



(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)



1-0028758

(51)⁷ A61K 39/12; A61K 39/385

(13) B

(21) 1-2015-03992

(22) 10/04/2014

(86) PCT/EP2014/057287 10/04/2014

(87) WO 2014/167060 16/10/2014

(30) 13163299.4 11/04/2013 EP

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/03/2016 336A

(73) CEVA SANTE ANIMALE (FR)

10 avenue de la Ballastière, F-33500 Libourne, France

(72) SATO, Takanori (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) POLYPEPTIT DUNG HỢP VÀ CHẾ PHẨM VACXIN

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit gây miễn dịch và chế phẩm vacxin chứa chúng. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, vector và tế bào biểu hiện polypeptit này. Cụ thể hơn là, polypeptit theo sáng chế còn chứa vùng gây miễn dịch và vùng định hướng màng tế bào có nguồn gốc từ gen B5R. Polypeptit theo sáng chế là đặc biệt thích hợp để sản xuất vacxin cho động vật không phải người, đặc biệt để chủng ngừa cho lợn chống nhiễm PCV2.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit gây miễn dịch và sử dụng chúng trong chế phẩm vaccin. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, vectơ và tế bào biểu hiện polypeptit này và sử dụng chúng. Cụ thể hơn, polypeptit theo sáng chế chứa miền gây miễn dịch và miền định hướng màng tế bào có nguồn gốc từ gen B5R. Sáng chế đặc biệt thích hợp để sản xuất vaccin cho động vật không phải người, đặc biệt là để chủng ngừa cho lợn chống nhiễm PCV2.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Circovirus ở lợn (Porcine circovirus - PCV) được xác định lần đầu tiên dưới dạng chất lây nhiễm trong môi trường nuôi cấy tế bào thận lợn (PK15 ATCC CCL-33). Hạt virus PCV có đặc điểm là virus không có vỏ ngoài, có hình khối hai mươi mặt với ADN sợi đơn dạng vòng dài khoảng 1,76 kb. PCV được xếp vào chi Circovirus thuộc họ Circoviridae, mà gồm các circovirus ở động vật khác như virus gây bệnh mỗ-lông ở vẹt, circovirus ở ngỗng, circovirus ở vịt, và circovirus ở chim bồ câu. Hai kiểu gen của PCV đã được nhận diện. PCV có nguồn gốc từ tế bào PK15 được coi là không gây bệnh cho lợn, và được chỉ định là PCV typ 1 (PCV1). Mặt khác, PCV typ 2 (PCV2) đã được thừa nhận là tác nhân gây nhiễm chính liên quan đến một vài bệnh ở lợn. Các bệnh liên quan đến PCV2 gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho các nhà chăn nuôi lợn trên toàn thế giới. Các bệnh liên quan đến PCV2 được mô tả trong WO2007/076520 và bao gồm, ví dụ, Hội chứng còi cọc ở lợn sau cai sữa (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS), Hội chứng viêm da và bệnh thận ở lợn (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome - PDNS), Bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (Porcine Respiratory Disease Complex - PRDC), rối loạn sinh sản, viêm ruột gây u hạt, viêm loét da do tụ cầu khuẩn, viêm hạch bạch huyết hoại tử, và bệnh run bầm sinh. Sự xuất hiện của PCV2 kiểu phụ A (PCV2A) và PCV2 kiểu phụ B (PCV2B) đã được báo cáo cụ thể năm 2000 ở Tây Âu và ở Trung Âu năm 2003. Các thay đổi tương tự gần đây hơn đã được báo cáo năm 2008 ở lợn rừng.

Vaccin PCV2 được phát triển gần đây, như Circovac® (Merial), Ingelvac®, CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica), hoặc Suvaxyn®, là vaccin PCV2 bất

hoạt hoặc vacxin tiểu phần. Liên quan đến vacxin PCV2 bất hoạt, các chủng PCV2 kiểu phụ A hoặc B hiện nay thể hiện một vài nhược điểm. Cụ thể là, các virus PCV2 chỉ có thể được tạo ra ở độ chuẩn thấp, thường ít hơn 10^5 hạt virus TCID₅₀ mỗi ml. Tương tự, các virus này không thể được duy trì trong môi trường nuôi cấy mô và dòng tế bào lây nhiễm lâu dài. Liên quan đến vacxin tiểu phần PCV2, chúng thường sử dụng protein capsid của PCV2 tái tổ hợp, được tinh chế, được tạo ra bởi việc biểu hiện gen ORF2 của PCV2 trong hệ baculovirus. Về điểm này, protein được mã hóa bởi ORF2 của các thể phân lập PCV2 Imp1011 đã được báo cáo trong EP 1741785. Protein được mã hóa bởi ORF2 của thể phân lập PCV2 PCV2Rm đã được báo cáo trong WO2010/061000. Protein được mã hóa bởi ORF2 của thể phân lập PCV2 412 đã được báo cáo trong EP1816200. Protein khác được mã hóa bởi ORF2 của thể phân lập PCV2 khác đã được báo cáo trong EP 1036180 hoặc EP2225367.

Tuy nhiên, hiệu quả biểu hiện và tính sinh miễn dịch của các protein capsid tự nhiên này là không tối ưu và không phải là luôn luôn tạo ra các mức bảo vệ miễn dịch yêu cầu ở các động vật được chủng ngừa. Cụ thể, protein ORF2 chứa trình tự định vị nhân mà dẫn đến sự biểu hiện protein trong nhân của tế bào. Sự định vị trong tế bào này không tạo thuận lợi cho việc tách chiết hoặc tinh chế protein và có thể còn ngăn cản hoặc làm giảm hiệu quả của vacxin ADN hoặc vector mà biểu hiện protein ORF2 *in vivo* ở động vật.

Tài liệu WO2010/068969 đề xuất việc biến đổi protein biểu hiện của ORF2 để biểu hiện kháng nguyên ORF2 ở dạng hòa tan bằng cách sử dụng trình tự peptit tín hiệu tiết ngoại lai. Tài liệu này đề xuất việc dung hợp ORF2 với tín hiệu tiết hoặc tín hiệu màng tế bào, và bao gồm vị trí phân cắt trong cấu trúc sao cho ORF2 hòa tan được có thể được giải phóng ở dạng hòa tan. Tài liệu này đề xuất một danh sách dự đoán dài các peptit tiết ứng cử tiềm năng. Tuy nhiên, tài liệu này không chứa bất kỳ dữ liệu thử nghiệm nào cho thấy rằng sự biểu hiện/tính sinh miễn dịch hiệu quả hoặc được cải thiện có thể thu được bằng cách làm biến đổi protein biểu hiện của ORF2. Không có cấu trúc nào được bộc lộ là cho phép sự gây miễn dịch hiệu quả.

Sáng chế đề xuất cấu trúc mới được cải thiện để biểu hiện polypeptit kháng nguyên. Sáng chế bộc lộ sản phẩm dung hợp mà đặc biệt thích hợp cho sự biểu hiện

được cải thiện của polypeptit kháng nguyên ở bề mặt tế bào, cụ thể là bằng cách sử dụng vector biểu hiện của virus như virus gây bệnh đậu lợn.

Sáng chế cho thấy rằng bằng cách biểu hiện polypeptit kháng nguyên ở bề mặt của tế bào bị nhiễm/tải nạp sử dụng tín hiệu định hướng có nguồn gốc từ B5R, sẽ thu được đáp ứng miễn dịch cải thiện, tạo ra sự bảo vệ hiệu quả. Bằng cách trình diện kháng nguyên ở bề mặt tế bào in vivo ở động vật, vaccin theo sáng chế phân phối và phơi kháng nguyên một cách hiệu quả nhất với hệ miễn dịch, cụ thể là với các tế bào miễn dịch như tế bào lympho, tế bào đuôi gai và đại thực bào. Bằng cách trình diện kháng nguyên ở bề mặt tế bào, sáng chế đề xuất chất kháng nguyên ở cấu hình hoạt động để gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ tiềm năng. Sáng chế có thể được áp dụng cho polypeptit kháng nguyên bất kỳ, đặc biệt là kháng nguyên của virus.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất polypeptit chứa peptit tín hiệu có nguồn gốc từ gen B5R của virus Vaccinia liên kết hoạt động với polypeptit kháng nguyên khác loại.

Theo một phương án cụ thể, peptit tín hiệu chứa SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 1. Polypeptit kháng nguyên có thể là kháng nguyên virus, vi khuẩn hoặc ký sinh trùng. Tốt hơn nếu polypeptit kháng nguyên là kháng nguyên virus, tốt hơn nữa nếu là protein capsid hoặc miền gây miễn dịch của nó.

Theo một phương án cụ thể, polypeptit kháng nguyên là ORF2 của virus PCV2, hoặc miền kháng nguyên của nó. Phương án được ưu tiên sử dụng polypeptit kháng nguyên chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 80% với SEQ ID NO: 3.

Polypeptit theo sáng chế có thể là tổng hợp hoặc tái tổ hợp, và có thể chứa các biến đổi sau phiên mã như glycosyl hóa, nhóm hóa chất bổ sung, v.v.. Tốt nhất là, polypeptit theo sáng chế không có vị trí phân cắt giữa peptit định hướng và peptit kháng nguyên.

Một mục đích khác của sáng chế là tế bào biểu hiện polypeptit như được xác định ở trên trên bề mặt của nó.

Mục đích khác nữa của sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa polypeptit như được xác định ở trên.

Một mục đích khác của sáng chế là vector chứa axit nucleic theo sáng chế. Tốt hơn là, vector là vector virus, như tốt nhất là virus bệnh giả dại (pseudorabies virus PRV) hoặc virus bệnh đậu lợn (SPV). Sử dụng virus bệnh đậu lợn là đặc biệt có lợi do peptit tín hiệu B5R có nguồn gốc từ virus Vaccinia có tính tương thích cao với virus bệnh đậu lợn.

Mục đích khác nữa của sáng chế bao gồm chế phẩm chứa polypeptit, tế bào, axit nucleic, hoặc vector như được xác định ở trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là vacxin chứa polypeptit, tế bào, axit nucleic, hoặc vector như được xác định ở trên và, tùy ý, chất bổ trợ.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp gây miễn dịch hoặc gây đáp ứng miễn dịch ở động vật không phải người (ví dụ, lợn) bao gồm việc cho động vật này sử dụng polypeptit, axit nucleic, tế bào, vector hoặc vacxin như được mô tả ở trên.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh liên quan đến PCV2 ở động vật không phải người (ví dụ, lợn) bao gồm việc cho động vật này dùng polypeptit, axit nucleic, tế bào, vector hoặc vacxin như được mô tả ở trên.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng peptit tín hiệu có nguồn gốc từ gen B5R của virus Vaccinia để biểu hiện polypeptit kháng nguyên khác loại ở tế bào.

Sáng chế có thể được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch và/hoặc để chủng ngừa cho động vật không phải người bất kỳ. Sáng chế đặc biệt hữu dụng để chủng ngừa cho lợn kháng sự nhiễm PCV2 hoặc các bệnh do PCV2.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình thể hiện sơ đồ cấu trúc của plasmit tương đồng, pSP72-Ess_ORF2.

Fig. 2 là hình thể hiện thử nghiệm mảng đen của rSPV (SVR3, SVR7) sử dụng kháng thể đơn dòng 36F1. Các tế bào ESK-4 được gây nhiễm SPV bố mẹ hoặc các virus tái tổ hợp (SVR3 hoặc SVR7). Sáu ngày sau, tế bào được đưa qua thử nghiệm mảng đen sử dụng kháng thể đơn dòng 36F1 (1:500), kháng thể thử kháng IgG của chuột liên hợp biotin, và ABC- ALP (Vecterstain).

Fig. 3: là hình thể hiện IFA của tế bào nhiễm SPV. Tế bào ESK-4 được gây nhiễm bằng rSPV (SVR3 hoặc SVR7) hoặc SPV bố mẹ. Năm ngày sau, tế bào bị nhiễm được xử lý bằng axeton/metanol (a) hoặc không xử lý (b), và được cho phản ứng với các kháng thể thứ nhất [kháng thể thử kháng β -Galactosidaza (α - β Gal) và kháng thể chuột kháng PCV2-ORF2 (α -ORF2) (1:1000)] và các kháng thể thứ hai [kháng thể dê kháng IgG của thử Alexa Fluor 488 và kháng IgG của chuột Alexa Fluor 546 (1:1000)].

Fig. 4 là sơ đồ độ chuẩn IF huyết thanh học kháng PCV2. Tế bào RPL-2 nhiễm Rm40 được phủ lên mỗi giếng trong tấm 96 giếng. Tế bào được cố định bằng axeton/metanol, và dung dịch huyết thanh pha loãng hai lần được ủ trong 1 giờ sau khi phong bế (sữa không béo 0,5% trong PBS). Kháng thể FITC kháng IgG của lợn được tạo ra ở thử (SIGMA Cat. #: F1638, 1:1000) được sử dụng làm kháng thể thử cấp. Độ chuẩn IF của huyết thanh lợn dương tính tiêu chuẩn, PAB-PCV2 (VMRD) là 2560.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến polypeptit gây miễn dịch mới và sử dụng chúng, đặc biệt là trong chế phẩm vaccin. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, vector và tế bào biểu hiện polypeptit và sử dụng chúng. Cụ thể hơn, polypeptit theo sáng chế chứa miền gây miễn dịch và miền định hướng màng tế bào mà được liên kết hoạt động, trong đó miền định hướng màng tế bào có nguồn gốc từ gen B5R. Sáng chế là đặc biệt thích hợp để sản xuất vaccin cho động vật không phải người, đặc biệt là để chủng ngừa cho lợn kháng lại sự nhiễm PCV2.

Peptit định hướng màng tế bào có nguồn gốc từ B5R

Thuật ngữ "có nguồn gốc từ" chỉ ra rằng trình tự của peptit định hướng là giống với hoặc gần như tương tự với trình tự của peptit tín hiệu của gen B5R của virus

Vaccinia. Theo phương án được ưu tiên, peptit định hướng chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự của peptit tín hiệu của gen B5R của virus Vaccinia, còn tốt hơn nữa là có độ tương đồng về trình tự ít nhất 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 hoặc 99%.

Ví dụ được ưu tiên nhất về trình tự của peptit tín hiệu của gen B5R là SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 1, tốt hơn là có độ tương đồng ít nhất 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 hoặc 99% với SEQ ID NO: 1. Do đó, theo một phương án cụ thể, polypeptit theo sáng chế chứa trình tự của peptit tín hiệu mà chứa SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 1.

Peptit tín hiệu có thể còn chứa axit amin có nguồn gốc từ gen B5R, miễn là axit amin này không làm thay đổi các đặc tính định hướng màng của peptit. Về điểm này, theo một phương án cụ thể, peptit tín hiệu chứa SEQ ID NO: 2. Axit amin từ 23 đến 36 nêu trong SEQ ID NO: 2 gần như không tham gia vào chức năng định hướng màng. Tuy nhiên, kết quả thể hiện rằng các axit amin này tạo thuận lợi cho sự ổn định và cấu tạo thích hợp của polypeptit dung hợp.

Theo cách khác, hoặc ngoài ra, peptit tín hiệu có thể còn chứa axit amin mà không có nguồn gốc từ gen B5R, miễn là các axit amin này không làm thay đổi các đặc tính định hướng màng của peptit. Các axit amin này có thể có tính hữu dụng trong việc tách dòng (ví dụ các vị trí giới hạn, ví dụ), hoặc có thể tham gia vào khả năng ổn định của polypeptit.

Tốt hơn là, peptit tín hiệu không chứa nhiều hơn 100 axit amin, còn tốt hơn nữa là không nhiều hơn 50 axit amin.

Như được nêu ở trên, sáng chế bao gồm các peptit tín hiệu chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Mức độ tương đồng giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự axit nucleic có thể được xác định bằng các chương trình máy tính vốn đã được biết đến trong lĩnh vực như GAP được cung cấp trong gói chương trình GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Phiên bản 8, tháng 8/1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 5371 1) (Needleman, S. B. and Wunsch, CD., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-

453). Sử dụng GAP (khoảng trống) với các cài đặt sau đây để so sánh trình tự ADN: điểm trừ tạo GAP bằng 5,0 và điểm trừ mở rộng GAP bằng 0,3. Phân tử axit nucleic/axit amin có thể được xếp thẳng hàng với nhau bằng phần mềm xếp hàng Pileup, là một phần của gói chương trình GCG, sử dụng, ví dụ, cài đặt mặc định với điểm trừ tạo gap bằng 5 và điểm trừ mở rộng gap bằng 0,3.

Các điều kiện thử nghiệm thích hợp để xác định xem phân tử axit nucleic xác định có lai với axit nucleic cụ thể hay không có thể bao gồm việc ngâm trước dịch lọc chứa mẫu axit nucleic được kiểm tra trong dung dịch 5 x SSC trong 10 phút, và việc lai trước dịch lọc trong dung dịch 5 x SSC, 5 x dung dịch Denhardt, SDS 0,5% và 100 [mu]g/ml của ADN trong tinh dịch cá hồi được biến tính bằng siêu âm, sau đó lai trong cùng dung dịch chứa mẫu dò được đánh dấu P-dCTP nồng độ 10 ng/ml trong 12 giờ ở nhiệt độ xấp xỉ 45°C, theo các phương pháp lai như được mô tả trong tài liệu Sambrook và cộng sự (1989; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour, New York). Sau đó, dịch lọc được rửa hai lần trong 30 phút trong dung dịch 2 x SSC, SDS 0,5% ở nhiệt độ ít nhất bằng 55°C (độ nghiêm ngặt thấp), ít nhất bằng 60°C (độ nghiêm ngặt trung bình), ít nhất bằng 65°C (độ nghiêm ngặt trung bình/cao), ít nhất bằng 70°C (độ chính xác cao), hoặc ít nhất bằng 75°C (độ nghiêm ngặt rất cao). Việc lai có thể được phát hiện bằng cách phơi dịch lọc ra màng tia x.

Theo phương án được ưu tiên, tín hiệu peptit chứa SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo một phương án cụ thể, tín hiệu peptit chứa SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Các polypeptit kháng nguyên

Sáng chế có thể được sử dụng với polypeptit kháng nguyên bất kỳ, nghĩa là, với polypeptit bất kỳ chứa một hoặc nhiều epitop mà có thể gây ra đáp ứng miễn dịch. Polypeptit có thể là protein toàn vẹn, mảnh protein, hoặc peptit nhỏ gồm, ví dụ 10 axit amin. Tốt hơn là, polypeptit kháng nguyên chứa ít hơn khoảng 500 axit amin.

Polypeptit kháng nguyên là "khác loại" so với peptit tín hiệu, điều này nghĩa là polypeptit kháng nguyên không kết hợp một cách tự nhiên với peptit tín hiệu trong tự nhiên. Thông thường, polypeptit kháng nguyên không phải là trình tự của protein B5R.

Thuật ngữ khác loại có nghĩa là, ví dụ, polypeptit kháng nguyên là từ virus khác virus Vaccinia, hoặc từ protein khác protein B5R, ví dụ.

Polypeptit kháng nguyên có thể là polypeptit kháng nguyên của tác nhân virus, tế bào (ví dụ, vi khuẩn) hoặc ký sinh trùng.

Về điểm này, như được nêu ở trên, theo phương án được ưu tiên, polypeptit kháng nguyên là protein ORF2 của virus PCV2, hoặc miễn kháng nguyên của nó.

Protein ORF2 của thể phân lập PCV2 Imp1011 đã được báo cáo trong EP1741785. Protein ORF2 của thể phân lập PCV2 PCV2Rm đã được báo cáo trong WO2010/061000. Protein ORF2 của phân lập PCV2 412 đã được báo cáo trong EP1816200. Protein ORF2 khác của phân lập PCV2 khác được báo cáo trong EP 1036180 hoặc EP2225367. Tất cả các protein ORF2 này được thiết kế để sử dụng trong sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên, protein ORF2 để dùng trong sáng chế chứa SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất 80% với SEQ ID NO: 3, còn tốt hơn nữa là có độ tương đồng ít nhất 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, hoặc 99% với SEQ ID NO: 3.

Thông thường, protein ORF2 của PCV2 chứa khoảng 234 axit amin. Trình tự này chứa trình tự định vị nhân, mà thường tương ứng với axit amin từ 1 đến 42 của trình tự.

Được ưu tiên theo sáng chế là sử dụng một phần của protein ORF2 mà không có trình tự định vị nhân tự nhiên (nghĩa là, trình tự ở gốc 1 đến 42 của ORF2 tự nhiên), và thay thế trình tự này bằng peptit định hướng màng tế bào. SEQ ID NO: 3 là trình tự axit amin của protein ORF2 không có trình tự định vị nhân.

Trình tự có tính tương đồng với SEQ ID NO: 3 và duy trì hoạt tính gây miễn dịch của PCV2 có thể có nguồn gốc nhân tạo hoặc thu được từ các kiểu huyết thanh của PCV2 được liệt kê ở trên, hoặc từ các kiểu huyết thanh khác nữa. Thông thường, 42 axit amin đầu tiên của protein ORF2 được loại bỏ để ức chế chức năng định vị nhân.

Như đã được chỉ ra, sáng chế có thể được sử dụng với polypeptit gây miễn dịch của kháng nguyên virus hoặc kháng nguyên gây bệnh khác như, ví dụ, protein bất kỳ (ví dụ, glycoprotein, protein vỏ ngoài, hoặc mảnh kháng nguyên của chúng) của virus hoặc tác nhân gây bệnh được chọn từ ví dụ, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Adenovirus; Alphavirus như Virus viêm não ngựa miền Đông; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., tốt hơn là *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, tốt hơn là các biến thể sinh học (biovar) 1, 2 và 3; Virus gây sốt cổ điển ở lợn, Virus gây dịch tả heo châu Phi; *Chlamydia* và *Chlamydophila* sp. và tốt hơn là *C. pecorum* và *C. abortus*; *Clostridium* spp., tốt hơn là *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* kiểu A, B và C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirus gây bệnh tiêu hóa và hô hấp; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* tên hiện nay là *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, tốt hơn là các nhóm phụ 1, 7 và 14; Virus gây bệnh viêm dạ dày ruột; *Isospora suis*; Virus viêm não Nhật Bản; Virus viêm ruột; *Leptospira* spp., tốt hơn là *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira Pomona* và *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp., tốt hơn là, *M. avium*, *M. intracellulare* và *M. bovis*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; Parvovirus; *Pasteurella multocida*; Virus cytomegalo ở lợn; Parovirus ở lợn, Virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn; Virus bệnh giả dại; Rotavirus; Sagiyama virus; *Salmonella* spp. tốt hơn là, *S. typhimurium* và *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp., tốt hơn là, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., tốt hơn là *Strep. suis*; Cytomegalovirus ở lợn; Virus gây bệnh mụn nước ở lợn; Virus cúm ở lợn; Virus gây bệnh đậu lợn; *Toxoplasma gondii*; Virus gây bệnh viêm miệng có mụn nước và virus gây ban bọ nước ở lợn hoặc các thể phân lập và các nhóm phụ của circovirus ở lợn.

Ghép và sản xuất polypeptit

Polypeptit theo sáng chế thường chứa peptit định hướng màng tế bào liên kết hoạt động với polypeptit kháng nguyên. Thuật ngữ "liên kết hoạt động" nghĩa là hai miền được dung hợp với nhau, trực tiếp hoặc gián tiếp, theo cách mà cho phép định

hướng polypeptit đến màng tế bào và biểu hiện polypeptit kháng nguyên bên ngoài tế bào.

Tốt nhất là, peptit định hướng màng tế bào nằm ở đầu tận cùng N và polypeptit gây miễn dịch nằm ở đầu tận cùng C. Cả hai miền được liên kết cộng hóa trị, tốt hơn là bằng liên kết amin. Do đó, polypeptit theo sáng chế tốt hơn là chứa, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:

- . peptit định hướng màng tế bào,

- . polypeptit gây miễn dịch

Polypeptit có thể còn chứa miền hoặc trình tự bổ sung. Ví dụ, polypeptit có thể chứa trình tự liên kết, giữa peptit định hướng màng tế bào và polypeptit gây miễn dịch. Tuy nhiên, tốt hơn là, hai miền được liên kết trực tiếp mà không có trình tự phân liên kết. Tương tự, theo phương án được ưu tiên, polypeptit không có vị trí phân cắt sao cho polypeptit gây miễn dịch được phơi ở bên mặt của tế bào và về cơ bản là không được giải phóng dưới dạng tan được.

Ví dụ được ưu tiên và cụ thể của polypeptit theo sáng chế chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.

Polypeptit theo sáng chế có thể còn chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N.

Polypeptit theo sáng chế có thể được glycosyl hóa.

Polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra bởi quy trình tổng hợp, hoặc là tái tổ hợp. Tốt hơn là, polypeptit theo sáng chế được thiết kế để được tạo ra/được biểu hiện trực tiếp trong tế bào hoặc toàn bộ cơ quan bằng cách biểu hiện phân tử axit nucleic mã hóa. Thật vậy, profin biểu hiện mới của polypeptit theo sáng chế là đặc biệt thích hợp để thiết kế vacxin ADN hoặc vacxin vector, mà chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit theo sáng chế. Bằng việc đưa vào một cơ quan, axit nucleic đi vào tế bào và biểu hiện polypeptit mà sẽ được phơi ở bề mặt tế bào và thể hiện khả năng gây miễn dịch cải thiện. Như sẽ được bàn đến dưới đây, axit nucleic có thể là trần, hoặc được tạo chế phẩm với vector thích hợp bất kỳ. Theo cách khác, sáng chế có thể sử dụng vacxin tế bào, trong đó polypeptit được biểu hiện trong môi trường nuôi cấy ở bề mặt tế bào và tế bào thu được được sử dụng làm chế phẩm vacxin.

Do đó, sáng chế còn bao hàm và sử dụng phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit như được xác định ở trên.

Axit nucleic

Mục đích khác nữa của sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit như được xác định ở trên. Axit nucleic có thể được dùng để tạo ra polypeptit in vitro, hoặc để tạo ra tế bào biểu hiện polypeptit trên bề mặt của chúng, hoặc để sản xuất vacxin trong đó hoạt chất là axit nucleic hoặc vector chứa axit nucleic.

Axit nucleic theo sáng chế có thể là ADN hoặc ARN, sợi đơn hoặc sợi đôi. Axit nucleic thường là cADN hoặc ARN. Axit nucleic có thể được tạo ra bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, như tổng hợp, hoặc tách dòng, hoặc khuếch đại trình tự mã hóa polypeptit gây miễn dịch; tổng hợp, hoặc tách dòng, hoặc khuếch đại trình tự mã hóa trình tự hướng đích màng tế bào; nối trình tự và tách dòng/khuếch đại chúng trong vector và tế bào thích hợp.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic chứa SEQ ID NO: 5.

Vector

Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được tạo ra dưới dạng phân tử axit nucleic về bản chất như phân tử axit nucleic trần; vector; virus hoặc tế bào chủ v.v, hoặc là có nguồn gốc từ tế bào tiền nhân hoặc từ tế bào nhân chuẩn. Vector bao gồm vector biểu hiện mà chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế. Vector theo sáng chế có thể, ví dụ, chứa gen khởi đầu phiên mã, và/hoặc gen kết thúc phiên mã, trong đó gen khởi đầu liên kết hoạt động với phân tử axit nucleic, và trong đó phân tử axit nucleic liên kết hoạt động với gen kết thúc phiên mã.

Về điểm này, mục đích cụ thể của sáng chế là vector virus chứa axit nucleic như được xác định ở trên. Vector virus có thể có nguồn gốc từ các loại virus khác nhau, như, tốt hơn là, Virus gây bệnh đậu lợn, Virus gây bệnh đậu gà, Virus gây bệnh giả dại, virus Aujeszky, salmonella, virus Vaccinia, Virus gây bệnh mụn nước ở bò (Bovine Herpes Virus - BHV), Virus gây bệnh mụn nước ở gà tây (Herpes Virus of Turkey – HVT), Adenovirus, Coronavirus gây bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm ở lợn (Transmissible

Gastroenteritidis Coronavirus - TGEV), Erythrovirus, và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ SIV (Simian Immunodeficiency Virus - SIV).

Theo phương án được ưu tiên, vector là virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp. Virus bệnh đậu lợn (SPV) chỉ gây bệnh nhẹ ở lợn, và tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Do đó, SPV là ứng viên tuyệt vời để làm vector virus ở lợn. Quy trình chung để tạo SPV tái tổ hợp được mô tả trong một số tài liệu tham khảo (Vet Rec. 1994 Jan 1; 134(1): 13-8.). Theo phương pháp thông thường, bước thứ nhất trong việc cấu trúc SPV tái tổ hợp là tạo ra plasmit tương đồng mà có thể điều khiển việc chèn (các) đơn vị phiên mã cho gen polypeptit kháng nguyên theo sáng chế vào bộ gen SPV. Việc chèn xảy ra bởi sự tái tổ hợp tương đồng và vì vậy đòi hỏi ADN chèn được bỏ qua bởi vùng bộ gen SPV liên tục. Trong trường hợp các tái tổ hợp SPV, gen thymidin kinaza (TK) được chọn trước tiên làm vị trí chèn và cho thấy là vùng không thiết yếu để sao chép virus. Do bộ máy phiên mã của virus truyền bệnh đậu sẽ không nhận ra gen khởi đầu của tế bào chủ, gen polypeptit kháng nguyên theo sáng chế tốt hơn là được liên kết với gen khởi đầu của virus truyền bệnh đậu. Gen khởi đầu của virus Vaccinia như P11 hoặc P7.5 được ưu tiên để biểu hiện trong SPV tái tổ hợp, nhưng các gen khởi đầu của virus truyền bệnh đậu khác có thể được sử dụng. Khi plasmit tương đồng được tạo ra, nó được chuyển nhiễm sang các tế bào khả biến như tế bào thận của lợn phôi thai (ESK-4) hoặc tế bào thận của lợn (PK-15) mà đã được gây nhiễm trước với SPV. Các tái tổ hợp được tạo ra bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa bộ gen SPV sao chép và plasmit chuyển nhiễm. SPV tái tổ hợp có thể được chọn/sàng lọc bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Một phương pháp nhận diện sử dụng gen *Escherichia coli lacZ* làm gen đánh dấu. Trong trường hợp này, chất nền sinh màu, 5-brom-4-clo-3-indolyl β -D-galactosid (X-gal), mà chuyển thành hợp chất màu xanh lam do tác dụng của enzym được biểu hiện (β -galactosidaza) sau đó được dùng để nhận diện mảng virus tạo ra bởi virus tái tổ hợp ở đời con so với nền của mảng không màu tạo ra bởi virus không tái tổ hợp. Trong trường hợp không có gen đánh dấu, việc tạo ra polypeptit kháng nguyên được biểu hiện bởi SPV tái tổ hợp có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu kháng polypeptit kháng nguyên trong thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang. Sử dụng quy trình được đề cập ở trên, SPV tái tổ hợp biểu hiện polypeptit kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra.

Các hệ biểu hiện và vector khác cũng có thể được sử dụng, như plasmid mà sao chép và/hoặc hợp nhất vào tế bào nấm men.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế polypeptit theo sáng chế, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vector như được xác định ở trên dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện axit nucleic và thu hồi polypeptit. Như được nêu ở trên, các protein và peptit có thể được tinh chế theo kỹ thuật vốn đã biết trong lĩnh vực. Sáng chế còn đề xuất bộ kit biểu hiện bao gồm (a) tế bào chủ (tốt hơn là tế bào côn trùng hoặc tế bào nấm men), (b) phương tiện biểu hiện polypeptit theo sáng chế, ví dụ bao gồm hệ vector có khả năng sao chép trong tế bào này, và (c) phương tiện thu hồi protein hoặc peptit theo sáng chế.

Chế phẩm vaccin

Thuật ngữ "vaccin" được sử dụng ở đây bao gồm tác nhân mà có thể được sử dụng để tạo ra, kích thích hoặc khuếch đại hệ miễn dịch của động vật (ví dụ, lợn) chống lại tác nhân gây bệnh. Vaccin theo sáng chế có khả năng tạo ra hoặc kích thích hoặc khuếch đại tính miễn dịch chống lại virus PCV2.

Thuật ngữ "gây miễn dịch" bao gồm quá trình cung cấp chất kháng nguyên cho đối tượng. Gây miễn dịch có thể, ví dụ, cho phép mức kháng thể và/hoặc đáp ứng của tế bào cao liên tục trong đó tế bào lympho T có thể diệt hoặc ức chế tác nhân gây bệnh ở động vật không phải người được gây miễn dịch, như lợn, mà nhằm chống lại tác nhân gây bệnh hoặc kháng nguyên mà động vật đã được phơi ra trước đó.

Vaccin theo sáng chế chứa lượng có hiệu quả miễn dịch của polypeptit, tế bào hoặc axit nucleic như được mô tả ở trên trong chất dẫn thuốc được dụng. Kết quả của việc chủng ngừa bằng chế phẩm theo sáng chế là động vật trở nên miễn dịch ít nhất một phần hoặc hoàn toàn với việc nhiễm PCV2, hoặc kháng lại việc nhiễm PCV2 phát triển vừa hoặc nặng. Vaccin PCV2 có thể được sử dụng để gây ra đáp ứng thể dịch và/hoặc tế bào.

Nhiễm PCV2 hoặc các bệnh có liên quan đến PCV2 bao gồm, không kể những cái khác, Hội chứng còi cọc sau cai sữa (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome – PMWS), Hội chứng viêm da và bệnh thận ở lợn (Porcine Dermatitis and

Nephropathy Syndrome - PDNS), Bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (Porcine Respiratory Disease Complex - PRDC), rối loạn sinh sản, viêm ruột gây u hạt, viêm loét da do tụ cầu khuẩn, bệnh hạch bạch huyết hoại tử, và bệnh run bầm sinh. Tốt hơn là, đối tượng động vật không phải người, như lợn, được bảo vệ đến mức độ ở đó một đến tất cả các triệu chứng sinh lý hoặc tác động bất lợi do nhiễm PCV2 được giảm đáng kể, được cải thiện hoặc được ngăn ngừa hoàn toàn.

Sáng chế còn đề cập đến vaccin kết hợp chứa polypeptit, axit nucleic hoặc tế bào theo sáng chế kết hợp với ít nhất một kháng nguyên protein bổ sung [Gupi P. S. Nayar và cộng sự (Can. Vet. J, vol. 38, 1997: 385-387) và Clark E. G. (Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997; 499-501)].

Trong thực tế, lượng chính xác cần cho liều có hiệu quả miễn dịch có thể thay đổi ở đối tượng này so với đối tượng khác phụ thuộc các yếu tố như độ tuổi và các tình trạng chung của đối tượng, bản chất của chế phẩm và cách sử dụng. “Lượng có hiệu quả” thích hợp có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực chỉ cần sử dụng thử nghiệm thông thường. Ví dụ, các phương pháp đã biết trong lĩnh vực để xác định hoặc chuẩn độ liều dùng thích hợp của vaccin để tìm ra liều dùng có hiệu quả tối thiểu dựa trên trọng lượng của đối tượng động vật không phải người, nồng độ của vaccin và các yếu tố thông thường khác.

Theo phương án thông thường, vaccin chứa liều đơn nhất của kháng nguyên polypeptit hoặc axit nucleic theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50 μ g, tốt hơn là từ 0,1 đến 25, còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 15 μ g, thông thường là khoảng 10 μ g.

Liều dùng của vaccin, nồng độ của các thành phần trong đó và thời gian sử dụng vaccin, mà gây ra đáp ứng miễn dịch thích hợp, có thể được xác định bằng các phương pháp như chuẩn độ kháng thể của huyết thanh, ví dụ, bởi kỹ thuật phân tích ELISA và/hoặc phân tích thử nghiệm trung hòa huyết thanh và/hoặc đánh giá thử thách chủng ngừa.

Theo một phương án cụ thể, vaccin chứa polypeptit theo sáng chế ở dạng được tinh chế, tùy ý kết hợp với tá dược hoặc chất mang thích hợp bất kỳ.

Theo phương án cụ thể khác, vacxin chứa axit nucleic như được xác định ở trên, tùy ý kết hợp với tá dược hoặc chất mang thích hợp bất kỳ. Vacxin được ưu tiên nhất chứa vectơ virus chứa axit nucleic như được xác định ở trên. Vacxin được ưu tiên hơn nữa chứa virus bệnh đậu lợn chứa axit nucleic như được xác định ở trên.

Vacxin có thể chứa các thành phần khác, vốn đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, như chất mang, tá dược, chất pha loãng, chất hỗ trợ, chất ổn định đông khô, tác nhân thẩm ướt hoặc nhũ hóa, tác nhân đệm pH, chất phụ gia tạo gel hoặc chất phụ gia tăng cường độ nhớt, và chất bảo quản dược dụng, phụ thuộc vào đường dùng.

Ví dụ về chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở nước khử khoáng hoặc nước cất; dung dịch nước muối; dầu gốc thực vật như dầu củ lạc, dầu lạc, dầu rum, dầu ô liu, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu vừng, hoặc dầu dừa; dầu silicon, bao gồm polysiloxan, như methyl polysiloxan, phenyl polysiloxan và methylphenyl polysiloxan; silicon dễ bay hơi; dầu khoáng như dầu parafin lỏng nhẹ, hoặc dầu parafin lỏng nặng; squalen; dẫn xuất xenluloza như methyl xenluloza, ethyl xenluloza, carboxymethylxenluloza, muối natri carboxymethylxenluloza, hoặc hydroxypropyl methylxenluloza; alkanol thấp, ví dụ etanol hoặc iso-propanol; aralkanol thấp; polyalkylen glycol thấp hoặc alkylen glycol thấp, ví dụ polyetylen glycol, polypropylen glycol, etylen glycol, propylen glycol, 1,3-butylen glycol hoặc glycerin; este của axit béo như isopropyl palmitat, isopropyl myristat hoặc etyl oleat; polyvinylpyrrolidon; aga; carrageenan; gôm tragacan hoặc gôm acacia, và mỡ dầu hỏa. Thông thường, chất mang hoặc các chất mang sẽ tạo thành từ 10% đến 99,9% theo khối lượng chế phẩm vacxin và có thể được đệm bằng các phương pháp thông thường sử dụng các chất phản ứng đã biết trong lĩnh vực, như natri hydro phosphat, natri dihydro phosphat, kali hydro phosphat, kali dihydro phosphat, hỗn hợp của chúng, và chất tương tự.

Các ví dụ về chất hỗ trợ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhũ tương dầu trong nước, nhôm hydroxit (alum), phức chất kích thích miễn dịch, polyme khối không ion hoặc copolyme, xytokin (như IL-1, IL-2, IL-7, IFN-[alpha], IFN-[beta], IFN-gamma, v.v.), saponin, monophosphoryl lipid A (MLA), muramyl dipeptit (MDP) và chất tương tự.

chất bổ trợ thích hợp khác bao gồm, ví dụ, nhôm kali sulfat, (các) độc tố trong ruột không ổn định nhiệt hoặc ổn định nhiệt được phân lập từ *Escherichia coli*, độc tố tả hoặc tiểu phần B của chúng, độc tố bạch hầu, độc tố uốn ván, độc tố ho lâu ngày, tá được đầy đủ hoặc không đầy đủ của Freund, v.v.. Chất bổ trợ trên cơ sở độc tố, như độc tố bạch hầu, độc tố uốn ván và độc tố ho lâu ngày có thể được làm bất hoạt trước khi sử dụng, ví dụ, bằng cách xử lý với formaldehyt.

Các ví dụ của chất ổn định đông khô có thể là, ví dụ các hydrat cacbon như sorbitol, manitol, tinh bột, sucroza, dextran hoặc glucoza, protein như albumin hoặc casein, và các dẫn xuất của chúng.

Vacxin có thể còn bao gồm ít nhất một chất kháng nguyên từ ít nhất một tác nhân gây bệnh bổ sung, ví dụ, tác nhân gây bệnh của lợn như *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Adenovirut; Alphavirut như Virut gây viêm não ngựa miền Đông; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., tốt hơn là *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, tốt hơn là các biến thể sinh học 1, 2 và 3; Virut gây sốt cổ điển ở lợn, Virut gây dịch tả heo châu Phi; *Chlamydia* và *Chlamydophila* sp. và tốt hơn là *C. pecorum* và *C. abortus*; *Clostridium* spp., tốt hơn là *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* kiểu A, B và C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirut gây bệnh tiêu hóa và hô hấp; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* tên hiện nay là *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, tốt hơn là các nhóm phụ 1, 7 và 14; Virut gây bệnh viêm dạ dày ruột; *Isospora suis*; Virut viêm não Nhật Bản; Virut viêm ruột; *Leptospira* spp., tốt hơn là *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira Pomona* và *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp., tốt hơn là, *M. avium*, *M. intracellular* và *M. bovis*; *Mycoplasma hypopneumoniae*; Parvovirut; *Pasteurella multocida*; Virut cytomegalo ở lợn; Parovirut ở lợn, Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn: Virut bệnh giả dại; Rotavirut; Sagiyama virut; *Salmonella* spp. tốt hơn là, *S. typhimurium* và *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp. tốt hơn là, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., tốt hơn là *Strep. suis*; Cytomegalovirut ở lợn; Virut gây bệnh mụn nước ở lợn; Virut cúm ở lợn; Virut gây

bệnh đậu lợn; *Toxoplasma gondii*; Virut gây bệnh viêm miệng có mụn nước và virut gây ban bọc nước ở lợn hoặc các phân lập và các nhóm phụ của Circovirus ở lợn.

Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể là chế phẩm lỏng như dung dịch nước, nhũ tương nước trong dầu hoặc nhũ tương dầu trong nước, sirô, cồn ngọt, cồn thuốc, chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ, sử dụng để tiêm), như huyền phù hoặc nhũ tương vô trùng. Các chế phẩm này là đã biết trong lĩnh vực và thường được điều chế bằng cách hòa tan kháng nguyên và các phụ gia thông thường khác trong chất mang hoặc hệ dung môi thích hợp. Chế phẩm lỏng còn có thể bao gồm huyền phù và nhũ tương mà chứa tác nhân tạo huyền phù hoặc nhũ hóa.

Đường dùng có thể là qua da, thông qua sử dụng qua niêm mạc, hoặc qua đường ngoài đường tiêu hóa (trong da, trong cơ, dưới da, trong tĩnh mạch, hoặc trong màng bụng). Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng một mình, hoặc có thể được sử dụng đồng thời hoặc được dùng liên tiếp với các điều trị hoặc liệu pháp chữa bệnh khác.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp gây miễn dịch hoặc gây đáp ứng miễn dịch ở động vật không phải người (ví dụ, lợn) bao gồm việc cho động vật này dùng polypeptit, axit nucleic, tế bào, vectơ hoặc vaccin như được mô tả ở trên.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến PCV2 ở động vật không phải người (ví dụ, lợn) bao gồm việc cho động vật này dùng polypeptit, axit nucleic, tế bào, vectơ hoặc vaccin như được mô tả ở trên.

Như được đề cập ở trên, nhiễm PCV2 hoặc các bệnh có liên quan đến PCV2 bao gồm, không kể những cái khác, Hội chứng còi cọc sau cai sữa (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome – PMWS), Hội chứng viêm da và bệnh thận ở lợn (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome - PDNS), Bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (Porcine Respiratory Disease Complex - PRDC), rối loạn sinh sản, viêm ruột gây u hạt, viêm loét da do tụ cầu khuẩn, bệnh hạch bạch huyết hoại tử, và bệnh run bẩm sinh.

Vaccin theo sáng chế có thể được dùng một cách thuận lợi trong mũi, qua da (cụ thể là, dùng trên hoặc ở bề mặt da để hấp thụ theo đường toàn thân), ngoài đường

tiêu hóa, trong mắt, v.v. Sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đường dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng và đường dùng tương tự.

Liều dùng của vaccin theo sáng chế sẽ phụ thuộc vào loài, giống, độ tuổi, kích thước, lịch sử chủng ngừa, tình trạng sức khỏe của động vật được chủng ngừa, cũng như đường dùng, ví dụ, dùng dưới da, trong da, qua miệng, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch.

Vaccin theo sáng chế có thể được dùng ở dạng liều đơn hoặc liều lặp lại. Vaccin theo sáng chế có thể được dùng một mình, hoặc có thể được dùng đồng thời hoặc được dùng liên tiếp với một hoặc nhiều chế phẩm khác, như ví dụ chế phẩm gây miễn dịch ở lợn khác hoặc chế phẩm vaccin. Khi chế phẩm được dùng ở các thời điểm khác nhau, việc dùng có thể tách biệt với nhau hoặc chồng chéo về thời gian.

Theo một phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế được dùng cho đối tượng mắc hoặc mặt khác có nguy cơ nhiễm PCV2 để tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch của đối tượng. Theo một phương án, đối tượng được dùng vaccin là lợn. Động vật có thể dễ bị nhiễm PCV2 hoặc virus có quan hệ gần gũi.

Tốt hơn là, vaccin theo sáng chế được dùng cho lợn, lợn trưởng thành, và cả lợn con, lợn con hoặc lợn cái mang thai, hoặc cho các loại động vật không phải người khác. Việc chủng ngừa cho lợn cái mang thai là đặc biệt có lợi vì nó tạo ra miễn dịch thụ động cho lợn sơ sinh thông qua việc truyền kháng thể của mẹ. Lợn có thể ít hơn 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 tuần tuổi; từ 1 đến 6 tuần tuổi; từ 2 đến 5 tuần tuổi; hoặc từ 3 đến 4 tuần tuổi. Ví dụ, động vật "thử nghiệm" có thể được dùng vaccin theo sáng chế để đánh giá hiệu quả của vaccin đối với việc sử dụng cuối cùng hoặc sự phát triển của vaccin cho lợn. Mong muốn là, vaccin được dùng cho đối tượng chưa bao giờ bị phơi với virus PCV2. Tốt hơn là, đối tượng là lợn cần chủng ngừa chống lại Hội chứng còi cọc sau cai sữa (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome – PMWS) và/hoặc Hội chứng viêm da và bệnh thận ở lợn (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome - PDNS).

Sáng chế còn bao gồm vaccin kết hợp, bao gồm vaccin theo sáng chế và ít nhất một thành phần có hoạt tính gây miễn dịch có hiệu quả chống lại sinh vật gây bệnh

khác ở lợn như, ví dụ *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Adenovirus*; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., tốt hơn là *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *Brucella suis*, tốt hơn là các biến thể sinh học 1, 2 và 3; Virus gây sốt cổ điển ở lợn, Virus gây dịch tả heo châu Phi; *Chlamydia* và *Chlamydophila* sp. và tốt hơn là *C. pecorum* và *C. abortus*; *Clostridium* spp., tốt hơn là *Cl. difficile*, *Cl. perfringens*; *Coronavirus* gây bệnh hô hấp ở lợn; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* có tên hiện nay là *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*; Virus viêm não tủy ngưng kết hồng cầu; *Isospora suis*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., tốt hơn là *Leptospira Pomona*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp. tốt hơn là, *M. avium*; *Mycoplasma hyponeumoniae*; *Pasteurella multocida*; Virus cytomegalo ở lợn; Parovirus ở lợn, Virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn, Virus bệnh giả dại; *Rotavirus*; *Salmonella* spp., tốt hơn là, *S. typhimurium* và *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp., tốt hơn là, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., tốt hơn là *S. suis*; *Cytomegalovirus* ở lợn; Virus cúm ở lợn; Virus gây bệnh đậu lợn; *Toxoplasma gondii*; Virus gây bệnh viêm miệng có mụn nước và virus gây ban bọ nước ở lợn hoặc các phân lập và các nhóm phụ của *Circovirus* ở lợn.

Sáng chế còn đề xuất vật chứa chứa polypeptit, axit nucleic hoặc vaccin với lượng có hiệu quả miễn dịch như được mô tả ở trên. Sáng chế còn đề xuất bộ kit chủng ngừa bao gồm vật chứa vô trùng tùy ý chứa lượng có hiệu quả miễn dịch của vaccin, phương tiện để đưa vaccin vào động vật, và tùy ý, hướng dẫn sử dụng bao gồm thông tin để sử dụng lượng có hiệu quả miễn dịch của chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến PCV2.

Các khía cạnh và lợi ích khác của sáng chế được đề xuất trong phần dưới đây, mà được coi là chỉ nhằm minh họa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Cấu trúc axit nucleic mã hóa polypeptit kháng nguyên chứa peptit tín hiệu B5R và PCV2 ORF2

Hai ADN sợi đôi tổng hợp nêu trong SEQ ID NO: 6 và NO: 7 được đặt hàng từ Takara Bio (Japan). Vị trí enzym giới hạn ở đầu 5'/3' của chúng lần lượt là

*Bam*HI/*Sa*II và *Xba*I/*Sa*II. Các ADN được tách dòng lần lượt vào các plasmit pMD18-Ess (B/X/S) và pMD18-ORF2(X/S).

Do có vị trí *Xba*I ở trước vị trí *Sa*II ở đầu 3' nêu trong SEQ ID NO: 6, pMD18-Ess (B/X/S) được cắt bằng hai enzym giới hạn, *Xba*I và *Sa*II. Đoạn ADN dài 561bp có nguồn gốc từ pMD18-ORF2(X/S) được cắt bằng *Xba*I và *Sa*II được chèn vào vị trí *Xba*I/*Sa*II của pMD18-Ess (B/X/S). Plasmit thu được, pMD18-Ess_ORF2, bao gồm gen peptit kháng nguyên nêu trong SEQ ID NO: 5.

Plasmit, pGTPs40K-S (được mô tả trên Fig. 2 của tài liệu USP7,348,422) được cắt bằng hai enzym giới hạn, *Bam*HI và *Sa*II, và được thay bằng đoạn dài 0,7 kbp được cắt bằng *Bam*HI/*Sa*II có nguồn gốc từ pMD18-Ess_ORF2. Plasmit thu được được gọi là pGTPs-Ess_ORF2. Plasmit này bao gồm gen khởi đầu của virus bệnh đậu mạnh (Ps) và gen peptit kháng nguyên nêu trong SEQ ID NO: 5.

Ví dụ 2: Các plasmit để tạo ra SPV tái tổ hợp

Trước tiên, ADN bộ gen của SPV được điều chế như sau:

Chủng kasza của SPV (VR-363) và tế bào thận của lợn phôi thai, tế bào ESK-4 (CL-184) có thể được mua từ American Type Culture Collection (ATCC). Tế bào ESK-4 được nuôi cấy thông thường ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5% trong môi trường F-12K của Ham (Gibco, Cat. No.: 21127-022) được bổ sung streptomycin-penicillin 1% (Gibco, Cat. No.: 15140-122) và FBS 5% (Gibco, Cat. No.: 10437-028). Để điều chế ADN bộ gen của SPV, tế bào ESK-4 hợp dòng trong bình thót cổ có đường kính 225cm² được gây nhiễm SPV và được ủ trong 6 ngày đến khi tế bào thể hiện 100% hiệu ứng bệnh lý tế bào (CPE). Sau đó, tế bào đã gây nhiễm được thu hoạch bằng cách cạo tế bào vào môi trường và quay ly tâm với tốc độ 1300 vòng/phút trong 5 phút. Môi trường được gạn, và viên tế bào được tạo huyền phù lại một cách nhẹ nhàng trong 2ml nước muối đệm Phosphat (PBS: 1,5g Na₂HPO₄, 0,2g KH₂PO₄, 0,8g NaCl và 0,2g KCl cho mỗi lít H₂O) và được kết đông - xả đông hai lần liên tiếp. Sau đó, các mảnh tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Hạt virus SPV, có mặt trong chất nổi trên bề mặt, sau đó được kết viên bằng cách quay ly tâm với tốc độ 20.000xg trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, viên thu được được tạo huyền phù với Tris 10mM pH=7,5. Sau đó, ADN bộ gen SPV được

tách chiết từ hạt virus SPV bằng cách tạo huyền phù với đệm dung giải (Tris 20mM, pH=9, NaCl 0,1M, EDTA 5mM, SDS 0,1%, proteinaza K 0,2mg/ml) và ủ ở nhiệt độ 60°C trong 5 phút. Thực hiện tách chiết phenol:cloroform (1:1) hai lần, và mẫu được kết tủa bằng cách thêm hai thể tích etanol và ly tâm. Phần nổi trên bề mặt được gạn, và viên (ADN của SPV) được làm khô trong không khí và được hydrat hóa lại trong Tris 10mM pH=7,5, EDTA 1mM ở nhiệt độ 4°C.

Tiếp theo, vùng kẹp sườn TK trong bộ gen SPV được tách dòng bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Hai đoạn mồi (oligonucleotit tổng hợp), SP54242F và SP57617R được nêu trong SEQ ID NO: 8 và 9 được mua từ Takara Bio. Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng LA Taq polymeraza (Takara Bio) và bộ đoạn mồi gồm SP54242F và SP57617R với ADN của SPV làm khuôn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

ADN được khuếch đại dài khoảng 3,4kbp được xác nhận bằng cách điện di trên gel agarosa 0,8%, và được tinh chế từ gel này sử dụng Bộ kit chiết gel QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Đoạn ADN tinh chế được tách dòng vào vector pCR4-TOPO (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 14 thể biến nạp kháng ampicillin màu trắng được nhặt ra và được nuôi trong môi trường nuôi cấy canh LB và mỗi plasmit được điều chế với bộ kit QuickLyse Miniprep (Qiagen). Mỗi plasmit được cắt bằng SpeI, và hai loại plasmit ứng viên (cả hai hướng của ADN được chèn) được chọn. ADN được chèn của chúng được đọc trình tự bằng chất phản ứng DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing) và thiết bị đọc trình tự CEQ2000XL (Beckman Coulter). Một trong số các plasmit ứng viên, pCR-SPV54242/57617 (#2), được xác nhận là có chứa đoạn ADN nằm trong khoảng từ 54.242nt đến 57.617nt của ADN bộ gen của SPV (GeneBank Acc: NC_003389) và sử dụng làm plasmit cơ sở (Fig. 1).

Tiếp theo, kỹ thuật gây đột biến bằng PCR được thực hiện để làm khuyết một phần của gen TK và đưa các vị trí enzym đa giới hạn vào sử dụng pCR-SPV54242/57617 (#2) làm khuôn và sử dụng hai loại bộ đoạn mồi, (1) SEQ ID NO: 10 và 11 hoặc (2) SEQ ID NO: 12 và 13.

Mỗi sản phẩm PCR được áp dụng điện di trên gel agarosa 0,8% và được tinh chế sử dụng Bộ kit chiết gel QIAquick. Đoạn ADN tinh chế, mà được khuếch đại bởi

PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 10 và 11, được cắt bằng hai enzym giới hạn, *KpnI* và *HindIII*, và được nối bằng pBluescript KS (+) được cắt bởi cùng enzym giới hạn (Stratagene). Plasmid pBS-TKR (*Kpn.Hin*) thu được (Fig. 1) được cắt bằng *SacI* và *PstI*, và đoạn ADN được cắt bởi cùng enzym giới hạn được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 12 và 13, được chèn vào nó. Plasmid thu được được gọi là pSP70 (Fig. 1).

Giữa vị trí *EcoRI* và *HindIII* trong các vị trí enzym đa giới hạn của pSP70 được thay bằng đoạn nối (adapter) oligonucleotit được điều chế bằng cách bắt cặp hai oligonucleotit ADN tổng hợp nêu trong SEQ ID NO: 14 và 15. Plasmid thu được được gọi là pSP71 (Fig. 1).

Các đoạn ADN của catxet gen 'gen khởi đầu P7.5-LacZ' có nguồn gốc từ pNZ76, mà được cắt bằng *HindIII* và *SmaI* của pNZ76 và sau đó cắt cụt bằng ADN polymeraza (được mô tả trong USP5,387,519) được nối vào vị trí *SmaI* của pSP71. Plasmid thu được gọi là pSP72 (Hình 1), và catxet gen 'P7.5-LacZ' được chèn vào gen TK (từ 55625nt đến 56170nt trong bộ gen của SPV).

Đoạn được cắt bằng *BglI* dài 0,8kb thu được từ pGTPs-Ess_ORF2 (Ví dụ 1) được chèn vào vị trí *SfiI* của pSP72, và plasmid thu được được gọi là pSP72-Ess_ORF2 (Fig. 1). Plasmid này bao gồm catxet gen 'gen khởi đầu của virus bệnh đậu lợn mạnh (Ps)-Ess_ORF2' cũng nằm trong gen TK, và được sử dụng làm plasmid tương đồng để tạo ra SPV, SVR7 tái tổ hợp.

Thay vì Ess_ORF2, gen PCV2-ORF2 tự nhiên được chèn vào plasmid tương đồng khác để dùng làm tham chiếu. Mặc dù nhiều dữ liệu trình tự của PCV2-ORF2 đã được báo cáo, một trong số chúng, ADN sợi đôi nêu trong SEQ ID NO: 16, được tổng hợp. SEQ ID NO: 16 là ADN bổ trợ mã hóa ORF2 của PCV2 được phân lập từ Pháp (GenBank: AF055393), và vị trí *BamHI* và *SalI* được gắn tương ứng ở đầu 5' và 3' của nó. ADN tổng hợp được cắt bằng *BamHI* và *SalI* và được thay bằng vùng *BamHI/SalI* của pSP72-Ess_ORF2. Plasmid thu được được gọi là pSP72-ORF2 và được sử dụng làm plasmid tương đồng để tạo ra SPV, SVR3 tái tổ hợp.

Ví dụ 3: Sản xuất SPV, SVR3 và SVR7 tái tổ hợp

(1) Sản xuất SPV, SVR3 và SVR7 tái tổ hợp

SPV tái tổ hợp được tạo ra trong tế bào ESK-4 bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa bộ gen SPV kiểu dại và vector tương đồng. Tế bào ESK-4 hợp dòng phụ trong tám 6 giếng được gây nhiễm SPV kiểu dại, 4 giờ trước khi chuyển nhiễm với mỗi 2 μ g pSP72-Ess_ORF2 hoặc pSP72-ORF2 sử dụng chất phản ứng Lipofectamin Plus (Invitrogen) và để ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 ngày đến khi hiệu ứng bệnh lý tế bào (CPE) xảy ra. Sản phẩm dung giải tế bào từ tế bào lây nhiễm-chuyển nhiễm được sàng lọc cho các mảng tái tổ hợp biểu hiện β -galactosidaza bằng cách thêm 0,5mg/ml Bluo-gal (Invitrogen Cat. No.: 15519-028) trong lớp phủ agarosa dinh dưỡng. Virut tái tổ hợp không kiểu dại được tinh chế qua 4 đến 6 vòng sàng lọc. SPV tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng pSP72-Ess_ORF2 hoặc pSP72-ORF2 lần lượt được gọi là SVR7 và SVR3.

(2) Thử nghiệm mảng đen (BP A)

Tế bào ESK-4 trong tám 24 giếng được gây nhiễm SVR3, SVR7 hoặc SPV dại, và được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 6 ngày, lớp đơn được cố định bằng axeton và metanol (2:1). Kháng thể đơn dòng kháng PCV2 trung hòa (Ingenase clone 36F1) được pha loãng (dung dịch pha loãng có tỷ lệ 1:500) trong sữa khô 5% trong PBS và được sử dụng cho tế bào đã được gây nhiễm và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng (RT). Tế bào đã được gây nhiễm được rửa bằng PBS và được cho phản ứng với biotin liên hợp với kháng thể thổ kháng IgG của chuột (dung dịch pha loãng có tỷ lệ 1:1000), và bộ kit chuẩn VECTASTAIN ABC (Vector Laboratory PK-4000). Chất nền kiềm phosphataza, dung dịch gốc NBT/BCIP (Roche, Cat. No.: 1 1681451001), được pha loãng trong Tris 0,1M pH=9,5, NaCl 0,1M, MgCl₂ 50mM, và được thêm vào tế bào đã được gây nhiễm và được ủ trong khoảng từ 5 đến 30 phút ở nhiệt độ phòng đến khi các mảng SVR3 hoặc SVR7 chuyển thành màu tím/đen. Trong khi các mảng do SPV dại có màu trắng (âm tính), tất cả các mảng do SVR3 và SVR7 được xác nhận là có màu đen (dương tính) (Fig. 2).

Ví dụ 4: Kháng thể đa dòng để phát hiện PCV2-ORF2

Để tạo ra kháng thể đa dòng kháng PCV2-ORF2, protein dung hợp Glutathion S-transferaza (GST) với vùng đầu tận C của PCV2-ORF2 được biểu hiện ở *E.coli*.

Trước hết, đoạn ADN được tạo ra bởi PCR sử dụng pMD18-ORF2(X/S) (Ví dụ 1) làm khuôn, và bộ đoạn mỗi nêu trong SEQ ID NO: 17 và 18.

ADN được khuếch đại dài 0,45kbp được cắt bằng *Bam*HI và *Sal*I, và được chèn vào các vị trí *Bam*HI/*Sal*I của pGEX-6p-3 (GE Healthcare, 28-9546-51). Các plasmid ứng viên được đọc trình tự bằng đoạn mỗi đọc trình tự, pGEX-5'-SP hoặc -3'-SP (GE Healthcare, 27-1410-01 hoặc 27-141 1-01, tương ứng) và được xác nhận là giống sơ đồ cấu trúc. Plasmid thu được được gọi là pGEX-TGXR2.

Tế bào chủ *E. coli*, BL21 (GE Healthcare, 27-1542-01) được biến nạp bằng pGEX-TGXR2, và thể biến nạp được xác nhận là biểu hiện protein dung hợp có khối lượng khoảng 40kDa bằng cách cảm ứng Isopropyl β -D-thio-galactosid (IPTG).

Để tạo ra protein dung hợp để gây miễn dịch ở động vật, khuẩn lạc đơn của thể biến nạp được cấy vào các phần 5 ml môi trường nuôi cấy canh LB chứa 50 μ g/ml ampicillin (Amp), và được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc. Sáng hôm sau, giống cấy qua đêm được cấy vào 1 lít môi trường nuôi cấy canh LB chứa Amp, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc đến OD600 bằng 0,7, khi IPTG được thêm vào môi trường nuôi cấy đến nồng độ cuối bằng 0,1mM. Môi trường nuôi cấy được ủ thêm 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc. Vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm với tốc độ 3500xg trong 20 phút, và được tạo huyền phù lại trong 20ml đệm dung giải PBS (1% Triton X-100 trong PBS). Huyền phù của vi khuẩn được xử lý bằng sóng siêu âm trên đá lạnh trong 10 giây bùng lên với 10 giây nghỉ trên đá lạnh ba lần. Chất dung giải được ly tâm với tốc độ 17.000xg trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C, và chất nổi trên bề mặt được chuyển sang ống mới.

Do các protein dung hợp GST mục tiêu được tạo thành thể vùi, chúng được tinh chế bằng chất rửa giải gel toàn phần nhỏ (Mini Whole Gel Eluter, Bio-Rad Laboratories, Cat. No.: 165-1255) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các protein dung hợp GST mục tiêu ~40 kDa được tinh chế trong phân đoạn số 7 từ chất rửa giải gel toàn phần nhỏ (Fig. 3b). Dung dịch của phân đoạn số 7 được thẩm tách bằng PBS. Kháng thể đa dòng kháng protein dung hợp này được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho chuột. Ba chuột cái Wister (SPF) ở 5 tuần tuổi được gây miễn dịch dưới da bằng 0,1 mg protein GST-ORF2 dưới dạng nhũ tương trong tá được

Freund đầy đủ, và ba tuần sau, chúng được tăng cường với 0,05mg cùng kháng nguyên này trộn với tá được Freund không đầy đủ ba lần mỗi lần cách nhau 3 tuần. Hai tuần sau lần gây miễn dịch cuối, chuột được lấy máu để thu huyết thanh ~1ml mỗi chuột.

Ví dụ 5: Đặc trưng hóa các peptit kháng nguyên được biểu hiện bởi SPV tái tổ hợp

Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFA) được thực hiện để xác nhận sự định vị của protein ORF2 được biểu hiện bởi SVR3 hoặc SVR7. Tế bào ESK-4 được gây nhiễm rSPV (SVR3 hoặc SVR7) hoặc SPV bố mẹ. Năm ngày sau, tế bào nhiễm được rửa bằng PBS hai lần, được xử lý ở nhiệt độ phòng trong 5 phút với (a) axeton/metanol (2:1) hoặc (b) PBS. Axeton/metanol hoặc PBS được lấy ra, và PBS được thêm không để mẫu khô đi. Chúng được rửa hai lần bằng PBS và được phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút với kháng thể sơ cấp [kháng thể thô kháng β -Galactosidaza (α - β Gal) (CAPPEL, Cat.#: 0631-0002) và kháng thể chuột kháng PCV2-ORF2 (α -ORF2) (Ví dụ 4), (dung dịch pha loãng có tỷ lệ 1:1000 trong PBS)]. Tiếp theo, mẫu thử được rửa bằng PBS ba lần, và được phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút với kháng thể thứ cấp [kháng thể dê kháng IgG của thỏ (H+L) Alexa Fluor 488 (Life technology, A-11006) và kháng IgG của chuột (H+L) Alexa Fluor 546 (A-11081) (dung dịch pha loãng có tỷ lệ 1:1000 trong PBS)]. Mẫu thử được rửa bằng PBS ba lần, và được quan sát trong kính hiển vi huỳnh quang.

Trong trường hợp (a) tế bào được xử lý bằng Axeton/MeOH, cả β -galactosidaza (dấu hiệu màu xanh lục) và ORF2 (dấu hiệu màu đỏ) đều được quan sát thấy trong các tế bào được gây nhiễm mỗi SVR3 hoặc SVR7, vì màng tế bào có khả năng thấm qua (Fig. 3a). Ngược lại, trong trường hợp (b) tế bào nguyên vẹn, cả β -galactosidaza (màu xanh lục) và ORF2 (màu đỏ) đều không được phát hiện trên tế bào được gây nhiễm SVR3, nhưng ORF2 (đỏ) được quan sát thấy rõ trên tế bào được gây nhiễm SVR7 (Fig. 3b). Các kết quả này chỉ ra rõ ràng rằng việc định vị của protein ORF2 đã thay đổi từ trong tế bào như ORF2 gốc được biểu hiện bởi SVR3 ra ngoài tế bào và trên bề mặt tế bào bởi SVR7.

Do đó, hiệu quả của vacxin do SVR7 là mạnh hơn SVR3, và tín hiệu định hướng thu được từ B5R có thể cải thiện sự đáp ứng miễn dịch kháng PCV2-ORF2.

Ví dụ 6: Hiệu quả chủng ngừa trong cơ thể

Lợn được chủng ngừa bằng vector mã hóa polypeptit của SVR7 theo sáng chế. Làm ví dụ so sánh, lợn được chủng ngừa bằng SVR3. Để gây miễn dịch, $3-5 \times 10^4$ TCID₅₀/liều được tiêm. Sau đó, lợn được thử thách với PCV2.

Cụ thể hơn là, 24 lợn con, mà không có hoặc âm tính với PCV2, được thiết lập ở 3 tuần tuổi, trước khi chủng ngừa và được chia vào các nhóm khác nhau như được thể hiện dưới đây:

Nhóm SVR3: 7 lợn con, 4 đực, 3 cái.

Nhóm SVR7: 7 lợn con, 4 đực, 3 cái.

Nhóm không được gây miễn dịch: 7 lợn con, 4 đực, 3 cái.

Nhóm không được gây miễn dịch, không được thử thách: 3 lợn con, 3 cái.

Việc chủng ngừa được thực hiện ở 4 tuần tuổi và thử thách PCV2 được thực hiện 2 tuần sau khi gây miễn dịch. Đối với thử thách PCV2, 6×10^5 TCID₅₀ của PCV2/liều được tiêm. Khi mổ tử thi (4 tuần sau thử thách PCV2), một số cơ quan được thu để phát hiện PCV2, bao gồm ba cơ quan lympho, amidan, hạch bạch huyết bẹn, lympho ruột và tuyến ức.

Số lượng bản sao bộ gen của PCV2 được xác định trong huyết thanh 1, 2 và 3 tuần sau chủng ngừa. Kết quả được trình bày dưới đây cho thấy rằng vaccin theo sáng chế đem lại sự giảm mạnh về số lượng bản sao bộ gen của PCV2. Kết quả này chỉ ra rằng vaccin theo sáng chế có hiệu lực hơn vaccin trên cơ sở trình tự ORF2 tự nhiên.

Bảng: Tỷ lệ phần trăm (dương tính/tổng số lợn) của lợn dương tính với PCV2-qPCR trong huyết thanh

Nhóm	Trước miễn dịch	Trước thử thách (6 tuần)	1 wpc (7 tuần)	2 wpc (8 tuần)	3 wpc (9 tuần)
SVR3	0% (0/7)	0% (0/7)	17% (1/6)	33% (2/6)	100% (6/6)
SVR7	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/6)	0% (0/6)	67% (4/6)
Thử thách NI	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	29% (2/7)	100% (7/7)

NINC	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/7)	0% (0/3)
------	----------	----------	----------	----------	----------

Ngoài ra, kết quả được thể hiện trên Fig. 4 chứng minh rõ ràng rằng SVR7 gây ra đáp ứng kháng thể kháng PCV2. Các kết quả này cho thấy rằng SVR7 cảm ứng kháng thể quan trọng cho PCV2 ORF2. Đáp ứng kháng thể là lớn hơn với SVR3. Việc gây ra đáp ứng kháng thể quan trọng tương ứng với sự giảm đáng kể số lượng bản sao của bộ gen PCV2.

Các dữ liệu này minh họa rõ ràng tính hiệu quả chủng ngừa của polypeptit và vectơ theo sáng chế.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: KTISVVTLLCVLPAVVYSTCTV

SEQ ID NO: 2: KTISVVTLLCVLPAVVYSTCTVPTMNNAKLTSTETS

SEQ ID NO: 3:

GVLNTRL SRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFVPPGGGSNPRSVPF EY
 YRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRH
 TITQPFSYHSRYFTP KPVLDSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTAGNV DHVGLGTA
 FENSKYDQEYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLNP

SEQ ID NO: 4:

KTISVVTLLCVLPAVVYSTCTVPTMNNAKLTSTETS**WKKE**GVNTRL SRTF
 GYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFVPPGGGSNPRSVPF EYYRIRKVKVEF
 WPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRH TITQPFSYHSR
 YFTP KPVLDSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTAGNV DHVGLGTAFENSKYDQEY
 NIRVTMYVQFREFNLKDPPLNP

SEQ ID NO: 5:

ATGAAAACGATTTCCGTTGTTACGTTGTTATGCGTACTACCTGCTGTTGTTT
 ATTCAACATGTACTGTACCCACTATGAATAACGCTAAATTGACGTCTACCG
 AAACATCGTGGA AAAAAGAGAAAGGAGTCTTGAACACCAGATTGTCTAGA
 ACCTTCGGTTACACCATTAAGAGAACCACCGTCAAAACCCCATCTTGGGCT
 GTCGATATGATGAGATTCAACATCAACGATTTTCGTCCCACCTGGTGGTGGA
 TCAAACCCTAGATCCGTTCCATTTCGAGTACTACAGAATCAGAAAAGTCAAA
 GTCGAGTTCTGGCCATGCTCTCCTATTACTCAGGGTGATAGAGGAGTTGGA
 TCAACTGCCGTCATCTTGGATGACA ACTTCGTCACTAAGGCTACTGCCTTG
 ACCTACGATCCTTACGTCAATTACTCTAGTAGACACACCATCACCCAACCA
 TTCTCATACCATTCCAGATACTTCACTCCAAAACCTGTCTTGGACTCAACCA
 TCGATTACTTTCAACCAAACAACAAGAGAAACCAATTGTGGTTGAGATTGC
 AAAGTCCGGTAACGTCGATCATGTTCGGATTGGGAACCGCCTTCGAAAACCT
 CCAAATACGACCAGGAGTACAACATTAGAGTCACCATGTACGTCCAATTC
 AGAGAGTTCAACTTGAAGGACCCACCATTGAACCCATAA

SEQ ID NO: 6:

GGATCCACCATGAAAACGATTTCCGTTGTTACGTTGTTATGCGTACTACCT
GCTGTTGTTTATTCAACATGTACTGTACCCACTATGAATAACGCTAAATTG
ACGTCTACCGAAACATCGTGGAAAAAAGAGAAAGGAGTCTTGAACACCAG
ATTGTCTAGACATTGAACCCATAAGTCGAC

SEQ ID NO: 7:

TCTAGAACCTTCGGTTACACCATTAAGAGAACCACCGTCAAAACCCCATCT
TGGGCTGTGATATGATGAGATTCAACATCAACGATTTTCGTCCCACCTGGT
GGTGGATCAAACCCTAGATCCGTTCCATTCGAGTACTACAGAATCAGAAA
AGTCAAAGTCGAGTTCTGGCCATGCTCTCCTATTACTCAGGGTGATAGAGG
AGTTGGATCAACTGCCGTCATCTTGGATGACAACTTCGTCACTAAGGCTAC
TGCCTTGACCTACGATCCTTACGTCAATTACTCTAGTAGACACACCATCAC
CCAACCATTCTCATACCATTCCAGATACTTCACTCCAAAACCTGTCTTGGA
CTCAACCATCGATTACTTTCAACCAAACAACAAGAGAAACCAATTGTGGTT
GAGATTGCAAACCTGCCGGTAACGTCGATCATGTTCGGATTGGGAACCGCCTT
CGAAAACCTCAAATACGACCAGGAGTACAACATTAGAGTCACCATGTACG
TCCAATTCAGAGAGTTCAACTTGAAGGACCCACCATTGAACCCATAAGTCG
AC

SEQ ID NO: 8:

AATATTACGGGTGCTGTTT

SEQ ID NO: 9:

AAAAACATCGTATTCCTG

SEQ ID NO: 10:

CGTTCATGTTAAGCTTAACCTGAAATATTG

SEQ ID NO: 11:

GTTTAAACGAATTCGGTACCCTTAAAAACATCG

SEQ ID NO: 12:

CGCCGAGCTCGAGAATATTACGGGTGCTGTTTTTAC

SEQ ID NO: 13:

CCAGACTGCAGAGAACATAGGTCCTAATATAAG

SEQ ID NO: 14:

AATTGCCCCGGGTACCGTCGATCGACTTTTTATGGCCCCCCCCGGCCA

SEQ ID NO: 15:

AGCTTGGCCGGGGGGGCCATAAAAAGTCGATCGACGGTACCCGGGC

SEQ ID NO: 16:

GGATCCACCATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCG
CCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCA
CCCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCC
GCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGCGAACCACAGTCAGAACGC
CCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTTCCCC
CAGGAGGGGGCTCAAACCCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAA
GAAAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCCAGGGTGACA
GGGGAGTGGGCTCCAGTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGG
CCACAGCCCTCACCTATGACCCCTATGTAACTACTCCTCCCGCCATACCA
TAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGCTACTTTACCCCCAAACCTGTCCT
AGATTCCACTATTGATTACTTCCAACCAAACAACAAAAGAAACCAGCTGTG
GCTGAGACTACAACTGCTGGAAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCACTG
CGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGT
ATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTTAACCCTTAAT
AGTCGAC

SEQ ID NO: 17: GGTGGTGGATCCAACCCTAGATCCG

SEQ ID NO: 18: GGTGGGTCGACCAAGTTGAACTCTCTG

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chứa peptit định hướng màng tế bào liên kết hoạt động trực tiếp với polypeptit kháng nguyên khác loại, trong đó peptit định hướng màng tế bào được định vị ở đầu tận N, và trong đó trình tự của peptit định hướng màng tế bào có chiều dài là 50 axit amin hoặc ngắn hơn và chứa SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự có độ tương đồng với SEQ ID NO: 1 ít nhất là 90%.
2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó peptit định hướng màng tế bào bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 1; hoặc SEQ ID NO: 2.
3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó peptit định hướng màng tế bào chứa SEQ ID NO: 2 và có chiều dài 50 axit amin hoặc ngắn hơn.
4. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit kháng nguyên này là polypeptit kháng nguyên của virus.
5. Polypeptit theo điểm 4, trong đó polypeptit kháng nguyên này là polypeptit kháng nguyên của virus Circovirus lợn typ 2 (PCV2).
6. Polypeptit theo điểm 5, trong đó polypeptit kháng nguyên này là ORF2 của virus PCV2 hoặc miền kháng nguyên của nó.
7. Polypeptit theo điểm 6, trong đó polypeptit kháng nguyên chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 80% với SEQ ID NO: 3.
8. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.
9. Polypeptit theo điểm 8, trong đó polypeptit này còn chứa gốc methionin đầu tận N.
10. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này được glycosyl hóa.
11. Polypeptit chứa peptit tín hiệu liên kết hoạt động trực tiếp với polypeptit kháng nguyên từ virus Circovirus lợn typ 2 (PCV2), trong đó peptit tín hiệu được định vị ở đầu tận N và polypeptit kháng nguyên được định vị ở đầu tận C, và trong đó peptit tín hiệu bao gồm SEQ ID NO: 1.
12. Chế phẩm vacxin chứa polypeptit theo điểm 1 và chất mang hoặc tá dược.

13. Chế phẩm vacxin theo điểm 12, trong đó chế phẩm vacxin này còn chứa chất pha loãng, chất bổ trợ, chất làm ổn định đông khô, chất thấm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất phụ gia tạo gel hoặc chất phụ gia tăng cường độ nhớt, hoặc chất bảo quản.

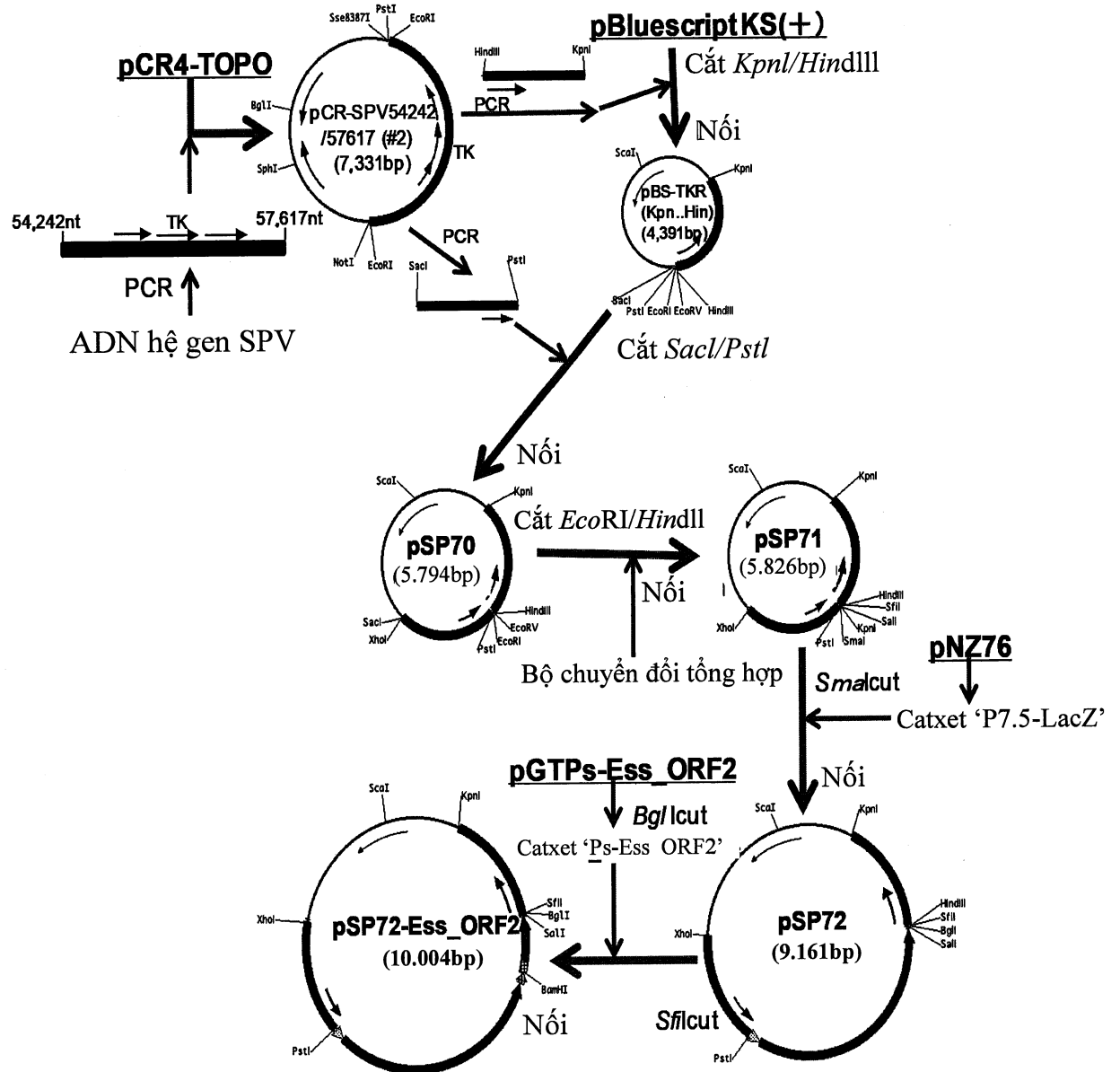
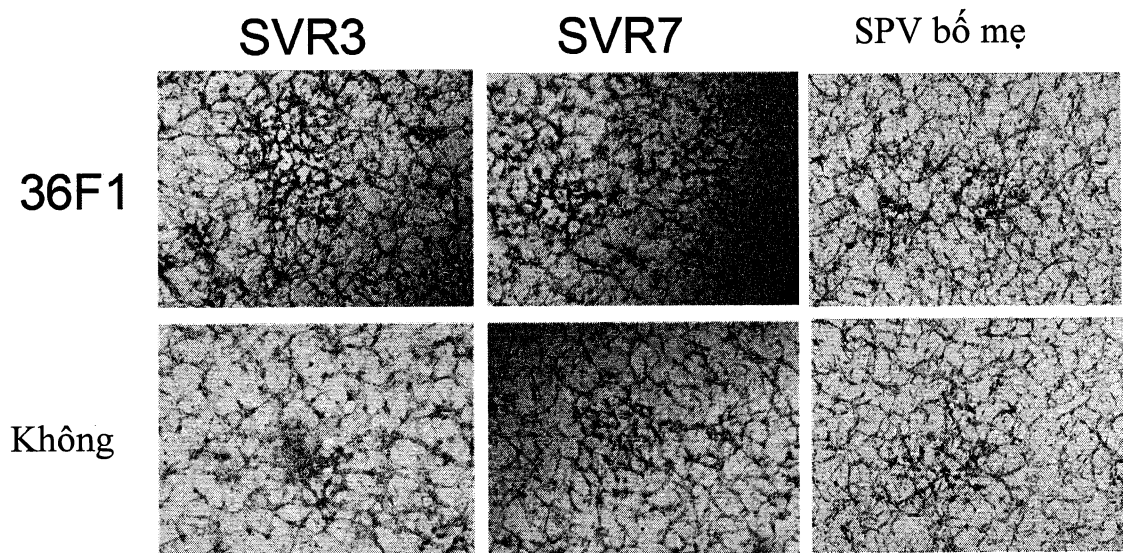


FIG. 1

**Fig. 2**

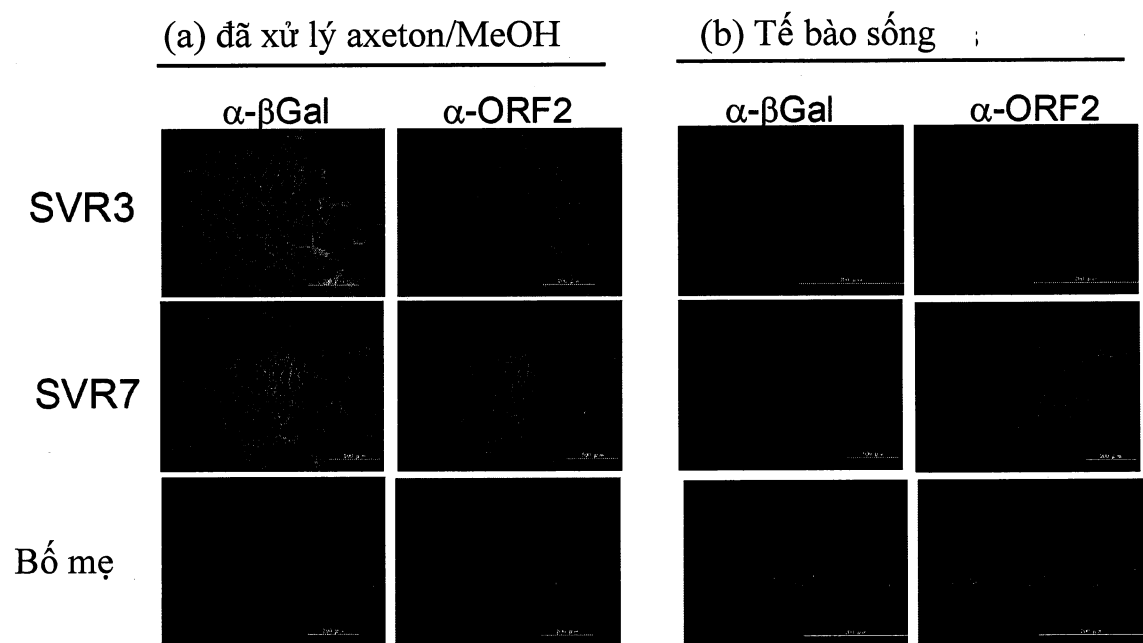


Fig. 3

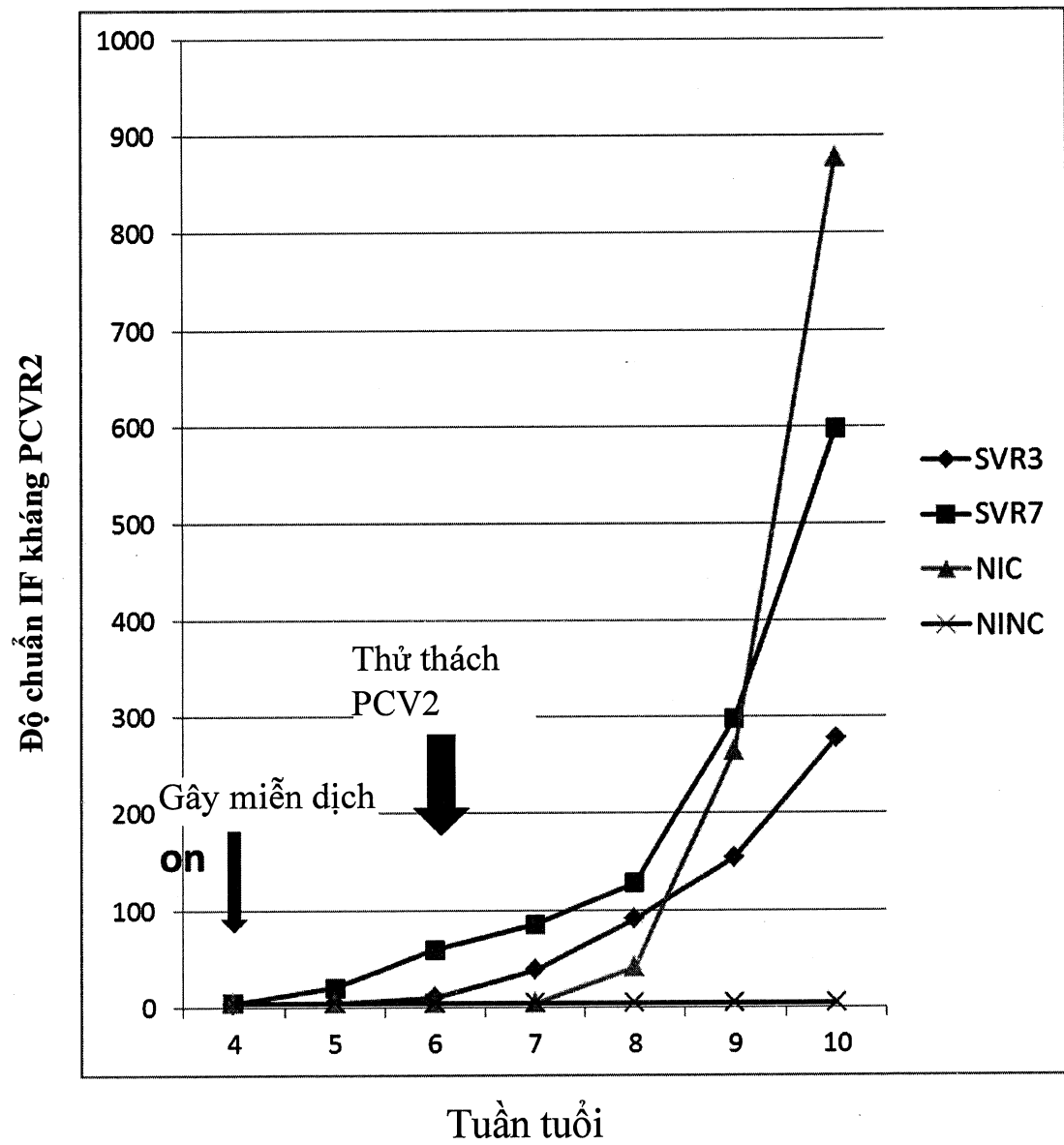


Fig. 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CEVA SANTE ANIMALE

<120> POLYPEPTIT DUNG HỢP VÀ CHẾ PHẨM VACXIN

<130> B1588

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu có nguồn gốc từ vaccinia Virut BR5

<400> 1

Lys Thr Ile Ser Val Val Thr Leu Leu Cys Val Leu Pro Ala Val Val
 1 5 10 15

Tyr Ser Thr Cys Thr Val
 20

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu có nguồn gốc từ Vaccinia virut BR5

<400> 2

Lys Thr Ile Ser Val Val Thr Leu Leu Cys Val Leu Pro Ala Val Val
 1 5 10 15

Tyr Ser Thr Cys Thr Val Pro Thr Met Asn Asn Ala Lys Leu Thr Ser
 20 25 30

Thr Glu Thr Ser
 35

<210> 3

<211> 191

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCV2 ORF2

<400> 3

Gly	Val	Leu	Asn	Thr	Arg	Leu	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ile	Lys
1				5					10					15	

Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Pro	Ser	Trp	Ala	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe
			20					25					30		

Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Val	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Arg	Ser
		35					40					45			

Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Trp
	50					55					60				

Pro	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr	Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Thr	Ala
65					70					75					80

Val	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn	Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr
			85						90					95	

Asp	Pro	Tyr	Val	Asn	Tyr	Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Thr	Gln	Pro	Phe
			100					105					110		

Ser	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Thr
		115					120					125			

Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro	Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg
	130					135					140				

Leu	Gln	Thr	Ala	Gly	Asn	Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe
145					150					155					160

Glu	Asn	Ser	Lys	Tyr	Asp	Gln	Glu	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr
				165					170					175	

Val	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Asn	Pro	
			180					185					190		

<210> 4
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit dung hợp

<400> 4

Lys Thr Ile Ser Val Val Thr Leu Leu Cys Val Leu Pro Ala Val Val
 1 5 10 15

Tyr Ser Thr Cys Thr Val Pro Thr Met Asn Asn Ala Lys Leu Thr Ser
 20 25 30

Thr Glu Thr Ser Trp Lys Lys Glu Lys Gly Val Leu Asn Thr Arg Leu
 35 40 45

Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr Pro
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
 225 230

<210> 5
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN mã hóa polypeptit dung hợp

<400> 5
 atgaaaacga tttccgttgt tacgttggtta tgcgtactac ctgctgttgt ttattcaaca
 60

tgtactgtac ccactatgaa taacgctaaa ttgacgtcta ccgaaacatc gtggaaaaaa
 120

gagaaaggag tcttgaacac cagattgtct agaaccttcg gttacaccat taagagaacc
 180

accgtcaaaa ccccatcttg ggctgtcgat atgatgagat tcaacatcaa cgatttcgtc
 240

ccacctggtg gtggatcaaa ccctagatcc gttccattcg agtactacag aatcagaaaa
 300

gtcaaagtcg agttctggcc atgctctcct attactcagg gtgatagagg agttggatca
 360

actgccgtca tcttggatga caacttcgtc actaaggcta ctgccttgac ctacgatcct
 420

tacgtcaatt actctagtag acacaccatc acccaaccat tctcatacca ttccagatac
 480

ttcactccaa aacctgtctt ggactcaacc atcgattact ttcaaccaa caacaagaga
 540

aaccaattgt gggtgagatt gcaaactgcc ggtaacgtcg atcatgtcgg attgggaacc
600

gccttcgaaa actccaaata cgaccaggag tacaacatta gagtcaccat gtacgtccaa
660

ttcagagagt tcaacttgaa ggacccacca ttgaacccat aa
702

<210> 6
<211> 182
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN tổng hợp

<400> 6
ggatccacca tgaaaacgat ttccgttggt acgttggtat gcgtactacc tgctgttggt
60

tattcaacat gtactgtacc cactatgaat aacgctaaat tgacgtctac cgaaacatcg
120

tggaaaaaag agaaaggagt cttgaacacc agattgtcta gacattgaac ccataagtcg
180

ac
182

<210> 7
<211> 561
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN tổng hợp

<400> 7
tctagaacct tcggttacac cattaagaga accaccgtca aaaccccatc ttgggctgtc
60

gatatgatga gattcaacat caacgatttc gtccacctg gtggtggatc aaaccctaga
120

tccgttccat tcgagtacta cagaatcaga aaagtcaaag tcgagttctg gccatgctct
180

cctattactc agggatgatag aggagttgga tcaactgccg tcattcttgga tgacaacttc
240

gtcactaagg ctactgcctt gacctacgat ccttacgtca attactctag tagacacacc
300

atcacccaac cattctcata ccattccaga tacttcactc caaaacctgt cttggactca
360

accatcgatt actttcaacc aaacaacaag agaaaccaat tgtggttgag attgcaaact
420

gccggtaacg tcgatcatgt cggattggga accgccttcg aaaactccaa atacgaccag
480

gagtacaaca ttagagtcac catgtacgtc caattcagag agttcaactt gaaggaccca
540

ccattgaacc cataagtcga c
561

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 8
aatattacgg gtgctgttt
19

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 9
aaaaacatcg tattcctg
18

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 10

cgttcatggtt aagcttaacc tgaaatattg
30

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 11
gtttaaacga attcgggtacc cttaaaaaca tcg
33

<210> 12
<211> 36
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 12
cgccgagctc gagaatatta cgggtgctgt ttttac
36

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 13
ccagactgca gagaacatag gtcctaatat aag
33

<210> 14
<211> 46
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 14
aattgcccggtaccgtcga tcgacttttt atggcccccc cgcca
46

<210> 15
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 15
 agcttgggccg ggggggcat aaaaagtcga tcgacggtac ccgggc
 46

<210> 16
 <211> 719
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DNA encoding ORF2

<400> 16
 ggatccacca tgacgtatcc aaggaggcgt taccggagaa gaagacaccg ccccgccagc
 60

catcttggcc agatcctccg ccgccgcccc tggctcgtcc acccccgcca ccgttaccgc
 120

tggagaagga aaaatggcat cttcaacacc cgctctccc gcaccttcgg atatactgtc
 180

aagcgaacca cagtcagaac gccctcctgg gcggtggaca tgatgagatt caatattaat
 240

gactttcttc cccaggagg gggctcaaac cccgctctg tgccctttga atactacaga
 300

ataagaaagg ttaaggttga attctggccc tgctccccga tcaccagggt tgacagggga
 360

gtgggctcca gtgctgttat tctagatgat aactttgtaa caaaggccac agccctcacc
 420

tatgaccctt atgtaaacta ctctccccgc cataccataa cccagccctt ctctaccac
 480

tcccgtact ttacccccaa acctgtccta gattccacta ttgattactt ccaaccaaac
 540

aacaaaagaa accagctgtg gctgagacta caaactgctg gaaatgtaga ccacgtaggc
 600

ctcggcactg cgttcgaaaa cagtatatatac gaccaggaat acaatatccg tgtaaccatg
660

tatgtacaat tcagagaatt taatcttaaa gacccccac ttaaccctta atagtcgac
719

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 17
ggtgggtgat ccaaccctag atccg
25

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 18
ggtgggtcga ccaagttgaa ctctctg
27