



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027761

(51)⁷ C07K 14/005; C12N 7/04; A61K 39/12 (13) B

(21) 1-2016-01097

(22) 02/10/2014

(86) PCT/US2014/058793 02/10/2014

(87) WO2015/051099 09/04/2015

(30) 61/885,871 02/10/2013 US

(45) 25/03/2021 396

(43) 25/08/2016 341A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA, INC. (US)

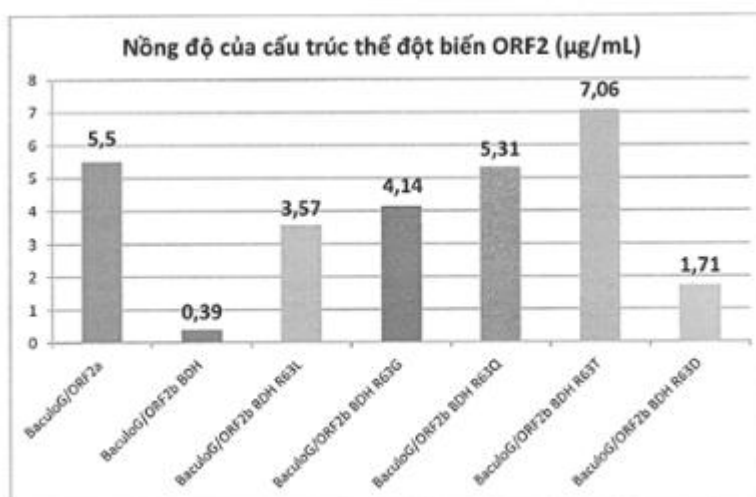
3239 Satellite Blvd., Duluth, Georgia 30096, United States of America

(72) HERNANDEZ, Luis Alejandro (US); MUEHLENTHALER, Christine Margaret (US); VAUGHN, Eric Martin (US); HAIWICK, Gregory (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PROTEIN PCV2 ORF2, CHẾ PHẨM MIỄN DỊCH VÀ HẠT TƯƠNG TỰ VIRUS CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit là các biến thể của protein PCV2 ORF2. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến protein PCV2 kiểu phụ b (PCV2b) ORF2 hoặc các chế phẩm miễn dịch chứa protein PCV2b ORF2 này. Các protein và chế phẩm miễn dịch này được sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 thuộc cùng kiểu phụ PCV2b và/hoặc kiểu phụ khác; làm giảm, phòng ngừa hoặc điều trị các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi sự nhiễm PCV2 thuộc cùng PCV2b hoặc một kiểu phụ khác; và/hoặc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh gây ra bởi sự nhiễm PCV2 thuộc cùng PCV2b và/hoặc một kiểu phụ khác. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến protein PCV2 kiểu phụ b (PCV2b) ORF2 đặc trưng ở chỗ chúng chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC mà nhờ đó protein được biểu hiện tốt hơn là được biểu hiện với lượng lớn hơn so với protein PCV2 ORF2 không bao gồm đột biến này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các polypeptit là các biến thể của protein PCV2 ORF2. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm miễn dịch và hạt tương tự virus chứa polypeptit này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Circovirus typ 2 gây bệnh ở lợn (Porcine circovirus type 2 - PCV2) là virus ADN nhỏ (đường kính 17-22nm), hai mươi mặt, không có vỏ bọc, có hệ gen vòng sợi đơn. PCV2 có mức độ tương đồng về trình tự khoảng 80% so với circovirus typ 1 gây bệnh ở lợn (porcine circovirus type 1 - PCV-1). Tuy nhiên, trái với PCV1, mà nó thường không gây độc, lợn bị nhiễm PCV2 thể hiện hội chứng thường được nhắc đến như là Hội chứng còi cọc sau cai sữa (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS). PMWS được đặc trưng về mặt lâm sàng bởi sự còi cọc, da xanh, không phát triển, suy hô hấp, tiêu chảy, vàng da, và hoàng đản. Ở một số con lợn bị nhiễm bệnh, tổ hợp của tất cả các triệu chứng là rõ rệt trong khi các con lợn khác sẽ chỉ có một hoặc hai trong số các triệu chứng lâm sàng này. Trong quá trình mổ khám nghiệm, các thương tổn vi mô và vĩ mô cũng xuất hiện trên nhiều mô và cơ quan, trong đó các cơ quan bạch huyết là vị trí thương tổn thông thường nhất. Quan sát thấy sự tương quan rõ rệt giữa lượng axit nucleic hoặc kháng nguyên của PCV2 và mức độ nghiêm trọng của các thương tổn bạch huyết vi mô. Tỷ lệ chết đối với lợn bị lây nhiễm PCV2 có thể lên đến 80%. Ngoài PMWS, PCV2 có liên quan đến một số lây nhiễm khác bao gồm giả dại, hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS), bệnh Glasser, viêm màng não do tụ cầu khuẩn gây ra, bệnh phó thương hàn, bệnh tiêu chảy sau cai sữa do E Coli, bệnh gan do chế độ dinh dưỡng, và bệnh viêm cuống phổi có mưng mủ.

Hiện nay, có ba kiểu phụ PCV2 đã biết (PCV2a, PCV2b và PCV2c), được phân loại theo danh pháp thống nhất đối với kiểu gen PCV2 (Segales, J. *et al.*, 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8). Hai kiểu phụ khác (PCV2d và PCV2e) đã được đề xuất (Wang *et al.* Virus Res. 2009 145(1):151-6), tuy nhiên, cuối cùng đã chứng minh rằng chúng thuộc về các cụm PCV2a và PCV2b (Cortey *et al.* Vet Microbiol. 2011 149(3-4):522-32011). Theo danh pháp thống nhất

đối với các kiểu gen PCV2 này, gen orf2 được sử dụng để thực hiện xác định kiểu gen đối với pcv-2, trong đó việc xác định kiểu gen được dựa trên tỷ lệ của các vị trí nucleotit mà ở đó hai trình tự được so sánh là khác nhau (khoảng cách p). Trị số này thu được bằng cách chia số nucleotit chênh lệch cho tổng số nucleotit được so sánh (Kumar *et al.* 2001 Bioinformatics 17, 1244-1245) và sau đó, xây dựng biểu đồ khoảng cách p/tần số cho phép xác định điểm cắt tiềm năng để phân biệt các kiểu gen khác nhau (Rogers and Harpending 1992 Molecular Biology and Evolution 9, 552-569; Biagini *et al.* 1999 Journal of General Virology 80, 419-424). Bằng cách sử dụng hệ phương pháp này, các trình tự orf2 pcv-2 được cho là thuộc các kiểu gen khác nhau khi khoảng cách di truyền giữa chúng là 0,035.

US 2011/0305725 A1 mô tả nghiên cứu nhằm thử nghiệm một chế phẩm vaccin mới ở lợn để đánh giá hiệu lực của nó đối với circovirus và *M. hyopneumoniae* ở lợn. Trong quá trình nghiên cứu, đã quan sát thấy rằng một số con lợn ở các nhóm đối chứng và nhóm được cho dùng vaccin biểu hiện các triệu chứng lâm sàng của PMWS. Sau đó, đã xác nhận rằng những con lợn này đã được tiếp xúc với PCV2 ngoài môi trường trước khi tham gia thử nghiệm. Phân tích phân tử đối với các mẫu máu và mô từ những con lợn này đã tiết lộ rằng chúng chứa chủng typ 2B khác với chủng được sử dụng cho thử nghiệm (đoạn [0152] của US 2011/0305725 A1).

WO2011116094 A2 bộc lộ dòng ADN nhiễm circovirus thể khảm ở lợn và virus khảm sống được làm giảm độc lực với kiểu phụ của PCV2 là PCV2b, và gen vỏ capsid của kiểu phụ PCV2b được hợp nhất vào bộ gen virus PCV1 không gây bệnh, trong đó virus khảm đã được làm giảm độc lực có thể được sử dụng làm vaccin sống, cũng như là vaccin đã được làm bất hoạt (chết).

WO2013030320 A1 đề cập đến protein capsid kiểu Circovirus tổng hợp và phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh có liên quan đến PCV2 ở động vật có vú bằng cách sử dụng các protein này. Hai trình tự đã được thiết kết theo WO2013030320 A1, trong đó một trình tự được cải biến với sự tối ưu hóa, ngoài những tối ưu hóa khác, như sau:

- vị trí tách tiềm năng được giới hạn ở vị trí axit amin 165.
- đột biến được đưa vào ở vị trí 200.
- thay thế được thực hiện ở vị trí 161.
- thay thế được thực hiện ở vị trí 170.

- gốc S ở vị trí 225 được thay bằng D.
- thay thế được thực hiện ở vị trí 143.
- hai thay thế được thực hiện ở đầu tận cùng N của trình tự (các vị trí 13 và 20).

Tuy nhiên, trên thực tế, sự biểu hiện của protein ORF2 thuộc PCV2b kiểu đại được nhận thấy là không đủ và cần phải có các bước cô đặc tiếp theo để nhận được các hạt tương tự virus (VLP) hữu hiệu để điều chế vaccin dưới đơn vị, sự cải biến dễ dàng trình tự protein ORF2 từ PCV2b xuất hiện trong tự nhiên là cần thiết để gia tăng hiệu lực biểu hiện và để gia tăng sản lượng VLP, nhờ đó cho phép sản xuất nhanh chóng và dễ dàng các vaccin dưới đơn vị PCV2 hữu hiệu.

Giải pháp cho vấn đề kỹ thuật nêu trên đạt được nhờ phân mô tả và các phương án được mô tả đặc trưng trong phần yêu cầu bảo hộ.

Vì vậy, theo các khía cạnh khác nhau của nó, sáng chế được tạo ra căn cứ vào phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến polypeptit được chọn từ nhóm gồm (a), (b), và (c) sau đây:

(a) protein PCV2 ORF2 có

- gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 59, và/hoặc
- gốc prolin ở vị trí axit amin 88, và/hoặc
- gốc threonin ở vị trí axit amin 151, và/hoặc
- gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 206, và/hoặc
- gốc asparagin ở vị trí axit amin 232,

và có gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 63,

trong đó việc đánh số vị trí axit amin dựa vào trình tự axit amin của protein PCV2 ORF2 kiểu đại;

(b) protein PCV2 ORF2 đặc trưng ở chỗ nó (i) chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC và (ii) tốt hơn là được biểu hiện với lượng lớn hơn so với protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này;

tổ hợp của (a) và (b).

Sáng chế đề cập đến chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit đã nêu, trong đó tùy ý chế phẩm miễn dịch này còn chứa polypeptit PCV2a ORF-2, trong đó polypeptit PCV2a ORF-2 đã nêu tốt hơn là giống ít nhất là 94% hoặc tốt hơn là ít nhất là 95% với trình tự SEQ ID NO:3.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit đã nêu.

Sáng chế cũng đề cập đến plasmit, tốt hơn là vector biểu hiện, bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit đã nêu.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chứa plasmit, tốt hơn là vector biểu hiện, mà bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit đã nêu.

Sáng chế cũng đề cập đến hạt tương tự virus bao gồm nhiều polypeptit đã nêu.

Sáng chế cũng đề cập đến baculovirus chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa polypeptit đã nêu.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào, tốt hơn là tế bào côn trùng, chứa baculovirus chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa polypeptit đã nêu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 - Sự thay đổi axit amin chủ yếu giữa các trình tự axit amin ORF2 ở PCV2a và PCV2b.

Fig. 2 – Đánh giá phản dịch nòi baculovirus thu nhận được đối với ORF2 từ PCV2b. Đường 1 = Circoflex WSV (PCV2a ORF2), Đường 2 = PCV2b ORF2 BDH SFCO, Đường 4 = PCV2b ORF2 BDH R63T, Đường 5 = PCV2b ORF2 BDH R63K.

Fig. 3 – Đánh giá 100.000g viên kết đối với PCV2b ORF2. Đường 1 = PCV2b ORF2 BDH, Đường 2 = PCV2b ORF2 BDH R63K, Đường 3 = PCV2b ORF2 BDH R63T, Đường 4 = Circoflex WSV (PCV2a ORF2).

Fig. 4 – Tách các phân đoạn gradient sucroza nhờ SDS-PAGE. F1 – F12 = Các phân đoạn 1-12.

Fig. 5A và FIG. 5B– Xác nhận sự tạo thành VLP bởi EM

Fig. 6 – Kết quả đánh giá cấu trúc đột biến ORF2 của PCV2b. SFCO = Codon được tối ưu hóa đối với *Spodoptera frugiperda*. Các cấu trúc ORF2 BDH và R63K của PCV2b không được kiểm tra VLP hoặc được định lượng dưới dạng cấu trúc R63T được phát hiện ở cùng thời điểm.

Fig. 6 – Kết quả đánh giá cấu trúc đột biến ORF2 của PCV2b. SFCO = Codon được tối ưu hóa đối với *Spodoptera frugiperda*. Định lượng VPL của các cấu trúc đột biến ORF2 được biểu thị dưới dạng µg/ml.

Fig. 8 – So sánh bằng cách sắp thẳng hàng các trình tự axit amin PCV2b ORF2 kiểu dại và đột biến, trong đó các trình tự có tên SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 là trình tự PCV2b ORF2 kiểu dại và các trình tự có tên SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9 là trình tự đột biến, và trong đó SEQ ID NO: 3 tương ứng với trình tự của protein ORF2 từ PCV2a kiểu dại. Trong trình tự có tên SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, và SEQ ID NO:9: “X” (ở các vị trí 8, 53, 57, 68, 89, 90, 121, 134, 169, 190, 215 và 234) là gốc axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W và Y; “X” (ở vị trí 63) là gốc axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W và Y; và “x” (ở vị trí 210) là gốc axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm D và E.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế dựa trên phát hiện đáng ngạc nhiên rằng một đột biến đơn lẻ trong trình tự axit amin của protein ORF2 PCV2 kiểu phụ b (PCV2b) là đủ để gia tăng mức sản sinh VLP một cách đáng kể, nhờ đó cho phép sản xuất nhanh chóng vacxin dưới đơn vị PCV2 hữu hiệu.

Trong quá trình thực hiện sáng chế các vị trí khác biệt axit amin chủ yếu giữa các trình tự PCV2a và PCV2b ORF2 được nhận biết như là các vị trí đột biến tiềm năng.

Trong tình huống này, sáu vị trí axit amin điển hình đối với protein PCV2 ORF2b được nhận biết, cụ thể

- gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 59,
- gốc arginin or a gốc lysin ở vị trí axit amin 63,
- gốc prolin ở vị trí axit amin 88,
- gốc threonin ở vị trí axit amin 151,
- gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 206, và
- gốc asparagin ở vị trí axit amin 232.

Như đã mô tả ở đây, việc đánh số các vị trí axit amin dựa vào trình tự axit amin của protein ORF2 PCV2 kiểu dại với chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID

NO:5). Do đó, việc đánh số các vị trí amino như được đề cập ở đây là có liên quan đến trình tự protein PCV2 ORF2 kiểu đại có 234 hoặc 233 gốc axit amin, bao gồm gốc methionin ở vị trí axit amin 1 (đầu tận cùng N).

Vì vậy, cụm từ “trong đó việc đánh số các vị trí axit amin dựa trên trình tự axit amin của protein PCV2 ORF2 kiểu đại”, như được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế này, dùng để chỉ trình tự của protein PCV2 ORF2 xuất hiện trong tự nhiên, như trình tự được nêu làm ví dụ minh họa trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:5.

Sự đột biến của sáu vị trí axit amin điển hình đối với protein ORF2 PCV2b đã bất ngờ chỉ ra rằng một đột biến của vị trí thuộc trình tự axit amin của vòng BC của protein PCV2 ORF2, cụ thể là sự thế của gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí 63, là đủ để gia tăng sự biểu hiện của protein PCV2 ORF2 một cách đáng kể so với protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit được chọn từ nhóm gồm các polypeptit (a), (b) và (c) sau đây: (a) protein PCV2 ORF2 có: gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 59, và/hoặc gốc prolin ở vị trí axit amin 88, và/hoặc gốc threonin ở vị trí axit amin 151, và/hoặc gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 206, và/hoặc gốc asparagin ở vị trí axit amin 232, và có gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 63, trong đó việc đánh số vị trí axit amin dựa vào trình tự axit amin của protein PCV2 ORF2 kiểu đại; (b) protein PCV2 ORF2 đặc trưng ở chỗ nó (i) chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC và (ii) tốt hơn là được biểu hiện với lượng cao hơn đáng kể so với protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này; và (c) tổ hợp gồm (a) và (b).

Tốt hơn là, polypeptit này, mà dưới đây cũng thường được gọi là “polypeptit theo sáng chế”, là polypeptit được phân lập.

Cụ thể là, polypeptit theo sáng chế là polypeptit không xuất hiện trong tự nhiên.

Vì vậy, theo khía cạnh thứ nhất (a), polypeptit theo sáng chế là protein PCV2 ORF2 có một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc axit amin (mã chữ cái đơn lẻ trong ngoặc đơn) được chọn từ nhóm gồm gốc arginin (R) hoặc gốc lysin (K) ở vị trí axit amin 59, gốc prolin (P) ở vị trí axit amin 88, gốc threonin (T) ở vị trí axit amin 151, gốc isoleuxin (I) ở vị trí axit amin 206, và gốc asparagin (N) ở vị trí axit amin 232, và có gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 63.

Cụ thể là, gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí 63 là gốc

axit amin xuất hiện trong tự nhiên, tốt hơn là được mã hóa di truyền, khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin.

Tiếp theo, các chữ viết tắt sau đây cũng được sử dụng:

“R59” là chữ viết tắt của "gốc arginin ở vị trí axit amin 59",

“K59” là chữ viết tắt của "gốc lysin ở vị trí axit amin 59",

“P88” là chữ viết tắt của "gốc prolin ở vị trí axit amin 88",

“T151” là chữ viết tắt của "gốc threonin ở vị trí axit amin 151",

“I206” là chữ viết tắt của “gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 206”,

“N232” là chữ viết tắt của "gốc asparagin ở vị trí axit amin 232".

Vì vậy, tốt hơn là, polypeptit theo khía cạnh (a) là protein PCV2 ORF2 có P88,

hoặc có T151,

hoặc có I206,

hoặc có N232,

hoặc có R59 hoặc K59,

hoặc có P88 và T151,

hoặc có P88 và I206,

hoặc có P88 và N232,

hoặc có P88 và R59 hoặc K59,

hoặc có T151 và I206,

hoặc có T151 và N232,

hoặc có T151 và R59 hoặc K59,

hoặc có I206 và N232,

hoặc có I206 và R59 hoặc K59,

hoặc có N232 và R59 hoặc K59,

hoặc có P88 và T151 và I206,

hoặc có P88 và T151 và N232,

hoặc có P88 và T151 và R59 hoặc K59,

hoặc có P88 và I206 và N232,

hoặc có P88 và I206 và R59 hoặc K59,

hoặc có P88 và N232 và R59 hoặc K59,

hoặc có T151 và I206 và N232,

hoặc có T151 và I206 và R59 hoặc K59,

hoặc có T151 và N232 và R59 hoặc K59,

hoặc có I206 và N232 và R59 hoặc K59,
 hoặc có P88 và T151 và I206 và N232,
 hoặc có P88 và T151 và I206 và R59 hoặc K59,
 hoặc có P88 và T151 và N232 và R59 hoặc K59,
 hoặc có P88 và I206 và N232 và R59 hoặc K59,
 hoặc có T151 và I206 và N232 và R59 hoặc K59,
 hoặc có P88 và T151 và I206 và N232 và R59 hoặc K59.

Do đó, tốt hơn nữa là, polypeptit theo khía cạnh (a) được chọn từ nhóm gồm

protein PCV2 ORF2 có P88,
 protein PCV2 ORF2 có T151,
 protein PCV2 ORF2 có I206,
 protein PCV2 ORF2 có N232,
 protein PCV2 ORF2 có R59
 protein PCV2 ORF2 có K59,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và T151,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và I206,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và N232,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và R59,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và K59,
 protein PCV2 ORF2 có T151 và I206,
 protein PCV2 ORF2 có T151 và N232,
 protein PCV2 ORF2 có T151 và R59,
 protein PCV2 ORF2 có T151 và K59,
 protein PCV2 ORF2 có I206 và N232,
 protein PCV2 ORF2 có I206 và R59,
 protein PCV2 ORF2 có I206 và K59,
 protein PCV2 ORF2 có N232 và R59,
 protein PCV2 ORF2 có N232 và K59,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và I206,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và N232,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và R59,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và K59
 protein PCV2 ORF2 có P88 và I206 và N232,
 protein PCV2 ORF2 có P88 và I206 và R59,

protein PCV2 ORF2 có P88 và I206 và K59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và N232 và R59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và N232 và K59,
protein PCV2 ORF2 có T151 và I206 và N232,
protein PCV2 ORF2 có T151 và I206 và R59,
protein PCV2 ORF2 có T151 và I206 và K59,
protein PCV2 ORF2 có T151 và N232 và R59,
protein PCV2 ORF2 có T151 và N232 và K59,
protein PCV2 ORF2 có I206 và N232 và R59,
protein PCV2 ORF2 có I206 và N232 và K59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và I206 và N232,
protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và I206 và R59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và I206 và K59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và N232 và R59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và N232 và K59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và I206 và N232 và R59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và I206 và N232 và K59,
protein PCV2 ORF2 có T151 và I206 và N232 và R59,
protein PCV2 ORF2 có T151 và I206 và N232 và K59,
protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và I206 và N232 và R59, và
protein PCV2 ORF2 có P88 và T151 và I206 và N232 và K59.

Theo khía cạnh thứ hai (b), polypeptit theo sáng chế là protein PCV2 ORF2 cụ thể đặc trưng ở chỗ nó (i) chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC và (ii) được biểu hiện, cụ thể là ở hệ biểu hiện baculovirus, với lượng cao hơn đáng kể, tốt hơn là với lượng cao hơn ít nhất 2 lần, tốt hơn nữa là với lượng cao hơn ít nhất 3 lần, cũng tốt hơn nữa là với lượng cao hơn ít nhất 5 lần, tốt hơn nữa là với lượng cao hơn ít nhất 8 lần, so với a protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này, trong đó protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này tốt hơn là có trình tự axit amin giống với polypeptit theo sáng chế ngoại trừ ít nhất một đột biến trên vòng BC.

Vì vậy, cần phải hiệu rằng các trình tự axit amin của các protein PCV2 ORF2 mà sự biểu hiện của chúng được so sánh theo khía cạnh này của sáng chế là giống hệt ngoại trừ ít nhất một đột biến đã nêu trên vòng BC.

Thuật ngữ “vòng BC”, trong ngữ cảnh sáng chế, cụ thể là dùng để chỉ phần

trình tự axit amin của ORF2 của PCV2 nằm giữa hai axit amin ở đầu tận cùng N duỗi ra và gấp lại thành cấu trúc bậc hai gấp nếp β , như có thể thấy trong cấu trúc tinh thể của protein PCV2 ORF2 như được công bố bởi Khayat *et al.* J Virol 85:7856-62 (2011), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Cụ thể là Khayat *et al.* mô tả các vòng nối các sợi β BC, DE, FG và HI ở dạng có chiều dài gồm từ bốn đến chín gốc axit amin, và các vòng BC và HI ở dạng các phần lồi ra kiểu nút bấm duỗi xa nhất từ bề mặt capsid PCV và sửa lại các trục gấp nếp bậc 5.

Để xác định xem liệu protein PCV2 ORF2 chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC có được biểu hiện với lượng lớn hơn so với protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này hay không, tốt hơn là phương pháp như được mô tả trong ví dụ 1 ở đây được sử dụng.

Vì vậy, trong một ví dụ, để xác định xem liệu protein PCV2 ORF2 chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC có được biểu hiện với lượng lớn hơn so với protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này hay không, hệ biểu hiện baculovirus được sử dụng trong phương pháp bao gồm các bước: gây nhiễm các tế bào Sf⁺ với baculovirus ở MOI đích bằng 0,1, để phát triển gây nhiễm trong 5 – 7 ngày, thu nhận bằng cách ly tâm ở 20.000g trong 20 phút để loại bỏ mảnh vụn tế bào và protein không hòa tan, lọc phần dịch nổi sau thu nhận qua màng lọc cỡ 0,2 μ m, và đánh giá trực tiếp sự biểu hiện của ORF2 PCV2 bằng thử nghiệm western blot có sử dụng kháng thể α -PCV2.

Tốt hơn là, phương pháp này còn bao gồm bước chuẩn bị baculovirus để dùng cho bước gây nhiễm các tế bào Sf⁺ ở MOI đích bằng 0,1, và cụ thể còn bao gồm một hoặc nhiều bước sau: tạo dòng trình tự mã hóa mà mã hóa protein PCV2 ORF2 chứa ít nhất một đột biến trong vòng BC vào vector truyền baculovirus, tạo dòng trình tự mã hóa mà mã hóa protein PCV2 ORF2 mà không chứa đột biến này vào vector truyền baculovirus, đồng chuyển nhiễm vector truyền baculovirus đã nêu bao gồm trình tự mã hóa mà mã hóa protein PCV2 ORF2 chứa ít nhất một đột biến trong vòng BC với ADN baculovirus trong tế bào Sf9, đồng chuyển nhiễm vector truyền baculovirus đã nêu bao gồm trình tự mã hóa mà mã hóa protein PCV2 ORF2 mà không chứa đột biến này với ADN baculovirus trong tế bào Sf9.

Tốt hơn nữa là, phương pháp này còn bao gồm một hoặc nhiều bước sau: kiểm tra sự biểu hiện của protein PCV2 ORF2 ở baculovirus tái tổ hợp tạo thành bởi IFA,

chuẩn bị dung dịch gốc đã được khuếch đại của mỗi baculovirus tái tổ hợp trên tế bào Sf+, chuẩn độ dung dịch gốc đã khuếch đại này nhờ phương pháp TCID₅₀ để xác định hiệu giá baculovirus.

Cụ thể là, polypeptit theo sáng chế là protein PCV2 ORF2 chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC được biểu hiện với lượng lớn hơn so với protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này trong các điều kiện môi trường tương tự và/hoặc có thể so sánh được, tốt hơn là trong hệ biểu hiện baculovirus.

Cụ thể hơn, protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này là protein PCV2 ORF2 kiểu dại.

Tốt hơn là, ít nhất một đột biến trên vòng BC theo sáng chế là ít nhất một đột biến trong vùng gồm các vị trí axit amin từ 58 đến 66 và cụ thể là bao gồm hoặc gồm có sự khuyết đoạn, sự thay thế, và/hoặc sự bổ sung từ 1 đến 7 gốc axit amin trong vùng gồm các vị trí axit amin từ 60 đến 66.

Tốt hơn nữa là, ít nhất một đột biến trên vòng BC là sự khuyết đoạn, sự thay thế, và/hoặc sự bổ sung của một gốc axit amin ở vị trí axit amin 63, trong đó tốt nhất là sự thế của gốc axit amin ở vị trí axit amin 63 bằng một gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin.

Cũng tốt hơn nữa là, sự thế của gốc axit amin ở vị trí axit amin 63 bằng gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin là sự thay thế bằng một gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin, xuất hiện trong tự nhiên, tốt hơn là được mã hóa di truyền.

Trình tự được ưu tiên của vòng BC theo sáng chế bao gồm sự thế của gốc axit amin ở vị trí axit amin 63 bằng gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin được nêu trong các SEQ ID NO: 10-45.

Vì vậy, cụ thể là, ít nhất một đột biến trên vòng BC theo sáng chế bao gồm hoặc là sự thế của gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 63 bằng gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin.

Vì vậy, protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này, như được mô tả ở đây, tốt hơn là có gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 63, gốc này tiếp theo được thế theo phương án được ưu tiên theo sáng chế, nhờ đó tạo ra polypeptit theo

sáng chế.

Tốt nhất là, polypeptit theo sáng chế bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 10-45, trong đó trình tự này cụ thể là nằm ở các vị trí axit amin từ 58 đến 66 của trình tự polypeptit theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ ba (c), polypeptit theo sáng chế là tổ hợp bất kỳ của protein PCV2 ORF2 theo khía cạnh (a) và khía cạnh (b), như được mô tả ở đây, và vì vậy là protein ORF2 bất kỳ của PCV2 có:

- gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 59, và/hoặc
- gốc prolin ở vị trí axit amin 88, và/hoặc
- gốc threonin ở vị trí axit amin 151, và/hoặc
- gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 206, và/hoặc
- gốc asparagin ở vị trí axit amin 232,

và có gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 63, trong đó việc đánh số vị trí axit amin dựa trên trình tự axit amin của protein PCV2 ORF2 kiểu đại; và được đặc trưng ở chỗ nó (i) chứa ít nhất một đột biến trên vòng BC và (ii) tốt hơn là được biểu hiện với lượng cao hơn đáng kể so với protein PCV2 ORF2 mà không bao gồm đột biến này.

Thuật ngữ “gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin được mã hóa di truyền”, như được mô tả trong ngữ cảnh sáng chế này, cụ thể là dùng để chỉ gốc axit amin (mã chữ cái đơn lẻ trong ngoặc đơn) được chọn từ nhóm gồm gốc alanin (A), gốc aspartat (D), gốc asparagin (N), gốc xystein (C), gốc glutamin (Q), gốc glutamat (E), gốc phenylalanin (F), gốc glyxin (G), gốc histidin (H), gốc isoleuxin (I), gốc leuxin (L), gốc methionin (M), gốc prolin (P), gốc serin (S), gốc threonin (T), gốc valin (V), gốc tryptophan (W), và gốc tyrosin (Y).

Cụ thể hơn, gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin amino này được chọn từ nhóm gồm gốc axit amin với mạch bên có cực nhưng không mang điện tích, gốc axit amin với mạch bên kỵ nước, và gốc glyxin, trong đó tốt hơn là gốc axit amin với mạch bên có cực nhưng không mang điện tích được chọn từ nhóm gồm gốc serin, gốc threonin, gốc tyrosin, gốc asparagin, và gốc glutamin, và/hoặc trong đó gốc axit amin với mạch bên kỵ nước đã nêu tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm gốc alanin,

gốc valin, gốc leuxin, gốc isoleuxin, gốc phenylalanin, và gốc tryptophan.

Tốt nhất là, gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin, như được đề cập đến trong bản mô tả này, được chọn từ nhóm gồm gốc serin và gốc threonin.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, polypeptit theo sáng chế là protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp, như protein PCV2 ORF2 được biểu hiện ở baculovirus tái tổ hợp.

Thuật ngữ “protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, cụ thể là đề cập đến phân tử protein được biểu hiện từ phân tử ADN tái tổ hợp, như polypeptit được sản xuất bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. Một ví dụ về công nghệ như vậy bao gồm trường hợp khi ADN mã hóa protein được biểu hiện được cài xen vào vector biểu hiện thích hợp, tốt hơn là vector biểu hiện baculovirus, vector này được sử dụng để truyền nhiễm, hoặc trong trường hợp vector biểu hiện baculovirus gây nhiễm, tế bào chủ để sản sinh protein hoặc polypeptit được mã hóa bởi ADN này. Vì vậy, thuật ngữ “protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, cụ thể là đề cập đến phân tử protein được biểu hiện từ phân tử ADN tái tổ hợp.

Theo một ví dụ cụ thể, protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp được sản xuất bởi phương pháp bao gồm các bước sau: Gen PCV2 ORF2 được tạo dòng vào vector truyền baculovirus; vector truyền này được sử dụng để tạo ra baculovirus tái tổ hợp chứa gen đã nêu bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong các tế bào côn trùng; và tiếp theo protein PCV2 ORF2 được biểu hiện ở tế bào côn trùng trong quá trình gây nhiễm baculovirus tái tổ hợp.

Theo một ví dụ khác, protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp được biểu hiện ở tế bào côn trùng từ plasmid biểu hiện tái tổ hợp. Trong trường hợp của một ví dụ khác, không cần đến baculovirus.

Cần phải hiểu kỹ hơn rằng thuật ngữ “protein PCV2 tái tổ hợp bao gồm trình tự” cụ thể cũng liên quan đến sự cải biến hoặc những sự cải biến đồng phiên mã và/hoặc sau phiên mã của trình tự được gây ra bởi tế bào mà ở đó polypeptit này được biểu hiện. Vì vậy, thuật ngữ “protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp bao gồm trình tự”, như được mô tả ở đây, cũng nhằm đến trình tự có một hoặc nhiều cải biến được gây ra bởi tế bào mà ở đó polypeptit này được biểu hiện, cụ thể là những cải biến của gốc axit

amin được gây ra trong quá trình sinh tổng hợp protein và/hoặc xử lý protein, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm glycosyl hóa, phosphoryl hóa và axetyl hóa.

Tốt hơn là, protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp theo sáng chế được sản xuất hoặc có thể thu được bởi hệ biểu hiện baculovirus, cụ thể là ở tế bào côn trùng được nuôi cấy.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, polypeptit theo sáng chế là protein ORF2 PCV2 kiểu phụ b (PCV2b) .

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác nữa, polypeptit theo sáng chế là protein PCV2 ORF2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin có mức đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 90%, tốt hơn là ít nhất là 92%, tốt hơn nữa là ít nhất là 94%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 96%, cũng tốt hơn nữa là ít nhất là 98%, hoặc cụ thể là 100% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.

Tốt nhất là, polypeptit theo sáng chế được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 6-9, cũng được chỉ ra trên Fig. 8. Vì vậy, polypeptit theo sáng chế tốt hơn là được chọn từ các trình tự (i)-(iv) sau:

(i) MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIF
NTRLSTXGYTXKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYR
IRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTI
TQPFSYHSRYFTPKPVLDTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAF
ENSIYDQxYNIRXTMYVQFREFNLKDPPLNP (SEQ ID NO:6),

(ii) MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIF
NTRLSTXGYTXKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYR
IRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTI
TQPFSYHSRYFTPKPVLDTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAF
ENSIYDQxYNIRXTMYVQFREFNLKDPPLNP (SEQ ID NO:7),

(iii) MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIF
NTRLSTXGYTXKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYR
IRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTI
TQPFSYHSRYFTPKPVLDTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAF
ENSIYDQxYNIRXTMYVQFREFNLKDPPLNPX (SEQ ID NO:8),

(iv) MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIF

NTRL SRTXGYTXKKTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYR
IRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTI
TQPFSYHSRYFTPKPVLDTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAF
ENSIYDQxYNIRXTMYVQFREFNLKDPPLNPX (SEQ ID NO:9),

trong đó trong các trình tự (i)-(iv) này:

“X” là gốc axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W và Y;

“X” là gốc axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W và Y; và

“x” là gốc axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm D và E.

Nhằm mục đích giải thích và trong ví dụ không giới hạn, polypeptit theo sáng chế là polypeptit bao gồm trình tự:

MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL VHPRHRYRWRRKNGIFNTR
LSRTIGYTVKKTTVXTPSWNVDMMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFEEYYRIRKV
KVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFS
YHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKRNQLWLRLQTTGNVDHVGLGTAFENSIY
DQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLNPK (SEQ ID NO:46),

trong đó “X” là gốc axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W và Y.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác nữa của sáng chế, protein PCV2 ORF2 kiểu đại, như được mô tả ở đây, là protein được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, sáng chế còn đề xuất chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế, và polypeptit PCV2a ORF-2, trong đó polypeptit PCV2a ORF-2 này tốt hơn là polypeptit mà có ít nhất 94% hoặc tốt hơn là ít nhất là 95 % trình tự giống với trình tự của SEQ ID NO: 3.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa polypeptit theo sáng chế, trong đó polynucleotit theo sáng chế tốt hơn là polynucleotit được phân lập.

Nhằm mục đích nêu làm ví dụ và trong một ví dụ không giới hạn, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự set nêu trong SEQ ID NO: 4.

Việc sản xuất polynucleotit được mô tả ở đây là trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và có thể được thực hiện theo các công nghệ tái tổ hợp được mô tả trong tài liệu Sam brook *et al.*, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Amusable, *et al.*, 2003, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis *et al.* (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; và Erlich (ed), 1994, PCR Technology, Oxford University Press, New York, ngoài những tài liệu khác, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế cũng đề xuất cụ thể đến baculovirus chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa polypeptit theo sáng chế, trong đó baculovirus theo sáng chế tốt hơn là baculovirus được phân lập.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất plasmit, tốt hơn là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit theo sáng chế, trong đó plasmit theo sáng chế cụ thể là plasmit được phân lập.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chứa baculovirus bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit theo sáng chế, hoặc plasmit, tốt hơn là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit theo sáng chế, trong đó tế bào theo sáng chế tốt hơn là tế bào được phân lập.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng polypeptit theo sáng chế; baculovirus theo sáng chế; chế phẩm miễn dịch theo sáng chế; polynucleotit theo sáng chế; plasmit theo sáng chế; và/hoặc tế bào theo sáng chế để bào chế thuốc, tốt hơn là vaccin.

Trong bản mô tả này, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước gây nhiễm tế bào, tốt hơn là tế

bào côn trùng, với baculovirus theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước chuyển nhiễm tế bào với plasmit theo sáng chế.

Tốt hơn là, polypeptit theo sáng chế được biểu hiện với lượng lớn đủ để hạt tương tự virus tự gắn một cách ổn định, mà sau đó những hạt này có thể được sử dụng để chủng ngừa bằng một mũi duy nhất, cụ thể là khi chúng được chứa trong một chế phẩm miễn dịch, nhờ đó cho phép làm giảm và ngăn ngừa các triệu chứng lâm sàng được gây ra do sự nhiễm PCV2, chẳng hạn như nhiễm PCV2b và/hoặc PCV2a.

Vì vậy, sáng chế cụ thể còn dựa trên polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch theo sáng chế, một cách tương ứng, trong đó polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng cho các mục đích cụ thể.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế để dùng trong phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2, làm giảm, phòng ngừa hoặc điều trị các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi sự nhiễm PCV2, hoặc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh gây ra bởi sự nhiễm PCV2.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2, làm giảm, phòng ngừa hoặc điều trị các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi sự nhiễm PCV2, hoặc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh gây ra bởi sự nhiễm PCV2, bao gồm bước cho động vật, cụ thể là động vật cần điều trị hoặc phòng ngừa, sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc sử dụng chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2, làm giảm, phòng ngừa hoặc điều trị các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi sự nhiễm PCV2, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh gây ra bởi sự nhiễm PCV2.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, sự nhiễm PCV2, như được mô tả ở đây, là sự nhiễm PCV2 kiểu phụ b (PCV2b) và/hoặc sự nhiễm PCV2 thuộc kiểu phụ khác với

kiểu phụ 2b.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhiễm PCV2” là tương đương với thuật ngữ “sự nhiễm PCV2”.

Cụ thể là, sự nhiễm PCV2 thuộc kiểu phụ khác với kiểu phụ 2b, như được đề cập ở đây, là sự nhiễm PCV2 kiểu phụ a (PCV2a) và/hoặc PCV2 kiểu phụ c (PCV2c), và tốt hơn là sự nhiễm PCV2a.

Thuật ngữ “protein ORF2 PCV2 kiểu phụ b (PCV2b)”, như được mô tả ở đây, dùng để chỉ protein được mã hóa bởi gen ORF2 của PCV-2b như được định nghĩa bởi danh pháp tiêu chuẩn đối với định nghĩa về kiểu gen PCV2 (Segales, J. *et al.*, 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8) được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, sự nhiễm PCV2 thuộc kiểu phụ khác với kiểu phụ 2b, như được mô tả ở đây, là nhiễm đồng thời (i) PCV2 thuộc kiểu phụ khác với kiểu phụ 2b và (ii) PCV2b, cụ thể là nhiễm đồng thời PCV2a và PCV2b.

Thuật ngữ “PCV2a”, “PCV2b” và “PCV2c”, tương ứng, như được mô tả ở đây, dùng để chỉ PCV-2a, PCV-2b và PCV-2c, tương ứng, theo danh pháp tiêu chuẩn đối với định nghĩa về kiểu gen PCV2 (Segales, J. *et al.*, 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Cụ thể là, sự nhiễm PCV2b, như được đề cập ở đây, là sự nhiễm (i) PCV2 chứa polypeptit có ít nhất là 94%, tốt hơn là ít nhất là 95%, tốt hơn nữa là ít nhất là 96%, cũng tốt hơn nữa là ít nhất là 97%, tốt hơn nữa là ít nhất là 98%, và tốt nhất là ít nhất là 99% trình tự giống với trình tự SEQ ID NO: 2 hoặc (ii) PCV2 chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa polypeptit có ít nhất là 94%, tốt hơn là ít nhất là 95%, tốt hơn nữa là ít nhất là 96%, cũng tốt hơn nữa là ít nhất là 97 %, tốt hơn nữa là ít nhất là 98%, và tốt nhất là ít nhất là 99% trình tự giống với trình tự SEQ ID NO:2.

Như được sử dụng ở đây, cụ thể là cần hiểu rằng thuật ngữ “giống với trình tự SEQ ID NO: X” là tương đương với thuật ngữ “giống với trình tự SEQ ID NO: X trên chiều dài của SEQ ID NO: X” hoặc tương đương với thuật ngữ “giống với trình tự SEQ ID NO: X trên toàn bộ chiều dài của SEQ ID NO: X”, tương ứng. Trong bản mô tả này, “X” là số nguyên bất kỳ được chọn từ 1 đến 3 sao cho “SEQ ID NO: X” là

trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO nêu ở đây.

Tốt hơn là, sự nhiễm PCV2a, như được mô tả ở đây, là sự nhiễm (i) PCV2 chứa polypeptit mà có ít nhất 94%, tốt hơn là ít nhất là 95%, tốt hơn nữa là ít nhất là 96%, cũng tốt hơn nữa là ít nhất là 97%, tốt hơn nữa là ít nhất là 98%, và tốt nhất là ít nhất là 99% trình tự giống với trình tự SEQ ID NO:3 hoặc (ii) PCV2 chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa polypeptit có ít nhất 94%, tốt hơn là ít nhất là 95%, tốt hơn nữa là ít nhất là 96%, cũng tốt hơn nữa là ít nhất là 97%, tốt hơn nữa là ít nhất là 98%, và tốt nhất là ít nhất là 99% trình tự giống với trình tự SEQ ID NO:3.

Tốt hơn là, trong bản mô tả sáng chế này, việc điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 là dựa trên hoặc bao gồm hoặc gồm có việc gây ra đáp ứng miễn dịch đối với PCV2 đã nêu, các triệu chứng lâm sàng, như được đề cập ở đây, được chọn từ nhóm gồm tiêu mô bạch huyết, viêm mô bạch huyết, IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô bạch huyết, nhiễm virus trong máu, chảy nước mũi, sốt, lượng tăng thể trọng trung bình hàng ngày giảm, viêm phổi, IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô phổi, và/hoặc bệnh, như được đề cập ở đây, là PMWS.

Cụ thể là, trong bản mô tả sáng chế này, việc điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 thuộc kiểu phụ khác không phải 2b được dựa trên hoặc bao gồm hoặc gồm có việc gây ra đáp ứng miễn dịch đối với PCV2 thuộc kiểu phụ khác không phải 2b đã nêu hoặc đồng thời gây ra đáp ứng miễn dịch đối với PCV2 thuộc kiểu phụ khác với 2b và đối với PCV2b.

Thuật ngữ “sự phòng ngừa” hoặc “sự giảm” hoặc “việc phòng ngừa” hoặc “việc giảm” tương ứng, như được sử dụng ở đây, có nghĩa, nhưng không giới hạn ở, quy trình bao gồm bước cho động vật sử dụng kháng nguyên PCV2, cụ thể là polypeptit theo sáng chế, được chứa trong chế phẩm theo sáng chế, trong đó kháng nguyên PCV2 đã nêu, khi được dùng cho động vật đã nêu gây ra hoặc có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch đối với PCV2 ở động vật đã nêu. Nhìn chung, việc điều trị như vậy làm giảm các triệu chứng lâm sàng của bệnh gây ra bởi PCV2 hoặc các triệu chứng lâm sàng có liên quan đến sự nhiễm PCV2, tương ứng. Cụ thể hơn, thuật ngữ “phòng ngừa” hoặc “việc phòng ngừa”, như được sử dụng ở đây, thường có nghĩa là quá trình phòng bệnh trong đó động vật được cho tiếp xúc với chế phẩm miễn dịch theo sáng chế trước khi gây ra hoặc khởi phát quá trình bệnh gây ra bởi PCV2.

Ở đây, “làm giảm các triệu chứng lâm sàng có liên quan đến sự nhiễm PCV2” có nghĩa là, nhưng không giới hạn ở, làm giảm số lượng đối tượng bị lây nhiễm trong nhóm, làm giảm hoặc loại bỏ số đối tượng thể hiện các triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm, hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng lâm sàng bất kỳ có mặt trong đối tượng, so với lây nhiễm kiểu đại. Ví dụ, thuật ngữ này đề cập đến sự giảm bất kỳ tải lượng mầm bệnh, sự thải loại mầm bệnh, làm giảm sự lan truyền mầm bệnh, hoặc làm giảm triệu chứng lâm sàng bất kỳ của sự nhiễm PCV2. Tốt hơn là, các triệu chứng lâm sàng ở đối tượng nhận chế phẩm theo sáng chế được giảm ít nhất 10% so với đối tượng không nhận chế phẩm và có thể bị nhiễm. Tốt hơn nữa là, các triệu chứng lâm sàng ở đối tượng nhận chế phẩm theo sáng chế giảm ít nhất 20%, tốt hơn là giảm ít nhất 30%, tốt hơn là ít nhất 40%, và thậm chí tốt hơn là ít nhất 50%.

Thuật ngữ “giảm sự nhiễm virus trong máu” có nghĩa, nhưng không giới hạn ở, giảm virus PCV2 đi vào dòng máu của động vật, trong khi mức độ nhiễm virus trong máu, nghĩa là, số lượng bản sao ARN PCV2 trong một ml huyết thanh máu hoặc số lượng khuẩn lạc tạo đám hoại tử trong một đề-xi-lít huyết thanh máu, trong huyết thanh máu của đối tượng nhận chế phẩm theo sáng chế giảm ít nhất 50% so với đối tượng không nhận chế phẩm và có thể bị nhiễm. Tốt hơn nữa là, mức độ nhiễm virus trong máu ở đối tượng nhận chế phẩm theo sáng chế giảm ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 99,9%, tốt hơn là ít nhất 99,99%, và thậm chí tốt hơn là ít nhất 99,999%.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhiễm virus trong máu” được hiểu cụ thể như là tình trạng bệnh trong đó các hạt PCV2 tái sinh và tuần hoàn trong dòng máu của động vật.

Thuật ngữ “động vật”, như được sử dụng ở đây, cụ thể là dùng để chỉ động vật có vú, tốt hơn là họ lợn, tốt hơn là lợn, tốt nhất là lợn con.

Theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế, polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch theo sáng chế chỉ được dùng một lần.

Tốt hơn là, trong bản mô tả của sáng chế, polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch theo sáng chế để dùng hoặc được dùng, tương ứng, cụ thể là chỉ một lần, cho động vật, tốt hơn là họ lợn, tốt hơn là lợn, cụ thể tốt hơn là lợn con.

Sáng chế này khắc phục được các nhược điểm vốn có trước đây và tạo ra sự cải

tiến rõ rệt trong lĩnh vực. Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc sự giảm các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng-PCV2, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch theo sáng chế với lượng hữu hiệu.

Thuật ngữ “vacxin” hoặc “chế phẩm miễn dịch” (cả hai thuật ngữ đều được sử dụng đồng nghĩa) như được sử dụng ở đây dùng để chỉ được phẩm bất kỳ chứa polypeptit theo sáng chế, được phẩm này có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở đối tượng. Chế phẩm miễn dịch được ưu tiên có thể gây ra, kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với PCV2. Vì vậy, thuật ngữ này bao hàm cả các chế phẩm miễn dịch dưới đơn vị, như được mô tả dưới đây, cũng như là các chế phẩm chứa thể đột biến PCV2b nguyên vẹn đã được làm chết, hoặc được làm giảm độc lực và/hoặc được làm bất hoạt.

Cụ thể, cần phải hiểu rằng thuật ngữ “thể đột biến PCV2b”, như được mô tả ở đây, dùng để chỉ thể đột biến PCV2b chứa polypeptit theo sáng chế và/hoặc polynucleotit theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc phương pháp làm giảm các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2, cụ thể là kháng thể kháng PCV2 có nguồn gốc từ mẹ, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế với lượng hữu hiệu, trong đó chế phẩm miễn dịch là chế phẩm miễn dịch dưới đơn vị, các chế phẩm chứa PCV2b nguyên vẹn được làm chết, hoặc được làm giảm độc lực và/hoặc được làm bất hoạt.

Thuật ngữ “chế phẩm miễn dịch dưới đơn vị” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chế phẩm chứa ít nhất một polypeptit miễn dịch hoặc kháng nguyên, nhưng không phải tất cả các kháng nguyên, bắt nguồn từ hoặc tương đồng với kháng nguyên từ thể đột biến PCV2b. Chế phẩm như vậy về cơ bản không chứa thể đột biến PCV2b ở dạng nguyên vẹn. Vì vậy, “chế phẩm miễn dịch dưới đơn vị” được điều chế từ các polypeptit miễn dịch được tinh chế hoặc phân đoạn ít nhất một phần (tốt hơn là về cơ bản được tinh chế) từ thể đột biến PCV2b, hoặc các chất tương tự tái tổ hợp của nó.

Chế phẩm miễn dịch dưới đơn vị có thể bao gồm kháng nguyên dưới đơn vị hoặc các kháng nguyên quan tâm về cơ bản không chứa các kháng nguyên hoặc polypeptit khác từ thể đột biến PCV2b, hoặc trong các phân đoạn từ thể đột biến này. Chế phẩm miễn dịch dưới đơn vị được ưu tiên bao gồm polypeptit theo sáng chế như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch” có nghĩa, nhưng không giới hạn ở, sự phát triển đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể ở vật chủ đối với chế phẩm hoặc vaccin quan tâm. Thông thường, “đáp ứng miễn dịch” bao gồm nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều tác động sau đây: sự sản sinh hoặc hoạt hóa kháng thể, tế bào B, tế bào T hỗ trợ, tế bào T ức chế, và/hoặc tế bào T gây độc tế bào, hướng cụ thể đến kháng nguyên hoặc các kháng nguyên được chứa trong chế phẩm hoặc vaccin quan tâm. Tốt hơn là, vật chủ sẽ thể hiện đáp ứng đáp ứng (trí nhớ) miễn dịch điều trị hoặc bảo vệ mà nó chống lại việc lây nhiễm mới sẽ gia tăng và/hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng về mặt lâm sàng của bệnh. Sự bảo vệ như vậy sẽ được chứng minh bởi sự giảm về số lượng hoặc mức độ nghiêm trọng của, hoặc sự vắng mặt của một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến sự nhiễm PCV2, cụ thể là sự nhiễm PCV2 kiểu phụ b (PCV2b) và/hoặc sự nhiễm PCV2 thuộc kiểu phụ khác ngoài kiểu phụ 2b, làm chậm sự khởi phát sự nhiễm virus trong máu, làm giảm tính bền của virus, làm giảm toàn bộ tải lượng virus và/hoặc làm giảm sự tiết virus.

Thuật ngữ “kháng nguyên” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ trình tự axit amin mà gây ra đáp ứng miễn dịch như đã nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, tốt nhất là chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây bao gồm polypeptit theo sáng chế, hoặc đoạn của nó, được biểu hiện bởi polypeptit theo sáng chế. Polypeptit được ưu tiên theo sáng chế là polypeptit có SEQ ID NO: 1. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng trình tự này có thể thay đổi đến mức độ tương đồng về mặt trình tự là 1-5% và vẫn còn các đặc tính kháng nguyên khiến cho nó có thể sử dụng trong các chế phẩm miễn dịch theo sáng chế.

“Tính đồng nhất về mặt trình tự” như đã biết trong lĩnh vực dùng để chỉ mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều hơn hai trình tự polypeptit hoặc hai hoặc nhiều hơn hai trình tự polynucleotit, cụ thể là trình tự tham chiếu và một trình tự cho trước để so

sánh với trình tự tham chiếu này. Tính đồng nhất về mặt trình tự được xác định bằng cách so sánh trình tự đã nêu với trình tự tham chiếu sau khi các trình tự này đã được sắp thẳng hàng một cách tối ưu để tạo ra mức độ tương tự cao nhất về mặt trình tự, như được xác định bởi sự phù hợp giữa các chuỗi trình tự này. Bằng cách sắp thẳng hàng như vậy, độ đồng nhất về mặt trình tự được xác định ở mỗi vị trí, chẳng hạn, các trình tự là “đồng nhất” ở một vị trí cụ thể nếu ở vị trí đó, các nucleotit hoặc gốc axit amin là giống nhau. Tiếp theo, tổng số các độ đồng nhất vị trí như vậy được chia cho tổng số nucleotit hoặc các gốc trong trình tự tham chiếu để thu được độ đồng nhất về mặt trình tự tính theo %. Độ đồng nhất về mặt trình tự có thể được tính toán một cách dễ dàng bằng các phương pháp đã biết, bao gồm nhưng không giới hạn ở, các phương pháp được mô tả trong tài liệu: Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); và Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp được ưu tiên để xác định độ đồng nhất về mặt trình tự được thiết kế sao cho thu được sự phù hợp lớn nhất giữa các trình tự được thử nghiệm. Các phương pháp để xác định độ đồng nhất về mặt trình tự được mã hóa trong các chương trình máy tính sẵn có công khai mà nó xác định độ đồng nhất về mặt trình tự giữa các trình tự đã nêu. Ví dụ về các chương trình như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gói chương trình GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN và FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990). Chương trình BLASTX sẵn có công khai từ NCBI và các nguồn khác (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. *et al.*, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Các chương trình này sắp thẳng hàng các trình tự theo cách tối ưu bằng cách sử dụng trọng số khoảng hở mặc định để tạo ra mức độ đồng nhất cao nhất về mặt trình tự giữa trình tự tham chiếu và trình tự đưa ra. Theo một ví dụ minh họa, do polynucleotit có trình tự nucleotit có “mức đồng

nhất về mặt trình tự” ít nhất là, chẳng hạn, 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là 95% với trình tự nucleotit tham chiếu, dự định rằng trình tự nucleotit của polynucleotit đã nêu là giống với trình tự tham chiếu chỉ khác là trình tự polynucleotit đã nêu có thể bao gồm lên tới 15, tốt hơn là lên tới 10, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5 đột biến điểm trên mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham chiếu. Nói cách khác, trong polynucleotit có trình tự nucleotit có mức đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là 95% so với trình tự nucleotit tham chiếu, thì có tới 15%, tốt hơn là 10%, thậm chí tốt hơn nữa là 5% nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được loại bỏ hoặc thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc một số lượng nucleotit lên tới 15%, tốt hơn là 10%, thậm chí tốt hơn nữa là 5% tổng số nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được cài xen vào trình tự tham chiếu. Các đột biến như vậy đối với trình tự tham chiếu có thể xảy ra ở các vị trí đầu tận cùng 5’ hoặc 3’ của trình tự nucleotit tham chiếu hoặc ở bất kỳ nơi nào giữa các vị trí đầu tận cùng này, được nằm rải rác riêng rẽ trong các nucleotit trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề thuộc trình tự tham chiếu này. Tương tự, do i tit có trình tự axit amin đã nêu có mức đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là, chẳng hạn, 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là 95% với trình tự axit amin tham chiếu, dự định rằng trình tự axit amin đã nêu của polypeptit giống với trình tự tham chiếu chỉ khác ở chỗ trình tự polypeptit đã nêu có thể bao gồm lên tới 15, tốt hơn là lên tới 10, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5 sự thay đổi axit amin trên mỗi 100 axit amin của trình tự axit amin tham chiếu. Nói cách khác, để thu được trình tự polypeptit đã nêu có mức đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là 95% với trình tự axit amin tham chiếu, thì lên tới 15%, tốt hơn là lên tới 10%, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5% gốc axit amin trong trình tự tham chiếu có thể được loại bỏ hoặc được thay thế bằng một axit amin khác, hoặc số lượng axit amin lên tới 15%, tốt hơn là lên tới 10%, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5% tổng số gốc axit amin trong trình tự tham chiếu có thể được cài xen vào trình tự tham chiếu. Những thay đổi như vậy đối với trình tự tham chiếu có thể xảy ra ở các vị trí đầu tận cùng amino hoặc carboxy của trình tự axit amin tham chiếu hoặc ở bất kỳ nơi nào giữa các vị trí đầu tận cùng này, được nằm rải rác riêng rẽ trong số các gốc trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề thuộc trình tự tham chiếu này. Tốt hơn là, các vị trí còn lại không giống nhau, khác biệt bởi các thay thế axit amin có bảo

toàn. Tuy nhiên, các thay thế có bảo toàn không được tính như là khớp khi xác định độ đồng nhất về mặt trình tự.

“Sự tương đồng về mặt trình tự”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ phương pháp xác định mối quan hệ giữa hai trình tự. Để xác định mức tương đồng về mặt trình tự, hai hoặc nhiều hơn hai trình tự được sắp thẳng hàng theo cách tối ưu, và các khoảng trống được đưa vào nếu cần. Tuy nhiên, ngược với “mức đồng nhất về mặt trình tự”, các thay thế axit amin có bảo toàn được tính là khớp khi xác định mức tương đồng về mặt trình tự. Nói cách khác, để thu được polypeptit hoặc polynucleotit có mức tương đồng về mặt trình tự là 95% với trình tự tham chiếu, 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là 95% gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự tham chiếu cần phải khớp với hoặc bao gồm sự thay thế có bảo toàn bằng một axit amin hoặc nucleotit khác, hoặc một số lượng axit amin hoặc nucleotit lên tới 15%, tốt hơn là lên tới 10%, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5% tổng số gốc axit amin hoặc nucleotit, không bao gồm các thay thế có bảo toàn, trong trình tự tham chiếu có thể được cài xen vào trình tự tham chiếu. Tốt hơn là, trình tự tương đồng bao gồm ít nhất một mạch gồm 50, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 100, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 250, và thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 500 nucleotit.

“Sự thay thế có bảo toàn” dùng để chỉ sự thế của gốc axit amin hoặc nucleotit bằng gốc axit amin hoặc nucleotit khác có đặc điểm hoặc đặc tính tương tự bao gồm kích thước, tính kỵ nước, v.v., sao cho độ chức tổng thể không bị thay đổi một cách đáng kể.

“Được phân lập” có nghĩa là được thay đổi “bởi bàn tay con người” từ trạng thái tự nhiên của nó, nghĩa là, nếu nó xuất hiện trong tự nhiên, nó được thay đổi hoặc loại bỏ khỏi môi trường ban đầu của nó, hoặc cả hai. Chẳng hạn, polynucleotit hoặc polypeptit có mặt trong tự nhiên trong cơ thể sống không “được phân lập” nhưng polynucleotit hoặc polypeptit tương tự được tách từ nguyên liệu đồng tồn tại của trạng thái tự nhiên của nó là “được phân lập”, theo như thuật ngữ được dùng ở đây.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất a phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2, cụ thể là kháng thể kháng PCV2 có nguồn gốc từ mẹ, bao gồm bước

cho động vật cần điều trị sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế với lượng hữu hiệu, trong đó polypeptit theo sáng chế đã nêu là polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, polypeptit của protein theo sáng chế là: (i) polypeptit bao gồm hoặc gồm có trình tự SEQ ID NO: 1; hoặc (ii) polypeptit bất kỳ mà có mức tương đồng ít nhất 95% với polypeptit nêu ở (i).

Theo một khía cạnh khác, polypeptit theo sáng chế được đưa vào chế phẩm miễn dịch ở tỷ lệ protein hữu hiệu để gây ra đáp ứng miễn dịch mong muốn, cụ thể là làm giảm tỷ lệ mắc bệnh, làm giảm mức độ nghiêm trọng của, hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng gây ra do hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2. Tốt hơn là, tỷ lệ polypeptit theo sáng chế ít nhất là 0,2µg protein / ml chế phẩm miễn dịch cuối (µg/ml), tốt hơn nữa là từ khoảng 0,2 đến khoảng 400 µg/ml, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,3 đến khoảng 200 µg/ml, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 0,35 đến khoảng 100 µg/ml, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,4 đến khoảng 50 µg/ml, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,45 đến khoảng 30 µg/ml, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,5 đến khoảng 18 µg /ml, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 0,6 đến khoảng 15 µg/ml thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 0,75 đến khoảng 8 µg/ml, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 1,0 đến khoảng 6 µg/ml, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 1,3 đến khoảng 3,0 µg/ml, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 1,4 đến khoảng 2,5 µg/ml, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 1,5 đến khoảng 2,0 µg/ml, và tốt nhất là khoảng 1,6 µg/ml.

Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ protein ít nhất là 0,2 µg/ PCV2b ORF-2 protein như đã nêu trên trên một liều chế phẩm miễn dịch cuối cùng (µg/liều), tốt hơn nữa là từ khoảng 0,2 đến khoảng 400 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,3 đến khoảng 200 µg/liều, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 0,35 đến khoảng 100 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,4 đến khoảng 50 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,45 đến khoảng 30 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 0,5 đến khoảng 18 µg/liều, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 0,6 đến khoảng 15 µg/ml, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 0,75 đến khoảng 8 µg/liều, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 1,0 đến khoảng 6 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là từ khoảng 1,3 đến khoảng 3,0 µg/liều, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 1,4 đến khoảng 2,5 µg/liều, thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng 1,5

đến khoảng 2,0 µg/liều, và tốt nhất là khoảng 1,6 µg/liều. Ngoài ra, tỷ lệ polypeptit theo sáng chế (hàm lượng kháng nguyên) nhỏ hơn 20 µg/liều, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 18 µg/liều là thích hợp để có được tính miễn dịch ở các động vật con và/hoặc ở các động vật mà dương tính đối với kháng thể PCV2, cụ thể là những động vật dương tính đối với kháng thể kháng PCV2 có nguồn gốc từ mẹ. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2, cụ thể là kháng thể kháng PCV2 có nguồn gốc từ mẹ, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế với lượng ít hơn 20µg/ liều, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 18 µg/liều. Polypeptit đã nêu theo sáng chế là polypeptit bất kỳ được mô tả trong đơn sáng chế này.

Polypeptit theo sáng chế được sử dụng trong chế phẩm miễn dịch theo sáng chế có thể thu được theo cách bất kỳ bao gồm phân lập và tinh chế polypeptit theo sáng chế, tổng hợp protein tiêu chuẩn, và phương pháp tái tổ hợp. Các phương pháp được ưu tiên để thu nhận polypeptit theo sáng chế được đề xuất trong WO06/072065, toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, do bất ngờ phát hiện ra rằng các phương pháp được mô tả ở đây để thu nhận polypeptit PCV2a ORF-2 có thể được sử dụng một cách phù hợp để thu nhận polypeptit theo sáng chế. Tóm lại, các tế bào dễ bị ảnh hưởng được gây nhiễm với vector virus tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa ADN mã hóa polypeptit theo sáng chế, polypeptit của protein theo sáng chế được biểu hiện bởi virus tái tổ hợp này, và polypeptit được biểu hiện theo sáng chế được thu nhận từ phần dịch nổi bằng cách lọc và làm bất hoạt bằng phương pháp thông thường bất kỳ, tốt hơn là bằng cách sử dụng etylenimin hai thành phần, chất này sau đó được trung hòa để dừng quá trình bất hoạt.

Chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây còn dùng để chỉ chế phẩm bao gồm i) polypeptit bất kỳ theo sáng chế được mô tả trên đây, tốt hơn là với nồng độ đã nêu ở trên, và ii) ít nhất một phần vector virus biểu hiện polypeptit theo sáng chế, tốt hơn là một phần của baculovirus tái tổ hợp. Ngoài ra, chế phẩm miễn dịch có thể bao gồm i) polypeptit bất kỳ theo sáng chế được mô tả trên đây, tốt hơn là với nồng độ đã

nêu ở trên, ii) ít nhất một phần vector virus biểu hiện polypeptit theo sáng chế, tốt hơn là một phần của baculovirus tái tổ hợp, và iii) một phần dịch nuôi cấy tế bào.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2, cụ thể là kháng thể kháng PCV2 có nguồn gốc từ mẹ, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế với lượng hữu hiệu, trong đó polypeptit theo sáng chế là polypeptit tái tổ hợp, tốt hơn là polypeptit theo sáng chế được biểu hiện ở baculovirus. Tốt hơn là, polypeptit tái tổ hợp hoặc được biểu hiện ở baculovirus theo sáng chế có trình tự như đã nêu trên.

Chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây còn dùng để chỉ chế phẩm bao gồm i) polypeptit bất kỳ theo sáng chế được mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ đã nêu ở trên, ii) ít nhất một phần vector virus biểu hiện polypeptit đã nêu theo sáng chế, tốt hơn là một phần của baculovirus tái tổ hợp, và iii) một phần dịch nuôi cấy tế bào; trong đó khoảng 90% các hợp phần có kích cỡ nhỏ hơn 1 μm .

Chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây còn dùng để chỉ các chế phẩm bao gồm i) polypeptit bất kỳ theo sáng chế được mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ đã nêu ở trên, ii) ít nhất một phần vector virus biểu hiện polypeptit đã nêu theo sáng chế, iii) một phần dịch nuôi cấy tế bào, iv) và tác nhân gây bất hoạt để làm bất hoạt vector virus tái tổ hợp tốt hơn là BEI, trong đó khoảng 90% các hợp phần từ i) đến iii) có kích cỡ nhỏ hơn 1 μm . Tốt hơn là, BEI có mặt với nồng độ hữu hiệu để làm bất hoạt baculovirus, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến khoảng 8 mM BEI, tốt hơn là khoảng 5 mM BEI.

Chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây còn dùng để chỉ chế phẩm bao gồm i) polypeptit bất kỳ theo sáng chế được mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ đã nêu ở trên, ii) ít nhất một phần vector virus biểu hiện polypeptit đã nêu theo sáng chế, iii) một phần dịch nuôi cấy tế bào, iv) tác nhân gây bất hoạt để làm bất hoạt vector virus tái tổ hợp, tốt hơn là BEI, và v) tác nhân trung hòa để dừng quá trình bất hoạt do tác nhân gây bất hoạt gây ra, trong đó khoảng 90% các hợp phần từ i) đến iii) có kích

cỡ nhỏ hơn 1 μm . Tốt hơn là, nếu tác nhân gây bất hoạt là BEI, chế phẩm đã nêu bao gồm natri thiosulfat với lượng tương đương với BEI.

Protein được kết hợp vào chế phẩm có thể được dùng cho động vật dễ bị nhiễm PCV2. Ở các dạng được ưu tiên, chế phẩm cũng có thể bao gồm các hợp phần khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (cũng xem Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18th ed. Mack Publ., Easton). Ngoài ra, chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều chất mang có thể chấp nhận được trong thú y. Như được sử dụng ở đây, "chất mang có thể chấp nhận được trong thú y" bao gồm bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, chất bao, tá dược, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn và chất kháng nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm quá trình hấp phụ, và các chất tương tự. Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm miễn dịch bao gồm polypeptit theo sáng chế như được đề xuất ở đây, tốt hơn là với nồng độ đã nêu ở trên, được trộn với tá dược, tốt hơn là Carbopol, và nước muối sinh lý.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng chế phẩm được sử dụng ở đây có thể kết hợp các dung dịch đã biết có thể dùng để tiêm, chấp nhận được về mặt sinh lý và tiết trùng. Để bào chế dung dịch dùng ngay để tiêm hoặc truyền ngoài đường tiêu hóa, các dung dịch nước đẳng trương, chẳng hạn như nước muối hoặc các dung dịch protein huyết thanh tương ứng là sẵn có để dùng. Ngoài ra, các chế phẩm miễn dịch và vacxin theo sáng chế có thể bao gồm chất pha loãng, chất đẳng trương, chất làm ổn định, hoặc tá dược. Chất pha loãng có thể bao gồm nước, nước muối, dextroza, etanol, glyxerol, và các chất tương tự. Chất đẳng trương có thể bao gồm natri clorua, dextroza, manitol, sorbitol, và lactoza, ngoài những chất khác. Chất làm ổn định bao gồm albumin và các muối kiềm của axit etylenđiamintetraxetic, ngoài các chất khác.

"Tá dược" như được sử dụng ở đây, có thể bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, saponin chẳng hạn, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước. Nhũ tương có thể là trên cơ sở, cụ thể là, dầu parafin lỏng nhẹ (loại European Pharmacopea); dầu isoprenoit như dầu squalan hoặc squalen thu được từ quá trình

theoligomer hóa các alken, cụ thể là theoligomer hóa isobuten hoặc đexen; este của axit hoặc rượu chứa một nhóm alkyl mạch thẳng, cụ thể hơn là dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol di-(caprylat/caprat), glyxeryl tri-(caprylat/caprat) hoặc propylen glycol dioleat; este của axit hoặc rượu béo mạch nhánh, cụ thể là este của axit isostearic. Dầu được sử dụng kết hợp với chất nhũ hóa để tạo thành nhũ tương. Chất nhũ hóa tốt hơn là chất hoạt động bề mặt không ion, cụ thể là este của sorbitan, este của manit (chẳng hạn, anhydromanitol oleat), este của glycol, este của polyglyxerol, este của propylen glycol và este của axit oleic, isostearic, rixinoleic hoặc hydroxystearic, tùy ý được etoxyl hóa, và các copolyme khối polyoxypropylen-polyoxyetylen, cụ thể là các sản phẩm Pluronic, đặc biệt là L121. Xem Hunter *et al.*, The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) và Todd *et al.*, Vaccine 15:564-570 (1997).

Chẳng hạn, có thể sử dụng nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 của tài liệu “Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach” được biên tập bởi M. Powell và M. Newman, Plenum Press, 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 của cùng tài liệu này.

Một ví dụ khác nữa về tá dược là hợp chất được chọn từ các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic và các copolyme của maleic anhydrit và dẫn xuất alkenyl. Các hợp chất có lợi để dùng làm tá dược là các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic mà được liên kết ngang, đặc biệt là với các polyalkenyl ete của đường hoặc rượu đa chức. Các hợp chất này được biết đến bằng thuật ngữ carbomer (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng có thể đề cập đến Patent Mỹ số 2,909,462 mô tả các acrylic polyme như vậy được liên kết ngang với hợp chất được polyhydroxyl hóa có ít nhất 3 nhóm hydroxyl, tốt hơn là không nhiều hơn 8, nguyên tử hydro của ít nhất ba nhóm hydroxyl được thay bằng các gốc béo chưa bão hòa có ít nhất 2 nguyên tử cacbon. Các gốc được ưu tiên là các gốc chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, chẳng hạn, vinyl, allyl và các nhóm chưa bão hòa về mặt etylen khác. Bản thân các gốc chưa bão hòa có thể chứa các phần tử thế khác, chẳng hạn như methyl. Các sản phẩm được bán dưới tên Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, USA) là đặc biệt thích hợp. Chúng được liên kết ngang với allyl sucroza hoặc với allyl pentaerythritol. Trong số chúng, đáng lưu ý là Carbopol 974P, 934P và 971P. Tốt nhất

là sử dụng Carbopol, cụ thể là sử dụng Carbopol 971P, tốt hơn là với lượng từ khoảng 500 μg đến khoảng 5 mg mỗi liều, thậm chí tốt hơn là với lượng từ khoảng 750 μg đến khoảng 2,5 mg mỗi liều và tốt nhất là với lượng khoảng 1 mg mỗi liều.

Các tá được thích hợp khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hệ tá được RIBI (Ribi Inc.), co-polyme khối (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monophosphoryl lipit A, tá được Avridine lipit-amin, độc tố đường ruột từ E. coli dễ bị phân hủy bởi nhiệt (dạng tái tổ hợp hoặc dạng khác), độc tố gây bệnh tả, IMS 1314, hoặc muramyl dipeptit, trong số nhiều tá được khác.

Tốt hơn là, tá được được bổ sung với lượng từ khoảng 100 μg đến khoảng 10 mg mỗi liều. Thậm chí tốt hơn nữa là, tá được được bổ sung với lượng từ khoảng 100 μg đến khoảng 10 mg mỗi liều. Thậm chí tốt hơn nữa là, tá được được bổ sung với lượng từ khoảng 500 μg đến khoảng 5 mg mỗi liều. Thậm chí tốt hơn nữa là, tá được được bổ sung với lượng từ khoảng 750 μg đến khoảng 2,5 mg mỗi liều. Tốt nhất là, tá được được bổ sung với lượng khoảng 1 mg mỗi liều.

Ngoài ra, chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều chất mang được dụng. Như được sử dụng ở đây, “chất mang được dụng” bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn và chất kháng nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm quá trình hấp phụ, và các chất tương tự. Tốt nhất là, chế phẩm được đề xuất ở đây, chứa polypeptit theo sáng chế được thu hồi từ phần dịch nổi của các tế bào được nuôi cấy in vitro, trong đó các tế bào này được gây nhiễm với vectơ virus tái tổ hợp chứa ADN mã hóa polypeptit theo sáng chế và biểu hiện polypeptit theo sáng chế, và trong đó dịch nuôi cấy tế bào này được xử lý với khoảng 2 đến khoảng 8 mM BEI, tốt hơn là với khoảng 5 mM BEI để làm bất hoạt vectơ virus, và tác nhân trung hòa với nồng độ tương đương, tốt hơn là dung dịch natri thiosulfat đến nồng độ cuối bằng khoảng 2 đến khoảng 8 mM, tốt hơn là bằng khoảng 5 mM.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm miễn dịch chứa i) polypeptit bất kỳ theo sáng chế được mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ đã nêu ở trên, ii) ít nhất một phần vectơ virus biểu hiện polypeptit đã nêu theo sáng chế, iii) một phần dịch nuôi cấy tế bào, iv) tác nhân gây bất hoạt để làm bất hoạt vectơ virus tái tổ hợp tốt hơn là BEI, và v) tác nhân trung hòa để dừng quá trình bất hoạt do tác nhân gây bất hoạt gây ra, tốt

hơn là natri thiosulfat với lượng tương đương với BEI; và vi) tá dược thích hợp, tốt hơn là Carbopol 971 với lượng được mô tả ở trên; trong đó khoảng 90% các hợp phần từ i) đến iii) có kích cỡ nhỏ hơn 1 μm . Theo một khía cạnh khác, chế phẩm miễn dịch này còn chứa muối được dụng, tốt hơn là muối phosphat ở nồng độ sinh lý dụng. Tốt hơn là, độ pH của chế phẩm miễn dịch đã nêu được điều chỉnh đến độ pH sinh lý, nghĩa là nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây còn dùng để chỉ chế phẩm bao gồm (i) ít nhất 1,6 μg polypeptit theo sáng chế được mô tả ở trên, tốt hơn là ít hơn 20 μg (ii) ít nhất một phần baculovirus biểu hiện polypeptit theo sáng chế (iii) một phần dịch nuôi cấy tế bào, (iv) khoảng từ 2 đến 8 mM BEI, (v) natri thiosulfat với lượng tương đương với BEI; và (vi) khoảng 1 mg Carbopol 971, và (vii) muối phosphat ở nồng độ sinh lý dụng trong một ml; trong đó khoảng 90% các hợp phần từ (i) đến (iii) có kích cỡ nhỏ hơn 1 μm và độ pH của chế phẩm miễn dịch đã nêu được điều chỉnh đến khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Các chế phẩm miễn dịch có thể còn bao gồm một hoặc nhiều tác nhân điều biến miễn dịch khác, chẳng hạn như, interleukin, interferon, hoặc các xytokin khác. Các chế phẩm miễn dịch cũng có thể bao gồm Gentamicin và Merthiolate. Mặc dù lượng và nồng độ của tá dược và chất bổ trợ có thể sử dụng trong ngữ cảnh sáng chế có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, sáng chế dự tính bao hàm chế phẩm chứa từ khoảng 50 μg đến khoảng 2000 μg tá dược và tốt hơn là khoảng 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liều chế phẩm vacxin. Vì vậy, chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây còn dùng để chỉ chế phẩm bao gồm từ khoảng 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đến khoảng 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chất kháng sinh, và tốt hơn nữa là ít hơn khoảng 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chất kháng sinh.

Chế phẩm miễn dịch như được sử dụng ở đây còn dùng để chỉ chế phẩm bao gồm (i) polypeptit bất kỳ theo sáng chế được mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ đã nêu ở trên; (ii) ít nhất một phần vectơ virus biểu hiện polypeptit đã nêu theo sáng chế; (iii) một phần dịch nuôi cấy tế bào; (iv) tác nhân gây bất hoạt để làm bất hoạt vectơ virus tái tổ hợp tốt hơn là BEI; và (v) tác nhân trung hòa để dừng quá trình bất hoạt do tác nhân gây bất hoạt gây ra, tốt hơn là natri thiosulfat với lượng tương đương với BEI; (vi) tá dược thích hợp, tốt hơn là Carbopol 971 với lượng được mô tả ở trên; (vii) dung dịch muối đệm với nồng độ được dụng, tốt hơn là muối phosphat với nồng độ

được dụng; và (viii) tác nhân có hoạt tính kháng vi sinh vật; trong đó khoảng 90% các hợp phần từ (i) đến (iii) có kích cỡ nhỏ hơn 1 μm .

Để khảo sát sự can thiệp có thể có của polypeptit theo sáng chế vào kháng thể mẹ, có thể tiến hành nghiên cứu trong đó hiệu giá kháng thể của các động vật nghiên cứu được xác định ở thời điểm chủng ngừa, sau đó được nhóm thành các nhóm kháng thể có hiệu giá thấp, trung bình và cao: Hiệu giá trung bình nhân $< 1:100$ được xem là hiệu giá kháng thể thấp, hiệu giá từ $1:100$ đến $1:1000$ được xem là hiệu giá kháng thể trung bình và hiệu giá $> 1:1000$ được xem là hiệu giá kháng thể cao. Kiểu phân nhóm như vậy có thể so sánh được với kiểu mà đã được thực hiện trong một nghiên cứu trong cùng lĩnh vực ở Canada, ở đó hiệu giá kháng thể bằng $1:80$ được xem là thấp, hiệu giá kháng thể bằng $1:640$ được xem là trung bình và hiệu giá kháng thể $> 1:1280$ được xem là cao (Larochelle *et al.*, 2003, Can. J. Vet. Res.; 67: 114-120). Để phân tích tác động của hiệu giá kháng thể thấp, trung bình và cao ở thời điểm chủng ngừa lên sự nhiễm virus trong máu, các động vật đã được chủng ngừa và đã được điều trị bằng giả dược được so sánh về sự khởi phát, sự kết thúc, khoảng thời gian nhiễm virus trong máu, số ngày lấy mẫu dương tính và tải lượng virus. Sự có mặt của kháng thể kháng PCV2, cụ thể là kháng thể bắt nguồn từ thể mẹ, tốt hơn là không chịu tác động đáng kể của các thông số bất kỳ trong số các thông số này. Nói cách khác, tốt hơn là hiệu quả của polypeptit theo sáng chế trong phòng ngừa và điều trị sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật không bị ảnh hưởng vào ngày chủng ngừa bởi sự có mặt của kháng thể kháng PCV2, tốt hơn là bởi hiệu giá kháng thể kháng PCV2 lên tới $1:100$, tốt hơn là lớn hơn $1:100$, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn $1:250$, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn $1:500$, thậm chí tốt hơn nữa là bằng $1:640$; thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn $1:750$, tốt nhất là lớn hơn $1:1000$. Hiệu quả này có thể được thể hiện trong thí nghiệm chủng ngừa một lần duy nhất, có nghĩa là polypeptit theo sáng chế được dùng chỉ một lần và không kèm theo lần sử dụng tiếp theo bất kỳ nào của polypeptit theo sáng chế.

Phương pháp phát hiện và định lượng kháng thể kháng PCV2 là đã biết trong lĩnh vực này. Chẳng hạn, việc phát hiện và định lượng kháng thể kháng PCV2 có thể được thực hiện theo phương pháp huỳnh quang miễn dịch gián tiếp như được mô tả trong

Magar *et al.*, 2000, Can. J. Vet Res. ; 64: 184-186 hoặc Magar *et al.*, 2000, J. Comp. Pathol.; 123: 258-269. Thử nghiệm tiếp theo để định lượng kháng thể kháng PCV2 được mô tả trong tài liệu: Opriessnig *et al.*, 2006, 37th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. Ngoài ra, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp, mà có thể được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực bao gồm các bước: cấy khoảng 20,000 đến 60,000 tế bào PK15 hoặc VIDO R1 mỗi lỗ trên đĩa 96 lỗ; gây nhiễm tế bào với thể phân lập PCV2, khi các lớp đơn đạt mức độ nhập dòng khoảng 65 đến 85%; ủ các tế bào đã gây nhiễm trong 48 giờ; loại bỏ môi trường và rửa các tế bào 2 lần bằng PBS; loại bỏ dung dịch đệm rửa và xử lý tế bào bằng dung dịch hãm lạnh metanol/axeton theo tỷ lệ 50/50 (~100 μ l/lỗ) trong khoảng 15 phút ở nhiệt độ khoảng -20°C ; loại bỏ dung dịch hãm và làm khô đĩa bằng không khí; chuẩn bị dung dịch pha loãng theo dãy nồng độ chứa các mẫu huyết thanh lộn trong PBS và dung dịch pha loãng theo dãy nồng độ chứa mẫu đối chứng âm tính và dương tính với kháng PCV2 (các mẫu đối chứng dương tính và âm tính); bổ sung các dung dịch pha loãng theo dãy nồng độ này vào các đĩa và ủ để cho phép kháng thể gắn kết nếu nó có mặt trong các mẫu huyết thanh trong khoảng 1 giờ ở $36,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$; rửa đĩa ba lần bằng PBS và loại bỏ PBS; nhuộm đĩa bằng thể tiếp hợp thương mại ở kháng FITC ở lộn được pha loãng theo tỷ lệ 1:100 trong PBS và được ủ trong khoảng 1 giờ ở $36,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$; lấy các vi đĩa ra khỏi thiết bị ủ, thể tiếp hợp được loại bỏ và đĩa được rửa 2 lần bằng PBS; đọc đĩa bằng cách sử dụng kính hiển vi UV và ghi lại mỗi đĩa là dương tính hay âm tính, trong đó các mẫu đối chứng dương tính và các mẫu đối chứng âm tính được sử dụng để giám sát hệ thống thử nghiệm; và tính toán hiệu giá kháng thể trong huyết thanh bằng cách sử dụng dung dịch loãng nhất thể hiện khả năng phản ứng IFA đặc hiệu và số lỗ dương tính đối với mỗi dịch pha loãng, hoặc điểm cuối 50% được tính toán bằng cách sử dụng công thức Reed-Muench thích hợp.

Một thử nghiệm như vậy được mô tả trong ví dụ 2 của WO 2008/076915 A2.

Trong trường hợp kết quả gây tranh cãi và có bất cứ sự nghi ngờ nào, hiệu giá kháng PCV2 như được đề cập ở đây, dùng để chỉ hiệu giá mà được/có thể được ước tính theo thử nghiệm này.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi

hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2, cụ thể là kháng thể thể mẹ, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng polypeptit theo sáng chế với lượng hữu hiệu, tốt hơn là ít hơn 20 µg/liều trong đó động vật đã nêu có hiệu giá kháng thể kháng PCV2 có thể phát hiện được lên tới 1:100, tốt hơn là lớn hơn 1:100, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:250, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:500, thậm chí tốt hơn nữa là bằng 1:640, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:750, tốt nhất là lớn hơn 1:1000. Tốt hơn là, hiệu giá kháng thể kháng PCV2 này là có thể phát hiện được và có thể định lượng theo thử nghiệm miễn dịch kháng PCV2 đặc hiệu, tốt hơn là trong thử nghiệm như đã nêu trên, như được mô tả minh họa trong ví dụ 2 của WO 2008/076915 A2. Tốt hơn nữa là, các kháng thể kháng PCV-2 là các kháng thể bắt nguồn từ thể mẹ. Tốt nhất là, polypeptit theo sáng chế được dùng chỉ một lần, tốt hơn là với liều lượng ít hơn 20 µg/liều.

Lợn con với kháng thể kháng PCV2 có nguồn gốc từ mẹ chỉ có hiệu giá thấp (< 1:100) hoặc hiệu giá trung bình (< 1:1000) không được bảo vệ đầy đủ chống lại sự nhiễm PCV2 xảy ra trước 3 tuần tuổi. Vì vậy, nên chủng ngừa ở giai đoạn rất sớm trong cuộc đời. Trong phạm vi sáng chế, việc chủng ngừa/điều trị cho động vật ở hoặc trước 3 tuần tuổi là được ưu tiên. Ngoài ra, tốt hơn là hiệu giá kháng thể kháng PCV2 lớn hơn 1:1000 không ảnh hưởng đến hiệu quả của vacxin PCV2 bất kể hiệu giá kháng thể ban đầu hiện có ở mức nào. Chẳng hạn, tốt hơn là việc chủng ngừa động vật với hiệu giá cao (hiệu giá kháng thể kháng PCV2 > 1:1000) dẫn đến khoảng thời gian nhiễm virus trong máu ngắn hơn, kết thúc khoảng thời gian nhiễm virus trong máu sớm hơn, số ngày lấy mẫu nhiễm virus trong máu ít đi và làm giảm tổng lượng các đương lượng trong hệ gen/ml so với động vật đối chứng không được chủng ngừa. Khi so sánh các động vật được chủng ngừa “hiệu giá cao”, “hiệu giá trung bình” và “hiệu giá thấp”, tốt hơn là không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể về các thông số khác của nhiễm virus PCV2 trong máu. Ngoài ra, do có hiệu giá kháng thể kháng PCV2 cao, tốt hơn là polypeptit theo sáng chế được sử dụng để chủng ngừa cũng làm giảm một cách đáng kể sự nhiễm virus trong máu (chấm dứt việc nhiễm virus trong máu, khoảng thời gian nhiễm virus trong máu, tải lượng virus). Tốt hơn là, không nhận thấy sự khác biệt về thể trọng sống khi so sánh các động vật có hiệu giá thấp và hiệu giá cao thuộc nhóm được chủng ngừa. Hơn nữa, tốt hơn là các động vật đã được chủng ngừa với hiệu giá kháng thể kháng PCV2 cao ở thời điểm chủng ngừa/điều trị (>

1:1000) cũng thể hiện thể trọng sau khi khởi phát nhiễm virus trong máu lớn hơn một cách đáng kể so với động vật được điều trị bằng giả dược với hiệu giá kháng thể ban đầu là cao. Do đó, theo một khía cạnh được ưu tiên, có thể chủng ngừa/điều trị động vật 1 ngày tuổi hoặc già hơn bằng polypeptit theo sáng chế. Tuy nhiên, việc chủng ngừa nên được thực hiện trong vòng 8 tuần tuổi đầu tiên, tốt hơn là trong vòng 7 tuần tuổi đầu tiên. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế ở ngày tuổi thứ nhất hoặc muộn hơn, tốt hơn là không muộn hơn ở thời điểm 8 tuần tuổi. Theo một phương án được ưu tiên, ít hơn 20 µg/liều polypeptit theo sáng chế là cần thiết để có được tính miễn dịch ở động vật. Theo một phương án được ưu tiên hơn, tốt hơn là ít hơn 20 µg/liều polypeptit theo sáng chế được dùng chỉ một lần cho động vật cần điều trị.

Theo một phương án phổ biến hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở các động vật con, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế.

Thuật ngữ “động vật con” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ động vật từ 1 đến 22 ngày tuổi. Tốt hơn là, thuật ngữ động vật con có nghĩa là động vật từ 1 đến 20 ngày tuổi. Tốt hơn nữa là, thuật ngữ động vật con dùng để chỉ động vật từ 1 đến 15 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 ngày tuổi đến 14 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 12 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 10 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 8 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 7 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 6 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 5 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 4 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 ngày tuổi, tốt nhất là động vật 1 ngày tuổi. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật con, bao gồm bước cho động vật từ 1 đến 22 ngày tuổi, tốt hơn là từ 1 đến 20 ngày tuổi, tốt hơn nữa là từ 1 đến 15 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 14 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 12 ngày tuổi,

thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 10 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 8 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 7 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 6 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 5 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 4 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 ngày tuổi, tốt nhất là 1 ngày tuổi cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế. Chẳng hạn, tốt hơn là việc chủng ngừa/điều trị ở động vật từ 19 đến 22 ngày tuổi thể hiện hiệu quả chủng ngừa cao. Ngoài ra, tốt hơn là việc chủng ngừa/điều trị ở 12 đến 18, tốt hơn là 12 đến 14 ngày tuổi là cực kỳ hữu hiệu trong việc làm giảm các triệu chứng lâm sàng có liên quan đến sự nhiễm PCV2, làm giảm tải lượng virus tổng thể, làm giảm khoảng thời gian nhiễm virus trong máu, làm chậm sự khởi phát của nhiễm virus trong máu, làm tăng thể trọng. Ngoài ra, tốt hơn là việc chủng ngừa ở 1 tuần tuổi là cực kỳ hữu hiệu trong việc làm giảm các triệu chứng lâm sàng có liên quan đến sự nhiễm PCV2, làm giảm tải lượng virus tổng thể, làm giảm khoảng thời gian nhiễm virus trong máu, làm chậm sự khởi phát của nhiễm virus trong máu, làm tăng thể trọng. Tốt hơn là ít hơn 20 µg/liều polypeptit theo sáng chế là cần thiết để tạo ra tính miễn dịch ở các động vật con này. Theo một phương án được ưu tiên hơn, polypeptit theo sáng chế, tốt hơn là ít hơn 20 µg được dùng chỉ một lần cho động vật con cần điều trị này.

Do PCV2 có mặt ở khắp mọi nơi trên đồng ruộng, hầu hết các con lợn non có huyết thanh dương tính đối với PCV2. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật con, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2 ở ngày chủng ngừa, bao gồm bước cho động vật từ 1 đến 22 ngày tuổi, tốt hơn là từ 1 đến 20 ngày tuổi, tốt hơn nữa là từ 1 đến 15 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 14 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 12 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 10 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 8 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 7 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 6 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 5 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 4 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 ngày tuổi, tốt nhất là 1 ngày tuổi cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế. Tốt hơn là, động vật con đã nêu, ở ngày chủng ngừa/điều trị, có hiệu giá kháng thể kháng PCV2 có thể phát hiện được

lên tới 1:100, tốt hơn là lớn hơn 1:100, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:250, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:500, thậm chí tốt hơn nữa là 1:640, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:750, tốt nhất là lớn hơn 1:1000 ở ngày chủng ngừa/điều trị. Tốt hơn là, ít hơn 20 µg/liều polypeptit theo sáng chế là cần thiết để tạo ra tính miễn dịch thích đáng ở các động vật con này. Theo một phương án được ưu tiên hơn, polypeptit theo sáng chế, tốt hơn là ít hơn 20 µg được dùng chỉ một lần cho động vật con cần điều trị này.

Như đã nêu trên, việc chủng ngừa/điều trị động vật con bằng polypeptit theo sáng chế tốt hơn là làm rút ngắn giai đoạn nhiễm virus trong máu so với động vật đối chứng không được chủng ngừa. Tốt hơn là, thời gian rút ngắn trung bình có thể, chẳng hạn, là 9,5 ngày so với động vật đối chứng không được chủng ngừa cùng loại. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật con, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế, trong đó việc điều trị hoặc phòng ngừa dẫn đến làm rút ngắn giai đoạn nhiễm virus trong máu đi 5 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 6 ngày hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 7 ngày hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 8 ngày hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 9 ngày, thậm chí tốt hơn nữa là 10 ngày, thậm chí tốt hơn nữa là 12 ngày, thậm chí tốt hơn nữa là 14 ngày, tốt nhất là lớn hơn 16 ngày so với động vật thuộc nhóm đối chứng không được điều trị cùng loại. Trong một số trường hợp, giai đoạn nhiễm virus trong máu tốt hơn là được rút ngắn nhiều hơn 20 ngày. Thông thường, việc chủng ngừa lợn con tốt hơn là gây ra sự giảm hao hụt thể trọng tăng được, làm rút ngắn khoảng thời gian nhiễm virus trong máu, làm chấm dứt sớm hơn quá trình nhiễm virus trong máu, và làm giảm tải lượng virus. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật con, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế, trong đó việc điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 tạo ra sự cải thiện về thông số hiệu lực vacxin được chọn từ nhóm gồm làm giảm sự hao hụt thể trọng tăng được, rút ngắn khoảng thời gian nhiễm virus trong máu, làm chấm dứt sớm hơn quá trình nhiễm virus trong máu, làm giảm tải lượng virus, hoặc tổ hợp của các thông số này so với động vật thuộc nhóm đối chứng không được xử lý cùng loại. Tốt hơn là, ít hơn 20 µg/liều polypeptit theo sáng

chế là cần thiết để tạo ra sự cải thiện thông số bất kỳ trong số các thông số hiệu lực vaccin nêu trên. Ngoài ra, thông số hiệu lực vaccin được cải thiện như vậy là đạt được bằng cách cho dùng chỉ một liều duy nhất.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” như được sử dụng ở đây có nghĩa, nhưng không giới hạn ở, lượng polypeptit theo sáng chế gây ra hoặc có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật mà liều hữu hiệu polypeptit theo sáng chế này được dùng cho nó. Tốt hơn là, lượng hữu hiệu được định nghĩa là lượng polypeptit theo sáng chế tạo ra khoảng thời gian miễn dịch (duration of immunity - DOI) ít nhất là 10 tuần, tốt hơn là ít nhất là 12 tuần (DOI), tốt hơn nữa là ít nhất là 15 tuần (DOI), tốt nhất là ít nhất là 20 tuần (DOI).

Lượng hữu hiệu tùy thuộc vào thành phần của vaccin và chế độ sử dụng. Điển hình, khi chế phẩm virus đã được làm bất hoạt hoặc virus sống đã được cải biến được sử dụng trong vaccin phối hợp, lượng vaccin chứa khoảng $10^{2,0}$ đến khoảng $10^{9,0}$ TCID₅₀ mỗi liều, tốt hơn là khoảng $10^{3,0}$ đến khoảng $10^{8,0}$ TCID₅₀ mỗi liều, Tốt hơn nữa là, khoảng $10^{4,0}$ đến khoảng $10^{8,0}$ TCID₅₀ mỗi liều. Cụ thể là, khi PCV2 sống được cải biến được sử dụng trong vaccin, liều dùng được khuyến cáo để dùng cho động vật dễ bị nhiễm tốt hơn là khoảng $10^{3,0}$ TCID₅₀ (điểm tới hạn 50% liều lượng lây nhiễm dịch nuôi cấy mô - tissue culture infective dose 50% end point)/liều đến khoảng $10^{6,0}$ TCID₅₀/liều và tốt hơn nữa là từ khoảng $10^{4,0}$ TCID₅₀/liều đến khoảng $10^{5,0}$ TCID₅₀/liều. Thông thường, lượng kháng nguyên sẽ nằm trong khoảng từ 0,2 đến 5000 microgam, và nằm trong khoảng từ $10^{2,0}$ đến $10^{9,0}$ TCID₅₀, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $10^{3,0}$ đến $10^{6,0}$ TCID₅₀, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $10^{4,0}$ đến $10^{5,0}$ TCID₅₀, khi kháng nguyên đã tinh chế được sử dụng.

Vaccin dưới đơn vị thường được sử dụng với mức protein chứa trong đó ít nhất là 0,2 µg protein mỗi liều, tốt hơn là với từ khoảng 0,2 đến khoảng 400 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là với từ khoảng 0,3 đến khoảng 200 µg/liều, thậm chí tốt hơn nữa là với từ khoảng 0,35 đến khoảng 100 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là với từ khoảng 0,4 đến khoảng 50 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là với từ khoảng 0,45 đến khoảng 30 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là với từ khoảng 0,5 đến khoảng 18 µg/liều, cũng tốt hơn nữa là với từ khoảng 0,6 đến khoảng 16 µg/liều, thậm chí tốt hơn nữa là với từ khoảng 0,75 đến

khoảng 8 μg /liều, thậm chí tốt hơn nữa là với từ khoảng 1,0 đến khoảng 6 μg /liều, cũng tốt hơn nữa là với từ khoảng 1,3 đến khoảng 3,0 μg /liều.

Tốt hơn là, việc sử dụng các chế phẩm miễn dịch nêu trên nhằm mục đích phòng bệnh là hữu hiệu để làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2, tốt hơn là ở động vật con và/hoặc ở các động vật có miễn dịch thụ động đối với PCV2 ở ngày điều trị. Cụ thể là, việc sử dụng các chế phẩm miễn dịch như được mô tả ở đây, và cụ thể là các chế phẩm chứa polypeptit theo sáng chế, nhằm mục đích phòng bệnh tốt hơn là hữu hiệu để làm giảm bệnh hạch bạch huyết, tiêu mô bạch huyết và/hoặc mô bào đa nhân/không lồ ở các động vật nhiễm PCV2 và mang kháng thể kháng PCV-2 thể mẹ ở ngày điều trị/chủng ngừa. Chẳng hạn, đã khám phá ra rằng việc sử dụng các chế phẩm miễn dịch như được mô tả ở đây nhằm mục đích phòng bệnh là hữu hiệu để làm giảm chứng tiêu mô bạch huyết, viêm mô bạch huyết, IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô bạch huyết, nhiễm virus trong máu, chảy nước mũi, sốt, lượng tăng thể trọng trung bình hằng ngày giảm, viêm phổi, IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô phổi.

Ngoài ra, việc sử dụng các chế phẩm miễn dịch như được mô tả ở đây nhằm mục đích phòng bệnh tốt hơn là hữu hiệu để làm giảm (1) viêm phổi kẽ với phù gian tiểu thùy, (2) da xanh hoặc vàng da, (3) gan teo có đốm, (4) loét dạ dày, (5) chứng viêm thận và (6) các rối loạn sinh sản, chẳng hạn sảy thai, thai lưu, thai hoại tử, v.v., (7) các thương tổn tương tự Pia, thường được biết là có liên quan đến nhiễm Lawsonia nội bào (chứng viêm ruột hồi), (8) bệnh hạch bạch huyết, (9) tiêu mô bạch huyết và/hoặc (10) mô bào đa nhân/không lồ (11) viêm da ở lợn và hội chứng bệnh thần kinh (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome - DNS), (12) tử vong liên quan đến PCVAD, (13) hao hụt thể trọng liên quan đến PCVAD, (14), giảm khả năng thay đổi sinh trưởng (15), giảm tần xuất “còi cọc” (16), giảm khả năng lây nhiễm đồng thời Porcine Reproductive và Respiratory Disease Complex (PRRSV). Các chế phẩm miễn dịch như vậy cũng hữu hiệu trong việc cải thiện các thông số sinh trưởng quan trọng về mặt kinh tế như thời gian cho đến lúc mổ lấy thịt, trọng lượng thịt móc hàm, và tỷ lệ thịt nạc. Vì vậy, thuật ngữ “dấu hiệu lâm sàng” như được sử dụng ở đây, có nghĩa là, nhưng không giới hạn ở (1) viêm phổi kẽ với phù gian tiểu thùy, (2) da xanh hoặc vàng da, (3) gan teo có đốm, (4) loét dạ dày, (5) chứng viêm thận và (6) các rối loạn

sinh sản, chẳng hạn sảy thai, thai lưu, thai hoại tử, v.v., (7) thương tổn tương tự Pia, thường được biết là có liên quan đến nhiễm Lawsonia nội bào (chứng viêm ruột hồi), (8) bệnh hạch bạch huyết, (9) tiêu mô bạch huyết và/hoặc (10) mô bào đa nhân/không lồ (11) viêm da ở lợn và hội chứng bệnh thần kinh (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome - PDNS), (12) tử vong liên quan đến PCVAD, (13) hao hụt thể trọng liên quan đến PCVAD, (14) giảm khả năng thay đổi sinh trưởng (15) giảm tần xuất “còi cọc” (16) giảm khả năng lây nhiễm đồng thời phức hợp bệnh hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Disease Complex - PRRSV), (17) viêm mô bạch huyết, (18) IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô bạch huyết, (19) nhiễm virus trong máu, (20) chảy nước mũi, (21) sốt, (22) lượng tăng thể trọng trung bình hằng ngày giảm, (23) viêm phổi, (24) IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô phổi. Ngoài ra, chế phẩm miễn dịch được nêu ở đây làm giảm tải lượng circovirus tổng thể bao gồm làm chậm sự khởi phát, rút ngắn khoảng thời gian nhiễm bệnh, chấm dứt sớm hơn quá trình nhiễm virus trong máu, và làm giảm tải lượng virus và tác động ức chế miễn dịch của nó ở động vật con, cụ thể là ở các động vật mang kháng thể kháng PCV2 ở ngày chủng ngừa, nhờ đó tạo ra mức độ kháng bệnh chung lớn hơn và làm giảm tỷ lệ mắc phải các bệnh và các triệu chứng lâm sàng có liên quan đến PCV2.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật con và/hoặc ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế, trong đó các triệu chứng lâm sàng này được chọn từ nhóm gồm: (1) viêm phổi kèm với phù gian tiểu thùy, (2) da xanh hoặc vàng da, (3) gan teo có đốm, (4) loét dạ dày, (5) chứng viêm thận và (6) các rối loạn sinh sản, chẳng hạn sảy thai, thai lưu, thai hoại tử, v.v., (7) thương tổn tương tự Pia, thường được biết là có liên quan đến nhiễm Lawsonia nội bào (chứng viêm ruột hồi), (8) bệnh hạch bạch huyết, (9) tiêu mô bạch huyết và/hoặc (10) mô bào đa nhân/không lồ (11), viêm da ở lợn và hội chứng bệnh thần kinh (PDNS), (12) tử vong liên quan đến PCVAD, (13) hao hụt thể trọng liên quan đến PCVAD, (14) giảm khả năng thay đổi sinh trưởng (15) giảm tần xuất “còi cọc”, (16) giảm khả năng lây nhiễm đồng thời phức hợp bệnh hô hấp và

sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Disease Complex - PRRSV), (17) viêm mô bạch huyết, (18) IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô bạch huyết, (19) nhiễm virus trong máu, (20) chảy nước mũi, (21) sốt, (22) lượng tăng thể trọng trung bình hằng ngày giảm, (23) viêm phổi, (24) IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô phổi. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật con, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế, trong đó các triệu chứng lâm sàng này được chọn từ nhóm gồm: (1) viêm phổi kẽ với phù gian tiểu thùy, (2) da xanh hoặc vàng da, (3) gan teo có đốm, (4) loét dạ dày, (5) chứng viêm thận và (6) các rối loạn sinh sản, chẳng hạn sảy thai, thai lưu, thai hoại tử, v.v., (7) thương tổn tương tự Pia, thường được biết là có liên quan đến nhiễm Lawsonia nội bào (chứng viêm ruột hồi), (8) bệnh hạch bạch huyết, (9) tiêu mô bạch huyết và/hoặc (10) mô bào đa nhân/không lồ (11) viêm da ở lợn và hội chứng bệnh thần kinh (PDNS), (12) tử vong liên quan đến PCVAD, (13) hao hụt thể trọng liên quan đến PCVAD, (14) giảm khả năng thay đổi sinh trưởng (15) giảm tần xuất “còi cọc” (16) giảm khả năng lây nhiễm đồng thời phức hợp bệnh hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive và Respiratory Disease Complex - PRRSV), (17) viêm mô bạch huyết, (18) IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô bạch huyết, (19) nhiễm virus trong máu, (20) chảy nước mũi, (21) sốt, (22) lượng tăng thể trọng trung bình hằng ngày giảm, (23) viêm phổi, (24) IHC dương tính đối với kháng nguyên PCV2 của mô phổi.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng, trong biểu bì, trong khí quản, hoặc trong âm đạo. Chế phẩm này tốt hơn là có thể được sử dụng trong cơ hoặc trong mũi, tốt nhất là trong cơ. Trong cơ thể động vật, có thể chứng minh rằng việc áp dụng được phẩm như đã nêu trên trong tĩnh mạch hoặc bằng cách tiêm trực tiếp vào mô đích là có lợi. Để dùng toàn thân, việc dùng trong tĩnh mạch, trong mạch, trong cơ, trong mũi, trong động mạch, trong màng bụng, qua đường miệng, hoặc trong vỏ là được ưu tiên. Việc dùng cục bộ hơn có thể có hiệu quả khi được dùng dưới da, trong biểu bì, trong da, trong tim, trong thùy, trong tủy xương, trong phổi hoặc trực tiếp hoặc gần mô được điều trị (mô liên kết, mô xương, mô cơ, mô thần kinh, biểu mô). Tùy thuộc vào khoảng thời gian và hiệu quả của quá trình điều trị, các chế phẩm

theo sáng chế có thể được dùng một hoặc vài lần, cùng như là dùng gián đoạn, chẳng hạn dùng hằng ngày trong vài ngày, vài tuần hoặc vài tháng và theo các liều khác nhau.

Tốt hơn là, cho động vật cần điều trị dùng một liều chế phẩm miễn dịch như đã nêu trên trong cơ. Theo một khía cạnh khác, polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit bất kỳ theo sáng chế như được mô tả ở đây được đóng chai và được dùng một (1) mL mỗi liều. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất 1 ml chế phẩm miễn dịch, chứa polypeptit theo sáng chế như được mô tả ở đây, để điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật con, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế. Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất 1ml chế phẩm miễn dịch, chứa polypeptit theo sáng chế như được mô tả ở đây, để điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm PCV2 hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm PCV2 ở động vật, tốt hơn là động vật mang kháng thể kháng PCV2, bao gồm bước cho động vật cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm miễn dịch chứa polypeptit theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, ít nhất một lần sử dụng khác nữa của ít nhất một liều chế phẩm miễn dịch như đã nêu trên được dùng cho động vật cần đến nó, trong đó lần dùng thử hai hoặc lần dùng bất kỳ khác nữa được dùng ít nhất 14 ngày sau lần dùng đầu tiên hoặc sau các lần dùng bất kỳ trước đó. Tốt hơn là, chế phẩm miễn dịch được dùng với một chất kích thích miễn dịch. Tốt hơn là, chất kích thích miễn dịch được dùng ít nhất hai lần. Tốt hơn là, khoảng thời gian giữa lần dùng đầu tiên chất kích thích miễn dịch và lần dùng thứ hai hoặc lần dùng khác bất kỳ sau đó ít nhất là 3 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất là 5 ngày, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 7 ngày. Tốt hơn là, chất kích thích miễn dịch được dùng ít nhất 10 ngày, tốt hơn là 15 ngày, thậm chí tốt hơn nữa là 20, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 22 ngày sau lần dùng đầu tiên chế phẩm miễn dịch đã nêu ở đây. Chất kích thích miễn dịch được ưu tiên, chẳng hạn, là keyhole limpet hemocyanin (KLH), tốt hơn là được nhũ hóa với tá dược Freund không toàn vẹn (KLH/ICFA). Tuy nhiên, trong bản mô tả này cần phải hiểu rằng cũng có thể sử dụng chất kích thích miễn dịch bất kỳ khác mà người có hiểu biết trung bình trong

lĩnh vực này đã biết. Thuật ngữ “chất kích thích miễn dịch” như được sử dụng ở đây, có nghĩa là chất hoặc chế phẩm bất kỳ mà có thể gây ra đáp ứng miễn dịch, tốt hơn là không kèm theo sự khởi đầu hoặc gia tăng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, chẳng hạn đáp ứng miễn dịch chống lại một bệnh cụ thể. Việc sử dụng chất kích thích miễn dịch với liều thích hợp cũng được hướng dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây nêu các vật liệu và quy trình được ưu tiên theo sáng chế. Mặc dù các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả có thể được dùng để thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp, thiết bị và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không có ví dụ nào trong số chúng được hiểu là nhằm giới hạn phạm vi tổng thể của sáng chế.

VÍ DỤ 1

Vật liệu & Quy trình/Thiết kế thể đột biến

Trình tự axit amin PCV2a ORF2 của protein PCV2 ORF2 chứa trong sản phẩm CIRCOFLEX® được so sánh bằng cách sắp thẳng hàng với trình tự axit amin PCV2b ORF2 BDH và một số các trình tự axit amin PCV2a và PCV2b ORF2 được công bố khác từ Genbank bằng cách sử dụng phương pháp Clustal W. Các vị trí khác biệt chủ yếu về axit amin giữa các trình tự PCV2a và PCV2b ORF2 được nhận biết là các vị trí đột biến tiềm năng (xem FIG. 1). Bằng cách sử dụng các thay đổi về axit amin chính đã được nhận biết, bảy trình tự mã hóa PCV2b ORF2 đã được điều chế thay đổi các axit amin từ PCV2b ORF2 BDH bằng các axit amin tương ứng từ PCV2a ORF2. Các codon PCV2a ORF2 (CIRCOFLEX®) được sử dụng để mã hóa các axit amin đột biến. Bảy cấu trúc đột biến PCV2b ORF2 được chỉ ra cụ thể dưới đây:

1. PCV2b ORF2 BDH K59A
2. PCV2b ORF2 BDH R63T
3. PCV2b ORF2 BDH R63K
4. PCV2b ORF2 BDH SFCO P88K T151P**
5. PCV2b ORF2 BDH G191R

6. PCV2b ORF2b BDH I206K
7. PCV2b ORF2 BDH N232E

Tất cả các trình tự mã hóa được tổng hợp ở Integrated DNA Technologies ngoại trừ trình tự #4 được tạo ra bằng cách đột biến điểm định hướng trình tự mã hóa PCV2b ORF2b BDH SFCO được tổng hợp.

** SFCO = codon được tối ưu hóa đối với *Spodoptera frugiperda*. Cấu trúc này được tạo ra trước khi sắp thẳng hàng trình tự như đã mô tả ở trên thông qua đánh giá sơ bộ trình tự. Hai đột biến cũng được nhận biết trong đánh giá trình tự này.

Chuẩn bị thể đột biến PCV2b ORF2 Baculovirus

Mỗi trong số bảy trình tự mã hóa thể đột biến PCV2b ORF2, cũng như là trình tự mã hóa PCV2b ORF2 BDH chưa được đột biến, được tạo dòng vào vector truyền baculovirus pVL1393 và được đồng chuyển nhiễm với ADN baculovirus trong tế bào Sf9. Mỗi baculovirus tái tổ hợp tạo thành được kiểm tra sự biểu hiện PCV2b ORF2 bởi IFA. Dung dịch gốc đã được khuếch đại của mỗi baculovirus tái tổ hợp được chuẩn bị trên các tế bào Sf+ và được chuẩn độ bằng phương pháp TCID₅₀ để xác định hiệu giá baculovirus.

Đánh giá sự biểu hiện của thể đột biến PCV2b ORF2 Baculovirus

Mỗi baculovirus tái tổ hợp được đánh giá sự biểu hiện trình tự mã hóa PCV2b ORF2 của nó bằng cách gây nhiễm các tế bào Sf+ ở MOI đích bằng 0,1. Các tế bào lây nhiễm được để tiến triển trong 5 – 7 ngày, sau đó được thu nhận bằng cách ly tâm ở 20.000g trong 20 phút để loại bỏ mảnh vụn tế bào và protein không hòa tan. Phần dịch nổi sau thu nhận được lọc qua màng lọc cỡ lỗ 0,2µm và được đánh giá trực tiếp sự biểu hiện PCV2b ORF2 bằng thử nghiệm western blot có sử dụng kháng thể α-PCV2 (chẳng hạn FIG. 2). Phần dịch nổi sau thu nhận cũng được đánh giá sự có mặt của các cấu trúc đại phân tử. Tóm lại, mẫu của mỗi dịch nổi thu nhận được ly tâm ở 100.000g trong 2 giờ. Các viên kết thu được được tái tạo hỗn dịch trong một thể tích nhỏ TBS và được tách bởi SDS-PAGE. Các băng PCV2b ORF2 được hiện hiện trên gel được nhuộm màu bằng cách so sánh kích thước với PCV2a ORF2 (chẳng hạn FIG. 3). Các viên kết đã được tái tạo hỗn dịch cũng được tách trên gradient sucroza gián đoạn 10%

- 60% bằng cách ly tâm ở 100.000g trong hai giờ để tinh chế một phần protein PCV2b ORF2 để định lượng và xác nhận VLP bằng kính hiển vi điện tử (electron microscopy - EM) (chẳng hạn, FIG. 4).

Sau khi tách gradient sucroza, gom các phân đoạn chứa PCV2b ORF2 và nồng độ PCV2b ORF2 được xác định bằng phép đo tỷ trọng trên gel SDS-PAGE so với đường cong tiêu chuẩn BSA. Ngoài ra, mẫu vật liệu đã được tinh chế bằng gradient sucroza được cô đặc tiếp và được đưa đi xác nhận VLP bằng EM có sử dụng axit phosphotungstic làm thuốc nhuộm âm tính (chẳng hạn, FIG. 5).

Bảng kết quả đánh giá các cấu trúc đột biến PCV2b ORF2 BDH được chỉ ra trên FIG. 6. Kết quả đã chứng minh rằng đột biến axit amin đơn lẻ từ arginin thành threonin ở vị trí 63 làm tăng sự biểu hiện của PCV2b ORF2 BDH ở các tế bào Sf+ lên gần mười lần. Đột biến đơn lẻ R63T làm tăng sự biểu hiện của PCV2b ORF2 BDH ở các tế bào Sf+ đến mức tương tự như đối với PCV2a ORF2. Phân tích trình tự axit amin của PCV2b ORF2 BDH gợi ý rằng vòng BC có thể dễ bị tách bởi proteaza tương tự trypsin. Dữ liệu cấu trúc được công bố bởi Khayat *et al.* vào năm 2011 gợi ý rằng arginin 63 thuộc vòng BC và nó nhô ra xa nhất từ vỏ capsid của virus PCV2 được tạo thành bởi protein ORF2, khiến cho nó nhạy với proteaza được giải phóng sau khi phân giải các tế bào Sf+ trong quá trình sao chép baculovirus.

Ngoài sự thay thế threonin ở vị trí 63, theo một phương án khác của sáng chế, arginine được thay thế bằng một axit amin phân cực và không mang điện tích khác bao gồm serin, tyrosin, asparagin và glutamin để đạt được tác dụng ổn định tương tự. Ngoài ra, axit amin không phân cực bao gồm glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, phenylalanin và tryptophan cũng có thể đạt được tác dụng tương tự.

VÍ DỤ 2

Nghiên cứu này minh họa hiệu quả của một phương án của Vacxin Circovirus typ 2 gây bệnh ở lợn ORF2b kháng lại sự lây nhiễm PCV2a và/hoặc PCV2b. Lợn con thiếu sữa non do được sinh mổ (Cesarean-derived colostrum-deprived - CDCD) được sử dụng trong nghiên cứu này và được chia thành 2 nhóm; 1) lợn được chủng ngừa bằng Vacxin circovirus ở lợn thí nghiệm chứa biến thể PCV2b ORF2 R63T ở ví dụ 1 (vectơ Baculovirus chết) được gây nhiễm với PCV2b từ virus và, 2) lợn đối chứng đã lây nhiễm không được chủng ngừa mà được lây nhiễm PCV2b từ virus. Ở ngày 0,

nhóm 1 được cho dùng 1 mL vacxin trong cơ (IM) trong đó nhóm 2, lợn đối chứng đã lây nhiễm không được chủng ngừa không nhận bất cứ một phương pháp điều trị nào. Ở ngày 28, tất cả các con lợn ở các nhóm 1 và 2 được gây nhiễm với PCV2b từ virus 1mL trong mũi (IN) và 1mL trong cơ (IM) với liều xấp xỉ 3,0 Log₁₀TCID₅₀/mL virus sống. Tất cả các con lợn được cho dùng trong cơ 2,0 mL Keyhole Limpet Hemocyanin được nhũ hóa trong tá được Freund's không toàn vẹn (KLH/ICFA) vào các ngày 25 và 31. Các con lợn được giám sát các triệu chứng lâm sàng hằng ngày, và máu được lấy để thử nghiệm huyết thanh định kỳ. Ở ngày 56 tất cả các con lợn được mổ khám nghiệm và các mô chọn lọc được gộp lại và thực hiện quan sát bệnh học nói chung.

Tất cả các động vật đã được chủng ngừa có sự giảm về tất cả các thông số thử nghiệm so với nhóm đối chứng lây nhiễm tương ứng của chúng.

VÍ DỤ 3

Một số thay thế khác ở vị trí axit amin 63 được tạo ra để so sánh với chủng PCV2b ORF BDH nguyên thể. Kết quả từ việc đánh giá các cấu trúc đột biến PCV2b ORF2 BDH được thể hiện trên các FIG. 7A và 7B. Kết quả này chứng tỏ rằng ngoài đột biến axit amin từ arginin (R) thành threonin (T) ở vị trí 63, sự đột biến axit amin từ arginin (R) 63 thành glyxin (G), arginin (R) 63 thành glutamin (Q), và arginin (R) 63 thành aspartat (D) làm tăng sự biểu hiện của PCV2b ORF2 BDH ở các tế bào Sf+ ít nhất là bốn lần so với kiểu dại. Cụ thể là, các đột biến đơn lẻ R63G và R63Q làm tăng sự biểu hiện của PCV2b ORF2 BDH ở các tế bào Sf+ đến mức tương tự như đối với PCV2a ORF2.

Sự tạo thành baculovirus tái tổ hợp mã hóa thể đột biến PCV2b ORF2 R63

Đột biến điểm trong trình tự mã hóa của PCV2b ORF2 ở vị trí axit amin 63 được tạo ra bằng phương pháp đột biến điểm định hướng. Tóm lại, plasmit pVL1393-PCV2b ORF2 truyền baculovirus được tham gia đột biến điểm định hướng bằng cách sử dụng các đoạn môi trong bảng 1. Vectơ truyền baculovirus tạo ra được đọc trình tự để xác nhận sự đột biến thích hợp của trình tự mã hóa và sau đó được đồng chuyển nhiễm cùng với ADN baculovirus đã được duỗi mạch vào các tế bào Sf9. Các tế bào đã được đồng chuyển nhiễm được thu hoạch sau 5 ngày và được đánh giá sự biểu hiện PCV2b ORF2 bằng IFA có sử dụng kháng thể đặc hiệu PCV2. Nguyên liệu gốc đối

với mỗi baculovirus được tạo ra trên các tế bào Sf9 và được chuẩn độ nhờ phương pháp TCID₅₀ trên cơ sở IFA có sử dụng kháng thể đơn dòng gp64 từ α -baculovirus.

Bảng 1 Đoạn mỗi dùng cho đột biến điểm định hướng.

Đoạn mỗi	Trình tự
Xuôi chiều	5'-CTGTCAAGAAAACCACAGTCX ¹ X ² X ³ ACGCCCTCCTGGAATGTG-3'
Ngược chiều	Trình tự bổ trợ ngược chiều của trình tự xuôi chiều

Đột biến	X ¹	X ²	X ³
R63D	G	A	C
R63Q	C	A	G
R63G	G	G	A
R63L	T	T	G
R63T	A	C	A

Sự biểu hiện và định lượng các VLP PCV2b ORF2

Các tế bào SF+ trong bình xoay được gây nhiễm với baculovirus tái tổ hợp ở MOI bằng 0,1 và được ủ ở 27°C trong điều kiện khuấy ổn định ở tốc độ khoảng 100rpm. Các dịch nuôi cấy đã được cấy nhiễm được thu nhận khi khả năng sống sót của tế bào SF+ giảm xuống dưới 30% hoặc ở 7 ngày sau lây nhiễm. Các dịch thu nhận baculovirus ở dạng thô được ly tâm ở 20.000g trong 20 phút ở 4°C để kết viên các tế

bào và các mảnh vụn tế bào không hòa tan và sau đó được lọc qua cỡ lỗ 0,2 μ m. Dịch thu nhận baculovirus đã lọc (35mL) được đưa đi ly tâm ở 100.000g RCF trong 2 giờ ở 4°C để kết viên các VLP PCV2b ORF2. Các viên kết thu được được tái tạo hỗn dịch trong TBS và được tách tiếp ở gradient sucroza gián đoạn 10% - 60% ở 100.000g RCF trong 2 giờ ở 4°C. Các phân đoạn chứa đa số PCV2b ORF2, như được xác định bởi SDS-PAGE và Western blot có sử dụng kháng thể α -PCV2, được gom lại và đánh giá bằng phép đo tỷ trọng. Tóm lại, các phân đoạn chứa PCV2b ORF2 đã được gom lại được tách bằng SDS-PAGE và được nhuộm với SIMPLYBLUE™ Safe Stain. Chụp ảnh gel và phân tích bằng cách sử dụng máy quay phim và phần mềm của Alpha View. Khối lượng của các băng PCV2b ORF2 được tính toán bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn BSA được lập cho mỗi gel. Nồng độ PCV2b ORF2 của phần gom được tính toán bằng cách chia khối lượng của các băng PCV2b ORF2 cho tổng thể tích của mẫu được nạp trên gel. Nồng độ của PCV2b ORF2 trong nguyên liệu thu nhận được tính toán bằng cách nhân nồng độ PCV2b ORF2 trong phần gom với thể tích của phần gom và sau đó chia kết quả này cho thể tích ban đầu của dịch thu nhận được dùng cho ly tâm.

VÍ DỤ 4

Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả của vacxin ORF2b Prototype Circovirus typ 2 gây bệnh ở lợn (bao gồm protein PCV2b ORF2 có SEQ ID NO: 1 được biểu hiện ở baculovirus tái tổ hợp) đối với sự lây nhiễm PCV2b khi được cho dùng ở ba tuần tuổi.

Bốn mươi hai con lợn CDCD khỏe mạnh (X con lợn từ mỗi lứa trong số X lứa và X con lợn từ mỗi lứa trong số X lứa) được quây lại và nhốt giữa sáu bãi rào kín. Các con lợn trong bãi rào được chia ngẫu nhiên đồng đều thành 1 trong số 5 nhóm được điều trị: Nhóm 1 (nhóm đối chứng âm tính tuyệt đối) bao gồm X con lợn và không được điều trị, Nhóm 2 (Nhóm đối chứng lây nhiễm, n=X) được điều trị, Nhóm 3 (nhóm thí nghiệm PCV2b chứa SEQ ID NO: 1 + vacxin carbopol, n=X), Nhóm 4 (PCV2b thí nghiệm chứa SEQ ID NO: 1 + vacxin ISA207VG, n=X). Tổng quan về các nhóm điều trị được nêu trong bảng 2.

Bảng 2:

Nhóm	Số con lợn	Chế phẩm xử lý	Ngày 0	Ngày 11 và Ngày 17	Ngày 14	Ngày 42
1	≥ 5	Đối chứng âm tính tuyệt đối	n/a	n/a	Mổ khám nghiệm	n/a
2	≥ 20	Đối chứng lây nhiễm	n/a	Điều trị KLH/ICF A	Lây nhiễm PCV2b	Mổ khám nghiệm
3	≥ 20	Protein PCV2b ORF2 + Carbopol	Chủng ngừa	Điều trị KLH/ICF A	Lây nhiễm PCV2b	Mổ khám nghiệm
4	≥ 20	Protein PCV2b ORF2 + ISA207VG	Chủng ngừa	Điều trị KLH/ICF A	Lây nhiễm PCV2b	Mổ khám nghiệm
5	≥ 20	Protein PCV2a/PCV2b ORF2 + Carbopol	Chủng ngừa	Điều trị KLH/ICF A	Lây nhiễm PCV2b	Mổ khám nghiệm

Ở ngày D0, các con lợn được 24 ngày tuổi và các con lợn thuộc Nhóm 3 được cho dùng vacxin với liều 1 mL trong cơ (IM). Ở D11 và D17, tất cả các con lợn nhận liều 2,0 mL KLH/ICFA trong cơ (IM). Ở D14, tất cả các con lợn được lây nhiễm với virus sống PCV2b với mật độ $5,0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ với lượng 1,0 mL ở phía bên phải của cổ qua đường IM và 1,0 mL trong mũi. Các con lợn được kiểm tra tình trạng sức khỏe chung hằng ngày. Các mẫu máu được lấy ở D-4, D14, D21, D28, D33 và D42, và huyết thanh được kiểm tra sự nhiễm virus PCV2 trong máu bằng phản ứng định lượng chuỗi polymeraza thời gian thực ở tất cả các ngày ngoại trừ ngày D-4. Các động vật đã chủng ngừa thể hiện lượng virus trong máu thấp hơn một cách đáng kể và giảm đến

mức không xuất hiện các triệu chứng lâm sàng so với các động vật không được chủng ngừa sau khi lây nhiễm PCV2b.

Trong ngữ cảnh của sáng chế được tạo ra và dữ liệu thí nghiệm được nêu trong đó, những vấn đề cụ thể sau được xem xét:

- đối với sự tiêu mô bạch huyết: để xác nhận chứng cứ về “trợ giúp trong phòng ngừa sự tiêu mô bạch huyết”, lợn được cho là dương tính khi một hoặc nhiều trong số 4 mẫu mô bạch huyết (a-mi-đan, TBLN, MLN hoặc ILN) là dương tính về mặt mô học đối với sự tiêu mô bạch huyết;
- đối với sự viêm mô bạch huyết: để xác nhận chứng cứ về “trợ giúp trong phòng ngừa sự viêm mô bạch huyết”, lợn được cho là dương tính khi một hoặc nhiều trong số 4 mẫu mô bạch huyết (a-mi-đan, TBLN, MLN hoặc ILN) là dương tính về mặt mô học đối với sự viêm mô bạch huyết;
- đối với sự xâm thực mô bạch huyết: để xác nhận chứng cứ cho thấy lợn hết lây nhiễm sau khi tiếp xúc với virus trong 4 tuần, lợn được xem là dương tính khi một hoặc nhiều trong số 4 mẫu mô bạch huyết (a-mi-đan, TBLN, MLN hoặc ILN) là dương tính đối với sự xâm thực mô bạch huyết PCV2 bởi IHC;
- đối với sự nhiễm virus trong máu: để xác nhận chứng cứ về “trợ giúp trong phòng ngừa nhiễm virus trong máu”, lợn được xem là dương tính ở ngày lấy mẫu khi thử nghiệm PCR thời gian thực trên huyết thanh cho thấy $\geq 1,0 \times 10^4$ đương lượng PCV2 trong hệ gen (mức thấp hơn tuyến tính); và
- đối với sự tử vong: để xác nhận chứng cứ về “trợ giúp trong phòng ngừa tử vong”, lợn được xem là dương tính đối với sự tử vong khi nó không chống nổi sự lây nhiễm (chết hoặc cần phải làm cho chết không đau đớn vì lý do nhân đạo với các triệu chứng lâm sàng có thể tính đến, thương tổn chung và/hoặc thương tổn về mặt mô học phù hợp với PCV2).

Trong phần danh mục trình tự:

SEQ ID NO: 1 tương ứng với SEQ ID NO: 2 bao gồm sự thay thế R63T.

SEQ ID NO: 2 tương ứng với trình tự của protein PCV2b ORF2 kiểu đại.

SEQ ID NO: 3 tương ứng với trình tự của protein PCV2a ORF2 kiểu đại.

SEQ ID NO: 4 tương ứng với trình tự polynucleotit mã hóa SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 5 tương ứng với trình tự của protein PCV2b ORF2 kiểu đại.

SEQ ID NO: 6 tương ứng với trình tự của polypeptit theo sáng chế có chiều dài gồm 233 gốc axit amin và có gốc arginin ở vị trí axit amin 59.

SEQ ID NO: 7 tương ứng với trình tự của polypeptit theo sáng chế có chiều dài gồm 233 gốc axit amin và có gốc lysin ở vị trí axit amin 59.

SEQ ID NO: 8 tương ứng với trình tự của polypeptit theo sáng chế có chiều dài gồm 234 gốc axit amin và có gốc arginin ở vị trí axit amin 59.

SEQ ID NO: 9 tương ứng với trình tự của polypeptit theo sáng chế có chiều dài gồm 234 gốc axit amin và có gốc lysin ở vị trí axit amin 59.

SEQ ID NO:10 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc alanin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:11 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc xystein ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:12 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc aspartat ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:13 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc glutamat ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:14 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc phenylalanin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:15 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc glyxin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:16 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc histidin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:17 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:18 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc leuxin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:19 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc methionin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:20 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc asparagin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:21 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc prolin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:22 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc glutamin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:23 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc serin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:24 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc threonin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:25 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là “vòng BC”) của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc valin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:26 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc tryptophan ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:27 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc tyrosin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:28 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc arginin ở vị trí axit amin 59 và có gốc alanin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:29 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc xystein ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:30 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc aspartat ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:31 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc glutamat ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:32 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc phenylalanin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:33 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc glyxin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:34 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc histidin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:35 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:36 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc leuxin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:37 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc methionin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:38 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc asparagin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:39 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc prolin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:40 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc glutamin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:41 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc serin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:42 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc threonin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:43 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc valin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:44 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc tryptophan ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO:45 tương ứng với trình tự gồm các axit amin ở vị trí 58-66 (trong bản mô tả này còn được gọi là "vòng BC") của polypeptit theo sáng chế có gốc lysin ở vị trí axit amin 59 và có gốc tyrosin ở vị trí axit amin 63.

SEQ ID NO: 46 tương ứng với trình tự của polypeptit theo sáng chế có chiều dài gồm 234 gốc axit amin và có gốc threonin ở vị trí axit amin 63.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein PCV2 ORF2 chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có mức đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 96% với trình tự axit amin SEQ ID NO:1 trên toàn bộ chiều dài của SEQ ID NO: 1, và trong đó protein PCV2 ORF2 này có:

- gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 59, và
- gốc prolin ở vị trí axit amin 88, và
- gốc threonin ở vị trí axit amin 151, và
- gốc isoleuxin ở vị trí axit amin 206, và
- gốc asparagin ở vị trí axit amin 232,

và có gốc axit amin khác ngoài gốc arginin hoặc gốc lysin ở vị trí axit amin 63,

trong đó việc đánh số vị trí axit amin dựa vào trình tự axit amin của protein PCV2 ORF2 kiểu dại.

2. Protein PCV2 ORF2 theo điểm 1, trong đó:

- protein PCV2 ORF2 này có gốc axit amin xuất hiện trong tự nhiên, tốt hơn là được mã hóa di truyền, ở vị trí axit amin 63, và/hoặc
- protein PCV2 ORF2 này có gốc axit amin được chọn từ nhóm gồm gốc axit amin với mạch bên có cực nhưng không mang điện tích, gốc axit amin với mạch bên kỵ nước, và gốc glyxin ở vị trí axit amin 63,

và trong đó gốc axit amin với mạch bên có cực nhưng không mang điện tích đã nêu tùy ý được chọn từ nhóm gồm gốc serin, gốc threonin, gốc tyrosin, gốc asparagin, và gốc glutamin, và/hoặc trong đó gốc axit amin với mạch bên kỵ nước đã nêu tùy ý được chọn từ nhóm gồm gốc alanin, gốc valin, gốc leuxin, gốc isoleuxin, gốc phenylalanin, và gốc tryptophan,

và/hoặc

- protein PCV2 ORF2 này có gốc axit amin được chọn từ nhóm gồm gốc serin và gốc threonin ở vị trí axit amin 63.

3. Protein PCV2 ORF2 theo điểm 1 hoặc 2,

trong đó protein PCV2 ORF2 đã nêu là protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp, tốt hơn là protein PCV2 ORF2 được biểu hiện trên baculovirus tái tổ hợp, và/hoặc

trong đó protein PCV2 ORF2 đã nêu là protein PCV2 kiểu phụ b (PCV2b) ORF2, và/hoặc

trong đó protein PCV2 ORF2 kiểu đại đã nêu là protein như nêu trong SEQ ID NO:2.

4. Chế phẩm miễn dịch chứa protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

5. Polynucleotit chứa trình tự mã hóa protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

6. Plasmid, tốt hơn là vector biểu hiện, bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

7. Tế bào chứa plasmid, tốt hơn là vector biểu hiện, mà bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

8. Hạt tương tự virus bao gồm nhiều protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

9. Baculovirus chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

10. Tế bào, tốt hơn là tế bào côn trùng, chứa baculovirus chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

11. Phương pháp sản xuất protein PCV2 ORF2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phương pháp này bao gồm bước:

- chuyển nhiễm tế bào với plasmid, tốt hơn là vector biểu hiện, bao gồm polynucleotit chứa trình tự mã hóa protein PCV2 ORF2 này,

hoặc

- gây nhiễm tế bào, tốt hơn là tế bào côn trùng, với baculovirus chứa polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa protein PCV2 ORF2 này.

Danh mục trình tự

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC

<120> Protein PCV2 ORF2, chế phẩm miễn dịch và hạt tương tự virus chứa protein này

<130> P10-0163

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tương ứng với SEQ ID NO:2 với sự thay thế R63T

<400> 1

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Phe	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Pro	Arg
1				5				10						15	

Ser	His	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Val	His	Pro
			20					25					30		

Arg	His	Arg	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Phe	Asn	Thr	Arg
		35					40					45			

Leu	Ser	Arg	Thr	Ile	Gly	Tyr	Thr	Val	Lys	Lys	Thr	Thr	Val	Thr	Thr
	50					55					60				

Pro	Ser	Trp	Asn	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Leu
65					70					75					80

Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Tyr
				85					90					95	

Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr
			100					105					110		

Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn
		115					120					125			

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

130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
 225 230
 <210> 2
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn
 <400> 2
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45
 Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225 230

<210> 3

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
 225 230

<210> 4
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mã hóa SEQ ID NO:1

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (187)..(189)

<400> 4

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattcttggc
60

cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg
120

aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc
180

acagtcacaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt
240

ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag
300

gttaagggtg agttctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc
360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc
420

tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtag
480

tttaccgccg aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga
540

aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact
600

gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa
660

ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca ctttaacccta agtga
705

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 5

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

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

[illegible] $\langle 210 \rangle$ 6

- <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa ở vị trí 63 được chọn từ nhóm gồm Ala,
 Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro,
 Ser,
 Thr, Trp, Tyr, và Val.
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (89)..(90)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (121)..(121)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (134)..(134)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (169)..(169)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
- <220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (190)..(190)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (210)..(210)

<223> Xaa ở vị trí 210 được chọn từ nhóm gồm Asp và Glu.

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (215)..(215)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 6

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Pro	Arg
1				5				10						15	

Ser	His	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Val	His	Pro
			20					25					30		

Arg	His	Arg	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Phe	Asn	Thr	Arg
		35					40					45			

Leu	Ser	Arg	Thr	Xaa	Gly	Tyr	Thr	Xaa	Lys	Arg	Thr	Thr	Val	Xaa	Thr
	50					55					60				

Pro	Ser	Trp	Xaa	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Leu
65					70					75					80

Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Xaa	Xaa	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Tyr
				85					90					95	

Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr
			100					105						110	

Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Xaa	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn
		115					120					125			

Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Xaa	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val	Asn	Tyr
	130					135					140				

Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Thr	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr
145					150					155					160

Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Xaa	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

165

170

175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
 180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
 225 230

<210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa ở vị trí 63 được chọn từ nhóm gồm Ala,
 Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro,
 Ser,
 Thr, Trp, Tyr, và Val.

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (89)..(90)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (121)..(121)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (134)..(134)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (169)..(169)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (190)..(190)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (210)..(210)

<223> Xaa ở vị trí 210 được chọn từ nhóm gồm Asp và Glu.

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (215)..(215)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 7

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Pro	Arg
1				5				10						15	

Ser	His	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Val	His	Pro
			20					25					30		

Arg	His	Arg	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Phe	Asn	Thr	Arg
		35				40						45			

Leu	Ser	Arg	Thr	Xaa	Gly	Tyr	Thr	Xaa	Lys	Lys	Thr	Thr	Val	Xaa	Thr
	50					55					60				

Pro	Ser	Trp	Xaa	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Leu
65					70					75					80

Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Xaa	Xaa	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

85

90

95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Xaa Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

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

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 8

<211> 234

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (8)..(8)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<222> (53)..(53)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa ở vị trí 63 được chọn từ nhóm gồm Ala,
 Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro,
 Ser,
 Thr, Trp, Tyr, và Val.

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (89)..(90)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (121)..(121)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (134)..(134)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (169)..(169)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (190)..(190)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (210)..(210)
 <223> Xaa ở vị trí 210 được chọn từ nhóm gồm Asp
 và Glu.

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (215)..(215)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (234)..(234)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 8

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Arg Thr Thr Val Xaa Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Xaa Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Xaa Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

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

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa
 225 230

<210> 9
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa ở vị trí 63 được chọn từ nhóm gồm Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, và Val.

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (89)..(90)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (121)..(121)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (134)..(134)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (169)..(169)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (190)..(190)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (210)..(210)
 <223> Xaa ở vị trí 210 được chọn từ nhóm gồm Asp và Glu.

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (215)..(215)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (234)..(234)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 9

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Pro	Arg
1				5				10						15	

Ser	His	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Val	His	Pro
			20					25					30		

Arg	His	Arg	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Phe	Asn	Thr	Arg
		35					40					45			

Leu	Ser	Arg	Thr	Xaa	Gly	Tyr	Thr	Xaa	Lys	Lys	Thr	Thr	Val	Xaa	Thr
	50					55					60				

Pro	Ser	Trp	Xaa	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Leu
65					70					75					80

Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Xaa	Xaa	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Tyr
				85					90					95	

Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr
			100					105					110		

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Xaa Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

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

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
 180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa
 225 230

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 10

Lys Arg Thr Thr Val Ala Thr Pro Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 11

Lys Arg Thr Thr Val Cys Thr Pro Ser
 1 5

<210> 12

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 12

Lys Arg Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 13

Lys Arg Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 14

Lys Arg Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 15

Lys Arg Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 16

Lys Arg Thr Thr Val His Thr Pro Ser
 1 5

<210> 17
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 17

Lys Arg Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 18

Lys Arg Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 19

Lys Arg Thr Thr Val Met Thr Pro Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 20

Lys Arg Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 21

Lys Arg Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 22

Lys Arg Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 23

Lys Arg Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 24

Lys Arg Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 25

Lys Arg Thr Thr Val Val Thr Pro Ser
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 26

Lys Arg Thr Thr Val Trp Thr Pro Ser
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 27

Lys Arg Thr Thr Val Tyr Thr Pro Ser
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 28

Lys Lys Thr Thr Val Ala Thr Pro Ser
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 29

Lys Lys Thr Thr Val Cys Thr Pro Ser
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 30

Lys Lys Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 31

Lys Lys Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 32

Lys Lys Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 33

Lys Lys Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 34

Lys Lys Thr Thr Val His Thr Pro Ser
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 35

Lys Lys Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 36

Lys Lys Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 37

Lys Lys Thr Thr Val Met Thr Pro Ser
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 38

Lys Lys Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 39

Lys Lys Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 40

Lys Lys Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 41

Lys Lys Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 42

Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 43

Lys Lys Thr Thr Val Val Thr Pro Ser
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 44

Lys Lys Thr Thr Val Trp Thr Pro Ser
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<400> 45

Lys Lys Thr Thr Val Tyr Thr Pro Ser
1 5

<210> 46
<211> 234
<212> PRT
<213> Circovirus gây bệnh ở lợn

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (63)..(63)
<223> Xaa ở vị trí 63 được chọn từ nhóm gồm Ala,
Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro,
Ser,
Thr, Trp, Tyr, và Val.

<400> 46

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Xaa Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225 230

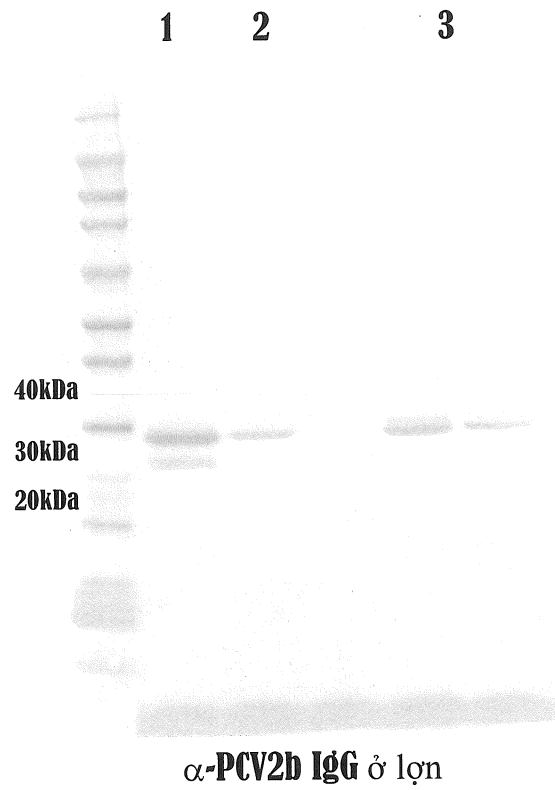
1/8

FIG. 1

Vị trí	2a	2b
59	A	R/K
63	T	R/K
88	K	P
151	P	T
191	R	G
206	K	I
232	E	N

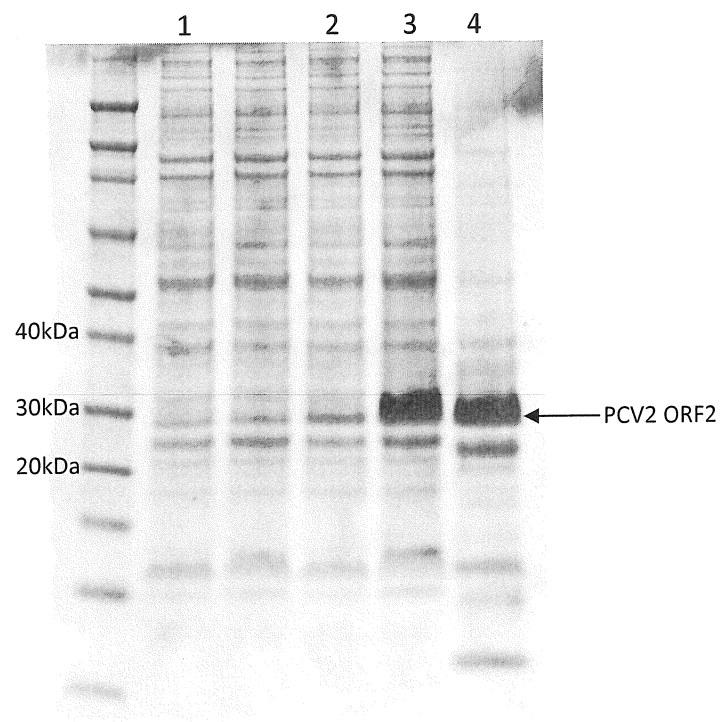
2/8

FIG. 2



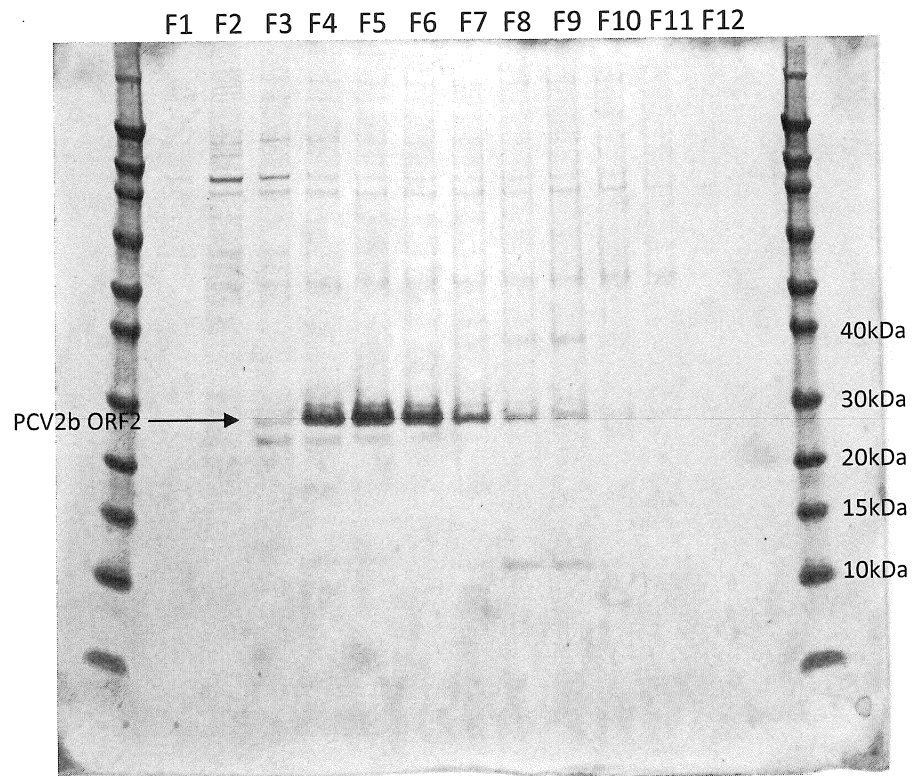
3/8

FIG. 3



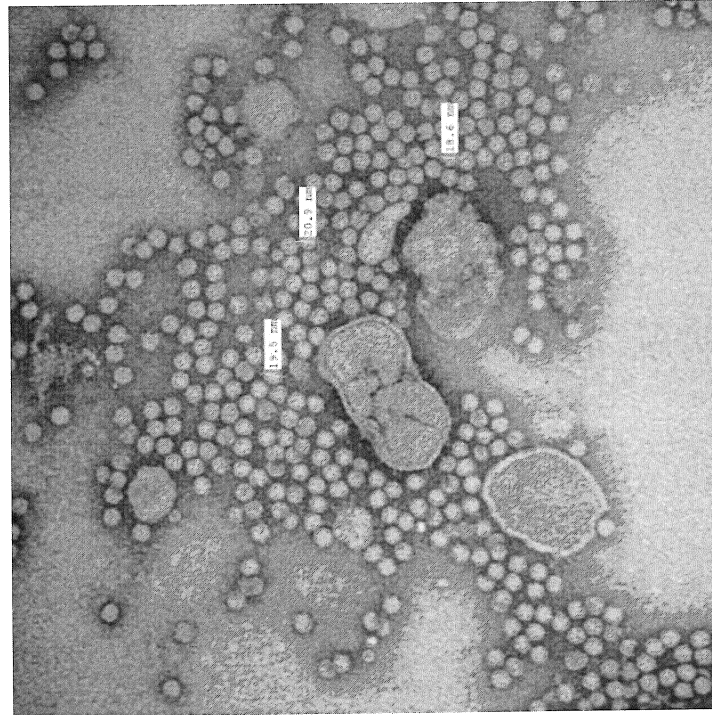
4/8

FIG. 4



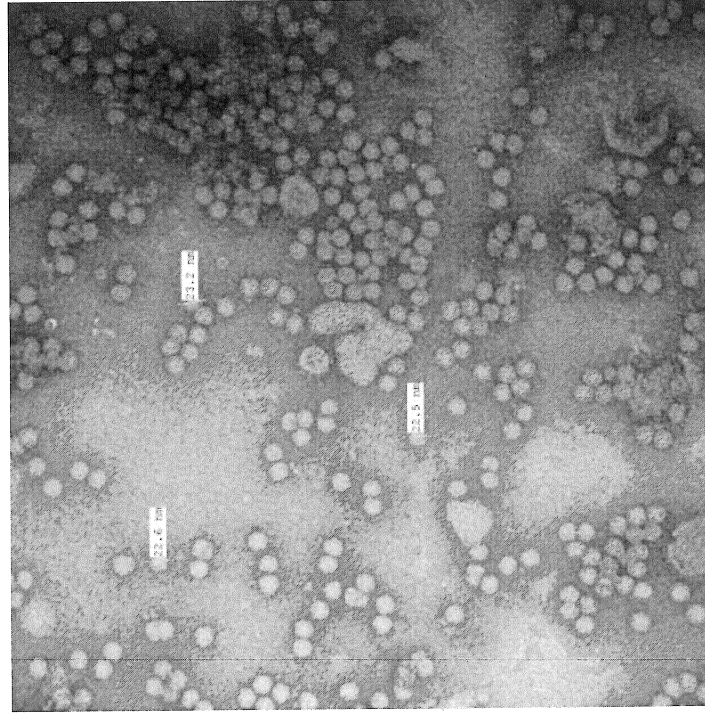
SDS-PAGE

FIG. 5A



PCV2a ORF2 VLP

FIG. 5B



PCV2b ORF2 VLP

6/8

FIG. 6

Cấu trúc	Xác nhận VLP bằng EM	Hiệu suất VLP ở quy mô 1L
ORF2a	Y	5,5mg/L
ORF2b BDH		
ORF2b BDH SFCO	Y	0,4mg/L
ORF2b BDH K59A	Y	0,34mg/L
ORF BDH R63K		
ORF2b BDH R63T	Y	3,2mg/L
ORF2b BDH SFCO P88K T151P	**	**
ORF2b BDH G191R	N	N/A
ORF2b BDH N232E	Y	0,57mg/L
ORF2b BDH I206K	N	N/A

7/8

FIG. 7A

Cấu trúc	Nồng độ (ug/ml)
BaculoG/ORF2a	5,5
BaculoG/ORF2b BDH	0.39
BaculoG/ORF2b BDH R63L	3,57
BaculoG/ORF2b BDH R63G	4,14
BaculoG/ORF2b BDH R63Q	5,31
BaculoG/ORF2b BDH R63T	7,06
BaculoG/ORF2b BDH R63D	1,71

FIG. 7B

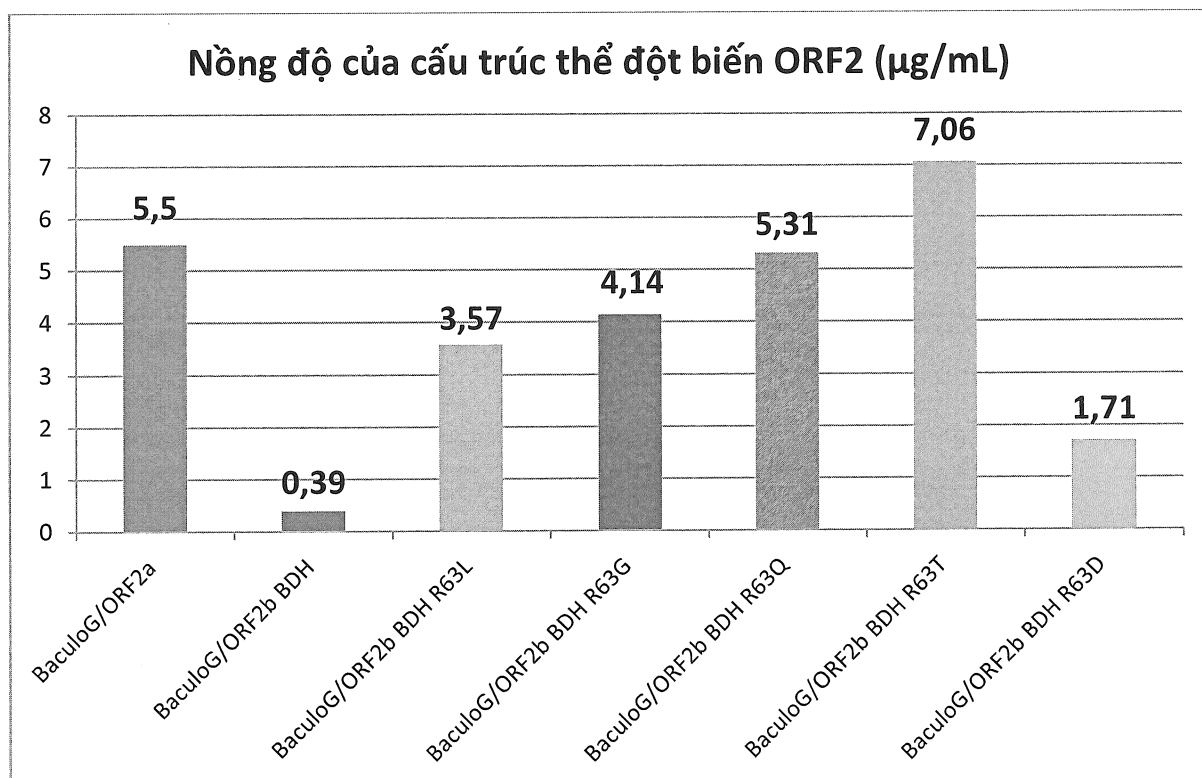


FIG. 8

[illegible]