も用いることができる（Curie等、Hum. Gene Ther. 3: 147-154、1992、WuおよびWu、J. Biol. Chem. 262: 4429-4432、1987）。米国特許第5580859号および第5589466号は、トランスフェクション促進剤を含まない外因性DNA配列の哺乳動物における送達を開示している。最近、比較的低電圧で効率の高い、電気伝達と呼ばれる*in vivo*のDNA伝達技法が記載された（Mir等、C. P

20

30

40

50

. Acad. Sci., 321: 891, 1998, WO99/01157, WO99/01158, WO99/01175)。

【0135】

ワクチン接種方法

先天性振せんに対して対象にワクチン接種するために、種々の方法を用いることができる。ポリペプチド・ワクチン製剤は、皮下(s.c.)、腹腔内(i.p.)、筋肉内(i.m.)、真皮下(s.d.)、真皮内(i.d.)によって、または抗原呈示細胞への *ex vivo* 投与、それに続く細胞の対象への投与によって送達することができる。

【0136】

同様に、たとえば遺伝子銃または直接注入などによる、*naked DNA* および *RNA* 送達など、上に記載した任意の遺伝子送達方法を、対象にベクター・ワクチンを投与するために用いることができる。

【0137】

ワクチン接種の有効性は、免疫刺激分子、たとえば免疫刺激または免疫増強活性サイトカイン、リンホカイン、またはケモカインを、そのワクチン、特にベクター・ワクチンと併用投与することによって増強することができる。たとえば、サイトカインまたはサイトカイン遺伝子、たとえばインターロイキン(IL)-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13、顆粒球マクロファージ(GM)コロニー刺激因子(CSF)、マクロファージ炎症因子など、ならびにいくつかの主要共刺激分子またはその遺伝子(たとえば、B7.1、B7.2)を用いることができる。

【0138】

粘膜ワクチン接種。感染は多くの場合粘膜を経て起こるので、粘膜ワクチン方法は多くの病原性細菌に関して特に有効である。したがって、ポリペプチド、およびDNAワクチンの両方に関して粘膜ワクチン接種方法が企図される。粘膜はワクチンの局所送達によって標的とされることができ一方、種々の方法が免疫原性タンパク質を粘膜に送達するために用いられてきた(これらの方法には、たとえばベクター標的タンパク質として特定の粘膜標的タンパク質を用いることによって、または粘膜標的タンパク質との混合剤でワクチン・ベクターを送達することによってDNAワクチンを送達することも含む)。

【0139】

たとえば特定の実施形態において、免疫原性ポリペプチドまたはベクター・ワクチンを、コレラ毒素B、またはコレラ毒素A/Bキメラなどのコレラ毒素との混合剤で、あるいはコレラ毒素との複合体またはキメラfusionタンパク質として、投与することができる(Hajishengallis等、J Immunol., 154: 4322-32, 1995、JoblingおよびHolmes、Infect Immun, 60: 4915-24, 1992)。コレラ毒素Bサブユニットの使用に基づく粘膜ワクチンは、これまでに記載されている(LebensおよびHolmgren、Dev Biol Stand 82: 215-27, 1994)。他の実施形態において、易熱性エンテロトキシン(LT)との混合剤を、粘膜ワクチン接種のために調製することができる。

【0140】

他の粘膜免疫化方法には、免疫原をマイクロカプセルに被包すること(米国特許第5075109号、第5820883号、および第5853763号)、および免疫増強活性膜様担体を用いること(WO98/0558)が含まれる。経口投与された免疫原の免疫原性は、赤血球(rbc)、またはrbcゴーストを用いることによって(米国特許第5643577号)、またはブルータング抗原を用いることによって(米国特許第5690938号)増強することができる。標的化免疫原の全身投与も、粘膜免疫化をもたらすことができる(米国特許第5518725号を参照)。

【0141】

粘膜組織での発現のために遺伝子を送達するために、キメラ・ライノウイルス(米国特許第5714374号)、アデノウイルスの使用、または核酸の特異標的化(WO97/05267)など、種々の方法を用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

受動免疫化

上に記載した能動免疫化ワクチン接種方法に加えて、本発明はさらに、好ましくは P C V 抗原に対して産生された P C V 抗原反応性抗体による受動免疫化を企図する。受動免疫化は、宿主の免疫機構が応答できる以前の初期感染または確立感染に対して特に有効である。

【 0 1 4 3 】

受動免疫化に用いる抗体源の 1 つは、感染宿主と同一種の罹患動物の回復期血清から得られる。したがって、たとえば、好ましくは P C V ポリペプチドに対する親和精製によってブタ血清から抗体を単離し、新しく感染したブタを受動的に免疫化するために用いることができる。

10

【 0 1 4 4 】

別法として、抗体を免疫原性ポリペプチドに対して産生することができ、すなわちワクチン方法を、受動免疫化の抗体を産生するためにも用いることができる。

【 0 1 4 5 】

本発明の抗 P C V 抗体は、交叉反応性であることができ、たとえば種々の P C V 株を認識することができる。ポリクローナル抗体は、交叉反応性である可能性が高い。

【 0 1 4 6 】

先天性振せんに対する防御免疫のイムノアッセイ

他の実施形態において、本発明の免疫原性ポリペプチドは、ブタの先天性振せんに対する防御抗体を検出するためのイムノアッセイに用いることができる。本発明の発見に基づいて、高力価の P C V 抗原との（特異的な）抗体反応性は、その個体が P C V による感染から、したがって先天性振せんから防御されている可能性を示す。P C V 抗原との低い、または検出されない抗体反応性は、その個体が感染から防御されていない可能性を示す。

20

【 0 1 4 7 】

本発明のイムノアッセイは、たとえば回復期血清など、P C V 感染に暴露された対象において抗体レベルを検出するために用いることができる。このイムノアッセイはさらに、未知の状態の対象において抗体を検出するために用いることもできる。そのような対象の高レベルの抗体力価は、P C V への事前暴露、および防御免疫性の可能性を示す。最後に、このイムノアッセイは、本発明のワクチンの有効性を評価するために用いることができる。

30

【 0 1 4 8 】

上述の任意のイムノアッセイ方式を、本発明のイムノアッセイに用いることができる。好ましくは、P C V ポリペプチドを固相に吸着させ、血清（好ましくは段階希釈中）を固相に接触させ、たとえば血清中の抗体に特異的な標識抗体を用いて抗体結合を検出する E L I S A アッセイを用いる。別法として、血清試料中の抗 P C V 抗体が、たとえば上述の通り調製された P C V ポリペプチドに特異的な標識抗体に対して固相ポリペプチドへの結合を競合する、競合 E L I S A 方式を用いることができる。さらなる別法においては、ポリペプチドを標識し、そのポリペプチドに特異的な抗体を、固相支持体に吸着させる。生物試料（たとえば、血清）中に抗体が存在すると、ポリペプチドに対する競合が生じ、標識の吸着抗体への結合を妨げることになる。さらに、以下に記載する都合のよいクロマトグラフィ・イムノアッセイ方式を用いることができる。

40

【 0 1 4 9 】

ここに記載したイムノアッセイは、血清における抗 P C V 抗体の存在を試験することに関するが、抗体を提供する任意の生物試料を試験することができ、これらに限定することなく、血液、血清、血漿、組織試料、リンパ、粘膜分泌物、痰、滑液、および他の炎症性流体などが含まれる。

【 0 1 5 0 】

キット

イムノアッセイを実施するための構成要素は、都合よくキット形態で提供することができ

50

る。もっとも基本的な実施形態において、本発明のキットは、PCVポリペプチド、および試験される対象の抗体に特異的な標識抗体などの抗体検出剤を提供する。それぞれの量を予め測定して、規定数のアッセイを提供することができる。

【0151】

さらなる実施形態において、このキットは、プレートなどの、好ましくはプラスチック、またはタンパク質の非特異結合を回避するように処理された材料のアッセイ容器を含む。本明細書では、容器という用語はもっとも広範な意味を有し、すなわち材料または試薬を保持するための任意の入れ物である。この容器は、ガラス、プラスチック、セラミック、金属などから製造することができる。

【0152】

さらなる実施形態において、このキットは、PCVポリペプチド、またはPCVポリペプチドに特異的な抗体いずれか1種の試薬が不可逆的に結合した、免疫クロマトグラフィ膜または支持体を含む。免疫クロマトグラフィ・アッセイに関して当分野で知られている多くの方法および装置を、本発明において用いることができる。上述のとおり、免疫クロマトグラフィ・アッセイは、実験室の機器が利用できない野外条件下で特に有用である。そのようなアッセイの例は、米国特許第5248619号、第5451504号、第5500375号、第5624809号、および第5658801号に記載されている。

【0153】

本発明のキットは、好ましくは、包装、および、たとえば包装上の、または包装に挿入された使用説明書を含む。

【0154】

複合法

複合免疫化またはワクチン接種プログラムに関して、ブタ・シルコウイルスに対する免疫化またはワクチン接種を、他のブタ病原体、特にPMWS症候群に関連する病原体に対する免疫化またはワクチン接種と組み合わせることも可能である。したがって、本発明による免疫原性組成物またはワクチンは、パルボウイルス(US6217883)から、PRRS(ブタ繁殖呼吸障害症候群)、および/またはMycoplasma hyopneumoniae、および/または大腸菌、および/または萎縮性鼻炎、および/または仮性狂犬病(アウエスキー病)ウイルス、および/またはブタ・インフルエンザ、および/またはアクチノバチルス胸膜肺炎、および/またはブタ・コレラ、およびそれらの組合せから選択された別のブタ病原体に対応する別の価を含むことができる。好ましくは、本発明による免疫化またはワクチン接種プログラム、およびワクチンは、シルコウイルスに対する免疫化またはワクチン接種と、PRRS(WO93/07898、WO94/18311、FR-A-2709966、C. Charreyre等、Proceedings of the 15. sup. th. IPVS Congress, Birmingham, England, 7月5-9、1998、139頁)、および/またはMycoplasma hyopneumoniae(EP-A-597852、EP-A-550477、EP-A571648、O. Martinon等、157、284、285頁、およびG. Reynaud等、150頁、すべてProceedings of the 15. sup. th. IPVS Congress)、および/またはブタ・インフルエンザと組み合わせられる。したがって、本明細書に記載のとおり、ブタ・シルコウイルスに対する免疫原性組成物またはワクチンと組み合わせるために、任意の適切な形態の免疫原性組成物またはワクチン、特に任意の市販のワクチンを用いることが可能である。

【0155】

したがって、本発明の主題はさらに、多価免疫原性組成物およびワクチン、多ワクチンキット、およびそのような複合免疫化またはワクチン接種プログラムの使用を可能にする複合免疫化またはワクチン接種方法である。

【0156】

本発明は以下の実施例を参照することによってよりよく理解されるであろうが、実施例は例示のために示されるものであって、本発明を限定するものではない。

【 0 1 5 7 】

【 実施例 】

実施例 I : ブタの先天性振せんに関連するブタ・シルコウイルスの配列分析

方法

PCV 感染組織試料および細胞系 : PCV に感染したブタを、米国インディアナ州の農場から得た。ブタは最初に、PMWS または CT いずれかの徴候によって、続いて組織切片の顕微鏡検査によって識別した。組織中の PCV の存在は、さらに PCV 特異オリゴヌクレオチド・プローブを用いる *in situ* ハイブリダイゼーション、PCV に対する抗血清を用いる間接蛍光抗体アッセイ (IFA)、および PCV に特異的なプライマーを用いる PCR によって確認した。PMWS の徴候を示すブタから採取した 4 種の PCV 単離株は、PMWS - PCV - P 1、PMWS - PCV - P 2、PMWS - PCV - P 3、および PMWS - PCV - P 4 と命名した。CT の徴候を示すブタから採取した 2 種の PCV 単離株は、CT - PCV - P 5、および CT - PCV - P 6 と命名した。

10

【 0 1 5 8 】

歴史上重要な PCV 単離株を単離するために、PCV 混入細胞系 (PCNS) を、CT の徴候を示すブタの脳から誘導した。妊娠した雌ブタに、CT ブタ腎細胞から得た細胞培養上澄みを実験的に接種した (Gustafson および Kanitz、1974)。PCNS 細胞を、10% Fetal Clone III (HyClone, Inc.) を含有するイーグル最小必須培地 (EMEM) [Life Technologies, Inc.] 中で増殖した。細胞を採取し、PCV 特異オリゴヌクレオチド・プローブを用いる *in situ* ハイブリダイゼーション、電子顕微鏡検査 (EM)、および PCV 特異プライマーを用いる PCR によって、PCV に関して試験した。この PCV 単離株は、CT - PCV - P 7 と命名した。

20

【 0 1 5 9 】

DNA 単離および PCR : 細胞が培地で浮動を開始したときに、EMEM で増殖させた PCNS 細胞を採取した。細胞ペレットを、SDS プロナーゼ (10 mM の Tris、pH 7.4、10 mM の EDTA、および 0.5% の SDS 中プロナーゼ 500 μ g/ml) で溶解し、一晚 37 でインキュベートした。全細胞 DNA を、フェノールの抽出、続いてエタノールの沈殿によって単離した。

30

【 0 1 6 0 】

PMWS - PCV - P 1、P 2、P 3、P 4、および CT - PCV - P 6 のリンパ節、ならびに CT - PCV - P 5 の肝臓を、ティシュマイザ (tissuizer) を用い、続いて音波破碎機を用いる音波破碎によって EMEM 中で均質化した。組織ホモジネートを、等量の SDS - プロナーゼ (20 mM の Tris、pH 7.4、20 mM の EDTA、および 1% の SDS 中プロナーゼ 1 mg/ml) と共に、一晚 37 でインキュベートした。フェノール抽出、およびエタノール沈殿によって、全細胞 DNA を得た。全 PCV ゲノムを増幅するための 2 対のプライマーと共に Vent DNA ポリメラーゼ (New England Biolab) を用いる PCR に、この DNA をテンプレートとして用いた。PMWS - PCV - P 1、P 2、および P 3、CT - PCV - P 5、および P 6 に対して、PCV 2 - 1 および PCV 2 - 2 と、PCV 2 - 3 および PCV 2 - 4 のプライマー・セットを用いた (表 1)。PMWS - PCV - P 4 に対しては、PCV 2 - 1 および PCV 2 - 2 と、PCV 4 - 1 および PCV 4 - 2 のプライマー・セットを用いた (表 1)。CT - PCV - P 7 に対しては、PCV 1 - 3 および PCV 1 - 4 と、PCV 7 - 1 および PCV 7 - 2 のプライマー・セットを用いた (表 1)。PCR 産物を、1% アガロース・ゲルで分析し、UV トランスイルミネータで視覚化した。

40

【 表 1 】

表1 PCVゲノムのクローニングに本研究で用いたプライマーのヌクレオチド配列

およびプライマーの位置

プライマー	SEQ ID NO	プライマーの位置 (ヌクレオチド)*	プライマーのヌクレオチド配列
PCV1-3	8	37-56	5'TACTCCTCAACTGCTGTCCC3'
PCV1-4	9	1605-1624	5'TCCATCCCACCACTTATTTTC3'
PCV2-1	10	1076-1093	5'ACGCTGAATAATCCTTCC3'
PCV2-2	11	679-660	5'CCAACAAAATCTCTATACCC3'
PCV2-3	12	7-24	5'ATTACCAGCAATCAGACC3'
PCV2-4	13	1657-1640	5'AACAACCACTTCCTTCACC3'
PCV4-1	14	611-629	5'AGCAGGGCCAGAATTCAAC3'
PCV4-2	15	1100-1079	5'CGTCTTCGGAAGGATTATTACAG3'
PCV7-1	16	1597-1617	5'GCCTAGTAGAAATAAGTGGTG3'
PCV7-2	17	87-68	5'AGTAATCCTCCGATAGAGAG3'

*プライマーPCV2-1、2-2、2-3、2-4、4-1、4-2、およびプライマーPCV1-1、1-2、

7-1、7-2の位置は、それぞれ、PMWS-PCV(Hamel等、1999)、およびPK-15-PCV(Mee

han等、1997)の配列に基づく。

【0161】

PCR産物のクローニング：PCR産物を、T4DNAリガーゼ(New England BioLab)を用いる平滑末端ライゲーションによって、pUC18のSmaI部位にクローン化した。PMWS-PCV-P1、-P2、および-P3の全ゲノムを構成するために、PCV2-1および2プライマーで増幅したnt1076-679のPCR産物、PCV2-3および4プライマーで増幅したnt7-1657のPCR産物を含有するpUC18を、StuIおよびKpnIを用いて消化した。PCV2-1および2で増幅したPCR産物を含有するpUC18の4kbのStuI-KpnIフラグメントを用いて、PCV2-3および4で増幅したPCR産物を含有するpUC18の1.3kbのStuI-KpnIフラグメントを挿入し、ヌクレオチド1076-1768、および1-1657のPCVゲノムを含有するpUC18を生じた。結果として生じたPMWS-PCV-P1、-P2、または-P3いずれかのゲノムを含有するプラスミドを、それぞれ、pPCV-P1、pPCV-P2、およびpPCV-P3と命名した。これらのプラスミドをSacII135で消化して、完全PCVゲノムの線形化形態を産生した。同様に、他のPCV株から得たPCR産物も、平滑末端ライゲーションによって、pUC18のSmaI部位でクローン化した。プラスミドDNAを、塩化セシウム-臭化エチジウム勾配中、等密度遠心分離によって精製した(Sambrook等、Molecular cloning: A laboratory manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)。

【0162】

クローンPCVDNAのトランスフェクションおよびPCVの検出：PCVDNA(PCV-P1、-P2、および-P3)の全ゲノムを含有するプラスミドをSacIIで消化して、2つのフラグメント、全PCVゲノムDNA、pUC18とPCVDNAの一部、を生じた。6ウェル・プレート中のPCVを含まないPK-15細胞の半融合単一層を、リポフェクティン媒介トランスフェクション・プロトコル(Life Technologies, Inc.)を用いて、1μgのライゲートしたPCVゲノムでトランスフェクトした。細胞を3回継代した。3回目の継代後、細胞を採取し、サイトスピンし、アセト

ンで固定した。ウサギで作製した P M W S - P C V に対するポリクローナル抗体を (M o r r o z o v および P a u l 、 I o w a S t a t e U n i v e r s i t y 、 A m e s 、 I o w a) 、 I F A に用いた。E M のために、細胞ペレットに水を加え、細胞内容物を 5 分間 1 0 0 0 0 r p m で遠心分離した。上澄みを集め、4 0 分間 2 0 0 0 0 r p m で遠心分離した。細胞ペレットを、3 % リンタングステン酸、および 1 % ウシ血清アルブミンを含有する水に再懸濁した。試料を、炭素被覆グリッド上で霧状にし、P h i l l i p s 2 0 1 電子顕微鏡で検査した。

【 0 1 6 3 】

D N A 配列決定および配列分析：P C V D N A を含有するプラスミドを、ユニバーサル・プライマーおよびリバー・プライマーを用いて配列決定した。その後、D N A の両株を、応用 B i o s y s t e m s 3 7 3 A 自動配列装置を用いて、プライマー・ウォーキングによって配列決定した。7 種の P C V 単離株 (P M W - P C V - P 1 、 - P 2 、 - P 3 、 - P 4 、および C T - P C V - P 5 、 - P 6 、および - P 7) の全ゲノムを、G C G 配列分析ソフトウェア (W i s c o n s i n p a c k a g e) を用いて分析した。

10

【 0 1 6 4 】

系統発生の算出：C l u s t a l W プログラムによって、配列アライメントを得た。系統発生の算出を、P H Y L I P プログラム・パッケージ、バージョン 3 . 5 7 2 c によって行った (F e l s e n s t e i n 、 C l a d i s t i c s 5 : 1 6 4 - 1 6 6 、 1 9 8 9) 。最大節約分析のために、P r o t p a r s または D N A p a r s プログラムを用いた。距離分析のために、P r o t d i s t (D a y h o f f P A M 0 0 1 マトリクス) または D N A d i s t (K i m u r a 2 パラメータ) 、続いて F i t c h (全体的な再配列を伴う) を適用した。ブートストラップ分析の間、上記の算出を S e q b o o t (1 0 0 データ・セット) によって進め、続いて C o n s e n s u s プログラムによって、コンセンサス系統樹を得た。最後に、T r e e V i e w プログラムによって結果を視覚化した (P a g e 、 C o m p u t e r A p p l i c a t i o n s i n t h e B i o s c i e n c e s 1 2 : 3 5 7 - 3 5 8 、 1 9 9 6) 。応用した方法のより詳細な説明は他に発表されている (H a r r a c h および B e n k o 、 A d e n o v i r u s M e t h o d s a n d P r o t o c o l s M e t h o d s i n M o l e c u l a r M e d i c i n e 、 2 1 : 3 0 9 - 3 3 9 、 1 9 9 8) 。

20

【 0 1 6 5 】

結果

P C V を含まない P K - 1 5 細胞の P C V D N A によるトランスフェクション。最初に、P M W S に関連する 3 種の P C V 単離株 (P M W S - P C V - P 1 、 - P 2 、および - P 3) の全ゲノムを、2 組のプライマーを用いて P C R によって増幅した。P C R 産生フラグメントを用いて、P C V ゲノムを含有するプラスミド (p P C V - P 1 、 - P 2 、および - P 3) を構成した。これらのプラスミドを S a c I I で消化して、完全 P C V ゲノムの線状形態を得た。クローン P C V ゲノムが感染しているかどうかを試験するために、S a c I I 消化再ライゲート、または非ライゲート p P C V - P 1 、 - P 2 、および - P 3 を用いて、P C V を含まない P K - 1 5 細胞をトランスフェクトした。3 回の継代後に細胞を採取し、I F A によって P C V 抗原の存在を分析した。I F A によって、S a c I I 消化再ライゲート P C V D N A でトランスフェクトしたいくつかの細胞は P C V 抗原に対して陽性であり、それに対して、S a c I I 消化非ライゲート P C V D N A でトランスフェクトした細胞は P C V 抗原に対して陰性であった。P C V D N A によるトランスフェクションが P C V ビリオンの産生をもたらすかどうかをさらに確認するために、P C V D N A でトランスフェクトした P K - 1 5 細胞を E M によって分析した。直径約 1 7 n m の小さい球状ウイルスが認められた。P C V D N A でトランスフェクトした細胞における P C V 抗原の検出、およびウイルス粒子の観察は、クローン全長環状 P C V D N A が、ウイルスの複製、およびウイルス粒子の産生をもたらすことを示した。P C R によって増幅されたこの全長 P C V ゲノムは感染性であったので、本発明者等は P C R 技法を用いて、他の P C V 野外株のゲノムを増幅した。

30

40

50

【 0 1 6 6 】

PMWS-PCVと、旧および新CT-PCV単離株の配列比較。本発明者等は、PMWSに関連する4種のPCV単離株(PMWS-PCV-P1、-P2、-P3、および-P4)、1990年代終わりのCTに関連する2種のPCV単離株(CT-PCV-P5、および-P6)、および1960年代終わりのCTに関連する1種のPCV単離株(CT-PCV-P7)の全ゲノムを配列決定した。これらの単離の配列を、以前に記載されたPMWS-PCV単離株(Hamel等、1998)、およびPK-15-PCV単離株(Meehan等、Journal of General Virology 78: 221-227、1997)の配列と比較した。PMWS-PCV-P1、-P2、および-P4のゲノムは1768ヌクレオチド(nt)の長さであり、それに対してPMWS-PCV-P3は、820と825ntとの間で6ntが欠失しているため、他のPMWS-PCV単離株よりも6ヌクレオチド短かった(図1)。本発明のすべてのPMWS-PCV単離株は、互いに全体で99%のnt配列同一性を有した。PMWS-PCV-P1の各ORFの配向、および相対的長さを示す(図2A)。PMWS-PCVのゲノムにおける各ORFのコーディング鎖、アミノ酸数、および位置を表に示す(表2)。

【 表 2 】

表2 PMWS-PCVと新しいCT-PCVのORFの比較*

ORF	PMWS-PCV-P1			PMWS-PCV-P2			PMWS-PCV-P4		
	コーディング鎖	アミノ酸数	位置 (ヌクレオチド)	アミノ酸数	位置 (ヌクレオチド)	アミノ酸数	位置 (ヌクレオチド)	位置	
ORF1	V	314	1019-195	-	1013-195	-	-		
ORF2	C	233	935-234	231	926-234	-	-		
ORF3	C	104	1639-1325	-	1633-1319	-	-		
ORF4	C	59	1533-1354	-	1527-1348	-	-		
ORF5	V	53	216-377	-	-	104	216-530		
ORF6	C	29	811-724	-	-	-	-		
ORF7	V	19	882-941	-	876-935	-	-		
ORF8	C	21	1721-1656	-	1715-1650	-	-		
ORF9	C	42	1061-932	-	1055-926	-	-		
ORF10	V	35	724-931	61	724-909	-	-		
ORF11	C	14	233-189	-	-	-	-		

*PMWS-PCV-P3、CT-PCV-P5、およびCT-PCV-P6の各ORFのアミノ酸数および位置は、PMWS-PCV-P1と同一である。

*Vはウイルス粒子に包膜されたウイルス鎖を表し、Cはウイルス鎖の相補鎖を表す

-は、PMWS-PCV-P11と同じであることを表す。

【 0 1 6 7 】

ORF1のアミノ酸配列は、これらのすべてのPMWS-PCV単離株の間で高度に相同性であった(アミノ酸レベルで約99%の相同性)。これらのPMWS-PCV単離株のいくつかのORFにおいて認められたアミノ酸残基の変化を表に示す(表3)。ORF2は、ORF1と比較してPMWS-PCVの間でアミノ酸変化が多かったが、それでも約97%の相同性を有した。オープン・リーディング・フレーム3、4、7、および8は、PMWS-PCV単離株の間で同一であり、他のORFでは少数のみが変化していた(表3)。

【表 3】

表3 種々のPCVのORFとPMWS-PCV-P1またはPK-15-PCVのORFとの
アミノ酸配列比較*

	PMWS-PCV- P2	PMWS-PCV- P3	PMWS-PCV- P4	CT-PCV-P6	PMWS-PCV ^b	CT-PCV-P7	
ORF1		K30N, T292M			H82Y	T283N	10
ORF2	P,59 ^a , K75T, L76I, V130F, A133S, N134T, N232K	R35dY36d	R59A, K75N, L76L P13IT, N134S, L185K L187I, N2S2K	N134T, N2-32K	R59A, T63F, K75N, L76I, T53R, Y63H P13IT, N134T, Y72H, K74R, N181T, K206L N232K	A30V, T44K, H176Q, Y201F, A207D, K233E	
ORF3	-	-	-		-	S139G, A163T, W203G	
ORF4	-	-	-		-	-	20
ORF5	F51, V9F	-	F51, V9F, H48Y	F51, V9F	V9F, F35Y	V12L, N69Y	
ORF6	S17P, V18L	P25R	S17RV18L	A7G, S8F	S17R, V18L, Q22E	N6D, Q16R, L51stop	
ORF7	-	-	-			K48Q	
ORF8	-	-	-	-	-	-	
ORF9	W2R	-	-	-	-	Q25H	
ORF10	R13A	Q5H	R13A	R23S	V9L, R13A	-	
ORF11	K2N	-	K2N	K2N	-	-	30

*PMWS-PCV-P2、-P3、-P4、PMWS-PCV、およびCT-PCV-P6のORFは、PMWS-PCV-1のORFと比較し、CT-PCV-P7のORFは、PK-15-PCVのORFと比較した。

^aアミノ酸の変化は、PMWS-PCV-P1に存在するアミノ酸、位置、および変化したアミノ酸として記載する。

^bPMWS-PCVの配列はすでに公表されている(Hamel等、Journal of Virology 72:52 62-5267、1998)。

^c欠失アミノ酸を表す。

stop:ORFの終止点をもたらす終止コドンを表す。

40

【0168】

PMWS-PCV-P4のORF、およびPMWS-PCV-P3のORF10は、本発明の他のPMWS-PCV単離株の対応するORFと比べて、それぞれアミノ酸54個、および26個長かった。

【0169】

1990年代終わりに単離された2種の新しいCT-PCV単離株(CT-PCV-P5、および-P6)は、1768ntの長さであった(図2)。これらのCT-PCVは、約99%のnt配列同一性を有した。興味深いことに、新しいCT-PCV単離株はさら

50

に、新しいPMWS-PCV単離株と、約99%のnt配列同一性を示した。PMWS-PCV-P1とCT-PCV-P5のゲノムは同一であった。PMWS-PCVおよび新しいCT-PCVのゲノムは共に11の潜在ORFをエンコードする。PMWS-PCV-P1のORFと比較した新しいCT-PCVの種々のORFにおけるアミノ酸変化を表に示す(表3)。

【0170】

古いCT-PCV(CT-PCV-P7)のゲノムは、1759ヌクレオチドの長さであった(図1)。CT-PCV-P7のゲノムも、11の潜在ORFをエンコードした。各ORFの配向、相対的長さを図2Bに示す。

【0171】

CT-PCV-P7の各ORFのアミノ酸数、および位置を示す(表4)。

【表4】

表4 PK-15-PCVと古いCT-PCVのORFの比較

ORF	コーディング鎖*	PK-15-PCV		CT-PCV-P7	
		アミノ酸数	位置 (ヌクレオチド)	アミノ酸数	位置 (ヌクレオチド)
ORF1	V	312	1019-198	-	-
ORF2	C	233	936-235	-	-
ORF3	C	206	1630-1010	-	-
ORF4	C	115	1524-1177	-	-
ORF5	V	95	376-663	-	-
ORF6	C	62	731-543	50	731-579
ORF7	V	56	883-1053	-	-
ORF8	C	37	1712-1599	-	-
ORF9	C	31	181-86	-	-
ORF10	V	37	855-968	-	-
ORF11	V	23	1620-1691	-	-

*Vはウイルス粒子に包装されたウイルス鎖を表し、Cはウイルス鎖の相補鎖を表す

-は、PK-15-PCVと同じであることを表す。

【0172】

CT-PCV-P7のゲノムは、PMWS-PCV、および両方の新しいCT-PCVとわずく約72%のnt配列同一性を有したが、驚くことにPK-15-PCVと約98%のnt配列同一性を共有した。CT-PCV-P7のすべてのORFのアミノ酸配列も、PK-15-PCVのORFと高度に相同性であった。PK-15-PCVのORFと比較したCT-PCV-P7の種々のORFにおけるアミノ酸変化を表に示す(表3)。

【0173】

Meehan等、J Gen Virol 78:221-227、1997は、PK-15-PCVのステム・ループ構造の先端にノナヌクレオチド配列の存在を認めており、これは植物のナノウイルスおよびジェミニウイルスで述べられたものと類似していた。本発明のすべてのPCV単離株は、ステム・ループ構造およびノナヌクレオチド(A/NTAGTATTAC)を保存しており、これはローリング・サークル型DNA複製の起点を表す

10

20

30

40

50

(Mankerts等、Journal of Virology 71:2562-2566、1997、Journal of General Virology 79:381-384、1998)。以前にHamel等(1998)によって報告されている潜在的なグリコシル化部位(N-X-T、またはN-X-S、Xは任意のアミノ酸)は、6位でアミノ酸残基「N」が「D」と置き換わっているCT-PCV-P7のORF6を除いて、本発明のすべてのPCV単離株で保存された。

【0174】

系統発生分析：複製関連タンパク質(ORF1/レプリカーゼ/rep/coat/P35.8タンパク質)、およびタンパク質P27.9(ORF2)などの個々のタンパク質の推定アミノ酸配列、または完全ゲノムのヌクレオチド配列を系統発生分析に用いたとき、距離マトリクスおよび最節約分析は共に、かなり類似したトポロジーを有する2つの別個の集団を生じた。株間の相違は適度なものであり、距離マトリクス分析がより一貫性のあるデータを与えると考えられたので(HarrachおよびBenko、Adenovirus Methods and Protocols Methods in Molecular Medicine、21:309-339、1998)、本発明者等は研究結果を完全ゲノムの距離マトリクス分析によって示すことを選択した(図3)。

10

【0175】

種々のブタおよびウシ・シルコウウイルスゲノムに関する距離マトリクス分析のもっとも明白な結果は、単離株の2集団への明確な単離であった(図3)。検査したゲノムの数は(7つの新しい配列を含む)29であり、単離株の起源は地理的に遠い地域に及んだが、中間の遺伝子型は見つからなかった。

20

【0176】

小さいほうの集団(1型)は、PK-15細胞系の異なる系統由来の単離株、および異なる病理学的実体(PMWSおよびCT)から単離された2種のシルコウウイルス株(PMWSアクセッション番号AF012107、およびCT-PCV-P7)を含有した。他方のかなり大きい集団(2型)は、PMWSを有するブタ由来の21種、2種の新しいCT単離株(CT-PCV-P5および-6)、およびウシ単離株(AF109397)を含む残りの24種の単離株を含有した。この系統樹に基づいて考えると、シルコウウイルス株の遺伝的関係は、その病原性能と直接関連していないように思われる。

【0177】

考察

本研究の目的は、CTに関連するPCVの遺伝的変異性を求めることであった。PMWS-PCV単離株は、互いに約99%のnt配列同一性を有し、さらに英国、カナダ、フランス、および米国で単離されたPMWS-関連PCVと96%のnt同一性を有し(Mehran等、Journal of General Virology 79:2171-2179、1998、Morozov等、Journal of Clinical Microbiology 9:2535-2541、1998、Hamel等、Journal of Virology 72:5262-5267、1998、Mankertz等、Virus Research、6665-77、2000)、種々のPMWS-PCV単離株はその起源の場所にかかわらず相同性が高いことを示している。

30

40

【0178】

1990年代終わりの新しいCT-PCV単離株、および1960年代終わりの古いCT-PCV単離株は、CTA2型を有する新生ブタを起源としたが、それらはわずか72%のnt配列同一性を共有した。2種の新しいCT-PCVのゲノムは、PMWSPCVの新しい単離株とかなり類似しており、それに対して古いCT-PCV単離株は、PK-15-PCV変株に非常に近かった。広範な系統発生算出に基づいて、異なるPCV単離株を、2つのグループに分けることができる。PK-15-PCV変株、本発明の古いCT-PCV-P7、および単一の特性決定されていないPMWS単離株(AF012107)は、PCV1型(PCV1)を構成し、残りの20種の新しいPMWS-PCV、および2種の新しいCT-PCV野外単離株(CT-PCV-P5および-P6)は、PCV

50

2 型 (P C V 2) を構成する。 P K - 1 5 - P C V および 4 種の P M W S 関連 P C V 単離株の配列分析に基づいて、 P K - 1 5 - P C V を P C V 1、 P M W S - P C V 単離株を P C V 2 と分類する予備案が提示された (M e e h a n 等、 1 9 9 8)。

【 0 1 7 9 】

P K - 1 5 - P C V (P C V 1 単離株) は、離乳ブタの接種実験において臨床的に非病原性であったが (T i s c h e r 等、 A r c h i v e s o f V i r o l o g y 9 1 : 2 7 1 - 2 7 6、 1 9 8 6、 A l l a n 等、 V e t e r i n a r y M i c r o b i o l o g y 4 4 : 4 9 - 6 4、 1 9 9 5)、それに対して C T - P C V - P 7 単離株 (同じく P C V 1) は 1 9 6 0 年代終わりに C T を有する新生ブタから得られたものであり、妊娠 7 0 日で妊娠雌ブタに接種したとき、子孫に先天性振せんを引き起こすようである (K a n i t z、博士論文、 P u r d u e U n i v e r s i t y、 1 9 7 2)。 P K - 1 5 - P C V も C T の原因となり得るのか、あるいは C T - P C V - P 7 が離乳ブタにおいて病原性であるのかどうかは明らかでない。年齢、感染経路、および / またはいくつかの他の要因が、 P C V 1 および P C V 2 の病原性および臨床的発現を決定する可能性がある。新しい C T - P C V および P M W S - P C V 株の間に約 9 9 % の n t 配列同一性が存在することは、最近の P M W S および C T の発生が P C V の同一の型 (すなわち、 P C V 2) に関連していることを示唆している。 P M W S を有するブタの報告された年齢は 6 - 1 2 週であるのに対して (E l l i s 等、 C a n a d i a n V e t e r i n a r y J o u r n a l 3 9 : 4 4 - 5 1、 1 9 9 8、 K i u p e l 等、 I n d i a n a V e t e r i n a r y P a t h o l o g y 3 5 : 3 0 3 - 3 0 7、 1 9 9 8、 R o s e l l 等、 J o u r n a l o f C o m p a r a t i v e P a t h o l o g y 1 2 0 : 5 9 - 7 8、 1 9 9 9)、 C T は新生ブタの疾患である (S t e v e n s o n 等、 J o u r n a l o f V e t e r i n a r y D i a g n o s t i c I n v e s t i g a t i o n s、印刷中)。 P C V によって起こる症候群の型の決定には、年齢が重要な役割を果たしているようである。最近、自然発生 of C T を有する新生ブタの脳および脊髄の多数のニューロンにおいて、 P C V 2 D N A の存在が実証された。胎児の発育中、神経細胞分裂が排他的に起こる。 P C V はその複製に細胞分裂を必要とするので、胎児発育中が、 P C V にとって神経組織内で複製し、 C T の徴候に至ることのできる唯一の期間である可能性がある (T i s c h e r 等、 A r c h i v e s o f V i r o l o g y 9 6 : 3 9 - 5 7、 1 9 8 7)。 P C V 2 を無菌ブタに接種したとき、接種後 3 5 日までに病変が発現するが、 P M W S の典型的な臨床疾患ではない。しかしながら、 P C V 2 をブタ・パルボウイルスまたはブタ繁殖呼吸障害症候群ウイルスと共に接種したとき、 P C V の複製は増強され、 P M W S が再現される (A l l a n 等、 J o u r n a l o f C o m p a r a t i v e P a t h o l o g y 1 2 1 : 1 - 1 1、 1 9 9 9)。他のウイルスは、 P C V 標的細胞の分裂を直接または間接的に引き起こすことによって、 P C V 複製を強化する可能性がある。

【 0 1 8 0 】

P C V 1 は、最初に 1 9 6 0 年代および 7 0 年代に同定され (T i s c h e r 等、 Z e n t r a l b l a t t f u r B a k t e r i o l o g i e , P a r a s i t e n k u n d e , I n f e k t i o n s k r a n k h e i t e n , u n d H y g i e n e - E r s t e A b t e i l u n g O r i g i n a l e - R e i h e A : M e d i z i n i s c h e M i k r o b i o l o g i e u n d P a r a s i t o l o g i e 2 2 6 : 1 5 3 - 1 6 7、 1 9 7 4、 M e e h a n 等、 J o u r n a l o f G e n e r a l V i r o l o g y 7 8 : 2 2 1 - 2 2 7、 1 9 9 7、本研究)、それに対して P C V 2 は、 1 9 9 0 年代終わりに同定された (H a m e l 等、 J o u r n a l o f V i r o l o g y 7 2 : 5 2 6 2 - 5 2 6 7、 1 9 9 8、 M e e h a n 等、 J o u r n a l o f G e n e r a l V i r o l o g y 7 9 : 2 1 7 1 - 2 1 7 9、 1 9 9 8、 M a n k e r t z 等、 V i r u s R e s e a r c h、 6 6 6 5 - 7 7、 2 0 0 0)。配列分析に基づいて、 P C V 2 は P C V 1 に由来する可能性があると考えられる。しかしながら、 2 種の型の間に大きな系統発生距離があること、および中間体が完全に欠けていると思われることは、 2 種の型の間の直接的な最近の係に矛盾する。これらの発見は、蔓延した P C V 感染 (たと

えば、ワクチン媒介疾患)の起源としてのPK-15細胞系の役割を支持しない。2型PCVの集団には、単一のウシ起源シロコウイルス単離株が含まれる。シロコウイルス感染がどのようにウシに広がったのかはわかっていない。この単一ウシ単離株とPCV2との間の高い類似性に基づいて考えると、この2種の異なるPCV系統が、アデノウイルスの場合に見られるように(RussellおよびBenko、Encyclopedia of Virology、14-21頁、1999)、ブタおよびウシ宿主において以前に、同時に進化したという魅力的な推測は否定される。しかしながら、そのようなPCV1およびPCV2株の進化は、2種以上のまだ同定されていない宿主種で発生した可能性はある。

【0181】

実施例II：自然発生先天性振せんを有するブタにおけるブタ・シロコウイルスの組織分布および遺伝子タイピング

材料および方法

研究計画：2日齢未満のブタを、CTA2型と一致する疾患が発生した米国中西部の4つの農場から選択した。各農場から、CTを有するブタ2-4頭(n=13)、および臨床的に正常なブタ1-2頭(n=6)を、Purdue Animal Disease Diagnostic Laboratory、Lafayette、INに移送し、ペントバルビタールで安楽死させた。死体解剖検査を行い、試験のために組織を採取した。大脳、小脳、脳橋、脊髄分節C1、C4、C7、T3、T6、T9、T12、L2、L5、およびS2、肺、肝臓、腎臓、脾臓、扁桃、腸間膜および兎径リンパ節の試料を、試験のために、中性緩衝ホルマリン中に採取するか、または-20℃で凍結した。

【0182】

組織病理学およびin situハイブリダイゼーション：慣例的な方法によって、組織を室温で24時間固定し、次いでパラフィンに包埋し、薄片にして、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。すべての組織を、顕微鏡的病変に関して評価した。前に記載したとおり、PCV1およびPCV2の両方でハイブリダイズすることが知られているPCVオリゴヌクレオチド・プローブを用いて、in situハイブリダイゼーションを行った(Kiupel等、Eur J Vet Pathol、1999、Rossell等、Encyclopedia of Virology、14-21頁、1999)。PCV特異オリゴヌクレオチドをジゴキシゲニンで3'末端標識した(Boehringer Mannheim Biochemica、Indianapolis、IN)。脱パラフィン化し、0.25%のペプシンを用いて105℃で8分間、続いて37℃で10分間タンパク質酵素消化を行い、オートメーション・バッファで洗浄、100%のホルムアミドを用いて105℃で5分間プレハイブリダイゼーションした後、市販のワークステーション(Fisher Scientific、Pittsburgh、PA)を用いて、プローブ濃度5μl/mlで、105℃で5分間、および37℃で60分間、ハイブリダイゼーションを行った。食塩水クエン酸ナトリウム緩衝液で高ストリンジェンシーの洗浄を行い、プローブと標的の結合を確実にした。アルカリホスファターゼとコンジュゲートした抗ジゴキシゲニン抗体からなる検出系(希釈1:500)(Boehringer Mannheim Biochemica、Indianapolis、IN)を37℃で45分間適用し、基質「NBT/X-Phos」(ニトロブルー・テトラゾリウム5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート)(Boehringer Mannheim Biochemica、Indianapolis、IN)を適用した。連続切片上で、45分、90分、および180分間、不溶性青色ホルマザンに色素還元した。対照は、PCV1感染PK-15細胞(Stevenson等、Veterinary Pathology 36:368-378、1999)、PCV2-感染ブタ(Kiupel等、Indiana Veterinary Pathology 35:303-307、1998)およびPCVを持たないノイバイオート・ブタの脳、脊髄、およびリンパ組織のドット・プロット・スライドを含んだ。スライドを、プローブを用いずにハイブリダイゼーション溶液でインキュベートし、陰性試薬対照として用いた。

10

20

30

40

50

【0183】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試験：PCVの遺伝子型を1型または2型として求めるために、すべてのブタから得た小脳および肝臓試料のPCR試験を行った。対照は、*in situ*ハイブリダイゼーション試験と同じものを用いた。組織を、ティッシュマイザーを用い、等量のTE（10mMのTris-HCl、1mMのEDTA、pH7.5）中で均質化した。標準的なプロトコルを用いて、全細胞DNAを抽出した（Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、1989）。PCV（Meehan等、Journal of General Virology 78:221-227、1997）、またはPCV2（Hamel等、Journal of Virology 72:5262-5267、1998）に対して特異性となるようにプライマー・セットを設計し、Vent DNAポリメラーゼ（New England Biolab, Inc.、Beverly、MA）を用いてPCRによってPCV配列を増幅するためにそれを用いた。PCR増幅DNA試料を、電気泳動によって1%アガロース・ゲル上で分析し、予期されるサイズの帯を、UVトランスイルミネーターで視覚化した。PCR成果物の特異性は、配列分析によって確認した。

【0184】

凍結切片間接免疫蛍光抗体試験：前に*in situ*ハイブリダイゼーションによってPCVに関して陽性を試験した肝臓および小脳の試料を、各群1頭のブタから選択した。PCV特異抗原の存在を確認するために、間接蛍光抗体試験を行った。凍結組織切片を調製し、間接蛍光抗体試験は、1:500希釈のウサギで作製した精製PCV2に対して作られた市販のポリクローナル抗体（MorozovおよびPaul、Iowa State University、Ames、IA）、および1:250希釈のフルオレセイン・コンジュゲート・マウス抗ウサギIgGを用いて、慣例的な方法で行った。

【0185】

他の因子の試験：仮性狂犬病ウイルス（NYSL、AMES、IA）、ブタ・インフルエンザウイルス（NYSL、AMES、IA）、ブタ・ロタウイルス（NYSL、AMES、IA）、ブタ血球凝集性脳炎ウイルス（NYSL、AMES、IA）、ブタ・パルボウイルス（American Bioresearch、Sevierville、TN）、および伝染性胃腸炎ウイルス（American Bioresearch、Sevierville、TN）を含む、他のブタ・ウイルス因子に関して、間接免疫蛍光を用いる慣例試験を、Purdue Animal Disease Diagnostic Laboratory、Lafayette INで市販の診断用試薬を用いて行った。血清、脾臓、および肺の試料を、ブタ繁殖呼吸障害症候群（PRRS）ウイルスに関して、ブタ1次肺胞マクロファージ細胞培養物中、ウイルス単離によって試験した。脳、脾臓、および扁桃の試料を、仮性狂犬病ウイルスに関して、直接蛍光抗体試験およびブタ鼻甲介細胞中ウイルス単離によって試験した。脳、脾臓、および扁桃の試料を、細胞変性ウイルスに関して、ブタ鼻甲介およびブタ精巢細胞中で試験した。

【0186】

結果

CTが発生した4つの農場はすべて、外部の供給源から更新用の種蓄を購入していた。種蓄の供給源は各農場で異なっており、いずれの農場も共通の遺伝を共有していなかった。ブタが屠殺齢まで維持された3つの農場では、最近のPMWS歴はなかった。試験に用いるために選択されたCTを有するブタはすべて、生後48時間以下で、中程度から重篤な振せんを伴い、ブタが自発的運動を試みたときにもっとも重篤であった。ブタが安静なときは、振せんが部分的に弱まった。年齢を対応させた臨床的に正常な対照ブタとして選択されたブタはすべて、CTブタのいないリフター（lifter）を起源とした。試験に選択されたブタはすべて敏捷で、活発であり、他の点では臨床的に正常であった。

【0187】

いずれのCTブタまたは正常ブタにおいても、肉眼的病変、または顕微鏡的病変はなかつ

た。P R R S ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、および他の細胞変性ウイルスに関するすべての試験は陰性であった。P C V は、*i n s i t u*ハイブリダイゼーション、P C R、およびI F A 試験によって、C T ブタ13頭中13頭、臨床的正常ブタ6頭中5頭の組織で実証された。C T ブタおよび臨床的正常ブタの両方で、もっとも一般的にP C V に感染していた組織は、中枢神経組織および肝臓であった。*i n s i t u*ハイブリダイゼーションは、P C V 陽性ブタにおいて、C T ブタの12/13および臨床的正常ブタの5/6の中枢神経組織、C T ブタの11/13および臨床的正常ブタの2/6の肝臓、ならびにより低い割合でC T ブタおよび臨床的正常ブタ5/6のすべての他の組織で、P C V を実証した。形態学的にマクロファージの典型である分散細胞の少数が、肝臓および他の非神経組織において陽性であった。P C V 核酸は、陽性のマクロファージの細胞質のほとんど、陽性マクロファージの少数の核にのみ存在した。C T ブタおよび臨床的正常ブタの両方の中枢神経組織に、他の組織より多くのP C V 陽性細胞が存在した。脳および脊髄の陽性細胞は、主として大ニューロンであり、陽性小ニューロンはそれよりも少なく、陽性稀突起神経膠細胞は希少であった。大脳および骨髄の核において大ニューロンが陽性であり、小脳のプルキンエ細胞が陽性であり、脊髄灰白質の大ニューロン、特に下位運動ニューロンが陽性であった。マクロファージと同様に、陽性ニューロンは一般に、細胞質にのみP C V 核酸を有し、核には希少であった。

10

【0188】

中枢神経系のP C V 感染細胞は、臨床的に正常なブタよりもC T ブタにおいて、数が多く、より広範に分布していた(表5)。一般に、C T ブタは、脳および脊髄に広範に分布した多数の陽性大ニューロンを有した。臨床的に正常なブタは、脳および脊髄に多焦点に分布した、より少数のP C V 陽性大ニューロンを有した。

20

【表5】

表5 先天性振せん(CT)を有した、または臨床的に正常であった1-2日齢のPCV感染ブタにおいて、*i n s i t u*ハイブリダイゼーションでPCVに陽性であった試料採取部位の割合。陽性数/試験を行った試料採取部位数

	大脳	小脳	髄質	頸髄	胸髄	腰仙髄	合計
CT	9/13	9/13	8/13	20/33	20/44	17/33	83/149
(N=13)	(.69)	(.69)	(.62)	(.61)	(.45)	(.52)	(.56)
正常*	1/5	3/5	2/5	1/15	1/20	3/15	11/65
(N=5)	(.20)	(.60)	(.40)	(.07)	(.05)	(.20)	(.17)

30

PCV陽性であった5頭の臨床的に正常なブタのみを表に含めた。1頭の臨床的に正常なブタは、本研究に適用したすべての試験方法で陰性であった。

40

【0189】

各群1頭のブタから得た小脳および肝臓の凍結切片の間接蛍光抗体試験によって、*i n s i t u*ハイブリダイゼーション試験の結果が確認された。P C V 特異抗原は、*i n s i t u*ハイブリダイゼーションのP C V 特異核酸とほぼ同じ数および細胞型で、同じ細胞位置において実証された。すべてのブタから得た小脳および肝臓のP C R 試験は、4つすべての農場のすべての陽性ブタにおいて、P C V 2 特異配列の増幅を実証したが、P C V 1 特異配列は実証されなかった。

50

【0190】

考察

C T A 2 型の発生中に、臨床的に正常なブタ、およびC T ブタの両方が、1 - 2 日齢でP C V 2 に感染していた。両方とも、先天的にウイルスに感染していたと思われる。P C V 2 は、すべての感染ブタで広範囲に分布しており、もっとも一般的には中枢神経組織に存在していた。

【0191】

しかしながら、臨床的に正常なブタと比較したとき、分布がより広範で、感染細胞の割合が高いために、C T ブタの脳および脊髄により多くのP C V 感染細胞が存在した。もっとも一般的な感染細胞は、脳および脊髄の大ニューロン、ならびに非神経組織のマクロファージであった。稀突起神経膠細胞はほとんど感染していなかった。

【0192】

C T ブタが脳および脊髄において先天的にミエリンを欠損していることは、以前の研究で実証されている (Christensen, Nord Veterinaermed 8 : 921 - 943, 1956)。他の研究は、年齢および遺伝的に対応する正常な対照ブタと比較して、C T ブタが不相応に低いセレブロシド、および高いコレステロールからなる異常に未熟なミエリンを有することを実証した (Patterson, J. Neurochem 26 : 481 - 485, 1976)。稀突起神経膠細胞がC N S においてP C V に感染する主要な細胞であって、それがミエリン合成の減少および異常の原因であろうというのが、本研究以前の仮説であった。脳および脊髄において多数のP C V 感染ニューロンが見つかったことは驚くべきことであり、さらにこのことがミエリン欠損は別にして、あるいはミエリン欠損に加えて、C T の重要な原因である可能性がある。以前の研究は、C T ブタにおけるミエリン欠損の程度は変化し、振せんの重篤度とは密接に関連していないことを実証した (Fletcher, J. Am Vet Med Assoc 29 (12) : 2255 - 2262, 1968)。この発見は、ミエリン異常は、単独ではC T の原因となり得ないことを示唆している。一研究において、C T および対照ブタの神経系で、大脳除去、片側迷路摘出、腰仙根の片側神経根切断、および胸髄離断を含む外科的切除が行われ、手術後神経学的検査によって振せんの原因が脊髄レベルに位置することが確認された。他の研究によって、C T ブタにおける脊髄反射は、単シナプス過剰興奮性であることが判明した (Stromberg, Am J Vet Res 20 : 319 - 323, 1959)。脊髄の運動ニューロンのP C V 感染が機能に直接影響を及ぼし、運動ニューロンをより興奮性にし、それによって脊髄反射弓に影響を与えている可能性がある。

【0193】

P C V 2 感染稀突起神経膠細胞が少数であることは、P C V 2 感染稀突起神経膠細胞の機能障害をC T A 2 型におけるミエリン欠損の原因とする仮説を支持しない。しかしながら、本発明者等はこれらのブタにおいてミエリン欠損を確認しておらず、そのため存在しなかったことも考えられる。さらに、これらのブタにおいて、以前にP C V 誘発の稀突起神経膠細胞の喪失および除去があった可能性も排除できない。P M W S を有するブタにおけるP C V 2 感染に伴う肉芽腫性炎症性反応は、これらのC T ブタのいずれのP C V 2 感染組織においても認められなかった。炎症が見られない理由は明らかではないが、胎内でのP C V 感染は免疫耐性を誘導する可能性がある。

【0194】

実施例 I I I : P C V 2 の先天性伝播

方法

ブタ繁殖呼吸障害症候群ウイルス (P R R S V) にセロネガティブである、健康状態の高い民間のブタ農場から入手した8頭の多経産妊娠雌ブタを、帝王切開 / 初乳非投与 (C D / C D) ブタを産生するために用いた。すべての雌ブタを、妊娠後90日より前にPurdue Universityの隔離室に移し、妊娠第94日に、4頭の雌ブタに、組織培養適合P C V 2 (P M W S - P C V - P 4) 1 . 0 m l (107 T C I D 50 / m l) を筋肉内および鼻腔内接種した。妊娠第114日に、4頭のP C V 接種雌ブタ、および4

頭の非PCV接種雌ブタに帝王切開手術を行い、続いて安楽死をさせて、先天的にPCV2にされた暴露CD/CDブタ(C+ブタ)、および先天的にPCV2を伴わないCD/CDブタ(C-ブタ)を産生した。雌ブタの死体解剖検査を行い、種々のブタ・ウイルスに関して試験をするために、血清、脳、脊髄、肝臓、肺、脾臓、気管気管支リンパ節、および単径リンパ節の試料を採取した。各同腹子から3頭のブタを生後3日に安楽死させた。残りの新生ブタは、PMWSの病変を産生するための実験に用いた。安楽死させたブタ、および帝王切開後の最初の2週間の間に死亡したブタの完全な死体解剖検査を行った。各ブタから脳、脊髄、肝臓、肺、腎臓、脾臓、扁桃、骨髄、胸腺、気管気管支リンパ節、および単径リンパ節の試料を採取し、-20で保存するか、あるいは中性緩衝ホルマリンに保存(血清および血液以外)した。組織病理学、およびPCVin situハイブリダイゼーションをすべての組織で行い、顕微鏡的病変、およびPCV分布を評価した。選択したプール試料でPCV2PCRを行った。

10

【0195】

結果

帝王切開後、最初の2週間に、4頭のC+雌ブタ由来の15頭が死亡し、さらに3頭を安楽死させた。最初の3日間で死亡した4頭のブタ、さらに死産であった1頭の子ブタは、ドーム形状の頭を有し、小さく、虚弱で、環境に順応することが困難であった。11頭のC+ブタはすべて活力に欠け、数頭は細菌性敗血症によって死亡した。全体として、C-ブタに比べて、C+ブタは活力に欠け、生後2週間まで生育することができなかった。研究の最初の3週間の間に死体解剖を行った19頭のC+ブタにおいて、PMWSに特徴的な肉眼的病変は同定されなかった。

20

【0196】

顕微鏡的には、最初の3週で死亡した8頭のC+ブタは、重篤な間質性肺炎を有し、細菌性敗血症を示した。これらのブタにおいて他の顕微鏡的病変は見られなかった。3週齢の間に死亡した5頭のC+ブタから得たリンパ節の切片、1頭のブタの肝臓の切片、2頭の肺の切片、および1頭のブタの心臓の切片は、in situハイブリダイゼーションによってPCV2が疑われた。個々のブタから得た脾臓、扁桃、気管支、および腸間膜リンパ節を含むリンパ組織のプールは、19頭のC+ブタの7頭で、PCVによってPCV2に陽性であった。すべてのC+ブタの肺、脾臓、および気管支リンパ節の試料は、および仮性狂犬病ウイルス(PRV)、ブタ・インフルエンザウイルス(SIV)、ブタ繁殖呼吸障害症候群ウイルス(PRRSV)、ブタ・パルボウイルス(PPV)、または伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)に関して、ウイルス単離およびFA試験によって陰性であった。3週齢の間に出血した3頭のC+ブタの利用可能な血液試料は、PCV2、およびPPVに対して血清学的に陰性であった。このPCV2接種材料は、PPVが混入していることがわかった。

30

【0197】

考察

これらの結果は、PCV2が、感染した雌ブタからその同腹子に伝播され得ることを示唆した。PCV2単独で、または補助因子との組合せで、先天的に伝播することが可能であった。

40

【0198】

実施例IV：ウサギにおけるPCV特異抗体の作製

PMWS-PCV-P1 ORF1(314R)、PMWS-PCV-P1 ORF2カルボキシ領域(129R)、CT-PCV-P6 ORF3(104R)、CT-PCV-P6 ORF4(59R)、CT-PCV-P7 ORF2(カルボキシ部)を代表するオープン・リーディング・フレーム(ORF)を、適切なプライマーを用いてPCRによって増幅した。PCR産物を、ヒスチジンカセットに融合した異種挿入物の発現を駆動する細菌発現および精製ベクターpET30aに挿入した。細菌におけるPCVタンパク質の発現は非常に効率がよく、これらのORFが機能タンパク質をコードする可能性を有することを示唆した。融合タンパク質としてPCV特異タンパク質をNi++アフィニティ・

50

クロマトグラフィによって精製した。これらの精製タンパク質を、ウサギを免疫化して抗体を作製するために用いた。

【 0 1 9 9 】

実施例 V : P C V 2 抗体をスクリーニングするための E L I S A の発展

本発明者等は、細菌性発現 P M W S - P C V - P 1 O R F 2 カルボキシ部精製タンパク質を用いてプレートを被覆することによって、P C V 2 に対する抗体を検出するためにブタ血清をスクリーニングする E L I S A アッセイをより詳細に発展させた。

【 0 2 0 0 】

本発明は、本明細書に記載された特定の実施形態によって範囲を限定されるものではない。さらに上記の説明および添付の図面から、本明細書に記載したものに加えて本発明の様々な変更が当分野の技術者に明らかとなるであろう。そのような変更は、添付の請求の範囲に含まれるものとする。

10

【 0 2 0 1 】

さらに、すべての値が近似値であり、説明のために提供されたものであることが理解される。

【 0 2 0 2 】

本明細書において引用したすべての特許、特許出願、刊行物、および他の資料は、その全体を参照により本明細書の一部とする。

【 0 2 0 3 】

【 配 列 表 】

20

SEQUENCE LISTING

<110> Suresh Kumar Mittal
 Gregory Wayne Stevenson
 Jiwon Choi
 Matti Klupel
 Charles Lee Kanitz

<120> DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROCINE
 CIRCOVIRUS ASSOCIATED CONGENITAL TREMORS AND OTHER DISORDERS

<130> 3759/2J429-WO

<150> 60/211,710

<151> 2000-06-15

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1762

<212> DNA

<213> PMWS-PCV-P1

<400> 1

attctgatta	ccagcaatca	gaccccggtg	gaatgggtact	cctcaactgc	tgtcccagct	60
gtagaagctc	tctatcggag	gattacttcc	ttgggtatttt	ggaagaatgc	tacagaacaa	120
tccatggagg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctttccccc	catgccctga	atttccatat	180
gaaataaatt	actgagtcct	ttttatcact	tcgtaatggt	ttttattttt	catttagggg	240
ttaagtgggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	catacatggt	tacacggata	300
ttgtagtcct	ggtcgtattt	actgttttcg	aacgcagtgc	cgaggcctac	gtgggtccaca	360
tttctagagg	ttttagtcct	cagccaaagc	tgattccttt	tggtatttgg	ttggaagtaa	420
tcaatagtgg	agtcaagaac	agggttgggt	gtgaagtaac	gggagtggta	ggagaagggg	480
tgggggattg	tatggcggga	ggagtagttt	acatatgggt	cataggttag	ggcattggcc	540
tttggtacaa	agttatcatc	tagaataaca	gcagtggagc	ccactcccct	atcacctgg	600
gtgatggggg	agcagggcca	gaattcaacc	ttacttttcc	ttattctgta	gtattcaaag	660
ggtatagaga	ttttgttggg	ccccctccc	gggggaacaa	agtcgtcaag	cttaaatctc	720
atcatgtcca	ccgcccacga	gggcgttggt	actgtggtac	gcttgacagt	atatccgaag	780
gtgcgggaga	ggcgggtggt	gaagatgcca	tttttccctc	tccaacgggtg	gcgggggtgg	840
acgagccagg	ggcggcgggc	gaggatctgg	ccaagatggc	tgccggggcg	gtgtctctct	900
ctgcggtaac	gcctccttgg	atacgtcata	gctgaaaacg	aaagaagtgc	gctgtaagta	960
ttaccagcgc	acttcggcag	cggcagcacc	tcggcagcac	ctcagcagca	acatgccccag	1020
caagaagaat	ggaagaagcg	gaccccaacc	acataaaaagg	tggtgtttca	cgctgaataa	1080
tccttcgaa	gacgagcgca	ataaaatcgc	ggagctccca	atctccctat	ttgattattt	1140
tattgttggc	gaggagggtg	atgaggaagg	acgaacacct	caacctcagg	ggttcgctaa	1200
ttttgtgaag	aagcaaactt	ttaataaagt	gaagtgggtat	ttgggtgccc	gctgccacat	1260
cgagaaagcc	aaagggaactg	atcagcagaa	taaagaatat	tcagtagaaag	aaggcaactt	1320
acttattgaa	tgtggagctc	ctcgatctca	aggacaacgg	agtgaacctgt	ctactgctgt	1380
gagtaccttg	ttggagagcg	ggagtctggt	gaccgttgca	gagcagcacc	ctgtaacggt	1440
tgtcagaaat	ttccgcgggc	tggctgaact	tttgaagtg	agcgggaaaa	tgcagaagcg	1500
tgattggaag	accaatgtac	acgtcattgt	ggggccacct	gggtgttgta	aaagcaaatg	1560
ggctgcta	tttgcagacc	cggaaaccac	atactggaaa	ccacctagaa	acaagtgggtg	1620
ggatggttac	catggtgaag	aagtgggtgt	tattgatgac	ttttatggct	ggctgcccgtg	1680
ggatgatcta	ctgagactgt	gtgatcgata	tccattgact	gtagagacta	aagggtggaac	1740
tgtacctttt	ttggcccgca	gt				1762

<210> 2

10

20

30

<211> 1768
 <212> DNA
 <213> PMWS-PCV-P2

<400> 2

attctgatta	ccagcaatca	gaccccggtg	gaatgggtact	cctcaactgc	tgtcccagct	60
gtagaagctc	tctatcggag	gattacttcc	ttgggtathtt	ggaagaatgc	tacagaacaa	120
tccacggagg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctttccccc	catgcocctga	atttccatat	180
gaaataaatt	actgagtcct	ttttatcaact	togtaatggg	ttttattatt	catttagggg	240
tttaagtggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	catacatggg	tacacggata	300
ttgtagtcct	ggtcgtatct	actgttttcg	aacgcagtgc	cgaggcctac	gtgggccaca	360
tttctagagg	tttgtagcct	cagccaaagc	tgattccctt	tggtatttgg	ttggaagtaa	420
tcaatagtgg	agtcaagaac	aggtttgggt	gtgaagtaac	gggagtggta	ggagaagggt	480
tgggggattg	tatggcggga	ggagtagttt	acatatgggt	cataggttag	ggctgtgctc	540
tttggaaaaa	agttatcate	tagaataaca	gcagtggagc	ccactccct	atcacccctg	600
gtgatggggg	agcagggcca	gaattcaacc	tttaaccttc	ttattctgta	gtattcaaa	660
gggtatagaga	ttttgttggg	ccccctccc	gggggaacaa	agtcgtcaat	cgtaaatctc	720
atcatgtcca	cgcgccagga	ggcggttgg	actgtggtag	ccttgacagt	atatccgaag	780
gtgcgggaga	ggcgggtggt	gaagatgcca	tttttccctc	tccaacggta	gcgggtggcg	840
gggtggacga	tccgaagacg	gcgcgggagg	atctggccaa	gatggctgcg	ggggcggtgt	900
cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcatagctg	aaaacgaaag	aagtgcgctg	960
taagtattac	cagcgcactt	cggcagcggc	agcacctcgg	cagcacctca	gcagcaacat	1020
gcccagcaag	aagaatggaa	gaagcggacc	ccaacctcat	aaaagggtgg	tgttcacgct	1080
gaataatcct	tccgaagacg	agcgcaagaa	aatacgggag	ctcccaatct	ccctatttga	1140
ttattttatt	gttggcgagg	agggtaatga	ggaaggacga	acacctcacc	tccaggggtt	1200
cgctaatttt	gtgaagaagc	aaacttttaa	taaagtgaag	tggtatttgg	gtgcccgtg	1260
ccacatcgag	aaagccaaag	gaactgatca	gcagaataaa	gaatattgca	gtaaagaagg	1320
caacttactt	attgaatgtg	gagctcctcg	atctcaagga	caacggagtg	acctgtctac	1380
tgctgtgagt	accttgttgg	agagcgggag	tctggtgacc	gttgacagag	agcacctgt	1440
aacgtttgtc	agaaatttcc	gcgggtgggc	tgaacttttg	aaagtgagcg	ggaaaatgca	1500
gaagcgtgat	tggaagacca	atgtacaagt	cattgtgggg	ccacctgggt	gtggtaaaag	1560
caaatggggt	gctaattttg	cagacccgga	aaccacatac	tggaaccac	ctagaaacaa	1620
gtggtgggat	ggttaccatg	gtgaagaagt	ggttgttatt	gatgactttt	atggctggct	1680
gcogtgggat	gatctactga	gactgtgtga	togatatcca	ttgactgtag	agactlaaag	1740
tggaactgta	ccttttttgg	ccgcagct				1768

10

20

<210> 3
 <211> 1768
 <212> DNA
 <213> PMWS-PCV-P3

<400> 3

attctgatta	ccagcaatca	gaccccggtg	gaatgggtact	cctcaactgc	tgtcccagct	60
gtagaagctc	tctatcggag	gattacttcc	ttgggtathtt	ggaagaatgc	tacagaacaa	120
tccacggagg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctttccccc	catgcocctga	atttccatat	180
gaaataaatt	actgagtcct	ttttatcaact	togtaatggg	ttttattttt	catttagggg	240
tttaagtggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	catacatggg	tacacggata	300
ttgtagtcct	ggtcgtatct	actgttttcg	aacgcagtgc	cgaggcctac	gtgggccaca	360
tttctagagg	tttgtagcct	cagccaaagc	tgattccctt	tggtatttgg	ttggaagtaa	420
tcaatagtgg	agtcaagaac	aggtttgggt	gtgaagtaac	gggagtggta	ggagaagggt	480
tgggggattg	tatggcggga	ggagtagttt	acatatgggt	cataggttag	ggcattggcc	540
tttggtacaa	agttatcate	tagaataaca	gcagtggagc	ccactccct	atcacccctg	600
gtgatggggg	agcagggcca	gaattcaacc	tttaaccttc	ttattctgta	gtattcaaa	660
gggtatagaga	ttttgttggg	ccccctccc	gggggaacaa	agtcgtcaag	cttaaatctc	720
atcatgtcca	cgcgccagga	ggcggttgg	actgtggtag	gcttgacagt	atatccgaag	780
gtgcgggaga	ggcgggtggt	gaagatgcca	tttttccctc	tccaacggta	gcgggtggcg	840
gggtggacga	gccaggggag	gcgcgggagg	atctggccaa	gatggctgcg	ggggcggtgt	900
cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcatagctg	aaaacgaaag	aagtgcgctg	960
taagtattac	cagcgcactt	cggcagcggc	agcacctcgg	cagcacctca	gcagcaacat	1020
gcccagcaag	aagaatggaa	gaagcggacc	ccaaccacat	aaaagggtgg	tgttcacgct	1080

30

40

gaataatcct	tccgaagacg	agcgcaagaa	aatacgggag	ctcccaatct	ccctatttga	1140
ttatttttatt	gttggcgagg	agggtaaatga	ggaaggacga	acacctcacc	tccaggggtt	1200
cgctaatttt	gtgaagaagc	aaactttcaa	taaagtgaag	tggtatttgg	gtgcccgctg	1260
ccacatcgag	aaagccaaag	gaactgatca	gcagaataaa	gaatatttga	gtaaagaagg	1320
caacttactt	attgaatgtg	gagctcctcg	atctcaagga	caacggagtg	acctgtctac	1380
tgctgtgagt	acctgtgttg	agagcgggag	tctggtgacc	gttgcagagc	agcacctgtt	1440
aacgtttgtc	agaaatttcc	gcgggctggc	tgaacttttg	aaagtgagcg	ggaaaatgca	1500
gaagcgtgat	tggaagacca	atgtacacgt	cattgtgggg	ccacctgggt	gtggtaaaag	1560
caaattgggt	gctaattttg	cagacccgga	aaccacatac	tggaaaccac	ctagaaccaa	1620
gtggtgggat	ggttaccatg	gtgaagaagt	ggttgttatt	gatgactttt	atggctgggt	1680
gccgtgggat	gatctactga	gactgtgtga	tcgatatcca	ttgactgtag	agactaaagg	1740
tggaactgta	cctttttttg	ccgcgagt				1768

<210> 4

<211> 1768

<212> DNA

<213> PMWS-PCV-P4

10

<400> 4

attctgatta	ccagcaatca	gaccccggtg	gaatggtaact	cctcaactgc	tgtccagct	60
gtagaagctc	tctatcggag	gattacttcc	ttggtatttt	ggaagaatgc	tacagaacaa	120
tccacggagg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctttccccc	catgccctga	atttccatat	180
gaaataaatt	actgagtctt	ttttatcact	tcgtaaatggt	ttttattatt	catttagggg	240
ttaagtgggg	ggtcctttaag	attaaattct	ctgaattgta	catacatggt	tacacggata	300
ttgtagtcc	ggtcgtattt	actgttttgc	aacgcagtg	cgaggccctac	gtggtctaca	360
tttctagagg	tttgtatcct	catccaaagc	tgattccttt	tggtatttgg	ttggaagtaa	420
tcaatagtgg	agtcaagaac	aggtttgggt	gtgaagtaac	gggagtggta	ggagaagggt	480
tgggggattg	tatggcgagg	ggagtagttt	acatacggtt	catagggttag	ggctgaggcc	540
tttgttacaa	agttatcctc	tagaataaca	gcagtgaggc	ccactccctc	atcaccctgg	600
gtgatggggg	agcagggcca	gaattcaacc	tttaacttttc	ttattctgta	gtattcaaa	660
ggtatagaga	ttttgttggg	ccccctccc	gggggaaaca	agtcgtcaat	attaaatctc	720
atcatgtcca	ccgcccagga	gggcgttgtg	actgtggtag	ccttgacagt	atatccgaag	780
gtgcggggaga	gcggggtgtt	tttttccttc	tccaaaggta	gcgggtggcg	gaggtggcgt	840
gggtggacga	gccagggggc	gcggcgagg	atctggccaa	gatggctgcg	ggggcggtgt	900
cttcttctgc	ggttaacgct	ccttggtatc	gtcatagctg	aaaacgaaag	aagtgcgctg	960
taagtattac	cagcgcactt	cggcagcggc	agcacctcgg	cagcacctca	gcagcaacat	1020
gcccagcaag	aagaattggaa	gaagcggacc	ccaaccacat	aaaagggtgg	tggtcacgct	1080
gaataatcct	tccgaagacg	agcgcaagaa	aatacgggag	ctcccaatct	ccctatttga	1140
ttatttttatt	gttggcgagg	agggtaaatga	ggaaggacga	acacctcacc	tccaggggtt	1200
cgctaatttt	gtgaagaagc	aaacttttaa	taaagtgaag	tggtatttgg	gtgcccgctg	1260
ccacatcgag	aaagccaaag	gaactgatca	gcagaataaa	gaatatttga	gtaaagaagg	1320
caacttactt	attgaatgtg	gagctcctcg	atctcaagga	caacggagtg	acctgtctac	1380
tgctgtgagt	acctgtgttg	agagcgggag	tctggtgacc	gttgcagagc	agcacctgtt	1440
aacgtttgtc	agaaatttcc	gcgggctggc	tgaacttttg	aaagtgagcg	ggaaaatgca	1500
gaagcgtgat	tggaagacca	atgtacacgt	cattgtgggg	ccacctgggt	gtggtaaaag	1560
caaattgggt	gctaattttg	cagacccgga	aaccacatac	tggaaaccac	ctagaaccaa	1620
gtggtgggat	ggttaccatg	gtgaagaagt	ggttgttatt	gatgactttt	atggctgggt	1680
gccgtgggat	gatctactga	gactgtgtga	tcgatatcca	ttgactgtag	agactaaagg	1740
tggaactgta	cctttttttg	ccgcgagt				1768

<210> 5

<211> 1768

<212> DNA

<213> CT-PCV-P5

<400> 5

attctgatta	ccagcaatca	gaccccggtg	gaatggtaact	cctcaactgc	tgtccagct	60
gtagaagctc	tctatcggag	gattacttcc	ttggtatttt	ggaagaatgc	tacagaacaa	120
tccacggagg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctttccccc	catgccctga	atttccatat	180
gaaataaatt	actgagtctt	ttttatcact	tcgtaaatggt	ttttattttt	catttagggg	240

40

ttaagtgggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	catacatggt	tacacggata	300
ttgtagtcct	ggtcgtatct	actgttttct	aacgcagtc	cgaggcctac	gtggtccaca	360
tttctagagg	ttttagtcct	cagccaaagc	tgatttcctt	tggtatttgg	ttggaagtaa	420
tcaatagtg	agtcagaagc	aggtttgggt	gtgaagtaac	gggagtggt	ggagaagggt	480
tgggggattg	tatggcgagg	ggagtagttt	acatatgggt	cataggttag	ggcattggcc	540
tttggtagaa	agttatcate	tagaataaca	gcagtgagc	ccactccct	atcacctgg	600
gtgatgggg	agcaggggca	gaattcaacc	ttacttttct	ttattctgta	gtattcaaa	660
ggtatagaga	ttttgttgg	ccccctccc	gggggaacaa	agtcgtcaag	cttaaatctc	720
atcatgtcca	ccgcccagga	gggcgttgtg	actgtggtac	gcttgacagt	atatccgaag	780
gtgcgggaga	ggcgggtgtt	gaagatgcca	tttttccttc	tccaacggta	gcggtggcgg	840
gggtggagca	gccaggggag	gcccgggagg	atctggccaa	gatggctgcg	ggggcggtgt	900
cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcatagctg	aaaacgaaag	aagtgcgctg	960
taagtattac	cagcgcactt	cggcagcggc	agcacctcgg	cagcacctca	gcagcaacat	1020
gcccagcaag	aagaatggaa	gaagcggacc	ccaaccacat	aaaaggtggg	tggtcaagct	1080
gaataatcct	tccgaagacg	agcgaagaa	aatacgggag	ctcccaatct	ccctatttga	1140
ttattttatt	gttggcgagg	aggtaatga	ggaaggacga	acacctcacc	tccaggggtt	1200
cgctaatttt	gtgaagaagc	aaactttcaa	taaagtgaag	tggtatttgg	gtgcccgtg	1260
ccacatcgag	aaagccaaag	gaactgatca	gcagaataaa	gaatattgca	gtaaagaagg	1320
caacttactt	attgaatgtg	gagctcctcg	atctcaagga	caacggagtg	acctgtctac	1380
tgctgtgagt	accttgttgg	agagcgggag	tctggtgacc	gttgacagag	agcacctgt	1440
aacgtttgtc	agaaatttcc	gcgggctggc	tgaacttttg	aaagtgcgag	ggaaaatgca	1500
gaagcgtgat	tggaaagacca	atgtacacgt	cattgtgggg	ccacctgggt	gtggtaaaa	1560
caaattgggt	gctaattttg	cagacccgga	aaccacatac	tggaaaccac	ctagaaccaa	1620
gtggtgggat	ggttaccatg	gtgaagaagt	ggttgttatt	gatgactttt	atggctggct	1680
gcccgtgggt	gatctactga	gactgtgtga	tcatatcca	ttgactgtag	agactaaagg	1740
tggaaactgta	ccttttttgg	ccgcagct				1768

<210> 6

<211> 1768

<212> DNA

<213> CT-PCV-P6

10

20

<400> 6

attctgatta	ccagcaatca	gaccccggtg	gaatggtaact	cctcaactgc	tgtcccagct	60
gtagaagctc	tctatcgagg	gattacttcc	ttggattttt	ggaagaatgc	tacagaacaa	120
tccacggagg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctttccccc	catgcctga	atttccatat	180
gaataaaatt	actgagtcct	ttttatcact	tctgaatggt	ttttattatt	catttagggg	240
ttaagtgggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	catacatggt	tacacggata	300
ttgtagtcct	ggtcgtatct	actgttttct	aacgcagtc	cgaggcctac	gtggtccaca	360
tttctagagg	ttttagtcct	cagccaaagc	tgatttcctt	tggtatttgg	ttggaagtaa	420
tcaatagtg	agtcagaagc	aggtttgggt	gtgaagtaac	gggagtggt	ggagaagggt	480
tgggggattg	tgtggcgagg	ggagtagttt	acatatgggt	cataggttag	ggctgtggcc	540
tttggtagaa	agttatcate	tagaataaca	gcagtgagc	ccactccct	atcacctgg	600
gtgatgggg	agcaggggca	gaattcaacc	ttacttttct	ttattctgta	gtattcaaa	660
ggtatagaga	ttttgttgg	ccccctccc	gggggaacaa	agtcgtcaag	cttaaatctc	720
atcatgtcca	ccgcccagga	gggcgttgtg	actgtggtac	gcttgacagt	atatccgaag	780
gtgcgggaaa	gccgggtgtt	gaagatgcca	tttttccttc	tccaacggta	gcggtggcgg	840
gggtggagca	gccaggggag	gcccgggagg	atctggccaa	gatggctgcg	ggggcggtgt	900
cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcatagctg	aaaacgaaag	aagtgcgctg	960
taagtattac	cagcgcactt	cggcagcggc	agcacctcgg	cagcacctca	gcagcaacat	1020
gcccagcaag	aagaatggaa	gaagcggacc	ccaaccacat	aaaaggtggg	tggtcaagct	1080
gaataatcct	tccgaagacg	agcgaagaa	aatacgggag	ctcccaatct	ccctatttga	1140
ttattttatt	gttggcgagg	aggtaatga	ggaaggacga	acacctcacc	tccaggggtt	1200
cgctaatttt	gtgaagaagc	aaacttttaa	taaagtgaag	tggtatttgg	gtgcccgtg	1260
ccacatcgag	aaagccaaag	gaactgatca	gcagaataaa	gaatattgca	gtaaagaagg	1320
caacttactt	attgaatgtg	gagctcctcg	atctcaagga	caacggagtg	acctgtctac	1380
tgctgtgagt	accttgttgg	agagcgggag	tctggtgacc	gttgacagag	agcacctgt	1440
aacgtttgtc	agaaatttcc	gcgggctggc	tgaacttttg	aaagtgcgag	ggaaaatgca	1500
gaagcgtgat	tggaaagacca	atgtacacgt	cattgtgggg	ccacctgggt	gtggtaaaa	1560
caaattgggt	gctaattttg	cagacccgga	aaccacatac	tggaaaccac	ctagaaccaa	1620

30

40

```

gtggtgggat  gggtaccatg  gtgaagaagt  ggttgttatt  gatgactttt  atggctggct  1680
gccgtgggat  gatctactga  gactgtgtga  tcgatatcca  ttgactgtag  agactaaagg  1740
tggaactgta  ccttttttgg  cccgcagt    1768

```

```

<210> 7
<211> 1759
<212> DNA
<213> CT-PCV-P7

```

```

<400> 7
attttgatta  ccagcaatca  ggccccccag  gaatgggtact  cctcaactgc  tgtccagct  60
gtagaagctc  tctatcggag  gattactact  ttgcaatttt  ggaagaatgc  tggagaacaa  120
tccacggagg  taaccgaagg  ccgatttgaa  gcagtggacc  caccctgtgc  ccttttccca  180
tataaaataa  attactgagt  cttttttgtt  atcacatcgt  aatggttttt  atttttatcc  240
atttagaggg  tctttcagga  taaattctct  gaattgtaca  taaatagtca  gccttaccac  300
ataatttttg  gctgtgtctg  catttttgag  cgcaaagccg  aggcctgtgt  gctcgacatt  360
ggtgtgggta  tttaaatgga  gccacagctg  gtttctttta  ttattttggc  ggaaccaatc  420
aattgttttg  tccagctcag  gtttgggggt  gaagtacctg  gagtggtagg  taaagggttg  480
ccttatgggt  tggcgggagg  agtagttaat  ataggggtca  taggcacagg  tgggtggagg  540
ggttacaaag  ttggcatcca  agataacaa  agtggaacct  acacctcttt  gattagaggt  600
gatggggtct  ctggggtaaa  attcatattt  agcctttcta  atacggtagt  attggaagg  660
taggggtagg  ggggttggtg  cgcgcgagg  ggggaggaac  tggccgatgt  tgaatctgag  720
gtggttaaca  ttccaagatg  gctgcgagtg  tctctctttt  atgggtgagta  caaattctct  780
agaaaggcgg  gaattgaaga  tacccttctt  tcggcgccat  ctgtaacggt  ttctgaaggc  840
gggggtgtac  aaatatggtc  ttctccggag  gatgtttcca  agatggctgc  gggggcgggt  900
ccttctcttg  cggtaacgcc  tcttggcca  cgtcatccta  taaaagtga  agaagtgcgc  960
tgctgtagta  ttaccagcgc  acttcggcag  cggcagcacc  tcggcagcgt  cagtgaatat  1020
gccagcaag  aaaagcggcc  cgcaacccca  taagagggtg  gtgttcaccc  ttaataatcc  1080
ttccgaggag  gagaaaaaca  aaatacggga  gcttccaatc  tccctttttg  attattttgt  1140
ttgtggagag  gaaggttttg  aagaggtag  aactcctcac  ctccagggtt  ttgcgaattt  1200
tgctaagaag  cagaccttta  acaaggtag  gtggtatttt  ggtgcccgct  gccacatcga  1260
gaaagcgaaa  ggaaccgacc  agcagaataa  agaatactgc  agtaaagaag  gccacatact  1320
tatcgagtg  ggaagctcgc  ggaaccagg  gaagcgcagc  gacctgtcta  ctgctgtgag  1380
tacccttttg  gagacggggt  ctttgggtg  ttagccgag  cagttccctg  taacgtatgt  1440
gagaaatttc  cgcgggctgg  ctgaactttt  gaaagtgagc  gggaagatgc  agcagcgtga  1500
ttggaagaca  gctgtacacg  tcatagtggg  ccgcgccggt  tgtgggaaga  gccagtgggc  1560
ccgtaatttt  gctgagccta  gggacaccta  ctggaagcct  agtagaaata  agtgggtggg  1620
tgatatacat  ggagaagaag  ttgtttttt  ggatgatttt  tatggctggt  taccctggga  1680
tgatctactg  agactgtgtg  accggtatcc  attgactgta  gagactaaag  ggggtactgt  1740
tccttttttg  gccgcagt    1759

```

```

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> primer

```

```

<400> 8
tactctcaa  ctgctgtccc  20

```

```

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> primer

```

10

20

30

40

<400> 9		
tccatcccac cacttatttc	20	
<210> 10		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 10		
acgctgaata atccttcc	18	10
<210> 11		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 11		
ccaacaaaat ctctataccc	20	
<210> 12		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> primer		
<400> 12		
attaccagca atcagacc	18	
<210> 13		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 13		
aacaaccact tcttcacc	18	30
<210> 14		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 14		
agcaggcca gaattcaac	19	
<210> 15		
<211> 22		

<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 15		
cgtcttcgga aggattatc ag	22	
<210> 16		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		10
<223> primer		
<400> 16		
gcctagtaga aataagtggt g	21	
<210> 17		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 17		
agtaatcctc cgatagagag	20	20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

PMWS - PCV - P 1、P 2、P 3、P 4、および CT - PCV - P 5、P 6、P 7 のヌクレオチド配列の比較を示す図である。

- は同一のヌクレオチドを表す。

・ は欠失ヌクレオチドを表す。

PMWS - PCV、および PK - 15 - PCV のヌクレオチド配列は、それぞれ Hamel 等、1998、および Meehan 等、1997 から採用した。

【図 2】

PMWS - PCV - P 1 (図 2 A)、および CT - PCV - P 7 (図 2 B) の 11 種の ORF の概略図である。PMWS - PCV - P 1、および CT - PCV - P 7 のゲノムの大きさは、それぞれヌクレオチド 1768、および 1759 である。矢印の方向は、各 ORF の配向を表す。

【図 3】

ブタおよびウシ・シルコウイルス単離株の全ゲノムの距離マトリクス分析を示す図である。枝の長さは、単離株の系統発生距離に比例する。線は 2 つの配列間の 10 % の差異を表す。無根系統樹、1 型株 (CT - P 7、PMWS - AF012107、および PK - 15 細胞系由来株) はアウトグループとして用いた。ブートストラップ値 (100 データセット) を示す (全長アラインメントによって得られた系統樹トポロジーが確認されなかった PCV 2 - B の場合を除く)。ウイルス株は、原因疾患 (既知の場合)、および株名 (得られる場合。得られない場合は、アクセッション番号、または提示された制限酵素フラグメンテーションの型) によって表す。株 (本発明のもの以外)、およびその GenBank アクセッション番号は以下のとおりである。PK - 15 細胞系由来株: PK - ISA (U49186)、PK - 15 B (Y09921)、PK - 15 C (AF071879)、PMWS 株: PMWS - AF012107、P / 48121 (Imp. 1011 48121、AF055393)、P / ISU - 31 (AJ223185)、P / 48285 (

30

40

50

Imp. 1011 48285、AF055394)、P/AF027217、P/IS
UVDL (ISUVDL98-15237、AF147751)、(Imp. 999 (A
F055391)、P/Imp. 1010 (Imp. 1010 - Stoon、AF055
392)、疾患の記載のない株：Tainan (AF166528)、MLTW98 (A
F154679)、B9 (AF086834)、9741 (AF086835)、412
450 (AF085695)、M226 (AF086836)、制限酵素フラグメンテー
ション・パターンの型名を有する株：PCV2-B (AF112862)、PCV2-C
(AF109398)、PCV2-D (AF117753)、PCV2-E (AF109
399)、ウシ・シルコウイルス：Bovine CV (AF109397)。

【図4】

10

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム1 (ORF1) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図5】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム2 (ORF2) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図6】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム3 (ORF3) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

20

【図7】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム4 (ORF4) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図8】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム5 (ORF5) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図9】

30

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム6 (ORF6) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図10】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム7 (ORF7) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図11】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム8 (ORF8) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

40

【図12】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム9 (ORF9) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図13】

本発明のPMWS - およびCT - PCV単離株のオープン・リーディング・フレーム10 (ORF10) をPMWS - PCVおよびPK - 15 - PCVの公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【図14】

50

本発明の P M W S - および C T - P C V 単離株のオープン・リーディング・フレーム 1 1 (O R F 1 1) を P W M S - P C V および P K - 1 5 - P C V の公開配列と比較したタンパク質相同性を示す図である。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96377 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/005

(11) International Application Number: PCT/US01/19320

(22) International Filing Date: 15 June 2001 (15.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/211,710 15 June 2000 (15.06.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): PUR-
DUE RESEARCH FOUNDATION (US/US), 1291 Cum-
berland Avenue, West Lafayette, IN 47906 (US).

(72) Inventors and

(73) Inventors/Applicants (for US only): MITTAL, Suresh,

K. (CA/US), 2839 Ashland Street, West Lafayette, IN
47906 (US); STEVENSON, Gregory, W. (US/US),
2336 North 600 West, West Lafayette, IN 47907 (US);
CHOI, Jiwan (KR/US), 3420 Cheswick Court, #54, West
Lafayette, IN 47907 (US); KIUPEL, Matti (DE/US);
3056 Pheasant Run Drive, #1046, Lafayette, IN (US);
KANTZ, Charles, L. (US/US), 1558 Crestwood Lane,
Lafayette, IN 47905 (US).(74) Agents: FEHLNER, Paul, F. et al.; Darby & Darby, P.C.,
905 Third Avenue, New York, NY 10022 7513 (US).(81) Designated States (national): AB, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM,
HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(Continued on next page)

(54) Title: VACCINE FOR CONGENITAL TREMORS IN PIGS

ABSTRACT

The invention is based on the cloning of porcine circovirus (PCV) strains from pigs with congenital tremors. These results provide a first step for the development of diagnostic and therapeutic applications for congenital tremors in a pig. The diagnostic method comprises determining whether the pig has been infected by a porcine circovirus strain of type 1 or type 2. The invention further provides a method for the prevention or treatment of congenital tremors in a pig, which method comprises administering to the pig an effective amount of an immunogenic PCV 1 or PCV 2 polypeptide or of a nucleic acid encoding this polypeptide. Another subject of the invention is the new PCV nucleic acid sequences identified by the inventors and the polypeptides encoded by these sequences, as well as the new PCV isolates and immunogenic preparations thereof.

(57) Abstract: The invention is based on the cloning of porcine circovirus (PCV) strains from pigs with congenital tremors. These results provide a first step for the development of diagnostic and therapeutic applications for congenital tremors in a pig. The diagnostic method comprises determining whether the pig has been infected by a porcine circovirus strain of type 1 or type 2. The invention further provides a method for the prevention or treatment of congenital tremors in a pig, which method comprises administering to the pig an effective amount of an immunogenic PCV 1 or PCV 2 polypeptide or of a nucleic acid encoding this polypeptide. Another subject of the invention is the new PCV nucleic acid sequences identified by the inventors and the polypeptides encoded by these sequences, as well as the new PCV isolates and immunogenic preparations thereof.

WO 01/96377 A2

WO 01/96377 A2



(84) Designated States (optional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, U, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

VACCINE FOR CONGENITAL TREMORS IN PIGS

This application claims priority to U.S. Provisional Application Serial No. 60/211,710, filed June 15, 2000 under 35 U.S.C. § 119(e), which is incorporated herein by reference in its entirety.

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the identification of an association between porcine circovirus (PCV) and congenital tremors in pigs and to related diagnostic and therapeutic compositions and methods. The invention more particularly provides specific congenital tremors associated PCV nucleic acids and polypeptides.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Porcine circovirus (PCV) was initially discovered as a noncytopathic contaminant of PK-15, a porcine kidney cell line (Tischer et al., *Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie* 226: 153-167, 1974). This virus was characterized in 1982 (Tischer et al., *Nature*, 295:64-66, 1982) and classified among the circoviridae with the chicken anemia virus (Yuasa et al., *Avian Diseases* 23: 366, 1979), the psittacine beak and feather disease virus (Pass & Perry, *Austrian Veterinary Journal*, 61:69-74, 1984) and the pigeon circovirus (Woods et al., *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*: 5:609-612, 1983). Circoviral genome consists of a single copy of circular single-stranded ambisense DNA genome (Lukert et al., *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 166-168, 1995). The size of the genome varies between 1.7 and 2.3 kb. Circoviruses are non-enveloped and have icosahedral symmetry. The PCV, derived from the PK-15 cells has first been considered not to be pathogenic. Its complete genome was sequenced (Meehan et al., *Journal of General Virology* 78:221-227 1997) and it has been characterized electron microscopically (Stevenson

20

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-2-

et al., *Veterinary Pathology* 36:368-378, 1999). PK-15-PCV has never been associated with a naturally occurring disease and experimental inoculation of pigs did not result in clinical disease (Tischer et al., *Archives of Virology* 91:271-276, 1986; Allan et al., *Journal of Comparative Pathology* 121: 1-11, 1995).

Phylogenetic analysis of PK-15-PCV, chicken and psittacine animal circoviruses, plant geminiviruses and nanoviruses (previously known as plant circoviruses) classified PK-15-PCV as most closely related to psittacine beak and feather disease virus; both PK-15-PCV and psittacine circovirus shared features with and were intermediate between the 2 plant viral groups (Niagro et al., *Archives of Virology* 143:1723-1744, 1998). Additional analyses suggested that a predecessor to PK-15-PCV and/or psittacine circovirus originated from a plant nanovirus that infected a vertebrate host and recombined with a vertebrate-infecting RNA virus, most likely a calicivirus (Gibbs & Weiller, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96:8022-8027, 1999).

Infection by PCV has been associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), that is clinically characterized by progressive weight loss, dyspnea, tachypnea and icterus in postweaned pigs (Daft et al, Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Little Rock, AR, USA, p32, 1996; Clark, *Proceedings of the 28th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*, Quebec City, Quebec, pp. 499-501 1997; Kiupel et al., *Indiana Veterinary Pathology* 35:303-307, 1998; Ellis et al., *Canadian Veterinary Journal* 39:44-51, 1998; Allan & Ellis, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 12:3-14, 2000). The complete genomic sequences of a number of PCV associated with PMWS are available (Hamel et al., *Journal of Virology* 72:5262-5267, 1998; Meehan et al., *Journal of General Virology* 79:2171-2179, 1998; Morozov et al., *Journal of Clinical Microbiology* 9:2535-2541, 1998; Mankertz et al., *Virus Research*, 6665-77, 2000; WO 99/18214, WO 99/45956, U.S. Patent No. 6,217,883). Isolates of PMWS-PCV differ from PK-15-PCV antigenically and genetically (Allan et al., *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 10:3-10, 1998; Hamel et al, *Journal of Virology* 72:5262-5267, 1998). These PMWS-associated PCV were thus referred to as PCV2 as opposed to the original PK-15 cell culture isolate referred to as PCV 1 (Meehan et al., *Journal of General Virology* 79:2171-2179, 1998).

Congenital tremors (CT) in pigs are associated with myelin deficiency and may be caused by genetic abnormalities (Harding et al., *Vet Rec* 92:527-529, 1973; Patterson et

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-3-

al., *J Neurochem* 26:481-485, 1976), in-utero trichlorfon toxicity (Knox et al., *Nord Veterinaarmed* 30:538-545, 1978) and in-utero infection with classical swine fever virus (Harding et al., *Vet Rec* 79:388-390, 1966) or Aujeszky's virus (Mare et al., *J Am Vet Med Assoc* 164:309-310, 1974). The most common form of CT in North America is transmissible and classified as type A2 (Done et al., *Veterinary Annual* 16:98-102, 1976). The epidemiology of CT type A2 has been reviewed (Bolin et al., eds. Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Aulaire S, Taylor DJ, 7th ed., pp.247-249, 1992). Disease occurs in all breeds, is not seasonal, is more common in litters of first parity sows and is frequently associated with the introduction of replacement breeding stock from an outside source (Stromberg et al., *Am J Vet Res* 19:377-382, 1958). Prevalence among and within affected litters varies from 0-100%. Outbreaks usually last for 1-8 weeks, but the disease rarely may be endemic. Affected pigs exhibit clonic contractions of skeletal muscles of varying severity that usually diminish and resolve by 4 weeks-of-age but that may continue until slaughter-age. Myoclonus abates when pigs are resting and is exacerbated by external stimuli (Christensen et al., *Nord Veterinaarmed* 8:921-943, 1956; Stromberg et al., *Am J Vet Res* 20: pp. 319-323 and 627-633, 1959). Mortality in affected pigs may be as high as 50% and is caused by an inability to suckle.

The association of a virus with CT type A2 has been known for many years, but the virus strains have so far not been identified. The first studies described an unidentified, approximately 20 nm, cuboidal virus in filtrates from primary kidney cell cultures derived from neonatal pigs with CT type A2 (Kanitiz CL: 1972, *Myoclonia congenita: Studies of the resistance to viral infection of tissue culture cell lines derived from myoclonic pigs*. PhD dissertation, Purdue University, West Lafayette, IN). These studies included intramuscular inoculation of pregnant sows with the cuboidal virus prepared as a filtrate of kidney cell-culture supernatant, which resulted in the birth of litters with congenital tremors. Other researchers purified a virus on cesium chloride gradients from primary kidney cell cultures obtained from a pig with CT type A2 and identified the virus as PCV-based on morphology and indirect immunologic methods (Hines RK: 1994, *Porcine circovirus causes congenital tremors type A-11 proved by fulfilling Koch's postulates*. PhD dissertation, University of Georgia, Athens, GA). Subsequent subcutaneous, intranasal and oral inoculation of pregnant sows in the last third of gestation with this purified virus resulted in the birth of pigs with congenital tremors. PCV was re-isolated from intestinal tissues but not nervous tissues of pigs

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-4-

with CT and not from tissues of normal control pigs derived from sham-inoculated dams. PCV DNA was also found in samples from swine herds with CT, using PCR primers sets designed to amplify a PMWS PCV isolate (G.W. Stevenson et al, IX International Symposium, College Station, Texas, June 1999).

5 However genetic analysis of PCV isolates associated with CT has not been reported yet. Thus there is a need to confirm the association of PCV with congenital tremors and to precisely identify what types of PCV are involved in the disease. Indeed only such an analysis may allow to produce diagnostic and therapeutic tools against congenital tremors in pigs, as currently no effective diagnostic tests nor vaccines for congenital tremors are
10 available.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention is based on the cloning of porcine circovirus (PCV) strains from pigs with congenital tremors.

15 These results provide a first step for the development of diagnostic and therapeutic applications.

Accordingly, the present invention provides a method of diagnosis a pathological cause of congenital tremors in a pig, which method comprises determining whether the pig has been infected by a porcine circovirus strain of type 1 or type 2.

20 The invention further provides a method for the prevention or treatment of congenital tremors in a pig, which method comprises administering to the pig an effective amount of an immunogenic PCV 1 or PCV 2 polypeptide or of a nucleic acid encoding this polypeptide.

25 Another subject of the invention is the new PCV nucleic acid sequences identified by the inventors and the polypeptides encoded by these sequences, as well as the new PCV isolates and immunogenic preparations thereof.

Accordingly, the invention relates to an isolated porcine circovirus (PCV), which nucleic acid has a sequence that is identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.

30 The invention further relates to an isolated nucleic acid from porcine circovirus (PCV), which nucleic acid comprises a sequence coding for a circovirus polypeptide having a sequence selected from the group consisting of sequences coded by any

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-5-

of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.

Another subject of the invention is an expression vector comprising this nucleic acid operatively associated with an expression control sequence.

This expression vector may be associated to a pharmaceutically acceptable excipient to form a vaccine, that also is part of the invention.

The invention is further directed to a host cell comprising this expression vector.

The invention also provides a method for producing a PCV protein, which method comprises culturing this host cell under conditions that result in expression of the nucleic acid coding for a circovirus.

The polypeptides comprising the amino acid sequences encoded by any of ORF1 to ORF11 of SEQ ID NO:1 to NO:7 are also described herein, as well as the antibodies directed against these polypeptides.

A further subject of the invention is a method for culturing a porcine circovirus strain which method comprises introducing a nucleic acid comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 TO SEQ ID NO:6 into a suitable host cell under conditions that result in the production of porcine circovirus particles having a genome that comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 TO SEQ ID NO:6.

The invention also encompasses The isolated PCV strains which have a genome comprising a sequence selected from SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6.

DRAWINGS

Figure 1 is a nucleotide sequence comparison of PMWS-PCV-P1, P2, P3, P4, and CT-PCV-P5, -P6, -P7.

- Indicates the same nucleotide.

• Indicates a deleted nucleotide.

The nucleotide sequence of PMWS-PCV and PK-15-PCV were taken from Hamel et al, 1998 and Meehan et al., 1997, respectively.

Figure 2 is a schematic representation of 11 ORFs of PMWS-PCV-P1 (Figure 2A) and CT-PCV-P7 (Figure 2B). The size of genome of PMWS-PCV-P1 and CT-PCV-P7 is 1768 and 1759 nucleotides, respectively. The direction of arrows indicates the orientation of each ORF.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-6-

Figure 3 shows a distance matrix analysis of the full genome of porcine and bovine circovirus isolates. Branch length is proportional to the phylogenetic distance of the isolates. The bar represents 10% difference between two sequences. Unrooted tree; the type 1 strains (CT-P7, PMWS-AF012107, and the PK-15 cell line derived strains) were used as outgroup. Bootstrap values (for 100 data sets) are shown (except in the case of PCV 2-B when the tree topology gained by the full-length alignment has not been confirmed). Virus stains are represented by the caused disease (if known) and the strain name (if available, otherwise by the accession number or the proposed restriction enzyme fragmentation type). Stains (other than ours) and their GenBank accession numbers are as follows. PK-15 cell line derived strains: PK-ISA (U49186), PK-15B (Y09921), PK-15C (AF071879); PMWS strains: PMWS-AF012107, P/48121 (Imp.1011 48121, AF055393), P/ISU-31 (AJ223185), P/48285 (Imp.1011 48285, AF055394), P/AF027217, P/ISLVDL (ISUVDL 98-15237, AF147751), (Imp.999 (AF055391), P/Imp.1010 (Imp.1010-Stoon, AF055392), strains without described disease: Tainan (AF166528), MT.TW98 (AF154679), B9 (AF086834), 9741 (AF086835), 412 450 (AF085695), M226 (AF086836), strains with type names referring to restriction enzyme fragmentation pattern: PCV 2-B (AF112862), PCV 2-C (AF109398), PCV 2-D (AF117753), PCV 2-E (AF109399), bovine circovirus: Bovine CV (AF109397).

Figure 4 is a protein homology comparison of open reading frame 1 (ORF1) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

Figure 5 is a protein homology comparison of open reading frame 2 (ORF2) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

Figure 6 is a protein homology comparison of open reading frame 3 (ORF3) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

Figure 7 is a protein homology comparison of open reading frame 4 (ORF4) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

Figure 8 is a protein homology comparison of open reading frame 5 (ORF5) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-7-

Figure 9 is a protein homology comparison of open reading frame 6 (ORF6) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

5 Figure 10 is a protein homology comparison of open reading frame 7 (ORF7) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

Figure 11 is a protein homology comparison of open reading frame 8 (ORF8) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

10 Figure 12 is a protein homology comparison of open reading frame 9 (ORF9) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

Figure 13 is a protein homology comparison of open reading frame 10 (ORF10) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

15 Figure 14 is a protein homology comparison of open reading frame 11 (ORF11) of PMWS- and CT-PCV isolates of the invention with the published sequences of a PMWS-PCV and the PK-15-PCV.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-3-

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention solves the problem of identifying with certainty the strains of etiologic agent for congenital tremors. Cloning and sequencing porcine circovirus (PCV) strains from pigs with congenital tremors and comparing them with PCV strains associated with PMWS have resulted in the development of many useful materials available, such as primers, probes or viral strains. The invention permits cloning strains and culturing virus of known CT pathogenicity.

The invention is based, in part, on the discovery that PCV genomic DNA present in neurons and, to a lesser degree, glial cells in the brain and spinal chord of pigs shared very close sequence similarity, greater than about 95%, to the genomic DNA of a strain associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The entire genomes of seven isolates of PCV from pigs with congenital tremors (CT) or PMWS were cloned and sequenced. One isolate was from a neonatal pig with CT type A2 that was isolated in the late 1960s. Two recent PCV isolates were from two affected neonatal pigs from different farms with unrelated outbreaks of CT type A2. Four isolates originated from four different farms from pigs with PMWS. The comparative analysis of the four PMWS-PCVs demonstrated that they share 99% sequence identity with each other, and over 96% with previously sequenced PMWS-PCVs. The two new CT-PCVs, however, shared 99% identity with each other and interestingly, also with the new PMWS-PCV isolates. There were no consistent genomic differences between PMWS and new CT isolates. The old CT-PCV showed 98% identity to PK-15-derived PCV strains and demonstrated only 72% identity to the new CT-PCVs. Phylogenetic analysis confirmed that PCV isolates could be divided into two groups. PCV type 1 is composed of PK-15-PCVs and our old isolate of CT-PCV, and PCV type 2 contains PMWS and our new CT isolates.

Additional work established the tissue distribution and genetic type of PCV in 1-2 day-old pigs with naturally occurring CT type A2 using *in-situ* hybridization, polymerase chain reaction (PCR) and frozen-tissue-section indirect fluorescent antibody tests. CT affected and clinically normal pigs originating from four Midwestern U. S. farms undergoing outbreaks of CT type A2 were selected. All CT and most normal pigs were infected with PCV. PCV was widely distributed in tissues of infected pigs and was most common in central nervous tissues and liver. In all infected pigs, there were more PCV-infected cells in brain and spinal cord than in non-neural tissues. CT pigs had many more

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-9-

PCV-infected cells in the brain and spinal cord than did clinically normal pigs due to a more diffuse distribution and a larger proportion of infected cells. The cells most commonly infected with PCV in brain and spinal cord were large neurons. In non-neural tissues macrophages were the most frequent cell type infected. PCR tests demonstrated only PCV type 2 and not PCV type 1 in all PCV-infected pigs on all four farms.

The invention is further based on evidence that PCV2 can be transmitted from an infected sow to its litter *in utero*. PCV2 alone or in combination of a co-factor therefore can be congenitally transmitted.

As noted above, these discoveries resolve ambiguity concerning the etiological relationship of PCV with CT, as well as the relationship between PCV virus that is associated with PMWS (prior work, for example, left open the possibility that another PCV virus strain was associated with CT, if indeed PCV was the etiological agent for CT). Thus, in addition to the novel PCV strains described herein (e.g., PMWS-PCV-P1, PMWS-PCV-P2, PMWS-PCV-P3, PMWS-PCV-P4, CT-PCV-P5, CT-PCV-P6, and CT-PCV-P7), the invention provides diagnostic and therapeutic methods and materials based on these reagents, and identifies PCV, particularly PCV type 2, as a target for diagnostic evaluation and therapeutic, particularly immunological, intervention.

As used herein, the term "PCV" refers specifically to a pig circovirus, e.g., as shown in the distance matrix analysis of the full genome of porcine and bovine circovirus isolates (Figure 3). In particular, the term PCV means PMWS-PCV-P1 (SEQ ID NO:1), PMWS-PCV-P2 (SEQ ID NO:2), PMWS-PCV-P3 (SEQ ID NO:3), PMWS-PCV-P4 (SEQ ID NO:4), CT-PCV-P5 (SEQ ID NO:5), and CT-PCV-P6 (SEQ ID NO:6). In addition, PCV includes CT-PCV-P7 (SEQ ID NO:7), PK-15 PCV (Meehan *et al.*, 1997), and PMWS-PCV (Hamel *et al.*, 1998).

A "PCV polypeptide" (or "PCV protein") refers to a polypeptide gene product encoded by a PCV open reading frame (ORF). Each PCV has 11 ORFs, and thus there is an ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7, ORF8, ORF9, ORF10, and ORF11 for each strain, as set forth above. The characteristics of the ORFs and polypeptides they encode are set forth in the Tables in Example 1, *infra*, and in Figures 4-14.

The term "vaccine" refers to a composition (protein or vector; the latter may also be loosely termed a "DNA vaccine", although RNA vectors can be used as well) that can be used to elicit protective immunity in a recipient. It should be noted that to be effective, a

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-10-

vaccine of the invention can elicit immunity in a portion of the population, as some individuals may fail to mount a robust or protective immune response, or, in some cases, any immune response. This inability may stem from the individual's genetic background or because of an immunodeficiency condition (either acquired or congenital) or immunosuppression (e.g., treatment with immunosuppressive drugs to prevent organ rejection or suppress an autoimmune condition).

The term "immunotherapy" refers to a treatment regimen based on activation of a pathogen-specific immune response. A vaccine can be one form of immunotherapy. Charging dendritic cells with PCV polypeptide (a "PCV antigen"), optionally with a stimulatory cytokine such as GM-CSF or Flt3 ligand *ex vivo* (followed by transplantation into the subject) or *in vivo* is also a form of immunotherapy.

The term "protect" is used herein to mean prevent or treat, or both, as appropriate, an PCV infection in a subject. Thus, prophylactic administration of the vaccine can protect the recipient subject from PCV infection, e.g., to prevent infectious mononucleosis or lymphoproliferative diseases. Therapeutic administration of the vaccine or immunotherapy can protect the recipient from PCV-infection-mediated pathogenesis, e.g., to treat a disease or disorder such as PMWS or CT.

The term "subject" as used herein refers to an animal that supports PCV. In particular, the term refers to a pig.

The term "vector for expression in pigs" or "porcine expression vector" as used herein means that the vector at least includes a promoter that is effective in porcine cells, and preferably that the vector is safe and effective in pigs. Such a vector will, for example, omit extraneous genes not involved in developing immunity. If it is a viral vector, it will omit regions that permit replication and development of a robust infection, and will be engineered to avoid development of replication competence *in vivo*. Such vectors are preferably safe for use in pigs on a farm; in a more preferred embodiment, the vector is approved by a government regulatory agency (such as the United States Department of Agriculture (USDA)) for clinical testing or use in pigs. Specific vectors are described in greater detail below.

As used herein, the term "immunogenic polypeptide" means that the polypeptide is capable of eliciting a humoral or cellular immune response, and preferably both. An immunogenic polypeptide is also antigenic. A molecule is "antigenic" when it is capable of specifically interacting with an antigen recognition molecule of the immune

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-11-

system, such as an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor. An antigenic polypeptide contains an epitope of at least about 5, and preferably at least about 10, amino acids. An antigenic portion of a polypeptide, also called herein the epitope, can be that portion that is immunodominant for antibody or T cell receptor recognition, or it can be a portion used to generate an antibody to the molecule by conjugating the antigenic portion to a carrier polypeptide for immunization. A molecule that is antigenic need not be itself immunogenic, *i.e.*, capable of eliciting an immune response without a carrier.

The term "adjuvant" refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood et al., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). Often, a primary challenge with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, will fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, saponin, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. Alternatively, or in addition, immunostimulatory proteins, as described below, can be provided as an adjuvant or to increase the immune response to a vaccine. Preferably, the adjuvant is pharmaceutically acceptable.

The phrase "pharmaceutically acceptable" or "veterinary acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to an animal. Preferably, as used herein, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Sterile water or aqueous solution saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

As used herein, the term "isolated" means that the referenced material is

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-12-

removed from its native environment, e.g., a cell. Thus, an isolated biological material can be free of some or all cellular components, i.e., components of the cells in which the native material occurs naturally (e.g., cytoplasmic or membrane component). A material shall be deemed isolated if it is present in a cell extract or if it is present in a heterologous cell or cell extract. In the case of nucleic acid molecules, an isolated nucleic acid includes a PCR product, an isolated mRNA, a cDNA, or a restriction fragment. Isolated nucleic acid molecules include sequences inserted into plasmids, cosmids, artificial chromosomes, and the like, i.e., when it forms part of a chimeric recombinant nucleic acid construct. Thus, in a specific embodiment, a recombinant nucleic acid is an isolated nucleic acid. An isolated protein may be associated with other proteins or nucleic acids, or both, with which it associates in the cell, or with cellular membranes if it is a membrane-associated protein. An isolated organelle, cell, or tissue is removed from the anatomical site in which it is found in an organism. An isolated material may be, but need not be, purified.

The term "purified" as used herein refers to material that has been isolated under conditions that reduce or eliminate the presence of unrelated materials, i.e., contaminants, including native materials from which the material is obtained. For example, a purified protein is preferably substantially free of other proteins or nucleic acids with which it is associated in a cell; a purified nucleic acid molecule is preferably substantially free of proteins or other unrelated nucleic acid molecules with which it can be found within a cell. As used herein, the term "substantially free" is used operationally, in the context of analytical testing of the material. Preferably, purified material substantially free of contaminants is at least 50% pure. Purity can be evaluated by chromatography, gel electrophoresis, immunoassay, composition analysis, biological assay, and other methods known in the art.

In accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook *et al.*, 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)];

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-13-

B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

An "open-reading frame", "coding sequence" or a sequence "encoding" an expression product, such as a RNA, polypeptide, protein, or enzyme, is a nucleotide sequence that, when expressed, results in the production of that RNA, polypeptide, protein, or enzyme, *i.e.*, the nucleotide sequence encodes an amino acid sequence for that polypeptide, protein or enzyme. A coding sequence for a protein may include a start codon (usually ATG) and a stop codon.

A coding sequence is "under the control of" or "operatively associated with" transcriptional and translational control sequences in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into RNA, particularly mRNA, which is then trans-RNA spliced (if it contains introns) and translated into the protein encoded by the coding sequence.

The "expression control sequences" are transcriptional or translational control sequences including enhancer, repressor or promoter sequences.

A "promoter" or "promoter sequence" is a DNA regulatory region capable of binding RNA polymerase in a cell and initiating transcription of a downstream (3' direction) coding sequence. For purposes of defining the present invention, the promoter sequence is bounded at its 3' terminus by the transcription initiation site and extends upstream (5' direction) to include the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription at levels detectable above background. Within the promoter sequence will be found a transcription initiation site (conveniently defined for example, by mapping with nuclease S1), as well as protein binding domains (consensus sequences) responsible for the binding of RNA polymerase.

The terms "vector", "cloning vector" and "expression vector" mean the vehicle by which a DNA or RNA sequence (*e.g.* a foreign gene) can be introduced into a host cell, so as to transform the host and promote expression (*e.g.* transcription and translation) of the introduced sequence. Vectors include plasmids, phages, viruses, etc.; they are discussed in greater detail below.

Vectors typically comprise the DNA of a transmissible agent, into which foreign DNA is inserted. A common way to insert one segment of DNA into another segment of DNA involves the use of enzymes called restriction enzymes that cleave DNA at specific sites (specific groups of nucleotides) called restriction sites.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-14-

A "cassette" refers to a DNA coding sequence or segment of DNA that codes for an expression product that can be inserted into a vector at defined restriction sites. The cassette restriction sites are designed to ensure insertion of the cassette in the proper reading frame. Generally, foreign DNA is inserted at one or more restriction sites of the vector DNA, and then is carried by the vector into a host cell along with the transmissible vector DNA. A segment or sequence of DNA having inserted or added DNA, such as an expression vector, can also be called a "DNA construct." A common type of vector is a "plasmid", which generally is a self-contained molecule of double-stranded DNA, usually of bacterial origin, that can readily accept additional (foreign) DNA and which can readily introduced into a suitable host cell. A plasmid vector often contains coding DNA and promoter DNA and has one or more restriction sites suitable for inserting foreign DNA. Coding DNA is a DNA sequence that encodes a particular amino acid sequence for a particular protein or enzyme. Promoter DNA is a DNA sequence which initiates, regulates, or otherwise mediates or controls the expression of the coding DNA. Promoter DNA and coding DNA may be from the same gene or from different genes, and may be from the same or different organisms. A large number of vectors, including plasmid and fungal vectors, have been described for replication and/or expression in a variety of eukaryotic and prokaryotic hosts. Non-limiting examples include pKK plasmids (Clontech), pUC plasmids, pET plasmids (Novagen, Inc., Madison, WI), pRSET or pREP plasmids (Invitrogen, San Diego, CA), or pMAL plasmids (New England Biolabs, Beverly, MA), and many appropriate host cells, using methods disclosed or cited herein or otherwise known to those skilled in the relevant art. Recombinant cloning vectors will often include one or more replication systems for cloning or expression, one or more markers for selection in the host, *e.g.* antibiotic resistance, and one or more expression cassettes.

The terms "express" and "expression" mean allowing or causing the information in a gene or DNA sequence to become manifest, for example producing a protein by activating the cellular functions involved in transcription and translation of a corresponding gene or DNA sequence. A DNA sequence is expressed in or by a cell to form an "expression product" such as a protein. The expression product itself, *e.g.* the resulting protein, may also be said to be "expressed" by the cell. An expression product can be characterized as intracellular, extracellular or secreted. The term "intracellular" means something that is inside a cell. The term "extracellular" means something that is outside a cell. A substance is

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-15-

"secreted" by a cell if it appears in significant measure outside the cell, from somewhere on or inside the cell.

The term "transfection" means the introduction of a foreign nucleic acid into a cell. The term "transformation" means the introduction of a "foreign" (*i.e.* extrinsic or extracellular) gene, DNA or RNA sequence to a host cell, so that the host cell will express the introduced gene or sequence to produce a desired substance, typically a protein or enzyme coded by the introduced gene or sequence. The introduced gene or sequence may also be called a "cloned" or "foreign" gene or sequence, may include regulatory or control sequences, such as start, stop, promoter, signal, secretion, or other sequences used by a cell's genetic machinery. The gene or sequence may include nonfunctional sequences or sequences with no known function. A host cell that receives and expresses introduced DNA or RNA has been "transformed" and is a "transformant" or a "clone." The DNA or RNA introduced to a host cell can come from any source, including cells of the same genus or species as the host cell, or cells of a different genus or species.

The term "host cell" means any cell of any organism that is selected, modified, transformed, grown, or used or manipulated in any way, for the production of a substance by the cell, for example the expression by the cell of a gene, a DNA or RNA sequence, a protein or an enzyme. Suitable host cells include primary macrophages, particularly porcine macrophages, or such a macrophage cell line, porcine kidney cells, or other mammalian cells in which PCV can produce virus, or that support a viral infection, or both.

The term "expression system" means a host cell and compatible vector under suitable conditions, *e.g.* for the expression of a protein coded for by foreign DNA carried by the vector and introduced to the host cell. Common expression systems include *E. coli* host cells and plasmid vectors, insect host cells and *Baculovirus* vectors, and mammalian host cells and vectors. In a specific embodiment, the protein of interest is expressed in COS-1 or C₂C₁₂ cells. Other suitable cells include CHO cells, HeLa cells, 293T (human kidney cells), mouse primary myoblasts, and NIH 3T3 cells.

"Sequence-conservative variants" of a polynucleotide sequence are those in which a change of one or more nucleotides in a given codon position results in no alteration in the amino acid encoded at that position.

"Function-conservative variants" are those in which a given amino acid residue in a protein or enzyme has been changed without altering the overall conformation and

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-16-

function of the polypeptide, including, but not limited to, replacement of an amino acid with one having similar properties (such as, for example, polarity, hydrogen bonding potential, acidic, basic, hydrophobic, aromatic, and the like). Amino acids with similar properties are well known in the art. For example, arginine, histidine and lysine are hydrophilic-basic amino acids and may be interchangeable. Similarly, isoleucine, a hydrophobic amino acid, may be replaced with leucine, methionine or valine. Such changes are expected to have little or no effect on the apparent molecular weight or isoelectric point of the protein or polypeptide. Amino acids other than those indicated as conserved may differ in a protein or enzyme so that the percent protein or amino acid sequence similarity between any two proteins of similar function may vary and may be, for example, from 70% to 99% as determined according to an alignment scheme such as by the Cluster Method, wherein similarity is based on the MEGALIGN algorithm. A "function-conservative variant" also includes a polypeptide or enzyme which has at least 60 % amino acid identity as determined by BLAST or FASTA algorithms, preferably at least 75%, most preferably at least 85%, and even more preferably at least 90%, and which has the same or substantially similar properties or functions as the native or parent protein or enzyme to which it is compared.

As used herein, the term "homologous" in all its grammatical forms and spelling variations refers to the relationship between proteins that possess a "common evolutionary origin," including proteins from superfamilies (e.g., the immunoglobulin superfamily) and homologous proteins from different species (e.g., myosin light chain, etc.) (Reeck *et al.*, Cell 50:667, 1987). Such proteins (and their encoding genes) have sequence homology, as reflected by their sequence similarity, whether in terms of percent similarity or the presence of specific residues or motifs at conserved positions.

Accordingly, the term "sequence similarity" in all its grammatical forms refers to the degree of identity or correspondence between nucleic acid or amino acid sequences of proteins that may or may not share a common evolutionary origin (see Reeck *et al.*, *supra*). However, in common usage and in the instant application, the term "homologous," when modified with an adverb such as "highly," may refer to sequence similarity and may or may not relate to a common evolutionary origin.

In a specific embodiment, two DNA sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when at least about 80%, and most preferably at least about 90 or 95%) of the nucleotides match over the defined length of the DNA sequences, as determined

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-17-

by sequence comparison algorithms, such as BLAST, FASTA, DNA Strider, etc. An example of such a sequence is an allelic or species variant of the specific genes of the invention. Sequences that are substantially homologous can be identified by comparing the sequences using standard software available in sequence data banks, or in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions as defined for that particular system.

Similarly, in a particular embodiment, two amino acid sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when greater than 80% of the amino acids are identical, or greater than about 90% are similar (functionally identical). Preferably, the similar or homologous sequences are identified by alignment using, for example, the GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, *Version 7*, Madison, Wisconsin) pileup program, or any of the programs described above (BLAST, FASTA, etc.).

A nucleic acid molecule is "hybridizable" to another nucleic acid molecule, such as a cDNA, genomic DNA, or RNA, when a single stranded form of the nucleic acid molecule can anneal to the other nucleic acid molecule under the appropriate conditions of temperature and solution ionic strength (*see Sambrook et al., supra*). The conditions of temperature and ionic strength determine the "stringency" of the hybridization. For preliminary screening for homologous nucleic acids, low stringency hybridization conditions, corresponding to a T_m (melting temperature) of 55°C, can be used, *e.g.*, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.25% milk, and no formamide; or 30% formamide, 5x SSC, 0.5% SDS. Moderate stringency hybridization conditions correspond to a higher T_m , *e.g.*, 40% formamide, with 5x or 6x SCC. High stringency hybridization conditions correspond to the highest T_m , *e.g.*, 50% formamide, 5x or 6x SCC. SCC is a 0.15M NaCl, 0.015M Na-citrate. Hybridization requires that the two nucleic acids contain complementary sequences, although depending on the stringency of the hybridization, mismatches between bases are possible. The appropriate stringency for hybridizing nucleic acids depends on the length of the nucleic acids and the degree of complementation, variables well known in the art. The greater the degree of similarity or homology between two nucleotide sequences, the greater the value of T_m for hybrids of nucleic acids having those sequences. The relative stability (corresponding to higher T_m) of nucleic acid hybridizations decreases in the following order: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. For hybrids of greater than 100 nucleotides in length, equations for calculating T_m have been derived (*see Sambrook et al., supra*, 9.50-9.51). For hybridization with shorter nucleic acids, *i.e.*, oligonucleotides, the position of mismatches becomes more

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-18-

important, and the length of the oligonucleotide determines its specificity (see Sambrook *et al.*, *supra*, 11.7-11.8). A minimum length for a hybridizable nucleic acid is at least about 10 nucleotides; preferably at least about 15 nucleotides; and more preferably the length is at least about 20 nucleotides.

In a specific embodiment, the term "standard hybridization conditions" refers to a T_m of 55°C, and utilizes conditions as set forth above. In a preferred embodiment, the T_m is 60°C; in a more preferred embodiment, the T_m is 65°C. In a specific embodiment, "high stringency" refers to hybridization and/or washing conditions at 68°C in 0.2XSSC, at 42°C in 50% formamide, 4XSSC, or under conditions that afford levels of hybridization equivalent to those observed under either of these two conditions.

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a nucleic acid, generally of at least 10, preferably at least 15, and more preferably at least 20 nucleotides, preferably no more than 100 nucleotides, that is hybridizable to a genomic DNA molecule, a cDNA molecule, or an mRNA molecule encoding a gene, mRNA, cDNA, or other nucleic acid of interest. Oligonucleotides can be labeled, *e.g.*, with ^{32}P -nucleotides or nucleotides to which a label, such as biotin, has been covalently conjugated. In one embodiment, a labeled oligonucleotide can be used as a probe to detect the presence of a nucleic acid. In another embodiment, oligonucleotides (one or both of which may be labeled) can be used as PCR primers, either for cloning full length or a fragment of the gene, or to detect the presence of nucleic acids encoding the protein. In a further embodiment, an oligonucleotide of the invention can form a triple helix with a DNA molecule. Generally, oligonucleotides are prepared synthetically, preferably on a nucleic acid synthesizer. Accordingly, oligonucleotides can be prepared with non-naturally occurring phosphoester analog bonds, such as thioester bonds, etc.

Cloning and Expression of PCV

The inventors have succeeded in cloning and sequencing seven porcine circovirus (PCV) strains: one of a virus strain isolated in the late 1960's (herein named CT-PCV 7) and originated from neonatal pigs with congenital tremors (CT) of Type A2; two new PCV isolates from pigs showing CT (herein named CT-PCV-P5, and CT-PCV-P6); and four PCV strains obtained from pigs showing signs of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (herein named PMWS-PCV-P1, PMWS-PCV-P2, PMWS-PCV-P3, and

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-19-

PMWS-PCV-P4).

It was discovered that the PMWS-PCV isolates yielded an approximately 99% nucleotide sequence identity with each other. Furthermore although the new CT-PCV isolates from the late 1990s and the old CT-PCV isolate from the late 1960's originated from neonatal pigs with CT type A2, they shared only 72% nucleotide sequence identity. The genomes of the 2 new CT-PCVs share high sequence homology with the type 2 PMWS-PCV isolates. On the other hand the CT-PCV-7 strain was found to be very close to type 1 PK-15-PCV variants.

A subject of the present invention is, thus, an isolated nucleic acid from PCV, which nucleic acid comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.

Another subject of the invention is an isolated nucleic acid from PCV which has a sequence identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.

The nucleic acid sequences of the invention may be useful to design probes or primers for detecting the presence of a PCV nucleic acid in a biological sample. Such probes or primer may be more particularly in the form of oligonucleotides, that specifically hybridize to PCV nucleic acid sequences under conditions of high stringency. Such oligonucleotides, which preferably comprise at least about 20 bases that has a sequence found in 20 contiguous bases of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7 or a complement thereof.

Eleven open-reading frame (ORF) sequences have been determined and are presented in Tables 2 and 4 of the Examples. The corresponding polypeptide sequences are also shown on Figures 4 to 14.

The invention, thus, also provides a nucleic acid from PCV, which nucleic acid comprises a sequence coding for a circovirus polypeptide having a sequence selected from the group consisting of the amino acid sequences coded by any of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7. More particularly the nucleic acid of the invention comprises a sequence selected from any of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7. Among these, ORFs 1, 2, 3 or 4, are particularly interesting.

The present invention encompasses conservative sequences, that is to say the sequences which do not change the functionality or the strain-specificity of the sequence

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-20-

described or of the polypeptides encoded by this sequence. These sequences are also called "function-conservative variants". The sequences differing by degeneracy of the code, which are called "sequence-conservative variants", also are encompassed.

5 The invention also covers the equivalent sequences in the sense that they are capable of hybridizing with the above sequence under high stringency conditions and/or have a very high homology with the strains of the invention.

Cloning vectors comprising any of these nucleic acid sequences are also part of the invention. The preparation of such vectors is well-known by one skilled in the art and is described in the above definitions.

10 These nucleic acid sequences and their fragments can be advantageously used for *in vitro* or *in vivo* expression of a polypeptide with the aid of appropriate expression vectors.

These vectors more particularly comprise a sequence selected from the group consisting of any of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7, operatively associated with an expression control sequence.

15 The vectors of the invention may be used to transfect host cells, which are also part of the present invention. Vectors are introduced into the desired host cells by methods known in the art, *e.g.*, transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, lipofection (lysosome fusion), use of a gene gun, or a DNA vector transporter (see, *e.g.*, Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624, 1988; Hartmut *et al.*, Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990).

20 The invention further provides a method for producing a PCV protein, which method comprises culturing a cell transfected with an expression vector as above-defined under conditions that result in expression of the nucleic acid coding for a circovirus protein. *E. coli* or baculovirus are the expression systems that may be used (U.S. Patent No. 4,745,051) for that purpose. The coding sequences may be integrated into the baculovirus genome (*e.g.* the baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV) and the latter can be then propagated on insect cells, *e.g.* *Spodoptera frugiperda* Sf9 (deposit ATCC CRL 1711).

30 More generally the invention is directed to the expression of PCV polypeptides or proteins *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo*. For these various purposes, one skilled in the art may

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-21-

select any suitable expression system, as detailed below.

Expression Systems

A wide variety of host/expression vector combinations (*i.e.*, expression systems) may be employed in expressing the polypeptides of this invention. Useful expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, *e.g.*, *E. coli* plasmids col E1, pCR1, pRR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith *et al.*, Gene 67:31-40, 1988), pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; gram positive vectors such as *Strep. gordonii*; phage DNAs, *e.g.*, the numerous derivatives of phage 1, *e.g.*, NM989, and other phage DNA, *e.g.*, M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2 μ plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like.

Expression of the protein or polypeptide may be controlled by any promoter/enhancer element known in the art, but these regulatory elements must be functional in the host selected for expression. Promoters which may be used to control gene expression include, but are not limited to, cytomegalovirus (CMV) promoter, the SV40 early promoter region (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, Cell 22:787-797, 1980), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445, 1981), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, Nature 296:39-42, 1982); prokaryotic expression vectors such as the b-lactamase promoter (Villa-Komaroff, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731, 1978), or the *tac* promoter (DeBoer, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25, 1983); see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 242:74-94, 1980; promoter elements from yeast or other fungi such as the Gal 4 promoter, the ADC (alcohol dehydrogenase) promoter, PGK (phosphoglycerol kinase) promoter, alkaline phosphatase promoter; and control regions that exhibit hematopoietic tissue specificity, in particular: beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogam *et al.*, Nature 315:338-340, 1985; Kollias *et al.*, Cell 46:89-94, 1986), hematopoietic stem cell differentiation factor promoters, erythropoietin

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-22-

receptor promoter (Maouche *et al.*, Blood, 15:2557, 1991), etc; and control regions that exhibit mucosal epithelial cell specificity.

Preferred vectors, particularly for cellular assays *in vitro* and vaccination *in vivo* or *ex vivo*, are viral vectors, such as lentiviruses, retroviruses, herpes viruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, vaccinia viruses, baculoviruses, and other recombinant viruses with desirable cellular tropism. Thus, a vector encoding an immunogenic polypeptide can be introduced *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro* using a viral vector or through direct introduction of DNA. Expression in targeted tissues can be effected by targeting the transgenic vector to specific cells, such as with a viral vector or a receptor ligand, or by using a tissue-specific promoter, or both. Targeted gene delivery is described in International Patent Publication WO 95/28494, published October 1995.

Viral vectors commonly used for *in vivo* or *ex vivo* targeting and vaccination procedures are DNA-based vectors and retroviral vectors. Methods for constructing and using viral vectors are known in the art (*see, e.g.*, Miller and Rosman, BioTechniques, 7:980-990, 1992). Preferably, the viral vectors are replication defective, that is, they are unable to replicate autonomously in the target cell. Preferably, the replication defective virus is a minimal virus, *i.e.*, it retains only the sequences of its genome which are necessary for encapsidating the genome to produce viral particles.

DNA viral vectors include an attenuated or defective DNA virus, such as but not limited to herpes simplex virus (HSV), papillomavirus, Epstein Barr virus (EBV), adenovirus, adeno-associated virus (AAV), vaccinia virus, and the like. Examples of particular vectors include, but are not limited to, a defective herpes virus 1 (HSV1) vector (Kapliitt *et al.*, Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330, 1991; International Patent Publication No. WO 94/21807, published September 29, 1994; International Patent Publication No. WO 92/05263, published April 2, 1994); an attenuated adenovirus vector, such as the vector described by Stratford-Perricaudet *et al.* (J. Clin. Invest. 90:626-630, 1992; *see also* La Salle *et al.*, Science 259:988-990, 1993); and a defective adeno-associated virus vector (Samulski *et al.*, J. Virol. 61:3096-3101, 1987; Samulski *et al.*, J. Virol. 63:3822-3828, 1989; Lebkowski *et al.*, Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996, 1988).

Various companies produce viral vectors commercially, including but by no means limited to Avigen, Inc. (Alameda, CA; AAV vectors), Cell Genesys (Foster City, CA; retroviral, adenoviral, AAV vectors, and lentiviral vectors), Clontech (retroviral and

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-23-

baculoviral vectors), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; adenoviral and AAV vectors), Genvec (adenoviral vectors), IntroGene (Leiden, Netherlands; adenoviral vectors), Molecular Medicine (retroviral, adenoviral, AAV, and herpes viral vectors), Norgen (adenoviral vectors), Oxford BioMedica (Oxford, United Kingdom; lentiviral vectors), and Transgene (Strasbourg, France; adenoviral, vaccinia, retroviral, and lentiviral vectors).

Adenovirus vectors. Adenoviruses are eukaryotic DNA viruses that can be modified to efficiently deliver a nucleic acid of the invention to a variety of cell types. Various serotypes of adenovirus exist. Of these serotypes, preference is given, within the scope of the present invention, to using type 2 or type 5 human adenoviruses (Ad 2 or Ad 5) or adenoviruses of animal origin (see WO94/26914). Those adenoviruses of animal origin which can be used within the scope of the present invention include adenoviruses of canine, bovine, murine (example: Mav1, Beard *et al.*, Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, avian, and simian (example: SAV) origin. Preferably, the adenovirus of animal origin is a canine adenovirus, more preferably a CAV2 adenovirus (e.g. Manhattan or A26/61 strain (ATCC VR-800), for example). Various replication defective adenovirus and minimum adenovirus vectors have been described (WO94/26914, WO95/02697, WO94/28938, WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697 WO96/22378). The replication defective recombinant adenoviruses according to the invention can be prepared by any technique known to the person skilled in the art (Levrero *et al.*, Gene 101:195 1991; EP 185 573; Graham, EMBO J. 3:2917, 1984; Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59, 1977). Recombinant adenoviruses are recovered and purified using standard molecular biological techniques, which are well known to one of ordinary skill in the art.

Adeno-associated viruses. The adeno-associated viruses (AAV) are DNA viruses of relatively small size which can integrate, in a stable and site-specific manner, into the genome of the cells which they infect. They are able to infect a wide spectrum of cells without inducing any effects on cellular growth, morphology or differentiation, and they do not appear to be involved in human pathologies. The AAV genome has been cloned, sequenced and characterized. The use of vectors derived from the AAVs for transferring genes *in vitro* and *in vivo* has been described (see WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US 5,139,941, EP 488 528). The replication defective recombinant AAVs according to the invention can be prepared by cotransfecting a plasmid containing the nucleic acid sequence of interest flanked by two AAV inverted terminal repeat (ITR) regions, and a

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-24-

plasmid carrying the AAV encapsidation genes (rep and cap genes), into a cell line which is infected with a human helper virus (for example an adenovirus). The AAV recombinants which are produced are then purified by standard techniques.

Retrovirus vectors. In another embodiment the gene can be introduced in a retroviral vector, *e.g.*, as described in Anderson *et al.*, U.S. Patent No. 5,399,346; Mann *et al.*, Cell 33:153 1983; Temin *et al.*, U.S. Patent No. 4,650,764; Temin *et al.*, U.S. Patent No. 4,980,289; Markowitz *et al.*, J. Virol. 62:1120 1988; Temin *et al.*, U.S. Patent No. 5,124,263; EP 453242, EP178220; Bernstein *et al.* Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689; International Patent Publication No. WO 95/07358, published March 16, 1995, by Dougherty *et al.*; and Kuo *et al.*, Blood 82:845, 1993. The retroviruses are integrating viruses which infect dividing cells. The retrovirus genome includes two LTRs, an encapsidation sequence and three coding regions (gag, pol and env). In recombinant retroviral vectors, the gag, pol and env genes are generally deleted, in whole or in part, and replaced with a heterologous nucleic acid sequence of interest. These vectors can be constructed from different types of retrovirus, such as, HIV, MoMuLV ("murine Moloney leukaemia virus" MSV ("murine Moloney sarcoma virus"), HaSV ("Harvey sarcoma virus"), SNV ("spleen necrosis virus"); RSV ("Rous sarcoma virus") and Friend virus. Suitable packaging cell lines have been described in the prior art, in particular the cell line PA317 (US 4,861,719); the PsiCRIP cell line (WO 90/02806) and the GP+envAm-12 cell line (WO 89/07150). In addition, the recombinant retroviral vectors can contain modifications within the LTRs for suppressing transcriptional activity as well as extensive encapsidation sequences which may include a part of the gag gene (Bender *et al.*, J. Virol. 61:1639, 1987). Recombinant retroviral vectors are purified by standard techniques known to those having ordinary skill in the art.

Retrovirus vectors can also be introduced by DNA viruses, which permits one cycle of retroviral replication and amplifies transfection efficiency (see WO 95/22617, WO 95/26411, WO 96/39036, WO 97/19182).

Lentivirus vectors. In another embodiment, lentiviral vectors can be used as agents for the direct delivery and sustained expression of a transgene in several tissue types, including brain, retina, muscle, liver and blood. The vectors can efficiently transduce dividing and nondividing cells in these tissues, and maintain long-term expression of the gene of interest. For a review, see, Naldini, Curr. Opin. Biotechnol., 9:457-63, 1998; see also

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-25-

Zufferey, *et al.*, J. Virol., 72:9873-80, 1998). Lentiviral packaging cell lines are available and known generally in the art. They facilitate the production of high-titer lentivirus vectors for gene therapy. An example is a tetracycline-inducible VSV-G pseudotyped lentivirus packaging cell line which can generate virus particles at titers greater than 10⁶ IU/ml for at least 3 to 4 days (Kafri, *et al.*, J. Virol., 73: 576-584, 1999). The vector produced by the inducible cell line can be concentrated as needed for efficiently transducing nondividing cells *in vitro* and *in vivo*.

Non-viral vectors. In another embodiment, the vector can be introduced *in vivo* by lipofection, as naked DNA, or with other transfection facilitating agents (peptides, polymers, etc.). Synthetic cationic lipids can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7417, 1987; Felgner and Ringold, Science 237:387-388, 1989; see Mackey, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031, 1988; Ulmer *et al.*, Science 259:1745-1748, 1993). Useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in International Patent Publications WO95/18863 and WO96/17823, and in U.S. Patent No. 5,459,127. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting (see Mackey, *et al.*, *supra*). Targeted peptides, *e.g.*, hormones or neurotransmitters, and proteins such as antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically.

Other molecules are also useful for facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, such as a cationic oligopeptide (*e.g.*, International Patent Publication WO95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (*e.g.*, International Patent Publication WO96/25508), or a cationic polymer (*e.g.*, International Patent Publication WO95/21931).

It is also possible to introduce the vector *in vivo* as a naked DNA plasmid. Naked DNA vectors for gene therapy can be introduced into the desired host cells by methods known in the art, *e.g.*, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun (ballistic transfection), or use of a DNA vector transporter (see, *e.g.*, Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624, 1988; Harimut *et al.*, Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990; Williams *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730, 1991). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel *et al.*, Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992; Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987). US Patent Nos.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-26-

5,580,859 and 5,589,466 disclose delivery of exogenous DNA sequences, free of transfection facilitating agents, in a mammal. Recently, a relatively low voltage, high efficiency *in vivo* DNA transfer technique, termed electroporation, has been described (Mir *et al.*, C.P. Acad. Sci., 321:893, 1998; WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175).

5

Purification of the PCV polypeptides

The polypeptide that is so produced may be recovered and preferably purified. Methods for purification are well-known in the art. The purification methods including, without limitation, preparative disc-gel electrophoresis and isoelectric focusing; affinity, HPLC, reversed-phase HPLC, gel filtration or size exclusion, ion exchange and partition chromatography; precipitation and salting-out chromatography; extraction; and countercurrent distribution. For some purposes, it is preferable to produce the polypeptide in a recombinant system in which the protein contains an additional sequence tag that facilitates purification, such as, but not limited to, a polyhistidine sequence, or a sequence that specifically binds to an antibody, such as FLAG and GST. The polypeptide can then be purified from a crude lysate of the host cell by chromatography on an appropriate solid-phase matrix. Alternatively, antibodies produced against the protein or against peptides derived therefrom can be used as purification reagents.

10

15

Anti-PCV antibodies

Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and an Fab expression library.

20

Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to PCV polypeptides or derivative or analog thereof. For the production of antibody, various host animals can be immunized by injection with the antigenic polypeptide, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, etc. Preferably, the immunized animal is of the same species as the animal who will receive the antibodies in passive immunization, to avoid allergic reactions to the antibodies.

25

For preparation of monoclonal antibodies directed toward the PCV polypeptides, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (Nature 256:495-497,

30

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-27-

1975), as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, Immunology Today 4:72, 1983; Cote *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030, 1983), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985). In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals (International Patent Publication No. WO 89/12690, published 28 December, 1989).

According to the invention, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent Nos. 5,476,786 and 5,132,405 to Huston; U.S. Patent 4,946,778) can be adapted to produce the PCV polypeptide-specific single chain antibodies. Indeed, these genes can be delivered for expression *in vivo*. An additional embodiment of the invention utilizes the techniques described for the construction of Fab expression libraries (Huse *et al.*, Science 246:1275-1281, 1989) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for a PCV polypeptide, or its derivatives, or analogs.

Antibody fragments which contain the idiotype of the antibody molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, *e.g.*, radioimmunoassay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, precipitation reactions, agglutination assays (*e.g.*, gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labeled. Many means are known in the

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-28-

art for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention.

Culturing PCV In Vitro

The present invention further relates to a method of culturing a porcine circovirus strain which method comprises introducing a nucleic acid comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 TO SEQ ID NO:6 into a suitable host cell under conditions that result in the production of porcine circovirus particles having a genome that comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 TO SEQ ID NO:6.

Uninfected cells of any type, preferably pig cells (*e.g.*, cells derived from *Sus scrofa* or *Tayassu tajacu*), more preferably neuronally derived pig cells (*e.g.*, glial cells), pig kidney cells (*e.g.*, PK-15 cells) or pig macrophage cells may be infected by introduction of PCV nucleic acids of the invention (*e.g.*, single or preferably double stranded genomic DNA or one or more plasmids comprising PCV genomic DNA) into the cells. Infection or transfection of a host cell line is a technique which is commonly known in the art and may be performed by any practitioner of ordinary skill in the art. For example, Example 1 includes a procedure for transfecting PK-15 cells with PCV DNA (see Transfection of cloned PCV DNAs and detection of PCV).

Once infected, one or more clones from the infected cell line may be selected and propagated. The cells from the selected clones may be stored (*e.g.*, frozen) and used as a master cell bank from which samples may be taken and used to generate multiple working cell lines. Viral particles which are used for vaccine production and as a source of viral proteins may be obtained from the working cell lines. Specifically, a working cell line may be produced by thawing a sample of a frozen master cell line and expanding the cells in culture; the cells in the expanded cell culture are used as the working cell line. For example, the master cell line may be thawed and grown in a Nunc Cell Factory (Nalge Nunc International, Rochester, NY) for production of a large quantity of cells.

Viral particles may be obtained from the working cell lines by methods which are commonly known to those of ordinary skill in the art. For example, viral particles in the culture supernatant of the working cell lines may be harvested, filtered, purified (*e.g.*, by gradient centrifugation) and used for vaccine generation.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-29-

Diagnosis of Congenital Tremors

The evidence of an association between porcine circovirus and congenital tremors (CT) allows the inventors to present a method for diagnosing a pathological cause of congenital tremors (CT) in a pig or its progeny, which method comprises determining whether the pig has been infected by a porcine circovirus.

As used herein, the term "diagnosis" refers to the identification of the disease at any stage of its development, and also includes the determination of a predisposition of a foetus or new-born piglet to develop the disease or a predisposition of a sow to transmit the disease to the foetus.

The diagnostic method of the invention may involve the detection of any PCV strain of Type 1 or Type 2. The repartition of PCV strains between the two types is shown in Figure 3. PCV strains of Type 1 more particularly include PK-15 PCV or the so-called "CI-PCV-7" strain that comprises nucleic acid sequence SEQ ID NO. 7. PCV strains of Type 2 more particularly include the strains that comprise a nucleic acid sequence of any of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 6. PCV strains that are associated with PMWS ("PMWS-PCV") are also included in the target PCV strains.

The diagnostic method of the invention may be performed by any standard technique well-known by one skilled in the art, as reviewed for example, in the International Application WO 99/18214.

In a first embodiment, the determination of the infection may encompass detecting the presence of a PCV nucleic acid in a biological sample of the test pig.

In a second embodiment, the determination of the infection may encompass detecting the presence of a PCV polypeptide in a biological sample of the test pig.

In a third embodiment, the determination of the infection may be effected by detecting the presence of an antibody directed against a PCV polypeptide in a biological sample of the test pig.

The biological sample may be of any kind, including a fluid sample (blood, plasma, serum, cerebrospinal fluid, etc.) or an organ or tissue sample (ganglions, liver, etc.). Cells or cell extracts from the central nervous system may be used more particularly for post-mortem diagnosis.

However preferred test samples and methods are those that can be easily

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-30-

implemented by a veterinarian or the animal breeder on the farm. Accordingly, Western blot, immunofluorescence, ELISA or immunochromatography suit these applications very well.

In ELISA assays, a polypeptide of the invention or epitopic fragment thereof are immobilized onto a selected surface, for example, a surface capable of binding proteins such as the wells of a polystyrene microtiter plate. After washing to remove incompletely adsorbed polypeptides, a nonspecific protein such as a solution of bovine serum albumin (BSA) that is known to be antigenically neutral with regard to the test sample may be bound to the selected surface. This allows for blocking of nonspecific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the background caused by nonspecific bindings of antisera onto the surface. The immobilizing surface is then contacted with a sample, such as clinical or biological materials, to be tested in a manner conducive to immune complex (antigen/antibody) formation. This may include diluting the sample with diluents, such as solutions of BSA, bovine gamma globulin (BGG) and/or phosphate buffered saline (PBS)/Tween. The sample is then allowed to incubate for from 2 to 4 hours, at temperatures such as of the order of about 25° to 37°C. Following incubation, the sample-contacted surface is washed to remove non-immunocomplexed material. The washing procedure may include washing with a solution, such as PBS/Tween or borate buffer. Following formation of specific immunocomplexes between the test sample and the bound polypeptide, and subsequent washing, the occurrence, and an even amount of immunocomplex formation may be determined by subjecting the immunocomplex to a second antibody having specificity for the first antibody. To provide detecting means, the second antibody may have an associated activity such as an enzymatic activity that will generate, for example, a color development upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. Quantification may then be achieved by measuring the degree of color generation using, for example, a visible spectra spectrophotometer.

As to immunochromatography techniques, one skilled in the art may find detailed information in F. Zurk *et al.*, Clin. Chem. 31/7, 1144-1150 (1985), as well as in patents or patent applications WO-88/08 534; WO-91/12528; EP 291 176; EP 299 428; EP 291 194; EP 284 232; US 5,120,643; US 5,030,558; US 5,266,497; US 4,740,468; US 5,266,497; US 4,855,240; US 5,451,504; US 5,141,850; US 5,232,835; US 5,238,652.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-31-

Alternative methods include the use of nucleic acid sequences such as oligonucleotides to detect the presence of a PCV nucleic acid in a biological sample.

For that purpose, one skilled in the art may use hybridization probes in solution hybridizations and in embodiments employing solid-phase procedures. In
5 embodiments involving solid-phase procedures, the test is adsorbed or otherwise affixed to a selected matrix or surface. The fixed, single-stranded nucleic acid is then subjected to specific hybridization with selected probes.

In another embodiment, one skilled in the art may use oligonucleotide primers in an amplification technique, such as PCR ("polymerase chain reaction"), to
10 specifically amplify the target PCV nucleic acid potentially present in the biological sample. Examples of such primers are given in Table 1 of Example 1.

Prevention and treatment of Congenital Tremors

The present invention contemplates vaccination or passive immunization to prevent or treat congenital tremors. The antigenic or immunogenic compositions of the
15 invention are broadly applicable to protect a pig or its progeny from infection by porcine circovirus. The term "protect" is used herein to mean for the treatment or prevention of PCV infection, and congenital tremors. Thus, any animal susceptible to this type of infection can be vaccinated. Pigs may be treated at any age, and include new-born piglets. Treatment of sows is particularly useful to protect foetus.

The present invention more particularly relates to antigenic or
20 immunogenic compositions that comprise a circovirus antigen, a veterinary acceptable vehicle or excipient and generally a veterinary acceptable adjuvant.

An immunogenic composition elicits an immunological response which can, but need not be, protective. A vaccine composition elicits a protective response.
25 Accordingly, the term "immunogenic composition" includes a vaccine composition (as the former term can be protective composition).

The subject of the invention also is a method of immunization or of vaccination against congenital tremors, comprising the administration of an immunogenic composition or a vaccine against the porcine circovirus. This method of immunization or
30 vaccination uses in particular the vaccines as defined below.

A subject of the present invention is thus an antigenic preparation directed

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-32-

against congenital tremors (CT), comprising at least one porcine circovirus (PCV) antigen. This antigen may consist of an attenuated live whole PCV, an inactivated whole PCV, a subunit antigen, a recombinant live vector, or a DNA vector.

5

Whole PCV vaccines

A subject of the invention is an isolated porcine circovirus strain, which has a genome comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of any of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7. Purified preparations of viruses may be obtained by one skilled in the art knowing these sequences.

10

These virus may be used in an antigenic composition for vaccinating pigs against congenital tremors. For that purpose the virus particles may be attenuated, inactivated, or killed, according to standard techniques well known by one skilled in the art, as described below.

15

For the production of circovirus antigenic preparations, the circoviruses may be obtained after passage in cells, in particular cell lines, e.g. PK/15 cells. The culture supernatants or extracts, optionally purified by standard techniques, may be used as antigenic preparation.

20

In the context of attenuated antigenic preparations and attenuated immunogenic compositions or vaccines, the attenuation may be carried out according to the customary methods, e.g. by passage on cells, preferably by passage on pig cells, especially cell lines, such as PK/15 cells (for example from 50 to 150, especially of the order of 100, passages). These immunogenic compositions and vaccines comprise in general a veterinary acceptable vehicle or a diluent, with optionally in addition a veterinary acceptable adjuvant as well as optionally a freeze-drying stabilizer.

25

These antigenic preparations, immunogenic compositions and vaccines will preferably comprise from 10^3 to 10^9 TCID₅₀ of the attenuated virus in question.

30

They may be antigenic preparations, immunogenic compositions and vaccines based on inactivated whole antigen. The inactivated immunogenic compositions and vaccines comprise, in addition, a veterinary acceptable vehicle or a diluent, with optionally in addition a veterinary acceptable adjuvant.

The circoviruses according to the invention, with the fractions which may be present, are inactivated according to techniques known to persons skilled in the art. The

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-33-

inactivation will be preferably carried out by the chemical route, e.g. by exposing the antigen to a chemical agent such as formaldehyde (formalin), paraformaldehyde, .beta.-propiolactone or ethyleneimine or its derivatives. The preferred method of inactivation will be herein the exposure to a chemical agent and in particular to

5 ethyleneimine or to .beta.-propiolactone.

The antigenic preparations, immunogenic compositions and vaccines will preferably comprise from 10^5 to 10^8 TCID₅₀ of the inactivated whole virus in question.

Preferably, the attenuated or inactivated antigenic preparations and the attenuated or inactivated immunogenic compositions and vaccines according to the invention will be supplemented with adjuvant, advantageously by being provided in the form of emulsions, for example water-in-oil or oil-in-water, according to techniques well known to persons skilled in the art. It will be possible for the adjuvant character to also come from the incorporation of a customary adjuvant compound into the active ingredient.

Among the adjuvants which may be used, there may be mentioned by way of example aluminium hydroxide, the saponines (e.g. Quillaja saponin or Quil A; see Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, Plenum Press, New-York and London, p.210), Avridine.RTM. (Vaccine Design p. 148), DDA (Dimethyldioctadecyl-ammonium bromide, Vaccine Design p. 157), Polyphosphazene (Vaccine Design p. 204), or alternatively oil-in-water emulsions based on mineral oil, squalene (e.g. SPT emulsion, Vaccine Design p. 147), squalene (e.g. MF59, Vaccine Design p. 183), or water-in-oil emulsions based on metabolizable oil (preferably according to WO 94/20071) as well as the emulsions described in U.S. Pat. No. 5,422,109. It is also possible to choose combinations of adjuvants, for example Avridine.RTM. or DDA combined with an emulsion.

As freeze-drying stabilizer, there may be mentioned by way of example SPGA (Bovarnik et al., J. Bacteriology 59, 509, 950), carbohydrates such as sorbitol, mannitol, starch, sucrose, dextran or glucose, proteins such as albumin or casein, derivatives of these compounds, or buffers such as alkali metal phosphates.

Subunit and vector vaccines

As used herein, the term "subunit antigen" refers to an antigenic PCV polypeptide or an antigenic fragment thereof. The term "subunit or polypeptide vaccine"

30

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-34-

refers to a vaccine comprising an immunogenic polypeptide and, generally, an adjuvant.

A "vector vaccine" comprise "recombinant live vectors" or "DNA vectors".

As used herein the term "recombinant live vector" refers to the vectors used to express an antigenic or immunogenic polypeptide for *in vivo* or *ex vivo* vaccination.

Preferred vectors are viral vectors, such as DNA-based vectors and retroviral vectors. As appropriate live vectors, there may be used preferably live viruses, preferably capable of multiplying in pigs, nonpathogenic for pigs (naturally nonpathogenic or rendered as such), according to techniques well known to persons skilled in the art. There may be used in particular parvoviruses (US 6,217,883), pig herpesviruses such as Aujeszky's disease virus, porcine adenovirus, poxviruses, especially vaccinia virus, avipox virus, canarypox virus, swinopox virus. DNA vectors can also be used as vectors (WO 90/11092, WO 93/19813, WO 94/21797, WO 95/20660). Generally, the vector is administered *in vivo*, but *ex vivo* transduction of appropriate antigen presenting cells, such as dendritic cells, with administration of the transduced cells *in vivo*, is also contemplated.

In another embodiment, the vector may be in the form of a DNA molecule that can be introduced *in vivo* by lipofection, as naked DNA, or with other transfection facilitating agents (peptides, polymers, etc.). This embodiment is herein referred to as the "DNA vector" technology. Synthetic cationic lipids can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection (Felgner, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7417, 1987; Felgner and Ringold, Science 337:387-388, 1989; see Mackey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031, 1988; Ulmer et al., Science 259:1745-1748, 1993). Useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in International Patent Publications WO95/18863 and WO96/17823, and in U.S. Patent No. 5,459,127. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting (see Mackey, et al., *supra*). Targeted peptides, e.g., hormones or neurotransmitters, and proteins such as antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically. Other molecules are also useful for facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, such as a cationic oligopeptide (e.g., International Patent Publication WO95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (e.g., International Patent Publication WO96/25508), or a cationic polymer (e.g., International Patent Publication WO95/21931). It is also possible to introduce the vector *in vivo* as a naked DNA plasmid. Naked DNA vectors for gene therapy can be introduced into the desired host cells by

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-35-

methods known in the art, *e.g.*, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun (ballistic transfection), or use of a DNA vector transporter (see, *e.g.*, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:963-967, 1992; Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624, 1988; Hartmut *et al.*, Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990; Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-2730, 1991). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 3:147-154, 1992; Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, 1987). US Patent Nos. 5,580,859 and 5,589,466 disclose delivery of exogenous DNA sequences, free of transfection facilitating agents, in a mammal. Recently, a relatively low voltage, high efficiency *in vivo* DNA transfer technique, termed electrotransfer, has been described (Mir *et al.*, *C.P. Acad. Sci.*, 321:893, 1998; WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175).

Vaccination Strategies

Various strategies can be employed to vaccinate subjects against congenital tremors. The polypeptide vaccine formulations can be delivered by subcutaneous (*s.c.*), intraperitoneal (*i.p.*), intramuscular (*i.m.*), subdermal (*s.d.*), intradermal (*i.d.*), or by administration to antigen presenting cells *ex vivo* followed by administration of the cells to the subject.

Similarly, any of the gene delivery methods described above can be used to administer a vector vaccine to a subject, such as naked DNA and RNA delivery, *e.g.*, by gene gun or direct injection.

Vaccination effectiveness may be enhanced by co-administration of an immunostimulatory molecule, such as an immunostimulatory or immunopotentiating, cytokine, lymphokine, or chemokine with the vaccine, particularly with a vector vaccine. For example, cytokines or cytokine genes such as interleukin (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13, granulocyte-macrophage (GM)-colony stimulating factor (CSF), macrophage inflammatory factor, as well as some key costimulatory molecules or their genes (*e.g.*, B7.1, B7.2) can be used.

Mucosal Vaccination. Mucosal vaccine strategies are particularly effective for many pathogenic bacteria, since infection often occurs via the mucosa. Thus, mucosal vaccination strategies for both polypeptide and DNA vaccines are contemplated. While the mucosa can be targeted by local delivery of a vaccine, various strategies have been

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-36-

employed to deliver immunogenic proteins to the mucosa (these strategies include delivery of DNA vaccines as well, e.g., by using the specific mucosal targeting proteins as vector targeting proteins, or by delivering the vaccine vector in an admixture with the mucosal targeting protein).

For example, in a specific embodiment, the immunogenic polypeptide or vector vaccine can be administered in an admixture with, or as a conjugate or chimeric fusion protein with, cholera toxin, such as cholera toxin B or a cholera toxin A/B chimera (Hajishengallis *et al.*, *J Immunol.*, 154:4322-32, 1995; Jobling and Holmes, *Infect Immun.*, 60:4915-24, 1992). Mucosal vaccines based on use of the cholera toxin B subunit have been described (Lebens and Holmgren, *Dev Biol Stand* 82:215-27, 1994). In another embodiment, an admixture with heat labile enterotoxin (LT) can be prepared for mucosal vaccination.

Other mucosal immunization strategies include encapsulating the immunogen in microcapsules (U.S. Patents No. 5,075,109, No. 5,820,883, and No. 5,853,763) and using an immunopotentiating membranous carrier (WO 98/0558). Immunogenicity of orally administered immunogens can be enhanced by using red blood cells (rbc) or rbc ghosts (U.S. Patent No. 5,643,577), or by using blue tongue antigen (U.S. Patent No. 5,690,938). Systemic administration of a targeted immunogen can also produce mucosal immunization (*see*, U.S. Patent No. 5,518,725).

Various strategies can be used to deliver genes for expression in mucosal tissues, such as using chimeric rhinoviruses (U.S. Patent No. 5,714,374), adenoviruses, or specific targeting of a nucleic acid (WO 97/05267).

Passive Immunization

In addition to the active immunization vaccination strategies described above, the present invention further contemplates passive immunization with an antibody reactive with, and preferably generated against a PCV antigen. Passive immunization is particularly effective for an incipient or established infection, before the host's immune system can respond.

One source of antibodies for use in passive immunization is from convalescent serum of affected animals of the same species as the infected host. Thus, for example, antibodies from pig sera can be isolated, preferably by affinity purification

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-37-

against a PCV polypeptide and used to passively immunize newly infected pigs.

Alternatively, antibodies can be generated against the immunogenic polypeptide, *i.e.*, the vaccine strategy can also be used to generate antibodies for passive immunization.

5 The anti-PCV antibodies of the invention may be cross reactive, *e.g.*, they may recognize various PCV strains. Polyclonal antibodies have greater likelihood of cross reactivity.

Immunoassay for Protective Immunity to Congenital Tremors

10 In another embodiment, an immunogenic polypeptide of the invention can be used in an immunoassay to detect protective antibodies against Congenital Tremors in a pig. Based on the discoveries of the present invention, a high titer of antibody reactive with (specific for) a PCV antigen indicates that the individual may be protected from an infection by PCV, and consequently from congenital tremors. Low or no detectable
15 antibodies reactive with a PCV antigen indicates that the individual may not be protected from infection.

The immunoassay of the invention can be used to detect antibody levels in subjects who have been exposed to a PCV infection, *e.g.*, in convalescent serum. It can also be used to detect antibodies in subjects of unknown status. High level antibody titers
20 in such subjects would indicate prior exposure, and possibly protective immunity, to PCV. Finally, the immunoassay can be used to evaluate the effectiveness of a vaccine of the invention.

Any of the immunoassay formats described above can be used in an immunoassay of the invention. Preferably, an ELISA assay is used in which a PCV
25 polypeptide is adsorbed to the solid phase, sera (preferably in serial dilution) is contacted with the solid phase, and antibody binding is detected, *e.g.*, with a labeled antibody specific for antibodies in the serum. Alternatively, a competitive ELISA format could be used, in which anti-PCV antibodies in the serum sample compete for binding to the solid phase polypeptide against labeled antibodies specific for a PCV polypeptide, *e.g.*, prepared
30 as described above. In another alternative, the polypeptide is labeled, and antibody specific for the polypeptide adsorbed to the solid phase support. The presence of antibodies in the biological sample (*e.g.*, serum) will result in competition for the

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-38-

polypeptide, preventing binding of the label to the adsorbed antibodies. In addition, convenient chromatographic immunoassay formats, as described below, can be used.

Although the immunoassays described here refer to testing for the presence of anti-PCV antibodies in serum, any biological sample that provides antibodies, can be tested, including without limitation, blood, serum, plasma, tissue samples, lymph, mucosal secretions, sputum, synovial fluid and other inflammatory fluids, and the like.

Kits

The components for practicing the immunoassays can be conveniently provided in a kit form. In its simplest embodiment, a kit of the invention provides a PCV polypeptide and an antibody detector, such as a labeled antibody specific for antibodies from the subject to be tested. The amounts of each can be pre-measured to provide a specified number of assays.

In a further embodiment, the kit will include an assay container, such as a plate, preferably of plastic or a material treated to avoid non-specific binding of protein. As used herein, the term container has its broadest meaning, *i.e.*, any receptacle for holding material or reagents. It can be fabricated from glass, plastic, ceramic, metal, etc.

In still a further embodiment, the kit includes an immunochromatographic membrane or support, to which one reagent, either a PCV polypeptide or an antibody specific for the PCV polypeptide has been irreversibly coupled. Numerous methods and devices known in the art for immunochromatographic assays can be employed in the invention. As noted above, immunochromatographic assays are particularly useful under field conditions, where laboratory equipment is not available. Examples of such assays are provided in U.S. Patents No. 5,248,619, No. 5,451,504, No. 5,500,375, No. 5,624,809, and No. 5,658,801.

A kit of the invention preferably includes packaging and instructions for its use, *e.g.*, on the packaging or package insert.

Combined strategies

In the context of combined immunization or vaccination programs, it is also possible to combine the immunization or vaccination against the porcine circovirus with an immunization or vaccination against other pig pathogens, in particular those which

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-39-

could be associated with the PMWS syndrome. The immunogenic composition or vaccine according to the invention may therefore comprise another valency corresponding to another pig pathogen chosen from parvovirus (US 6,217,883), from PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) and/or *Mycoplasma hyopneumoniae*, and/or *E. coli*, and/or Atrophic Rhinitis, and/or Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus and/or porcine influenza and/or *Actinobacillus pleuropneumoniae* and/or Hog cholera, and combinations thereof. Preferably, the programme of immunization or vaccination and the vaccines according to the invention will combine immunizations or vaccinations against the circovirus, and the PRRS (WO 93/07898, WO 94/18311, FR-A-2 709 966 ; C. Charreyre et al., Proceedings of the 15^{sup}.th IPVS Congress, Birmingham, England, Jul. 5-9, 1998, p 139 ; and/or *Mycoplasma hyopneumoniae* (EP-A-597 852, EP-A-550 477, EP-A571 648 ; O. Martinon et al. p 157, 284, 285 and G. Reynaud et al., p 150, all in the above-referenced Proceedings of the 15^{sup}.th IPVS Congress) and/or porcine influenza. It is thus possible to use any appropriate form of immunogenic composition or vaccine, in particular any available commercial vaccine, so as to combine it with the immunogenic composition or vaccine against the porcine circovirus as described here.

The subject of the present invention is therefore also multivalent immunogenic compositions and vaccines, multivaccine kits, and combined immunization or vaccination methods which makes it possible to use such combined immunization or vaccination programs.

The present invention will be better understood by reference to the following examples, which are provided by way of exemplification and are not intended to limit the invention.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-40-

EXAMPLES:**Example I: Sequence Analysis of Porcine Circovirus Associated With Congenital Tremors In Pigs.****Methods**

5 *Tissue samples and a cell line infected with PCV.* Pigs infected with PCV were obtained from farms in Indiana, USA. Pigs were initially identified by signs of either PMWS or CT, followed by microscopic examination of tissue sections. Presence of PCV in tissue was further confirmed by *in situ* hybridization using PCV-specific oligonucleotide probe, indirect fluorescent assay (IFA) using antiserum against PCV and
10 PCR using primers specific to PCV. Four PCV isolates collected from pigs showing signs of PMWS were named as PMWS-PCV-P1, PMWS-PCV-P2, PMWS-PCV-P3, and PMWS-PCV-P4. Two PCV isolates collected from pigs showing signs of CT were named as CT-PCV-P5, and CT-PCV-P6.

15 For the isolation of a historic PCV isolate, a PCV contaminated cell line (PCNS) was derived from the brain of a pig showing signs of CT. A pregnant sow was experimentally inoculated with the cell culture supernatant from CT pig kidney cells (Gustafson & Kanitz, 1974). PCNS cells were grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM) [Life Technologies, Inc.] containing 10% FetalCione III (HyClone, Inc.). Cells were harvested and tested for PCV by *in situ* hybridization using a
20 PCV-specific oligonucleotide probe, electronmicroscopy (EM), and by PCR using PCV-specific primers. This PCV isolate was named as CT-PCV-P7.

DNA isolation and PCR. PCNS cells grown in EMEM were harvested when cells started floating in the medium. The cell pellet was lysed by SDS-pronase (500 µg/ml pronase in 10 mM Tris, pH7.4, 10 mM EDTA, and 0.5 % SDS) and incubated at
25 37°C overnight. The total cellular DNA was isolated by phenol extraction followed by ethanol precipitation.

 Lymph nodes for PMWS-PCV-P1, -P2, -P3, -P4, and CT-PCV-P6 and liver for CT-PCV-P5 were homogenized in EMEM using a tissumizer followed by sonication using a sonicator. Tissue homogenates were incubated with the equal volume of
30 SDS-pronase (1 mg/ml pronase in 20 mM Tris, pH7.4, 20 mM EDTA, and 1 % SDS) at 37°C overnight. Total cellular DNA was obtained by phenol extraction and ethanol precipitation. The DNA was used as a template for PCR using Vent DNA polymerase

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-41-

(New England BioLab) with two pairs of primers to amplify the entire PCV genome. For PMWS-PCV-P1, -P2, and -P3, CT-PCV-P5, and -P6; PCV2-1 & PCV2-2 and PCV2-3 & PCV2-4 sets of primers were used (Table 1). For PMWS-PCV-P4, PCV2-1 & PCV2-2 and PCV4-1 & PCV4-2 sets of primers were used (Table 1). For CT-PCV-P7, PCV1-3 & PCV1-4 and PCV7-1 & PCV7-2 sets of primers were used (Table 1). PCR products were analyzed on 1% agarose gel and visualized with an UV transilluminator.

TABLE 1 Nucleotide sequence and the location of primers used in this study for the cloning of PCV genome

Name of primer	SEQ ID NO	Location of primer (nucleotide) ^a	Nucleotide sequence of primer
PCV1-3	8	37-56	5'TACTCCTCAACTGCTGTCCC3'
PCV1-4	9	1605-1624	5'TCCATCCCACCACCTATTTC3'
PCV2-1	10	1076-1093	5'ACGCTGAATAATCCTTCC3'
PCV2-2	11	679-660	5'CCAACAAAATCTCTATACCC3'
PCV2-3	12	7-24	5'ATTACCAGCAATCAGACC3'
PCV2-4	13	1657-1640	5'AACAACCACTTCCTTCACC3'
PCV4-1	14	611-629	5'AGCAGGGCCAGAATTC AAC3'
PCV4-2	15	1100-1079	5'CGTCTTCGGAAGGATTAATCAG3'
PCV7-1	16	1597-1617	5'GCCTAGTAGAAATAAGTGGTG3'
PCV7-2	17	87-68	5'AGTAATCCTCCGATAGAGAG3'

^a The location of primers PCV2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 4-1, 4-2 and primers PCV1-1, 1-2, 7-1, 7-2 is based upon the sequence of PMWS-PCV (Hamel *et al.*; 1999) and PK-1 5-PCV (Meehan *et al.* 1997), respectively.

Cloning of PCR products. The PCR products were cloned into the SmaI site of pUC18 by blunt-end ligation using T4 DNA ligase (New England Bio Lab). To construct the entire genome of PMWS-PCV-P1, -P2, and -P3, pUC18 containing PCR products from nt 1076-679 amplified with PCV2-1 & 2 primers and PCR products from nt 7-1657 amplified with PCV2-3 & 4 primers were digested with *StuI* and *KpnI*. The 4 kb *StuI* - *KpnI* fragment from pUC 18 containing PCV2-1 & 2 amplified PCR product was used to insert a 1.3 kb *StuI* - *KpnI* fragment from pUC18 containing PCV2-3 & 4 amplified PCR product to result in pUC 18 containing PCV genome from nucleotide 1076-1768 and 1- 1657. The resultant plasmids containing the genome of either

WO 01/96377

-42-

PCT/US01/19220

PMWS-PCV-P1, -P2 or -P3 were named pPCV-P1, pPCV-P2 and pPCV-P3, respectively. These plasmids when digested with *Sac*II 135 produced the linearized-form of complete PCV genomes. Similarly PCR products obtained from other PCV strains were also cloned at the *Sma*I site of pUC18 by blunt-end ligation. Plasmid DNA was purified by isopycnic centrifugation in cesium chloride-ethidium bromide gradients (Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Transfection of cloned PCV DNAs and detection of PCV. Plasmids containing entire genome of PCV DNA (pPCV-P1, -P2, and -P3) were digested with *Sac*II to result in two fragments, the full-PCV genomic DNA and pUC18 plus a part of PCV DNA. Semi-confluent monolayers of PCV-free PK-15 cells in 6-well plates were transfected with 1 µg of the ligated PCV genome using Lipofectin-mediated transfection protocol (Life Technologies, Inc.). Cells were passaged three times. After the third passage, cells were harvested, cytopspined and fixed with acetone. Polyclonal antibody against PMWS-PCV raised in a rabbit (Morozov and Paul, Iowa State University, Ames, Iowa) was used for IFA. For EM, water was added to cell pellets and the cell contents were centrifuged at 10,000 RPM for 5 min. Supernatants were collected and centrifuged at 20,000 RPM for 40 min. The cell pellets were resuspended in water containing 3% phosphotungstic acid and 1% bovine serum albumin. Samples were nebulized onto the carbon-coated grids and examined with a Philips 201 electronmicroscope.

DNA sequencing and sequence analysis. Plasmids containing PCV DNA were sequenced using universal and reverse primers. Subsequently, both strands of DNA were sequenced by primer walking using an applied Biosystems 373A automated sequencer. The entire genomes of 7 PCV isolates (PMW-PCV-P1, -P2, -P3, -P4, and CT-PCV-P5, -P6, and -P7) were analyzed using the GCG sequence analysis software (Wisconsin package).

Phylogenetic calculations. The sequence alignments were gained by the ClustalW program. The phylogenetic calculations were performed by the PHYLIP program package version 3.572c (Felsenstein, Cladistics 5:164-166, 1989). For the parsimony analysis, the programs Protpars or DNAPars were used. For the distance

WO 01/96377

-43-

PCT/US01/19220

analysis, the Protdist (Dayhoff's PAM 001 matrix) or DNAdist (Kimura 2-parameter) followed by Fitch (with global rearrangements) were applied. During the bootstrap analysis, the above calculations were preceded by the Seqboot (100 datasets) and followed by the Consensus program to get the consensus tree. Finally, the results were visualized by the TreeView program (Page, Computer Applications in the Biosciences 12:357-358, 1996). A more detailed description of the applied methods has been published elsewhere (Harrach & Benkő, Adenovirus Methods and Protocols Methods in Molecular Medicine, 21:309-339, 1998).

Results

Transfection of PCV-free PK-15 cells with PCV DNAs. Initially, the entire genomes of three PCV isolates associated with PMWS (PMWS-PCV-P1, -P2, and -P3) were amplified by PCR using two sets of primers. PCR generated fragments were used to construct plasmids (pPCV-P1, -P2 and -P3) containing PCV genomes. These plasmids, on digestion with *Sac*II, resulted in a linear form of complete PCV genome. To test whether the cloned PCV genomes were infectious, the *Sac*II-digested-religated or unligated pPCV-P1, -P2 and -P3 were used to transfect PCV-free PK-15 cells. Cells were harvested after third passage and analyzed for the presence of PCV antigen by IFA. A number of cells transfected with *Sac*II-digested religated PCV DNA were positive for PCV antigen, whereas cells transfected with *Sac*II-digested unligated PCV DNA were negative for PCV antigen by IFA. To further determine whether transfection with PCV DNA resulted in the production of PCV virion, PK-15 cells transfected with PCV DNA were analyzed by EM. Small spherical viruses, approximately 17nm in diameter, were observed. The detection of PCV antigen and the observation of virus particles in cells transfected with PCV DNA indicated that the cloned full-length circular PCV DNA results in viral replication and production of virus particles. Since the full-length PCV genomes amplified by PCR were infectious, the inventors used PCR technique to amplify genomes of other PCV field strains.

Sequence comparison of PMWS-PCV, and old and new CT-PCV isolates.

The inventors sequenced the entire genomes of 4 PCV isolates associated with PMWS (PMWS-PCV P1, -P2, -P3 and -P4), 2 PCV isolates associated with CT in the late 1990s

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-44-

(CT-PCV-P5 and -P6)), and one PCV isolate associated with CT in the late 1960s (CT-PCV-P7). Sequences of these isolates were compared with that of the previously described PMWS-PCV isolate (Hamel *et al.*, 1998) and PK-15-PCV isolate (Meehan *et al.*, Journal of General Virology 78:221-227, 1997). Genomes of PMWS-PCV-P1, -P2, and -P4 were 1768 nucleotides (nt) long, whereas PMWS-PCV-P3 was 6 nucleotides shorter than the rest of PMWS PCV isolates due to a 6-nt deletion between 820 to 825 nt (Fig. 1). All the PMWS-PCV isolates of the invention had an overall 99% nt sequence identity with each other. The orientation and the relative length of each ORF of PMWS-PCV-P1 are shown (Fig. 2A). The coding strand, number of amino acids, and the location of each ORF in the genomes of PMWS-PCVs are listed (Table 2).

TABLE 2. Comparison of ORFs of PMWS-PCVs and new CT-PCVs*

ORF	PMWS-PCV-P1			PMWS-PCV-P2		PMWS-PCV-P4	
	Coding strand	Number of amino acids	Location (nucleotide)	Number of amino acids	Location Number of (nucleotide)	Location Number of amino acids	Location (Nucleotide)
15	ORF1 V	314	1019-195	-	1013-195	-	-
	ORF2 C	235	935-234	231	926-234	-	-
	ORF3 C	104	1639-1325	-	1633-1319	-	-
	ORF4 C	59	1533-1354	-	1527-1348	-	-
	ORF5 V	53	216-377	-	-	104	216-530
20	ORF6 C	29	811-724	-	-	-	-
	ORF7 V	19	882-941	-	876-935	-	-
	ORF8 C	21	1721-1656	-	1715-1650	-	-
	ORF9 C	42	1061-932	-	1055-926	-	-
	ORF10 V	35	724-931	61	724-909	-	-
25	ORF11 C	14	233-189	-	-	-	-

* Number of amino acids and the location of each ORF of PMWS-PCV-P3, CT-PCV-P5, and CT-PCV-P6 are identical to those of PMWS-PCV-P1.

*V indicate viral strand that is encapsidated into virus particles and C indicates the complementary strand to viral strand.

- Indicates same as the corresponding of PMWS-PCV-P11

The amino acid sequence of ORF1 was highly homologous (approximately

WO 01/96377

-45-

PCT/US01/19220

99% homology at amino acid level) among all these PMWS-PCV isolates. Observed changes in amino acid residues in various ORFs of these PMWS-PCV isolates are listed (Table 3). The ORF2 had more amino acid changes than ORF1 among PMWS-PCVs, but still had an approximately 97% homology. Open reading frames 3, 4, 7, and 8 were identical among PMWS-PCV isolates and there were only few changes in the rest of ORFs (Table 3).

TABLE 3. Amino acid sequence comparison of ORFs of various PCVs with those of PMWS-PCV-P1 or PK-15-PCV*

	PMWS-PCV-P2	PMWS-PCV-P3	PMWS-PCV-P4	CT-PCV-P6	PMWS-PCV ^b	CT-PCV-P7
10	ORF1	K30N, T292M			I182Y	T283N
15	ORF2 P ₃₉ , K75T, L76I, V130F, A133S, N134T, N232K	R35dY36d	R59A, K75N, L76L P131T, N134S, L185K L187I, N282K	N134f, N2-32K	R59A, T63F, A30V, T44K, K75N, L76I, T53R, Y63H, P131T, N134T, Y72H, K74R, N181T, K206L, N232K	H176Q, Y201F, A207D, K233E
20	ORF3 -	-	-	-	-	S139G, A163T, W203G
	ORF4 -	-	-	-	-	-
25	ORF5 F51, V9F	-	F51, V9F, H48Y	F51, V9F	V9F, F35Y	V12L, N69Y
	ORF6 S17P, V18L	P25R	S17RV18L	A7G, S8F	S17R, V18L, Q22E	N6D, Q16R, L51stop
	ORF7 -	-	-	-	-	K48Q
	ORF8 -	-	-	-	-	-
30	ORF9 W2R	-	-	-	-	Q25H
	ORF10 R13A	Q5H	R13A	R23S	V9L, R13A	-
	ORF11 K2N	-	K2N	K2N	-	-

* ORFs of PMWS-PCV-P2, -P3, -P4, PMWS-PCV, and CT-PCV-P6 were compared with those of

PMWS-PCV-P1, whereas ORFs of CT-PCV-P7 were compared with those of PK-15-PCV.

^b Amino acid change is depicted as amino acid present in the PMWS-PCV-P1, the location and the changed

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-46-

amino acid.

^b The sequence of PMWS-PCV has been published (Hamel *et al.*, Journal of Virology 72:5262-5267 1998).

^d Indicates the deleted amino acid.

Stop: Indicates the stop codon resulting in the end of ORF.

5 The ORFs of PMWS-PCV-P4 and ORF10 of PMWS-PCV-P3 were 54 and 26 amino acids longer, respectively than their counterpart in the rest of our PMWS-PCV isolates.

10 Two new CT-PCV isolates (CT-PCV-P5 and -P6), which were isolated in the late 1990s, were 1768 nt long (Fig. 2). These CT-PCVs had approximately 99% nt sequence identity. Interestingly, new CT-PCV isolates also demonstrated an approximately 99% nt sequence identity with the new PMWS-PCV isolates. The genomes of PMWS-PCV-P1 and CT-PCV-P5 were identical. Both PMWS-PCV and new CT-PCV genomes encode 11 potential ORFs. The amino acid changes in the various ORFs of new CT-PCV compared to those of PMWS-PCV-P1 are listed (Table 3).

15 The genome of the old CT-PCV (CT-PCV-P7) was 1759 nucleotides long (Fig. 1). The CT-PCV-P7 genome also encoded 11 potential ORFs. The orientation and relative length of each ORF are shown in Fig. 2B.

 The numbers of amino acids and the location of each ORF of CT-PCV-P7 are shown (Table 4).

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-17-

TABLE 4. Comparison of ORF of PK-15-PCV and old CT-PCV

ORF	Coding Strand ^a	PK-15-PCV		CT-PCV-P7	
		Number of amino acids	Location (nucleotide)	Number of amino acids	Location (nucleotide)
ORF1	V	312	1019-198	-	-
ORF2	C	233	936-235	-	-
ORF3	C	206	1630-1010	-	-
ORF4	C	115	1524-1177	-	-
ORF5	V	95	376-663	-	-
ORF6	C	62	731-543	50	731-579
ORF7	V	56	883-1053	-	-
ORF8	C	37	1712-1599	-	-
ORF9	C	31	181-86	-	-
ORF10	V	37	855-968	-	-
ORF11	V	23	1620-1691	-	-

^a V indicates viral strand that is encapsidated into virus particles and C indicates the complementary strand to viral strand.

- Indicates same as the corresponding of PK-15-PCV.

The genome of CT-PCV-P7 had only approximately 72% nt sequence identity with PMWS-PCVs and both new CT-PCVs, but shared a surprising approximately 98% nt sequence identity with PK-15-PCV. Amino acid sequences of all ORFs of CT-PCV-P7 were also highly homologous to those of PK-15-PCV. Amino acid changes in various ORFs of CT-PCV-P7 compared to their counterpart in PK-15-PCV are listed (Table 3).

Meehan *et al.*, J Gen Virol 78:221-227, 1997 observed the presence of a nonanucleotide sequence at the apex of the stem loop structure of PK-15-PCV which was similar to that described in nanoviruses and geminiviruses of plants. All our PCV isolates had the conserved stem-loop structure and nonanucleotide (A/TAGTATTAC), representing the origin of rolling-circle DNA replication (Mankertz, *et al.*, Journal of Virology 71:2562-2566, 1997; Journal of General Virology 79:381-384, 1998). The potential glycosylation sites (N-X-T or N-X-S, where 'X' is any amino acid), which were

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-48-

previously reported by Hamel *et al.*, (1998), were conserved in all our PCV isolates except ORF6 of CT-PCV-P7 where the amino acid residue 'N' at number 6 was replaced with 'D'.

Phylogenetic analysis. When either the deduced amino acid sequences of individual proteins, such as the replication associated protein (ORF1/replicase/rep/coat/P35.8 protein) and the protein P27.9 (ORF2), or the nucleotide sequence of the full genome were used for phylogenetic analysis, both the distance matrix and the parsimony analyses yielded two distinct clusters of fairly similar topology. Since the differences between the strains were moderate, and the distance matrix analysis seemed to yield the more consistent data (Harrach & Benkő, Adenovirus Methods and Protocols Methods in Molecular Medicine, 21:309-339, 1998), the inventors chose to present their findings by the distance matrix analysis of the full genomes (Fig. 3).

The most evident result of the distance matrix analysis of various porcine and bovine circovirus genomes was the clear separation of the isolates into two clusters (Fig. 3). No intermediate genotypes were found though the number of the examined genomes (including the 7 new sequences) included 29, and the origin of the isolates covered geographically distant regions.

The smaller cluster (type 1) contained the isolates from the different lineages of the PK-15 cell line, and 2 circovirus strains (PMWS accession number AF012107 and CT-PCV-P7) isolated from different pathological entities (PMWS and CT). The other fairly large cluster (type 2) contained the remaining 24 isolates, including 21 from pigs with PMWS, the 2 recent CT isolates (CT-PCV-P5 & -P6) and a bovine isolate (AF109397). Based on this phylogenetic tree, the genetic relatedness of the circovirus strains seems not to be directly connected to the pathogenic ability.

Discussion

The goal of this study was to determine genetic variability in PCV associated with CT. The PMWS-PCV isolates yielded an approximately 99% nt sequence identity with each other and also 96% nt identity to PMWS-associated PCVs isolated in the U.K., Canada, France, and U.S. (Meehan *et al.*, Journal of General Virology 79:2171-2179, 1998; Morozov *et al.*, Journal of Clinical Microbiology 9:2535-2541, 1998; Hamel *et al.*, Journal of Virology 72:5262-5267, 1998; Mankertz *et al.*, Virus Research,

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-49-

6665-77, 2000) indicating that various PMWS-PCV isolates are highly homologous regardless of their place of origin.

Although the new CT-PCV isolates from the late 1990s and the old CT-PCV isolate from the late 1960s originated from neonatal pigs with CT type A2, they shared only 72% nt sequence identity. The genomes of the 2 new CT-PCVs were rather similar to the recent isolates of PMWS PCV, whereas the old CT-PCV isolate was very close to PK-15-PCV variants. Based on extensive phylogenetic calculations, different PCV isolates can be divided into 2 groups. PK-15-PCV variants, our old CT-PCV-P7 and a single uncharacterized PMWS isolate (AF012107) comprise PCV type 1 (PCV1) and the remaining 20 recent PMWS-PCVs and the 2 new CT-PCV field isolates (CT-PCV-P5 & -P6) comprise PCV type 2 (PCV2). On the basis of sequence analysis of a PK-15-PCV and 4 PMWS associated PCV isolates, a preliminary proposal to classify PK-15-PCV as PCV 1 and PMWS-PCV isolates as PCV2 was suggested (Meehan *et al.*, 1998).

PK-15-PCV (a PCV 1 isolate) was clinically nonpathogenic in inoculation studies in weaned pigs (Tischer *et al.*, Archives of Virology 91:271-276, 1986; Allan *et al.*, Veterinary Microbiology 44:49-64, 1995), whereas the CT-PCV-P7 isolate (also a PCV1) was derived from a neonatal pig with CT in the late 1960s and seemingly caused congenital tremors in progeny when inoculated into a pregnant sow at 70 days-of-gestation (Kanitz, Ph.D. Dissertation, Purdue University, 1972). It is unclear whether PK-15-PCV could also cause CT or whether CT-PCV-P7 is pathogenic in weaned pigs. The age, route of infection and/or some other factors may determine the pathogenicity and clinical manifestations of PCV 1 and PCV2. The presence of an approximate 99% nt sequence identity among the new CT-PCV and PMWS-PCV strains indicates that recent outbreaks of PMWS and CT are associated with the same type of PCV (*i.e.*, PCV2). The reported age of pigs with PMWS is 6-12 weeks (Ellis *et al.*, Canadian Veterinary Journal 39:44-51, 1998; Kiupel *et al.*, Indiana Veterinary Pathology 35:303-307, 1998; Rosell *et al.*, Journal of Comparative Pathology 120:59-78, 1999), whereas CT is a disease of newborn pigs (Stevenson *et al.*, Journal of Veterinary Diagnostic Investigations, in press). It appears that age plays a critical role in determining the type of syndrome caused by PCV. The presence of PCV2 DNA has recently been demonstrated in large numbers of neurons in brain and spinal cord of neonatal pigs with naturally occurring CT. Neural cell division occurs exclusively during fetal development. Thus, during fetal development may be the only

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-50-

period when PCV could replicate in nervous tissues leading to signs of CT, because PCV requires cell division for its replication (Tischer, *et al.*, Archives of Virology 96:39-57, 1987). When PCV2 is inoculated into germ-free pigs, lesions but not clinical disease typical of PMWS develop by 35 days postinoculation. However, when PCV2 is inoculated

5 with porcine parvovirus or porcine reproductive and respiratory syndrome virus, replication of PCV is enhanced and PMWS is reproduced (Allan *et al.*, Journal of Comparative Pathology 121, 1-11, 1999). Other viruses might enhance PCV replication by directly or indirectly causing division of PCV-target cells.

PCV1 was first identified during the 1960s and 70s (Tischer *et al.*, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, und Hygiene – Erste Abteilung Originale – Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie 226:153-167, 1974; Meehan *et al.*, Journal of General Virology 78:221-227, 1997; this study), whereas PCV2 was identified in the late 1990s (Hamel *et al.*, Journal of Virology 72:5262-5267, 1998; Meehan *et al.*, Journal of General Virology 79:2171-2179, 1998;

15 Mankertz *et al.*, Virus Research, 66:65-77, 2000). On the basis of sequence analysis, it appears that PCV2 may have derived from PCV1. However, the large phylogenetic distance between the two types and the seeming total lack of intermediates contradicts a direct and recent connection between the two types. These findings do not support a role of the PK-15 cell line as origin of a wide spread PCV infection (e.g., vaccine borne disease).

20 The cluster of type 2 PCVs includes a single bovine-origin circovirus isolate. It is unknown how widespread circoviral infection is in bovids. Based on the high similarity between this single bovine isolate and PCV2's, the tempting speculation that the two different PCV lineages previously and simultaneously evolved in porcine and bovine hosts as seen in the case of adenoviruses (Russell & Benkö, Encyclopedia of Virology, pp.

25 14-21, 1999) is contradicted. However, such PCV1 and PCV2 strain evolution may have occurred in 2 or more yet unidentified host species.

**Example II: Tissue distribution and Genetic Typing of Porcine Circoviruses
In Pigs With Naturally Occurring Congenital Tremors.**

Materials and Methods

30 ***Study design*** . Pigs less than 2 days-of-age were selected from 4 farms in the Midwestern United States that were experiencing outbreaks of disease consistent with

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-51-

CT type A2. From each farm, 2-4 pigs with CT (n = 13) and 1-2 clinically normal pigs (n = 6) were transported to Purdue Animal Disease Diagnostic Laboratory, Lafayette, IN where they were euthanized with pentobarbital. Necropsy examinations were performed and tissues were collected for testing. Samples of cerebrum, cerebellum, pons, spinal cord segments C1, C4, C7, T3, T6, T9, T12, L2, L5 and S2, lung, liver, kidney, spleen, tonsil, mesenteric and inguinal lymph nodes were collected in neutral buffered formalin or frozen at -20°C for testing.

Histopathology and in-situ hybridization. Tissues were fixed at room temperature for 24 hours then were embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin by routine methods. All tissues were evaluated for microscopic lesions. *In situ* hybridization was accomplished using a PCV oligonucleotide probe known to hybridize with both PCV1 and PCV2 as previously described (Kiupel *et al.*, Eur J Vet Pathol., 1999; Rossell *et al.*, Encyclopedia of Virology, pp. 14-21, 1999). The PCV-specific oligonucleotide was 3'-end labeled with digoxigenin (Boehringer Mannheim Biochemica, Indianapolis, IN). After deparaffinization, proteolytic digestion with 0.25% pepsin for 8 min at 105°C followed by 10 min at 37°C, washes in automation buffer and prehybridization with 100% formamide for 5 min at 105°C, hybridization was performed for 5 minutes at 105°C and 60 minutes at 37°C with a probe concentration of 5 µl/ml using a commercial workstation (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). High stringency washes were made with saline sodium citrate buffer to ensure binding of probe and target. The detection system consisted of the antidigoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase (dilution 1:500) (Boehringer Mannheim Biochemica, Indianapolis, IN) applied at 37°C for 45 min and the substrates "NBT/X-Phos" (Nitro-blue tetrazolium 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) (Boehringer Mannheim Biochemica, Indianapolis, IN). Dye reduction to insoluble blue formazan was allowed for 45, 90 and 180 min on serial sections. Controls included dot-blot slides of PCV1- infected PK-15 Cells (Stevenson *et al.*, Veterinary Pathology 36:368-378, 1999) brain, spinal cord, and lymphoid tissue from PCV2- infected Pig (Kiupel *et al.*, Indiana Veterinary Pathology 35:303-307, 1998) and from PCV-free gnotobiotic pigs. Slides incubated with hybridization solution without probe were used as negative reagent controls.

Polymerase chain reaction (PCR) testing. PCR testing of cerebellum and liver samples from all pigs was accomplished to determine the genotype of PCV as type 1

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-52-

or type 2. Controls were the same as used for *in situ* hybridization testing. Tissues were homogenized in equal volume of TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) using a tissunizer. Total cellular DNA was extracted using a standard protocol (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 1989). Primer sets were designed to be specific for PCV (Mechan *et al.*, Journal of General Virology 78:221-227, 1997) or PCV2 (Hamel *et al.*, Journal of Virology 72:5262-5267, 1998) and were used to amplify PCV sequences by PCR using Vent DNA polymerase (New England Biolab, Inc., Beverly, MA). PCR amplified DNA samples were analyzed on 1 % agarose gel by electrophoresis and the bands of the expected size were visualized with an UV transilluminator. Specificity of PCR results was confirmed by sequence analysis.

Frozen-section indirect immunofluorescent antibody testing. Samples of liver and cerebellum that had previously tested positive for PCV by *in-situ* hybridization were selected from one pig from each herd. Indirect fluorescent antibody testing was completed to confirm the presence of PCV-specific antigen. Frozen tissue sections were prepared and indirect fluorescent antibody tests were performed by routine methods using a commercially available polyclonal antibody (Morozov and Paul, Iowa State University, Ames, IA) produced against purified PCV2 raised in a rabbit at a 1:500 dilution and fluorescein-conjugated murine anti-rabbit IgG at 1:250 dilution.

Testing for other agents. Routine testing using indirect immunofluorescence for other swine viral agents, including pseudorabies virus (NYSL, Ames, IA), swine influenza virus (NYSL, Ames, IA), porcine rotavirus (NYSL, Ames, IA), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (NYSL, Ames, IA), porcine parvovirus (American Bioresearch, Sevierville, TN) and transmissible gastroenteritis virus (American Bioresearch, Sevierville, TN) was completed at Purdue Animal Disease Diagnostic Laboratory, Lafayette, IN using commercially available diagnostic tests. Samples of serum, spleen and lung were tested by virus isolation in swine primary alveolar macrophage cell cultures for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Samples of brain, spleen and tonsil were tested by direct fluorescent antibody tests and virus isolation in swine turbinate cells for pseudorabies virus. Samples of brain, spleen and tonsil were tested in swine turbinate and swine testicular cells for cytopathic viruses.

WO 01/96377

-53-

PCT/US01/19220

Results

All 4 farms experiencing outbreaks of CT purchased all replacement breeding stock from outside sources. Sources of breeding stock were different for each farm and no farms shared common genetics. On the three farms, where pigs were retained to slaughter age, there was no recent history of PMWS. All pigs with CT that were selected for study were ≤ 48 hours old and had moderate to severe tremors that were most severe when pigs attempted voluntary movements. Tremors partially abated when pigs rested. All pigs selected as age-matched, clinically normal, control pigs originated from lifters with no CT pigs. All pigs selected for testing were alert, active and otherwise clinically normal.

There were no gross or microscopic lesions in any CT or normal pigs. All tests for PRRS virus, pseudorabies virus and other cytopathic viruses were negative. PCV was demonstrated by *in situ* hybridization, PCR and IFA testing in tissues in 13 of 13 CT pigs and in 5 of 6 clinically normal pigs. Central nervous tissues and liver were the tissues most commonly infected with PCV in both CT and clinically normal pigs. *In situ* hybridization demonstrated PCV in PCV-positive pigs in the central nervous tissues of 12/13 CT and 5/6 clinically normal pigs, in the liver of 11/13 CT and 2/6 clinically normal pigs and in a lower proportion of all other tissues in CT and 5/6 clinically normal pigs. Few scattered cells that were morphologically typical of macrophages were positive in liver and other non-nervous tissues. PCV nucleic acid was only in the cytoplasm of most positive macrophages and in the nuclei of few positive macrophages. There were more PCV-positive cells in the central nervous tissues of both CT and clinically normal pigs than in other tissues. Positive cells in the brain and spinal cord were predominantly large neurons with fewer positive small neurons and rare positive oligodendrocytes. Large neurons in cerebral and medullary nuclei were positive, Purkinje cells in the cerebellum were positive and large neurons in the spinal gray matter were positive, especially lower motor neurons. Like macrophages, positive neurons usually had PCV nucleic acid only in the cytoplasm and rarely in the nucleus.

PCV infected cells in the central nervous system were more numerous and more widely distributed (Table 5) in CT pigs than in clinically normal pigs. Generally, CT pigs had large numbers of positive, large neurons diffusely distributed in the brain and spinal cord. Clinically normal pigs had fewer PCV-positive, large neurons distributed

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-54-

multifocally in the brain and spinal cord.

Table 5. Proportion of sampling sites positive for PCV by in-situ hybridization in 1-2 day-old PCV-infected pigs that had congenital tremors (CT) or were clinically normal. No. positive / No. sampling sites examined

		Cerebrum	Cerebellum	Medulla	Cervical cord	ThoracicLumbo- cord	Total sacral cord	
10	CT	9/13 (.69)	9/13 (.69)	8/13 (.62)	20/33 (.61)	20/44 (.45)	17/33 (.52)	83/149 (.56)
	Normal*	1/5 (.20)	3/5 (.60)	2/5 (.40)	1/15 (.07)	1/20 (.05)	3/15 (.20)	11/65 (.17)

15 *only the 5 clinically normal pigs that were PCV positive are included in the table, one clinically normal pig was negative for PCV with all test methods applied in this study

Indirect fluorescent antibody testing on frozen sections of cerebellum and liver from a single pig from each herd confirmed the results of *in situ* hybridization testing. PCV-specific antigens were demonstrated in approximately the same number and type of cells and in the same cellular locations as were PCV-specific nucleic acids with *in situ* hybridization. PCR testing of cerebellum and liver from all pigs demonstrated amplification of PCV2 specific sequences but not PCV1 specific sequences in all positive pigs from all 4 farms.

Discussion

25 During outbreaks of CT type A2, both clinically normal and CT pigs were infected with PCV2 at 1-2 days-of-age. It is likely that both were born virus-infected. PCV2 was widely distributed in all infected pigs and was most common in central nervous tissues.

30 However, there were many more PCV-infected cells in the brain and spinal cord of CT pigs when compared to clinically normal pigs due to more diffuse distribution and a larger proportion of infected cells. The most commonly infected cells were large neurons in the brain and spinal cord and macrophages in non-neural tissues. Few

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-55-

oligodendrocytes were infected.

Previous studies have demonstrated that CT pigs are born with deficient myelin in the brain and spinal cord (Christensen, Nord Veterinaarmed 8:921-943, 1956). Other studies demonstrated that CT pigs had abnormally immature myelin composed of disproportionately low cerebroside and high cholesterol esters relative to age-and-genetically matched normal control pigs (Patterson, J Neurochem 26:481-485, 1976). The hypothesis prior to this study was that oligodendrocytes would be the primary cell infected with PCV in the CNS accounting for reduced and abnormal myelin synthesis. The finding of large numbers of PCV-infected neurons in the brain and spinal cord was surprising and may be a significant cause of CT apart from, or in addition to, myelin deficiency. Previous studies determined that the degree of myelin deficiency in CT pigs was variable and not closely correlated with the severity of tremors (Fletcher, J Am Vet Med Assoc 29(12):2255-2262, 1968). This finding suggests that dysmyelinogenesis alone cannot account for CT. In one study, surgical ablations were performed on the nervous system of CT and control pigs including decerebration, unilateral labyrinthectomy, unilateral rhizotomy of lumbosacral roots and transection of the thoracic spinal cord and it was determined by post-surgical neurological examinations that the cause of tremors is located at the spinal cord level. Others determined that the spinal reflex in CT pigs is monosynaptically hyperexcitable (Stromberg, Am J Vet Res 20:319-323, 1959). It may be that PCV infection of motor neurons in the spinal cord has a direct affect on function, rendering them more excitable and thus influencing spinal reflex arcs.

The paucity of PCV2-infected oligodendrocytes does not support the hypothesis of dysfunction of PCV2-infected oligodendrocytes as the cause of myelin deficiency in CT type A2. However, the inventors did not confirm myelin deficiency in these pigs, so it is possible that none existed. In addition, previous PCV-induced loss and removal of oligodendrocytes in these pigs cannot be ruled out. The granulomatous inflammatory reaction that is associated with PCV2 infection in pigs with PMWS was not observed in any PCV2-infected tissues of these CT pigs. The reason for a lack of inflammation is not clear, but *in utero* infection with PCV might induce immunotolerance.

Example III: Congenital transmission of PCV2

Methods

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-56-

Eight pregnant high parity sows from a high-health-status commercial swine farm, seronegative to porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV), were used to produce caesarian-derived/colostrums-deprived (CD/CD) pigs. All sows were moved into isolation rooms at Purdue University prior to 90 days of gestation and on day 94 of gestation 4 sows were inoculated intramuscularly and intranasally with 1.0 ml (10⁷ TCID₅₀/ml) of tissue culture-adapted PCV2 (PMWS-PCV-P4). Caesarian surgery followed by euthanasia was performed on the 4 PCV inoculated sows and 4 non-PCV-inoculated sows on day 114 of gestation to produce PCV2 congenitally exposed CD/CD pigs (C+ pigs) and PCV2 congenitally free CD/CD pigs (C- pigs). Necropsy examinations were performed on sows and samples of serum, brain, spinal cord, liver, lung, spleen, tracheobronchial lymph node and inguinal lymph node were collected for testing for various porcine viruses. Three neonatal pigs from each litter were euthanized 3 days after birth. The remaining neonatal pigs were used in an experiment to produce lesions of PMWS. Complete necropsy examinations of euthanized pigs and pigs that died during the first 2 weeks after caesarian section were performed. Samples of brain, spinal cord, liver, lung, kidney, spleen, tonsil, bone marrow, thymus, tracheobronchial lymph node and inguinal lymph node were collected from each pig and preserved at -20°C and or in neutral buffered formalin (except serum and blood). Histopathology and PCV *in-situ* hybridization were completed on all tissues to evaluate microscopic lesions and PCV distribution. PCV2 PCR was performed on selected pooled samples.

Results

Fifteen pigs derived from 4 C+ sows died and 3 more pigs were euthanized during the first 2 weeks after caesarian section. Four pigs that died during the first 3 days and one additional piglet that was born dead, had dome shaped heads, were small, weak and had difficulties to orientate themselves in their environment. All other 11 C+ pigs lacked vigor and several died due to bacterial septicemia. Generally, C+ pigs lacked vigor and failed to thrive for the first 2 weeks after birth compared to C- pigs. No gross lesions characteristic of PMWS were identified in 19 C+ pigs that were necropsied during the first 3 weeks of the study.

Microscopically, 8 C+ pigs that died during the first 3 weeks of age had a severe interstitial pneumonia suggesting of bacterial septicemia. No other microscopic lesions were found in these pigs. Sections of lymph nodes from 5 of the C+ pigs that died

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-57-

during the first 3 weeks of age, sections of liver from 1 pig, sections of lungs from 2 pigs, and sections of heart from 1 pig were suspect for PCV2 by in-situ hybridization. Pools of lymphoid tissues including spleen, tonsils, bronchial, and mesenteric lymph nodes from individual pigs were positive for PCV2 by PCV in 7 of 19 C+ pigs. Samples of lung, spleen, and bronchial lymph node from all C+ pigs were negative by virus isolation and FA tests for pseudorabies virus (PRV), swine influenza virus (SIV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine parvovirus (PPV) or transmissible gastroenteritis virus (TGEV). The available blood samples from 3 of the C+ pigs that bled during the first 3 weeks of age were serologically negative for PCV2 and for PPV. The PCV2 inoculum was found to be contaminated with PPV.

Discussion

These results suggest PCV2 can be transmitted from an infected sow to its litter. PCV2 alone or in combination of a co-factor could be congenitally transmitted.

Example IV: Raising PCV-specific Antibodies in Rabbits

The open reading frames (ORFs) representing PMWS-PCV-P1 ORF1 (314R), PMWS-PCV-P1 ORF2 carboxy region (129R), CT-PCV-P6 ORF3 (104R), CT-PCV-P6 ORF4 (59R), CT-PCV-P7 ORF2 (carboxy part) were amplified by PCR using suitable primers. PCR products were inserted into a bacterial expression and purification vector pBT30a that drives the expression of the foreign insert fused to the histidine cassette. Expression of PCV proteins in bacteria was very efficient suggesting that these ORFs have the potential to code for functional proteins. PCV-specific proteins as fusion proteins were purified by Ni++ affinity chromatography. These purified proteins were used to immunize rabbits to raise antibodies.

Example V: Development of ELISA to screen for PCV2 antibody

The inventors have more particularly developed an ELISA assay for screening pig sera to detect antibody against PCV2 by using bacterially expressed PMWS-PCV-P1 ORF2 carboxy-portion purified protein to coat the plates.

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-58-

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

It is further to be understood that all values are approximate, and are provided for description.

All patents, patent applications, publications, and other materials cited herein are hereby incorporated herein reference in their entireties.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-39-

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. An isolated nucleic acid from a porcine circovirus (PCV), which
2 nucleic acid has a sequence that is identical to a sequence selected from the group
3 consisting of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.
- 1 2. A nucleic acid comprising the isolated nucleic acid of claim 1.
- 1 3. An isolated nucleic acid from porcine circovirus (PCV), which
2 nucleic acid comprises a sequence coding for a circovirus polypeptide having a sequence
3 selected from the group consisting of sequences coded by any of ORF1 to ORF11 of any
4 of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.
- 1 4. The nucleic acid of claim 3 having a nucleotide sequence selected
2 from the group consisting of sequences ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ
3 ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.
- 1 5. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 3
2 operatively associated with an expression control sequence.
- 1 6. A vaccine comprising the expression vector of claim 5 and a
2 pharmaceutically acceptable excipient.
- 1 7. A host cell comprising the expression vector of claim 5.
- 1 8. A method for producing a PCV protein, which method comprises
2 culturing a host cell of claim 7 under conditions that result in expression of the nucleic
3 acid coding for a circovirus protein.
- 1 9. The method according to claim 8, wherein the PCV protein has an
2 amino acid sequence selected from the group consisting of sequences coded by any of
3 ORF1 to ORF11 of sequences added by any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-60-

- 3 ORF1 to ORF11 of sequences added by any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID
4 NO. 7.
- 1 10. The isolated polypeptide from a porcine circovirus (PCV) which has
2 a sequence selected from the group consisting of sequences coded by any of ORF1 to
3 ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO. 1 to SEQ ID NO. 7.
- 1 11. A vaccine comprising the isolated polypeptide of claim 10 and an
2 adjuvant.
- 1 12. An isolated porcine circovirus strain, which has a genome
2 comprising a sequence selected from the group consisting of sequences of SEQ ID NO. 1
3 to SEQ ID NO. 6.
- 1 13. The porcine circovirus of claim 12 which is attenuated, inactivated,
2 or killed.
- 1 14. A vaccine comprising a porcine circovirus of claim 13 and an
2 adjuvant.
- 1 15. A method of diagnosing a pathological cause of congenital tremors
2 in a pig, which method comprises determining whether the pig has been infected by a
3 porcine circovirus strain of type 1 or type 2.
- 1 16. The method according to claim 15, wherein the porcine circovirus
2 has a genome comprising a sequence selected from the group consisting of sequences SEQ
3 ID NO:1 to SEQ ID NO:6.
- 1 17. A method of diagnosing a pathological cause of congenital tremors
2 in a pig, which method comprises determining whether the pig has been infected by a
3 porcine circovirus strain has a genome comprising a sequence selected from the group
4 consisting of sequences SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-61-

1 18. The method according to claim 17, wherein the determination of the
2 infection is effected by detecting the presence of a PCV nucleic acid in a biological sample
3 from the pig.

1 19. The method according to claim 18, which comprises detecting
2 hybridization of an oligonucleotide of at least about 20 bases that has a sequence found in
3 20 contiguous bases of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6 or a complement thereof.

1 20. The method according to claim 17, wherein the determination of the
2 infection is effected by detecting the presence of a PCV polypeptide in a biological sample
3 from the pig.

1 21. The method according to claim 20, which comprises detecting
2 binding of an antibody that specifically binds a polypeptide which has a sequence selected
3 from the group consisting of sequences coded by any of ORF1 to ORF11 of any of the
4 sequences of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6.

1 22. The method according to claim 17, wherein the determination of the
2 infection is effected by detecting the presence of antibodies directed against a PCV
3 polypeptide in a biological sample of the pig.

1 23. An antibody directed against the polypeptide of claim 10.

1 24. A method for the prevention or treatment of congenital tremors in a
2 pig or its progeny, which method comprises administering to a pig in need of such
3 treatment an immunoprotective amount of a vaccine comprising an immunogenic
4 polypeptide of a type 1 or type 2 PCV strain and an adjuvant.

1 25. The method according to claim 24 wherein the PCV polypeptide has
2 an amino acid sequence selected from the group consisting of sequences coded by any of
3 ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6.

WO 01/96377

PCT/US01/19220

-62-

1 26. A method for the prevention or treatment of congenital tremors in a
2 pig or its progeny, which method comprises administering to a pig in need of such
3 treatment an immunoprotective amount of a vaccine comprising an immunogenic
4 polypeptide that has an amino acid sequence selected from the group consisting of
5 sequences coded by any of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO:1 to
6 SEQ ID NO:6 and an adjuvant.

1 27. A method for the prevention or treatment of congenital tremors in a
2 pig or its progeny, which method comprises administering to a pig in need of such
3 treatment an immunoprotective amount amount of a PCV nucleic acid that encodes an
4 immunogenic polypeptide of a type 1 or type 2 PCV strain, with a pharmaceutically
5 acceptable carrier.

1 28. The method according to claim 27 wherein the PCV polypeptide
2 has an amino acid sequence selected from the group consisting of sequences coded by any
3 of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6.

1 29. A method for the prevention or treatment of congenital tremors in a
2 pig or its progeny, which method comprises administering to a pig in need of such
3 treatment an immunoprotective amount amount of a PCV nucleic acid that encodes an
4 immunogenic polypeptide that has an amino acid sequence selected from the group
5 consisting of sequences coded by any of ORF1 to ORF11 of any of the sequences of SEQ
6 ID NO:1 to SEQ ID NO:6 with a pharmaceutically acceptable carrier.

1 30. A method for the prevention or treatment of congenital tremors in a pig
2 or its progeny, which method comprises administering to a pig in need of such treatment
3 an immunoprotective amount of an antibody of claim 23.

1 31. A method of culturing a porcine circovirus strain, which method
2 comprises introducing a nucleic acid comprising a sequence selected from the group
3 consisting of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6 into a suitable host cell under conditions that

WO 01/46377

PCT/US01/19220

-63-

4 result in the production of porcine circovirus particles having a genome that comprises a
5 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:6.

1 32. The method according to claim 31, wherein the host cell is a PK-15
2 cell.

1 33. The method of claim 31, wherein the nucleic acid is introduced in
2 the form of a cloned double-stranded DNA.

PCCT/US01/19220

Figure 1

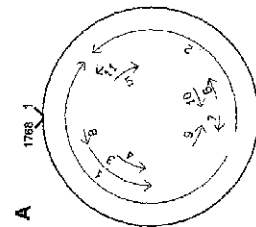
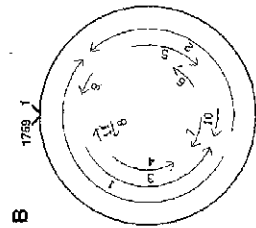
WO 01/96377

2/16

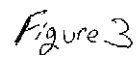
PCT/US01/19220

491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547
 548
 549
 550
 551
 552
 553
 554
 555
 556
 557
 558
 559
 560
 561
 562
 563
 564
 565
 566
 567
 568
 569
 570
 571
 572
 573
 574
 575
 576
 577
 578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585
 586
 587
 588
 589
 590
 591
 592
 593
 594
 595
 596
 597
 598
 599
 600
 601
 602
 603
 604
 605
 606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624
 625
 626
 627
 628
 629
 630
 631
 632
 633
 634
 635
 636
 637
 638
 639
 640
 641
 642
 643
 644
 645
 646
 647
 648
 649
 650
 651
 652
 653
 654
 655
 656
 657
 658
 659
 660
 661
 662
 663
 664
 665
 666
 667
 668
 669
 670
 671
 672
 673
 674
 675
 676
 677
 678
 679
 680
 681
 682
 683
 684
 685
 686
 687
 688
 689
 690
 691
 692
 693
 694
 695
 696
 697
 698
 699
 700
 701
 702
 703
 704
 705
 706
 707
 708
 709
 710
 711
 712
 713
 714
 715
 716
 717
 718
 719
 720
 721
 722
 723
 724
 725
 726
 727
 728
 729
 730
 731
 732
 733
 734
 735
 736
 737
 738
 739
 740
 741
 742
 743
 744
 745
 746
 747
 748
 749
 750
 751
 752
 753
 754
 755
 756
 757
 758
 759
 760
 761
 762
 763
 764
 765
 766
 767
 768
 769
 770
 771
 772
 773
 774
 775
 776
 777
 778
 779
 780
 781
 782
 783
 784
 785
 786
 787
 788
 789
 790
 791
 792
 793
 794
 795
 796
 797
 798
 799
 800
 801
 802
 803
 804
 805
 806
 807
 808
 809
 810
 811
 812
 813
 814
 815
 816
 817
 818
 819
 820
 821
 822
 823
 824
 825
 826
 827
 828
 829
 830
 831
 832
 833
 834
 835
 836
 837
 838
 839
 840
 841
 842
 843
 844
 845
 846
 847
 848
 849
 850
 851
 852
 853
 854
 855
 856
 857
 858
 859
 860
 861
 862
 863
 864
 865
 866
 867
 868
 869
 870
 871
 872
 873
 874
 875
 876
 877
 878
 879
 880
 881
 882
 883
 884
 885
 886
 887
 888
 889
 890
 891
 892
 893
 894
 895
 896
 897
 898
 899
 900
 901
 902
 903
 904
 905
 906
 907
 908
 909
 910
 911
 912
 913
 914
 915
 916
 917
 918
 919
 920
 921
 922
 923
 924
 925
 926
 927
 928
 929
 930
 931
 932
 933
 934
 935
 936
 937
 938
 939
 940
 941
 942
 943
 944
 945
 946
 947
 948
 949
 950
 951
 952
 953
 954
 955
 956
 957
 958
 959
 960
 961
 962
 963
 964
 965
 966
 967
 968
 969
 970
 971
 972
 973
 974
 975
 976
 977
 978
 979
 980
 981
 982
 983
 984
 985
 986
 987
 988
 989
 990
 991
 992
 993
 994
 995
 996
 997
 998
 999
 1000

Figure 1



Figures 2A and 2B



five 4

[illegible]

Figure 4

[illegible]

Figure 5.

PCT/US01/19220

Figure 6

PCT/US01/19220

Figure 7

[illegible]

WO 01/96377

PCT/US01/19220

10/16

Emas-Rev-PL-Orf5	NAVIFPHLGM	MGVFKIKFS	LYIHGYTDIV	VLEVPTVFER	SAAYVVIIS	RGLIS
Emas-Rev-P3-Orf5	NAVIFPHLGM	MGVFKIKFS	LYIHGYTDIV	VLEVPTVFER	SAAYVVIIS	RGLIS
Ce-Rev-P3-Orf5	NAVIFPHLGM	MGVFKIKFS	LYIHGYTDIV	VLEVPTVFER	SAAYVVIIS	RGLIS
Emas-Rev-P3-Orf5	NAVIFPHLGM	MGVFKIKFS	LYIHGYTDIV	VLEVPTVFER	SAAYVVIIS	RGLIS
Ce-Rev-P6-Orf5	NAVIFPHLGM	MGVFKIKFS	LYIHGYTDIV	VLEVPTVFER	SAAYVVIIS	RGLIS
Emas-Rev-Orf5	NAVIFPHLGM	MGVFKIKFS	LYIHGYTDIV	VLEVPTVFER	SAAYVVIIS	RGLIS

Figure 8

Figure 10

Pmws-Pcv-P1-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P2-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P3-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P4-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P5-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P6-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P7-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P8-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P9-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2
Pmws-Pcv-P10-Orf9	MMLGSASSIL	LAGHVAAEVL	PRCCCRSAL	VILTARPER	QLQ2

Figure 12

PCT/US01/19220

15/16

Figure 13

WO 01/96377

16/16

PCT/US01/19220

Rms-Pcv-P2-Orf11	NNNNHYEV1	KKTO14
Ct-Pcv-P6-Orf11	NNNNHYEV1	KKTO14
Rms-Pcv-P1-Orf11	NNNNHYEV1	KKTO14
Rms-Pcv-P3-Orf11	NNNNHYEV1	KKTO14
Ct-Pcv-P5-Orf11	NNNNHYEV1	KKTO14

Figure 14

WO 01/46377

PCT/US01/19220

SEQUENCE LISTING

<110> Suresh Kumar Mittal
 Gregory Wayne Stevenson
 Jiwon Choi
 Matti Kiupel
 Charles Lee Kanitz

<120> DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROCTINB
 CIRCOVIRUS ASSOCIATED CONGENITAL TREMORS AND OTHER DISORDERS

<130> 3759/2J429-WO

<150> 60/211,710

<151> 2000-06-15

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1762

<212> DNA

<213> PMNS-PCV-F1

<400> 1
 attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatggtaact cctcaactgc tgtccagct 60
 gtagaagctc tctatccgag gattacttcc ttggatattt ggaagaatgc tacagaacaa 120
 tccatggagg aagggggcca gttctcacc atttccccc catgcccctga atttccatat 180
 gaaataaatt actgagtcct tttatcact tctgaatggt ttttattttt catttagggg 240
 ttaagtgggg ggtccttaag attaaattct ctgaattgta catacatggt tacacggata 300
 ttgtagtcct ggtcgtattt actgttttcc aacgcagtcg cgaagccctac gtggtccaca 360
 ttcttagagg ttgttagcct cagcccaagc tgatttcttt tgttatttgg ttggaagtaa 420
 tcaatagtcg actcaagaa acggtttggg gtgaagtaac ggaagtggtg ggcgaagggc 480
 tggcgatttg tatggcgagg gaagtagtth acataggggt cataggttag ggcattgggc 540
 ttgtgacaa agttatcttc tagaataaca gcagtggagc ccactccctc atcacccctg 600
 gtgatggggg agcagggcca gaattcaacc ttaacttttc ttattctgta gtattcaag 660
 ggtatagaga ttctgttgtt ccccccctcc gggggaacaa agtctgcaag cttaatcttc 720
 atcatgtcca ccgccacaga gggcggttgt actgtggtac gcttgacagt atatacgaag 780
 gtgcgggaga ggcgggtgtt gaagatgcca tttttccttc tccaaacgtg gggggggtgg 840
 acgagccagg ggcggggcgg gaggatctgg ccaagatggc tgcggggcgg gtgctctctt 900
 ctgcggtaac gctcctttgg atactcata gctgaacacg aaagaagtcg gctgtaagta 960
 ttaccagcgc acttcggcag cggcagcacc tcggcagcac ctacagcaga acatgcccag 1020
 caagaagaat ggaagaagcg gaccccaacc acataaagg tgggtgtcca cgtgaataa 1080
 tccctccgaa gacgagcgca ataaaatacg ggagctccca atctccctat ttgattattt 1140
 tattgttggc gaggagggtg atgaagaaag acgaacacct caccctcagg ggttcgttaa 1200
 ttctgtgaag aagcaacct ttaataaagt gaagtggat ttgggtgccc gctgacacat 1260
 cgaagaagcc aaaggaactg atcagcagaa taagaatat tgcagtaaac aaggcaactt 1320
 acttattgaa tgtggagctc ctgcattcca aggaacaagg agtgaactgt ctactgctgt 1380
 gagtaccltg ttggcagggc ggaagtctgt gaccgttgca gacgagcacc ctgtaacgtt 1440
 tgtcagaagt ttccgcggcg tggctgaact ttgaaagtg agcgggaaaa tgcagaagcg 1500
 tgattggaag accaatgtac acgtcattgt ggggccaact ggtgtggtg aaagcaaatg 1560
 ggctgctaatt ttgcagacc cggaaaccaa atactggaaa ccaactgaga acaagtgggt 1620
 ggatggttac catggtgaag aagtgggtgt tattgatgaa ttttatgggt ggcgtccgtg 1680
 ggatgatcta ctgagactgt gtgatcgata tccattgact gtgagacta aaggtggaac 1740
 tgtacclttt ttggcccgca gt 1762

<210> 2

WO 01/46377

PCT/US01/19220

<211> 1768
 <212> DNA
 <213> PMWS-PCV-P2

<400> 2
 attctgattt ccagcaatca gaccccggtg gaattggaact cctcaactgc tgtccagct 60
 gttagagctc tctatcgagg gattactctc ttgttatctt ggaagaaatg tacagaacaa 120
 tccagggagg aagggggcca gtctgtcacc ctttccccc cctgcctcga ctctccatct 180
 gaataaattt actgagtcct ttatatacct cagcaatggt ttattatttt catctagcgt 240
 ttatgtgggt ggtctttaag attaaattct ctgaattgta catcaatggt tacacggata 300
 ttgtatgctt ggtctgattt actgttttcg aacgcagtgc cagggcctac gtgttccaca 360
 ttctatagag ttgtatgctt cagccaaagc tgattctctt tgttatcttg ttggaagtaa 420
 tcaatagctg actcaagaac aggtttgggt gtgaagtaac ggcagtggtt ggaagaagggt 480
 tgggggagtg tatggcgagg ggaatagttt acatatgggt cataggttag ggtgtgtctc 540
 tttygaataa agttatcacc tagaataaca gcagtggagc ccaatccctt atcacctcgg 600
 gtgtatgagg agcaggggcca gaattcaacc ttaacctttc ttattctgta gtattcaagg 660
 ggtatagaga ttctgttgtt ccccccctcc gggggaaaca agtctgaat cgttaattct 720
 atcatgtcca cggcccgagg gggcgttgtt actgttgttg ccttgacagt atatcgaag 780
 gtgcgggaga ggggggtgtt gaagatgcca ttctctcttc tccaaaggta cgggtggcgg 840
 ggttggaaga gccagggggg gggcgggagg atctggccaa gttggctcgg gggcggtgt 900
 ttctctctgc ggtacggcct ccttggtatc gtctatagct aaaaagaaag aagtggctgt 960
 taagtattac cagcgacact ggggaaggcg agcaactcgg cagcaactca gacgaacat 1020
 ggcacgcaag aagaatgaaa gaagcggacc ccaacccact aaaaagtggt tgttcaagct 1080
 gaaatactct tccgaagagc agcgcaagaa aatacgggag ctcccactct ccttatttga 1140
 ttattttatt gttggcgagg aggttaatat ggaaggaaga acacccacc tccaggggtt 1200
 cgttaatttt ttgaagaagc aactctttta taagtgtag ttgtattcgg gtgcgcgtgt 1260
 cccacacgag aagcccaag gactgatca gcagaataaa gaattattga gtaagaaggt 1320
 caacttactt attgaalgtc gactgtctcg atctcaagga caagggagtg acctgtctac 1380
 tgcgtgtagt acctgttgtt agagcgggag tctgttgacc gttgcaagag agcacctgt 1440
 aagcttctgc agaaalttcc gggggtggc tgaacttttg aagtgagcg gaaaatgca 1500
 gaagcgtgat ttgaagacca ctgtacacgt cattgtgggg ccaactgggt gtggttaaa 1560
 caaatgggct gctaattttg cagacccgga aaccaatcac tgaataccac ctgacaccaa 1620
 gtgggggggt ggttaacctg gtgaagaagt ggtgtttatt gatgaacttt atggtcgtgt 1680
 ggcgtgggat gttctactga gactgtgtga tctgatatca ttgactgtag agactaaagg 1740
 ttgaactgta ccttttttgg cagcagat 1768

<215> 3
 <211> 1768
 <212> DNA
 <213> PMWS-PCV-P3

<400> 3
 attctgattt ccagcaatca gaccccggtg gaattggaact cctcaactgc tgtccagct 60
 gttagagctc tctatcgagg gattactctc ttgttatctt ggaagaaatg tacagaacaa 120
 tccagggagg aagggggcca gtctgtcacc ctttccccc cctgcctcga ctctccatct 180
 gaataaattt actgagtcct ttatatacct tegttaattt ttattatttt catctagcgt 240
 ttatgtgggt ggtctttaag attaaattct ctgaattgta catcaatggt tacacggata 300
 ttgtatgctt ggtctgattt actgttttcg aacgcagtgc cagggcctac gtgttccaca 360
 ttctatagag ttgtatgctt cagccaaagc tgattctctt tgttatcttg ttggaagtaa 420
 tcaatagctg actcaagaac aggtttgggt gtgaagtaac ggcagtggtt ggaagaagggt 480
 tgggggagtg tatggcgagg ggaatagttt acatatgggt cataggttag ggcattggcc 540
 ttgtgttcca agttatcacc tagaataaca gcagtggagc ccaatccctt atcacctcgg 600
 gtgtatgagg agcaggggcca gaattcaacc ttaacctttc ttattctgta gtattcaagg 660
 ggtatagaga ttctgttgtt ccccccctcc gggggaaaca agtctgaat cgttaattct 720
 atcatgtcca cggcccgagg gggcgttgtt actgttgttg ccttgacagt atatcgaag 780
 gtgcgggaga ggggggtgtt gaagatgcca ttctctcttc tccaaaggta cgggtggcgg 840
 ggttggaaga gccagggggg gggcgggagg atctggccaa gttggctcgg gggcggtgt 900
 ctctctctgc ggtacggcct ccttggtatc gtctatagct aaaaagaaag aagtggctgt 960
 taagtattac cagcgacact ggggaaggcg agcaactcgg cagcaactca gacgaacat 1020
 ggcacgcaag aagaatgaaa gaagcggacc ccaacccact aaaaagtggt tgttcaagct 1080

WO 01/46377

PCT/US01/19220

```

gaataatcct tccgaagacg agcgcaagaa aatacgggag ctcccaatct cccattttga 1140
ttattttatt gttggcgagg aggttaalga ggaaggacga acacccaccc tccagggttt 1200
cgctaatttt gtgaagaagc aaactttcaa taagtgagag tggcatttgg gtcgccgctg 1260
ccacatcgag aaagccaaag gaactgatca gcagataaaa gaattattga glaaagaayg 1320
caacttaact attgaatgtg gagctcctcg atctcaagga caacggagtg acctgtctac 1380
tgctgtgagt acottgttgg agagcgaggag totggtgacc gttgcagagc agcacccctgt 1440
aacgtttgtc agaaatttcc gcgggtgtgc tgaatttttg aaagtgaagc ggaataatgc 1500
gagcgtgatg tggagagccc atgtacacgt ctttgggggg ccactcgggt slggtatagc 1560
caaatgggct gtaatttttg cagacccgga aacaaataac tggaaacccc ctgaaacaaa 1620
gtgtgtggat ggttaacatg gtgaagagct ggttgttatt gatgaatttt atgctgtgct 1680
gcgtgtggat gatctactga gactgttga togatatcca ttgaatgtag agactaaagg 1740
tggaacltga ccttttttgg cccgcagt 1768

```

<210> 4

<211> 1768

<212> DNA

<213> FMS-PCV-P4

<400> 4

```

attctgatta ccagcaatca gaacccgttg gaattgtact cctcaactgc tgtcccgagt 60
gtagaagctc tctatcggag gattactctc ttggtatttt ggaagaatgc tacagaacaa 120
tccagggagg aaagggggca gtttgcacac ctttccccc ccctgcctga atttccatat 180
gaataaatat acagagcttt ttttatcaat togtaatggt ttttattatt cacttagggg 240
ttaagtgggg ggtctttaa attaaatctc ctgaatttga cttacatggt taacaggata 300
ttgaagctcc gtttgtattt actgttttgc aacycagtgc cggggccctac tggctctaca 360
tttctagagg ttgtatactc catccaaagc tgattccttt tgttatttgg ttggaagtaa 420
tcaatagtggt atccaagac aggtttgggt gtaagtaaac gggagtggtt ggaagaggtt 480
tgggggattg tatggcgagg gagtagtttt acataaggggt nataggttag ggtgagggcc 540
tttgtacaaa agttatcctc tagantaaac gcaagtggag ccaactccctc atcacctcgg 600
gtgatggggg agcaggggca gaattcaacc tttaacttttc ttattctgta gtattcaaaag 660
ggtatagaga ttttgttgtt ccccccctcc gggggaacaa agtcgtcaat attaaatctc 720
atcctgtcca ccgcccagga gggcgttgtg actgtgttag ccttgaacgt atatccgaag 780
gtgcgggaga ggcgggtgtt gaagatgcca ttttcccttc tcccaaggta cgggtggggt 840
gggtggagga gccagggggc gacagggagg atctggcaca gttggctggc gggcgctgtg 900
cttctctcgc gtttaacgct ccttggatac gttatagctg aaagcgaaag aagtgggtg 960
taaglataac cagcgccttt cggcaggggc agcaactcgg cagcaactca gaaacaaat 1020
gcccaacaaa aagaatgaaa gaagcgagac caaacacat aaagggtggg tgttcaagct 1080
gacaaatcct tccgaagacg agcgcaagaa aatacgggag ctcccaatct cctatttga 1140
ttattttatt gttggcgagg aggttaalga ggaaggacga acacccaccc tccagggttt 1200
cgctaatttt gtgaagaagc aaactttcaa taagtgagag tggcatttgg gtcgccgctg 1260
ccacatcgag aaagccaaag gaactgatca gcagataaaa gaattattga glaaagaayg 1320
caacttaact attgaatgtg gagctcctcg atctcaagga caacggagtg acctgtctac 1380
tgctgtgagt acottgttgg agagcgaggag totggtgacc gttgcagagc agcacccctgt 1440
aacgtttgtc agaaatttcc gcgggtgtgc tgaatttttg aaagtgaagc ggaataatgc 1500
gagcgtgatg tggagagccc atgtacacgt ctttgggggg ccactcgggt slggtatagc 1560
caaatgggct gtaatttttg cagacccgga aacaaataac tggaaacccc ctgaaacaaa 1620
gtgtgtggat ggttaacatg gtgaagagct ggttgttatt gatgaatttt atgctgtgct 1680
gcgtgtggat gatctactga gactgttga togatatcca ttgaatgtag agactaaagg 1740
tggaacltga ccttttttgg cccgcagt 1768

```

<210> 5

<211> 1768

<212> DNA

<213> CT-PCV-P5

<400> 5

```

attctgatta ccagcaatca gaacccgttg gaattgtact cctcaactgc tgtcccgagt 60
gtagaagctc tctatcggag gattactctc ttggtatttt ggaagaatgc tacagaacaa 120
tccagggagg aaagggggca gtttgcacac ctttccccc ccctgcctga atttccatat 180
gaataaatat acagagcttt ttttatcaat togtaatggt ttttattatt cacttagggg 240

```

WO 01/46377

PCT/US01/19220

```

ttaagtgggg ggtctttaag aataaattct ctgaattgta catatcaggt tacanggata 300
ttgtagtcc ggtcgtatct actgttttct aacgcagtc cgaagccatc gtgtccaca 360
tttctagagg ttgtagcct cagccaaagc tgattccctt ttttttllgg ttggaagtaa 420
tcaatagtg aglcaagacc aggtttgggt gtgaagtaac ggaagtgga ggaagagggt 480
tgggggattg tatggcgagg ggaagtattt acatattgggt cataggttag ggcattgguc 540
tttggtaaca agttatcac tagaataaca gcaatggagc caactccct atcaccttg 600
gtgatgggg agcagggcca gaattcaacc ttacotttto ttattctgta gttatccaa 660
gttatagag ttgttttgg ccccccctcc ggggggacaa agtcgtcag gttaaatct 720
ataatgtcca ccgcacagg gggcggttgc aatgtgttgc gcttgacag alatatcga 780
gtgcgggga ggcgggaggt gaagatgcaa tttttcttc tccacggga ggcgtggcg 840
gggtgggga gcnaggggcg ggcgggaggt atctggccaa gatggctgg gggcggtgt 900
cttctctgc ggttaacgct ccttggatac gtcatagctg aacacgaaag agtgcgctg 960
taagtattc ccgcacctt cggcagcgcc agcacctcg cagcacctca gacgaacat 1020
gcccagcaag aagaatggaa gaagcgagcc caaacacat aaaaagtgg tgttaccgt 1080
gaataatct tccgaagag agcgcaagaa aatacgggag ctcccatct cctatttga 1140
ttattttatt ttggcgagg aggttaatga ggaaggagca aacatccac tccaggggt 1200
cgctatttt gtgaagagc aaactttca taaagtgaag tggattttg gtgcctctg 1260
cccatcgag aagccaaag gaactgatac gcaagataaa gaattttgc gtaagaagg 1320
caacttact attgaatgt gagctcctgc atctcaggga caaggagtg acctgtctac 1380
tgctgtgag accttcttgg agacgggag tctgttgacc gttycagag agcacctgt 1440
aacgtttgtc agaatcttc ggcggcgag tgaactttg ggaagtgga ggaagtgga 1500
gaagctgtg ttgaagacca atgtatcagg caactgggt caactgggt ggaagtgga 1560
caactgggt gctaatctt cagaacggga aacacatac tggaaacac ctgaaacaa 1620
gkgtlggat gtttccatg gtgaagaggt ggttcttatt gatlgaattt atgtgctgt 1680
gcctlggat gattctatga gacttctgta tctatctca ttgacttag agcataagg 1740
tggaaatgta ccttttttgg ccgcagtc 1768

```

<210> 6

<211> 1768

<212> DNA

<213> CT-PCV-P6

<400> 6

```

attctgatca ccagacatca gacccggttg gaattgtact cctcaactgc tgtccagct 60
gtacagagtc tctatccagg gattatcttc ttgtattttt cgaagaatgc tacagaaca 120
tccacggagg aagggggccc gttcgtccac ctttccccc cgtgacatga atttccatct 180
gaatkaatt actgagctct ttttatcact ttgtaatggt ttttattatt tattttaggt 240
ttaagtgggg gctctttaag attaatctct ctgaattgla catatctgti tacacggata 300
ttgtagtcc ggtcgtatct actgttttct aacgcagtc cgaagccatc gtgtccaca 360
tttctagagg ttgtagcct cagccaaagc tgattccctt ttttttllgg ttggaagtaa 420
tcaatagtg agtcaagaac aggtttgggt gtgaagtaac ggaagtgga ggaagagggt 480
tgggggattg tttggcgagg ggaagtattt acatattgggt cataggttag ggcattgguc 540
tttggtaaca agttatcac tagaataaca gcaatggagc caactccct atcaccttg 600
gtgatgggg agcagggcca gaattcaacc ttacotttto ttattctgta gttatccaa 660
ggtatagaga ttttcttgg cccccctcc gggggacaaa agtcytcag attaatctc 720
atcatgtcca ccgcacagg gggcggtgt actgttgacc gtttgacagt atactcgag 780
gtcggggaa ggcgggaggt gaagatgca attttcttc tccaaaggta cgggtggcg 840
gggtgggga gccagggag ggcgggaggt atcggccaa gatggctgc gggcggtgt 900
cttcttctgc gtlcaagcct ccttggatac gtcatagctg aacacgaaag agtgcgctg 960
taagtattc ccgcacctt cggcagcgcc agcacctcg cagcacctca gacgaacat 1020
gcccagcaag aagaatggaa gaagcgagcc caaacacat aaaaagtgg tgttaccgt 1080
gaataatct tccgaagag agcgcaagaa aatacgggag ctcccatct cctatttga 1140
ttattttatt ttggcgagg aggttaatga ggaaggagca acacatcacc tccaggggt 1200
cgctatttt gtgaagagc aaacttttca taaagtgaag tggattttg gtgcctctg 1260
cccatcgag aagccaaag gaactgatac gcaagataaa gaattttgc gtaagaagg 1320
caacttact attgaatgt gagctcctgc atctcaggga caaggagtg acctgtctac 1380
tgctgtgag accttcttgg agacgggag tctgttgacc gttycagag agcacctgt 1440
aacgtttgtc agaatcttc ggcggcgag tgaactttg ggaagtgga ggaagtgga 1500
gaagctgtg ttgaagacca atgtatcagg caactgggt caactgggt ggaagtgga 1560
caactgggt gctaatctt cagaacggga aacacatac tggaaacac ctgaaacaa 1620

```

WO 01/46377

PCT/US01/19220

```

gtggtgggat gggtaccatg gtgaagaagt ggttggtatt gatgaatttt atggtgggt 1680
gcgtgggat gatctactga gactgtgtga togatatcaa ttgaactgag agactaaagg 1740
tgaactgta ccttttttg cccgcagt 1768

```

<210> 7
 <211> 1759
 <212> DNA
 <213> CT-PCV-P7

```

<400> 7
atlttgaita ccagcaatca ggcctccacg gaatggtact cctcaactgc tctccagct 60
gtgaagctc tctatcgag gattactant ttgcaatttt ggaagaatgc tggagaacaa 120
tccacggagg taacogaagg cagattttga gcagtggacc caccctgtgc ccttttccca 180
tatanaataa ttaactgagt cttttttgtt atcaactcgt aatggttttt atttttattc 240
atttagaggg tcttccagga taaattctct gaattgtaca taaatagta gcttaccac 300
ataattttgg gctgtgtctg caattttgag cgcacagccg aggcctgtgt gctcgacatc 360
gggtgggata ttttaattga gccacagctg gtttctttta ttatttgggt ggaacccatc 420
aatgttttgc tccagctcag gtttgggggt gaagtacctg gagtggtagg taaagggttg 480
ccttatggtg tggcggggag agtagttaat ctagggggtca taggcaagggt tggtaggggg 540
ggttaccagc ttggcaltcc agataaccac agtggacctt cccctctctt gattagaggt 600
gatgggtctc ctggggaaa atctaatltt agcctttcta ataggtatgt attggaaagg 660
tagggtagg ggttgggtgc cgcctcgagg gggagagaa tggcagatgt tgaactctag 720
gtggttaaca ttccagagat gctgcagatg tctctctttt atggtgagta caaattctct 780
agaaaggcgg gaattgaaga taccctctct tggcgcccat ctgttaacgt tcttgaaggg 840
gggtgtacc aatatcggtc ttctccggag gatgtttcna agatggctgc gggggcgggt 900
ccttctctct cggtaacgcn tcttggccc cgtcatccta taaagtga aaagtgcgc 960
tgcgtagta ttacacagcg acttcggcag cgcagacacc tggcagcgt cagtgaat 1020
gccagcaag aaagcgggcc cgcaccccca taagaggtgg gtgttcacc ktaataatc 1080
ttccagagag gggaaacac naatauggga gcttccatc tcccttttg attatcttct 1140
tttgaggag gaagggttgg aagagggtag aactctcac ctccaggggt ttgcgaattt 1200
tgctagagac cagaccttta acaggtgaa gtggtatttt ggtgcccgt gccacatcga 1260
ggaagcgaag ggaacggacc agcagaataa agaatactgc agtaaaagg gccacatc 1320
tactagatct ggaactccgc ggaacagagg gaagcgcagc gacctgtcta ctgctgtgag 1380
tacctttttt ggaacggggc ctttggtgac gttagcggag cagttccctg taaggtatgt 1440
gagaaatttc cgggggtgtg ctgaactttt gaaagtgaag ggaagatgc agcagctgta 1500
ttgaaagaca cgtgtacagc tcatagtggg cccgcacggt cgtaggagag gccagtggc 1560
cngtaatttt cctggaccta gggacaccta ctggagcct agtagaata agtggtagga 1620
tgatatacat ggaagaagag ttgtgtttt ggaatgattt tatgctggt taccttgga 1680
tgatatactg agactgtgt acoggtatcc attgactgta gagactaaag ggggtactgt 1740
tcttttttg gccgcagt 1759

```

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> primer

```

<400> 8
tactctcaa ctgtgtccc 20

```

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> primer

WO 01/96377

PCT/US01/19220

<400> 9	
tccatccac caattatttc	20
<210> 10	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 10	
acgctgaata atccttcc	18
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 11	
ccaaacaaat ctctataccc	20
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 12	
attaacagca atcagacc	18
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 13	
aacaaacct tcttccac	18
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 14	
agcagggcca gaattccac	19
<210> 15	
<211> 22	

WO 01/46377

PCT/US01/19220

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 15
cgtctctcggg aggtattcttc ag 22
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 16
gcctagttaga tataaagtggt g 21
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 17
agtaatcctc cgatagagag 20

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

INTERNET FILING SYSTEM FOR THE PATENT COOPERATION TREATY

(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96377 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/01,
16A06, C12N 7/00, 7/02(74) Agents: FEHLNER, Paul, F. et al.; Darby & Darby, P.C.,
805 Third Avenue, New York, NY 10022-7513 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/19220

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 15 June 2001 (15.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00/211,710 15 June 2000 (15.06.2000) US(84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): PUR-
DUE RESEARCH FOUNDATION [US/US]; 1391 Con-
tinent Avenue, West Lafayette, IN 47906 (US).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
13 June 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MITTAL, Suresh,
K. [CA/US]; 2839 Ashland Street, West Lafayette, IN
47906 (US); STEVENSON, Gregory, W. [US/US];
2336 North 600 West, West Lafayette, IN 47904 (US);
CHOI, Jiwon [KR/US]; 3420 Cheswick Court, #E4, West
Lafayette, IN 47907 (US); KJUEPEL, Matti [DE/US];
3056 Theasant Run Drive, #1046, Lafayette, IN (US);
KANTIZ, Charles, L. [US/US]; 1558 Crestwood Lane,
Lafayette, IN 47905 (US).

WO 01/96377 A3

(54) Title: VACCINE FOR CONGENITAL TREMORS IN PIGS

(57) Abstract: The invention is based on the cloning of porcine circovirus (PCV) strains from pigs with congenital tremors. These results provide a first step for the development of diagnostic and therapeutic applications for congenital tremors in a pig. The diagnostic method comprises determining whether the pig has been infected by a porcine circovirus strain of type 1 or type 2. The invention further provides a method for the prevention or treatment of congenital tremors in a pig, which method comprises administering to the pig an effective amount of an immunogenic PCV 1 or PCV 2 polypeptide or of a nucleic acid encoding this polypeptide. Another subject of the invention is the new PCV nucleic acid sequences identified by the inventors and the polypeptides encoded by these sequences, as well as the new PCV isolates and immunogenic preparations thereof.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/19220
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/01 C07K16/08 C12N7/00 C12N7/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N A61K G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. MEEHAN ET AL.: "Characterisation of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs" J. GEN. VIROL., vol. 79, 1998, pages 2171-2179, XP002194335 page 2172; figures 2,5	1-12, 31-33
Y	J. TSCHACHTSCHAL ET AL.: "Das Porzine Circovirus - Eine Literaturübersicht" TIERÄRZTLICHE UMSCHAU, vol. 56 - 2001 pages 185-198, XP001064247 page 189, column 1, line 21 - line 46 --- -/-	15-22, 24-30
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 March 2002		Date of mailing of the international search report 10/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 2016 Patentkanal 2 818 - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl Fax: (+31-70) 340-9016		Authorized officer Skelly, J

Form PCT/ISA/210 (separate sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Patent Application No.
PCT/US 01/19220

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 18214 A (MERIAL) 15 April 1999 (1999-04-15)	1-12, 31-33
Y	the whole document	15-22, 24-30
X	WO 99 29717 A (UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 17 June 1999 (1999-06-17)	1-12,23
	the whole document	
X,P	G. STEVENSON ET AL.: "Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tumours" J. VET. DIAGN. INVEST. vol. 13, 2001, pages 57-62, XP001064291 the whole document	15-23
A	G. ALLAN ET AL.: "Porcine circoviruses: a review" J. VET. DIAGN. INVEST., vol. 12, 2000, pages 3-14, XP001064282 the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/19220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918214 A	15-04-1999	FR 2769321 A1	09-04-1999
		FR 2769322 A1	09-04-1999
		FR 2776294 A1	24-09-1999
		AU 9355598 A	27-04-1999
		BR 9812845 A	08-08-2000
		CA 2305623 A1	15-04-1999
		CN 1278301 T	27-12-2000
		EP 1019510 A1	19-07-2000
		WO 9918214 A1	15-04-1999
		HU 0003756 A2	28-02-2001
		JP 2001519159 T	23-10-2001
		PL 339631 A1	02-01-2001
		WO 0170037 A1	27-09-2001
		US 6143334 A	07-11-2000
WO 9929717 A	17-06-1999	AU 1552699 A	28-06-1999
		BR 9813485 A	17-10-2000
		CA 2313806 A1	17-06-1999
		WO 9929717 A2	17-06-1999
		EP 1037909 A2	27-09-2000
		JP 2001525194 T	11-12-2001
		ZA 9811410 A	11-06-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 16/08	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 N 7/04	
C 1 2 N 7/04	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/564	Z
G 0 1 N 33/564	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/569	G
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,S, E,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100101465
弁理士 青山 正和

(74)代理人 100094400
弁理士 鈴木 三義

(74)代理人 100107836
弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉

(72)発明者 スレッシュ・ケイ・ミッター
アメリカ合衆国・インディアナ・4 7 9 0 6・ウエスト・ラファイエット・アシュランド・ストリート・2 8 3 9

(72)発明者 グレゴリー・ダブリュ・スティーヴンソン
アメリカ合衆国・インディアナ・4 7 9 0 9・ウエスト・ラファイエット・ノース・6 0 0・ウエスト・2 3 3 6

(72)発明者 ジウオン・チョイ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 2 1 2 8・サン・ディエゴ・ティヴォリ・パーク・ロー・# 4・1 2 0 4 7

(72)発明者 マッティ・キウペル
アメリカ合衆国・インディアナ・ラファイエット・# 1 0 4 6・フェザント・ラン・ドライブ・3 0 5 6

(72)発明者 チャールズ・エル・カニッツ
アメリカ合衆国・インディアナ・4 7 9 0 5・ラファイエット・クレストウッド・レイン・1 5 5 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 BA61 CA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA01
GA11 HA08 HA11

专利名称(译)	猪先天性震颤疫苗		
公开(公告)号	JP2004503234A	公开(公告)日	2004-02-05
申请号	JP2002510517	申请日	2001-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	普渡研究基金会		
申请(专利权)人(译)	普渡大学研究基金会		
[标]发明人	スレッシュケイミツタル グレゴリーダブリュスティーヴンソン ジウオンチョイ マッティキウベル チャールズエルカニッツ		
发明人	スレッシュ・ケイ・ミツタル グレゴリー・ダブリュ・スティーヴンソン ジウオン・チョイ マッティ・キウベル チャールズ・エル・カニッツ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/12 A61K48/00 A61P31/20 C07K14/005 C07K14/01 C07K16/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N7/04 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/00 A61K2039/525 A61K2039/53 C12N2750/10022		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/12 A61K48/00 A61P31/20 C07K14/005 C07K16/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12N7/04 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/564.Z G01N33/566 G01N33/569.G C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS32 4B063/QS34 4B064/AG26 4B064/AG32 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA04 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA13 4C084/MA05 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB332 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/CC08 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA01 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	60/211710 2000-06-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

相关的诊断和治疗组合物和方法涉及鉴定猪蚕丝病毒 (PCV) 和先天性震颤 (震颤) 的关联。更具体地，它涉及特定的先天性震颤相关的PCV核酸和多肽。特别是，猪圆环病毒 (PCV) 和分离的核酸，提供具有相同序列选自SEQ ID NO : 1的组所选择的序列的核酸：SEQ 7 ID NO : 1。

