



(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)



1-0031673

(51)⁷ A61K 39/12; C12N 7/00; C12N 7/04;
A61P 31/20

(13) B

(21) 1-2016-01347

(22) 24/09/2014

(86) PCT/US2014/057190 24/09/2014

(87) WO/2015/048115 02/04/2015

(30) 61/882,289 25/09/2013 US

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/08/2016 341A

(73) ZOETIS SERVICES LLC (US)

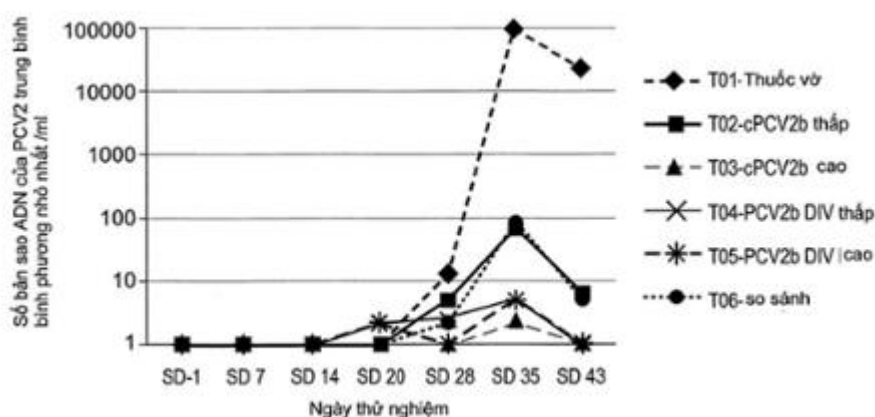
10 Sylvan Way, Parsippany, NJ 07054, United States of America

(72) NITZEL, Gregory, Paul (US); SZAKIEL, Gloria, K (US).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHẾ PHẨM VACXIN ĐỂ BẢO VỆ LỢN CHỐNG LẠI CIRCOVIRUT LỢN TYP 2 VÀ KIT CHỨA CHẾ PHẨM VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin để bảo vệ lợn chống lại circovirut lợn typ 2 (porcine circovirus type 2: PCV2), kể cả biến chủng của PCV2b có độc tính cao, chế phẩm này chứa polypeptit ORF2 của biến chủng của PCV2b, trong đó polypeptit ORF2 này chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQID NO: 1.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến circovirut lợn. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin chứa kháng nguyên ORF2 của biến chủng PCV2b và việc sử dụng nó trong vacxin để bảo vệ lợn chống lại PCV2, kể cả biến chủng của circovirut lợn typ 2b (PCV2b) có độc tính cao, và hội chứng còi cọc sau cai sữa (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome: PMWS).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Circovirut lợn typ 2 (Porcine circovirus type 2: PCV2), một thành viên của họ virut *Circovirida*, chi virut *Circovirut*, là virut nhỏ hình tròn không có vỏ bọc được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1998. PCV2 là một trong hai thể gây bệnh thường gặp nhất trong ngành chăn nuôi lợn, thể gây bệnh còn lại là *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo). Lợn bị nhiễm PCV2 có hội chứng thường được gọi là hội chứng còi cọc sau cai sữa (PMWS). PMWS được đặc trưng về mặt lâm sàng bởi tình trạng gầy mòn, da nhợt nhạt, phát triển kém, khó thở, tiêu chảy, và vàng da. Ngoài PMWS, PCV2 liên quan đến một số bệnh khác bao gồm bệnh giả dại, hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS), bệnh viêm phổi địa phương, bệnh Glasser, bệnh viêm màng não do liên cầu khuẩn, bệnh nhiễm salmonella, bệnh nhiễm E. coli sau cai sữa, bệnh viêm gan dinh dưỡng, và bệnh viêm phế quản-phổi mưng mủ. Các biểu hiện lâm sàng khác nhau của bệnh nhiễm PCV2 ở lợn trong các nhóm tuổi được biết là bệnh liên quan đến circovirut lợn (Porcine Circovirus Associated Disease: PCVAD) và được đặc trưng bởi tình trạng gầy mòn và chậm phát triển. Virut PRRS, virut gây bệnh cúm lợn (Swine Influenza Virus: SIV), vi khuẩn M. hyo, và các vi khuẩn khác được cho là các đồng nhân tố chính trong quá trình phát triển bệnh PCVAD. PCVAD tiếp tục là mối đe dọa đối với ngành chăn nuôi lợn, gây tổn thất lớn về kinh tế.

Hiện nay, thể phân lập của PCV2 được chia nhỏ tiếp thành ba kiểu gen: PCV2a, PCV2b, và PCV2c. PCV2 chứa hai khung đọc mở chủ yếu mã hóa protein liên quan đến sự sao chép (ORF1, 945 nucleotit), và vỏ capsit của virut (ORF2, 702 nucleotit). PCV2 đã biến đổi di truyền đáng kể trong những năm gần đây. PCV2 đột biến mới xuất

hiện có một lysin bổ sung (K) ở đầu C của protein vỏ capsit được mã hóa bởi ORF2 so với các kiểu gen PCV2a và PCV2b cổ điển được phân lập vào năm 2008 từ mẫu huyết thanh của lợn bị sẩy thai (Guo et al., 2010, *Virology Journal* 7: 273). Trong PCV2 đột biến mới xuất hiện này, sự mất một bazơ ở vị trí 1039 trong trình tự hệ gen dẫn đến sự đột biến của codon kết thúc (từ UAA thành AAG) trong ORF2, để tạo ra gen ORF2 có 705 nucleotit và codon kết thúc mới (Guo et al., 2011, *Virology Journal* 8: 291). Ngoài ra, Knell và các đồng tác giả đã thông báo rằng các đột biến có thể xảy ra trong gen ORF2, do sự mất một bazơ (T) được phát hiện ở vị trí 1042 trong hệ gen có 1767 nucleotit của một chủng virus (mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen số AY713470), điều này dẫn tới sự kéo dài một axit amin (lysine) ở đầu C của protein vỏ capsit được mã hóa bởi ORF2 (Knell et al., 2005, *Veterinary Microbiology* 109: 169-177). Olvera và các đồng tác giả cũng thông báo sự kéo dài một gốc lysine ở đầu C của protein vỏ capsit do sự đột biến ở codon kết thúc của ORF2 (Olvera et al., 2007, *Virology* 357: 175- 185). Ngoài ra, chủng PCV2 được gọi là “JSTZ” có mã số lưu giữ số JQ413808 trong Ngân hàng gen được phát hiện và xác định trong mẫu phân của lợn con bị bệnh tiêu chảy nặng ở Trung Quốc, và hệ gen đầy đủ có 1767 nucleotit của nó được giải trình tự (Li et al., 2012, *Journal of Virology* (jvi.asm.org), p. 4716). Phân tích phát sinh giống loài dựa trên hệ gen của chủng PCV2 JSTZ và ORF của các chủng PCV2 Trung Quốc khác cho thấy rằng chủng PCV2 JSTZ thuộc một kiểu gen mới ở Trung Quốc (Li et al., 2012 nêu trên).

Guo và các đồng tác giả đã đánh giá độc tính tương đối của chủng PCV2 đột biến được gọi là PCV2b/rBDH hoặc BDH (mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen (GenBank) là HM038017), chủng này được phát hiện vào năm 2008 trong mẫu lấy từ lợn bị sẩy thai mắc hội chứng PMWS, và đã khẳng định độc tính cao hơn của chủng PCV2 đột biến ở lợn con so với độc tính liên quan đến các kiểu gen của PCV2a và PCV2b cổ điển (Guo et al., 2012, *PLoS ONE* (plosone.org), Vol. 7, Issue 7, e41463, 1-10). Chủng PCV2 đột biến này gây ra các dấu hiệu nặng hơn phù hợp với hội chứng PMWS, được đặc trưng bởi tình trạng gầy mòn, ho, khó thở, tiêu chảy, có lớp phủ trên lông thô ráp và suy nhược. Ngoài ra, các tổn thương bệnh lý và tình trạng virus huyết, cũng như tải lượng virus trong các hạch bạch huyết, amidan, và lách, ở lợn con được thử thách bằng chủng PCV2 đột biến là nặng hơn đáng kể so với ở các nhóm được thử thách bằng PCV2a và PCV2b cổ điển. Ngoài ra, mức tăng trọng trung bình hàng ngày

thấp hơn đáng kể được ghi nhận ở nhóm được thử thách bằng chủng PCV2 đột biến so với ở các nhóm được thử thách bằng các kiểu gen của virus PCV2a và PCV2b đang thịnh hành (Guo et al., 2012, nêu trên).

Hai chủng PCV2 là chủng US22625-33 và US22664-35, được xác định gần đây trong các trường hợp nghi ngờ thất bại vaccin ở lợn bị PMWS trong hệ thống sản xuất ở Mỹ (Xiao et al., 2012, Journal of Virology (jvi.asm.org), Vol. 86, No. 22, trang 12469). Hệ gen đầy đủ của hai chủng US này được phát hiện là bao gồm 1767 nucleotit, và kích thước gen ORF2 của nó là 705 nucleotit, mã hóa protein ORF2 có 234 axit amin, kích thước này dài hơn một axit amin so với kích thước của PCV2 thông thường. Phân tích phát sinh giống loài đối với trình tự nucleotit của ORF2 của các chủng PCV2a và PCV2b cổ điển gợi ý rằng cả hai chủng PCV2 ở Mỹ là US22625-33 và US22664-35 đều có liên hệ chặt chẽ với PCV2b. So với PCV2b cổ điển, sự mất một bazơ trong gen ORF2 dẫn tới sự bổ sung một axit amin (lysine) vào đầu C của protein ORF2. Kết quả so sánh và phân tích trình tự bằng phương pháp BLAST cho thấy rằng cả hai chủng PCV2 ở Mỹ đều có mức độ tương đồng cao (99,9%) với chủng PCV2 là BDH được phát hiện ở Trung Quốc, và được thông báo là có độc tính gia tăng. Một đột biến câm (1677A→1677T) trong ORF1 được phát hiện giữa BDH và hai chủng PCV2 đột biến ở Mỹ. Theo tiêu chí mới về cách gọi tên và định nghĩa kiểu gen của PCV2 (Cortey, et al., 2011, Vet. Microbiol. 149:522-523; Segales, et al., 2008, Vet. Rec. 162:867-868), tất cả các chủng PCV2 đột biến mới này có thể được phân loại thành kiểu gen PCV2b, dựa trên phân tích phát sinh giống loài đối với trình tự nucleotit của gen ORF2 (Xiao et al., 2012, nêu trên).

Do độc tính gia tăng được thông báo của biến chủng của PCV2b mới, cũng như sự có mặt của nó trong các trường hợp nghi ngờ thất bại vaccin ở Mỹ, cần có vaccin hữu hiệu chống lại biến chủng của PCV2b mới này. Tốt hơn nếu vaccin này sẽ tương hợp với các kháng nguyên khác của lợn, như M. hyo và virus PRRS.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin để bảo vệ lợn chống lại PCV2, kể cả biến chủng của circovirus lợn typ 2b (PCV2b) có độc tính cao, chế phẩm này chứa polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, trong đó polypeptit ORF2 chứa leucine (L) ở vị trí 89, threonine (T) ở vị trí 90, và asparagine (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO:

1. Theo một phương án, chế phẩm này còn có tác dụng bảo vệ khác chủng đối với các chủng PCV2a và PCV2b cổ điển.

Theo một phương án, chế phẩm này ở dạng virus toàn phần biến chủng PCV2b được bất hoạt chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b.

Theo một phương án khác, chế phẩm này ở dạng virus thể khảm bất hoạt, trong đó virus thể khảm này là circovirus lợn typ 1 tái tổ hợp được bất hoạt chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b.

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm này ở dạng polypeptit ORF2 của PCV2b biến đổi tái tổ hợp được phân lập. Theo một phương án, polypeptit ORF2 của PCV2b biến đổi tái tổ hợp được phân lập được biểu hiện từ vector. Theo một phương án khác, vector này là baculovirus hoặc parapoxvirus. Theo một phương án khác, vector này là vector sống hoặc bất hoạt.

Theo một phương án, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1, còn chứa ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 1).

Theo một phương án khác, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1, polypeptit này còn chứa lysin (K) ở gốc 59 và lysin (K) ở gốc 234 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án khác, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, asparagin (N) ở vị trí 134, lysin (K) ở gốc 59 và lysin (K) ở gốc 234, theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1, còn chứa threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của trình tự nhận biết số 1.

Theo một phương án, polypeptit ORF2 của PCV2 đã biến đổi được thể hiện bằng trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc đoạn của nó.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế chứa polypeptit ORF2 của PCV2 đã biến đổi còn chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung của lợn. Theo một

phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung này có tác dụng bảo vệ chống lại bệnh ở lợn gây bởi vi sinh vật.

Theo một phương án, vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, virus, hoặc động vật nguyên sinh. Theo một phương án khác, vi sinh vật được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vi sinh vật sau: virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV), parvovirus ở lợn (porcine parvovirus: PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, vi khuẩn leptospira, *Lawsonia intracellularis*, virus gây bệnh cúm lợn (swine influenza virus: SIV), kháng nguyên của *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirut gây bệnh hô hấp ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea: PED), rotavirut, Torque teno virut (TTV), virus cự bào ở lợn, virus đường ruột ở lợn, virus gây bệnh viêm não-cơ tim, tác nhân gây bệnh Aujeszky, bệnh dịch tả lợn (Classical Swine fever: CSF) và tác nhân gây bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm ở lợn, hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế còn chứa chất phụ trợ. Theo một phương án, chất phụ trợ này được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất phụ trợ dạng dầu trong nước, chất phụ trợ polyme và nước, chất phụ trợ dạng nước trong dầu, chất phụ trợ nhôm hydroxit, chất phụ trợ vitamin E và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế còn chứa chất mang được dụng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp gây miễn dịch cho lợn chống lại PCV2, kể cả biến chủng của PCV2b, phương pháp này bao gồm việc cho lợn sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả ở trên. Chế phẩm này bao gồm polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, trong đó polypeptit ORF2 này bao gồm leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1. Như được mô tả ở trên, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b này có thể còn bao gồm ít nhất một gốc được chọn từ các gốc sau: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, chế phẩm để sử dụng theo sáng chế bao gồm virus chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b. Theo một phương án khác,

chế phẩm để sử dụng theo sáng chế bao gồm polypeptit ORF2 của virus PCV2b tái tổ hợp được phân lập.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm này có thể được sử dụng qua đường trong cơ, trong chân bì, qua da, dưới da, trong mũi, hoặc đường miệng, hoặc bằng các đường khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Theo một phương án khác, chế phẩm này được sử dụng theo một liều duy nhất. Theo một phương án khác nữa, chế phẩm này được sử dụng theo hai liều.

Theo một phương án khác, chế phẩm này được sử dụng cho lợn có kháng thể từ mẹ kháng PCV2.

Theo một phương án, chế phẩm này được sử dụng cho lợn ba tuần tuổi hoặc nhiều tuần tuổi hơn.

Sáng chế còn đề xuất kit. Kit này bao gồm lọ chứa chế phẩm vaccin theo sáng chế để bảo vệ lợn chống lại biến chủng của circovirus lợn typ 2b (PCV2b) có độc tính cao. Chế phẩm vaccin này bao gồm polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, trong đó polypeptit ORF2 này bao gồm leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của trình tự nhận biết số 1. Như được mô tả ở trên, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b này có thể còn bao gồm ít nhất một gốc được chọn từ các gốc sau: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin ở dạng virus chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b. Theo một phương án khác của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin ở dạng polypeptit ORF2 của PCV2b biến đổi tái tổ hợp được phân lập.

Theo một phương án của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin trong lọ ở dạng chế phẩm lỏng để sử dụng ngay. Theo một phương án khác của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin trong lọ ở dạng đông khô. Theo một phương án khác, kit theo sáng chế có thể chứa chất pha loãng. Theo một phương án khác nữa, kit theo sáng chế có thể còn bao gồm hướng dẫn sử dụng chứa thông tin về cách sử dụng chế phẩm vaccin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả sắp thẳng hàng trình tự axit amin giữa trình tự vỏ capsit

của biến chủng của PCV2b được gọi là “PCV2B-DIV-MUT”, và trình tự vỏ capsit của chủng PCV2a cổ điển (được gọi là ISU-40895) và chủng PCV2b cổ điển (được gọi là NMB).

Fig.2 là đồ thị thể hiện giá trị trung bình theo phương pháp bình phương nhỏ nhất của số bản sao ADN theo ngày thử nghiệm. *Tất cả các giá trị bằng “0” được chuyển thành bằng 1 để vẽ đồ thị.

Fig.3 là đồ thị thể hiện giá trị trung bình theo phương pháp bình phương nhỏ nhất của mức độ thải virus qua phân (số bản sao ADN) theo ngày thử nghiệm sau khi thử thách.*Tất cả các giá trị bằng “0” được chuyển thành 1 để vẽ đồ thị.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích ELISA về lượng PCV2 trung bình bình phương nhỏ nhất đã từng dương tính trong huyết thanh theo ngày thử nghiệm và chủng ngựa.

Fig.5 là đồ thị thể hiện giá trị trung bình bình phương nhỏ nhất của số bản sao ADN theo ngày thử nghiệm.

Fig.6 là đồ thị thể hiện giá trị trung bình bình phương nhỏ nhất được biến đổi ngược của mức thải virus qua phân (số bản sao ADN) theo ngày điều trị sau khi thử thách.

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích ELISA về lượng PCV2 trung bình bình phương nhỏ nhất cho thấy huyết thanh dương tính theo ngày thử nghiệm.

Mô tả vắn tắt các trình tự

Như được sử dụng ở đây, thể phân lập PCV2 được thể hiện bằng các SEQ ID NO: 1 đến 57 và 66 là các ví dụ đại diện về các biến chủng của PCV2b.

SEQ ID NO: 1 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của biến chủng của PCV2b được gọi là PCV2B-DIV-MUT.

SEQ ID NO: 2 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của biến chủng của PCV2b được gọi là PCV2B-DIV-MUT.

SEQ ID NO: 3 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: 798-1, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là AB462384.

SEQ ID NO: 4 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: 798-1, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là AB462384.

SEQ ID NO: 5 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: FF, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là DQ231516.

SEQ ID NO: 6 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: FF, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là DQ231516.

SEQ ID NO: 7 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: VC 2002-k2, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là EF990645.

SEQ ID NO: 8 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: VC 2002-k2, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là EF990645.

SEQ ID NO: 9 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: GY09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là GQ845025.

SEQ ID NO: 10 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: GY09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là GQ845025.

SEQ ID NO: 11 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: XS09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là GQ845028.

SEQ ID NO: 12 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: XS09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là GQ845028.

SEQ ID NO: 13 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: SD1d01, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HM535640.

SEQ ID NO: 14 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: SD1d01, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HM535640.

SEQ ID NO: 15 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: SD1d02, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HM755880.

SEQ ID NO: 16 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: SD1d02, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HM755880.

SEQ ID NO: 17 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: HM01, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HM755881.

SEQ ID NO: 18 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: HM01, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HM755881.

SEQ ID NO: 19 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: NIVS-1, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HQ378157.

SEQ ID NO: 20 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2: NIVS-1, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là HQ378157.

SEQ ID NO: 21 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: C/2010-2*, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF683394.

SEQ ID NO: 22 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: C/2010-2*, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF683394.

SEQ ID NO: 23 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: G/2009-2, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF683408.

SEQ ID NO: 24 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: G/2009-2, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF683408.

SEQ ID NO: 25 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: 1/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927984.

SEQ ID NO: 26 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: 1/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927984.

SEQ ID NO: 27 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: J/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927985.

SEQ ID NO: 28 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: J/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927985.

SEQ ID NO: 29 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: K/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927986.

SEQ ID NO: 30 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: K/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927986.

SEQ ID NO: 31 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: M/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927988.

SEQ ID NO: 32 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: M/2010, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JF927988.

SEQ ID NO: 33 là trình tự axit amin tương ứng với the capsit của PCV2 được phân lập: WB/ROM89, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JN006445.

SEQ ID NO: 34 là trình tự nucleotit mã hóa the capsit của PCV2 được phân lập: WB/ROM89, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JN006445.

SEQ ID NO: 35 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: EU-RO-F4-3, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là

JN382188.

SEQ ID NO: 36 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: EU-RO-F4-3, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JN382188.

SEQ ID NO: 37 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: HNĐing09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JN411096.

SEQ ID NO: 38 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: HNĐing09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JN411096.

SEQ ID NO: 39 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: YWu09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JN411099.

SEQ ID NO: 40 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: YWu09, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JN411099.

SEQ ID NO: 41 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT4, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984586.

SEQ ID NO: 42 là trình tự nucleotit của gen vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT4, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984586.

SEQ ID NO: 43 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT6, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984588.

SEQ ID NO: 44 là trình tự nucleotit của gen vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT6, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984588.

SEQ ID NO: 45 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT7, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984589.

SEQ ID NO: 46 là trình tự nucleotit của gen vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT7, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984589.

SEQ ID NO: 47 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984590.

SEQ ID NO: 50 là trình tự nucleotit của gen vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT9, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984591.

SEQ ID NO: 51 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT10, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984592.

SEQ ID NO: 52 là trình tự nucleotit của gen vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT10, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984592.

SEQ ID NO: 53 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT11, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984593.

SEQ ID NO: 54 là trình tự nucleotit của gen vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: CH-IVT11, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX984593.

SEQ ID NO: 55 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: GDYX, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX519293.

SEQ ID NO: 56 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2 được phân lập: GDYX, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX519293.

SEQ ID NO: 57 là trình tự hệ gen đầy đủ của thể phân lập PCV2: GDYX, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là JX519293.

SEQ ID NO: 58 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2a cổ điển được phân lập: ISU-40895, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là AF264042.

SEQ ID NO: 59 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2a được phân lập: ISU-40895, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là AF264042.

SEQ ID NO: 60 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2a cổ điển được phân lập: Imp.1010-Stoon, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là AF055392.

SEQ ID NO: 61 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2a cổ điển được phân lập: Imp.1010-Stoon, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là AF055392.

SEQ ID NO: 62 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2b cổ điển: NMB, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là GU799576.

SEQ ID NO: 63 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của PCV2b cổ điển được phân lập: NMB, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là GU799576.

SEQ ID NO: 64 là trình tự axit amin tương ứng với vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2c cổ điển: DK1980PMWSfree, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là EU148503.

SEQ ID NO: 65 là trình tự nucleotit mã hóa vỏ capsit có chiều dài đầy đủ của chủng PCV2c cổ điển: DK1980PMWSfree, có mã số lưu giữ trong Ngân hàng gen là EU148503.

SEQ ID NO: 66 là trình tự hệ gen đầy đủ của PCV2 đã biến đổi được gọi là “PCV2b-DIV-MUT”.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, dạng số ít bao gồm cả dạng số nhiều nếu ngữ cảnh không chỉ rõ theo cách khác. Ví dụ, thuật ngữ “kháng nguyên protein” bao gồm nhiều kháng nguyên protein, kể cả hỗn hợp của chúng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chứa” được dự định để chỉ chế phẩm và phương pháp bao gồm các thành phần được nêu ra, nhưng không loại trừ các thành phần khác.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “biến chủng của PCV2b”, “biến chủng PCV2b”, “PCV2 đột biến”, “PCV2 đột biến mới”, và thuật ngữ tương tự để chỉ chủng PCV2b có độc tính cao, có polypeptit vỏ capsit của ORF2 bao gồm leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1. Polypeptit ORF2 được mã hóa của biến chủng PCV2b này có thể còn bao gồm ít nhất một gốc được chọn từ: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b” được dự định bao gồm virus chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, sao cho polypeptit ORF2 này là một thành phần của chính virus (ví dụ, lớp vỏ protein của virus). Virus này có thể là PCV, nhưng không được hiểu là chỉ giới hạn ở

đó, và có thể bao gồm các virus khác. Thuật ngữ này cũng được dự định bao gồm polypeptit ORF2 của PVC2b biến đổi tái tổ hợp được phân lập.

Thuật ngữ “kháng nguyên” để chỉ hợp chất, chế phẩm hoặc chất sinh miễn dịch có thể kích thích quá trình tạo kháng thể hoặc đáp ứng của tế bào T, hoặc kích thích cả hai quá trình này ở động vật, bao gồm các chế phẩm được tiêm hoặc hấp thu vào động vật. Đáp ứng miễn dịch có thể được tạo ra đối với toàn bộ phân tử, hoặc với một phần của phân tử này (ví dụ, epitop hoặc hapten). Thuật ngữ “kháng nguyên” có thể bao gồm virus toàn phần, polypeptit, hoặc đoạn của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chế phẩm vaccin" bao gồm ít nhất một kháng nguyên hoặc chất sinh miễn dịch trong chất dẫn thuốc được dùng có thể dùng để gây đáp ứng miễn dịch ở vật chủ. Chế phẩm vaccin này có thể được sử dụng với liều lượng, và bằng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y học và thú y đã biết rõ, khi cân nhắc các yếu tố như tuổi, giới tính, thể trọng, loài và tình trạng của động vật được sử dụng, và đường dùng. Đường dùng có thể là sử dụng qua da, qua niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, mũi, hậu môn, âm đạo) hoặc ngoài đường tiêu hóa (trong chân bì, qua da, trong cơ, dưới da, trong tĩnh mạch, hoặc trong màng bụng). Chế phẩm vaccin có thể được sử dụng một mình, hoặc có thể được đồng sử dụng hoặc sử dụng lần lượt với cách điều trị khác hoặc liệu pháp khác. Dạng sử dụng của chế phẩm này có thể bao gồm hỗn dịch, xirô hoặc cốm ngọt, và chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong chân bì, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ, chế phẩm tiêm) như hỗn dịch hoặc nhũ tương vô trùng. Chế phẩm vaccin có thể được sử dụng dưới dạng khí dung, hoặc được trộn vào thức ăn và/hoặc nước, hoặc được trộn với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược thích hợp như nước vô trùng, nước muối sinh lý, glucoza, hoặc chất tương tự. Chế phẩm này có thể chứa chất phụ trợ như chất thẩm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm độ pH, chất phụ trợ, chất tạo gel hoặc chất làm tăng độ nhớt, chất bảo quản, chất điều vị, chất màu, và chất tương tự, tùy thuộc vào đường dùng và chế phẩm mong muốn. Các tài liệu được chuẩn như "Remington's Pharmaceutical Sciences" (1990) có thể được tham khảo để bào chế các chế phẩm thích hợp mà không cần thử nghiệm quá mức.

Như được sử dụng ở đây, “chế phẩm sinh miễn dịch hoặc chế phẩm miễn dịch” để chỉ hỗn hợp chất chứa ít nhất một kháng nguyên để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ có đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc qua trung gian kháng thể đối

với chế phẩm hoặc vacxin cần quan tâm.

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" như được sử dụng ở đây để chỉ đáp ứng tạo ra ở động vật. Đáp ứng miễn dịch có thể đề chỉ miễn dịch tế bào (cellular immunity: CMI), miễn dịch thể dịch, hoặc có thể bao gồm cả hai đáp ứng này. Sáng chế còn dự định cả đáp ứng giới hạn ở một phần của hệ miễn dịch. Thông thường, "đáp ứng miễn dịch" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều tác dụng sau đây: 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 và/hoặc tế bào T yd, kháng đặc hiệu kháng nguyên hoặc các kháng nguyên có trong chế phẩm hoặc vacxin cần quan tâm. Tốt hơn nếu vật chủ sẽ biểu hiện đáp ứng miễn dịch bảo vệ hoặc điều trị, để làm tăng sức đề kháng đối với lần nhiễm virus mới, và/hoặc giảm mức độ nặng của bệnh trên lâm sàng. Tác dụng bảo vệ này sẽ được chứng minh bằng sự giảm hoặc không có các triệu chứng thường biểu hiện ở vật chủ bị nhiễm virus, thời gian hồi phục nhanh hơn, và/hoặc hiệu giá virus trong vật chủ bị nhiễm giảm đi.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tính sinh miễn dịch" để chỉ khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở động vật chủ chống lại kháng nguyên hoặc các kháng nguyên. Đáp ứng miễn dịch này là cơ sở của miễn dịch bảo vệ tạo bởi vacxin chống lại sinh vật gây nhiễm cụ thể.

Thuật ngữ "chất phụ trợ" như được sử dụng ở đây để chỉ hỗn hợp bao gồm một hoặc nhiều chất làm tăng đáp ứng miễn dịch đối với (các) kháng nguyên. Cơ chế hoạt động của chất phụ trợ là chưa được biết rõ hoàn toàn. Một số chất phụ trợ được cho là làm tăng đáp ứng miễn dịch nhờ tác dụng làm giải phóng chậm kháng nguyên, trong khi chính các chất phụ trợ khác là chất sinh miễn dịch mạnh, và được cho là có tác dụng hiệp đồng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đa giá" để chỉ vacxin chứa nhiều hơn một kháng nguyên, bất kể từ cùng loài vi sinh vật (ví dụ, các thể phân lập khác nhau của *Mycoplasma hyopneumoniae* hoặc PCV), từ loài khác (ví dụ, ccs thể phân lập từ cả *Pasteurella hemolytica* lẫn *Pasteurella multocida*), hoặc vacxin chứa hỗn hợp các kháng nguyên từ các chủng khác nhau (ví dụ, vacxin chứa các kháng nguyên của *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* và *Clostridium*).

Thuật ngữ "lợn" hoặc "lợn con" như được sử dụng ở đây để chỉ động vật có nguồn gốc từ lợn, trong khi "lợn nái" để chỉ lợn cái ở tuổi sinh sản và có khả năng sinh sản. "Lợn cái con" là lợn cái chưa từng mang thai.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "độc tính" có nghĩa là thể phân lập vẫn giữ được khả năng gây nhiễm của nó ở động vật chủ và có thể gây bệnh ở động vật chủ.

"Vaccin bất hoạt" để chỉ chế phẩm vaccin chứa sinh vật gây nhiễm hoặc thể gây bệnh không còn khả năng sao chép hoặc sinh trưởng. Thể gây bệnh này có thể có nguồn gốc vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh hoặc nấm. Việc bất hoạt có thể được thực hiện bằng các phương pháp khác nhau, bao gồm làm lạnh-tan băng, xử lý hóa học (ví dụ, xử lý bằng γ -propiolacton (BPL) hoặc formalin), siêu âm, chiếu xạ, gia nhiệt, hoặc phương pháp thông thường bất kỳ khác đủ để ngăn ngừa quá trình sao chép hoặc sinh trưởng của sinh vật trong khi duy trì tính sinh miễn dịch của nó.

Thuật ngữ "biến thể" như được sử dụng ở đây để chỉ polypeptit hoặc trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit, có một hoặc nhiều sự biến đổi axit amin bảo toàn hoặc sự biến đổi nhỏ khác sao cho polypeptit tương ứng có chức năng gần như tương đương so với polypeptit kiểu dại. Thuật ngữ "biến thể" cũng có thể để chỉ vi sinh vật chứa trình tự polypeptit hoặc axit nucleic có các thay đổi hoặc biến đổi nêu trên.

"Biến đổi bảo toàn" để chỉ sự thay thế gốc axit amin bằng gốc tương tự về mặt sinh học khác, hoặc sự thay thế nucleotit trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin được mã hóa không thay đổi, hoặc là gốc tương tự về mặt sinh học khác. Ví dụ về biến đổi bảo toàn bao gồm sự thay thế một gốc kỵ nước, như isoleuxin, valin, leuxin hoặc methionin, cho một gốc kỵ nước khác, hoặc sự thay thế một gốc phân cực bằng một gốc phân cực khác, như sự thay thế arginin cho lysin, axit glutamic cho axit aspartic, hoặc glutamin cho asparagin, và sự thay thế tương tự. Thuật ngữ "biến đổi bảo toàn" còn bao gồm sự thay thế axit amin được thế cho axit amin gốc, với điều kiện kháng thể tạo ra đối với polypeptit được thế cũng phản ứng miễn dịch với polypeptit gốc (không được thế).

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "chất mang được dụng" và "chất dẫn thuốc được dụng" có thể thay đổi lẫn nhau, và để chỉ chất dẫn thuốc dạng lỏng để chứa các kháng nguyên của vaccin có thể được tiêm vào vật chủ mà không có tác dụng có hại. Chất mang được dụng thích hợp đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước vô trùng, nước muối, glucoza, dextroza, hoặc dung dịch đệm. Chất

mang có thể bao gồm chất phụ trợ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất pha loãng, chất ổn định (tức là đường và axit amin), chất bảo quản, chất thấm ướt, chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất làm tăng độ nhớt, chất màu, và chất tương tự.

"Virus PRRS Bắc Mỹ" để chỉ virus PRRS bất kỳ có các đặc tính di truyền liên quan đến thể phân lập của virus PRRS Bắc Mỹ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus PRRS được phân lập lần đầu tiên ở Mỹ vào khoảng đầu những năm 90 của thế kỷ 20 (ví dụ, xem tài liệu: Collins, J. E., et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); thể phân lập MN-1b của virus PRRS Bắc Mỹ (Kwang, J. et al., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); chủng Quebec LAF-exp91 của virus PRRS (Mardassi, H. et al., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); và thể phân lập VR 2385 của virus PRRS Bắc Mỹ (Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Ví dụ khác về chủng virus PRRS Bắc Mỹ là đã biết trong lĩnh vực này. Các đặc tính di truyền để chỉ mức độ giống về trình tự nucleotit hệ gen và mức độ giống về trình tự axit amin của các chủng virus PRRS Bắc Mỹ. Các chủng virus PRRS của Trung Quốc thường có mức độ giống về trình tự nucleotit bằng khoảng 80-93% với các chủng virus Bắc Mỹ.

"Virus PRRS châu Âu" để chỉ chủng virus PRRS bất kỳ có các đặc tính di truyền liên quan đến virus PRRS được phân lập lần đầu tiên ở châu Âu vào khoảng năm 1991 (ví dụ, xem tài liệu: Wensvoort, G., et al., 1991, Vet. Q. 13:121-130). Đôi khi, "virus PRRS châu Âu" còn được gọi là "virus Lelystad". Ví dụ khác về các chủng virus PRRS châu Âu là đã biết trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, virus được biến đổi di truyền được "giảm độc lực" nếu nó ít độc hơn chủng gốc không được biến đổi của nó. Một chủng là "ít độc hơn" nếu nó có sự giảm có ý nghĩa thống kê của một hoặc nhiều thông số quyết định mức độ nặng của bệnh. Các thông số này có thể bao gồm mức virus huyết, mức độ sốt, mức độ nặng của tình trạng suy hô hấp, mức độ nặng của các triệu chứng sinh sản, hoặc số lượng hoặc mức độ nặng của các tổn thương bệnh lý, v.v..

"Dòng gây nhiễm" là hệ gen được tạo dòng hoặc được phân lập của tác nhân gây bệnh (ví dụ, virus) có thể được biến đổi đặc hiệu và có chủ đích trong phòng thí nghiệm, và sau đó được sử dụng để tái tạo sinh vật sống được biến đổi di truyền. Virus sống được biến đổi di truyền tạo ra từ dòng gây nhiễm có thể được sử dụng trong vắc xin chứa virus sống. Theo cách khác, vắc xin chứa virus bất hoạt có thể được bào chế bằng cách xử lý virus sống thu được từ dòng gây nhiễm bằng chất gây bất hoạt như formalin,

beta-propiolacton, dung môi kép etylenmin hoặc kỵ nước, axit, v.v., bằng cách chiếu ánh sáng tử ngoại hoặc tia X, bằng cách gia nhiệt v.v..

Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin để bảo vệ lợn chống lại PCV2, kể cả biến chủng của circovirut lợn typ 2b (PCV2b) có độc tính cao, chế phẩm này chứa polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, trong đó polypeptit ORF2 này chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và aspargin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1. Như được mô tả ở trên, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b này có thể còn bao gồm ít nhất một gốc được chọn từ các gốc sau: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và aspargin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1, còn chứa lysin (K) ở gốc 59 và lysin (K) ở gốc 234 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án khác, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, aspargin (N) ở vị trí 134, lysin (K) ở gốc 59 và lysin (K) ở gốc 234 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1, còn chứa threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215, theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, polypeptit ORF2 của PCV2 đã biến đổi được thể hiện bằng trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn của nó. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở phương án này. Ví dụ, theo các phương án khác, polypeptit ORF2 của PCV2 đã biến đổi có thể được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21 hoặc đoạn của nó, trình tự

axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 37 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 hoặc đoạn của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 hoặc đoạn của nó, hoặc trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 hoặc đoạn của nó.

Theo một phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm ít nhất một kháng nguyên bổ sung. Theo một phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung này có tác dụng bảo vệ chống lại bệnh ở lợn gây bởi vi sinh vật.

Theo một số phương án, ít nhất một thành phần kháng nguyên bổ sung nêu trên có tác dụng bảo vệ chống lại bệnh ở lợn gây bởi vi khuẩn, virus, hoặc động vật nguyên sinh được biết là gây nhiễm cho lợn. Ví dụ về các vi sinh vật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vi sinh vật sau: M. hyo, virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive và respiratory syndrome virus: PRRSV), parvovirus lợn (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, vi khuẩn leptospira, *Lawsonia intracellularis*, virus gây bệnh cúm lợn (SIV), kháng nguyên của *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirut hô hấp ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PED), rotavirut ở lợn (ví dụ, nhóm A, B, và C), Torque teno virut (TTV), virus cự bào ở lợn, virus đường ruột ở lợn, virus gây bệnh viêm não-cơ tim, tác nhân gây bệnh Aujeszky, dịch tả lợn (CSF) và tác nhân gây bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm ở lợn, hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung là *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo). Theo một phương án khác, ít nhất một kháng nguyên bổ sung là virus PRRS, như chủng virus PRRS Bắc Mỹ, chủng virus PRRS Trung Quốc, hoặc chủng virus PRRS châu Âu. Cũng dự định rằng ít nhất một kháng nguyên bổ sung có thể là thể phân lập khác của PCV2, như chủng PCV2a cổ điển, chủng PCV2b cổ điển, hoặc các kiểu gen PCV2 khác.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế ở dạng biến chủng virus PCV2b toàn phần được bất hoạt chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b.

Theo một phương án, gen vỏ capsit ORF2 của biến chủng virus PCV2b toàn phần tương ứng với SEQ ID NO: 2. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b được biểu hiện bởi biến chủng virus PCV2b toàn phần tương ứng với SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn của nó. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án này. Ví dụ, theo một số phương án, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b được biểu hiện bởi biến chủng virus PCV2b toàn phần có thể được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự sau đây hoặc đoạn của nó: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, hoặc SEQ ID NO: 55. Các trình tự gen ORF2 tương ứng được mô tả ở đây.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế ở dạng virus thể khả được bất hoạt, trong đó virus thể khả này chứa circovirus lợn typ 1 tái tổ hợp được bất hoạt chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b (virus PCV1-2b thể khả). Circovirus lợn thể khả và phương pháp điều chế chúng được mô tả trong WO 03/049703 A2, và cả trong các bằng sáng chế Mỹ số 7,279,166 và 7,575,752, các tài liệu này được viện dẫn toàn bộ ở đây.

Theo một phương án, gen vỏ capsit ORF2 của virus PCV1-2 thể khả tương ứng với SEQ ID NO: 2. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b được biểu hiện bởi virus PCV1-2b thể khả tương ứng với SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn của nó. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án

này. Ví dụ, theo một số phương án, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b được biểu hiện bởi virus PCV1-2b thể khảm có thể được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự sau đây hoặc đoạn của nó: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, hoặc SEQ ID NO: 55.

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế ở dạng polypeptit ORF2 của PVC2b biến đổi tái tổ hợp được phân lập. Theo một phương án, polypeptit ORF2 của PVC2b biến đổi tái tổ hợp được phân lập được biểu hiện từ vector, như baculovirus. Theo cách khác, các vector biểu hiện đã biết khác có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vector parapox. Theo một phương án, vector có thể là vector sống hoặc bất hoạt.

Theo một phương án khác, polypeptit ORF2 được biểu hiện tái tổ hợp của biến chủng PCV2b tương ứng với SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn của nó. Theo cách khác, theo một số phương án, polypeptit ORF2 được biểu hiện tái tổ hợp của biến chủng PCV2b có thể được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự sau đây hoặc đoạn của nó: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, hoặc SEQ ID NO: 55.

Theo một số phương án, các đoạn sinh miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi được sử dụng làm thành phần kháng nguyên trong chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, dạng được cắt ngắn và/hoặc được thể hoặc các đoạn protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng các biến thể của polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế, miễn là chúng vẫn giữ được các đặc tính kháng nguyên làm cho chúng có thể dùng trong chế phẩm vacxin theo sáng chế. Tốt hơn nếu các biến thể biến chủng PCV2b có

mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% với trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của thể phân lập của PCV2 được gọi là PCV2B-DIV-MUT. Các đặc tính kháng nguyên của chế phẩm miễn dịch có thể được đánh giá bằng thử nghiệm thử thách như nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Ngoài ra, đặc tính kháng nguyên của kháng nguyên ORF2 đã biến đổi của biến chủng PCV2b vẫn giữ được khi kháng nguyên đã biến đổi này tạo ra ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn nữa là 90% miễn dịch bảo vệ so với protein ORF2 kiểu dại của biến chủng PCV2b có SEQ ID NO: 1.

Thành phần kháng nguyên ORF2 của biến chủng PCV2b được tạo ra trong chế phẩm sinh miễn dịch/chế phẩm vaccin với lượng kháng nguyên đưa vào hữu hiệu để tạo ra đáp ứng miễn dịch mong muốn, tức là làm giảm tỷ lệ mắc bệnh hoặc làm giảm mức độ nặng của các dấu hiệu lâm sàng do nhiễm chủng PCV2b có độc tính cao, một ví dụ về nó là virus có tên gọi PCV2B-DIV-MUT ở đây. Theo một số phương án, chế phẩm này cũng có tác dụng bảo vệ chủng chống lại các chủng PCV2a và PCV2b cổ điển khác loại.

Theo một phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế ở dạng circovirus lợn typ 1 tái tổ hợp được bất hoạt chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b (virus PCV1-2bDIV thể khảm). Virus thể khảm này được đưa vào chế phẩm theo sáng chế với lượng ít nhất là $1,0 \leq RP \leq 5,0$, trong đó RP là đơn vị hiệu lực tương đối được xác định bằng phương pháp định lượng kháng nguyên ELISA (thử nghiệm hiệu lực *in vitro*) so với vaccin tham chiếu. Theo một phương án khác, virus PCV1-2bDIV thể khảm được đưa vào chế phẩm theo sáng chế ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,5% đến 5% kháng nguyên PCV1-2bDIV cô 20 lần (20X).

Theo một phương án khác, chế phẩm vaccin theo sáng chế ở dạng biến chủng virus PCV2b toàn phần được bất hoạt chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b. Virus này được đưa vào chế phẩm theo sáng chế với lượng ít nhất là $1,0 \leq RP \leq 5,0$, trong đó RP là đơn vị hiệu lực tương đối được xác định bằng phương pháp định lượng kháng nguyên ELISA (thử nghiệm hiệu lực *in vitro*) so với vaccin tham chiếu. Theo một phương án khác, biến chủng virus PCV2b toàn phần được bất hoạt được đưa vào chế phẩm theo sáng chế ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,5% đến 5% kháng nguyên ORF2 của PCV2b đa hướng cô 20 lần (20X).

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm vaccin theo sáng chế ở dạng polypeptit ORF2 tái tổ hợp được phân lập của PCV2b biến đổi. Protein ORF2 tái tổ hợp của biến chủng PCV2b có thể được đưa vào chế phẩm theo sáng chế với lượng ít nhất là 0,2µg kháng nguyên/ml chế phẩm sinh miễn dịch/vaccin cuối (µg/ml). Theo một phương án khác, lượng polypeptit ORF2 tái tổ hợp của biến chủng PCV2b được đưa vào nằm trong khoảng từ 0,2 đến 400 µg/ml. Theo một phương án khác nữa, lượng polypeptit ORF2 tái tổ hợp của biến chủng PCV2b được đưa vào nằm trong khoảng từ 0,3 đến 200 µg/ml. Theo một phương án khác nữa, lượng polypeptit ORF2 tái tổ hợp của biến chủng PCV2b được đưa vào nằm trong khoảng từ 0,35 đến 100 µg/ml. Theo một phương án khác nữa, lượng polypeptit ORF2 tái tổ hợp của biến chủng PCV2b được đưa vào nằm trong khoảng từ 0,4 đến 50 µg/ml.

Theo một phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm hỗn hợp của polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, và ít nhất một kháng nguyên hòa tan của *M. hyo* (ví dụ, hai hoặc nhiều kháng nguyên). Theo một phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b và một hoặc nhiều kháng nguyên protein đặc hiệu của *M. hyo* sau đây: các protein có trọng lượng phân tử khoảng 46kD (p46), 64kD (p64) và 97kD (p97) của *M. hyo*. Protein có trọng lượng phân tử khoảng 64kD của *M. hyo* (p64) có thể được gọi theo cách khác là kháng nguyên bề mặt p65 của *M. hyo* đã được Kim và các đồng tác giả mô tả [Infect. Immun. 58(8):2637-2643 (1990)], cũng như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 5,788,962. Futo và các đồng tác giả mô tả việc tạo dòng và xác định tính chất của protein bề mặt có trọng lượng phân tử 46kD của *M. hyo* có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế [J. Bact 177: 1915-1917 (1995)]. Zhang và các đồng tác giả mô tả và xác định tính chất của protein adhesin p97 của *M. hyo* [Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995]. Ngoài ra, King và các đồng tác giả mô tả protein có trọng lượng phân tử 124kD được gọi là Mhp1 của chủng *M. hyo* P-5722 và các dữ liệu được đưa ra gợi ý rằng Mhp1 và p97 là cùng một protein [Vaccine 15:25-35 (1997)]. Protein p97 này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể bao gồm các kháng nguyên protein đặc hiệu khác của *M. hyo* như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein có trọng lượng khoảng 41kD (p41), 42kD (p42), 89kD (p89), và 65kD (p65). Xem tài liệu: Okada et al., 2000, J. Vet. Med. B 47:527-533 và Kim et al., 1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643. Ngoài ra, thành phần *M. hyo* có thể bao gồm các kháng nguyên

protein đặc hiệu của M. hyo có trọng lượng phân tử khoảng 102kD (p102) và 216kD (p216). Xem bằng sáng chế Mỹ số 6,162,435 và 7,419,806 cấp cho Minion và các đồng tác giả.

Theo một phương án khác, chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm hỗn hợp của polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, ít nhất một kháng nguyên hòa tan của M. hyo (ví dụ, hai hoặc nhiều kháng nguyên), cũng như kháng nguyên của virus PRRS. Các kháng nguyên của virus PRRS thích hợp để sử dụng trong chế phẩm biến chủng PCV2b/M. hyo/PRRS theo sáng chế bao gồm các thể phân lập của virus American PRRS Bắc Mỹ, chủng virus PRRS Trung Quốc, và chủng PRRS châu Âu, cũng như các dạng được biến đổi di truyền của các thể phân lập/chủng virus này. Theo một phương án, thành phần kháng nguyên của virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là virus PRRS Bắc Mỹ.

Theo một số phương án, thành phần kháng nguyên của virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là thể phân lập của virus PRRS Bắc Mỹ được ký hiệu là P129 hoặc virus sống được biến đổi di truyền của nó. Tốt hơn nếu virus PRRS được biến đổi di truyền không thể gây nhiễm bệnh nhưng có thể tạo ra đáp ứng bảo vệ miễn dịch hữu hiệu chống lại sự nhiễm virus PRRS kiểu dại.

Virus PRRS được biến đổi di truyền để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra từ dòng gây nhiễm. Việc điều chế dòng cADN gây nhiễm của thể phân lập của virus PRRS Bắc Mỹ được ký hiệu là P129 được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,500,662 được viện dẫn toàn bộ ở đây. Trình tự của cADN P129 được bộc lộ trong trình tự có mã số lưu giữ AF494042 trong Ngân hàng gen và trong bằng sáng chế Mỹ số 6,500,662.

Theo một phương án, vaccin hỗn hợp biến chủng PCV2b/M. hyo được tạo ra dưới dạng vaccin liều duy nhất đựng trong một lọ. Theo một phương án khác, vaccin hỗn hợp biến chủng PCV2b/M. hyo/ virus PRRS được tạo ra dưới dạng vaccin liều duy nhất đựng trong hai lọ. Ví dụ, theo một số phương án, hỗn hợp biến chủng PCV2b/M. hyo được tạo ra dưới dạng chế phẩm lỏng ổn định trong lọ thứ nhất và virus PRRS được tạo ra ở trạng thái đông khô trong lọ thứ hai. Theo một số phương án, kháng nguyên bổ sung của lợn có thể được bổ sung vào lọ thứ nhất hoặc lọ thứ hai.

Theo một phương án, thành phần virus PRRS được tạo ra dưới dạng virus sống được biến đổi di truyền được làm đông khô. Trước khi sử dụng, chất lỏng biến chủng

PCV2b/M. hyo từ lọ thứ nhất có thể được sử dụng để hydrat hóa lại virus PRRS trong lọ thứ hai sao cho cả ba kháng nguyên có thể được sử dụng cho động vật theo một liều duy nhất.

Vaccine theo sáng chế có thể được bào chế theo quy trình đã được chấp nhận để đưa chất mang được dùng đối với động vật, kể cả người (nếu có) vào vaccine, như chất đệm chuẩn, chất ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, và/hoặc chất hòa tan, và cũng có thể được bào chế để tạo điều kiện thuận lợi cho sự giải phóng kéo dài. Chất pha loãng bao gồm nước, nước muối, dextroza, etanol, glyxerol, và chất tương tự. Chất phụ gia để tạo đẳng trương bao gồm natri clorua, dextroza, manitol, sorbitol, và lactoza, ngoài các chất khác. Chất ổn định bao gồm albumin, ngoài các chất khác. Các chất dẫn và chất phụ gia thích hợp khác của vaccine bao gồm các chất đặc biệt hữu ích để bào chế vaccine sống được biến đổi là đã biết hoặc sẽ biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem tài liệu: Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing được viện dẫn ở đây.

Vaccine theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần điều biến miễn dịch bổ sung, ví dụ, chất phụ trợ hoặc xytokin, trong số các chất khác. Các loại chất phụ trợ thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm các chất sau: chất phụ trợ dạng dầu trong nước, chất phụ trợ polyme và nước, chất phụ trợ dạng nước trong dầu, chất phụ trợ nhôm hydroxit, chất phụ trợ vitamin E và hỗn hợp của chúng. Một số ví dụ cụ thể về chất phụ trợ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tá dược Freund đầy đủ, tá dược Freund không đầy đủ, *Corynebacterium parvum*, *Bacillus Calmette Guerin*, gel nhôm hydroxit, glucan, dextran sulfat, sắt oxit, natri alginat, tá dược Bacto, một số polyme tổng hợp như poly axit amin và co-polyme của axit amin, copolyme khối (CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), tá dược AMPHIGEN®, saponin, Quil A hoặc phân đoạn saponin khác, monophosphoryl lipid A, và tá dược Avridin lipid-amin (N,N-dioctadexyl-N',N'-- bis(2-hydroxyetyl)-propandiamin), "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), dầu parafin, hệ tá dược RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), muramyl dipeptit và chất tương tự.

Ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế về nhũ tương dầu trong nước có thể dùng trong vaccine theo sáng chế bao gồm chế phẩm SEAM62 và SEAM 1/2 cải biến. SEAM62 cải biến là nhũ tương dầu trong nước chứa 5% (thể tích) squalen (Sigma), 1%

(thể tích) chất tẩy rửa SPAN® 85 (ICI Surfactants), 0,7% (thể tích) chất tẩy rửa TWEEN® 80 (ICI Surfactants), 2,5% (thể tích) etanol, 200 µg/ml Quil A, 100 µg/ml cholesterol, và 0,5% (thể tích) lexitin. SEAM 1/2 cải biến là nhũ tương dầu trong nước chứa 5% (thể tích) squalen, 1% (thể tích) chất tẩy rửa SPAN® 85, 0,7% (thể tích) chất tẩy rửa Tween 80, 2,5% (thể tích) etanol, 100 µg/ml Quil A, và 50 µg/ml cholesterol.

Một ví dụ khác về chất phụ trợ có thể dùng trong chế phẩm theo sáng chế là dầu SP. Như được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "dầu SP" để chỉ nhũ tương trong dầu chứa copolyme khối polyoxyetylen-polyoxypropylen, squalen, polyoxyetylen sorbitan monooleat và dung dịch muối đậm. Copolyme khối polyoxyetylen-polyoxypropylen là chất hoạt động bề mặt giúp tạo hỗn dịch các thành phần dạng rắn và dạng lỏng. Các chất hoạt động bề mặt này là có bán trên thị trường dưới dạng polyme với tên thương mại Pluronic®. Chất hoạt động bề mặt được ưu tiên là poloxame 401 có bán trên thị trường với tên thương mại Pluronic® L-121. Nói chung, nhũ tương dầu SP là hỗn hợp tá dược kích thích miễn dịch chứa 1 đến 3% thể tích copolyme khối, 2 đến 6% thể tích squalen, cụ thể hơn là 3 đến 6% squalen, và khoảng 0,1 đến 0,5% thể tích polyoxyetylen sorbitan monooleat, tỷ lệ còn lại là dung dịch muối đậm. Theo một phương án, nhũ tương dầu SP có mặt trong chế phẩm cuối với lượng theo thể tích nằm trong khoảng từ 1% đến 25%, tốt hơn là 2% đến 15%, tốt hơn nữa là từ 5% đến 12%.

Một ví dụ khác nữa về tá dược thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là tá dược AMPHIGEN™ bao gồm lexitin đã loại dầu được hòa tan trong dầu, thường là parafin lỏng nhẹ.

Ví dụ khác về tá dược có thể dùng trong chế phẩm theo sáng chế là các tá dược độc quyền sau đây: hệ tá dược nhũ tương kép Microsol Diluvac Forte®, tá dược Emunade, và tá dược Xsolve. Cả tá dược Emunade và Xsolve đều là nhũ tương của dầu khoáng nhẹ trong nước, nhưng Emunade còn chứa alhydrogel, và d,l- α -tocopheryl axetat là một phần của tá dược XSolve. Một ví dụ khác nữa về tá dược thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là tá dược ImbranFLEX™ (tá dược dạng nước trong dầu). Một ví dụ khác nữa về tá dược thích hợp là tá dược trên cơ sở Carbomer (Carbopol®). Tá dược Carbopol® được ưu tiên bao gồm polyme Carbopol® 934 và polyme Carbopol®941.

Theo một phương án, tá dược hoặc hỗn hợp tá dược này được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100 μ g đến 10mg cho một liều. Theo một phương án khác, tá dược/hỗn hợp tá dược này được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 200 μ g đến 5mg cho một liều. Theo một phương án khác nữa, tá dược/hỗn hợp tá dược này được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 300 μ g đến 1mg/liều.

Tá dược hoặc hỗn hợp tá dược này thường có mặt trong chế phẩm vaccin theo sáng chế với lượng theo thể tích nằm trong khoảng từ 1% đến 25%, tốt hơn là từ 2% đến 15%, tốt hơn nữa là từ 5% đến 12%.

Các "chất điều biến miễn dịch" khác có thể được đưa vào vaccin bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều interleukin, interferon, hoặc các xytokin đã biết khác. Theo một phương án, chất phụ trợ này có thể là dẫn xuất xyclodextrin hoặc polyme polyanion như các chất được mô tả trong các bằng sáng chế Mỹ số 6,165,995 và 6,610,310 tương ứng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp gây miễn dịch cho lợn chống lại biến chủng của PCV2b, phương pháp này bao gồm việc cho lợn sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả ở trên. Chế phẩm này bao gồm polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, trong đó polypeptit ORF2 này bao gồm leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1. Như được mô tả ở trên, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b này có thể còn bao gồm ít nhất một gốc được chọn từ các gốc sau: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215, theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, chế phẩm để sử dụng theo sáng chế bao gồm virus chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b. Theo một phương án khác, chế phẩm để sử dụng theo sáng chế bao gồm polypeptit ORF2 của virus PCV2b tái tổ hợp được phân lập.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm này được sử dụng trong cơ, trong chân bì, qua chân bì, dưới da, hoặc đường miệng. Theo một phương án khác, chế phẩm này được sử dụng theo một liều duy nhất. Theo một phương án khác nữa, chế phẩm này được sử dụng theo hai liều.

Theo một phương án khác, chế phẩm này được sử dụng cho lợn có kháng thể từ mẹ chống lại PCV2.

Theo một phương án, chế phẩm này được sử dụng cho lợn ba tuần tuổi hoặc nhiều tuần tuổi hơn.

Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng với liều lượng và bằng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y học hoặc thú y đã biết rõ khi cân nhắc các yếu tố như tuổi, giới tính, thể trọng, loài, và tình trạng của động vật sử dụng vaccin, và đường dùng. Đường dùng có thể là sử dụng qua da, qua niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, mũi, hậu môn, âm đạo) hoặc ngoài đường tiêu hóa (trong chân bì, qua 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 đồng sử dụng hoặc sử dụng lần lượt với các cách điều trị hoặc liệu pháp khác. Dạng sử dụng có thể bao gồm hỗn dịch, xirô hoặc cốm ngọt, và chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong chân bì, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ, chế phẩm tiêm), như hỗn dịch hoặc nhũ tương vô trùng. Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng khí dung, hoặc được trộn vào thức ăn và/hoặc nước, hoặc được trộn với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược thích hợp như nước vô trùng, nước muối sinh lý, glucoza, hoặc chất tương tự. Chế phẩm này có thể chứa chất phụ trợ như chất thẩm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm độ pH, tá dược, chất tạo gel hoặc chất làm tăng độ nhớt, chất bảo quản, chất điều vị, chất màu, và chất tương tự, tùy thuộc vào đường dùng và chế phẩm mong muốn.

Sáng chế còn đề xuất kit. Kit này bao gồm lọ chứa chế phẩm vaccin theo sáng chế để bảo vệ lợn chống lại biến chủng của circovirut lợn typ 2b (PCV2b) có độc tính cao. Chế phẩm vaccin này bao gồm polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b, trong đó polypeptit ORF2 này bao gồm leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1. Như được mô tả ở trên, polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b này có thể còn bao gồm ít nhất một gốc được chọn từ các gốc sau: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215, theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin ở dạng virut chứa và/hoặc biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b. Theo một phương án khác của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin ở dạng polypeptit ORF2 của PVC2b biến đổi tái tổ hợp được phân lập.

Theo một phương án của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin trong lọ được tạo ra ở dạng chế phẩm dạng lỏng để sử dụng ngay. Theo một phương án khác của kit theo sáng chế, chế phẩm vaccin trong lọ được tạo ra ở dạng đông khô. Theo một phương án khác, kit có thể bao gồm chất pha loãng. Theo một phương án khác nữa, kit có thể còn bao gồm hướng dẫn sử dụng chứa thông tin về cách sử dụng chế phẩm vaccin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm vaccin ở dạng virus thể khả bất hoạt, trong đó virus thể khả này bao gồm circovirus lợn typ 1 tái tổ hợp được bất hoạt biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b. Circovirus lợn thể khả và phương pháp điều chế chúng được mô tả trong WO 03/049703 A2, và cả trong các bằng sáng chế Mỹ số 7,279,166 và 7,575,752. Phương pháp tạo ra circovirus lợn thể khả kể cả PCV1 được bất hoạt biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b được mô tả trong Ví dụ 1 dưới đây. Theo một phương án, chế phẩm cuối được điều chế bằng cách kết hợp virus cPCV1-2b đã bất hoạt với tá được thích hợp và/hoặc chất mang được dụng khác.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm vaccin ở dạng biến chủng virus PCV2b toàn phần được bất hoạt biểu hiện polypeptit ORF2 của biến chủng PCV2b. Phương pháp này được mô tả trong Ví dụ 3 dưới đây. Theo một phương án, chế phẩm cuối được điều chế bằng cách kết hợp virus PCV2B-DIV-MUT đã bất hoạt với tá được thích hợp và/hoặc chất mang được dụng khác.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi tái tổ hợp bao gồm các bước: i) gây nhiễm tế bào nhạy cảm trong dịch nuôi cấy bằng vector virus tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa ADN ORF2 của PCV2 đã biến đổi, trong đó protein ORF2 được biểu hiện bởi vector virus tái tổ hợp này, và ii) sau đó thu hồi protein ORF2 trong dịch nổi. Thông thường, lượng lớn protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi có thể được thu hồi trong dịch nổi. Lượng lớn protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi để chỉ lượng lớn hơn 20 µg/ml dịch nổi, tốt hơn là lớn hơn khoảng 25 µg/ml, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 30 µg/ml, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 40 µg/ml, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 50 µg/ml, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 60 µg/ml, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 80 µg/ml, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 100 µg/ml, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 150 µg/ml, tốt nhất là lớn hơn khoảng 190 µg/ml.

Dịch nuôi cấy tế bào được ưu tiên có số tế bào nằm trong khoảng từ $0,3$ đến $2,0 \times 10^6$ tế bào/ml, tốt hơn nữa là từ $0,35$ đến $1,9 \times 10^6$ tế bào/ml, còn tốt hơn nữa là từ $0,4$ đến $1,8 \times 10^6$ tế bào/ml, còn tốt hơn nữa là từ $0,45$ đến $1,7 \times 10^6$ tế bào/ml, và tốt nhất là từ $0,5$ đến $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Tế bào được ưu tiên là có thể xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tế bào được ưu tiên là tế bào dễ bị nhiễm vector virus tái tổ hợp thích hợp, chứa ADN ORF2 của PCV2 đã biến đổi và biểu hiện protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi. Tốt hơn nếu, tế bào này là tế bào của côn trùng, và tốt hơn nữa nếu chúng bao gồm các tế bào côn trùng có bán trên thị trường với nhãn hiệu hàng hóa Sf+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, Conn.).

Môi trường sinh trưởng thích hợp cũng sẽ có thể xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này với môi trường sinh trưởng được ưu tiên là môi trường tế bào côn trùng không chứa huyết thanh như Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, Kans.) và môi trường tương tự. Vector virus được ưu tiên bao gồm baculovirus như BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.), cụ thể là khi tế bào sản xuất là tế bào côn trùng. Mặc dù hệ biểu hiện baculovirus là được ưu tiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng các hệ biểu hiện khác sẽ được sử dụng nhằm mục đích của sáng chế, tức là biểu hiện ORF2 của PCV2 đã biến đổi vào dịch nổi nuôi cấy tế bào. Các hệ biểu hiện khác này có thể cần sử dụng trình tự tín hiệu để gây biểu hiện ORF2 vào môi trường. Tuy nhiên, nếu ORF2 được tạo ra bởi hệ biểu hiện baculovirus thì thông thường hệ này không cần trình tự tín hiệu bất kỳ hoặc cải biến thêm để gây biểu hiện ORF2 vào môi trường. Protein này được cho là có thể độc lập tạo ra các hạt giống virus (Journal of General Virology 2000, Vol. 81, trang 2281-2287), và được tiết vào dịch nổi nuôi cấy. Vector virus tái tổ hợp này chứa trình tự ADN ORF2 của PCV2 đã biến đổi có độ bội nhiễm (multiplicity of infection: MOI) được ưu tiên nằm trong khoảng từ $0,03$ đến $1,5$, tốt hơn nữa là từ $0,05$ đến $1,3$, còn tốt hơn nữa là từ $0,09$ đến $1,1$, và tốt nhất là từ $0,1$ đến $1,0$, khi được sử dụng để gây nhiễm tế bào nhạy cảm. Tốt hơn nếu MOI nêu trên liên quan đến 1ml dịch nuôi cấy tế bào. Tốt hơn nếu phương pháp được mô tả ở đây chứa mức độ nhiễm $0,35$ - $1,9 \times 10^6$ tế bào/ml, còn tốt hơn nữa là $0,4$ đến $1,8 \times 10^6$ tế bào/ml, còn tốt hơn nữa là $0,45$ đến $1,7 \times 10^6$ tế bào/ml, và tốt nhất là $0,5$ đến $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml bằng vector virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 đã biến đổi và biểu hiện protein ORF của PCV2 đã biến đổi có MOI nằm trong

khoảng từ 0,03 đến 1,5, tốt hơn nữa là 0,05 đến 1,3, còn tốt hơn nữa là 0,09 đến 1,1, và tốt nhất là từ 0,1-1,0.

Sau đó, tế bào bị nhiễm được ủ trong thời gian tối đa là 10 ngày, tốt hơn nữa là từ 2 ngày đến 10 ngày, còn tốt hơn nữa là từ 4 ngày đến 9 ngày, và tốt nhất là từ 5 ngày đến 8 ngày. Điều kiện ủ được ưu tiên bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22 đến 32°C, tốt hơn nữa là từ 24 đến 30°C, còn tốt hơn nữa là từ 25 đến 29°C, còn tốt hơn nữa là từ 26 đến 28°C, và tốt nhất là khoảng 27°C. Tốt hơn nếu tế bào Sf+ được quan sát sự thay đổi tính chất do baculovirus gây ra sau khi cấy. Quan sát này có thể bao gồm theo dõi xu hướng mật độ tế bào và sự giảm khả năng sống trong thời gian sau khi gây nhiễm. Hiệu giá virus cao nhất thường được quan sát 3-5 ngày sau khi nhiễm, và mức giải phóng ORF2 cao nhất từ tế bào vào dịch nổi thường thu được trong thời gian từ ngày 5 đến ngày 8, và/hoặc khi khả năng sống của tế bào giảm tới mức nhỏ hơn 10%.

Tốt hơn nếu quá trình thu hồi bắt đầu bằng việc tách các mảnh tế bào ra khỏi polypeptit ORF2 đã biểu hiện của PCV2 trong môi trường bằng bước tách. Bước tách được ưu tiên bao gồm lọc, ly tâm ở tốc độ tối đa 20000 x g, ly tâm dòng liên tục, tách bằng cách sắc ký sử dụng chất trao đổi ion hoặc lọc qua gel, và các phương pháp ái lực miễn dịch thông thường. Các phương pháp này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (ví dụ, Harris and Angel (eds.), Protein purification methods-a practical approach, IRL press Oxford 1995). Phương pháp lọc được ưu tiên bao gồm vi lọc theo dòng vuông góc và lọc theo dòng tiếp tuyến (hoặc lọc theo dòng ngang), kể cả lọc qua màng sợi rỗng. Trong số các phương pháp này, phương pháp vi lọc theo dòng vuông góc là được ưu tiên. Cỡ lỗ được ưu tiên để vi lọc theo dòng vuông góc nằm trong khoảng từ 0,30 đến 1,35µm, tốt hơn nữa là từ 0,35 đến 1,25µm, còn tốt hơn nữa là từ 0,40 đến 1,10µm, và tốt nhất là từ 0,45 đến 1,0µm.

Để thu hồi polypeptit ORF2 của PCV2 đã biến đổi tái tổ hợp để sử dụng trong chế phẩm miễn dịch hoặc sinh miễn dịch như vacxin, bước bất hoạt là được ưu tiên để làm bất hoạt vector virus. Tốt hơn nếu quá trình bất hoạt này được thực hiện ngay trước hoặc ngay sau bước lọc, với thời điểm bất hoạt được ưu tiên là sau bước lọc. Phương pháp bất hoạt thông thường bất kỳ có thể được sử dụng nhằm mục đích của sáng chế. Do đó, quá trình bất hoạt có thể được thực hiện bằng cách xử lý hóa học và/hoặc vật lý. Theo các phương án được ưu tiên, thể tích chất lỏng thu hồi được xác định và nhiệt độ được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 32 đến 42°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ

34 đến 40°C, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 35 đến 39°C. Phương pháp bất hoạt được ưu tiên bao gồm bổ sung etylenimin kép (binary ethylenimine: BEI) được đóng vòng, tốt hơn là ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 20mM, tốt hơn là khoảng 2 đến 10mM, còn tốt hơn nữa là khoảng 2 đến 8mM, còn tốt hơn nữa là khoảng 3 đến 7mM, tốt nhất là khoảng 5mM. Ví dụ, việc bất hoạt bao gồm bổ sung dung dịch chứa 2-bromoetylenamin hydrobromua, tốt hơn là ở nồng độ khoảng 0,4M, đã được đóng vòng thành etylenimin kép (BEI) 0,2M trong NaOH 0,3N, vào chất lỏng nêu trên để thu được nồng độ cuối khoảng 5mM BEI. Tốt hơn nếu chất lỏng này được khuấy liên tục trong 72-96 giờ, và chất lỏng đã bất hoạt thu được có thể được bảo quản lạnh ở nhiệt độ -40°C hoặc thấp hơn hoặc nhiệt độ nằm trong khoảng từ 1 đến 7°C. Sau khi bất hoạt xong, dung dịch natri thiosulfat, tốt hơn là ở nồng độ 1,0M, được bổ sung vào để trung hòa BEI còn lại bất kỳ. Tốt hơn nếu natri thiosulfat được bổ sung với lượng đương lượng so với lượng BEI được bổ sung trước để bất hoạt. Ví dụ, trong trường hợp BEI được bổ sung tới nồng độ cuối 5mM, dung dịch natri thiosulfat 1,0M được bổ sung vào để thu được nồng độ cuối tối thiểu bằng 5mM để trung hòa BEI còn lại bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm chứa protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi, và vectơ virus được bất hoạt. Phương pháp này bao gồm các bước: i) tạo dòng gen ORF2 đã khuếch đại của PCV2 đã biến đổi vào vectơ truyền; ii) chuyển nhiễm phân vectơ truyền chứa gen ORF2 tái tổ hợp của PCV2 đã biến đổi vào virus; iii) gây nhiễm tế bào trong môi trường bằng vectơ virus đã chuyển nhiễm; iv) làm cho vectơ virus đã chuyển nhiễm biểu hiện protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2 đã biến đổi từ gen ORF2 của PCV2 đã biến đổi; v) tách tế bào ra khỏi dịch nổi; vi) thu hồi protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi từ dịch nổi; và vii) bất hoạt vectơ virus tái tổ hợp này. Tốt hơn nếu vectơ virus tái tổ hợp này là baculovirus chứa trình tự mã hóa ADN của ORF2, và tế bào là tế bào Sf+. Bước tách được ưu tiên là các bước được mô tả ở trên, tốt nhất là bước lọc. Bước bất hoạt được ưu tiên là các bước được mô tả ở trên. Tốt hơn nếu bước bất hoạt được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35 đến 39°C và với sự có mặt của 2 đến 8mM BEI, được ưu tiên hơn nữa là với sự có mặt của khoảng 5mM BEI. Tốt hơn nếu bước bất hoạt được thực hiện trong thời gian ít nhất 24 giờ, còn tốt hơn nữa là trong 24 đến 72 giờ.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp bào chế chế phẩm chứa protein ORF2 của PCV2 đã biến đổi và vectơ virus được bất hoạt như được mô tả ở trên còn bao gồm

bước trung hòa sau bước vii). Bước viii) này bao gồm bổ sung lượng đương lượng của chất có tác dụng trung hòa chất bất hoạt trong dung dịch. Tốt hơn nếu chất bất hoạt là BEI, việc bổ sung natri thiosulfat tới lượng đương lượng là được ưu tiên. Do đó, theo một khía cạnh khác, bước viii) bao gồm bổ sung dung dịch natri thiosulfat tới nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 20mM, tốt hơn là khoảng 2 đến 10mM, còn tốt hơn nữa là khoảng 2 đến 8mM, còn tốt hơn nữa là khoảng 3 đến 7mM, tốt nhất là khoảng 5mM, nếu chất bất hoạt là BEI.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm, tốt hơn là chế phẩm kháng nguyên, như vaccin, để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại chủng PCV2 đã biến đổi. Nói chung, phương pháp này bao gồm các bước chuyển nhiễm cấu trúc gen vào virus, trong đó cấu trúc này chứa i) ADN tái tổ hợp từ ORF2 của chủng PCV2 đã biến đổi, ii) gây nhiễm tế bào trong môi trường sinh trưởng bằng virus đã chuyển nhiễm, iii) làm cho virus này biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2 đã biến đổi, iv) thu hồi protein ORF2 được biểu hiện từ dịch nổi, v) và điều chế chế phẩm bằng cách kết hợp protein này với chất phụ trợ thích hợp và/hoặc chất mang được dụng khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đưa ra vật liệu và quy trình được ưu tiên theo sáng chế. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không dự định để giới hạn phạm vi chung của sáng chế.

Ví dụ 1: Phương pháp tạo ra circovirus lợn thể khảm (cPCV)1-2

cPCV1-2 được tạo ra bằng cách tạo dòng gen vỏ capsit sinh miễn dịch của chủng circovirus lợn typ 2b biến đổi gây bệnh (được gọi là “PCV2B-DIV-MUT”) vào khung chính hệ gen của circovirus lợn typ 1 không gây bệnh (PCV1). Quy trình tạo ra dòng ADN thể khảm được mô tả, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ số 7,279,166, được viện dẫn toàn bộ ở đây. Nguồn gây nhiễm của virus thể khảm này được sử dụng để gây nhiễm vào các tế bào thận của lợn (Porcine Kidney: PK) PK15 sinh trưởng trong môi trường cần thiết tối thiểu (Minimum Essential Medium: MEM) có bổ sung sản phẩm thủy phân lactalbumin (sản phẩm thủy phân lactalbumin: LAH) 0,05%, 30 µg/ml gentamixin sulfat, và 5% huyết thanh bào thai bò. Tế bào PK-15 đã nhiễm cPCV1-2 thu được được phát triển tiếp bằng cách cấy chuyển hàng loạt sản phẩm bốn lần nữa bằng cách sử dụng

môi trường sinh trưởng giống hệt, chỉ khác là chứa 2-3% huyết thanh bào thai bò. Mè cấy chuyển thứ năm được làm đông lạnh, làm tan băng và lọc, và dịch tan thu được được sử dụng để tiền giống gốc và sau đó là giống gốc.

Môi trường dùng để sản xuất virus giống là giống như môi trường dùng để sản xuất virus gốc. Đối với môi trường sinh trưởng, MEM, OptiMEM, hoặc môi trường tương đương là các môi trường cơ bản có thể được sử dụng để cấy dòng tế bào PK-15 để phát triển mạnh. Môi trường sinh trưởng có thể được bổ sung tối đa 10% huyết thanh bò, tối đa 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, tối đa 0,5% albumin huyết thanh bò, và tối đa 30 µg/ml gentamixin. Để làm môi trường sinh sản cho virus, MEM, OptiMEM, hoặc môi trường tương đương được sử dụng. Môi trường sinh sản cho virus có thể được bổ sung tối đa 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, tối đa 2% huyết thanh bò, tối đa 0,5% albumin huyết thanh bò, và tối đa 30 µg/ml gentamixin. Tối đa 5 g/l glucoza và tối đa 5 mmol/l L-glutamin có thể được bổ sung vào môi trường sinh trưởng và/hoặc môi trường cho virus sinh sản nếu cần để duy trì các tế bào này.

Virus chủng giống gốc cPCV1-2 được bổ sung vào hỗn dịch tế bào PK-15 và hấp phụ trong thời gian tới 3 giờ. Virus giống gốc được pha loãng trong môi trường sinh trưởng cơ bản để tạo ra mức bội nhiễm (MOI) nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2.

Đầu tiên, dịch nuôi cấy tế bào PK-15 được cấy chủng virus giống sản xuất ở thời điểm cấy tế bào, hoặc khi tế bào đạt tới mức độ nhập dòng khoảng 20% đến 50%. Bước cấy chuyển ban đầu này có thể được gọi là “phương pháp gây nhiễm một bước” để tạo ra nguồn kháng nguyên, hoặc có thể được sử dụng tiếp để cấy chuyển hàng loạt sản phẩm. Để cấy chuyển hàng loạt sản phẩm, tế bào PK-15 đã nhiễm cPCV1-2 được tiếp tục nhân lên tới lần cấy chuyển thứ 7 bằng cách chia tách hàng loạt sản phẩm ở tỷ lệ 1:5-20 để virus sinh sản. Môi trường nuôi cấy chứa hỗn dịch tế bào đã nhiễm virus từ lần cấy chuyển trước có thể dùng làm vật liệu giống cho lần cấy chuyển tiếp theo. Các tế bào nhiễm cPCV1-2 được ủ trong thời gian 3 đến 14 ngày đối với mỗi lần cấy chuyển ở nhiệt độ $36 \pm 2^\circ\text{C}$ khi tế bào đạt tới mức độ nhập dòng $\geq 90\%$. Virus cPCV1-2 gây ra các thay đổi bệnh lý tế bào quan sát được trong quá trình sao chép của virus. Khi thu hoạch, sự co tròn tế bào và mảnh tế bào nổi đáng kể được quan sát. Dịch nuôi cấy cũng được quan sát về dấu hiệu nhiễm vi khuẩn hoặc nấm. Thời gian ủ giữa các lần thu hoạch kháng nguyên cPCV được nêu trong Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Thời gian tối thiểu và tối đa để thu hoạch kháng nguyên cPCV

Phương pháp	Thời gian tối thiểu/tối đa	Khoảng nhiệt độ
Gây nhiễm một bước	5 đến 16 ngày	$36 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Cấy chuyển hàng loạt sản phẩm (MSV + 1 đến MSV + 4)	16 đến 36 ngày	$36 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Dịch nuôi cấy cPCV1-2 được thu hoạch vào các lọ vô trùng và được lấy mẫu để xác định mức độ nhiễm Mycoplasma bằng cách sử dụng phương pháp đã biết. Nhiều lần thu hoạch có thể được thực hiện từ bình quay, bình phản ứng sinh học và bình truyền dịch.

Trước khi bất hoạt virus cPCV1-2 thu hoạch được, một hoặc nhiều lô kháng nguyên có thể được cô (ví dụ, tới 60 lần) bằng cách siêu lọc. Dịch cô có thể được rửa bằng dung dịch muối cân bằng để làm giảm lượng protein huyết thanh.

Phương pháp bất hoạt, làm giảm độc lực, hoặc khử độc tính của virus cPCV1-2 sẽ được mô tả. Sau khi cô kháng nguyên cPCV, β -propiolacton (BPL) được bổ sung vào cPCV1-2 đã thu gom để thu được nồng độ khoảng 0,2% theo thể tích. Sau đó, virus đã thu gom này được khuấy trong thời gian tối thiểu 15 phút và sau đó dịch kháng nguyên để bất hoạt này được chuyển sang bình vô trùng thứ hai. Dịch kháng nguyên này được duy trì ở nhiệt độ $2 - 7^{\circ}\text{C}$ kết hợp khuấy liên tục trong thời gian tối thiểu 24 giờ. Sau thời gian tối thiểu 24 giờ, bổ sung 0,2% thể tích BPL lần hai vào hỗn dịch đã thu gom. Sau đó, hỗn dịch này được khuấy, chuyển sang bình thứ ba, và duy trì ở nhiệt độ $2 - 7^{\circ}\text{C}$, kết hợp khuấy liên tục trong thời gian không ít hơn 84 giờ. Nói chung, tổng thời gian bất hoạt không nhỏ hơn 108 giờ và không lớn hơn 120 giờ. Phương pháp bất hoạt này được nêu tóm tắt trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Phương pháp bất hoạt

Chất bất hoạt	Nồng độ cuối	Khoảng nhiệt độ	Thời gian, giờ (tối thiểu/tối đa)
β -propiolacton (BPL)	0,4% thể tích (2 lần bổ sung 0,2% thể tích)	$2 - 7^{\circ}\text{C}$ (kết hợp khuấy)	108 - 120

Quá trình bất hoạt được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch natri thiosulfat có nồng độ cuối không lớn hơn 0,1M. Độ pH của lô kháng nguyên đã bất hoạt này được điều chỉnh đến 6,8 bằng cách sử dụng NaOH hoặc HCl. Sau khi bất hoạt, mẫu đại diện được lấy từ hỗn hợp và thử nghiệm về mức độ bất hoạt hoàn toàn. Sản phẩm kháng nguyên cPCV1-2 đã bất hoạt được chuẩn hóa để đáp ứng mục tiêu lớn hơn RP 1,0 như

được xác định bằng phân tích ELISA về hiệu lực. Theo một phương án, chế phẩm cuối được điều chế bằng cách kết hợp virus cPCV1-2b đã bất hoạt với chất phụ trợ thích hợp và/hoặc chất mang được dụng khác.

Ví dụ 2: Phương pháp sản xuất protein vỏ capsit tái tổ hợp của biến chủng PCV2b

Quá trình sản xuất vacxin chứa kháng nguyên tiểu đơn vị là quá trình hai giai đoạn: trước hết, tạo ra kháng nguyên tiểu đơn vị ORF2 trong hệ biểu hiện baculovirus và sau đó, bào chế/sản xuất sản phẩm cuối. Đối với các bước đầu tiên này (thiết kế baculovirus tái tổ hợp và tạo kháng nguyên ORF2), phương pháp công nghệ cơ bản được sử dụng sẽ được mô tả. Hệ biểu hiện baculovirus được sử dụng để biểu hiện gen ORF2 từ biến chủng của PCV2b. Baculovirus tái tổ hợp chứa gen ORF2 của PCV2 được tạo ra như sau: ADN của virus được phân lập từ tế bào PK-15 đã nhiễm biến chủng của PCV2b được gọi ở đây là “PCV2B-DIV-MUT”. Gen ORF2 của biến chủng của PCV2b này được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR để chứa trình tự 5' Kozak (ccgccatg) và vị trí 3' *EcoR*I (gaattc), và được tạo dòng vào vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, Wis.). Tiếp đó, nó được cắt và tạo dòng con vào vector truyền pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.). Sau đó, plasmid pVL1392 chứa gen ORF2 của biến chủng PCV2b được đồng chuyển nhiễm bằng ADN của baculovirus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) vào tế bào côn trùng *Spodoptera frugiperda* (Sf+) (Protein Sciences, Meriden, Conn.) để tạo ra baculovirus tái tổ hợp chứa gen ORF2 của biến chủng của PCV2b. Baculovirus tái tổ hợp chứa gen ORF2 của biến chủng của PCV2b này được tinh chế vết tan và virus chủng giống gốc (Master Seed Virus: MSV) được nhân lên trên dòng tế bào Sf+, chia thành các phần phân ước, và bảo quản ở nhiệt độ -70°C. MSV được xác định dương tính là baculovirus chứa ORF2 của PCV2 theo phương pháp PCR-RFLP bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu baculovirus. Tế bào côn trùng được gây nhiễm baculovirus chứa ORF2 của PCV2 để tạo ra MSV hoặc chủng virus giống sản xuất biểu hiện kháng nguyên ORF2 của PCV2. Sự biểu hiện của gen ORF2 của PCV2B-DIV-MUT được khẳng định bằng thử nghiệm miễn dịch bằng cách sử dụng huyết thanh siêu miễn dịch được tạo ra chống lại PCV2B-DIV-MUT ở thỏ, hoặc kháng thể đơn dòng trong thử nghiệm phân tích kháng thể huỳnh quang gián tiếp. Theo cách khác, sự biểu hiện của gen ORF2 của PCV2B-DIV-MUT được khẳng định bằng thử nghiệm miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể được tạo ra chống lại PCV2a hoặc PCV2b cổ điển phản ứng chéo với biến

chủng của PCV2b. Ngoài ra, việc xác định baculovirus chứa ORF2 của biến chủng PCV2b được khẳng định bằng cách giải trình tự axit amin đầu N. MSV baculovirus chứa ORF2 của biến chủng PCV2b cũng được thử nghiệm về độ tinh khiết theo phương pháp 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28, và 113.55.

Vector virus tái tổ hợp chứa trình tự ADN của ORF2 của PCV2 có độ bội nhiễm (MOI) được ưu tiên nằm trong khoảng từ 0,03 đến 1,5, tốt hơn nữa là từ 0,05 đến 1,3, còn tốt hơn nữa là từ 0,09 đến 1,1, và tốt nhất là từ 0,1 đến 1,0, khi được sử dụng để gây nhiễm các tế bào nhạy cảm. Tốt hơn nếu phương pháp được mô tả ở đây bao gồm gây nhiễm $0,35-1,9 \times 10^6$ tế bào/ml, còn tốt hơn nữa là từ $0,4$ đến $1,8 \times 10^6$ tế bào/ml, còn tốt hơn nữa là từ $0,45$ đến $1,7 \times 10^6$ tế bào/ml, và tốt nhất là từ $0,5$ đến $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml bằng vector virus tái tổ hợp chứa trình tự ADN của ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF của PCV2 có MOI nằm trong khoảng từ 0,03 đến 1,5, tốt hơn nữa là từ 0,05 đến 1,3, còn tốt hơn nữa là từ 0,09 đến 1,1, và tốt nhất là từ 0,1 đến 1,0.

Sau đó, các tế bào đã nhiễm virus được ủ trong thời gian tối đa 10 ngày, tốt hơn nữa là từ 2 ngày đến 10 ngày, còn tốt hơn nữa là từ 4 ngày đến 9 ngày, và tốt nhất là từ 5 ngày đến 8 ngày. Điều kiện ủ được ưu tiên bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22 đến 32°C, tốt hơn nữa là từ 24 đến 30°C, còn tốt hơn nữa là từ 25 đến 29°C, còn tốt hơn nữa là từ 26 đến 28°C, và tốt nhất là khoảng 27°C. Tốt hơn nếu tế bào Sf+ được quan sát sự thay đổi đặc tính do baculovirus gây ra sau khi cấy. Việc quan sát này có thể bao gồm theo dõi xu hướng mật độ tế bào và sự giảm khả năng sống trong thời gian sau khi gây nhiễm. Hiệu giá virus cao nhất thường được quan sát 3-5 ngày sau khi nhiễm và mức độ giải phóng ORF2 cao nhất từ tế bào vào dịch nổi thường thu được giữa các ngày 5 và 8, và/hoặc khi khả năng sống của tế bào giảm tới dưới 10%.

Theo một phương án, bình quay dung tích 1000ml được cấy khoảng $1,0 \times 10^6$ tế bào Sf+/ml trong 300ml môi trường Excell 420. Sau đó, bình này được ủ ở nhiệt độ 27°C và khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút. Sau đó, bình này được cấy chủng virus giống PCV2b ORF2/Bac (baculovirus tái tổ hợp chứa gen ORF2 của biến chủng của PCV2b) có MOI bằng 0,1 sau khi ủ trong 24 giờ.

Sau đó, bình này được ủ ở nhiệt độ 27°C trong thời gian tổng cộng 6 ngày. Sau khi ủ, khối tế bào trong bình được ly tâm, và dịch nổi tạo ra được thu hoạch, vi lọc qua màng lọc có cỡ lỗ 0,45-1,0µm, và sau đó bất hoạt. Dịch nổi được bất hoạt bằng cách tăng nhiệt độ tới 37+/-2°C, và bổ sung 10mM etylenimin kép (BEI) vào dịch nổi này.

Sau đó, dịch nổi được khuấy liên tục trong 48 giờ. Dung dịch natri thiosulfat 1,0M để tạo ra nồng độ tối thiểu cuối bằng 5mM được bổ sung vào để trung hòa BEI còn lại bất kỳ. Lượng ORF2 trong dịch nổi đã trung hòa được xác định bằng cách sử dụng quy trình thử nghiệm ELISA như quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 của bằng sáng chế Mỹ số 7,700,285 cấp cho Eichmeyer và các đồng tác giả. Kháng thể phát hiện được sử dụng là kháng thể đơn dòng kháng protein vỏ capsit ORF2 của biến chủng PCV2b.

Sáng chế có thể tăng quy mô sản xuất ORF2 tái tổ hợp của biến chủng PCV2b từ quy mô nhỏ lên quy mô lớn.

Giai đoạn thứ hai của quá trình sản xuất vacxin là bào chế/sản xuất thành phẩm. Phương pháp trộn là dựa trên: a) lượng kháng nguyên cố định cho một liều, và b) lượng cố định của ít nhất một chất phụ trợ. Theo một phương án, dạng được phẩm của sản phẩm là tương đương với nhũ tương dầu trong nước. Để bào chế vacxin cuối, chất phụ trợ này được bổ sung vào phần kháng nguyên và khuấy cho đến khi thu được nhũ tương đồng nhất. Có bằng chứng về mức độ đồng nhất mỹ mãn. Để đảm bảo rằng mẻ vacxin sẽ có hiệu quả cần thiết, hiệu lực tương đối của nó được xác định bằng thử nghiệm *in vivo* đã được phê chuẩn. Dựa trên việc phân tích này, thử nghiệm về hiệu lực có thể phát hiện các mẻ có hiệu lực thấp hơn bình thường.

Ví dụ 3: Phương pháp tạo ra biến chủng virus PCV2b toàn phần được bất hoạt

Nguồn gây nhiễm là biến chủng virus PCV2b: PCV2B-DIV-MUT được sử dụng để gây nhiễm tế bào thận của lợn (PK) 15 sinh trưởng trong môi trường cần thiết tối thiểu (MEM), có bổ sung 0,05% sản phẩm thủy phân lactalbumin (LAH), 30 µg/ml gentamixin sulfat, và 5% huyết thanh bào thai bò. Tế bào PK-15 đã nhiễm PCV2B-DIV-MUT được nhân lên tiếp bằng cách cấy chuyển hàng loạt sản phẩm bốn lần nữa bằng cách sử dụng môi trường sinh trưởng giống hệt, chỉ khác là chứa 0,5-3% huyết thanh bào thai bò. Mẻ cấy chuyển thứ năm được làm đông lạnh, làm tan băng và lọc, và dịch tan thu được được sử dụng để điều chế giống tiền gốc và sau đó là giống gốc.

Môi trường được sử dụng để tạo ra virus giống là giống như môi trường được sử dụng để tạo ra virus gốc. Đối với môi trường sinh trưởng, MEM, OptiMEM, hoặc môi trường tương đương là môi trường cơ bản có thể được sử dụng để cấy dòng tế bào PK-15 để tế bào sinh trưởng. Môi trường sinh trưởng có thể được bổ sung tối đa 10% huyết thanh bò, tối đa 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, tối đa 0,5% albumin huyết thanh bò, và tối đa 30 µg/ml gentamixin. Để làm môi trường cho virus sinh sản, MEM,

OptiMEM, hoặc môi trường tương đương được sử dụng. Môi trường cho virus sinh sản có thể được bổ sung tối đa 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, tối đa 2% huyết thanh bò, tối đa 0,5% albumin huyết thanh bò, và tối đa 30 µg/ml gentamixin. Tối đa 5 g/l glucoza và tối đa 5 mmol/l L-glutamin có thể được bổ sung vào môi trường sinh trưởng và/hoặc môi trường để virus sinh sản, nếu cần, để duy trì các tế bào này.

Chủng virus giống gốc PCV2B-DIV-MUT được bổ sung vào hỗn dịch tế bào PK-15 và hấp phụ trong thời gian tới 3 giờ. Virus giống gốc được pha loãng trong môi trường sinh trưởng cơ bản để tạo ra độ bội nhiễm (MOI) nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2.

Đầu tiên, dịch nuôi cấy tế bào PK-15 được cấy chủng virus giống sản xuất ở thời điểm cấy tế bào, hoặc khi tế bào đạt tới mức độ nhập dòng nằm trong khoảng từ 20% đến 50%. Bước cấy chuyển đầu tiên này có thể được gọi là “Phương pháp gây nhiễm một bước” để tạo ra nguồn kháng nguyên, hoặc có thể được sử dụng tiếp để cấy chuyển hàng loạt sản phẩm. Để cấy chuyển hàng loạt sản phẩm, tế bào PK-15 đã nhiễm PCV2B-DIV-MUT được tiếp tục nhân lên tới lần cấy chuyển thứ 7 bằng cách chia tách hàng loạt sản phẩm ở tỷ lệ 1:5-20 để virus sinh sản. Môi trường nuôi cấy chứa hỗn dịch tế bào đã nhiễm virus từ lần cấy chuyển trước có thể dùng làm vật liệu giống cho lần cấy chuyển tiếp theo. Tế bào nhiễm PCV2B-DIV-MUT được ủ trong 3 đến 14 ngày đối với mỗi lần cấy chuyển ở nhiệt độ $36 \pm 2^\circ\text{C}$ khi tế bào đạt tới mức độ nhập dòng $\geq 90\%$. Virus PCV2B-DIV-MUT có thể gây ra các thay đổi bệnh lý tế bào quan sát được trong quá trình sao chép virus. Khi thu hoạch, sự co tròn tế bào và mảnh tế bào nổi đáng kể được quan sát. Dịch nuôi cấy cũng được quan sát về dấu hiệu nhiễm vi khuẩn hoặc nấm. Thời gian ủ giữa các lần thu hoạch kháng nguyên PCV2B-DIV-MUT là giống như nêu trong bảng 1 trên đây.

Dịch nuôi cấy PCV2B-DIV-MUT được thu hoạch vào các bình vô trùng, và được lấy mẫu để xác định mức độ nhiễm Mycoplasma bằng cách sử dụng phương pháp đã biết. Nhiều mẻ thu hoạch có thể thu được từ bình quay, bình phản ứng sinh học và bình truyền dịch.

Trước khi bất hoạt virus PCV2B-DIV-MUT thu hoạch được, một hoặc nhiều lô kháng nguyên có thể được cô (ví dụ, tối đa 60 lần) bằng cách siêu lọc. Dịch cô có thể được rửa bằng dung dịch muối cân bằng để làm giảm lượng protein huyết thanh.

Phương pháp bất hoạt, làm giảm độc lực, hoặc khử độc tính của virus PCV2B-DIV-MUT là giống như được mô tả trong Ví dụ 1 và bảng 2 trên đây. Quá trình bất hoạt được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch natri thiosulfat ở nồng độ cuối không lớn hơn 0,1M. Độ pH của lô kháng nguyên đã bất hoạt này được điều chỉnh đến 6,8 bằng cách sử dụng NaOH hoặc HCl. Sau khi bất hoạt, mẫu đại diện được lấy từ hỗn hợp thu được và thử nghiệm về mức độ bất hoạt hoàn toàn. Kháng nguyên PCV2B-DIV-MUT đã bất hoạt được chuẩn hóa để đáp ứng mục tiêu hiệu lực tương đối RP lớn hơn 1,0 như được xác định bằng phương pháp phân tích ELISA về hiệu lực. Theo một phương án, chế phẩm cuối được điều chế bằng cách kết hợp virus PCV2B-DIV-MUT đã bất hoạt với chất phụ trợ thích hợp và/hoặc chất mang được dụng khác.

Ví dụ 4: Nghiên cứu bằng chứng về nguyên lý tác dụng của PCV2b

Mục đích của thử nghiệm là đánh giá vaccine ứng viên chứa biến chủng PCV2b về tác dụng bảo vệ cùng chủng và khác chủng. Thiết kế thử nghiệm được nêu trong bảng 3. Sản phẩm thú y nghiên cứu (Investigational Veterinary Product: IVP) T04, T08 và T12 bao gồm biến chủng virus PCV2b đã chết được bổ sung 10% dầu SP. Sản phẩm thú y nghiên cứu T02, T06 và T10 bao gồm virus PCV1:2a thể khả đã chết được bổ sung 10% dầu SP. Sản phẩm thú y nghiên cứu T03, T07 và T11 bao gồm virus PCV1:2b thể khả đã chết được bổ sung 10% dầu SP.

Bảng 3. Thiết kế thử nghiệm bằng chứng nguyên lý

Nhóm	N	Sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP)	Lần chủng ngừa	Thử thách			Mổ xác
				Ngày	Chủng	Liều, đường dùng	
T01	10	Thuốc vờ	Ngày 0 (khoảng 3 tuần tuổi) 2ml tiêm trong cơ bên phải của cổ	Ngày 21 (khoảng 6 tuần tuổi)	PCV2b	1ml/ IM 2ml/ IN	Mổ xác (khoảng 9 tuần tuổi) và thu thập mô
T02	10	PCV1:PCV2a thể khảm					
T03	10	PCV1:PCV2b thể khảm					
T04	10	biến chủng PCV2b đã chết					
T05	10	Thuốc vờ			PCV2a		
T06	10	PCV1:PCV2a thể khảm					
T07	10	PCV1:PCV2b thể khảm					
T08	10	biến chủng					

		PCV2b đã chết					
T09	10	Thuốc vờ					
T10	10	PCV1:PCV2a thể khảm					
T11	10	PCV1:PCV2b thể khảm					
T12	10	biến chủng PCV2b đã chết			biến chủng PCV2b		

Lợn được 3 đến 4 tuần tuổi vào ngày 0 để chủng ngừa. Liều duy nhất 2ml của vacxin đã định được sử dụng trong cơ (IM) vào bên phải của cổ. Bơm tiêm vô trùng dung tích 3ml có kim chiều dài 1 inơ (2,54cm) hoặc $\frac{3}{4}$ inơ được sử dụng cho mỗi con lợn. Thông tin chủng ngừa chi tiết được ghi lại. Sau mỗi lần chủng ngừa, lợn được quan sát các dấu hiệu lâm sàng bất thường trong thời gian 1 giờ (± 30 phút), bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chứng ngủ lịm, thở khó nhọc, nôn, và mất phối hợp. Dấu hiệu lâm sàng bất kỳ quan sát được ghi trên phiếu theo dõi tình trạng sức khỏe. Bác sỹ thú y được thông báo theo dõi hai con lợn có dấu hiệu thể trạng kém và suy giảm sức khỏe. Các con lợn này được chết êm ái.

Thử thách được thực hiện vào ngày 21, khi lợn được 6-7 tuần tuổi. Mỗi con lợn được cấy tổng cộng 3ml chủng virus thử thách tương ứng, đã pha loãng trước tới nồng độ 4,8-5,8 log₁₀ TCID₅₀/ml, với 1ml được sử dụng trong mũi (intranasally: IN) vào mỗi lỗ mũi, và 1ml được sử dụng trong cơ (intramuscularly: IM). Mẫu phân ước dự trữ của virus thử thách được chuẩn độ sau khi thử thách để khẳng định liều thử thách thực tế.

Các mẫu máu riêng rẽ (5-10ml) được lấy vào các ống tách huyết thanh (serum separator tube: SST) vào ngày -1 (trước khi chủng ngừa), và các ngày 7, 14, 20/21, 28, 35, và 42. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ $\leq -65^{\circ}\text{C}$, và sau đó được kiểm tra hiệu giá kháng thể PCV2 bằng thử nghiệm ELISA, và lượng virus PCV2 trong máu bằng phương pháp qPCR.

Các que lấy mẫu phân riêng rẽ cũng được lấy từ mỗi con lợn trước khi thử thách (ngày 20/21), và hàng tuần sau khi thử thách. Các que polyeste vô trùng riêng rẽ được sử dụng để lấy mẫu phân, và cho vào ống chứa 3ml môi trường PBS vô trùng. Các que lấy mẫu phân được xoay tròn trong 5 giây trong môi trường này trước khi bỏ đi. Các

mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ $\leq -65^{\circ}\text{C}$. Các mẫu này được xác định mức độ thải virus bằng quy trình PCR định lượng chuẩn.

Trong quá trình mổ xác, các mẫu khí-phế quản, mạc treo và hạch bạch huyết bẹn nông, và mô amidan cũng được thu thập theo hai bộ mẫu đối với mỗi con lợn, được xác định riêng, và được cố định trong dung dịch đệm formalin 10%. Một bộ mẫu được lưu trữ, trong khi bộ còn lại được gửi đi xét nghiệm mô bệnh học chuẩn về sự tiêu bạch huyết (PCVAD), và thay thế mô bào. Kết luận được ghi là có (+) hoặc không (-). Lợn được cho là có sự tiêu bạch huyết hoặc thay thế mô bào nếu một hoặc nhiều mô được ghi là “+”. Ngoài ra, mô này cũng được xét nghiệm kháng nguyên PCV2 bằng IHC. Kết quả được ghi là 0 (không nhuộm) và 1-3 (mức độ nhuộm khác nhau). Điểm số bằng 0 được cho là IHC (-) với PCV2 và điểm số bằng 1 hoặc cao hơn được cho là IHC (+) với PCV2. Lợn được cho là IHC (+) nếu một hoặc nhiều mô là IHC (+).

Kết quả ban đầu cho thấy tác dụng bảo vệ cùng chủng và khác chủng của vaccin ứng viên so với thuốc vờ. Biến số sơ cấp là tình trạng virus huyết, và biến số thứ cấp là sự thải virus qua phân và tổn thương mô bệnh học.

Kết quả cho thấy rằng lợn vẫn âm tính về tình trạng virus HCV2 huyết và sự thải virus qua phân trước khi thử thách như nêu trong các bảng 4 và 5. Tuy nhiên, trong quá trình thử nghiệm, tất cả các con lợn trong tất cả các nhóm điều trị trở nên dương tính đối với PVC2 ở thời điểm nào đó, như được đánh giá bằng phân tích PCR định lượng đối với lượng virus PCV2 trong máu (bảng 4) và mức độ thải virus PCV2 qua phân (bảng 5).

Bảng 4. Lượng virus PCV2 trong máu

Nhóm thử nghiệm	Thử thách	Thời điểm (số bản sao ADN trung bình nhân bình phương nhỏ nhất)						
		Trước khi thử thách				Sau khi thử thách		
		Ngày -2	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 42
T01	PCV2b	0	0	0	0	30421	280798	5184
T02	PCV2b	0	0	0	0	1866	22	2
T03	PCV2b	0	0	0	0	3870	238	10
T04	PCV2b	0	0	0	0	615	66	6
T05	PCV2a	0	0	0	0	10927	22982	1906
T06	PCV2a	0	0	0	0	43	2	2
T07	PCV2a	0	0	0	0	25991	211465	189
T08	PCV2a	0	0	0	0	309	20	6

T09	biến chủng PCV2b	0	0	0	0	413	384933	50683
T10	biến chủng PCV2b	0	0	0	0	7	314	65
T11	biến chủng PCV2b	0	0	0	0	406	427073	40711
T12	biến chủng PCV2b	0	0	0	0	189	3315	9

Bảng 5. Mức độ thải virus PCV2 qua phân

Nhóm thử nghiệm	Thử thách	Thời điểm (số bản sao ADN trung bình bình phương nhỏ nhất)			
		Trước khi thử thách		Sau khi thử thách	
		Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 42
T01	PCV2b	0	257	24822	106798
T02	PCV2b	0	7	7	0
T03	PCV2b	0	450	140	111
T04	PCV2b	0	43	288	16
T05	PCV2a	0	184	4130	23485
T06	PCV2a	0	0	16	2
T07	PCV2a	0	866	10072	6477
T08	PCV2a	0	387	73	20
T09	biến chủng PCV2b	0	1007	199324	89204
T10	biến chủng PCV2b	0	881	1880	65
T11	biến chủng PCV2b	0	58519	480005	219127
T12	biến chủng PCV2b	0	65	541	541

Hiệu giá trước khi thử thách như được xác định bằng thử nghiệm ELISA đối với PCV2 cho thấy rằng hiệu giá trung bình bình phương nhỏ nhất của tất cả các nhóm điều trị là âm tính với kháng thể PCV2 (bảng 6). Hiệu giá kháng thể PCV2 theo thử nghiệm ELISA >0,5 được cho là dương tính với kháng thể PCV2.

Bảng 6. Thử nghiệm ELISA đối với PCV2

Nhóm thử nghiệm	Thử thách	Ngày -2	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 42
T01	PCV2b	0,1673	0,2741	0,1245	0,0241	0,0223	0,0995	0,3663
T02	PCV2b	0,1828	0,2934	0,1640	0,0644	0,3926	0,6212	0,5712
T03	PCV2b	0,1628	0,2783	0,1700	0,0183	0,0434	0,1833	0,2481
T04	PCV2b	0,1673	0,2593	0,1088	0,0278	0,1635	0,3956	0,3491
T05	PCV2a	0,2316	0,4322	0,2580	0,0320	0,0256	0,2396	0,3511
T06	PCV2a	0,1970	0,3726	0,2357	0,0887	0,4316	0,5458	0,4569
T07	PCV2a	0,2582	0,3787	0,2079	0,0399	0,0914	0,3066	0,4831
T08	PCV2a	0,1940	0,3437	0,2012	0,0357	0,2637	0,4717	0,4526
T09	biến chủng PCV2b	0,1334	0,2283	0,1603	0,0070	0,0102	0,0989	0,2374

Nhóm thử nghiệm	Thử thách	Ngày -2	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 42
T10	biến chủng PCV2b	0,1593	0,2071	0,1400	0,0518	0,4015	0,6827	0,6433
T11	biến chủng PCV2b	0,1752	0,2484	0,1340	0,0252	0,0807	0,2255	0,3105
T12	biến chủng PCV2b	0,1652	0,3035	0,1669	0,0270	0,2632	0,4868	0,4604

Việc chủng ngừa bằng vaccin thử nghiệm chứa PCV2b biến đổi (nhóm T04, T08, và T12) làm giảm lượng virus PCV2 trong máu (bảng 4) và mức độ thải virus qua phân (bảng 5). Việc chủng ngừa này cũng dẫn tới làm giảm tổn thương mô bệnh học ở hầu hết các thời điểm so với thuốc vờ, như được chứng minh bằng điểm số hóa mô miễn dịch (immunohistochemistry: IHC) (bảng 7), và điểm số tiêu bạch huyết (bảng 8). Sau khi thử thách, phản ứng miễn dịch nhớ lại trung bình thể hiện ở hiệu giá kháng thể PCV2 theo thử nghiệm ELISA được quan sát trong tất cả các nhóm thử thách (bảng 6), có thể gợi ý rằng liều kháng nguyên vaccin cần được tối ưu hơn nữa. Mặc dù so sánh thống kê không được thực hiện trong thử nghiệm này, rõ ràng là việc chủng ngừa bằng vaccin biến chủng PCV2b có tác dụng bảo vệ đối với các chủng virus thử thách PCV2a, PCV2b, và biến chủng PCV2b.

Để đánh giá hiệu quả của vaccin PCV2, tình trạng virus huyết và sự tiêu bạch huyết được coi là các thông số đánh giá chủ yếu. Trong thử nghiệm này, điều quan trọng là cần lưu ý rằng vaccin biến chủng PCV2b có tác dụng bảo vệ chống lại sự thử thách bằng biến chủng PCV2b tốt hơn nhiều so với vaccin PCV2a hoặc PCV2b.

Bảng 7. Điểm số hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry: IHC)

Nhóm thử nghiệm	Thử thách	Đã từng bất thường?				Tổng số lần quan sát
		không		có		
		#	%	#	%	#
T01	PCV2b	2	22,2	7	77,8	9
T02	PCV2b	6	66,7	3	33,3	9
T03	PCV2b	4	50,0	4	50,0	8
T04	PCV2b	8	80,0	2	20,0	10
T05	PCV2a	3	30,0	7	70,0	10
T06	PCV2a	6	60,0	4	40,0	10
T07	PCV2a	4	44,4	5	55,6	9
T08	PCV2a	7	70,0	3	30,0	10
T09	biến chủng PCV2b	4	40,0	6	60,0	10
T10	biến chủng PCV2b	9	100,0	0	0,0	9
T11	biến chủng PCV2b	2	22,2	7	77,8	9
T12	biến chủng PCV2b	7	77,8	2	22,2	9

Bảng 8. Điểm số tiêu bạch huyết

Nhóm nghiệm	thử	Thử thách	Đã từng bất thường?				Tổng số lần quan sát
			không		có		
			#	%	#	%	#
T01		PCV2b	3	33,3	6	66,7	9
T02		PCV2b	7	77,82	2	22,2	9
T03		PCV2b	7	87,5	1	12,5	8
T04		PCV2b	8	80,0	2	20,0	10
T05		PCV2a	4	40,0	6	60,0	10
T06		PCV2a	10	100,0	0	0	10
T07		PCV2a	6	66,7	3	33,3	9
T08		PCV2a	7	70,0	3	30,0	9
T09		biến chủng PCV2b	5	50,0	5	50,0	10
T10		biến chủng PCV2b	7	77,8	2	22,2	9
T11		biến chủng PCV2b	5	55,6	4	44,4	9
T12		biến chủng PCV2b	8	88,9	1	11,1	9

Ví dụ 5: Thử nghiệm tối ưu hóa mô hình thử thách bằng PCV2b

Mục đích của thử nghiệm này là đánh giá chuẩn độ virus thử thách PCV2b và đường dùng. Ngoài ra, việc đánh giá sơ bộ về chế phẩm thử thách mới chứa biến chủng PCV2b được thực hiện cùng với các mô hình thử thách bằng PCV2a và PCV2b đã được phê chuẩn hiện nay. Nguyên tắc chung của thiết kế thử nghiệm được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9. Thiết kế thử nghiệm tối ưu hóa mô hình thử thách bằng PCV2b

Nhóm	N	Thử thách			Mô xác
		Chủng	Chuẩn độ	Liều, đường dùng	
T01	12	PCV2b	4,7 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	Mô xác (khoảng 9 tuần tuổi) và thu thập mô
T02	12		5,4 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	
T03	12		6,1 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	
T04	12		5,4 log/3ml	3ml/ IN	
T05	12	PCV2a	4,45 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	
T06	12		5,15 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	
T07	12		5,85 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	
T08	12		5,15 log/3ml	3ml/ IN	
T09	12	biến chủng	4,38 log/3ml	1ml/ IM	

		PCV2b		2ml/ IN	
T10	12		5,08 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	
T11	12		5,78 log/3ml	1ml/ IM 2ml/ IN	
T12	12		5,08 log/3ml	3ml/ IN	

Lợn giống lai khoảng 6 tuần tuổi vào ngày 0, có mức kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh từ thấp đến âm tính, và không chứa virus PCV2 trong máu, được thả vào các chuồng/phòng đã định trong thiết bị BSL-2 có các khoảng không riêng biệt. Có 4 chuồng trong mỗi phòng trong số 3 phòng, với 12 con lợn mỗi chuồng. Lợn được nhốt trong các chuồng đã định trong quá trình thử nghiệm. Lợn được tùy ý uống nước và ăn khẩu phần đầy đủ thích hợp với tuổi và không chứa thuốc trong quá trình thử nghiệm. Tất cả các con lợn được để thích nghi trong thời gian tối thiểu 3 ngày.

Thử thách được thực hiện vào ngày 0, khi lợn được 6 tuần tuổi. Mỗi con lợn được cấy tổng cộng 3ml virus thử thách tương ứng đã pha loãng trước tới 4,0-6,0 +/- 0,5 log₁₀ TCID₅₀ /ml, trong đó 2ml được sử dụng trong mũi (IN) vào mỗi lỗ mũi và 1ml được sử dụng trong cơ (IM), hoặc 3ml được sử dụng trong mũi, tùy thuộc vào nhóm điều trị. Mẫu phân ước dự trữ của virus thử thách được chuẩn độ sau khi thử thách để khẳng định liều thử thách thực tế.

Các mẫu máu riêng rẽ (5-10ml) được lấy và các ống tách huyết thanh (SST) vào ngày -21, ngày -1 (trước khi chủng ngừa), và các ngày 7, 14, và 21. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ ≤ -65°C. Huyết thanh của các ngày -21, -1, 7, 14 và 21 được xác định hiệu giá kháng thể PCV2 bằng phân tích ELISA, và xác định lượng virus PCV2 trong máu bằng phương pháp qPCR.

Các que lấy mẫu phân riêng rẽ được lấy từ mỗi con lợn trước khi thử thách (ngày -1), và hàng tuần sau khi thử thách. Các que polyeste vô trùng riêng rẽ được sử dụng để lấy mẫu phân, và cho vào ống chứa 3ml môi trường PBS vô trùng. Các que lấy mẫu phân được xoay tròn trong 5 giây trong môi trường này trước khi bỏ đi. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ ≤ -65°C. Các mẫu này được thử nghiệm mức độ thải virus bằng quy trình PCR định lượng chuẩn.

Trong quá trình mổ xác, các mẫu khí-phế quản, mạc treo và hạch bạch huyết bẹn nông, và mô amidan được thu thập theo hai bộ mẫu đối với mỗi con lợn, được xác định

riêng và cố định trong dung dịch đệm formalin 10%. Một bộ mẫu được gửi đi xét nghiệm mô bệnh học chuẩn về sự tiêu bạch huyết (PCVAD), và thay thế mô bào. Kết luận được ghi là có (+) hoặc không (-). Lợn được cho là có sự tiêu bạch huyết hoặc thay thế mô bào nếu một hoặc nhiều mô được ghi là "+". Ngoài ra, mô này cũng được xét nghiệm kháng nguyên PCV2 bằng IHC. Kết quả được ghi là 0 (không nhuộm) và 1-3 (mức độ nhuộm khác nhau). Điểm số bằng 0 được cho là IHC (-) với PCV2 và điểm số bằng 1 hoặc cao hơn được cho là IHC (+) với PCV2. Lợn được cho là IHC (+) nếu một hoặc nhiều mô là IHC (+).

Do sự phức tạp trên thực tế của việc nghiên cứu dịch tễ học PCV và độ nhạy của phương pháp phân tích qPCR đối với PCV2, một số con lợn có thể có tình trạng virus huyết trước khi thử thách. Các con lợn thử nghiệm có tình trạng virus huyết trước khi thử thách có thể bị loại khỏi thử nghiệm, và có thể được loại ra khi phân tích dữ liệu dựa trên sự thận trọng của nhà tài trợ thử nghiệm lâm sàng.

Kết quả chính là thể phân lập biến chủng PCV2b được thử nghiệm so với các mô hình thử thách bằng PCV2a và PCV2b đã được phê chuẩn.

Kết quả

Lợn được thử thách bằng thể phân lập biến chủng PCV2b có sự tăng hiệu giá kháng thể từ trước khi thử thách đến khi kết thúc thử nghiệm trong các nhóm được chủng ngừa. Nhóm được thử thách bằng chế phẩm không pha loãng, sau đó là nhóm T12 (được pha loãng theo tỷ lệ 1:5, sử dụng qua đường trong mũi) có mức virus huyết cao nhất vào thời điểm 14 ngày sau khi thử thách, với số bản sao ADN/ml lần lượt là trên 4 triệu và 1 triệu. Mức giải phóng PCV2 cao nhất khi sử dụng virus thử thách không pha loãng là 754114 bản sao ADN/ml. Việc chỉ sử dụng virus thử thách không pha loãng qua đường IM/IN và sử dụng virus thử thách pha loãng theo tỷ lệ 1:5 qua đường IN dẫn tới số lượng cao nhất của lợn dương tính với các bất thường mô bệnh lý và sự khu trú PCV2.

Dựa trên các dữ liệu thu được từ thử nghiệm tối ưu hóa thử thách bằng PCV2b này (dữ liệu không được thể hiện), đường và liều thử thách được thay đổi thành liều 3ml sử dụng qua đường trong mũi. Sự thay đổi đường và liều thử thách này được cho là làm giảm khả năng xảy ra biến cố có hại được cho là do việc sử dụng trong cơ gây ra và tăng tổng lượng virus thử thách.

Ví dụ 6: Đánh giá hai vaccin ứng viên chống lại PCV2b khi thử thách

Mục đích của thử nghiệm là đánh giá tác dụng bảo vệ của vaccin PCV2b thể khảm và vaccin biến chủng PCV2b, mỗi vaccin này được sử dụng ở liều kháng nguyên thấp và cao chống lại thử thách bằng PCV2b. Thiết kế thử nghiệm được nêu trong bảng 10. Thuốc vờ (T01) là dầu SP 10%. IVP là như sau: T02, killed vaccin liều thấp chứa virut thể khảm đã chết có vỏ capsit PCV1:PCV2b (cPCV2b thấp), được bổ sung 10% dầu SP; T03, vaccin liều cao chứa virut thể khảm đã chết có vỏ capsit PCV1:PCV2b (cPCV2b cao), được bổ sung 10% dầu SP; T04, vaccin liều thấp chứa biến chủng PCV2b đã chết (PCV2b DIV thấp), được bổ sung 10% dầu SP; T05, vaccin liều cao chứa biến chủng PCV2b đã chết (PCV2b DIV cao), được bổ sung 10% dầu SP. Các vaccin này được điều chế bằng cách sử dụng kháng nguyên cô đặc 20x và điều chế vaccin ở liều kháng nguyên 0,69% = liều thấp hoặc liều kháng nguyên 3,00% = liều cao.

Bảng 10. Thiết kế thử nghiệm

Nhóm	N	Sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP)	Chủng ngừa	Thử thách			Mổ xác
				Ngày	Chủng	Liều, đường chủng ngừa	
T01	12	Thuốc vờ	Ngày 0 (khoảng 3 tuần tuổi) 2ml IM Bên phải của cổ	ngày 21 (khoảng 6 tuần tuổi)	PCV2b	3ml IN	ngày 42 (khoảng 9 tuần tuổi) và thu thập mô
T02	12	vaccin virut thể khảm PCV1:PCV2b đã chết, có tá dược (liều thấp)					
T03	12	vaccin virut thể khảm PCV1:PCV2b đã chết, có tá dược (liều cao)					
T04	12	vaccin biến chủng virut PCV2b đã chết, có tá dược (liều thấp)					
T05	12	vaccin biến chủng virut					

		PCV2b đã chết, có tá được (liều cao)					
--	--	---	--	--	--	--	--

Lợn được khoảng 3 tuần tuổi (21 ± 7 ngày tuổi) vào ngày 0 để chủng ngừa. Lợn được sử dụng liều duy nhất 2ml vaccin đã định trong cơ (IM) vào bên phải của cổ. Một bơm tiêm vô trùng dung tích 3ml có kim dài 1 inơ (2,54cm) hoặc $\frac{3}{4}$ inơ được sử dụng cho mỗi con lợn. Thông tin chủng ngừa chi tiết được ghi lại. Lợn được quan sát trong thời gian 1 giờ (± 30 phút) sau mỗi lần chủng ngừa về các dấu hiệu lâm sàng bất thường, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chứng ngủ lịm, thở khó nhọc, nôn, và mất phối hợp. Dấu hiệu lâm sàng bất kỳ quan sát được được ghi trên phiếu theo dõi tình trạng sức khỏe. Bác sỹ thú y được thông báo theo dõi các con lợn có dấu hiệu bất kỳ được mô tả ở trên.

Thử thách được thực hiện vào ngày 21 khi lợn được khoảng 6 tuần tuổi. Mỗi con lợn được cấy tổng cộng 3ml dịch nuôi cấy chứa chủng PCV2b có độc tính, được pha loãng trước tới $4,8-5,8 \log_{10}$ TCID₅₀ /ml qua đường trong mũi (IN). Mẫu phân ước được dự trữ của virus thử thách được chuẩn độ sau khi thử thách để khẳng định liều thử thách thực tế.

Các mẫu máu riêng rẽ (5-10ml) được lấy vào các ống tách huyết thanh (SST) vào ngày -1 (trước khi chủng ngừa), và các ngày 7, 14, 20/21, 28, 35, và 42. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ $\leq -65^{\circ}\text{C}$. Sau đó, các mẫu này được kiểm tra hiệu giá kháng thể PCV2 bằng phương pháp ELISA và xác định lượng virus PCV2 trong máu bằng phương pháp qPCR.

Các que lấy mẫu phân riêng rẽ được lấy từ mỗi con lợn trước khi thử thách (ngày 20/21) và hàng tuần sau khi thử thách. Các que polyester vô trùng riêng rẽ được sử dụng để lấy mẫu phân và cho vào ống chứa 3ml môi trường PBS vô trùng. Các que lấy mẫu phân được xoay tròn trong 5 giây trong môi trường này trước khi bỏ đi. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ $\leq -65^{\circ}\text{C}$. Các mẫu này được thử nghiệm mức độ thải virus bằng quy trình PCR định lượng chuẩn.

Trong quá trình mổ xác, các mẫu khí-phế quản, mạc treo và hạch bạch huyết bẹn nông, và mô amidan được thu thập theo hai bộ mẫu đối với mỗi con lợn, được xác định riêng và được cố định trong dung dịch đệm formalin 10%. Một bộ mẫu được lưu trữ, trong khi bộ còn lại được gửi đi xét nghiệm mô bệnh học chuẩn về sự tiêu bạch huyết

(PCVAD), và thay thế mô bào. Kết luận được ghi là có (+) hoặc không (-). Lợn được cho là có sự tiêu bạch huyết hoặc thay thế mô bào nếu một hoặc nhiều mô được ghi là Ngoài ra, mô này cũng được xét nghiệm kháng nguyên PCV2 bằng IHC. Kết quả được ghi là 0 (không nhuộm) và 1-3 (mức độ nhuộm khác nhau). Điểm số bằng 0 được cho là PCV2 IHC (-), và điểm số bằng 1 hoặc cao hơn được cho là PCV2 IHC (+). Lợn được cho là IHC (+) nếu một hoặc nhiều mô có IHC (+).

Kết quả ban đầu là một trong bốn vacxin ứng viên có tác dụng bảo vệ chống lại sự thử thách bằng PCV2b so với thuốc vờ. Biến số sơ cấp là tình trạng virus huyết, và biến số thứ cấp là mức độ thải virus qua phân và tổn thương mô bệnh học.

Kết quả

Tình trạng virus PCV2 huyết

Huyết thanh được lấy mẫu hàng tuần và được phân tích lượng virus PCV2 trong máu bằng phương pháp PCR định lượng. Giá trị trung bình bình phương nhỏ nhất của mỗi ngày thử nghiệm được thể hiện trên Fig.2. Tất cả các con lợn đều âm tính về lượng virus PCV2 trong máu trước khi thử thách, như được thể hiện trong bảng 11 dưới đây.

Bảng 11. Lượng virus PCV2 trong máu (số bản sao ADN) được xác định bằng phương pháp qPCR theo ngày thử nghiệm

Nhóm thử nghiệm	Loại	Thời điểm (số bản sao ADN trung bình bình phương nhỏ nhất)						
		Trước khi thử thách				Sau khi thử thách		
		Ngày -1	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 44
T01	Thuốc vờ	0	0	0	0	30	132010,6	24113,9
T02	cPCV2b thấp	0	0	0	0	3,8	0	0
T03	cPCV2b cao	0	0	0	0	1,2	4,5	0
T04	PCV2b DIV thấp	0	0	0	0	29,9	12,1	1,4
T05	PCV2b DIV cao	0	0	0	0	1,2	0	0

Lượng virus PCV2 trong máu (số bản sao ADN) của các nhóm được chủng ngừa và thử thách do chủng ngừa và thử thách được thể hiện trong bảng 12 dưới đây. Tất cả các nhóm được chủng ngừa đều khác đáng kể so với nhóm T01 sau khi thử thách vào các ngày 35 và 44 ($P < 0,0001$).

Tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính trong quá trình thử nghiệm được nêu dưới đây (bảng 12). Nhóm sử dụng thuốc vờ có số lợn đã từng dương tính cao hơn đáng

kể so với các nhóm được chủng ngừa ($P < 0,0124$).

Bảng 12. qPCR định lượng xác định tình trạng virus huyết - tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính

Loại	Đã từng dương tính?				Tổng số lần quan sát	Giá trị p
	Dương tính		Âm tính			
	#	%	#	%	Số lần	
Thuốc vờ	11	100,0	0	0	11	
cPCV2b thấp	2	16,7	10	83,3	12	0,0001
cPCV2b cao	2	16,7	10	83,3	12	0,0001
PCV2b DIV thấp	5	45,5	6	54,5	11	0,0124
PCV2b DIV cao	1	8,3	11	91,7	12	0,0001

Mức độ thải virus PCV2 qua phân

Mức độ thải virus qua phân trung bình bình phương nhỏ nhất theo ngày thử nghiệm được thể hiện trên Fig.3. Mức độ thải virus PCV2 qua phân (số bản sao ADN) do chủng ngừa và thử thách được thể hiện trong bảng 13 dưới đây. Tất cả các nhóm được chủng ngừa đều khác đáng kể so với nhóm T01 sau khi thử thách vào các ngày 35 và 44 ($P < 0,0001$).

Bảng 13. Mức độ thải virus PCV2 qua phân (số bản sao ADN) được xác định bằng phương pháp qPCR

Nhóm thử nghiệm	Loại	Thời điểm (số bản sao ADN trung bình bình phương nhỏ nhất)			
		Trước khi thử thách	Sau khi thử thách		
		Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 44
T01	Thuốc vờ	0	29,9	65713,8	19996,2
T02	cPCV2b thấp	0	3,8	3,8	0
T03	cPCV2b cao	0	1,2	1,3	0
T04	PCV2b DIV thấp	0	29,9	12,1	1,4
T05	PCV2b DIV cao	0	1,2	9,6	0

Tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính về sự thải virus qua phân trong quá trình thử nghiệm được nêu dưới đây (bảng 14). Nhóm sử dụng thuốc vờ có số lợn đã từng

thải virus qua phân cao hơn đáng kể so với các nhóm được chủng ngừa ($P < 0,0124$).

Bảng 14. Kết quả phân tích qPCR định lượng xác định mức độ thải virus qua phân - tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính

Loại	Đã từng dương tính?				Tổng số lần quan sát	Giá trị p
	Dương tính		Âm tính			
	#	%	#	%	Số lần	
Thuốc vờ	11	100,0	0	0	11	
cPCV2b thấp	3	25,0	9	75,0	12	0,0003
cPCV2b cao	1	8,3	11	91,7	12	≤0,0001
PCV2b DIV thấp	5	45,5	6	54,5	11	0,0124
PCV2b DIV cao	4	33,3	8	66,7	12	0,0013

Phản ứng kháng thể trong huyết thanh

Hiệu giá kháng thể PCV2 trung bình của mỗi thử nghiệm theo ngày thử nghiệm được thể hiện trên Fig.4. Tất cả các con lợn đều có huyết thanh âm tính với PCV2 trước khi chủng ngừa. Lợn trong nhóm sử dụng thuốc vờ vẫn có huyết thanh âm tính trước khi thử thách.

Hiệu giá kháng thể PCV2 theo thử nghiệm ELISA được nêu tóm tắt trong bảng 15 dưới đây. Tất cả các hiệu giá $> 0,5$ được cho là dương tính với kháng thể PCV2. Lợn trong tất cả các nhóm được chủng ngừa có sự tăng đáng kể ($P \leq 0,0895$) hiệu giá kháng thể PCV2 vào ngày 28-44 sau khi chủng ngừa so với nhóm sử dụng thuốc vờ, cho thấy đáp ứng miễn dịch chủ động đối với PCV2 sau khi chủng ngừa. Ngoài ra, nhóm T03 và T05 cũng có hiệu giá cao hơn đáng kể vào ngày 20 sau khi chủng ngừa ($P \leq 0,0684$ và $P \leq 0,0738$, tương ứng).

Bảng 15. Hiệu giá trung bình bình phương nhỏ nhất đã tường huyết thanh dương tính với PCV2 theo ELISA theo ngày thử nghiệm

Chủng ngừa	Ngày -1	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 20	Ngày 28
Thuốc vờ	0,215	0,172	0,092	0,066	0,046
cPCV2b thấp	0,203	0,168	0,119	0,113	0,266*
cPCV2b cao	0,195	0,156	0,118	0,138*	0,214*
PCV2b DIV thấp	0,193	0,176	0,090	0,086	0,172*

PCV2b DIV cao	0,233	0,191	0,125	0,137*	0,157*
Chủng ngừa	Ngày 35	Ngày 44			
Thuốc vờ	0,225	0,526			
cPCV2b thấp	0,715*	0,807*			
cPCV2b cao	0,667*	0,706*			
PCV2b DIV thấp	0,563*	0,685*			
PCV2b DIV cao	0,702*	0,783*			

Mô bệnh học: Sự tiêu bạch huyết (LD) và nhiễm virus trong mô bạch huyết (IHC)

Điểm số mô bệnh học bất thường theo tỷ lệ phần trăm PCV2 (dữ liệu không được thể hiện) không cho thấy sự khác nhau đáng kể giữa nhóm sử dụng thuốc vờ và nhóm được chủng ngừa khi xem xét tổn thương mô bạch huyết và sự có mặt của kháng nguyên PCV2.

Dữ liệu từ thử nghiệm này cho thấy rằng tất cả các con lợn vào ngày thử nghiệm cho tới khi thử thách vào ngày 21 vẫn không bị nhiễm PCV2 như được thấy rõ ở các dấu hiệu: 1) không phát hiện được ADN của PCV2 trong mẫu huyết thanh được lấy hàng tuần từ thời điểm chủng ngừa đến thời điểm thử thách và 2) không có bằng chứng huyết thanh học trong nhóm T01 rằng có sự phơi nhiễm không chủ đích bất kỳ với PCV2 trước khi thử thách. Tất cả các vaccin đều có tác dụng bảo vệ đáng kể lợn đã chủng ngừa khỏi bị nhiễm virus huyết sau khi thử thách. Ngoài ra, tất cả các vaccin đều làm giảm đáng kể mức độ thải virus PCV2 qua phân sau khi thử thách ở các con lợn được chủng ngừa. Lợn trong tất cả các nhóm được chủng ngừa có sự tăng đáng kể ($P \leq 0,0895$) hiệu giá kháng PCV2 vào ngày 28-44 sau khi chủng ngừa so với thuốc vờ, cho thấy đáp ứng miễn dịch chủ động đối với PCV2 sau khi chủng ngừa. Có sự giảm đáng kể mức độ khu trú virus (IHC) ở tất cả các nhóm được chủng ngừa so với nhóm đối chứng, nhưng sự giảm này không có ý nghĩa thống kê. Việc không có sự khác nhau đáng kể giữa các nhóm có thể là do thử thách yếu ở nhóm đối chứng.

Ví dụ 7: Đánh giá hai vaccin ứng viên khi thử thách bằng biến chủng PCV2b

Mục đích của thử nghiệm là đánh giá tác dụng bảo vệ của vaccin PCV2b thể khảm và vaccin biến chủng PCV2b, mỗi vaccin này được sử dụng ở liều kháng nguyên thấp và cao, cũng như vỏ capsit PCV2a được biểu hiện ở baculovirus, chống lại sự thử thách bằng biến chủng PCV2b. Thiết kế thử nghiệm được nêu trong bảng 16. Thuốc vờ

(T01) là 10% dầu SP. IVP là như sau: T02, vaccin chứa virus thể khảm đã chết có vỏ capsit PCV1:PCV2b ở liều thấp (cPCV2b thấp), được bổ sung 10% dầu SP; T03, vaccin chứa virus thể khảm đã chết có vỏ capsit PCV1:PCV2b ở liều cao (cPCV2b cao), được bổ sung 10% dầu SP; T04, vaccin liều thấp chứa biến chủng virus PCV2b đã chết (PCV2b DIV thấp), được bổ sung 10% dầu SP; T05, vaccin liều cao chứa biến chủng virus PCV2b đã chết (PCV2b DIV cao), được bổ sung 10% dầu SP; T06, baculovirus đã chết biểu hiện vỏ capsit PCV2a, trong tá dược hệ nước (sản phẩm so sánh). Các vaccin T02-T05 được tạo ra bằng cách sử dụng kháng nguyên cô 20 lần và sau đó bào chế vaccin ở liều kháng nguyên 0,69% = liều thấp hoặc liều kháng nguyên 3,00% = liều cao.

Bảng 16. Thiết kế thử nghiệm

Nhóm	N	Sản phẩm thử nghiệm cứu (IVP)	Lần chủng ngừa	Thử thách			Mô xác
				Ngày	Chủng	Liều, đường dùng*	
T01	12	Thuốc vờ	ngày 0 (khoảng 3 tuần tuổi) 2ml IM Bên phải của cổ	ngày 21 (~6 tuần tuổi)	Biến chủng PCV2b	3ml IN	ngày 42 (khoảng 9 tuần tuổi) và thu thập mô
T02	12	vaccin chứa virus thể khảm PCV1:PCV2b đã chết, có tá dược (liều thấp)					
T03	12	vaccin chứa virus thể khảm PCV1:PCV2b đã chết, có tá dược (liều cao)					
T04	12	vaccin chứa biến chủng virus PCV2b đã chết, có tá dược (liều thấp)					
T05	12	vaccin chứa biến chủng virus PCV2b đã chết, có tá dược (liều cao)					
T06	12	baculovirus đã chết biểu hiện vỏ capsit của PCV2a	1ml IM Bên phải của cổ				

Lợn được khoảng 3 tuần tuổi (21 ± 8 ngày tuổi) vào ngày 0 để chủng ngừa. Lợn được sử dụng liều vaccin đã định duy nhất 2ml (T01-T05) hoặc 1ml (T06) trong cơ (IM) vào bên phải của cổ. Một bơm tiêm vô trùng dung tích 3ml có kim dài 1 inso

(2,54cm) hoặc $\frac{3}{4}$ inso được sử dụng cho mỗi con lợn. Thông tin chủng ngừa chi tiết được ghi lại. Lợn được quan sát trong thời gian 1 giờ (± 30 phút) sau mỗi lần chủng ngừa về các dấu hiệu lâm sàng bất thường, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chứng ngủ lịm, thở khó nhọc, nôn, và mất phối hợp. Dấu hiệu lâm sàng bất kỳ quan sát được được ghi trên phiếu theo dõi tình trạng sức khỏe. Bác sỹ thú y được thông báo theo dõi các con lợn có dấu hiệu bất kỳ được mô tả ở trên.

Thử thách được thực hiện vào ngày 21 khi lợn được khoảng 6 tuần tuổi. Mỗi con lợn được cấy tổng cộng 3ml dịch nuôi cấy chứa biến chủng của PCV2b có độc tính qua đường trong mũi (IN), được pha loãng trước tới 4,8-5,8 $\log_{10}$ TCID₅₀ /ml. Mẫu phân ước được dự trữ của virus thử thách được chuẩn độ sau khi thử thách để khẳng định liều thử thách thực tế.

Các mẫu máu riêng rẽ (5-10ml) được lấy vào các ống tách huyết thanh (SST) vào ngày -1 (trước khi chủng ngừa), và các ngày 7, 14, 20/21, 28, 35, và 42. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở $\leq -65^{\circ}\text{C}$. Sau đó, các mẫu này được kiểm tra hiệu giá kháng thể PCV2 bằng phương pháp ELISA và xác định lượng virus PCV2 trong máu bằng phương pháp qPCR.

Các que lấy mẫu phân riêng rẽ được lấy từ mỗi con lợn trước khi thử thách (ngày 20/21), và hàng tuần sau khi thử thách. Các que polyeste vô trùng riêng rẽ được sử dụng để lấy mẫu phân và cho vào ống chứa 3ml môi trường PBS vô trùng. Các que lấy mẫu phân được xoay tròn trong 5 giây trong môi trường này trước khi bỏ đi. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ $\leq -65^{\circ}\text{C}$. Các mẫu này được thử nghiệm mức độ thải virus bằng quy trình PCR định lượng chuẩn.

Trong quá trình mổ xác, các mẫu khí-phế quản, mạc treo và hạch bạch huyết bẹn nông, và mô amidan được thu thập theo hai bộ mẫu đối với mỗi con lợn, được xác định riêng và được cố định trong dung dịch đệm formalin 10%. Một bộ mẫu được lưu trữ, trong khi bộ còn lại được gửi đi xét nghiệm mô bệnh học chuẩn về sự tiêu bạch huyết (PCVAD), và thay thế mô bào. Kết luận được ghi là có (+) hoặc không (-). Lợn được cho là có sự tiêu bạch huyết hoặc thay thế mô bào nếu một hoặc nhiều mô được ghi là “+”. Ngoài ra, mô này cũng được xét nghiệm kháng nguyên PCV2 bằng IHC. Kết quả được ghi là 0 (không nhuộm) và 1-3 (mức độ nhuộm khác nhau). Điểm số bằng 0 được cho là PCV2 IHC (-), và điểm số bằng 1 hoặc cao hơn được cho là PCV2 IHC (+). Lợn được cho là IHC (+) nếu một hoặc nhiều mô là IHC (+).

Kết quả ban đầu là tác dụng bảo vệ của một trong số bốn vaccin ứng viên và vaccin chứa baculovirut chống lại sự thử thách bằng biến chủng PCV2b so với thuốc vờ. Biến số sơ cấp là tình trạng virus huyết, và biến số thứ cấp là mức độ thải virus qua phân và tổn thương mô bệnh học.

Tình trạng virus PCV2 huyết

Huyết thanh được lấy mẫu hàng tuần và được phân tích lượng virus PCV2 trong máu bằng phương pháp PCR định lượng. Giá trị trung bình bình phương nhỏ nhất của mỗi ngày thử nghiệm được thể hiện trên Fig.5. Tất cả các con lợn, trừ một con lợn trong cả hai nhóm T04 và T05 đều âm tính về lượng virus PCV2 trong máu trước khi thử thách như được thể hiện trong bảng 17 dưới đây.

Bảng 17. Lượng virus PCV2 trong máu (số bản sao ADN) được xác định bằng phương pháp qPCR theo ngày thử nghiệm

Nhóm điều trị	Loại sản phẩm	Thời điểm (số bản sao ADN trung bình bình phương nhỏ nhất)						
		Trước khi thử thách				Sau khi thử thách		
		Ngày -1	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 44
T01	Thuốc vờ	0	0	0	0	12,2	91196,2	22165,7
T02	cPCV2b thấp	0	0	0	0	3,8	68	4,9
T03	cPCV2b cao	0	0	0	0	0,0	1,2	0,0
T04	PCV2b DIV thấp	0	0	0	1,2	1,5	3,8	0,0
T05	PCV2b DIV cao	0	0	0	1,2	0,0	3,8	0,0
T06	Baculovirut biểu hiện vỏ capsit của PCV2a	0	0	0	0,0	1,2	86,0	3,8

Tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính trong quá trình thử nghiệm được nêu dưới đây (bảng 18). Nhóm sử dụng thuốc vờ có tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính cao hơn đáng kể so với các nhóm được chủng ngừa ($P \leq 0,0046$).

Bảng 18. qPCR định lượng xác định tình trạng virus huyết – tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính

Nhóm thử nghiệm	Loại sản phẩm	Đã từng dương tính?				Tổng số lần quan sát	Giá trị P
		Dương tính		Âm tính			
		#	%	#	%	Số lần	
T01	Thuốc vờ	12	100,0	0	0	12	
T02	cPCV2b thấp	5	41,7	7	58,3	12	0,0046
T03	cPCV2b cao	1	8,3	11	91,7	12	0,0001
T04	PCV2b DIV thấp	2	16,7	10	83,3	12	0,0001
T05	PCV2b DIV cao	2	16,7	10	83,3	12	0,0001
T06	Baculovirut biểu hiện vỏ capsit của PCV2a	5	41,7	7	58,3	12	0,0046

Mức độ thải virus PCV2 qua phân

Giá trị trung bình bình phương nhỏ nhất của mức thải virus qua phân theo ngày thử nghiệm được thể hiện trên Fig.6. Mức thải virus PCV2 qua phân (số bản sao ADN) khi chủng ngừa và thử thách được thể hiện trong bảng 19 dưới đây. Một con lợn trong nhóm T04 có sự thải virus qua phân vào ngày trước khi thử thách. Tất cả các nhóm được chủng ngừa có số bản sao ADN của PCV2 trung bình bình phương nhỏ nhất giải phóng qua phân thấp hơn đáng kể ($P \leq 0,0001$) so với nhóm sử dụng thuốc vờ vào các ngày 35 và 43 sau khi thử thách. Ngoài ra, các nhóm T03, T05 và T06 cũng có số bản sao ADN trung bình bình phương nhỏ nhất giải phóng qua phân thấp hơn đáng kể ($P \leq 0,0830$) vào ngày 28 của thử nghiệm.

Bảng 19. Mức thải virus PCV2 trong phân (số bản sao ADN) được xác định bằng phương pháp qPCR

Nhóm thử nghiệm	Loại sản phẩm	Thời điểm (Số bản sao ADN trung bình bình phương nhỏ nhất)			
		Trước khi thử thách	Sau khi thử thách		
		Ngày 20	Ngày 28	Ngày 35	Ngày 44
T01	Thuốc vờ	0	22,3	24228,5	10281,5
T02	cPCV2b thấp	0	111,3	36,2	5,1
T03	cPCV2b cao	0	1,2	0,0	0,0
T04	PCV2b DIV thấp	1,2	1,7	1,2	5,0
T05	PCV2b DIV cao	0	0,0	0,0	0,0
T06	Baculovirut biểu hiện vỏ capsit của PCV2a	0	0,0	3,8	0,0

Tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính về sự giải phóng virus qua phân trong quá trình thử nghiệm được nêu dưới đây (bảng 20). Sau khi thử thách, so với nhóm sử

dụng thuốc vờ, các nhóm T03-T06 có sự giảm đáng kể ($P \leq 0,0028$) tỷ lệ phần trăm lợn có sự giải phóng ADN của PCV2 có thể phát hiện được bằng phương pháp PCR.

Bảng 20. qPCR định lượng sự thải virus qua phân – tỷ lệ phần trăm lợn đã từng dương tính

	Đã từng dương tính?				Tổng số lần quan sát	Giá trị P
	Dương tính		Âm tính			
	#	%	#	%	Số lần	
Thuốc vờ	11	91,7	1	8,3	12	
cPCV2b thấp	8	66,7	4	33,3	12	0,3168
cPCV2b cao	1	8,3	11	91,7	12	0,0001
PCV2b DIV thấp	3	25,0	9	75,0	12	0,0028
PCV2b DIV cao	0	0	12	100,0	12	0,0001
Baculovirut biểu hiện vỏ capsit của PCV2a	2	16,7	10	83,3	12	0,0006

Đáp ứng kháng thể trong huyết thanh

Liên quan đến hiệu giá kháng thể PCV2, kết quả thử nghiệm cho thấy rằng nhóm được chủng ngừa vaccin biến chủng PCV2b (T04; T05) có đáp ứng huyết thanh mạnh hơn so với các nhóm được chủng ngừa khác trước khi thử thách vào ngày thử nghiệm 21, như được đánh giá bằng phương pháp ELISA (bảng 21; Fig.7). Tuy nhiên, sau khi thử thách, việc chủng ngừa bằng biến chủng PCV2b không đáp ứng mạnh như các việc chủng ngừa khác (Fig.7). Một kết luận có thể đưa ra là lợn đã có đáp ứng kháng thể đặc hiệu mạnh kháng biến chủng PCV2b và có thể trung hòa và loại bỏ virus thử thách rất nhanh. Điều này dẫn tới đáp ứng kháng thể sau khi thử thách giảm đi so với đáp ứng của vaccin khác chủng. Mặc dù huyết thanh học là không giống như hiệu quả, đã chứng minh được rằng sự giảm hiệu giá kháng thể ở lợn sử dụng vaccin chứng tỏ có tác dụng bảo vệ (Thacker et al., 2013, Proc AASV, 217).

Bảng 21. Phân tích ELISA đối với PCV2

Vaccin thử nghiệm	Ngày thử nghiệm						
	-1	7	14	20	28	35	43
T01	0,2094	0,1427	0,0937	0,0824	0,0539	0,0877	0,3064
T02	0,1943	0,1249	0,1133	0,0981	0,1328	0,7637*	0,7935*
T03	0,2102	0,1377	0,1458	0,1671*	0,2362*	0,8084*	0,7973*
T04	0,1856	0,1399	0,1467	0,1560	0,2388*	0,4836*	0,6209*
T05	0,2064	0,1274	0,0772	0,1362	0,2902*	0,5438*	0,5749*
T06	0,1814	0,1283	0,0999	0,1089	0,1627	0,8350*	0,8902*

*giá trị $P < 0,10$ so với T01

Mô bệnh học: Sự tiêu bạch huyết (LD) và nhiễm virus trong các mô bạch huyết (IHC)

Vào thời điểm mổ xác, so với nhóm sử dụng thuốc vờ, tất cả các nhóm được chủng ngừa có tỷ lệ phần trăm lợn có tổn thương mô bạch huyết (LD) khi soi kính hiển vi và có sự khu trú kháng nguyên PCV2 (IHC) giảm đáng kể, $P \leq 0,0995$.

Dữ liệu IHC đối với PCV2 được nêu tóm tắt trong bảng 22 dưới đây.

Bảng 22. Điểm số PCV2 IHC: Nếu mô bạch huyết hoặc amidan đã từng bất thường

Vaccine thử nghiệm	Loại sản phẩm sản phẩm	Đã từng bất thường?				Tổng số lần quan sát
		Không		Có		
		#	%	#	%	Số lần
T01	Thuốc vờ	4	33,3	8	66,7	12
T02	cPCV2b thấp	9	75	3	25	12
T03	cPCV2b cao	10	83,3	2	16,7	12
T04	PCV2b DIV thấp	11	91,7	1	8,3	12
T05	PCV2b DIV cao	12	100	0	0	12
T06	Baculovirut biểu hiện vỏ capsit của PCV2a	12	100	0	0	12

Dữ liệu về sự tiêu bạch huyết (LD) do PCV2 được nêu tóm tắt trong bảng 23 dưới đây.

Bảng 23. Điểm số tiêu bạch huyết PCV2: Nếu mô bạch huyết hoặc amidan đã từng bất thường

Loại sản phẩm	Đã từng bất thường?				Tổng số lần quan sát
	Không		Có		
	#	%	#	%	Số lần
Thuốc vờ	4	33,3	8	66,7	12
cPCV2b thấp	9	75	3	25	12
cPCV2b cao	12	100	0	0	12
PCV2b DIV thấp	10	83,3	2	16,7	12
PCV2b DIV cao	11	91,7	1	8,3	12
Baculovirut biểu hiện vỏ capsit của PCV2a	12	100	0	0	12

Dữ liệu từ thử nghiệm này cho thấy rằng lượng PCV2 trung bình bình phương nhỏ nhất tất cả các nhóm được chủng ngừa đều là huyết thanh âm tính trước khi chủng ngừa. Lợn trong nhóm sử dụng thuốc vờ vẫn có huyết thanh âm tính trước khi thử thách. Một con lợn trong cả hai nhóm T04 và T05 có tình trạng nhiễm virus huyết vào ngày trước khi thử thách. Lợn trong nhóm T04 cũng có sự giải phóng virus, tuy nhiên dưới 10% các con lợn có tình trạng nhiễm virus huyết trước khi thử thách và thử nghiệm được cho là hợp lệ. Sau khi thử thách, so với nhóm sử dụng thuốc vờ, tất cả các nhóm

được chủng ngừa có sự giảm đáng kể tỷ lệ phần trăm lợn nhiễm virus huyết. Sau khi thử thách, so với nhóm sử dụng thuốc vờ, các nhóm T03-T06 có sự giảm đáng kể tỷ lệ phần trăm lợn có sự giải phóng ADN của PCV2 có thể phát hiện được bằng phương pháp PCR. Khi mổ xác, so với nhóm sử dụng thuốc vờ, tất cả các nhóm được chủng ngừa có tỷ lệ phần trăm của lợn có tổn thương mô bạch huyết (LD) khi soi kính hiển vi và có sự khu trú kháng nguyên PCV2 giảm đáng kể. Thử nghiệm này cho thấy rằng vacxin chứa cPCV1-2b, biến chủng PCV2b và baculovirus biểu hiện vỏ capsid của PCV2a có tác dụng bảo vệ chéo đối với sự thử thách bằng biến chủng của PCV2b.

Cần hiểu rằng các ví dụ trên đây được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không ví dụ nào trong đó được cho là làm giới hạn phạm vi chung của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vaccin để bảo vệ lợn chống lại circovirus lợn typ 2 (porcine circovirus type 2: PCV2), kể cả biến chủng PCV2b có độc tính cao, chế phẩm này chứa polypeptit ORF2 của PCV2b được mã hóa bởi biến chủng của PCV2b có mức độ giống với SEQ ID NO: 66 ít nhất là 95%, trong đó polypeptit ORF2 này chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1, và chất phụ trợ dùng cho nhũ tương dầu trong nước.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này ở dạng virus biến chủng toàn phần PCV2b được bất hoạt chứa polypeptit ORF2 của PCV2b làm vỏ capsit virus của nó.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này ở dạng virus toàn phần circovirus lợn typ 1-typ 2 thể khảm được bất hoạt, trong đó circovirus lợn ở thể khảm này chứa circovirus lợn typ 1 tái tổ hợp được bất hoạt mà chứa polypeptit ORF2 của PCV2b thay cho vỏ capsit ORF2 của PVC1.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này ở dạng polypeptit ORF2 của PVC2b tái tổ hợp đã phân lập.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này còn chứa vector biểu hiện.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó vector này là baculovirus hoặc parapoxvirus.
7. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó vector này là vector sống hoặc được bất hoạt.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polypeptit ORF2 của PCV2b còn chứa ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.
9. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polypeptit ORF2 của PCV2b còn chứa lysin (K) ở gốc 59 và lysin (K) ở gốc 234 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.
10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó polypeptit ORF2 của PCV2b còn chứa threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polypeptit ORF2 của PCV2 được thể hiện bằng trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc phần sinh miễn dịch của nó tương ứng với dạng bị cắt cụt của polypeptit ORF2.
12. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung của lợn.
13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó ít nhất một kháng nguyên bổ sung có tác dụng bảo vệ chống lại bệnh gây ra bởi vi sinh vật.
14. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó vi sinh vật là vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh.
15. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó vi sinh vật này được chọn từ nhóm bao gồm *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV), parvovirus ở lợn (porcine parvovirus: PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, vi khuẩn leptospira, *Lawsonia intracellularis*, virus gây bệnh cúm lợn (swine influenza virus: SIV), kháng nguyên *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirut gây bệnh hô hấp ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (porcine epidemic diarrhea: PED), rotavirut, virus đường ruột ở lợn, virus gây bệnh viêm não-cơ tim, tác nhân gây bệnh Aujeszky, bệnh dịch tả lợn (Classical Swine Fever: CSF) và tác nhân gây bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm ở lợn, hoặc hỗn hợp của chúng.
16. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất phụ trợ dùng cho nhũ tương dầu trong nước dựa trên squalan và chứa copolyme khối.
17. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang được dụng.
18. Kit bao gồm lọ chứa chế phẩm vaccin để bảo vệ lợn chống lại circovirut lợn typ 2 (porcine circovirus type 2: PCV2), kể cả biến chủng của PCV2b có độc tính cao, chế phẩm này chứa polypeptit ORF2 của PCV2b được mã hóa bởi biến chủng của PCV2b có mức độ giống với SEQ ID NO: 66 ít nhất là 95%, trong đó polypeptit ORF2 này

chứa leuxin (L) ở vị trí 89, threonin (T) ở vị trí 90, và asparagin (N) ở vị trí 134 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1, và chất phụ trợ dùng cho nhũ tương dầu trong nước.

19. Kit theo điểm 18, trong đó polypeptit ORF2 của biến chủng của PCV2b còn chứa ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm: lysin (K) ở gốc 59, lysin (K) ở gốc 234, threonin (T) ở gốc 190, isoleuxin (I) ở gốc 53, asparagin (N) ở gốc 68, arginin (R) hoặc glyxin (G) ở gốc 169, và isoleuxin (I) ở gốc 215 theo cách đánh số của SEQ ID NO: 1.

20. Kit theo điểm 19, trong đó chế phẩm trong lọ được cung cấp dưới dạng chế phẩm dạng lỏng để sử dụng ngay.

21. Kit theo điểm 18, trong đó chế phẩm này được cung cấp ở dạng đông khô.

22. Kit theo điểm 21, trong đó kit này còn chứa chất pha loãng.

FIG. 1

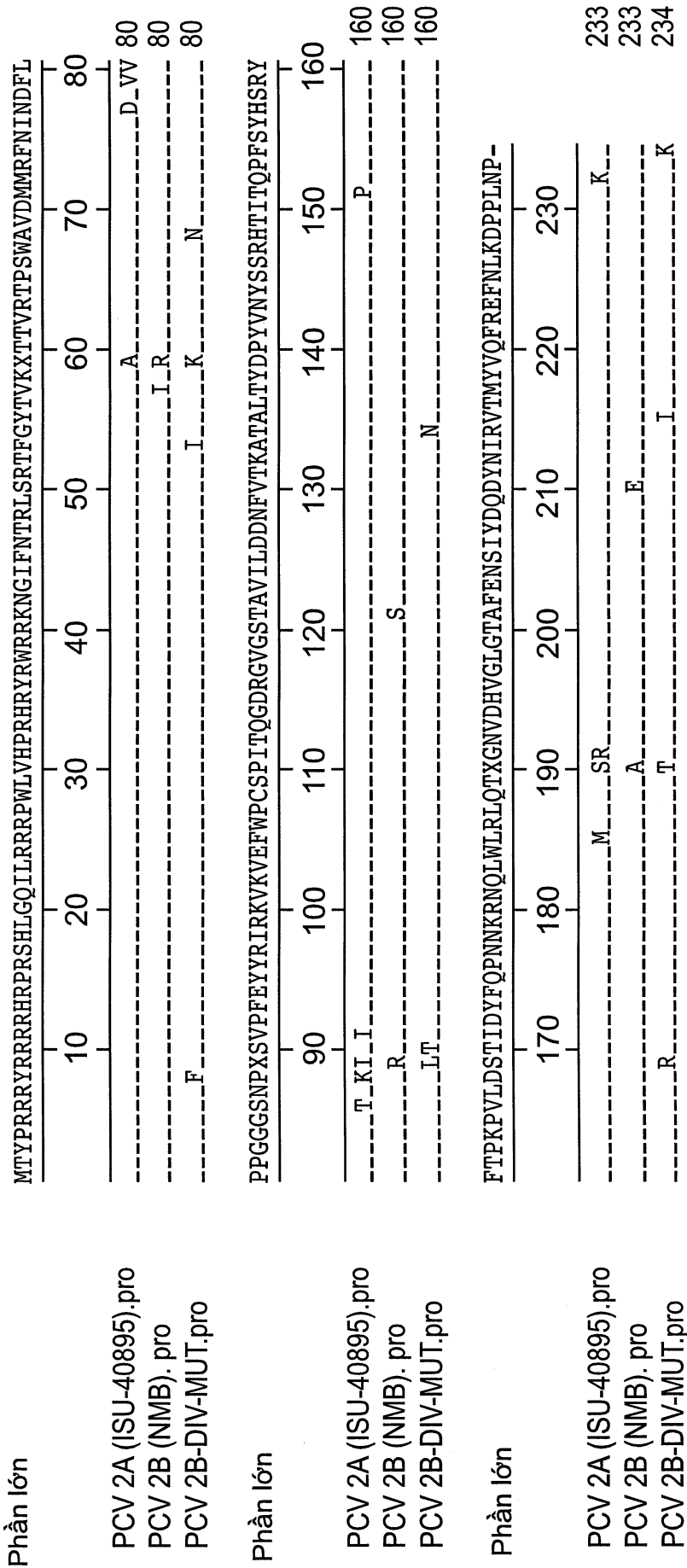


FIG. 2

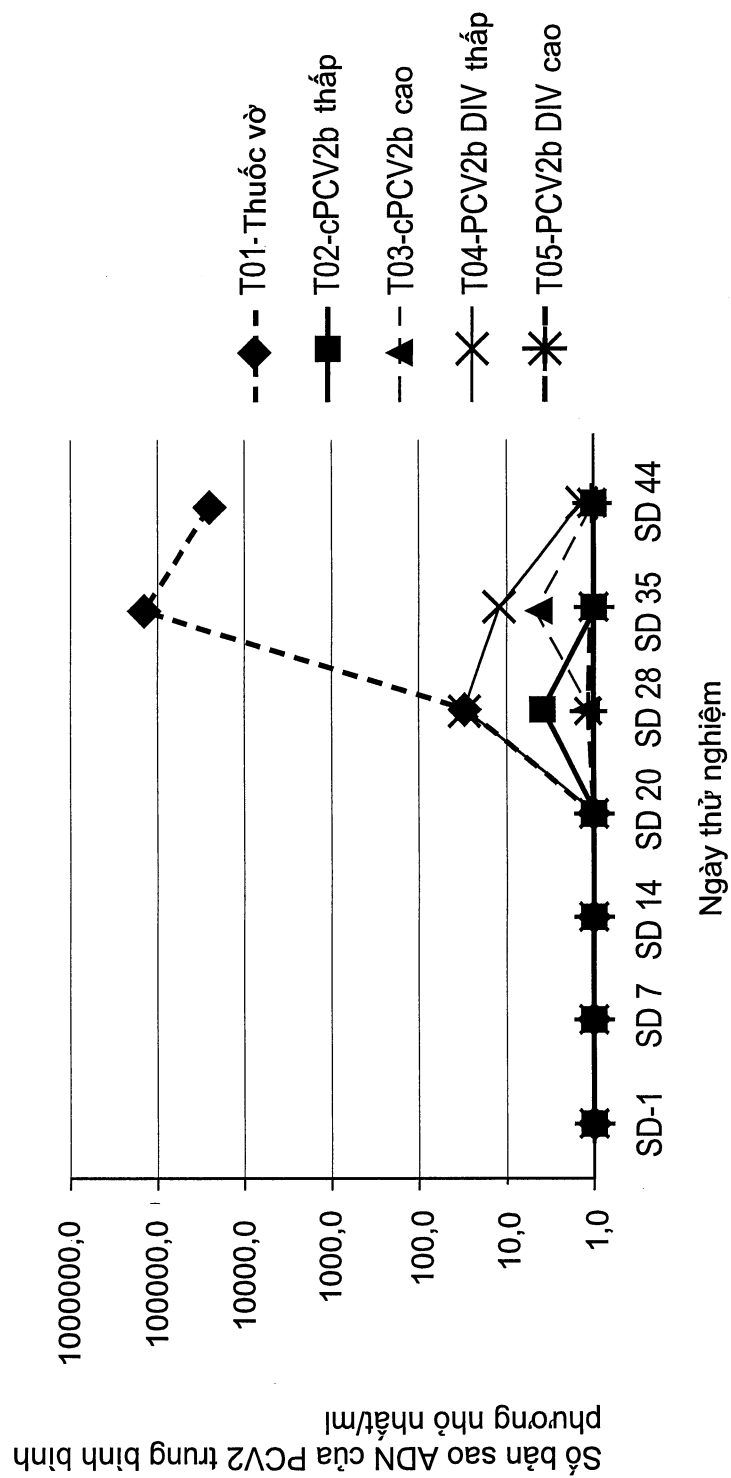


FIG. 3

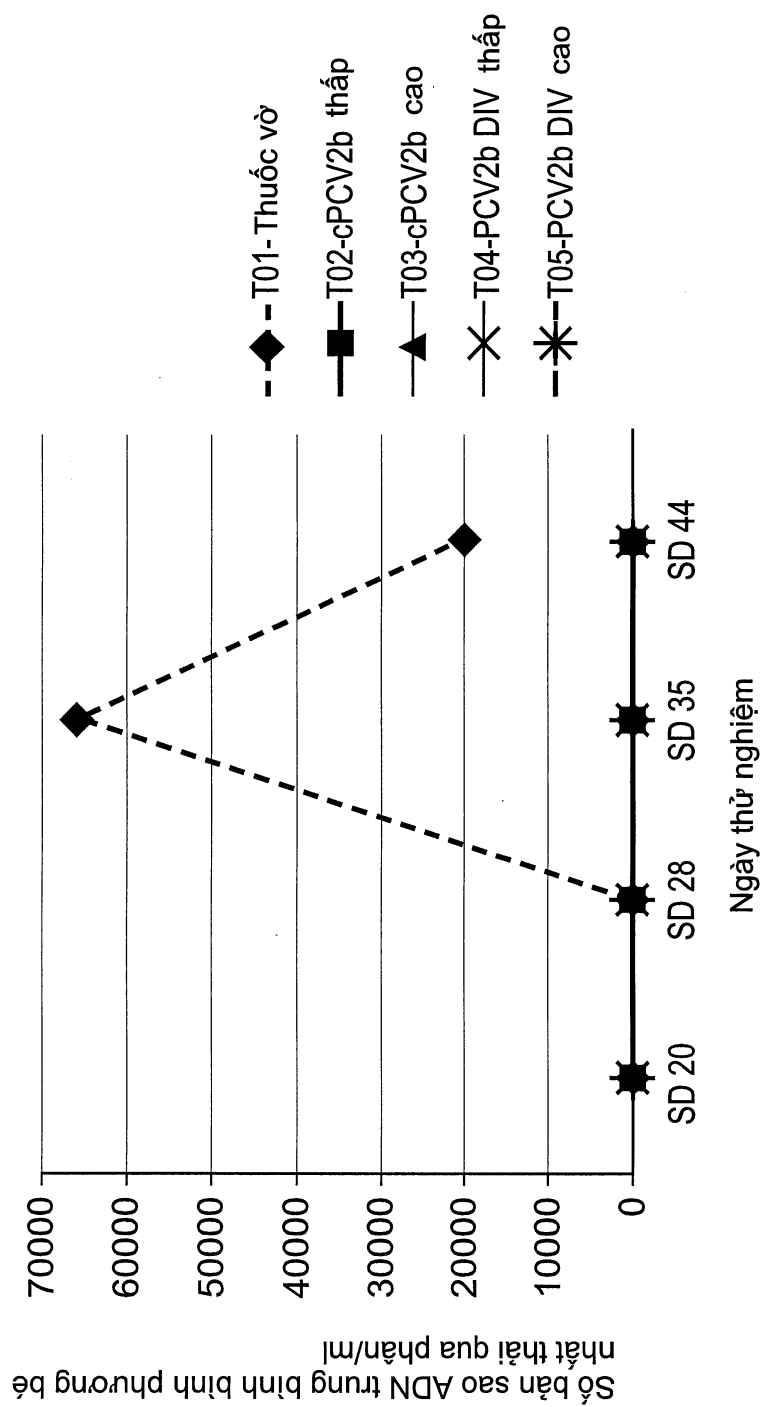


FIG. 4

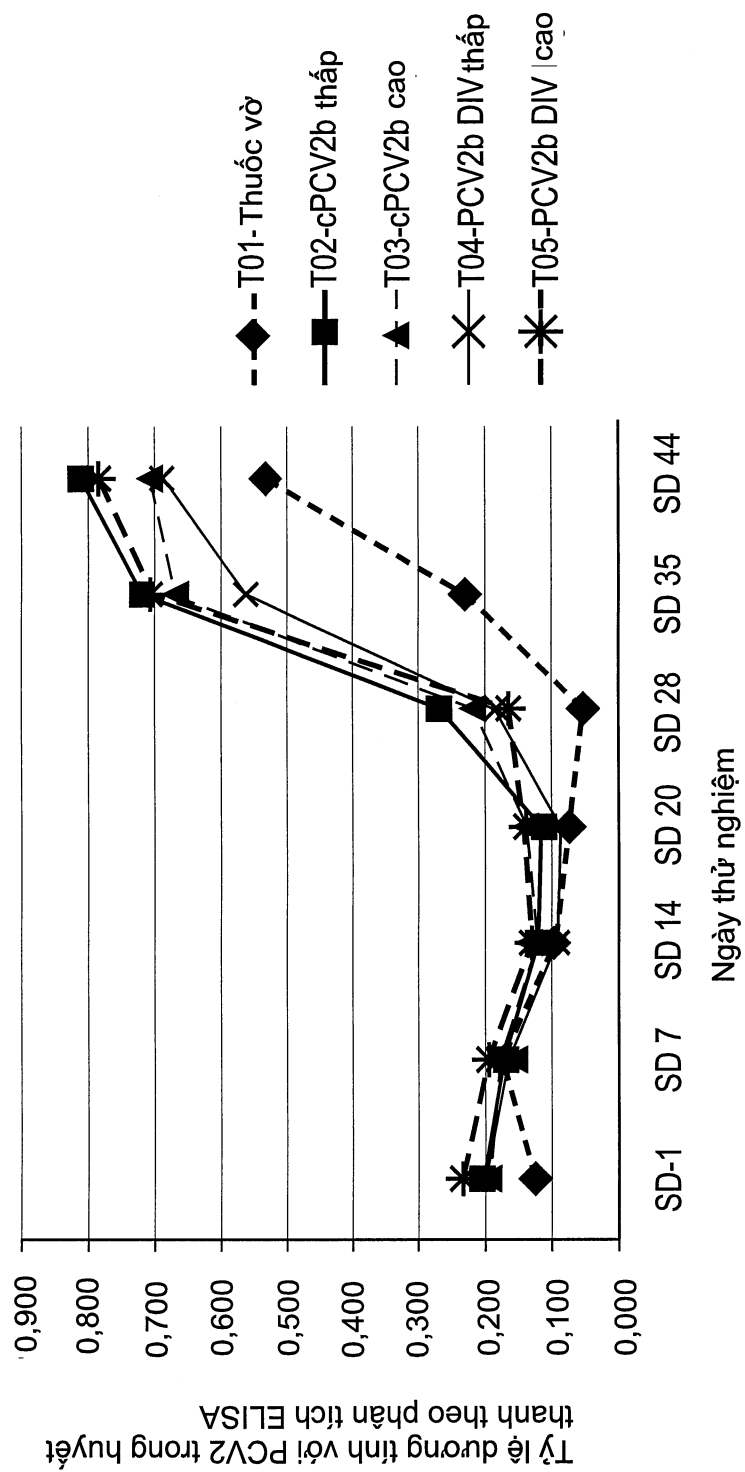


FIG. 5

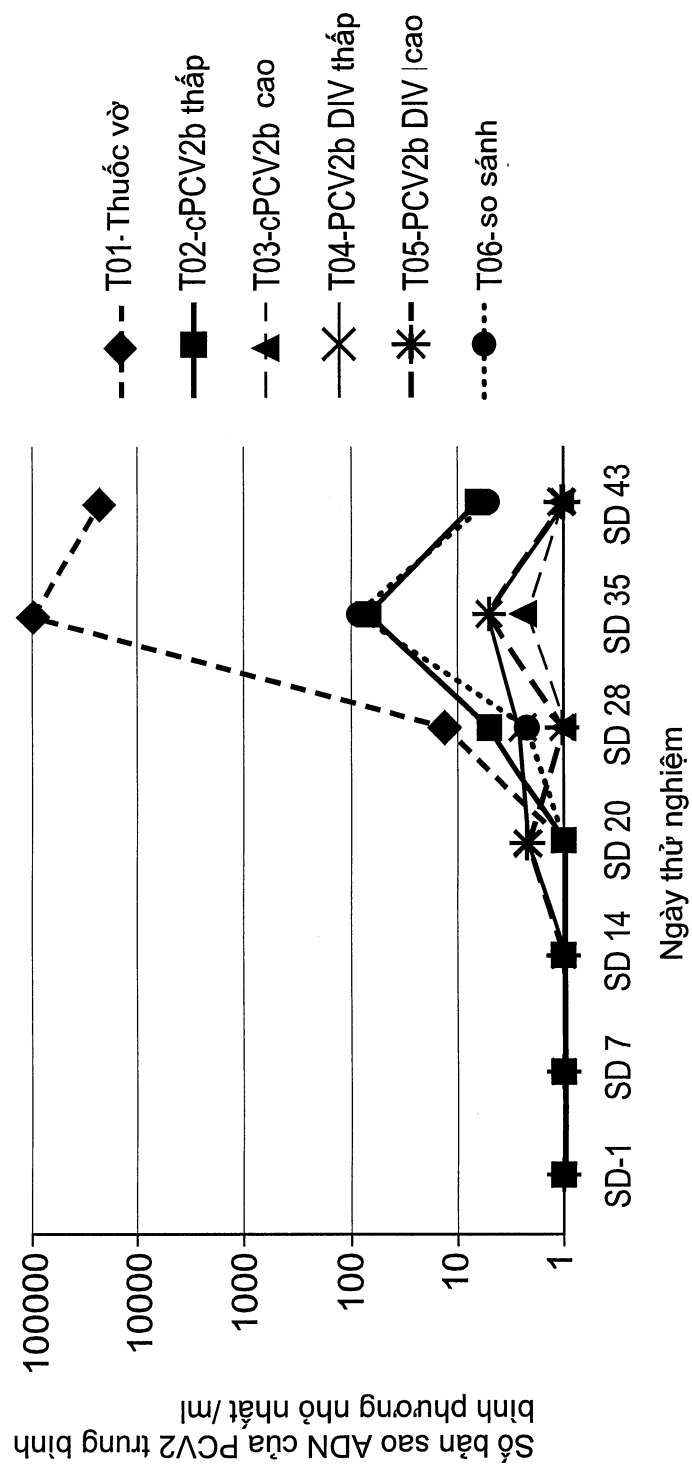


FIG. 6

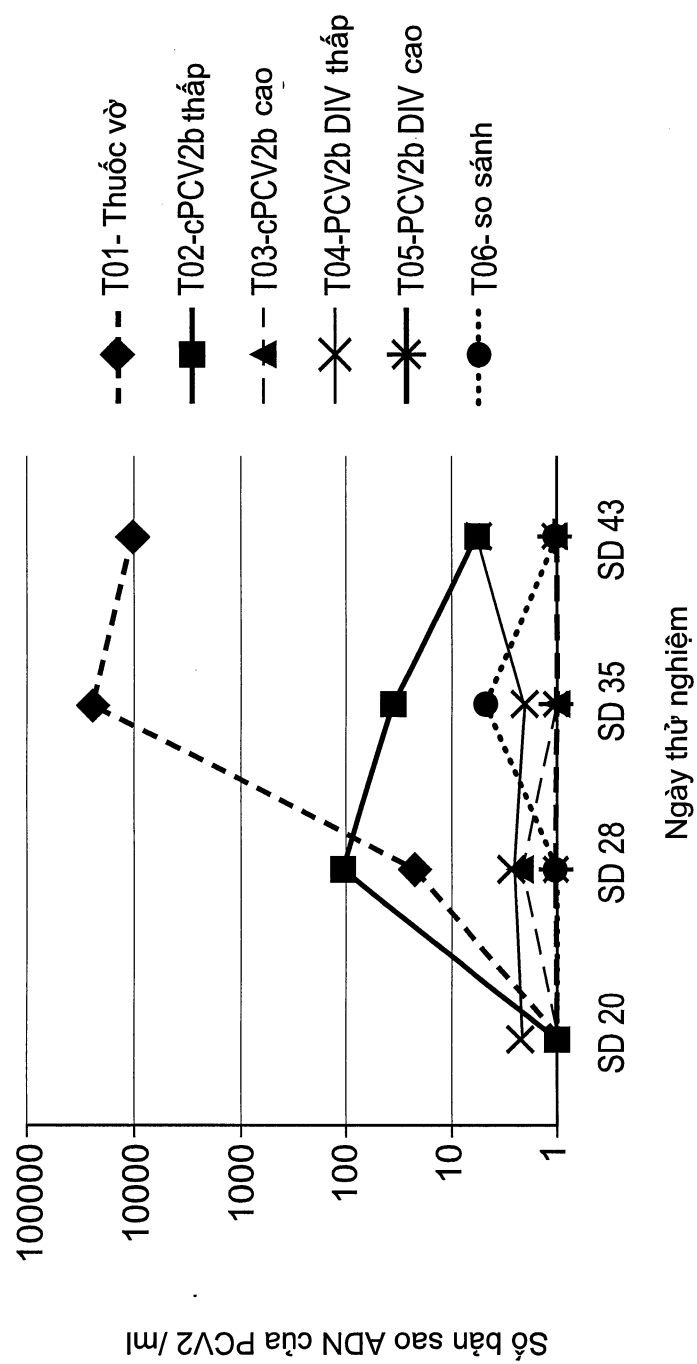
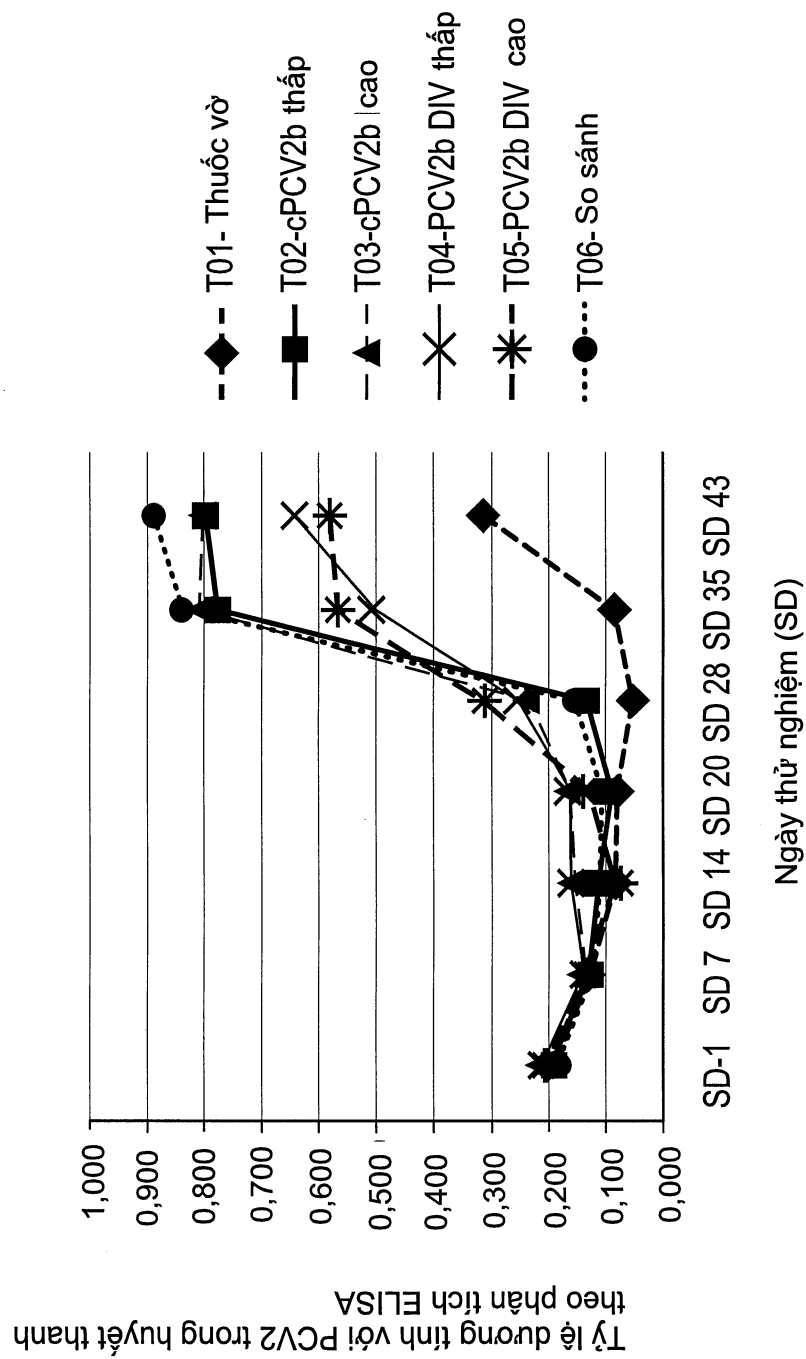


FIG. 7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Zoetis LLC

<120> Chế phẩm vaccin để bảo vệ lợn chống lại Circovirut lợn typ 2 và kit chứa chế phẩm vaccin này

<130> ZP000029A

<140> 61/882289

<141> 2013-09-25

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> circovirut lợn

<400> 1

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65 70 75 80Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175Asn 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> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 2
atgacgtatc cwaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgcccttg aatactacag aataaggaag 300
gttaaggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtag 480
tttaccgga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca ctaacccta agtga 705

<210> 3
<211> 234
<212> PRT
<213> circovirut lqn

<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 Ile Gly Tyr Thr Val Lys Ala 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 ₈₅	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr ₉₀	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr ₉₅	Tyr
Arg	Ile	Arg	Lys ₁₀₀	Val	Lys	Val	Glu	Phe ₁₀₅	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro ₁₁₀	Ile	Thr
Gln	Gly	Asp ₁₁₅	Arg	Gly	Val	Gly	Ser ₁₂₀	Thr	Ala	Val	Ile	Leu ₁₂₅	Asp	Asp	Asn
Phe	Val ₁₃₀	Thr	Lys	Ala	Asn	Ala ₁₃₅	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro ₁₄₀	Tyr	Val	Asn	Tyr
Ser ₁₄₅	Ser	Arg	His	Thr	Ile ₁₅₀	Pro	Gln	Pro	Phe	Ser ₁₅₅	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr ₁₆₀
Phe	Thr	Pro	Lys	Pro ₁₆₅	Val	Leu	Asp	Arg	Thr ₁₇₀	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln ₁₇₅	Pro
Asn	Asn	Lys	Arg ₁₈₀	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu ₁₈₅	Arg	Leu	Gln	Thr	Thr ₁₉₀	Gly	Asn
Val	Asp	His ₁₉₅	Val	Gly	Leu	Gly	Thr ₂₀₀	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser ₂₀₅	Ile	Tyr	Asp
Gln	Asp ₂₁₀	Tyr	Asn	Ile	Arg	Ile ₂₁₅	Thr	Met	Tyr	Val	Gln ₂₂₀	Phe	Arg	Glu	Phe
Asn ₂₂₅	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro ₂₃₀	Leu	Asn	Pro	Lys						

<210> 4
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lon

<400>	4						
atgacgtatc	caaggaggcg	ttaccgaaga	cgaaggcacc	gccccgcag	ccatcttggc		60
cagatcctcc	gccgccgccc	ctggctcgtc	cacccccgcc	accgttaccc	ctggagaagg		120
aaaaatggca	tcttcaacac	ccgcctctcc	cgcaccatcg	gttatactgt	caaagctacc		180
acagtaagaa	caccctcctg	gaatgtggac	atgatgagat	ttaatattaa	tgattttctt		240
cccccaggag	ggggctcaaa	ccccctcact	gtgccctttg	aatactacag	aataaggaag		300
gttaaggttg	aattctggcc	ctgctcccca	atcaccagg	gtgacagggg	agtgggctcc		360
actgctgtta	ttctagatga	taactttgta	acaaaggcca	atgccctaac	ctatgacccc		420
tatgtaaact	actcctcccg	ccataccata	ccccagccct	tctcctacca	ctcccgttat		480
ttcaccccca	aacctgtcct	tgataggaca	atcgattact	tccaacccaa	taacaaaaga		540
aatcaactct	ggctgagact	acaaactact	ggaaatgtag	accatgtagg	cctcggcact		600
gcgttcgaaa	acagtatata	cgaccaggac	tacaatatcc	gtataacct	gtatgtacaa		660

ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttacccta agtga

705

<210> 5
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirus lon

<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
 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 Ala 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 Pro 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 His 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> 6
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> circovirut lgn

<400> 6
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga cgaagacacc gcccccgag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaagctacc 180
 acagtaagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccacagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata cccagccct tctcctacca ctcccgctat 480
 ttcaccccca aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtataca cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 7
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirut lgn

<400> 7

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

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

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

Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Ala 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 Pro 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 Lys 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> 8
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> circovirut lqn

<400> 8
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgct caccgccg accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaagctacc 180
 acagtcagaa cgccctctcg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaaact actcctcccg ccataccata cccagccct tctcctacca ctcccgtat 480
 ttcaccccca aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg actcggcact 600
 gccttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agaccccca ctaacccta agtga 705

<210> 9
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirut lqn

<400> 9

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 Pro 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> 10
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 10
atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattctggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120

```

aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgcctctctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata cccagccct tctcctacca ctcccgtac 480
tttaccgga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttacccta agtga 705

```

```

<210> 11
<211> 234
<212> PRT
<213> circovirus lon

```

```
<400> 11
```

```

Met Thr Tyr Pro Met 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 Ala 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> 12
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 12
atgacgtatc ctatgaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattctggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccaggg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttgccccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattctaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 13
<211> 233
<212> PRT
<213> circovirut lqn

<400> 13

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 Cys 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
225 230

<210> 14
<211> 702
<212> ADN
<213> circovirus lqn

<400> 14
atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gctgccgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatag gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420

tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtag 480
 tttaccccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaccctt aa 702

<210> 15
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> circovirus l  n

<400> 15

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 Cys 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
 225 230

<210> 16
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> circovirut lqn

<400> 16
 atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gcccccgag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gctgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatag gttatactgt caagaaaacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccaggg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgta ttttagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
 tttaccccg aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccct aa 702

<210> 17
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> circovirut lqn

<400> 17

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 Cys 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 Met 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 Thr 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
225 230

<210> 18
<211> 702
<212> ADN
<213> circovirut lòn

<400> 18
atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gctgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accggtaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccatgg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt 240
ccccaggag gggggtcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca accaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac 480
tttaccgccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccctt aa 702

<210> 19
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirut lqn

<400> 19

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 Ile Gly Tyr Thr Val Lys Ala 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 Pro 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> 20
 <211> 705

<212> ADN

<213> circovirut lqn

<400> 20

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattcttggc      60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg      120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaggctacc      180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt      240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgcccttg aatactacag aataaggaag      300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc      360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc      420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata cccagccct tctcctacca ctcccgttac      480
tttaccgga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga      540
aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact      600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa      660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca ctaacccta agtga                        705

```

<210> 21

<211> 234

<212> PRT

<213> circovirut lqn

<400> 21

```

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 His Pro Leu Asn Pro Lys
 225 230

<210> 22
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> circovirut lơn

<400> 22
 atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accggtaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgatttttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
 tttaccccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaattctaa agaccaccca cttaacccta agtga 705

<210> 23
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirut lơn

<400> 23

Met Thr Tyr Ser 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 Ser Ala 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 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> 24
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 24
atgacgtatt ccaggaggcg tttccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt gaagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240

```

ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag      300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc      360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc      420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata accagccct tctcctacca ctcccgtac      480
tttaccgccg aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga      540
aatcaactct ggctgagact acaaacctct gcaaattgtag accacgtagg cctcggcact      600
gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa      660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttacccta aatga                        705

```

```

<210> 25
<211> 234
<212> PRT
<213> circovirut lon

```

```
<400> 25
```

```
Met Thr Phe 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 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> 26
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 26
atgacgtttc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctacgacccc 420
tatgtaaaact actcctccc ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttaccgccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactgt ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta aatga 705

<210> 27
<211> 234
<212> PRT
<213> circovirut lqn

<400> 27

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Lys 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> 28
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lön

<400> 28
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaa agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttaccgccg aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540

aatcaactgt ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 tttagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 29
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirut lön
 <400> 29

Met Thr Tyr Ser 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> 30
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut løn

<400> 30
atgacgtatt caaggaggcg tttccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac 480
tttaccgccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactgt ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 31
<211> 234
<212> PRT
<213> circovirut løn

<400> 31

Met Thr Tyr Ser Met 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> 32
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 32
atgacgtatt caatgaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaaact actcctcccg ccataccata accgagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttaccgga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 33
<211> 234
<212> PRT
<213> circovirut lqn

<400> 33

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 Pro 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> 34

<211> 702

<212> ADN

<213> circovirut lơn

<400> 34

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
 acagtcaaaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata cccagccct tctcctacca ctcccgctat 480
 ttcaccccca aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta ag 702

<210> 35
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> circovirus 10n

<400> 35

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 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 165	Val	Leu	Asp	Arg	Thr 170	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln 175	Pro	
Asn	Asn	Lys	Arg 180	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu 185	Arg	Leu	Gln	Thr	Thr 190	Gly	Asn	
Val	Asp	His 195	Val	Gly	Leu	Gly	Thr 200	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser 205	Ile	Tyr	Asp	
Gln	Asp 210	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val 215	Thr	Met	Tyr	Val	Gln 220	Phe	Arg	Glu	Phe	
Asn 225	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro 230	Leu	Asn	Pro								

<210>	36
<211>	702
<212>	ADN
<213>	circovirut 10n

<400>	36						
atgacgtatc	caaggaggcg	ttaccggaga	agaagacacc	gccccgcgag	ccatcttggc		60
cagatcctcc	gccgccgccc	ctggctcgtc	cacccccgcc	accgttaccg	ctggagaagg		120
aaaaatggca	tcttcaacac	ccgcctctcc	cgcaccatcg	gttatactgt	caagaaaacc		180
acagtcagaa	cgccctcctg	gaatgtggac	atgatgagat	ttaatattaa	tgattttctt		240
cccccaggag	ggggctcaaa	ccccctcact	gtgccctttg	aatactacag	aataaggaag		300
gttaaggttg	aattctggcc	ctgctcccca	atcaccagg	gtgacagggg	agtgggctcc		360
actgctgtta	ttctagatga	taactttgta	acaaaggcca	atgccctaac	ctatgacccc		420
tatgtaaact	actcctccc	ccataccata	accagccct	tctctacca	ctcccggtac		480
tttaccgccg	aacctgtcct	tgataggaca	atcgattact	tccaacccaa	taacaaaaga		540
aatcaactct	ggctgagact	acaaactact	ggaaatgtag	accatgtagg	cctcggcact		600
gcgttcgaaa	acagtatata	cgaccaggac	tacaatatcc	gtgtaaccat	gtatgtacaa		660
ttcagagaat	ttaatcttaa	agacccccca	cttaaccctt	aa			702

```
<210> 37
<211> 234
<212> PRT
<213> circovirut lon
```

<400> 37

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 Val 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> 38

<211> 705

<212> ADN

<213> circovirus 10n

<400> 38

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattctggc 60

cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120

aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180

acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgggtgagat ttaatatata tgattttctt 240

ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgcccttg aatactacag aataaggaag 300

gttaagggtg aattctggcc ctgctccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
 tttaccccgga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataacgat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 39
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirus 10n

<400> 39

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 Ala 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 Gly 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
195 205

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> 40
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 40
atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta gcaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtac 480
tttaccgccga aacctgtcct tgatgggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaaccttaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 41
<211> 233
<212> PRT
<213> circovirut lqn

<400> 41

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 Lys Pro
 225 230

<210> 42
 <211> 718
 <212> ADN
 <213> circovirut lön

<400> 42
 atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccg accggtaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaaaaaacc 180
 acagtcagaa cgcctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaagggtt aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctccc ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac 480
 tttaccccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacaaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660

ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aaatgaataa taaaaacc

718

<210> 43
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> circovirus 1gn

<400> 43

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 Lys Pro
 225 230

<210> 44
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> circovirut lqn

<400> 44
 atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaaaaaacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgatttttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaaggttg aattctggcc ctgctccca atcaccacagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtag 480
 ttaccccgga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaattctaa agacccccca cttaaacc 699

<210> 45
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> circovirut lqn

<400> 45

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 Lys Pro
225 230

<210> 46
<211> 699
<212> ADN
<213> circovirut løn

<400> 46
atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaaaaaacc 180
acagtcagaa cgcctctctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttaccgga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattctaa agacccccca cttaaacc 699

<210> 47
<211> 233
<212> PRT
<213> circovirut løn

<400> 47

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 Gly Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 48
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> circovirut lòn

<400> 48
 atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccctcgcc accgttaccg ctggagaagg 120

```

aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaaaaaacc      180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt      240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag      300
gttaaggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc      360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc      420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtag      480
tttaccgccg aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaaa taacaaaaga      540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact      600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa      660
ttcagagaat ttaatcttaa gggcccccca cttaaacc      699

```

```

<210> 49
<211> 233
<212> PRT
<213> circovirus 1

```

```

<400> 49

```

```

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 Gly Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 50
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> circovirut løn

<400> 50
 atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgc accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca ttttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaaaaaacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac 480
 tttaccccg aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacaaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaattctaa gggcccccca cttaaacc 699

<210> 51
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> circovirut løn

<400> 51

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 Gly Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 52
<211> 699
<212> ADN
<213> circovirut løn

<400> 52
atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tctttaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaaaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaaggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagcct tctcctacca ctcccgtac 480

```

tttaccgccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga      540
aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact      600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa      660
ttcagagaat ttaatcttaa gggcccccca cttaaacc      699

```

```

<210> 53
<211> 233
<212> PRT
<213> circovirus 10n

```

```

<400> 53

```

```

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 Gly Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 54
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> circovirut løn

<400> 54
 atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caaaaaaacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt 240
 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaaggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtac 480
 tttacccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga 540
 aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa gggcccccca cttaaacc 699

<210> 55
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirut løn

<400> 55

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 Gly 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> 56
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 56
atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgcccttg aatactacag aataaggaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaaact actcctcccg ccataccata accagccct tctcctacca ctcccgtac 480
tttaccgccga aacctgtcct tgatgggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaccta agtga 705

<210> 57

<211> 1767
 <212> ADN
 <213> circovirut lgn

<400> 57
 aaatttctga caaacgttac aggggtgctgc tctgcaacgg tcaccagact cccgctctcc 60
 aacaaggtag tcacagcagt agacaggtag ctgcgttgctc cttgagatct aggagctcca 120
 cactcgataa gtaagttgcc ttctttactg cagtattctt tattctgctg gtctgttcct 180
 ttcgctttct cgatgtggca gcgggcacca aaataccact tcactttatt aaaagtttgc 240
 ttcttcacaa aattagcgaa cccctgtagg tgggggtgttc ggccttcctc attaccctcc 300
 tcgccaacaa taaaataatc aaataggtag attgggagct cccgtatttt cttgcgctcg 360
 tcttcggaag gattattgag agtgaacacc caccttttat gtggttgggg tccgcttctt 420
 ccattcttct tactgggcat gttgctgctg aggtgctgcc gaggtgctgc cgctgccgaa 480
 gtgcgctggg aatacttaca gcgcacttct ttcgttttca gctatgacgt atccaaggag 540
 gcgtttccgc agacgaagac accgcccccg cagccatctt ggccagatcc tccgccgccg 600
 cccctggctc gtccaccccc gccaccgtta ccgctggaga aggaaaaatg gcatcttcaa 660
 caccgcctc tccgcacca tcggttatac tgtcaagaaa accacagta gaacgccctc 720
 ctggaatgtg gacatgatga gatttaatat taatgatttt cttccccag gagggggctc 780
 aaacccccctc actgtgccct ttgaatacta cagaataagg aagggttaagg ttgaattctg 840
 gccctgctcc ccaatcacc aggggtgacag gggagtgggc tccactgctg ttattctaga 900
 tgataacttt gtaacaaagg ccaatgccct aacctatgac ccctatgtaa actactcctc 960
 ccgccatacc ataaccagc ctttctccta cactccccg tactttacc cgaaacctgt 1020
 ccttgatggg acaatcgatt acttccaacc caataacaaa agaaatcaac tctggctgag 1080
 actacaaact actggaaatg tagaccatgt aggcctcggc actgcgttcg aaaacagtat 1140
 atacgaccag gactacaata tccgtataac catgtatgta caattcagag aatttaattct 1200
 taaagacccc ccacttaacc ctaagtgaat aataaaaacc attacgaagt gataaaaaag 1260
 actcagtaat ttatttcata tggaaattca gggcatgggg gggaaagggt gacgaactgg 1320
 ccccttcct ccgtggattg ttctgtagca ttcttccaaa ataccaagga agtaatcctc 1380
 cgatagagag cttctacagc taggacagca gttgaggagt accattcaa cggggtctga 1440
 ttgctggtaa tcagaatact gcgggccaaa aaaggtagag ttccaccttt agtctctaca 1500
 gtcaatggat atcgatcaca cagtctcagt agatcatccc acggcagcca accataaaag 1560
 tcatcaataa caaccacttc ttcaccatgg taaccatccc accacttggt tcgagggtgg 1620
 ttccagtatg tggtttccgg gtctgcaaaa ttagcagccc atttgctttt accacacca 1680
 ggtggcccca caatgacgtg tacattggct ttccaatcac gcttctgcat tttccgctc 1740
 actttcaaaa gttcagccag cccgcgg 1767

<210> 58
 <211> 233
 <212> PRT

<213> circovirut lqn

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 59

<211> 702

<212> ADN

<213> circovirut lqn

<400> 59
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttggt 240
 cccccgggag gggggaccaa caaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
 tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccggtac 480
 ttcacaccca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
 aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 60
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> circovirus lön

<400> 60

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 Leu 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 Arg Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Lys 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 Gly Asn
180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 61
<211> 702
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 61
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcctc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caagcgctacc 180
acagtcacaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaaaattga cgactttgtt 240
ccccggggag gggggaccaa caaaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaaggttg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
ttcacaccca aacctgttct tgactccact attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggetgaggct acaaacctct ggaaatgtgg accacgtagg cctcggcatt 600
gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 62
<211> 233
<212> PRT
<213> circovirut lqn

<400> 62

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 Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser 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 Ser 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 Thr 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 Ala 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 Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 63
<211> 702
<212> ADN
<213> circovirut lqn

<400> 63
atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctatcc cgcaccttcg gatatactat caagcgaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa ccccgcctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300

gttaagggttg aattctggcc ctgctccccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 agtgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac 480
 tttacccccca aacctgtcct agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 540
 aaccagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaccctt aa 702

<210> 64
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> circovirus lon

<400> 64

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

Ser His Leu Gly His 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 Ala Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Ser Phe Val Tyr Thr Val Asn Ala Ser Gln Val Ser Pro
50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Gln 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 Phe Ala Arg Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asn 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 Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

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

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

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

Gln Ala Tyr Asn Val Arg Val 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> 65
<211> 705
<212> ADN
<213> circovirus lon

<400> 65
atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
catatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
aaaaatggaa tcttcaatgc ccgcctctcc cgctcctttg ttataaccgt taatgcctca 180
caggctctcac caccctcttg ggcggtggac atgatgagat ttaatattaa ccaatttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaaagtgg aattctttgc aagatcccc atcacccaag gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctaaatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccaacct tctcctacca ctcccgtac 480
tttaccacca aacctgtcct tgattccact attgattact tccaaccaa taacaaaaga 540
aatcagctgt ggatgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggacac 600
gcctttcaaa acagtacaaa tgcccaggcc tacaatgtcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agaccccca cttaacccta agtga 705

<210> 66
<211> 1767
<212> ADN
<213> circovirus lon

<400> 66
gtctttttta tcacttcgta atggttttta ttattcactt aggggttaagt ggggggtctt 60
taagattaaa ttctctgaat tgtacataca tggttatacg gatattgtag tcctggctcg 120
atatactgtt ttcgaacgca gtgccgaggc ctacatggtc tacatttcca gtagtttgta 180
gtctcagcca gagttgattt cttttgttat tgggttgga gtaatcgatt gtcctatcaa 240
ggacagggtt cggggtaaaag taccgggagt ggtaggagaa gggctgggtt atgggtatggc 300
gggaggagta gtttacatag gggcataggt ttagggcatt ggcctttgtt acaaagtatt 360
catctagaat aacagcagtg gagccactc ccctgtcacc ctgggtgatt ggggagcagg 420
gccagaattc aaccttaacc ttccttattc ttagtatttc aaagggcaca gtgaggggggt 480
ttgagcccc tcctggggga agaaaatcat taatattaaa tctcatcatg tccacattcc 540
aggagggcgt tctgactgtg gttttcttga cagtataacc gatgggtgcg gagaggcggg 600

tgttgaagat gccatttttc cttctccagc ggtaacggtg gcgggggtgg acgagccagg	660
ggcggcgggc gaggatctgg ccaagatggc tgcgggggcg gtgtcttcgt ctgcggaaac	720
gcctccttgg atacgtcatc gctgaaaacg aaagaagtgc gctgtaagta ttaccagcgc	780
acttcggcag cggcagcacc tcggcagcac ctcagcagca acatgcccag caagaagagt	840
ggaagaagcg gaccccaacc acataaaagg tgggtgttca cgctgaataa tccttccgaa	900
gacgagcgca agaaaatacg ggagctcca atctccctat ttgattattt tattgttggc	960
gaggaaggta atgaggagg ccgaacaccg cacctacagg ggttcgctaa ttttgtgaag	1020
aagcaaactt ttaataaagt gaagtggat tttggtgcc gctgccacat cgagaaagcg	1080
aaaggaacag atcagcagaa taaagaatat tgcagtaaag aaggcaactt actgatagaa	1140
tgtggagctc ctagatctca aggacaacgg agtgacctct ctactgctgt gagtaccttg	1200
ttggagagcg ggagtctggt gaccgttga gagcagcacc ctgtaacgtt tgcagaaat	1260
ttccgcgggc tggctgaact tttgaaagtg agcgggaaaa tgcagaagcg tgattggaag	1320
acgaatgtac acgtcattgt ggggccacct ggggtgtggc aaagcaaag ggctgcta	1380
tttgcagacc cgaaaccac atactggaaa ccacctagaa acaagtgggt ggatggttac	1440
catggtgaag aagtggttgt tattgatgac ttttatggct ggctgccgtg ggatgatcta	1500
ctgagactct gtgatcgata tcctttgact gttgagacta aaggtggaac tgtacctttt	1560
ttggcccgc gtattctgat taccagcaat cagaccccg tggaatggta ctctcaact	1620
gctgtcccag ctgtagaagc tctctatcgg aggattactt ccttggtatt ttggaagaat	1680
gctacagaac aatccacgga ggaaggggac cagttcgtca ccctttcccc cccatgccct	1740
gaatttccat atgaaataaa ttactga	1767